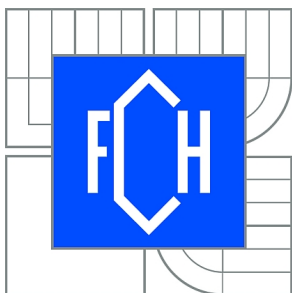




VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ

ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE

FACULTY OF CHEMISTRY

INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

STUDIUM ACIDOBAZICKÝCH A ELEKTROLYTICKÝCH VLASTNOSTÍ HYALURONANU V ROZTOKU

INVESTIGATION OF ACID-BASE AND ELECTROLYTIC PROPERTIES OF HYALUORNAN IN
AQUEOUS SOLUTIONS

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. ŠÁRKA SUCHÁ

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. MARTIN CHYTIL, Ph.D.

BRNO 2015



Vysoké učení technické v Brně
Fakulta chemická
Purkyňova 464/118, 61200 Brno 12

Zadání diplomové práce

Číslo diplomové práce:	FCH-DIP0860/2014	Akademický rok: 2014/2015
Ústav:	Ústav fyzikální a spotřební chemie	
Student(ka):	Bc. Šárka Suchá	
Studijní program:	Spotřební chemie (N2806)	
Studijní obor:	Spotřební chemie (2806T002)	
Vedoucí práce	Ing. Martin Chytil, Ph.D.	
Konzultanti:		

Název diplomové práce:

Studium acidobazických a elektrolytických vlastností hyaluronanu v roztoku

Zadání diplomové práce:

1. Prostudovat acidobazické chování hyaluronanu ve vodných roztocích při proměnlivé iontové síle
2. Určení disociační konstanty hyaluronanu
3. Sledování vlivu použitých činidel na případnou degradaci hyaluronanu
4. Prostudovat elektrolytické chování hyaluronanu v roztoku pomocí konduktometrických titrací

Termín odevzdání diplomové práce: 11.5.2015

Diplomová práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu a v elektronické formě vedoucímu diplomové práce. Toto zadání je přílohou diplomové práce.

Bc. Šárka Suchá
Student(ka)

Ing. Martin Chytil, Ph.D.
Vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
Ředitel ústavu

V Brně, dne 30.1.2015

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
Děkan fakulty

ABSTRAKT

Diplomová práce se zabývá studiem acidobazického a elektrolytického chování roztoků hyaluronanu při různé iontové síle. Acidobazické chování hyaluronanu bylo studováno pomocí acidobazických titrací, které byly prováděny dvěma různými způsoby, kyselou a zásaditou acidobazickou titrací. Z výsledků acidobazických titrací byly vyhodnocovány disociační konstanty při různé iontové síle při nulovém stupni disociace a při 50% stupni disociace. Výsledné disociační konstanty získané z kyselých acidobazických titrací se pohybovaly mezi hodnotami 3,0 a 3,6. Disociační konstanty, které byly získány ze zásaditých acidobazických titrací, nemají velkou vypovídací hodnotu, protože jejich hodnoty jsou daleko vyšší, než byly očekávané hodnoty. Aby bylo acidobazické chování roztoků hyaluronanu kompletní, byla provedena studie degradace hyaluronanu při acidobazické titraci. Elektrolytické chování roztoků hyaluronanu bylo studováno pomocí konduktometrických titrací ve třech různých prostředích.

ABSTRACT

This diploma thesis deals with acid-base and electrolytic behavior of hyaluronan solutions at different ionic strength. Acid-base behavior of hyaluronan was investigated by acid-base titrations which were carried out with two different methods, acid and alkaline acid-base titration. Dissociation constants at different ionic strength at zero degree of dissociation and at 50% degree of dissociation were evaluated from the results of acid-base titrations. Dissociation constants obtained from acid acid-base titrations have values between 3,0 and 3,6. Dissociation constants obtained from alkaline acid-base titrations are not very informative because their values are much higher than the expected values. The study of degradation of hyaluronan during acid-base titration was performed to complete study of acid-base behavior. Electrolytic behavior of hyaluronan solution was performed by conductometric titrations in three different environments.

KLÍČOVÁ SLOVA

Kyselina hyaluronová, acidobazická titrace, studium degradace, konduktometrická titrace, vliv iontové síly, disociační konstanta

KEYWORDS

Hyaluronic acid, acid-base titration, study of degradation, conductometric titration, effect of ionic strength, dissociation constant

SUCHÁ, Š. Studium acidobazických a elektrolytických vlastností hyaluronanu v roztoku. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2015. 73 s. Vedoucí diplomové práce Ing. Martin Chytil, Ph.D.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Diplomová 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 zde poděkovala vedoucímu mé diplomové práce Ing. Martinu Chytlovi, Ph.D. za trpělivost při konzultacích, vstřícnost, připomínky a za čas, který mi věnoval. Dále bych ráda poděkovala rodině za podporu během celé doby studia.

Obsah

1	Úvod	7
2	Současný stav řešené problematiky	8
2.1	Kyselina hyaluronová	8
2.1.1	Úvod	8
2.1.2	Sekundární a terciární struktura a struktura v roztoku	8
2.1.3	Výskyt, úloha v organismu a metabolismus	9
2.1.4	Výroba a použití	10
2.2	Polyelektrolyty	10
2.2.1	Úvod	10
2.2.2	Dělení polyelektrolytů	12
2.3	Potenciometrie	12
2.3.1	Úvod	12
2.3.2	Skleněná elektroda	13
2.4	Volumetrická analýza	14
2.4.1	Úvod	14
2.4.2	Titrace polyelektrolytů	14
2.5	Konduktometrie	19
2.5.1	Úvod	19
2.5.2	Stanovení disociační konstanty slabé kyseliny	20
2.5.3	Vodivost polyelektrolytů	21
2.6	Reologie	23
2.6.1	Úvod	23
2.6.2	Newtonské a nenewtonské kapaliny	24
2.6.3	Měření viskozity	25
2.6.4	Reologie polyelektrolytů	25
2.7	SEC-MALLS	26
2.7.1	Rozměrově vylučovací chromatografie	26
2.7.2	Multi-angle laser light scattering	28
2.7.3	SEC-MALLS polyelektrolytů	29
3	Experimentální část	30
3.1	Použité chemikálie	30
3.2	Použité metody	30
3.2.1	Příprava roztoků	30
3.2.2	Acidobazické titrace	31
3.2.3	Studium degradace	31
3.2.4	Konduktometrické titrace	33
3.3	Zpracování dat	34

3.3.1	Acidobazické titrace	34
3.3.2	Studium degradace	35
3.3.3	Konduktometrická titrace	36
4	Výsledky a diskuze	39
4.1	Acidobazické titrace	39
4.2	Studium degradace	47
4.2.1	Reometrie	47
4.2.2	SEC-MALLS	52
4.3	Konduktometrické titrace	57
5	Závěr	61
6	Seznam použitých zdrojů	63
7	Seznam použitých zkratk a symbolů	66
8	Přílohy	69

1 ÚVOD

V roce 1934 Karl Mayer a John Palmer objevili polysacharid, který pojmenovali kyselina hyaluronová. Dalším studiem bylo zjištěno, že kyselina hyaluronová se v lidském organismu běžně vyskytuje, především v kůži, pojivových tkáních, očním sklivci nebo v synoviální tekutině. Je to tedy pro lidský organismus známá látka a lidské tělo ji umí odbourávat. Kyselina hyaluronová má neobvyklé vlastnosti a díky nim si našla široké uplatnění v mnoha odvětvích. Její hydrofilní schopnost je využívána v organismu na hydrataci tkání, ale lze ji využít v kosmetice nebo například při očních operacích, kdy zabraňuje vysušení oka. Relativně novou metodou, kde se kyselina hyaluronová využívá, je takzvané mokré hojení. Kyselina hyaluronová zde nejen udržuje vlhké prostředí díky své hydrofilnosti, ale také přispívá k hojení rány, protože je schopná vyvolat imunitní reakci. Další zajímavou vlastností je viskoelasticita, díky které kyselina hyaluronová obsažená v synoviální tekutině tlumí nárazy při chůzi a zabraňuje tak opotřebení kloubu. Z tohoto důvodu se kyselina hyaluronová hojně využívá v léčbě osteoporózy. Studiemi bylo také prokázáno, že se kyselina hyaluronová vyskytuje v okolí rakovinotvorných buněk. Tohoto faktu by se mohlo využít při vývoji léčiva na rakovinu, kde by se kyselina hyaluronová mohla využít jako cílený distributor cytostatik.

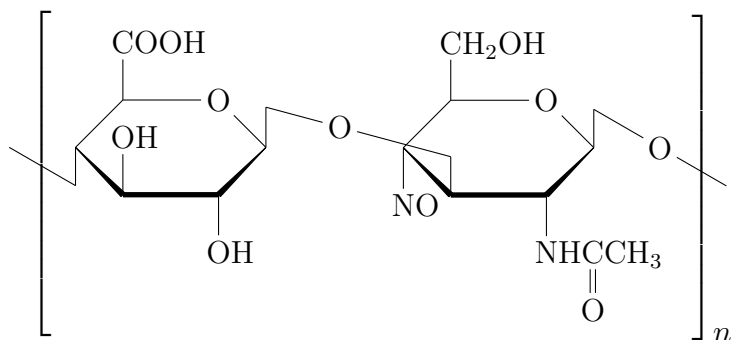
Kyselina hyaluronová ve své struktuře obsahuje kromě záporně nabitě karboxylové skupiny také hydrofobní oblast o délce oktanové kyseliny, což jí dává jedinečné chování ve vodném roztoku. Cílem této práce je tedy prozkoumat acidobazické a elektrolytické chování kyseliny hyaluronové ve vodných roztocích při různých iontových silách. Protože se kyselina hyaluronová řadí mezi slabé polyelektrolyty, bude se tato práce také zabývat stanovením disociační konstanty kyseliny hyaluronové a vlivem iontové síly na disociační konstantu.

2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

2.1 Kyselina hyaluronová

2.1.1 Úvod

Kyselina hyaluronová je v přírodě se vyskytující lineární polysacharid. Řadí se mezi glykosaminoglykany a v této skupině patří mezi strukturně nejjednodušší. Jako jediná z glykosaminoglykanů není kovalentně vázaná s proteinem, není vyráběná v Golgiho aparátu a není sulfátovaná. [1] Poprvé byla popsána Karlem Mayerem a Johnem Palmerem v roce 1934, kteří ji izolovali z očního sklivce skotu. Dvacet let po tomto objevu byla určena její přesná struktura. Základní stavební jednotku tohoto polymeru tvoří opakující se disacharidová jednotka složená z D-glukuronové kyseliny a D-N-acetylglukosaminu spojených střídající se $\beta(1\rightarrow4)$ a $\beta(1\rightarrow3)$ glykosidickou vazbou. [2, 3] Počet opakujících se disacharidových jednotek v molekule kyseliny hyaluronové může být až 10 000 a více. Průměrná délka jedné disacharidové jednotky je 1 nm a molekulární hmotnost $400 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, takže molekula kyseliny hyaluronové obsahující 10 000 disacharidových jednotek by v nataženém stavu měla $10 \mu\text{m}$ a molekulovou hmotnost 4 miliony $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$. [2] Za fyziologických podmínek nesou všechny glukuronové jednotky v disociovaném stavu záporný náboj, který bývá kompenzován kationty, nejčastěji Na^+ , K^+ , Ca^{2+} a Mg^{2+} . [4]



Obrázek 1: Struktura kyseliny hyaluronové

2.1.2 Sekundární a terciární struktura a struktura v roztoku

Řetězec kyseliny hyaluronové obsahuje dva druhy spojů. Prvním jsou monosacharidové jednotky, které jsou relativně tvarově stabilní. Druhým druhem spojení jsou glykosidické vazby mezi těmito glukózovými jednotkami, které jsou tvořeny atomem kyslíku připojeným ke dvěma glykosidickým jednotkám. Tato vazba připomíná tvar písmene V. Dřívější výpočty a modely, které dokázaly, že glykosidické substituenty nemohou dosáhnout všech možných konfigurací, byly potvrzeny nukleární magnetickou rezonancí. [4] Ve studiích bylo pomocí rentgenové difrakce dokázáno, že struktura kyseliny hyaluronové závisí na prostředí, zejména na protiiontech, vlhkosti vláken a pH. Levotočivá trojitá a čtyřikrát zatočená šroubovice byla pozorována v přítomnosti draselných, sodných a vápenatých protiiontů. V přítomnosti rubidných a cesiových protiiontů byla objevena čtyřnásobná

dvoušroubovice a při pH rovno 2 dvojité šroubovice. V novějších studiích, při kterých byla použita ke studiu struktury kyseliny hyaluronové nukleární magnetická rezonance a počítačem vytvořené modely, bylo zjištěno, že kyselina hyaluronová má tvar zkrácené čtyřnásobné šroubovice. [6]

Hlavní řetězec kyseliny hyaluronové je tvořen glukózovými jednotkami, na které jsou navázány různé skupiny atomů, např. karboxylové nebo hydroxylové. Tyto skupiny jsou uspořádány tak, že prostorově objemnější a zároveň polární skupiny upřednostňují ekvatoriální pozici, zatímco prostorově malé atomy vodíku obsazují axiální pozici, která je stericky méně výhodná. Celé toto uspořádání je energeticky velmi stabilní. [2] Důsledkem tohoto uspořádání atomů vodíku je vznik hydrofobní části řetězce, jehož délka je přibližně stejné délky jako oktanová kyselina. Kyselina hyaluronová má amfifilní vlastnosti, protože v řetězci obsahuje jak hydrofobní, tak hydrofilní části. Ve vodném prostředí dochází ke shluknutí hydrofobních částí řetězce, aby došlo k omezení styčné plochy s rozpouštědlem, a toto shluknutí přispívá ke stabilizaci dvojité šroubovice. [4] Axiální atomy vodíku, které tvoří nepolární část, jsou tedy uvnitř šroubovice a na povrchu ve styku s vodou nalezneme polární skupiny. Molekula kyseliny hyaluronové tvoří v roztoku rozlehlou spirálovitou strukturu a zaujímá velkou oblast. [2] Celá struktura kyseliny hyaluronové je stabilizována vodíkovými můstky. Vodíkové můstky vznikají mezi acetylamidovou skupinou a karboxylovou skupinou. V nevodném prostředí tato vazba vede přímo, ale ve vodném se jí účastní i molekula vody. Dále mohou vznikat vodíkové vazby mezi hydroxylovými skupinami a acetylamidovou skupinou nebo kyslíkem v glukuronové jednotce. [4]

2.1.3 Výskyt, úloha v organismu a metabolismus

V lidském těle a tělech obratlovců je kyselina hyaluronová všudypřítomná, i když jen v relativně malém množství. Dále se vyskytuje v kapsulích některých bakterií, ale naopak úplně chybí v houbách, rostlinách a hmyzu.

V lidském těle je nejvíce kyseliny hyaluronové obsaženo v synoviální tekutině, pupěční šňůře a očním sklivci. Přibližně polovina kyseliny hyaluronové, která se vyskytuje v lidském těle, je v kůži, převážně v mezibuněčném prostoru, kde její koncentrace může dosáhnout až $2,5 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$. Kyselina hyaluronová má schopnost zadržovat vodu ve tkáních a tím měnit kožní objem a stlačitelnost. Kyselina hyaluronová obsažená v kůži je schopna zachycovat volné radikály vytvořené ultrafialovým slunečním zářením. V synoviální tekutině vysoká koncentrace vysokomolekulové kyseliny hyaluronové poskytuje potřebnou lubrikaci pro klouby, absorbuje nárazy, omezuje tření způsobené pohybem kostí a minimalizuje opotřebení kloubů. Tuto funkci může plnit díky svým viskoelastickým vlastnostem.

Poznaček z roku 1981, že se kyselina hyaluronová vyskytuje v malém množství v krevním oběhu, vyvolal vlnu otázek po jejím původu. Nedlouho poté bylo zjištěno, že do krve přichází z periferních tkání pomocí lymfy. Pro zjištění, jak se kyselina hyaluronová z krve odbourává, byly králíkům, krysám a lidem intravenózně podány vzorky, u kterých byly acetylové skupiny označeny tritiovým vodíkem. Bylo zjištěno, že velká část byla odbou-

rána játry a označení se v oběhu objevilo po dvaceti minutách od podání jako tritiová voda. [2]

2.1.4 Výroba a použití

Výskyt kyseliny hyaluronové v mnoha tkáních obratlovců byl důvodem pro využití těchto tkání jako jejího zdroje. Protože se ale často vyskytuje ve formě komplexu spolu s dalšími biopolymery, musela být důkladně přečištěna. Ze zvířecích tkání se nejčastěji využívá kohoutí hřebínek kvůli vysokému obsahu kyseliny hyaluronové. Dalším způsobem získávání kyseliny hyaluronové je využití určitých kmenů streptokoků, například *Streptococcus zooepidemicus* a *Streptococcus equi*. Dalším z nadějných kandidátů na výrobu kyseliny hyaluronové je geneticky modifikovaný bakteriální kmen *Bacillus subtilis*. Tento kmen obsahuje gen ze *Streptococcus equisimilis*, který kóduje enzym pro syntézu kyseliny hyaluronové. Výhodou použití *Bacillus subtilis* je schopnost vyrobit kyselinu hyaluronovou s molekulární hmotností v rozmezí 1 100–1 200 kg·mol⁻¹, dá se snadno kultivovat a produkty vyrobené tímto mikroorganismem jsou bezpečné, protože získaly označení GRAS (generally recognized as safe). [1] Další výhodou *Bacillus subtilis* proti kmenům *Streptococcus* je, že kyselinu hyaluronovou vylučují přímo do okolního prostředí, takže není vázána s buňkou.

Typické viskoelastické vlastnosti spolu s nedostatkem imunogenicity a toxicity vedly k širokému používání kyseliny hyaluronové v kosmetice, farmaceutickém průmyslu, k hydrataci kůže, léčbě osteoartritidy, v oční chirurgii a hojení ran. [5]

2.2 Polyelektrolyty

2.2.1 Úvod

Jako polyelektrolyt je označován polymerní systém skládající se z makroiontů. Je to vlastně makromolekula, která obsahuje kovalentně vázané aniontové nebo kationtové skupiny a nekovalentně vázané nízkomolekulární protiionty. [7] Za určitých podmínek může dojít k disociaci kationtových nebo aniontových skupin, která má za následek vysoký náboj této makromolekuly, a tato molekula je nazývána jako polyiont. Ke každé disociované skupině musí být přiřazen jeden protiiont opačného náboje, než má polyiont. Pokud je náboj polyiontu $Q = Z \cdot e$ kde e je elementární náboj, pak je každý polyiont doprovázen Z protiionty. Polyelektrolyty s výjimkou proteinů jsou charakterizovány velmi kompaktním uspořádáním ionizovatelných skupin, kdy každý monomer má obvykle pouze jednu ionizovatelnou skupinu. Důsledkem toho mohou molekuly polyelektrolytu vykazovat značné elektrostatické interakce v roztoku. Všechny makromolekulární elektrolyty jsou rozpustnější v polárních rozpouštědlech než v nepolárních, protože makromolekuly interagují s polárními rozpouštědly daleko silněji než s nepolárními díky ionogenním skupinám. [8]

Bodový elektrický náboj q vyvolá podle Coulombova zákona ve svém okolí elektrický potenciál ϕ :

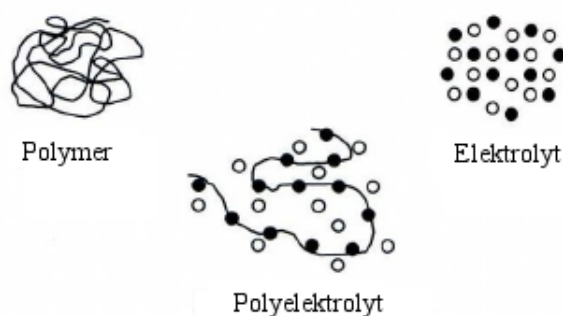
$$\phi = \frac{q}{4\pi \cdot \varepsilon_0 \cdot \varepsilon_r \cdot r} \quad (1)$$

kde r je vzdálenost od náboje, ε_0 permitivita vakua a ε_r relativní permitivita prostředí. V roztoku elektrolytu je jakýkoli iont, který zvolíme za centrální, obklopen jinými ionty. Uspořádání iontů udává rovnováha mezi elektrostatickými silami a účinek tepelného pohybu iontů. V blízkém okolí centrálního iontu se vyskytuje více iontů s opačným nábojem než se souhlasným. Toto rozložení iontů se nazývá iontová atmosféra. Ta není elektricky neutrální, ale vyznačuje se určitou prostorovou hustotou opačného náboje. Tato hustota se s rostoucí vzdáleností od centrálního iontu blíží k nule a strmost jejího poklesu je dána parametrem κ , který lze z Debye-Hückelovy teorie vyjádřit jako

$$\kappa = \left(\frac{2 \cdot N_A \cdot e^2 \cdot I}{\varepsilon_0 \cdot \varepsilon_r \cdot R \cdot T} \right)^{1/2} = B \cdot \sqrt{I} \quad (2)$$

Elektrostatický potenciál je v okolí centrálního iontu nižší, než by měl být podle rovnice 1, což je způsobeno opačně nabitou iontovou atmosférou, která odstiňuje náboj centrálního iontu.

Ve vodném prostředí disociuje pouze určitý podíl ionizovatelných skupin, a pokud není polyelektrolyt amfoterní, jedná se o náboje stejného druhu, které se odpuzují. Při velkém zředění jsou polyionty navzájem izolovány velkými oblastmi prostředí, ve kterém se mohou vyskytovat protiionty. Rozptýlením protiiontů v roztoku dojde ke snížení jejich odstiňujícího účinku a projeví se odpudivý efekt polyiontu jeho expanzí, tj. natažením jeho vlastních řetězců. Se zvyšováním koncentrace polyelektrolytu dochází ke zvyšování koncentrace protiiontů, které odstiňují odpudivé interakce mezi náboji polyiontu, a řetězce polyelektrolytu se začnou smršťovat. Pokud do roztoku přidáme nízkomolekulární elektrolyt, zvýšíme tak iontovou sílu roztoku a také odstiňující účinek odpudivých elektrostatických interakcí mezi stejně nabitými skupinami polyiontu. [9]



Obrázek 2: Schematické znázornění rozdílu mezi polymerem, elektrolytem a polyelektrolytem [8]

2.2.2 Dělení polyelektrolytů

Podle rozdílného stupně disociace polyelektrolytu ve vodném roztoku můžeme polyelektrolyty dělit na slabé a silné. Ionizovatelné skupiny silných polyelektrolytů jsou ve vodném roztoku plně disociované, zatímco u slabých jsou disociovány pouze částečně.

Nabité polymery mohou být rozděleny do dvou skupin, na polyelektrolyty a polyamfolyty. Polyelektrolyty obsahují náboje pouze jednoho druhu a bývají obklopeny mračenem protiiontů. Polyelektrolyty nabývají v roztocích bez přídavku soli nebo s nízkou koncentrací soli prodloužené konformace díky odpudivým silám. Polyamfolyty jsou látky, které obsahují jak kyselé tak zásadité skupiny a mohou být nabity buď negativně, nebo pozitivně. [8] Při vysokých hodnotách pH dochází u polyamfolytů k disociaci kyselých skupin, proto se polyiont chová jako polyaniont. Při nízkých hodnotách pH se protonizují zásadité skupiny a z polyamfolytu se stává polykationt. Při středních hodnotách pH dochází k disociaci jak kyselých tak zásaditých skupin a chování polyiontu závisí na tom, kterých skupin je disociovaných více. Při určitém pH dojde k vyrovnání nábojů, takže se molekula jeví jako neutrální. Tento stav se nazývá izoelektrický stav a pH, při kterém k tomuto jevu došlo, izoelektrický bod. V roztocích, jejichž pH je odlehlé od izoelektrického bodu, polyamfolyty expandují, protože na řetězci dochází k odpuzování vlivem disociovaných skupin se stejným nábojem. Pokud je pH roztoku rovno izoelektrickému bodu, dochází k přitahování skupin s opačným nábojem a řetězec se sbalí. [9]

Polyelektrolyty mohou být dále děleny podle podstaty ionogenních skupin na anionické a kationické. Anionické polyelektrolyty obsahují kyselé skupiny, například karboxylovou, která je obsažena například v arabské gumě nebo v alginové kyselině. Kationické polyelektrolyty mají ve struktuře zásaditou skupinu jako třeba amino skupinu. Látky s amino skupinou v protonizované formě se volně v přírodě nevyskytují, ale mohou být syntetizovány nebo mohou vzniknout z látky při jiném pH. Příkladem může být chitosan, který se při nižší hodnotě pH protonizuje a získává tak kladný náboj. [8]

2.3 Potenciometrie

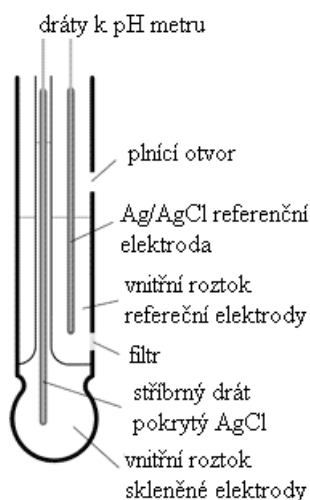
2.3.1 Úvod

Potenciometrie je elektroanalytická metoda založená na elektrodovém ději, kterým může být například oxidačně redukční reakce. Tento elektrodový děj je v rovnováze a faradaický proud je nulový. Potenciometrií můžeme zjistit množství sledované látky měřením potenciálového rozdílu mezi indikační a měrnou elektrodou.

2.3.2 Skleněná elektroda

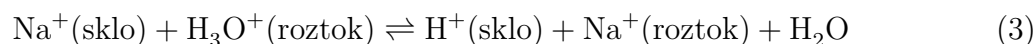
Skleněná elektroda je jedna z nejčastěji využívaných elektrod pro měření pH, protože ji lze použít v roztocích silně kyselých i zásaditých i v přítomnosti oxidačních nebo redukčních látek. Skleněná elektroda se řadí mezi iontově selektivní elektrody, protože vzniklý potenciál je důsledkem výměnných dějů. [10]

Skleněná směsná elektroda obsahuje jak skleněnou tak i referenční elektrodu a je zobrazena na obrázku 3. Částí, která je citlivá na pH, je tenká skleněná membrána ve tvaru kuličky na spodní části elektrody. [11]



Obrázek 3: Schéma skleněné směsné elektrody [12]

Při ponoření skleněné elektrody do roztoku začnou na jejím povrchu probíhat výměnné reakce a například ionty sodíku obsažené ve skle se budou vyměňovat za protony z roztoku podle rovnice:



V rovnováze potom platí

$$K_s = \frac{a_{\text{H}^+}^* \cdot a_{\text{Na}^+}}{a_{\text{Na}^+}^* \cdot a_{\text{H}^+}} \quad (4)$$

kde K_s je konstanta selektivity elektrody na jeden nebo druhý iont. Symbol * značí fázi skla.

Potenciál skleněné elektrody je definován vztahem

$$E_g = E_g^0 + \frac{RT}{F} \ln (a_{\text{H}_3\text{O}^+} + K_s a_{\text{Na}^+}) \quad (5)$$

kde R je molární plynová konstanta, F Faradayova teplota, T termodynamická teplota a a aktivita.

U skleněných elektrod z jednoduchých sodnovápenatých skel je měření v alkalických roztocích zatížené tak zvanou alkalickou chybou, která se projeví tím, že naměřená hodnota pH je ve skutečnosti menší než teoretická a korekci je třeba přičíst. V silně kyselých roztocích se projeví kyselá chyba, u které se korekce odečítá. [10]

2.4 Volumetrická analýza

2.4.1 Úvod

Volumetrická analýza je analýza, pomocí které můžeme učit neznámé množství stanovené látky. K roztoku dané látky přidáváme odměrný roztok, kterým je titrační činidlo se známou koncentrací účinné látky. Odměrný roztok přidáváme nejčastěji pomocí byrety až do dosažení bodu ekvivalence, což je okamžik, kdy je množství přidané účinné látky rovno chemicky ekvivalentnímu množství stanovené látky. V bodě ekvivalence je změna pH maximální. Bod ekvivalence je nutné určit co nejpřesněji, buď vizuálně, pomocí indikátorů, nebo s využitím instrumentální metody, například potenciometrické, amperometrické, konduktometrické nebo fotometrické metody. Grafickou podobou závislosti změny pH na množství přidaného titračního činidla je titrační křivka.

