

VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ

CENTRUM MATERIÁLOVÉHO VÝZKUMU

FACULTY OF CHEMISTRY

MATERIALS RESEARCH CENTRE

ELEKTROLYTICKÉ VLASTNOSTI ROZTOKŮ HYALURONANU

ELECTROLYTIC PROPERTIES OF HYALURONAN SOLUTIONS

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

ŠÁRKA SUCHÁ

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. MARTIN CHYTIL, Ph.D.

BRNO 2013



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

Zadání bakalářské práce

Číslo bakalářské práce: **FCH-BAK0713/2012** Akademický rok: **2012/2013**
Ústav: Centrum materiálového výzkumu
Student(ka): **Šárka Suchá**
Studijní program: Chemie a chemické technologie (B2801)
Studijní obor: Spotřební chemie (2806R002)
Vedoucí práce **Ing. Martin Chytil, Ph.D.**
Konzultanti:

Název bakalářské práce:

Elektrolytické vlastnosti roztoků hyaluronanu

Zadání bakalářské práce:

Prostudovat elektrolytické vlastnosti hyaluronanu ve vodných roztocích. Vyhodnotit stupeň disociace a disociační konstantu hyaluronanu.

Termín odevzdání bakalářské práce: 10.5.2013

Bakalářská práce se odevzdává ve třech exemplářích na sekretariát ústavu a v elektronické formě vedoucímu bakalářské práce. Toto zadání je přílohou bakalářské práce.

Šárka Suchá
Student(ka)

Ing. Martin Chytil, Ph.D.
Vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
Ředitel ústavu

V Brně, dne 31.1.2013

prof. Ing. Jaromír Havlica, DrSc.
Děkan fakulty

ABSTRAKT

Bakalářská práce se zabývá studiem elektrolytických vlastností roztoků kyseliny hyaluronové. Při výzkumu bylo použito těchto metod: měření vodivosti, acidobazické a konduktometrické titrace a UV-VIS spektrofotometrie. Měření vodivosti bylo prováděno s několika koncentracemi kyseliny hyaluronové v roztocích s různou iontovou silou. Acidobazické titrace byly prováděny ve vodném prostředí a konduktometrické titrace v roztoku $0,3\text{mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$ chloridu sodného. UV-VIS spektra kyseliny hyaluronové byla proměřena v roztoku s přidavkem kyseliny, zásady a v pufru. Hodnoty pK_a získané z jednotlivých metod se pohybovaly v rozmezí 2,8–6,5.

ABSTRACT

This bachelor thesis deals with electrolytic properties of hyaluronan in aqueous solutions. In this study measuring of conductance, acid-base and conductometric titration, and UV-VIS spectroscopy were used. The measuring of conductance was made on the solutions of different concentrations of hyaluronic acid and of different ionic strength. Acid-base titrations were performed in water solution and conductometric titrations were performed in $0,3\text{mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$ solution of sodium chloride. UV-VIS spectra of hyaluronic acid were measured in solution with addition of acid, base and in buffer solution. Values of pK_a obtained from the above mentioned measurements was between 2,8–6,5.

KLÍČOVÁ SLOVA

Kyselina hyaluronová, elektrolytické vlastnosti, vodivost, acidobazické/potenciometrické titrace, UV-VIS spektrofotometrie

KEYWORDS

Hyaluronic acid, electrolytic properties, conductance, acid-base/potentiometric titrations, UV-VIS spectroscopy

SUCHÁ, Š. Elektrolytické vlastnosti roztoků hyaluronanu. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2013. 52 s. Vedoucí bakalářské práce Ing. Martin Chytil, Ph.D..

PROHLÁŠENÍ

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

.....
podpis studenta

Ráda bych zde poděkovala vedoucímu mé bakalářské práce Ing. Martinu Chytilovi, Ph.D. za cenné rady, trpělivost při konzultacích a čas, který mi věnoval. Dále bych chtěla poděkovat rodině za podporu a pomoc při studiu.

OBSAH

Obsah.....	5
1 Úvod.....	7
2 Teoretická část.....	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.....	10
2.1.4 Výroba a použití	10
2.2 Polyelektrolyty	10
2.2.1 Úvod	10
2.2.2 Dělení polyelektrolytů	12
2.3 Konduktometrie	12
2.3.1 Úvod	12
2.3.2 Stanovení disociační konstanty slabé kyseliny konduktometricky	14
2.3.3 Vodivost polyelektrolytů	15
2.4 pH metrie	16
2.4.1 Skleněná elektroda.....	16
2.5 Volumetrická analýza	17
2.5.1 Úvod	17
2.5.2 Určení bodu ekvivalence	18
2.5.3 Titrace polyelektrolytů	19
2.6 UV-VIS spektrofotometrie.....	20
2.6.1 Úvod	20
2.6.2 Metody měření a instrumentace	21
2.6.3 Stanovení disociační konstanty spektrofotometricky	22
2.6.4 UV-VIS spektrofotometrie polyelektrolytů.....	23
3 Experimentální část	25
3.1 Použité chemikálie	25
3.2 Použité metody.....	25
3.2.1 Příprava roztoků	25
3.2.2 Měření vodivosti.....	26
3.2.3 Konduktometrická titrace	26
3.2.4 Acidobazická titrace	27
3.2.5 UV-VIS spektroskopie	27

3.2.6	Měření pH.....	27
3.3	Zpracování dat	27
3.3.1	Diskontinuální měření vodivosti	27
3.3.2	Konduktometrická titrace	28
3.3.3	Acidobazická titrace	29
3.3.4	UV-VIS spektrofotometrie	29
4	Výsledky a diskuze.....	30
4.1	Diskontinuální měření vodivosti.....	30
4.2	Konduktometrická titrace.....	35
4.3	Acidobazická titrace.....	39
4.4	UV-VIS spektrofotometrie.....	41
5	Závěr.....	44
6	Seznam použitých zdrojů	46
7	Seznam použitých zkratk a symbolů	48
8	Přílohy	50

1 ÚVOD

V roce 1934 Karl Meyer a jeho asistent John Palmer poprvé popsali proces izolace nového glykosaminoglykanu z očního sklivce skotu. Zjistili, že tato látka obsahuje uronovou kyselinu a aminocukr, ale žádné sulfoestery. Rozhodli se tento glykosaminoglykan pojmenovat kyselina hyaluronová. Tímto objevem poskytli světu univerzální, zajímavou a v přírodě se vyskytující se makromolekulu. [1] Během několika let našla kyselina hyaluronová široké využití v kosmetice, léčbě osteoartritidy, v revmatologii, oftalmologii a při léčbě zranění. Její hlavní výhodou jsou její viskoelastické vlastnosti a to, že se běžně vyskytuje v lidském organismu, takže nezpůsobuje alergické reakce a je snadno odbouratelná.

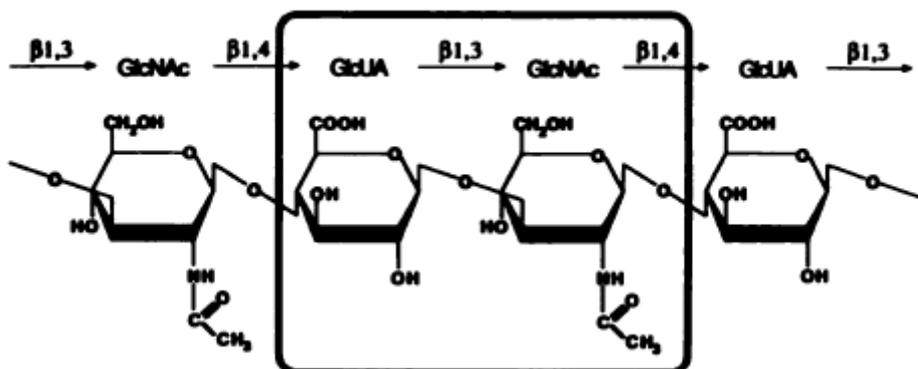
Již několik studií se zabývalo elektrolytickým chováním kyseliny hyaluronové v různém prostředí. Většinou se jedná o vodivostní měření a acidobazické titrace. Protože tyto studie jsou ve většině případů zaměřeny pouze na jednu metodu, je cílem této práce vytvořit komplexnější přehled, který by jednotlivé studie shrnul. Dalším cílem této práce je pokusit se stanovit disociační konstantu pomocí vodivostního měření, acidobazických titrací a UV-VIS spektrofotometrie a potvrdit tak hodnoty, získané především z acidobazických titrací.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Kyselina hyaluronová

2.1.1 Úvod

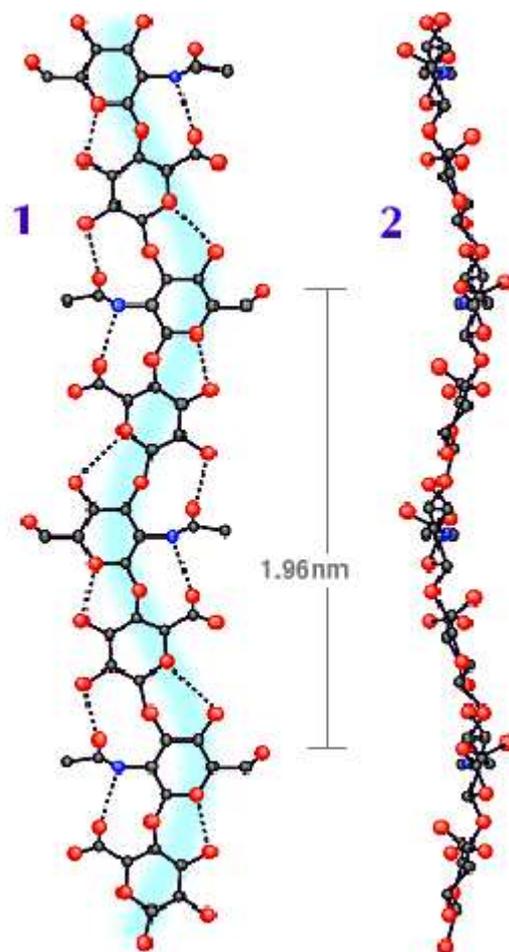
Kyselina hyaluronová je v přírodě se vyskytující lineární polysacharid. Řadí se mezi glykosaminoglykany a v této skupině patří mezi strukturně nejjednodušší. Jako jediná z glykosaminoglykanů není kovalentně vázaná s proteinem, vyráběná v Golgiho aparátu a není sulfátovaná. [2] Poprvé byla popsána Karlem 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 (GlcUA) a D-N-acetylglukosaminu (GlcNAc) spojených střídající se $\beta(1\rightarrow4)$ a $\beta(1\rightarrow3)$ glykosidickou vazbou. [1][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 μm a molekulovou hmotnost 4 miliony $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$. [1] 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 [3]

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 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 2 dvojitá 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. [5]



Obrázek 2: Rovinné (1) a vertikální (2) zobrazení dvojité šroubovice kyseliny hyaluronové [4]

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. [1] 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. [1] 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, pupeční 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 koncentrace až $2,5 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$. 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 kloub, absorbuje nárazy, omezuje tření způsobené pohybem kostí a minimalizuje opotřebení kloubů. Tuto funkci může plnit díky svým viskoelastickým vlastnostem. [1]

Poznatek 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 intravenózně podány vzorky, u kterých byly acetylové skupiny označeny tritiovým vodíkem, králíkům, krysám a lidem. Bylo zjištěno, že velká část byla odbourána játry a označení se v oběhu objevilo po dvaceti minutách od podání jako tritiová voda. [1]

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*. Z dalších 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 $1\ 100\text{--}1\ 200 \text{ kg}\cdot\text{mol}^{-1}$, dá se snadno kultivovat a produkty vyrobené tímto mikroorganismem jsou bezpečné, protože získaly označení GRAS (generally recognized as safe). [2] Další výhodou *Bacillus subtilis* oproti kmenům Streptokoků je, že kyselinu hyaluronovou vylučují přímo do okolního prostředí, takže není vázána s buňkou. [6]

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. [6]

2.2 Polyelektrolyty

2.2.1 Úvod

Polyelektrolyty jsou makromolekuly nebo supramolekulární entity, které nesou velké množství ionizovatelných skupin. Při určitých podmínkách dochází u těchto skupin k disociaci, 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, a tak může dojít k deformaci řetězce. 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. [7]

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

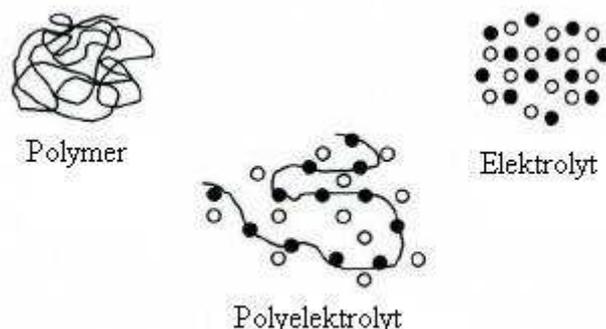
$$\varphi = \frac{q}{4\pi \cdot \varepsilon_0 \cdot \varepsilon_r \cdot r} \quad (1)$$

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, která 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, 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 jeho iontovou sílu a také odstiňující účinek odpudivých elektrostatických interakcí mezi stejně nabitými skupinami polyiontu. [8]



Obrázek 3: Schematické znázornění rozdílu mezi polymerem, elektrolytem a polyelektrolytem [7]

2.2.2 Dělení polyelektrolytů

Na základě stupně disociace polyelektrolytu ve vodném roztoku mohou být polyelektrolyty buď slabé, nebo silné. Ionizovatelné skupiny silných polyelektrolytů jsou ve vodném roztoku plně disociované, zatímco u slabých jsou disociovány pouze částečně.

Nabitě polymery mohou být rozděleny do dvou skupin, 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. [7] 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 polyiontu 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 odlehle 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. [8]

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. [7]

2.3 Konduktometrie

2.3.1 Úvod

Konduktometrie patří mezi elektroanalytické metody, které jsou založeny na měření vodivosti roztoku elektrolytu. [9][12] Na základě změřené vodivosti lze zjistit obsah nabitých částic [12] nebo jiné veličiny, jako třeba stupeň disociace a disociační konstantu slabého elektrolytu nebo součin rozpustnosti silného elektrolytu. Protože se na vodivosti podílejí všechny látky přítomné v roztoku, je konduktometrie řazena mezi neselektivní analytické metody. [12] Při kondutometrických titracích bývá sledována závislost vodivosti elektrolytu na objemu titračního činidla. [9]

Vodivost G je veličina, která vyjadřuje schopnost elektrolytu vést elektrický proud a je převrácenou hodnotou elektrického odporu. Rozměr vodivosti je siemens. Při měření je zjišťován elektrický proud I , který prochází při daném napětí U mezi dvěma vodivými deskami, a z něj je pomocí Ohmova zákona možné vypočítat odpor R , resp. vodivost:

$$R = \frac{U}{I} = \frac{1}{G} \quad (3)$$

Vodivost závisí na ploše S elektrod a jejich vzdálenosti l , proto byla zavedena veličina, která je nezávislá na ploše elektrod a jejich vzdálenosti. Touto veličinou je měrná vodivost κ , která má rozměr $S \cdot m^{-1}$:

$$\kappa = G \frac{l}{S} \quad (4)$$

a měrný odpor ρ , který je převrácenou hodnotou měrné vodivosti:

$$\rho = R \frac{S}{l} \quad (5)$$

Rozměr měrného odporu je $\Omega \cdot m$. [9]

Jednotlivé ionty přispívají k celkové měrné vodivosti roztoku a jejich příspěvek udává rovnice:

$$\kappa = \sum c_i \cdot \lambda_i \cdot z_i \quad (6)$$

kde c_i je molární koncentrace, λ_i iontová vodivost a z_i náboj jednotlivých iontů. Pokud je v roztoku jediný elektrolyt, pak je podíl měrné vodivosti tohoto roztoku a jeho koncentrace rovný molární vodivosti λ s rozměrem $S \cdot m^2 \cdot mol^{-1}$:

$$\lambda = \frac{\kappa}{c} \quad (7)$$

Molární vodivost na rozdíl od měrné vodivosti a měrného odporu roztoku elektrolytu by neměla být závislá na druhu a množství vodivých částic v roztoku. Tato nezávislost není u reálných roztoků vždy splněna. V roztocích silných elektrolytů o velmi nízké koncentraci mají ionty mezi sebou velké vzdálenosti, takže se navzájem neovlivňují. Ve vyšších koncentracích silných elektrolytů dochází ke snižování molární vodivosti, protože v roztoku dochází k interakcím. Slabé elektrolyty nepodléhají úplné disociaci, ale ve velmi zředěných roztocích se jejich disociace blíží 100 %.

Kvůli neideálnostem v chování reálných roztoků elektrolytů bývá pro jejich charakterizaci použita mezní molární vodivost λ^0 , molární vodivost pro koncentraci blížící se nule. Protože při velmi nízkých koncentracích jsou ionty od sebe tak daleko, že se navzájem neovlivňují, je molární vodivost při nekonečném zředění rovna součtu iontových molárních vodivostí λ jednotlivých iontů. To tvoří podstatu Kohlrauschova zákona nezávislého putování iontů:

$$\lambda^0(B_x A_y) = \sum \lambda_i^0 = x \cdot \lambda(B^{y+}) + y \cdot \lambda(A^{x-}) \quad (8)$$

S rostoucí koncentrací u slabého elektrolytu způsobuje stupeň disociace α pokles molární vodivosti, takže by měla platit přímá úměra mezi molární vodivostí a stupněm disociace:

$$\lambda = k \cdot \alpha \quad (9)$$

Vzhledem k tomu, že při nízkých koncentracích je stupeň disociace roven jedné a molární vodivost λ je rovna molární vodivosti při nulové koncentraci λ^0 , pak:

$$\lambda = \lambda^0 \cdot \alpha \quad (10)$$

Stupeň disociace je dán rovnicí:

$$\alpha = \frac{c - c_{\text{nedisoc}}}{c} \quad (11)$$

kde c_{nedisoc} je koncentrace nedisociovaných molekul. [9][12]

2.3.2 Stanovení disociační konstanty slabé kyseliny konduktometricky

Slabá kyselina ve vodném prostředí disociuje podle rovnice:



Tato rovnováha je charakterizována disociační konstantou K_a :

$$K_a = \frac{a_{\text{H}_3\text{O}^+} \cdot a_{\text{A}^-}}{a_{\text{HA}} \cdot a_{\text{H}_2\text{O}}} \quad (13)$$

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

$$K_a = \frac{c_{\text{H}_3\text{O}^+} \cdot c_{\text{A}^-}}{c_{\text{HA}}} \cdot \frac{f_{\text{H}_3\text{O}^+} \cdot f_{\text{A}^-}}{f_{\text{HA}}} \quad (14)$$

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

$$c_{\text{A}^-} = c_{\text{H}_3\text{O}^+}; c_{\text{HA}} = c_0 - c_{\text{H}_3\text{O}^+} \quad (15)$$

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

$$\alpha = \frac{c_{\text{A}^-}}{c_0} \quad (16)$$

Potom

$$K_a = c_0 \frac{\alpha^2}{1 - \alpha} f_{\pm}^2 \quad (17)$$

kde f_{\pm} je střední aktivní koeficient iontů H_3O^+ a A^- . Za použití vztahu (7) lze předchozí rovnici upravit:

$$K_a = c_0 \frac{\lambda^2}{\lambda^0 (\lambda^0 - \lambda)} f_{\pm}^2 \quad (18)$$

