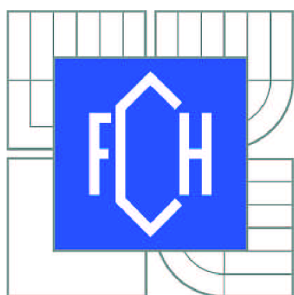


VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ

CENTRUM MATERIÁLOVÉHO VÝZKUMU

FACULTY OF CHEMISTRY

MATERIALS RESEARCH CENTRE

HOMOGENITA ADITIV V NANOVLÁKNECH

HOMOGENITY OF ADITIVES IN NANOFIBRES

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

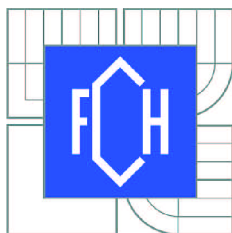
VOJTĚCH LINHA

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Kateřina Knotková, Ph.D.

BRNO 2014



Vysoké učení technické v Brně
Fakulta chemická
Purkyňova 464/118, 61200 Brno 12

Zadání bakalářské práce

Číslo bakalářské práce:	FCH-BAK0845/2013	Akademický rok: 2013/2014
Ústav:	Centrum materiálového výzkumu	
Student(ka):	Vojtěch Linha	
Studijní program:	Chemie a chemické technologie (B2801)	
Studijní obor:	Chemie pro medicínské aplikace (2808R031)	
Vedoucí práce	Ing. Kateřina Knotková, Ph.D.	
Konzultanti:	doc. RNDr. Ivana Márová, CSc.	

Název bakalářské práce:

Homogenita aditiv v nanovlákních

Zadání bakalářské práce:

1. Rešerže – nanovlákná z polyvinyl alkoholu, nosiče léčiv, barviva, léčiva
2. Metody – elektrospinning, stanovení aditiv pomocí UV-Vis spektrofotometrie, konduktometrie, povrchové napětí, viskozimetrie
3. Experimentální část – charakterizace zvláknovaných roztoků, viskoelastické vlastnosti, příprava nanovlákněných vrstev s aditivou metodou elektrostatického zvláknování, analýza vlákněných vrstev a obsah aditiv
4. Vyhodnocení výsledků a diskuse

Termín odevzdání bakalářské práce: 23.5.2014

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

Vojtěch Linha
Student(ka)

Ing. Kateřina Knotková, Ph.D.
Vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
Ředitel ústavu

V Brně, dne 31.1.2014

prof. Ing. Jaromír Havlica, DrSc.
Děkan fakulty

ABSTRAKT

Cílem této práce bylo shrnout základní možnosti zvlákňování polymerů a inkorporace aditiv. V teoretické části jsou popsány možnosti výroby nanovláken pomocí přístroje 4SPIN® společně s jednotlivými elektrodami pro zvlákňování.

Experimentální část byla zaměřena na vliv struktury aditiva na množství inkorporované látky. K tomuto výzkumu byla použita barviva erytrosin, riboflavin, brilantní modř a eriochromová čern. Vyhodnocování obsahu aditiv bylo prováděno pomocí UV-Vis spektrofotometrie.

ABSTRACT

The goal of this thesis was to summarize basic options of fiber spinning and incorporation of additives. Options for nanofiber production by 4SPIN® are described along with particular electrodes for spinning in theoretical part.

The experimental part was focused on influence of molecular structure of additives to incorporated volume of the substance. For this research four dye was used: erythrosine, riboflavin, brilliant blue and eriochrom black. UV-Vis spectroscopy was used for evaluation of volume of aditives in nanofiber layer.

KLÍČOVÁ SLOVA

nanovlákná, aditiva, hyaluronan, polyvinylalkohol

KEY WORDS

nanofiber, additives, hyaluronan, polyvinyl alcohol

LINHA, V. *Homogenita aditiv v nanovlákních*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2014. 44 s. Vedoucí bakalářské práce Ing. Kateřina Knotková, Ph.D..

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracoval samostatně a že všechny použité literární zdroje byly správně a úplně citovány. 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:

Tímto bych chtěl poděkovat Ing. Kateřině Knotkové, PhD. za trpělivost a odbornou pomoc při vedení méji bakalářské práce a firmě Contipro za možnost tuto práci naměřit a zpracovat.

Obsah

1. Úvod.....	7
2. Teoretická část	8
2.1 Výroba nanovláken.....	8
2.1.1 4SPIN®	9
2.2 Nosné materiály	11
2.2.1 Kyselina hyaluronová.....	11
2.2.2 Polyethylen oxid.....	12
2.2.3 Polyvinylalkohol	12
2.3 Inkorporace aditiv do nanovláčenné vrstvy.....	13
2.3.1 Společné zvlákňování polymeru a aditiva.....	13
2.3.2 Navázání i imobilizace na povrchu nanovláken.....	13
2.3.3 Plášťová vrstva a několikavrstvé nosiče	14
2.3.4 Koaxiální nanovláčna.....	15
2.3.5 Nanovláčenná vrstva ve spojení s hydrogely	16
2.4 Aditiva	17
2.4.1 Erytrosin	17
2.4.2 Riboflavin.....	17
2.4.3 Brilantní modř	18
2.4.4 Eriochromová čerň	18
2.5 Cíl práce.....	19
3. Experimentální část.....	20
3.1 Materiály a přístroje.....	20
3.1.1 Použité chemikálie	20
3.1.2 Použité přístroje.....	20
3.2 Pracovní postupy	20
3.2.1 Příprava zásobních roztoků	20
3.2.2 Příprava pracovních roztoků	20
3.2.3 Zvlákňování roztoků	21
3.2.4 Příprava vzorků pro UV-Vis spektrofotometrii	21
3.2.5 Příprava roztoků kalibrační řady	21
3.2.6 Postup analýzy vzorků	22
3.2.7 Vyhodnocení dat	23

4. Výsledky a diskuze	24
4.1 Hyaluronan	24
4.1.1 Kalibrace	24
4.1.2 Vyhodnocení obsahu aditiv v připravené vrstvě	27
4.2 Polyvinylalkohol.....	30
4.2.1 Kalibrace	30
4.2.2 Vyhodnocení obsahu aditiv v připravené vrstvě	32
5. Závěr	35
6. Seznam zkratk	36
7. Reference.....	37
8. Reference obrázků.....	40
9. Seznam příloh.....	41
10. Přílohy	42

1. Úvod

Už od raného středověku lidé přikládali na rány obvazy, aby zamezili krvácení a infekci a napomohli hojícímu procesu různými bylinami a mastmi. Nejdříve se používaly látkové obvazy, v 19. století se začátkem výroby buničiny přišly gázové obvazy a vývoj postupoval dál až k dnešním materiálům pro krytí ran.

Důležitým milníkem ve vývoji hojení ran bylo znovuobjevení vlhkého hojení v 60. letech 20. století. Tento postup už byl znám v starověku v Mezopotámii a Egyptu, kde se používal med k udržení vlhkosti rány a navíc jeho antiseptické a antibakteriální účinky pomáhaly dezinfikovat ránu.

Pro hojení ran je důležitých několik faktorů: pH, teplota, vlhkost a samozřejmě sterilita. Toto optimální prostředí je nejvýhodnější pro rychlé uzdravení rány a krycí materiály použité při léčbě by toto prostředí měli podporovat, nikoli jak je tomu v případě suché gázy, hojně používané v dnešním zdravotnictví, která má skvělé sací schopnosti, krev z rány odsaje a občas vytvoří strup pevně spojený obkladovým materiálem. Při odstranění obkladu pak dojde k odtržení strupu, otevření nové rány a hojící proces může začínat od začátku. Návrat do původního stavu trvá 6-8 hodin a je pro tělo zatěžující.

Moderní materiály by měly být navrhnuty tak, aby podporovaly hojivé prostředí rány a jejich výměna by nebyla tak častá. Společně s vlhkým prostředím rány nedochází k zarůstání tkáně do obvazového materiálu a výměna obvazů není pro pacienty tak bolestivá. [1]

Moderní nanomateriály navíc mají možnost sloužit jako nosiče léčiv a poté je uvolňovat do rány, tím přispívat k hojivému procesu a rychlejšímu a dokonalejšímu zacelení rány.

2. Teoretická část

2.1 Výroba nanovláken

Netkané nanovláčené textilie se dají vytvářet jak z přírodních tak syntetických polymerů mnoha způsoby např. tažení (drawing), syntéza šablonou (template synthesis), fázová separace (phase separation), samosestavování (self-assembly), technologie melt-blown, výroba bikomponentních vláken – typ „ostrovky v moři“ a electrospinning. Pod název electrospinning lze schovat ještě dva podobné procesy electroblowing a electrospraying. Poslední tři jmenované procesy pracují každý trochu jinak, ale základní princip mají všechny stejný.



Obrázek 1: Princip výroby nanovláken

Proces electrospinningu vyžaduje dvě elektrody, zvlákňovací (emitor) a sběrnou (kolektor). Na emitor je ze zásobníku přiváděn roztok, který je napětím v řádech kV přitahován ke sběrné elektrodě. Elektrické pole působí na kapku roztoku na emitoru, deformuje její tvar a vytahuje ji do útvaru zvaný Taylorův kužel. Při správných podmínkách se roztok v tenkém proudu začne vytrhávat z kapky a vylétávat ke sběrné elektrodě. Cestou se vypařuje rozpouštědlo a polymer zasychá. V obecném případě jsou vlákna neuspořádaná.

V případě electrospinningu by měla vylétávat souvislá řada nanovláken. Jejich velikost pak závisí jak na použitém materiálu, tak na pracovních podmínkách jako je velikost napětí, vlhkost a vzdálenost elektrod. Velikost vláken se může pohybovat od 2 nm do řádu mikrometrů.

Electroblowing je metoda kombinující electrospinning a proudění vzduchu. Výhodou je řízení podmínek v bezprostředním okolí emitoru a proud vzduchu navíc pomáhá vytrhávat roztok z kapky. Tato metoda se používá pro obzvláště viskózní roztoky a rozpouštědla, která se pomalu nebo špatně odpařují.

Electrospraying je proces, při kterém se nevytvářejí vlákna, ale útvary kulovitěho tvaru s průměrem od desítek nanometrů do několika mikrometrů. Tato metoda se používá na nanášení tenkých vrstev, většinou na podkladovou plochu. Electrospraying je také nechtěným výsledkem při pokusech vláknit špatně vláknitelný polymer metodou electrospinning za špatných podmínek.

Vlastností nanovláknenné vrstvy se tedy dají měnit pomocí podmínek ve zvláknovací komoře, použitou metodou, i ale typem zvláknovací a sběrné elektrody. V následujících odstavcích budou rozebrány jednotlivé kolektory a emitory zařízení 4SPIN® a jejich funkce.

2.1.1 4SPIN®

4SPIN® je zařízení vyvinuté a vytvořené firmou Contipro, jako univerzální nástroj pro výrobu nanovláken. Jeho výhodou je velká rozmanitost kolektorů a emitorů a možnost jednoduchého volení pracovních podmínek.

Různé typy použitých emitorů mohou ovlivnit výrobnost a účinnost. Na druhou stranu kolektory mohou ovlivňovat také velikost a orientovanost nanovláken ve vyrobené textilií (vrstvě). [2]

Emitory

U emitorů je důležité, aby byly zachovány nejdůležitější vlastnosti a to, aby na emitoru bylo vysoké napětí, aby byla zajištěna nepřerušovaná dodávka polymeru a aby se mohla vytvořit kapka, ze které by mohl vytrysknout proud nanovláken. Kvůli vysokým tlakům, při protlačování viskózních roztoků tenkými trubičkami emitorů, se používá standardizovaný systém LuckerLock® na připojení emitoru a zásobní stříkačky s polymerem.

Na 4SPIN® se dají upevnit následující čtyři elektrody:

E1 - Jednoduchá jehla

Tato tryska je nejlepší volbou v případě špatně vláknitelných nebo pokusných roztoků. Díky celokovové konstrukci dobře přenáší elektrické napětí a díky malé ploše na špičce emitoru vzniká malá, snadno odtrhnutelná kapka. Výhodou je i její relativně rychlé čištění.

Nevýhoda této trysky je ale zřejmá. Kvůli malé ploše roztoku na elektrodě vzniká pouze jeden Taylorův kužel a vláknění probíhá pomalu. Typické dávkování pro tento emitor je 10 μ l/min.

Na tento typ emitoru lze přidělat nástavec, který okolo jehly fouká suchý vzduch a tak může být použit k electroblowingu.

E2 – Vícenásobná jehla

Složená jehla má všechny výhody jednoduché jehly, ale oproti ní má vyšší výrobnost, a to šestkrát. Typické dávkování pro tento emitor je 60 μ l/min.

Nevýhodou tohoto emitoru je nemožnost použití electroblowingu a poměrně velká časová náročnost na čištění.

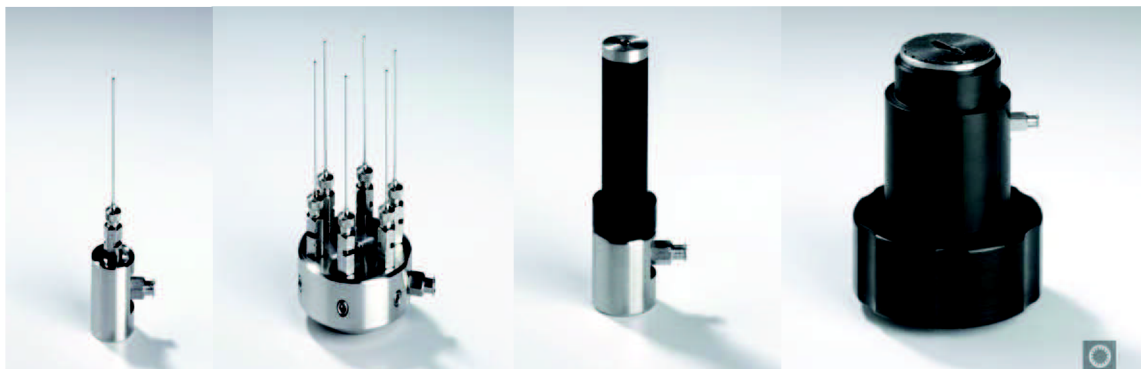
E3 – Bezjehlová tryska – trn

Trn sice oplývá nižší schopností vláknit než jehlové elektrody, ale v jiných ohledech je dalece převyšuje. Vyznačuje se značnou výrobností, jednoduchou konstrukcí a snadnou omyvatelností. Typické dávkování pro tento emitor je 60-80 μ l/min. Navíc k němu lze připojit nástavec na electroblowing.

E4 – Kruhová bezjehlová ryska

Kruhová bezjehlová tryska je kombinací několika bezjehlových trysek uspořádaných do kruhu. Ze všech trysek má největší výrobnost a dávkování (standardně okolo 150 μ l/min.) a stále si zachovává velmi slušnou schopnost vláknit. Díky nastavci lze opět použít electroblowing.

Nevýhodou je složitá konstrukce a s ní spojené složité čištění. Proto se tato tryska hodí při výrobě textilií z již vyzkoušených polymerů, než na optimalizaci s vláknění.



Obrázek 2: Jehla, Vícenásobná jehla, bezjehlová tryska, kruhová bezjehlová tryska

Kolektory

Použitý kolektor ovlivňuje u vytvořené vrstvy nejvíce orientaci a strukturu nanovláken.

C1 – statický

Statický je základní typ kolektoru, který se používá v prvotních fázích vývoje, kdy je od vzorku požadovaný vysoký stupeň homogenity.

Tento kolektor tvoří neuspořádané nanovláknenné struktury. Na druhou stranu lze na tento typ kolektoru připevnit podkladová vrstva, na níž vzorek vlákní a dá se tedy snadněji snímat.

C2 – statický dělený

Tento typ kolektoru vytváří vlákna seřazená dle jedné osy. Stupeň uspořádanosti lze měnit v závislosti na technických parametrech kolektoru. Výhodou je, že nemá žádné pohyblivé části a je jednoduchý na konstrukci.

