



**Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně**  
**Fakulta technologická**

Disertační práce

**Syntéza a modifikace fyzikálně-chemických  
vlastností gelových soustav pro terapeutické aplikace**

**Synthesis and modification of physico-chemical properties of gel  
systems for therapeutic applications**

**Autor:** **Ing. Ivana Kupská**

**Studijní program:** P2808 Chemie a technologie materiálů

**Studijní obor:** 2808V009 Chemie a technologie materiálů

**Školitel:** prof. Ing. Lubomír Lapčík, Ph.D.

**Oponenti:** prof. Ing. Marián Valko, DrSc.  
prof. RNDr. Vladimír Čech, Ph.D.  
prof. Ing. Petr Svoboda, Ph.D.

Zlín, říjen 2017

© Ivana Kupská

Vydala **Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně** v edici **Doctoral Thesis Summary**.  
Publikace byla vydána v roce 2017.

*Klíčová slova: kyselina hyaluronová (HA), deriváty kyseliny hyaluronové, viskozita, Hugginsova konstanta, limitní viskozitní číslo, prášková reologie, povrchové vlastnosti.*

*Key words: hyaluronic acid (HA), derivatives hyaluronic acid, viscosity, Huggin's constant, intrinsic viscosity, powder rheology, surface properties.*

## ABSTRAKT

Tato práce v teoretické části popisuje čtyři základní kapitoly, kde v první byl popsán obecný přehled gelových soustav. Dále navazuje na hlavní kapitolu o kyselině hyaluronové (HA) jakož to významného zástupce biopolymerů se širokým významem jak v biologii tak i v praktických terapeutických a biomedicínských aplikacích. V této kapitole je podrobně popsáno chemické složení HA a jeho struktura v roztoku, ale také chování polymerního klubka spolu s polyelektrolytickým a reologickým chováním. Další podstatná kapitola se zabývá základními typy derivátů této kyseliny, postupu syntézy a jejich materiálově a fyzikálně-chemické charakterizace. Poslední kapitola teoretického rámce je zaměřena na viskozitu a charakteristiku viskozimetrického měření, kterou byly studovány polymerní roztoky HA.

Předložená práce je v praktické části zaměřena na studium reologických vlastností roztoků hyaluronátu sodného. Předmětem studie bylo pomocí fyzikálně chemických metod sledovat chování hyaluronových roztoků v závislosti na koncentraci. Pro bližší zkoumání vlivu prostředí byly testovány různé iontové složení rozpouštědla. Z důvodu termodynamických parametrů toku je dále popisován vliv rostoucí teploty na viskozitu roztoků a také vliv měnícího se pH. Na základě získaných dat z viskozimetrického měření byly určeny hodnoty limitního viskozitního čísla a Hugginsovy konstanty, které jsou důležité pro pochopení chování polymerního klubka a jeho konformačních změn.

Součástí praktické části byla také charakterizace povrchové energie pomocí inverzní plynové chromatografie (SEA), charakterizace práškové formy kyseliny hyaluronové na základě reologického měření, analýza povrchu prášku HA metodou SEM a studování procesu probíhajícího ve struktuře pomocí termogravimetrie.

## **ABSTRACT**

This thesis is divided into 4 theoretical basic parts. Gels systems in general are described into first part followed by main part regarding hyaluronic acid as significant biopolymers with wide range of use in biology and also in therapeutic fields in biomedical applications. There is a chemistry description and its structure in solution study, but also approach of polymeric coil behaviour with respect to polyelectrolytical and rheological behaviour aspects. Next part deals with basic HA derivates, syntethesis description and physico-chemical characterization. Last theoretical part is mainly focused HA polymeric solution, by studying of viscosimetric measurement.

Submitted thesis is deeply focused on rheological properties of studied sodium hyaluronate solution. The main body of practical part is solved by polymer concentration dependence to rheological sodium hyaluronate solution study from methodical point of view with respect to physico-chemical characterization. Therefore, a viscometric measurement is also discussed as a basic of polymer solution study. Influence of increasing temperature and effect of pH change to viscosity solution is described further due to thermodynamic parameters of flow. Ionic composition of solvents and chemical modification by acid and alkaline substances are also mentioned. Based on viscosimetric measurement data of polymeric coil and conformation changes, intrinsic viscosity and Huggin's constant were calculated.

Surface energy characterization by inverse gas chromatography (SEA) approach is also mentioned. HA topography study by scanning electron microscopy and structure processes by thermogravimetry are described as well.

# OBSAH

1.	ÚVOD.....	8
2.	SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY .....	9
3.	CÍLE DISERTAČNÍ PRÁCE .....	11
4.	TEORETICKÝ RÁMEC.....	13
4.1	Makromolekulární gelová forma hmoty .....	13
4.1.1	Chemicky síťované gely .....	14
4.1.2	Fyzikálně síťované gely .....	14
4.1.3	Hydrogely.....	15
4.2	Kyselina hyaluronová.....	16
4.2.1	Použitelnost a význam v průmyslu .....	17
4.2.2	Chemické složení a struktura .....	18
4.2.3	Struktura v roztoku .....	19
4.2.4	Konformace polymerního klubka a polyelektrolytické chování ..	20
4.2.5	Reologické chování.....	21
4.3	Chemické modifikace hyaluronanu.....	22
4.3.1	Reakce na karboxylové skupině .....	23
4.3.2	Reakce na hydroxylové skupině .....	25
4.4	Viskozita.....	26
4.4.1	Viskozimetrie .....	28
4.4.2	Viskozita disperzních soustav .....	29
4.4.3	Limitní viskozitní číslo a Hugginsova konstanta.....	30
5.	ZVOLENÉ METODY ZPRACOVÁNÍ.....	32
5.1	Příprava vzorků- specifikace roztoků pro viskozimetrii .....	32
5.1.1	Příprava demineralizované vody .....	32
5.2	Měření viskozity na Ubbelohdeho viskozimetru .....	32
5.2.1	Výpočet limitního viskozitního čísla a Hugginsovy konstanty ....	33
5.2.2	Stanovení pH.....	34

5.3	Inverzní plynová chromatografie- SEA (Surface Energy Analyser)...	35
5.4	Prášková reologie.....	36
5.5	Elektronová mikroskopie (SEM).....	38
5.6	Termogravimetrie (TG) .....	39
6.	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....	40
6.1	Použité chemikálie .....	40
6.2	Příprava zásobních roztoků v destilované vodě- vzorek A .....	40
6.3	Příprava zásobních roztoků v 0,01 M KCl- vzorek B .....	41
6.4	Modifikace vzorků A a B pomocí 0,1 M NaOH a 0,1 M HCl .....	41
6.5	Reologické měření viskozity .....	43
6.6	Měření pH .....	44
6.7	Inverzní plynová chromatografie (SEA) .....	45
6.8	Prášková reologie.....	46
6.9	Elektronová mikroskopie SEM.....	46
6.10	Termogravimetrie .....	47
7.	VÝSLEDKY A DISKUZE .....	48
7.1	Viskozimetrické měření.....	48
7.2	Inverzní plynová chromatografie (SEA) .....	55
7.3	Prášková reologie.....	57
7.4	SEM .....	59
7.5	Termogravimetrie .....	60
8.	PŘÍNOS PRÁCE PRO VĚDU A PRAXI .....	62
9.	ZÁVĚR .....	63
10.	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY .....	65
11.	SEZNAM OBRÁZKŮ.....	79
12.	SEZNAM GRAFŮ.....	80
13.	SEZNAM TABULEK .....	81
14.	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK .....	83
15.	SEZNAM PŘÍLOH.....	85

15.1	Příloha A: Výsledky z viskozimetrického měření pro vodný roztok HA .....	85
15.2	Příloha B: Výsledky z viskozimetrického měření pro HA v 0,01 M roztoku KCl.....	90
16.	PUBLIKAČNÍ ČINNOST .....	95
17.	ŽIVOTOPIS .....	97

# 1. ÚVOD

Samotná aplikace gelů nebo gelových soustav v materiálovém inženýrství spadá do velice širokého spektra různých oborů. Používají se především inteligentní materiály, jako jsou hydrogely, které mají své uplatnění například v lékařství, jak při výrobě kontaktních čoček, či jako nosiče léčiv s řízeným uvolňováním v oblasti dávkování léčiv [1, 2]. Aplikace polymerních biomateriálů je v současné době trendem v rekonstrukční medicíně tzv. tkáňové inženýrství. Tento obor se zaměřuje na postupy, které regenerují poškozené či nemocné tkáně a také náhradní tkáně uměle připravenou cestou. V regenerativní medicíně je aplikace hydrogelu nedílnou součástí ošetření míst, které se těžce zacelují a chronických ran tzv. hydrogelovým krytím. Krytí je schopno absorbovat sekret z ran ale především rehydratovat suchou tkáň. Kyselina hyaluronová (HA) je čím dál tím více studována vzhledem k její aktivní využitelnosti v praxi, což také dokazuje vysoká četnost odborných publikací. Vývoj a výzkum pramení z potřeb dnešní doby, proto se tento lineární polysacharid, vyskytující se v živých organizmech drží na špičce popularnosti v mnoha oborech lékařství [3, 4, 5].

V průmyslu se tato kyselina používá především na bakteriálním základu, ale v prvopočátcích výzkumu byla získávána extrakcí, především ze zvířecích tkání. Pro komerční využití se HA vyskytuje v řadě forem, kde odlišnost je dána jednak molekulovou hmotností, původem, ale také chemickou modifikací. K novým aplikacím přispívá samotná modifikace, která mění biologické vlastnosti. S užitím chemických modifikací je dosaženo např. zlepšení reologických vlastností. V současné literatuře je jen z části zastoupeno studování reologického chování HA, a proto se tato práce z větší části zabývá problematiku fyzikálních vlastností biologické a fyziologické funkce roztoku kyseliny hyaluronové. Získané výsledky z praktického měření viskozit mohou být užitečné pro vývoj v biomedicínském průmyslu, který se intenzivně zabývá vývojem nanovláken HA. Efektivnost produkce hyaluronových vláken nese veliké množství faktů, které jsou předmětem dalších studií s uplatněním v tkáňovém inženýrství [6, 7].



## 2. SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

Viskozimetrické vlastnosti roztoků jsou velice významným okruhem pro zdroj informací o chování molekul. Na základě měření viskozity je možné získat parametry jako je např.: molekulová hmotnost, limitní viskozitní číslo, průměrná molekulová hmotnost aj. Tyto parametry se získávají i složitějšími a náročnějšími metodami jako je rozptyl světla a ultracentrifuga. U měření viskozity pomocí viskozimetru, se jedná zpravidla o přesnou a poměrně rychlou metodu, která vzhledem ke své jednoduchosti provedení se dá využít jak v průmyslových provozech, tak v laboratorních podmínkách. Pro určující parametry reologických vlastností jako je závislost redukované viskozity na koncentraci polymerního roztoku se používají rovnice, ať už empirické či odvozené od různých teoretických modelů. Aplikací rovnic, které se používají při extrapolaci ze získaných dat viskozimetrického měření jsou: Hugginsova rovnice (Huggins eq.), Kraemerova rovnice (Kraemer eq.), Schulz-Blaschkeho rovnice (Schulz-Blaschke eq.) a Martinova rovnice (Martin eq.) [8, 9, 10].

V současné době se uplatňuje v hojném zastoupení pro vyjádření závislosti viskozity na koncentraci Hugginsova rovnice, ze které se pro interpretaci používá tzv. Hugginsova konstanta  $k_H$  a limitní viskozitní číslo  $[\eta]$ . V publikacích se můžeme běžně setkat s konstantami odvozenými z rovnic, kde se v mnoha případech diskutuje právě hodnota  $k_H$ . Vyskytuje se také Kraemerův koeficient  $k_K$ , který se liší oproti  $k_H$  ve výpočtu a to logaritmem relativní viskozity na koncentraci [9, 11, 12, 13, 14]. U výpočtu Hugginsovy konstanty se jedná o lineární závislost redukované viskozity na koncentraci, kde nám tato konstanta popisuje interakce mezi polymerními klubky a rozpouštědlem. V mnoha publikacích je Hugginsova konstanta sledována z pohledu konformačních změn, ale je zde brán ohledem na okolní podmínky měření- pH, iontová síla, typ proti-iontu, teplota, stupeň degradace polymeru. Teoretická hodnota  $k_H$  byla stanovena již mnoha odbornými články na přibližnou hodnotu 0,4, ale odchylky od této hodnoty mohou být způsobeny neideálním chováním polymerů [15-20].

V literatuře lze najít řadu odborných publikací, které se zabývají reologickým chováním kyseliny hyaluronové. V publikacích jsou jako měřicí přístroje především využívány kapilární nebo rotační viskozimetry [12, 21, 22, 23]. Vstupní podmínky pro měření jako je teplota a rozpouštědlo se mění vzhledem k prováděné studii, ale obecně se dá předpokládat, že se jedná o laboratorní teplotu  $\pm 10^\circ\text{C}$ . Mnoho odborných publikací se zabývaly studiem roztokových

forem HA v NaCl. Takto zvolené rozpouštědlo evidentně simuluje fyziologický roztok, který se používá v lékařském průmyslu [24, 25].

Vzhledem ke kombinaci fyzikálně-chemických vlastností plní kyselina hyaluronová nesčetně fyziologických funkcí v lidském těle. Jednou z funkcí je lubrikační účinek v synoviálních tekutinách, dále ovlivňuje transport tekutin v závislosti regulace interakce polymer-rozpouštědlo. Podstatná funkce je vytváření specifické vazby s proteoglykany, které zabezpečují stabilizaci organizovaných struktur. V neposlední řadě výčtu funkcí nesmí chybět také ovlivňování distribuce plazmových proteinů mezi intra- a extravaskulárními prostorem a také transportní děje v tkanivu, které se regulují vlivem na difúzi jiných makromolekulárních látek [2].

Pro konkrétní aplikaci ve farmakologii na cílenou distribuci léčiv se hyaluronan využívá jako nosič léčiva, kde jsou hlavní interakce mezi karboxylovými a hydroxylovými skupinami na řetězci. Z léků podávaných běžným způsobem- ústně je dostáno jen malé procento léku a to především z důvodu, že se látka dostává přes krevní oběh do celého těla a ne jen k cílené oblasti. Pro metodu cílené distribuce léčiv, je stěžejní vytvoření vhodné prostorové struktury, tak aby nedocházelo k deformaci řetězců vlivem elektrostatických sil. Tato aplikace je nyní ve fázi výzkumu a vývoje pro léčbu rakoviny pomocí chemoterapie za využití cytostatik [26].

Vzhledem k praktickému využití také práškové formy kyseliny hyaluronové v různých průmyslových odvětvích, je důležité sledovat nestabilitu v jejím toku. Vzniklé problémy toku, což je již uvedená nestabilita, kdy volně tekoucí prášek přestane téct, jsou v současné době běžné zádrhly komplikující jejich zpracování. Vlastní manipulace s práškovými materiály, je běžnou součástí chemického, farmaceutického, biotechnologického průmyslu. Na mechanické zpracování sypkých pevných látek jsou kladeny vysoké standardy kvality, především na profily vlastností [27].

### 3. CÍLE DISERTAČNÍ PRÁCE

Cíle disertační práce jsou rozdělené do dvou sekcí. Kde v konečném výsledku se jedná o pochopení kolektivního chování makromolekul HA v kapalně a tuhé fázi- práškové formě.

V první sekci bylo cílem sledování změn reologického chování roztokové formy kyseliny hyaluronové. Konformační změny přírodních biopolymerů ovlivňují řadu fyziologických procesů živých organismů. Tyto změny jsou modulovány např.: změnou iontového složení, pH, teplotou, přičemž tyto změny probíhají jak na mikro škále, tak v některých případech i makroskopických dimenzích. Jedná se zejména o změny terciálních a kvartérních nadmolekulárních struktur. Pro struktury biopolymerů konkrétně glykosaminoglykanů jsou to degradační procesy primárních a sekundárních struktur. Tyto změny konformace případně i konfigurace se projevují ve změně reologického chování jednak v přímé blízkosti primární a sekundární struktury biopolymeru v důsledku např.: kontrakce nebo expanze makromolekulárního klubka případně změnou terciální struktury např.: změnou dvojitě šroubovice v klubko.

V druhé sekci se studovala prášková forma této kyseliny. Tato problematika se jeví z hlediska praktické aplikace jako velice zajímavá k výše uvedeným roztokovým formám. Znalost povrchových charakteristik tj. např.: smáčivost a povrchová energie práškových forem, najdou své praktické využití pro formy inhalačních kompozic, pro přípravu a výrobu tablet doplňků stravy. Pro problematiku směsování práškových forem je důležitá detailní znalost povrchových charakteristik pro různé stupně pokrytí povrchu. Pokrytí povrchu pak zásadním způsobem ovlivňuje tokové vlastnosti a schopnost tabletování v konečné aplikační formě.

Hlavním cílem plánované disertační práce je získání široké škály experimentálních údajů změn kinematické viskozity vodných roztoků HA a jejich změn vlivem teploty a koncentrace. Na základě Hugginsovy rovnice charakterizovat tokové vlastnosti a rozměr makromolekulárních klubek při daných experimentálních podmínkách. Výsledky budou dále teoreticky zpracovány a statisticky vyhodnoceny. Pro dosažení cílů k disertační práci bylo nezbytné stanovit následující dílčí cíle:

- Prostudovat základní problematiku chování HA v roztoku.
- Zvládnout metodiku viskozimetrického měření na Ubbelohdeho viskozimetru.
- Vypočítat kinematickou a redukovanou viskozitu pro všechny sady vzorků.
- Graficky zpracovat Hugginsovu rovnici.
- Vypočítat Hugginsovu konstantu a limitní viskozitní číslo pro všechny sady vzorků ve 2 rozpouštědlech (0,01 M KCl a demi- vodě) při 3 různých teplotách (25 °C, 30 °C a 35°C).
- Pozorovat změny chování makromolekulárních klubek na základě přísad kyselého a zásaditého prostředí.
- Naměřit pH všech sad vzorků, které byly sledovány.

Jako další cíle vedoucí k prostudování tokových vlastností práškové formy HA a její povrchové energie, identifikaci dějů spojených s výměnou tepla a analyzování povrchu bylo nezbytné stanovit následující dílčí cíle:

- Provést charakterizaci povrchové energie pomocí inverzní plynové chromatografie (SEA).
- Studovat tokové vlastnosti práškových vzorků pomocí práškového reometru.
- Sledovat povrch pomocí skenovacího elektronového mikroskopu (SEM).
- Studovat proces probíhající ve vnitřní struktuře pomocí termogravimetrie.

## 4. TEORETICKÝ RÁMEC

### 4.1 Makromolekulární gelová forma hmoty

Makromolekulární gely nebo také gelové soustavy jsou popisovány a zkoumány již od 19. století našeho letopočtu, kde první zmínky o systémech vytvářejících gely definoval Thomas Graham roku 1861. Definice gelu jsou různé a liší se podle autora, ale jednoduše se dá popsat jako systém, který je tvořený trojrozměrnou sítí o makroskopické velikosti. Tato síť vytváří strukturu tvořenou z řetězců makromolekul, která souvisle prostupuje disperzním prostředím. Za vznik polymerního gelu je tedy považováno samovolné bobtnání polymerní sítě ve vhodném rozpouštědle, když je rozpouštědlem vodné prostředí vzniká polymerní hydrogel [28, 29, 30].

Polymerní gely jsou obecně popisovány jako měkké materiály, které obsahují velké množství kapalného disperzního prostředí, kde na základě jejího obsahu dělíme gely na xerogely a lyogely. Dalším nejčastějším kritériem pro dělení gelových soustav je chování ve vysušeném stavu, kde se gely dělí na reverzibilní a ireverzibilní [31].

Tvoření gelu nebo přesně proces vzniku gelu se nazývá gelace, a je to důsledek příčného síťování lineárních polymerních řetězců, kde se vytvoří dostatečný počet spojů mezi makromolekulami. Síťová struktura je tedy tvořena ze spojovacích oblastí, které se mohou také nazývat uzlové oblasti. Samotné tvorbě gelů lze dosáhnout buď za pomoci chemických reakcí, kde takto vzniklé gely nazýváme kovalentně síťované, druhou možností vzniku je působení fyzikální vlivů, kde vzniknou fyzikálně síťované gely. Při tvorbě polymerní sítě je kladen především důležitý požadavek na vzájemné působení reagujících molekul a také na podmínky, jako je vliv teploty, koncentrace, mechanické vlastnosti a v neposlední řadě vliv pH.

Z hlediska vlastností gelu můžeme říci, že čím větší je rozměr makromolekulární sítě gelu, tím více je pravděpodobný vyšší počet možných vazeb v uzlových bodech. To znamená, že čím víc vazeb mezi řetězci polymeru je, tím menší pravděpodobnost změny tvaru makromolekuly nastává. Hustota a počet funkčních vazeb v uzlových oblastích ve vzniklé prostorové síti má především vliv na rigiditu neboli tuhost gelu a také na jeho porozitu [2, 32, 33, 34].

### 4.1.1 Chemicky síťované gely

Uzly sítě vzniklé chemickou reakcí nazýváme kovalentními sítěmi nebo přesněji kovalentně síťované gely. Tyto gely jsou tedy vzniklé v důsledku primárních vazeb, kde za obecnou chemickou vazbu uvažujeme vazbu kovalentní, iontovou a také kovovou. Kovalentní gel můžeme brát jako síťovou strukturu tvořenou chemickými vazbami, kde tato nekonečná trojrozměrná struktura se může chápat jako makromolekula velikých rozměrů.

Chemicky síťované gely se dají připravit dvěma způsoby. První přidáním síťovacího činidla u lineárních polymerů, dojde k zesíťování. Při tomto způsobu přípravy dojde k vytvoření chemicky vázaných můstků mezi jednotlivými řetězci. Druhý způsob přípravy vzniká u nelineárních polymerů pomocí kondenzační polymerace nebo adiční polymerace [31, 32, 35, 36]. Řetězová chemická reakce neboli polymerace se vyznačuje velkým počtem molekul monomeru, kde vznikají dlouhé makromolekuly polymeru [37].

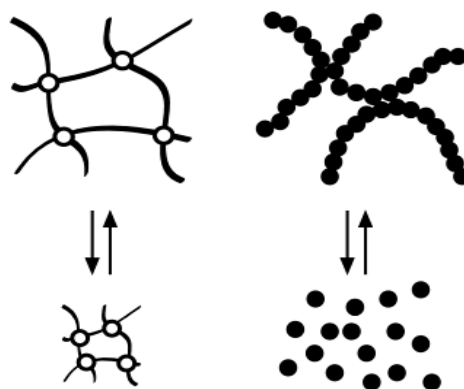
V obou případech způsobu přípravy u síťovacích reakcí roste polymerizační stupeň makromolekulárních útvarů, tzn. nárůst průměrného počtu monomerních jednotek, které připadají na jednu makromolekulu v polymeru. V závěru chemické reakce tvořící kovalentně síťovaný gel se utvoří jedna makromolekula, která prostupuje celým systémem, kde je tento stav označován jako gel. Spojením lineární makromolekuly chemickými vazbami vzniká vysokomolekulární sloučenina síťové struktury, kde struktura je velice pevná [36, 38].

### 4.1.2 Fyzikálně síťované gely

Tyto gely vznikají za pomoci fyzikálních sil, kde samotná struktura je tvořena útvary, které vznikají spojováním úseků polymerních řetězců do uzlových oblastí. Makromolekulární řetězce jsou tedy působením buď van der Waalsových sil, vodíkových vazeb a, nebo polárních sil sdružovány do úseků, které plní funkci uzlů charakteristické pro fyzikální spoje. Uzlové oblasti jsou tedy spojnicí makromolekul, kde v závislosti na své délce se může zapojit do více uzlových oblastí. Spojné oblasti mohou vznikat buď asociací makromolekulárních řetězců, nebo nedokonalou fázovou separací. Základní dva pochody vzniku uzlových oblastí jsou ve výsledku kombinovány do velice složitých mechanismů.

Důležitý ukazatel pro gely vzniklé v důsledku sekundárních vazeb jsou různé typy uzlů, které se liší dobou trvání, strukturou, velikostí a také pevností. Tyto parametry jsou nedílnou součástí reologického studia fyzikálně síťovaných gelů a jejich chování [1, 31, 32].

Při porovnání viskozit je zřejmé, že u fyzikálního gelu je nižší viskozita v porovnání s gely chemických a to z důvodu zesíťování kovalentními vazbami [39]. K porovnání gelů vzniklých v důsledku primárních vazeb (chemicky síťované) s vazbami sekundárními (fyzikálně síťované) poslouží obrázek (1). Obecně se dá říct, že vzniklé fyzikální spoje jsou mnohem větší, než kovalentní uzly, ale také by se neměl opomenout fakt, že uzly u fyzikálních gelů mohou v čase zanikat a poté opět vznikat [38].



Obrázek 1: Struktura chemicky síťovaného gelu (vlevo) a fyzikálně síťovaného gelu (vpravo) [38].

### 4.1.3 Hydrogely

Hydrogel můžeme zařadit do skupiny zesíťovaných gelů s hydrofilním charakterem. Jeho uplatnění je především v medicínském a biotechnologickém průmyslu. Z důvodu již zmíněných aplikací se hydrogely používají především jako inteligentní biomateriály, které se v poslední době čím dál tím víc dostávají do popředí kvůli své biokompatibilitě. Tří dimenzionální polymerní sítě s výraznou afinitou k vodě jsou schopné bobtnat do rovnovážného stavu, což znamená, že volná energie bobtnajícího systému dosáhne svého minima. Absorbovaná voda v zesíťované struktuře hydrogelů propůjčuje chování vlastním měkkým tkáním.

Pro přípravu hydrogelů mohou být použity různé druhy materiálů, jak už syntetické, přírodní či hybridní. Zajímavé jsou především materiály přirozeně se vyskytující, jako je např.: kolagen, želatina, chitosan a kyselina hyaluronová. Síťované deriváty kyseliny hyaluronové tzv. hylany jsou velice atraktivní tématy ke zkoumání. Výjimečnost hylanů tkví především ve vysoké elasticitě [40, 41, 42, 43, 4, 45].

## 4.2 Kyselina hyaluronová

Hyaluronan nebo také hyaluronát, je sodná sůl kyseliny hyaluronové která patří do skupiny glykosaminoglykanů (*GAG*). Tato molekula je vysokomolekulárním lineárním polysacharidem, který se přirozeně vyskytuje v živých organismech a je nejdůležitější složkou mezibuněčné hmoty [46]. Kyselina hyaluronová se v lidském těle vyskytuje přirozeně jako sodná sůl (sodium hyaluronate, *HyA*), kde zaujímá přibližně 15 g při hmotnosti 70 kg a je tedy nutná pro správnou funkci lidského organismu. Zde se účastní v celé škále biologických procesů např.: proliferace a diferenciací buněk, kde jsou tyto imunomodulační procesy využívány při procesech hojení ran [47, 48, 49].

Molekulová hmotnost je důležitým ukazatelem při rozsahu využití a s tím je také spjata přesná úloha hyaluronanu v organismu. Vysokomolekulární hyaluronan může být považován jako strukturní jednotka, neboť nejeví biologickou aktivitu. Naproti tomu nízkomolekulární hyaluronan má vliv na pochody v tkáních a buňkách [50, 51]. Jak již bylo zmíněno, tvoří základní stavební jednotku v extracelulární matrici, kde představuje hlavní složku. V mezibuněčné hmotě je tvořený řadou buněk, kde mezi nejvýznamnější a na syntéze se podílející jsou především fibroblasty, keratinocyty a chondrocyty. Vysoká koncentrace HA je u lidského jedince zastoupena např. v synoviální tekutině, očním sklivci, pupeční šňůře a ledvinách. Díky struktuře je vysoká hydrofilita jednou z nejdůležitějších vlastností, která ukazuje na neobvyklé reologické vlastnosti a lubrikační účinky. Tyto vlastnosti jsou v lidském těle charakteristické především v pohyblivých částech těla, jako jsou klouby a svaly. Zde jsou brány jako viskoelastické látky. V synoviální tekutině je žádoucí vysoká koncentrace pro její mazací účinek, která pomáhá dobré pohyblivosti kloubů a regeneraci vaziv [48, 52, 53, 54].



#### 4.2.1 Použitelnost a význam v průmyslu

Obecně se dá říci, že hydrofilní chování, snadná biodegradovatelnost ve tkáních a především možnost chemické modifikace, staví tento biopolymer na přední příčky ve využitelnosti v mnoha odvětvích. Předmětem této práce není studie aplikací, proto je tato kapitola pouze obecným přehledem. Níže jsou uvedeny přímé aplikace, se kterými se již můžeme setkat v praxi. Běžně se dnes HA využívá při chirurgických operacích v oftalmologii jako ochrana jemných očních tkání a také k zajištění potřebného prostoru během zákroku. Další z aplikací je v ortopedii a revmatologii, kde se používá při léčbě revmatoidní artritidy.

Dermatologie a plastická chirurgie je oblast pro použití derivátů hyaluronanu, ale i hyaluronanu ve své přirozeně se vyskytující lineární formě. V kosmetickém průmyslu má prokazatelné účinky pro pokožku např. zpomalování stárnutí pokožky, hydrataci spolu s protizánětlivými účinky. Zesíťovaná HA je využívána v plastické chirurgii k vyplnění vrásek v obličeji, zvětšení rtů, vyhlazení jizev ale také při prevenci proti pooperačním srůstům např. v gynekologii. Velký přínos má vysokomolekulární HA v přípravcích na lokální ošetření čerstvých ran a také k hojení zánětů kůže. Modifikované HA mají své místo v přenosu léčiv. Zde byly vyvinuty deriváty hyaluronanu jako prostředky pro kontrolované a lokalizované přenosy biologických aktivních molekul [55, 56, 57, 58].

Produkty na bázi kyseliny hyaluronové nesou svoji prestiž také ve veterinární sféře pro technické veterinární prostředky. V tomto odvětví slouží stejně jako pro lidské tělo k léčbě pohybového aparátu, hojení ran a při oftalmologických problémech. Hitem poslední doby jsou produkty s obsahem kyseliny hyaluronové pro perorální podání. Tyto preparáty mají většinou vysokou molekulární váhu, což může způsobit neefektivnost absorpce přes gastrointestinální trakt. Při aplikaci preparátů s nízkou molekulovou hmotností je možné dosáhnout celkového vstřebání a předpokládanou výživu kůže, kloubů, pojivových tkání, synoviální tekutiny a dalších orgánů [59, 60, 61].

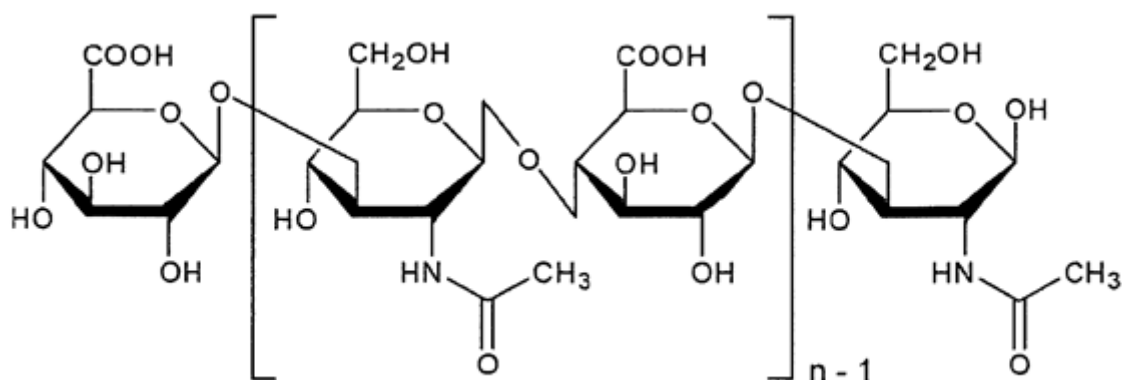
Hlavní pozornost při jednotlivých aplikacích je především fakt, že se dá průmyslově vyrábět v dostatečném množství a vysoké čistotě biotechnologickými procesy z organismů tzv. biosyntézou. Tato látka je prakticky neimunogenní, necytotoxická a nemutagení. Kyselina hyaluronová, vyráběna biotechnologicky mikrobiologickou fermentací pomocí oslabených kmenů *Streptococcus zooepidemicus*, je společensky přijatelnější než dřívější

izolace ze zvířecích tkání např. z kohoutích hřebínků. Vzhledem k náročnosti a možnému výskytu kontaminace v konečném produktu je tato metoda získávání přímo z tkání na ústupu [44, 48, 62].

