

Ing. Lenka Gřundělová

**Stabilita a chování hyaluronanu v roztocích pro technologii
výroby farmaceutických přípravků**

**The stability of hyaluronan's behaviour in solutions for the
technology of pharmaceutical products**

Dizertační práce

Studijní program: Chemie a technologie materiálů

Studijní obor: Technologie Makromolekulárních látek

Školitel: doc. Mgr. Aleš Mráček Ph.D.

Konzultant: doc. Ing. Věra Kašpárková, CSc.

Konzultant: Ing. Adriana Gregorová Ph.D.

Zlín, 2014

ABSTRAKT

Tato dizertační práce na téma „Stabilita a chování hyaluronanu v roztocích pro technologii výroby farmaceutických přípravků“ se v první části věnuje základnímu popisu struktury kyseliny hyaluronové, jejímu chování v roztocích a vlastnostem, které jsou důležité pro pochopení studované problematiky. V další části práce následuje charakterizace tenzidů včetně jejich základního rozdělení. Nebyly opomenuty některé pojmy, které s tenzidy úzce souvisí např. kritická micelární koncentrace nebo interakce polymer-tenzid. Další kapitola teoretické části uvádí základní popis Hofmeisterovy řady solí, její charakterizace a základní rozdělení, které je doplněno popisem Hofmeisterových interakcí. V závěru teoretické části je pozornost věnována metodám vhodným pro charakterizaci tohoto biopolymeru, jejich stručnému popisu a zhodnocení. Představené metody byly využity k dosažení cílů zadaného tématu disertační práce a přispěly k pochopení fyzikálně-chemického a roztokového chování kyseliny hyaluronové. Experimentální část disertační práce je tématicky rozdělená do tří oddílů, z nichž první je věnován studiu vlivu kvartérních amoniových solí na konformační chování hyaluronanu, druhý chování hyaluronanu v roztocích solí z Hofmeisterovy řady a konečně třetí viskoelastickému chování karbodiimidu modifikovaného hyaluronanu.

Klíčová slova: Kyselina hyaluronová, tenzidy, Hofmeisterova řada solí, rozptyl světla, viskozimetrie, povrchové napětí

ABSTRACT

Ph.D. thesis „The stability of hyaluronan’s behaviour in solutions for the technology of pharmaceutical products“ is in the first part focused on the description of the hyaluronic acid structure, it’s solution behaviour and properties, which are essential for understanding of the studied problematics. The next part deals with characterization of surfactants, including their classification, followed terms which are closely related to surfactants, such as critical micelle concentration or polymer-surfactant interaction. The next chapter of the theoretical part provides a basic description of Hofmeister series salts and their classification, which is accompanied by a description of Hofmeister interactions. The basic theoretical background of utilized characterization methods, including their brief description and evaluation is also provided. These methods were chosen in order to contribute to clarification of physico-chemical properties and solution behaviour of hyaluronic acid. Experimental part of the thesis is divided into three parts, the first part is dealing with the influence of quaternary salt on hyaluronan conformation and particle size in solution, the next is dealing with behavior of hyaluronan in solutions with salts of the Hofmeister series, and finally the third part is aimed at viscoelastic properties of hyaluronan films and hydrogels modified by carbodiimide.

Keywords: Hyaluronic acid, surfactants, salts of Hofmeister series, light scattering, viscometry, surface tension

PODĚKOVÁNÍ

Chtěla bych poděkovat vedoucímu dizertační práce doc. Mgr. Alešovi Mráčkovi, Ph.D. (UTB, Zlín) za jeho odborné vedení, pomoc, trpělivost a podporu v průběhu celého doktorského studia, zejména při interpretaci výsledků a sepisování této práce. Mé díky patří i konzultantce doc. Ing. Věře Kašpárkové, CSc. (UTB, Zlín) za pomoc, cenné rady, předané zkušenosti a v neposlední řadě za její pomoc při korektuře dizertační práce. Nakonec bych chtěla poděkovat své konzultantce Ing. Adrianě Gregorové, Ph.D. (ICTM, Graz) za její vedení, motivaci a odborné nasměrování.

OBSAH

SEZNAM OBRÁZKŮ.....	6
SEZNAM TABULEK.....	11
SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....	12
1 ÚVOD.....	16
2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY.....	17
3 CÍLE DISERTAČNÍ PRÁCE.....	21
4 TEORETICKÁ ČÁST.....	22
4.1 KYSELINA HYALURONOVÁ.....	22
4.1.1 Výskyt HA a její výroba.....	24
4.1.2 Struktura HA a její chování v roztocích.....	27
4.2 TENZIDY.....	33
4.2.1 Charakteristika tenzidů a jejich základní rozdělení.....	33
4.2.2 Kritická micelární koncentrace.....	37
4.2.3 Interakce polymer-tenzid.....	41
4.3 HOFMEISTEROVA ŘADA SOLÍ (HOFMEISTER SERIES).....	44
4.3.1 Charakterizace a základní rozdělení.....	44
4.3.2 Hofmeisterovy interakce.....	46
5 VYBRANÉ METODY STUDIA CHOVÁNÍ HYALURONANU V ROZTOKU.....	51
5.1 MĚŘENÍ VELIKOSTI ČÁSTIC DISPERZNÍCH SYSTÉMŮ.....	51
5.1.1 Rozptyl světla.....	53
5.2 VISKOZIMETRIE.....	61
5.2.1 Ubbelohdeho kapilární viskozimetr.....	62
5.3 POVRCHOVÉ NAPĚTÍ A JEHO STANOVENÍ.....	66
5.3.1 Wilhelmyho metoda.....	68
5.3.2 Du Noüyho metoda odtrhávání prstence.....	69
6 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	72
6.1 STUDIUM VLIVU KVARTÉRNÍCH AMONIOVÝCH SOLÍ NA KONFOMAČNÍ CHOVÁNÍ HYALURONANU.....	72
6.1.1 Použité materiály a příprava vzorků.....	72
6.1.2 Výsledky a diskuze.....	74
6.2 CHOVÁNÍ HYALURONANU V ROZTOCÍCH SOLÍ Z HOFMEISTEROVY ŘADY.....	85
6.2.1 Použité materiály a příprava vzorků.....	85
6.2.2 Diskuze a výsledky.....	88
6.3 VISKOELASTICKÉ CHOVÁNÍ KARBODIIMIDY MODIFIKOVANÉHO HYALURONANU.....	121
6.3.1 Použité materiály a příprava vzorků.....	121
6.3.2 Diskuze a výsledky.....	126
7 PŘÍNOS PRÁCE PRO VĚDU A PRAXI.....	135
8 ZÁVĚR.....	136
9 LITERATURA.....	138
PŘÍLOHY.....	161

SEZNAM OBRÁZKŮ

<i>Obrázek 1: Schéma výroby kyseliny hyaluronové [39].</i>	27
<i>Obrázek 2: Strukturní jednotka kyseliny hyaluronové.</i>	28
<i>Obrázek 3: Sekundární struktura HA ve vodných roztocích tvořená vodíkovými můstky mezi amidovými a karboxylovými skupinami, umožňuje amidové části řetězce zaujímat trans konformaci [71,75].</i>	29
<i>Obrázek 4: Sekundární a terciární struktura HA [74,76,77].</i>	30
<i>Obrázek 5: Stáčení řetězce dimeru HA [86].</i>	32
<i>Obrázek 6: Ilustrace základní struktury tenzidu [95].</i>	33
<i>Obrázek 7: Přehled základních typů tenzidů [98].</i>	34
<i>Obrázek 8: Strukturní vzorec benzalkonia chloridu [94].</i>	35
<i>Obrázek 9: Změny vybraných fyzikálních veličin v závislosti na koncentraci [95].</i>	37
<i>Obrázek 10: Kritický sbalovací parametr CPP [95,102,106].</i>	39
<i>Obrázek 11: Základní tvary micel [94,95].</i>	40
<i>Obrázek 12: Polymer - surfaktant interakce [94].</i>	42
<i>Obrázek 13: Typické uspořádání Hofmeisterovy řady iontů [120].</i>	45
<i>Obrázek 14: Vliv kosmotropních a chaotropních iontů na molekuly vody [124].</i>	46
<i>Obrázek 15: Znázornění molekul vody (modře) obklopující chaotropní a kosmotropní ionty (šedě). Elektrostatické uspořádání molekul vody, je v přítomnosti malých iontů založeno na jejich dipólové orientaci. U velkých iontů se molekuly vody uspořádají tak, aby vytvořily vodíkové vazby. Červené body znázorňují kladný dipólový konec; záporný konec dipólu je znázorněn v jejich středu [128].</i>	48
<i>Obrázek 16: Rozdělení kosmotropních a chaotropních iontů podle velikosti [121].</i>	48
<i>Obrázek 17: Iontové párování malých a velkých iontů [121].</i>	49
<i>Obrázek 18: Ekvivalentní průměry [136,137].</i>	52
<i>Obrázek 19: Rozdíl mezi statickým a dynamickým rozptylem světla [142].</i>	55
<i>Obrázek 20: Princip metody DLS [153].</i>	57
<i>Obrázek 21: Hydrodynamický průměr D_H [137].</i>	58
<i>Obrázek 22: Znázornění intenzitních fluktuací rozptýleného světla jako funkce času a jejich převedení na intenzitní distribuci [147,155].</i>	58
<i>Obrázek 23: Uspořádání přístroje pro měření DLS [147].</i>	60
<i>Obrázek 24: Ubbelohdeho viskozimetr [135].</i>	64
<i>Obrázek 25: Síly působící na molekulu na povrchu a v objemu [164].</i>	66
<i>Obrázek 26: Určení povrchového napětí Wilhelmyho metodou [165,182].</i>	68
<i>Obrázek 27: Du Noüyho odtrhávací metoda [164].</i>	70
<i>Obrázek 28: Velikost polymerních klubek NaHy v přítomnosti studovaných přísad BAC v roztoku ($NaHy_{M_w} = 1,8MDa$ (Δ) a $NaHy_{M_w} = 1,8MDa$ (\circ)).</i>	75
<i>Obrázek 29: Stanovení kritické micelární koncentrace BAC ve fosfátovém pufru (Δ) a v de-ionizované vodě (\circ).</i>	76
<i>Obrázek 30: Stanovení kritické micelární koncentrace systému NaHy-BAC ve fosfátovém pufru (\circ).</i>	77
<i>Obrázek 31: Předpokládané interakce probíhající mezi NaHy a BAC.</i>	78

Obrázek 32: Intenzitní distribuce roztoku (a) BAC ve fosfátovém pufru, (b) BAC v de-ionizované vodě, (c) NaHy ($M_w = 1,8 \text{ MDa}$) ve fosfátovém pufru (d) NaHy ($M_w = 1,8 \text{ MDa}$) s BAC ($c = 4,2 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$) ve fosfátovém pufru.....	81
Obrázek 33: Intenzitní distribuce roztoku (a) BAC ve fosfátovém pufru, (b) BAC v de-ionizované vodě, (e) NaHy ($M_w = 0,35 \text{ MDa}$) ve fosfátovém pufru, (d) NaHy ($M_w = 0,35 \text{ MDa}$) s BAC ($c = 4,2 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$) ve fosfátovém pufru.	81
Obrázek 34: Vyjádření poměru relativní viskozity a koncentrace BAC (●) NaHy bez BAC, (○) NaHy s BAC.....	84
Obrázek 35: Porovnání časového průběhu povrchového napětí de-ionizované vody (Δ) a roztoku chaotropních iontů NH_4SCN ($I=0,1\text{M}$) (○). Stanoveno při teplotě $T = 25^\circ\text{C}$	90
Obrázek 36: Závislost relativní viskozity NaHy v de-ionizované vodě (\square) na koncentraci stanovené při teplotě $T = 25^\circ\text{C}$	91
Obrázek 37: Závislost relativní viskozity systému NaHy- NH_4SCN ($I=0,1\text{M}$) (○) na koncentraci stanovené při teplotě $T = 25^\circ\text{C}$	92
Obrázek 38: Porovnání časového průběhu povrchového napětí systému NaHy v de-ionizované vodě (DEMI) (\square) a NaHy s přidavkem chaotropních iontů NH_4SCN ($I=0,1\text{M}$) (○). Stanoveno při teplotě $T = 25^\circ\text{C}$	95
Obrázek 39: Intenzitní distribuce velikosti částic NaHy v de-ionizované vodě při teplotě $T=25^\circ\text{C}$. Střední velikost částic (z-average) odpovídá hodnotě 286 nm.	97
Obrázek 40: Teplotní závislost střední velikosti částic (z-average) NaHy v de-ionizované vodě (DEMI) (\square).	98
Obrázek 41: Intenzitní distribuce velikosti částic systému NaHy v prostředí NH_4SCN ($I=0,1\text{M}$) při teplotě $T=25^\circ\text{C}$. Střední velikost částic (z-average) odpovídá hodnotě 68 nm.	99
Obrázek 42: Teplotní závislost střední velikosti částic (z-average) systému NH_4SCN -NaHy (○). Velikost částic NaHy je v prostředí NH_4SCN stabilní do teploty $T=24^\circ\text{C}$	100
Obrázek 43: Porovnání časového průběhu povrchového napětí de-ionizované vody (Δ) a kosmotropních iontů Na_2SO_4 ($I=0,1\text{M}$) (○), stanoveného při teplotě $T = 25^\circ\text{C}$	101
Obrázek 44: Závislost relativní viskozity systému NaHy- Na_2SO_4 ($I=0,1\text{M}$) (○) na koncentraci stanovené při teplotě $T = 25^\circ\text{C}$	102
Obrázek 45: Porovnání časového průběhu povrchového napětí systému NaHy- Na_2SO_4 ($I=0,1\text{M}$) (○) stanoveného při teplotě $T = 25^\circ\text{C}$	103
Obrázek 46: Intenzitní distribuce velikosti částic systému NaHy v prostředí Na_2SO_4 ($I=0,1\text{M}$) při teplotě $T=25^\circ\text{C}$. Střední velikost částic (z-average) odpovídá hodnotě 70 nm.	105
Obrázek 47: Intenzitní distribuce velikosti částic NaHy v prostředí fosfátového pufru při teplotě $T=25^\circ\text{C}$. Střední velikost částic (z-average) odpovídá hodnotě 70 nm.	105
Obrázek 48: Teplotní závislost střední velikosti částic (z-average) NaHy v prostředí Na_2SO_4 (○). Velikost částic NaHy v prostředí Na_2SO_4 je stabilní do teploty $T=40^\circ\text{C}$	106
Obrázek 49: Teplotní závislost střední velikosti částic (z-average) NaHy ve fosfátovém pufru, zástupce kosmotropních iontů (○). Velikost částic NaHy je v prostředí fosfátového pufru stabilní do teploty $T=40^\circ\text{C}$	107
Obrázek 50: Porovnání časového průběhu povrchového napětí de-ionizované vody (Δ), iontů $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ($I=0,1\text{M}$) (○), iontů NaSCN ($I=0,1\text{M}$) (○) a iontů NaCl ($I=0,1\text{M}$) (○) stanoveného při teplotě $T = 25^\circ\text{C}$	109
Obrázek 51: Závislost relativní viskozity systému NaHy- NH_4SCN ($I=0,1\text{M}$) (○) na koncentraci stanovené při teplotě $T = 25^\circ\text{C}$	110
Obrázek 52: Závislost relativní viskozity systému NaHy- NaSCN ($I=0,1\text{M}$) (○) na koncentraci stanovené při teplotě $T = 25^\circ\text{C}$	111

Obrázek 53: Porovnání časového průběhu povrchového napětí systému NaHy-NaSCN ($I=0,1M$) (\circ) stanoveného při teplotě $T = 25^{\circ}C$	112
Obrázek 54: Porovnání časového průběhu povrchového napětí systému NaHy- $(NH_4)_2SCN$ ($I=0,1M$) (\circ) stanoveného při teplotě $T = 25^{\circ}C$	113
Obrázek 55: Porovnání časového průběhu povrchového napětí systému NaHy-NaCl ($I=0,1M$) (\circ) stanoveného při teplotě $T = 25^{\circ}C$	114
Obrázek 56: Intenzitní distribuce velikosti částic systému NaHy v prostředí NaSCN ($I=0,1M$) při teplotě $T=25^{\circ}C$. Střední velikost částic (z-average) odpovídá hodnotě 69 nm.	115
Obrázek 57: Intenzitní distribuce velikosti částic systému NaHy v prostředí $(NH_4)_2SO_4$ ($I=0,1M$) při teplotě $T=25^{\circ}C$. Střední velikost částic (z-average) odpovídá hodnotě 66 nm.	116
Obrázek 58: Intenzitní distribuce velikosti částic systému NaHy v prostředí NaCl ($I=0,1M$) při teplotě $T=25^{\circ}C$. Střední velikost částic (z-average) odpovídá hodnotě 61 nm.	116
Obrázek 59: Teplotní závislost střední velikosti částic (z-average) NaHy v prostředí NaSCN (\circ). Velikost částic NaHy je v prostředí NaSCN stabilní do teploty $T=33^{\circ}C$	117
Obrázek 60: Teplotní závislost střední velikosti částic (z-average) NaHy v prostředí $(NH_4)_2SO_4$ (\circ). Velikost částic NaHy je v prostředí $(NH_4)_2SO_4$ stabilní do teploty $T=38^{\circ}C$	118
Obrázek 61: Teplotní závislost střední velikosti částic (z-average) NaHy v prostředí NaCl (\circ). Velikost částic NaHy je v prostředí NaCl stabilní do teploty $T=45^{\circ}C$	119
Obrázek 62: Organizovaná struktura systému NaHy-NaSCN na Si-waferu.	120
Obrázek 63: Sušící cela pro přípravu NaHy filmů.	122
Obrázek 64: Nesíťovaný NaHy film.	122
Obrázek 65: Síťovaný NaHy hydrogel válcového tvaru.	123
Obrázek 66: Zkušební tělísko NaHy připravené na DMA analýzu.....	125
Obrázek 67: Časová závislost „swelling testu“ síťovaného NaHy.	127
Obrázek 68: "Swelling test" síťovaného NaHy filmu (a) a hydrogelu (b).	128
Obrázek 69: FT-IR spektra (a) nesíťovaného NaHy (NaHy_A_film), (b) síťovaného NaHy (NaHy_B_film) a (c) síťovaného hydrogelu NaHy (NaHy_B_cylindr).	129
Obrázek 70: 1H NMR Spektra a) NaHy v D_2O , b) standard EDC v D_2O , c) NaHy hydrogel, d) kapalina vytlačená z NaHy hydrogelu.	130
Obrázek 71: Mechanické vlastnosti nesíťovaného (NaHy_A_film) a síťovaného NaHy filmu (NaHy_B_film); (a) protažení při protažení (b) napětí při přetržení.	132
Obrázek 72: Křip/křipové zotavení NaHy vzorků; a) křipová a obnovitelná poddajnost, b)křipové zotavení.....	133
Obrázek 73: Porovnání časového průběhu povrchového napětí NaHy v de-ionizované vodě (\square) stanoveného při teplotách $T = 15^{\circ}C$, $T=20^{\circ}C$, $T=25^{\circ}C$, $T=30^{\circ}C$, $T=35^{\circ}C$, $T=40^{\circ}C$, $T=45^{\circ}C$	165
Obrázek 74: Porovnání časového průběhu povrchového napětí systému NaHy-NaSCN (\circ) stanoveného při teplotách $T = 15^{\circ}C$, $T=20^{\circ}C$, $T=25^{\circ}C$, $T=30^{\circ}C$, $T=35^{\circ}C$, $T=40^{\circ}C$, $T=45^{\circ}C$	165
Obrázek 75: Porovnání časového průběhu povrchového napětí de-ionizované vody (DEMI) (\square) a chaotropních iontů NH_4SCN ($I=0,1M$) (\circ), stanoveného při teplotě $T = 15^{\circ}C$	166
Obrázek 76: Porovnání časového průběhu povrchového napětí de-ionizované vody (DEMI) (\square) a chaotropních iontů NH_4SCN ($I=0,1M$) (\circ), stanoveného při teplotě $T = 20^{\circ}C$	166
Obrázek 77: Porovnání časového průběhu povrchového napětí de-ionizované vody (DEMI) (\square) a chaotropních iontů NH_4SCN ($I=0,1M$) (\circ), stanoveného při teplotě $T = 30^{\circ}C$	167
Obrázek 78: Porovnání časového průběhu povrchového napětí de-ionizované vody (DEMI) (\square) a chaotropních iontů NH_4SCN ($I=0,1M$) (\circ), stanoveného při teplotě $T = 35^{\circ}C$	167

Obrázek 79: Porovnání časového průběhu povrchového napětí de-ionizované vody (DEMI) (□) a chaotropních iontů NH_4SCN ($I=0,1\text{M}$) (○), stanoveného při teplotě $T = 40^\circ\text{C}$	168
Obrázek 80: Porovnání časového průběhu povrchového napětí de-ionizované vody (DEMI) (□) a chaotropních iontů NH_4SCN ($I=0,1\text{M}$) (○), stanoveného při teplotě $T = 45^\circ\text{C}$	168
Obrázek 81: Porovnání časového průběhu povrchového napětí systému $\text{NaHy-Na}_2\text{SO}_4$ ($I=0,1\text{M}$) (○) stanoveného při teplotě $T = 15^\circ\text{C}$	169
Obrázek 82: Porovnání časového průběhu povrchového napětí systému $\text{NaHy-Na}_2\text{SO}_4$ ($I=0,1\text{M}$) (○) stanoveného při teplotě $T = 20^\circ\text{C}$	169
Obrázek 83: Porovnání časového průběhu povrchového napětí systému $\text{NaHy-Na}_2\text{SO}_4$ ($I=0,1\text{M}$) (○) stanoveného při teplotě $T = 30^\circ\text{C}$	170
Obrázek 84: Porovnání časového průběhu povrchového napětí systému $\text{NaHy-Na}_2\text{SO}_4$ ($I=0,1\text{M}$) (○) stanoveného při teplotě $T = 35^\circ\text{C}$	170
Obrázek 85: Porovnání časového průběhu povrchového napětí systému $\text{NaHy-Na}_2\text{SO}_4$ ($I=0,1\text{M}$) (○) stanoveného při teplotě $T = 40^\circ\text{C}$	171
Obrázek 86: Porovnání časového průběhu povrchového napětí systému $\text{NaHy-Na}_2\text{SO}_4$ ($I=0,1\text{M}$) (○) stanoveného při teplotě $T = 45^\circ\text{C}$	171
Obrázek 87: Porovnání časového průběhu povrchového napětí systému NaHy-NaSCN ($I=0,1\text{M}$) (○), stanoveného při teplotě $T = 15^\circ\text{C}$	172
Obrázek 88: Porovnání časového průběhu povrchového napětí systému $\text{NaHy}-(\text{NH}_4)_2\text{SCN}$ ($I=0,1\text{M}$) (○) stanoveného při teplotě $T = 15^\circ\text{C}$	172
Obrázek 89: Porovnání časového průběhu povrchového napětí systému NaHy-NaCl ($I=0,1\text{M}$) (○) stanoveného při teplotě $T = 15^\circ\text{C}$	173
Obrázek 90: Porovnání časového průběhu povrchového napětí systému NaHy-NaSCN ($I=0,1\text{M}$) (○) stanoveného při teplotě $T = 20^\circ\text{C}$	173
Obrázek 91: Porovnání časového průběhu povrchového napětí systému $\text{NaHy}-(\text{NH}_4)_2\text{SCN}$ ($I=0,1\text{M}$) (○) stanoveného při teplotě $T = 20^\circ\text{C}$	174
Obrázek 92: Porovnání časového průběhu povrchového napětí systému NaHy-NaCl ($I=0,1\text{M}$) (○) stanoveného při teplotě $T = 20^\circ\text{C}$	174
Obrázek 93: Porovnání časového průběhu povrchového napětí systému NaHy-NaSCN ($I=0,1\text{M}$) (○) stanoveného při teplotě $T = 30^\circ\text{C}$	175
Obrázek 94: Porovnání časového průběhu povrchového napětí systému $\text{NaHy}-(\text{NH}_4)_2\text{SCN}$ ($I=0,1\text{M}$) (○) stanoveného při teplotě $T = 30^\circ\text{C}$	175
Obrázek 95: Porovnání časového průběhu povrchového napětí systému NaHy-NaCl ($I=0,1\text{M}$) (○) stanoveného při teplotě $T = 30^\circ\text{C}$	176
Obrázek 96: Porovnání časového průběhu povrchového napětí systému NaHy-NaSCN ($I=0,1\text{M}$) (○) stanoveného při teplotě $T = 35^\circ\text{C}$	176
Obrázek 97: Porovnání časového průběhu povrchového napětí systému $\text{NaHy}-(\text{NH}_4)_2\text{SCN}$ ($I=0,1\text{M}$) (○) stanoveného při teplotě $T = 35^\circ\text{C}$	177
Obrázek 98: Porovnání časového průběhu povrchového napětí systému NaHy-NaCl ($I=0,1\text{M}$) (○) stanoveného při teplotě $T = 35^\circ\text{C}$	177
Obrázek 99: Porovnání časového průběhu povrchového napětí systému NaHy-NaSCN ($I=0,1\text{M}$) (○) stanoveného při teplotě $T = 40^\circ\text{C}$	178
Obrázek 100: Porovnání časového průběhu povrchového napětí systému $\text{NaHy}-(\text{NH}_4)_2\text{SCN}$ ($I=0,1\text{M}$) (○) stanoveného při teplotě $T = 40^\circ\text{C}$	178
Obrázek 101: Porovnání časového průběhu povrchového napětí systému NaHy-NaCl ($I=0,1\text{M}$) (○) stanoveného při teplotě $T = 40^\circ\text{C}$	179

<i>Obrázek 102: Porovnání časového průběhu povrchového napětí systému NaHy-NaSCN ($I=0,1M$) (\circ) stanoveného při teplotě $T = 45^{\circ}C$.....</i>	<i>179</i>
<i>Obrázek 103: Porovnání časového průběhu povrchového napětí systému NaHy-$(NH_4)_2SCN$ ($I=0,1M$) (\circ) stanoveného při teplotě $T = 45^{\circ}C$.</i>	<i>180</i>
<i>Obrázek 104: Porovnání časového průběhu povrchového napětí systému NaHy-NaCl ($I=0,1M$) (\circ) stanoveného při teplotě $T = 45^{\circ}C$.....</i>	<i>180</i>
<i>Obrázek 105: Porovnání časového průběhu povrchového napětí systému NaHy-NaCl (\circ) stanoveného při teplotách $T = 15^{\circ}C, T=20^{\circ}C, T=25^{\circ}C, T=30^{\circ}C, T=35^{\circ}C, T=40^{\circ}C, T=45^{\circ}C$.....</i>	<i>181</i>
<i>Obrázek 106: Porovnání časového průběhu povrchového napětí systému NaHy-NH_4SCN (\circ) stanoveného při teplotách $T = 15^{\circ}C, T=20^{\circ}C, T=25^{\circ}C, T=30^{\circ}C, T=35^{\circ}C, T=40^{\circ}C, T=45^{\circ}C$.....</i>	<i>181</i>
<i>Obrázek 107: Porovnání časového průběhu povrchového napětí systému NaHy-Na_2SO_4 (\circ) stanoveného při teplotách $T = 15^{\circ}C, T=20^{\circ}C, T=25^{\circ}C, T=30^{\circ}C, T=35^{\circ}C, T=40^{\circ}C, T=45^{\circ}C$.....</i>	<i>182</i>
<i>Obrázek 108: Porovnání časového průběhu povrchového napětí systému NaHy-$(NH_4)_2SO_4$ (\circ) stanoveného při teplotách $T = 15^{\circ}C, T=20^{\circ}C, T=25^{\circ}C, T=30^{\circ}C, T=35^{\circ}C, T=40^{\circ}C, T=45^{\circ}C$.....</i>	<i>182</i>
<i>Obrázek 109: Porovnání časového průběhu povrchového napětí systému NaHy-NaSCN(\circ) stanoveného při teplotách $T = 15^{\circ}C, T=20^{\circ}C, T=25^{\circ}C, T=30^{\circ}C, T=35^{\circ}C, T=40^{\circ}C, T=45^{\circ}C$.:</i>	<i>183</i>
<i>Obrázek 110: Srovnání závislost relativní viskozity na koncentraci pro systémy NaHy-NaSCN ($I=0,1M$) (\circ), NaHy-NH_4SCN ($I=0,1M$) (\circ), NaHy-Na_2SO_4 ($I=0,1M$) (\circ), NaHy-$(NH_4)_2SO_4$ ($I=0,1M$) (\circ) stanovené při teplotě $T = 25^{\circ}C$.</i>	<i>183</i>

SEZNAM TABULEK

<i>Tabulka 1.: Časový horizont důležitých událostí týkajících se kyseliny hyaluronové [28].</i>	23
<i>Tabulka 2: Střední velikost částic (z-average) NaHy ($M_w = 1,8\text{MDa}$) jednotlivých přídavků BAC.</i>	75
<i>Tabulka 3: Střední velikost částic (z-average) NaHy ($M_w = 0,35\text{MDa}$) jednotlivých přídavků BAC.</i>	76
<i>Tabulka 4: Limitní viskozitní číslo a Hugginsova konstanta roztoku NaHy s BAC ve fosfátovém pufri</i>	82
<i>Tabulka 5: Počet molekul soli, který připadá 1 mer NaHy.</i>	87
<i>Tabulka 6: Limitní viskozitní číslo a Hugginsova konstanta roztoku NaHy rozpuštěné v de-ionizované vodě, Na_2SO_4, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, NaSCN, NH_4SCN.</i>	93

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

<i>symbol</i>	<i>jednotka</i>	<i>význam</i>
A		základní linie korelační funkce pro nekonečný čas
a	m	poloměr kapiláry
A₂	m ³ ·kg ⁻¹	druhý viriální koeficient
AFM		mikroskopie atomárních sil
B		směrnice korelační funkce
BAC		benzalkonium chlorid
c	kg·m ⁻³	koncentrace
CAC		kritická agregační koncentrace
CMC		kritická micelární koncentrace
CONTIN		generalizovaná inverzní Laplaceova transformace
CPP		pakovací parametr
CTAB		dodecyltrimethylammonium bromide
d	m	tloušťka destičky
DEMI		de-ionizovaná voda
D-GlcA		kyseliny D-glokoronová
D-GlcNAc		N-acetyl-D-glukosamin
D_H	m	hydrodynamický ekvivalentní průměr
D_i	m ² ·s ⁻¹	difúzní koeficient látky v prostředí
DLS		dynamický rozptyl světla
dn/dc		inkrement indexu lomu
DMA		dynamická mechanická analýza
DMSO		pod tlakem čerstvě destilovaná voda
D_p	m	průměr částice
DP		degradační produkt
D_S	m	Stokesův průměr
DTAB		dodecyltrimethylamonium bromid
D_{volume}	m	objemově-ekvivalentní průměr
dx/dt	s ⁻¹	gradient rychlosti
E	N·m ⁻¹	povrchová energie

EDC		N-(3-dimethylaminopropyl-N'-ethylkarbodiimid chlorid
F	N	působící síla
F_{max}	N	maximální síla
FW_{MU}	Da	hmotnostní jednotka jednoho meru
g	m·s ⁻²	tíhové zrychlení
G(τ)		časová korelační funkce
h₀	m	výška hladiny
HA		kyselina hyaluronová
HDO		signál
I		intenzita světla
I_i		integrální intenzita ¹ H NMR signálu
I₀		jednotková intenzita primárního paprsku
I(t)		intenzita světla v čase t
I(t+τ)		intenzita světla v čase (t+τ)
I_θ		intenzita rozptýleného světla
J	mm ² ·N ⁻¹	křipová poddajnost
J_{max}	mm ² ·N ⁻¹	maximální křipová poddajnost
J_R	mm ² ·N ⁻¹	znovu použitelná poddajnost
K_c		optická konstanta
K	mm ² ·s ⁻²	viskozimetrická konstanta
k_b	J·K ⁻¹	Boltzmannova konstanta
k_H		Hugginsova konstanta
L	m	smáčená délka destičky
l	m	délka kapiláry
L_{alky.}	M	efektivní délka alkylového řetězce
LVČ	cm ³ ·g ⁻¹	limitní viskozitní číslo
M	kg·mol ⁻¹	molekulová hmotnost
Mw	Da	molekulová hmotnost
N		počet molekul
n		index lomu disperzního prostředí
n₀		index lomu rozpouštědla
N_A	mol ⁻¹	Avogadrova konstanta

NaBr		bromid sodný
NaCl		chlorid sodný
NaHy		hyaluronan sodný
NaSCN		thionyanát sodný
Na₂SO₄		síran sodný
NHS		N-hydroxysukcinimid
NH₄SCN		thiokyanát amonný
(NH₄)₂SO₄		síran amonný
NMR		spektroskopie nukleární magnetické rezonance
PAL		povrchově aktivní látka
ΔP	Pa	tlakový rozdíl
pH vodíkových		záporně vzatý dekadický logaritmus aktivity kationtů
pk_a		disociační konstanta
PTFE		polytetrafluorethylen
Q	m ³ ·s ⁻¹	objemový tok
$\vec{ q }$		vlnový vektor rozptýleného světla
\vec{q}_0		označení směru vektoru
R	%	krípkové zotavení
R_θ		Rayleigho poměr
r_p	m	poloměr prstence
S	m ²	obsah plochy
SbQ		1-methyl-4-[2-(4-formylphenyl)-ethenyl]-pyridinium-methosulphate
SFT		povrchové napětí
T	°C	absolutní teplota
t	s	čas
(t+τ)	s	časový rozdíl
TTAB		tetradecyltrimethylammonium bromide
UK		United Kingdom
UV		ultrafialové záření
V	m ³	definovaný objem
V_{částice}	m ³	objem částice

W	J	práce
w	m	šířka destičky
w_i	kg	hmotnost nabobtnalého vzorku
w₀	kg	hmotnost suchého vzorku (počáteční hmotnost)
z-average	nm	intenzitně vážený průměr
α		velikostní parametr
β	°	kontaktní úhel
Γ		rychlost poklesu korelační funkce
γ	N·m ⁻¹	povrchové napětí
ε		relativní protažení
η	N·s·m ⁻²	dynamická viskozita
η_{roz}	N·s·m ⁻²	dynamická viskozita rozpouštědla
[η]	cm ³ ·g ⁻¹	limitní viskozitní číslo
η_r		relativní viskozita
η_{red}		redukováná viskozita
η_{rel-BAC}		relativní kinematická viskozita NaHy s přidaným BAC
η_{rel-0}		relativní kinematická viskozita NaHy bez přidaného BAC
η_{sp}		specifická viskozita
Θ	°	úhel rozptylu světla
λ	nm	vlnová délka záření
λ₀	nm	vlnová délka světla ve vakuu
π		matematická konstanta
ν	m ² ·s ⁻¹	kinematická viskozita
ν_k	m·s ⁻¹	konečná rychlost
ρ_L	kg·m ⁻³	hustota kapaliny
ρ_S	kg·m ⁻³	hustota částic
σ	Pa	smykové napětí
τ	s	časové zpoždění
Φ		korekční faktor

1 ÚVOD

Kyselina hyaluronová, stejně jako její sodná sůl (hyaluronan), představuje vysokomolekulární anionický biopolymer vyskytující se v mnoha živočišných tkáních. Je jednou z hlavních součástí mezibuněčné hmoty a můžeme ji najít v synoviální tekutině nebo jako součást většiny pojivových tkání a pokožky [1,2,3]. Její základní stavební jednotku tvoří *N*-acetyl-D-glukosamin spojený s kyselinou D-glukoronovou střídající se β -1,3 a β -1,4 glykosidickou vazbou, kterou stabilizují intramolekulární vodíkové vazby [4]. Každá disacharidová jednotka obsahuje jednu karboxylovou, čtyři methylové a jednu acetamidovou skupinu. S ohledem na primární a sekundární strukturu, zaujímá kyselina hyaluronová v roztoku konformace náhodně sbaleného klubka, což je způsobeno chemickou strukturou disacharidů, vnitřními vodíkovými můstky a interakcemi polymeru s rozpouštědlem [5,6]. Díky svým hydrofilním vlastnostem může řetězec kyseliny hyaluronové ve vodných roztocích expandovat až na tisícinásobek svého původního objemu a vytvořit tak volně hydratovanou matici [3,7,8].

Interakce kyseliny hyaluronové s různými ionty a tenzidy v roztocích byly předmětem řady studií, které dokumentují, že vlastnosti jejích roztoků, zejména viskozita, jsou silně závislé na prostředí [9-16]. Je známo, že přítomnost jednoduchých solí výrazně snižuje viskozitu polyelektrolytů, a tedy i kyseliny hyaluronové. Tento fakt může být vysvětlen sbalováním lineárního polymerního řetězce a překrýváním nábojů polyelektrolytu ionty přítomnými v roztoku [10,13].

Předložená práce se zabývá studiem vlivu vybraných tenzidů a iontů z Hofmeisterovy řady solí na chování hyaluronanu v roztoku. Mezi metody, které byly zvoleny k dosažení cílů zmíněných v Kapitole 5 této práce, patří metoda dynamického rozptylu světla (DLS), měření povrchového napětí spolu s měřením viskozity pomocí kapilárního Ubbelohdeho viskozimetru.

2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

Podobné problematice, kterou se zabývá předložená práce, se věnovala řada autorů [9-15,17-19]. Kyselina hyaluronová (HA) se ve farmaceutickém průmyslu i medicíně málokdy vyskytuje v podobě čistých roztoků v deionizované vodě. Z tohoto důvodu a na základě faktu, že se vodný roztok HA chová jako polyelektrolyt, je nezbytné se zabývat také roztoky HA s přísádky tenzidů nebo iontů. Polyelektrolyty a opačně nabitě tenzidy v roztoku mezi sebou vytváří komplexní útvary, ovlivňující konformační, strukturní a dynamické chování původního polyelektrolytu. Z toho důvodu se většina autorů při studiu interakcí záporně nabitých (anionických) polyelektrolytů s tenzidy zaměřuje na tenzidy kationické [19]. Chování těchto systémů je poměrně komplikované, protože jejich vzájemné interakce ovlivňuje struktura jak polyelektrolytu, tak tenzidu a nelze opomenout ani iontovou sílu a pH roztoku. Výsledné spojení mezi opačně nabitým polymerem a tenzidem je realizováno prostřednictvím elektrostatických a hydrofobních interakcí [12].

Při interakcích mezi tenzidem a negativně nabitým hyaluronanem může docházet k vázání surfaktantu nebo jeho micel na tento polymer. Ke kooperativnímu vázání tenzidu na polyaniont dochází nad kritickou agregační koncentrací (CAC), která je podstatně nižší než kritická micelární koncentrace (CMC) přítomného tenzidu [9]. Interakce kyseliny hyaluronové s kationickými tenzidy byly studovány jako specifický případ obecných interakcí polyelektrolyt – surfaktant za účelem objasnění fázového chování těchto směsí. Současně byly studovány i fyzikální příčiny těchto interakcí, včetně vlivu elektrolytů na hodnoty CAC a CMC [15]. Podrobněji se fázovému chování hyaluronanu v přítomnosti kationického tenzidu a soli (většinou NaBr) ve svých publikacích věnoval Thalberg a kol. [10,11,17], kteří zjistili, že pod CAC kationického surfaktantu dochází, díky elektrostatickým silám, k vazbě molekul surfaktantu na polymerní řetězec, zatímco nad touto koncentrací vznikají uskupení typu hyaluronan – micely. Účinky kationického surfaktantu trimethyltetradecylamonia bromidu (TTAB) na HA se zabýval Herslöf a kol. [9]. Jejich práce je zaměřena na určení fázové rovnováhy mezi HA a surfaktantem v závislosti na rostoucí iontové síle

(NaCl) při neutrálním pH, kdy dochází k úplné ionizaci karboxylových skupin polymerního řetězce. Ve vodném prostředí, při poměrně nízkých, nebo naopak poměrně vysokých koncentracích TTAB, dochází k vytvoření jednofázového systému a rozdělení fází nastává pouze ve středním koncentračním rozsahu surfaktantu. Tato fázová separace může být potlačena nebo zcela eliminována přidáním vhodného elektrolytu (NaCl, NaBr) [9]. Studie zaměřená na samoorganizační chování HA ve vodném prostředí po přidání opačně nabitého tenzidu, SbQ, poskytla informace o funkcionalizaci a modifikaci HA [20]. Vzájemné působení hyaluronanu a surfaktantů, a to zejména při fyziologických podmínkách, je však stále nedostatečně prozkoumanou oblastí [15].

Řada autorů se zaměřila na charakterizaci viskoelastického chování vodných roztoků HA bez přítomnosti nebo s přidáním různých solí, zejména NaCl [10,18]. Tomuto tématu se věnovali, mimo jiné, autoři Cowman a Matsuoka, kteří shrnuli ve své přehledné práci hydrodynamické vlastnosti hyaluronanu v roztocích obsahujících fyziologické koncentrace NaCl a popsali tak současný stav znalostí na základě poměrně rozsáhlých experimentálních studií [21]. Studium reologických vlastností HA ve fyziologickém roztoku, za rozdílných experimentálních podmínek, se zabývala skupina autorů Calcia-Rusu a kol. Jejich experimentální výsledky jsou srovnatelné s výsledky získanými analýzou komerčních viskoelastických oftalmologických látek, používaných při operaci šedého zákalu [22]. Menší pozornosti se dostává konformačnímu chování hyaluronanu v roztocích dalších solí. Jednou z prací popisujících konformační a hydrodynamické chování hyaluronanu v závislosti na koncentraci dodecyltrimethylamonia bromidu (CTAB) s přidáním NaCl, využívající metodu statického a dynamického rozptylu světla za účelem pochopení konformačního chování systému polyelektrolyt – surfaktant, je publikace autorů Villetti a kol. [12]. Z jejich výsledků je patrné, že vázání CTAB na hyaluronový řetězec v roztoku bez přidaného NaCl je mnohem silnější než s přidaným NaCl a fázové rozdělení nastává u koncentrací CTAB, vyšších než $0,04 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$.

Franz Hofmeister [23], který se ve své práci věnoval převážně účinkům jednotlivých solí na chování proteinů, představil řadu solí, která má výrazný vliv na rozpustnost proteinů a stabilitu jejich sekundární a terciální struktury. Hofmeisterova řada solí charakterizuje schopnost jednotlivých iontů vysolovat nebo naopak rozpouštět proteiny. První pokusy, které se snažily popsat interakční chování mezi solemi a proteiny, makromolekulami nebo koloidními částicemi, se odvolávaly na velikost iontu, jeho interakcí s molekulami vody a jejich hydratační schopnost, která byla detailněji rozepsána v práci Kunze a kol. [24]. První, kdo připsal příčinu vzniku interakcí působících mezi ionty v roztoku adsorbci elektrolytů, nebo interakcím působícím mezi koloidními částicemi či proteiny van der Waalsovým silám, byl Ninham [25,26]. Jeho závěry, které šly proti zavedeným předpokladům, naznačovaly, že van der Waalsovy interakce jsou mnohem silnější než interakce elektrostatické. Jeho závěry byly založeny na předpokladu, že vyšší koncentrace elektrolytů mohou stínit elektrostatické interakce, aniž by snížily vliv působících van der Waalsových interakcí. Intenzita van der Waalsových interakcí strmě roste s šestou mocninou klesající vzdálenosti mezi ionty. Kunz a kol., analyzoval několik prací, zabývajících se fyzikálně-chemickými parametry, které se snažily vysvětlit a seřadit Hofmeisterovu řadu solí podle lyotropního čísla, Gibbsovy volné energie a entropie hydratace jednotlivých kationtů a aniontů, zvyšování povrchového napětí, polarizovatelnosti, parciálního molárního objemu nebo změny entropie vody. Ninham spolu s jeho kolektivem, se snažili ukázat nepochybný přínos iontových disperzních sil zodpovědných za interakce mezi fázovým rozhraním a micelizací. Byl to také jeden z důvodů, proč se kromě jiného věnoval např. interakcím působícím mezi molekulami vody a ionty z pohledu hydratačního čísla a jeho poloměru, nebo různým typům interakcí působícím mezi vodou, kationty a anionty, které vedou k rozdílné interakci hydratovaných iontů s fázovým rozhraním [24,26,27]. Vliv Hofmeisterovy řady solí na micelizaci a emulzní stabilitu je pospán v práci Ivanova a kol. [28]. Tito autoři vysvětlují účinky Hofmeisterových solí pomocí jedné z Kunzových teorií [24], která zmiňuje vliv iontové specifity (velikost, povrchový náboj) na adsorpční konstantu ionických surfaktantů [28]. Vliv jednotlivých solí Hofmeisterovy řady na povrchové a

mezifázové napětí popisují autoři Santos a Levin [29]. Jejich výsledky naznačují, že ionty v blízkosti fázového rozhraní, se rozdělují do dvou skupin na tzv. kosmotropní a chaotropní ionty. Kosmotropní ionty, které si zachovávají svoji solvatační vrstvu, se nachází v určité vzdálenosti pod povrchem. Naopak chaotropní ionty, které o svoji solvatační vrstvu přicházejí, se adsorbují přímo na povrchu [185]. Předpokládá se, že kosmotropní a chaotropní ionty vykazují tzv. „structure-making“ a „structure-breaking“ vlastnosti. Proti této teorii ovšem vystoupil Bakker a kol. [30,31], kteří ve svých studiích ukazují, že tyto ionty nemají ani ve vysokých koncentracích ($c = 6 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) žádný vliv na dynamické chování molekul vody v celém jejich objemu. Naopak tvrdí, že kosmotropní a chaotropní ionty nevykazují žádné interakce na dlouhou vzdálenost [30,31]. Podle Zhanga a kol., závisí většina modelů popisujících Hofmeisterovy interakce na přímých interakcích působících mezi ionty a makromolekulami, a na interakcích s molekulami vody [32]. Viskozitnímu chování vybraných polyelektrolytů v prostředí různých solí se věnoval Wyatt a kol. [33]. Zjistili, že při nízké koncentraci polymeru, dochází přidavkem monovalentní soli (NaCl) ke stonásobnému snížení viskozity. S rostoucí koncentrací polymeru se, ale vliv této soli výrazně snižuje [33].

Toto shrnutí naznačuje, že i přes řadu prací, které se problematice chování kyseliny hyaluronové v přítomnosti solí věnují, existuje stále ještě řada otázek, které je potřeba zodpovědět a kterými se zabývá i tato řešená dizertační práce.

3 CÍLE DISERTAČNÍ PRÁCE

Kyselina hyaluronová je z hlediska primární chemické struktury jednoznačně definována, avšak konformace jejích řetězců je stále diskutovaným tématem. V roztocích může tento polymer podléhat různým konformačním změnám, agregovat, vytvářet nadmolekulární struktury a případně může docházet i k jeho degradaci. Problém samotné degradace, či konformační nestability lze řešit přidavkem konzervačních látek, tenzidů nebo přísady iontů. Tyto látky však způsobují v roztocích HA změny její nadmolekulární struktury, která pak výrazně ovlivňuje další vlastnosti a chování tohoto polymeru. Proto je cílem této práce přispět k pochopení fyzikálně-chemického chování HA a získat dostatek informací k objasnění jejího roztokového chování v přítomnosti ionických sloučenin.

4 TEORETICKÁ ČÁST

4.1 KYSELINA HYALURONOVÁ

Kyselina hyaluronová (HA), či sodná sůl kyseliny hyaluronové (hyaluronan, NaHy), je biopolymer, glykosaminoglykan, vyskytující se v mnoha živých organismech. První zmínka, kterou lze spojit s kyselinou hyaluronovou, se datuje do roku 1880, kdy francouzský chemik Portes zjistil, že mucin ve sklivci, který pojmenoval „hyalomucin“ se chová odlišně od mucinů přítomných v rohovce a chrupavce. O padesát šest let později, v roce 1936, Karl Meyer a John Palmer popsali nový způsob izolace této makromolekuly a ze sklivce hovězího skotu izolovali dosud neznámou chemickou látku, glykosaminoglykan, kterou následně pojmenovali kyselina hyaluronová [34]. Její první komerční využití se datuje do roku 1942, kdy Endre Balazs patentoval HA jako náhražku vaječného bílku pro pekařský průmysl. V medicíně byla HA jako první použita v 50. letech minulého století při náhradě očního sklivce [34]. Pro lékařské účely byla HA nejprve získávána izolací z pupeční šňůry a krátce nato i z kohoutích hřebínků. Jednalo se o vysoce čištěnou, vysokomolekulární sodnou sůl kyseliny hyaluronové [35,36]. Následně byla HA izolována z mnoha dalších zdrojů a její fyzikálně-chemická struktura a biologické funkce byly studovány v řadě laboratoří [37,38].

Tabulka 1.: Časový horizont důležitých událostí týkajících se kyseliny hyaluronové [39].

ČASOVÝ HORIZONT	UDÁLOST
1880	* Portes objevil, že mucin ze sklivce se značně liší od mucinů pocházejících z rohovku a chrupavky
1934	* Meyer a Palmer izolovali a identifikovali dosud neznámý polysacharid "kyselinu hyaluronovou"
30.-50.léta	* hyaluronan izolován z různých tkání obratlovců * získání hyaluronanu z bakterií
50.léta	* první použití hyaluronanu v oční chirurgii
40.-70.léta	* optimalizace extrakčního procesu a minimalizace degradace HA
1979	* získán první patent na izolaci ultra čisté HA, izolované z kohoutích hřebínků * začátek průmyslové výroby hyaluronanu z živočišných zdrojů pro lékařské aplikace
90.léta	* oživení studia bakteriální fermentace na výrobu vysokomolekulární HA * kladení důrazu na kontrolu velikosti částic a polydisperzity výsledného produktu hyaluronanu
1993	* identifikace a charakterizace syntézy HA z jiných mikroorganismů
1996	* chemicky syntetizován největší fragment HA "oktamer"
2003	* výzkum enzymatické syntézy hyaluronanu a monodisperzního HA oligosacharidů s definovanou délkou řetězce

Polymerní řetězec HA může být tvořen až několika tisíci základními jednotkami. Co se týče složení, je to lineární polyaniont s opakující se disacharidovou strukturou [(1→3)-β-D-GlcNAc-(1→4)-β-D-GlcA-], kde D-GlcNAc je N-acetyl-D-glukosamin a D-GlcA je kyselina D-glukoronová. Vyskytuje se především v extracelulární a pericelulární matrix. Mezi její základní biologické funkce a vlastnosti lze řadit zachovávání viskoelasticity tekutin spojovacích tkání (např. synoviální tekutina, tekutina očního sklivce), kontrolu tkáňové hydratace a transportu vody nebo supramolekulární shromažďování proteoglykanů v mezibuněčném prostoru [40-42]. Mezi další zajímavé vlastnosti patří extrémní schopnost vázat vodu nebo lubrikovat pohyblivé části lidského těla, jako jsou klouby a svaly. HA představuje jednu z hydrofilních přírodních molekul, často označovanou za přirozené hydratační činidlo. Unikátní viskoelastický charakter HA, spolu s její biokompatibilitou a schopností nevyvolávat imunitní reakci organismu, ji předurčují k mnoha klinickým aplikacím,

mezi které lze například zařadit doplňování synoviální tekutiny při artritidě, použití jako lubrikantu v ortopedii, k ochraně očních tkání a zrakových buněk nebo jako látky zvyšující viskozitu očních kapek v oftalmologii. V kosmetice lze HA využít jako materiál, který napomáhá hydrataci pokožky, zvyšuje její elasticitu a přispívá k vyhlazení vrásek. HA rovněž stimuluje migraci epidermálních buněk a dovoluje biologicky aktivním látkám, které jsou běžnou součástí kosmetických přípravků, setrávat anebo penetrovat do epidermis. Podle Trommera a kol., jsou přípravky na bázi HA schopné chránit lidskou pokožku před UV zářením [43]. Předpokládá se, že HA funguje jako absorbér a lapač volných radikálů vytvořených vlivem UV záření [7,38]. Využití HA bylo rovněž popsáno při regeneraci šlach, při hojení a regeneraci ran a zvyšování krevní snášenlivosti kardiovaskulárních implantátů, jako jsou cévní tepenné štěpy. Aplikační potenciál je i v jejím použití jako nosiče při cíleném transportu léčiv nebo při přípravě up-konverzních nanočástic, které mohou být v budoucnu využívány při léčbě nádorových onemocnění [37,44,45].

4.1.1 Výskyt HA a její výroba

Hyaluronan je součástí měkkých tkání lidského těla všech obratlovců. Lze jej nalézt v řasách [36], měkkýších, ale i v eukaryotních a některých prokaryotních buňkách v podobě tzv. mukoidního pouzdra obklopujícího buňku. Ve vyšších koncentracích se vyskytuje v pupeční šňůře, synoviální tekutině ($3-4 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$) a očním sklivci ($0,1 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$). Bylo zjištěno, že v těle člověka vážícího 70 kg se nachází přibližně 15 g tohoto polymeru, z čehož je přibližně jedna třetina denně spotřebována a následně obnovena. Největší množství hyaluronanu (7-8 g) se vyskytuje v pokožce (epidermis i dermis), což odpovídá asi 50 % jeho celkového množství v těle [46,47]. HA je v organismu degradována hydrolyticky katalyzovanou hyaluronidázou. Poločas rozpadu HA v kůži se odhaduje na 24 h, v oku mezi 24-36 h, chrupavce 1-3 týdny a ve sklivci okolo 70 dní [48-51].

Větší množství HA ($7,7 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$) obsahují kohoutí hřebínky, které se v minulosti staly preferovaným zdrojem její průmyslové výroby. Mimo uvedené zdroje hyaluronanu jej lze najít v membránách některých mikrobiálních patogenů, jako jsou *Pasteurella*

multocida, ve skupině A a C *Streptococcus uberis*, *Streptococcus pyogenes* (lidský patogen) a *Streptococcus equi* (zvířecí patogen) [52,53]. Tyto mikroorganismy používají hyaluronan k zapouzdření svých buněk, což zabraňuje imunitnímu systému, aby jej rozpoznal jako patogen. Současně jim HA umožňuje snížit adhezi vůči prostředí [54]. Hyaluronan bakteriálního původu představuje největší zdroj materiálu pro lékařské využití. Zpočátku panoval názor, že HA mikrobiálního původu představuje inertní materiál nevykazující specifické interakce s dalšími makromolekulami. Nicméně po odhalení faktu, že hyaluronan interaguje s proteoglykany obsaženými v chrupavce [55] byla řada studií zaměřena na samotný hyaluronan a jeho vliv na buněčnou aktivitu, buněčné dělení (mitózu), záněty a další biologické pochody probíhající v organismu [7,39].

Průmyslovou výrobu kyseliny hyaluronové je možno provádět dvěma odlišnými postupy, a to extrakcí z živočišných tkání a mikrobiální fermentací z bakteriálních kmenů. Obě tyto technologie poskytují polydisperzní, vysokomolekulární hyaluronan s molekulovou hmotností $M_w \geq 1 \times 10^6$ Da a polydisperzitou ležící v intervalu 1,2 – 2,3, který se využívá v kosmetice i medicíně. Hyaluronan extrahovaný z živočišných tkání byl původně používán k laboratorním účelům s cílem identifikovat a charakterizovat polymer a zhodnotit jeho aplikační potenciál v medicíně. Byl izolován a popsán hyaluronan z očního sklivce, pupeční šňůry, synoviální tekutiny, prasečí kůže, králičí osrdečnickové tekutiny, žraločí chrupavky a také ze sklivce rybího oka [56]. Nicméně, za nejdosažitelnější zdroje průmyslové výroby vysokomolekulárního hyaluronanu byly považovány kohoutí hřebínky ($1,2 \times 10^6$ Da), lidská pupeční šňůra ($3,4 \times 10^6$ Da), sklivec hovězího dobytka ($7,7 \times 10^4 - 1,7 \times 10^6$ Da) a hovězí synoviální tekutina (14×10^6 Da).

Navzdory velkému počtu metod izolace a čištění hyaluronanu živočišného původu, uvedenému v dřívější literatuře, se pro výrobu farmaceutického hyaluronanu primárně používal proces extrakce z živočišných tkání, vyvinutý v roce 1979. V tomto roce Balazs použil účinný postup izolace a purifikace HA z kohoutích hřebínků a lidské pupeční šňůry, který splňoval kritéria průmyslové výroby s následným použitím pro

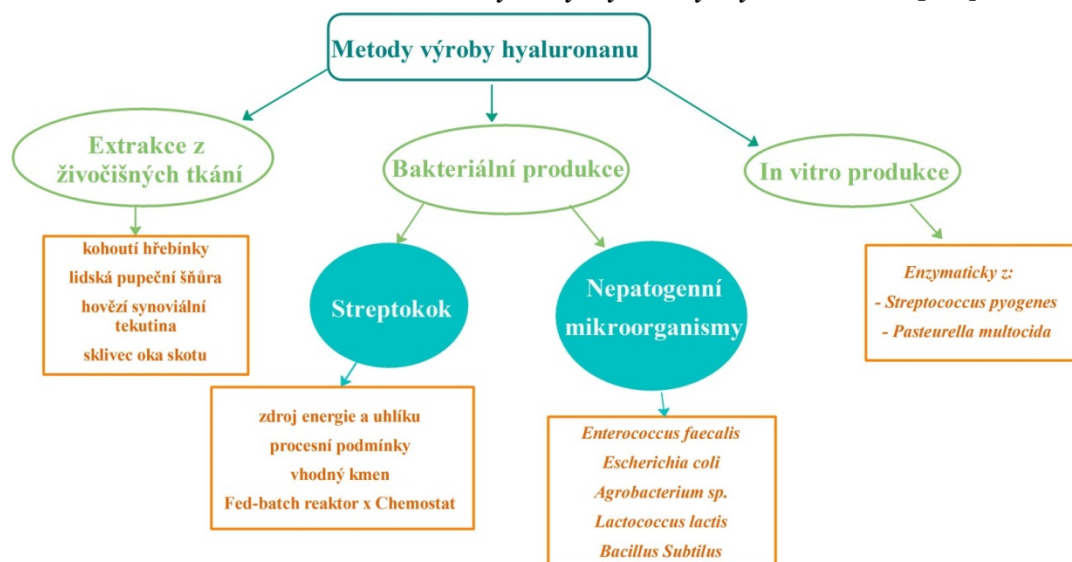
lékařské aplikace [57]. Mezi nevýhody tohoto postupu patří dodržování striktních podmínek během procesu extrakce a degradace hyaluronanu, způsobená endogenní aktivitou enzymu hyaluronidázy přítomné ve tkáních. Stejně jako u jiných procesů výroby medicínsky využitelných materiálů z živočišných zdrojů, i tady existuje potenciální riziko kontaminace proteiny a viry, které lze minimalizovat použitím tkání ze zdravých zvířat a extenzivním čištěním [39].

Další možnost výroby hyaluronanu, metoda bakteriální fermentace, se rozvinula do vyspělé technologie až v posledních dvou dekadách 20. století. Jedná se o proces s vysokým výnosem HA, jehož výhodou je možnost fyziologické nebo metabolické modifikace bakteriálních buněk za účelem vyšší produkce vysokomolekulárního NaHy. Mezi další výhody této technologie patří nízké náklady, spolu s minimálním znečištěním životního prostředí. Každoročně se touto cestou vyrobí tuny HA, které jsou využívány v lékařství a kosmetickém průmyslu [56]. Ve výrobním procesu jsou využívány buď patogenní streptokoky nebo bezpeční, rekombinantní (genetickou rekombinací vytvoření) hostitelé obsahující nezbytnou hyaluronan syntázu. V současné době jsou nejvíce preferovány posledně jmenované technologie.

Mezi bakterie schopné syntetizovat HA lze zařadit tyto bakteriální kmeny: Streptokoky skupiny A a C, gram-pozitivní bakterie *Streptococcus equi*, *Streptococcus equisimilis*, *Streptococcus pyogenes* a *Streptococcus uberis* [53]. Jako první byla HA izolována ze skupiny A hemolytického streptokoka, ze kterého bylo získáno 60-140 mg·l⁻¹ této bakteriální suspenze [36]. Následovalo několik dalších pokusů, jejichž cílem byla izolace většího množství HA, a to s využitím tradičních metod, mezi které patří např. optimalizace extrakčního procesu, adaptace kultivačního média a výběr vhodného bakteriálního kmene s vysokou produkcí hyaluronanu. Mezi bakteriální druhy schopné dosáhnout vysoké produkce HA, patří streptokoky skupiny C nebo živočišné patogenní bakterie, například *Pasteruella multocida*. Nejpoužívanějšími kmeny jsou pak *Streptococcus equi* subsp. *equi* a *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* [58-61]. Určitou nevýhodu tohoto způsobu výroby HA lze spatřit v možném riziku kontaminace bakteriálními endotoxiny. Z tohoto důvodu je stále

větší pozornost věnována výrobě HA pomocí rekombinantních mikroorganismů. Dosud se podařilo připravit rekombinantní *Streptococcus thermophilus*, který je schopný produkovat až 1,2 g hyaluronanu·l⁻¹ suspenze se střední molekulovou hmotností, srovnatelnou s HA produkovaným původním kmenem této bakterie [62]. Současný výzkum optimalizace procesu fermentace není zdaleka ukončen a soustřeďuje se na postupy vedoucí ke zlepšení výtěžnosti HA, zvýšení molekulové hmotnosti a snížení jeho polydiperzity, což jsou parametry určující další aplikace HA. Otázkou ovšem zůstává, zda lze těchto cílů dosáhnout optimalizací procesních podmínek, výběrem používaného bakteriálního kmene případně vývojem metabolického inženýrství [38,39,56].

Obrázek 1: Schéma výroby kyseliny hyaluronové [39].

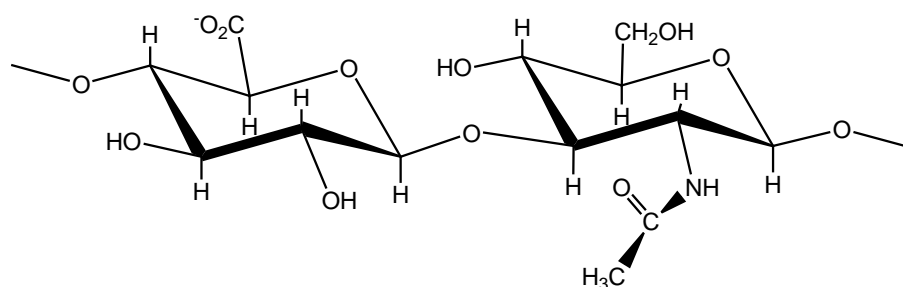


4.1.2 Struktura HA a její chování v roztocích

Struktura HA byla poprvé popsána Weissmanem a Meyerem v roce 1950 [63]. Jedná se o lineární polymer, tvořený disacharidovou jednotkou, složenou z kyseliny D-glukuronové a N-acetyl-D-glukosaminu, navzájem spojených alternujícími β -(1,3) a β -(1,4) glykosidickou vazbou (obr. 2) [64]. Ze struktury HA je patrné, že tento polymer bude díky velkému počtu hydroxylových skupin dobře vázat vodu, a díky nábojové repulsi, vyvolané karboxylovými skupinami, bude ve vodě velmi dobře rozpustný.

Hydroxylové skupiny spolu se skupinami karboxylovými představují vhodné místo k chemické modifikaci HA. Disociovatelná karboxylová skupina zároveň představuje místo, kde se mohou vázat nejen kationty různých kovů, ale i polykationty či další kladně nabitě látky [65].

Obrázek 2: Strukturní jednotka kyseliny hyaluronové



Energetická stabilita disacharidové jednotky je dána jejím výhodným sterickým uspořádáním. Objemné skupiny (hydroxyly, část karboxylátu, anomerní uhlík) jsou umístěny v ekvatoriální rovině, zatímco malé vodíkové atomy zaujímají pozice v energeticky méně výhodné axiální rovině. Axiální vodíky tvoří nepolární hydrofobní část, zatímco ekvatoriální boční řetězce tvoří polární, hydrofilní část molekuly [37,66]. Počet opakujících se disacharidových jednotek n v celé molekule HA může dosahovat 10.000 i více a při molekulové hmotnosti monomerní jednotky 379 Da pak výsledná molekulová hmotnost polymeru dosahuje až 4×10^6 Da. Průměrná délka disacharidu je přibližně 1 nm, tzn., že natažený polymerní řetězec HA tvořený 10.000 jednotkami může dosáhnout délky 10 μm , což je délka odpovídající průměru lidského erytrocytu [21,66].

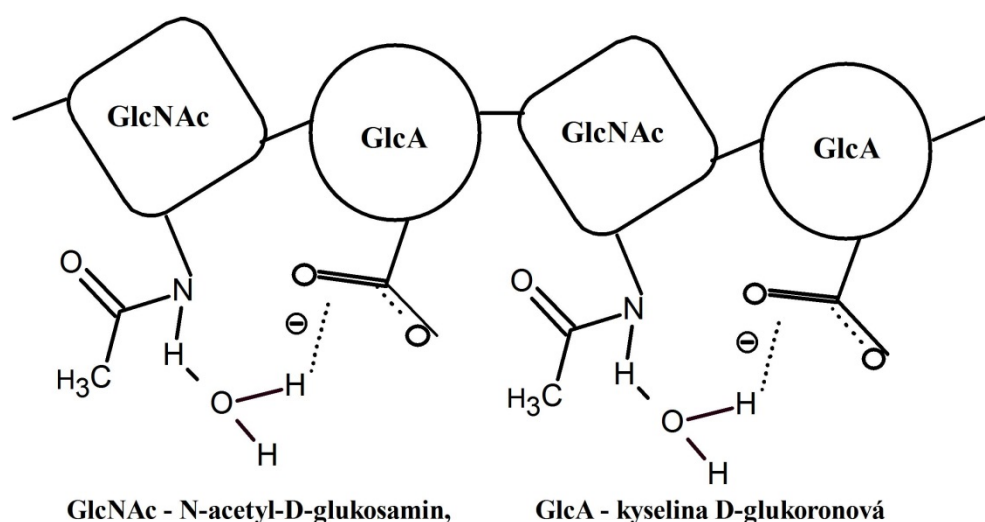
Primární struktura HA (viz obr. 2) je z pohledu uspořádání poměrně jednoduchá. Jak již bylo zmíněno výše, je tvořena disacharidovou jednotkou složenou z $[-\beta\text{-D-glukuronové kyseliny-}\beta\text{-(1}\rightarrow\text{3)-N-acetyl-}\beta\text{-D-glukosaminu-}\beta\text{-(1}\rightarrow\text{4)-}]_n$ v poměru 1:1 [64,67-69].

Každá disacharidová jednotka je vůči předcházející i následující jednotce v řetězci pootočená o 180° . Dvě otáčky představují tedy stočení o 360° , čímž se vrací v pořadí třetí monomerní jednotka HA do roviny prvního monomeru. Výsledkem takového

uspořádání je jednoduchá pásová šroubovice, stabilizovaná vodíkovými vazbami, označovaná jako sekundární struktura HA (obr. 3) [3,70-72].

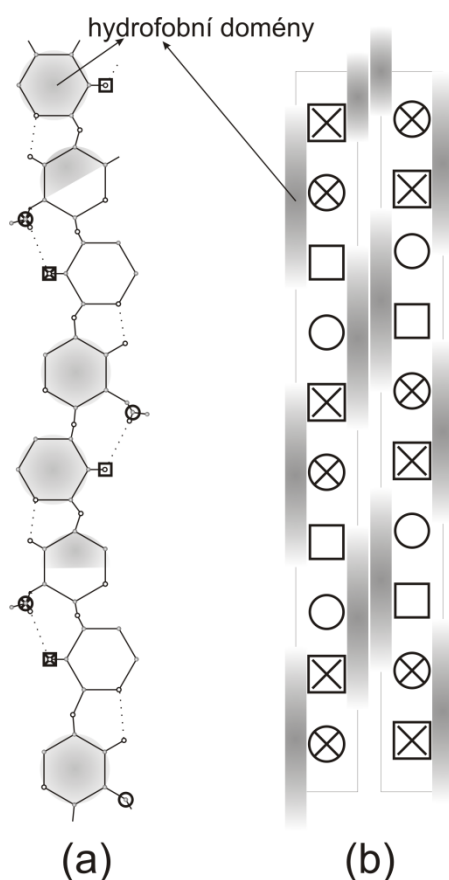
Některé studie prokázaly přítomnost hydrofobních oblastí, tvořených osmi C-H skupinami umístěnými střídavě na stranách jednoduché šroubovice HA. Tento efekt způsobuje již zmíněné stáčení řetězce a vytváří tzv. hydrofobní oblasti umožňující asociaci s dalšími HA řetězci, a to navzdory jejich zápornému náboji [21,73,74].

Obrázek 3: Sekundární struktura HA ve vodných roztocích tvořená vodíkovými můstky mezi amidovými a karboxylovými skupinami, umožňuje amidové části řetězce zaujímat trans konformaci [71,75].



Dvě molekuly HA se mohou vzájemně vázat a vytvářet tak opakující se opačně orientovanou (antiparalelní) strukturu, ve které se hydrofobní oblasti (znázorněné šedě na obr. 4) skládají proti sobě po obou stranách každé šroubovice [75]. Amidová skupina je umístěna v poloze trans a HA řetězce zaujímají nataženou konformaci dvakrát stočené, šroubovice. Tato terciární struktura hyaluronanu je stabilizována mezimolekulárními vodíkovými vazbami mezi amidy a karboxylovými skupinami sousedních molekul [68]. Hydrofobní chování spolu s vodíkovými vazbami a kombinací elektrostatického odpuzování dovoluje spojovat velký počet molekul do rozsáhlé molekulové sítě, matrice HA [3,5,75].

Obrázek 4: Sekundární a terciární struktura HA [74,76,77].



Scott a kol. předpokládali, že řetězce hyaluronanu zaujmají v roztoku konformaci statistického klubka (random coil) [70]. Ve vodném nebo fyziologickém roztoku se HA chová jako typická semiflexibilní polymerní molekula. Krátké řetězce jsou do určité míry lineární, zatímco dlouhé se náhodně sbalují [21]. Roztokové chování polymerního řetězce NaHy je ve fyziologickém roztoku určeno kombinací chemické struktury disacharidu, přítomností slabých vazebných interakcí v samotném řetězci polymeru (vodíkové vazby) a interakcemi s rozpouštědlem [70]. Jak už bylo zmíněno dříve, molekula NaHy zaujímá ve fyziologickém roztoku strukturu rozbaleného, statistického klubka, které vyplňuje velké domény roztoku. Skutečná koncentrace hyaluronanu uvnitř těchto domén je velmi nízká $\sim 0,1 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$. Při této koncentraci se pak domény budou v roztoku vzájemně překrývat. Scott a kol., poukázali na skutečnost, že pokud se řetězce zaplétají, vzájemně mezi sebou interagují a vytváří

pružnou, dvakrát stočenou šroubovici, již zmíněnou sekundární strukturu, která je mechanicky pevnější a přispívá k typickým reologickým vlastnostem tohoto polymeru [73]. Ve vodném prostředí se hydrofobní části řetězce ve snaze snížit kontakt s vodou shlukují, hydrofobně se vážou, přestože nedochází k vytvoření chemických vazeb [66].

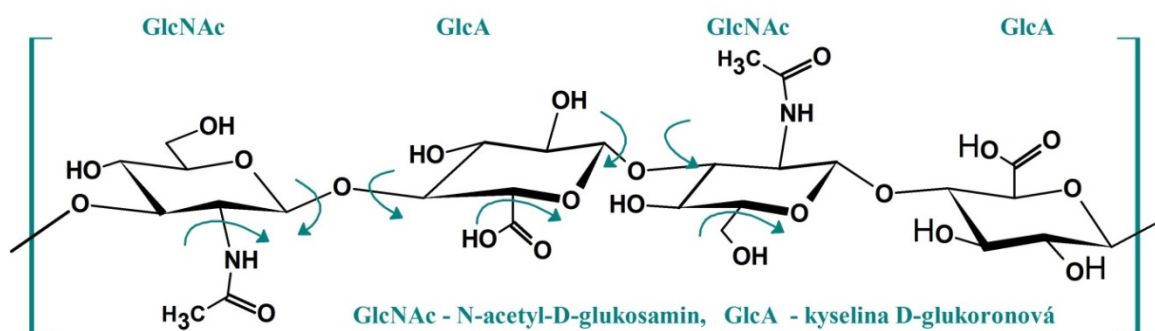
“Doménová struktura“ HA je příčinou charakteristických roztokových vlastností tohoto polymeru. Malé molekuly jako jsou voda, nízkomolekulární elektrolyty a živiny mohou s rozpouštědlem přes tuto doménu volně difundovat, zatímco větší molekuly, jako jsou například proteiny, budou z domény díky své hydrodynamické velikosti částečně vyloučeny. Čím větší molekuly budou, tím méně prostoru pro ně v doméně HA bude, difúze makromolekul skrze doménu se bude zpomalovat a bude docházet k jejich delšímu zadržení uvnitř domény oproti okolnímu prostředí bez HA. Efektivní velikost pórů v doméně se kontinuálně mění. Statisticky sice mohou tyto póry nabývat všech velikostí, ale s různou pravděpodobností. To znamená, že doménovou strukturou (sítí) HA mohou, v závislosti na hydrodynamickém objemu, projít molekuly různých velikostí [66,70].

Ve zředěném roztoku se HA chová jako velké solvatované klubko s gyračním poloměrem ca 200 nm, které zaujímá objem 1000-krát větší, než je skutečný objem nesolvatovaného polymeru v řetězci. Velká expanze klubka je pravděpodobně výsledkem tuhosti řetězce způsobené stabilizujícími vodíkovými vazbami, umístěnými rovnoběžně s osou polymerního řetězce.

