



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ
BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ
ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE

FACULTY OF CHEMISTRY
INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

STUDIUM INTERAKCÍ PROTONIZOVANÝCH AMINOKYSELIN S NÍZKOMOLEKULÁRNÍM HYALURONANEM

STUDY ON INTERACTIONS OF PROTONATED AMINOACIDS WITH LOW-MOLECULAR
WEIGHT HYALURONAN

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE
BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE
AUTHOR

JANA CHLUMSKÁ

VEDOUCÍ PRÁCE
SUPERVISOR

Ing. MARTIN CHYTIL, Ph.D.

BRNO 2013

ABSTRAKT

Tato bakalářská práce pojednává o interakcích nízkomolekulární (110-130 kDa) kyseliny hyaluronové (HA) s protonizovanými aminokyselinami lysinem a 6-aminokapronovou kyselinou. Ke zkoumání těchto interakcí byly použity metody měření pH, měření vodivosti, viskozity a dynamického rozptylu světla. Předpokládají se elektrostatické interakce mezi karboxylovými skupinami HA a aminoskupinou aminokyselin. Prokázání těchto interakcí by umožnilo fyzikální modifikaci HA a následné využití jako cíleného nosiče léčiv.

Měření interakcí protonizovaného lysinu s HA bylo prováděno v čisté vodě či v roztoku $15 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ NaCl. Interakce 6-aminokapronové kyseliny byly zkoumány pouze v čisté vodě. Pro obě aminokyseliny vždy v koncentračním rozmezí $0,9\text{--}20 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Interakce byly prokázány snížením viskozity zejména pro systém obsahující lysin. V systémech s 6AKK nebyly interakce tolik výrazné.

ABSTRACT

This bachelor thesis deals with interactions between hyaluronic acid (HA) of low molecular weight (110-130 kDa) and protonated aminoacids lysine and 6-aminocaproic acid. For investigation of these interactions, methods such as pH-metry, conductance measurement, viscometry and dynamic light scattering were used. The electrostatic interactions between carboxylic group of HA and the aminogroup of the aminoacids are presumed. Proving these interactions would allow us to physically modify HA and further more, using such a system as a carrier of pharmaceuticals.

The interactions of protonated lysine with HA were studied in pure water or in the solution of NaCl ($c = 15 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$). Interactions of 6-aminocaproic acid were studied only in pure water. Both aminoacids were in the concentration range $0.9\text{--}20 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$. The decrease in the viscosity of the solutions indicates the interactions for lysine; for 6-aminocaproic acid the interactions also occurred, but not as significantly as for the system containing lysine.

KLÍČOVÁ SLOVA

Kyselina hyaluronová, lysin, 6-aminokapronová kyselina, interakce, viskozimetrie, dynamický rozptyl světla, konduktometrie

KEY WORDS

Hyaluronic acid, lysine, 6-aminocaproic acid, interactions, viscometry, dynamic light scattering, conductivity

CHLUMSKÁ, J. *Studium interakcí protonizovaných aminokyselin s nízkomolekulárním hyaluronanem*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2019. 45 s. Vedoucí bakalářské práce Ing. Martin Chytil, Ph.D..

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Bakalářská práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího diplomové práce a děkana FCH VUT.

.....
podpis studenta

Ráda bych tímto poděkovala vedoucímu práce Ing. Martinu Chytilovi, Ph.D. za trpělivost, ochotu a připomínky při konzultacích. Dále bych chtěla poděkovat své rodině za psychickou podporu během studia.

OBSAH

ABSTRAKT.....	3
PROHLÁŠENÍ.....	4
OBSAH	5
1. ÚVOD	7
2. TEORETICKÁ ČÁST.....	8
2.1. Kyselina hyaluronová	8
2.1.1. Úvod.....	8
2.1.2. Struktura	8
2.1.3. Hyaluronan ve tkáních	9
2.1.4. Vlastnosti a interakce	9
2.1.5. Užití.....	11
2.2. Aminokyseliny.....	12
2.2.1. Lysin.....	12
2.2.2. 6 – aminokapronová kyselina.....	12
2.3. Viskozita.....	13
2.3.1. Definice	13
2.3.2. Měření viskozity.....	13
2.4. Konduktometrie	14
2.4.1. Definice	14
2.4.2. Měření, konduktometry	15
2.5. pH – metrie	15
2.5.1. Měření	15
2.6. Dynamický rozptyl světla.....	17
2.6.1. Definice	17
2.6.2. Problémy měření roztoků bez elektrolytu	18
2.6.3. Měření	18
3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	19
3.1. Použité materiály	19
3.2. Metody a vyhodnocení	19
3.2.1. Příprava roztoků	19
3.2.2. pH – metrie.....	21
3.2.3. Konduktometrie.....	21

3.2.4.	Viskozimetrie	22
3.2.5.	Dynamický rozptyl světla.....	23
4.	VÝSLEDKY	25
4.1.	pH-metrie.....	25
4.2.	Konduktometrie	26
4.3.	Viskozimetrie.....	28
4.4.	Dynamický rozptyl světla.....	30
5.	ZÁVĚR.....	37
6.	POUŽITÁ LITERATURA.....	38
7.	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	41
8.	PŘÍLOHY.....	42

1. ÚVOD

Kyselina hyaluronová se dostává do lidského podvědomí už desítky let, jako látka ovlivňující náš život. Poprvé byla popsána v roce 1934 na Kolumbijské univerzitě Karlem Meyerem a jeho spolupracovníkem. Je to látka, která se nachází v těle každého obratlovce, tedy i v lidském organismu, kde hraje několik důležitých rolí. Např. zajišťuje bezproblémový pohyb kloubů či hydrataci pokožky.

Následné výzkumy HA se zaměřily primárně na užití této látky v lékařství. Díky elektrostatickým interakcím s aminokyselinami by mohla fungovat jako cílený distributor léčiv do postižených míst. Konkrétně by se to mohlo týkat i rakoviny, protože bylo zjištěno, že HA se nachází v rakovinotvorných buňkách ve zvýšené koncentraci. Takto distribuované léčivo by mohlo pacienty zachránit před chemoterapiemi, které zasahují celý organismus.

V této práci navazují na předchozí práce několika studentů, kteří se zabývali interakcemi vysokomolekulární HA s aminokyselinami upravenými protonizací. Na rozdíl od výše zmíněných prací jsou v experimentální části zkoumány interakce nízkomolekulární kyseliny hyaluronové s protonizovaným lysinem a 6-aminokapronovou kyselinou pomocí několika metod: viskozimetrie, konduktometrie, pH-metrie a nově dynamického rozptylu světla. Cílem je tedy potvrdit zda mohou tyto interakce nastat i s použitím nízkomolekulární HA.

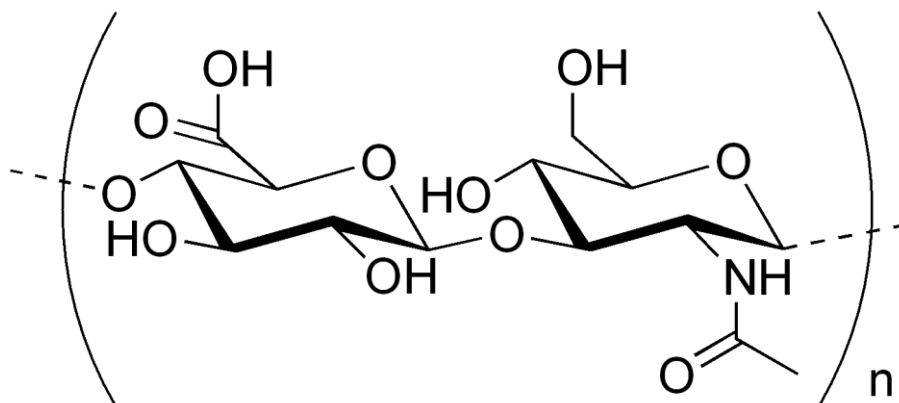
2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1. Kyselina hyaluronová

2.1.1. Úvod

Kyselina hyaluronová byla poprvé izolována v roce 1934 Karlem Meyerem a Johnem Palmerem. Popsali postup izolace této nové látky z očního sklivce krav. Zároveň látku pojmenovali jako hyaluronovou kyselinu (hyaloid – sklivec, uronová kyselina). Je to lineární přírodní polysacharid ze skupiny glukosaminoglykanů. Je tvořena disacharidovými podjednotkami, které se stále střídají. První podjednotka je vždy D-glukuronová kyselina, druhá vždy N-acetyl-D-glukosamin. Monosacharidy se při biosyntéze vážou $\beta(1-3)$ a $\beta(1-4)$ glykosidickou vazbou. Počet těchto podjednotek se může pohybovat ve stovkách až deseti milionech. K celkové stabilitě pak přispívají čtyři intramolekulární vodíkové můstky vedoucí z každého meru uvnitř řetězce. Ve vodním prostředí pak dochází k tvorbě vodíkových můstků i s molekulami vody.

Vyskytuje se v tělech všech obratlovců, kde nachází široké uplatnění v biologických funkcích. Obecně lze říci, že její funkce v organismu jsou spojeny s její schopností vázat na sebe velké množství vody. Transportuje vodu a hydratuje okolí orgánů, promazává klouby díky svým reologickým vlastnostem a schopnosti na sebe vázat vodu, vyskytuje se v chrupkách či v očním sklivci. [1,2]



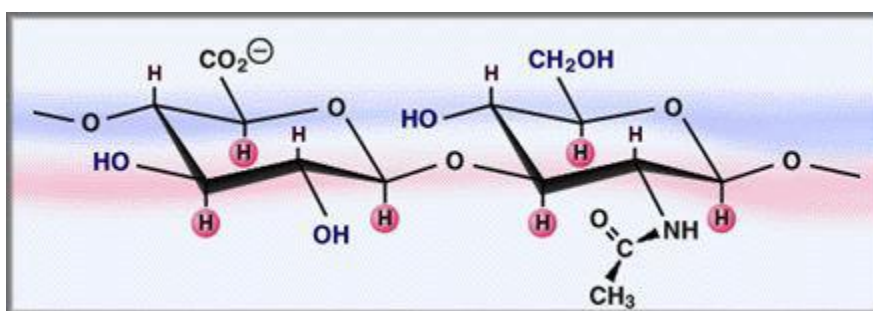
Obrázek 1: Struktura disacharidové jednotky kyseliny hyaluronové

Vzhledem k výskytu látky v živých organismech (při biologickém pH 7,4) jako polyanion a ne ve formě protonované kyseliny je více využíván název hyaluronan. Záporný náboj vzniklý z disociované karboxylové skupiny může tedy interagovat s kladnými náboji na jiných molekulách.

2.1.2. Struktura

Dalších 20 let trvalo laboratoři Karla Meyera popsat přesněji chemickou strukturu hyaluronanu. V těle dokáže vytvářet dlouhé lineární řetězce ze dvou monosacharidových jednotek – přesněji určených jako D-glukuronová kyselina a N-acetyl-glukosamin. Mezi těmito dvěma sacharidy dochází ke vzniku $\beta(1-3)$ a $\beta(1-4)$ glykosidické vazby. Vytvoří se tak základní stavební jednotka – monomer – celého hyaluronanu. Jedna takováto jednotka má

molekulovou hmotnost přibližně 400 Da. Díky rozmezí počtu jednotek může vzniknout polymer s molekulovou hmotností až několika milionu daltonů, ale zároveň i několika desítek tisíců daltonů ($1 \text{ Da} = 1 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$). U takovýchto polymerů můžeme pozorovat i výraznou změnu některých vlastností látky – čím vyšší molekulová hmotnost, tím vyšší viskozita i elasticita. Vysokomolekulární HA zajišťuje mechanickou odolnost a viskoelasticitu, nízkomolekulární HA je v organismu využívána převážně k transportu vody. Oba sacharidy (prostorově podobné glukóze) v beta konfiguraci umožňují svým hydroxylovým a karboxylovým skupinám (stericky objemné) obsadit preferované ekvatoriální pozice, zatímco malé vodíkové skupiny se nachází v méně příhodných axiálních pozicích. Tato struktura velice přispívá k energetické stabilitě disacharidu. Zároveň axiální vodíky přispívají k tvorbě malých hydrofobních domén v HA. Při kontaktu s rozpouštědlem jsou pak tyto nepolární skupiny orientovány dovnitř řetězce a polární skupiny jsou orientovány do rozpouštědla. Tato skutečnost přispívá k vysoké hydrofilitě HA. Dochází pak k vazbě vody do řetězce HA. [3]



Obrázek 2: Obsazené axiální a ekvatoriální pozice ve struktuře HA

2.1.3. Hyaluronan ve tkáních

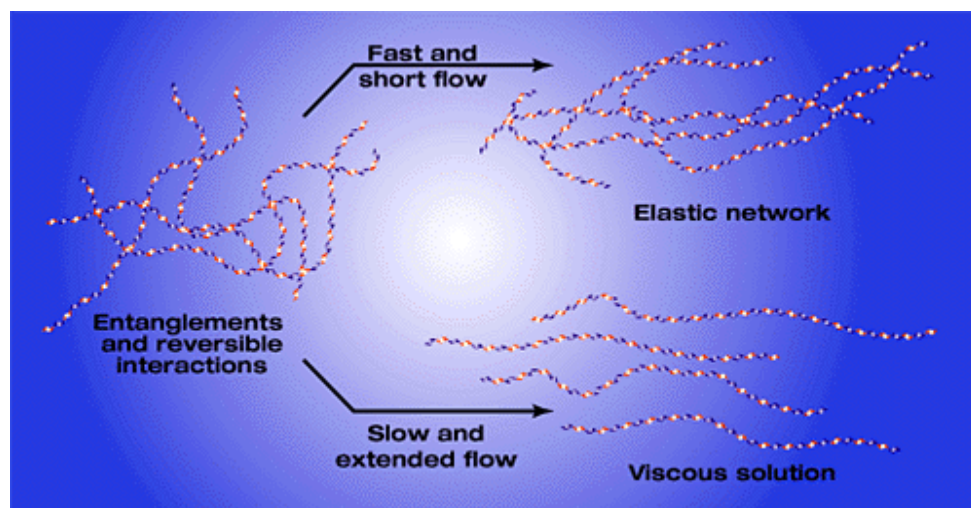
Hyaluronan je přítomen ve tkáních všech obratlovců, dále například v některých druzích streptokoka. V lidském těle tvoří důležitou složku očního sklivce ($0,1 - 0,4 \text{ mg/g}$), synoviální tekutiny v kloubech ($3 - 4 \text{ mg/ml}$) nebo buněk v děloze před ovulací ($0,5 \text{ mg/ml}$). Hojně je však hyaluronan zastoupen v kůži ($7 - 8 \text{ g}$ na dospělého člověka), což tvoří 50 % veškerého množství. Je obsažen jak v pokožce ($0,1 \text{ mg/g}$) tak škáře ($0,5 \text{ mg/g}$). Nejvyšší koncentrace hyaluronanu v lidském těle se nachází v pupeční šňůře (4 mg/ml). Pro porovnání kohoutí hřebínek obsahuje dokonce $7,5 \text{ mg/ml}$. [1]

Průmyslová výroba hyaluronanu je dnes založená zejména na fermentačním způsobu. Získává se pomocí biosyntézy některých bakterií *Streptococcus*. Dle druhu bakterií je vyrobena kyselina hyaluronová o nízké (*Streptococcus equi*) či vysoké (*Streptococcus zooepidemicus*) molekulové hmotnosti. Dále je možno získávat HA extrakcí z výše jmenovaných tkání. Pro laboratorní účely je možno využít například i jako zdroj prasečí kůži či osrdečnickovou tekutinu králíků. Z 500 g kohoutích hřebínku se získá výsledný produkt o hmotnosti 500 mg.