#### 4.2.2 Chemické složení a struktura

Z chemického hlediska se jedná o nevětvený mukopolysacharid, který je složený z D-glukuronové kyseliny a N-acetyl-D-glukosaminu v přesném poměru 1:1. Skupinu složených sacharidů (mukopolysacharidů) můžeme nazývat také jako glykosaminoglykany. V základní jednotce jsou tedy obsaženy dva různé sacharidy. Samotný řetězec kyseliny vzniká postupným spojováním disacharidových jednotek kyseliny D-glukuronové (*GlcA*) a N-acetyl-D-glukosaminem (*GlcNAc*). Celková struktura biopolymeru je výsledkem pravidelně se opakujících disacharidových jednotek, které jsou vzájemně spojeny střídající se  $\beta$ -1,3 a  $\beta$ -1,4 glykosidickou vazbou. Jak již bylo zmíněno struktura této kyseliny má nerozvětvený řetězec a jedná se o lineární biopolysacharid [48, 58, 63].

Kyselina hyaluronová je zajímavým zastupitelem glykosaminoglykanů z důvodu odlišného chování od ostatních členů z této skupiny a to především tím, že se neváže na proteinové jádro a je syntetizován přímo do extracelulárního prostoru. Dále nemá na svůj řetězec navázané záporně nabitě sulfátové skupiny a v neposlední řadě disponuje extrémní délkou molekul [64, 65]. Na obrázku (2) je znázorněna chemická struktura HA.



Obrázek 2: Chemická struktura kyseliny hyaluronové [66].

Každá disacharidová jednotka molekuly  $n$ , dosahuje počtu v rozmezí  $10^2$ - $10^4$  Da, kde molární hmotnost HA může dosahovat až milionů Daltonů ( $1\text{Da} = 1\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ ). Z důvodu velkého rozmezí počtu jednotek v jednom řetězci vykazují různé vlastnosti při různých molekulových hmotnostech. Nízkomolekulární HA má rozmezí hodnot od 0,5 do 0,7 mil. Da. U střední molekulové hmotnosti se hodnoty pohybují 0,8-1,5 mil. Da a HA vysokomolekulární je od více než 1,5 mil. Da. Molekulová hmotnost může dosáhnout až 4 milionů Da. Ze studií vyplývá, že počet opakujících se jednotek v hyaluronu je okolo 10 000 a více. Přibližná délka průměrného disacharidu se pohybuje okolo 1 nm a má molekulovou hmotnost cca 400 Da. Délka rozložení molekuly HA, tvořena 10 000 mery, by mohla dosahovat 10  $\mu\text{m}$  [53, 62, 67].

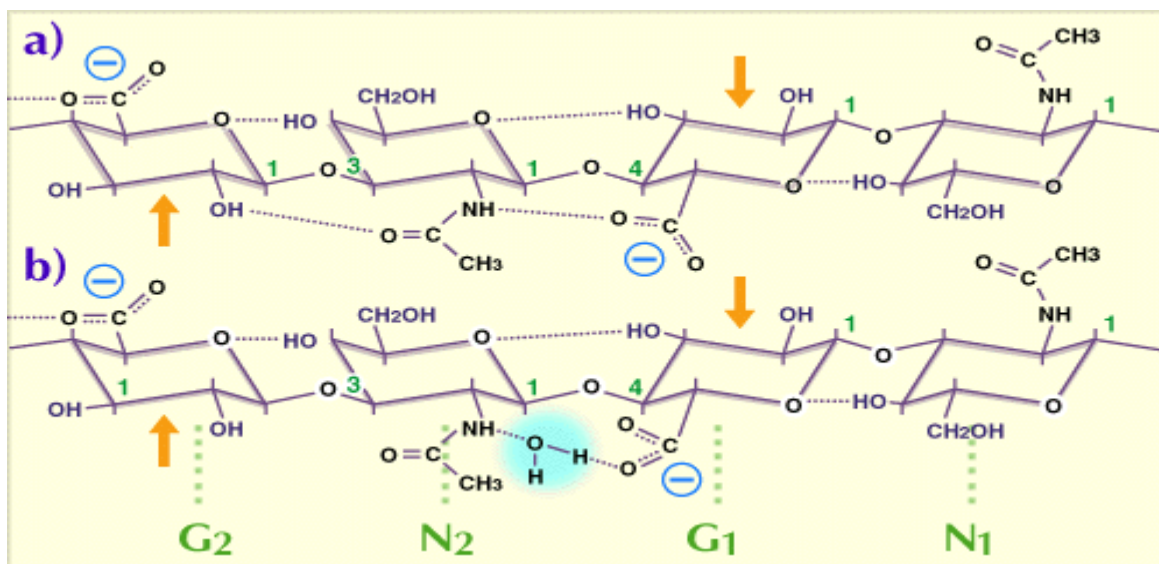
Struktura disacharidové jednotky je velmi stabilní. Hlavní příčina je už v prostorovém uspořádání glykosaminoglykanů, kde základní jednotkou je krevní cukr glukóza. Objemové skupiny hydroxylové a karboxylové v  $\beta$  konfiguraci zaujímají výhodnou energetickou orientaci do ekvatoriálních pozic, tj.: že méně stericky příznivé axiální polohy jsou obsazeny malými atomy vodíků. Molekula je dále stabilizována vznikem vodíkových můstků vznikající mezi volnými elektronovými páry kyslíku v základním glukózovém cyklu, či kyslíky z karboxylových skupin a vodíkem z hydroxylových skupin [68, 69, 70, 71].

### 4.2.3 Struktura v roztoku

Chování HA ve fyziologickém roztoku je výčetem mnoha okolností a to především kombinací chemické struktury disacharidových jednotek, vnitřních vodíkových vazeb a v neposlední řadě interakce s rozpouštědlem. Vodný roztok je závislý na viskozitě, která je silně závislá na molekulové hmotnosti a koncentraci roztoku, což jsou další faktory, které ovlivňují výslednou strukturu. Sekundární strukturu tvoří polymerní řetězce zaujímající v roztoku helikální konformaci, kde obě dvě strany řetězce jsou totožné, ale protisměrně orientované tzv. antiparalelní. Molekula HA zaujímá v roztoku strukturu ve formě náhodně svinutého klubka [52, 53, 72, 73].

Polysacharidové řetězce se přeskupují ve vodném prostředí vlivem rozdílné polarity. Nepochární části jsou tedy axiální vodíky, které se vyznačují hydrofobním charakterem. Ekvatoriální (rovníkové) postranní řetězce jsou zástupcem polární části a zaujímá hydrofilní charakter. Ve strukturálním uspořádání se nepolární část orientuje dovnitř a polární vně do prostředí s rozpouštědlem. Tímto způsobem dochází k vytvoření kompaktní terciální

struktury, která je výsledkem vzájemného kontaktu mezi řetězci. Stáčejší řetězce zaujímají tvar šroubovice (helix). Toto chování je způsobené také superpozicí elektrostatických repulzí ovlivňovaných iontovou silou a pH prostředí [2, 62, 68, 74]. Strukturální uspořádání HA řetězce ve vodném a nevodném prostředí je ukázáno na obrázku (3), kde znázorněný tetrasacharid obsahuje dvě opakující se disacharidové jednotky. Vzniklé vodíkové můstky mezi *GlcA* a *GlcNAc*, jsou označeny tečkovanými čarami. Za nevodné rozpouštědlo je brán např. dimethyl sulfoxid. Zde vznikají prioritně vodíkové vazby (obrázek 3a). Vodíkové můstky ve vodném prostředí jsou nahrazeny přímou vodíkovou vazbou, kdy molekula vody je vázána mezi karboxylovou skupinou D-glukuronové kyseliny a aminoskupinu N-acetyl-D-glukosaminu (obrázek 3b) [75].



Obrázek 3: Chování tetrasacharidu hyaluronového řetězce v nevodném prostředí (a) a ve vodném prostředí (b), kde G znázorňuje kyselinu D-glukuronovou a N znázorňuje N-acetyl-D-glukosamin [75].

#### 4.2.4 Konformace polymerního klubka a polyelektrolytické chování

Makromolekulární charakter a chemická struktura již byly popsány v předešlých odstavcích, ale na úvod této části je důležité zmínit důležité faktory. V tuhém stavu sodná sůl kyseliny hyaluronové tvoří hexagonální mřížku o rozměrech 1,17 nm, kde vzdálenost opakující se jednotky je 2,85 nm. Toto uspořádání struktury je popisováno jako troj-řetězcová svinutá spirála [2].

Řetězec HA obsahuje vazby o různých typech. Vyskytující se kovalentní vazby v glukózových kruzích jsou poměrně pevné a tím udržují stálý tvar

cukernatých zbytků. Propojení cukernatých zbytků nastává přes atom kyslíku spojeného kovalentní glykosidickou vazbou, která je stabilizována vodíkovými můstky. Připojené substituenty ke koncům těchto vazeb mohou rotovat o 360°. Kolem inter-glykosidické vazby je omezená rotace, což má za následek poměrně velkou tuhost řetězce. Molekulární modely vytvořené na počítači daly jasnou představu o konfiguraci této molekuly. Bylo zjištěno velké množství konfigurací na každém glykosidickém můstku. Terciální struktura molekuly není náhodná a to především ze sterických důvodů. Každá disacharidová jednotka je pootočená o 180°, kde dvěma pootočeními se dostává do původní konfigurace. Struktura této molekuly se označuje jako dvakrát stočená šroubovice („two-fold helix“) [76, 77, 78].

Molekula HA se ve vodných roztocích zachovává jako záporně nabitý polyelektrolyt. Důvod je takový, že obsahuje disociovatelné karboxylové skupiny, kde dochází k vázání kladných iontů o různém mocenství v blízkosti ionizovaných karboxylových skupin. Toto chování se projevuje změnou konformace, která závisí na stupni disociace, který je charakterizován pH a iontovou silou. Karboxylová skupina v monomerní jednotce je při fyziologickém pH silně disociována, čímž dává tomuto polysacharidu polyanionický charakter. Disociační konstanta určité skupiny v makromolekulárním řetězci polyelektrolytu velice závisí na iontové síle rozpouštědla a dále také na disociačním stupni dalších funkčních skupin, které jsou přítomny v molekule [79, 80, 81].

#### **4.2.5 Reologické chování**

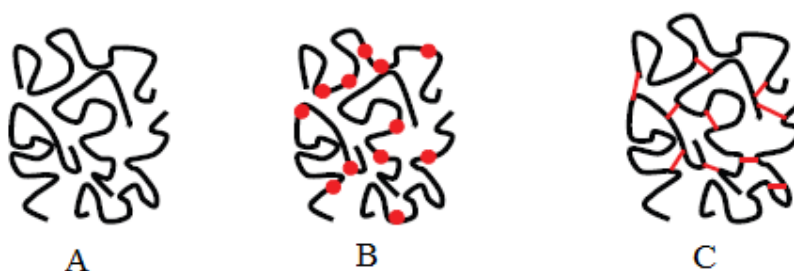
Kyselina hyaluronová je známá svými unikátními reologickými vlastnostmi. Reologické chování je úzce spjata s molekulovou hmotností a koncentrací rozpuštěné HA. Roztoky kyseliny hyaluronové vykazují pseudoplastické chování již při nízkých koncentracích, to znamená, že roztoky mají vysokou viskozitu, která se postupně snižuje ze zvyšující se smykovou rychlostí.

Viskoelastický charakter roztoků je způsoben odchylkou od Newtonova viskozitního zákona u dostatečně dlouhých hyaluronových řetězců nad  $10^5$  Da, kde se z fyzikálního hlediska vyznačuje vysokou hodnotou limitní viskozity. Tato vlastnost je pozorována u koncentrovanějších roztoků HA, kde dochází k proplétání řetězců polymeru a tvoří se souvislé porézní síť. Tyto sítě jsou vytvořené v důsledku vnitřního tlaku, který vznikne mezi a uvnitř molekul a způsobí botnání klubka, což vede k nárůstu měřené viskozity. Při vysokých smykových rychlostech, dochází k poklesu viskozity, která je způsobena

narušením vodíkových můstků v místě vodného můstku a dochází k deformaci a rozplétání útvarů, které značí již zmíněný pokles viskozity. Při překonání kritické smykové rychlosti se již útvary- shluky molekul nestíhají relaxovat a celá kapalina vykazuje chování newtonské kapaliny (roztoky nízkomolekulární HA < 100 kDa). U řetězců HA o nízkých molekulových hmotnostech pod  $10^5$  Da nedochází v roztocích ke vzniku shluků, které jsou propletené. Na základě toho není viskozita kapaliny závislá na velikosti deformačních sil a chová se jako newtonská kapalina [67, 78, 82, 83].

### 4.3 Chemické modifikace hyaluronanu

Na základě chemické modifikace se dají připravit deriváty HA o požadovaných vlastnostech, čímž je možno cíleně dosáhnout specifického chování při jednotlivých aplikacích. Přírodní HA v lineární podobě má vysokou rozpustnost ve vodě a rychlou degradaci v těle. V klinickém využití je tato vlastnost nežádoucí, proto se přistupuje k chemickým modifikacím, které vytváří stabilnější deriváty HA. Fyzikální vlastnosti, biokompatibilitu derivátu a rychlost degradace lze řídit typem chemické vazby, stupněm substituce, umístěním ligandu na hyaluronan, volbou substituentů na ligandu a v neposlední řadě použitým typem síťovací reakce. Záměrem chemických modifikací u biopolymerů je hlavně zvýšit afinitu k nepolárním účinným látkám, ale zároveň je kladen důraz na udržení biokompatibility a biologické účinnosti [6, 59, 84]. Následující obrázek (4) je obecným popisem různých podob kyseliny hyaluronové.



Obrázek 4: Lineární (A), derivovaná (B) a zesíťovaná podoba HA (C) [6].

Z předcházejícího obrázku vyplývá, že existují dva způsoby jak je možno chemicky modifikovat HA a to síťováním nebo konjugací. Tyto chemické úpravy jsou založeny na stejné chemické reakci, ale odlišnost mezi těmito variantami je taková, že sloučenina navázaná na jeden HA řetězec jednou vazbou je konjugace. V případě síťování, se jedná o spojení odlišných hyaluronových řetězců dvěma nebo více vazbami. Pro síťování HA řetězců

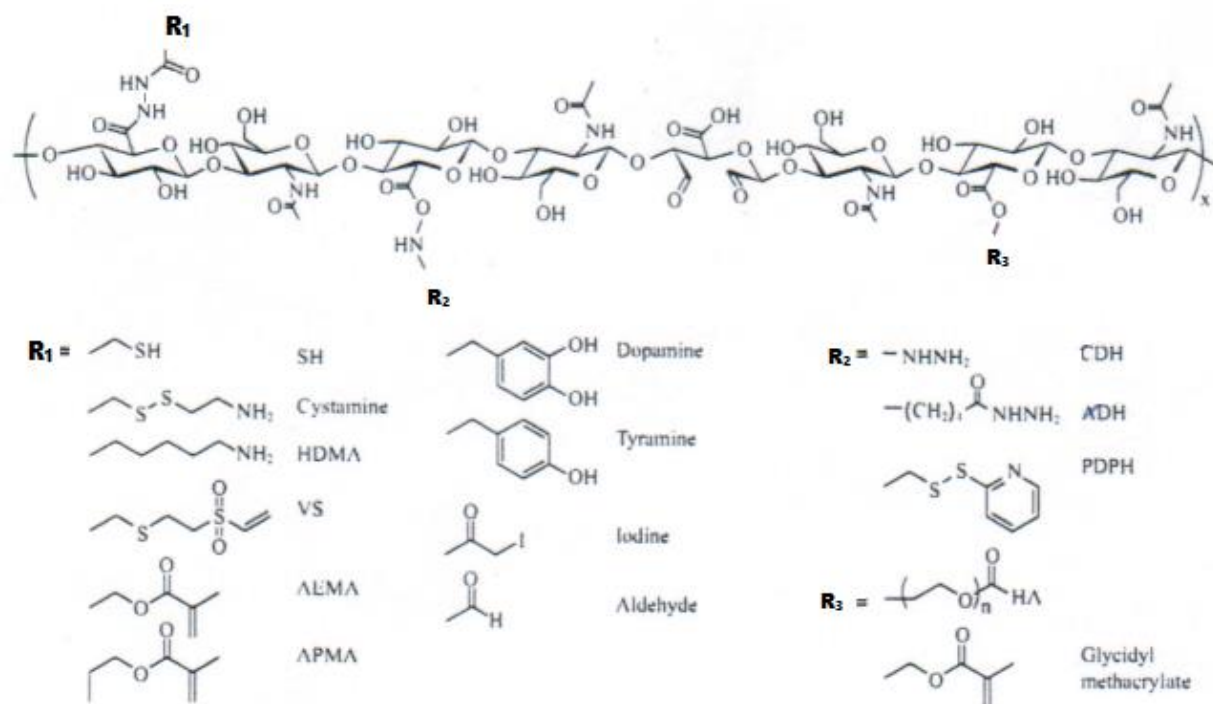
existují různé postupy lišící se typem síťovacího činidla a reakčním mechanismem, kde síťování je zprostředkováno etherovými nebo esterovými vazbami [85].

Strategie k získání derivátů se dají popsat třemi způsoby: Esterifikací, pomocí karbodiimidů, sulfatací. Tyto základní modifikační postupy jsou používány k vytvoření HA derivátů, které jsou vhodné pro přímé aplikace nebo pro následující síťovací procesy. Chemická modifikace může být prováděna na více funkčních místech a to na karboxylové skupině ( $-\text{COOH}$ ), hydroxylové skupině ( $-\text{OH}$ ) a aminoskupině ( $-\text{NH}_2$ ) ve vodném prostředí. Některé modifikace musí být uskutečňovány v organických rozpouštědlech, jako je například dimethylsulfoxid (DMSO), nebo dimethylformamid (DMF).

Výzkum, je v současné době směřován na vytváření derivátů hyaluronanu, které mají způsobilost vytvářet za fyziologických podmínek trojrozměrnou síť, která je základem pro hydrogely. Hydrogely mají lepší mechanické vlastnosti, větší odolnost proti enzymatické a chemické hydrolýze s využitím při různých specializacích v medicíně. Konkrétně v tkáňovém inženýrství se pomocí navázaných ligandů na hyaluronový řetězec tvoří hydrogely, které mohou být prakticky využity jako nosiče léčiv, kryty ran a popálenin [86, 87].

#### 4.3.1 Reakce na karboxylové skupině

Nejběžněji používané modifikace na karboxylové skupině pro hyaluronové řetězce jsou reakce zprostředkované pomocí karbodiimidů (amidace), esterifikace a oxidace jodistanem. Jednotlivé reaktivní místa na řetězci jsou znázorněny na obrázku (5), kde sloučeniny navázané na hyaluronový řetězec jsou rozděleny do 3 skupin ( $R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_3$ ) [86, 87]. Dle následujícího obrázku skupinu  $R_1$  tvoří SH:thiol; cystamin; HDMA: hexane-1,6-diamine; VS:vinyl sulfonyl; AEMA: 2-aminoethyl metakrylát hydrochlorid; APMA: 2-aminoethyl metakrylát; dopamin; tyramin; jód a aldehyd. Do skupiny  $R_2$  spadá CDH: karbodihydrazid; ADH: dihydrazid kyseliny adipové a PDPH: pyridyldithioethylamin. V poslední skupině  $R_3$  je zástupce glycidyl methakrylátu [88].

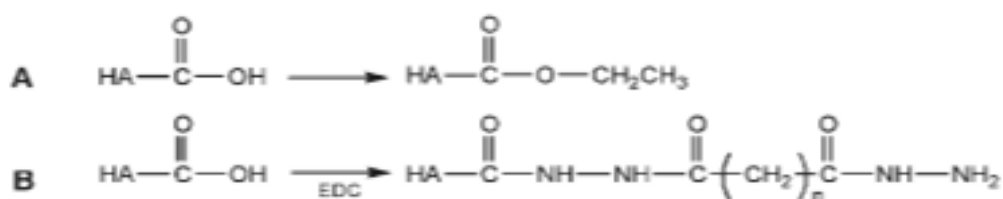


Obrázek 5: Základní modifikace karboxylové skupiny HA [88].

Esterifikace na karboxylové skupině slouží pro přípravu esterů, které jsou podstatné pro různé druhy aplikací. V tkáňovém inženýrství jsou vyžadovány estery, které se budou jen velmi pomalu v organismu odbourávat. Tyto estery jsou ve vodě nerozpustné už při nízkém stupni substituce a v organismu jsou velmi stabilní. Příprava esterů pro tuto aplikaci se provádí ve vodném prostředí oproti klasickým postupům, které zahrnovali přípravu tetrabutylamonné soli (TBA) a byli prováděné v organických rozpouštědlech. Čím více je derivát esterifikován, tím více se stává tužší a více hydrofobní. Narůstající hydrofobní charakter znamená že, deriváty jsou méně rozpustné ve vodě a méně náchylné k enzymatické degradaci. Jak už bylo zmíněno, základní postup esterifikace zahrnuje dva kroky, kde první je příprava kvartérní soli a pak následuje reakce s esterifikačním činidlem v rozpouštědle při určité teplotě. Dalším využitím derivátů esterů HA mohou být při výrobě vláken, membrán, mikro-vrstev [85, 86, 88].



Pro aktivaci karboxylových skupin se velice rozsáhle používají reakce prostřednictvím karbodiimidů (1-ethyl-3-(3'-dimethylaminopropyl) karbodiimid =EDC). Karbodiimidy jsou běžně zprostředkovány kovalentní vazbou karboxylové skupiny jedné bioaktivní molekuly s aminem jiné molekuly (např. reakcí mezi aminokyselinami během peptidické syntézy). Tyto modifikace jsou velmi citlivé na pH, proto je zřejmá vysoká závislost na reakčních podmínkách. Deriváty jsou například používány jako médium k dopravě léčiv. Následující obrázek (6) znázorňuje chemismus esterifikace a reakce pomocí karbodiimidů.

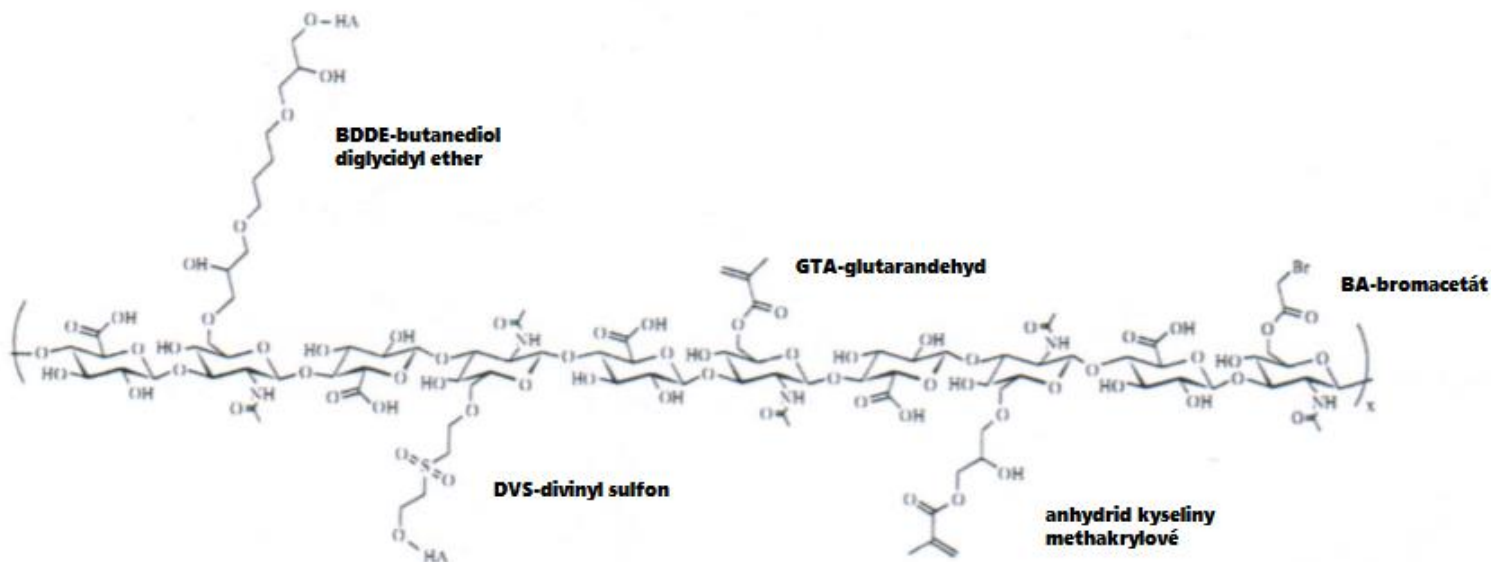


Obrázek 6: Nezesíťované HA deriváty založené na esterifikaci-etyl ester derivátu (A), reakce pomocí karbodiimidů-hydrazid derivátu (B)[85].

Modifikace uskutečněné pomocí alkylace na karboxylové skupině s alkyl-halogenidy jako jsou alkyl jodidy a bromidy, přináší amfifilní deriváty HA. Derivát hyaluronanu nesoucí cystamin, cystein, či jinou thiolovou sloučeninu jsou deriváty připravovány pomocí reduktivní aminace. Sloučeniny tohoto typu se jednoduše na vzduchu spojují a to za vzniku disulfidických vazeb. Využívají se pro přípravu mukoadhezivních přípravků na bázi hyaluronanu a také pro oxidativní reversibilní síťování thiolových derivátů HA [59, 85, 86, 88, 89, 90].

### 4.3.2 Reakce na hydroxylové skupině

Hydroxylové skupiny jsou obvykle upravované etherifikací a také esterifikací pomocí divinylsulfonovým síťovadlem a bis-epoxidovým síťovadlem. Na obrázku (7) jsou znázorněny základní modifikace, kde místem derivatizace jsou hydroxylové skupiny C-2 a C-3 kyseliny glukuronové, které jsou sice méně reaktivní, ale schopné síťování [85, 86, 88].



Obrázek 7: Základní modifikace hydroxylové skupiny HA [88].

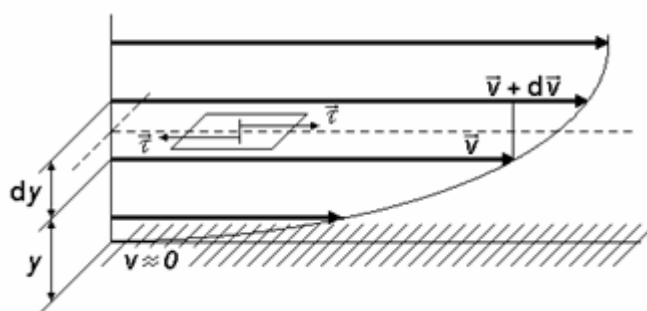
Estery lze připravit klasickou reakcí na primární či sekundární hydroxylové skupině HA. Pokud se použije k přípravě derivátů esterifikace vyšší mastné kyseliny, tak bude mít molekula změněnou rozpustnost ve vodě a tím pádem zvýšenou tendenci interagovat s hydrofobními molekulami v jejím okolí. Pro esterifikaci je na obrázku (7) znázorněn jako zástupce aktivátoru anhydrid kyseliny methakrylové. Další způsob obměny hydroxylové skupiny HA je etherifikace. Pokud je u tohoto typu reakce činidlem DVS, tak je toto činidlo vázáno kovalentně sulfonfyl-bis-etylovou vazbu a vytváří nerozpustný a silný gel. Dalším běžným síťovacím činidlem je epoxid (BDDE-1,4 butandiolglycid eter). GTA- glutarandehyd je méně používaný z důvodu toxicity ve spojitosti s biomedicínskou aplikací. Další reakce a veškeré mechanismy jsou popsány podrobně v následně citovaných publikacích [85, 86, 88, 89].

#### 4.4 Viskozita

Viskozita je základní fyzikální veličina, která se využívá k charakterizaci kapalin. Tato materiálová konstanta vyjadřuje vnitřní tření kapaliny neboli míru odporu tekutiny vůči tečení. Viskozita může být označována také termínem vazkost, která má nulovou hodnotu pro ideální kapalinu. Což ovšem platí jen za předpokladu, že neexistují žádná smyková napětí. V případě skutečné tekutiny je platnost vnitřního tření=0 pouze za podmínky nepohyblivosti tekutin. Vazké

kapaliny se označují především jako viskózní kapaliny s nenulovou viskozitou a při laminárním proudění kapalin (tzn. při malé rychlosti proudění) je tok kapalin uskutečňován jako smyková deformace. Vzniklé vnitřní síly při laminárním proudění jsou v kapalinách důsledkem existence kohezních sil, které působí mezi jednotlivými molekulami kapalin. V případě laminárního proudění probíhají proudové vlákna souběžně a kapalina se nepromíchává [91, 92].

První vysvětlení a pochopení vzniku viskozity dal Newtonův zákon, který vychází z charakteru proudící reálné kapaliny. Tento zákon popisuje proudící kapaliny v relativním pohybu, kde tato viskózní tekutina lpí na smočené stěně a podél normály ke stěně vytváří rychlostní profil newtonské tekutiny. Na obrázku (8) je znázorněný rychlostní profil v proudící kapalině, na němž je také graficky zobrazené rozdělení rychlostí v příčném směru.



Obrázek 8: Rychlostní gradient [93].

Sousedící vrstvy kapaliny mají různou rychlost, kde mezi nimi na jejich rozhraní dochází ke tření a tím pádem ke vzniku tečného napětí v jednotlivých vrstvách proudící kapaliny. Pro newtonské kapaliny platí, že tečné napětí je tím větší, čím více roste rychlost reálné kapaliny od vrstvy k vrstvě. Gradient rychlosti je charakteristický pro pozorování změny rychlosti, je kolmý na směr proudění a podle Newtonova zákona o tření je tečné napětí přímo úměrné gradientu rychlosti. Tento vztah je popsán v následující rovnici (1),

$$\tau = \eta \cdot \frac{dv}{dy} \quad (1)$$

kde tečné napětí označujeme  $\tau$  [Pa], které se dá popsat jako smykové napětí jednotky plochy v rovině x, y. Rychlost toku ve směru osy x je označeno  $v$  [ $\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ ], gradient rychlosti neboli smykový spád  $dv/dy$  [ $\text{s}^{-1}$ ]. Konstanta úměrnosti  $\eta$  je nazývána viskozitou nebo také koeficientem viskozity [ $\text{N}\cdot\text{m}^2\cdot\text{s} = \text{Pa}\cdot\text{s}$ ] [31, 94, 95].

Dynamická viskozita  $\eta$  je veličina a je mírou vnitřního tření a velikosti odporů v tekutině, kde definice udává poměr tečného napětí  $\tau$ . Toto napětí působí ve směru pohybu prostředí k velikosti gradientu rychlosti, který je kolmý na směr pohybu prostředí. Často se používá také přepočítání na kinematickou viskozitu  $\nu$ , která je definována podílem dynamické viskozity  $\eta$  a hustoty dané tekutiny  $\rho$  v rovnici (2), kde jednotkou kinematické viskozity je [ $\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1}$ ].

$$\nu = \frac{\eta}{\rho} \quad (2)$$

Obecně viskozita je funkcí stavových veličin a to teploty a tlaku. Především závisí na teplotě, kde tento vliv je více výrazný než vliv tlaku, který je většinou zanedbatelný. U kapalin s rostoucí teplotou viskozita klesá z důvodu klesajících mezimolekulárních sil, ale na druhou stranu s rostoucím tlakem vzrůstá v případě zvláště vysokých tlaků. Naopak u plynů s rostoucí teplotou viskozita roste z důvodů nárůstu vnitřní energie a tím tedy i rychlosti molekul [96, 97].

#### 4.4.1 Viskozimetrie

Jedná se o instrumentální metodu, která se zabývá měřením viskozity tekutin. Měrnou a základní veličinou ve viskozimetrii je viskozita, jejíž charakter byl popsán výše. Tato metoda poskytuje informace o tvaru a velikosti biopolymerů a dále se dá viskozimetrie zařadit do skupiny hydrodynamických metod. Základ pro hydrodynamické metody spočívá ve sledování pohybu nebo změny orientace látek rozpuštěných, které jsou pod vlivem silového pole [96].

Viskozimetrie je tedy metoda využitelná především k charakterizaci roztoků makromolekulárních látek, které lze podle velikosti částic zařadit mezi koloidní systémy. Jako už bylo napsáno, měřením viskozity lze zjistit chování makromolekul v roztocích, ale také přináší informaci o tvaru makromolekul. Viskozita se zvyšuje s růstem molekulové hmotnosti polymeru [91].

