

Vliv teploty, koncentrace a stupně chemického zesíťování roztoků hyaluronátu sodného na jejich tokové charakteristiky.

Bc. Karolína Žáková



***nascannované zadání s. 1**

nascannované zadání s. 2

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že

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

Ve Zlíně

.....

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ABSTRAKT

Cílem této diplomové práce bylo studium reologických vlastností vodných roztoků sodné soli kyseliny hyaluronové v závislosti na iontovém složení okolního rozpouštědla (čistá redestilovaná voda, 0,01 M KCl) a dále vliv stupně chemického zesíťování divinyl sulfonem na změnu reologického chování. V této souvislosti byly proměřeny jednak koncentrační závislosti kinematické viskozity připravených roztoků za různých teplot 25, 30 a 35°C na průtokovém viskozimetru (Ubbelohde) a také na rotačním viskozimetru (konfigurace válec-válec). Z naměřených dat byly vypočteny základní reologické charakteristiky jako limitní viskozitní číslo, dynamická a kinematická viskozita. Byla potvrzena transformace expandované klubko – zdvojená šroubovice pro studované roztoky při teplotě 30°C. Byl zjištěn mikro-heterogenní charakter síťovací reakce hyaluronátu sodného pomocí divinyl sulfonu.

Klíčová slova: Kyselina hyaluronová, reologie, viskozita, chemické síťování, divinyl sulfon, iontová síla

ABSTRACT

The aim of this MSc. thesis was to study the rheological properties of the aqueous solutions of the sodium salt of hyaluronic acid as a function of the ionic strength of the surrounding solvent (pure redistilled water, 0,01 M KCl) as well as the effect of the chemical crosslinking degree by divinyl sulphone on rheological behaviour. With respect to the latter mentioned there were measured concentration dependencies of the kinematic viscosity of the prepared solutions at different temperatures 25, 30 and 35°C as well as were performed rheological measurements on rotational viscometer (configuration cylinder-cylinder). From the measured data there were calculated basic rheological characteristics of the studied systems such as intrinsic viscosity, dynamic and kinematic viscosity. There was confirmed expanded coil – double helix transformation for studied solutions at 30°C temperature. There was found micro-heterogeneous character of the crosslinking reaction of sodium hyaluronate with divinyl sulphone.

Keywords: Hyaluronic acid, rheology, viscosity, chemical crosslinking, divinyl sulphone, ionic strength

Chtěla bych zde uvést poděkování vedoucímu mé diplomové práce prof. Ing. Lubomíru Lapčikovi, Ph.D. za jeho pomoc, cenné rady a trpělivost při zpracování této diplomové práce.

Velké poděkování patří i mé rodině, přátelům a životnímu partnerovi, kteří mi byli oporou po všech stránkách, za odborné konzultace, příkladný přístup a poskytnutí odborných připomínek při řešení této práce.

OBSAH

ÚVOD	10
I TEORETICKÁ ČÁST	11
1 POLYSACHARIDY	12
2 KYSELINA HYALURONOVÁ (HA)	14
2.1 HISTORIE.....	14
2.2 VELIKOST, TVAR A KONFORMACE.....	14
2.3 RELATIVNÍ MOLÁRNÍ HMOTNOST.....	16
2.4 PŘÍPRAVA.....	17
2.5 VLASTNOSTI HA.....	19
2.5.1 Polyeletrolytické vlastnosti.....	19
2.5.2 Hydrodynamické vlastnosti.....	19
2.6 DEGRADACE KYSELINY HYALURONOVÉ.....	20
2.6.1 Termická, chemická a enzymatické degradace.....	20
2.6.2 Fotochemická degradace.....	21
2.7 ZPŮSOBY SÍŤOVÁNÍ KYSELINY HYALURONOVÉ.....	21
2.7.1 Reakce na karboxylové skupině.....	21
2.7.2 Reakce na hydroxylové skupině.....	22
2.7.3 Reakce na amino skupině.....	24
2.8 APLIKACE A VYUŽITÍ.....	24
3 REOLOGIE	26
3.1 REOLOGICKÉ CHOVÁNÍ.....	26
3.2 DEBOŘINO ČÍSLO.....	27
3.3 REOLOGICKÉ MODEL Y.....	27
3.3.1 Newtonské kapaliny.....	27
Viskozita.....	28
3.3.2 Neneutonské látky.....	29
4 VISKOELASTICITA	30
4.1 VISKOELASTICKÉ MODEL Y.....	30
4.1.1 Kelvinův model.....	30
4.1.2 Maxwellův model.....	31
4.1.3 Tucketův model.....	32
5 ZÁVISLOST TOKU POLYMERŮ NA PROCESNÍCH A MOLEKULÁRNÍCH PARAMETRECH	33
5.1 VLIV TEPLoty.....	33
5.2 VLIV ČASU.....	34
5.3 VLIV SÍŤOVÁNÍ.....	34
6 MĚŘENÍ VISKOZITY	35
6.1 ROTAČNÍ VISKOZIMETRY.....	35
6.1.1 Typ válec-válec.....	36
6.1.2 Typ kužel-deska.....	36
6.1.3 Typ deska-deska.....	37

6.2	KAPILÁRNÍ VISKOZIMETR	38
6.3	HÖPPLERŮV VISKOZIMETR.....	39
II PRAKTICKÁ ČÁST		40
7	PŘÍPRAVA A POUŽITÍ VZORKŮ	41
7.1	CHARAKTERISTIKA POUŽITÝCH MATERIÁLŮ.....	41
7.1.1	Hyaluronan sodný	41
7.1.2	Divinylsulfon.....	42
7.1.3	Vzorek A – HA 0,1 hm% v 0,01M roztoku KCl.....	42
7.1.4	Vzorek B – HA 0,1hm% v destilované vodě	43
7.1.5	Vzorek C – HA 1hm% v 0,1M NaOH	43
8	POUŽITÉ PŘÍSTROJE A VYBAVENÍ	44
8.1	UBBELOHDE VISKOZIMETR	44
8.1.1	Technické parametry	45
8.1.2	Zásady pro použití.....	46
8.1.3	Pracovní postup měření.....	46
8.2	VISCO TESTER 6L.....	47
8.2.1	Pracovní postup měření.....	48
9	NAMĚŘENÉ HODNOTY VISKOZITY	49
9.1	NAMĚŘENÉ HODNOTY PRO VZOREK A	49
9.2	NAMĚŘENÉ HODNOTY PRO VZOREK B	51
9.3	NAMĚŘENÉ HODNOTY PRO VZOREK C	53
10	VÝPOČTENÉ HODNOTY A VYHODNOCENÍ MĚŘENÍ.....	57
ZÁVĚR.....		65
SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....		67
SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK		69
SEZNAM OBRÁZKŮ		71
SEZNAM TABULEK.....		73
SEZNAM PŘÍLOH.....		75

ÚVOD

Polysacharidy řadíme mezi biologické polymery a zkoumání jejich vlastností je z mnoha hledisek velmi zajímavé, protože sehrávají důležitou roli při stavbě živé hmoty. Kromě velkého významu v přírodě mají také široké využití v potravinářství, farmacii a v dalších odvětvích. Polysacharidy najdeme jako hlavní složku v papíru, textilních tkaninách, stavebních hmot a v neposlední řadě v potravinách jako zahušťovadlo anebo jsou součástí léků. V oblíbených cukrovinkách jako jsou zmrzliny, a různé dezerty najdeme deriváty škrobu.

Kyselina hyaluronová a její soli jsou nepochybně nepostradatelnou složkou pro všechny živočichy, kde je součástí všech spojovacích tkání i pokožky, složka synoviálních tekutin a najdeme jí i jako součást extracelulárního matrixu. Její využití dnes bez pochyby patří do farmaceutického a kosmetického průmyslu, kde slouží pro hojení ran jako pojivý materiál a je velmi nápomocná v boji proti vráskám.

Obsahuje dvě opakující se disacharidové jednotky. Jedna z nich je kyselina D-glukuronová a druhá N-acetylglukosamin spojené glykosidickou vazbou. Její biologické účinky se liší na molekulové hmotnosti a prostorovém uspořádání. Řetězec kyseliny hyaluronové má silné hydrofilní vlastnosti, díky kterým může ve vodných roztocích tvořit spirálovou konfiguraci.

Cílem diplomové práce je zjistit chování hyaluronových klubek v měnící se koncentraci roztoků a teplotě. Dále budeme zjišťovat chování hyaluronátu v závislosti s přidavkem síťovadla do roztoku.

I. TEORETICKÁ ČÁST

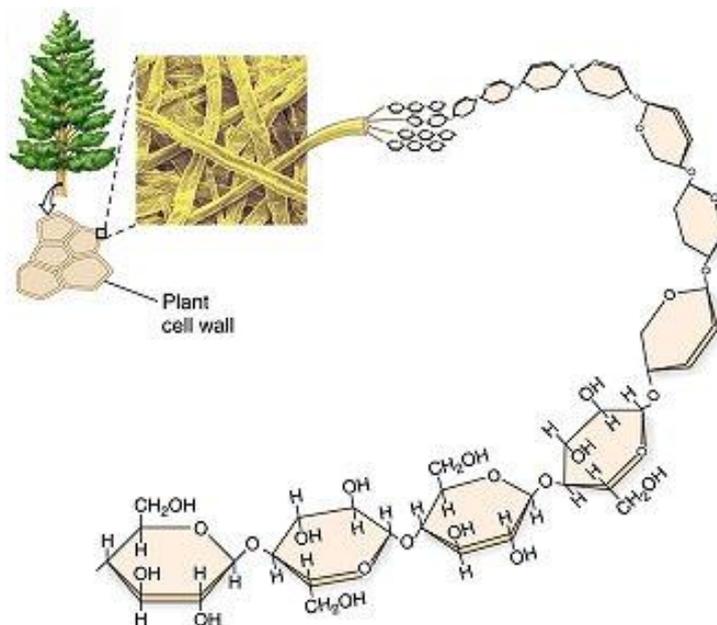
1 POLYSACHARIDY

Polysacharidy jsou složeny cukry, které vznikají z monosacharidů v rostlinách nebo v živočišných organismech postupným růstem přímého a rozvětveného řetězce. Nejdříve se tvoří molekuly disacharidů a dále polysacharidy. Jednotlivé molekuly monosacharidů jsou spojeny glykosidickou vazbou [1].

Přírodní polysacharidy mívají často pravidelnou strukturu, což znamená, že jsou složeny ze strukturálních jednotek, které obsahují dva a více monosacharidů, které se v řetězci pravidelně opakují v identickém prostorovém uspořádání. Určením této strukturální jednotky je definována konfigurace celé makromolekuly polysacharidu a do určité míry i její konformace.

Z velkého množství hexos a pentos a jejich derivátů se v přírodních polysacharidech vyskytuje jen omezené množství:

- **Hexos**- D-glukosa, D-mannosa, D-galaktosa, L-galaktosa, D-idosa a L-altosa.
- **Pentos**- D-xyloza, L-arabinosa, D-arabinosa.
- **Deriváty urované kyseliny (hexos)**- D-glukosamin, D-galaktosamin.



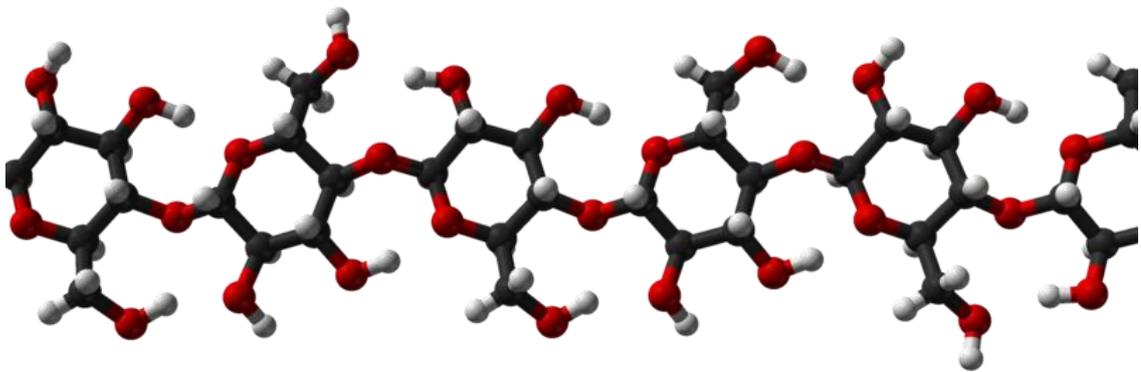
Obr. 1 – Přírodní polysacharid [2].

Společnou vlastností všech polysacharidů je jejich velká polarita, schopnost vytvářet intra- a inter- molekulární vodíkové vazby a komplexy s kationty. Značně se liší

rozpustností ve vodě a často tvoří viskózní roztoky a gely. Právě tyto vlastnosti jsou důležité pro jejich biologické funkce a pro technické využití. V kyselém prostředí (zvláště za vysoké teploty) se hydrolyzují postupně až na monosacharidy, v zásaditém prostředí jsou relativně stálé.

Polysacharidy patří v přírodě k nejrozšířenějším sloučeninám a mají řadu významných funkcí:

- Stavební – celulóza, chitin.
- Zásobní – glykogen, škrob.



Obr. 2 – 3D schéma celulózy a beta-glukanu [3].

Z přírodních zdrojů se izolují extrakcí vodou, vodným dimethylsulfoxidem nebo jinými polárními rozpouštědly a z roztoků se srážejí ethanolem, acetonem, roztoky solí apod. Takto získané surové polysacharidy se dále čistí chromatograficky. Některé polysacharidy byly připraveny polymerací, polykondenzací nebo biotechnologicky [4,5].

2 KYSELINA HYALURONOVÁ (HA)

Přírodně vyskytující se lineární polysacharid, o velké molekulové hmotnosti. Patří do skupiny glykosaminoglykanů. Obsahuje dvě opakující se disacharidové jednotky. Jedna z nich je kyselina D-glukuronová a druhá N-acetylglukosamin spojené glykosidickou vazbou. Její biologické účinky se liší na molekulové hmotnosti a prostorovém uspořádání. V organismu se nachází jako sodná nebo jiná sůl, je tedy známá jako hyaluronan nebo hyaluronát [6].

Tato kyselina je přirozenou součástí lidského těla. Nachází se v řadě tkání, převážně v pojivých a je hlavní součástí synoviální tekutiny. Je součástí mezibuněčné hmotě, zajišťuje hydrataci pokožky, nalezneme ji v našem oku. Je součástí vaziva, díky ní se mohou naše klouby hladce pohybovat. Spolu s kolagenem a elastinem poskytují pokožce konzistenci a pružnost. HA je syntetizována v plazmatické membráně fibroblastů a má mimořádnou schopnost zadržovat vodu. Jedná se o přirozený polyelektrolyt s karboxylovými a acetamidovými funkčními skupinami. Kyselé skupiny jsou umístěny na obou stranách řetězce, které umožňují maximální držení vody. Karboxylové skupiny získají iontovou formu při vyšším pH. Struktura HA může obsahovat atypické prvky, které by mohly být zodpovědné za její specifické biologické vlastnosti [6, 7].

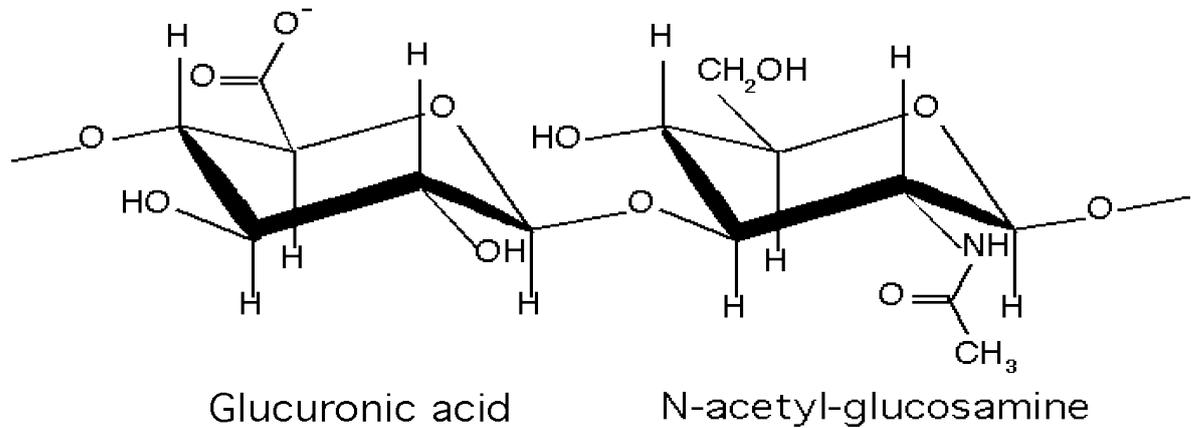
2.1 Historie

V roce 1934 byla izolována jako neznámá látka z očních čoček dobytka Meyerem a Palmerem, kteří ji dali název kyselina hyaluronová. Meyer taky jako první rozebral chemickou strukturu této látky v roce 1950. Dále byl získáván nešetnou cestou ze zvířecích tkání (kohoutí hřebínky, pupeční šňůry, oči tuňáků apod.). To s sebou přinášelo mnoho etických i zdravotních problémů a rizik. Proto společnosti zaměřené na produkci hyaluronanu pro další kosmetické a farmaceutické využití volí nákladnější, složitější, avšak čistší a rizik prostou cestu biotechnologické výroby. Při ní se HA získává z buněčných stěn bakterií druhu *Streptococcus zooepidemicus* [8].

2.2 Velikost, tvar a konformace

Makromolekuly HA jsou nerozvětvené lineární řetězce. Tuhost řetězce se připisuje omezené rotaci kolem interglykozidické vazby.

Fessler a Fessler určili pomocí elektronové mikroskopie délku řetězce 2,4 μm při $M=2 \times 10^6$. RTG-analýzou vláken HA byla zjištěna periodičtita 119,8 nm, což koresponduje s disacharidickou strukturou monomerní jednotky.



Obr. 3 – Schéma monomerní jednotky HA [9].

Měření RTG-rozptylu filmů HA naznačilo pravděpodobnou existenci konfigurace ve formě spirálové struktury s dvoj-,troj- a čtyř-řetězovou svinutou symetrií.

Sodná sůl HA v tuhém stavu tvoří hexanogální mřížku s rozměry $a=1,17$ nm a se vzdáleností opakující se jednotky 2,85 nm ve formě trojřetězové svinuté spirálové struktury. Bylo zjištěno i uspořádání ve formě monoklinické mřížky ve formě dvojřetězové svinuté spirálové struktury.

Molekula kyseliny hyaluronové obsahuje disociovatelné skupiny COOH. Proto se ve vodných roztocích chová jako záporně nabitý polyelektrolyt a její konformace, tvar, rozměry i stupeň hydratace závisí na stupni disociace, který je určen pH a iontovou silou a přítomností kladně nabitých iontů, jejich povahou a mocenstvím. K významným změnám konformace může dojít i ve směsných rozpouštědlech.

Znalosti a představy o tvaru molekuly HA v roztocích jsou závislé na vývoji experimentálních i teoretických metod fyzikální chemie makromolekulárních sloučenin. Výsledky metod musíme i porovnávat v závislosti oboru koncentrací, ve kterých pracujeme.

V nejstarších publikacích interpretovali Ogston a Stainer hydrodynamické vlastnosti HA modelem sol vatované koule o tisícinásobný přebytek vody proti organickému materiálu. Při studiu úhlové závislosti rozptylu světla, bylo dospěno k závěru, že molekuly HA

se chovají jako více méně tuhé statické klubko. Na tuto strukturu poukazuje taktéž viskózní limitní číslo v závislosti na molární hmotnost. Tento názor také podporuje skutečnost spojená se změnou velikosti molekuly HA, které jsou vyvolané změnou rozpouštědla, pH a iontové síly roztoku. Například rozpouštěním cetylpyridiniové soli HA v metanolu dochází ke ztuhnutí expandovaného statického klubka.