Konformace řetězce HA je citlivá na přítomnost iontů v roztoku. S rostoucí iontovou silou podléhá HA klubko stále silnějším coulombovským interakcím. Na konformaci a interakce mezi jednotlivými monomery má také vliv mocenství daného iontu [14,21,71,72,77-80]. Obecně lze říci, že na rozdíl od situace, která nastává v deionizované vodě, zaujímá řetězec HA v přítomnosti iontů odlišné konformační uspořádání. V průběhu posledních dvaceti let se konformačním chováním hyaluronanu v iontových vodných roztocích zabývalo mnoho autorů [81-86]. Ti zjistili, že většina kationtů přítomných v roztoku HA způsobuje vznik konformace řetězce ve tvaru

dvakrát stočené šroubovice [84]. V přítomnosti sodných, draselných a amonných iontů je však řetězec HA tzv. čtyřikrát stočenou levotočivou šroubovicí nebo v přítomnosti vápenatých iontů tvoří třikrát stočenou levotočivou šroubovicí [81,82,85,86]. Stočení řetězce je v tomto případě vztaženo k šesti dimerům hyaluronanu (viz obr. 5) [86].

Obrázek 5: Stáčení řetězce dimeru HA [86].



I přes značnou rozmanitost těchto konformací způsobených interakcemi HA řetězce s ionty, jsou u všech těchto struktur v místě glykosidických vazeb přítomné mezimolekulární vodíkové vazby (viz obr. 3) [83,86]. S výše zmíněnými variantami uspořádání řetězců hyaluronanu ve vodě souvisí i velikost jeho polymerních klubek, která je ovlivněna typem šroubovice [81-86].

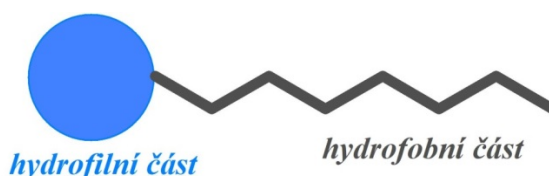
Při viskozitních měřeních bylo zjištěno, že pro hyaluronan rozpuštěný ve vodných roztocích je typické, že s jeho rostoucí molekulovou hmotností, koncentrací a smykovou rychlostí dochází k přechodu z Newtonského chování na chování ne-Newtonské [87]. S rostoucí molekulovou hmotností a koncentrací se zvyšuje i jeho viskoelastická [87-91], která závisí především na pH a je ovlivněna i iontovou silou prostředí, ve kterém se HA nachází [90,92,93]. Disociační konstanta pK_A hyaluronanu nabývá hodnoty kolem 3, a proto se jakákoli změna pH roztoku výrazně projeví na míře disociace HA řetězců [3]. Změnou disociace dochází ke změně mezimolekulárních interakcí mezi řetězci HA, a tudíž i ke změně reologických vlastností jejích roztoků [5].

4.2 TENZIDY

4.2.1 Charakteristika tenzidů a jejich základní rozdělení

Povrchově aktivní látky (PAL), tenzidy nebo také surfaktanty jsou organické molekuly, schopné adsorbovat se na povrch a významně tím ovlivňovat fyzikální vlastnosti fázových rozhraní. Jedná se o amfifilní molekuly, tedy molekuly složené z nepolární hydrofobní části, obvykle tvořené lineárními nebo větvenými uhlovodíkovými nebo fluorovodíkovými řetězci, které jsou vázány k části polární, hydrofilní (obr. 6) [94,95].

Obrázek 6: Ilustrace základní struktury tenzidu [95].

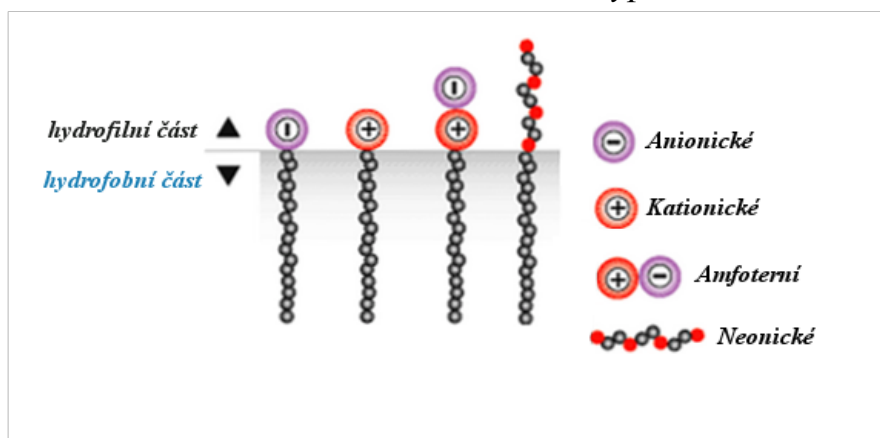


Hydrofobní část tenzidu může být lineární nebo větvená. Polární hlava tenzidu je obvykle, připojena k jednomu konci alkylového řetězce. Míra větvení alkylového řetězce, pozice polární hlavy a délka řetězce představují důležité parametry ovlivňující fyzikální vlastnosti daného tenzidu [95]. Jak už bylo naznačeno, tenzidy běžně obsahují jednu polární část. Existují však tzv. dimerické surfaktanty, obsahující dva hydrofobní řetězce a dvě polární hlavy, mezi sebou spojené krátkým uhlovodíkovým řetězcem. Tato specifická skupina surfaktantů se nazývá gemini surfaktanty, které díky svému strukturnímu uspořádání vykazují specifické vlastnosti např. vysokou účinnost snižovat povrchové napětí a velmi nízkou kritickou micelární koncentraci [95,96]. Ve vodném prostředí uhlovodíkový řetězec s molekulou vody slabě interaguje, zatímco polární část tenzidu tzv. hlava, vytváří silné dipólové nebo ion-dipólové interakce, které tyto povrchově aktivní látky činí ve vodě rozpustné. Hnací silou adsorpce surfaktantů je snižování volné energie fázového rozhraní označované jako povrchové nebo mezifázové napětí γ . Povrchově aktivní látky agregují za vzniku micel, způsobující omezení kontaktu mezi uhlovodíkovou částí řetězce tenzidu a

vodou. Uvnitř micely pak dochází k výrazné orientaci a hydrofobní skupiny surfaktantu se orientují dovnitř uskupeného agregátu, zatímco hydrofilní polární skupiny směrem ven do polárního rozpouštědla. Surfaktanty nacházejí své uplatnění ve většině oblastí chemického průmyslu, zejména jako důležité složky detergentů, barev, barviv, kosmetických, farmaceutických a agrochemických přípravků ale i plastů. Příležitostně bývají využívány např. při ochraně životního prostředí jako dispergační látky ropných skvrn.

Jednoduché rozdělení tenzidů je založeno na charakteru přítomných hydrofilních skupin. Podle tohoto kritéria, se surfaktanty rozdělují na neionické, anionické, kationické a amfoterní (obr. 7) [94,96,97].

Obrázek 7: Přehled základních typů tenzidů [98].



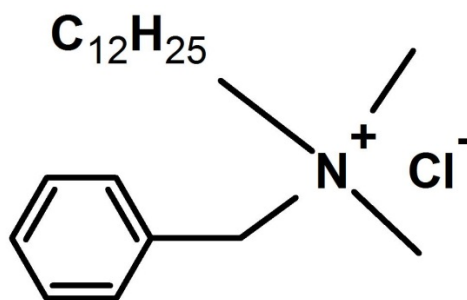
Anionické tenzidy

Patří mezi nejpoužívanější tenzidy [99,100]. Z celkové produkce tenzidů zaujímají 60% a to především díky jejich snadné výrobě a nízkým výrobním nákladům [97,95]. Pro optimální účinnost anionických tenzidů se délka lineárního hydrofobního řetězce pohybuje v rozmezí 8 až 16 uhlíkových atomů. Lineární řetězce jsou narozdíl od rozvětvených účinnější a lépe odbouratelné. Mezi nejčastěji používané hydrofilní skupiny těchto tenzidů patří karboxyláty ($C_nH_{2n+1}COO^-X$), sulfáty ($C_nH_{2n+1}OSO_3^-X$), sulfonáty ($C_nH_{2n+1}SO_3^-X$) a fosfáty ($C_nH_{2n+1}OPO(OH)O^-X$), kde $n = 8-16$ atomů a protiont X bývá nejčastěji Na^+ . Mezi běžně dostupné komerční anionické tenzidy lze zařadit i sulfosukcináty a tauráty [94-96].

Kationické tenzidy

Ve vodě disociují na amfifilní kationt a aniont nejčastěji halogenového typu. Velkou část této skupiny tenzidů tvoří dusíkaté látky, např. soli mastných aminů nebo nejpoužívanější kvarterní amoniové soli s jedním či několika alkylovými řetězci, kde *R* reprezentuje alkylovou skupinu, zatímco *X* chloridový iont [94,97]. Mezi běžné kationické tenzidy patří skupina alkyl trimethyl amonia chloridu s 8 až 18 uhlíkovými atomy, jako je například dodecyl trimethyl amonium chlorid ($C_{12}H_{25}(CH_3)_3NCl$). Jinou skupinu tvoří surfaktanty s dvěma dlouhými alkylovými řetězci, např. dialkyl dimethyl amonium chlorid, jehož alkylový řetězec může obsahovat 8-18 atomů uhlíku. Dialkylové surfaktanty jsou v porovnání s monoalkylovými mnohem méně rozpustné ve vodě a používají se spíše jako textilní změkčovadla. Velmi často používaným kationickým tenzidem je alkyl dimethyl benzyl amonium chlorid, často označovaný jako benzalkonium chlorid (obr. 8), který je znám svou vysokou účinností proti bakteriím [94,96].

Obrázek 8: Strukturní vzorec benzalkonia chloridu [94].



Kationické tenzidy jsou stabilní v kyselém i zásaditém prostředí. Vykazují dobrou chemickou stálost a to i v přítomnosti přidaných elektrolytů. Kritická micelární koncentrace se v případě stejné délky alkylového řetězce podobá anionickým surfaktantům. Hlavní předností kationických tenzidů je jejich tendence adsorbovat se na opačně nabitým povrchu a jsou proto používány jako antikorozivní činidla, flotační

sběrné látky minerálních látek, dispergační látky anorganických pigmentů, antistatické látky u plastů, textilní změkčovadla, vlasové kondicionéry nebo dezinfekční prostředky [94,96].

Neionické tenzidy

Patří mezi druhou skupinu nejpoužívanějších tenzidů. Jejich výroba zaujímá kolem 40% z celkové produkce tenzidů [97]. Většina neionických tenzidů je založena na ethylen oxidu a jsou označovány jako ethoxylované tenzidy. Mezi základní skupiny patří: alkoholové ethoxyláty, alkyl fenolové ethoxyláty, ethoxyláty mastných kyselin, mono-alkanolamidové ethoxyláty, sorbitan esterové ethoxyláty a jiné. Další skupiny neionických tenzidů tvoří například glykolestery, estery glycerolu, a estery sacharózy a glukózy. Oxidy aminu a sulphynylové surfaktanty zastupují neionické tenzidy s malou hlavou [94-96].

Amfoterní tenzidy

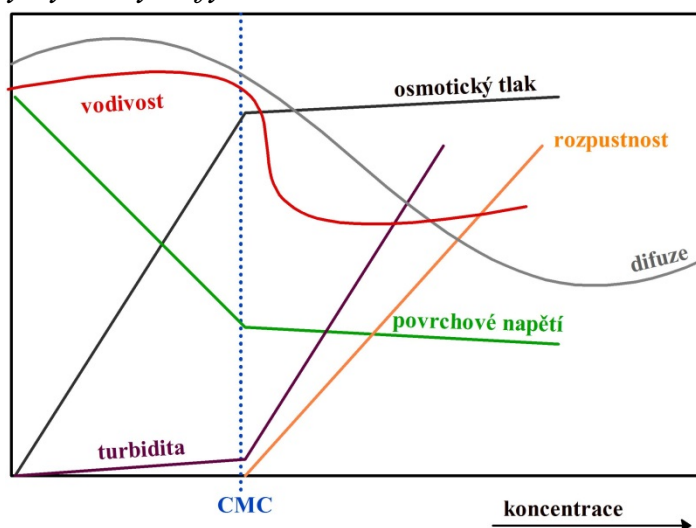
Jedná se o PAL, které ve své struktuře obsahují kationt i aniont současně. Mezi takové tenzidy řadíme *N*-alkyl betainy tzn. deriváty trimethylglycínu ($((CH_3)_3NCH_2COOH)$), sulfobetainy, aminokyseliny nebo fosfolipidy [97]. Příkladem betainového tenzidu je lauryl amido propyl dimetyl betain ($C_{12}H_{25}CON(CH_3)_3CH_2COOH$). Hlavní charakteristickou amfoterních surfaktantů je jejich závislost na pH roztoku, ve kterém jsou rozpuštěny. V roztocích s kyselým pH získává molekula tenzidu kladný náboj a chová se jako kationický tenzid, zatímco v roztocích se zásaditým pH, se stává negativně nabitou a chová se jako surfaktant anionický. Amfoterní tenzidy jsou často označovány jako „zwitterionické“ molekuly. Jsou rozpustné ve vodě, ale v izoelektrickém bodě je jejich výsledná rozpustnost minimální. Amfoterní tenzidy vykazují obecně dobrou mísitelnost s ostatními tenzidy, se kterými tvoří směsné micely. Jsou chemicky stabilní v kyselém i zásaditém prostředí. Jejich povrchová aktivita, se v závislosti na vzdálenosti mezi nabitými skupinami výrazně liší a svého maxima dosahuje v izoelektrickém bodě. Změny náboje vyvolané rozdílnými

hodnotami pH výrazně ovlivňují některé jejich výsledné vlastnosti, např. smáčení, detergenční vlastnosti, pěnovost atd. [94]. Vlastnosti amfoterních tenzidů se v izoelektrickém bodě podobají spíše neionickým surfaktantům, naopak v oblastech pod a nad izoel. bodem spíše kationickým a anionickým tenzidům. „Zwitterionické“ tenzidy vykazují výborné dermatologické vlastnosti, a to především díky schopnosti nevyvolávat téměř žádné podráždění kůže a očí. Z těchto důvodů se běžně používají v kosmetických přípravcích [94-96].

4.2.2 Kritická micelární koncentrace

Fyzikální vlastnosti povrchově aktivních látek se nad určitou koncentrací výrazně mění. Základní přehled vybraných fyzikálních vlastností v závislosti na koncentraci ilustruje obrázek 9.

Obrázek 9: Změny vybraných fyzikálních veličin v závislosti na koncentraci [95].



Většina vlastností tenzidů se při nízké koncentraci podobá vlastnostem jednoduchých elektrolytů. Vyjimku tvoří povrchové napětí, které s rostoucí koncentrací tenzidu klesá. Nicméně, při dosažení tzv. kritické koncentrace prochází všechny objemové i povrchové vlastnosti výraznou změnou, kdy se povrchově aktivní ionty nebo molekuly shlukují do větších útvarů (micel). Koncentrace, při které dochází k těmto výrazným změnám a při které se začínají vytvářet micely, se nazývá kritická micelární koncentrace (CMC). Kritická micelární koncentrace je při dané teplotě charakteristickou pro každý tenzid [94,95]. Hnací silou vzniku micel jsou hydrofobní

interakce. Podstatou hydrofobních interakcí při přechodu tenzidu z jeho volného stavu do agregovaného stavu, je výrazné zvyšování entropie ($140 \text{ J}\cdot\text{K}^{-1}\cdot\text{mol}^{-1}$), způsobené desolvatací hydrofobních alkylových řetězců. V případě ionických tenzidů, může být micelizace exotermním procesem. Enthalpická změna se pohybuje kolem $10 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ a závisí na délce uhlovodíkového řetězce [95,101,102].

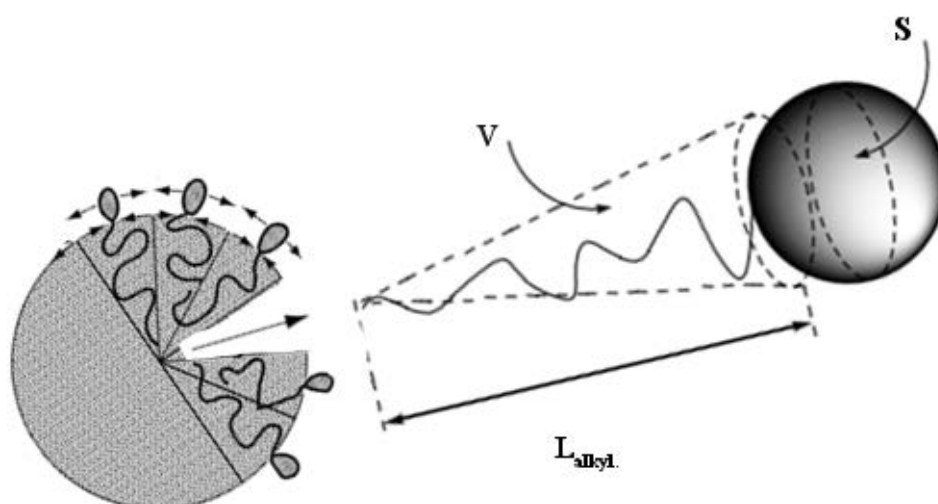
Nejpoužívanější a nejjednodušší metodou, vhodnou ke stanovení CMC, je měření povrchového napětí γ . Povrchové napětí zůstává po dosažení CMC daného tenzidu, která odpovídá příslušnému zlomu v závislosti γ vs c , s dalším nárůstem koncentrace téměř konstantní (viz obr. 9). Hodnota CMC s rostoucí délkou uhlovodíkového řetězce klesá. Obecně platí, že neionické surfaktanty mají hodnoty CMC nižší než surfaktanty ionické. Kationické tenzidy mají ve srovnání s tenzidy anionickými lehce vyšší hodnotu CMC. Například pouhým připojením fenylové skupiny na tenzidový řetězec dochází k výraznému zvýšení hydrofobicity celého tenzidu a tedy i k významnému vlivu na CMC, než k jakému by mohlo dojít pouhým zvýšením počtu uhlíků na hlavním řetězci tenzidu. Hodnotu CMC lze zásadně ovlivnit mocenstvím protiontu ionického tenzidu. Zvýšení mocenství protiiontu z 1 na 2, způsobí až čtyřnásobné snížení CMC [94]. Kromě již zmíněných vlivů má na CMC vliv samotný přídavek iontů, elektrolytů ale i alkoholu do jejich vodných roztoků. Přídavkem elektrolytu k roztoku anionického tenzidu v poměru 1:1 dojde k poklesu CMC až o jeden řád. Tento efekt je patrný už u tenzidů s krátkými řetězci, ale mnohem výrazněji je rozdíl v CMC vidět u tenzidů s řetězci dlouhými. K největšímu poklesu CMC dochází u tenzidů s dlouhými alkylovými řetězci v prostředí vysokých koncentrací elektrolytů. Přítomnost micel v roztoku, byla potvrzena již McBainem [103], který předpokládal, že pod CMC se většina tenzidů chová nespojitě, zatímco nad touto koncentrací začínají koexistovat již zmíněné micely. Podle autorů Adama a Hartleyho [104,105] má většina micel sférický tvar s následujícími vlastnostmi:

- poloměr sférické micely odpovídá délce uhlovodíkového řetězce,
- micely obsahují kolem 50 až 100 monomerních jednotek, jejichž počet roste s délkou alkyly,

- většina ionických tenzidů spolu vzájemně asociuje a snižují tím svoji mobilitu.

Pomoci experimentálních metod, jako je rozptyl světla či neutronový rozptyl, bylo však zjištěno, že u některých systémů dochází k vytvoření tzv. nesférických micel. Debye and Ancker potvrdili, že ve vodném roztoku hexadecyltrimethyl amonia bromidu vznikají např. micely cylindrické [94]. Typ vznikajících micel závisí na vzájemném poměru velikosti a tvaru hydrofilní a hydrofobní části molekuly tenzidu. Tento poměr je kvantitavně vyjádřen bezrozměrnou veličinou, tzv. kritickým parametrem sbalení (critical packing parametr) CPP (viz obr. 10), který lze stanovit podle rovnice (1) [95,102,106].

Obrázek 10: Kritický sbalovací parametr CPP [95,102,106].

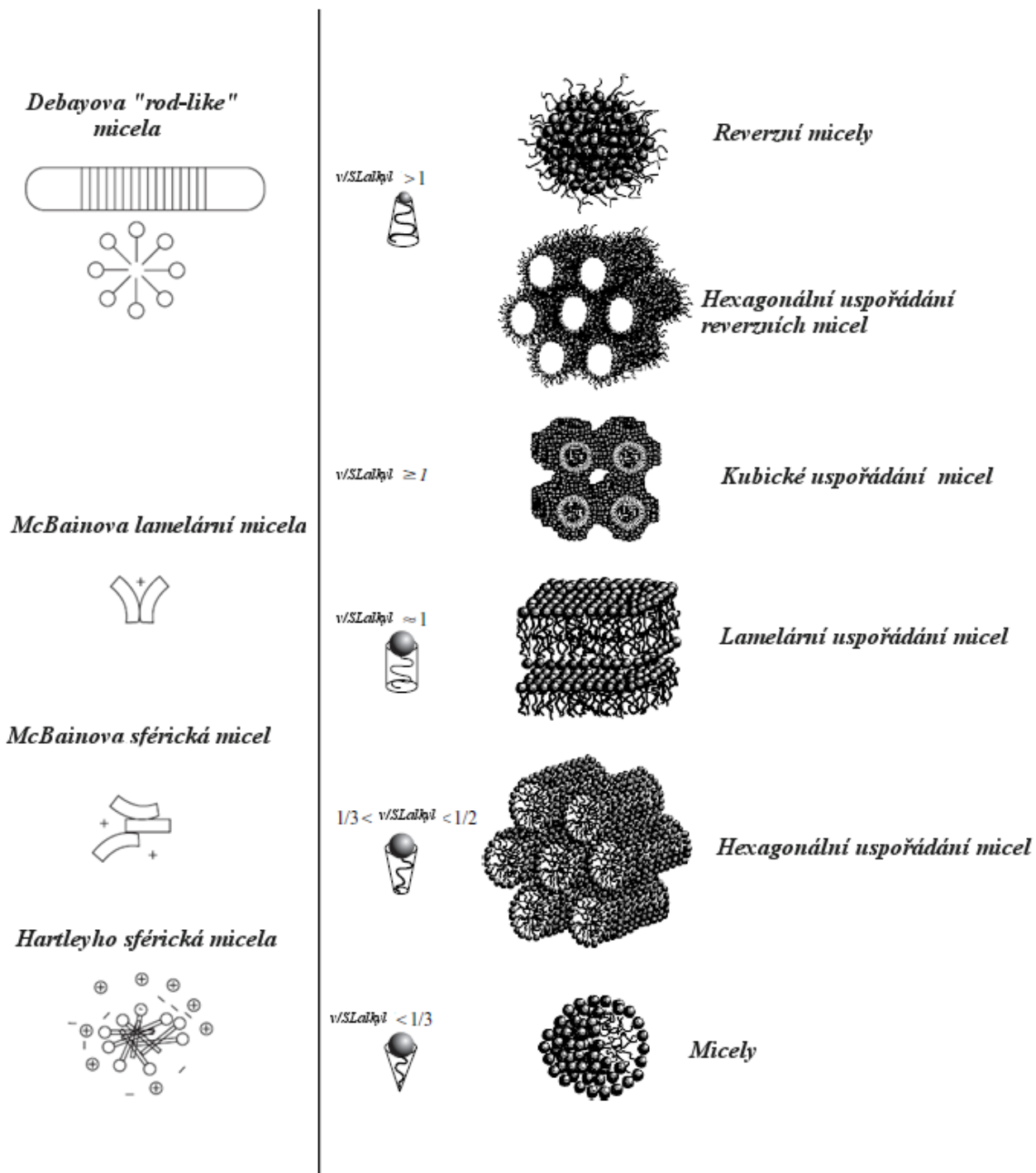


$$CPP = \frac{V}{S \cdot L_{alkyl}}, \quad (1)$$

kde V je objem, který zaujímá alkylový řetězec tenzidu v micelle, S je plocha, kterou na fázovém rozhraní micely a objemové fáze zaujímá polární část tenzidu, L_{alkyl} je efektivní délka alkylového řetězce.

V závislosti na parametru CPP mohou vznikat reverzní, sférické, elipsoidní, válcovité micely uspořádané do hexagonální či lamelární fáze (rod-like micelles) (viz obr. 11) [95,102].

Obrázek 11: Základní tvary micel [94,95].

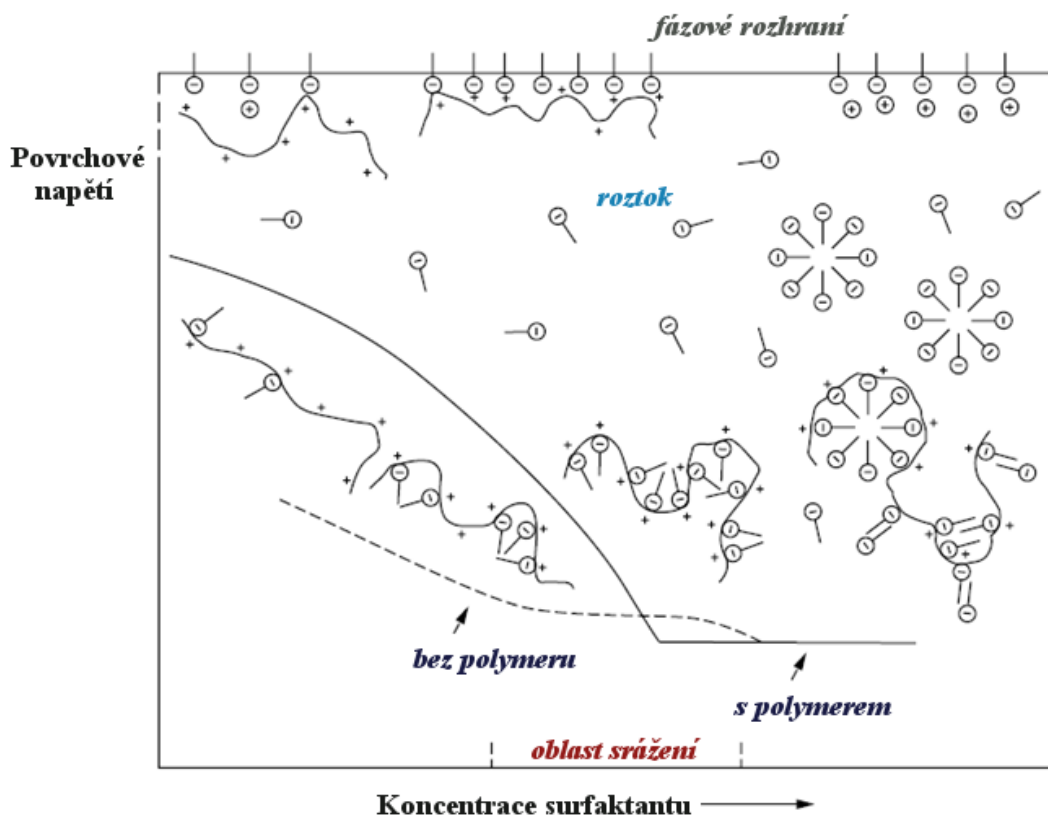


4.2.3 Interakce polymer-tenzid

Interakce polymerů s tenzidy v roztoku byly předmětem řady významných studií [107-110]. Tenzidy se v kombinaci s polymery běžně používají při stabilizaci suspenzí a emulzí, snížení pěnovosti, zlepšení rozlivových vlastností disperzí atd., zatímco polymery mohou působit např. jako zahušťovadla nebo látky zvyšující funkčnost kosmetických či farmaceutických přípravků. Interakce, které působí mezi polymery a tenzidy mohou vyvolat tzv. synergický efekt a zvýšit tak jejich účinnost [94].

Nejstarší studie, která se zabývá popisem interakcí polymer-tenzid, byla založena na měření povrchového napětí [111]. Při měření povrchového napětí systému s neměnnou koncentrací polymeru ale různou koncentrací tenzidu, byly stanoveny dvě kritické koncentrace (obr. 12). Nižší koncentrace představuje koncentraci, při které dochází k navazování tenzidu na polymer a začínají se projevovat první interakce polymer-tenzid a silně kooperativní vázání. Jedná se o tzv. kritickou agregační koncentraci (CAC), která je výrazně nižší než CMC samotného tenzidu. Jakmile dojde k nasycení polymeru tenzidem tzn., že koncentrace tenzidu překročí kritickou micelární koncentraci, začínají se některé volné micely seskupovat a vytvářet složitější útvary. V této fázi dochází k vzájemné koexistenci volných micel a surfaktantem agregovaného polymeru v roztoku [13].

Obrázek 12: Polymer - surfaktant interakce [94].



Pro smíšené roztoky polymer – tenzid platí že, CAC i CMC slabě závisí na koncentraci polymeru. Anionické surfaktanty vykazují silné interakce s většinou homopolymerů, zatímco vliv kationických tenzidů je slabší [94]. Mezi základní faktory, které ovlivňují interakce mezi polymery a tenzidy patří teplota (s rostoucí teplotou roste CAC), koncentrace elektrolytů (přítomnost elektrolytů snižuje CAC a zvyšuje jejich asociaci), délka alkylu (s rostoucí délkou alkylového řetězce klesá CAC, což zvyšuje výslednou asociaci), struktura a typ tenzidu (kationické tenzidy vykazují slabší interakce než tenzidy anionické), struktura polymeru a jeho hydrofobicita [94]. Hnací síla interakcí polymer-tenzid je stejná jako v případě procesu micelizace, kdy se převážně jedná o entropicky řízený proces, jehož výsledkem je omezení kontaktu uhlovodíkového řetězce tenzidu s vodou. Mezi molekuly podporující asociace polymer-tenzid patří ty, které zeslabují interakce mezi polárními skupinami např. mezi elektrolyty a alkoholy, nebo polymerní molekuly obsahující hydrofobní a hydrofilní

části. Ty naopak zvyšují ion-dipólové interakce působící mezi dipóly hydrofilních skupin polymeru a ionických skupin tenzidu. K zesílení asociací dále přispívá samotný kontakt hydrofobních částí polymeru s odhalenými uhlovodíkovými částmi micel. Popis interakcí polymer-tenzid se odráží od dvou hlavních přístupů. Podle prvního se jedná o silně kooperativní asociace s tenzidu s polymerním řetězcem, zatímco podle druhého jde o micelizaci surfaktantu probíhající přímo na řetězci polymeru nebo v jeho blízkém okolí. Vázání tenzidu s polymerním řetězcem upřednostňují spíše polymery s hydrofobními skupinami, zatímco v roztocích hydrofilních polymerů dochází spíše k formování micel. U hydrofobizovaných polymerů dochází k silné interakci hydrofobních skupin polymeru s tenzidem, jehož výsledkem je posílení asociací mezi polymerním řetězcem a molekulami tenzidu. Nejprve dochází k interakci monomerů surfaktantu s hydrofobními skupinami polymeru a při dosažení CAC, jsou vznikající micely vzájemně sdíleny polymerními řetězci a přispívají k jejich vzájemnému seskupování. Následně, při vyšších koncentracích surfaktantu, kdy se v roztoku vyskytuje již příliš mnoho micel, dochází k omezení sdílení polymer-tenzid a k výslednému rozpadu vzniklého uskupení. Tyto efekty jsou prokazatelné viskozitním měřením, protože s rostoucí koncentrací tenzidu roste viskozita roztoku hydrofobizovaného polymeru, která při překročení určitého maxima, odpovídajícího maximálnímu seskupení, začíná s dalším zvyšováním koncentrace tenzidu klesat [94].

Tenzidy v přítomnosti opačně nabitého polyelektrolytu začínají při překročení CAC vytvářet agregáty [13,112]. Příčinu vzniku těchto uskupení polymer-tenzid lze nalézt v elektrostatickém vázání tenzidu na polymer, jehož řetězec je tak stabilizován hydrofobními interakcemi. Tenzidový iont nahradí protiiont polyelektrolytu a v místě polymerního řetězce, které je k navázání tenzidového iontu vhodné vznikne neutrální dipól. A právě vlivem silného elektrostatického přitahování je proces navazování tenzidu na polymer významný, přičemž závisí na nábojové hustotě polyelektrolytu. Proto, jak ukázalo i přímé stanovení celkového množství tenzidu, který se váže na řetězec polyelektrolytu, dochází k vázání tenzidu na polymer už při jeho relativně

nízkých koncentracích (1/20 CMC) [13,94,113]. Afinitu samotného vázání lze ovlivnit typem a koncentrací polyelektrolytu, v jehož přítomnosti dochází k vázání tenzidu na polymer už při vyšších koncentracích tenzidu. V neposlední řadě afinitu ovlivňuje délka alkylového řetězce tenzidu (s rostoucí délkou se ochota vázat zvyšuje) [94]. Konformační změny, které jsou velmi silně ovlivnitelné hydrofobními interakcemi, solvatací, a dynamickým chováním řetězců polyelektrolytu, lze stanovit ze stupně ionizace, koncentrace a distribuce protiiontů. Solvatace protiiontů může probíhat různými způsoby, což má vliv na solvataci samotného polymeru. Nízkomolekulární amfifilní molekuly se mohou redistribuovat do jednotlivých oblastí polymeru nebo adsorbovat přímo na jeho hlavní řetězec a ovlivnit tak jeho fyzikálně-chemické vlastnosti [13,112]. Díky silným elektrostatickým interakcím polymer-tenzid, je vyvolána nerovnoměrná distribuce iontů v roztoku a v blízkosti polyelektrolytu dojde ke zvýšení koncentrace protiiontů, která klesá s rostoucí vzdáleností od polymerního řetězce [13,114]. Hlavním důvodem proč dochází ke kooperativnímu vázání molekul tenzidu na opačně nabitý polyelektrolyt, je elektrostatická stabilizace micel surfaktantu [13].

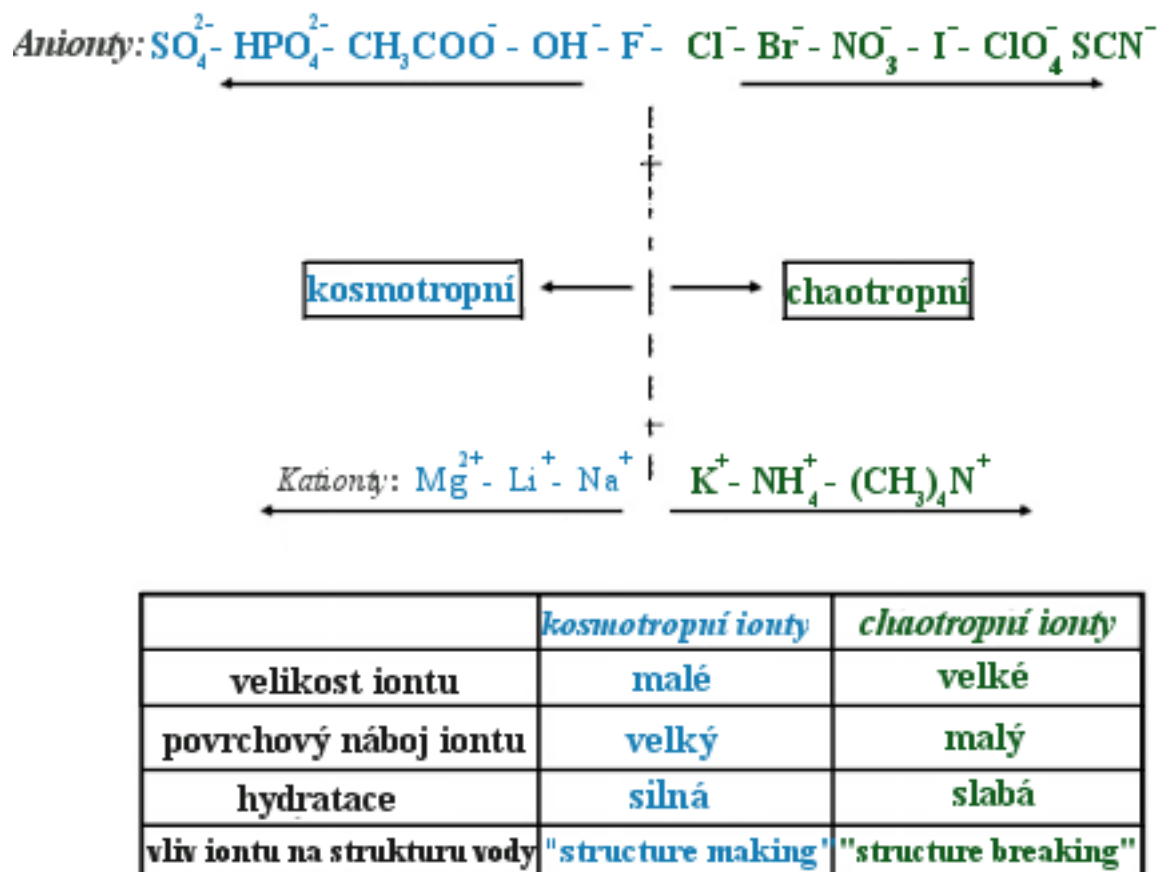
4.3 HOFMEISTEROVA ŘADA SOLÍ (Hofmeister series)

4.3.1 Charakterizace a základní rozdělení

První zmínka o vlivu specifických iontů byla zaznamenána několik desetiletí před Franzem Hofmeisterem. První, kdo v roce 1987 zaznamenal, že některé ze solí zvyšují viskozitu roztoku, zatímco jiné ji snižují, byl Poiseuille [115]. Jeho předpoklady byly detailněji rozebrány o něco později autory Jonesem and Dolem v roce 1929 a Coxem a Wolfendenem v roce 1934 [116,117]. Uspořádání iontů na základě jejich lyotropních čísel představil biochemik A. Voet [118]. Navržené uspořádání iontů odpovídalo a zároveň korelovalo s jejich vlivy na botnění gelů, viskozitu solů, zeta potenciál koloidů nebo iontovou hydrataci. Pearson se pokusil [119] na základě „změkčujících“ a „zpevňujících“ vlastností iontů, seřadit a sjednotit jejich reakční chemismus. Franz

Hofmeister [23], navázal na zmíněné autory a představil sérii solí, které mají výrazný vliv na rozpustnost proteinů a stabilitu jejich sekundární a terciální struktury. Typické uspořádání jednotlivých kationtů a aniontů Hofmeisterovy řady je zobrazeno na obrázku 13 [120,121].

Obrázek 13: Typické uspořádání Hofmeisterovy řady iontů [120].



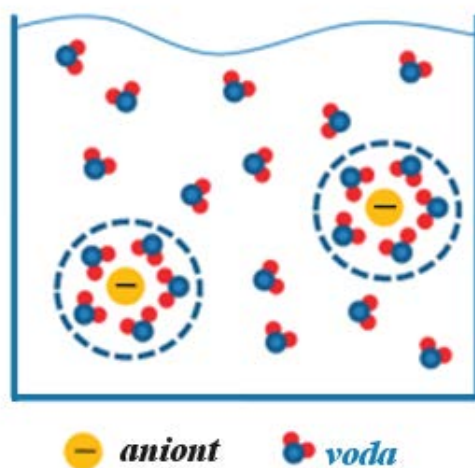
Důležitým poznatkem, který se často opomíjí, je fakt, že Hofmeister předpokládal řadu solí vykazujících specifické vlastnosti, nikoli řadu jednotlivých iontů [121]. Některé z běžných iontů je navíc obtížné začlenit do studovaného systému, např. guanidiniový iont. Tento iont je velmi slabě hydratující stejně jako amoniové ionty, a proto by jeho pozice v Hofmeisterově řadě měla být na levé straně této řady (obr. 13). Nicméně, podle všeobecně známé skutečnosti, že guanidinium je silný denaturant, byl umístěn na pravou stranu Hofmeisterovy řady. Podle autorů Mason a kol. [122,123] je důležitým

faktorem, vyvolávající konkrétní chování iontů, rozložení nábojové hustoty a rovný povrch [32].

4.3.2 Hofmeisterovy interakce

Na základě interakcí solí Hofmeisterovy řady tedy jejich schopnosti interagovat s molekulami vody a měnit tak její strukturní uspořádání, je lze rozdělit na kosmotropní (levá strana Hofmeisterovy řady až po chloridový iont) a chaotropní soli (pravá strana Hofmeisterovy řady od chloridového iontu). Kosmotropní ionty jsou v důsledku silných interakcí s molekulami vody, které jsou silnější než interakce voda-voda, schopné zvyšovat uspořádání molekul vody (obr. 14) a oslabovat tak případné hydrofobní interakce s polymery. Naopak ionty chaotropní představují slabě hydratující ionty, které naopak rozrušují, snižují lokální uspořádání molekul vody a posilují hydrofobní interakce s polymerem [124]. Způsob, jakým zmíněné ionty ovlivňují chování proteinů a polymerů je stále předmětem intenzivního výzkumu a diskuzí. Ačkoliv je objasnění vlivu Hofmeisterových solí předmětem řady vědeckých studií, stále neexistuje ucelená teorie vysvětlující principy těchto interakcí.

Obrázek 14: Vliv kosmotropních a chaotropních iontů na molekuly vody [124].



Prvním a zároveň nejdůležitějším parametrem, který ovlivňuje účinky působících iontů je nábojová hustota [$C \cdot m^{-2}$] tj. poměr mezi nábojem a velikostí iontu (fyzikálně se jedná o plošnou hustotu náboje). Rozhodující je i samotné uspořádání molekul vody

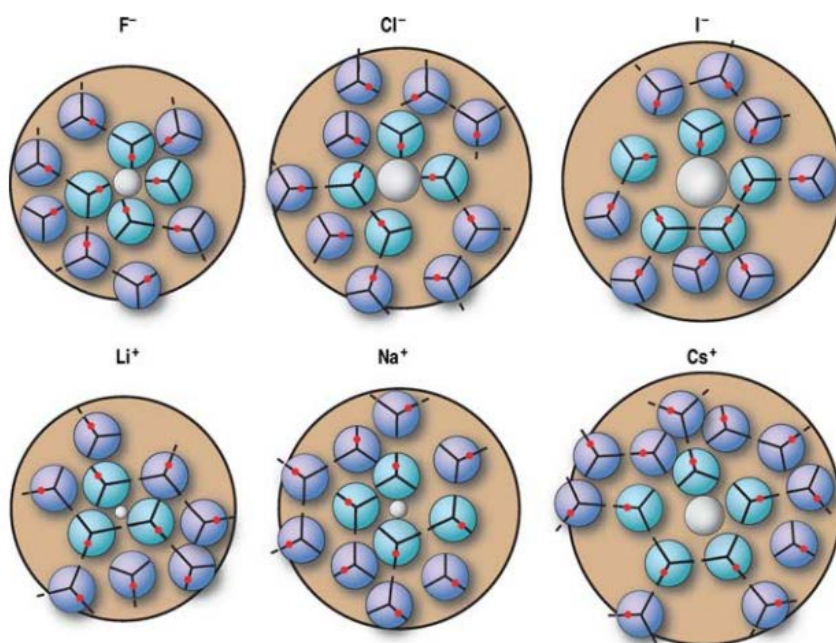
na povrchu iontu. Lund et al. [125] ve své práci zmínil adsorbci halogenových iontů na kladně nabitých hydrofobních částech. Předpokládal, že anionty budou elektrostaticky přitahovány k opačnému náboji, ale také, že mohou být ovlivněny solvatujícími molekulami vody. Proto není nikterak překvapující, že velké ionty s malou nábojovou hustotou (např. iodidy) vykazují mimořádnou schopnost vázat se právě k hydrofobním částem makromolekuly a to stejně silně jako k jejich kladně nabitým částem [121]. Obecně platí, že v případě, kdy jsou působící interakce mezi ionty a molekulami vody dominantní, specifický vliv kationtů není, ve srovnání s anionty, tak výrazný, protože anionty vykazují s molekulami vody silnější interakce. Jestliže mají dominantní vliv přímé iont-iont nebo „iont-charged headgroup“ interakce, může být účinek kationtů s anionty srovnatelný [121]. O něco komplikovanější je to v případě dlouhých řetězců kvartérních amoniových iontů, protože čím delší je řetězec daného iontu, tím větší je jeho denaturující účinek. Výsledné chování iontů je ovlivněno strukturou a chemickým složením polymeru, prostředím, ve kterém jsou rozpuštěny, na protiontu, koncentraci a pH. Při velmi nízkých koncentracích (< 0,1 M) převažují elektrostatické interakce, zatímco ve středním koncentračním rozsahu (0,1-2 M) jsou v důsledku odstínění elektrostatických sil měřitelné specifické vlivy iontů. U vysokých koncentrací iontů je velká část molekul vody využita k jejich solvataci a proto se mnohem více projevují účinky chaotropních iontů [121].

První pokus objasnit vliv Hofmeisterových solí byl založen na vysvětlení změn v uspořádání molekul vody vyvolaných iontovou hydratací, protože specifita iontů závisí na jejich schopnosti vytvořit (kosmotropní) nebo naopak rozrušit (chaotropní) vodíkové vazby ve vodě. Nedavné studie ovšem prokázaly, že specifita iontů ovlivňuje pouze několik prvních hydratačních vrstev (<5Å) [126].

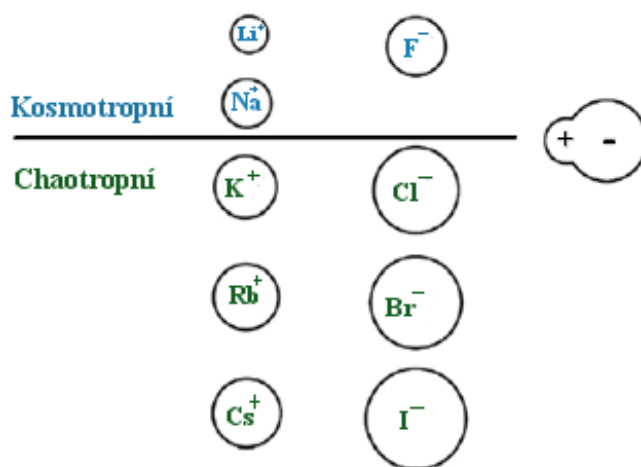
Collins a kol. [127], kteří studovali chování Hofmeisterových solí metodou chromatografie, došli k závěru, že chování těchto solí v roztoku v přítomnosti s proteiny souvisí s intenzitou působících interakcí iont-voda a voda-voda. Collins ve svém modelu vysvětluje sílu těchto interakcí, jako důsledek nábojové hustoty a vodíkových interakcí působících mezi molekulami vody a ionty přidaných solí. Ionty

malého průměru (kosmotropní) totiž vážou molekuly vody těsně vedle sebe, zatímco u velkých iontů je výsledkem volně vázaná solvatovaná vrstva (chaotropní ionty) (obr. 15) [121].

Obrázek 15: Znárodnění molekul vody (modře) obklopující chaotropní a kosmotropní ionty (šedě). Elektrostatické uspořádání molekul vody, je v přítomnosti malých iontů založeno na jejich dipólové orientaci. U velkých iontů se molekuly vody uspořádají tak, aby vytvořily vodíkové vazby. Červené body znázorňují kladný dipólový konec; záporný konec dipólu je znázorněn v jejich středu [128].

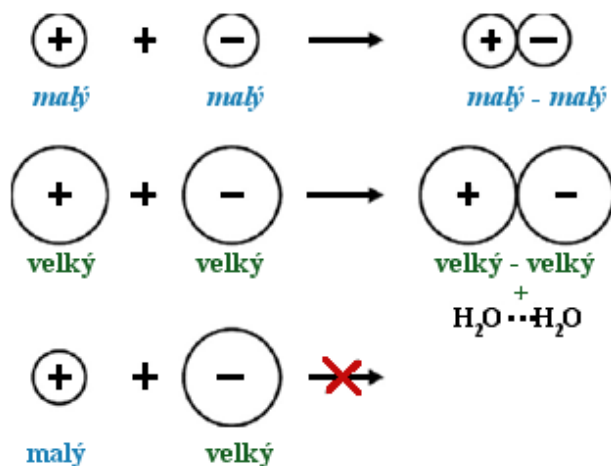


Obrázek 16: Rozdělení kosmotropních a chaotropních iontů podle velikosti [121].



K tomu, aby Collins vysvětlil jednotlivé typy interakcí, zavedl předpoklad dvou silně hydratujících iontů opačného náboje, které podléhají velmi silnému vzájemnému přitahování, jehož důsledkem je vytvoření společného iontového páru, narušující hydratační vrstvu. V případě slabě hydratujících iontů, je stejného výsledku dosaženo jiným způsobem. Elektrostatické přitažlivé interakce, které mezi nimi působí, jsou v porovnání s kosmotropními ionty slabé, i přesto u chaotropních iontů dochází v důsledku vytvoření iontových párů, k vyloučení volně hydratované vrstvy. Interakce, působící mezi kosmotropními (malé ionty) a chaotropními (velké ionty) opačně nabitými ionty (obr. 16), nejsou dostatečně silné a kosmotropní ionty ztrácí svoji solvatační vrstvu. Důsledkem vytvoření kosmotropně-chaotropního iontového páru je oddělení molekul vody a neschopnost vytvořit silný iontový pár (obr. 17) [120,121].

Obrázek 17: Iontové párování malých a velkých iontů [121].



Na základě Collinsova konceptu, by měly acetátové ionty vytvářet skryté iontové páry nebo alespoň lehce zvyšovat asociace s jinými kosmotropními ionty, například s lithiem, a naopak vykazovat slabší interakce s ionty, které mají malou nábojovou hustotu, např. rubidium. U bromidového iontu by měla být situace opačná, tzn., že bromidy, jakožto ionty s nízkou nábojovou hustotou, by měly více interagovat s protionty s nízkou nábojovou hustotou jako je rubidium, ale méně s kationty, které mají vysokou nábojovou hustotu, jako je lithium. Navržený koncept je v souladu

s teoretickými výsledky autorů Friedmana a kol., publikovanými téměř před čtyřiceti lety [120,121]. Díky silné interakci kosmotropních aniontů (např. SO_4^{2-}) s molekulami vody, původně spojenými s proteiny, dochází k jejich vzájemnému vyloučení z povrchu proteinů. Důsledkem obnovení těchto hydrofobních interakcí, které jsou podpořeny snahou proteinových molekul minimalizovat povrch částí vystavených rozpouštědлу, je upřednostňování původní konformace proteinu. Chaotropní aniont (např. SCN) vykazuje kromě slabé afinity vůči molekulám vody, vysokou polarizovatelnost, tzn. preferenci se vázat na vodou solvatovaný povrch proteinu a protein destabilizovat [126].

Jak už bylo naznačeno v předchozí části textu, protože jsou anionty mnohem lépe polarizovatelné a silně hydratující, mají kationty, v porovnání s anionty, slabší účinky. Navíc kationty svůj vliv projevují nepřímo přes interakce s anionty. To znamená, že kosmotropní chování aniontů může být v přítomnosti kosmotropních kationtů omezeno. Předpokládá se, že kosmotropní kationty, opačné k chaotropním, mají větší sklon iontového párování s ionty kosmotropními a zároveň snižují nadbytek volných aniontů v roztoku [129].

Ve vodných roztocích, lze účinek působících interakcí seřadit následujícím způsobem:

kosmotropní-kosmotropní > kosmotropní-voda > voda-voda > chaotropní-voda > chaotropní-chaotropní.

Podle tohoto uspořádání je vidět, že opačně nabitě ionty v roztoku vytváří iontové páry, pokud mají rozdílnou afinitu k vodě. V důsledku relativně silných interakcí voda-voda, které udržují chaotropní ionty pohromadě, budou iontové páry tvořit i chaotropní aniont a chaotropní kationt [126].

5 VYBRANÉ METODY STUDIA CHOVÁNÍ HYALURONANU V ROZTOKU

5.1 Měření velikosti částic disperzních systémů

Velikost částic představuje jeden z nejdůležitějších parametrů v materiálové vědě. Může ovlivnit řadu klíčových vlastností a pochodů, jako jsou např. tuhnutí betonu, krycí schopnost pigmentů, účinnost katalyzátorů, difúzi, tok, lesk a koncentraci barev, transport léčiv nebo zpracovatelnost, chuť i barvu potravin. V ideálním světě charakterizace by byly všechny částice homogenními koulemi. Měly by uniformní vlastnosti – hustotu, chemické složení, barvu i opacitu. Všechny metody měření velikosti částic by pak poskytovaly stejné hodnoty jejich průměrů i stejnou distribuci velikostí, bez ohledu na použitý princip dané měřicí techniky. V reálném světě je však většina částic nekulových, má různé tvary, složení i povrchové vlastnosti [130-132].

Metody používané k charakterizaci velikosti částic jsou založeny na rozdílných principech, např. na vizuálním či mikroskopickém pozorování, rozptylu světla, absorpci ultrazvuku, sedimentační rychlosti, Brownovu pohybu nebo elektrickém odporu. Každá metoda tak poskytuje charakteristickou velikost nebo distribuci velikostí ekvivalentních koulí, tzv. ekvivalentní průměry (obr. 18), které jsou u nekulových částic závislé na měřícím principu [130,133]. Mezi nejpoužívanější ekvivalentní průměry patří:

- *Objemově-ekvivalentní průměr D_{volume}* , definovaný jako *průměr koule stejného objemu*, jako má nepravidelná částice

$$D_{volume} = \frac{6}{\pi} V_{částice} \quad (2)$$

- *Stokesův průměr D_S* , definovaný jako ekvivalentní průměr odpovídající průměru koule se stejnou konečnou rychlostí klesání jako nepravidelná částice při laminárním toku v tekutině stejné hustoty a viskozity,

$$D_S = \sqrt{\frac{18\eta v_k}{(\rho_s - \rho_L)g}}, \quad (3)$$

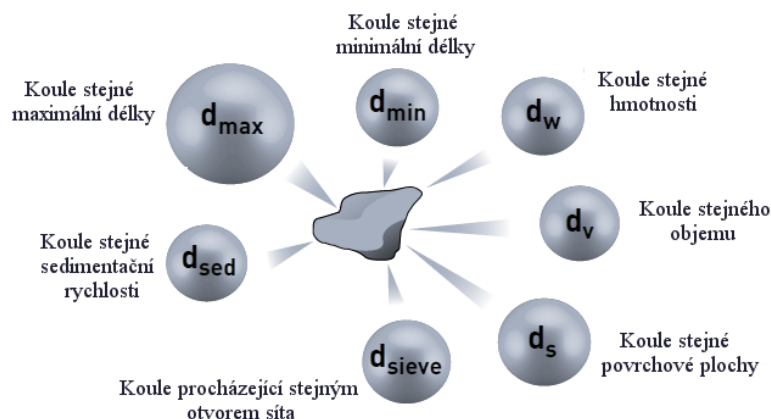
kde η je viskozita kapaliny, ρ_s je hustota částic, ρ_L je hustota kapaliny, v_k je konečná rychlost klesání a g tíhové zrychlení.

- *Hydrodynamický ekvivalentní průměr* D_H , definovaný jako ekvivalentní průměr částice se stejným difúzním koeficientem za stejných podmínek jako nepravidelná částice, vyjádřený Stokes-Einsteinovou rovnicí

$$D_H = \frac{k_B T}{3\pi\eta D_i}, \quad (4)$$

kde η je viskozita disperzního prostředí, T je absolutní teplota, D_i je difúzní koeficient a k_B je Boltzmanova konstanta ($k_B = 1,38 \times 10^{-23} \text{ J}\cdot\text{K}^{-1}$) [132-135].

Obrázek 18: Ekvivalentní průměry [136,137].



Analytické metody používané k charakterizaci částic lze rozdělit na „ensemblové“ a „ne-ensemblové“, neboli „čítací“, podle toho, jestli jsou v průběhu měření detekovány signály nebo shromažďovány informace od částic různých i stejných vlastností. Obě skupiny metod mají řadu výhod i nevýhod. Mezi výhody ensemblových metod patří to, že jsou rychlé a nedestruktivní, lze jimi stanovit široký dynamický rozsah velikostí a mají vysokou statistickou přesnost. Mezi jejich nevýhody lze zařadit nízké rozlišení a nižší citlivost. Proces získávání informace z detekovaného signálu, od částic

s rozdílnými vlastnostmi, vyžaduje k převodu signálu teoretický model. Mezi nejběžnější ensemblové metody lze zařadit fotonovou korelační spektroskopii a laserovou difrakci. U metod čítacích dochází k separaci nebo frakcionaci vzorku na jednotlivé složky. Výhodou těchto metod je jejich vysoké rozlišení a vysoká citlivost. Do této skupiny patří například síťová analýza, chromatografie nebo frakcionace v tokovém poli [132,138].

5.1.1 Rozptyl světla

V roce 1869 studoval fyzik J. Tyndall rozptyl světla částicemi v koloidním roztoku a učinil závěr, že pokud je dopadající světlo polarizováno, je rozptyl způsobený částicemi viditelný pouze ve směru kolmém na směr dopadajícího paprsku. V letech 1871 a 1881 odvodil Lord Rayleigh rovnici dokazující, že rozptyl světla částicemi, menšími než je vlnová délka dopadajícího záření, je nepřímo úměrný čtvrté mocnině vlnové délky tohoto dopadajícího světla. Později, v letech 1944 až 1947, P. Debye poukázal na skutečnost, že množství světla rozptýleného roztokem vysokomolekulárních polymerů souvisí s molekulovou hmotností rozpuštěných molekul a že měřením intenzity rozptýleného světla lze stanovit molekulovou hmotnost polymerů ve zředěných roztocích a určit velikost a tvar makromolekul. Tím se rozptyl světla stal důležitým nástrojem při studiu chování polymerů v roztocích [139]. Podle parametru α souvisejícího s velikostí částic, definovaného rovnicí (5.):

$$\alpha = \frac{\pi D_p}{\lambda}, \quad (5)$$

kde πD_p je obvod částice a λ vlnová délka dopadajícího záření je možno rozlišit:

1. $\alpha \ll 1$ *Rayleighova rozptyl* – rozptylující částice jsou ve srovnání s vlnovou délkou dopadajícího záření malé (intenzita rozptýleného záření je úměrná λ^{-4});
2. $\alpha \approx 1$ *Mieův rozptyl* – částice mají srovnatelnou velikost s vlnovou délkou dopadajícího záření;
3. $\alpha \gg 1$ *Geometrický rozptyl* – částice jsou mnohem větší, než je vlnová délka dopadajícího světla [140,101].

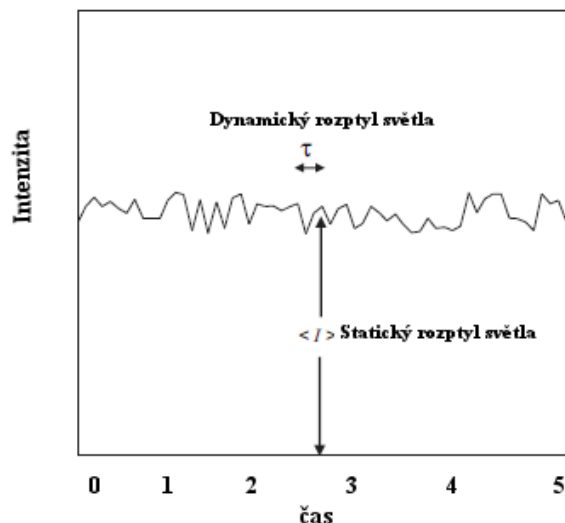
Dalším možným způsobem klasifikace je členění rozptylu světla na 1) elastický, 2) neelastický a 3) kvazielastický rozptyl světla. Pokud má rozptýlené světlo stejnou vlnovou délku jako světlo dopadající, znamená to, že jeho fotony mají stejnou energii jako dopadající fotony a jedná se o rozptyl elastický. Naopak došlo-li, v průběhu rozptylu ke změně energie dopadajících fotonů, a rozptýlené světlo má delší nebo kratší vlnovou délku než světlo dopadající, mluvíme o rozptylu neelastickém. Příkladem neelastického rozptylu je Ramanův nebo Brillounův rozptyl [142,143]. Kvazielastický rozptyl světla je pak limitním případem rozptylu neelastického, při kterém má dopadající světlo téměř stejnou vlnovou délku jako světlo rozptýlené (rozdíly jsou v řádu několika nm). Příkladem využití takového rozptylu může být metoda dynamického rozptylu světla (DLS) [95].

5.1.1.1 Statický rozptyl světla

Klasický rozptyl světla (statický nebo Rayleighův rozptyl) je neinvazivní metoda používaná při charakterizaci makromolekul v roztoku. Poskytuje informace o hmotnostním průměru molekulové hmotnosti, gyračním poloměru, polydisperzitě, stupni větvení, tuhosti řetězce a druhém viriálním koeficientu analyzovaných makromolekul [144,145]. Je vhodnou metodou při studiu syntetických a přírodních polymerů v roztocích a při určení agregace a konformační stability jejich řetězců [146].

Principem této metody je měření časového průměru intenzity rozptýleného světla při jednom, nebo několika úhlech pozorování jako funkce koncentrace měřeného roztoku (obr. 19).

Obrázek 19: Rozdíl mezi statickým a dynamickým rozptylem světla [142].



Prochází-li roztokem makromolekul světlo o vlnové délce λ , polarizované vertikálně na rovinu pozorování, dochází na makromolekulách s velikostí menší než $\lambda/20$ k rozptýlu světla, jehož intenzita je ve všech směrech stejně velká. Intenzitu rozptýleného světla vyjádřenou jako R_θ v daném úhlu pozorování je pak možno definovat rovnicí (6),

$$\frac{K_c c}{R_\theta} = \frac{1}{M} + 2A_2 c, \quad (6)$$

kde M je molekulová hmotnost, R_θ je Rayleigho poměr vyjadřující hustotu světelného toku světla rozptýleného makromolekulou pod úhlem θ , definovaný jako I_θ/I_0 , kde I_θ je intenzita rozptýleného světla a I_0 je jednotková intenzita primárního paprsku, A_2 je druhý viriální koeficient charakterizující interakce mezi rozpuštěnou látkou a rozpouštědlem, c představuje koncentraci a pro optickou konstantu K_c platí vztah (7) [147,148]:

$$K_c = \frac{2\pi^2}{\lambda_0^4 N_A} \left(n_0 \frac{dn}{dc} \right)^2, \quad (7)$$

kde λ_0 je vlnová délka primárního paprsku, N_A představuje Avogadrovu konstantu ($N_A = 6,022 \times 10^{23} \text{ mol}^{-1}$), n_0 je index lomu rozpouštědla a dn/dc je inkrement indexu lomu.

Rovnice (6.) a (7.) naznačují, že ve zředěných roztocích závisí rozptyl světla na úhlu mezi primárním a rozptýleným paprskem, indexu lomu rozpouštědla, vlnové délce světla a koncentraci rozpuštěného polymeru [149]. Mimo to závisí na polarizovatelnosti molekul, která je pro praktické použití nahrazena inkrementem indexu lomu, definovaným jako poměr rozdílu indexu lomu roztoku n a indexu lomu čistého rozpouštědla n_0 ku hmotnostní koncentraci analyzovaného polymeru c , $(n-n_0)/c$ [149,150]. Je-li velikost molekuly dostatečně malá, Rayleigho poměr na rozptylovém úhlu nezávisí. V roztoku polymeru obsahujícím izotropně rozptylující molekuly splňující podmínku, že jejich průměr je menší $\lambda/20$, je pak možno molekulovou hmotnost polymeru stanovit pouze při jednom úhlu měření.

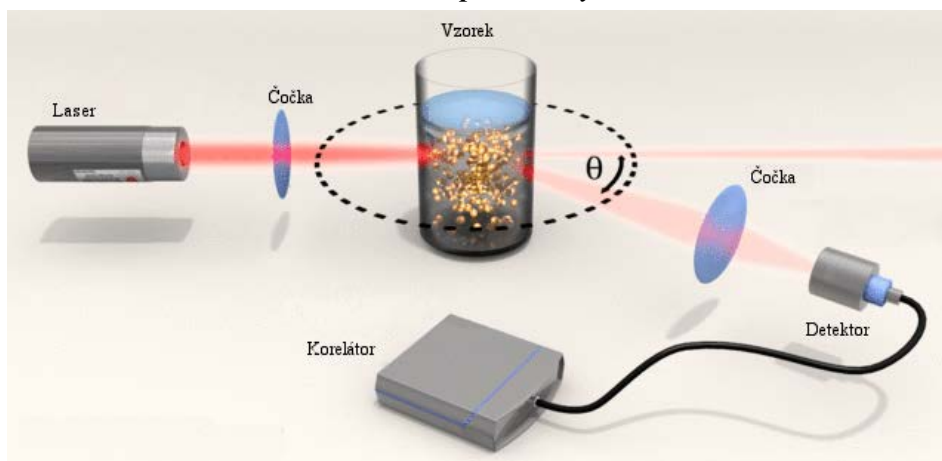
Jsou-li rozměry rozpuštěných molekul větší než $\lambda/20$, stává se závislost složitější. Rayleigho poměr je úměrný koncentraci, ale díky intramolekulárním interferencím světelného paprsku dochází k různě velkému zeslabení rozptýleného světla a R_θ závisí rovněž na rozptylovém úhlu. [143,145,147,148,149,150].

Měření rozptylu světla je z experimentálního pohledu hodně náročné, protože intenzita rozptýleného světla je malá a poměr intenzit rozptýleného a primárního světla je 10^{-4} až 10^{-5} a jakékoli znečištění roztoku může měření silně zkreslit [149].

5.1.1.2 Dynamický rozptyl světla

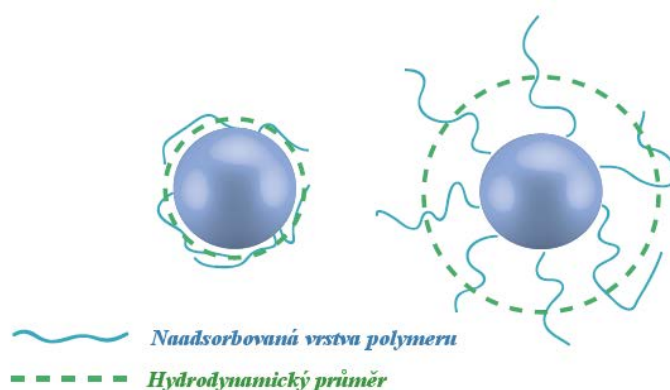
Dynamický rozptyl světla (DLS) neboli fotonová korelační spektroskopie představuje důležitou experimentální metodu, která je široce využívána ke stanovení velikosti částic [146]. Jedná se o neinvazivní a nedestruktivní metodu, která se stala nepostradatelnou při studiu suspenzí, koloidních a roztoků, makromolekul, tekutých krystalů, ale také při studiu hydrodynamických interakcí koncentrovaných disperzí [151,152].

Obrázek 20: Princip metody DLS [153].



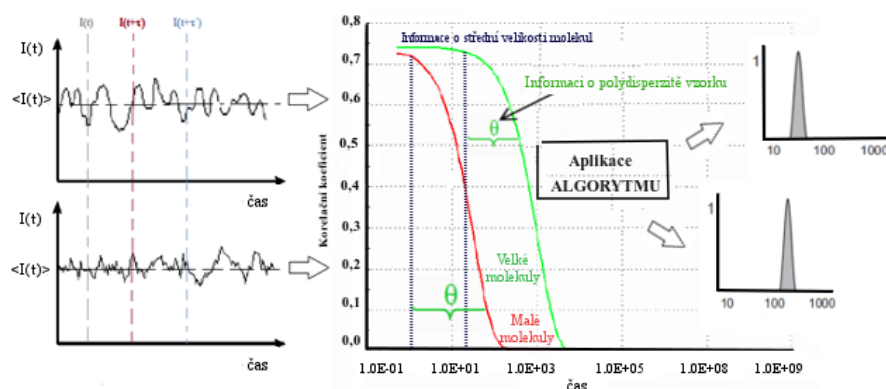
Dopadem monochromatického světla, obvykle z laserového zdroje, do roztoku s částicemi, které konají Brownův pohyb, dojde interakcí světla s částicemi k interferenci a k Dopplerově posunu. Výsledkem tohoto posunu je změna frekvence rozptýleného záření oproti záření primárnímu, která souvisí s velikostí částic (obr. 20). Protože se částice v kapalině pohybují, bude podle Dopplerova principu dopadat na detektor světlo s vyšší nebo nižší frekvencí podle toho, pohybuje-li se částice směrem od detektoru nebo k detektoru. Mění se tedy vzdálenost, kterou musí rozptýlené světlo k detektoru urazit a toto světlo pak může interferovat v závislosti na vzdálenosti mezi částicí a detektorem. Výsledkem jsou fluktuace intenzity rozptýleného záření okolo její průměrné hodnoty. Čím rychleji se budou měřené částice pohybovat, tím rychleji bude docházet ke změně intenzity rozptýleného světla. Rychlost těchto změn závisí na velikosti molekul, a je rovněž ovlivňována teplotou a viskozitou rozpouštědla [152]. V případě známé teploty a viskozity rozpouštědla, se fluktuace intenzity rozptýleného světla stává přímo úměrnou velikosti molekuly, tedy jejímu hydrodynamickému průměru D_H (obr. 21) [154].

Obrázek 21: Hydrodynamický průměr D_H [137].



Jak již bylo uvedeno, analýza časových fluktuací poskytuje informaci o pohybu a tedy i velikosti částic. Tato analýza je u metody DLS zajištěna korelátorem, který měří stupeň podobnosti mezi jednotlivými signály v po sobě jdoucích časových intervalech a který převádí fluktuace intenzity rozptýleného světla na korelační funkci [134,155]. Ta představuje vztah mezi průměrem intenzity rozptýleného světla v čase $(t + \tau)$ a v čase t . Při velké hodnotě τ , tedy při velkém zpoždění jsou intenzity $I(t)$ a $I(t+\tau)$ na sobě nezávislé, naopak při krátkém zpoždění na sobě závislé jsou. Graficky jsou fluktuace intenzity rozptýleného světla pro malé i velké částice zobrazeny na obrázku 22.

Obrázek 22: Znázornění intenzitních fluktuací rozptýleného světla jako funkce času a jejich převedení na intenzitní distribuci [147,155].



Korelační funkci $G(\tau)$ lze pak psát ve tvaru [134]:

$$G(\tau) = \langle I(t) \rangle \cdot I(t + \tau) . \quad (8)$$

Pro monodisperzní částice konající Brownův pohyb je korelační funkce exponenciálně klesající funkcí korelačního času

$$G(\tau) = A + B^{(-2\Gamma\tau)}, \quad (9)$$

kde A je základní linie korelační funkce pro nekonečný čas, B je směrnice korelační funkce a Γ je rychlost poklesu.

Z této funkce lze z rovnice (10) určit translační difúzní koeficient D_i ,

$$\Gamma = D_i |\vec{q}|^2, \quad (10)$$

kde \vec{q} je vlnový vektor rozptýleného světla, který je definován pomocí indexu lomu disperzního prostředí n , vlnové délky světelného zdroje ve vakuu λ_0 a úhlu při kterém dochází k rozptylu světla Θ podle rovnice (11):

$$|\vec{q}| = \frac{4\pi n}{\lambda_0} \sin\left(\frac{\Theta}{2}\right) \vec{q}_0. \quad (11)$$

S difúzním koeficientem souvisí již dříve zmíněný hydrodynamický průměr D_H , který jak už bylo zmíněno výše, lze získat ze Stokes-Einsteinovy rovnice platné pro kulovité částice (rov. 4) [132,134,155,156]. Pro polydisperzní systémy je tvar autokorelační funkce podstatně složitější [157].

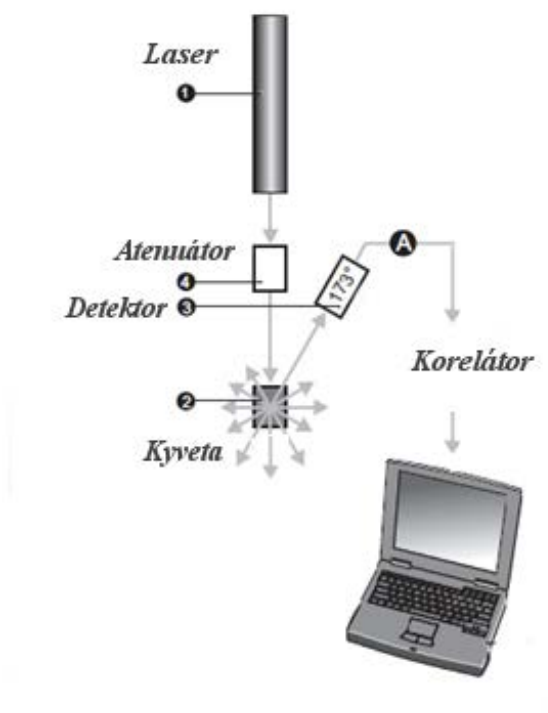
Velikost částic se z autokorelační funkce získá použitím vhodných algoritmů. Může se jednat o proložení korelační funkce jednou exponenciální funkcí (lineární fit) jehož výsledkem je stanovení průměrné velikosti částic (z-average) a odhad šířky distribuce (index polydisperzity), který se označuje jako „Cumulants analysis“. Tento způsob vyhodnocení je vhodný zejména pro monodisperzní vzorky. Další možností vyhodnocení dat je dekonvoluce všech příspěvků získaných z jednotlivých exponenciálních funkcí stanovené autokorelační funkce, jejímž výsledkem je distribuce velikosti částic tzv. CONTIN (generalizovaná inverzní Laplaceova transformace), vhodná pro polydisperzní vzorky [152,155,158].