2.1.4. Vlastnosti a interakce

Hyaluronan vykazuje po vytvoření zapletenin (jejich tvorba závisí na molekulové hmotnosti a koncentraci polymeru) dlouhých řetězců viskoelastické vlastnosti. Při rychlém, krátkém a intenzivním pohybu můžeme jeho vlastnosti popsat jako elastické. Naopak při dlouhém a pomalém pohybu jsou patrné vlastnosti viskózní. Při vysoké koncentraci v roztoku

je vytvořena zapletená síť řetězců, chování takového roztoku je patrné na obrázku č. 3. Bylo zjištěno, že viskoelastické vlastnosti HA závisí na jeho koncentraci, ale hlavně molekulové hmotnosti v roztoku.



Obrázek 3: Viskoelastické vlastnosti HA řetězců

Na počátku výzkumu hyaluronanu se vědci primárně zabývali, zda tyto změny nastávají pouze díky mechanickému zapletení či díky interakcím mezi řetězci. Přidáním krátkých HA řetězců do roztoku bylo potvrzeno, že interakce mezi řetězcem mohou nastat – kratší řetězce soutěžily o místo mezi delšími. Tyto interakce výrazně přispívají k reologickým vlastnostem HA.

Tento výzkum je zaměřen na interakce elektrostatické povahy. Elektrostatické interakce jsou nekovalentní interakce (přitažlivé/odpudivé) nábojů, které jsou řízeny Coulombovým zákonem

$$F_e = \frac{1}{4\pi\epsilon_0\epsilon_r} \cdot \frac{|Q_1||Q_2|}{r^2}, \quad (1)$$

kde ϵ_0 je permitivita vakua, ϵ_r je relativní permitivita prostředí, Q_1 a Q_2 jsou velikosti nábojů a r je vzdálenost nábojů. Nazývají se též Coulombické interakce a oproti ostatním nekovalentním interakcím mají daleký dosah. Výzkum interakcí HA je zaměřen na amfifily – některé aminokyseliny. Protože je HA hojně zastoupena v lidském organismu, uvažuje se, že by díky těmto interakcím mohla sloužit jako nosič léčiv na místa potřeby. Na polysacharidový řetězec HA by se elektrostatickými interakcemi navázaly molekuly aminokyselin, které by vhodně změnilly její vlastnosti (například rozpustnost či biologickou odbouratelnost). HA by pak byla schopna reagovat s léčivem. Tato práce se zabývá interakcemi nízkomolekulární HA s lysinem s 6-aminokapronovou kyselinou.

Výzkum výše zmíněných interakcí navazuje na poznatky z interakcí mezi HA s tenzidy – zejména kationaktivními. Tenzidy jsou organické látky schopné snížit povrchovou či

mezifázovou energii a samovolně se tak koncentrují na fázovém rozhraní – jsou to tedy povrchově aktivní látky. Mají bipolární chemickou strukturu (polární a nepolární konec – amfifilní povahu) a dělíme je dle iontového charakteru polární skupiny na ionogenní a neionogenní. Po vložení tenzidu do vodného prostředí dojde k disociaci molekuly a projeví se její náboj. Ionogenní tenzidy se dle náboje dělí na anionaktivní (ve vodném prostředí mají záporný náboj), kationaktivní (ve vodném prostředí mají kladný náboj) a amfolytické (náboj je určen dle pH prostředí). Neionogenní tenzidy nemají v molekule náboj a jejich rozpustnost ve vodě je ovlivněna hydrofilními skupinami. Tenzidy se mohou pomocí elektrostatických interakcí vázat na HA a změnit její konformaci. Většinou dochází ke změně hydrodynamického objemu, což má za následek snížení viskozity roztoku. Z pohledu rozptylu světla dochází s přidavkem tenzidu a zvýšením iontové síly v roztoku k růstu intenzity. [4]

Interakce HA s tenzidy se dají přirovnat k interakcím s aminokyselinami díky struktuře – tenzidy jsou amfifilní molekuly, které ve své struktuře obsahují atom dusíku, stejně jako aminokyseliny. Kationaktivní tenzidy bývají většinou kvarterní amoniové soli mající na konci svého řetězce aminoskupinu obdobně jako některé aminokyseliny. Aby aminokyselina vytvořila ve vodném prostředí kladný náboj je potřeba ji protonizovat – v kyselém prostředí se totiž chová jako zásada přijímající proton a dochází k tvorbě amonného kationtu. (Způsob změny pH bude popsán v experimentální části.) Pomocí výše zmíněných elektrostatických interakcí je pak aminokyselina resp. její aminoskupina schopna se vázat s karboxylovou skupinou na kyselině hyaluronové. Díky navázání aminokyseliny na HA může dojít ke změně konformace či ke změně vlastností. Tenzidy vytvářejí při cmc – kritické micelární koncentraci micely (agregáty s hydrofobním koncem uvnitř a hydrofilním na povrchu). Dochází k vazbě na opačně nabitě molekuly HA a ke zvýšení hydrodynamického objemu. Při elektrostatických interakcích nejdříve dochází k poklesu viskozity, avšak s přibývajícemi micelami v roztoku další pokles nenastává. Naopak jakmile dosáhne minima, nastává mírný nárůst. Interakce lze tedy pozorovat pod cmc. [5,6,7] S přidavkem nízkomolekulárního elektrolytu dochází ke snížení hodnoty cmc, ale dochází tak k odstínění interakcí. Na základě těchto zjištění můžeme posuzovat i interakce s aminokyselinami.

2.1.5. Užití

Kyselina hyaluronová je v dnešní době hojně využívána ve farmakologických či kosmetologických přípravcích jako jedna z hlavních účinných složek. [2] Našla své místo v oční chirurgii, kde díky svým viskoelastickým vlastnostem chrání oční tkáň při operacích oka, využívá se jako přídatek do očních kapek, kde je schopná zvýšit dostupnost samotného léku – prodlužuje délku působení aktivní složky díky vysoké viskozitě nehybného roztoku. Vytváří na povrchu oka dlouhodobě setrvávající film a neodplavuje se. HA se dále využívá při kloubních zánětech, kde je na sebe schopna vázat vodu a proteiny a ulehčovat tak pohyb kloubů či tlumit nárazy při pohybu. Při těchto zánětech je membrána uvnitř kloubů více propustná pro proteiny, což má za následek snížení molekulové hmotnosti HA díky tvorbě radikálů a posléze horší reologické vlastnosti. [8]

Velké uplatnění nachází kyselina hyaluronová v kosmetickém průmyslu. S rostoucím věkem dochází k úbytku HA v lidské pokožce, proto bývá častou složkou např. v krémech proti vráskám či bývá dokonce využívána jako plnivo při plastických operacích.

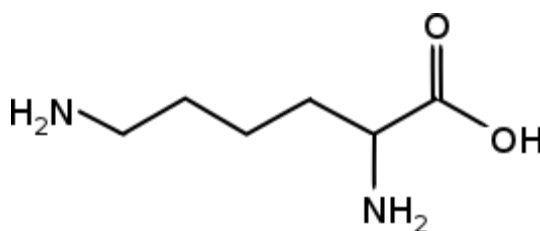
Nové výzkumy ukázaly další možné využití HA v lékařství. HA by sloužila jako nosič bioaktivních látek na cílené místo v lidském těle. Nejznámější receptor, jehož interakce s HA

se využívají, je CD44. Interakce těchto dvou látek v těle způsobují např. aktivaci leukocytů. Nejvíce se nyní zkoumá možnost využití HA při léčbě rakoviny – rakovinové buňky v sobě obsahují velkou koncentraci kyseliny hyaluronové díky zvýšené míře receptoru CD44, který na sebe váže HA z mezibuněčné hmoty. CD44 je na HA citlivý a v případě modifikace HA, na kterou by bylo navázané léčivo, by se dopravilo přímo do místa rakovinových buněk. Mohlo by se tak zabránit chemoterapiím, které ovlivňují celý lidský organismus.

2.2. Aminokyseliny

2.2.1. Lysin

2,6-diaminohexanová kyselina – triviálním názvem lysin – je bazická aminokyselina díky přítomnosti dvou aminoskupin. Jedna aminoskupina je vázána na primárním α -uhlíku a druhá na ϵ -uhlíku. Díky obsahu asymetrického uhlíku se vyskytuje ve dvou enantiomerech L a D, v bílkovinách pouze L-forma. Hodnota izoelektrického bodu pI je 9,59. Disociační konstanty lysinu pK při 25 °C jsou $pK_{COOH} = 2,20$, $pK_{NH_2} = 8,90$ a $pK_{\epsilon-NH_2} = 10,28$. V kyselém prostředí AMK přijímá proton a dochází k tvorbě amonného kationtu, nad hodnotou izoelektrického bodu pak převládá tvorba karboxylových aniontů. [9]

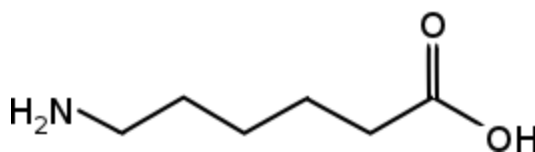


Obrázek 4: Lysin

Lysin je esenciální aminokyselina – potřebná pro lidské tělo, které si ho však samo neumí produkovat. Je potřebný pro růst a produkci karnitinu a musíme ho tedy získávat z potravy. Konvertuje mastné kyseliny na energii a pomáhá snižovat cholesterol. Většina lidí přijímá dostatek lysinu z masa či luštěnin. Jeho nedostatek může způsobit nevolnosti, nechutenství, anémii atd. [10]

2.2.2. 6 – aminokapronová kyselina

6 – aminokapronová kyselina je strukturně lysinu velmi podobná. Obsahuje ve svém řetězci jen jednu aminoskupinu, což způsobuje nižší bazicitu než má lysin samotný. Izoelektrický bod této kyseliny je 7,6. Disociační konstanty pK při 25 °C 6AKK jsou $pK_{COOH} = 4,43$ a $pK_{NH_2} = 10,75$. 6AKK je využívána v medicíně na zastavení krvácení po operacích či při těžkých onemocněních jater. [11,12]



Obrázek 5: 6-aminokapronová kyselina

2.3. Viskozita

2.3.1. Definice

Viskozita je fyzikální veličina, která udává poměr mezi tečným napětím a změnou rychlosti v závislosti na vzdálenosti mezi sousedními vrstvami při proudění kapaliny, popisuje tedy vnitřní odpor tekutiny. Charakterizuje vnitřní tření a závisí na přitažlivých silách mezi částicemi. Čím vyšší přitažlivé síly, tím vyšší viskozita – vyšší odpor při pohybu kapaliny nebo těles v kapalině. Kapaliny s nenulovou viskozitou označujeme jako *viskózní*, kapaliny s nulovou hodnotou viskozity se nazývají *ideální*. Ve skutečnosti však nulová hodnota viskozity nemůže nastat, všechny látky mají hodnotu viskozity pozitivní. Viskozita závisí na teplotě a tlaku (vliv většinou zanedbatelný) a můžeme ji dělit na dynamickou a kinematickou.

Dynamická viskozita η udává poměr tečného napětí a gradientu rychlosti [Pa·s]

$$\tau = \eta \cdot \frac{d\gamma}{dt} = \eta \cdot \dot{\gamma} \text{ [Pa]}, \quad (2)$$

kde τ je tečné napětí, η je dynamická viskozita, $\dot{\gamma}$ je rychlost růstu deformace (smyková rychlost).

Tečné napětí pak zjistíme jako podíl síly F vyvolávající deformaci a plochy A , na kterou tato síla působí [Pa]

$$\tau = \frac{F}{A}. \quad (3)$$

Kinematická viskozita ν je pak podíl dynamické viskozity a hustoty kapaliny [m²·s⁻¹]

$$\nu = \frac{\eta}{\rho}. \quad (4)$$

Výpočet dynamické viskozity se řídí dle Newtonového zákona viskozity. Tímto zákonem se řídí většina kapalin i plynů – tzn. jejich viskozita je úměrně závislá na gradientu rychlosti. Tyto látky se nazývají *newtonské* tekutiny a jsou popsitelné viskozitou. Existují však i látky, jejichž chování tímto zákonem popsat nelze – *nenewtonské* tekutiny, které musíme popsat funkcí závislosti rychlosti deformace na tečném napětí.

Veličina označovaná jako relativní viskozita popisuje vztah mezi dynamickou viskozitou disperzního prostředí a viskozitou čistého rozpouštědla

$$\eta_{rel} = \frac{\eta}{\eta_0}. \quad (5)$$

Z Einsteinovy rovnice pro viskozitu pak vychází závislost viskozity na objemovém zlomku

$$\eta = \eta_0(1 + 2,5 \cdot \varphi), \quad (6)$$

kde η_0 je viskozita čistého rozpouštědla a φ je objemový zlomek disperzního podílu. [13,14]

2.3.2. Měření viskozity

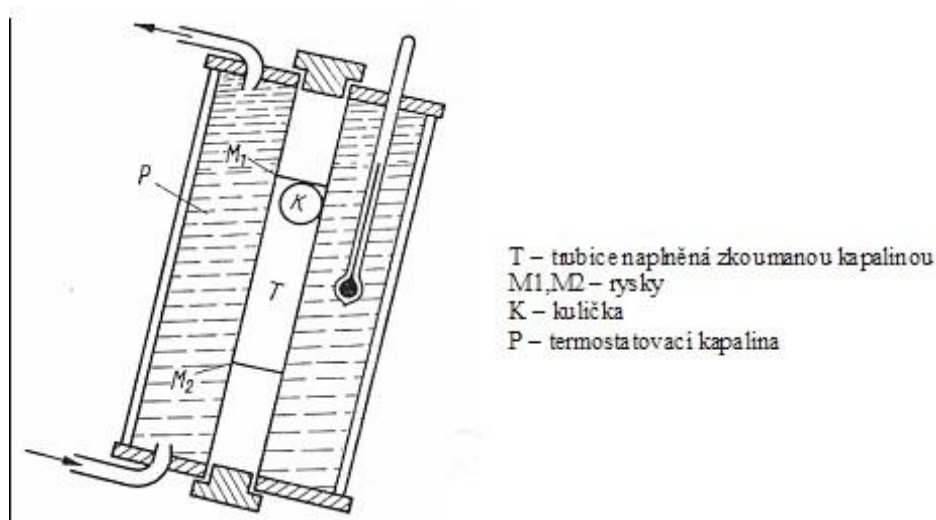
Dynamickou viskozitu lze měřit Höpplerovým tělískovým viskozimetrem. Skládá se z měrné trubice naplněné zkoumanou kapalinou, která je obklopená skleněným pláštěm

s temperační kapalinou. Trubice je nakloněna o 10° a je v ní kulička, pomocí které se určuje dynamická viskozita. Ta se vypočítá z rychlosti jejího pádu. Rychlost pádu kuličky vychází ze sedimentační rovnováhy. Nejdříve na kuličku působí gravitační síla zmenšená o sílu vztakovou, s vyšší rychlostí pak vzrůstá třecí síla a v určitém okamžiku se síly vyrovnají.

Viskozitu poté vypočítáme

$$\eta = \frac{2 \cdot g \cdot r^2 \cdot \Delta\rho \cdot t}{9 \cdot l}, \quad (7)$$

kde g je gravitační konstanta, r poloměr kuličky, $\Delta\rho$ je rozdíl hustot kapalin, t čas pádu kuličky a l délka dráhy.



Obrázek 6: Tělíkový viskozimetr

Další možností měření viskozity jsou kapilární viskozimetry. S jejich pomocí se měří průtok kapaliny kapilárou vyvolaný gravitací. Z času, za který kapalina s určitým objemem proteče, můžeme kinematickou viskozitu vypočítat dle Hagen-Poiseillova zákona. Kapilárními viskozimetry nemohou být měřeny newtonské kapaliny.

