



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

FÁZOVÁ SEPARACE VE ZŘEDĚNÝCH ROZTOCÍCH POLYMERŮ A TENZIDŮ

PHASE SEPARATION IN DILUTE SOLUTIONS OF POLYMERS AND SURFACTANTS

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Tereza Klementová

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Filip Mravec, Ph.D.

BRNO 2017

Zadání bakalářské práce

Číslo práce: FCH-BAK1172/2016
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie
Studentka: **Tereza Klementová**
Studijní program: Chemie a chemické technologie
Studijní obor: Spotřební chemie
Vedoucí práce: **Ing. Filip Mravec, Ph.D.**
Akademický rok: 2016/17

Název bakalářské práce:

Fázová separace ve zředěných roztocích polymerů a tenzidů

Zadání bakalářské práce:

1. Literární rešerše na interakci kationaktivních tenzidů s hyaluronanem, s přihlédnutím na pozorovanou fázovou separaci v nízkých koncentracích obou složek a vzniku mikrogelu.
2. Na základě rešerše experimentálně potvrdit fázovou separaci a připravit dostatečné množství vzorku pro reologickou a mikroskopickou analýzu.
3. Provést reologickou analýzu připraveného mikrogelu a porovnat s gely vznikajícími ve vysokých koncentracích.
4. Zhodnotit způsob přípravy a zjištěné výsledky.

Termín odevzdání bakalářské práce: 19.5.2017

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

Tereza Klementová
student(ka)

Ing. Filip Mravec, Ph.D.
vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2017

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

ABSTRAKT

Tato bakalářská práce se věnuje podmínkám fázové separace za nízkých koncentrací v systému polyelektrolytu (hyaluronanu sodného) a kationaktivního tenzidu cetyltrimethylamonium bromidu. Separovaná fáze byla studována pomocí fluorescenčního měření, s použitím Nilské červeně jako fluorescenční sondy a byly také stanoveny reologické vlastnosti provedením frekvenčních a tokových testů. Dále bylo sledováno chování vzniklého mikrogelu v prostředí NaCl.

ABSTRACT

This bachelor's thesis deals with conditions of phase separation in system of polyelectrolyte (sodium hyaluronate) and cationic surfactant (cetyltrimethylammonium bromide). Separated phase was studied by fluorescence measurement with Nile red as a fluorescence probe and there were also specified rheological properties using flow tests and frequency oscillatory tests. Behaviour of separated microgel was also observed in solution of NaCl.

KLÍČOVÁ SLOVA

kyselina hyaluronová, tenzid, interakce, fázová separace, reologie

KEY WORDS

hyaluronic acid, surfactant, interaction, phase separation, rheology

KLEMENTOVÁ, T. *Fázová separace ve zředěných roztocích polymerů a tenzidů*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2017. 35 s. Vedoucí bakalářské práce Ing. Filip Mravec, Ph.D.

PROHLÁŠENÍ

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

.....
podpis studenta

Poděkování:

Ráda bych poděkovala vedoucímu bakalářské práce Ing. Filipu Mravcovi, Ph.D. za vstřícnost, rady, trpělivost a čas, který mi věnoval. Také bych chtěla poděkovat Ing. Sabině Jarábkové za její čas a rady při řešení experimentální části práce. Velké poděkování patří mé rodině a přátelům, kteří mne při studiu významně podporovali.

Obsah

1	ÚVOD	6
2	TEORETICKÁ ČÁST	7
2.1	Disperzní soustavy.....	7
2.2	Amfifilní látky	8
2.2.1	Tenzidy.....	8
2.3	Vznik micel.....	9
2.4	Solubilizace	10
2.5	Hyaluronan	10
2.5.1	Průmyslová výroba hyaluronanu.....	10
2.5.2	Význam v organismech a účinky na hojení ran	11
2.6	Gely	11
2.6.1	Vznik gelů	12
2.7	Reologie.....	12
2.7.1	Newtonovské a nenevtonovské chování kapalin.....	13
2.8	Fluorescence	15
2.8.1	Fluorescenční korelační spektroskopie	15
2.8.2	Fluorescenční sondy	16
3	SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	17
4	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	19
4.1	Použité chemikálie.....	19
4.2	Použité metody	20
4.2.1	Příprava zásobních roztoků	20
4.2.2	Ověření koncentračního rozsahu	20
4.2.3	Příprava mikrogelů – ‚up scale‘ proces.....	21
4.2.4	Reologická měření.....	21
4.2.5	Fluorescenční měření	22

5	VÝSLEDKY A DISKUZE.....	23
5.1	Vizuální vyhodnocení.....	23
5.1.1	Koncentrační řady.....	23
5.2	Reologická měření.....	24
5.2.1	Vyhodnocení frekvenčních testů.....	24
5.2.2	Vyhodnocení tokových testů.....	27
5.3	Fluorescenční měření.....	28
5.3.1	Mikrogel v prostředí NaCl.....	30
6	ZÁVĚR.....	31
7	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	32
8	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ.....	35
8.1	Seznam zkratk.....	35
8.2	Seznam symbolů.....	35

1 ÚVOD

Kyselina hyaluronová je jedním z nejdůležitějších polymerů v lidském těle. Tvoří jednu z hlavních složek mezibuněčné hmoty, je součástí kůže, pojivových, epiteliálních a nervových tkání. Hydrogely připravené z kyseliny hyaluronové, vhodně voleného tenzidu a fyziologického roztoku se v praxi osvědčily v regenerativní medicíně, v přípravcích pro hojení ran a popálenin, v obvazech s vysokou absorpční schopností, při léčbě kloubů nebo jako scaffoldy ve tkáňovém inženýrství. Využívají se i v dermatologické léčbě, jelikož jsou schopny dodat hydrofobní lék i do hlubších vrstev kůže, jsou součástí injekcí pro estetickou medicínu a pečující kosmetiky. Také cílení léčiv je velká otázka poslední doby, a hyaluronan v plášti polymerních micel může dobře sloužit k cílení molekuly do tkání, které jsou na jeho navázání nadměrně citlivé, což se týká mimo jiné tkání bohatých na patologické CD44 receptory.

Práce si klade za cíl navázat na dosud prováděný výzkum v oblasti interakce tenzidů s hyaluronanem na fakultě chemické VUT v Brně a rozšířit poznatky, které přineslo dosavadní zkoumání těchto systémů. Interakcí ve zmíněných systémech a testování vlastností vzniklých gelů je věnována pozornost mnoha vědeckých skupin, jelikož potenciální využití těchto látek je široké. Mnohé aplikace se již dostaly do praxe, avšak rozsáhlé praktické a komerční využití je do jisté míry omezeno také vysokými výrobními náklady. Připravené mikrogely by mohly najít využití například ve farmaceutických aplikacích, kde je žádoucí před aplikací přípravku vytvořit rovnoměrnou jemnou disperzi s terapeutickou koncentrací léčivé látky. Po zhodnocení výsledků měření budou vlastnosti takto připravených mikrogelů porovnány s vlastnostmi klasických makrogelů a bude určeno, zda lze tyto systémy považovat za stejné, případně jak se jejich vlastnosti liší.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Disperzní soustavy

Disperzní soustava je termodynamický systém, který je tvořený částicemi rozptýlenými v disperzním prostředí, většinou se jedná o vícesložkové systémy, složené ze vzájemně nemísitelných fází. Rozlišujeme analyticky, koloidně a hrubě disperzní systémy.

Koloidně disperzní systémy jsou takové, kde nalezneme koloidní částice o velikostech 1 nm – μm . Disperzní prostředí i disperzní podíl jsou zde spojité a jejich charakteristickou vlastností je tvorba gelů [1, 2].

Koloidně disperzní systémy zahrnují [1]:

koloidní disperze – nestálé, samovolně zanikající heterogenní systémy. Disperzní podíl a prostředí představují dvě různé fáze, oddělené fázovým rozhraním. Jejich přehled je uveden v Tabulce 1.

koloidní roztoky – homogenní koloidní systémy, kde disperzní podíl a prostředí tvoří jednu fázi. Jsou to právě roztoky makromolekul, stálé, vzniklé samovolným rozpouštěním.

micelární koloidy – vznikají samovolnou reverzibilní asociací nízkomolekulárních látek s amfifilní strukturou v pravém roztoku. Mezi molekulami v roztoku a asociáty se ustavuje rovnováha, systémy jsou termodynamicky stabilní.

Tabulka 1: Koloidní disperze [1]

KOLOIDNÍ DISPERZE $10^{-9} < d < 10^{-6}$ m	
roztoky makromolekul	<ul style="list-style-type: none">• disperzní částice jsou monomolekulární• vznik samovolným rozpouštěním, kterému předchází bobtnání• jsou homogenní
asociativní koloidy	<ul style="list-style-type: none">• disperzní částice jsou polymolekulární• vznik asociací z pravých roztoků amfifilních molekul• jsou stabilní v určitém rozmezí podmínek
heterogenní koloidy	<ul style="list-style-type: none">• disperzní částice jsou polymolekulární• vznik z hrubých disperzí umělým dispergováním nebo z pravých roztoků srážením na částice koloidní velikosti• nestálé, koagulují, sedimentují• heterogenní, velká plocha fázového rozhraní, stoupá se stupněm disperzity

2.2 Amfifilní látky

Schopnost tvořit micely je podmíněna specifickou strukturou molekul. Je nutné, aby v roztoku byly přítomné tzv. amfifilní molekuly, což jsou povrchově aktivní látky (PAL), nesoucí na jedné straně řetězce skupiny s velkou afinitou k vybranému rozpouštědлу a na straně druhé skupiny v daném prostředí nerozpustné. Aby docházelo k asociaci, musí mít povrchově aktivní látky navíc dostatečně dlouhý uhlovodíkový řetězec [1].

Dle schopnosti disociovat ve vodném roztoku dělíme povrchově aktivní látky na [3]:

Neionogenní – v roztocích nedisociují, afinitu zde způsobují polární neionogenní skupiny (hydroxylové nebo esterové), nepolární část molekul jsou v tomto případě deriváty mastných kyselin.

Aniontové – disociují na povrchově aktivní anionty. Jde o soli vyšších mastných kyselin, kde skupina -COO^- je příčinou rozpustnosti, a uhlovodíkový řetězec zde představuje část schopnou asociace.

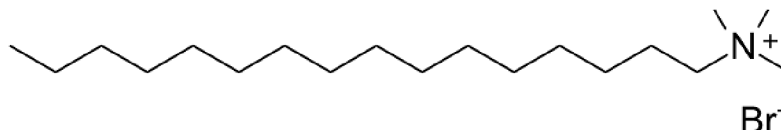
Kationtové – disociují za vzniku povrchově aktivních kationtů, většinou obsahují kvartérní dusíkový atom nesoucí kladný náboj (hovoříme pak o kvartérní amoniové soli). Vynikají svým antimikrobiálním účinkem, a proto se využívají jako dezinfekční a antiseptické látky (vytvářejí adsorpční vrstvy na buňkách mikroorganismů a tím narušují jejich metabolické funkce).

Zvláštní skupinou jsou *amfoterní* PAL, kde je náboj micely závislý na pH. Současná přítomnost aniontových a kationtových PAL v roztoku není možná, jelikož dochází ke tvorbě velmi slabé disociující soli o velké molární hmotnosti, která je téměř nerozpustná. Mezi PAL rozpustné ve vodě řadíme mýdla, detergenty a tenzidy [1, 3].