#### 4.4.2 Viskozita disperzních soustav

Disperzní soustava je soustava obsahující alespoň dvě složky (fáze), přičemž jedna složka je rozptýlena ve druhé. Spojitá fáze je disperzním prostředím (rozpouštědlem) a rozptýlená fáze je označována jako disperzní podíl (částice). K charakterizaci viskozit disperzních systémů s kapalným disperzním prostředím se využívají tyto veličiny:

- Relativní viskozita, vyjádřena vztahem (3) udává poměr mezi viskozitou zkoumaného disperzního systému  $\eta$  a viskozitou čistého disperzního prostředí  $\eta_0$ . V koloidních systémech je relativní viskozita vždy větší než 1, bezrozměrná veličina.

$$\eta_{rel} = \frac{\eta}{\eta_0} \quad (3)$$

- Specifická, nebo také nazývána měrná viskozita představuje poměrný přírůstek viskozity. Tato bezrozměrná veličina popisuje relativní změnu viskozitního koeficientu roztoku  $\eta$  proti viskozitnímu koeficientu rozpouštědla  $\eta_0$ . Hodnoty specifické viskozity nabývají vyšších hodnot jak 0 a je definována vztahem (4).

$$\eta_{sp} = \frac{\eta - \eta_0}{\eta_0} = \eta_{rel} - 1 \quad (4)$$

- Redukovaná viskozita, je vyjádření specifické viskozity vztažené na hmotnostní koncentraci polymerního roztoku  $c$ . Velikost redukované viskozity závisí na koncentračním vyjádření disperzního podílu, které bylo použito. Tato veličina sděluje rozdílnost viskozit disperzního systému od viskozit disperzního prostředí a je vyjádřena vztahem (5).

$$\eta_{red} = \frac{\eta_{sp}}{c} \quad (5)$$

- Inherentní viskozita, je dána rovnicí (6), kde přirozený logaritmus relativní viskozity je dělený koncentrací disperzního podílu.

$$\eta_{inh} = \frac{\ln \eta_{rel}}{c} \quad (6)$$

- Limitní viskozitní číslo, je hodnota redukované a inherentní viskozity extrapolovaná na nulovou koncentraci roztoku jak je patrné z následující rovnice (7).

$$[\eta] = \lim_{c \rightarrow 0} \eta_{red} = \lim_{c \rightarrow 0} \eta_{inh} \quad (7)$$

Interakce zředěných roztoků jsou závislé na velikosti a tvaru polymerních klubek, a také na jejich schopnosti protékat mezi molekulami rozpouštědla [32, 98].

#### 4.4.3 Limitní viskozitní číslo a Hugginsova konstanta

Pro limitní viskozitní číslo získané z viskozimetrického měření jsou důležité veličiny, které byly popsány rovnicemi v předešlé kapitole- viskozita disperzních soustav. Samotné určení  $[\eta]$  vychází z grafického zpracování redukované viskozity a koncentrace, kde následuje extrapolace na nulovou koncentraci měřeného polymeru. Limitní viskozitní číslo je úsekem na ose pořadnic, kde po extrapolaci přímka tento úsek protne. Jestliže závislost není lineární, je možné určit  $[\eta]$  jako  $\ln \eta_{red}/c$  vs.  $c$ . Jednotka limitního viskozitního čísla je převrácené koncentrace, což je (l/g) [8].

Pro výpočet limitního viskozitního čísla byla zvolena Hugginsova rovnice, která vyjadřuje závislosti limitního viskozitního čísla na koncentraci, jejíž definice je popsána rovnicí (8). Obecně tato rovnice popisuje viskozitu zředěného roztoku měřenou při různých koncentracích. Křivka závislosti  $\frac{\eta_{sp}}{c}$  vs.  $c$  závisí na molekulové hmotnosti polymeru. S užitím lineární extrapolace je limitováno relativní viskozitou  $\eta_{rel}$  a hodnota je menší než 2.

$$\frac{\eta_{sp}}{c} = [\eta] + k_H[\eta]^2 c \quad (8)$$

Hugginsovu konstantu  $k_H$  určíme z rovnice přímky a to ze směrnice  $K_H[\eta]^2$ . Pokud není závislost lineární, tak se  $k_H$  určí ze směrnice tečny při nulové koncentraci. Podle Hugginse má konstanta  $k_H$  hodnotu 0,38 ale měření ukázala, že hodnota je konstantní pouze u roztoků polymerů o velkých molekulových hmotnostech [8, 9, 99].

Hugginsova konstanta není závislá na molekulové hmotnosti a je bezrozměrná. Popisuje hydrodynamické a termodynamické interakce mezi molekulami rozpouštědla a jednotlivými polymerními klubky. V dobrých rozpouštědlech konstanta  $k_H$  klesá s rostoucím expanzním koeficientem až k hodnotě 0,25. Ve stavu théta nabývá hodnot mezi 0,50-0,55 a ve špatných rozpouštědlech jsou hodnoty mezi 0,8-1. Vysoké hodnoty Hugginsovy konstanty jsou připisovány asociaci makromolekul, kde četnost narůstá s koncentrací. Obecně vzato Hugginsova rovnice nám dává přímou informaci o konfiguraci a konformaci polymerních řetězců ve zředěných rozpouštědlech [11, 32, 99].

Hodnota limitního viskozitního čísla roste působením faktorů, které zvětšují objem polymerního klubka. Rozpouštědlo je hlavním atributem pro ovlivnění hodnoty  $[\eta]$ . S rostoucí kvalitou rozpouštědla makromolekuly bobtnají a rozbalují se, čímž se podílí na zvýšení viskozity a limitního viskozitního čísla, které bude také vzrůstat. Na druhou stranu ve špatném rozpouštědle jsou makromolekuly silně sbaleny. V dobrých rozpouštědlech limitní viskozitní číslo s teplotou vzrůstá. Závislost na teplotě je také důležitým faktorem pro posuzování hodnoty limitního viskozitního čísla. Hodnota  $[\eta]$  se stoupající teplotou narůstá, protože se stoupající teplotou proniká rozpouštědlo do makromolekulárního klubka, které botná. S dalším nárůstem teploty se může více sbalit a hodnota  $[\eta]$  klesá. Příčina je, že při dalším nárůstu teploty se zmenšuje omezování volné otáčivosti kolem jednoduchých vazeb a molekula už není natolik tuhá. Na základě toho, se může polymerní klubko sbalit a ve výsledku klesne hodnota limitního viskozitního čísla [8].

## 5. ZVOLENÉ METODY ZPRACOVÁNÍ

### 5.1 Příprava vzorků- specifikace roztoků pro viskozimetrii

Pro přípravu roztoků se používala prášková forma HA o molekulové hmotnosti 0,7-0,9 MDa (CPN, Česká Republika) mikrobiologického původu. Byly použity 2 druhy rozpouštědel, kde první řadě byla demineralizovaná voda (A) a v druhém případě se jednalo o 0,01 M KCl (B). Celkově bylo namícháno pro tyto dvě rozpouštědla 5 různých koncentrací. Jednotlivé roztoky byly dále modifikovány pomocí přísad kyselých a zásaditých roztoků konkrétně 0,1 M NaOH a 0,1 M HCl, které se přikapávaly v počtu 1, 2, 5, 10, 15, 20 kapek. Detailnější popis přípravy jednotlivých roztoků a konkrétnější specifikace měření bude charakterizována v experimentální části.

#### 5.1.1 Příprava demineralizované vody

Jedná se o velmi jednoduchou laboratorní přípravu čisté vody z pitné vody o výkonu 3-10 l/hod reverzní osmózou. Reverzní osmóza odstraní z vody anorganické ionty s účinností 95-99% a bakterie a mikroorganismy. Parametry zařízení pro vstupní vodu jsou 1000  $\mu\text{S}/\text{cm}$ , teplota 5-30°C, elektrický příkon 10W. Tento typ přístroje má zabudované měřidlo vodivosti, kde je možné sledovat kvalitu výstupní vody. Vodivost demi-vody pro tento typ je  $<1 \mu\text{S}/\text{cm}$  [100].

### 5.2 Měření viskozity na Ubbelohdeho viskozimetru

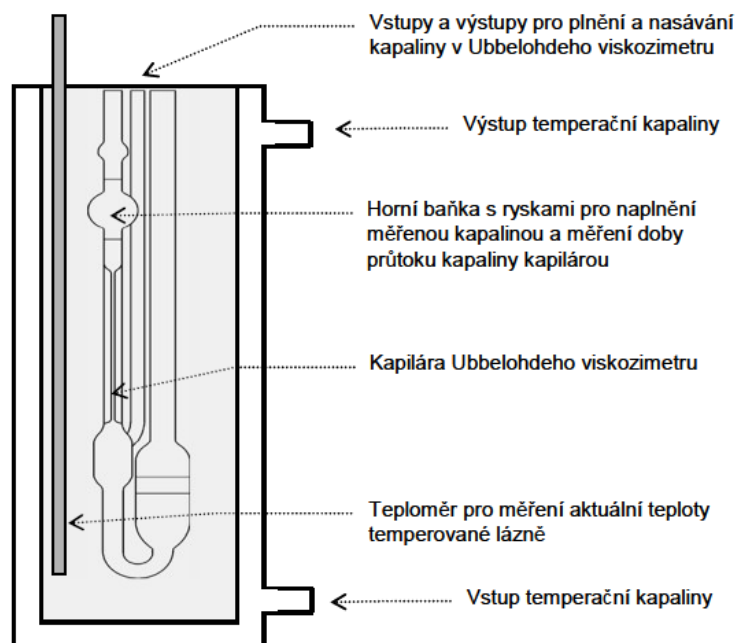
Principem přístroje pro měření kinematické viskozity pomocí Ubbelohdeho viskozimetru je měření fyzikálních veličin a vlastností měřené kapaliny ve specificky tvarované kapiláře. Konstrukce viskozimetru je znázorněna na obrázku (9), kde výsledkem tohoto měření je průtokový čas vzorku mezi ryskami. Kapilární viskozimetry mají přesnost 0,01-0,1 %.

Měření viskozity bylo prováděno pomocí kapilárního viskozimetru již zmíněného typu Ubbelohde (Technosklo, Držkov, Česká Republika). Technické parametry použitého viskozimetru při experimentu: Typ UIa, průměr kapiláry 0,6 mm a konstanta viskozimetru  $K=0,03020 \text{ mm}^2/\text{s}^2$ . Z naměřených průtokových dob jednotlivých roztoků byla dále vypočítána kinematická viskozita  $\nu$  dle rovnice číslo (9):

$$\nu = K \cdot t \quad (9)$$



Z rovnice je zřejmé, že kinematická viskozita  $\nu$  [ $\text{m}^2/\text{s}$ ] je součinem změřené doby průtoku kapaliny kapilárou  $t$  [s] a konstanty viskozimetru uvedené výrobcem  $K$  [ $\text{mm}^2/\text{s}^2$ ].

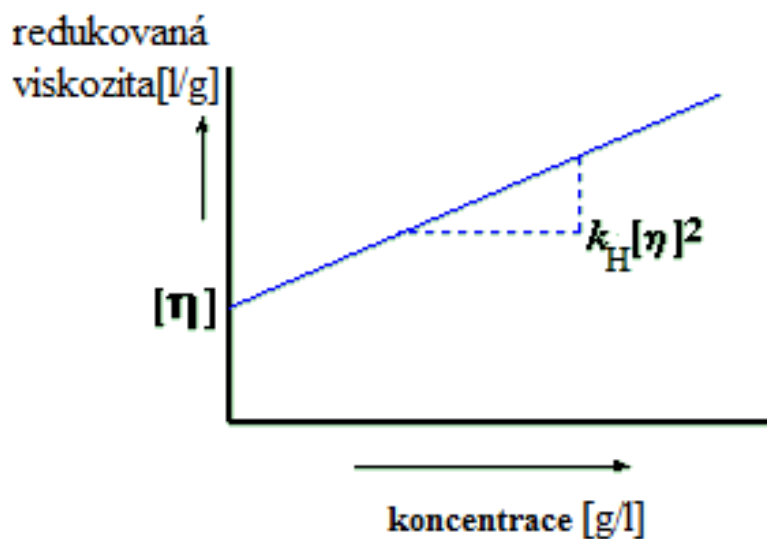


Obrázek 9: Konstrukce Ubbelohdeho viskozimetru [101].

Na základě stanovení kinematické viskozity se dále vypočítala specifická viskozita dle rovnice č. (4). Nedílnou součástí výpočtu specifické viskozity je také stanovení viskozity čistého rozpouštědla v našem případě redestilované vody a 0,01 M KCl.

### 5.2.1 Výpočet limitního viskozitního čísla a Hugginsovy konstanty

Limitní viskozitní číslo  $[\eta]$  bylo určeno z rovnice (8), kde z praktického hlediska byl zjišťován poměr redukované viskozity a koncentrace. Graficky se znázornila závislost již zmíněných veličin (redukované viskozity a koncentrace), kde při extrapolaci křivky na  $c=0$ , přímka vytknula úsek na ose  $\eta_{sp}/c$ , tímto způsobem se získala hodnota limitního viskozitního čísla. Výsledkem je tedy číslo odečtené z regresivní rovnice přímky jako úsek na ose y, jak je viditelné na obrázku (10). Na základě stanovení limitního viskozitního čísla se dále vypočítala Hugginsova konstanta  $k_H$  z rovnice přímky a to ze směrnice  $K_H[\eta]^2$ .



Obrázek 10: Vyhodnocení limitního viskozitního čísla [102].

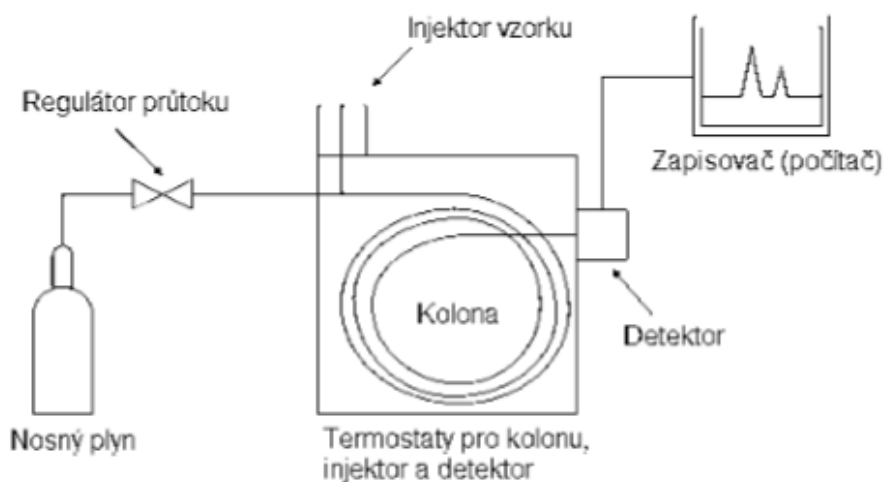
Byly stanoveny limitní viskozitní čísla a Hugginsovy konstanty pro vodné roztoky kyseliny hyaluronové ve 2 rozpouštědlech pro 3 teploty. Tyto základní hodnoty se dále rozšířily o srovnání  $[\eta]$  pro modifikované roztoky 0,1 M NaOH a 0,1 M HCl. Veškeré výpočty navážek, koncentrací, průtokových dob a viskozit budou detailně popsány v praktické části disertační práce spolu s grafickým zpracováním a vyhodnocením  $[\eta]$  a konstanty  $K_H$ .

### 5.2.2 Stanovení pH

Pro přesné měření pH jednotlivých koncentrací byl použit pH metr typu Seven Easy s elektrodou InLab Routine (Metler Toledo, Švýcarsko). Byly proměřeny všechny koncentrace základních roztoků ve vodném tak i v 0,01 M KCl rozpouštědle, a také všechny koncentrace modifikovaných roztoků upravované 0,1 M NaOH a 0,1 M HCl. Přidávky byly přikapávány do roztoku o objemu 40 ml mikropipetou, kde objem kapek byl- 15, 30, 75, 150, 225, 300  $\mu$ l.

### 5.3 Inverzní plynová chromatografie- SEA (Surface Energy Analyser)

Toto zařízení slouží k charakterizaci povrchových a sorpčních vlastností prášků, filmů i vláken. Princip této experimentální metody spočívá ve sledování adsorpce množství plynu na povrchu vzorku. Na základě množství zachyceného plynu na povrchu zkoumaného vzorku se určí specifický povrch námi zkoumaného materiálu. Plyn je vstříkáván do kolony tyčového tvaru, ve které se nachází pevný vzorek a zde dochází k interakci par se zkoumaným materiálem. Retence je sledována pomocí odezvy detektoru plynového chromatografu. Detektor reaguje na přítomnost složky v nosném plynu a vysílá signál, který zaregistroval. Přítomnost složky je indikována měřením určité vlastnosti plynu přicházejícího z kolony. Pro měření byla použita eluční metoda, která je založena na jednorázovém vymývání dávkovaného vzorku nosným plynem. Vzorek se dávkuje najednou do proudu nosného plynu před vstupem do kolony [103, 104]. Princip inverzní plynové chromatografie je schematicky znázorněn na následujícím obrázku (11).



Obrázek 11: Schéma inverzní plynové chromatografie [105].

Až dojde v chromatografické koloně k rozdělení všech n-složek analyzovaného vzorku, chromatogram obsahuje n-elučních píků těchto složek. Na základě získaných retenčních parametrů jednotlivých signálů, výšky a plochy píků lze generovat identitu látky. Z hodnoty retenční vzdálenosti tj. vzdálenost vrcholu píku od počátku chromatogramu se snadno zjistí retenční objem a

retenční čas. Pokud mluvíme o retenčním objemu tak je to objem mobilní fáze, který projde kolonou za určitou dobu při definovaném objemovém průtoku nosného plynu. V případě retenčního času je to celková doba průchodu látky kolonou a vyjadřuje tedy sílu interakce mezi parami a pevnou látkou [104, 105].

Na základě primárních dat z inverzní plynové chromatografie, lze určit mnoho fyzikálně chemických charakteristik- povrchovou energii, aciditu, bazicitu povrchu, parametry rozpustnosti, heterogenitu aj. Pro vyhodnocení povrchové energie a disperzní složky povrchové energie-  $\gamma_S^D$ , byly zvolené dva přístupy, které se řídí následujícími rovnicemi. První je Schultzeho [106], kde definice je popsána rovnicí (10) a druhý přístup je podle Dorris and Gray [107] dle rovnice (11).

$$RT \ln V_N = a(\gamma_L^D)^{1/2} 2N_A (\gamma_S^D)^{1/2} + C \quad (10)$$

Kde  $T$ - absolutní teplota,  $a$ - průřez plochy adsorbovaných molekul,  $R$ - univerzální plynová konstanta,  $\gamma_L^D$ - disperzní složka povrchové energie kapaliny,  $\gamma_S^D$ - disperzní složka povrchové energie pevné látky,  $V_N$ - retenční objem,  $C$ - konstanta.

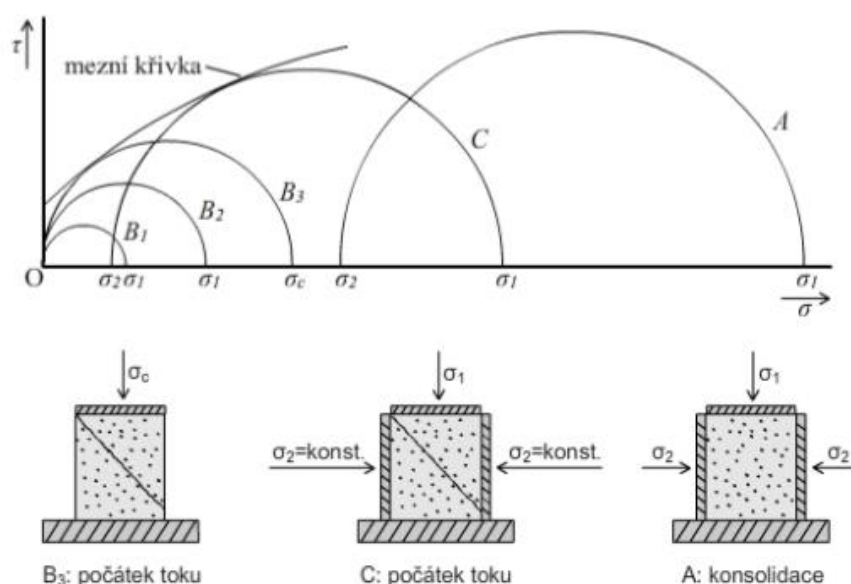
$$\gamma_S^D = \frac{RT \ln(V_{N(C_{n+1}H_{2n+4})}/V_{N(C_nH_{2n+2})})}{4N_A^2 a_{CH_2}^2 \gamma_{CH_2}} \quad (11)$$

Kde  $a_{CH_2}$ - plocha  $CH_2$  jednotky ( $\sim 0,6 \text{ nm}^2$ ),  $n$ - počet karbonových atomů v alkalickém prostředí,  $\gamma_{CH_2}$ - volná energie (přibližně  $35,6 \text{ mJ/m}^2$ ).

## 5.4 Prášková reologie

Partikulární látky jsou charakteristické tím, že na rozdíl od kapalin jsou schopny přenášet třecí síly i v klidové stavu. Silové působení je označováno jako vnitřní tření nebo ho můžeme také nazvat třecí vazbou. K posouzení tokových mechanických vlastností práškových materiálů se využívá smyková cela, která je principiálně popsána v praktické části spolu se schématickým znázorněním na obrázku (16) [108].

Mezi procesní (mechanické) vlastnosti k charakterizaci partikulárních látek patří: stlačitelnost, konsolidace, smyková pevnost, součinitel vnitřního a vnějšího tření. Z hlediska tokových funkcí u práškových materiálů nastane překonání mezi-částicové síly a tzn., že se překročí určitý mezní stav napětí. Pokles napětí pod mezní stav vyvolá v materiálu znovu stav klidu až do té doby, než se napětí nezvýší znova nad mezní stav. Toto chování můžeme aplikovat na příkladu, že prášek je zatížen konsolidačním napětím  $\sigma_1$  v dutém válci a stěna válce působí na vzorek normálovým napětím  $\sigma_2$ . Poté co je konsolidační napětí odstraněno dojde po určité hodnotě napětí k porušení materiálu, kde se jedná o prostou mez kluzu  $\sigma_c$ , tato zkouška se nazývá jednoosá zkouška tlakem a je znázorněna na obrázku (12) ve spodní části spolu s vykreslenými Mohrovými kružnicemi a mezní tokovou křivkou, která charakterizuje rozložení napětí v konsolidovaném vzorku. Z průměrných naměřených hodnot smykového napětí jsou získané body smyku a jejich spojením vznikne mezní křivka [109, 110].



Obrázek 12: Mohrovy kružnice spolu s jednoosou zkouškou tlakem [109].

Tečná (obalová) křivka Mohrových kružnic prezentuje veškeré mezní stavy napjatosti pro dané napětí konsolidovaného materiálu a může být nazývána také jako mezní křivka. Jakékoliv Mohrovy kružnice tečné k mezní křivce jsou stavem, při němž práškový materiál zahajuje tok a je dosaženo mezního stavu napjatosti (kružnice  $B_3$  na obr. 12). Všechny ostatní kružnice, které se nacházejí pod mezní křivkou ( $B_1$  a  $B_2$  na obr. 12), jsou tzv. klidovém stavu a zde dochází pouze k elastické deformaci. Tokové vlastnosti partikulárních látek jsou

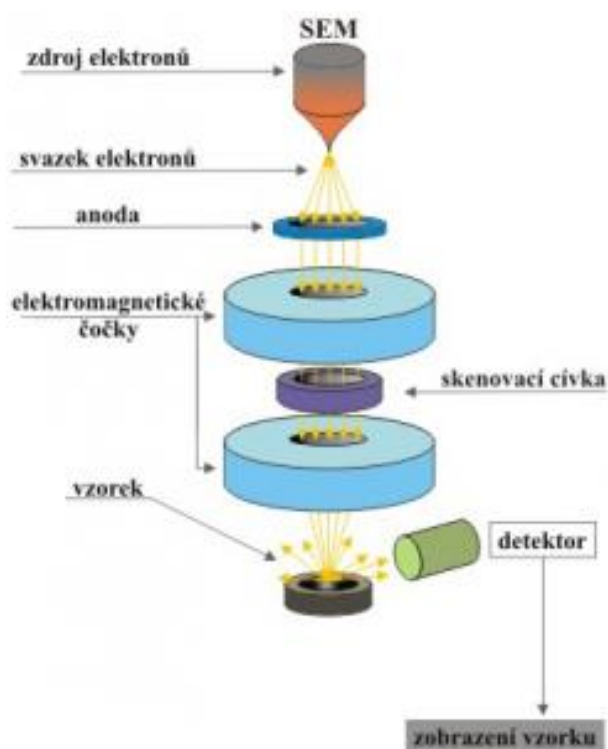
definovány pomocí hodnoty tokové funkce- $ff_c$ , která je vyjádřena vztahem (12) a udává poměr mezi hlavním napětím  $\sigma_1$  a tlakovou pevností (mezi kluzu)  $\sigma_c$ .

$$ff_c = \frac{\sigma_1}{\sigma_c} \quad (12)$$

Klasifikace materiálu podle tokové funkce se dělí na tyto skupiny:  $ff_c < 1$  netekoucí materiál,  $ff_c < 2$  velmi soudržný materiál,  $ff_c < 4$  soudržný materiál,  $ff_c < 10$  snadno tekoucí materiál,  $ff_c > 10$  volně tekoucí materiál [111, 109].

## 5.5 Elektronová mikroskopie (SEM)

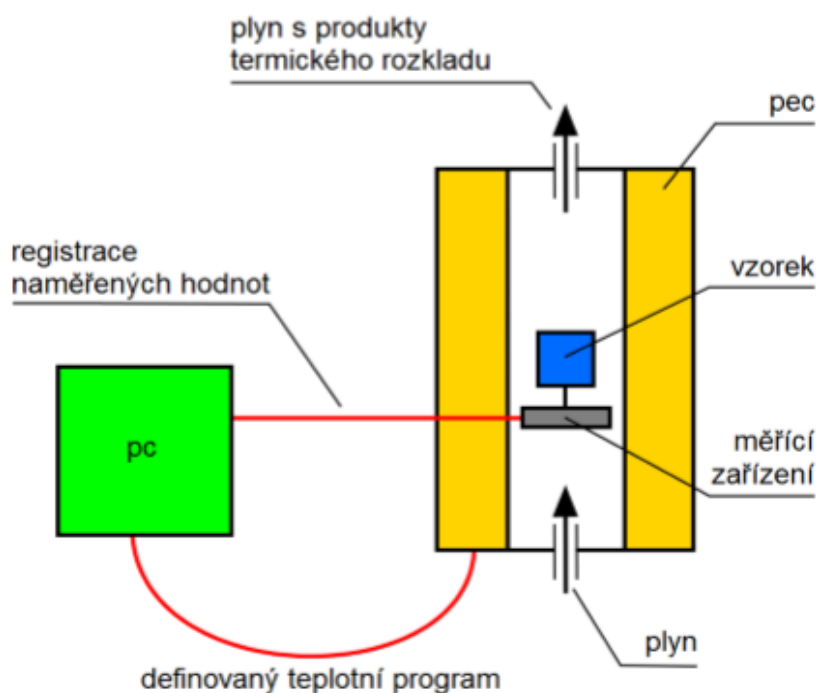
Princip skenovací elektronové mikroskopie je založený na získání obrazu interakce primárního svazku s povrchem prohlíženého vzorku. Primární paprsek elektronů produkovaných žhavenou katodou se pohybuje po řádcích na preparátu a vyráží sekundární elektrony. Sekundární elektrony jsou snímány sondou a převáděny na videosignál, který je zobrazený na monitoru. Žhavená katoda je obvykle elektroda se záporným napětím a děj, při kterém se pohybuje po preparátu, se nazývá rastrování. Na obrázku (13), můžeme vidět schéma optické soustavy pro tzv. řádkovací elektronový mikroskop [112, 113].



Obrázek 13: Znárodnění principu SEM [112].

## 5.6 Termogravimetrie (TG)

Jedná se o základní metodu termické analýzy, která studuje hmotnost nebo změny hmotnosti v závislosti na teplotě, kde výsledkem je termogravimetrická křivka. Vybavení přístroje pro termogravimetrii obsahuje elektrickou pec, analytické váhy, nosič vzorků, zařízení pro řízení a měření teploty, registrační zařízení- počítač vše znázorněné na obrázku (14). Obecně přístroj k měření TG může být označován jako termováha, která se skládá z pánvičky (platinová/korundová) a je zavěšena na citlivých vahách, které zaznamenávají změnu hmotnosti daného vzorku. Vzorek má ve svém okolí buď statickou atmosféru (bez použití žádného plynu) nebo dynamickou atmosféru tzn., že plyn prochází určitou rychlostí. Mohou se použít různé dynamické atmosféry, jako jsou například oxidační- vzduch a  $O_2$  dále inertní- Ar,  $N_2$  a také reaktivní  $SO_2$ ,  $Cl_2$ . Důležité faktory pro analýzu jsou především, příprava vzorku, tvar a materiál pánvičky (kelímku), pečící atmosféra, teplotní program a pecní tlak a vlhkost. Program ohřevu je lineární funkcí času a zkoumaný vzorek podléhá změnám fyzikálních a chemických přeměn. Metodika slouží především k studování složení, tepelné stability, rozkladu, absorpce nebo desorpce, odpařování aj. [114, 115,116].



Obrázek 14: Schéma termogravimetrické analýzy [115].

## 6. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 6.1 Použité chemikálie

Hlavní zkoumanou sloučeninou této disertační práce byl suchý hyaluronát sodný vyrobený CPN spol. s. r.o., Dolní Dobrouč, ČR s výrobním číslem 119-12-01. Tento prášek byl biotechnologického původu, bílé až lehce nažloutlé barvy. Vzhled 0,5% roztoku- čirý, bezbarvý a lehce opalescentní. Obsah sušiny >90,0 %, molekulová hmotnost 0,70-0,90 MDa, pH 0,5% vodného roztoku 5,0-8,0. Čírost 1% vodného roztoku (660 nm, 1cm) < 0,010, obsah bílkovin < 20,0 %, celkový mikrobiální počet (CFU/g) < 100, kyselina uronová- UA > 45,0 %, popel <10,0 % a bez dalších přísad.

Jako další materiál a chemikálie, které byly používány pro viskozimetrické měření:

- Demineralizovaná voda o konduktivitě 0,061 S/cm připravena demineralizací vody reverzní osmózou pomocí přístroje Watek Demiwa 3ROS, ČR.
- Chlorid draselný- KCl (Sigma-Aldrich), M=74,55 g/mol
- Hydroxid sodný- NaOH (Sigma-Aldrich), M=40 g/mol
- Kyselina chlorovodíková- HCl (Sigma-Aldrich), M=36,46 g/mol
- Laboratorní sklo a vybavení- kádinky, váženky, pipety, odměrné baňky aj.
- Magnetické míchadlo, analytické váhy, teploměr.

### 6.2 Příprava zásobních roztoků v destilované vodě- vzorek A

Byly připraveny zásobní roztoky kyseliny hyaluronové a to následujícím způsobem: V první fázi byla odvážená navážka o hmotnosti 1 g HA na analytických vahách s přesností 0,0001 g. Tato navážka byla poté přesypána do demi-vody o objemu 1 l ve které se mísila na magnetickém míchadle po dobu 24 hodin, při pokojové teplotě. V druhé fázi se z takto připraveného zásobní roztoku 0,1 hm% HA ředilo na 4 další koncentrace do objemu 40 ml dle následující tabulky č. 1:



Tabulka 1: Ředění vzorků na základní koncentrace.

Označení ředění	Vzorek A (ml)	H <sub>2</sub> O (ml)	c (g/l)
C <sub>1</sub>	40	0	1
C <sub>2</sub>	28	12	0,7
C <sub>3</sub>	24	16	0,6
C <sub>4</sub>	20	20	0,5
C <sub>5</sub>	16	24	0,4

### 6.3 Příprava zásobních roztoků v 0,01 M KCl- vzorek B

Pro přípravu HA v roztoku KCl byl nejdříve namíchán zásobní roztok o koncentraci 0,01 M postupným rozpouštěním přesně naváženého množství chloridu draselného v demi-vodě podle rovnice (13),

$$m = c * M * V \quad (13)$$

kde  $c$ -molární koncentrace (mol/l),  $M$ - molární hmotnost (g/l),  $V$ - objem (l).

Byly připraveny zásobní roztoky 0,01 M KCl do objemu 1l s vypočítanou navázkou 0,7455 g KCl, které se mísily na magnetickém míchadle po dobu 24 hodin při pokojové teplotě. Do takto připraveného čerstvého roztoku 0,01 M KCl se navážil 1 g HA a nechal se opět mísit na magnetickém míchadle 24 hod., kde vznikl 0,1 hm. % HA v 0,01 M KCl. V konečné fázi se také takto připravené zásobní roztoky ředily stejným způsobem jako u vodných roztoků do objemu 40 ml dle tabulky č. 1. Rozdíl byl pouze v rozpouštědle HA, kde se v druhém sloupci jednalo o vzorek B a jako ředící roztok ve 3 sloupci byl použit roztok 0,01 M KCl a ne voda.