Metoda dynamického rozptylu světla poskytuje intenzitně váženou distribuci velikostí všech populací částic přítomných v analyzovaném vzorku. Intenzitní distribuce je

úměrná druhé mocnině molekulové hmotnosti, což může v některých případech poskytnout zavádějící výsledky. Zejména v přítomnosti malého množství agregátů, či větších částic, jejichž rozptyl v této distribuci dominuje, i když je jejich množství malé [159]. Realističtější pohled na analyzovaný vzorek pak přináší objemová distribuce, kterou lze z intenzitní vypočítat pomocí Mieovy teorie, je-li známa hodnota indexu lomu rozptylujících částic. V případě, že je distribuce částic monomodální, převod intenzitní distribuce pomocí Mieovy teorie na distribuci objemovou není nutný [155]. Objemová distribuce charakterizuje relativní podíl jednotlivých složek vzorku na základě jejich hmotnosti případně objemu [159]. Objemová distribuce se upřednostňuje v případech, kdy je ve vzorku přítomno více druhů částic, tedy v případě multimodální distribuce [154,155].

Přístroj pro měření dynamického rozptylu světla je tvořen laserovým zdrojem světla, které je do měřeného vzorku vedeno pomocí čoček. Světlo rozptýlené měřenými částicemi je detekováno při jednom úhlu, nejčastěji při 90° nebo 173° . Fluktuační intenzity rozptýleného světla jsou pak převáděny na elektrické pulzy a zpracovávány digitálním korelátorem, který generuje autokorelační funkci, ze které je vyhodnocena velikost částic. Základní uspořádání zobrazuje obrázek 23.

Obrázek 23: Uspořádání přístroje pro měření DLS [147].



Měřicí rozsah přístroje se pohybuje v rozmezí 0,6 nm až k několika mikrometrům, což je rozsah pro řadu jiných metod obtížně dosažitelný. Je příliš malý pro optickou spektroskopii, ale příliš velký pro elektronovou mikroskopii [152]. Komerčně dostupný přístroj firmy Malvern (UK) Zetasizer Nano ZS, na kterém je prováděno měření velikosti částic, detekuje intenzitu rozptýleného světla pod úhlem 173° , tedy při tzv. zpětném rozptylu. Měření při zpětném rozptylu sebou přináší řadu výhod. Laserový paprsek nemusí při měření procházet celým vzorkem, čímž se snižuje působení tzv. mnohonásobného rozptylu. Účinek mnohonásobného rozptylu je minimální při 180° , což při analýze při 173° umožňuje měřit koncentrovanější vzorky. Je rovněž omezen rozptyl na velkých částicích, jako jsou prach a nečistoty [155]. Metoda rovněž umožňuje analýzu polydisperzních vzorků a měření je možno provádět s malým množstvím vzorku (0,75 – 1 ml).

Nedostatkem metody DLS je její citlivost vůči přítomnosti různých typů agregátů a nečistot. Prach a větší částice mohou způsobit interferenci, která může značně ovlivnit výslednou velikost částic ve vzorku [140].

5.2 Viskozimetrie

Viskozita je základní vlastností všech kapalin a vyjadřuje míru odporu vůči toku nebo smykovém namáhání tekutiny [139,160]. Lze ji označit za sílu, která je mírou tření tekutiny. Je funkcí teploty a tlaku [160].

Dynamickou viskozitu η je možno definovat jako tečnou sílu působící na jednotku plochy, které je zapotřebí k posunu jedné vrstvy kapaliny vůči vrstvě druhé, udržované v jednotkové vzdálenosti [160]. Matematicky ji lze vyjádřit vztahem (12):

$$\sigma = \eta \frac{dx}{dt}, \quad (12)$$

kde dx/dt je gradient rychlosti a σ je smykové napětí.

Ze znalosti dynamické viskozity a hustoty kapaliny ρ_L lze dále definovat viskozitu kinematickou (rov. 13):

$$\nu = \frac{\eta}{\rho_L}, \quad (13)$$

Jednotkami dynamické viskozity jsou Pa·s nebo N·s·m⁻². Kinematická viskozita je udávána v jednotkách m²·s⁻¹ [139,160].

Viskozitu lze měřit různými typy viskozimetrů, které jsou přehledně uvedeny v následující části práce. Přístroje používané k měření viskozity lze rozdělit do těchto kategorií:

1. Kapilární viskozimetry
2. Rotační viskozimetry
3. Pádové viskozimetry
4. Vibrační viskozimetry
5. Ultrazvukové viskozimetry
6. Vysokoteplotní smykové viskozimetry.

Měření viskozity je v této práci prováděno pomocí kapilárního viskozimetru, kterému bude věnována největší pozornost.

5.2.1 Ubbelohdeho kapilární viskozimetr

Kapilární viskozimetry se nejčastěji používají k měření viskozity newtonských kapalin, pro které je charakteristické, že jejich viskozita je konstantní a nezávislá na použitém smykovém napětí. Princip kapilárních viskozimetrů spočívá v měření toku kapaliny uvnitř kapiláry, která protéká mezi dvěma definovanými ryskami [139,160]. Kapilární viskozimetry umožňují přímé stanovení viskozity z tokové rychlosti, tlaku a rozměrů použitého viskozimetru. Výpočet kinematické viskozity z měření provedeného kapilárním viskozimetrem, je založen na Poiseuillově rovnici, která předpokládá, že při průtoku kapaliny kapilárou o délce l , poloměru a , vzniká na jejích koncích rozdíl tlaků ΔP . Objemový tok této tekutiny Q lze poté vyjádřit vztahem (14) [135,139,160],

$$Q = \frac{\pi \Delta P a^4}{8 \eta l}. \quad (14)$$

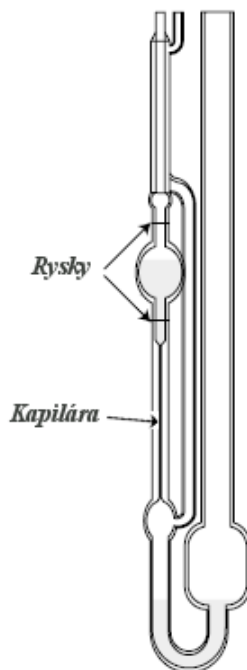
Tuto rovnici, lze převést do tvaru odpovídajícímu vertikálnímu viskozimetru, kde uvažujeme hydrostatický tlak ($\Delta P = \rho_L g h_0$) a objemový tok kapaliny $Q = \frac{V}{t}$ (V je definovaný objem kapaliny, který proteče mezi dvěma ryskami za čas t). Poté lze rovnici (14) přepsat do tvaru:

$$\eta = \frac{\pi g h_0 a^4}{8 l V} \rho_L t \Rightarrow \eta = K \rho_L t \Rightarrow \nu = K t, \quad (15)$$

kde K je konstanta viskozimetru.

Kapilární viskozimetr o známé konstantě K , tak může být použit k měření času potřebného k průtoku dané kapaliny mezi dvěma definovanými ryskami a následnému určení kinematické viskozity [160]. Při měření v kapilárním viskozimetru by měl měřený roztok protékat skrze kapiláru pomalu, aby vlivem velkých smykových napětí, nedocházelo ke změně tvaru rozpuštěných makromolekul. Průtoková doba čistého rozpouštědla by se měla pohybovat okolo 100 s [149]. Ubbelohdeho viskozimetr zobrazený na obrázku 24, se používá ke stanovení kinematické viskozity Newtonských kapalin v rozsahu od $0,3 \times 10^{-6}$ až $1 \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$.

Obrázek 24: Ubbelohdeho viskozimetr [135].



Mezi výhody Ubbelohdeho viskozimetru patří jednoduchost měření, přesnost ($\pm 0,1\%$), potřeba malého množství vzorku (1 ml), a nízké pořizovací náklady. Jeho nevýhodou může být případné ucpávání tenké kapiláry [160].

Mezi důležité parametry, které lze získat měřením viskozity řadíme limitní viskozitní číslo $[\eta]$, definované jako

$$[\eta] = \lim_{c \rightarrow 0} \frac{\eta_{sp}}{c}, \quad (16)$$

kde c je koncentrace polymeru v roztoku [$\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$] a poměr η_{sp}/c představuje redukovanou viskozitu [135,139].

Pro stanovení limitního viskozitního čísla je nutné nejdříve určit relativní viskozitu η_r , udávající poměr mezi dynamickou viskozitou roztoku η a viskozitou čistého rozpouštědla η_{roz} (rov. 17) [139],

$$\eta_r = \frac{\eta_{roztok}}{\eta_{rozpouštědlo}} = \frac{\eta}{\eta_{roz}}. \quad (17)$$

Relativní viskozitu lze, za předpokladu stejné hustoty roztoku a rozpouštědla, vyjádřit podílem průtokových časů měřené kapaliny v kapilárním viskozimetru [149]. Pro nekonečně zředěné roztoky se hodnota relativní viskozity blíží jedné, a proto je výhodnější definovat specifickou viskozitu η_{sp} (rov. 18) [135,149,161]:

$$\eta_{sp} = \eta_r - 1 = \frac{\eta - \eta_{roz}}{\eta_{roz}}. \quad (18)$$

Poměr specifické viskozity a koncentrace roztoku popisuje redukovaná viskozita η_{red} , pro kterou platí rovnice (19) [88]:

$$\eta_{red} = \frac{\eta_{sp}}{c} = \frac{\eta - \eta_{roz}}{\eta_{roz}c}. \quad (19)$$

Limitní viskozitní číslo (rov. 16) pak udává mezní hodnotu poměru specifické viskozity a koncentrace nekonečně zředěného roztoku polymeru. Z rovnice (16) je patrné, že viskozita zředěných polymerních roztoků se měří při různých koncentracích a následně extrapoluje na koncentraci nulovou [149]. Jednotkou limitního viskozitního čísla je obvykle $\text{ml} \cdot \text{g}^{-1}$ nebo $\text{dl} \cdot \text{g}^{-1}$ [135]. Limitní viskozitní číslo závisí na molekulové hmotnosti, struktuře a konformaci polymerních molekul, použitém rozpouštědle a teplotě, při které je měření prováděno [162].

K vyjádření koncentrační závislosti limitního viskozitního čísla se nejčastěji používá Hugginsova rovnice (rov. 19):

$$\frac{\eta_{sp}}{c} = [\eta] + k_H[\eta]^2c, \quad (20)$$

kde k_H je Hugginsova viskozitní konstanta.

Tento parametr popisuje interakce polymerních molekul a závisí zejména na molekulové hmotnosti polymeru, charakteru rozpouštědla (v případě vodných roztoků i na pH a iontové síle) a na síle interakcí mezi polymerem a rozpouštědlem. Pro polymery rozpuštěné v dobrých rozpouštědlech se jeho hodnota pohybuje okolo 0,3, zatímco hodnoty ležící v intervalu od 0,8 do 1, jsou typické pro polymery ve špatných rozpouštědlech [161].

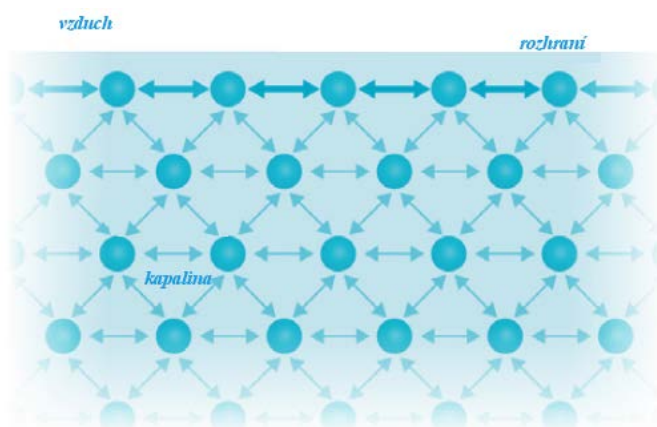
5.3 Povrchové napětí a jeho stanovení

Povrchové napětí γ je definováno jako síla F v rovině povrchu působící na jednotku délky, vyjádřeného rovnicí (21),

$$\gamma = \frac{F}{L}, \quad (21)$$

Ke vzniku povrchového napětí přispívají mezimolekulové síly působící na obou stranách rozhraní, které jsou obvykle různě veliké. Proto síly působící na molekuly uvnitř kapaliny nebudou shodné se silami působící na molekulu přítomnou v povrchové vrstvě, jak je patrné z obrázku 25 [163].

Obrázek 25: Síly působící na molekulu na povrchu a v objemu [164].



Molekuly na fázovém rozhraní tj. rozhraní oddělující dvě fáze se, oproti molekulám objemové fáze, chovají odlišně. Zaujímají jinou orientaci a jsou ve stavu s vyšší volnou energií [165]. V případě rozhraní kapalně a plynné fáze jsou molekuly kapalně fáze vystaveny kohezním přitažlivým silám sousedních molekul působícím ve všech směrech. Přitažlivé síly, které působí, na molekuly povrchu kapaliny z kapalně fáze jsou silnější než síly, které na molekuly působí z fáze plynné [166,150]. Molekuly na povrchu kapaliny se chovají tak, jako by byly tvořeny tenkou, pružnou vrstvou, která je vtahována dovnitř. V důsledku takového působení je počet povrchových molekul

menší a kapalina při daném objemu zaujímá tvar s co nejmenším povrchem. Proto zaujímají kapky a bubliny kulovitý tvar [163,166,167]. Aby došlo ke zvětšení povrchu kapaliny, musí na její povrch přejít z objemové fáze další molekuly. Tyto molekuly musí vynaložit určitou energii, která odpovídá překonání přitažlivých sil působících na molekuly objemové fáze [166]. Jakákoli molekula na povrchu kapalné fáze je pod asymetrickým silovým polem, jehož výsledkem je mezifázové, povrchové napětí [101].

Povrchové napětí je číselně i rozměrově rovno povrchové energii W vztažené na jednotku plochy, definované rov. 22, tzn. jako práce potřebná k izotermickému a vratnému zvětšení mezifáze o jednotku plochy. Potřebná práce je úměrná počtu molekul převedených z objemu na fázové rozhraní [150,165,167-169]:

$$\Delta E = W = \gamma \Delta S, \quad (22)$$

Například množství práce potřebné k vytvoření povrchu 1 m^2 vody odpovídá $72,8 \times 10^{-3} \text{ J}$ [166]. Povrchové napětí se u kapalin měří přímo a vyjadřuje se v jednotkách $\text{N} \cdot \text{m}^{-1}$ nebo $\text{mN} \cdot \text{m}^{-1}$ [168]. U většiny kapalin s rostoucí teplotou povrchové napětí klesá, protože s rostoucí teplotou klesá míra přitažlivých sil mezi molekulami v kapalné fázi [165,166].

Mezi nejčastěji používané metody měření povrchového napětí patří Du Noüyho metoda odtrhávání prstence, měření pomocí Wilhelmyho destičky, metoda visící kapky, stalagmometrická metoda vážení kapky, Zismanova metoda [170] a metoda sedící kapky, kde je povrchové napětí počítáno prostřednictvím kontaktních úhlů smáčení jedné až několika druhů kapalin na základě různých fyzikálních modelů [171-178]. V této práci je používána Wilhelmyho metoda, která bude vysvětlena podrobněji.

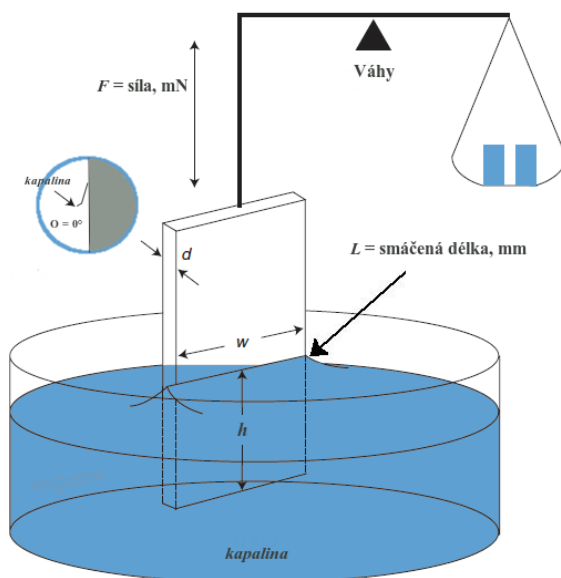
5.3.1 Wilhelmyho metoda

Wilhelmyho metoda [179], patří mezi nejčastěji používané metody měření povrchového napětí, či stanovení kontaktního úhlu smáčení pevných látek. Princip metody je založen na využití pevné platinové destičky známé délky, tloušťky a hmotnosti, zavěšené na ramě citlivých vah, která je částečně ponořena do kapaliny. Měří se síla potřebná k odtržení této destičky od fázového rozhraní [169,180,181]. Povrchové napětí se stanoví na základě této síly podle rov. 23 [168]:

$$\gamma = \frac{F}{2(w + d) \cos \beta}, \quad (23)$$

kde w je šířka destičky, β je kontaktní úhel a d je tloušťka destičky.

Obrázek 26: Určení povrchového napětí Wilhelmyho metodou [165,182].



V případě, že je kontaktní úhel blízký nule, povrch kapaliny je téměř vertikálně orientovaný (obr. 26), lze rovnici (23) zjednodušit do tvaru [165,166]:

$$\gamma = \frac{F}{L}, \quad (24)$$

kde L je smáčená délka destičky $L = 2(w+d)$.

Moderní přístroje používají standardizované destičky, u kterých není vyžadována znalost její hmotnosti. Nejčastěji se vyrábí z platiny, slitiny platiny a iridia, skla, slídy, nerezové oceli a jiných chemicky inertních materiálů [165].

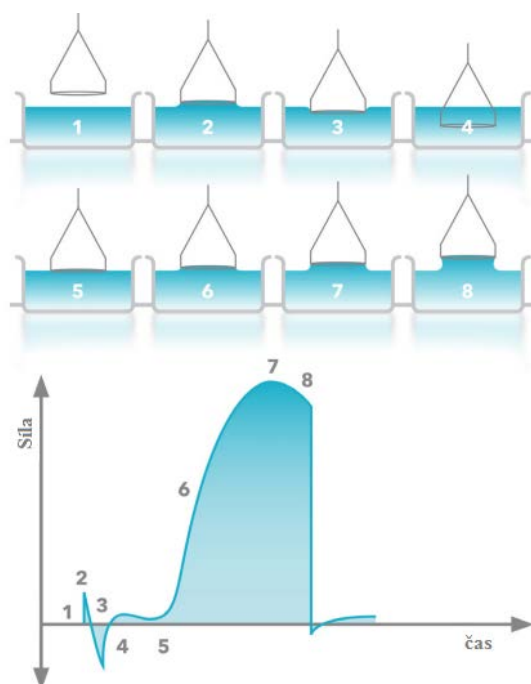
5.3.2 *Du Noüyho metoda odtrhávání prstence*

Další často používanou metodou ke stanovení povrchového napětí je Du Noüyho metoda odtrhávání prstence [183]. Princip této metody je založen na měření maximální síly F_{max} potřebné k odtržení dobře smáčeného prstence od fázového rozhraní vyjádřeného rovnicí (25)

$$\gamma = \frac{F_{max}}{4\pi r_p} \Phi, \quad (25)$$

kde r_p představuje poloměr prstence a Φ korekční faktor příslušné kapaliny, kterým je kompenzováno její ulpívání na prstenci při jeho odtržení [150]. Korekční faktor závisí na přesné geometrii prstence (poloměru, tloušťce), hustotě stanovované kapaliny a objemu menisku [150,165,180]. Podrobný popis samotného průběhu měření je uvedený na obrázku 27.

Obrázek 27: Du Noüyho odtrhávací metoda [164].



Proces měření povrchového napětí znázorněného obr. 27 lze popsat tímto způsobem:

1. Prstenec je umístěn nad povrchem, síla je nulová, váhy jsou vytárovány
2. Prstenec dosáhl povrchu měřené kapaliny a v důsledku adheze prstence k povrchu je registrován slabý nárůst síly
3. Prstenec musí projít povrchem, což se projeví zápornou hodnotou měřené síly
4. Prstenec prošel skrze povrch, malá kladná síla vlivem působení kapaliny na podpůrné drátky
5. Při zvedání prstence začíná měřená síla růst
6. Měřená síla roste, dokud nedosáhne své maximální hodnoty
7. Měřená síla dosáhla své maximální hodnoty
8. Po dosažení maximální síly dochází k jejímu poklesu následovaným odtržením prstence do doby, než je prstenec znovu ponořen pod povrch měřené kapaliny

Kontaktní úhel mezi měřenou kapalinou a prstencem je nulový, protože dochází k jeho dokonalému smáčení. Prstenec musí být rovný a paralelní s povrchem měřené

kapaliny. Jeho případné vychýlení o $2,1^\circ$ může způsobit chybu měření až 1,6 %. Kruhový prstenec se nejčastěji vyrábí z platiny a slitiny platiny a iridia. Du Noüyho metoda odtrhávání prstence je použitelná při měření mezifázového napětí stejně jako ke stanovení kritické micelární koncentrace. Touto metodou lze stanovit povrchové napětí čistých kapalin, případně polárních i nepolárních vzorků s nízkou koncentrací tenzidu. Nedoporučuje se měření viskózních kapalin případně roztoků, které dosahují rovnovážného povrchového napětí pomaleji [165,180].

6 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

Experimentální část dizertační práce je rozdělena do tří tématických oblastí. První část shrnuje výsledky konformačního chování hyaluronanu v roztocích s přísávkou kvartérních amoniových solí. Druhá část experimentální práce je zaměřena na studium vlivu vybraných Hofmeisterových solí na chování hyaluronanu ve vodě. Ve třetí a poslední části této kapitoly bude rozebrána příprava ve vodě nerozpustného hyaluronanu jako materiálu, který v kombinaci s jinými polysacharidy, například ligninem, může být využitelný při adsorbci těžkých kovů.

6.1 Studium vlivu kvartérních amoniových solí na konformační chování hyaluronanu

Jak již bylo zmíněno v teoretické části, hyaluronan ve vodných roztocích výrazně podléhá různým konformačním změnám v závislosti na koncentraci surfaktantu obsaženého v rozpouštědle. Vliv koncentrace kvartérní soli na velikost, popř. konformaci, klubek HA byl studován pomocí dynamického rozptylu světla. Dále byla sledována závislost povrchového napětí a viskozity roztoků hyaluronanu na koncentraci surfaktantu. Na základě výsledků byla vytvořena hypotéza o možných interakcích hyaluronanu a tenzidu v roztoku.

6.1.1 Použité materiály a příprava vzorků

6.1.1.1 Materiály

V této části experimentální práce byly použity následující materiály:

- Sodná sůl kyseliny hyaluronové (**NaHy**), $M_w = 1,8$ MDa, $M_w = 0,35$ MDa, Contipro Ltd., Česká republika
- Benzalkonium chlorid (**BAC**) – $C_{8-16}H_{17-33}ClN$ (≥ 95 %), Fluka
- Chlorid sodný – **NaCl**, Fluka
- Dihydrogenfosforečnan sodný – **NaH₂PO₄**, Sigma Aldrich
- Hydrogenfosforečnan sodný – **Na₂HPO₄**, Sigma Aldrich
- De-ionizovaná voda – **H₂O**

6.1.1.2 Příprava vzorků

Fosfátový pufr, ve kterém byl rozpuštěn hyaluronan, byl připraven smícháním příslušných množství hydrogenfosforečnanu sodného a dihydrogenfosforečnanu sodného v de-ionizované vodě tak aby výsledná hodnota pH byla 7,36. Ustálení připraveného fosfátového pufru, bylo provedeno přidáním odpovídajícího přídatku chloridu sodného.

Roztok hyaluronanu o koncentraci 0,1 hm% byl připraven jeho rozpuštěním ve fosfátovém pufru, které probíhalo za neustálého míchání při teplotě 50°C po dobu 24hodin. Do takto připraveného zásobního roztoku NaHy byl přidán, ve fosfátovém pufru rozpuštěný, benzalkonium chlorid (BAC) a to v sedmi různých koncentracích: $0,32 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$, $0,42 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$, $1,6 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$, $1,8 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$, $2,1 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$, $3,1 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$, $4,2 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$. Pro větší názornost, byly jednotlivé přídatky BAC, přepočítány na počet molekul, připadajících na jednu molekulu hyaluronanu podle níže uvedeného příkladu.

Zadané parametry:

$$M_{w(\text{NaHy})} = 1,8 \text{ MDa}, c_{\text{NaHy}} = 0,5556 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1},$$

$$M_{w(\text{BAC})} = 340 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}, c_{\text{BAC}} = 14,71 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1},$$

$$M_{w(1 \text{ meru NaHy})} = 395,3 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1},$$

a) Stanovení počtu molekul

$$\frac{M_{w(\text{NaHy})}}{M_{w(1 \text{ meru NaHy})}} = \frac{1,8 \cdot 10^6}{395,3} = \underline{4553} \text{ merů v NaHy} \quad (26)$$

$$n_{(\text{NaHy})} = c_{(\text{NaHy})} \cdot V = 0,5556 \cdot 10^{-6} \cdot 0,03 = \underline{16,67 \cdot 10^{-8}} \text{ mol} \quad (27)$$

$$N_{(\text{NaHy})} = N_A \cdot n_{(\text{NaHy})} = 6,023 \cdot 10^{23} \cdot 16,67 \cdot 10^{-8} = \underline{1 \cdot 10^{16}} \text{ molekul Na} \quad (28)$$

b) Stanovení počtu molekul BAC připadajících na 1 molekulu NaHy pro přídatek $0,32 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ BAC

$$n_{(BAC)} = c_{(BAC)} \cdot V = 14,71 \cdot 10^{-3} \cdot 0,03 \cdot 10^{-3} = \underline{0,4412 \cdot 10^{-6}} \text{ mol} \quad (29)$$

$$N_{(BAC)} = N_A \cdot n_{(BAC)} = 6,023 \cdot 10^{23} \cdot 0,4412 \cdot 10^{-6} = \underline{2,657 \cdot 10^{17}} \text{ molekul} \quad (30)$$

$$\frac{N_{BAC}}{N_{NaHy}} = \frac{2,657 \cdot 10^{17}}{1 \cdot 10^{16}} \quad (31)$$

$$= \underline{26,57} \text{ molekul BAC na 1 molekulu NaHy}$$

BAC byl tedy do roztoku NaHy přidáván v koncentracích, které odpovídaly 26, 35,140, 150, 176, 265 a 353 molekulám BAC, připadajícím na 1 molekulu hyaluronanu.

Pro měření velikosti částic metodou dynamického rozptylu světla byly připravené vzorky ředěny 3 ml fosfátového pufru a následně filtrovány přes 0,22 μm PTFE mikro filtry. Každý vzorek byl analyzován třikrát.

Ke stanovení limitního viskozitního čísla a Hugginsovy konstanty 0,1 hm. % roztoku NaHy, byly roztoky NaHy obsahující jednotlivé přídavky BAC, rozředěny do pěti různých koncentrací.

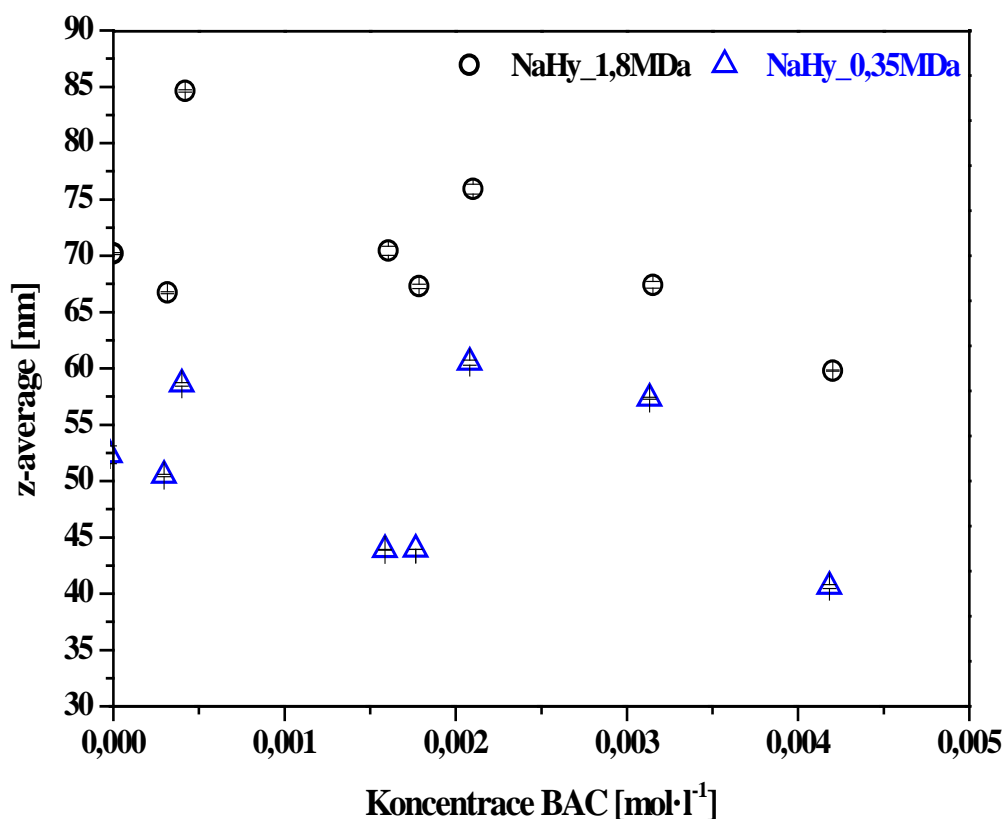
Pro určení kritické micelární koncentrace BAC byla připravena série jeho koncentrací v rozsahu 0,32 - 8,9 $\text{mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ ve fosfátovém pufru, de-ionizované vodě a v 0,1 hm.% roztoku hyaluronanu.

Veškeré roztoky hyaluronanu s jednotlivými přídavky BAC, byly pro jednotlivá měření připraveny tak, aby zůstal zachován poměr koncentrace NaHy a přidávaného BAC.

6.1.2 Výsledky a diskuze

Závislost velikosti částic hyaluronanu na koncentraci použitého benzalkonia chloridu je znázorněna na obrázku 28. Detailní přehled všech použitých koncentrací a příslušných hodnot střední velikosti částic ("z-average") pro obě zvolené molekulové hmotnosti NaHy je obsažen v tabulkách 2 a 3.

Obrázek 28: Velikost polymerních klubek NaHy v přítomnosti studovaných přísadků BAC v roztoku ($\text{NaHy}_{M_w=1,8\text{MDa}}$ (Δ) a $\text{NaHy}_{M_w=1,8\text{MDa}}$ (\circ)).



Tabulka 2: Střední velikost částic (z-average) NaHy ($M_w = 1,8\text{MDa}$) po přidavku jednotlivých koncentrací BAC.

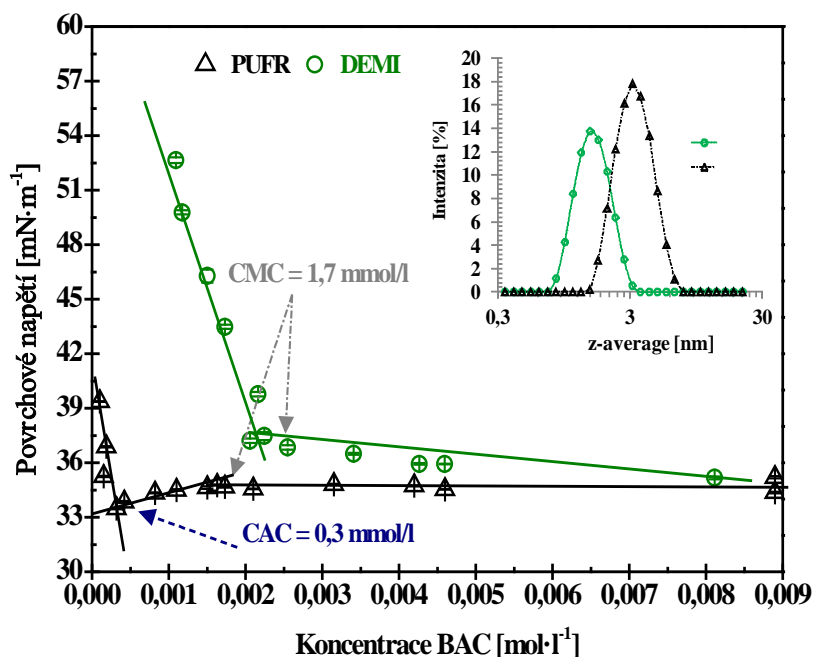
C-NaHy [mol/l]	C-BAC [mmol/l]	z-average [nm]	molekuly BAC na 1molekulu NaHY
1,77E-07	0	70	0
1,76E-07	0,32	67	26
1,75E-07	0,42	85	35
1,31E-07	1,6	70	140
1,30E-07	1,8	67	150
1,69E-07	2,1	76	176
1,65E-07	3,2	67	265
1,62E-07	4,2	60	353

Tabulka 3: Střední velikost částic (z-average) NaHy ($M_w = 0,35$ MDa) jednotlivých přídavek BAC.

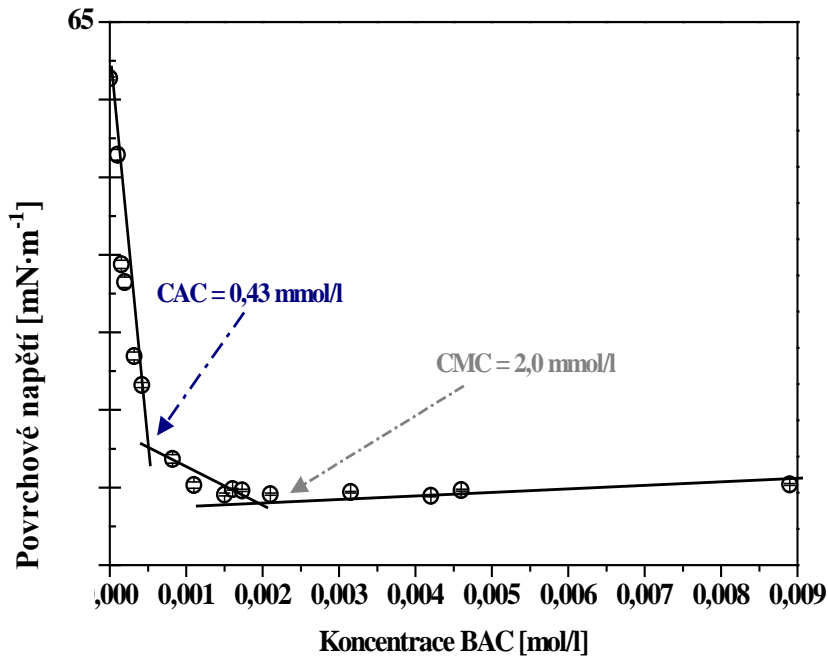
C-NaHy [mol/l]	C-BAC [mmol/l]	z-average [nm]	molekuly BAC na 1 molekulu NaHY
9,09E-07	0	46	0
9,03E-07	0,32	44	5
9,01E-07	0,42	53	7
8,79E-07	1,6	36	26
8,75E-07	1,8	36	29
8,70E-07	2,1	56	34
8,51E-07	3,2	52	51
8,33E-07	4,2	32	69

Z těchto výsledků je patrné, že výchozí velikost hyaluronového klubka je 70 nm ($M_w=1,8$ MDa), respektive 46 nm ($M_w= 0,35$ MDa). Tato zjištění potvrzují skutečnost, že hyaluronan, jakožto flexibilní polyelektrolyt, zaujímá v roztoku pufru konformaci sbaleného klubka [9]. Nicméně s rostoucí koncentrací BAC v roztoku, dochází k výrazným změnám v jeho velikosti. První přídavek BAC ($c = 0,00032$ mol·l⁻¹) do roztoku hyaluronanu, odpovídá jeho kritické agregační koncentraci (obr. 29).

Obrázek 29: Stanovení kritické micelární koncentrace BAC ve fosfátovém pufru (Δ) a v de- ionizované vodě (\circ).

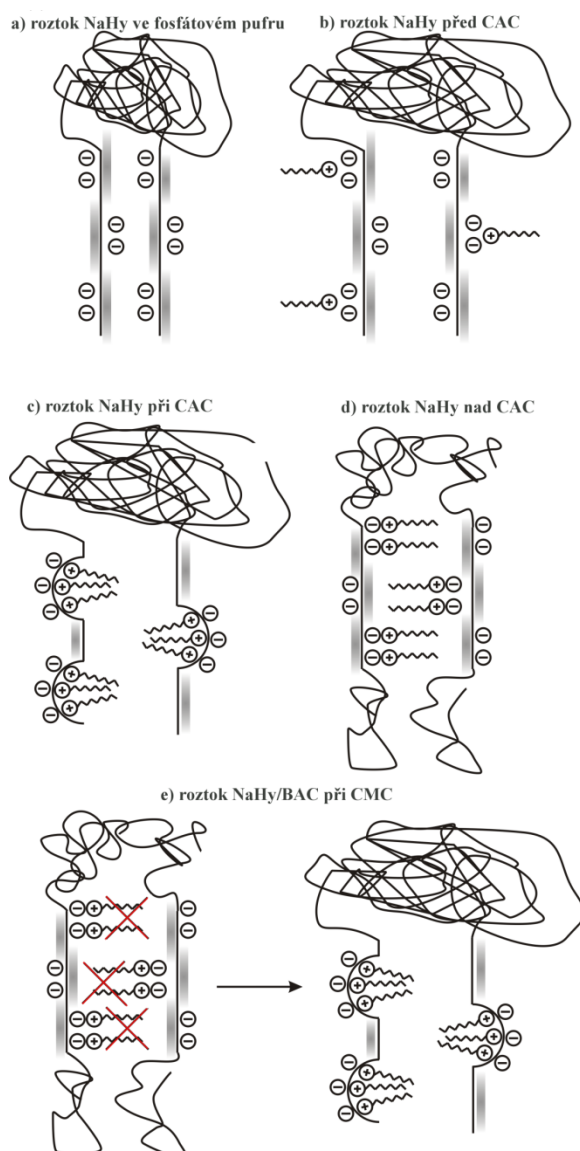


Obrázek 30: Stanovení kritické micelární koncentrace systému NaHy-BAC ve fosfátovém pufru (○).



Překročením CAC dochází k počátku asociací tenzid-polymer a k následnému poklesu velikosti hyaluronového klubka. Dochází k navazování kladně nabitého BAC na záporně nabitá místa hyaluronového řetězce, což vede ke smrštění polymerního řetězce (obr. 31 a-c), tedy poklesu velikosti částic, který je pozorován u NaHy s oběma molekulovými hmotnostmi a je v souladu s předchozími výsledky autorů Pisarčíka a kol. [184].

Obrázek 31: Předpokládané interakce probíhající mezi NaHy a BAC.



Tyto výsledky jsou podpořeny měřeními povrchového napětí roztoku NaHy s BAC ve fosfátovém pufru (obr. 30). Stanovená CAC systému NaHy-BAC ve fosfátovém pufru ($c = 0,43 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$) odpovídá výsledkům z měření velikosti částic, kde byl výrazný nárůst z-average zaznamenán při koncentraci BAC $c = 0,42 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ (obr. 28). Na základě získaných výsledků lze předpokládat, že interakce hydrofobních částí hyaluronanu s BAC řetězcí, vedou k vytvoření jeho tuhé struktury a zároveň k rozbalení hydrofilních částí NaHy (obr. 31 d) [74,77]. Třetí přidavek BAC ($c = 1,6 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$) se projevuje poklesem z-average což platí pro obě molekulové hmotnosti. Thalberg a kol. [185], přisuzuje tento pokles silně kooperativnímu vázání opačně

nabitého tenzidu (v tomto případě decyl/dodecyl-trimethylamonium bromidu) na NaHy, k němuž dochází pod jeho CMC. Jak bude nastíněno v pozdější části textu, při této koncentraci BAC dochází k formování dvou typů micel a termodynamické podmínky v roztoku mohou vést k oslabení hydrofobních interakcí ve prospěch interakcí působících mezi agregáty NaHy-BAC a rozpouštědlem (obr. 26 e). Výsledky získané z měření velikosti částic ukazují, že chování NaHy v přítomnosti rostoucích koncentrací BAC, odpovídá navržené hypotéze (obr. 31 b-e). Kromě CAC, byla v roztoku hyaluronanu v přítomnosti BAC detekována i kritická micelární koncentrace ($c = 2 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$). Tuto interpretaci prezentovaných výsledků, zejména nárůst velikosti klubka hyaluronanu, lze mimo jiné podložit výsledky Bjolinga a kol. [186], kteří ukázali, že NaHy molekuly mohou být spojeny s molekulami TTAB (pozn. BAC, jsou svým charakterem velmi blízké molekulám TTAB).

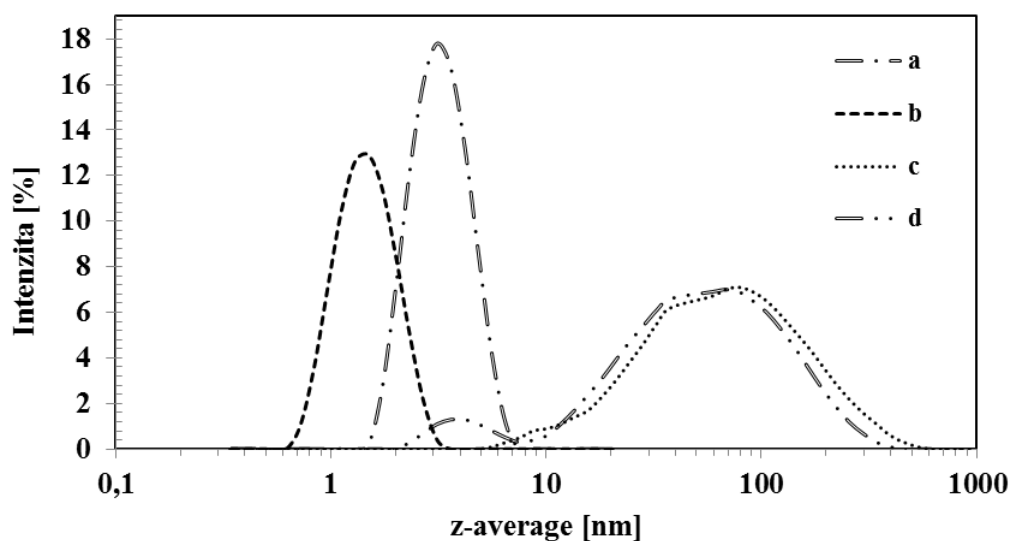
Závěry založené na měření velikosti částic jsou velmi dobře podpořeny výsledky z měření povrchového napětí a kinematické viskozity. Na základě měření povrchového napětí lze konstatovat, že na rozdíl od molekul benzalkonia chloridu rozpuštěných ve vodě, mohou molekuly BAC ve fosfátovém pufru vytvářet dva typy micel. Tento fakt potvrzují také výsledky měření povrchového napětí hyaluronanu s přísadkou BAC zobrazené na obr. 30. Na grafu (viz obr. 29) je vidět, že jak v prostředí fosfátového pufru, tak v prostředí deionizované vody, prochází závislost povrchového napětí na koncentraci tenzidu minimem, které odpovídá kritické agregační koncentraci, tedy koncentraci při které dochází ke vzniku prvních micel a postupnému vytváření komplexů hyaluronan-BAC, jejichž příčina může být vysvětlena elektrostatickou stabilizací micel tenzidu. Po nasycení všech míst, která jsou vhodná k navázání tenzidu na polymerní řetězec, způsobí další přidávání tenzidu do roztoku tvorbu volných micel v roztoku a následné dosažení kritické micelární koncentrace, která odpovídá druhému zlomu na křivce povrchového napětí. Přítomnost dvou různých typů micel v roztoku fosfátového pufru naznačuje i DLS měření. Z těchto výsledků je zřejmé, že micely BAC rozpuštěného ve fosfátovém pufru (z-average $d = 3\text{nm}$), mají ve srovnání s BAC micelami ve vodě (z-average $d =$

1,5nm) větší velikost, která může vysvětlovat přítomnost dvou typů micel, jenž je v přítomnosti NaHy metodikou DLS jen obtížně rozlišitelná. Přítomnost dvou typů micel byla u kationických surfaktantů, konkrétně dodecyltrimethylamonia bromidu (DTAB), tetradecyltrimethylamonia bromidu (TTAB) a hexydecyltrimethylamonia bromidu prokázána autory Mata a kol. [5]. Tito autoři na základě viskozitního měření prokázali, že s rostoucí koncentrací tenzidu dochází kromě vzniku sférických micel, také ke vzniku tyčinkovitých micel [5]. V našem případě, tzn. v prostředí fosfátového pufru, došlo k vytvoření prvního typu micel už při koncentraci $c = 0,3 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$, zatímco druhý typ micel se začal vytvářet při koncentraci $c = 1,7 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$, tedy v místě druhého zlomu na křivce povrchového napětí (obr. 29). Podobné výsledky měření povrchového napětí v prostředí fosfátového pufru lze najít i v literatuře [16,18,84,187,188]. Jak je vidět z obr. 28, třetí přídavek BAC ($c = 1,6 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$), který vyvolá pokles z-average, odpovídá druhému zlomu na křivce povrchového napětí ve fosfátovém pufru (obr. 29) a je srovnatelný s CMC BAC v de-ionizované vodě (obr. 29). Minimální rozdíly, které jsou patrné u výsledků obou molekulových hmotností hyaluronanu mohou pravděpodobně souviset s nižší mobilitou a nižší schopností se samoorganizovat v případě vysokomolekulárního hyaluronanu. Proto jsou NaHy-BAC interakce z termodynamického hlediska výhodější a preferovanější (obr. 31c-e). Patý přídavek BAC ($c = 2,1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$) se projevil opětovným rozbalením polymerního klubka. Pravděpodobně se jedná o stejnou příčinu, která byla zmíněna u druhého přídavku BAC koncentrace $c = 0,42 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$. S dalším zvyšováním koncentrace BAC v roztoku hyaluronanu, už nedochází k výrazným změnám velikosti klubka. Podrobněji bude tento fakt rozebrán později a to v souvislosti s Hugginsovým koeficientem a viskozitním měřením.

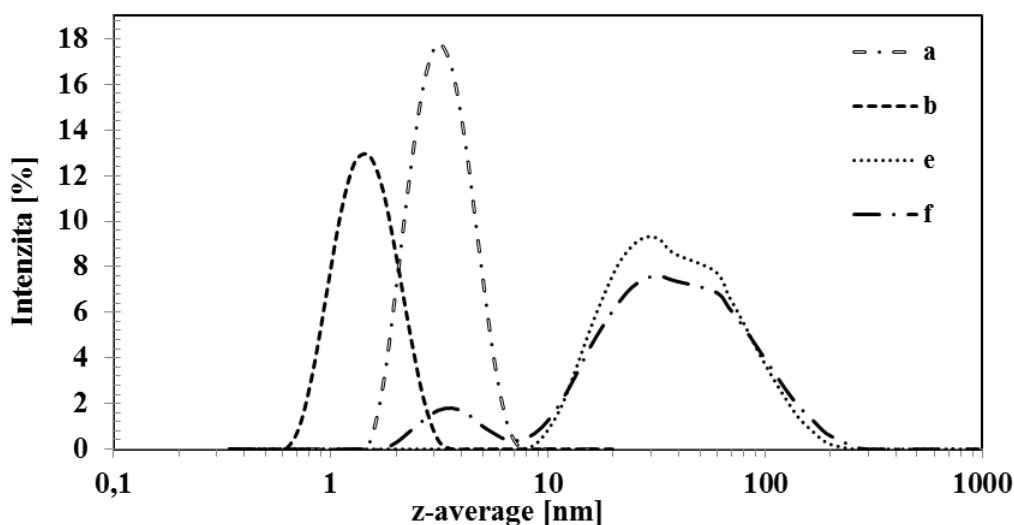
Porovnáním intenzitních distribucí získaných měřeními velikosti částic NaHy rozpuštěného ve fosfátovém pufru, NaHy ve fosfátovém pufru s nejvyšším přídavkem BAC ($c = 4,2 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$) a stejné koncentrace BAC rozpuštěného v de-ionizované vodě a fosfátovém pufru je zobrazeno na obrázku 32 ($M_w = 1,8 \text{ MDa}$) a obrázku 33 ($M_w = 0,35 \text{ MDa}$). Jak je vidět pík reflektující „z-average“ BAC micely v roztoku pufru,

odpovídá piku přítomnému v roztoku NaHy s přidavkem BAC. To znamená, že při této koncentraci BAC je hyaluronový řetězec BAC molekulami plně saturovaný a přebytek volných molekul BAC se podílí na tvorbě micelárních agregátů koexistujících s uskupením polymer-tenzid. To odpovídá změnám ve velikosti částic znázorněným na obr. 28.

Obrázek 32: Intenzitní distribuce roztoku (a) BAC ve fosfátovém pufru, (b) BAC v deionizované vodě, (c) NaHy ($M_w = 1,8$ MDa) ve fosfátovém pufru (d) NaHy ($M_w = 1,8$ MDa) s BAC ($c = 4,2$ mmol·l⁻¹) ve fosfátovém pufru.



Obrázek 33: Intenzitní distribuce roztoku (a) BAC ve fosfátovém pufru, (b) BAC v deionizované vodě, (e) NaHy ($M_w = 0,35$ MDa) ve fosfátovém pufru, (d) NaHy ($M_w = 0,35$ MDa) s BAC ($c = 4,2$ mmol·l⁻¹) ve fosfátovém pufru.



Výsledky, které byly určeny z viskozitního měření, tzn. limitní viskozitní číslo (LVČ) a Hugginsův koeficient (k_H) jsou shrnuty v tabulce 4.

Tabulka 4: Limitní viskozitní číslo a Hugginsova konstanta roztoku NaHy s BAC ve fosfátovém pufru

C-BAC [mmol/l]	$[\eta]$ [100mL·g ⁻¹]	k_H
0	17,7	0,32
0,32	17,8	0,29
0,42	17,4	0,36
2,1	18,6	0,13
3,2	22,5	-0,23
4,2	25,1	-0,27

Interpretace hodnot k_H není jednoduchá a v případě asociace NaHy s BAC se stává ještě mnohem složitější. Nicméně předchozí diskuze založená na měření konformačních změn hyaluronového klubka pomocí DLS, ke kterým dochází v přítomnosti BAC o různých koncentracích, poměrně dobře koreluje s výsledky získanými pomocí viskozitních měření, konkrétně s hodnotou k_H . V případě, že vezmeme v úvahu skutečnost, že polymerní řetězec NaHy je tvořen hydrofobními doménami [74,189], můžeme předpokládat, že ve vodném prostředí budou hydrofilní části NaHy flexibilní, zatímco segmenty tvořené asociáty NaHy-BAC budou spíše tužší. Hugginsův koeficient je parametr popisující konformační chování polymerů a závisí zejména na molekulové hmotnosti polymeru, charakteru rozpouštědla a na síle interakcí mezi polymerem a rozpouštědlem. Výrazně ho ovlivňuje tuhost řetězce, interakce mezi flexibilními a tuhými částmi polymerního řetězce a mezimolekulární hydrodynamické interakcemi s rozpouštědlem. Podle teorie je hodnota k_H získaná z Hugginsovy rovnice (závislosti η_{sp}/c versus c) kladná [9]. Stejná skutečnost byla zjištěna v případě NaHy rozpuštěného ve fosfátovém pufru, kde závislost $\eta_{sp}/$

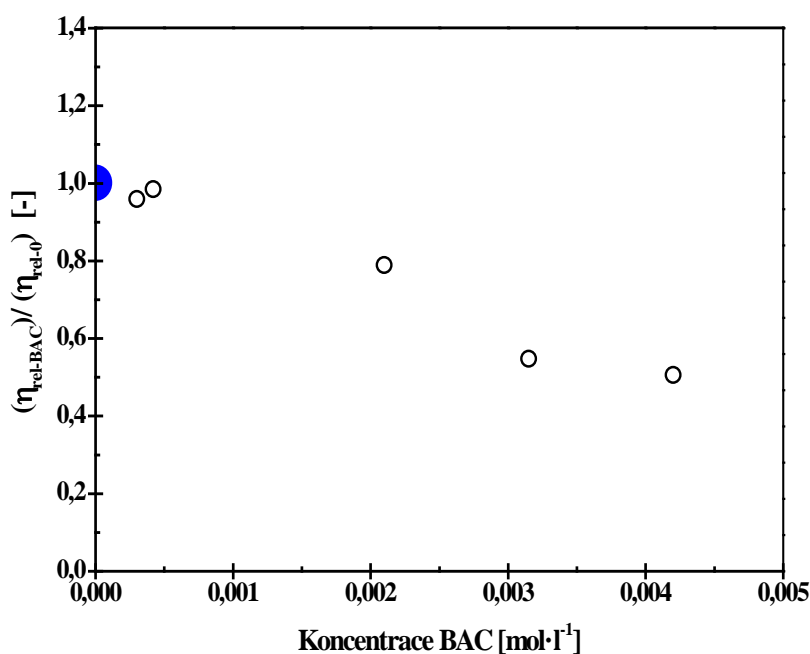
c versus c ukázala očekávaný průběh. Stanovená hodnota Hugginsova koeficientu roztoku hyaluronanu bez přidaného tenzidu ($k_H = 0,32$) odpovídá teoretickým hodnotám prezentovaným v literatuře [162]. Odpovídajícím způsobem byly získány hodnoty Hugginsova koeficientu 0,29 respektive 0,36 pro roztok NaHy s koncentrací BAC $c = 0,32 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ a $c = 0,42 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ (Tab. 4). Stejně jako u velikosti částic, i u Hugginsova koeficientu je patrný mírný pokles, následovaný jeho opětovným nárůstem. Ovšem s rostoucí koncentrací přidávaného tenzidu BAC dochází k dalším změnám. Přidáním koncentrace BAC $c = 0,42 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ dochází k prudkému poklesu k_H na hodnotu 0,13. S dalším zvýšením koncentrace BAC byly zjištěny negativní hodnoty Hugginsova koeficientu, které jsou sice neobvyklé ale nikoli neznámé. Obdobné chování bylo totiž pozorováno u kopolymerů polydimethylsiloxanu a močoviny [179]. Podle této studie poukazuje takovéto chování na rozdílnou flexibilitu a velmi silné interakce polymeru s rozpouštědlem [190]. Efekt klesajících hodnot Hugginsova koeficientu a difúzního koeficientu botnání byl rovněž pozorován v práci autorů Lapčíka a kol., a Mráčka a kol. [191,192] v závislosti na délce alkylového řetězce hydrofobizovaného hyaluronanu [192]. Záporné hodnoty Hugginsovy konstanty mohou být rovněž přisuzovány interakcím působícím mezi hydrofilní a hydrofobní části hyaluronanu vyvolaným přítomností BAC micel, vázaných na hlavní řetězec polymeru případně změnami interakcí polymer-rozpouštědlo.

Jak je vidět z výsledků prezentovaných v tabulce č. 4, hodnoty limitního viskozitního čísla čistého roztoku hyaluronanu a roztoku hyaluronanu s nejnižšími přísadky BAC, zůstávají téměř nezměněny a jsou v souladu s teoretickými hodnotami, které odpovídají vysokomolekulárním polymerům. Jak ve své práci deklarovali Krause a kol. [193], roztoky NaHy ve fosfátovém pufru jsou viskoelastické kapaliny s koncentračně závislou viskozitou, která je typická pro polyelektrolyty s přísadkou solí. Nicméně s rostoucí koncentrací benzalkonia chloridu v roztoku hyaluronanu (nad $c = 2,1 \text{ mmol/l}$) dochází k postupnému zvyšování limitního viskozitního čísla. Teoreticky může být tento nárůst vysvětlen změnou charakteru hyaluronového řetězce, rostoucí molekulovou hmotností, tvorbou aglomerátů, expanzí polymerního klubka

nebo upřednostňováním interakcí polymer-rozpouštědlo, souvisejících právě s rostoucí koncentrací tenzidu.

Kromě limitního viskozitního čísla a Hugginsova koeficientu, byl z relativní kinematické viskozity roztoku NaHy s přidaným BAC ($\eta_{rel-BAC}$) a roztoku čisté NaHy (η_{rel-0}), spočítán viskozitní poměr ($\eta_{rel-BAC}$)/(η_{rel-0}), který představuje relativní příspěvek BAC k celkovému viskozitnímu chování NaHy klubek (viz obr. 34).

Obrázek 34: Vyjádření poměru relativní viskozity a koncentrace BAC (●) NaHy bez BAC, (○) NaHy s BAC.



Z přiložené grafické závislosti (obr. 34) je zřejmé, že přidavek 0,32 mmol·l⁻¹ a 0,42 mmol·l⁻¹ BAC způsobuje pouze nepatrnou změnu relativní viskozity. Ovšem rostoucí koncentrace přidávaného BAC, vyvolá postupný pokles poměru ($\eta_{rel-BAC}$)/(η_{rel-0}), a tedy celkové zmenšení hydrodynamického poloměru klubka vyvolaného přítomným tenzidem. Tento jev je výsledkem smrštění polymerního řetězce způsobeného adsorbci BAC molekul nebo BAC micel na polymerní řetězec. Z toho důvodu lze konstatovat, že data získaná viskozitním měřením jsou v souladu s výsledky měření velikosti částic.

6.2 Chování hyaluronanu v roztocích solí z Hofmeisterovy řady

Vliv solí Hofmeisterovy řady (Na_2SO_4 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, NaSCN , NH_4SCN , NaCl) na velikost, popř. konformaci, klubek NaHy byl studován pomocí dynamického rozptylu světla. Dále bylo sledováno povrchové napětí (SFT) a viskozita roztoků hyaluronanu v souvislosti s typem iontů (chaotropní, kosmotropní a jejich kombinace). Současně byl také studován vliv teploty na konformační stabilitu těchto roztoků hyaluronanu. Jak je patrné z teoretické části disertační práce, vliv iontů Hofmeisterovy řady je intenzivně studován v případě proteinů, které jsou z hlediska své konformace rigidní ve srovnání s polymerními klubky. Chování polysacharidů v těchto typech iontových roztoků není v literatuře příliš popsáno, přestože se (zejména hyaluronan) ve farmacii i medicíně aplikuje téměř výhradně v kombinaci s různými ionty, ať už ve formě roztoků nebo gelů.

6.2.1 Použité materiály a příprava vzorků

6.2.1.1 Materiály

V této části experimentální práce byly použity následující materiály:

- Sodná sůl kyseliny hyaluronové (**NaHy**), $M_w = 1,8 - 2,1$ MDa, Contipro Ltd., Česká republika
- Síran sodný (**Na₂SO₄**) – (≥ 99 %), Sigma Aldrich
- Síran amonný – (**(NH₄)₂SO₄**) – (≥ 99 %), Sigma Aldrich
- Thiokyanát sodný – (**NaSCN**), (≥ 98 %), Sigma Aldrich
- Thiokyanát amonný – (**NH₄SCN**), ($\geq 97,5$ %), Sigma Aldrich
- Chlorid sodný – (**NaCl**), Fluka
- De-ionizovaná voda (**DEMI**) – **H₂O**

6.2.1.2 Příprava vzorků

Pro měření byly připraveny roztoky Hofmeisterových solí o iontové síle $I = 0,1$ mol/l, ve kterých byl rozpuštěna sodná sůl kyseliny hyaluronové ($M_w=1,8-2,1$ MDa).

Roztok hyaluronanu (0,1 hm. %), byl připraven jeho rozpuštěním v Na₂SO₄, (NH₄)₂SO₄, NaSCN, NH₄SCN a NaCl, které probíhalo za neustálého míchání při teplotě 50 °C po dobu 24 hodin.

Pro lepší představu, byla iontová síla použitých solí z Hofmeisterovy řady přepočítána na počet molekul, připadajících na jednu molekulu hyaluronanu nebo jeden mer NaHy podle níže uvedeného příkladu.

Zadané parametry:

$$M_{w(NaHy)} = 1,8-2,1 \text{ MDa}, c_{NaHy} = 0,513 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot l^{-1},$$

$$M_{w(Na_2SO_4)} = 142,04 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}, c_{(Na_2SO_4)} = 0,033 \text{ mol} \cdot l^{-1},$$

$$M_{w(1 \text{ meru NaHy})} = 395,3 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1},$$

a) Stanovení počtu molekul

$$\frac{M_{w(NaHy)}}{M_{w(1 \text{ meru NaHy})}} = \frac{1,95 \cdot 10^6}{395,3} = \underline{4933} \text{ merů v NaHy} \quad (32)$$

$$n_{(NaHy)} = c_{(NaHy)} \cdot V = 0,513 \cdot 10^{-6} \cdot 0,01 = \underline{5,13 \cdot 10^{-9}} \text{ mol} \quad (33)$$

$$N_{(NaHy)} = N_A \cdot n_{(NaHy)} = 6,023 \cdot 10^{23} \cdot 5,13 \cdot 10^{-9} = \underline{3,09 \cdot 10^{15}} \text{ molekul } \Lambda \quad (34)$$

b) Stanovení počtu molekul Na₂SO₄ připadajících na 1 mer NaHy pro $I = 0,1 \text{ mol} \cdot l^{-1}$

1

$$n_{(Na_2SO_4)} = c_{(Na_2SO_4)} \cdot V = 0,033 \cdot 0,01 = \underline{0,33 \cdot 10^{-3}} \text{ mol} \quad (35)$$

$$N_{(Na_2SO_4)} = N_A \cdot n_{(Na_2SO_4)} = 6,023 \cdot 10^{23} \cdot 0,33 \cdot 10^{-3} = \underline{1,99 \cdot 10^{20}} \text{ molek} \quad (36)$$

$$\frac{N_{Na_2SO_4}}{N_{NaHy}} = \frac{1,99 \cdot 10^{20}}{3,09 \cdot 10^{15}} \quad (37)$$

$$= \underline{64323} \text{ molekul } Na_2SO_4 \text{ na 1 molekulu } NaHy$$

$$\frac{N_{Na_2SO_4}}{N_{merů \ NaHy}} = \frac{64323}{4933} = \underline{13} \text{ molekul } Na_2SO_4 \text{ na 1 mer } NaHy \quad (38)$$

Přidávky zvolených solí, které byly do roztoku NaHy přidávány v koncentracích odpovídající určitému počtu molekul soli (N_{soli}) připadajících na 1 mer NaHy, jsou přiloženy v tabulce č. 5.

Tabulka 5: Počet molekul soli, který připadá 1 mer NaHy.

sůl	N_{soli}
Na_2SO_4	13
$(NH_4)_2SO_4$	13
$NaSCN$	40
NH_4SCN	40
$NaCl$	40

Velikost částic NaHy v roztoku Na_2SO_4 , $(NH_4)_2SO_4$, $NaSCN$, NH_4SCN , $NaCl$ byla stanovena v teplotním intervalu $5^\circ C - 65^\circ C$. Pro měření velikosti částic byly připravené vzorky ředěny v poměru 1:4 (NaHy:roztok soli) a následně filtrovány přes $0,22 \mu m$ PTFE mikro filtry.

Ke stanovení limitního viskozitního čísla a Hugginsovy konstanty 0,1 hm. % roztoku NaHy rozpuštěného v Na_2SO_4 , $(NH_4)_2SO_4$, $NaSCN$, NH_4SCN , $NaCl$, byl roztok ředěn do pěti různých koncentrací: $0,513 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot l^{-1}$, $0,359 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot l^{-1}$, $0,256 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot l^{-1}$, $0,128 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot l^{-1}$, $0,513 \cdot 10^{-7} \text{ mol} \cdot l^{-1}$. Měření probíhalo při teplotě $25^\circ C$.

Povrchové napětí NaHy v roztocích de-ionizované vody, Na₂SO₄, (NH₄)₂SO₄, NaSCN, NH₄SCN, NaCl bylo měřeno v závislosti na čase (v průběhu 5 minut) při teplotě 15, 20, 25, 30, 35, 40 a 45°C.

6.2.2 Diskuze a výsledky

Pro přehlednost a srozumitelnost bude následující kapitola tématicky rozdělena do tří částí na diskuzi výsledků; chaotropní ionty, kosmotropní ionty a jejich kombinace.

6.2.2.1 Chaotropní ionty (CH-I)

I. Chování ve vodě

a. Viskozita

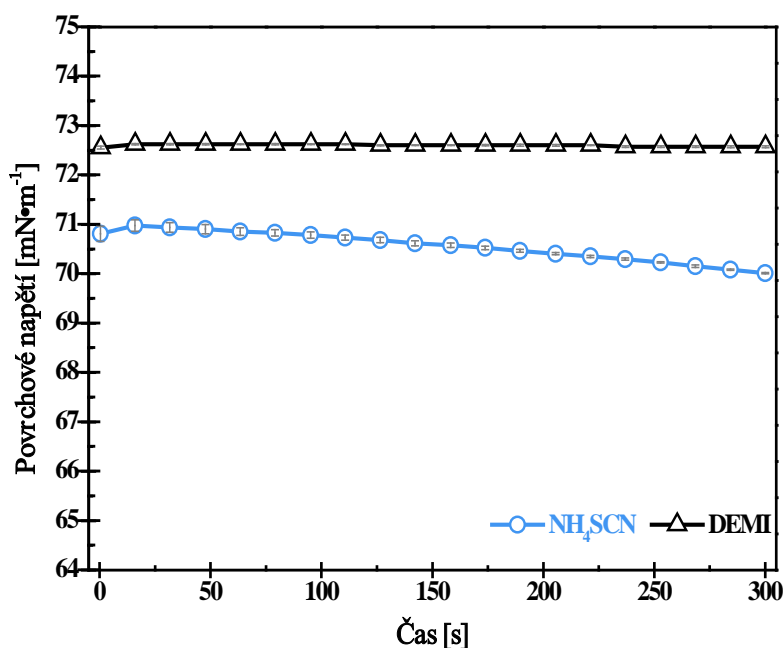
Mezi první autory, kteří potvrdili, že přidavek některých solí zvyšuje viskozitu vody (např. litium nitrát), zatímco jiné jí snižují, patří Poiseuille [115]. Podle jiného autora Applebeye [194], který se zabýval viskozitou roztoků různých solí, lze vliv, ve vodě rozpuštěných iontů na viskozitu, rozdělit na dva hlavní efekty: (1) snížení viskozity vyvolané rozpadem molekulárních klastrů vody, (H₂O)₃, na jednoduché molekuly a (2) zvýšení viskozity, kterou způsobí přítomnost iontů solí a neionizované molekuly solí. V případě solí, které nejsou plně hydratovány jako např. Cs⁺, Rb⁺, K⁺, NH₄⁺, I⁻, Br⁻, NO₃⁻ je pokles viskozity vyvolán spíše díky rozpadu klastrů molekul vody. Většina iontů je však plně hydratována, a předpokládá se u nich nárůst viskozity [116]. Podle Collinse [195] lze konstatovat, že relativní viskozita chaotropních iontů klesá s klesající teplotou.

b. Povrchové napětí (SFT)

Povrchové a mezifázové napětí poskytuje nepřímou informaci o rozložení iontů v blízkosti povrchu. Heydweiller [196], který se ve své práci zabýval povrchovým napětím různých roztoků elektrolytů zjistil, že přidavek soli ovlivňuje povrchové napětí měřeného roztoku na fázovém rozhraní voda-vzduch. Zjistil, že jednotlivé

anionty z Hofmeisterovy řady solí mají výrazný vliv na povrchové napětí, zatímco u kationtů je tento vliv nevýrazný. Obecně lze říci, že přítomnost chaotropních iontů vyvolává pokles povrchového napětí [29,196]. Tuto skutečnost potvrzují výsledky měření (viz obr. 35), kde je zobrazeno srovnání časového průběhu povrchového napětí vodného roztoku thiokyanátu amonného (NH_4SCN) s de-ionizovanou vodou (DEMI). Z těchto výsledků je zřejmé, že povrchové napětí de-ionizované vody je $72,6 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ a v průběhu jeho měření ($t = 300\text{s}$) nedochází k jeho žádnému výraznému poklesu. Naopak přidáním NH_4SCN ($I=0,1\text{M}$) do roztoku de-ionizované vody, byl zaznamenán pokles SFT a to na hodnotu $\gamma = 70,6 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$. Z uvedené časové závislosti pro NH_4SCN je vidět, že v průběhu měření ($t = 300\text{s}$) hodnota povrchového napětí ještě dále poklesla o 1,1%, pravděpodobně díky organizaci iontů na rozhraní. Rozpuštění velkých iontů jako je např. NH_4^+ vede k pozitivní entropické změně, což znamená, že chaotropní ionty narušují pravidelné uspořádání molekul vody [128]. Pokles povrchového napětí by mohl být přisuzován postupné ztrátě solvatační vrstvy chaotropních iontů a jejich následnou adsorpcí přímo na povrchu mezifázového rozhraní [29]. Podle Boströma a kol. [197], jsou za iontovou adsorpcí zodpovědné disperzní síly úměrné jejich polarizovatelnosti. Zcela jiného názoru jsou Levin a kol., podle kterých je adsorpce iontů způsobena hydrofobními interakcemi [29,198].

Obrázek 35: Porovnání časového průběhu povrchového napětí de-ionizované vody (Δ) a roztoku chaotropních iontů NH_4SCN ($I=0,1\text{M}$) (\circ). Stanoveno při teplotě $T = 25^\circ\text{C}$.



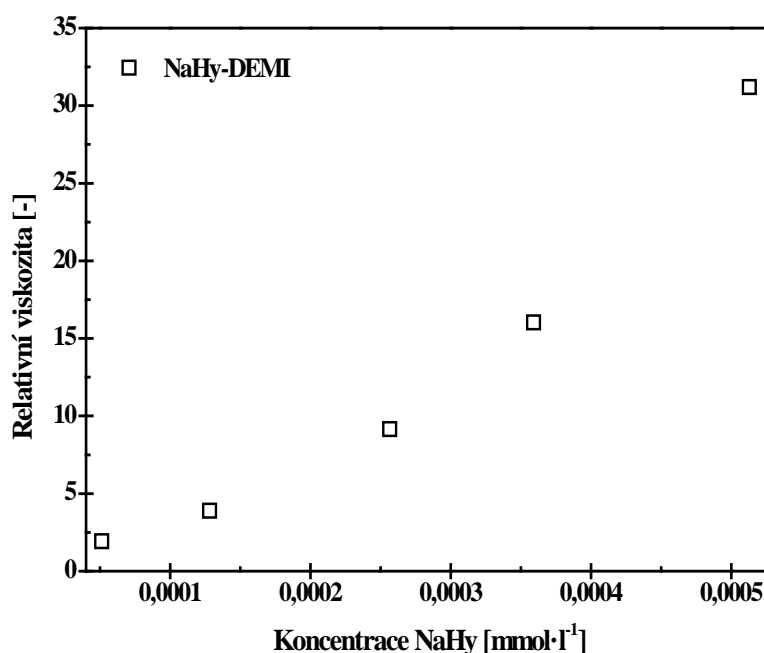
II. Chování v systému iont-NaHy-voda (CH-I—NaHY—DEMI)

a. Viskozita

Změny tvaru makromolekuly se výrazněji projevují především u polyelektrolytů. Proto viskozita roztoků polyelektrolytů silně závisí na koncentraci polymeru a jeho ionizačním stupni, kdy elektrostatické síly přítomných skupin mohou bránit sbalení řetězce, ale také na přítomnosti a druhu malých iontů, které ionizaci ovlivňují [149]. V roztoku bez přidaných solí, mohou coulombické interakce, působící mezi náboji hlavního polymerního řetězce polyelektrolytu, způsobovat natažení jeho jednotlivých částí, a ovlivnit tak reologické chování polyelektrolytů. Vhodný přírůstek protiontu, může naopak zastínit elektrostatické interakce, které působí mezi náboji na polymerním řetězci, a umožnit polymerní molekule zaujmout sbalenější a kompaktnější konformaci. Stupeň sbalení řetězce polymeru bude záviset na tuhosti polymerního řetězce v roztoku. Jak už bylo několikrát zmíněno, přírůstek soli do roztoku polyelektrolytu má výrazný vliv na jeho reologické chování. Ve zředěných a částečně zředěných roztocích, se sbalení polymerního řetězce projeví poklesem viskozity. Naopak u některých polyelektrolytů (některé přírodní kationické a anionické

polymery, syntetické polymery) způsobují vznikající vodíkové vazby zastínění elektrostatických repulzí, které se projeví zvýšením viskozity. Repulzivní interakce, působící v jedné části polymerního řetězce, vyvolávají vzájemný kontakt v jeho jiné části, což přispívá ke vzniku vodíkových vazeb. Vodíkové vazby, které mezi jednotlivými částmi polymerních řetězců vznikají, znesnadňují jejich vzájemný pohyb v roztoku a ve výsledku přispívají ke zvýšení viskozity. V případě, že množství přidané soli bude dostatečně vysoké (počet přidaných iontů bude větší než počet volných protiontů v roztoku), může být vliv elektrostatických interakcí zanedbatelný a polymer se bude projevovat neutrálním chováním [33]. Závislost relativní viskozity NaHy v de-ionizované vodě, která byla určena při teplotě $T=25^{\circ}\text{C}$, je přiložena v grafu (viz obr. 36).