Podle druhu reakce, která probíhá mezi stanovovanou a účinnou látkou, lze volumetrickou analýzu rozdělit na metody založené na kombinaci iontů a na metody založené na přenosu elektronů. Mezi metody založené na kombinaci iontů patří acidobazické, srážecí a komplexotvorné metody. Reakce uskutečňující se při volumetrické analýze by měla probíhat dostatečně rychle a její průběh by se měl dát vyjádřit rovnicí s definovanými stechiometrickými koeficienty. [10]

2.4.2 Titrace polyelektrolytů

Hodnota pH slabých polykyselin je dána rovnicí:

$$pH = pK_a + \log \left(\frac{\alpha}{1 - \alpha} \right) = pK_0 + \Delta pK + \log \left(\frac{\alpha}{1 - \alpha} \right) \quad (6)$$

kde α je podíl disociovaných kyselých skupin (stupeň ionizace), pK_a záporně vzatý logaritmus efektivní disociační konstanty, která je závislá na stupni ionizace, a pK_0 záporně vzatý logaritmus skutečné disociační konstanty, která je rovna pK_a , když $\alpha = 0$. Hodnota ΔpK představuje zvýšení disociační konstanty, které je způsobeno změnou volné elektrostatické energie G_e polykyselin v závislosti na počtu negativně nabitých skupin n . [8]

$$\Delta pK = \frac{0,4343}{kT} \left(\frac{\delta G_e}{\delta n} \right)_\kappa \quad (7)$$

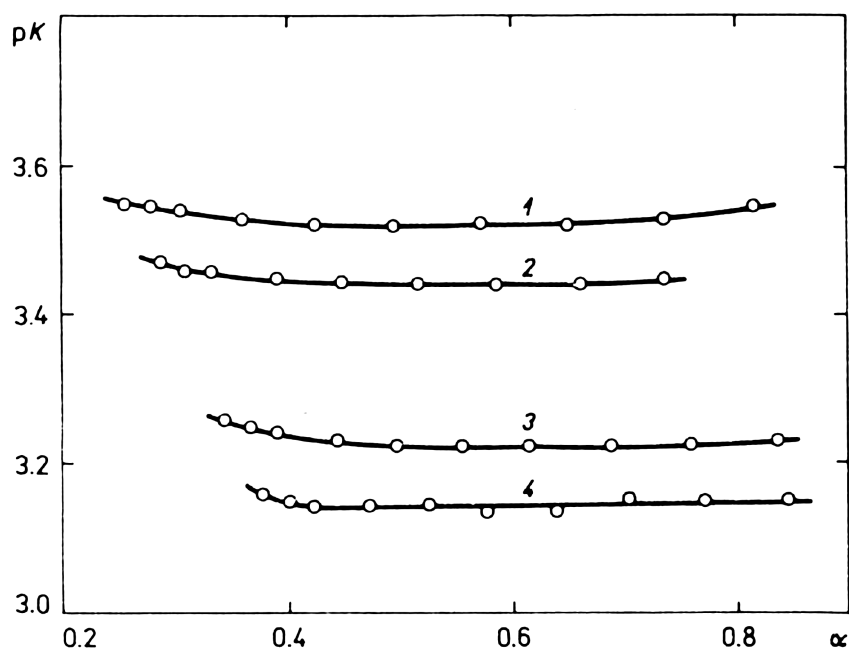
V roce 1978 R. Kohn a P. Kováč publikovali práci, jejíž cílem bylo stanovit disociační konstantu D-galakturonové a D-glukuronové kyseliny a jejich kyslíkatých derivátů pomocí potenciometrických titrací. Roztok kyseliny o koncentraci $3 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ byl titrován

$0,05\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ hydroxidem sodným. Iontová síla roztoku nebyla během titrace udržována konstantní. Disociační konstanta byla vypočtena podle následujících rovnic:

$$pK = pH - \log \frac{[\text{RCOO}^-]}{[\text{RCOOH}]} \quad (8)$$

$$[\text{RCOO}^-] = [\text{B}] + [\text{H}^+] - [\text{OH}^-] \quad (9)$$

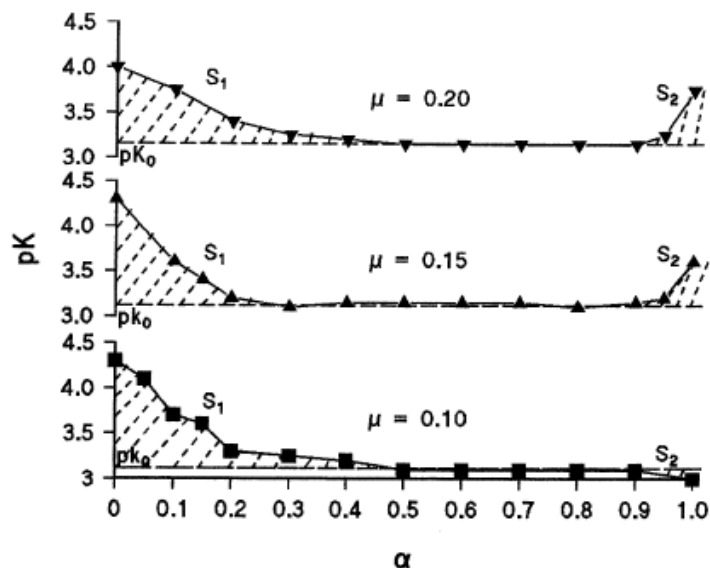
kde $[\text{B}]$ je koncentrace soli, která vznikla přidáním hydroxidu sodného. Koncentrace protonů $[\text{H}^+]$ byla zjištěna z hodnot pH a pro zjednodušení výpočtů byly roztoky považovány za velmi zředěné. Za předpokladu těchto podmínek experimentu mohl být člen $[\text{OH}^-]$ zanedbán. Disociační konstanta pK byla zjištěna pro deset různých stupňů ionizace α . Hodnoty pK získané podle rovnic 8 a 9 byly vyneseny v závislosti na stupni ionizace α . Tato závislost je zobrazena na obrázku 4. Je zřejmé, že v relativně širokém rozmezí stupně ionizace α zůstává pK prakticky konstantní. Získané disociační konstanty při stupni disociace rovném 0,5 byly pro D-galakturonovou kyselinu $3,51 \pm 0,01$ a pro D-glukuronovou $3,28 \pm 0,01$. [13]



Obrázek 4: Závislost disociační konstanty pK v závislosti na stupni ionizace α pro D-galakturonovou kyselinu (1) a její deriváty (2, 3, 4) [13]

Ve studii z roku 2001 se Carmen Rueda a kol. věnovali vlivu iontové síly na titrační křivky mukopolysacharidů, konkrétně kyseliny hyaluronové, chondroitin 4-sulfátu a chondroitin 6-sulfátu. Nejprve byly připraveny dvě řady roztoků každého z mukopolysacharidů o koncentracích $2 \cdot 10^{-4}$, $2 \cdot 10^{-3}$, $2 \cdot 10^{-2}$ % w/v. Jedna řada byla okyselena $0,1\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ kyselinou chlorovodíkovou, dokud nebylo dosaženo pH 2, kdy jsou karboxylové skupiny

prakticky nedisociované. K druhé řadě byl přidáván $0,1\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ roztok hydroxidu sodného do dosažení pH 11. Iontová síla ve všech roztocích byla upravována pomocí chloridu sodného. Titrace byly prováděny v dusíkaté atmosféře, aby se zabránilo přístupu oxidu uhličitého, a při konstantní teplotě. Ze závislosti pK na stupni disociace, jejíž příklad je zobrazen na obrázku 5, byla extrapolací určena vnitřní disociační konstanta pK_0 . Získané hodnoty pro kyselinu hyaluronovou jsou uvedeny v tabulce 1. [14]

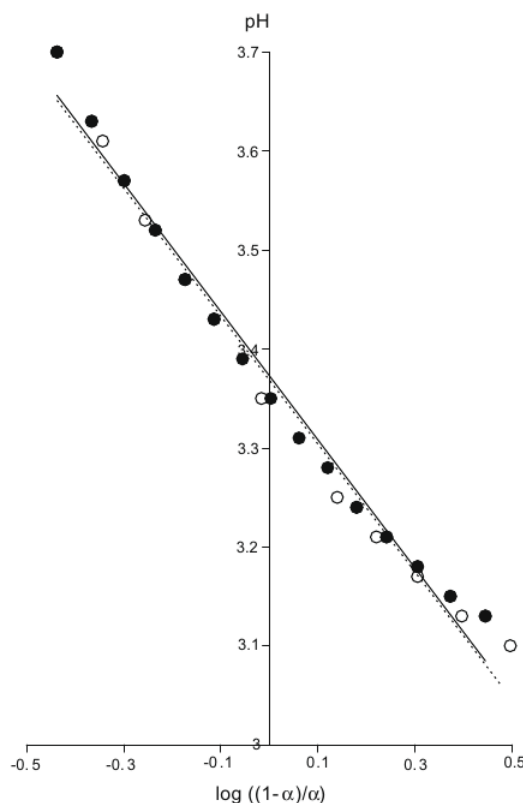


Obrázek 5: Závislost disociační konstanty pK na stupni disociace α pro $2 \cdot 10^{-4}$ %w/v chondroitin 4-sulfát při různých iontových silách [14]

Tabulka 1: Vnitřní disociační konstanty kyseliny hyaluronové [14]

c [% w/v]	I	pK_0
$2 \cdot 10^{-4}$	0,10	3,02
	0,15	3,10
	0,60	3,10
$2 \cdot 10^{-3}$	0,1	3,10
	0,15	3,20
	0,20	3,10
$2 \cdot 10^{-2}$	0,10	3,10
	0,15	3,00
	0,20	3,08

Kristoffer Tømmeraas a Per-Olof Wahlund v roce 2009 zveřejnili článek, který se zabývá vlastnostmi kyseliny hyaluronové studované titrací. Při studii použili potenciometrickou a ^1H NMR titraci a enzymaticky upravený vzorek kyseliny hyaluronové o hmotnostním



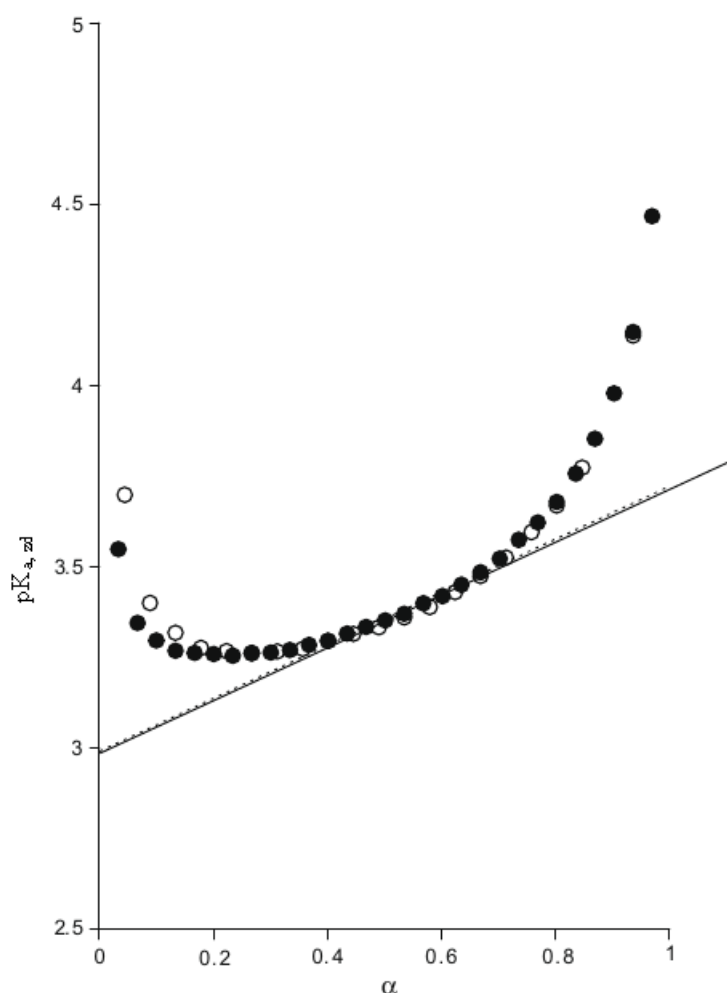
Obrázek 6: Závislost pH na $\log[(1-\alpha)/\alpha]$ v přítomnosti $0,1\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ NaCl (●) a $0,1\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ NaNO_3 (○) [15]

středu molekulové hmotnosti $4830\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$. Potenciometrické titrace byly prováděny ve dvou různých prostředích, a to v $0,1\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ chloridu sodném a $0,1\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ dusičnanu sodném. Při samotných potenciometrických titracích autoři nejprve upravili pH roztoku kyseliny hyaluronové na hodnotu 8,99 pomocí $0,1\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ hydroxidu sodného. Poté vzorek titrovali $0,1\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ kyselinou chlorovodíkovou. Po každém $100\mu\text{l}$ přidavku kyseliny chlorovodíkové byla změřena hodnota pH . Titrace byla ukončena ve chvíli, kdy pH titrovaného roztoku dosáhlo hodnoty 1,50. Jak je zřejmé z popisu postupu potenciometrické titrace, iontová síla roztoku byla konstantní během celé titrace. Na základě Katchalského teorie slabých polykyselin použili autoři pro zjištění zdánlivé disociační konstanty tento vztah:

$$pK_{a, \text{zd}} = pH - \log\left(\frac{\alpha}{1-\alpha}\right) \quad (10)$$

Ze závislosti pH na výrazu $\log[\alpha/(1-\alpha)]$, která je zobrazena na obrázku 6, autoři získali hodnotu disociační konstanty při 50% stupni disociace jako hodnotu pH , když je výraz $\log[\alpha/(1-\alpha)]$ roven nule. Ze závislosti pK_a na stupni disociace α , zobrazené na obrázku 7, získali autoři extrapolací na nulový stupeň disociace hodnotu vnitřní pK_a . Vnitřní disociační konstanta odpovídá disociační konstantě jedné kyselé skupiny za podmínky, že všechny okolní skupiny jsou bez náboje. V obou studovaných prostředích potenciometricky stanovená vnitřní disociační konstanta byla rovna 2,99 a disociační konstanta při

50% disociaci 3,37. Při ^1H NMR titracích byly vzorky rozpuštěny v D_2O s 0,05 % 3-trimethylsilyl propionátu sodného jako vnitřního standardu a různou koncentrací chloridu sodného. Hodnoty pH^* roztoku byly upravovány pomocí DCl nebo NaOD o stejné koncentraci, jakou měl v roztoku chlorid sodný, aby zůstala zachována iontová síla. Všechny chemické posuny byly sledovány na H-1 glukuronové kyseliny a stanovovány relativně k vnitřnímu standardu. Vyhodnocení disociační konstanty bylo provedeno stejným způsobem jako u potenciometrických titrací a získané hodnoty pro jednotlivé iontové síly jsou uvedeny v tabulce 2. Při srovnávání hodnot disociačních konstant získaných potenciometrickou a ^1H NMR titrací autoři pozorovali odchylku, ke které docházelo kvůli rozdílné schopnosti deuteriových iontů asociovat se záporným nábojem proti vodíkovému iontu. [15]



Obrázek 7: Závislost $\text{pK}_{a,zd}$ na α v přítomnosti $0,1\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ NaCl (●) a $0,1\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ NaNO_3 (○) [15]

Tabulka 2: Disociační konstanty získané z ^1H NMR titrací [15]

$I [\text{mmol} \cdot \text{dm}^{-3}]$	$\text{pK}_{\text{a, vnitřní}}$	$\text{pK}_{\text{a, } \alpha = 0,5}$
10	3,05	3,14
50	2,82	3,16
100	2,81	3,15

2.5 Konduktometrie

2.5.1 Úvod

Konduktometrie je metoda zabývající se měřením vodivosti roztoků elektrolytů ve vodě nebo v jiném rozpouštědle, kde elektrolyty mohou disociovat na ionty. Patří mezi elektroanalytické metody, u nichž není třeba přihlížet k elektrodové reakci. Elektrické vlastnosti článku tedy závisí na vlastnostech systému, který je mezi elektrodami, a ne na specifických jevech na rozhraní mezi elektrodou a systémem. Podmínkou pro konduktometrická měření je schopnost roztoku vést elektrický proud. Konduktometrický článek tvoří dvě kovové elektrody, které jsou ponořeny do analyzovaného roztoku.

Elektrický odpor dlouhého vodiče je přímo úměrný jeho délce l a nepřímo úměrný jeho průřezu A :

$$R = \rho \cdot \frac{l}{A} \quad (11)$$

kde ρ je měrný odpor vodiče. Vodivost G získáme převrácením hodnoty měrného odporu vodiče a její jednotkou je Siemens. Měrná vodivost neboli konduktivita charakterizuje vodivost roztoku elektrolytu a je dána vztahem

$$\kappa = \frac{1}{\rho} = \frac{1}{R} \cdot \frac{l}{A} \quad (12)$$

Pokud konduktivitu elektrolytu podělíme molární koncentrací c elektrolytu, získáme veličinu zvanou molární vodivost elektrolytu:

$$\Lambda = \frac{\kappa}{c} \quad (13)$$

Na základě této rovnice by konduktivita měla být úměrná koncentraci za podmínky, že molární vodivost je nezávislá na koncentraci elektrolytu. Ve skutečnosti molární vodivost je závislá na koncentraci. S klesající koncentrací molární vodivost roste a maximální hodnotu má při nekonečném zředění. Molární vodivost při nekonečném zředění se označuje symbolem λ_{∞} . Při nekonečném zředění, kdy se jednotlivé ionty pohybují nezávisle na ostatních, platí tzv. Kohlrauschův zákon nezávislého putování iontů:

$$\lambda_{\infty} = \sum \lambda^0 \quad (14)$$

kde λ^0 je iontová vodivost konkrétního iontu při nekonečném zředění. Kohlrauschův zákon vztah platí pro silné i slabé elektrolyty, protože při nekonečném zředění dochází k disociaci

všech elektrolytů. [10, 16] U slabých elektrolytů má na závislost molární vodivosti na koncentraci vliv stupeň disociace α :

$$\Lambda = \lambda_{\infty} \cdot \alpha \quad (15)$$

$$\alpha = \frac{c - c_{\text{nedisoc}}}{c} \quad (16)$$

kde c_{nedisoc} je molární koncentrace nedisociovaných molekul a c molární koncentrace všech molekul.

2.5.2 Stanovení disociační konstanty slabé kyseliny

Slabá kyselina ve vodném prostředí disociuje podle rovnice



Tato rovnováha je charakterizována disociační konstantou K_{a} :

$$K_{\text{a}} = \frac{a_{\text{H}_3\text{O}^+} \cdot a_{\text{A}^-}}{a_{\text{HA}} \cdot a_{\text{H}_2\text{O}}} \quad (18)$$

Ve velmi zředěných roztocích můžeme aktivitu nedisociovaných molekul vody považovat za jednotkovou. Pokud pro ionty a nedisociované molekuly zvolíme standardní koncentrační stav ($c_0 = 1 \text{ mol} \cdot \text{m}^{-3}$), můžeme disociační konstantu vyjádřit jako

$$K_{\text{a}} = \frac{c_{\text{H}_3\text{O}^+} \cdot c_{\text{A}^-}}{c_{\text{HA}}} \cdot \frac{f_{\text{H}_3\text{O}^+} \cdot f_{\text{A}^-}}{f_{\text{HA}}} \quad (19)$$

kde f_i jsou aktivitní koeficienty. Hodnotu aktivitního koeficientu nedisociovaných molekul lze také považovat za jednotkovou. Pokud zanedbáme ionty vzniklé disociací vody, platí:

$$c_{\text{A}^-} = c_{\text{H}_3\text{O}^+}; c_{\text{HA}} = c_0 - c_{\text{H}_3\text{O}^+} \quad (20)$$

kde c_0 je počáteční koncentrace kyseliny a stupeň disociace kyseliny lze vyjádřit jako

$$\alpha = \frac{c_{\text{A}^-}}{c_0} \quad (21)$$

Potom

$$K_{\text{a}} = c_0 \frac{\alpha^2}{1 - \alpha} f_{\pm}^2 \quad (22)$$

kde $f_{\pm}$ je střední aktivitní koeficient iontů H_3O^+ a A^- . Za použití vztahu 15 lze předchozí rovnici upravit:

$$K_{\text{a}} = c_0 \frac{\lambda^2}{\lambda_{\infty} (\lambda_{\infty} - \lambda)} f_{\pm}^2 \quad (23)$$

Pro další výpočty použijeme označení koncentrační konstanty

$$K_c = c_0 \frac{\lambda^2}{\lambda_\infty (\lambda_\infty - \lambda)} \quad (24)$$

a z Debye-Hückelovy teorie vyjádříme střední aktivitní koeficient jako

$$\log f_\pm = -A_c |z_+ z_-| \sqrt{I_c} \quad (25)$$

kde z jsou náboje elektrolytu, A_c je konstanta závislá na rozpouštědle a iontová síla pro 1-1 elektrolyt je rovna

$$I_c = c_{A^-} = \alpha \cdot c_0 \quad (26)$$

Po upravení rovnic 23 a 24 získáme

$$\log K_a = \log K_c + 2 \log f_\pm \quad (27)$$

což lze s použitím rovnice 25 upravit na

$$\log K_c = \log K_a + 2A_c \sqrt{\alpha \cdot c_0} \quad (28)$$

Pokud vyneseme závislost $\log K_c$ na $\sqrt{\alpha \cdot c_0}$ a proložíme lineární regresní přímkou, bude úsek na ose y roven $\log K_a$. [17]

2.5.3 Vodivost polyelektrolytů

Vyhovující teorie, která by popisovala vodivostní chování polyelektrolytů, zatím neexistuje. Problémy bránící vzniku vhodné teorie, která popisuje vodivostní chování, jsou způsobeny asymetrií polyelektrolytu. Prostorný a vysoce nabitý polyiont je obklopen malými protiionty, které stíní jeden nebo jen několik málo nábojů. Proto všechny teoretické přístupy jsou založeny na zjednodušení tohoto předpokladu.

Obecně je molární vodivost roztoku polyelektrolytu dána rovnicí

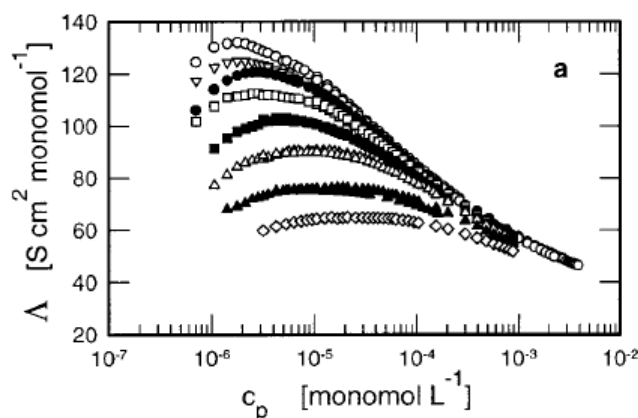
$$\lambda = f_c (\lambda_p + \lambda_c^0) \quad (29)$$

kde λ_c^0 je molární vodivost protiiontu v nekonečně zředěném roztoku za nepřítomnosti polyiontů, λ_p je molární vodivost polyiontu a f_c je koeficient, který zahrnuje elektrostatické interakce mezi polyiontem a protiionty, stupeň ionizace a vnitřní tření. Molární vodivost λ polyelektrolytu s jednomocným protiiontem může být vyjádřena jako

$$\lambda = \frac{\kappa - \kappa_0}{c_p} = \lambda_\infty + \Phi(c_p) \quad (30)$$

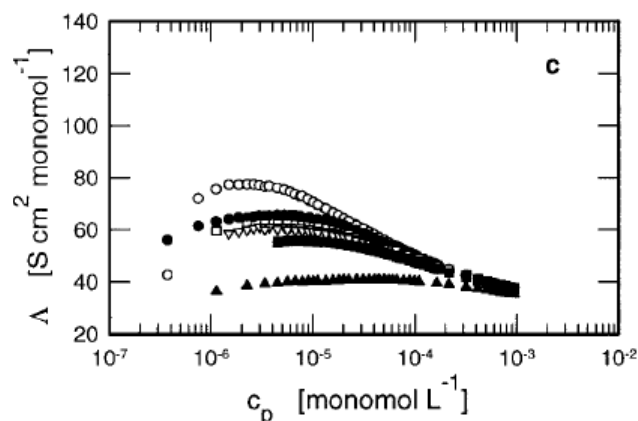
kde κ je měrná elektrická vodivost roztoku, κ_0 je měrná elektrická vodivost rozpouštědla, λ_∞ molární vodivost při nekonečném zředění a $\Phi(c_p)$ udává vnitřní interakce. V důsledku silných vnitřních interakcí není závislost měrné elektrické vodivosti na koncentraci polyelektrolytu ve vodném prostředí lineární. [8]

Christine Wandrey v roce 1999 publikovala studii elektrické vodivosti roztoků sodné soli polystyrensulfonátu a polydiallylmethylamonium chloridu v roztocích s různou iontovou silou. Vodivostní měření byla prováděna konduktometrem při 20 °C v dusíkaté atmosféře. Aby bylo možné pokrýt celý koncentrační rozsah, byla měření rozdělena na části. Přidáváním zásobního roztoku polymeru o různých koncentracích nebyl celkový objem zvýšen o více než 10 %. Byla vypočtena molární vodivost podle rovnice 30 a vynesena její závislost na koncentraci polyelektrolytu. Příklady těchto závislostí znázorňují obrázky 8 a 9. Pro oba polyelektrolyty v roztocích bez přídavku soli roste molární vodivost s klesající molekulovou hmotností a klesající koncentrací polyelektrolytu. S rostoucí iontovou silou je molární vodivost zmenšená v oblastech vyššího zředění pro všechny molekulové hmotnosti. Maximální hodnota molární vodivosti klesá a zplošťuje se s přídavkem chloridu sodného. [18]

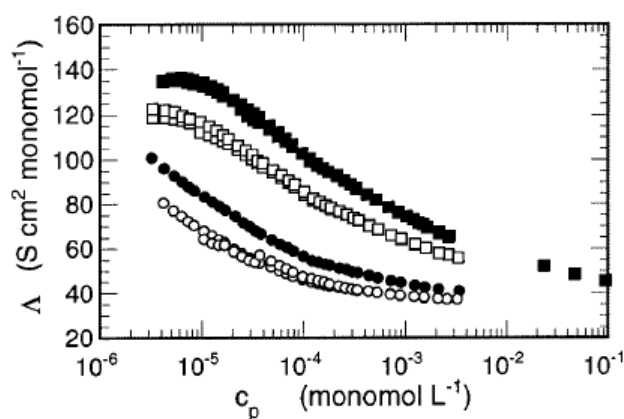


Obrázek 8: Koncentrační závislost molární vodivosti a vlivu iontové síly na roztok sodné soli polystyrensulfonátu pro molekulovou hmotnost $8\,000\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ bez soli ($\circ$), $1\cdot 10^{-6}$ ($\triangle$), $2\cdot 10^{-6}$ ($\bullet$), $4\cdot 10^{-6}$ ($\square$), $1\cdot 10^{-5}$ ($\blacksquare$), $5\cdot 10^{-5}$ ($\blacktriangle$), $1\cdot 10^{-4}$ ($\diamond$) $\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ NaCl [18]

V roce 2000 zveřejnili Ch. Wandrey a kol. článek, ve kterém se zabývají studiem sloučenin odvozených od polyvinylbenzyltrialkylamonium chloridu o různém stupni polymerizace. Molární vodivost byla vypočtena podle rovnice 30. Obrázek 10 zobrazuje koncentrační závislost molární vodivosti pro polyvinylbenzyltrialkylamonium chlorid, jehož substituenty byl n-butyl a dva metyly. [19]



Obrázek 9: Koncentrační závislost molární vodivosti a vlivu iontové síly na roztok sodné soli polystyrenesulfonátu pro molekulovou hmotnost $46\,400\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ bez soli (○), $2\cdot 10^{-6}$ (●), $4\cdot 10^{-6}$ (□), $5\cdot 10^{-6}$ (△), $1\cdot 10^{-5}$ (■), $5\cdot 10^{-5}$ (▲) $\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ NaCl[18]



Obrázek 10: Koncentrační závislost molární vodivosti pro různé délky řetězce polyvinylbenzyltri-alkylamonium chloridu P_n : 27 (■), 56 (□), 181 (●), 407 (○) [19]

2.6 Reologie

2.6.1 Úvod

Reologie je vědní obor, který se zabývá studiem deformace a tokem hmoty. Tento termín zavedl americký fyzik E. C. Bingham a definice byla přijata spolu se založením American Society of Rheology v roce 1929. [20, 21] Matematickým vyjádřením tokových vlastností kapalin jsou většinou vztahy mezi deformačním smykovým napětím a deformací kapaliny. Grafickým vyjádřením těchto vztahů jsou tokové křivky. [22]

Ideální pevné látky se deformují elasticky. To znamená, že energie potřebná k deformaci je zpátky uvolněna ve chvíli, kdy je namáhání odstraněno. Ideální tekutiny jsou

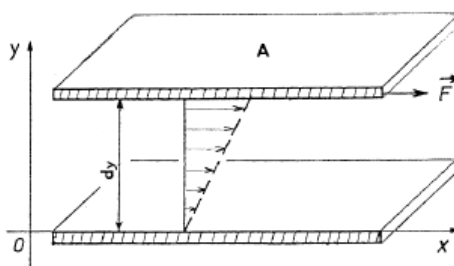
deformovány ireverzibilně, to znamená, že tečou. Energie, kterou spotřebujeme na deformaci ideální tekutiny, je disipována ve formě tepla. Reálná hmota není ani ideální pevná látka, ani ideální tekutina. [23]

2.6.2 Newtonské a nenewtonské kapaliny

Newtonskými kapalinami můžeme nazvat takové materiály, které se řídí Newtonovým zákonem:

$$\tau_{xy} = \eta \frac{du_x}{dy} = \eta \dot{\gamma} \quad (31)$$

Předpokládejme dvě paralelní desky o ploše A , které jsou od sebe vzdálené o hodnotu y a prostor mezi těmito deskami je vyplněn tekutinou. Spodní deska je nepohyblivá a na vrchní desku působí síla F , takže se deska pohybuje ve směru x . Síla způsobující pohyb vztažená na jednotku plochy desky je rovna tečnému napětí τ_{xy} . Tečné napětí je dle Newtonova zákona úměrné rychlostnímu gradientu $\frac{du_x}{dy}$ a koeficientem úměrnosti je dynamická viskozita η . Dynamická viskozita je ovlivněna teplotou, tlakem a složením tekutiny.