Pro další výpočty použijeme označení koncentrační konstanty:

$$K_c = c_0 \frac{\lambda^2}{\lambda^0 (\lambda^0 - \lambda)} \quad (19)$$

a z Debye-Hückelovy teorie vyjádříme střední aktivní koeficient jako:

$$\log f_{\pm} = -A_c |z_+ z_-| \sqrt{I_c} \quad (20)$$

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

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

Po upravení rovnic (18) a (19) získáme:

$$\log K_a = \log K_c + 2 \log f_{\pm} \quad (22)$$

což lze s použitím rovnice (20) upravit na:

$$\log K_c = \log K_a + 2A_c \sqrt{\alpha \cdot c_0} \quad (23)$$

Pokud vyneseme závislost $\log K_c$ na $\sqrt{\alpha \cdot c_0}$ a proložíme lineární regresní přímkou, bude úsek na ose y roven $\log K_a$. [23]

2.3.3 Vodivost polyelektrolytů

Vyhovující teorie, která by popisovala vodivostní chování polyelektrolytů, zatím neexistuje. Problémy bránící vzniku vhodné teorie popisující 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:

$$\lambda = f_c (\lambda_p + \lambda_c^0) \quad (24)$$

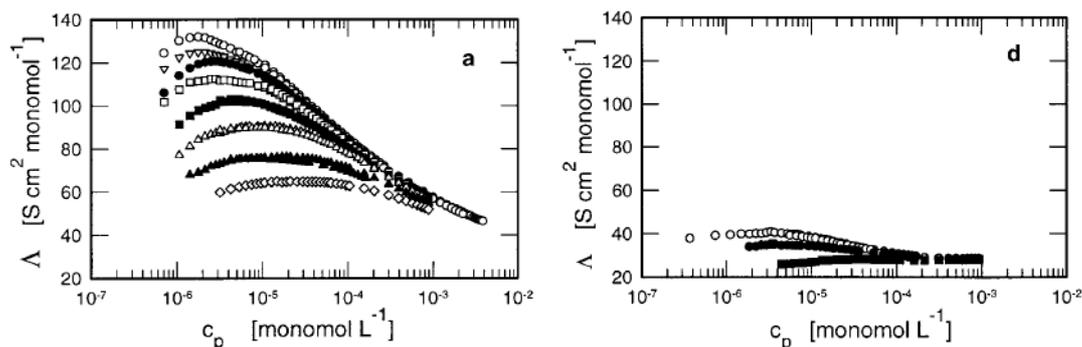
kde λ_c^0 je molární vodivost protiiontu v nekonečně zředěném roztoku za nepřítomnosti polyiontů, λ_p je molární vodivost polyiontu a f_c je koeficient, který zahrnuje elektrostatické interakce mezi polyiontem a protiionty, stupeň ionizace a vnitřní tření. Molární vodivost λ polyelektrolytu s jednomocným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

$$\lambda = \frac{\kappa - \kappa_0}{c_p} = \lambda^0 + \Phi(c_p) \quad (25)$$

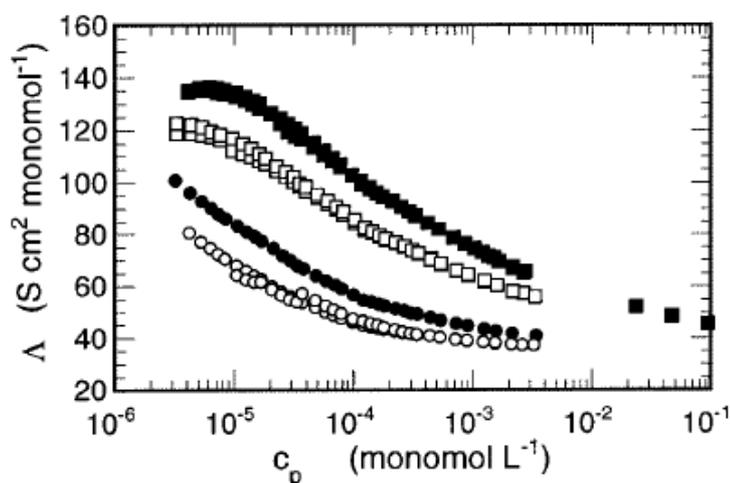
kde κ je měrná elektrická vodivost roztoku, κ_0 je měrná elektrická vodivost rozpouštědla, λ^0 molární vodivost při nekonečném zředění a $\Phi(c_p)$ udává vnitřní interakce. Důsledkem silných vnitřních interakcí závislost měrné elektrické vodivosti na koncentraci polyelektrolytu není lineární ve vodném prostředí. [7]

Christine Wandrey v roce 1999 publikovala studii elektrické vodivosti roztoků sodné soli polystyrenulfonátu 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 (25) a vynesena její závislost na koncentraci polyelektrolytu. Příklady těchto závislostí zobrazuje Obrázek 4. 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 NaCl. [17]

V roce 2000 zveřejnili Wandrey, Ch. a spol. článek, ve kterém se zabývají studiem sloučenin odvozených od polyvinylbenzyltrialkylamonium chloridu o různém stupni polymerizace. Molární vodivost byla vypočtena podle rovnice (25). Obrázek 5 zobrazuje koncentrační závislost molární vodivosti pro polyvinylbenzyltrialkylamonium chlorid, jehož substituenty byl n-butyl a dva methyly. [18]



Obrázek 4: Koncentrační závislost molární vodivosti a vlivu iontové síly na roztok sodné soli polystyrensulfonylu pro různé molekulové hmotnosti: a ($8\,000\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) (\circ) bez soli, (∇) $1\cdot 10^{-6}$, (\bullet) $2\cdot 10^{-6}$, (\square) $4\cdot 10^{-6}$, (\blacksquare) $1\cdot 10^{-5}$, (\triangle) $2\cdot 10^{-5}$, (\blacktriangle) $5\cdot 10^{-5}$, (\diamond) $1\cdot 10^{-4}\text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}\text{ NaCl}$; d ($183\,000\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) (\circ) bez soli, (\bullet) $2\cdot 10^{-6}$, (\blacksquare) $1\cdot 10^{-5}\text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}\text{ NaCl}$ [17]



Obrázek 5: Koncentrační závislost molární vodivosti pro různé délky řetězce polyvinylbenzyltrialkylamonium chloridu. P_n : (\blacksquare) 27; (\square) 56; (\bullet) 181; (\circ) 407 [18]

2.4 pH metrie

2.4.1 Skleněná elektroda

Skleněná elektroda je v současnosti nepoužívanější iontově selektivní elektrodou používanou pro měření pH. Výhodou je, že její potenciál není ovlivňován přítomností oxidačních nebo redukčních činidel. [14] U skleněné elektrody se používá membrána skleněná, kterou tvoří trojrozměrná síť skupin SiO_4^{4-} . Na každý atom křemíku jsou navázány čtyři atomy kyslíku a každý atom kyslíku je sdílen dvěma atomy křemíku. Náboj křemičitých iontů je vyvážen sodnými, draselnými nebo lithnými ionty, které se mohou volně pohybovat a vyměňovat za jiné ionty z roztoku. Selektivitu skleněných membrán lze ovlivnit složením skla. [12]

Skleněnou elektrodu tvoří banička z elektrodového skla s vnitřním roztokem o stálé aktivitě hydratovaných protonů. Tento vnitřní roztok, kterým nejčastěji bývá roztok chloridu draselného, roztok kyseliny chlorovodíkové nebo roztok tlumiče, zajišťuje konstantní hodnotu potenciálu na vnitřní straně baničky. [11]

Pro měření pH je potřeba na povrchu skleněné membrány vytvořit hydratovanou vrstvu, ve které se sodné ionty ze skla nahradí vodíkovými ionty z roztoku. Vodíkové ionty z hydratované vrstvy se účastní při měření pH rovnovážné výměnné reakce s vodíkovými ionty v analyzovaném a vnitřním roztoku. Výsledkem rovnovážné reakce je vznik

membránového potenciálu. [12] Pokud je aktivita solvatovaných protonů v hydratované vrstvě konstantní, platí pro rozdíl membránových potenciálů tento vztah:

$$\Delta\varphi = \varphi_1 - \varphi_2 = 0,06 \log \frac{a_{H(1)}}{a_{H(2)}} = 0,06 \log a_{H(1)} - 0,06 \log a_{H(2)} \quad (26)$$

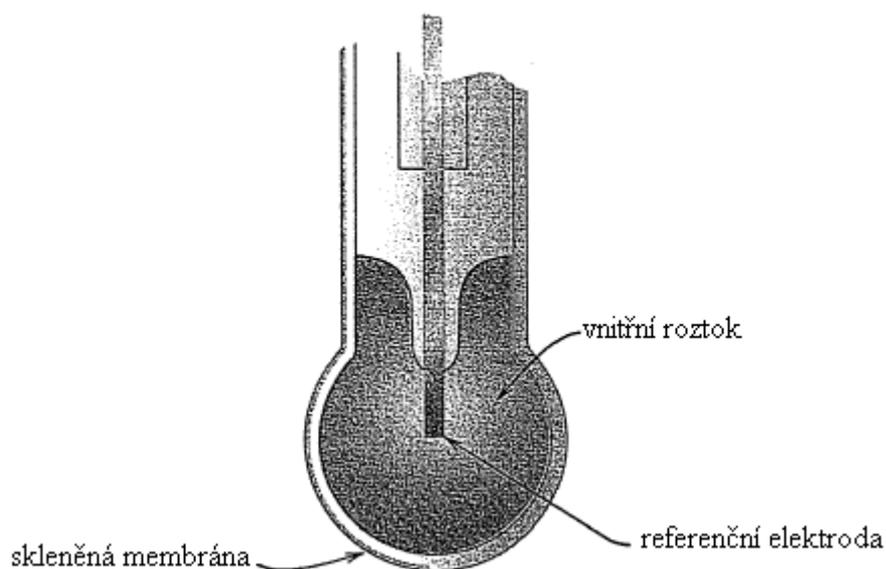
kde $a_{H(1)}$ a $a_{H(2)}$ jsou aktivity hydratovaných vodíkových iontů v měřeném a vnitřním roztoku.

Pokud je aktivita hydratovaných vodíkových iontů ve vnitřním roztoku konstantní, například při použití $0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ roztoku HCl, pak platí:

$$E = E^0 - 0,06 \log pH_x \quad (27)$$

Z této rovnice vyplývá, že by závislost potenciálu skleněné elektrody na pH roztoku, měla být přímková. [11] V reálných případech však dochází k odchýlkám. Některé z nich jsou:

1. Alkalická chyba. Dochází k ní při pH vyšším než 9. Elektroda se stává citlivou na alkalické ionty a dává nižší hodnoty pH.
2. Kyselá chyba. Při pH menším než je 0,5 ukazuje skleněná elektroda hodnoty pH vyšší, než by měly být.
3. Dehydratace. Dehydratace může způsobit odchylky v chování elektrody.
4. Chyba v pH standardního pufru. Jakákoli nepřesnost při přípravě pufrů pro kalibraci nebo změna ve složení během skladování může způsobit odchylku v pH. [13]



Obrázek 6: Schéma skleněné elektrody [14]

2.5 Volumetrická analýza

2.5.1 Úvod

Při volumetrické analýze se měří objem roztoku titračního činidla, které při titraci reaguje s analyzovanou složkou. Obsah analyzované složky zjistíme z objemu a koncentrace titračního činidla v bodě ekvivalence.

Titrace je možné dělit na acidobazické, redoxní, srážecí a komplexometrické. Při acidobazických titracích dochází k reakci hydroxoniových a hydroxylových iontů. Redoxní titrace jsou specifické přenosem elektronů mezi redukčním a oxidačním činidlem. Při

srážecích titracích vznikají málo rozpustné sloučeniny a při komplexometrických málo disociované komplexy.

Pro volumetrickou analýzu je potřeba zajistit kvantitativní a jednotný reakční průběh, dostatečně rychlou reakci v daném prostředí a stechiometrický průběh reakce.

Titrační křivka vyjadřuje závislost vlastnosti titračního činidla nebo koncentrace některé z reagujících látek na přídávku titračního činidla. Její tvar je sigmoidální a má oblasti pozvolného průběhu a oblast prudké změny vlastností systému.

Bod ekvivalence je v oblasti prudké změny vlastností systému a je dosažen ve chvíli, kdy je spotřeba titračního činidla stechiometrická. [10]

2.5.2 Určení bodu ekvivalence

Existuje několik metod, které mohou být použity k detekci bodu ekvivalence. Tyto metody je možné rozdělit na dvě skupiny, metody vizuální a metody potenciometrické. U potenciometrických metod se jedná o určení bodu inflexe, ve kterém by měl nastat bod ekvivalence. Metody potenciometrické je možné dále rozdělit na metody grafické a výpočtové.

Při vizuální indikaci bodu ekvivalence se používají chemické indikátory. Jsou to většinou slabé kyseliny nebo zásady, jejichž disociovaná a nedisociovaná forma je jinak zbarvená. Zabarvení indikátoru závisí na pH roztoku, ve kterém se indikátor nachází. Každý indikátor má jinou funkční oblast, ve které mění své zbarvení. Pro vizuální indikaci bodu ekvivalence je třeba vybrat takový indikátor, jehož funkční oblast odpovídá pH v bodě ekvivalence.

Mezi grafické metody určení bodu inflexe patří Tubbsova metoda soustředných kružnic. Tento postup je vhodný pro vyhodnocení nesymetrických titračních křivek. Pomocí systému kružnic o různých poloměrech se vyhledají středy křivosti obou ohybů titračních křivek tak, aby daná kružnice byla s ohybem titrační křivky shodná v co nejdelším úseku. Spojnice středů křivosti obou kružnic protíná titrační křivku v bodě inflexe.

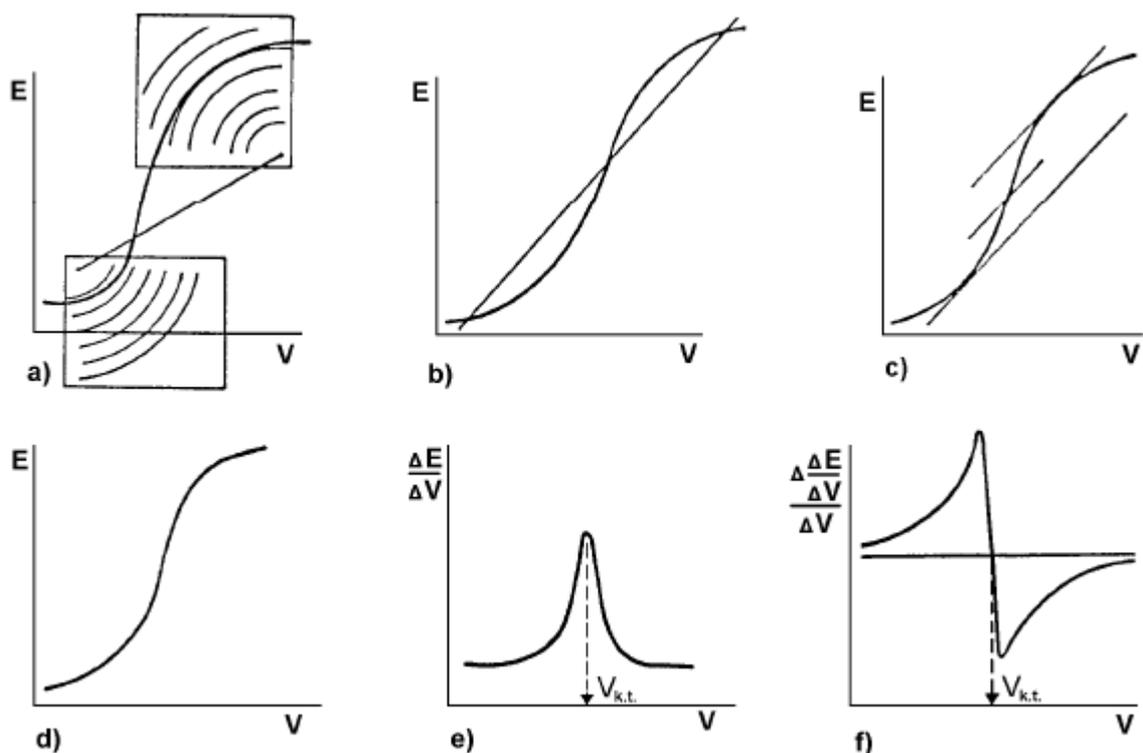
Pro titrační křivky, které jsou symetrické, je možné použít přímkovou metodu. Zkusmo se nalezne taková sečna, která vytne na obou větvích titrační křivky stejné plochy. Tato metoda se někdy také nazývá metodou tří bodů. Sečna bývá obvykle vedena pod úhlem 35–50°.

Další grafickou metodou, kterou je možné použít pro symetrické křivky, je metoda rovnoběžných tečen. Nejčastěji v ohybech titrační křivky jsou vyneseny rovnoběžné tečny. Rovnoběžka, která pólí jejich kolmou vzdálenost, protíná křivku v bodě inflexe. [15]

Nejjednodušší metoda výpočtového vyhodnocení bodu inflexe zahrnuje vynesení závislosti potenciálu (případně pH) na objemu titračního činidla. Poté vizuálně určíme inflexní bod ve strmě stoupající části křivky.

Druhý způsob je vypočítat změnu potenciálu za jednotku objemu titračního činidla. Stanovíme vlastně první derivaci titrační křivky. Grafická závislost první derivace na objemu je křivka s maximem, které odpovídá bodu inflexe. Pokud je titrační křivka symetrická, potom se bod maxima shoduje s bodem ekvivalence. U asymetrických křivek je pozorována malá titrační chyba při použití maxima jako bodu ekvivalence.

