



**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

**HYDROGELY HYLAURONAN-TENZID - FÁZOVÝ DIAGRAM**

HYDROGELS HYALURONAN-SURFACTANT: PHASE DIAGRAM

**BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

BACHELOR'S THESIS

**AUTOR PRÁCE**

AUTHOR

**Eliška Gruberová**

**VEDOUCÍ PRÁCE**

SUPERVISOR

**prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.**

**BRNO 2019**

## Zadání bakalářské práce

Číslo práce: FCH-BAK1459/2018 Akademický rok: 2018/19  
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie  
Studentka: **Eliška Gruberová**  
Studijní program: Chemie a chemické technologie  
Studijní obor: Chemie pro medicínské aplikace  
Vedoucí práce: **prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.**

### Název bakalářské práce:

Hydrogely hylauronan–tenzid – fázový diagram

### Zadání bakalářské práce:

Seznámit se se základy interakcí mezi polyelektrolyty a tenzidy. Navrhnout jednoduchou vizuální metodiku sledování separace hydrogelů v systému hyaluronan–kationtový tenzid a využít ji ke konstrukci schematického fázového diagramu uvedeného systému.

### Termín odevzdání bakalářské práce: 24.5.2019:

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

-----  
Eliška Gruberová  
student(ka)

-----  
prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.  
vedoucí práce

-----  
prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.  
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2019

-----  
prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.  
děkan

## **ABSTRAKT**

Tato práce se zabývá prozkoumáním fázové separace v systému hyaluronan-kationtový tenzid v modelu fyziologického roztoku 0,15 M NaCl vedoucí ke vzniku gelu. K tvorbě gelu byly použity nejčastěji využívané koncentrace hyaluronanu a široké rozmezí koncentrací tenzidu a bylo zkoumáno, za jakých podmínek vznikne největší množství kompaktního gelu. Bylo zjištěno, že v celém rozmezí koncentrací dochází k fázové separaci. Největší množství gelu se tvořilo při nejvyšší koncentraci jak hyaluronanu, tak tenzidu. Výsledky byly zaznamenány do přehledných grafů. K indikaci přítomnosti micelárních útvarů bylo použito hydrofobní barvivo a výsledky byly zaznamenány do schématického fázového diagramu.

## **ABSTRACT**

This bachelor's thesis deals with phase separation of the hyaluronan-cationic surfactant system in a model physiological solution of 0,15 M NaCl resulting in gel formation. The most widely used concentrations of hyaluronan and a wide range of surfactant concentrations was used to form the gel. We have investigated under which conditions the greatest amount of compacted gel was produced. It has been found that phase separation occurs over the entire concentration range. The largest amount of gel was formed at the highest concentration of both hyaluronan and surfactant. The results were plotted in well-arranged graphs. A hydrophobic colorant was used to indicate the presence of micellar formations and the results were depicted in a schematic phase diagram.

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

hyaluronan, cetyltrimethylamonium bromid, Septonex, karbethopendecinium bromid, interakce hyaluronan-kationtový tenzid, hydrogely, fázový diagram

## **KEYWORDS**

hyaluronan, cetyltrimethylammonium bromide, Septonex, carbethopendecinium bromide, interactions between hyaluronan and cationic surfactants, hydrogels, phase diagram

GRUBEROVÁ, Eliška. Hydrogely hyaluronan-tenzid - fázový diagram. Brno, 2019. Dostupné také z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/115260>. Bakalářská práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav fyzikální a spotřební chemie. Vedoucí práce Miloslav Pekař.

## **PROHLÁŠENÍ**

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně a že všechny použité 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 mojí bakalářské práce prof. Ing. Miloslavu Pekařovi, CSc. za odborný dohled, cenné rady, komentáře a připomínky. Dále bych chtěla poděkovat své mamince za korektury a Království Chemiček za neocenitelnou podporu.

## OBSAH

1	ÚVOD .....	7
2	TEORETICKÁ ČÁST.....	8
2.1	Gely .....	8
2.1.1	Rozdělení gelů.....	8
2.1.2	Vznik .....	8
2.1.3	Vlastnosti.....	9
2.1.4	Hydrogely.....	9
2.1.4.1	Využití hydrogelů.....	9
2.2	Tenzidy .....	10
2.2.1	Struktura .....	10
2.2.2	Typy tenzidů.....	11
2.2.3	Agregace a tvorba micel.....	12
2.2.4	Solubilizace .....	12
2.2.5	CTAB .....	13
2.2.6	Karbethopendecinium bromid.....	14
2.3	Polymery .....	14
2.3.1	Základní pojmy .....	14
2.3.2	Konstituce makromolekul .....	15
2.3.3	Dělení polymerů.....	15
2.4	Polyelektrolyty .....	16
2.4.1	Interakce polyelektrolytů s tenzidy .....	16
2.4.2	Interakce hyaluronan-kationtový tenzid.....	17
2.4.3	Hyaluronan.....	18
2.4.3.1	Historie .....	18
2.4.3.2	Struktura .....	18
2.4.3.3	Síťování .....	19
2.4.3.4	Chování v roztoku .....	20
2.4.3.5	Syntéza .....	21
3	SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY .....	22
4	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	24
4.1	Materiály .....	24
4.2	Příprava zásobních roztoků a vzorků .....	24
4.3	Vyhodnocení vzorků .....	24
4.4	Rozpustnost Septonexu a CTAB.....	25
5	VÝSLEDKY A DISKUZE .....	26
5.1	Septonex.....	26

5.1.1	Vizuální charakterizace a fázový diagram .....	26
5.1.2	Hmotnost gelu .....	32
5.1.3	Obsah vody.....	33
5.1.4	Rozpustnost .....	35
5.2	CTAB .....	35
5.2.1	Vizuální charakterizace a fázový diagram .....	35
5.2.2	Hmotnost gelu .....	42
5.2.3	Obsah vody.....	43
5.2.4	Rozpustnost .....	45
5.3	Zpětná hydratace vysušených gelů .....	45
5.4	Srovnání Septonexu a CTAB .....	46
6	ZÁVĚR.....	48
7	SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ .....	49
8	SEZNAM PŘÍLOH.....	54

# 1 ÚVOD

Původní inspirace ke zkoumání interakcí hyaluronanu a kationtového tenzidu pochází od firmy Contipro, firemního partnera Fakulty chemické VUT v Brně, který měl návrh na využití tenzidů v oblasti nosičů léčiv. Tenzidy tvoří micely, do kterých se dá uzavřít léčivo, většinou hydrofobní, a toto léčivo tak dopravit až do postižené tkáně. Ale kvůli svým nepříznivým vlivům na buňky nemůže být využit samotný. Firma Contipro přišla s myšlenkou obalit tenzid hyaluronanem a snížit tak cytostatické účinky léčiva na zdravou tkáň. Systémy by bylo možné i zacílit na konkrétní oblast lidského těla nebo proti konkrétnímu typu buněk. Právě při plnění tohoto projektu bylo zjištěno, že interakcí hyaluronanu a kationtového tenzidu vznikají hydrogely. Hydrogely mají široké využití v medicínských aplikacích v oblasti tkáňového inženýrství, hojení ran nebo již zmiňované distribuce léčiv.

Tato bakalářská práce se zabývá zkoumáním fázové separace v systému hyaluronan-kationtový tenzid Septonex a CTAB. Oba tenzidy jsou hojně používány na pracovišti Fakulty chemické VUT v Brně, ale Septonex ještě nebyl použit pro zkoumání fázového chování. Hlavní rozdíl mezi Septonexem a CTAB je struktura polární hlavičky. Septonex se od CTAB odlišuje přítomností ethoxykarbonylové skupiny v blízkosti trimethylamoniové skupiny a má hydrofobní řetězec složený z 15 uhlíkových atomů. K tvorbě hydrogelů byly použity nejvíce využívané koncentrace hyaluronanu a široké rozmezí koncentrace tenzidu a nás zajímá, za jakých podmínek vznikne největší množství kompaktního gelu. Výsledkem je schématický fázový diagram, který znázorňuje fázové chování tohoto systému za konstantního tlaku a teploty. Fázové chování je definováno pomocí hydrofobního solubilizovaného barviva a v grafu je zaznačeno pomocí barevných značek.

## 2 TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1 Gely

Jako gely označujeme systémy tvořené trojrozměrnou sítí, která vytváří souvislou strukturu, prostupující celým disperzním prostředím. V důsledku uspořádání částic do trojrozměrné sítě mají gely mechanické vlastnosti charakteristické pro tuhý stav, i když je disperzní prostředí kapalné. Gely s kapalným disperzním prostředím se označují lyogely. Mezi gely můžeme také zahrnovat xerogely, které vznikají odstraněním disperzního prostředí lyogelů, tedy jejich vysušením [1].

Gely a gelace mají velký význam v lékařství (srážlivost krve způsobená zvýšením její viskozity v důsledku gelace), biologii i v průmyslových odvětvích (výroba vláken, aplikace lepidel, zpracování kůží), ve farmaceutickém průmyslu (gelové kapsle), ve sklářském a keramickém průmyslu a také v potravinářství [1].

#### 2.1.1 Rozdělení gelů

Gely je možné rozdělovat podle řady hledisek. Podle chemického složení disperzního prostředí je dělíme na anorganické a organické, podle charakteru disperzního prostředí na hydrogely (vodné prostředí), organogely (organická kapalina) a izogely (disperzní prostředí je monomerním disperzním podílu – polystyren ve styrenu). Nejčastěji ale bývají klasifikovány podle chování ve vysušeném stavu [1].

**Reverzibilní** gely jsou gely, které po vysušení zmenší svůj objem, dávají kompaktní xerogely a jsou schopny přecházet do původního stavu bobtnáním, tj. přijímáním disperzního prostředí nebo jiných kapalin [1, 2].

**Irreverzibilní** gely jsou sice schopny stykem s disperzním prostředím přijmout určité množství kapaliny, ale lyogel nevznikne. Ve vysušeném stavu mají přibližně stejný objem jako původní lyogely, ale jsou porézní [1, 2].

#### 2.1.2 Vznik

Gely vznikají vytvořením sítě makromolekulárních řetězců spojených působením sil fyzikálně nebo chemické povahy v místech, které se označují uzly nebo uzlové body. Celý proces vzniku gelu se nazývá gelace [1, 2].

Fyzikálně síťované gely vznikají spojováním úseků polymerních řetězců do uzlových oblastí působením fyzikálních sil jako van der Waalovy síly, polární síly, vodíkové vazby. Lze je připravit změnou fyzikálních podmínek ve vzorku. Změnou teploty mohou vznikat termoreverzibilní hydrogely na bázi agarózy, změnou pH hydrogely huminových kyselin nebo se využívá omezená rozpustnost některých látek v různých rozpouštědlech [1, 3].

Kovalentně nebo-li chemicky síťované gely vznikají chemickou reakcí. Gel představuje nekonečnou trojrozměrnou síťovou strukturu, tvořenou chemickými vazbami, která vzniká nelineární kondenzační nebo adiční polymerací monomerů nebo z lineárních polymerů zesíťováním za přítomnosti síťovacího činidla. Na rozdíl od fyzikálně síťovaných gelů mají pevnější uzly, větší mechanickou odolnost a rigidnější strukturu [1, 3].

Gely mohou také vzniknout procesem zvaným bobtnání, kdy gel ve vysušeném stavu (xerogel) je schopen přijmout velké množství disperzního prostředí. Objem i hmotnost se přitom zvětšují. Tento proces jde realizovat pouze u reverzibilních gelů [2, 3].



Gelace roztoků vysokomolekulárních látek má různý průběh při různých podmínkách. Zvýšení teploty obvykle brání vzniku gelu, pokud nedochází k nevratným chemickým změnám. Naopak snížení tvorbu gelu podporuje. Na teplotě je úměrně závislá intenzita tepelných pohybů jednotlivých segmentů a to má vliv na počet i dobu trvání vazeb mezi makromolekulami. Se zvýšením počet i doba klesají, se snížením stoupají. Gelaci napomáhá vzrůst koncentrace, protože se zvětšuje počet vazeb kvůli častějším srážkám makromolekul. Zanedbatelný není ani vliv mechanických podmínek nebo vliv pH roztoku, gely vznikají nejlépe při pH odpovídajícímu jejich izoelektrickému bodu [1].

### 2.1.3 Vlastnosti

Gel se od určité hodnoty tečného napětí chová jako elastické tuhé těleso. Tato hodnota závisí na koncentraci uzlů a jejich pevnosti. Čím více vazeb mezi řetězci, tím menší možnost změny tvaru makromolekuly tím rigidnější je prostorová síť. Reverzibilní gely s kovalentními spoji jsou obvykle označovány jako elastické. U některých gelů je možné protřepáním ho převést na sol a po určité době stání v klidu opět na gel. Tento jev se nazývá tixotropie, mechanickými účinky se ruší slabé vazby a odpočinkem se opět obnovují [1, 2].

Obsahuje-li disperzní prostředí disociované nízkomolekulární elektrolyty, jsou gely elektricky vodivé. Malé molekuly a ionty se pohybují disperzním prostředím stejně rychle jako v solu. Elektrická vodivost zůstává stejně vysoká, také difuzivita nízkomolekulárních látek v gelu je jen o něco menší, i přes prudký vzrůst viskozity soustavy [2].

Čerstvé gely nejsou v termodynamické rovnováze, proto dochází k řadě samovolných pochodů. Zdokonaluje se struktura přeskupováním řetězců, což má za následek snížení Gibbsovy energie. Tento děj se nazývá stárnutí gelu. Může dojít ke smrštění síťové struktury, pokud se zvýší počet uzlů. Nastává synerge, tedy vytlačování kapaliny, pro kterou už není v gelu místo. Tento jev je podporován zvýšením teploty nebo přidávkem elektrolytu [1].

### 2.1.4 Hydrogely

Hydrogely jsou trojrozměrné sítě hydrofilních polymerů a vody, která vyplňuje místa mezi makromolekulami [4]. Mohou absorbovat velké množství vody od 10% až do tisícínásobků jejich hmotnosti ve vysušeném stavu, aniž by se rozpouštěly [5]. Jako první jsou hydratovány polární skupiny (hydroxylové, karboxylové, amidické, sulfinické) i přes vodíkové můstky nebo iontové interakce. Takto se absorbuje primárně vázaná voda. Po hydrataci polárních skupin se zvětší prostorová síť a tím se odhalí hydrofobní skupiny. Ty interagují s vodou a dojde k navázání sekundární vody [5, 6].

Přirozeně se vyskytují jako polymerní sítě želatiny nebo kolagenu, ale mohou být i uměle syntetizovány chemicky i fyzikálně [7]. Chemicky síťované gely, označují se jako permanentní hydrogely, mají pevnější vazby, ale jejich příprava často vyžaduje přítomnost toxických látek a tedy nejsou vhodné pro použití v medicínských aplikacích. Fyzikálně síťované gely jsou pro tyto aplikace vhodnější [5].

#### 2.1.4.1 Využití hydrogelů

Hydrogely jsou velice slibné biomateriály, protože vykazují dobrou biokompatibilitu a biodegradabilitu při kontaktu s tkání a tělními tekutinami. Největší využití nachází

v biomedicině jako nosiče léčiv, biosenzory a jako scaffoldy v tkáňovém inženýrství. Běžně jsou používány pro výrobu kontaktních čoček, obvazů a superabsorbentů [7].

V tkáňovém inženýrství se klade zvláštní důraz na biodegradabilitu hydrogelu. U materiálů aplikovaných jako kloubní náhrady je potřeba, aby materiál vydržel co nejdelší dobu a po tu dobu si uchoval stejné vlastnosti. Na druhou stranu u materiálů aplikovaných např. jako vstřebatelné stehy je doba degradace stanovena tak, aby se materiál odboural až po srůstu kůže. Hydrogely v tkáňovém inženýrství využíváme nejčastěji jako scaffoldy pro růst kmenových buněk na stanoveném místě. Slouží jako vhodné prostředí s optimálním pH, vlhkostí a vhodnou stavbou pro růst buněk [3].

Hydrogely nemusí být jen pasivním scaffoldem, ale mohou aktivně přispívat k léčbě jako matrice pro kontrolované uvolňování léčiv. Principem kontrolovaného uvolňování léčiv je postupné uvolňování léčiva tak, aby se prodloužila doba účinku léčiva a snížily jeho potenciální negativní účinky. Je možné systémy zacílit na konkrétní oblast lidského těla nebo proti konkrétnímu typu buněk. Ze struktury hydrogelu se léčivo může uvolnit dvěma způsoby. Prostou difuzí biologicky aktivní látky z hydrogelu do pacientovy tkáně nebo degradací struktury hydrogelu, což v důsledku vede k uvolnění biologicky aktivní molekuly ze struktury nosiče. První způsob je uplatňován častěji, ale vytváří to problém odstranění prázdných systémů z těla pacienta, proto je žádoucí jistá míra biodegradability nosiče [3].

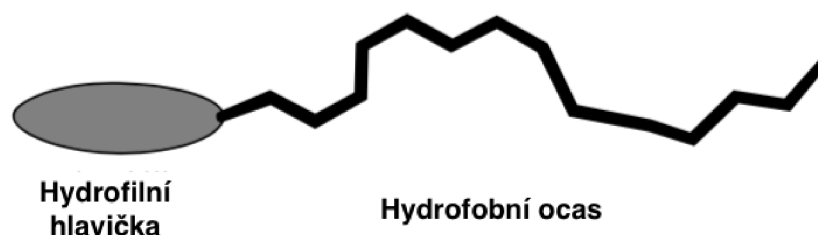
## 2.2 Tenzidy

Tenzidy jsou povrchově aktivní organické látky (PAL), které jsou schopné se hromadit při nízké koncentraci na fázovém rozhraní a tím snižují mezifázovou energii soustavy [8]. V nízkých koncentracích se tenzidy chovají jako pravé roztoky, nachází se jako volné molekuly v roztoku, se vzrůstající koncentrací se začínají hromadit na mezifázovém rozhraní a při úplném nasycení povrchu dochází k dosažení kritické micelární koncentrace [9].

Vlastnosti tenzidů jsou dány existencí micel. Schopností snižovat povrchové napětí rozpouštědel je usnadněno smáčení povrchu a odstraňování nečistot. V jejich přítomnosti je možné rozpouštění látek nerozpustných nebo málo rozpustných ve vodě (solubilizace). Tenzidy mají výrazné pěnicí a emulgační schopnosti. Stabilizují disperzní systémy a celkově ovlivňují fyzikálně-chemické vlastnosti materiálů [10].

### 2.2.1 Struktura

Tenzidy mají amfifilní strukturu. Jedná se o bipolární strukturu, tzn. obsahuje dvě části. Jedna z nich je rozpustná v daném prostředí (lyofilní) a druhá je nerozpustná, tvořená uhlovodíkovým řetězcem (lyofobní). Pokud se jedná o PAL ve vodním prostředí, je molekula složená z hydrofilní, polární části – hlavičky a z hydrofobní, nepolární části – ocasu. Schématické znázornění struktury tenzidu je na Obr. 1 [9].



Obr. 1: Schématické znázornění amfifilní struktury tenzidu [9].

## 2.2.2 Typy tenzidů

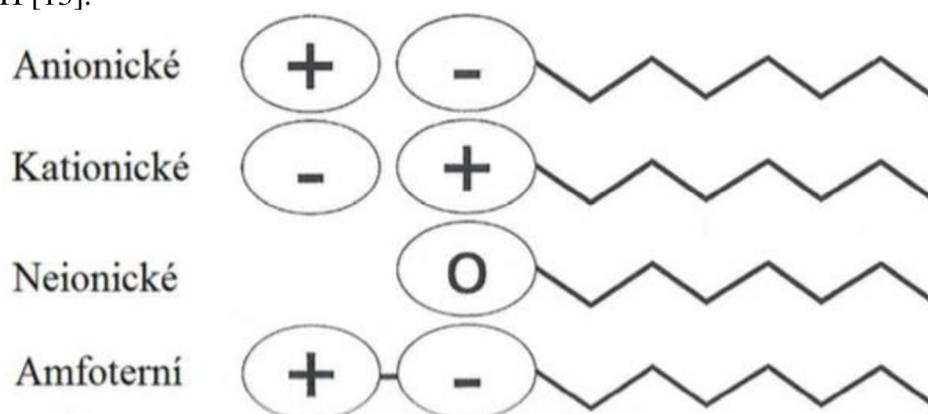
Tenzidy je možné dělit dle různých kritérií, například podle názvosloví organických sloučenin, hydrofilně-lipofilní rovnováhy nebo podle typu hydrofobní složky. Mezi nejčastější patří dělení podle typu hydrofilní složky [11]. Ta určuje iontový charakter dané látky (Obr. 2), principem je schopnost hydrofilní skupiny ve vodných roztocích disociovat na ionty. Podle tohoto kritéria rozlišujeme následující tenzidy [12]:

**Aniontové tenzidy** (ionické tenzidy) patří mezi historicky nejstarší a nejpoužívanější PAL. Nositelem povrchové aktivity je anion a jako protionty se nejčastěji uplatňují sodné, draselné nebo amonné kationty. Rozdělujeme je podle charakteru polární skupiny na PAL s karboxylovou skupinou (mýdla), sulfáty, sulfonáty a minoritní tenzidy s jinými skupinami. Nacházejí uplatnění v hygienických prostředcích díky výborným čistícím účinkům a také jako smáčedla, emulgátory a detergenty [13].

**Kationtové tenzidy** (ionické tenzidy) jsou sloučeniny s jednou nebo více funkčními skupinami, které ve vodných roztocích disociují na kladně nabitě organické ionty, které jsou nositeli povrchové aktivity [12]. Je pro ně v molekule typická přítomnost dusíku, nejčastěji se využívá PAL na bázi aminů a kvarterní amoniové soli [13]. S aniontovými tenzidy tvoří ve vodě nerozpustné komplexy [14]. Mají dezinfekční účinky, jsou horší detergenty než jiné typy PAL, využívají se jako antistatické přípravky, inhibiční prostředky koroze, textilní změkčovadla a vlasové kondicionéry [13].

**Amfoterní tenzidy** (ionické tenzidy) se dále dělí na klasické a zwitterionické tenzidy. Klasické se chovají jako amfolyty, tedy náboj obou skupin je závislý na pH prostředí. V alkalickém prostředí dochází ke ztrátě náboje u bazické skupiny, v kyselém prostředí u skupiny kyselé. Zwitterionické tenzidy mají kladný náboj představovaný kvartérní amoniovou solí v celém rozmezí pH a po jeho odstranění by nastala destrukce struktury molekuly. Náboj kyselé karboxylové skupiny je závislý na pH prostředí [11]. Optimální povrchová aktivita amfoterních tenzidů je v oblasti neutrálního pH, využívají se proto společně ve spojení s jinými tenzidy v kosmetických prostředcích (šampony, sprchové gely, pěny do koupele) [14].

Hydrofilní část **neionických tenzidů** není schopná disociace. Je tvořena větším množstvím kyslíkatých můstků, hydroxylových skupin nebo jejich kombinací. Od ionických tenzidů se liší rozpustností a závislostí na teplotě. Výhodou je, že jejich povrchová aktivita není závislá na hodnotě pH [13].

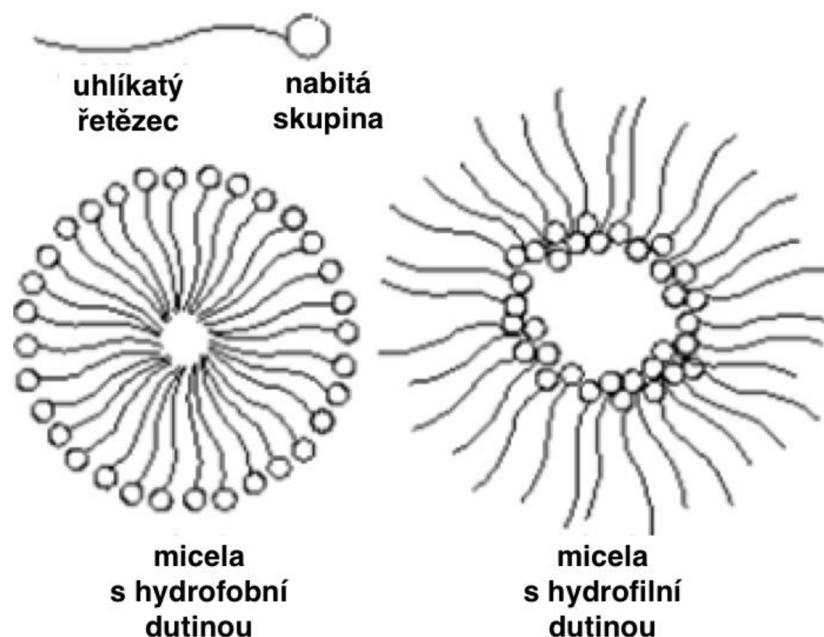


Obr. 2: Schéma různých typů tenzidů dle typu hydrofilní složky [15].

### 2.2.3 Agregace a tvorba micel

Další charakteristickou vlastností tenzidů, kromě jejich tendence adsorbovat na fázovém rozhraní, je jejich agregace v roztoku. Je to důsledek toho, že po nasycení fázového rozhraní se tenzidy na něm dále nehromadí, ale vzhledem k jejich bipolárnímu charakteru se stále snaží snížit energii systému a to například zrušením kontaktu hydrofobních skupin s vodou. Vzniklé agregáty se označují jako micely, jejich charakter závisí na okolním prostředí. Micely vznikají již při nízkých koncentracích tenzidu ve vodě. Koncentrace, při které ke vzniku micel dochází, se nazývá kritická micelární koncentrace (CMC). Je to nejvyšší možná koncentrace, při které se tenzidy vyskytují v roztoku v molekulové formě [9, 1].

Micela je koloidní částice, která zaujímá takovou strukturu, aby interakce s okolním rozpouštědlem byla energeticky výhodná. Aby bylo dosaženo minimálního styku mezi molekulami vody a hydrofobní části molekuly, je ve vodném prostředí jádro micely tvořeno propletenými uhlovodíkovými řetězci tenzidu a hydrofilní část rozmístěna na povrchu. V nepolárním prostředí je uspořádání micely opačné, jádro je tvořeno hydrofilní částí a hydrofobní část je rozmístěna na povrchu. (Obr. 3). Základní příčinou vzniku agregátů z uhlovodíkových řetězců ve vodných roztocích je velikost kohezních sil mezi molekulami vody, které jsou vyšší než vzájemná přitažlivost uhlovodíkových řetězců i přitažlivost mezi molekulami vody a uhlovodíkovými řetězci. S vytěšňováním uhlovodíkových řetězců z roztoku molekulami vody je spojen pokles Gibbsovy energie soustavy [1].



Obr. 3: Struktura micely v odlišných prostředích [16].

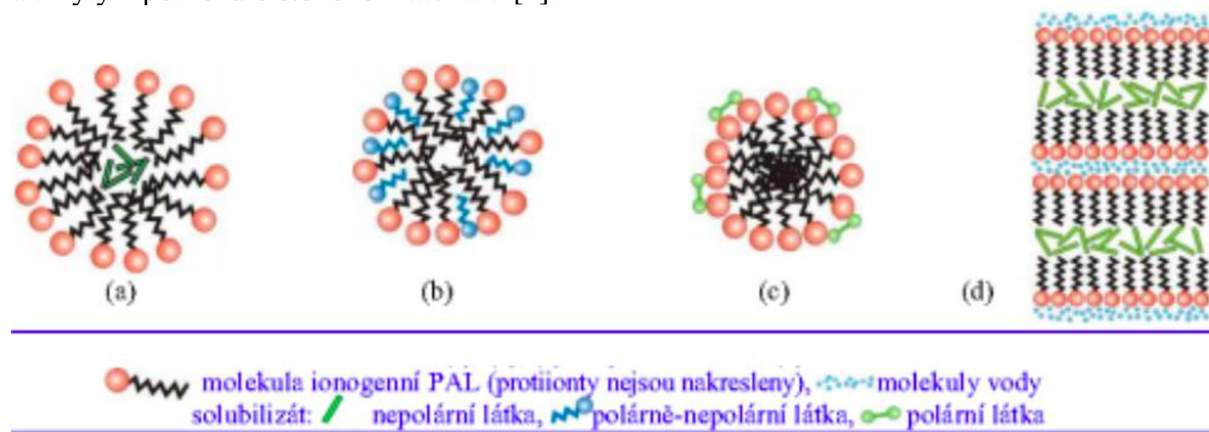
### 2.2.4 Solubilizace

Solubilizace je schopnost rozpouštět látky v čistém disperzním prostředí nerozpustné. Může k ní docházet až po vzniku micel ve vodném roztoku, mechanismus může být různý. Nepochopitelně látky se rozpouštějí v jádru micely, polárně-nepolární organické látky jsou umístěny podobně

jako molekuly tenzidu. Uhlovodíkové řetězce směřují dovnitř micel a polární část ven z micel, do vodné fáze. Polární látky se solubilizují na povrchu nebo v těsné blízkosti povrchu micely. V laminárních micelách dochází k oddálení vrstev molekulových řetězců, protože organická látka se rozmisťuje mezi uhlovodíkové konce molekuly (Obr. 4) [1].

Hmotnost micel při solubilizaci roste v důsledku zabudování molekul solubilizátu do micely. Se solubilizací se zvětší objem hydrofobního jádra, musí se tedy zvětšit i počet molekul tenzidu tvořících micely [1]. Solubilizace stoupá se zvyšující se CMC, koncentrací tenzidu, zvětšující se velikostí micel, u anionických tenzidů stoupá s délkou uhlovodíkového řetězce. Elektrolyty solubilizaci jak podporují, tak omezují [12].

Solubilizace se využívá ve farmaceutickém (nosiče nepolárních léčiv pro národovou terapii) a kosmetickém průmyslu, při výrobě herbicidů, insekticidů a fungicidů. V praxi se nejčastěji setkáme s využitím solubilizace při detergentci, praní znečištěných povrchů působením PAL, u kosmetických a pracích prostředků. Mastné nečistoty jsou uzavřeny uvnitř micel detergentů a smyty z povrchu čištěného materiálu [1].

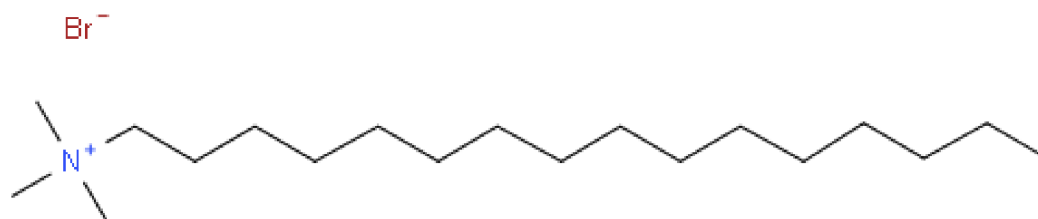


Obr. 4: Solubilizace (a), (b), (c) malými micelami, (d) laminárními micelami [1].

## 2.2.5 CTAB

Cetyltrimethylamonium bromid je kationaktivní tenzid s polární hlavičkou tvořenou kvarterní amoniovou sloučeninou a nepolárním řetězcem složeným z 16 uhlíků. Rozpouští se ve vodě a v alkoholu [17]. Název dle IUPAC je hexadexyl(trimethyl)azanium bromid [18] a jeho struktura je uvedena na Obr. 5 [19].

CTAB má mikrobicidní účinky a je využíván jako efektivní antiseptické činidlo proti mikroorganismům. Používá se také k separaci a čištění DNA.



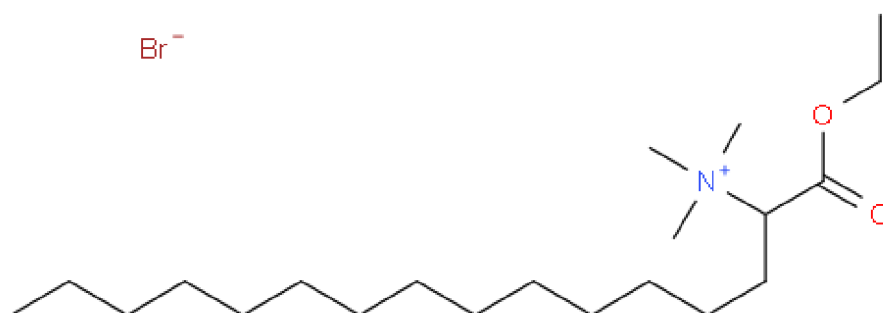
Obr. 5: Struktura CTAB [19].

## 2.2.6 Karbethopendecinium bromid

Karbethopendecinium bromid je kvarterní amoniová sloučenina ve formě bílého až slabě nažloutlého krystalického prášku. Snadno se rozpouští ve vodě, etanolu a chloroformu. Vodný roztok při protřepání silně pění. Název dle IUPAC je (1-ethoxy-1-oxohexadekan-2-yl)-trimethylazanium bromid, můžeme ho nalézt i pod obchodním názvem Septonex [20]. Chemický vzorec je uveden na Obr. 6 [21].

Hlavní rozdíl mezi Septonexem a CTAB je struktura polární hlavičky. Septonex se od CTAB odlišuje přítomností ethoxykarbonylové skupiny v blízkosti trimethylamoniové skupiny a má hydrofobní řetězec složený z 15 uhlíkových atomů [22].

Využívá se jako antiseptická a dezinfekční látka na kůži v okolí ran a k čištění a dezinfekci povrchů a chirurgických nástrojů [23].



Obr. 6: Struktura Septonexu [21].

## 2.3 Polymery

Polymer je makromolekulární látka, pro kterou je charakteristické mnohonásobné opakování jednoho nebo více druhů atomů nebo skupin atomů navzájem spojených ve velkém počtu chemickými vazbami. Proces přeměny monomerů na polymer se nazývá polymerizace [24].

### 2.3.1 Základní pojmy

**Polymer** jsou makromolekulární látky, jejichž molekuly se vyznačují mnohonásobným opakováním základních jednotek (merů) v jejich řetězové struktuře. Poly- obecně označuje mnohost, četnost nebo různost [25].

**Oligomer** je látka tvořená molekulami, které obsahují několik konstitučních jednotek. Fyzikální vlastnosti se přidáním nebo odstraněním jedné nebo několika jednotek změni [24].

**Konstituční jednotka** je atom nebo skupina atomů, které jsou přítomné v molekulách polymeru nebo oligomeru [24].

**Monomer** je sloučenina tvořená molekulami z nichž každá může poskytnout jednu nebo více konstitučních jednotek [24].

**Opakující se konstituční jednotka** je nejmenší konstituční jednotka, jejímž opakováním je popsán regulární polymer [24].

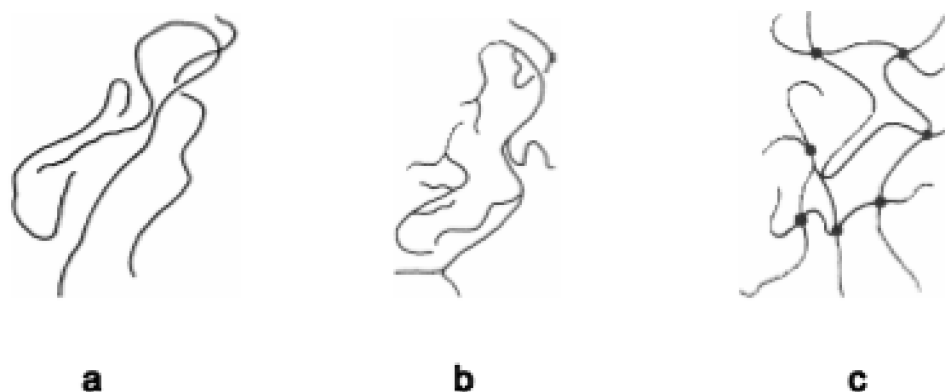
**Monomerní jednotka** je největší konstituční jednotka vznikající v průběhu polymerizace z jediné molekuly monomeru [24].

**Polymerace** je řetězová reakce velkého počtu molekul monomeru. Při této reakci se nevytváří vedlejší produkty. Chemické složení polymeru odpovídá chemickému složení

monomeru. Skládá se ze tří částí: iniciace, propagace, terminace. Mezi základní typy patří řetězové polymerace (radikálové a iontové), polykondenzace, polyadice a koordinační polymerace [24, 26].

### 2.3.2 Konstituce makromolekul

Dle konstituce makromolekul rozlišujeme polymery lineární, rozvětvené a síťované viz. Obr. 7 [27]. Makromolekuly lineárního polymeru jsou tvořeny prostými řetězci. V důsledku otáčivosti atomů zaujímají makromolekuly různé konformace, energeticky nejvýhodnější je tvar klubka. Rozvětvený polymer má k hlavním řetězcům připojené postranní a síťovaný polymer má řetězce spojené v prostorovou síť [24, 27].



Obr. 7: Polymery dle konstituce makromolekul: a – lineární, b – rozvětvené, c – síťované [27].

### 2.3.3 Dělení polymerů

Polymery lze dělit na základě různých kritérií, nejběžnější dělení polymerů je dle původu, dle druhu meru a dle náboje.

Dle původu rozlišujeme polymery přírodní (biopolymery) a syntetické:

**Biopolymery** se nachází v přírodě v těle rostlin a živočichů. Tendence tvořit makromolekuly se projevuje zejména u organických sloučenin. Uhlík obsažený v molekulách má schopnost vytvářet řetězové struktury složené z velkého počtu atomů vzájemně spojené chemickými vazbami. Mezi nejběžnější patří celulóza, škrob, bílkoviny, nukleové kyseliny nebo přírodní kaučuk [25].

**Syntetické** polymery vznikají činností člověka – chemickou syntézou. Inspirací pro jejich výrobu byla snaha o napodobení dobrých vlastností biopolymerů. Historie syntetických polymerů začíná před první světovou válkou, kdy Američan Baekeland připravil fenolformaldehydové pryskyřice [25].

Dle druhu meru rozlišujeme homopolymery a kopolymery:

Jako **homopolymery** se označují polymery jen s jedním druhem monomerních jednotek [24].

**Kopolymery** vznikají současnou polymerizací dvou nebo více monomerů. Podle rozmístění jednotlivých druhů monomerů v řetězci rozlišujeme kopolymery statické, blokové a roubované [24, 27].

Dle náboje rozlišujeme neionogenní polymery a polyelektrolyty.

Řetězce **neionogenních** polymerů nenesou žádné funkční skupiny, které by byly schopné elektrolytické disociace [28].

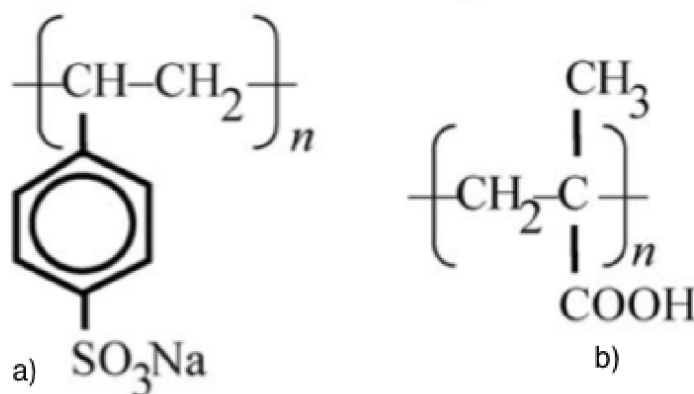
Naopak řetězce **polyelektrolytů** obsahují disociovatelné funkční skupiny.

## 2.4 Polyelektrolyty

Polyelektrolyty jsou polymery, které nesou pozitivně nebo negativně nabitě ionizovatelné skupiny. V polárních rozpouštědlech dochází k disociaci těchto skupin a vzniká makroion o velkém počtu elementárních nábojů a ekvivalentní počet protiiontů, malých iontů opačného náboje [29, 30].

Vlastnosti polyelektrolytů v roztoku závisí na zlomcích disociovaných ionizovatelných skupin, rozpustnosti polymeru, dielektrické konstantě, koncentraci soli a interakci polymeru se substrátem. Díky elektrostatickým interakcím se polyelektrolytické roztoky chovají jiným způsobem než nenabitě polymery. K síťování dochází při nižších koncentracích, osmotický tlak je vyšší, viskozita je přímo úměrná odmocnině koncentrace polymeru [29].

Mezi polyelektrolyty patří například polyakrylová a polymetakrylová kyselina a jejich soli a polystyrenulfonát sodný (Obr. 8) [29].



Obr. 8: Příklad polyelektrolytů - a) polystyrenulfonát sodný, b) polymetakrylát [29].