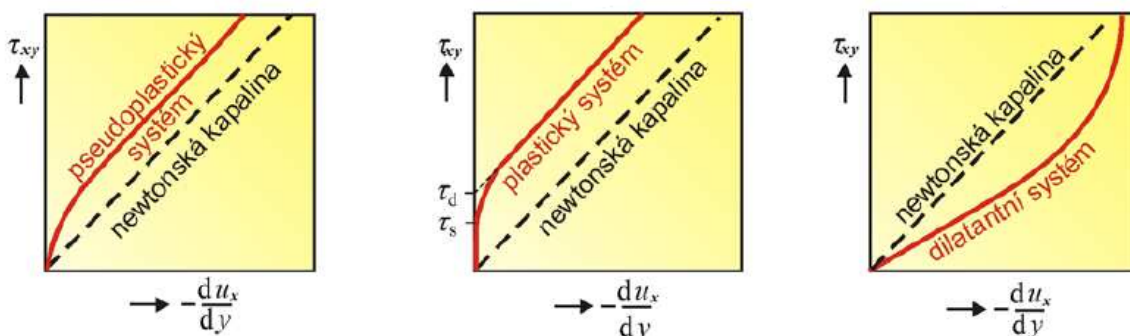
Obrázek 11: Prostý smyk [24]

Nenewtonské kapaliny vykazují odchylky od Newtonova zákona, ale je možné pro ně uvést obdobný vztah:

$$\tau_{xy} = \eta' \frac{du_x}{dy} = \eta' \dot{\gamma} \quad (32)$$

kde η' je zdánlivá viskozita. Zdánlivá viskozita není látkovou konstantou, protože závisí na rychlosti deformace a tečném napětí.

Nenewtonské kapaliny lze rozdělit na tyto druhy: pseudoplastické, dilatantní a binghamské. Srovnání tokových křivek těchto druhů kapalin je na obrázku 12. U pseudoplastických kapalin se zdánlivá viskozita zmenšuje s rostoucím gradientem rychlosti, zatímco u dilatantních kapalin zdánlivá viskozita roste. Za binghamské kapaliny můžeme považovat všechny kapaliny s elastickou složkou deformace, která se uplatňuje pod mezí toku. Jejich společným znakem je, že začínají téci až po překročení určité hodnoty tečného napětí meze toku τ_0 . [20, 22]



Obrázek 12: Srovnání tokových křivek pro newtonské a nenewtonské kapaliny [25]

2.6.3 Měření viskozity

K měření viskozity se nejčastěji využívají tři druhy viskozimetrů: pádové, průtokové a rotační.

Pádový viskozimetr je založen na měření času průchodu kuličky mezi dvěma ryskami ve skleněném válci naplněném tekutinou, jejíž viskozitu zjišťujeme. Skleněný válec bývá obalen pláštěm, aby byla teplota během měření konstantní.

Principem průtokového viskozimetru je měření času, za který daný objem kapaliny proteče kapilárou vlivem vlastní váhy. [23]

Rotační viskozimetry lze rozdělit do tří skupin podle druhu použité geometrie: dva soustředné válce, systém kužel-deska a systém deska-deska. Princip je u všech druhů stejný. Jedna část sestavy se otáčí konstantní úhlovou rychlostí. Toto otáčení se vnitřním třením kapaliny přenáší na druhou část sestavy, která je upevněná na torzním vlákně. Po ustavení rovnováhy se měří úhel otočení druhé části sestavy φ od původní polohy. Úhel otočení φ je úměrný úhlové rychlosti vnějšího válce ω a viskozitě kapaliny η :

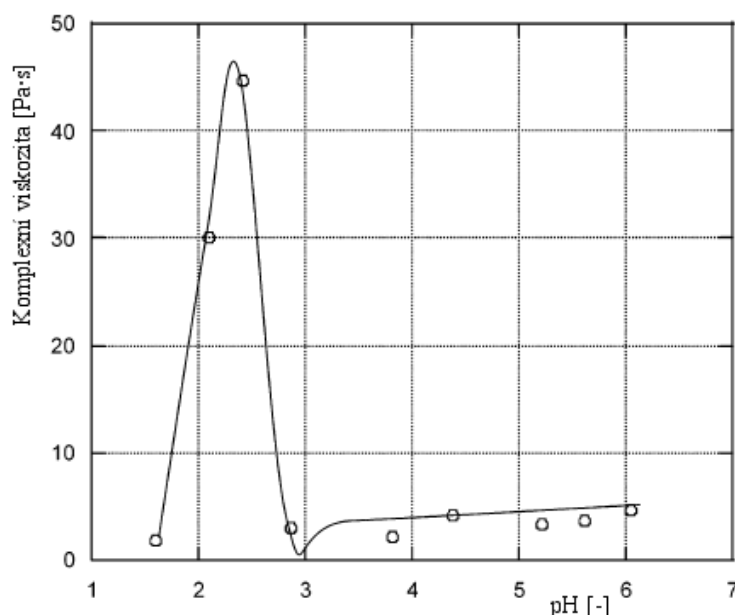
$$\varphi = k \cdot \eta \cdot \omega \quad (33)$$

kde k je konstanta přístroje. [25]

2.6.4 Reologie polyelektrolytů

Iuliana Gatej a kol. zkoumali v článku z roku 2005 vliv pH na hyaluronan. Pro svou studii použili hyaluronan o hmotnostním středu molekulové hmotnosti $1,334 \cdot 10^6 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ a indexu polydisperzity 1,49. Pro reologická měření použili roztok kyseliny hyaluronové o koncentraci $10 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ v $0,15 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ chloridu sodném. pH roztoku bylo upravováno přísadky kyseliny chlorovodíkové pro kyselé prostředí nebo hydroxidu sodného pro bazické prostředí. Měření probíhalo při 20°C za použití geometrie kužel-deska. Komplexní viskozita byla určována při nízké frekvenci, která odpovídá Newtonské oblasti. Pokud Newtonská oblast neexistovala, byla určována při frekvenci $0,1 \text{ rad} \cdot \text{s}^{-1}$. Obrázek 13 zobrazuje komplexní viskozitu jako funkci pH v kyselé oblasti. Z grafu je zřejmé, že při hodnotě

pH 2,4 dosahuje komplexní viskozita maxima, které je způsobeno gelovitým chováním roztoku hyaluronanu při této hodnotě pH. V rozmezí hodnot pH od 2,86 do 6,05 a při pH 1,5 je komplexní viskozita jen mírně modifikovaná změnou iontové síly roztoku. Na obrázku 14 je zobrazena závislost komplexní viskozity na pH pro zásaditou oblast. Zde je možné pozorovat pokles viskozity do pH 11,58, která odpovídá pK hydroxylových skupin. Existují dvě teorie, kterými by bylo možné vysvětlit tento pokles viskozity. První teorií je pokles rozměrů molekuly způsobený poklesem tuhosti polymeru a druhou je degradace hlavního řetězce polymeru s poklesem molekulové hmotnosti. Aby si autoři ověřili možnost druhé teorie, provedli SEC charakterizaci některých vzorků a zjistili, že molekulová hmotnost se mění pouze nepatrně. Závěrem lze tedy říct, že chování kyseliny hyaluronové závisí na pH a že v docela širokém rozmezí hodnot (2,8–12) zůstává reologické chování roztoků nezměněno. [26]

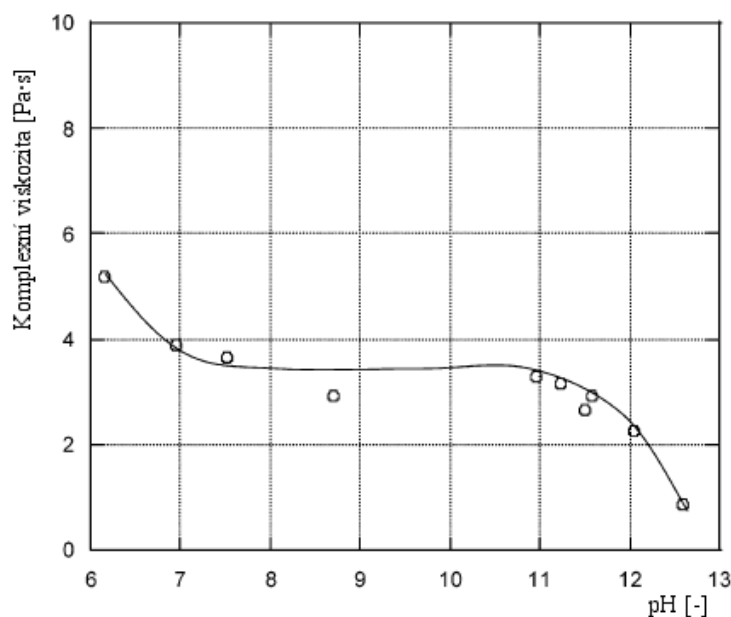


Obrázek 13: Závislost komplexní viskozity na pH v kyselé oblasti [26]

2.7 SEC-MALLS

2.7.1 Rozměrově vylučovací chromatografie

Chromatografie je separační proces, který využívá schopnosti sloučenin dělit se mezi dvě navzájem nemísitelné fáze, mobilní a stacionární fázi. Dělená směs látek prochází přes kolonu, kde jsou tyto dvě fáze umístěny. Stacionární fáze je pevně ukotvena v koloně, zatímco mobilní fáze se pohybuje kolonou a bývá nejčastěji tvořena kapalnou nebo plynou fází. Podle druhu mobilní fáze dělíme chromatografické metody na kapalnou nebo plynou chromatografii. Tekutina, která do kolony vstupuje, se nazývá eluent a tekutina z kolony vystupující eluát.



Obrázek 14: Závislost komplexní viskozity na pH v zásadité oblasti [26]

Chromatografické metody mohou být děleny podle druhu interakce mezi rozpuštěnými látkami a stacionární fází. Rozměrově vylučovací chromatografie dělí molekuly podle velikosti. Stacionární fáze je tvořena porézním materiálem, do kterého mohou pronikat pouze molekuly o určité velikosti. Molekuly, které jsou větší než póry ve stacionární fázi, projdou kolonou nejrychleji, protože nemohou vstupovat do pórů. Molekuly, které jsou menší než póry, budou kolonou procházet delší dobu, protože při průchodu kolonou budou vstupovat do pórů. [11] Primárním účelem vylučovací chromatografie bylo získat distribuci molekulárních hmotností daného polymerního materiálu.

Pro zjištění molekulové hmotnosti zkoumaného vzorku lze využít dvou postupů. Buď můžeme kolonu kalibrovat, čímž získáme vztah mezi elučním objemem a molekulovou hmotností, nebo použít detektor, který bude citlivý na molekulovou hmotnost. Problémem kalibrace kolony je, že na kalibraci musíme použít stejnou chemickou entitu, kterou poté budeme analyzovat, a že rozsah molekulových hmotností při kalibraci musí být větší než rozsah, který budeme měřit. Provedená kalibrace je také použitelná pouze pro stejný systém polymer-rozpouštědlo. Další komplikací kalibrace může být dostupnost standardů a pro větvené polymery a kopolymery neexistuje jedna kalibrační křivka, která by udávala vztah mezi elučním objemem a molekulovou hmotností.

Mezi nejpoužívanější metody detekce molekulové hmotnosti patří viskozimetrie a rozptyl světla. Při měření viskozimetrie může být molekulová hmotnost vypočítána z Mark-Houwinkovy rovnice

$$[\eta] = KM^a \quad (34)$$

kde $[\eta]$ je vnitřní viskozita a K a a jsou koeficienty pro daný systém polymer-rozpouštědlo při dané teplotě. [27]

2.7.2 Multi-angle laser light scattering

Ačkoli jsou koloidní soustavy proti světlu průhledné, rozptylují část procházejícího světla, což způsobí, že primární paprsek má po průchodu roztokem nižší intenzitu než před průchodem. Intenzita rozptýleného světla roste s velikostí částic, proto není tolik výrazná u pravých roztoků. Pokud jsou částice dostatečně velké, dá se rozptyl pozorovat okem. Například při bočním osvětlení úzkým paprskem světla můžeme u koloidních roztoků pozorovat tzv. Tyndallův jev, kdy se nám paprsek jeví jako kužel.

Rovnici pro rozptyl světla odvodil Lord Rayleigh. Tato rovnice platí pouze pro rozptyl ve velmi zředěných soustavách na izotropních částicích, které nejsou větší než dvacetina vlnové délky použitého záření, a mohou tudíž být považovány za bodové zdroje rozptýleného světla, a jejichž polarizovatelnost je ve všech směrech stejná. Rovnice pro rozptyl světla má tvar

$$\frac{i_p(\theta)}{I_0} = \frac{\pi^2 \cdot \alpha_p^2 \cdot F(\theta)}{\varepsilon_0^2 \cdot \lambda^4 \cdot r^2} \quad (35)$$

kde $i_p(\theta)$ je intenzita světla rozptýleného jednou částicí pod úhlem θ , I_0 celková intenzita dopadajícího záření, α_p polarizovatelnost částice, θ rozptylový úhel (úhel pozorování), ε_0 permitivita vakua, λ vlnová délka dopadajícího i rozptýleného světla a r vzdálenost od detektoru. $F(\theta)$ je funkce, kterou je definován vliv geometrie uspořádání, protože rozptýlené světlo nemusí mít ve všech směrech stejnou intenzitu. Ve většině měření se používá vertikálně polarizované světlo, protože když se dopadající paprsek šíří ve směru x a rozptýlené světlo sledujeme v rovině xy pod proměnným úhlem θ , šíří se rozptýlené světlo ve všech směrech v rovině xy se stejnou intenzitou a funkce $F(\theta)$ nabývá hodnoty 1 pro všechny úhly θ . Aby bylo možné vliv geometrického uspořádání zanedbat, byl zaveden Rayleighův poloměr

$$R(\theta) = \frac{r^2}{F(\theta)} \cdot \frac{i_v(\theta)}{I_0} \quad (36)$$

Tímto vztahem je možné přepočítat naměřenou intenzitu na jednotkovou intenzitu primárního světla, jednotkovou vzdálenost detektoru od kyvety a úhel $\theta = 0$, kdy bez ohledu na polarizaci platí $F(\theta) = 0$. [9]

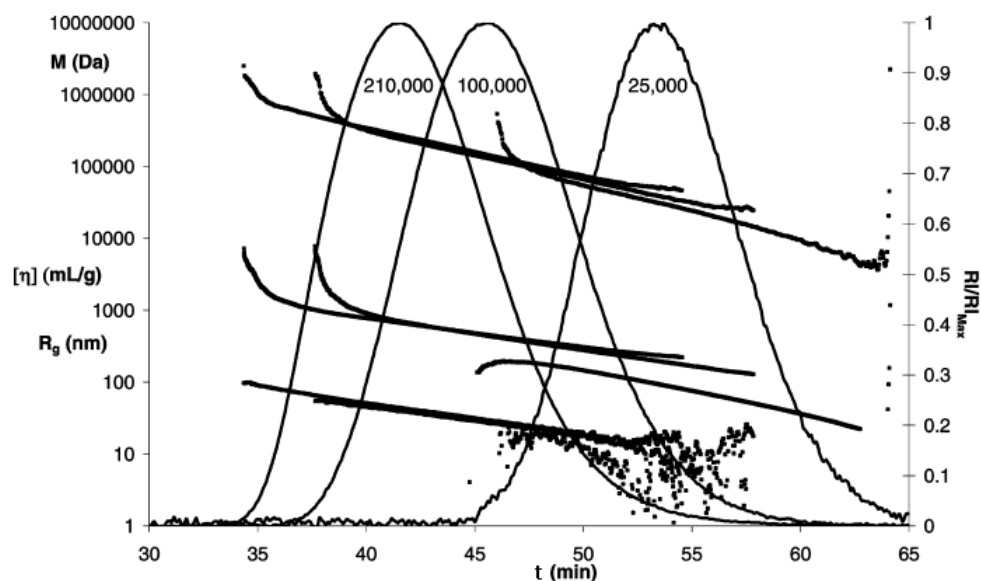
Vztah intenzity světla rozptýleného roztokem polymeru a molekulové hmotnosti polymeru může být vyjádřen jako

$$\frac{K^*c}{R(\theta)} = \frac{1}{M_w F(\theta)} + 2A_2c \quad (37)$$

kde c je koncentrace polymeru, M_w hmotnostně střední molekulární hmotnost polymeru, A_2 druhý viriální koeficient systému polymer-rozpouštědlo a K^* optická konstanta pro daný systém. Tato konstanta je vyjádřena vztahem

$$K^* = \frac{4\pi^2 n_0^2 (dn/dc)^2}{\lambda^4 N_A} \quad (38)$$

kde n_0 je index lomu rozpouštědla, dn/dc inkrement indexu lomu roztoku, λ_0 vlnová délka dopadajícího světla ve vakuu a N_A Avogadrova konstanta. [27]



Obrázek 15: SEC-MALLS chromatogramy kyseliny hyaluronové po 1,17 (210 000), 4,17 (100 000) a 23 (25 000) hodinách degradace [28]

2.7.3 SEC-MALLS polyelektrolytů

Ve studii z roku 2008 se Kristoffer Tømmeraas a Claes Melander zabývali kyselou hydrolyzou roztoků kyseliny hyaluronové pomocí SEC-MALLS analýzy. Ve studii použili kyselinu hyaluronovou o hmotnostním středu molekulové hmotnosti 321 000 s indexem polydisperzity 1,3. Kyselou hydrolyzu zkoumali při teplotách 40, 60 a 80 °C a při sedmi různých koncentracích kyseliny chlorovodíkové. Na obrázku 15 jsou zobrazeny chromatogramy ze sledování degradace kyseliny hyaluronové v 0,1 mol · dm⁻³ kyselině chlorovodíkové při 60 °C po různém čase působení. Autoři také ověřili pomocí NMR spektroskopie, že při hydrolyze nevznikají žádné vedlejší produkty. [28]

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Použité chemikálie

- kyselina hyaluronová 90–130 kg · mol⁻¹ Technical grade, Contipro Biotech s.r.o.
- kyselina hyaluronová 1 500–1 750 kg · mol⁻¹ Technical grade, Contipro Biotech s.r.o.
- polystyrensulfonát sodný 10⁶ g · mol⁻¹
- chlorid sodný p.a., Lach-Ner, s.r.o.
- hydroxid sodný p.a., Lach-Ner, s.r.o.
- kyselina chlorovodíková p.a., Lach-Ner, s.r.o.
- Milli-Q voda

3.2 Použité metody

3.2.1 Příprava roztoků

Při přípravě zásobních roztoků kyseliny hyaluronové byla kyselina hyaluronová nejprve sušena v sušárně patnáct minut při 90 °C, aby došlo k odstranění vody, která v ní mohla být obsažena. Po vysušení kyseliny hyaluronové bylo její potřebné množství odváženo na váženice s přesností na čtyři desetinná místa. Část navážky byla převedena do zásobní nádoby, ve které byla část celkového objemu Milli-Q vody. Tato navážka byla převrstvena další částí celkového objemu Milli-Q vody a celý postup se opakoval, dokud nebyla do nádoby převedena všechna potřebná kyselina hyaluronová. Poté byla váženka zvážena, aby bylo zjištěno, kolik kyseliny hyaluronové na ní ulpělo. Na základě tohoto zjištění bylo přepočteno potřebné množství Milli-Q vody tak, aby výsledný roztok kyseliny hyaluronové měl požadovanou koncentraci, a zbývající Milli-Q voda byla přidána. Takto připravený zásobní roztok byl zaparafilmován a byl míchán minimálně 24 hodin na magnetické míchačce při laboratorní teplotě.

Při přípravě zásobních roztoků chloridu sodného a hydroxidu sodného bylo naváženo potřebné množství dané chemikálie s přesností na čtyři desetinná místa, které bylo kvantitativně převedeno do části celkového množství Milli-Q vody, doplněno na potřebný objem a důkladně promícháno. Při přípravě roztoků kyseliny chlorovodíkové bylo potřebné množství kyseliny odpipetováno do malého množství Milli-Q vody a doplněno na potřebný objem.

Roztoky kyseliny hyaluronové v roztoku chloridu sodného o dané koncentraci byly připraveny smícháním zásobního roztoku kyseliny hyaluronové se zásobním roztokem chloridu sodného tak, aby výsledný roztok měl požadovanou koncentraci obou látek. Roztok byl zaparafilmován a míchán na magnetické míchačce minimálně dvě hodiny.

3.2.2 Acidobazické titrace

Acidobazické titrace byly prováděny dvěma různými způsoby. Při obou způsobech probíhalo měření pH a měrné vodivosti na pH-metru a konduktometru SevenMulti Mettler Toledo a přidávky byly realizovány titrátorem TitroLine alpha plus od firmy Schott a titrátorem Titronic universal od firmy Schott. Přidávky titračních činidel o různém objemu byly přidávány každých šedesát sekund a odečet hodnot pH a měrné vodivosti probíhal každých deset sekund. Po celou dobu titrace byl roztok zaparafilmován a míchán. Každá titrace byla provedena minimálně dvakrát.

Při kyselé acidobazické titraci byl 0,1% roztok kyseliny hyaluronové v daném prostředí nejprve přetitrován hydroxidem sodným do pH přibližně 9. K přetitraci bylo použito 7,5 ml hydroxidu sodného o koncentraci $1 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$, který byl připraven ve stejném prostředí jako kyselina hyaluronová. Roztok hydroxidu sodného byl přidáván po 0,25 ml. Přetitrovaný roztok byl následně titrován kyselinou chlorovodíkovou do pH přibližně 3. Kyselina chlorovodíková byla také připravena ve stejném prostředí jako roztoky kyseliny hyaluronové a její koncentrace byla $10 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Při titraci bylo přidáváno 0,05 ml kyseliny chlorovodíkové, dokud celkový objem přidané kyseliny chlorovodíkové netvořil 20 ml.

Druhým způsobem byly zásadité acidobazické titrace. Při těchto titracích byl 0,1% roztok kyseliny hyaluronové v daném prostředí nejprve přetitrován kyselinou chlorovodíkovou do pH přibližně 3. Přetitrace byla realizována pomocí 7,5 ml $10 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ kyseliny chlorovodíkové v daném prostředí, která byla přidávána po 0,25 ml přidavicích. Přetitrovaný roztok byl poté titrován hydroxidem sodným v daném prostředí do pH přibližně 9. Na titraci bylo použito 20 ml $10 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ roztoku hydroxidu sodného, který byl přidáván po 0,05 ml.

Dále byla provedena kyselé i zásadité acidobazické titrace při iontové síle $5 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$. V obou případech byly titrovány 0,1% vzorky kyseliny hyaluronové v $5 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ roztoku chloridu sodného. K titracím byly použity roztoky kyseliny chlorovodíkové a hydroxidu sodného o koncentraci $5 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Při kyselé acidobazické titraci při iontové síle $5 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ bylo k přetitraci použito 1,5 ml hydroxidu, který byl přidáván po 0,1 ml. K přetitrovanému roztoku bylo následně přidáno celkem 20 ml kyseliny chlorovodíkové. Jednotlivé přidávky měly objem 0,05 ml. Při zásadité acidobazické titraci bylo k roztoku kyseliny hyaluronové nejprve přidáno 12,5 ml kyseliny chlorovodíkové po 0,5 ml přidavicích. Poté byl k přetitrovanému roztoku přidáván hydroxid sodný po 0,05 ml přidavicích do dosažení celkového objemu 20 ml.

3.2.3 Studium degradace

Degradace kyseliny hyaluronové byla studována pomocí reometrických měření a SEC-MALLS analýzy. Vzorky, které byly použity při reologickém měření a které byly dány na změření SEC-MALLS, byly připraveny podle rozpisu v tabulce 3. Během přípravy

roztoků bylo měřeno pH. Při každém měření pH byly pro každý vzorek odečteny tři ustálené hodnoty.

Hodnota pH byla změřena pro zásobní roztok kyseliny hyaluronové, který byl použit pro přípravu vzorků. Poté bylo k vzorkům přidáno titrační činidlo, a to buď $1\text{mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ hydroxid sodný, nebo $10\text{mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ kyselina chlorovodíková, a roztok byl devadesát minut míchán na magnetické míchačce. Přídavky titračního činidla měly takový objem, aby odpovídaly přídavkům 0, 0,5, 1, 2, 5 a 7,5 ml při acidobazických přetitracích. Po devadesátiminutovém míchání bylo změřeno pH u všech roztoků. Poté bylo k roztokům přidáno neutralizační činidlo, kterým byla buď $10\text{mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ kyselina chlorovodíková, nebo $100\text{mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ hydroxid sodný, roztok byl míchán a po třicetiminutovém míchání bylo změřeno pH. Následně byla přidána Milli-Q voda a roztoky byly šedesát minut míchány. U vzorku č. 1 bylo místo Milli-Q vody přidáno 10 ml $0,01\text{mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ roztoku chloridu sodného a u vzorku č. 2 10 ml $1,5\text{mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ chloridu sodného. Chlorid sodný byl přidáván proto, aby bylo možné zjistit, jaký vliv má na tokové křivky chlorid sodný, který vznikne z titračního a neutralizačního činidla. Poté bylo provedeno poslední měření hodnoty pH.

Nízkomolekulová kyselina hyaluronová byla připravována obdobně, s tím rozdílem, že zásobní roztok kyseliny hyaluronové měl koncentraci 0,5 % a nebyly připraveny roztoky s chloridem sodným.