C3 – rotační

Tento kolektor je vhodný pro výrobu většího množství nanovláken, která zároveň mají mít určitý stupeň uspořádanosti. Navíc jako na první kolektor je zde možnost upevnit podkladovou vrstvu

Se zvyšováním rychlosti otáček vznikají uspořádanější nanovláknenné struktury.

C4 – rotační dělený

Tento kolektor spojuje výhody druhého a třetího kolektoru. Díky dělené konstrukci a rotující sběrné ploše vytváří extrémně uspořádané struktury. Toto je asi nejlepší kolektor při výrobě nanovláken, u kterých si přejeme přesné parametry. Bohužel lze použít pouze pro omezenou výrobnost.



Obrázek 3: Kolektory: statický, statický dělený, rotační, rotační dělený

2.2 Nosné materiály

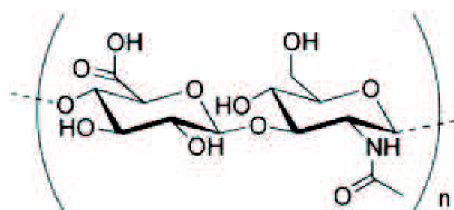
Jak již bylo zmíněno, nanovlákná mohou být připraveny jak ze syntetických polymerů, tak z biopolymerů. V této práci byli použiti zástupci obou skupin a to kyselina hyaluronová a polyvinylalkohol.

2.2.1 Kyselina hyaluronová

Hyaluronan (HA) je polymer, který je bioaktivní, neimunogenní a je to látka tělu vlastní. Je součástí extracelulární matrix, která vyplňuje prostor mezi buňkami a drží je na svém místě. Napomáhá hojivému procesu, tím pádem je skvělým kandidátem na krycí a hojivé materiály. Navíc má antibakteriální účinky. Nevýhodou je rozpustnost ve vodě a rychlá odbouratelnost enzymy v těle. Hyaluronan je dostupný v širokém rozmezí molekulových hmotností od 10 po 3 000 kDa.

Hyaluronan ale kvůli svým fyzikálním vlastnostem nelze zvláknit samostatně, a proto je potřeba vytvářet nanovláknenné textilie hyaluronanu s přidavkem dalšího nosného polymeru. Výbornými kandidáty jsou polyethylen oxid nebo chitosan.[3]

Kyselina hyaluronová je v poslední době komerčně velmi zpopularizovaná a v malých koncentracích se přidává do celé řady kosmetických výrobků a používá se, jako hojivá látka v léčebných přípravcích. Jedním z nich je hyiodine, roztok kyseliny hyaluronové s jódem, kde hyaluronan slouží jako hojivá látka a navíc ránu udržuje hydratovanou a jód funguje jako dezinfekční činidlo udržující ránu čistou. [4]



Obrázek 4: Hyaluronan

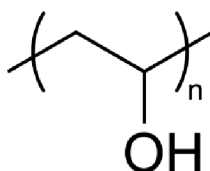
2.2.2 Polyethylen oxid

Polyethylen oxid (PEO), nebo také polyethylen glykol, je polymerní látka používaná jako podpůrný polymer pro kyselinu hyaluronovou. Je běžně komerčně dostupný v rozmezí od 300 – 10 000 000 Da. S délkou řetězce se mění pouze fyzikální vlastnosti polymeru, jako jsou viskozita nebo teplota tání, nikoli však vlastnosti chemické.

Existuje několik typů řetězců polymerů polyethylen oxidu. Větvené polymery obvykle mají 10 – 100 řetězců vycházejících z centrálního jádra, větvené 3 – 10 řetězců vycházejících z větvičího uzlu a hřebenovité mají několik řetězců odbočujících z hlavního řetězce. [5] Při zvláknování elektrospinningem je užíván PEO lineární.

2.2.3 Polyvinylalkohol

Polyvinylalkohol (PVA) je dlouho známý a používaný polymer právě kvůli jeho vlastnostem. Má výbornou chemickou odolnost, fyzikální vlastnosti, je biodegradabilní, dobře vláknitelný a levný. Často se používá jako polymer na tvorbu adhesivních materiálů, filmů, membrán a nosičů na cílenou distribuci léčiv. Vlákna PVA jsou velmi silná jak v tažném tak stlačitelném směru.



Obrázek 5: Polyvinylalkohol

PVA je polymer, jeho vlastnosti se tedy odvíjejí od molekulové hmotnosti a délky řetězce. Bylo zjištěno, že optimální počet jednotek řetězce je 1700 a 4000. Při velikosti 1700 jednotek měla vlákna průměrný průměr 300 a při velikosti 4000 jednotek 240 nm. Přitom s rostoucím elektrickým potenciálem na elektrodách mírně klesal průměr vláken. Navíc vlákna z delšího řetězce vykazovala vlastnosti krystalové struktury, větší tepelnou stabilitu a lepší mechanické vlastnosti než nanovlákna z polymeru s nižší molekulovou hmotností.[6]

Stejně jako je tomu u jiných nanovláknenných materiálů, platí i zde, že i když nějaká látka funguje dobře sama o sobě, snažíme se vždy nalézt, zda v kombinaci s nějakou další neprojevuje lepší vlastnosti. Na toto téma byl veden výzkum buněčné odpovědi na různé nanovláknenné materiály z PVA a různých jiných polymerů. Konkrétně to byly chitosan (CHI), kyselina hyaluronová (HA), kolagen (COL), a fibrin z hedvábí (SF). Všechny takto připravené nanovláknenné vrstvy, až na vrstvu s kyselinou hyaluronovou, vykazují nižší hydrofilní charakter, než čistá vrstva tvořená výhradně PVA. Bylo také pozorováno zlepšení mechanických, obzvláště tažných, vlastností, díky vazbám, které vznikly navíc během

procesu výroby vrstvy. Tyto materiály by se daly v budoucnosti použít na výrobu scaffoldů. [7]

2.3 Inkorporace aditiv do nanovláknenné vrstvy

Existuje řada způsobů začlenění přídatných látek do nanovláken. Způsob, který je volen, závisí na dané látce, nejvíce na její molekulové hmotnosti, dále potom na její rozpustnosti a hydrofobním či hydrofilním charakteru či komplexotvornosti. Léčiva, která bývají malými molekulami, lze rozpustit přímo v roztoku vlákníciho polymeru, ale látky, které by v přítomnosti vysokého elektrického pole nebo organických rozpouštědel v roztoku polymeru, podléhaly denaturaci a degradaci, musí být inkorporovány jinými metodami. Různé metody začleňování léčiv mohou také ovlivňovat rychlost uvolňování léčiv.[8]

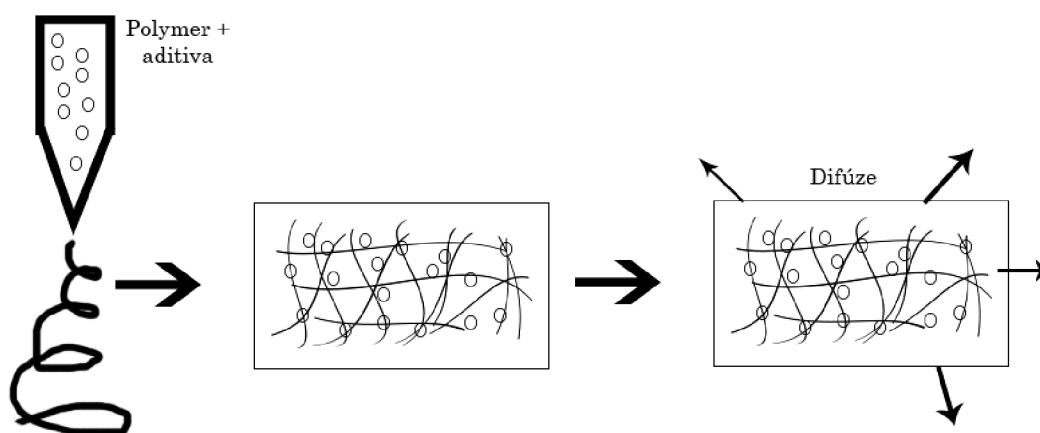
2.3.1 Společné zvlákňování polymeru a aditiva

Základní metodou je zvlákňování roztoku polymeru, ve kterém je rozpuštěno aditivum (léčivo). Při vlákníciím procesu je strhává polymer částice aditiva sebou a jak roztok vysychá, léčivo zůstane navázané na vlákně polymeru.

První zaznamenaná nanovláknenná vrstva s inkorporovaným léčivem byla vytvořena doktorem Kenawyem zvlákňováním polyethylen-co-vinyl acetátu (PEVA) a polykyseliny mléčné (PLA) s přídatkem Tetracyklinu. [9]

Největším požadavkem na aditivum při této metodě je jeho rozpustnost. [10] Hydrofobní molekuly se samozřejmě dají rozpustit v organických rozpouštědlech, ale u bioaktivních molekul dochází k jejich degradaci a ztrácejí svoje vlastnosti.[11]

Další nevýhodou této metody je špatně kontrolovatelné uvolňování léčiv, kvůli velkému měrnému povrchu nanovláken a obecné hydrofilitě používaných nanomateriálů. Dochází ke vstřebávání vody do nanovláknenné vrstvy a prostou difúzí jsou částice léčiv uvolňovány. Proto dochází k prvotnímu uvolnění velkého množství aditiva. Rychlost difúze se snižující se koncentrací aditiva v nanovlákněch s časem klesá, což je také jev nežádoucí.[12]



Obrázek 6: Zvlákňování roztoku polymeru a aditiva

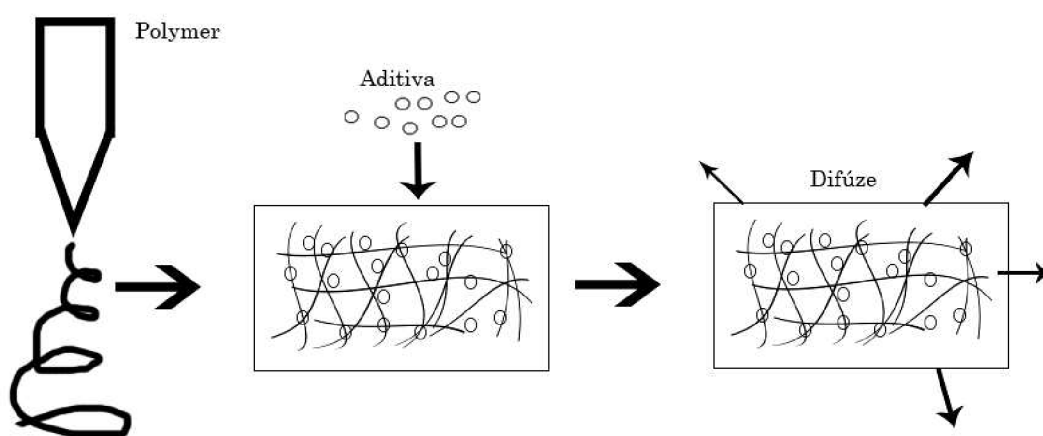
2.3.2 Navázání i imobilizace na povrchu nanovláken

Navázáním aditiv na povrch nanovláken lze zabránit jejich denaturaci při vystavení léčiv organickým rozpouštědlům nebo vysokému napětí ve vlákníci komoře. Léčiva se vážou

na nanovláknna převážně elektrostaticky, vodíkovými můstky, Van der Walsovými interakcemi a hydrofobními interakcemi. [8]

Jako vzorový případ slouží heparin, negativně nabitý polysacharid, který má velkou afinitu k různým růstovým faktorům a dokáže je inhibovat. Proto se může použít jako látka ovlivňující uvolňování a účinek léčiv podporující růst. Ve spojení s nanovláknny se používá heparin na nanovláknennou vrstvu polykaproacetonových a želatinových vláken. Po navázání růstového faktoru a testování uvolňování aditiva byl pozorován pomalejší a pozvolnější průběh uvolňování, které trvalo až 20 dní. [13]

Další metodou imobilizace léčiv jsou modifikace povrchu nanovláknenné vrstvy obsahující amino, karboxy, hydroxy nebo thiolové skupiny. Takto upravené skupiny jsou pak schopny na sebe vázat léčiva a tím i přesněji definovat jejich množství obsažené ve vrstvě než je tomu u metody fyzického zachytávání léčiv. Kvůli síle vazby také trvá déle, než se léčiva uvolní a vstřebávání aditiv je tak pozvolnější. [13]



Obrázek 7: Navázání a inhibice aditiv na povrchu nanovláken

2.3.3 Plášťová vrstva a několikavrstvé nosiče

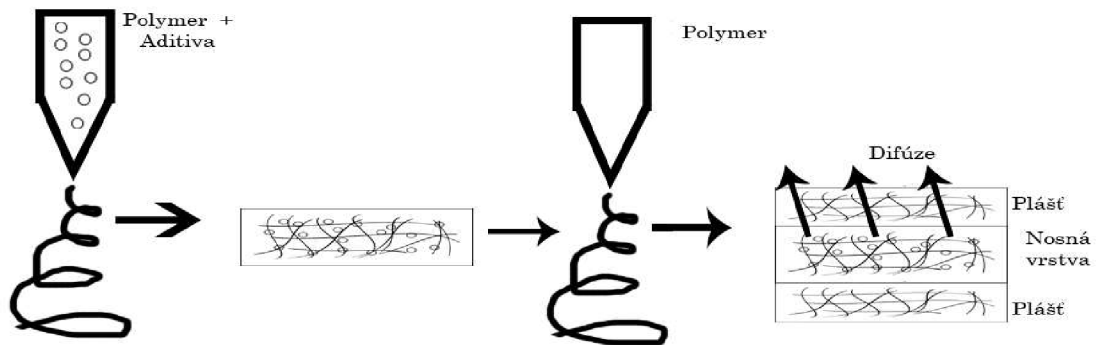
Klasická metoda společného vláknnění polymeru a aditiva je jednoduchá a efektivní. Její nevýhodou je rychlé uvolňování a velká počáteční dávka aditiv po uvolnění – tzv. Burst efekt. V případě hyaluronanu zde nastává také problém rychlého rozpouštění nanovláknenné vrstvy. Tyto nevýhody se dají kompenzovat takzvanou plášťovou vrstvou.

Plášťová vrstva je nanovláknenná vrstva, která chrání vrstvu sloužící jako nosič léčiv, a funguje jako polopropustná membrána regulující distribuci aditiv. Úpravou jejích parametrů lze také upravovat kinetiku uvolňování aditiv. Faktory ovlivňující uvolňování mohou být např. síla plášťové vrstvy, její hydrofilní charakter, tloušťka vláken a rozpustnost vláken, polymeru. Nejčastěji se optimalizuje dávka aditiv a její řízené uvolňování difúzí, které je kvůli rozdílu koncentrací nejmarkantnější na počátku celého procesu. Studie také ukázaly, že tato technika redukuje kinetiku přestupu aditiv do prostředí na kinetiku nultého řádu. [14]

Není nutné zůstávat pouze u jedné vrstvy. Lze zvláknit více polymerů na sebe, ať už kvůli látkám rozpuštěným ve vláknících roztocích nebo kvůli zlepšení mechanických a fyzikálních vlastností nanovláknenné vrstvy. Takovýmto vláknněním lze získat směs nanovláken s různým obsahem aditiv a jejich pořadím lze určit uvolňování daných látek. Okuda et al. zmiňuje zvláknění roztoku poly(L-lactide-co-ε-caprolactone) (PLCL), se dvěma různými aditivy. Nejdříve byla zvlákněna vrstva s prvním léčivem, poté, k oddělení vrstev obsahujících aditiva,

byla zvlákněna vrstva bez aditiv a nakonec vrstva s druhým druhem léčiva. Celá směs pak byla připevněna stranou s druhým léčivem na neprostupnou vrstvu a bylo pozorováno uvolňování léčiv. Na takto vytvořené nanovlákněné směsi bylo podle očekávání pozorováno nejprve uvolňování léčiva z odhalené nanovlákněné vrstvy a až po čase uvolňování léčiva ze spodní, kryté vrstvy. [15]

Tato metoda výroby nanovlákněných vrstev s regulovaným uvolňováním aditiv je zajímavý koncept, který je možno použít pouze v makroskopickém měřítku, například jako obvaz pro krytí externích ran. Tento koncept výroby nanovláken ale byl posunut dále, do podoby takzvaných koaxiálních nanovláken.