Další možností je použít závislost druhé derivace titrační křivky na objemu titračního činidla. V bodě, kde tato závislost prochází nulou, je bod inflexe, a tudíž bod ekvivalence. Toto určení bodu ekvivalence může být velmi přesné. [13]



Obrázek 7: Určení bodu inflexe: a) Tubbsova metoda soustředěných kružnic, b) přímková metoda, c) metoda rovnoběžných sečen, d) titrační křivka, e) první derivace titrační křivky, f) druhá derivace titrační křivky [15]

Další výpočtovou metodou určení bodu ekvivalence je Granova metoda. Pro body před bodem ekvivalence provedeme matematickou transformaci na klesající lineární závislost a vyneseme ji do grafu v závislosti na objemu přidaného titračního činidla. Pro body za bodem ekvivalence provedeme podobnou matematickou transformaci, která je lineární a rostoucí, a vyneseme ji do stejného grafu. Proložení těchto závislostí přímkami je možné vypočítat jejich průsečík. Spuštěním kolmice v tomto průsečíku získáme objem v bodu ekvivalence. [22]

2.5.3 Titrace polyelektrolytů

Hodnota pH slabých polykyselin je dána rovnicí:

$$pH = pK_a + \log\left(\frac{\alpha}{1-\alpha}\right) = pK_0 + \Delta pK + \log\left(\frac{\alpha}{1-\alpha}\right) \quad (28)$$

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 . [7]

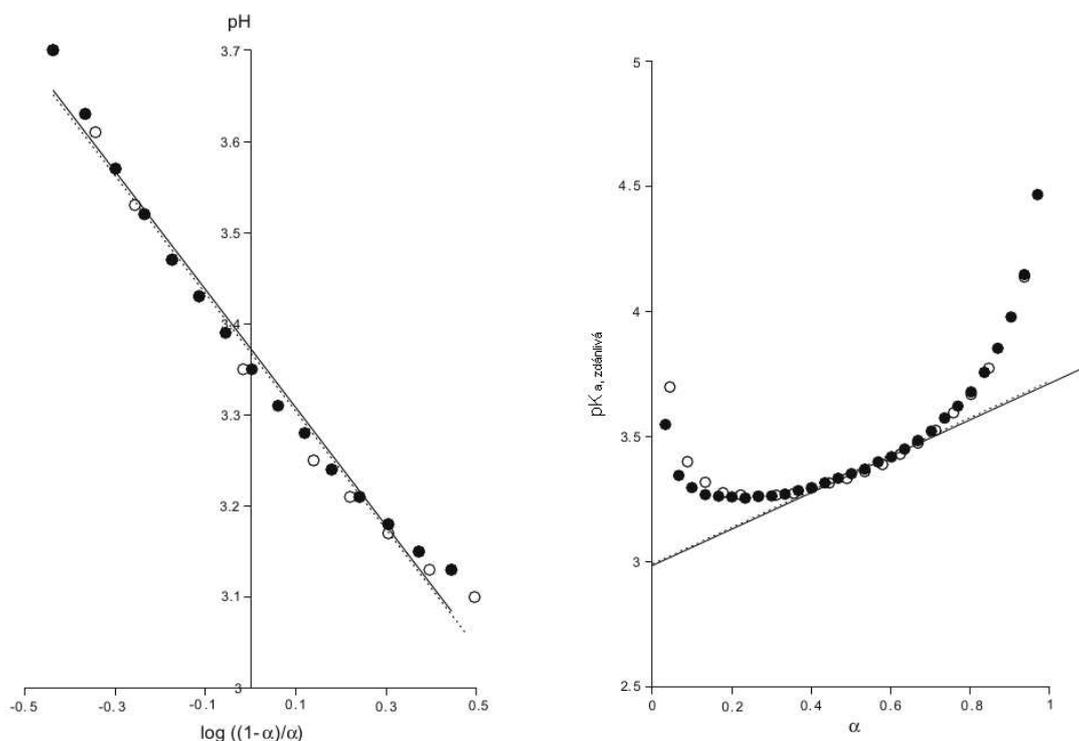
$$\Delta pK = \frac{0,4343}{kT} \left(\frac{\delta G_e}{\delta n} \right)_\kappa \quad (29)$$

Kristoffer Tømmeraas a Per-Olof Wahlund v roce 2009 zveřejnili článek, který se zabývá vlastnostmi kyseliny hyaluronové studované titrací. Potenciometrická titrace a ^1H NMR titrace byly použity ke stanovení disociační konstanty karboxylové skupiny kyseliny

hyaluronové. Byla stanovena vnitřní pK_a a pK_a při 50% disociaci v přítomnosti $0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ roztoku chloridu sodného a dusičnanu sodného. Nejprve byl pomocí enzymatické degradace připraven nízkomolekulární hyaluronan s průměrnou molekulovou hmotností $4\,830 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$. Hodnota pH 100 ml roztoku hyaluronanu o koncentraci $10 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ byla upravena na hodnotu 8,99 pomocí roztoku hydroxidu sodného. Nízkomolekulární hyaluronan byl titrován $0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ roztokem kyseliny chlorovodíkové s přidavkem $100 \mu\text{l}$. Hodnota pH byla měřena po každém přidavku a měření bylo ukončeno po dosažení pH 1,50. Hodnota pK_a při 50% disociaci byla určena ze závislosti pH na $\log[(1 - \alpha)/\alpha]$ jako hodnota pH, kdy $\log[(1 - \alpha)/\alpha]$ je rovno nule. Dále byla vypočtena zdánlivá pK_a pomocí rovnice:

$$pK_{a,\text{zdánlivá}} = pH - \log\left(\frac{\alpha}{1 - \alpha}\right) \quad (30)$$

Extrapolací na nulový stupeň disociace závislosti zdánlivé pK_a na stupni disociace α byla zjištěna hodnota vnitřní pK_a . Potenciometricky stanovená vnitřní disociační konstanta při koncentraci soli $0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ byla rovna 2,99 a disociační konstanta při 50% disociaci byla rovna 3,37. [19]



Obrázek 8: Závislost pH na $\log[(1 - \alpha)/\alpha]$ (vlevo) a závislost $pK_{a,\text{zdánlivá}}$ na stupni disociace α (vpravo) v přítomnosti $0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ NaCl (●) a $0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ NaNO₃ (○) [19]

2.6 UV-VIS spektrofotometrie

2.6.1 Úvod

Předpokladem pro použití ultrafialové a viditelné spektrofotometrie je absorpce molekul v oblasti ultrafialového a viditelného záření, při které dojde k excitaci elektronů molekulových orbitalů. Excitované elektrony se vrací zpět do základního stavu bez radiace. Zářivá energie se změnila v tepelnou energii a došlo ke zvýšení kinetické energie molekuly. [11]

Pokud na kyvetu obsahující vzorek dopadá zářivý tok Φ_0 , prošlý zářivý tok je roven Φ a odraz a rozptyl záření je zanedbatelný, poté je transmitance T , část prošlého záření, rovna:

$$T = \frac{\Phi}{\Phi_0} \quad (31)$$

Transmitance je často udávána v procentech.

Záporně vzatý dekadický logaritmus transmitance se nazývá absorbance A :

$$A = -\log T = \log \frac{\Phi_0}{\Phi} \quad (32)$$

V případě, že je absorpce záření nulová, je transmitance jednotková a absorbance nulová. Absorbance je závislá na koncentraci absorbující látky a na tloušťce absorbující vrstvy. Tuto závislost popisuje Lambert-Beerův zákon:

$$A = \varepsilon_\lambda \cdot c \cdot l \quad (33)$$

kde ε_λ je molární absorpční koeficient při určité vlnové délce, c látková koncentrace a l je tloušťka absorbující vrstvy. [9] Lambert-Beerův zákon platí pro roztoky o nízkých koncentracích a pro monochromatická záření, kdy je závislost absorbance na koncentraci dle definice přímková. [11]

2.6.2 Metody měření a instrumentace

Spektrofotometry lze rozdělit na dva druhy, jednopaprskový a dvoupaprskový. Liší se od sebe v uspořádání. U jednopaprskového spektrofotometru prochází paprsek roztokem se srovnávacím roztokem, poté je tento roztok nahrazen roztokem analytu a změřen tento roztok. Je třeba provést dvě měření. Ve dvoupaprskovém spektrofotometru je zařazeno sektorové zrcadlo, které propouští záření buď do roztoku se srovnávacím roztokem, nebo do roztoku se vzorkem. Oba vzorky jsou tak měřeny zároveň a několikrát za sekundu. Z detektoru u dvoupaprskového spektrofotometru pak vychází pulzující elektrický signál, jehož amplituda je úměrná rozdílu intenzit obou paprsků.

Každý spektrofotometr se skládá ze zdroje záření, monochromátoru, komory, ve které je vzorek, a detektoru.

Jako zdroj záření se většinou používá wolframová lampa, která vytváří záření v rozmezí 320–2 500 nm. Pro ultrafialovou spektroskopii bývá zařazena i deuteriová lampa, jejíž emise záření je od 200 do 400 nm.

Funkcí monochromátoru je rozložit záření na jednotlivé vlnové délky a vymezit úzké pásmo vlnových délek, které budou procházet vzorkem. Jako monochromátor je možné použít filtr, hranol nebo optickou mřížku.

Do komory, kde dochází k měření vzorku, se vzorek většinou vkládá v kyvetě, která je vyrobená z křemičitého skla. Křemičité sklo na rozdíl od normálního skla nebo plastu propouští ultrafialové záření, takže může být použito i pro měření v ultrafialové oblasti.

Jako detektor se nejčastěji používá fotonásobič. Fotonásobič je velmi citlivý detektor. Když záření o dostatečné energii dopadne na fotosensitivní katodu, emituje elektron do vakua uvnitř fotonásobiče. Emitovaný elektron dopadne na další fotokatodu (dynodu), která je pod vhodně zvoleným napětím. Tento elektron zde dopadne s energií větší, než byla jeho původní energie, a vyrazí tak větší počet elektronů. Tyto elektrony putují k další dynodě a celý postup se několikrát opakuje. Z každého fotonu, který dopadne na katodu, může být v konečném

výsledku získáno až 10^6 elektronů, takže i extrémně nízké intenzity záření mohou být změřeny. [11][16]

2.6.3 Stanovení disociační konstanty spektrofotometricky

Absorpční spektra sloučenin s kyselými a bazickými skupinami závisí na pH prostředí. Z rovnice disociace kyseliny (12) ve vodném roztoku můžeme disociační konstantu definovat jako:

$$K_a = \frac{[\text{H}_3\text{O}^+] \cdot [\text{A}^-]}{[\text{HA}]} \quad (34)$$

za podmínky, že je roztok velmi zředěný a tak můžeme aktivitní koeficienty považovat za rovny 1. Tento výraz může být upraven do tvaru:

$$pK_a = pH + \log \frac{[\text{HA}]}{[\text{A}^-]} \quad (35)$$

Poměr těchto koncentrací je možné určit spektrofotometricky. V silně kyselém prostředí je rovnováha posunuta ve prospěch kyseliny, která je prakticky nedisociovaná, zatímco v silně zásaditém prostředí je disociace úplná. Absorbanci v těchto prostředích udává Lambert-Beerův zákon. V prostředí, kde se projevují obě formy, je absorbance daná rovnicí:

$$A_p = (\varepsilon_{\text{HA}} [\text{HA}] + \varepsilon_{\text{A}^-} [\text{A}^-]) \cdot l \quad (36)$$

Molární absorpční koeficienty disociované a nedisociované kyseliny je možné vyjádřit z absorbancí v zásaditém, resp. kyselém prostředí:

$$\varepsilon_{\text{A}^-} = \frac{A_z}{c_{\text{A}^-} \cdot l}; \varepsilon_{\text{HA}} = \frac{A_k}{c_{\text{HA}} \cdot l} \quad (37)$$

Za podmínky, že je koncentrace kyseliny ve všech roztocích stejná, je možné rovnici (36) upravit na tvar:

$$[\text{HA}] = \frac{c_{\text{HA}} (A_p - A_z)}{A_{\text{HA}} - A_z} \quad (38)$$

Protože celková koncentrace kyseliny je rovna součtu nedisociovaných a disociovaných rovnovážných koncentrací, je možné jejich poměr vyjádřit pomocí absorbance ve velmi nízkém pH (A_k), ve velmi vysokém pH (A_z) a ve středním pH (A_p):

$$\frac{[\text{HA}]}{[\text{A}^-]} = \frac{(A_p - A_z)}{A_k - A_p} \quad (39)$$

Dosazením do rovnice (35) získáme:

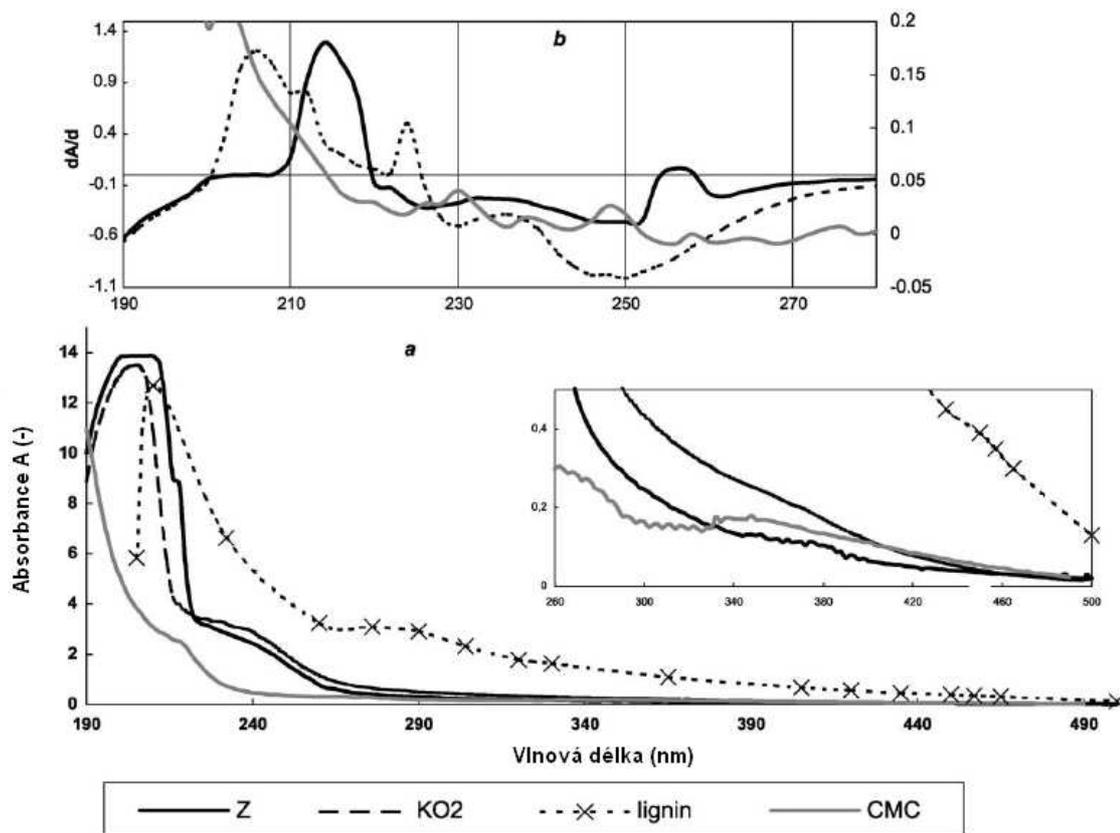
$$pK_a = pH + \log \frac{A_p - A_z}{A_k - A_p} \quad (40)$$

Tuto rovnici můžeme použít pouze v případě, že koncentrace kyseliny je ve všech roztocích stejná a absorbance náleží stejné vlnové délce. [23]

2.6.4 UV-VIS spektrofotometrie polyelektrolytů

Jamal Alyoussef Alkrad a spol. v roce 2003 zveřejnili článek, který se zabývá charakterizací enzymaticky štěpené kyseliny hyaluronové. Zaměřili se na specifikaci dvojné vazby v kyselině hyaluronové po enzymatickém trávení pomocí ^1H NMR, ^{13}C NMR, Ramanové, infračervené a UV-VIS spektrofotometrie. Roztok kyseliny hyaluronové byl připraven a zbaven plynů pomocí ultrazvuku 30 minut před měřením. Kyselina hyaluronová po enzymatickém štěpení o molekulové hmotnosti $31 \text{ kg}\cdot\text{mol}^{-1}$ měla absorpční maximum při vlnové délce 226 nm, která odpovídá přítomnosti dvojné vazby, která vznikla při štěpení hyaluronidázou. Při molekulových hmotnostech 235 a $1\,200 \text{ kg}\cdot\text{mol}^{-1}$ nebyla absorpce při 226 nm pozorována. [20]

V roce 2003 publikovali T. Bikova a A. Treimanis článek, ve kterém studují absorbanci v rozmezí 190 až 500 nm oxidovaného xylanu, který neobsahuje lignin a byl izolován z nebělené a ozonem bělené sulfátové buničiny. Dále studovali absorbanci monokarboxyl celulózy v roztoku NaOH. Termo-oxidačním rozkladem polysacharidů během rozvlákňování a bělení dochází k akumulaci karboxyl, aldo- a keto-skupin. Tyto skupiny v celulóze a hemicelululóze absorbují v rozmezí 210–320 nm. Roztoky xylanu byly rozpuštěny v roztoku hydroxidu draselného a sodného. Roztok monokarboxyl celulózy byl připraven v roztoku hydroxidu sodného. Pro lepší interpretaci naměřených spekter byla vypočtena i jejich první derivace. Při vlnových délkách vyšších než 260 nm byla nalezena maxima při 270–290 nm a 350–380 nm pro všechny vzorky. Maximální hodnoty při 210–220 nm a 270–280 nm byly připisány absorbanci karboxylových a karbonylových skupin. Protože byly vzorky měřeny v zásaditých roztocích, projevila se disociace karboxylových skupin a také ionizace a následná izomerizace keto- a aldo-skupin. Předpokládaná absorbance těchto skupin je při delších vlnových délkách. [21]



Obrázek 9: UV-VIS spektrum xylanu izolovaného z nebělené (KO_2) a bělené (Z) sulfátové buničiny, monokarboxyl celulozy (CMC) a ligninu [21]

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

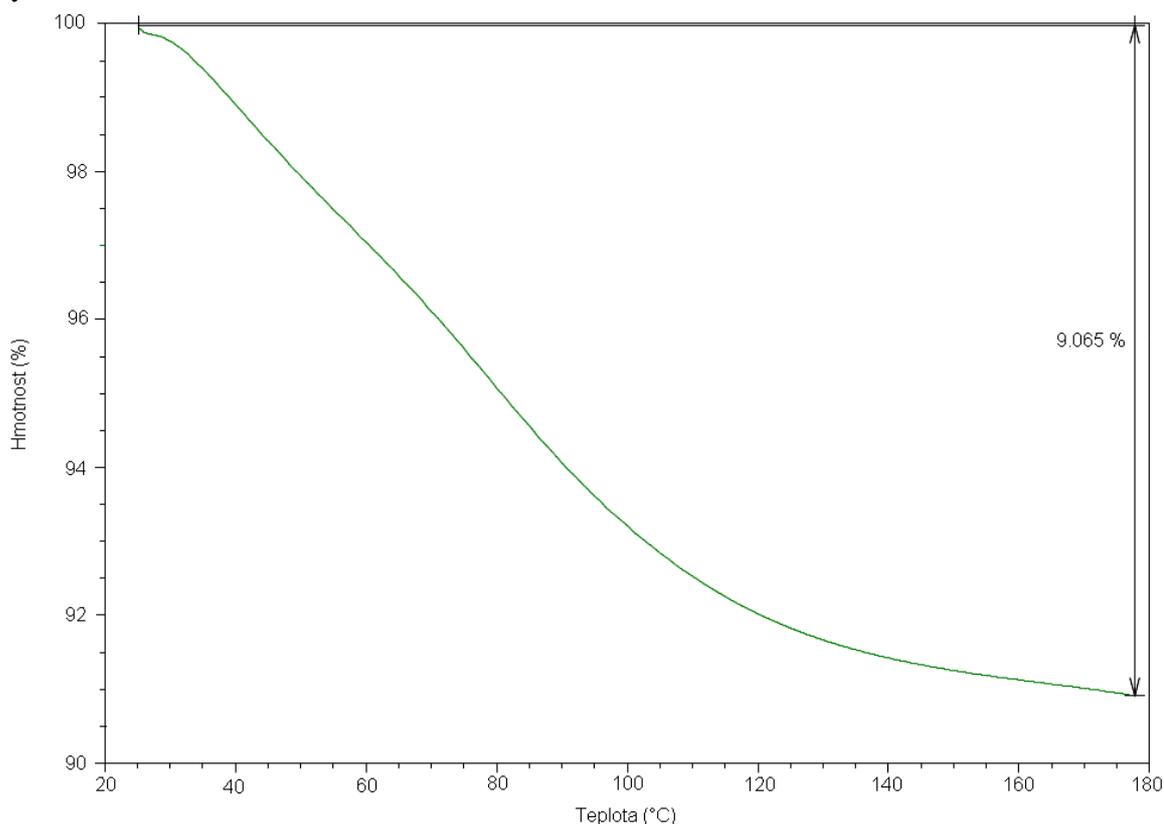
3.1 Použité chemikálie

- kyselina hyaluronová 90–110 kg·mol⁻¹, Contipro Pharma, a.s.
- kyselina hyaluronová 1500–1750 kg·mol⁻¹, Contipro Pharma, a.s.
- chlorid sodný p.a., Lach-Ner, s. r. o.
- hydroxid sodný p.a., Lach-Ner, s. r. o.
- kyselina citronová monohydrát p.a., Penta
- hydrogenfosforečnan disodný dihydrát p.a., Penta
- kyselina sírová 96% p.a., Lach-Ner, s. r. o.
- Milli-Q voda

3.2 Použité metody

3.2.1 Příprava roztoků

Pro vybrané vzorky kyseliny hyaluronové byla provedena termická analýza, přesněji řečeno termogravimetrie, aby byl zjištěn obsah vody. Termogravimetrie byla prováděna ve vzduchu a příklad jejího výsledku pro nízkomolekulovou kyselinu hyaluronovou zobrazuje Obrázek 10. U nízkomolekulové kyseliny hyaluronové klesla hmotnost během sušení o 9,1 % a u vysokomolekulové o 7,5 %.