Tabulka 3: Rozpis přípravy vzorků pro vysokomolekulovou kyselinu hyaluronovou

Vzorek č.	V(0,2% VMHA) [ml]	V($1\text{mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ NaOH) [ml]	V($10\text{mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ HCl) [ml]	V(MQ vody/NaCl) [ml]
1	10	0	0	10
2	10	0	0	10
3	10	0	0	10
4	10	0,1	0,01	9,89
5	10	0,2	0,02	9,78
6	10	0,4	0,04	9,56
7	10	1	0,10	8,90
8	10	1,5	0,15	8,35
Vzorek č.	V(0,2% VMHA) [ml]	V($10\text{mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ HCl) [ml]	V($100\text{mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ NaOH) [ml]	V(MQ vody) [ml]
9	10	0,1	0,01	9,89
10	10	0,2	0,02	9,78
11	10	0,4	0,04	9,56
12	10	1,0	0,10	8,90
13	10	1,5	0,15	8,35

Měření tokových křivek probíhalo pomocí reometru AR-G2 od firmy TA Instruments při teplotě 25 °C. Roztoky vysokomolekulové kyseliny hyaluronové byly měřeny pomocí geometrie kužel-deska. Kužel měl průměr 60 mm a úhel zkosení 1° a vzorky byly mezi jednotlivými měřeními měněny za nové. Roztoky nízkomolekulové kyseliny hyaluronové byly měřeny pomocí tzv. „double-gap concentric cylinders“. Před samotným měřením bylo na vzorek vždy aplikováno pětiminutové ustálení, které zahrnovalo pro vysokomolekulovou kyselinu hyaluronovou třicetisekundové a pro nízkomolekulovou kyselinu hyaluronovou šedesátisekundové působení smykovou rychlostí 20 s⁻¹. Pro každý vzorek byly prováděny dva druhy měření, kontinuální rampa a dvakrát měření ustáleného stavu. Test kontinuální rampy sloužil ke zjištění vhodného rozsahu smykového napětí. Při testu ustáleného stavu byly pro každý měřený bod odečítány tři hodnoty deformace, které neměly po dobu deseti sekund odchylku od průměrné hodnoty větší než 5 %.

Vzorky na SEC-MALLS byly před jejich změřením přefiltrovány stříkačkou přes 0,45 μm filtr do vialek.

3.2.4 Konduktometrické titrace

Při konduktometrických titracích bylo 40 ml 0,04% roztoku kyseliny hyaluronové v roztoku chloridu sodného o dané koncentraci titrováno 50 ml roztoku chloridu sodného o stejné koncentraci. Každých šedesát sekund byly přidány 2 ml roztoku chloridu sodného a odečet hodnot měrné vodivosti a pH byl realizován každých deset sekund. Po skončení titrace bylo odebráno 40 ml ztitrovaného roztoku kyseliny hyaluronové a znovu titrováno 50 ml roztoku chloridu sodného. Titrace podle uvedeného postupu byla opakována celkem devětkrát. Měření měrné vodivosti a pH probíhalo na pH-metru a konduktometru SevenMulti Mettler Toledo a přídavky byly realizovány titrátorem Titronic universal od firmy Schott. Konduktometrická titrace v každém prostředí byla provedena dvakrát.

V rámci konduktometrických titrací byly změřeny i měrné vodivosti roztoků chloridu sodného použitých při titracích. Po dvouminutovém ustálení byla odečítána hodnota měrné vodivosti v desetisekundových intervalech do dosažení minimálně pěti po sobě jdoucích stejných hodnot nebo po dobu tří minut. Měření měrné vodivosti každého roztoku bylo zopakováno třikrát. Měření měrné vodivosti probíhalo na konduktometru SevenMulti Mettler Toledo.

Z důvodu zjištění reprodukovatelnosti experimentů od Ch. Wandrey byly v rámci konduktometrických titrací provedeny i titrace polystyrensulfonátu sodného v 0 mmol · dm⁻³ chloridu sodném. Tyto titrace byly prováděny dvěma způsoby. První způsob byl shodný s provedením konduktometrických titrací kyseliny hyaluronové. To znamená, že 0,04% roztok polystyrensulfonátu sodného byl titrován 50 ml Milli-Q vody. Milli-Q voda byla přidávána každých šedesát sekund po 2 ml a měrná vodivost a hodnoty pH byly odečítány každých deset sekund. Po skončení titrace bylo odebráno 40 ml ztitrovaného roztoku polystyrensulfonátu sodného a znovu bylo přidáváno 50 ml Milli-Q vody. Celkem byla tato titrace opakována devětkrát. Při druhém způsobu bylo 50 ml roztoku polystyrensulfo-

nátu sodného přidáváno do 40 ml Milli-Q vody. Celkem byly provedeny čtyři titrace a při jednotlivých titracích byly použity roztoky polystyrensulfonátu sodného o koncentracích $7 \cdot 10^{-2}$, $7 \cdot 10^{-3}$ a $7 \cdot 10^{-4}$ %. Při každé titraci byl přidáván 1 ml roztoku polystyrensulfonátu sodného každých šedesát sekund a odečet hodnot měrné vodivosti a pH byl realizován každých deset sekund. Při obou způsobech provedení titrace byl použit konduktometr a pH-metr SevenMulti Mettler Toledo a titrátor Titronic universal od firmy Schott.

3.3 Zpracování dat

Zpracování všech naměřených dat bylo provedeno v programu MS Excel a OriginPro 7.0.

3.3.1 Acidobazické titrace

Oba způsoby acidobazických titrací byly vyhodnocovány z větší části stejným způsobem.

Nejprve byl pro každou naměřenou hodnotu určen přírůstek titračního činidla. Teoreticky, na základě nastavení přístrojů, by pro každý přírůstek titračního mělo být naměřeno 6 hodnot pH a měrné vodivosti. Při odečítání hodnot pH a měrné vodivosti však docházelo ke zpoždování, takže tento předpoklad nebyl splněn. Ze znalosti začátku (6 hodnot před prvním přírůstkem titračního činidla) a konce titrace (6 hodnot po posledním přírůstku titračního činidla) byl pro každou titraci rozpočítán celkový přidávaný objem titračního činidla na každou naměřenou hodnotu pH a měrné vodivosti.

Pro každou hodnotu pH byla vypočtena koncentrace vodíkových protonů

$$[\text{H}^+] = 10^{-pH} \quad (39)$$

a počet molů vodíkových protonů v roztoku

$$n(\text{H}^+) = [\text{H}^+] \cdot (V_{\text{HA}} + V_{\text{HCl}} + V_{\text{NaOH}}) \quad (40)$$

kde V_{HA} , V_{HCl} a V_{NaOH} jsou objemy kyseliny hyaluronové, kyseliny chlorovodíkové a hydroxidu sodného. Dále byl vypočten počet molů hydroxidu sodného

$$n(\text{NaOH}) = c_{\text{NaOH}} \cdot V_{\text{NaOH}} \quad (41)$$

kde c_{NaOH} je molární koncentrace hydroxidu sodného a V_{NaOH} je přidávaný objem hydroxidu sodného. Dále bylo nutné určit počet molů karboxylových skupin. Protože každá disacharidová jednotka kyseliny hyaluronové obsahuje jednu karboxylovou skupinu, byl počet molů karboxylových skupin vypočítán jako

$$n(\text{COOH}) = \left(\frac{w(\text{HA}) \cdot \rho}{M_{\text{DJ}}} \right) \cdot V_{\text{HA}} \quad (42)$$

kde $w(\text{HA})$ je hmotnostní zlomek kyseliny hyaluronové v roztoku, ρ hustota roztoku, M_{DJ} molární hmotnost jedné disacharidové jednotky kyseliny hyaluronové a V_{HA} objem roztoku kyseliny hyaluronové.

Výpočet stupně disociace byl rozdílný pro kyselou a zásaditou acidobazickou titraci. Stupeň disociace pro kyselou acidobazickou titraci byl vypočten podle vzorce

$$\alpha = \frac{n(\text{COOH}) - n(\text{H}^+) - n(\text{NaOH})}{n(\text{COOH})} \quad (43)$$

a pro zásaditou acidobazickou titraci podle vzorce

$$\alpha = \frac{n(\text{H}^+) + n(\text{NaOH})}{n(\text{COOH})} \quad (44)$$

Tento rozdíl ve výpočtech byl proveden proto, že u kyselé acidobazické titrace po přetitraci hydroxidem sodným je kyselina hyaluronová téměř disociovaná a přidáváním kyseliny chlorovodíkové se stupeň disociace snižuje. U zásadité acidobazické titrace nejprve přetitrací kyselinou chlorovodíkovou snížíme stupeň disociace na hodnotu blízkou nule a postupným přidáváním hydroxidu sodného stupeň disociace kyseliny hyaluronové zvyšujeme.

Dále by vypočten výraz $\log[\alpha/(1 - \alpha)]$ a byla vynesena závislost pH na tomto výrazu pro jednotlivá měření. Ze závislosti pH na $\log[\alpha/(1 - \alpha)]$ byla určována disociační konstanta při 50% stupni disociace. Tato závislost byla proložena lineární regresí v rozmezí hodnot $\log[\alpha/(1 - \alpha)] \in \langle -0,2; 0,2 \rangle$ pro kyselou acidobazickou titraci a v rozmezí $\log[\alpha/(1 - \alpha)] \in \langle -0,1; 0,1 \rangle$ pro zásaditou acidobazickou titraci. Všechny získané lineární regrese měly koeficient spolehlivosti vyšší než 0,95. Disociační konstanta při 50% stupni disociace byla získána jako hodnota pH, když byl výraz $\log[\alpha/(1 - \alpha)]$ roven nule. Pro každý druh titrace byly získány dvě hodnoty disociační konstanty, které byly zprůměrovány. Průměrné disociační konstanty byly vyneseny v závislosti na koncentraci chloridu sodného v roztoku.

Na základě odvozené rovnice

$$pK_{a,zd} = pH - \log\left(\frac{\alpha}{1 - \alpha}\right) \quad (45)$$

byla vypočtena zdánlivá disociační konstanta pro každou naměřenou hodnotu a byla vynesena v závislosti na stupni disociace α pro jednotlivá měření. Extrapolací křivky na nulový disociační stupeň lineární regresí v rozmezí hodnot $\alpha \in \langle 0,4; 0,6 \rangle$ pro kyselou acidobazickou titraci a v rozmezí $\alpha \in \langle 0,3; 0,4 \rangle$ pro zásaditou acidobazickou titraci byla získána vnitřní disociační konstanta. Všechny použité lineární regrese měly koeficient spolehlivosti větší než 0,95. Pro každý druh titrace byly získány dvě hodnoty disociační konstanty, které byly zprůměrovány. Průměrné disociační konstanty byly vyneseny v závislosti na koncentraci chloridu sodného v roztoku.

3.3.2 Studium degradace

Vyhodnocení tokových křivek bylo provedeno v programu Rheology Advantage Data Analysis. Při vyhodnocování byla použita pouze data z měření ustáleného stavu.

Nejprve byla upravena oblast smykových rychlostí vhodná pro extrapolaci pomocí funkce Cursors tak, aby po proložení dat příslušným modelem byla chyba co nejmenší.

Pro všechna proložení byly chyby nižší než 10 %. Poté byla vybraná část křivky proložena vhodným modelem. U nízkomolekulové kyseliny hyaluronové byl vybrán Newtonský model a u vysokomolekulové kyseliny hyaluronové Crossův model, který je uveden v následující rovnici:

$$\frac{\eta - \eta_{\infty}}{\eta_0 - \eta_{\infty}} = \frac{1}{1 + (k \cdot \dot{\gamma})^m} \quad (46)$$

kde η_0 je viskozita při smyku limitně blížícímu se 0, η_{∞} viskozita při smyku limitně blížícímu se nekonečnu, k konzistence, $\dot{\gamma}$ smyková rychlost a m index rychlosti. Pro nízkomolekulovou kyselinu hyaluronovou byla odečtena hodnota viskozity a chyba měření a pro vysokomolekulovou kyselinu hyaluronovou viskozita při smyku limitně blížícímu se 0, konzistence, která odpovídá převrácené hodnotě kritické smykové rychlosti, index rychlosti a chyba měření.

Z dat, které byly získány ze SEC-MALLS analýzy, byly sestrojeny závislosti gyračního poloměru na molekulové hmotnosti a vnitřní viskozity na molekulové hmotnosti pro každý vzorek. Obě závislosti byly proloženy mocninnou regresí tak, aby získaná závislost měla koeficient spolehlivosti vyšší než 0,99. Ze závislosti gyračního poloměru na molekulové hmotnosti byl odečítán koeficient konformačního grafu k_{cp} jako exponent získané závislosti. Závislost vnitřní viskozity na molekulové hmotnosti odpovídá Mark-Houwink-Sakuradově rovnici, která je zobrazena v rovnici 34, tudíž z mocninné regrese byly odečteny koeficienty K a a . Získané koeficienty byly vyneseny v závislosti na přídatku titračního činidla.

3.3.3 Konduktometrická titrace

Při konduktometrických titracích byly měřeny měrné vodivosti titračních činidel. Z každého měření měrné vodivosti titračního činidla bylo posledních pět naměřených hodnot zprůměrováno a pro tato data byla vypočtena směrodatná odchylka.

Tabulka 4: Ukázka zpracování naměřených dat pro Milli-Q vodu

$\kappa_1 [\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}]$	$\kappa_2 [\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}]$	$\kappa_3 [\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}]$
0,80	0,59	0,59
0,82	0,59	0,60
0,84	0,60	0,61
0,86	0,60	0,61
0,88	0,61	0,62
průměrná hodnota		0,68
směrodatná odchylka		0,11

Nejprve byl pro každou naměřenou hodnotu měrné vodivosti a pH vypočten přírůstek titračního činidla na základě znalosti začátku (6 hodnot před prvním přírůstkem titračního činidla) a konce titrace (6 hodnot po posledním přírůstku titračního činidla). Ze znalosti

počáteční koncentrace roztoku kyseliny hyaluronové byla vypočtena její hmotnost v titrovaném roztoku podle rovnice

$$m(\text{HA}) = w_{\text{poč}} \cdot V_{\text{poč}} \quad (47)$$

kde $w_{\text{poč}}$ je hmotnostní zlomek kyseliny hyaluronové v roztoku na začátku titrace a $V_{\text{poč}}$ objem kyseliny hyaluronové před začátkem titrace. Pro každou odečtenou hodnotu měrné vodivosti byl vypočten hmotnostní zlomek kyseliny hyaluronové

$$w_{\text{HA}} = \frac{m(\text{HA})}{V_{\text{poč}} + V_{\text{titr}}} \quad (48)$$

kde V_{titr} je přidaný objem titračního činidla. Dále byla vypočtena molární koncentrace monomerních jednotek kyseliny hyaluronové

$$c_{\text{DJ}} = \left(\frac{w(\text{HA}) \cdot \rho}{M_{\text{DJ}}} \right) \quad (49)$$

kde $w(\text{HA})$ je hmotnostní zlomek kyseliny hyaluronové v roztoku, ρ hustota roztoku, M_{DJ} molární hmotnost jedné disacharidové jednotky kyseliny hyaluronové. Molární koncentrace monomerních jednotek kyseliny hyaluronové má rozměr $\text{monomol} \cdot \text{dm}^{-3}$.

Od získaných hodnot měrné vodivosti byla odečtena průměrná hodnota měrné vodivosti titračního činidla

$$\Delta\kappa_1 = \kappa_i - \kappa_0 \quad (50)$$

kde $\Delta\kappa_1$ je rozdíl měrných vodivostí pro první provedení titrace, κ_i změřená měrná vodivost roztoku a κ_0 průměrná hodnota měrné vodivosti titračního činidla. Z rozdílů měrných vodivostí pro obě opakování titrace byla vypočtena průměrná hodnota

$$\Delta\kappa_{\text{prům}} = \frac{\Delta\kappa_1 + \Delta\kappa_2}{2} \quad (51)$$

Dále byla vypočtena molární vodivost roztoku pro obě měření

$$\lambda_i = \frac{\Delta\kappa_1}{c_{\text{DJ}}}; \lambda_i = \frac{\Delta\kappa_2}{c_{\text{DJ}}} \quad (52)$$

a průměrná hodnota molární vodivosti roztoku

$$\lambda_{i, \text{prům}} = \frac{\Delta\kappa_{\text{prům}}}{c_{\text{DJ}}} \quad (53)$$

Byla vynesena závislost průměrné molární vodivosti roztoku na molární koncentraci monomerních jednotek kyseliny hyaluronové. Dále byla vynesena závislost molární vodivosti roztoku na odmocnině z molární koncentrace monomerních jednotek kyseliny hyaluronové a z této závislosti byla extrapolací určena molární vodivost při nekonečném zředění λ_{∞} . Extrapolace byly prováděny v rozmezí molárních koncentrací monomerních jednotek $c \in \langle 1,5 \cdot 10^{-6}; 6,8 \cdot 10^{-7} \rangle \text{ monomol} \cdot \text{dm}^{-3}$ a všechny lineární regrese měly koeficient spolehlivosti vyšší než 0,95. Pomocí molární vodivosti při nekonečném zředění byl vypočten stupeň disociace

$$\alpha = \frac{\lambda_i}{\lambda_{\infty}} \quad (54)$$

Dále byla vypočtena koncentrační disociační konstanta

$$K_c = \frac{w_{\text{HA}} \cdot \lambda_i^2}{\lambda_\infty \cdot (\lambda_\infty - \lambda_i)} \quad (55)$$

Následně byla vynesena závislost logaritmu koncentrační disociační konstanty na odmocnině součinu stupně disociace a molární koncentrace a extrapolací této závislosti byla získána disociační konstanta.

Konduktometrická titrace polystyrensulfonátu sodného byla vyhodnocována výše popsaným způsobem. Jedním z rozdílů od vyhodnocování konduktometrické titrace kyseliny hyaluronové byl výpočet hmotnosti polystyrensulfonátu sodného při titraci, kdy byl roztok polystyrensulfonátu sodného přidáván do Milli-Q vody. Hmotnost polystyrensulfonátu sodného byla vypočtena jako

$$m(\text{PSS}) = w_{\text{poč}} \cdot V_{\text{přid}} \quad (56)$$

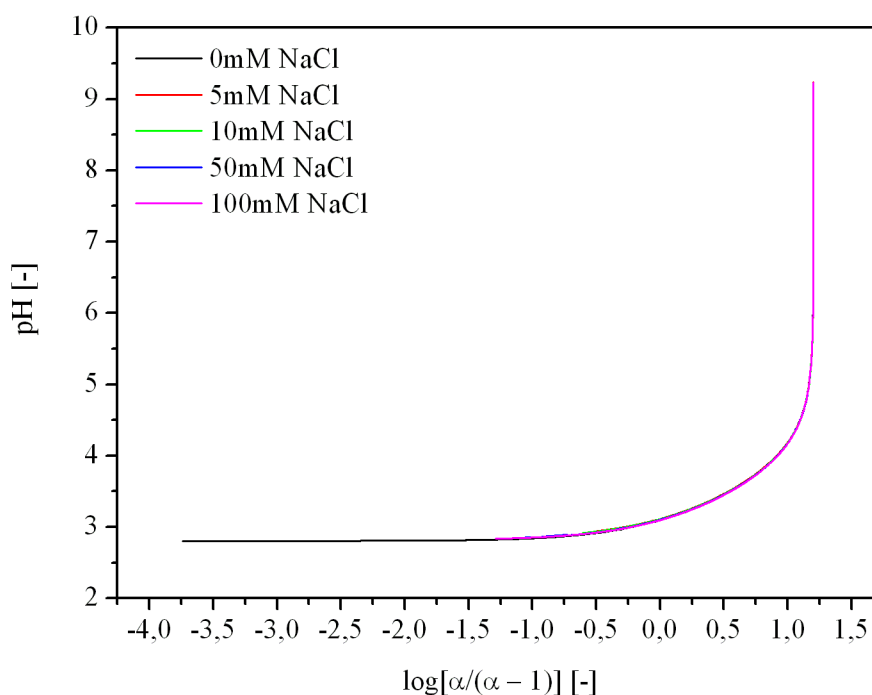
kde $V_{\text{přid}}$ je objem přidaného roztoku polystyrensulfonátu sodného. Dalším rozdílem u této titrace bylo výpočet $\Delta\kappa$. V jednom případě byla použita změřená hodnota měrné vodivosti Milli-Q vody a v druhém případě byla jako hodnota měrné vodivosti Milli-Q vody κ_0 brána průměrná hodnota prvních šesti změřených hodnot měrné vodivosti. Tyto hodnoty měrné vodivosti poté nebyly použity pro další výpočty.

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

4.1 Acidobazické titrace

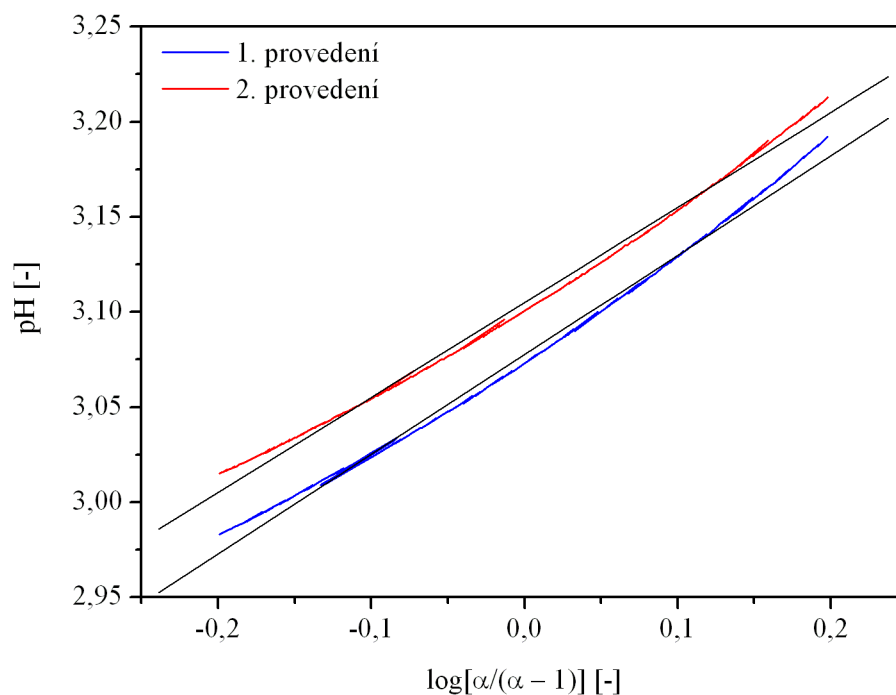
Acidobazické titrace byly prováděny za účelem určení disociační konstanty nízkomolekulové a vysokomolekulové kyseliny hyaluronové. Titrace byly prováděny v různých prostředích, aby bylo možné zjistit, jaký vliv má iontová síla na disociační konstantu kyseliny hyaluronové. Z experimentů byly určovány dva druhy disociačních konstant, disociační konstanta při 50% stupni disociace a při nulovém stupni disociace.

Na obrázku 16 je zobrazeno srovnání závislostí pH na $\log[\alpha/(1-\alpha)]$ pro vysokomolekulovou kyselinu hyaluronovou při kyselé acidobazické titraci v různých prostředích. O všech křivkách je možné konstatovat, že mají stejný průběh a liší se od sebe minimálně. Větší rozdíly mezi křivkami převážně v oblasti, kdy $\log[\alpha/(1-\alpha)] = 0$, bylo možné pozorovat při zásaditých acidobazických titracích. Důvodem bylo to, že prudký vzrůst hodnot pH okolo $\log[\alpha/(1-\alpha)] = 1$, který je možné pozorovat u kyselých acidobazických titrací, byl u zásaditých acidobazických titrací posunut k nižším hodnotám $\log[\alpha/(1-\alpha)]$.

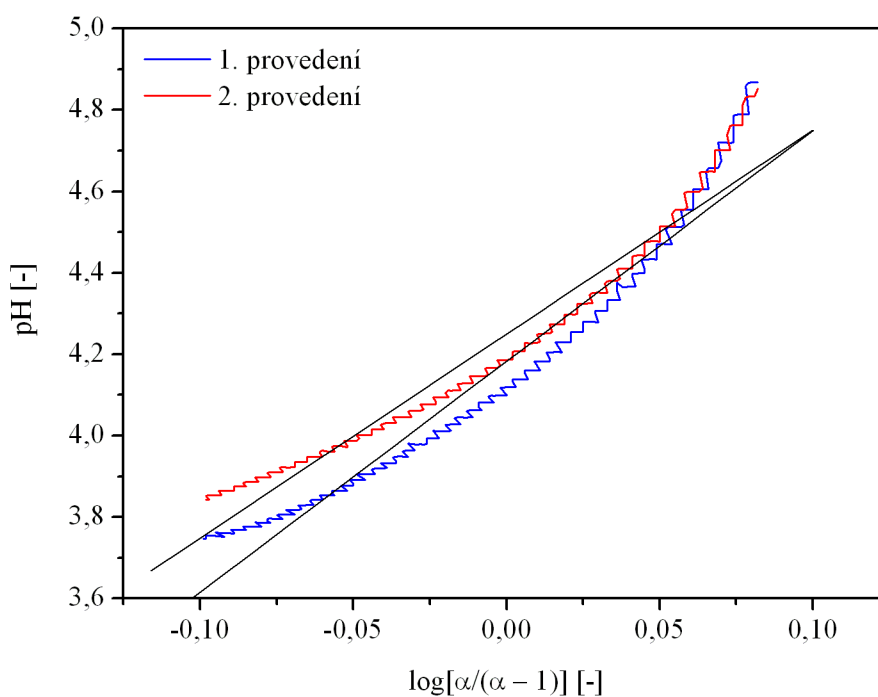


Obrázek 16: Závislost pH na $\log[\alpha/(1-\alpha)]$ při různé koncentraci chloridu sodného pro vysokomolekulovou kyselinu hyaluronovou při kyselé acidobazické titraci

Každá ze závislostí pH na $\log[\alpha/(1-\alpha)]$ byla proložena lineární regresí. Ukázka tohoto proložení pro vysokomolekulovou kyselinu hyaluronovou v $100\text{mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$ chloridu sodném při kyselé acidobazické titraci je zobrazena na obrázku 17. Na obrázku 18 je zobrazeno proložení lineární regresí pro vysokomolekulovou kyselinu hyaluronovou v $100\text{mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$ chloridu sodném při zásadité acidobazické titraci.