Spirálová struktura byla vyvozena ze studia nízko-úhlového rozptylu RTG-zářením.

NMR měření však ukázala, že HA je v roztocích ve formě jednoho řetězce stabilizovaného pevným systémem vodíkových vazeb. Podobný výsledek zaznamenali i Scott se spolupracovníky při studiu tetra-,hexa- a okta-sacharidů připravených degradací hyaluronátu sodného.

Při měření teplotních závislostí viskozity roztoků HA bylo prokázáno, že zvyšování teploty vede k postupnému trhání systému vodíkových vazeb, čímž se zvyšuje flexibilita celého řetězce. K trhání vodíkových vazeb dochází také vlivem vysokého pH a to v důsledku ionizace hydroxylových skupin, které se projevuje poklesem viskozity roztoků.

HA je záporně nabitý polyelektrolyt a ve vodných roztocích dochází k vázání kladně nabitých iontů o různém mocenství v blízkosti ionizovaných karboxylových skupin. To se projevuje změnou konformace. Byla využita metoda cirkulárního dichroizmu, vliv směsných rozpouštědel na změnu konformace. Bylo zjištěno ve směsovéch rozpouštědlech, že dochází k vytvoření uspořádané struktury HA, což se projevuje narůstáním intenzity CD pásu a intenzitu pásu snižuje zahřívání, které signalizuje zánik struktury.

V roztocích HA a jejich solí můžeme tedy očekávat polymerní řetězce ve formě náhodně uspořádaného klubka. Musíme však počítat s určitými odchylkami. 1. Její makromolekulový řetězec vykazuje určitý stupeň tuhosti způsobený systémem pevných vodíkových vazeb, 2. Vzájemný kontakt mezi řetězci indukuje vznik další terciální a vyšší stupňové struktury, která je způsobená superpozicí elektrostatických repulzí ovlivňovaných iontovou silou, nebo pH prostředí [10].

2.3 Relativní molární hmotnost

Již v 50. letech byly první studie zaměřeny na relativní molární hmotnost HA, hlavně co se týká přípravy a jeho vlivu na polymerizační stupeň. Relativní molární hmotnost se izolované HA se pohybovala v rozmezí od 10^4 do 10^7 . Pro stanovení byly

použity metody jako je sedimentace, rozptyl světla, osmometrie a kombinace sedimentace a difúze.

Při analytické centrifugaci a metodou pomocí rozptylu světla je pro stanovení molární hmotnosti potřeba znát hodnoty parciálního měrného objemu, resp. indexu lomu. Nejstarší a nejčastěji používanou hodnotou je $\bar{U}=0,66\text{cm}^3\cdot\text{g}^{-1}$), kterou stanovil Varga. Novější výsledky podrobných měření jsou podstatně nižší. Inkrement indexu lomu HA byl stanoven více autory. Publikované hodnoty najdeme v rozmezí od 0,14 do 0,18. Velké rozdíly jsou dány rozdílným znečištěním vzorků a nepřesností metod jejího stanovení. Výsledek se liší dle stanovené hodnoty dn/dc , které mají široký interval.

Nejběžnější metodou pro stanovení relativní molární hmotnosti jsou viskozimetrická měření. Tato metoda není absolutní, vyžaduje kalibraci pomocí metod, které poskytují hmotnostně střední molární hmotnosti. Parametry Mark-Houwinkovy rovnice

$$[\eta] = K \cdot M^a \quad (1)$$

závisí na iontové síle roztoku. Hodnoty logaritmické závislosti $[\eta]$ vs M u polysacharidů nebývají lineární v širším oboru molárních hmotností, takže parametry Mark-Houwinkovy rovnice závisí do určité míry na oboru molárních hmotností. Na toto je třeba dbát pro výpočet molárních hmotností z limitního viskozitního čísla.

Kvalita separace HA je závislá na pH, iontové síle, typu soli a rychlosti toku mobilní fáze [10].

2.4 Příprava

Největším cílem je získat vysoce čisté deriváty HA. Existuje několik preparátů na bázi HA o různé relativní hmotnosti. Jen některé z nich jsou ovšem vhodné pro aplikace v medicíně (z důvodu vysokého obsahu bílkovin, které mohou způsobit zápalová onemocnění). HA je součástí spojovací tkáně, v synoviálních tekutinách a ve sklivci, odkud je možno ji izolovat.

První izolace a čištění HA byla metoda vyvinutá Balazsem. Preparát získáme s 0,5% hm. obsahem bílkovin a výtěžnost produktu je 0,9g/kg výchozí suroviny.

K izolaci jsou použity suroviny, jako je například pupeční šňůra nebo kohoutí hřebeny. Tyto suroviny jsou zmrazeny, aby byly rozrušeny buněčné stěny a rozřezány na malé

kousky. Dochází k extrakci ethanolem s přidavkem cetylpyridinia chloridu, chloroformu a vody. Po-té dochází k čištění a úpravě pH a iontové síly.

Podle československého patentu, autorů Galatík, Kuběna a Blažej, je možno izolovat vysoce čistou HA s obsahem bílkovin pod 0,1% hm. při výtěžnosti 1,6 g/kg suroviny. Podstatným znakem tohoto způsobu je modifikace některých polárních a tiolových skupin, které tvoří nekovalentní vazby s HA, v molekule kontaminujících bílkovin pomocí alkylačních činidel. Z téhož produktu lze také připravit preparáty o vysoké čistotě ionto-výměnnou chromatografií.

Metodou podle Della Valleho a Aurelia je možno připravit roztoky HA z kohoutích hebenů vhodné pro oftomologické aplikace o různé relativní hmotnosti.

Pro aplikace v kosmetickém průmyslu, získáváme produkt z bakterií *Streptococcus equi* a *Streptococcus zoopidemicus*. Kultivaci se provádí v roztocích glukózy s obsahem kvasinek a soli při teplotě 33°C a pH 8,5. Prvním způsobem vyrobená HA má relativně nízkou molekulovou hmotnost, přičemž při druhém způsobu 1,8 až 2×10^6 , při výtěžnosti 3-4 g/dm³ kultivované směsi.

Velká pozornost byla věnována výzkumům vlastností síťovaných derivátů HA tzv. hylanů. Vyznačují se vysokou elasticitou jejich roztoků a gelů. Příprava lze provést dvěma způsoby, z čehož první je použitím formaldehydu při neutrálním pH, kde je možno vytvořit stálou vazbu mezi C-OH skupinami polysacharidu a amini, nebo imino skupinami proteinu. Tento protein pak tvoří spojovací vazbu mezi dvěma molekulami polysacharidu, tvořící tak elasticko-viskózní roztok. Za vhodných podmínek reakce nevede tento síťovací proces k vytvoření úplně síťovaného systému, ale jen k vazbě dvou až osmi molekul kyseliny navzájem. Relativní molekulová hmotnost takto připravených hylanů je 8 až 24 milionů, obsah proteinů se udává 0,4 až 0,8% vzhledem k HA.

Při druhém způsobu reaguje vinyl sulfon s hydroxylovými skupinami HA vytvářející tak značně prosíťovaný systém prostřednictvím sulfonyl-bis-etylových příčných vazeb. Tímto způsobem je možno připravit gely s proměnlivým obsahem vody [10].

2.5 Vlastnosti HA

2.5.1 Polyelektrolytické vlastnosti

HA obsahuje ve své monomerní jednotce jednu karboxylovou skupinu, která je při fyziologickém pH silně disociována a způsobuje polyanionický charakter tohoto polysacharidu.

Hodnota disociační konstanty závisí na disociačním stupni ostatních funkčních skupin, které jsou přítomny v molekule a na iontové síle rozpouštědla.

Hodnota pK HA ve vodných roztocích se pohybuje od 3,45 v čisté vodě do hodnoty 2,95 v 0,2M NaCl v závislosti na koncentraci elektrolytu. Hodnota je blízká k pK kyseliny glukorové, která má hodnotu 3,33.

Za povšimnutí také stojí vliv vázání kationtů na řetězce makromolekuly, který ovlivňuje změnu celkového počtu zbylých elektrických nábojů a tím i změnu velikosti odpudivých sil mezui jednotlivými karboxylovými skupinami. To se výrazně projevuje i ve změně velikosti a tvaru makromolekuly. Její klubko je při nízké iontové síle a vysokém pH silně expandované a v důsledku toho se zvýší i limitní viskozitní číslo. S tím souvisí vliv iontové síly na sedimentační a difúzní koeficient, typická polyelektrolytická závislost viskozity na koncentraci. Toto chování bylo studováno i metodou rozptylu světla. Zjistilo se zvětšení hodnoty gyačního poloměru HA z hodnoty 84 na 190 nm vlivem změny iontové síly rozpouštědla z 0,3 na nulu [10].

2.5.2 Hydrodynamické vlastnosti

Hydrodynamické vlastnosti HA byly zkoumány různými metodami: viskozimetricky, sedimentačními metodami, difúzním měřením, dvojlomem v toku, dielektrickými měřeními v toku a reologickými měřeními.

Vysoká viskozita a současná elasticita je stále středem zkoumání. Viskozita polyelektrolytů je komplexní funkcí koncentrace pomyleru, intové síly, pH rozpouštědla a rychlostí gradientu je použitelnost viskozimetrických dat závislá na experimentálních podmínkách.

Vliv pH na viskozitu můžeme popsat následujícím příkladem. Při neutrálním pH a nízkých koncentracích se viskozita pohybuje v rozsahu od 50 do 100 Pa.s. Při snížení pH na 3 až 4 dochází ke gelovatění. Při pH 12,5 dochází k ostrému, avšak na změnu pH

reverzibilnímu poklesu viskozity. Zvyšováním iontové síly se potlačuje repulze jednotlivých karboxylových skupin, čímž se dosáhne liberalizace závislosti $\eta_{sp}/c=f(c)$.

Závislost viskozity roztoků HA na smykovém napětí je výrazná hlavně při vyšších koncentracích. Při vysokých molárních hmotnostech však zůstává tato závislost zachována i při nekonečném zředění. Proto při praktické aplikaci je nutno dodržovat smykové napětí, při kterém byl vztah $[\eta]$ vs M určený, anebo extrapolovat $[\eta]$ k nulovému smykovému napětí.

Pokud se z $[\eta]$ odvozují informace o tvaru, rozměrech a konformaci molekul, je nutno pracovat při velmi nízkých smykových napětích.

Viskoelasticita roztoků HA byla zkoumána již počátkem 50. let. Reologické vlastnosti jsou charakteristické extrémní závislostí viskozity na rychlostní gradient a frekvenční závislostí elasticity. Její roztoky jsou převážně viskózní při nízkých frekvencích a převážně elastické při vysokých frekvencích. Při nízkých frekvencích jsou řetězce dostatečně rychlé na to, aby umožnily klubkům zajmout náhodnou konfiguraci pod vlivem působícího vnějšího napětí a klouzat jedno po druhém, vytvářející tak viskózní tok. Při vysokých frekvencích klubka nemohou měnit svou konfiguraci tak rychle jako je změna oscilujícího napětí, takže jsou deformované, střídavě se stlačují a elasticky uvolňují [10].

2.6 Degradace kyseliny hyaluronové

2.6.1 Termická, chemická a enzymatické degradace

Při dlouhodobém zahřívání roztoků HA dochází ke snižování relativní molární hmotnosti. Kinetika tepelné degradace při neutrálním pH a teplotě 128°C probíhá mechanismem náhodného štěpení. Byla vyvinuta metoda, při které je vyloučena degradace tohoto polysaccharidu. Byl pozorován pokles relativní molární hmotnosti při zahřívání teplotou 128° C v autoklávě. Závislost převrácené hodnoty polymerizačního stupně na čase zahřívání je lineární, což umožňuje určit střední hodnotu zdánlivé rychlostní konstanty termické degradace. Krátkodobým varem vodných roztoků HA nedochází k výrazné změně viskozity jejich roztoků. V přítomnosti tiolů a přechodných kovů, dochází také k degradaci HA, protože tyto kovy stimulují produkci reaktivních OH radikálů, které jsou iniciátorem degradace HYA [10].

2.6.2 Fotochemická degradace

Vliv HA na různé druhy záření je sledována nejvíce v souvislosti patologických procesů, které probíhají v oku.

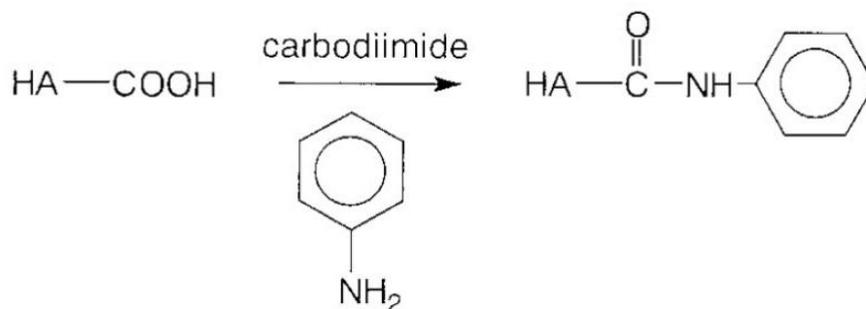
UV záření způsobuje pokles viskozity, a také byl pozorován pokles schopnosti vazby kationtů. Autoři předpokládají, že UV záření způsobuje trhání interglykozidické vazby za současného odbourávání vedlejších skupin.

Degradace může nastat také účinkem singletového kyslíku $^1\text{O}_2$. Autoři zjistili, že degradace je stimulována molekulami singletového kyslíku způsobující tak v první fázi změnu terciální a kvartetní struktury makromolekuly HA [10].

2.7 Způsoby síťování kyseliny hyaluronové

2.7.1 Reakce na karboxylové skupině

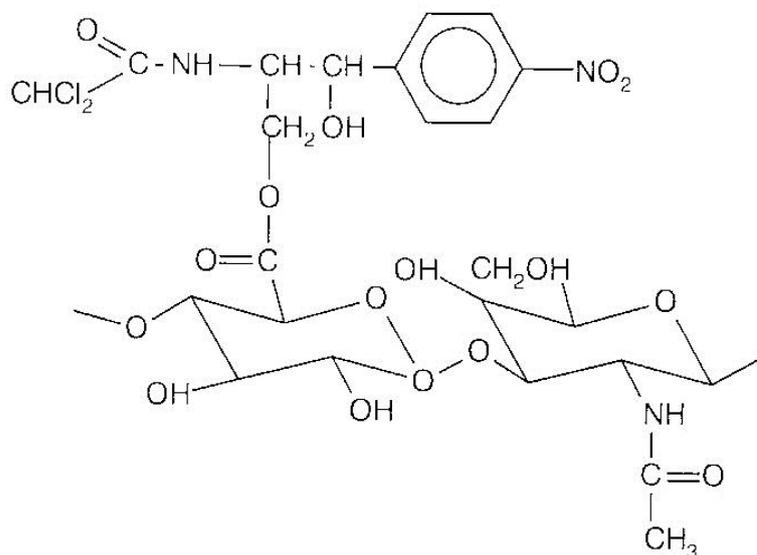
Jedna část monomerní jednotky HA je kyselina glukuronová. Strukturu můžeme pro psaní reakcí zjednodušit na HA-COOH. Před reakcí je důležité samotnou skupinu nejprve aktivovat. Existují dva způsoby úprav. První z nich je pomocí nesíťovaných derivátů HA, reakcí monofunkčních činidel. Druhá je pomocí síťování. Síťovadlo je látka, která obsahuje dvě nebo více nukleofilních částí, které obsahují například amino skupiny, které jsou schopny reagovat s aktivovanou HA. Preferované nukleofily jsou biokompatibilní a jsou schopny reagovat s aktivovanou HA tak aby vznikl biokompatibilní výrobek, který může být používán. Mezi preferované nukleofily jsou některé aminokyseliny: metylester leucinu, izoleucin, valin, fenylalanin.



Obr. 4 – Reakce HA za přítomnosti aktivátoru karbodiimidu [11].

V této části mohou být zapojeny estery HA, které jsou ve formě nesíťovaných derivátů. Zdá se být velice výhodná pro použití na systematicky uvolňované léčiva, i když jsou estery HA nerozpustné ve vodě a jejich fyzikálně-chemické vlastnosti jsou odlišné od původní HA. Esterifikace může být provedena s neléčebnými alkoholy, jako jsou etyl, propyl, benzyl alkohol do formy semisyntetických polymerů.

Pro připojení amino skupiny, která obsahuje léčivé látky, může být použit 2-etyl-5-fenyl-isoxazolium-3-sulfon jako spojovací činidlo. Vytvoří vazbu pomocí karboxylové skupiny. Chloramfenikol může být k esterové skupině připojen kovalentní vazbou na ester skupinu, nebo přes alanin jako meziprodukt propojení [11].

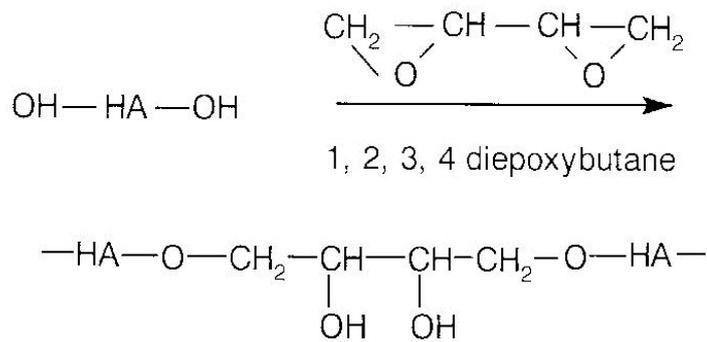


Obr. 5 – Chloramfenikol kovalentně vázaný na karboxylovou skupinu HA [11].

2.7.2 Reakce na hydroxylové skupině

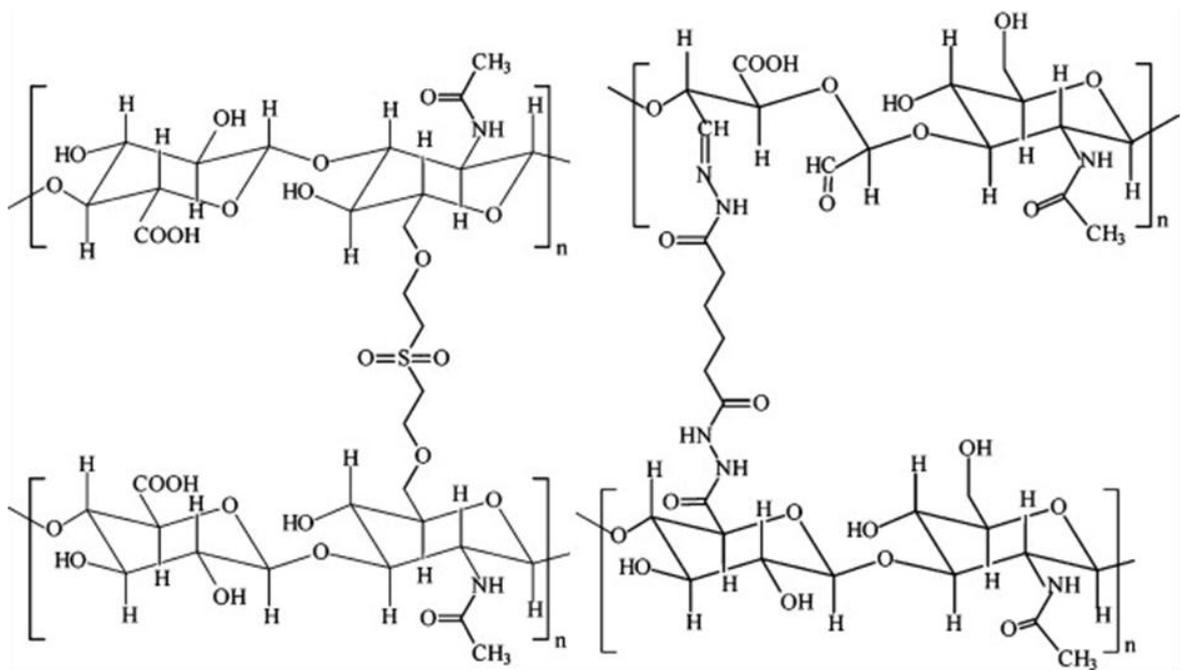
HA obsahuje velké množství hydroxylových skupin, které jsou schopné síťování. Hydroxylové skupiny C-2 a C-3 kyseliny glukuronové, jsou nejdostupnější pro derivatizaci, ale obecně jsou málo reaktivní. Síťovací činidlo je molekula, která obsahuje dvě nebo více elektrofilních částí schopných reagovat s hydroxylovými skupinami HA. Strukturu kyseliny hyaluronové opět zjednodušíme na HA-OH pro mechanismy reakcí.