### 2.4.1 Interakce polyelektrolytů s tenzidy

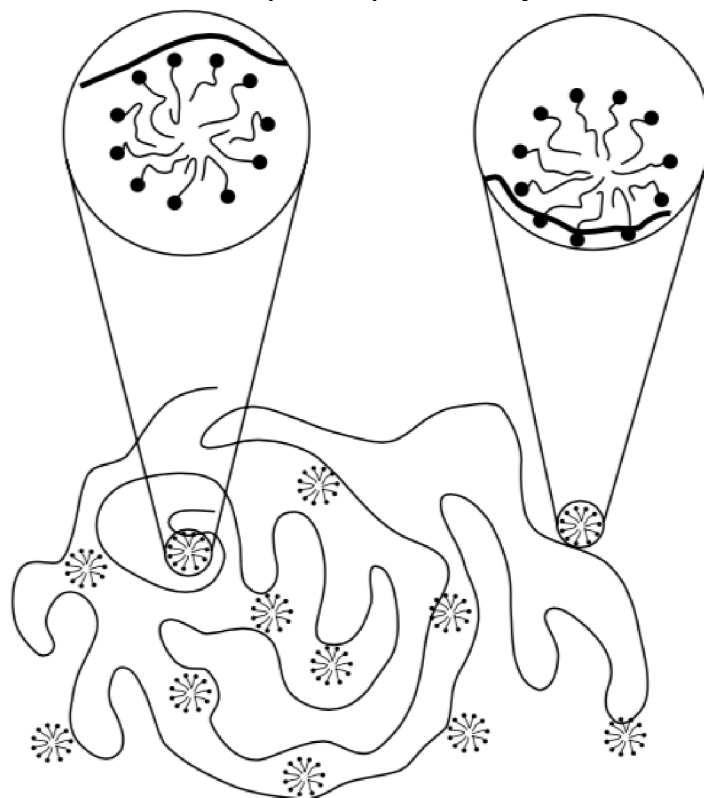
Důležitým faktorem interakcí polyelektrolytu s tenzidem jsou vlastnosti polyelektrolytu, patří mezi ně chemické složení, lineární hustota a pozice náboje a dynamika kostry polymeru [31]. Dominantní jsou elektrostatické interakce mezi nábojem polyelektrolytu a opačně nabitou hlavičkou tenzidu. V pozadí se uplatňují hydrofobní síly mezi alkyly tenzidu a hydrofobní částí polyelektrolytového řetězce [31, 32]. Díky jasně definovaným vazebním místům polyelektrolytu je formace komplexu polymer-tenzid jednodušší než u nenabitého polymeru [31]. Tyto komplexy jsou různého tvaru, velikosti, stability, s přítomností/nepřítomností uspořádaných struktur, s různými fyzikálně-chemickými vlastnostmi a možností aplikace, jsou vysoce stabilní, stechiometrické a nerozpustné ve vodě [32].

Tenzidy interagují s polymery ve formě menších agregátů po dosažení kritické agregační koncentrace (CAC), která je nižší než kritická micelární koncentrace (CMC). Při dostatečném



množství tenzidu vznikají micely navázané na polyelektrolytovém řetězci. Při příliš vysoké koncentraci dochází k tvorbě přebytku volných micel [33]. Nejvíce využívaným modelem, který zjednodušeně popisuje interakce polymer-tenzid, je model perlového náhrdelníku (Obr. 9) [9]. Využívá se jako obecný pohled na vazebné procesy v různých stádiích [34].

Komplexy mají široké využití v biologických materiálech, dodávání léčiv, povrchových modifikacích, koloidní stabilizaci a ve spoustě spotřebitelských zdravotních produktů [32].



Obr. 9: Model perlového náhrdelníku komplexu polyelektrolyt-tenzid [9].

#### 2.4.2 Interakce hyaluronan-kationový tenzid

Hyaluronan se přirozeně nachází v těle obratlovců a to je jedním z důvodů, proč je vhodným kandidátem pro medicínské aplikace. Splňuje také požadavky na biokompatibilitu a biodegradabilitu, je netoxický a stejně tak jeho degradační produkty [35].

Interakce hyaluronanu s kationovými tenzidy probíhá obdobně, jako bylo popsáno v kapitole 2.4.1. Při dosažení kritické agregační koncentrace (CAC) se molekuly tenzidu začnou vázat na řetězce a tvoří zde minimicely. Upřednostnění tenzidového kationu hyaluronanem je dáno hydrofobicitou iontu s dlouhým uhlovodíkovým řetězcem, protože se pak redukuje jeho styk s vodou. Tenzidový iont se z elektrostatického hlediska chová jako jeho hyaluronový protiiont. Díky tomu koncentrace tenzidů v okolí polyelektrolytu lokálně vzrůstá, může tak lokálně být překročena CMC a micely vznikají již při celkové koncentraci tenzidu nižší než CMC. Ale z důvodu nižší hustoty náboje na řetězci hyaluronanu jsou síly mezi ním a tenzidy slabší. Po dosažení určité koncentrace hyaluronanu a tenzidu dochází k fázové separaci a tvorbě gelu. Tyto gely je možné znovu rozpustit přidáním velkého nadbytku tenzidu

či zvýšením iontové síly roztoku. Koncentrace elektrolytu potřebná pro zabránění vzniku fázové separace se nazývá kritická koncentrace elektrolytu (CEC) [36, 37, 38, 39].

### **2.4.3 Hyaluronan**

Kyselina hyaluronová (HyA), neboli sodná sůl kyseliny hyaluronové (hyaluronan, NaHy) je přirozeně se vyskytující vysokomolekulární polysacharid, který se skládá z opakujících disacharidových jednotek N-acetyl-D-glukosamin a D-glukoronové kyseliny [40]. Primárně se vyskytuje v extracelulární matrici [35] a hraje důležitou roli při lubrikaci, sorpci a zadržování vody a také u řady buněčných funkcí [22]. Je jednou z nejvíce hydrofilních molekul a může být popsána jako přírodní hydratační látka [35]. V lidském těle se hlavně vyskytuje v pojivových tkáních, jako je oční sklovina, pupeční šňůra a synoviální tekutina. Proto je hyaluronan atraktivním stavebním materiálem pro přípravu biokompatibilních a biodegradabilních materiálů, které by mohly být uplatněny v tkáňovém inženýrství, dávkování léků nebo kosmetice [22].

#### **2.4.3.1 Historie**

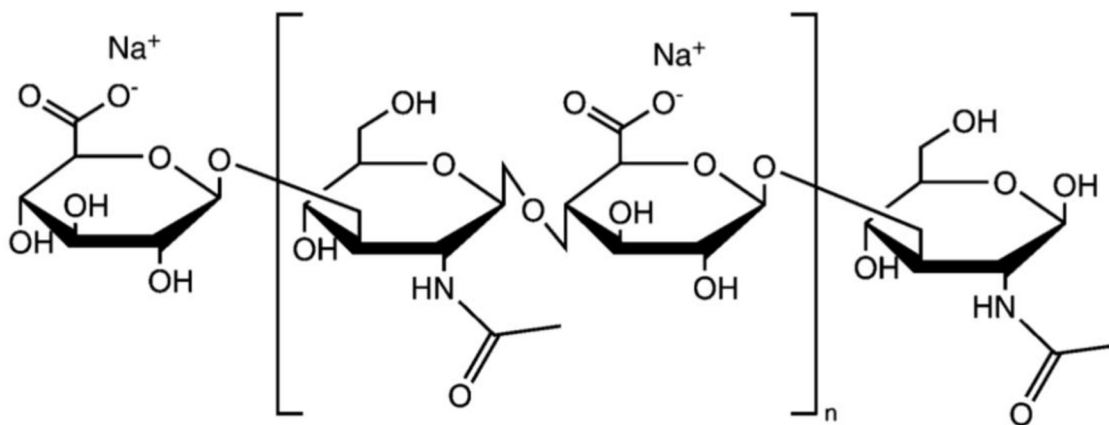
V roce 1934 Karl Meyer a jeho kolega John Palmer izolovali dříve neznámou chemickou látku ze skloviny kravského oka. Zjistili, že látka obsahuje dvě molekuly cukru, z nichž jedna byla kyselina uronová. Navrhli pro ni název kyselina hyaluronová (z řeckého „hyalos“ pro sklo + kyselina uronová) [35].

Komerčně byla kyselina hyaluronová poprvé využita v roce 1942, kdy Endre Balazs požádal o patent na použití hyaluronan jako náhražku vaječných bílků v pekařských výrobcích. První medicínskou aplikací u člověka byla náhrada oční skloviny koncem padesátých let 20. století. Použitý hyaluronan byl izolován z lidské pupeční šňůry, krátce poté už ve vysoce čisté a vysokomolekulární formě z kohoutích hřebínků [35].

Termín „hyaluronan“ byl zaveden v roce 1986 v souladu s mezinárodní nomenklaturou polysacharidů a je připisován Endre Balazsovi, který poprvé vytvořil všechny formy, které molekula může zaujmout – kyselina hyaluronová a její soli, jako je hyaluronan sodný, který se zformuje při fyziologickém pH [35].

#### **2.4.3.2 Struktura**

Struktura hyaluronanu byla popsána Karlem Meyerem v 50. letech minulého století. Jedná se o záporně nabitý, lineární nerozvětvený glykosaminoglykan tvořený opakujícími se disacharidovými jednotkami N-acetyl-D-glukosamin a D-glukoronová kyselina vzájemně spojenými střídavými  $\beta$ -1,4 a  $\beta$ -1,3 glykosidickými vazbami (Obr. 10). Polárnější postranní řetězce tvořené objemnými skupinami (hydroxylovými, karboxylovými) jsou ve sféricky výhodnější ekvatoriální pozici, zatímco nepolární vodíkové atomy zaujímají sféricky méně příznivé axiální polohy. Toto uspořádání přispívá k vysoké energetické stabilitě [35], která ovlivňuje chování kyseliny hyaluronové ve vodných roztocích a k hydrofobně-hydrofilnímu charakteru [41].



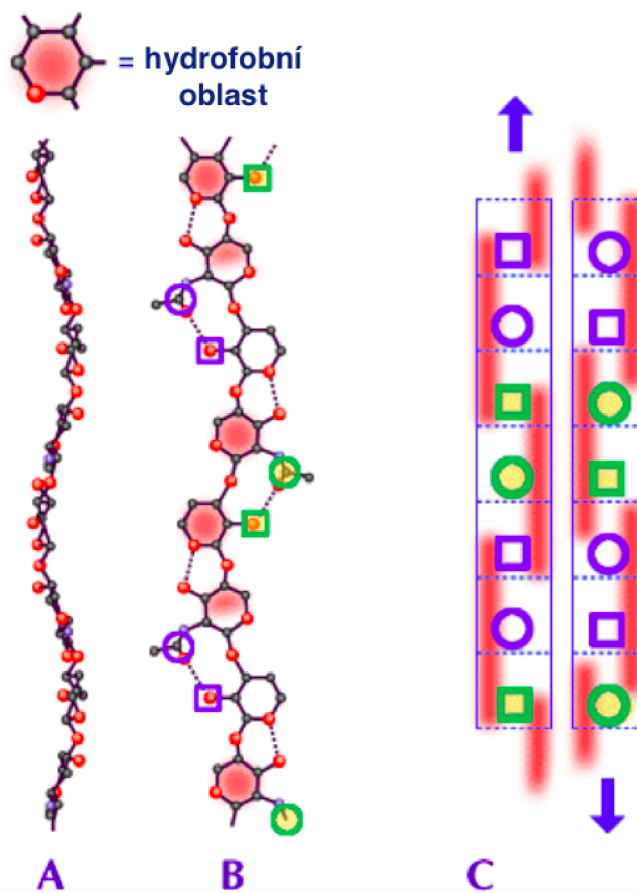
Obr. 10: Chemická struktura kyseliny hyaluronové [42].

Primární struktura, jak již bylo popsáno, je tvořena střídajícími se disacharidovými jednotkami s až pěti vodíkovými vazbami mezi dvěma sousedními disacharidy. Sekundární strukturu tvoří pásová dvojitá šroubovice tvořená stočenými disacharidovými jednotkami, které jsou vůči sobě pootočený o úhel  $180^\circ$  [43]. Toto uspořádání se nazývá „two-fold helix“ neboli dvakrát stočená šroubovice [44]. Terciární struktura je stabilizována interakcemi hydrofobní části a přítomností intramolekulárních vodíkových vazeb [43].

K rostoucímu řetězci jsou pomocí enzymů syntézy hyaluronanu střídavě přidávány disacharidové jednotky N-Acetyl-D-glukosamin a D-glukoronová kyselina za použití aktivovaných nukleotidových cukrů (UDP-glukuronát a UDP-N-acetylglukosamin) jako substrátů. V dokončené molekule hyaluronanu může počet opakujících se disacharidových jednotek dosáhnout 10 000 a více s molekulovou hmotností přibližně 4 miliony daltonů (každý disacharid přibližně 400 daltonů). Průměrná délka disacharidu je 1 nm, tedy molekula hyaluronanu o 10 000 jednotek by mohla po natažení dosáhnout délky 10  $\mu\text{m}$ , délky přibližně stejné jako průměr lidského erytrocytu [35].

#### 2.4.3.3 Sít'ování

Hyaluronan má schopnost agregovat sám se sebou a to díky vazbám mezi hydrofobními oblastmi. Sekundární struktura má tvar ploché rovinné stuhly a agregáty mohou růst z obou stran. Je to způsobené zajímavými vlastnostmi sekundární struktury, obě strany stuhly jsou identické, ale jedna strana běží v protisměru druhé, jsou antiparalelní. Silná elektrostatická repulze, která vzniká mezi řetězci – polyaniony, je vyvážena hydrofobními interakcemi i vodíkovými můstky mezi karboxylovými a acetamidovými skupinami (Obr. 11) a díky tomu nedochází k disociaci agregátů [45].



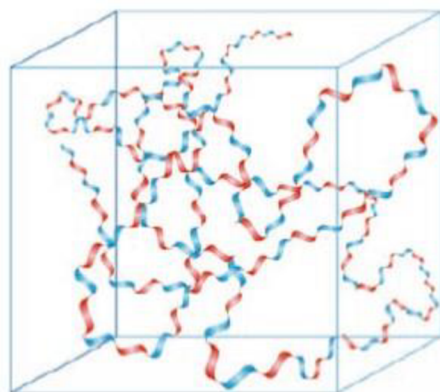
Obr. 11: A a B představují molekulu hyaluronanu. Hydrofobní oblasti jsou označeny červeně, čtverce představují kyseliny a kruhy acetamidové skupiny. C znázorňuje možnost dvojnásobného antiparalelního řetězce hyaluronanu. Sacharidová jednotka je ohraničena tečkovanou čarou [45].

#### 2.4.3.4 Chování v roztoku

V roztocích molekula hyaluronanu obsahuje disociované karboxylové skupiny, které dávají každé opakující se jednotce negativní náboj, což je důvodem proč je hyaluronan pospán jako negativně nabitý elektrolyt [22]. Ve fyziologickém roztoku se řetězce polymeru vzájemně proplétají do náhodně uspořádaného, tuhého, statického klubka již za nízkých koncentrací. Vzniklá klubka jsou schopna na sebe vázat až tisícinásobně více vody, než je jejich hmotnost. Chování řetězce molekuly hyaluronanu v roztoku je ovlivněno několika faktory, chemickou strukturou výchozího disacharidu, působením vnitřních vodíkových vazeb a jeho interakcemi s rozpouštědlem.

Axiální vodíkové atomy vytvářejí nepolární, relativně hydrofobní část molekuly, zatímco boční řetězce tvoří polární, hydrofilní část. To má za následek zformování struktury tzv. stočené stuhly, která je znázorněna na Obr. 12 [46].

Roztoky hyaluronanu vykazují neobvyklé reologické vlastnosti, jsou velmi hydrofilní a dobrými lubrikanty. Hyaluronan se chová jako pseudoplastický materiál vykazující viskoelastické vlastnosti, viskozita roztoků závisí na působícím smykovém napětí [35].



Obr. 12: Struktura hyaluronanu v roztoku – struktura stočené stuhly. Modrá barva představuje hydrofilní a červená hydrofobní část [46].

#### 2.4.3.5 Syntéza

Existují dva hlavní způsoby výroby hyaluronanu, mikrobiální a extrakce z živočišných zdrojů. Nejpoužívanějšími živočišnými zdroji byly pro laboratorní účely prasečí kůže, osrdečnicková tekutina králíků a žraločí chrupavka, pro průmysl kohoutí hřebínky, pupeční šňůra a oční sklivec hovězího dobytka [47]. Od způsobu přípravy z biologických zdrojů se ale upustilo kvůli jeho náročnosti a riziku kontaminace výchozí surovinou živočišného původu (bakteriální endotoxiny, chondroitin sulfát, nukleové kyseliny, NaCl, těžké kovy) [43, 47]. V posledních době je kyselina hyaluronová získávána především moderními biotechnologickými postupy [43].

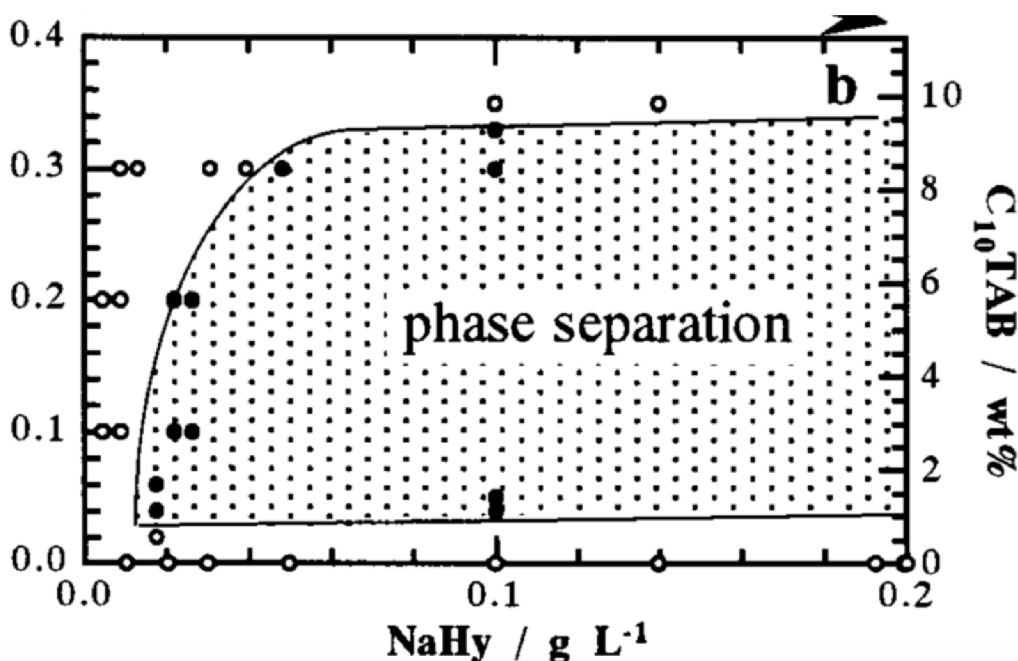
První průmyslově používanou metodou přípravy hyaluronanu pro farmaceutické účely byla extrakční metoda. Postup spočíval ve zmrazení suroviny, tedy pupeční šňůry nebo kohoutích hřebínků, aby došlo k rozrušení buněčné membrány. Dále byla surovina rozřezána na malé kousky, kyselina hyaluronová extrahována vodou a vysrážena organickými rozpouštědly (chloroform, ethanol, cetylpyridinium chlorid). Výsledný produkt byl přečištěn a bylo upraveno jeho pH, zbytkové nečistoty byly 0,5% proteiny, výtěžnost konečného produktu byla až 0,9 g·kg<sup>-1</sup> původního materiálu [43].

V současnosti jsou využívány biotechnologické postupy výroby hyaluronanu. Hyaluronan je syntetizován jako extracelulární kapsule patogenních streptokoků skupiny A a C (*Streptococcus equi*, *Streptococcus zooepidemicus*, *Streptococcus pneumoniae*) [43, 47]. Pod mikroskopem se tyto nepohyblivé bakterie jeví jako kulaté nebo oválné buňky, které jsou typicky uspořádané ve dvojicích nebo řetězcích obklopených rozlehlou extracelulární kapsulí. Kapsule brání rozpoznání bakterií imunitním systémem, chrání je před reaktivními oxidy uvolněnými bílými krvinkami a napomáhá migraci skrz epitelové vrstvy [47]. Kultivace bakterií se provádí v roztoku glukózy s obsahem kvasinek a soli při teplotě 33 °C a pH 8.5 [43]. Po fermentaci je hyaluronát sodný z kultivačního roztoku získán z média filtrací po zahřátí, následně se precipituje přidáním ethanolu. Precipitát se opět rozpustí a precipitace pomocí cetylpyridinu a ethanolu se opakuje až do úplného vyčištění. Před konečnou precipitací se provede výrobní krok, zahrnující působení aktivního uhlí pro snížení obsahu bílkovin. Konečný produkt je usušen [47].

### 3 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

Doposud byla problematika fázové separace systému hyaluronan-kationtový tenzid řešena z teoretického hlediska. Tato práce má spíše praktické zaměření. Zaměřuje se na nejčastěji používané koncentrace hyaluronanu a široké rozmezí koncentrací tenzidu a zkoumá, za jakých podmínek vznikne nejvíce kompaktního gelu. Jako tenzid byly vybrány CTAB a Septonex. Zatímco CTAB se již objevilo v některých studiích [48], se Septonexem z fázového hlediska nebyly provedeny žádné studie.

**K. Fukada a spol.** [48] ve své práci zkoumá interakce mezi hyaluronanem sodným a CTAB, zaměřuje se na fázové chování, viskozitu a na dynamický modul pružnosti ve smyku. Fázový diagram tříložkového systému NaHy-CTAB-voda při 25 °C (Obr. 13) byl vytvořen vizuálním pozorováním. Bylo zjištěno, že k fázové separaci na dvě fáze, jednu s nízkou viskozitou a druhou s vysokou koncentrací hyaluronanu, dochází, pokud je koncentrace CTAB mezi 0,03 a 0,35 M a koncentrace polymeru je vyšší než 0,05 g·l<sup>-1</sup>. Při koncentracích tenzidu vyšších než 0,35 M docházelo k „znovu rozpuštění“ sraženiny [48].

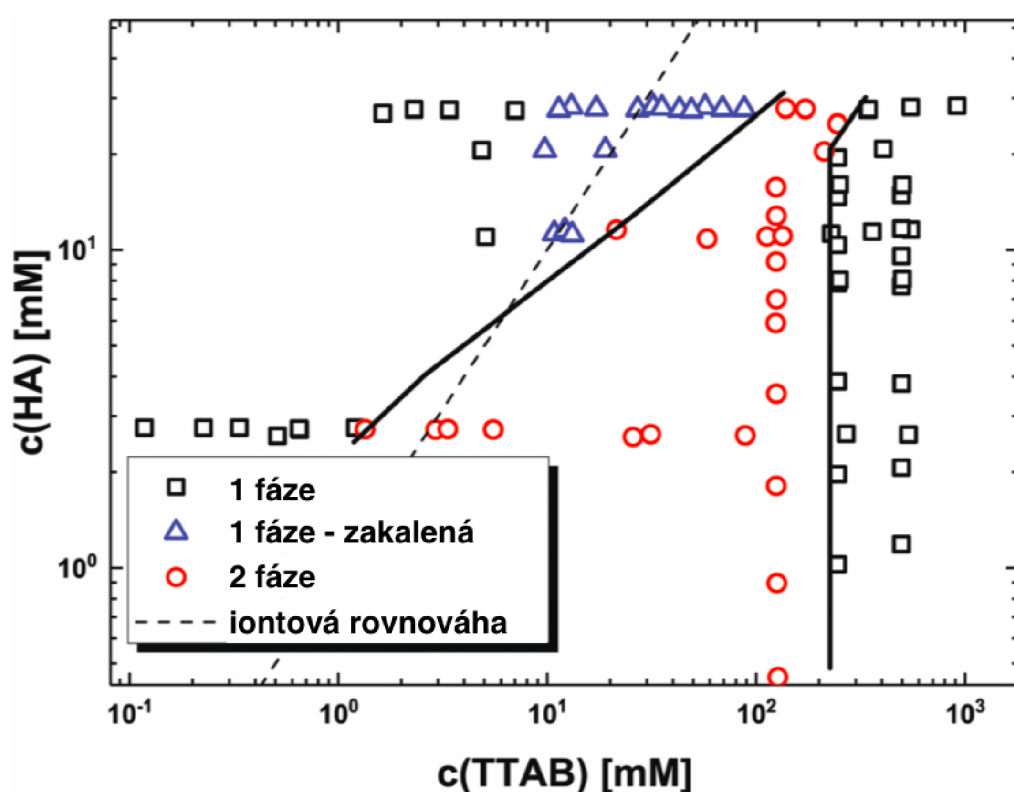


Obr. 13: Fázový diagram systému NaHy-CTAB-voda při 25 °C. Prázdné kroužky značí systém pouze s jednou fází, vyplněné kroužky ukazují dvofázové systémy [48].

**P. Buchold a spol.** [42] ve své práci řeší problematiku fázového chování komplexu hyaluronan-TTAB (tetradecyltrimethylammonium bromid). Obecně k formování komplexů u systému polyelektrolyt - opačně nabitý tenzid dochází v důsledku uvolňování protiontů a elektrostatických interakcí. Z tohoto důvodu jsou komplexy hyaluronan-TTAB citlivé na iontovou sílu roztoku a je potřeba tyto systémy studovat za přesně definovaných podmínek. Pro udržení iontové síly na stejné úrovni jako je iontová síla v extracelulární matrici byla jako rozpouštědlo zvolena sůl NaBr o koncentraci 160 mM [42].

Pro sestavení fázového diagramu (Obr. 14) bylo použito rozmezí koncentrací hyaluronanu od 1 mM do 25 mM a TTAB o koncentraci 125; 245 a 496 mM. U jednofázových roztoků

(čtverečky) bylo dosaženo homogenního roztoku po několika dnech extenzivních míchání. Roztoky byly číré s výjimkou roztoků s koncentrací hyaluronanu mezi tečkovanou čarou pro iontovou rovnováhu a spojitou čarou oddělující dvoufázové roztoky, které byly mírně zakalené (trojúhelníčky). Roztoky ležící ve dvoufázové oblasti (kolečko) byly oddělené do dvou jasně odlišitelných fází při pozorování po 48 hodinách po vytvoření. Jedna fáze byla hustý zakalený gel, který měl vysokou koncentraci hyaluronanu a druhá fáze byla kapalná fáze o stejné viskozitě jako čisté rozpouštědlo. V komplexech, kde rozpouštědlem byla čistá voda bez přídavku soli, se tvořila pevná bílá sraženina. Tyto poznatky vedly k závěru, že vysokomolekulární hyaluronan s TTAB tvoří pevnou sraženinu, která v přítomnosti soli nabobtná na hydrogel. Všechny precipitáty/gely mohou být rozpuštěny v nadbytku tenzidu i soli [42].



Obr. 14: Fázový diagram systému hyaluronan-TTAB v 160 mM NaBr při 25 °C [42].

Oba předchozí články navazovaly na práci **K. Thalberga a spol.** [9, 36, 37], který se zabýval studiem komplexů polyelektrolyt hyaluronát sodný a kationtový tenzid TTAB ve vodném prostředí. Bylo zjištěno, že polyelektrolyt a opačně nabitý tenzid silně asociují a ve vodném roztoku se dělí do dvou fází, jedné s nízkou viskozitou a druhé s vysokou viskozitou a koncentrací polymeru i tenzidu. Míra fázové separace se zvyšuje s délkou alkylového řetězce tenzidu a molekulovou hmotností polymeru. Po přídavku elektrolytu (250 mM NaBr) je fázová separace narušena, ale při vyšších koncentracích elektrolytu k fázové separaci opět dochází [9].

## 4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 4.1 Materiály

Hyaluronan	<b>HyA</b> (hyaluronan o molekulové hmotnosti 600-800 kDa), $M_w = 750$ kDa, CPN spol. s r. o., š. 241214-2-D2
Tenzid	<b>CTAB</b> , hexadecyltrimethylammonium bromide, Sigma-Aldrich, CAS 57-09-0, š. 117K0730  <b>CTAB</b> , hexadecyltrimethylammonium bromide, Sigma-Aldrich, CAS 57-09-0, š. SLBT7256  <b>Septonex</b> , karbethodecinium bromid, GNB chem, CAS 10567-02-9, š. 511SEP003
Rozpouštědlo	<b>čistá voda</b> , deionizovaná voda Milliphore: Purelab: ELGA <b>NaCl</b> , chlorid sodný, Penta s. r. o., CAS 7647-14-5, š. 2106210616
Barvivo	<b>Sudan Red G</b> , Sigma-Aldrich, CAS 1229-55-6, š. BCBN5381V

### 4.2 Příprava zásobních roztoků a vzorků

Byl nachystán zásobní roztok 0,15 M roztoku NaCl, který představuje fyziologický roztok. Dále byly připraveny zásobní roztoky hyaluronanu o koncentracích 2; 1; 0,5; 0,2; 0,1 hm. % rozpuštěním navážky v roztoku NaCl a zásobní roztoky CTAB a Septonexu v NaCl o koncentraci 0,3 M obarvené barvivem Sudan Red. Dalším rozředováním byly připraveny roztoky o koncentracích 0,25; 0,2; 0,15; 0,1; 0,075; 0,05; 0,025; 0,015; 0,01 M. Roztoky hyaluronanu byly skladovány v lednici a ostatní zásobní roztoky při laboratorní teplotě.

Při přípravě vzorků byl smíchán hyaluronan s příslušným tenzidem v poměru 1:1 (3 ml:3 ml) dle tabulky 1. Směs byla 1 min vortexována a ponechána 24 hodin stát při laboratorní teplotě bez přístupu světla. Pro každý tenzid byly vytvořeny dvě sady vzorků, jenom hyaluronan o koncentraci 0,1 hm. % byla u Septonexu přidána až pro druhou sadu vzorků, pro CTAB byly nachystány kompletní sady.

### 4.3 Vyhodnocení vzorků

Při přípravě vzorků byla zvážená prázdná vialka bez víčka, množství hyaluronanu a celý roztok. Hmotnost tenzidu byla zjištěna odečtením hmotnosti hyaluronanu od hmotnosti roztoku. Vzorky byly ponechány stát 24 hodin při laboratorní teplotě a bez přístupu světla. Po té bylo vizuálně zhodnoceno, zda se vytvořil gel a jeho barva, stejně tak byl popsán i supernatant (barva, zákal, viskozita). Vzorky byly ponechány 1 týden stát za stejných podmínek.

Po 1 týdnu byly zaznamenány změny ve vzorcích (barva, zákal) a byl zvážen celý roztok, supernatant a gel. Gely ve vialkách byly umístěny do sušárny při 50 °C, aby byl zjištěn obsah



vody v gelu. Gel byl sušen po dobu 1 týdne. Po vysušení byly gely znovu zvaženy a obsah vody byl zjištěn výpočtem.

*Tabulka 1: Příprava vzorků.*

hyaluronan [hm. %]	2,0	1,0	0,5	0,2	0,1
tenzid [M]	0,300	0,300	0,300	0,300	0,300
	0,250	0,250	0,250	0,250	0,250
	0,200	0,200	0,200	0,200	0,200
	0,150	0,150	0,150	0,150	0,150
	0,100	0,100	0,100	0,100	0,100
	0,075	0,075	0,075	0,075	0,075
	0,050	0,050	0,050	0,050	0,050
	0,025	0,025	0,025	0,025	0,025
	0,015	0,015	0,015	0,015	0,015
	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010

#### 4.4 Rozpustnost Septonexu a CTAB

Byl namíchán nasycený roztok Septonexu ve dvou vialkách (59 g/100 ml 0,15 M NaCl) a nasycený roztok CTAB ve dvou vialkách (18 g/100 ml 0,15 NaCl a 19 g/100 ml 0,15 NaCl). Vialky byly ponechány stát při laboratorní teplotě 14 dnů pro ustálení rovnováhy. Po 14 dnech byla změřena rozpustnost termogravimetricky. Jako blank byl použit 0,15 M NaCl.

## 5 VÝSLEDKY A DISKUZE

Cílem experimentální části práce je navrhnout jednoduchou vizuální metodiku sledování separace hydrogelů v systému hyaluronan-kationtový tenzid a využít ji ke konstrukci schématického fázového diagramu uvedeného systému. Fázový diagram je základní charakterizací vícesložkových systémů. Jsou jím popisovány fázové rovnováhy pomocí tlaku, objemu, teploty nebo složení. Fázový diagram určuje vztah mezi dvěma zvolenými veličinami při konstantní hodnotě ostatních veličin. Pojem fázový diagram je v této práci použit pro graf, který znázorňuje schéma fázového chování systému hyaluronan-kationtový tenzid za konstantního tlaku a teploty. Pomocí hydrofobního solubilizovaného barviva bylo definováno různé fázové chování, které je v grafu zaznačeno pomocí barevných značek. Fázový diagram se vztahuje k supernatantu.

Jak již bylo diskutováno v kapitole 3, z fázového hlediska byl zkoumán pouze CTAB, Septonex zatím ne. Oproti provedeným studiím je tato práce zaměřená více prakticky, zabývá se studiem fázového chování a podmínek, za jakých vznikne největší množství kompaktního gelu.

### 5.1 Septonex

Pro popis výsledků byla vybrána řada vzorků s hyaluronanem o koncentraci 0,5 % hm. Další grafy a obrázky byly vloženy do přílohy.

#### 5.1.1 Vizuální charakterizace a fázový diagram

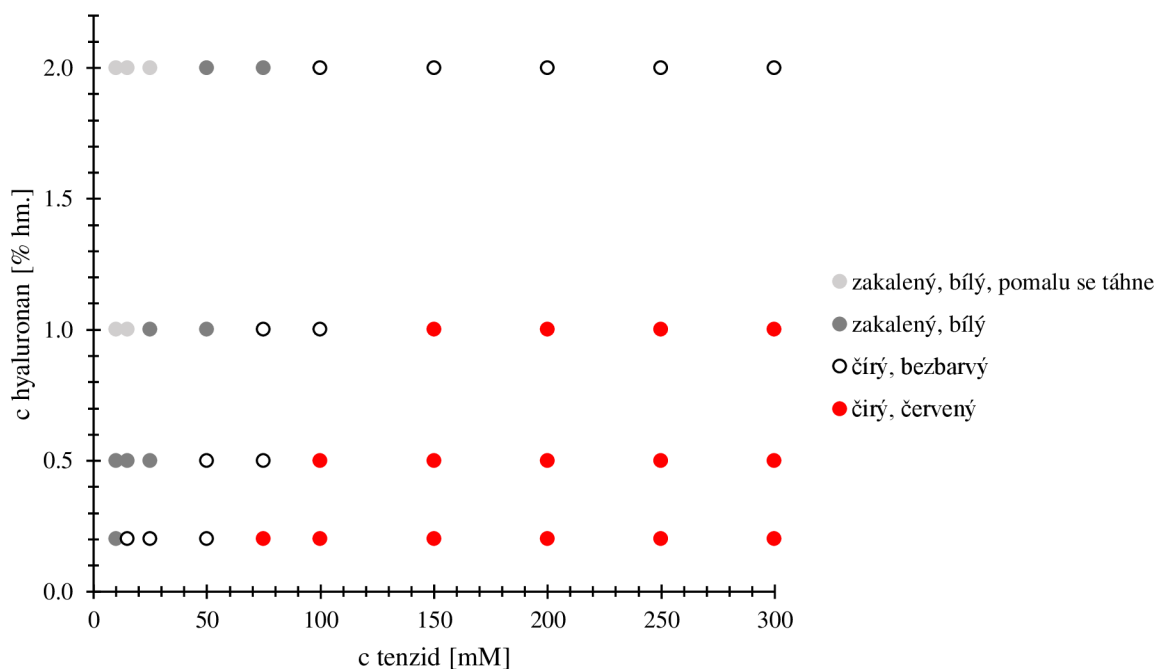
Gely byly vyhodnocovány po 24 hodinách a pak po 1 týdnu stání za tmy při laboratorní teplotě. Byl sledován stav supernatantu a gelu (barva, zákal, struktura) a vizuálně bylo vyhodnoceno množství vytvořeného gelu. Pozorování gelu i supernatantu je přehledně popsáno tabulkou 2 pro 1. opakování, pro 2. opakování byla tabulka vložena do přílohy.

Pro první i druhé opakování experimentu bylo pozorování stejné u všech koncentrací, kromě 2% roztoku hyaluronanu. Při pozorování po 24 hodinách byly pozorovány změny pro koncentrace tenzidu 10; 50 a 100 mM, jak je vidět při srovnání grafů na obrázku 15 a 16. Po 1 týdnu došlo k ustálení rovnováhy a výsledný fázový diagram (Obr. 17) je pro obě opakování stejný. Bylo zjištěno, že k fázové separaci dochází v celém rozmezí koncentrací. U nejnižších koncentrací tenzidu (10 a 15 mM) bylo pouze lehce pokryté dno bezbarvou zakalenou vrstvou gelu, u koncentrací tenzidu, u 1% hyaluronanu při koncentracích tenzidu 10 a 15 mM a u 2% hyaluronanu při koncentracích tenzidu 10; 15 a 25 mM nevznikal kompaktní gel, ale bezbarvá viskózní kapalina, která se držela na dně a po otočení vialky se po čase přelila.

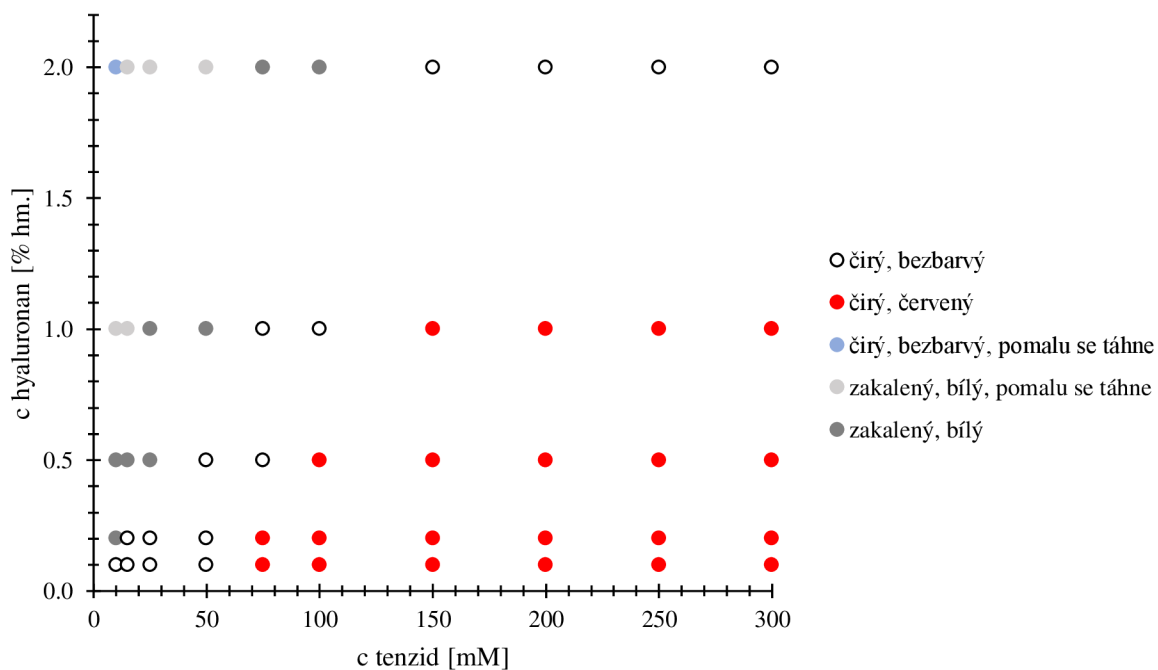
Pomocí hydrofobního barviva Sudan Red byla zjišťována přítomnost micelárních útvarů v roztoku. Pokud byl v supernatantu přítomný tenzid, zbarvil se supernatant do červena. V některých případech byl veškerý tenzid spotřebován na tvorbu gelu a supernatant neměl žádné zbarvení. Přítomnost tenzidu v gelu byla též indikována červeným zbarvením. U koncentrací, při kterých vznikal zakalený supernatant, se již tvořily malé částice, které rozptylují světlo a roztok se jeví zakalený. Počet těchto částic je ale příliš malý, proto ještě nevypadl tuhý gel.