Posledním typem viskozimetrů jsou rotační viskozimetry. Mezi dvěma většinou válcovými plochami je vzorek podrobován smyku. Jedna z ploch vykonává otáčivý pohyb a zjišťuje se vliv na vzorek při různých smykových rychlostech. Mezi nejběžnější typy takovýchto viskozimetrů patří systém souosých válců či systém kužel-deska. Pro tuto práci však nebyl tento typ viskozimetrů využíván. [14]

2.4. Konduktometrie

2.4.1. Definice

Konduktometrie je fyzikální metoda založená na měření vodivosti zkoumaných vzorků. Fyzikální veličina vodivost G vyjadřuje, zda a jak je vzorek schopný vést elektrický proud. Čím vyšší je hodnota vodivosti, tím lépe vede vzorek elektrický proud. Vodivost se vypočítá jako převrácená hodnota elektrického odporu

$$G = \frac{1}{R}. \quad (8)$$

Jednotkou vodivosti je Siemens Ω^{-1} (v SI soustavě $\text{m}^{-2} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{s}^3 \cdot \text{A}^2$). Vodivost v roztoku je měřena na dvou elektrodách, na které je přiváděno napětí U a měřen elektrický proud I

$$G = \frac{I}{U}. \quad (9)$$

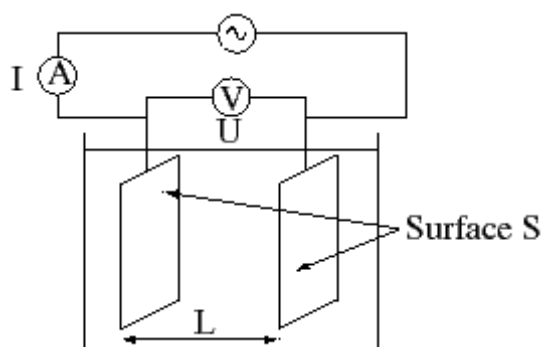
Velikost vodivosti je ovlivněna vlastnostmi vodiče – průřezem plochy kolmé na dráhu vedení proudu S , délkou mezi elektrodami l a konduktivitou κ

$$\kappa = G \cdot \frac{l}{S}. \quad (10)$$

Jednotkou konduktivity je $\text{S} \cdot \text{m}^{-1}$ (v SI soustavě $\text{m}^{-3} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{s}^3 \cdot \text{A}^2$). Udává tedy měrnou vodivost tělesa, která nezávisí na jeho délce. [15]

2.4.2. Měření, konduktometry

Vodivost roztoků je měřena v systému dvou elektrod v konstantní poloze, jak je uvedeno na obrázku č. 7. Mezi elektrody je přiváděno konstantní napětí a na ampérmetru je odečítán proud v závislosti na vodivosti roztoku.



Obrázek 7: Schéma konduktometru

Konduktometr poté přepočítá proud na vodivost. Přístroje jsou kalibrovány na 25 °C, při měření roztoků za jiné teploty musí dojít ke kompenzaci pomocí faktoru β dle vztahu

$$G = \beta \cdot \frac{I}{U}. \quad (11)$$

2.5. pH – metrie

2.5.1. Měření

V praxi se pro měření orientačního pH roztoků používá několik druhů metod - například pomocí indikátorových papírků či přidavkem indikátorů.

Nejpřesnější metodou pro stanovení pH je však užití pH-metru. pH-metr měří elektrický potenciál mezi měrnou a referentní elektrodou na potenciometru. Jako měrná elektroda je využívána skleněná elektroda jako referentní pak elektroda argentochloridová.

Argentochloridová elektroda je složena ze stříbrného drátku potaženého vrstvou AgCl, který je ponořený do nasyceného roztoku KCl. Elektroda je obalena skleněným pláštěm, ve kterém se nachází membrána citlivá na koncentraci oxoniových iontů v roztoku. Změnou aktivity vodíkových iontů dojde ke změně elektrochemického potenciálu dle Nernstovy rovnice:

$$E_{(AgCl/Ag)} = E_{(Ag^+/Ag)}^0 - \frac{R \cdot T}{F} \cdot \ln a_{Cl^-}, \quad (12)$$

kde $E_{(AgCl/Ag)}$ je potenciál argentochloridové elektrody, $E_{(Ag^+/Ag)}^0$ je standardní elektrodový potenciál ustanovený mezi stříbrným drátkem a roztokem KCl, R je univerzální plynová konstanta ($R = 8,31441 \text{ J} \cdot \text{K}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$), T je termodynamická teplota roztoku [K], F je Faradayova konstanta ($F = 9,648 \cdot 10^4 \text{ C} \cdot \text{mol}^{-1}$) a a_{Cl^-} je aktivita chloridových aniontů.

Skleněná elektroda je tvořena křemičitanovou krystalovou mřížkou skla, na kterou se vážou elektrostatickými silami ionty vodíku a alkalických kovů. Při styku s roztokem se na povrchu vytváří solvatovaná vrstva, kde dochází k výměně vodíkových iontů mezi roztokem a sklem. Membránový potenciál skleněné elektrody vzniká jako rozdíl potenciálů na vnější a vnitřní stěně skleněné membrány. Potenciál této elektrody závisí na poměru aktivit vodíkových iontů na obou stranách membrány dle Nicolsky-Eisenmanovy rovnice:

$$E = K + \frac{R \cdot T}{F} \cdot \ln \frac{a_{H^+}}{a_{H^+(inner)}}, \quad (13)$$

kde E je potenciál skleněné elektrody, K je standardní potenciál zahrnující v sobě druh a složení skla, způsob přípravy elektrody, kvalitu povrchu a vnitřní náplň elektrody, R je univerzální plynová konstanta ($R = 8,31441 \text{ J} \cdot \text{K}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$), T je termodynamická teplota roztoku

[K], F je Faradayova konstanta ($F = 9,648 \cdot 10^4 \text{ C} \cdot \text{mol}^{-1}$) a $\frac{a_{H^+}}{a_{H^+(inner)}}$ je poměr aktivit

vodíkových iontů na obou stranách membrány.

Aktivita iontů uvnitř membrány je konstantní a může být zahrnuta do K' . Pro 25°C pak získáme:

$$E = K' + \frac{R \cdot T}{F} \cdot \ln a_{H^+} = K' - 0,059 \text{ pH} \quad (14)$$

Skleněná elektroda se uchovává v destilované vodě, aby zůstala stále hydratovaná. [16,17]

2.6. Dynamický rozptyl světla

2.6.1. Definice

Fyzikální jev nazývaný dynamický rozptyl světla (DLS - Dynamic Light Scattering) zaznamenává Brownův pohyb částic a z difúzního koeficientu, získaného autokorelační funkcí, vypočítává velikost částic ve formě hydrodynamického poloměru. Pomocí laseru, který osvítl částice, se analyzuje fluktuace intenzity světla rozptýleného částicemi. Dochází ke změně frekvence tohoto záření dle pohybu částic od detektoru – zda se k němu přibližují či vzdalují. Takto osvětlená malá částice poté rozptyluje světlo ve všech směrech.

V případě měření naprosto nehybných částic je zobrazování řízeno interferenčním jevem a dle fázových posunů vln se poté zobrazují jasné či tmavé oblasti. Pokud světlo dorazí na detektor ve stejné fázi, vytvoří se jasná oblast světla. Tmavé oblasti vznikají z vzájemně destruktivních fázových přídavek a navzájem se zruší. V praxi ovšem nejsou částice v kapalině nikdy nehybné díky výše zmíněnému Brownovu pohybu. Tento pohyb vzniká díky náhodné srážce částic s molekulami kapaliny. Obecně je důležité, že malé částice se pohybují rychle a velké pomaleji. Díky neustálému pohybu se zdá, že se tmavé a světlé oblasti pohybují, ve skutečnosti se zvyšuje či snižuje jejich intenzita – intenzita v čase fluktuuje. Fluktuace je určena autokorelační funkcí:

$$g(\tau) = \frac{\langle I(t)I(t+\tau) \rangle}{\langle I(t) \rangle^2}, \quad (15)$$

kde $I(t)$ určuje intenzitu v čase t a výrazy v závorkách pak zprůměrování celkového času t .

Pro monodisperzní roztoky platí:

$$g(t) = B + \beta^{-2\Gamma t}, \quad (16)$$

kde B (baseline) je základní korelační funkce pro nekonečný čas, β je amplituda korelační křivky s nulovým zpožděním a Γ je rychlost poklesu.

Dále můžeme vypočítat difúzní koeficient:

$$D = \frac{\Gamma}{q^2}, \quad (17)$$

kde q je velikost rozptylového vektoru.

Rozptylový vektor lze vypočítat z n indexu lomu disperzního prostředí, λ_0 vlnové délky světelného zdroje ve vakuu a θ úhlu rozptylu dle vztahu:

$$q = \frac{4\pi \cdot n}{\lambda_0} \sin\left(\frac{\theta}{2}\right). \quad (18)$$

Ze Stokes-Einsteinovy rovnice poté vypočítáme hydrodynamický poloměr částic:

$$R_h = \frac{k \cdot T}{6\pi \cdot \eta \cdot D}, \quad (19)$$

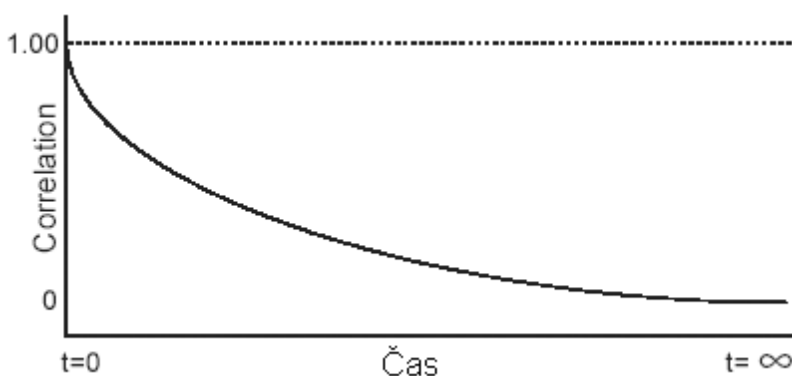
kde k je Boltzmannova konstanta ($k = 1,38 \cdot 10^{-23} \text{ JK}^{-1}$), T je termodynamická teplota, η je viskozita rozpouštědla a D difúzní koeficient. [18]

2.6.2. Problémy měření roztoků bez elektrolytu

Pro měření dynamického rozptylu světla jsou důležité podmínky, při kterých měření probíhá. Měření je závislé na čistotě prostředí, prachových částicích či bublinkách ve vzorku, intenzitě světelného zdroje i délce měření. Zároveň je podstatné disperzní prostředí vzorku. Pro měření DLS se do roztoku měřeného polyelektrolytu přidává nízkomolekulární elektrolyt například NaCl. S jeho přidávkem dochází v roztoku ke zvýšení rozpustnosti, zmenšení poloměru částic a polymer se tak smrští do menšího tvaru. [23]

2.6.3. Měření

Přístroje pro měření dynamického rozptylu světla měří tedy fluktuaci intenzity rozptylu a díky ní vypočítá difúzní koeficient a poté hydrodynamický poloměr částic ve vzorku. Uvnitř přístroje se nachází digitální korelátor, který měří stupeň podobnosti dvou signálů v určité době. Intenzity signálů v krátkém časovém úseku jsou si velmi podobné, o chvíli později se podoba snižuje, až s časem dosáhne korelace na nulu. K tomuto případu nastane díky Brownovu pohybu- částice se pohybují v náhodných směrech. Časová měřítka pro DLS jsou však velmi malá. Aby korelace dosáhla na nulu u typického vzorku, je potřeba jedna až deset milisekund. Kroky pro postupné měření korelace se pohybují v řádech nano nebo mikrosekund. Dokonalé korelace (1) dosáhneme v případě identických signálů, tedy porovnáním intenzity v určitém čase samu se sebou. Žádná korelace (0) znamená, že mezi signály není žádná shoda. Korelace měřená v několika časových úsecích je zobrazena na následujícím obrázku. [26]



Obrázek 8: Korelace v časových úsecích

3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1. Použité materiály

Kyselina hyaluronová, přesněji její sodná sůl, byla vyrobena v Dolní Dobrouči v České republice firmou Contipro Biotech s.r.o.. Pro tuto práci byl využit hyaluronan s nízkou molekulovou hmotností $M_w = 110\text{--}130$ kDa technické kvality. Pro přípravu roztoků HA byla použita injekční voda, vyrobená firmou Fresenius Kabi Italia, S.r.l., Verona, Itálie. Použité aminokyseliny lysin a 6 – aminokapronová o p.a. čistotě byly vyrobeny firmou Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo.

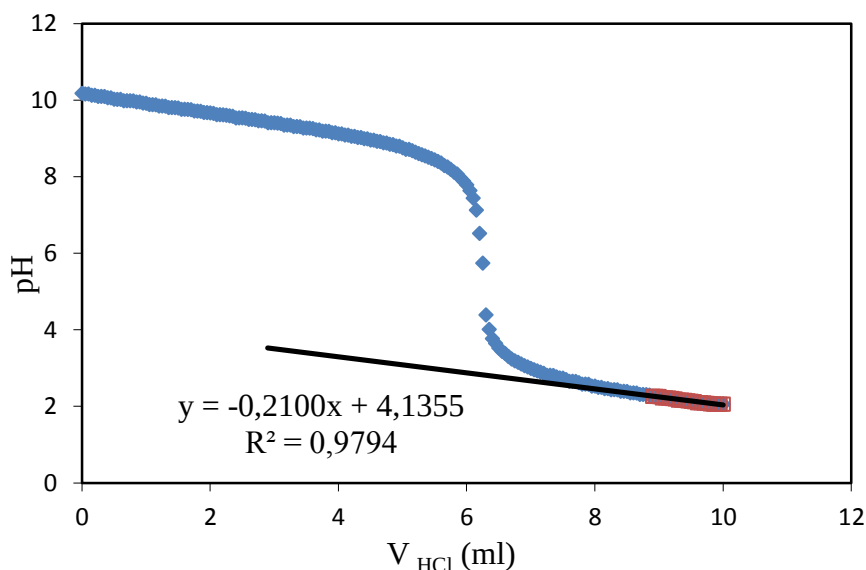
3.2. Metody a vyhodnocení

3.2.1. Příprava roztoků

Roztoky kyseliny hyaluronové byly připraveny následujícím způsobem. S přesností na čtyři desetinná místa bylo odváženo množství kyseliny hyaluronové. Nádoba s malým množstvím injekční vody byla umístěna na magnetickou míchačku a za stálého míchání a laboratorní teploty byla do roztoku přidávána navážka kyseliny hyaluronové střídaná s injekční vodou v množství pro dosažení přesné koncentrace. Toto vrstvení způsobí lepší homogenizaci HA v roztoku. Poté byla nádoba uzavřena a roztok míchán 24 hodin za účelem dosažení nejvyšší homogenity. Roztoky kyseliny hyaluronové byly vždy po míchání uchovávány v chladu, aby došlo ke zpomalení případné degradace a aby se prodloužila čerstvost roztoků. Takto byly připraveny roztoky o koncentracích 0,1%hm, 0,2%hm, a 0,5%hm, pro následné měření.

Roztoky aminokyselin byly připravovány do odměrných baněk na výslednou koncentraci $0,264\text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$. Potřebné množství bylo naváženo na analytických vahách s přesností na čtyři desetinná místa. Roztoky byly připravovány z injekční vody za laboratorní teploty a ponechány na magnetické míchačce 1 hodinu. Po odstavení roztoků aminokyselin z magnetické míchačky byla provedena protonizace použitím HCl o dané koncentraci v závislosti na aminokyselině. Pro lysin byl použit roztok HCl o koncentraci $2\text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$, pro 6 – aminokapronovou kyselinu $0,1\text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$. Roztoky protonizovaných aminokyselin byly též uchovávány v chladu.