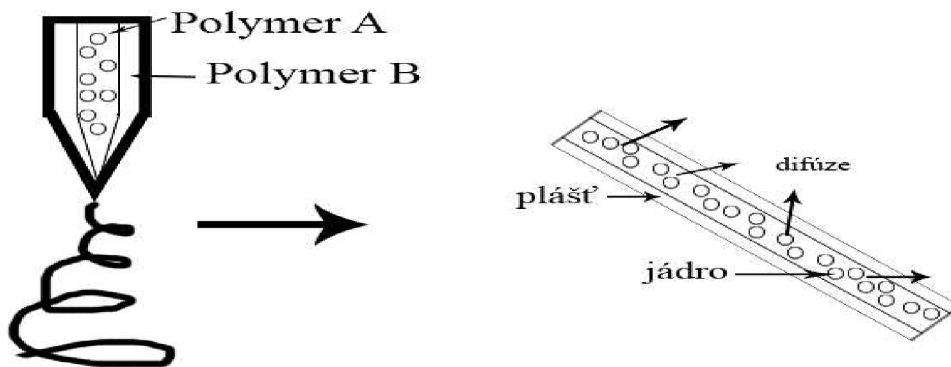


Obrázek 8: Zvláknění vícevrstevných směsí

2.3.4 Koaxiální nanovlákná

Koaxiální nanovlákná jsou dvojitá nanovlákná typu jádro-plášť tvořená dvěma různými typy látek. Výroba probíhá tak, že do speciální dvojité jehly jsou hnány dva polymery a elektrostatické pole vytahuje oba polymery najednou a tím se tvoří nanovlákná typu jádro-plášť, tzv. core-shell. [16]

V porovnání s metodou zvláknění jednoduchou jehlou je účinnost včleňování léčiv do vláken stále vysoká. Tato metoda se nejčastěji používá pro distribuci proteinů, kdy proteiny jsou rozpuštěny v jádře nanovlákná. [12] Zároveň tak lze připravit vrstvu nanovláken, která by nesla dvě léčiva, jedno v plášti a druhé v jádru. Tato nanovlákná by pak mohla sloužit jako nosič léčiv s dvěma různými dynamickými vlastnostmi uvolňování. Příkladem je vrstva koaxiálních nanovláken s obsahem základního fibroblastického růstového faktoru (bFGF) a epidermálního růstového faktoru (EGF). BFGF byl rozpuštěn ve vodní fázi plášťového polymeru a EGF byl rozpuštěn v polymeru jádra koaxiálního nanovlákná. Tímto krokem byla zmenšena počáteční difúze léčiv z nanovláken a uvolňování růstových faktorů bylo pozorováno i po 7 dnech. [17]



Obrázek 9: Koaxiální zvlákňování

2.3.5 Nanovláknenná vrstva ve spojení s hydrogely

Snaha o zakomponování hydrogelů na nanovláknennou vrstvu plyne z jejich vlastností. Obzvláště pak ze schopnosti zadržovat obrovské množství vody a sloužit jako vrstva bránící okamžitému uvolňování léčiv.

Těchto vlastností využil Young, když zasíťoval roztok polyethylen glykolu pomocí UV záření na zvlákněné nanovrstvě polykaprolaktanu (PLC), ve kterém byl rozpuštěn, jako kontrolní aditivum, hovězí albumin (BSA). Takto upravená nanovláknenná vrstva vykazovala daleko nižší počáteční dávku albuminu a uvolňování BSA pomocí difúze probíhalo po dobu až 30 dnů. [8]

Není to ale pouze tak, že hydrogely zlepšují vlastnosti nanovláken a jejich potenciál nosičů léčiv, ale i nanovláknna zlepšují vlastnosti hydrogelů. Hydrofobní nanovláknna inkorporovaná do hydrogelu zlepšují jeho mechanické vlastnosti a tím zlepšují jejich použití v tkáňovém inženýrství. [18] Důležitým faktorem je, aby si nanovláknna zachovaly svoji vláknennou strukturu po inkorporování do hydrogelu. Je důležité pracovat s hydrofobními materiály, protože použití hydrofilních a dobře rozpustných materiálů spíše zvyšuje prvotní dávku a rychlost uvolňování léčiv navázaných na nanovláknnech.



Obrázek 10: Vrstva s hydrogelem

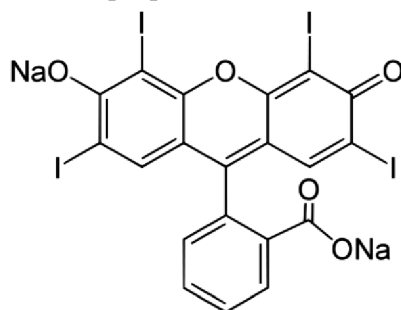
Nicméně, povrchová úprava nanovlákněné vrstvy může snížit počáteční dávku a rychlost uvolňování léčiv. Im a kol. použil polyvinylalkohol, který může být po navázání léčiv upraven fluorem tak, aby byla snížena rychlost uvolňování aditiv. Úprava fluorem snížila markantně prvotní dávku a upravený polyvinylalkohol vylučoval kontrolní aditivum po dobu 67 dnů. Nicméně vysoký tlak, kterému byla vrstva vystavena při nanášení fluoru, zdeformoval nanovlákněnou vrstvu do podoby filmu. [19]

2.4 Aditiva

Jak již bylo zmíněno, nanovlákněna se jeví být ideálním nosičem různých léčiv. Pro navržené experimenty bylo zvolené přímé smíchání aditiva a nosného polymeru přímo ve vlákněném roztoku popsané v kapitole 2.3.1. Jako modelové látky byla zvolena barviva pro jejich snadnou dostupnost, malou toxicitu a snadnou možnost kvalitativní i kvantitativní analýzy. Nosnými polymery jsou chemicky neutrální PVA a anionický polymer hyaluronan, dá se tedy předpokládat, že budou mít různou interakci s různými typy molekul. Z toho důvodu byla zvolena eriochrom čern jako zástupce anionických barviv, brilantní modř jako zástupce kationických barviv a erytrosin a riboflavin jako molekuly neutrální každá s jinou mírou hydrofobicity a komplexotvornosti.

2.4.1 Erytrosin

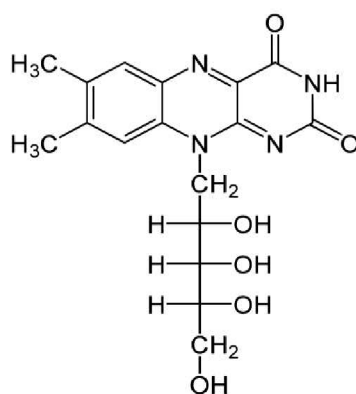
Erytrosin (Ery) je červené potravinářské barvivo označované také kódem E127. Jedná se o disodnou sůl tetrajodofluoresceinu. Ve vodném roztoku má maximální absorpční při 530 nm. Používá se jako barvivo pro potraviny, jako náplň do tiskáren a k odhalování zubního plaku. Ve většině zemí je povolený, pouze v USA se používá zřídka, protože může způsobovat problémy se soustředěním. [20]



Obrázek 11: Erytrosin

2.4.2 Riboflavin

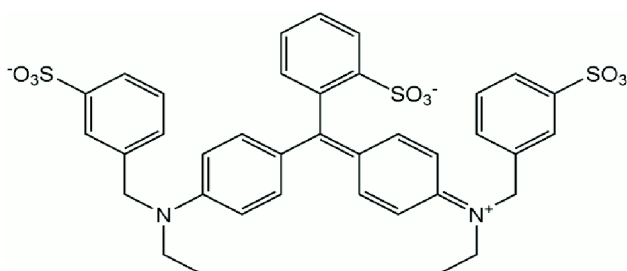
Riboflavin (Rib), nebo také vitamín B2, je žluté přírodní barvivo málo rozpustné ve vodě. Označuje se kódem E101. Strukturu riboflavinu tvoří heterocyklickéisoalloxazinové jádro a cukerný alkoholribitol. Působením světla se rozkládá a díky svojí struktuře fluoreskuje. Je součástí koenzymů flavinadeninmononukleotidu (FAD) a flavinmononukleotidu (FMN) a má svoji roli v oxidačním metabolismu. V těle se nedostatek riboflavinu projevuje záněty úst, rtů, jazyka a spojivek. Předávkování touto látkou není možné, protože patří mezi vitamíny rozpustné ve vodě a nadbytek vitamínu se z těla odplavuje společně s močí.[21]



Obrázek 12: Riboflavin

2.4.3 Brilantní modř

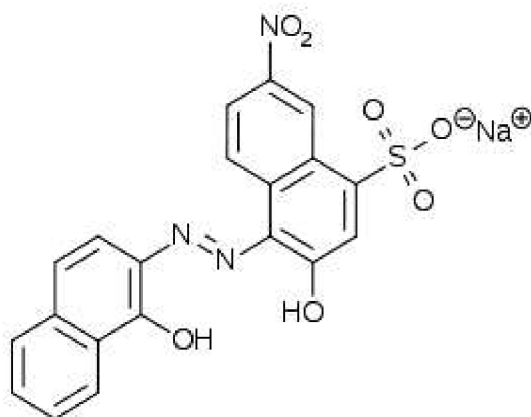
Brilantní modř (BB) je modré potravinářské barvivo známé také pod označením E133. Je to syntetické barvivo vyráběné z aromatických uhlovodíků izolovaných z ropy. Používá se při barvení různých potravinářských výrobků jako například zmrzliny, konzervovaného hrášku, a potravin s obsahem oštružin. I když se při požití trávicím traktem vstřebá pouze 5% pozřené barvivo, v roce 2003 vydala americká administrace pro potraviny a léčiva článek upozorňující na případná rizika. V reakci na to byl v Evropské unii určen limit 150-300 mg brilantní modře na 1 kilogram potravin. Nebezpečí brilantní modři spočívá v jejím blokování receptorů ATP neuronů míchy. Tento efekt má ale pouze, je-li přímo vstříknuta do míchy. [22]



Obrázek 13: Brilantní modř

2.4.4 Eriochromová čerň

Eriochromová čerň (EC) je komplexotvorná látka používaná jako indikační činidlo. Patří mezi azobarviva a je dobře rozpustná ve vodě a v ethanolu. Ve své protonované formě má tmavě modré zbarvení, při reakci s ionty kovů však mění svoji barvu do červena. Používá se jako indikátor při titraci EDTA a k důkazu kovů v půdě. [23]



Obrázek 14: Eriochromová čern

2.5 Cíl práce

Cílem práce bylo zjistit rozložení aditiv v nanovlákně připravené formou elektrospinningu na přístroji 4SPIN®. Nosnými polymery byly PVA a směs HA/PEO v poměru 80/20. Jako modelové látky byly užity barviva s různým typem nositelů barevnosti a různou mírou hydrofobicity. Kvantitativní stanovení bylo provedeno pomocí UV-Vis spektrometrie.

3. Experimentální část

3.1 Materiály a přístroje

3.1.1 Použité chemikálie

Kyselina hyaluronová – 83,2 kDa, Contipro Biotech s.r.o.

Polyethylen oxid – 400kDa, Scientific Polymers

Polyvinylalkohol – Solviol R16, 16% roztok, Novácké závody

Erytrosin – Aroco spol. s.r.o.

Riboflavin – Sigma-Aldrich

Brilantní modř – Sigma-Aldrich

Eriochromová čerň – Sigma-Aldrich

3.1.2 Použité přístroje

4SPIN®

Spektrofotometr Varian Cary 100 Conc.

3.2 Pracovní postupy

3.2.1 Příprava zásobních roztoků

Zásobní roztok hyaluronanu obsahoval 6 hm. % sušiny, která se skládá z 80 hm. % kyseliny hyaluronové a 20 hm. % polyethylen oxidu. Bylo naváženo 19,2 g hyaluronanu o molekulové hmotnosti 83,2 kDa a 4,8 g PEO o molekulové hmotnosti 400 kDa. Do 1 l láhve Duran-Schott bylo naváženo 376 g vody. Láhev byla umístěna na míchačku a postupně byly přidávány oba navážené polymery. Po prvotním promíchání byla láhev umístěna na 16 h na třepačku.

Zásobní roztok polyvinylalkoholu byl připraven z originálního roztoku Solviol R16 (16 hm. %). Do 1 l láhve Duran-Schott bylo naváženo 100 g vody a 300 g Solviol R 16. Láhev byla umístěna na 16 h na třepačku.

3.2.2 Příprava pracovních roztoků

Ze zásobního roztoku hyaluronanu bylo odebráno přibližně po 100 g roztoku do čtyř zásobních lahví. Do těchto lahví bylo poté naváženo barvivo na koncentraci 0,1 hm. %. Celý roztok se nechal min. 24 hodin třepat na třepačce před dalším zpracováním.

Ze zásobního roztoku polyvinylalkoholu bylo odebráno přibližně po 100 g roztoku do čtyř zásobních lahví. Do těchto lahví bylo poté naváženo barvivo na koncentraci 0,1 hm. %. Celý roztok se nechal alespoň 24 hodin třepat na třepačce, než s ním bylo pracováno dále.

3.2.3 Zvlákňování roztoků

Ke zvlákňování byl použit přístroj firmy Contipro. Jako zvlákňovací elektroda byla ve všech případech použita lineární bezjehlová tryska s označením E5 a jako sběrná elektroda byl použit statický kolektor s označením C1.

Zvlákňování probíhalo při konstantní vzdálenosti elektrod 18 cm a při konstantním napětí, tj. pro roztoky hyaluronanu 59 kV a pro polyvinylalkohol 55kV.

Tab. 1 Vzorový protokol ze zvlákňovacího procesu.

Datum zvlákňování	
Elektrostatické zvlákňování	
Teplota [°C]	23
Vlhkost [%RH]	24
Zvlákňovací elektroda	E5
Rychlost otáčení [rpm]	x
Sběrná elektroda	C1
Rychlost posunu [m/min]	x
Vzdálenost elektrod [cm]	18
Napětí [kV]	59
Proud [mA]	35-50
Podkladová vrstva	x
Kontinuálně/staticky	staticky
Počet vrstev	x
Stáří roztoku	den
Metoda měření	x
Elektronový mikroskop	ne
Označení vzorku	NJ_20140224_03
Hodnocení	Zvlákňování probíhalo dobře. Roztok vláknil po celé délce elektrody

3.2.4 Příprava vzorků pro UV-Vis spektrofotometrii

Po zvlákňování roztoků byla nanovláknenná vrstva sejmuta z kolektoru a přenesena na silikonovaný papír, kvůli lepší manipulaci. Z nanovláknenné vrstvy byly pak odebrány vzorky pomocí kruhových nůžek, které vystřihují kolečka o průměru 1,25 cm. Každý vzorek byl zvážen. Typická hmotnost vzorku polymeru HA/PEO se pohybovala okolo 6 mg a vzorku polymeru PVA okolo 15 mg. Tyto vzorky byly rozpuštěny v přesně definovaném množství vody tak, aby celková hmotnost roztoku byla 4 g.