### 6.4 Modifikace vzorků A a B pomocí 0,1 M NaOH a 0,1 M HCl

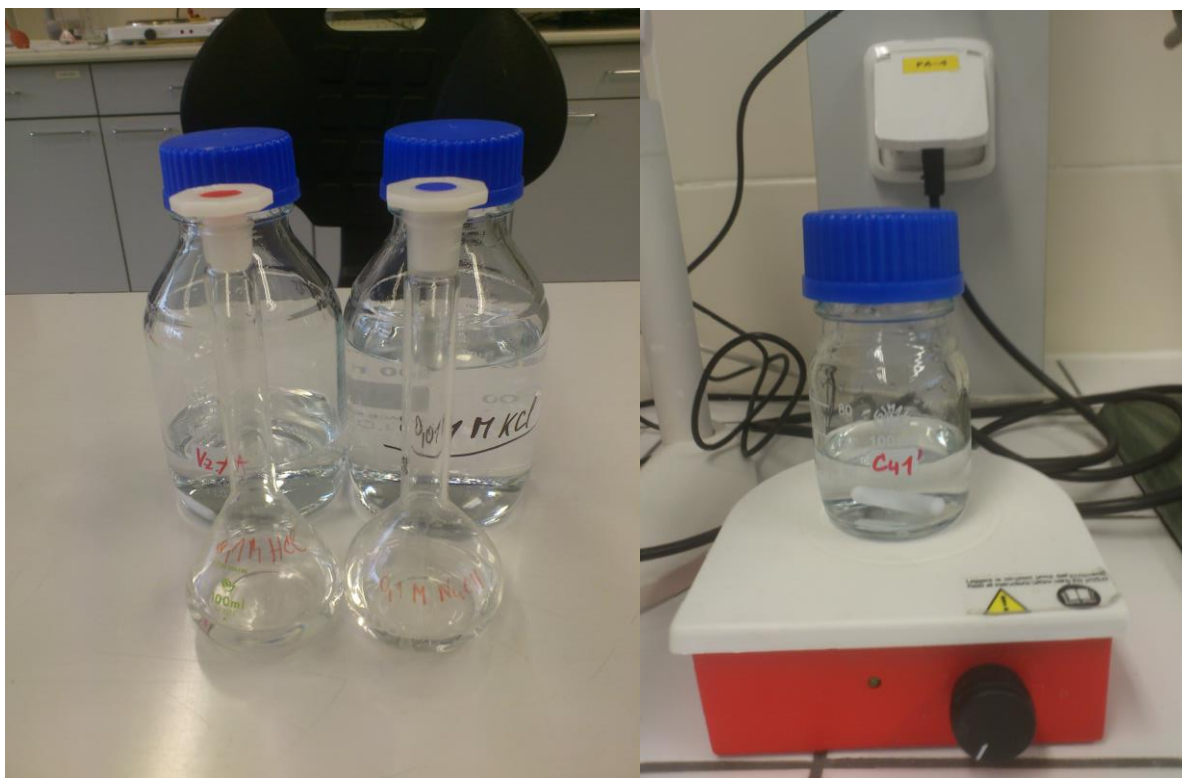
Pro pozorování vlastností a změn chování makromolekulárního klubka byly dále do základních roztoků c<sub>1</sub>-c<sub>5</sub> o objemu 40 ml přidávány kapky v počtu 1, 2, 5, 10, 15, 20. Bylo zkoumáno chování vzorků A a B pro dva rozdílné roztoky, kde v prvním případě se jednalo o zásaditou anorganickou sloučeninu 0,1 M

NaOH a v druhém případě o kyselinu 0,1 M HCl. Kapky se přidávaly pomocí mikropipety, přičemž objem jedné kapky byl přibližně 15  $\mu\text{l}$ . Navážky pro přípravu roztoků byly opět stanoveny na základě vzorce (13). Při výpočtu se počítalo s objemem 100 ml, kde pro 0,1 M NaOH byla navážka 0,40049 g a pro 0,1 M HCl 0,37128 g.

V následující tabulce č. 2 je přehled značení všech zásobních roztoků, pro které bylo přeměřeno pH a následně se měřila kinematičká viskozita pomocí Ubbelohdeho viskozimetru. Změny chování byly pozorovány v závislosti na teplotě při 25°C, 30°C, 35°C. Pro vzorky A s přidavkem 0,1 M NaOH se jednalo o popis pomocí písmen A-F. U přidavků 0,1 M HCl do vzorků A byly písmena A-F doplněny o číselný index 1. Pro vzorky B s přidavkem 0,1 M NaOH se jednalo o popis pomocí číselné řady 1-6. U přidavků 0,1 M HCl do vzorků B byl popis číselné řady doplněn o apostrof. V obou případech začíná značení 0- tzn. že se jedná o čistý roztok vzorků A nebo B bez přidavků kapek. Například vzorek označen  $c_3C$  značí, že se jedná o vodný roztok HA o koncentraci 0,6 g/l s přidavkem 5 kapek o objemu 75  $\mu\text{l}$  0,1 M NaOH.

*Tabulka 2: Popis značení vzorků pro viskozimetrické měření.*

HA ve vodném roztoku- vzorek A				HA v 0,01 M KCl- vzorek B			
0,1 M NaOH		0,1 M HCl		0,1 M NaOH		0,1 M HCl	
Značení	Objem kapky [ $\mu\text{l}$ ]	Značení	Počet kapek	Značení	Objem kapky [ $\mu\text{l}$ ]	Značení	Počet kapek
$C_1-c_50$	0	$C_1-c_50$	0	$C_1-c_50$	0	$C_1-c_50$	0
$C_1-c_5A$	15	$C_1-c_5A_1$	1	$C_1-c_51$	15	$C_1-c_51'$	1
$C_1-c_5B$	30	$C_1-c_5B_1$	2	$C_1-c_52$	30	$C_1-c_52'$	2
$C_1-c_5C$	75	$C_1-c_5C_1$	5	$C_1-c_53$	75	$C_1-c_53'$	5
$C_1-c_5D$	150	$C_1-c_5D_1$	10	$C_1-c_54$	150	$C_1-c_54'$	10
$C_1-c_5E$	225	$C_1-c_5E_1$	15	$C_1-c_55$	225	$C_1-c_55'$	15
$C_1-c_5F$	300	$C_1-c_5F_1$	20	$C_1-c_56$	300	$C_1-c_56'$	20



Obrázek 15: Připravené zásobní roztoky HA (vlevo) a vzorek HA v 0,01 M KCl o koncentraci 0,5 g/l s přidavkem 1 kapky 0,1 M HCl (vpravo).

## 6.5 Reologické měření viskozity

Základem reologického měření bylo stanovení dílčích kroků popsaných výše v kapitole o zvolených metodách zpracování. Počáteční měření kinematické viskozity a dále stanovení specifické viskozity jsou hlavní body, od kterých se stanovují výsledné reologické veličiny jako je limitní viskozitní číslo a Hugginsova konstanta.

Měření viskozity probíhalo na Ubbelohdeho kapilárním viskozimetru dle obr. 10, kde se nejdříve měřilo čisté rozpouštědlo a až poté byly měřeny průtokové časy vzorků A a vzorků B o nejvyšší koncentraci  $c_1=1$  g/l. Tento roztok se poté ředil čistým rozpouštědlem pro vzorek A-demi-vodou a pro vzorek B- 0,01 M KCl dle tabulky č. 1 na 5 základních koncentrací. Vzhledem ke zkoumané problematice chování makromolekulárního klubka, se měřily také průtokové časy modifikovaných zásobních roztoků s 0,1 M NaOH a 0,1 M HCl definované kapitolou 6.4 a popsané v tabulce č. 2. Všechny připravené vzorky byly temperovány a měřeny při 25, 30, 35 °C pro pozorování závislosti koncentrací na teplotě. Teplota lázně se během měření udržovala v rozmezí 0,01 °C. Při vlastním měření byla kladena především největší pozornost na správné

vytemperování roztoků, kde se každý vzorek temperoval 20 minut a v neposlední řadě přesnému odečtení průtokových časů, které se opakovalo u každého vzorku 3x. Z hodnot byl vypočten průměr a používal se k dalším výpočtům.

Výpočty pro stanovení limitního viskozitního čísla z průměrných hodnot průtokových časů vzorků a čistého rozpouštědla a hodnot koncentrací probíhaly dle rovnic 3-6. Vzhled k velkému objemu dat z viskozimetrického měření budou průběžné výsledky vedoucí k dosažení sledovaných veličin součástí přílohy A, přílohy B. Na základě výpočtů poté byly sestrojeny grafy závislosti redukované viskozity na koncentraci, kde extrapolací lineární části závislosti redukované viskozity na nulovou koncentraci byla získána hodnota limitního viskozitního čísla  $[\eta]$  výpočet prováděný dle rovnice (7) a Hugginsova konstanta  $k_H$  se stanovila ze směrnice dle rovnice (8).

Vzhledem k naměřeným relativně vysokým hodnotám kinematičké viskozity, budeme uvažovat, že  $[\nu]=[\eta]$ . Toto tvrzení je podloženo rovnicí (14), u které je poslední člen  $A=\frac{1-\nu_2\rho_0}{100\rho_0}$  zanedbatelný u všech měření,

$$[\eta] = [\nu] + \frac{1-\nu_2\rho_0}{100\rho_0} \quad (14)$$

kde  $\nu_2$  je parciální specifický objem a  $\rho_0$  je hustota rozpouštědla [117].

## 6.6 Měření pH

Samostatné měření pH probíhalo po dokonalé homogenizaci suchého hyaluronátu sodného s různým druhem zásobního roztoku. Příprava zásobních roztoků a jejich koncentrace je popsána v předcházejících kapitolách 6.2-6.4. V úvodu měření proběhla kalibrace pH metru dle instrukcí výrobce kalibračními vodnými roztoky- pufry. Základem kalibrace je zadání výchozích podmínek programu pro výpočet hodnoty pH do paměti pH metru. Vlastní realizace měření probíhala na základě ponoření elektrody pH metru do vzorku při pokojové teplotě. Elektroda generuje napětí v závislosti na hodnotě pH v roztoku. Výsledek z pH-metru byl zapsán až po ustálení hodnoty pro všechny připravené koncentrace 2 zásobních roztoků do přehledné tabulky č. 3. Měření probíhalo při pokojové teplotě, kde výsledkem je průměrná hodnota z 10 opakování s vypočítanou směrodatnou odchylkou.

Tabulka 3: Souhrn naměřeného pH pro 2 druhy rozpouštědel.

		25 °C		30 °C		35 °C	
		0,1 hm% HA v H <sub>2</sub> O	0,1hm% HA v 0,01 M KCl	0,1 hm% HA v H <sub>2</sub> O	0,1hm% HA v 0,01 M KCl	0,1 hm% HA v H <sub>2</sub> O	0,1hm% HA v 0,01 M KCl
ČISTÝ		7,01±0,18	6,23±0,60	7,09±0,29	6,24±0,60	7,00±0,29	6,24±0,60
NaOH	1 k*	9,25±0,09	6,83±1,33	9,22±0,10	6,81±1,32	9,25±0,10	6,80±1,29
	2 k	9,83±0,08	7,64±1,53	9,48±0,08	7,71±1,49	9,83±0,09	7,71±1,49
	5 k	10,31±0,09	9,64±0,92	10,33±0,08	9,66±0,93	10,33±0,09	9,64±0,92
	10 k	10,64±0,09	10,32±0,50	10,66±0,09	10,32±0,50	10,64±0,11	10,32±0,50
	15 k	10,80±0,09	10,24±1,20	10,82±0,10	10,23±1,20	10,81±0,11	10,24±1,19
	20 k	10,93±0,09	10,54±0,82	10,94±0,08	10,54±0,82	10,93±0,10	10,53±0,82
HCl	1 k	5,85±0,15	5,61±0,12	5,89±0,17	5,63±0,11	5,92±0,08	5,67±0,03
	2 k	5,44±0,08	5,12±0,11	5,46±0,10	5,11±0,11	5,46±0,10	5,11±0,11
	5 k	4,84±0,14	4,56±0,10	4,85±0,14	4,57±0,94	4,85±0,15	4,58±0,08
	10 k	4,11±0,62	4,16±0,12	4,31±0,22	4,14±0,13	4,12±0,63	4,14±0,14
	15 k	3,99±0,22	3,95±0,20	4,00±0,23	3,96±0,20	4,00±0,24	3,95±0,20
	20 k	3,76±0,21	3,73±0,19	3,76±0,10	3,73±0,20	3,77±0,21	3,73±0,19

\*k= kapka

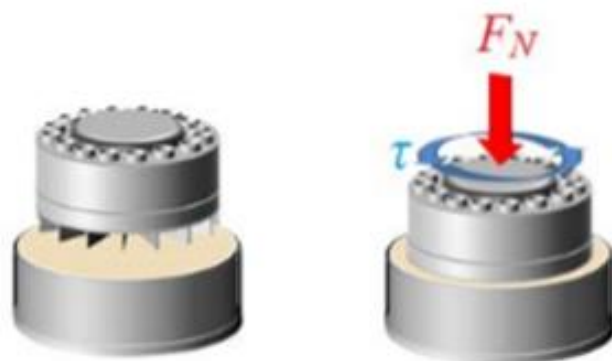
## 6.7 Inverzní plynová chromatografie (SEA)

Povrchová energie byla charakterizována pomocí inverzní plynové chromatografie měřicím přístrojem (SEA). Disperzní složka povrchové energie  $\gamma_s^D$  byla vypočítána na základě retenčního času získaného z měření inverzní plynové chromatografie pro sérii n-alkanů: Nonan, oktan, hexan, heptan (Sigma Aldrich USA). Experimenty prováděné s nekonečným zředěním znamenají nulové pokrytí povrchu a v tomto případě se izoterma řídí Henryho zákonem a množství par je lineárně závislé na koncentraci nástřiku [118].

Vzorek byl nastříknut do komory temperované nástřikové kolony (injektoru), kde se odpaří a je dále ve formě par unášen nosným plynem až do kolony o vnitřním průměru 4 mm a o celkové ploše přibližně 0,5 m<sup>2</sup>. Složky ze vzorku se na začátku kolony sorbují ve stacionární fázi a dělicí proces se neustále opakuje. Okamžitou koncentraci separovaných látek v nosném plynu indikuje detektor, kde signál detektoru je vyhodnocován z časového průběhu za určením druhu kvantitativního zastoupení složek.

## 6.8 Prášková reologie

Studium tokových vlastností bylo pozorováno pomocí FT4 práškového reometru (Freeman Technology, UK). Experimenty byly prováděny při pokojové teplotě 24° C a relativní vlhkosti 43 %. Jedná se o patentovanou dynamickou metodu, která byla speciálně vyvinuta pro pochopení chování práškových materiálů, kde vyhodnocení je automatické. Pro naše měření byla použita smyková cela složená z misky, která je vodorovně položená a na ní umístěné víčko, které je v případě FT4 reometru pohyblivou částí. Vzorek materiálu v cele je tedy upevněný a působí na něj vertikálně normálová síla  $F_N$ , která se přepočítává na normálové napětí  $\sigma$ . Víčko se pohybuje rotačním pohybem, který tvoří v materiálu smykové napětí  $\tau$  [108, 119]. Zobrazení smykové cely pro typ FT4 práškového reometru je na obrázku (16).



Obrázek 16: Smyková cela pro FT4 reometr [120].

## 6.9 Elektronová mikroskopie SEM

Pro pozorování povrchu práškové formy HA byl použit skenovací elektronový mikroskop (Hitachi 6600 FEG, Japonsko). Vzorek práškové formy HA byl suchý bez cizorodých částic, prachu přichycen na podložku. Při expozici primárními elektrony nedocházelo k nabíjení a vzorek produkoval dostatečné množství sekundárních elektronů.

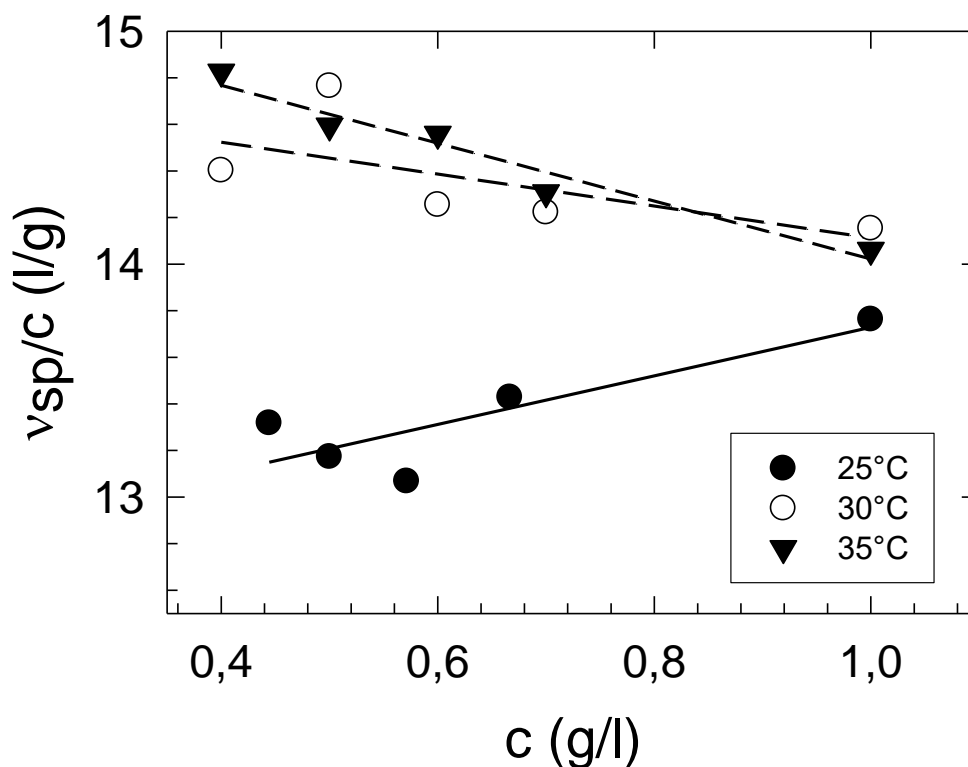
## 6.10 Termogravimetrie

Pro naše účely byly připraven vzorky pro charakterizaci obsahu vlhkosti pomocí DTA-TG, kde analýza byla prováděna na termogravimetru (Shimadzu DTG 60, Japonsko). Zkoumaný vzorek- prášková forma HA se umístí v kelímku (nosiči) na termo-váhy v pícce termického analyzátoru. Měření bylo prováděno v dynamické atmosféře a inertním prostředí dusíku ( $N_2$ -50 ml/min) s teplotním programem  $10^\circ C/min$  v intervalu  $40^\circ C - 500^\circ C$ . U vzorku dochází vlivem ohřevu definovanou rychlostí k lineárnímu růstu teploty s časem. Výsledek analýzy je termogravimetrická křivka práškové formy kyseliny hyaluronové, která bude diskutována v následující kapitole.

## 7. VÝSLEDKY A DISKUZE

### 7.1 Viskozimetrické měření

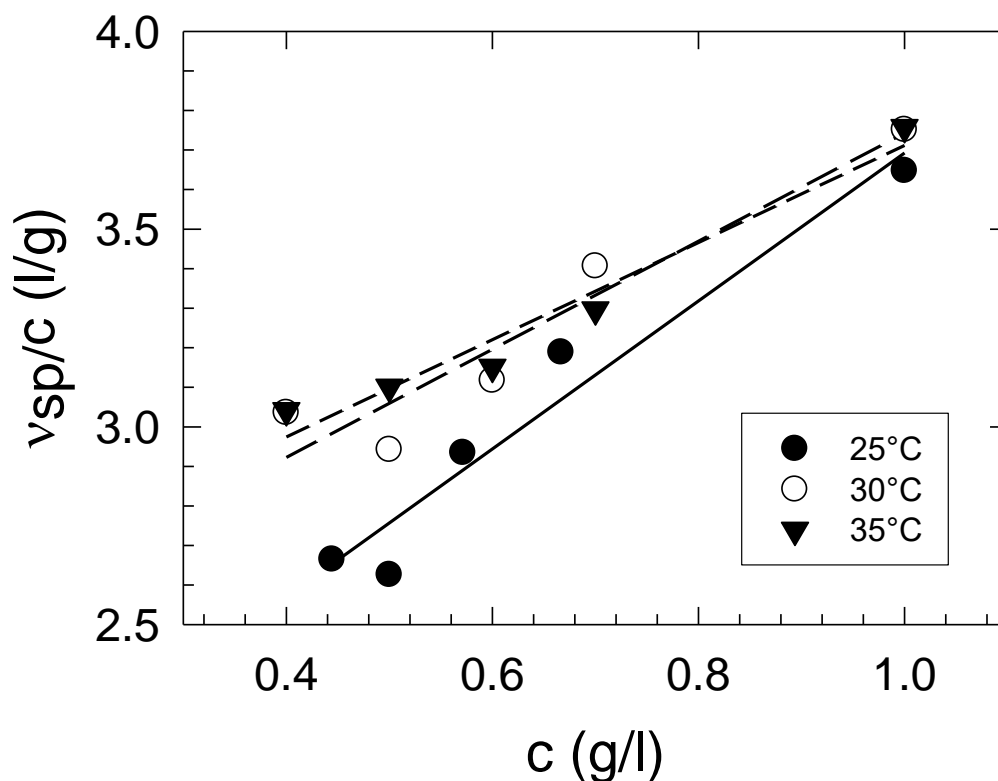
Zkoumané roztoky kyseliny hyaluronové byly již detailně popsány co do přípravy, tak do problematiky výpočtů potřebných parametrů. Nyní bude následovat diskuze hlavních výsledků, kterých bylo dosaženo pro vodné a 0,01 M KCl roztoky HA. Výsledky studovaných roztokových forem vypovídají o chování makromolekulárního klubka, které jsou vlivem pH, iontového složení rozpouštědla a teploty zapříčiněny o změnu charakteru s projevem rozbalení nebo stažení klubka. Výsledky z měření viskozit pro základní roztok HA jsou viditelné v grafu č. 1 pro vodný roztok a v grafu č. 2 pro roztok HA v 0,01 M KCl.



Graf 1: Závislost redukované viskozity na koncentraci pro HA ve vodném roztoku.

V obou případech se jedná o grafickou závislost redukované viskozity ( $v_{sp}/c$ ) na koncentraci pro 3 sledované teploty. Na základě výpočtů z grafu č. 1 a 2 se získali již popsanou metodikou pro získání limitního viskozitního čísla z rovnice (8) hodnoty  $[\eta]$  a konstanty  $K_H$  pro čistý roztok HA. Tento princip získání hodnot limitního viskozitního čísla a Hugginsovy konstanty se aplikoval i u dalších modifikovaných roztoků s přidavkem 0,1 M NaOH a 0,1 M HCl popsaných v tabulce č. 2.





Graf 2: Závislost redukované viskozity na koncentraci pro HA v 0,01 M KCl.

Pro vodné roztoky byla konstanta  $k_H$  stanovena pro 25°C na 0,007, pro 30°C na -0,003 a pro 35°C na -0,005 na základě grafu č. 1. Pro roztoky HA 0,01 M KCl byla konstanta  $k_H$  vypočítána na 0,56 při 25°C, dále na 0,24 při 30°C a pro poslední sledovanou teplotu 35°C na 0,20 z grafu č. 2. V dobrém rozpouštědle makromolekulární klubko botná a viskozita roztoku roste, tato skutečnost se dá také popsat tak, že se makromolekula snaží vystavit působení rozpouštědla co nejvíce. Konstanta  $k_H$  klesá s rostoucím expanzním koeficientem až k hodnotám 0,25. Ve stavu této hodnoty konstanty jsou mezi 0,50-0,55, tzn., že jsou vzájemné interakce vyrovnané a řetězce makromolekul se při náhodném setkání navzájem nepřekáží a ani spolu neinteragují. Ve špatných rozpouštědlech je klubko více svinuté, protože není v takovém styku s molekulami rozpouštědla a dochází spíše k tvorbě kontaktů mezi jednotlivými segmenty makromolekuly, kde ve vztahu ke konstantě jsou hodnoty mezi 0,8-1. Vysoké hodnoty Hugginsovy konstanty jsou připisovány asociaci makromolekul, kde četnost narůstá s koncentrací. Kompletní výsledky naměřených veličin jsou souhrnně uvedeny v tabulce č. 4 a č. 5. Diskutované veličiny vychází z viskozimetrického měření a podklady pro výpočty jsou v příloze A, příloze B.

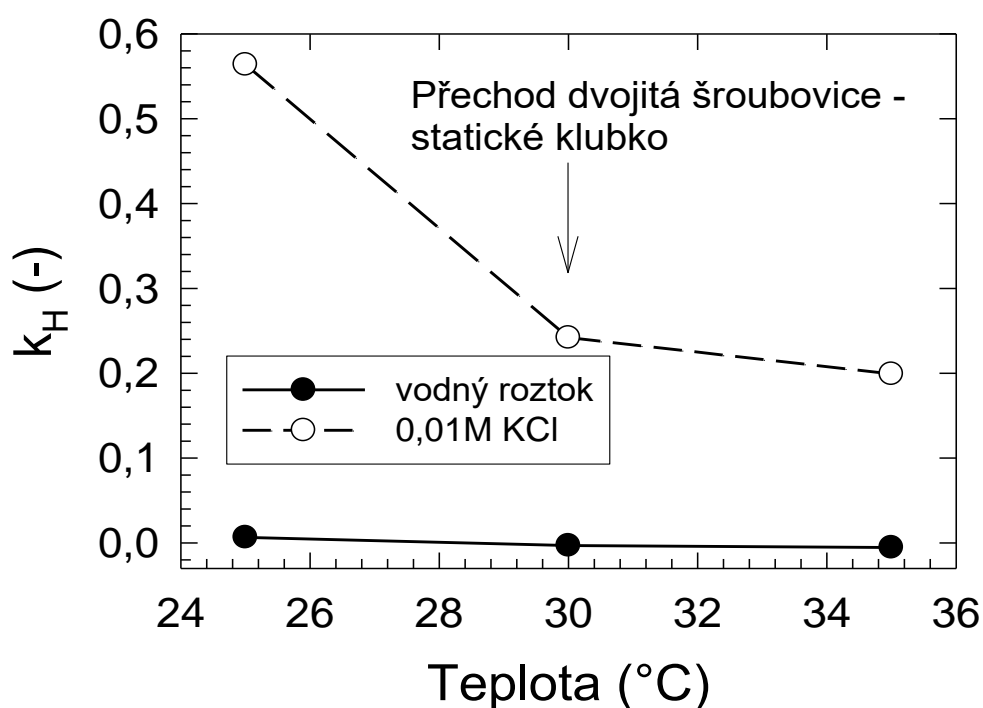
Tabulka 4: Celkové výsledky viskozimetrického měření pro HA v 0,01 M KCl.

25 °C			30 °C			35 °C		
pH	[η](l/g)	k <sub>H</sub> (-)	pH	[η](l/g)	k <sub>H</sub> (-)	pH	[η](l/g)	k <sub>H</sub> (-)
3.7	1.49	0.46	3.7	0.76	2.47	3.7	0.44	7.96
4.0	1.27	0.96	4.0	0.95	1.59	4.0	0.56	5.18
4.2	1.56	0.55	4.1	1.15	1.04	4.1	0.70	3.02
4.6	1.69	0.53	4.6	1.25	0.96	4.6	0.86	2.17
5.1	1.91	0.39	5.1	1.49	0.64	5.1	1.06	1.32
5.6	1.96	0.37	5.6	1.53	0.59	5.7	1.16	1.06
<b>6.2</b>	<b>1.82</b>	<b>0.56</b>	<b>6.2</b>	<b>2.38</b>	<b>0.24</b>	<b>6.2</b>	<b>2.48</b>	<b>0.20</b>
6.8	1.85	0.45	6.8	1.39	0.81	6.8	1.63	1.34
7.6	1.81	0.48	7.7	1.38	0.82	7.7	1.04	1.39
9.6	1.80	0.46	9.7	1.31	0.90	9.6	1.00	1.52
10.3	1.66	0.56	10.3	1.23	1.03	10.3	0.87	2.01
10.2	1.91	0.33	10.2	1.28	0.85	10.2	0.95	1.56
10.5	1.61	0.53	10.5	1.12	1.20	10.5	0.86	1.91

Tabulka 5: Celkové výsledky viskozimetrického měření pro HA ve vodném roztoku.

25 °C			30 °C			35 °C		
pH	[ $\eta$ ](l/g)	$k_H$ (-)	pH	[ $\eta$ ](l/g)	$k_H$ (-)	pH	[ $\eta$ ](l/g)	$k_H$ (-)
3.8	1.71	1.74	3.8	1.77	1.67	3.8	1.75	1.70
4.0	2.83	0.63	4.0	2.95	0.58	4.0	2.87	0.63
4.1	4.87	0.20	4.3	4.94	0.20	4.1	4.76	0.25
4.8	8.75	0.04	4.9	8.39	0.05	4.9	8.54	0.04
5.4	11.00	0.01	5.5	11.13	0.01	5.5	11.32	0.01
5.9	12.22	0.00	5.9	12.66	0.00	5.9	12.80	0.00
<b>7.0</b>	<b>12.68</b>	<b>0.007</b>	<b>7.1</b>	<b>14.80</b>	<b>-0.003</b>	<b>7.0</b>	<b>15.26</b>	<b>-0.005</b>
9.3	9.70	0.05	9.2	11.12	0.02	9.3	11.16	0.02
9.8	9.56	0.02	9.5	9.70	0.03	9.8	9.90	0.02
10.3	6.59	0.09	10.3	8.03	0.05	10.3	6.74	0.09
10.6	3.79	0.33	10.7	3.92	0.31	10.6	3.88	0.33
10.8	3.36	0.34	10.8	3.50	0.32	10.8	3.65	0.27
10.9	2.79	0.46	10.9	2.92	0.41	10.9	2.95	0.40

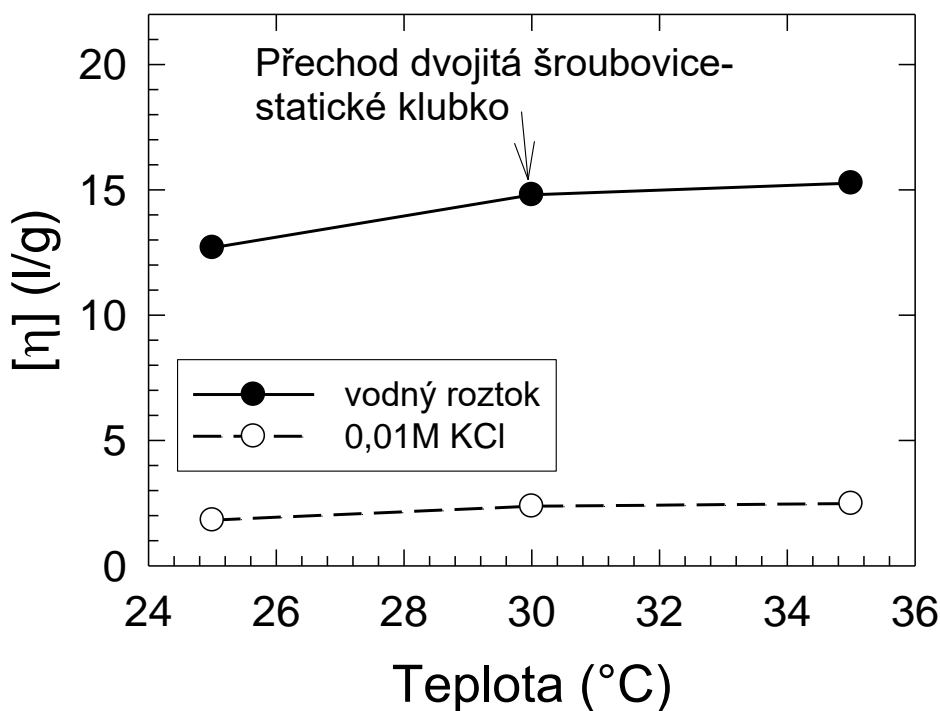
Na následujícím grafu č. 3 je zřejmá změna viskozitního chování na základě změny Hugginsovy konstanty v roztoku 0,01 M KCl. Z grafu je jasně viditelná skoková změna reologického chování odrážející se v konformační změně ze zdvojené šroubovice na statické klubko při 30°C. V případě vodného roztoku se jedná o méně patrný jev a to především z důvodu takového, že karboxylové skupiny HA jsou více ionizovány v porovnání s roztokem KCl. Na základě toho se potlačuje jeho polyelektrolytický charakter a ten má za následek přijetí konformace méně průtočného makromolekulárního klubka [78].



Graf 3: Závislost Hugginsovy konstanty na teplotě pro 2 roztoky HA.