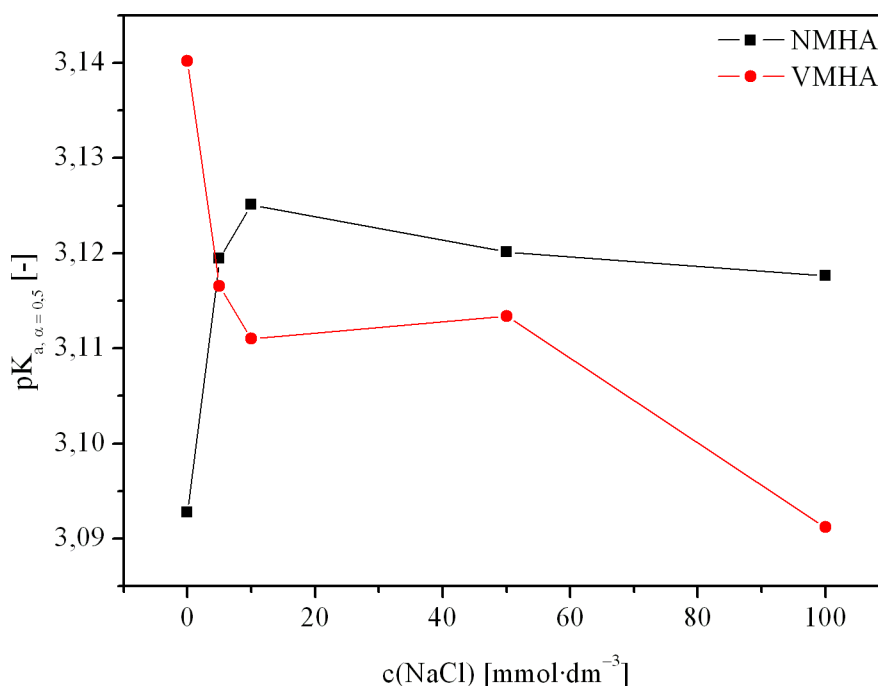


Obrázek 17: Ukázka extrapolace závislosti pH na $\log[\alpha/(1 - \alpha)]$ pro vysokomolekulovou kyselinu hyaluronovou v $100\text{mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ chloridu sodném při kyselé acidobazické titraci



Obrázek 18: Ukázka extrapolace závislosti pH na $\log[\alpha/(1 - \alpha)]$ pro vysokomolekulovou kyselinu hyaluronovou v $100\text{mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ chloridu sodném při zásadité acidobazické titraci

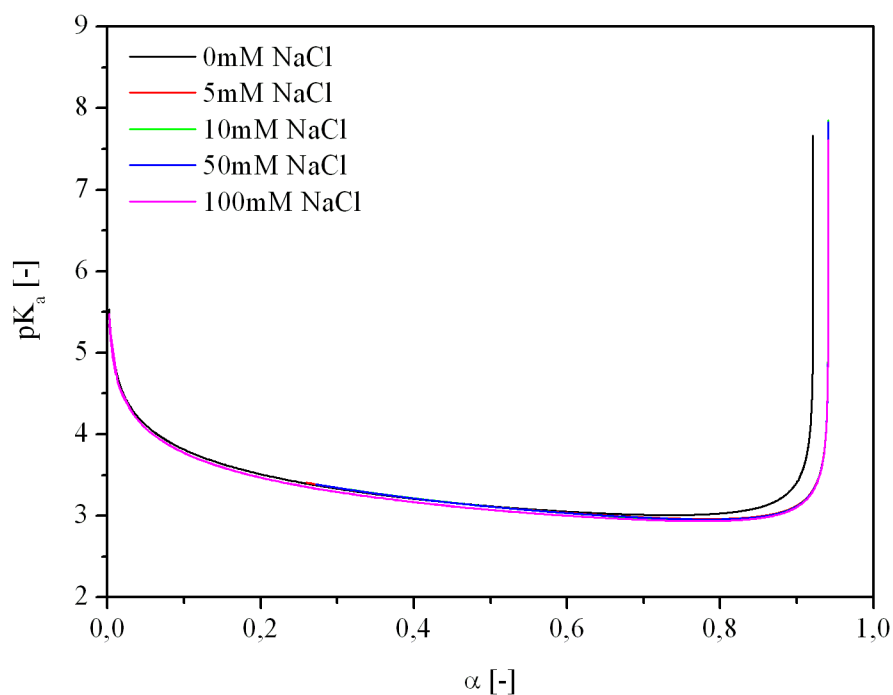
Průměrné disociační konstanty při 50% stupni disociace vynesené v závislosti na koncentraci chloridu sodného jsou zobrazeny na obrázku 19. Disociační konstanta při 50% stupni disociace nízkomolekulové kyseliny hyaluronové s rostoucí koncentrací chloridu sodného nejprve roste, dokud nedosáhne svého maxima v $10\text{mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ chloridu sodném, a poté mírně klesá, zatímco disociační konstanta při 50% stupni disociace vysokomolekulové kyseliny hyaluronové vykazuje s rostoucí koncentrací chloridu sodného klesající charakter. Závislosti získané ze zásaditých acidobazických titrací měly téměř stejný průběh jako závislosti z kyselých acidobazických titrací. U zásadité acidobazické titrace byly ovšem získané hodnoty disociační konstanty vyšší než u kyselé acidobazické titrace, a to z důvodu výše zmiňovaného posunu křivky zásadité acidobazické titrace proti křivce kyselé acidobazické titrace. Všechny získané disociační konstanty při 50% stupni disociace jsou uvedeny v tabulce 5 a 6.



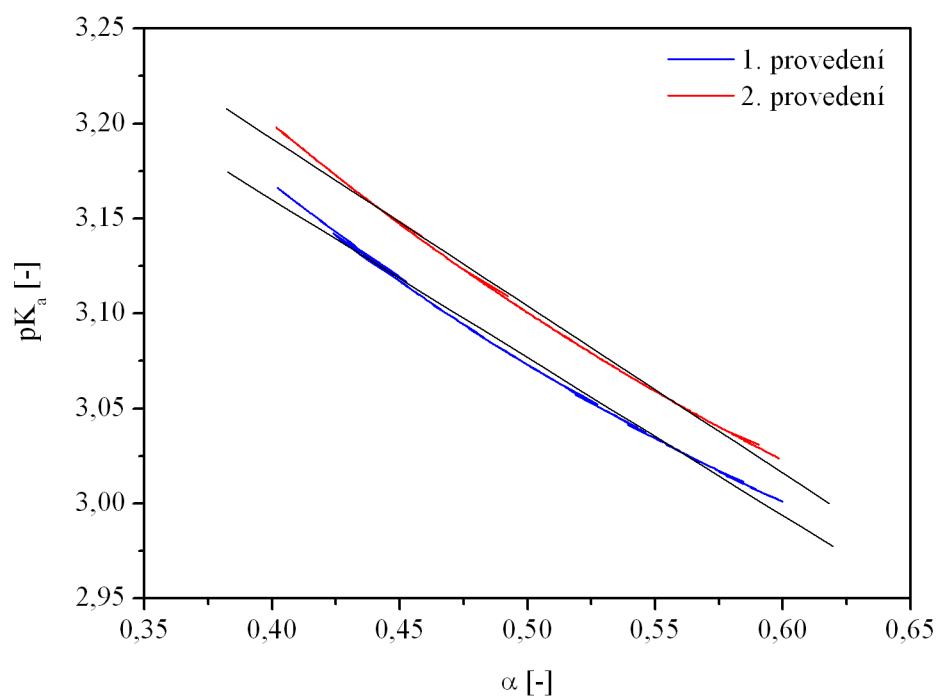
Obrázek 19: Závislost průměrných disociačních konstant při 50% stupni disociace na koncentraci chloridu sodného pro nízkomolekulovou a vysokomolekulovou kyselinu hyaluronovou získaných z kyselé acidobazické titrace

Obrázek 20 zobrazuje závislost zdánlivé disociační konstanty na stupni disociace pro vysokomolekulovou kyselinu hyaluronovou v různých prostředích při kyselé acidobazické titraci. Vliv prostředí opět není u kyselé acidobazické titrace výrazný, ale u zásadité acidobazické titrace se vliv přítomnosti chloridu sodného v roztoku projevil.

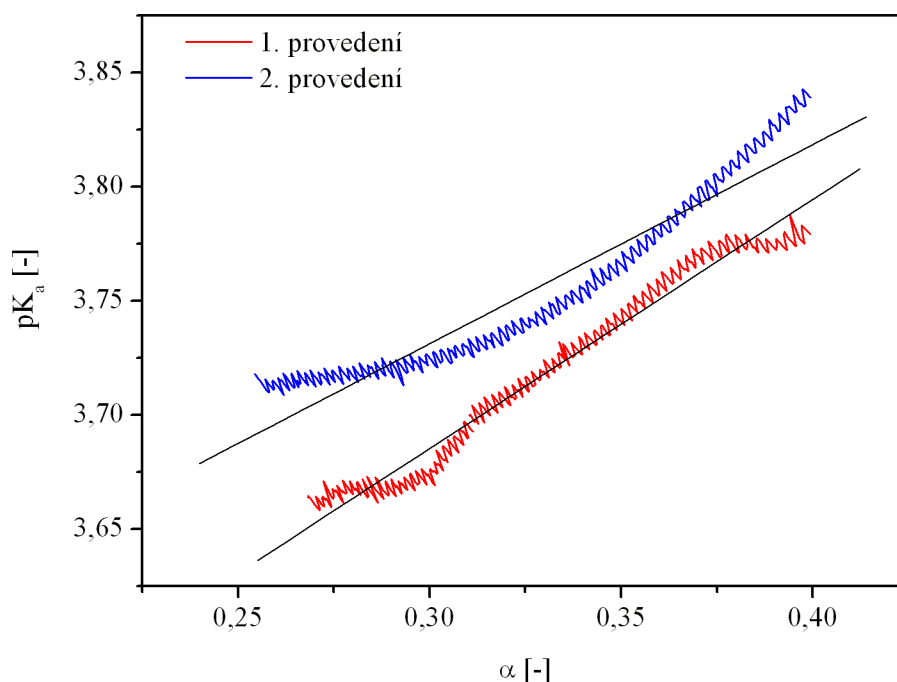
Na obrázcích 21 a 22 jsou zobrazeny ukázky extrapolací závislostí zdánlivé disociační konstanty na stupni disociace pro vysokomolekulovou kyselinu hyaluronovou, která byla připravena v $100\text{mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ chloridu sodném, při kyselé a zásadité acidobazické titraci.



Obrázek 20: Závislost pK_a na α při různé koncentraci chloridu sodného pro vysokomolekulovou kyselinu hyaluronovou při kyselě acidobazické titraci



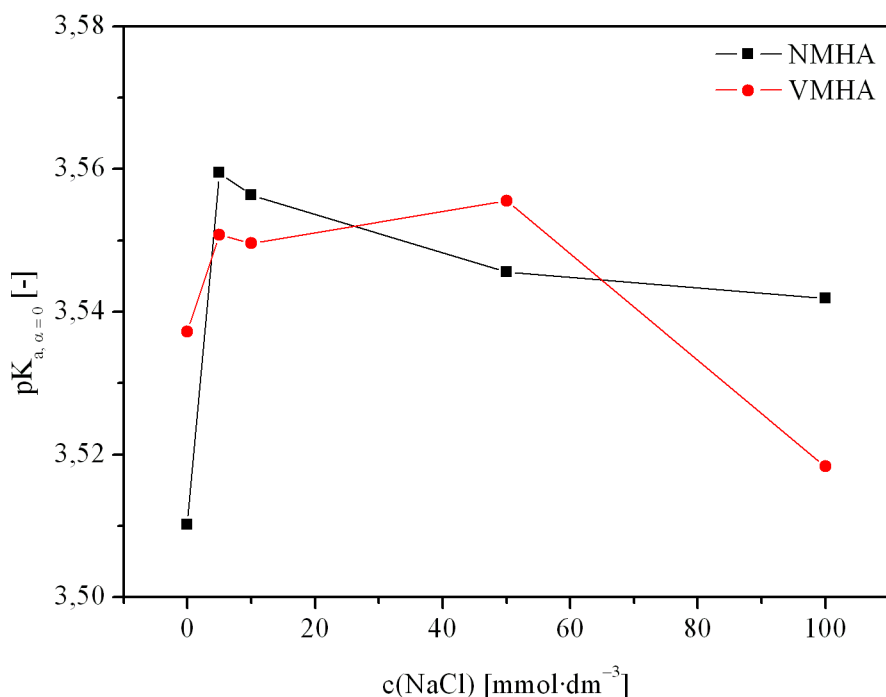
Obrázek 21: Ukázka extrapolace závislosti pK_a na α pro vysokomolekulovou kyselinu hyaluronovou v $100\text{mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ chloridu sodném při kyselě acidobazické titraci



Obrázek 22: Ukázka extrapolace závislosti pK_a na α pro vysokomolekulovou kyselinu hyaluronovou v $100\text{mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ chloridu sodném při zásadité acidobazické titraci

Na obrázku 23 je uvedena disociační konstanta kyseliny hyaluronové při nulovém stupni disociace v závislosti na koncentraci chloridu sodného. Závislost disociační konstanty nízkomolekulové kyseliny hyaluronové při nulovém stupni disociace na koncentraci chloridu sodného u kyselých acidobazických titrací nejprve roste, dokud nedosáhne svého maxima v $5\text{mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ chloridu sodném a poté klesá. Tato závislost pro vysokomolekulovou kyselinu hyaluronovou zprvu také roste s rostoucí koncentrací chloridu sodného a po dosažení maxima v $50\text{mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ chloridu sodném klesá. Disociační konstanty při nulovém stupni disociace pro obě molekulové hmotnosti kyseliny hyaluronové při zásaditých titracích klesají s rostoucí koncentrací chloridu sodného. Získané disociační konstanty při nulovém stupni disociace jsou uvedeny v tabulkách 5 a 6.

Disociační konstanty kyseliny hyaluronové získané z kyselých acidobazických titrací jsou uvedeny v tabulce 5. Disociační konstanty při nulovém stupni disociace mají ve většině případů vyšší hodnotu než disociační konstanty při 50% stupni disociace, což je naopak než výsledky, které získali Tømmeraas a Wahlund a které jsou uvedené v tabulce 2. Všeobecně lze konstatovat, že jednotlivé disociační konstanty se od sebe hodnotou výrazně neliší.



Obrázek 23: Závislost průměrných disociačních konstant při nulovém stupni disociace na koncentraci chloridu sodného pro nízkomolekulovou a vysokomolekulovou kyselinu hyaluronovou získaných z kyselé acidobazické titrace

Tabulka 5: Získané průměrné disociační konstanty pro nízkomolekulovou a vysokomolekulovou kyselinu hyaluronovou při kyselých acidobazických titracích

c(NaCl) [mmol · dm ⁻³]	NMHA		VMHA	
	pK _{a, α=0,5}	pK _{a, α=0}	pK _{a, α=0,5}	pK _{a, α=0}
0	3,09 ± 0,03	3,51 ± 0,05	3,14 ± 0,01	3,54 ± 0,02
5	3,119 ± 0,003	3,559 ± 0,007	3,117 ± 0,003	3,551 ± 0,007
10	3,13 ± 0,02	3,556 ± 0,009	3,11 ± 0,01	3,55 ± 0,03
50	3,12 ± 0,02	3,55 ± 0,02	3,113 ± 0,006	3,56 ± 0,01
100	3,12 ± 0,03	3,542 ± 0,009	3,09 ± 0,02	3,52 ± 0,04

Tabulka 6: Získané průměrné disociační konstanty pro nízkomolekulovou a vysokomolekulovou kyselinu hyaluronovou při zásaditých acidobazických titracích

c(NaCl) [mmol · dm ⁻³]	NMHA		VMHA	
	pK _{a, α=0,5}	pK _{a, α=0}	pK _{a, α=0,5}	pK _{a, α=0}
0	5,06 ± 0,2	4,0 ± 0,3	9,9 ± 0,2	4,5 ± 0,2
5	4,8 ± 0,2	3,98 ± 0,08	4,7 ± 0,2	3,97 ± 0,06
10	5,0 ± 0,6	3,73 ± 0,06	4,5 ± 0,2	3,4 ± 0,4
50	4,5 ± 0,1	3,57 ± 0,01	4,29 ± 0,4	3,36 ± 0,09
100	4,3 ± 0,1	3,53 ± 0,09	4,21 ± 0,06	3,35 ± 0,01

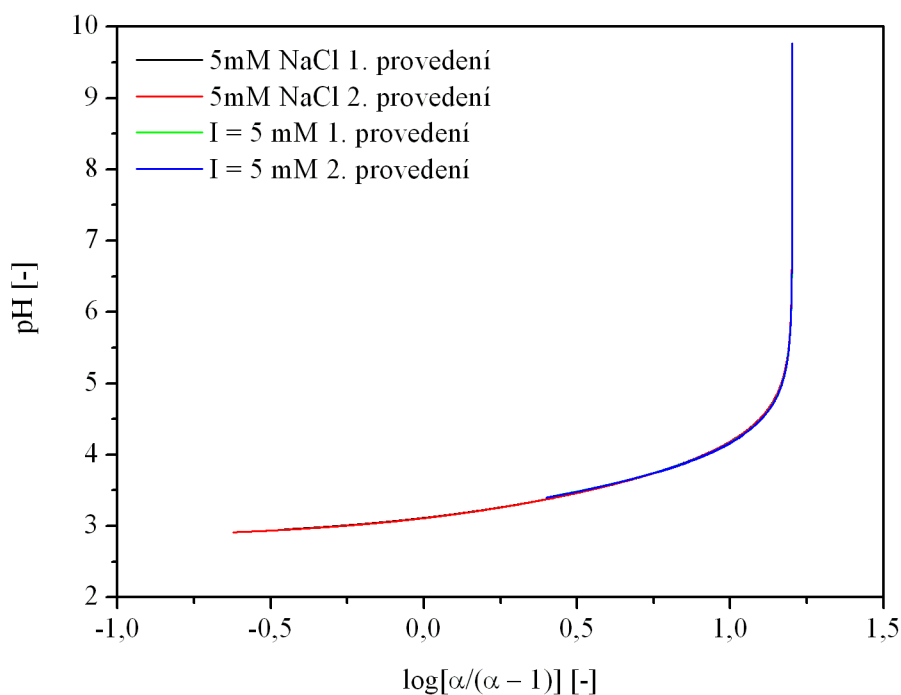
Disociační konstanty kyseliny hyaluronové získané ze zásaditých acidobazických titrací, které jsou uvedeny v tabulce 6, mají vyšší hodnotu než disociační konstanty získané z kyselých acidobazických titrací, a tudíž i než disociační konstanty, které získali autoři citovaných článků. Z tohoto důvodu nelze výsledky získané zásaditou acidobazickou titrací považovat za příliš spolehlivé. Tento posun hodnot disociačních konstant je způsoben tvarem extrapolovaných závislostí, na který měl největší vliv výpočet stupně disociace během titrace, ale také samotné provedení titrace. Pro další měření by pravděpodobně bylo třeba provést přetitraci do nižšího pH, aby byl na počátku samotné titrace stupeň disociace co nejnižší.

Po provedení většiny experimentů acidobazických titrací bylo zjištěno, že původní záměr provádět titrace při konstantní iontové síle nebyl dodržen. Tabulka 7 uvádí, k jakým změnám v iontové síle docházelo v průběhu acidobazických titrací. K největším změnám docházelo v 0, 5 a 10 mmol · dm⁻³ chloridu sodném. Aby bylo možné zjistit, jak velký vliv má tato změna iontové síly na provedené experimenty, byla provedena kyselá i zásaditá acidobazická titrace při konstantní iontové síle 5 mmol · dm⁻³.

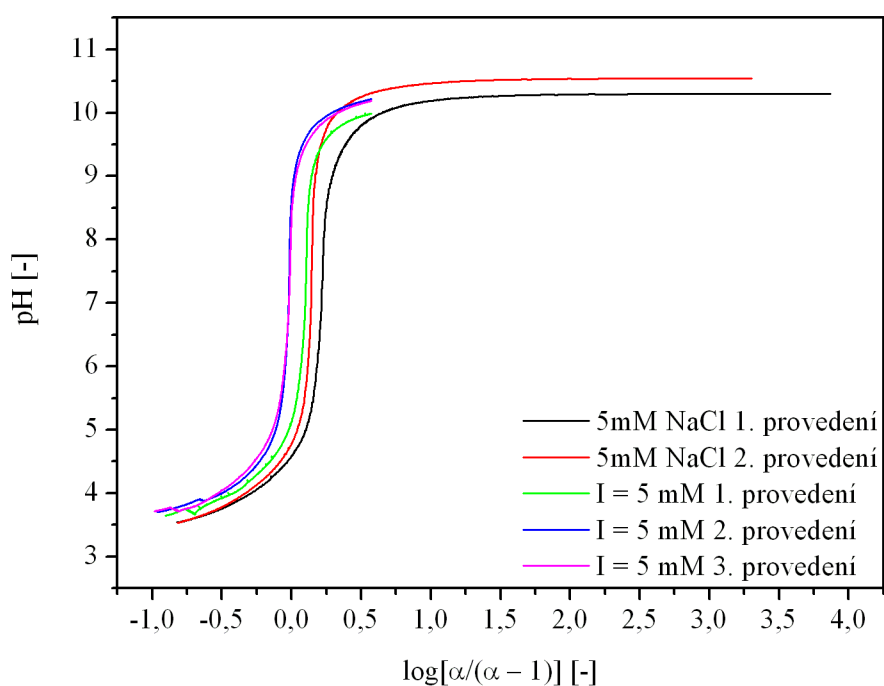
Tabulka 7: Změny iontové síly v průběhu acidobazických titrací

		I [mmol · dm ⁻³]		
		před přetitrací	po přetitrací	po titraci
kyselá	0 mmol · dm ⁻³ NaCl	0,00	0,13	2,68
	5 mmol · dm ⁻³ NaCl	5,00	5,13	7,68
	10 mmol · dm ⁻³ NaCl	10,00	10,13	12,68
	50 mmol · dm ⁻³ NaCl	50,00	50,13	52,68
	100 mmol · dm ⁻³ NaCl	100,00	100,13	102,68
zásaditá	0 mmol · dm ⁻³ NaCl	0,00	1,30	3,55
	5 mmol · dm ⁻³ NaCl	5,00	6,30	8,55
	10 mmol · dm ⁻³ NaCl	10,00	11,30	13,55
	50 mmol · dm ⁻³ NaCl	50,00	51,30	53,55
	100 mmol · dm ⁻³ NaCl	100,00	101,30	103,55

Na obrázcích 24 a 25 jsou uvedena srovnání kyselé a zásadité acidobazické titrace vysokomolekulové kyseliny hyaluronové v 5 mmol · dm⁻³ chloridu sodném a při konstantní iontové síle 5 mmol · dm⁻³. Ze srovnání kyselé acidobazické titrace je patrné, že k výrazným změnám nedošlo. U zásadité acidobazické titrace jsou změny patrnější, což může být způsobeno tím, že strmá část této závislosti je blízko hodnoty $\log[\alpha/(1 - \alpha)] = 0$, a tudíž i menší posun strmé části křivky může způsobit relativně velký rozdíl mezi disociačními konstantami při 50% disociaci. Vyhodnocení disociačních konstant z titrací při konstantní iontové síle 5 mmol · dm⁻³ nemohlo být provedeno, protože u některých křivek nebylo dosaženo potřebného rozsahu hodnot pro extrapolace.



Obrázek 24: Srovnání závislosti pH na $\log[\alpha/(1 - \alpha)]$ v $5\text{mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ chloridu sodném a při konstantní iontové síle $5\text{mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ pro vysokomolekulovou kyselinu hyaluronovou při kyselé acidobazické titraci



Obrázek 25: Srovnání závislosti pH na $\log[\alpha/(1 - \alpha)]$ v $5\text{mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ chloridu sodném a při konstantní iontové síle $5\text{mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ pro vysokomolekulovou kyselinu hyaluronovou při zásadité acidobazické titraci

4.2 Studium degradace

Protože při acidobazických titracích bylo dosaženo relativně nízkých, ale i vysokých hodnot pH, bylo třeba zjistit, zda při těchto hodnotách pH nemůže dojít k degradaci kyseliny hyaluronové. Ke studiu degradace byly použity dvě metody, a to reometrie a SEC-MALLS.

Příprava roztoků pro obě metody byla stejná. Během přípravy bylo měřeno pH roztoků, a to na počátku měření, po přidavku titračního činidla, po přidavku neutralizačního činidla a po přidání vody nebo roztoku chloridu sodného. Změřené hodnoty pH jsou uvedeny v tabulce 8. Ačkoli byl přírůstek titračního činidla zmenšen tak, aby odpovídal přírůstkům 0, 0,5, 1, 2, 5 a 7,5 ml při acidobazických přetitracích, nebylo při studiu degradace dosaženo stejného pH jako při acidobazických přetitracích. Důvodem může být, že při acidobazických titracích nemusely být roztoky plně homogenizované. Po každém přidavku při acidobazických titracích byl roztok míchán pouze šedesát sekund, zatímco při přípravě roztoků na studium degradace se roztoky po přidavku titračního činidla míchaly devadesát minut. Po přidavku neutralizačního činidla a vody se ve většině případů vrátila hodnota pH na hodnotu pH původního roztoku, nebo alespoň na hodnotu jí blízkou.

4.2.1 Reometrie

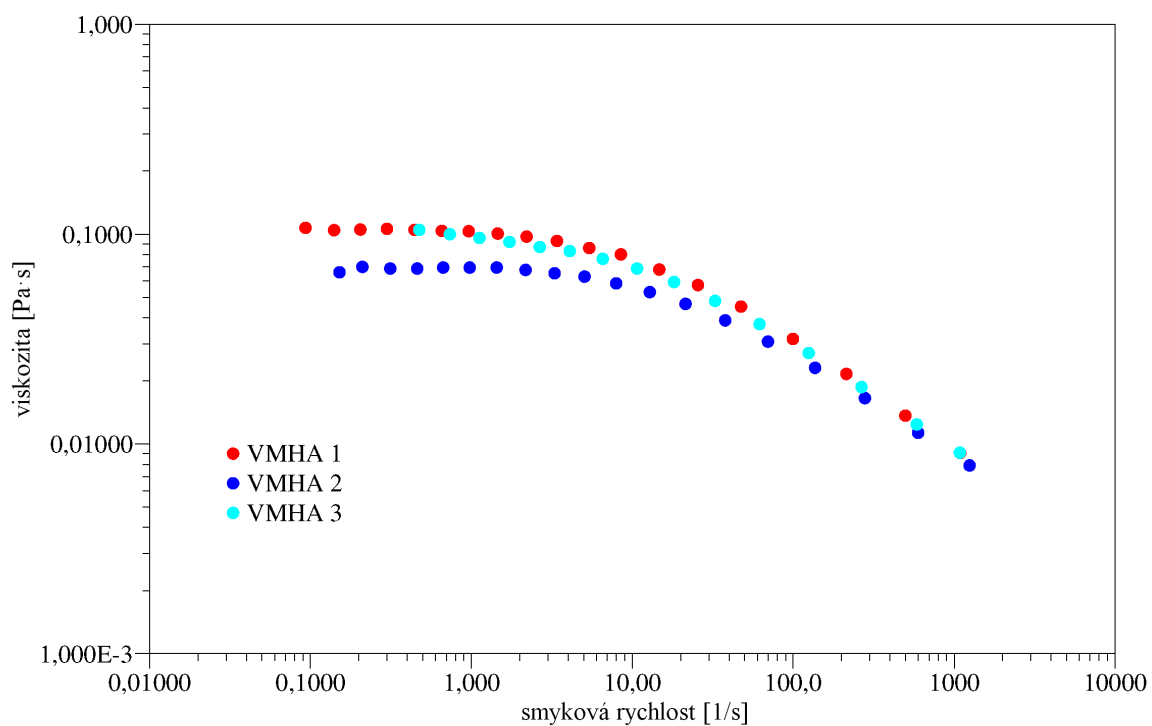
Protože při přípravě roztoků na reometrická měření byl ke kyselině hyaluronové přidáván hydroxid sodný a kyselina chlorovodíková, bylo třeba ověřit, jaký vliv na tokové křivky kyseliny hyaluronové bude mít vznikající chlorid sodný, aby bylo možné odlišit vliv degradace od vlivu přítomnosti chloridu sodného. Proto byly pro reometrická měření připraveny dva vzorky navíc, s nejnižší a nejvyšší koncentrací chloridu sodného, které mohlo být přírůstek titračních a neutralizačních činidel dosaženo.

Na obrázku 26 jsou zobrazeny tokové křivky vysokomolekulové kyseliny hyaluronové srovnávající vliv koncentrace chloridu sodného. U vzorku č. 1, ve kterém je kyselina hyaluronová v $0,005 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ chloridu sodném, nebyl pozorován výrazný pokles proti křivce v Milli-Q vodě (vzorek č. 3). U vzorku č. 2, kde je kyselina hyaluronová v $0,75 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ chloridu sodném, lze pozorovat výraznější pokles závislosti viskozity na smykové rychlosti především při nízkých smykových rychlostech.