2.2.1 Tenzidy

Tenzidy jsou organické látky s širokým spektrem využití, uplatňují se při výrobě kosmetických přípravků, detergentů, v průmyslu výroby celulózy a papíru a v neposlední řadě při organických syntézách. V aplikacích je využíváno povrchové aktivity tenzidů, jelikož snižují povrchové napětí na fázovém rozhraní látek, a tak je umožněna dispergace nemísitelných fází (buď dočasně – při mytí a praní anebo trvale, např. u výroby emulzí). Aby v kapalině mohlo dojít k dispergaci druhé fáze, je třeba vynaložením práce (třepáním, mícháním) zvětšit fázové rozhraní. Tenzidy snižují práci potřebnou ke zvětšení fázového rozhraní, jejich účinek je fyzikálně chemické povahy a tenzid se tedy při procesu chemicky nemění [1, 3, 4].

Cetyltrimethylamoniumbromid (CTAB) je kationový tenzid, jde o kvartérní amoniovou sloučeninu (struktura viz Obrázek 1). Bývá složkou povrchových antiseptik, je účinným činidlem proti bakteriím a houbám, ve vysokých koncentracích je však toxický. Desinfekční vlastnosti jsou využívány při přípravě hojivých hydrogelů na bázi CTAB a hyaluronanu [3, 5].

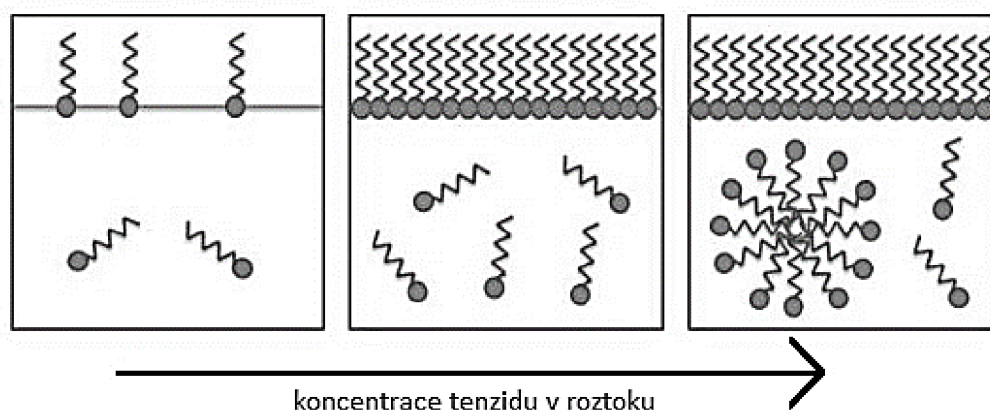


Obrázek 1: Struktura molekuly CTAB

2.3 Vznik micel

Proces micelizace (viz Obrázek 2) je samovolný, Gibbsova energie je menší než 0, aby došlo k formování micel, musí být v roztoku dosaženo kritické micelární koncentrace (CMC). Pod hodnotou CMC je povrchově aktivní látka v roztoku pouze ve formě volných molekul, CMC je tak jinými slovy nejvyšší možná koncentrace, kdy se povrchově aktivní látka nachází v roztoku ještě v iontové formě. Pro různé PAL kolísá hodnota kritické micelární koncentrace v rozmezí řádově 10^{-5} až 10^{-3} mol·dm⁻³. Hodnota je závislá na délce a struktuře uhlovodíkového řetězce PAL a na vlastnostech přítomné hydrofilní skupiny. U ionogenních PAL klesá s rostoucí délkou uhlovodíkového řetězce a je také ovlivněna přítomností dalších látek v roztoku.

Ve zředěných roztocích (pokud je dosaženo CMC) vznikají malé micely, kulovité agregáty PAL, jejichž uhlovodíkové řetězce tvoří jádro micely a polární skupiny směřují ven. S rostoucí koncentrací se zvětšuje rozměr micel a uhlovodíkové řetězce se postupně orientují vzájemně rovnoběžně. Velikost a tvar micel závisí na koncentraci, teplotě, pH, složení a molekulární struktuře PAL [1, 6].



Obrázek 2: Formování micel v roztoku [7]

2.4 Solubilizace

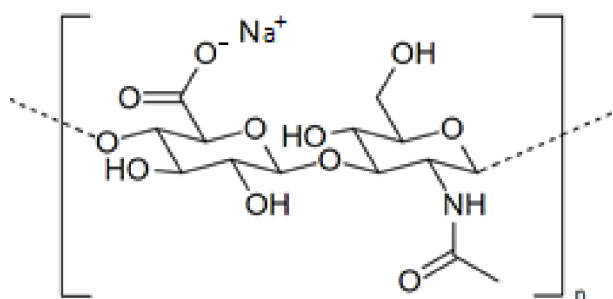
Schopnost rozpustit látky, které jsou v čistém disperzním prostředí nerozpustné, za vzniku koloidních roztoků označujeme jako *solubilizaci*. Mechanismus tohoto procesu vychází z polariry disperzního prostředí. Nepochární látky vstupují do jádra micel (dojde ke zvětšení hydrofobního jádra a nárůstu hmotnosti micel povrchově aktivní látky), solubilizace polárních látek probíhá na povrchu micel nebo v jeho těsné blízkosti.

Této vlastnosti se využívá mimo jiné ve farmaceutickém průmyslu, pro převedení špatně rozpustných léčiv do rozpustné formy. Konkrétně u hydrogelů je snaha solubilizovat do struktury hydrofobní léčiva [1–3].

2.5 Hyaluronan

Hyaluronan, je nevětvený polysacharid, nesulfátovaný glykosaminoglykan. Je složen z disacharidových jednotek kyseliny D-glukuronové a N-acetyl-D-glukosaminu, střídavě vázaných β -1,4 a β -1,3 glykosidickými vazbami (viz Obrázek 3). Chemická struktura základního disacharidu tvořícího hyaluronan byla objevena v roce 1954 a bylo také zjištěno, že tato molekula je stabilizována na základě elektrostatických interakcí. Axiální vodíky v molekule tvoří nepolární, hydrofobní část a ekvatoriální boční řetězce jsou polární, hydrofilní částí molekuly.

Tento polysacharid je v přírodě přítomen ve formě soli, kyselina totiž velmi rychle degraduje a její roztok je velmi kyselý, proto ji za fyziologických podmínek nenalezneme. Kyselina hyaluronová i její sodná sůl jsou rozpustné ve vodě, kde disociují na stejný anion, takže v konečných aplikacích jde o zcela stejnou molekulu [8–10].



Obrázek 3: Strukturní vzorec hyaluronanu sodného

2.5.1 Průmyslová výroba hyaluronanu

Od roku 1934, kdy byl hyaluronan poprvé izolován ze sklivce hovězích očí, byly v následujících letech využity jako zdroje této látky kouhoutí hřebeny, prasečí kůže, oční sklivce nebo streptokokové bakterie. V současné době se získává technologicky náročným procesem z buněčných stěn bakterií *Streptococcus zooepidemicus*, které jsou zbaveny všech patogenů a představují žádné riziko pro člověka a přírodu [8].

2.5.2 Význam v organismech a účinky na hojení ran

Hyaluronan se jako součást těla nachází v mezibuněčné hmotě, ve zvýšené koncentraci jej najdeme v očích, kůži či v kloubní tekutině. Díky jeho biokompatibilitě je využíván v kosmetice a farmaceutickém průmyslu. Biologické účinky a konkrétní využití přípravků na bázi hyaluronanu jsou ovlivněny jeho molekulovou hmotností; například při aplikacích na kůži je vhodný hyaluronan o nižší molekulové hmotnosti, jelikož jeho menší molekuly proniknou pokožkou výrazně lépe. Do struktury hydrogelu připraveného na bázi hyaluronanu lze zahrnout buňky, vlákna, mikročástice, nanočástice nebo aktivní chemické či biologické látky. Hyaluronanové hydrogely a jejich rezidua jsou biokompatibilní, biologicky odbouratelné, nezpůsobují cytotoxickou reakci, a tak je možno také formovat gely in situ.

Pokud dojde k poranění, složky extracelulární matrix (ECM) jsou poškozeny nejen mechanicky, ale také bakteriemi a vlastním imunitním systémem. Hyaluronan je jednou z prvních složek, která je v místě zranění syntetizována. Dochází ke štěpení molekul hyaluronanu na krátké fragmenty o nízké molekulové hmotnosti, které aktivují imunitní buňky, a tak ovlivňují zánět – první fázi procesu hojení a současně aktivují buňky zodpovědné za regeneraci. Druhou úlohou hyaluronanu je zajištění vlhkého prostředí v ráně, čímž podporuje syntézu dalších složek pojivové tkáně a množení buněk. Konkrétní funkce hyaluronanu je závislá na jeho molekulové hmotnosti. Molekula s hmotností pod 200 kDa funguje jako signální molekula, zatímco hyaluronan s vysokou molekulovou hmotností plní funkci při organizaci extracelulární matrix, kde tvoří síťovitou strukturu. Díky této schopnosti může interagovat s proteoglykany, proteiny a buněčnými receptory a je zodpovědný za správnou organizaci kolagenových vláken a mikrofibril. Interakce s buněčnými receptory (CD44, RHAMM) umožňuje začleňovat jednotlivé buňky do ECM a současně se i podílet na migraci buněk, které migrují podél vláken hyaluronanu. Společně s proteoglykany (které rovněž obsahují anionické polysacharidy) má velkou afinitu k vodě, a tak hydratuje ECM, což usnadňuje volný průchod živin a kyslíku a nebrání signálním buňkám v pohybu tkání [8–10].

2.6 Gely

Disperze tuhých látek v kapalinách mají schopnost gelatinizovat. Gely jsou systémy tvořené trojrozměrnou sítí, tvořící souvislou strukturu, prostupující celým disperzním prostředím. Okamžik, kdy se v systému objeví trojrozměrná síť, je označován jako bod gelace. Důsledkem síťového uspořádání mají gely mechanické vlastnosti charakteristické pro tuhý stav, i pokud je disperzní prostředí kapalné – disperzní částice jsou v prostředí poutány adhezními silami a nemohou se v něm nezávisle volně pohybovat. Systém, kde je disperzní prostředí kapalné, se označuje jako lyogel a odstraněním disperzního prostředí (vysušením lyogelu) vzniká xerogel [1].

Podle chování v suchém stavu rozlišujeme [1]:

gely reverzibilní – vysoušením zmenšují objem a bobtnáním (přijímáním disperzního prostředí zpět) mohou přecházet do původního stavu. Jejich struktura je tvořena sítí makromolekulárních řetězců spojených v uzlových oblastech.

gely ireverzibilní – ve vysušeném stavu mají stejný objem jako původní lyogel, ale jsou porézní. Při kontaktu s disperzním prostředím mohou kapalinu sorbovat, ale zpětně nevzniká lyogel, přeměna je nevratná. Vznikají gelací lyofobních solů.

Oba zmíněné typy gelů podléhají stárnutí. Jelikož tyto systémy nejsou v termodynamické rovnováze, dochází k tomuto jevu samovolně. Síťová struktura gelu se smršťuje a část gelem přijaté kapaliny je vytlačována ven. Tento jev se označuje jako synerese.

2.6.1 Vznik gelů

K procesu gelace může dojít [1]:

chemickou reakcí – poskytuje kovalentně síťované gely, které po překročení kritické hodnoty napětí podlehnou trvalé deformaci.

změnou fyzikálních podmínek (změnou pH, iontová síla, síla rozpouštědla) – vznikají fyzikálně síťované gely, úseky polymerních řetězců se spojují pomocí fyzikálních sil

Gel může také vznikat bobtnáním xerogelu. Pokud toto bobtnání není zastaveno, vzniká sol, což je koloidní suspenze, kterou je možno přeměnit na gel.