Laurent popsal první úspěšnou reakci síťování HA s použitím 1,2,3,4-diepoxybutanu v zásaditém prostředí při 50°C.



Obr. 6 – Síťování pomocí 1,2,3,4 diepoxybutanu [11].

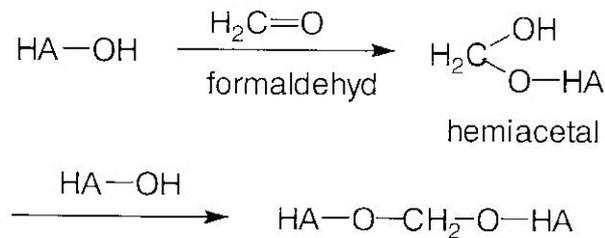
Hydroxylové skupiny HA jsou schopné reagovat v zásaditém prostředí s divinylsulfonem (DVS). Činidlo kovalentně vázané přes sulfonyl-bis-etylovou vazbu tvoří v několika minutách silný nerozpustný gel.



Obr. 7 – Síťování pomocí DVS [12].

Činidla pro vyhovující síťování jsou polyfunkční epoxidy, například nižší alifatické epoxidy, nebo jejich odpovídající halogenhydriny a halogenidy. Jako vhodné příklady mohou být uvedeny epichlorhydrin, 1,4-butandioldiglycid eter, N,N-diglycid anilin. Zesíťovaný gel obsahuje určité zbytkové stopy činidel je tedy důležité gel pořádně promýt, například v páře fosfátového pufru. Čistý gel lze získat síťováním HA ze sklivce.

Další vhodnou metodou pro síťování může být metoda od Balazse. Změnil činidla jakou jsou polyaziridin, formaldehyd, etylen oxid a další.



Obr. 8 – Síťování formaldehydem [11].

Konjugáty kyseliny hyaluronové s fyziologickou aktivitou nebo chemoterapeutickými vlastnostmi jsou cenné léčebné látky. Obsahují volné primární amino skupiny pomocí nichž dochází k reakci, které jsou výhodné obzvláště pro amino skupiny obsahující antibiotické účinky, například ampicilin [11].

2.7.3 Reakce na amino skupině

Modifikované reakce na amino skupině nejsou tak časté jako reakce na hydroxylové nebo karboxylové skupině.

Sekundární aminy ve struktuře kyseliny hyaluronové lze aktivovat změnou pH. N-acetylové skupiny v kyselině lze odstranit úpravou pomocí hydroxidu sodného. Tato základní hydrolyza poskytuje amino skupinu, která poté může reagovat s polyetylenglykolem [11].

2.8 Aplikace a využití

Již v 60. letech 20. století se využívala k lokální léčbě popálenin a kožních vředů. Od r. 1979 je na trhu určená pro použití v oční chirurgii. Užívá se k dočasnému vyplnění prostoru přední komory oční a ochraně očních tkání před poškozením při operacích. Druhé nejširší využití představuje intraartikulární aplikace (tzv. viskosuplementace) u pacientů s osteoartrózou. Novou možností je periartikulární aplikace při podvrtnutí kotníku.

Významné je využití k augmentaci v plastické chirurgii (vyplň vrásek, vtažených jizev, zvětšení prsou). Velké využití má v přípravcích pro podporu hojení ran. Dobré výsledky byly zaznamenány v kombinaci s jódem při hojení chronických ran, diabetických nohou a bérceových vředů. Uplatnění našla také ve veterinární medicíně,

kde se vysokomolekulární hyaluronan uplatňuje díky svým viskoelastickým a protizánětlivým vlastnostem. Užívá se především při léčbě nemocí kloubů koní, psů a koček. Nové využití našla i v oblasti péče o zrak, jako lubrikační látka v očních kapkách nebo v roztocích na kontaktní čočky [13, 14].



Obr. 9 – Výrobek z kyseliny hyaluronové [15].

3 REOLOGIE

3.1 Reologické chování

Reologie se zabývá deformací a tokem hmoty za působení vnějších sil. Řeší vztah mezi napětím, deformací a časem. Podle chování určujeme dva limitní stavy.

- Jestliže po účinku vnější síly nastane deformace, která po jejím odstranění vymizí, mluvíme o elastickém chování, které vykazují tuhé látky. Během deformace se vynaložená energie ukládá a po relaxaci látky se uvolní. Látka se chová v ideálním stavu jako pružina, tj. reaguje okamžitě a reakce je dokonale vratná. Elastické látky se při malých deformacích řídí podle Hookoeva zákona. Při smyku je rovnováha napětí a deformace vyjádřena vztahem:

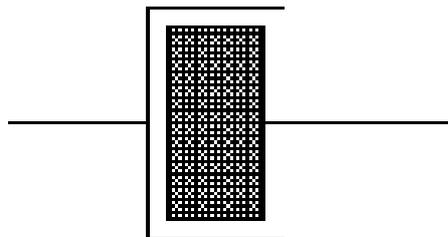
$$\sigma = G * \gamma \quad (2)$$

G - smykový modul, γ – rychlost smykové deformace



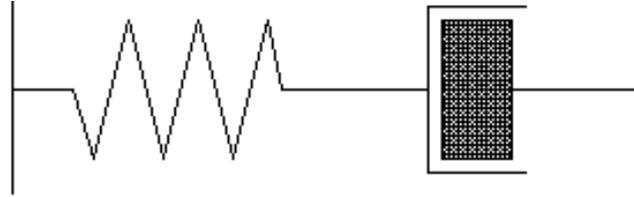
Obr. 10. Elastický model pevné látky [16].

- Jestliže působením síly hmota teče a tok se zastaví, ale neobráť, je-li síla odstraněna, mluvíme o viskózním chování, které je charakteristické pro jednoduché tekutiny. Viskózní tekutina reaguje na působení napětí jako píst (tlumič), tj. deformuje se s časovým zpožděním a nevratně. Vynaložená energie je disipována jako teplo.



Obr. 11. Viskózní model tekutiny [16].

- Polymerní taveniny jsou deformovány viskoelasticky. Píst a pružinu lze zapojit paralelně i sériově [16, 17].



Obr. 12. Deformační chování polymerních tavenin (sériový model) [16].

3.2 Debořino číslo

Při posuzování deformačního chování materiálů je důležité rozhodnutí, zda na ně pohlížet jako na tekutiny či pevné látky. Všechny materiály se za určitých podmínek chovají jako tekutiny, tj. tečou. Příkladem, který si lze jednoduše ověřit, je skutečnost, že okna ve starých katedrálách mají u země větší tloušťku než u stropu, tj. z pohledu staletí je sklo tekutina.

$$De = \frac{\lambda}{\theta} \quad (3)$$

λ – charakteristický symbol materiálu vyjadřující schopnost molekulárního přeskupování,

θ – doba pozorování

Pokud jde $De \rightarrow 0$. Pak se materiál jeví jako tekutina.

Pokud jde $De \rightarrow \infty$. Pak se materiál jeví jako pevná látka [16].

3.3 Reologické modely

K popisu tokového chování se využívají reologické modely.

3.3.1 Newtonské kapaliny

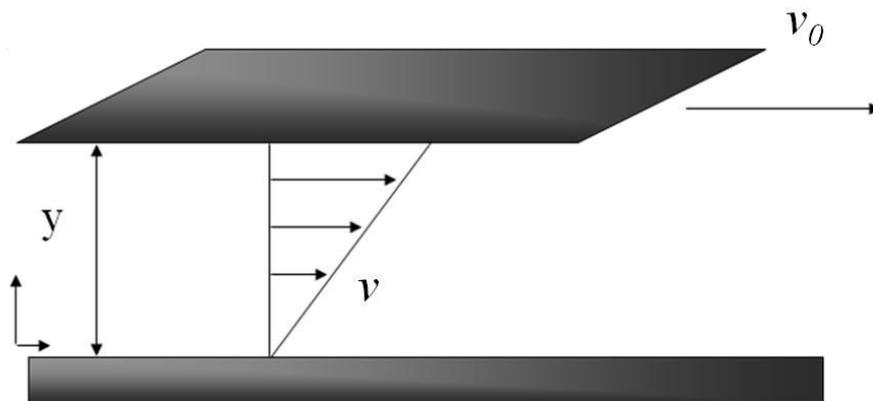
Nejjednodušší model, který je využíván pro popis toku kapaliny během smykového namáhání, je Newtonův zákon:

$$\tau_{xy} = \eta_0 * \gamma_{xy} \quad (4)$$

τ_{xy} – smykové napětí, η_0 – newtonská viskozita, γ_{xy} – rychlost smykové deformace

Při jeho popisu si představme dvě desky z nichž dolní je stacionární a horní se pohybuje rychlostí v , která je vyvolána smykovou rychlostí F působící v rovině desky s plochou A . Horní deska se působením síly posune. Smykové napětí je pak vyjádřeno rovnicí:

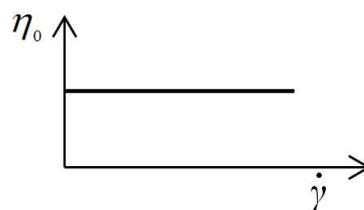
$$\tau = \frac{F}{A} \quad (5)$$



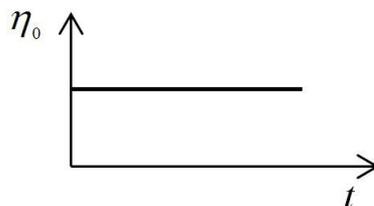
Obr. 13. Model reologického chování během smykového namáhání [16].

Viskozita

Viskozita je mírou úměrnosti mezi napětím a rychlostí smykové deformace, která má rozměr Pa.s. Pro newtonské látky je viskozita materiálovou konstantou, je nezávislá na čase a rychlosti smykové deformace [16, 19].



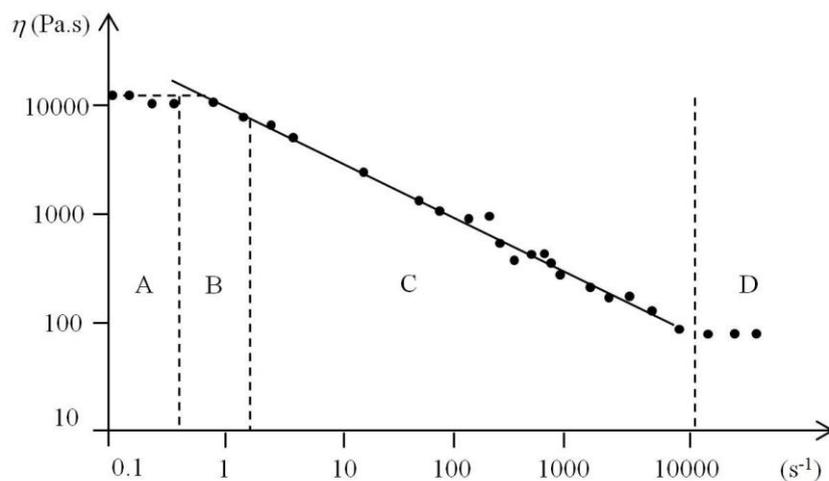
Obr. 14. Viskozita newtonských látek jako veličina nezávislá na rychlosti smykové deformace [16].



Obr. 15. Viskozita newtonských látek jako veličina nezávislá na teplotě [16].

3.3.2 Nenevtonské látky

Polymerní látky vykazují newtonské chování pouze při nízké rychlosti smykové deformace (obr.5 - oblast A). Při dalším zvyšování rychlosti smykové deformace začíná viskozita klesat (obr. 5 – oblast B), což je typické pro polymerní taveniny. Hodnota se pomalu ustaluje do konstantní hodnoty, která určuje nenevtonské chování (obr. 5 – oblast C). Poslední oblast tokové křivky (oblast D) je tzv. druhé newtonské plateau, které je charakterizované opětovným ustálením viskozity nezávisle na stále se zvyšující rychlosti smykové deformace [16].



Obr. 16. Toková křivka polymerních látek [16].

4 VISKOELASTICITA

Polymerní látky se chovají současně jako pevné hookovské látky a i jako viskózní newtonské kapaliny. Takové chování se nazývá viskoelastické. Na deformaci reagují tyto látky vždy se zpožděním. Při stanovení odezvy viskoelastického chování jsou rozlišovány dva typy experimentů: [16, 18].

- **Kríp**

Kdy je sledována závislost deformace na čase při konstantním napětí a teplotě. Napětí je zavedeno skokově v určitém čase [16, 18].

$$\varepsilon(t) = D(t) * \sigma \quad (6)$$

- **Relaxace**

Je popsána jako napětí v polymeru s časem při konstantní deformaci a teplotě. Při relaxačním pokusu se v určitém čase polymer zatíží konstantní deformací. Při vložení deformace reaguje pružina okamžitě, zatímco u pístu je deformace nulová [16, 18].

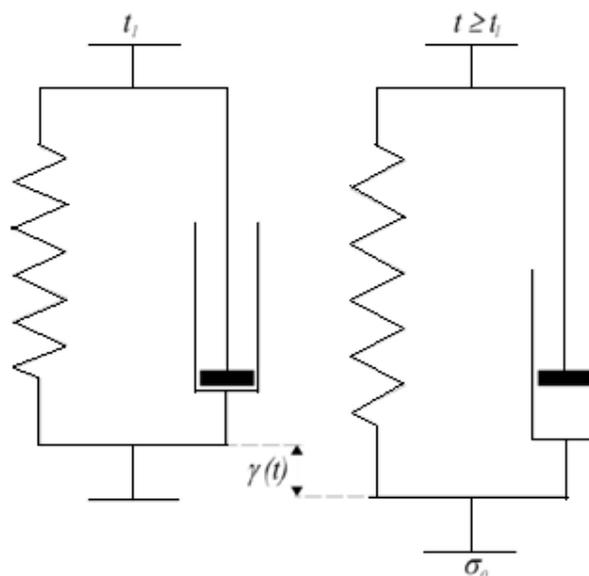
$$\sigma(t) = E(t) * \varepsilon \quad (7)$$

4.1 Viskoelastické modely

Základní prvky modelů je pružina, která znázorňuje hookovské elasticity a píst, který znázorňuje newtonský tok. U obou prvků se volí konstanty tak, aby byly jednotkové. Čím více prvků je v modelu, tím lépe model vystihuje reologické chování reálného systému [16, 18].

4.1.1 Kelvinův model

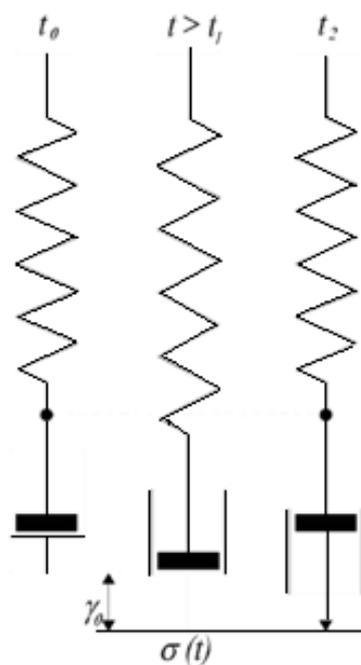
Model představuje paralelní spojení pístu a pružiny. Deformační stav pružiny je v tomto případě brzděn viskózním prvkem. Kelvinův model se tedy deformuje vratně, jeho elasticita není okamžitá, ale časově závislá. Elasticita je zpožděná. Deformace u obou prvků je stejná a napětí se spočítá součtem u obou prvků. U tohoto modelu nastává zpětný kríp, který nastává, přestaneme-li působit vnější síla a systém se vrací do nedeformovaného stavu. Tento jev je také nazýván jako elastické zotavení [16, 18].



Obr. 17. Kelvinův model [16].

4.1.2 Maxwellův model

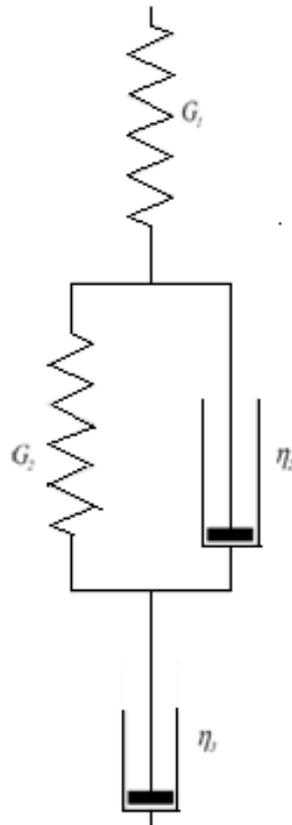
Pomocí Maxwellova modelu popisujeme relaxaci polymeru. Model je stejně jako Kelvinův tvořen elastickou a newtonskou částí, kde dochází k toku, který je komplikován elasticitou. Při sériovém zapojení je celková deformace rovna součtu deformací obou prvků. Napětí je u obou prvků a v celém modelu stejné [16, 18].



Obr. 18. Maxwellův model [16].

4.1.3 Tucketův model

Deformaci lineárního amorfního polymeru je určována třemi parametry: pružina udává okamžitou deformaci valenčních úhlů, vazeb a mezimolekulových vzdáleností, zpožděnou elastickou deformaci polymerních klubek určuje kelvinův model a píst koresponduje s nevratným přesunem klubek [16, 18].



Obr. 19. Tucketův model [16].

5 ZÁVISLOST TOKU POLYMERŮ NA PROCESNÍCH A MOLEKULÁRNÍCH PARAMETRECH

Každá měřená vlastnost materiálů je závislá na mnoha faktorech, které ovlivňují její konečnou hodnotu. U stejného materiálu se hodnota může změnit na úplně jinou, a to klidně nepatrným působením jednoho faktoru.

5.1 Vliv teploty

Závislost viskozity na teplotě popisujeme jak teoretickými tak empirickými vzorci. Pro empirický vztah, který dobře vystihuje závislost viskozity amorfních polymerních tavenin na teplotě v intervalu teplot (T_g , $T_g + 100$ K) je WLF (Williams–Landel–Ferry, 1953) rovnice:

$$\log \eta(T) = \log \eta(T_g) - [c_1(T - T_g)] / [c_2 + T - T_g] \quad (8)$$

c_1 a c_2 jsou univerzální konstanty.