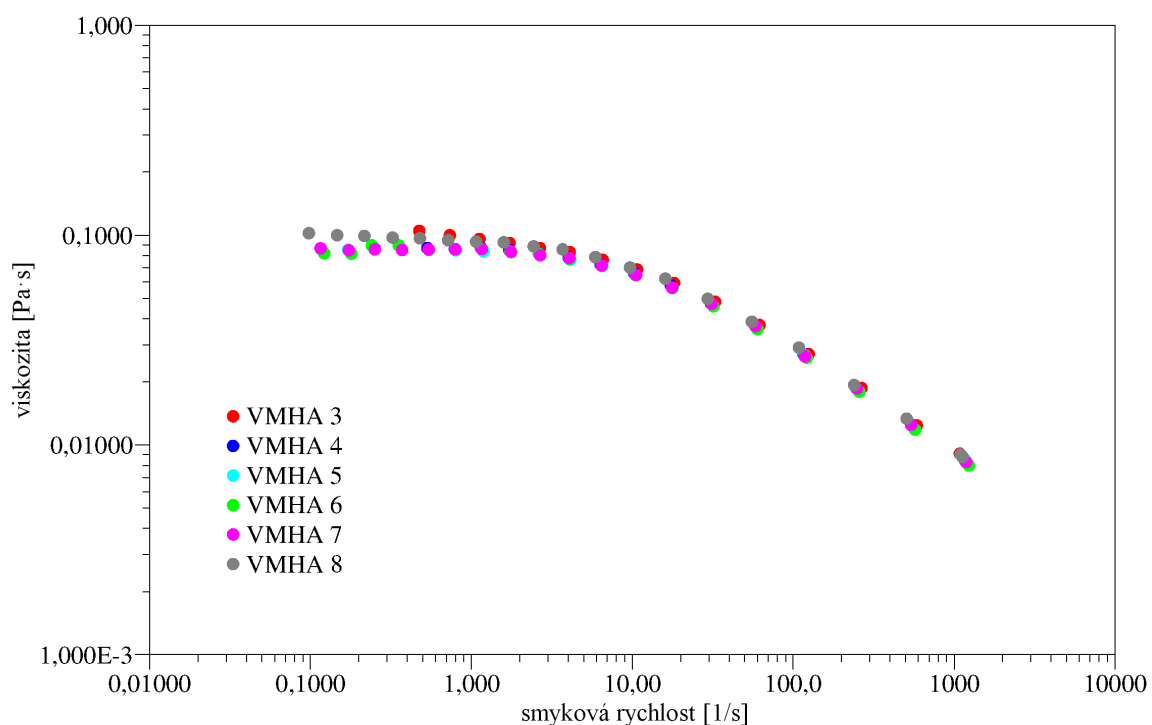
Na obrázcích 27 a 28 jsou zobrazena srovnání tokových křivek vysokomolekulové kyseliny hyaluronové s různými přírůstky hydroxidu sodného, respektive s různými přírůstky kyseliny chlorovodíkové. Mezi závislostmi s přírůstkem hydroxidu sodného není pozorovatelný velký rozdíl, křivky jsou téměř totožné. U závislosti s přírůstkem kyseliny chlorovodíkové je při nižších smykových rychlostech pozorovatelný rozdíl, který ale mizí s rostoucí smykovou rychlostí. Mezi závislostmi viskozity nízkomolekulové kyseliny hyaluronové na smykové rychlosti s různým přírůstkem titračního činidla nebyly pozorovány výraznější rozdíly, křivky měly téměř totožný průběh.

Tabulka 8: Hodnoty pH získané během přípravy vzorků na měření degradace

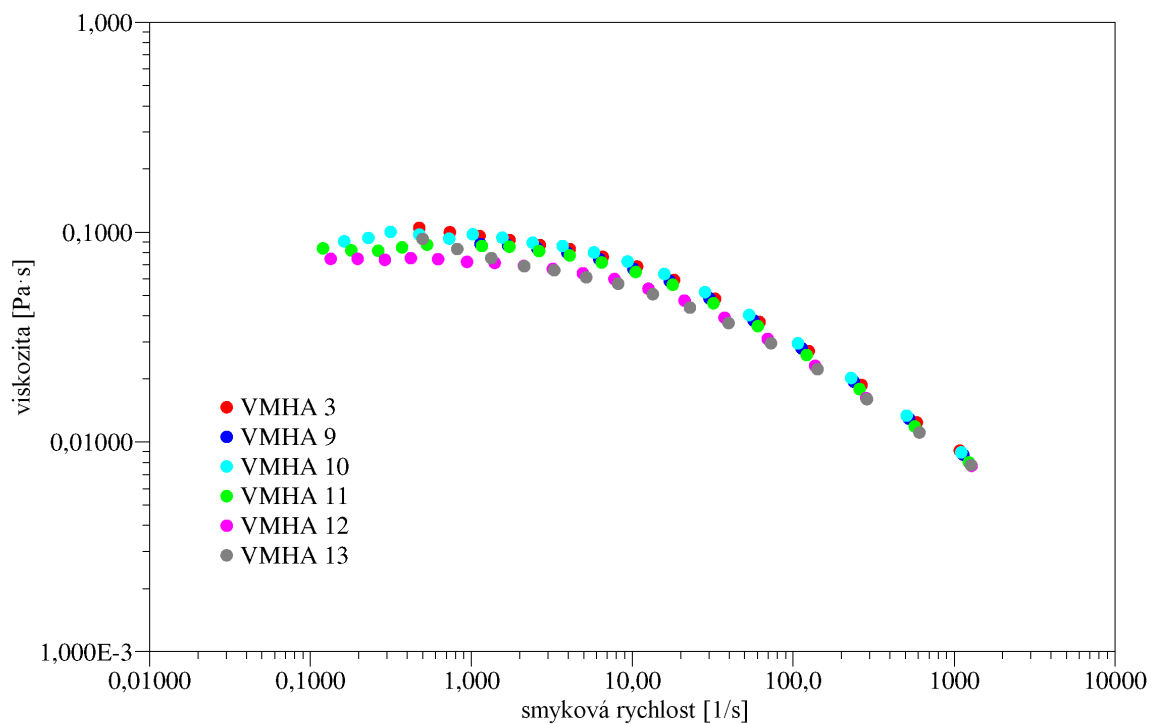
	Vzorek č.	pH _{poč}	pH _{titr.č.}	pH _{neutr.}	pH _{voda}
VMHA	1	6,2	6,2	6,2	6,4
+ NaCl	2	6,2	6,2	6,2	6,3
VMHA	3	6,2	6,2	6,2	6,2
	4	6,2	6,5	6,2	6,2
VMHA	5	6,2	6,6	6,2	6,2
+	6	6,2	6,9	6,2	6,2
NaOH	7	6,2	8,6	6,2	6,2
	8	6,2	9,3	6,1	6,1
	9	6,2	5,5	6,4	6,3
VMHA	10	6,2	5,2	6,4	6,4
+	11	6,2	4,9	6,7	6,6
HCl	12	6,2	4,3	7,2	6,8
	13	6,2	4,0	7,1	6,6
NMHA	14	6,1	6,1	6,1	6,1
	15	6,1	6,1	5,9	6,1
NMHA	16	6,1	6,2	6,0	6,2
+	17	6,1	6,4	6,0	6,1
NaOH	18	6,1	7,9	6,0	6,1
	19	6,1	7,6	6,0	6,1
	20	6,1	5,5	6,2	6,3
NMHA	21	6,1	5,2	6,2	6,2
+	22	6,1	5,0	6,4	6,4
HCl	23	6,1	4,5	6,7	6,4
	24	6,1	4,3	6,7	6,4



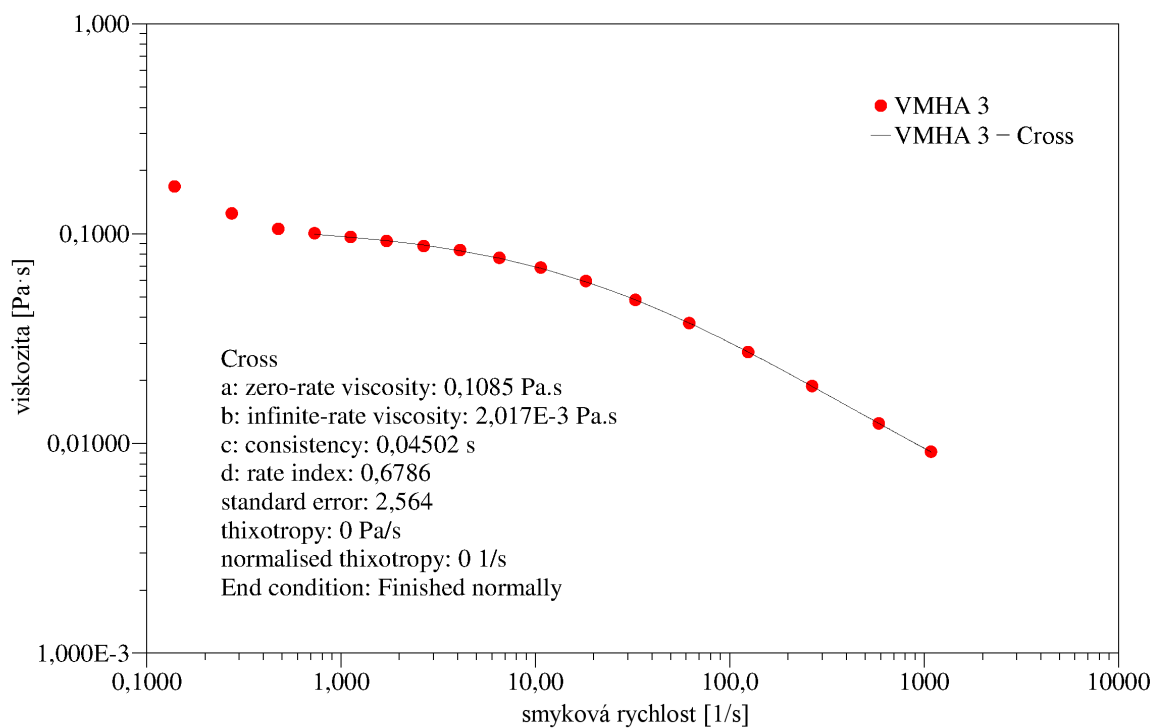
Obrázek 26: Závislost viskozity na smykové rychlosti pro vysokomolekulovou kyselinu hyaluronovou v prostředích s různou koncentrací chloridu sodného



Obrázek 27: Závislost viskozity na smykové rychlosti pro vysokomolekulovou kyselinu hyaluronovou v prostředích s různým přídávkem hydroxidu sodného



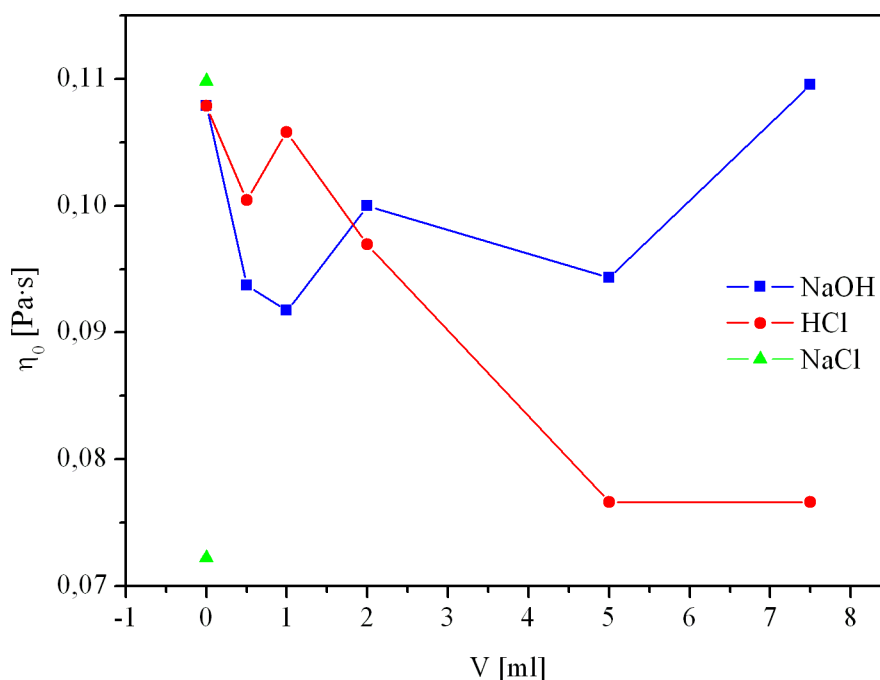
Obrázek 28: Závislost viskozity na smykové rychlosti pro vysokomolekulovou kyselinu hyaluronovou v prostředích s různým přídatkem kyseliny chlorovodíkové



Obrázek 29: Ukázka proložení závislosti viskozity na smykové rychlosti pro vysokomolekulovou kyselinu hyaluronovou Crossovým modelem

Obrázek 29 zobrazuje ukázkou proložení závislosti viskozity na smykové rychlosti Crossovým modelem pro vysokomolekulovou kyselinu hyaluronovou bez přídavku hydroxidu sodného nebo kyseliny chlorovodíkové.

Na obrázku 30 je zobrazena závislost získaných viskozit při smyku blížícímu se 0 pro vysokomolekulovou kyselinu hyaluronovou na přídavku titračního činidla. Na první pohled se u této závislosti neprojevil jednoznačný trend. Vzhledem k tomu, že viskozity při smyku blížícímu se 0 pro všechny vzorky, ke kterým bylo přidáno titrační činidlo, leží mezi hodnotami viskozit vzorků, ke kterým byl přidán roztok chloridu sodného, lze předpokládat, že k výraznější degradaci u těchto vzorků nedošlo. Závislosti viskozity nízkomolekulové kyseliny hyaluronové na objemu titračního činidla měly pro obě titrační činidla podobný průběh. Nejprve v obou případech došlo k vzrůstu viskozity, poté bylo dosaženo maxima a viskozita s rostoucím přídavkem titračního činidla klesala. Maxima bylo dosaženo při přídavku 1 ml hydroxidu sodného a při přídavku 2 ml kyseliny chlorovodíkové. Vzhledem k tomuto průběhu závislosti viskozity nízkomolekulové kyseliny hyaluronové na objemu titračního činidla lze také předpokládat, že k výraznější degradaci nedošlo.



Obrázek 30: Závislost viskozity při smyku blížícímu se 0 získané z Crossova modelu na přídavku titračního činidla pro vysokomolekulovou kyselinu hyaluronovou

V tabulce 9 jsou uvedeny všechny parametry, které byly získány po proložení tokových křivek Crossovým a Newtonským modelem.

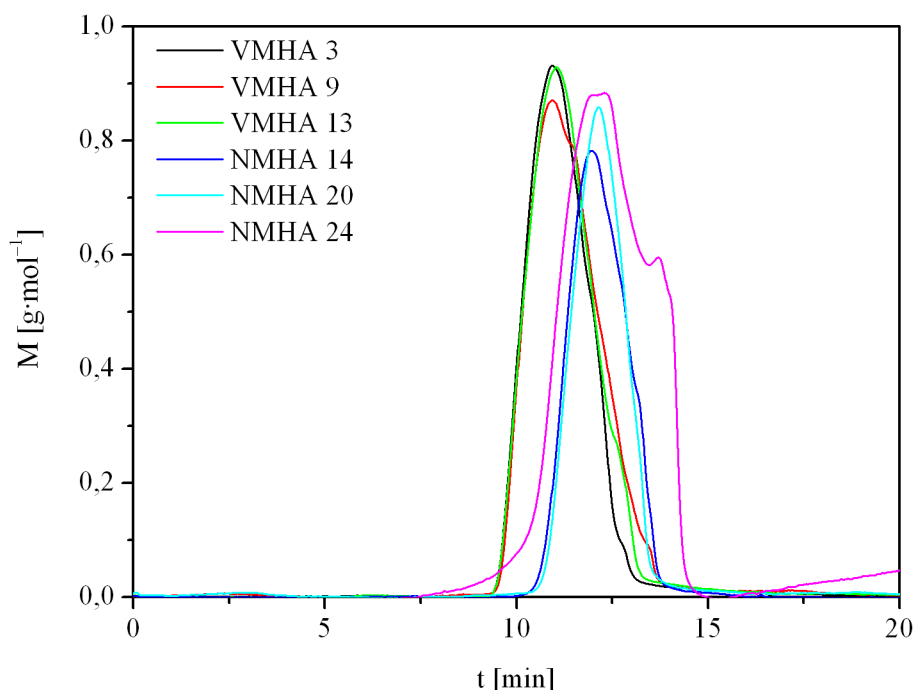
Tabulka 9: Hodnoty získané proložením tokových křivek kyseliny hyaluronové v různých prostředích Crossovým a Newtonským modelem

VMHA				NMHA	
Vzorek č.	η_0 [Pa·s]	k [s]	m [-]	Vzorek č.	η [Pa·s]
1	0,1098	0,0378	0,7653	14	$4,23 \cdot 10^{-3}$
2	0,0722	0,0249	0,7500	15	$4,33 \cdot 10^{-3}$
3	0,1079	0,0447	0,6794	16	$4,36 \cdot 10^{-3}$
4	0,0937	0,0337	0,7430	17	$4,29 \cdot 10^{-3}$
5	0,0917	0,0324	0,7454	18	$4,25 \cdot 10^{-3}$
6	0,1000	0,0448	0,6820	19	$4,27 \cdot 10^{-3}$
7	0,0943	0,0356	0,7225	20	$4,28 \cdot 10^{-3}$
8	0,1095	0,0450	0,7017	21	$4,36 \cdot 10^{-3}$
9	0,1005	0,0391	0,7096	22	$4,41 \cdot 10^{-3}$
10	0,1058	0,0404	0,7152	23	$4,17 \cdot 10^{-3}$
11	0,0970	0,0367	0,7273	24	$4,13 \cdot 10^{-3}$
12	0,0766	0,0269	0,7442		
13	0,0766	0,0301	0,6992		

4.2.2 SEC-MALLS

Analýza SEC-MALLS byla prováděna primárně za účelem zjištění molekulové hmotnosti kyseliny hyaluronové, aby bylo možné potvrdit závěry získané z reologických měření. Na obrázku 31 je zobrazena ukázka chromatogramů pro vysokomolekulovou a nízkomolekulovou kyselinu hyaluronovou ve třech různých prostředích, bez přídavku titračního činidla, s nejnižším přídavkem kyseliny chlorovodíkové a s nejvyšším přídavkem kyseliny chlorovodíkové. Chromatogramy pro jednotlivou molekulovou hmotnost kyseliny hyaluronové se od sebe výrazně neliší. Pouze u nízkomolekulové kyseliny hyaluronové s nejvyšším přídavkem kyseliny chlorovodíkové (purpurová křivka) můžeme pozorovat, že křivka má dva píky. Druhý pík je způsoben pravděpodobně nečistotami nebo tím, že vzorek byl měřen přibližně s týdenním zpožděním ve srovnání s ostatními vzorky. Při srovnání chromatogramů vysokomolekulové a nízkomolekulové kyseliny hyaluronové je viditelný jejich vzájemný posun. Důvodem tohoto posunu je fakt, že nízkomolekulová kyselina hyaluronová má menší rozměr molekul než vysokomolekulová kyselina hyaluronová, a proto jí trvá delší dobu projít kolonou.

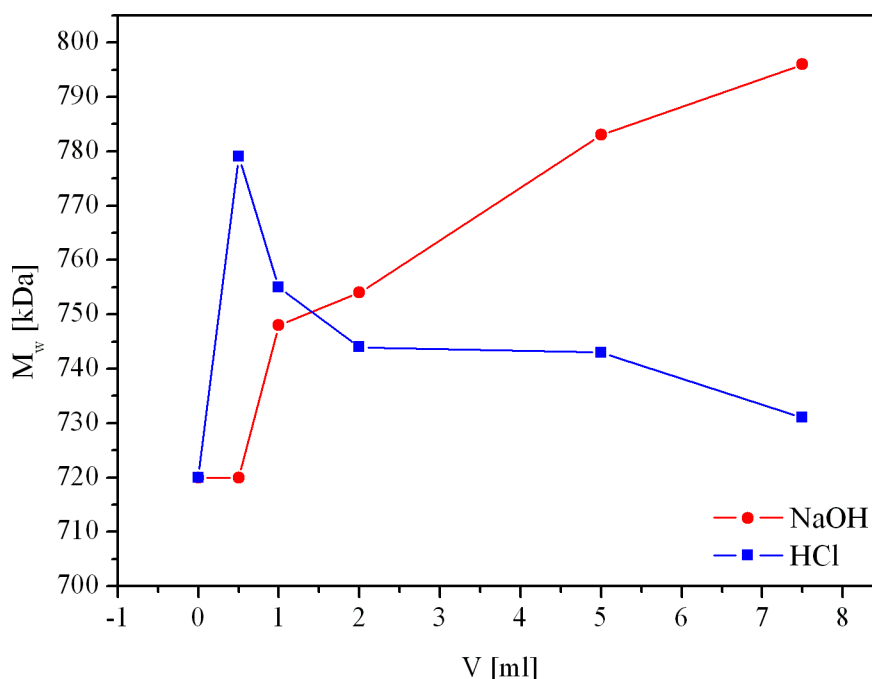
Na obrázku 32 je zobrazena získaná hmotnostně střední molekulová hmotnost pro vysokomolekulovou kyselinu hyaluronovou v závislosti na přídavku titračního činidla. Zatímco při přídavcích hydroxidu sodného můžeme v případě vysokomolekulové kyseliny hyaluronové sledovat vzrůst hodnot molekulových hmotností spolu se vzrůstem přídavků, u přídavků kyseliny chlorovodíkové lze vzrůst pozorovat pouze do přídavku 0,5 ml ky-



Obrázek 31: Ukázka chromatogramů pro vysokomolekulovou a nízkomolekulovou kyselinu hyaluronovou bez přidavku titračního činidla (černá a modrá křivka), s nejnižším (červená a azurová křivka) a nejvyšším přidavkem kyseliny chlorovodíkové (zelená a purpurová křivka)

seliny chlorovodíkové, poté molekulové hmotnosti klesají s rostoucím přidáním objemu kyseliny chlorovodíkové. Konkrétní získané hodnoty pro nízkomolekulovou kyselinu hyaluronovou jsou uvedeny v tabulce 10. U závislosti hmotnostně střední molekulové hmotnosti nízkomolekulové kyseliny hyaluronové na přidavcích hydroxidu sodného a na přidavcích kyseliny chlorovodíkové nebyl pozorován jednoznačný trend. Závislost hmotnostně střední molekulové hmotnosti na přidavcích kyseliny chlorovodíkové vykazovala od přidavku 2 ml prudký vzrůst. Důvodem tohoto vzrůstu je pravděpodobně to, že tyto tři vzorky byly měřeny s týdenním zpožděním proti ostatním vzorkům a u všech se v chromatogramu objevil druhý pík, pravděpodobně způsobený nečistotami. Pro všechny vzorky byly také získány početně střední molekulové hmotnosti kyseliny hyaluronové, které po vynesení v závislosti na přidavku titračního činidla měly téměř totožný průběh jako závislosti hmotnostně střední molekulové hmotnosti na přidavku titračního činidla.

Dalším zajímavým výsledkem ze SEC-MALLS analýzy jsou samotné hodnoty získaných molekulových hmotností, které jsou uvedeny v tabulce 10. Podle údaje od výrobce byla pro analýzu použita kyselina hyaluronová s molekulovou hmotností 90–130 kDa a 1 500–1 750 kDa. Získané molekulové hmotnosti se pro vysokomolekulovou kyselinu hyaluronovou pohybují v hodnotách přibližně o polovinu menších, než udává výrobce. Získané molekulové hmotnosti pro nízkomolekulovou kyselinu hyaluronovou se pohybují na spodní hranici molekulové hmotnosti udané výrobcem. Tento pokles může mít dvě příčiny.



Obrázek 32: Závislost hmotnostně střední molekulové hmotnosti na přídávku titračního činidla pro vysokomolekulovou kyselinu hyaluronovou

První možnou příčinou je sušení kyseliny hyaluronové před samotnou přípravou zásobního roztoku, během kterého mohlo dojít k její degradaci. Druhou možnou příčinou poklesu molekulových hmotností vzorků kyseliny hyaluronové může být relativně dlouhá prodleva mezi přefiltrováním vzorků a samotným změřením vzorků. Tato prodleva byla způsobena poruchou na pumpě mobilní fáze, která musela být pro správnou funkčnost přístroje odstraněna. Během této prodlevy byly vzorky skladovány při laboratorní teplotě, což mohlo přispět ke snížení molekulových hmotností vzorků.

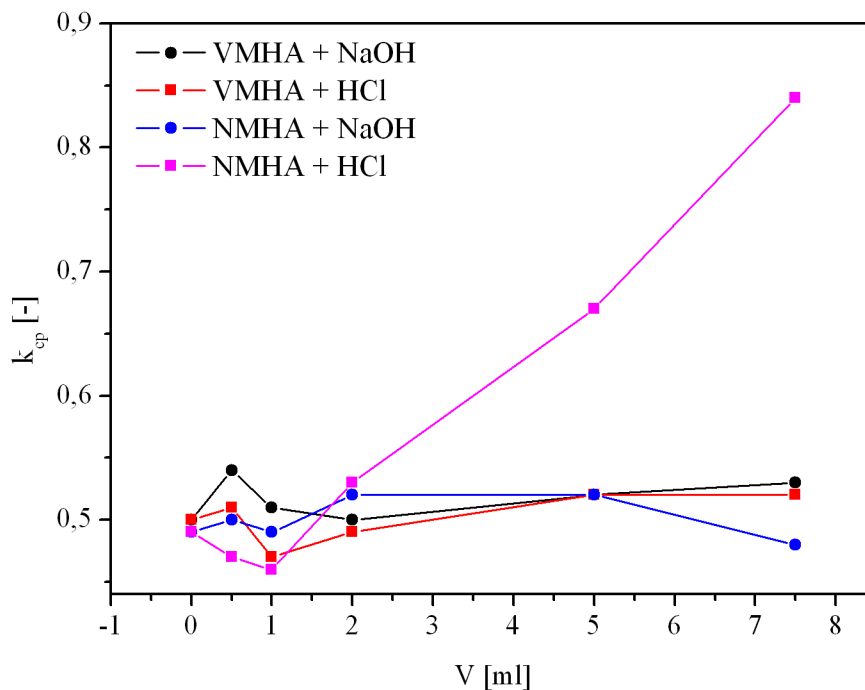
Kromě hmotnostně střední molekulové hmotnosti kyseliny hyaluronové M_n a početně střední molekulové hmotnosti M_w byly ze SEC-MALLS analýzy získány také další parametry. Mezi tyto parametry patří index polydisperzity I , gyrační poloměr R_w , hydrodynamický poloměr získaný z měření viskozity $R_{h(v)w}$ a vnitřní viskozita $[\eta]$. Všechny získané hodnoty jsou uvedeny v tabulce 10.

Na obrázku 33 je uvedena závislost koeficientu k_{cp} získaného z konformačního grafu na přídávku titračního činidla pro nízkomolekulovou i vysokomolekulovou kyselinu hyaluronovou. S výjimkou vzorků s dvěma nejvyššími přídávky kyseliny chlorovodíkové k nízkomolekulové kyselině hyaluronové se všechny hodnoty koeficientu k_{cp} z konformačního grafu pohybují okolo hodnoty 0,5, což by znamenalo, že se kyselina hyaluronová v roztoku nachází v konformaci náhodného klubka. U těchto tří vzorků je odchylka od hodnoty 0,5 pravděpodobně způsobena pozdním změřením vzorků a přítomností nečistot. Konkrétní hodnoty jsou uvedeny v tabulce 11.