2.7 Reologie

Reologie, obor na hraně mechaniky a fyzikální chemie, studuje tok a deformaci hmoty vyvolané vlivem vnějších mechanických sil. Stanovuje vztah mezi napětím, deformací a rychlostí deformace pro jednotlivé látky. Jelikož tyto parametry nelze stanovit přesně, reologie zavádí modely vystihující charakter deformačního chování různých skupin látek [11–14].

Rozlišujeme tyto typy chování látek: [1]

Elastické chování – je vykazováno tuhými látkami, kdy účinkem síly nastane deformace, která vymizí po jejím odstranění, vynaložená energie se ukládá a po relaxaci látky se uvolní.

Viskózní chování – charakterizuje jednoduché tekutiny, působením síly hmota teče a tok se zastaví, ale po odstranění působící síly se neobrátí se, vynaložená energie je disponována jako teplo.

Viskoelastické systémy – pomezi viskózních a elastických látek, vyznačují se odezvou na působící sílu v závislosti na době, po kterou tato síla působí. Toto chování vykazuje řada koloidně disperzních systémů, zejména roztoky polymerů. V těchto systémech platí vztah:

$$G^* = G' + iG'' \quad (1)$$

ve kterém G^* je komplexní modul, obsahující informace o mechanické odolnosti látky (složený z elastického a viskózního modulu). Elastický modul souvisí se schopností tělesa uchovat elastickou energii, tvoří reálnou část modulu G^* a viskózní modul souvisí s deformační energií, tvoří imaginární složku modulu G^* . Z těchto veličin určujeme ztrátový úhel δ , vyjadřující poměr mezi elastickým a viskózním modulem dle vztahu:

$$\tan \delta = \frac{G''}{G'} \quad (2)$$

Hodnota ztrátového úhlu určí charakter zkoumané látky, zda převažuje elastické nebo viskózní chování. Pokud je hodnota $\delta = 45^\circ$, nepřevažuje žádná ze složek a látka vykazuje viskoelastický charakter. V případě, kdy $\delta > 45^\circ$, převažuje viskózní složka a látka vykazuje viskózní chování, v opačném případě, tedy $\delta < 45^\circ$, převažuje elastická složka, látka vykazuje elastické chování [14, 15].

2.7.1 Newtonovské a nenewtonovské chování kapalin

Newtonovské kapaliny jsou charakterizovány hodnotou viskozity (míra odporu kapaliny vůči toku), ta je pro ně látkovou konstantou. Při toku jednoduchých kapalin je rychlost růstu deformace lineární funkcí síly, která na kapalinu působí. Tuto závislost vyjadřuje Newtonův viskozitní zákon:

$$\tau = \eta \cdot \frac{du}{dx} = \eta \cdot D \quad (3)$$

kde součinitel η je dynamická viskozita, charakterizující vnitřní tření newtonské kapaliny, du je vzájemná rychlost pohybu smykových rovin o dx a D je gradient rychlosti (rychlost deformace, rychlost smyku), který charakterizuje tvarové změny v proudící tekutině.

Jedná se především o roztoky nízkomolekulárních látek a čisté kapaliny, v takových roztocích dochází pouze k zanedbatelným interakcím mezi molekulami.

Pokud tato závislost v kapalině neplatí, jedná se o *nenewtonovskou kapalinu*, pro kterou nelze stanovit jedinou hodnotu viskozity a tyto látky mají specifické mechanické vlastnosti [13, 14].

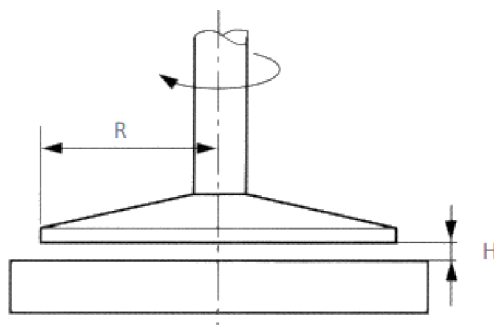
Mezi neneutronovské kapaliny řadíme tyto skupiny kapalin [13]:

pseudoplastické – nátěrové hmoty, roztoky detergentů, taveniny polymerů. Pseudoplastické kapaliny při zvyšující se smykové rychlosti snižují zdánlivou viskozitu. Tato vlastnost snižuje energetickou náročnost míchání a toku těchto látek, což je technologicky výhodné.

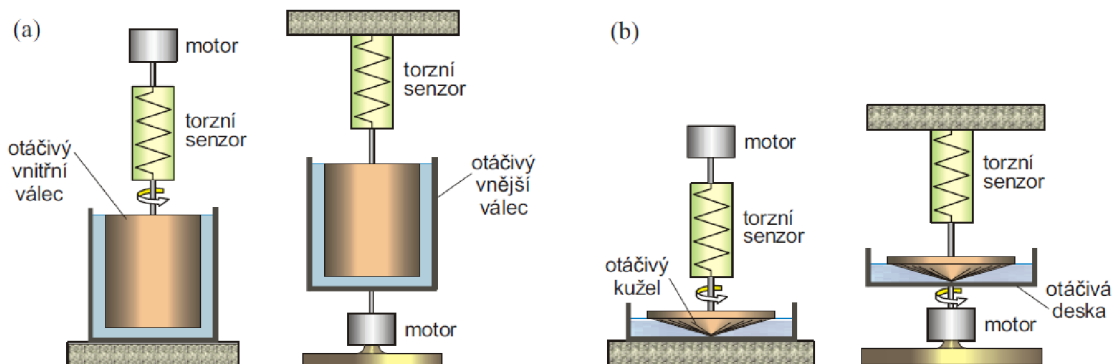
dilatantní – např. vysoce koncentrované škrobové suspenze. Tyto kapaliny se zvyšující se smykovou rychlostí mají vyšší zdánlivou viskozitu, což je pro technologické procesy nežádoucí.

plastické – k toku dochází teprve po překročení meze toku. Řadí se sem kašovitě suspenze, např. vápno ve vodě.

Reologické vlastnosti materiálů, respektive viskozita, se měří různými typy viskozimetrů, např. průtokovými, pádovými nebo rotačními. Rotační viskozimetr neboli reometr (viz. Obrázek 4 a Obrázek 5), je schopen rotujícím senzorem o různé (vhodně volené) geometrii měřený vzorek deformovat mechanicky, různou rychlostí a vynaložením síly. Testováním pomocí rotace senzoru získáme informace o viskozitě a tokových vlastnostech vzorku (toková křivka je záznam viskozity v závislosti na intenzitě otáčení měřícího senzoru). Na vzorek můžeme také působit oscilačním pohybem senzoru a výstupem jsou potom informace o elasticitě vzorku. Porovnáním poměru modulů elastického G' a viskózního G'' určíme, zda jde o materiál elastického či viskózního charakteru [11, 12].



Obrázek 4: Rotační viskozimetr – typ deska/deska



Obrázek 5: Rotační viskozimetry (a) Couettův typ, (b) Searleův typ – kužel/deska [1]

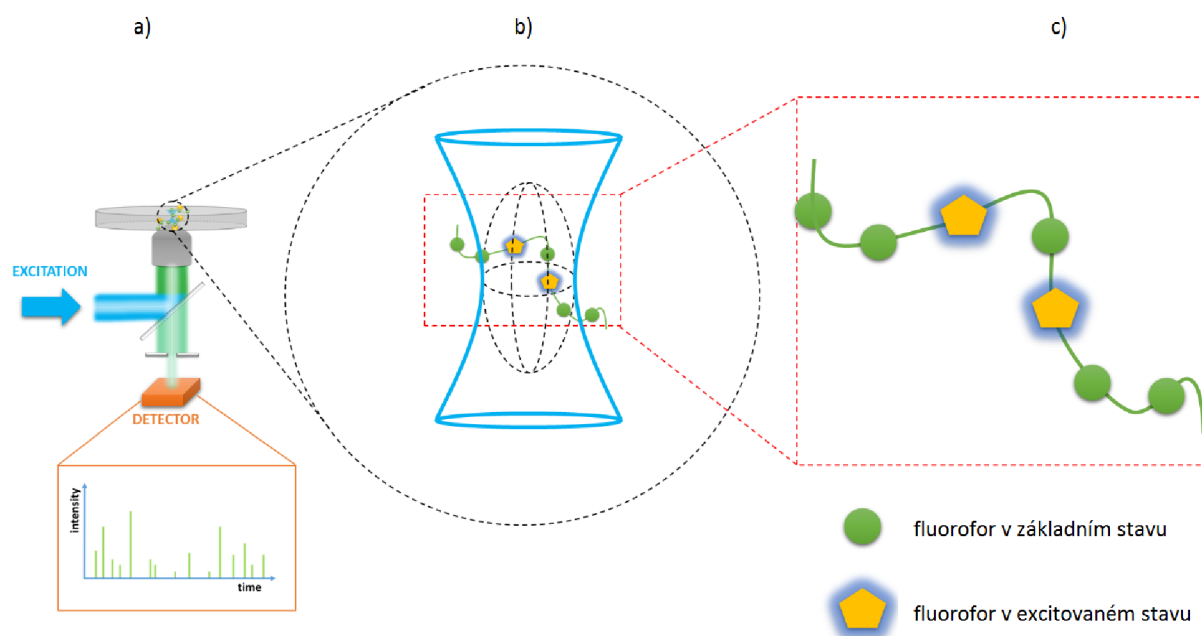
2.8 Fluorescence

Pokud excitujeme elektron ze základní energetické hladiny S_0 do některé z vyšších hladin zářením, jde o fotoluminiscenční proces. Podle povahy excitovaného stavu pak rozlišujeme fotoluminiscenční procesy na fluorescenci a fosforescenci. Po absorpci kvanta záření dojde k přechodu elektronů ze základního do excitovaného stavu (v atomech dochází k přesunu elektronu z valenčního orbitalu do prázdného orbitalu s vyšší energií; v molekulách excitace elektronu probíhá z orbitalu HOMO do orbitalu LUMO).

Při fluorescenci molekula nejprve absorbuje záření určité vlnové délky, dojde k excitaci a následně se vrací do základního stavu, přitom vyzáří foton – emise záření trvá řádově 10^{-8} s. Pokud excitovaný elektron přešel do tripletového stavu T_1 , tak dodáním energie se nejprve dostává do singletového stavu S_1 a až poté se vrací do základního stavu S_0 za současného vyzáření fotonu. Tento přechod se nazývá zpožděná fluorescence. Výstupem fluorescenčního měření je emisní spektrum, tedy závislost intenzity fluorescence na vlnové délce [16–18].

2.8.1 Fluorescenční korelační spektroskopie

Fluorescenční korelační spektroskopie je velmi rozšířená analytická metoda, založená na sledování průběhu intenzity fluorescence, pocházející z látek difundujících přes velmi malý pozorovaný objem (v řádu femtolitrů). Sledovaný objem je vymezen fokusovaným laserovým paprskem. Princip FCS je naznačen na Obrázku 6. Časové fluktuace intenzity fluorescence jsou zaznamenávány a analyzovány pomocí autokorelační funkce. Z analýzy těchto fluktuací lze získat informace o difúzních koeficientech pozorovaných látek, o jejich molekulárním jasu a koncentraci.