3.2.5 Příprava roztoků kalibrační řady

Roztoky pro tvorbu kalibrační řady byly připraveny ředěním pracovních roztoků polymerů. Zásobní roztok daného polymeru byl desetkrát naředěn a ponechán na třepačce minimálně 1 den. Z tohoto roztoku byly naředěny roztoky kalibrační řady podle následujících tabulek (Tab. 2 a 3):

Tab. 2 Ředění pro roztoky hyaluronanu obsahující erytrosin a riboflavin

Kalibrační roztoky hyaluronanu pro Ery a Rib		
Číslo roztoku	Zásobní roztok [g]	Rozpouštědlo [g]
1	0,25	2,25
2	0,5	2
3	0,75	1,75
4	1	1,5
5	1,25	1,25
6	1,5	1
7	1,75	0,75
8	2	0,5
9	2,5	0

Při přípravě dalších kalibračních řad byl přidán ještě jeden bod kalibrační křivky (Tab. 3).

Uvedeným postupem byly připraveny dvě sady kalibračních řad. V první řadě byl zásobní roztok ředěn čistou vodou, v druhé řadě byl roztok ředěn 10x ředěným roztokem daného polymeru bez barviva. Vznikly tak dvě řady kalibračních roztoků pro každou sérii aditiv a rozpouštědel. Řady ředěné vodou se označovali K1, řady ředěné roztokem polymeru se označovali K2.

Tab. 3 Ředění pro roztoky hyaluronanu obsahující brilantní modř a eriochromovou čerň a pro roztoky polyvinylalkoholu obsahující všechny užití barvy

Kalibrační roztoky HA pro BB a EC			Kalibrační roztoky PVA		
Číslo roztoku	Zásobní roztok [g]	Rozpouštědlo [g]	Číslo roztoku	Zásobní roztok [g]	Rozpouštědlo [g]
1	0,125	2,375	1	0,125	2,375
2	0,25	2,25	2	0,25	2,25
3	0,5	2	3	0,5	2
4	0,75	1,75	4	0,75	1,75
5	1	1,5	5	1	1,5
6	1,25	1,25	6	1,25	1,25
7	1,5	1	7	1,5	1
8	1,75	0,75	8	1,75	0,75
9	2	0,5	9	2	0,5
10	2,5	0	10	2,5	0

3.2.6 Postup analýzy vzorků

Rozpuštěné vzorky nanovláčkové vrstvy a kalibrační roztoky byly podrobeny UV-Vis spektrofotometrií v transmisním módu ve dvou různých měřeních. V obou měřeních se vždy proměřovalo spektrum v rozmezí 200-800 nm. Pro měření byla použita křemenná kyveta QS 104, s délkou optické cesty 10 mm, vnějšími rozměry 12,5x12,5x45 mm a vnitřním objemem 1,4 ml.

V prvním měření byla proměřena absorbance kalibrační řady K1, K2 a rozpuštěných vzorků nanovláčkové vrstvy daného aditiva proti vodě. Přitom byl proměřen i čistý roztok

polymeru použitý na ředění řady K2. V druhém měření byla proměřena absorbance pouze kalibrační řady K2 a rozpuštěných vzorků proti roztoku čistého polymeru o koncentraci 10krát menší než byla koncentrace vláknícího roztoku, tj. pro roztok HA/PEO 0,6 hm. % a pro PVA 1,2 hm. %.

Naměřená data byla uložena a exportována do programu Microsoft Office Excel 2007, kde byla dále zpracována.

3.2.7 Vyhodnocení dat

Vyhodnocení dat bylo uskutečněno pomocí programu Microsoft Excel. Byly použity dvě metody pro vyhodnocení obsahu aditiva v zvlákněném vzorku.

Prvním způsobem vyhodnocení byla metoda určení koncentrace pomocí výšky píku. U každého absorpčního spektra daného aditiva byla odečtena hodnota v bodě maximální absorbance s odchylkou 10 nm. Pro první měření každého aditiva byly vyhodnoceny kalibrační křivky K1 a K2, obě měřené proti vodě. Z regresních rovnic obou kalibračních přímk měřených proti vodě byl vypočítán obsah modelových barviv ve vzorcích zvlákněných nanovlákněných vrstev a jejich koncentrace. Obdobně byly vyhodnoceny i vzorky měřené proti roztoku polymeru. Tyto vzorky byly vyhodnoceny pomocí kalibrační řady K2 měřené proti roztoku polymeru.

Druhá metoda vyhodnocení byla metoda integrace plochy absorpčního pásu. Křivky absorpčních spekter byly integrovány v oblasti mimo oblast absorpce polymerů, aby s analýzou neinterferovalo jejich absorpční spektrum. Erytrosin byl integrován v rozsahu 600 až 400 nm, riboflavin 530 až 310 nm, brilantní modř 775 až 460 nm a eriochromová čern v rozsahu 775 až 460 nm. Velikost plochy pod touto křivkou byla použita jako hodnota absorbance při dané koncentraci.

4. Výsledky a diskuze

Cílem práce bylo určit poměr mezi množstvím aditiv ve vláknícím roztoku a v nanovlákněné vrstvě a také homogenitu plošné koncentrace v nanovlákněné vrstvě. K tomuto účelu byly z připravených roztoků naměřeny kalibrační křivky a podle nich byl vypočítán obsah barviva v nanovlákněné vrstvě. Tyto experimenty byly prováděny na směsi hyaluronanu s polyethylen oxidem a polyvinylalkoholem, z důvodů různých vlastností vláknících polymerů.

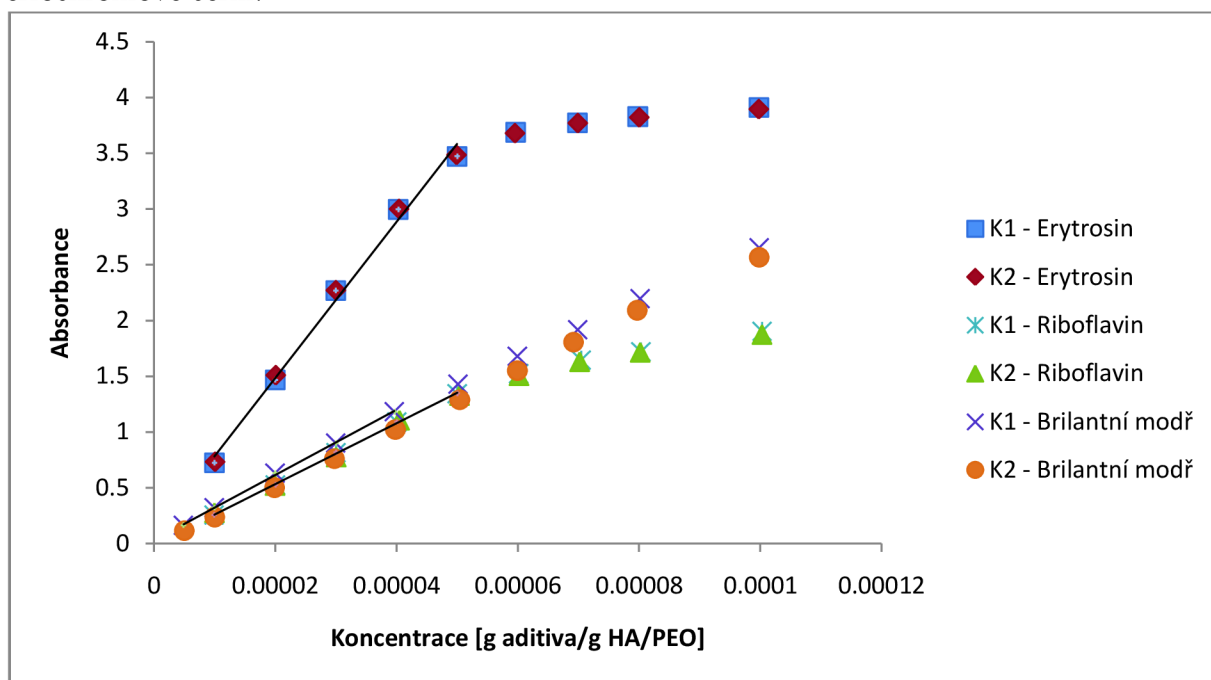
4.1 Hyaluronan

Na přípravu vrstev byl připraven 6hm. % roztok HA/PEO s obsahem 0,1 hm. % aditiva. Obsah aditiva vůči suchému podílu je tedy 1,67 hm. %, což je i teoretické maximum obsahu aditiva v zvlákněné vrstvě.

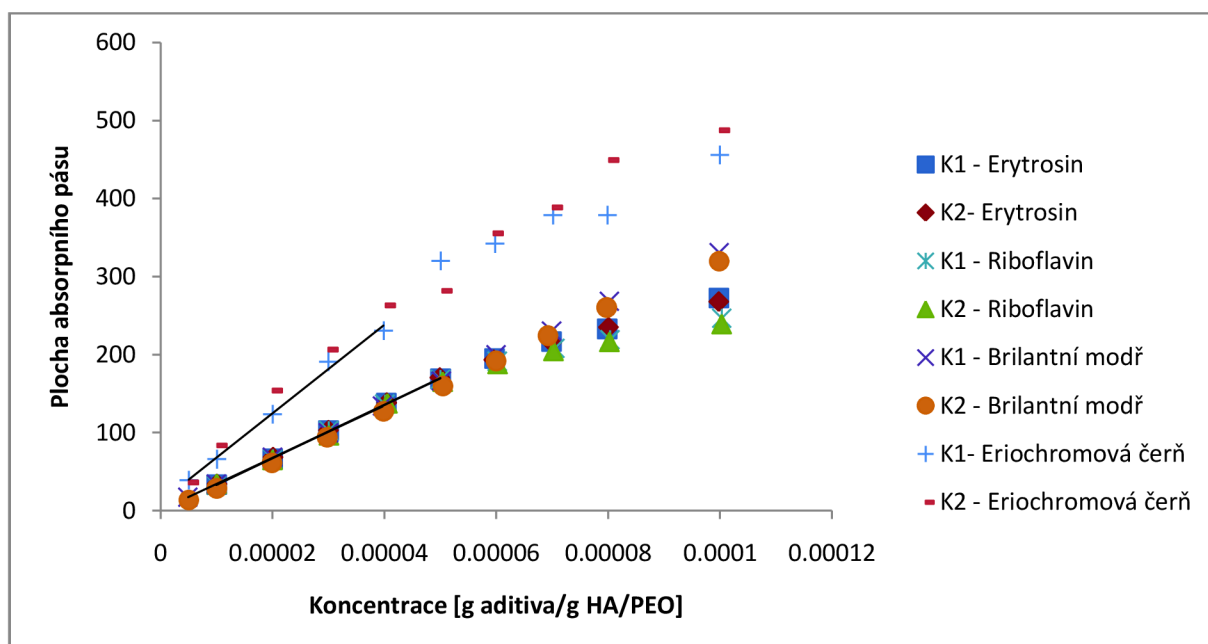
4.1.1 Kalibrace

Při určování kalibračních křivek z vytvořených řad kalibračních roztoků K1 a K2, bylo naměřeno 6 kalibračních řad pro aditiva erytrosin, riboflavin a brilantní modř. Kvůli posunu absorpčního spektra eriochromové černi, byla data pro tuto barvu vyhodnocována pouze pomocí integrace plochy pod křivkou naměřeného spektra.

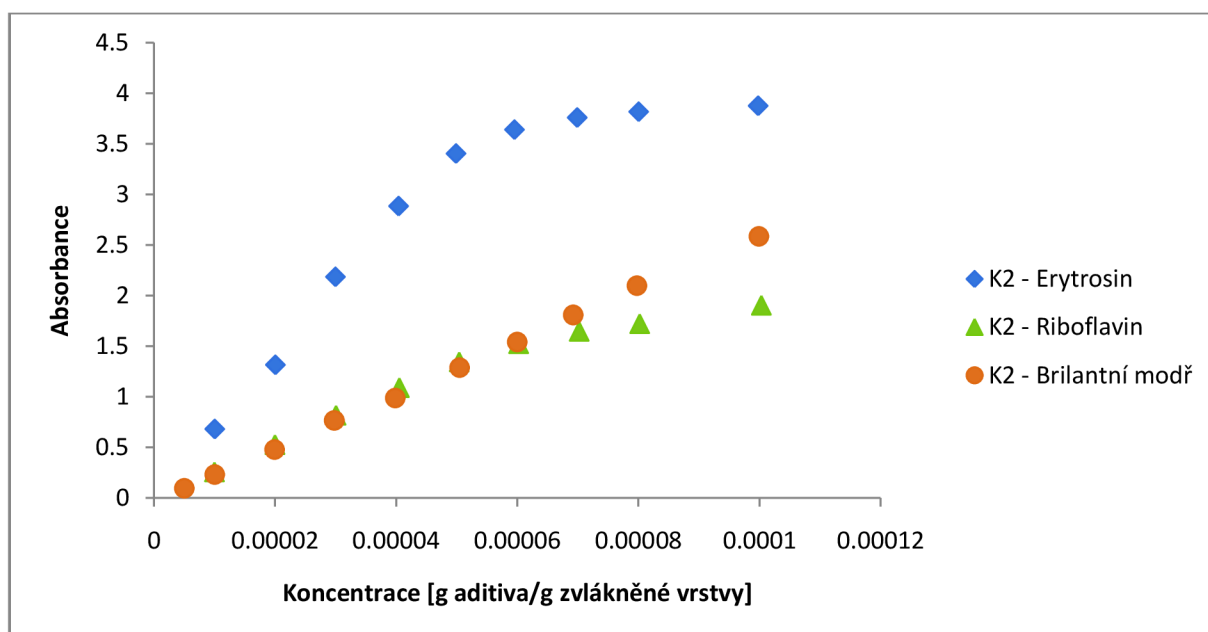
V příloze jsou k nahlédnutí grafy absorpčních spekter a graf posunu absorpčního spektra eriochromové černi.



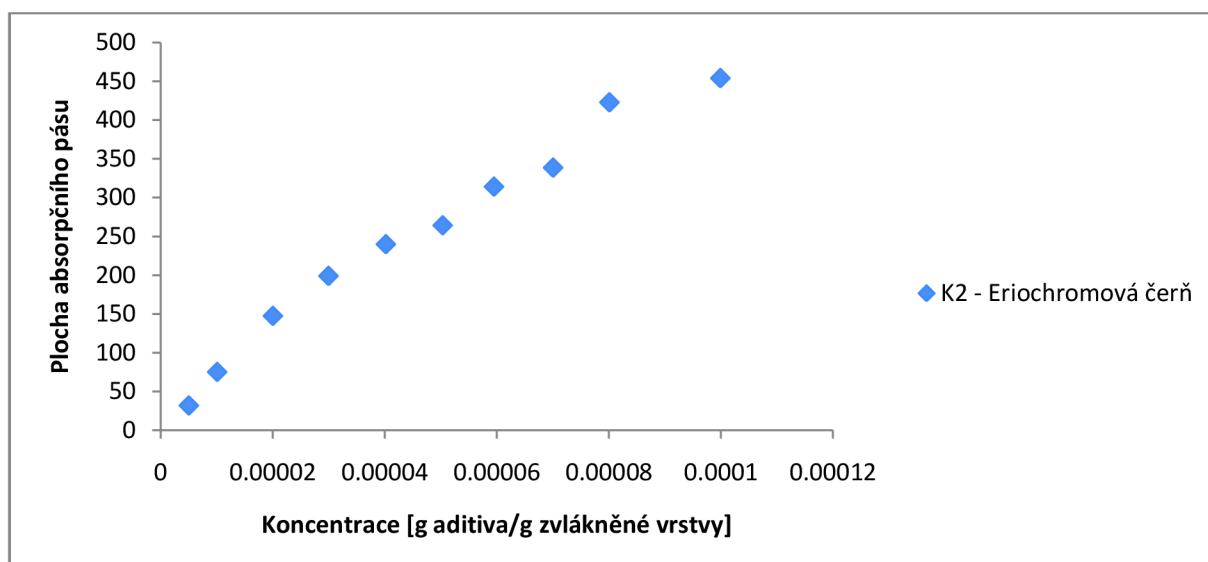
Graf 1- Kalibrační křivky absorbance aditiv podle výšky píku absorpčního pásu měřených proti vodě



Graf 2 - Kalibrační křivky absorbance aditiv podle plochy absorpčního pásu měřených proti vodě



Graf 3 - Kalibrační křivky aditiv podle výšky píku absorpčního pásu měřených proti roztoku HA/PEO



Graf 4 - Kalibrační křivka EC podle plochy absorpčního pásu proti roztoku HA/PEO

Se zvyšující se koncentrací aditiva v kalibračním roztoku vzrůstá jak výška, tak plocha absorpčního pásu pro všechna testovaná aditiva. Od koncentrace 0,005-0,006 hm. % aditiva dochází k vychýlení od linearitu závislosti pro kalibrační křivky založené na výšce absorpčního pásu. V případě použití plochy absorpčního pásu k odchylce dochází u vyšších hodnot (0,007-0,01 hm. %). Kalibrační přímky byly proto vypočítávány pouze z lineární oblasti grafu, tj. z prvních 5 bodů naměřených závislostí.