Co se týče vizuálního pozorování množství vytvořeného gelu, s rostoucí koncentrací hyaluronanu i tenzidu rostlo množství gelu. U 300 mM tenzidu s 0,1% hyaluronanem vznikla

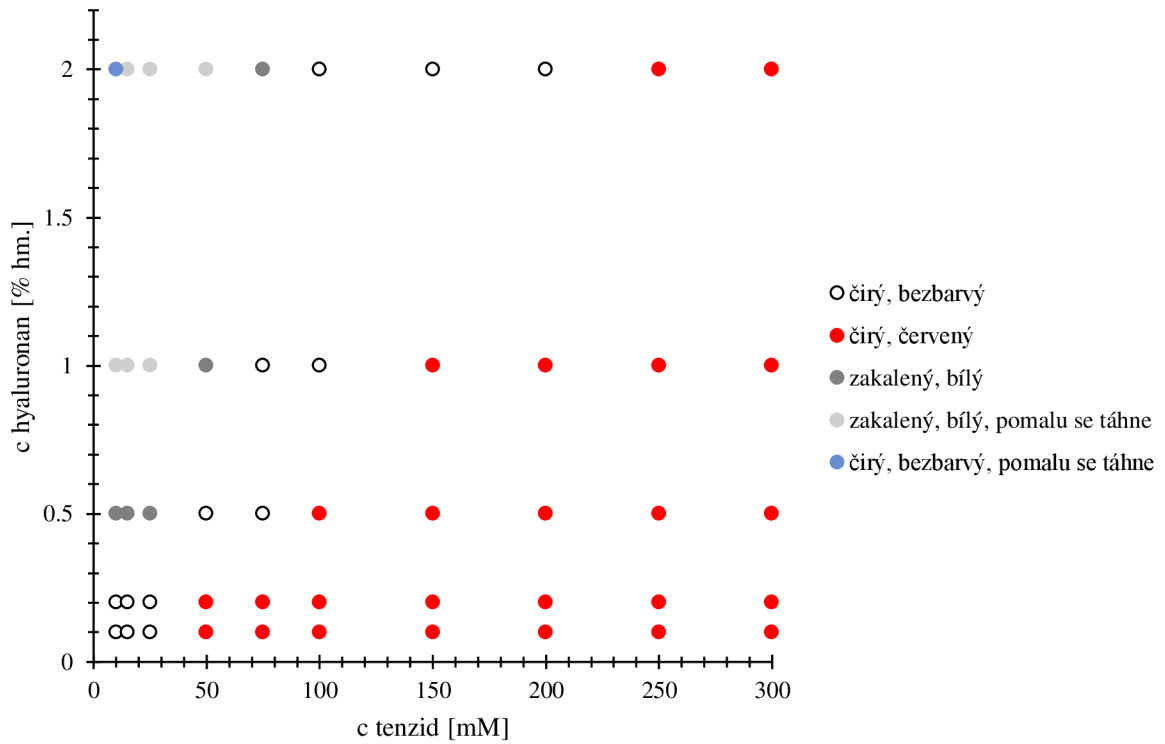
vrstva vysoká přibližně 1 mm, s 0,2% hyaluronanem 2 mm, s 0,5% hyaluronanem 3-4 mm, s 1% hyaluronanem 5-6 mm a s 2% hyaluronanem vrstva vysoká přibližně 8-10 mm.



Obr. 15: Fázový diagram systému Septonex-hyaluronan v 0,15 M NaCl při pozorování po 24 hodinách, 1. opakování, data se vztahují k supernatantu.



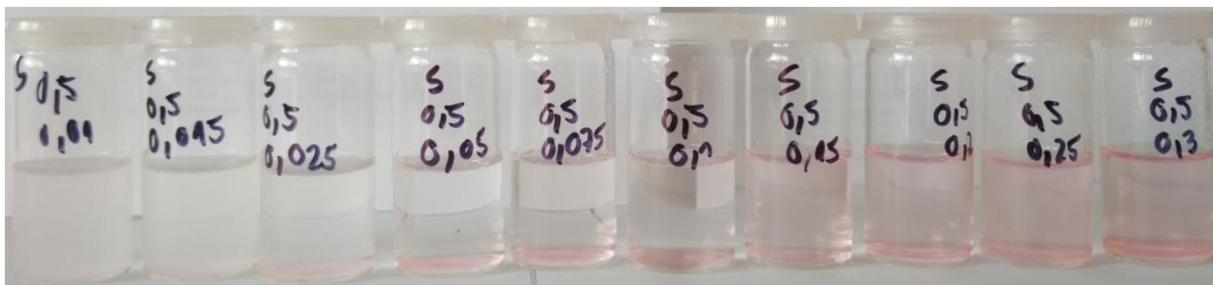
Obr. 16: Fázový diagram systému Septonex-hyaluronan v 0,15 M NaCl při pozorování po 24 hodinách, 2. opakování, data se vztahují k supernatantu.



Obr. 17: Fázový diagram systému Septonex-hyaluronan v 0,15 M NaCl při pozorování po 1 týdnu, 1. a 2. opakování, data se vztahují k supernatantu.



Obr. 18: Gely 24 hodin po přípravě, Septonex, 0,5% hyaluronan, 2. opakování.



Obr. 19: Gely 1 týden po přípravě, Septonex, 0,5% hyaluronan, 2. opakování.

Tabulka 2: Septonex, 2. opakování – vizuální charakteristika gelů a supernatantu.

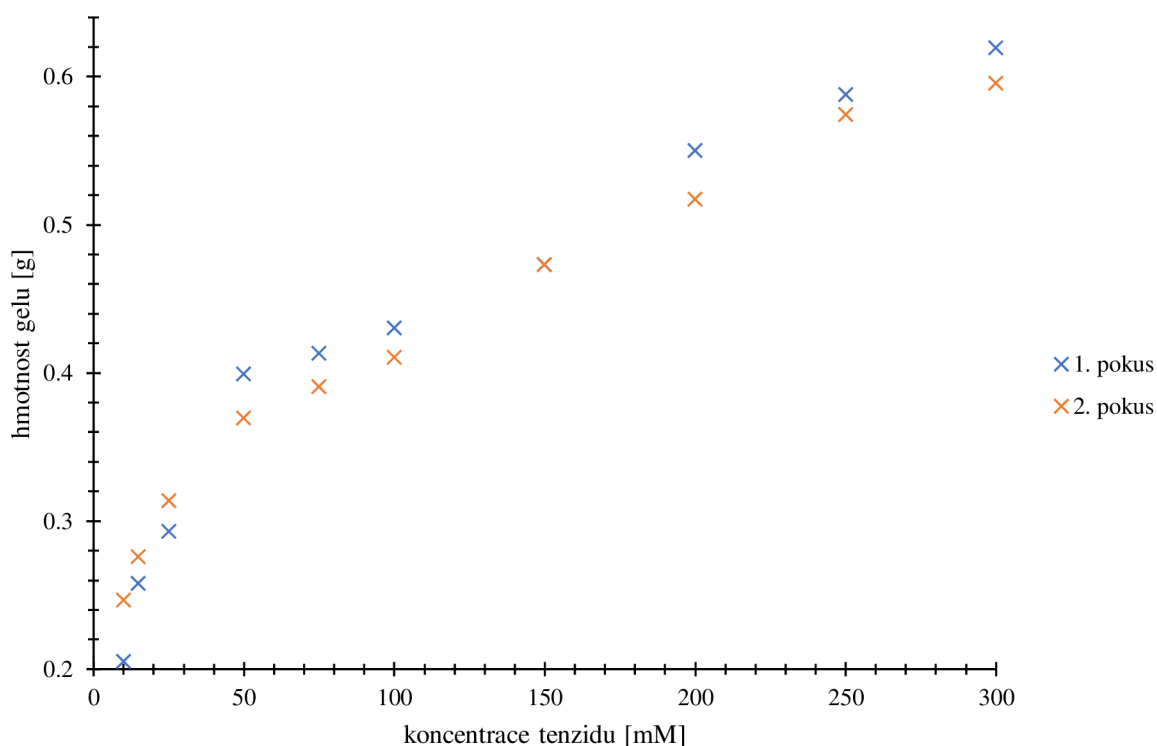
2. opakování							
Chyaluronan [% hm.]	Ctenzid [mM]	po 24 hodinách			po 1 týdnu		
		vzhled supernatantu	vzhled gelu	množství gelu	vzhled supernatantu	vzhled gelu	množství gelu
0,1	10	čirý, bezbarvý	zakalený, bezbarvý	tenká vrstva na dně	čirý, bezbarvý	zakalený, bezbarvý	tenká vrstva na dně
	15	čirý, bezbarvý	červený	tenká vrstva na dně	čirý, bezbarvý	zakalený, bezbarvý	tenká vrstva na dně
	25	čirý, bezbarvý	červený	tenká vrstva na dně	čirý, bezbarvý	červený	tenká vrstva na dně
	50	čirý, bezbarvý	červený	tenká vrstva na dně	čirý, červený	červený	tenká vrstva na dně
	75	čirý, červený	červený	tenká vrstva na dně	čirý, červený	červený	tenká vrstva na dně
	100	čirý, červený	červený	tenká vrstva na dně	čirý, červený	červený	tenká vrstva na dně
	150	čirý, červený	červený	tenká vrstva na dně	čirý, červený	červený	tenká vrstva na dně
	200	čirý, červený	červený	tenká vrstva na dně	čirý, červený	červený	tenká vrstva na dně
	250	čirý, červený	červený	tenká vrstva na dně	čirý, červený	červený	tenká vrstva na dně
	300	čirý, červený	červený	tenká vrstva na dně	čirý, červený	červený	tenká vrstva na dně

0,2	10	zakalený, bílý	zakalený, bezbarvý	tenká vrstva na dně	čirý, bezbarvý	zakalený, bezbarvý	tenká vrstva na dně
	15	čirý, bezbarvý	červený, pevný	tenká vrstva na dně	čirý, bezbarvý	červený, pevný	tenká vrstva na dně
	25	čirý, bezbarvý	červený, pevný	tenká vrstva na dně	čirý, bezbarvý	červený, pevný	tenká vrstva na dně
	50	čirý, bezbarvý	červený, pevný	tenká vrstva na dně	čirý, červený	červený, pevný	tenká vrstva na dně
	75	čirý, červený	červený, pevný	tenká vrstva na dně	čirý, červený	červený, pevný	tenká vrstva na dně
	100	čirý, červený	červený, pevný	tenká vrstva na dně	čirý, červený	červený, pevný	tenká vrstva na dně
	150	čirý, červený	červený, pevný	tenká vrstva na dně	čirý, červený	červený, pevný	tenká vrstva na dně
	200	čirý, červený	červený, pevný	tenká vrstva na dně	čirý, červený	červený, pevný	tenká vrstva na dně
	250	čirý, červený	červený, pevný	tenká vrstva na dně	čirý, červený	červený, pevný	tenká vrstva na dně
	300	čirý, červený	červený, pevný	tenká vrstva na dně	čirý, červený	červený, pevný	tenká vrstva na dně
0,5	10	zakalený, bílý	zakalený, bezbarvý	tenká vrstva na dně	zakalený, bílý	zakalený, bezbarvý	tenká vrstva na dně
	15	zakalený, bílý	zakalený, bezbarvý	tenká vrstva na dně	zakalený, bílý	červený, pevný	tenká vrstva na dně
	25	zakalený, bílý	červený, pevný	tenká vrstva na dně	zakalený, bílý	červený, pevný	na dně
	50	čirý, bezbarvý	červený, pevný	tenká vrstva na dně	čirý, bezbarvý	červený, pevný	na dně
	75	čirý, bezbarvý	červený, pevný	tenká vrstva dno, stěny	čirý, bezbarvý	červený, pevný	na dně
	100	čirý, červený	červený, pevný	tenká vrstva dno, stěny	čirý, červený	červený, pevný	na dně
	150	čirý, červený	červený, pevný	tenká vrstva dno, stěny	čirý, červený	červený, pevný	na dně a stěnách
	200	čirý, červený	červený, pevný	tenká vrstva dno, stěny	čirý, červený	červený, pevný	na dně a stěnách
	250	čirý, červený	červený, pevný	tenká vrstva dno, stěny	čirý, červený	červený, pevný	na dně a stěnách
	300	čirý, červený	červený, pevný	tenká vrstva dno, stěny	čirý, červený	červený, pevný	na dně a stěnách

1	10	zakalený, bílý, viskózní	zakalený, bezbarvý	asi 1 ml gelu	zakalený, bílý, viskózní	zakalený, bezbarvý	asi 1 ml gelu
	15	zakalený, bílý, viskózní	zakalený, bezbarvý	na dně	zakalený, bílý, viskózní	zakalený, bezbarvý	asi 1 ml gelu
	25	zakalený, bílý	zakalený, červený	na dně	zakalený, bílý, viskózní	zakalený, červený	asi 1 ml gelu
	50	zakalený, bílý	červený, pevný	na dně	zakalený, bílý	červený, pevný	na dně
	75	čirý, bezbarvý	červený, pevný	na dně a stěnách	čirý, bezbarvý	červený, pevný	na dně a stěnách
	100	čirý, bezbarvý	červený, pevný	na dně a stěnách	čirý, bezbarvý	červený, pevný	na dně a stěnách
	150	čirý, červený	červený, pevný	na dně a stěnách	čirý, červený	červený, pevný	na dně a stěnách
	200	čirý, červený	červený, pevný	na dně a stěnách	čirý, červený	červený, pevný	na dně a stěnách
	250	čirý, červený	červený, pevný	na dně a stěnách	čirý, červený	červený, pevný	na dně a stěnách
	300	čirý, červený	červený, pevný	na dně a stěnách	čirý, červený	červený, pevný	na dně a stěnách
2	10	čirý, bezbarvý, viskózní	bezbarvý, tekutý	asi 3-4 ml	čirý, bezbarvý, viskózní	bezbarvý, tekutý	asi 3-4 ml
	15	zakalený, bílý, viskózní	bezbarvý, tekutý	asi 3-4 ml	zakalený, bílý, viskózní	bezbarvý, tekutý	asi 3-4 ml
	25	zakalený, bílý, viskózní	bezbarvý, tekutý	asi 3-4 ml	zakalený, bílý, viskózní	bezbarvý, tekutý	asi 3-4 ml
	50	zakalený, bílý, viskózní	bezbarvý, zakalený	na dně a stěnách	zakalený, bílý, viskózní	červený, zakalený	na dně a stěnách
	75	zakalený, bílý	červený, pevný	na dně a stěnách	zakalený, bílý	červený, zakalený	na dně a stěnách
	100	zakalený, bílý	červený, pevný	na dně a stěnách	čirý, bezbarvý	červený, pevný	na dně a stěnách
	150	čirý, bezbarvý	červený, pevný	na dně a stěnách	čirý, bezbarvý	červený, pevný	na dně a stěnách
	200	čirý, bezbarvý	červený, pevný	na dně a stěnách	čirý, bezbarvý	červený, pevný	na dně a stěnách
	250	čirý, bezbarvý	červený, pevný	na dně a stěnách	čirý, červený	červený, pevný	na dně a stěnách
	300	čirý, bezbarvý	červený, pevný	na dně a stěnách	čirý, červený	červený, pevný	na dně a stěnách

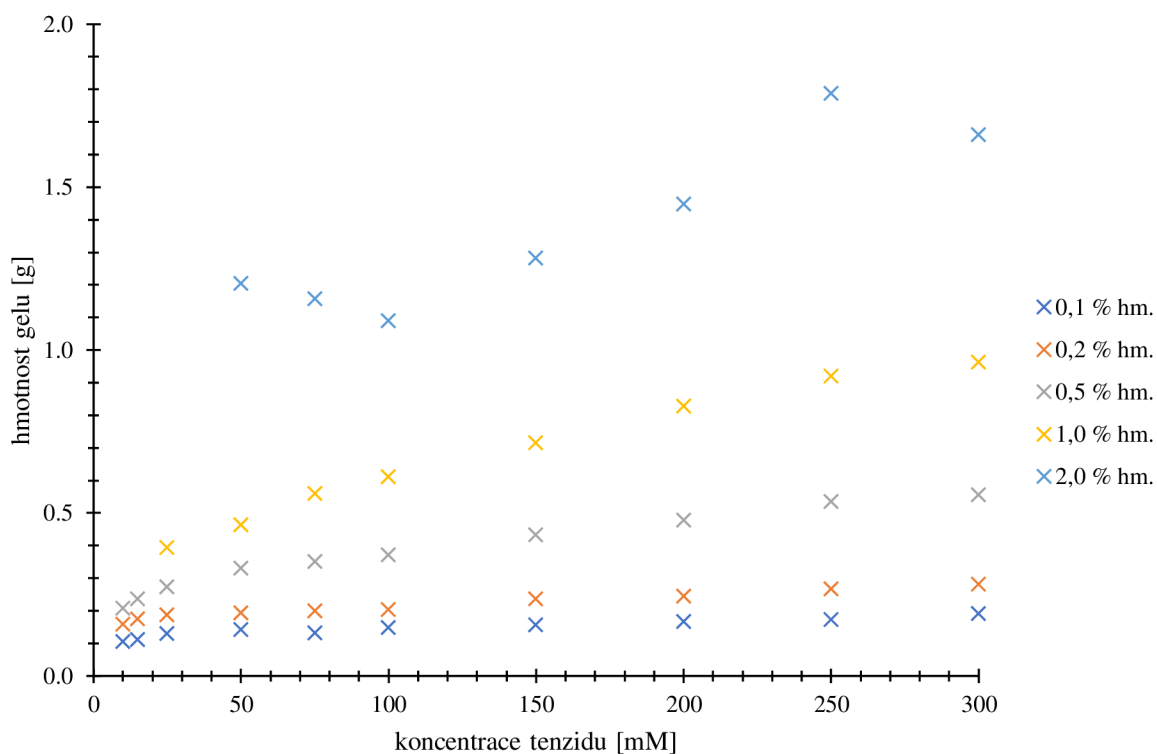
### 5.1.2 Hmotnost gelu

Hmotnost gelu před vysušením byla zjišťována odlitím supernatantu z vialky a následným vážením. Jak je patrné z grafu na obrázku 20, množství gelu ve vialce roste se vzrůstající koncentrací tenzidu. Bylo tak potvrzeno vizuální pozorování. Srovnají-li se všechny naměřené hodnoty (Obr. 21), je vidět, že množství gelu roste nejen s koncentrací tenzidu, ale i s koncentrací hyaluronanu. Nejvíce gelu se tvořilo u 2% hyaluronanu. U nejnižších koncentrací tenzidu pro koncentrace hyaluronanu 0,1; 0,2; 0,5 % hm. se tvořil gel v tenké bezbarvé zakalené vrstvě. U prvních dvou hodnot 1% hyaluronanu (koncentrace tenzidu 10 a 15 mM) a prvních čtyř hodnot 2% hyaluronanu (koncentrace tenzidu 10; 15; 25; 50 mM) došlo k vysoké chybě měření, proto byly hodnoty vynechány z grafu na obrázku 21. Celý systém působil spíše jako viskózní kapalina a nebylo možné přesně rozlišit fázové rozhraní. Při separaci gelu od supernatantu pravděpodobně došlo k odlití části gelu.



Obr. 20: Závislost hmotnosti gelu na koncentraci Septonexu pro 0,5% hyaluronan.

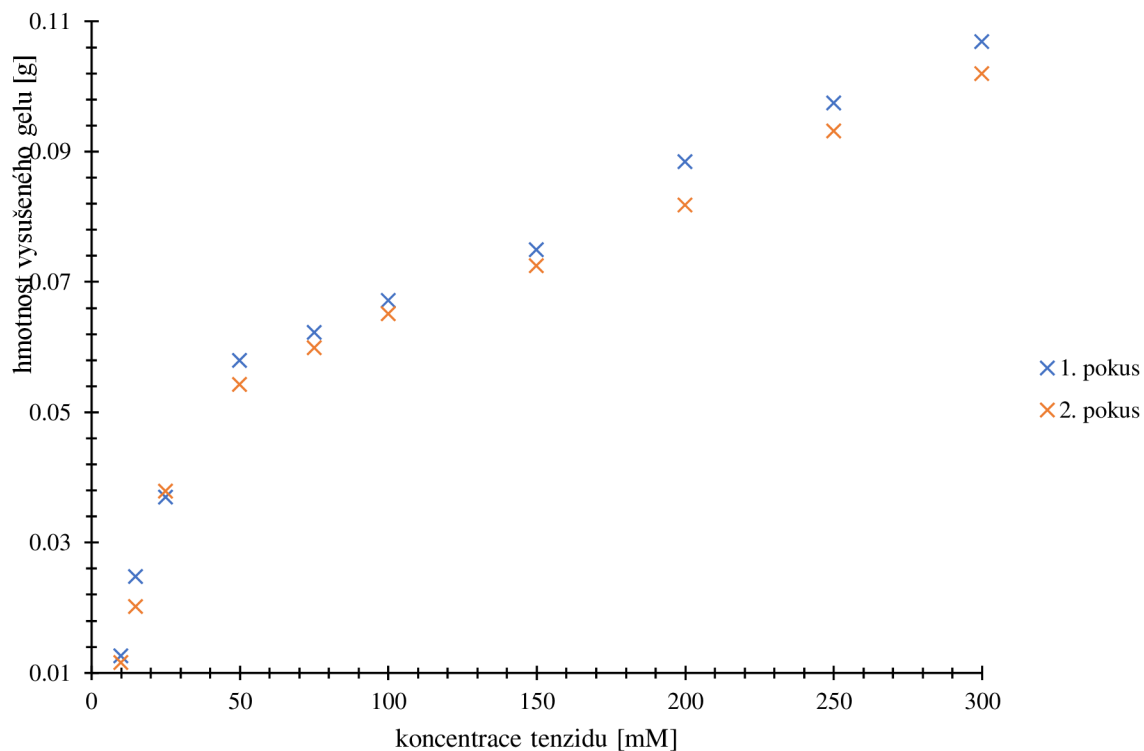




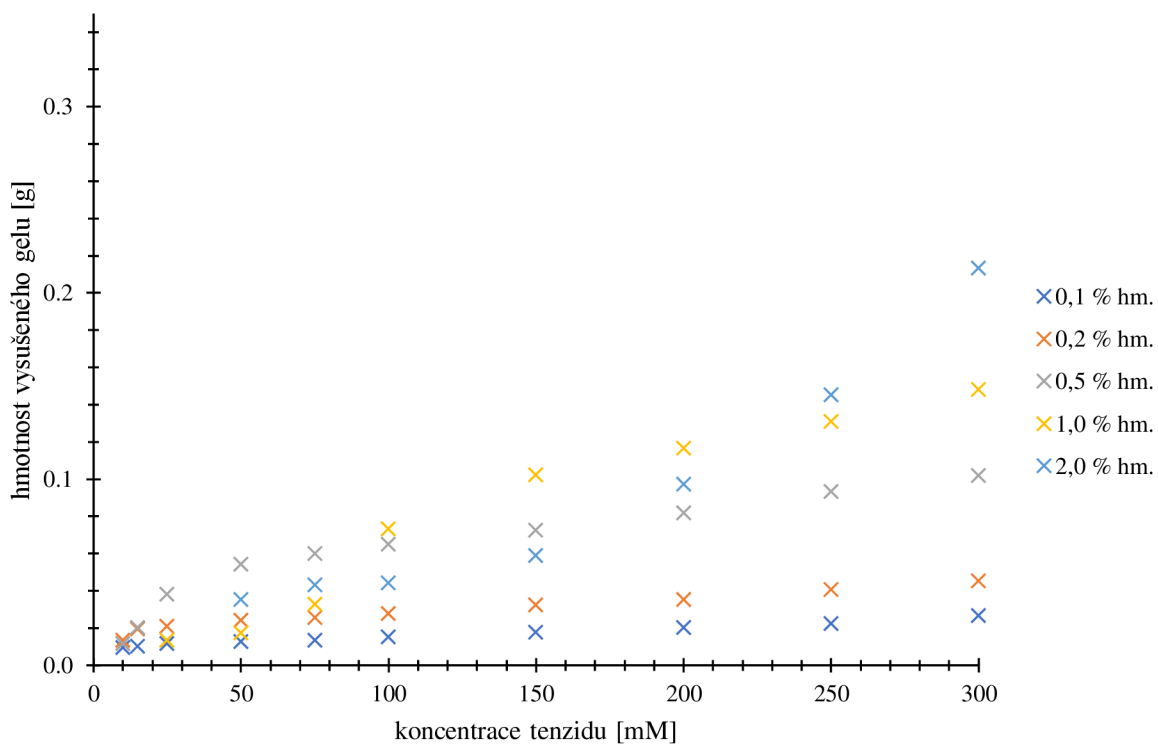
Obr. 21: Závislost hmotnosti gelu na koncentraci Septonexu pro všechny koncentrace hyaluronanu, 2. opakování.

### 5.1.3 Obsah vody

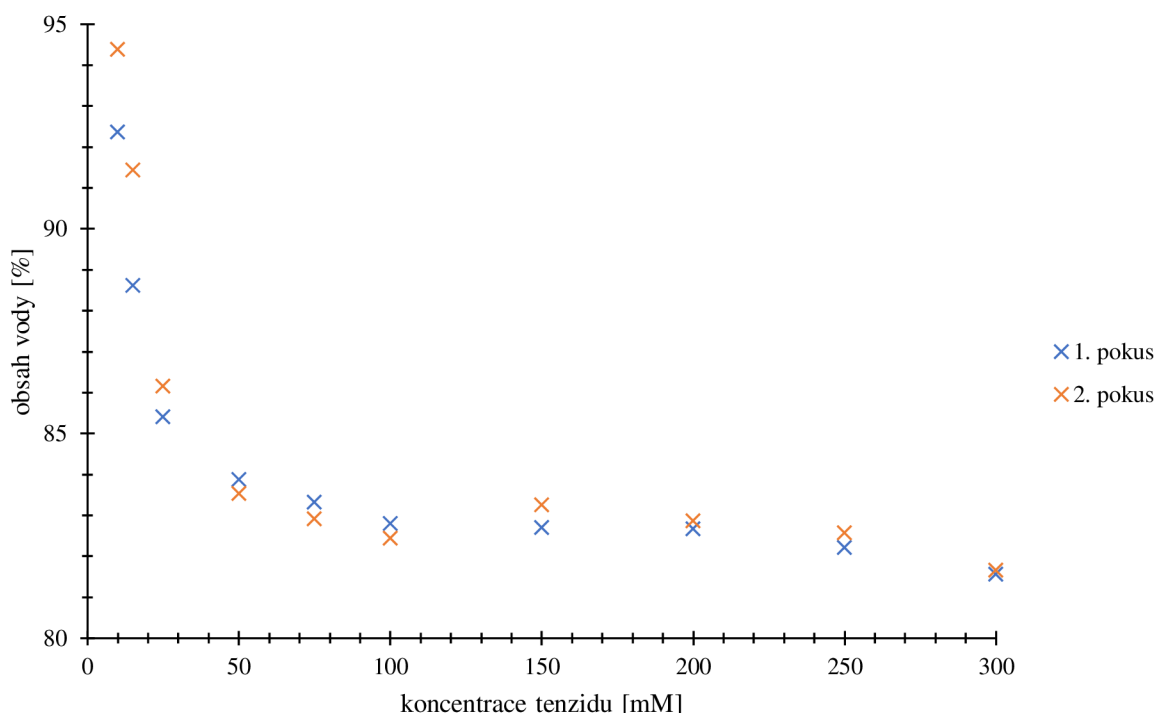
Vialky s gelem byly vloženy do sušárny a sušeny při 50 °C 7 dnů. Po té byl obsah vialky zvážen a výpočtem zjištěn obsah vody. V grafu na obrázku 22 je vidět, že po odstranění vody je závislost hmotnosti gelu na koncentraci tenzidu přesnější. Hodnoty pro první a druhé opakování se téměř neliší a pro 1% a 2% hyaluronan se chyba vzniklá odlitím části gelu částečně eliminovala. Při srovnání hmotností vysušeného gelu pro všechny koncentrace hyaluronanu v závislosti na koncentraci tenzidu (Obr. 23) se změnila koncentrace, pro které se tvoří nejvíce gelu. Při koncentracích Septonexu 10-75 mM se tvoří nejvíce gelu s 0,5% hyaluronanem, při koncentracích 100-200 mM s 1% hyaluronanem a při 250-300 mM s 2% hyaluronanem. Graf na obrázku 24 ukazuje, že obsah vody klesá s rostoucí koncentrací tenzidu. Tedy obsah sušiny v gelu byl nejvyšší u 300 mM tenzidu.



Obr. 22: Hmotnost vysušeného gelu v závislosti na koncentraci Septonexu pro hyaluronan 0,5%.



Obr. 23: Hmotnost vysušeného gelu v závislosti na koncentraci Septonexu pro všechny koncentrace hyaluronanu, 2. opakování.



Obr. 24: Závislost obsahu vody v gelu na koncentraci Septonexu, 0,5% hyaluronan.

#### 5.1.4 Rozpustnost

Stanovení rozpustnosti bylo provedeno jako orientační zkouška. Původně bylo naváženo 16 g/100 ml 0,15 M NaCl, ale v této koncentraci se Septonex rozpustil, proto byla koncentrace zvýšená až na 59 g/100 ml 0,15 M NaCl. Při této koncentraci se Septonex také rozpustil, ale kapalina byla velmi viskózní. Byla provedena termogravimetrická analýza a vyhodnocením výsledků bylo zjištěno, že rozpustnost Septonexu je minimálně 39 mg<sub>Septonex</sub>/100 mg<sub>0,15 M NaCl</sub>. Je možné, že Septonex tvořil hydratované krystaly a tedy se z něj stal hydrát.

V práci byla použita nejvyšší koncentrace 300 mM, protože s vyšší koncentrací by se hůř pracovalo kvůli viskozitě a vyšší koncentrace se již nedají využít v medicínských aplikacích kvůli vysokým dezinfekčním a antiseptickým účinkům.

## 5.2 CTAB

Pro popis výsledků byla vybrána řada vzorků s hyaluronanem o koncentraci 0,5 % hm. Další grafy a obrázky byly vloženy do přílohy.

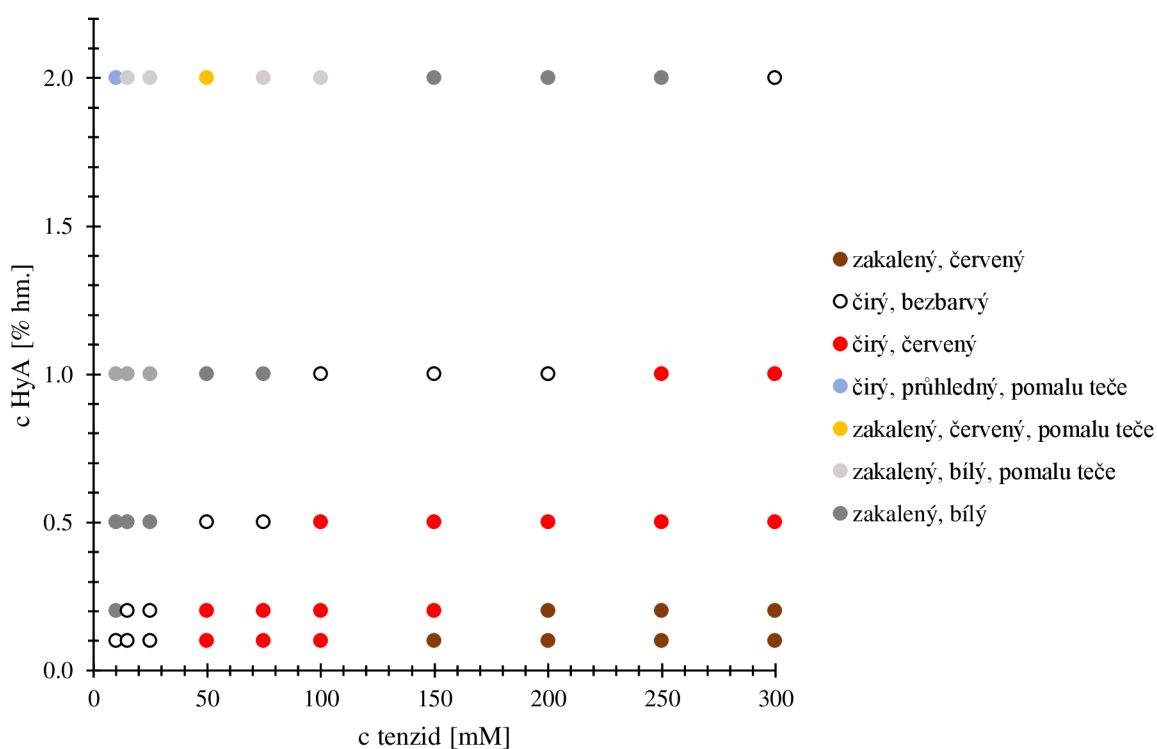
### 5.2.1 Vizuální charakterizace a fázový diagram

Podobně jako u Septonexu bylo pozorování pro 1. a 2. opakování stejné, až na některé koncentrace tenzidu u 0,2%, 1% a 2% hyaluronanu. Při pozorování po 24 hodinách od vytvoření byly pozorovány změny u 150 mM CTAB, 0,2% hyaluronan; 200 mM CTAB, 1% hyaluronan a 75 mM a 100 mM, 2% hyaluronan. Změny jsou patrné při srovnání grafů na obrázku 25 a 26. Po 1 týdnu došlo k ustálení rovnováhy a výsledný fázový diagram (Obr. 27) je pro obě opakování stejný, stejně jako u Septonexu. K fázové separaci dochází v celém koncentračním rozmezí, pevný gel se ale nevytvořil vždy. Pro tenzid 10 mM nevznikala kompaktní hmota, ale

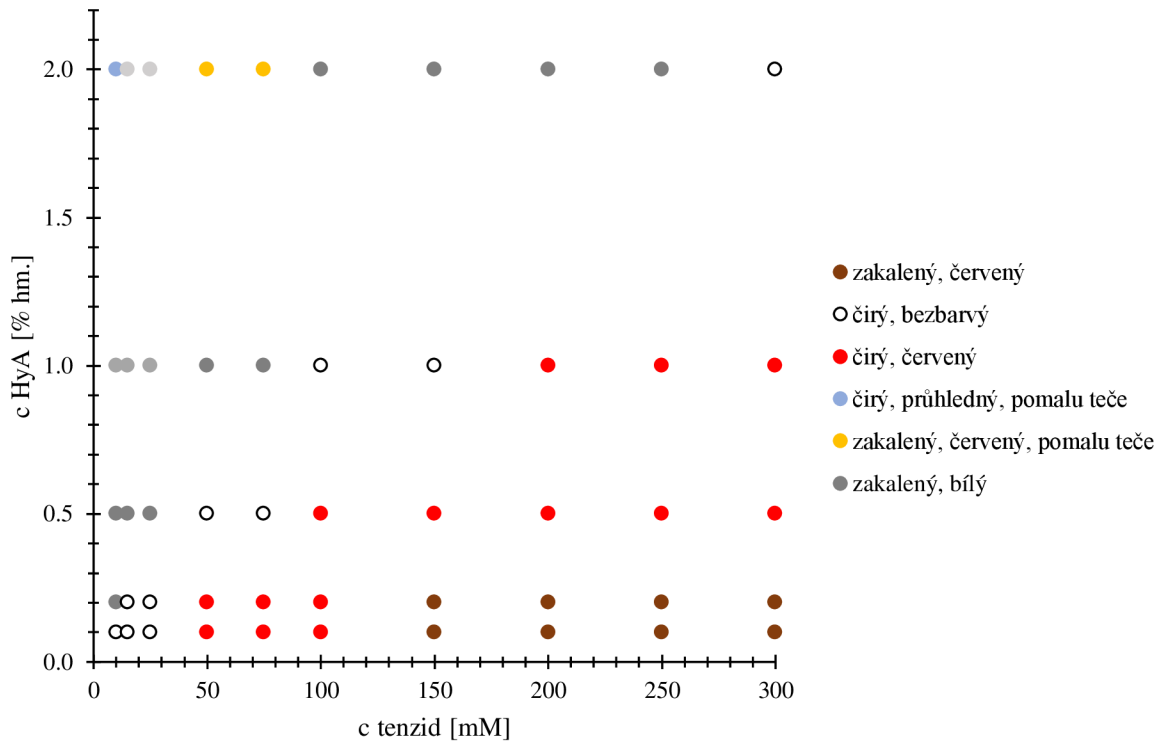
tekutý gel a to od koncentrace hyaluronanu 0,2 % hm., pro 2% hyaluronan byl gel čirý, při ostatních koncentracích zakalený. U 1% hyaluronanu vznikal tekutý gel do 25 mM, v případě 2% hyaluronanu až do 50 mM. Gel se držel u dna vialky a po čase se přelil.

Přítomnost micelárních útvarů v roztoku byla zjišťována pomocí hydrofobního barviva Sudan Red. Pokud tenzid zůstal přítomný v supernatantu, zbarvil se do červena, byl-li přítomný v gelu, gel měl také červené zbarvení. V některých případech byl supernatant čirý a bezbarvý, v jiných čirý, červený nebo zakalený, červený. Vznikal-li zakalený supernatant, byly v roztoku přítomny malé částice rozptylující světlo, ale nebyly v dostatečné koncentraci potřebné k zformování gelu.

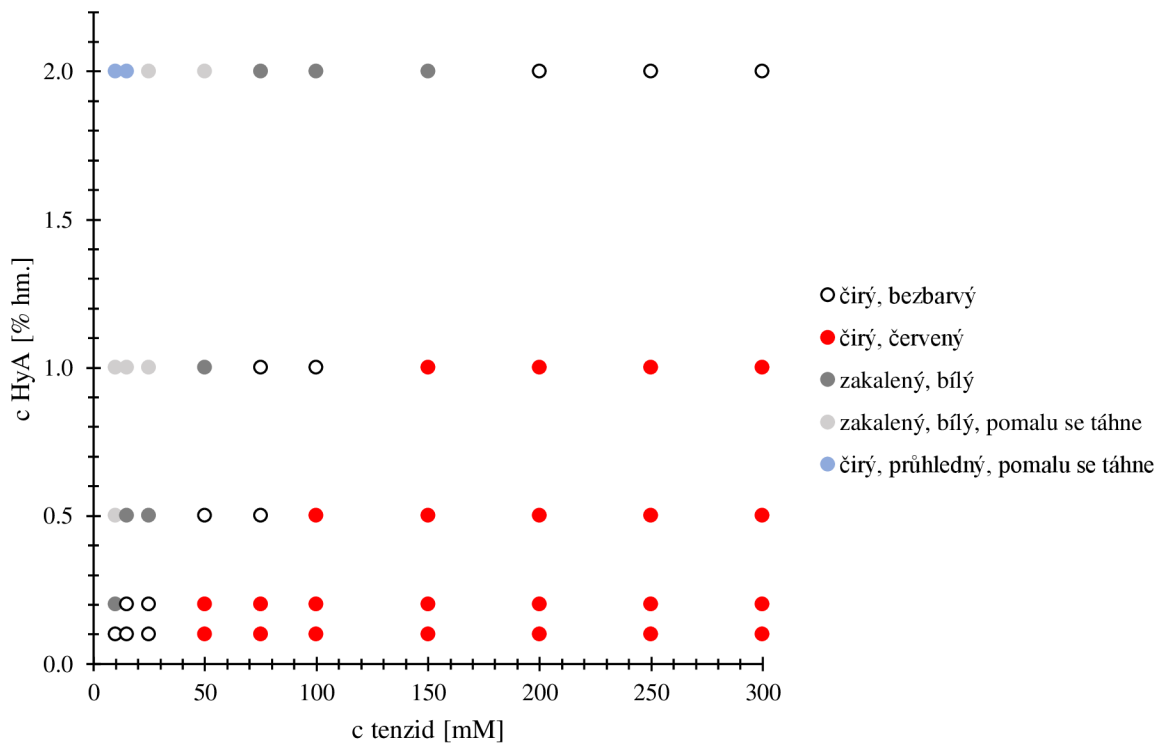
Vizuálním pozorováním množství gelu bylo zjištěno, že s rostoucí koncentrací hyaluronanu i tenzidu roste množství gelu. Gel vznikal na dně i na stěnách a občas jako prstenec kolem vnitřní stěny vialky. Protože byl gel rozptýlený po celé vialce, špatně se odhadovala výška gelové vrstvy.



Obr. 25: Fázový diagram systému CTAB-hyaluronan v 0,15 M NaCl při pozorování po 24 hodinách, 1. opakování, data se vztahují k supernatantu.



Obr. 26: Fázový diagram systému CTAB-hyaluronan v 0,15 M NaCl při pozorování po 24 hodinách, 2. opakování, data se vztahují k supernatantu.



Obr. 27: Fázový diagram systému CTAB-hyaluronanu v 0,15 M NaCl při pozorování po 1 týdnu, 1. a 2. opakování, data se vztahují k supernatantu.



Obr. 28: Gely 24 hodin po přípravě, CTAB, 0,5% hyaluronan, 2. opakování.



Obr. 29: Gely 1 týden po přípravě, CTAB, 0,5% hyaluronan, 2. opakování.

Tabulka 3: Septonex, 2. opakování – vizuální charakteristika gelů a supernatantu.