Souběžně ze zmíněnými změnami Hugginsovy konstanty jsou také korespondující změny limitním viskozitním číslům, které jsou evidentní pro konformační změny makromolekulárních řetězců. U grafu č. 4 je znázorněná závislost limitního viskozitního čísla na teplotě pro dva studované roztoky, které popisují změnu konformace ze zdvojené šroubovice. Tato změna je popisována pro vodný roztok HA tak, že při hodnotě limitního čísla 12,68 l/g (25°C) zdvojená šroubovice přechází na statické klubko hodnotou 14,80 l/g (30°C) a u teploty 35°C dojde k expandování klubka. V případě roztoku HA v 0,01 M KCl jsou hodnoty limitních viskozitních čísel nižší, ale je zde opět viditelný přechod mezi sledovanými teplotami při 25 °C bylo  $[\eta]=1,82$  l/g, při 30°C byla hodnota

2,38 l/g a při 35°C se nepatrně zvýšila na 2,48 l/g. Z hodnot limitního viskozitního čísla je patrné, že k nárůstům dochází s rostoucí teplotou u obou sledovaných vzorků a to v konečném výsledku svědčí o zvětšování hydrodynamického rozměru makromolekulárního klubka.

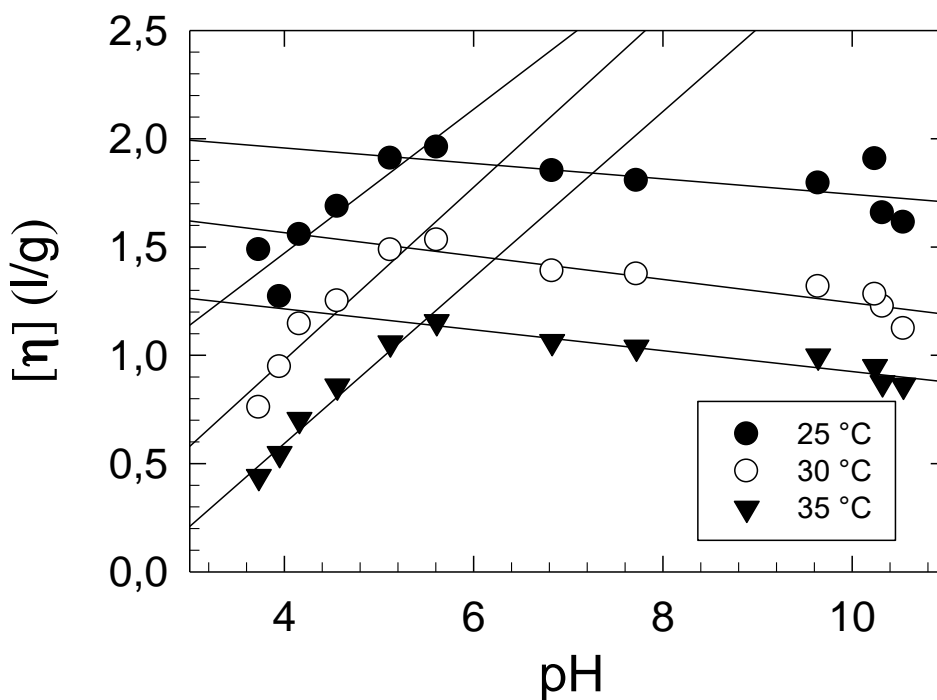


Graf 4: Závislost limitního viskozitního čísla na teplotě pro 2 roztoky HA.

Naměřené výsledky korespondují s výsledky, které sledovaly vliv přítomnosti iontů na strukturu kyseliny hyaluronové. Viskozimetrické a AFM sledování vlivu bivalentních kationtů ( $Ba^{2+}$ ), byly identifikovány konformační změnou vedoucí k nárůstu viskozity roztoku HA. Bivalentní kationty indukují transformaci z prodloužené konformace na propojené molekuly, které vykazují menší hydrodynamický poloměr a také ostré ohyby [121].

Pozorovaná změna konformace pomocí změny pH pro roztok HA v 0,01 M KCl je vidět v grafu č. 5. Zde je podobně jako v předcházející diskuzi potvrzení skokové změny z dvojitě šroubovice na expandované klubko přibližně v hodnotě pH 5,4 pro 3 studované teploty. Expanze polymerního klubka je prokazatelná se stoupající hodnotou pH, kde po dosažení zlomového bodu se stává polymer více stabilní a tuhý. Tento fakt se projevuje v menším sklonu limitního viskozitního čísla s pH.

Zajímavý je také poznatek, že bod zlomu se posouval ve směru k vyšším hodnotám pH se stoupající teplotou z 5,3 pro teplotu 25 °C k 5,4 pro 35 °C dle grafu č. 5. Stejného efektu bylo dosaženo v případě vodného roztoku HA, výsledky dle tabulky č. 5, kde byl bod zlomu pozorovaný při pH 6,8.

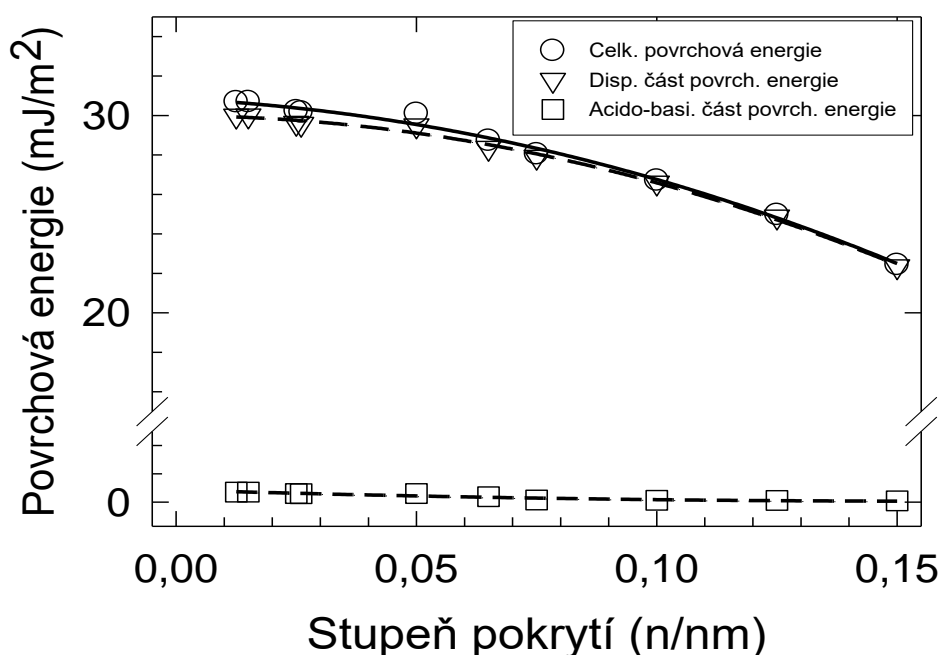


Graf 5: Závislost limitního viskozitního čísla na pH pro roztok HA v 0,01M KCl.

## 7.2 Inverzní plynová chromatografie (SEA)

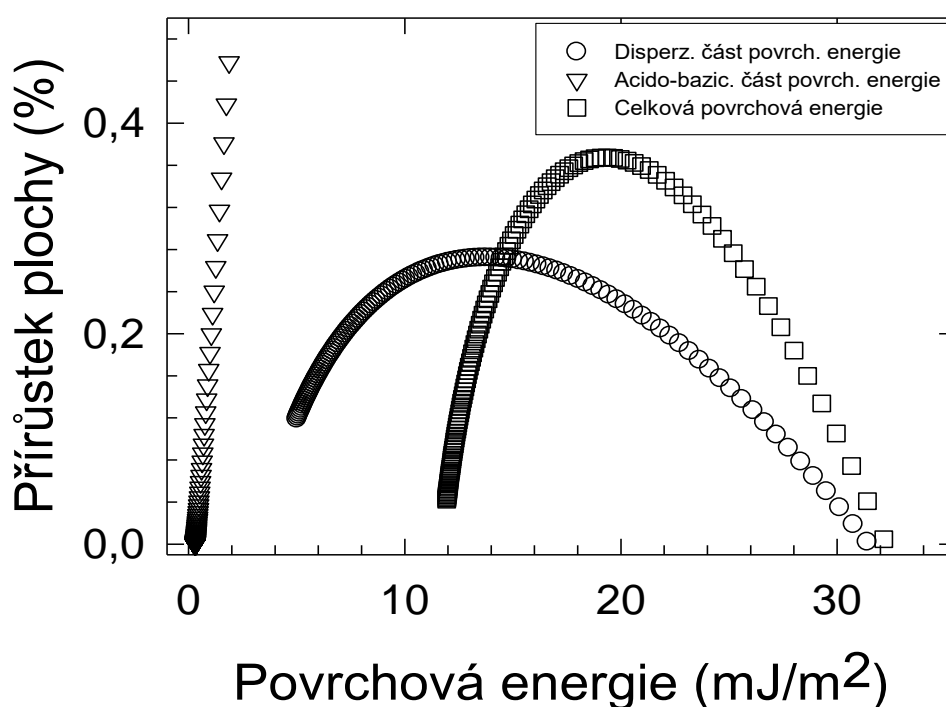
Na základě plynové chromatografie byl stanovený průběh povrchové energie pro práškovou formu HA, který je znázorněn na grafu č. 6. Z grafu disperzní složky povrchové energie a pokrytí molekulami plynu, má křivka exponenciálně klesající průběh. Hodnota povrchové energie s její disperzní složkou byla  $34.0 \text{ mJ/m}^2$  pro 0% pokrytí a postupně klesala na  $11,7 \text{ mJ/m}^2$  respektive na  $4,9 \text{ mJ/m}^2$  pro disperzní složku povrchové energie pro 100% pokrytí. Největší energetická stopa zaujímá přibližně 5% povrchu HA [27]. Významný rozdíl v povrchové energii pro nulové a 100 % pokrytí je znakem vysokého stupně nehomogenity, která je vyjádřen přibližně trojnásobným poklesem hodnoty povrchové energie.

Disperzní složka povrchové energie vypočítaná podle Schultzeho koresponduje z výsledky metodiky z kontaktních úhlů smáčení, kde bylo zjištěno  $39,8 \text{ mJ/m}^2$  [122]. Z grafu č. 6 také vyplývá acidobazická část povrchové energie, která má mírně lineární nárůst z  $0,7 \text{ mJ/m}^2$  pro 0% pokrytí až do  $6,8 \text{ mJ/m}^2$  pro 100% pokrytí. Získané výsledky ukazují majoritní disperzní složku povrchové energie a acidobazická složka je zanedbatelná.



Graf 6: Závislost povrchové energie na stupni pokrytí vyjádřená pomocí acidobazické a disperzní složky povrchové energie pro HA.

Pro lepší ilustraci heterogenity vzorku je vynášena do grafu přírůstek plochy v závislosti na povrchové energii, což je znázornění na grafu č. 7. Zobrazení je získáno díky integraci profilů povrchových energií. Z grafu č. 7 vyplývá, že je povrchová energie charakteristická širokou distribucí celkové povrchové energie v rozsahu 10-34 mJ/m<sup>2</sup> s maximem v 18,5 mJ/m<sup>2</sup> a disperzní část povrchové energie je v distribuční křivce od 3,3-34,1 mJ/m<sup>2</sup>. Je evidentní, že polarita povrchu HA je nízká a za chování odpovídá především disperzní složka povrchové energie, která zaujímá širokou distribuci [113].

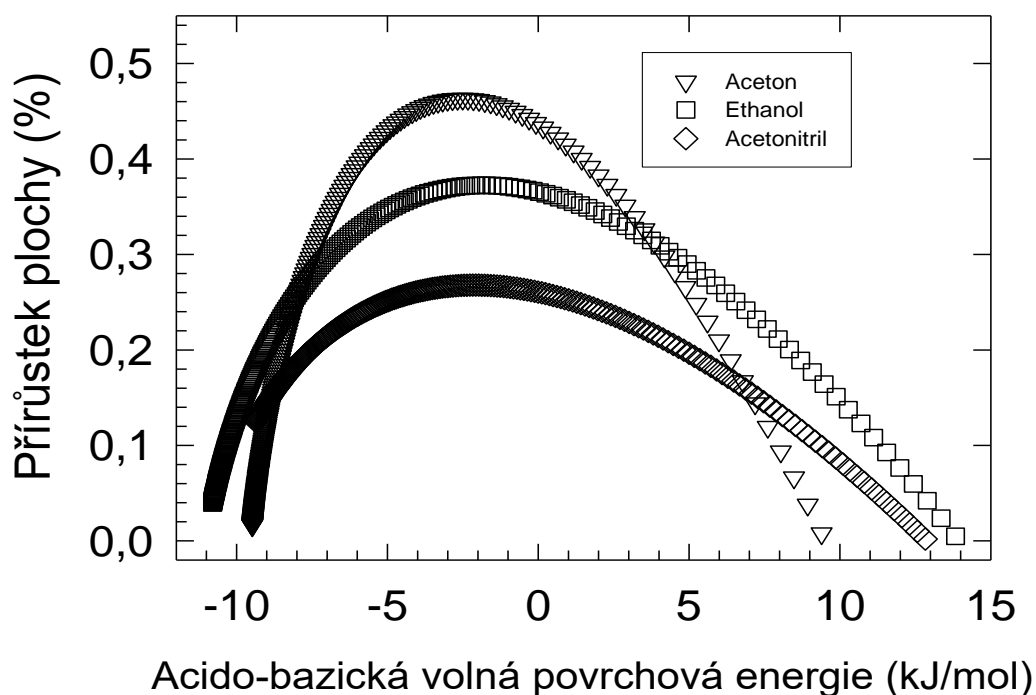


*Graf 7: Distribuční křivka celkové povrchové energie a její komponent pro HA.*

Výsledky z grafu č. 8 popisují acidobazickou volnou povrchovou energii pro zvolené kapaliny s rozdílnou polaritou a ta vyjadřuje hodnotu komponenty donor-akceptorové vazby na rozhraní HA pevné a plynné fáze. Nejširší distribuce byla nalezená pro acetonitril v rozsahu od -11,8 kJ/mol do 15,0 kJ/mol pro acidobazickou složku povrchové energie. Nejužší distribuce byla pro



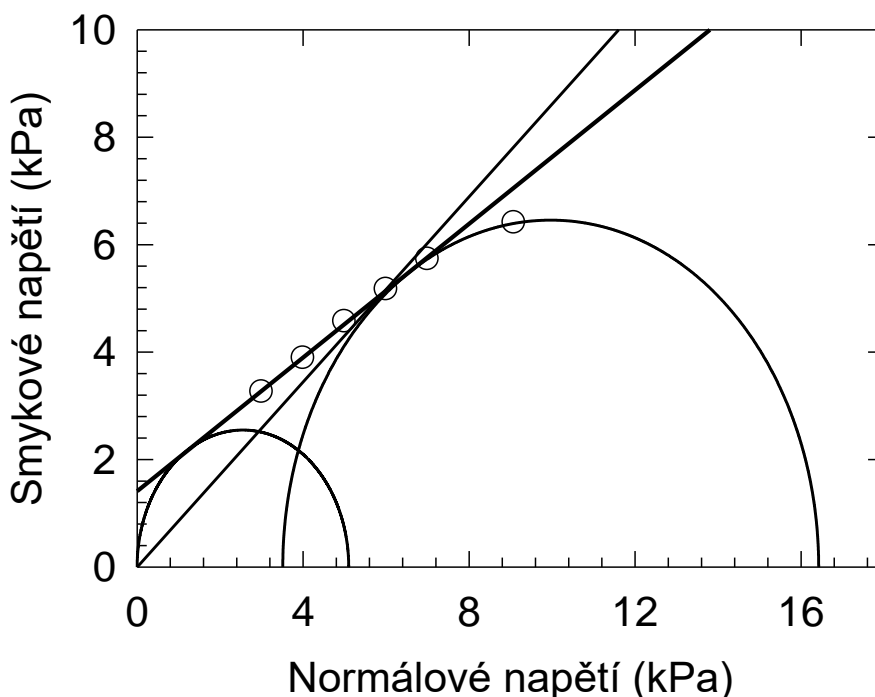
dichlormethan v rozsahu od -10,8 do 2,3 kJ/mol. Určujícím faktorem je polární složka od -10,6 do 12,8 kJ/mol.



Graf 8: Distribuční křivka acido-bazické volné povrchové energie pro prášek HA.

### 7.3 Prášková reologie

Výsledkem měření je graf závislosti smykového napětí ( $\tau$ ) na normálovém napětí ( $\sigma$ ) viz graf č. 9, kde k vyhodnocení je nutné sestavit Mohrovy kružnice, které charakterizují rozložení napětí v konsolidovaném vzorku. Mohrovy kružnice jsou vždy symetrické vůči ose ( $\sigma$ ), takže se vykresluje pouze část odpovídající kladným ( $\tau$ ). V grafu jsou vyneseny body smyku a bod předsmyku, kde tyto body jsou získány z průměrných hodnot smykového napětí. Pro vyhodnocení dat je podstatná sestrojená mezní křivka kluzu tím, že se proloží přímkou body smyku [109, 110].



Graf 9: Toková křivka spolu s Mohrovými kružnicemi pro práškovou formu HA.

První Mohrova kružnice procházející počátkem diagramu je zároveň tečná k mezní tokové křivce a průsečík s osou  $\sigma$  je tzv. tlaková pevnost nebo také nazývána mez kluzu  $\sigma_c = 5,08$  kPa. Druhá Mohrova kružnice je také tečná k mezní tokové křivce a průsečík této kružnice s osou  $\sigma$  určuje hlavní napětí při konsolidaci  $\sigma_1 = 16,4$  kPa. Body na mezní křivce charakterizují stavy napjatosti, které vedou k poruše toku.

Index toku, nebo-li tokovost, je vypočítán poměrem konsolidačního napětí a mezi kluzu dle rovnice (12) na  $ff_c = 3,24$ . Obecně se dá říci, že čím menší je mez kluzu materiálu, tím lépe materiál teče a tím pádem se nám zvětšuje hodnota  $ff_c$ . V našem případě se může sypkost prášku HA zařadit do kategorie soudržných materiálů, protože hodnota indexu toku se pohybuje v této kategorii  $2 < ff_c < 4$ .

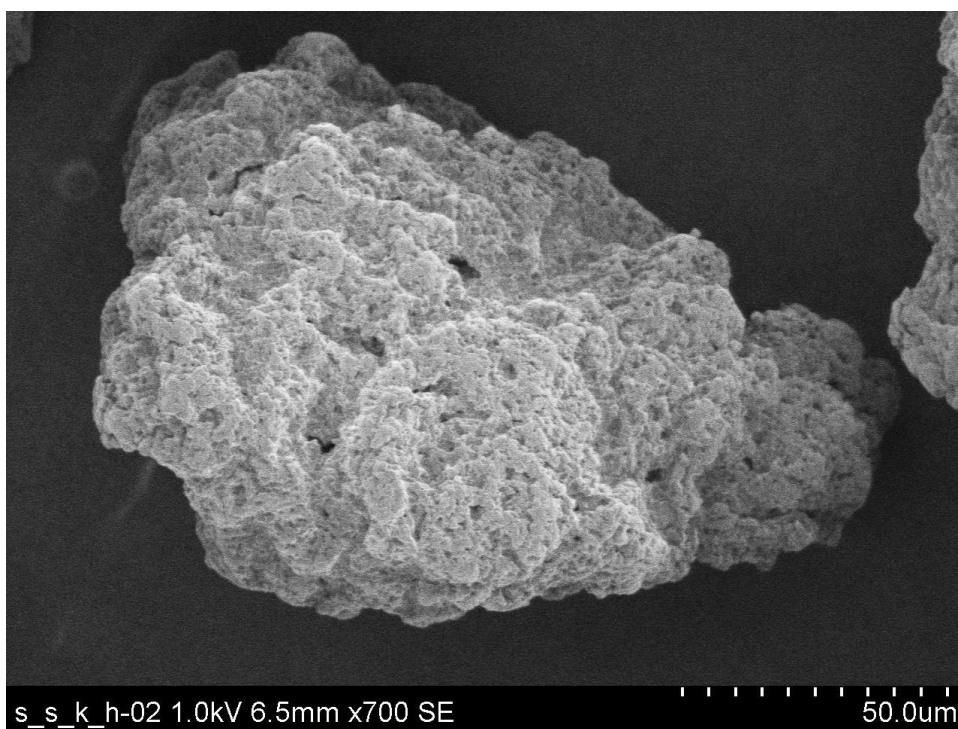
Z mezní křivky, lze dále určit další veličinu a to kohezi (soudržnost)  $\tau_c = 1,41$  kPa, kterou určuje smykové napětí ve vzorku, na který nepůsobí žádný normálový tlak, tzn., že mezní křivka protíná osu  $\tau$  při normálovém napětí  $\sigma = 0$ . Další vyhodnocenou veličinou je úhel, který tvoří přímka s osou normálového napětí a nazývá se úhel vnitřního tření  $\varphi_1 = 31,9^\circ$  práškové formy HA pro dané  $\sigma_1$ . Částice práškové formy HA jsou spojované pomocí adhezních sil i bez

normálového napětí vykazují smykovou deformaci. Efektivní úhel vnitřního tření  $\varphi_e = 40,75^\circ$  je ukazatelem míry vnitřního tření v rovnovážném stavu toku. Sypké materiály vykazují při nulovém normálovém napětí nulovou hodnotu smykového napětí, proto jejich mezní přímka prochází počátkem. Výsledky úhlů vykazují, že se jedná o kohezní materiál, protože hodnoty daných úhlů jsou rozdílné [108, 109]. Veškeré diskutované hodnoty  $\sigma_c$ ,  $\tau_c$ ,  $\varphi_i$ ,  $\varphi_e$  vycházejí z pevnostního diagramu dle grafu č. 9.

## 7.4 SEM

Jak již byl princip této metody a definice přístroje popsán ve zvolené metodice zpracování, rastrovací elektronová mikroskopie je využívána k analýze struktury látek pomocí elektronového svazku. Při měření bylo použito urychlovací napětí 1 kV, které je vhodné v případě nevodivých vzorků. Zvolení špatného napětí by znamenalo značné hromadění elektronů v preparátu a jeho nabíjení, přičemž se tento jev projevuje deformací vzorku nebo ztrátou ostrosti obrazu. Jak je vidět na následujícím obrázku hodnota urychlovacího napětí byla zvolena správně, vzhledem k vysoké kvalitě ostrého obrazu, který je brán jako výstup z elektronového rastrovacího mikroskopu.

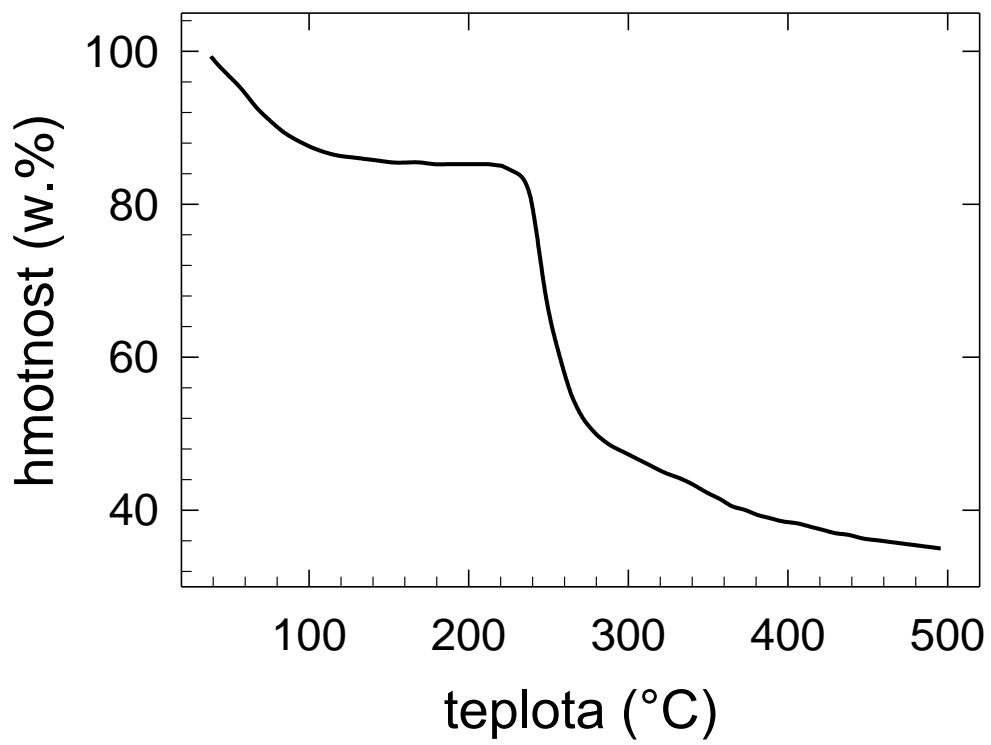
Výsledný obraz, který zobrazuje povrch hyaluronového prášku, byl tvořen pomocí sekundárních elektronů, které mají přibližně 50 eV a vystupují z hloubky řádově desítek nm (5-15 nm). V konečném výsledku kopírují povrch a výsledkem jsou informace o topografii [123]. Snímek ze skenovacího rastrovacího mikroskopu je na obrázku (17), kde se vzorek HA vyznačuje především kulovitým a válcovitým tvarem přibližně 70  $\mu\text{m}$  širokým v průměru.



Obrázek 17: Snímek práškové formy kyseliny hyaluronové ze SEM.

## 7.5 Termogravimetrie

Kvůli velké schopnosti kyseliny hyaluronové na sebe vázat vodu, bylo provedeno termogravimetrické měření, kde se pozorovala celková obsažená vlhkost v nesušeném vzorku. Výsledkem je termogravimetrická křivka, která vyhodnocuje procentuální úbytek hmotnosti v závislosti na teplotě, viz následující graf č. 10. Křivka je rozdělena na tři regiony, kde se stoupající teplotou je prvně viditelný úbytek hmotnosti, který začíná s počátkem samotné termogravimetrické analýzy a končí při 180°C. Tento děj je typický pro ztrátu vlhkosti- sušení v tomto případě voda zaujímal 13,72 hm. %. Poté probíhá termický rozklad v regionu 2, který začíná v oblasti termické stability (180°C) a končí na teplotě 300°C, kde dílčí úbytek hmotnosti je 38,55 hm. %. Poslední region 3 má dílčí úbytek hmotnosti 12,26 hm. %. Oblast křivky od 180°C až 300°C je charakteristická pro degradaci polysacharidů, u HA se jedná o depolymerizaci. Na základě reakce látek označující se jako rozkladné dochází ke štěpení řetězce na menší části nebo ke změně chemické povahy tzn., že se z řetězce odštěpí malé molekuly [124, 125].



*Graf 10: Termogravimetrická křivka pro práškovou formu HA.*

## 8. PŘÍNOS PRÁCE PRO VĚDU A PRAXI

Disertační práce představuje přínos v oblasti vědního oboru a oblasti praxe především v odvětví klinické medicíny. Obecné množství hyaluronanu v lidském těle je přibližně 10-15 g u dospělého jedince, kde se z 50% nachází v kožní tkáni (dermis a epidermis) a dále v synoviální tekutině v kloubech, pupeční šňůře a očním sklivci. Úloha hyaluronanu v organismu je silně závislá na molekulové hmotnosti a tedy i na jeho koncentraci. Je vědecky dokázáno, že biologická aktivita HA roste se snižující se molekulovou hmotností. Vysokomolekulární HA (nad 1,5 mil. Da) představuje hlavně organizační a strukturální jednotku pro zajištění mechanické odolnosti právě v synoviální tekutině nebo očním sklivci. Naproti tomu nízkomolekulární HA (od 0,5-0,7 mil. Da) je spojováno s biologickou aktivitou a má vliv na pochody v tkáních a buňkách. Vzhledem k důležité roli HA jakožto složky mezibuněčné hmoty, jsou její vlastnosti s ohledem na lidské tělo především zabraňovat nežádoucímu tření a udržování vlhkosti [50, 51, 53, 62].

Pro konkrétní přímou aplikaci HA může být například viskosuplementace, která redukuje tření v chrupavce zničené osteoartritidou za pomoci intraartikulární injekce, zde dochází k zlepšení lubrikace mezi povrchy chrupavky. V dermatologii se setkáváme s velkou četností použití HA ve formě vnější aplikace v podobě krémů ale také ve formě tzv. hydrogelového krytí, které pomáhá hydratovat, regenerovat a hojit poškozenou tkáň především jizev a ran. V oftalmologické chirurgie slouží k ochraně tkání při chirurgickém zákroku a v estetické medicíně se hojně využívají produkty na bázi HA pro dermální výplně [6, 84].

Nativní molekula HA má výborné výchozí vlastnosti, ale pro použití v lékařství jsou nutné modifikace buď fyzikální, nebo chemické. Vzhledem k uplatnění této disertační práce, se nabízí použitelnost výsledků především pro ne vazebné fyzikální modifikace polymerního řetězce HA. Pochopení kolektivního chování studované v této práci napomůže například při vlastní studii ne vazebné interakce s dalšími molekulami, kterými mohou být třeba amfifilní aminokyseliny, tenzidy, proteiny. Tyto interakce jsou podstatné právě pro stabilizaci chrupavkové mezibuněčné hmoty (extracelulárního matrixu), dále také v buněčné proliferaci, v morfogenezi ale také při zánětech a rakovině. Při terapii rakoviny se HA zkoumá z hlediska nosiče bioaktivní látky, pro cílenou distribuci léčiva k rakovinotvorným buňkám [52,55].

## 9. ZÁVĚR

Předmětem této disertační práce bylo studium jak kapalně, tak tuhé fáze kyseliny hyaluronové. Předem je důležité zmínit fakt, že veškeré vytyčené cíle, které se dělily do dvou sekcí v úvodu disertační práce, byly splněny. V první fázi se jednalo o pochopení kolektivního chování HA, ve kterém bylo sledováno viskozitní chování polymerních klubek za různých podmínek. Pro sledování konformačních změn byly stanoveny parametry- limitní viskozitní číslo  $[\eta]$  a Hugginsova konstanta  $k_H$  pro vodný roztok HA a roztok HA v 0,01 M KCl. Druhá fáze byla zaměřena na charakterizaci práškové formy kyseliny hyaluronové. Na základě vybraných experimentálních technik, které jsou popsány a diskutovány v experimentální části, lze vyvodit následující závěry:

- Z provedených viskozimetrických měření je možno konstatovat, že na základě již zmíněných parametrů je evidentní změna rozměru makromolekulárního klubka a to především vlivem teploty, iontového rozpouštědla ale i pH. Nelze však opomenout skutečnost, že kyselina hyaluronová se chová jako záporný polyelektrolyt.
- Z experimentálních dat byl zjištěn nárůst hodnot limitního viskozitního čísla pro oba studované čisté roztoky HA, který zcela jistě vypovídá o zvětšování hydrodynamického rozměru makromolekulárního klubka. Pro vodný roztok HA byl pozorován nárůst z teploty 25°C, kde  $[\eta]$  činilo 12,68 l/g na teplotu 30 °C- 14,80 l/g a expanze klubka nastala při 35°C- 15,26 l/g. Stejný trend měl i druhý sledovaný roztok HA v 0,01 M KCl, pouze s tím rozdílem, že hodnoty byly nižší z důvodu vyšší iontové síly.
- Z komplexnějšího pozorování konformačních změn struktury HA, při které se upravovalo pH přídavky kyselé a zásadité sloučeniny svědčí o schopnosti expanze nebo kolapsu makromolekulárního klubka. Při fyziologické iontové síle a neutrálním pH zaujímá HA konformaci statického klubka, které je stabilizované vodíkovými vazbami.
- Z výsledků Hugginsovy konstanty vyplývá, že nastala transformace ze zdvojené šroubovice do expandovaného polymerního klubka, kde tento fakt vyplývá ze skokové změny interakčního parametru  $k_H$  při 30°C. Svinutí makromolekulárních klubek nastává v okamžiku poklesu hydrodynamického rozměru daného limitním viskozitním číslem, protože v tomto okamžiku dosáhne koncentračního maxima.

- V experimentální části zaměřené na analýzu práškové formy HA, byla za použití inverzní plynové chromatografie (SEA) definována povrchová energie, kde na základě výsledků dominuje především disperzní část povrchové energie a podíl polární složky je velice nízký.
- Bylo zjištěno pro 0% pokrytí povrchu, že celková povrchová energie byla  $30 \text{ mJ/m}^2$ . Povrchová struktura polymerního prášku HA byla vyhodnocena jako relativně nehomogenní a to hlavně na základě trojnásobného poklesu povrchové energie, které bylo zjištěno pro 100% pokrytí-  $11,7 \text{ mJ/m}^2$ .
- Dále lze také konstatovat, že celková povrchová energie je dána distribuční křivkou v rozsahu  $10\text{-}34 \text{ mJ/m}^2$  s maximem v  $18,5 \text{ mJ/m}^2$ .
- Pomocí práškového reometru byla studována a vyhodnocena toková křivka, kde z hlediska makroskopického tokového chování smykového napětí oproti různému typu zatížení byl zjištěn parametr tokovosti  $ff_c=3,24$ . Z této analýzy bylo zjištěno, že prášková forma HA má charakter kohezní látky, kde toto tvrzení potvrzují naměřené úhly-efektivní úhel vnitřního tření  $\varphi_e=40,75^\circ$  a úhel vnitřního tření  $\varphi_i=31,9^\circ$ .
- Z termogravimetrické analýzy bylo zjištěno, že voda v nesusušeném vzorku, který je práškové konzistence zaujímal  $13,72 \text{ hm. \%}$ . Termický rozklad HA nastal v oblasti termogravimetrické křivky v oblasti od  $180^\circ\text{C}$  až  $300^\circ\text{C}$ .
- Při pozorování povrchu prášku pomocí SEM byl vyhodnocen válcovitý a kulovitý tvar částic s průměrnou velikostí přibližně  $70 \mu\text{m}$ .



