

# Studium komplexů chitosanu s ionickým tenzidem

Bc. Darina Heimová

---

Diplomová práce  
2015



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně  
Fakulta technologická

---

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně  
Fakulta technologická  
Ústav technologie tuků, tenzidů a kosmetiky  
akademický rok: 2014/2015

## ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE (PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Darina Heimová**  
Osobní číslo: **T13403**  
Studijní program: **N2901 Chemie a technologie potravin**  
Studijní obor: **Technologie tuků, detergentů a kosmetiky**  
Forma studia: **prezenční**

Téma práce: **Studium komplexů chitosanu s ionickým tenzidem**

Zásady pro vypracování:

### **Teoretická část:**

- 1. Definujte chitosan, vlastnosti, aplikace, metody charakterizace.**
- 2. Zaměřte se na komplexy na bázi polymerů v kombinaci s tenzidy.**

### **Praktická část:**

- 1. Charakterizujte chitosan prostřednictvím dostupných metod.**
- 2. Připravte systémy obsahující chitosan–tenzid a studujte jejich chování.**
- 3. Dosažené výsledky diskutujte.**

Rozsah diplomové práce:

Rozsah příloh:

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná/elektronická**

Seznam odborné literatury:

1. **MYERS, D. Surfactant Science and Technology. New Persey, John Wiley & Sons, Inc., 2006.**
2. **BROZE, G. Handbook of Detergents: Part A: Properties. New York, Marcel Dekker, Inc., 1999.**
3. **GODDARD, E. D., ANATHAPADMANABHAN, K. P. Interactions of Surfactants with Polymers and Proteins. CRC Press, Inc., Boca Raton FL, 1993.**
4. **VAVŘÍKOVÁ, E., VINŠOVÁ, J. Chitosan a jeho farmaceutické aplikace. Chem. Listy 103, 56–65. 2009.**

Vedoucí diplomové práce:

**Ing. Jana Sedlaříková, Ph.D.**

Ústav technologie tuků, tenzidů a kosmetiky

Datum zadání diplomové práce:

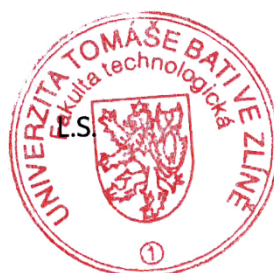
**20. ledna 2015**

Termín odevzdání diplomové práce:

**18. května 2015**

Ve Zlíně dne 20. ledna 2015

  
doc. Ing. Roman Čermák, Ph.D.  
*děkan*



  
Ing. Martina Černeková, Ph.D.  
*ředitel ústavu*

Příjmení a jméno: Darina Heimová

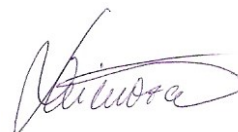
Obor: TTDK

## PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že

- beru na vědomí, že odevzdáním diplomové/bakalářské práce souhlasím se zveřejněním své práce podle zákona č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, bez ohledu na výsledek obhajoby <sup>1)</sup>;
- beru na vědomí, že diplomová/bakalářská práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému dostupná k nahlédnutí, že jeden výtisk diplomové/bakalářské práce bude uložen na příslušném ústavu Fakulty technologické UTB ve Zlíně a jeden výtisk bude uložen u vedoucího práce;
- byl/a jsem seznámen/a s tím, že na moji diplomovou/bakalářskou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, zejm. § 35 odst. 3 <sup>2)</sup>;
- beru na vědomí, že podle § 60 <sup>3)</sup> odst. 1 autorského zákona má UTB ve Zlíně právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona;
- beru na vědomí, že podle § 60 <sup>3)</sup> odst. 2 a 3 mohu užít své dílo – diplomovou/bakalářskou práci nebo poskytnout licenci k jejímu využití jen s předchozím písemným souhlasem Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně, která je oprávněna v takovém případě ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které byly Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně na vytvoření díla vynaloženy (až do jejich skutečné výše);
- beru na vědomí, že pokud bylo k vypracování diplomové/bakalářské práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tedy pouze k nekomerčnímu využití), nelze výsledky diplomové/bakalářské práce využít ke komerčním účelům;
- beru na vědomí, že pokud je výstupem diplomové/bakalářské práce jakýkoliv softwarový produkt, považují se za součást práce rovněž i zdrojové kódy, popř. soubory, ze kterých se projekt skládá. Neodevzdání této součásti může být důvodem k neobhájení práce.

Ve Zlíně 13. 5. 2015



---

<sup>1)</sup> zákon č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, § 47 Zveřejňování závěrečných prací:

(1) Vysoká škola nevydělečně zveřejňuje disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce, u kterých proběhla obhajoba, včetně posudků oponentů a výsledku obhajoby prostřednictvím databáze kvalifikačních prací, kterou spravuje. Způsob zveřejnění stanoví vnitřní předpis vysoké školy.

(2) Disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce odevzdané uchazečem k obhajobě musí být též nejméně pět pracovních dnů před konáním obhajoby zveřejněny k nahlížení veřejnosti v místě určeném vnitřním předpisem vysoké školy nebo není-li tak určeno, v místě pracoviště vysoké školy, kde se má konat obhajoba práce. Každý si může ze zveřejněné práce pořizovat na své náklady výpisy, opisy nebo rozmnoženiny.

(3) Platí, že odevzdáním práce autor souhlasí se zveřejněním své práce podle tohoto zákona, bez ohledu na výsledek obhajoby.

<sup>2)</sup> zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 35 odst. 3:

(3) Do práva autorského také nezasahuje škola nebo školské či vzdělávací zařízení, užije-li nikoli za účelem přímého nebo nepřímého hospodářského nebo obchodního prospěchu k výuce nebo k vlastní potřebě dílo vytvořené žákem nebo studentem ke splnění školních nebo studijních povinností vyplývajících z jeho právního vztahu ke škole nebo školskému či vzdělávacího zařízení (školní dílo).

<sup>3)</sup> zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 60 Školní dílo:

(1) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení mají za obvyklých podmínek právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla (§ 35 odst. 3). Odpirá-li autor takového díla udělit svolení bez vážného důvodu, mohou se tyto osoby domáhat nahrazení chybějícího projevu jeho vůle u soudu. Ustanovení § 35 odst. 3 zůstává nedotčeno.

(2) Není-li sjednáno jinak, může autor školního díla své dílo užít či poskytnout jinému licenci, není-li to v rozporu s oprávněnými zájmy školy nebo školského či vzdělávacího zařízení.

(3) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení jsou oprávněny požadovat, aby jim autor školního díla z výdělku jím dosaženého v souvislosti s užitím díla či poskytnutím licence podle odstavce 2 přiměřeně přispěl na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložily, a to podle okolností až do jejich skutečné výše; přitom se přihlédne k výši výdělku dosaženého školou nebo školským či vzdělávacím zařízením z užití školního díla podle odstavce 1.

## **ABSTRAKT**

Diplomová práce se zabývá studiem komplexů chitosanu s anionickým tenzidem dioktylsulfosukcinátem sodným. Teoretická část je zaměřena na charakteristiku chitosanu a klasifikaci tenzidů. Dále jsou zde popsány vlastnosti a význam dioktylsulfosukcinátu sodného a poslední část rešerše je věnována interakcím mezi tenzidy a polymery. V praktické části je charakterizován chitosan pomocí stanovení stupně deacetylace a molekulové hmotnosti, dále jsou studovány micelizační podmínky použitého anionického tenzidu. Poslední část se zabývá samotnými interakcemi mezi chitosanem a tenzidem s ohledem na reakční podmínky tvorby komplexů.

Klíčová slova:

Chitosan, tenzidy, dioktylsulfosukcinát sodný, stupeň deacetylace, molekulová hmotnost, kritická micelární koncentrace, povrchové napětí, zeta potenciál.

## **ABSTRACT**

This thesis studies the complexes of chitosan with dioctyl sodium sulfosuccinate anionic surfactant. The theoretical part focuses on the characteristics of chitosan and the classification of surfactants. Then the characteristics and importance of dioctyl sodium sulfosuccinate are described and the last part of the research is devoted to the interactions between surfactants and polymers. In the practical part, chitosan is characterized by determining the degree of deacetylation and molecular weight, and micellization conditions of anionic surfactant are also studied. The last part deals with the actual interactions between chitosan and surfactant with respect to the reaction conditions for the formation of complexes.

Keywords:

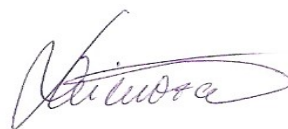
Chitosan, surfactants, dioctyl sodium sulfosuccinate, degree of deacetylation, molecular weight, critical micellar concentration, surface tension, zeta potential.

## PODĚKOVÁNÍ

Tímto bych chtěla poděkovat své vedoucí práce Ing. Janě Sedlaříkové Ph.D. za odbornou pomoc, cenné rady, ochotu a trpělivost, bez kterých by tato práce nemohla vzniknout. Poděkování patří také kolektivu laboratoří Ústavu technologie tuků, tenzidů a kosmetiky za obětavou pomoc při tvorbě této diplomové práce. Děkuji svým rodičům, že mi byli po celou dobu studia oporou a svému příteli Ing. Patriku Sniehoffovi za podporu a trpělivost během psaní diplomové práce.

Prohlašuji, že odevzdaná verze bakalářské/diplomové práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou totožné. Prohlašuji, že jsem na diplomové práci pracovala samostatně a použitou literaturu jsem citovala. V případě publikace výsledků, je-li to uvedeno na základě licenční smlouvy, budu uvedena jako spoluautorka.

Ve Zlíně 13. 5. 2015



.....  
Podpis studenta

## OBSAH

<b>OBSAH .....</b>	<b>8</b>
<b>ÚVOD.....</b>	<b>10</b>
<b>1 CHITOSAN.....</b>	<b>12</b>
<b>1.1 STRUKTURA CHITOSANU.....</b>	<b>12</b>
<b>1.2 VLASTNOSTI CHITOSANU .....</b>	<b>13</b>
<b>1.3 APLIKACE CHITOSANU.....</b>	<b>15</b>
1.3.1 Medicína a farmacie .....	16
1.3.2 Kosmetika.....	18
1.3.3 Potravinářství .....	18
1.3.4 Další průmyslová odvětví.....	19
<b>1.4 METODY STANOVENÍ STUPNĚ DEACETYLACE CHITOSANU.....</b>	<b>19</b>
1.4.1 Elementární analýza .....	20
1.4.2 Metody titrační .....	20
1.4.3 Metody spektroskopické .....	23
1.4.4 Metody hydrolytické .....	24
<b>1.5 STANOVENÍ MOLEKULÁRNÍ HMOTNOSTI CHITOSANU.....</b>	<b>27</b>
<b>2 TENZIDY.....</b>	<b>29</b>
<b>2.1 DĚLENÍ TENZIDŮ .....</b>	<b>29</b>
2.1.1 Anionické tenzidy .....	29
2.1.2 Kationické tenzidy.....	30
2.1.3 Amfoterní tenzidy .....	30
2.1.4 Neionické tenzidy.....	31
<b>2.2 TVORBA MICEL .....</b>	<b>31</b>
2.2.1 Stanovení kritické micelární koncentrace .....	31
2.2.2 Charakteristika micel.....	34
2.2.3 Elektrická dvojrstva a zeta potenciál.....	36
<b>3 DIOKTYLSULFOSUKCINÁT SODNÝ.....</b>	<b>38</b>
<b>4 INTERAKCE MEZI TENZIDY A POLYMERY.....</b>	<b>41</b>
<b>4.1 METODY SLEDOVÁNÍ INTERAKCÍ.....</b>	<b>41</b>
4.1.1 Měření povrchového napětí.....	41
4.1.2 Konduktometrie.....	42
4.1.3 Stanovení adsorpční isotermy .....	43
<b>4.2 INTERAKCE NABITÝ POLYMER – OPAČNĚ NABITÝ TENZID.....</b>	<b>44</b>
<b>4.3 INTERAKCE CHITOSAN – ANIONICKÝ TENZID .....</b>	<b>45</b>
4.3.1 Interakce chitosan – dioktylsulfosukcinát sodný .....	46
<b>5 CÍLE PRÁCE .....</b>	<b>50</b>
<b>6 POUŽITÉ CHEMIKÁLIE, ZAŘÍZENÍ A POSTUPY.....</b>	<b>51</b>
<b>6.1 CHEMIKÁLIE .....</b>	<b>51</b>
<b>6.2 POMŮCKY A PŘÍSTROJE.....</b>	<b>51</b>



<b>6.3</b>	<b>CHARAKTERISTIKA POUŽITÝCH CHEMIKÁLÍ</b> .....	<b>52</b>
6.3.1	Stanovení sušiny.....	52
6.3.2	Příprava zásobních roztoků 0.1M NaOH a 0.1M HCl.....	52
6.3.3	Stanovení stupně deacetylce chitosanu potenciometrickou titrací.....	53
6.3.4	Stanovení stupně deacetylce chitosanu konduktometrickou titrací.....	54
6.3.5	Stanovení molekulové hmotnosti chitosanu.....	56
<b>6.4</b>	<b>STANOVENÍ KRITICKÉ MICELÁRNÍ KONCENTRACE DIOCTYLSULFOSUKCINÁTU SODNÉHO</b> .....	<b>58</b>
<b>6.5</b>	<b>INTERAKCE CHITOSAN –DIOKTYLSULFOSUKCINÁT SODNÝ</b> .....	<b>59</b>
6.5.1	Příprava zásobních roztoků a pufrů.....	60
6.5.2	Měření povrchového napětí.....	61
6.5.3	Měření zeta potenciálu.....	61
6.5.4	Stanovení zákalových křivek.....	61
<b>7</b>	<b>VÝSLEDKY A DISKUZE</b> .....	<b>63</b>
<b>7.1</b>	<b>STANOVENÍ STUPNĚ DEACETYLACE</b> .....	<b>63</b>
<b>7.2</b>	<b>STANOVENÍ MOLEKULOVÉ HMOTNOSTI CHITOSANU</b> .....	<b>65</b>
<b>7.3</b>	<b>STANOVENÍ KRITICKÉ MICELÁRNÍ KONCENTRACE DIOKTYLSULFOSUKCINÁTU SODNÉHO</b> .....	<b>69</b>
<b>7.4</b>	<b>INTERAKCE CHITOSAN – DIOKTYLSULFOSUKCINÁT SODNÝ</b> .....	<b>74</b>
7.4.1	Měření povrchového napětí.....	74
7.4.2	Měření zeta potenciálu.....	77
<b>ZÁVĚR</b> .....		<b>83</b>
<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY</b> .....		<b>85</b>
<b>SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK</b> .....		<b>94</b>
<b>SEZNAM OBRÁZKŮ</b> .....		<b>96</b>
<b>SEZNAM TABULEK</b> .....		<b>98</b>

## ÚVOD

Interakce mezi polymery a tenzidy jsou v posledních letech předmětem řady studií. Důvodem je fakt, že tato kombinace bývá často základem mnoha komerčních produktů, používaných v potravinářství, medicíně, farmacii, při výrobě detergentů atd. Obzvláště v kosmetickém a farmaceutickém průmyslu jsou kladeny vysoké požadavky na bezpečnost a „mírnost“ používaných materiálů. Do popředí zájmu se dostávají zejména systémy na bázi nabitého polymeru a opačně nabitě povrchově aktivní látky, kde se předpokládá interakce na bázi elektrostatických sil.

Chitosan je polysacharid, získávaný částečnou deacetylací chitinu. Vzhledem k jeho vlastnostem, jako je biokompatibilita, snadná biodegradabilita a nízká toxicita, je vhodným kandidátem pro výše uvedené aplikace. Bylo prokázáno, že jej lze využít i v oblasti úpravy odpadních vod, jako složku pomocných přípravků v textilním průmyslu, doplněk stravy pro hubnutí a snižování hladiny cholesterolu, při tvorbě biodegradabilních filmů a hydrogelů atd. V neposlední řadě je nutno zmínit jeho potenciál pro využití v systémech pro řízené uvolňování léčiv. Chitosan je rozpustný v kyselém prostředí, kde dochází k protonaci aminoskupin v jeho molekule. Následně může tvořit specifické komplexy s anionickými tenzidy, jejichž významné povrchově aktivní vlastnosti lze využít například pro stabilizaci emulzí v kosmetickém průmyslu.

Diplomová práce se zabývá studiem interakcí mezi chitosanem a anionickým tenzidem dioktylsulfosukcinátem sodným, který obsahuje ve své molekule dva nepolární alkylové řetězce a polární sulfoskupinu. Tento tenzid je charakteristický svou silnou povrchovou aktivitou a výhodnými micelizačními vlastnostmi. Vzhledem k jeho biokompatibilitě s pokožkou by výsledné komplexy mohly sloužit jako bezpečné složky pro stabilizaci kosmetických přípravků i jako základ pro systémy kontrolovaného uvolňování aktivních látek z těchto produktů.

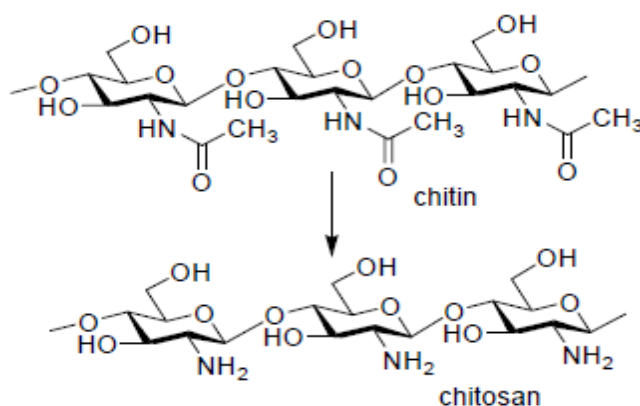
## **I. TEORETICKÁ ČÁST**

## 1 CHITOSAN

### 1.1 Struktura chitosanu

Chitosan, neboli (1→4)-2-amino-2-deoxy- $\beta$ -D-glukan, je biopolymer, který patří mezi nejvýznamnější deriváty chitinu. Chitin je tvořen z molekul N-acetyl-D-glukosaminu, které jsou spojeny 1,4- $\beta$ -glykosidickou vazbou. Po celulóze je druhým nejrozšířenějším přírodním polysacharidem. Chitin byl poprvé objeven v roce 1830 profesorem Branconnotem v houbách *Aspergillus a Mucor* a později byl izolován také z hmyzu. Hlavním zdrojem pro jeho průmyslovou výrobu jsou však krunýře korýšovitých živočichů, což je také důvod, proč jsou největšími výrobci chitinu Norsko a Švédsko – země s velkým podílem lovu krabů, humrů, kalmarů apod. [1] s. 56

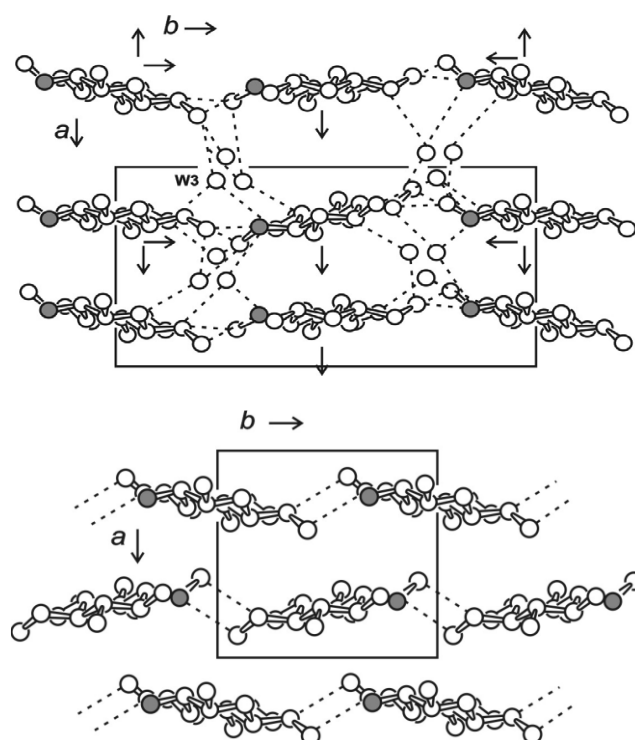
Rozdíl mezi chitinem a chitosanem je ve stupni acetylace, což je poměr glukosaminových jednotek k celkovému počtu glukosaminových a N-acetylglukosaminových skupin. Chitosan se vyrábí částečnou alkalickou deacetylací chitinu, která se provádí buď varem s 50% hydroxidem sodným nebo enzymatickým působením N-deacetylasy. (obr. 1) [1] s. 56, [2] s. 93, [3] [4] s. 53.



Obr. 1 Deacetylace chitinu [1] s. 56

Pomocí rentgeno-strukturní analýzy byla dokázána přítomnost 4 krystalických polymorfů chitosanu [1] s. 57. Tři polymorfy jsou hydratované a snadno vytvářejí ve vodě rozpustné soli s organickými a minerálními kyselinami. Jedna polymorfa je nehydratovaná a vzniká zahříváním hydratovaného chitosanu na teplotu 200°C. Dehydratací dochází ke zkrácení vzdálenosti vrcholů struktur a k následnému oddálení jejich řetězců (obr. 2). Tato nevratná změna má za následek vznik nehydratovaných krystalů, které jsou nerozpustné v kyselinách a ztrácí charakter biomateriálů [2] s. 92.

Molekulární hmotnost chitosanu je 1 – 1 000 kg.mol<sup>-1</sup>. Tento rozptyl je dán stupněm acetylace. Pro srovnání u kulovitých bílkovin je tato hodnota 10x menší s. 695 [5].



Obr. 2 a) Hydratovaný chitosan; b) nehydratovaný chitosan [1]

Chitosan obsahuje ve své struktuře 3 reaktivní centra – primární aminoskupinu, primární a sekundární hydroxyskupinu na C-2, C-3 a C-6. Aminoskupina tvoří komplexy s ionty kovů a primární hydroxyskupina je substituována spojovacími články „spacery“, na které se váže aktivní složka (léčiva aj.) Sekundární hydroxyskupina je modifikována, přičemž účelem je zvýšit rozpustnost ve vodě [2] s. 93. Díky hygroskopické povaze obsahuje chitosan zbytkové množství vody, které je více vázané na hydroxyskupiny. Proto musí být při charakterizaci chitosanu vždy uveden přesný obsah vlhkosti [4] s. 53.

## 1.2 Vlastnosti chitosanu

Chitosan má vyšší chemickou a biochemickou reaktivitu než chitin. Tyto vlastnosti, spolu s dalšími charakteristikami, jako je rozpustnost, biodegradabilita a adsorpce mnoha substrátů závisí na množství protonovaných aminoskupin, tedy na podílu acetylovaných a neacetylovaných D-glukosaminových jednotek [1] s. 56, [2] s. 91, [3]. Aminoskupiny jsou protonované v kyselinách s disociační konstantou pKa menší než 6,2. Chitosan je

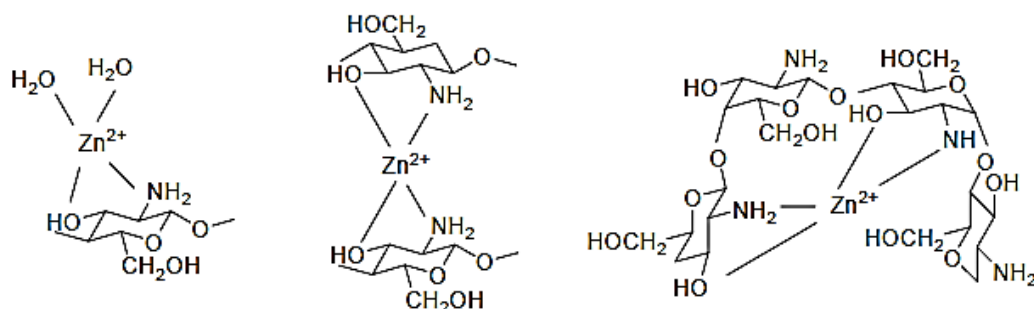
nerozpustný ve vodě a organických rozpouštědlech, naopak je rozpustný v kyselinách (octové, chlorovodíkové, dusičné atd.) [2] s 91.

Chitosan je znám pro své antibakteriální účinky. Působí jak vůči grampozitivním (*Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermis*, *Bacillus subtilis*) a gramnegativním bakteriím (*Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus vulgaris*), tak vůči houbám. Kladně nabité aminoskupiny glukosaminových jednotek vzájemně interagují s negativně nabitými součástmi mikrobiálních buněčných membrán. Následkem je změna propustnosti membrán, což vede k úniku intracelulárního obsahu a rozpadu buňky. Dále také může nízkomolekulární chitosan penetrovat do buňky, čímž se naváže na DNA a způsobí částečnou inhibici RNA a proteinovou syntézu [1] s. 57.

Biologická aktivita chitosanu se mění v závislosti na jeho molekulové hmotnosti, stupni deacetylace, rozpustnosti, pH, velikosti substituentů atd. Bylo prokázáno, že pro optimální antibakteriální efekt je vhodný chitosan s molekulovou hmotností mezi 2 a 200 kg.mol<sup>-1</sup>. Tento fakt byl potvrzen při studiu účinku chitosanu vůči bakterii *Escherichia coli* [1] s. 57, kdy bylo zjištěno, že vysokomolekulární chitosan zamezuje pronikání živin dovnitř buňky vytvořením zábrany na její vnější stěně. Chitosan s malou molekulovou hmotností naopak proniká dovnitř buňky, kde může být metabolizován.

Dalším faktorem, který ovlivňuje antibakteriální vlastnosti chitosanu, je hodnota pH. Antibakteriální aktivita klesá s rostoucím pH. Při pH vyšším než 7 je neúčinný a zároveň nerozpustný (rozpustnost lze pozitivně ovlivnit modifikací chitosanu – např. kvarternizací nebo hydrofilní substitucí). Antibakteriální aktivitu je možné pozorovat při pH menším než 6,5, kdy dochází k ionizaci molekuly. Spektrum antimikrobiální účinnosti chitosanu lze zvýšit kombinací se stříbrnými (mohou zvýšit účinek až o 98 %) nebo zinečnatými ionty (obr. 3), nebo s jiným antibakteriálním činidlem (např. tetracyklinem) [6] s. 65. Chitosan byl také použit k syntéze isoniazidu (polymerní proléčivo – významné antituberkulotikum), čímž se prodloužila doba jeho působení. K léčbě ran a popálenin se využívá monomerní alginát sodný v kombinaci s chloridem vápenatým, který je pokryt chitosanem. Při této aplikaci chitosan podporuje růst fibroblastů a tím i aktivitu makrofágů, což má za následek urychlení léčebného procesu [1] s. 60.

Chitosan také vykazuje protinádorový a antioxidační účinek, který závisí na molekulové hmotnosti, rozpustnosti a obsahu acetylovaných skupin. Nízkomolekulární chitosan rozpustný ve vodě působí jako přírodní antioxidant [1] s. 61.



Obr. 3 Struktura zinečnatých komplexů [1] s. 60

### 1.3 Aplikace chitosanu

Chitosan je biodegradabilní, biokompatibilní, zároveň je netoxický a působí antimikrobiálně. Z těchto důvodů patří mezi nejvýznamnější biopolymery s širokým uplatněním v biomedicíně, farmacii, potravinářství, kosmetice, agrochemii, fyzikální chemii a dalších odvětvích [7] s. 439. Hlavní aplikační oblasti jsou uvedeny v tab. 1.

Tab. 1 Hlavní oblasti využití chitosanu [8]

Oblast aplikace	Vlastnosti
Zemědělství	Stimulace růstu rostlin, povrchové úpravy semen, ochrana rostlin proti mrazu, postupné uvolňování hnojiv a živin do půdy
Voda, nakládání s odpady	Čištění vody vložkováním (pitná voda, bazény), odstranění kovových iontů, ekologické polymer (odstranění syntetických polymerů), snížení zápachu
Jídlo a nápoje	Dietní vláknina (nevstřebatelná lidským organismem), vázání lipidů (snížení hladiny cholesterolu), konzervační, zahušťovadlo a stabilizátor, ochranný, fungistatický, antibakteriální účinek na ovoce

Kosmetika a toaletní potřeby	Udržování vlhkosti pokožky, léčba akné, zlepšení pružnosti vlasů, snížení statické elektřiny vlasů, tónování pleti, péče o dutinu ústní (zubní pasty, žvýkačky)
Biofarmaceutika	Imunologický, protinádorový, hemostatický a antikoagulační, léčebný, bakteriostatický

### 1.3.1 Medicína a farmacie

V posledních létech se pozornost soustřeďuje na využití chitosanu jako nosiče léčiv. Další oblastí jeho využití jsou potravinové doplňky pro vázání tuků nebo v procesech čištění krve [9] s. 47.