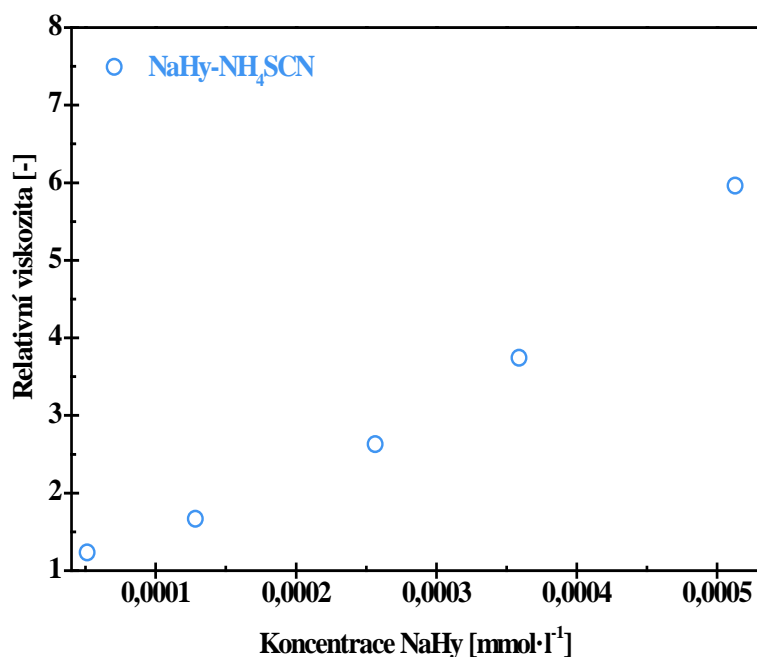
Obrázek 36: Závislost relativní viskozity NaHy v de-ionizované vodě (\square) na koncentraci stanovené při teplotě $T = 25^{\circ}\text{C}$.



Z uvedeného grafu (obr. 36) je vidět, že relativní viskozita NaHy o koncentraci $c = 0,513\cdot 10^{-3}\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ je $31\pm 0,02$ a s klesající koncentrací NaHy, její hodnota klesá a to až na hodnotu $1,9\pm 0,000082$ ($c = 0,513\cdot 10^{-4}\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$). Hodnoty měřené viskozity jsou

poměrně vysoké ($31 \pm 0,02$) a lze z toho usuzovat, že konformace NaHy řetězce jsou ve srovnání s viskozitou roztoků NaHy s přidanými ionty (obr. č. 37, 44, 51, 52, 110) pravděpodobně mnohem rozbalenější. Tuto skutečnost potvrzuje i velikost částic, která se u NaHy, rozpuštěného pouze ve vodě, pohybuje kolem hodnoty 286 nm (viz obr. 39). Přidání chaotropních iontů do roztoku NaHy, se projeví výrazným poklesem viskozity, který je zobrazen v grafu (viz obr. 37).

Obrázek 37: Závislost relativní viskozity systému NaHy- NH_4SCN ($I=0,1M$) (\circ) na koncentraci stanovené při teplotě $T = 25^\circ\text{C}$.



Výsledky relativní viskozity pro systém NH_4SCN -NaHy (obr. 37) ukazují, že u nejvyšší koncentrace ($c = 0,513 \cdot 10^{-3} \text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$) NaHy došlo k výraznému snížení viskozity z hodnoty $31 \pm 0,02$ (čistá NaHy, viz obr. 36) na hodnotu $6 \pm 0,003$ (NaHy- NH_4SCN , viz obr. 37) a stejně jako u čisté NaHy, se její hodnota s klesající koncentrací snižuje a to až na hodnotu $1,2 \pm 0,0017$. Je známo, že přidavek monovalentních solí do roztoku polyelektrolytu, se projeví snížením jeho viskozity. Přidané soli totiž zastíní elektrostatické repulze mezi podobnými náboji umístěnými podél polymerního řetězce, které se projeví sbalením polymerního klubka, doprovázeným poklesem viskozity roztoku [33]. Sbalení polymerního klubka NaHy v prostředí NH_4SCN potvrzují i výsledky získané z měření velikosti částic (obr. 41).

Velikost částic NaHy přidáním NH_4SCN do jejího roztoku klesne až na hodnotu 68 nm a navíc je při sledování teplotní závislosti, až do 24°C konstantní (obr. 42) ve srovnání s NaHy ve vodě (obr. 40).

Kromě relativní viskozity byly z viskozitního měření určeny další dva parametry, limitní viskozitní číslo $[\eta]$ a Hugginsův koeficient (k_H). Hodnoty limitního viskozitního čísla a Hugginsova koeficientu pro NaHy v de-ionizované vodě, včetně všech přidávaných solí, jsou uvedeny v tabulce č. 6.

Tabulka 6: Limitní viskozitní číslo a Hugginsův koeficient NaHy rozpuštěného v de-ionizované vodě, Na_2SO_4 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, NaSCN , NH_4SCN .

sůl	$[\eta]$ [$100\text{mL}\cdot\text{g}^{-1}$]	k_H [-]
NaHy-DEMI	59,4	0,66
Na_2SO_4	21,6	0,72
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	18,5	0,95
NaSCN	20,7	0,73
NH_4SCN	19,4	0,78

Hugginsův koeficient, jak už bylo naznačeno v kapitole 6.1 experimentální části, je parametr odrážející interakce polymeru s rozpouštědlem a tedy ovlivňující konformaci polymeru. Hodnota k_H pro pevné polymery kulovitěho tvaru může dosahovat až hodnoty 2, zatímco u flexibilních polymerů, jakým je NaHy, by se k_H měl pohybovat v rozmezí hodnot 0,35-0,4 [199]. Hugginsův koeficient, který byl stanoven u roztoku NaHy v de-ionizované vodě, odpovídá hodnotě 0,66. Na základě této hodnoty, lze konstatovat, že pro roztoky NaHy se voda z pohledu kvality rozpouštědla, jeví spíše jako špatné rozpouštědlo, a NaHy zaujímá ve vodě sbalenou konformaci. Hodnoty k_H stanovené pro NaHy rozpuštěného ve vodných roztocích jednotlivých solí ukazují, že vůči roztoku NaHy ve vodě, jeho hodnota roste z 0,66 na 0,72 (Na_2SO_4) nebo až na 0,95 ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$). To by znamenalo, že v případě ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) převládá spíše vliv kosmotropního aniontu, který výrazně zhoršuje rozpustnost. Srovnáme-li uvedené výsledky s hodnotami k_h stanovenými pro NaHy v NaSCN lze konstatovat, že zde

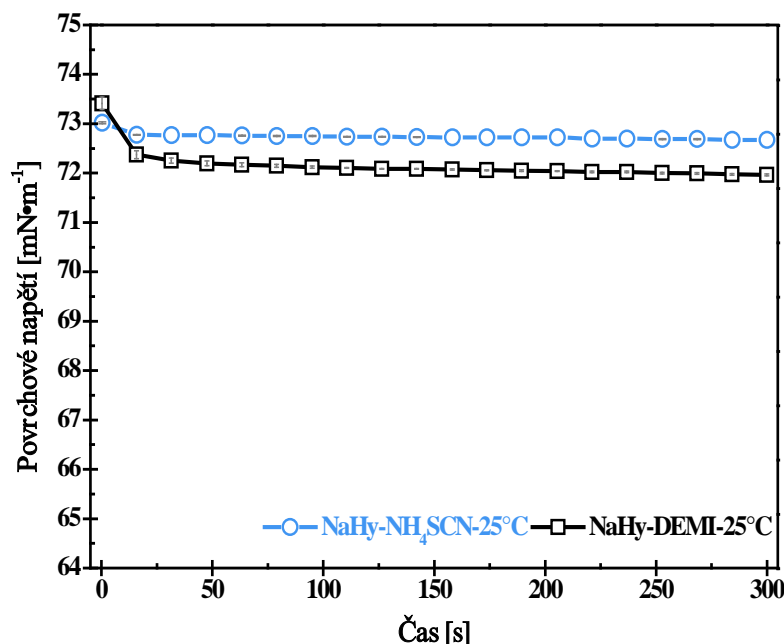
převládá spíše vliv chaotropního aniontu. Získané výsledky odpovídají obecné platnosti, že k_H s rostoucí iontovou silou roste, tzn., klesá rozpustnost polymeru. Jinými slovy, že intenzita interakcí polymer-rozpouštědlo klesá, zatímco intenzita interakcí polymer-polymer asociací roste [200]. Zajímavé ovšem je, že při sledování teplotního trendu velikosti částic a povrchového napětí, která bude nastíněna v další části textu, byl prokázán opak.

Při porovnání roztoku NaHy ve vodě s jeho roztoky ve vybraných solích, je vidět, že hodnoty limitního viskozitního čísla klesají. Největší pokles byl zaznamenán u $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, kde LVC klesá z hodnoty $59,4 \text{ 100mL}\cdot\text{g}^{-1}$ stanoveného pro NaHy v demineralizované vodě na hodnotu $18,5 \text{ 100mL}\cdot\text{g}^{-1}$. Naopak nejmenší pokles LVC se projevuje u kosmotropních iontů Na_2SO_4 a to z hodnoty $59,4 \text{ 100mL}\cdot\text{g}^{-1}$ na hodnotu $21,6 \text{ 100mL}\cdot\text{g}^{-1}$. Výrazný pokles limitního viskozitního čísla NaHy v přítomnosti vybraných solí může být vysvětlen právě již zmíněným stíněním elektrostatických repulzí, při kterém může přidaná sůl iniciovat tvorbu kompaktnější struktury polymeru. Podle Tsain a kol. [201] souvisí limitní viskozitní číslo s objemem, který makromolekula zaujímá v roztoku, a s rostoucí iontovou silou pak klesá.

b. Povrchové napětí

Jak už bylo popsáno na začátku kapitoly 1.1.2.1, přítomnost chaotropních iontů vyvolává pokles povrchového napětí, který může být vysvětlen jejich adsorpcí na povrchu fázového rozhraní [29,196]. Platnost tohoto tvrzení byla ověřena měřením povrchového napětí roztoku NH_4SCN ($I = 0,1\text{M}$) v de-ionizované vodě (viz obr. 35). Ovšem časová závislost povrchového napětí NH_4SCN v přítomnosti NaHy při iontové síle $I = 0,1\text{M}$ (viz obr. 38) ukazuje zcela jiný průběh, který lze vysvětlit pravděpodobným interakčním chováním hyaluronanu s přidanými chaotropními ionty.

Obrázek 38: Porovnání časového průběhu povrchového napětí systému NaHy v de-ionizované vodě (DEMI) (\square) a NaHy s přidavkem chaotropních iontů NH_4SCN ($I=0,1\text{M}$) (\circ). Stanoveno při teplotě $T = 25^\circ\text{C}$.



Výsledky analýz ukazují, že povrchové napětí systému NaHy-NH₄SCN při teplotě 25°C je vyšší než hodnota povrchového napětí NaHy v de-ionizované vodě ($\gamma = 72,1 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$). Z časového průběhu je navíc vidět, že povrchové napětí NaHy ve vodě klesá o 2 %, což znamená, že dochází k reorganizaci polymeru na fázovém rozhraní kapalina-vzduch. Přidáním NH₄SCN ($I = 0,1\text{M}$) do roztoku NaHy hodnota SFT vzroste na hodnotu $\gamma = 72,7 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ a v průběhu měření ($t = 300\text{s}$) pak klesne pouze o 0,5 %. Pokud srovnáme povrchové napětí NH₄SCN ve vodě (obr. 35) a NH₄SCN v roztoku s NaHy (obr. 38) zjistíme, že v přítomnosti NaHy jeho hodnota vzrostla z $\gamma = 70,6 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ na $\gamma = 73,0 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$. V důsledku disociace Na⁺ kationtů, které do roztoku přechází z řetězce NaHy, pravděpodobně může docházet k vytvoření kosmotropně-chaotropního iontového páru, jehož důsledkem je oddělení molekul vody a neschopnost vytvářet silné iontové páry [120]. Kationty a anionty se stejnou velikostí iontu mají tendenci vytvářet kontaktní iontové páry a snížit tak svou hydrataci. Soli s různou velikostí kationtů a aniontů naopak vytváří s rozpouštědlem oddělené iontové páry, které mají omezenou schopnost reorientace molekul vody. U

Na^+ a SCN^- iontů tak bude málo pravděpodobné, že vytvoří přímé iontové páry, ale naopak budou více interagovat s rozpouštědlem [202]. Proto by mohl být nárůst povrchového napětí v přítomnosti chaotropního iontu důsledkem vytlačení chaotropních iontů z povrchu fázového rozhraní ionty sodnými. Ionty Na^+ pocházející z NaHy řetězce, se budou nacházet v dostatečné vzdálenosti od povrchu, a tím pravděpodobně přispějí k nárůstu SFT.

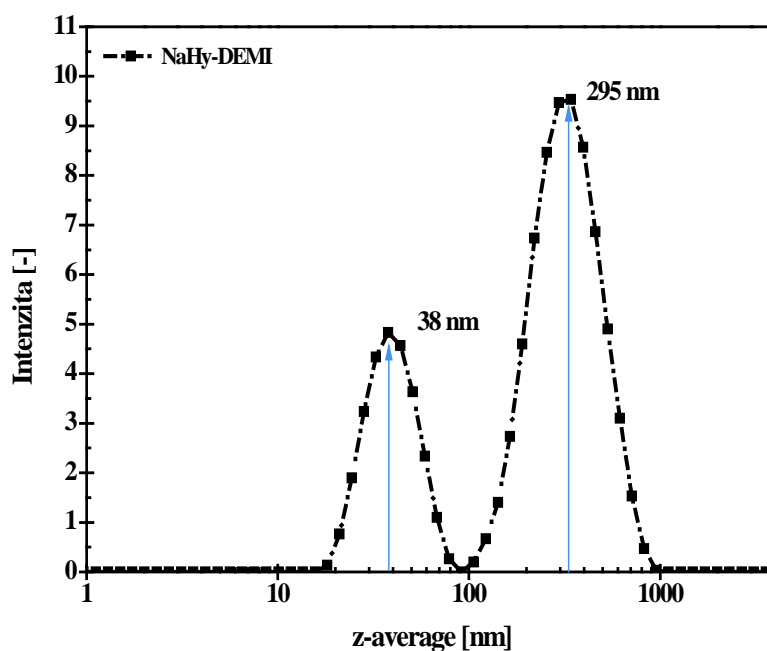
Zajímavých výsledků bylo dosaženo, u srovnání časových závislostí hodnot povrchového napětí roztoků NH_4SCN v NaHy (obr. 75-80) a NaHy ve vodě stanovených při různých teplotách (obr. 73), které jsou součástí přílohy C. Z teplotního trendu SFT, lze vidět, že v rozmezí teplot 15-35°C povrchové napětí NaHy pozvolna klesá (obr. 73). Nejnižší rozdíl SFT zaznamenaný v časovém rozmezí $t = 300\text{s}$, byl naměřen u teplot 20 °C, 30 °C a 35 °C a to 1,3%. Naopak nejvyšší pokles v hodnotě povrchového napětí je vidět při teplotách 40 °C a 45 °C. Při těchto teplotách je rozdíl v hodnotách povrchového napětí stanovený v průběhu měření ($t = 300\text{s}$) 4,5% respektive 4,1%. To znamená, že u takto vysokých teplot, roste mobilita polymerního řetězce NaHy, která se projevuje snahou NaHy se samo-organizovat na fázovém rozhraní a tím snižovat povrchové napětí. Snaha s jakou se polymer bude reorganizovat na povrchu, může být ovlivněna molekulovou hmotností polymeru, tuhostí či rozdílnou flexibilitou polymerních řetězců, ale i koncentrací polymeru. Studium vlivu rozdílné teploty a koncentrace na povrchové napětí hyaluronanu v roztoku NaCl se zabývali, Ribeiro a kol. [203]. Podle těchto autorů, povrchové napětí nejvýrazněji klesá v koncentračním rozmezí 2,2-3 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$, tedy v oblasti, ve které se začíná projevovat vliv vzájemného zaplétání polymerních řetězců [203]. Z teplotního trendu systému NaHy- NH_4SCN (obr. 75-80) je vidět, že SFT se mění nejvýrazněji při teplotách 30, 35, 40 a 45°C. V tomto teplotním rozsahu je registrován pokles povrchového napětí o 2,4%, 4,1%, 4,3% a 7,1%. Zajímavé je, že přítomnost chaotropních iontů u teplot 20 °C a 25 °C povrchové napětí NaHy zvyšuje. Při teplotách 15, 20 a 25°C je v průběhu měření ($t = 300\text{s}$) SFT nižší pouze o 0,3%, 0,4%

a 0,3%. V teplotním rozmezí 15, 30, 35, 40 a 45 °C ionty NH_4SCN povrchové napětí NaHy snižují.

c. Velikost částic

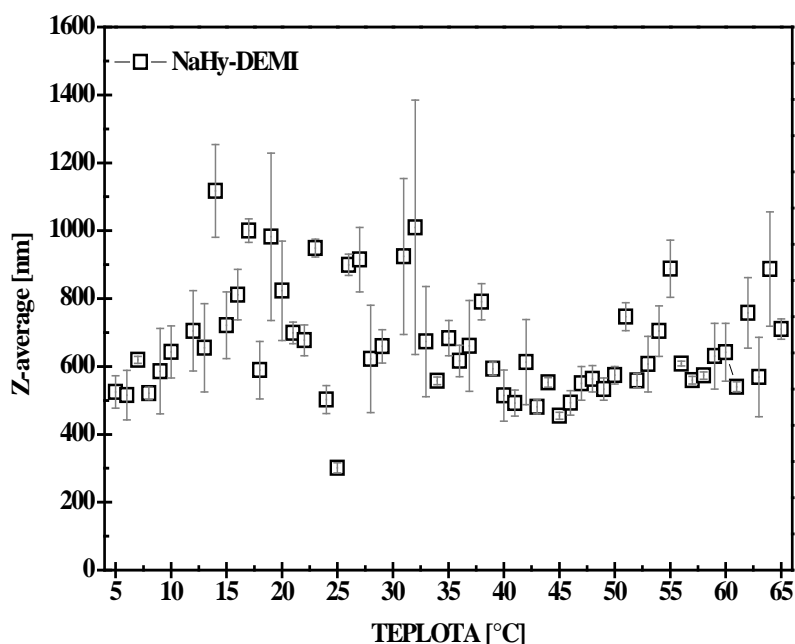
Při stanovení střední velikosti částic NaHy rozpuštěného v de-ionizované vodě (obr. 39), se ve výsledné intenzitní distribuci dají nalézt dva typy částic. Prvním typem jsou částice, s velikostí 295 nm, a druhým typem jsou částice, jejichž velikost odpovídá 38 nm.

Obrázek 39: Intenzitní distribuce velikosti částic NaHy v de-ionizované vodě při teplotě $T=25^\circ\text{C}$. Střední velikost částic (z-average) odpovídá hodnotě 286 nm.



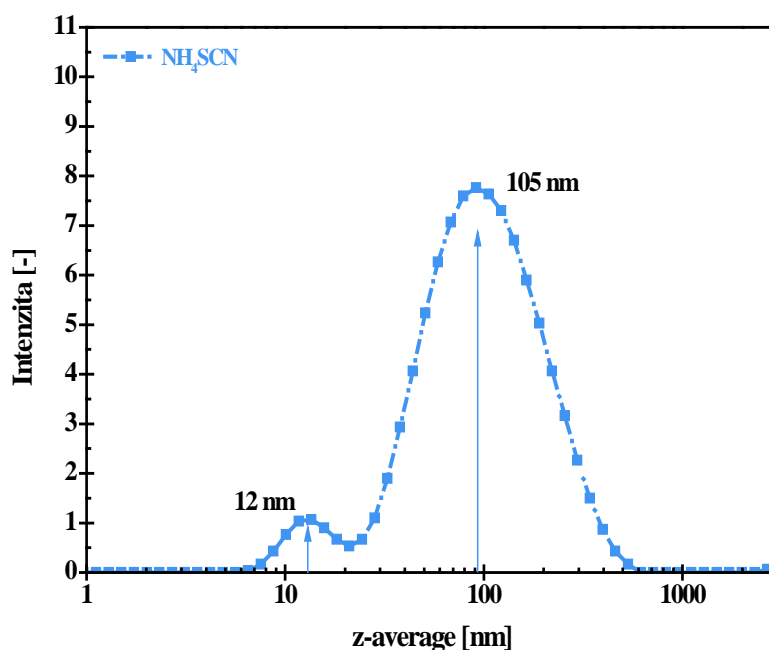
Na základě těchto výsledků, tak můžeme konstatovat, že NaHy zaujímá ve vodě volnější konformaci, což potvrzují i výsledky stanovené z viskozitního měření. Kromě teplotního trendu povrchového napětí, bylo provedeno srovnání velikostí částic, které byly stanoveny v rozsahu teplot od 5 °C do 65 °C. Teplotní závislost střední velikosti částic NaHy rozpuštěného ve vodě je vidět na obr. 40.

Obrázek 40: Teplotní závislost střední velikosti částic (z-average) NaHy v deionizované vodě (DEMI) (□).



Teplotní závislost velikosti částic čistého hyaluronanu ve vodě ukazuje, že velikost částic měřená metodou dynamického rozptylu světla je těžko interpretovatelná. Z průběhu závislosti hodnot střední velikosti částic v celém teplotním rozsahu (obr. 40) lze usuzovat, že polymerní řetězec může zaujímat rozvolněnou konformaci. Naopak bude-li se NaHy nacházet v prostředí soli, mělo by dojít k jeho výraznému sbalení. Střední velikost částic systému NaHy-NH₄SCN, stanovená při 25°C, je vidět v grafu (viz obr. 41).

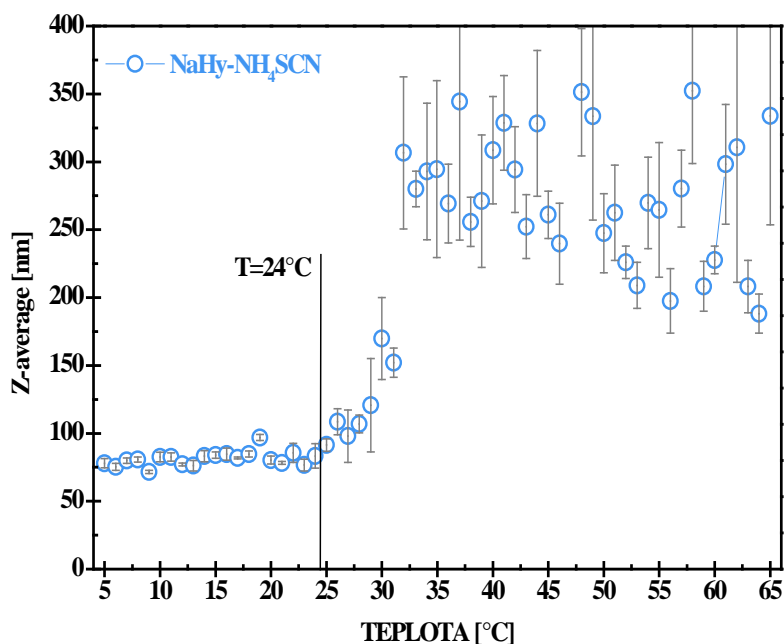
Obrázek 41: Intenzitní distribuce velikosti částic systému NaHy v prostředí NH_4SCN ($I=0,1\text{M}$) při teplotě $T=25^\circ\text{C}$. Střední velikost částic (z-average) odpovídá hodnotě 68 nm.



Přídavek 0,1M NH_4SCN do roztoku NaHy, způsobí sbalení polymerního řetězce, které se projeví poklesem velikosti částic z hodnoty 286 nm (NaHy-DEMI) na hodnotu 68 nm (NaHy- NH_4SCN). Pokles velikosti částic, ke kterému pravděpodobně dochází v důsledku zastínění elektrostatických repulzí působících mezi náboji na polymerním řetězci [33], odpovídá poklesu relativní viskozity systému NaHy- NH_4SCN (viz obr. 37).

Z výsledků teplotního trendu systému NaHy- NH_4SCN (viz obr. 42) je vidět, že velikost částic se do teploty 24°C výrazněji nemění. Do této teploty se střední velikost částic pohybuje v rozmezí 70-80 nm a vykazuje pouze minimální změny. Překročením této teploty dochází k výraznému rozptylu hodnot z-average, patrně souvisejícím s větší mobilitou polymerního řetězce.

Obrázek 42: Teplotní závislost střední velikosti částic (z-average) systému NH_4SCN - NaHy (\circ). Velikost částic NaHy je v prostředí NH_4SCN stabilní do teploty $T=24^\circ\text{C}$.



6.2.2.2 Kosmotropní ionty (K-I)

I. Chování ve vodě

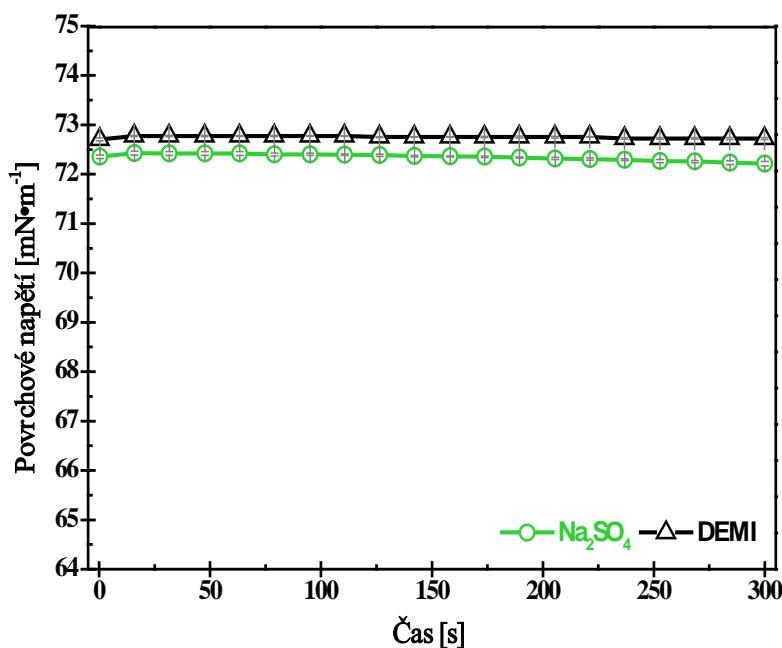
a. Viskozita

Kosmotropní ionty se výrazně podílí na uspořádání molekul vody v roztoku, a tím zvyšují jeho viskozitu. Podle Collinse [195], relativní viskozita kosmotropních iontů roste s klesající teplotou, protože se při nižších teplotách více projevují Hofmeisterovy interakce. S klesající teplotou má totiž rozpuštěná látka tendenci zaujímat v roztoku ne-uniformní distribuci a čím dál tím více vytvářet s molekulami vody klastry, které se vzdalují od povrchu [195]. Kosmotropní chování kationtů může být v přítomnosti kosmotropních aniontů omezeno [129].

b. Povrchové napětí

Jak už bylo řečeno, kosmotropní ionty mají kolem sebe těsně vázané molekuly vody. Tyto ionty zvyšují povrchové napětí, ke kterému dochází v důsledku jejich vzdalování z povrchu. Jednou z příčin, proč tyto ionty upřednostňují objemovou solvataci a zdržují se v objemové fázi roztoku, jsou silné disperzní interakce, které působí mezi ionty a molekulami vody [29]. Při porovnání časového průběhu povrchového napětí de-ionizované vody v přítomnosti kosmotropních iontů (viz obr. 43) bylo zjištěno, že hodnota povrchového napětí Na_2SO_4 je téměř srovnatelná s povrchovým napětím vody. Povrchové napětí roztoku Na_2SO_4 pokleslo z hodnoty $72,6 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ (voda) na hodnotu $72,4 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ a v průběhu měření tzn. $t = 300\text{s}$ nebyla zaznamenána jeho výraznější změna. Celkový pokles SFT roztoku Na_2SO_4 odpovídá 0,2%. V tomto případě tak bylo jasně prokázáno, že vybrané kosmotropní ionty při zvolené koncentraci nemají výrazný vliv na změnu povrchového napětí.

Obrázek 43: Porovnání časového průběhu povrchového napětí de-ionizované vody (Δ) a kosmotropních iontů Na_2SO_4 ($I=0,1\text{M}$) (\circ), stanoveného při teplotě $T = 25^\circ\text{C}$.

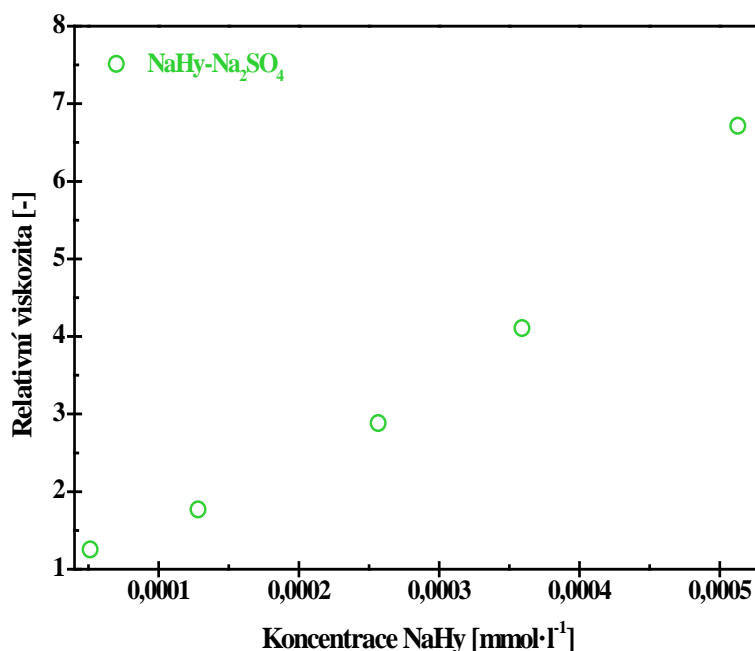


II. Chování v systému iont-NaHy-voda (K-I—NaHy—DEMI)

a. Viskozita

Závislost relativní viskozity systému NaHy-Na₂SO₄ na koncentraci NaHy ilustruje obrázek obr. 44. Stejně jako u chaotropních iontů, dochází v přítomnosti kosmotropních iontů k výraznému snížení viskozity.

Obrázek 44: Závislost relativní viskozity systému NaHy-Na₂SO₄ ($I=0,1M$) (○) na koncentraci stanovené při teplotě $T = 25^{\circ}C$.

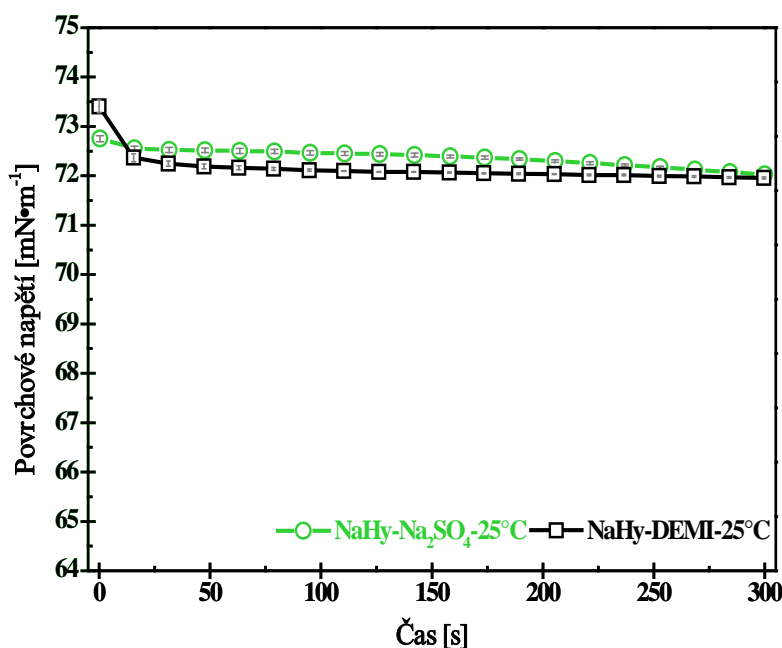


Relativní viskozita klesá z hodnoty $6,7 \pm 0,0017$ ($c = 0,513 \cdot 10^{-3} \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$) na hodnotu $1,3 \pm 0,0011$ ($c = 0,513 \cdot 10^{-4} \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$). Při porovnání účinku chaotropních a kosmotropních iontů na viskozitu NaHy, je vidět, že mezi nimi dochází k nepatrnému rozdílu. Nicméně chaotropní ionty, v našem případě NH₄SCN, viskozitu NaHy snižují účinněji. Největší rozdíl v poklesu viskozity je patrný u nejvyšší měřené koncentrace ($c = 0,513 \cdot 10^{-3} \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$). Hodnota relativní viskozity u NaHy-NH₄SCN odpovídá $6,0 \pm 0,003$, zatímco u NaHy-Na₂SO₄ $6,7 \pm 0,0017$. Lze proto tvrdit, že chaotropní ionty viskozitu snižují výrazněji.

b. Povrchové napětí

Kosmotropní ionty by se měly významně podílet na zvyšování povrchového napětí. Při porovnávání jejich účinků ve vodě, bylo zjištěno, že hodnota povrchového napětí se buď téměř nemění, nebo mírně klesá. Měření systému NaHy-Na₂SO₄ ukázalo, že v přítomnosti této soli se povrchové napětí při 25°C nijak výrazně nemění. Povrchové napětí NaHy ve vodě je 72,2 mN·m⁻¹, zatímco SFT systému NaHy-Na₂SO₄ 72,4 mN·m⁻¹, které v průběhu měření pokleslo o 1%. U NaHy-DEMI, byl zaznamenán pokles SFT o 2%. Nevýrazné změny povrchového napětí NaHy v přítomnosti Na₂SO₄ mohou být způsobeny oslabením vlivu kosmotropních aniontů, ke kterému v přítomnosti kosmotropních kationtů může docházet [129]. Výraznější zvýšení povrchového napětí NaHy bylo pozorováno při teplotě 45°C (obr. 103, Příloha C). Povrchové napětí Na₂SO₄ kleslo z hodnoty ($t = 0s$) 70,7 mN·m⁻¹ na hodnotu 69,4 mN·m⁻¹ ($t = 300s$). Celkový pokles tedy odpovídal 1,8%. Naopak u NaHy-DEMI byl zaznamenán pokles SFT z ($t = 0s$) 72,1 mN·m⁻¹ na hodnotu 68,0 mN·m⁻¹, tzn. 5,7%.

Obrázek 45: Porovnání časového průběhu povrchového napětí systému NaHy-Na₂SO₄ ($I=0,1M$) (\circ) stanoveného při teplotě $T = 25^{\circ}C$.

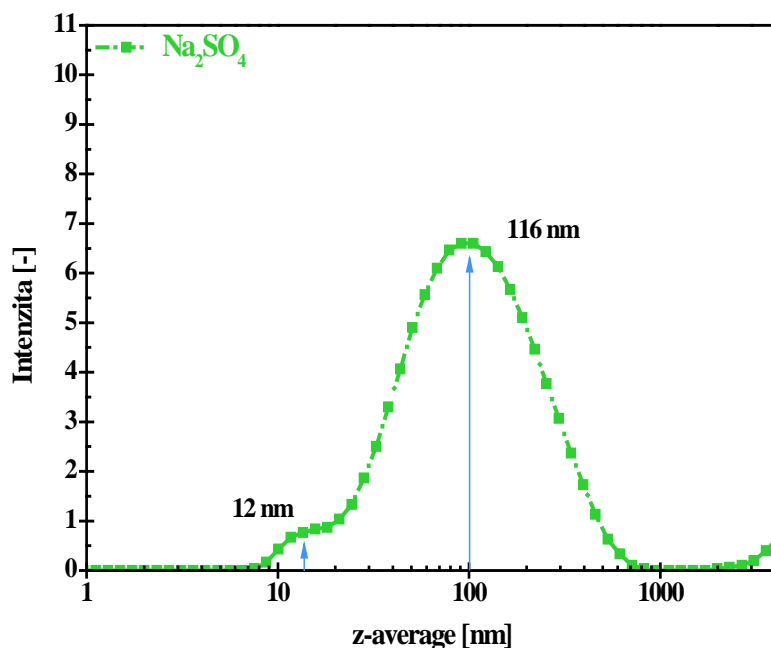


Výraznější změny průběhu povrchového napětí jsou pozorovány na obr. 81-86 a 107 (příloha C), kde byla sledována teplotní závislost povrchového napětí systému NaHy- Na_2SO_4 . K nejvýraznějšímu snížení povrchového napětí dochází při teplotách 40 °C a 45 °C. SFT poklesne o 2,9% a 1,3%. Zajímavé je, že pokles SFT NaHy ve vodě odpovídá při stejných teplotách hodnotám 4,5% a 4,1%. To znamená, že přítomnost Na_2SO_4 v roztoku NaHy výrazně snižuje mobilitu jejího řetězce a v celkovém výsledku i její tendenci se reorganizovat na fázovém rozhraní. Podle Swanna a kol. [124] by kosmotropní ionty měly být schopné oslabovat hydrofobní interakce polymerů. Díky silné interakci kosmotropních aniontů s molekulami vody dochází k jejich vzájemnému vyloučení z blízkosti polymeru, jehož výsledkem může být podpora hydrofobních interakcí. Polymerní řetězec se bude snažit zaujmout sbalenější konformaci, která by se v porovnání s chaotropními ionty, měla projevit poklesem hydrodynamického poloměru.

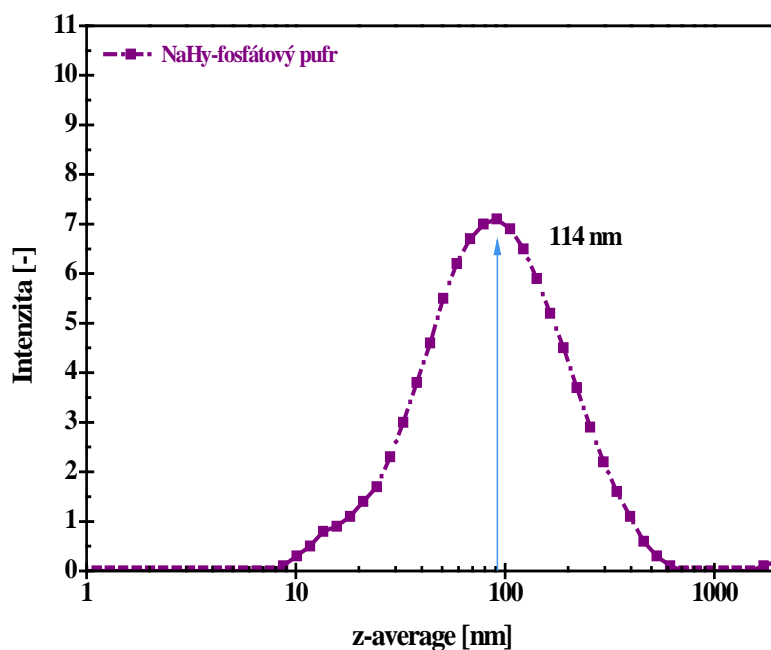
c. Velikost částic

Měření střední velikosti částic ukázalo, že velikost částic NaHy se v přítomnosti Na_2SO_4 mění. Velikost částic NaHy klesá z 286 nm (obr. 39) na hodnotu 70 nm (obr. 46). Pokud porovnáme velikost částic stanovenou při 25°C u chaotropních a kosmotropní iontů, dojdeme k následujícímu závěru. Velikost částic NH_4SCN se pohybuje okolo 68 nm, zatímco u Na_2SO_4 okolo 70 nm. Tento výsledek byl podpořen měřením velikosti částic NaHy v prostředí fosfátového pufru (obr. 47), jakožto zástupce kosmotropních solí. Velikost částic NaHy v prostředí fosfátového pufru odpovídá stejně jako v případě Na_2SO_4 , 70nm. Zvýšení velikosti částic, které bylo pozorováno u tohoto systému (NH_4SCN) při teplotě 25°C je natolik malé, že nelze prokázat, že se velikost částic nepohybuje v rozmezí chyby měření.

Obrázek 46: Intenzitní distribuce velikosti částic systému NaHy v prostředí Na_2SO_4 ($I=0,1\text{M}$) při teplotě $T=25^\circ\text{C}$. Střední velikost částic (z-average) odpovídá hodnotě 70 nm.

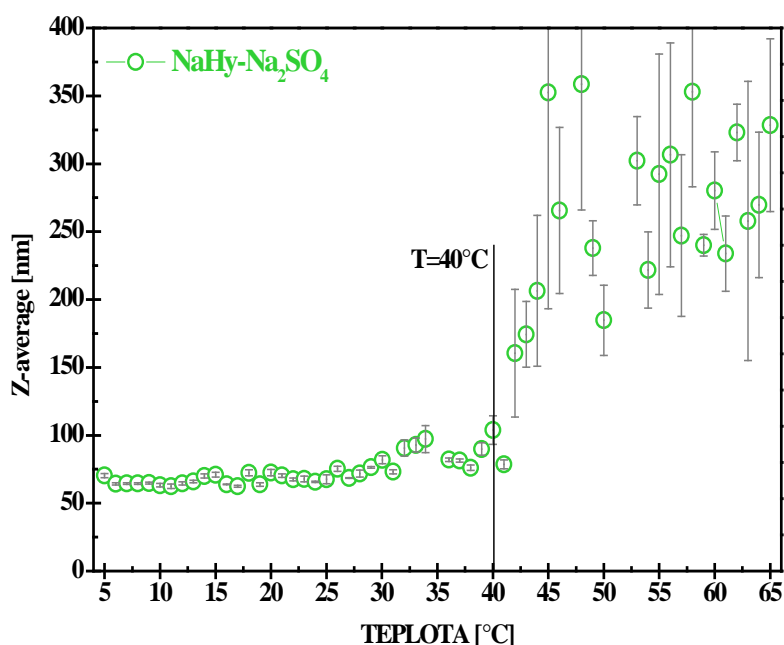


Obrázek 47: Intenzitní distribuce velikosti částic NaHy v prostředí fosfátového pufru při teplotě $T=25^\circ\text{C}$. Střední velikost částic (z-average) odpovídá hodnotě 70 nm.



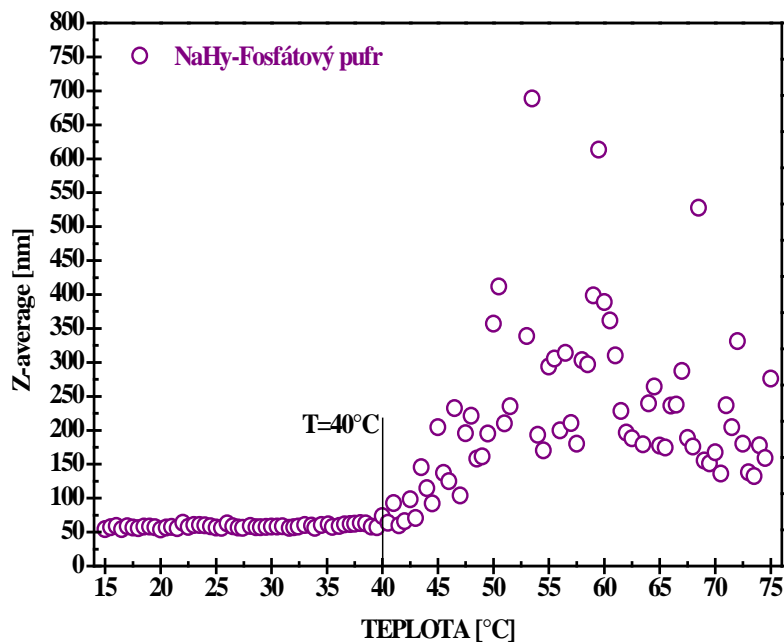
Z výsledků teplotního trendu systému NaHy-Na₂SO₄ (viz obr. 48) je vidět, že velikost částic vykazuje do teploty 40°C stabilitu z hlediska „z-average“. Do této teploty se střední velikost částic pohybuje v blízkosti hodnoty 75 nm. Překročením této teploty, dochází k výraznému rozptylu hodnot, který patrně souvisí s větší mobilitou polymerního řetězce stejně jako u NH₄SCN, kde se však „oscilace“ ve velikosti částic objevily již při teplotě 24°C (viz obr. 42).

Obrázek 48: Teplotní závislost střední velikosti částic (z-average) NaHy v prostředí Na₂SO₄ (○). Velikost částic NaHy v prostředí Na₂SO₄ je stabilní do teploty T=40°C.



Přítomnost studované kosmotropní soli v roztoku NaHy tedy způsobuje, že velikost NaHy klubka je stabilní až do vyšších teplot (40 °C). Velikost částic se v teplotním intervalu od 5°C až do 40°C pohybuje kolem zmíněných 75 nm. Tento vliv potvrzuje také teplotní trend NaHy v prostředí fosfátového pufru, který můžeme také zařadit ke kosmotropním solím (viz obr. 49).

Obrázek 49: Teplotní závislost střední velikosti částic (z-average) NaHy ve fosfátovém pufru, zástupce kosmotropních iontů (○). Velikost částic NaHy je v prostředí fosfátového pufru stabilní do teploty $T=40^{\circ}\text{C}$.



U NaHy ve fosfátovém pufru vykazuje v teplotním rozmezí od 15°C do 40°C velikost částic ca 60 nm. Jakmile dojde k překročení této teploty, začíná velikost částic výrazně růst a od teploty 40°C je pozorován značný rozptyl měřených hodnot „z-average“. U teplotního trendu stanoveného pro NaHy v roztocích chaotropních solí je zmíněný rozptyl hodnot patrný po překročení teploty 24°C . S rostoucí teplotou se postupně zvyšuje mobilita polymerního řetězce, která se projevuje rostoucí velikostí částic. Ionty, které mají malý povrchový náboj (SCN^- , NH_4^+) se snaží organizovat v těsné blízkosti hydrofobních částí polymerního řetězce a podpořit tak jeho hydrofilní interakce. Toto chování pak způsobuje, že se konformace polymeru rozvolňuje a dochází k celkové nestabilitě NaHy klubka, která se začíná projevovat už při nižších teplotách. Naopak čím větší budou mít ionty povrchový náboj, tím kompaktnější strukturu bude NaHy zaujímat. U kosmotropních solí dochází k opačnému efektu. Kosmotropní ionty podporují hydrofobní interakce NaHy, které se snaží minimalizovat jeho kontakt s rozpouštědlem, což vede k vytvoření kompaktní sbalené

struktury. Rigidnější struktura sbaleného klubka, pak snáze odolává působení vyšší teplot, které se projevilo na zmíněných teplotních trendech velikosti částic.

6.2.2.3 Kombinace chaotropní-kosmotropní ionty

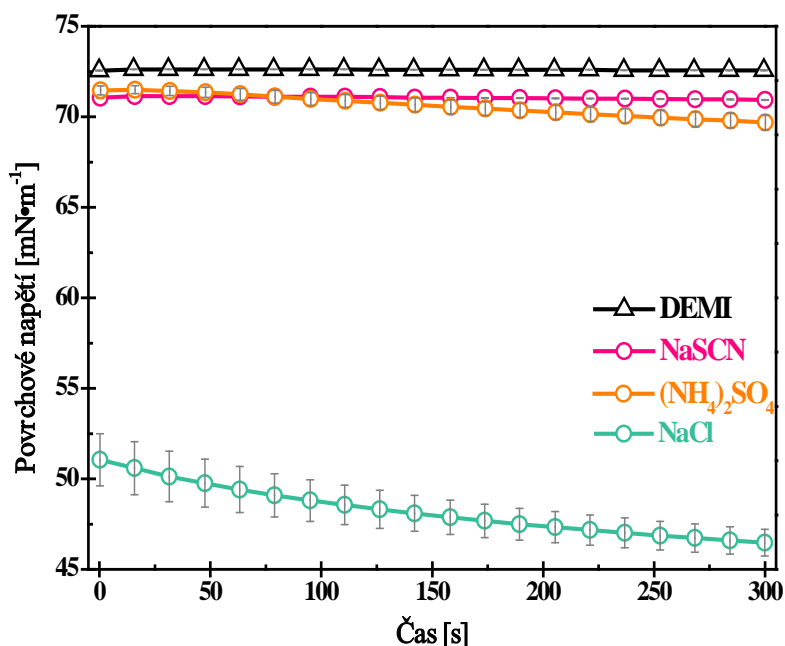
I. Chování ve vodě

a. Povrchové napětí

Za účelem posouzení vlivu jednotlivých solí, byly do roztoku NaHy přidávány vybrané kombinace kosmotropních a chaotropních aniontů a kationtů. Jednalo se o kombinace $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, NaSCN a NaCl.

Povrchové napětí měřené v závislosti na čase u solí NaSCN, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ a NaCl při 25°C je zobrazeno na obrázku 50. Ze závislosti je patrné, že přidaná sůl $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ výrazně mění povrchové napětí. Povrchové napětí $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ klesá z hodnoty $71,5\text{mN}\cdot\text{m}^{-1}$ (v čase $t = 0\text{s}$) na hodnotu $69,7\text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ (v čase $t = 300\text{s}$). Celkový pokles povrchového napětí $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ v průběhu $t = 300\text{s}$ tak činí 2,5%. Je vidět, že přídavek $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ snížil povrchové napětí vody jen nepatrně z hodnoty $72,6\text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ (voda) na hodnotu $70,7\text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$). Tyto výsledky ukazují, že u kombinace chaotropního kationtu a kosmotropního aniontu ve vodě, převládá vliv chaotropních aniontů.

Obrázek 50: Porovnání časového průběhu povrchového napětí de-ionizované vody (Δ), iontů $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ($I=0,1\text{M}$) (\circ), iontů NaSCN ($I=0,1\text{M}$) (\circ) a iontů NaCl ($I=0,1\text{M}$) (\circ) stanoveného při teplotě $T = 25^\circ\text{C}$.



Obdobná situace nastává v případě soli NaSCN (viz obr. 50). Přídavek NaSCN do vody sníží povrchové napětí z hodnoty $72,6 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ (voda) na hodnotu $71 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ (NaSCN). Povrchové napětí roztoku NaSCN během měření téměř neklesalo; počáteční hodnota ($t = 0\text{s}$) $71 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$, konečná hodnota $70,9 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ ($t = 300\text{s}$). Celková změna povrchového napětí tak odpovídala $0,2\%$. V případě kombinace kosmotropního kationtu a chaotropního aniontu jasně převládá vliv chaotropního aniontu, který SFT snižuje.

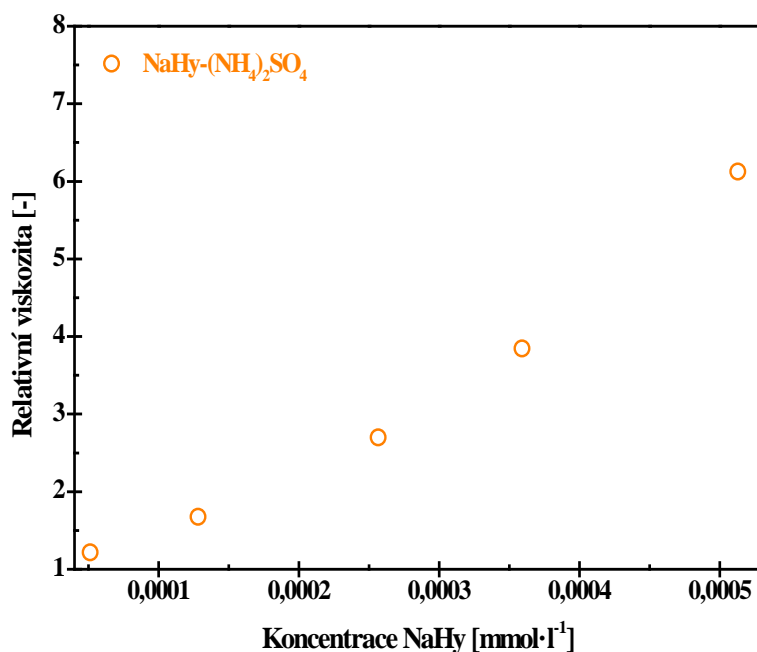
Poslední solí, u které byl zjišťován její vliv povrchové napětí, byl NaCl . Časový průběh povrchového napětí NaCl ve vodě zobrazuje obrázek 50. Jak je z přiloženého grafu patrné, povrchové napětí vody v přítomnosti NaCl výrazně klesá. Jedná se o pokles z počáteční hodnoty ($t = 0\text{s}$) $51 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ na hodnotu $46,5 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ ($t = 300\text{s}$). Celkový pokles SFT roztoku NaCl odpovídá 9% . Stejně jako u roztoku NaSCN , v případě NaCl , převládá vliv chaotropního aniontu nad kosmotropním kationtem, a zároveň tak potvrzuje fakt, že vliv aniontů je ve srovnání s kationty, mnohem výraznější.

II. Chování v systému iont-NaHy-voda (K-I—NaHy—DEMI)

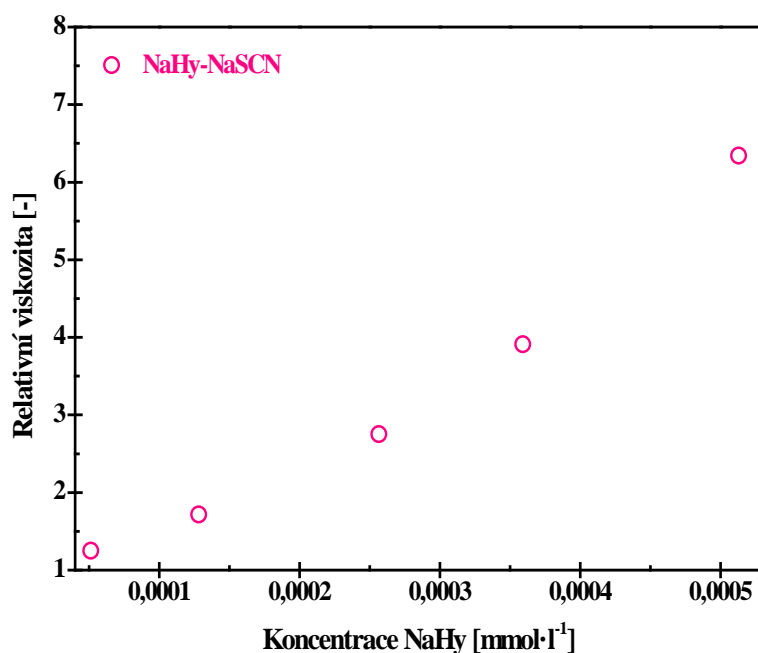
a. Viskozita

Závislost relativní viskozity NaHy- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ na koncentraci ukazuje obr. 51. Stejně jako u chaotropních iontů, ale i kosmotropních iontů dochází i v přítomnosti $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ k výraznému snížení viskozity. Relativní viskozita klesá z hodnoty $6,1 \pm 0,0026$ ($c = 0,513 \cdot 10^{-3} \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$) na hodnotu $1,2 \pm 0,00087$ ($c = 0,513 \cdot 10^{-4} \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$). V případě NaSCN (viz obr. 52) relativní viskozita klesá z hodnoty $6,3 \pm 0,0021$ ($c = 0,513 \cdot 10^{-3} \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$) na hodnotu $1,2 \pm 0,0031$ ($c = 0,513 \cdot 10^{-4} \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$).

Obrázek 51: Závislost relativní viskozity systému NaHy- NH_4SCN ($I=0,1M$) (\circ) na koncentraci stanovené při teplotě $T = 25^\circ\text{C}$.



Obrázek 52: Závislost relativní viskozity systému NaHy-NaSCN ($I=0,1M$) (\circ) na koncentraci stanovené při teplotě $T = 25^{\circ}C$.



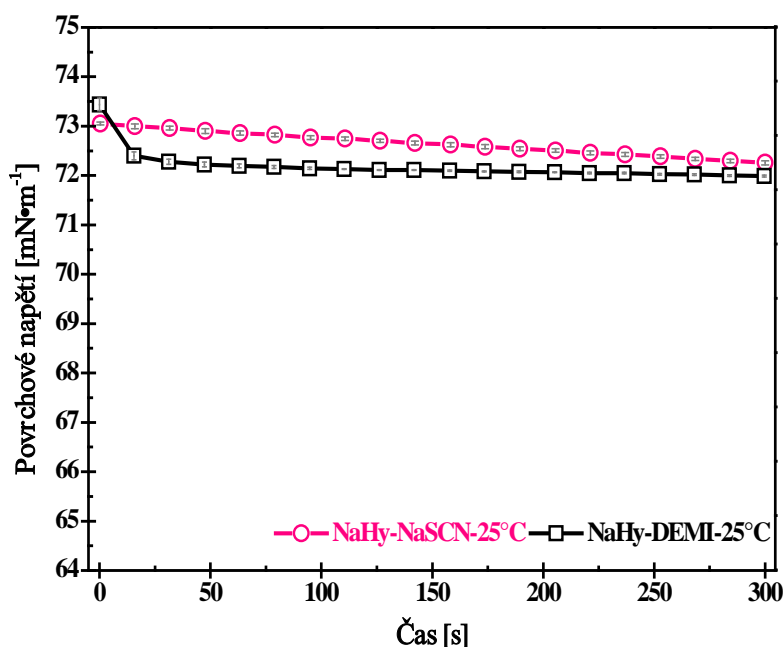
Při porovnání účinku chaotropního kationtu a kosmotropního aniontu na viskozitu NaHy, není příliš jasné, který z vlivů převládá. Změny u relativní viskozity jsou natolik malé, že lze těžko odhadnout, který z iontů má rozhodující vliv. Viskozitním chováním xantanu se ve své práci zabývá Wyatt a kol. [33]. Podle této práce došlo v přítomnosti NaCl až ke 100 násobnému snížení jeho viskozity. Podobné viskozitní chování bylo zjištěno u několika dalších polyelektrolytů např. chitosanu, draselné soli xantanu, karagenanu nebo welanu [33].

b. Povrchové napětí

Při porovnání závislosti povrchového napětí stanoveného při teplotě $25^{\circ}C$ systému NaHy-NaSCN (viz obr. 53), můžeme dojít k následujícím závěrům. Povrchové napětí roztoku NaHy-NaSCN kleslo z počáteční hodnoty ($t = 0s$) $73,0 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ na hodnotu $72,6 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ ($t = 300s$). Celkový pokles povrchového napětí odpovídal 0,6%. Povrchové napětí roztoku NaHy-DEMI kleslo z počáteční hodnoty ($t = 0s$) $73,43 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ na hodnotu $71,9 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ ($t = 300s$). Celkový pokles povrchového napětí

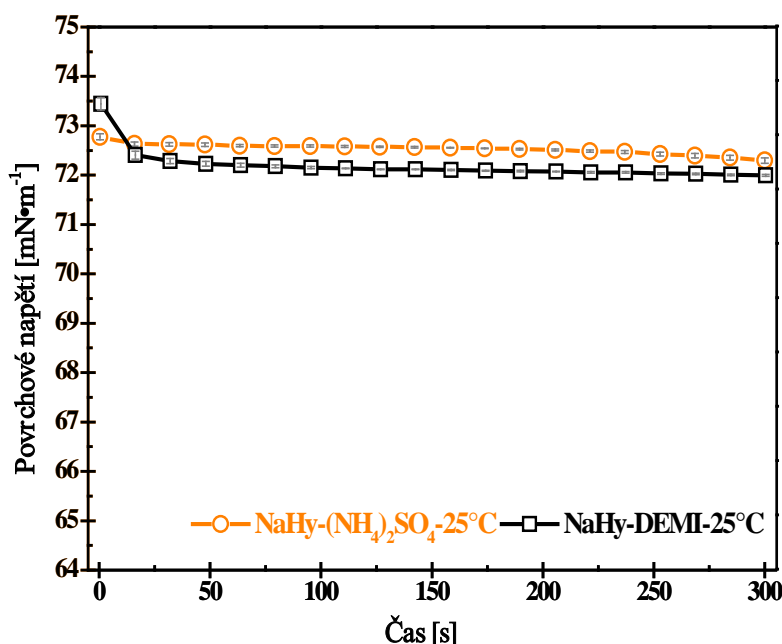
odpovídal 1,4%. Za zmínku stojí, že u NaSCN ve vodě došlo k výraznému poklesu povrchového napětí, který se v přítomnosti NaHy neprokázal, ale naopak se projevil opačný průběh. Obdobné chování bylo vidět při teplotě 15 °C (viz obr. 87, příloha C). Časová závislost povrchového napětí systému NaHy-NaSCN při teplotách 20 °C a 30 °C ukázala, že povrchové napětí je nižší než u NaHy ve vodě (viz obr. 90, 93, příloha C). U teplot 35°C, 40°C a 45°C bylo povrchové napětí vzájemně srovnatelné (viz obr. 96, 99, 102, 110).

Obrázek 53: Porovnání časového průběhu povrchového napětí systému NaHy-NaSCN ($I=0,1M$) (\circ) stanoveného při teplotě $T = 25^{\circ}C$.



Výsledky povrchového napětí NaHy v prostředí NaSCN naznačují, že v případě malého kationtu a velkého aniontu, tzn. kationtu s velkým povrchovým nábojem a aniontu s malým povrchovým nábojem, bude v prostředí hyaluronanu převládat vliv kosmotropního iontu. Navíc účinek samotného kationtu bude pravděpodobně přítomností aniontu omezen a neprojeví se tak, jak by se od něj očekávalo (viz obr. 53).

Obrázek 54: Porovnání časového průběhu povrchového napětí systému NaHy-(NH₄)₂SCN (*I*=0,1M) (○) stanoveného při teplotě *T* = 25°C.

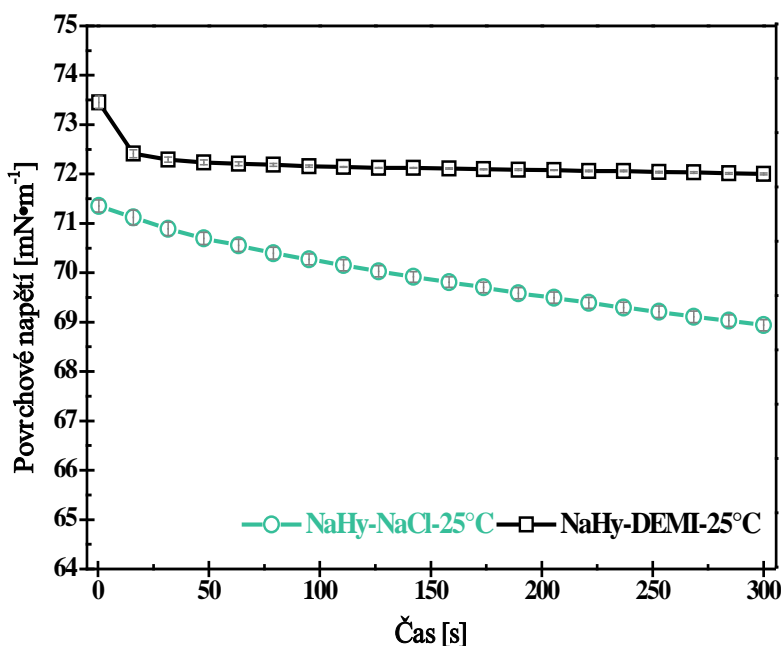


Odlišné chování iontů v prostředí deionizované vody a NaHy bylo zjištěno také u (NH₄)₂SO₄. Při porovnání závislosti povrchového napětí stanoveného při teplotě 25 °C pro systém NaHy-(NH₄)₂SO₄ (viz obr. 54), můžeme dojít k následujícím závěrům. Povrchové napětí roztoku NaHy-(NH₄)₂SO₄ kleslo z počáteční hodnoty (*t* = 0s) 73,0 mN·m⁻¹ na hodnotu 72,7 mN·m⁻¹ (*t* = 300s). Celkový pokles povrchového napětí odpovídal 0,6%. Povrchové napětí roztoku NaHy-DEMI kleslo z počáteční hodnoty (*t* = 0s) 73,4 mN·m⁻¹ na hodnotu 71,9 mN·m⁻¹ (*t* = 300s). Celkový pokles povrchového napětí odpovídal 0,7%. Při teplotní závislosti povrchového napětí systému NaHy-(NH₄)₂SO₄ byl u teplot 15, 20, 30, 35, 40 a 45°C zaznamenán opačný průběh, tzn., že povrchové napětí systému NaHy-(NH₄)₂SO₄ bylo nižší než u NaHy-DEMI (obr. 88, 91, 94, 97, 100, 103 a 108, příloha C).

Výsledky povrchového napětí NaHy v prostředí (NH₄)₂SO₄, ukazují, že v případě velkého kationtu a malého aniontu, tzn. kationtu s malým povrchovým nábojem a aniontu s velkým povrchovým nábojem, bude v prostředí hyaluronanu převládat vliv kosmotropního iontu. Převládající vliv kosmotropního aniontu byl potvrzen i u

teplotního trendu velikosti částic (viz. obr. 60). Závislost povrchového napětí NaHy v roztoku NaCl při teplotě 25 °C je vidět na obrázku 55.

Obrázek 55: Porovnání časového průběhu povrchového napětí systému NaHy-NaCl ($I=0,1M$) (\circ) stanoveného při teplotě $T = 25^{\circ}C$.

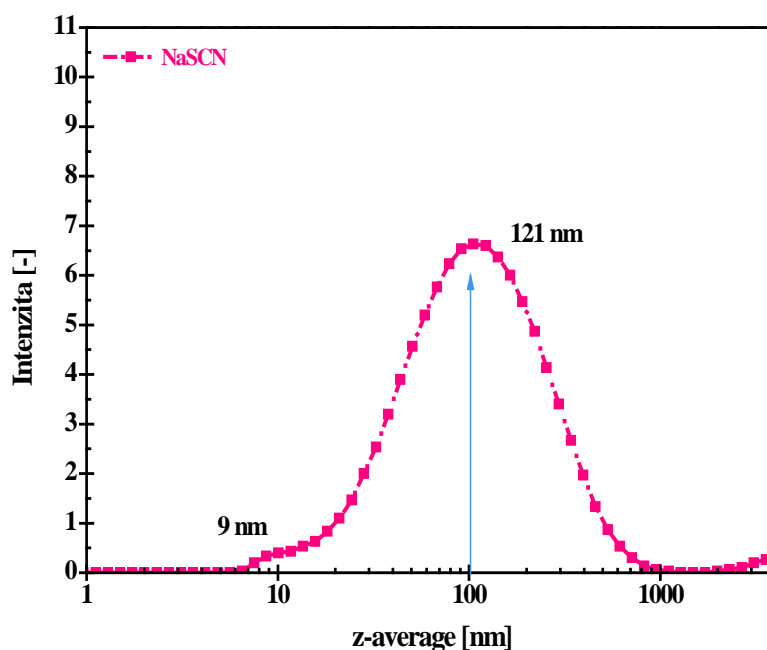


Povrchové napětí roztoku NaHy-NaCl kleslo z počáteční hodnoty ($t = 0s$) $71,3 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ na hodnotu $68,9 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ ($t = 300s$). Celkový pokles povrchového napětí odpovídá 3,4%. Povrchové napětí roztoku NaHy-DEMI kleslo z počáteční hodnoty ($t = 0s$) $73,4 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ na hodnotu $71,9 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ ($t = 300s$). Celkový pokles povrchového napětí odpovídal 2 %. Je tedy zřejmé, že NaCl zvyšuje snahu NaHy se reorganizovat na fázovém rozhraní kapalina-plyn. Teplotní závislost povrchového napětí systému NaHy-NaCl nevykázala výraznější změny. Povrchové napětí v rozmezí teplot $15^{\circ}C - 45^{\circ}C$ výrazně klesá (obr. 89, 92, 95, 98, 101, 104, 105, příloha C).

c. Velikost částic

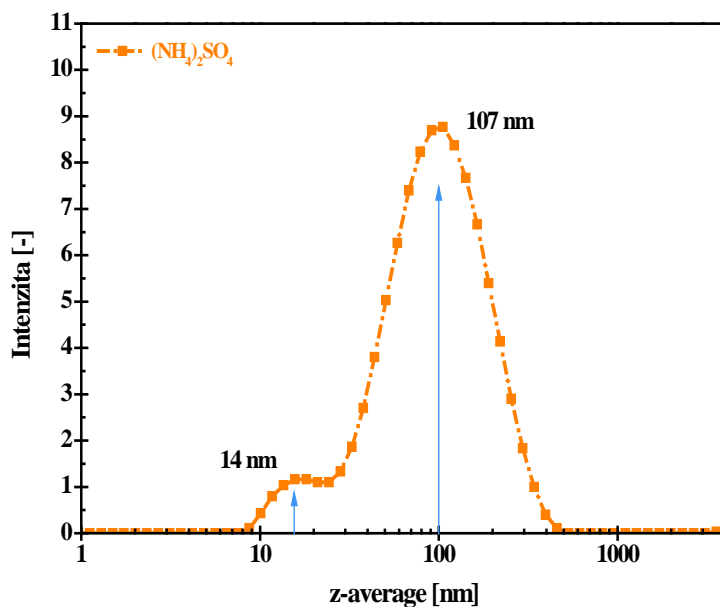
Převahu kosmotropních kationtů v případě NaSCN a kosmotropních aniontů u $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ podporují výsledky z měření velikosti částic. Střední velikost částic systému NaHy-NaSCN je zřetelně zobrazena na obrázku 56. Podle námi předkládané teorie, se převaha kosmotropních iontů projeví podporou hydrofobních interakcí NaHy, které budou svým působením iniciovat sbalení polymerního klubka, případně jeho agregaci, tzn. pokles velikosti částic. Pokles velikosti částic je patrný z intenzitní distribuce NaHy-NaSCN (viz obr. 56). Hodnota NaHy klesá z 286 nm (voda) na 69 nm (NaSCN).

Obrázek 56: Intenzitní distribuce velikosti částic systému NaHy v prostředí NaSCN ($I=0,1M$) při teplotě $T=25^\circ\text{C}$. Střední velikost částic (z-average) odpovídá hodnotě 69 nm.



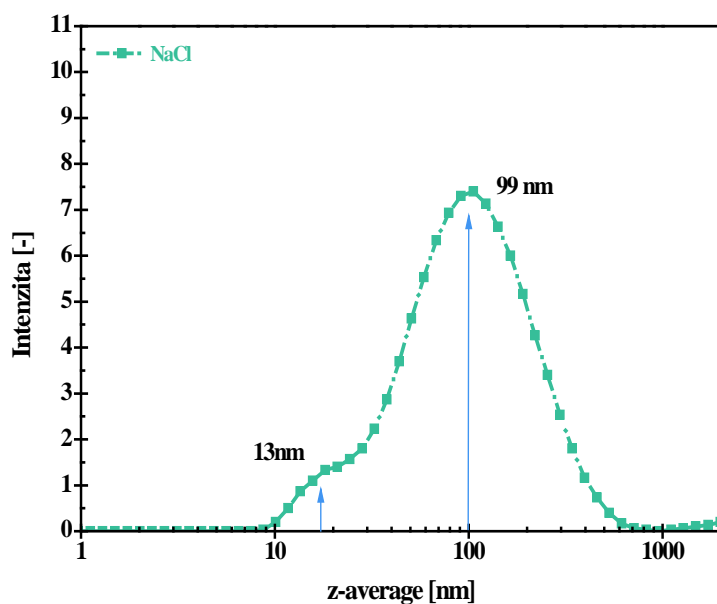
Podobný vliv byl zjištěn také u systému NaHy- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (viz obr. 57). Tady došlo ke snížení velikosti částic na 66 nm. Mírný pokles hodnot velikosti částic by mohl poukazovat na sbalenější konformaci polymerního řetězce, ale i na skutečnost, že ve srovnání s kosmotropním kationtem převládá spíše účinek kosmotropního aniontu.

Obrázek 57: Intenzitní distribuce velikosti částic systému NaHy v prostředí $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ($I=0,1\text{M}$) při teplotě $T=25^\circ\text{C}$. Střední velikost částic (z-average) odpovídá hodnotě 66 nm.



Výrazný vliv NaCl napolysacharidy pozorovaný v případě xantanu, který ve své práci zaznamenal již zmíněný Wyatt a kol. [33], byl prokázán při měření SFT a velikosti částic rovněž i u systému NaHy-NaCl (viz obr. 58).

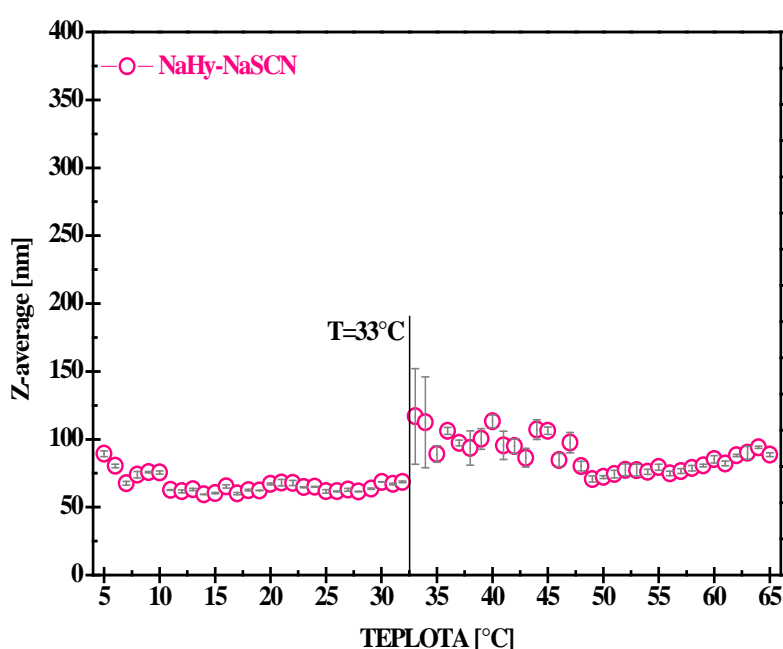
Obrázek 58: Intenzitní distribuce velikosti částic systému NaHy v prostředí NaCl ($I=0,1\text{M}$) při teplotě $T=25^\circ\text{C}$. Střední velikost částic (z-average) odpovídá hodnotě 61 nm.



V prostředí NaCl, došlo k poklesu střední velikosti částic (z-average) až na hodnotu 61 nm, což znamená že, sodné ionty, které vyvolávají sbalování polymerního řetězce, se pravděpodobně hromadí v těsné blízkosti polymerního řetězce.