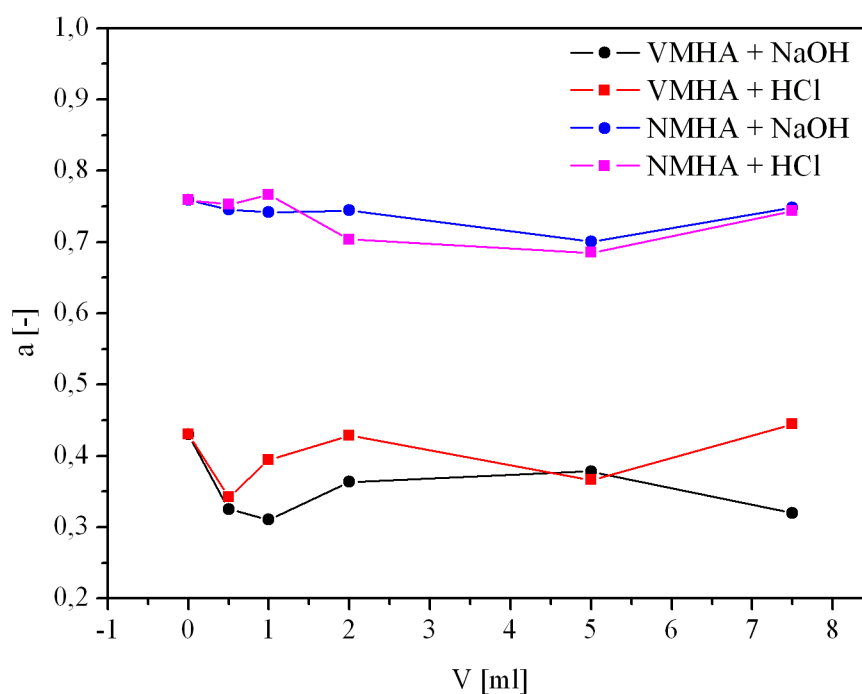
Tabulka 10: Hodnoty získané ze SEC-MALLS analýzy

	Vzorek č.	M_n [kDa]	M_w [kDa]	I [-]	R_w [nm]	$R_{h(v)w}$ [nm]	$[\eta]$ [ml · g ⁻¹]
VMHA	3	625	720	1,51	112	57	1 680
	4	654	720	1,10	121	57	1 644
VMHA	5	681	748	1,10	119	58	1 725
+	6	687	754	1,10	123	59	1 716
NaOH	7	719	783	1,09	124	59	1 727
	8	732	796	1,09	125	60	1 780
	9	724	779	1,08	122	60	1 772
VMHA	10	683	755	1,11	117	60	1 798
+	11	668	744	1,12	121	58	1 707
HCl	12	669	743	1,11	120	58	1 700
	13	664	731	1,10	120	57	1 677
NMHA	14	82	96	1,17	33	17	357
	15	78	93	1,19	32	17	351
NMHA	16	76	93	1,23	33	17	347
+	17	75	92	1,23	32	17	343
NaOH	18	82	95	1,16	34	17	350
	19	77	95	1,22	33	17	355
	20	78	94	1,21	33	17	352
NMHA	21	78	94	1,21	33	17	352
+	22	105	113	1,08	34	18	339
HCl	23	109	120	1,10	37	19	356
	24	101	109	1,08	14	18	336

Obrázek 34 zobrazuje závislost koeficientu a , který byl získán z Mark-Houwink-Sakuradaovy rovnice, na přídatku titračního činidla pro nízkomolekulovou i vysokomolekulovou kyselinu hyaluronovou. Hodnoty získané pro nízkomolekulovou kyselinu hyaluronovou se pohybují mezi hodnotami 0,7–0,8, z čehož lze usuzovat, že se nízkomolekulová kyselina hyaluronová v roztoku nachází v konformaci velmi expandovaného náhodného klubka. Hodnoty získané pro vysokomolekulovou kyselinu hyaluronovou však nabývají hodnot mezi 0,3 a 0,4, čímž se konformace náhodného klubka nepotvrdila. Přehled získaných koeficientů a a K je zobrazen v tabulce 11.



Obrázek 33: Závislost koeficientu k_{cp} získaného z konformačního grafu na přidavku titračního činidla pro nízkomolekulovou a vysokomolekulovou kyselinu hyaluronovou



Obrázek 34: Závislost koeficientu a získaného z Mark-Howwink-Sakuradovy rovnice na přidavku titračního činidla pro nízkomolekulovou a vysokomolekulovou kyselinu hyaluronovou

Tabulka 11: Hodnoty koeficientů získaných z konformačního grafu a Mark-Houwink-Sakuradovy rovnice

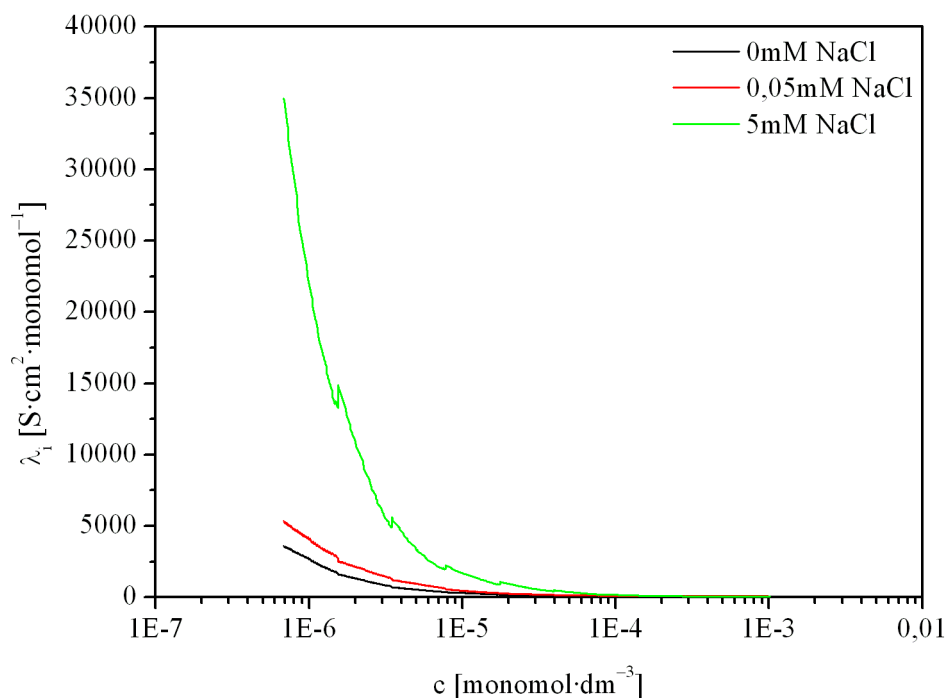
	Vzorek č.	k_{cp} [-]	K [ml · g ⁻¹]	$a \cdot 10^{-1}$ [-]
VMHA	3	0,50	5,22	4,31
	4	0,54	22,10	3,25
VMHA	5	0,51	27,36	3,11
+	6	0,50	13,07	3,64
NaOH	7	0,52	10,45	3,79
	8	0,53	24,44	3,19
	9	0,51	18,01	3,43
VMHA	10	0,47	8,91	3,94
+	11	0,49	5,50	4,29
HCl	12	0,52	12,66	3,66
	13	0,52	4,33	4,44
NMHA	14	0,49	$6,03 \cdot 10^{-2}$	7,59
	15	0,50	$7,01 \cdot 10^{-2}$	7,46
NMHA	16	0,49	$7,38 \cdot 10^{-2}$	7,42
+	17	0,52	$7,07 \cdot 10^{-2}$	7,44
NaOH	18	0,52	$11,64 \cdot 10^{-2}$	7,01
	19	0,48	$6,90 \cdot 10^{-2}$	7,48
	20	0,47	$6,47 \cdot 10^{-2}$	7,53
NMHA	21	0,46	$5,50 \cdot 10^{-2}$	7,66
+	22	0,53	$9,48 \cdot 10^{-2}$	7,04
HCl	23	0,67	$11,94 \cdot 10^{-2}$	6,85
	24	0,84	$6,26 \cdot 10^{-2}$	7,44

4.3 Konduktometrické titrace

Cílem konduktometrických titrací bylo prozkoumat, jak se kyselina hyaluronová chová v roztocích chloridu sodného, respektive získat závislost molární vodivosti na molární koncentraci monomerních jednotek kyseliny hyaluronové, ze které by bylo možné určit disociační konstantu kyseliny hyaluronové.

Na obrázku 35 je zobrazena závislost molární vodivosti vysokomolekulové kyseliny hyaluronové na molární koncentraci monomerních jednotek. Již při prvním pohledu je zřejmé, že získaná závislost se liší od závislostí zobrazených na obrázcích 8 a 9, které získala Christine Wandrey. Ačkoli byla konduktometrická titrace prováděna ve stejném koncentračním rozsahu jako ve studii Ch. Wandrey, měla závislost molární vodivosti kyseliny hyaluronové na molární koncentraci jejích monomerních jednotek rostoucí charakter se snižující se molární koncentrací monomerních jednotek kyseliny hyaluronové v celém koncentrač-

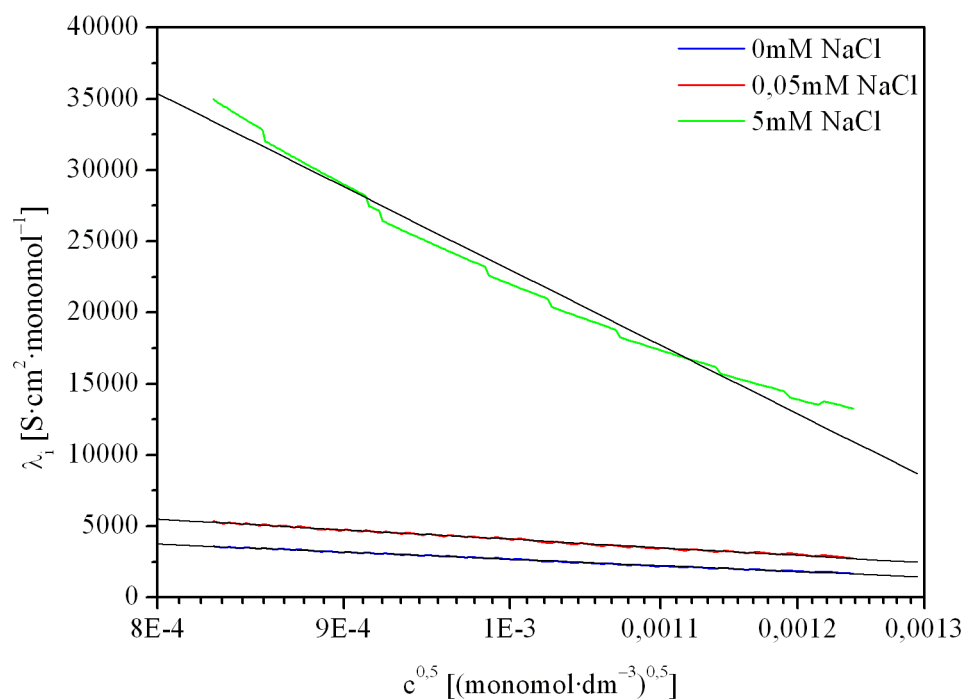
ním rozsahu. Také rozsah molárních vodivostí je daleko vyšší, než získala Ch. Wandrey. To může být způsobeno tím, že při velkém naředění roztoku kyseliny hyaluronové měl tento roztok měrnou vodivost velmi blízkou měrné vodivosti prostředí, která zůstávala téměř konstantní, zatímco se molární koncentrace monomerních jednotek kyseliny hyaluronové neustále snižovala. Dalším rozdílem je posloupnost křivek. Zatímco ve studii Ch. Wandrey s rostoucí koncentrací chloridu sodného molární vodivost polystyrensulfo-nátu sodného klesá, u kyseliny hyaluronové se projevil opačný trend, a sice že s rostoucí koncentrací chloridu sodného molární vodivost kyseliny hyaluronové roste.



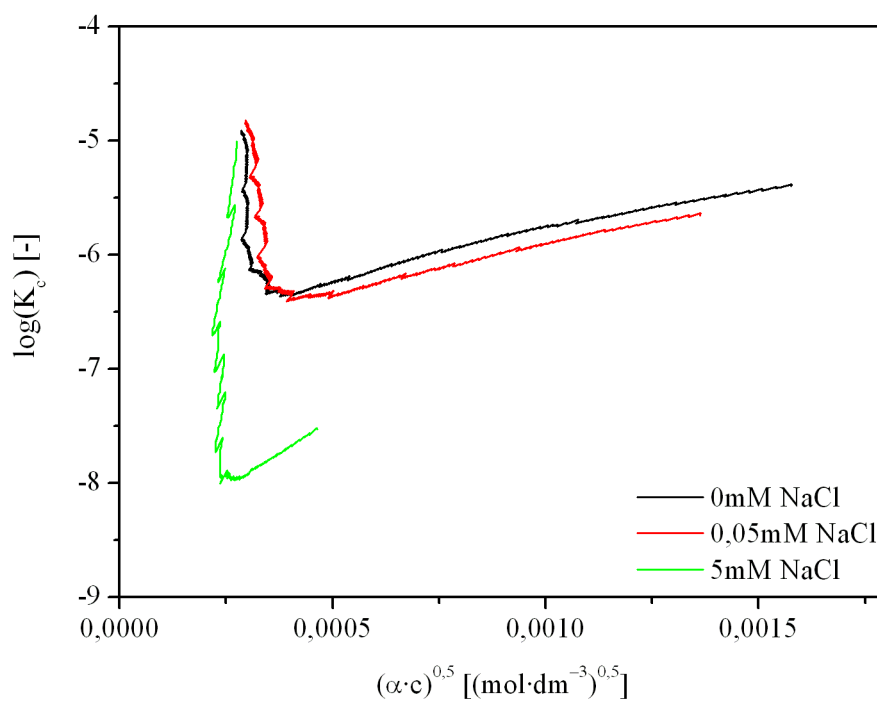
Obrázek 35: Závislost molární vodivosti vysokomolekulové kyseliny hyaluronové na molární koncentraci monomerních jednotek kyseliny hyaluronové v různém prostředí

Závislosti molární vodivosti na odmocnině z molární koncentrace monomerních jednotek kyseliny hyaluronové byly extrapolovány na nulovou koncentraci a byly tak získány molární vodivosti při nekonečném zředění. Ukázka těchto extrapolací je na obrázku 36.

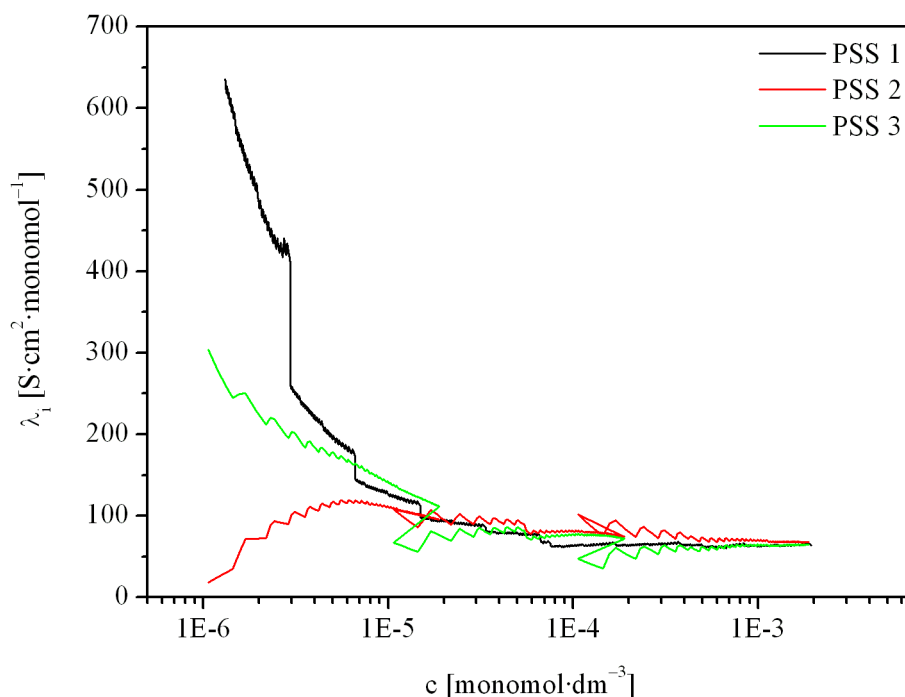
Na obrázku 37 je zobrazena závislost logaritmu koncentrační disociační konstanty na odmocnině ze součinu stupně disociace a molární koncentrace. Tato závislost by teoreticky měla mít lineární průběh, aby jí bylo možné proložit přímkou a určit tak disociační konstantu kyseliny hyaluronové. Závislosti získané z konduktometrických titrací v Milli-Q vodě a v 0,05mmol · dm⁻³ chloridu sodném by bylo možné v rozmezí hodnot $(\alpha \cdot c)^{0,5} \in \langle 5 \cdot 10^{-4}; 15 \cdot 10^{-4} \rangle (\text{mol} \cdot \text{m}^{-3})^{0,5}$ proložit lineární regresí, ale získané hodnoty disociační konstanty kyseliny hyaluronové by byly vysoké, proto tato extrapolace nebyla prováděna.



Obrázek 36: Ukázka extrapolací závislostí molární vodivosti kyseliny hyaluronové na odmocnině z molární koncentrace monomerních jednotek kyseliny hyaluronové



Obrázek 37: Závislost logaritmu koncentrační disociační konstanty na odmocnině ze součinu stupně disociace a molární koncentrace



Obrázek 38: Závislost molární vodivosti polystyrensulfonátu sodného na molární koncentraci jeho monomerních jednotek

Vzhledem k výsledkům konduktometrických titrací byly provedeny experimenty s polystyrensulfonátem sodným, aby bylo zjištěno, zda je v našich laboratorních podmínkách možné reprodukovat experiment Ch. Wandrey a poté provést obdobný experiment s kyselinou hyaluronovou. Konduktometrické titrace polystyrensulfonátu sodného byly prováděny dvěma způsoby, z nichž první byl identický s provedením konduktometrických titrací kyseliny hyaluronové a druhý byl napodobením experimentu Ch. Wandrey. Podstatným rozdílem od experimentu Ch. Wandrey bylo nepoužití dusíkaté atmosféry a vzrůst objemu titrovaného roztoku o více než 100 %. Černá křivka (PSS 1) na obrázku 38, která zobrazuje konduktometrickou titraci polystyrensulfonátu sodného prováděnou stejným způsobem jako konduktometrická titrace kyseliny hyaluronové, má obdobný tvar jako křivka kyseliny hyaluronové. Červená a zelená křivka zobrazuje titraci prováděnou obdobným způsobem jako ve studii od Ch. Wandrey, ale u každé z nich byla jiným způsobem určena měrná vodivost Milli-Q vody. U zelené křivky (PSS 3) byla měrná vodivost Milli-Q vody určena jako průměr prvních šesti změřených hodnot a u červené křivky (PSS 2) byla měrná vodivost Milli-Q vody změřena zvlášť. Z tvaru křivek je zřejmé, že určení měrné vodivosti prostředí, v tomto případě Milli-Q vody, má velký vliv na jejich výsledný tvar, zvláště při nižších molárních koncentracích monomerních jednotek polystyrensulfonátu sodného. Z tohoto důvodu by bylo vhodné experimenty provádět v dusíkaté atmosféře, aby nebyla měrná vodivost roztoků ovlivněna oxidem uhličitým přítomným v atmosféře.

5 ZÁVĚR

Cílem diplomové práce bylo prozkoumat acidobazické a elektrolytické chování vodných roztoků hyaluronanu sodného při různé iontové síle. Pro studium byly použity acidobazické a konduktometrické titrace. V rámci acidobazických titrací bylo také studováno, zda v jejich průběhu nedochází k degradaci kyseliny hyaluronové. Degradace byla studována pomocí reometrie a analýzy SEC-MALLS.

Acidobazické titrace byly prováděny dvěma rozdílnými způsoby. Prvním druhem acidobazických titrací byla kyselá acidobazická titrace, při které byl roztok kyseliny hyaluronové nejprve přetitrován hydroxidem sodným a poté titrován kyselinou chlorovodíkovou. Při druhém způsobu acidobazické titrace byl roztok kyseliny hyaluronové nejprve přetitrován kyselinou chlorovodíkovou a poté titrován hydroxidem sodným. Tento způsob titrace byl pro účely této práce nazván zásaditá acidobazická titrace.

Hlavním účelem provádění acidobazických titrací bylo stanovení disociační konstanty kyseliny hyaluronové při nulovém stupni disociace a při 50% stupni disociace. Dále byl studován vliv prostředí, respektive koncentrace chloridu sodného na tyto disociační konstanty. Vliv koncentrace chloridu sodného na disociační konstanty kyseliny hyaluronové z kyselých acidobazických titrací je zobrazen na obrázcích 19 a 23. Všechny stanovené disociační konstanty jsou uvedeny v tabulkách 5 a 6. Disociační konstanty stanovené kyselinou acidobazickou titrací mají hodnoty velmi blízké těm, které byly stanoveny v odborných člancích. U disociačních konstant získaných ze zásaditých acidobazických titrací k tak velké shodě s výsledky z odborných článků nedošlo. Tato odchylka může mít dvě příčiny. První příčinou tohoto rozdílu může být samotné provedení experimentů. U některých zásaditých acidobazických titrací nebylo při přetitraci dosaženo pH blízké hodnotě 3,0, ale pH se pohybovalo okolo hodnoty 3,5. Proto by bylo v dalších experimentech vhodné provést přetitraci tak, aby hodnota pH na jejím konci byla nižší než předpokládaná hodnota disociační konstanty. Aby bylo možné tento požadavek splnit, bude nutné zvýšit koncentraci kyseliny chlorovodíkové použité na přetitraci, což ale bude mít vliv na iontovou sílu v roztoku. Druhou příčinou může být výpočet stupně disociace, který měl přímý vliv na tvar výsledných extrapolovaných křivek.

Protože při acidobazických titracích bylo dosaženo relativně nízkých, ale i vysokých hodnot pH, bylo třeba zjistit, zda při těchto podmínkách nedochází k degradaci kyseliny hyaluronové, což by poté mohlo mít vliv na výsledné disociační konstanty. Bohužel při přípravě vzorků pro měření degradace nebylo dosaženo stejného rozmezí hodnot pH jako při acidobazických titracích, ačkoli příprava byla provedena podobně jako u acidobazických titrací, pouze v menším měřítku. Ke studiu degradace byly použity dvě experimentální metody, a to reometrie a SEC-MALLS. Výsledky získané oběma metodami nepotvrdily degradaci vlivem přídavku titračních činidel. Při SEC-MALLS analýze bylo zjištěno, že analyzované vzorky mají přibližně poloviční molekulovou hmotnost, než je molekulová hmotnost udávaná výrobcem. Tento rozdíl je pravděpodobně způsoben sušením kyseliny

hyaluronové před přípravou zásobního roztoku nebo relativně dlouhým skladováním přefiltrovaných vzorků kyseliny hyaluronové při laboratorní teplotě před samotným změřením z důvodu poruchy chromatografu. Vliv sušení kyseliny hyaluronové a skladování jejích roztoků při laboratorní teplotě na její degradaci by bylo vhodné detailněji prozkoumat, aby bylo možné zaručit, že použitá kyselina hyaluronová má při experimentech molekulovou hmotnost v mezích, které udává výrobce.

Cílem konduktometrických titrací bylo získat závislost molární vodivosti kyseliny hyaluronové na molární koncentraci monomerních jednotek kyseliny hyaluronové, ze které by poté bylo možné určit molární vodivost při nekonečném zředění a určit disociační konstantu kyseliny hyaluronové. Tento experiment měl být obdobou experimentu, který prováděla Ch. Wandrey ve studii z roku 1999. Hlavním nedostatkem varianty s kyselinou hyaluronovou byl tvar získaných závislostí molární vodivosti kyseliny hyaluronové na molární koncentraci monomerních jednotek kyseliny hyaluronové, které nedosáhly maxima, ale v celém koncentračním rozsahu měly rostoucí charakter. Důvodem tohoto rostoucího charakteru byl fakt, že měrná vodivost roztoku, měřená při nízkých koncentracích, zůstávala téměř konstantní, ale molární koncentrace monomerních jednotek kyseliny hyaluronové se snižovala, což vedlo k růstu molární vodivosti kyseliny hyaluronové. Pro další experimenty by bylo vhodné upravit provedení a nastavení experimentu. Zajímavé by bylo srovnání závislostí molární vodivosti na molární koncentraci monomerních jednotek, kdy by byl roztok chloridu sodného přidáván do roztoku kyseliny hyaluronové a kdy by byl roztok kyseliny hyaluronové přidáván do roztoku chloridu sodného. Dále by bylo vhodné zjistit, jak velký vliv má přítomný oxid uhličitý na provedení experimentu a zda by nebylo vhodnější provádět experimenty v dusíkaté atmosféře. Dalším faktorem, který může ovlivňovat výsledky, je doba vymezená na homogenizaci roztoku po přidání titračního činidla. Bylo by třeba zjistit, zda je tato doba dostatečná. Nemalý vliv na výsledné závislosti má také určení měrné vodivosti prostředí, ve kterém titrace probíhá. Vodivost prostředí je nutné určit co nejpresněji a během titrace zabránit případné absorpci oxidu uhličitého, která by mohla tuto hodnotu měnit.

6 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] KOGAN, Grigorij, Ladislav ŠOLTÉS, Robert STERN a Peter GEMEINER. Hyaluronic acid: a natural biopolymer with a broad range of biomedical and industrial applications. *Biotechnology Letters* [online]. 2006-12-8, vol. 29, issue 1, s. 17-25 [cit. 2014-12-14]. DOI: 10.1007/s10529-006-9219-z. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s10529-006-9219-z>
- [2] HASCALL, Vincent C. a Torvard C. LAURENT. Hyaluronan: Structure and Physical Properties. In: *GlycoForum / Science of Hyaluronan-1* [online]. 1997 [cit. 2014-12-14]. Dostupné z: <http://glycoforum.gr.jp/science/hyaluronan/HA01/HA01E.html>
- [3] LAURENT, Torvard C. a J. Robert E. FRASER. Hyaluronan. *Hyaluronan* [online]. 1992, vol. 6, no. 7, s. 2397-2404 [cit. 2014-12-14]. Dostupné z: <http://www.fasebj.org/content/6/7/2397.long>
- [4] SCOTT, John E. Secondary and Tertiary Structures of Hyaluronan in Aqueous Solution. Some Biological Consequences. In: *GlycoForum / Science of Hyaluronan-2* [online]. 1998 [cit. 2014-12-14]. Dostupné z: <http://glycoforum.gr.jp/science/hyaluronan/HA02/HA02E.html>
- [5] WIDNER, B., R. BEHR, S. VON DOLLEN, M. TANG, T. HEU, A. SLOMA, D. STERNBERG, P. L. DEANGELIS, P. H. WEIGEL a S. BROWN. Hyaluronic Acid Production in *Bacillus subtilis*. *Applied and Environmental Microbiology* [online]. 2005-07-06, vol. 71, issue 7, s. 3747-3752 [cit. 2014-12-14]. DOI: 10.1128/AEM.71.7.3747-3752.2005. Dostupné z: <http://aem.asm.org/cgi/doi/10.1128/AEM.71.7.3747-3752.2005>
- [6] ALMOND, Andrew, Paul L. DEANGELIS a Charles D. BLUNDELL. Hyaluronan: The Local Solution Conformation Determined by NMR and Computer Modeling is Close to a Contracted Left-handed 4-Fold Helix. *Journal of Molecular Biology* [online]. 2006, vol. 358, issue 5, s. 1256-1269 [cit. 2014-12-14]. DOI: 10.1016/j.jmb.2006.02.077. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022283606002920>
- [7] DAUTZENBERG, Herbert. *Polyelectrolytes: Formation, Characterization and Application*. Munich: Hanser Publishers, 1994, 343 s. ISBN 15-699-0127-9.
- [8] *Handbook of polyelectrolytes and their applications*. Stevenson Ranch: American Scientific Publishers, 2002, 331 s. ISBN 1-58883-016-03.
- [9] POUCHLÝ, Julius. *Fyzikální chemie makromolekulárních a koloidních soustav*. Vyd. 3. Praha: Vydavatelství VŠCHT, 2008, 205 s. ISBN 978-80-7080-674-6.
- [10] ZÝKA, Jaroslav et al. *Analytická příručka*. 4. uprav. vyd. Praha: SNTL - Nakladatelství technické literatury, 1988, 678.

- [11] HARRIS, Daniel C. *Exploring chemical analysis*. New York: W.H. Freeman and Company, 1997, 476 s. ISBN 07-167-3042-1.
- [12] pH electrode construction. *pH meter* [online]. 2005 [cit. 2015-04-05]. Dostupné z: <http://www.ph-meter.info/pH-electrode-construction>
- [13] KOHN, R. a P. KOVÁČ. Dissociation constants of D-galacturonic and D-glucuronic acid and their O-methyl derivatives. *Chemické zvesti*. Praha: Archivní správa ministerstva vnitra, 1978, vol. 32, no. 2.
- [14] RUEDA, Carmen, Concepcion ARIAS, Pedro GALERA, Enrique LÓPEZ-CABARCOS a Ana YAGÜE. Mucopolysaccharides in aqueous solutions: effect of ionic strength on titration curves. *Il Farmaco* [online]. 2001, vol. 56, 5-7, s. 527-532 [cit. 2015-02-18]. DOI: 10.1016/S0014-827X(01)01106-5. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0014827X01011065>
- [15] TØMMERAAS, Kristoffer a Per-Olof WAHLUND. Poly-acid properties of biosynthetic hyaluronan studied by titration. *Carbohydrate Polers* [online]. 2009, vol. 77, issue 2, s. 194-200 [cit. 2015-02-12]. DOI: 10.1016/j.carbpol.2008.12.021. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S014486170800605X>
- [16] BAREK, Jiří, František OPEKAR a Karel ŠTULÍK. *Elektroanalytická chemie*. 1. vyd. Praha: Karolinum, 2005, 188 s. ISBN 80-246-1146-5.
- [17] *Fyzikální chemie a fotochemie /: praktikum*. Vyd. 1. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2003, s. 44-48. ISBN 80-214-2470-2.
- [18] WANDREY, Christine. Concentration Regimes in Polyelectrolyte Solutions †. *Langmuir* [online]. 1999, vol. 15, issue 12, s. 4069-4075 [cit. 2015-02-12]. DOI: 10.1021/la980895h. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/la980895h>
- [19] WANDREY, Christine, David HUNKELER, Ulrich WENDLER a Werner JAEGER. Counterion Activity of Highly Charged Strong Polyelectrolytes. *Macromolecules* [online]. 2000, vol. 33, issue 19, s. 7136-7143 [cit. 2015-02-12]. DOI: 10.1021/ma991763d. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ma991763d>
- [20] BARNES, H. *An introduction to rheology*. Amsterdam: Elsevier, 1998, 199 s. ISBN 04-448-7469-0.
- [21] WEIN, Ondřej. *Úvod do reologie*. 1. vyd. Brno: Fakulta chemická VUT, 1996, 84 s.
- [22] *Reologie a reometrie kapalin - (KF) UPCE*. 11 s. Dostupné z: kf.upce.cz/Reologie%20a%20reometrie%20kapalin.doc
- [23] SCHRAMM, Gebhard. *A Practical Approach to Rheology and Rheometry*. Karlsruhe: HAAKE, 1994, 290 s.