Tab. 2 Hlavní vlastnosti chitosanu ve vztahu k jeho použití v biomedicínských aplikacích [8]

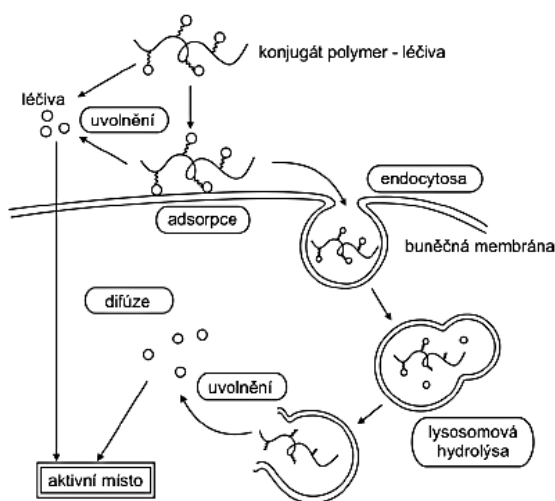
Potenciální biomedicínské aplikace	Základní charakteristika
chirurgické stehy zubní implantáty umělá kůže obnova kosti kontaktní čočky řízené uvolňování léčiv pro zvířata a lidi enkapsulační materiál	biokompatibilní biologicky odbouratelný obnovitelný filmotvorný hydratační činidlo netoxický biologická tolerance hydrolyzovatelný lysozymem vlastnosti pro hojení ran účinný proti bakteriím, virům, plísním

Systémy pro řízené uvolňování léčiv jsou v současnosti velice studovanou oblastí v rámci biomedicínských aplikací. Tyto zahrnují nosní, oční, ústní, transdermální a další přípravky, jejichž hlavním znakem je řízené a cílené uvolňování léčiva [2] s. 92.

Samotný polymer může být využíván jako léčivo, avšak to jen v případě pokud vykazuje farmakologickou aktivitu. Polymerní proléčivo je makromolekulární látka, sloužící jako nosič, přičemž sama nemusí vykazovat biologickou aktivitu. Skládá se z polymerního



nosiče, biodegradabilních vazeb mezi nosičem a léčivem, a skupin, které mají za úkol cílení na konkrétní buňku. Jednou z možností transportu léčiv je využití makromolekulárních proléčivových konjugátů s nízkou molekulovou hmotností. Změnou rozpustnosti a molekulární velikosti selepší pohyb látky a dochází k pomalému uvolňování léčiva z nosiče. Makromolekulární proléčivo může do buňky pronikat endocytózou konjugátu polymer-léčivo nebo difuzí uvolněného léčiva do buňky (obr. 4) [1] s. 57.



Obr. 4 Cesty léčivé látky k aktivnímu místu [1]

Chitosan může být využit pro přípravu hydrogelů, které jsou schopny zajistit lokální přenášení různých terapeutických látek. Hydrogely jsou tvořeny zesíťnými polymery, které obsahují velké množství vody. Část je pevně vázána na polymer a zbytek je v hydrogelu přítomen jako „volná“ voda [10] s. 32.

Plně zbotnalé hydrogely mají některé fyzikální vlastnosti (konzistence, nízké mezifázové napětí mezi vodou a biologickými tkáněmi) podobné vlastnostem živých tkání, což minimalizuje možnosti iritace okolních tkání po implantaci gelu a negativní imunitní reakce [2] s. 92, [4] s. 54, [11] s. 84.

Léčivá látka může být do hydrogelu zakomponována pomocí zapouzdření nebo mohou difundovat do pórů hydrogelů po zesíťování. Problémem obou zmíněných technik je poměrně rychlé uvolnění látky v počáteční fázi botnání hydrogelu, a tedy nedostatečný terapeutický účinek. Z toho důvodu je vývoj nových systémů s udržitelným uvolňováním léčiv v současnosti stále předmětem mnoha studií. Chitosan se, díky svým výjimečným

vlastnostem, jeví jako vhodný kandidát pro přípravu těchto systémů, splňující požadavky na biokompatibilitu, biodegradabilitu, nízkou toxicitu atd. [11] s. 85.

### 1.3.2 Kosmetika

Chitosan se v kosmetice využívá pro své bakteriostatické, fungistatické a filmotvorné vlastnosti, má také význam při přípravě systémů pro řízené uvolňování aktivních látek. Chitosan je aplikován do produktů vlasové kosmetiky (šampony, kondicionéry, vlasová tonika, laky na vlasy), zejména pro zajištění antistatických vlastností a změkčení vlasů, dále se uplatňuje při výrobě pleťových krémů, zubních past a dalších kosmetických přípravků. [8] s. 604, [12] s. 2.

Chemická struktura chitinu se podobá struktuře heparinu a kyselině hyaluronové. Má schopnost vázání kovových iontů, které jsou v mnoha případech důvodem alergických reakcí. Chitin a jeho deriváty se řadí mezi účinná hydratační činidla, která dodávají pokožce dostatečné množství vody. Další výhoda spočívá v tvorbě ochranného filmu na pokožce, na který se následně mohou zachytit další aktivní složky (např. další hydratační činidla, organické kyseliny, sluneční filtry) [13].

### 1.3.3 Potravinářství

Chitosan v potravinářství je možné použít jako antimikrobiální činidlo proti bakteriím a houbám, nebo jako aditivum pro zesílení přírodního aroma, zlepšení textury potraviny, zahušťovadlo a stabilizátor. Lze sem zahrnout i aplikace při výrobě obalových materiálů pro potraviny, kde chitosan může fungovat při regulované výměně vlhkosti, zajišťovat kontrolované (postupné) uvolňování antioxidantů, antibakteriálních a aromatických látek. Chitosan se také může uplatňovat pro zlepšení nutriční kvality potravin. [14] s. 40.

Chitosan se v potravinářství často využívá jako složka potravních doplňků, jelikož je schopen, díky kladně nabitým skupinám (aminokyselinám), vázat tuky z potravin přímo v trávicím traktu před strávením, a tím následně snižovat jejich vstřebávání lidským organismem. Chitosan přirozeně snižuje hladinu cholesterolu v krvi, jelikož tvoří v kyselém prostředí žaludku koaguláty, které zachycují a váží micely tvořené žlučovými kyselinami obsahujícími cholesterol. Tím dojde ke snížení obsahu emulgovaného cholesterolu, který se pak nedostane do krevního řečiště a je následně vyloučen stolicí. Chitosan má příznivý vliv na gastrointestinální trakt (zlepšení střevní peristaltiky, bakteriální flóry střeva a vylučování toxinů a radionuklidů ze střev) [15].

Účinnost chitosanu lze zvýšit v kombinaci s vitamínem C nebo vitamíny B-komplexu, které napomáhají snižovat hodnoty nevhodného cholesterolu a tím přispívat ke zlepšení kardiovaskulárního systému [16]. Problém při používání potravinových doplňků s obsahem chitosanu může nastat v případě, kdy díky jeho vazebné schopnosti dojde k možnému snížení vstřebávání některých minerálů (hořčík, vápník, zinek, železo). Z toho důvodu se doporučuje alespoň dvouhodinová prodleva před užitím léků [17].

#### 1.3.4 Další průmyslová odvětví

Chitosan nachází rovněž využití v textilním průmyslu, a to jak při primární výrobě textilních vláken (pro medicínské účely, např. obvazy, chirurgické nitě, apod.), tak při produkci pomocných chemikálií a činidel pro konečnou úpravu. Může zlepšit absorpci barviv na bavlněných vláknech, pevnost barvených tkanin. Chitosan lze použít jako pojivo v barvivech, ale také jako jejich ředidlo, či zahušťovadlo. To je dáno reologickými vlastnostmi chitosanu (za vhodných podmínek vytváří formace hydrogelu a chová se viskoelasticky). Také bylo zjištěno, že chitosan má velmi příznivé účinky na snížení nechtěného plstění vlny. Antibakteriální vlastnosti chitosanu zamezují vzniku zápachu z oděvů [18] s. 1.

Zvláště v posledních letech se chitosan uplatňuje při úpravě povrchových vod (pro výrobu pitné vody) nebo čištění odpadních vod k odstraňování organického znečištění nebo přírodních organických látek, které by jinak vedly ke tvorbě nežádoucího zákalu [19] s. 66.

V přírodně zakalených vodách dominují huminové látky, které obsahují, mimo jiné, i humusové kyseliny, jejichž disociace vede k vysoké stabilitě huminových koloidů v přírodních vodách. Tyto látky mají vysokou afinitu ke komplexům iontů kovů a organických znečišťujících látek. Následkem je nažloutlá barva, zákal, nežádoucí vůně a chuť vody. Jednou z odstranění huminových kyselin z přírodních vod je využití chitosanu. Předpokládá se, že jako kationtový polyelektrolyt bude koagulovat s negativně nabitými suspendovanými částicemi huminových látek. Jeho výhodou je, že oproti syntetických flokulantům nezatěžuje životní prostředí [19] s. 66.

#### 1.4 Metody stanovení stupně deacetylace chitosanu

Stupeň deacetylace (DD) je jedním z hlavních parametrů, charakterizujících chitosan. Jedná se o podíl D-glukosaminu a N-acetyl-D-glukosaminu, který ovlivňuje jak fyzikálně-chemické a biologické vlastnosti, tak následné průmyslové využití [2] s. 93. Například

bylo zjištěno, že chitosan s DD blížící se krajním hodnotám (0% nebo 100%) vykazuje delší dobu degradace a zvýšenou buněčnou adhezi (v případě DD okolo 50% tomu bylo právě naopak) [20] s. 1399. Z výše uvedených důvodů existuje řada metod pro stanovení stupně deacetylace chitosanu, z nichž nejčastěji využívané jsou shrnuty v následujících kapitolách.

#### 1.4.1 Elementární analýza

Definované množství chitosanu se zahřívá po dobu jedné hodiny při teplotě 600°C. Zbytek se pak zváží a zjistí se podíl anorganických látek. Následně se vypočítá stupeň acetylce dle vzorce (1.1):

$$\%DA = \frac{(8,695 - \%N)}{8,695 - 6,896} \cdot 100 \quad (1.1)$$

Kde:

- $\%DA$  stupeň acetylce
- 8,695 procento dusíku v plně deacetylovaném chitosanu
- 6,896 procento dusíku v plně acetylovaném chitinu
- $\%N$  procento organické části v analyzovaném materiálu

Vzorky s různým stupněm acetylce vykazují jen malé rozdíly v obsahu dusíku. To je důvodem, proč výsledky získané elementární analýzou prvků nejsou přesné a to zejména, pokud jsou přítomny kontaminanty. Tato metoda se používá k charakterizaci chitosanu s obsahem dusíku větším než 7% a chitinu s obsahem dusíku méně než 7% [2] s. 93.

#### 1.4.2 Metody titrační

##### Acidobazická titrace

Znamé množství chitosanu se rozpustí v 0,1 N roztoku kyseliny chlorovodíkové. Po dostatečném rozmíchání se tento roztok titruje 0,1 N roztokem hydroxidu sodného. Stupeň acetylce (DA) je pak stanoven z prvního a druhého inflexního bodu titrační křivky. Při této metodě mohou být výsledky ovlivněny viskozitou nebo tvorbou sraženin v roztoku [4] s. 55.

### Potenciometrická titrace

Při této metodě se rozpustí chitosan (asi 100 mg) ve známém objemu vodného roztoku kyseliny chlorovodíkové ( $0,01 \text{ mol.l}^{-1}$ ) a roztok se pak titruje  $0,1 \text{ mol.l}^{-1}$  NaOH, přičemž pH roztoku se měří při konstantní iontové síle ( $0,1 \text{ mol.l}^{-1}$  NaCl). První inflexní bod, v grafu závislosti pH na přidaném objemu báze, odpovídá neutralizaci kyseliny chlorovodíkové. Druhý bod pak určuje neutralizaci amonných iontů z chitosanu. Rozdíl mezi těmito dvěma inflexními body odpovídá množství aminoskupin v chitosanu (stupeň deacetylce, DD). Stupeň acetylce se vypočítá z následujícího vzorce [2] s. 94.

$$\%DA = 100 - \%DD \quad (1.2)$$

Kde:

- $\%DA$  stupeň acetylce
- $\%DD$  stupeň deacetylce

Problémem této metody je, že vzorky musí být zbaveny vlhkosti a nečistot, následně je provedena korekce naváženého množství chitosanu [2] s. 94.

### Koloidní titrace

Princip koloidní titrace je založen na stechiometrické interakci mezi pozitivními a negativními ionty. V průběhu reakce dochází k rychlému srážení, které je dokončeno v okamžiku, kdy je množství kladných a záporných nábojů vyrovnáno. Bod ekvivalence je detekován změnou barvy indikátoru [2] s. 94.

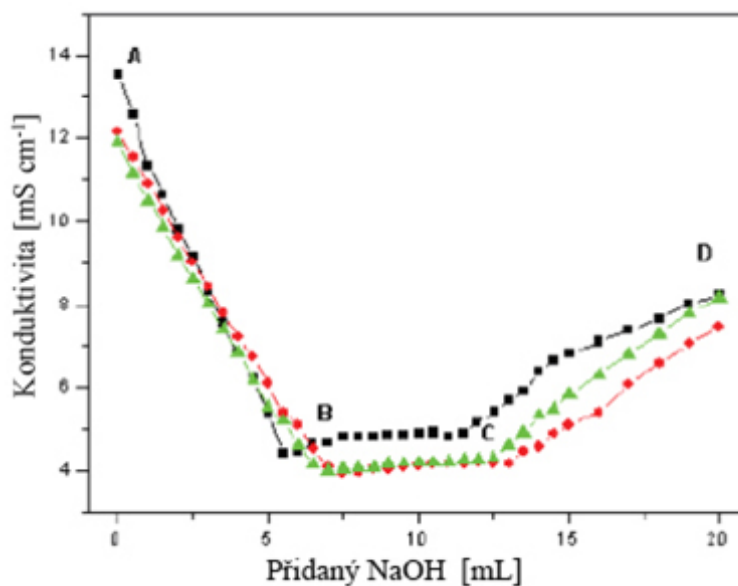
Vzorek chitosanu se rozpustí ve vodném roztoku kyseliny octové a následně je titrován polyvinylsulfátem draselným (PVS) za použití toluidinové modři (3-amino-7-dimethyl-amino-2-methyl-fenothiazin-5-ium chlorid) jako indikátoru. Pozitivně nabitě amonné skupiny chitosanu se pak přímo vážou k negativně nabitým sulfátovým skupinám PVS. Po dosažení bodu ekvivalence se zbytek PVS naváže na toluidinovou modř, v důsledku čehož dojde ke změně barvy roztoku z modré na červenou [2] s. 94.

I tato metoda má jisté nevýhody, zahrnující například fakt, že PVS musí být před použitím přečištěn dialýzou a kyselý roztok chitosanu je nutno přefiltrovat, aby byly odstraněny případné nerozpuštěné zbytky. U vzorků s nízkým stupněm acetylce ovšem nemusí vůbec dojít ke změně barvy ani k vysrážení, což může způsobit problémy při stanovení stupně deacetylce [4] s. 55.

**Konduktometrická titrace**

Princip konduktometrie spočívá v měření vodivosti roztoku v průběhu konduktometrické titrace, zatímco probíhá chemická reakce. Nejvíce vodivými ionty, které nejvýrazněji ovlivňují vodivost roztoku, jsou kationty  $H^+$  a anionty  $OH^-$  [2] s. 94.

Vzorek chitosanu se rozpustí v roztoku kyseliny chlorovodíkové a tento roztok je pak titrován hydroxidem sodným. Hodnoty vodivosti ( $mS \cdot cm^{-1}$ ) v závislosti na objemu titračního činidla jsou vyneseny do grafu, z něhož jsou patrné tři charakteristické úseky. První z nich má klesající trend a odpovídá neutralizaci přebytečné HCl (A-B). Druhý segment se pak vztahuje k neutralizaci amonných skupin (B-C) a třetí část charakterizuje přebytek báze (C-D). Rozdíl dvou průsečíků směrnic uvedené závislosti odpovídá množství zásady potřebné k neutralizaci amonných skupin (viz. obr. 5) [2] s. 94.



Obr. 5 Konduktometrická titrace vzorků chitosanu (2)

Procento aminoskupin reprezentovaných stupněm deacetylace se pak vypočte jako

$$\%DD = \frac{[báze](V_2 - V_1) \cdot 161}{m} \quad (1.3)$$

Kde [báze] je koncentrace roztoku NaOH v  $mol \cdot l^{-1}$  a  $V_1$  a  $V_2$  jsou objemy NaOH v ml. Číslo 161 pak představuje molární hmotnost monomeru ( $C_6H_{11}O_4N$ ) a  $m$  je hmotnost chitosanu v mg [2] s. 95.

### 1.4.3 Metody spektroskopické

#### *<sup>1</sup>H NMR spektroskopie*

Metoda nukleární magnetické spektroskopie (zkratka NMR z anglického Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy) využívá interakce atomových jader s magnetickým polem a umožňuje tak určit strukturu, složení a množství molekul zkoumané látky. Je založena na spinové rezonanci jader atomů s lichým počtem protonů nebo neutronů [21] s.1, [22] s. 2.

Při aplikaci této metody na stanovení stupně deacetylce byly vzorky chitosanu rozpuštěny v roztoku deuterium chloridu (DCI/D<sub>2</sub>O), při pH 4 [23] s. 7. Sloučeniny deuteria se používají z toho důvodu, že touto metodou nejsou detekovány (spektroskop detekuje jen atomy s lichým součtem protonů a neutronů v jádře [24] s. 171). Vzorky se následně lyofilizují a vyhodnocují na NMR spektroskopu. Stupeň deacetylce se pak stanoví z plochy příslušného signálu. Výhodou je velmi krátká doba vyhodnocení a potřeba jen malého množství materiálu pro analýzu. Tento postup je však použitelný jen u rozpustných vzorků [23] s. 7.

Stupeň deacetylce chitosanu je také možno zjistit pomocí <sup>13</sup>C a <sup>15</sup>N NMR spektroskopie, při níž lze analyzovat i vzorky v pevné fázi, avšak zásadní nevýhodou je vysoká cena a dlouhá doba měření (2) s. 95.

#### *UV-VIS Spektroskopie*

Metoda ultrafialovo-viditelné spektroskopie využívá měření absorpce světla měřenou látkou v ultrafialové a viditelné oblasti světla (od 200nm do 800 nm) [25] s. 61.

Existuje několik postupů jak stanovit stupeň deacetylce pomocí této metody. Nejdříve je potřeba vytvořit kalibrační křivku se známou koncentrací, podle které se pak stanoví stupeň acetylce (deacetylce) neznámého vzorku. Křivku můžeme získat přípravou kontrolního vzorku, rozpuštěním čistého chitinu a chitosanu v 0,85% kyselině fosforečné. Čistá 0,85% kyselina fosforečná pak funguje jako referenční kapalina. Postupně se přidává čistý chitosan a chitin v přesně definovaných koncentracích.

Další možností tvorby křivky je rozpustit vzorky, obsahující různé poměry čistého chitinu a chitosanu, ve vodném roztoku kyseliny chlorovodíkové (v koncentraci 0,1 mol.dm<sup>-3</sup>). Kalibrační křivka se pak vytvoří vynesemím vztahu mezi absorbcí vzorku a stupněm deacetylce.

Zjištění stupně deacetylce neznámého vzorku chitosanu se pak provede tak, že se rozpustí ve stejné kyselině, jako tomu bylo při tvorbě křivky. Po změření se absorbance neznámého vzorku je s pomocí kalibrační křivky možné zjistit stupeň deacetylce neznámého vzorku [23] s. 8.

### **IR spektroskopie**

V tomto případě se jedná o infračervenou spektroskopii. Princip této metody je podobný jako v případě US-VIS spektroskopie. Rozdíl je pouze v tom, že tomto případě se měří absorpce infračerveného záření při průchodu vzorkem [25] s. 3.

Její zásadní nevýhodou je reprodukovatelnost jejich výsledků. Při stanovení stupně deacetylce, mohou být hodnoty absorbance ovlivněny vlhkostí. V některých situacích může docházet k interferenci spektrometrem vysílaného signálu, se signálem vycházejícím z chitosanu. Stejně tak počáteční nastavení spektroskopie je problematické a z velké části závislé na zkušenostech obsluhy. Proto se IR spektroskopie doporučuje jen pro hrubé stanovení stupně deacetylce [23] s. 10.

#### **1.4.4 Metody hydrolytické**

##### **Kyselá hydrolýza**

Při tomto způsobu se známé množství chitosanu hydrolyzuje hydroxidem sodným a pak se k němu přidá kyselina fosforečná. V důsledku toho vznikne kyselina octová, která se pak destiluje a po přidání horké destilované vody se příslušné podíly titrují 0,01N hydroxidem sodným za použití indikátoru fenolftaleinu [2] s. 95. Stupeň acetylce se pak vypočte jako

$$\%DA = \frac{V \cdot 0,04305}{m} \quad (1.4)$$

Kde:

- $\%DA$  stupeň acetylce
- $V$  objem hydroxidu sodného vynásobený deseti
- $m$  hmotnost chitosanu



Nevýhodou tohoto postupu je značné množství kroků nutných k dosažení výsledku. Na druhou stranu není vyžadována nákladná aparatura a používají se snadno dostupné chemikálie [2] s. 96.

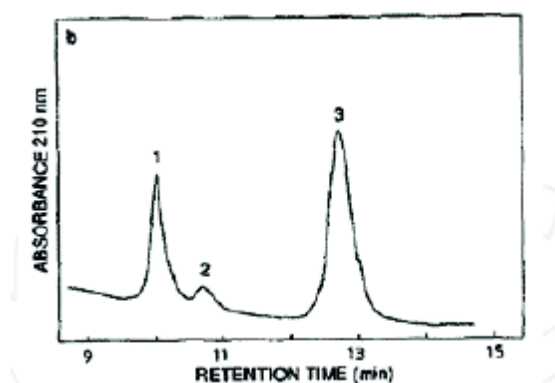
Pro stanovení stupně deacetylace kyselou hydrolyzou lze také využít HPLC. V takovém případě se nejdříve vzorek chitosanu hydrolyzuje ve vodném roztoku kyseliny sírové, šťavelové a propionové, a to při 155°C po dobu jedné hodiny. Po zchladnutí se pak vzorek filtruje, aby mohl být následně analyzován v HPLC. Kalibrační křivka se vytvoří pomocí různých koncentrací kyseliny octové [2] s. 96. Stupeň acetylce se vypočítá dle vzorce 1.5.

$$\%DA = \frac{161 \cdot M}{43 - 42 \cdot M} \cdot 100 \quad (1.5)$$

Kde:

- %DA stupeň acetylce
- $M$  podíl uvolněných acetylových skupin získaných kyselou hydrolyzou, k hmotnosti organického materiálu
- 161 molární hmotnost 2-amino-2-deoxy-D-glukosy
- 43 molární hmotnost acetylových skupin

Příklad HPLC chromatogramu je znázorněn na obr. 6.



Obr. 6 Ukázka HPLC chromatografie – reakce ve směsi chitosanu 1 – kyselina mravenčí, 2 – kyselina octová, 3 – kyselina propionová (2)

Tato metoda má řadu nevýhod, které zahrnují potřebu stanovení obsahu vody a anorganických látek ve vzorku před samotnou analýzou, dále pak delší dobu přípravy i samotné analýzy. Může také docházet k degradaci vzorku při hydrolyze za vysoké teploty, je nutno zajistit vhodnou kolonu odolnou vůči kyselinám stanovit kalibrační křivky pro různé koncentrace kyseliny octové. Výhodou pak je použitelnost pro kompletní rozsah

stupně deacetylace a lepší dostupnost vybavení v porovnání např. s NMR spektroskopií a fakt, že lze stanovovat i nerozpustné vzorky chitosanu [2] s. 96.

### **Enzymatická hydrolýza**

Při tomto způsobu zjištění stupně deacetylace se chitosan hydrolyzuje za působení směsi exo- $\beta$ -D-glukosaminidázy,  $\beta$ -N-acetylhexosaminidázy a chitosanázy. Množství D-glukosaminu a N-acetyl-D-glukosaminu se pak stanoví pomocí kolorimetrie a HPLC chromatografie. Plochy píků jsou pak převedeny na molární koncentrace a porovnány s chromatogramy D-glukosaminu a N-acetyl-D-glukosaminu. Vzorec pro výpočet stupně deacetylace je následující [2] s. 97.

$$\%DD = 100 \cdot \frac{DG}{DG + NADG} \quad (1.6)$$

Kde

- *DD* stupeň deacetylace
- *DG* koncentrace D-glukosaminu v  $\mu\text{mol/ml}$
- *NADG* koncentrace N-acetyl-D-glukosaminu v  $\mu\text{mol/ml}$

Nevýhodou této metody je, že je použitelná pouze pro vzorky rozpustné v 2% vodném roztoku kyseliny octové. Také je potřeba mít standardy D-glukosaminu a N-acetyl-D-glukosaminu. Výsledky mohou být ovlivněny přítomností nečistot v enzymových extraktech. Výhodou jsou poměrně nízké náklady delší životnost kolony chromatografu, v porovnání s kolonou používanou při kyselé hydrolýze [2] s. 97.

### **Pyrolýza - plynová chromatografie**

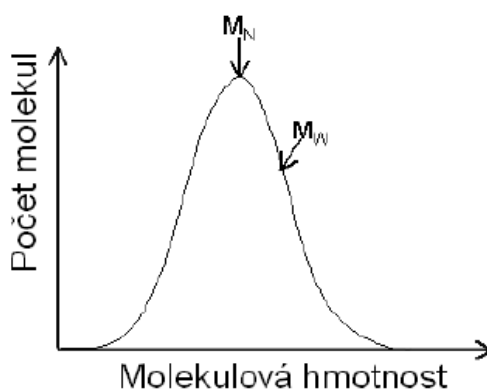
Pro zjištění stupně acetylce se používá kombinace plynového chromatografu s plamenovým ionizačním detektorem (FID) a vertikální mikropečí pyrolyzátoru [2]. Chitosan se rozpustil ve vodném roztoku kyseliny šťavelové, následně je v pyrolyzátoru zahříván při teplotě 450°C v atmosféře helia. Je používána speciální kovová kapilární kolona, potažená polyethylenglykolem. Jako standard se využívá N-acetyl-D-glukosamin [2] s. 97.

Nevýhodou je, že výsledný stupeň acetylce může být ovlivněn kontaminací uhlovodany nebo přebytkem kyseliny šťavelové. Dále dochází k rychlejšímu zkracování životnosti kolony vlivem kyseliny. Navíc, vzorek v důsledku pyrolýzy podléhá destrukci. Naopak

výhodou je, že metoda je použitelná pro celý rozsah stupně acetylace, je zapotřebí jen malé množství vzorku a doba analýzy je krátká [2] s. 97.

### 1.5 Stanovení molekulární hmotnosti chitosanu

Molekulová hmotnost  $\bar{M}$  je významnou charakteristikou polymerů, která určuje jejich chování v různých podmínkách. Polymery jsou polydisperzní systémy, tvořené makromolekulami o různé molekulové hmotnosti. Proto se stanovuje střední (průměrná) hodnota molekulové hmotnosti  $\bar{M}$  z tzv. distribuční křivky, která vyjadřuje závislost hmotnostního zlomku polymeru o dané velikosti makromolekuly na jeho molekulové hmotnosti [26] s. 37 (obr. 7).