Z výsledků teplotního trendu systému NaHy-NaSCN (viz obr. 59) je vidět, že velikost částic se do teploty 33°C téměř nemění. Do této teploty střední velikost částic odpovídá hodnotě ca 75 nm. Překročením této teploty dochází k rozptylu hodnot velikosti částic, patrně související s větší mobilitou polymerního řetězce.

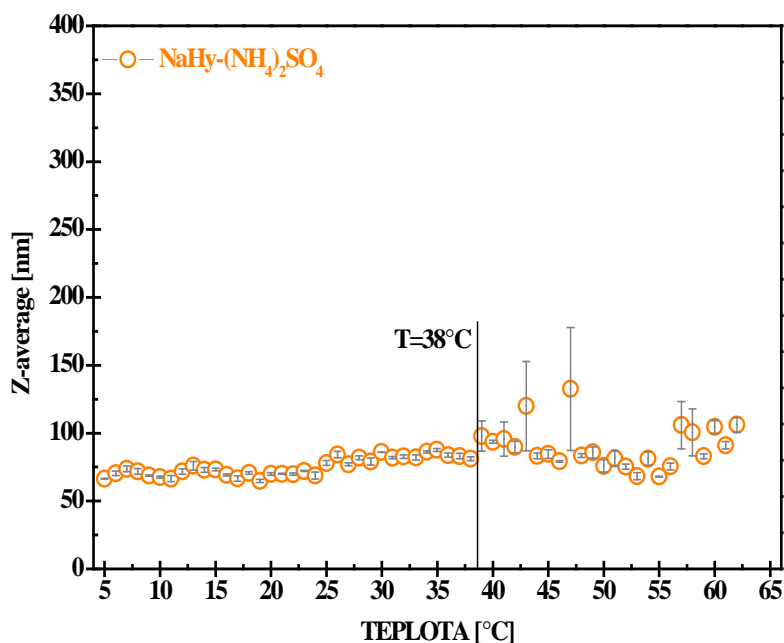
Obrázek 59: Teplotní závislost střední velikosti částic (z-average) NaHy v prostředí NaSCN (○). Velikost částic NaHy je v prostředí NaSCN stabilní do teploty $T=33^{\circ}\text{C}$.



Pokud porovnáme teplotní trend velikosti částic systému obsahujícího kosmotropní kationt a chaotropní aniont NaHy-NaSCN (viz obr. 59) s NaHy-Na₂SO₄ (oba kosmotropní, viz obr. 48) a NaHy-NH₄SCN (oba chaotropní, viz obr. 42) zjistíme, že u NaSCN převládá vliv kosmotropního kationtu. V důsledku působení chaotropního aniontu je jeho účinnost snížena, a proto jsou velikosti částic NaHy v jeho prostředí stabilní do nižších teplot (33 °C) ve srovnání s fosfátovým pufrům nebo NaHy-Na₂SO₄. Tento závěr je navíc podpořen i výsledky z měření povrchového napětí (viz

obr. 45). V případě soli $\text{NaHy}-(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ukázaly výsledky teplotního trendu velikosti částic (viz obr. 60) obdobný efekt.

Obrázek 60: Teplotní závislost střední velikosti částic (z-average) NaHy v prostředí $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (\circ). Velikost částic NaHy je v prostředí $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ stabilní do teploty $T=38^\circ\text{C}$.

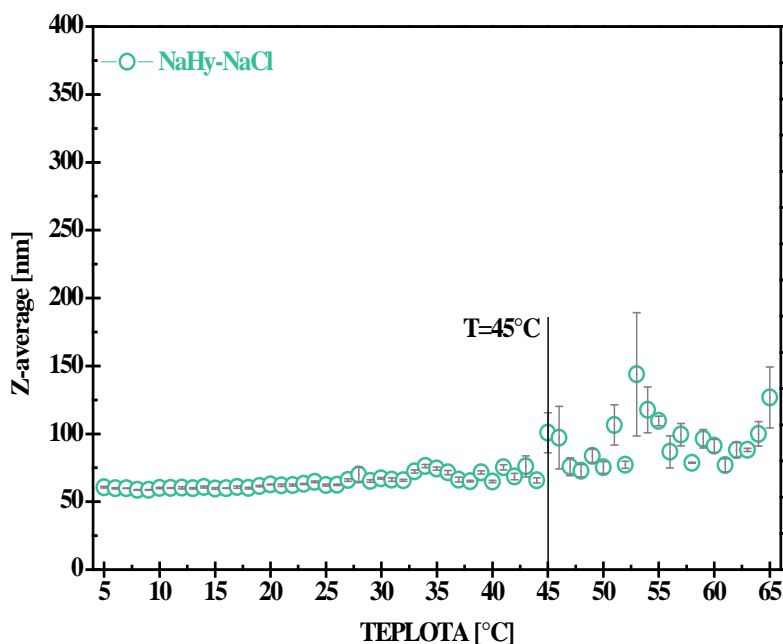


$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ představuje kombinaci malého povrchového náboje u kationtu a velkého povrchového náboje u aniontu, u které, jak už bylo naznačeno u povrchového napětí (viz obr. 54), převládá vliv kosmotropního aniontu. Dochází tak k podpoře hydrofobních interakcí polymeru a NaHy zaujímá kompaktnější a sbalenější uspořádání, které si NaHy zachovává do vyšších teplot. Při překročení teploty 38°C , má polymerní řetězec tendenci se rozvolňovat, ale ve srovnání s Na_2SO_4 a fosfátovým pufrem (kosmotropní aniont i kationt), (viz obr. 48 a 49), zde nedochází k tak velkému uvolnění a velikost klubka se v podstatě nemění až do 60°C . Velikost částic NaHy v prostředí $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ vykazuje do teploty 38°C hodnotu 75 nm, která následně vzroste na 90 nm.

Nejvýraznější stabilita velikosti částic byla zjištěna u systému NaHy-NaCl (viz obr. 61). Velikost částic leží v blízkosti hodnoty 66 nm, která po překročení teploty 45°C vzroste na hodnotu 95 nm. U NaCl tzn., kationtu s velkým povrchovým nábojem a

aniontu s malým povrchovým nábojem, převládá spíše vliv kosmotropního kationtu, protože neměnná velikost částic se v průběhu teplotního rozmezí 5°C – 45°C pohybuje v blízkosti teploty 45 °C, stejně jako u kosmotropních iontů.

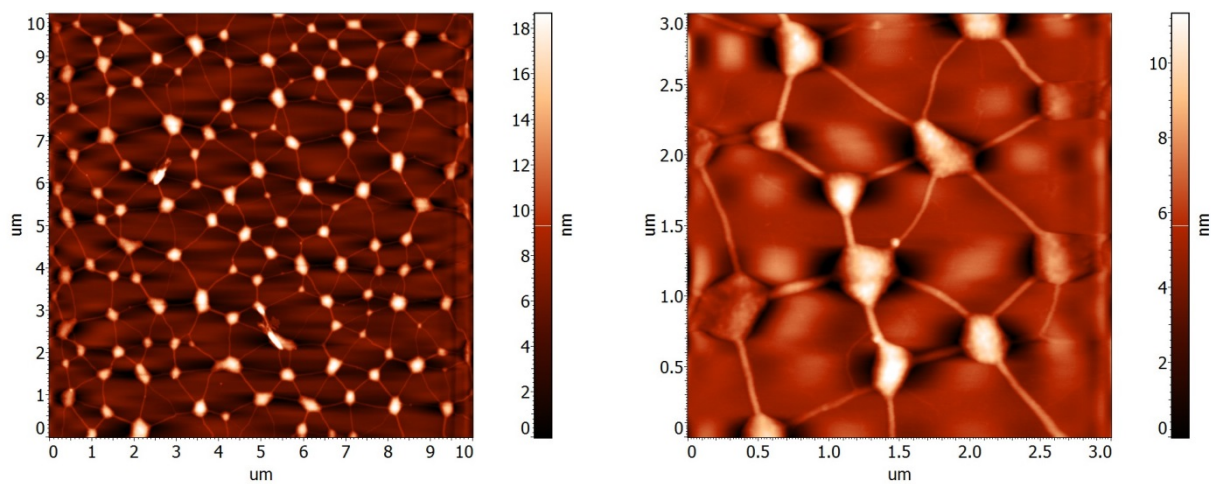
Obrázek 61: Teplotní závislost střední velikosti částic (z-average) NaHy v prostředí NaCl (○). Velikost částic NaHy je v prostředí NaCl stabilní do teploty $T=45^{\circ}\text{C}$.



Potvrzení skutečnosti, že ionty z Hofmeitserovy řady solí interagují s NaHy, bylo kromě výše uvedených metod podpořeno pilotní charakterizací systému NaHy-sůl pomocí mikroskopie atomárních sil (AFM), jejichž výsledky jsou uvedeny na obr. 62. Tento obrázek naznačuje, že systém NaHy-NaSCN, vytváří organizované struktury při odpaření z těchto roztoků na Si-waferu. Snímek byl pořízen pro roztok NaSCN ($I=0,01\text{M}$) s nižší iontovou silou, protože při vyšší iontové síle byl celý povrch pokryt vykrystalizovanou solí a struktura NaHy nebyla detekovatelná. To je však celkem logické, protože při odpařování dochází k zakoncentrování samotné soli v odpařovaném médiu až na nasycený roztok a sůl pak dostává možnost vytvářet krystaly, což je nepochybně z termodynamického hlediska upřednostněno před interakcemi s hyaluronanem. Krystaly NaSCN jsou přesto vidět na těchto snímcích. Jsou však mezi sebou spojeny pravděpodobně nataženými řetězci NaHy (velikosti

vláken jsou řádově desítky až jednotky nanometru, viz obr. 62). U ostatních solí, se nepodařilo, dosáhnout podobného výsledku prezentovaného na obr. 62.

Obrázek 62: Organizovaná struktura systému NaHy-NaSCN na Si-waferu.



6.3 Viskoelastické chování karbodiimidu modifikovaného hyaluronanu

Poslední experimentální část dizertační práce se týká charakterizace viskoelastických vlastností karbodiimidem modifikovaného NaHy. Karbodiimidem síťovaný hyaluronan byl charakterizován metodami: dynamická mechanická analýza (DMA), ^1H NMR a FTIR-ATR spektroskopie a byla provedena zkouška mechanických vlastností (pomocí trhačského stroje).

6.3.1 Použité materiály a příprava vzorků

6.3.1.1 Materiály

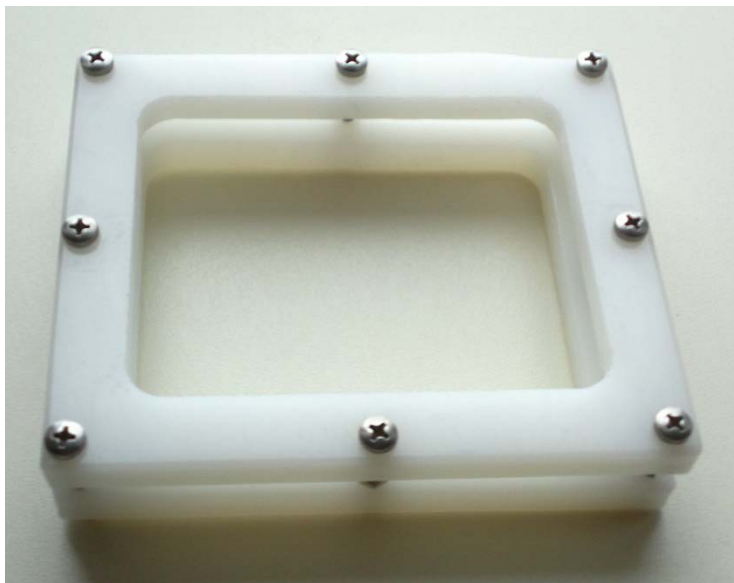
V této části experimentální práce byly použity následující materiály:

- Sodná sůl kyseliny hyaluronové (**NaHy**), $M_w = 500$ kDa, Contipro Ltd., Česká republika
- N-(3-dimethylaminopropyl-N'-etylkarbodiimid hydrochlorid (**EDC**) - ($\geq 99\%$), Sigma Aldrich
- N-hydroxysukcinimid (**NHS**) - ($\geq 99\%$), Sigma Aldrich
- Kyselina chlorovodíková (**HCl**) – 0,1M
- De-ionizovaná voda (**DEMI**) – H_2O

6.3.1.2 Příprava vzorků a měření

Pro přípravu ve vodě rozpustného NaHy filmu byl použit 1 hm. % roztok hyaluronanu v de-ionizované vodě. Hyaluronan byl rozpuštěn za neustálého míchání při teplotě 50°C po dobu 24 hodin. Připravený roztok NaHy byl vzápětí odlit na plazmaticky ošetřenou PMMA destičku (viz obr. 63) a sušen při teplotě 50°C po dobu 48 hodin. Tento film měl rozměry, 100 x 80 mm a tloušťku 0,05 mm (viz obr. 64).

Obrázek 63: Sušící cela pro přípravu NaHy filmů.



Obrázek 64: Nesíťovaný NaHy film.

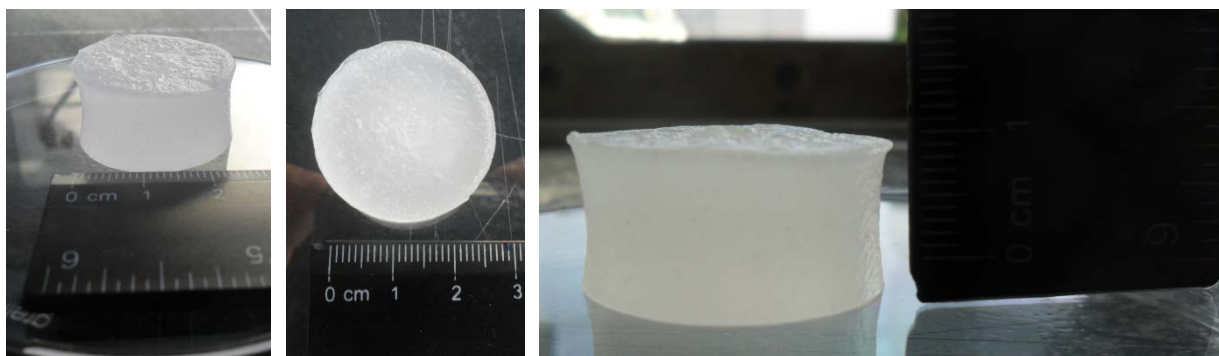


Ve vodě nerozpustný NaHy film, byl připraven smícháním síťovacích činidel N-(3-dimethylaminopropyl)-N'-etylkarbodiimidu hydrochloridu (EDC) a N-hydroxysukcinimidu (NHS) (v poměru 2:1) s 1 hm. % roztokem NaHy, které probíhalo při teplotě 25°C po dobu 1. hodiny. Výsledný roztok byl poté 1 hodinu titrován 0,1M HCl tak, aby jeho pH leželo v rozmezí hodnot 4,5-4,75. Po úpravě pH byl hotový roztok odlit na plazmaticky ošetřenou PMMA destičku (viz obr. 63) a následně vysušen při teplotě 50°C po dobu 48 hodiny. Vysušením byl získán čirý

síťovaný film sodné soli kyseliny hyaluronové o tloušťce 0,17 mm, který byl ve vodě a běžných rozpouštědlech zcela nerozpustný.

Ve vodě nerozpustný válcový NaHy hydrogel, byl připraven vzájemným smícháním síťovacího činidla N-(3-dimethylaminopropyl-N'-etylkarbodiimidu hydrochloridu (EDC) o koncentraci 100mM a 1% roztoku NaHy, které probíhalo za neustálého míchání při teplotě 25°C po dobu jedné hodiny. Takto připravený roztok byl 1 hodinu titrován 0,1M HCl tak, aby se jeho hodnota pH pohybovala v intervalu 4,5 - 4,75. Výsledný roztok byl odlit do válcových forem (2,8 x 0,1 cm) a vymražen po dobu 72 hodin při teplotě -18°C. Výsledkem byl ve vodě nerozpustný síťovaný NaHy hydrogel válcového tvaru (obr. 65).

Obrázek 65: Síťovaný NaHy hydrogel válcového tvaru.



Pro ^1H NMR spektroskopickou analýzu byly vzorky rozpuštěny v D_2O a následně získaná spektra byla kalibrována na 4,70 ppm, kvůli zbytkovému HD_2O signálu. Vzorky použité ke kvantitativní analýze byly připraveny následujícím způsobem. Z válcového hydrogelu NaHy bylo vytlačeno 0,5 ml kapaliny a smícháno s 0,01 ml DMSO (pod tlakem čerstvě destilované vody, filtrované přes 3Å molekulové síto), která byla použita jako interní standard. Koncentrace jednotlivých složek hydrogelu byla určena podle rovnice (39)

$$c_i = \frac{(I_i)}{N_i} \cdot \frac{N_{DMSO}}{I_{DMSO}} \cdot c_{DMSO}, \quad (39)$$

kde I_i je integrální intenzita ^1H NMR signálu a N je počet H atomů poskytujících signál. Objemová změna, která souvisí se smícháním 0,5 ml vzorku s 0,01 ml DMSO, byla zanedbána. Koncentrace všech dostupných karboxylových skupin, vhodných k modifikaci NaHy, byla stanovena dle rovnice (40)

$$(c_{(\text{COOH})}) = \frac{c_{\text{NaHy}} \cdot FW_{\text{NaHy}}}{FW_{\text{MU}}}, \quad (40)$$

kde FW_{MU} je hmotnostní jednotka jednoho meru. ^1H NMR spektra byla pořízena využitím BRUKER AVANCE 300 spektrometru při frekvenci 300,15 MHz a vyhodnocena ACD/NMR procesorem AE v. 12.01.

Modifikované vzorky NaHy, byly podrobeny tzv. bobtnacímu testu („swelling test“), který poskytuje informaci o stupni či rozsahu zesíťování, tedy o obsahu vody, který je materiál schopen absorbovat. NaHy vzorky určené k „swelling testu“ byly před samotnou analýzou kondicionovány po dobu 1 týdne při teplotě 25°C v exikátoru. Po uplynutí doby kondicionace, byla ze vzorků vyseknuta zkušební tělíska kruhového tvaru (průměr 11 nm), která byla následně vysušena při teplotě 60°C do konstantní hmotnosti. Takto připravená zkušební tělíska síťovaného NaHy filmu a válcovitého NaHy hydrogelu, byla ponechána v de-ionizované vodě, a v přesně stanovených intervalech byla odebírána a byla stanovena jejich hmotnost. Obsah vody, který absorbovaly testované vzorky NaHy, byl určen dle rovnice (41):

$$(\%) = \frac{(w_i - w_0)}{w_i} \cdot 100, \quad (41)$$

Kde w_i je hmotnost nabobtnalého vzorku a w_0 počáteční hmotnost suchého vzorku. Výsledky byly získány zprůměrováním čtyř nezávislých měření.

FT-IR spektra suchých nemodifikovaných NaHy filmů, síťovaných NaHy filmů a válcových NaHy hydrogelů, byla analyzována s využitím 6700 FT-IR spektrometru Nicolet, v ATR módu s diamantovým krystalem. Všechna pořízená spektra byla interpretována z 64 skenů při rozlišení 4 cm^{-1} v rozsahu vlnových délek $4000\text{-}400 \text{ cm}^{-1}$.

Mechanické vlastnosti u testovaných síťovaných a nesíťovaných NaHy filmů, byly stanoveny na univerzálním testovacím přístroji Instron 3345. Mechanická zkouška byla provedena na připravených zkušebních tělískách o rozměrech: síťovaný NaHy film (délka 30mm, šířka 4mm a tloušťka 0,17 mm), nesíťovaný NaHy film (délka 30mm, šířka 4mm a tloušťka 0,05 mm) 100N testovací hlavou. Testovací rychlost byla 1 mm/min. Výsledky stanovení mechanických vlastností byly stanoveny ze šesti nezávislých měření.

Poslední metodou, která byla využita pro určení viskoelastického chování připravených, byla dynamická mechanická analýza (DMA). DMA analýza byla provedena na přístroji DMA Q800 (TA Instruments, USA) v napěťovém a kompresním uspořádání („creep/creep recovery“). Parametry kríповého testování byly následující: statické zatížení 0,01 N, 20 minutová izoterma při teplotě 25°C, konstantní zatížení 1 kPa v průběhu 3 minut a 3 minutová relaxace bez napětí. Zkušební tělíska (viz obr. 65), která byla podrobena testování, měla tyto rozměry: NaHy filmy (délka 10 mm, šířka 4 mm, tloušťka 0,05 mm), válcový NaHy hydrogel (obr. 66) (průměr 15 mm, výška 6mm).

Obrázek 66: Zkušební tělísko NaHy připravené na DMA analýzu.



Viskoelastické charakteristiky NaHy vzorků byly získány na základě měření kríповého zotavení tzv. „creep/creep recovery“, vyhodnoceného jako kríповá

poddajnost (J) vyjadřující ochotu měřeného materiálu poddat se aplikovanému zatížení (42)

$$J = \frac{d\varepsilon}{d\sigma}, \quad (42)$$

kde ε je deformace a σ napětí v konkrétním čase. Kríповé zotavení (R), které lze určit z rovnice (43), popisuje schopnost daného materiálu zotavit se po odeznění zatížení.

$$R = \left(1 - \frac{J_{max} - J_R}{J_{max}}\right) \cdot 100, \quad (43)$$

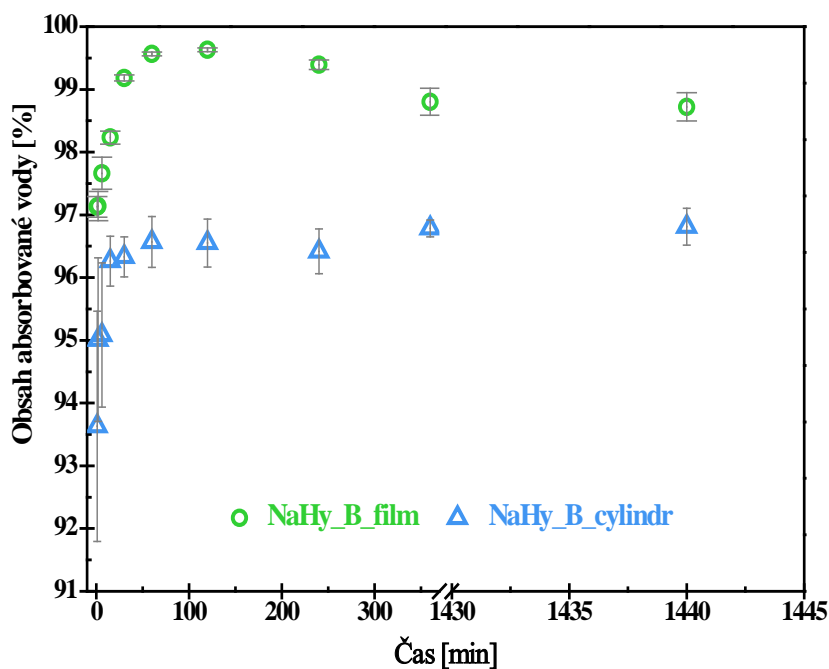
kde J_{max} je maximální dosažená kríповá poddajnost a J_R je znovu zbytková poddajnost po skončení relaxace měřeného materiálu.

6.3.2 Diskuze a výsledky

6.3.2.1 Sweling test

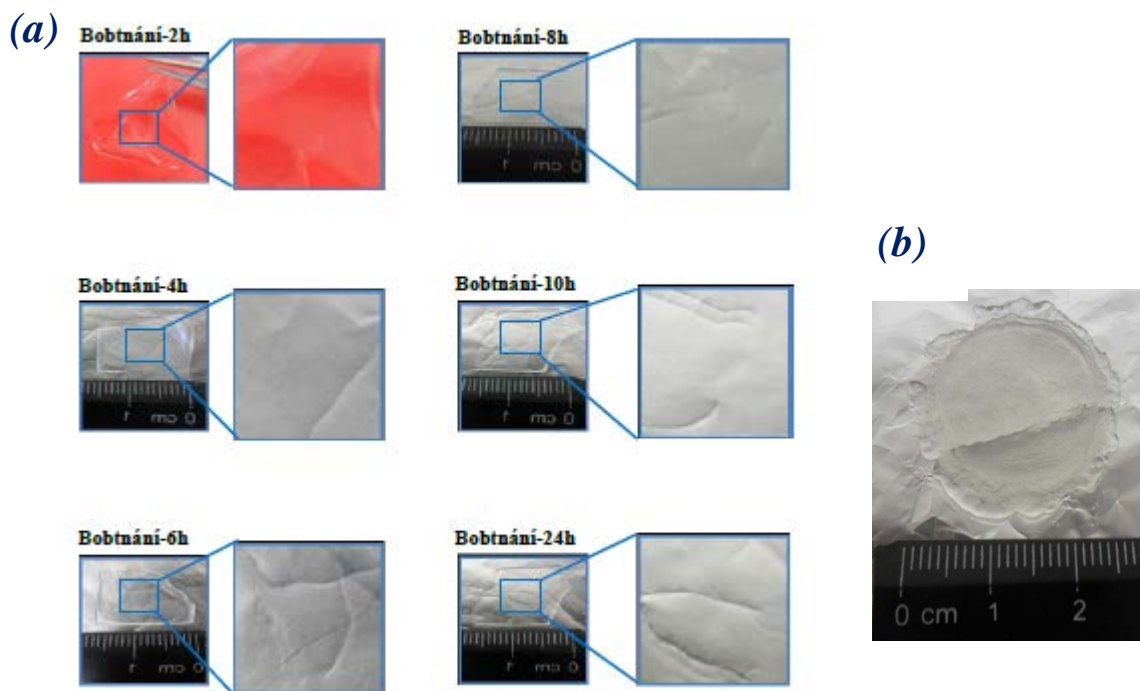
Závislost obsahu vody síťovaného NaHy filmu (NaHy_A_film) a hydrogelu (NaHy_B_cylindr) na době botnání je zobrazena na obrázku 67.

Obrázek 67: Časová závislost „swelling testu“ síťovaného NaHy.



Tyto výsledky ukazují, že rychlost s jakou síťovaný film dosáhne ustáleného stavu, tzn. stavu, ve kterém už nedochází k výrazným změnám v množství absorbované vody, odpovídá strmému nárůstu křivky (viz obr. 67) a u obou materiálů má bobtnací křivka velmi podobný tvar. Kromě toho, je ze „swelling testu“ zřejmé, že síťovaný NaHy film stejně jako síťovaný NaHy hydrogel jsou ve vodě zcela nerozpustné a jsou schopné absorbovat přibližně $99,19 \pm 0,03$ % a $97,00 \pm 0,13$ % vody. Průběh bobtnání síťovaného NaHy filmu a válcového NaHy hydrogelu je uveden na obrázku 68.

Obrázek 68: "Swelling test" síťovaného NaHy filmu (a) a hydrogelu (b).

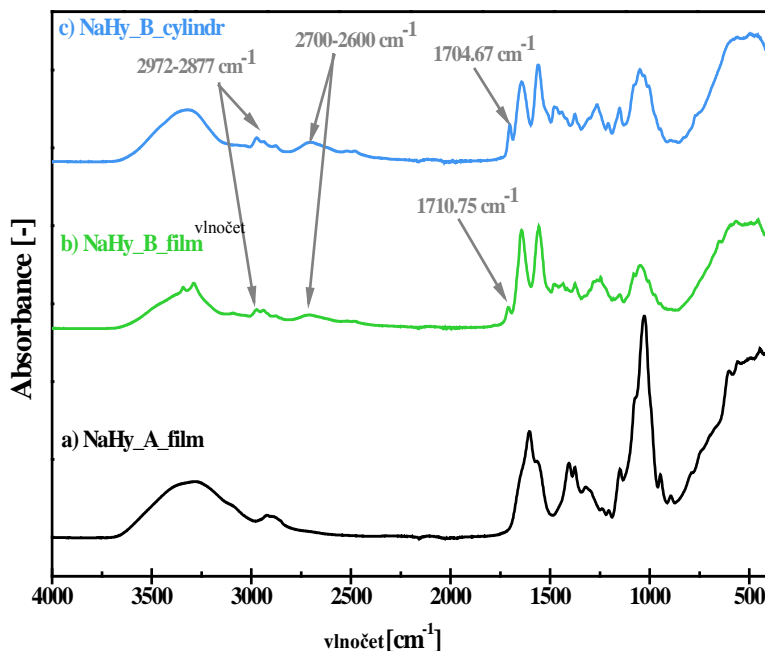


Nepatrný rozdíl mezi botnáním gelu a filmu, který je ve výsledcích „swelling testu“ vidět, pravděpodobně souvisí se způsobem samotné přípravy síťovaného materiálu a se složením rozpouštědla, jehož výsledkem může být rozdílná hustota zesíťování. Hustota zesíťování spolu s hydrofobicitou systému totiž odpovídá rychlosti, jakou je síťovaný materiál tzn. film nebo hydrogel, schopen dosáhnout stabilního obsahu naadsorbované vody, tedy rovnovážného stupně botnání [204]. Vymrazováním mohou vznikat krystaly vody, které v matrici hydrogelu vytvoří póry, které mohou následně napomáhat procesu botnání. Vysoká adsorpční schopnost síťovaného materiálu většinou poukazuje na nízkou hustotu síťování. Z práce autora Lai a kol. [205], lze usuzovat, že botnání, k němuž dochází u síťovaného NaHy, může vést ke zvětšení mezimolekulárních vzdáleností, a tudíž i rychlosti s jakou dochází k tvorbě kovalentních vazeb mezi polymerními řetězci. Kromě toho, závisí stupeň zesíťování na složení rozpouštědla použitého při síťovací reakci. Botnání klesá s rostoucím stupněm zesíťování.

6.3.2.2 ATR-FTIR analýza

Potvrzení esterových vazeb přítomných v síťovaném filmu a hydrogelu NaHy, bylo provedeno využitím ATR-FTIR spektroskopie. ATR-FTIR spektra nesíťovaného/síťovaného filmu a hydrogelu NaHy jsou zobrazena na obrázku 69.

Obrázek 69: FT-IR spektra (a) nesíťovaného NaHy (NaHy_A_film), (b) síťovaného NaHy (NaHy_B_film) a (c) síťovaného hydrogelu NaHy (NaHy_B_cylindr).



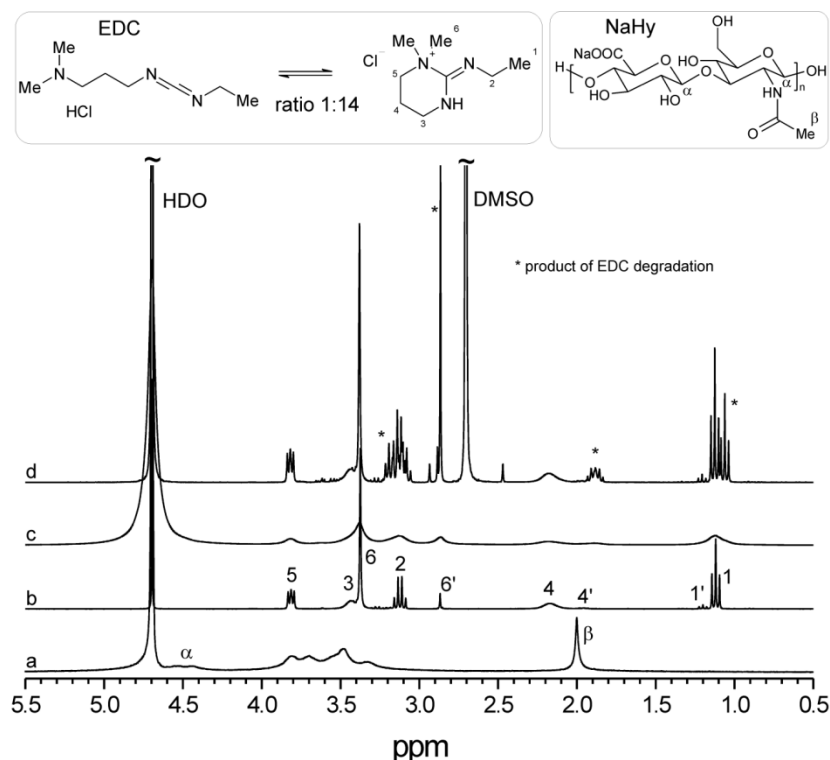
Obrázek 69 ilustruje, že rozdíl mezi spektry (a) nesíťovaného filmu (NaHy_A_film), (b) síťovaného filmu (NaHy_B_film) a (c) hydrogelu NaHy (NaHy_B_cylindr) je zřetelný v oblasti vlnočtu 1700-1724 cm⁻¹, který patří deformačním vibracím esterové vazby. Přítomnost esterové vazby u síťovaného NaHy potvrzují i malé píky, které odpovídají $\nu(\text{CH})$ a $\nu(\text{CH}_2)$ valenčním vibracím alkylových řetězců (oblast 2850-2930 cm⁻¹) [206]. Pík 1700 cm⁻¹, by mohl být také přiřazen karbonylové skupině acylmočoviny, vedlejšího produktu hydrolýzy EDC. Síťovací činidlo EDC se na polysacharidy, respektive NaHy, neváže přímo, ale prostřednictvím esterových vazeb, které vznikají mezi karboxylovými a hydroxylovými skupinami. Modifikací EDC, však může docházet ke vzniku derivátů močoviny, které se mohou podílet na tvorbě mezimolekulárního nebo intramolekulárního anhydridu kyseliny, který vzniká mezi dvěma karboxylovými skupinami. Z toho důvodu se při síťování NaHy v kombinaci

s karbodiimidy používají N-hydroxysukcinimidy, které vytvoření N-acylmočoviny zabraňují [207,208]. Příčinu vytvoření esterových vazeb mezi dvěma molekulami NaHy lze spíše najít v chemické reakci mezi anhydridem a hydroxylem. V případě, že kvůli vysoké nestabilitě anhydridu kyseliny ve vodě ($T = 25^{\circ}\text{C}$) nedojde k jeho vzájemnému kontaktu s hydroxylovými skupinami, síťovací reakce se neuskuteční [209-211]. Další pík, který se v oblasti $2700\text{-}2600\text{ cm}^{-1}$ pravděpodobně souvisí s -OH skupinou protonované močoviny. Všechny zbylé vazby a skupiny, které jsou ve spektru přítomny, odpovídají NaHy a jsou velmi podrobně rozebrány v práci autora Gilliho a kol. [212].

6.3.2.3 NMR

Stupeň modifikace NaHy byl ověřen ^1H NMR spektroskopií. Analýza byla provedena u výsledné směsi síťovaného hydrogelu NaHy a čiré tekutiny, získané jejím vytlačením z hydrogelu.

Obrázek 70: ^1H NMR Spektra a) NaHy v D_2O , b) standard EDC v D_2O , c) NaHy hydrogel, d) kapalina vytlačená z NaHy hydrogelu.

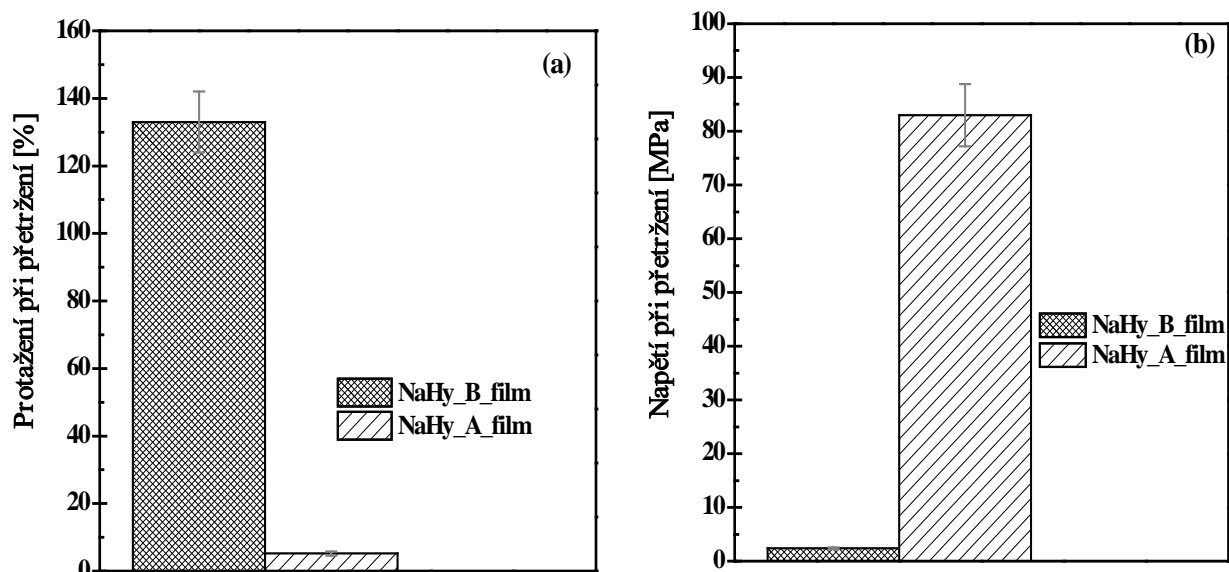


Jak lze vidět z NMR spektra (obr. 70), zesílený signál (linie c) naznačuje, že ve směsi hydrogelu a z něj pocházející tekutiny, byla potvrzena přítomnost EDC a jeho degradačního produktu (DP). Při porovnání spektra (a), které přísluší NaHy a spektra (b), které patří EDC, nebyl nalezen (kromě výše zmíněného signálu) jiný signál, který by pocházel z volného či modifikovaného NaHy. Na základě těchto zjištění byl stanoven nezreagovaný podíl EDC a jeho degradačního produktu, který poskytl informaci o rozsahu modifikace všech dostupných karboxylových skupin NaHy, které se mohou podílet na vzniku esterových vazeb. Molární koncentrace EDC a jeho degradačního produktu (DP), která byla určena z vlastních signálů koncových metylových skupin dle rovnice (39) ukázala, že koncentrace zbytkového EDC a DP byla 34,6 mM respektive 23mM. Pokud uvážíme, že počáteční koncentrace EDC odpovídala 0,1M je zřejmé, že bylo spotřebováno 42,4 mM EDC. Podle obecně přijaté teorie, že EDC reaguje výhradně s karboxylovými skupinami NaHy, je možné určit stupeň její modifikace. V případě že budeme vycházet z následujících parametrů: molekulová hmotnost NaHy $M_w = 500$ kDa, počáteční koncentrace NaHy $c_{NaHy} = 3,2 \cdot 10^{-5}$ M, molekulová hmotnost 1 meru NaHy $M_{meru} = 379,32$ Da, můžeme podle rovnice (40) spočítat koncentraci karboxylových skupin, která odpovídá 42,1 mM. Tento výsledek tak potvrzuje, že při síťování NaHy karbodiimidem, došlo k nasycení všech dostupných karboxylových skupin.

6.3.2.4 Mechanické vlastnosti

Mechanické vlastnosti nesíťovaného NaHy filmu (NaHy_A_film) a síťovaného NaHy filmu (NaHy_B_film) jsou zobrazeny na obr. 71 a, b. Testované vzorky připravené z nesíťovaného NaHy ukázaly, že napětí při přetržení (obr. 71b) dosahuje hodnoty 83 ± 15 MPa, zatímco u síťovaného NaHy pouze $2,4 \pm 0,2$ MPa. Kromě napětí při přetržení bylo také stanoveno protažení při přetržení (obr. 71a), které u nesíťovaného NaHy filmu dosahovalo, v porovnání se síťovaným filmem, výrazně nižších hodnot tedy $5,2 \pm 0,6$ % proti 133 ± 9 %.

Obrázek 71: Mechanické vlastnosti nesíťovaného (NaHy_A_film) a síťovaného NaHy filmu (NaHy_B_film); (a) protažení při přetržení (b) napětí při přetržení.



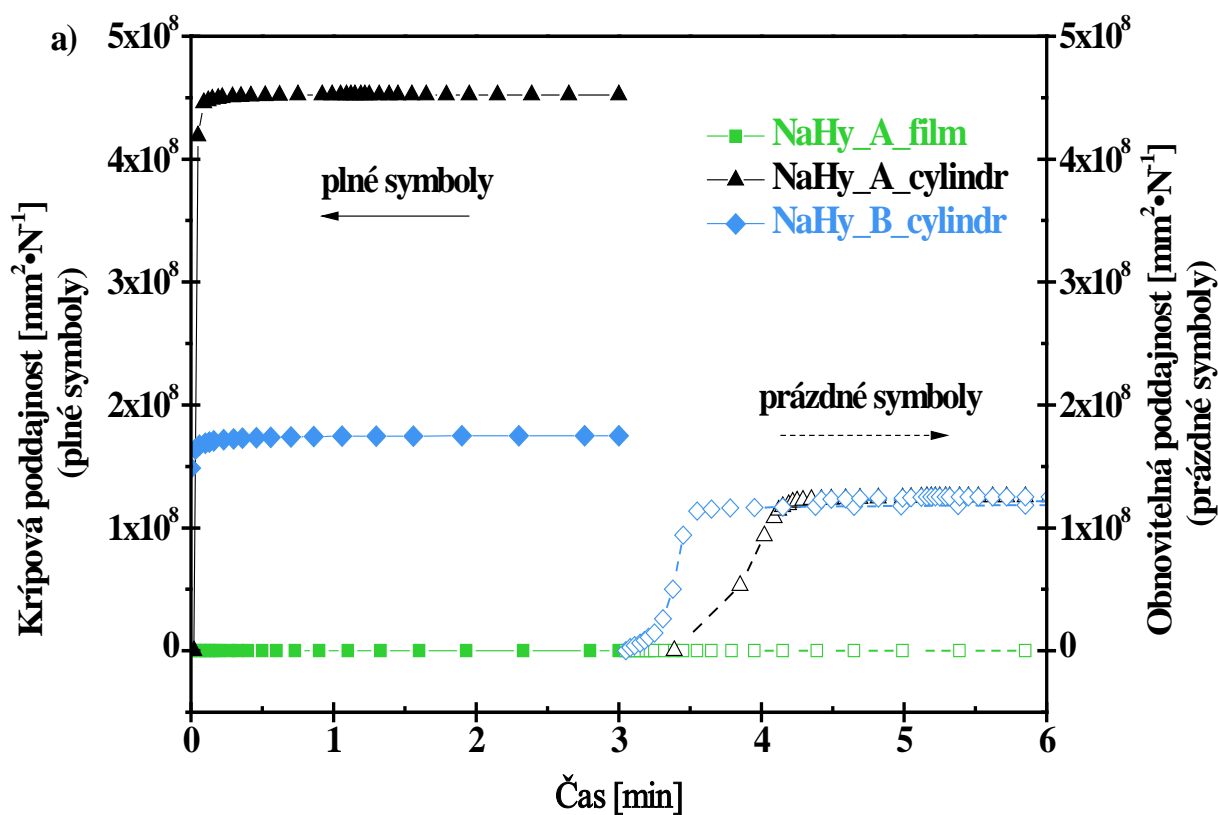
Tyto výsledky tak mohou poukazovat nato, že síťovaný NaHy film byl modifikován převážně tzv. „pendant“ modifikací, u které nemusí docházet k vzájemnému spojování molekul NaHy. Horší pevnost v tahu spolu se zvýšenou elasticitou je charakteristická pro materiály, které jsou typické nízkou hustotou zesíťování [213]. Jiný pohled ve své práci uvádí Lai a kol. [198], který poukazuje na vliv přítomné adsorbované vody, která může ovlivňovat stabilitu hydrofilní sítě NaHy a ve výsledku i mechanickou pevnost [213].

6.3.2.5 DMA analýza

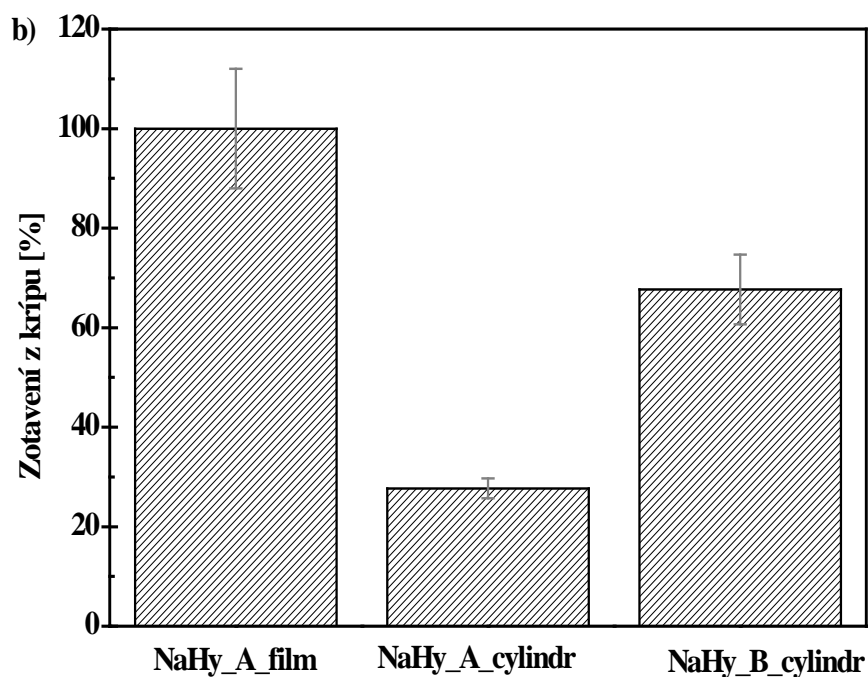
Viskoelastické vlastnosti nesíťovaných a síťovaných vzorků NaHy ve formě filmu a hydrogelu byly podrobeny měření kríповé poddajnosti (J) a kríповého zotavení (R). Kríповé chování NaHy vzorků vystavených napětí 1 kPa při teplotě 25°C jsou uvedeny na obrázku 72. Z přiložených výsledků, je zřejmé, že nejnižší kríповou poddajnost vykazuje nesíťovaný NaHy film (NaHy_A_film). Zesíťované NaHy filmy byly působícím napětím poškozeny, a proto u nich nebyla provedena další testování. U

nemodifikovaného (NaHy_A_cylindr) a síťovaného NaHy hydrogelu (NaHy_B_cylindr) odpovídala kríповá poddajnosť hodnotám $4,5 \cdot 10^8 \mu\text{m}^2 \cdot \text{N}^{-1}$ a $1,7 \cdot 10^8 \mu\text{m}^2 \cdot \text{N}^{-1}$. Jak je patrné z uvedených výsledků, změna tvaru materiálu způsobená vnější silou, významně závisí na metodě jeho přípravy. Kríповého zotavení testovaných vzorků NaHy získaných na základě výsledků z relaxace poddajnosti, lze seřadit následujícím způsobem: NaHy_A_cylindr < NaHy_B_cylindr < NaHy_A_film.

Obrázek 72: Kríp/kríповé zotavení NaHy vzorků; a) kríповá a obnovitelná poddajnosť, b) kríповé zotavení.



Časová závislost kríповého zotavení, vyjádřeného v procentech, je přiložena na obrázku 72b. U nesíťovaného filmu odpovídá jeho relaxační schopnost téměř 100%, zatímco dosažené stlačení pouze 0,3%. Naopak u nemodifikovaného hydrogelu (NaHy_A_cylindr) byla detekovaná 72% relaxace a 90% stlačení. Síťovaný hydrogel (NaHy_B_cylindr) vykazoval relaxaci kolem 68% a celkové možné stlačení 88%.



Na základě prezentovaných výsledků je tedy možné konstatovat, že NaHy síťovaná karbodiimidem dokáže absorbovat 99,9 a 97 % vody. Mimo jiné, bylo zjištěno, že síťováním NaHy dochází k výraznému snížení pevnosti v tahu a k 80% zlepšení prodloužení v tahu. Výsledky křípového testování ukázaly, že elasticita síťovaného NaHy výrazně závisí na formě a způsobu samotného síťování.

Prezentované výsledky budou použity jako podklad pro další výzkum, který je zaměřen na přípravu biodegradabilního kompozitu NaHy-lignin, využitelného pro jeho unikátní schopnost adsorbovat těžké kovy a ionty z vodných roztoků.

7 PŘÍNOS PRÁCE PRO VĚDU A PRAXI

Dizertační práce je zaměřená na popis chování hyaluronanu v prostředí solí, ať už v podobě tenzidu nebo Hofmeisterových solí.

Přínosem dizertační práce je shrnutí získaných informací vedoucí k pochopení základních principů konformačního chování hyaluronanu v prostředí přidaných elektrolytů či iontů ve formě tenzidů nebo různých solí. Objasnění interakcí NaHy-surfaktant je velmi důležité v mnoha oblastech medicíny či farmacie, protože roztoky tohoto typu jsou běžně používány, přestože detailní informace o chování NaHy v prostředí tenzidů nejsou dokonale popsány.

Nemalým benefitem této práce je studie popisující vliv jednotlivých solí z Hofmeisterovy řady na hyaluronan, provedená v širokém teplotním rozmezí. Problematika týkající se studia Hofmeisterových interakcí v prostředí polysacharidů je v literatuře téměř nedostupná a jakákoli charakterizace, natož hypotéza, objasňující interakce NaHy v roztoku s ionty Hofmeisterovy řady z hlediska problematiky kosmotropních nebo chaotropních iontů, je přínosná nejen z hlediska farmaceutických aplikací, ale i základního výzkumu

Nelze rovněž opomenout experimentální práci spojenou s přípravou a popisem viskoelastického chování karbodiimidu modifikovaného NaHy, která je rovněž významná. Tyto experimenty tvoří základ dalších studií vedoucích k přípravě kompozitních materiálů, hydrogelů či filmů NaHy s ligninem, který by měl v materiálu funkci adsorbéru těžkých kovů. Znalosti získané z předchozích experimentálních částí I a II této disertace budou pro přípravu zmíněných kompozitů velkou výhodou.

8 ZÁVĚR

Experimentální část dizertační práce byla rozdělená do tří částí. Její první část se zabývá studiem NaHy v přítomnosti opačně nabitého tenzidu, kvartérní amoniové soli v prostředí fosfátového pufru. Cílem bylo popsat interakce negativně nabitého NaHy a jeho konformační změny, vyvolané přidavky kladně nabitého benzalkonia chloridu (BAC). Sodná sůl kyseliny hyaluronové je záporný polyelektrolyt, který v roztoku zaujímá konformaci statistického klubka. Postupným přidáváním BAC do roztoku NaHy, dochází k hydrofobním interakcím působícím mezi NaHy a hydrofobními částmi BAC, které mají za následek výrazné změny ve velikosti a konformačním uspořádáním polymerního klubka NaHy.

Druhá část dizertační práce navazuje na studium interakčního chování NaHy, ale v prostředí vybraných solí Hofmeisterovy řady. Interakční chování těchto solí s NaHy bylo mimo jiné srovnání v rozmezí teplot 15, 20, 25, 30, 35, 40 a 45°C. Bylo zjištěno, že přidáním chaotropních iontů, tzn. iontů s malým povrchovým nábojem, dochází v přítomnosti NaHy k rozvolnění polymerního klubka, které souvisí s nestabilitou v jeho velikosti. Bylo zjištěno, že chaotropní ionty podporují hydrofilní interakce vedoucí k rozvolnění konformační struktury NaHy, ke kterému dochází při nižších teplotách. Čím větší povrchový náboj bude mít přidávaný iont, tím stabilněji (velikost částic) se NaHy v jeho prostředí bude chovat, a rozbalování polymerního klubka nastane až u vyšších teplot. Při porovnání účinků solí, nesoucích zároveň kosmotropní i chaotropní iont, byly zjištěny následující závěry. V případě kombinace malého povrchového náboje kationtu a velkého povrchového náboje aniontu, tzn. chaotropního kationtu a kosmotropního aniontu, bude převažovat vliv kosmotropního kationtu, který se projeví zvýšením povrchového napětí NaHy a podporou hydrofobních interakcí, které způsobují sbalování polymerního řetězce. Naopak u kombinace opačné, tzn. velkého povrchového náboje kationtu a malého povrchového náboje aniontu, se projeví vliv kosmotropního kationtu. Převaha kosmotropního kationtu způsobuje zvýšení povrchového napětí NaHy a stejně jako v předchozím případě i zmenšení velikosti částic, které souvisí s kompaktnější konformační

strukturou. Působení kosmotropního kationtu je však přítomností aniontu omezena, protože jeho účinnost je v porovnání s kationty mnohem výraznější.

Třetí a poslední část dizertační práce se věnuje viskoelastickému chování karbodiimidem modifikovaného NaHy. Byl připraven nerozpustný NaHy film a hydrogel, u kterých byla účinnost zesíťování NaHy potvrzena FT-IR a ^1H NMR spektroskopii, které prokázaly skutečnost, že všechny přítomné karboxylové skupiny NaHy byly modifikovány. Zesíťováním NaHy byl připraven materiál, který je schopen absorbovat 99,9 respektive 97 % vody. Mimo jiné bylo zjištěno, že síťováním NaHy dochází k výraznému snížení pevnosti v tahu a k 80 % zlepšení tahového prodloužení. Na základě výsledků kríповého testu bylo zjištěno, že elasticita síťovaného NaHy výrazně závisí na formě a způsobu samotného síťování. Tyto experimenty byly prováděny za účelem dalšího vývoje, který bude zaměřen na přípravu kompozitních systémů hydrogelů či nerozpustných filmů NaHy s ligninem. V tomto případě bude s výhodou využít i výzkum chování zředěných roztoků NaHy s přísávkou iontů Hofmeisterovy řady, případně kvartérních solí. Kompozitní materiál, ať už ve formě hydrogelu nebo filmu, by pak mohl najít přímé uplatnění v medicíně, konkrétně pro hojení ran.

9 LITERATURA

- [1.] Shalaby W. S., Burg K.J.L.: Absorbable and Biodegradable polymers. Advances in polymeric biomaterials series. CRC Press. 2004, 289p., ISBN: 0-8493-1484-4.
- [2.] Grigorij K., Šoltés L., Stern R., Gemeiner P.: Hyaluronic acid: a natural biopolymer with a broad range of biomedical and industrial applications. Biotechnol Lett. 2006, p.002-014, DOI: 10.1007/s10529-006-9219-z.
- [3.] Brown M.B., Jones S.A.: Hyaluronic acid: a unique topical vehicle for the localized delivery of drugs to the skin. European Academy of Dermatology and venereology. 2005, vol.19, p. 308-318, DOI: 10.1111/j.1468-3083.2004.01180.x.
- [4.] Sliva J., Minárik J.: Hyaluronát – nejen pasivní pozorovatel, nýbrž aktivní modulátor imunitních reakcí. New EU Magazine of Medicine. 2009, roč.1, č.2, s.75-79.
- [5.] Mata J., Varade D., Bahadur P.: Aggregation behavior of quaternary salt based cationic surfactants. Thermochemica Acta. 2005, vol.428, p.147–155, DOI: 10.1016/j.tca.2004.11.009.
- [6.] Kopecký F., Fazekas T., Kopecká B., Kaclík P.: Hydrophobicity and critical micelle concentration of some quaternary ammonium salts with one or two hydrophobic tails. Acta Facult. Pharm. Univ. Comenianae. 2007, vol. 54, p.84-94.
- [7.] Schiraldi Ch., Gatta A., Rosa M.: Biopolymers. 2010, Chapter 20. Biotechnological production an application of hyaluronan. Magdy Elnashar (Ed.), ISBN:978-953-307-109-1. DOI:10.5772/10271. (InTech, dostupné z <http://www.intechopen.com/books/biopolymers/biotechnological-production-characterization-and-application-of-hyaluronan>).

- [8.] Lapčik L. et al.: Hyaluronan: Preparation, Structure, Properties, and Applications. Chemical review. 1998, vol.98, n.8., p.2664-2684, DOI: 10.1021/cr941199z.
- [9.] Herslöf K., Sundelöf L., Edsman K.: Interaction between Polyelectrolyte and Surfactant of Opposite Charge. Hydrodynamic Effects in the Sodium Hyaluronate/Tetradecyltrimethylammonium Bromide/Sodium Chloride/Water System. J. Phys. Chem. 1992, vol. 96, no.5, p. 2345-2348. ISSN 0022-365, DOI: 10.1021/j100184a061.
- [10.] Thalberg K., Lindman B.: Interaction between hyaluronan and cationic surfactants. Journal of Physical Chemistry. 1989, vol. 93, p. 1478-1483, DOI: 10.1021/j100341a058.
- [11.] Thalberg K., Lindman B., Karlstrom G.: Phase Behavior of a System of Cationic Surfactant and Anionic Polyelectrolyte: The Effect of Salt. Journal of Physical Chemistry. 1991, vol. 95, p. 6004-6011, DOI: 10.1021/j100168a053.
- [12.] Villetti M.A., Borsali R., Crespo S.J., Soldi V., Fukada K.: Static and dynamic light scattering of polyelectrolyte/surfactant solutions: the Na-Hyaluronate/(C₁₀TAB) system. Macromol. Chem. Phys. 2004, vol. 205, p. 907-917, DOI: 10.1002/maco.200300192.
- [13.] Ansari A.A., Kamil M., Din K.U.: Interaction of oppositely charged polymer-surfactant system based on surface tension measurements. Journal of Petroleum science research (JPSR). 2013, vol.2, p.35-40.
- [14.] Horkay F., Basser P.J., Londono D.J., Hecht A., Geissler E.: Ions in hyaluronic acid solutions. The journal of chemical physics. 2009, vol. 131, p. 184902-1–184902-8, DOI: 10.1063/1.3262308.
- [15.] Halasova T., Krouska J., Mravec F., Pekař M.: Hyaluronan-surfactant interactions in physiological solution studied by tensiometry and fluorescence probe techniques. Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspect. 2011, vol.391, p.25-31, DOI: 10.1016/j.colsurfa.2011.05.035.

- [16.] Roure I., Rinaudo M., Milas M., Frollini E.: Viscometric behaviour of polyelectrolytes in the presence of low salt concentration. *Polymer*. 1998, vol. 39, n.22, p.5441-5445, DOI: 10.1016/S0032-3861(97)10274-9.
- [17.] Thalberg K., Lindman B., Karlström G.: Phase diagram of a system of cationic surfactant and anionic polyelectrolyte: tetradecyltrimethylammonium bromide-hyaluronan-water. *J. Phys. Chem.* 1990, vol. 94, p. 4289-4295, DOI: 10.1021/j100373a075
- [18.] Pisárčik M., Soldán M., Bakoš D., Devínsk F., Lacko I.: Viscometric study of the sodium hyaluronate-sodium chloride-alkyl-(n)-ammonium surfactant system. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering aspects*. 1990, vol. 150, p. 207-216, DOI: 10.1016/S0927-7757(98)00837-1.
- [19.] Ferber V.C., Löwen H.: Complexes of polyelectrolytes and oppositely charged ionic surfactants. *Journal of chemical physics*. 2003, vol. 118, n. 23, p. 10774-10779, DOI: 10.1063/1.1574782.
- [20.] Xu J., Bai H., Yi Ch., Luo J., Yang Ch., Xia W., Liu X.: Self-assembly behaviour between native hyaluronan and styrylpyridinium in aqueous solution. *Carbohydrate Polymers*. 2011, vol. 86, p. 678-683, DOI: 10.1016/j.carbpol.2011.05.006.
- [21.] Cowman M. K., Matsuoka S.: Experimental approaches to hyaluronan structure. *Carbohydrate Research*. 2005, vol. 340, p. 791-809, DOI: 10.1016/j.carres.2005.01.022.
- [22.] Calciu-Rusu D., Rothfuss E., Eckelt J., Haase T., Dick B. H., Wolf A.B.: Rheology of sodium hyaluronate saline solutions for ophthalmic use. *Biomacromolecules*. 2007, vol. 8, p. 1287-1292, DOI: 10.1021/bm061039k.
- [23.] Kunz W., Henle J., Ninham B.W.: „Zur Lehre von der Wirkung der Salze“ (about the science of the effect of salts): Franz Hofmeister's historical papers. *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, 2004. Vol.9, p.19-37, DOI: 10.1016/j.cocis.2004.05.005.

- [24.] Kunz W., lo Nostro P., Ninham B.W.: The present state of affairs with Hofmeister effects. *Curr Opin Colloid Interface Sci*, 2004, Vol. 9, p.1-18.
- [25.] Ninham B.W., Yaminsky V.: Ion binding and ions specificity: the Hofmeister effect and Onsager and Lifshitz theories. *Langmuir*, 1997. Vol.13, p.2097-20108.
- [26.] Boström M., Williams D.R.M., Ninham B.W.: Specific ion effects: why DLVO theory fails for biology and colloid systems. *Phys Rev Lett*, 2001. Vol.87, p.168103-1-168103-4, DOI: 10.1103/PhysRevLett.87.168103.
- [27.] Boström M., Williams D.R.M., Ninham B.W.: Ion specificity of micelles explained by ionic dispersion forces. *Langmuir*, 2002. Vol. 18, p.6010-6014, DOI: 10.1021/la0201220.
- [28.] Ivanov I.B., Slavchov I.R., Basheva E.S., Sidzhakova D., Karakashev S.I.: Hofmeister effect on micellization, thin films and emulsion stability. *Advances in Colloid and Interface Science*, 2011. Vol.168, p.93-104, DOI: 10.1016/j.cis.2011.06.002.
- [29.] Dos Santos A.P., Levin Y.: Surface and interfacial tensions of Hofmeister electrolytes. *Faraday Discuss.*, 2013. Vol.160, p.75-87, DOI: 10.1039/c2fd20067h.
- [30.] Omta A.W., Kropman M.F, Woutersen S., Bakker H.J.: Negligible effect of ions on the hydrogen-bond structure in liquid water. *Science*, 2003. Vol.301, p.347-349, DOI: 10.1126/science.1084801.
- [31.] Omta A.W, Kropman M.F., Woutersen S., Bakker H.J.: Influence of ions on the hydrogen-bond structure in liquid water. *J Chem Phys*, 2003. Vol.119, p.12457-12461, DOI: 10.1063/1.1623746.
- [32.] Zhang Y., Cremer P.S.: Interactions between macromolecules and ions: the Hofmeister series. *Current Opinion in Chemical Biology*, 2006. Vol.10, p. 658-663, DOI: 10.1016/j.cbpa.2006.09.020.
- [33.] Wyatt N.B., Gunther C.M., Liberatore M.W.: Increasing in entangled polyelectrolyte solutions by the addition of salt. *Polymer*, 2011. Vol. 52, p.2437-2444, DOI: 10.1016/j.polymer.2011.03.053.

- [34.] Meyer K., Palmer J.W.: The polysaccharide of the vitreous humor. *The Journal of Biological Chemistry*. 1934, vol.107, p.629-634.
- [35.] Hascall V.C.: The Karl Meyer Award for glycoconjugate research. *Glycobiology*. 2004, vol. 14, p. 3G-6G. DOI: 10.1093/glycob/cwh027.
- [36.] Kendall F.E., Heidelberger M., Dawson M.H.: A serologically inactive polysaccharide elaborated by mucoid strains of group A hemolytic streptococcus. *J Biol Chem*. 1937, vol. 118, p.61-69.
- [37.] Necas J., Bartosikova L., Brauner P., Kolar J.: Hyaluronic acid (hyaluronan): a review. *Veterinari medicine*. 2008, vo. 8, p. 397-411.
- [38.] Pethrick R.A., Ballada A., Zaikov G.E: *Handbook of polymer research: Monomers, Oligomers, Polymers and Composites*. Nova Science Publishers, Inc. 2007, Chapter 31, Kogan G., Šoltés L., Stern R., Mendichi R.: Hyaluronic acid: a biopolymer With versatile physico-chemical and biological properties. p. 393-439, ISBN:978-1-60021-652-0.
- [39.] Boeriu G. C., Springer J., Kooy F. K., Broek L. A. M., Eggink G.: Production methods for hyaluronan. *International Journal of Carbohydrate Chemistry*. 2013, p.1-14. DOI: 10.1155/2013624967.
- [40.] Balazs E.A., Laurent T.C., Jeanloz R.W.: Nomenclature of hyaluronic acid. *Biochem. J.* 1986, vol.242, p.903.
- [41.] Fraser J.R.E., Laurent T.C., Laurent U.B.G.: Hyaluronan: its nature, distribution, functions and turnover. *Journal of internal medicine*. 1997, vol. 242, p. 27-33, DOI: 10.1046/j.1365-2796.1997.00170.x.
- [42.] Manasa M., Sridevi V., Chandana Lakshmi M.V.V., Dedeepya J.: A Review on Hyaluronic Acid. *Int. J. Res. Chem. Environ*. 2012, vol.2, p.6-11, DOI: 10.1046/j.1365-2796.1997.00170.x.
- [43.] Trommer H., Wartewig S., Bottcher R., Poppl A., Hoentsch J., Ozegowski J.H., Neubert R.H.H.: The effects of hyaluronan and its fragments on lipid models exposed to UV irradiation. *Int J Pharm*. 2003, vol.254, p.223-234, DOI: 10.1016/S0378-5173(03)00033-4.

- [44.] Platt V.M., Szoka F.C.: Anticancer therapeutics: targeting macromolecules and nanocarriers to hyaluronan or CD44, a hyaluronan receptor. *Mol. Pharm.* 2008, vol.5, p.474-486, DOI: 10.1021/mp800024g.
- [45.] Yadav A.K., Mishra P., Mishra A.K., Jain S., Agrawal G.P.: Development and characterization of hyaluronic acid-anchored PLGA nanoparticulate carriers of doxorubicin. *Nanomedic.* 2007, vol.3, p.246-257, DOI: 10.1016/j.nano.2007.09.004.
- [46.] Toole B.P.: Hyaluronan in morphogenesis. *J Intern Med.* 1997, vol.242, n.1, p.35-40, DOI: 10.1046/j.1365-2796.1997.00171.x.
- [47.] Marcellin E., Chen W., Nielsen L.K.: Microbial Production of Biopolymers and Polymers Precursors: Application and Perspectives. B.H.A Rehm (Ed.), Chapter: Microbial hyaluronic acid biosynthesis. In p.163-180, Caisters academic press. 2009, vol.7, p.163-179. ISBN: 978-1-904455-36-3.
- [48.] Ignatova E. U., Gurov A.N.: Principles of extraction and purification of hyaluronic acid. *Khimiko-Farmatsevticheskii Zhurnal.* 1990, vol.24, n.3, p.42-46, DOI: 10.1007/BF00771704.
- [49.] Laurent U.B.G., Reed R.K.: Turnover of hyaluronan in the tissues. *Adv Drug Deliv Rev.* 1991, vol.7, p.237-256, DOI:10.1016/0169-409X(91)90004-V.
- [50.] Murray C.A., Zloty D., Warshawski L.: The evolution of soft tissue fillers in clinical practice. *Dermatol Clin.* 2005, vol.23, p.343-363, DOI: 10.1016/j.det.2004.09.009.
- [51.] Stern R., Kogan G., Jedrzejewski M., Soltes L.: The many ways to cleave hyaluronan. *Biotechnol Adv.* 2007, vol.25, p.537-557, DOI: 10.1016/j.biotechadv.2007.07.001.
- [52.] De Angelis P.L.: Hyaluronan synthases: fascinating glycosyltransferases from vertebrates, bacterial pathogens, and algal viruses. *Cell Mol Life Sci.* 1999, vol.56, p.670-682, DOI: 10.1007/s000180050461.
- [53.] De Angelis P.L., Jing W., Drake R.R., Achyuthan A.M.: Identification and Molecular Cloning of a Unique Hyaluronan Synthase from *Pasteurella*

multocida. J Biol Chem. 1998, vol.273, p.8454-8458, DOI: 10.1074/jbc.273.14.8454.

- [54.] Schmidt K.H., Gunther E., Courtney H.S.: Expression of both M protein and hyaluronic acid capsule by group A streptococcal strains results in a high virulence for chicken embryos. Med Microbiol Immunol. 1996, vol.184, n.4, p.169-73, DOI: 10.1007/BF02456131.
- [55.] Hardingham T.E., Muir H.: The specific interaction of hyaluronic acid with cartilage proteoglycans. Biochimica et Biophysica Acta. 1972, vol. 279, no. 2, p. 401–405, DOI: 10.1016/0304-4165(72)90160-2.
- [56.] Liu L., Yanfeng L., Jianghua L., Guocheng D., Jian Ch.: Microbial production of hyaluronic acid: current state, challenges, and perspectives. Microbial cell factories. 2011, vol.10, n.99, p.1-9, DOI: 10.1186/1475-2859-10-99.
- [57.] Balazs E.A.: Ultrapure hyaluronic acid and the use thereof. U.S. Patent. 1979, US4141973.
- [58.] Izawa N., Hanamizu T., Iizuka R., Sone T., Mizukoski H., Kimura K., Chiba K.: Streptococcus thermophilus produces exopolysaccharides including hyaluronic acid. Journal of Bioscience and Bioengineering. 2009, vol. 107, no. 2, p. 119–123, DOI:10.1016/j.jbiosc.2008.11.007.
- [59.] Fong Ch. B., Nielsen L.K.: Aerobic cultivation of Streptococcus zooepidemicus and the role of NADH oxidase. Biochem Eng J.. 2003, vol.16, p.153-162, DOI: 10.1016/S1369-703X(03)00031-7.
- [60.] Fong Ch. B., Nielsen L.K.: Amplifying the cellular reduction potential of Streptococcus zooepidemicus. J Biotechnol. 2003, vol.100, p.33-41, DOI: 10.1016/S0168-1656(02)00239-0.
- [61.] Krahulec J., Krahulcova J.: Increase in hyaluronic acid production by Streptococcus equi subsp zooepidemicus strain deficient in beta-glucuronidase in laboratory conditions. Appl Microbiol Biotechnol. 2006, vol.71, p.415-422, DOI: 10.1007/s00253-005-0173-9.

- [62.] Izawa N., Serata M., Sone T., Omasa T., Ohtake H.: Hyaluronic acid production by recombinant *Streptococcus thermophilus*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 2011, vol. 111, no. 6, p. 665–670, DOI: 10.1016/j.jbiosc.2011.02.005.
- [63.] Brimacombe J.S., Webber J.M.: *Mucopolysaccharides: Chemical structure, distribution and isolation*. Amsterdam: Elsevier Science Ltd., 1964. 181 p., ISBN: 0444400842, ISBN-13: 9780444400840.
- [64.] Laurent T. C., Fraser J.R.E.: Hyaluronan. *FASEB J.* 1992, vol.6, p.2397-2404.
- [65.] Velebný V.: *Hyaluronan-biopolymer pro tkáňové inženýrství*. Teze habilitační práce. VUT Brno 2012.
- [66.] Hascall C.V., Laurent C.T.Dr.: Hyaluronan: structure and physical properties. *Glycoforum*. 1997, p.1-5. (Dostupné z <http://www.glycoforum.gr.jp/science/hyaluronan/HA01/HA01E.html>).
- [67.] Balazs E.A.: *Chemistry and molecular biology of the intracellular matrix*. Chapter: Laurent T.C.: Structure of hyaluronic acid. Academic Press, London, 1970, p.703-732.
- [68.] Scot J. E., Heatley F.: Hyaluronan forms specific stable tertiary structures in aqueous solution: a C-13 NMR study. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1999, vol.96, p.4850-4855, DOI: 10.1073/pnas.96.9.4850.
- [69.] Pogány P., Kovács A.: Conformational properties of the disaccharide building units of hyaluronan. *Carbohydrate Research*. 2009, vol.344, p.745-1752, DOI: 10.1016/j.carres.2009.05.030.
- [70.] Scott J.E.: Secondary and tertiary structures of hyaluronan in aqueous solutions. Some biological consequences. 1998, p.1-10. (Dostupné z: <http://www.glycoforum.gr.jp/science/hyaluronan/HA02/HA02E.html>).
- [71.] Heatley F., Scott J.E.: A water molecule participates in the secondary structure of hyaluronan. *Biochem. J.* 1988, vol.254, p.489-493.
- [72.] Scott J.E., Heatley F., Moorcroft D., Olavesen A.H.: Secondary structures of hyaluronate and chondroitin sulphates. A ¹H NMR study of NH signals in

- dimethyl sulphoxide solution. *Biochem J.* 1981, vol.199, p.829-832, DOI: 10.1111/j.1432-1033.1983.tb07177.x.
- [73.] Laurent T.C., Laurent B.G.U., Fraser J.R.E.: The structure and function of hyaluronan: An overview. *Immunology and Cell Biology.* 1996, vol.74, p. A1-A7.
- [74.] Scott J.E., Cummings C., Brass A. Chen Y.: Secondary and tertiary structures of hyaluronan in aqueous solutions, investigated by rotary shadowing-electron microscopy and computer simulation. Hyaluronan is very efficient network-forming polymer. *Biochemical Journal.* 1991, vol.274, n.3, p.699-705.
- [75.] Blundell Ch.D., De Angelis P.L., Almond A.: Hyaluronan: the absence of amide-carboxylate hydrogen bond and the chain conformation in aqueous solution are incompatible with stable secondary and tertiary structure models. *Biochem. J.* 2006, vol.396, p.487-498, DOI: 10.1042/BJ20060085.
- [76.] Gřundělová L., Mráček A., Kašpárková V., Minařík T., Smolka P. The influence of quarternary salt on hyaluronan conformation and particle size in solution. *Carbohydrate polymers.* 2013, vol. 98, p.1039-1044, DOI: 10.1016/j.carbpol.2013.06.057.
- [77.] Scott J.E.: Supramolecular organisation of extracellular matrix glycosaminoglycans, in vitro and in the tissues. *FASEB Journal.* 1992, vol.6, p.2639-2645.
- [78.] Scott J.E., Chen Y., Brass A.: Secondary and tertiary structures involving chondroitin and chondroitin sulphates in solution, investigated by rotary shadowing-electron microscopy and computer simulation. *Eur Biochem. J.* 1992, vol.209, p. 675-800, DOI: 10.1111/j.1432-1033.1992.tb17335.x.
- [79.] Mráček A., Varhaníková J., Lehocký M., Gřundělová L., Pokopcová A., Velebný V.: The influence of hofmeister series ions on hyaluronan swelling and viscosity. *Molecules.* 2008, vol.13, p.1025-1034, DOI: 10.3390/molecules13051025.