První způsob protonizace roztoků aminokyselin byl prováděn za laboratorní teploty napipetováním potřebného množství roztoku HCl ($2\text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ pro lysin a $0,1\text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ pro 6AKK) k 10 ml aminokyseliny. Potřebné množství HCl bylo určeno z titračních křivek lysinu a 6AKK. Poté byl roztok doplněn injekční vodou na konečnou koncentraci již protonizované formy aminokyseliny $0,22\text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$. Takto připravené roztoky byly opět ponechány 24 hodin na magnetické míchačce a poté uchovávány v lednici. Na následujícím grafu je zobrazena křivka titrace roztoku lysinu o koncentraci $120\text{ mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$ roztokem 1M HCl viz Obr. 9. Titrační křivka pro $240\text{ mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$ 6AKK 0,1M HCl je uvedena v příloze viz Obr. 28. [27]



Obrázek 9: Titrační křivka $120 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ lysinu 1M HCl – červené body pro nízké pH byly proloženy lineární regresí

Druhý způsob protonizace byla úprava pH aminokyselin na pH vodného roztoku kyseliny hyaluronové (0,1%hm. a 0,25%hm.). Za stálého míchání byla do roztoku přidávána HCl po malých přídavicích a kontinuálně bylo měřeno pH roztoku. Po ustálení pH na pH roztoku HA (0,1%hm. a 0,25%hm.) byla přidána injekční voda pro dosažení koncentrace $0,22 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$.

Pro měření dynamického rozptylu světla byl do připravených koncentračních řad přidáván elektrolyt NaCl. Roztok HA byl tedy připraven o dvojnásobné koncentraci a v poměru 1:1 ředěn s připraveným roztokem NaCl o $c = 30 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Výsledná koncentrace NaCl v roztoku tím pádem byla $15 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$.

Z těchto zásobních roztoků bylo poté nachystáno několik koncentračních řad kyseliny hyaluronové s protonizovanými aminokyselinami. Všechny připravené sady obsahovaly 7 roztoků v koncentračním rozmezí $0,9 - 20 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Pro každou metodu byl dále nachystán referenční vzorek HA, který obsahoval pouze čistou kyselinu hyaluronovou. Dále byly připraveny koncentrační řady pouze protonizovaných aminokyselin v injekční vodě bez kyseliny hyaluronové pro měření pH a vodivosti pro následné porovnání se směsnými roztoky HA a aminokyselin. Roztoky všech sad byly vždy uzavřeny, ponechány na magnetické míchačce 24 hodin a poté uchovávány v ledničce do doby měření.

Všechny následující závislosti jsou pro porovnání uváděny na molárním poměru protonizované aminokyseliny ku HA. Koncentraci disacharidových jednotek HA jsme získali podělením hmotnostní koncentrace HA molární hmotností disacharidové jednotky HA:

$$c_{\text{HA}} = \frac{w_{\text{HA}}}{M_{\text{HA}}} = \frac{1}{415,349} = 2,4076 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3},$$

kde w_{HA} [g·l⁻¹] je hmotnostní koncentrace HA a M_{HA} [g·mol⁻¹] je molární hmotnost disacharidové jednotky HA.

Po naředění roztoku aminokyselinou byla výsledná koncentrace HA $c_{HA} = 2,1887$ mmol·dm⁻³. Obdobně byla vypočítána molární koncentrace roztoku 0,25% HA $c_{HA} = 5,4718$ mmol·dm⁻³.

3.2.2. pH – metrie

Měření pH bylo prováděno na pH-metru Mettler Toledo při referenční teplotě 25 °C. Před měřením každé koncentrační řady byl pH metr nakalibrován dle návodu výrobce pomocí tří pufrů (rozmezí pufrů vybíráno dle předpokládaného pH měřeného roztoku). Měřené roztoky byly vždy vytemperovány na laboratorní teplotu. Skleněná elektroda byla ponořena do měřeného roztoku a pH bylo odečítáno do ustálení hodnot. Celkem bylo získáno 6 hodnot, ze kterých byl vypočítán průměr a směrodatná odchylka z výběru dle následujícího vzorce:

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum (x - \bar{x})^2}{(n-1)}}. \quad (20)$$

Naměřené hodnoty pH byly vyhodnoceny pomocí programu Microsoft Excel. Bylo vypočítáno relativní pH dle následujícího vzorce:

$$pH_{rel} = \frac{pH_{HA+AMK+voda}}{pH_{voda+AMK}}. \quad (21)$$

Hodnoty relativního pH roztoku HA s lysinem a 6AKK byly vyneseny do grafu v závislosti na $\frac{c_{AMK}}{c_{HA}}$.

Do grafu byly vyneseny také chybové úsečky pro každý měřený roztok, jejichž velikost byla vypočítána ze vztahu:

$$\Delta\left(\frac{a}{b}\right) = \sqrt{\left(\frac{\Delta a}{a}\right)^2 + \left(\frac{\Delta b}{b}\right)^2} \cdot pH_{rel}, \quad (22)$$

kde Δa je směrodatná výběrová odchylka pH pro roztok HA s AMK, a je průměrné pH roztoku HA s AMK, Δb je směrodatná výběrová odchylka pH pro roztok AMK ve vodě, b je průměrné pH roztoku AMK ve vodě a pH_{rel} je relativní hodnota pH.

3.2.3. Konduktometrie

Měření vodivosti bylo prováděno na konduktometru Greinsinger Electronic. Měřené roztoky byly vždy vytemperovány na laboratorní teplotu. Elektroda byla ponořena do měřeného roztoku a vodivost byla odečítána do ustálení hodnot. Celkem bylo získáno 6 hodnot, ze kterých byl vypočítán průměr a směrodatná odchylka obdobně jako u pH-metrie.

Hodnoty z vodivostních měření byly zpracovány obdobně jako předchozí data pomocí programu Microsoft Excel. Ustálené vodivosti roztoků HA + AMK byly přepočítány na

relativní vodivosti a vyneseny do grafů v závislosti $\frac{c_{AMK}}{c_{HA}}$. Relativní vodivosti umožní zkoumání vlivu interakcí HA s aminokyselinou a popisuje poměr mezi roztokem kyseliny hyaluronové s AMK a aminokyselinou samotnou o téže koncentraci jako ve vzorku s HA:

$$G_{rel1} = \frac{G_{HA+AMK+voda}}{G_{voda+AMK}}. \quad (23)$$

Z naměřených dat byla dále vypočítána druhá relativní vodivost, která popisuje poměr vodivosti roztoku HA s aminokyselinou k roztoku čistého HA:

$$G_{rel2} = \frac{G_{HA+AMK+voda}}{G_{HA}}. \quad (24)$$

Závislost G_{rel2} na koncentraci aminokyselin byla též vynesena do grafu. Tato závislost vyjadřuje jak je ovlivněna vodivost pouze s přídavkem aminokyseliny.

Dále byly do grafů vyneseny chybové úsečky obdobně jako u měření pH dle vzorce:

$$\Delta\left(\frac{a}{b}\right) = \sqrt{\left(\frac{\Delta a}{a}\right)^2 + \left(\frac{\Delta b}{b}\right)^2} \cdot G_{rel1}, \quad (25)$$

kde Δa je směrodatná výběrová odchylka vodivosti pro roztok HA s AMK, a je průměrná vodivost roztoku HA s AMK, Δb je směrodatná výběrová odchylka vodivosti pro roztok AMK ve vodě, b je průměrná vodivost roztoku AMK ve vodě a G_{rel1} je hodnota relativní vodivosti 1.

3.2.4. Viskozimetrie

Viskozita byla měřena na AMVn viskozimetru značky Anton Paar za laboratorní teploty 25 °C. Měřené roztoky byly dopředu zfiltrvány (0,22 µm Millex mikrofiltr) a odstředěny 30 minut centrifugou (4000 ot/min). Do kapiláry ($d = 1,8$ mm) byla nejdříve vpravena kulička o známém poloměru a hustotě ($d = 1,5$ mm, $\rho = 7,85$ g·cm⁻³), poté byl nadávkován roztok a byl změřen čas doby pádu kuličky roztokem při dvou úhlech naklonění kapiláry (50° a 70°). Dle vztahu (7) byl čas přepočítán na viskozitu.

Výsledky viskozimetrického měření byly zpracovány pomocí programu Microsoft Excel. Měření viskozity bylo provedeno u koncentrační řady lysinu a 6AKK a následně bylo přepočítáno na relativní viskozity – poměr viskozity roztoku HA s aminokyselinou ku viskozitě čistého roztoku HA:

$$\eta_{rel} = \frac{\eta_{HA+AMK+voda}}{\eta_{voda+HA}}. \quad (26)$$

Relativní viskozita roztoků pro 50° i 70° byla vynesena do grafu v závislosti na $\frac{c_{AMK}}{c_{HA}}$.

Dále byly do grafů vyneseny chybové úsečky obdobně jako u předchozích měření dle vzorce:

$$\Delta\left(\frac{a}{b}\right) = \sqrt{\left(\frac{\Delta a}{a}\right)^2 + \left(\frac{\Delta b}{b}\right)^2} \cdot \eta_{rel}, \quad (27)$$

kde Δa je směrodatná výběrová odchylka viskozity pro roztok HA s AMK, a je viskozita roztoku HA s AMK, Δb je směrodatná výběrová odchylka viskozity pro roztok HA ve vodě, b je viskozita roztoku HA ve vodě a η_{rel} je hodnota relativní viskozity. Směrodatná odchylka byla vypočítána z procentuelních hodnot odchylek viskozit zjištěných viskozimetrem – dle doporučení výrobce byly hodnoty brány jako reprodukovatelné v případě odchylky menší než 0,4 %.

Koncentrační řada lysinu byla po měření ponechána 1 měsíc odstát za účelem zjištění vlivu případné degradace na viskozitu roztoků. U 2 mmol·dm⁻³ lysinu byl pozorován bílý zákal, nebyl tedy dále viskozimetricky měřen. Ostatní relativní viskozity vzorků z koncentrační řady jsou též vyneseny do grafu v závislosti na $\frac{C_{AMK}}{C_{HA}}$.

3.2.5. Dynamický rozptyl světla

Měření dynamického rozptylu světla probíhalo na přístroji Zetasizer Nano firmy Malvern Instruments. Řada těchto přístrojů poskytuje možnost měřit tři charakteristiky kapalných vzorků: velikost částic, Zeta potenciál a molekulovou hmotnost. Zetasizer umožňuje měřit v širokém rozsahu koncentrací.

Připravené vzorky byly zfiltrvány přes mikrofiltr Millex 0,22 μm a odstředěny 30 min centrifugou (4000 ot/min). Vzorky byly měřeny v jednorázových kyvetách. Zetasizer provedl temperaci roztoku po dobu 120 sekund na teplotu 25 °C a započalo měření pomocí Zetasizer Software. Tento software vyhodnocuje velikost částic dle intenzity či objemu, difúzní koeficient či index polydisperzity. U prvních tří koncentračních řad bylo měření provedeno u každého vzorku dvakrát a vypočítán průměr. Další dvě koncentrační řady čítaly šest měření pro každý vzorek (po třech měřeních byl vzorek znovu nadávkován do kyvety) a byl proveden Dean-Dixonův test na vyloučení odlehlých hodnot.

U každého vzorku bylo vyhodnoceno pomocí programu Microsoft Excel několik kritérií. Jednotlivá kritéria (Z-average – udává statistickou distribuci průměru velikosti všech částic v roztoku, difúzní koeficient, d_{vol} – udává velikost částic dle jejich objemů a d_{int} jednotlivých píků – určuje intenzitu a procentuelní zastoupení částic v roztoku) byly vyneseny do grafů v závislosti na molárním poměru lysinu ku HA $\frac{C_{lys}}{C_{HA}}$.

Směrodatná odchylka pro získaná data z dynamického rozptylu světla byla vypočítána obdobně jako v předchozích vyhodnoceních. Dále byly do grafů vyneseny chybové úsečky získané z těchto směrodatných odchylek.

Pro lepší reprodukovatelnost měření byl u koncentračních řad HA s lysinem a NaCl proveden Dean Dixonův test odlehlých hodnot:

$$Q_1 = \frac{|x_2 - x_1|}{|x_n - x_1|}, \quad (28)$$

$$Q_n = \frac{|x_n - x_{n-1}|}{|x_n - x_1|}, \quad (29)$$

kde Q zastupuje kritické hodnoty, x_1 nejnižší hodnota ze série měření, x_n nejvyšší hodnota série měření a x_2 a x_{n-1} reprezentují sousední výsledky nejnižších a nejvyšších hodnot.

Kritické hodnoty Q jsou uvedeny v následující tabulce. [27]

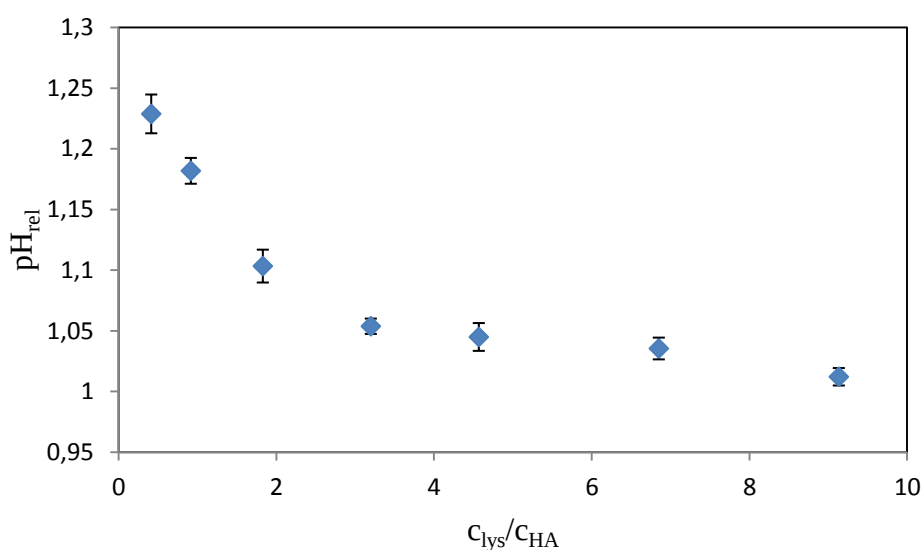
Tabulka 1: Kritické hodnoty Q pro 3-6 hodnot a hladinu významnosti $\alpha = 0,05$

n	Q_n
3	0,941
4	0,765
5	0,642
6	0,560

4. VÝSLEDKY

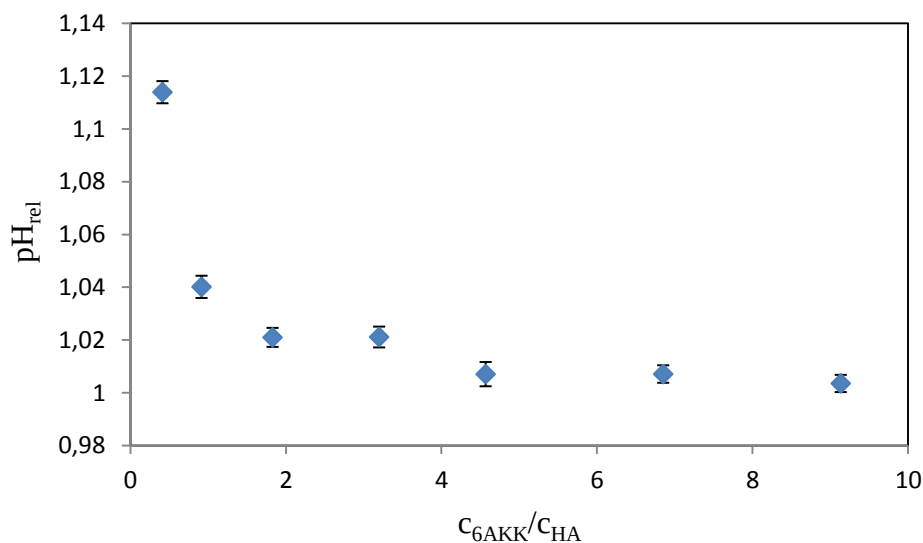
4.1. pH-metrie

Pomocí výsledků pH-metrie můžeme posoudit, zda dochází k interakcím mezi kyselinou hyaluronovou a aminokyselinami lysinem a 6AKK. Uvažované interakce by měly být elektrostatické interakce mezi zápornými karboxylovými skupinami na HA a protonizovanými amino skupinami na aminokyselinách. Snížení množství kladně nabitých částic v roztoku má za následek zvýšení celkového pH roztoků HA s aminokyselinami oproti vodným roztokům samotných aminokyselin. Mírný nárůst pH může být způsoben i přidavkem samotné HA do roztoku. Z následujících grafů je patrné, že k těmto interakcím dochází. Největší nárůst pH roztoku HA s protonizovanými aminokyselinami oproti vodným roztokům aminokyselin je v oblasti nízkých koncentrací lysinu i 6AKK. Pro lysin se to týká koncentrací $0,9 - 4 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ u 6AKK je rozdíl patrný pro koncentrace $0,9 - 7 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$. U vyšších koncentrací není rozdíl natolik markantní, protože dochází k nasycení většiny karboxylových skupin na HA – při vyšších koncentracích jsou pak v roztoku z nabitých částic přítomny pouze volné molekuly aminokyselin. Průběh pH pak vykazuje v obou případech klesající trend s přidavkem protonizované aminokyseliny. To je způsobeno poměrně nízkým pH protonizovaných aminokyselin díky přidavkům HCl. Pro lysin je tento pokles větší, protože byla použita HCl s vyšší koncentrací na protonizaci oproti 6AKK.