Obr. 7 Distribuční křivka molekulárních hmotností [27] s. 11

Pokud se molární hmotnost stanovuje pomocí veličin úměrných hmotnosti nebo objemu částice, jedná se o hmotnostně střední molekulovou hmotnost  $\bar{M}_w$ . V případě, že se měří sedimentační rovnováha, jedná se pak o z-průměr molekulových hmotností  $\bar{M}_z$ . Pokud jsou měřeny koligativní vlastnosti, pak se hovoří o početně střední molekulové hmotnosti  $\bar{M}_N$ . Měřením viskozity se získá tzv. viskozitní průměr molekulových hmotností  $\bar{M}_\eta$ . [28] Pro tyto molekulové hmotnosti pak platí vztah:

$$\bar{M}_N < \bar{M}_\eta < \bar{M}_w < \bar{M}_z \quad (1.7)$$

Molekulová hmotnost chitosanu je tedy další významnou charakteristikou, která poskytuje informace o jeho vlastnostech, jako je rozpustnost, krystalinita, degradace, pevnost v tahu a obsah vlhkosti [20] s. 1400. Nuthanid a kol. prokázali podstatně lepší tahové a adsorpční vlastnosti vysokomolekulárního chitosanu (600 až 1000 kg.mol<sup>-1</sup>) než u nízkomolekulárního vzorku (50 až 60 kg.mol<sup>-1</sup>) se stejným stupněm deacetylace [29] s. 144. Další studie potvrdila, že s rostoucí molekulovou hmotností chitosanu se zvyšuje

schopnost enkapsulace a zpomaluje se kinetika uvolňování [30] s. 641. Podobné výsledky byly potvrzeny i dalšími autory [31] s. 53, [32] s. 379.

Jedním z nejběžnějších způsobů zjištění molekulární hmotnosti je gelová chromatografie, při níž se využívá kalibrační křivky získané pro polysacharid pullulan. Ovšem molekulové hmotnosti chitinu a chitosanu nemohou být touto metodou přímo porovnány, jelikož neexistuje systém rozpouštědel, který by dokázal rozpustit oba tyto polymery zároveň [33] s. 11.

Další možností pro stanovení molekulární hmotnosti je využití mnohoúhlového rozptylu světla přes měřený vzorek. Velikost molekulární hmotnosti lze pak odvodit pomocí Zimmových grafů, vytvořených pro různé koncentrace vzorku (viskozita vzorku nesmí být příliš vysoká). Výsledky závisí na čistotě vzorků a přesnost měření se pohybuje v rozmezí  $\pm 10\%$  [33] s. 11.

Molekulární hmotnosti chitosanu se často stanovuje pomocí měření vnitřní viskozity, jejíž vztah s molekulovou hmotností polymeru udává Mark-Houwinkova rovnice (1.8) [34] s. 37

$$[\eta] = K \cdot \overline{M}_\eta^a \quad (1.8)$$

Kde

- $[\eta]$  kinematická viskozita roztoku
- $\overline{M}_\eta$  viskozitní průměr molekulové hmotnosti polymeru
- $K, a$  konstanty pro určitý systém polymer – rozpouštědlo při definované teplotě

Při tomto postupu je důležité sledovat koncentraci solí v roztoku, neboť ty (hlavně při nízkých koncentracích) mohou výrazně ovlivnit výslednou hodnotu viskozity [33] s. 11.

## 2 TENZIDY

Tenzidy, neboli povrchově aktivní látky (PAL), patří do skupiny organických látek, které nacházejí uplatnění v mnoha odvětvích průmyslu. Důvodem jsou jejich vlastnosti dané specifickou amfipatickou strukturou, pro niž je charakteristická přítomnost hydrofilní a hydrofobní části v molekule. Díky tomu jsou tenzidy schopny se již při nízkých koncentracích adsorbovat na fázových rozhraních a měnit tím jejich povrchovou, resp. mezifázovou volnou energii [35] s. 1.

### 2.1 Dělení tenzidů

Tenzidy je možno klasifikovat podle různých kritérií, jako například podle aplikace, HLB hodnoty (hydrofilně-lipofilní rovnováha), biologické degradability atd. Nejčastější je ovšem rozdělení podle charakteru hydrofilní části na tenzidy neionické a ionické, které lze dále dělit na látky anionické, kationické a amfoterní [36] s. 7.

#### 2.1.1 Anionické tenzidy

Jedná se o látky, které mají ve vodném roztoku povrchově aktivní záporně nabitý organický anion a neaktivní kation. Tento druh tenzidů má výborné detergenční schopnosti, která se nejlépe projeví v mírně alkalickém prostředí [36] s. 7. Nejběžnějšími typy anionických tenzidů jsou sulfáty, sulfonáty, karboxyláty, v menší míře fosfáty a estery kyseliny fosforečné [37] s. 7.

Soli karboxylových kyselin (mýdla), jejichž výhodou je výroba z poměrně dobře dostupných přírodních obnovitelných zdrojů, patří mezi nejstarší používané tenzidy. Jsou připravovány z tuků a olejů, nebo z mastných kyselin o různé délce řetězce (např. olejová, stearová, palmitová, laurová, aj.), které jsou následně neutralizovány nejčastěji na sodné nebo draselné soli. Hlavní nevýhodou karboxylátů je jejich citlivost vůči iontům tvrdé vody a nízkému pH, kdy dochází ke ztrátě jejich povrchové aktivity [38] s. 39.

S narůstající dostupností alternativních surovin se vyvinuly sulfátové a sulfonátové tenzidy, které splňovaly požadavky neustále se rozvíjejícího průmyslu. Sulfátové PAL, tedy estery kyseliny, mohou být vyráběny z mastných alkoholů, mastných kyselin, nebo tuků a olejů. Vykazují dobrou rozpustnost ve vodě a vysokou povrchovou aktivitu i v kyselém prostředí. Významným reprezentantem je lauryl(dodecyl) sulfát sodný, známý pod zkratkou SDS [38] s. 51. Skupina sulfonátů (solí kyseliny sulfonové) zahrnuje

parafinické a ropné sulfonáty, olefin sulfonáty, dále alkylarylsulfonáty (zde se řadí i jeden z neznámějších tenzidů alkylbenzen sulfonát sodný) a další [38] s. 54. Hydrofilní a hydrofobní část může být spojena prostřednictvím můstků, nejčastější typy jsou můstky esterický, etherický nebo amidický. Výslednými produkty pak jsou N-acyl-N-alkyltauriny, estery sulfosukcinátu atd., které mohou mít další zvýhodněné charakteristiky (například lepší rozpustnost ve vodě aj.) [38] s. 55.

### 2.1.2 Kationické tenzidy

Kationické tenzidy ve vodném roztoku disociují na kladně nabitý kation a na rozdíl od svých anionických a neionických protějšků jsou produkovány v menším rozsahu a využívány spíše pro specifické aplikace. Důvodem je jejich právě kladný náboj jejich hydrofilní části, díky němuž se pak silně adsorbují na většinu (negativně nabitých) substrátů. Nejsou tedy aplikovány jako klasické detergenční přípravky, ale v praxi se využívá jejich germicidních účinků pro nejrůznější dezinfekční a léčebné prostředky. Mimo to mají význam pro své antistatické a kondicionační vlastnosti, tzn. bývají součástí avivážních prostředků a kondicionérů v kosmetice [36] s. 10. Vyskytují se ve formách primárních až kvarterních aminů, přičemž nejběžnější jsou typy s 8 až 18 atomy uhlíku v řetězci. Poslední jmenovaná skupina, známá jako kvarterní amoniové sloučeniny (KAS), patří mezi významné složky komerčních dezinfekčních prostředků [36] s. 10.

### 2.1.3 Amfoterní tenzidy

Amfoterní tenzidy mají jak bazickou, tak kyselou hydrofilní skupinu, jejichž výsledný náboj je závislý na pH prostředí. Jejich výhodou je možnost kombinovat je s ostatními typy tenzidů a dobrá kompatibilita s pokožkou a sliznicemi, což je předurčuje pro použití v kosmetických produktech. Nevýhodou pak je nerozpustnost ve většině organických rozpouštědel [36] s. 10. Patří sem deriváty imidazolinu, betainy a sulfobetainy, deriváty aminokyselin a další [38] s. 74.

### 2.1.4 Neionické tenzidy

Zástupci těchto tenzidů ve vodném roztoku nedisociují na ionty (jsou tedy elektricky neutrální) a jejich rozpustnost je pak dána pomocí funkčních skupin v molekule, které mají vysokou afinitu k vodě. Neionické tenzidy se používají v mycích, čistících, ale také v kosmetických přípravcích [36] s. 11. Jejich největší výhodou je stabilita v celém rozsahu pH a kompatibilita s jinými tenzidy. Nejstaršími reprezentanty této skupiny jsou deriváty polyoxyetylenů, které jsou využívány mimo jiné jako emulgátory v potravinářství a kosmetice. Významnou rozvíjející se skupinu představují alkylnepolyglykosidy, získávané z přírodních obnovitelných surovin, které jsou díky tomu lehce biologicky odbouratelné. Jsou využívány v mycích a čistících prostředcích, dále pak jako emulgátory v kosmetice [39] s. 424.

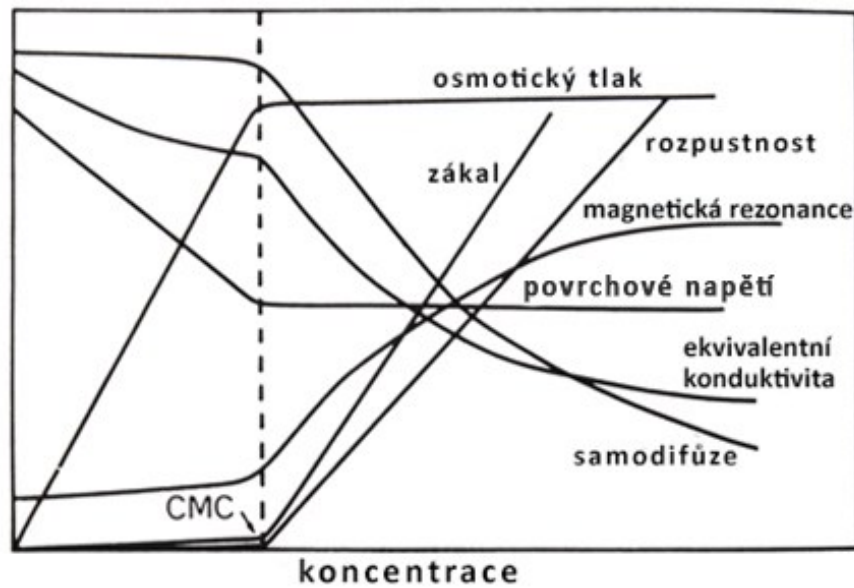
## 2.2 Tvorba micel

Zásadní vlastností tenzidů je schopnost tvořit micely, tj. agregáty koloidních rozměrů, které se začínají tvořit ve vodném roztoku, pokud koncentrace tenzidu překročí tzv. kritickou micelární koncentraci (CMC). Na procesu tvorby micel (micelizace) závisí řada významných jevů, probíhajících na fázových rozhraních, jako je detergence a solubilizace [35] s. 105.

### 2.2.1 Stanovení kritické micelární koncentrace

Počátek tvorby micel lze odhadnout ze závislosti různých fyzikálních veličin na koncentraci tenzidu v roztoku. V oblasti kritické micelární koncentrace (CMC) dochází totiž ke zlomům v grafech těchto závislostí, jak je patrné z obr. 8. Běžně se využívá měření povrchového napětí, dále pak měření vodivosti, viskozity, solubilizace atd. Hodnota CMC je ovlivňována řadou faktorů, jako je struktura tenzidu, zejména pak charakter hydrofobního řetězce, dále povaha protiontu, přídavek elektrolytů atd. [35] s. 120.

Pokles hodnoty CMC u ionických tenzidů je dán hlavně tím, když se ztenčí ionická vrstva kolem hlavové skupiny tenzidu. Výsledkem je, že zmenší odpudivé síly mezi micelami. To se může stát například přidáním elektrolytu [35] s. 145.

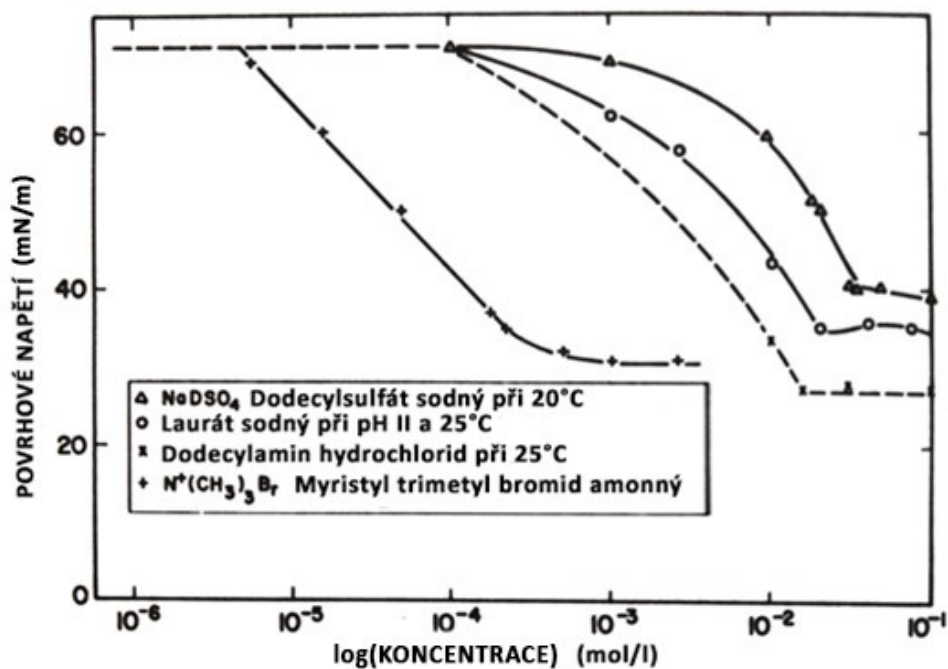


Obr. 8 Změna různých fyzikálních vlastností v oblasti CMC [37]

### Měření povrchového napětí

Při měření závislosti povrchového napětí na koncentraci tenzidu dochází při dosažení CMC k charakteristickému zlomu, po němž se hodnoty povrchového napětí ustalují. Povrchová aktivita je totiž dána pouze adsorpcí jednotlivých monomerů tenzidu. Typický průběh závislosti povrchového napětí na koncentraci (přesněji na logaritmu koncentrace) pro vybrané PAL je znázorněn na obr. 9.





Obr. 9 Závislost povrchového napětí na koncentraci PAL [37]

Povrchové napětí lze měřit pomocí celé řady metod, jako například metody stalagnometrické, kapilární elevace a metod odtrhvacích, kam spadá Wilhelmyho metoda. Princip Wilhelmyho metody spočívá ve využívání platinové destičky o definovaných rozměrech. Ta se upevní na vahadlo vah a ponoří do studované kapaliny. Z obou stran platinové destičky se tvoří menisky. Při vytažení vzhůru na destičku působí síla  $F$ , která se postupně zvyšuje a v okamžiku před jejím odtržením dosahuje maxima. Pro povrchové napětí pak platí vztah:

$$\gamma = \frac{F}{2 \cdot l \cdot \cos \theta} \quad (2.1)$$

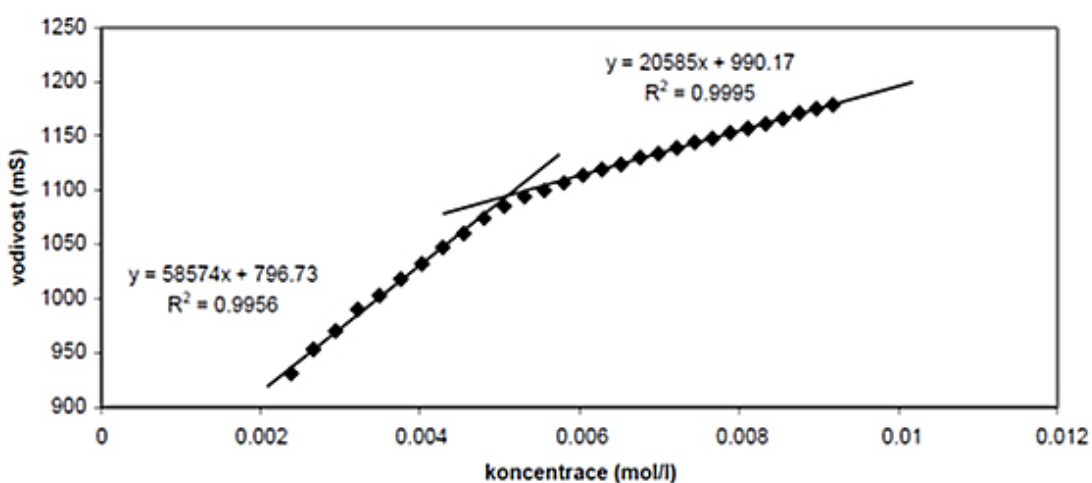
Kde:

- $\gamma$  povrchové nebo mezifázové napětí
- $l$  délka destičky
- $F$  síla při odtržení destičky
- $\theta$  úhel smáčení

### Měření konduktivity

Konduktometrie je elektroanalytická metoda založená na měření vodivosti iontů ve roztoku. Velikost konduktivity závisí na počtu iontů v roztoku, na jejich náboji, pohyblivosti a teplotě roztoku [40] s.1.

Pro stanovení hodnoty CMC lze využít metodu konduktometrické titrace, která je ovšem omezena pouze na měření ionických tenzidů. Principem je rozdílná pohyblivost jednotlivých molekul PAL a z nich tvořených micel, což se projeví ve změně směrnice. Z průsečíku obou lineárních úseků lze pak stanovit hodnotu CMC (obr. 10) [41] s. 1.



Obr. 10 Příklad funkční závislosti koncentrace na vodivosti při konduktometrické titraci pro čistý tenzid [41]

### 2.2.2 Charakteristika micel

Micely jsou dynamické útvary, které mohou měnit své uspořádání v závislosti na podmínkách. Klasická micela, tvořená běžnými molekulami PAL ve vodném prostředí, má sférický tvar, v němž jádro je zastoupeno uhlovodíkovými řetězci a vnější obal tvoří hydrofilní skupiny. Zvyšováním koncentrace PAL v roztoku vznikají složitější útvary – válcovité, tyčinkovité, lamelární micely.

Tvorba micel je podmíněna eliminací kontaktů mezi vodou a uhlovodíkovými částmi, přesto k určitému kontaktu dochází blízko předpokládaného rozhraní mezi oběma fázemi. Význam v tomto případě má poloměr jádra micely a plocha, kterou na povrchu zaujímá

jedna hydrofilní skupina. Z toho důvodu byl zaveden tzv. kritický agregační parametr (z ang. critical packing parameter), vypovídající o geometrii micely (vzorec) [36] s. 43.

$$CPP = \frac{V}{a_0 \cdot l_c} \quad (2.2)$$

Kde

- $V$  objem hydrofobní části molekuly
- $a_0$  plocha povrchu hydrofobní části
- $l_c$  maximální (kritická) délka hydrofobního řetězce

Přehled předpokládané struktury vzniklého agregátu v závislosti na hodnotách CPP je uveden v tab. 3 z [38] s. 126.

Tab. 3 Typ agregátů v závislosti na CPP [38]

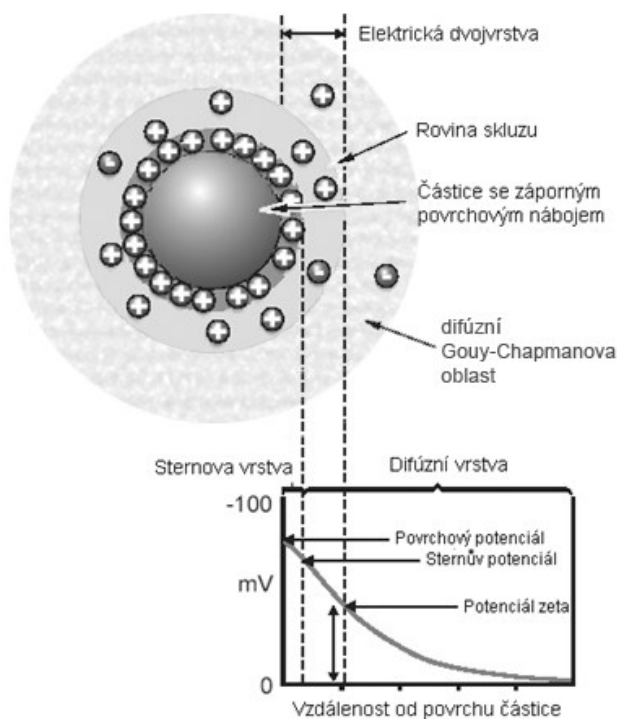
CPP	Všeobecný typ tenzidu	Očekávaná struktura agregátu
<0,33	Běžné tenzidy s jednoduchými řetězci a poměrně velkými hydrofilními skupinami	Sférické micely
0,33-0,5	Běžné tenzidy s malými hydrofilními skupinami	Válcové nebo tyčinkové micely
0,5-1,0	Tenzidy s dvojitými řetězci s velkými hydrofilními skupinami	Vezikuly a pružné dvouvrstvé struktury
1,0	Tenzidy s dvojitými řetězci s menšími hydrofilními skupinami	Plošné dvouvrstvé struktury
>1,0	Tenzidy s dvojitými řetězci s malými hydrofilními skupinami	Obrácené nebo inverzní micely

Další důležitou charakteristikou micel je agregační číslo, které vyjadřuje počet molekul PAL, tvořící jednu micelu. Agregační číslo závisí na mnoha interních (hydrofobní struktura, typ hlavové skupiny...) a externích (teplota, tlak, pH...). Obecně platí, že s rostoucí délkou hydrofobního řetězce se agregační číslo zvyšuje a naopak klesá s narůstající plochou, kterou zabírá na povrchu micely jedna hydrofilní skupiny. Další faktory zahrnují přidavek organických látek (které nejsou povrchově aktivní), vliv teploty aj. [38] s. 130.

Agregační číslo je možné stanovit mnoha způsoby, jedním z nejběžnějších je měření fluorescence vzorků. U této metody je potřeba znát koncentraci micel v měřeném vzorku. Další metody stanovení agregačního čísla zahrnují např. rozptyl světla, sedimentaci při ultraodstředování, měření rozptylu rentgenových paprsků, proudu neutronů nebo NMR [37] s. 34.

### 2.2.3 Elektrická dvojrstva a zeta potenciál

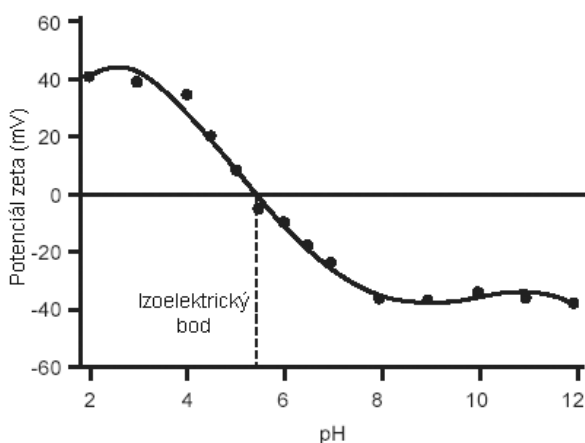
Elektrická dvojrstva je útvar složený ze dvou opačně nabitých vrstev, které vznikají při styku nabitě částice objemovou fází roztoku. K nabití povrchu částice může dojít ionizací skupin povrchových molekul nebo adsorpcí iontů přítomných v disperzním prostředí [40] s. 24. Schéma částí elektrické dvojrstvy je znázorněno na obr. 11. Pro popis elektrické dvojrstvy bylo vypracováno několik modelů. Podle Sternova uspořádání kolem každé nabitě částice ve vodném roztoku existuje vnitřní, Sternova vrstva, ve které jsou jednotlivé ionty mezi sebou silně vázány, a vnější difúzní (Gouy Chapmanova) vrstva s volně vázanými ionty. Hranice mezi těmito vrstvami se nazývá rovina skluzu a elektrický potenciál na této hranici se značí jako zeta potenciál [42].



Obr. 11 Schéma elektrické dvojrstvy nabitě částice [42]

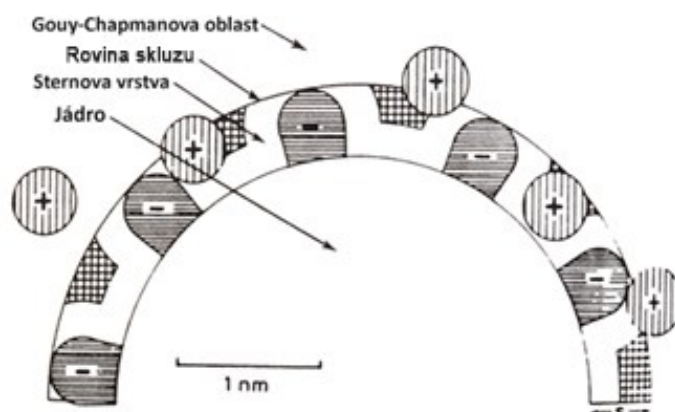
Velikost zeta-potenciálu vypovídá o stabilitě koloidního systému. Jestliže mají částice velký záporný nebo kladný zeta potenciál, pak se logicky budou od sebe odpuzovat.

Naopak, v případě nízké hodnoty zeta potenciálu, budou mít tendenci ke shlukování. Zásadním faktorem, ovlivňujícím hodnotu zeta potenciálu, je pH. Obecně platí, že v kyselém prostředí bude hodnota zeta potenciálu kladná a s rostoucím pH bude klesat. Hodnota pH, kdy bude mít roztok nulový zeta potenciál, se nazývá izoelektrický bod a v tomto bodě je koloidní systém obecně nejméně stabilní. [42]



Obr. 12 Závislost zeta potenciálu na pH [42]

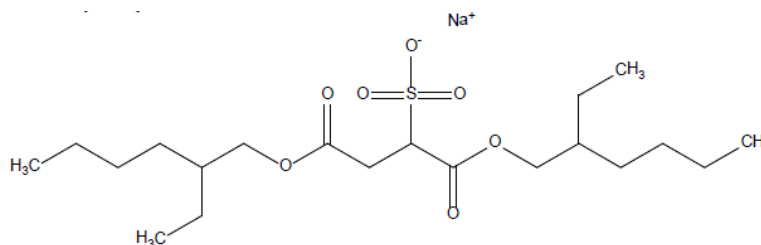
Na obr. 13 je znázorněna elektrická dvojvrstva na příčném řezu micelou anionického dodecyl sulfátu sodného. V případě ionických tenzidů je právě část protiontů silně vázána k povrchu micely (Sternova vrstva), díky kterým je povrch micely stabilizován. Zbytek protiontů je pak vázán v Gouy-Chapmanově oblasti [37] s. 105.



Obr. 13 Příčný řez micelou dodecylsulfátu sodného [37]

### 3 DIOKTYLSULFOSUKCINÁT SODNÝ

Dioktylsulfosukcinát sodný (přesně 1,4-bis(2-ethylhexyl)-1,4-dioxobutan-2-sulfonát sodný;  $C_{20}H_{37}NaO_7S$ ) patří mezi anionické tenzidy a v literatuře je označován mnoha zkratkami, jako například DSS, DOSS, Aerosol OT nebo AOT (v dalším textu bude využívána zkratka DSS). Jedná se o téměř bílou, voskovitou látku, hořké chuti a vůni po oktanolu. Je uveden v seznamu základních léků Světové zdravotnické organizace (WHO) [43] s. 3. Ve své molekule obsahuje dva hydrofobní řetězce navázané esterickou vazbou na jádro sulfojantaranu (obr. 14). Fyzikální a chemické vlastnosti jsou shrnuty v tabulkách 5 a 6.