Obrázek 10: Výsledky termogravimetrie pro nízkomolekulovou kyselinu hyaluronovou

Zásobní roztoky kyseliny hyaluronové byly připravovány následujícím způsobem. Kyselina hyaluronová byla vysušena při 90 °C po dobu 20 min na sušících váhách, během které došlo k ustálení hmotnosti kyseliny hyaluronové. Po vysušení kyseliny bylo na váženice odváženo její potřebné množství s přesností na čtyři desetinná místa. Část navážky byla převedena do zásobní nádoby s menším množstvím, než bylo potřeba pro danou koncentraci, Milli-Q vody

a přelita další Milli-Q vodou. Celý postup se opakoval, dokud nebyla do zásobní nádoby převedena všechna navážka. Poté byla váženka znovu zvážena, aby bylo možné zjistit, jak velká část navážky zůstala na váženke kvůli vzdušné vlhkosti. Dále bylo zjištěno skutečné množství kyseliny hyaluronové v zásobní nádobě, přepočítáno potřebné množství Milli-Q vody k tvorbě roztoku o dané koncentraci a přidáno zbývající množství Milli-Q vody. Zásobní roztok se míchal na magnetické míchače po dobu 24 hod, aby bylo dosaženo homogenního roztoku.

Při přípravě zásobních roztoků chloridu sodného, hydroxidu sodného, kyseliny citronové, hydrogenfosforečnanu disodného bylo naváženo potřebné množství dané chemikálie s přesností na čtyři desetinná místa, které bylo kvantitativně převedeno do menšího množství Milli-Q vody, zředěno na potřebný objem a důkladně promícháno. Při přípravě roztoku kyseliny sírové bylo potřebné množství kyseliny odpipetováno do malého množství Milli-Q vody a doplněno na potřebný objem.

Při přípravě pufru z kyseliny citronové a hydrogenfosforečnanu disodného byl do 50 ml kyseliny citronové o koncentraci $10 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ přidáván roztok hydrogenfosforečnanu disodného o koncentraci $20 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ za stálého míchání na magnetické míchače a měření pH do dosažení požadovaného pH.

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 míchán na magnetické míchače několik hodin.

Roztoky kyseliny hyaluronové v roztocích hydroxidu sodného, kyseliny sírové a pufru z kyseliny citronové a hydrogenfosforečnanu disodného byly připraveny smícháním zásobních roztoků tak, aby bylo dosaženo potřebné koncentrace. Roztoky byly důkladně promíchány.

3.2.2 Měření vodivosti

Vodivost homogenních roztoků kyseliny hyaluronové v roztoku chloridu sodného byla měřena konduktometrem Mettler Toledo. Do roztoku o laboratorní teplotě byla ponořena elektroda a po dvouminutovém ustálení byly odečítány hodnoty vodivosti v deseti sekundových intervalech. Odečítání vodivosti bylo ukončeno po získání minimálně pěti ustálených hodnot, tzn. s odchylkou menší než přibližně 1 %, nebo po třech minutách měření. Tento postup byl pro každý roztok proveden celkem třikrát.

3.2.3 Konduktometrická titrace

Při konduktometrické titraci vysokomolekulové kyseliny hyaluronové byl roztok kyseliny hyaluronové titrován roztokem chloridu sodného. Titrace nízkomolekulové kyseliny hyaluronové byla prováděna naopak než titrace vysokomolekulové kyseliny hyaluronové, tzn. do roztoku chloridu sodného byl přidáván roztok kyseliny hyaluronové. Měření vodivosti probíhalo na konduktometru Mettler Toledo a přídatky byly realizovány titrátorem TitroLine alpha plus od firmy Schott.

Pro dosažení potřebného koncentračního rozmezí byla konduktometrická titrace vysokomolekulové kyseliny hyaluronové rozdělena na šest částí. Při první titraci byl roztok kyseliny v roztoku $0,3 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ chloridu sodného o laboratorní teplotě titrován 50 ml téhož roztoku chloridu sodného. Roztok chloridu sodného byl přidáván každých 60 s po 1 ml. Interval odečítání hodnot vodivosti byl 10 s. Při dalších titracích bylo odebráno 40 ml ztitrovaného roztoku, který byl dále titrován stejným způsobem.

Titrace nízkomolekulové kyseliny hyaluronové byla rozdělena na dvě titrace roztoků kyseliny hyaluronové o různých koncentracích. Při titraci bylo 40 ml roztoku chloridu sodného o koncentraci $0,3 \text{ mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$ titrováno 40 ml roztoku kyseliny hyaluronové v témže roztoku chloridu sodného o laboratorní teplotě. Příklad roztoku kyseliny hyaluronové 1 ml byl dávkován každých 5 minut. Hodnoty vodivosti byly odečítány každých 10 s.

3.2.4 Acidobazická titrace

Při acidobazické titraci byly roztoky kyseliny hyaluronové o laboratorní teplotě titrovány 10 ml roztoku hydroxidu sodného o koncentraci $1 \text{ mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$. Roztok hydroxidu byl přidáván každých 60 s po 0,05 ml. Hodnoty pH se odečítaly každých 10 s. Měření pH probíhalo na pH-metru Mettler Toledo a přídatky byly realizovány titrátorem TitroLine alpha plus od firmy Schott.

3.2.5 UV-VIS spektroskopie

Při měření UV-VIS byly roztoky kyseliny hyaluronové v různých prostředích nality do křemenných kyvet, které byly předem vypláchnuté měřeným roztokem. Roztok kyseliny hyaluronové v pufru byl měřen po 10min míchání na elektromagnetické míchačce. Roztoky v kyselině sírové a hydroxidu sodném byly měřeny dvěma způsoby, ihned po smíchání a po 30min míchání. Roztoky, které byly měřeny po smíchání, byly promíchány ručně, zatímco ostatní roztoky byly 30 min míchány na elektromagnetické míchačce. Před měřením bylo provedeno stanovení baseliny pro každé prostředí. Měření probíhalo v rozmezí 400–200 nm s korekcí na rozpouštědlo na spektrofotometru Varian Cary 50 Probe. Rychlost scanu byla 300 nm za minutu. Každý vzorek byl přeměřen třikrát.

3.2.6 Měření pH

Měření pH probíhalo na pH-metru Mettler Toledo. Po dvouminutovém ustálení byly odečítány hodnoty pH v desetisekundových intervalech do dosažení minimálně pěti ustálených hodnot, nebo po dobu tří minut. Měření bylo pro každý roztok provedeno třikrát.

3.3 Zpracování dat

Zpracování všech naměřených dat bylo provedeno v programu MS Excel.

3.3.1 Diskontinuální měření vodivosti

Pro každý roztok byl z ustálených hodnot vodivosti vypočten průměr a pro tato data byla vypočtena směrodatná odchylka. Ukázkou tohoto zpracování zobrazuje Tabulka 1. Pro každý roztok byla vypočtena molární vodivost λ_i podle vzorce:

$$\lambda_i = \frac{\kappa_i - \kappa_0}{c_i} \quad (41)$$

kde κ_i je měrná vodivost pro roztok kyseliny hyaluronové a chloridu sodného ve vodě v $\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$, κ_0 vodivost roztoku chloridu sodného ve vodě v $\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ a c_i je koncentrace kyseliny hyaluronové v daném roztoku v $\text{monomol}\cdot\text{cm}^{-3}$. Koncentrace kyseliny hyaluronové v jednotkách $\text{monomol}\cdot\text{cm}^{-3}$ udává počet monomerních jednotek polysacharidu v 1 cm^3 roztoku. Rozměr vypočítané molární vodivosti je $\text{S}\cdot\text{cm}^2\cdot\text{monomol}^{-1}$.

Tabulka 1: Ukázka zpracování naměřených vodivostí pro roztok 0,002% NMHA ve vodě (* průměrná hodnota ze všech 15 hodnot)

κ_1 ($\mu\text{S/cm}$)	κ_2 ($\mu\text{S/cm}$)	κ_3 ($\mu\text{S/cm}$)
12,95	11,67	11,56
12,96	11,67	11,55
12,96	11,67	11,55
12,97	11,67	11,54
12,98	11,67	11,54
průměrná hodnota*		12,06
směrodatná odchylka		0,64

Molární vodivost byla vynesena v závislosti na koncentraci kyseliny hyaluronové v prostředích s různým obsahem chloridu sodného pro každou molekulovou hmotnost zvlášť. Dále byly porovnány molární vodivosti nízkomolekulové a vysokomolekulové kyseliny hyaluronové v jednotlivých prostředích o různé iontové síle.

Lineární části závislostí molárních vodivostí na koncentraci kyseliny hyaluronové v různém prostředí byly proloženy lineární regresí. Křivky byly proloženy lineární regresní přímkou v rozmezí koncentrací kyseliny hyaluronové $5,07 \times 10^{-4} - 5,07 \times 10^{-3}$ monomol $\cdot\text{dm}^{-3}$, což odpovídá 0,02–0,2 hm.% kyseliny hyaluronové. Lineární regrese byly extrapolovány na nulovou koncentraci. Tyto extrapolované molární vodivosti byly vyneseny do grafické závislosti na odmocnině z iontové síly roztoku. Do výpočtu iontové síly roztoku byly zahrnuty pouze ionty chloridu sodného.

Pomocí molárních vodivostí extrapolovaných na nulovou koncentraci byly pro každý roztok nízkomolekulové i vysokomolekulové kyseliny hyaluronové s různou iontovou silou vypočteny stupně disociace pomocí rovnice (10). S použitím rovnice (19) byla vynesena závislost K_c na výrazu $\sqrt{\alpha \cdot c}$ pro každý roztok. Tato závislosti byla proložena lineární regresní přímkou a na základě rovnice (23) byla určena disociační konstanta pK_a . Dále byla vynesena závislost hodnoty pK_a na iontové síle.

3.3.2 Konduktometrická titrace

Pro každý přírůstek v konduktometrické titraci nízkomolekulární i vysokomolekulární kyseliny hyaluronové bylo získáno šest hodnot měrné vodivosti. První a poslední naměřená hodnota byla kvůli lepší přesnosti výsledků zanedbána a pro zbylé hodnoty byly vypočteny průměrné hodnoty a směrodatné odchylky.

Z průměrných hodnot měrné vodivosti byla vypočtena molární vodivost pomocí rovnice (41). Jako měrná vodivost roztoku chloridu sodného ve vodě byla použita měrná vodivost roztoku chloridu sodného zjištěná v diskontinuálním měření vodivosti.

Lineární část závislosti molární vodivosti na koncentraci byla proložena lineární regresí a extrapolována na nulovou koncentraci. U nízkomolekulové kyseliny hyaluronové byla proložena závislost v rozmezí koncentrací $2,11 \times 10^{-3} - 4,93 \times 10^{-3}$ monomol $\cdot\text{dm}^{-3}$ kyseliny hyaluronové, což odpovídá 0,083–0,194 hm.% kyseliny hyaluronové. U vysokomolekulové kyseliny hyaluronové byla závislost proložena v rozmezí koncentrací $3,91 \times 10^{-2} - 6,64 \times 10^{-5}$ monomol $\cdot\text{dm}^{-3}$ kyseliny hyaluronové, což odpovídá $1,54 \times 10^{-3} - 2,62 \times 10^{-3}$ hm.% kyseliny hyaluronové. Pomocí této extrapolované mezní molární vodivosti byl vypočítán stupeň disociace podle rovnice (10). S použitím rovnice (19)

byla vynesena závislost K_c na výrazu $\sqrt{\alpha \cdot c}$ a na základě rovnice (23) byla určena disociační konstanta pK_a .

3.3.3 Acidobazická titrace

Při acidobazických titracích byla každých 10 s odečtena hodnota pH a každých 60 s byl k roztoku kyseliny hyaluronové přidán roztok hydroxidu sodného. Pro každý přírůstek titračního činidla bylo tedy naměřeno 6 hodnot pH. První a poslední naměřená hodnota pH pro daný přírůstek byly vyloučeny z dalšího zpracování, protože roztok nemusel být úplně homogenizován a mohlo dojít ke zpoždění odezvy elektrody na přírůstek. Zbylé čtyři hodnoty pH byly zprůměrovány a byla vypočtena jejich směrodatná odchylka.

Pro každý přírůstek byl vypočten počet molů hydroxidu sodného v roztoku:

$$n(\text{NaOH}) = c(\text{NaOH}) \cdot V(\text{NaOH}) \quad (42)$$

kde $c(\text{NaOH})$ je koncentrace zásobního roztoku hydroxidu sodného v $\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ a $V(\text{NaOH})$ je celkový objem přidaného hydroxidu sodného v dm^3 . Dále byl vypočten teoretický obsah karboxylových skupin v roztoku. Protože každá monomerní jednotka obsahuje jednu karboxylovou skupinu, teoretický obsah karboxylových skupin je roven počtu strukturních jednotek v roztoku:

$$n(\text{COOH}) = \left(\frac{w(\text{HA}) \cdot \rho}{M_{\text{MJ}}} \right) \cdot V(\text{HA}) \quad (43)$$

kde $w(\text{HA})$ je hmotnostní koncentrace kyseliny hyaluronové v roztoku, ρ hustota roztoku v $\text{g} \cdot \text{dm}^{-3}$, M_{MJ} je molární hmotnost strukturní jednotky kyseliny hyaluronové v $\text{g} \cdot \text{mol}^{-1}$ a $V(\text{HA})$ objem roztoku kyseliny hyaluronové na počátku titrace v dm^3 .

Stupeň disociace kyseliny hyaluronové byl vypočítán, jako podíl počtu molů hydroxidu sodného a počtu molů karboxylových skupin:

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

Dále byla do jednoho grafu vynesena závislost pH roztoku na hodnotě $\log[\alpha/(1-\alpha)]$ pro obě molekulové hmotnosti.

Ze závislosti pH roztoku na objemu přidaného roztoku NaOH, byl v programu Originu určen bod ekvivalence. Závislost v rozmezí objemů NaOH 0,5–8 ml byla proložena Boltzmannovou křivkou a byl zjištěn bod inflexe, který odpovídá bodu ekvivalence.

Dále byly vyneseny závislosti pK_a na stupni disociace a jejich lineární část byla proložena lineární regresní přímkou. Z této lineární regresní přímky byla zjištěna hodnota pK_a při nulovém stupni disociace.

3.3.4 UV-VIS spektrofotometrie

Pro každý vzorek byla provedena celkem tři měření. Hodnoty absorbancí, které byly naměřeny pro jeden vzorek v jednotlivých měřeních, byly zprůměrovány a byla vypočtena směrodatná odchylka pro danou vlnovou délku. Tyto zprůměrované hodnoty absorbancí byly vyneseny do jednoho grafu jako závislosti absorbance na vlnové délce pro všechny měřené vzorky. Pomocí rovnice (40) byla vypočtena hodnota pK_a pro všechny proměřené vlnové délky.

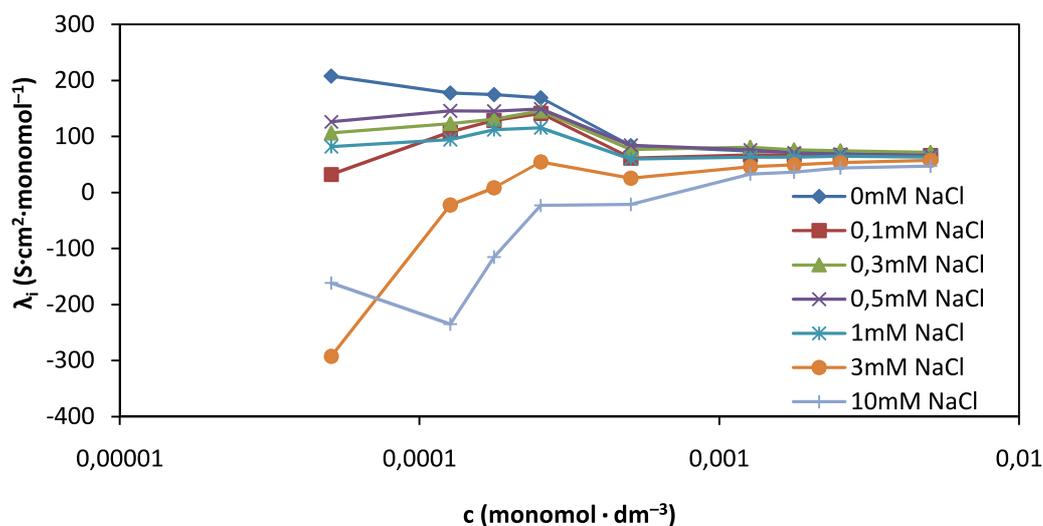
4 VÝSLEDKY A DISKUZE

V uvedených tabulkách a grafech jsou uvedeny výsledky pro měření vodivosti, acidobazické a konduktometrické titrace a pro UV-VIS spektrofotometrii roztoků nízkomolekulové ($90\text{--}110\text{ kg}\cdot\text{mol}^{-1}$) a vysokomolekulové ($1\ 500\text{--}1\ 750\text{ kg}\cdot\text{mol}^{-1}$) kyseliny hyaluronové v roztocích bez a s přidavkem soli.

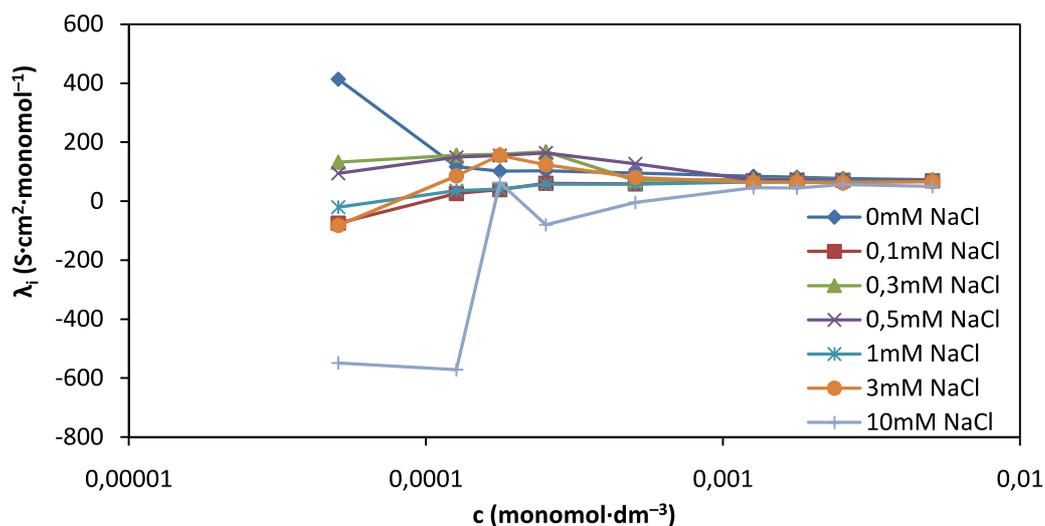
4.1 Diskontinuální měření vodivosti

Diskontinuální měření vodivosti bylo prováděno za účelem získání koncentračních závislostí molární vodivosti kyseliny hyaluronové v různých prostředích. Obrázek 11 a Obrázek 12 vyobrazuje tyto závislosti a je z nich patrné, že prostředí ovlivňuje chování kyseliny hyaluronové. V roztocích bez přidavku soli molární vodivost klesá s rostoucí koncentrací kyseliny hyaluronové, což odpovídá předpokladu, že při vyšších koncentracích polyelektrolytu ve vodném roztoku protiionty více odstiňují náboj polyaniontu. V roztocích s obsahem soli lze u většiny roztoků pozorovat se zvyšováním koncentrace kyseliny hyaluronové zvyšování molární vodivosti do dosažení maxima, které pro většinu roztoků nastalo při koncentraci kyseliny hyaluronové $2,54 \times 10^{-4}\text{ monomol}\cdot\text{dm}^{-3}$. Tato koncentrace odpovídá 0,01 hm.% kyseliny hyaluronové v roztoku. Po dosažení tohoto maxima se s rostoucí koncentrací molární vodivost snižovala. Při koncentracích vyšších než $1,27 \times 10^{-3}\text{ monomol}\cdot\text{dm}^{-3}$, což odpovídá 0,05 hm.% kyseliny hyaluronové v roztoku, má křivka lineární charakter. Průběh závislostí molární vodivosti na koncentraci kyseliny hyaluronové lze vysvětlit následovně. Při nízkých koncentracích kyseliny hyaluronové jsou jednotlivé polyionty a jejich protiionty od sebe natolik vzdálené, že se v roztoku téměř neovlivňují. Při nízkých koncentracích před dosažením maxima dochází ke kondenzaci protiiontů na řetězci polyelektrolytu, která snižuje molární vodivost roztoku. S rostoucí koncentrací kyseliny hyaluronové roste i obsah protiiontů, které se v roztoku jednodušeji pohybují, takže roste i molární vodivost roztoku. Při vyšších koncentracích kyseliny hyaluronové se více uplatňuje odstiňující efekt protiiontů, a proto molární vodivost klesá.