Zvýšená hodnota směrnice kalibrační přímky erytrosinu měřené pomocí výšky píku oproti ostatním barvivům je dána úzkým profilem absorpčního píku, a to i přesto že směrnice podle plochy píku byla podobná směrnicím ostatních aditiv. Ve výsledku barvivo vykazuje stejnou barevnost, ale sytější odstín.

Hodnoty kalibračních přímek společně s korelačním koeficientem jsou uvedeny v tabulkách níže. Chyba lineární závislosti byla počítána metodou nejmenších čtverců.

Tabulka č. 4 - Tabulka kalibračních přímek erytrosinu a riboflavinu

Kalibrační přímky	Erytrosin		Riboflavin	
	Rovnice	R ²	Rovnice	R ²
K1 - podle výšky píku, proti vodě	$y = 70\,025 \cdot x$	0,9935	$y = 25\,809 \cdot x$	0,9951
K2 - podle výšky píku, proti vodě	$y = 70\,017 \cdot x$	0,9946	$y = 25\,259 \cdot x$	0,9948
K1 - podle plochy pod křivkou, proti vodě	$y = 3\,415\,125 \cdot x$	0,9997	$y = 3\,227\,677 \cdot x$	0,9958
K2 - podle plochy pod křivkou, proti vodě	$y = 3\,422\,696 \cdot x$	1	$y = 3\,142\,881 \cdot x$	0,9953
K2 - podle výšky píku, proti roztoku HA/PEO	$y = 70\,177 \cdot x$	0,9947	$y = 27\,013 \cdot x$	0,9996

Tabulka č. 5 - Tabulka kalibračních přímek brilantní modři a eriochromové černi

Kalibrační přímky	Brilantní modř		Eriochromová čern	
	Rovnice	R ²	Rovnice	R ²
K1 - podle výšky píku, proti vodě	$y = 26\,171 \cdot x$	0,9981	x	x
K2 - podle výšky píku, proti vodě	$y = 26\,155 \cdot x$	0,9997	x	x
K1 - podle plochy pod křivkou, proti vodě	$y = 3\,298\,044 \cdot x$	0,9999	$y = 4\,520\,874 \cdot x$	0,9601
K2 - podle plochy pod křivkou, proti vodě	$y = 3\,261\,421 \cdot x$	0,9997	$y = 4\,806\,274 \cdot x$	0,9775
K2 - podle výšky píku, proti roztoku HA/PEO	$y = 26\,468 \cdot x$	0,9996	x	x
K2 - podle plochy pod křivkou, proti roztoku	x	x	$y = 4\,409\,804 \cdot x$	0,9754

Z korelačních koeficientů kalibračních přímek je patrné, že největší reprodukovatelnost pro stanovování obsahu aditiv má metoda integrace absorpčního spektra. Z podobných hodnot směrníc kalibračních přímek jednotlivých barev vyhodnocovaných buď podle výšky píku, nebo podle plochy absorpčního pásu můžeme usoudit, že určení směrníc dané metody bylo relativně přesné.

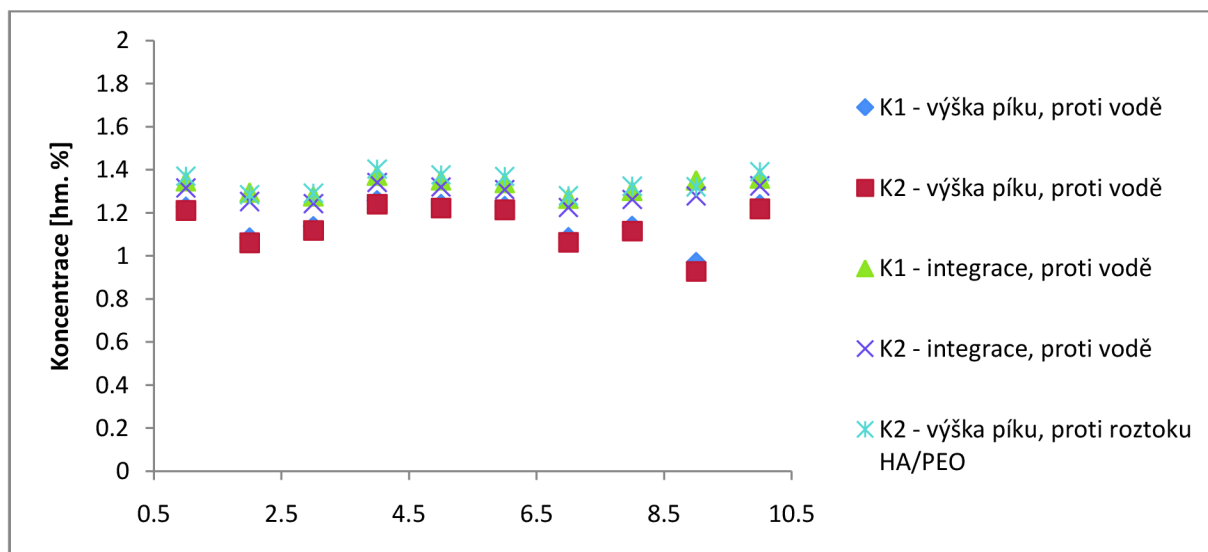
Z porovnání směrníc jednotlivých barev měřených metodou integrace plochy absorpčního pásu pak můžeme vyčíst, že nejbarevnější z aditiv byla eriochromová čern. Porovnáním směrníc získaných vyhodnocením dat pomocí výšky absorpčního pásu ale zjistíme, že nejvíce sytý odstín měl erytrosin.

Eriochromová čern touto metodou měřena nebyla.

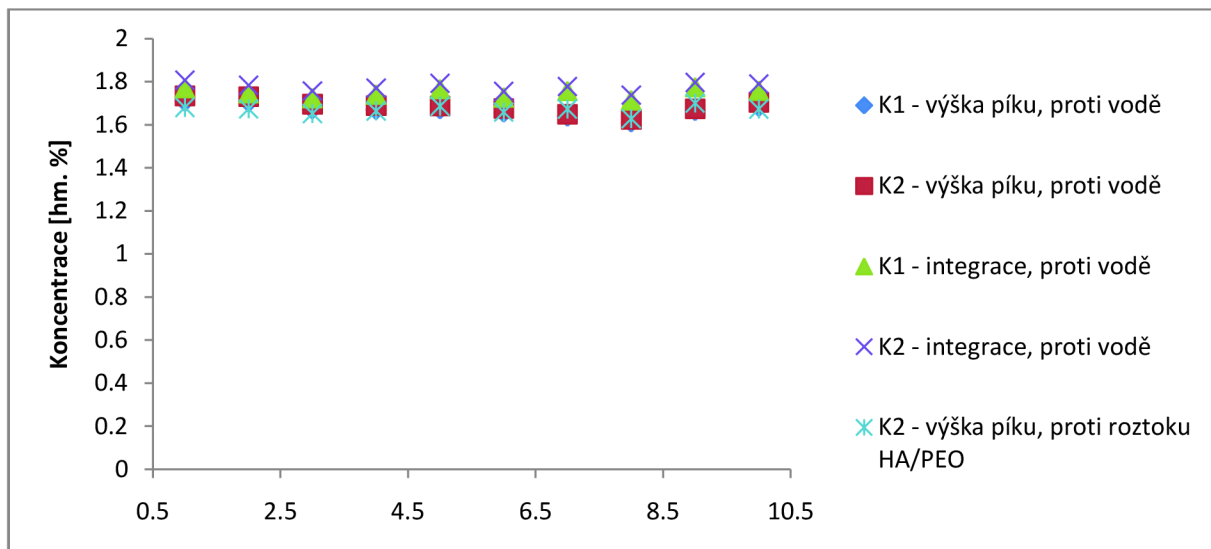
4.1.2 Vyhodnocení obsahu aditiv v připravené vrstvě

Z hodnot absorbancí vzorků jednotlivých aditiv byl pomocí kalibračních přímek určen obsah barviva ve vzorcích v jednotkách hm. % na sušinu. Každý vzorek byl změřen na 10 různých místech zvlákněného materiálu. Hodnoty naměřených absorbancí byly vyhodnocovány pomocí všech připravených kalibračních přímek pro daný vzorek.

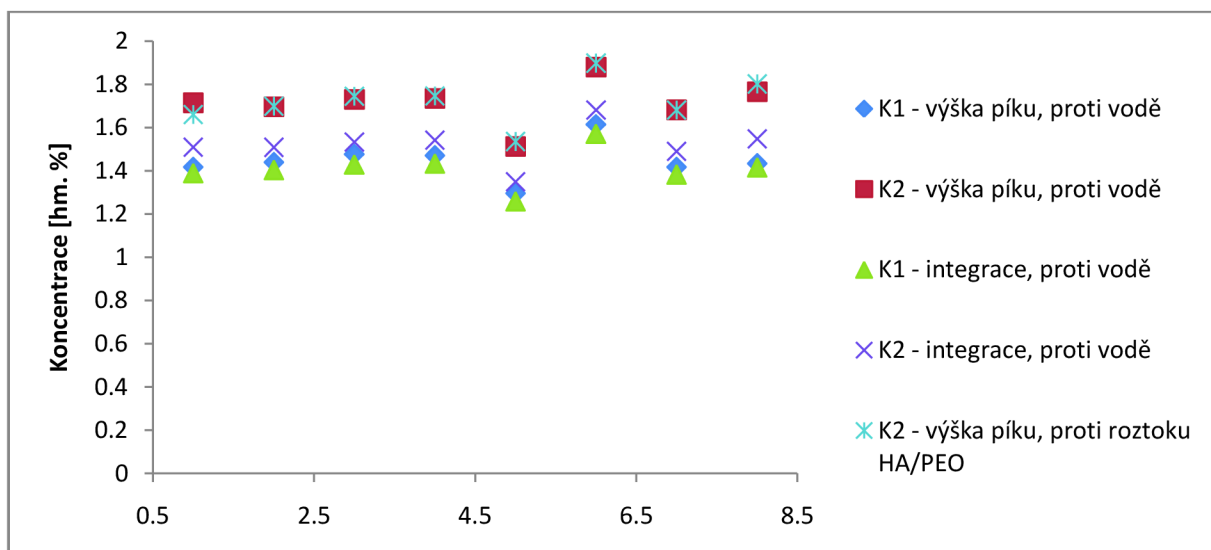
Níže jsou uvedeny grafy s výsledky analýzy jednotlivých vzorků danou metodou a tabulka s průměrným obsahem aditiva z dané metody.



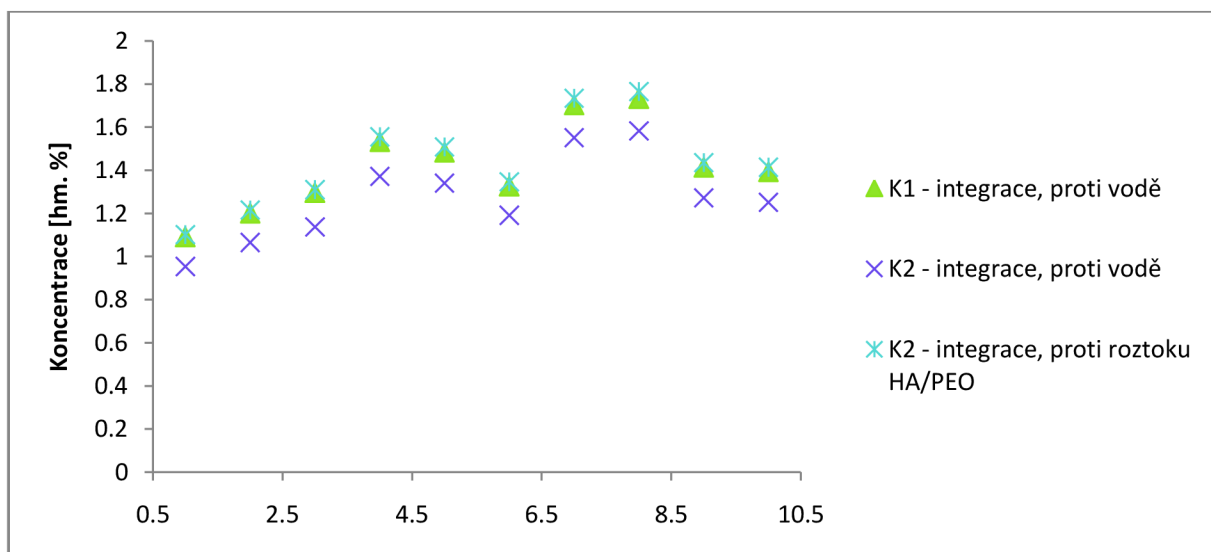
Graf 5 – Obsah erytrosinu ve vrstvě HA/PEO



Graf 6 – Obsah riboflavinu ve vrstvě HA/PEO



Graf 7 – Obsah brilantní modři ve vrstvě HA/PEO



Graf 8 – Obsah eriochromové černi ve vrstvě HA/PEO

Tabulka č. 6 - Tabulka obsahu aditiv ve zvlákněné vrstvě

Metoda	Ery [hm. %]	SM.ODCH. [hm. %]	Rib [hm. %]	SM.ODCH. [hm. %]	BB [hm. %]	SM.ODCH. [hm. %]	EC [hm. %]	SM.ODCH. [hm. %]
K1 - podle výšky píku, proti vodě	1,16	0,09	1,67	0,03	1,45	0,09	x	x
K2 - podle výšky píku, proti vodě	1,14	0,10	1,69	0,03	1,7	0,1	x	x
K1 - podle plochy, proti vodě	1,33	0,04	1,75	0,02	1,41	0,09	1,5	0,2
K2 - podle plochy, proti vodě	1,29	0,04	1,78	0,02	1,52	0,09	1,3	0,2
K2 - podle výšky píku, proti roztoku HA/PEO	1,34	0,05	1,67	0,02	1,7	0,11	1,5	0,21

Z porovnání výsledků metod vyhodnocení pomocí výšky absorpčního pásu a integrace plochy absorpčního pásu vyplývá, že integrální metody jsou reprodukovatelnější, kvůli korelačnímu koeficientu blízcímu se 1, a stabilnější, kvůli menšímu rozptylu hodnot obsahu aditiv v nanovlákněných vrstvách. Z porovnání vyhodnocování proti vodě a proti roztoku HA/PEO je patrné, že kalibrace měřené proti roztoku HA/PEO mají lepší reprodukovatelnost a protože je touto metodou proměřováno spektrum samotného barviva, tak by tyto výsledky měly být i přesnější. V dalším vyhodnocování se tedy braly v potaz pouze výsledky, získané kalibrační přímkou K2 měřenou proti roztoku HA/PEO.

Nejvyšší obsah aditiva v nanovlákněné vrstvě vykazovaly vzorky obsahující brilantní modř. Průměrné množství aditiva bylo $1,7 \pm 0,1$ hm. %, což odpovídá asi 101 % teoretického maxima. Překročení maximálního možného obsahu aditiva je pouze experimentální chyba. Zvýšené množství oproti ostatním vzorkům by mohlo být způsobeno nábojem polymeru a barviva. Hyaluronan jako polymer se záporným nábojem a brilantní modř s kladně nabitým dusíkovým iontem spolu mohou interagovat a tvořit silnější vazbu, což by vysvětlovalo zvýšenou koncentraci aditiva oproti ostatním vzorkům.