Obrázek 6: Schéma principu FCS [19]

- a) Epifluorescenční mikroskop b) tvar excitačního paprsku s naznačeným konfokálním objemem
c) fluorescenčně značený vzorek

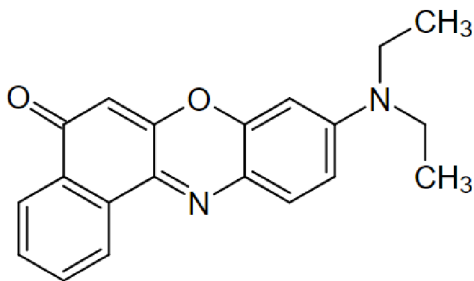
Metoda je vysoce citlivá, jelikož je v každém okamžiku pozorováno jenom několik fluoroforů, proto nemůže být provozována, pokud je roztok příliš koncentrovaný a v pozorovaném objemu je tedy přítomno příliš mnoho fluoroforů. Proces je opakovatelný, fluorofory lze excitovat opakovaně, pokud nenastane jev zvaný fotovybělování (nevratné zničení excitovaného fluoroforu) [16, 19, 20].

2.8.2 Fluorescenční sondy

Fluorofor je molekula, která po osvětlení světlem určité vlnové délky absorbuje energii tohoto záření a následně jí ztratí emisí záření o delší vlnové délce. Fluorofory mohou být vlastní, ty vykazují fluorescenci přirozeně (proteiny, redukované formy NADH), nebo nevlastní, které fluoreskují až po navázání na vzorek (všechny fluorescenční sondy a značky).

Fluorescenční značky jsou ke vzorku vázány kovalentně, naopak sondy ke vzorku poutá nekovalentní vazba. Vhodná volba fluorescenční sondy je klíčová pro optimální výsledky analýz, jelikož tyto molekuly jsou vysoce citlivé na změny prostředí. V současné době je známo několik tisíc různých sond, molekuly těchto látek jsou zpravidla planární s konjugovanými dvojnými vazbami.

Nilská červeň patří mezi často využívané fluorescenční sondy (strukturní vzorec viz Obrázek 7). Ve vodném prostředí je tato sonda nerozpustná, v organických rozpouštědlech se rozpouští velmi dobře. Běžně se využívá v biochemii pro studium hydrofobních domén proteinů. Molekula je vysoce solvatochromní (schopnost měnit zbarvení závisle na změně polarity rozpouštědla) a vlnová délka emise a excitace se mění závisle na polaritě rozpouštědla [18, 21].



Obrázek 7: Strukturní vzorec Nilské červeně

3 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

Výzkum, zabývající se systémy polyelektrolyt-tenzid, vychází z prací a poznatků K. Thalberga a B. Lindmana, kteří se touto problematikou zabývali už v 80. letech 20. století. Jelikož je řetězec hyaluronanu negativně nabitý, nabízí se především výzkum interakcí s kationtovými tenzidy.

K. Thalberg a B. Lindman v práci *Interaction between Hyaluronan and Cationic Surfactant* [22] zkoumali interakci mezi hyaluronanem sodným a kationtovými tenzidy, s ohledem na délku alkylových řetězců tenzidů. Využívali metody NMR, solubilizace barviv, fázové separace a vodivost. Bylo prokázáno, že pokud je počet atomů uhlíku v alkylovém řetězci tenzidu minimálně deset, tak stačí velmi nízká koncentrace tenzidu a dochází k interakci s hyaluronanem. V určitém stupni nasycení hyaluronového řetězce tenzidem, vzniklé molekuly nejsou dále rozpustné a dochází k fázové separaci. Tento jev lze pozorovat daleko za CMC tenzidu. Přidání velkého přebytku tenzidu pak způsobí opětovné rozpuštění těchto agregátů.

Björling a spol. v práci *An NMR Self-Diffusion Study of the Interaction between Sodium Hyaluronate and Tetradecyltrimethylammonium Bromide* [23] studovali pomocí NMR interakci hyaluronanu a tenzidu TTAB. Bylo zjištěno, že i po přidání soli v množství dostatečném pro potlačení srážení, dochází poměrně výrazně k vázání tenzidu na hyaluronan.

Iamazaki a spol. se v práci *Photophysical study of the interactions of charged copolymers with surfactants of opposite charge* [24] zabývali interakcí mezi kopolymery PSS-nBVE a opačně nabitými tenzidy ve vodném roztoku, pomocí pyrenu jako fluorescenční sondy. Zjistili, že vytvořené premicelární agregáty, vytvořené díky elektrostatické interakci mezi kopolymery a tenzidy, přitahují původně volné sondy, které migrují z vodného prostředí do nově vytvořených hydrofobních částí molekul. K formování premicelárních agregátů v systému dochází okolo CAC tenzidu, která se v tomto případě pohybuje v hodnotách $0,27 \pm 0,2$ mM. Hlavní interakce mezi tenzidy a kopolymery je umožněna elektrostatickými přitažlivými silami.

T. Halasová a spol. se v práci *Hyaluronan-surfactant interactions in physiological solution studied by tensiometry and fluorescence probe techniques* [25] zabývali interakcí hyaluronanu s tenzidy různého typu v prostředí NaCl. Výsledky fluorescenčního měření ukázaly, že formování agregátů probíhá v určitém intervalu koncentrací tenzidu, a zvláště vhodná je pro tuto agregaci přítomnost Hya. Největší vliv Hya byl pozorován v neutrálním Tween 20 a kationaktivním CTAB. Interakce hyaluronanu a CTAB se projevuje vzrůstem CMC a rozšířením oblastí, kde dochází ke tvorbě micel. Autoři to zdůvodňují silnějšími hydrofobními interakcemi mezi delším řetězcem CTAB a hydrofobními doménami na hlavním řetězci Hya. Agregace CTAB v porovnání s TTAB je přítomností hyaluronanu ovlivněna mnohem více, což je přisuzováno delšímu alkylovému řetězci tohoto tenzidu.

A. Kargerová a M. Pekař v článku *High-Resolution Ultrasonic Spectroscopy Study of Interactions between Hyaluronan and Cationic Surfactants* [26] popisují interakce v kladně nabitých systémech polyelektrolyt-tenzid ve vodném prostředí i v prostředí NaCl. Tyto interakce zkoumali pomocí ultrazvukové spektroskopie s vysokým rozlišením (HRUS). Byl použit hyaluronan o různých molekulových hmotnostech a tenzidy TTAB a CTAB. Ultrazvuková spektroskopie prokázala interakce v systému při velmi nízké koncentraci tenzidu. Interakce s CTAB byla pozorována již od počátku titrace, zatímco u TTAB až při dosažení koncentrace 0,4 mmol.

J. Krouská a spol. v článku *Study of interactions between hyaluronan and cationic surfactants by means of calorimetry, turbidimetry, potentiometry and conductometry* [27] studovali termodynamiku procesu formování micel tenzidů TTAB a CTAB s hyaluronanem. Turbidimetrie a potenciometrie potvrdila, že k interakci v systému dochází již při nízkých koncentracích, a to při značném přebytku hyaluronanu. Pomocí kalorimetrie byla studována fázová separace, ke které dojde, pokud je množství náboje hyaluronanu a tenzidu vyrovnané.

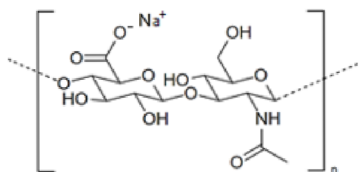
Tato bakalářská práce je pokračováním výzkumu, který prováděla **T. Halasová** v rámci dizertační práce *Interakce hyaluronanu a amfifilních molekul* [28]. Halasová se ve své dizertaci zabývala mimo jiné studiem interakce hyaluronanu o různých molekulových hmotnostech s tenzidem CTAB ve vodném prostředí, kdy tyto interakce pozorovala pomocí FCS. V tomto systému zaznamenala oblast fázové separace v oblasti koncentrací za CAC, kdy docházelo k usazování gelovité fáze na stěnách vialek. Výsledky měření z FCS poukázaly na fakt, že po přidávku hyaluronanu do roztoku tenzidu dojde k interakci a tvorbě větších agregátů, které difundují pomaleji než volně natažený řetězec. Bylo také pozorováno, že po čase dochází k rovnoměrnějšímu rozdělení tenzidových molekul podél řetězce a částečně k návratu do roztažené konformace.

Také **F. Stiborský** při řešení bakalářské práce *Studium agregace v systému biopolymer-tenzid za nízkých koncentrací tenzidu* [29] pozoroval v systému Hya-CTAB jev, kdy za určitých nízkých koncentrací tenzidu CTAB se vytvořila gelová vrstva, která se usadila na stěnách vialek. Tato vrstva se vytvořila při všech měřených koncentracích hyaluronanu a vždy při stejné koncentraci CTAB. Vrstva pravděpodobně vzniká, když agreguje polymer s tenzidem, který se nejdříve soustřeďuje elektrostaticky na polymerním řetězci a po nasycení tenzidem dojde právě k separaci fází mikrogelu od vody. S dalším nárůstem koncentrace tenzidu se začnou tyto fáze propojovat za vzniku micel a gelu.

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Použité chemikálie

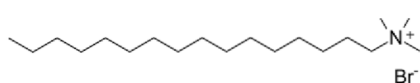
Kyselina hyaluronová (sodná sůl)



CAS: 9004-61-9
 $M_w = 350 \text{ kDa}$

číslo šarže: 230215-E1
Contipro Biotech s.r.o

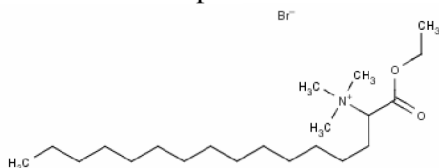
Cetyltrimethylamonium bromid



CAS: 57-09-0
 $M_r = 364,45 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

číslo šarže: H6269-500G
Sigma Aldrich

Septonex



CAS: 10567-02-9
 $M_r = 422,48 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

číslo šarže: 910SEP002
GNB chem, a.s.

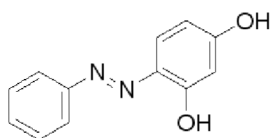
Chlorid sodný

NaCl

CAS: 7847-14-5
 $M_r = 58,44 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

číslo šarže: 903200314
Penta

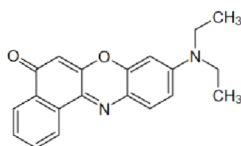
Sudan Orange G



CAS: 2051-85-6
 $M_r = 214,22 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

číslo šarže: S040195
Riedel-de Haën

Nilská červeň



CAS: 7385-67-3
 $M_r = 318,37 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

číslo šarže: BCBK2559V
Sigma Aldrich

Deionizovaná voda

ELGA

4.2 Použité metody

4.2.1 Příprava zásobních roztoků

Jako první byly připraveny zásobní roztoky hyaluronanu, tenzidů CTAB a Septonexu a také roztok NaCl. Pro přípravu zásobního roztoku polymeru o požadované koncentraci $200 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ bylo naváženo 200 mg hyaluronanu, který byl rozpuštěn v 1000 ml vody. Pro zásobní roztoky tenzidů o požadované koncentraci $1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ bylo naváženo 0,365 g CTAB a 0,423 g Septonexu, navážky byly vždy rozpuštěny v 1000 ml vody. Pro zásobní roztok NaCl o požadované koncentraci $2 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ bylo rozpuštěno 11,680 g NaCl ve 100 ml vody. Byl připraven také roztok Nílské červeně v CTAB, kdy 1 ml původního roztoku Nílské červeně v acetonu o koncentraci $6,3\cdot 10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ byl odpařen a dolit 10 ml připraveného zásobního roztoku CTAB. Všechny roztoky byly vždy po připravení ponechány přes noc na magnetické míchačce, aby došlo k úplné homogenizaci. Následně byly ze zásobních roztoků připravovány gely.