2. opakování							
Chyaluronan [% hm.]	Ctenzid [mM]	po 24 hodinách			po 1 týdnu		
		vzhled supernatantu	vzhled gelu	množství gelu	vzhled supernatantu	vzhled gelu	množství gelu
0,1	10	čirý, bezbarvý	červený	plave	čirý, bezbarvý	červený	tenká vrstva dno, stěny
	15	čirý, bezbarvý	červený	plave	čirý, bezbarvý	červený	tenká vrstva dno, stěny
	25	čirý, bezbarvý	červený	stěny	čirý, bezbarvý	červený	tenká vrstva dno, stěny
	50	čirý, červený	červený	tenká vrstva dno, stěny	čirý, červený	červený	tenká vrstva dno, stěny
	75	čirý, červený	červený	tenká vrstva dno, stěny	čirý, červený	červený	tenká vrstva dno, stěny
	100	čirý, červený	červený	tenká vrstva dno, stěny	čirý, červený	červený	tenká vrstva dno, stěny
	150	zakalený, červený	červený	tenká vrstva dno, stěny	čirý, červený	červený	tenká vrstva dno, stěny
	200	zakalený, červený	červený	tenká vrstva dno, stěny	čirý, červený	červený	tenká vrstva dno, stěny
	250	zakalený, červený	červený	tenká vrstva dno, stěny	čirý, červený	červený	tenká vrstva dno, stěny
	300	zakalený, červený	červený	tenká vrstva dno, stěny	čirý, červený	červený	tenká vrstva dno, stěny

0,2	10	zakalený, bílý	zakalený, tekutý	<1 ml	zakalený, bílý	zakalený, tekutý, červený	< 1 ml
	15	čirý, bezbarvý	červený	tenká vrstva dno, stěny	čirý, bezbarvý	červený	tenká vrstva dno, stěny
	25	čirý, bezbarvý	červený	tenká vrstva dno, stěny	čirý, bezbarvý	červený	tenká vrstva dno, stěny
	50	čirý, červený	červený	tenká vrstva dno, stěny	čirý, červený	červený	tenká vrstva dno, stěny
	75	čirý, červený	červený	tenká vrstva dno, stěny	čirý, červený	červený	tenká vrstva dno, stěny
	100	čirý, červený	červený	tenká vrstva dno, stěny	čirý, červený	červený	tenká vrstva dno, stěny
	150	zakalený, červený	červený	tenká vrstva dno, stěny	čirý, červený	červený	tenká vrstva dno, stěny
	200	zakalený, červený	červený	tenká vrstva dno, stěny	čirý, červený	červený	tenká vrstva dno, stěny
	250	zakalený, červený	červený	tenká vrstva dno, stěny	čirý, červený	červený	tenká vrstva dno, stěny
	300	zakalený, červený	červený	tenká vrstva dno, stěny	čirý, červený	červený	tenká vrstva dno, stěny
0,5	10	zakalený, bílý	zakalený, tekutý	asi 1 ml	zakalený, bílý, viskózní	zakalený, tekutý	asi 1 ml
	15	zakalený, bílý	zakalený, červený	tenká vrstva dno, stěny	zakalený, bílý	zakalený, červený	na dně
	25	zakalený, bílý	zakalený, červený	tenká vrstva dno, stěny	zakalený, bílý	zakalený, červený	na dně
	50	čirý, bezbarvý	červený, pevný	dno, stěny	čirý, bezbarvý	červený, pevný	dno, stěny
	75	čirý, bezbarvý	červený, pevný	dno, stěny	čirý, bezbarvý	červený, pevný	dno, stěny
	100	čirý, červený	červený, pevný	dno, stěny	čirý, červený	červený, pevný	dno, stěny
	150	čirý, červený	červený, pevný	dno, stěny	čirý, červený	červený, pevný	dno, stěny
	200	čirý, červený	červený, pevný	dno, stěny	čirý, červený	červený, pevný	dno, stěny
	250	čirý, červený	červený, pevný	dno, stěny	čirý, červený	červený, pevný	dno, stěny
	300	čirý, červený	červený, pevný	dno, stěny	čirý, červený	červený, pevný	dno, stěny

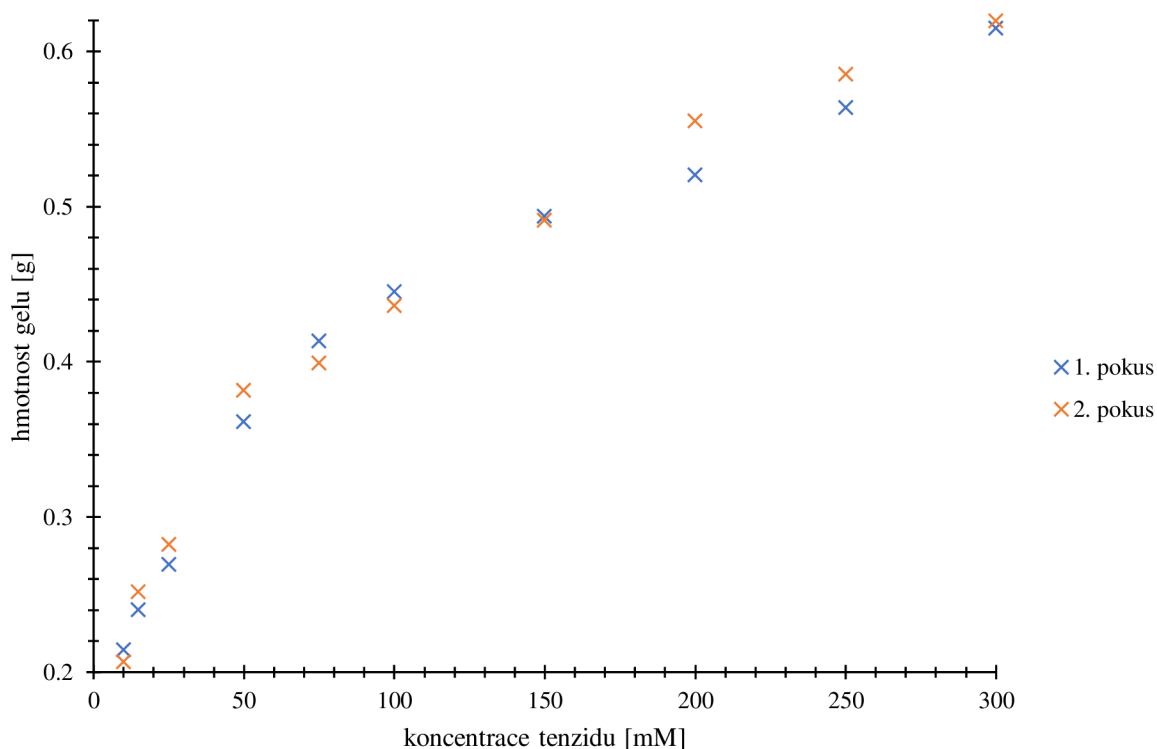


1	10	zakalený, bílý, viskózní	zakalený, tekutý	asi 2 ml	zakalený, bílý, viskózní	zakalený, tekutý	asi 2 ml
	15	zakalený, bílý, viskózní	zakalený, červený, tekutý	asi 2 ml	zakalený, bílý, viskózní	zakalený, červený, tekutý	asi 2 ml
	25	zakalený, bílý, viskózní	zakalený, červený, tekutější	asi 2 ml	zakalený, bílý, viskózní	zakalený, červený, tekutý	asi 2 ml
	50	zakalený, bílý	zakalený, červený	dno, stěny	zakalený, bílý	červený, pevný	dno, stěny
	75	zakalený, bílý	červený, pevný	dno, stěny	čirý, bezbarvý	červený, pevný	dno, stěny
	100	čirý, bezbarvý	červený, pevný	dno, stěny	čirý, bezbarvý	červený, pevný	dno, stěny
	150	čirý, bezbarvý	červený, pevný	dno, stěny	čirý, červený	červený, pevný	dno, stěny
	200	čirý, červený	červený, pevný	dno, stěny	čirý, červený	červený, pevný	dno, stěny
	250	čirý, červený	červený, pevný	dno, stěny	čirý, červený	červený, pevný	dno, stěny
	300	čirý, červený	červený, pevný	dno, stěny	čirý, červený	červený, pevný	dno, stěny

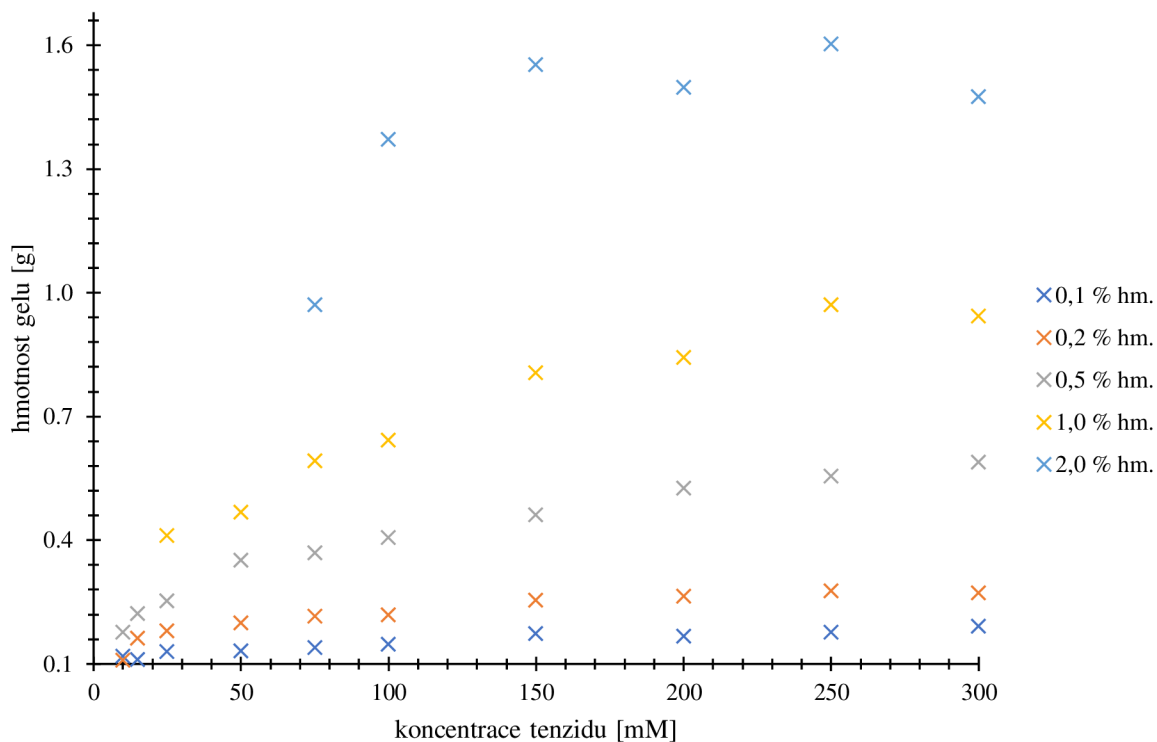
2	10	čirý, bezbarvý, viskózní	bezbarvý, tekutý	3-4 ml	čirý, bezbarvý, viskózní	bezbarvý, tekutý	3-4 ml
	15	zakalený, bílý, viskózní	bezbarvý, tekutý	3-4 ml	čirý, bezbarvý, viskózní	bezbarvý, tekutý	3-4 ml
	25	zakalený, bílý, viskózní	bezbarvý, tekutý	3-4 ml	zakalený, bílý, viskózní	bezbarvý, tekutý	3-4 ml
	50	zakalený, červený, viskózní	zakalený, červený, tekutější	3-4 ml	zakalený, bílý, viskózní	zakalený, červený, tekutější	3-4 ml
	75	zakalený, červený, viskózní	zakalený, červený, tekutější	3-4 ml	zakalený, bílý	červený, pevný	dno, stěny
	100	zakalený, bílý	červený, pevný	dno, stěny	zakalený, bílý	červený, pevný	dno, stěny
	150	zakalený, bílý	červený, pevný	dno, stěny	zakalený, bílý	červený, pevný	dno, stěny
	200	zakalený, bílý	červený, pevný	dno, stěny	čirý, bezbarvý	červený, pevný	dno, stěny
	250	zakalený, bílý	červený, pevný	dno, stěny	čirý, bezbarvý	červený, pevný	dno, stěny
	300	čirý, bezbarvý	červený, pevný	dno, stěny	čirý, bezbarvý	červený, pevný	dno, stěny

## 5.2.2 Hmotnost gelu

Jak již bylo zmíněno, množství vytvořeného gelu ve vialce roste se vzrůstající koncentrací tenzidu (Obr. 30). Srovnáním všech naměřených hodnot v grafu na obrázku 31 se potvrzuje, že množství gelu roste také s koncentrací hyaluronanu. Nejvíce gelu se tvořilo u 2% hyaluronanu, u nejnižších koncentrací tenzidu pro 0,1% a 0,2% hyaluronan byla vialka pokrytá červeným gelem v tenké vrstvě, občas vzniklý gel plaval v supernatantu. Při použití 1% hyaluronanu a 10 a 15 mM tenzidu a 2% hyaluronanu a 10; 15; 25; 50 mM tenzidu došlo k velké chybě měření, proto byly hodnoty vynechány z grafu na obrázku 31. Stejně jako u Septonexu, systém působil jako bezbarvá viskózní kapalina a nebylo možné přesně rozlišit fázové rozhraní. Je pravděpodobné, že při separaci gelu od supernatantu došlo k odlití části gelu, a proto byla hmotnost odlišná od ostatních hodnot a pro 1. a 2. opakování.



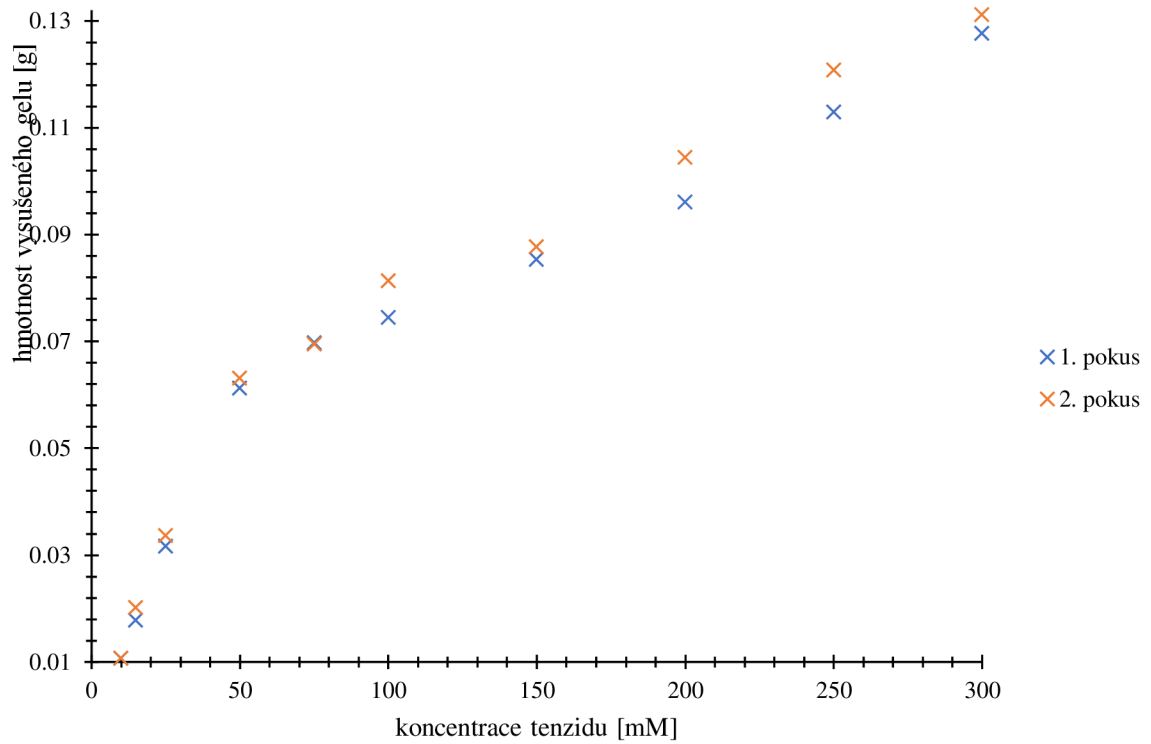
Obr. 30: Závislost hmotnosti gelu na koncentraci CTAB pro 0,5% hyaluronan.



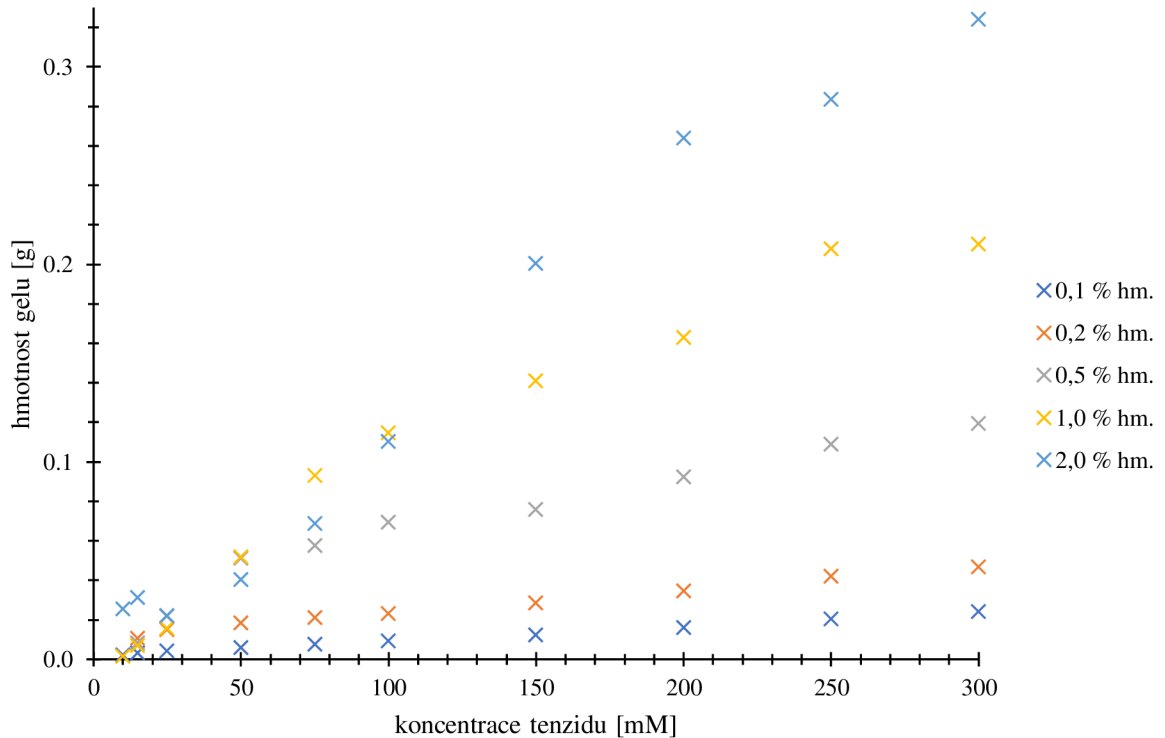
Obr. 31: Závislost hmotnosti gelu na koncentraci CTAB pro všechny koncentrace hyaluronanu, 2. opakování.

### 5.2.3 Obsah vody

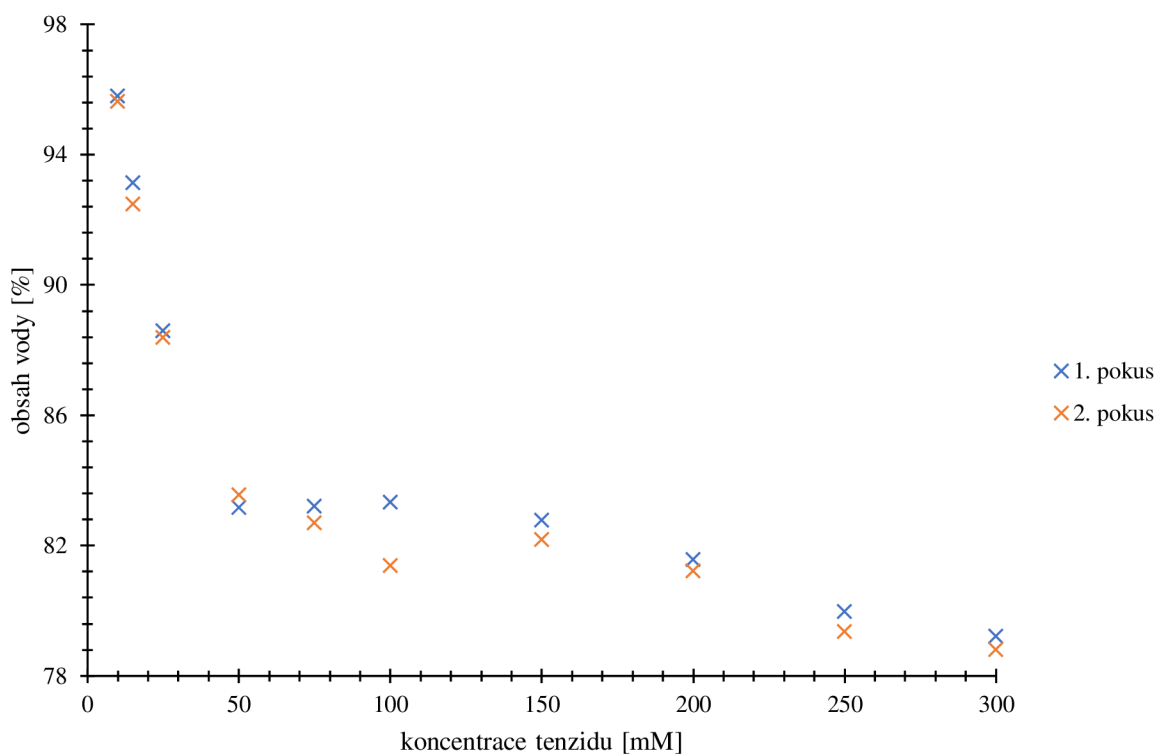
Po odstranění vody z gelů došlo k částečnému eliminování chyb při oddělování supernatantu od gelu. Z grafu na obrázku 32 je patrné, že závislost hmotnosti na koncentraci tenzidu je přesnější. Hodnoty pro první a druhé opakování jsou téměř totožné. V grafu na obrázku 33 jsou srovnané závislosti hmotnosti vysušeného gelu na koncentraci tenzidu pro všechny koncentrace hyaluronanu. Stejně jako u Septonexu, i u CTAB se změnila koncentrace, pro které se tvoří nejvíce gelu, ale méně výrazně. Při koncentracích CTAB 10-15 mM se tvoří nejvíce gelu s 2% hyaluronanem, při 50 mM je stejné množství gelu pro 0,5% a 1% hyaluronan, při 75 mM s 1% hyaluronanem, při 100 mM vznikalo stejné množství gelu pro 1% a 2% hyaluronan a pro koncentrace 150-300 mM bylo největší množství gelu opět s 2% hyaluronanem. Obsah vody v gelech klesá s rostoucí koncentrací tenzidu, jak je vidět v grafu na obrázku 34.



Obr. 32: Hmotnost vysušeného gelu v závislosti na koncentraci CTAB pro hyaluronan 0,5%.



Obr. 33: Hmotnost vysušeného gelu v závislosti na koncentraci CTAB pro všechny koncentrace hyaluronanu, 2. opakování.



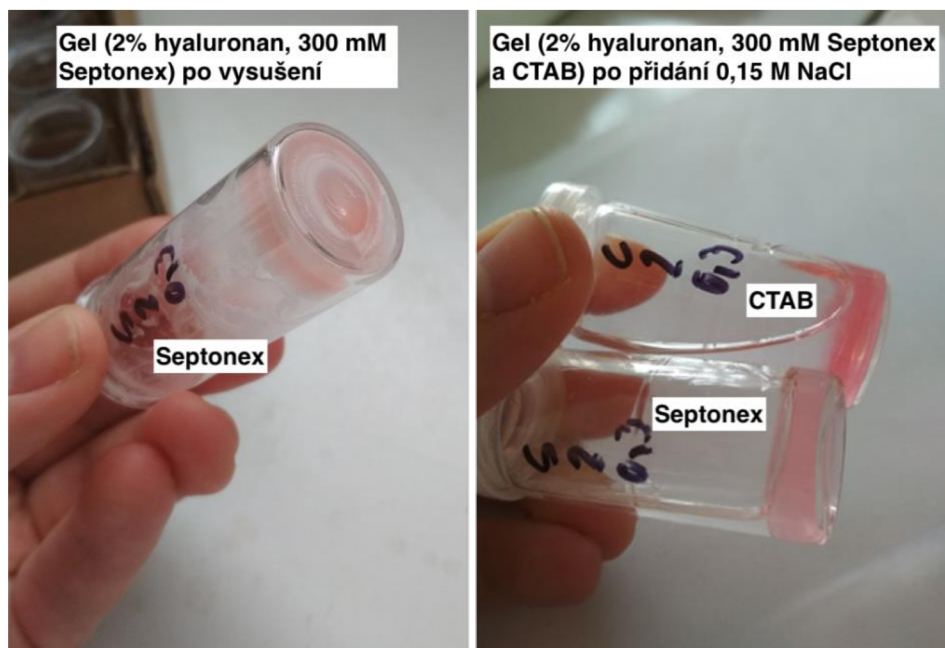
Obr. 34: Závislost obsahu vody v gelu na koncentraci CTAB, 0,5% hyaluronan.

#### 5.2.4 Rozpustnost

Stanovit rozpustnost CTAB bylo jednodušší než u Septonexu. Nasycený roztok byl namíchán již prvním pokusem. Při koncentraci 18 g/100 ml 0,15 NaCl a 19 g/100 ml 0,15 NaCl se na dně vialky tvořila vrstva nerozpuštěného tenzidu. Vyhodnocením výsledků z termogravimetrie byla rozpustnost CTAB stanovena na 13 mg<sub>CTAB</sub>/100 mg<sub>0,15 M NaCl</sub>.

#### 5.3 Zpětná hydratace vysušených gelů

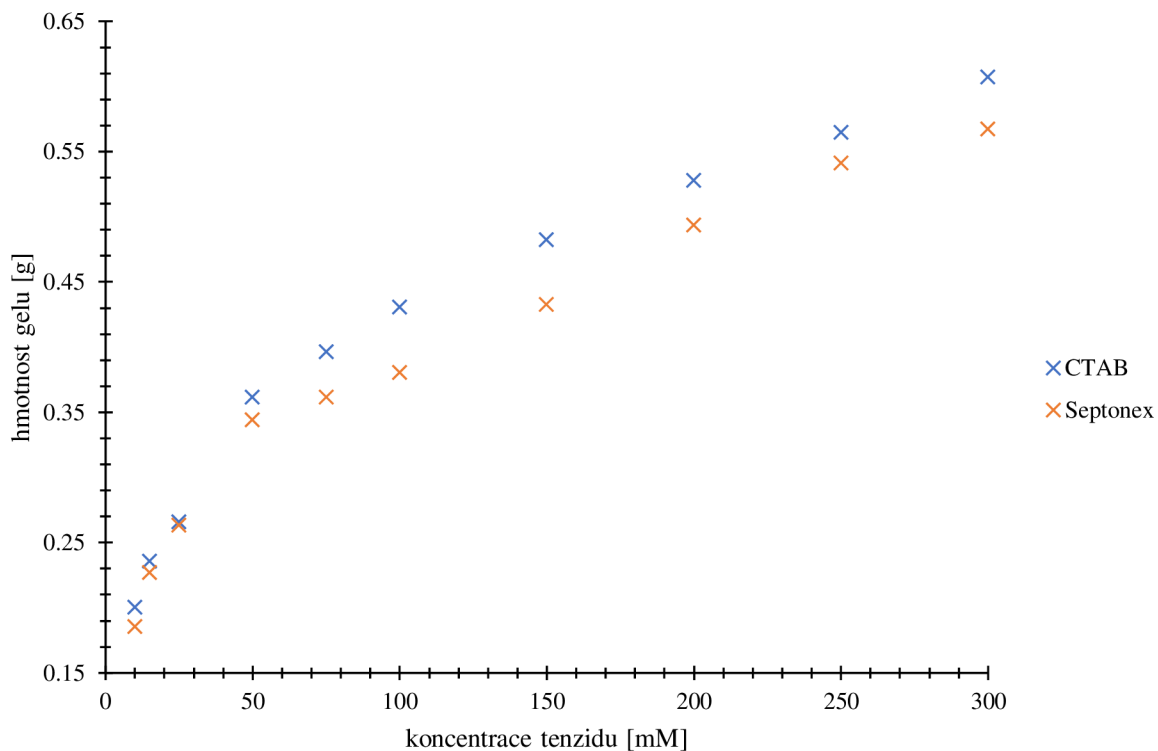
Ke gelům vytvořených z tenzidu 300 mM a hyaluronanu 2% byly přidány 3 ml 0,15 M NaCl, aby bylo prozkoumáno, zda se ze sušiny opět zformuje gel. Gel byl kontrolován po týdnu a bylo zjištěno, že gel nabobtná do původního stavu. Vzhled supernatantu zůstal čirý, bezbarvý (změna oproti gelu z 300 mM Septonexu před vysušením) a vytvořil se červený gel asi v 7 mm vrstvě, množství gelu se oproti gelu před vysušením téměř nezměnilo.



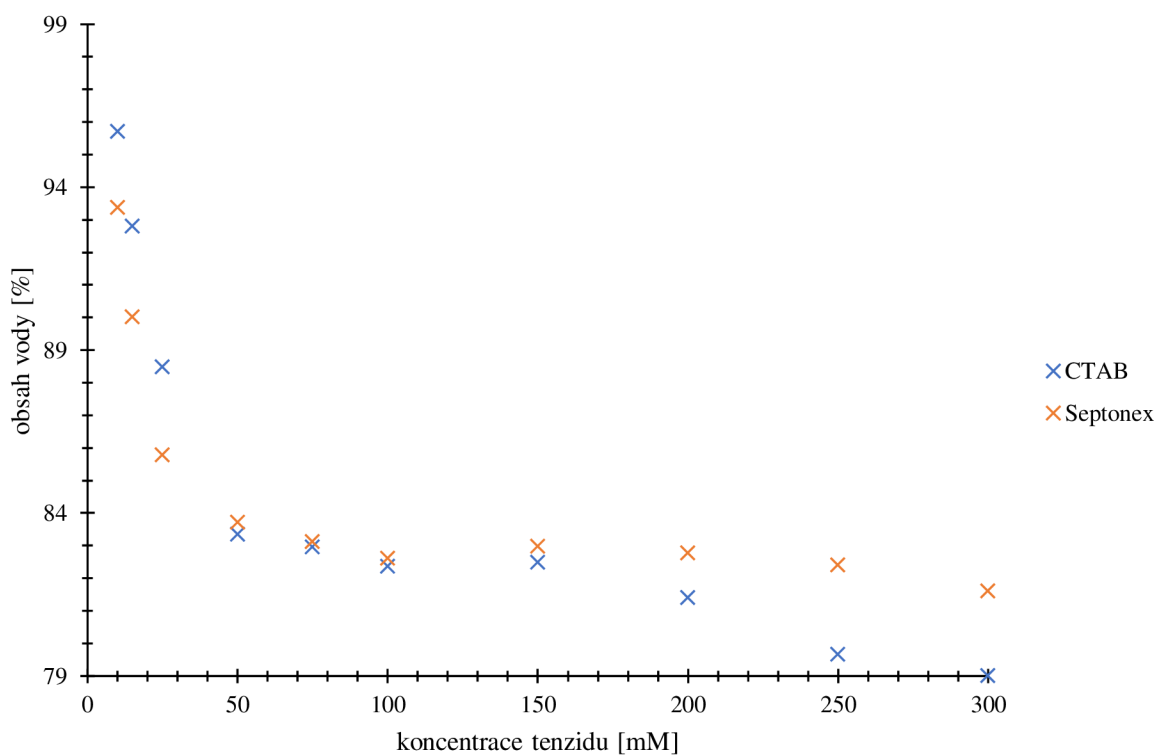
Obr. 35: Porovnání vysušeného a hydratovaného gelu.

#### 5.4 Srovnání Septonexu a CTAB

Interakce obou tenzidů s hyaluronem byly velmi podobné. V obou případech došlo k ustálení fázové rovnováhy až po 1 týdnu po vytvoření gelů. Pro 1% a 2% hyaluronan vznikaly tekuté gely, neboli bezbarvé viskózní kapaliny. U CTAB vznikaly častěji zakalené supernatanty, tedy byly v roztoku přítomny malé částice rozptylující světlo, ale nebyly v dostatečné koncentraci potřebné k zformování gelu. V případě Septonexu se častěji vyskytovalo červené zbarvení supernatantu, což indikuje přítomnost micelárních útvarů v roztoku. Z grafu na obrázku 36 pro 0,5% hyaluronan, který byl vytvořený z průměru hmotností obou opakování, lze vyčíst, že v komplexech hyaluronan-CTAB se tvořilo více gelu, než se Septonexem. Obsah vody se lišil pro různé koncentrace hyaluronanu. Pro 0,1% a 0,2% hyaluronan byl obsah vody vyrovnán až do 150 mM, od 200 mM byl obsah vody vyšší u Septonexu. Pro 0,5% hyaluronan v oblasti 10-25 mM byl obsah vody vyšší u CTAB, v oblasti 50-150 mM vyrovnán a od 200 mM vyšší u Septonexu. U 1% hyaluronanu v oblasti 10-75 mM byl větší obsah vody u CTAB, v oblasti 100-150 mM obsah vody vyrovnán a v oblasti 200-300 mM opět u Septonexu. U 2% hyaluronanu byl v oblasti 10-25 mM obsah vody vyrovnán, v oblasti 50-150 mM obsah vody větší u CTAB a v oblasti 200-300 mM u Septonexu. Obrázek 37 zobrazuje průměrné hodnoty pro 0,5% hyaluronan. Další grafy srovnání jak hmotností, tak obsahu vody jsou vloženy do příloh.



Obr 36: Srovnání hmotnosti gelů pro oba tenzidy pro 0,5% hyaluronan, graf byl vytvořený z průměrných hodnot z obou opakování.



Obr. 37: Srovnání obsahu vody v gelech pro oba tenzidy pro 0,5% hyaluronan, graf byl vytvořený z průměrných hodnot z obou opakování.

## 6 ZÁVĚR

Bakalářská práce se zabývá zkoumáním interakcí mezi polyelektrolyty a tensidy, konkrétně interakcí hyaluronanu a CTAB a hyaluronanu a Septonexu, které spolu tvoří hydrogely. Součástí této práce bylo i zpracování literární rešerše na dané téma.

První částí experimentální práce byla zaměřena na vizuální charakteristiku vzniklých hydrogelů a na sestrojení fázového diagramu, tedy grafu, který znázorňuje schéma fázového chování systému hyaluronan-kationtový tensid za konstantního tlaku a teploty. K tvorbě gelu byly použity nejčastěji využívané koncentrace hyaluronanu a široké rozmezí koncentrací tensidu v modelu fyziologického roztoku 0,15 M NaCl. Bylo zjištěno, že v celém rozmezí koncentrací dochází k fázové separaci. V nejnižších koncentracích tensidu (10-15 mM) nevznikal pevný gel, ale tekutý připomínající bezbarvou viskózní kapalinu, která se po čase přelila. V ostatních koncentracích (25-300 mM) vznikalo různé množství pevného gelu buď na dně, nebo na stěnách vialky. Pomocí hydrofobního solubilizovaného barviva bylo definováno různé fázové chování. Jak je vidět ve výsledném fázovém diagramu, docházelo ke vzniku 5 typů supernatantu – čirý, bezbarvý; čirý, červený; zakalený, bílý; pomalu se táhnoucí zakalený a pomalu se táhnoucí čirý. Červené zbarvení indikovalo přítomnost hydrofobní složky - tensidu, v roztoku, zakalení přítomnost částic rozptylujících světlo, ale v nízké koncentraci potřebné k tvorbě gelu.

Druhá část se zabývala zjištěním, při jakých koncentracích dochází ke vzniku největšího množství gelu. Se stoupající koncentrací jak hyaluronanu, tak i tensidu, vznikalo větší množství gelu. Obsah vody klesal se stoupající koncentrací tensidu. Pro koncentrace 10-25 mM byl obsah vody přibližně stejný, od 50 mM byl největší obsah vody v gelech pro 2% hyaluronan.

Hlavním cílem práce bylo sestrojit schématický fázový diagram pro uvedený systém a upřesnit podmínky, za kterých vznikne nejvíce gelu. Lze tedy konstatovat, že cíl byl splněn. Tato práce ukázala, že k fázové separaci dochází v celém rozmezí koncentrací, i když ne všechny gely mají potřebné vlastnosti k dalšímu použití. Z výsledků této práce jako nejvhodnější koncentrace tensidu a hyaluronanu pro využití v praxi vyplývají 0,5% hyaluronan a tensid 50-300 mM, 1% hyaluronan 75-300 mM a 2% hyaluronan a Septonex 100-300 mM a CTAB 200-300 mM.



## 7 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] Bartovská Lidmila, Šišková Marie: *Fyzikální chemie povrchů a koloidních soustav* [online]. Version 1.0. Praha : VŠCHT Praha, 2005 [cit. 2019-03-28]. P. 188. Available from www: <[http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid\\_isbn-80-7080-579-X/pages-img/188.html](http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_isbn-80-7080-579-X/pages-img/188.html)>. ISBN 80-7080-579-X
- [2] NOVÁK, Josef. Fyzikální chemie: bakalářský a magisterský kurz. Praha: Vydavatelství VŠCHT, 2008. ISBN 978-80-7080-675-3.
- [3] SMILEK, Jiří a Michal KALINA. Praktický úvod do nanotechnologií: (Laboratorní úlohy). Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická.
- [4] Radiation Formation of Hydrogels for Biomedical Applications. Division of applied radiation chemistry [online]. 2002, [cit. 2019-04-02]. Dostupné z: [http://www.mitr.p.lodz.pl/biomat/raport/2\\_radiation\\_hydrogels.html](http://www.mitr.p.lodz.pl/biomat/raport/2_radiation_hydrogels.html)
- [5] ROSIAK, Janusz M a Fumio YOSHII. Hydrogels and their medical applications. Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms. 1999, **151**(1-4), 56-64. DOI: 10.1016/S0168-583X(99)00118-4. ISSN: 0168583X. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168583X99001184>
- [6] GERLACH, Gerald a Karl-Friedrich ARNDT. Hydrogel sensors and actuators. New York: Springer, c2009. Springer series on chemical sensors and biosensors, 06. ISBN 978-3-540-75645-3.
- [7] PEPPAS, N.A., B.V. SLAUGHTER a M.A. KANZELBERGER. Hydrogels. Polymer Science: A Comprehensive Reference. Elsevier, 2012, 2012, , 385-395. DOI: 10.1016/B978-0-444-53349-4.00226-0. ISBN 9780080878621. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780444533494002260>
- [8] ŠMIDRKAL, Jan. Tenzidy a detergenty dnes. Chemické listy. 1999, (93), s. 421-427.
- [9] HOLMBERG, Krister. Surfactants and polymers in aqueous solution. 2nd ed. Hoboken, NJ: John Wiley, c2003. ISBN 04-714-9883-1.
- [10] KRS, Václav a Radek HANEK. Materiály I pro studijní obor Kosmetička. 2., aktualiz. vyd. Praha: Informatorium, 2011. ISBN 978-80-7333-085-9.
- [11] UTB ve Zlíně. Fyzikální, chemické a technické vlastnosti povrchově aktivních látek. Vzdělávací portál [online]. 2007 [cit. 2019-03-28]. Dostupný z WWW: <http://utb.cepac.cz/screens/default.aspx>
- [12] BLAŽEJ, Anton. Tenzidy. Bratislava: Alfa, 1977. Edícia chemickej literatúry.

- [13] UTB ve Zlíně. Systematika povrchově aktivních látek. Vzdělávací portál [online]. [cit. 2019-03-28]. Dostupný z WWW: <http://utb.cepac.cz/screens/default.aspx>
- [14] BROZE, Guy. Handbook of detergents – Part A: Properties. New York: Marcel Dekker, 1999. ISBN 0-8247-1417-2.
- [15] MALMSTEN, Martin. Surfactants and Polymers in Drug Delivery. New York: Marcel Dekker, 2002. ISBN 0-8247-0804-0.
- [16] Micellar Electrokinetic Capillary Chromatography, MECC. [online]. [cit. 2019-03- 28]. Dostupné z: <http://web.natur.cuni.cz/~pcoufal/mecc.html>
- [17] P212121: CTAB [online]. USA [cit. 2019-01-19]. Dostupné z: <https://store.p212121.com/ctab/>
- [18] PubChem [online]. [cit. 2019-01-19]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>
- [19] CSID:5754, <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.5754.html> (accessed 16:28, Jan 19, 2019)
- [20] MOHAMED, Gehad G., M. F. EL-SHAHAT, A. M. AL-SABAGH, M. A. MIGAHED a Tamer Awad ALI. Septonex–tetraphenylborate screen-printed ion selective electrode for the potentiometric determination of Septonex in pharmaceutical preparations. *The Analyst*. 2011, **136**(7). DOI: 10.1039/c0an00662a. ISSN 0003-2654. Dostupné také z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=c0an00662a>
- [21] CSID:141396, <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.141396.html> (accessed 13:19, Jan 18, 2019)
- [22] PILGROVÁ, Tereza, Tereza VENEROVÁ, Filip MRAVEC a Miloslav PEKAŘ. Interactions of hyaluronan with oppositely charged surfactants in very diluted solutions in water. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2018, **112**, 241-249. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2018.01.176. ISSN 01418130. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0141813017344689>
- [23] SWARBRICK, James. Cationic Surfactants. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 1970, **59**(9). DOI: 10.1002/jps.2600590941. ISSN 00223549. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022354915375158>
- [24] Prokopová Irena: *Makromolekulární chemie* [online]. Version 1.0. Praha : VŠCHT Praha, 2007 [cit. 2019-01-20]. P. 013. Available from [www: <http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid\\_isbn-978-80-7080-662-3/pages-pdf/013.html>](http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_isbn-978-80-7080-662-3/pages-pdf/013.html). ISBN 978-80-7080-662-3
- [25] PETRŮJ, Jaroslav. *Polymery (stručný přehled)*. Brno: VUT FCH.