Dále je z grafu patrné, že s rostoucí koncentrací chloridu sodného klesá molární vodivost roztoku. U roztoků s vyšší koncentrací chloridu sodného vychází molární vodivost záporně, protože naměřená vodivost roztoku byla menší než vodivost roztoku chloridu sodného o téže koncentraci. Toto chování lze vysvětlit tím, že s přidáním soli dochází k odstiňování náboje polyaniontu, což je důsledek nižší disociační schopnosti v přítomnosti nízkomolekulární soli. Při vyšších koncentracích soli má toto odstiňování silnější charakter. Dochází k potlačení disociace polyelektrolytu, část chloridů sodných může být uvnitř sbaleného polyelektrolytu a roztok má tudíž nižší vodivost než samotný roztok chloridu sodného.

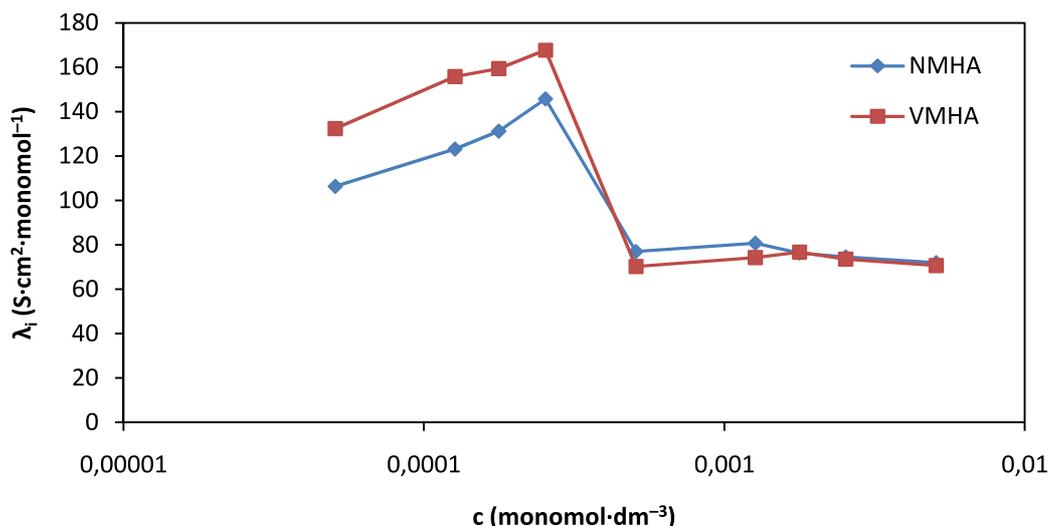


Obrázek 11: Závislost molární vodivosti na koncentraci pro NM HA



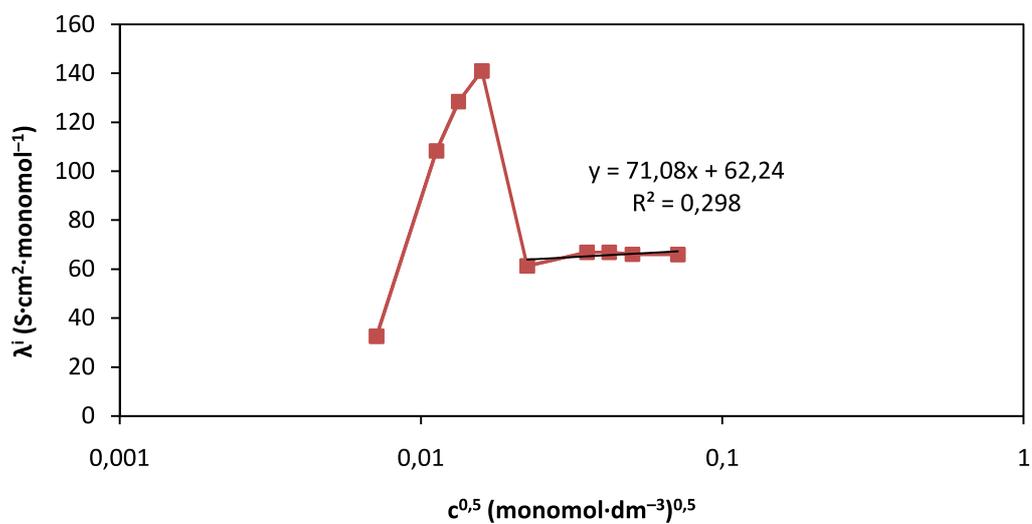
Obrázek 12: Závislost molární vodivosti na koncentraci pro VM HA

Příklad srovnání závislostí molární vodivosti na koncentraci kyseliny hyaluronové pro obě molekulové hmotnosti v příslušném roztoku chloridu sodného zobrazuje Obrázek 13. Z grafu je patrné, že průběh křivky je pro obě molekulové hmotnosti podobný. Vysokomolekulová kyselina hyaluronová má oproti nízkomolekulové kyselině hyaluronové vyšší hodnoty molární vodivosti. V porovnání s grafy, které získala Wandrey, Ch. (Obrázek 4 a Obrázek 5), mají naměřené závislosti jiný průběh.

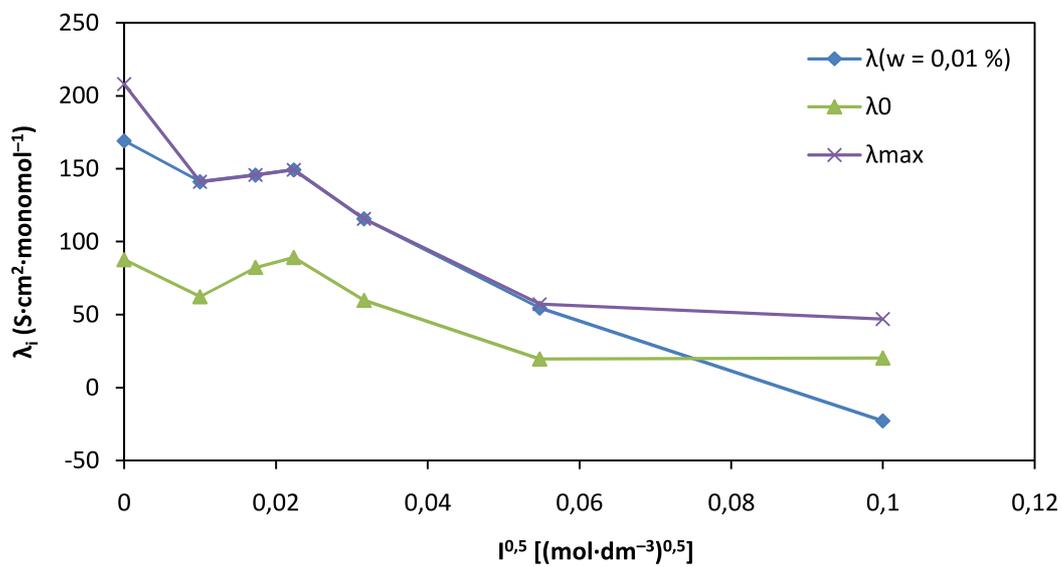


Obrázek 13: Závislosti molární vodivosti na koncentraci kyseliny hyaluronové pro obě molekulové hmotnosti v $0,3\text{mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$ NaCl

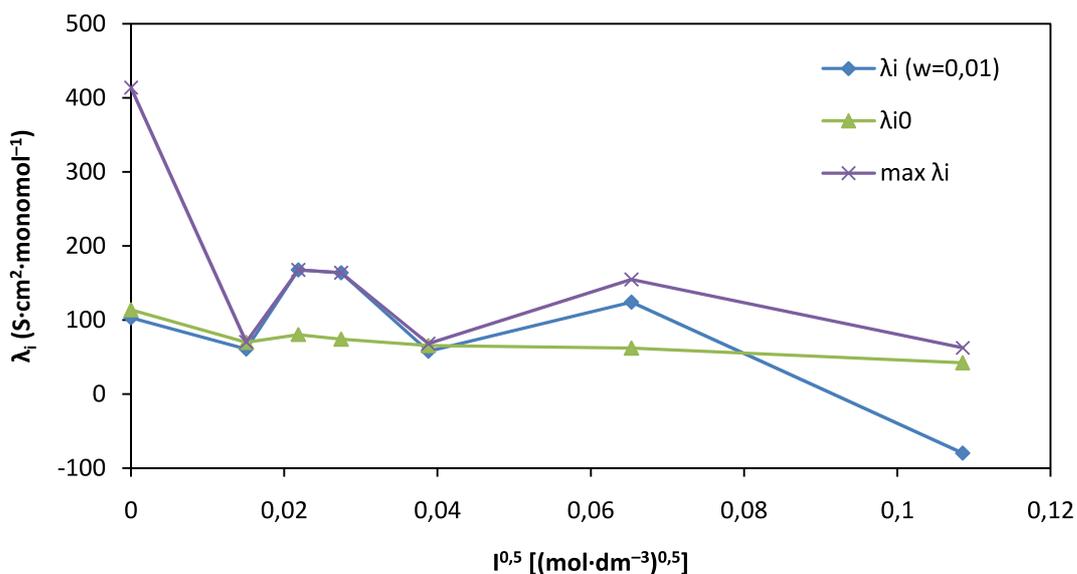
Lineární části křivek po maximu molární vodivosti byly proloženy lineárními regresními přímkami (viz Obrázek 14). Z těchto regresních přímek byly určeny molární vodivosti při nulové koncentraci kyseliny hyaluronové, které byly vyneseny do grafu v závislosti na odmocnině z iontové síly roztoku. Tyto závislosti pro nízkomolekulovou kyselinu hyaluronovou zobrazuje Obrázek 15 (zelená křivka) a pro vysokomolekulovou Obrázek 16 (zelená křivka). Dále byly na odmocnině z iontové síly vyneseny maximální hodnoty molární vodivosti pro každý roztok a molární vodivosti při koncentraci kyseliny hyaluronové $2,54 \times 10^{-4}$ monomol·dm⁻³ (0,01 hm. %), které ve většině případů odpovídají maximu na dané křivce. U nízkomolekulární kyseliny hyaluronové byl u extrapolované, maximální molární vodivosti a molární vodivosti při koncentraci kyseliny hyaluronové $2,54 \times 10^{-4}$ monomol·dm⁻³ pozorován klesající charakter s rostoucí iontovou silou. U vysokomolekulové kyseliny hyaluronové extrapolovaná molární vodivost s rostoucí iontovou silou nepatrně klesá. Maximální molární vodivost a molární vodivosti při koncentraci kyseliny hyaluronové $2,54 \times 10^{-4}$ monomol·dm⁻³ nemá jednoznačný průběh. Klesající charakter těchto závislostí s rostoucí iontovou silou lze vysvětlit rostoucím odstiňováním, které je způsobeno zvyšující se koncentrací protiiontů v roztoku.



Obrázek 14: Proložení lineárními regresními přímkami pro NM HA v $0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3} \text{ NaCl}$

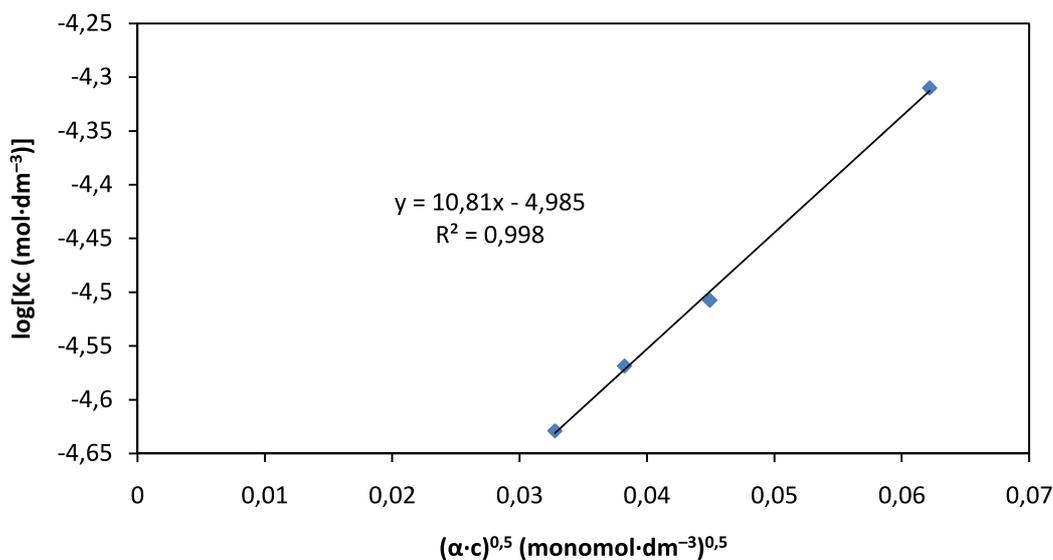


Obrázek 15: Závislost molární vodivosti na odmocnině z iontové síly pro NM HA

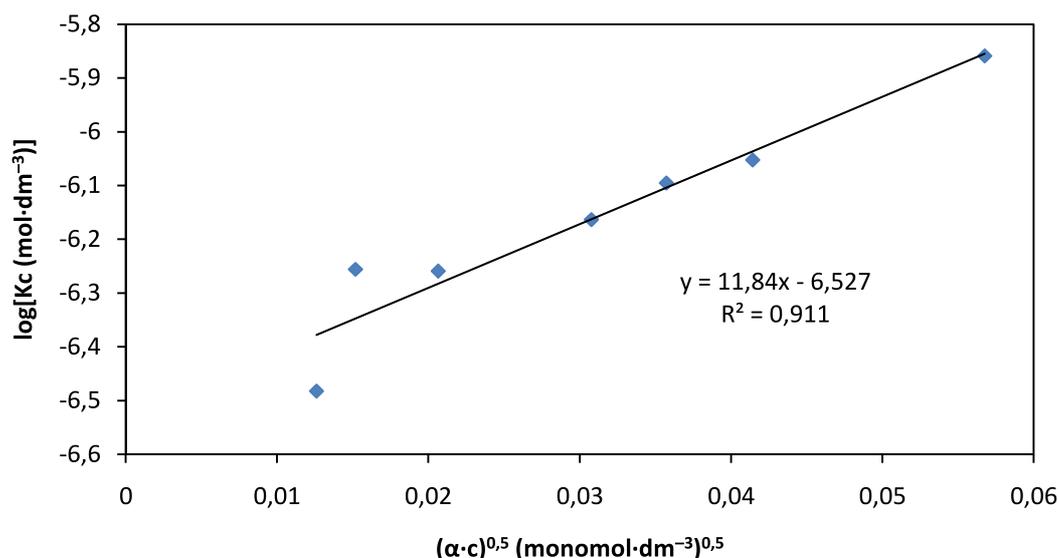


Obrázek 16: Závislost molární vodivosti na odmocnině z iontové síly pro VM HA

Pomocí extrapolovaných molárních vodivostí a rovnic (10) a (19) byla vypočtena hodnota koncentrační konstanty a výrazu $\sqrt{\alpha \cdot c}$. U některých vzorků nemohly být tyto výpočty provedeny z několika důvodů. Jedním důvodem bylo to, že u roztoků s vyšší iontovou silou měly roztoky s nízkou koncentrací kyseliny hyaluronové zápornou molární vodivost, což by způsobilo zápornou hodnotu stupně disociace. Dalším důvodem je, že u některých roztoků byla extrapolovaná molární vodivost menší než molární vodivost daného roztoku. Důsledkem toho vycházela koncentrační konstanta záporně, a tudíž z ní nemohla být vypočtena její logaritmická hodnota. U vzorků, u kterých bylo tři a více použitelných hodnot K_c a $\sqrt{\alpha \cdot c}$, byla sestrojena závislost logaritmu koncentrační konstanty na výrazu $\sqrt{\alpha \cdot c}$. Obrázek 17 a Obrázek 18 zobrazuje příklady těchto závislostí pro obě molekulové hmotnosti ve vodě. Závislosti koncentrační konstanty na $\sqrt{\alpha \cdot c}$ byly proloženy lineárními regresními přímkami, ze kterých byla odečtena hodnota pK_a pro kyselinu hyaluronovou při dané iontové síle.

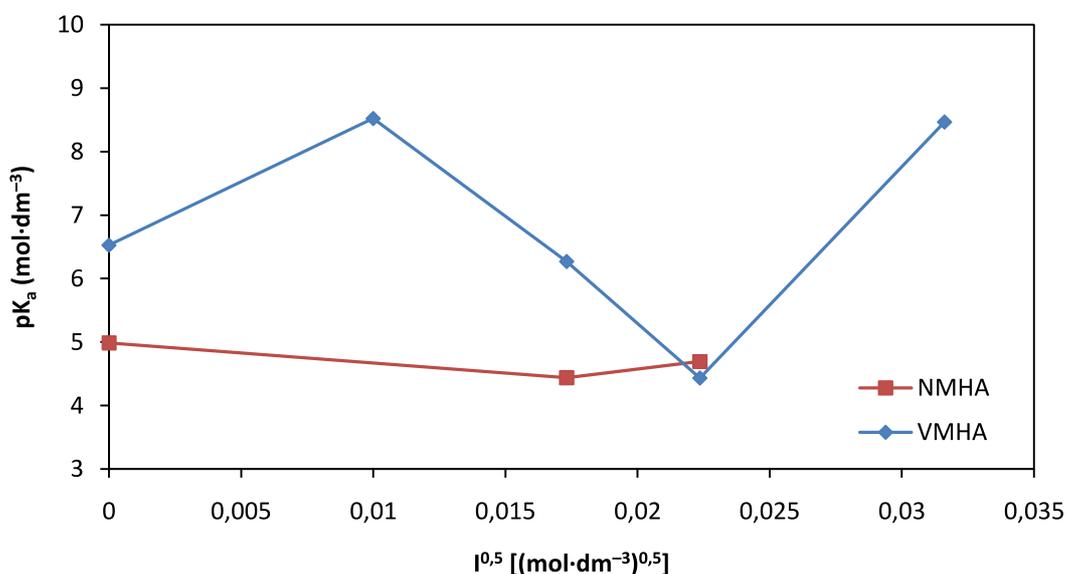


Obrázek 17: Vyhodnocení disociační konstanty pro NM HA ve vodě



Obrázek 18: Vyhodnocení disociační konstanty pro VM HA ve vodě

Zjištěné hodnoty pK_a pro kyselinu hyaluronovou při různé iontové síle byly vyneseny do závislosti na iontové síle pro obě molekulové hmotnosti kyseliny hyaluronové (Obrázek 19). U nízkomolekulové kyseliny hyaluronové je možné pozorovat mírné snížení a následně mírné zvýšení hodnoty pK_a s rostoucí iontovou silou. U vysokomolekulové kyseliny hyaluronové měla tato závislost nejednoznačný průběh. Tyto hodnoty mohou být ale zkreslené, protože pro jejich výpočet nebyly použity hodnoty z celé koncentrační řady v dané iontové síle.