Obr. 14 Struktura molekuly DSS (27) s. 11

Tab. 4 Fyzikální vlastnosti DSS [44] s. 3

Vlastnost	Hodnota	Jednotka
<b>Molekulární hmotnost</b>	444,56	$\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$
<b>Teplota tání</b>	153-157	$^{\circ}\text{C}$
<b>Hustota</b>	1,1	$\text{g}\cdot\text{m}^{-3}$

Tab. 5 Chemické vlastnosti DSS [44] s. 3

Vlastnost	Hodnota
<b>Rozpustnost</b>	Mírně rozpustný ve vodě, dobře rozpustný v organických rozpouštědlech (alkohol, glycerol, hexan)
<b>Stabilita</b>	Stabilní v kyselinách a neutrálních roztocích, hydrolyzuje v alkalických roztocích

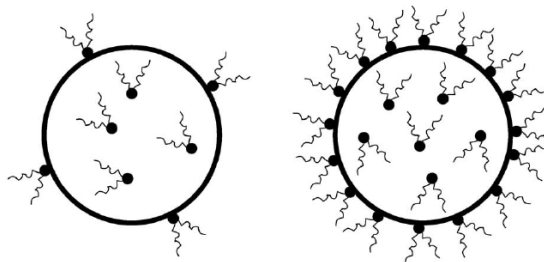
DSS je díky významné povrchové aktivitě využíván v řadě aplikací, například jako stabilizátor mikroemulzí bez nutnosti přídavku kosurfaktantu, dále jako disperzní činidlo v

ropném průmyslu, smáčedlo v pesticidních přípravcích a nosič léčebných látek ve farmaceutických aplikacích [45] s. 1, [38] s. 61.

V roce 1994 byla stanovena společností Cosmetic Ingredient Review Expert Panel bezpečná koncentrace DSS 0,42 %. V roce 1998 pak byl, na základě klinických studií, schválen jako bezpečný pro použití v kosmetických přípravcích [44] s. 3. Dioktysulfosukcinát sodný bývá běžně používán ve vlasových sprejích, koncentrace se pohybuje od 0,15 do 0,25 % [44] s. 3.

Ve vodném prostředí tvoří DSS klasické micely, při vzrůstající koncentraci pak hexagonální nebo lamelární útvary. Velikost a tvar agregátů DSS ve vodném roztoku je možné ovlivnit přidáním dalších sloučenin. Fajalia a kol. [46] studoval vliv cyklodextrinu na vlastnosti a intermicelární interakce DSS. Byl prokázán vznik stechiometrického komplexu mezi DSS a cyklodextrinem, čímž došlo ke snížení hydrofobicity molekul PAL. Část vytvořených komplexů zůstala v roztoku, což mělo za následek zvýšení efektivní kritické micelární koncentrace. Došlo ke snížení agregačního čísla, zmenšení micel a změně tvaru z elipsoidního na sférický.

DSS je specifický tenzid, u kterého dochází ve vodném roztoku již při malé koncentraci elektrolytu ke změně tvaru micel a tedy i ke změně konstanty charakterizující stupeň vázání protiontů. Dey a kol. studovali vliv  $\text{NH}_4\text{Cl}$  na chování DSS v roztoku a zjistili, že uvedené speciální chování vázání protiontů se projevuje i v přítomnosti jiných než sodných protiontů [47] s. 1. V práci Boukery a kol. [48] s. 303 byly studovány povrchové vlastnosti a konduktivita polymerní směsi na bázi polypyrolu (PPy; černý prášek podobný sazímu, je vodivý a nerozpustný ve většině organických rozpouštědel) a ethylhexyl sulfosukcinátu (DSS) za přítomnosti  $\text{FeCl}_3$  jako oxidačního činidla. Pomocí příslušných technik (rentgenová fotoelektronová spektroskopie, elementární analýza) byla sledována distribuce DSS ve struktuře polymerních částic. Výsledky odhalily, že při nízkých koncentracích DSS fungoval jako legovací látka zlepšující stabilitu směsi, při vyšším obsahu působil jako povrchově aktivní látka, vzhledem ke zvýšené adsorpci jednotlivých molekul v povrchových vrstvách polymerního prášku (obr. 15). Přídavek DSS ovlivnil také morfologické vlastnosti produktu, kdy byl získán kompaktnější prášek s menšími částicemi PPy. Navíc, výsledný prášek vykazoval o řád vyšší konduktivitu v porovnání s polymerem bez přítomnosti tenzidu. Optimální poměr PPy/DSS vzhledem k nejvyšší konduktivitě (27 S/cm) byl 7 [48] s. 313.



*Obr. 15 PPy/DSS částice při nízké (a)  
a vysoké (b) koncentraci DSS [48]*



## 4 INTERAKCE MEZI TENZIDY A POLYMERY

Studium interakcí mezi tenzidy a polymerními látkami se dostává do popředí zájmu mnoha vědeckých studií. Důvodem je skutečnost, že tyto dvě složky bývají kombinovány v řadě praktických aplikací zahrnujících chemický, kosmetický a farmaceutický průmysl. Výsledkem interakce mohou být změny mezifázových, reologických, spektroskopických a dalších fyzikálně-chemických vlastností, což ovlivňuje následné funkce a aplikace.

Při interakcích polymerů s povrchově aktivními látkami může docházet k jednoduché adsorpci (mezi jednotlivými molekulami PAL a polymerním řetězcem), nebo ke vzniku agregačních komplexů (mezi polymerem a micelami PAL) [38] s. 230.

Interakce mohou probíhat v heterogenní nebo homogenní fázi, přičemž vzhledem k předmětu diplomové práce budou další kapitoly směřovat na druhý zmíněný případ.

### 4.1 Metody sledování interakcí

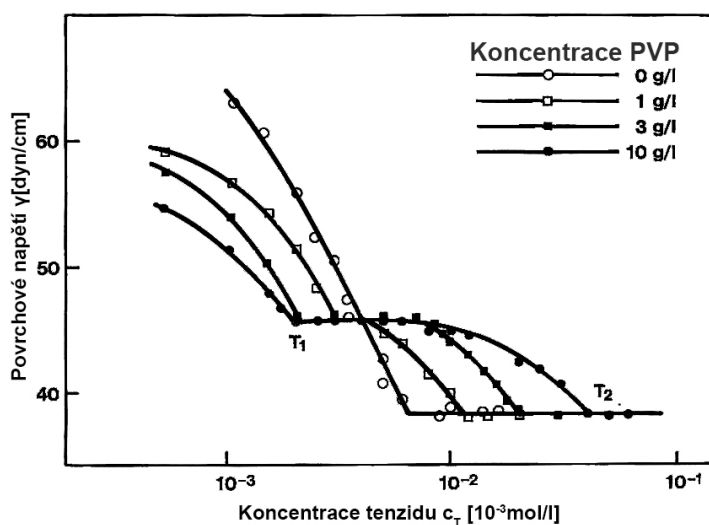
Jak již bylo řečeno, v důsledku interakcí mezi polymerními materiály a tenzidy dochází ke změně řady fyzikálně-chemických vlastností systému. Při studování těchto procesů se tedy často využívají techniky, jež jsou schopny tyto změny detekovat. Mezi nejrozšířenější patří měření povrchového napětí, elektrické konduktivity, solubilizace barviv, viskozity atd. Další možností je využití metod pro měření změn mezi interagujícími složkami na molekulární úrovni, jako například nukleární magnetická rezonance (NMR), kalorimetrická měření, metoda optické rotační disperze a další [37] s. 123.

#### 4.1.1 Měření povrchového napětí

Měření povrchového napětí je jedna z nejběžnějších metod pro zjištění interakce mezi polymerem a tenzidem ve vodném roztoku.

Principem je rozdílná závislost povrchového napětí v případě samotného tenzidu a v systému tenzid-polymer. Na obrázku 17 je znázorněna změna povrchového napětí směsi polyvinylpyrrolidonu a dodecylsírany sodného (PVP/SDS), s rostoucí koncentrací tenzidu s. 125 [37] s. 125.

Je zřejmé, že v systému PAL/polymer dochází také k poklesu povrchového napětí s rostoucí koncentrací tenzidu, ale první zlom na křivce se objevuje při koncentraci nižší než je běžná CMC. Tento bod (v obrázku T1) značí oblast tzv. kritické agregační koncentrace (CAC), která odpovídá počátku tvorby micel na polymeru (tzv. hemimicely).



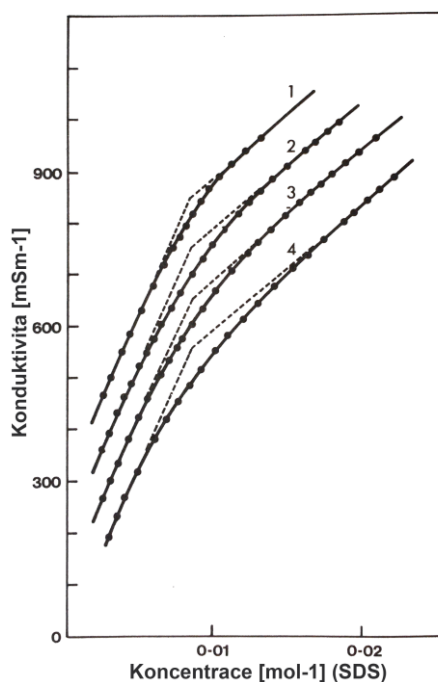
Obr. 16 Závislost povrchového napětí roztoku na koncentraci SDS v přítomnosti různých koncentrací PVP [37]

Od bodu  $T_1$  se s rostoucí koncentrací tenzidu v roztoku povrchové napětí po určitou dobu nemění, právě z důvodu tvorby výše zmíněných komplexů. K opětovnému poklesu povrchového napětí dochází až po nasycení polymeru micelami a výskytem dalších molekul PAL v roztoku (zvyšováním jejich koncentrace). Bod  $T_2$  pak znázorňuje oblast, kdy se začínají tvořit klasické micely a odpovídá tedy hodnotě CMC. Z obr. 16 je patrný i vliv rostoucí koncentrace polymeru na hodnotu CMC, která se zvyšuje. Důvodem je prodlužování doby vzniku komplexu polymer/tenzid při vyšším obsahu polymeru v systému. Minimální hodnotu povrchového napětí však přidaný polymer neovlivňuje [37] s. 126, [49] s. 1.

#### 4.1.2 Konduktometrie

Metodu konduktometrické titrace lze využít nejen pro stanovení CMC samotných ionických tenzidů (viz kapitola 2.2.1), ale i pro sledování interakcí mezi ionickými tenzidy a polymery.

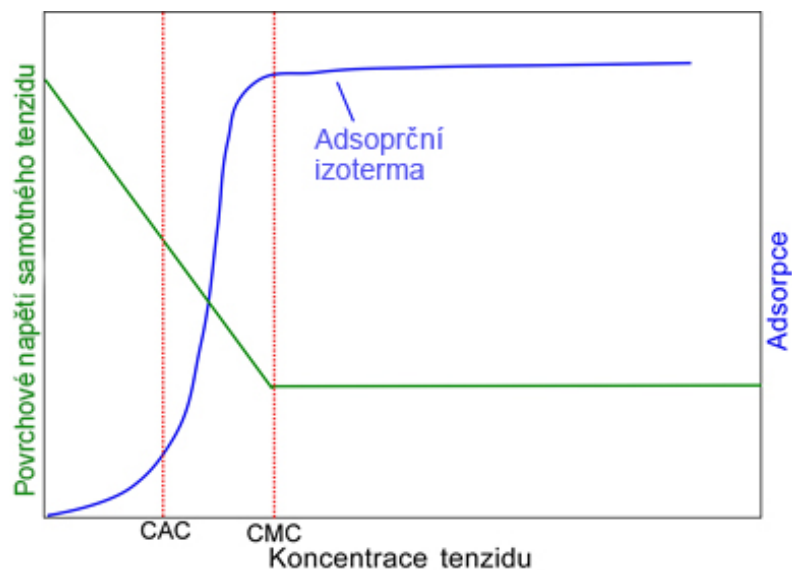
Na obr. 17 je zobrazen průběh konduktometrické titrace směsi PEO (polyetylenoxidu) a SDS. Je zřejmé, že střední část křivky přestává být lineární. Důvodem této přechodové oblasti je působení Coulombických a hydrofobních interakcí, ke kterým dochází mezi polymerem a tenzidem. Začátek a konec této nelineární části křivky odpovídají bodům  $T_1$  a  $T_2$  závislosti povrchového napětí (viz. obr. 16).



Obr. 17 Příklad funkční závislosti koncentrace  
na konduktivě pro PEO/SDS [37]

#### 4.1.3 Stanovení adsorpční izotermy

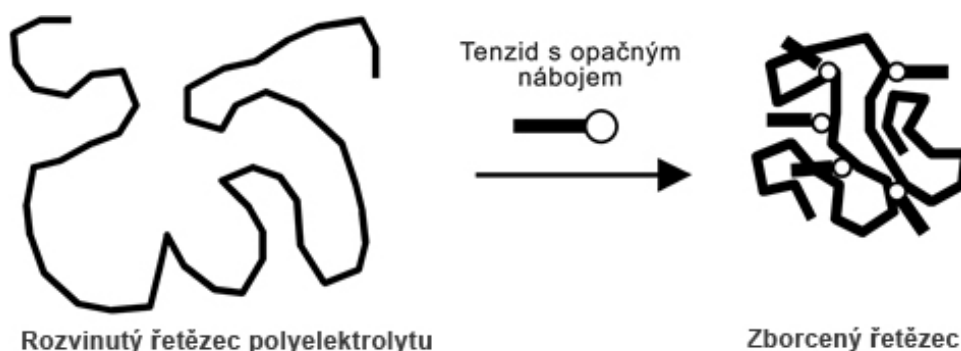
Křivka adsorpční izotermy znázorňuje závislost navázaného množství tenzidu na koncentraci volného tenzidu v roztoku. Během interakce dochází ke strmému nárůstu adsorpce. Z průběhu izotermy je pak možné stanovit jak kritickou agregační koncentraci (CAC), tedy koncentraci, kdy dochází k tvorbě hemicel s nižším agregačním číslem, tak kritickou micelární koncentraci (CMC), kdy dochází k ustálení hodnot (viz. obr. 18) [50] s. 24.



Obr. 18 Ukázka závislosti adsorpce na koncentraci pro neionický tenzid [51]

## 4.2 Interakce nabitý polymer – opačně nabitý tenzid

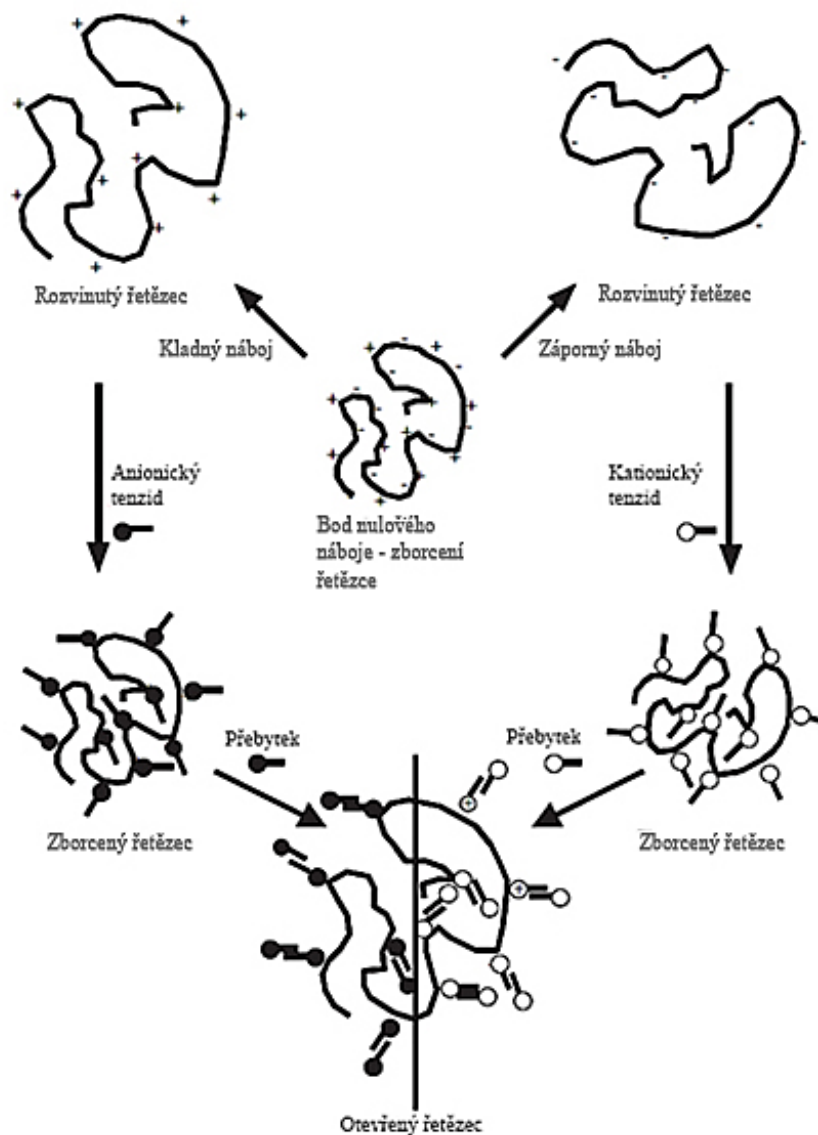
Interakce mezi nabitým polymerem a opačně nabitým tenzidem jsou založeny zejména na elektrostatických silách (obr. 19). Vlastnosti vzniklých agregátů mohou být modifikovány různými faktory, jako například hustotou náboje, délkou řetězce PAL, povahou a množstvím přidaných solí, atd. [52] s. 395. Výsledné systémy jsou pak využívány se v oblasti čisticích prostředků, při těžbě ropy, flotaci, při výrobě kosmetických přípravků aj. [53] s. 157.



Obr. 19 Schématický model interakce řetězce nabitého polymeru s opačně nabitým tenzidem [38]

Výsledkem těchto procesů je snížení celkového elektrického náboje komplexu, snížení rozpustnosti polymeru, které může vést až k oddělení fází [38] s. 232, [50] s. 24. Při dalších přídavcích molekul tenzidu do systému dochází k jejich interakci s elektricky neutrálním polymer/tenzidovým komplexem, jehož rozpustnost se opět zvyšuje a ve

výsledku vzniká komplex s nábojem, který odpovídá přidávanému tensid. Je tedy zřejmé, že v průběhu celého procesu mohou nastat zásadní změny ve viskozitě, rozpustnosti a změně náboje systému polymer/tenzid (obr. 20)



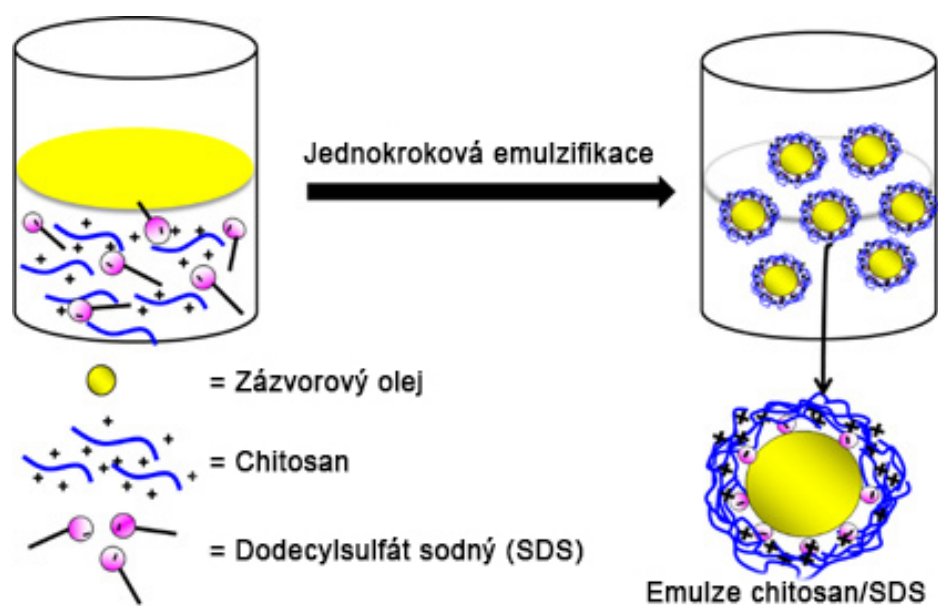
Obr. 20 Změna náboje a charakteru polymerního řetězce při interakci s opačně nabitým tensidem v závislosti na pH [38] s. 240

### 4.3 Interakce chitosan – anionický tenzid

Kationický chitosan může tvořit polyelektrolytové komplexy s opačně nabitými polymery (jako např. karboxymethylcelulóza) a anionickými tensidy (tzv. SPEC, z ang. surfactant/polyelectrolyte complexes [54] s. 1). Tyto komplexy, stabilizované

elektrostatickými a hydrofobními interakcemi, mohou vznikat již při koncentracích nižších, než je CMC a mohou být využity například ke stabilizaci emulzí v potravinářském, kosmetickém či farmaceutickém průmyslu [52] s. 395.

Sunintaboon a kol. studovali systém kationického chitosanu s anionickým dodecyl sulfátem sodným pro stabilizaci emulze v/o (voda v oleji). Olejová fáze byla tvořena extraktem zázvorového oleje. Bylo prokázáno, že uvedená jednkroková metoda umožňuje efektivně kontrolovat velikost kapek i stabilitu systému a připravit emulzi s potenciálním využitím v medicíně či kosmetice (obr. 21) [55] s. 151.



Obr. 21 Příprava emulze na bázi chitosan/SDS [55]

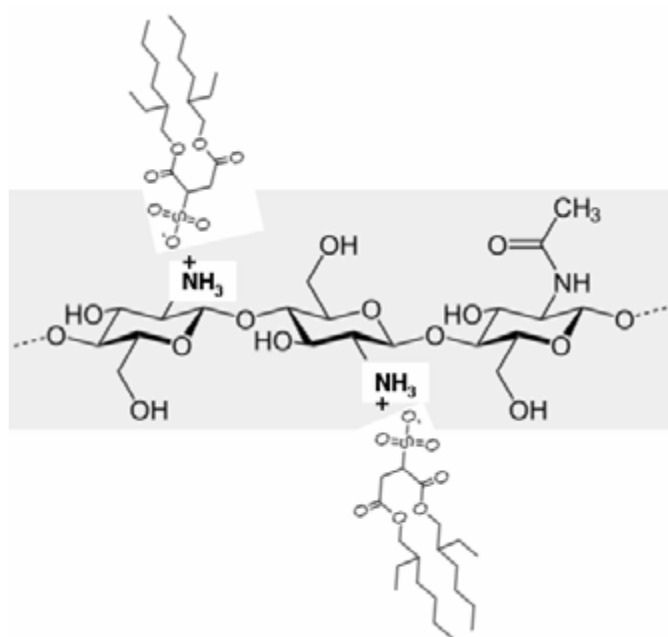
Chitosan/SDS komplexy byly studovány také dalšími autory [56] s. 8, [57] s. 100. Připravené systémy prokázaly specifické funkční charakteristiky s potenciálním využitím v potravinářství, například jako náhrada tuků nebo složka pro snižování cholesterolu.

#### 4.3.1 Interakce chitosan – dioktylsulfosukcinát sodný

Dioktylsulfosukcinát sodný, obsahující dva hydrofobní řetězce, lze řadit mezi tzv. gemini surfaktanty, které představují řadu výhod oproti běžným tenzidům (jako je například SDS). Jejich kritická micelární koncentrace je 10 až 100 krát nižší než u klasických PAL. Navíc, jsou známy svou vyšší povrchovou aktivitou, jsou tedy efektivnější ve snižování povrchového napětí. Azizinezhad a kol. ([58] s. 39) studovali interakci chitosanu s dioktylsulfosukcinátem sodným (DSS) ve vodném prostředí a v přítomnosti organického

rozpouštědla toluenu. U vodného emulzního systému bylo prokázáno s rostoucí koncentrací chitosanu zvýšení elektrické vodivosti a pokles hodnoty kritické micelární koncentrace (CMC). Důvodem byl nárůst akumulace micel v oblasti CMC a snížení povrchového napětí. U systému obsahujícího toluen byl pozorován stejný trend poklesu hodnot CMC se zvyšováním obsahu chitosanu. Ovšem, naměřené hodnoty kritických micelárních koncentrací byly nižší v porovnání vodnou směsí; a to v průměru o  $0,001 \text{ mol.l}^{-1}$ . Studium termodynamických parametrů prokázalo pozitivní vliv chitosanu jako kosurfaktantu pro oba systémy (voda i organické rozpouštědlo).

DSS byl také aplikován pro přípravu hydrofobního chitosanu, který byl následně zakomponován do polymerní matrice na bázi kyseliny polymléčné (PLA). Změna v hydrofilně-hydrofobním charakteru komplexu byla potvrzena řadou experimentálních technik, jako například XRD (rentgenová difrakční analýza) a FT-IR spektroskopie. Struktura komplexu mezi DSS a chitosanem je znázorněna na obr. 22 [59] s. 41.



Obr. 22 Komplex chitosanu/DSS [59]

Interakce chitosanu s anionickým DSS byla využita při tvorbě mikrokapslí s obsahem melatoninu, které představují slibný systém řízeného uvolňování léčiv pro kyselé prostředí gastrointestinálního traktu [59] s. 43. Tvorba komplexů, vytvořených díky amidické vazbě mezi primární aminoskupinou polymeru a karboxylátovou skupinou DSS, byla studována pomocí spektroskopických a kalorimetrických metod. Výsledný komplex byl překvapivě rozpustný v polárních rozpouštědlech a slabě rozpustný ve většině, pro chitosan běžných

rozpouštědlech. Vyrobené mikrokapsle prokázaly pomalejší kinetiku uvolňování aktivní látky v porovnání se systémy na bázi chitosanu a tripolyfosfátu.



## **II. PRAKTICKÁ ČÁST**

## 5 CÍLE PRÁCE

Cíle diplomové práce lze shrnout následovně:

- Charakterizovat chitosan prostřednictvím dostupných metod,
- Stanovit hodnoty kritické micelární koncentrace dioktylsulfosukcinátu sodného (DSS) v závislosti na pH,
- Připravit systémy na bázi chitosan-DSS a studovat jejich chování při různém pH,
- Diskutovat dosažené výsledky.

## 6 POUŽITÉ CHEMIKÁLIE, ZAŘÍZENÍ A POSTUPY

### 6.1 Chemikálie

Kyselina šťavelová dihydrát ( $C_2H_2O_4 \cdot 2 H_2O$ ) Lachema n.p. BRNO

Octan sodný krystalický ( $C_2H_3O_2Na \cdot 3 H_2O$ ) Lachema n.p. BRNO

Dioktylsulfosukcinát sodný Aldrich 98%

Chitosan (střední molekulová hmotnost) Sigma-Aldrich

Kyselina chlorovodíková (HCl) 37%

Kyselina octová ( $C_2H_4O_2$ )

Hydroxid sodný (NaOH)

1% Fenolftalein

### 6.2 Pomůcky a přístroje

Analytické váhy Sartorius Basic

Magnetické míchadlo MAGNETIC STIRRER HI 190 M

Magnetické míchadlo LAVAT CHOTOTICE

Bateriový pH metr CPH 51 se standardní kombinovanou pH elektrodou HC 103

Konduktometr INOLAB

Detektor intenzity rozptylu světla Zetasizer Nano series

Spekol 11 s nástavcem EK-1 Carl Zeiss Jena

Tenziometr Easy Dyne Krüss

Termostat typ: Thermo HAAKE C 10

Ubbelohdeho zředovací viskozimetr

Termostat typ: NBE

Sušárna typ: HS61 A

Skleněný temperovací válec

Ruční stopky

Mikropipeta – Eppendorf research plus

Běžné laboratorní sklo

## 6.3 Charakteristika použitých chemikálií

### 6.3.1 Stanovení sušiny

Do dvou předem vysušených a čistých skleněných váženek s víčkem bylo naváženo po 3 g chitosanu. Vzorke chitosanu byly následně sušeny v elektrické sušárně při teplotě 102 °C do konstantní hmotnosti. K výpočtu sušiny byl použit vzorec (5.1)

$$S = \frac{m_s}{m_p} \cdot 100 \quad [\%] \quad (6.1)$$

Kde:

- $m_s$  hmotnost vysušeného chitosanu [g]
- $m_p$  hmotnost nevysušeného chitosanu [g]
- $S$  sušina [%]

Podíl sušiny chitosanu byl stanoven na 91,56 %. Stejným způsobem byl stanoven podíl sušiny u tenzidu dioktylsulfosukcinátu sodného, který činil 96,96%.

### 6.3.2 Příprava zásobních roztoků 0.1M NaOH a 0.1M HCl

Bylo připraveno 250 ml 0,1 M NaOH navážením vypočteného množství NaOH, rozpuštěním v destilované vodě, kvantitativním převedením do 250 ml odměrné baňky a doplněním po rysku destilovanou vodou.