Pomocí WLF rovnice lze odhadnout teplotní závislost viskoelastických vlastností i u polymerů, kde ještě přesnější údaje nejsou k dispozici.

Pokud je teplota vyšší než 100 K nad T_g lze závislost viskozity na teplotě popsat Arrheniovým vztahem:

$$\eta = \eta_0 * e^{E/RT} \quad (9)$$

η – viskozita při teplotě T , η_0 - limitní (newtonská) viskozita, E – aktivační energie,

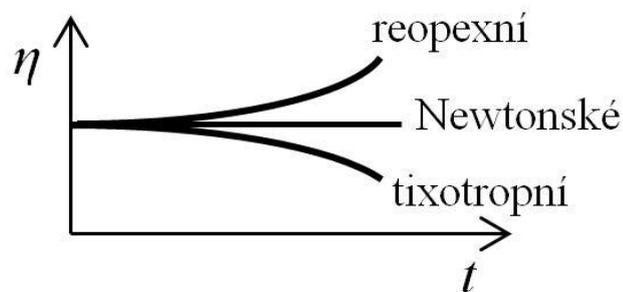
R – plynová konstanta, T – teplota

Vztah vychází z energetické teorie, která říká, že přenos částice se uskuteční jen v případě, že molekula získá dostatečnou aktivační energii, aby mohla bariéru překonat [16, 18].

5.2 Vliv času

U některých materiálů se viskozita mění s časem, i když je rychlost smykové deformace konstantní. Tato závislost je dána strukturními změnami během smykového namáhání a nesouvisí s elasticitou tavenin. Tyto změny ve struktuře jsou vratné.

Pokud je látka časově závislá a viskozita roste, chování označujeme za reopexii, kdy viskozita roste s dobou, po kterou působí smykové namáhání. Je-li systém v klidu, viskozita se vrátí postupně na nízkou hodnotu. Opačný jev, kdy viskozita klesá, je nazýván tixotropií, která je žádoucí např. u barev, kdy potřebujeme, aby látka byla v tekutém stavu [16, 18].



Obr. 20 – Závislost viskozity na čase [16].

5.3 Vliv síťování

Zavedením chemické příčné vazby do lineárního polymeru způsobí pokles volného objemu v jejím okolí. S vyšším stupněm síťování roste T_g a tím roste viskozita látky. V oblasti hustých sítí roste T_g až o desítky stupňů a tím i viskozita [18].

6 MĚŘENÍ VIZKOZITY

Pro měření tokových vlastností látek jsou používány reometry (viskozimetry). Polymerní procesy probíhají při různých rychlostech smykové deformace, proto jsou stanoveny reologické vlastnosti v širokém rozmezí.



Obr. 21 – Rychlost smykové deformace pro zpracovatelské procesy [16].

Pro měření viskozity jsou nejčastějšími typy využívány reometry:

- rotační – měříme při nízké rychlosti smykové deformace ($10^{-2} - 10^2 \text{ s}^{-1}$)
- kapilární (průtokové) – měříme při středních až vysokých rychlostech smykové deformace ($10 - 10^3 \text{ s}^{-1}$) [16].

6.1 Rotační viskozimetry

Skládají se ze dvou válců nebo kužele a desky, z nichž jeden je stacionární a druhý se otáčí konstantní úhlovou rychlostí. Při proudění kapaliny uvnitř válce dochází k vnitřnímu tření kapaliny, přičemž se otáčivý moment přenáší na druhý válec. Měříme úhel pootočení válce od původní polohy, který je úměrný úhlové rychlosti vnějšího válce ω a viskozitě kapaliny ve chvíli kdy ustane rovnováha.

$$\varphi = k \eta \omega \quad (10)$$

k – konstanta přístroje, φ – úhel pootočení válce, ω – úhlová rychlost vnějšího válce

Viskozimetry jsou vhodné i k měření neneutonských kapalin, protože umožňují měřit úhel pootočení v závislosti na rychlosti otáčení [19].

6.1.1 Typ válec-válec

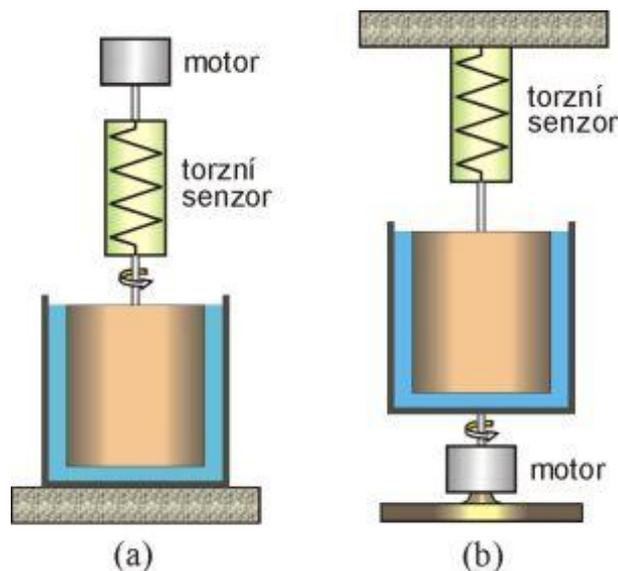
Typ je vhodný pro nízkoviskózní látky. Měříme torzní sílu, kterou působí kapalina, která rotuje uvnitř válce. Rychlost smykové deformace se u typu viskozimetru válec-válec mění s poloměrem válce:

$$\dot{\gamma} = r \frac{d\omega}{dr} \quad (11)$$

smykové napětí vyjadřujeme vztahem:

$$\tau = \frac{M}{2\pi r^2} \quad (12)$$

M – kroucí moment, ω – úhlová rychlost na poloměru r . [16, 20]



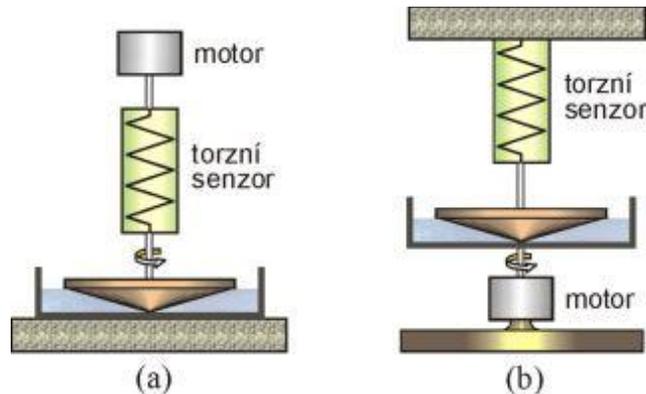
Obr. 22 – Rotační viskozimetr a) s otáčivým vnitřním válcem, b) s otáčivým vnějším válcem [20].

6.1.2 Typ kužel-deska

U viskozimetru tohoto typu jsou přesně definovány tokové podmínky. Měřený materiál je umístěn mezi deskou a kuželem. Popularita tohoto typu je zajištěna hlavně, pokud je malý úhel mezi kuželem a deskou, podle níž jsou napětí a rychlost smykové deformace v celém objemu vzorku konstantní: [16, 21].

$$\tau = \frac{3M}{2\pi R^2} \quad (13)$$

$$\dot{\gamma} = \frac{\Omega r - 0}{r\alpha} = \frac{\omega}{r} \quad (14)$$



Obr. 23 – Rotační viskozimetr a) s otáčivým kuželem, b) s otáčivou deskou [20].

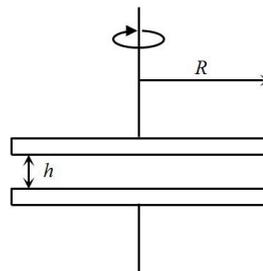
6.1.3 Typ deska-deska

Rychlost smykové deformace u tohoto typu je závislá na vzdálenosti mez deskami:

$$\dot{\gamma} = \frac{\omega R}{h} \quad (15)$$

Spodní deska je stacionární a horní deska při měření osciluje. Smykové napětí získáme z kroucího momentu, který naměříme: [16].

$$\tau = \frac{2M}{\pi R^3} \quad (16)$$



Obr. 24 – Viskozimetr deska-deska [16].

6.2 Kapilární viskozimetr

Nejvyužívanějším typem je zařízení pro měření index toku taveniny (ITT). Jedná se o normovanou zkoušku, podle které můžeme stanovit hmotnostní index toku taveniny (MFR) a objemový index toku taveniny (MVR). ITT udává množství taveniny protékající kapilárou o přesně daném průřezu a délce za přesný čas a přesně definované teplotě a zatížení. Hodnotu najdeme v materiálovém listu u polymerních granulátů. Hodnota ITT je pouze orientační, na tokové křivce představuje pouze jeden bod [16, 22].

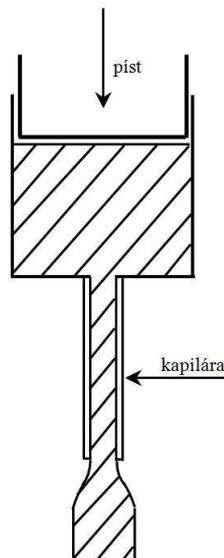
Rychlost smykové deformace lze pro newtonské látky vyjádřit vztahy:

$$\dot{\gamma} = \frac{dv}{dr} = \frac{4Q}{\pi R^3} \quad (17)$$

$$\tau = \frac{\Delta p R}{2L} \quad (18)$$

Δp – tlakový spád v kapiláře, Q – objemový průtok v kapiláře, L – délka kapiláry

R – poloměr kapiláry



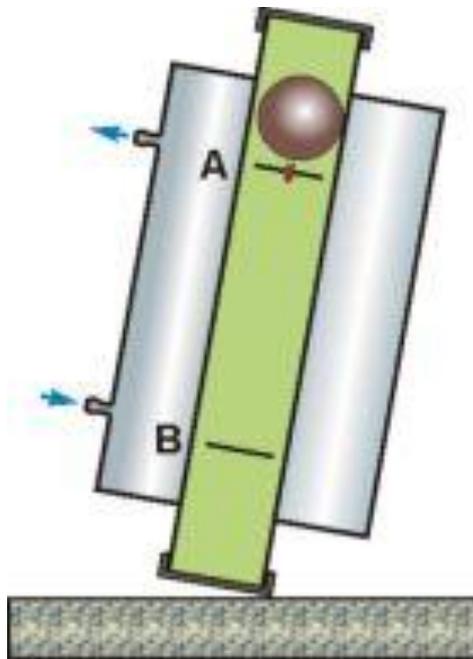
Obr. 25 – Kapilární viskozimetr [16].

6.3 Höpplerův viskozimetr

Známý také jako kuličkový (tělískový) viskozimetr. Měření je založeno na Stokesově vztahu pro pád koule ve viskózním prostředí. Měříme srovnávacím způsobem:

$$\frac{\eta}{\dot{\eta}} = \frac{u (\rho_k - \rho)}{u (\rho_k - \rho')} = \frac{\tau (\rho_k - \rho)}{\tau (\rho_k - \rho')} \quad (19)$$

ρ_k – hustota kuličky, u, u' – rychlost pádu kuličky, τ – doba průchodu kuličky mezi dvěma ryskami



Obr. 26 – Höpplerův viskozimetr [20].

Viskozimetr je vhodný pro kapaliny o větší hustotě a viskozitě, může však být použit jen pro průhledné nerovské kapaliny [13].

I. PRAKTICKÁ ČÁST

7 PŘÍPRAVA A POUŽITÍ VZORKŮ

Vzorky A a B připravené pro měření viskozity na průtokovém viskozimetru pro 5 koncentrací a 3 teploty. Dále byl připraven vzorek C pro další část měření, kde byla kyselina hyaluronová síťována DVS a na rotačním viskozimetru byla měřena viskozita pro 5 různých stupňů zesíťování.

7.1 Charakteristika použitých materiálů

Hlavní chemickou sloučeninou používanou při práci je suchý hyaluronát sodný (viz tabulka č. 1). Dále je použit suchý chlorid sodný ($M_n = 58,43$), čistý ethanol, deionizovaná voda, chlorid draselný od firmy PENTA, hydroxid sodný a síťovadlo divinylsulfon (viz tabulka č. 2).

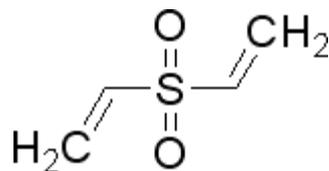
7.1.1 Hyaluronan sodný

Tabulka 1 - Hyaluronát sodný

Výrobce	CPN spol. s. r. o, Dolní Dobrouč, ČR
Výrobní číslo	119-12-01
Původ	Biotechnologická výroba
Vzhled	Bílý až nažloutlý prášek nebo granulky
Vzhled 0,5 % roztoku	Čirý, bezbarvý, lehce opalescentní
Čírost 1% vodného rozt. (660nm, 1cm)	<0,010
Sušina (%)	>90,0
Molekulová hmotnost (MDa)	0,70-0,90
pH 0,5% vodného roztoku	5,0-8,0
Obsah bílkovin (%)*	<20,0
Celkový mikrobiální počet (CFU/g)	<100
Kyselina uronová –UA (%)*	>45,0
Hyaluronan sodný – UA x 2,067 (%)*	>93,0
Popel (%)*	<10,0
Příspěvky	žádné

* vztaženo na suchý základ

7.1.2 Divinylsulfon



Obr. 27 - Strukturální vzorec divinylsulfonu

Tabulka 2 - Divinylsulfon

Výrobce	Aldrich®
Hustota při 25 °C (g/ml)	1,177
Koncentrace (%)	97
Bod varu (°C)	234
Molekulová hmotnost (Da)	118.15

7.1.3 Vzorek A – HA 0,1 hm% v 0,01M roztoku KCl

Byl připraven zásobní roztok 0,01M KCl dle vypočítané navážky podle vzorce:

$$m = VcM \quad (20)$$

m – hmotnost, V – objem, c – koncentrace, M – molární hmotnost

Navážka byla vypočítána na 0,3727 g KCl, naváženo bylo 0,3716g KCl. Navážka byla rozpuštěna v 0,5 l destilované vody a přes noc byla nechána na míchadle, kde se směs dokonale promísila.

Dále bylo připraveno 0,5 l roztoku kyseliny hyaluronové o 0,1 hm %. Bylo naváženo 0,5097g HA a k navážce byly přidány 2 ml ethanolu dále byl roztok doplněn do požadovaného objemu a rozpuštěn v připraveném roztoku 0,01M KCl. Připravený roztok byl taktéž přes noc nechán na míchadle pro lepší smíchání.



Obr. 28 – Vzorek na magnetickém míchadle.

7.1.4 Vzorek B – HA 0,1hm% v destilované vodě

Bylo naváženo 0,5032g HA, do které byly pro lepší rozpustnost přidány 2 ml ethanolu. Roztok byl dále doplněn do požadovaného objemu 0,5 l destilovanou vodou a přes noc byl nechán na míchadle pro lepší smíchání roztoku.

7.1.5 Vzorek C – HA 1hm% v 0,1M NaOH

Byl připraven zásobní roztok 0,1M NaOH, kde bylo naváženo 2,08g NaOH a rozpuštěno v 0,5 l destilované vody a necháno přes noc na míchadle. Dále bylo naváženo 5g HA do které bylo přidáno 20 ml ethanolu a roztok byl dále rozpuštěn v připraveném roztoku 0,1M NaOH.



Obr. 29 – Vzorky.

8 POUŽITÉ PŘÍSTROJE A VYBAVENÍ

Při měření byly využity dva typy viskozimetrů. Průtokový Ubbelohde viskozimetr UIa od firmy TECHNOSKLO s.r.o. Držkov. Druhým typem viskozimetru byl rotační viskozimetr typu Visco Tester 6L od firmy Gebr HAAKE GmbH v zastoupení Pragolab s.r.o, Praha.

8.1 Ubbelohde viskozimetr

Měření viskozity u průtokových viskozimetrů je založeno na Poiseuillově rovnici pro průtok kapaliny kapilárou:

$$\eta = \frac{\pi r^4 \Delta p t}{8 V l} \quad (21)$$

Kde: r - poloměr kapiláry, t -čas, V -objem kapaliny, l -délka kapiláry, Δp -rozdíl tlaků

Rozdíl tlaků je daný hydrostatickým tlakem kapaliny ve svislé kapiláře, který je úměrný hustotě kapaliny. Viskozita je úměrná hustotě kapaliny a době průtoku. Měření se provádí způsobem, při němž se na stejném viskozimetru porovnává viskozita měřené kapaliny η se známou viskozitou srovnávací kapaliny η_{ref} .

$$\frac{\eta}{\eta_{ref}} = \frac{t}{t_{ref}} \frac{\rho}{\rho_{ref}} \quad (22)$$

Kde: t, t_{ref} - doba průtoku, ρ, ρ_{ref} - hustota měrné a srovnávací kapaliny.

Kapilární viskozimetry jsou přesné 0,01 až 0,1 %, ale nemohou být použity pro neneutonské látky, neboť rychlostní gradient není konstantní – roste se vzdáleností od osy kapiláry [24].

Součástí skleněného viskozimetru byl skleněný termostatový plášť s kovovým držákem. V plášti je možné termostatovat viskozimetry na teplotu 8 až 180°C pomocí oběhového termostatu. Při měření bylo pro každou koncentraci měřeno s třemi teplotami: 25,30 a 35 °C.



Obr. 30 – Ubbelohde viskozimetr se skleněným držákem a termostatem.

8.1.1 Technické parametry

Viskozimetr použitý pro měření byl vyroben firmou TECHNOSKLO s.r.o. Držkov.

Tabulka 3 - Technická specifikace Ubbelohde viskozimetru.

Typové označení:	UIa
Průměr kapiláry:	0,836 mm
Konstanta viskozimetru:	0,2870 mm ² s ⁻²
Kinematická viskozita vyměřované kapaliny:	8,0173 mm ² s ⁻²
Aritmetický průměr výtokových dob:	279,30 s

Konstanta viskozimetru byla stanovena podle instrukce pro úřední ověřování viskozimetrů I 13-50 ověřenou kalibrační kapalinou při teplotě +20°C podle etanolového viskozimetru.

Vzorec pro výpočet kinematické viskozity:

$$\nu = A \cdot t \quad (23)$$

8.1.2 Zásady pro použití

- Přístroj musí být před použitím odmaštěn, musí být dokonale suchý a čistý.
- Plnění viskozimetru vzorkem měřené kapaliny musí probíhat pozvolna tak, aby se v kapalině netvořily vzduchové bubliny.
- Viskozimetr musí být zavěšen v temperovací lázni přesně ve svislé poloze a nesmí se dotýkat stěn ani dna. Vzdálenost od dna musí být minimálně 20mm.
- Naplnění viskozimetr musí být temperován minimálně 30minut.
- Teplota lázně musí být během měření udržována v rozmezí 0,01 °C.

Podrobný popis je uveden v instrukci pro ověřování viskozimetrů I 13-50 a technické požadavky a popis přístrojů jsou uvedeny v ČSN 257901 A ČSN 257910.

8.1.3 Pracovní postup měření

- Ubbelohde viskozimetr byl odmaštěn, vyčištěn a dokonale vysušen v sušárně při teplotě 65°C.
- Skleněný termostatový plášť byl umístěn na držák a pevně přichycen svorkami, poté byl plášť naplněn vodou.
- Viskozimetr byl po vysušení vložen do kovového držáku a vložen do termostatového skleněného pláště.
- Oběhový termostat byl naplněn vodou a vytemperován na teplotu 25°C.
- Nejprve byl ve viskozimetru měřen referenční vzorek (destilovaná voda).
- Po každém vzorku byl viskozimetr vypláchnut destilovanou vodou a ethanolem a poté byl vysušen v sušárně.
- Vzorek A i vzorek B byly měřeny při 5 různých zředění a to následovně:

Tabulka 4 - Zředění vzorků.