- [26] RYBNÍKÁŘ, František. Makromolekulární chemie. 1. vyd. Brno: VUT, 2000. ISBN 80-214-1556-8
- [27] Ducháček V.: *Polymery - výroba, vlastnosti, zpracování, použití*. 2. vyd. Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Praha 2006. Str. 033. ISBN 80-7080-617-6
- [28] VINKLÁREK, Z., VONDRUŠKA, M.: Intermakromolekulární intermakromolekulární komplexy. Agentura D s.r.o., Zlín 1995
- [29] DOBRYNIN, A a M RUBINSTEIN. Theory of polyelectrolytes in solutions and at surfaces. *Progress in Polymer Science*. 2005, **30**(11), 1049-1118. DOI: 10.1016/j.progpolymsci.2005.07.006. ISSN 00796700. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0079670005000936>
- [30] Pouchlý Julius: *Fyzikální chemie makromolekulárních a koloidních soustav* [online]. Version 1.0. Praha : VŠCHT Praha, 2008 [cit. 2019-01-22]. P. 127. Available from [www](http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_isbn-978-80-7080-674-6/pages-pdf/127.html): <[http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid\\_isbn-978-80-7080-674-6/pages-pdf/127.html](http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_isbn-978-80-7080-674-6/pages-pdf/127.html)>. ISBN 978-80-7080-674-6
- [31] KÖTZ, J., S. KOSMELLA a T. BEITZ. Self-assembled polyelectrolyte systems. *Progress in Polymer Science* [online]. 2001, č. 8, s. 1199-1232 [cit. 2019-02-03]. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0079670001000168>
- [32] GOSWAMI, Monojoy, Jose M. BORREGUERO, Philip A. PINCUS a Bobby G. SUMPTER. Surfactant-Mediated Polyelectrolyte Self-Assembly in a Polyelectrolyte–Surfactant Complex. *Macromolecules*. 2015, **48**(24), 9050-9059. DOI: 10.1021/acs.macromol.5b02145. ISSN 0024-9297. Dostupné také z: <http://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.macromol.5b02145>
- [33] CHATTERJEE, A., S.P. MOULIK, P.R. MAJHI a S.K. SANYAL. Studies on surfactant–biopolymer interaction. I. Microcalorimetric investigation on the interaction of cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) and sodium dodecylsulfate (SDS) with gelatin (Gn), lysozyme (Lz) and deoxyribonucleic acid (DNA). *Biophysical Chemistry*. 2002, **98**(3), 313-327. DOI: 10.1016/S0301-4622(02)00107-2. ISSN 03014622. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0301462202001072>
- [34] FERREIRA, Guilherme A. a Watson LOH. Liquid crystalline nanoparticles formed by oppositely charged surfactant-polyelectrolyte complexes. 2017, **32**, 11-22. DOI: 10.1016/j.cocis.2017.08.003. ISSN 13590294. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1359029417300055>
- [35] NECAS, J., L. BARTOSIKOVA, P. BRAUNER a J. KOLAR. Hyaluronic acid (hyaluronan): a review. *Veterinární Medicína*. 2008, **53**(No. 8), 397-411. DOI: 10.17221/1930-VETMED. ISSN 03758427.

- [36] Thalberg, K., Lindman, B., Karlstromt, G.: Phase Behavior of Systems of Cationic Surfactant and Anionic Polyelectrolyte: Influence of Surfactant Chain Length and Polyelectrolyte Molecular Weight. *Journal of Physical Chemistry*, 1991, č. 95, s. 3370-3376.
- [37] Thalberg, K., Lindman, B., Karlstromt, G.: Phase diagram of a system of cationic surfactant and anionic polyelectrolyte: tetradecyltrimethylammonium bromide- hyaluronan-water. *The Journal of Physical Chemistry*, 1990, roč. 94, č. 10.
- [38] Bjoerling, M., Hersloef-Bjoerling, A., Stilbs, A.: NMR selfdiffusion study of the interaction between sodium hyaluronate and tetradecyltrimethylammonium bromide. *Macromolecules*, 1995, roč. 28, č. 20, s.6970–6975.
- [39] Hersloef, A., Sundeloef, L. O., Edsman, K.: Interaction between polyelectrolyte and surfactant of opposite charge: hydrodynamic effects in the sodium hyaluronate/tetradecyltrimethylammonium bromide/sodium chloride/water system. *The Journal of Physical Chemistry*, 1992, roč. 96, č. 5, s. 2345–2348.
- [40] SAUEROVÁ, Pavla, Tereza PILGROVÁ, Miloslav PEKAŘ a Marie HUBÁLEK KALBÁČOVÁ. Hyaluronic acid in complexes with surfactants: The efficient tool for reduction of the cytotoxic effect of surfactants on human cell types. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2017, **103**, 1276-1284. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2017.05.173. ISSN 01418130. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S014181301731317X>
- [41] SCOTT, J. E., et al. Secondary and tertiary structures of hyaluronan in aqueous solution, investigated by rotary shadowing-electron microscopy and computer simulation. Hyaluronan is a very efficient network-forming polymer. *Biochem J.* 1991, vol. 274, no. 3, s. 699-705.
- [42] BUCHOLD, Philipp, Ralf SCHWEINS, Zhenyu DI a Michael GRADZIELSKI. Structural behaviour of sodium hyaluronate in concentrated oppositely charged surfactant solutions. *Soft Matter*. 2017, **13**(11), 2253-2263. DOI: 10.1039/C6SM02742C. ISSN 1744-683X. Dostupné také z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=C6SM02742C>
- [43] LAPČÍK, Lubomír Jr., LAPČÍK, Lubomír, Stefaan DE SMEDT, Joseph DEMEESTER a Peter CHABREČEK. Hyaluronan: Preparation, Structure, Properties, and Applications †. *Chemical Reviews*. 1998, **98**(8), 2663-2684. DOI: 10.1021/cr941199z. ISSN 0009-2665. Dostupné také z: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/cr941199z>
- [44] Hascall, V., Laurent, T.: Hyaluronan: Structure and physical properties. *Glycoforum* [online], 1997, [cit. 10. 3. 2019], <http://www.glycoforum.gr.jp/>.
- [45] SCOTT, J.E. Secondary and tertiary structures of hyaluronan in aqueous solutions. Some biological consequences. *Glycoforum* [online]. 1998 [cit. 2019-03-28]. Dostupné z: <http://glycoforum.gr.jp/science/hyaluronan/HA02/HA02E.html>

- [46] Role and Purpose of Hyaluronan: Structure of Hyaluronan [online]. England & Wales: TRB Chemedica International, 2016 [cit. 2019-03-10]. Dostupné z: <https://vismed.trbchemedica.co.uk/business-professionals/role-and-purpose-of-hyaluronan/structure-of-hyaluronan>
- [47] MRAVEC, Filip. Hyaluronan: Presentation presented at: [Technologie biopolymerů, VUT; 2019 Feb 27; Brno, Czechia.]
- [48] FUKADA, Kazuhiro, Emi SUZUKI a Tsutomu SEIMIYA. Rheological Properties of Sodium Hyaluronate in Decyltrimethylammonium Bromide Aqueous Solutions 1. *Langmuir*. 1999, **15**(12), 4217-4221. DOI: 10.1021/la9811822. ISSN 0743-7463. Dostupné také z: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/la9811822>
- [49] KARGEROVÁ, A.; PEKAŘ, M. Ultrasonic study of hyaluronan interactions with Septonex – a pharmaceutical cationic surfactant. *Carbohydrate Polymers*, 2019, roč. 204, č. 1, s. 17-23. ISSN: 0144-8617.

## 8 SEZNAM PŘÍLOH

Příloha 1: Septonex, 1. opakování – vizuální charakteristika gelů a supernatantu .....	56
Příloha 2: Gely 24 hodin a 1 týden po přípravě, Septonex, 0,2% hyaluronan, 1. opakování ..	58
Příloha 3: Gely 24 hodin a 1 týden po přípravě, Septonex, 0,5% hyaluronan, 1. opakování ..	59
Příloha 4: Gely 24 hodin a 1 týden po přípravě, Septonex, 1% hyaluronan, 1. opakování .....	59
Příloha 5: Gely 24 hodin a 1 týden po přípravě, Septonex, 2% hyaluronan, 1. opakování .....	59
Příloha 6: Gely 24 hodin a 1 týden po přípravě, Septonex, 0,1% hyaluronan, 2. opakování ..	60
Příloha 7: Gely 24 hodin a 1 týden po přípravě, Septonex, 0,2% hyaluronan, 2. opakování ..	60
Příloha 8: Gely 24 hodin a 1 týden po přípravě, Septonex, 1% hyaluronan, 2. opakování .....	60
Příloha 9: Gely 24 hodin a 1 týden po přípravě, Septonex, 2% hyaluronan, 2. opakování .....	61
Příloha 10: Závislost hmotnosti gelu na koncentraci Septonexu pro 0,1% hyaluronan.....	61
Příloha 11: Závislost hmotnosti gelu na koncentraci Septonexu pro 0,2% hyaluronan.....	62
Příloha 12: Závislost hmotnosti gelu na koncentraci Septonexu pro 1% hyaluronan.....	62
Příloha 13: Závislost hmotnosti gelu na koncentraci Septonexu pro 2% hyaluronan.....	63
Příloha 14: Závislost hmotnosti gelu na koncentraci Septonexu pro všechny koncentrace hyaluronanu, 1. opakování .....	63
Příloha 15: Hmotnost vysušeného gelu v závislosti na koncentraci Septonexu pro 0,1% hyaluronan.....	64
Příloha 16: Hmotnost vysušeného gelu v závislosti na koncentraci Septonexu pro 0,2% hyaluronan.....	64
Příloha 17: Hmotnost vysušeného gelu v závislosti na koncentraci Septonexu pro 1% hyaluronan.....	65
Příloha 18: Hmotnost vysušeného gelu v závislosti na koncentraci Septonexu pro 2% hyaluronan.....	65
Příloha 19: Hmotnost vysušeného gelu v závislosti na koncentraci Septonexu pro všechny koncentrace hyaluronanu, 1. opakování .....	66
Příloha 20: Obsah vody v závislosti na koncentraci Septonexu pro 0,1% hyaluronan .....	66
Příloha 21: Obsah vody v závislosti na koncentraci Septonexu pro 0,2% hyaluronan .....	67
Příloha 22: Obsah vody v závislosti na koncentraci Septonexu pro 1% hyaluronan .....	67
Příloha 23: Obsah vody v závislosti na koncentraci Septonexu pro 2% hyaluronan.....	68
Příloha 24: CTAB, 1. opakování – vizuální charakteristika gelů a supernatantu .....	69
Příloha 25: Gely 24 hodin a 1 týden po přípravě, CTAB, 0,1% hyaluronan, 1. opakování.....	72
Příloha 26: Gely 24 hodin a 1 týden po přípravě, CTAB, 0,2% hyaluronan, 1. opakování.....	72
Příloha 27: Gely 24 hodin a 1 týden po přípravě, CTAB, 0,5% hyaluronan, 1. opakování.....	72
Příloha 28: Gely 24 hodin a 1 týden po přípravě CTAB, 1% hyaluronan, 1. opakování.....	73
Příloha 29: Gely 24 hodin a 1 týden po přípravě CTAB, 2% hyaluronan, 1. opakování.....	73
Příloha 30: Gely 24 hodin a 1 týden po přípravě CTAB, 0,1% hyaluronan, 2. opakování.....	73
Příloha 31: Gely 24 hodin a 1 týden po přípravě CTAB, 0,2% hyaluronan, 2. opakování.....	74
Příloha 32: Gely 24 hodin a 1 týden po přípravě CTAB, 1% hyaluronan, 2. opakování.....	74
Příloha 33: Gely 24 hodin a 1 týden po přípravě CTAB, 2% hyaluronan, 2. opakování.....	74
Příloha 34: Závislost hmotnosti gelu na koncentraci CTAB pro 0,1% hyaluronan.....	75
Příloha 35: Závislost hmotnosti gelu na koncentraci CTAB pro 0,2% hyaluronan .....	75
Příloha 36: Závislost hmotnosti gelu na koncentraci CTAB pro 1% hyaluronan .....	76
Příloha 37: Závislost hmotnosti gelu na koncentraci CTAB pro 2% hyaluronan .....	76
Příloha 38: Závislost hmotnosti gelu na koncentraci CTAB pro všechny koncentrace hyaluronanu, 1. opakování .....	77
Příloha 39: Hmotnost vysušeného gelu v závislosti na koncentraci CTAB pro 0,1% hyaluronan.....	77
Příloha 40: Hmotnost vysušeného gelu v závislosti na koncentraci CTAB pro 0,2% hyaluronan.....	78

Příloha 41: Hmotnost vysušeného gelu v závislosti na koncentraci CTAB pro 1% hyaluronan .....	78
Příloha 42: Hmotnost vysušeného gelu v závislosti na koncentraci CTAB pro 2% hyaluronan .....	79
Příloha 43: Hmotnost vysušeného gelu v závislosti na koncentraci CTAB pro všechny koncentrace hyaluronanu, 1. opakování .....	79
Příloha 44: Obsah vody v závislosti na koncentraci CTAB pro 0,1% hyaluronan .....	80
Příloha 45: Obsah vody v závislosti na koncentraci CTAB pro 0,2% hyaluronan .....	80
Příloha 46: Obsah vody v závislosti na koncentraci CTAB pro 1% hyaluronan .....	81
Příloha 47: Obsah vody v závislosti na koncentraci CTAB pro 2% hyaluronan .....	81
Příloha 48: Srovnání hmotnosti gelů pro oba tenzidy pro 0,1% hyaluronan, graf byl vytvořený z průměrných hodnot z obou opakování .....	82
Příloha 49: Srovnání hmotnosti gelů pro oba tenzidy pro 0,2% hyaluronan, graf byl vytvořený z průměrných hodnot z obou opakování .....	82
Příloha 50: Srovnání hmotnosti gelů pro oba tenzidy pro 1% hyaluronan, graf byl vytvořený z průměrných hodnot z obou opakování .....	83
Příloha 51: Srovnání hmotnosti gelů pro oba tenzidy pro 2% hyaluronan, graf byl vytvořený z průměrných hodnot z obou opakování .....	83
Příloha 52: Srovnání obsahu vody v gelech pro oba tenzidy pro 0,1% hyaluronan, graf byl vytvořený z průměrných hodnot z obou opakování .....	84
Příloha 53: Srovnání obsahu vody v gelech pro oba tenzidy pro 0,2% hyaluronan, graf byl vytvořený z průměrných hodnot z obou opakování .....	84
Příloha 54: Srovnání obsahu vody v gelech pro oba tenzidy pro 1% hyaluronan, graf byl vytvořený z průměrných hodnot z obou opakování .....	85
Příloha 55: Srovnání obsahu vody v gelech pro oba tenzidy pro 2% hyaluronan, graf byl vytvořený z průměrných hodnot z obou opakování .....	85

Příloha 1: Septonex, 1. opakování – vizuální charakteristika gelů a supernatantu.

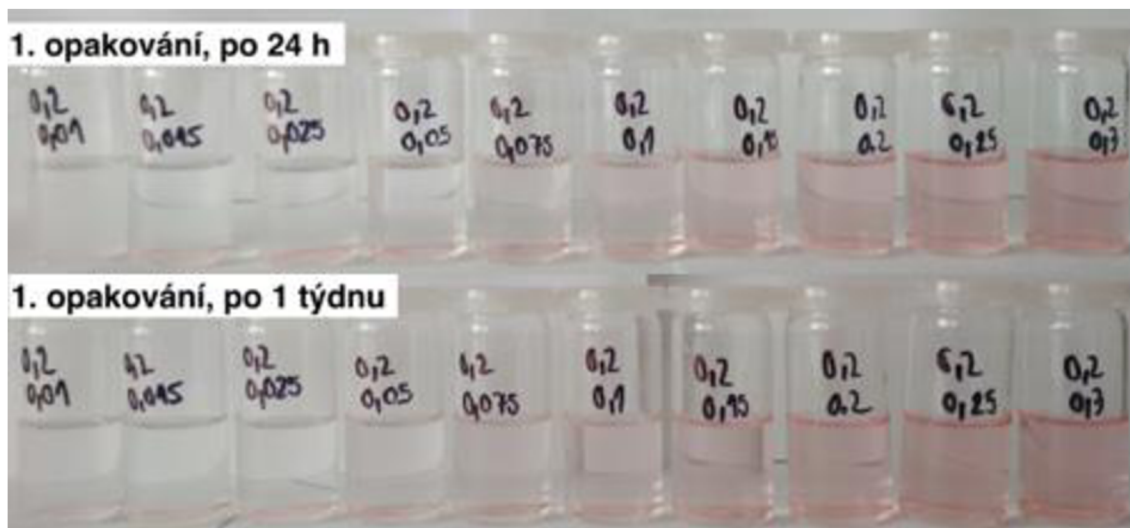
1. opakování							
CH <sub>4</sub> A [% hm.]	Ctenzid [mM]	po 24 hodinách			po 1 týdnu		
		vzhled supernatantu	vzhled gelu	množství gelu	vzhled supernatantu	vzhled gelu	množství gelu
0,2	10	zakalený, bílý	zakalený, bezbarvý	tenká vrstva na dně	čirý, bezbarvý	zakalený, bezbarvý	tenká vrstva na dně
	15	čirý, bezbarvý	červený, pevný	tenká vrstva na dně	čirý, bezbarvý	červený, pevný	tenká vrstva na dně
	25	čirý, bezbarvý	červený, pevný	tenká vrstva na dně	čirý, bezbarvý	červený, pevný	tenká vrstva na dně
	50	čirý, bezbarvý	červený, pevný	tenká vrstva na dně	čirý, červený	červený, pevný	tenká vrstva na dně
	75	čirý, červený	červený, pevný	tenká vrstva na dně	čirý, červený	červený, pevný	tenká vrstva na dně
	100	čirý, červený	červený, pevný	tenká vrstva na dně	čirý, červený	červený, pevný	tenká vrstva na dně
	150	čirý, červený	červený, pevný	tenká vrstva na dně	čirý, červený	červený, pevný	tenká vrstva na dně
	200	čirý, červený	červený, pevný	tenká vrstva na dně	čirý, červený	červený, pevný	tenká vrstva na dně
	250	čirý, červený	červený, pevný	tenká vrstva na dně	čirý, červený	červený, pevný	tenká vrstva na dně
	300	čirý, červený	červený, pevný	tenká vrstva na dně	čirý, červený	červený, pevný	tenká vrstva na dně



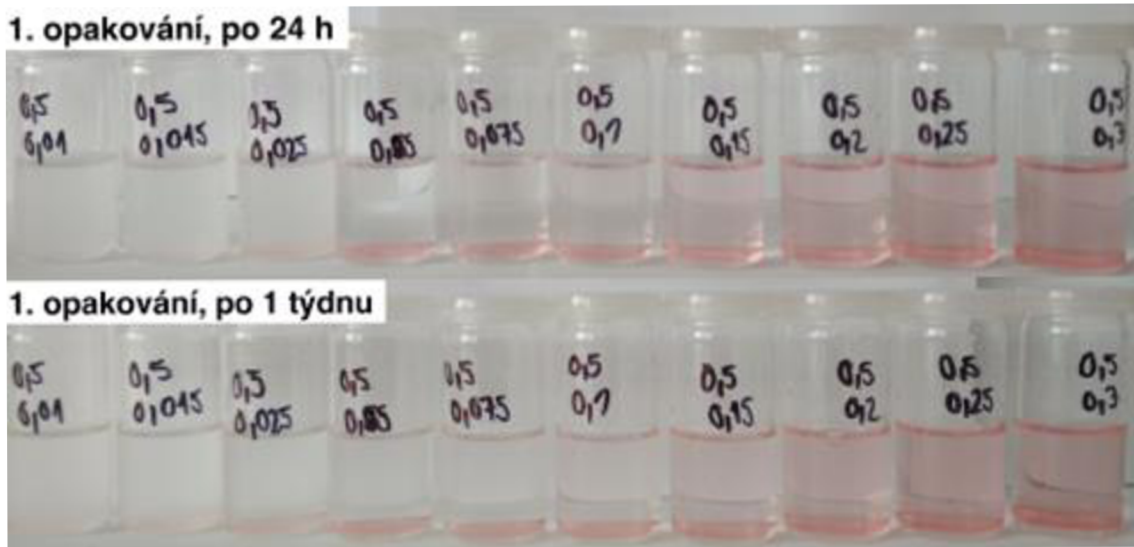
<b>0,5</b>	<b>10</b>	zakalený, bílý	zakalený, bezbarvý	tenká vrstva na dně	zakalený, bílý	zakalený, bezbarvý	tenká vrstva na dně
	<b>15</b>	zakalený, bílý	červený, pevný	tenká vrstva na dně	zakalený, bílý	červený, pevný	na dně a stěnách
	<b>25</b>	zakalený, bílý	červený, pevný	tenká vrstva na dně	zakalený, bílý	červený, pevný	na dně a stěnách
	<b>50</b>	čirý, bezbarvý	červený, pevný	tenká vrstva na dně	čirý, bezbarvý	červený, pevný	na dně a stěnách
	<b>75</b>	čirý, bezbarvý	červený, pevný	tenká vrstva na dně	čirý, bezbarvý	červený, pevný	na dně a stěnách
	<b>100</b>	čirý, červený	červený, pevný	tenká vrstva na dně	čirý, červený	červený, pevný	na dně a stěnách
	<b>150</b>	čirý, červený	červený, pevný	tenká vrstva na dně	čirý, červený	červený, pevný	na dně a stěnách
	<b>200</b>	čirý, červený	červený, pevný	2-3 mm	čirý, červený	červený, pevný	na dně a stěnách
	<b>250</b>	čirý, červený	červený, pevný	2-3 mm	čirý, červený	červený, pevný	na dně a stěnách
	<b>300</b>	čirý, červený	červený, pevný	3-4 mm	čirý, červený	červený, pevný	na dně a stěnách
<b>1</b>	<b>10</b>	zakalený, bílý, viskózní	bezbarvý, tekutý	asi 1 ml gelu	zakalený, bílý, viskózní	bezbarvý, tekutý	asi 1 ml gelu
	<b>15</b>	zakalený, bílý, viskózní	bezbarvý, tekutý	asi 1 ml gelu	zakalený, bílý, viskózní	červený, tekutý	na dně
	<b>25</b>	zakalený, bílý	červený, pevný	tenká vrstva na dně	zakalený, bílý, viskózní	červený, pevný	na dně
	<b>50</b>	zakalený, bílý	červený, pevný	tenká vrstva na dně	zakalený, bílý	červený, pevný	na dně a stěnách
	<b>75</b>	čirý, bezbarvý	červený, pevný	2 mm	čirý, bezbarvý	červený, pevný	na dně a stěnách
	<b>100</b>	čirý, bezbarvý	červený, pevný	2-3 mm	čirý, bezbarvý	červený, pevný	na dně a stěnách
	<b>150</b>	čirý, červený	červený, pevný	2-3 mm	čirý, červený	červený, pevný	na dně a stěnách
	<b>200</b>	čirý, červený	červený, pevný	4-5 mm	čirý, červený	červený, pevný	na dně a stěnách
	<b>250</b>	čirý, červený	červený, pevný	4-5 mm	čirý, červený	červený, pevný	na dně a stěnách
	<b>300</b>	čirý, červený	červený, pevný	5-6 mm	čirý, červený	červený, pevný	na dně a stěnách

2	10	zakalený, bílý, viskózní	bezbarvý, tekutý	asi 3-4 ml	čirý, bezbarvý, viskózní	bezbarvý, tekutý	asi 3-4 ml
	15	zakalený, bílý, viskózní	bezbarvý, tekutý	asi 3-4 ml	zakalený, bílý, viskózní	bezbarvý, tekutý	asi 3-4 ml
	25	zakalený, bílý, viskózní	bezbarvý, tekutý	asi 3-4 ml	zakalený, bílý, viskózní	červený, tekutý	asi 3-4 ml
	50	zakalený, bílý	červený, pevný	na dně a stěnách	zakalený, bílý, viskózní	červený, tekutější	asi 3 ml a na stěnách
	75	zakalený, bílý	červený, pevný	na dně a stěnách	zakalený, bílý	červený, pevný	na dně a stěnách
	100	čirý, bezbarvý	červený, pevný	5 mm	čirý, bezbarvý	červený, pevný	na dně a stěnách
	150	čirý, bezbarvý	červený, pevný	5-6 mm	čirý, bezbarvý	červený, pevný	na dně a stěnách
	200	čirý, bezbarvý	červený, pevný	7-8 mm	čirý, bezbarvý	červený, pevný	na dně a stěnách
	250	čirý, bezbarvý	červený, pevný	7-8 mm	čirý, červený	červený, pevný	na dně a stěnách
	300	čirý, bezbarvý	červený, pevný	8-10 mm	čirý, červený	červený, pevný	na dně a stěnách

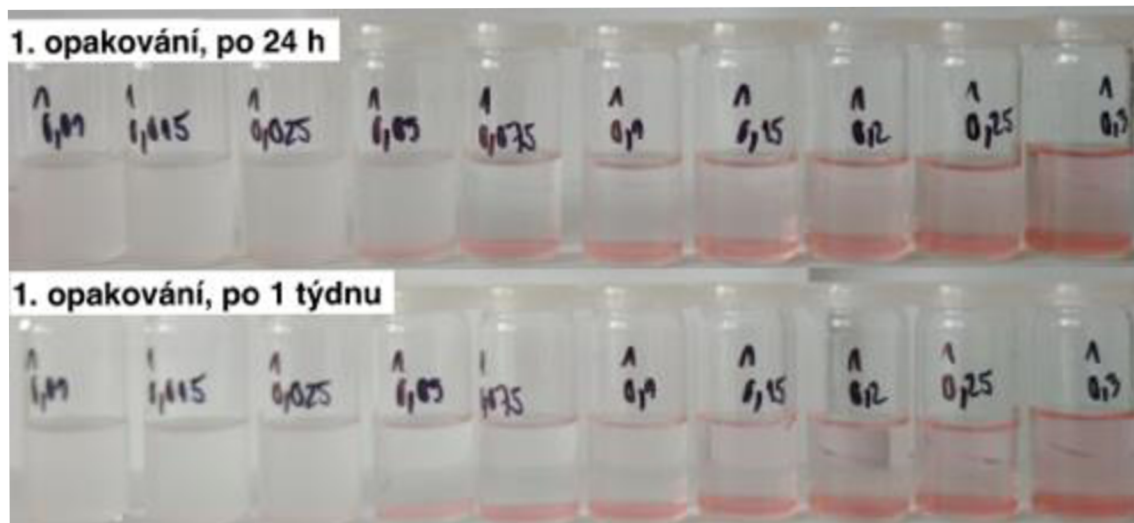
Příloha 2: Gely 24 hodin a 1 týden po přípravě, Septonex, 0,2% hyaluronan, 1. opakování.



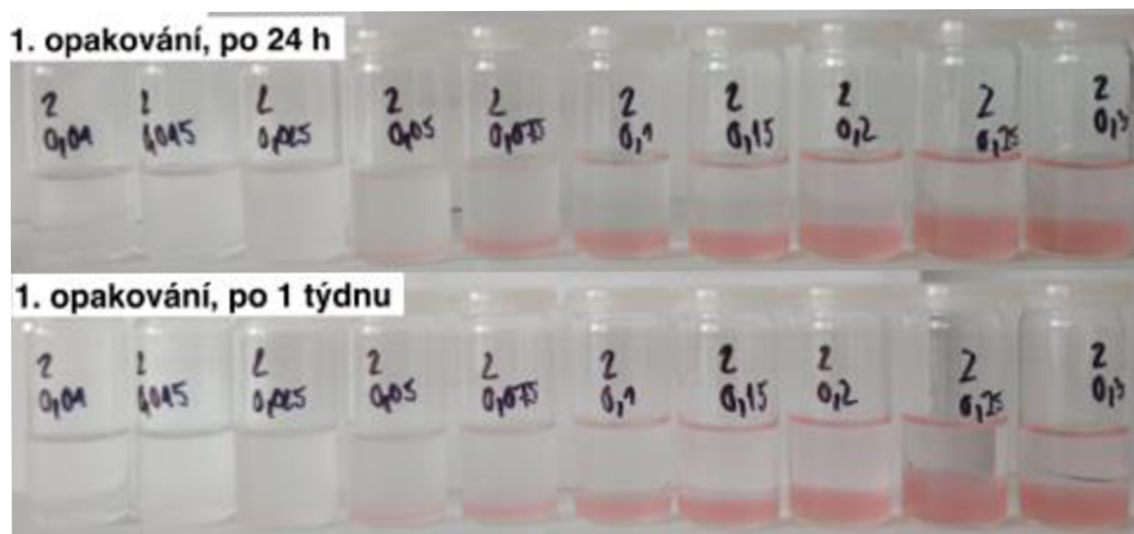
Příloha 3: Gely 24 hodin a 1 týden po přípravě, Septonex, 0,5% hyaluronan, 1. opakování.



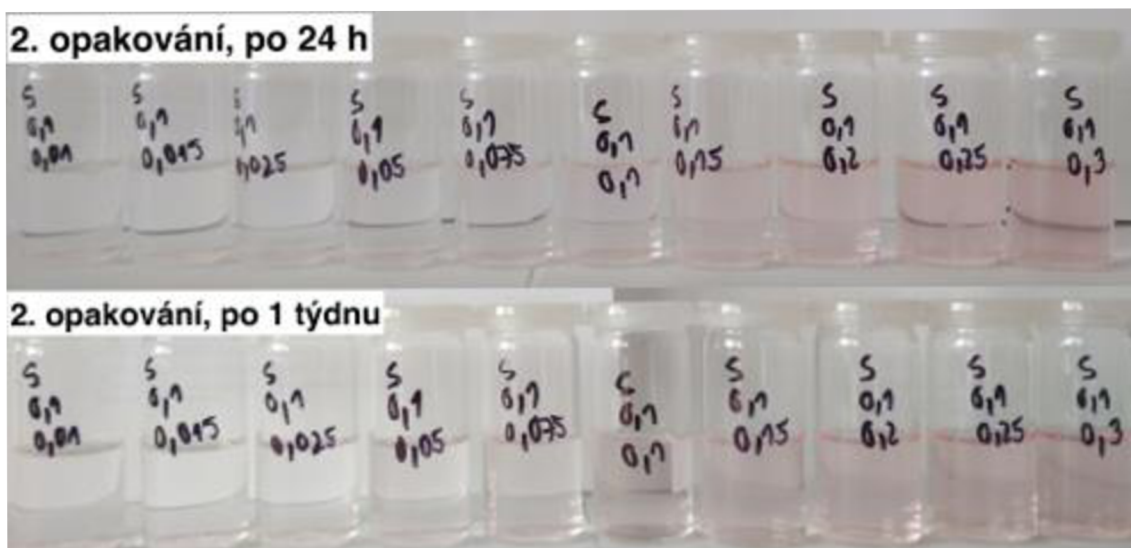
Příloha 4: Gely 24 hodin a 1 týden po přípravě, Septonex, 1% hyaluronan, 1. opakování.



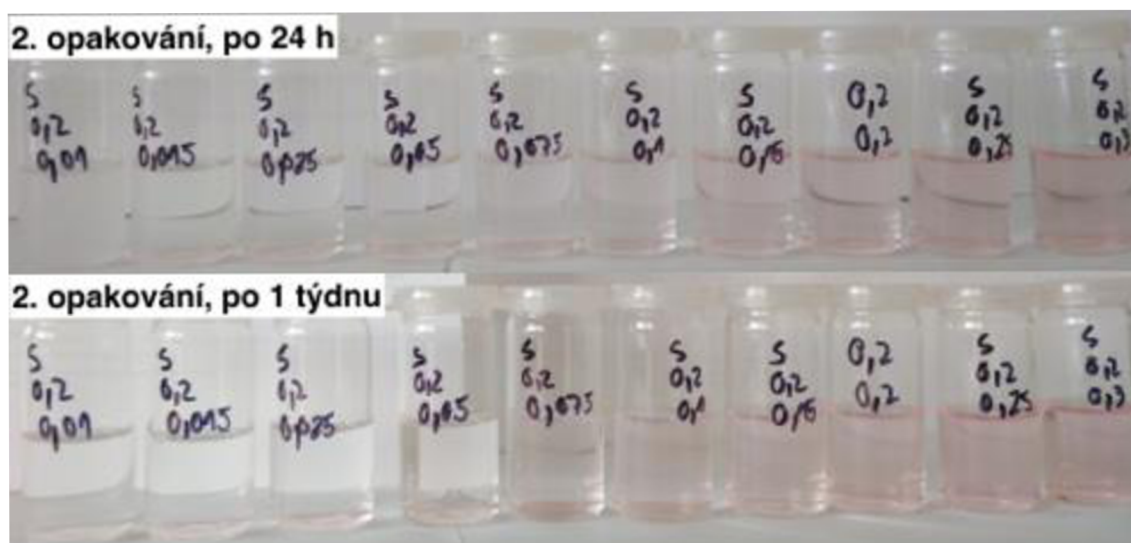
Příloha 5: Gely 24 hodin a 1 týden po přípravě, Septonex, 2% hyaluronan, 1. opakování.



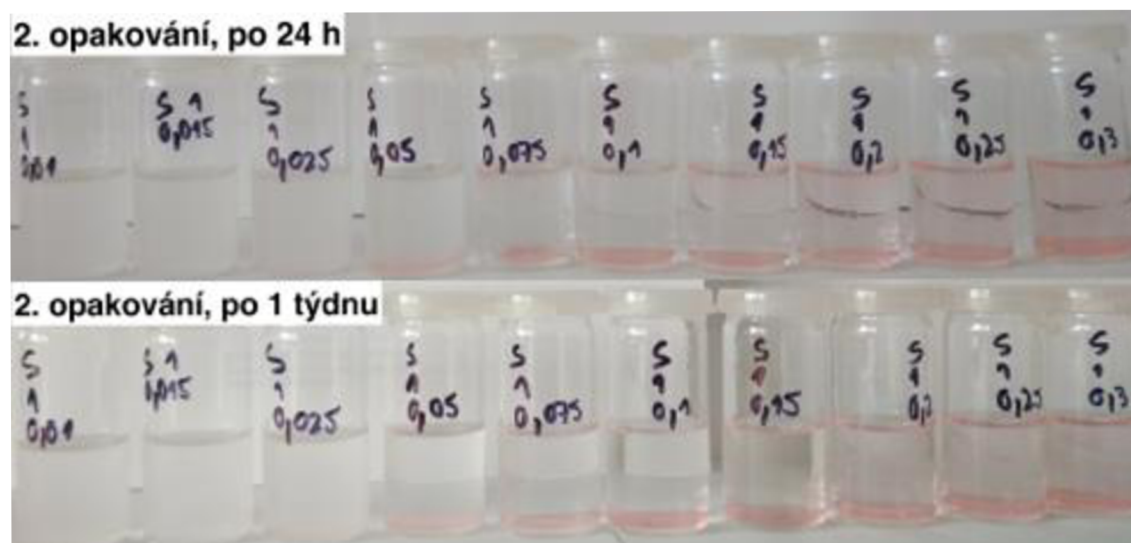
Příloha 6: Gely 24 hodin a 1 týden po přípravě, Septonex, 0,1% hyaluronan, 2. opakování.



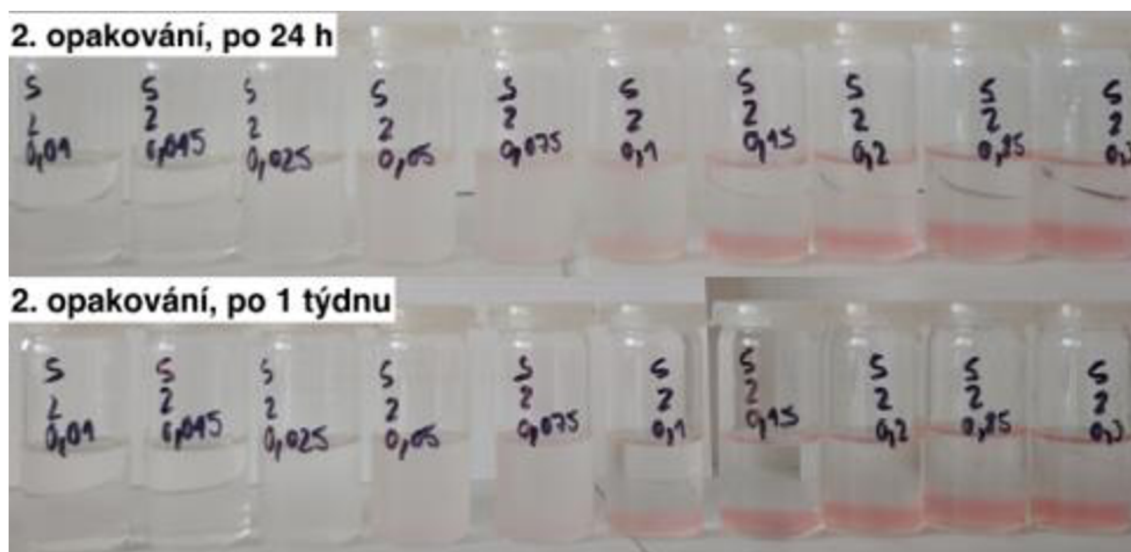
Příloha 7: Gely 24 hodin a 1 týden po přípravě, Septonex, 0,2% hyaluronan, 2. opakování.



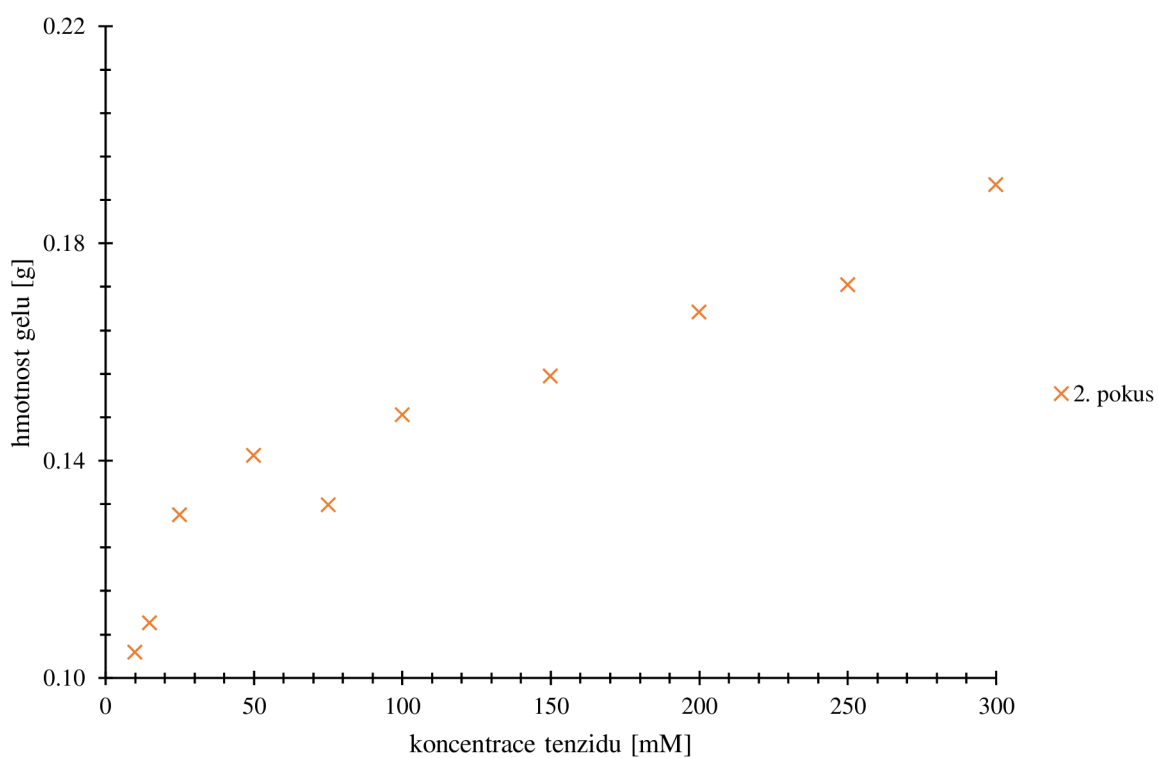
Příloha 8: Gely 24 hodin a 1 týden po přípravě, Septonex, 1% hyaluronan, 2. opakování.