- [80.] Geissler E., Hecht A-M., Horkay F.: Scaling behaviour of hyaluronic acid in solutions with mono- and divalents ions. *Macromol Symp.*. 2010, vol.291-292, n.1, p.362-370. DOI: 10.1002/masy.201050543.
- [81.] Sheehan J.K., Atkins E.D.T.: X-Ray fiber diffraction study of the conformational change in hyaluronate induced in the presence of sodium, potassium and calcium cations. *Int. J. Biol. Macromol.*. 1983, vol.5, p.215-221.
- [82.] Sheehan J.K., Gardner K.H., Atkins E.D.T: Hyaluronic acid: a double helical structure in the presence of potassium at low pH and found also with cations ammonium, rubidium and caesium. *J. Mol. Biol.*. 1977, vol.117, p.113-135, DOI: 10.1016/0022-2836(77)90027-4.
- [83.] Winter W.T., Smith P.J.C.: Hyaluronic acid: structure of a fully extended 3-fold helical sodium salt and comparison with the less extended 4-fold helical forms. *J Mol Biol.* 1975, vol.99, p.219-235, DOI: 10.1016/S0022-2836(75)80142-2.
- [84.] Atkins E.D.T., Phelps C.F., Sheehan J.K.: The conformation of the mucopolysaccharides; hyaluronates. *Biochem. J.*. 1972, vol.128, p.1255-1263, AC: WOS:A1972N183000033.
- [85.] Arnott S., Mitra A.K., Raghunathan S.: Hyaluronic acid double helix. *J. Mol. Biol.*. 1983, vol.169, p.861-872.
- [86.] Haxaire K., Bracciny I., Milas M., Rinaudo M., Pérez S.: Conformation behaviour of hyaluronan in relation to its physical properties as probed by molecular modeling. *Glycobiology.* 2000, vol.10, n.6, p.587-594, DOI: 10.1093/glycob/10.6.587.
- [87.] Gribbon P., Heng B.C., Hardingham T.E.: The analysis of intermolecular interactions in concentrated hyaluronan solutions suggest no evidence for chain-chain association. *Biochem J.*. 2000, vol.350, p.329-335, DOI: 10.1042/0264-6021:3500329.
- [88.] Gibbs D.A., Merrill E.W., Smith K.A., Balzs E.A: Rheology of hyaluronic acid. *Biopolymers.* 1968, vol.6, p.777-791, DOI: 10.1002/bip.1968.360060603.

- [89.] Karim S., Brown M.B. Ingham S. Martin G.P., Marriott C.: Rheological and molecular weight studies of hyaluronan. *Eur. J. Pharm Sci.*. 1996, vol.4, p.175-175(1), DOI: 10.1016/S0928-0987(97)86531-1.
- [90.] Kobayashi Y., Okamoto A., Nishinary K.: Viscoelasticity of hyaluronic acid with different molecular-weights. *Biorheology*. 1994, vol.31, p.235-244.
- [91.] Fujii K., Kawata M., Kobayashi Y., Okamoto A., Nishinari K.: Effects of the addition of hyaluronate segments with different chain lengths on the viscoelasticity of hyaluronic acid solutions. *Biopolymers*. 1996, vol.38, p.583-591, DOI: 10.1002/(SICI)1097-0282(199605)38:5<583::AID-BIP4>3.0.CO;2-O.
- [92.] Pasquali-Ronchetti I., Quaglino D., Mori G., Bacchelli B., Ghosh P.: Hyaluronan-phospholipid interactions. *J. Struct Biol Biol*. 1997, vol.120, p.1-10, DOI: 10.1006/jsbi.1997.3908.
- [93.] Ghosh P., Hutadilok N., Adam N., Lentini A.: Interactions of hyaluronan (hyaluronic-acid) with phospholipids as determined by gel-permeation chromatography, multi-angle laser-light-scattering photometry and H-1-Mmr spectroscopy. *Int. J. Biol: Macromol.*. 1994, vol.16, p.237-244, DOI: 0.1016/0141-8130(94)90028-0.
- [94.] Tadros T. F.: *Applied Surfactants*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim 2005. ISBN-13: 978-3-527-30629-9.
- [95.] Holmberg K., Jönsson B., Kronberg B., Lindman B.: *Surfactants and polymers in aqueous solutions*, second edition. John Wiley & Sons Ltd., England 2003. ISBN: 0-471-49883-1.
- [96.] Meyers D.: *Surfactants science and technology*, third edition. John Wiley & Sons INC., New Jersey. ISBN: 13 978-0471-68024-6.
- [97.] Salager J.L.: *Surfactants, types and uses. Laboratory of formulation, interfaces, rheology and processes*. Mérida-Venezuela, 2002.
- [98.] Dispersing proces. [online]. [cit.2014-06-30]. Dostupné z: <http://www.inkline.gr/inkjet/newtech/tech/dispersion/>.

- [99.] Linfield W.M., Linfield W.M. (ed.): Anionic Surfactants, Dekker M., New York, 1967.
- [100.] Lucassen-Reynders E.H.: Anionic Surfactants – Physical Chemistry of Surfactant Action, Dekker M., New York, 1981.
- [101.] Atkins P., Paula D.J.: Atkins' Physical chemistry. W. H. Freeman and Company, New York. Eight edition. 2006. ISBN: 0198700725.
- [102.] Hampl F.: Biomimetika – organizované vrstvy, liposomy. Ústav organické chemie VŠCHT, Praha. p.181-192.
- [103.] McBain J.W.: Mobility of Highly-charged Micelles. Trans. Faraday Soc., 1913. Vol. 9., p.99-101.
- [104.] Adam N.K.: The evaporation of water from clean and contaminated surfaces. J. Phys. Chem., 1925. Vol.29, p.87-101, DOI: 10.1021/j150251a010.
- [105.] Hartley G.S.: Aqueous of paraffin chain salts: a study in micelle formation. Hermann and Cie, Paris, 1936. p.69.
- [106.] Israelachvili J.N.: Intermolecular and Surface Forces, with applications to colloid and biological systems. Academic Press, London 1985. p.247, ISBN: 0123751802 9780123751805
- [107.] Jones M.N.: Dye solubilization by a polymer-surfactant complex. J. Colloid Interface Sci., 1968. Vol.27, p.532-533.
- [108.] Arai H., Murata M., Shinoda K.: The interaction between polymer and surfactant: The composition of the complex between polyvinylpyrrolidone and sodium alkyl sulfate as revealed by surface tension, dialysis, and solubilization. J. Colloid Interface Sci., 1971, Vol. 37, p.223-227, DOI:10.1016/0021-9797(71)90284-0.
- [109.] Shirahama K., Ide N.: The interaction between sodium alkylsulfates and poly(ethylene oxide) in 0.1 M NaCl solutions. J. Colloid Sci., 1976. Vol. 54, p.450-452, DOI: 10.1016/0021-9797(76)90326-X.
- [110.] Capalbi A., La Mesa C.: Polymer-surfactant interactions. Journal of Thermal Analysis and Calorimetry, 2001. Vol. 66, p. 233-241, DOI: 10.1023/A:1012456202997.

- [111.] Breuer M.M., Robb I.D.: Interactions between macromolecules and detergents. *Chem. Ind.*, 1972, Vol.13, p.530-535.
- [112.] Anghel D.F., Winnik F.M., Galatanu N.: Effect of the surfactant head group length on the interactions between polyethylene glycol mono-nonylphenyl ethers and poly(acrylic acid). *Colloid Surf.*, 1999. Vol. 149, p. 339-345, DOI: 10.1016/S0927-7757(98)00293-3.
- [113.] Wang L., Yu H.: Chain conformation of linear polyelectrolyte in salt solutions: sodium poly(styrenesulfonate) in potassium chloride and sodium chloride. *Macromolecules*, 1988. Vol. 21., P. 3498-3501, DOI: 10.1021/ma00190a026.
- [114.] Thalberg K., Lindman B, Bergfeldt K.: Phase behavior of systems of polyacrylate and cationic surfactants. *Langmuir*, 1991, vol. 7, p. 2893-2898, DOI: 10.1021/la00060a005.
- [115.] Poiseuille J.L.: Sur le mouvement de liquides de nature différente dans les tubes de très-petits diamètres. *Ann Chim Phys 3rd series*, 1847. Vol.21, p.76-110.
- [116.] Jones G., Dole M.: The viscosities of aqueous solutions of strong electrolytes with special reference to barium chloride. *J. Am. Chem Soc.*, 1929. Vol.51, p.50-64, DOI: 10.1021/ja01385a012.
- [117.] Cox W.M., Wolfenden J.H.: The viscosity of strong electrolytes measured by a differential method. *Proc R Soc Lond A*145, 1934. Vol.145, p.475-488, DOI: 10.1098/rspa.1934.0113.
- [118.] Voet A.: Quantitative lyotropy. *Chem Rev.*, 1937. Vol.20, p.169-179, DOI: 10.1021/cr60066a001.
- [119.] Pearson R.G.: Hard and soft acids and bases. *J Am Chem Soc.*, 1963. Vol.85, p.3533-3539, DOI: 10.1021/ja00905a001.
- [120.] Kunz W.: Specific Ion Effects. In Chapter 1: An attempt of a general overview. *World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd.*, 2009. ISBN: 978-981-4271-57-8.

- [121.] Kunz W.: Specific ion effects in colloidal and biological systems. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 2010. Vol. 15, p. 34-39. DOI: 10.1016/j.cocis.2009.11.008.
- [122.] Mason P.E., Neilson G.W., Enderby J.E., Saboungi M.L., Dempsey C.E., Mackerell A.D., Brady J.W.: The structure of aqueous guanidinium chloride solutions. *J Am Chem Soc.*, 2004. Vol.126, p.11462-11470. DOI: 10.1021/ja040034x.
- [123.] Mason Ph.E., Dempsey Ch.E., Vrbka L., Heyda J., Brady J.W., Jungwirth P.: Specificity of ion-protein interactions: complementary and competitive effects of tetrapropylammonium, guanidinium, sulfate, and chloride ions. *J Phys Chem B.*, 2009. Vol. 113, p.3227-3234, DOI: 10.1021/jp8112232.
- [124.] Swann J.M.G., Bras W., Topham P.D., Howse J.R., Ryan A.J.: Effect of the Hofmeister Anions upon the Swelling of a Self-Assembled pH-Responsive Hydrogel. *Langmuir*, 2010. Vol. 26, p. 10191-10197, DOI: 10.1021/1a100339f.
- [125.] Lund M., Vrbka L., Jungwirth P.: Specific ion binding to nonpolar surface patches of proteins. *J Am Chem Soc*, 2007. Vol.130, p.11582-11583, DOI: 10.1021/ja803274p.
- [126.] Yang Z.: Hofmeister effects: an explanation for the impact of ionic liquids on biocatalysis. *Journal of Biotechnology*, 2009. Vol.144, p. 12-22. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2009.04.011.
- [127.] Collins K.D.: Ions from the Hofmeister series and osmolytes: effects on proteins in solution and in the crystallization process. *Methods*, 2004. Vol.34, p.300-311, DOI: 10.1016/j.ymeth.2004.03.021.
- [128.] Dill K.A., Truskett T.M., Vlachy V., Hribar-Lee B.: Modeling water, the hydrophobic effect, and ion solvation. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, 2005. Vol.34, p.173-199, DOI: 10.1146/annurev.biophys.34.040204.144517.
- [129.] Eggers D.K., Valentine J.S.: Crowding and hydration effects on protein conformation: a study with sol-gel encapsulated proteins. *J. Mol. Biol.*, 2001. Vol. 314, p.911-922, DOI: 10.1006/jmbi.2001.5166.

- [130.] Merkus G. H. Particle size measurements: fundamentals, Practice, Quality. Springer Science+Bisuness Media B.V., 2009. ISBN: 978-1_4020-9015-8, e-ISBN: 978-1_4020-9016-5.
- [131.] Horiba Instruments, Inc.: A guidebook to particle size analysis – Horiba scientific. 2012, p.1-29.
- [132.] Pabst W., Gregorová E.: Characterization of particles and particle systems. ICT Prague 2007.(FRVŠ 674/2007 F1/b).
- [133.] Hogg R.: Issues in particle size analysis. KONA Powder and Particle Journal. 2008, n.26, p.81-93.
- [134.] Jaeger D.N. Demeyere H., Finsy R., Sneyers R., Vanderdeelen J., Meeren P., Laethem V.M.: Particle sizing by photon correlation spetctroskopy. Part I: Monodisperse Latices: Influences of scattering angle and concentration of dispersed material. Part. Part. Syst. Charactr. 1991, vol.8, p.179-186, DOI: 10.1002/ppsc.19910080134.
- [135.] Teraoka I.: Polymer Solutions: An introduction to physical properties. John Wiley & Sons, Inc. 2002. ISBNs: 0-471-38929-3 (Hardback); 0-471-22451-0 (Electronic).
- [136.] Rawle A.: Basic Principles of particle size analysis. Malvern Instrumets. UK, p.1-8.
- [137.] Malvern Instruments Worldwide.: A basic guide to particle characterization. Inform white paper. Malvern Instruments Limited. 2012, p.1-25, MRK1806-01.
- [138.] Renliang Xu.: Characterization: Light scattering methods. Kluwer academic publishers. 2002, ISBN: 0-792-36300-0, eBook ISBN: 0-306-47124-8.
- [139.] Sun S.F.: Physical chemistry of macromolecules, basic principles and issues. John Wiley & Sons, Inc., Second edition. 2004, ISBN: 0-471-28138-7.
- [140.] Brar S.K., Verma M.: Measurement of nanoparticles by light-scattering techniques. Trends in analytical chemistry. 2011, vol.30, n.1, p.4-17, DOI: 10.1016/j.trac.2010.08.008.
- [141.] Atkins P., Paula D.J.: Atkins' Physical chemistry. W. H. Freeman and Company, New York. Eight edition. 2006. ISBN: 0198700725.

- [142.] Øgendal L. Light scattering demystified theory and practice. University of Copenhagen. 2013, 125 p., (dostupné z http://igm.fys.ku.dk/~lho/personal/lho/lightscattering_theory_and_practice.pdf).
- [143.] Potts M.K.: Review of light scattering literature. Army research laboratory. 1994, p.1-29, NSN: 7540-01280-5500.
- [144.] Zhelev N., Barudov S.: Laser light scattering applications in biotechnology. *Biotechnol & Biotechnol. Eq.* 2005, vol.19, n.3, p.3-8.
- [145.] Murphy R.M.: Static and dynamic light scattering of biological macromolecules: what we can learn? *Current Opinion in Biotechnology.* 1997, vol.8, p.25-30, DOI: 10.1016/S0958-1669(97)80153-X.
- [146.] Holoubek J.: Some applications of light scattering in material science. *Journal of quantitative spectroscopy & Radiative transfer.* 2007, vol.106, p.104-121, DOI: 10.1016/j.jqsrt.2007.01.013.
- [147.] Malvern: Zetasizer Nano series user manual. Malvern Instruments Ltd., 2003, 2004, UK. MAN0317.
- [148.] Santos N.C., Castanho M.A.R.B.: Teaching light scattering spectroscopy: The dimension and shape of tobacco mosaic virus. *Biophysical Journal.* 1996, vol.71, p.1641-1646, DOI: 10.1016/S0006-3495(96)79369-4.
- [149.] Mleziva J., Kálal J.: *Základy makromolekulární chemie.* SNTL, Praha 1986, DT 541.64(075.8).
- [150.] Bartovská L., Šišková M., Pouchlý J.: *Co je co v povrchové a koloidní chemii.* Vysoká škola chemicko-technologická v praze. 2005, ISBN: 978-80-7080-674-6.
- [151.] Russo P.: A practical minicourse in dynamic light scattering. 2012, p.2-48. (dostupné z <http://macro-lsu.edu/how to>).
- [152.] Arznšek D., Podgornik R., Kuzman D.: *Dynamic light scattering and application to protein solutions.* Department of Physics, Faculty of mathematics and physics, University of Ljubljana 2010, p.1-18.

- [153.] LS-Instruments.: Dynamic light scattering: Measuring the particle size distribution. LS-Instruments [online]. © 2009. (Dostupné z: http://www.lsinstruments.ch/technology/dynamic_light_scattering_dls/).
- [154.] Jackson K.: Dynamický rozptyl světla - co, jak, proč? CHEMagazín. 2007, 4.1, roč. XVII, p.12-14.
- [155.] Malvern Instruments: Dynamic light scattering: An Introduction in 30 minutes. Malvern instruments Ltd, DLS technical note, p.1-8, MRK656-01.
- [156.] Wyatt technology Europe: Dynamic Light Scattering (DLS or QELS = Quasi-elastic Light Scattering). Wyatt Technology Europe GmbH. [online]. Copyright © 2012. (Dostupné z: http://www.wyatt.eu/index.php?id=dynamic_light_scattering&L=0%22onfocus%3D%22blurLink%28this%29%27%27).
- [157.] Kvítek L., Novotný R., Píkal P.: Stanovení velikostní distribuce částic anorganických disperzí metodou dynamického rozptylu světla. Chem. Listy. 1998, vol.92, p.431- 433.
- [158.] Tscharnuter W.: Photon correlation spectroscopy in particle sizing. Encyclopedia of analytical chemistry. R.A Meyers (Ed.), Copyright ©, John Wiley & Sons Ltd, Chichester. 2000, p.5469-5485, DOI: 10.1002/9780470027318.a1512.
- [159.] Malvern Instruments Worldwide.: Dynamic light scattering, Common terms defined. Inform white paper. Malvern Instruments Limited. 2011, p.1-6, MRK1764-01.
- [160.] Viswanath S.D., Ghosh K.T., Prasad D.H.L., Dutt N.V.K., Rani K.Y.: Viscosity of liquids: Theory, estimation, experiment and data. Springer. 2007, 660 p., ISBN-10 1-4020-5481-5 (HB).
- [161.] Barth H.G., Mays J.W.: Modern methods of polymer characterization. John Wiley & Sons 1991, 561p., ISBN 0-471-82814-9.
- [162.] Bohdanecký M., Kovář J.. Viscosity of polymer solutions. Elsevier. 1982.
- [163.] Mechlová R.: Molekulová fyzika 1, molekulové jevy v kapalinách. Ostravská univerzita v Ostravě. 2004, 63p., ISBN 80-7042-989-5.

- [164.] Attension: Theory note 2: Static and dynamic surface tension and their measurement techniques. p.1-4. (Dostupné z: <http://www.attension.com/file/filarkiv/application-theory-notes/attensiontn2st.pdf>).
- [165.] Erbil Y. H.: Surface chemistry of solid and liquid interfaces. Blackwell Publishing. 2006, 352p., ISBN-10: 1-4051-1968-3.
- [166.] Ghosh P.: Surface tension, NPTEL-Chemical engineering – Interfacial Engineering. Department of Chemical Engineering, IIT Guwahati, Guwahati-781039, India, Joint Initiative of IISc - Funded by MHRD, p. 1-24.
- [167.] Mortimer R. G.: Physical chemistry, third edition. Elsevier Academic Press, 2008, 1385p., ISBN-13: 978-0-12-370617-1.
- [168.] Webster J. G.: The measurements, instrumentation and sensors Handbook, In Chapter: Surface tension measurement. Thiessen D.B., Man K.F., CRC Press LLC. 1999, ISBN: 0-8493-2145-X, ISSN: 1523-3014.
- [169.] Adamson A. W., Gast A. P.: Physical chemistry of surfaces, Sixth edition. A Wiley-Interscience Publication. 1997, 784p., ISBN: 0-471-14873-3.
- [170.] Ebnesajjad S., Ebnesajjad C. F.: Surface treatment of materials for adhesion bonding. William Andrew publishing. 2006, 251p., ISBN-13: 978-0-8155-1523-4 (978-0-8155).
- [171.] Zusman W.A: Relation of the Equilibrium Contact Angle to Liquid and Solid Constitution: *Contact angle, wettability and adhesion*, in: *Advances in Chemistry Series: Special Conference Issue*, vol. 43, Ed.: Fowkes F.M., American Chemical Society, Book Chapter 1, 1-51, DOI:10.1021/ba-1964-0043.ch001. Washington, DC, 1964, ISBN13: 9780841200449, DOI: 10.1021/ba-1964-0043.
- [172.] Fowkes F.M.: Attractive forces at interfaces. *Industrial & Engineering Chemistry*. 1964, vol.56, n.12, p.40-52, DOI:10.1021/ie50660a008.
- [173.] Driedger O., Neumann A.W., Sell P.J.: Über die grenzflächenenergetische Zustandsfunktion. *Kolloid-Zeitschrift un Zeitschrift für Polymere*. 1965, vol.201, n.1, p.52-57, DOI:10.1007/BF01497080.

- [174.] Neumann A.W., Good R.J., Hope C.J., Sejpal M.: An equation-of-state approach to determine surface tensions of low-energy solids from contact angles. *Journal of Colloid and Interface Science*. 1974, vol.49, n.2, p.291-304, DOI:10.1016/0021-9797(74)90365-8.
- [175.] Spelt J.K., Li D., Neumann W.: The equation of state approach to interfacial tensions, in: A.W Neumann, J.K. Spelt (Eds.), *Applied Surface Thermodynamics*, Marcel Dekker Inc., New York, 1996, pp. 239-292, ISBN: 978-1-4899-1176-6, DOI: 10.1007/978-1-4899-1176-6_5.
- [176.] Owens D.K., Wendt R.C.: Estimation of the surface free energy of polymers. *Journal of Applied Polymer Science*. 1969, vol.13, n.8, p.1741-1747, DOI:10.1002/app.1969.070130815.
- [177.] van Oss C.J., Chaudhury M.K., Good R.J.: *Interfacial Lifshitz-van der Waals and Polar Interactions in Macroscopic Systems*, Chemical Reviews. 1988, vol.88, n.6, p.927-941, DOI:10.1021/cr00088a006.
- [178.] Good R.J., van Oss C.J.: The modern theory of contact angles and the hydrogen bond components of surface energies, in: Schrader M., Loeb G. (Eds.), *Modern Approaches to Wettability: Theory and Applications*, Plenum Press, New York, 1992, p. 1-27. ISBN-10:0306439859.
- [179.] Wilhelmy L.: *Ann. Phys.*, 1863, vol.119, p.177-181.
- [180.] Hofmann A.: *Tensiometry: The scientific background to tensiometric measurements*. LabPlus international. 2003, p.1-3.
- [181.] Aveyard R., Haydon D.A.: *An introduction to the principles of surface chemistry*. CUP Archive. 1973, p. ISBN: 0521097940, 9780521097949.
- [182.] KRÜSS customer support Lab certified with succes: Wilhelmy plate method. KRÜSS GmbH. (Dostpné z: <http://www.kruss.de/services/education-theory/glossary/wilhelmy-plate-method/>).
- [183.] Masutani G., Stenstrom M.K.: A review of surface tension measuring techniques, surfactants, and their implications for oxygen transfer in wastewater treatment plants. Water resources program. Shool of engineering and applied science. University of California, Los Angeles 1984, p.1-66.

- [184.] Pisárčik M., Toyoko I., Devínsky F., Lacko I.: Agregates of sodium hyaluronate with cationic and aminoxide surfactants in aqueous solution – light scattering study. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering aspects*. 2001, vol. 183-185, p. 555-562, DOI: 10.1016/S0927-7757(01)00512-X.
- [185.] Thalberg K., van Stam J., Lindblad C., Almgren M., Lindman B.: Time-resolved fluorescence and self-diffusion studies in systém of cationic surfactant and an anionic polyelectrolyte. *Journal of Physical chemistry*, 1991. Vol.95, p.8975-8982, DOI: 10.1021/j100175a101.
- [186.] Björling M., Herslöf-Björling A., Stillbst P.: An NMR self-diffusion study of the interaction between sodium hyaluronate and tetradecyltrimethylammonium bromide. *Macromolecules*, 1995. Vol.28, p.6970-6975, DOI: 10.1021/ma00124a038.
- [187.] Podzimek S., Hermanova M., Bilerova H., Bezakova Z., Velebny V.: Solution properties of hyaluronic acid and comparison of SEC-MALS-VIS data with off-line capillary viscometry. *Journal of Applied Polymer Science*, 2010. Vol.116, p. 3013-3020, DOI: 10.1002/app.31834.
- [188.] Pisárčik M., Toyoko I., Devínsky F., Lacko I., Bakoš D.: Aggregation properties of sodium hyaluronate with alkanediyl- α,ω -bis(dimethylalkylammonium bromide) surfactants in aqueous sodium chloride solution. *Journal of Colloids and Interface Science*, 2000. Vol. 228, p. 207-212, DOI: 10.1006/jcis.2000.6948.
- [189.] Scott J.E., Heatley F.: Hyaluronan forms specific stable tertiary structures in aqueous solution: A ^{13}C NMR study. *Biochemistry*, 1999. Vol. 96, p.4850-4855, DOI: 10.1073/pnas.96.9.4850.
- [190.] Yilgor I., Ward T.C., Yilgor E., Atilla G.E.: Anomalous dilute solutions properties of segmented polydimethylsiloxane-polyurea copolymers in isopropyl alcohol. *Polymer*, 2006. Vol.47, p.1179-1186, DOI: 10.1016/j.polymer.2005.12.008.

- [191.] Lapčák L. Jr., Benešová K., Lapčák L., De Smedt S., Lapčíková B.: Chemical modification of hyaluronic acid: Alkylation. *International Journal of Polymer Analysis and Characterization*, 2010. Vol. 15, p.486-496, DOI: 10.1080/1023666X.2010.520904.
- [192.] Mráček A., Benešová K., Minařík T., Urban P., Lapčák L.: The diffusion proces of sodium hyaluronate (Na-HA) and Na-HA-n-alkyl derivates films swelling. *Journal of Biomedical Materials Research: Part A*, 2007. Vol. 83A, p.184-190, DOI: 10.1002/jbm.a.31188.
- [193.] Krause W.E., Bellomo E.G., Colby R.H.: Rheology of sodium hyaluronate under physiological conditions. *Biomacromolecules*, 2001. Vol.2, p.65-69, DOI: 10.1021/bm0055798.
- [194.] Applebey M.P.: The viscosity of salt solutions. *J. Chem. Soc.*, 1910. Vol.97.
- [195.] Collins K.D., Washabaugh M.W.: The Hofmeister effect and the behaviour of water at interfaces. *Quarterly Review of Biophysics*, 1985. Vol.18, p.323-422.
- [196.] Heydweiller A.: Zur Kenntnis der Glaselektrolyse. In *Annalen der Physik*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim 1910. Vol.337, p.739748, DOI: 10.1002/andp.19103370903.
- [197.] Boström M., Williams D.R.M., Ninham B.W.: Surface tension of electrolytes: specific ion effects explained by dispersion forces. *Langmuir*, 2001. Vol. 17, p.4475-4478, DOI: 10.1021/la0102298.
- [198.] Levin Y., dos Santos A.P., Diehl A.: Ions at the air-water interface: an end to a hundred-year-old mystery? *Physical review letters*, 2009. Vol.103, p. 257802/1-257802/4, DOI: 10.1103/PhysRevLett.103.257802.
- [199.] Harding S.E.: The intrinsic viscosity of biological macromolecules. Progress in measurement, interpretation and application to structure in dilute solution. *Prog. Biophys. Molec. Biol.*, 1997. Vol. 68, p. 207-262.
- [200.] Cho J., Heuzey M.-C., Bégin A., Carreau P.J.: Viscoelastic properties of chitosan solutions: Effect of concentration and ionic strength. *Journal of Food Engineering*, 2006. Vol.74, p.500-515, DOI: 10.1016/j.jfoodeng.2005.01.047.

- [201.] Chen R.H., Lin J.H., Tsai T.: Effect of urea on the conformation and chain flexibility of chitosan molecules with various degree of deacetylation. *Journal of Marine Science and Technology*, 1994. Vol.2, p.1-7,
- [202.] Wen Jun X., ChengWen L., LiJang Y., YiQin G.: On the molecular mechanism of ion specific Hofmeister series. *Sci. China Chem*, 2014. Vol.57, p.36-47, DOI: 10.1007/s11426-013-5019-1.
- [203.] Ribeiro W., Luis Mata J., Saramago B.: Effect of concentration and temperature on surface tension of sodium hyaluronate saline solutions. *Langmuir*, 2007. Vol. 23, p.7014-7017, DOI: 10.1021/la700269k.
- [204.] Collins M.N., Birkinshaw C.: Physical properties of crosslinked hyaluronic acid hydrogels. *J Mater Sci: Mater Med*, 2008. Vol. 19, p. 3335-3343. DOI: 10.1007/s10856-008-3476-4.u.
- [205.] Lai J.-Y.: Solvent composition is critical for carbodiimide cross-linking of hyaluronic acid as an ophthalmic biomaterial. *Materials*, 2012. Vol. 5, p.1986-2002. DOI: 10.3390/ma5101986.
- [206.] Mlčochová P., Bystrický S., Steiner B., Machová E., Koóš M., Velebný V., Krčmář M.: Synthesis and characterization of new biodegradable hyaluronan alkyl derivatives. *Biopolymers*, 2006. Vol. 82, p. 74-79. DOI:10.1002/bip.2046.1.
- [207.] Tomihata K., Ikada Y.: Crosslinking of hyaluronic acid with water-soluble carbodiimide. *J. Biomed Mater Res.*, 1997. Vol. 37, p. 243-251, DOI: 10.1002/(SICI)1097-4636(199711)37:23.0.CO;2-F.
- [208.] Bulpitt P., Aeschlimann D.: New strategy for chemical modification of hyaluronic acid: Preparation of functionalized derivatives and their use in the formation of novel biocompatible hydrogels. *Journal of Biomedical Materials Research*, 1999. Vol. 47, p. 151-169. DOI: 10.1002/(SICI)1097-4636(199911)47:2<152::AID-JBM5>3.0.CO;2-I.
- [209.] Schanté C. E., Zuber G., Herlin C., Vandamme T. F.: Chemical modifications of hyaluronic acid for the synthesis of derivative for a broad range of biomedical applications. *Carbohydrate Polymers*, 2011. Vol. 85, p. 469-489. DOI: 10.1016/j.carbpol.2011.03019.

- [210.] Sannino A., Pappadà, Madaghiele M., Maffezzoli A., Ambrosio L., Nicolais L.: Crosslinking of cellulose derivates and hyaluronic acid with water-soluble carbodiimide. *Polymer*, 2005. Vol. 46, p. 11206-11212. DOI: 0.1016/j.polymer.2005.10.048.
- [211.] Nakajima N., Ikada Y.: Mechanism of Amide formation by carbodiimide for Bioconjugation in aqueous media. *Bioconjugate Chem*, 1995. Vol. 6, p. 123-130. DOI: 10.1021/bc00031a015.
- [212.] Gilli R., Kacuráková M., Mathlouthi M., Navarini L., Paoletti S.: FTIR studies of sodium hyaluronate and its oligomers in the amorphous solid phase and in aqueous solution. *Carbohydrate Research*, 1994. Vol. 263, p.315-326, DOI: 10.1016/0008-6215(94)00147-2.
- [213.] Kablik J., Monheit G.D., YL., Chang G., Gershkovich J.:Comparative physic properties of hyaluronic acid dermal fillers. *Dermatol. Surg.*, 2009. Vol. 35, p. 302-312. DOI: 10.1111/j.1524-4725.2008.01046.x.

PŘÍLOHY

Příloha A: SEZNAM PUBLIKACÍ

Publikace v odborných časopisech

1. Gřundělová L., Mráček A., Kašpárková V., Minařík T., Smolka P.: The influence of quarternary salt on hyaluronan conformation and particle size in solution. Carbohydrate polymers. 2013, vol. 98, p.1039-1044, DOI: 10.1016/j.carbpol.2013.06.057.
2. Mráček A., Varhaníková J., Gřundělová L., Pokopcová A., Lehocký M., Velebný V.: The influence of Hofmeister series ions on Hyaluronan swelling and viscosity. Molecules. 2008, vol.13, p.1025–1034.

Publikace v recenzním řízení

1. Gřundělová L., Adriana Gregorová, Aleš Mráček, Robert Vícha, Petr Smolka, Antonín Minařík: Viscoelastic and mechanical properties of hyaluronan films and hydrogels modified by carbodiimide. Carbohydrate polymers, (přijatý k recenzi 25.6.2014).

Příspěvky ve sbornících

1. Gřundělová L., Mráček A., Kašpárková V., Minařík A., Smolka P., Velebný V.: Influence of cationic surfactant on particle size of Hyaluronan coil in solution. Conference Plastko 2012. April 11.-12. Zlín, Czech Republic, ISBN: 978-80-7454-137-7.
2. Gřundělová L., Pokopcová A., Varhaníková J., Bilerová H., Mráček A., Velebný V. The Influence of Hofmeister Series ions on Hyaluronan Swelling and Viscosity. 5th International Conference Juniomat-Brno 07.September 19.-20. Brno 2007, Czech Republic, CSNMT Praha, ISBN: 978-80-214-3459-2.

Příloha B: CURRICULUM VITAE

Osobní informace



LENKA GRUNDĚLOVÁ

Datum narození: **12. prosince 1985**

Adresa: **Květná 287, 78832 Staré
Město, Česká Republika**

Národnost: **Česká**

Rodinný stav: **svobodná**

Pohlaví: **žena**

E-mail: **grundelova@ft.utb.cz**

Tel. No.: **+420 777 807 178**

**Ústav fyziky a materiálového inženýrství,
Fakulta technologická,
Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně,
Náměstí T. G. M. 5555, 760 01, Zlín**

Vzdělání/Akademické zkušenosti

**[2010-2014] Doktorské studium na Fakultě technologické, Univerzity Tomáše Bati
ve Zlíně**

Téma: Stabilita a chování hyaluronanu v roztocích pro technologii výroby
farmaceutických přípravků.

Studijní program: Chemie a technologie materiálů

Study obor: Technologie makromolekulárních látek

**[3.3-2.5/2013] Institute for Chemistry and technology of Materials (ICTM), Graz
University of Technology, Austria**

Zahraněční stáž, laboratorní a výzkumná činnost v oblasti fyzikální
chemie a materiálového inženýrství.

[2005-2010] **Bakalářské a navazující magisterské studium na Fakultě technologické, Univerzitě Tomáše Bati ve Zlíně**

Téma: Chování klubek hyaluronanu v roztocích s přísádky kvartérních solí

Studijní program: Chemie a technologie materiálů

Studijní obor: Materiálové Inženýrství

[2001-2005] **Středoškolské vzdělání, Gymnázium Šumperk**

Řešené projekty

[11/2012-dosud] ***Projekt “Centrum polymerních systémů“***

Reg. Číslo: CZ.1.05/2.1.00/03.0111

Pozice: Projektový pracovník

[2014] ***Grant IGA/XY/FT/14/D***

„Příprava a charakterizace superhydrofobních a hydrofilních povrchů pro speciální aplikace“

Pozice: Spoluřešitel (člen výzkumného týmu)

[2013] ***Grant IGA/015/FT/13/D***

„Studium změn v polymerních maticích připravovaných na strukturovaných površích a solidifikovaných v teplotních polích s ohledem na jejich mechanické vlastnosti.“

Pozice: Spoluřešitel (člen výzkumného týmu)

[2012] **Grant IGA/037/FT/12/D**

„Vliv fyzikálně chemických vlastností povrchů na samo-organizační schopnosti roztoků polysacharidů“

Pozice: Spoluřešitel (člen výzkumného týmu)

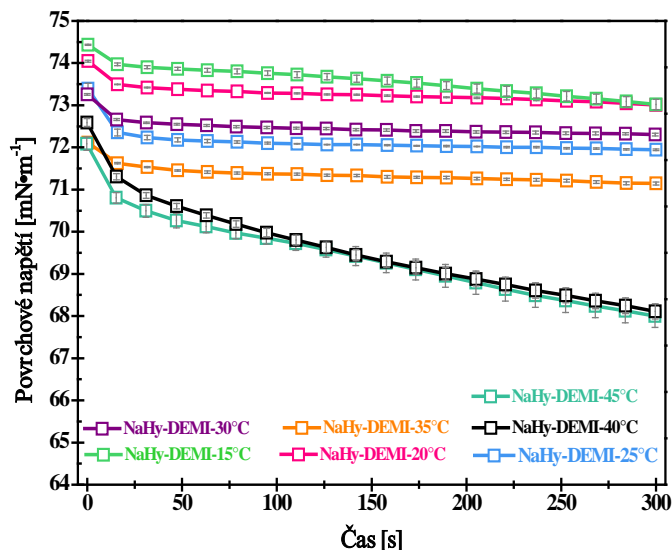
[2011] **Grant IGA/13/FT/11/D**

„Fyzikální a fyzikálně-chemické modifikace a charakterizace polymerů“

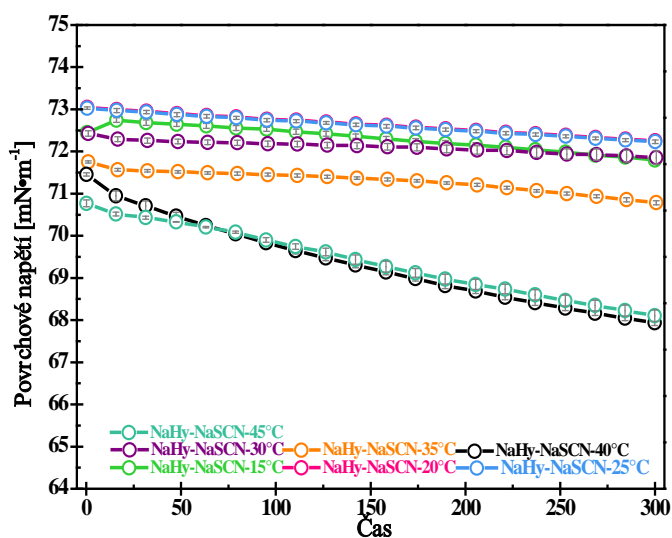
Pozice: Hlavní Řešitel

Příloha C: VÝSLEDKY Z EXPERIMENTÁLNÍ ČÁSTI

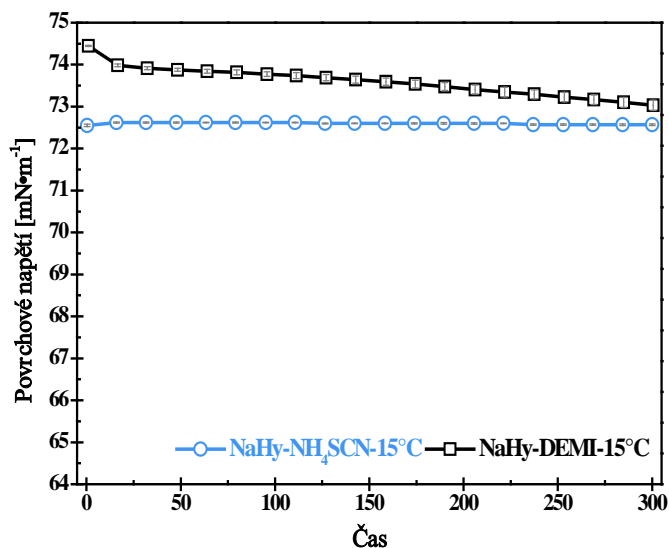
Obrázek 73: Porovnání časového průběhu povrchového napětí NaHy v de-ionizované vodě (\square) stanoveného při teplotách $T = 15^{\circ}\text{C}$, $T=20^{\circ}\text{C}$, $T=25^{\circ}\text{C}$, $T=30^{\circ}\text{C}$, $T=35^{\circ}\text{C}$, $T=40^{\circ}\text{C}$, $T=45^{\circ}\text{C}$.



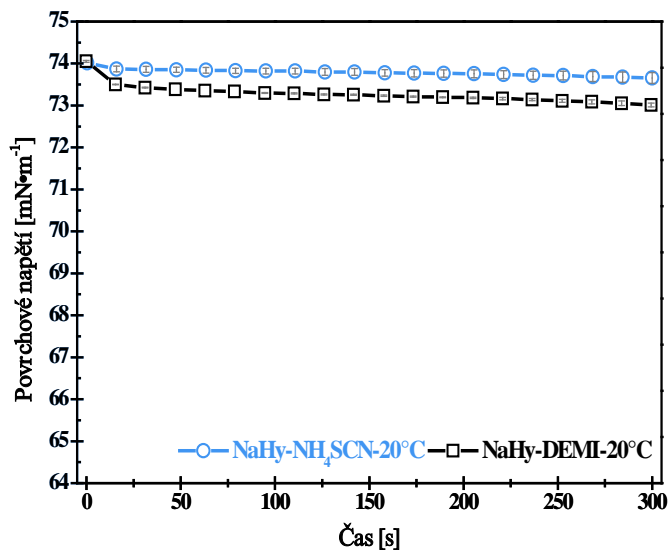
Obrázek 74: Porovnání časového průběhu povrchového napětí systému NaHy-NaSCN (\circ) stanoveného při teplotách $T = 15^{\circ}\text{C}$, $T=20^{\circ}\text{C}$, $T=25^{\circ}\text{C}$, $T=30^{\circ}\text{C}$, $T=35^{\circ}\text{C}$, $T=40^{\circ}\text{C}$, $T=45^{\circ}\text{C}$.



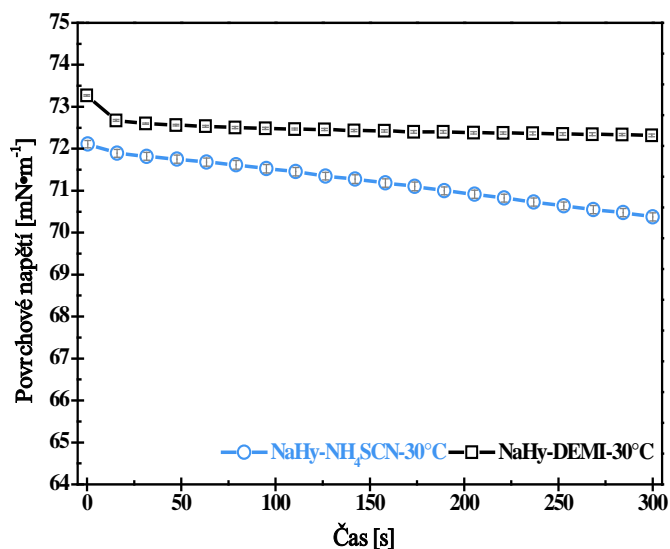
Obrázek 75: Porovnání časového průběhu povrchového napětí de-ionizované vody (DEMI) (\square) a chaotropních iontů NH_4SCN ($I=0,1\text{M}$) (\circ), stanoveného při teplotě $T = 15^\circ\text{C}$.



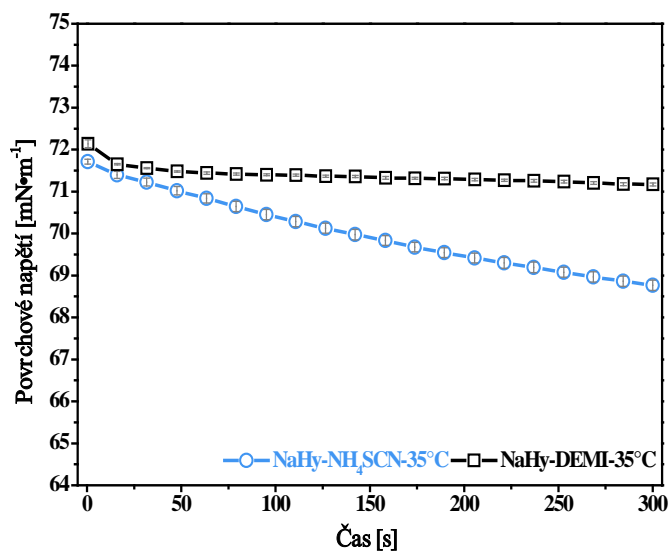
Obrázek 76: Porovnání časového průběhu povrchového napětí de-ionizované vody (DEMI) (\square) a chaotropních iontů NH_4SCN ($I=0,1\text{M}$) (\circ), stanoveného při teplotě $T = 20^\circ\text{C}$.



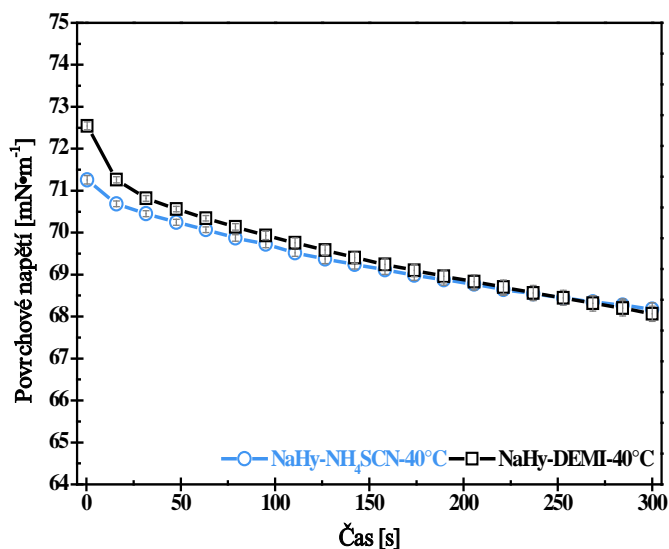
Obrázek 77: Porovnání časového průběhu povrchového napětí de-ionizované vody (DEMI) (\square) a chaotropních iontů NH_4SCN ($I=0,1\text{M}$) (\circ), stanoveného při teplotě $T = 30^\circ\text{C}$.



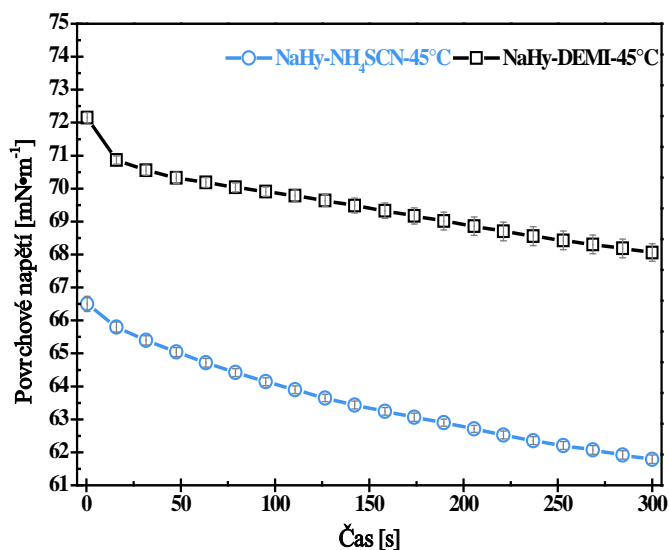
Obrázek 78: Porovnání časového průběhu povrchového napětí de-ionizované vody (DEMI) (\square) a chaotropních iontů NH_4SCN ($I=0,1\text{M}$) (\circ), stanoveného při teplotě $T = 35^\circ\text{C}$.



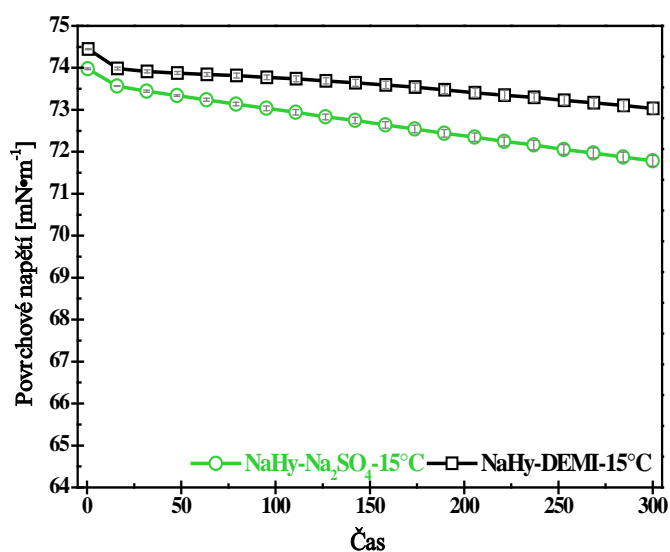
Obrázek 79: Porovnání časového průběhu povrchového napětí de-ionizované vody (DEMI) (\square) a chaotropních iontů NH_4SCN ($I=0,1\text{M}$) (\circ), stanoveného při teplotě $T = 40^\circ\text{C}$.



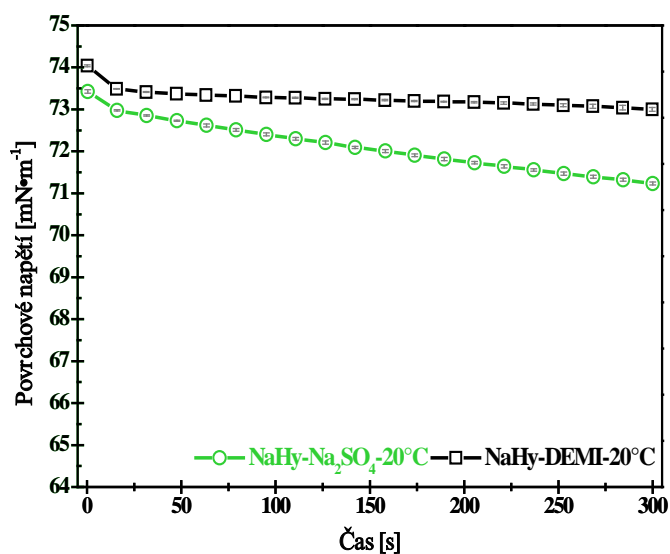
Obrázek 80: Porovnání časového průběhu povrchového napětí de-ionizované vody (DEMI) (\square) a chaotropních iontů NH_4SCN ($I=0,1\text{M}$) (\circ), stanoveného při teplotě $T = 45^\circ\text{C}$.



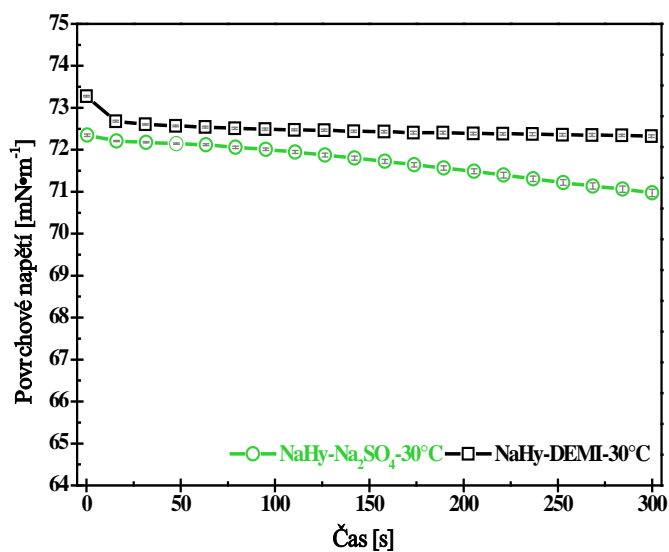
Obrázek 81: Porovnání časového průběhu povrchového napětí systému NaHy-Na₂SO₄ (I=0,1M) (○) stanoveného při teplotě T = 15°C.



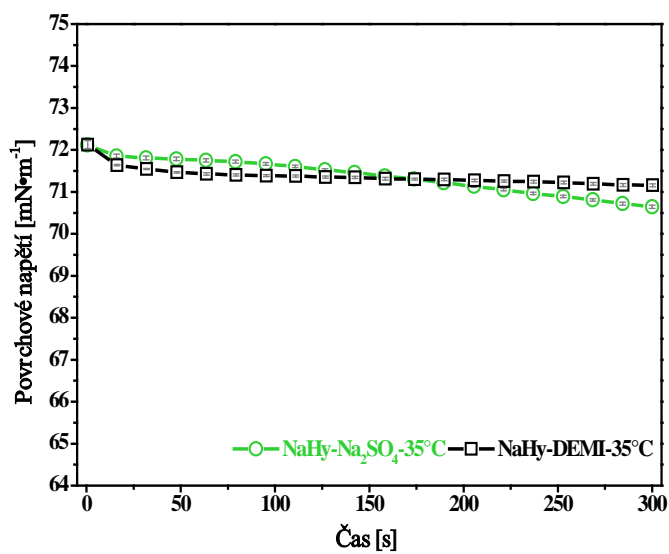
Obrázek 82: Porovnání časového průběhu povrchového napětí systému NaHy-Na₂SO₄ (I=0,1M) (○) stanoveného při teplotě T = 20°C.



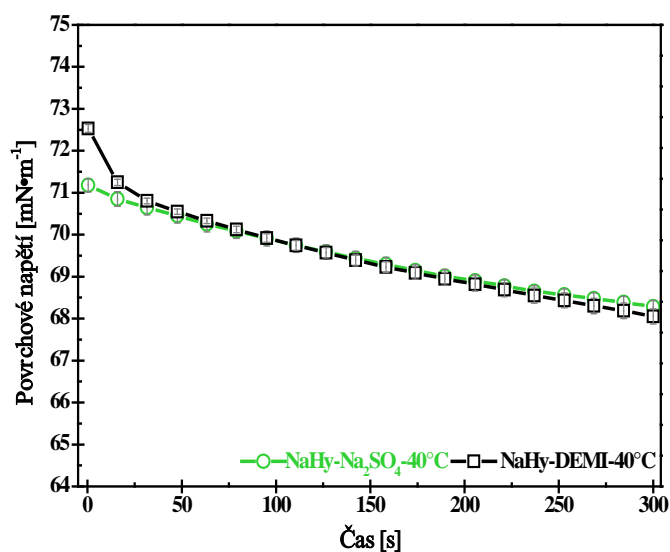
Obrázek 83: Porovnání časového průběhu povrchového napětí systému NaHy-Na₂SO₄ (I=0,1M) (○) stanoveného při teplotě T = 30°C.



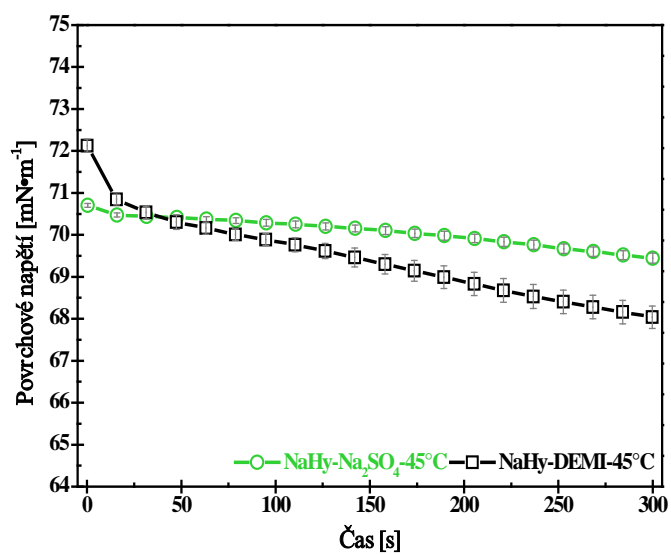
Obrázek 84: Porovnání časového průběhu povrchového napětí systému NaHy-Na₂SO₄ (I=0,1M) (○) stanoveného při teplotě T = 35°C.



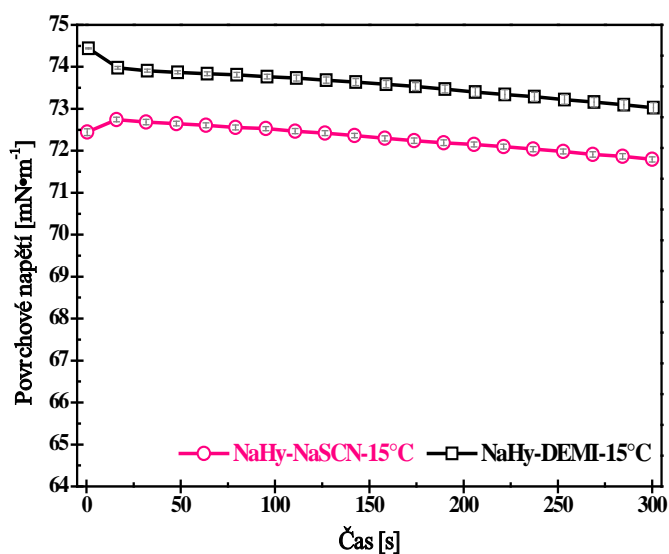
Obrázek 85: Porovnání časového průběhu povrchového napětí systému NaHy-Na₂SO₄ ($I=0,1M$) (○) stanoveného při teplotě $T = 40^{\circ}C$.



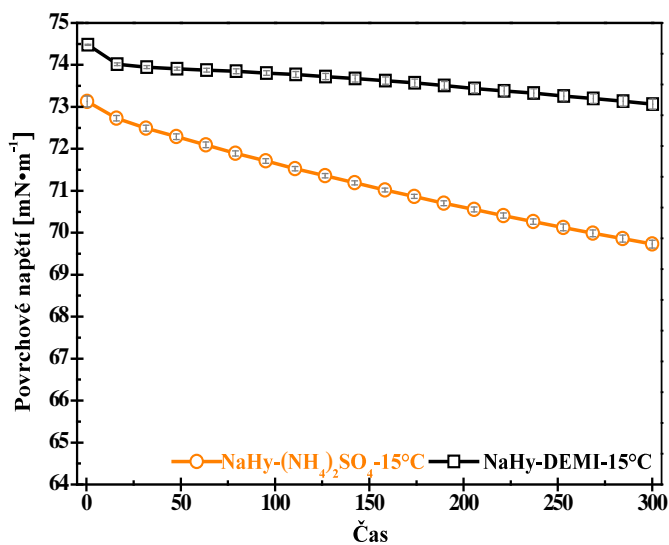
Obrázek 86: Porovnání časového průběhu povrchového napětí systému NaHy-Na₂SO₄ ($I=0,1M$) (○) stanoveného při teplotě $T = 45^{\circ}C$.



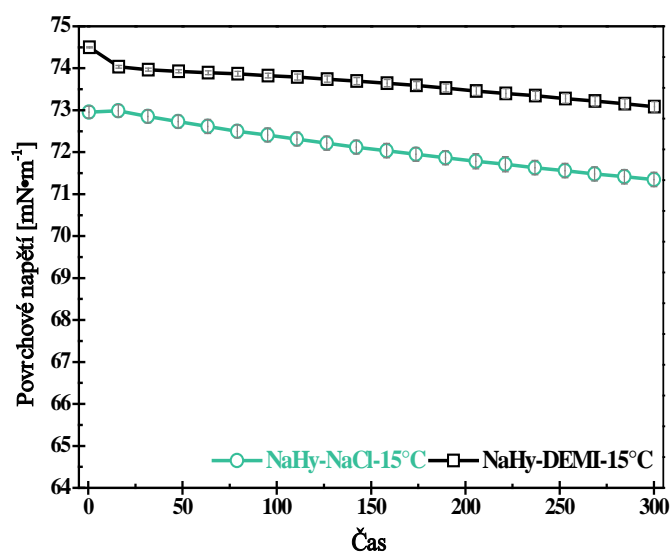
Obrázek 87: Porovnání časového průběhu povrchového napětí systému NaHy-NaSCN ($I=0,1M$) (\circ), stanoveného při teplotě $T = 15^{\circ}C$.



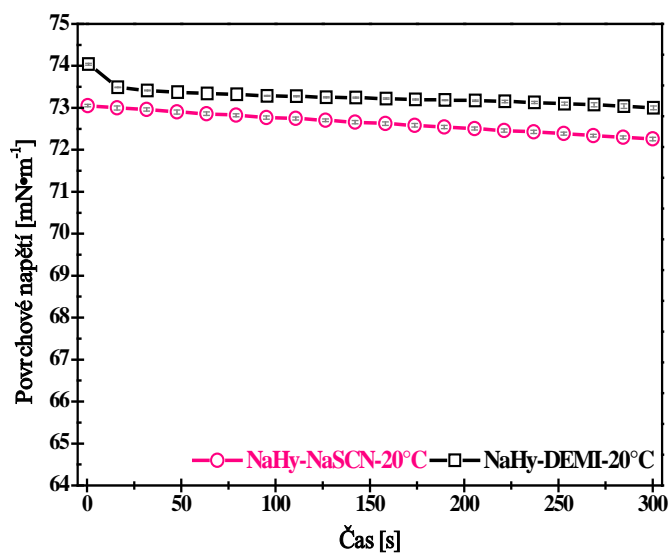
Obrázek 88: Porovnání časového průběhu povrchového napětí systému NaHy- $(NH_4)_2SCN$ ($I=0,1M$) (\circ) stanoveného při teplotě $T = 15^{\circ}C$.



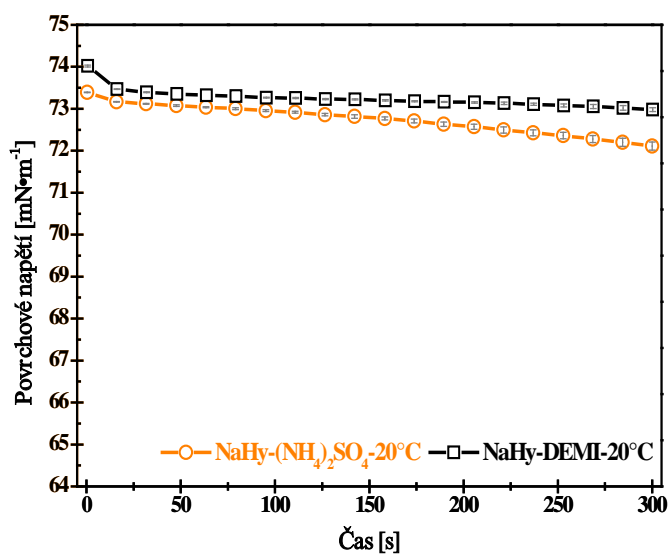
Obrázek 89: Porovnání časového průběhu povrchového napětí systému NaHy-NaCl ($I=0,1M$) (\circ) stanoveného při teplotě $T = 15^{\circ}C$.



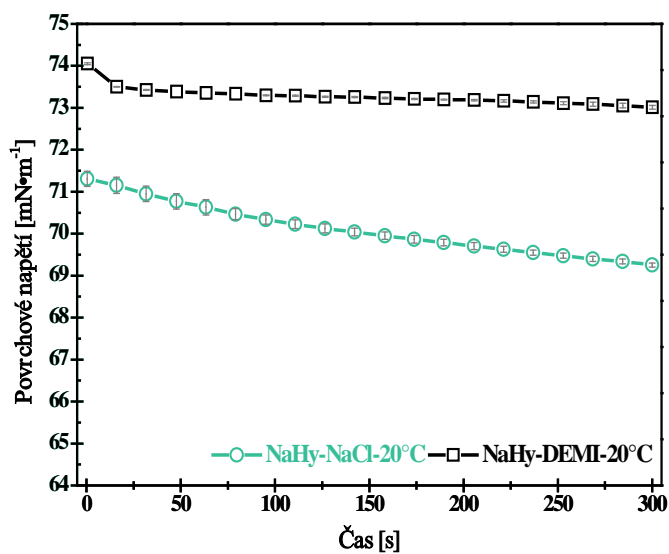
Obrázek 90: Porovnání časového průběhu povrchového napětí systému NaHy-NaSCN ($I=0,1M$) (\circ) stanoveného při teplotě $T = 20^{\circ}C$.



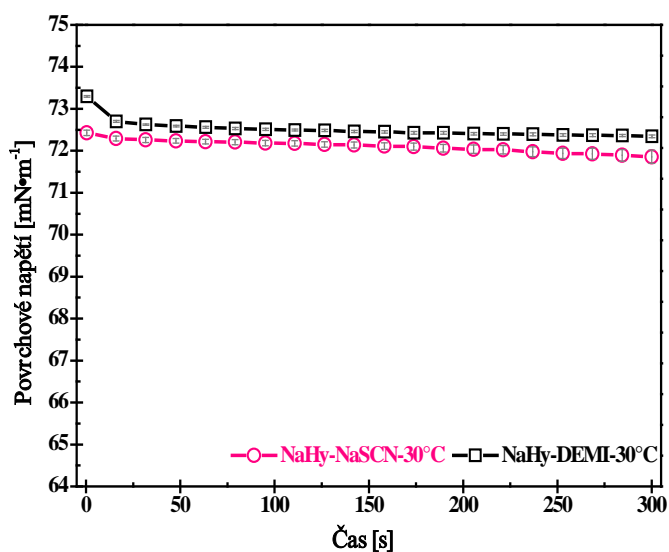
Obrázek 91: Porovnání časového průběhu povrchového napětí systému NaHy- $(\text{NH}_4)_2\text{SCN}$ ($I=0,1M$) (\circ) stanoveného při teplotě $T = 20^\circ\text{C}$.



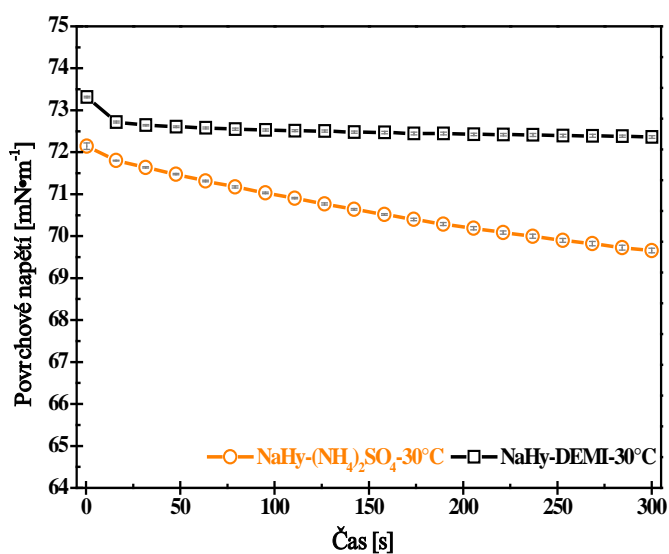
Obrázek 92: Porovnání časového průběhu povrchového napětí systému NaHy-NaCl ($I=0,1M$) (\circ) stanoveného při teplotě $T = 20^\circ\text{C}$.



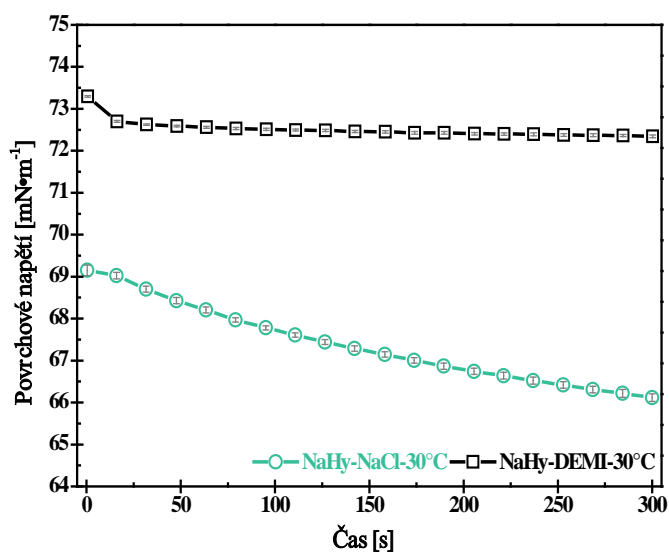
Obrázek 93: Porovnání časového průběhu povrchového napětí systému NaHy-NaSCN ($I=0,1M$) (\circ) stanoveného při teplotě $T = 30^{\circ}C$.



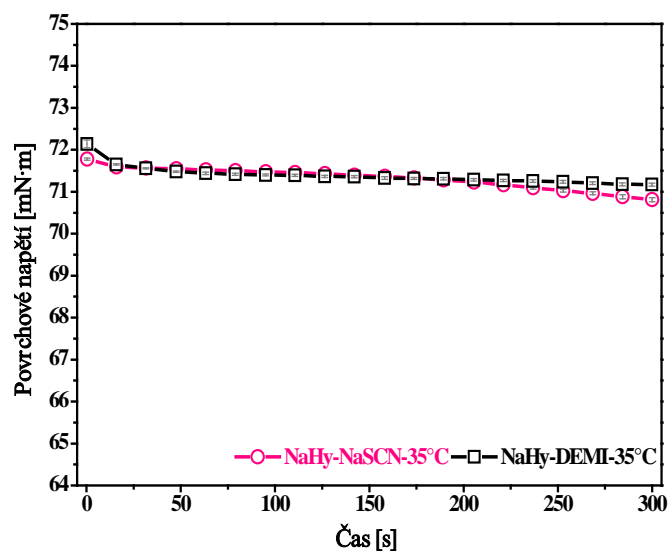
Obrázek 94: Porovnání časového průběhu povrchového napětí systému NaHy-(NH₄)₂SCN ($I=0,1M$) (\circ) stanoveného při teplotě $T = 30^{\circ}C$.



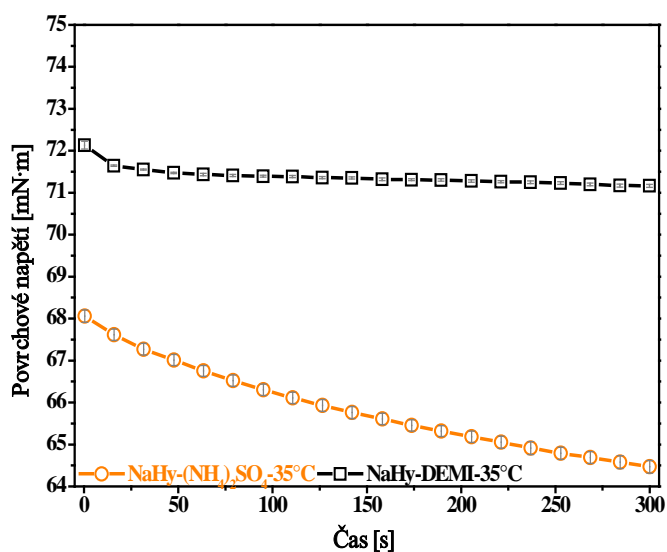
Obrázek 95: Porovnání časového průběhu povrchového napětí systému NaHy-NaCl ($I=0,1M$) (\circ) stanoveného při teplotě $T = 30^{\circ}C$.



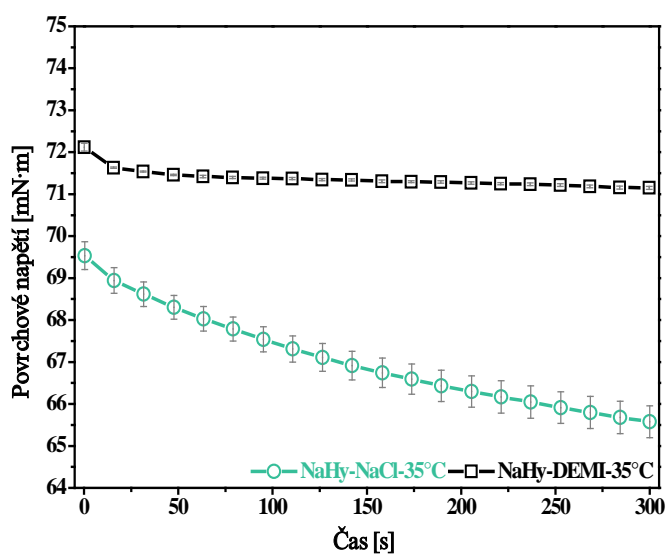
Obrázek 96: Porovnání časového průběhu povrchového napětí systému NaHy-NaSCN ($I=0,1M$) (\circ) stanoveného při teplotě $T = 35^{\circ}C$.



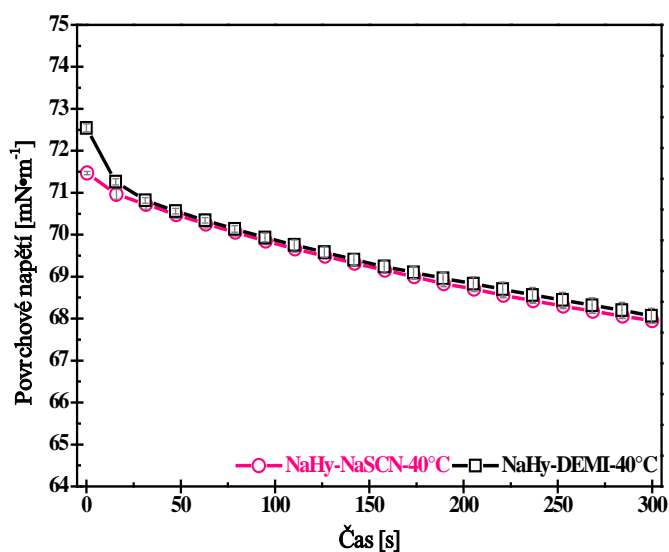
Obrázek 97: Porovnání časového průběhu povrchového napětí systému NaHy- $(\text{NH}_4)_2\text{SCN}$ ($I=0,1\text{M}$) (\circ) stanoveného při teplotě $T = 35^\circ\text{C}$.



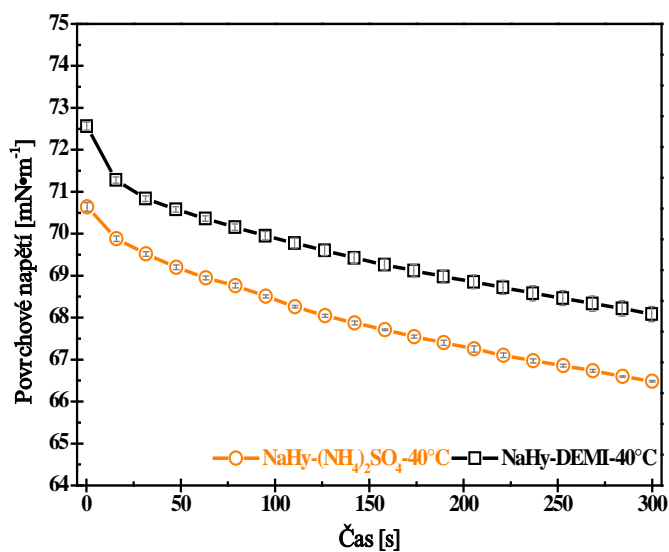
Obrázek 98: Porovnání časového průběhu povrchového napětí systému NaHy-NaCl ($I=0,1\text{M}$) (\circ) stanoveného při teplotě $T = 35^\circ\text{C}$.