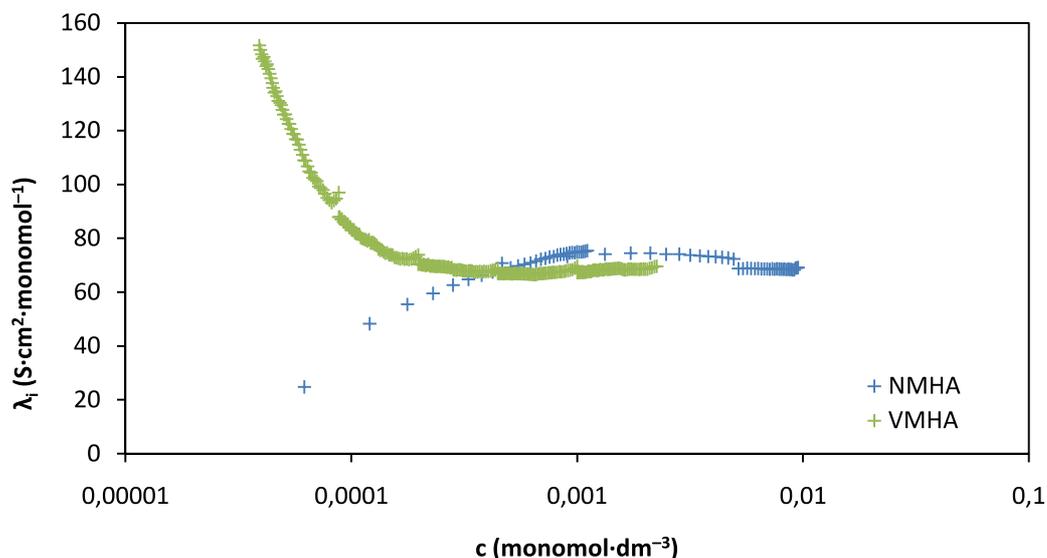


Obrázek 19: Závislost pK_a na odmocnině z iontové síly roztoku pro obě molekulové hmotnosti kyseliny hyaluronové

4.2 Konduktometrická titrace

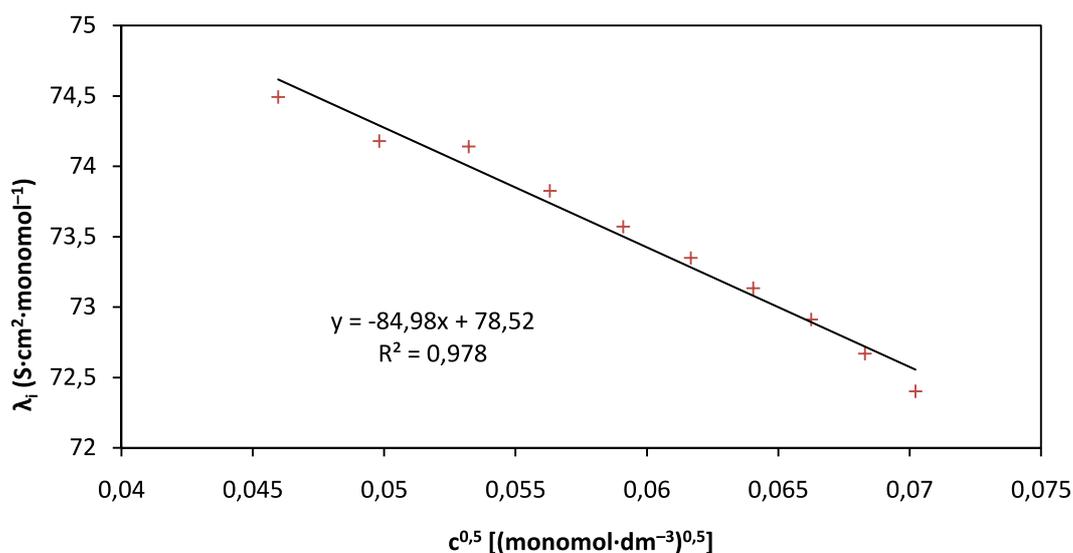
Obrázek 20 zobrazuje koncentrační závislosti molární vodivosti při konduktometrických titracích pro nízkomolekulovou i vysokomolekulovou kyselinu hyaluronovou. Z grafu je patrné, že molekulová hmotnost ovlivňuje průběh této závislosti. Zatímco u vysokomolekulové kyseliny hyaluronové s klesající koncentrací roste molární vodivost, u nízkomolekulové klesá. Při vyšších koncentracích jsou molární vodivosti pro obě

molekulové hmotnosti velmi podobné, protože došlo k zastínění náboje polyaniontu protiionty. Podobný průběh závislosti molární vodivosti na koncentraci zjistili i Wandrey, Ch. a spol. (viz Obrázek 5).

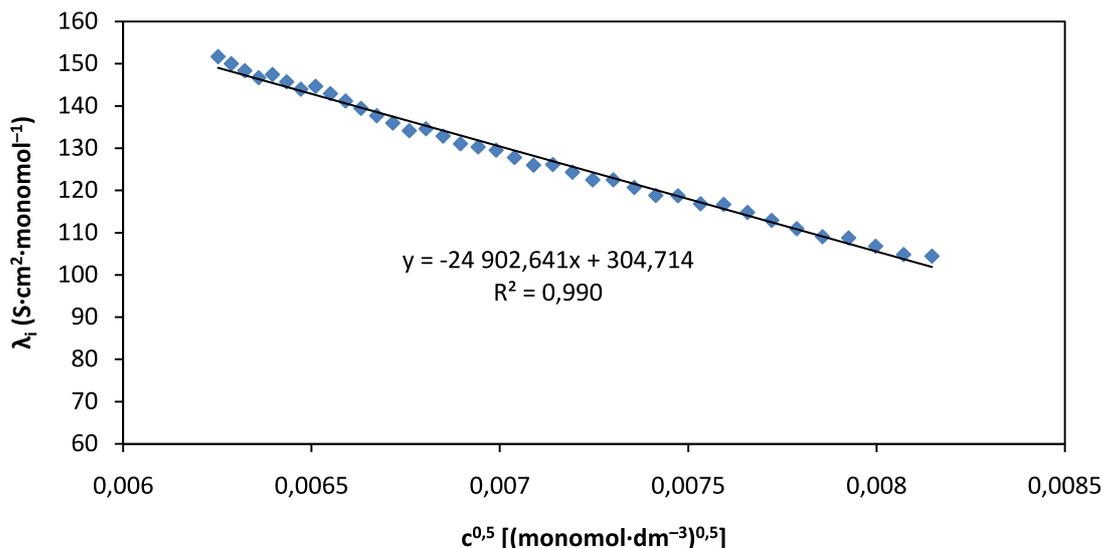


Obrázek 20: Závislost molární vodivosti na koncentraci kyseliny hyaluronové při konduktometrických titracích pro obě molekulové hmotnosti v $0,3\text{mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$ NaCl

U koncentrační závislosti molární vodivosti nízkomolekulové kyseliny hyaluronové byla lineární regresní přímkou proložena část křivky s koncentrací kyseliny hyaluronové v rozmezí $2,11 \times 10^{-3} - 4,93 \times 10^{-3}$ monomol·dm⁻³ (viz Obrázek 21). Pokud by byla proložena část s nižšími koncentracemi, měla by extrapolovaná molární vodivost zápornou hodnotu. U vysokomolekulové kyseliny hyaluronové byla proložena část s koncentracemi kyseliny hyaluronové $3,91 \times 10^{-2} - 6,64 \times 10^{-5}$ monomol·dm⁻³ (viz Obrázek 22). Z lineárních regresních přímek byly zjištěny mezní molární vodivosti jako úseky na ose y. Pro nízkomolekulovou kyselinu hyaluronovou je mezní molární vodivost rovna $78,5 \pm 0,3$ S·cm²·monomol⁻¹ a pro vysokomolekulovou 305 ± 3 S·cm²·monomol⁻¹.

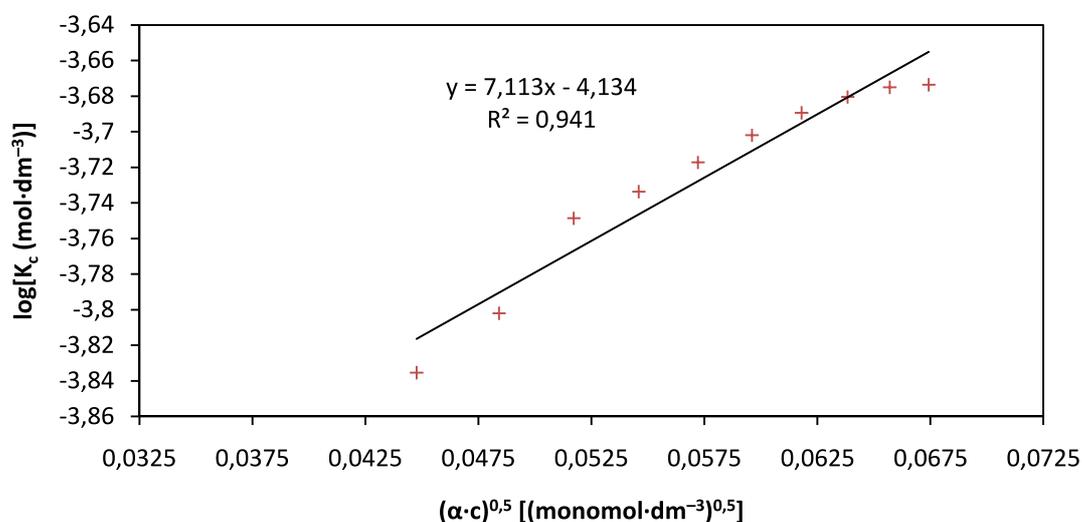


Obrázek 21: Extrapolace molární vodivosti NM HA na nulovou koncentraci

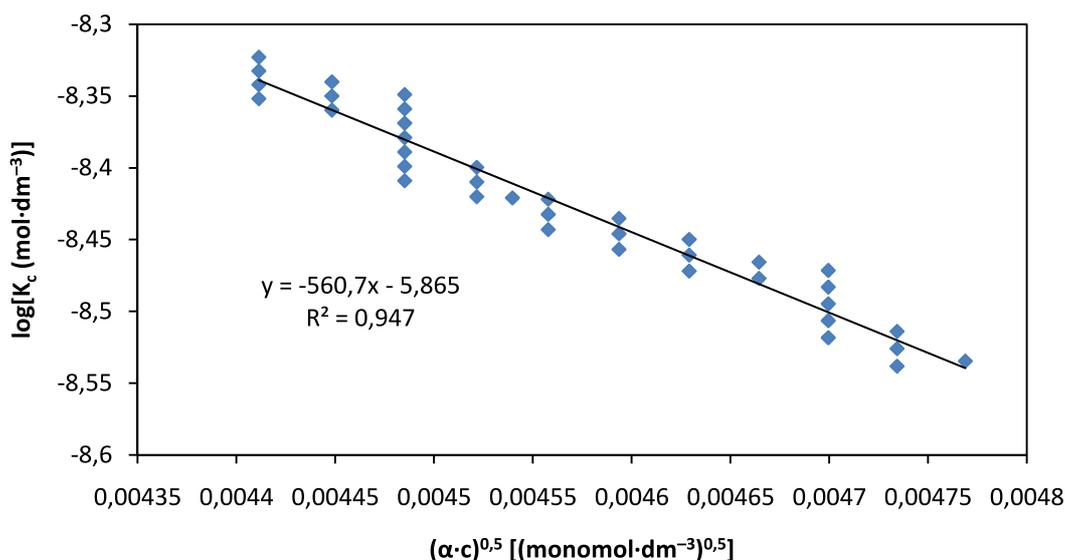


Obrázek 22: Extrapolace molární vodivosti VM HA na nulovou koncentraci

Obrázek 23 a Obrázek 24 zobrazuje závislosti koncentrační konstanty K_c na výrazu $\sqrt{\alpha \cdot c_0}$ pro obě molekulové hmotnosti v intervalu, ze kterého byly zjištěny extrapolované hodnoty. S využitím rovnice (23) byla určena hodnota pK_a pro nízkomolekulovou kyselinu jako $4,13 \pm 0,04$ a pro vysokomolekulovou jako $5,9 \pm 0,1$.

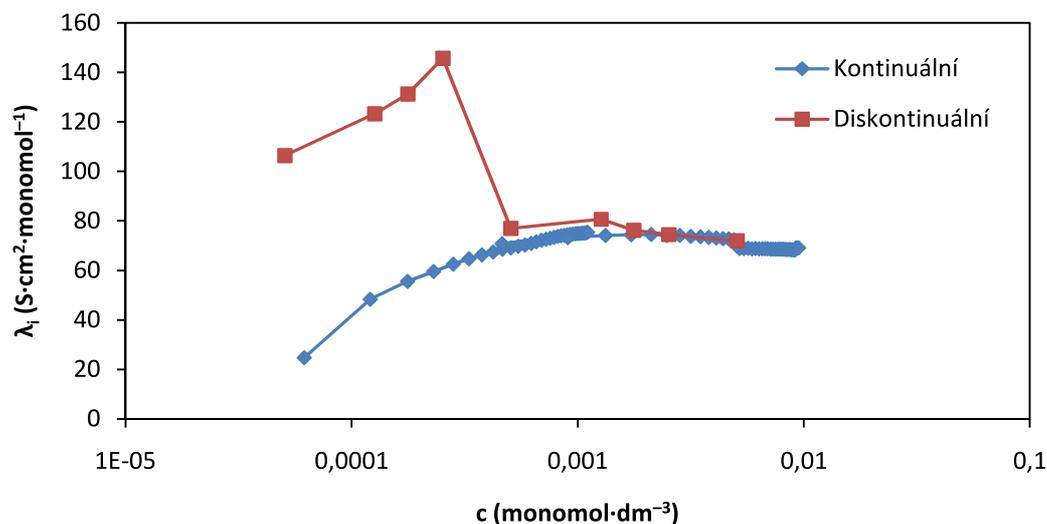


Obrázek 23: Stanovení disociační konstanty pro NM HA v 0,3mmol·dm⁻³ NaCl

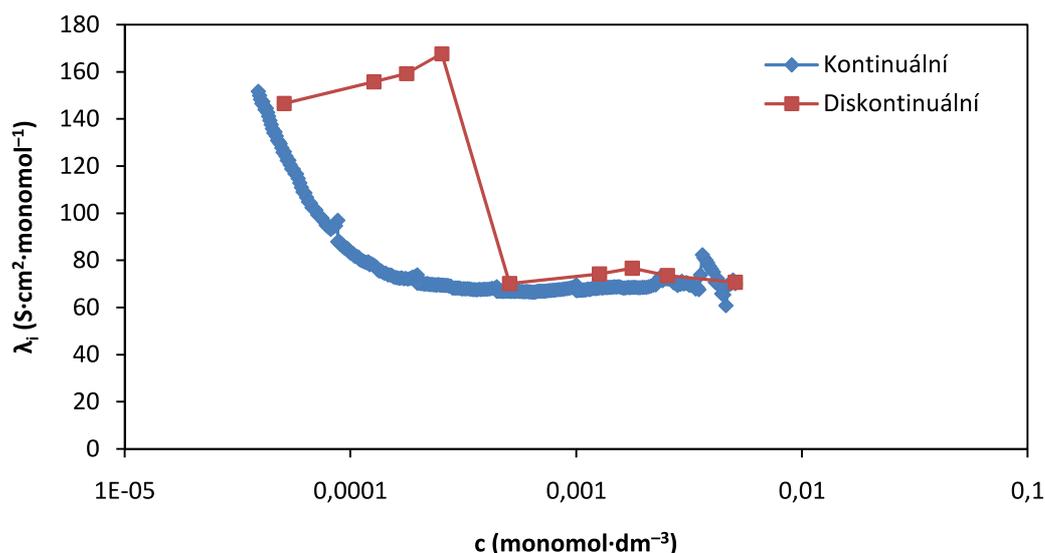


Obrázek 24: Stanovení disociační konstanty pro VM HA v $0,3\text{mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$ NaCl

Diskontinuální měření vodivosti bylo porováno s kontinuálním, tedy konduktometrickými titracemi (Obrázek 25 a Obrázek 26). Z grafů je zřejmé, že závislosti molární vodivosti na koncentraci zjištěné diskontinuálním měřením vodivosti a konduktometrickou titrací se od sebe liší. Největší rozdíly v jejich průběhu lze pozorovat při nižších koncentracích, kdy při diskontinuálním měření vodivosti byly zjištěny vyšší hodnoty molární vodivosti než při konduktometrických titracích. Tento rozdíl, který nastal při nižších koncentracích kyseliny hyaluronové v roztoku, může být způsoben absorpcí oxidu uhličitého ze vzduchu při diskontinuálním měření. Při diskontinuálním měření vodivosti totiž roztoky nebyly vůbec chráněny před vzduchem, zatímco při konduktometrických titracích byly roztoky po celou dobu měření obaleny parafilmem, takže přísun vzduchu k nim byl menší. Dalším důvodem odlišností závislostí získaných diskontinuálním a kontinuálním měřením vodivosti může být nedokonalá homogenizace roztoků při konduktometrických titracích. Při diskontinuálním měření se jednotlivé roztoky před měřením míchaly více než 24 hodin, zatímco při kontinuálním měření byl čas na homogenizaci daleko kratší.