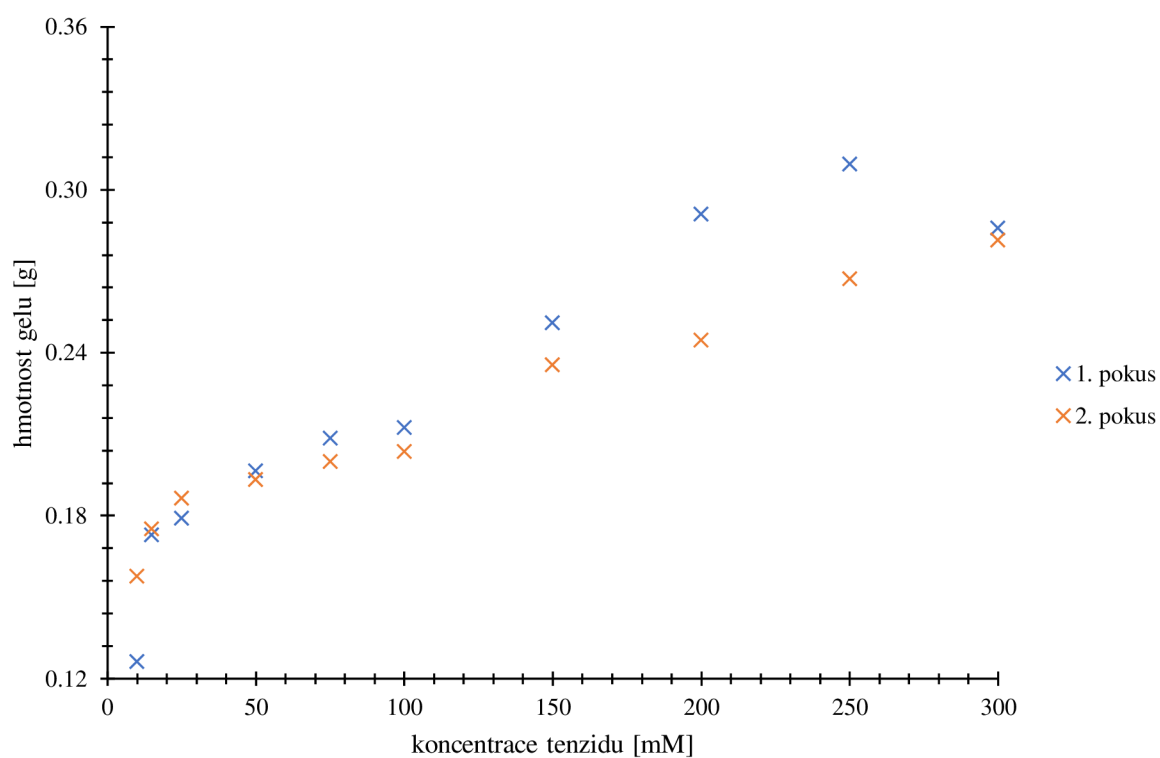
Příloha 9: Gely 24 hodin a 1 týden po přípravě, Septonex, 2% hyaluronan, 2. opakování.



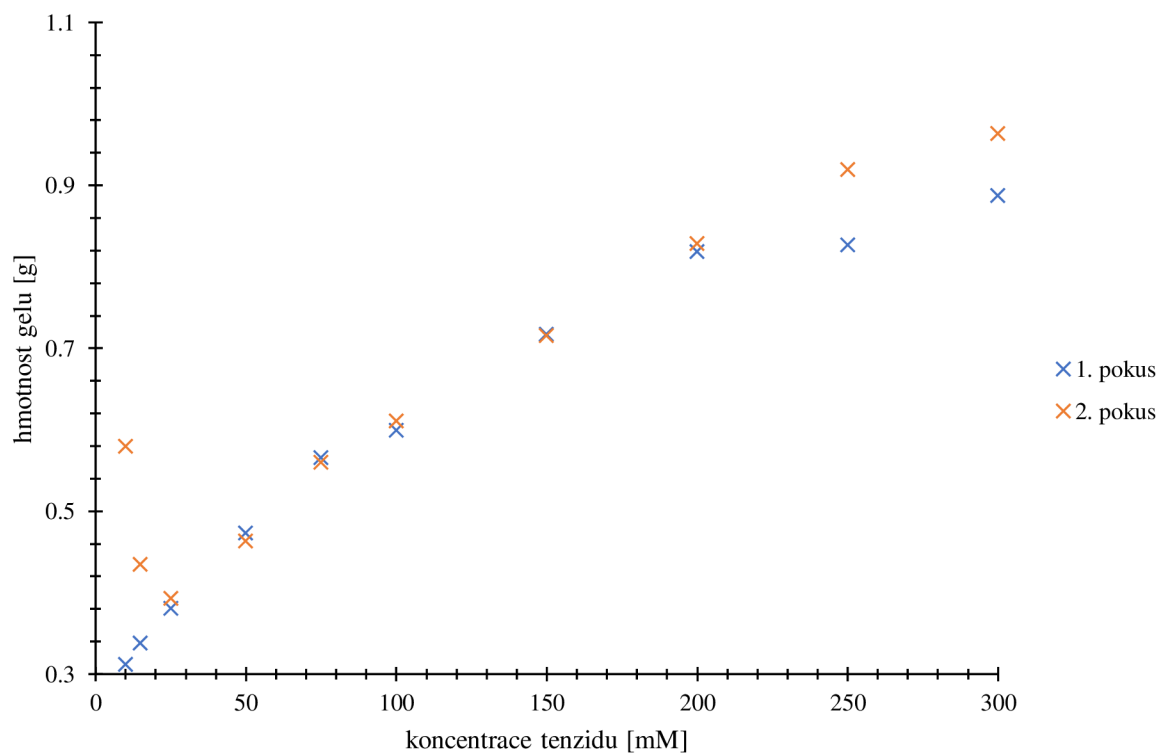
Příloha 10: Závislost hmotnosti gelu na koncentraci Septonexu pro 0,1% hyaluronan.



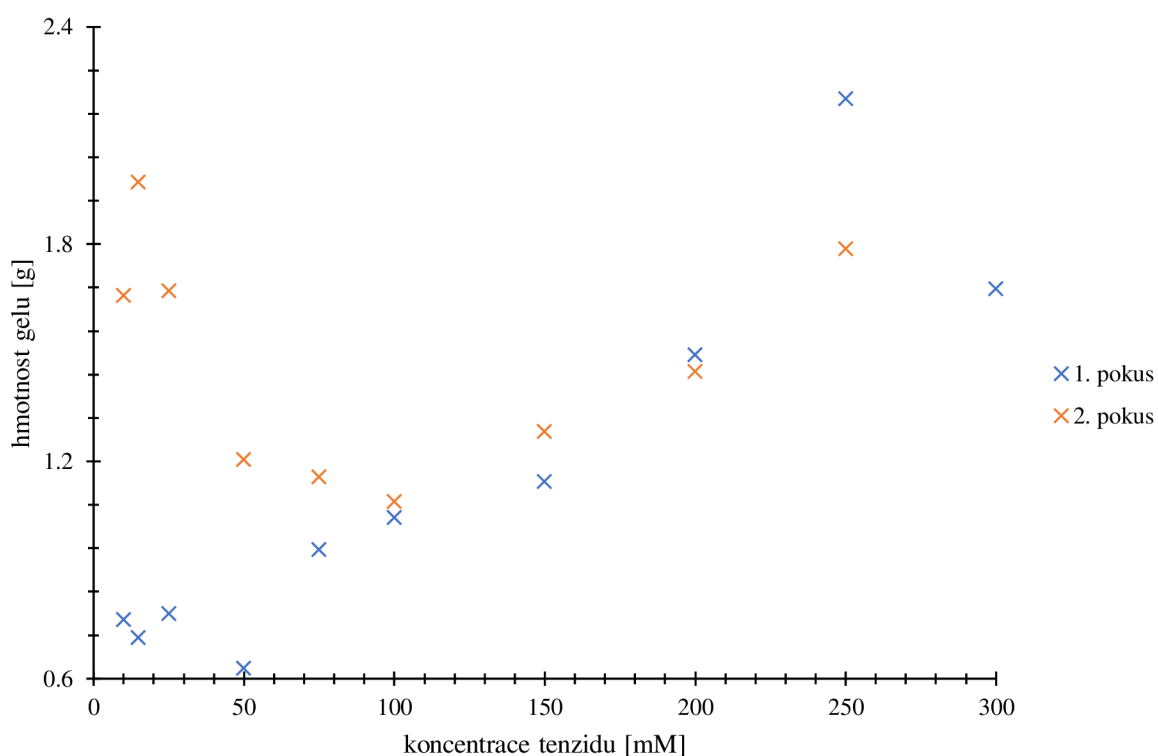
Příloha 11: Závislost hmotnosti gelu na koncentraci Septonexu pro 0,2% hyaluronan.



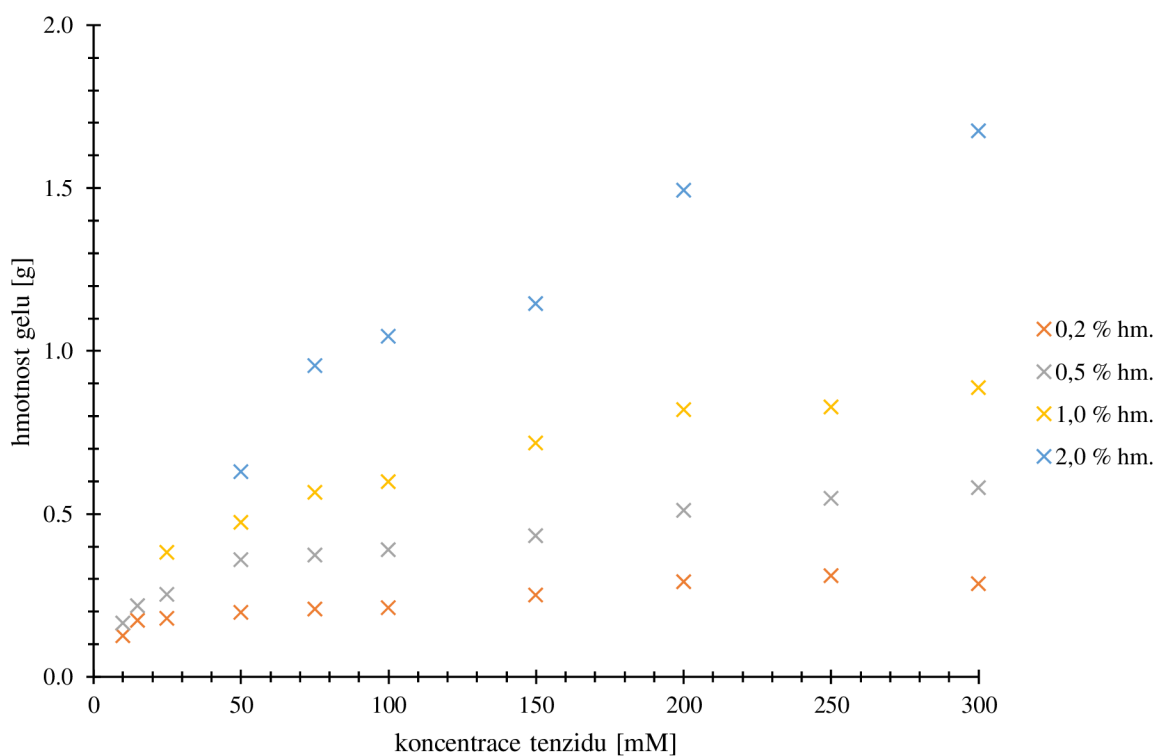
Příloha 12: Závislost hmotnosti gelu na koncentraci Septonexu pro 1% hyaluronan.



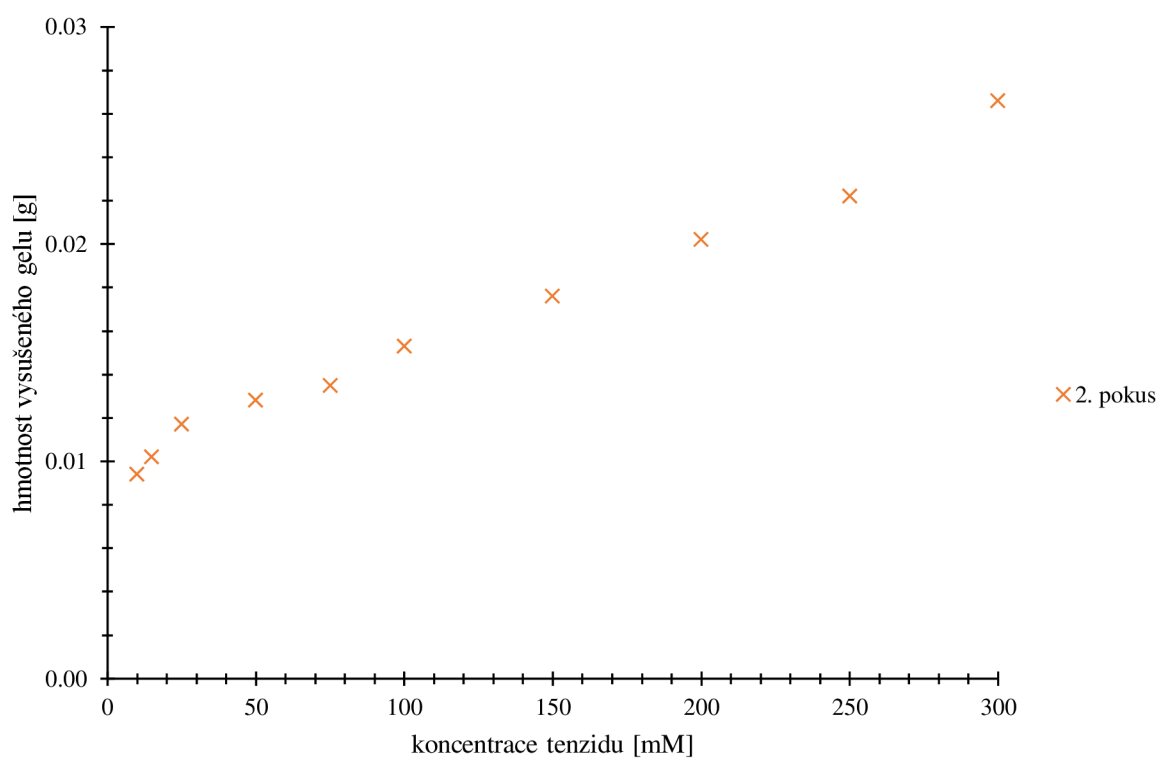
Příloha 13: Závislost hmotnosti gelu na koncentraci Septonexu pro 2% hyaluronan.



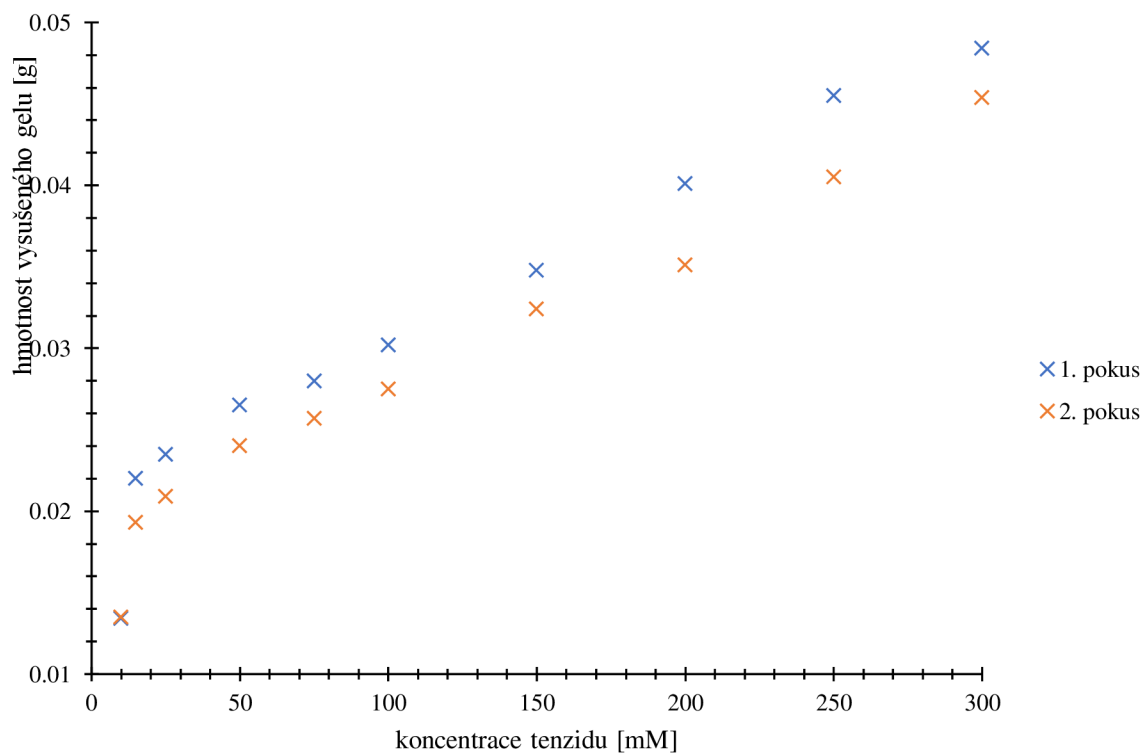
Příloha 14: Závislost hmotnosti gelu na koncentraci Septonexu pro všechny koncentrace hyaluronanu, 1. opakování.



Příloha 15: Hmotnost vysušeného gelu v závislosti na koncentraci Septonexu pro 0,1% hyaluronan.

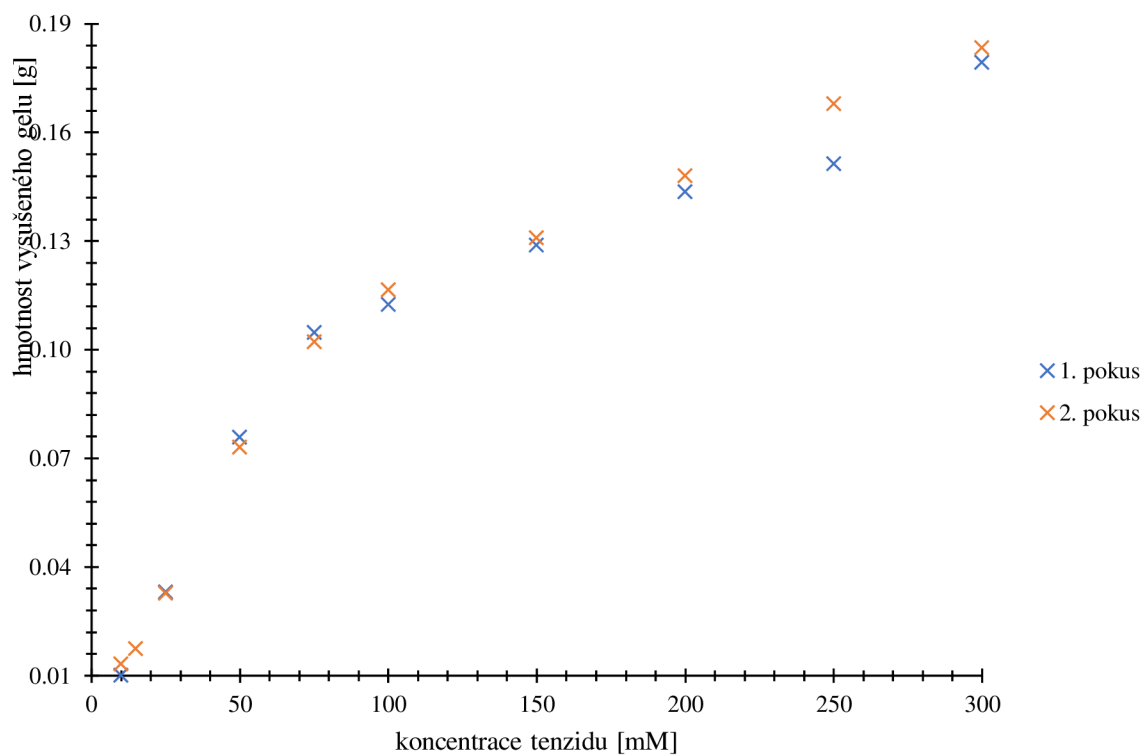


Příloha 16: Hmotnost vysušeného gelu v závislosti na koncentraci Septonexu pro 0,2% hyaluronan.

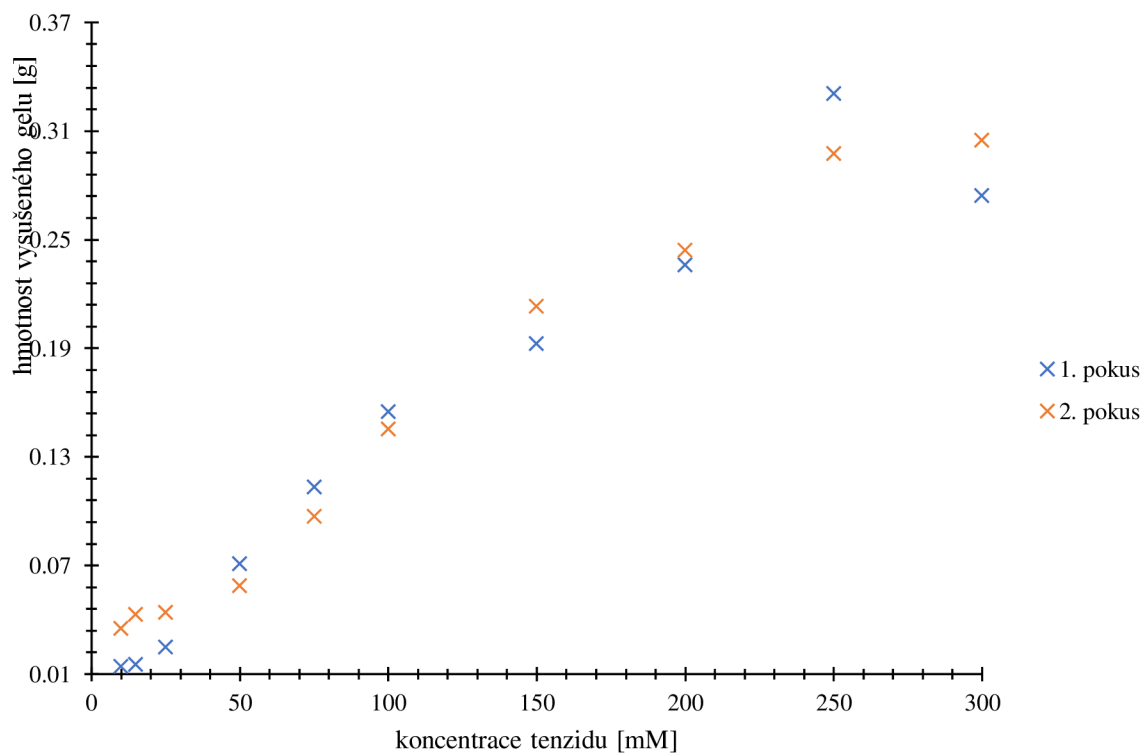




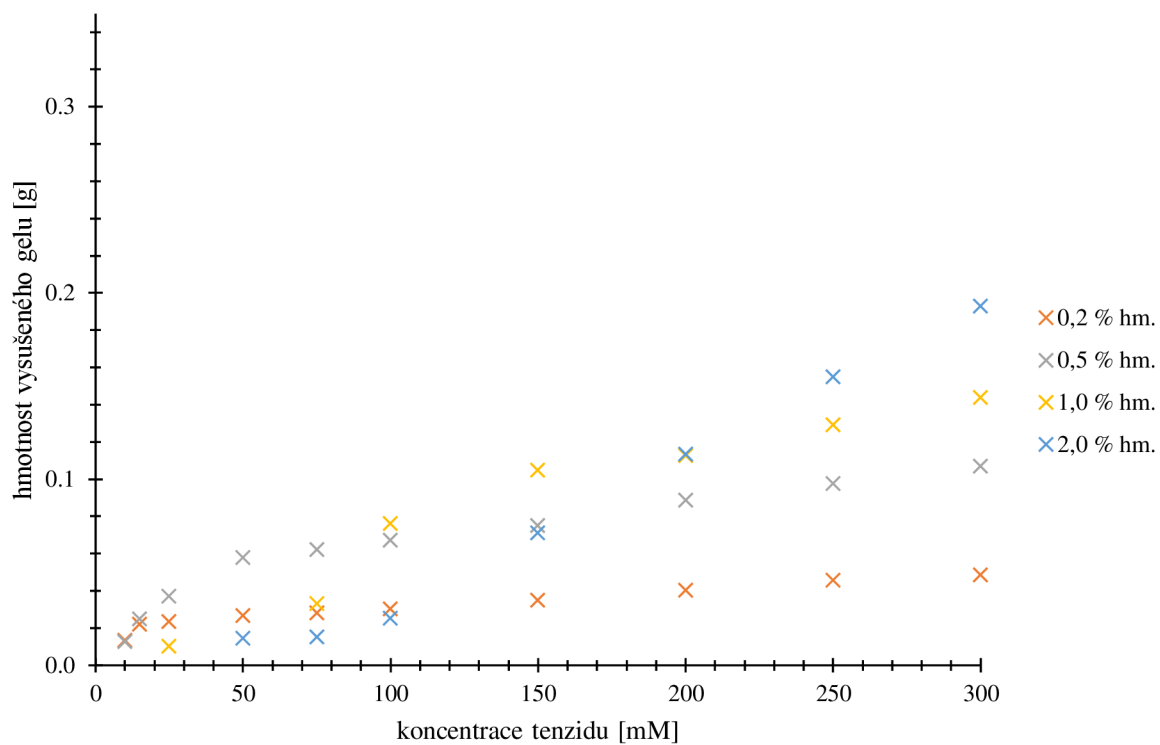
Příloha 17: Hmotnost vysušeného gelu v závislosti na koncentraci Septonexu pro 1% hyaluronan.



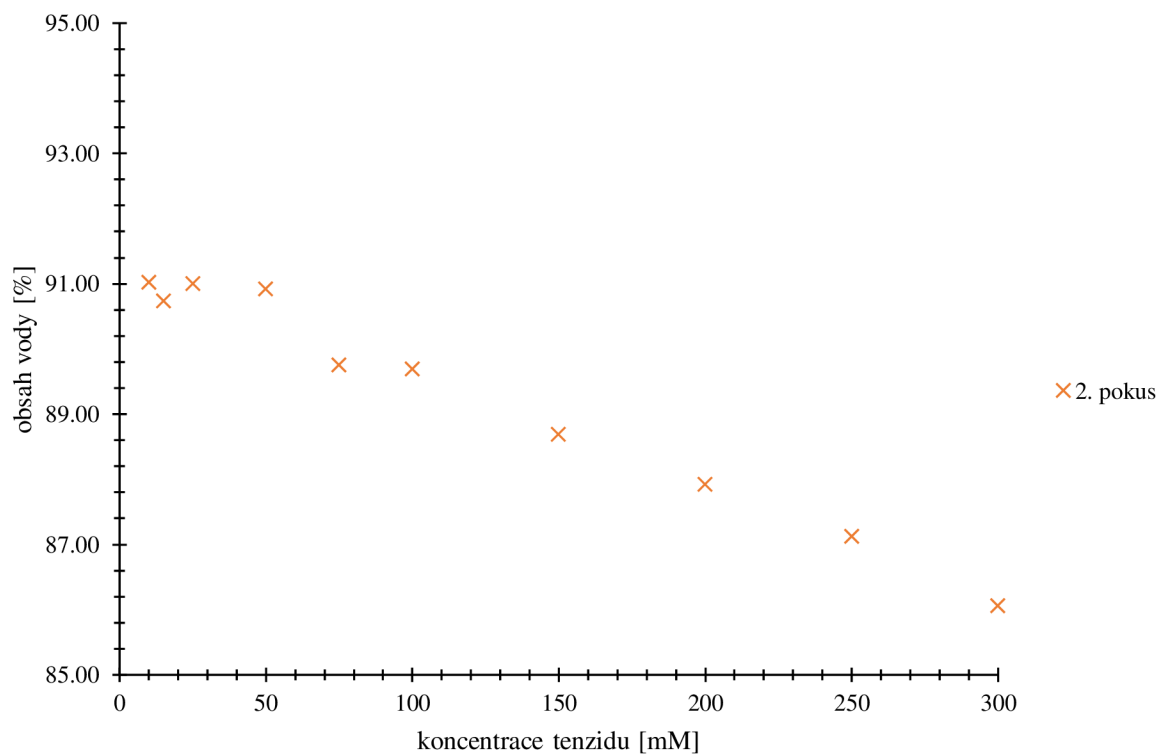
Příloha 18: Hmotnost vysušeného gelu v závislosti na koncentraci Septonexu pro 2% hyaluronan.



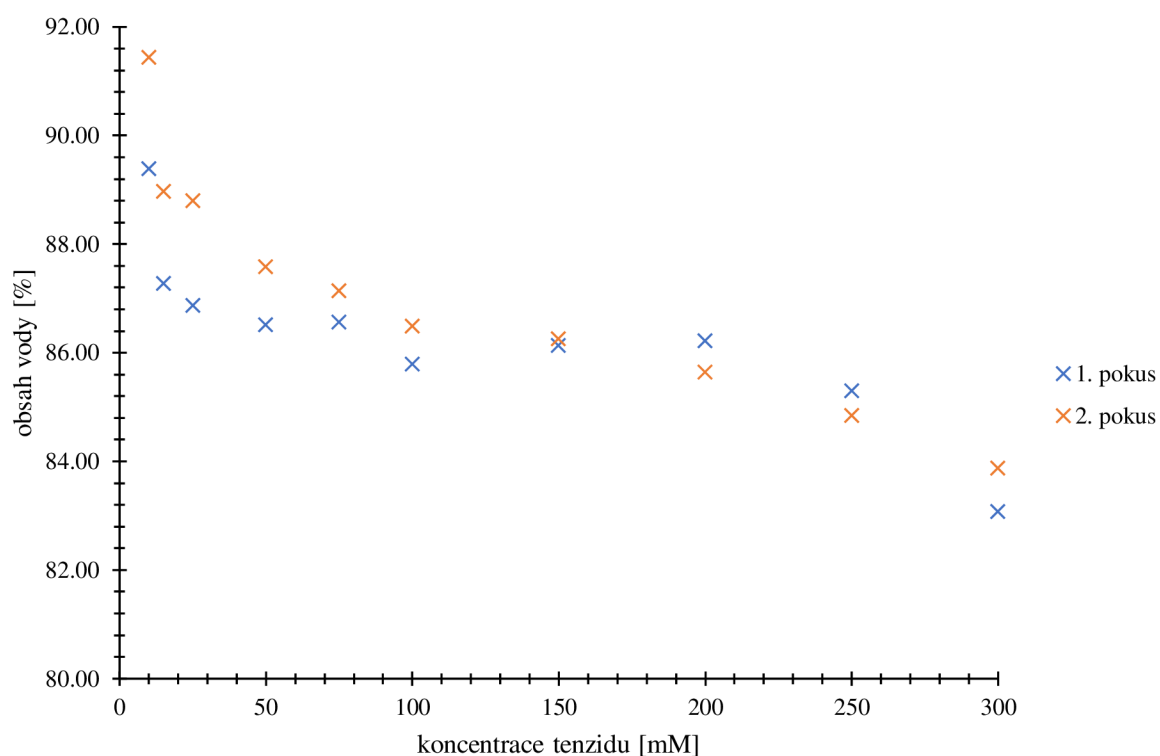
Příloha 19: Hmotnost vysušeného gelu v závislosti na koncentraci Septonexu pro všechny koncentrace hyaluronanu, 1. opakování.



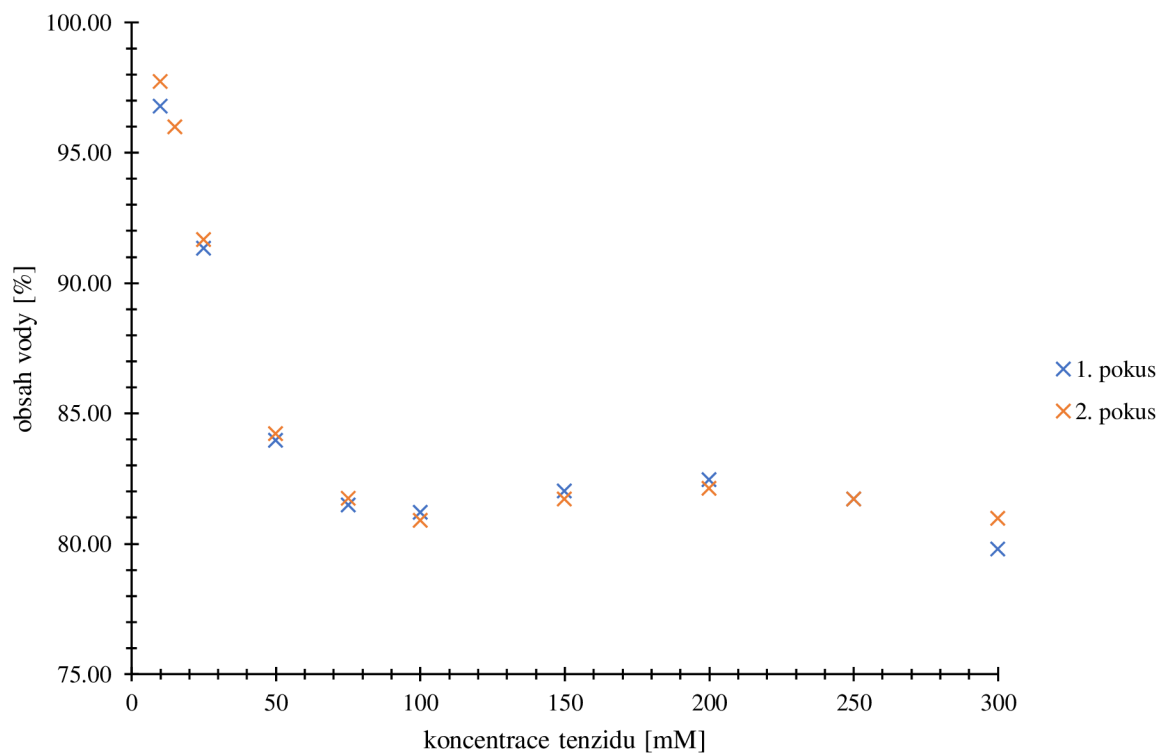
Příloha 20: Obsah vody v závislosti na koncentraci Septonexu pro 0,1% hyaluronan.



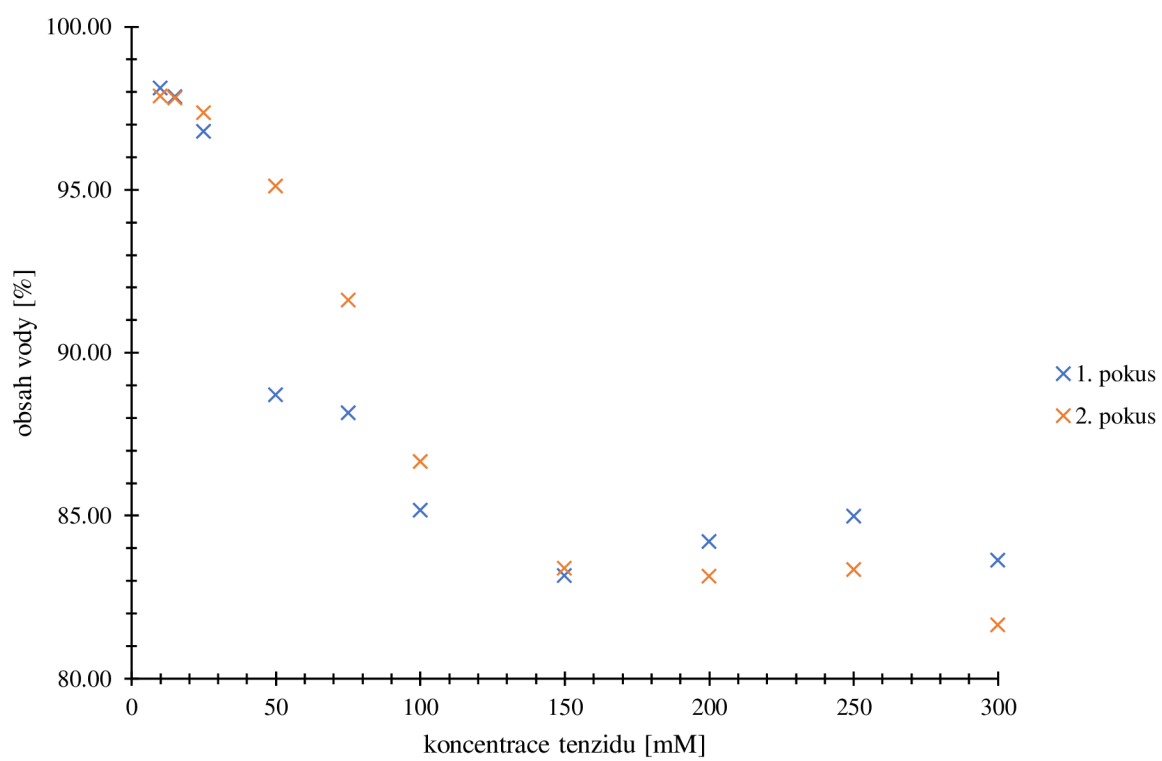
Příloha 21: Obsah vody v závislosti na koncentraci Septonexu pro 0,2% hyaluronan.



Příloha 22: Obsah vody v závislosti na koncentraci Septonexu pro 1% hyaluronan.



Příloha 23: Obsah vody v závislosti na koncentraci Septonexu pro 2% hyaluronan.



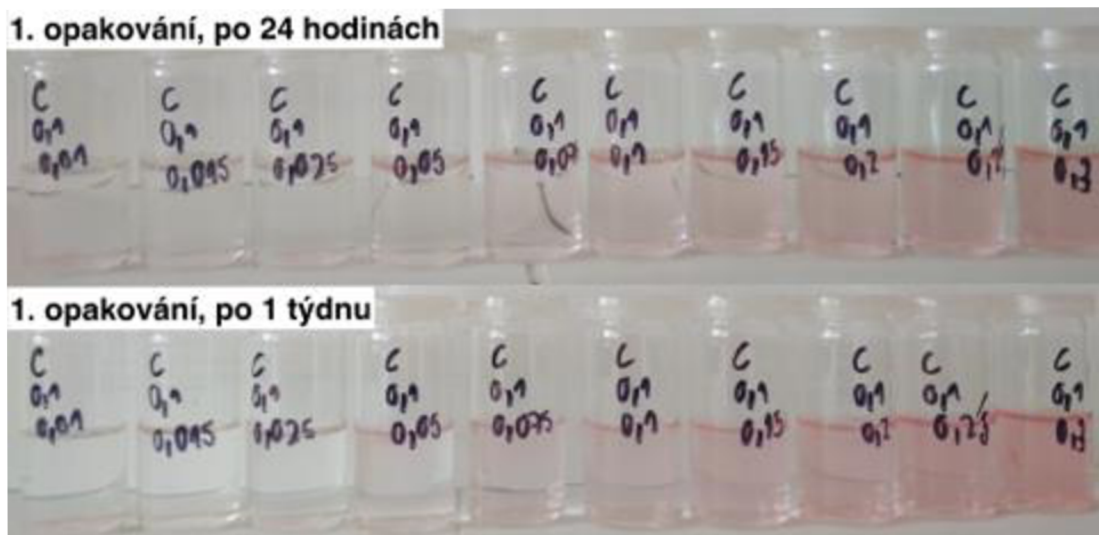
Příloha 24: CTAB, 1. opakování – vizuální charakteristika gelů a supernatantu.