Druhý nejvyšší podíl inkorporovaného aditiva vykazovaly vzorky s riboflavinem a to průměrně $1,67 \pm 0,02$ hm. %. Tato hodnota odpovídá 99,4 % teoretické maximální hodnoty aditiva v zvlákněné vrstvě. Nejvyšší obsah souvisí s faktem, že riboflavin není dobře rozpustný ve vodě a částice barviva mohly agregovat do větších zrn, která se snáze vytrhovala s vlákněným polymerem nebo silnou polaritou necyklického zbytku aditiva – $C_5H_{10}O_4$ dobře interagující s hyaluronanem.

Aditivum o třetím nejvyšším obsahu v polymeru byla eriochromová čern. Obsah aditiva ve vrstvě činil $1,5 \pm 0,2$ hm. %, což odpovídá asi 89 % teoretického maximálního množství. Velká odchylka výsledků a zdánlivá nehomogenita je dána charakterem aditiva. Eriochromová čern jakožto komplexotvorné barvivo vytváří komplexy s ionty kovů. Protože hyaluronan je sodná a draselná sůl kyseliny hyaluronové, interagovalo barvivo s ionty obsaženými v polymeru a měnilo svoje absorpční spektrum. V příloze je uveden graf s posunem absorpčního spektra eriochromové černi.

Aditivum s nejnižším obsahem ve zkoumané vrstvě byl erytrosin. Obsah erytrosinu v zvlákněné vrstvě byl $1,34 \pm 0,05$ hm. %, což tvoří 80 % teoretického maximálního výtěžku. Toto barvivo má záporný náboj, který neinteraguje se směsí polymerů HA/PEO, netvoří

komplexy a dobře se rozpouští ve vodě. Proto je možné použít toto barvivo jako modelový příklad a porovnávat s ním ostatní aditiva a vliv jejich struktury na schopnost se vázat do zvlákněných vrstev.

Homogenita se zjišťovala pro všechny vzorky z 10 různých míst, plocha 1 místa byla 4,906 cm², a vyhodnocovala se jako sm. odchylka z obsahu aditiva v sušině.

Nejhomogenněji byl dispergován riboflavin (sm. odch. = 0,02 hm. %) a nejméně homogenní byl Er. čern (sm. odch. = 0,2 hm. %). Důvodem homogenity byla pravděpodobně homogenní rozptýlení neutrálního a nereagujícího Rib. ve zvláknovací kapalině. Naproti tomu Eri. čern byla vázána ve formě komplexů na Na⁺ a K⁺, které nejsou v HA rozprostřeny homogenně, a tak i Er. čern nebyla zvlákněna do homogenní vrstvy.

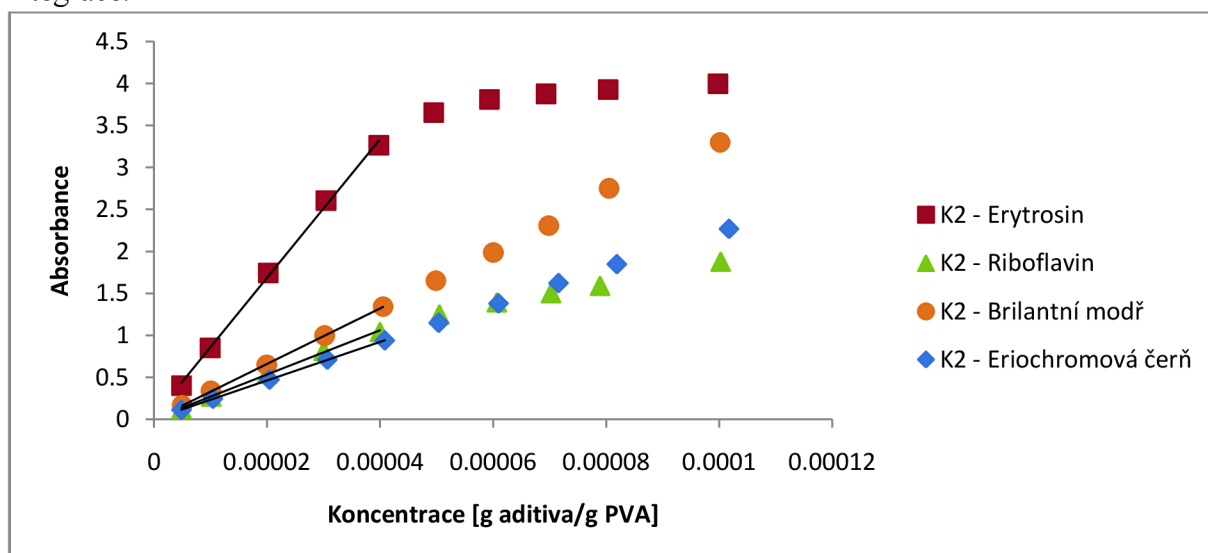
4.2 Polyvinylalkohol

Na přípravu vrstev byl připraven 12% roztok PVA jako neutrální polymer s obsahem 0,1 % aditiva. Obsah aditiva vůči suchému podílu je tedy 0,833 %, což je i teoretické maximum obsahu aditiva v zvlákněné vrstvě.

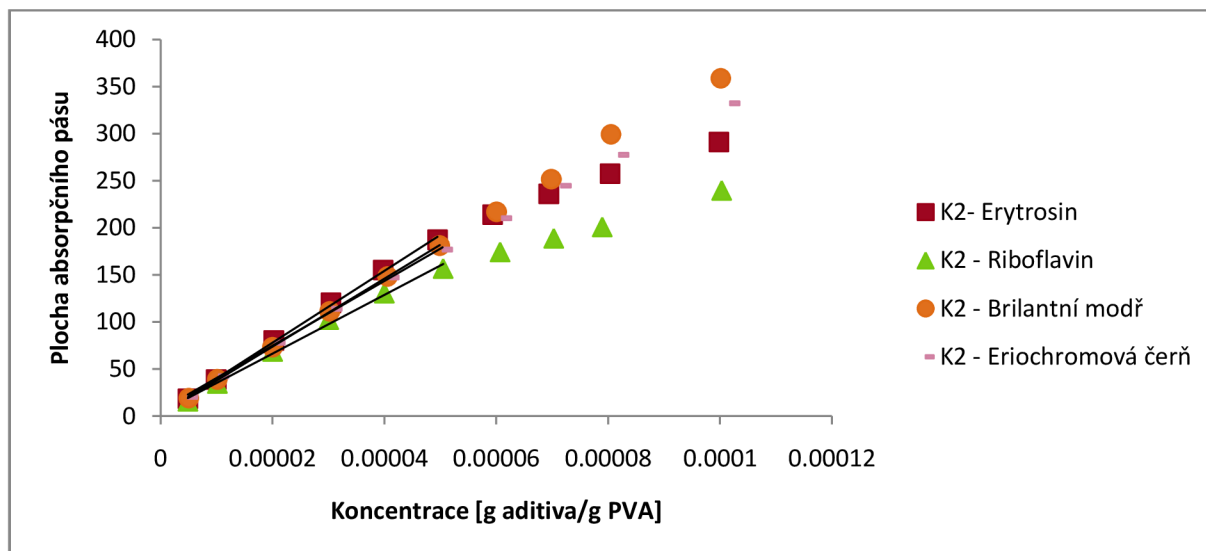
4.2.1 Kalibrace

Kalibrační křivky pro vzorky PVA byly měřeny pouze pomocí kalibračních roztoků K2, protože z výsledků kalibračních závislostí hyaluronanu, bylo určeno, že absorbance roztoků měřených proti roztoku polymeru mají přesnější hodnoty pro analýzu. Kalibrační roztoky PVA byly tedy měřeny pouze proti roztoku polymeru.

Níže jsou uvedeny grafy kalibračních křivek a tabulka s lineární regresí a korelačním koeficientem. Obdobně jako u kalibračních přímek hyaluronanu, byly kalibrační přímky počítány pouze z lineární části grafu. Korelační koeficient byl počítán metodou nejmenších čtverců. Optimální metodou pro stanovení aditiva je tedy metoda K2 s určením pomocí integrace.



Graf 9 – Kalibrační křivky aditiv podle výšky absorpčního pásu měřených proti roztoku PVA



Graf 10 – Kalibrační křivky aditiv podle plochy absorpčního pásu měřených proti roztoku PVA

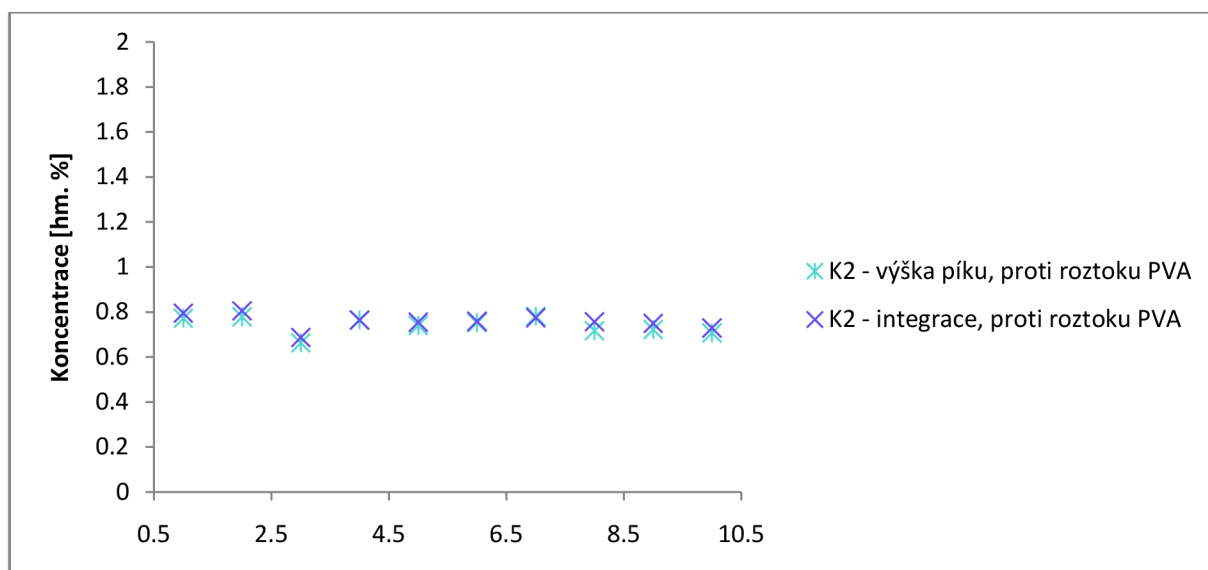
Tabulka č. 7 - Tabulka kalibračních přímek pro vzorky PVA

	Kalibrační přímky	K2 - podle výšky píku, proti roztoku PVA	K2 - podle plochy absorpčního pásma, proti roztoku PVA
Erytrosin	Rovnice	$y = 82\,688 \cdot x$	$y = 3\,924\,498 \cdot x$
	R^2	0,9984	0,9997
Riboflavin	Rovnice	$y = 24\,969 \cdot x$	$y = 3\,121\,569 \cdot x$
	R^2	0,9956	0,9956
Brilantní modř	Rovnice	$y = 33\,321 \cdot x$	$y = 3\,602\,821 \cdot x$
	R^2	0,9993	0,9993
Eriochromová čern	Rovnice	$y = 22\,297 \cdot x$	$y = 3\,228\,752 \cdot x$
	R^2	0,9998	0,9983

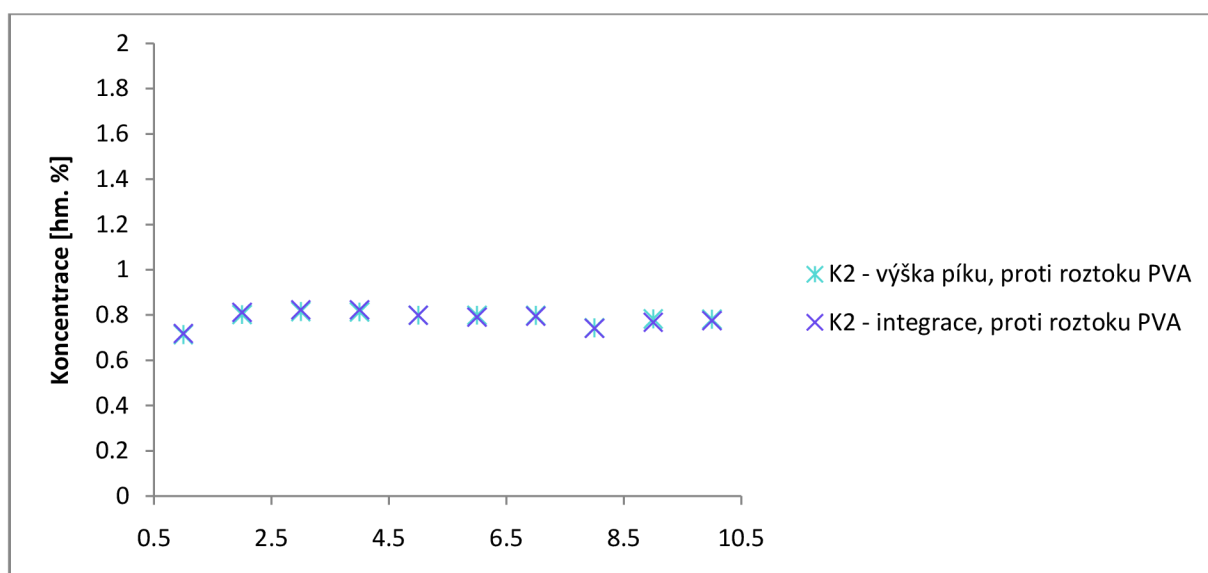
Směrnice kalibračních přímek roztoků PVA mají podobný trend jako kalibrační přímky roztoků HA/PEO, ale mají větší hodnotu.

Kalibrační přímka eriochromové černi se oproti vyhodnocování u hyaluronanu nemusela vyhodnocovat pouze pomocí integrace, ale i pomocí metody výšky píku, protože na rozdíl od směsi HA/PEO nedocházelo k posunu absorpčního spektra vlivem tvorby komplexu.