Přesná koncentrace roztoku NaOH byla stanovena pomocí kyseliny šťavelové. Vypočtené množství kyseliny šťavelové (0,0945 g) bylo smícháno s cca 10 ml destilované vody a 3 kapkami 1% fenolftaleinu. Takto připravený roztok byl titrován odměrným roztokem 0,1 M NaOH do růžového zbarvení. Stanovení bylo provedeno třikrát vedle sebe. Pomocí výpočtu (6.2) byla stanovena přesná koncentrace  $c_{\text{NaOH}}$ .

$$c_{\text{NaOH}} = \frac{m_K}{\frac{1}{2} \cdot \frac{M_K}{1000} \cdot a} \quad (6.2)$$

Kde:

- $m_K$  navážka  $\text{H}_2\text{C}_2\text{O}_4$  [g]
- $M_K$  molární hmotnost  $\text{H}_2\text{C}_2\text{O}_4$  [ $\text{g} \cdot \text{mol}^{-1}$ ]
- $a$  spotřeba roztoku NaOH [l]

- $c_{NaOH}$  zjištěná koncentrace NaOH [ $mol.l^{-1}$ ]

Dále bylo připraveno 250 ml 0,1 M HCl napipetováním vypočteného množství HCl a doplněním po rysku destilovanou vodou. 10 ml takto připraveného roztoku bylo v kádince smícháno s 3 kapkami 1% fenolftaleinu. Jako odměrný roztok sloužil již připravený roztok NaOH o stanovené přesné koncentraci. Přesná koncentrace HCl byla vypočtená pomocí vzorce (5.3).

$$V_1 \cdot c_1 = V_2 \cdot c_2 \quad (6.3)$$

Kde

- $V_1$  spotřeba roztoku NaOH [ $l$ ]
- $c_1$  přesná koncentrace NaOH [ $mol.l^{-1}$ ]
- $V_2$  pipetovaný objem HCl [ $l$ ]
- $c_2$  přesná koncentrace HCl [ $mol.l^{-1}$ ]

### 6.3.3 Stanovení stupně deacetylace chitosanu potenciometrickou titrací

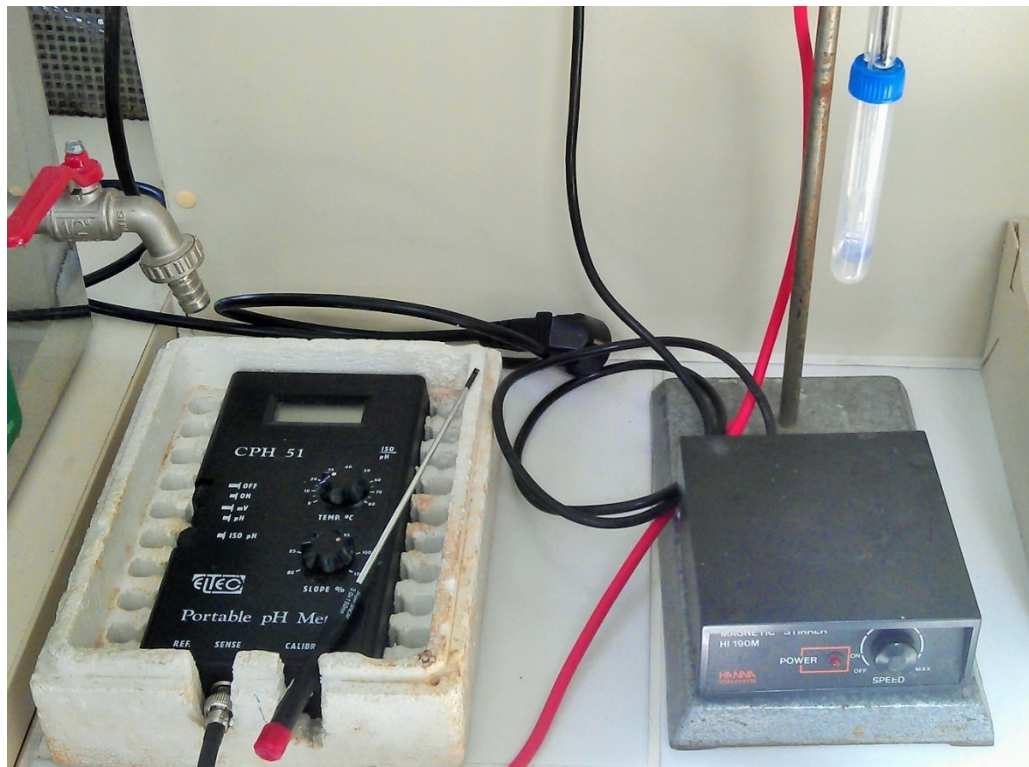
Vysušený vzorek chitosanu (0,125 - 0,130 g) byl rozpuštěn ve 20 ml 0,1 M HCl a 25 ml destilované vody. Po 30 minutách míchání s mírným zahříváním se ke vzorku přidalo dalších 25 ml destilované vody a vzorek se následně opět míchal dalších 30 minut. Po rozpuštění chitosanu se provedla potenciometrická titrace odměrným roztokem 0,1 M NaOH.

Stupeň deacetylace DD byl vypočítán podle následujícího vzorce:

$$DD[\%] = 2,03 \cdot \frac{V_2 - V_1}{m + 0,0042 \cdot (V_2 - V_1)} \quad (6.4)$$

Kde

- $m$  navážka vzorku [ $g$ ]
- $V_1, V_2$  objemy 0,1 M NaOH pro první a druhý bod ekvivalence [ $ml$ ]
- $2,03$  koeficient daný molární hmotností monomerní jednotky chitinu
- $0,0042$  koeficient daný rozdílem molárních hmotností monomerních jednotek chitinu a chitosanu



Obr. 23 Aparatura pro potenciometrickou titraci

#### 6.3.4 Stanovení stupně deacetylace chitosanu konduktometrickou titrací

Postup přípravy chitosanu pro konduktometrickou titrací je shodný s přípravou chitosanu pro potenciometrickou titrací.



Obr. 24 Aparatura pro konduktometrickou titraci

Ze získaných závislostí vodivosti na koncentraci byly stanoveny body ekvivalence a použity pro výpočet stupně deacetylace dle vzorce (6.5). Rozdíl ( $V_2 - V_1$ ) odpovídá objemu roztoku NaOH potřebnému k neutralizaci aminoskupin chitosanu.

$$\%DD = \frac{c_{NaOH} \cdot (V_2 - V_1) \cdot 161}{m} \quad (6.5)$$

Kde:

- $V_1, V_2$  objemy 0,1 M NaOH pro první a druhý bod ekvivalence [ml]
- $c_{NaOH}$  koncentrace 0,1M NaOH [ $mol \cdot l^{-1}$ ]
- $m$  hmotnost chitosanu [mg]
- 161 molární hmotnost monomeru [ $g \cdot mol^{-1}$ ]

Z rozdílu ( $V_2 - V_1$ ) bylo vypočítáno i množství miliekvivalentů  $NH_3^+$  [ $m_{ekv} \cdot g^{-1}$ ] chitosanu dle vzorce:

$$NH_3^+ [m_{ekv} \cdot g^{-1}] = \frac{c_{NaOH} \cdot (V_2 - V_1)}{m} \quad (6.6)$$

Kde:

- $V_1$             objem 0,1M NaOH [ml]
- $V_2$             objem 0,1M NaOH [ml]
- $c_{NaOH}$         koncentrace 0,1M NaOH [mol/l]
- $m$              hmotnost chitosanu [g]

### 6.3.5 Stanovení molekulové hmotnosti chitosanu

Ke stanovení molekulové hmotnosti chitosanu bylo využito metody měření vnitřní viskozity a vyhodnocení podle Mark-Houwinkovy rovnice.

#### Příprava zásobního roztoku chitosanu

Byl připraven 0,2% roztok chitosanu navážením vypočteného množství (0,5460 g), rozpuštěním v připraveném pufru 0,2M  $\text{CH}_3\text{COOH}/0,1\text{M CH}_3\text{COONa}$  (2 hodiny) a následným doplněním po rysku pufrům ve 250 ml odměrné baňce. Takto připravený zásobní roztok chitosanu byl následně pod tlakem filtrován přes fritu (0,45  $\mu\text{m}$ ).

#### Příprava pracovních roztoků

Z 0,2% ního zásobního roztoku chitosanu byly připraveny pracovní roztoky o koncentraci v rozmezí od 0,02% do 0,05% napipetováním potřebného množství zásobního roztoku do 50 ml odměrné baňky a doplněním po rysku připraveným pufrům (0,2M  $\text{CH}_3\text{COOH}/0,1\text{M CH}_3\text{COONa}$ ). Pipetovaný objem pracovního roztoku byl vypočten dle vzorce:

$$V_1 \cdot c_1 = V_2 \cdot c_2 \quad (6.7)$$

Kde

- $V_1$             objem pracovního roztoku [l]
- $c_1$             koncentrace pracovního roztoku [mol.l<sup>-1</sup>]
- $V_2$             objem pipetovaného zásobního roztoku [l]
- $c_2$             koncentrace pipetovaného zásobního roztoku [mol.l<sup>-1</sup>]

#### Stanovení hustoty pracovních roztoků

Stanovení hustoty vzorků bylo prováděno při teplotě  $30 \pm 1^\circ\text{C}$  pyknometricky. Nejprve byl zvážěn prázdný a vysušený pyknometr. V dalším kroku se pyknometr naplnil destilovanou



vodou, po temperaci se zvážil a stanovila se tzv. vodní hodnota pyknometru. Stejným způsobem byl opět vysušený a prázdný pyknometr naplněn připravenými pracovními roztoky chitosanu a zvážen. Hustota byla vypočítaná dle vzorce:

$$\rho = \frac{m_1 - m}{m_2 - m} \quad (6.8)$$

Kde

- $\rho$  hustota vzorku [ $g \cdot cm^{-3}$ ]
- $m_1$  hmotnost pyknometru se vzorkem [g]
- $m_2$  hmotnost pyknometru s destilovanou vodou [g]
- $m$  hmotnost prázdného a vysušeného pyknometru [g]

### Viskozimetrické měření vzorků chitosanu

U pracovních roztoků (koncentrace 0,02 – 0,05 %) byla proměřena viskozita na Ubbelohdeho viskozimetru. Do termostatu byl vložen suchý Ubbelohdeho viskozimetr a temperován na teplotu 30°C. Do viskozimetru bylo napipetován vzorek chitosanu o dané koncentraci a ponechán cca 10 minut temperovat. Po uplynutí této doby byl vzorek pomocí laboratorního balónku nasát do rozšířené části nad měrnou kapiláru. Po uvolnění podtlaku byla měřena doba průtoku vzorku mezi vyznačenými ryskami s přesností na 0,01s. Pro každý vzorek chitosanu bylo toto měření opakováno pětkrát. Ze získaných hodnot byla vypočtena hodnota redukované viskozity postupně pomocí vzorců (6.9) až (6.11) :

*Relativní viskozita*

$$\eta_r = \frac{\eta}{\eta_0} = \frac{t}{t_0} \quad (6.9)$$

Kde

- $\eta_r$  relativní viskozita
- $\eta$  viskozita roztoku
- $\eta_0$  viskozita rozpouštědla
- $t$  doba průtoku roztoku
- $t_0$  doba průtoku rozpouštědla

*Specifická viskozita*

$$\eta_{SP} = \eta_r - 1 \quad (6.10)$$

Kde

- $\eta_{sp}$       specifická viskozita
- $\eta_r$         relativní viskozita

*Redukovaná viskozita*

$$\eta_{red} = \frac{\eta_{SP}}{c} \quad (6.11)$$

Kde

- $c$          koncentrace vzorku [g/dl]
- $\eta_{red}$      redukovaná viskozita
- $\eta_{sp}$      specifická viskozita

Ze získaných výsledků redukované viskozity byl sestaven graf závislosti redukované viskozity na koncentraci roztoků vzorků chitosanu. Z rovnice lineární regrese bylo následně stanoveno limitní viskozitní číslo jako úsek na ose y. Pomocí Mark-Houwinkovy rovnice byla pak vypočtena molekulová hmotnost, konkrétně viskozitní průměr molekulové hmotnosti polymeru:

$$[\eta] = K \cdot \bar{M}^a \quad (6.12)$$

Kde

- $[\eta]$       limitní viskozitní číslo
- $K, a$      konstanty pro daný systém polymer-rozpouštědlo [ $K = 0,104 \cdot 10^{-5} \text{ dl} \cdot \text{g}^{-1}$ ,  
 $a = 1,12$ ]
- $\bar{M}$         molární hmotnost chitosanu

#### **6.4 Stanovení kritické micelární koncentrace dioctylsulfosukcinátu sodného**

Pro stanovení hodnoty kritické micelární koncentrace (CMC) dioctylsulfosukcinátu sodného (DSS) bylo využito měření povrchového napětí metodou Wilhelmyho destičky.

Ze zásobního roztoku DSS o koncentraci  $50 \text{ mmol.l}^{-1}$  byly připraveny pracovní roztoky DSS v destilované vodě do 50 ml odměrných baněk o koncentraci od 0,04 do  $5 \text{ mmol.l}^{-1}$ . Každý vzorek byl převeden do misky od tenziometru a ponechán temperovat na teplotu  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  a poté bylo u něj proměřeno povrchové napětí. Stejným způsobem bylo provedeno měření DSS v pufru o pH 4; 4,4 a 5.



*Obr. 25 Použitá aparatura pro stanovení povrchového napětí*

Kritická micelární koncentrace (CMC) dioktylsulfosukcinátu sodného v destilované vodě byla zjišťována také pomocí konduktometrického měření. Do 100 ml odměrných baněk byly připraveny roztoky DSS o koncentraci 0,2 do  $9,6 \text{ mmol.l}^{-1}$ , a byla měřena jejich konduktivita. Měření probíhalo při teplotě  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ .

### **6.5 Interakce chitosan –dioktylsulfosukcinát sodný**

Pro zjištění interakce chitosanu s ionickým tenzidem dioctylsulfosukcinátem sodným byly zvoleny metody měření povrchového napětí, vytvoření zákalových křivek a stanovení zeta potenciálu.

### 6.5.1 Příprava zásobních roztoků a pufců

#### Příprava pufců o pH 4; 4,4 a 5

Octanové pufcy o pH 4; 4,4 a 5 byly připraveny dle návodu z [60] smícháním daných složek (0,2M CH<sub>3</sub>COOH/0,2M CH<sub>3</sub>COONa) ve vhodném poměru (tab. 6).

Tab. 6 Příprava octanového pufcy o pH 4; 4,4 a 5

pH	0,2M CH <sub>3</sub> COOH [ml]	0,2M CH <sub>3</sub> COONa [ml]
4	820	180
4,4	630	370
5	295	705

#### Příprava 500 ml 0,01% zásobního roztoku chitosanu

Pro přípravu 500 ml 0,01% zásobního roztoku chitosanu bylo naváženo 0,0546 g s přesností na 0,0001 g a smícháno s cca 400 ml připraveného pufcy o daném pH (4; 4,4 a 5). Po cca 24 hodinovém míchání (zpočátku byl roztok krátce zahřát pro usnadnění rozpouštění chitosanu) byl vzorek kvantitativně převeden do 500 ml odměrné baňky a doplněn po rysku daným pufcem. Takto připravený roztok chitosanu byl následně pod tlakem filtrován přes fritu (0,45 μm).

#### Příprava zásobního roztoku dioctylsulfosukcinátu sodného (50 mmol.l<sup>-1</sup>)

Pro přípravu roztoku DSS bylo naváženo vypočtené množství 2,22 g s přesností na 0,0001 g, které bylo vypočteno dle následující rovnice

$$m = V \cdot c \cdot M \quad (6.13)$$

Kde

- $m$  hmotnost vzorku [g]
- $V$  objem roztoku [l]
- $c$  koncentrace roztoku [mol.l<sup>-1</sup>]
- $M$  molární hmotnost DSS [g.mol<sup>-1</sup>]

Takto navážené množství DSS, které bylo v kádince za mírného zahřívání rozpouštěno v pufru o daném pH (4; 4,4; 5). Poté byl roztok DSS kvantitativně převeden do 100 ml odměrné baňky a doplněn po rysku pufrům o daném pH.

### 6.5.2 Měření povrchového napětí

Do 100 ml kádinky bylo napipetováno 50 ml 0,01% zásobního roztoku chitosanu. Za mírného míchání se do roztoku následně přidalo automatickou pipetou stanovené množství ze zásobního roztoku DSS (koncentrace pracovních roztoků byly v rozmezí od  $0,5 \cdot 10^{-3}$  do  $0,13 \text{ mmol.l}^{-1}$ ). Takto připravený pracovní roztok chitosanu s DSS se nechal míchat 30 minut. Připravený vzorek byl převeden do misky od tenziometru a po temperaci na teplotu  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  se u něj proměřilo povrchové napětí. Tímto způsobem se připravily všechny roztoky chitosanu s různými koncentracemi DSS v pufrách o pH 4; 4,4 a 5.

### 6.5.3 Měření zeta potenciálu

Vzorky chitosanu s DSS v různých pufrách byly připraveny stejným způsobem jako pro měření povrchového napětí v kapitole 6.5.2. Měření jednotlivých vzorků probíhalo při teplotě  $25 \pm 5^\circ\text{C}$  a na přístroji ZETASIZER nano series ZS 90.

Vzorky chitosanu s DSS v pufru o daném pH a koncentraci od  $0,5 \cdot 10^{-3} \text{ mmol.l}^{-1}$  do  $0,131 \text{ mmol.l}^{-1}$  byly pomocí injekční stříkačky převedeny do speciální kyvety určené pro přístroj ZETASIZER. Takto naplněná kyveta byla vložena do přístroje a po vytemperování byl měřen zeta potenciál.

### 6.5.4 Stanovení zákalových křivek

Zákalové křivky byly proměřovány na přístroji SPEKOL 11. Do 100 ml kádinky bylo napipetováno 50 ml připraveného 0,01 %ního zásobního roztoku chitosanu a k němu bylo přidáváno vypočtené množství ze zásobního roztoku DSS o koncentraci od  $0,5 \cdot 10^{-3} \text{ mmol.l}^{-1}$  až do vytvoření sraženiny. Po 15 minutách míchání při teplotě  $25^\circ\text{C}$  byla změřena absorbance roztoku proti slepému pokusu (chitosan v pufru o daném pH) při vlnové délce 420 nm. Po proměření se ke vzorku přidal další přírůstek roztoku DSS a po promíchání byly postupně měřeny absorbance. Tímto způsobem byly připraveny a proměřeny všechny vzorky chitosanu v pufrách o pH 4; 4,4 a 5 s přírůstkem

dioctylsulfosukcinátu sodného. Byly proměřeny i absorbance samotného DSS ve všech pufrech.



*Obr. 26 Použitá aparatura pro stanovení základových křivek*

## 7 VÝSLEDKY A DISKUZE

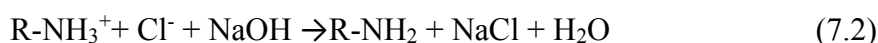
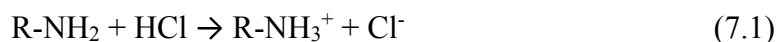
### 7.1 Stanovení stupně deacetylace

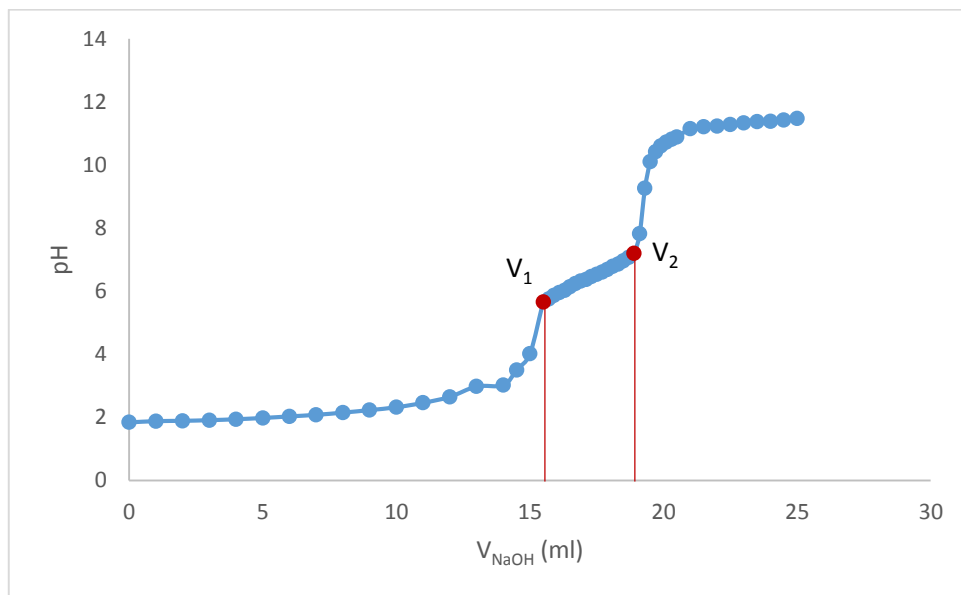
Proces deacetylace chitosanu zahrnuje odstranění acetylových skupin. Stupeň deacetylace bývá považován za významnou charakteristiku, ovlivňující fyzikálně-chemické a biologické vlastnosti chitosanu. Navíc, tato hodnota také ovlivňuje výběr podmínek (tj. rozpouštědla, příslušných konstant pro daný systém polymer-rozpouštědlo) pro měření molekulové hmotnosti pomocí limitního viskozitního čísla (viz kapitola 6.3.5). K jeho stanovení bývá aplikována řada metod (viz kap. 1.4), v naší DP bylo využito potenciometrické a konduktometrické titrace.

Chitosan obsahuje ve své molekule  $\text{NH}_2$  skupiny, které jsou ve vodném roztoku HCl protonovány. Chitosan se stává polyelektrolytem a může tvořit tzv. SPEC (surfactant-polyelectrolyte complexes – komplex tenzid-polyelektrolyt).

Na obr. 27 je zobrazena potenciometrická titrace vzorku chitosanu se dvěma zřetelnými inflexními body. První odpovídá neutralizaci HCl (rovnice 7.1), druhý značí neutralizaci amonných iontů chitosanu (rovnice 7.2). Rozdíl těchto dvou bodů představuje množství aminoskupin v molekule chitosanu, z něž je možno stanovit stupeň deacetylace, stejně jako množství miliekvivalentů  $\text{NH}_3^+$  skupin vztažených na gram vzorku chitosanu. Pro přesnější stanovení byly body ekvivalence odečítány ze závislosti druhé derivace pH na koncentraci NaOH.

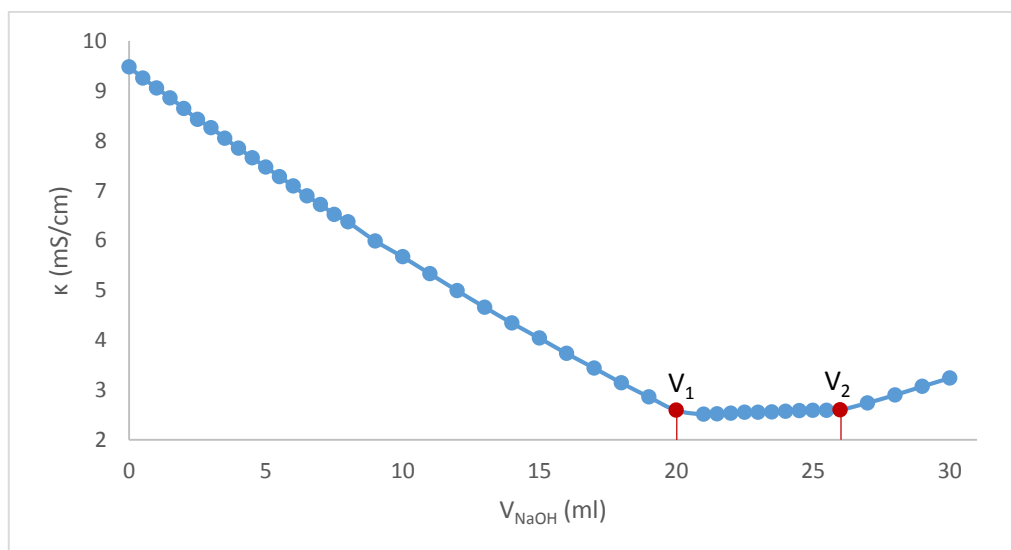
Měření bylo prováděno při  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  a v průběhu reakce byl sledován stav roztoku. Již po dosažení prvního inflexního bodu se v roztoku chitosanu začal tvořit zákal vzhledem ke zhoršující se rozpustnosti chitosanu při vyšších hodnotách pH. Před druhým bodem ekvivalence byl roztok již zcela zakalený.





Obr. 27 Potenciometrická titrace chitosanu

Průběh konduktometrické titrace, tedy závislosti změny vodivosti na objemu přidávaného titračního činidla, je znázorněn na obr. 28. První úsek je opět spojen s neutralizací volné HCl přítomné v roztoku; pokles vodivosti je zapříčiněn přidávkem NaOH ( $\text{Na}^+$  je větší iont než  $\text{H}^+$ ). V další fázi dochází k neutralizaci protonovaných aminoskupin v chitosanu (vodivost začíná růst z důvodu větší mobility  $\text{Na}^+$  iontů). Poslední úsek je charakteristický zásadnějším nárůstem vodivosti z důvodu přebytku přidávané báze.



Obr. 28 Konduktometrická titrace chitosanu



Výsledky stanovení potenciometrické i konduktometrické titrace jsou průměrem ze tří měření a jsou uvedeny v tabulce 7. Stupeň deacetylce získaný potenciometricky činil 75,773 %, tedy asi o 8,7 % méně než při konduktometrickém stanovení. Je zřejmé, že výsledky se liší v závislosti na použité metodě stanovení, což se prokázalo i v práci Czechowske a kol. [23] s. 10 kdy byly porovnávány metody potenciometrické titrace s  $^1\text{H}$  NMR, UV/Vis a FTIR. Rozdíly ve výsledných hodnotách DD% činily až 50 % (konkrétně mezi  $^1\text{H}$  NMR a FTIR metodou). Studie potvrdila, že přestože  $^1\text{H}$  NMR je nejlepší a nejpřesnější metodou pro stanovení DD%, potenciometrie zde má také své nezastupitelné místo, vzhledem k ekonomice procesu a dostupnosti používaných přístrojů a chemikálií. Chyba stanovení může vzniknout v důsledku srážení chitosanu při vyšších hodnotách pH.

Počet  $\text{NH}_3^+$  [ $\text{mekv.g}^{-1}$ ] skupin chitosanu byl 4,587 pro potenciometrickou a 5,385 pro konduktometrickou titraci. Podobného výsledku, získaného konduktometrickou titrací (tj. 5,101  $\text{NH}_3^+$  [ $\text{mekv.g}^{-1}$ ] skupin chitosanu), bylo dosaženo v práci Raymonda a kol. [61] s. 333, kteří stanovili stupeň deacetylce na 82,21 % (u jednoho z testovaných vzorků chitosanu). Konduktometrická metoda zde prokázala vysokou míru přesnosti stanovení v porovnání s UV spektrometrií a NMR.

Tab. 7 Stupeň deacetylce a počet  $\text{NH}_3^+$  [ $\text{mekv.g}^{-1}$ ] chitosanu

Metoda	DD %	$\text{NH}_3^+$ [ $\text{mekv.g}^{-1}$ ]
Potenciometrická titrace	75,773 ± 1,819	4,587 ± 0,133
Konduktometrická titrace	82,370 ± 0,900	5,385 ± 0,325

## 7.2 Stanovení molekulové hmotnosti chitosanu

Střední molekulová hmotnost je další významnou charakteristikou, ovlivňující vlastnosti polymerů. Ke stanovení bylo využito limitního viskozitního čísla, tzv. vnitřní viskozity  $[\eta]$ , která se vztahuje k viskozitní průměrné molekulové hmotnosti dle Mark Houwinkovy rovnice. Měření bylo prováděno ve zředěovacím Ubbelohdeho viskozimetru při teplotě 30°C. Pro stanovení limitního viskozitního čísla bylo zapotřebí naměřit časy průtoku jednotlivých roztoků vzorků chitosanu v pufru (0,2M  $\text{CH}_3\text{COOH}/0,1\text{M}$   $\text{CH}_3\text{COONa}$ ) na

Ubbelohdeho viskozimetru. Výsledky jsou průměrem z 5 měření a jsou uvedeny v (tab. 8). Poté byly pyknometricky stanoveny hustoty vzorků (tab. 9).