Č.zředění	Vzorek A (ml)	0,01MKCl (ml)
1	15	0
2	10	5
3	10	7,5
4	10	10
5	10	12,5

Č.zředění	Vzorek B (ml)	H ₂ O (ml)
1	15	0
2	10	5
3	10	7,5
4	10	10
5	10	12,5

- Každé zředění bylo měřeno při teplotách 25,30 a 35°C.

- Byl měřen čas průtoku kapaliny mezi ryskami, hodnoty byly následně zapisovány do tabulky, z které byly vyhodnoceny výsledky měření.

8.2 Visco Tester 6L

Viscotester je klasický rotační viskozimetr určený k rychlému stanovení viskozity, jak to definuje ISO 2555, a dále standardy ASTM. Haake používá kvalitní řídicí systém, certifikovaný podle EN 29001. Viskozimetr pracuje na stejném principu, jako všechny ostatní rotační viskozimetry, tj. válec je ponořen do testované látky a měří se síla, potřebná k překonání viskózního odporu vůči rotaci nebo průtoku. Mezi válcem je pružina a motorová hřídel, která se otáčí určitou rychlostí. Deviační úhel vřetene vůči měřicí pružině se měří elektronicky, a výsledkem je hodnota točivého momentu.

Točivý moment, naměřený viskozimetrem, se vypočítá na základě rychlosti a geometrie vřetene. Výsledkem je přímý odečet viskozity v mPas.

Model má celkem 19 rychlostí (0,3 / 0,5 / 0,6 / 1,0 / 1,5 / 2,0 / 2,5 / 3,0 / 4,0 / 5,0 / 6,0 / 10 / 12 / 20 / 30 / 50 / 100 / a 200 min⁻¹) a 4 druhy vřetene. Při měření bylo využito vřeteno typu L1, které se používá při nejnižším stupni viskozity.

Tabulka 5 - Technická specifikace Visco Tester 6L.

Teplota prostředí	od 10 do 40°C
Relativní vlhkost	méně než 80%
Přesnost	více než 0,5% abs.hodnoty
Rozsah měření	3-2 000 000 mPas
Rychlostí	19
Vřetena	4



Obr. 31 – Visco Tester 6L.

8.2.1 Pracovní postup měření

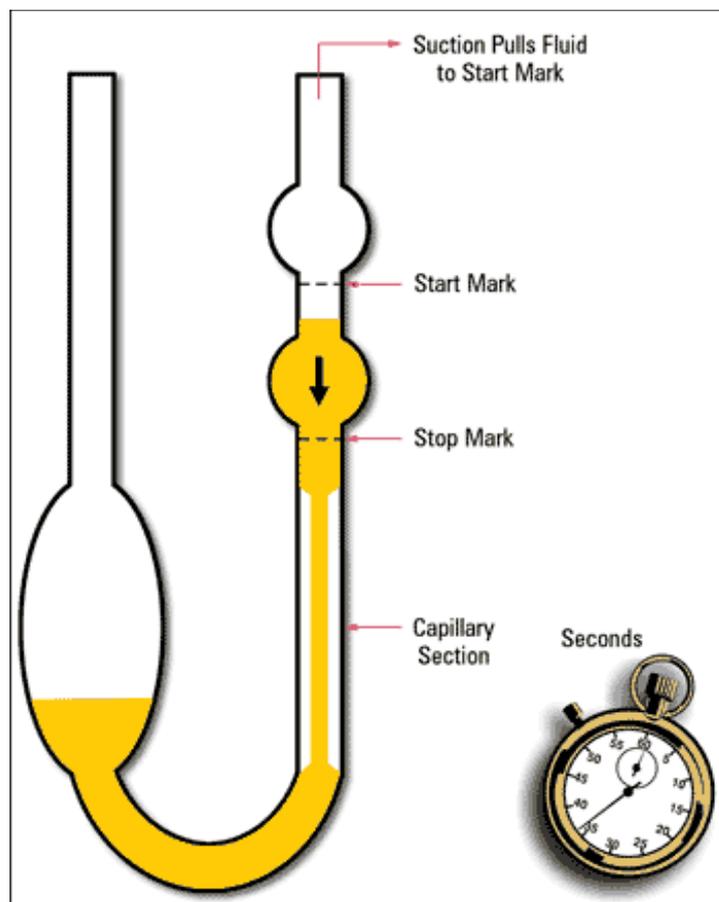
- Visco Tester byl nastaven dle pokynů a bylo použito vřeteno L1.
- Do kádinky o objemu 250ml byl odměřen vzorek C a postupně byly odečítány hodnoty, které byly automaticky vyhodnocovány programem HAAKE RheoWin, který byl spuštěn na počítači.
- Rychlosti smykové deformace byly postupně zvyšovány a odečítány až po maximální možnou hodnotu a poté opět snižovány po maximální možnou hodnotu.
- Dále byl vzorek C síťován pomocí divinylsulfonu v množství od 1 do 5ml.
- Každý stupeň zesíťování byl opět Visco Testrem změřen.

9 NAMĚŘENÉ HODNOTY VIZKOZITY

Vzorek A a B byly měřeny na průtokovém Ubbelohde viskozimetru a vzorek C byl podroben zkoušce na rotačním viskozimetru typu Visco tester 6L.

9.1 Naměřené hodnoty pro vzorek A

Podstatou zkoušky bylo stanovení doby průtoku stálého objemu kapaliny v Ubbelohde viskozimetru při přesně měřené teplotě. Kinematická viskozita byla určena dle rovnice (23), kde hodnota A pro daný viskozimetr měla hodnotu $0,2870 \text{ mm}^2\text{s}^{-2}$.



Obr. 32 – Schéma kapilárního viskozimetru [23].

Tabulka 6 – Naměřené hodnoty a vypočítané viskozity pro koncentraci 0,1 hm. % HA v 0,01M KCl

Zředění (ml)	15 HA	0 KCl	
Teplota (°C)	25	30	35
čas (min)	2,25	2,13	2,03
	2,25	2,12	1,59
	2,24	2,12	2,05
ø	2,25	2,13	2,02
čas ø(s)	144,67	132,67	120,02
Viskozita:	4,1520 mm ² /s	3,8076 mm ² /s	3,4447 mm ² /s

Tabulka 7 - Naměřené hodnoty a vypočítané viskozity pro koncentraci 0,07 hm. % HA v 0,01M KCl

Zředění (ml)	10 HA	5 KCl	
Teplota (°C)	25	30	35
čas (min)	1,37	1,3	1,21
	1,37	1,33	1,21
	1,38	1,31	1,2
ø	1,37	1,31	1,21
čas ø(s)	97,30	91,33	80,67
Viskozita:	2,7925 mm ² /s	2,6212mm ² /s	2,3152 mm ² /s

Tabulka 8 – Naměřené hodnoty a vypočítané viskozity pro koncentraci 0,06 hm. % HA v 0,01M KCl

Zředění (ml)	10 HA	7,5 KCl	
Teplota (°C)	25	30	35
čas (min)	1,23	1,18	1,12
	1,23	1,18	1,1
	1,24	1,17	1,1
ø	1,23	1,18	1,11
čas ø(s)	83,33	77,66	70,66
Viskozita:	2,3916 mm ² /s	2,2288 mm ² /s	2,0279 mm ² /s

Tabulka 9 - Naměřené hodnoty a vypočítané viskozity pro koncentraci 0,05 hm. % HA v 0,01M KCl

Zředění (ml)	10 HA	10 KCl	
Teplota (°C)	25	30	35
čas (min)	1,11	1,09	1,05
	1,12	1,09	1,03
	1,13	1,09	1,02
$\bar{\theta}$	1,12	1,09	1,03
čas $\bar{\theta}$ (s)	72,00	69,00	63,30
Viskozita:	2,0664 mm ² /s	1,9803 mm ² /s	1,8167 mm ² /s

Tabulka 10 - Naměřené hodnoty a vypočítané viskozity pro koncentraci 0,04 hm. % HA v 0,01M KCl

Zředění (ml)	10 HA	12,5 KCl	
Teplota (°C)	25	30	35
čas (min)	1,07	1,06	60
	1,08	1,06	59
	1,09	1,06	59
$\bar{\theta}$	1,08	1,06	59,33
čas $\bar{\theta}$ (s)	68,00	65,60	59,33
Viskozita:	1,9516 mm ² /s	1,8827 mm ² /s	1,7028mm ² /s

9.2 Naměřené hodnoty pro vzorek B

Tabulka 11 - Naměřené hodnoty a vypočítané viskozity pro koncentraci 0,1 hm. % HA v H₂O

Zředění (ml)	15 HA	0 H ₂ O	
Teplota (°C)	25	30	35
čas (min)	7,44	7,05	6,24
	7,45	7,01	6,22
	7,44	7,03	6,23
$\bar{\theta}$	7,44	7,03	6,23
čas $\bar{\theta}$ (s)	464,30	423,00	383,00
Viskozita:	13,325 mm ² /s	12,1401 mm ² /s	10,9921 mm ² /s

Tabulka 12 - Naměřené hodnoty a vypočítané viskozity pro koncentraci 0,07 hm. % HA v H₂O

Zředění (ml)	10 HA	5 H ₂ O	
Teplota (°C)	25	30	35
čas (min)	5,11	4,55	4,3
	5,15	4,51	4,26
	5,13	4,52	4,28
ø	5,13	4,53	4,28
čas ø(s)	313,00	292,60	268,00
Viskozita:	8,9831 mm ² /s	8,3976 mm ² /s	7,6916 mm ² /s

Tabulka 13 - Naměřené hodnoty a vypočítané viskozity pro koncentraci 0,06 hm. % HA v H₂O

Zředění (ml)	10 HA	7,5 H ₂ O	
Teplota (°C)	25	30	35
čas (min)	4,27	4,15	3,56
	4,27	4,16	3,57
	4,26	4,15	3,58
ø	4,26	4,15	3,57
čas ø(s)	266,30	255,30	237,00
Viskozita:	7,6428 mm ² /s	7,3271 mm ² /s	6,8019 mm ² /s

Tabulka 14 - Naměřené hodnoty a vypočítané viskozity pro koncentraci 0,05 hm. % HA v H₂O

Zředění (ml)	10 HA	10 H ₂ O	
Teplota (°C)	25	30	35
čas (min)	3,58	3,55	3,29
	3,59	3,54	3,32
	3,59	3,53	3,32
ø	3,59	3,54	3,31
čas ø(s)	238,60	234,00	211,00
Viskozita:	6,8478 mm ² /s	6,7158 mm ² /s	6,0557 mm ² /s

Tabulka 15 - Naměřené hodnoty a vypočítané viskozity pro koncentraci 0,04 hm. % HA v H₂O

Zředění	10 HA	12,5 H ₂ O	
Teplota (°C)	25	30	35
čas (min)	3,37	3,28	3,14
	3,37	3,26	3,13
	3,39	3,26	3,12
ø	3,38	3,27	3,31
čas ø(s)	217,60	206,60	193,00
Viskozita:	6,2451 mm ² /s	5,9294 mm ² /s	5,5391 mm ² /s

9.3 Naměřené hodnoty pro vzorek C

Tabulka 16 – 1hm.% HA v 0,1M NaOH

$\gamma(1/s)$	$\tau(Pa)$	$\eta(Pa/s)$	$\gamma(1/s)$	$\tau(Pa)$	$\eta(Pa/s)$
2	0,072	0,036	100	3,390	0,034
2,5	0,078	0,031	60	1,992	0,033
3	0,090	0,030	50	1,650	0,033
4	0,120	0,030	30	0,972	0,032
5	0,162	0,032	20	0,648	0,034
6	0,180	0,030	12	0,390	0,033
10	0,324	0,032	10	0,330	0,033
12	0,384	0,032	6	0,186	0,031
20	0,636	0,032	5	0,168	0,034
30	0,972	0,032	4	0,120	0,030
50	1,632	0,032	3	0,090	0,030
60	2,004	0,033	2,5	0,084	0,034
100	3,366	0,034			

Tabulka 17 – 1hm.% HA v 0,1M NaOH sít'ovaný 1ml DVS

$\gamma(1/s)$	$\tau(Pa)$	$\eta(Pa/s)$	$\gamma(1/s)$	$\tau(Pa)$	$\eta(Pa/s)$
2	0,084	0,042	100	4,116	0,041
2,5	0,102	0,041	60	2,472	0,041
3	0,114	0,038	50	2,040	0,041
4	0,150	0,038	30	1,218	0,040
5	0,210	0,042	20	0,804	0,040
6	0,228	0,038	12	0,486	0,041
10	0,402	0,040	10	0,438	0,044
12	0,480	0,040	6	0,240	0,040
20	0,792	0,040	5	0,216	0,043
30	1,200	0,040	4	0,162	0,041
50	2,010	0,040	3	0,120	0,040
60	2,472	0,041	2,5	0,108	0,043
100	4,116	0,041	2	0,090	0,045

Tabulka 18 – 1hm.% HA v 0,1M NaOH sít'ovaný 2 ml DVS

$\gamma(1/s)$	$\tau(Pa)$	$\eta(Pa/s)$	$\gamma(1/s)$	$\tau(Pa)$	$\eta(Pa/s)$
2	0,126	0,063	100	5,838	0,058
2,5	0,156	0,062	60	3,474	0,058
3	0,174	0,058	50	2,886	0,058
4	0,228	0,057	30	1,728	0,058
5	0,300	0,060	20	1,152	0,058
6	0,342	0,057	12	0,696	0,058
10	0,594	0,059	10	0,588	0,059
12	0,708	0,059	6	0,348	0,058
20	1,156	0,059	5	0,306	0,061
30	1,758	0,059	4	0,234	0,059
50	2,940	0,059	3	0,180	0,060
60	3,546	0,059	2,5	0,156	0,062
100	5,880	0,059	2	0,126	0,063

Tabulka 19 - 1hm.% HA v 0,1M NaOH síťovaný 3 ml DVS

$\gamma(1/s)$	$\tau(\text{Pa})$	$\eta(\text{Pa/s})$	$\gamma(1/s)$	$\tau(\text{Pa})$	$\eta(\text{Pa/s})$
2	0,126	0,063	100	5,838	0,058
2,5	0,156	0,062	60	3,474	0,058
3	0,174	0,058	50	2,886	0,058
4	0,228	0,057	30	1,728	0,058
5	0,300	0,060	20	1,152	0,058
6	0,342	0,057	12	0,696	0,058
10	0,594	0,059	10	0,588	0,059
12	0,708	0,059	6	0,348	0,058
20	1,156	0,059	5	0,306	0,061
30	1,758	0,059	4	0,234	0,059
50	2,940	0,059	3	0,180	0,060
60	3,546	0,059	2,5	0,156	0,062
100	5,880	0,059	2	0,126	0,063

Tabulka 20 - 1hm.% HA v 0,1M NaOH síťovaný 4 ml DVS

$\gamma(1/s)$	$\tau(\text{Pa})$	$\eta(\text{Pa/s})$
2	0,378	0,189
2,5	0,486	0,194
3	0,588	0,196
4	0,798	0,200
5	1,026	0,205
6	1,260	0,210
10	2,148	0,215
12	2,598	0,217
20	4,380	0,219
20	4,422	0,221
12	2,700	0,225
10	2,280	0,228
6	1,356	0,227
5	1,146	0,229
4	0,918	0,230
3	0,696	0,232
2,5	0,588	0,235
2	0,480	0,240

Tabulka 21 - 1hm.% HA v 0,1M NaOH síťovaný 3 ml DVS

$\dot{\gamma}$ (1/s)	τ (Pa)	η (Pa/s)
2	0,516	0,258
2,5	0,642	0,257
3	0,762	0,254
4	1,002	0,254
5	1,260	0,252
6	1,500	0,250
10	2,520	0,252
12	3,012	0,252
20	5,028	0,251
20	5,040	0,252
12	3,072	0,255
10	2,556	0,256
6	1,530	0,255
5	1,284	0,256
4	1,026	0,257
3	0,804	0,268
2,5	0,654	0,262
2	0,552	0,276

10 VÝPOČTENÉ HODNOTY A VYHODNOCENÍ MĚŘENÍ

Byla stanovena kinematická viskozita rozpouštědla a vypočítán inkrement relativní viskozity (specifická viskozita), která udává poměrný přírůstek viskozity:

$$\nu_{sp} = \frac{\nu_{vz} - \nu_{\theta}}{\nu_{\theta}} \quad (24)$$

ν_{vz} – kinematická viskozita vzorku, ν_{θ} – kinematická viskozita rozpouštědla

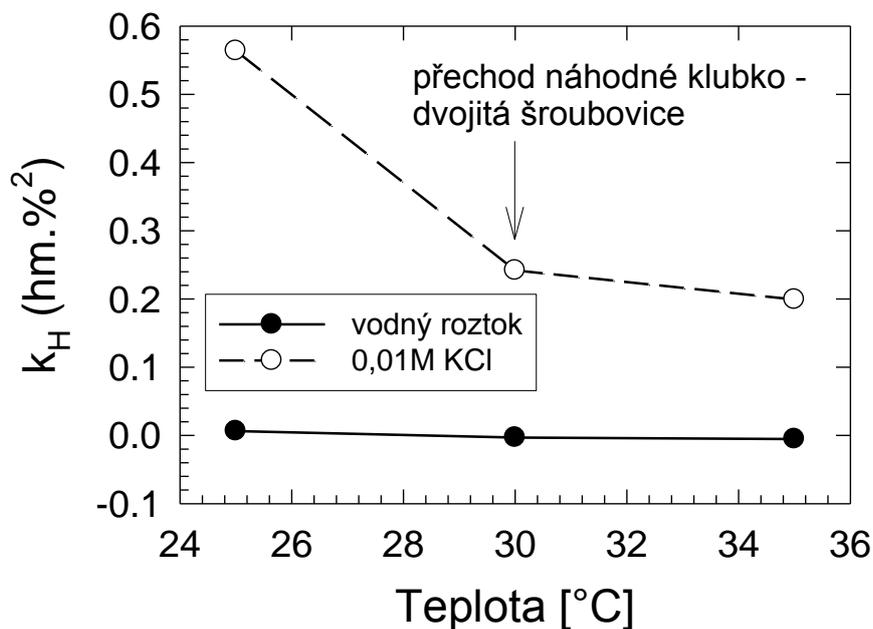
Koncentrační závislosti viskozity byly zpracovány pomocí Hugginsovy rovnice:

$$\frac{\eta_{sp}}{c} = [\eta] + k_H [\eta]^2 c \quad (25)$$

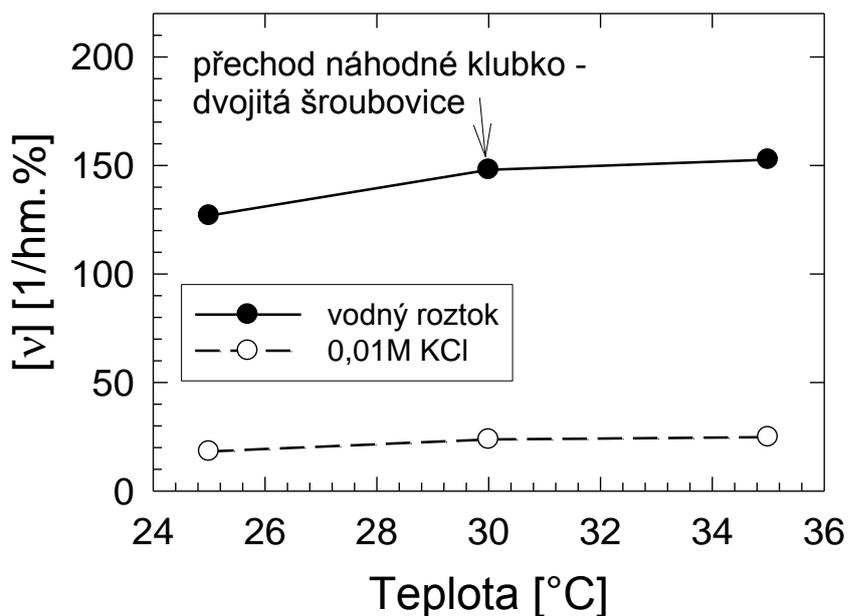
Vypočtené hodnoty limitního viskozitního čísla a Hugginsovy konstanty jsou uvedeny v tabulce 22. Z těchto hodnot je patrná změna rozměru makromolekulárního klubka hyaluronátu sodného vlivem teploty i iontového složení rozpouštědla. Jak je patrné z absolutních hodnot limitního viskozitního čísla, s rostoucí teplotou dochází k jeho nárůstu, což svědčí o zvětšování hydrodynamického rozměru makromolekulárního klubka v obou případech studovaných roztoků. Byla zjištěna skoková změna interakčního parametru k_H při teplotě 30°C, kdy dochází ke změně svinutí makromolekulárních klubek z konformace expandovaného klubka na zdvojenou šroubovici v 0,01 M KCl. Tento jev je také méně patrný v případě vodného roztoku HA, kdy ionizované karboxylové skupiny hyaluronátu jsou více ionizovány v porovnání s roztokem KCl. Tím se potlačuje jeho polyelektrolytický charakter, který má za následek přijetí konformace méně průtočného makromolekulárního klubka.