## 10. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] DJABOUROV, Madeleine and NISHINARI Katsuyoshi and S ROSS-MURPHY. *Physical Gels from Biological and Synthetic Polymer*. Cambridge University Press, 2013, ISBN 978-0-521-76964-8.
- [2] LAPČÍK, Lubomír a Miroslav RAAB. *Nauka o materiálech II*. Vyd. 2., rozš. Zlín: Univerzita Tomáše Bati, 2004, 133 s. ISBN 80-7318-229-7.
- [3] ANDRADE, J. *Hydrogels for Medical and Related Applications*. ACS Symposium Series, American Chemical Society: Washington, DC, 1976 Chapter 1: RATNER, Buddy D. and HOFFMAN, Allan S. *Synthetic Hydrogels for Biomedical Applications*.
- [4] LEE, Kven Yong and David J. MOONEY. Hydrogels for tissue engineering. *Chemical Reviews*. 2001, 101(7), 1870-1879.
- [5] COLLINS, Maurice N. and Colin BIRKINSHAW. Hyaluronic acid based scaffolds for tissue engineering—A review. *Carbohydrates Polymers*. 2013, vol. 92, issue 2, pp. 1262– 1279. DOI: 10.1016/j.carbpol.2012.10.028. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0144861712010478>
- [6] ELNASHAR, Magdy: *Biopolymers. Chapter 20- Biotechnological production and application of hyaluronan*. 2010, Sciyo, ISBN 978-953-307-109-1. Dostupné z: <http://www.intechopen.com/books/biopolymers/biotechnological-production-characterization-and-application-of-hyaluronan>
- [7] LINHARTOVÁ, B. : *Nanovlákná na bázi hyaluronanu*, bakalářská práce. 2008. Vysoké učení technické v Brně, fakulta chemická, Brno.
- [8] ŠIMEK, Lubomír a Josef HRNČIŘÍK. *Fyzikální chemie II: (koloidní a makromolekulární systémy)*. Vyd. 3. Zlín: Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, 2005, 94 s. ISBN 80-7318-325-0.
- [9] KWAAMBWA, H. M., et al. Viscosity, molecular weight and concentration relationships at 298K of low molecular weight cis-polyisoprene in a good solvent. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 2007, vol. 294, issue 1, pp. 14-19. DOI: 10.1016/j.colsurfa.2006.07.041. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0927775706005747>

- [10] MAŠURA, Vlado. Vzťah medzi viskozitou roztokov nitrocelulózy a hraničnou viskozitou pri miešaní vysokomolekulových a nízkomolekulových polymérov. *Chemické zvesti*. 1961 ročník XV, číslo 10, ČSAV. Dostupné z: [https://www.chempap.org/file\\_access.php?file=1510a689.pdf](https://www.chempap.org/file_access.php?file=1510a689.pdf)
- [11] PAMIES, Ramón, et al. Determination of intrinsic viscosities of macromolecules and nanoparticles. Comparison of single-point and dilution procedures. *Colloid and Polymer Science*, 2008, vol. 286, issue 11, pp. 1223-1231. DOI: 10.1007/s00396-008-1902-2. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00396-008-1902-2>
- [12] GARCÍA-ABUÍN, A., et al. Viscosimetric behaviour of hyaluronic acid in different aqueous solutions. *Carbohydrate Polymers*. 2011, vol. 85, no. 3, pp. 500–505. ISSN: 0144-8617.
- [13] MA, Juntao, et al. Dilute solution properties of hydrophobically associating polyacrylamide: fitted by different equations. *Polymer*. 2003, vol. 44, issue 4, pp. 1281-1286. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/S0032-3861\(02\)00851-0](https://doi.org/10.1016/S0032-3861(02)00851-0)
- [14] CHYTIL, Martin a Miloslav PEKAŘ. Effect of new hydrophobic modification of hyaluronan on its solution properties: evaluation of selfaggregation. *Carbohydrate Polymers*. 2009, vol. 76, no. 3, pp. 443–448. ISSN: 0144-8617.
- [15] GRUNDĚLOVÁ, Lenka: *Stabilita a chování hyaluronanu v roztocích pro technologii výroby farmaceutických přípravků*, disertační práce. 2014. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, fakulta technologická, Zlín.
- [16] SHIMADA, E., MATSUMURA G. Viscosity and molecular weight of hyaluronic acid. *Journal of Biochemistry*. 1975, vol. 78, issue 3, pp. 513–517.
- [17] GAMNI, A. and S. PAOLETTI and F. ZANETTI, in: HARDING, S.E. ; SATELLE, D.B. and BLOOMFIELD V. A. (Eds.) *Laser Light Scattering in Biochemistry*, Royal Society of Chemistry, Cambridge, 1992, pp. 294–311.
- [18] HAYASHI, Kanako, Kikuko TSUTSUMI, Fumio NAKAJIMA, Takashi NORISUYE, Akio TERAMOTO. *Macromolecules*. 1995, vol. 28, issue 11, pp. 3824–3830. DOI: 10.1021/ma00115a012.

- [19] BERRIAUD, N. , MILAS, M., RINAUDO, M. Rheological study on mixtures of different molecular weight hyaluronates. *International Journal of Biological Macromolecules*. 1994, vol. 16, pp. 137–142.
- [20] MILAS M. and M. RINAUDO, at al. Comparative rheological behavior of hyaluronan from bacterial and animal sources with cross-linked hyaluronan (hylan) in aqueous solution. *Biopolymers*. 2001, vol. 59, issue 4, pp. 191–204.
- [21] PODZIMEK, Štěpán a Martina HERMANNOVÁ, Helena BILEROVÁ at al. Solution properties of hyaluronic acid and comparison of SEC-MALS-VIS data with off-line capillary viscometry. *Journal of Applied Polymer Science*. 2010, vol. 116, pp. 3013–3020. Doi:10.1002/app.31834.
- [22] CALCIU-RUSU, Daniela, ROTHFUSS, Ernst, ECKELT, John, HAASE, Tanja, DICK, H. Buckhard a Bernhard A. WOLF. Rheology of sodium hyaluronate saline solutions for ophthalmic use. *Biomacromolecules*. 2007, vol. 8, no. 4, pp. 1287–1292. ISSN: 1525-7797.
- [23] MALEKI, Atoosa, KJØNIKSEN, Anna-Lena a Bo NYSTRÖM. Anomalous viscosity behavior in aqueous solutions of hyaluronic acid. *Polymer Bulletin*. 2007, vol. 59, no. 2, s. 217–226. ISSN: 0170-0839.
- [24] PRESTWICH, G. D.: *Biomaterials from Chemically- Modified Hyaluronan*. Glycoforum [online]. 2001 [cit. 2016-06-09]. Dostupné z: <http://www.glycoforum.gr.jp/>
- [25] PISÁRČIK, Martin, Maroš SOLDÁN, Dušan BAKOŠ, Ferdinand DEVÍNSKY a Ivan LACKO. Viscometric study of the sodium hyaluronate-sodium chloride-alkyl-(n)-ammonium surfactant system. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 1999, vol. 150, issue 1-3. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0927775798008371>
- [26] MANICH, Gupta and VIMUKTA, Sharma.: Targeted drug delivery system: A Review. *Research Journal of Chemical Science* [online]. 2011, vol. 1, issue.2, pp. 135-138 [cit. 2017-03-05]. Dostupné z: <https://pdfs.semanticscholar.org/7e82/738dca918261f6e3f5b07641a68efb9fe545.pdf>

- [27] LAPČÍK, L. and OTYEPKOVÁ E., B. LAPČÍKOVÁ, M. OTYEPKA. Surface energy analysis (SEA) study of hyaluronan powders. *Colloids and A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 2013, vol. 436, pp. 1170-1174.
- [28] WEISS, Richard G. and TERECH, Pierre. *Molecular gels*. 2006, Springer, ISBN-10 1-4020-3352-4.
- [29] OSADA, Yoshihito and Kanji KAJIWARA. *Gels handbook*. San Diego: Academic Press, c2001, ISBN 0-12-394690-5.
- [30] SCHACHT, E. H.. Polymer chemistry and hydrogel systems. *Journal of Physics: Conference Series* 3. 2004, vol. 3, pp. 22–28.
- [31] BARTOVSKÁ, Lidmila a Marie ŠIŠKOVSKÁ. *Fyzikální chemie povrchů a koloidních soustav*. 5 vyd. Praha: VŠCHT, 2005, 244 s. ISBN 80-7080-579-X.
- [32] POUCHLÝ, Julius. *Fyzikální chemie makromolekulárních a koloidních soustav*. 3. vyd. Praha: VŠCHT, Praha, 2008, 205 s. ISBN 978-80-7080-674-6.
- [33] Biopolymer Network Assembly: Measurement and Theory. EDITED BY STEFAN KASAPIS, Ian T. *Modern biopolymer science: bridging the divide between fundamental treatise and industrial application*, 1 st ed. Amsterdam: Elsevier/Academic Press, 2009. ISBN: 978-0-12-374195-0.
- [34] ALMDAL, K., et al. Towards a phenomenological definition of the term 'gel'. *Polymer gels and networks*, 1993, vol. 1, issue 1, pp. 5-17. DOI: 10.1016/0966-7822(93)90020-I. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/096678229390020I>
- [35] TOKITA, M. and K. NISHINARI: Progres in colloid and polymer science, *Gels: Structures, properties, and functions*, Fundamentals and Applications, Springer-Verlag Berlín Heidelberg 2009, ISBN: 978-3-642-00864-1.
- [36] GRASSINO, S. B.: Polymer science learning center [online]. 2005 [cit. 2013-04-06]. Gel: a Short Word With a Long Meaning. Dostupné z: <http://pslc.ws/mactest/gel.htm>.

- [37] DUCHÁČEK, Vratislav. *Polymery: výroba, vlastnosti, zpracování, použití*. Vyd. 2., přeprac. Praha: Vydavatelství VŠCHT, 2006, 278 s. ISBN 80-7080-617-6.
- [38] ESCUDER, Beatriu and Juan F MIRAVET: *Functional molecular gels*, XI, 319 pp. RSC soft matter series, 1. ISBN: 978-1-84973-665-7.
- [39] KŘÍŽEK, Tomáš a Pavel COUFAL, a další. Fyzikální gely v kapilární gelové elektroforéze a jejich uplatnění v analýze bílkovin. *Chemické listy*. 2009, vol. 103, str. 130-135.
- [40] AHMED, Enas M. Hydrogel: Preparation, characterization, and applications. *Journal of Advanced Research*. 2013. DOI: 10.1016/j.jare.2013.07.006. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2090123213000969>
- [41] PEPPAS, N. A. and Y. HUANG, M. TORRES-LUGO, J. H. WARD and J. ZHANG. Physicochemical foundations and structural design of hydrogels in medicine and biology. *Annual Review of Biomedical Engineering*. 2000, vol. 2, issue 1, pp 9–29. DOI: 10.1146/annurev.bioeng.2.1.9. Dostupné z: <http://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.bioeng.2.1.9>
- [42] GIBAS, Iwona and Helena JANIK, Review: Synthetic polymer hydrogels for biomedical applications. *Chemistry and Chemical technology*. 2010, vol. 4, no. 4, pp. 297-304. Dostupné z: [http://science2016.lp.edu.ua/sites/default/files/Full\\_text\\_of\\_%20papers/full\\_text\\_338.pdf](http://science2016.lp.edu.ua/sites/default/files/Full_text_of_%20papers/full_text_338.pdf)
- [43] SLAUGHTER, Brandon V., et al. Hydrogels in regenerative medicine. *Advanced materials*, 2009, vol. 21, issue 32-33, pp. 3307-3329. DOI: 10.1002/adma.200802106. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/adma.200802106>
- [44] LAPČÍK, Lubomír. Jr., BOHDANECKÝ, M. LAPČÍK, L. BAKOŠ, D. : Kyselina hyaluronová- příprava, struktúra. Vlastnosti, aplikácia. *Chemické listy*. 1991, vol. 85, str. 281-299.
- [45] WANG, Xiumei and HE, Jin and WANG, Ying and CUI, Fu-Zhai. Hyaluronic acid-based scaffold for central neural tissue engineering. *Interface Focus*. 2012, vol. 2, issue 3, pp. 278-291. DOI:

10.1098/rsfs.2012.0016. Dostupné z:  
<http://rsfs.royalsocietypublishing.org/content/2/3/278#abstract-1>

- [46] LEHNINGER, Albert L, David L NELSON and Michael M COX. *Lehninger principles of biochemistry* [online]. 4th ed. New York: W.H.Freeman, c2005, 1 v. [cit. 2014-09-09] ISBN: 978-0716743392. Dostupné z:  
<http://www.irb.hr/users/precali/Znanost.o.Moru/Biokemija/Literatura/Lehninger%20Principles%20of%20Biochemistry,%20Fourth%20Edition%20-%20David%20L.%20Nelson,%20Michael%20M.%20Cox.pdf>
- [47] EL-SAFORY, Nermeen S., Ahmed E. FAZARY and Cheng-Kang LEE. Hyaluronidases, a group of glycosidases: Current and future perspectives. *Carbohydrate Polymers*. 2010, vol. 81, issue 2, pp 165-181. DOI: 10.1016/j.carbpol.2010.02.047. Dostupné z:  
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0144861710001402>
- [48] SLÍVA, Jiří a Juraj MINÁRIK. Hyaluronát-nejen pasivní pozorovatel nýbrž aktivní modulátor imunitních reakcí. *New EU Magazine of Medicine*. 2009, roč. 1, č. 2, s. 75-79.
- [49] SVANOVSKÝ, Evžen. Fyziologie a farmakologie kyseliny hyaluronové. *Česká a slovenská farmacie*. 2007, roč. 56, č. 6, s. 264-268. ISSN: 1210-7816.
- [50] ITANO, Naoki. Simple primary structure, Complex Turnover Regulation and Multiple Roles of Hyaluronan. *Journal of Biochemistry*. 2008, vol. 144, issue 2, pp 131-137. DOI: 10.1093/jb/mvn046. Dostupné z:  
<http://jb.oxfordjournals.org/cgi/doi/10.1093/jb/mvn046>.
- [51] ALMOND, A. Hyaluronan. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2007, vol. 64, issue 13, pp 1591-1596. DOI: 10.1007/s00018-007-7032-z. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00018-007-7032-z>.
- [52] GANDHI, Neha S. and Ricardo L. MANCERA. The Structure of Glycosaminoglycans and their Interactions with Proteins. *Chemical Biology*. 2008, vol. 72, issue 6, pp 455-482. DOI: 10.1111/j.1747-0285.2008.00741.x. Dostupné z:<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1747-0285.2008.00741.x>

- [53] NECAS, Jiri and L. BARTOSIKOVA, P. BRAUNER, J. KOLAR. Hyaluronic acid (hyaluronan): a review. *Veterinarni Medicina*. 2008, vol. 53, issue 8, pp. 397-411. Dostupné z: <https://www.vri.cz/docs/vetmed/53-8-397.pdf>
- [54] DAVID A. SWANN, ERIC L. RADIN, MICHAEL NAZIMIEC, PAUL A. WEISSER, NANCY CURRAN, GEORGE LEWINNEK. Role of hyaluronic acid in joint lubrication. *Annals of the Rheumatic Diseases*. 1974, vol. 33, pp. 318. Dostupné z: <http://ard.bmj.com/content/annrheumdis/33/4/318.full.pdf>
- [55] PRESTWICH, Glenn D. and Koen P. VERCRUYSSSE. Therapeutic applications of hyaluronic acid and hyaluronan derivatives. *Pharmaceutical Science and Technology Today*. 1998, vol. 1, No. 1, pp. 42-43.
- [56] WIDNER, B., R. BEHR, S. VON DOLLEN, M. TANG, T. HEU, A. SLOMA, D. STERNBERG, P. L. DEANGELIS, P. H. WEIGEL and S. BROWN. Hyaluronic Acid Production in *Bacillus subtilis*. *Applied and Environmental Microbiology*. 2005, vol. 71, issue 7, pp 3747–3752. DOI: [10.1128/AEM.71.7.3747-3752.2005](https://doi.org/10.1128/AEM.71.7.3747-3752.2005). Dostupné z: <http://aem.asm.org/cgi/doi/10.1128/AEM.71.7.3747-3752.2005>
- [57] BOERIU, Carmen G. and Jan SPRINGER et al. Production Methods for Hyaluronan, Review Article. *International Journal of Carbohydrate Chemistry*. 2013, vol. 2013, Article ID 624967, 14 pages <http://dx.doi.org/10.1155/2013/624967>
- [58] KALIA and Luc AVEROUS. Polysaccharides. *Biopolymers: Biomedical and environmental applications*. Hoboken: Wiley, c2011, pp. 3-34. ISBN: 978-0-470-63-923-8.
- [59] VELEBNÝ, Vladimír.: *Hyaluronan – biopolymer pro tkáňové inženýrství*, Teze habilitační práce. 2012. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Brno, 29s.
- [60] PERCIVAL, S. L., KNOTTENBELT, D.C., COCHRANE CH. A. *Biofilms and veterinary medicine*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2011, ISBN: 978-3-642-21288-8.

- [61] PITARRESI, Giovanna and PALUMBO, F. S. et al. Medicated hydrogels of hyaluronic acid derivatives for use in orthopedic field. *International Journal of Pharmaceutics*. 2013, vol. 449, issue 1-2, pp 84-94. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2013.03.059.
- [62] HASCALL, V. C. and LAURENT, C. T.: *Hyaluronan: Structure and Physical Properties*. Glycoforum [online]. 1997, [cit. 2013–04–16]. Dostupné z: <http://www.glycoforum.gr.jp/>
- [63] HOOK, M. and L. KJELLEN, S. JOHANSSON and J. ROBINSON. Cell-Surface Glycosaminoglycans. *Annual Review of Biochemistry*. 1984, vol. 53, issue 1, pp. 847-869. DOI: 10.1146/annurev.bi.53.070184.004215. Dostupné z: <http://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.bi.53.070184.004215>
- [64] STUHLMEIER, Karl M.: Aspects of the biology of hyaluronan, a largely neglected but extremely versatile molecule. *Wiener Medizinische Wochenschrift*. 2006, vol. 156, no. 21- 22, pp. 563-568.
- [65] SLEVIN, Mark, et al.: Hyaluronan-mediated angiogenesis in vascular disease: uncovering RHAMM and CD44 receptor signaling pathways. *Matrix Biology*. 2007, vol. 26, no. 1, pp. 58-68.
- [66] WU Tsung-Chung: Mixture of hyaluronic acid for treating and preventing inflammatory bowel disease. *European patent application*. EP 2 292 243 A1. Dostupný z: <https://www.epo.org/searching-for-patents/technical/ep-full-text.html#tab-1>
- [67] COWMAN, Mary K. and Shiro MATSUOKA. Experimental approaches to hyaluronan structure. *Carbohydrate Research*. 2005, vol. 340, issue 5, pp 791-809. DOI: 10.1016/j.carres.2005.01.022. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0008621505000534>
- [68] HATAKEYAMA, Hyoe and Tatsuko HATAKEYAMA. Interaction between water and hydrophilic polymers. *Thermochimica Acta*. 1998, vol. 308, 1-2, pp 3-22. DOI: 10.1016/S0040-6031(97)00325-0. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0040603197003250>
- [69] MEYER, Karl. The biological significance of hyaluronic acid and hyaluronidase. *Physiological reviews*. 1947, vol. 27, no. 3, pp. 335-359.



- [70] ALMOND, Andrew and John K. SHEEHAN and Andy BRAS. Molecular dynamics simulations of the two disaccharides of hyaluronan in aqueous solution. *Glycobiology*. 1997, vol. 7, no. 5, pp. 597-604.
- [71] LIŠKA, František. *Konstituce, konformace, konfigurace v názvech organických sloučenin*. 1 vyd. Praha: Vydavatelství VŠCHT, 2008, 247 s. ISBN: 978-80-7080-640-1.
- [72] SCOTT, John E.; HEATLEY, Frank; HULL, W. E. Secondary structure of hyaluronate in solution. A <sup>1</sup>H-nmr investigation at 300 and 500 MHz in [2H<sub>6</sub>] dimethyl sulphoxide solution. *Biochemical Journal*. 1984, vol. 220, issue 1, pp. 197-205.
- [73] ATKINS, E. D. T.; PHELPS, C. F.; SHEEHAN, J. K. The conformation of the mucopolysaccharides. Hyaluronates. *Biochemical Journal*. 1972, vol. 128, issue 5, pp. 1255-1263. Dostupné z: <http://www.biochemj.org/bj/128/1255/1281255.pdf>
- [74] SCOTT, John E.; HEATLEY, Frank. Hyaluronan forms specific stable tertiary structures in aqueous solution: a <sup>13</sup>C NMR study. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1999, vol. 96, issue 9, pp. 4850-4855. Dostupné z: <http://www.pnas.org/content/96/9/4850.full.pdf>
- [75] SCOTT, J. Ed. Secondary structures in hyaluronan solutions: chemical and biological implications. In: *Ciba Foundation Symposium 143-The Biology of Hyaluronan*. John Wiley & Sons, Ltd., 2007. p. 6-20.
- [76] HAXAIRE, Katia, et al. Conformational behavior of hyaluronan in relation to its physical properties as probed by molecular modeling. *Glycobiology*. 2000, vol. 10, issue 6, pp. 587-594.
- [77] SCOTT, John E., et al. Secondary and tertiary structures of hyaluronan in aqueous solution, investigated by rotary shadowing-electron microscopy and computer simulation. Hyaluronan is a very efficient network-forming polymer. *Biochemical Journal*. 1991, vol. 274, issue 3, pp. 699-705. Dostupné z: <http://www.biochemj.org/bj/274/0699/2740699.pdf>
- [78] LAPČÍK, Lubomír; LAPČÍK, Lubomír; SMEDT, Stefaan DE; DEMEESTER, Joseph and Peter CHABREČEK. Hyaluronan: Preparation, Structure, Properties, and Applications. *Chemical Reviews*. 1998, vol. 98, issue 8, pp. 2663-2684. DOI: 10.1021/cr941199z. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/cr941199z>.

- [79] RUEDA, Carmen, et al. Mucopolysaccharides in aqueous solutions: effect of ionic strength on titration curves. *Il Farmaco*. 2001, vol. 56, issue 5-7, pp. 527-532. DOI: 10.1016/S0014-827X(01)01106-5. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0014827X01011065>
- [80] BUHLER, Eric a François BOUÉ. Chain Persistence Length and Structure in Hyaluronan Solutions: Ionic Strength Dependence for a Model Semirigid Polyelectrolyte. *Macromolecules*. 2004, vol. 37, issue 4, s. 1600-1610. DOI: 10.1021/ma0215520. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ma0215520>
- [81] VOYCHECK a Julia S. TAN Ion-Containing Polymers and Their Biological Interactions. HARA, Masanori. *Polyelectrolytes: science and technology*. New York: Marcel Dekker, CRC Press. 1992, pp 299-369. ISBN 0-8247-8759-5.
- [82] FRASER, J. R. E.; LAURENT, T. C.; LAURENT, U. B. G. Hyaluronan: its nature, distribution, functions and turnover. *Journal of internal medicine*. 1997, vol. 242, issue 1, pp. 27-33.
- [83] HLISNIKOVSÁ, Kristýna: *Reologie roztoků hyaluronanů*. Diplomová práce. 2008. Vysoké učení technické v Brně, fakulta chemická, Brno.
- [84] GARG, H. G., HALES, CH. A.: *Chemistry and biology of hyaluronan*, 2004, Elsevier Ltd, Oxford, 605 s., ISBN 0-08-044382-6. SHU, XIAO ZHENG; PRESTWICH, GLENND. D. Therapeutic biomaterials from chemically modified hyaluronan, pp. 475 – 504.
- [85] LEACH, Jennie B. and Christine E. SCHMIDT. Hyaluronan. *Encyclopedia of biomaterials and biomedical engineering*. 2008, pp. 1421-1431. ISBN: 978-1-4200-7802-2. DOI: 10.3109/E-EBBE-120007317.
- [86] SCHANTÉ, Carole E., Guy ZUBER, Corinne HERLIN a Thierry F. VANDAMME. Chemical modifications of hyaluronic acid for the synthesis of derivatives for a broad range of biomedical applications. *Carbohydrate Polymers*. 2011, vol. 85, issue 3, pp. 469-489. DOI: 10.1016/j.carbpol.2011.03.019. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0144861711002001>
- [87] DRNOVSKÁ, H., LAPČÍK, L. Jr.: Hyaluronate derivatives and their applications, *Plasty a kaučuk* 36. 1999, vol. 36, issue 10, pp. 291-294.

- [88] OOMMEN, P. and Shujiang WANG, Jöns HILBORN and OOMMEN P. Varghese. Chemical modification of hyaluronan for therapeutic applications. *Hyaluronic acid for biomedical and pharmaceutical applications*. Ed.: Maurice N. Collins: Smithers Rapra, Shrewsbury. 2014, pp.149-176. ISBN 978-19-090-3077-0.
- [89] PRESTWICH, Glenn D., et al. Controlled chemical modification of hyaluronic acid: synthesis, applications, and biodegradation of hydrazide derivatives. *Journal of Controlled Release*. 1998, vol. 53, issue 1, pp. 93-103.
- [90] MERO, Anna; CAMPISI, Monica. Hyaluronic acid bioconjugates for the delivery of bioactive molecules. *Polymers*. 2014, vol. 6, issue 2, pp. 346-369. DOI: 10.3390/polym6020346.
- [91] VISWANATH, Dabir S., et al. Introduction. In: *Viscosity of Liquids*. Springer Netherlands, 2007. p. 1-8. ISBN-10 1-4020-5481-5 (HB).  
Dostupné z:  
<http://www.cementtechnology.ir/Library/Viscosity.of.Liquids.pdf>
- [92] KULICKE, Werner-Michael; CLASEN, Christian. *Viscosimetry of polymers and polyelectrolytes*. Springer Science & Business Media, 2013. ISBN 3-540-40760-X.
- [93] VŠCHT: Charakterizace obrázku- *Stanovení viskozity roztoků-teoretická část*. Obrázek – Rychlostní profil v proudící reálné kapalině [online]. 2015 [cit. 2017-01-05]. Dostupné z:  
[http://old.vscht.cz/met/stranky/vyuka/labcv/labor/res\\_stanoveni\\_viskozity\\_roztoku/teorie.htm](http://old.vscht.cz/met/stranky/vyuka/labcv/labor/res_stanoveni_viskozity_roztoku/teorie.htm)
- [94] MORAWETZ, Herbert. *Chování makromolekul roztoku*. 1. Vyd. Praha: Academia, 1971, 512 s.
- [95] MOORE, Walter John. *Fyzikální chemie*. 2., nezm. vyd. Praha: SNTL – Nakladatelství technické literatury. 1981, 974 s.
- [96] JANALÍK, Jaroslav. *Viskozita tekutin a její měření*. Učební texty. Vysoká škola Báňská, Technická Univerzita Ostrava, fakulta strojní, Ostrava 2010.

- [97] European Pharmacopoeia, 5 edition: 2. Methods of analysis, 2.2.9. *Capillary viscometer method+Viscosity* [online]. 2005 [cit. 2017-02-06]. Dostupné z: [http://lib.njtc.edu.cn/yaodian/ep/EP5.0/02\\_methods\\_of\\_analysis/2.2.physical\\_and\\_physicochemical\\_methods/2.2.8.%20Viscosity.pdf](http://lib.njtc.edu.cn/yaodian/ep/EP5.0/02_methods_of_analysis/2.2.physical_and_physicochemical_methods/2.2.8.%20Viscosity.pdf)
- [98] KVÍTEK, Libor a Aleš PANÁČEK. *Základy koloidní chemie* [online]. Olomouc, 2007 [cit. 2014-11-02]. Dostupné z: <http://fch.upol.cz/skripta/kol/koch.pdf>
- [99] NAIR A., John. *Polymer Characterization* [online]. Material Science and Engineering 5473, Spring 2003 [cit. 2014-10-08]. Chapter 6.- Viscosity, pp. 77-88. Dostupné z: [http://www.ias.ac.in/initiat/sci\\_ed/resources/chemistry/Viscosity.pdf](http://www.ias.ac.in/initiat/sci_ed/resources/chemistry/Viscosity.pdf)
- [100] WATEK s.r.o.: *DEMIWA-Přístroj pro přípravu laboratorní čisté vody*. [online]. 2016 [cit. 2016-03-05]. Dostupné z: <http://www.watek.cz/cs/demiwa-jednoduche-pristroje-pro-pripravu-laboratorni-ciste-vody>
- [101] Ústav fyziky a materiálového inženýrství UTB: *Studijní texty pro základy fyziky*, laboratorní úloha č. 2- Měření kinematické a dynamické viskozity kapalin [online]. 2017 [cit. 2017-01-04]. Dostupné z: [http://ufmi.ft.utb.cz/texty/zakl\\_fyz/ZF\\_lab\\_02.pdf](http://ufmi.ft.utb.cz/texty/zakl_fyz/ZF_lab_02.pdf)
- [102] Polymer Science Learning Center: *Dilute Solution- Viscometry*. [online]. 2016 [cit. 2016-12-07]. Dostupné z: <http://pslc.ws/macrog/vis.htm>
- [103] Pragolap, s.r.o.: *The total Sorption Solution- SEA*. Charakterizace přístroje. [online]. 2017 [cit. 2017-08-07]. Dostupné z: <http://www.pragolab.cz/documents/SEA%20v%201.0.pdf>
- [104] MOHAMMADI-JAM, S.; WATERS, K. E. Inverse gas chromatography applications: A review. *Advances in colloid and interface science*. 2014, vol. 212, pp. 21-44.
- [105] Ústav fyziky a materiálového inženýrství UTB: *Studijní texty pro kontrolní a zkušební metody*, kapitola 7- Chromatografie [online]. 2017 [cit. 2017-02-04]. Dostupné z: [http://ufmi.ft.utb.cz/texty/kzm/KZM\\_07.pdf](http://ufmi.ft.utb.cz/texty/kzm/KZM_07.pdf)

- [106] SCHULTZ, J.; LAVIELLE, L.; MARTIN, C. The role of the interface in carbon fibre-epoxy composites. *The Journal of Adhesion*. 1987, vol. 23, issue 1, pp. 45-60.
- [107] DORRIS, Gilles M.; GRAY, Derek G. Adsorption of n-alkanes at zero surface coverage on cellulose paper and wood fibers. *Journal of Colloid and Interface Science*. 1980, vol. 77, issue 2, pp. 353-362.
- [108] HARE, C., et al. Analysis of the dynamics of the FT4 powder rheometer. *Powder Technology*. 2015, vol. 285, pp. 123-127.
- [109] SCHULZE, D. Properties exhibited by some bulk solids-flow agents. In: *Powders and Bulk Solids-Behavior C, Storage and Flow ISBN 978-3-540-73767-4*. Springer Berlin Heidelberg, New York, 2008. p. 211-215.
- [110] SCHWEDES, Jörg: Review on testers for measuring flow properties of bulk solids. *Granular Matter*, 2003, vol. 5, issue 1, pp 1-43.
- [111] ZUBEK, P.: *Sypké vlastnosti jemných práškovitých materiálů*, diplomová práce. 2012. Vysoké učení technické v Brně, fakulta chemická, Brno.
- [112] Fyzikální ústav AV ČR: JÄGER A., GÄRTNEROVÁ V.: *Elektronovým mikroskopem do nitra materiálů aneb jak vypadá jejich struktura*. [on-line] 2014 [cit. 2017-08-06]. Dostupné z: <http://www.fzu.cz/popularizace/elektronovym-mikroskopem-do-nitra-materialu-aneb-jak-vypada-jejich-struktura>
- [113] Laboratoř NMR Spektroskopie: *Elektronová mikroskopie - přednáška*. VŠCHT Praha [on-line] 2009 [cit. 2010-04-10]. Dostupné z: [http://www.vscht.cz/nmr/mol\\_model\\_bioinfo/lekce/mikroskopie.pdf](http://www.vscht.cz/nmr/mol_model_bioinfo/lekce/mikroskopie.pdf)
- [114] KLOUŽKOVÁ, A., P. ZEMENOVÁ, J. KLOUŽEK a W. PABST. *Termická analýza*. 2012, VŠCHT, Praha.
- [115] ŠIMÁČKOVÁ, Marcela: *Termální degradace hyaluronanu*. Diplomová práce, 2016. Vysoké učení technické v Brně, fakulta chemická, Brno.
- [116] GABBOTT, Paul (ed.). *Principles and applications of thermal analysis*. John Wiley & Sons, 2008. ISBN 978-140-5131-711.