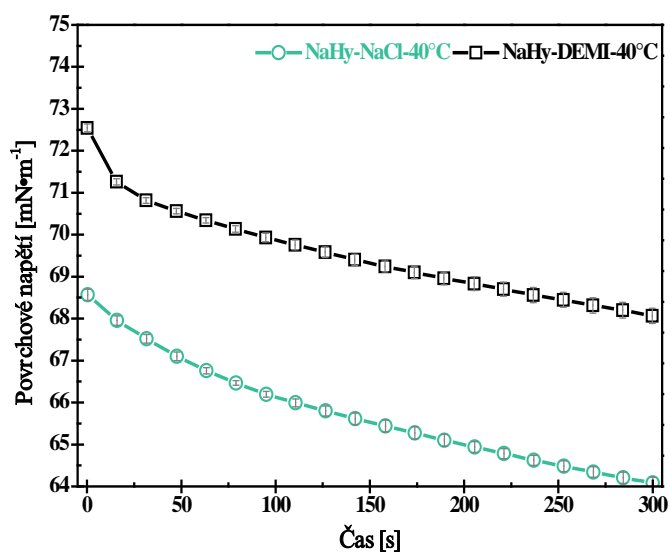
Obrázek 99: Porovnání časového průběhu povrchového napětí systému NaHy-NaSCN ($I=0,1M$) (\circ) stanoveného při teplotě $T = 40^{\circ}C$.



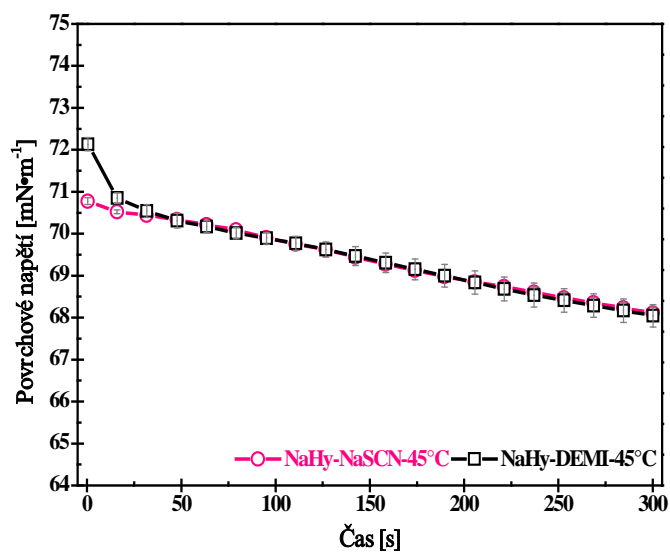
Obrázek 100: Porovnání časového průběhu povrchového napětí systému NaHy- $(NH_4)_2SCN$ ($I=0,1M$) (\circ) stanoveného při teplotě $T = 40^{\circ}C$.



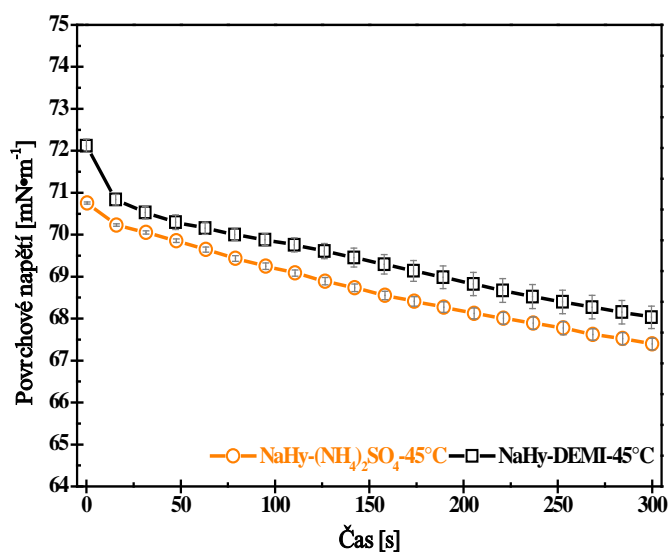
Obrázek 101: Porovnání časového průběhu povrchového napětí systému NaHy-NaCl ($I=0,1M$) (\circ) stanoveného při teplotě $T = 40^{\circ}C$.



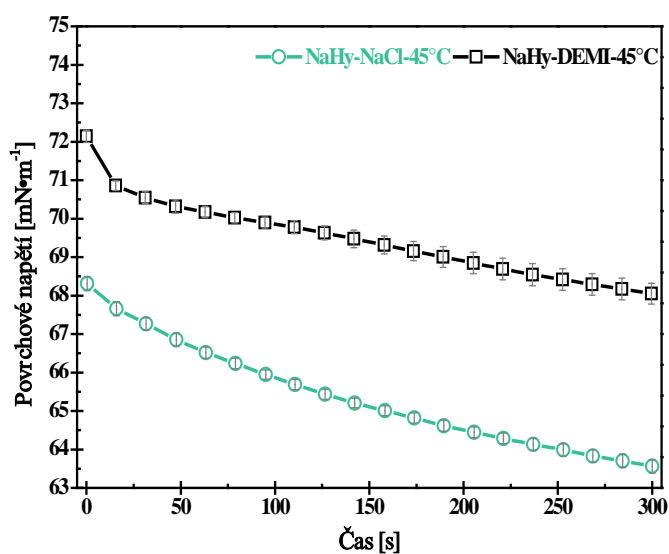
Obrázek 102: Porovnání časového průběhu povrchového napětí systému NaHy-NaSCN ($I=0,1M$) (\circ) stanoveného při teplotě $T = 45^{\circ}C$.



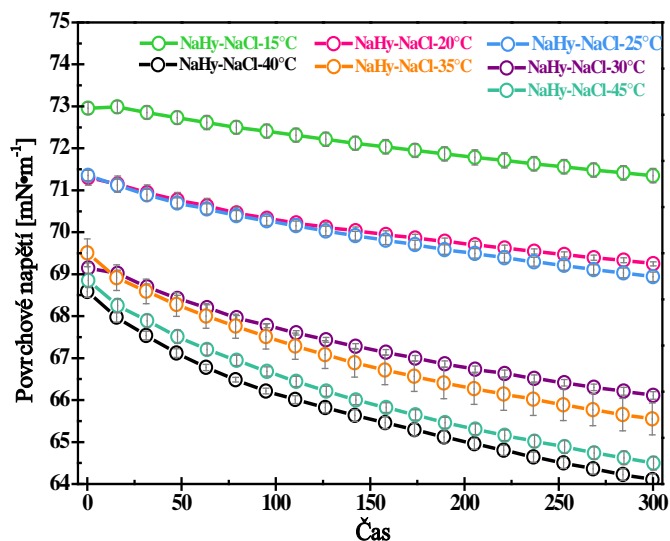
Obrázek 103: Porovnání časového průběhu povrchového napětí systému NaHy- $(\text{NH}_4)_2\text{SCN}$ ($I=0,1M$) (\circ) stanoveného při teplotě $T = 45^\circ\text{C}$.



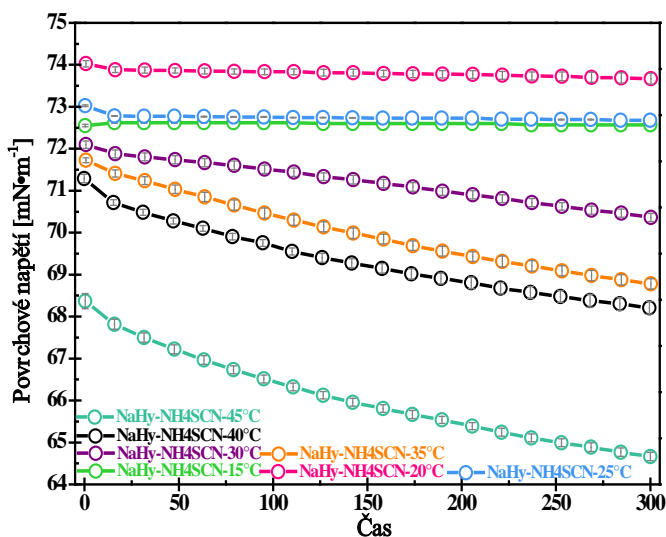
Obrázek 104: Porovnání časového průběhu povrchového napětí systému NaHy-NaCl ($I=0,1M$) (\circ) stanoveného při teplotě $T = 45^\circ\text{C}$.



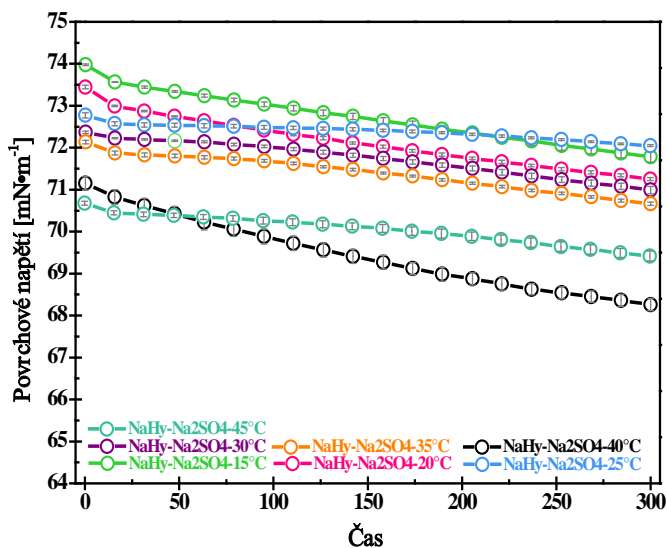
Obrázek 105: Porovnání časového průběhu povrchového napětí systému NaHy-NaCl (○) stanoveného při teplotách $T = 15^{\circ}\text{C}$, $T=20^{\circ}\text{C}$, $T=25^{\circ}\text{C}$, $T=30^{\circ}\text{C}$, $T=35^{\circ}\text{C}$, $T=40^{\circ}\text{C}$, $T=45^{\circ}\text{C}$.



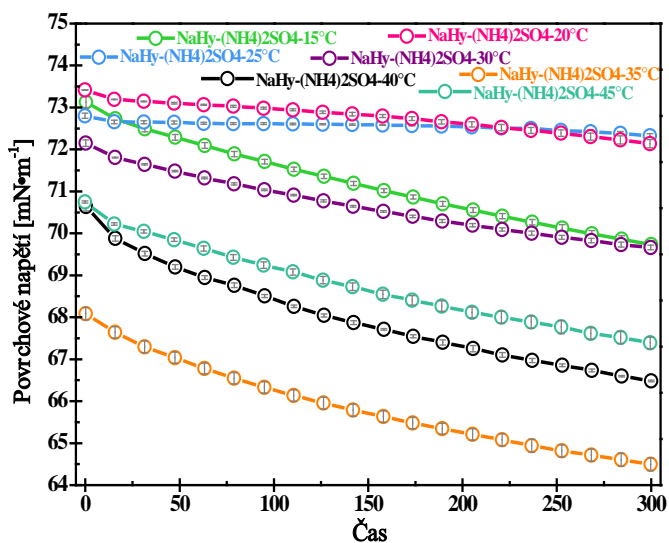
Obrázek 106: Porovnání časového průběhu povrchového napětí systému NaHy-NH₄SCN (○) stanoveného při teplotách $T = 15^{\circ}\text{C}$, $T=20^{\circ}\text{C}$, $T=25^{\circ}\text{C}$, $T=30^{\circ}\text{C}$, $T=35^{\circ}\text{C}$, $T=40^{\circ}\text{C}$, $T=45^{\circ}\text{C}$.



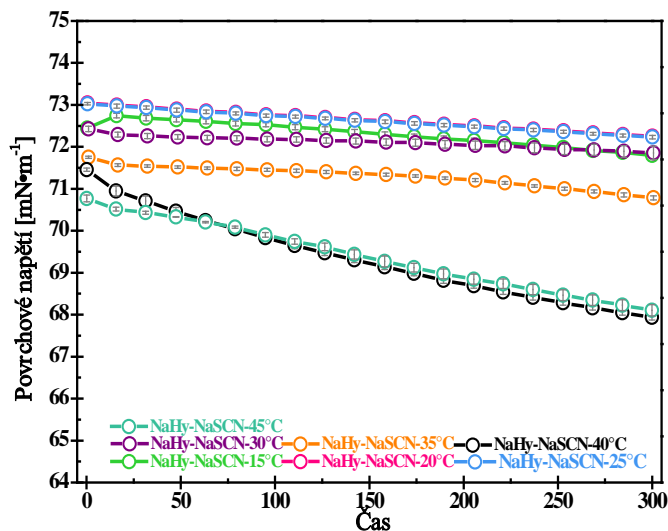
Obrázek 107: Porovnání časového průběhu povrchového napětí systému NaHy- Na_2SO_4 (\circ) stanoveného při teplotách $T = 15^\circ\text{C}$, $T=20^\circ\text{C}$, $T=25^\circ\text{C}$, $T=30^\circ\text{C}$, $T=35^\circ\text{C}$, $T=40^\circ\text{C}$, $T=45^\circ\text{C}$.



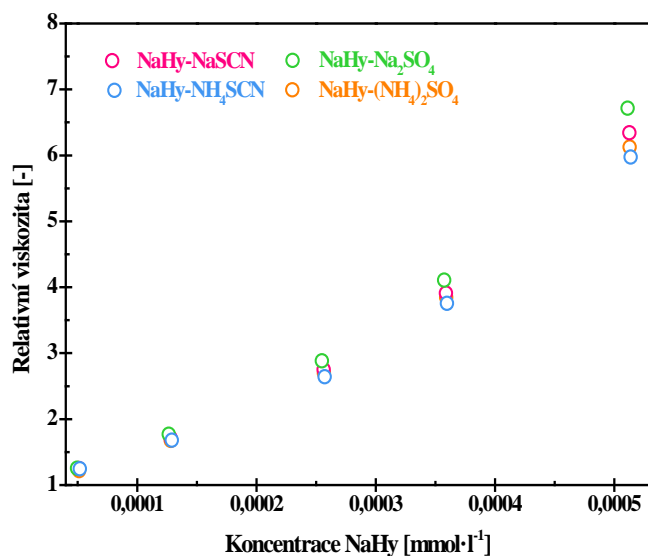
Obrázek 108: Porovnání časového průběhu povrchového napětí systému NaHy- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (\circ) stanoveného při teplotách $T = 15^\circ\text{C}$, $T=20^\circ\text{C}$, $T=25^\circ\text{C}$, $T=30^\circ\text{C}$, $T=35^\circ\text{C}$, $T=40^\circ\text{C}$, $T=45^\circ\text{C}$.



Obrázek 109: Porovnání časového průběhu povrchového napětí systému NaHy-NaSCN (\circ) stanoveného při teplotách $T = 15^{\circ}\text{C}$, $T = 20^{\circ}\text{C}$, $T = 25^{\circ}\text{C}$, $T = 30^{\circ}\text{C}$, $T = 35^{\circ}\text{C}$, $T = 40^{\circ}\text{C}$, $T = 45^{\circ}\text{C}$.



Obrázek 110: Srovnání závislosti relativní viskozity na koncentraci pro systémy NaHy-NaSCN ($I=0,1\text{M}$) (\circ), NaHy-NH₄SCN ($I=0,1\text{M}$) (\circ), NaHy-Na₂SO₄ ($I=0,1\text{M}$) (\circ), NaHy-(NH₄)₂SO₄ ($I=0,1\text{M}$) (\circ) stanovené při teplotě $T = 25^{\circ}\text{C}$.



Příloha C: TIŠTĚNÉ PUBLIKACE

Article

The Influence of Hofmeister Series Ions on Hyaluronan Swelling and Viscosity

Aleš Mráček ^{1*}, Júlia Varhaníková ¹, Marián Lehocký ², Lenka Gřundělová ¹, Alena Pokopcová ¹ and Vladimír Velebný ³

¹ Department of Physics and Materials Engineering, Faculty of Technology, Tomas Bata University in Zlín, Nad Stráněmi 4511, 76005 Zlín, Czech Republic; E-mails: juliavarhanikova@seznam.cz; Grundy.L@seznam.cz; salinka.p@azet.sk

² Medical Materials Research Centre, Technology park, University Institute, Tomas Bata University in Zlín, Nad Ovcirnou III 3685, Zlín, 76001 Czech Republic; E-mail: lehocky@post.cz

³ CPN Ltd., Dolní Dobrouč 401, 561 02 Dolní Dobrouč, Czech Republic; E-mail: velebn@contipro.cz

* Author to whom correspondence should be addressed. E-mail: mracek@ft.utb.cz;
Fax: +420576035141; Tel: +420576035102

Received: 28 February 2008; in revised form: 17 April 2008 / Accepted: 30 April 2008 /

Published: 1 May 2008

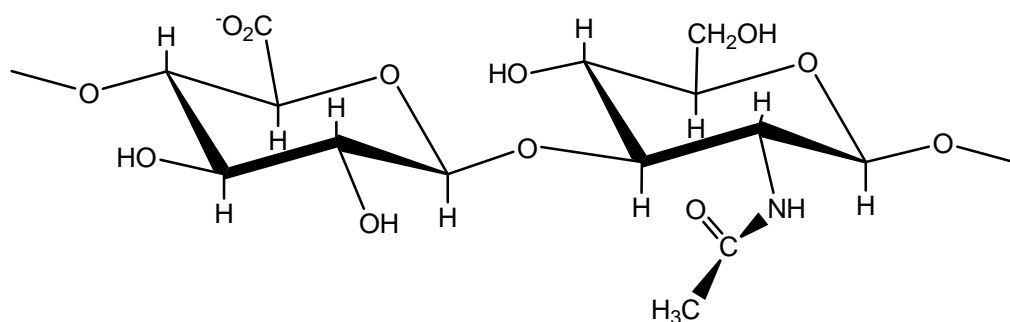
Abstract: The dissolution of hyaluronan in water leads to its degradation, and as a result its molecular weight decreases. The degradation of hyaluronan is mainly influenced by temperature, solution composition, and also its pH. This study describes the influence of Hofmeister series ions on hyaluronan behaviour and hyaluronan film swelling by solutions of these ions. It was found that Hofmeister ions show lyotropic effects influencing the entanglement of hyaluronan coils and their expansion from solid polymer films into swollen gel state. The hydrophobic and hydrophilic interactions in the structure of hyaluronan macromolecules are represented by the mutual diffusion coefficient $D(c)$, the mean mutual diffusion coefficient \bar{D}_s , the expansion work of coil swelling $RA_{\delta,s}$, the activation enthalpy of diffusion connected with swelling $H_{D,s}$ and kinematic viscosity of hyaluronan-ions solutions ν .

Keywords: Material Science; biomaterials; hyaluronan; Hofmeister series.

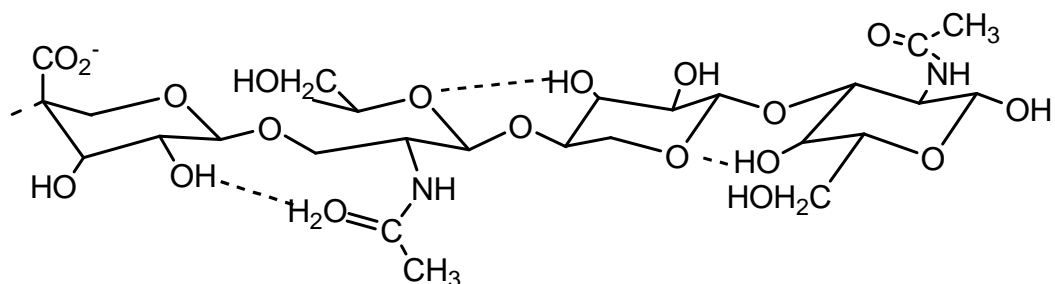
Introduction

In 1934 Meyer and Palmer described a procedure for isolation of a novel glycosaminoglycan from the vitreous humor of bovine eyes [1]. They showed that this substance contained an uronic acid and an aminosugar, but no sulfoesters. This marked the birth announcement of one of Nature's most versatile and fascinating macromolecules. It was first isolated as an acid, but it behaved like a salt (sodium hyaluronate) under physiological conditions. Today, this macromolecule is most frequently referred to as hyaluronan, reflecting the fact that it exists *in vivo* as a polyanion and not in the protonated acid form. During the 1930s and 1940s, hyaluronan was isolated from many different sources such as synovial fluids, umbilical cords, vitreous body, skin, rooster comb and also biotechnologically synthesized from streptococci suspensions. Numerous ideas have been offered for applying hyaluronan in different areas and nowadays, many of them are actually used in medicine, pharmacology or in cosmetics. It would take an additional 20 years before Meyer's laboratory finally completed the work that determined the precise chemical structure of the basic disaccharide unit that forms hyaluronan [2]. During these years they showed that the uronic acid and aminosugar in the disaccharide are D-glucuronic acid and D-N-acetylglucosamine, and that they are linked together through alternating β -1,4 and β -1,3 glycosidic bonds. Both sugars are spatially related to glucose, which in the beta configuration allows all of its bulky groups to be in sterically favourable equatorial positions while all of the small hydrogen atoms occupy the less sterically favourable axial position. Thus, the structure of the disaccharide shown in Figure 1 is energetically very stable [3]. The conformation of hyaluronan acid (HA) has been analysed by a number of techniques showing that the hydrogen bonds are crucial to both secondary and tertiary structures [4].

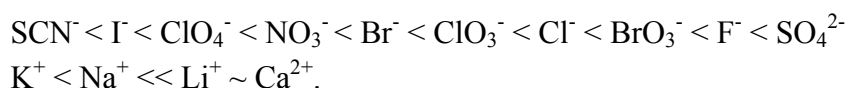
Figure 1. The monomeric unit of hyaluronic acid.



The secondary structure of HA (a reducing terminal tetrasaccharide fragment) as a two-fold helix with hydrogen bonds (dotted lines) can be seen in Figure 2. All the indicated H-bonds form in dimethyl sulfoxide solution, whereas in aqueous solution some are replaced by water bridges. In connection with this, it is very useful to study the influence of any ions present in hyaluronan solutions on the secondary and tertiary structure of this polysaccharide.

Figure 2. The secondary structure of HA.

Ions of the Hofmeister series have a significant effect on the solubility of macromolecular substances and on the stability of their respective secondary, tertiary and quaternary structures. The Hofmeister series (lyotropic series - an order of ability of ions to convert into salt-out or salt-in proteins) are considered to be ions having a typical ion-specific influence on polymers in aqueous systems. The order of Hofmeister anions and cations is:



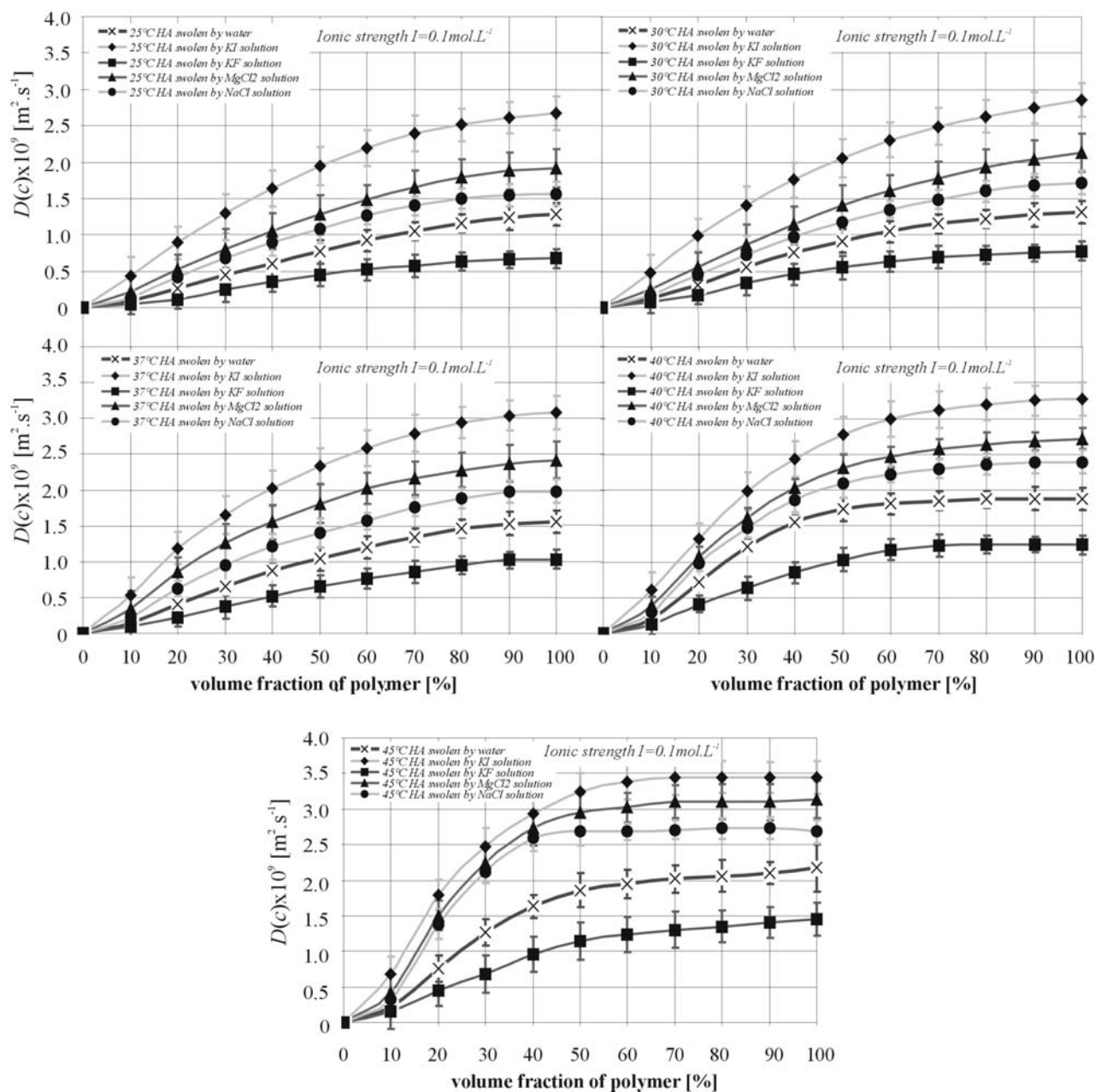
The effects of the Hofmeister series seems to apply mainly in experiments where solvents with higher salt concentrations are used. The initial ions in the series increase the solvent surface tension and decrease the solubility of non-polar "salt-out" molecules, which leads to a strengthening of the hydrophobic interactions. On the other hand, a few final salts in Hofmeister series increase the solubility of non-polar "salt-in" molecules and increase the order in water, which decreases the hydrophobic interactions. These salts interact directly with proteins or polymers and may even be specifically bonded with ions having a strong "salting-in" effect [5, 16-18]. Similar ion-effects have been found in the swelling behaviour of several kinds of polymer gels. Suzuki *et al.* [6] investigated the effects of ions on the thermal volume transition in polymer gels and some kind of Hofmeister series effects were detected for the temperature transition. There was discrepancy with the speculations that the origin of ion-effect is caused by the change in water structure around the hydrophobic group [6].

The behaviour of hyaluronan during diffusion process of swelling is presented in this article. The theoretical background behind the computation of mutual diffusion coefficients, mean mutual diffusion coefficients, the expansion work of swelling coils and the activation enthalpy of diffusion connected with swelling $H_{D,s}$ has been fully published by Mracek *et al.* [7].

Results and Discussion

The influence of Hofmeister series ions on hyaluronan behaviour and hyaluronan films swelling by solutions of these ions can be studied by interferometric methods. The dependence of the mutual diffusion coefficient of swelling on the ability of water to solvate hyaluronan was verified. As can be seen in Figure 3, the relation between the mutual diffusion coefficient and hyaluronan concentration in swollen layer shows a statistically significant decreasing rate of swelling diffusion process for experiment with *KF* addition (Ionic strength $I = 0.1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$) as compared with swelling of hyaluronan by pure water. On the other hand, solutions of *NaCl*, *MgCl₂* and *KI* force diffusion swelling processes.

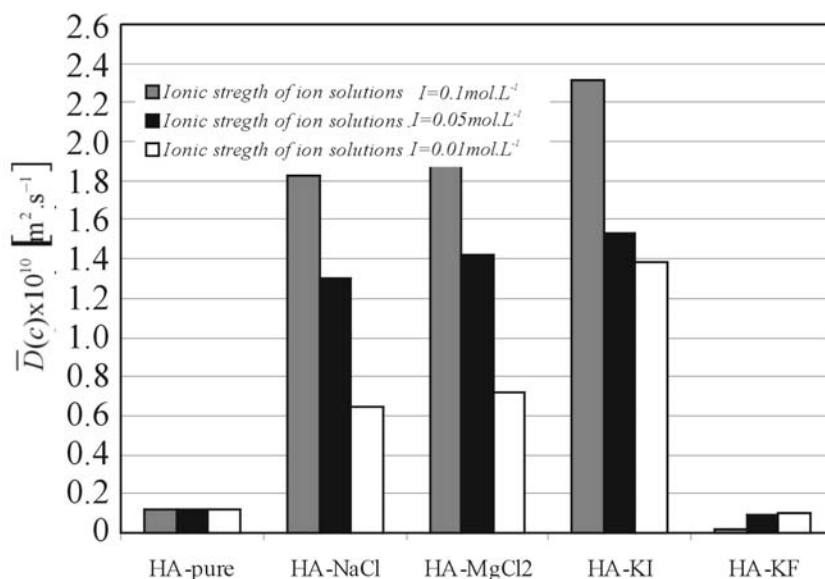
Figure 3. Relation between mutual diffusion coefficient and HA concentration in surface swollen layers.



Differences between monovalent cations (Na^+ , K^+) and divalent cations (Mg^{2+}) at ionic strength $I = 0.1 \text{ mol.L}^{-1}$ are consistent with predictions that charge shielding by divalent ions is greater [8, 9]. The data for the swelling diffusion process suggests that Mg^{2+} causes greater domain contraction, which is additional to the electrostatically induced changes in HA properties observed with K^+ and Na^+ . Individual Mg^{2+} ions may co-ordinate two carboxy groups on the same HA chain secondary structure (Figure 2), and promote chain contraction. Consequently, cations of Mg^{2+} could induce a significant reduction of chain stiffness. However, the mutual diffusion coefficient $D(c)$ of swelling shows (Figure 4) nearly order of magnitude differences for KI solutions in comparison with KF ones. In this case, the influence of the anions (F^- , Cl^- , I^-) on the behaviour of the K^+ cation is evident. This fact can be viewed as in accordance with theory of Hofmeister ion series (hydrophilic→

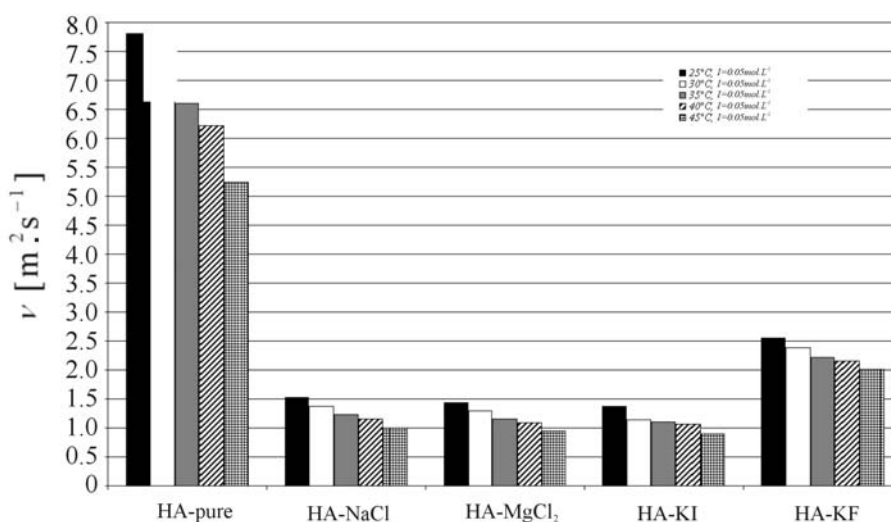
$F^1 < Cl^1 < F^1 \leftarrow$ hydrophobic). F^- or Cl^- ions may alter the co-ordination of water molecules with HA chains, thereby disrupting the hydrogen bonds involved in water bridges. The strong reduction of hydrophilic chain interaction and creation of hairpin loops caused by F^- can consequently induce a significant increase of chain stiffness. The lower ionic strength shows similar dependences (see in Figure 4), which are represented by the mean mutual diffusion coefficient.

Figure 4. The mean mutual diffusion coefficients of hyaluronan solutions.



The results and conclusions from the diffusion process of swelling can be compared with results obtained by viscosity measurements (see Figure 5). The additions of ions to aqueous hyaluronan solutions are generally connected with a decrease in the kinematic viscosity. However, the observed higher kinematic viscosity values of KF -enriched HA solutions supports the hypothesis of an increase of chain stiffness caused by the presence of F^- .

Figure 5. The kinematic viscosity: the comparison of HA-water solutions and HA-ion solutions.



Figures 6 and 7 show the relationship between $RA_{\delta,s}$ and $\Delta H_{D,s}$, respectively, and additions of salts ($NaCl$, $MgCl_2$, KI , KF) at different ionic strengths ($I = 0.01$, 0.05 and $0.1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$). These results show that solvation of HA by water is strongly dependent on the ionic strength and particularly on the variety of salt dissociated in the aqueous solutions of HA.

Figure 6. The volume expansion work ($RA_{\delta,s}$) resulting from expansion of HA coils during their transition from solid polymer phase into the gel phase of swollen layer.

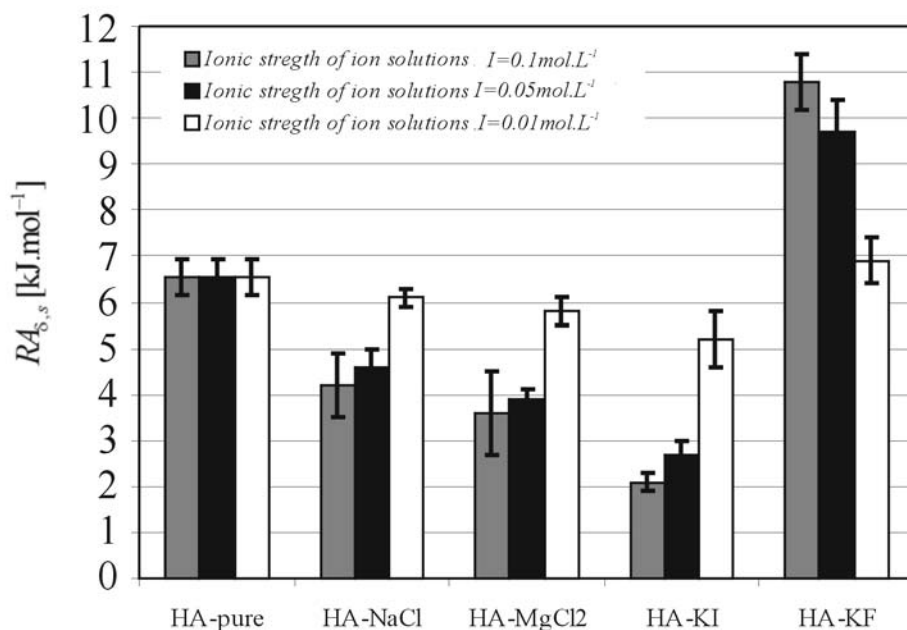
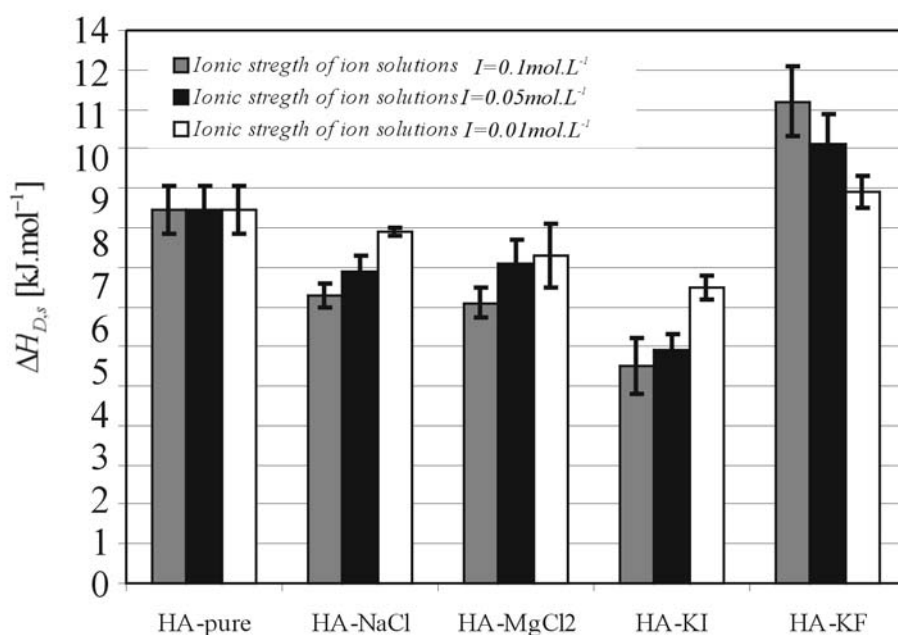


Figure 7. The activation enthalpy of diffusion connected with swelling ($\Delta H_{D,s}$) under constant pressure.



The values of $RA_{\delta,s}$ and $\Delta H_{D,s}$ are considerably influenced by the polarity of the basic structural polymer unit - the monomer. Some authors have reported [4, 10-12] the important role of hydrogen bonds in hyaluronate chain structures and the associated problem of the relationship between hyaluronate swelling and intermolecular interactions influenced by hydrogen bonds [13,14]. The functionality of hyaluronic acid can mostly be traced back to the swelling properties of polyelectrolyte networks. In aqueous solutions the hyaluronan molecule becomes a negatively charged polyelectrolyte and its size, conformation and its degree of hydration depend on dissociation [13]. Consequently, the affinity between the polymer film and the solvent are very important in the swelling diffusion process, because the solvent molecules must penetrate into the polymer and then the polymer chain molecules must be solvated by solvent molecules. Subsequently, the swelling continues with the expansion of polymer coils and the polymer mobility and permeability increases [15]. As can be seen in Figure 6, the volume expansion work $RA_{\delta,s}$ for HA-KF is significant higher than for HA-pure and it is evident (see Figure 7), that the values of activation enthalpy of diffusion connected with swelling $\Delta H_{D,s}$ are largely dependent on the variety of salts and the salts on the hydrophobic part of Hofmeister series increase these values. It is assumed that the solvation of HA with ion solutions on the hydrophobic part of Hofmeister series results in the decreasing flexibility of the macromolecular coil and results in an increase of the potential barrier which must be overcome during the diffusion process of swelling.

The results obtained support the hypothesis of hydrophilic-hydrophobic interaction [19] in hyaluronan chains swollen by Hofmeister ions solutions. This hypothesis was verified by diffusion process of swelling and viscosity measurements. With respect to applications of hyaluronan in ophthalmology, surgery and wound healing, it will be very interesting to study the behaviour of hyaluronan in the water solutions with additions of quaternary ions (for example hexadecyltrimethylammonium bromide). It is known that these quaternary ions create hyaluronan precipitates in aqueous solution. The results (the influence Hofmeister ions on swelling and kinematic viscosity of hyaluronan solutions) reported in this paper can be used for re-conversions of these precipitates. Accordingly, our next results concerning to this hyaluronan precipitates problem will be published shortly.

Experimental

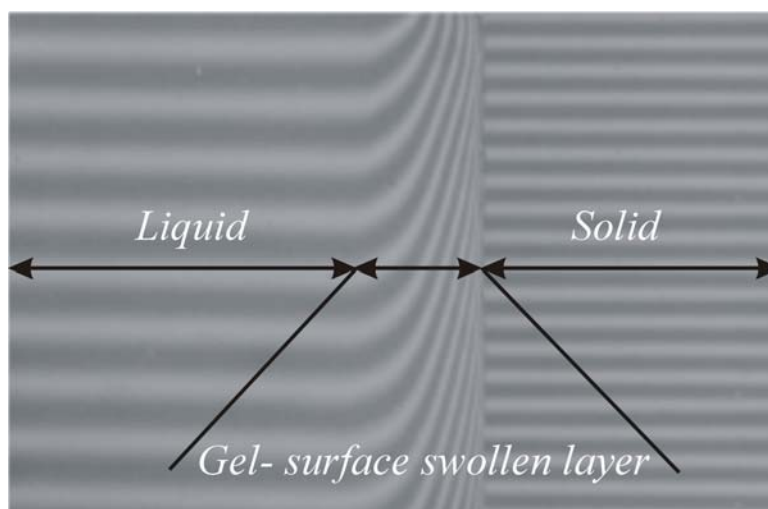
Materials

The hyaluronan samples (rank 150806-D1) were obtained from Contipro, Ltd., Dolní Dobrouč, Czech Republic, (molar mass $M_w = 630 \times 10^3 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$). All materials and chemicals used for the experiments were of standard purity p.a. The following salts in solutions (redistilled water + salt) for swelling process and viscosity measurements were used: sodium chloride, *NaCl* (Fluka); magnesium chloride, *MgCl₂* (Fluka); potassium fluoride, *KF* (Fluka); potassium iodide, *KI* (Sigma-Adrich). The process of swollen surface layer formation was studied on the solid films of polymer samples prepared by casting from the 0.01M concentration solutions in redistilled water and by subsequent evaporation in a desiccator.

Experimental setup and measurements

The swelling diffusion process measurements were done using the previously described wedge interferometer [7, 8]. Experiments were performed at five temperatures (25, 30, 37, 40 and 45°C). The mutual diffusion coefficient $D(c)$ and mean mutual diffusion coefficient of swelling (\bar{D}_s) at definite times were measured and computed from recorded interferograms. A typical interferogram can be seen in Figure 8, which shows the concentration field of hyaluronan on the surface swollen layer expressed as the change of refractive index.

Figure 8. A typical interferogram obtained from swelling diffusion process measurement.



Samples of thin hyaluronan films were put in a temperature-controlled holder of $(23 \times 20 \times 3.5) \times 10^{-9} \text{ m}^3$ volume between two semi-transparent glass plates with a transparency of about 40%. The temperature was controlled exactly constant to a deviation of $\pm 0.1^\circ\text{C}$. In each measurement, 3-5 shots were taken at regular intervals. The final resultant interferograms were scanned with a NIKON COOLPIX 4500 digital camera. The SAIA software developed by Urban and Mracek (Department of Physics and Materials Engineering, FT, TBU in Zlin) was used for the image analyses of the interferograms. The factors $RA_{\delta,s}$, $\Delta H_{D,s}$, were calculated using logarithmic form formulas [7, 8], consequently, standard estimation errors for $RA_{\delta,s}$ and $\Delta H_{D,s}$ were computed for confidence interval at 80% significance level. The kinematic viscosity ν values were obtained from measurements executed on an Ubbelohde viscometer ($C = 0.01$) at five temperatures (25, 30, 37, 40 and 45°C) and the ionic strength of solvents was $I = 0.05 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$.

Acknowledgements

This research was supported by grant from CPN, Ltd. Author M. Lehocký would also like to express his gratitude to the Ministry of Education, Youth and Physical Training of the Czech Republic (Grant VZ MSM 7088352101).

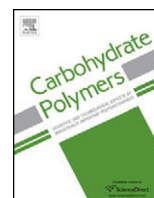
References

1. Meyer, K.; Palmer, J.W. The polysaccharide of the vitreous humor. *J. Biol. Chem.* **1934**, *107*, 629-634.
2. Weissman, B.; Meyer, K. The structure of hyalobiuronic acid and of hyaluronic acid from umbilical cord. *J. Am. Chem. Soc.* **1954**, *76*, 1753-1757.
3. Hascall, V.C.; Laurent, T.C. *Hyaluronan: Structure and Physical Properties*. Available on: <<http://www.glycoforum.gr.jp/>>.
4. Fischer, E.; Callaghan, P.T.; Heatley, F.; Scott, J.E. Shear flow affects secondary and tertiary structures in hyaluronan solution as shown by rheo-NMR. *J. Mol. Struct.* **2002**, *602-603*, 303-311.
5. Baldwin, R.L. How Hofmeister ion interactions affect protein stability. *Biophys. J.* **1996**, *71*, 2056-2063 .
6. Suzuki, A.; Hirasa, O. An approach to artificial muscle using polymer gels formed by microphase separation. *Adv. Polym. Sci.* **1993**, *110*, 241-261.
7. Mráček, A.; Benešová, K.; Minařík, T.; Urban, P.; Lapčík, L. The diffusion process of Sodium Hyaluronate (Na-HA) and Na-HA-n-alkyl derivatives films swelling. *J. Biomed. Mat. Res., A* **2007**, *83A*, 184-190.
8. Maroudas, A.; Weinberg, P.D.; Parker, K.H.; Winlove, C.P. The distribution and diffusivities of small ions in chondroitin sulphate, hyaluronate and some proteoglycan solutions. *Biophys. Chem.* **1988**, *32*, 257-270.
9. Parker, K.H.; Winlove, C.P.; Maroudas, A. The theoretical distributions and diffusivities of small ions in chondroitin sulphate and hyaluronate. *Biophys. Chem.* **1988**, *32*, 271-282.
10. Cowman, M.K.; Matsuoka, S. Experimental approaches to hyaluronan structure. *Carbohydr. Res.* **2005**, *340*, 791-809.
11. Almond, A.; Brass, A.; Sheeman, J.K. Dynamic exchange between stabilized conformations predicted for hyaluronan tetrasaccharides: comparison of molecular dynamics simulations with available NMR data. *Glycobiology* **1998**, *8*, 973-980.
12. Gribbon, P.; Heng, B.Ch.; Hardingham, T.E. The analysis of intermolecular interactions in concentrated hyaluronan solutions suggest no evidence for chain-chain association. *Biochem. J.* **2000**, *350*, 329-335.
13. Albersdörfer, A.; Sackman, E. Swelling behaviour and viscoelasticity of ultrathin grafted hyaluronic acid films. *Eur. Phys. J. B* **1999**, *10*, 663-672.
14. Haeshin, L.; Ho Choi, S.; Park, T.G. Direct visualization of hyaluronic acid polymer chain by self-assembled one-dimensional array of gold nanoparticles. *Macromolecules* **2006**, *39*, 23-25.
15. Miller-Chou, B.A.; Koenig, J.L. Polymer dissolution. *Prog. Polym. Sci.* **2003**, *28*, 1223-1270.
16. Kunz, W.; Lo Nostro, P.; Ninham, B.W. The present state of affairs with Hofmeister effects. *Curr. Opin. Colloid Interf. Sci.* **2004**, *9*, 1-18.
17. Cacace, M.G.; Landau, E.M.; Ramsden, J.J. The Hofmeister series: salt and solvent effects on interfacial phenomena. *Quart. Rev. Biophys.* **1997** *30*, 241-277.
18. Collins, K.D.; Washabaugh, M.W. The effect and behavior of water interfaces. *Quart. Rev. Biophys.* **1985** *18*, 323-422.

19. Scott, J.E.; Cummings, C.; Brass, A.; Chen, Y. Secondary and tertiary structures of hyaluronan in aqueous solution, investigated by rotary shadowing-electron microscopy and computer simulation. hyaluronan is very efficient network-forming polymer. *Biochem. J.* **1991** *274*, 699-705.

Sample Availability: Contact the authors.

© 2008 by the authors; licensee Molecular Diversity Preservation International, Basel, Switzerland. This article is an open-access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution license (<http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>).



The influence of quarternary salt on hyaluronan conformation and particle size in solution



Lenka Gřundělová^{a,b}, Aleš Mráček^{a,b,*}, Věra Kašpárková^{b,c}, Antonín Minařík^{a,b}, Petr Smolka^{a,b}

^a Tomas Bata University in Zlín, Faculty of Technology, Department of Physics and Material Engineering, nám. T.G. Masaryka 275, 760 01 Zlín, Czech Republic

^b Centre of Polymer Systems, University Institute, Tomas Bata University in Zlín, Nad Ovcírnou 3685, 760 01 Zlín, Czech Republic

^c Tomas Bata University in Zlín, Faculty of Technology, The Department of Fat, Surfactant and Cosmetics Technology, nám. T.G. Masaryka 275, 760 01 Zlín, Czech Republic

ARTICLE INFO

Article history:

Received 15 November 2012
Received in revised form 6 May 2013
Accepted 25 June 2013
Available online xxx

Keywords:

Hyaluronan
Quarternary salts
Dynamic light scattering
Hyaluronan conformation
Critical micellar concentration
Hyaluronan hydrophobic interactions

ABSTRACT

Interaction of hyaluronan (NaHy) with the quarternary salt, benzalkonium chloride (BAC), was studied. Based on the DLS experiments, viscometry and surface tension measurements executed on hyaluronan samples with two molecular weights of $M_w = 1.8$ MDa and $M_w = 0.35$ MDa, the hypothesis was proposed suggesting that at certain BAC concentrations, hyaluronan can form aggregates, which lead to increase of the polymer coil size measured as z-average diameter. Moreover, it was confirmed that within the whole range of BAC concentrations, repeated variations in size and conformations of polymer coils occur, being connected with the critical micellar concentration of BAC and with hydrophobic interactions of non-polar segments of BAC with hyaluronan hydrophobic domains. Tensiometry, DLS and viscometry data support the assumption that variations of thermodynamical “favourability” of BAC–BAC or NaHy–BAC interactions take place in hyaluronan solutions, based on the BAC concentration.

© 2013 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

The physical and physico-chemical properties of hyaluronic acid and its sodium salt – hyaluronan (NaHy) in solutions are of great interest in various industrial branches, e.g. pharmaceuticals, cosmetics, tissue engineering and many others. The behaviour of NaHy in solution strongly depends on the conformation of its polymer chain, which is influenced by molecular weight, polydispersity and the unique chemical composition of the NaHy molecule. Sodium hyaluronate is a natural polysaccharide with a regularly alternating disaccharide units of D-glucuronic acid and N-acetyl-D-glucosamin that can be found in various body fluids, tissues and extracellular matrix. The first description of this substance was performed in 1934 by Meyer and Palmer (1934). Conformation of NaHy in highly diluted aqueous (<1%) solution is driven by hydrogen bonds acting mostly between water and polysaccharide molecules. With a slight increase of the concentration of NaHy in solution, also inter- and intramolecular interactions must

be considered. NaHy molecule forms ordered secondary structure, containing hydrophobic domains (patches). From the physical point of view, the hydrophobic domains are presented in the backbone, and hydrophilic groups are located in the side branches of the NaHy molecule (Scott, 1992). According to Scott and co-authors (Scott, Cummings, Brass, & Chen, 1991; Heathly & Scott, 1988), NaHy may aggregate and create tertiary structures due to bonding between the hydrophobic patches (see Fig. 1), forming thus two-fold helix based aggregates which are stable at physiological temperatures in water (Heathly & Scott, 1988). In solutions with a very low concentration of high molecular NaHy, presence of intramolecular interactions based on the principle described above can be expected (Heathly & Scott, 1988), which will affect size of the polymer coil.

The theory of chain interactions in dilute and semi-dilute solutions of polyelectrolytes, studied from the point of view of statistical physics and the scaling concept, can be found in Dobrynin, Colby and Rubinstein, (1995), Dobrynin and Rubinstein (2005), and information about behaviour of NaHy chains in semidilute solutions based directly on the interpretation of dielectric measurements data present Vuletić, Babić, Ivek, Grgičin, and Tomić (2010).

From the hydrophobic and hydrophilic nature of the NaHy molecule follows that in aqueous solution NaHy will be very sensitive to the presence and concentration of any surface

* Corresponding author at: Tomas Bata University in Zlín, Faculty of Technology, Department of Physics and Material Engineering, nám. T.G. Masaryka 275, 760 01 Zlín, Czech Republic. Tel.: +420 576035110.

E-mail address: mracek@ft.utb.cz (A. Mráček).

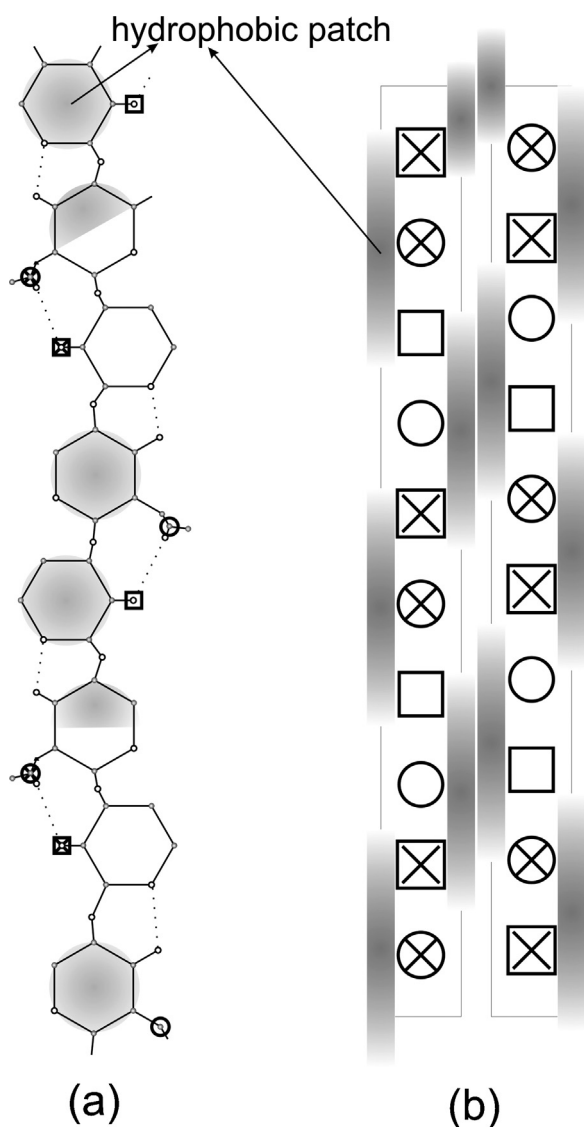


Fig. 1. (a) The hydrophobic patches stretching along three sugar units on alternate sides of polymer chain (circles – acetamido groups, squares – carboxylate groups), (b) Possible duplex between two molecules of hyaluronan (Scott, 1992; Scott, Cummings, Brass, & Chen, 1991).

active compound. Among the substances used for preservation of NaHy solutions, quarternary salts are commonly applied (Pisarcik, Soldan, Bakos, Devinsky, & Lacko, 1999; Pisarcik, Toyoko, Devinsky, Lacko, & Bakos, 2000; Pisarcik, Toyoko, Devinsky, & Lacko, 2001). These salts are classified as cation-active surfactants, capable of micelle formation at concentrations above their critical micelle concentrations. Hyaluronan dissolved in water, on the other side acts as a negatively charged polyelectrolyte and attracts cation-active surfactants, which may bond to specific sites in its structure. In solution, these bonded molecules can interact with each other and form micelles, thus effecting the conformation and coil size of NaHy. As a result, these changes will be reflected in the flow properties of the NaHy/BAC solution, which can be determined for example by viscosity measurements.

In order to calculate limiting viscosity number $[\eta]$, the dilute solution viscometry data are usually processed using the Huggins equation. In addition to $[\eta]$, another parameter derived from this equation is Huggins coefficient (k_H), which reflects binary interactions of polymer molecules, both hydrodynamic and thermodynamic. Huggins coefficient is thought to depend mainly on

molecular weight and the strength of the polymer-solvent interaction and should be lower in good solvents and at higher molecular weights. Values of k_H for NaHy have been provided by several researches and were found to be prevalingly in the range of 0.35–0.45, as published in Bohdanecky and Kovar (1982). Another method capable of determining the conformation changes in NaHy chain due to the presence of BAC is dynamic light scattering, used for example by Pisarcik et al. (2001).

In this article, the effect of benzalkonium chloride (BAC) presence on the conformation of NaHy coil in phosphate buffered aqueous solution was studied by the means of dynamic light scattering (DLS) and viscometric methods. The critical micellar concentration (CMC) of BAC was determined by standard surface tension measurements and a new possibility of critical aggregation concentration (CAC) identification in more complex polysaccharides/surfactant systems using DLS was also presented. Moreover, the hypothesis explaining NaHy behaviour in the presence of different BAC concentrations was proposed.

2. Materials and methods

Sodium hyaluronate (NaHy) samples of two molecular weights, $M_w = 1.8$ MDa and $M_w = 0.35$ MDa were kindly provided by Contipro, Ltd. (Dolní Dobrouč, Czech Republic). Cationic surfactant benzalkonium chloride (BAC) ($\geq 95.0\%$) and sodium chloride were purchased from Fluka. Phosphate buffer (pH = 7.36) was prepared by dissolving appropriate amount of Na_2HPO_4 and NaH_2PO_4 (both purchased from Sigma-Aldrich) in de-ionized water. Stock solution of NaHy in phosphate buffer was prepared in concentration of 0.1% (w/w) by slowly adding polymer to the buffer solution under continuous stirring, followed by 24-h dissolving at 50 °C. The stock solution of hyaluronan with added BAC was then used for surface tension, particle size and viscosity measurements.

2.1. Surface tension measurement

The critical micellar concentration of BAC was determined by surface tension measurement. For a series of BAC concentrations ranging from 0.032 mmol L^{-1} to 0.89 mmol L^{-1} , surfactant was dissolved in phosphate buffer and de-ionized water, respectively. The surface tension of the first sample set was measured immediately after preparation. For the second set of samples, the measurement was performed after one day equilibration of the prepared surfactant solutions. The surface tension measurement was performed at 25.0 ± 0.1 °C with a K100MK3 Tensiometer (Krüss), utilizing the Wilhelmy plate method.

2.2. Dynamic light scattering measurement (DLS)

Solution of NaHy and NaHy with BAC (0.32–4.2 mmol L^{-1}) was characterized by dynamic light scattering. Zetasizer Nano ZS (Malvern) equipped with 4 mW He-Ne laser operating at the wavelength of 633 nm was used for the measurement of hydrodynamic diameter (z-average) at 25 °C. The intensity of scattered light was observed at the angle of 173°. Prior to each measurement, the samples were filtered through 0.22 μm pore-size PTFE Syringe filters (Millipore). The mean hydrodynamic diameter and the polydispersity index (PDI) were obtained. Each sample was measured in triplicate.

2.3. Kinematic viscosity measurement

The kinematic viscosity measurement on NaHy solutions with the same BAC concentration as for DLS measurements, was carried out in a Ubbelohde capillary viscometer (0.53 \pm 0.01 mm diameter).

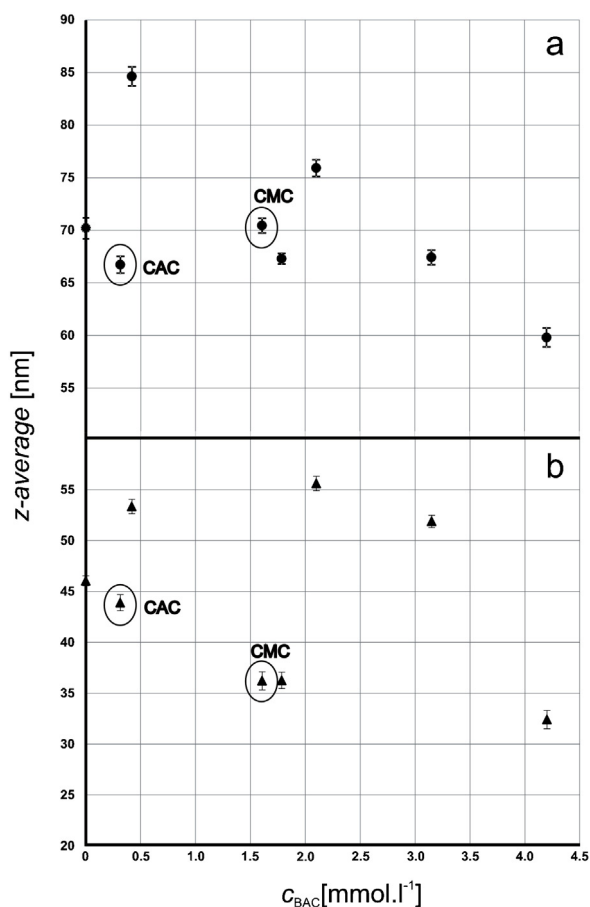


Fig. 2. Relation between NaHy (constant weight fraction NaHy/phosphate buffer) coils z-average and BAC concentration in phosphate buffer, (a) $M_w = 1.8$ MDa (b) $M_w = 0.35$ MDa.

The viscometer was placed into a water-cooled bath with the temperature 25.0 ± 0.1 °C. The ratio between viscosity of NaHy solution with added BAC (η) and NaHy solution of the same concentration without BAC addition (η_0) was defined as $\eta_r = \eta/\eta_0$.

2.4. Limiting viscosity number

NaHy solution with concentration of 0.1% in phosphate buffer was added 0.32 mmol L^{-1} BAC. The polymer/BAC solution was gradually diluted with phosphate buffer in order to obtain five solutions differing in concentrations. Values of limiting viscosity number (LVN) $[\eta]$ and Huggins parameter k_H were then determined from the flow times measured with these polymer/BAC solutions and the linear least square regression of the η_{sp}/c vs c dependence was used for the $[\eta]$ and k_H calculation (c is polymer concentration $[\text{g L}^{-1}]$, η_{sp} is specific viscosity). Correspondingly, the measurements were performed with NaHy added all studied BAC concentrations ranging from 0.42 mmol L^{-1} to 4.2 mmol L^{-1} , one by one, and values of $[\eta]$ and k_H were determined for each of the BAC addition.

3. Results and discussion

Substantial variation of the z-average diameter can be observed in Fig. 2a and b depicting the dependence of the sodium hyaluronate particle sizes versus concentration of the used surfactant, benzalkonium chloride for both samples differing in molecular weights ($M_w = 1.8$ MDa and $M_w = 0.35$ MDa).

It can be stated that NaHy with both molecular weights used, dissolved in phosphate buffer without BAC forms a random coil

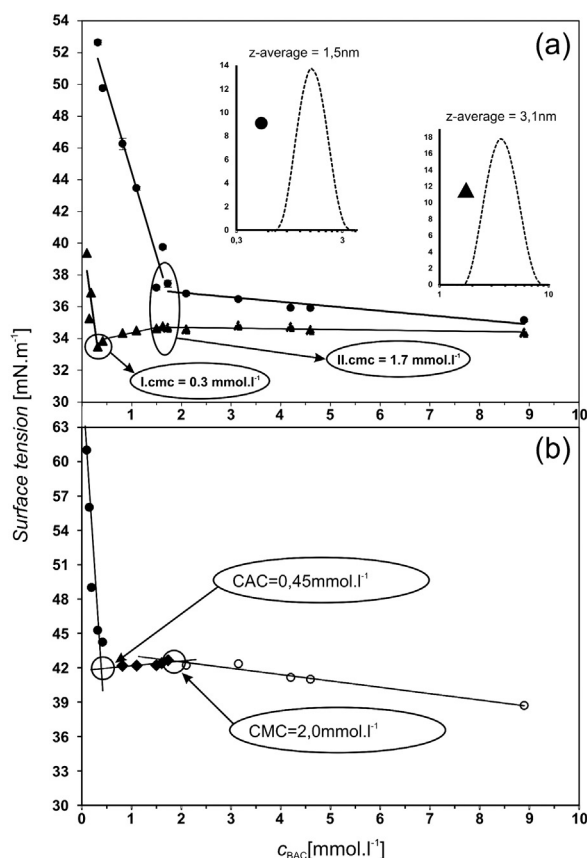


Fig. 3. (a) Surface tension of BAC in de-ionized water (● z-average = 1.5 nm) and phosphate buffer (▲ z-average = 3.1 nm), (b) surface tension of NaHy–BAC (NaHy $M_w = 1.8$ MDa) in phosphate buffer solution.

with the mean diameter of 70 nm, resp. 46 nm. This confirms to generally accepted finding that in aqueous solutions with excess salt, NaHy chains have an expanded random coil conformation as would be expected for a flexible polyelectrolyte (Herslöf, Sundelöf, & Edsman, 1992). Nevertheless, the first addition of BAC, corresponding with the BAC critical micelle concentration (CMC) of 0.3 mmol L^{-1} in a buffered solution (Fig. 3) induced formation of BAC-polymer associates resulting in contraction (tighter packing) of the NaHy coils and lowering of hydrodynamic coil radius (see Fig. 2).

From the previous research it is well known that in the absence of polymer and below the CMC surfactant molecules (with the exception of the monomolecular film present at the liquid/gas boundary) can exist only as individual entities, while above the CMC they begin to aggregate into micelles (Wennerström & Lindman, 1979). In the presence of NaHy and at low surfactant concentration, no micellization appeared, as positively charged BAC molecules bound to negatively charged groups of NaHy. Generally, this process proceeded until all the accessible, negatively charged groups of NaHy were occupied by BAC and critical aggregation concentration (CAC) was reached. With further increase of BAC concentration micelle formation in the solution can be expected accompanied by a process involving surfactant molecules bound on the NaHy chain, leading to the shrinkage/contraction of the polymeric coil (Fig. 4a–c). This fact is supported by surface tension measurement of NaHy–BAC in phosphate buffer (Fig. 3b). The CAC of NaHy–BAC complex at 0.45 mmol L^{-1} BAC addition was observed (Fig. 3b), which corresponds with results of NaHy z-average increase detected at 0.42 mmol L^{-1} BAC concentration (Fig. 2).

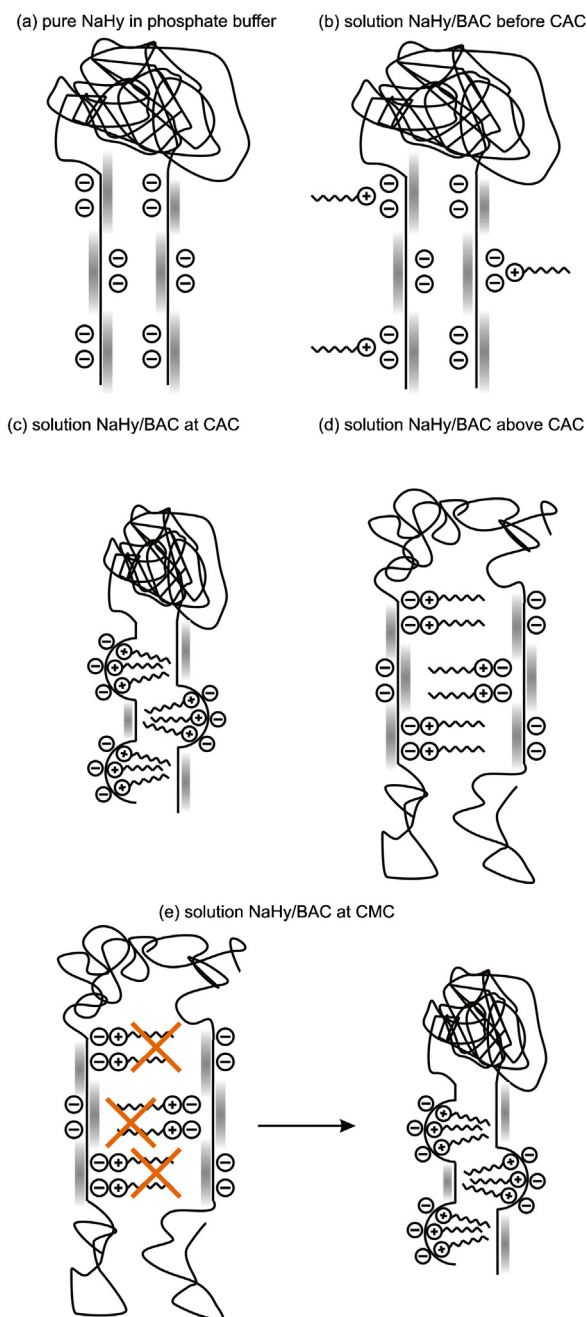


Fig. 4. Hypothesis of interaction between NaHy and BAC.

When moderately exceeding the CMC of added BAC (0.42 mmol L^{-1}), a significant expansion of NaHy–BAC aggregates/complexes occurs in samples with both molecular weights resulting in an increase of z-average diameter measured by DLS, which agrees with previously published results (Pisarcik et al., 2001). Here, a hypothesis could apply suggesting that thanks to interactions between NaHy hydrophobic patches (Scott, 1992; Scott, Cummings, Brass, & Chen, 1991) and BAC tails, rigid structures are formed, which tend to unpack the otherwise hydrophilic NaHy chain (see Fig. 4d). The third addition of BAC with concentration of 1.61 mmol L^{-1} causes steep drop of the z-average diameter in both studied samples. The above explanation can be also formulated according to Thalberg, van Stam, Lindblad, Almgren, & Lindman (1991), who attributed critical aggregation concentration of NaHy to presence of oppositely charged surfactants

decyl- and dodecyl-trimethylammonium bromide below their CMC, as was indicated by the isotherms showing strongly cooperative binding. As explained later in the text, this BAC concentration is a point, where second type of micelles may form. Thus the thermodynamic conditions in the solution can lead to weakening of the hydrophobic interactions in favour of interactions between NaHy/BAC aggregate and solvent (see Fig. 4e). The data of the z-average diameter measurements obtained in the presence of even higher BAC concentrations suggest that the behaviour of NaHy in solution may follow similar pattern as proposed in Fig. 4b–e. In addition to CAC, the CMC of NaHy–BAC complex at 2.0 mmol L^{-1} BAC concentration was observed (Fig. 3b), which corresponds with results of NaHy z-average increase at 2.1 mmol L^{-1} BAC. The alternative interpretation of above results can be provided based on the conclusions presented by Bjoling, Herslof-Bjorling, and Stilbst (1995), who showed that NaHy molecules can be bridged by TTAB molecules, which are of similar character as BAC. This might also be explanation of the increasing z-average values in Fig. 2.

The conclusions based on the DLS experiments are further supported with the discussed viscosity measurement results. As mentioned earlier, apart from the hydrophilic nature of the molecule as the whole, features NaHy also hydrophobic character along the chain backbone axis (Podzimek, Hermannova, Bilerova, Bezakova, & Velebný, 2010; Pisarcik et al., 1999, 2000, 2001). Possible reason of described behaviour can be the fact that in the phosphate buffer, the BAC molecules may form two types of micelles in contrast to the BAC molecules in the de-ionized water. This statement can be again supported by the surface tension measurements presented in Fig. 3a, where two breaks on the dependence C_{BAC} vs γ (surface tension) can be observed, being typical for different micelle types. The presence of two types of BAC micelles in buffer solution can be indicated by DLS measurements, showing distribution curve of higher polydispersity (z-average diameter of 3 nm) compared with that of recorded in water (1.5 nm). The higher polydispersity might be a reason for presence of two micelle types that cannot be differentiated by DLS method. Formation of different micelle types was reported for cationic surfactants, quaternary salts dodecyltrimethylammonium bromide (DTAB), tetradecyltrimethylammonium bromide (TTAB) and hexadecyltrimethylammonium bromide for example by Mata, Varade, & Bahadur (2005). Based on viscometry measurements, the authors concluded that in addition to standard spherical micelles, formation of rod-like micelles with increased surfactant concentration occurs (Mata, Varade, & Bahadur, 2005). In the buffered solution of the current study, the micelles formed already at the concentration of 0.3 mmol L^{-1} and a second break related to the second micelle type formation occurs at the concentration of 1.7 mmol L^{-1} , which is approaching the CMC of BAC in the de-ionized water (see Fig. 3a). In literature, comparable results for surface tension measurements in similar surfactant systems in a buffered solution are also stated (Roure, Rinaudo, Milas, & Frollini, 1998; Podzimek et al., 2010; Pisarcik et al., 1999, 2000, 2001). As can be seen in Fig. 2, with the third addition of the BAC (1.6 mmol L^{-1}), which corresponds to the second break for BAC in the buffered solution (see Fig. 3b) and is identical with CMC of BAC in the de-ionized water (see Fig. 3a), a significant drop of the z-average diameter of NaHy occurs. The minor difference between the results for polymers with distinct molecular weights can probably be attributed to a lower mobility and lower reorganization ability of the NaHy sample with higher molecular weight and are seen in Fig. 2. Accordingly, the polymer chain conformations incorporating the NaHy–BAC interactions are thermodynamically more convenient and preferred (see Fig. 4c–e). The fifth BAC addition (2.1 mmol L^{-1}) results in repeated expansion of NaHy polymer coils. It is probably the same effect as with the second BAC addition (0.42 mmol L^{-1}), i.e. exceeding the second CMC in the later

Table 1
Limiting viscosity number and Huggins coefficient of NaHy in buffer and BAC addition.

C_{BAC} [mmol L ⁻¹]	$[\eta]$ [100 mL g ⁻¹]	k_{H}
0	17.7	0.32
0.32	17.8	0.29
0.42	17.4	0.36
2.1	18.6	0.13
3.15	22.5	-0.23
4.2	25.1	-0.27

case. With further increase of BAC concentration in the NaHy solution the z-average values keep descending. This fact is discussed in connection with the Huggins constant and viscosity measurement later in the text (see Table 1 and Fig. 6). Fig. 5 presents a comparison of the particle size measurements for pure NaHy in a buffered solution, NaHy in a buffered solution with the highest BAC addition (4.2 mmol L⁻¹) and the same concentration of pure BAC in a buffered solution and in de-ionized water, respectively. As can be seen, the peak of BAC depicting z-average micelle diameter in a buffered solution corresponds with the peak of BAC micelles formed in a solution in the presence of NaHy. This means that at this BAC concentration, the NaHy polymer coils are entirely saturated with the BAC molecules and excess of not bound (free) BAC molecules form micelles coexisting with polymer-surfactant associate. The shift of the NaHy peak maximum with maximal BAC addition towards lower polymeric coil size values in comparison to pure NaHy (Fig. 5) can be also noticed which corresponds to the z-average diameter changes depicted in Fig. 2.