Tabulka 22 – Vypočítané limitní viskozitní čísla a Hugginsovy konstanty

Teplota [°C]	Vzorek			
	Vodný roztok HA		0.01M KCl HA	
	[v] [1/hm.%]	k_H [hm.% ²]	[v] [1/hm.%]	k_H [hm.% ²]
25	126.8597	0.006481	18.2159	0.563778
30	147.9793	-0.00313	23.7613	0.241965
35	152.6445	-0.00533	24.8323	0.199157



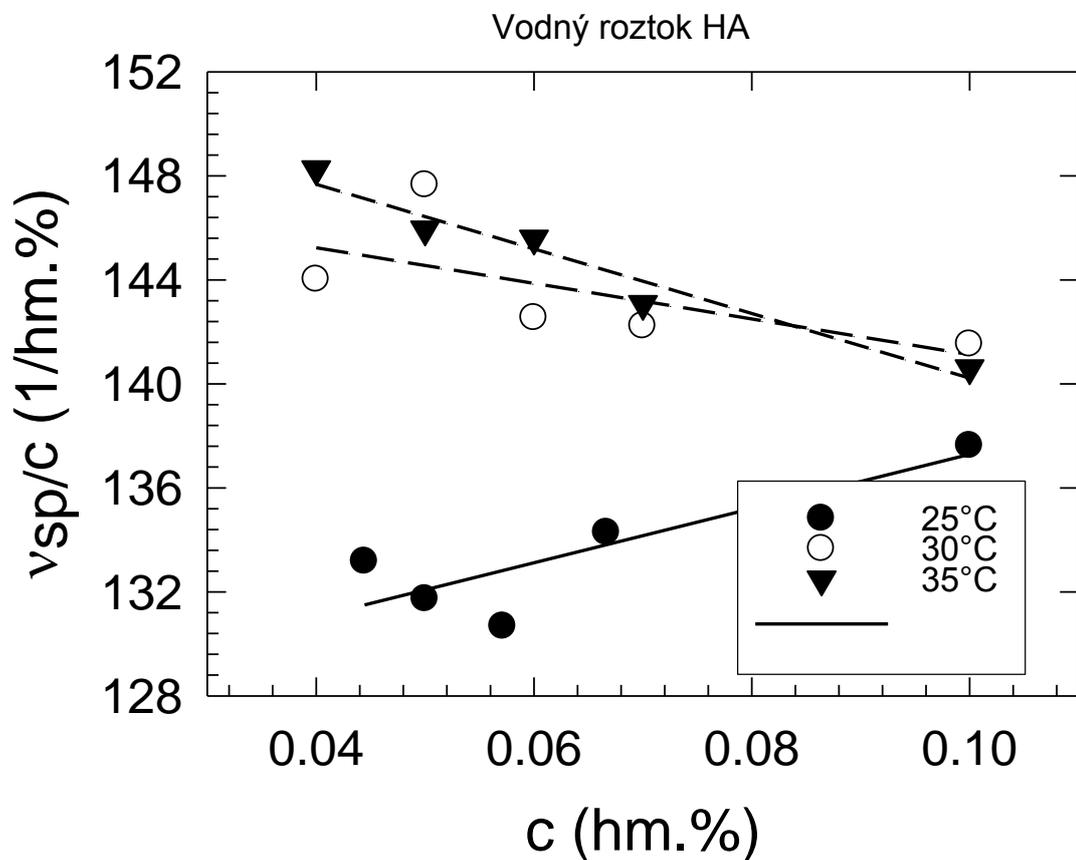
Obr. 33 - Teplotní závislost Hugginsovy konstanty pro 0,1 hm. % hyaluronátu sodného ve vodném roztoku (plné kolečko) a v roztoku 0,01M KCl (prázdné kolečko).



Obr. 34 - Teplotní závislost limitního viskozitního čísla pro 0,1 hm. % hyaluronátu sodného ve vodném roztoku (plné kolečko) a v roztoku 0,01M KCl (prázdné kolečko).

Tabulka 23 – Výsledky výpočtů specifické kinematické viskozity/c při různých teplotách pro vzorek A

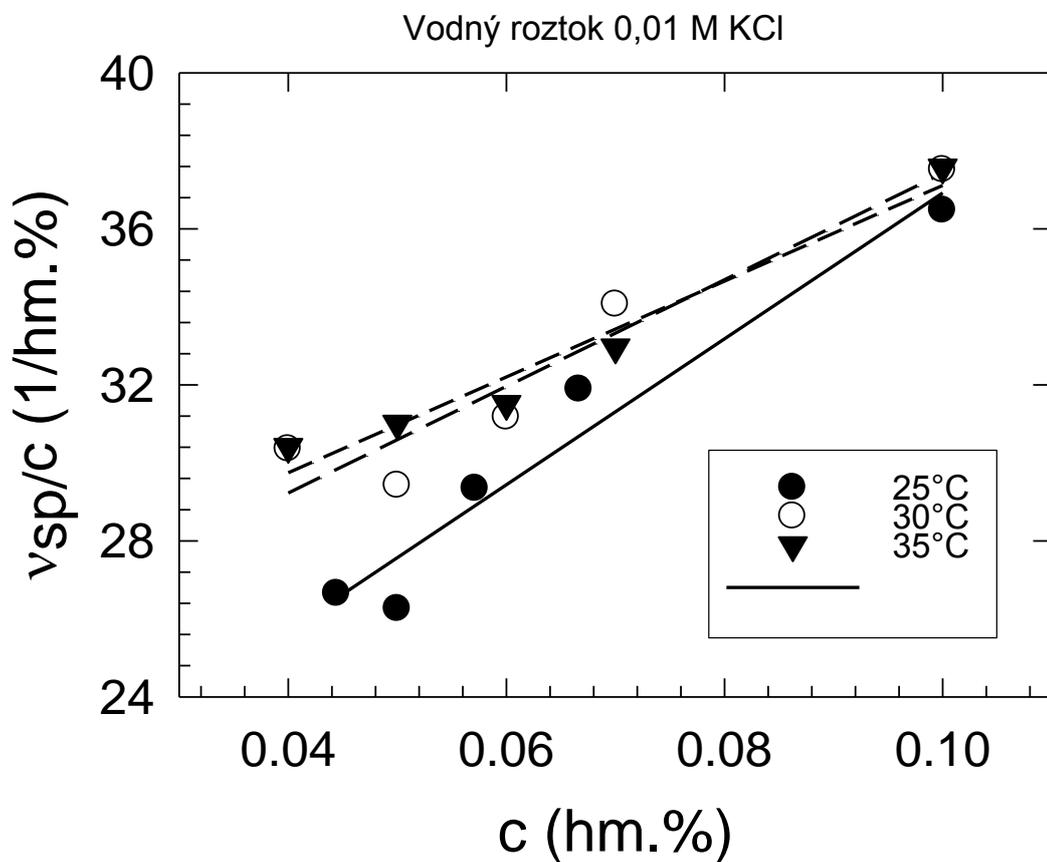
c (hm. %)	v_{sp}/c při 25°C (g/100g)	v_{sp}/c při 25°C (g/100g)	v_{sp}/c při 25°C (g/100g)
0,10	137,63	141,53	140,60
0,07	134,28	142,22	143,07
0,06	130,68	142,54	145,59
0,05	131,73	147,65	145,94
0,04	133,17	144,02	148,25



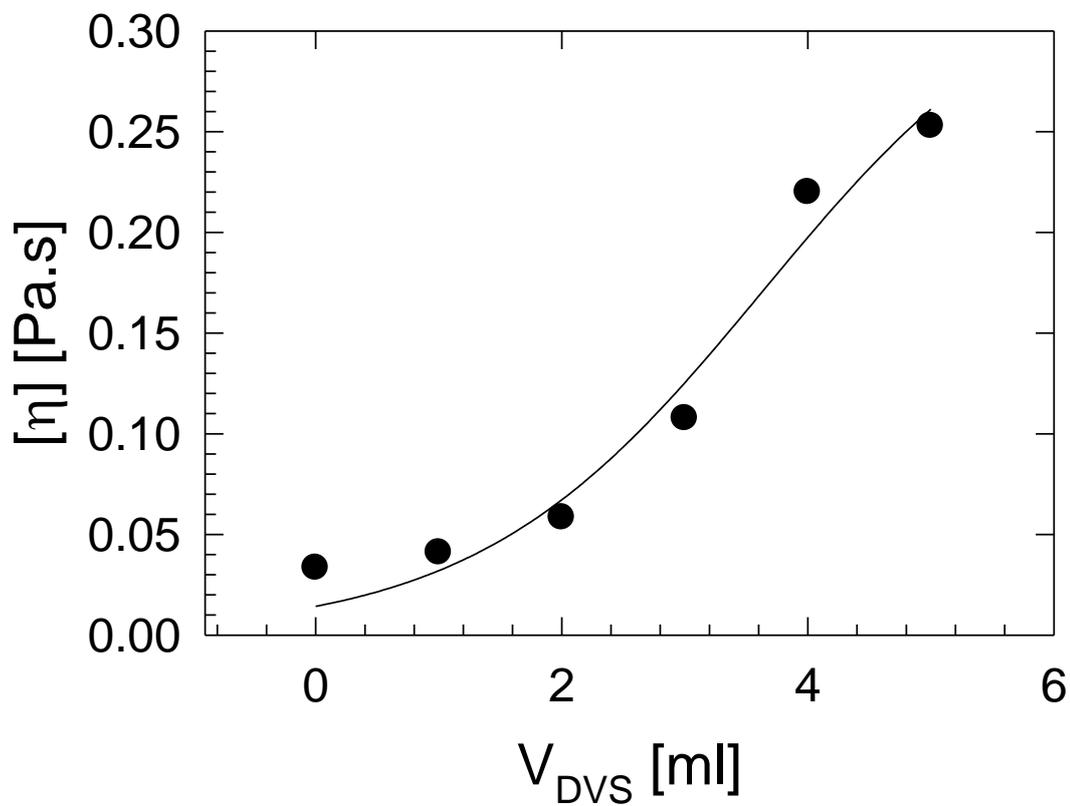
Obr. 35 - Závislost měrné kinematické viskozity/c na koncentraci (Hugginsovy rovnice) vodného roztoku sodné soli kyseliny hyaluronové při různých teplotách.

Tabulka 24 - Výsledky výpočtů specifické kinematické viskozity/c při různých teplotách pro vzorek B

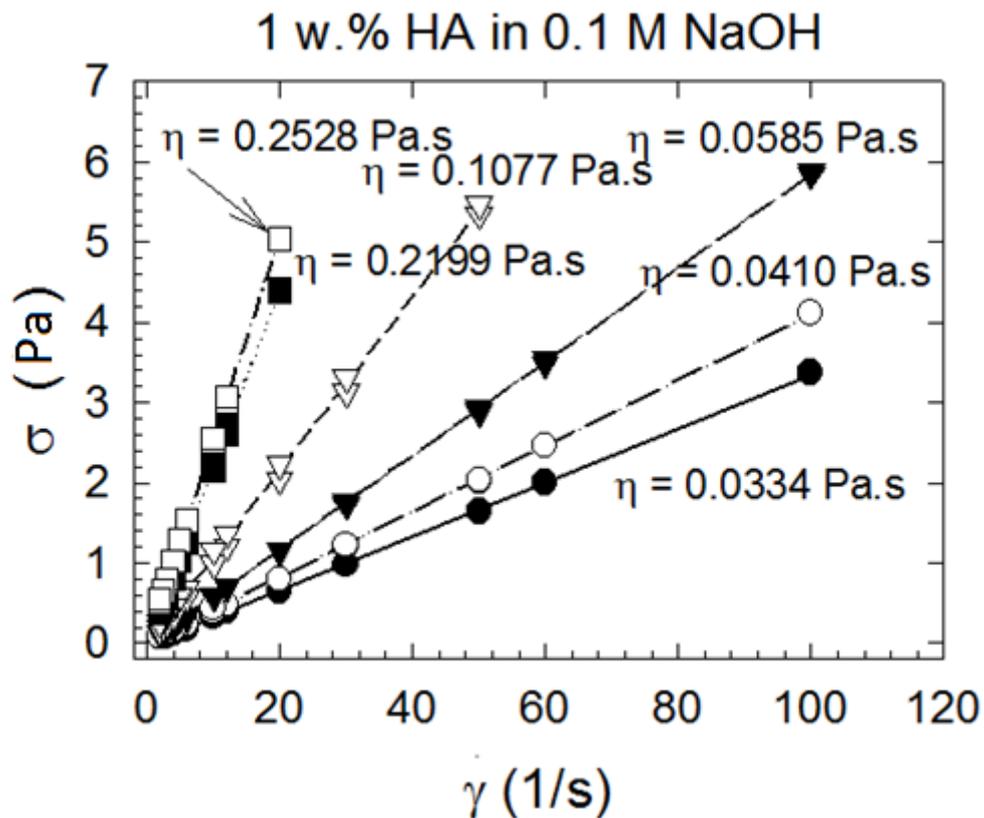
c (hm. %)	v_{sp}/c při 25°C (g/100g)	v_{sp}/c při 25°C (g/100g)	v_{sp}/c při 25°C (g/100g)
0,10	36,47	37,51	37,57
0,07	31,89	34,06	32,96
0,06	29,35	31,17	31,51
0,05	26,26	29,42	31,01
0,04	26,65	30,36	30,41



Obr. 36 - Závislost měrné kinematické viskozity/c na koncentraci (Hugginsovy rovnice) sodné soli kyseliny hyaluronové v 0,01 M KCl při různých teplotách.

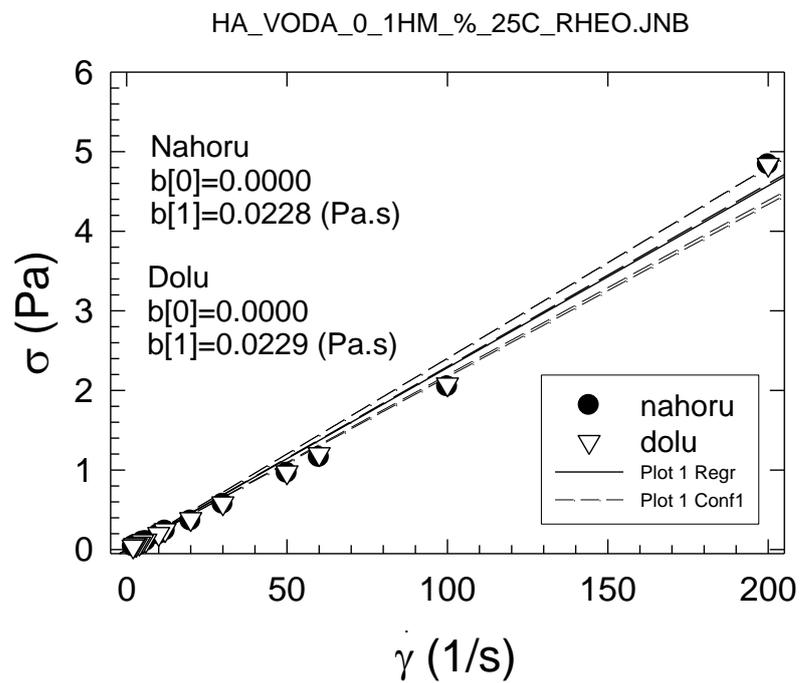


Obr. 37 - Závislost dynamické viskozity 1 hm. % roztok hyaluronátu sodného v 0,1 M NaOH.

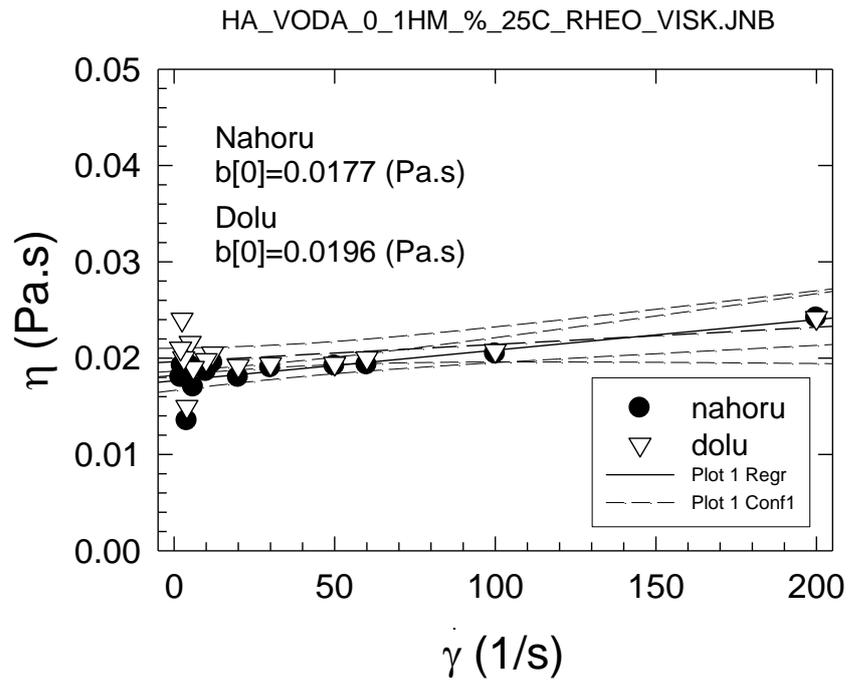


Obr. 38 - Závislost smykového napětí na smykové rychlosti 1 hm. % roztoku sodné soli kyseliny hyaluronové v 0,1 M NaOH při 25°C. Plné kolečko: bez DVS, prázdné kolečko: 1 ml DVS, plný trojúhelník: 2 ml DVS, prázdný trojúhelník: 3 ml DVS, plný čtverec: 4 ml DVS, prázdný čtverec: 5 ml DVS.