Obrázek 10: Závislost relativního pH roztoku HA s protonizovaným lysinem v závislosti na

$$\frac{c_{\text{lys}}}{c_{\text{HA}}}$$

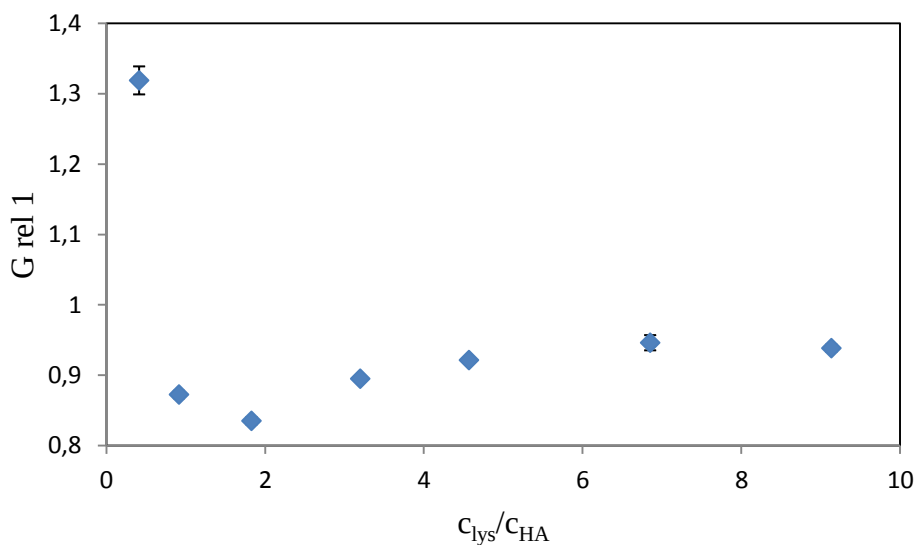


Obrázek 11: Závislost relativního pH roztoku HA s protonizovanou 6AKK v závislosti na

$$\frac{C_{6AKK}}{C_{HA}}$$

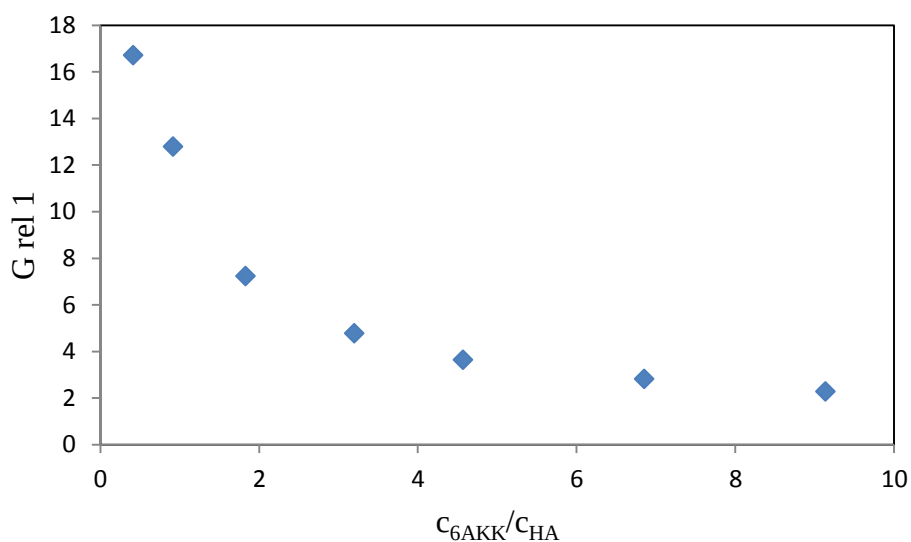
4.2. Konduktometrie

Z hodnot vodivostních výsledků jsme schopni určit přítomnost interakcí mezi HA a lysinem/6AKK, ale zároveň i míru velikosti těchto interakcí. Díky porovnání vodivostí roztoků HA s AMK a vodivostí vodných roztoků aminokyselin samotných můžeme určit trend, který ve vodivosti nastává. U koncentrační řady HA s protonizovaným lysinem nastává pro relativní vodivost G_{rel1} nejprve výrazný pokles – nejmenší hodnoty dosahuje pro koncentraci lysinu $4 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$, poté dojde k menšímu nárůstu a víceméně ustálení hodnot. Výrazný pokles při koncentraci $2 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ může popisovat jistou hranici, od které dochází k zjišťovaným interakcím díky vhodnému sterickému uspořádání molekul. Tento trend je možno pozorovat na následujícím obrázku č. 12.



Obrázek 12: Relativní vodivost 1 roztoku HA s protonizovaným lysinem v závislosti na $\frac{c_{\text{lys}}}{c_{\text{HA}}}$

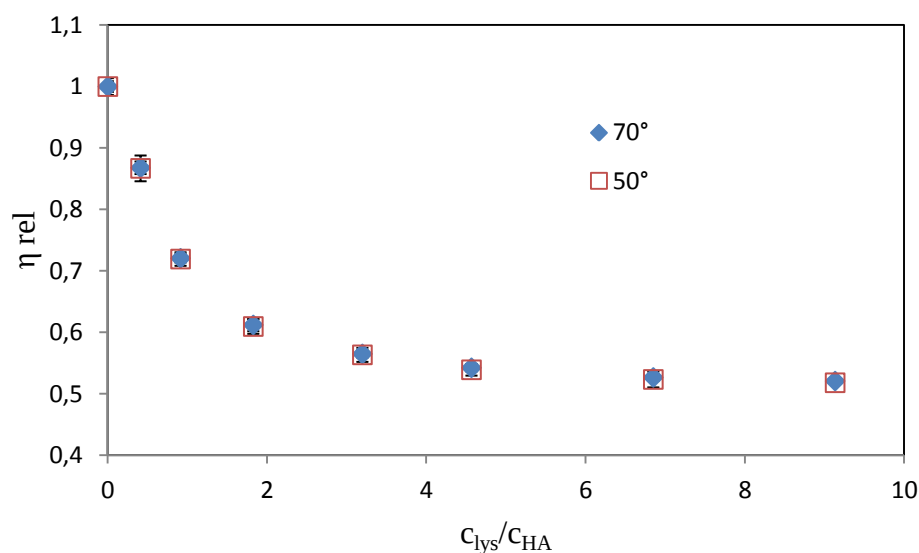
U koncentrační řady roztoku HA s protonizovanou 6-aminokapronovou kyselinou byla též relativní vodivost zanesena do grafů v závislosti na koncentraci. S každým přírůstkem 6AKK je patrný pokles vodivosti $G_{\text{rel } 1}$. Na protonizaci 6AKK byla využita HCl s podstatně nižší molární koncentrací – to má za následek nižší koncentraci volných iontů v roztoku. Na této vodivosti se tedy z velké části podílí vodivost samotné HA.



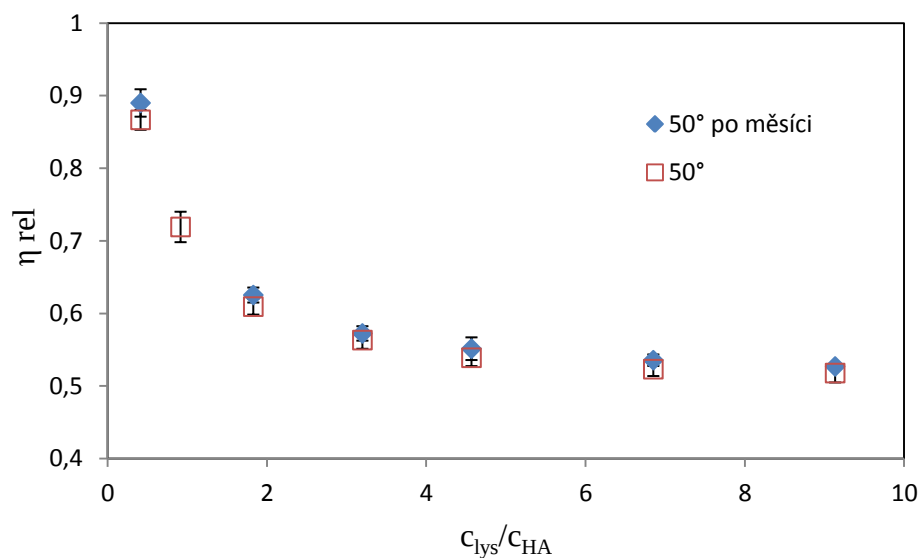
Obrázek 13: Relativní vodivost 1 roztoku HA s protonizovanou 6AKK v závislosti na $\frac{c_{\text{6AKK}}}{c_{\text{HA}}}$

4.3. Viskozimetrie

Přítomnost interakcí mezi HA a protonizovanými aminokyselinami je podmíněna poklesem viskozity v roztoku. Dochází k saturaci karboxylových skupin na molekule HA, což má za následek kontrakci molekul, zmenšení hydrodynamického objemu a snížení viskozity. Na následujících grafech je patrný pokles viskozity s přidavkem protonizovaných AMK, z čehož vyplývá, že k interakcím mezi karboxylovými skupinami na HA a protonizovanými aminokyselinami dochází. V grafech je zobrazena závislost relativní viskozity na koncentraci přidané aminokyseliny pro oba sklony kapiláry. Dále je v grafech znázorněna relativní viskozita koncentrační řady lysinu po jednom měsíci pro zjištění degradačních procesů. Ani po měsíci však nedošlo k výrazné změně viskozity roztoků.



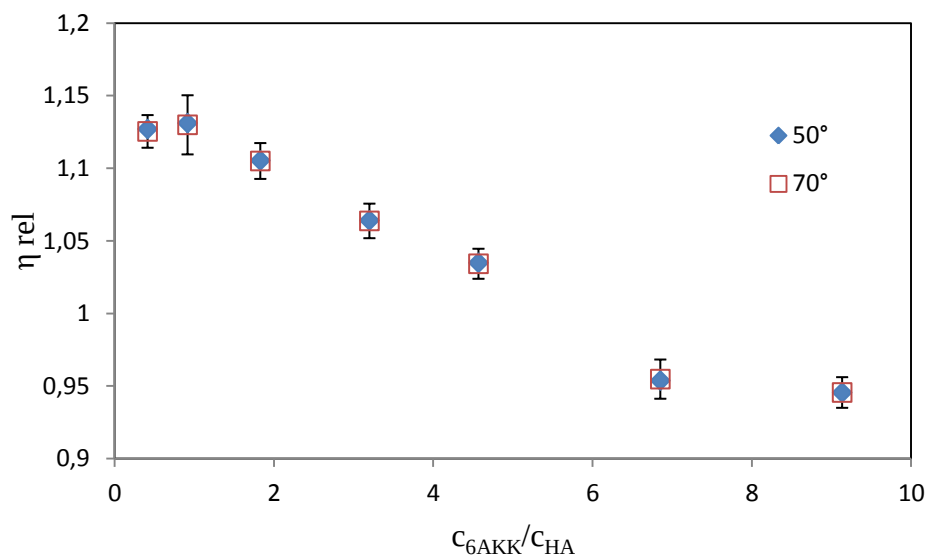
Obrázek 14: Závislost relativní viskozity roztoku HA s protonizovaným lysinem na $\frac{C_{lys}}{C_{HA}}$ pro sklon kapiláry 50° a 70°



Obrázek 15: Závislost relativní viskozity roztoku HA s protonizovaným lysinem po měsíci na

$$\frac{c_{\text{lys}}}{c_{\text{HA}}} \text{ pro sklon kapiláry } 50^\circ$$

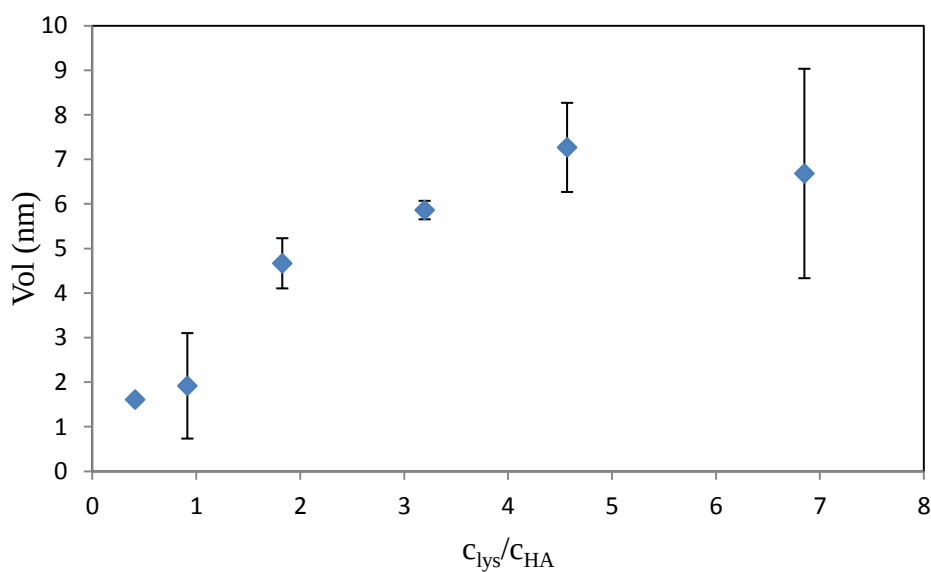
V případě relativní viskozity koncentrační řady HA s 6AKK je obdobně jako u lysinu patrný pokles viskozity. Na rozdíl od předchozí řady však není natolik markantní a dochází k němu pozvolně. Vypovídá to o tom, že u 6AKK nenastávají tolik silné interakce s nízkomolekulárním hyaluronanem jako v případě lysinu. V oblasti koncentrace 6AKK $2 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ nastává pro relativní viskozitu lokální maximum. To by mohlo být způsobeno nižším množstvím kladně nabitých částic v roztoku – interakce by pak nastávaly až od této určité koncentrace, kdy je již dostatek protonizovaných amino skupin v roztoku. Tato závislost je viditelná na následujícím grafu.