4.2.2 Ověření koncentračního rozsahu

Roztok polymeru byl vždy smíchán s tenzidem (byla připravena koncentrační řada s CTAB i Septonexem) podle poměrů uvedených v Tabulka 2. Tenzid byl před smícháním pro lepší viditelnost vzniklého mikrogelů obarven Sudanem III. Směsi ve vialkách byly ponechány dva dny na třepačce, než došlo k fázové separaci, kdy na stěnách nádob docházelo k usazování vzniklého gelu.

Tabulka 2: Tabulka uvádějící poměr P/T pro jednotlivé vzorky [28]

CTAB $\text{mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$	P/T poměr		
	hya $5 \text{ mg}\cdot\text{dm}^{-3}$	hya $30 \text{ mg}\cdot\text{dm}^{-3}$	hya $50 \text{ mg}\cdot\text{dm}^{-3}$
0,02	0,62	3,7	6
0,03	0,42	2,5	4
0,04	0,31	1,9	3
0,05	0,25	1,5	2,5
0,06	0,21	1,2	2
0,08	0,16	0,9	1,6
0,1	0,12	0,7	1,2
0,15	0,08	0,5	0,8
0,2	0,06	0,4	0,6
0,25	0,05	0,3	0,5
0,3	0,042	0,25	0,41
0,35	0,036	0,21	0,35
0,4	0,031	0,19	0,31
0,5	0,025	0,15	0,25
0,6	0,021	0,12	0,21
0,7	0,017	0,1	0,18
0,8	0,016	0,09	0,16

4.2.3 Příprava mikrogelů – ,up scale‘ proces

Po vizuálním vyhodnocení připravené koncentrační řady byly vybrány vzorky, kde vzniklo nejvíce gelu a tyto byly připraveny znovu, nejprve ve vialkách a poté nádobách s větším objemem.

U takto připravených gelů byly stanovovány reologické vlastnosti a vzorky byly také analyzovány pomocí FCS, proto část vzorků byla připravena s obsahem fluorescenční sondy Nilské červeně. Výsledná koncentrace Nilské červeně ve vzorku byla $1 \cdot 10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ a následně v další sadě vzorků byla tato koncentrace snížena na $1 \cdot 10^{-12} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$, jelikož při původním množství sondy v roztoku došlo k navázání veškerého jejího množství do vzniklého mikrogelů a signál při měření byl příliš intenzivní.

Bylo pozorováno také chování vzniklého mikrogelů v prostředí NaCl, kdy z vybraných vzorků byl po vzniku mikrogelů odstraněn původní roztok a tento byl nahrazen roztokem NaCl, se vzrůstající koncentrací od $0,05 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$; $0,15 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$; $0,25 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ až k $0,50 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$.

4.2.4 Reologická měření

Reologické parametry mikrogelů byly měřeny na rotačním reometru ARG 2 firmy TA Instruments HR-2 s měřicím systémem deska-deska. Byla zvolena geometrie s ocelovou deskou o průměru 8 mm se vzdáleností 100 μm od spodní stacionární desky v měřicí poloze. Nastavení parametrů měření bylo provedeno pomocí softwaru TRIOS, data byla poté vyhodnocena v programu MS Excel. Byly provedeny frekvenční a tokové testy, veškerá měření byla provedena při teplotě 25 °C. Součástí každého měření byl „conditioning step“, aby došlo k ustálení podmínek měření.

Frekvenčními testy, kdy na gely je působeno stále stejnou normálovou silou a mění se pouze doba jejího působení, byla získána závislost viskoelastických modulů na úhlové frekvenci oscilace a následně byla stanovena hodnota ztrátových úhlů. Ze závislosti viskozity gelů na smykové rychlosti byly získány tokové křivky a dle jejich tvaru bylo posuzováno chování vzorků.

Data byla vyhodnocena v programu MS Excel, kde bylo pro lepší orientaci v grafech na osách nastaveno logaritmické měřítko. Nastavení parametrů přístroje pro jednotlivé testy je uvedeno v Tabulka 3 a Tabulka 4.

Tabulka 3: Nastavení parametrů pro frekvenční test

Frekvenční test	
teplota:	25 °C
čas relaxace:	5 min
amplituda deformace:	1 %
úhlová frekvence:	0,01 – 20 Hz
body na dekádu:	7

Tabulka 4: Nastavení parametrů pro tokový test

Tokový test	
teplota:	25 °C
čas relaxace:	5 min
smyková rychlost:	0,2 – 200 1/s
body na dekádu:	5
doba na vzorek:	10 s
tolerance:	5 %
počet bodů v rámci tolerance:	3
max. čas na vzorek	1 min

4.2.5 Fluorescenční měření

Fluorescenční měření bylo provedeno na přístroji Fluorolog firmy HORIBA, zdrojem světla byla xenonová výbojka s výkonem 450 W. Vlnová délka pro excitaci nastavena na 508 nm a intenzita emise byla měřena v rozmezí 550–690 nm.

Použitím FLIM metody (Fluorescence life-time imaging microscopy) byl sledován časový pokles fluorescence po excitaci. Při této metodě je využívána pulzní povaha zdroje, kdy je perioda excitačního pulzu zvolena delší, než je časový pokles vyvolané fluorescence. Metodou FLIM byla studována distribuce modelové hydrofobní látky Nílské červeně.

5 VÝSLEDKY A DISKUZE

Cílem této bakalářské práce je příprava a charakterizace mikrogelů vznikajících při nízkých koncentracích hyaluronanu a CTAB, případně Septonexu. V této části práce bude na základě pozorování, reologických měření a fluorescenčních měření diskutován vliv způsobu přípravy na tvorbu mikrogelu a jeho vlastnosti stanovené pomocí zmíněných metod.

5.1 Vizuální vyhodnocení

5.1.1 Koncentrační řady

Jedním z cílů práce bylo ověřit navržený koncentrační rozsah a vyhodnotit, kde vzniká nejvíce gelu, který byl následně připraven ve větším množství, aby bylo možno provést požadovaná měření. Jako nejvhodnější byl na základě opakované přípravy koncentrační řady, up scale procesů (viz Obrázek 8 a Obrázek 9) a vizuálního vyhodnocení, zvolen poměr $\text{hya} : \text{CTAB} = 0,21$ v Tabulka 2 vyznačeno červeně). Pro další měření byly připravovány mikrogely s tenzidem CTAB, jelikož při použití septonexu nebylo dosaženo dobrých výsledků, mikrogel vznikal pouze ve velmi malém množství (viz Obrázek 8). Veškerá další měření byla provedena na vzorku připraveném smícháním roztoku tenzidu a hyaluronanu vždy v uvedeném poměru.



Obrázek 8: Mikrogel (zbarvený okraj na stěně vialek) připravený s tenzidem CTAB (nahore) a Septonexem (dole)



Obrázek 9: ‚Up scale‘ procesy

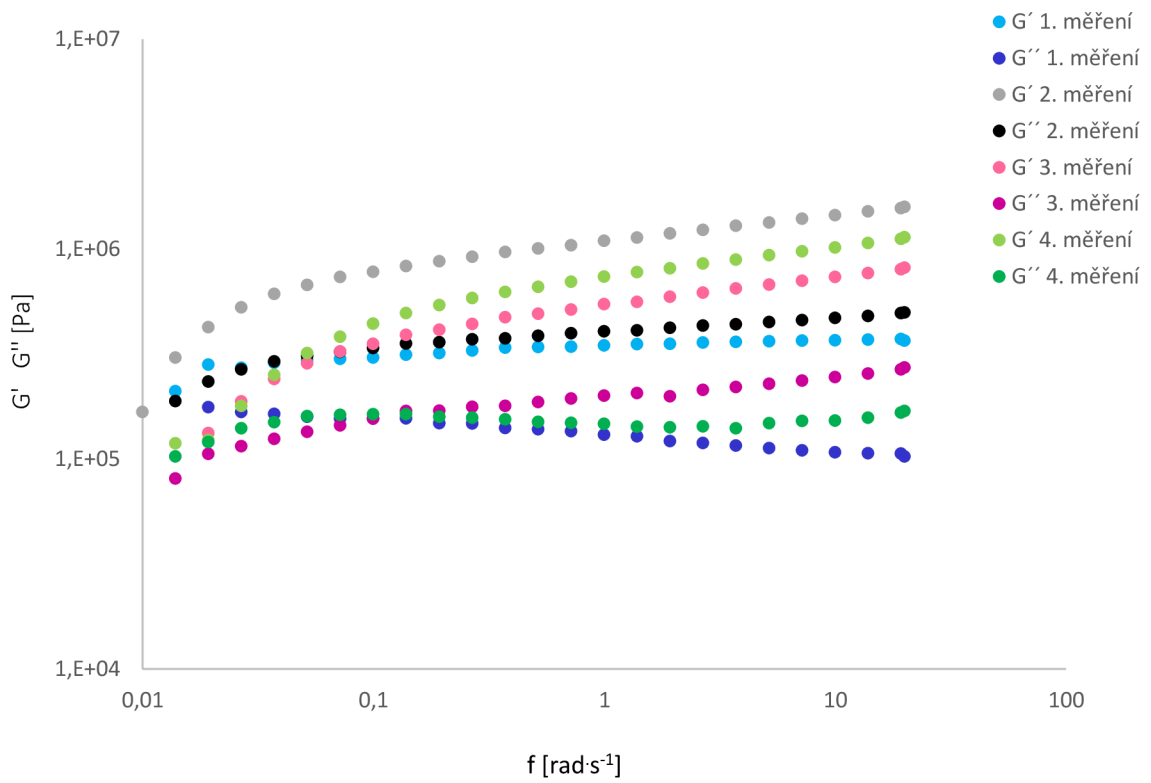
5.2 Reologická měření

Charakteristické vlastnosti gelů byly stanoveny reologickými měřeními, cílem těchto měření bylo zjistit, zda připravené vzorky vykazují spíše elastické nebo viskózní chování. Ke stanovení vlastností byly provedeny jak frekvenční testy, tak tokové křivky.