Na obr. 38 jsou vyneseny závislosti smykového napětí na smykové rychlosti pro různé stupně zesíťování studovaného roztoku hyaluronátu sodného. Z těchto závislostí jsou vypočteny dynamické viskozity studovaných roztoků. Z grafu je patrný nárůst dynamické viskozity s rostoucím stupněm zesíťování. Jak je patrné z obrázku 38 tento nárůst má nelineární charakter, charakteristický pro mikro-heterogenní průběh síťovací reakce. Z toho vyplývá, že dominantním typem reakce je intramolekulární síťování a až v druhém kroku intermolekulární síťování. Z obr. 38 je patrné, že studované roztoky nevykazují hysterezi tokových křivek.



Obr. 39 – Závislost smykového napětí na smykové rychlosti 0,1 hm. % HA



Obr. 40 - Závislost dynamické viskozity na smykové rychlosti 0,1 hm. % vodného roztoku sodné soli kyseliny hyalurónové při 25°C. Plné kolečko: ve směru vzrůstu smykové rychlosti, prázdný trojúhelník: ve směru poklesu smykové rychlosti.

ZÁVĚR

Cílem diplomové práce bylo zjištění chování hyaluronátu sodného v závislosti na teplotě, koncentraci a také zesíťování pomocí divinylsulfonu.

V teoretické části je zpracována problematika týkající se polysacharidů obecně, dále je podrobně popsána kyselina hyaluronová a její vlastnosti. Další část teoretické práce je věnována reologii a chování viskoelastických látek. V praktické části byla měřena viskozita pomocí dvou metod, proto byla v teoretické části zahrnuta i část týkající se měření viskozity.

V praktické části byla popsána detailní příprava vzorků A, B a C, které byly použity při měření. Vzorky A a B byly připraveny z hyaluronátu sodného, který byl rozpuštěn v roztoku KCl a redestilované vodě. U obou vzorků byl měřen průtokový čas na Ubbelohde viskozimetru s měnicí se koncentrací a teplotou. Oba vzorky byly od koncentrace 0,1 hm. % zředovány po hodnotu 0,04 hm. % a jejich tokové vlastnosti byly měřeny při teplotách 25, 30 a 35 °C. Následně byla vypočítána hodnota kinematické viskozity. U obou zkoumaných vzorků bylo zjištěno, že viskozita připravených roztoků klesá v závislosti na snižující se hmotnostní koncentraci a zvyšující se teplotě. Z vypočtených hodnot limitního viskozitního čísla a Hugginsovy konstanty je patrná změna rozměru makromolekulárního klubka hyaluronátu sodného vlivem teploty i iontového složení rozpouštědla. Z absolutních hodnot limitního viskozitního čísla je patrné, že k jeho nárůstu dochází s rostoucí teplotou, u obou roztoků tedy dochází ke zvětšování makromolekulárního klubka. Skoková změna interakčního parametru k_H byla zjištěna při 30°C, kdy dochází ke změně svinutí makromolekulárních klubek z konformace expandovaného klubka na zdvojenou šroubovici u vzorku A. U vzorku B je jev patrný méně neboť ionizované karboxylové skupiny hyaluronátu jsou více ionizovány v porovnání se vzorkem A. V případě vzorku A je tímto potlačen jeho polyelektrolytický charakter, který má za následek přijetí konformace méně průtočného makromolekulárního klubka.

Vzorek C byl připraven z hyaluronátu sodného a rozpuštěn v zásaditém prostředí NaOH aby bylo docíleno síťovací reakce. Vzorek byl měřen na rotačním viskozimetru, kde byla na počítači zaznamenávána jeho dynamická viskozita v závislosti na rychlosti smykové deformace a dále na závislosti přidaného síťovadla. Už při měření nezesíťovaného roztoku bylo patrné, že dynamická viskozita není závislá na rychlosti smykové deformace z čehož

je patrné, že se jedná o Newtonskou kapalinu, kdy je její viskozita nezávislá na teplotě a rychlosti smykové deformace. Dynamická viskozita má rostoucí charakter v závislosti na stupni zesíťování. Růst je nelineární což je charakteristické pro mikro-heterogenní průběh síťovací reakce. Z čehož můžeme usoudit, že dominantním typem reakce je intramolekulární síťování a až v druhém kroku intermolekulární.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] HALABALOVÁ V., Sterická exkluzní chromatografie polysacharidů a polyethylenoxidů, UFMI, UTB [online]. [cit. 2012-05-06]. Dostupný z WWW: http://ufmi.ft.utb.cz/texty/separacni_metody/SM_lab_04a.pdf
- [2] *Carbohydrates, lipids and proteins*. [online]. [2012-08-15]. Dostupný z WWW: http://www.tokresource.org/tok_classes/biobiobio/biomenu/carbs_lipids_proteins/index.htm
- [3] BARTOVSKÁ L., ŠIŠKOVÁ M., *Fyzikální chemie povrchů a koloidních soustav*. Vydavatelství VŠCHT 2005, Praha. ISBN 80-7080-579-X.
- [4] *Wikipedia: internetová encyklopedie*. [online]. [2012-08-14]. Dostupný z WWW: <http://en.wikipedia.org/wiki/Polysaccharide>
- [5] ČERNÝ M., TRNKA T., BUDĚNŠÍNSKÝ M., *Sacharidy*. Vydavatelství ČSCH 2010, Praha. ISBN 978-80-86238-81-4.
- [6] *Wikipedia: internetová encyklopedie*. [online]. [2012-07-15]. Dostupný z WWW: http://cs.wikipedia.org/wiki/Kyselina_hyaluronov%C3%A1
- [7] *Kyselina hyaluronová*. [online]. [2012-07-15]. Dostupný z WWW: <http://www.contipro.com/cs/o-kyseline-hyaluronove>
- [8] DRNOVSKÁ H., LAPCIK L. Jr., *Plasty a kaučuk*. VUT 1999, Praha. ISBN 80-85009-36-6.
- [9] *What is hyaluronic acid?* [online]. [2012-07-16]. Dostupný z WWW: <http://www.madsci.org/posts/archives/2001-04/986571103.Bc.r.html>
- [10] LAPČÍK L., RAAB M.: *Nauka o materiálech II*. UTB – Academia centrum, Zlín 2004. ISBN: 80-7318-229-7.
- [11] DRNOVSKÁ H., LAPCIK L. Jr., *Hyaluronate derivatives and their applications*. VUT 1999, Brno. ISBN 80-214-1371-9.
- [12] *Structural Analysis and Mechanical Characterization of Hyaluronic Acid-Based Doubly Cross-Linked Networks*. [online]. [2012-06-25]. Dostupný z WWW: <http://ukpmc.ac.uk/articles/PMC2636963/>
- [13] *Hyiodine*. [online]. [2012-07-16]. Dostupný z WWW: <http://www.hyiodine.cz/about-hyiodine>

- [14] *Kontaktní čočky – kyselina hyaluronová* [online]. [2012-07-19]. Dostupný z WWW:
<http://www.cocky-kontaktni.cz/informace/kyselina-hyaluronova.html>
- [15] *Hyaluronic acid krém.* [online]. [2012-07-19]. Dostupný z WWW:
<http://salonbelleza.cz/eshop/cs/hyaluronic-acid-pece-o-plet-s-viditelnymi-znamkami-starnuti/198-hyaluronic-acid-krem.html>
- [16] HAUSNEROVÁ B., *Fyzika polymerů.* [online]. [2012-05-12]. Dostupný z WWW:
http://ufmi.ft.utb.cz/index.php?page=fyzika_pol
- [17] MEISSNER B., *Fyzikální vlastnosti polymerů.* Vydavatelství VŠCHT 1971. SNTL
- [18] MEISSNER B., ZILVAR V., *Fyzika polymerů.* Vydavatelství SNTL 1987, Praha.
- [19] *Kyselina hyaluronová.* [online]. [2012-07-19]. Dostupný z WWW:
<http://www.viscoderm.cz/viscoderm/index.php?mid=1>
- [20] *Měření viskozity.* [online]. [2012-07-02]. Dostupný z WWW:
http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_es-001/hesla/mereni_viskozity.html
- [21] WEIN O., *Úvod do reologie.* Vydavatelství Malé Centrum 1996, Brno.
- [22] *CS NORMY.* [online]. [2012-07-19]. Dostupný z WWW:
<http://www.csnormy.cz/norma/43619>
- [23] *Stanovení viskozity roztoků.* [online]. [2012-07-19]. Dostupný z WWW:
http://www.vscht.cz/met/stranky/vyuka/labcv/labor/res_stanoveni_viskozity_roztku/teorie.htm

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

a	konstanta pro dvojici polymer-rozpouštědlo
A	plocha[m ²]
c	koncentrace, [mol/l]
ČSN	Československá norma
De	debořino číslo
DVS	divynylsulfon
EN	evropská norma
E	aktivační energie
F	síla [N]
G	smykový modul
ITT	index toku taveniny
ISO	International Standard Organization
k	konstanta přístroje,
K	konstanta pro dvojici polymer-rozpouštědlo
KCl	chlorid draselná
L	délka kapiláry[m]
M	krouticí moment,
m	hmotnost, [kg]
M	molární hmotnost[kg.mol ⁻¹]
MVR	objemový index toku taveniny
MFR	hmotnostní index toku taveniny
NaOH	hydroxid sodný
Δp	tlakový spád v kapiláře, [Pa]
Q	objemový průtok v kapiláře, [m ³ .s ⁻¹]
R	poloměr kapiláry[m]

R	plynová konstanta,
T _g	teplota skelného přechodu [°C]
T	teplota[°C]
u, u'	rychlost pádu kuličky, [m.s-1]
V	objem, [m ³]
WLF	Williams–Landel–Ferry rovnice
τ	tečné napětí [Pa]
γ	smyková rychlost [s-1]
σ	smykové napětí [Pa]
η	dynamická viskozita [Pa.s]
ø	průměr
λ	charakteristický symbol materiálu vyjadřující schopnost molekulárního přeskupování,
Θ	doba pozorování [s]
η ₀	newtonská viskozita,
η	viskozita při teplotě T,
φ	úhel pootočení válce, [o]
ω	úhlová rychlost vnějšího válce[rad.s-1]
ω	úhlová rychlost na poloměru r
ρ _k	hustota kuličky,[kg.m-3]
τ	doba průchodu kuličky mezi dvěma ryskami[s]

SEZNAM OBRÁZKŮ

<i>Obr. 1 – Přírodní polysacharid [2].</i>	12
<i>Obr. 2 – 3D schéma celulózy a beta-glukanu [3].</i>	13
<i>Obr. 3 – Schéma monomerní jednotky HA [9].</i>	15
<i>Obr. 4 – Reakce HA za přítomnosti aktivátoru karbodiimidu [11].</i>	21
<i>Obr. 5 – Chloramfenikol kovalentně vázaný na karboxylovou skupinu HA [11].</i>	22
<i>Obr. 6 – Síťování pomocí 1,2,3,4 diepoxybutanu [11].</i>	23
<i>Obr. 7 – Síťování pomocí DVS [12].</i>	23
<i>Obr. 8 – Síťování formaldehydem [11].</i>	24
<i>Obr. 9 – Výrobek z kyseliny hyaluronové [15].</i>	25
<i>Obr. 10. Elastický model pevné látky [16].</i>	26
<i>Obr. 11. Viskózní model tekutiny [16].</i>	26
<i>Obr. 12. Deformační chování polymerních tavenin (sériový model) [16].</i>	27
<i>Obr. 13. Model reologického chování během smykového namáhání [16].</i>	28
<i>Obr. 14. Viskozita newtonských látek jako veličina nezávislá na rychlosti smykové deformace [16].</i>	28
<i>Obr. 15. Viskozita newtonských látek jako veličina nezávislá na teplotě [16].</i>	29
<i>Obr. 16. Toková křivka polymerních látek [16].</i>	29
<i>Obr. 17. Kelvinův model [16].</i>	31
<i>Obr. 18. Maxwellův model [16].</i>	31
<i>Obr. 19. Tucketův model [16].</i>	32
<i>Obr. 20 – Závislost viskozity na čase [16].</i>	34
<i>Obr. 21 – Rychlost smykové deformace pro zpracovatelské procesy [16].</i>	35
<i>Obr. 22 – Rotační viskozimetr a) s otáčivým vnitřním válcem, b) s otáčivým vnějším válcem [20].</i>	36
<i>Obr. 23 – Rotační viskozimetr a) s otáčivým kuželem, b) s otáčivou deskou [20].</i>	37
<i>Obr. 24 – Viskozimetr deska-deska [16].</i>	37
<i>Obr. 25 – Kapilární viskozimetr [16].</i>	38
<i>Obr. 26 – Höpplerův viskozimetr [20].</i>	39
<i>Obr. 27 - Strukturní vzorec divinylsulfonu</i>	42
<i>Obr. 28 – Vzorek na magnetickém míchadle.</i>	43
<i>Obr. 29 – Vzorky.</i>	43
<i>Obr. 30 – Ubbelohde viskozimetr se skleněným držákem a termostatem.</i>	45

<i>Obr. 31 – Visco Tester 6L</i>	48
<i>Obr. 32 – Schéma kapilárního viskozimetru [23]</i>	49
<i>Obr. 33 - Teplotní závislost Hugginsovy konstanty pro 0,1 hm. % hyaluronátu sodného ve vodném roztoku (plné kolečko) a v roztoku 0,01M KCl (prázdné kolečko)</i>	58
<i>Obr. 34 - Teplotní závislost limitního viskozitního čísla pro 0,1 hm. % hyaluronátu sodného ve vodném roztoku (plné kolečko) a v roztoku 0,01M KCl (prázdné kolečko)</i>	58
<i>Obr. 35 - Závislost měrné kinematické viskozity/c na koncentraci (Hugginsovy rovnice) vodného roztoku sodné soli kyseliny hyaluronové při různých teplotách</i>	59
<i>Obr. 36 - Závislost měrné kinematické viskozity/c na koncentraci (Hugginsovy rovnice) sodné soli kyseliny hyaluronové v 0,01 M KCl při různých teplotách</i>	60
<i>Obr. 37 - Závislost dynamické viskozity 1 hm. % roztok hyaluronátu sodného v 0,1 M NaOH</i>	61
<i>Obr. 38 - Závislost smykového napětí na smykové rychlosti 1 hm. % roztoku sodné soli kyseliny hyaluronové v 0,1 M NaOH při 25°C. Plné kolečko: bez DVS, prázdné kolečko: 1 ml DVS, plný trojúhelník: 2 ml DVS, prázdný trojúhelník: 3 ml DVS, plný čtverec: 4 ml DVS, prázdný čtverec: 5 ml DVS</i>	62
<i>Obr. 39 – Závislost smykového napětí na smykové rychlosti 0,1 hm. % HA</i>	63
<i>Obr. 40 - Závislost dynamické viskozity na smykové rychlosti 0,1 hm. % vodného roztoku sodné soli kyseliny hyaluronové při 25°C. Plné kolečko: ve směru vzrůstu smykové rychlosti, prázdný trojúhelník: ve směru poklesu smykové rychlosti</i>	64

SEZNAM TABULEK

<i>Tabulka 1 - Hyaluronát sodný</i>	<i>41</i>
<i>Tabulka 2 - Divinylsulfon.....</i>	<i>42</i>
<i>Tabulka 3 - Technická specifikace Ubbelohde viskozimetru.</i>	<i>45</i>
<i>Tabulka 4 - Zředění vzorků.</i>	<i>46</i>
<i>Tabulka 5 - Technická specifikace Visco Tester 6L.</i>	<i>47</i>
<i>Tabulka 6 – Naměřené hodnoty a vypočítané viskozity pro koncentraci 0,1 hm. % HA v 0,01M KCl.....</i>	<i>50</i>
<i>Tabulka 7 - Naměřené hodnoty a vypočítané viskozity pro koncentraci 0,07 hm. % HA v 0,01M KCl.....</i>	<i>50</i>
<i>Tabulka 8 – Naměřené hodnoty a vypočítané viskozity pro koncentraci 0,06 hm. % HA v 0,01M KCl.....</i>	<i>50</i>
<i>Tabulka 9 - Naměřené hodnoty a vypočítané viskozity pro koncentraci 0,05 hm. % HA v 0,01M KCl.....</i>	<i>51</i>
<i>Tabulka 10 - Naměřené hodnoty a vypočítané viskozity pro koncentraci 0,04 hm. % HA v 0,01M KCl.....</i>	<i>51</i>
<i>Tabulka 11 - Naměřené hodnoty a vypočítané viskozity pro koncentraci 0,1 hm. % HA v H₂O.....</i>	<i>51</i>
<i>Tabulka 12 - Naměřené hodnoty a vypočítané viskozity pro koncentraci 0,07 hm. % HA v H₂O.....</i>	<i>52</i>
<i>Tabulka 13 - Naměřené hodnoty a vypočítané viskozity pro koncentraci 0,06 hm. % HA v H₂O.....</i>	<i>52</i>
<i>Tabulka 14 - Naměřené hodnoty a vypočítané viskozity pro koncentraci 0,05 hm. % HA v H₂O.....</i>	<i>52</i>
<i>Tabulka 15 - Naměřené hodnoty a vypočítané viskozity pro koncentraci 0,04 hm. % HA v H₂O.....</i>	<i>53</i>
<i>Tabulka 16 – 1hm.% HA v 0,1M NaOH</i>	<i>53</i>
<i>Tabulka 17 – 1hm.% HA v 0,1M NaOH síťovaný 1ml DVS</i>	<i>54</i>
<i>Tabulka 18 – 1hm.% HA v 0,1M NaOH síťovaný 2 ml DVS</i>	<i>54</i>
<i>Tabulka 19 - 1hm.% HA v 0,1M NaOH síťovaný 3 ml DVS.....</i>	<i>55</i>
<i>Tabulka 20 - 1hm.% HA v 0,1M NaOH síťovaný 4 ml DVS.....</i>	<i>55</i>
<i>Tabulka 21 - 1hm.% HA v 0,1M NaOH síťovaný 3 ml DVS.....</i>	<i>56</i>
<i>Tabulka 22 – Vypočítané limitní viskozitní čísla a Hugginsovy konstanty.....</i>	<i>57</i>

<i>Tabulka 23 – Výsledky výpočtů specifické kinematické viskozity/c při různých teplotách pro vzorek A.....</i>	<i>59</i>
<i>Tabulka 24 - Výsledky výpočtů specifické kinematické viskozity/c při různých teplotách pro vzorek B.....</i>	<i>60</i>

SEZNAM PŘÍLOH

PŘÍLOHA P I: ZÁVISLOST SMYKOVÉHO NAPĚTÍ NA SMYKOVÉ RYCHLOSTI BEZ DVS.

PŘÍLOHA P II: ZÁVISLOST SMYKOVÉHO NAPĚTÍ NA SMYKOVÉ RYCHLOSTI S 1ML DVS.