Tab. 8 Naměřené časy průtoku roztoků chitosanu na Ubbelohdeho viskozimetru

Koncentrace chitosanu [%]	Čas [s]
0	64,942 ± 0,276
0,02	77,708 ± 0,429
0,03	84,990 ± 0,259
0,04	92,446 ± 0,101
0,05	100,950 ± 0,429

Tab. 9 Hmotnosti a hustoty vzorků chitosanu

Koncentrace chitosanu [%]	Hmotnost [g]	Hustota [g.cm <sup>-3</sup> ]
0	44,4173	1,0030
0,02	44,3878	1,0018
0,03	44,4191	1,0030
0,04	44,4150	1,0028
0,05	44,4106	1,0027

Příklad výpočtu hustoty pro vzorek chitosanu o koncentraci 0,03 % dle vzorce:

$$\rho = \frac{m_1 - m}{m_2 - m} = \frac{44,4191 - 19,2897}{44,3440 - 19,2897} = 1,0030 \quad (7.3)$$

Kde:

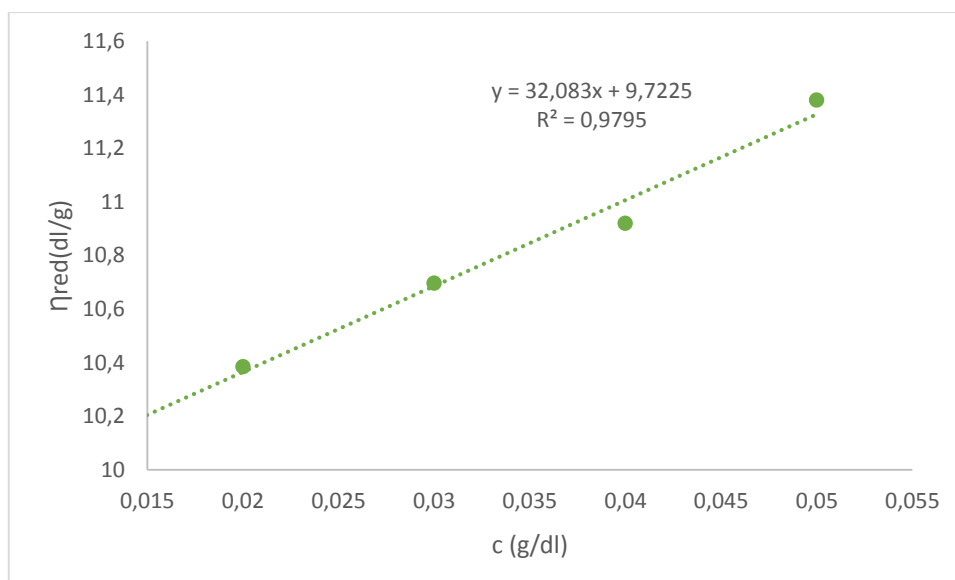
- $\rho$  hustota vzorku [g.cm<sup>-3</sup>]
- $m_1$  hmotnost pyknometru a vzorku [g]
- $m_2$  hmotnost pyknometru a destilované vody [g]
- $m$  hmotnost prázdného pyknometru [g]

Tyto zjištěné hodnoty následně sloužily k výpočtu jednotlivých viskozit vzorků chitosanu (relativní, specifické a redukované viskozity). Výsledky jsou shrnuty v následující tabulce.

Tab. 10 Hodnoty relativní, specifické a redukované viskozity pro jednotlivé vzorky chitosanu

Koncentrace chitosanu [%]	Čas průtoku t [s]	Relativní viskozita $\eta_r$	Specifická viskozita $\eta_{SP}$	Redukovaná viskozita $\eta_{red}$ [dl/g]
0	64,342	-	-	-
0,02	77,708	1,2077	0,2077	10,3850
0,03	84,990	1,3209	0,3209	10,6967
0,04	92,446	1,4368	0,4368	10,9200
0,05	100,950	1,5690	0,5690	11,3800

Z vypočtených hodnot byl sestaven graf závislosti redukované viskozity na koncentraci chitosanu. Výsledná rovnice lineární regrese, resp. z ní stanovený úsek na ose y, byl použit pro výpočet molekulové hmotnosti chitosanu dle Mark Houwinkovy rovnice.



Obr. 29 Závislost redukované viskozity na koncentraci chitosanu

$$y = 32,083 \cdot x + 9,7225 \leftrightarrow \eta_{red} = 32,083 \cdot c + [\eta] \quad (7.4)$$

$$[\eta] = K \cdot \bar{M}^a$$

$$\ln [\eta] = \ln K + a \cdot \ln M$$

$$\ln M = \frac{\ln [\eta] - \ln K}{a}$$

$$\ln M = \frac{\ln 9,7225 - \ln 0,104 \cdot 10^{-5}}{1,12}$$

$$\ln M = \frac{16,051}{1,12} = 14,33$$

$$M = 1672784,23$$

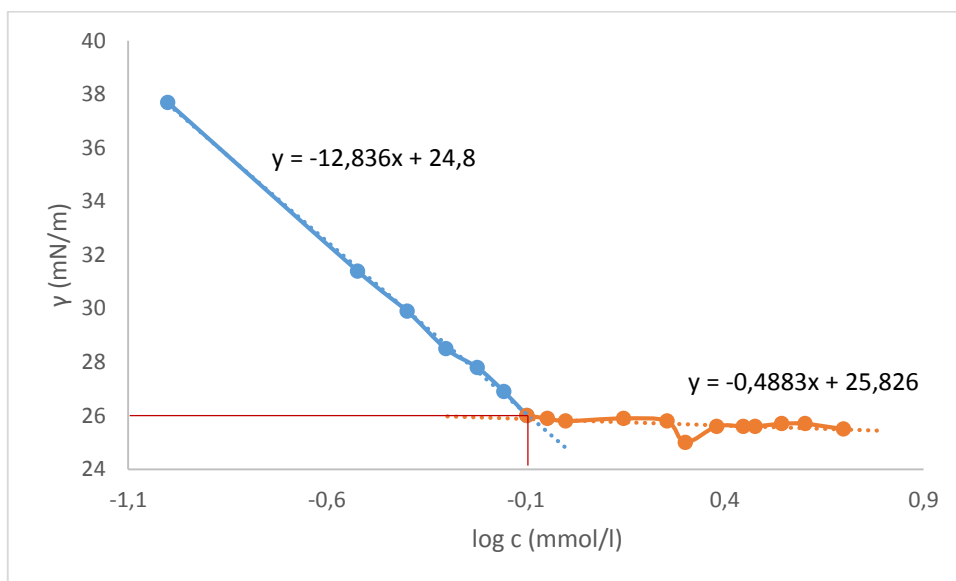
Na základě viskozimetrického měření byla vypočítána průměrná viskozitní molekulová hmotnost chitosanu, a to  $1,67 \cdot 10^6$ , tedy srovnatelná s prací Hwanga a Shina [62] s. 175, kteří jako rozpouštědlo využili 0,1M NaCl/0,1 M CH<sub>3</sub>COOH. Přestože na obalu používaného chitosanu byla výrobcem deklarována střední molekulová hmotnost, námi získaná hodnota spíše spadá do rozmezí odpovídající vysokomolekulárním vzorkům. Je ovšem nutno podotknout, že v různých literárních zdrojích lze nalézt variabilní rozsahy pro nízko-, průměrně a vysokomolekulární chitosan. Námi vypočítaná molekulová hmotnost je v souladu se studií Kasaaie [63] s. 485, která shrnuje podmínky (teplota, rozpouštědlo) viskozitního měření pro vzorky chitosanu o různém stupni deacetylce včetně konstant ( $K$ ,  $a$ ) nutných pro dosazení do Mark-Houwinkovy rovnice. Z těchto hodnot vyplývá, že pro systém 0,2M CH<sub>3</sub>COOH/0,1M CH<sub>3</sub>COONa, teplotu 30°C a stupeň deacetylce 69 % (což odpovídá námi stanoveným výsledkům) se průměrná molekulová hmotnost může pohybovat v rozmezí od  $0,477 \cdot 10^6$  do  $2,510 \cdot 10^6$ . Zjištěná vyšší molekulová hmotnost našeho vzorku by odpovídala také faktu, že se chitosan velmi špatně rozpouštěl při pH větším než 5. Z toho důvodu bylo také nutno omezit rozsah pH při sledování interakcí s tenzidem DSS.

### 7.3 Stanovení kritické micelární koncentrace dioktylsulfosukcinátu sodného

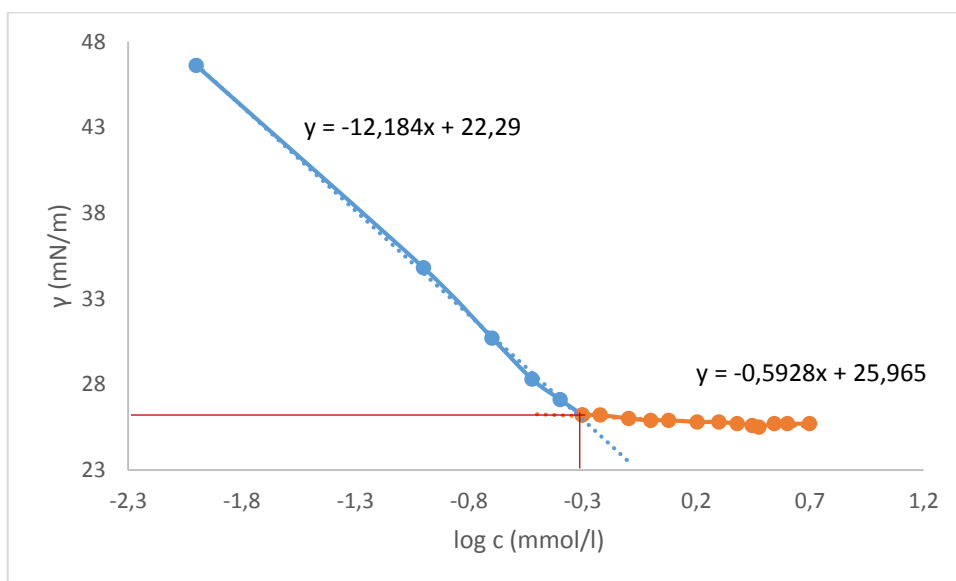
Dioktylsulfosukcinát sodný je znám pro své specifické chování v roztocích, jelikož je jediným anionickým tenzidem, u něž dochází ke změně tvaru micel již při nízkých koncentracích sodných iontů v roztoku [64] s. 209. Navíc, vzhledem k jeho struktuře, je schopen tvořit inverzní micely nebo mikroemulze V/O v nepolárních rozpouštědlech, které mohou do svého hydrofilního jádra zachytit větší či menší množství vody. Pro studium mezifázového chování DSS byla využita řada technik, zahrnujících NMR, IR spektroskopii, rozptyl světla aj. [65] s. 43.

Aby bylo možno alespoň částečně porozumět agregačnímu chování DSS, byla stanovena kritická micelární koncentrace, a to pomocí měření povrchového napětí metodou Wilhelmyho destičky. Hodnota CMC byla stanovena z průsečíků směrnic vynesných závislostí povrchového napětí na logaritmu koncentrace tenzidu (viz. obr. 30 až obr. 32) Výsledné hodnoty CMC jako průměry ze tří měření spolu s hodnotami minimálního dosaženého povrchového napětí  $\gamma_{\min}$  jsou shrnuty v tab. 11.

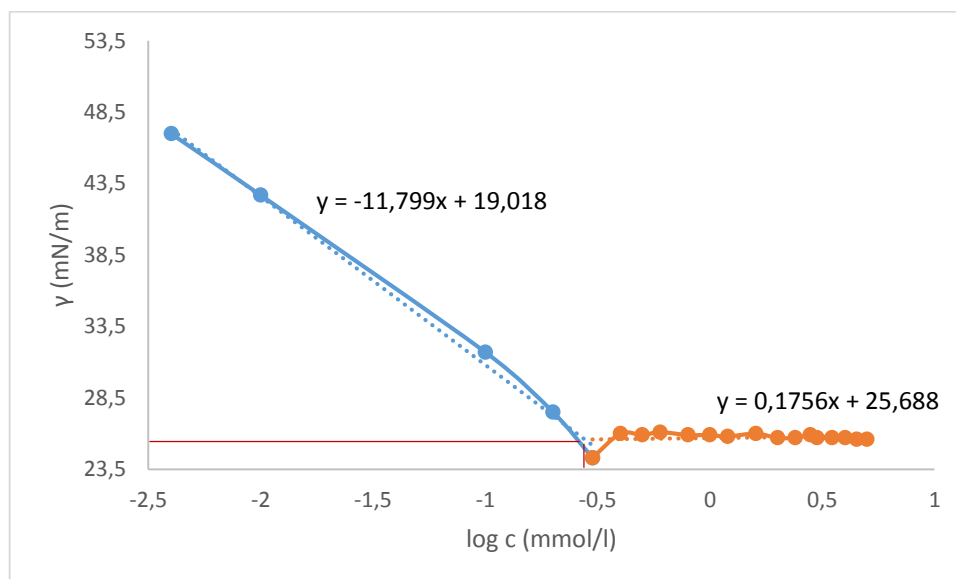
Při stanovení v destilované vodě bylo dosaženo CMC 2,7 mmol/l DSS, což odpovídá hodnotě uvedené dalšími autory. Například v práci Sansanwala [66] s. 59 bylo za stejných podmínek (tedy teplotě 25°C, tenziometrickým stanovením) dosaženo hodnoty 2,65 mmol.l<sup>-1</sup>. Při měření v pufru o pH 4 došlo k poměrně zásadnímu poklesu hodnoty kritické micelární koncentrace oproti destilované vodě na 0,889 mmol.l<sup>-1</sup>. Při stanovení v pufru o pH 4,4 a 5 se hodnota CMC postupně dále snižovala (viz tab. 11).



Obr. 30 Závislost povrchového napětí na koncentraci DSS (pH 4)



Obr. 31 Závislost povrchového napětí na koncentraci DSS (pH 4,4)

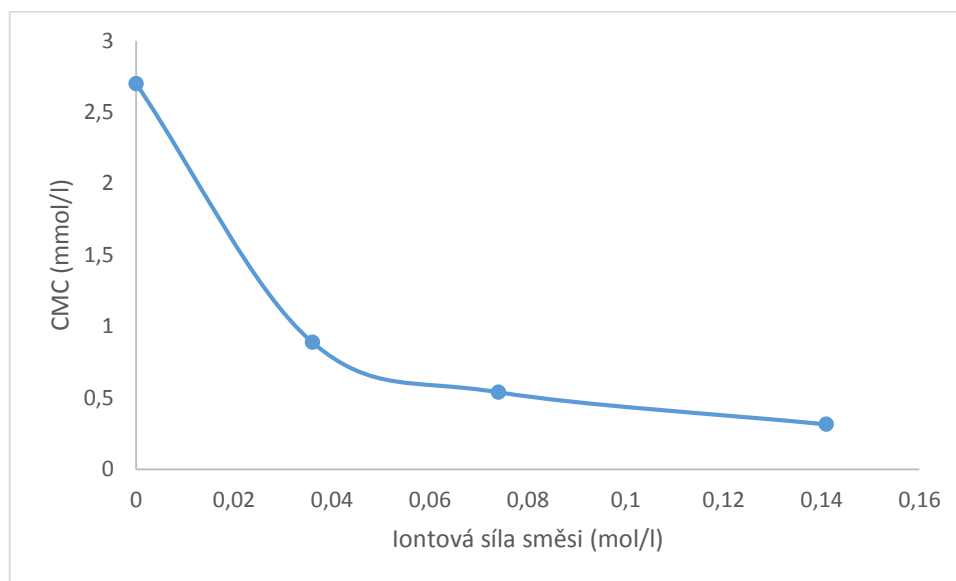


Obr. 32 Závislost povrchového napětí na koncentraci DSS (pH 5)

V tab. 11 a na obr. 33 je zohledněn i vliv iontové síly na micelizaci a z uvedených výsledků lze konstatovat, že zvyšováním iontové síly roztoku klesá kritická micelární koncentrace tenzidu. Tento závěr odpovídá obecně platným poznatkům o faktorech ovlivňujících hodnotu CMC. Bylo totiž prokázáno, že přítomnost elektrolytů v roztoku způsobuje snížení kritické micelární koncentrace, a to zejména v případě ionických PAL. Důvodem je snížení elektrostatického odpuzování mezi hydrofilními částmi tenzidu, vyvolané protionty, jejichž koncentrace v roztoku je dána nejen disociací tenzidu, ale i přidáním elektrolytu do roztoku [38] s 144.

Tab. 11 Micelizační parametry a hodnoty minimálního povrchového napětí DSS v závislosti na pH a iontové síle

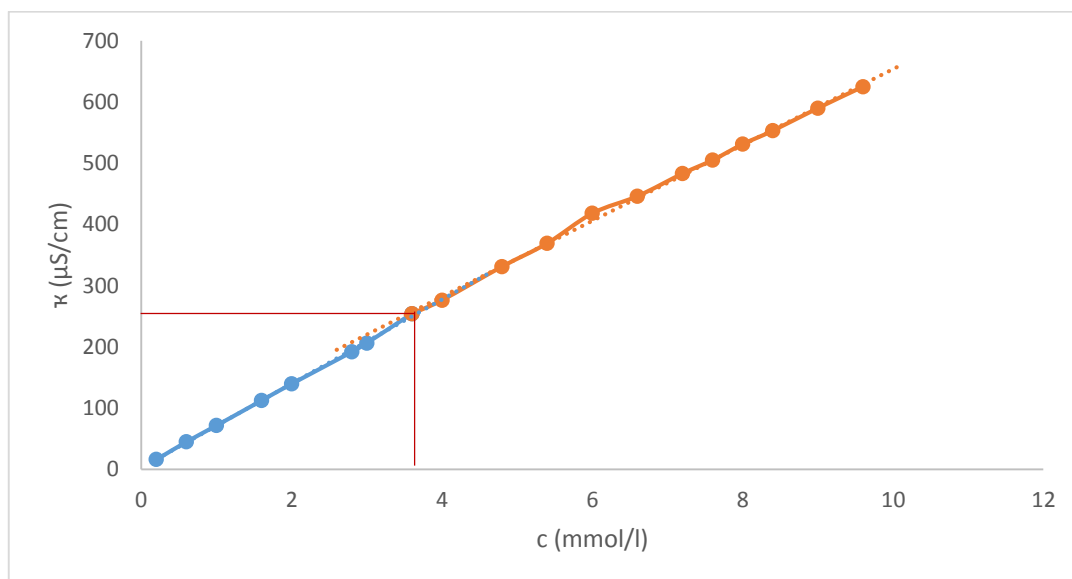
Roztok	Iontová síla [mol.l <sup>-1</sup> ]	CMC [mmol.l <sup>-1</sup> ]	$\Delta G^0_{mic}$ [kJ.mol <sup>-1</sup> ]	$\gamma_{min}$ [mN.m <sup>-1</sup> ]
Destilovaná voda	0	2,700 ± 0,260	-14,66	28,1
Pufř o pH 4	0,036	0,889 ± 0,058	-	25,5
Pufř o pH 4,4	0,074	0,540 ± 0,020	-	25,5
Pufř o pH 5	0,141	0,315 ± 0,038	-	25,6



Obr. 33 Závislost CMC na iontové síle

Ke stanovení kritické micelární koncentrace DSS byla využita i konduktometrická titrace, ovšem ze získané závislosti nebylo možno CMC spolehlivě odečíst (obr. 34). Byla stanovena hodnota CMC  $3,52 \text{ mmol.l}^{-1}$ , tedy zhruba o 30,3 % vyšší než při tenziometrickém stanovení. Rozdíly ve stanovení CMC v závislosti na různých použitých experimentálních metodách byly prokázány i v jiných studiích. Například Cheng a kol. [67] s. 56 prováděl stanovení CMC dioktylsulfosukcinátu sodného pomocí tenziometrie, konduktometrie a fluorescenční spektroskopie, přičemž zjištěné hodnoty CMC byly  $2,4 \text{ mmol.l}^{-1}$ ,  $2,93 \text{ mmol.l}^{-1}$  a  $3,7 \text{ mmol.l}^{-1}$  v uvedeném pořadí. Bylo tedy dosaženo podobného výsledku jako v našem případě, kdy CMC stanovená konduktometricky byla vyšší, než hodnota zjištěná tenziometrickým měření. Minimální hodnota povrchového napětí  $\gamma_{\min}$  byla stanovena na  $27,7 \text{ mN.m}^{-1}$ , tedy taktéž srovnatelná s naším výsledkem ( $28,1 \text{ mN.m}^{-1}$ ).





Obr. 34 Závislost vodivosti na koncentraci DSS (v destilované vodě)

Termodynamické vlastnosti micelizace dioktylsulfosukcinátu sodného ve vodě byly vyhodnoceny pomocí stanovení volné energie micelizace  $\Delta G^0_{mic}$  dle vzorce (7.5)

$$\Delta G^0_{mic} = R \cdot T \cdot (1 + \beta) \cdot \ln CMC \quad (7.5)$$

Kde:

- $\Delta G^0_{mic}$  Gibbsova volná energie micelizace
- $R$  molární plynová konstanta ( $8,314\ 4621\ \text{J}\cdot\text{K}^{-1}\cdot\text{mol}^{-1}$ )
- $T$  termodynamická teplota [K]
- $\beta$  stupeň vázání protiontu na micelu
- $CMC$  hodnota kritické micelární koncentrace

$$\beta = 1 - \frac{S_2}{S_1} \quad (7.6)$$

Kde:

- $S_1$  směrnice křivky konduktometrické titrace v oblasti existence monomerů tenzidu
- $S_2$  směrnice křivky konduktometrické titrace v oblasti tvorby micel

Výsledná záporná hodnota  $\Delta G^0_{\text{mic}} = -14,66 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$  je důkazem spontánního procesu tvorby micel. Stupeň vázání protiontů  $\beta$  odpovídá množství protiontů navázaných na povrch micely a byl stanoven ze směrnic závislosti konduktometrického stanovení. Vzhledem k charakteru křivky (obr. 34) je možno poměr  $S_2/S_1$  považovat za jednotkový a po úpravě lze tedy stupeň vázání protiontů ve vzorci zanedbat.

Hodnoty volné energie micelizace se mohou lišit v závislosti na experimentálních podmínkách. Termodynamické parametry micelizace dioktylsulfosukcinátu sodného byly studovány i v práci Chenga a kol. [67] s. 56, kdy při teplotě 25°C byla stanovena hodnota volné energie micelizace na  $-26,36 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$  a parametr  $\beta$  byl roven 0,08. Je třeba podotknout, že v uvedené studii také nebyl zcela patrný zlom ve směrnicích závislosti konduktivity na koncentraci tenzidu pro přesný odečet hodnoty kritické micelární koncentrace.

Na základě výsledků provedených měření pro stanovení kritické micelární koncentrace DSS byla tedy v dalším postupu (sledování interakcí mezi DSS a chitosanem) preferována metoda měření povrchového napětí.

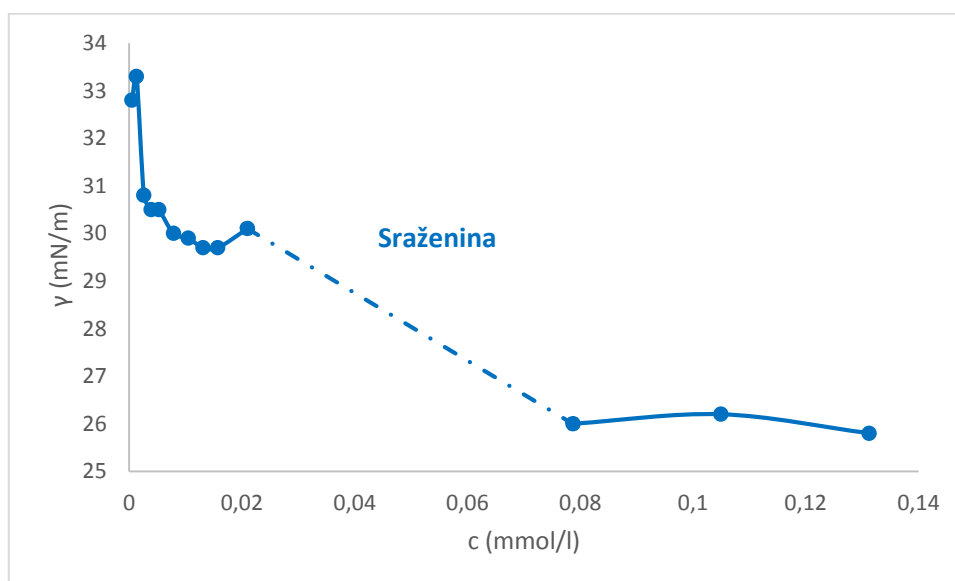
## 7.4 Interakce chitosan – dioktylsulfosukcinát sodný

Sledování interakcí chitosanu s dioktylsulfosukcinátem sodným bylo prováděno pomocí metod měření povrchového napětí, stanovení základových křivek a měření zeta potenciálu.