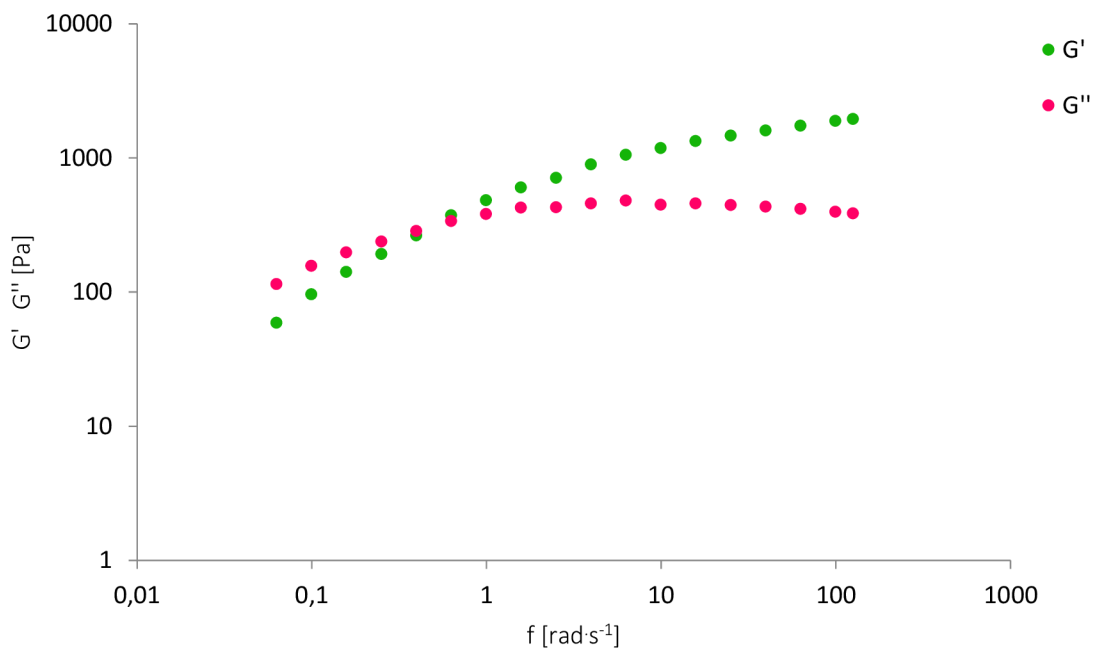
5.2.1 Vyhodnocení frekvenčních testů

Na Obrázku 10 je uveden graf závislosti viskózního a elastického modulu na měnící se úhlové frekvenci. Dle naměřených výsledků, u všech měření převyšuje modul elastický modul viskózní, a to v celém rozsahu frekvencí. Toto chování je typické pro viskoelastický materiál s převahou elastické složky (resp. je to chování typické pro gely). Ve měřeném rozsahu frekvencí nedochází k překřížení (tzv. cross-over pointu), ale lze předpokládat, že při frekvencích nižších, než je měřený rozsah, k překřížení modulů dochází. Měření bylo limitováno množstvím připraveného vzorku, reologické testy byly opakovány čtyřikrát, ale reprodukovatelnost výsledku není optimální.

Výsledky měření byly porovnány s výsledky zjištěnými u klasických makrogelů. Jelikož se hodnoty modulů u mikrogelů pohybují v řádově výrazně vyšších hodnotách, lze usuzovat, že mikrogel vykazuje lepší mechanické vlastnosti (je pevnější), než klasický makrogel. Je ale nutné podotknout, že v průběhu měření docházelo k vysychání vzorku, čímž jsou pravděpodobně hodnoty naměřené ve vyšších frekvencích ovlivněny. Avšak hodnoty modulů z počátku měření (při nižších frekvencích), kde obsah vody v gelu je ještě vysoký, také zřetelně převyšují klasické hydrogely a proto hypotéza o vyšší tuhosti mikrogelů může být správná. Tuto domněnku potvrzují i stanovené hodnoty ztrátových úhlů a také tokové křivky, které jsou diskutovány dále. Pro porovnání je uveden průběh modulů v makrogelu (viz Obrázek 11).



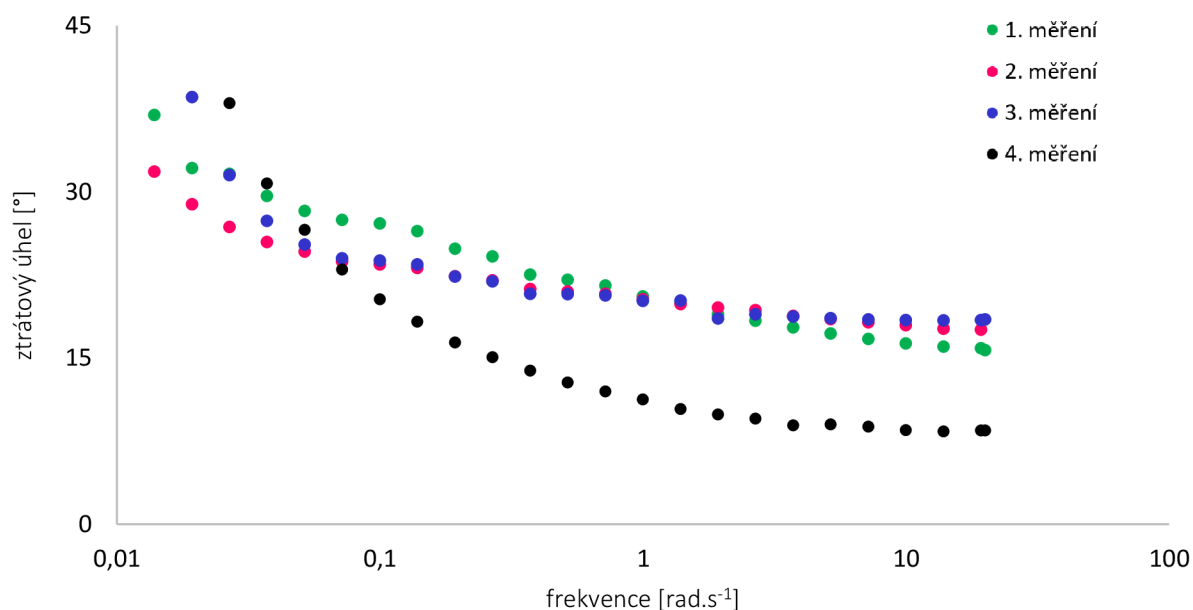
Obrázek 10: Závislost viskózního a elastického modulu na úhlové frekvenci – mikrogel



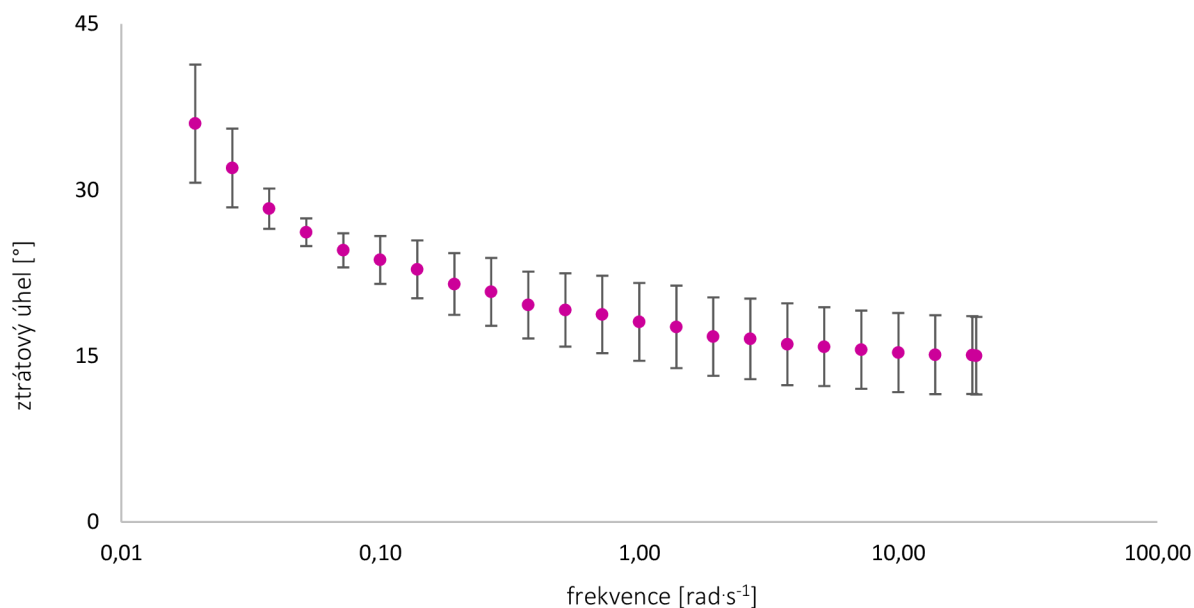
Obrázek 11: Závislost viskózního a elastického modulu na úhlové frekvenci – klasický makrogel

Závislost ztrátového úhlu δ na úhlové frekvenci, včetně odchylek je uvedena na Obrázku 12 a Obrázku 13. U gelů obecně jsou z počátku měření, kdy napětí působící na vzorky je nižší, hodnoty ztrátových úhlů také nízké a se zvyšujícím se napětím dochází k deformaci struktur, materiál začíná „téct“ a hodnoty ztrátových úhlů se zvyšují.

Měřené mikrogely se vymykají chování typickému pro gely, pozorujeme zde opačný efekt. Hodnoty ztrátových úhlů v celém rozsahu frekvencí nepřesahují 45° a tak lze říci, že vzorky vykazují chování viskoelastické látky s převahou elastické složky. Průběh je tedy opačný, vzorky jakoby se „stabilizovaly“ se zvyšujícím se napětím. Toto je však pravděpodobně způsobeno již zmiňovaným vysycháním gelu v průběhu měření.



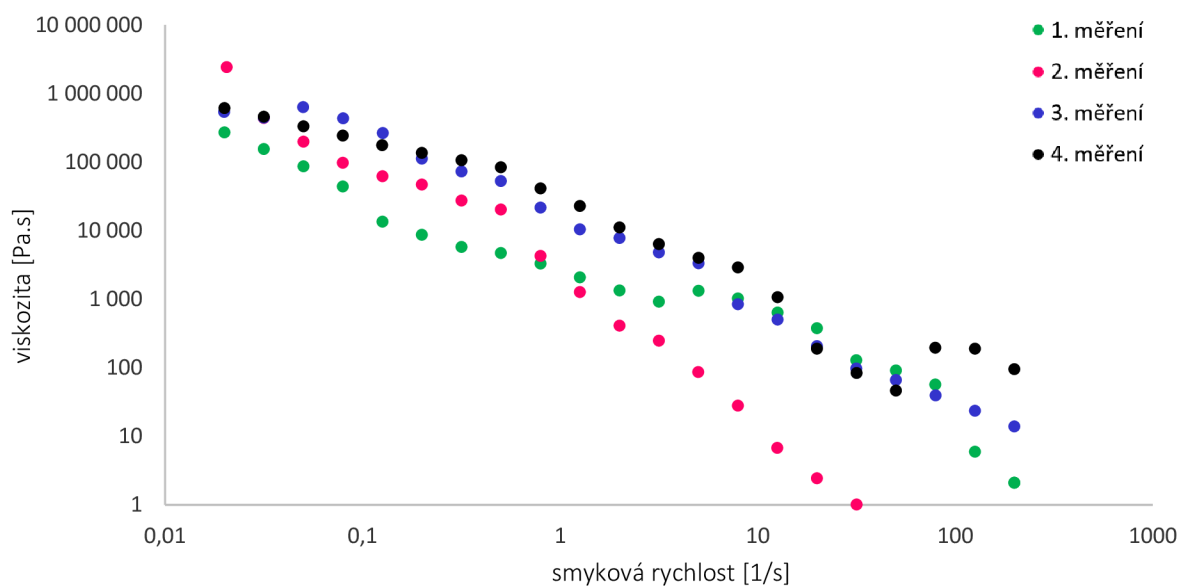
Obrázek 12: Závislost ztrátových úhlů na měnící se úhlové frekvenci – měření jednotlivých vzorků