1. opakování							
CH <sub>3</sub> A [% hm.]	Ctenzid [mM]	po 24 hodinách			po 1 týdnu		
		vzhled supernatantu	vzhled gelu	množství gelu	vzhled supernatantu	vzhled gelu	množství gelu
0,1	10	čirý, bezbarvý	červený	tenká vrstva dno, stěny	čirý, bezbarvý	červený	tenká vrstva na dně
	15	čirý, bezbarvý	červený	tenká vrstva dno, stěny	čirý, bezbarvý	červený	tenká vrstva dno, prstenec
	25	čirý, bezbarvý	červený	tenká vrstva dno, stěny	čirý, bezbarvý	červený	tenká vrstva dno, prstenec
	50	čirý, červený	červený	tenká vrstva dno, stěny	čirý, červený	červený	tenká vrstva dno, prstenec
	75	čirý, červený	červený	tenká vrstva dno, stěny	čirý, červený	červený	tenká vrstva dno, prstenec
	100	čirý, červený	červený	tenká vrstva dno, stěny	čirý, červený	červený	tenká vrstva dno, prstenec
	150	zakalený, červený	červený	tenká vrstva dno, stěny	čirý, červený	červený	tenká vrstva dno, prstenec
	200	zakalený, červený	červený	tenká vrstva dno, stěny	čirý, červený	červený	tenká vrstva dno, prstenec
	250	zakalený, červený	červený	tenká vrstva dno, stěny	čirý, červený	červený	tenká vrstva dno, prstenec
	300	zakalený, červený	červený	tenká vrstva dno, stěny	čirý, červený	červený	tenká vrstva dno, prstenec

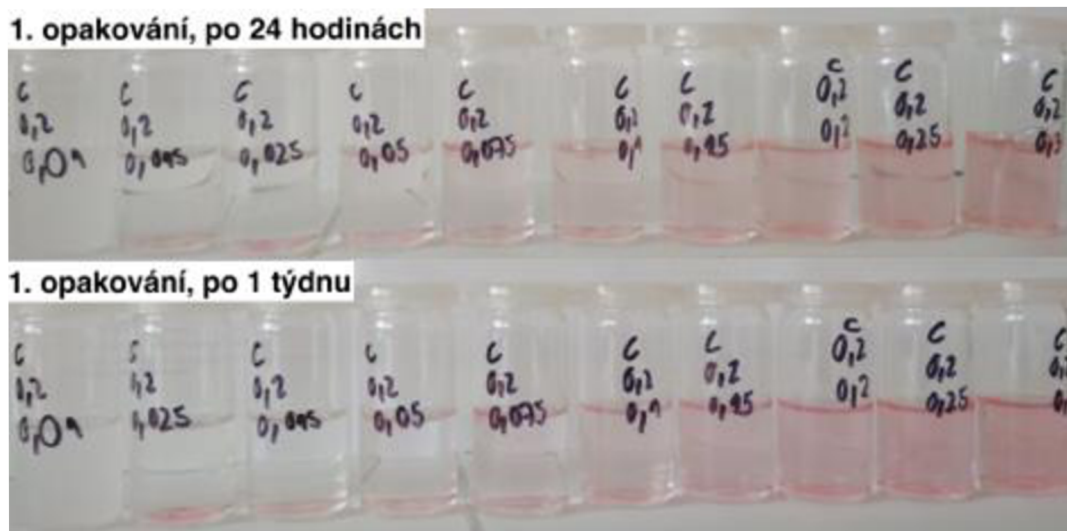
0,2	10	zakalený, bílý	zakalený, tekutý	<1 ml	zakalený, bílý	zakalený, tekutý, červený	<1 ml
	15	čirý, bezbarvý	červený	tenká vrstva na dně	čirý, bezbarvý	červený	tenká vrstva na dně
	25	čirý, bezbarvý	červený	tenká vrstva dno, stěny	čirý, bezbarvý	červený	tenká vrstva na dně
	50	čirý, červený	červený	tenká vrstva dno, stěny	čirý, červený	červený	tenká vrstva dno, stěny
	75	čirý, červený	červený	tenká vrstva dno, stěny	čirý, červený	červený	tenká vrstva dno, prstenec
	100	čirý, červený	červený	tenká vrstva dno, stěny	čirý, červený	červený	tenká vrstva dno, prstenec
	150	čirý, červený	červený	tenká vrstva dno, stěny	čirý, červený	červený	tenká vrstva dno, prstenec
	200	zakalený, červený	červený	tenká vrstva dno, stěny	čirý, červený	červený	tenká vrstva dno, prstenec
	250	zakalený, červený	červený	tenká vrstva dno, stěny	čirý, červený	červený	tenká vrstva dno, prstenec
	300	zakalený, červený	červený	tenká vrstva dno, stěny	čirý, červený	červený	tenká vrstva dno, prstenec
0,5	10	zakalený, bílý	zakalený, tekutý	asi 1 ml	zakalený, bílý, viskózní	zakalený, tekutý	asi 1 ml
	15	zakalený, bílý	zakalený, červený	na dně	zakalený, bílý	zakalený, červený	na dně
	25	zakalený, bílý	červený, pevný	dno, stěny	zakalený, bílý	zakalený, červený	na dně
	50	čirý, bezbarvý	červený, pevný	dno, stěny	čirý, bezbarvý	červený, pevný	tenká vrstva dně, prstenec
	75	čirý, bezbarvý	červený, pevný	dno, stěny	čirý, bezbarvý	červený, pevný	tenká vrstva dně, prstenec
	100	čirý, červený	červený, pevný	dno, stěny	čirý, červený	červený, pevný	dno, stěny
	150	čirý, červený	červený, pevný	dno, stěny	čirý, červený	červený, pevný	dno, stěny
	200	čirý, červený	červený, pevný	dno, stěny	čirý, červený	červený, pevný	dno, stěny
	250	čirý, červený	červený, pevný	dno, stěny	čirý, červený	červený, pevný	dno, stěny
	300	čirý, červený	červený, pevný	dno, stěny	čirý, červený	červený, pevný	dno, stěny

1	10	zakalený, bílý, viskózní	zakalený, tekutý	asi 2 ml	zakalený, bílý, viskózní	zakalený, tekutý	asi 2 ml
	15	zakalený, bílý, viskózní	zakalený, červený, tekutý	asi 2 ml	zakalený, bílý, viskózní	zakalený, červený, tekutý	asi 2 ml
	25	zakalený, bílý, viskózní	zakalený, červený, tekutější	asi 2 ml	zakalený, bílý, viskózní	zakalený, červený, tekutý	asi 2 ml
	50	zakalený, bílý	zakalený, červený	dno, stěny	zakalený, bílý	červený, pevný	dno, stěny
	75	zakalený, bílý	zakalený, červený	dno, stěny	čirý, bezbarvý	červený, pevný	dno, prsteneček
	100	čirý, bezbarvý	červený, pevný	dno, stěny	čirý, bezbarvý	červený, pevný	dno, prsteneček
	150	čirý, bezbarvý	červený, pevný	dno, stěny	čirý, červený	červený, pevný	dno, stěny
	200	čirý, bezbarvý	červený, pevný	dno, stěny	čirý, červený	červený, pevný	dno, stěny
	250	čirý, červený	červený, pevný	dno, stěny	čirý, červený	červený, pevný	dno, stěny
	300	čirý, červený	červený, pevný	dno, stěny	čirý, červený	červený, pevný	dno, stěny
2	10	čirý, bezbarvý, viskózní	bezbarvý, tekutý	3-4 ml	čirý, bezbarvý, viskózní	bezbarvý, tekutý	3-4 ml
	15	zakalený, bílý, viskózní	bezbarvý, tekutý	3-4 ml	čirý, bezbarvý, viskózní	bezbarvý, tekutý	3-4 ml
	25	zakalený, bílý, viskózní	bezbarvý, tekutý	3-4 ml	zakalený, bílý, viskózní	bezbarvý, tekutý	3-4 ml
	50	zakalený, červený, viskózní	zakalený, červený, tekutější	3-4 ml	zakalený, bílý, viskózní	zakalený, červený, tekutější	3-4 ml
	75	zakalený, bílý, viskózní	zakalený, červený, pevný	dno, stěny	zakalený, bílý	červený, pevný	dno, stěny
	100	zakalený, bílý, viskózní	zakalený, červený, pevný	dno, stěny	zakalený, bílý	červený, pevný	dno, stěny
	150	zakalený, bílý	červený, pevný	dno, stěny	zakalený, bílý	červený, pevný	dno, stěny
	200	zakalený, bílý	červený, pevný	dno, stěny	čirý, bezbarvý	červený, pevný	dno, stěny
	250	zakalený, bílý	červený, pevný	dno, stěny	čirý, bezbarvý	červený, pevný	dno, stěny
	300	čirý, bezbarvý	červený, pevný	dno, stěny	čirý, bezbarvý	červený, pevný	dno, stěny

Příloha 25: Gely 24 hodin a 1 týden po přípravě, CTAB, 0,1% hyaluronan, 1. opakování.



Příloha 26: Gely 24 hodin a 1 týden po přípravě, CTAB, 0,2% hyaluronan, 1. opakování.

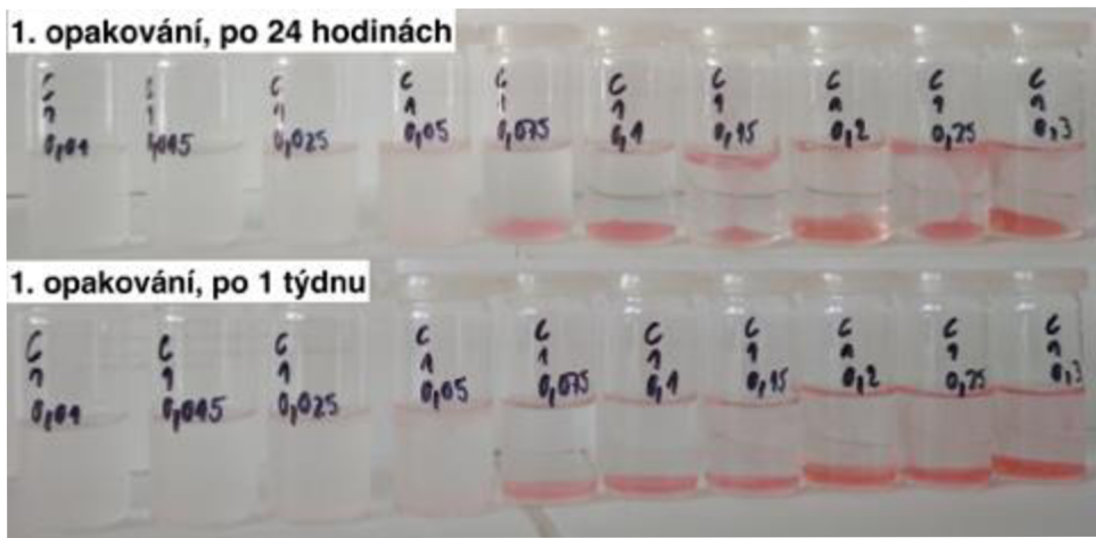


Příloha 27: Gely 24 hodin a 1 týden po přípravě, CTAB, 0,5% hyaluronan, 1. opakování.

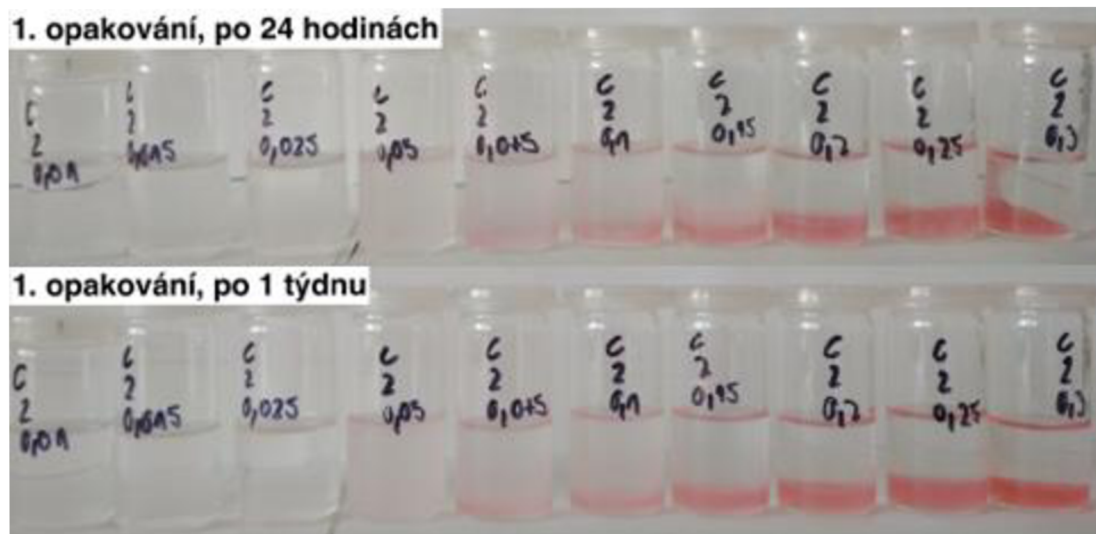




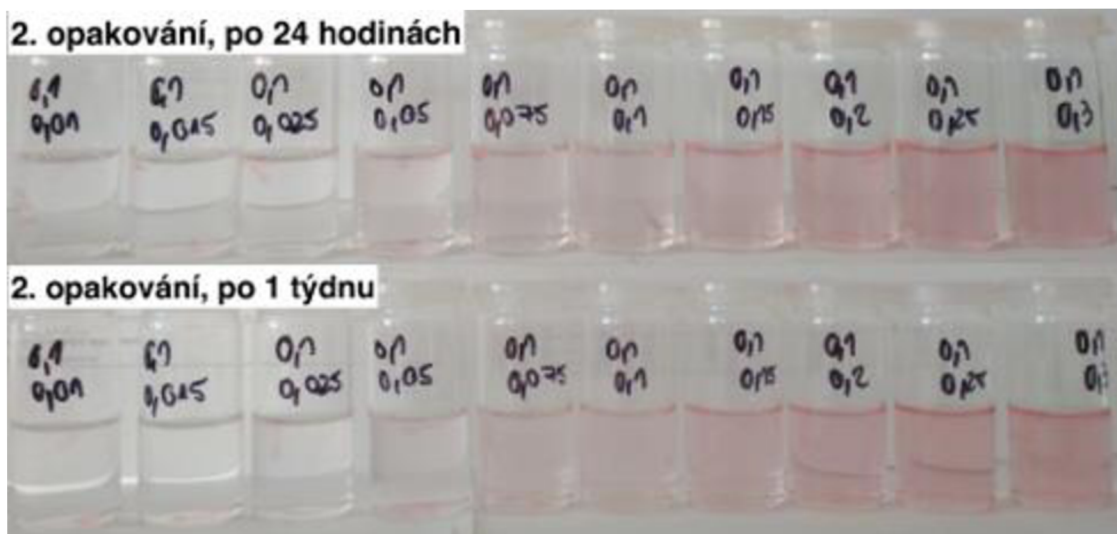
Příloha 28: Gely 24 hodin a 1 týden po přípravě CTAB, 1% hyaluronan, 1. opakování.



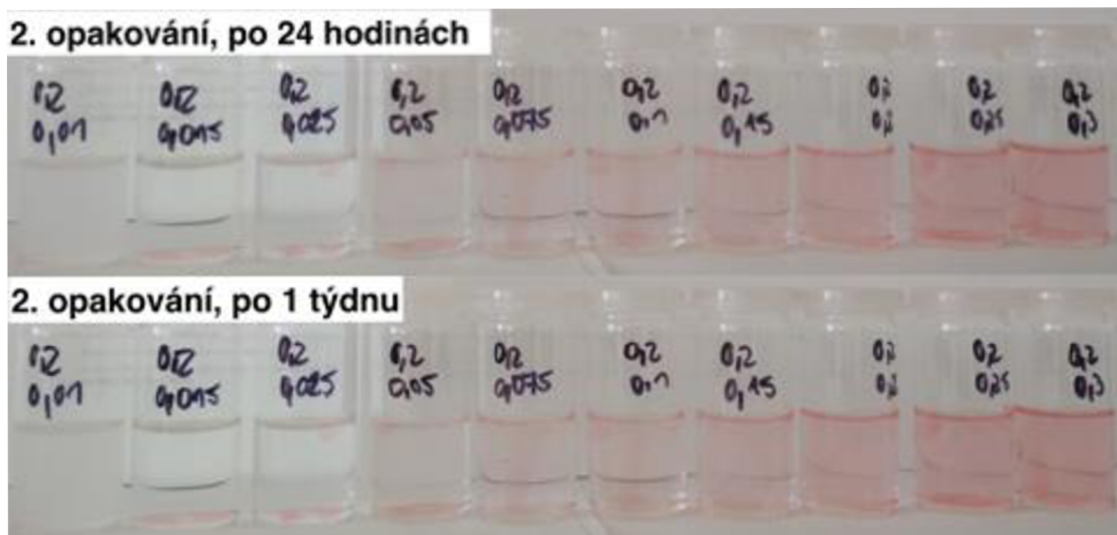
Příloha 29: Gely 24 hodin a 1 týden po přípravě CTAB, 2% hyaluronan, 1. opakování.



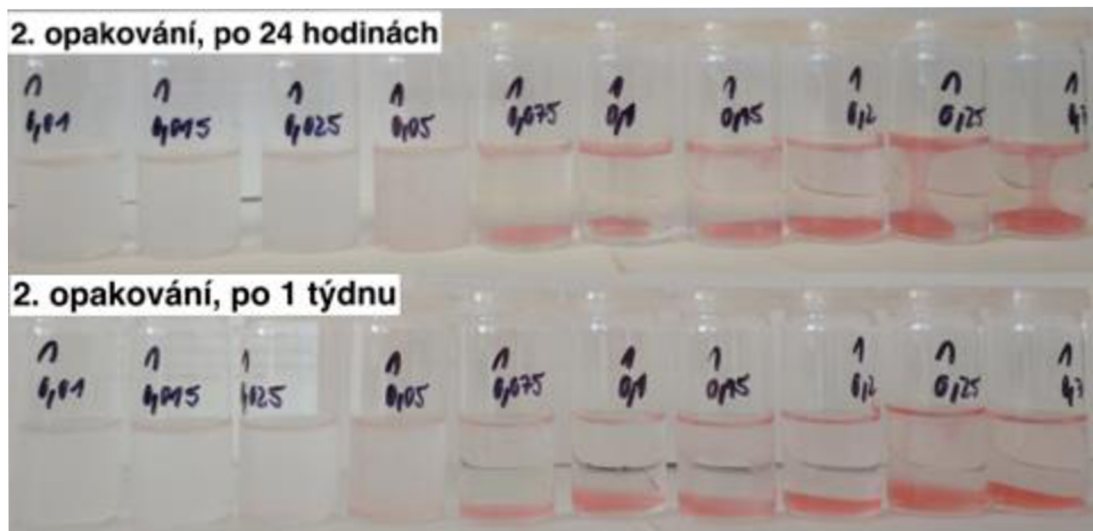
Příloha 30: Gely 24 hodin a 1 týden po přípravě CTAB, 0,1% hyaluronan, 2. opakování.



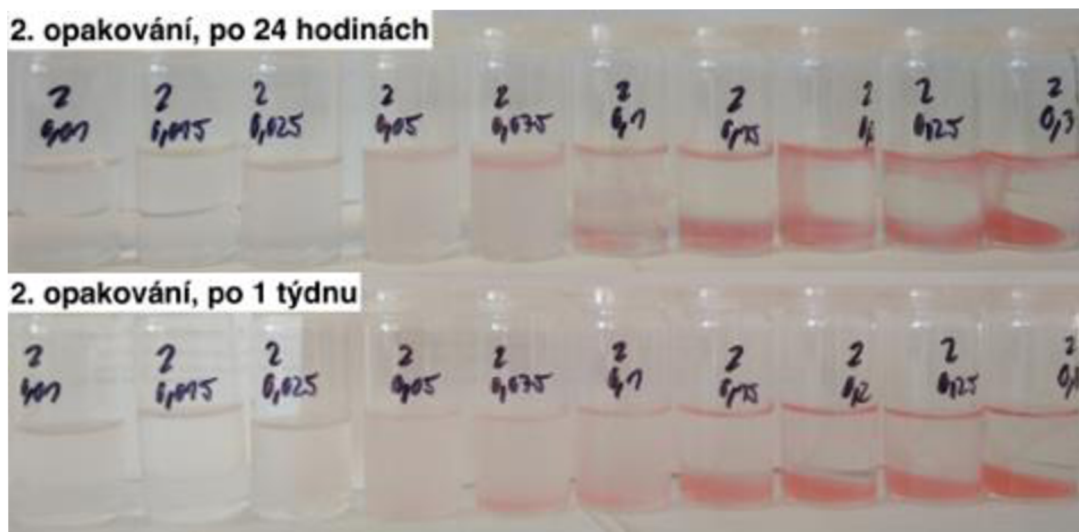
Příloha 31: Gely 24 hodin a 1 týden po přípravě CTAB, 0,2% hyaluronan, 2. opakování.



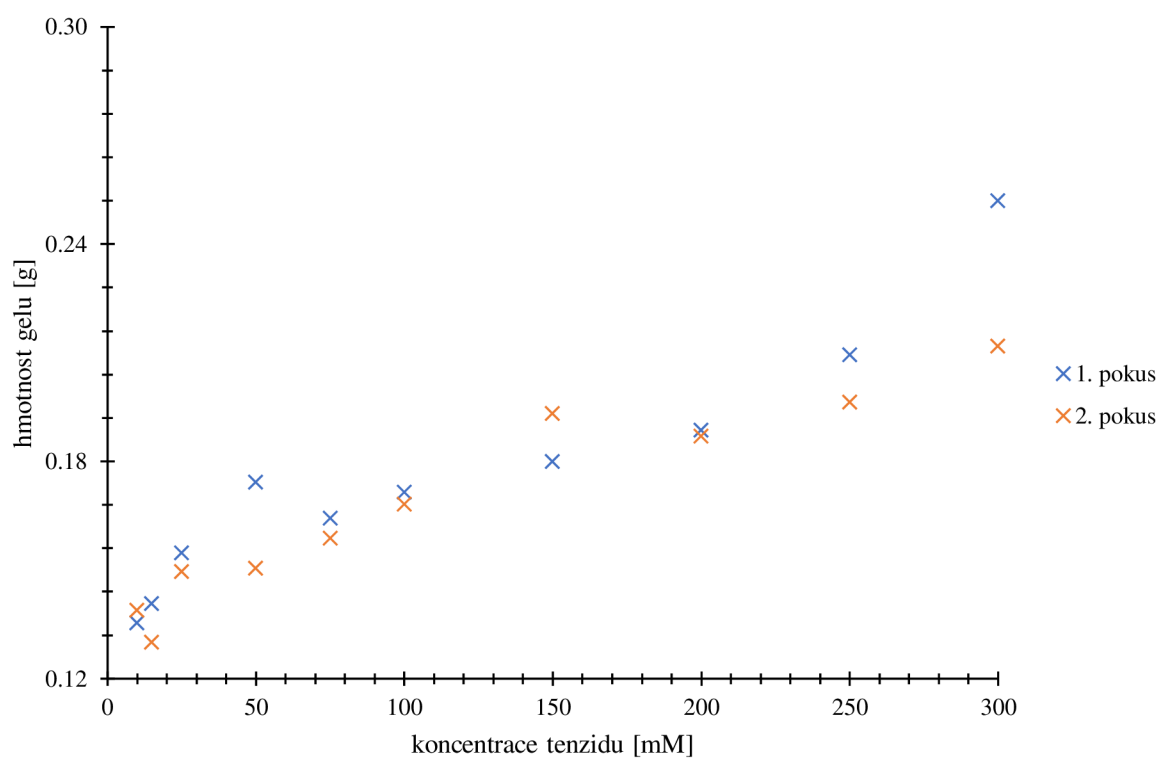
Příloha 32: Gely 24 hodin a 1 týden po přípravě CTAB, 1% hyaluronan, 2. opakování.



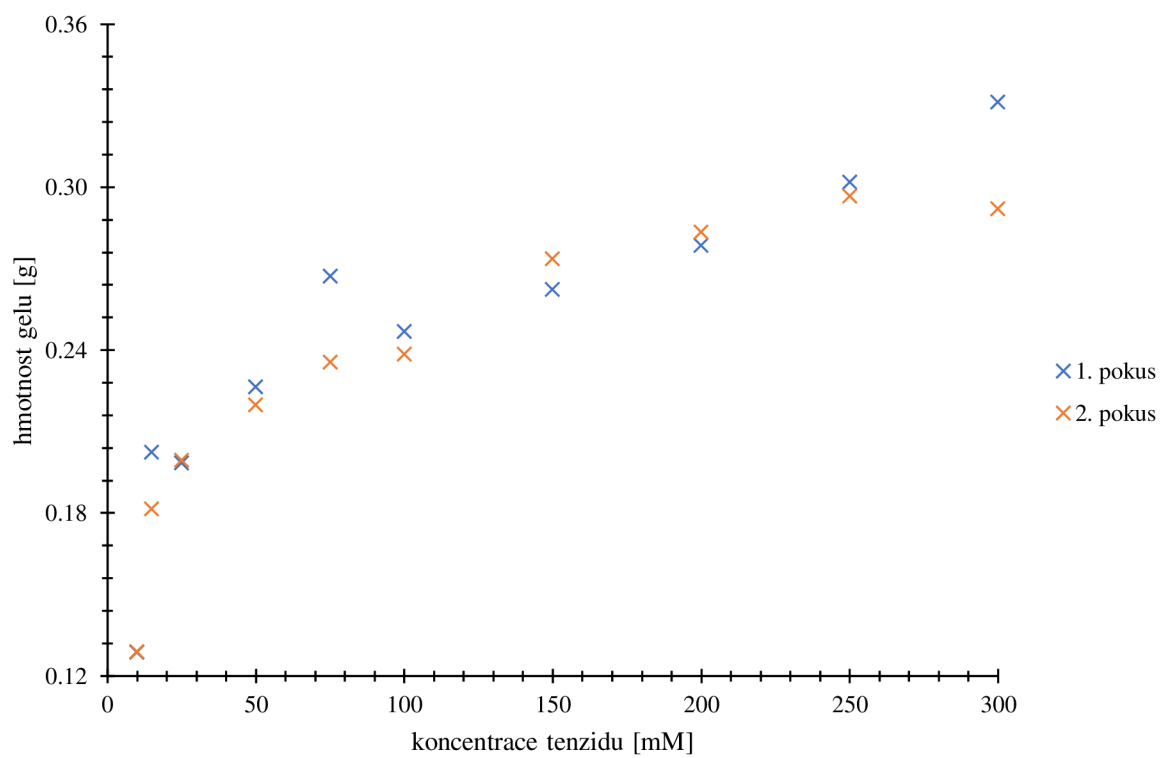
Příloha 33: Gely 24 hodin a 1 týden po přípravě CTAB, 2% hyaluronan, 2. opakování.



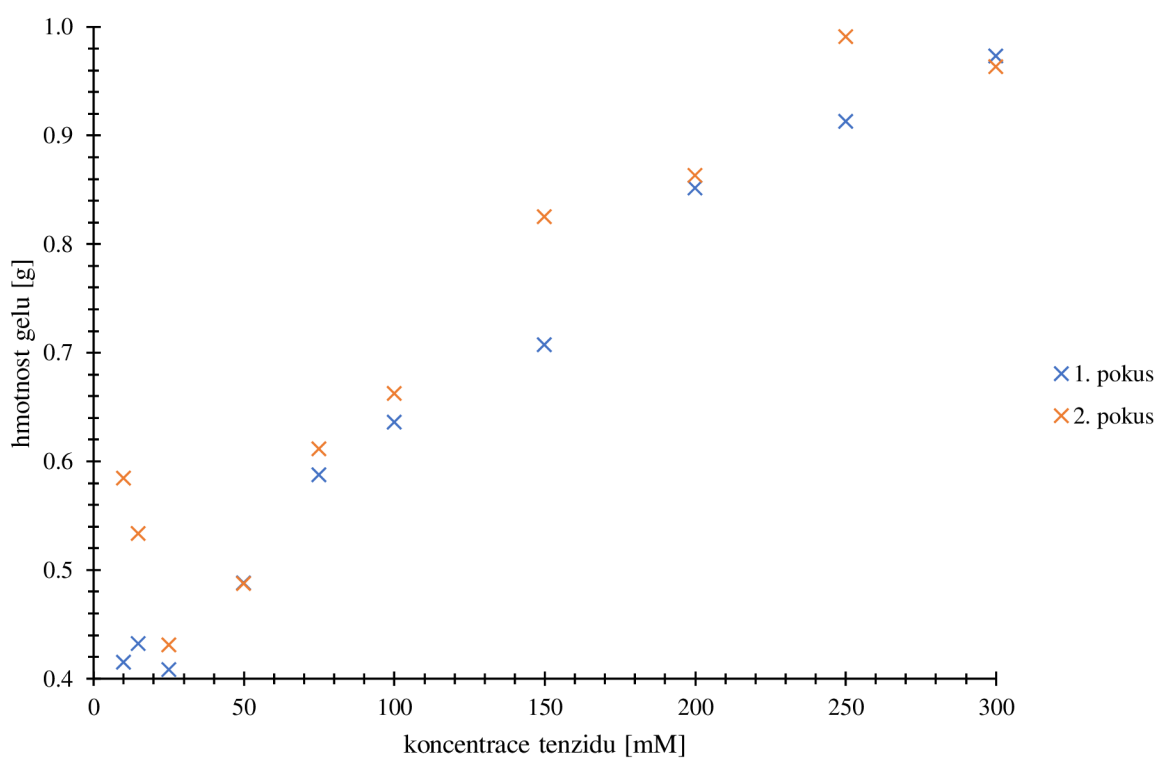
Příloha 34: Závislost hmotnosti gelu na koncentraci CTAB pro 0,1% hyaluronan.



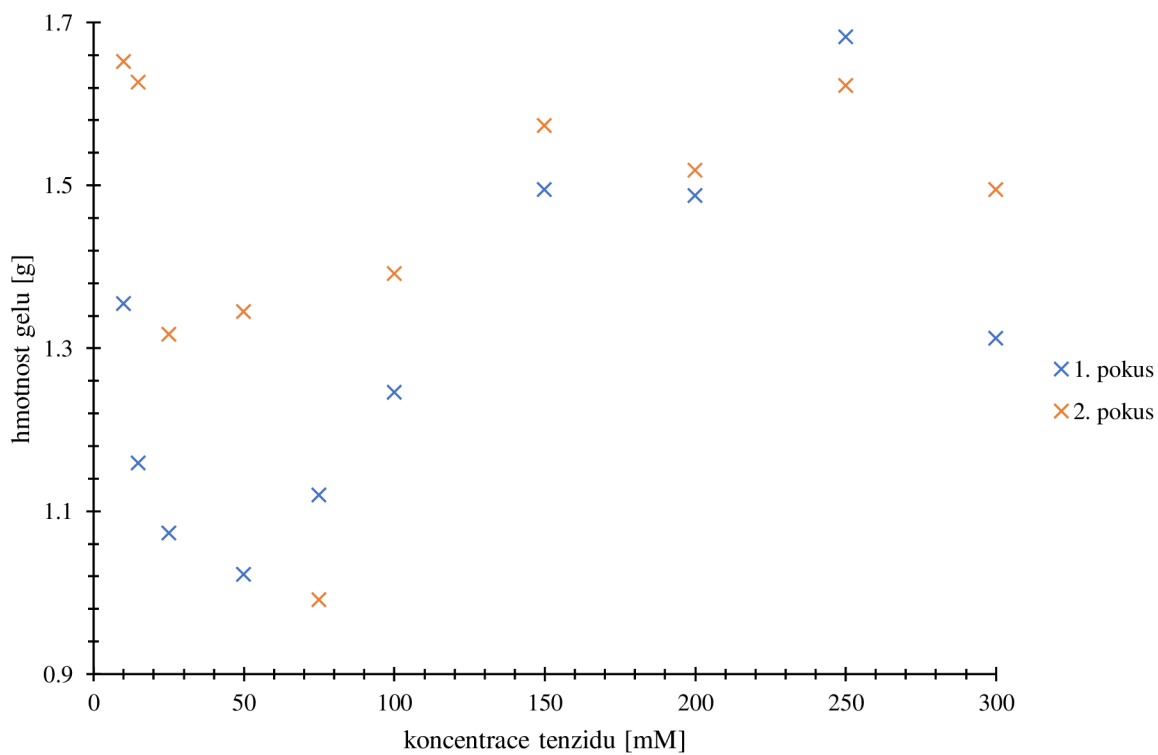
Příloha 35: Závislost hmotnosti gelu na koncentraci CTAB pro 0,2% hyaluronan.



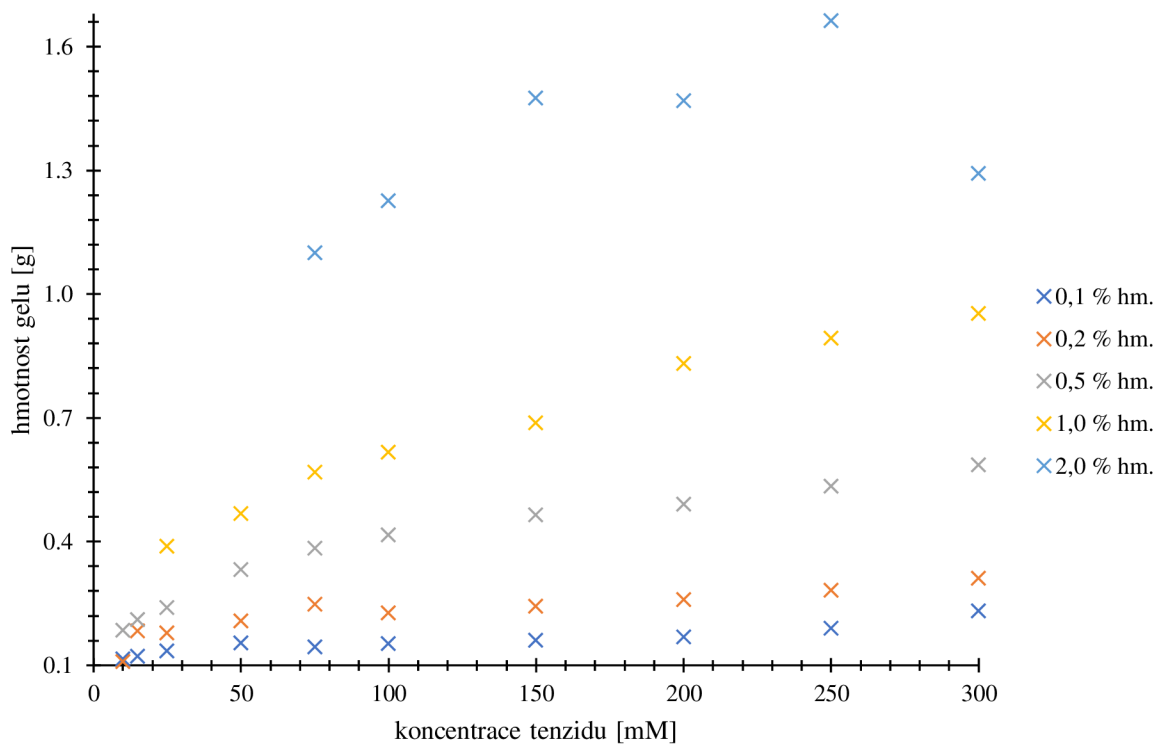
Příloha 36: Závislost hmotnosti gelu na koncentraci CTAB pro 1% hyaluronan.



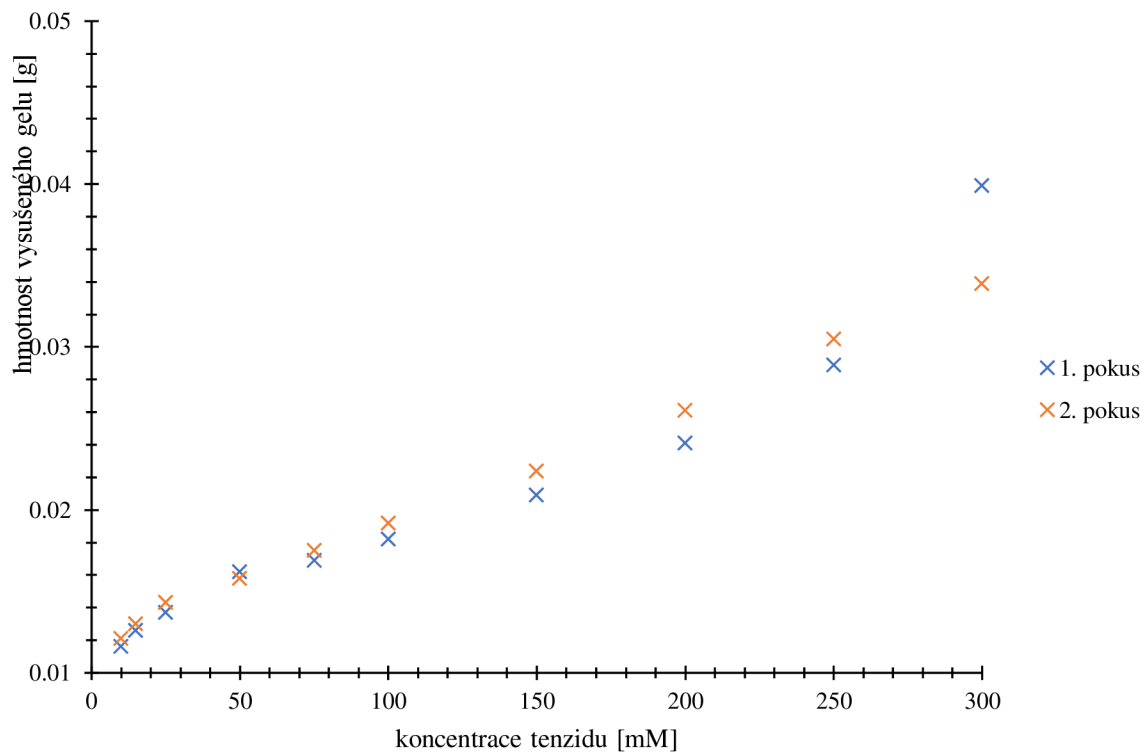
Příloha 37: Závislost hmotnosti gelu na koncentraci CTAB pro 2% hyaluronan.



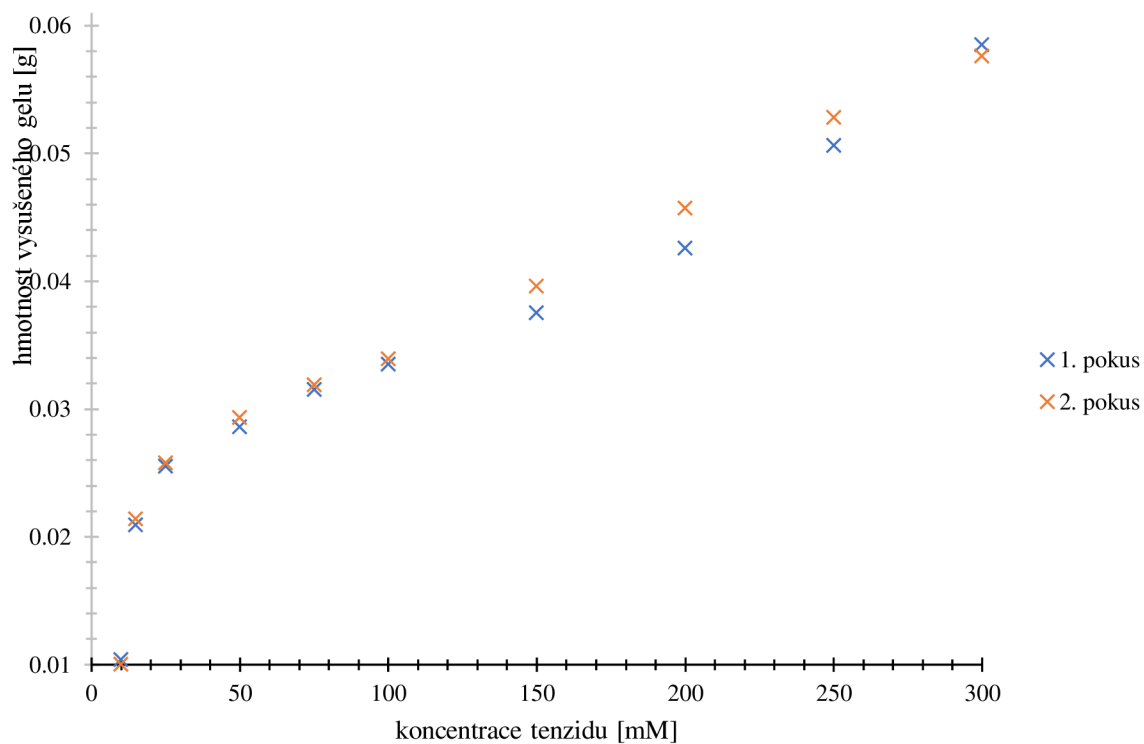
Příloha 38: Závislost hmotnosti gelu na koncentraci CTAB pro všechny koncentrace hyaluronanu, 1. opakování.