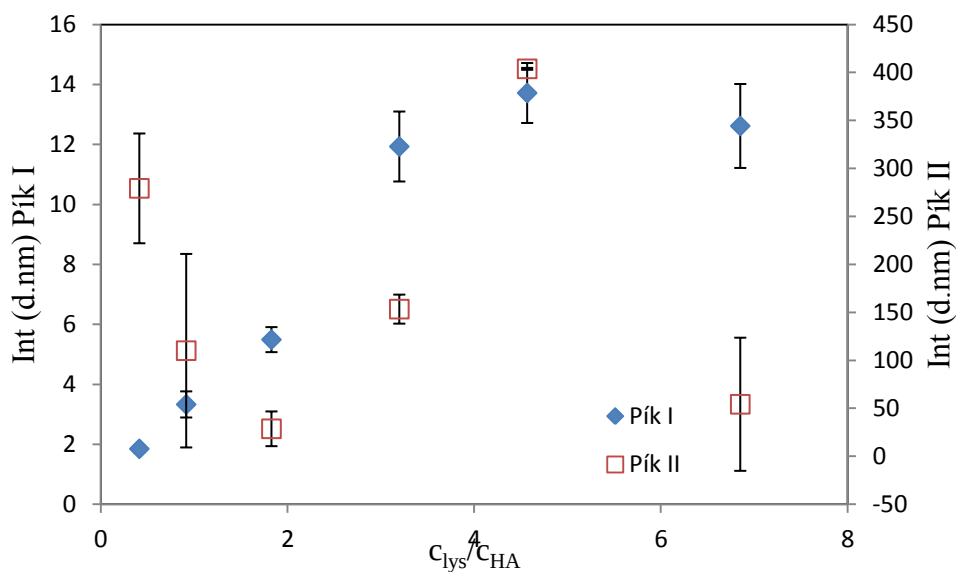
Obrázek 16: Závislost relativní viskozity roztoku HA s protonizovanou 6AKK na $\frac{C_{6AKK}}{C_{HA}}$

4.4. Dynamický rozptyl světla

První měření DLS bylo provedeno u koncentrační řady HA s lysinem bez přidavku elektrolytu. Několik roztoků vykazovalo vysoký index polydisperzity a přestože byly všechny roztoky filtrovány a odstředěny, objevovaly se při měření výrazně větší částice, než bylo očekáváno. Na následujícím grafu závislosti d_{vol} na $\frac{C_{lys}}{C_{HA}}$ je patrný rostoucí trend. S přidavkem protonizovaného lysinu tedy dochází ke zvětšování částic v roztoku.

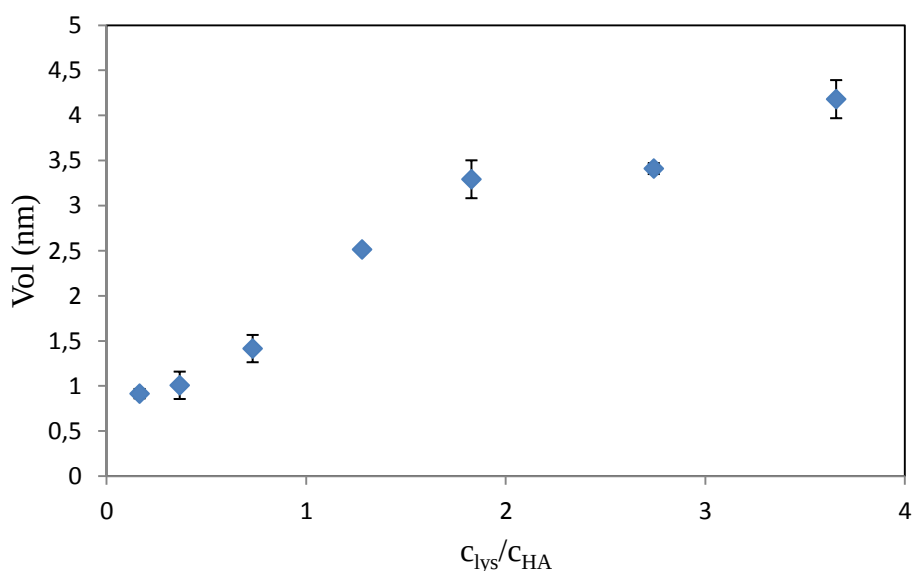


Obrázek 17: Závislost d_{vol} roztoku HA s protonizovaným lysinem na $\frac{C_{lys}}{C_{HA}}$



Obrázek 18: Závislost d_{int} roztoku HA s protonizovaným lysinem na $\frac{c_{lys}}{c_{HA}}$

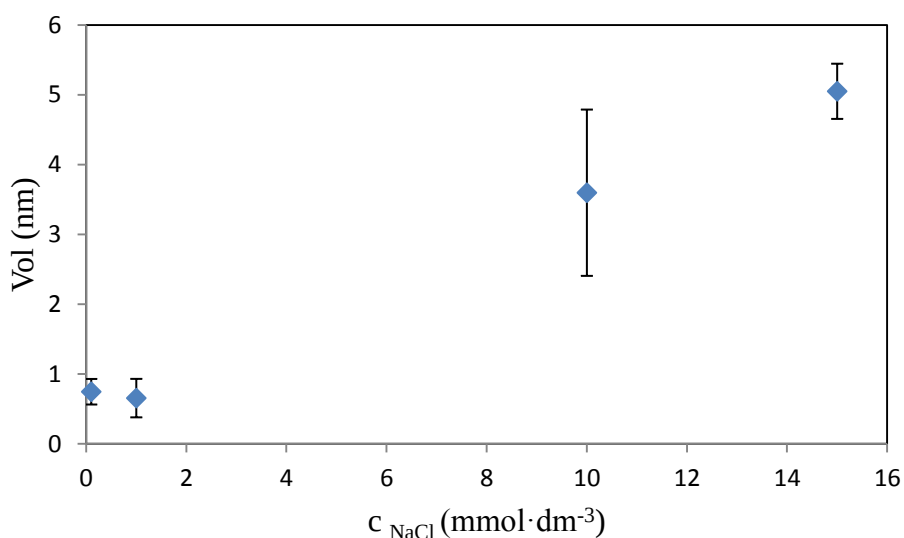
Druhým úkolem bylo zjistit míru interakcí HA s lysinem protonizovaným pouze do pH 0,25% kyseliny hyaluronové – hodnota pH 5,6. Při těchto měřeních se již neobjevovaly tolik odlehlé hodnoty. Velikost částic však byla podstatně menší. Přesto je vidět stále jasný rostoucí trend – viz následující graf.



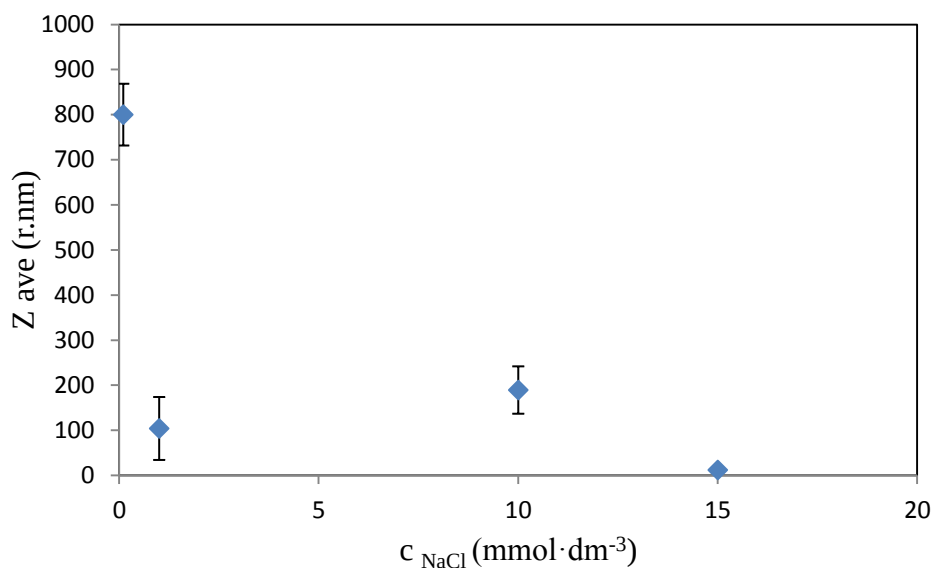
Obrázek 19: Závislost d_{vol} roztoku HA s protonizovaným lysinem do pH 5,6 na $\frac{c_{lys}}{c_{HA}}$

Software k přístroji Zetasizer nebyl schopen vyhodnotit korelační funkce jako dobré. Měřené vzorky byly vždy pro analýzu moc polydisperzní. Je možné, že jsou ve vzorku obsaženy moc velké částice či prach, který by ovšem měl být eliminován filtrací. Dále je možná změna konformace HA v roztoku mechanickým působením – HA může v roztoku vytvořit dlouhý řetězec, který lze mírným tlakem přefiltrovat a poté může zpět získat svou sbalenou podobu. Na obrázcích v příloze (Obr. 29 a Obr. 30) je možno porovnat korelační křivky roztoků bez přidaného elektrolytu a s jeho přidavkem.

Pro další koncentrační řadu lysinu bylo tedy provedeno měření čtyř roztoků HA s různou koncentrací NaCl – 0,1; 1,0; 10; 15 mmol·dm⁻³. Nejlépe reprodukovatelné výsledky vykazoval roztok HA s 15 mmol·dm⁻³ NaCl. S rostoucí iontovou silou v roztoku by mělo docházet postupně ke zmenšování částic v roztoku. Na následujících grafech je však patrné, že se jednotlivá kritéria neshodují. d_{vol} vykazuje opačný trend než ostatní kritéria – rostoucí velikost částic. Porovnání je zde provedeno s kritériem Z-average. V příloze viz Obr. 31 je vidět pro první intenzitní pík stejný trend jako pro Z-average. Je proto důležité hodnotit výsledky dle více kritérií zároveň.

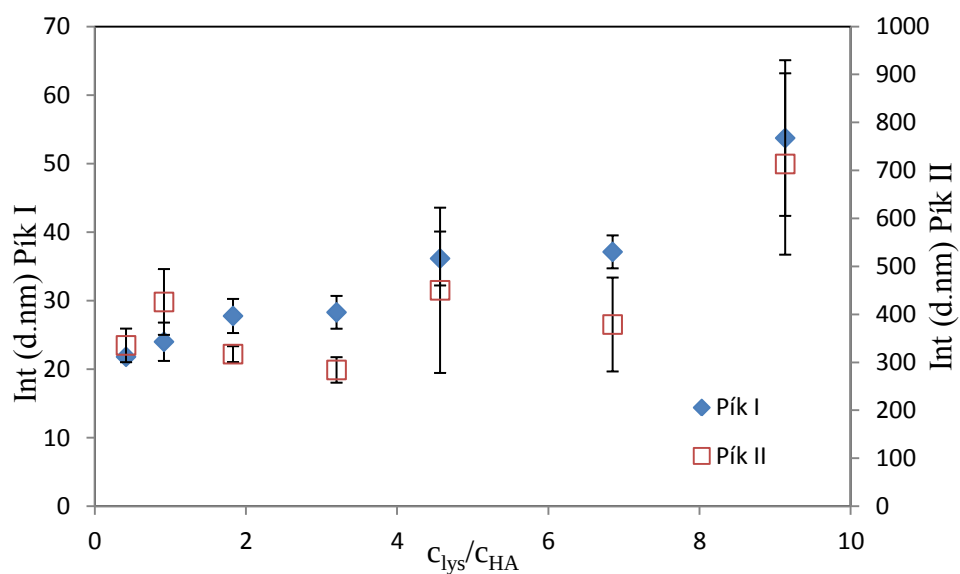


Obrázek 20: Závislost d_{vol} roztoku HA s NaCl na koncentraci NaCl



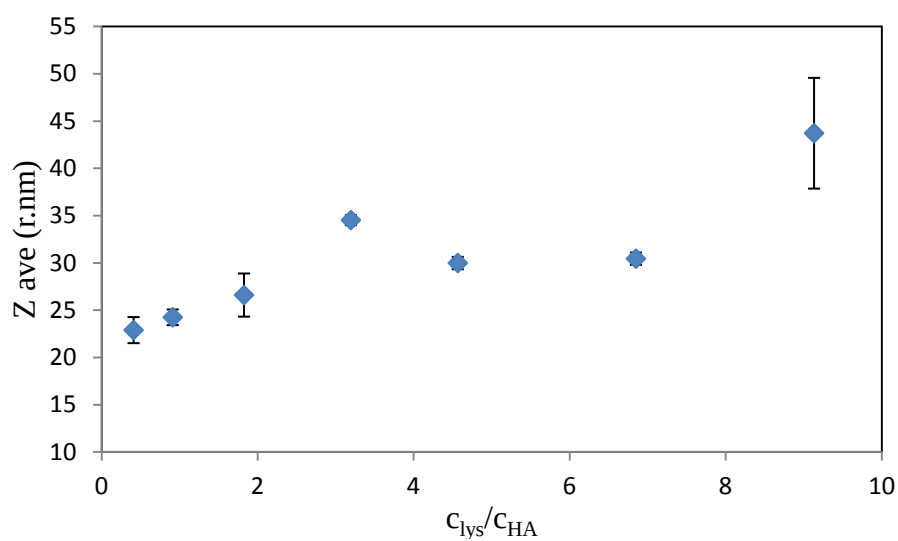
Obrázek 21: Závislost Z-average roztoku HA s NaCl na koncentraci NaCl

Pro hodnocení koncentrační řady HA s lysinem a $15 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ NaCl byl jako první vybrán parametr intenzity. Ve všech případech měření se objevují dva píky pro d_{int} . V případě této koncentrační řady je tento rozdíl vidět nejmarkantněji. První pík velikosti částic se pohybuje v řádu desítek nanometrů, druhý pík pak v řádu stovek jak je vidět na následujícím grafu. Procentuelně jsou v roztoku více zastoupeny částice z oblasti prvního píku, tedy ty o velikosti desítek nanometrů. Podstatně větší částice druhého píku pak přispívají do celkové intenzity zhruba ze 30%. Plocha jednotlivých píku je vidět na obrázku v příloze viz Obr. 31. Je pravděpodobné, že v částech roztoku jsou vytvořeny větší agregáty. Stále je patrný rostoucí trend ve velikosti částic s přidavkem lysinu.