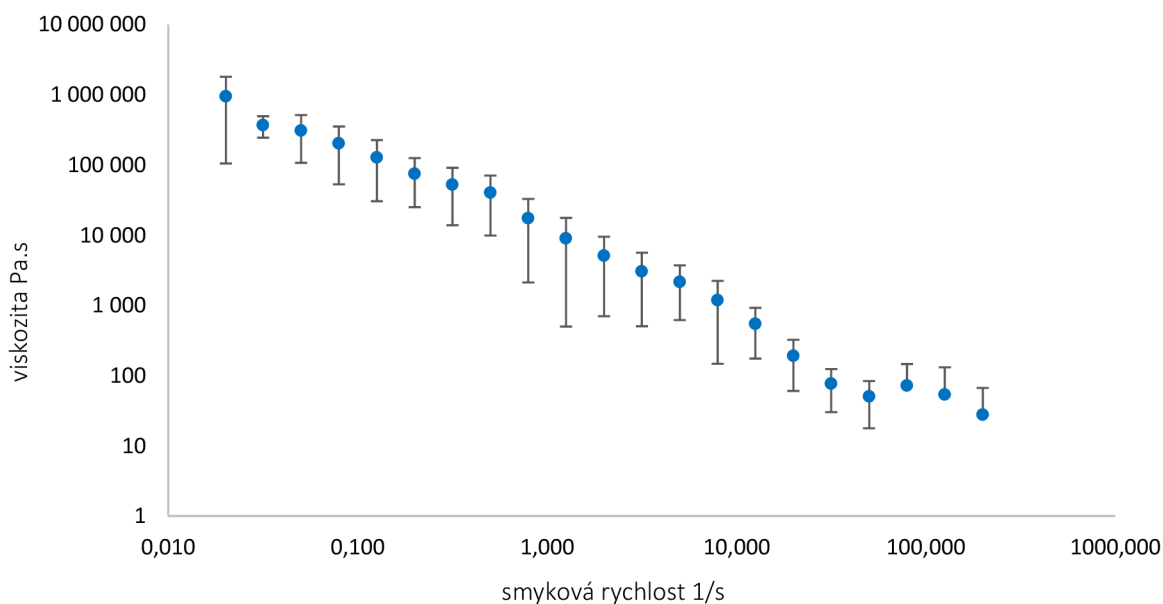
Obrázek 13: hodnoty ztrátových úhlů se započtenou odchylkou

5.2.2 Vyhodnocení tokových testů

Z naměřených závislostí viskozity na smykových rychlostech lze usoudit, že mikrogely mají tokové křivky charakteristického průběhu pro pseudoplastickou látku. Viskozita se snižuje s rostoucí smykovou rychlostí, klesající trend vykazují všechny měřené vzorky (viz Obrázek 14). Při vyšších smykových rychlostech řetězce gelů nejsou schopny odolávat mechanickému napětí, a tudíž dochází k totální deformaci struktur, což způsobí také pokles viskozity. Ke zpětné obnově řetězců pravděpodobně již nedochází, jelikož viskozita klesá téměř o pět řádů. Výsledky jsou však s ohledem na značné odchylky při měření jednotlivých vzorků poměrně špatně reprodukovatelné (viz Obrázek 15).



Obrázek 14: Závislost viskozity na smykové rychlosti



Obrázek 15: Závislost viskozity na smykové rychlosti – jednotlivá měření

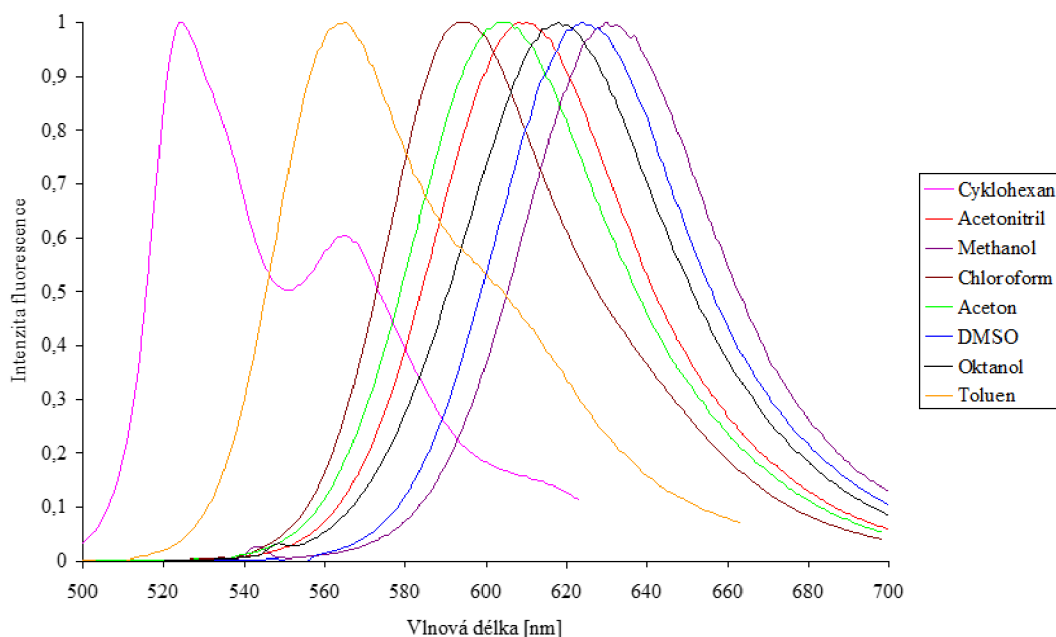
5.3 Fluorescenční měření

Při přípravě vzorků s fluorescenční sondou Nílskou červení došlo k zajímavému jevu, kdy se velká část přidané sondy zachytila ve vznikajícím mikrogelu (gel byl při odebrání vzorku k měření silně růžově zbarven, viz Obrázek 16).



Obrázek 16: Mikrogel s obsahem Nílské červeně

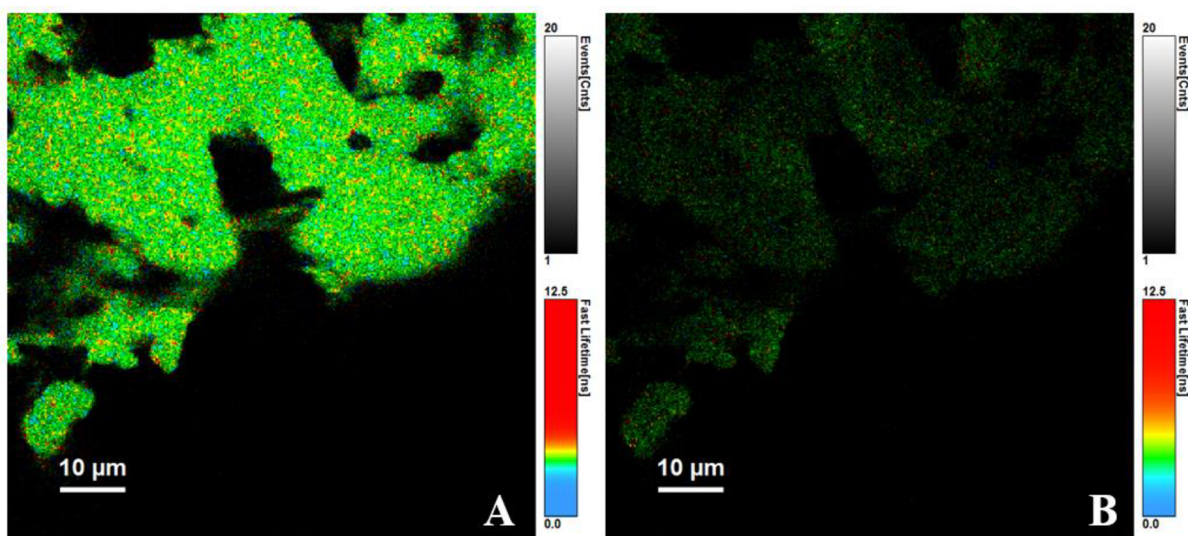
Fluorescenčním měřením byla studována distribuce modelové látky – Nílské červeně, u které se v polárním prostředí očekává emise okolo 600–650 nm (vlnová délka emise narůstá se zvyšující se polaritou prostředí) a v prostředí nepolárním okolo 550 nm (viz emisní spektra Nílské červeně, Obrázek 17). U Nílské červeně tedy očekáváme vyšší jas v méně polárních částech gelu.



Obrázek 17: Emisní spektra Nílské červeně v rozpouštědlech o různé polaritě ($c_{nc}=10^{-5}M$) [30]

Jak je patrné na Obrázku 18 Nilská červeň je ve vzorku lokalizovaná v polárních oblastech (Obrázek 18. A), v oblastech hydrofobních je emise méně intenzivní (Obrázek 18. B). Obrázky byly pořízeny v různých spektrálních oblastech, bylo měřeno zároveň na dvou detektorech.

Z výsledků měření vyplývá, že systém je spíše homogenní, což potvrzují také doby života fluorescence, které jsou rozloženy rovnoměrně. CTAB zůstává v systému v micelární formě. Micely se pravděpodobně nezvětšují, nedochází k jejich fúzi a látky solubilizované do micel tak budou mít po inkorporaci v gelu stejnou pozici a stejný kontakt s okolím, jako v micelárním roztoku. Na tuto skutečnost je potřeba brát ohled při případné solubilizaci větších molekul.



Obrázek 18: A – excitace 508 m, emise 690/70; B – excitace 508 m, emise 550/49

5.3.1 Mikrogel v prostředí NaCl

<p>0,05 M NaCl</p>		<p>nebyly detekovány žádné fluoreskující molekuly, mikrogel se rozpadl na drobné shluky, volně se vyskytující v roztoku</p>
<p>0,15 M NaCl</p>		<p>koncentrace fluoreskujících molekul je pod detekčním limitem mikroskopu, ale došlo k rozptýlení mikrogelu zpět do roztoku</p>
<p>0,25 M NaCl</p>		<p>stanovená koncentrace fluoreskujících molekul v roztoku: 60 ± 14 nmol, mikrogel byl rozptýlen do roztoku</p>
<p>0,50 M NaCl</p>		<p>stanovená koncentrace fluoreskujících molekul v roztoku: 831 ± 54 nmol, došlo k rozptýlení mikrogelu do roztoku</p>

6 ZÁVĚR

Cílem této bakalářské práce byla příprava gelu vznikajícího ve vodném prostředí, za nízkých koncentrací hyaluronanu a kationaktivního tenzidu, a následná charakterizace jeho fyzikálních vlastností. Toto měření bylo inspirováno závěrečnými pracemi T. Halasové [28] a F. Stiborského [29], kteří pozorovali jako jedni z prvních ve vzorcích tvorbu mikrogelu.

Mikrogel byl pro účely této práce cíleně připraven – nejprve byl na základě přípravy a vyhodnocení koncentrační řady stanoven nejvhodnější poměr polymeru a tenzidu tak, aby mikrogel vznikal v co největším množství a následně byla provedena reologická a fluorescenční měření. K fázové separaci docházelo významněji pouze při použití tenzidu CTAB, Septonex se ukázal jako méně vhodný.

Reologicky bylo zjištěno, že mikrogely vykazují chování typické pro gely (elastický modul převyšuje v celém rozsahu frekvencí modul viskózní) a hodnoty modulů se zároveň pohybují ve výrazně vyšších hodnotách než při měření makrogelů, mikrogel má tedy pravděpodobně lepší mechanické vlastnosti (je pevnější), než klasický makrogel. Při stanovování ztrátových úhlů bylo zjištěno, že mikrogely se typickému chování gelů vymykají, hodnoty nepřesahují 45° a vzorky se chovají jako viskoelastické látky s převahou elastické složky. Tokové křivky byly vyhodnoceny jako charakteristické pro pseudoplastickou látku. Vzhledem k velmi malému množství vznikajícího mikrogelu mohly být vzorky při reologickém měření částečně nehomogenní, a tak jsou patrné poměrně značné odchylky mezi jednotlivými proměřovanými vzorky, jak při měření viskozity, tak u stanovování ztrátových úhlů. K odchylkám taky přispívá fakt, že vzorky po vyjmutí z původního roztoku poměrně rychle začaly vysychat a ke konci reologického měření byly zřetelně tužší konzistence.