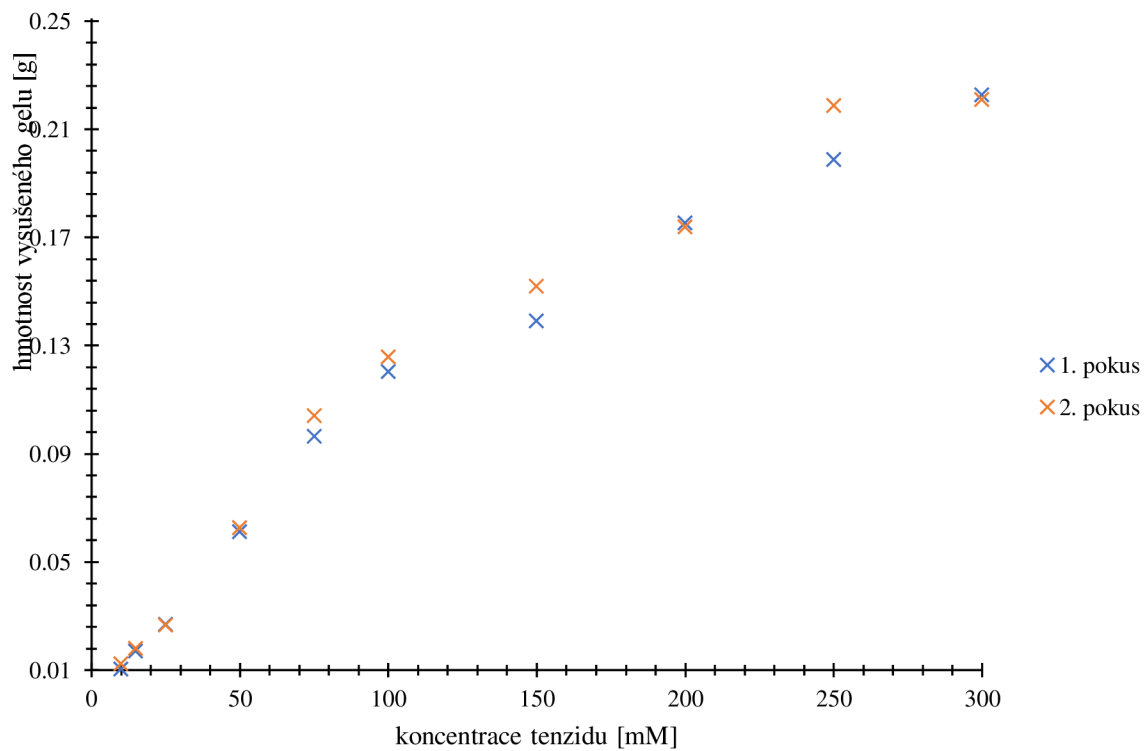
Příloha 39: Hmotnost vysušeného gelu v závislosti na koncentraci CTAB pro 0,1% hyaluronan.



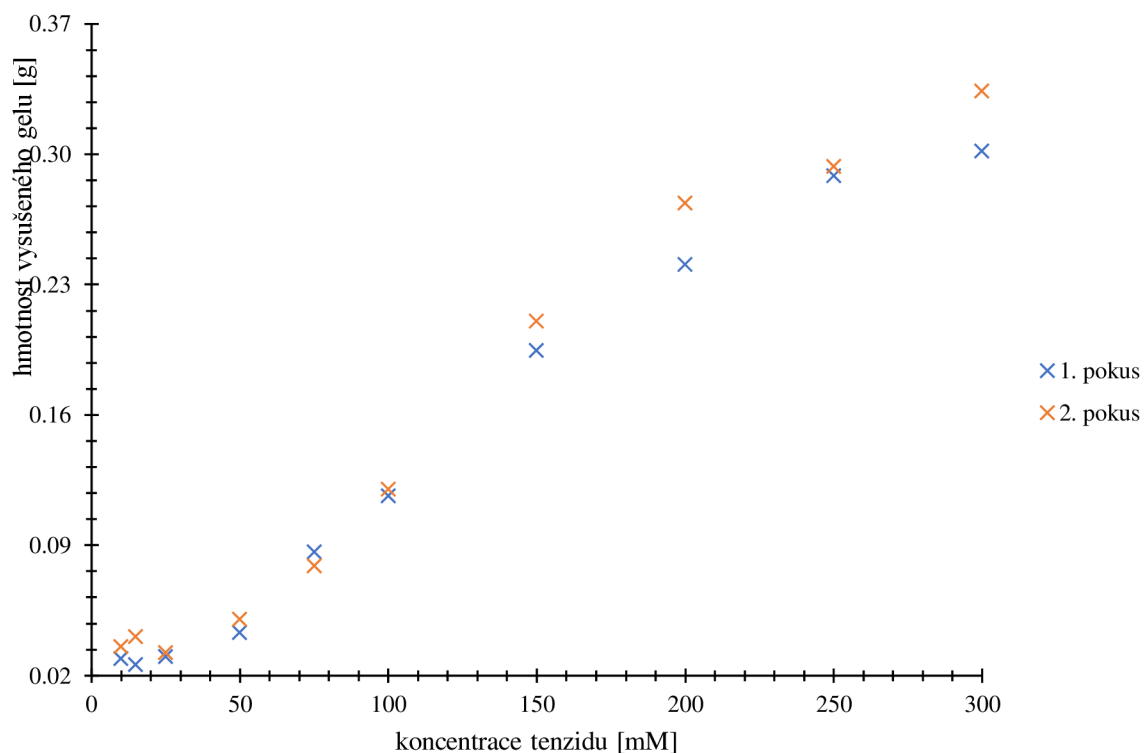
Příloha 40: Hmotnost vysušeného gelu v závislosti na koncentraci CTAB pro 0,2% hyaluronan.



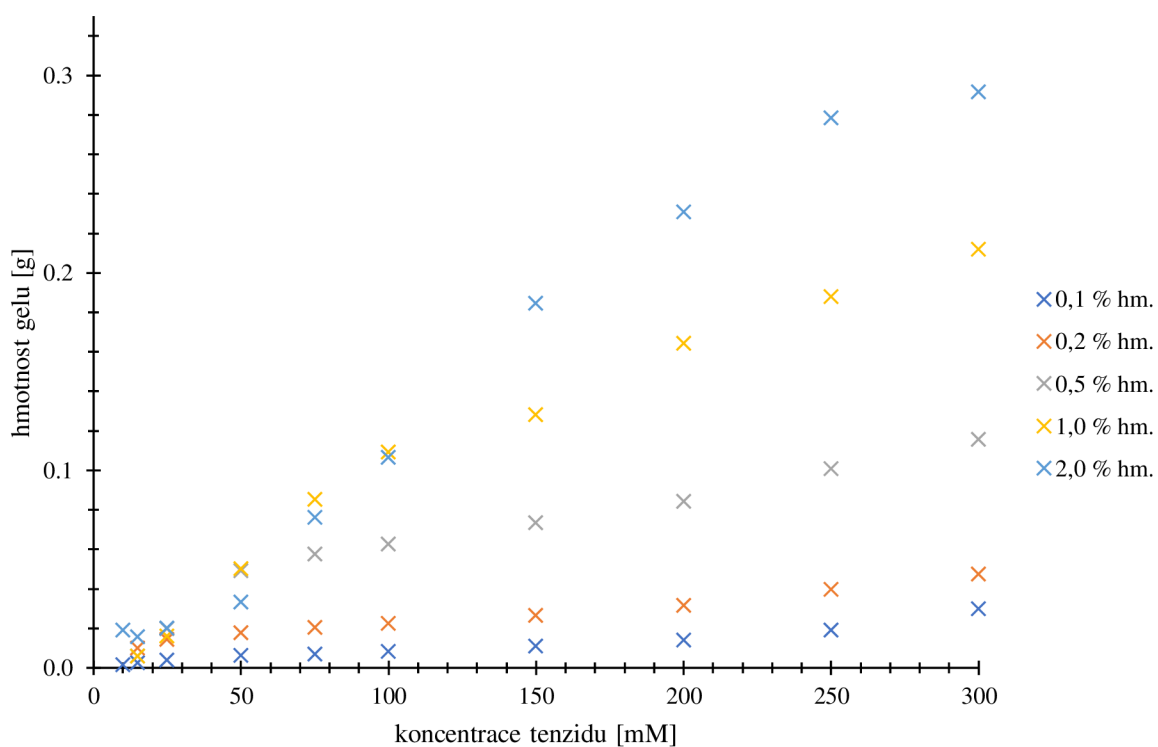
Příloha 41: Hmotnost vysušeného gelu v závislosti na koncentraci CTAB pro 1% hyaluronan.



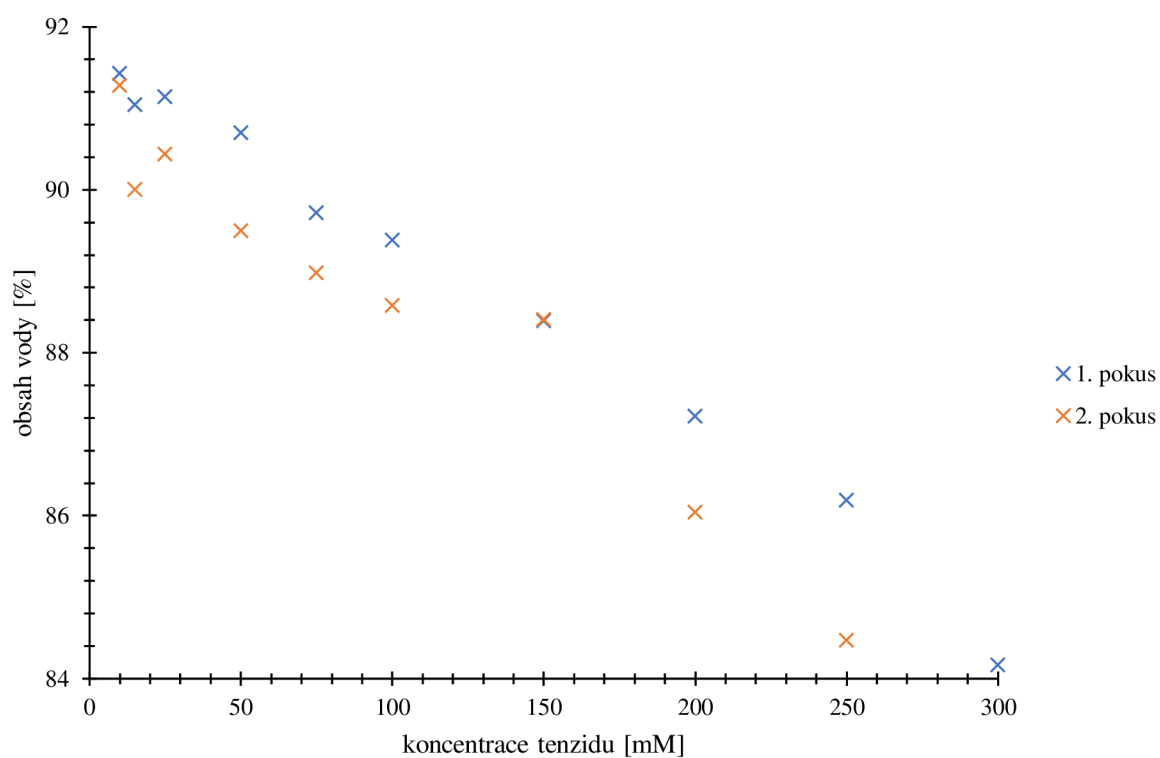
Příloha 42: Hmotnost vysušeného gelu v závislosti na koncentraci CTAB pro 2% hyaluronan.



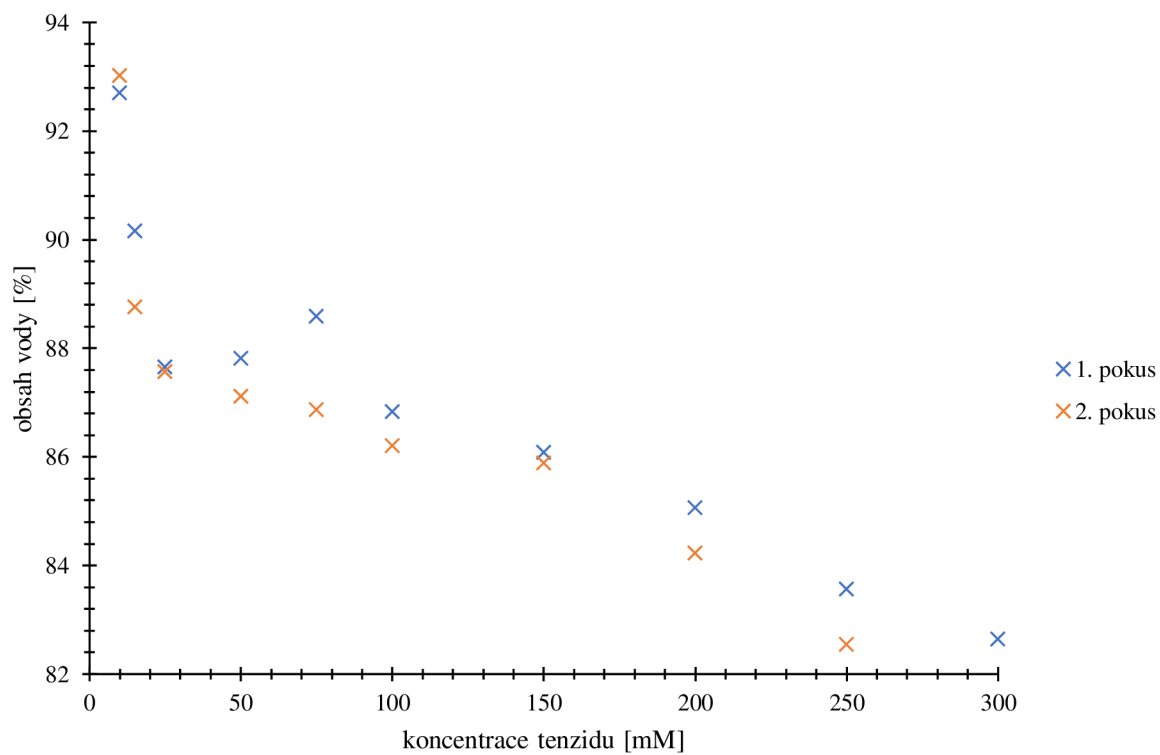
Příloha 43: Hmotnost vysušeného gelu v závislosti na koncentraci CTAB pro všechny koncentrace hyaluronanu, 1. opakování.



Příloha 44: Obsah vody v závislosti na koncentraci CTAB pro 0,1% hyaluronan.

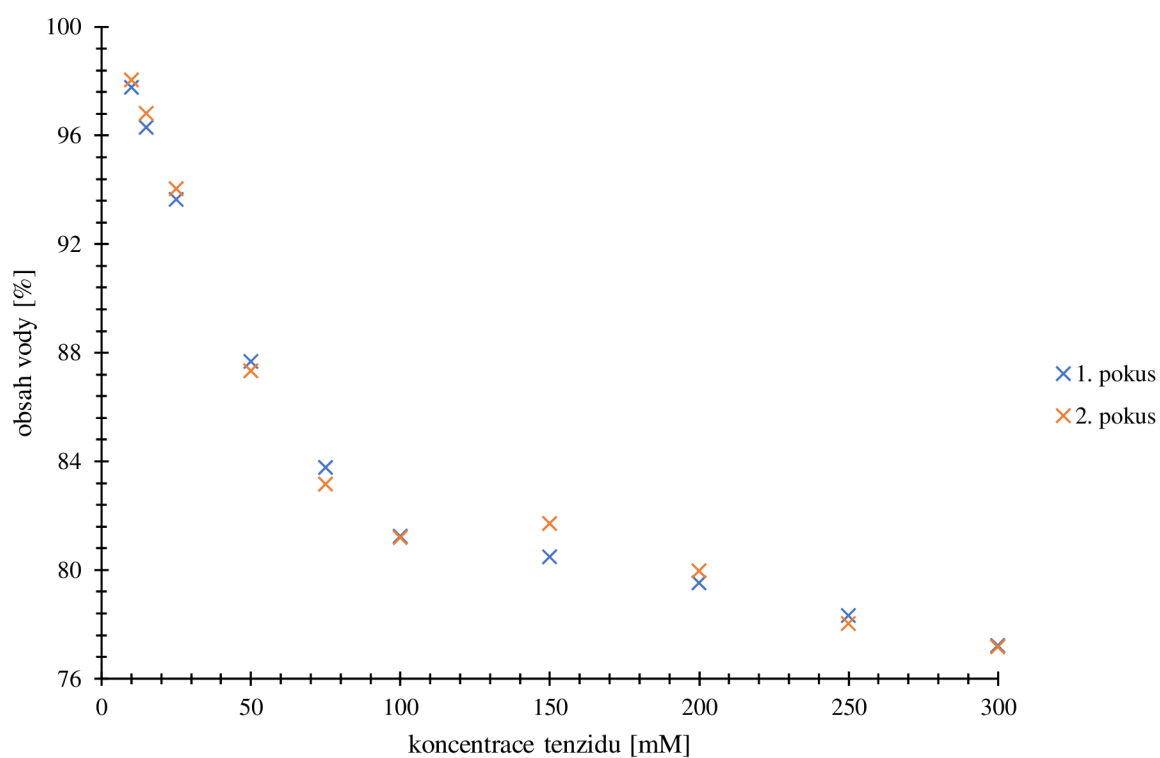


Příloha 45: Obsah vody v závislosti na koncentraci CTAB pro 0,2% hyaluronan.

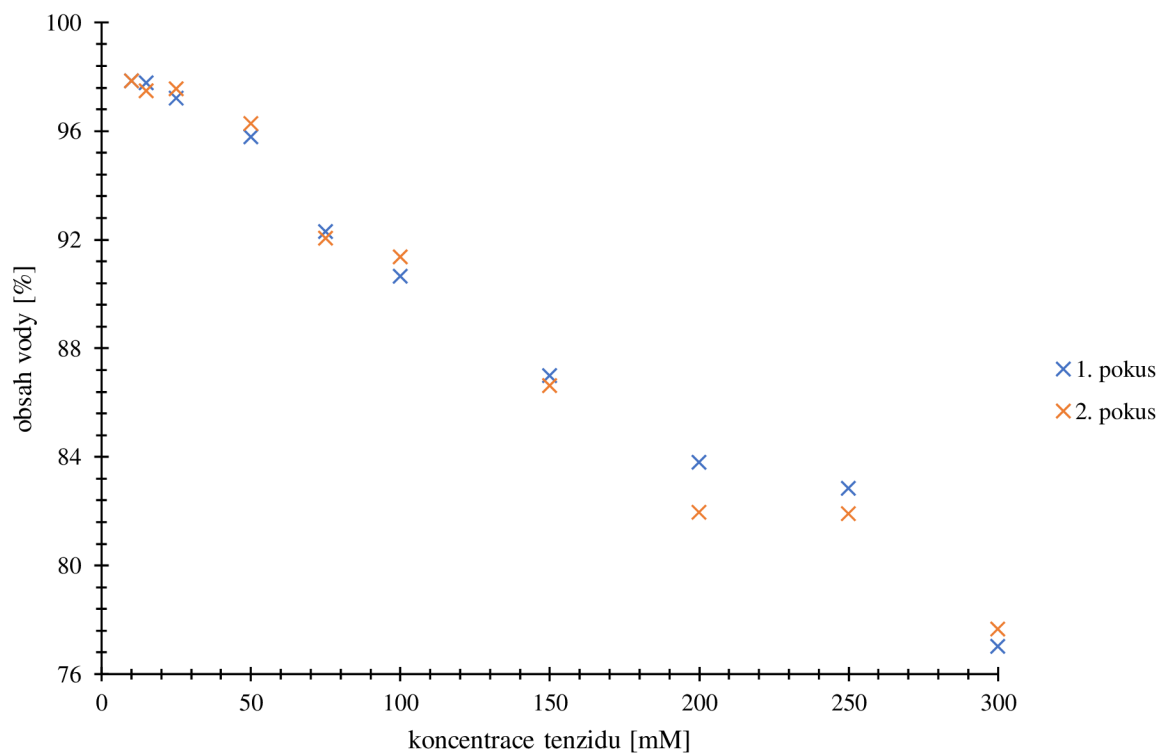




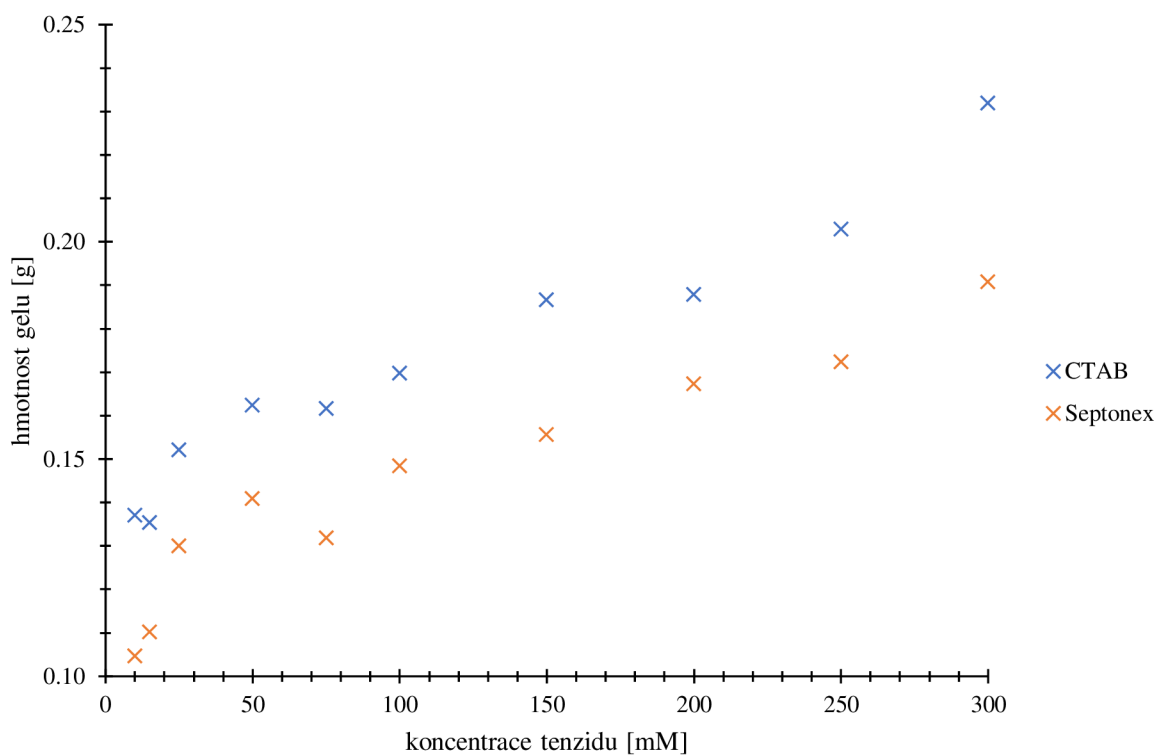
Příloha 46: Obsah vody v závislosti na koncentraci CTAB pro 1% hyaluronan.



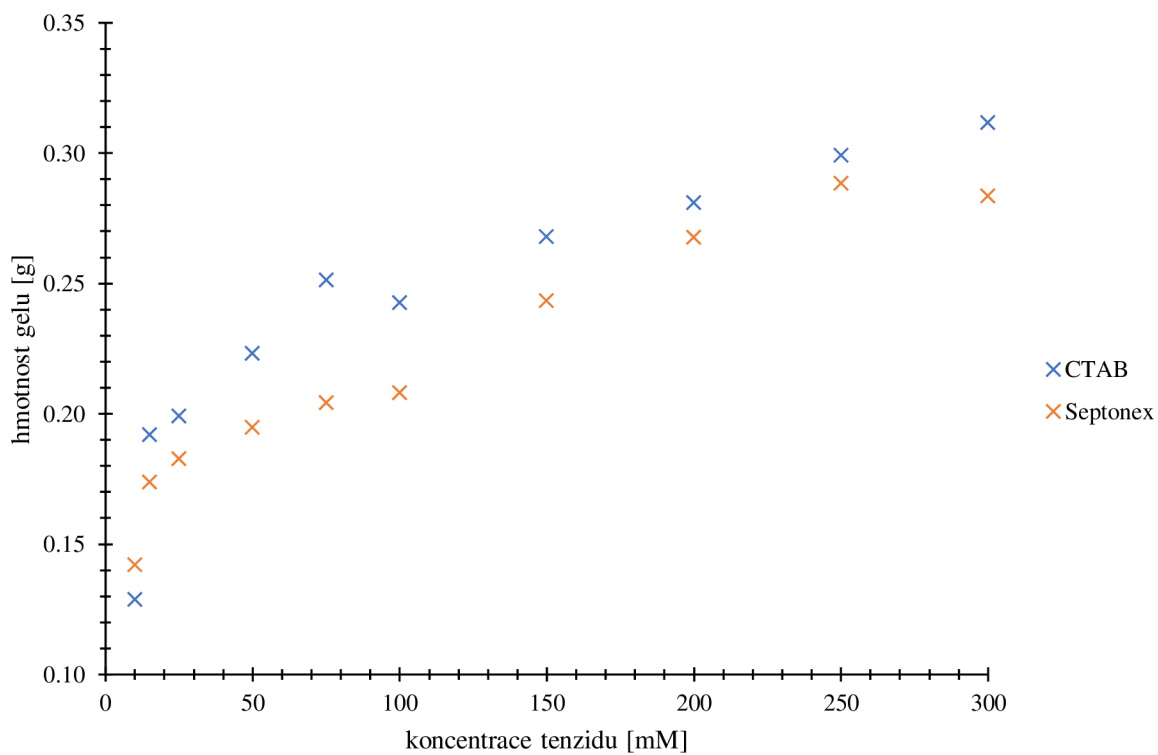
Příloha 47: Obsah vody v závislosti na koncentraci CTAB pro 2% hyaluronan.



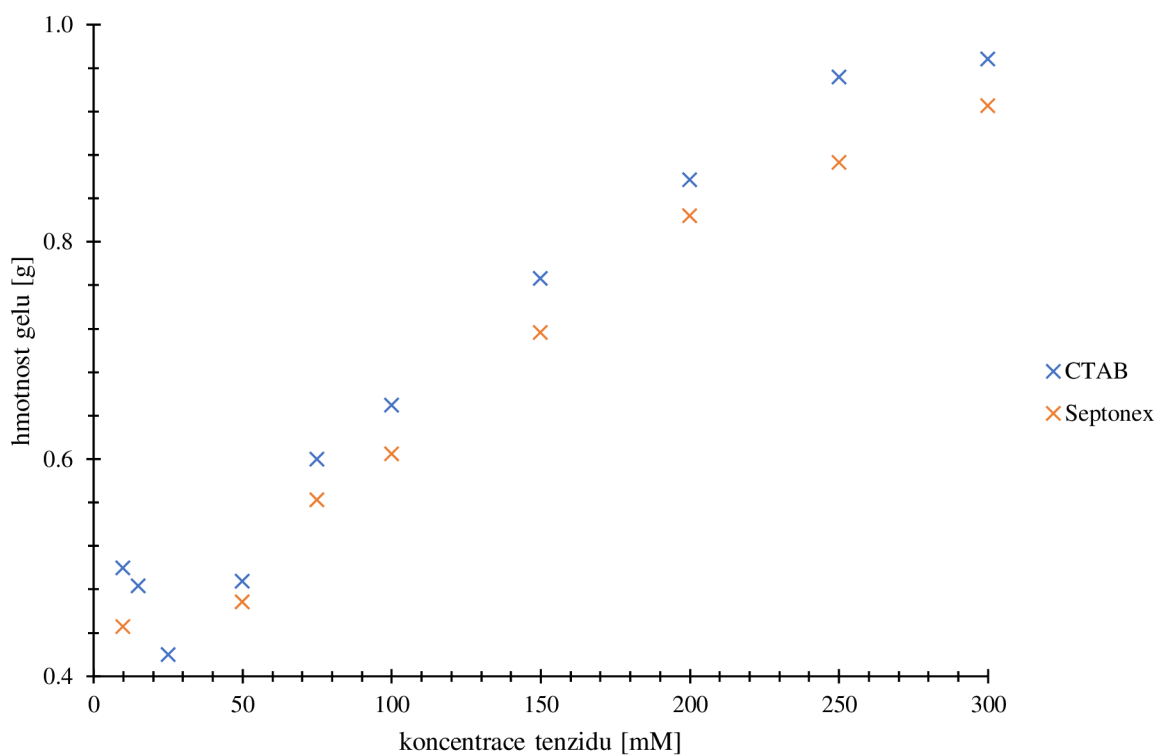
Příloha 48: Srovnání hmotnosti gelů pro oba tenzidy pro 0,1% hyaluronan, graf byl vytvořený z průměrných hodnot z obou opakování.



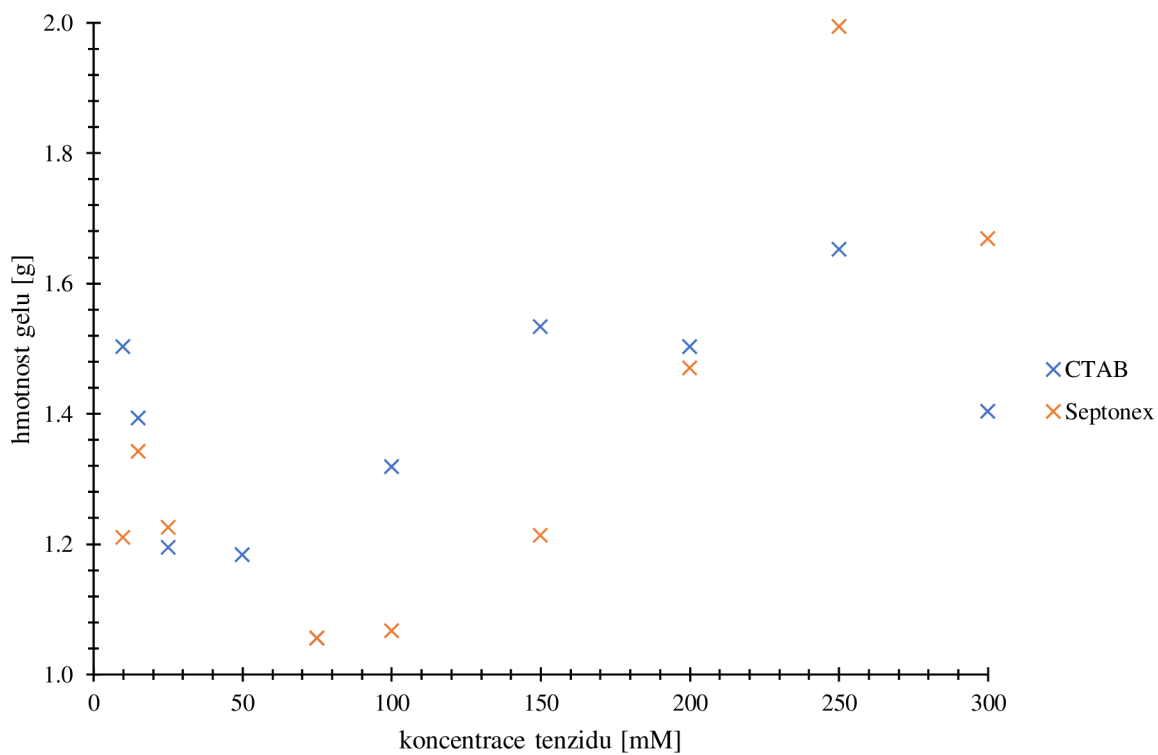
Příloha 49: Srovnání hmotnosti gelů pro oba tenzidy pro 0,2% hyaluronan, graf byl vytvořený z průměrných hodnot z obou opakování.



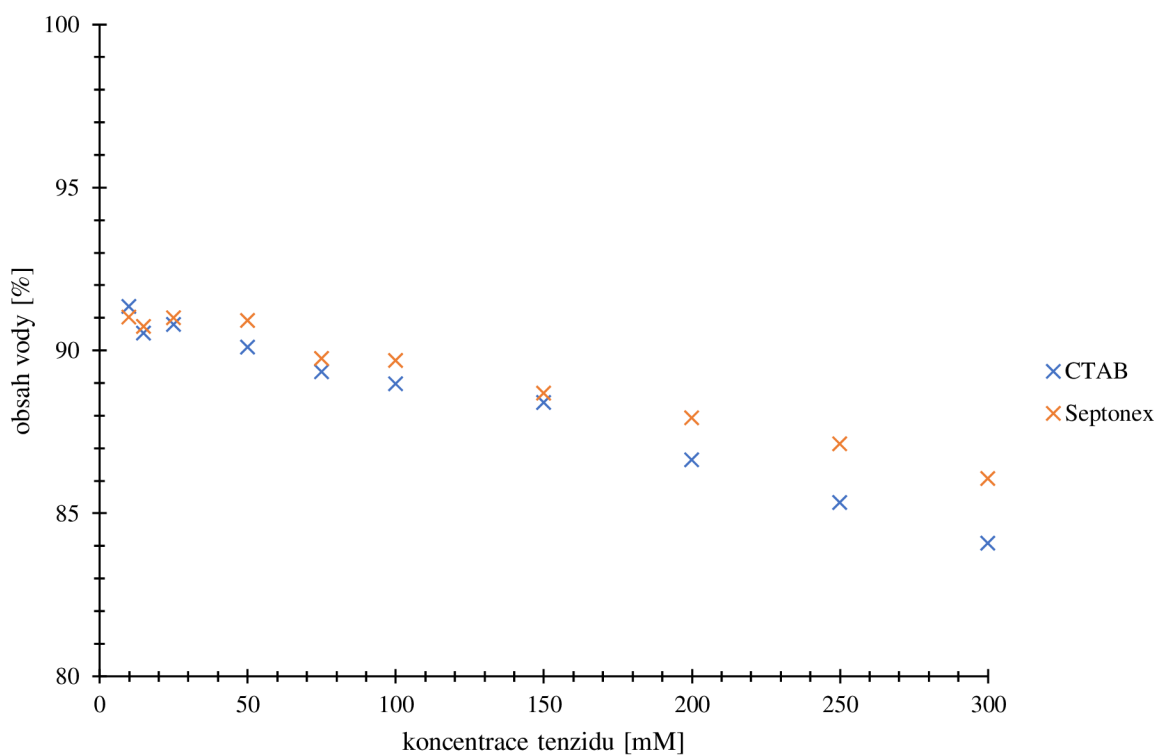
Příloha 50: Srovnání hmotnosti gelů pro oba tenzidy pro 1% hyaluronan, graf byl vytvořený z průměrných hodnot z obou opakování.



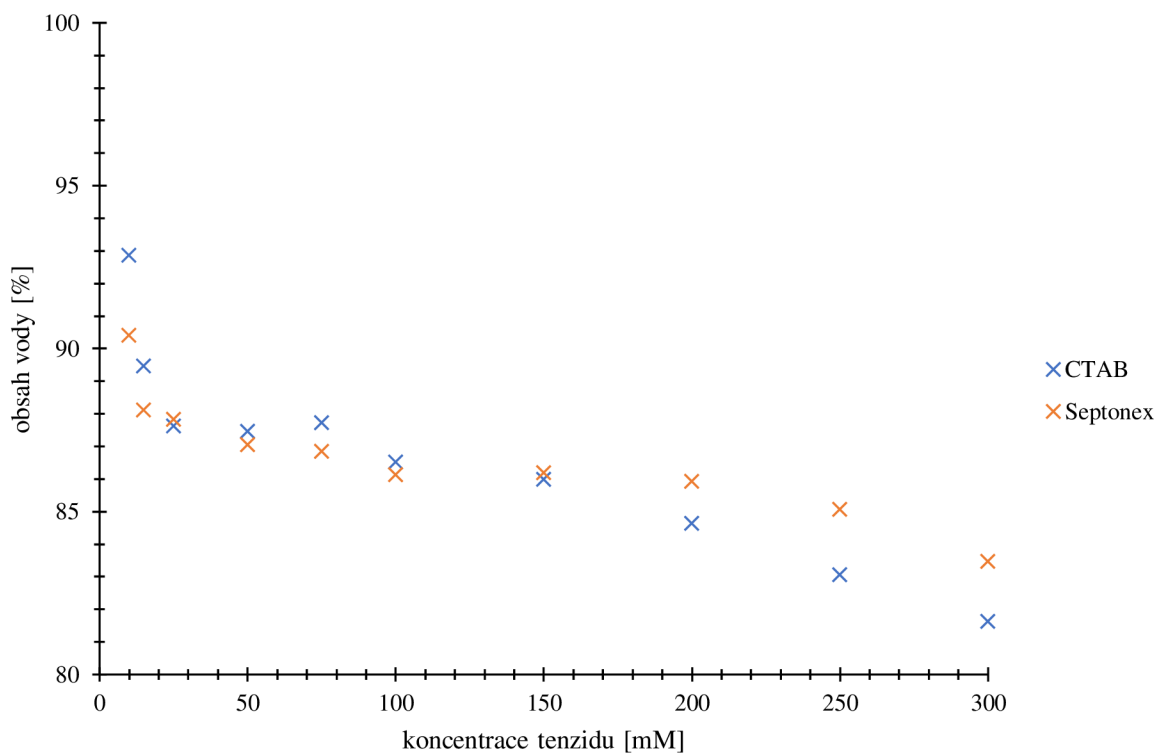
Příloha 51: Srovnání hmotnosti gelů pro oba tenzidy pro 2% hyaluronan, graf byl vytvořený z průměrných hodnot z obou opakování.



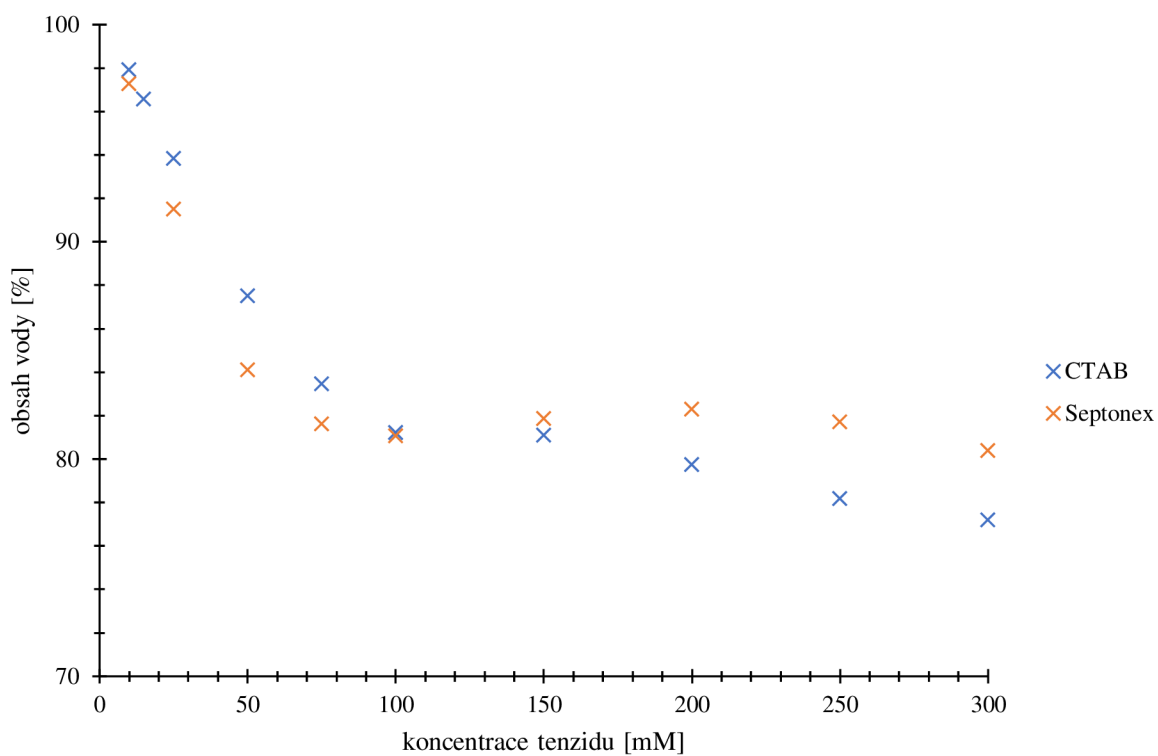
Příloha 52: Srovnání obsahu vody v gelech pro oba tenzidy pro 0,1% hyaluronan, graf byl vytvořený z průměrných hodnot z obou opakování.



Příloha 53: Srovnání obsahu vody v gelech pro oba tenzidy pro 0,2% hyaluronan, graf byl vytvořený z průměrných hodnot z obou opakování.



Příloha 54: Srovnání obsahu vody v gelech pro oba tenzidy pro 1% hyaluronan, graf byl vytvořený z průměrných hodnot z obou opakování.



Příloha 55: Srovnání obsahu vody v gelech pro oba tenzidy pro 2% hyaluronan, graf byl vytvořený z průměrných hodnot z obou opakování.