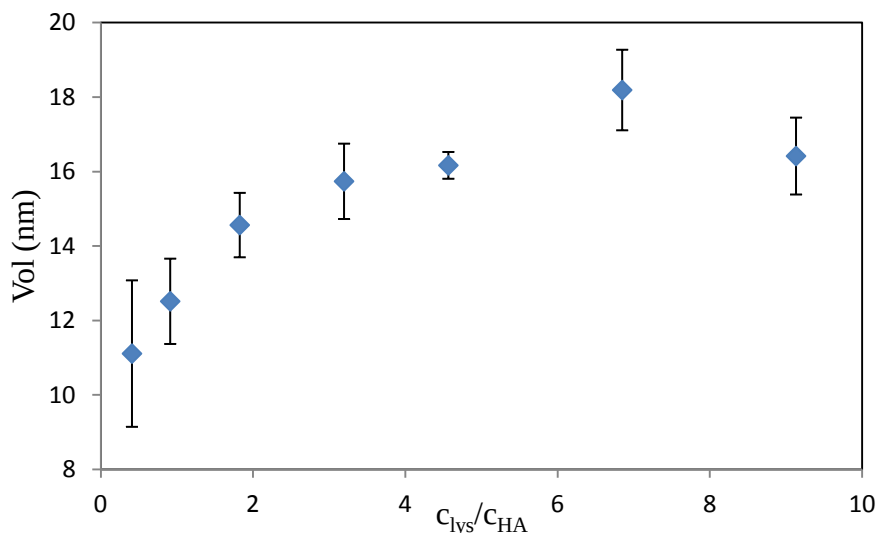
Obrázek 22: Závislost d_{int} roztoku HA s protonizovaným lysinem a $15 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3} \text{ NaCl}$ na

$$\frac{c_{lys}}{c_{HA}}$$



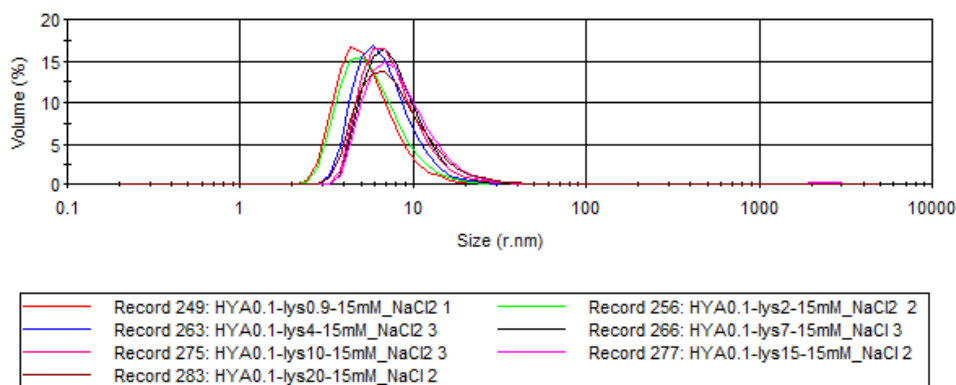
Obrázek 23: Závislost Z-average roztoku HA s protonizovaným lysinem a $15 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3} \text{ NaCl}$

$$\text{na } \frac{c_{lys}}{c_{HA}}$$



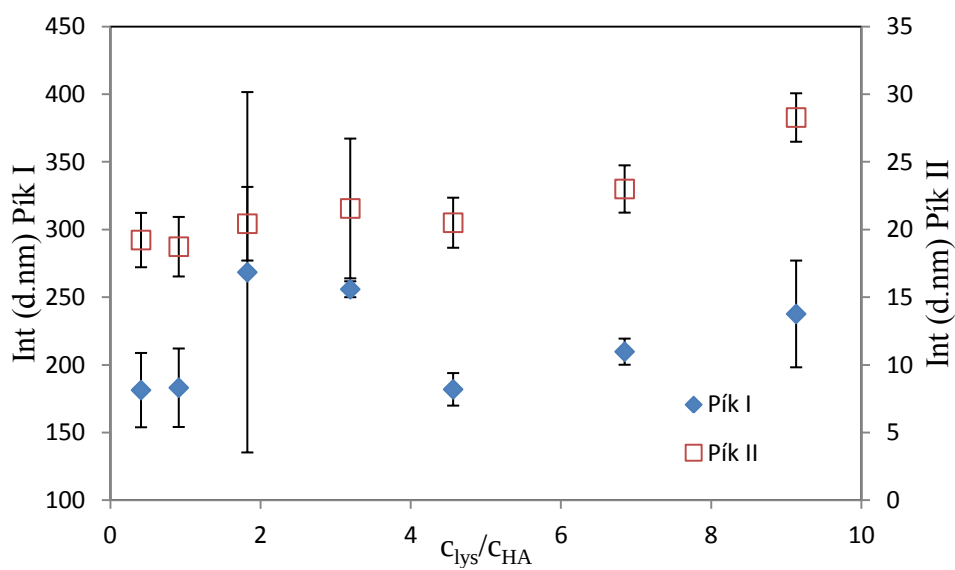
Obrázek 24: Závislost d_{vol} roztoku HA s protonizovaným lysinem a $15 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ NaCl na

$$\frac{c_{lys}}{c_{HA}}$$



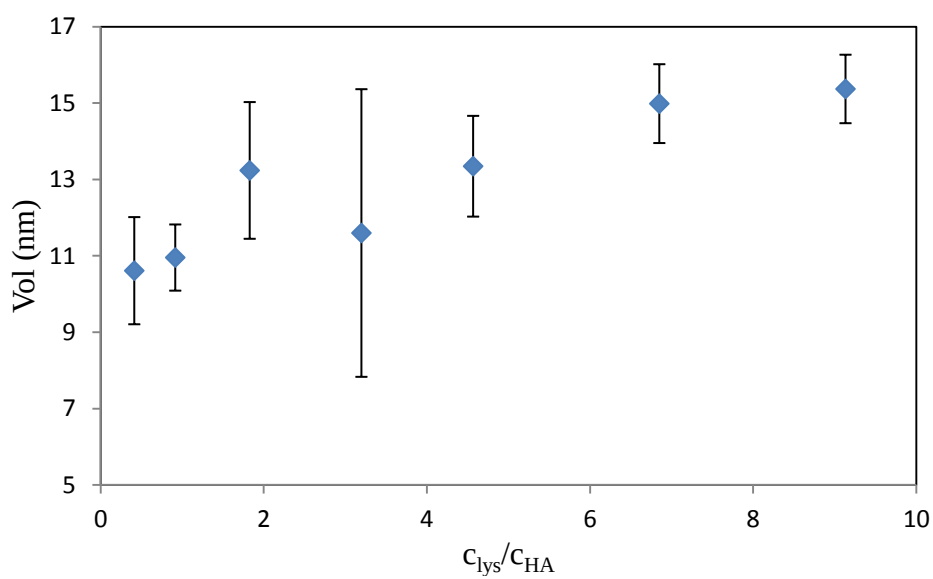
Obrázek 25: Závislost d_{vol} roztoku HA s protonizovaným lysinem a $15 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ NaCl – data získaná z přístroje

Poslední měřená koncentrační řada byly roztoky HA s lysinem protonizovaným do pH 6,1 (pH HA) s přidavkem $15 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ NaCl. Na hodnotách lze stále vidět jasný rostoucí trend velikosti částic dle objemu i intenzity. Jsou zde patrné opět dva píky intenzity. Rozdíl mezi velikostmi však již není natolik patrný. Tuto závislost lze vidět na následujícím grafu. Plocha těchto píků se víceméně u všech vzorků vyrovnala.



Obrázek 26: Závislost d_{int} roztoku HA s lysinem protonizovaným do pH 6,1 a $15 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$

$$NaCl \text{ na } \frac{c_{lys}}{c_{HA}}$$



Obrázek 27: Závislost d_{vol} roztoku HA s lysinem protonizovaným do pH 6,1 a $15 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$

$$NaCl \text{ na } \frac{c_{lys}}{c_{HA}}$$

5. ZÁVĚR

Cílem této práce bylo prostudovat informace o elektrostatických interakcích nízkomolekulární kyseliny hyaluronové s protonizovanými aminokyselinami lysinem a 6-aminokapronovou kyselinou. Ke zkoumání těchto interakcí bylo využito několika metod: pH-metrie, konduktometrie, viskozimetrie a dynamický rozptyl světla. V případě pH-metrie a konduktometrie byly hodnoty roztoků HA s AMK porovnány s roztoky čistých aminokyselin ve vodě. Viskozimetrie byla měřena u roztoků HA s AMK a velikost částic byla měřena pomocí DLS u roztoků HA s protonizovaným lysinem bez přídavku nízkomolekulárního elektrolytu, s lysinem protonizovaným do pH HA a s přídavkem NaCl.

Pomocí pH-metrie byl potvrzen vznik interakcí HA s protonizovanými aminokyselinami. Došlo ke zvýšení pH oproti roztoku s aminokyselinou ve vodě bez HA. Nejpatrnější rozdíl nastává v oblasti nízkých koncentrací $0,9-7 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ jak pro lysin tak pro 6AKK. Dochází ke snížení počtu kladně nabitých částic v roztoku pravděpodobně v důsledku tvorby elektrostatických párů mezi karboxylovými skupinami a aminoskupinami.

V případě měření vodivosti by se interakce mezi HA a protonizovanými aminokyselinami projevíly snížením vodivosti roztoků. Oproti měření vodivosti čistých aminokyselin ve vodě nastal opravdu prudký pokles viskozity převážně v oblasti nízkých koncentrací aminokyselin v roztoku HA. Pro lysin v oblasti vyšších koncentrací již nebyl rozdíl ve vodivosti nijak patrný pravděpodobně vysokou vodivostí samotného lysinu ve vodě a nasycením HA řetězce molekulami lysinu. U 6AKK nastalo zvýšení vodivosti celkového roztoku pravděpodobně z důvodu nízké vodivosti roztoku aminokyseliny – nejvyšší podíl vodivosti pak tvoří roztok HA. Pro nasycení HA 6-aminokapronovou kyselinou je potřeba přibližně dvojnásobná koncentrace oproti lysinu díky pouze jedné aminoskupině v řetězci.

Výsledky viskozimetrického měření prokázaly vznik interakcí mezi HA a protonizovanými aminokyselinami. S přídavkem aminokyselin do roztoku HA dochází k relativnímu poklesu viskozity celého systému. V případě nejvyšších měřených koncentrací $15-20 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ k poklesu již nedochází pravděpodobně díky nasycení karboxylových skupin HA amino skupinami protonizovaných aminokyselin.

Měření velikosti částic pomocí dynamického rozptylu světla bylo provedeno u několika druhů koncentračních řad HA s protonizovaným lysinem. Nejprve bylo provedeno měření koncentrační řady bez přídavku nízkomolekulárního elektrolytu, kde nastávaly poměrně velké odchylky při měření a přístroj často vyhodnocoval korelační křivky jako špatné díky vysokému indexu polydisperzity. Dále byla proměřena koncentrační řada lysinu, který byl protonizován pouze do pH 0,25%hm. HA. Výsledky již nevykazují tak velké množství chyb jako v předchozím případě. Nejvíce však byly zkoumány interakce u koncentračních řad s přídavkem NaCl – HA s protonizovaným lysinem a $15 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ NaCl a HA s lysinem protonizovaným do pH 0,1%hm HA a $15 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Ve všech případech je patrný rostoucí trend velikosti částic s přídavkem protonizovaného lysinu. Dle intenzity je možno pozorovat v roztocích vždy dva píky o různé velikosti částic. Je patrné, že tedy vznikají v roztoku i větší agregáty.

6. POUŽITÁ LITERATURA

- [1] HASCALL a LAURENT. Hyaluronan: Structure and Physical Properties. *GlykoForum* [online]. 1997, No. 1 [cit. 2013-04-27]. Dostupné z: <http://www.glycoforum.gr.jp/science/hyaluronan/HA01/HA01E.html>
- [2] Hyaluronic Acid. *Kaviskin* [online]. 2011 [cit. 2013-04-27]. Dostupné z: <http://www.kaviskin.com/info/hyaluronicacid.html>
- [3] SCOTT, J. E. Secondary and Tertiary Structure of Hyaluronan in Aqueous Solution. *Glycoforum* [online]. 1998, č. 2 [cit. 2013-04-27]. Dostupné z: <http://glycoforum.gr.jp/science/hyaluronan/HA02/HA02E.html>
- [4] THALBERG, Kyrre a Björn LINDMAN. Interaction between Hyaluronan and Cationic Surfactants. *The Journal of Physical Chemistry*. 1989, No. 4, s. 1478-1483.
- [5] PISÁRČIK, Martin, Toyoko IMAE, Ferdinand DEVÍNSKY, Ivan LACKO a Dušan BAKOŠ. Aggregation Properties of Sodium Hyaluronate with Alkanediyl- α,ω -bis(dimethylalkylammonium Bromide) Surfactants in Aqueous Sodium Chloride Solution. *Journal of Colloid and Interface Science*. 2000, č. 228, s. 207-212.
- [6] HERSLÖF, Asa, Lars-Olof SUNDELÖF a Katarina EDSMAN. Interaction between Polyelectrolyte and Surfactant of Opposite Charge. Hydrodynamic Effects in the Sodium Hyaluronate/Tetradecyltrimethylammonium Bromide/Sodium Chloride/Water System. *The Journal of Physical Chemistry*. 1992, No. 5, s. 2345-2348.
- [7] 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, 1-3. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0927775798008371>
- [8] PAVELKA, Karel. Kyselina hyaluronová v léčbě osteoartrózy. *Medical Tribune*. 2009, č. 2. Dostupné z: <http://www.tribune.cz/clanek/13792>
- [9] Lysin. *Datový standard MZ ČR* [online]. 2005 [cit. 2013-04-27]. Dostupné z: http://ciselniky.dasta.mzcr.cz/CD_DS3/hypertext/KPAAQ.htm
- [10] Lysine. *University of Maryland Medical Center* [online]. 2011 [cit. 2013-04-27]. Dostupné z: <http://www.umm.edu/altmed/articles/lysine-000312.htm>
- [11] VODRÁŽKA, Zdeněk. *Biochemie*. 2. oprav. vyd. Praha: Academia, 2002, Přer. str. ISBN 80-200-0600-1.
- [12] Aminocaproic acid - injection, Amicar. *MedicineNet.com: We Bring Doctors' Knowledge to You* [online]. 2011 [cit. 2013-04-27]. Dostupné z: http://www.medicinenet.com/aminocaproic_acid-injection/article.htm
- [13] Co je co v povrchové a koloidní chemii. BARTOVSKÁ, Lída a Marie ŠIŠKOVÁ. *Vysoká škola chemicko-technologická, Praha* [online]. 2005 [cit. 2013-04-27]. Dostupné z: http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_es-001/motor/main.obsah.html

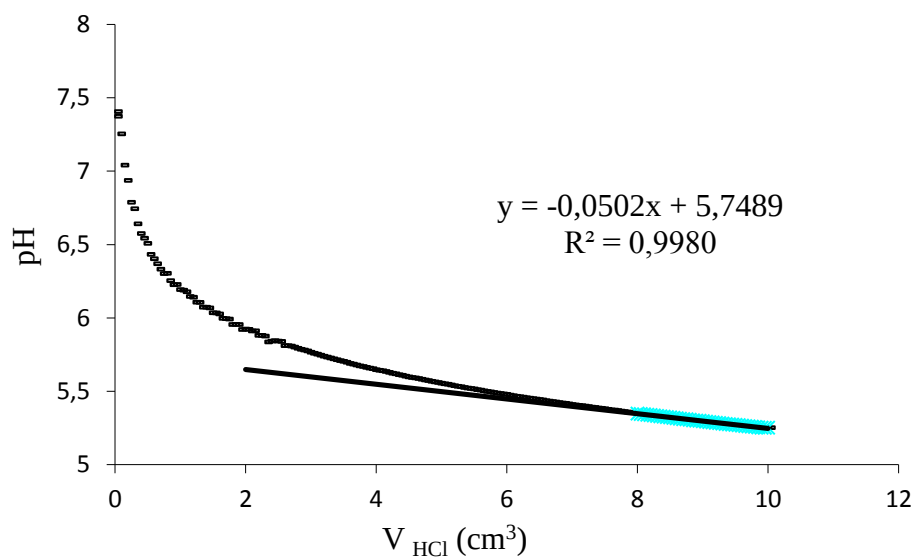
- [14] SOPOUŠEK, Jiří. *Základy reologie a reometrie kapalin* [online]. Brno: Masarykova univerzita, 2007 [cit. 2013-04-27]. Dostupné z: http://is.muni.cz/el/1431/jaro2007/C5760/um/2457585/2457594/Reologie_a_reometrie_kapalin.pdf
- [15] PEKAŘ, Miloslav, Martina KLUČÁKOVÁ, Michal VESELÝ a Michal ČEPPAN. *Fyzikální chemie a fotochemie*. první. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2003. ISBN 80-214-2470-2.
- [16] KLOUDA, Pavel. *Moderní analytické metody*. Ostrava: Pavel Klouda, 2003. ISBN 80-86369-07-2.
- [17] SOMMER, Lubomír. *Základy analytické chemie II*. Brno: VUTIUM, 2000. ISBN 80-214-1742-0
- [18] Dynamic Light Scattering (DLS or QELS = Quasi-elastic Light Scattering). *Wyatt Technology* [online]. [cit. 2013-04-27]. Dostupné z: http://www.wyatt.eu/index.php?id=dynamic_light_scattering&L=0%22onfocus%3D%22blurLink%28this%29%27%27
- [19] WATERS, Jason a Danielle LEISKE. *Characterization of Hyaluronic Acid with On-Line Differential Viscometry, Multiangle Light Scattering and Differential Refractometry*. U.S.A.: An Advanstar Publication, 2005.
- [20] M. MURPHY, Regina. Static and dynamic light scattering of biological macromolecules: what can we learn?. *Current Opinion in Biotechnology*. 1997, č. 1, s. 25-30.
- [21] GOLDBURG, W. I. Dynamic light scattering. *Am. J. Phys.* 1999, č. 12.
- [22] SHEEHAN, John a Andrew ALMOND. Hyaluronan: Static, Hydrodynamic and Molecular Dynamic Views. *Glycoforum* [online]. 2001, č. 21 [cit. 2013-04-27]. Dostupné z: <http://glycoforum.gr.jp/science/hyaluronan/HA21/HA21E.html#III>
- [23] *Handbook of polyelectrolytes and their applications*. Stevenson Ranch: American Scientific Publishers, 2002, 341 s. ISBN 1-58883-015-22.
- [24] ROURE, I., M. RINAUDO, M. MILAS a E. FROLLINI. Viscometric behaviour of polyelectrolytes in the presence of low salt concentration. *Polymer*. 1998, č. 22, s. 5441-5445.
- [25] FOUISSAC, E., M. MILAS, M. RINAUDO a R. BORSALI. Influence of the ionic Strength on the Dimensions of Sodium Hyaluronate. *Macromolecules*. 1992, č. 21, s. 5613-5617.
- [26] MALVERN INSTRUMENTS. *Zetasizer Nano Příručka pro uživatele*. 3. vyd. 2007.
- [27] ZEMAN, Jan. *Reologické studium interakcí vysokomolekulárního hyaluronanu a protonizovaných aminokyselin*. Brno, 2011. Bakalářská práce. Vysoké učení technické v Brně. Vedoucí práce Ing. Martin Chytil, Ph.D.
- [28] Statistické tabulky. *Veterinární a farmaceutická univerzita Brno* [online]. [cit. 2013-04-27]. Dostupné z: <http://cit.vfu.cz/statpotr/POTR/Teorie/tabulky.htm#Dixon>