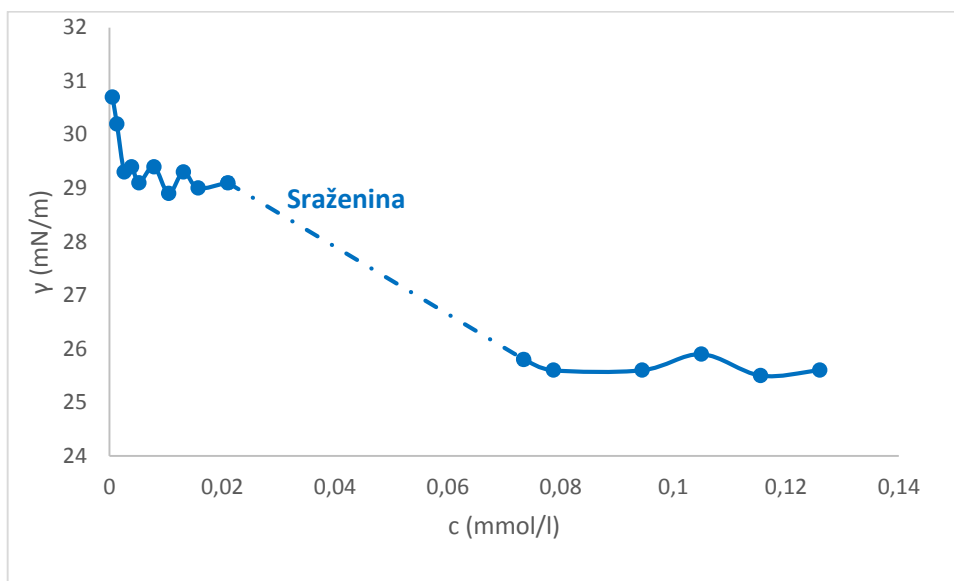
### 7.4.1 Měření povrchového napětí

Chování DSS v přítomnosti 0,01 %ního roztoku chitosanu v pufrech o pH 4; 4,4 a 5 bylo sledováno pomocí tenziometrického měření. S rostoucí koncentrací DSS docházelo ke snižování povrchového napětí, ovšem již při nízkých koncentracích DSS ( $5 \cdot 10^{-3} \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ) se začal tvořit v roztoku zákal a při koncentraci  $0,021 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  došlo ke vzniku sraženiny, která znemožnila další měření povrchového napětí. Proto byly připraveny vzorky s ještě

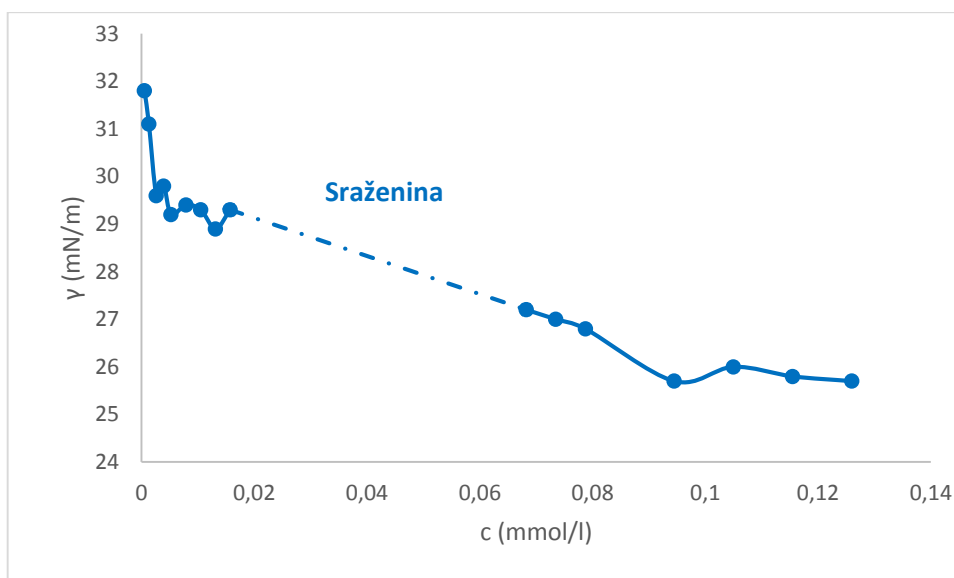
vyššími přídávky tenzidu a bylo zjištěno, že při dostatečném přebytku DSS dochází k rozpuštění sraženiny a povrchové napětí je možno dále měřit. Situace je znázorněna na obr. 35 až obr. 37. Lze konstatovat, na základě průběhu grafických závislostí, že dochází ke zřejmým interakcím mezi DSS a chitosanem. Z počátečního průběhu závislostí je možno pouze odhadovat potenciální hodnotu kritické agregační koncentrace, kdy dochází k tvorbě hemimicel. Je ovšem zřejmé, že k tomuto jevu došlo při koncentracích až o dva řády nižších, než byla stanovena kritická micelární koncentrace samotného DSS v jednotlivých pufrch. Lze také konstatovat, že rostoucí pH mělo mírně pozitivní vliv na průběh interakcí s ohledem na tvorbu sraženiny. V dalším úseku bohužel měření nebylo proveditelné, z výše uvedeného důvodu vzniku sraženiny. Měření pokračovalo až od vyšších koncentrací ( $7,9 \cdot 10^{-2}$  mmol.l<sup>-1</sup> při pH 4;  $7,4 \cdot 10^{-2}$  mmol.l<sup>-1</sup> při pH 4,4;  $6,8 \cdot 10^{-2}$  mmol.l<sup>-1</sup> při pH 5) a to do hodnot odpovídajících dosaženému povrchovému napětí samotného DSS v příslušném roztoku. Ve všech případech došlo k ustálení hodnot povrchové napětí od koncentrace DSS okolo 0,1 mmol.l<sup>-1</sup>. Každé měření bylo provedeno nejméně dvakrát.



Obr. 35 Závislost povrchového napětí na koncentraci chitosanu + DSS + pufr o pH 4



Obr. 36 Závislost povrchového napětí na koncentraci chitosanu + DSS + pufr o pH 4,4

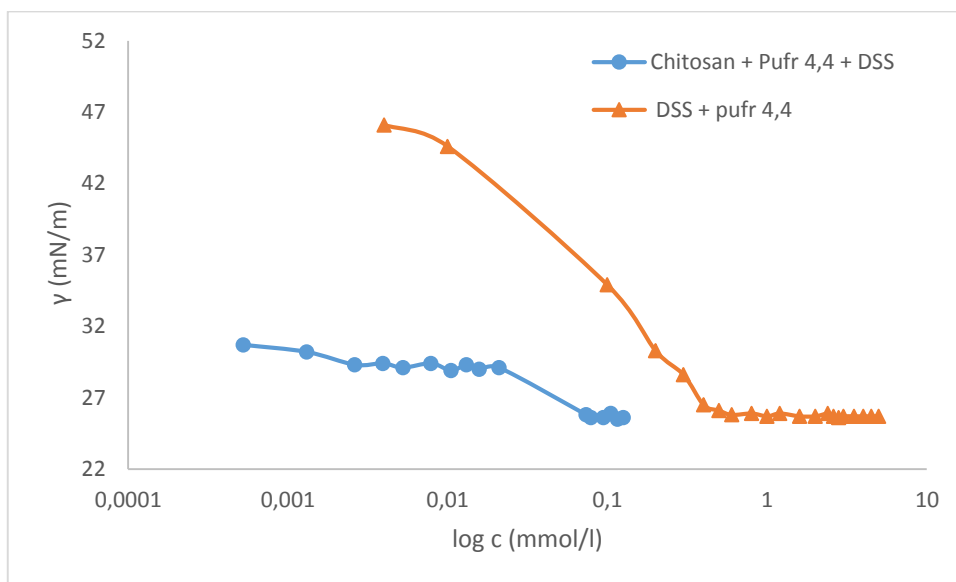


Obr. 37 Závislost povrchového napětí na koncentraci chitosanu + SJS + pufr o pH 5

Onesippe a Lagerge [57] s. 101 studovali tvorbu komplexů mezi chitosanem a dodecyl sulfátem sodným (SDS) prostřednictvím tenziometrie, turbidimetrického měření a stanovení zeta potenciálu. Při pH 4 v přítomnosti 0,01%ního roztoku chitosanu stanovili hodnotu kritické agregační koncentrace  $0,45 \text{ mmol.l}^{-1}$ . Evidentně zde nedocházelo k problémům se vznikem sraženiny, což naznačuje, že struktura tenzidu značně ovlivňuje charakter interakcí. SDS ve své molekule obsahuje pouze jeden hydrofobní řetězec a na

něm navázanou sulfátovou skupinu, zatímco DSS je charakteristický dvěma alkylovými řetězci a hydrofilní sulfoskupinou. Námi získané výsledky mohly být ovlivněny i charakterem samotného používaného chitosanu, kdy již při pH okolo 5 docházelo k problematickému rozpouštění.

Na obr. 38 je srovnání výsledků stanovení závislosti povrchového napětí na koncentraci DSS v případě samotného tenzidu a v kombinaci s chitosanem v pufru 4,4. Je zřejmé, že kvůli tvorbě sraženin při interakci polymeru s tenzidem nebylo možno provádět měření při vyšších koncentracích DSS, ale bylo dosaženo srovnatelných hodnot minimálního povrchového napětí.



Obr. 38 Závislost povrchového napětí na koncentraci pro samotný DSS a systém DSS/chitosan

#### 7.4.2 Měření zeta potenciálu

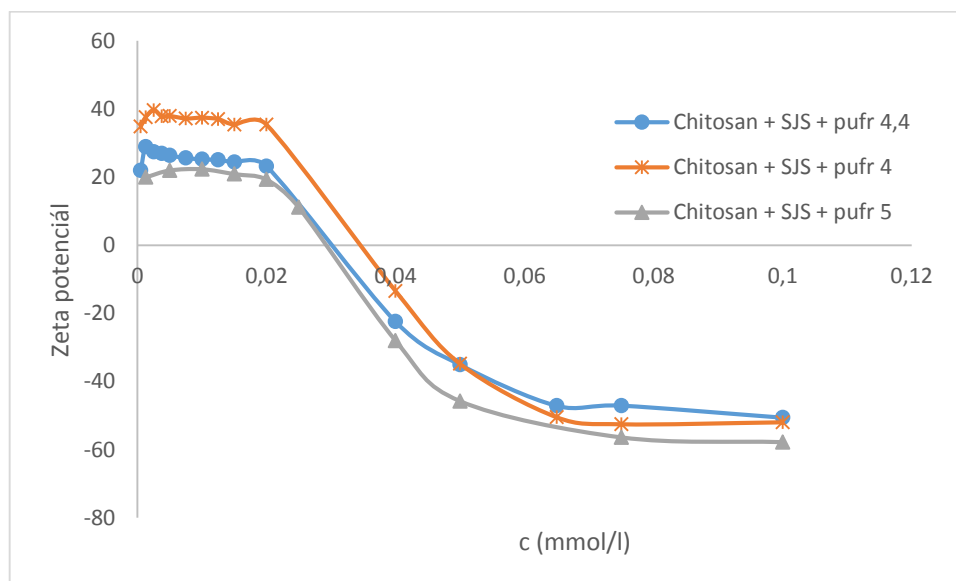
Pro lepší porozumění vlivu koncentrace tenzidu na chování komplexů DSS/chitosan byly sledovány změny jejich náboje prostřednictvím i měření zeta potenciálu. Závislost hodnot zeta potenciálu na koncentraci DSS ve vzorku je znázorněna na obr. 39. Měření bylo prováděno při pH 4; 4,4 a 5 a výsledné křivky jsou průměrem ze tří stanovení. Z grafu je zřejmé, že při počátečních koncentracích (do 0,02 mmol.l<sup>-1</sup> DSS) se hodnoty zeta potenciálu pohybují v kladných hodnotách a nedochází k zásadním výkyvům. S rostoucí koncentrací anionického tenzidu ve vzorku hodnota zeta potenciálu logicky klesá (až na -51,97 mV při pH 4, -50,58 při pH 4,4 a -57,8 při pH 5). V oblasti, kdy křivky procházejí nulovou hodnotou, dochází k neutralizaci náboje a lze předpokládat vytvoření stechiometrického komplexu mezi DSS a chitosanem. Cílem stanovení bylo zjistit přesné

reakční poměry obou složek v oblasti nulového zeta potenciálu. Vzhledem k charakteru použitých sloučenin byl použit výpočet pomocí miliekvivalentů funkčních skupin ve směsi, přestože tato jednotka v současnosti není běžně doporučována. V našem případě lze ale konstatovat, že hodnota vyjádřená prostřednictvím miliekvivalentů číselně odpovídá koncentraci v  $\text{mmol.l}^{-1}$ , tedy je možno reakční poměry přítomných složek při nulové hodnotě zeta potenciálu ve směsi spolehlivě porovnat (tab. 12).

Tab. 12 Množství  $\text{NH}_3^+$  [ $\text{mekv.g}^{-1}$ ] a DSS ve směsi v oblasti nulového zeta potenciálu

pH	$\text{NH}_3^+$ [ $\text{mekv.g}^{-1}$ ]	DSS [ $\text{mmol.l}^{-1}$ ]
4	0,048	0,035
4,4	0,047	0,030
5	0,042	0,029

Tab. 12 vyplývá, že s rostoucím pH dochází ke snižování protonovaných skupin chitosanu ve vzorku. Výsledky taky poukazují na fakt, že chitosan je ve směsi v mírném přebytku vůči anionickému DSS. Důvodem může být již zmíněná velmi špatná rozpustnost našeho vzorku chitosanu, kdy již při nízké koncentraci (okolo  $0,021 \text{ mmol.l}^{-1}$ ) DSS docházelo ke tvorbě sraženiny. Tudíž, lze předpokládat, že při interakci byla část chitosanu navázána na funkční skupinu DSS a část byla právě ve formě sraženiny. Navíc, může docházet ke stínění náboje v molekule chitosanu jiným přítomným protiontem (i vlivem samotného pufru). Všechny tyto faktory mohou ztížit přístup  $\text{SO}_3^-$  skupiny tenzidu do molekuly chitosanu a odrazit se na výsledné hodnotě zeta potenciálu.



Obr. 39 Závislost Zeta potenciálu na koncentraci DSS

V práci Piconeho a Cunhy [5] s. 700, kteří zkoumali elektrostatické komplexy na bázi chitosanu a gellanové gumy, byla stanovena hodnota zeta potenciálu 0,01%ního roztoku chitosanu na 51,3 mV. Z našich měření je tedy zřejmé, že stačil již poměrně nízký přírůstek tenzidu DSS ke snižování hodnot zeta potenciálu. Hodnoty samotného DSS v jednotlivých pufrch byly (-30,7 mV při pH 4; -44,38 mV při pH 4,4 a -49,52 mV při pH 5), což odpovídá hodnotám naměřeným u směsi chitosanu obsahující přibližně 0,05 mmol.l<sup>-1</sup> DSS při všech měřených pH. Stanovení základových křivek

Měření základových křivek bylo prováděno na vzorcích 0,01%ního chitosanu s dioktylsulfosukcinátem sodným, který byl přidáván postupně za stálého míchání až do maximální měřitelné koncentrace, po níž kvůli vzniklé sraženině docházelo k velkým výkyvům a dlouhé době ustalování hodnot absorbance. Byla provedena také měření samotného DSS pro všechna pH, z nichž bylo potvrzeno, že nedochází k zásadnějšímu nárůstu hodnot absorbance v rozsahu koncentrací používaných pro sledování interakcí, které by mohly ovlivnit stanovení. Všechna stanovení byla provedena třikrát.

Tab. 13 Koncentrace DSS při vzniku zákalu a sraženiny

pH	$c_z$ DSS [mmol.l <sup>-1</sup> ]	$c_z$ [mmol.l <sup>-1</sup> ]	$c_s$ [mmol.l <sup>-1</sup> ]
4	2,00	$3,15 \cdot 10^{-2}$	$5,25 \cdot 10^{-2}$
4,4	1,40	$2,36 \cdot 10^{-2}$	$3,94 \cdot 10^{-2}$
5	0,60	$3,15 \cdot 10^{-2}$	$5,25 \cdot 10^{-2}$

Tabulka 13 shrnuje koncentrace DSS, při nichž byly sledovány změny v roztoku, kdy  $c_z$  DSS je oblast zakalování roztoku samotného DSS,  $c_z$  a  $c_s$  jsou koncentrace při tvorbě zákalu a sraženiny u vzorků DSS/chitosan. Je patrné, že k zakalování roztoku samotného DSS docházelo při koncentracích až téměř o dva řády vyšších než u směsi s chitosanem (pH 4). Koncentrace vzniku zákalu mají klesající trend s rostoucím pH, podobně jako při stanovení kritické micelární koncentrace DSS (viz tab. 13).

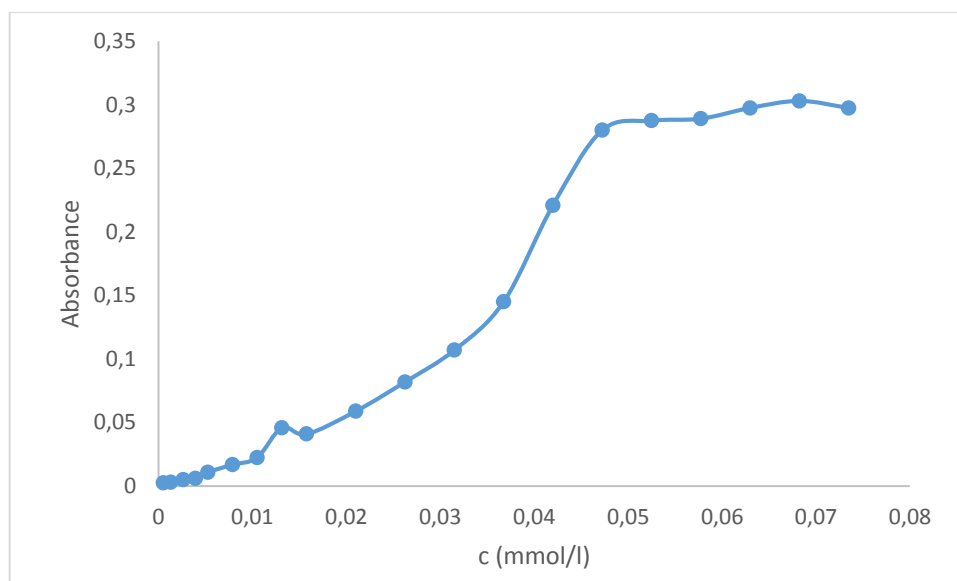
V případě interakcí DSS s chitosanem lze postupné zvyšování absorbance pozorovat od koncentrací okolo 0,03 mmol.l<sup>-1</sup> DSS, tedy hodnotě blízké nulovému zeta potenciálu. Viditelná sraženina se ve vzorku objevila při koncentraci 0,05 mmol.l<sup>-1</sup> pro pH 4 a pH 5. V případě pufru pH 4,4 došlo k tvorbě zákalu i sraženiny dříve, pro což ovšem není jednoznačné vysvětlení. Tento nesoulad je patrný i z obr. 40 až obr. 42, kdy zákalové křivky měřené pro pH 4 a 5 vykazují podobný trend (ustalování absorbance okolo koncentrace 0,05 mmol.l<sup>-1</sup> DSS), zatímco v případě pufru pH 4,4 došlo k ustalování hodnot dříve.

V porovnání s výsledky získanými tenziometrickým měřením, kdy bylo kvůli sraženině znemožněno měření již u koncentrace 0,02 mmol.l<sup>-1</sup> DSS, lze konstatovat, že ke tvorbě sraženiny ve směsi DSS/chitosan docházelo později. Tento fakt lze vysvětlit jiným způsobem přípravy vzorků, kdy pro měření zákalových křivek byl DSS k roztoku chitosanu postupně přidáván, zatímco pro měření povrchového napětí byl každý pracovní roztok připravován zvlášť.

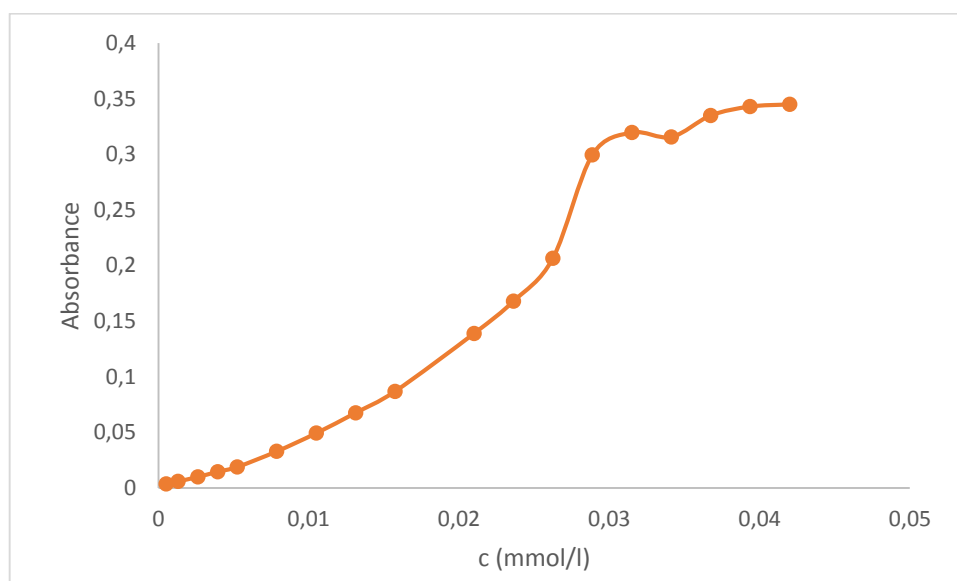
Ze všech získaných závislostí je ovšem patrné zvyšování absorbance na koncentraci tenzidu, což lze vysvětlit zvyšujícím se počtem přítomných nerozpustných komplexů ve vzorku dostatečně velkých na to, aby ovlivnily hodnotu absorbance. Lze tedy potvrdit, že



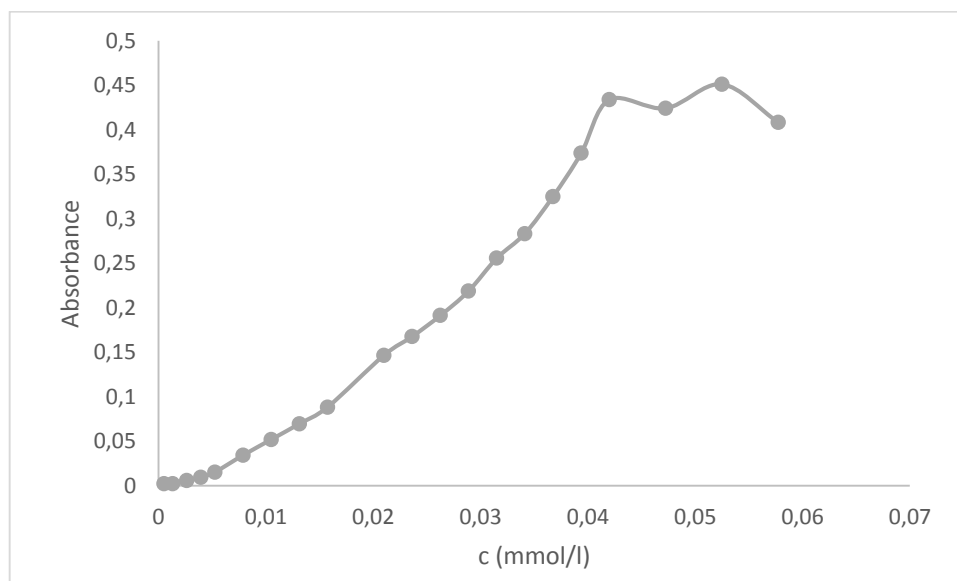
při pH 4 až 5 dochází k předpokládaným elektrostatickým interakcím mezi kladně nabitou  $\text{NH}_3^+$  skupinou chitosanu a záporně nabitou  $\text{SO}_3^-$  skupinou dioktylsulfosukcinátu sodného.



Obr. 40 Závislost absorbance na koncentraci DSS v pufru o pH 4



Obr. 41 Závislost absorbance na koncentraci DSS v pufru o pH 4,4



Obr. 42 Závislost absorbance na koncentraci DSS v pufru o pH 5

## ZÁVĚR

Podstatou předložené diplomové práce bylo studium interakcí mezi kladně nabitým chitosanem a anionickým tenzidem dioktylsulfosukcinátem sodným (DSS).

V úvodu praktické části je charakterizován chitosan prostřednictvím stanovení stupně deacetylace a průměrné viskozitní molekulové hmotnosti. Druhá část práce je věnována studiu micelizačního chování použitého tenzidu v destilované vodě a v prostředí pufrů o různém pH. Poslední část se zabývá podmínkami vzniku specifických polyelektrolytových komplexů na bázi chitosanu a DSS.

Z výsledků získaných pomocí těchto měření plynou následující závěry:

- Hodnota stupně deacetylace chitosanu se může lišit v závislosti na způsobu stanovení. V této práci byl stupeň deacetylace stanoven pomocí potenciometrické ( $75,773 \pm 1,819$  %) a konduktometrické titrace ( $82,370 \pm 0,900$  %). Výsledky se tedy lišily asi o 8,7 %.
- Na základě stanovení limitního viskozitního čísla byla vypočítána průměrná viskozitní molekulová hmotnost chitosanu, a to  $1,67 \cdot 10^6$ . Tato hodnota odpovídá spíše vysokomolekulárnímu chitosanu, přestože výrobce deklaroval střední molekulovou hmotnost. Tento výsledek byl ale podpořen i velmi problematickou rozpustností našeho vzorku chitosanu už při pH mírně vyšším než 5, přestože různé dostupné vědecké práce dokládají možnou rozpustnost chitosanu se středně molekulovou hmotností i při pH 6,5. Z výše uvedených důvodů musel být limitován rozsah pH pro sledování interakcí pouze na pH 4 až 5. Hodnota pH 4 byla stanovena na základě prvního inflexního bodu potenciometrické titrace chitosanu, kdy se předpokládá přítomnost protonovaných  $\text{NH}_3^+$  skupin v molekule chitosanu. Hodnota pH 5 byla tedy horní hranicí rozpustnosti našeho vzorku.
- Tenziometrickým měřením byla stanovena hodnota kritické micelární koncentrace DSS v destilované vodě ( $2,70 \text{ mmol.l}^{-1}$ ) a v pufrch o pH 4 ( $0,89 \text{ mmol.l}^{-1}$ ), pH 4,4 ( $0,54 \text{ mmol.l}^{-1}$ ) a pH 5 ( $0,32 \text{ mmol.l}^{-1}$ ). Bylo také prokázáno, že s rostoucí iontovou silou dochází ke snižování hodnoty CMC. Zároveň bylo provedeno konduktometrické měření, z nějž bylo ovšem pouze možno odhadovat hodnotu CMC  $3,52 \text{ mmol.l}^{-1}$  z důvodu nezřetelného zlomu ve směrnících závislosti vodivosti na koncentraci DSS. Na základě konduktometrické titrace byla

vypočítána volná Gibbsova energie micelizace  $\Delta G^0_{mic} = -14,66 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ . Negativní hodnota vypovídá o spontánní tvorbě micel.

- Interakce mezi DSS a chitosanem byly sledovány pomocí tenziometrického měření, které prokázalo, že při všech hodnotách pH docházelo k tvorbě komplexů. Bohužel, nebylo možno spolehlivě stanovit hodnotu kritické agregační koncentrace (CAC) ani kritické micelární koncentrace (CMC) vzhledem k tvorbě sraženiny, k níž docházelo při určitých koncentracích DSS.
- Pro lepší porozumění vlivu různých koncentrací DSS na komplex chitosan/DSS byl měřen zeta potenciál, který vypovídá o náboji částic v roztoku. S rostoucí koncentrací anionického tenzidu docházelo k poklesu zeta potenciálu z důvodu postupného zvyšování záporného náboje. Ze zjištěné závislosti bylo možno stanovit reakční podmínky v bodě nulového zeta potenciálu, tedy v případě neutralizovaného náboje. Na základě vypočítaných hodnot lze tedy konstatovat, že při všech pH byl chitosan v mírném přebytku vůči tenzidu. Důvodem může být jeho již zmíněná špatná rozpustnost nebo stínící efekty vlivem jiných protiontů ztěžující přístup sulfoskupiny DSS do molekuly chitosanu.
- Doplnujícím měřením pro sledování chování směsi chitosanu s různými koncentracemi DSS bylo sestavení zákalových křivek. Rostoucí hodnoty absorbance potvrdily tvorbu komplexů mezi přítomnými složkami. K ustalování došlo okolo  $0,03$  až  $0,05 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  DSS ve vzorku. Měření bylo opět limitováno tvorbou sraženiny, která ztěžovala ustalování hodnot absorbancí při vyšších koncentracích tenzidu.
- Závěrem lze tedy shrnout, že výsledky předložené diplomové práce potvrzují tvorbu specifických komplexů chitosanu s anionickým dioktylsulfosukcinátem, kde se předpokládají přednostní interakce na základě elektrostatických sil. Je nutno podotknout, že navržení optimálních reakčních poměrů v této konkrétní kombinaci složek nebylo dosud předmětem vědeckých studií. Výsledky této DP mohou tedy sloužit jako základ pro další měření, které by mělo být rozšířeno o další metody pro přesnější charakterizaci uvedených interakcí.

**SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY**

1. VAVŘÍKOVÁ, E. a J. VINŠOVÁ. Chitosan a jeho farmaceutické aplikace. *Chemické listy*. 2009, s. 56-65 [cit. 2015-02-11]. ISSN 1213-7103. Dostupné z: [http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2009\\_01\\_56-65.pdf](http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2009_01_56-65.pdf)
2. DE ALVARENGA, E. S. *Characterization and Properties of Chitosan*. InTech, 2011, 364 s. [cit. 2015-02-11]. ISBN 978-953-307-179-4. Dostupné z: <http://www.intechopen.com/books/biotechnology-of-biopolymers/characterization-and-properties-of-chitosan>
3. Chitosan. In: *NovaMatrix* [online]. 2011 [cit. 2015-02-11]. Dostupné z: [http://www.novamatrix.biz/Portals/novamatrix/Content/Docs/ProductDocs/chitosan\\_General\\_info.pdf](http://www.novamatrix.biz/Portals/novamatrix/Content/Docs/ProductDocs/chitosan_General_info.pdf)
4. GARTNER, C. et al. Interplay between Structure and Dynamics in Chitosan Films Investigated with Solid-State NMR, .... *Biomacromolecules*. 11. března 2011, č. 12, s. 1380–86 [cit. 2015-02-11]. ISSN: 1525-7797. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/full/10.1021/bm200193u>
5. PICONE, C. S. F. a R. L. CUNHA. Chitosan–gellan electrostatic complexes: Influence of preparation conditions and surfactant presence. *Carbohydrate Polymers*. ELSEVIER, 2013, č. 94, s. 695-703. ISSN 0144-8617.
6. NO, H. K. et al. Antibacterial activity of chitosans and chitosan oligomers with different molecular weights. *International Journal of Food Science*. 74. 25. března 2002 roč. 1-2, s. 65-72. Dostupné také z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168160501007176>
7. TAPAN, K. G. et al. Modified chitosan hydrogels as drug delivery and tissue engineering systems: present status and .... *Acta Pharmaceutica Sinica B*. 2012, 2 (5), 439–49 [cit. 2015-04-19]. ISSN: 2211-3835. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2211383512001153>
8. RINAUDO, M. Chitin and chitosan: Properties and applications. *Progress in Polymer Science*. 2006, č. 31, s. 603-32. ISSN: 0079-6700. Dostupné také z: <http://>

- farmacia.udea.edu.co/~marinos/chitin.pdf
9. ZARZYCKI, R. a Z. MODRZEJEWSKA. Use of chitosan in medicine and biomedical engineering. *Polymers in Medicine*. 33. 2003, s. 47-58. ISSN 0370-0747.
  10. ROHINDRA, , NAND a KHURMA. Swelling properties of chitosan hydrogels. *The South Pacific Journal of Natural Science*. 22. 2004, č. 1 [cit. 2015-03-07]. Dostupné z: [http://www.publish.csiro.au/?act=view\\_file&file\\_id=SP04005.pdf](http://www.publish.csiro.au/?act=view_file&file_id=SP04005.pdf)
  11. BHATTARAI, N. J. GUNN a M. ZHANG. *Chitosan-based hydrogels for controlled, localized drug delivery*. 31. ledna 2010 [cit. 2015-02-11]. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0169409X09002828>
  12. Kraeber. In: *Chitosan, the product of opportunities* [online]. 25. 3. 2011 [cit. 2015-03-14]. Dostupné z: <http://www.kraeber.de/download/JUK%20Flyer%20-%20Chitosan%20cosmetic.pdf>
  13. Chitosan and Cosmetics. *France chitine* [online]. [cit. 2015-03-14]. Dostupné z: <http://www.france-chitine.com/ecosm.html>
  14. SHAHIDI, F. J. K. V. ARACHCHI a Y.J. JEON. Food applications of chitin and chitosans. *Trends in Food Science & Technology*. 1999, č. 10, s. 37-51 [cit. 2015-04-22]. ISSN: 0924-2244. Dostupné z: [http://www.researchgate.net/profile/You-Jin\\_Jeon/publication/222488413\\_Food\\_applications\\_of\\_chitin\\_and\\_chitosans/links/0a85e53b73348499bd000000.pdf](http://www.researchgate.net/profile/You-Jin_Jeon/publication/222488413_Food_applications_of_chitin_and_chitosans/links/0a85e53b73348499bd000000.pdf)
  15. Chitosan - lapač tuku. *Bylinka* [online]. [cit. 2015-03-07]. Dostupné z: <http://bylinka.cz/shop/chitosan.html>
  16. Chitosan. *Vitalion* [online]. [cit. 2015-03-07]. Dostupné z: <http://doplanky.vitalion.cz/chitosan/>
  17. Potravinové doplňky. *Gastroprofesor* [online]. [cit. 2015-03-07]. Dostupné z: <http://www.gastroprofesor.cz/clanek/potravinove-doplanky>
  18. CHATTOPADHYAY, D. P. a M. S. INAMDAR. Aqueous Behaviour of Chitosan. *International Journal of Polymer Science*. 2010, s. 7.
  19. KLÍMOVÁ, Z. Využití chitosanu při úpravě pitné vody. In: *Sborník příspěvků XII*.

- mezinárodní vodohospodářské konference VODA ZLÍN 2008*. Zlín: Moravská vodárenská a.s. 2008, s. 6 [cit. 2015-02-11]. ISBN 978-80-254-1348-7. Dostupné z: <http://www.smv.cz/res/data/015/001808.pdf?seek=1>
20. YUAN, Y. et al. Deacetylation of Chitosan: Material Characterization and in vitro Evaluation via Albumin Adsorption .... *Materials*. 12. srpna 2011, s. 1399-416 [cit. 2015-03-14]. ISSN 1996-1944. Dostupné z: [www.mdpi.com/1996-1944/4/8/1399/pdf](http://www.mdpi.com/1996-1944/4/8/1399/pdf)
21. MORAVEC, Z. NMR laboratoř - Ústav chemie PřF MU. In: *NMR spektroskopie* [online]. 6. 10. 2012 [cit. 2015-02-11]. Dostupné z: <http://nmrlab.chemi.muni.cz/img/NMR.pdf>
22. OTYEPKOVÁ, E. a M. OTYEPKA. Katedra fyzikální chemie - Univerzita Palackého v Olomouci. In: *NMR spektroskopie* [online]. 5. 2. 2010 [cit. 2015-02-11]. Dostupné z: [http://fch.upol.cz/skripta/zfcm\\_pred/5\\_nmr.pdf](http://fch.upol.cz/skripta/zfcm_pred/5_nmr.pdf)
23. CZECHOWSKA-BISKUP, R. et al. Determination of Degree of Deacetylation of Chitosan - Comparison of Methods [PCACD]. *Progress on Chemistry and Application of Chitin and its Derivatives*. Polish Chitin Society, 2012, č. XVII, s. 16. ISSN 1896-5644.
24. SÁNDOR, E. a R. F. C. FARROW. Crystal Structure of Solid Hydrogen Chloride and Deuterium Chloride. *Nature*. 1967, s. 171-72.
25. KORMUNDA, M. Katedra fyziky - PřF Univerzita J. E. Purkyně. In: *IR a UV VIS spektroskopie* [online]. 11. 10. 2012 [cit. 2015-02-11]. Dostupné z: <http://physics.ujep.cz/~mkormund/P219/NanoMataChar-prednaska3.pdf>
26. PROKOPOVÁ, I. *Makromolekulární chemie*. 2. Praha: VŠCHT, 2007, 207 s.. ISBN: 978-80-7080-662-3.
27. BRYCHTOVÁ, M. *Polymery v kosmetických přípravcích*. Zlín: 2012.
28. Střední molární hmotnost. *Vysoká škola chemicko-technologická v Praze* [online]. 25. 7. 2005 [cit. 2015-04-07]. Dostupné z: [http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid\\_es-001/hesla/stredni\\_molarni\\_hmotnost.html](http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_es-001/hesla/stredni_molarni_hmotnost.html)
29. NUNTHANID, J. et al. Physical properties and molecular behavior of chitosan films.

- Drug Development and Industrial Pharmacy*. 27. 2001, č. 2, s. 143-57. ISSN 0363-9045.
30. HAMILTON, V. et al. Bone cell attachment and growth on. *Polymer International*. 56. 29. prosince 2006 roč. V, s. 641-47. ISSN: 1097-0126.
31. HONARY, , MALEKI a KARAMI. The effect of chitosan molecular weight on the properties of alginate/ chitosan microparticles .... *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*. Benin City: 2008, **8** (1), 53-61. ISSN 1596-5996.
32. SUN, Y. et al. The effect of chitosan molecular weight on the characteristics of spray-dried methotrexate-loaded .... *Drug Development and Industrial Pharmacy*. Shenyang: 2008, **35** (3), 379-86. DOI: 10.1080/03639040802395185.
33. BAXTER, S. R. *Molecular Weight and Degree of Acetylation of Ultrasonicated Chitosan*. Knoxville: University of Tennessee, 2004, 74 s.. Dostupné také z: [http://trace.tennessee.edu/utk\\_gradthes/1870](http://trace.tennessee.edu/utk_gradthes/1870)
34. MASUELLI, M. A. Mark-Houwink Parameters for Aqueous-Soluble Polymers and Biopolymers at Various Temperatures. *Journal of Polymer and Biopolymer Physics Chemistry*. 2. 2014 roč. II, s. 37-43. ISSN 2373-3403.
35. ROSEN, M. J. a J. T. KUNJAPPU. *Surfactants and Interfacial Phenomena*. 4. Wiley, 2012, 455 s.. ISBN: 978-0-470-54194-4.
36. SEDLÁŘÍKOVÁ, J. *Chemie a technologie tenzidů II*. Zlín: 2015, 167 s. [cit. 2015-04-06]. CZ. 1.07/2.2.00/28.0132. Dostupné z: <http://kosmetika.ft.utb.cz/Services/Downloader.ashx?id=134&disposition=inline>
37. GODDARD, E. a K. P. ANANTHAPADMANABHAN. *Interaction of Surfactants with Polymers and Proteins*. Boca Raton: CRC Press, 1993, 427 s.. ISBN 0-8493-6784-0.
38. MYERS, D. *Surfactant science and technology*. Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons, Inc., 2006. ISBN-13 978-0-471-68024-6.
39. SMIDRKAL, J. Tenzidy a detergenty dnes. *Chemické listy*. 1999 roč. XCIII, s. 421-27. ISSN 0009-2770.



40. KVÍTEK, L. a A. PANÁČEK. *Základy koloidní chemie*. Olomouc: UPOL, 2007.
41. MÜLLER, L. Katedra analytické chemie, Přírodovědecká fakulta Univerzity Palackého v Olomouci. In: *Přesné měření kritické micelární koncentrace tenzidů a její využití v kapilární elektroforéze* [online]. 10. 1. 2013 [cit. 2015-04-08]. Dostupné z: <http://kalch.upce.cz/merck2003/pdf/9.pdf>
42. Zeta potenciál. *Czech and Slovak Crystallographic Association (CSCA)* [online]. 2. 2. 2012 [cit. 2015-04-12]. Dostupné z: <http://www.xray.cz/kfkl-osa/eng/zetasizer/zeta.htm>
43. WHO Model List of Essential Medicines. In: *World Health Organization* [online]. 2013 [cit. 2015-03-31]. Dostupné z: [http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/93142/1/EML\\_18\\_eng.pdf?ua=1](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/93142/1/EML_18_eng.pdf?ua=1)
44. Safety Assessment of Dialkyl Sulfosuccinate Salts as Used in Cosmetics. *CIR Expert Panel Meeting*. Washington: Cosmetic Ingredient Review, 20. června 2013, č. 128, s. 18.
45. *Stanovení molární hmotnosti polystyrenu viskozimetricky*. Zlín: 2. 3. 2012.
46. FAJALIA, A. I. et al. Self-assembly of sodium bis(2-ethylhexyl) sulfosuccinate in aqueous solutions: Modulation of .... *Journal of Molecular Liquids*. 2015, s. 11. ISSN 0167-7322.
47. DEY, J. U. THAPA a K. ISMAIL. Aggregation and adsorption of sodium dioctylsulfosuccinate in aqueous ammonium chloride solution: .... *Journal of Colloid and Interface Science*. 2012, č. 367, s. 305-10. ISSN 0021-9797.
48. BOUKERMA, K. et al. Surface properties and conductivity of bis(2-ethylhexyl) sulfosuccinate-containing polypyrrole. *Applied Surface Science*. 2005, č. 249, s. 303-14. ISSN 0169-4332.
49. SVOBODOVÁ, E. Ústav technologie tuků, tenzidů a kosmetiky - UTB. In: *Interakce polymeru s PAL* [online]. 15. 1. 2008 [cit. 2015-04-08]. Dostupné z: [http://utttk.ft.utb.cz/Tenzidy\\_files/Interakce%20polymeru%CC%80%20s%20PAL.doc](http://utttk.ft.utb.cz/Tenzidy_files/Interakce%20polymeru%CC%80%20s%20PAL.doc)
50. MARTINCOVÁ, J. *Interakce směsi anionických tenzidů se želatinou*. Zlín: 2013.

51. Surfactant Adsorption Prediction. *SurfSorb* [online]. 18. 12. 2012 [cit. 2015-04-08]. Dostupné z: <http://surfsorb.com/productandservice.htm>
52. DESBERIERES, J. C. BOUSQUET a V. BABAK. Surfactant-chitosan interactions and application to emulsion stabilization. *Cellulose Chemistry & Technology*. 2010, č. 44, s. 395-406. ISSN 0576-9787.
53. BROZE, J. *Handbook of Detergents, Part A: Properties*. Basel: CRC Press, 1999, 814 s.. ISBN: 978-0-8247-1417-8.
54. HUANG, R. Y. M. G. Y. MOON a R. PAL. Chitosan/anionic surfactant complex membranes for the pervaporation separation of methanol/MTBE and .... *Journal of Membrane Science*.. 1. března 2001 roč. CLXXXIV, s. 1-15. ISSN 0376-7388.
55. SUNINTABOON, P. et al. One-step preparation of chitosan/sodium dodecyl sulfate-stabilized oil-in-water emulsion of .... *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 414. 20. listopadu 2012, s. 151-59. ISSN: 0927-7757.
56. GEETHA, G. C. SURESH KUMAR a N. DEVANNA. Characterization of Molecular interactions between Chitosan and Sodium Dodecyl Sulfate (SDS). *International Journal of Science & Technology*. 2. 2012 roč. II, s. 8-15. ISSN 2250-141X. Dostupné také z: [http://www.ijst.co.in/papers/vol2issue2/ijst\\_120402.pdf](http://www.ijst.co.in/papers/vol2issue2/ijst_120402.pdf)
57. ONÉSIPPE, C. a S. LAGERGE. Study of the complex formation between sodium dodecyl sulfate and hydrophobically modified chitosan. *Carbohydrate Polymers A*. 317. 2008, s. 100-08. ISSN 0144-8617.
58. AZIZINEZHAD, F. a M. T. AGHCHEHROOD. Conductometric Investigation of the Interaction of Chitosan-Dioctyl Sulfo-Succinate Surfactant in .... *Bulletin of Environment, Pharmacology and Life Sciences*. KUMAR, M. ed. 2014, **3** (2), 39-44. ISSN 2277-1808.
59. CHOUWATAT, P. et al. Preparation of Hydrophobic Chitosan Using Complexation Method for PLA/Chitosan Blend. *Journal of Metals, Materials and Minerals*. Bangkok: 2010, **20** (1), 41-44.
60. SÝKORA, V. a V. ZAŤKA. *Příruční tabulky pro chemiky*. 2. Praha: Státní

- nakladatelství technické literatury, 1960.
61. RAYMOND, R. H. MARCHESSAULT a F. G. MORIN. Degree of deacetylation of chitosan using conductometric titration and solid-state NMR. *Carbohydrate Research*. 17. srpna 1993, č. 246, s. 331-35. ISSN: 0008-6215.
  62. HWANG, J. K. a H. H. SHIN. Rheological properties of chitosan solutions. *Korea-Australia Rheology Journal*. 2000, **12** (3/4), 175 - 179 [cit. 2015-05-04]. ISSN: 2093-7660. Dostupné z: <http://www.cheric.org/PDF/KARJ/KR12/KR12-3-0175.pdf>
  63. KASAAI, M. R. Calculation of Mark–Houwink–Sakurada (MHS) equation viscometric constants for chitosan in any .... *Carbohydrate Polymers*. 2007, č. 68, s. 477-88. ISSN 0144-8617.
  64. ISMAIL, K. a O. G. SINGH. Effect of sodium chloride on the aggregation, adsorption and counterion binding behavior of .... *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 2012, č. 414, s. 209-15. ISSN: 0927-7757.
  65. YUAN, S. et al. The interaction between polymer and AOT or NaDEHP in aqueous solution: mesoscopic simulation study .... *Colloids and Surfaces A Physicochemical and Engineering Aspects*. 256. 2005 roč. I, s. 43-50. ISSN: 0927-7757.
  66. SANSANWAL, P. K. Effect of co-solutes on the physico-chemical properties of surfactant solution. *Journal of Scientific & Industrial Research*. 2006, č. 65, s. 57-64. ISSN 0975-1084.
  67. CHENG, N. et al. Aggregation behavior of anionic surface active ionic liquids with double hydrocarbon chains in .... *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 453. 2014, s. 53-61. ISSN: 0927-7757.
  68. KOLESA, P. Vysoké učení technické v Brně. In: *Vliv poyelektrolytových biopolymerů na transport iontů* [online]. 2014 [cit. 2015-02-11]. Dostupné z: [https://www.vutbr.cz/www\\_base/zav\\_prace\\_soubor\\_verejne.php?file\\_id=81777](https://www.vutbr.cz/www_base/zav_prace_soubor_verejne.php?file_id=81777)
  69. PENG, B. *Interactions between Surfactants and Biodegradable Thermo-Responsive Polymeric Nanostructures in ....* Waterloo (Canada, Ontario): 2013.
  70. MACAKOVA, L. *Interactions between Biopolymers and Surfactants with focus on*

- Fluorosurfactants and Proteins*. Stockholm: 2007, 108 s.. ISBN 978-91-7178-739-2.
71. WEISEROVÁ, E. *Chitosan a jeho využití v potravinových doplňcích*. Zlín: 2007, 36 s. [cit. 2015-02-11]. Dostupné z: [https://dspace.k.utb.cz/bitstream/handle/10563/4755/weiserov%C3%A1\\_2007\\_bp.pdf?sequence=1](https://dspace.k.utb.cz/bitstream/handle/10563/4755/weiserov%C3%A1_2007_bp.pdf?sequence=1)
72. EL-GIBALY, I. Development and in vitro evaluation of novel floating chitosan microcapsules for oral use: .... *International Journal of Pharmaceutics*. 2002, č. 249, s. 7-21. ISSN 0378-5173.
73. HARKOT, J. a B. JAŃCZUK. The role of adsorption of sodium bis(2-ethylhexyl) sulfosuccinate in wetting of glass and .... *Applied Surface Science*. 2008, č. 254, s. 2825-30. ISSN 0169-4332.
74. PATIL, S. B. a K. K. SAWANT. Chitosan microspheres as a delivery system for nasal insufflation. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2011, 2 (84), 384-89. ISSN 0927-7765.
75. DE ALVARENGA, E. S. C. P. DE OLIVEIRA a C. R. BELLATO. An approach to understanding the deacetylation degree of chitosan. *Carbohydrate Polymers*. 2010, č. 80, s. 1156-60 [cit. 2015-04-30]. ISSN 0144-8617. Dostupné z: [http://www.researchgate.net/profile/Elson\\_Alvarenga/publication/244330425\\_An\\_approach\\_to\\_understanding\\_the\\_deacetylation\\_degree\\_of\\_chitosan/links/00b4953b9bd6a9eb65000000.pdf](http://www.researchgate.net/profile/Elson_Alvarenga/publication/244330425_An_approach_to_understanding_the_deacetylation_degree_of_chitosan/links/00b4953b9bd6a9eb65000000.pdf)
76. LIU, N. et al. Effect of MW and concentration of chitosan on antibacterial activity of *Escherichia coli*. *Carbohydrate Polymers*. 2006, č. 64, s. 60-65 [cit. 2015-05-01]. ISSN 0144-8617. Dostupné z: [http://www.mwit.ac.th/~teppode/th\\_1\\_1.pdf](http://www.mwit.ac.th/~teppode/th_1_1.pdf)
77. Adsorpce z kapalně fáze na tuhé látce. *Vysoká škola chemicko-technologická v Praze* [online]. 28. 7. 2005 [cit. 2015-04-08]. Dostupné z: [http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid\\_es-001/hesla/adsorpce\\_z\\_kapalne\\_faze\\_na\\_tuhe\\_latce.html](http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_es-001/hesla/adsorpce_z_kapalne_faze_na_tuhe_latce.html)
78. 2b. Konduktometrie. *Veterinární a farmaceutická univerzita brno* [online]. 5. 2. 2014 [cit. 2015-04-08]. Dostupné z: <http://cit.vfu.cz/biochemie/biofyz12/konduktometrie.html>

79. Chitosan, patenty ověřený derivát. In: *Výzkumný ústav potravinářského průmyslu* [online]. 14. 8. 2006 [cit. 2015-02-11].
80. K100MK3 tenziometr pro plně automatizované měření povrchového a mezifázového napětí. *Centrum polymerních systémů UTB* [online]. 2015 [cit. 2015-04-09]. Dostupné z: <http://cps.utb.cz/index.php/pistrojove-vybaveni/142-tenziometr-krss-k100?lang=>
81. DASH, M. et al. Chitosan—A versatile semi-synthetic polymer in biomedical applications. *Progress in Polymer Science*. ELSEVIER, 2011, č. 36, s. 981-1014. ISSN 0079-6700.
82. KHOR, E. a L. Y. LIM. Implantable applications of chitin and chitosan. *Biomaterials*. 2003, č. 24, s. 2339–49 [cit. 2015-02-11]. ISSN: 0142-9612. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0142961203000267>
83. PEPIĆ, I. J. FILIPOVIĆ-GRČIĆ a I. JALŠENJAK. Interactions in a nonionic surfactant and chitosan mixtures. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. ELSEVIER, 2008, č. 327, s. 90-102. ISSN 0927-7757.
84. RICHARDSON, K. E. et al. Physicochemical and antibacterial properties of surfactant mixtures with quaternized chitosan .... *Carbohydrate Polymers*. Yakov, 2013, č. 93, s. 709-17. ISSN 0144-8617.
85. ZHOU, H. Y. et al. Effect of molecular weight and degree of chitosan deacetylation on the preparation and .... *Carbohydrate Polymers*. ELSEVIER, 2008, č. 73, s. 265-73. ISSN 0144-8617.

**SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK**

CAC	Kritická agregační koncentrace
CMC	Kritická micelární koncentrace
DA	Stupeň acylace
DCI/D <sub>2</sub> O	Roztok deuterium chlorid
DD	Stupeň deacetylace
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
DSS	Dioctylsulfosukcinát sodný
FeCl <sub>3</sub>	Chlorid železitý
FID	Plamenový ionizační detektor
HCl	Kyselina chlorovodíková
HLB	Hydrofilně-lipofilní rovnováha
HPLC	Kapalinová chromatografie
CH <sub>3</sub> COOH	Kyselina octová
CH <sub>3</sub> COONa	Octan sodný
IR spektroskopie	Infračervená spektroskopie
KAS	Kvarterní amoniové sloučeniny
NaCl	Chlorid sodný
NaOH	Hydroxid sodný
NH <sub>4</sub> Cl	Chlorid amonný
NMR	Nukleární magnetická spektroskopie
PAL	Povrchově aktivní látka
PEO	Polyetylenoxid
PLA	Polymléčná kyselina
PPy	Polypyrol

---

PVP	Polyvinylpyrrolidon
PVS	Polyvinylsulfát draselný
RNA	Ribonukleová kyselina
SDS	Lauryl(dodecyl)sulfát sodný
SPEC	Specifický komplex tenzid-polyelektrolyt
UV-VIS spektroskopie	Ultrafialovo-viditelná spektroskopie
V/O	Voda v oleji
WHO	Světová zdravotní organizace
XRD	Rentgenová difrakční analýza

**SEZNAM OBRÁZKŮ**

Obr. 1 Deacetylace chitinu [1] s. 56 .....	12
Obr. 2 a) Hydratovaný chitosan; b) nehydratovaný chitosan [1].....	13
Obr. 3 Struktura zinečnatých komplexů [1] s. 60 .....	15
Obr. 4 Cesty léčivé látky k aktivnímu místu [1].....	17
Obr. 5 Konduktometricka titrace vzorků chitosanu (2) .....	22
Obr. 6 Ukázka HPLC chromatografie – reakce ve směsi chitosanu 1 – kyselina mravenčí, 2 – kyselina octová, 3 – kyselina propionová (2).....	25
Obr. 7 Distribuční křivka molekulárních hmotností [27] s. 11.....	27
Obr. 8 Změna různých fyzikálních vlastností v oblasti CMC [37].....	32
Obr. 9 Závislost povrchového napětí na koncentraci PAL [37] .....	33
Obr. 10 Příklad funkční závislosti koncentrace na vodivosti při konduktometrické titraci pro čistý tenzid [41] .....	34
Obr. 11 Schéma elektrické dvojvrstvy nabitě částice [42] .....	36
Obr. 12 Závislost zeta potenciálu na pH [42] .....	37
Obr. 13 Příčný řez micelou dodecylsulfátu sodného [37] .....	37
Obr. 14 Struktura molekuly DSS (27) s. 11 .....	38
Obr. 15 PPy/DSS částice při nízké (a) a vysoké (b) koncentraci DSS [48] .....	40
Obr. 16 Závislost povrchového napětí roztoku na koncentrace SDS v přítomnosti různých koncentrací PVP [37] .....	42
Obr. 17 Příklad funkční závislosti koncentrace na konduktivitě pro PEO/SDS [37] .....	43
Obr. 18 Ukázka závislosti adsorpce na koncentraci pro neionický tenzid [51].....	44
Obr. 19 Schématický model interakce řetězce nabitého polymeru s opačně nabitým tenzidem [38].....	44
Obr. 20 Změna náboje a charakteru polymerního řetězce při interakci s opačně nabitým tenzidem v závislosti na pH [38] s. 240 .....	45
Obr. 21 Příprava emulze na bázi chitosan/SDS [55] .....	46
Obr. 22 Komplex chitosanu/DSS [59].....	47
Obr. 23 Aparatura pro potenciometrickou titraci.....	54
Obr. 24 Aparatura pro konduktometrickou titraci .....	55
Obr. 25 Použitá aparatura pro stanovení povrchového napětí .....	59
Obr. 26 Použitá aparatura pro stanovování zákalových křivek .....	62
Obr. 27 Potenciometrická titrace chitosanu .....	64



Obr. 28	Konduktometrická titrace chitosanu .....	64
Obr. 29	Závislost redukované viskozity na koncentraci chitosanu .....	67
Obr. 30	Závislost povrchového napětí na koncentraci DSS (pH 4).....	70
Obr. 31	Závislost povrchového napětí na koncentraci DSS (pH 4,4).....	70
Obr. 32	Závislost povrchového napětí na koncentraci DSS (pH 5).....	71
Obr. 33	Závislost CMC na iontové síle .....	72
Obr. 34	Závislost vodivosti na koncentraci DSS (v destilované vodě) .....	73
Obr. 35	Závislost povrchového napětí na koncentraci chitosanu + DSS + pufr o pH 4.....	75
Obr. 36	Závislost povrchového napětí na koncentraci chitosanu + DSS + pufr o pH 4,4.....	76
Obr. 37	Závislost povrchového napětí na koncentraci chitosanu + SJS + pufr o pH 5 .....	76
Obr. 38	Závislost povrchového napětí na koncentracipro samotný DSS a systém DSS/chitosan .....	77
Obr. 39	Závislost Zeta potenciálu na koncentraci DSS .....	79
Obr. 40	Závislost absorbance na koncentraci DSS v pufru o pH 4 .....	81
Obr. 41	Závislost absorbance na koncentraci DSS v pufru o pH 4,4 .....	81
Obr. 42	Závislost absorbance na koncentraci DSS v pufru o pH 5 .....	82

**SEZNAM TABULEK**

Tab. 1 Hlavní oblasti využití chitosanu [8].....	15
Tab. 2 Hlavní vlastnosti chitosanu ve vztahu k jeho použití v biomedicínských aplikacích [8].....	16
Tab. 3 Typ agregátů v závislosti na CPP [38] .....	35
Tab. 4 Fyzikální vlastnosti DSS [44] s. 3 .....	38
Tab. 5 Chemické vlastnosti DSS [44] s. 3 .....	38
Tab. 6 Příprava octanového pufru o pH 4; 4,4 a 5.....	60
Tab. 7 Stupeň deacetylace a počet $\text{NH}_3^+$ [ $\text{mekv}\cdot\text{g}^{-1}$ ]chitosanu .....	65
Tab. 8 Naměřené časy průtoku roztoků chitosanu na Ubbelohdeho viskozimetru .....	66
Tab. 9 Hmotnosti a hustoty vzorků chitosanu .....	66
Tab. 10 Hodnoty relativní, specifické a redukované viskozity pro jednotlivé vzorky chitosanu.....	67
Tab. 11 Micelizační parametry a hodnoty minimálního povrchového napětí DSS v závislosti na pH a iontové síle.....	71
Tab. 12 Množství $\text{NH}_3^+$ [ $\text{mekv}\cdot\text{g}^{-1}$ ] a DSS ve směsi v oblasti nulového zeta potenciálu .....	78
Tab. 13 Koncentrace DSS při vzniku zákalu a sraženiny.....	80