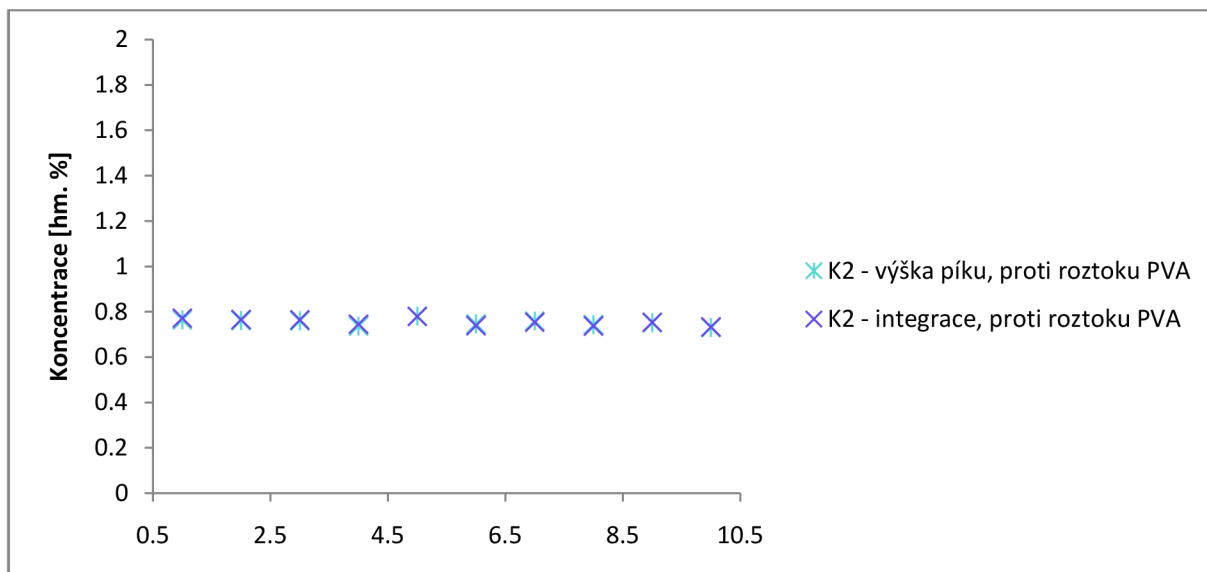
4.2.2 Vyhodnocení obsahu aditiv v připravené vrstvě



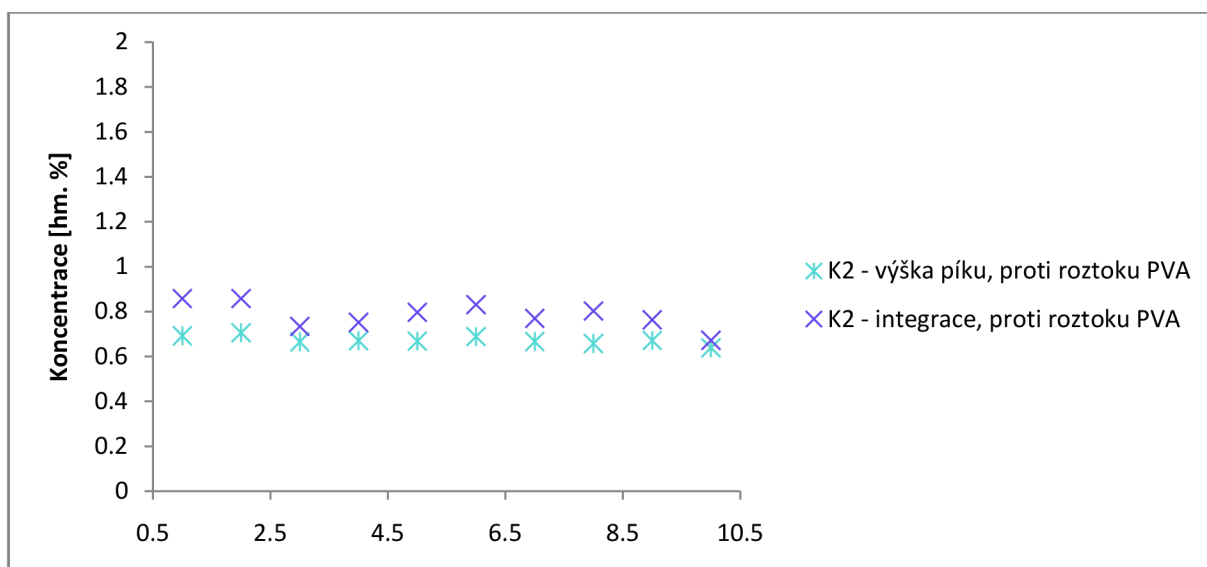
Graf 11 – Obsah erytrosinu ve vrstvě PVA



Graf 12 – Obsah riboflavinu ve vrstvě PVA



Graf 13 – Obsah brilantní modři ve vrstvě PVA



Graf 14 – Obsah eriochromové černi ve vrstvě PVA

Tabulka č. 8 - Tabulka obsahu aditiv ve zvlákněné vrstvě PVA

Metoda	Erytrosin [hm. %]	Riboflavin [hm. %]	Brilantní modř [hm. %]	Eriochromová čern [hm. %]
K2 - podle výšky píku, proti roztoku PVA	0,74	0,78	0,75	0,67
Směrodatná odchylka	0,04	0,03	0,02	0,02
K2 - podle plochy, proti roztoku PVA	0,76	0,78	0,75	0,78
Směrodatná odchylka	0,03	0,04	0,02	0,06

Všechny vzorky vykazovaly podobný obsah aditiva inkorporovaného ve své struktuře. Ve zvlákněné vrstvě s erytrosinem bylo přítomno $0,76 \pm 0,03$ hm. % aditiva, což odpovídá 90 % teoretického obsahu ve zvlákněvacím roztoku. Ve zvlákněné vrstvě s riboflavinem bylo přítomno $0,78 \pm 0,04$ hm. % aditiva, což odpovídá 92,8 % teoretického maxima. Ve zvlákněné

vrstvě s brilantní modří bylo přítomno $0,75 \pm 0,02$ hm. % aditiva, což odpovídá 89 % teoretického maxima. Ve zvlákněné vrstvě s eriochromovou černí bylo přítomno $0,78 \pm 0,06$ hm. % aditiva, což odpovídá 92,9 % teoretického maxima.

Obsah aditiv se tedy výrazně nemění a není závislý na struktuře, polaritě či chemismu aditiv neinteragujících s relativně inertním PVA. Protože je PVA bez náboje a volných iontů, chová se vůči aditivům inertně a neovlivňuje míru inkorporace v porovnání s hyaluronanem.

Největší homogenitu pak vykazoval vzorek s brilantní modří, jehož rozptyl činil pouze 0,02 hm. %, která byla výrazně nižší v porovnání se zvlákněním hyaluronanu (rozptyl 0,11 hm. %). Nejméně homogenní byla naopak vrstva PVA s eriochromovou černí, jejíž rozptyl byl 0,06 hm. %. I tato hodnota však byla nižší pro aditivum v PVA než při zvláknění hyaluronanu (rozptyl 0,2 hm. %). Obecným problémem stanovení eriochromové černí a následným velkým rozptylem byl široký profil absorpčního pásu vnášející experimentální chybu při zpracování.

5. Závěr

Cílem této práce bylo stanovit obsah různých aditiv, po jejich inkorporaci do nanovlákných vrstev hyaluronanu/polyethylen oxidu a polyvinylalkoholu a vliv jejich struktury a vlastností na jejich obsah. Polymery s aditivou byly zvlákněny a z nanovlákných vrstev byly připraveny vzorky. V těchto vzorcích byl spektrofotometricky stanoven obsah aditiva, podle připravených kalibračních řad.

Obsah červeného barviva, erytrosinu, byl stanoven na $1,34 \pm 0,05$ hm. % celkové hmotnosti nanovlákněné vrstvy HA/PEO a $0,76 \pm 0,033$ % celkové hmotnosti nanovlákněné vrstvy PVA. Protože se u erytrosinu nepředpokládá žádná interakce s polymery nanovlákněné vrstvy, mohou tyto data sloužit jako standardní model pro ostatní aditiva a pro porovnání vlivu struktury na míru inkorporace.

V obou vrstvách byl zjištěn největší obsah žlutého barviva riboflavinu. V nanovlákněné vrstvě HA/PEO byl obsah aditiva roven $1,67 \pm 0,02$ hm. % celkové hmotnosti vrstvy. Ve vrstvě PVA byl obsah aditiva roven $0,78 \pm 0,4$ % celkové hmotnosti vrstvy. Toto množství odpovídá téměř 100% účinnosti při zvláknování, neboť koncentrace ve zvláknějícím roztoku a vrstvě jsou stejné. Zvýšené množství inkorporovaného aditiva je pravděpodobně způsobeno malou rozpustností riboflavinu ve vodě a jeho agregací s řetězcem polymeru a silně polární strukturou necyklického konce aditiva – $C_5H_{10}O_4$.

Průměrný obsah brilantní modři byl stanoven na $1,7 \pm 0,1$ hm. % celkové hmotnosti nanovlákněné vrstvy HA/PEO a $0,75 \pm 0,02$ hm. % celkové hmotnosti nanovlákněné vrstvy PVA. Zvýšený obsah ve vrstvě HA/PEO je dán iontovým charakterem barviva a polymeru. Ve vrstvě HA/PEO interagoval parciální kladný náboj aditiva se záporně nabitými částmi řetězce hyaluronanu.

Průměrný obsah eriochromové černi byl stanoven na $1,5 \pm 0,2$ hm. % celkové hmotnosti nanovlákněné vrstvy HA/PEO a $0,78 \pm 0,06$ hm. % celkové hmotnosti nanovlákněné vrstvy PVA. Analýza obsahu eriochromové černi ve vrstvě HA/PEO může být ale nepřesná, kvůli interakci komplexotvorného barviva a kovových iontů hyaluronanu. Tím pádem docházelo k posunu absorpčního maxima eriochromové černi.

Z hlediska absolutního množství aditiva ve zvlákněné vrstvě je v případě HA/PEO rozdíl mezi různými aditivou vlivem vyšší interakce a složitějšího chemismu ve zvláknovacím roztoku (interakce parciálních nábojů aditiva a HA, tvorba komplexů...). Díky tomu, že PVA je chemicky inertnější, tyto interakce jsou slabší, což vede k podobnému množství různých aditiv v připravené vrstvě.

Při porovnání homogenity ve vrstvě HA/PEO a PVA vycházela lepší homogenita u vzorku HA/PEO pro vrstvu s riboflavinem. Pro všechna ostatní aditiva byla rovnoměrněji rozptýlena ve vrstvě PVA. Obecně nejnižší rozptyl vykazovaly vzorky erytrosinu a riboflavinu v obou polymerech a vzorky brilantní modři ve vrstvě HA/PEO. Rozptyl obsahu aditiva se pohyboval v řádech setin hm. %, což znamená odchylku 0,1 mg na 1 g nanovlákněné vrstvy.

6. Seznam zkratek

HA	Kyselina hyaluronová/Hyaluronan
PEO	Polyethylen oxid
PVA	Polyvinylalkohol
UV-Vis	Ultraviolet-Visible (Ultrafialové-Viditelné)
CHI	Chitosan
COL	Kolagen
SF	Fibrin z hedvábí
PEVA	Polyethylen-co-vinyl acetát
PLA	Polykyselina mléčná
PLCP	poly(L-lactide-co-ε-caprolactone)
bFGF	fibroblastický růstový faktor
EGF	epidermální růstový faktor
PLC	polykaprolaktan
BSA	hovězí albumin
Ery	Erytrosin
Rib	Riboflavin
BB	Brilantní modř
EC	Eriochromová čern

7. Reference

- [1] Vlhké hojení. *Zelená hvězda* [online]. 2010 [cit. 2013-06-13]. Dostupné z: <http://www.zelenahvezda.cz/pacientska-sekce/p-rany/vlhke-hojeni>
- [2] Device for preparing nanofiber layers - 4SPIN. *4SPIN* [online]. 2014 [cit. 2014-04-24]. Dostupné z: <http://www.4SPIN.info/>
- [3] FLIMEL, Karol. Znamý neznámý hyaluronan. *Chempoint* [online]. 2011 [cit. 2014-04-05]. Dostupné z: <http://www.chempoint.cz/znamy-neznamy-hyaluronan>
- [4] Hyiodine. *Hyiodine* [online]. [cit. 2014-04-05]. Dostupné z: http://www.hyiodine.cz/images/Brochures/hyiodine_a4_brozura.pdf
- [5] Polyethylenglykol. In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA): WikimediaFoundation, 2013 [cit. 2014-04-05]. Dostupné z: <http://cs.wikipedia.org/wiki/Polyethylenglykol>
- [6] LEE, Joon Seok, Kyu Ha CHOI, Han Do GHIM, Sam Soo KIM, Du Hwan CHUN, Hak Yong KIM a Won Seok LYOO. Role of molecular weight of atactic poly(vinyl alcohol) (PVA) in the structure and properties of PVA nanofabric prepared by electrospinning. *Journal of Applied Polymer Science* [online]. 2004-08-15, vol. 93, issue 4, s. 1638-1646 [cit. 2014-05-13]. DOI: 10.1002/app.20602. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/app.20602>
- [7] LEE, So Young, Da Hyun JANG, Yun Ok KANG, O Bok KIM, Lim JEONG, Hyun Ki KANG, Seung Jin LEE, Chong-Heon LEE, Won Ho PARK a Byung-Moo MIN. Cellular response to poly(vinyl alcohol) nanofibers coated with biocompatible proteins and polysaccharides. *Applied Surface Science* [online]. 2012, vol. 258, issue 18, s. 6914-6922 [cit. 2014-05-13]. DOI: 10.1016/j.apsusc.2012.03.135. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0169433212005740>
- [8] SON, Woo Jin KIM a Hyuk Sang YOO. Therapeutic applications of electrospun nanofibers for drug delivery systems. *Archives of Pharmacal Research* [online]. 2014, vol. 37, issue 1, s. 69-78 [cit. 2014-05-13]. DOI: 10.1007/s12272-013-0284-2. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s12272-013-0284-2>
- [9] KENAWY, El-Refaie, Gary L. BOWLIN, Kevin MANSFIELD, John LAYMAN, David G. SIMPSON, Elliot H. SANDERS a Gary E. WNEK. Release of tetracycline hydrochloride from electrospun poly(ethylene-co-vinylacetate), poly(lactic acid), and a blend. *Journal of Controlled Release* [online]. 2002, vol. 81, 1-2, s. 57-64 [cit. 2014-05-13]. DOI: 10.1016/S0168-3659(02)00041-X. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S016836590200041X>
- [10] ZENG, Jing, Lixin YANG, Qizhi LIANG, Xuefei ZHANG, Huili GUAN, Xiuling XU, Xuesi CHEN a Xiabin JING. Influence of the drug compatibility with polymer solution on the release kinetics of electrospun fiber formulation. *Journal of Controlled Release* [online]. 2005, vol. 105, 1-2, s. 43-51 [cit. 2014-05-13]. DOI: 10.1016/j.jconrel.2005.02.024. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168365905001227>
- [11] YANG, Ye, Xiaohong LI, Mingbo QI, Shaobing ZHOU, Jie WENG, Xiuling XU, Xuesi CHEN a Xiabin JING. Release pattern and structural integrity of lysozyme encapsulated in core–sheath structured poly(dl-lactide) ultrafine fibers prepared by emulsion electrospinning. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* [online].