Results from viscosity measurements in terms of limiting viscosity number and Huggins coefficient k_{H} are presented in Table 1. The interpretation of k_{H} values, in general, is not simple and can be considered even more complicated when association of NaHy with BAC arises. However, the above discussion on the changes of NaHy coil conformation due to the presence of different concentrations of BAC based on DLS measurements can be correlated with results

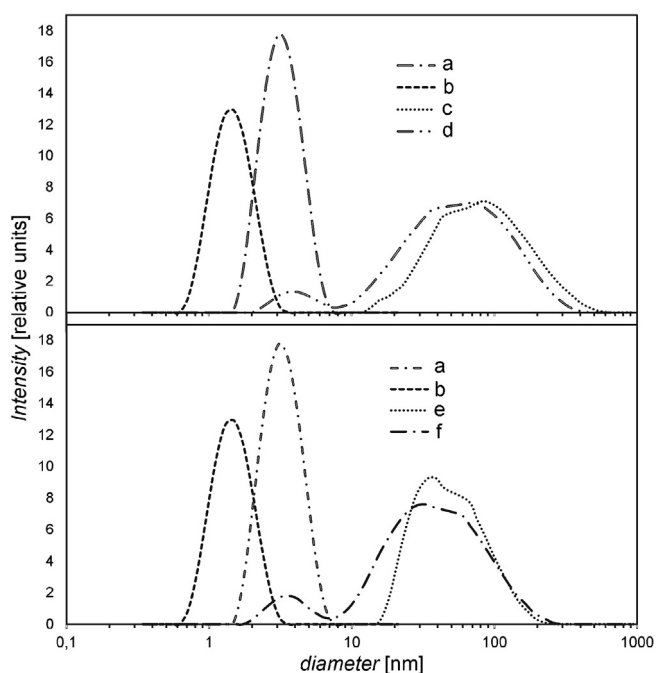


Fig. 5. Particle size measurement (a) BAC in buffered solution, (b) BAC in de-ionized water, (c) pure NaHy ($M_w = 1.8$ MDa) in buffered solution, (d) NaHy ($M_w = 1.8$ MDa) in buffered solution with BAC ($c = 4.2$ mmol L⁻¹), (e) pure NaHy ($M_w = 0.35$ MDa) in buffered solution, (f) NaHy ($M_w = 0.35$ MDa) in buffered solution with BAC ($c = 4.2$ mmol L⁻¹).

from k_{H} determination. Taking into account the fact that polymer chain of NaHy shows a microdomain structure with hydrophobic part present (Scott & Heatley, 1999; Scott, Cummings, Brass, & Chen, 1991), it can be assumed that in aqueous solvents the hydrophilic parts are flexible while the segments formed of NaHy–BAC associates are more rigid. The conformation parameters of such polymer (k_{H}) can be, in principle, influenced by additional factors such as chain stiffness, interaction between the flexible and stiff segments or intermolecular hydrodynamic interactions of each of the part with the solvent.

Based on the theory, the value of k_{H} is positive showing the Huggins' plot of η_{sp}/c vs. c with a positive slope (Herslöf et al., 1992). This situation was also observed for pure NaHy in saline buffered PBS, where the η_{sp}/c vs c dependence shows an expected course with k_{H} value of 0.32, which is in good correlation with the values published in literature (Bohdanecky & Kovar, 1982). Correspondingly, the NaHy solution with 0.32 mmol L⁻¹ and 0.42 mmol L⁻¹ BAC, showed positive slope of the aforementioned dependence, with k_{H} values of 0.29 and 0.36, respectively (Table 1). Here the similar effect as for z-average particle diameter, namely a shallow drop and subsequent increase of k_{H} , can be observed. However, after the BAC concentration started to increase, the change of the η_{sp}/c vs c took place. Addition of 2.1 mmol L⁻¹ BAC caused k_{H} drop to 0.13 and when increasing surfactant concentration above 3.15 mmol L⁻¹, an unusual course of the η_{sp}/c vs c plot was observed, showing lower reduced viscosities with the increase of the polymer concentration. This leads to negative Huggins coefficients obtained through a linear fit. The observed effect is unusual, though not unknown in the literature. The corresponding behaviour was observed for polydimethylsiloxane–polyurea copolymers and was explained by the presence of the two blocks showing the different flexibility and by very strong interactions of polymer with the solvent (Yilgor, Ward, Yilgor, Atilla, 2006). Effect of decreasing of Huggins coefficient and diffusion coefficient of swelling was also observed on the hydrophobically modified derivatives of hyaluronic acid by Lapčík, Benešová, Lapčík, De Smedt, & Lapčíková (2010) and Mráček, Benešová, Minařík, Urban, & Lapčík (2007). The negative k_{H} observed in current study can be then attributed to interactions between the hydrophobic part of the NaHy chain and the BAC bound on the polymer. Moreover the changes in polymer-solvent interactions may also take place and influence the k_{H} value.

Results presented in Table 1 also show that for the pure NaHy and NaHy with two lowest concentrations of BAC, the values of $[\eta]$ remained almost unchanged and were in good agreement with those typically observed for high molecular weight polymers.

As stated in Krause, Bellomo, & Colby (2001), NaHy solutions in phosphate-buffered saline are viscoelastic liquids with a concentration-dependent viscosity typical for polyelectrolytes with excess salt. However, increasing the BAC concentration above 2.1 mmol L⁻¹ resulted in gradual increase of limiting viscosity number caused by the above described behaviour of the NaHy–BAC complex. Theoretically, the increase of $[\eta]$ is inherently connected with increase of polymer molecular weight, formation of agglomerates or coil expansion caused by the preferential polymer-solvent interactions. Here, the reason $[\eta]$ increase can be found in the change of NaHy chain character caused by the BAC presence.

In addition to limiting viscosity number, viscosity ratio η/η_0 was calculated, relating kinematic viscosity of NaHy solution with added BAC (η) and pure NaHy solution of the same concentration (η_0). The data, hence, represent the relative contribution of the BAC to the overall viscosity behaviour of the NaHy coils (Fig. 6). The results show that the addition of 0.32 mmol L⁻¹ and 0.42 mmol L⁻¹ BAC caused only an insignificant change of relative viscosity. However further increase of BAC concentration induced gradual lowering of η/η_0 ratio indicating thus an overall reduction of the hydrodynamic radius of the coil generated by the surfactant

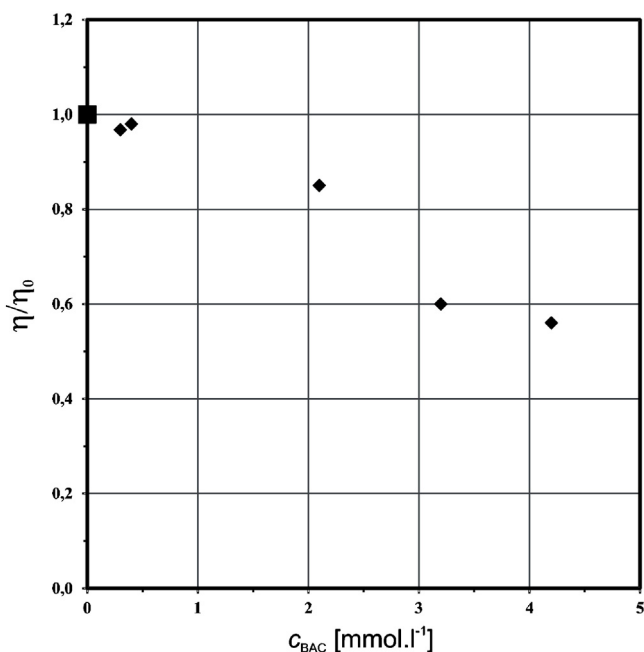


Fig. 6. Relation of relative viscosity to BAC concentration.

presence. This effect is a consequence of the chain shrinkage caused by the adsorption of BAC molecules, or BAC micelles, on the polymer chain. The viscosity results hence support data recorded by DLS.

4. Conclusion

Based on the obtained, the hypothesis of hydrophobic interactions of NaHy with BAC hydrophobic “tails” leading to statistically significant variations in size and conformation of NaHy polymer coils with increasing BAC concentration was proposed. This study can extend the theory of hydrophobic “patches” according to Scott and co-authors (Scott, 1992; Scott, Cummings, Brass, & Chen, 1991). In further experiments, thermodynamic aspects of interactions, namely Gibbs energy of van der Waals bonds between NaHy and BAC will be developed in more details, with the help of previously published method of Mráček (Mráček, 2010; Mráček et al., 2008), which should confirm the herein described hypothesis of NaHy interactions and quaternary salts in general.

Acknowledgements

This article was written with support of Operational Program Research and Development for Innovations co-funded by the European Regional Development Fund (ERDF) and national budget of Czech Republic, within the framework of project Centre of Polymer Systems (reg. number: CZ.1.05/2.1.00/03.0111) This article was created with support of the internal grant of TBU in Zlín no. IGA/13/FT/11/D and no. IGA/037/FT/12/D funded from the resources of specific university research and national budget of Czech Republic.

References

- Bjoling, M., Herslof-Bjorling, A., & Stilbst, P. (1995). An NMR self-diffusion study of the interaction between sodium hyaluronate and tetradecyltrimethylammonium bromide. *Macromolecules*, 28, 6970–6975.
- Bohdanecky, M., & Kovar, J. (1982). J. D. Jenkins (Ed.), *Viscosity of polymer solutions* (vol. 2). Amsterdam: Elsevier.
- Dobrynin, A. V., Colby, R. H., & Rubinstein, M. (1995). Scaling theory of polyelectrolyte solutions. *Macromolecules*, 28, 1859–1871.
- Dobrynin, A. V., & Rubinstein, M. (2005). Theory of polyelectrolytes in solutions and at surfaces. *Progress in Polymer Science*, 30, 1049–1118.
- Heathly, F., & Scott, J. E. (1988). A water molecule participates in the secondary structure of hyaluronan. *Biochemical Journal*, 172, 489–493.
- Herslöf, A., Sundelöf, L. O., & Edsman, K. (1992). Interaction between polyelectrolyte and surfactant of opposite charge. Hydrodynamic effects in the sodium hyaluronate/tetradecyltrimethylammonium bromide/sodium chloride/water system. *Journal of Physical Chemistry*, 96, 2345–2348.
- Krause, W. E., Bellomo, E. G., & Colby, R. H. (2001). Rheology of sodium hyaluronate under physiological conditions. *Biomacromolecules*, 2(1), 65–69.
- Lapčák, L., Jr., Benešová, K., Lapčák, L., De Smedt, S., & Lapčáková, B. (2010). Chemical modification of hyaluronic acid: Alkylation. *International Journal of Polymer Analysis and Characterization*, 15(8), 486–496.
- Mata, J., Varade, D., & Bahadur, P. (2005). Aggregation behavior of quaternary salt based cationic surfactants. *Thermochimica Acta*, 428, 147–155.
- Meyer, K., & Palmer, J. W. (1934). The polysaccharide of the vitreous humor. *Journal of Biological Chemistry*, 107, 629–634.
- Mráček, A. (2010). The measuring of polymer swelling process by interferometric method and diffusion coefficients evaluation. *International Journal of Molecular Sciences*, 11(2), 532–543.
- Mráček, A., Benešová, K., Minařík, T., Urban, P., & Lapčák, L. (2007). The diffusion process of sodium hyaluronate (Na-HA) and Na-HA-n-alkyl derivatives films swelling. *Journal of Biomedical Materials Research: Part A*, 83A(1), 184–190.
- Mráček, A., Varhaníková, J., Gřundělová, L., Pokopcová, A., Lehocký, M., & Velebný, V. (2008). The influence of Hofmeister series ions on Hyaluronan swelling and viscosity. *Molecules*, 13, 1025–1034.
- Pisarcik, M., Soldan, M., Bakos, D., Devinsky, F., & Lacko, I. (1999). Viscometric study of the sodium hyaluronate-sodium chloride-alkyl-(n)-ammonium surfactant system. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 150, 207–216.
- Pisarcik, M., Toyoko, I., Devinsky, F., Lacko, I., & Bakos, D. (2000). Aggregation properties of sodium hyaluronate with alkanediyl- α,ω -bis(dimethylalkylammonium bromide) surfactants in aqueous sodium chloride solution. *Journal of Colloid and Interface Science*, 228, 207–212.
- Pisarcik, M., Toyoko, I., Devinsky, F., & Lacko, I. (2001). Aggregates of sodium hyaluronate with cationic and aminoxide surfactants in aqueous solution – light scattering study. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 183–185, 555–562.
- Podzimek, S., Hermannova, M., Bilerova, H., Bezakova, Z., & Velebný, V. (2010). Solution properties of hyaluronic acid and comparison of SEC-MALS-VIS data with off-line capillary viscometry. *Journal of Applied Polymer Science*, 116, 3013–3020.
- Roure, I., Rinaudo, M., Milas, M., & Frollini, E. (1998). Viscometric behaviour of polyelectrolytes in the presence of low salt concentration. *Polymer*, 39(22), 5441–5445.
- Scott, J. E. (1992). Supramolecular organisation of extracellular matrix glycosaminoglycans, in vitro and in the tissues. *FASEB Journal*, 6, 2639–2645.
- Scott, J. E., Cummings, C., Brass, A., & Chen, Y. (1991). Secondary and tertiary structures of hyaluronan in aqueous solution, investigated by rotary shadowing-electron microscopy and computer simulation. Hyaluronan is a very efficient network-forming polymer. *Biochemical Journal*, 274(3), 699–705.
- Scott, J. E., & Heatley, F. (1999). Hyaluronan forms specific stable tertiary structures in aqueous solution: A ¹³C NMR study. *Biochemistry*, 96, 4850–4855.
- Thalberg, K., van Stam, J., Lindblad, C., Almgren, M., & Lindman, B. (1991). Time-resolved fluorescence and self-diffusion studies in system of cationic surfactant and an anionic polyelectrolyte. *Journal of Physical Chemistry*, 95(22), 8975–8982.
- Vuletić, T., Babić, S. D., Ivek, T., Grgičin, D., & Tomić, S. (2010). Structure and dynamics of hyaluronic acid semidilute solutions: A dielectric spectroscopy study. *Physical Review E*, 82, 011922 (pages 10).
- Wennerström, H., & Lindman, B. (1979). Micelles. Physical chemistry of surfactant association. *Physics Reports*, 52(1), 1–86.
- Yilgor, I., Ward, T. C., Yilgor, E., & Atilla, G. E. (2006). Anomalous dilute solution properties of segmented polydimethylsiloxane-polyurea copolymers in isopropyl alcohol. *Polymer*, 47, 1179–1186.

Elsevier Editorial System(tm) for Carbohydrate Polymers
Manuscript Draft

Manuscript Number:

Title: Viscoelastic and mechanical properties of hyaluronan films and hydrogels modified by carbodiimide

Article Type: Research Paper

Keywords: hyaluronan, cross-linking, carbodiimide, mechanical properties, viscoelastic properties

Corresponding Author: Dr. Adriana Gregorova,

Corresponding Author's Institution: Graz University of Technology

First Author: Lenka Gřundělová

Order of Authors: Lenka Gřundělová; Adriana Gregorova; Aleš Mráček; Robert Vícha; Petr Smolka; Antonín Minařík

Abstract: This study investigated an effect of different ways of the preparation of insoluble hyaluronan material on its mechanical and viscoelastic properties. Hyaluronan (NaHy) of molecular weight $M_w = 500\text{kDa}$ was cross-linked with carbodiimide (EDC) and N-hydroxysuccinimide (NHS), to be able absorb liquid without changing its mechanical properties. The cross-linked, water insoluble NaHy materials were prepared in different geometry; as cross-linked films and cross-linked cylinders. The occurrence of cross-linking was confirmed by FTIR and ^1H NMR spectroscopy and swelling test. The determined mechanical and viscoelastic properties of uncross-linked and cross-linked hyaluronan revealed the high dependency of elasticity changes depending on the gel processing method. Moreover, NaHy gels in the cylindrical form with the sponge-like structure predominant them as a convenient geometry for application in a humid environment.

Suggested Reviewers: Jiri Kucerik

Environmental and Soil Chemistry, University Koblenz-Landau, Frankfurt

kucerik@uni-landau.de

Professor with research area in Thermal analysis and mechanical properties of hyaluronan

Miroslav Pekar

Department of Physical Chemistry, Brno University of Technology

pekar@fch.vutbr.cz

Professor concerning his research for structure of Hyaluronan, Hydrophobic Hyaluronan, Cross-linked Hyaluronan, Thermal analysis

Vincent Verney

Institute of Chemistry of Clermont-Ferrand , Universite Blaise Pascal

Vincent.Verney@univ-bpclermont.fr

Dr. Verney is an expert in rheology and dynamic mechanical analysis.

Dear editor,

enclosed you can find the manuscript: Viscoelastic and mechanical properties of hyaluronan films and hydrogels modified by carbodiimide. This manuscript contains original new data that have been not published yet.

Hyaluronan is a water soluble linear polysaccharide. Cross-linking change this polymer in water insoluble with an interesting physico-mechanical properties. We have prepared cross-linked hyaluronan hydrogels in two geometrical forms as film and cylinders. We would like to show that not only cross-linking but also geometric form of hydrogels influence their final mechanical and viscoelastic properties and so open many new possibilities for applications.

I hope that our manuscript will be suitable for Carbohydrate Polymers. It would be my pleasure to have a possibility to publish our new results in your journal.

Yours sincerely

Adriana Gregorova

Highlights (for review)

- Crosslinked hyaluronan in two geometrical forms was prepared
- Cross-linked hyaluronan films can be stretched up to 130% before breaking
- Elasticity of hyaluronan gels depend on their geometrical form
- Cylindrical form of cross-linked hyaluronan gels improve their creep recovery ability

1 **Viscoelastic and mechanical properties of hyaluronan films and hydrogels modified**
2 **by carbodiimide**

3
4 Lenka Grundělová^{a,b}, Adriana Gregorová^{c,*}, Aleš Mráček^{a,b,*}, Robert Vícha^d, Petr Smolka^{a,b},
5 Antonín Minařík^{a,b},
6

7 ^a*Tomas Bata University in Zlín, Faculty of Technology, Department of Physics and Material Engineering,*
8 *nám. T.G. Masaryka 5555, 760 01 Zlín, Czech Republic*

9 ^b*Centre of Polymer Systems, Tomas Bata University in Zlín, nám. T.G.Masaryka 5555, 760 01 Zlín, Czech*
10 *Republic*

11 ^c*Institute for Chemistry and Technology of Materials, Graz University of Technology, Stremayrgasse 9, 8010*
12 *Graz, Austria*

13
14 ^d*Tomas Bata University in Zlín, Faculty of Technology, The Department of Chemistry, nám. T.G. Masaryka*
15 *5555, 760 01 Zlín, Czech Republic*

16
17 **Abstract**

18 This study investigated an effect of different ways of the preparation of insoluble hyaluronan
19 material on its mechanical and viscoelastic properties. Hyaluronan (NaHy) of molecular
20 weight $M_w = 500\text{kDa}$ was cross-linked with carbodiimide (EDC) and N-hydroxysuccinimide
21 (NHS), to be able absorb liquid without changing its mechanical properties. The cross-
22 linked, water insoluble NaHy materials were prepared in different geometry; as cross-linked
23 films and cross-linked cylinders. The occurrence of cross-linking was confirmed by FTIR
24 and ¹H NMR spectroscopy and swelling test. The determined mechanical and viscoelastic
25 properties of uncross-linked and cross-linked hyaluronan revealed the high dependency of
26 elasticity changes depending on the gel processing method. Moreover, NaHy gels in the
27 cylindrical form with the sponge-like structure predominant them as a convenient geometry
28 for application in a humid environment.

29 *Key words:* hyaluronan, cross-linking, carbodiimide, mechanical properties, viscoelastic
30 properties

31
32 ^{*} *Authors for correspondence: adriana.gregorova@tugraz.at; mracek@ft.utb.cz*

33

34

35 1. Introduction

36 Hyaluronic acid (HA) is a linear biopolymer with a high molecular weight, naturally
37 presented in vertebrate organism. The highest amount of hyaluronic acid was discovered in
38 the extracellular matrix of connective tissues. Furthermore, it can be found as a constituent in
39 all body fluids and in the vitreous humour of the eye and the synovial fluid in the joints. Its
40 structural unit consists of N-acetyl-D-glucosamine and D-glucuronic acid connecting with
41 alternating β -1,3 and β -1,4 glycosidic bond. HA chain may expand to thousand fold of its
42 original volume and form a loose hydrated network because of hydrophilic nature. The
43 molecular weight of NaHy can reach 10^6 to 10^8 Daltons according to different sources and
44 methods used to its determination. Due to such high molecular weight and its viscoelastic and
45 rheological properties predestine hyaluronic acid to play important roles in living organisms
46 (Kogen et al., 2007; Price et al., 2007; Brown et al., 2005; Guillaumie et al., 2009). The
47 above mentioned, unmodified hyaluronic acid has many important applications in drug
48 delivery and surgery as well as in the field of ophthalmology, tissue engineering and wound
49 healing (Saettone et al., 1994; Moore et al., 1995; Davidson et al., 1991; Vecruysse et al.,
50 1998; Prestwitt et al., 1998). Chemical modification of sodium salt hyaluronan (NaHy)
51 allows modifying its solubility, viscosity, amphiphilicity, rate of degradation and *in vivo*
52 residence time. Schanté et al. reviewed a number of chemical modification methods (Schanté
53 et al., 2011). The most common modification of hyaluronic acid is a crosslinking, which can
54 fix its structure and many papers devoted to this have been reported in literature (Lu et al.,
55 2008). The mechanism of HA crosslinking has been a subject of intensive research (Collins &
56 Birkinshaw, 2007). It is known that the functional groups responsible for crosslinking of HA
57 molecules are carboxyl and hydroxyl groups, whereby carboxyl groups can be easy cross-
58 linked generating an ether bond, and hydroxyl groups form ester bond. However, other
59 reactive groups such as amino groups can be in HA introduced also. For instance, water-
60 insoluble films could be prepared by an extensive esterification of hyaluronic acid with mono-
61 functional organic halides whereas highly swollen gels or insoluble plastic materials by
62 crosslinking with divinylsulfone, bisepoxides, formaldehyde, glutaraldehyde, bishalides and
63 carbodiimide (Balazs & Leshchiner, 1986; Balazs & Leshchiner, 1987; De Belder & Mälson,
64 1986; Mälson et Lindqvist, 1986; Valle & Romeo, 1988; Valle & Romeo, 1987; Hu et al.,
65 2000). Hamilton et al. patented in 1970 cross-linking of HA by carbodiimide. Further
66 experiments concerning modification of NaHy by carbodiimides were performed by many
67 other authors (Xuejun et al., 2004; Tomihata et al., 1997; Kuo et al., 1991; Sannino et al.,

68 2005). Generally, carbodiimide is preferable as a crosslinking agent with low cytotoxicity and
69 water solubility.

70 Despite of considerable research concerning of physicochemical properties of cross-linked or
71 modified NaHy (Haxaire et al., 2000; Hamilton et al., 1970) rather less attention has been paid
72 to viscoelastic properties of cross-linked NaHy materials depending on its geometry. We
73 hypothesise that cross-linking of NaHy change not only its solubility but especially
74 viscoelastic properties. Moreover, the geometric form of the final crosslinked NaHy can
75 significantly influence its mechanical and viscoelastic properties. In this article, the water-
76 insoluble hyaluronan material in the form of films and cylinders were prepared and
77 characterized by nuclear magnetic resonance (NMR), FTIR-ATR spectroscopy, tensile testing
78 and dynamic mechanical analysis (DMA).

79

80 **2. Materials and methods**

81 The experimental part was performed on sodium hyaluronate sample (NaHy) of molecular
82 weight $M_w = 500\text{kDa}$ which was provided by Contipro, (Czech Republic). Cross-linking
83 agents N-(3-dimethylaminopropyl-N'-ethylcarbodiimide hydrochloride (EDC) and N-
84 hydroxysuccinimid (NHS) were purchased from Sigma-Aldrich.

85

86 *2.1. Preparation of hyaluronan films*

87 Stock solution of NaHy in de-ionised water was prepared in concentration of 1% (w/w) by
88 slowly adding polymer to the deionised water continuous stirring, followed by 24-hours
89 dissolving at 50°C. The solution of hyaluronan was then poured into a polystyrene mould
90 and dried at 40°C to obtain hyaluronan film with dimensions approximately 100 mm, 80 mm
91 and 0.05 mm.

92

93

2.2. Preparation of cross-linked hyaluronan films

94 Cross-linking agent EDC works as the activating ingredient of the carboxylic groups
95 (100mM) and NHS as the proton exchanger in a weight ratio 2:1 were added to already
96 prepared 1% (w/w) hyaluronan and stirred for 1 hour at 25°C. This solution was then titrated
97 with 0.1M HCl to adjusting pH in the range 4.5 – 4.75 under continuous stirring 1 hour.
98 Resulting solution was then poured into a polystyrene mould and dried at high temperature

99 to obtain cross-linked hyaluronan film with dimensions approximately 100 x 80 mm and
100 thickness 0.17 mm.

101

102 2.3. Preparation of cross-linked hyaluronan cylinder hydrogels

103 The NaHy cylinder hydrogels with a sponge-like solid structure were prepared as follows:
104 100 mM EDC was added to 1% (w/w) hyaluronan solution and stirred for 1 hour at 25°C. A
105 0.1M HCl was then added to adjust pH to 4.5 – 4.75 under continuous stirring during 1 hour.
106 Subsequently, this solution was casted in polyethylene bins and kept at -18°C for 72 hours to
107 prepare hyaluronan hydrogels in the cylinder form with the diameter of 2.8 cm and the
108 height of 0.1 cm.

109

110 2.4. Preparation of samples for NMR

111 The samples were dissolved in D₂O, and the spectra were calibrated to 4.70 ppm for residual
112 HDO signal. The sample for quantitative analysis was prepared as follows. The 0.5 cm³ of
113 liquid (the sponge solid material was gently compressed) was taken from the reaction mixture
114 of the final volume of 10 cm³ and 0.01 cm³ of DMSO (freshly distilled under reduced
115 pressure and dried over a 3Å molecular sieve) was added as an internal standard.
116 Concentrations of solution components were calculated according equation (1) where I is
117 integral intensity of ¹H NMR signal, N is the number of H-atoms providing signal under
118 consideration. The volume change related to the mixing of 0.5 cm³ of sample with 0.01 cm³ of
119 DMSO was ignored.

$$(c_i) = \frac{(I_i)}{N_i} \cdot \frac{N_{DMSO}}{I_{DMSO}} \cdot c_{DMSO} \quad (1)$$

120

121 The concentration of carboxylic groups available for modification was calculated according
122 equation (2) where FW_{MU} is formula weight of mer unit.

$$(c_{COOH}) = \frac{c_{NaHy} \cdot FW_{NaHy}}{FW_{MU}} \quad (2)$$

123

124 2.5. Swelling test

125 The water content (%) measurement as used to determine the extent of cross-linking of
126 hyaluronan films and hydrogels. Prepared hyaluronan samples were kept in an desiccator for

127 one week. After that were cut to round shape samples of diameter 11mm, and were then dried
128 to constant weight at 60°C. The cross-linked films and hydrogels were then swelled in de-
129 ionised water and reweighed immediately at predetermined time intervals. The water content
130 (%) of test samples was calculated according to the equation (3):

$$(\%) = \frac{(w_i - w_0)}{w_i} \cdot 100 \quad (3)$$

131

132 where w_i is the weight of the swollen sample and w_0 is its initial dry weight. Results were
133 averaged on four independent runs.

134

135 2.6. FTIR - ATR analysis

136 The FT-IR spectra of dried NaHy film, cross-linked NaHy film and NaHy hydrogel were
137 recorded with Nicolet 6700 FT-IR spectrometer in ATR arrangement with diamond crystal.
138 All spectra were recorded in the absorbance mode in the wave number range 4000-400 cm^{-1}
139 and 64 accumulations at the resolutions 4 cm^{-1} .

140

141 2.7. NMR

142 ^1H NMR spectra were recorded using a BRUKER AVANCE 300 spectrometer at frequency
143 of 300.15 MHz and processed using ACD/NMR Processor AE v. 12.01.

144

145 2.8. Tensile tests

146 In order to obtain information about mechanical properties of uncross-linked NaHy and cross-
147 linked NaHy films the Instron tensile machine with 100N force sensor was utilised, using a
148 crosshead speed of 1 mm/min at 25°C. Dimensions of the specimens were following: for
149 cross-linked film length 30 mm, width 4 mm and thickness 0.17 mm, for uncross-linked film
150 length 30 mm, width 4 mm and thickness 0.05 mm. Each presented result is the average from
151 six independents measurements.

152

153 2.9. *Dynamic mechanical analysis (DMA)*

154 Dynamic mechanical analysis (DMA) was carried out under a) tensile and b) compression
155 geometry in transient mode as creep/creep recovery experiments using instrument DMA Q800
156 (TA Instruments, USA). Creep testing was performed by applying 0.01 N of static load, 20
157 min isotherm at 25°C, following by applying of constant stress of 1 kPa for 3 minutes and
158 relaxation without stress for 3 minutes. Samples used for DMA had following dimensions: a)
159 strips with a width of 4 mm were cut from films and mounted in the DMA with a gauge
160 length of 10 mm. The thickness of sheet was about 50 μm; b) cylinders with the diameter of
161 15 mm were punched out from the original hyaluronan cylinder hydrogels and excess water
162 was squeezed between filter paper to reach final sample height of 6 mm.

163 The viscoelastic properties of hyaluronan samples obtained by creep/creep recovery
164 measurements were evaluated as creep compliance (J) and creep recovery (R). The creep
165 compliance, J expresses the sample's willingness to yield (or compress in the compression
166 mode) and can be calculated as an inverse of the modulus:

$$J = \frac{d\varepsilon}{d\sigma} \quad (4)$$

167 where, ε is a strain and σ is a stress at a specific time.

168 The creep recovery, R presents an ability of sample relax after a removal of stress:

$$R = \left(1 - \frac{J - J_R}{J}\right) \cdot 100 \quad (5)$$

169 where, J is a maximum reached creep compliance and J_R is a recoverable compliance at the
170 end of relaxation time.

171

172 **3. Results and discussion**

173 *3.1. Swelling tests*

174 The swelling test was applied only for cross-linked samples due to the completely solubility
175 of uncross-linked hyaluronan in water. Dependence of the water content of cross-linked
176 hyaluronan film (NaHy_A_film) and hydrogel (NaHy_B_cylinder) is shown in Figure 1. As
177 can be seen, the water content of the cross-linked film reached stabilization following a rapid

178 increase in the water contents. The course of stabilization for both materials has similar trend.
179 Moreover, swelling tests results revealed that, the cross-linked NaHy film and hydrogel are
180 not soluble in aqueous solutions and may absorb approximately 99.185 ± 0.028 % and 97 ± 0.13
181 % of water. The difference in water content of cross-linked film and hydrogel probably relates
182 to the way of preparation and solvent composition, resulting in different cross-linking density.
183 The cross-linking density and hydrophobicity of the system determine the rate, at which the
184 cross-linked films or hydrogels reach their water content equilibrium (Collins & Birkinshaw,
185 2008). The high ability of cross-linked material to absorb water adverts to low density of
186 cross-linking. From the previous research it is known (Lai, 2012), that swelling of hyaluronan
187 based materials with chemical cross-linking agent may enlarge the intermolecular distance
188 which results in decrease of the collision frequency of polysaccharide molecules and thus the
189 rate at which the covalent bond are formed between polymeric chains. In addition, the extent
190 of cross-linking of NaHy hydrogel and film significantly depends on the composition of used
191 solvent and rises with decreasing swelling ratio (Lai, 2012). These statements are supported
192 by the tensile test measurements of cross-linked NaHy film.

193

194 *1.1. FTIR- ATR analysis*

195 FTIR-ATR method was carried out to confirm the ester bond presence in modified film and
196 hydrogel as an affirmative proof of cross-linking. FTIR-ATR spectra of uncross-linked/cross-
197 linked NaHy film and NaHy hydrogel are shown in Figure 2. It is apparent from Fig. 2 that
198 the most noticeable difference in the IR spectrum of uncross-linked (NaHy_A-film) (a), cross-
199 linked NaHy film (NaHy_B_film) (b) and NaHy hydrogel (NaHy_B_cylinder) (c) is
200 observable in the wavenumber range $1700-1724\text{cm}^{-1}$ allocating to ester bond. An occurrence
201 of the ester bond is further suggested by additional peaks belonging to $\nu(CH)$ and $\nu(CH_2)$
202 vibrations of alkyl chains located in the range $2850-2930\text{cm}^{-1}$ in Fig. 2b,c (Mlčochová et al.,
203 2006). The peak at 1700cm^{-1} could be assigned to the carbonyl group of acylurea by-product
204 of EDC hydrolysis, too. The cross-linking agent EDC does not chemically bind to
205 polysaccharides, or more precisely to hyaluronic acid, but mediate ester bonds formation
206 between carboxyl and hydroxyl groups of different polysaccharides. Furthermore, EDC
207 causes the intramolecular or intermolecular formation of acid anhydride between two
208 carboxyl groups, which modify the EDC into urea derivate. In order to prevent the irreversible
209 N-acylurea by-product formation, N-hydroxysuccinimide was added to the cross-linked NaHy

210 film (Tomihata et al., 1997; Bulpitt & Aeschlimann, 1999). The chemical reaction between
211 this anhydride and hydroxyl is then responsible for the formation of the ester bond between
212 two NaHy molecules. The reaction cannot occur if any hydroxyl groups do not directly
213 encounter the acid anhydride due to the high instability of the acid anhydride in water
214 solutions at room temperature (Schanté et al., 2011; Sannino et al., 2005; Nakajima & Ikada,
215 1995). Another new peak appears at the range 2700-2600 cm^{-1} and can probably be assigned
216 to -OH stretch of protonated urea. All other bands observed in this spectrum are typical for the
217 sodium salt of hyaluronic acid (Gilli et al., 1994)

218

219 1.2. NMR

220 We attempted to determine the degree of modification of hyaluronic acid employing the ^1H
221 NMR spectroscopy. The resulted mixture consisted of sponge-like solid material (hydrogel)
222 and clear colourless mother liquor. As it can be seen in Fig. 3, line c, only broadened signals
223 of EDC and of its degradation product (DP) can be observed in the NMR spectrum of sample
224 containing sponge and mother liquor. Notably, no signals related to the free or modified
225 NaHy were observed. For comparison, see line a for NaHy and line b for EDC. Therefore, we
226 decided to determine the portion of non-reacted EDC and of its DP in mother liquor. For this
227 purpose, the 0.5 cm^3 of mother liquor was separated from sponge solid using micropipette and
228 0.01 cm^3 of DMSO was added as an internal standard. The NMR spectrum of this sample is
229 depicted in Figure 3d. The molar concentrations of EDC and of DP were calculated
230 considering the respective signals of terminal methyl group according to equation (1) to reveal
231 that concentration of remaining EDC and DP was 34.6 mM and 23.0 mM, respectively.
232 Considering the initial concentration of EDC of 0.1M, it is obvious that 42.4 mmol of EDC
233 per dm^3 was consumed. As it is well known that the EDC reacts with carboxylic group of the
234 HA, we were able to calculate the degree of modification. The average formula weight of
235 used NaHy was 500 kDa. If we take into account the initial concentration of NaHy of $3.2 \cdot 10^{-5}$
236 M, the formula weight (FW) of the mer unit of 379.32 Da and ignore the slightly higher FW
237 of terminal units, we can employ the equation (2) to calculate the concentration of carboxylic
238 groups of 42.1 mM. Upon these calculations we can conclude that essentially all carboxylic
239 groups were modified with EDC under our procedure.

240

241

242 *1.3. Tensile tests*

243 Mechanical properties of NaHy film and cross-linked NaHy film are depicted in Figure 4. The
244 test specimens prepared from the uncross-linked NaHy film showed the stress at break
245 (83 ± 15) MPa, which is significantly higher than cross-linked NaHy film (2.4 ± 0.2) MPa. In
246 addition, it was found that the strain at break, of the uncross-linked NaHy film was markedly
247 lower (5.2 ± 0.6) % than cross-linked NaHy film (133 ± 9) %. These results could indicate that
248 cross-linked NaHy film is composed mainly of pendant modification, because the
249 modification does not indispensably cross-link NaHy molecule with other. Reason of this
250 could be a pendant cross-linker. Additionally, the poorer tensile strength and enhanced
251 elasticity of modified films are characteristic for a low cross-link density material ([Kablik et
252 al., 2009](#)). Another approach to these tensile results mentioned *Lai et al.*, in his study. They
253 referred to the presence of absorbed water, which may affect the mechanical strength and
254 stability of hydrophilic NaHy networks (Lai, 2012).

255

256 *1.4. DMA*

257 Viscoelastic properties of uncross-linked and cross-linked hyaluronan samples, in the form of
258 films and cylinders were determined by measuring the creep compliance (J) and creep
259 recovery (R). Figure 5 shows creep behaviour of hyaluronan samples depending on stage and
260 sample form, at a temperature of 25°C, and an applied stress of 1 KPa.

261 As observed, the lowest creep compliance of $1E3 \mu\text{m}^2/\text{N}$ was detected for uncross-linked
262 hyaluronan film. The cross-linked NaHy film did not stand an applied stress, therefore no data
263 are available. The uncross-linked and cross-linked NaHy gels in the form of cylinders reached
264 creep compliance of $4.5E8 \mu\text{m}^2/\text{N}$ and $1.7.0 \mu\text{m}^2/\text{N}$, respectively. It can be seen that the
265 willingness to change the shape of a material significantly depends on the processing method.
266 The creep recovery, based on the detected values of relaxation compliance, can be ordered as
267 follows: NaHy_A_cylinder < NaHy_B_cylinder < NaHy_A_film. Figure 5b displays creep
268 recovery data (expressed in percentage) in dependence on sample form and processing
269 method. The uncross-linked film reached the highest relaxation ability of about 100% but
270 with the lowest reached compression of 0.3% in comparison to uncross-linked cylinder gel
271 with the decreased relaxation ability about 72% but with reached compression of 90%. The
272 cross-linked cylinder gel displayed 88% compression with 68% strain recovery.

273 **2. Conclusions**

274 Water soluble and water insoluble hyaluronan materials in the form of films and cylinders
275 were prepared. Water solubility of hyaluronan gel materials was limited by crosslinking with
276 N-(3-dimethylaminopropyl-N'-ethylcarbodiimide hydrochloride). The accomplished
277 crosslinking of hyaluronan was confirmed by IR and NMR spectroscopy. Both cross-linked
278 NaHy film and cylinder were in water insoluble in comparison to those uncross-linked,
279 soluble in water after a few minutes. Furthermore, cross-linked film and cylinder can absorb
280 about 99.9% and 97% of water, respectively. The applied crosslinking decreased the tensile
281 strength of NaHy film 24.5 times and increased the tensile strain at break about 80%. The
282 viscoelastic properties of hyaluronan samples in film and cylindrical form were determined by
283 creep/creep recovery testing. It was shown that elasticity of hyaluronan samples highly
284 depend on the sample form as well as applied processing method.

285 It can be concluded that cross-linked hyaluronan gels in cylindrical form possess high
286 willingness to change shape after an applied stress as well as high relaxation ability after
287 stress recovery. Moreover, its sponge like solid structure enables to absorb high amounts of
288 liquid. On the base of our results, we can suggest that cross-linked hyaluronan material with
289 sponge like solid structure in combination with metal scavengers, for example with lignin,
290 could be used as biodegradable composites for water treatment. This will be a subject of our
291 future research.

292

293 **Acknowledgements**

294 This article was written with support of Operational Program Research and Development
295 Fund (ERDF) and national budget of Czech Republic, within the framework of project
296 Centre of Polymer Systems (reg. number: CZ.1.05/2.1.00/03.0111). This article was created
297 with support of the internal grant of TBU in Zlín no. IGA/FT/2013/015 and
298 IGA/FT/2014/018 funded from the resources of specific university research and national
299 budget of Czech Republic. Moreover, the second author would like to thank for the financial
300 support from European Regional Development Fund (ERDF) through project: Future
301 Innovation – Regional Competitiveness Styria 2007-2013, Project - DMA analyser 2012.

302

303

304 **References:**

305 Balazs E. A., Leshchiner A.: Cross-linked gels of hyaluronic acid and products
306 containing such gels. *US Patent*, 1986. US4582865 A.

307 Balazs E. A., Leshchiner A.: Cosmetics, Drugs. *US Patent*, 1987. US4636524 A.

308 De Belder A. N., Mälson T.: Gel For Preventing Adhesion Between Body Tissues And
309 Process For Its Production. *PCT Int. Appl.*, 1986. WO 8600.912.

310 Brown M. B.: Jones S. A.: Hyaluronic acid: a unique topical vehicle for the localized
311 delivery of drugs to the skin. *JEADV*, 2005. Vol. 19, p. 308-318. DOI: 10.1111/j.1468-
312 3083.2004.01180.x.

313 Bulpitt P., Aeschlimann D.: New strategy for chemical modification of hyaluronic
314 acid: Preparation of functionalized derivatives and their use in the formation of novel
315 biocompatible hydrogels. *Journal of Biomedical Materials Research*, 1999. Vol. 47, p. 151-
316 169. DOI: 10.1002/(SICI)1097-4636(199911)47:2<152::AID-JBM5>3.0.CO;2-I.

317 Collins M. N., Birkinshaw c.: Comparison of the effectiveness of four different
318 crosslinking agents with hyaluronic acid hydrogel films tissue-culture applications. *Journal of*
319 *Applied polymer science*, 2007. Vol. 104, p. 3183-3191. DOI: 10.1002/app.25993.

320 Collins M.N., Birkinshaw C.: Physical properties of crosslinked hyaluronic acid
321 hydrogels. *J Mater Sci: Mater Med*, 2008. Vol. 19, p. 3335-3343. DOI: 10.1007/s10856-008-
322 3476-4.u.

323 Davidson J. M., Nanney L. B., Broadley K. N., Whitsett J. S., Aquino A. M.:
324 Hyaluronate derivates and their application to wound healing: preliminary observations. *Clin.*
325 *Mater.*, 1991. Vol. 8, p. 171-177, DOI: 0.1016/0267-6605(91)90027-D.

326 Gilli R., Kacuráková M., Mathlouthi M., Navarini L., Paoletti S.: FTIR studies of
327 sodium hyaluronate and its oligomers in the amorphous solid phase and in aqueous solution.
328 *Carbohydrate Research*, 1994. Vol. 263, p.315-326, DOI: 10.1016/0008-6215(94)00147-2.

329 Guillaumie F., Furrer P., Felt-Baeyens O., Fuhlendorff B. L., Nymand S., Westh P.,
330 Gurny R., Schwach-Abdellaoui K.: Comparative studies of various hyaluronic acids produces
331 by microbial fermentation for potential topical ophthalmic applications. *Journal of*
332 *Biomedical Materials Research, Part A*, 2009. p.1421-1430. DOI: 10.1002/jbm.a.32481.

333 Hamilton R., Fox E. M., Acharya R. A., Walts A. E.: Water insoluble derivates of
334 hyaluronic acid. *US Patent* 4.937.270.,1970.

335 Haxaire K., Braccini I., Milas M., Rinaudo M., Pérez S.: Conformation behaviour of
336 hyaluronan in relation to its physical properties as probed by molecular modelling.
337 *Glycobiology*, 2000. Vol. 10, p. 587-594, DOI: 10.1093/glycob/10.6.587.

338

339 Hu M., Sabelman E. E., Tsai C., Tan J., Hentz V. R.: Improvement of Schwann cell
340 attachment and proliferation on modified hyaluronic acid strands by polylysine. *Tissue*
341 *Engineering*, 2000, Vol. 6, p. 585-593. DOI: 10.1089/10763270050199532.

342 Kablik J., Monheit G.D., YL., Chang G., Gershkovich J.:Comparative physic
343 properties of hyaluronic acid dermal fillers. *Dermatol. Surg.*, 2009. Vol. 35, p. 302-312. DOI:
344 10.1111/j.1524-4725.2008.01046.x.

345 Khan R., Mahendhiran B., Aroulmoji V.: Chemistry of hyaluronic acid and its
346 significance in drug delivery strategies: A review. *IJPSR*, 2013. Vol. 4, p. 3699-3710. DOI:
347 10.13040/IJPSR.0975-8232.4(10).3699-10.

348 Kogen G., Šoltés L., Stern R., Gemeiner P.: Hyaluronic acid: a natural biopolymer
349 with a broad range of biomedical and industrial applications. *Biotechnol Lett.*, 2007. Vol. 29,
350 p. 17-25. DOI: 10.1007/s10529-006-9219-z.

351 Kuo J. W., Swann D. A., Prestwich G. D.: Chemical modification of hyaluronic acid
352 by carbodiimides. *Bioconjugate Chem.*, 1991. Vol. 2, p. 232-241, DOI:
353 10.1021/bc00010a007.

354 Lai J.-Y.: Solvent composition is critical for carbodiimide cross-linking of hyaluronic
355 acid as an ophthalmic biomaterial. *Materials*, 2012. Vol. 5, p.1986-2002. DOI:
356 10.3390/ma5101986.

357 Lu P.-L., Lai J.-Y., Ma D. H.-K., Hsiue G.-H.: Carbodiimide cross-linked hyaluronic
358 acid hydrogels as cell sheet delivery vehicles: characterization and interaction with corneal
359 endothelial cells. *J. Biomater. Sci. Polymer Ed.*, 2008. Vol. 19, p.1-18, DOI:
360 10.1163/156856208783227695.

361 Mälson T. Lindqvist B., L.: *PCT Int. Appl.* WO 86/79 A1, 1986.

362 Mlčochová P., Bystrický S., Steiner B., Machová E., Kooš M., Velebný V., Krčmář
363 M.: Synthesis and characterization of new biodegradable hyaluronan alkyl derivates.
364 *Biopolymers*, 2006. Vol. 82, p. 74-79. DOI:10.1002/bip.2046.1.

365 Moore A. R., Willoughby D. A.: Hyaluronan as drug delivery system for diclofenac: a
366 hypothesis for mode of action. *Int. J. Tissue React.*, 1995. Vol. 17, p. 153-156.

367 Nakajima N., Ikada Y.: Mechanism of Amide formation by carbodiimide for
368 Bioconjugation in aqueous media. *Bioconjugate Chem*, 1995. Vol. 6, p. 123-130. DOI:
369 10.1021/bc00031a015.

370 Prestwitch G. D., Marecak D. M., Marecak J. F., Vercruysse K. P., Ziebell M. R.:
371 Chemical modification of hyaluronic acid for drug delivery, biomaterials, and biochemical
372 probes, in: Laurent T. C. (Ed.), *The chemistry, Biology, and Medical Applications of*
373 *Hyaluronan and its Derivates*. Portland Press, 1998. London. p. 43-65.

374 Price R.D., Berry M.G., Navsaria H.A.: Hyaluronic acid: the scientific and clinical
375 evidence. *Journal of Plastic, Reconstructive et Aesthetic Surgery*, 2007. Vol. 60, p.1110-1119.
376 DOI: 10.1016/j.bjps.2007.03.005.

377 Quintana G.C., Rocha G.J., Gonçalves A.R., Velásquez J.A.: Evaluation of heavy
378 metal removal by oxidised lignins in acid media from various sources. *BioResources*, 2008,
379 Vol.3 (4), p.1092-1102.

380 Saettone M., Monti D., Torracca M. T.: Chetoni, mucoadhesive ophthalmic vehicles:
381 evaluation of polymeric low-viscosity formulations. *J. Ocular Pharm.*, 1994. Vol. 10, p. 83-
382 92, DOI: 10.1089/jop.1994.10.83.

383 Sannino A., Pappadà, Madaghiele M., Maffezzoli A., Ambrosio L., Nicolais L.:
384 Crosslinking of cellulose derivates and hyaluronic acid with water-soluble carbodiimide.
385 *Polymer*, 2005. Vol. 46, p. 11206-11212. DOI: 0.1016/j.polymer.2005.10.048.

386 Schanté C. E., Zuber G., Herlin C., Vandamme T. F.: Chemical modifications of
387 hyaluronic acid for the synthesis of derivate for a broad range of biomedical applications.
388 *Carbohydrate Polymers*, 2011. Vol. 85, p. 469-489. DOI: 20.1016/j.carbpol.2011.03019.

389 Tomihata K., Ikada Y.: Crosslinking of hyaluronic acid with water-soluble
390 carbodiimide. *J. Biomed Mater Res.*, 1997. Vol. 37, p. 243-251, DOI: 0.1002/(SICI)1097-
391 4636(199711)37:23.0.CO;2-F.

392 Valle D. F., Romeo A.: Crosslinked carboxy polysaccharides. *European Patent*
393 *Application* 87308863.7, 1988.

394 Valle D. F., Romeo A.: Partial esters of hyaluronic acid. *European Patent Application*
395 86305233.8, 1987.

396 Vercruysse K. P., Prestwich G. D.: Hyaluronate derivates in drug delivery. *Crit Rev.*
397 *Ther. Carrier Syst.*, 1998. Vol. 15, p. 513-555.

398 Xuejun X., Netti P. A., Ambrosio L., Nicolais L., Sannino A.: Preparation and
399 characterization of hydrogel from low-molecular weight hyaluronan. *Compat. Polym.*, 2004.
400 Ol. 19, p. 5-15, DOI: 10.1177/0883911504041608.

401

402 **Figure captions**

403 **Figure 1:** Dependence of the water content of hyaluronan samples cross-linked with
404 EDC/NHS respective EDC.

405 **Figure 2:** FTIR-ATR spektra of dried a) uncross-linked hyaluronan film (NaHy_A_film), b)
406 cross-linked hyaluronan film (NaHy_B_film), c) NaHy hydrogel (NaHy_B_cylinder).

407 **Figure 3:** Stacking plot of partial ¹H NMR spectra of a) sodium salt of hyaluronic acid in
408 D₂O at 303 K; b) standard EDC sample in D₂O at 303 K; c) sponge product (NaHy hydrogel)
409 in mother liquor – formed in D₂O using DCl for pH controlling; d) the mother liquor after
410 sponge.

411 **Figure 4:** Mechanical properties dependence of EDC cross-linked NaHy films a) Strain at
412 break of NaHy_A_film and NaHy_B_film, b) Stress at break of NaHy_A_film and
413 NaHy_B_film.

414 **Figure 5:** Creep/creep recovery properties of hyaluronan samples: a) creep compliance and
415 recoverable compliance, b) creep recovery.

Figure 1
[Click here to download high resolution image](#)

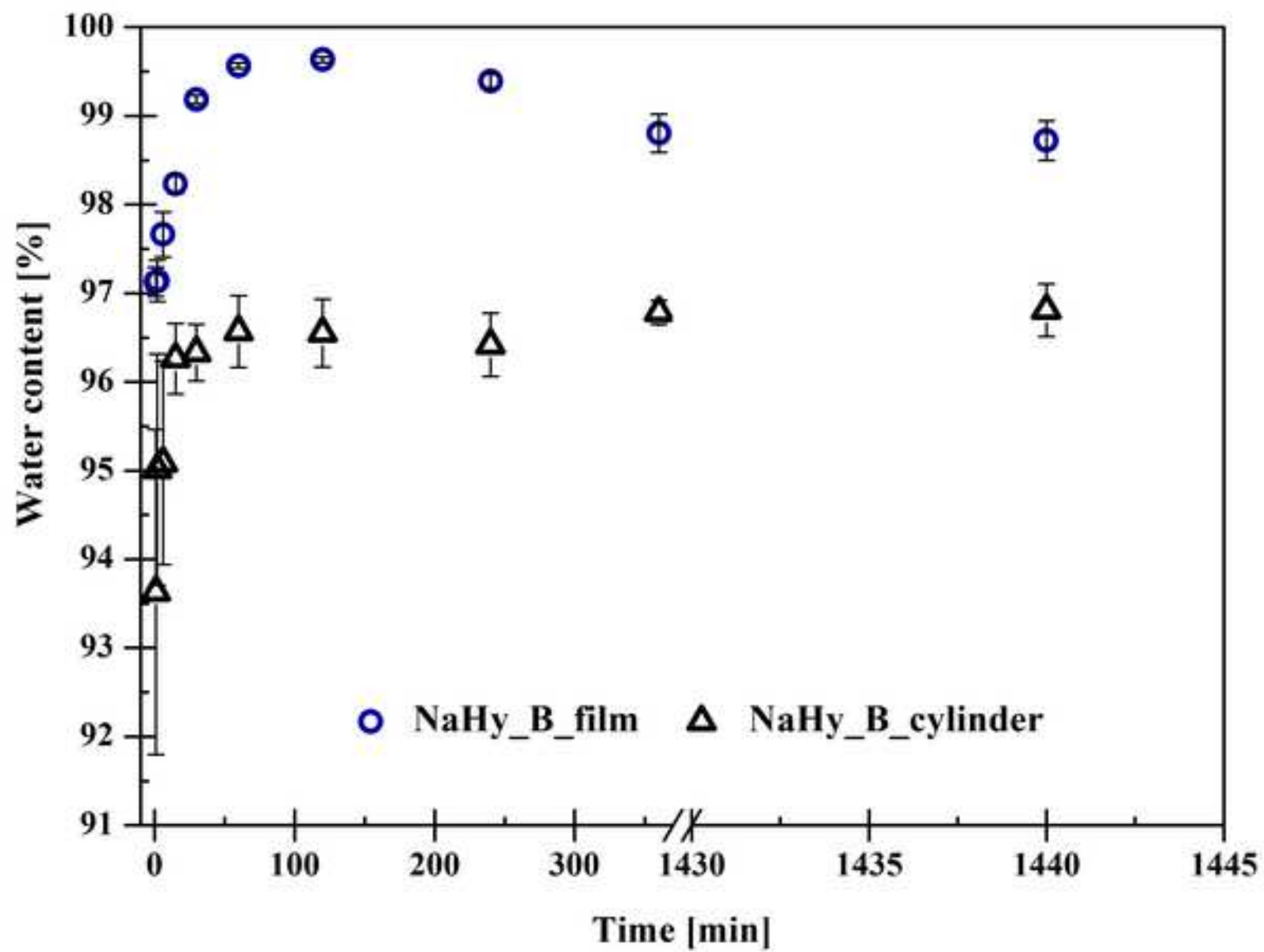


Figure 2
[Click here to download high resolution image](#)

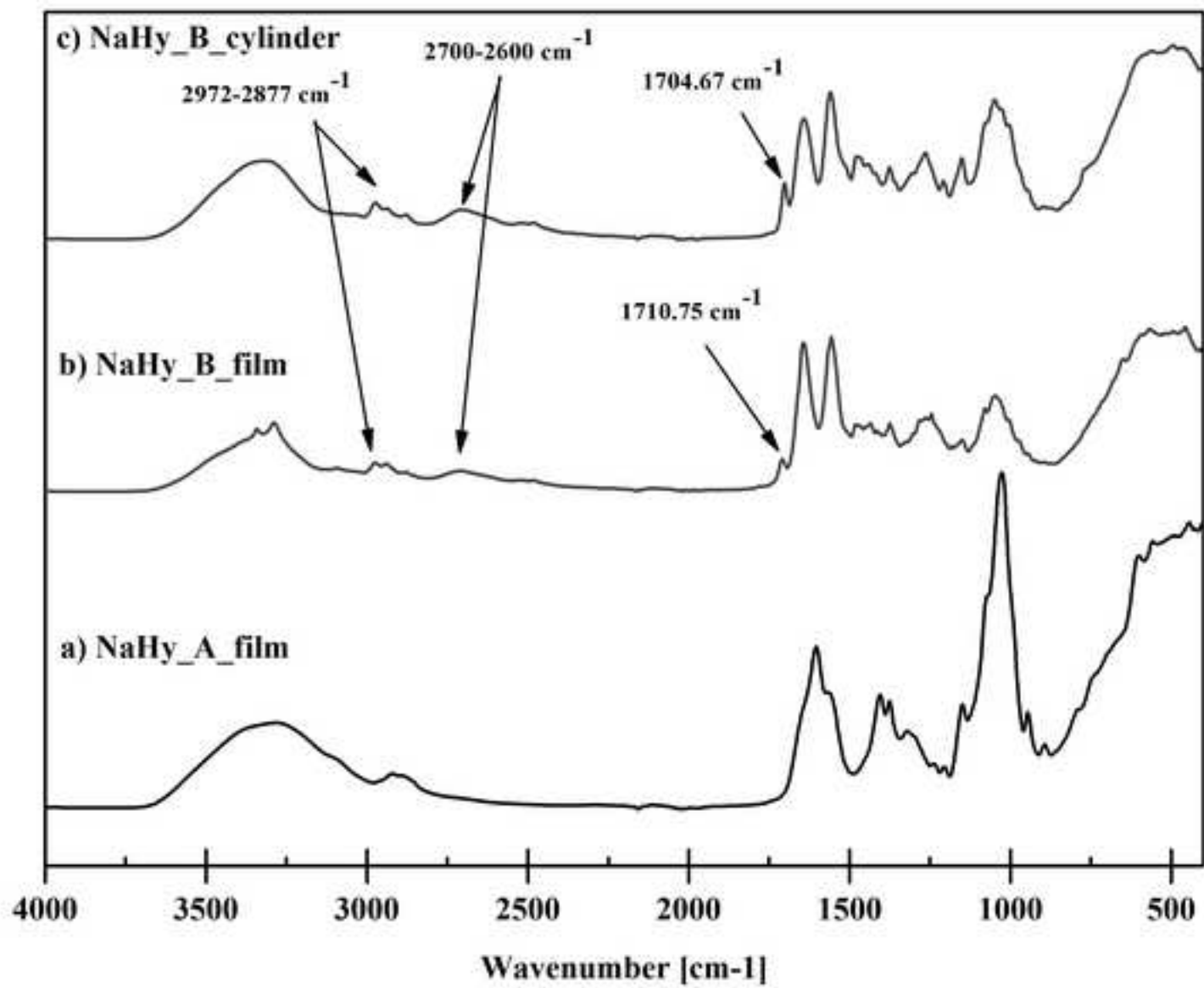


Figure 3
[Click here to download high resolution image](#)

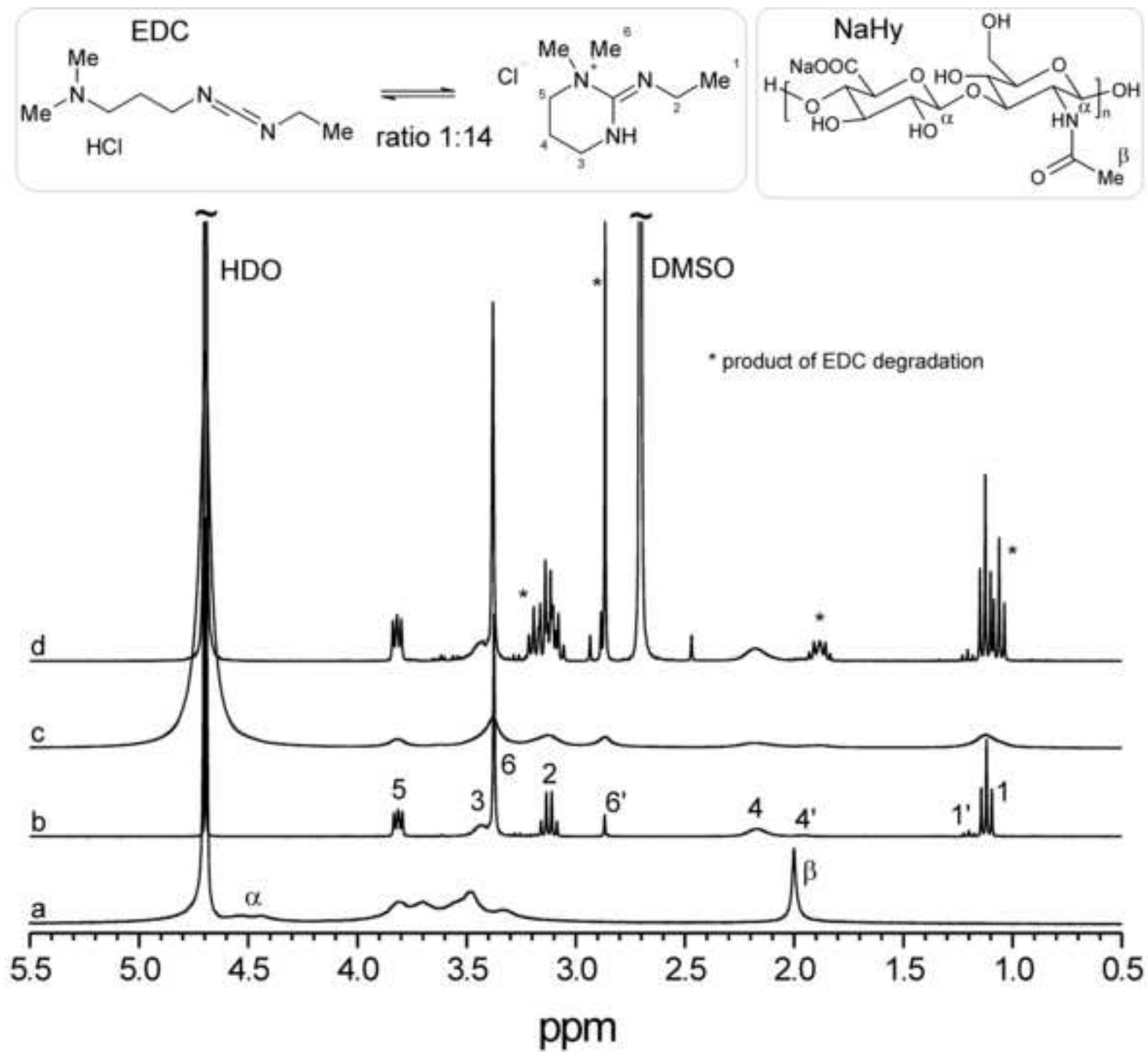


Figure 4a

[Click here to download high resolution image](#)

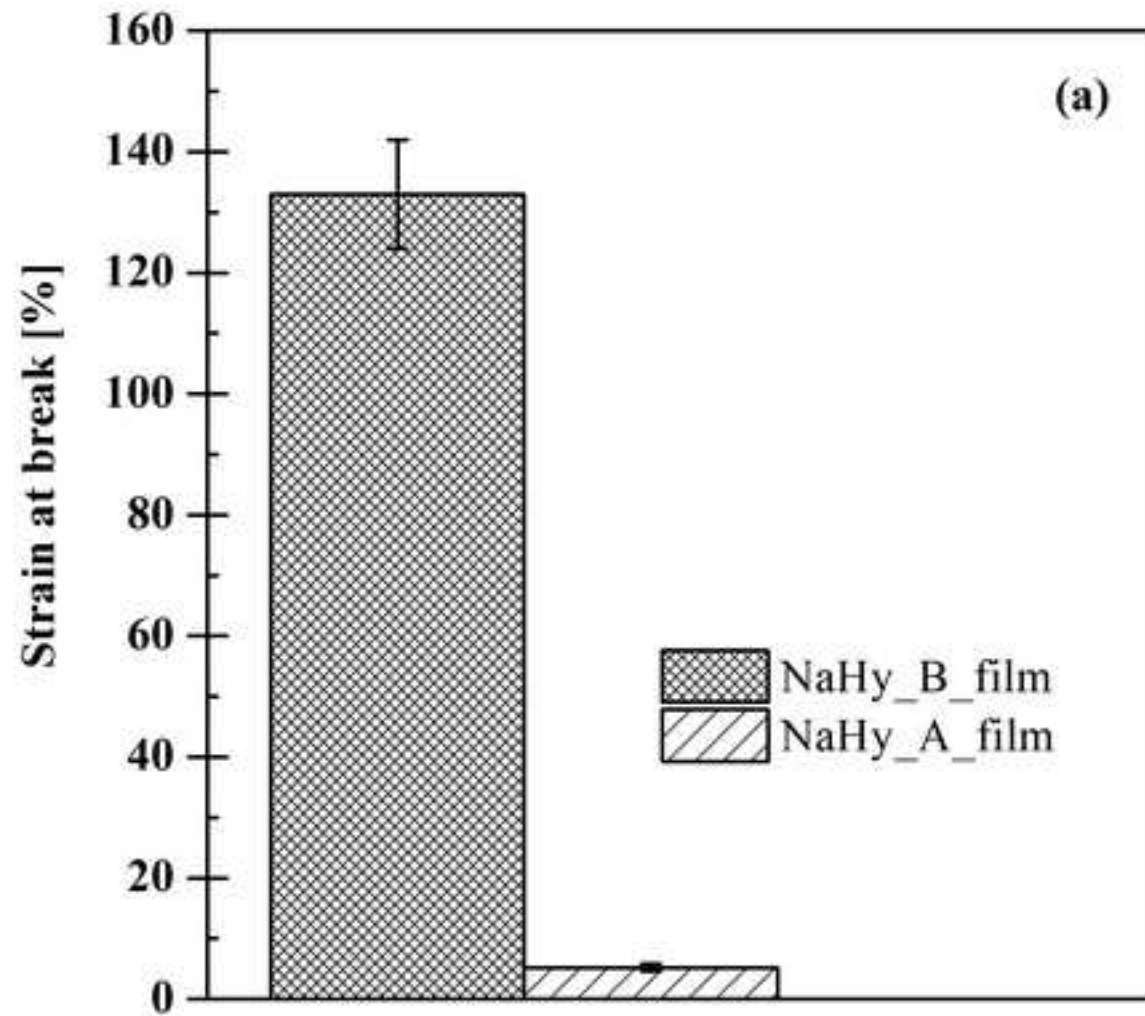


Figure 4b
[Click here to download high resolution image](#)

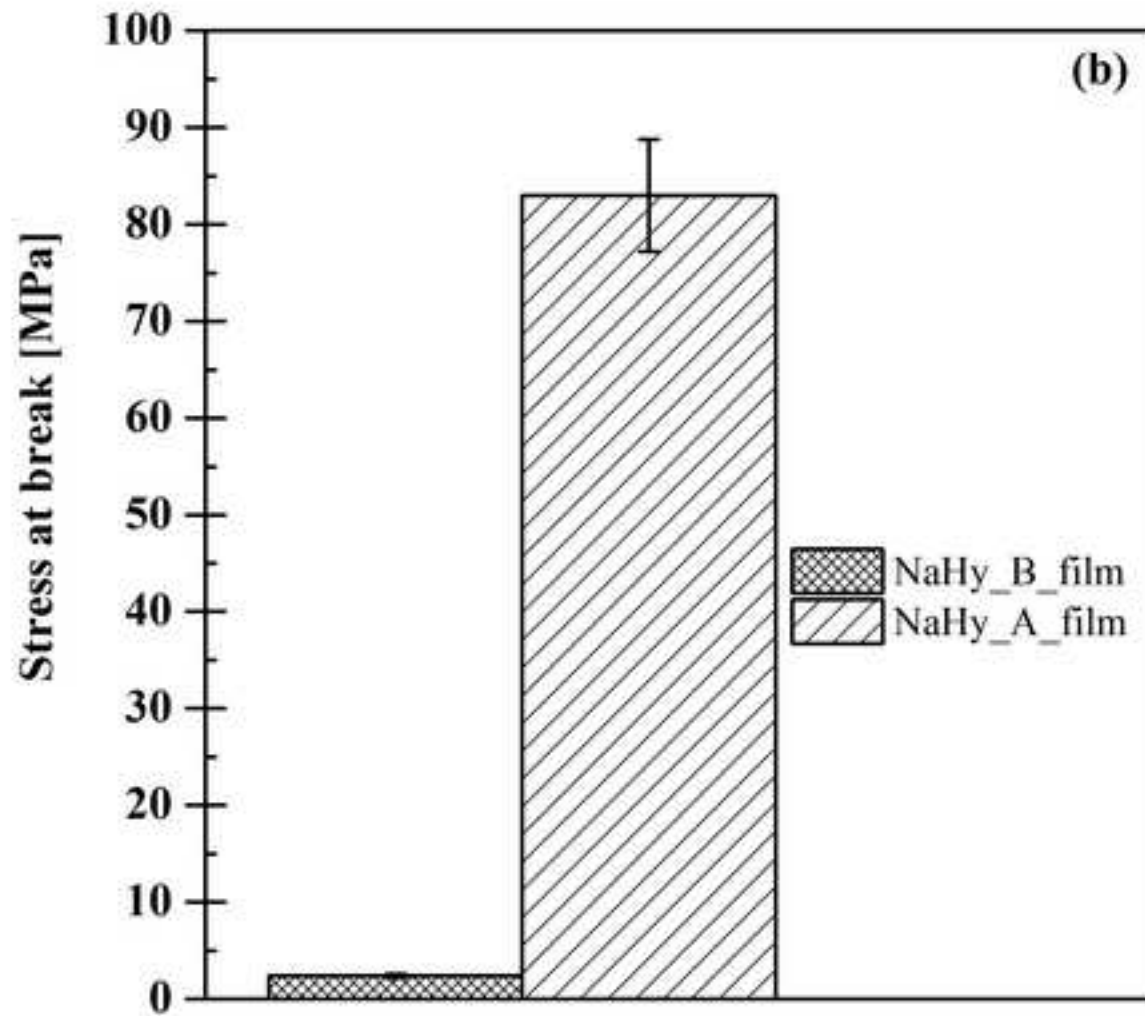


Figure 5a
[Click here to download high resolution image](#)

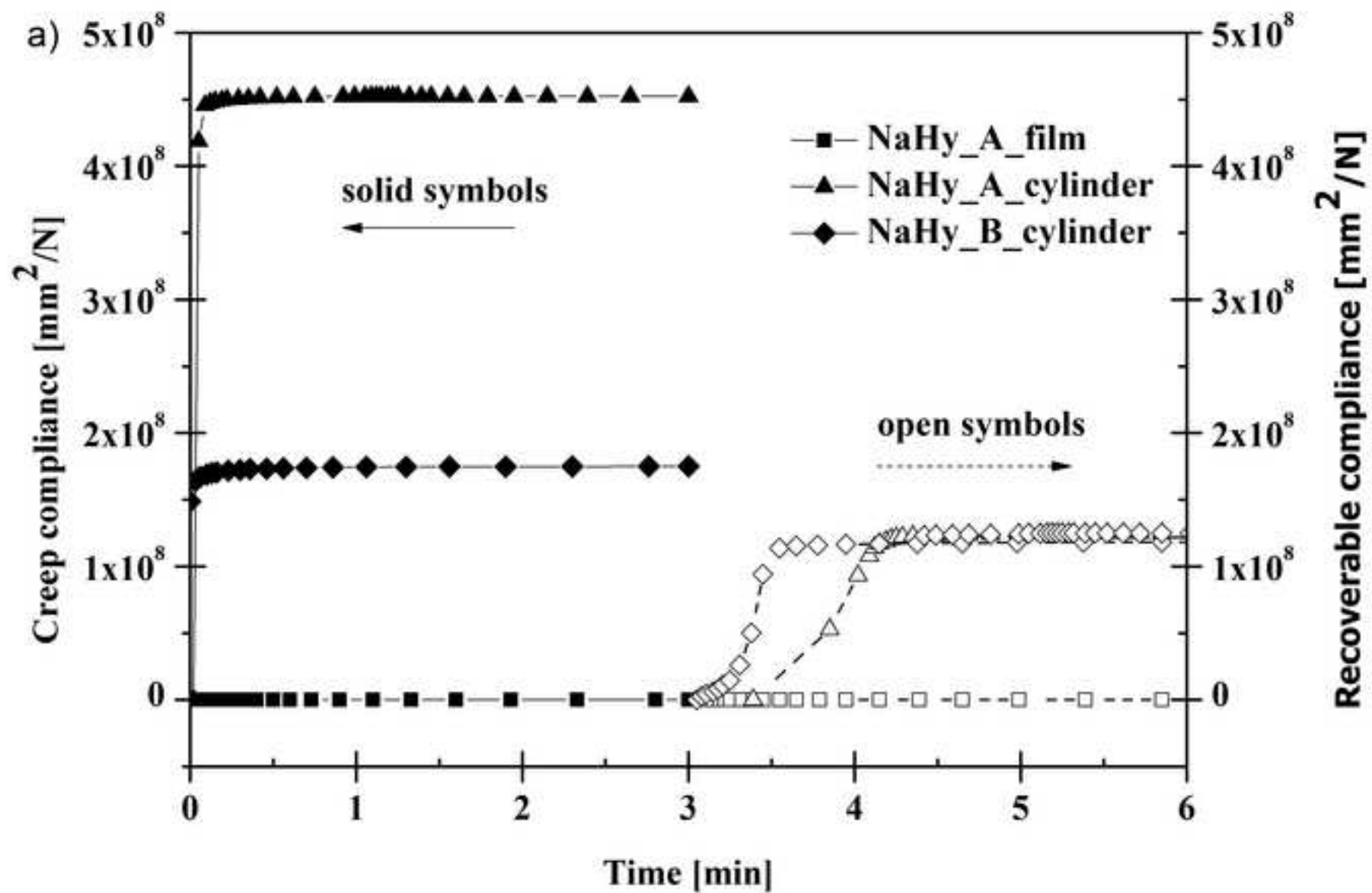


Figure 5b
[Click here to download high resolution image](#)