- [24] KLUČÁKOVÁ, Martina. *Přednáška z reologie ve spotřební chemii*.
- [25] BARTOVSKÁ, Lidmila. *Fyzikální chemie povrchů a koloidních soustav*. 5. přeprac. vyd. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 2005, 244 s. ISBN 80-708-0579-X.
- [26] GATEJ, Iuliana, Marcel POPA a Marguerite RINAUDO. Role of the pH on Hyaluronan Behavior in Aqueous Solution. *Biomacromolecules* [online]. 2005, vol. 6, issue 1, s. 61-67 [cit. 2015-04-05]. DOI: 10.1021/bm040050m. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/bm040050m>
- [27] *Handbook of size exclusion chromatography and related techniques*. 2nd ed., rev. and expanded. Editor Chi-san Wu. New York: Marcel Dekker, c2004, 694 s. ISBN 08-247-4710-0.
- [28] TØMMERAAS, Kristoffer a Claes MELANDER. Kinetics of Hyaluronan Hydrolysis in Acidic Solution at Various pH Values. *Biomacromolecules* [online]. 2008, vol. 9, issue 6, s. 1535-1540 [cit. 2015-04-05]. DOI: 10.1021/bm701341y. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/bm701341y>

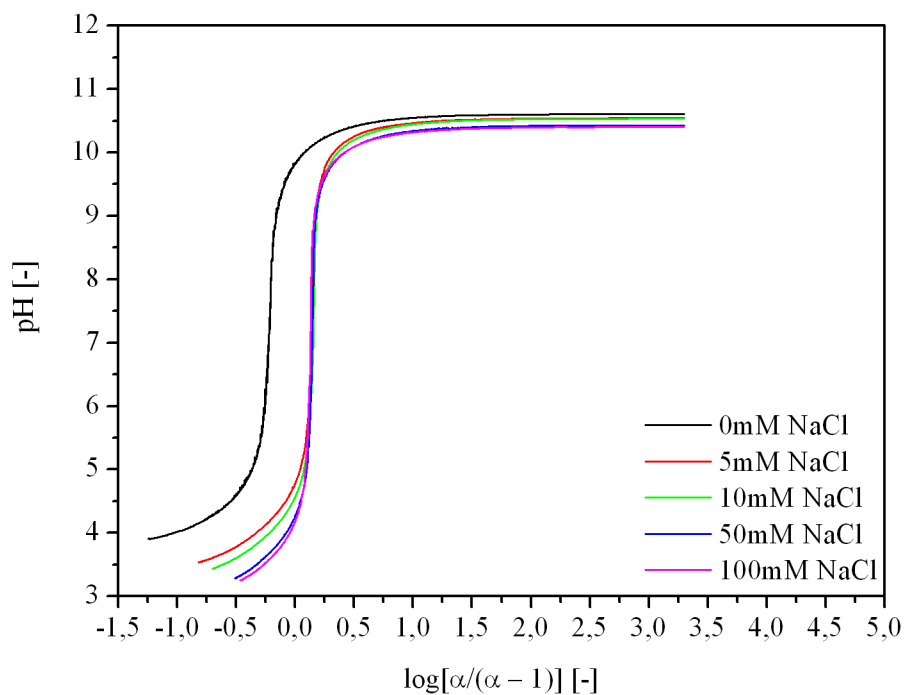
7 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

$^1\text{H NMR}$	nukleární magnetická rezonance využívající interakce ^1H
$[\text{x}]$	rovnovážná koncentrace látky x
$[\eta]$	specifická viskozita
a	koeficient Mark-Houwinkovy rovnice
A	plocha desky
A	průřez vodiče
A_2	druhý viriální koeficient systému polymer-rozpouštědlo
A_c	konstanta závislá na rozpouštědle
a_i	aktivita iontů
c	molární koncentrace
COOH	karboxylová skupina
dn/dc	inkrement indexu lomu roztoku
du_x/dy	rychlostní gradient
e	elementární náboj
E_g	potenciál skleněné elektrody
E_g^0	standardní potenciál skleněné elektrody
F	Faradayova teplota
F	síla
$F(\theta)$	funkce definující vliv geometrie uspořádání
f_c	koeficient
f_i	aktivitní koeficient
G	vodivost
G_e	elektrostatická energie polykyselin
I	index polydisperzity
I	iontová síla
I_0	celková intenzita dopadajícího záření
I_c	iontová síla pro 1-1 elektrolyt
$i_p(\theta)$	intenzita světla rozptýleného jednou částicí pod úhlem θ
k	konstanta přístroje
k	konzistence
K	koeficient Mark-Houwinkovy rovnice
K^*	optická konstanta pro daný systém
K_a	disociační konstanta
K_c	koncentrační disociační konstanta
k_{cp}	koeficient z konformačního grafu
K_s	konstanta selektivity elektrody
l	délka vodiče
m	index rychlosti
M	molekulová hmotnost

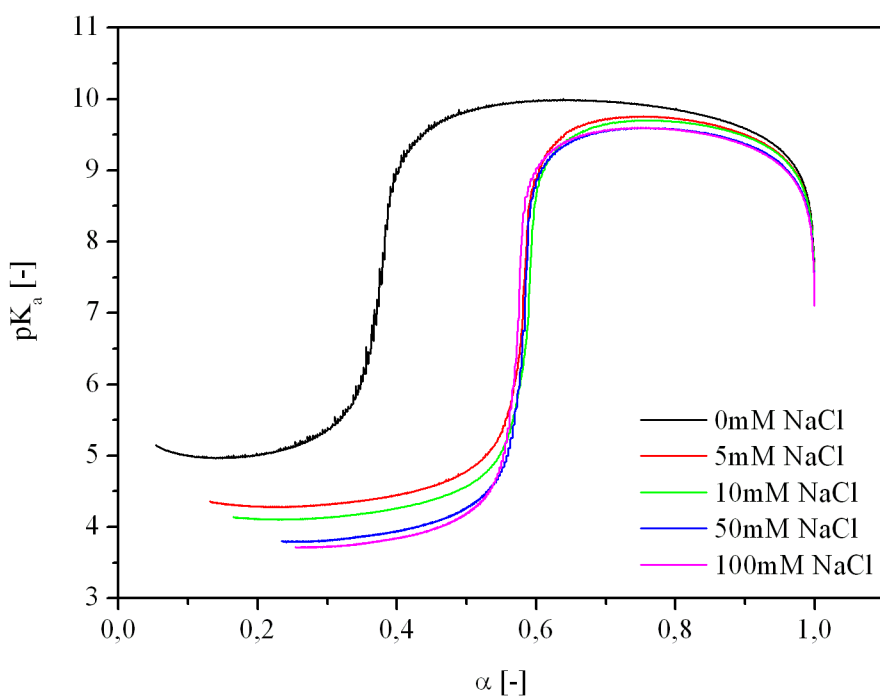
$m(x)$	hmotnost látky x
M_{DJ}	molární hmotnost disacharidové jednotky kyseliny hyaluronové
M_n	početně střední molekulová hmotnost
MQ	Milli-Q
M_w	hmotnostně střední molekulární hmotnost
n	počet negativně nabitých skupin
n_0	index lomu rozpouštědla
$n(x)$	počet molů látky x
N_A	Avogadrova konstanta
NMHA	nízkomolekulová kyselina hyaluronová
NMR	nukleární magnetická rezonance
pK_0	záporně vzatý dekadický logaritmus vnitřní disociační konstanty
pK_a	záporně vzatý dekadický logaritmus efektivní disociační konstanty
$pK_{a,zd}$	záporně vzatý dekadický logaritmus zdánlivé disociační konstanty
$pK_{a,\alpha=0}$	záporně vzatý dekadický logaritmus disociační konstanty při nulovém stupni disociace
$pK_{a,\alpha=0,5}$	záporně vzatý dekadický logaritmus disociační konstanty při 50% stupni disociace
PSS	polystyrensulfonát sodný
q	bodový elektrický náboj
Q	náboj polyiontu
r	vzdálenost od detektoru
r	vzdálenost od náboje
R	molární plynová konstanta
R	odpor vodiče
$R(\theta)$	Rayleighův poloměr
$R_{h(v)w}$	hydrodynamický poloměr získaný z měření viskozity
R_w	gyrační poloměr
SEC-MALLS	size exclusion chromatography multi angle laser light scattering
t	čas
T	termodynamická teplota
V_x	objem látky x
VMHA	vysokomolekulová kyselina hyaluronová
$w(x)$	hmotnostní zlomek látky x
z	náboj
Z	počet protiontů polyiontu
α	stupeň disociace
α_p	polarizovatelnost částice
$\dot{\gamma}$	smyková rychlost
ΔpK	zvýšení disociační konstanty
$\Delta\kappa$	rozdíl měrných vodivostí

ε_0	permitivita vakua
ε_r	relativní permitivita prostředí
η	dynamická viskozita
η_0	viskozita při smyku blížícímu se 0
η'	zdánlivá viskozita
η_∞	viskozita při smyku blížícímu se nekonečnu
θ	rozptylový úhel
κ	měrná vodivost/konduktivita
κ	parametr z Debye-Hückolovy teorie
κ_0	měrná vodivost rozpouštědla
λ	vlnová délka dopadajícího a rozptýleného světla
Λ	molární vodivost elektrolytu
λ_0	vlnová délka dopadajícího světla ve vakuu
λ^0	iontová vodivost při nekonečném zředění
λ_∞	molární vodivost při nekonečném zředění
λ_c^0	molární vodivost protiontu v nekonečně zředěném roztoku
λ_p	molární vodivost polyiontu
ρ	hustota roztoku
ρ	měrný odpor vodiče
τ_0	mez toku
τ_{xy}	tečné napětí
ϕ	elektrický potenciál
$\Phi(c_p)$	funkce udávající vnitřní interakce
φ	úhel otočení
ω	úhlová rychlost vnějšího válce

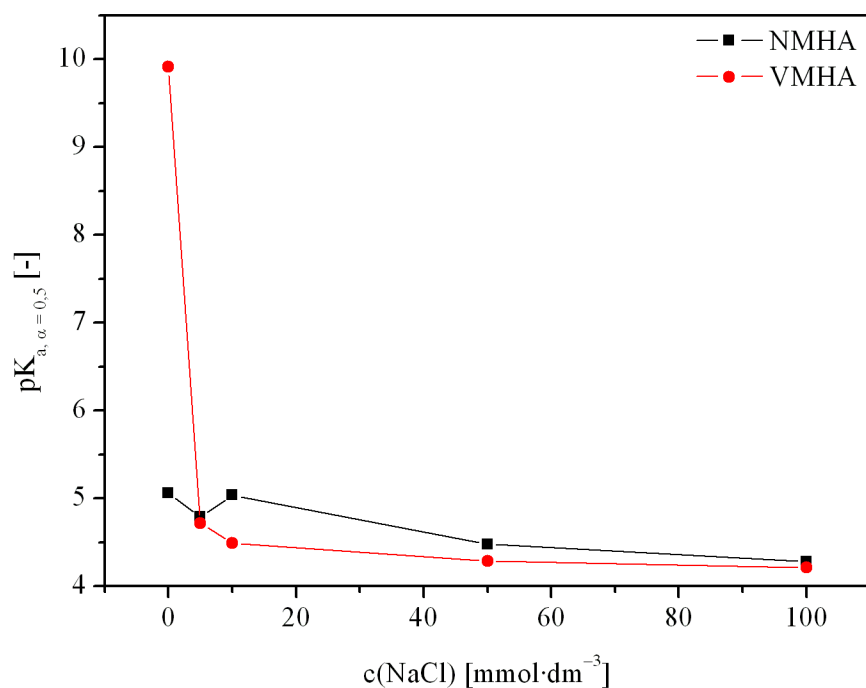
8 PŘÍLOHY



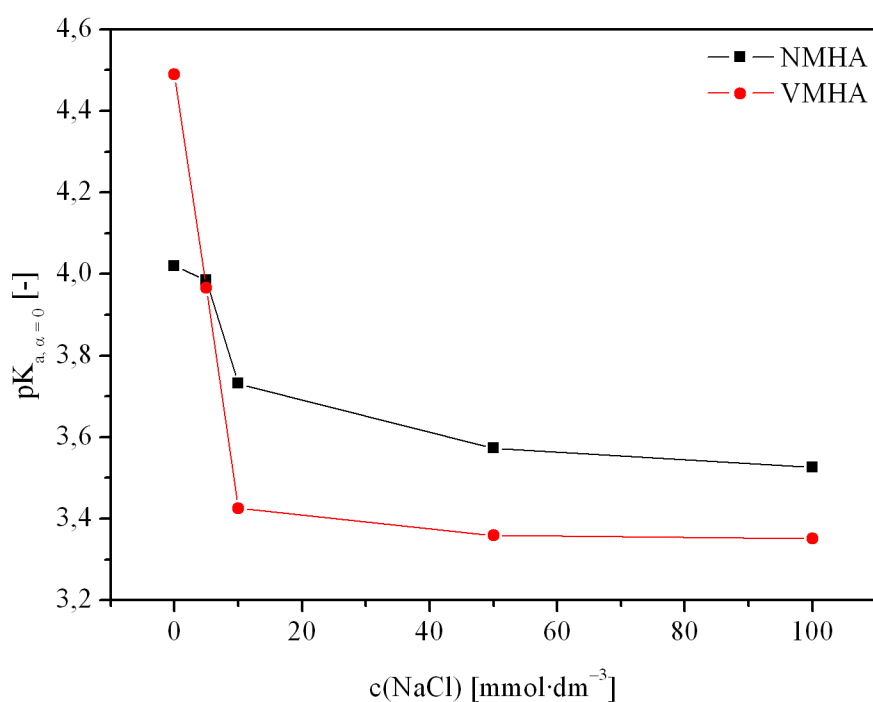
Obrázek 39: Závislost pH na $\log[\alpha/(1 - \alpha)]$ při různé koncentraci chloridu sodného pro vysokomolekulovou kyselinu hyaluronovou při zásadité acidobazické titraci



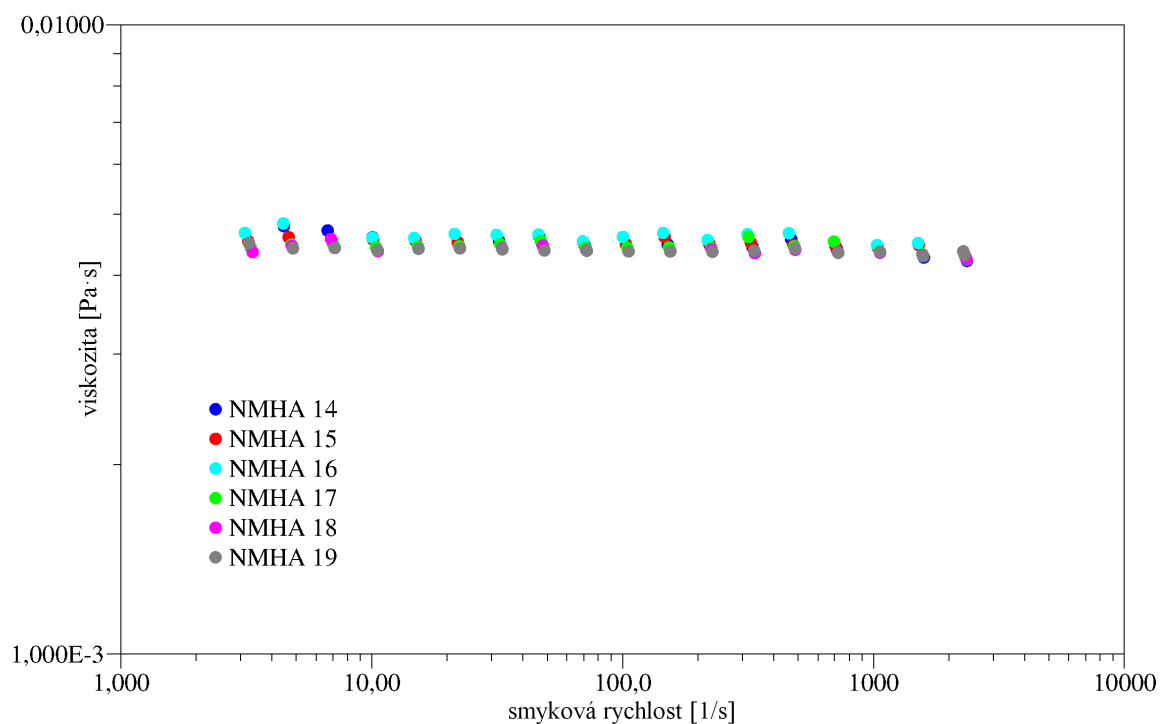
Obrázek 40: Závislost pK_a na α při různé koncentraci chloridu sodného pro vysokomolekulovou kyselinu hyaluronovou při zásadité acidobazické titraci



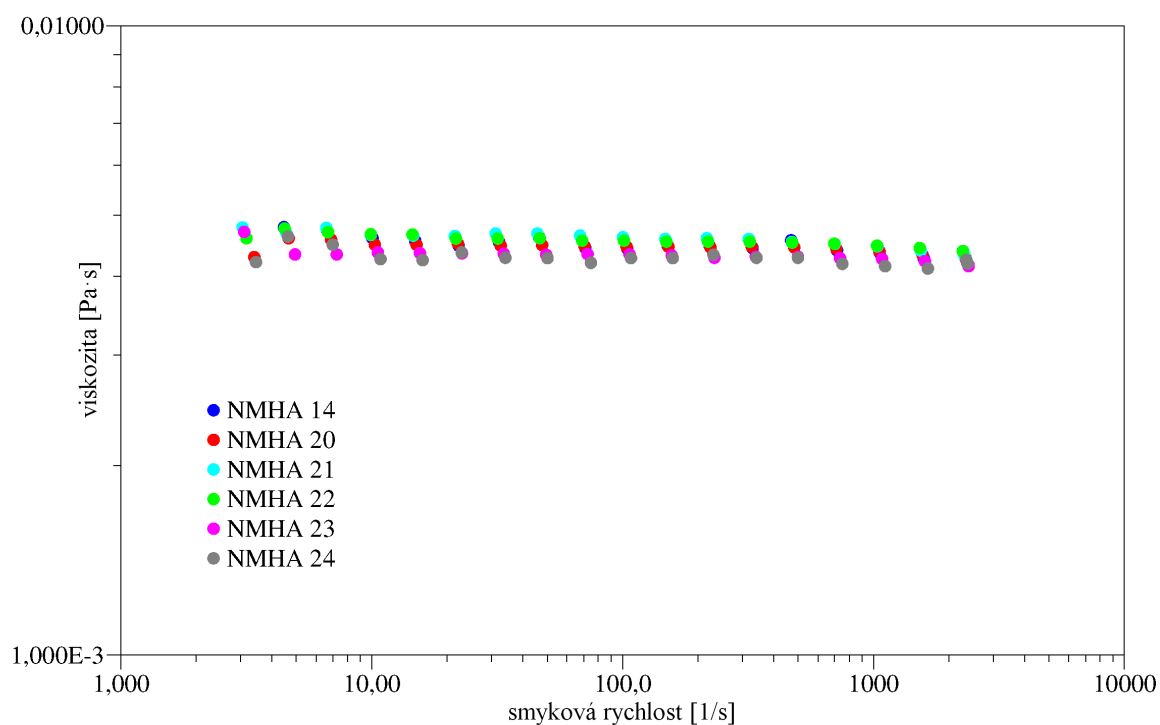
Obrázek 41: Závislost průměrných disociačních konstant při 50% stupni disociace na koncentraci chloridu sodného pro nízkomolekulovou a vysokomolekulovou kyselinu hyaluronovou získaných ze zásadité acidobazické titrace



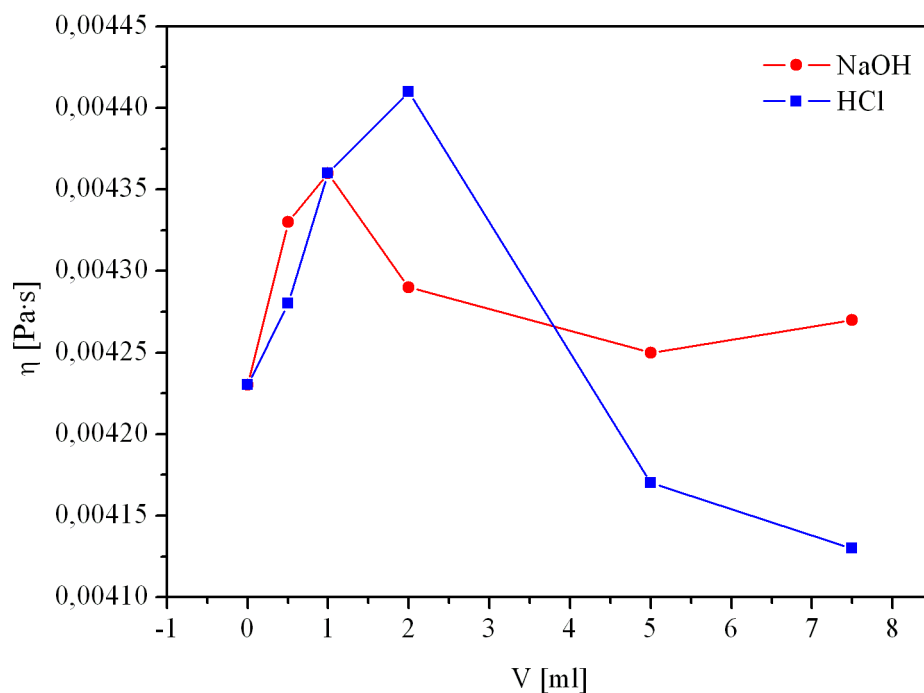
Obrázek 42: Závislost průměrných disociačních konstant při nulovém stupni disociace na koncentraci chloridu sodného pro nízkomolekulovou a vysokomolekulovou kyselinu hyaluronovou získaných ze zásadité acidobazické titrace



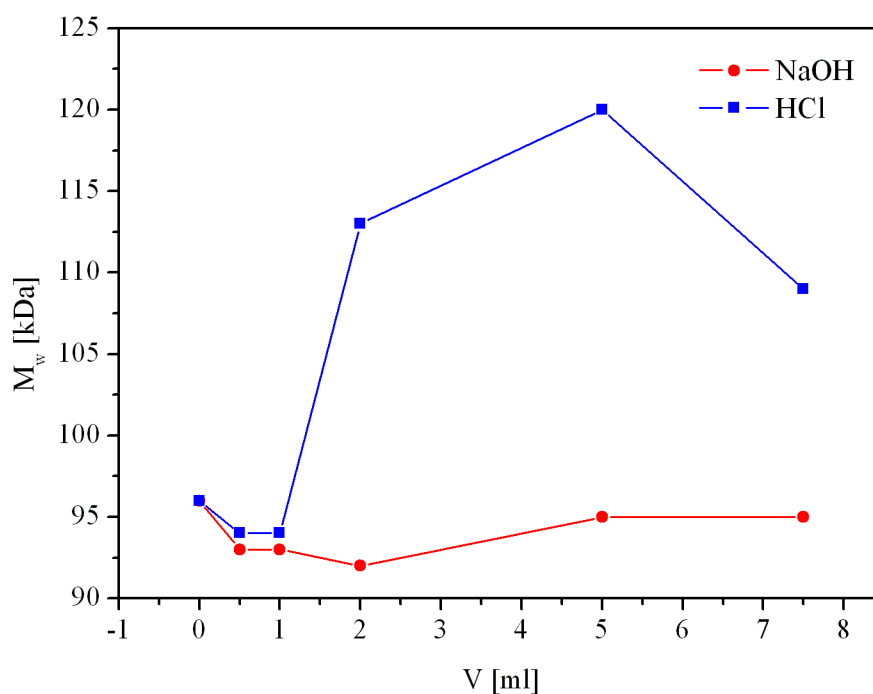
Obrázek 43: Závislost viskozity na smykové rychlosti pro nízkomolekulovou kyselinu hyaluronovou v prostředích s různým přídatkem hydroxidu sodného



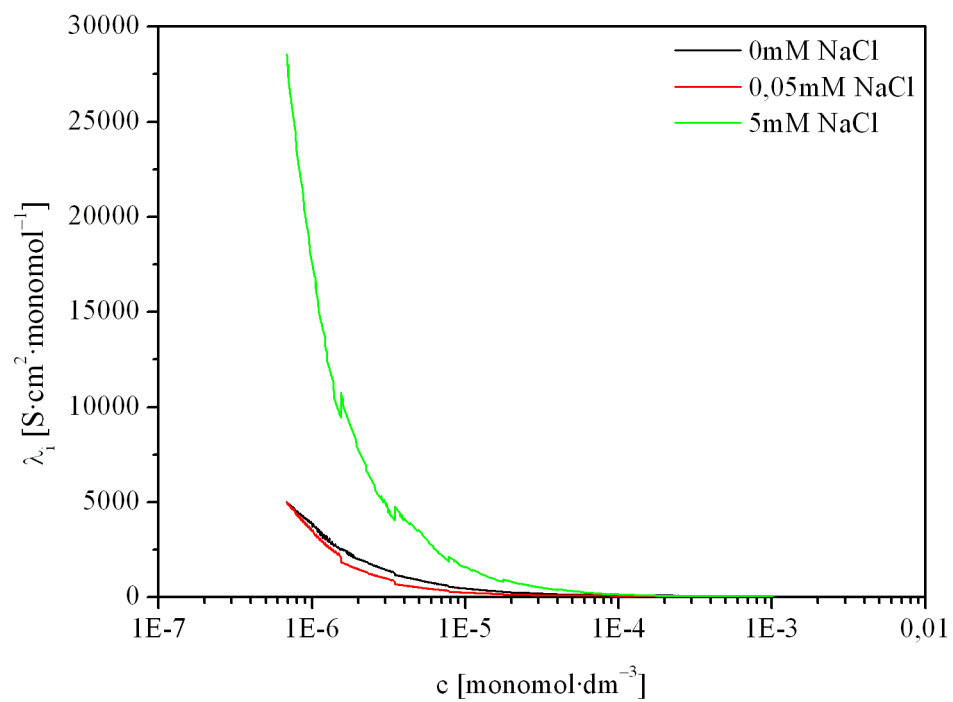
Obrázek 44: Závislost viskozity na smykové rychlosti pro nízkomolekulovou kyselinu hyaluronovou v prostředích s různým přídatkem kyseliny chlorovodíkové



Obrázek 45: Závislost viskozity získané z Newtonského modelu na přidavku titračního činidla pro nízkomolekulovou kyselinu hyaluronovou



Obrázek 46: Závislost hmotnostně střední molekulové hmotnosti získané ze SEC-MALLS na přidavku titračního činidla pro nízkomolekulovou kyselinu hyaluronovou



Obrázek 47: Závislost molární vodivosti nízkomolekulové kyseliny hyaluronové na molární koncentraci monomerních jednotek kyseliny hyaluronové v různém prostředí