Obrázek 25: Porovnání diskontinuálního měření vodivosti a konduktometrické titrace pro NM HA

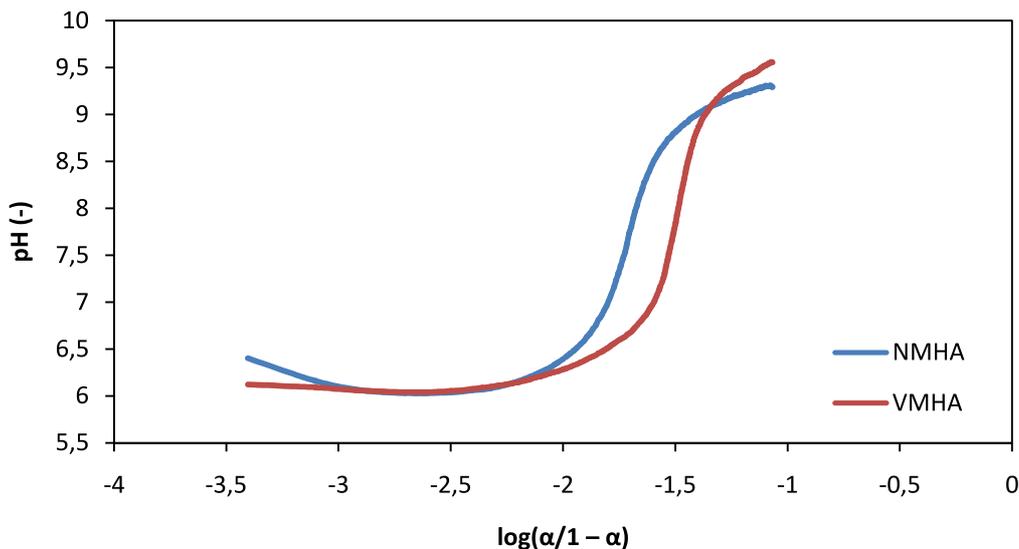


Obrázek 26: Porovnání diskontinuálního měření vodivosti a konduktometrické titrace pro VM HA

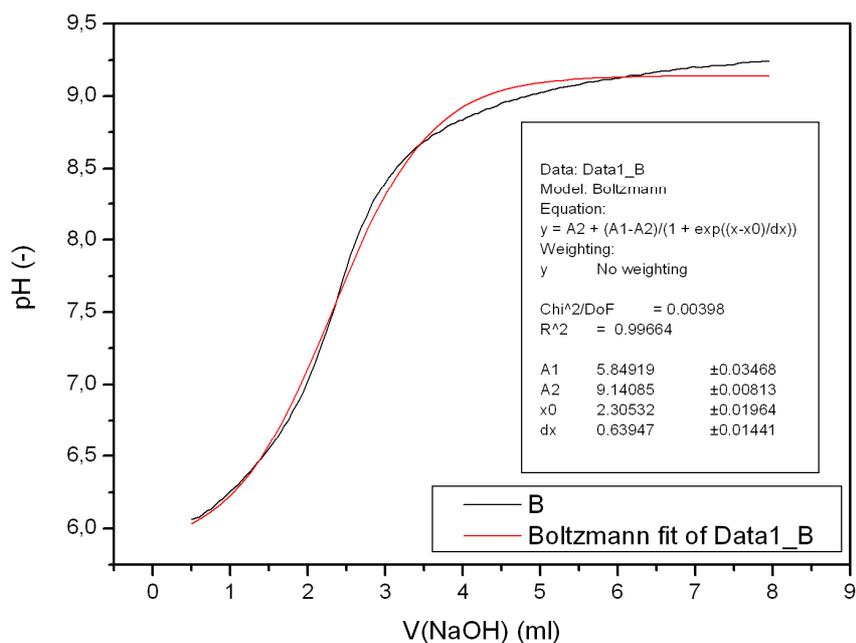
4.3 Acidobazická titrace

Ze závislosti pH na výrazu $\log[\alpha/(1-\alpha)]$ je patrné, že acidobazická titrace nízkomolekulové i vysokomolekulové kyseliny hyaluronové má podobný průběh. U vysokomolekulové kyseliny hyaluronové na rozdíl od nízkomolekulové je bodu ekvivalence dosaženo až při vyšším přídavku hydroxidu sodného. Protože bod ekvivalence u vysokomolekulové kyseliny hyaluronové nastává při vyšším přídavku hydroxidu sodného, měla by mít vysokomolekulová kyselina hyaluronová nižší hodnotu disociační konstanty a vyšší hodnotu pK_a .

Obrázek 28 zobrazuje závislost pH na přídavku hydroxidu sodného pro nízkomolekulovou kyselinu hyaluronovou, která byla proložena v programu Origin Boltzmannovou křivkou. Bod ekvivalence byl získán jako parametr x_0 získané funkce. Pro nízkomolekulovou kyselinu hyaluronovou byl zjištěn bod ekvivalence při přídavku $2,31 \pm 0,02$ ml hydroxidu sodného a pro vysokomolekulovou $3,82 \pm 0,01$ ml (Obrázek 37). Hodnota zdánlivé pK_a pro nízkomolekulovou kyselinu hyaluronovou zjištěná podle rovnice (30) byla při přídavku 2,30 ml hydroxidu sodného 9,86. Pro vysokomolekulovou kyselinu hyaluronovou při přídavku 3,80 ml hydroxidu sodného byla zjištěna hodnota pK_a 9,29. Tyto hodnoty jsou příliš vysoké, a protože pro přípravu roztoků byla použita sodná sůl kyseliny hyaluronové, pravděpodobně nepopisují disociaci karboxylové skupiny v molekule kyseliny hyaluronové.



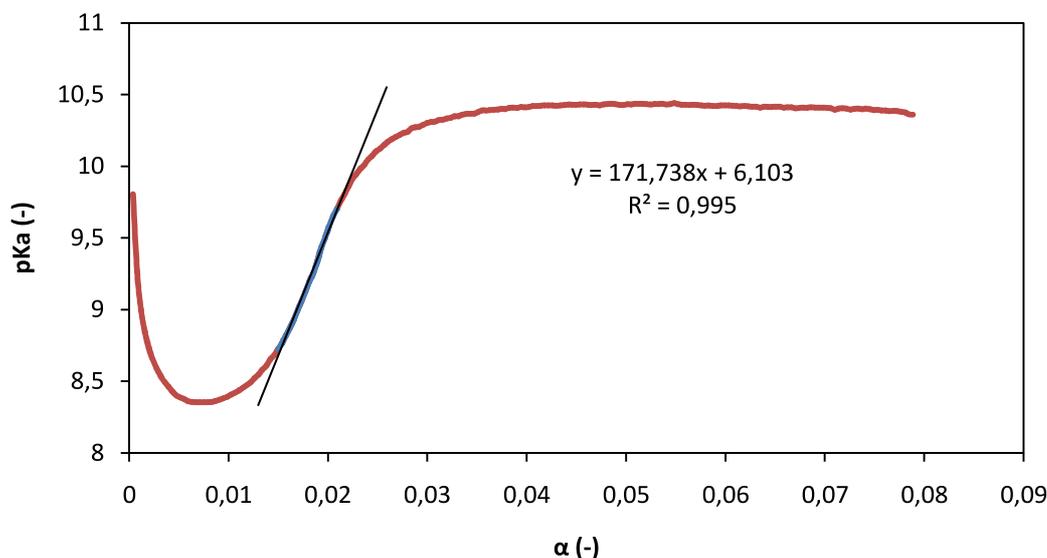
Obrázek 27: Závislost pH roztoku na $\log(\alpha/(1-\alpha))$



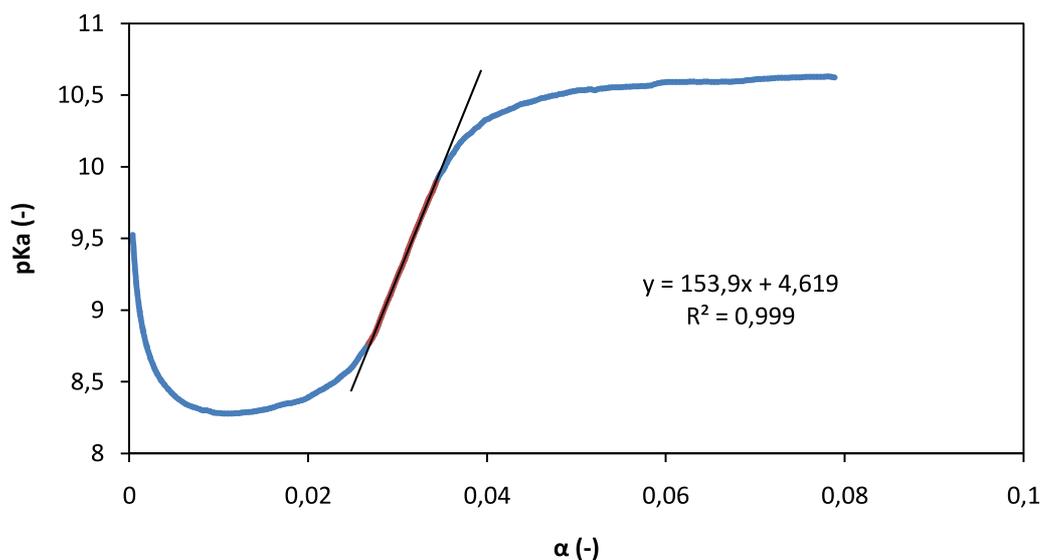
Obrázek 28: Určení bodu ekvivalence pro NM HA

Obrázek 29 a Obrázek 30 vyobrazuje závislosti pK_a na stupni disociace, ze kterých byly určeny hodnoty vnitřních pK_a , což jsou hodnoty pK_a při nulovém stupni disociace extrapolací. Pro nízkomolekulovou kyselinu hyaluronovou byla extrapolovaná hodnota pK_a rovna $6,10 \pm 0,06$ a pro vysokomolekulovou $4,62 \pm 0,02$. Nízkomolekulová kyselina hyaluronová má vyšší hodnotu pK_a , takže by měla mít nižší disociační konstantu. Kristoffer Tømmeraas a Per-Olof Wahlund, kteří stanovovali disociační konstantu nízkomolekulové kyseliny hyaluronové acidobazickými titracemi v $0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ roztoku soli, získali hodnotu vnitřní pK_a rovnu 2,99. Tato hodnota je odlišná od hodnoty získané v této práci. Důvodem této odlišnosti může být to, že byl prozkoumán menší rozsah hodnot pH, jiný způsob měření a jiné prostředí.

Kristoffer Tømmeraas a Per-Olof Wahlund nejdříve přidavkem hydroxidu zvýšili pH roztoku a poté tento roztok titrovali kyselinou chlorovodíkovou. Zatímco v této práci byl roztok kyseliny hyaluronové přímo titrován roztokem hydroxidu.



Obrázek 29: Závislost pK_a na stupni disociace pro NM HA



Obrázek 30: Závislost pK_a na stupni disociace pro VM HA

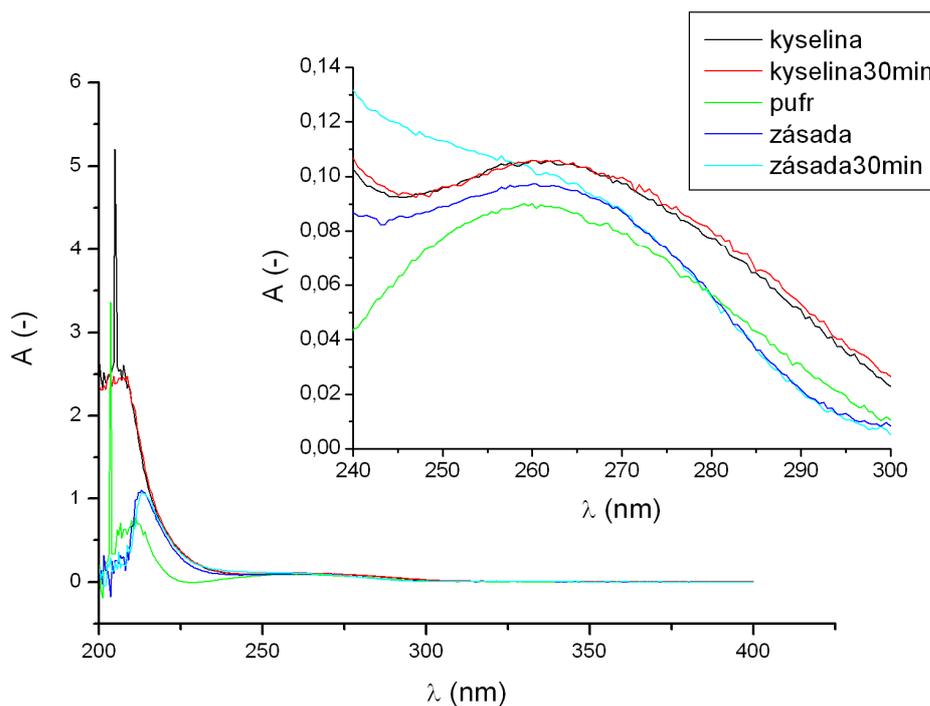
4.4 UV-VIS spektrofotometrie

Obrázek 31 a Obrázek 32 zobrazuje UV-VIS spektra pro nízkomolekulovou, resp. vysokomolekulovou kyselinu hyaluronovou. Průběh absorpčních spekter je ovlivněn prostředím, ve kterém se kyselina hyaluronová vyskytuje, protože pH roztoku má vliv na disociaci kyseliny hyaluronové. V okolí 260 nm byla pozorována maxima pro křivky ve všech prostředích pro obě molekulové hmotnosti. Dále byly při vlnových délkách nižších než 240 nm pozorovány maxima s daleko vyšší absorbancí. Křivky při těchto vlnových délkách měly dosti kolísavý průběh. Tato část spektra je pravděpodobně zatížena šumem přístroje.

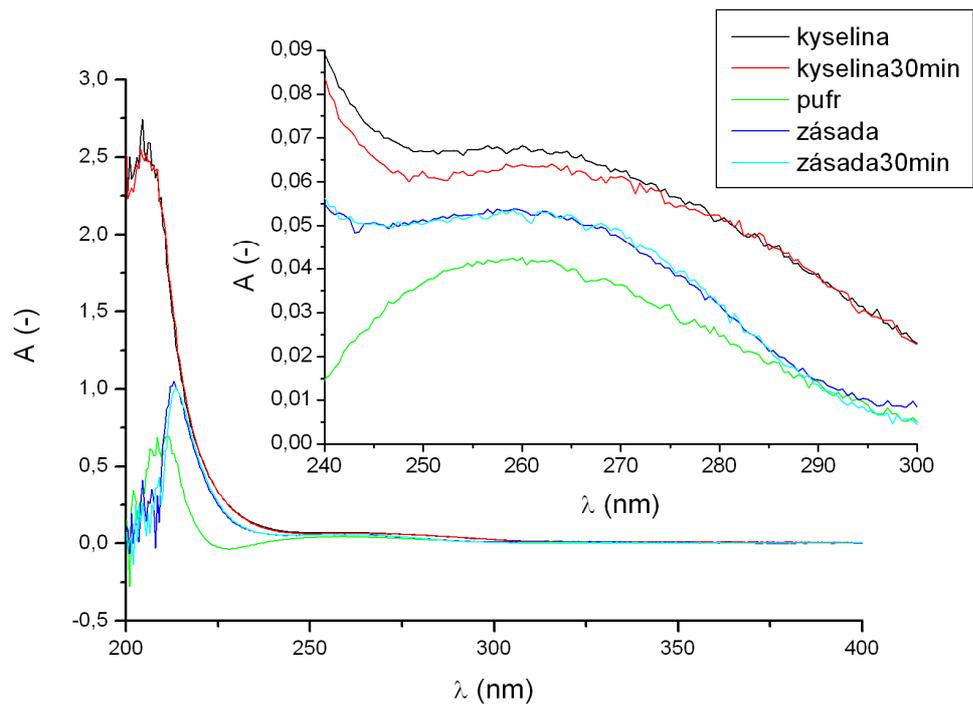
Pro většinu vlnových délek nebylo možné hodnotu pK_a podle rovnice (40) vypočítat, protože byla absorbance v pufru menší než absorbance v zásadě nebo větší než v kyselině,

takže argument logaritmu v této rovnici vycházel záporně. Pro výpočet pK_a byly použity hodnoty z rozmezí vlnových délek 280–306 nm, protože při vyšších vlnových délkách byly hodnoty absorbance velmi nízké a při nižších délkách hodnoty absorbance kolísaly.

Vypočítané hodnoty pK_a měly pro nízkomolekulovou kyselinu hyaluronovou měřenou ihned po smíchání hodnotu $4,01 \pm 0,35$ a po 30 min míchání $4,00 \pm 0,33$. Pro vysokomolekulovou kyselinu hyaluronovou, která byla měřena po smíchání, byla zjištěna hodnota $pK_a 2,87 \pm 0,04$. Tato hodnota byla zjištěna pouze ze dvou hodnot, protože pro zbylé hodnoty v intervalu 280–306 nm vycházel logaritmus v rovnici (40) záporně. Pro vysokomolekulovou kyselinu hyaluronovou míchanou 30 min před měřením byla zjištěna hodnota $pK_a 3,12 \pm 0,41$.



Obrázek 31: UV-VIS spektrum nízkomolekulární kyseliny hyaluronové v různém prostředí



Obrázek 32: UV-VIS spektrum vysokomolekulární kyseliny hyaluronové v různém prostředí

5 ZÁVĚR

Cílem této práce bylo prozkoumat elektrolytické vlastnosti roztoků kyseliny hyaluronové a pokusit se stanovit její disociační konstantu a disociační stupeň. Elektrolytické vlastnosti roztoků byly zkoumány pomocí měření vodivosti jednotlivě připravených roztoků, tzv. diskontinuální měření vodivosti, pomocí acidobazických a konduktometrických titrací, a pomocí UV-VIS spektrofotometrie. Největší pozornost v této práci byla věnována měření vodivosti jednotlivých roztoků. Ostatní metody posloužily jako doplnění, a proto nezkoumají tak velkou oblast jako měření vodivosti jednotlivých roztoků.

Diskontinuálním měřením byly získány hodnoty pK_a v roztocích o různých iontových silách. Tyto hodnoty zobrazuje Obrázek 19. Ve vodném prostředí bez přídavku soli měla nízkomolekulová kyselina hyaluronová hodnotu pK_a $4,99 \pm 0,01$ a vysokomolekulová $6,53 \pm 0,06$. V roztoku $0,3 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ byla hodnota pK_a pro nízkomolekulovou kyselinu hyaluronovou rovna $4,4 \pm 0,5$ a pro vysokomolekulovou $6,3 \pm 0,4$.

Pomocí konduktometrických titrací byly zjištěny hodnoty pK_a pro obě molekulové hmotnosti kyseliny hyaluronové. Pro nízkomolekulovou kyselinu hyaluronovou je hodnota pK_a $4,13 \pm 0,04$ a pro vysokomolekulovou $5,9 \pm 0,1$. Tyto hodnoty jsou pro kyselinu hyaluronovou, která byla v $0,3 \text{ mmol} / \text{dm}^3$ roztoku chloridu sodném, a mohou se lišit od hodnot zjištěných v roztoku bez přítomnosti soli. Tyto hodnoty jsou velmi podobné hodnotám pK_a , které byly získány z diskontinuálního měření vodivosti.

Při acidobazických titracích byly získány hodnoty pK_a dvěma způsoby. Prvním způsobem byla vypočtena zdánlivá disociační konstanta pomocí určení bodu inflexe titrační křivky, který odpovídá bodu ekvivalence. Tímto způsobem byla zdánlivá hodnota pK_a pro nízkomolekulovou kyselinu hyaluronovou rovna $9,86$ a pro vysokomolekulovou $9,29$. Tato zdánlivá hodnota pK_a pravděpodobně nepopisuje disociaci karboxylové skupiny kyseliny hyaluronové, a proto je oproti ostatním hodnotám o tolik vyšší. Druhým způsobem byla extrapolace závislosti hodnoty pK_a na stupni disociace na stupeň disociace roven nule, což vedlo k získání hodnoty vnitřní pK_a . Nízkomolekulové kyselině hyaluronové odpovídá hodnota pK_a $6,10 \pm 0,06$ a vysokomolekulové $4,62 \pm 0,02$.

Při použití UV-VIS spektrofotometrie byly získány hodnoty pK_a pouze v rozmezí vlnových délek 280–306 nm, protože ve zbytku spektra nebylo chování naměřených spekter ideální, tzn. byl zkreslen šumem, nebo byly hodnoty absorbancí velmi blízké nule. Pro nízkomolekulovou kyselinu hyaluronovou byla zjištěna hodnoty pK_a $4,01 \pm 0,35$ pro roztok měřený ihned po smíchání. Hodnota pK_a získaná z měření po 30 min míchání se od hodnoty získané z měření ihned po smíchání příliš nelišila. Pro vysokomolekulovou kyselinu hyaluronovou byla hodnota pK_a rovna $2,87 \pm 0,04$ a $3,12 \pm 0,41$ pro roztok měřený ihned po smíchání, resp. po 30 min míchání.