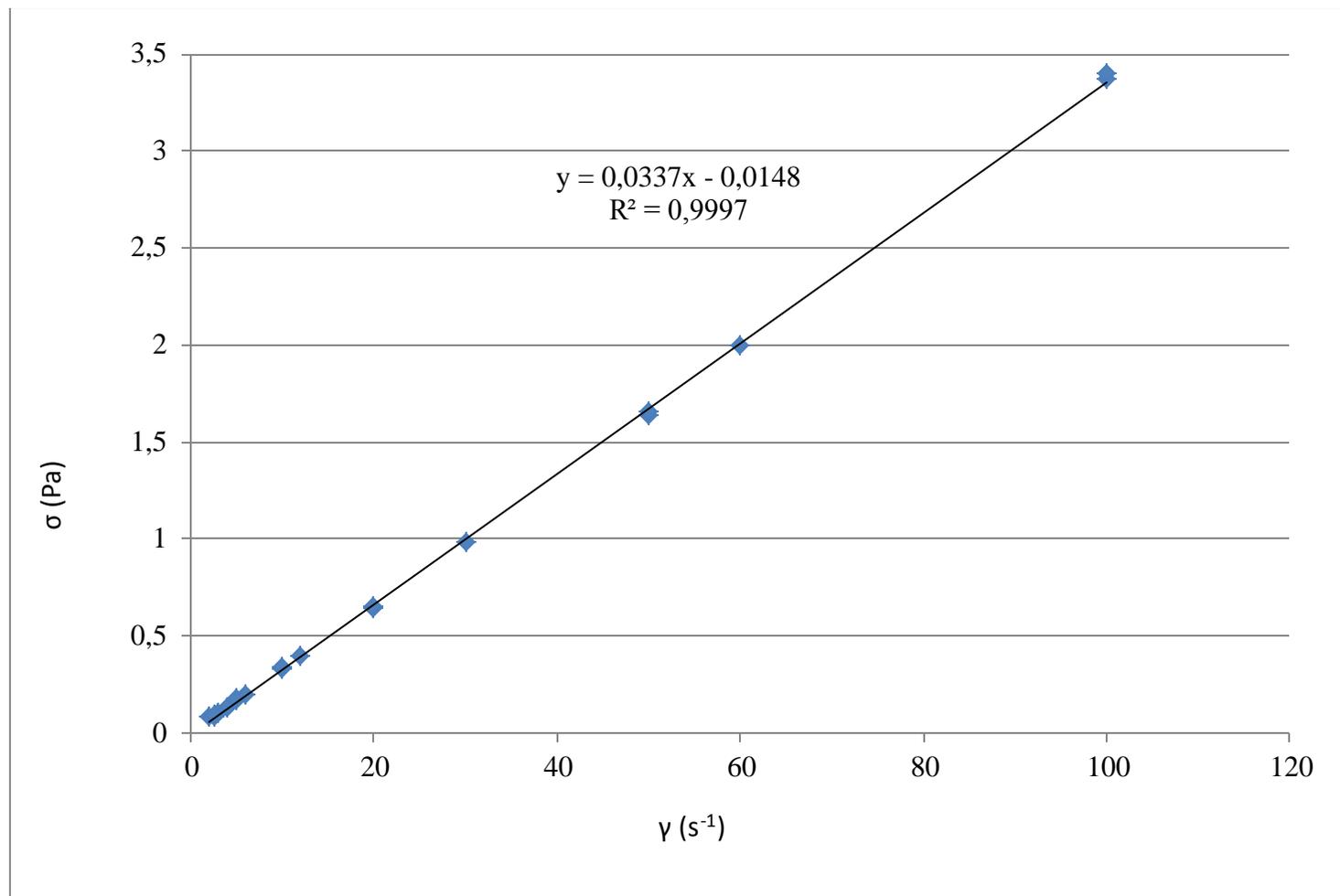
PŘÍLOHA P III: ZÁVISLOST SMYKOVÉHO NAPĚTÍ NA SMYKOVÉ RYCHLOSTI S 2ML DVS.

PŘÍLOHA P IV: ZÁVISLOST SMYKOVÉHO NAPĚTÍ NA SMYKOVÉ RYCHLOSTI S 3ML DVS.

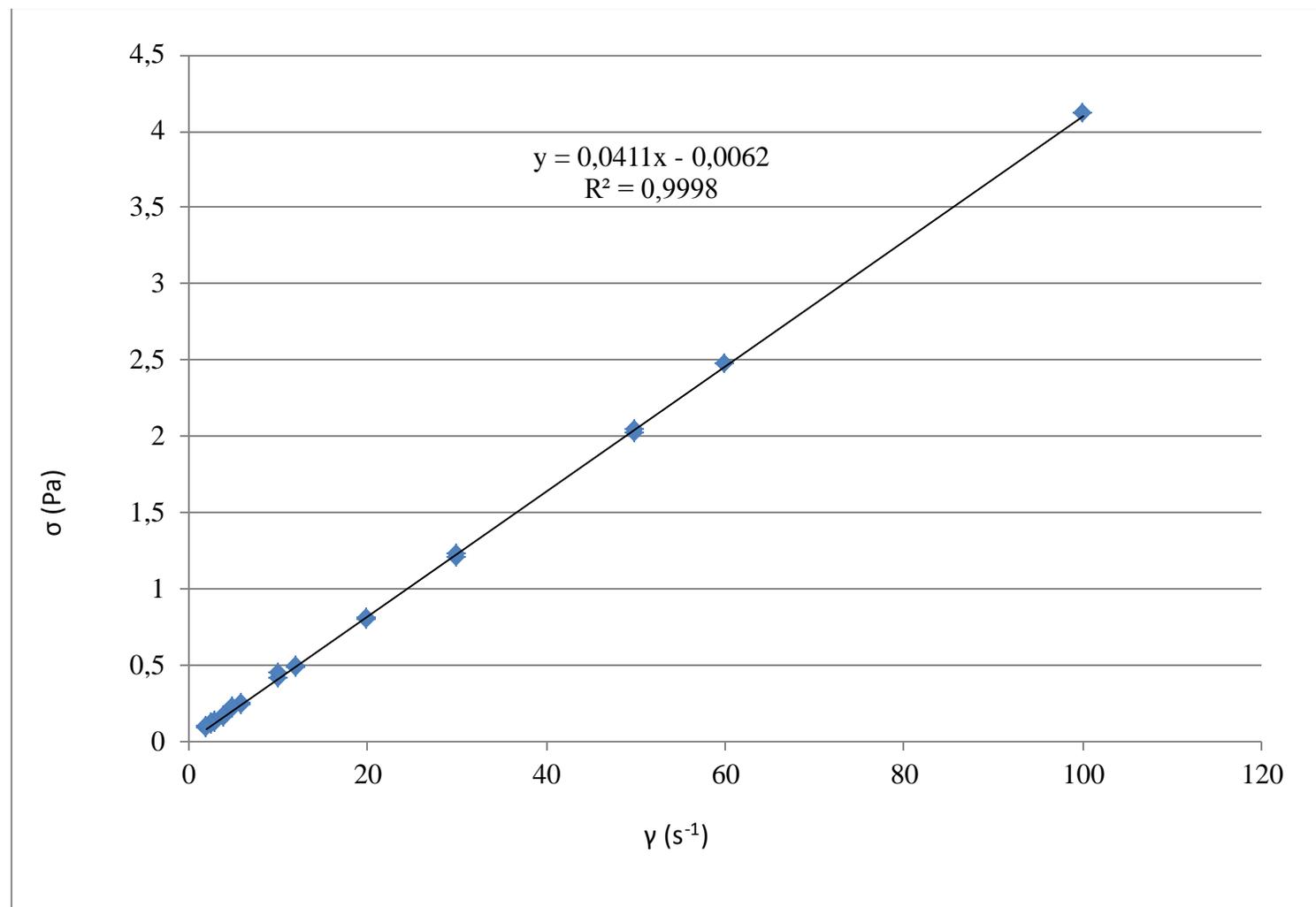
PŘÍLOHA P V: ZÁVISLOST SMYKOVÉHO NAPĚTÍ NA SMYKOVÉ RYCHLOSTI S 4ML DVS.

PŘÍLOHA P VI: ZÁVISLOST SMYKOVÉHO NAPĚTÍ NA SMYKOVÉ RYCHLOSTI S 5ML DVS.

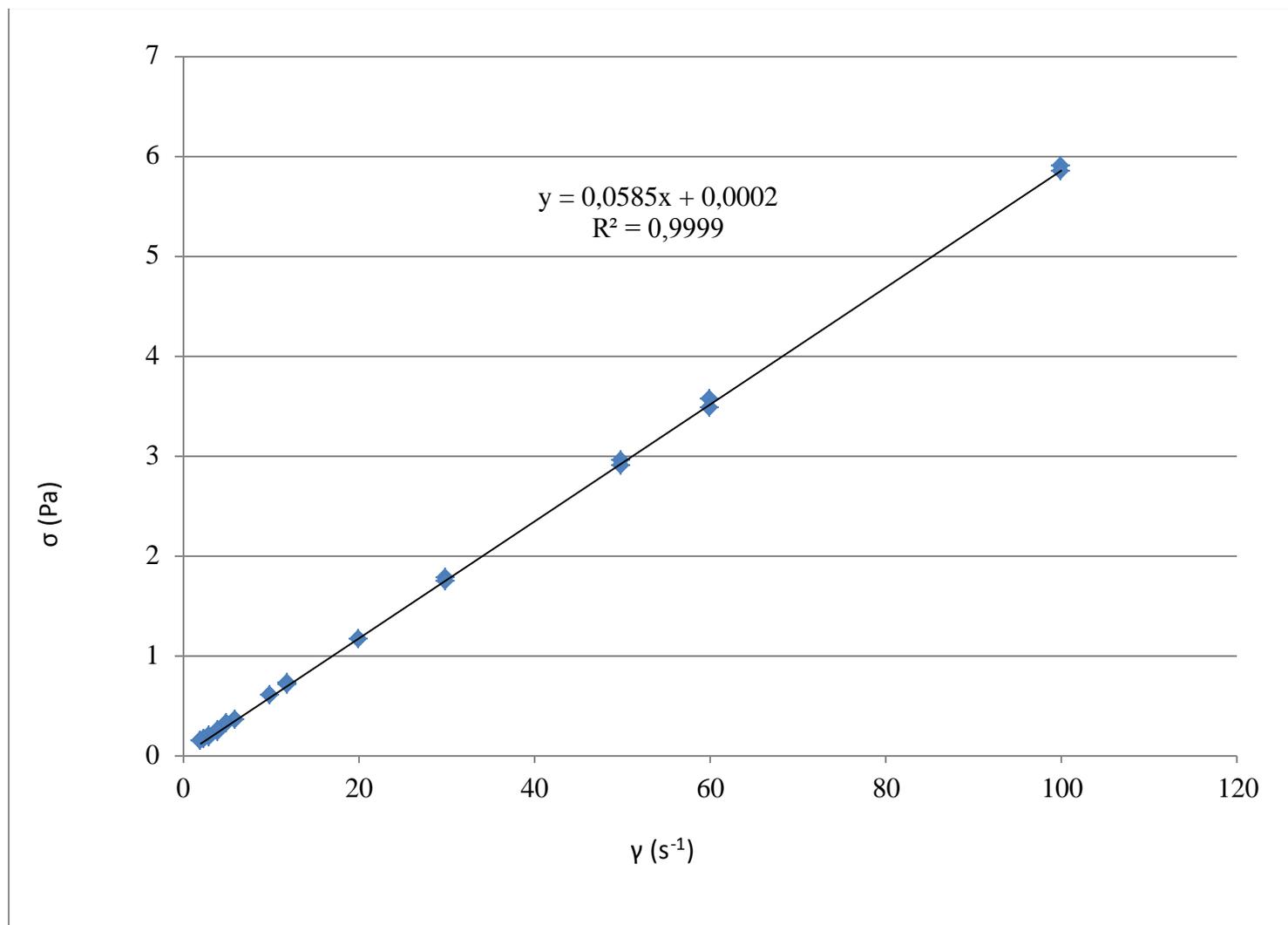
PŘÍLOHA PI: ZÁVISLOST SMYKOVÉHO NAPĚTÍ NA SMYKOVÉ RYCHLOSTI BEZ DVS.



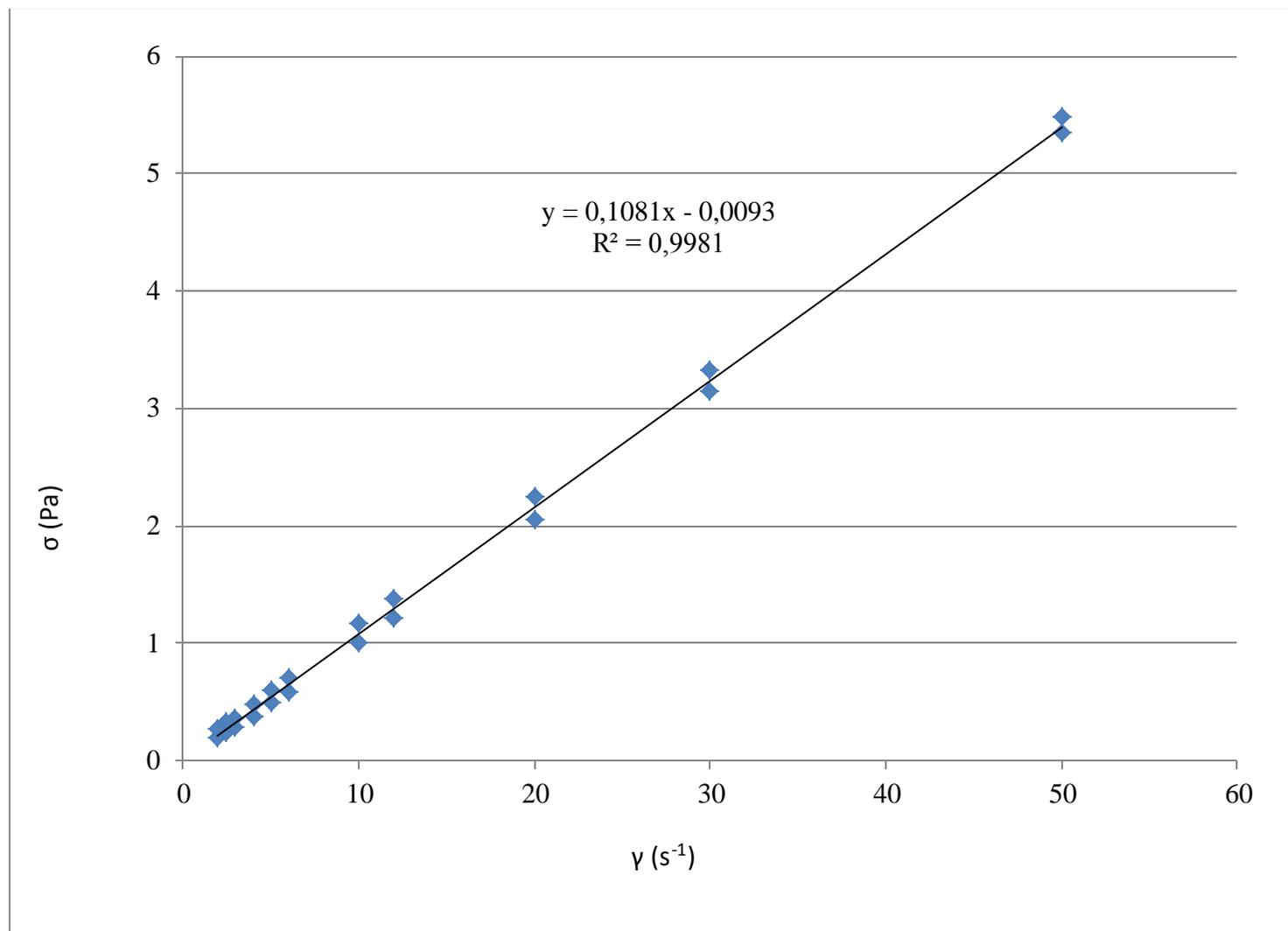
PŘÍLOHA P II: ZÁVISLOST SMYKOVÉHO NAPĚTÍ NA SMYKOVÉ RYCHLOSTI 1ML DVS.



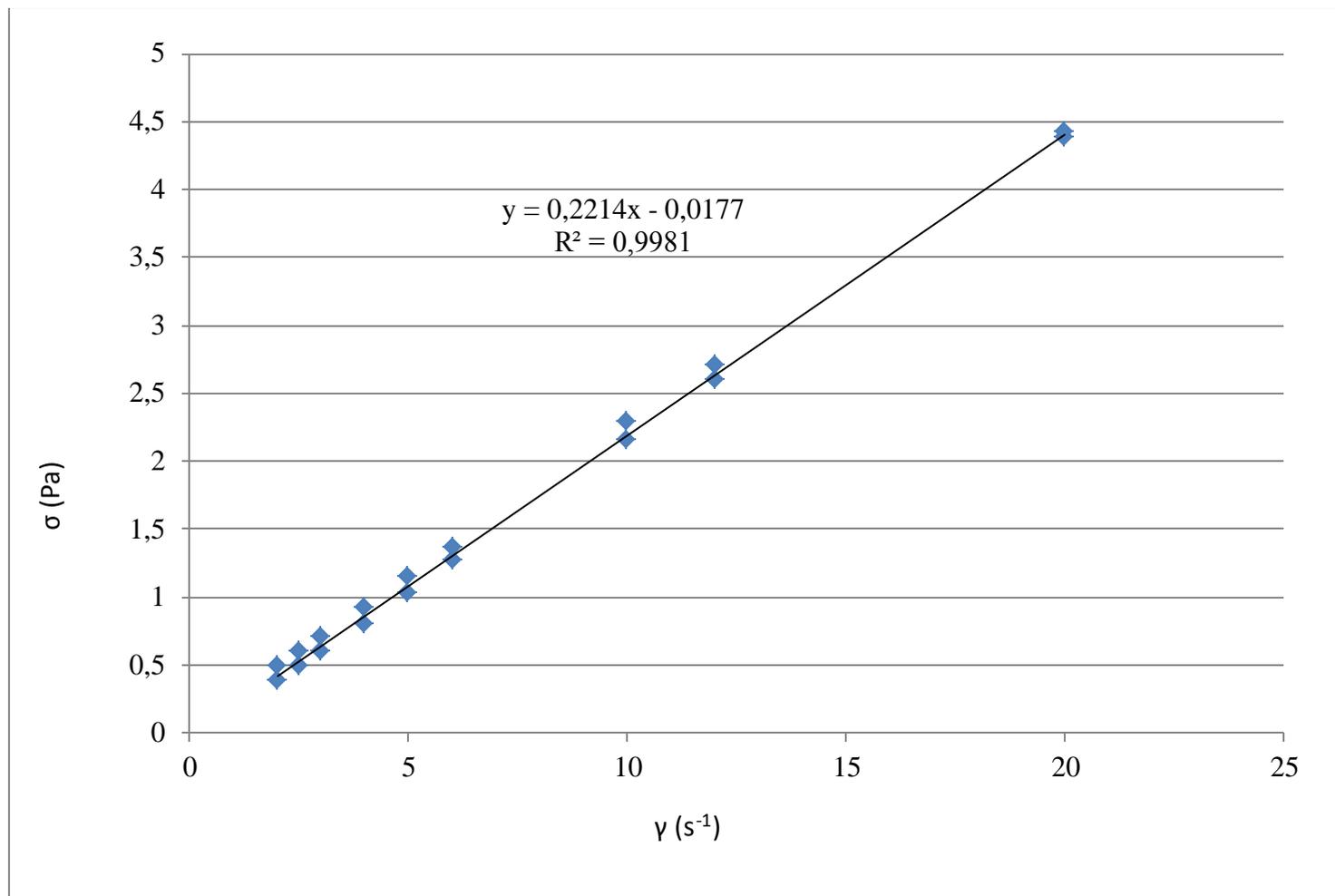
PŘÍLOHA P III: ZÁVISLOST SMYKOVÉHO NAPĚTÍ NA SMYKOVÉ RYCHLOSTI S 2ML DVS.



PŘÍLOHA P IV: ZÁVISLOST SMYKOVÉHO NAPĚTÍ NA SMYKOVÉ RYCHLOSTI S 3ML DVS.



PŘÍLOHA P V: ZÁVISLOST SMYKOVÉHO NAPĚTÍ NA SMYKOVÉ RYCHLOSTI 4ML DVS.



PŘÍLOHA P VI: ZÁVISLOST SMYKOVÉHO NAPĚTÍ NA SMYKOVÉ RYCHLOSTI S 5ML DVS.