- [117] TANFORD, Charles. Intrinsic viscosity and kinematic viscosity. *The Journal of Physical Chemistry*, 1955, vol. 59, issue 8, pp. 798-799. DOI: 10.1021/j150530a027
- [118] BELGACEM, M.N. and A. GANDINI in *Interfacial Phenomena in Chromatography*. Ed., PEFFERKORN, Emile. CRC Press, 1999, p. 145. ISBN: 0-8247-1947-6.
- [119] FREEMAN, Reg. Measuring the flow properties of consolidated, conditioned and aerated powders — a comparative study using a powder rheometer and a rotational shear cell. *Powder Technology*, 2007, vol. 174, issue 1, pp. 25–33.
- [120] Freeman technology. *Freeman technology* [online]. 2017 [cit. 2017-05-05]. Dostupné z: [http://www.freemantech.co.uk/\\_powders/](http://www.freemantech.co.uk/_powders/)
- [121] ZELLERMANN, Anna-Maria; BERGMANN, Dirk; MAYER, Christian. Cation induced conformation changes in hyaluronate solution. *European Polymer Journal*, 2013, vol. 49, issue 1, pp. 70-79. DOI:10.1016/j.eurpolymj.2012.09.025.
- [122] KAUFMANN, J.; WIEGEL, D.; ARNOLD, K. Polar interactions of hyaluronic acid-Experiments and molecular dynamics simulations. *Journal of dispersion science and technology*, 1998, vol. 19, issue 6-7, pp. 979-1001.
- [123] REIMER, Ludwig. *Scanning electron microscopy: physics of image formation and microanalysis*. 2000. Springer Science & Business Media, 1998, ISSN 0342-4111, ISBN 978-3-540-38967-5, DOI: 10.1007/978-3-540-38967-5.
- [124] CASPERSEN, Mikael Bjerg, et al. Thermal degradation and stability of sodium hyaluronate in solid state. *Carbohydrate polymers*, 2014, 107: 25-30. DOI: 10.1016/j.carbpol.2014.02.005. ISSN 01448617. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0144861714001258>
- [125] FRANZ, Gerhard; FEUERSTEIN, Ulrike. Chemical stability of some model polysaccharides. In: *Macromolecular Symposia*. Hüthig & Wepf Verlag, 1997. p. 169-181. DOI:10.1002/masy.19971200118.

## 11. SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Struktura chemicky síťovaného gelu (vlevo) a fyzikálně síťovaného gelu (vpravo) [38].	15
Obrázek 2: Chemická struktura kyseliny hyaluronové [66].	18
Obrázek 3: Chování tetrasacharidu hyaluronového řetězce v nevodném prostředí (a) a ve vodném prostředí (b), kde G znázorňuje kyselinu D-glukuronovou a N znázorňuje N-acetyl-D-glukosamin [75].	20
Obrázek 4: Lineární (A), derivovaná (B) a zesíťovaná podoba HA (C) [6].	22
Obrázek 5: Základní modifikace karboxylové skupiny HA [88].	24
Obrázek 6: Nezesíťované HA deriváty založené na esterifikaci-etyl ester derivátu (A), reakce pomocí karbodiimidů-hydrazid derivátu (B)[85].	25
Obrázek 7: Základní modifikace hydroxylové skupiny HA [88].	26
Obrázek 8: Rychlostní gradient [93].	27
Obrázek 9: Konstrukce Ubbelohdeho viskozimetru [101].	33
Obrázek 10: Vyhodnocení limitního viskozitního čísla [102].	34
Obrázek 11: Schéma inverzní plynové chromatografie [105].	35
Obrázek 12: Mohrovy kružnice spolu s jednoosou zkouškou tlakem [109].	37
Obrázek 13: Znázornění principu SEM [112].	38
Obrázek 14: Schéma termogravimetrické analýzy [115].	39
Obrázek 15: Připravené zásobní roztoky HA (vlevo) a vzorek HA v 0,01 M KCl o koncentraci 0,5 g/l s přidavkem 1 kapky 0,1 M HCl (vpravo).	43
Obrázek 16: Smyková cela pro FT4 reometr [120].	46
Obrázek 17: Snímek práškové formy kyseliny hyaluronové ze SEM.	60

## 12. SEZNAM GRAFŮ

Graf 1: Závislost redukované viskozity na koncentraci pro HA ve vodném roztoku.....	48
Graf 2: Závislost redukované viskozity na koncentraci pro HA v 0,01 M KCl.....	49
Graf 3: Závislost Hugginsovy konstanty na teplotě pro 2 roztoky HA. ....	52
Graf 4: Závislost limitního viskozitního čísla na teplotě pro 2 roztoky HA...53	
Graf 5: Závislost limitního viskozitního čísla na pH pro roztok HA v 0,01M KCl.....	54
Graf 6: Závislost povrchové energie na stupni pokrytí vyjádřená pomocí acidobazické a disperzní složky povrchové energie pro HA.....	55
Graf 7: Distribuční křivka celkové povrchové energie a její komponent pro HA.....	56
Graf 8: Distribuční křivka acido-bazické volné povrchové energie pro prášek HA.....	57
Graf 9: Toková křivka spolu s Mohrovými kružnicemi pro práškovou formu HA.....	58
Graf 10: Termogravimetrická křivka pro práškovou formu HA.....	61



### 13. SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Ředění vzorků na základní koncentrace. ....	41
Tabulka 2: Popis značení vzorků pro viskozimetrické měření. ....	42
Tabulka 3: Souhrn naměřeného pH pro 2 druhy rozpouštědel. ....	45
Tabulka 4: Celkové výsledky viskozimetrického měření pro HA v 0,01 M KCl. ....	50
Tabulka 5: Celkové výsledky viskozimetrického měření pro HA ve vodném roztoku. ....	51
Tabulka 6: Průběžné výpočty pro HA ve vodném roztoku bez přídavku-čistý nemodifikovaný roztok. ....	85
Tabulka 7: Průběžné výpočty pro HA ve vodném roztoku s přídavkem-1 kapky 0,1 M NaOH. ....	86
Tabulka 8: Průběžné výpočty pro HA ve vodném roztoku s přídavkem-2 kapek 0,1 M NaOH. ....	86
Tabulka 9: Průběžné výpočty pro HA ve vodném roztoku s přídavkem-5 kapek 0,1 M NaOH. ....	86
Tabulka 10: Průběžné výpočty pro HA ve vodném roztoku s přídavkem-10 kapek 0,1 M NaOH. ....	87
Tabulka 11: Průběžné výpočty pro HA ve vodném roztoku s přídavkem-15 kapek 0,1 M NaOH. ....	87
Tabulka 12: Průběžné výpočty pro HA ve vodném roztoku s přídavkem-20 kapek 0,1 M NaOH. ....	87
Tabulka 13: Průběžné výpočty pro HA ve vodném roztoku s přídavkem-1 kapky 0,1 M HCl. ....	88
Tabulka 14: Průběžné výpočty pro HA ve vodném roztoku s přídavkem-2 kapek 0,1 M HCl. ....	88
Tabulka 15: Průběžné výpočty pro HA ve vodném roztoku s přídavkem-5 kapek 0,1 M HCl. ....	88
Tabulka 16: Průběžné výpočty pro HA ve vodném roztoku s přídavkem-10 kapek 0,1 M HCl. ....	89
Tabulka 17: Průběžné výpočty pro HA ve vodném roztoku s přídavkem-15 kapek 0,1 M HCl. ....	89
Tabulka 18: Průběžné výpočty pro HA ve vodném roztoku s přídavkem-20 kapek 0,1 M HCl. ....	89
Tabulka 19: Průběžné výpočty pro HA v 0,01 M roztoku KCl bez přídavku-čistý nemodifikovaný roztok. ....	90

Tabulka 20: Průběžné výpočty pro HA v 0,01 M roztoku KCl s přídatkem-1 kapky 0,1 M NaOH. ....	91
Tabulka 21: Průběžné výpočty pro HA v 0,01 M roztoku KCl s přídatkem-2 kapek 0,1 M NaOH.....	91
Tabulka 22: Průběžné výpočty pro HA v 0,01 M roztoku KCl s přídatkem-5 kapek 0,1 M NaOH.....	91
Tabulka 23: Průběžné výpočty pro HA v 0,01 M roztoku KCl s přídatkem-10 kapek 0,1 M NaOH.....	92
Tabulka 24: Průběžné výpočty pro HA v 0,01 M roztoku KCl s přídatkem-15 kapek 0,1 M NaOH.....	92
Tabulka 25: Průběžné výpočty pro HA v 0,01 M roztoku KCl s přídatkem-20 kapek 0,1 M NaOH.....	92
Tabulka 26: Průběžné výpočty pro HA v 0,01 M roztoku KCl s přídatkem-1 kapky 0,1 M HCl. ....	93
Tabulka 27: Průběžné výpočty pro HA v 0,01 M roztoku KCl s přídatkem-2 kapek 0,1 M HCl. ....	93
Tabulka 28: Průběžné výpočty pro HA v 0,01 M roztoku KCl s přídatkem-5 kapek 0,1 M HCl. ....	93
Tabulka 29: Průběžné výpočty pro HA v 0,01 M roztoku KCl s přídatkem-10 kapek 0,1 M HCl. ....	94
Tabulka 30: Průběžné výpočty pro HA v 0,01 M roztoku KCl s přídatkem-15 kapek 0,1 M HCl. ....	94
Tabulka 31: Průběžné výpočty pro HA v 0,01 M roztoku KCl s přídatkem-20 kapek 0,1 M HCl. ....	94

## 14. SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

ADH	dihydrazid kyseliny adipové
AEMA	2-aminoethyl metakrylát hydrochlorid
APMA	2-aminoethyl metakrylát
BA	bromacetát
BDDE	1,4 butandiolglycid eter
c	koncentrace [g/l]
CDH	karbodihydrazid
DMF	dimethylformamid
DMSO	dimethylsulfoxid
EDC	1-ethyl-3-(3'-dimethylaminopropyl) karbodiimid
ff <sub>c</sub>	index toku=tokovost [-]
GAG	Glykosaminoglykany
GlcA	kyselina D-glukuronová
GlcNAc	N-acetyl-D-glukosamin
GTA	glutarandehyd
HA	kyselina hyaluronová [Da=Dalton]
HDMA	hexane-1,6-diamine
HyA	Sodium hyaluronate
k <sub>H</sub>	Hugginsova konstanta [-]
k <sub>K</sub>	Kraemerova konstanta [-]
M	molární hmotnost [g/l]
PDPH	pyridyldithioethylamin

SH	thiol
SEA	Surface Energy Analyser
SEM	Scanning Electron Microscope
TBA	tetrabutylamonná sůl
TG	termogravimetrie
VS	vinyl sulfonyl
$\gamma_S^D$	disperzní složka povrchové energie pevné látky
$\gamma_L^D$	disperzní složka povrchové energie kapaliny
$\eta$	dynamická viskozita [Pa.s]
$[\eta]$	limitní viskozitní číslo [l/g]
$\nu$	kinematická viskozita [m <sup>2</sup> .s <sup>-1</sup> ]
$\nu_{inh}$	inherentní viskozita [l/g]
$\nu_{red}$	redukováná viskozita [l/g]
$\nu_{rel}$	relativní viskozita [-]
$\nu_{sp}$	specifická viskozita [-]
$\rho$	hustota [g/cm <sup>3</sup> ]
$\sigma_c$	prostá mez kluzu [Pa]
$\sigma_1$	konsolidační napětí [Pa]
$\sigma_2$	normálové napětí [Pa]
$\tau$	smykové napětí [Pa]
$\tau_c$	koheze [kPa]
$\varphi_e$	efektivní úhel vnitřního tření [°]
$\varphi_i$	úhel vnitřního tření [°]

## 15. SEZNAM PŘÍLOH

### 15.1 Příloha A: Výsledky z viskozimetrického měření pro vodný roztok HA

Tabulka 6: Průběžné výpočty pro HA ve vodném roztoku bez přídavku- čistý nemodifikovaný roztok.

25°C				
koncentrace <b>c</b> (g/l)	kinematická viskozita roztoku ( <b>v</b> ) (m <sup>2</sup> /s)	specifická viskozita ( <b>v<sub>sp</sub></b> ) (-)	redukovaná viskozita ( <b>v<sub>red</sub></b> ) (l/g)	Limitní viskozitní číslo <b>[η]</b> (l/g) Hugginsova konstanta <b>k<sub>H</sub></b> (-)
0,4	5,71.10 <sup>-6</sup>	5,33	13,32	<b>[η]= 12,68 l/g</b> <b>k<sub>H</sub>= 0,007</b>
0,5	6,85.10 <sup>-6</sup>	6,59	13,18	
0,6	7,98.10 <sup>-6</sup>	7,84	13,07	
0,7	9,39.10 <sup>-6</sup>	9,04	13,43	
1	1,33.10 <sup>-5</sup>	13,76	13,76	
30°C				
0,4	5,41.10 <sup>-6</sup>	5,76	14,40	<b>[η]= 14,80 l/g</b> <b>k<sub>H</sub>= -0,003</b>
0,5	6,72.10 <sup>-6</sup>	7,38	14,77	
0,6	7,65.10 <sup>-6</sup>	8,55	14,25	
0,7	8,78.10 <sup>-6</sup>	9,96	14,22	
1	1,21.10 <sup>-5</sup>	14,14	14,15	
35°C				
0,4	5,06.10 <sup>-6</sup>	5,93	14,83	<b>[η]= 15,26 l/g</b> <b>k<sub>H</sub>= -0,005</b>
0,5	6,06.10 <sup>-6</sup>	7,30	14,60	
0,6	7,10.10 <sup>-6</sup>	8,74	14,56	
0,7	8,04.10 <sup>-6</sup>	10,02	14,31	
1	1,10.10 <sup>-5</sup>	14,1	14,07	
kinematická viskozita rozpouštědla ( <b>v<sub>0</sub></b> ): 25°C= 9,03.10 <sup>-7</sup> m <sup>2</sup> /s; 30°C= 8,01.10 <sup>-7</sup> m <sup>2</sup> /s; 35°C= 7,30.10 <sup>-7</sup> m <sup>2</sup> /s				

Tabulka 7: Průběžné výpočty pro HA ve vodném roztoku s přidavkem-1 kapky 0,1 M NaOH.

	25°C			30°C			35°C		
<b>c</b> (g/l)	<b>(v)</b> (m <sup>2</sup> /s)	<b>(v<sub>sp</sub>)</b> (-)	<b>(v<sub>red</sub>)</b> (l/g)	<b>(v)</b> (m <sup>2</sup> /s)	<b>(v<sub>sp</sub>)</b> (-)	<b>(v<sub>red</sub>)</b> (l/g)	<b>(v)</b> (m <sup>2</sup> /s)	<b>(v<sub>sp</sub>)</b> (-)	<b>(v<sub>red</sub>)</b> (l/g)
0,4	4,74.10 <sup>-6</sup>	4,25	10,63	4,35.10 <sup>-6</sup>	4,43	11,09	3,93.10 <sup>-6</sup>	4,39	10,98
0,5	6,38.10 <sup>-6</sup>	6,07	12,14	5,82.10 <sup>-6</sup>	6,26	12,53	5,37.10 <sup>-6</sup>	6,37	12,73
0,6	8,29.10 <sup>-6</sup>	8,19	13,65	6,84.10 <sup>-6</sup>	7,54	12,56	6,24.10 <sup>-6</sup>	7,56	12,59
0,7	9,09.10 <sup>-6</sup>	9,07	12,96	8,22.10 <sup>-6</sup>	9,26	13,23	7,47.10 <sup>-6</sup>	9,24	13,20
1	1,34.10 <sup>-5</sup>	13,88	13,88	1,09.10 <sup>-5</sup>	12,64	12,64	9,95.10 <sup>-6</sup>	12,64	12,64
	<b>[η]= 9,70 l/g; k<sub>H</sub>= 0,05</b>			<b>[η]= 11,12 l/g; k<sub>H</sub>= 0,02</b>			<b>[η]= 11,16 l/g; k<sub>H</sub>= 0,02</b>		
kinematická viskozita rozpouštědla (v <sub>0</sub> ): 25°C= 9,03.10 <sup>-7</sup> m <sup>2</sup> /s; 30°C= 8,01.10 <sup>-7</sup> m <sup>2</sup> /s; 35°C= 7,30.10 <sup>-7</sup> m <sup>2</sup> /s									

Tabulka 8: Průběžné výpočty pro HA ve vodném roztoku s přidavkem-2 kapek 0,1 M NaOH.

	25°C			30°C			35°C		
<b>c</b> (g/l)	<b>(v)</b> (m <sup>2</sup> /s)	<b>(v<sub>sp</sub>)</b> (-)	<b>(v<sub>red</sub>)</b> (l/g)	<b>(v)</b> (m <sup>2</sup> /s)	<b>(v<sub>sp</sub>)</b> (-)	<b>(v<sub>red</sub>)</b> (l/g)	<b>(v)</b> (m <sup>2</sup> /s)	<b>(v<sub>sp</sub>)</b> (-)	<b>(v<sub>red</sub>)</b> (l/g)
0,4	4,54.10 <sup>-6</sup>	4,03	10,08	4,15.10 <sup>-6</sup>	4,18	10,46	3,79.10 <sup>-6</sup>	4,20	10,50
0,5	5,67.10 <sup>-6</sup>	5,28	10,56	5,15.10 <sup>-6</sup>	5,43	10,85	4,72.10 <sup>-6</sup>	5,48	10,95
0,6	7,08.10 <sup>-6</sup>	6,84	11,40	6,41.10 <sup>-6</sup>	7,00	11,67	5,82.10 <sup>-6</sup>	6,97	11,62
0,7	8,06.10 <sup>-6</sup>	7,93	11,32	7,22.10 <sup>-6</sup>	8,01	11,45	6,60.10 <sup>-6</sup>	8,05	11,51
1	1,13.10 <sup>-5</sup>	11,51	11,51	1,05.10 <sup>-6</sup>	12,06	12,06	9,43.10 <sup>-6</sup>	11,93	11,93
	<b>[η]= 9,56 l/g; k<sub>H</sub>= 0,02</b>			<b>[η]= 9,70 l/g; k<sub>H</sub>= 0,03</b>			<b>[η]= 9,90 l/g; k<sub>H</sub>= 0,02</b>		

Tabulka 9: Průběžné výpočty pro HA ve vodném roztoku s přidavkem-5 kapek 0,1 M NaOH.

	25°C			30°C			35°C		
<b>c</b> (g/l)	<b>(v)</b> (m <sup>2</sup> /s)	<b>(v<sub>sp</sub>)</b> (-)	<b>(v<sub>red</sub>)</b> (l/g)	<b>(v)</b> (m <sup>2</sup> /s)	<b>(v<sub>sp</sub>)</b> (-)	<b>(v<sub>red</sub>)</b> (l/g)	<b>(v)</b> (m <sup>2</sup> /s)	<b>(v<sub>sp</sub>)</b> (-)	<b>(v<sub>red</sub>)</b> (l/g)
0,4	3,82.10 <sup>-6</sup>	3,23	8,07	3,48.10 <sup>-6</sup>	3,34	8,35	3,19.10 <sup>-6</sup>	3,37	8,43
0,5	4,58.10 <sup>-6</sup>	4,08	8,16	4,14.10 <sup>-6</sup>	4,17	8,34	3,77.10 <sup>-6</sup>	4,17	8,33
0,6	5,81.10 <sup>-6</sup>	5,44	9,06	7,07.10 <sup>-6</sup>	7,83	13,05	4,79.10 <sup>-6</sup>	5,56	9,27
0,7	6,94.10 <sup>-6</sup>	6,68	9,55	6,33.10 <sup>-6</sup>	6,90	9,85	5,78.10 <sup>-6</sup>	6,92	9,88
1	1,01.10 <sup>-5</sup>	10,19	10,19	9,16.10 <sup>-6</sup>	10,44	10,44	8,47.10 <sup>-6</sup>	10,60	10,60
	<b>[η]= 6,59 l/g; k<sub>H</sub>= 0,09</b>			<b>[η]= 8,03 l/g; k<sub>H</sub>= 0,05</b>			<b>[η]= 6,74 l/g; k<sub>H</sub>= 0,09</b>		

Tabulka 10: Průběžné výpočty pro HA ve vodném roztoku s přidavkem-10 kapek 0,1 M NaOH.

	25°C			30°C			35°C		
c (g/l)	(v) (m <sup>2</sup> /s)	(v <sub>sp</sub> ) (-)	(v <sub>red</sub> ) (l/g)	(v) (m <sup>2</sup> /s)	(v <sub>sp</sub> ) (-)	(v <sub>red</sub> ) (l/g)	(v) (m <sup>2</sup> /s)	(v <sub>sp</sub> ) (-)	(v <sub>red</sub> ) (l/g)
0,4	2,93.10 <sup>-6</sup>	2,25	5,62	2,62.10 <sup>-6</sup>	2,27	5,68	2,40.10 <sup>-6</sup>	2,29	5,73
0,5	3,55.10 <sup>-6</sup>	2,93	5,87	3,23.10 <sup>-6</sup>	3,03	6,06	2,91.10 <sup>-6</sup>	2,99	5,97
0,6	4,52.10 <sup>-6</sup>	4,01	6,68	4,10.10 <sup>-6</sup>	4,12	6,86	3,69.10 <sup>-6</sup>	4,06	6,77
0,7	5,71.10 <sup>-6</sup>	5,33	7,62	5,09.10 <sup>-6</sup>	5,35	7,65	4,62.10 <sup>-6</sup>	5,33	7,61
1	8,38.10 <sup>-6</sup>	8,28	8,28	7,54.10 <sup>-6</sup>	8,41	8,41	6,90.10 <sup>-6</sup>	8,46	8,46
	<b>[η]= 3,79 l/g; k<sub>H</sub>= 0,33</b>			<b>[η]= 3,92 l/g; k<sub>H</sub>= 0,31</b>			<b>[η]= 3,88 l/g; k<sub>H</sub>= 0,33</b>		

Tabulka 11: Průběžné výpočty pro HA ve vodném roztoku s přidavkem-15 kapek 0,1 M NaOH.

	25°C			30°C			35°C		
c (g/l)	(v) (m <sup>2</sup> /s)	(v <sub>sp</sub> ) (-)	(v <sub>red</sub> ) (l/g)	(v) (m <sup>2</sup> /s)	(v <sub>sp</sub> ) (-)	(v <sub>red</sub> ) (l/g)	(v) (m <sup>2</sup> /s)	(v <sub>sp</sub> ) (-)	(v <sub>red</sub> ) (l/g)
0,4	2,65.10 <sup>-6</sup>	1,94	4,85	2,40.10 <sup>-6</sup>	2,00	5,00	2,19.10 <sup>-6</sup>	2,01	5,02
0,5	3,26.10 <sup>-6</sup>	2,61	5,22	2,96.10 <sup>-6</sup>	2,69	5,39	2,70.10 <sup>-6</sup>	2,69	5,39
0,6	3,97.10 <sup>-6</sup>	3,40	5,67	3,59.10 <sup>-6</sup>	3,48	5,80	3,29.10 <sup>-6</sup>	3,51	5,84
0,7	4,89.10 <sup>-6</sup>	4,42	6,32	4,45.10 <sup>-6</sup>	4,55	6,50	4,04.10 <sup>-6</sup>	4,54	6,49
1	7,32.10 <sup>-6</sup>	7,12	7,12	6,63.10 <sup>-6</sup>	7,28	7,28	5,95.10 <sup>-6</sup>	7,15	7,15
	<b>[η]= 3,36 l/g; k<sub>H</sub>= 0,34</b>			<b>[η]= 3,50 l/g; k<sub>H</sub>= 0,32</b>			<b>[η]= 3,65 l/g; k<sub>H</sub>= 0,27</b>		

Tabulka 12: Průběžné výpočty pro HA ve vodném roztoku s přidavkem-20 kapek 0,1 M NaOH.

	25°C			30°C			35°C		
c (g/l)	(v) (m <sup>2</sup> /s)	(v <sub>sp</sub> ) (-)	(v <sub>red</sub> ) (l/g)	(v) (m <sup>2</sup> /s)	(v <sub>sp</sub> ) (-)	(v <sub>red</sub> ) (l/g)	(v) (m <sup>2</sup> /s)	(v <sub>sp</sub> ) (-)	(v <sub>red</sub> ) (l/g)
0,4	2,31.10 <sup>-6</sup>	1,56	3,90	2,06.10 <sup>-6</sup>	1,57	3,93	1,91.10 <sup>-6</sup>	1,62	4,06
0,5	3,04.10 <sup>-6</sup>	2,37	4,74	2,75.10 <sup>-6</sup>	2,43	4,87	2,48.10 <sup>-6</sup>	2,40	4,80
0,6	3,60.10 <sup>-6</sup>	2,99	4,99	3,23.10 <sup>-6</sup>	3,03	5,05	2,93.10 <sup>-6</sup>	3,02	5,03
0,7	4,42.10 <sup>-6</sup>	3,90	5,57	4,03.10 <sup>-6</sup>	4,03	5,76	3,64.10 <sup>-6</sup>	3,99	5,70
1	6,47.10 <sup>-6</sup>	6,17	6,17	5,75.10 <sup>-6</sup>	6,17	6,17	5,26.10 <sup>-6</sup>	6,21	6,21
	<b>[η]= 2,79 l/g; k<sub>H</sub>= 0,46</b>			<b>[η]=2,92 l/g; k<sub>H</sub>= 0,41</b>			<b>[η]=2,95 l/g; k<sub>H</sub>= 0,40</b>		

Tabulka 13: Průběžné výpočty pro HA ve vodném roztoku s přidavkem-1 kapky 0,1 M HCl.

c (g/l)	25°C			30°C			35°C		
	(v) (m <sup>2</sup> /s)	(v <sub>sp</sub> ) (-)	(v <sub>red</sub> ) (l/g)	(v) (m <sup>2</sup> /s)	(v <sub>sp</sub> ) (-)	(v <sub>red</sub> ) (l/g)	(v) (m <sup>2</sup> /s)	(v <sub>sp</sub> ) (-)	(v <sub>red</sub> ) (l/g)
0,4	5,26.10 <sup>-6</sup>	4,83	12,07	4,79.10 <sup>-6</sup>	4,98	12,46	4,43.10 <sup>-6</sup>	5,07	12,68
0,5	6,63.10 <sup>-6</sup>	6,35	12,69	6,09.10 <sup>-6</sup>	6,61	13,21	5,51.10 <sup>-6</sup>	6,55	13,11
0,6	7,83.10 <sup>-6</sup>	7,68	12,79	7,10.10 <sup>-6</sup>	7,87	13,12	6,48.10 <sup>-6</sup>	7,88	13,13
0,7	9,02.10 <sup>-6</sup>	8,99	12,85	8,13.10 <sup>-6</sup>	9,15	13,07	7,42.10 <sup>-6</sup>	9,17	13,10
1	1,23.10 <sup>-5</sup>	12,63	12,63	1,12.10 <sup>-5</sup>	13,00	13,00	1,02.10 <sup>-5</sup>	13,02	13,02
	<b>[η]= 12,22 l/g; k<sub>H</sub>= 0,00</b>			<b>[η]=12,22 l/g; k<sub>H</sub>= 0,00</b>			<b>[η]=12,80 l/g; k<sub>H</sub>= 0,00</b>		

Tabulka 14: Průběžné výpočty pro HA ve vodném roztoku s přidavkem-2 kapek 0,1 M HCl.

c (g/l)	25°C			30°C			35°C		
	(v) (m <sup>2</sup> /s)	(v <sub>sp</sub> ) (-)	(v <sub>red</sub> ) (l/g)	(v) (m <sup>2</sup> /s)	(v <sub>sp</sub> ) (-)	(v <sub>red</sub> ) (l/g)	(v) (m <sup>2</sup> /s)	(v <sub>sp</sub> ) (-)	(v <sub>red</sub> ) (l/g)
0,4	5,08.10 <sup>-6</sup>	4,63	11,57	4,62.10 <sup>-6</sup>	4,77	11,92	4,25.10 <sup>-6</sup>	4,82	12,05
0,5	6,17.10 <sup>-6</sup>	5,84	11,67	5,59.10 <sup>-6</sup>	5,98	11,97	5,09.10 <sup>-6</sup>	5,98	11,95
0,6	7,18.10 <sup>-6</sup>	6,96	11,59	6,14.10 <sup>-6</sup>	6,67	11,11	5,73.10 <sup>-6</sup>	6,85	11,42
0,7	8,80.10 <sup>-6</sup>	8,75	12,50	7,94.10 <sup>-6</sup>	8,91	12,73	7,30.10 <sup>-6</sup>	9,01	12,87
1	1,20.10 <sup>-5</sup>	12,32	12,32	1,09.10 <sup>-5</sup>	12,57	12,57	9,92.10 <sup>-6</sup>	12,60	12,60
	<b>[η]= 11,00 l/g; k<sub>H</sub>= 0,01</b>			<b>[η]=11,13 l/g; k<sub>H</sub>= 0,01</b>			<b>[η]=11,32 l/g; k<sub>H</sub>= 0,01</b>		

Tabulka 15: Průběžné výpočty pro HA ve vodném roztoku s přidavkem-5 kapek 0,1 M HCl.

c (g/l)	25°C			30°C			35°C		
	(v) (m <sup>2</sup> /s)	(v <sub>sp</sub> ) (-)	(v <sub>red</sub> ) (l/g)	(v) (m <sup>2</sup> /s)	(v <sub>sp</sub> ) (-)	(v <sub>red</sub> ) (l/g)	(v) (m <sup>2</sup> /s)	(v <sub>sp</sub> ) (-)	(v <sub>red</sub> ) (l/g)
0,4	4,12.10 <sup>-6</sup>	3,57	8,92	3,74.10 <sup>-6</sup>	3,67	9,17	3,44.10 <sup>-6</sup>	3,71	9,27
0,5	5,31.10 <sup>-6</sup>	4,89	9,77	4,85.10 <sup>-6</sup>	5,06	10,11	4,42.10 <sup>-6</sup>	5,05	10,11
0,6	7,67.10 <sup>-6</sup>	7,50	12,50	5,94.10 <sup>-6</sup>	6,42	10,70	5,38.10 <sup>-6</sup>	6,38	10,63
0,7	7,73.10 <sup>-6</sup>	7,56	10,80	7,56.10 <sup>-6</sup>	8,44	12,06	6,35.10 <sup>-6</sup>	7,70	11,00
1	1,09.10 <sup>-5</sup>	11,06	11,06	9,87.10 <sup>-6</sup>	11,33	11,33	8,91.10 <sup>-6</sup>	11,21	11,21
	<b>[η]= 8,75 l/g; k<sub>H</sub>= 0,04</b>			<b>[η]=8,39 l/g; k<sub>H</sub>= 0,05</b>			<b>[η]=8,54 l/g; k<sub>H</sub>= 0,04</b>		



Tabulka 16: Průběžné výpočty pro HA ve vodném roztoku s přidavkem-10 kapek 0,1 M HCl.

	25°C			30°C			35°C		
c (g/l)	(v) (m <sup>2</sup> /s)	(v <sub>sp</sub> ) (-)	(v <sub>red</sub> ) (l/g)	(v) (m <sup>2</sup> /s)	(v <sub>sp</sub> ) (-)	(v <sub>red</sub> ) (l/g)	(v) (m <sup>2</sup> /s)	(v <sub>sp</sub> ) (-)	(v <sub>red</sub> ) (l/g)
0,4	3,18.10 <sup>-6</sup>	2,52	6,30	2,88.10 <sup>-6</sup>	2,60	6,49	2,60.10 <sup>-6</sup>	2,56	6,41
0,5	4,13.10 <sup>-6</sup>	3,57	7,15	3,77.10 <sup>-6</sup>	3,70	7,41	3,40.10 <sup>-6</sup>	3,65	7,31
0,6	5,42.10 <sup>-6</sup>	5,01	8,35	4,50.10 <sup>-6</sup>	4,62	7,70	4,09.10 <sup>-6</sup>	4,61	7,68
0,7	6,18.10 <sup>-6</sup>	5,85	8,35	6,19.10 <sup>-6</sup>	6,73	9,61	6,26.10 <sup>-6</sup>	7,58	10,83
1	9,30.10 <sup>-6</sup>	9,30	9,30	8,32.10 <sup>-6</sup>	9,39	9,39	7,62.10 <sup>-6</sup>	9,45	9,45
	<b>[η]= 4,87 l/g; k<sub>H</sub>= 0,20</b>			<b>[η]=4,94 l/g; k<sub>H</sub>= 0,20</b>			<b>[η]=4,76 l/g; k<sub>H</sub>= 0,25</b>		

Tabulka 17: Průběžné výpočty pro HA ve vodném roztoku s přidavkem-15 kapek 0,1 M HCl.