V porovnání s hodnotami pK_a , které získali Kristoffer Tømmeraas a Per-Olof Wahlund acidobazickými titracemi, se zjištěné hodnoty v této práci liší. U acidobazických titrací může být důvodem různé provedení experimentu. U ostatních způsobů měření může být příčinou nevhodné provedení. Do budoucna by bylo vhodné se zaměřit více na konduktometrické titrace v různých prostředích než na diskontinuální měření vodivosti, které může být zkresleno chybou způsobenou přípravou jednotlivých roztoků a měřením jejich vodivosti s přístupem vzduchu. Konduktometrické titrace by se měly provádět stejným způsobem, aby se omezila chyba, která mohla být způsobena jiným provedením titrace. Pomocí acidobazických titrací by bylo vhodné prostudovat vliv pH na kyselinu hyaluronovou v širším rozsahu, tzn. i do hodnot pH menších než 6. S využitím UV-VIS spektrofotometrie by bylo

účelné zjistit spektra kyseliny hyaluronové v pufrch o různém pH, aby bylo pro výpočet hodnoty pK_a možné použít větší část spektra. Dále by bylo vhodné při UV-VIS spektrofotometrii použít roztoky o stejné iontové síle, která také ovlivňuje disociaci kyseliny hyaluronové.

6 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] HASCALL, Vincent C. a Torvard C. LAURENT. Hyaluronan: Structure and Physical Properties. *Glycoforum* [online]. 1997 [cit. 2013-03-12]. Dostupné z: <http://glycoforum.gr.jp/science/hyaluronan/HA01/HA01E.htm>
- [2] 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. 2013-03-12]. DOI: 10.1007/s10529-006-9219-z. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s10529-006-9219-z>
- [3] LAURENT, Torvard C. a J. Robert E. FRASER. Hyaluronan. *The FASEB journal* [online]. 1992 [cit. 2013-03-12]. 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. *Glycoforum* [online]. 1998 [cit. 2013-03-12]. Dostupné z: <http://glycoforum.gr.jp/science/hyaluronan/HA02/HA02E.html>
- [5] 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. 2013-05-06]. DOI: 10.1016/j.jmb.2006.02.077. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022283606002920>
- [6] 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. 2013-03-12]. 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>
- [7] *Handbook of polyelectrolytes and their applications*. Stevenson Ranch: American Scientific Publishers, 2002, s. 126–130, 147–169. ISBN 1588830020.
- [8] POUCHLÝ, Julius. *Fyzikální chemie makromolekulárních a koloidních soustav* [online]. Vyd. 3. Praha: Vydavatelství VŠCHT, 2008, s. 127–139 [cit. 2013-04-25]. ISBN 978-80-7080-674-6.
- [9] KLOUDA, Pavel. *Moderní analytické metody*. 2., upr. a dopl. vyd. Ostrava: Pavel Klouda, 2003, s. 77–81, 96–104, 120–123. ISBN 80-86369-07-2.
- [10] SOMMER, Lumír. *Základy analytické chemie I*. 1. vyd. Brno: VUTIUM, 1998, s. 126–127. ISBN 80-214-1300-x.
- [11] SOMMER, Lumír et al. *Základy analytické chemie II*. 1. vyd. Brno: VUTIUM, 2000, s. 18–20, 32–36, 61–75. ISBN 80-214-1742-0
- [12] BAREK, Jiří. *Elektroanalytická chemie*. 1. vyd. Praha: Karolinum, 2005, s. 7–8, 54–64, 147–159. ISBN 80-246-1146-5.
- [13] SKOOG, Douglas A. *Fundamentals of analytical chemistry*. 8th ed. / Belmont, CA: Thomson-Brooks/Cole, c2004, s. 621–625. ISBN 05-344-1796-5
- [14] CHRISTIAN, Gary D. *Analytical chemistry*. 6th ed. Hoboken, NJ: Wiley, c2004, s. 384–393. ISBN 04-712-1472-8.
- [15] *Analytická chemie I*. [online]. Vyd. 1. Pardubice: Univerzita Pardubice, 2004, s. 56–58 [cit. 2013-04-29]. ISBN 80-7194-723-7.

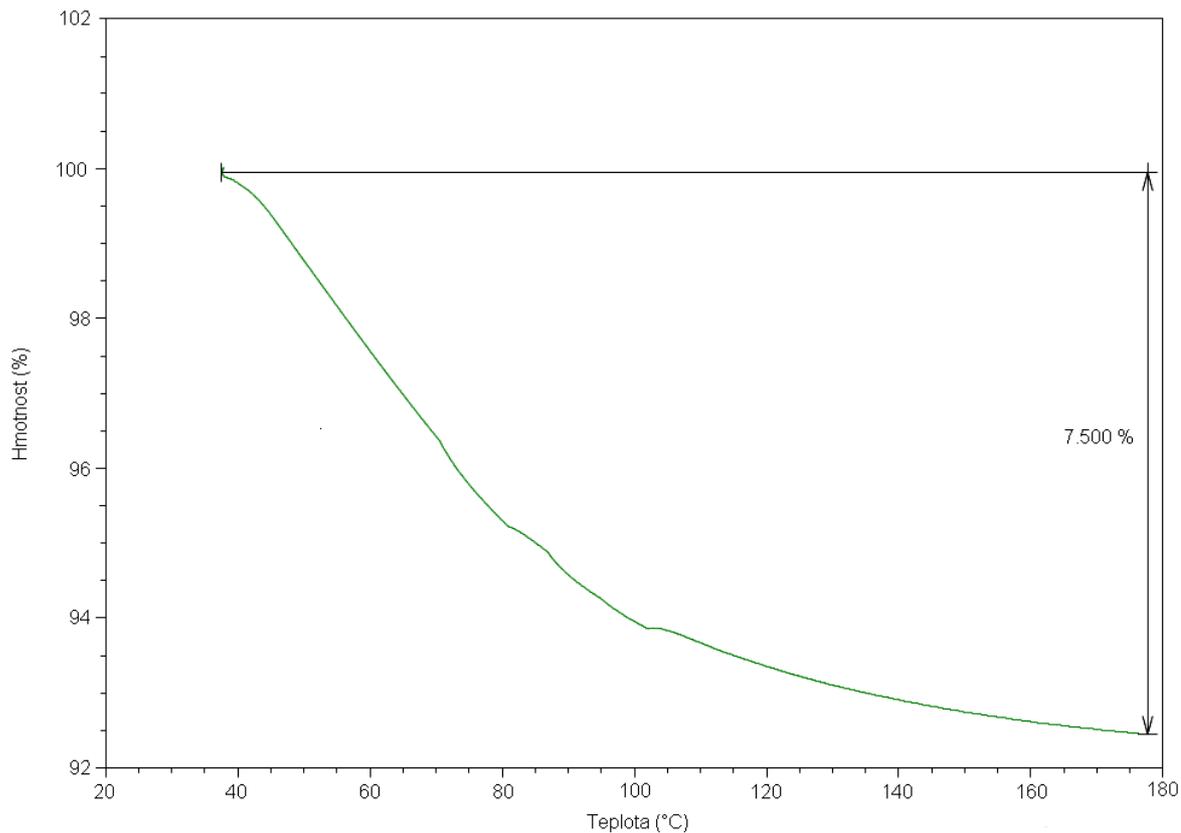
- [16] HARRIS, Daniel C. *Exploring chemical analysis*. 4th ed. New York: W.H. Freeman, c2009, s. 415–421. ISBN 1429201479.
- [17] WANDREY, Christine. Concentration Regimes in Polyelectrolyte Solutions †. *Langmuir* [online]. 1999, vol. 15, issue 12, s. 4069–4075 [cit. 2013-04-17]. DOI: 10.1021/la980895h. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/la980895h>
- [18] 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. 2013-04-17]. DOI: 10.1021/ma991763d. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ma991763d>
- [19] TØMMERAAS, Kristoffer a Per-Olof WAHLUND. Poly-acid properties of biosynthetic hyaluronan studied by titration. *Carbohydrate Polymers* [online]. 2009, vol. 77, issue 2, s. 194–200 [cit. 2013-04-17]. DOI: 10.1016/j.carbpol.2008.12.021. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S014486170800605X>
- [20] ALKRAD, Jamal Alyoussef, Yahya MRESTANI, Dieter STROEHL, Siegfried WARTEWIG a Reinhard NEUBERT. Characterization of enzymatically digested hyaluronic acid using NMR, Raman, IR, and UV-Vis spectroscopies. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* [online]. 2003, vol. 31, issue 3, s. 545–550 [cit. 2013-04-17]. DOI: 10.1016/S0731-7085(02)00682-9. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0731708502006829>
- [21] BIKOVA, T. UV-absorbance of oxidized xylan and monocarboxyl cellulose in alkaline solutions. *Carbohydrate Polymers* [online]. 2004, vol. 55, issue 3, s. 315–322 [cit. 2013-04-18]. DOI: 10.1016/j.carbpol.2003.10.005. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S014486170300300X>
- [22] JANČÁŘ, Luděk. Analytická chemie – odměrná analýza | Pedagogická fakulta. [online]. [cit. 2013-04-17]. Dostupné z: <http://is.muni.cz/do/1499/el/estud/pedf/js10/chemie/web/pages/gran.html>
- [23] PEKAŘ, Miroslav, Martina KLUČÁKOVÁ, Michal VESELÝ a Michal ČEPPAN. *Fyzikální chemie a fotochemie I: praktikum*. Vyd. 1. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2003, s. 44-48. ISBN 80-214-2470-2.

7 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

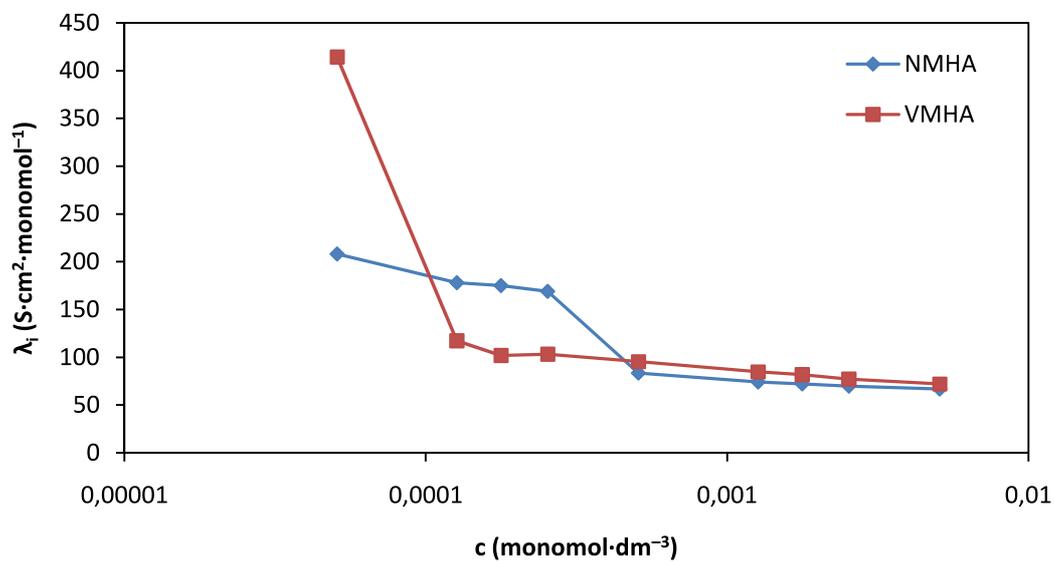
$^1\text{H NMR}$	nukleární magnetické rezonance využívající interakce ^1H
$^{13}\text{C NMR}$	nukleární magnetické rezonance využívající interakce ^{13}C
$[\text{x}]$	rovnovážná koncentrace látky x
A	absorbance
A_c	konstanta závislá na rozpouštědle
a_i	aktivita iontů
c_i	molární koncentrace
c_{nedisoc}	koncentrace nedisociovaných molekul
E	elektroodový potenciál
E^0	standardní elektroodový potenciál
e	elementární náboj
f_c	koeficient zahrnující elektrostatické interakce mezi polyiontem a protiionty, stupeň ionizace a vnitřní tření
f_i	aktivitní koeficient
f_{\pm}	střední aktivitní koeficient
G	vodivost
G_e	volná elektrostatická energie polykyselin
HA	kyselina hyaluronová
I	elektrický proud
I	iontová síla
k	Boltzmannova konstanta
K_a	disociační konstanta
K_c	koncentrační konstanta
l	tloušťka absorbující vrstvy
l	vzdálenosti elektrod
n	počet molů
n	počet negativně nabitých skupin
N_A	Avogadrova konstanta
NM	nízkomolekulová
P_n	stupeň polymerizace
pH_x	hodnota pH roztoku
$\text{p}K_0$	záporně vzatý logaritmus skutečné disociační konstanty
Q	náboj polyiontu
q	bodový elektrický náboj
r	vzdálenost od náboje
R	univerzální plynová konstanta
R	odpor
S	plocha elektrod
T	termodynamická teplota
T	transmitance
U	napětí
UV	ultrafialová oblast elektromagnetického záření
V	objem
VIS	viditelná oblast elektromagnetického záření
VM	visokomolekulová

w	hmotnostní koncentrace
Z	počet protiiontů
z_i	náboj jednotlivých iontů
α	stupeň disociace
ΔpK	zvýšení disociační konstanty
ε_0	permitivita vakua
ε_r	relativní permitivita prostředí
ε_λ	molární absorpční koeficient při určité vlnové délce
κ	parametr z Debye-Hückelovy teorie
κ	měrná vodivost
κ_0	měrná elektrická vodivost rozpouštědla
κ_i	měrná vodivost roztoku
λ	molární vodivosti
λ^0	mezní molární vodivost
λ_c^0	molární vodivost protiiontu v nekonečně zředěném roztoku
λ_i	iontová vodivost
λ_p	molární vodivost polyiontu
ρ	hustota roztoku
ρ	měrný odpor
φ	elektrický potenciál
φ	membránový potenciál
Φ	prošlý zářivý tok
Φ_0	dopadající zářivý tok
$\Phi(c_p)$	vnitřní interakce

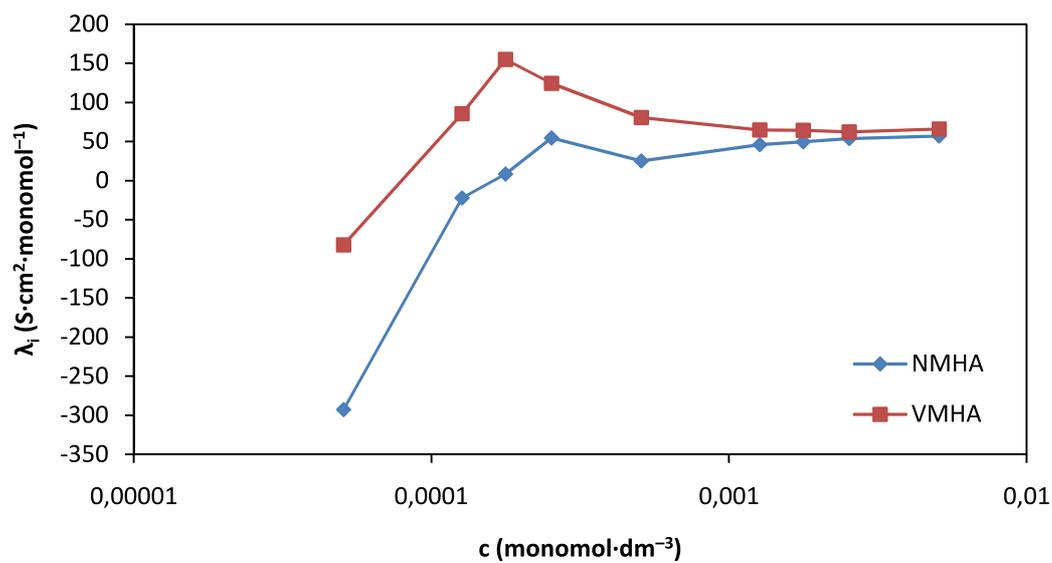
8 PŘÍLOHY



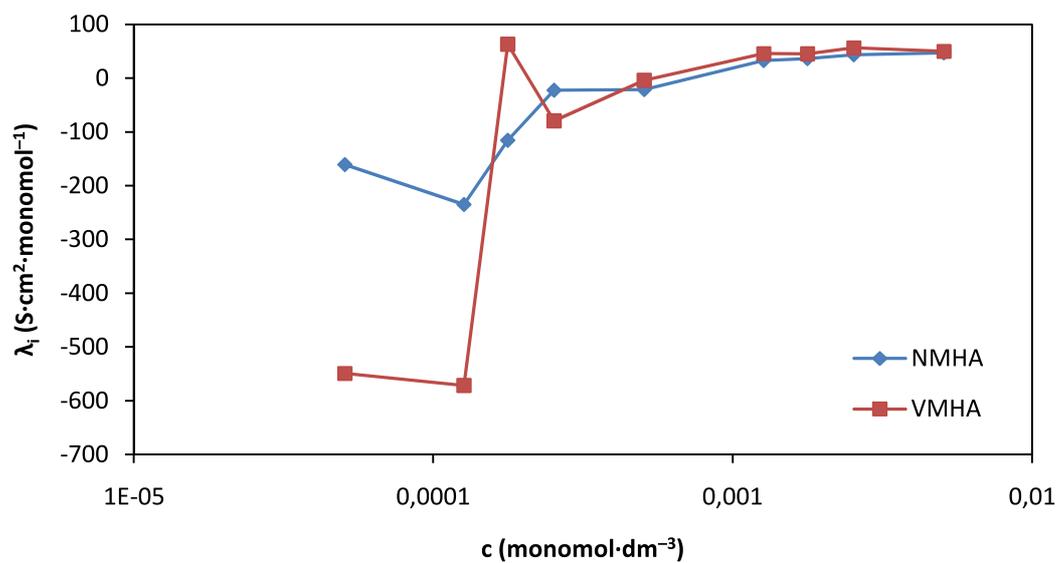
Obrázek 33: Výsledky termogravimetrie pro vysokomolekulovou kyselinu hyaluronovou



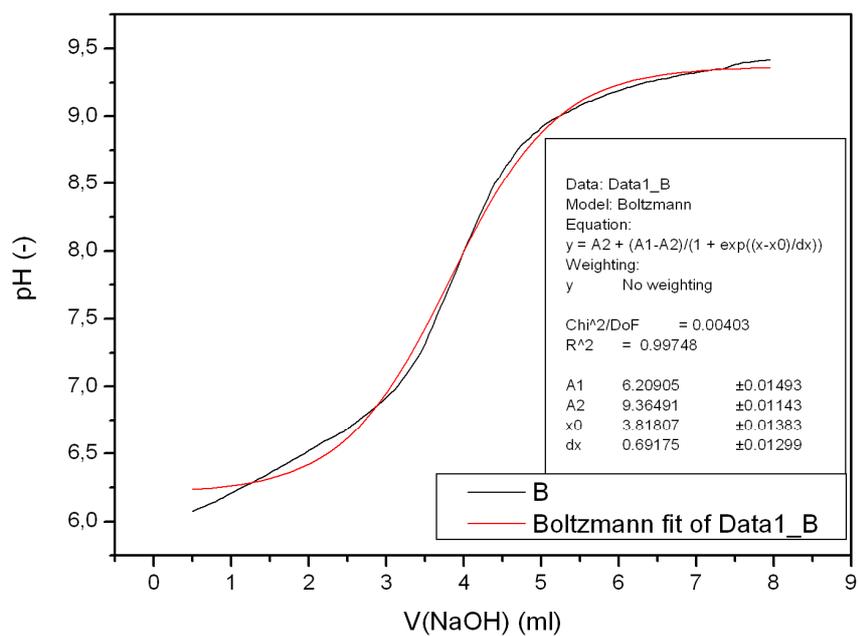
Obrázek 34: Závislosti molární vodivosti na koncentraci kyseliny hyaluronové pro obě molekulové hmotnosti ve vodě



Obrázek 35: Závislosti molární vodivosti na koncentraci kyseliny hyaluronové pro obě molekulové hmotnosti v 3mmol·dm⁻³ NaCl



Obrázek 36: Závislosti molární vodivosti na koncentraci kyseliny hyaluronové pro obě molekulové hmotnosti v 10 mmol·dm⁻³ NaCl



Obrázek 37: Určení bodu ekvivalence pro VM HA