- [29] PISÁRČIK, Martin, Dušan BAKOŠ a Michal ČEPPAN. Non-Newtonian properties of hyaluronic acid aqueous solution. *Colloids and Surfaces*. 1995, č. 97, s. 197-202.
- [30] TROJAN, Martin. *Viskozimetrie systémů hyaluronan-amfifil*. Brno, 2010. Bakalářská práce. Vysoké učení technické v Brně. Vedoucí práce Ing. Martin Chytil, Ph.D.
- [31] KOTOUČEK, M., J. SKOPALOVÁ a P. ADAMOVSKEÝ. *Příklady z analytické chemie* [online]. 2010 [cit. 2013-04-27]. Dostupné z: <http://ach.upol.cz/ucebnice/>

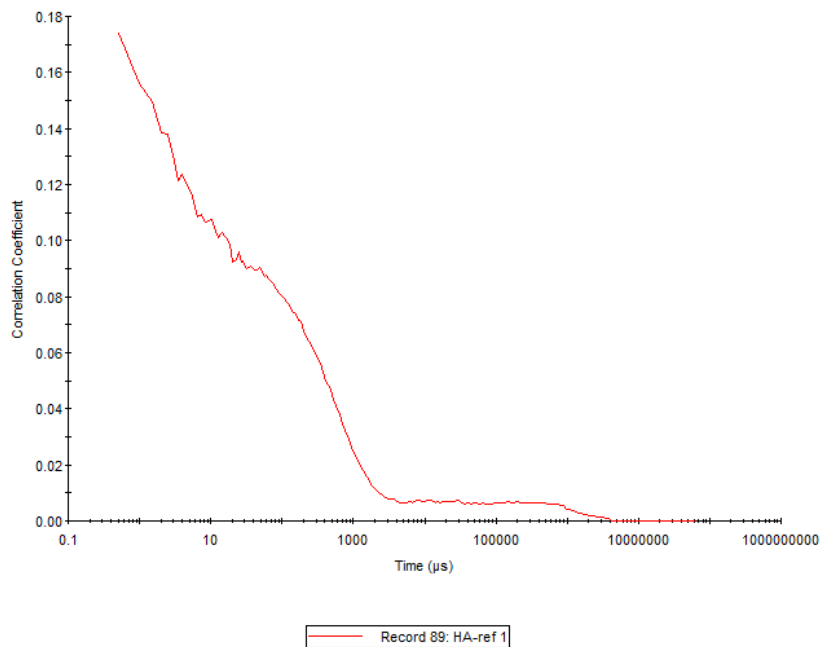
7. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

HA	hyaluronan, kyselina hyaluronová
6AKK	6-aminokapronová kyselina
Da	Dalton-jednotka molekulové hmotnosti ($1 \text{ Da} = 1,66 \cdot 10^{-27} \text{ kg}$)
CD44	specifický receptor pro kyselinu hyaluronovou
η	dynamická viskozita
τ	tečné napětí
ν	kinematická viskozita
r	poloměr
d	průměr
ρ	hustota
M	molární hmotnost
ε_r	relativní permitivita
ε_0	permitivita vakua
Q	elektrický náboj
π	Ludolfovo číslo
G	vodivost
a	aktivita
U	napětí
I	elektrický proud
R	elektrický odpor
c	koncentrace
F	síla
α	hladina významnosti pro Dean-Dixonův test
Q_n	kritické hodnoty pro Dean-Dixonův test
κ	konduktivita
S	plocha elektrod
l	vzdálenost elektrod
β	kompensační teplotní faktor vodivosti
η_{rel}	relativní viskozita
G_{rel1}	relativní vodivost 1
G_{rel2}	relativní vodivost 2
DLS	dynamický rozptyl světla

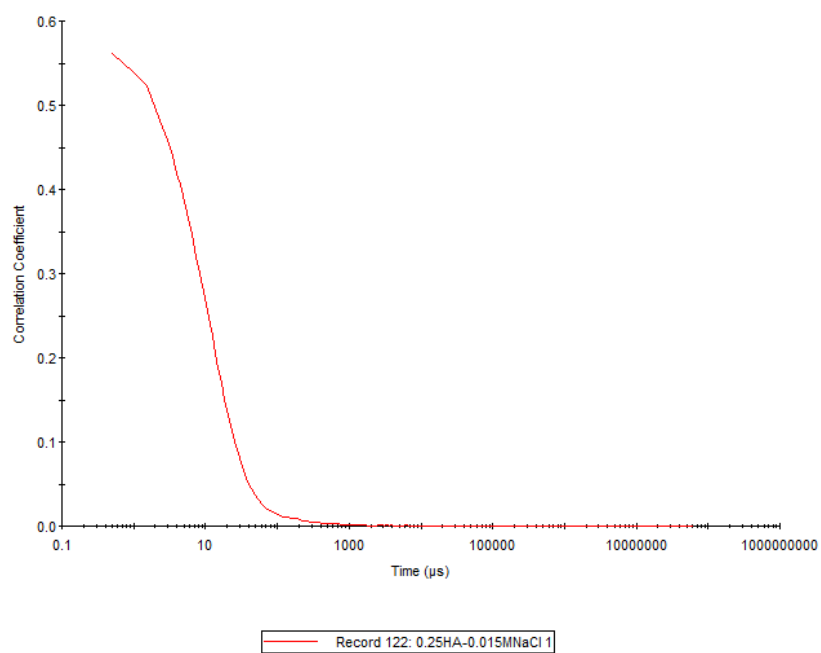
8. PŘÍLOHY



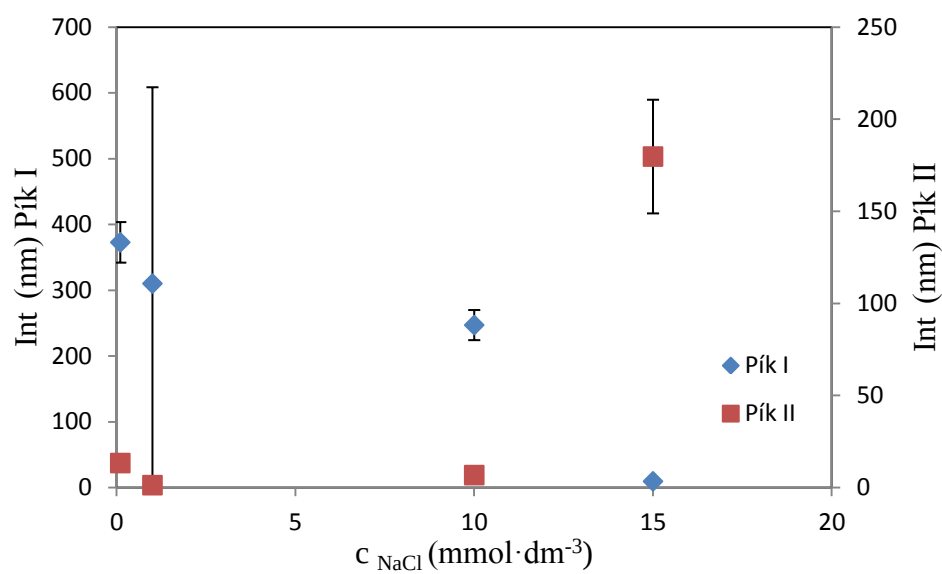
Obrázek 28: Titrací křivka $240 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ 6-aminokapronové kyseliny $0,1 \text{ M HCl}$ – zelené hodnoty pro nízké pH proloženy lineární regresí



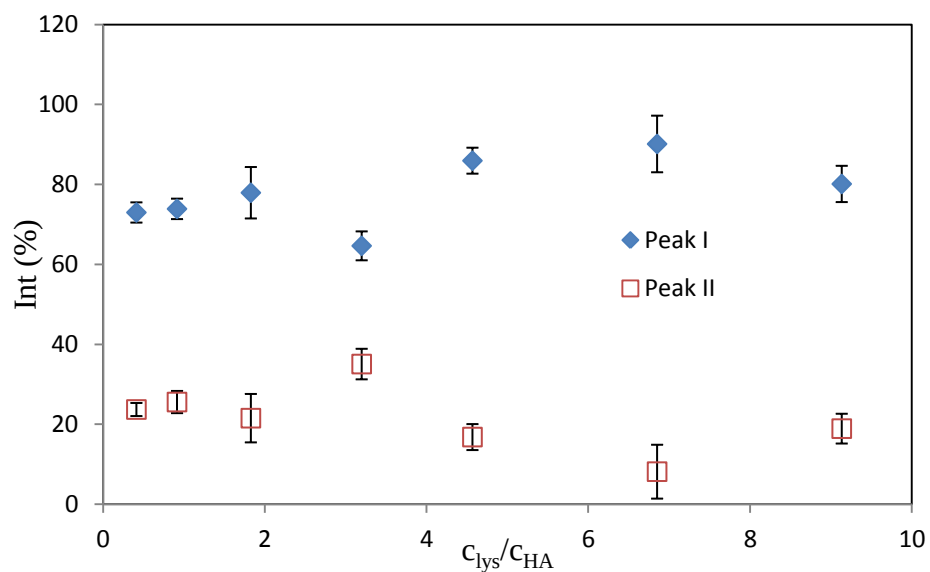
Obrázek 29: Korelační křivka pro roztok HA bez přidaného elektrolytu



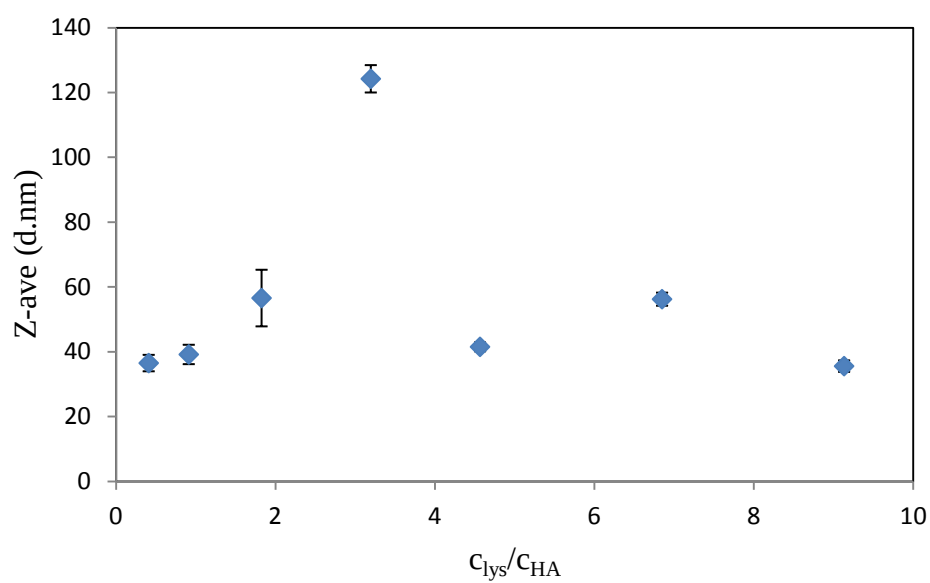
Obrázek 30: Korelační křivka pro roztok HA s přidáním elektrolytu



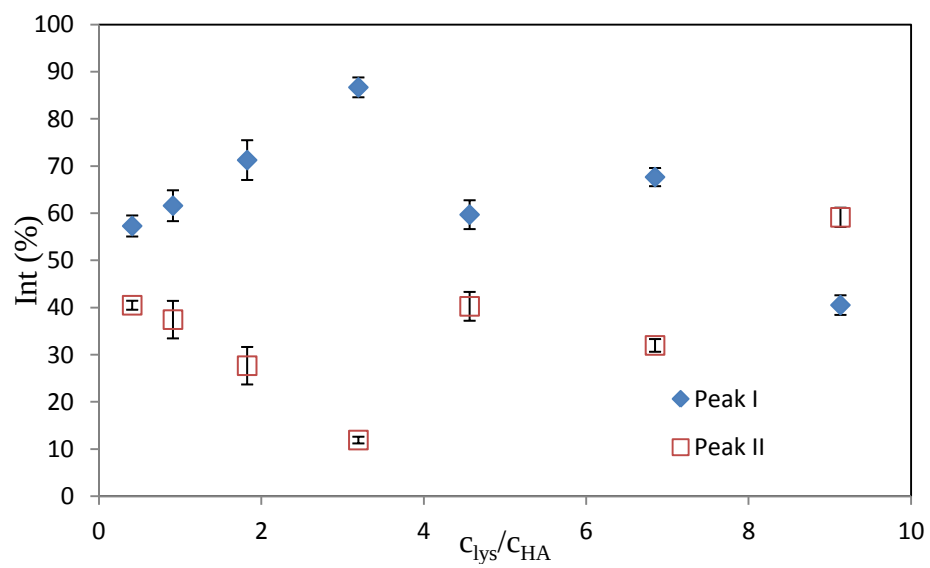
Obrázek 31: Závislost d_{int} roztoku HA s NaCl na koncentraci NaCl



Obrázek 32: Plocha jednotlivých píků intenzity roztoku HA s protonizovaným lysinem a 15 $\text{mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ NaCl v závislosti na $\frac{c_{\text{lys}}}{c_{\text{HA}}}$



Obrázek 33: Závislost Z-average roztoku HA s protonizovaným lysinem do pH 6,1 s přidavkem 15 $\text{mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ NaCl na $\frac{c_{\text{lys}}}{c_{\text{HA}}}$



Obrázek 34: Plocha jednotlivých píků intenzity roztoku HA s protonizovaným lysinem do pH

6,1 a s přidavkem $15 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3} \text{ NaCl}$ v závislosti na $\frac{c_{\text{lys}}}{c_{\text{HA}}}$