Při fluorescenčním měření se ukázalo, že koncentrace řádově $1 \cdot 10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ Nílské červeně ve vzorku byla pro analýzu příliš vysoká a ani po snížení koncentrace sondy na $1 \cdot 10^{-12} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ v další sadě vzorků, nebylo dosaženo optimálního signálu. Ve vzorcích došlo k navázání veškeré sondy do vznikajícího gelu, kde narostla koncentrace tak výrazně, že nebylo možno provést analýzu. Z obrázků pořízených na fluorescenčním mikroskopu je patrné, že významné množství Nílské červeně je lokalizované v polárních částech mikrogelu, kde je emise výrazně silnější než hydrofobních doménách. Měřený systém je spíše homogenního charakteru, což potvrzují také rovnoměrně rozložené doby života fluorescence. Micely v mikrogelu se pravděpodobně nezvětšují, a solubilizované látky tak budou mít po inkorporaci v gelu stejnou pozici a stejný kontakt s okolím, jako v micelárním roztoku. Na tuto skutečnost je třeba pomýšlet při případné solubilizaci objemných molekul, např. některých farmaceutik apod.

Po kontaktu vzorků s roztokem NaCl v případě koncentrace 0,05 M došlo k rozpadu mikrogelu na drobné shluky, které se volně vyskytovaly v roztoku. V případě koncentrace 0,15 M; 0,25 M a 0,5 M NaCl došlo k rozptýlení mikrogelu zpět do roztoku, a u koncentrací 0,25 M a 0,5 M NaCl bylo detekováno i množství fluoreskujících molekul.

Pro další práci s tímto typem vzorků lze doporučit spíše jinou metodiku přípravy, například použití větších nádob s rotující netkanou textilií, na které by se vznikající mikrogel zachytával. Při případné přípravě mikrogelu ve větším měřítku by bylo vhodné zvážit opětovné použití vody, které se při přípravě vzorků spotřebovává značné množství, což je nevýhodné nejen z ekonomického hlediska.

7 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] BARTOVSKÁ, Lidmila a Marie ŠÍŠKOVÁ. Fyzikální chemie povrchů a koloidních soustav. Vyd. 5., přeprac. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 2005. ISBN 80-708-0579-X.
- [2] POUCHLÝ Julius: Fyzikální chemie makromolekulárních a koloidních soustav. 3. vyd. Praha: VŠCHT Praha, 2008. ISBN 978-80-7080-674-6.
- [3] ZBIROVSKÝ, Miroslav. Speciální organické výrobky. Praha: VŠCHT, 1989. ISBN 80-708-0034-8.
- [4] HOLMBERG, T., B. JÖNSSON, B. KRONBERG, B. LINDMAN. Surfactants and Polymers in Aqueous Solution. 2002. [online]. ISBN 0-471-49883-1. Dostupné z: <http://www.files.rushim.ru/books/polimers/surfactants-and-polymers-in-aqueoussolution.pdf>.
- [5] ISOMAA, B., J. REUTER a B. M. DJUPSUND. The subacute and chronic toxicity of cetyltrimethylammonium bromide (CTAB), a cationic surfactant, in the rat. Archives of Toxicology. 1976, 35(2), 91-96. DOI: 10.1007/BF00372762. ISSN 0340-5761. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/BF00372762>
- [6] ATKINS, P., J. de PAULA. Atkins' physical chemistry. 7th edition, Oxford University Press, 2002. Micelle formation, s. 755. ISBN 0-19-879285-9.
- [7] Aplikovaná koloidní chemie. In: VUT Moodle [online]. Brno, 2017 [cit. 2017-05-08]. Dostupné z: <https://moodle.vutbr.cz/mod/book/view.php?id=93740>
- [8] Contipro. Contipro [online]. Czech Republic: Contipro, 2017 [cit. 2017-03-12]. Dostupné z: <http://www.contipro.cz/portfolio/farmaceuticka-kyselina-hyaluronova>
- [9] DAVID-RAOUDI, Maha, Frédéric TRANCHEPAIN, Brigitte DESCHREVEL, Jean-Claude VINCENT, Patrick BOGDANOWICZ, Karim BOUMEDIENE a Jean-Pierre PUJOL. Differential effects of hyaluronan and its fragments on fibroblasts: Relation to wound healing. Wound Repair and Regeneration [online]. Malden, USA: Blackwell Publishing, 0803, 16(2), 274-287 [cit. 2017-03-26]. DOI: 10.1111/j.1524-475X.2007.00342.x. ISSN 10671927. Dostupné z: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1524-475X.2007.00342.x/full>
- [10] HASCALL, C. V., LAURENT, C. T.: Hyaluronan: Structure and Physical Properties. Glycoforum [online], 1997, [cit. 3. 1. 2017]. Dostupné z: <http://www.glycoforum.gr.jp/>
- [11] WEIN, Ondřej. Úvod do reologie. Brno: Fakulta chemická VUT, 1996, 84 s.

- [12] CHYTIL, Martin. Měření reologických vlastností hyaluronanu. In: Chempoint [online]. 2011 [cit. 2017-03-26]. Dostupné z: <http://www.chempoint.cz/mereni-reologickych-vlastnosti-hyaluronanu>
- [13] PEKAŘ, M., M. KLUČÁKOVÁ, M. VESELÝ a M. ČEPAN. Fyzikální chemie a fotochemie. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická. 2003. ISBN: 80-214-2470-2.
- [14] MEZGER, T. G. The Rheology Handbook: for users of rotational and oscillatory rheometers. 3rd rev. ed. Hanover [Germany]: Vincentz Network, 2011. ISBN 978-3-86630-864-0.
- [15] SOPOUŠEK, Jiří. Základy reologie a reometrie kapalin [online]. Brno: Masarykova univerzita, 2007, [cit. 2017-01-04]. Dostupné z: http://is.muni.cz/el/1431/jaro2007/V5760/um/2457585/2457594/Reologie_a_reometrie_kapalin.pdf
- [16] LAKOWICZ, J. R.: Principles of Fluorescence Spectroscopy. 2. vyd. New York: Kluwer Academic Publishers, 1999. 698 s. ISBN 0-306-46093-9.
- [17] ROUESSAC, Francis. a Annick. ROUESSAC. Chemical analysis: modern instrumentation methods and techniques. 2nd ed. Chichester: John Wiley, 2007. ISBN 978-0-470-85903-2.
- [18] SKOOG, Douglas A., Donald M. WEST a F. James HOLLER. Analytical chemistry: an introduction. 6th ed. Philadelphia: Saunders College Publishing, 1994. Saunders golden sunburst series. ISBN 00-309-7285-X.
- [19] Materials Research Centre [online]. 2017 [cit. 2017-04-23]. Dostupné z: <http://www.materials-research.cz/cz/laboratore/laborator-biokoloidu/fluorescenci-korelacni-spektroskopie/>
- [20] FLUORESCENČNÍ SPEKTROSKOPIE V NEUROVĚDÁCH [online]. 2009 [cit. 2017-04-23]. Dostupné z: <http://www1.lf1.cuni.cz/~zfsar/fluorescence/Default.htm>
- [21] GREENSPAN, P. Nile red: a selective fluorescent stain for intracellular lipid droplets. The Journal of Cell Biology. 1985, 100(3), 965-973. DOI: 10.1083/jcb.100.3.965. ISSN 0021-9525. Dostupné také z: <http://www.jcb.org/cgi/doi/10.1083/jcb.100.3.965>
- [22] THALBERG, K., LINDMAN, B.: Interaction between Hyaluronan and Cationic Surfactant. The Journal of physical chemistry. Washington: American Chemical Society, 1989, č. 93, s. 1478-1483.

[23] BJOERLING, Mikael, Asa HERSLOEF-BJOERLING a Peter STILBS. An NMR self-diffusion study of the interaction between sodium hyaluronate and tetradecyltrimethylammonium bromide. *Macromolecules*. 1995, 28(20), 6970-6975. DOI: 10.1021/ma00124a038. ISSN 0024-9297. Dostupné také z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ma00124a038>

[24] IAMAZAKI, Eduardo T., Carla C. SCHMITT a Miguel G. NEUMANN. Photophysical Study of the Interactions of Charged Copolymers with Surfactants of Opposite Charge. *Langmuir*. 2001, 17(11), 3486-3490. DOI: 10.1021/la001204w. ISSN 0743-7463. Dostupné také z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/la001204w>

[25] HALASOVÁ, T., J. KROUSKÁ, F. MRAVEC a M. PEKAŘ. Hyaluronan-surfactant interactions in physiological solution studied by tensiometry and fluorescence probe techniques. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 2011, 391(1-3), 25-31. DOI: 10.1016/j.colsurfa.2011.05.035. ISSN 09277757. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0927775711003621>

[26] KARGEROVÁ, Andrea a Miloslav PEKAŘ. High-Resolution Ultrasonic Spectroscopy Study of Interactions between Hyaluronan and Cationic Surfactants. *Langmuir*. 2014, 30(40), 11866-11872. DOI: 10.1021/la501852a. ISSN 0743-7463. Dostupné také z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/la501852a>

[27] KROUSKÁ, J., M. PEKAŘ, M. KLUČÁKOVÁ, B. ŠARAC a M. BEŠTER-ROGAČ. Study of interactions between hyaluronan and cationic surfactants by means of calorimetry, turbidimetry, potentiometry and conductometry. *Carbohydrate Polymers*. 2017, 157, 1837-1843. DOI: 10.1016/j.carbpol.2016.11.069. ISSN 01448617. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0144861716313315>

[28] HALASOVÁ, T. Interakce hyaluronanu a amfifilních molekul. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2013. 160 s. Vedoucí dizertační práce prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc..

[29] STIBORSKÝ, F. Studium agregace v systému biopolymer-tenzid za nízkých koncentrací tenzidu. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2010. 36 s. Vedoucí bakalářské práce Ing. Filip Mravec, Ph.D.

[30] KUČEROVÁ, P. Spektrální chování fluorescenčních sond užitých ve studiu agregace biopolymerů. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2007. 31 s. Vedoucí bakalářské práce doc. Ing. Miloslav Pekař, CSc.

8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

8.1 Seznam zkratek

CAC	kritická agregační koncentrace
CMC	kritická micelární koncentrace
CTAB	cetyltrimethylamonium bromid
ECM	extracelulární matrix
FCS	fluorescenční korelační spektroskopie
FLIM	fluorescence life-time imaging microscopy
HOMO	highest occupied molecular orbital
HRUS	high resolution ultrasonic spectroscopy
Hya	hyaluronan
LUMO	lowest unoccupied molecular orbital
NADH	nikotinamidadenindinukleotid
NMR	nukleární magnetická rezonance
PAL	povrchově aktivní látka
PSS-nBVE	sodná sůl polystyrensulfonylu-n-butylvinyletheru
TTAB	tetradecyltrimethylammonium bromid

8.2 Seznam symbolů

d	lineární rozměr
du	vzájemná rychlost pohybu smykových rovin
dx	vzdálenost smykových rovin
D	smyková rychlost
G'	elastický modul
G''	viskozitní modul
G^*	komplexní modul
M	$\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$
M_r	molekulová hmotnost
δ	ztrátový úhel
η	dynamická viskozita