	25°C			30°C			35°C		
c (g/l)	(v) (m <sup>2</sup> /s)	(v <sub>sp</sub> ) (-)	(v <sub>red</sub> ) (l/g)	(v) (m <sup>2</sup> /s)	(v <sub>sp</sub> ) (-)	(v <sub>red</sub> ) (l/g)	(v) (m <sup>2</sup> /s)	(v <sub>sp</sub> ) (-)	(v <sub>red</sub> ) (l/g)
0,4	2,63.10 <sup>-6</sup>	1,91	4,78	2,39.10 <sup>-6</sup>	1,99	4,97	2,15.10 <sup>-6</sup>	1,95	4,88
0,5	3,26.10 <sup>-6</sup>	2,61	5,22	2,92.10 <sup>-6</sup>	2,65	5,30	2,67.10 <sup>-6</sup>	2,66	5,31
0,6	4,09.10 <sup>-6</sup>	3,53	5,88	3,67.10 <sup>-6</sup>	3,58	5,97	3,36.10 <sup>-6</sup>	3,60	6,00
0,7	5,11.10 <sup>-6</sup>	4,66	6,65	4,61.10 <sup>-6</sup>	4,75	6,79	4,17.10 <sup>-6</sup>	4,71	6,73
1	7,88.10 <sup>-6</sup>	7,73	7,73	7,11.10 <sup>-6</sup>	7,88	7,88	6,49.10 <sup>-6</sup>	7,90	7,90
	<b>[η]= 2,83 l/g; k<sub>H</sub>= 0,63</b>			<b>[η]=2,95 l/g; k<sub>H</sub>= 0,58</b>			<b>[η]=2,87 l/g; k<sub>H</sub>= 0,63</b>		

Tabulka 18: Průběžné výpočty pro HA ve vodném roztoku s přidavkem-20 kapek 0,1 M HCl.

	25°C			30°C			35°C		
c (g/l)	(v) (m <sup>2</sup> /s)	(v <sub>sp</sub> ) (-)	(v <sub>red</sub> ) (l/g)	(v) (m <sup>2</sup> /s)	(v <sub>sp</sub> ) (-)	(v <sub>red</sub> ) (l/g)	(v) (m <sup>2</sup> /s)	(v <sub>sp</sub> ) (-)	(v <sub>red</sub> ) (l/g)
0,4	2,21.10 <sup>-6</sup>	1,45	3,63	2,00.10 <sup>-6</sup>	1,50	3,75	1,82.10 <sup>-6</sup>	1,49	3,73
0,5	2,86.10 <sup>-6</sup>	2,17	4,34	2,58.10 <sup>-6</sup>	2,23	4,45	2,33.10 <sup>-6</sup>	2,20	4,40
0,6	3,60.10 <sup>-6</sup>	2,99	4,98	3,24.10 <sup>-6</sup>	3,05	5,08	2,95.10 <sup>-6</sup>	3,04	5,07
0,7	4,18.10 <sup>-6</sup>	3,64	5,19	3,78.10 <sup>-6</sup>	3,72	5,32	3,42.10 <sup>-6</sup>	3,69	5,27
1	7,05.10 <sup>-6</sup>	6,81	6,81	6,41.10 <sup>-6</sup>	7,00	7,00	5,80.10 <sup>-6</sup>	6,95	6,95
	<b>[η]= 1,71 l/g; k<sub>H</sub>= 1,74</b>			<b>[η]=1,77 l/g; k<sub>H</sub>= 1,67</b>			<b>[η]=1,75 l/g; k<sub>H</sub>= 1,70</b>		

## 15.2 Příloha B: Výsledky z viskozimetrického měření pro HA v 0,01 M roztoku KCl

Tabulka 19: Průběžné výpočty pro HA v 0,01 M roztoku KCl bez přídavku čistý nemodifikovaný roztok.

25°C				
koncentrace <b>c</b> (g/l)	kinematická viskozita roztoku ( <b>v</b> ) (m <sup>2</sup> /s)	specifická viskozita ( <b>v<sub>sp</sub></b> ) (-)	redukovaná viskozita ( <b>v<sub>red</sub></b> ) (l/g)	Limitní viskozitní číslo <b>[η]</b> (l/g) Hugginsova konstanta <b>k<sub>H</sub></b> (-)
0,4	1,85.10 <sup>-6</sup>	1,07	2,67	<b>[η]= 1,82 l/g</b> <b>k<sub>H</sub>= 0,56</b>
0,5	2,07.10 <sup>-6</sup>	1,31	2,63	
0,6	2,46.10 <sup>-6</sup>	1,76	2,93	
0,7	2,89.10 <sup>-6</sup>	2,23	3,19	
1	4,16.10 <sup>-6</sup>	3,65	3,65	
30°C				
0,4	1,98.10 <sup>-6</sup>	1,22	3,04	<b>[η]= 2,38 l/g</b> <b>k<sub>H</sub>= 0,24</b>
0,5	2,20.10 <sup>-6</sup>	1,47	2,94	
0,6	2,57.10 <sup>-6</sup>	1,87	3,12	
0,7	3,02.10 <sup>-6</sup>	2,38	3,41	
1	4,24.10 <sup>-6</sup>	3,75	3,75	
35°C				
0,4	1,98.10 <sup>-6</sup>	1,22	3,04	<b>[η]= 2,48 l/g</b> <b>k<sub>H</sub>= 0,20</b>
0,5	2,28.10 <sup>-6</sup>	1,55	3,10	
0,6	2,58.10 <sup>-6</sup>	1,89	3,15	
0,7	2,96.10 <sup>-6</sup>	2,31	3,30	
1	4,25.10 <sup>-6</sup>	3,76	3,76	
kinematická viskozita rozpouštědla ( <b>v<sub>0</sub></b> ): 25°C= 8,93.10 <sup>-7</sup> m <sup>2</sup> /s; 30°C= 8,01.10 <sup>-7</sup> m <sup>2</sup> /s; 35°C= 7,24.10 <sup>-7</sup> m <sup>2</sup> /s				

Tabulka 20: Průběžné výpočty pro HA v 0,01 M roztoku KCl s přidavkem-1 kapky 0,1 M NaOH.

	25°C			30°C			35°C		
c (g/l)	(v) (m <sup>2</sup> /s)	(v <sub>sp</sub> ) (-)	(v <sub>red</sub> ) (l/g)	(v) (m <sup>2</sup> /s)	(v <sub>sp</sub> ) (-)	(v <sub>red</sub> ) (l/g)	(v) (m <sup>2</sup> /s)	(v <sub>sp</sub> ) (-)	(v <sub>red</sub> ) (l/g)
0,4	1,81.10 <sup>-6</sup>	1,03	2,56	1,62.10 <sup>-6</sup>	0,81	2,03	1,50.10 <sup>-6</sup>	0,68	1,69
0,5	2,05.10 <sup>-6</sup>	1,29	2,58	1,85.10 <sup>-6</sup>	1,07	2,15	1,69.10 <sup>-6</sup>	0,89	1,78
0,6	2,34.10 <sup>-6</sup>	1,61	2,69	2,12.10 <sup>-6</sup>	1,38	2,30	1,94.10 <sup>-6</sup>	1,17	1,95
0,7	2,73.10 <sup>-6</sup>	2,06	2,94	2,47.10 <sup>-6</sup>	1,76	2,52	2,25.10 <sup>-6</sup>	1,52	2,17
1	3,96.10 <sup>-6</sup>	3,43	3,43	3,52.10 <sup>-6</sup>	2,94	2,94	3,18.10 <sup>-6</sup>	2,56	2,56
	<b>[η]= 1,85 l/g; k<sub>H</sub>= 0,45</b>			<b>[η]=1,39 l/g; k<sub>H</sub>= 0,81</b>			<b>[η]=1,63 l/g; k<sub>H</sub>= 1,34</b>		
kinematická viskozita rozpouštědla (v <sub>0</sub> ): 25°C= 8,93.10 <sup>-7</sup> m <sup>2</sup> /s; 30°C= 8,01.10 <sup>-7</sup> m <sup>2</sup> /s; 35°C= 7,24.10 <sup>-7</sup> m <sup>2</sup> /s									

Tabulka 21: Průběžné výpočty pro HA v 0,01 M roztoku KCl s přidavkem-2 kapek 0,1 M NaOH.

	25°C			30°C			35°C		
c (g/l)	(v) (m <sup>2</sup> /s)	(v <sub>sp</sub> ) (-)	(v <sub>red</sub> ) (l/g)	(v) (m <sup>2</sup> /s)	(v <sub>sp</sub> ) (-)	(v <sub>red</sub> ) (l/g)	(v) (m <sup>2</sup> /s)	(v <sub>sp</sub> ) (-)	(v <sub>red</sub> ) (l/g)
0,4	1,78.10 <sup>-6</sup>	0,99	2,49	1,61.10 <sup>-6</sup>	0,80	2,01	1,48.10 <sup>-6</sup>	0,65	1,63
0,5	2,01.10 <sup>-6</sup>	1,25	2,49	1,82.10 <sup>-6</sup>	1,04	2,07	1,67.10 <sup>-6</sup>	0,87	1,75
0,6	2,39.10 <sup>-6</sup>	1,68	2,79	2,16.10 <sup>-6</sup>	1,41	2,36	1,95.10 <sup>-6</sup>	1,19	1,98
0,7	2,72.10 <sup>-6</sup>	2,05	2,93	2,44.10 <sup>-6</sup>	1,73	2,47	2,21.10 <sup>-6</sup>	1,48	2,11
1	3,91.10 <sup>-6</sup>	3,38	3,38	3,49.10 <sup>-6</sup>	2,91	2,91	3,14.10 <sup>-6</sup>	2,52	2,52
	<b>[η]= 1,81 l/g; k<sub>H</sub>= 0,48</b>			<b>[η]=1,38 l/g; k<sub>H</sub>= 0,82</b>			<b>[η]=1,04 l/g; k<sub>H</sub>= 1,39</b>		

Tabulka 22: Průběžné výpočty pro HA v 0,01 M roztoku KCl s přidavkem-5 kapek 0,1 M NaOH.

	25°C			30°C			35°C		
c (g/l)	(v) (m <sup>2</sup> /s)	(v <sub>sp</sub> ) (-)	(v <sub>red</sub> ) (l/g)	(v) (m <sup>2</sup> /s)	(v <sub>sp</sub> ) (-)	(v <sub>red</sub> ) (l/g)	(v) (m <sup>2</sup> /s)	(v <sub>sp</sub> ) (-)	(v <sub>red</sub> ) (l/g)
0,4	1,76.10 <sup>-6</sup>	0,97	2,44	1,60.10 <sup>-6</sup>	0,79	1,97	1,47.10 <sup>-6</sup>	0,65	1,63
0,5	1,99.10 <sup>-6</sup>	1,23	2,46	1,81.10 <sup>-6</sup>	1,03	2,05	1,65.10 <sup>-6</sup>	0,84	1,69
0,6	2,33.10 <sup>-6</sup>	1,61	2,69	2,10.10 <sup>-6</sup>	1,36	2,26	1,91.10 <sup>-6</sup>	1,13	1,89
0,7	2,69.10 <sup>-6</sup>	2,01	2,87	2,41.10 <sup>-6</sup>	1,69	2,42	2,21.10 <sup>-6</sup>	1,47	2,10
1	3,82.10 <sup>-6</sup>	3,28	3,28	3,46.10 <sup>-6</sup>	2,88	2,88	3,11.10 <sup>-6</sup>	2,49	2,49
	<b>[η]= 1,80 l/g; k<sub>H</sub>= 0,46</b>			<b>[η]=1,31 l/g; k<sub>H</sub>= 0,90</b>			<b>[η]=1,00 l/g; k<sub>H</sub>= 1,52</b>		

Tabulka 23: Průběžné výpočty pro HA v 0,01 M roztoku KCl s přidavkem-10 kapek 0,1 M NaOH.

	25°C			30°C			35°C		
<b>c</b> (g/l)	<b>(v)</b> (m <sup>2</sup> /s)	<b>(v<sub>sp</sub>)</b> (-)	<b>(v<sub>red</sub>)</b> (l/g)	<b>(v)</b> (m <sup>2</sup> /s)	<b>(v<sub>sp</sub>)</b> (-)	<b>(v<sub>red</sub>)</b> (l/g)	<b>(v)</b> (m <sup>2</sup> /s)	<b>(v<sub>sp</sub>)</b> (-)	<b>(v<sub>red</sub>)</b> (l/g)
0,4	1,70.10 <sup>-6</sup>	0,90	2,26	1,54.10 <sup>-6</sup>	0,72	1,81	1,41.10 <sup>-6</sup>	0,58	1,45
0,5	1,98.10 <sup>-6</sup>	1,21	2,42	1,80.10 <sup>-6</sup>	1,02	2,04	1,62.10 <sup>-6</sup>	0,82	1,64
0,6	2,28.10 <sup>-6</sup>	1,56	2,59	2,05.10 <sup>-6</sup>	1,30	2,16	1,88.10 <sup>-6</sup>	1,11	1,84
0,7	2,59.10 <sup>-6</sup>	1,90	2,72	2,32.10 <sup>-6</sup>	1,60	2,28	2,11.10 <sup>-6</sup>	1,36	1,94
1	3,74.10 <sup>-6</sup>	3,18	3,18	3,37.10 <sup>-6</sup>	2,77	2,77	3,02.10 <sup>-6</sup>	2,38	2,38
	<b>[η]= 1,66 l/g; k<sub>H</sub>= 0,56</b>			<b>[η]=1,23 l/g; k<sub>H</sub>= 1,03</b>			<b>[η]=0,87 l/g; k<sub>H</sub>= 2,01</b>		

Tabulka 24: Průběžné výpočty pro HA v 0,01 M roztoku KCl s přidavkem-15 kapek 0,1 M NaOH.

	25°C			30°C			35°C		
<b>c</b> (g/l)	<b>(v)</b> (m <sup>2</sup> /s)	<b>(v<sub>sp</sub>)</b> (-)	<b>(v<sub>red</sub>)</b> (l/g)	<b>(v)</b> (m <sup>2</sup> /s)	<b>(v<sub>sp</sub>)</b> (-)	<b>(v<sub>red</sub>)</b> (l/g)	<b>(v)</b> (m <sup>2</sup> /s)	<b>(v<sub>sp</sub>)</b> (-)	<b>(v<sub>red</sub>)</b> (l/g)
0,4	1,72.10 <sup>-6</sup>	0,92	2,30	1,54.10 <sup>-6</sup>	0,72	1,81	1,42.10 <sup>-6</sup>	0,59	1,48
0,5	1,96.10 <sup>-6</sup>	1,19	2,38	1,77.10 <sup>-6</sup>	0,98	1,96	1,62.10 <sup>-6</sup>	0,81	1,62
0,6	2,50.10 <sup>-6</sup>	1,79	2,99	2,04.10 <sup>-6</sup>	1,28	2,14	1,88.10 <sup>-6</sup>	1,10	1,83
0,7	2,56.10 <sup>-6</sup>	1,87	2,67	2,34.10 <sup>-6</sup>	1,62	2,31	2,13.10 <sup>-6</sup>	1,38	1,97
1	3,63.10 <sup>-6</sup>	3,06	3,06	3,25.10 <sup>-6</sup>	2,64	2,64	2,96.10 <sup>-6</sup>	2,31	2,31
	<b>[η]= 1,91 l/g; k<sub>H</sub>= 0,33</b>			<b>[η]=1,28 l/g; k<sub>H</sub>= 0,85</b>			<b>[η]=0,95 l/g; k<sub>H</sub>= 1,56</b>		

Tabulka 25: Průběžné výpočty pro HA v 0,01 M roztoku KCl s přidavkem-20 kapek 0,1 M NaOH.

	25°C			30°C			35°C		
<b>c</b> (g/l)	<b>(v)</b> (m <sup>2</sup> /s)	<b>(v<sub>sp</sub>)</b> (-)	<b>(v<sub>red</sub>)</b> (l/g)	<b>(v)</b> (m <sup>2</sup> /s)	<b>(v<sub>sp</sub>)</b> (-)	<b>(v<sub>red</sub>)</b> (l/g)	<b>(v)</b> (m <sup>2</sup> /s)	<b>(v<sub>sp</sub>)</b> (-)	<b>(v<sub>red</sub>)</b> (l/g)
0,4	1,67.10 <sup>-6</sup>	0,87	2,18	1,52.10 <sup>-6</sup>	0,70	1,74	1,40.10 <sup>-6</sup>	0,57	1,41
0,5	1,89.10 <sup>-6</sup>	1,11	2,23	1,70.10 <sup>-6</sup>	0,90	1,81	1,57.10 <sup>-6</sup>	0,75	1,51
0,6	2,23.10 <sup>-6</sup>	1,49	2,48	2,00.10 <sup>-6</sup>	1,24	2,06	1,84.10 <sup>-6</sup>	1,05	1,76
0,7	2,54.10 <sup>-6</sup>	1,84	2,63	2,29.10 <sup>-6</sup>	1,56	2,23	2,10.10 <sup>-6</sup>	1,35	1,92
1	3,55.10 <sup>-6</sup>	2,98	2,98	3,23.10 <sup>-6</sup>	2,61	2,61	2,89.10 <sup>-6</sup>	2,24	2,24
	<b>[η]= 1,91 l/g; k<sub>H</sub>= 0,33</b>			<b>[η]=1,12 l/g; k<sub>H</sub>= 1,20</b>			<b>[η]=0,86 l/g; k<sub>H</sub>= 1,91</b>		

Tabulka 26: Průběžné výpočty pro HA v 0,01 M roztoku KCl s přidavkem-1 kapky 0,1 M HCl.

	25°C			30°C			35°C		
c (g/l)	(v) (m <sup>2</sup> /s)	(v <sub>sp</sub> ) (-)	(v <sub>red</sub> ) (l/g)	(v) (m <sup>2</sup> /s)	(v <sub>sp</sub> ) (-)	(v <sub>red</sub> ) (l/g)	(v) (m <sup>2</sup> /s)	(v <sub>sp</sub> ) (-)	(v <sub>red</sub> ) (l/g)
0,4	1,81.10 <sup>-6</sup>	1,02	2,55	1,65.10 <sup>-6</sup>	0,85	2,12	1,50.10 <sup>-6</sup>	0,68	1,71
0,5	2,11.10 <sup>-6</sup>	1,36	2,72	1,90.10 <sup>-6</sup>	1,13	2,26	1,74.10 <sup>-6</sup>	0,95	1,89
0,6	2,34.10 <sup>-6</sup>	1,62	2,70	2,11.10 <sup>-6</sup>	1,36	2,27	1,95.10 <sup>-6</sup>	1,18	1,97
0,7	2,73.10 <sup>-6</sup>	2,05	2,93	2,47.10 <sup>-6</sup>	1,76	2,52	2,26.10 <sup>-6</sup>	1,53	2,19
1	3,93.10 <sup>-6</sup>	3,40	3,40	3,52.10 <sup>-6</sup>	2,94	2,94	3,18.10 <sup>-6</sup>	2,56	2,56
	<b>[η]= 1,96 l/g; k<sub>H</sub>= 0,37</b>			<b>[η]=1,53 l/g; k<sub>H</sub>= 0,59</b>			<b>[η]=1,16 l/g; k<sub>H</sub>= 1,06</b>		

Tabulka 27: Průběžné výpočty pro HA v 0,01 M roztoku KCl s přidavkem-2 kapek 0,1 M HCl.

	25°C			30°C			35°C		
c (g/l)	(v) (m <sup>2</sup> /s)	(v <sub>sp</sub> ) (-)	(v <sub>red</sub> ) (l/g)	(v) (m <sup>2</sup> /s)	(v <sub>sp</sub> ) (-)	(v <sub>red</sub> ) (l/g)	(v) (m <sup>2</sup> /s)	(v <sub>sp</sub> ) (-)	(v <sub>red</sub> ) (l/g)
0,4	1,78.10 <sup>-6</sup>	1,00	2,49	1,64.10 <sup>-6</sup>	0,84	2,10	1,47.10 <sup>-6</sup>	0,65	1,62
0,5	2,08.10 <sup>-6</sup>	1,33	2,66	1,88.10 <sup>-6</sup>	1,11	2,21	1,72.10 <sup>-6</sup>	0,93	1,86
0,6	2,34.10 <sup>-6</sup>	1,62	2,71	2,10.10 <sup>-6</sup>	1,35	2,26	1,90.10 <sup>-6</sup>	1,13	1,89
0,7	2,71.10 <sup>-6</sup>	2,04	2,91	2,44.10 <sup>-6</sup>	1,73	2,47	2,22.10 <sup>-6</sup>	1,48	2,12
1	3,89.10 <sup>-6</sup>	3,35	3,35	3,52.10 <sup>-6</sup>	2,94	2,94	3,15.10 <sup>-6</sup>	2,53	2,53
	<b>[η]= 1,91 l/g; k<sub>H</sub>= 0,39</b>			<b>[η]=1,49 l/g; k<sub>H</sub>= 0,64</b>			<b>[η]=1,06 l/g; k<sub>H</sub>= 1,32</b>		

Tabulka 28: Průběžné výpočty pro HA v 0,01 M roztoku KCl s přidavkem-5 kapek 0,1 M HCl.

	25°C			30°C			35°C		
c (g/l)	(v) (m <sup>2</sup> /s)	(v <sub>sp</sub> ) (-)	(v <sub>red</sub> ) (l/g)	(v) (m <sup>2</sup> /s)	(v <sub>sp</sub> ) (-)	(v <sub>red</sub> ) (l/g)	(v) (m <sup>2</sup> /s)	(v <sub>sp</sub> ) (-)	(v <sub>red</sub> ) (l/g)
0,4	1,71.10 <sup>-6</sup>	0,92	2,30	1,55.10 <sup>-6</sup>	0,74	1,85	1,42.10 <sup>-6</sup>	0,59	1,48
0,5	2,01.10 <sup>-6</sup>	1,25	2,50	1,82.10 <sup>-6</sup>	1,04	2,07	1,66.10 <sup>-6</sup>	0,86	1,72
0,6	2,25.10 <sup>-6</sup>	1,51	2,52	2,02.10 <sup>-6</sup>	1,26	2,10	1,86.10 <sup>-6</sup>	1,08	1,80
0,7	2,58.10 <sup>-6</sup>	1,89	2,70	2,30.10 <sup>-6</sup>	1,58	2,25	2,11.10 <sup>-6</sup>	1,36	1,94
1	3,77.10 <sup>-6</sup>	3,22	3,22	3,38.10 <sup>-6</sup>	2,78	2,78	3,10.10 <sup>-6</sup>	2,47	2,47
	<b>[η]= 1,69 l/g; k<sub>H</sub>= 0,53</b>			<b>[η]=1,25 l/g; k<sub>H</sub>= 0,96</b>			<b>[η]=0,86 l/g; k<sub>H</sub>= 2,17</b>		

Tabulka 29: Průběžné výpočty pro HA v 0,01 M roztoku KCl s přidavkem-10 kapek 0,1 M HCl.

	25°C			30°C			35°C		
<b>c</b> (g/l)	<b>(v)</b> (m <sup>2</sup> /s)	<b>(v<sub>sp</sub>)</b> (-)	<b>(v<sub>red</sub>)</b> (l/g)	<b>(v)</b> (m <sup>2</sup> /s)	<b>(v<sub>sp</sub>)</b> (-)	<b>(v<sub>red</sub>)</b> (l/g)	<b>(v)</b> (m <sup>2</sup> /s)	<b>(v<sub>sp</sub>)</b> (-)	<b>(v<sub>red</sub>)</b> (l/g)
0,4	1,65.10 <sup>-6</sup>	0,85	2,12	1,50.10 <sup>-6</sup>	0,68	1,71	1,36.10 <sup>-6</sup>	0,52	1,30
0,5	1,89.10 <sup>-6</sup>	1,12	2,24	1,73.10 <sup>-6</sup>	0,94	1,87	1,55.10 <sup>-6</sup>	0,74	1,47
0,6	2,12.10 <sup>-6</sup>	1,37	2,29	1,91.10 <sup>-6</sup>	1,13	1,89	1,73.10 <sup>-6</sup>	0,93	1,56
0,7	2,45.10 <sup>-6</sup>	1,75	2,50	2,19.10 <sup>-6</sup>	1,45	2,07	1,99.10 <sup>-6</sup>	1,23	1,75
1	3,49.10 <sup>-6</sup>	2,91	2,91	3,16.10 <sup>-6</sup>	2,53	2,53	2,86.10 <sup>-6</sup>	2,20	2,20
	<b>[η]= 1,56 l/g; k<sub>H</sub>= 0,55</b>			<b>[η]=1,15 l/g; k<sub>H</sub>= 1,04</b>			<b>[η]=0,70 l/g; k<sub>H</sub>= 3,02</b>		

Tabulka 30: Průběžné výpočty pro HA v 0,01 M roztoku KCl s přidavkem-15 kapek 0,1 M HCl.

	25°C			30°C			35°C		
<b>c</b> (g/l)	<b>(v)</b> (m <sup>2</sup> /s)	<b>(v<sub>sp</sub>)</b> (-)	<b>(v<sub>red</sub>)</b> (l/g)	<b>(v)</b> (m <sup>2</sup> /s)	<b>(v<sub>sp</sub>)</b> (-)	<b>(v<sub>red</sub>)</b> (l/g)	<b>(v)</b> (m <sup>2</sup> /s)	<b>(v<sub>sp</sub>)</b> (-)	<b>(v<sub>red</sub>)</b> (l/g)
0,4	1,60.10 <sup>-6</sup>	0,79	1,97	1,46.10 <sup>-6</sup>	0,64	1,59	1,33.10 <sup>-6</sup>	0,49	1,22
0,5	1,83.10 <sup>-6</sup>	1,04	2,09	1,65.10 <sup>-6</sup>	0,85	1,70	1,49.10 <sup>-6</sup>	0,67	1,34
0,6	2,02.10 <sup>-6</sup>	1,26	2,09	1,81.10 <sup>-6</sup>	1,02	1,70	1,64.10 <sup>-6</sup>	0,83	1,39
0,7	2,31.10 <sup>-6</sup>	1,58	2,26	2,07.10 <sup>-6</sup>	1,31	1,88	1,88.10 <sup>-6</sup>	1,11	1,58
1	3,47.10 <sup>-6</sup>	2,89	2,89	3,07.10 <sup>-6</sup>	2,44	2,44	2,80.10 <sup>-6</sup>	2,13	2,13
	<b>[η]= 1,27 l/g; k<sub>H</sub>= 0,96</b>			<b>[η]=0,95 l/g; k<sub>H</sub>= 1,59</b>			<b>[η]=0,56 l/g; k<sub>H</sub>= 5,18</b>		

Tabulka 31: Průběžné výpočty pro HA v 0,01 M roztoku KCl s přidavkem-20 kapek 0,1 M HCl.

	25°C			30°C			35°C		
<b>c</b> (g/l)	<b>(v)</b> (m <sup>2</sup> /s)	<b>(v<sub>sp</sub>)</b> (-)	<b>(v<sub>red</sub>)</b> (l/g)	<b>(v)</b> (m <sup>2</sup> /s)	<b>(v<sub>sp</sub>)</b> (-)	<b>(v<sub>red</sub>)</b> (l/g)	<b>(v)</b> (m <sup>2</sup> /s)	<b>(v<sub>sp</sub>)</b> (-)	<b>(v<sub>red</sub>)</b> (l/g)
0,4	1,65.10 <sup>-6</sup>	0,84	2,10	1,37.10 <sup>-6</sup>	0,54	1,34	1,26.10 <sup>-6</sup>	0,40	1,01
0,5	1,75.10 <sup>-6</sup>	0,96	1,91	1,57.10 <sup>-6</sup>	0,75	1,51	1,43.10 <sup>-6</sup>	0,60	1,20
0,6	1,93.10 <sup>-6</sup>	1,17	1,94	1,73.10 <sup>-6</sup>	0,94	1,56	1,59.10 <sup>-6</sup>	0,78	1,29
0,7	2,22.10 <sup>-6</sup>	1,49	2,12	1,98.10 <sup>-6</sup>	1,22	1,74	1,83.10 <sup>-6</sup>	1,05	1,50
1	3,22.10 <sup>-6</sup>	2,61	2,61	2,86.10 <sup>-6</sup>	2,21	2,21	2,59.10 <sup>-6</sup>	1,90	1,90
	<b>[η]= 1,49 l/g; k<sub>H</sub>= 0,46</b>			<b>[η]=0,76 l/g; k<sub>H</sub>= 2,47</b>			<b>[η]=0,44 l/g; k<sub>H</sub>= 7,97</b>		

## 16. PUBLIKAČNÍ ČINNOST

### Impaktované publikace

**I. Kupská**, L. Lapčík, B. Lapčíková, K. Žáková, J. Juříková: „The viscometric behaviour of sodium hyaluronate in aqueous and KCl solutions.” *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects* 454, 32–37 (2014).

L. Lapčík, B. Lapčíková, I. Krásný, **I. Kupská**, R.W. Greenwood, K.E. Waters: „Effect of low temperature air plasma treatment on wetting and flow properties of kaolinite powders.” *Plasma Chemistry and Plasma Processing*, 32 (4), 845-858 (2012).

### Kapitola v knize

L. Lapčík, E. Otyepková, B. Lapčíková, M. Otyepka, J. Vlček, **I. Kupská**: „Physicochemical Analysis of hyaluronic acid powder for cosmetic and pharmaceutical processing.” *Hyaluronic acid for biomedical and pharmaceutical applications*, Ed.:Maurice N. Collins: Smithers Rapra, Shrewsbury (2014), 89-101. ISBN 978-19-090-3077-0.

### Neimpaktované recenzované publikace

I. Krásný, **I. Kupská**, L. Lapčík: „Effect of Glow-Discharge Air Plasma Treatment on Wettability of Synthetic Polymers.” *Journal of Surface Engineered Materials and Advanced Technology*, 32 (4), 142-148 (2012).

### Účast na konferencích

Plasma Surface Engineering 2012, 13th International Conference on Plasma Surface Engineering, Garmisch-Partenkirchen, Německo, 2012.

ICEAF 2013, 3rd International Conference of Engineering Against Failure, Kos, Řecko, 2013.

### Studijní a pracovní pobyty

2011                      University of Birmingham, Birmingham, Anglie. 3 měsíce

2012                      Université de Rennes, Rennes, Francie. 1 měsíc

## **Projekty řešené v rámci IGA projektů na FT UTB ve Zlíně**

- 2012            **IGA/FT/2012/020** (člen řešitelského týmu)  
Studium a modifikace fyzikálně-chemických vlastností nanokaolinu.
- 2013            **IGA/FT/2013/001** (člen řešitelského týmu)  
Studium vlivu plniva na bázi kaolinitu na fyzikálně-chemicko-mechanické vlastnosti polyethylenových kompozitů.



## 17. ŽIVOTOPIS

### OSOBNÍ ÚDAJE

Jméno a příjmení: Ing. Ivana Kupská  
Datum narození: 23. 5. 1986, Jindřichův Hradec  
Adresa: 9. května 605/II, 377 01, Jindřichův Hradec  
E-mail: [ivana.kupska@email.cz](mailto:ivana.kupska@email.cz)

### VZDĚLÁNÍ

2010- doposud **Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, Fakulta technologická**  
doktorské studium; obor Chemie a technologie materiálů.  
2008- 2010 **Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, Fakulta technologická**  
navazující magisterské studium; obor Chemie a technologie  
materiálů; specializace: Materiálové inženýrství.  
2005- 2008 **Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, Fakulta technologická**  
bakalářské studium; obor Chemie a technologie materiálů.

### VZDĚLÁVACÍ KURZY

2010 Letní škola SPM mikroskopie VUT a MU Brno.  
2011 Školení infračervené a molekulové spektroskopie, měření a  
interpretace vibračních spekter VŠCHT Praha, Nicolet CZ.  
2015 Řízení projektů s důrazem na plánování projektů a Ganttův  
diagram.

### ZAHRANIČNÍ STÁŽE A POBYTY

2011 University of Birmingham, Birmingham, United Kingdom.  
2012 Universite de Rennes, Rennes, France.

## **PRACOVNÍ ZKUŠENOSTI**

2017- doposud	<b>Aircraft Industries, a.s.</b> , Kunovice Technolog pro zvláštní procesy
2015- 2017	<b>Evektor, spol. s.r.o.</b> , Kunovice Technolog / Projektový manažer

## **JAZYKOVÉ ZNALOSTI**

Anglický jazyk	Pokročilá znalost – aktivně
Německý jazyk	Pasivní znalost

## **OSTATNÍ DOVEDNOSTI**

Práce s PC	OS Windows, MS Office (Word, Excel, PowerPoint, Outlook).
Řidičský průkaz	Skupina B