- 2008, vol. 69, issue 1, s. 106-116 [cit. 2014-05-13]. DOI: 10.1016/j.ejpb.2007.10.016.
Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0939641107003621>
- [12] YU, D.G., X. WANG, X.Y. LI, W. CHIAN, Y. LI, Y.Z. LIAO, Xuesi CHEN a Xiabin JING. Electrospun biphasic drug release polyvinylpyrrolidone/ethyl cellulose core/sheath nanofibers. *Acta Biomaterialia* [online]. 2013, vol. 9, issue 3, s. 5665-5672 [cit. 2014-05-13]. DOI: 10.1016/j.actbio.2012.10.021.
Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1742706112004989>
- [13] CHO, Young Il, Ji Suk CHOI, Seo Young JEONG, Hyuk Sang YOO, Y. LI, Y.Z. LIAO, Xuesi CHEN a Xiabin JING. Nerve growth factor (NGF)-conjugated electrospun nanostructures with topographical cues for neuronal differentiation of mesenchymal stem cells. *Acta Biomaterialia* [online]. 2010, vol. 6, issue 12, s. 4725-4733 [cit. 2014-05-13]. DOI: 10.1016/j.actbio.2010.06.019.
Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1742706110002850>
- [14] SHUTAVA, Tatsiana G., Shantanu S. BALKUNDI, Pranitha VANGALA, Joshua J. STEFFAN, Rebecca L. BIGELOW, James A. CARDELLI, D. Patrick O'NEAL a Yuri M. LVOV. Layer-by-Layer-Coated Gelatin Nanoparticles as a Vehicle for Delivery of Natural Polyphenols. *ACS Nano* [online]. 2009-07-28, vol. 3, issue 7, s. 1877-1885 [cit. 2014-05-13]. DOI: 10.1021/nn900451a. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/nn900451a>
- [15] OKUDA, Tatsuya, Kengo TOMINAGA, Satoru KIDOAKI, Joshua J. STEFFAN, Rebecca L. BIGELOW, James A. CARDELLI, D. Patrick O'NEAL a Yuri M. LVOV. Time-programmed dual release formulation by multilayered drug-loaded nanofiber meshes. *Journal of Controlled Release* [online]. 2010-04-19, vol. 143, issue 2, s. 258-264 [cit. 2014-05-13]. DOI: 10.1016/j.jconrel.2009.12.029.
Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/nn900451a>
- [16] WANG, Shu-Gen, Xin JIANG, Peng-Cheng CHEN, An-Guo YU, Xiao-Jun HUANG, James A. CARDELLI, D. Patrick O'NEAL a Yuri M. LVOV. Preparation of Coaxial-Electrospun Poly[bis(p-methylphenoxy)]phosphazene Nanofiber Membrane for Enzyme Immobilization. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2012, vol. 13, issue 12, s. 14136-14148 [cit. 2014-05-13]. DOI: 10.3390/ijms131114136. Dostupné z: <http://www.mdpi.com/1422-0067/13/11/14136/>
- [17] CHOI, Ji Suk, Hyuk Sang YOO, Peng-Cheng CHEN, An-Guo YU, Xiao-Jun HUANG, James A. CARDELLI, D. Patrick O'NEAL a Yuri M. LVOV. Pluronic/chitosan hydrogels containing epidermal growth factor with wound-adhesive and photocrosslinkable properties. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* [online]. 2010, 95A, issue 2, s. 564-573 [cit. 2014-05-13]. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/jbm.a.32848>
- [18] LOH, Xian Jun, Priscilla PEH, Susan LIAO, Colin SNG, Jun LI, James A. CARDELLI, D. Patrick O'NEAL a Yuri M. LVOV. Controlled drug release from biodegradable thermoresponsive physical hydrogel nanofibers. *Journal of Controlled Release* [online]. 2010-04-19, vol. 143, issue 2, s. 175-182 [cit. 2014-05-13]. DOI: 10.1016/j.jconrel.2009.12.030. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168365910000076>
- [19] IM, Ji Sun, Jumi YUN, Youn-Mook LIM, Hyung-Il KIM, Young-Seak LEE, James A. CARDELLI, D. Patrick O'NEAL a Yuri M. LVOV. Fluorination of electrospun

- hydrogel fibers for a controlled release drug delivery system. *Acta Biomaterialia* [online]. 2010, vol. 6, issue 1, s. 102-109 [cit. 2014-05-13]. DOI: 10.1016/j.actbio.2009.06.017. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1742706109002700>
- [20] Erythrosin. In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA): WikimediaFoundation, 2001- [cit. 2014-04-24]. Dostupné z: <http://cs.wikipedia.org/wiki/Erythrosin>
- [21] Riboflavin. In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA): WikimediaFoundation, 2001- [cit. 2014-04-24]. Dostupné z: <http://cs.wikipedia.org/wiki/Riboflavin>
- [22] Brilliant Blue FCF. In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA): WikimediaFoundation, 2001- [cit. 2014-04-24]. Dostupné z: http://en.wikipedia.org/wiki/Brilliant_Blue_FCF
- [23] Eriochrome Black T. In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA): WikimediaFoundation, 2001- [cit. 2014-04-24]. Dostupné z: http://en.wikipedia.org/wiki/Eriochrome_Black_T

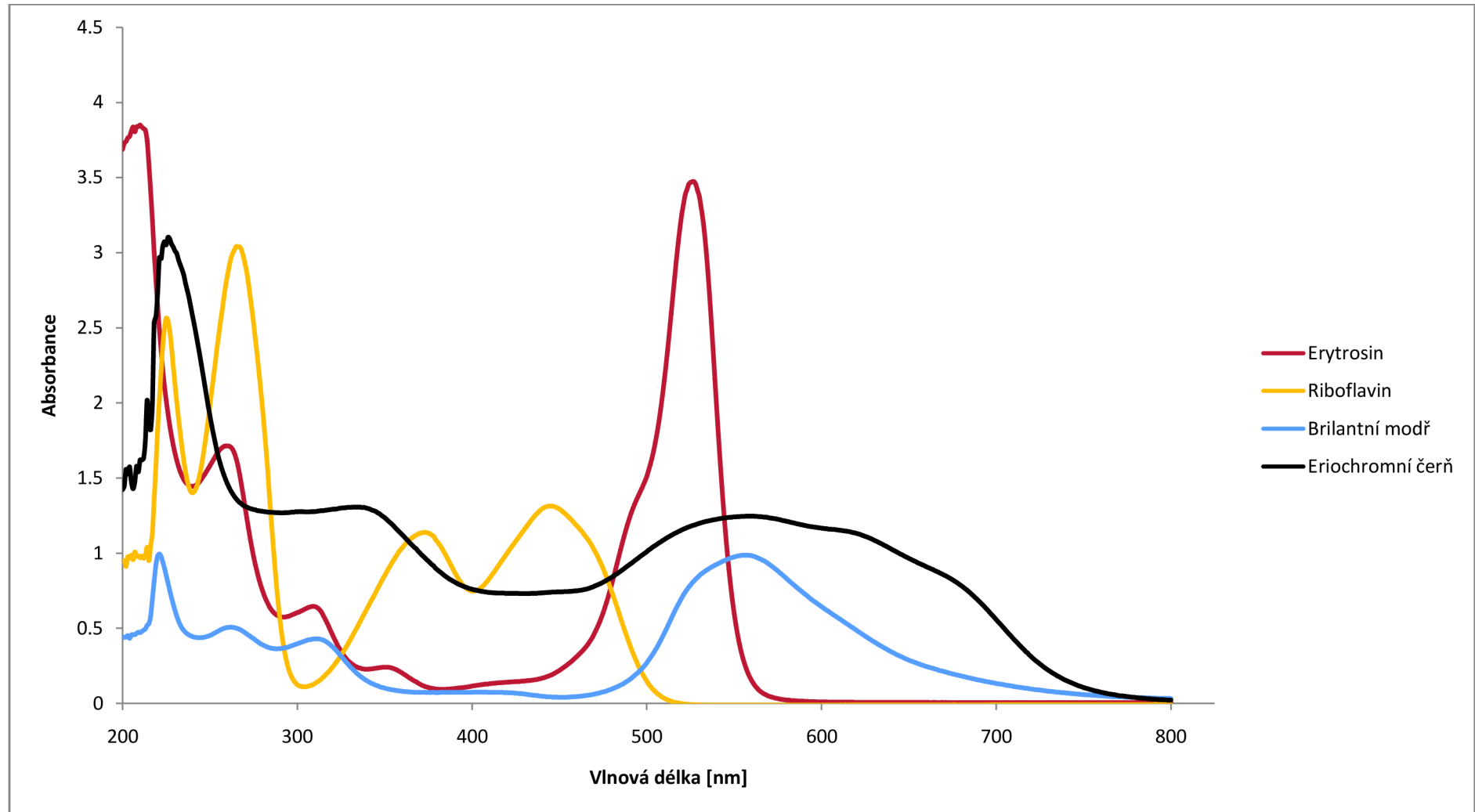
8. Reference obrázků

- Obrázek č. 1: Autor neuveden. *MichganTech* [online]. [cit. 13.5.2014]. Dostupný z: http://nano.mtu.edu/images/Electrospinning_alt.jpg
- Obrázek č. 2: Autor neuveden. *Device for preparing nanofiber layers - 4SPIN* [online]. [cit. 13.5.2014]. Dostupný z: <http://www.4spin.info/>
- Obrázek č. 3: Autor neuveden. *Device for preparing nanofiber layers - 4SPIN* [online]. [cit. 13.5.2014]. Dostupný z: <http://www.4spin.info/>

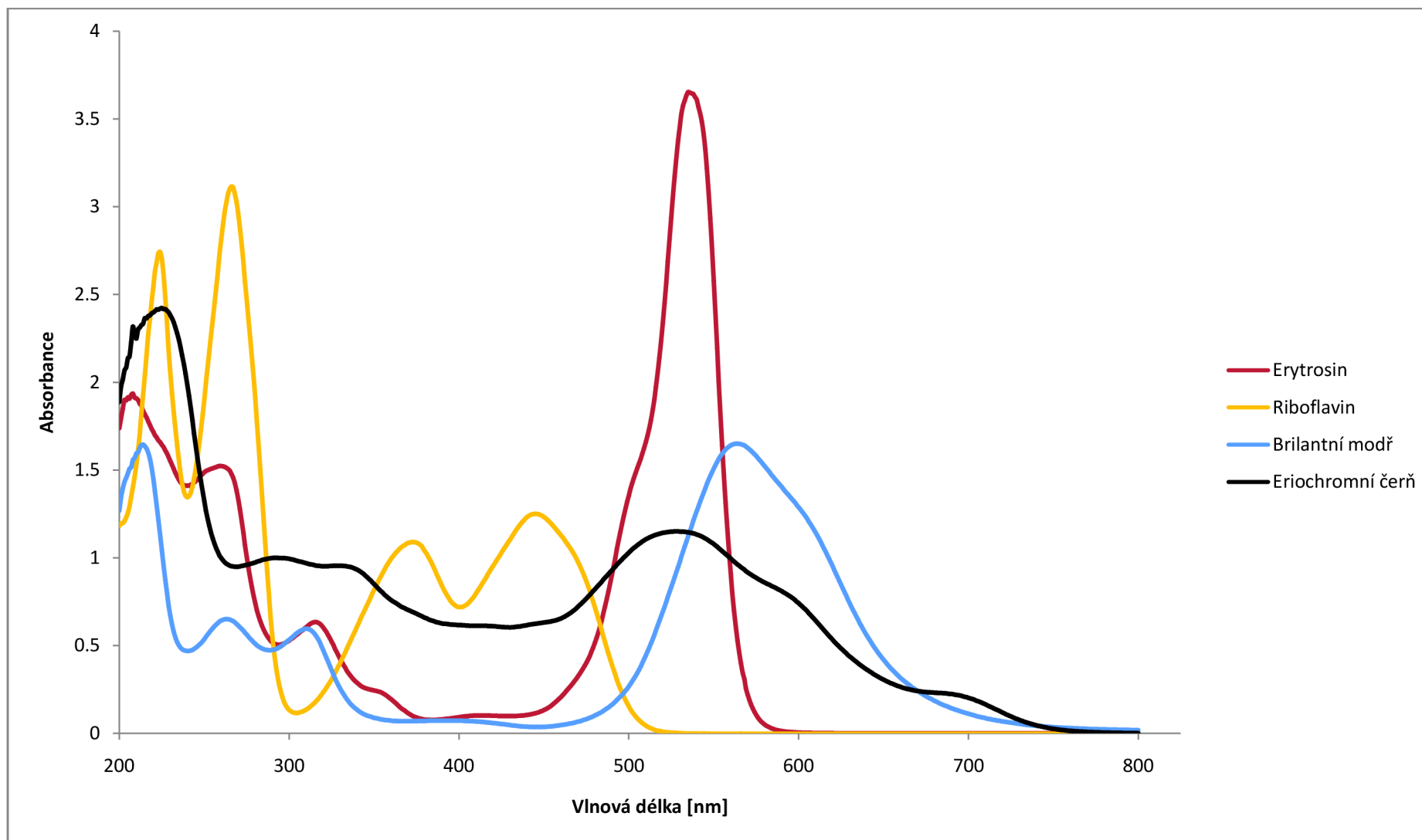
9. Seznam příloh

1. Graf absorpčních pásů jednotlivých aditiv v kalibračním roztoku HA/PEO o koncentraci 0,05 hm. %
2. Graf absorpčních pásů jednotlivých aditiv v kalibračním roztoku PVA o koncentraci 0,05 hm. %
3. Graf posunu absorpčního spektra eriochromové černi v závislosti na koncentraci v prostředí HA/PEO

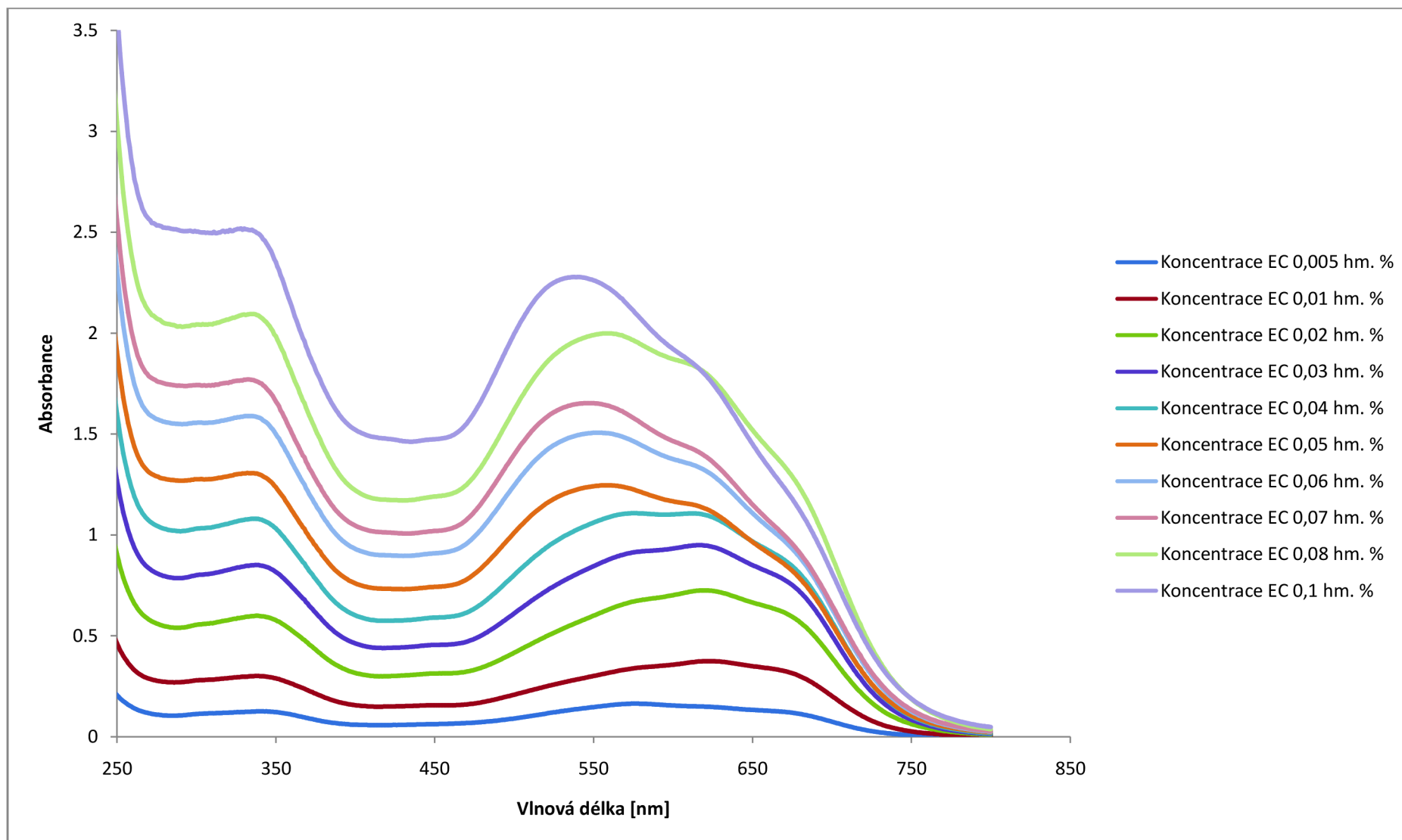
10. Přílohy



Příloha 1 – Graf absorpčních pásů jednotlivých aditiv v kalibračním roztoku HA/PEO o koncentraci 0,05 hm. %



Příloha 2 – Graf absorpčních pásů jednotlivých aditiv v kalibračním roztoku PVA o koncentraci 0,05 hm. %



Příloha 3 – Graf posunu absorpčního spektra eriochromové černi v závislosti na koncentraci v prostředí HA/PEO