

Měření viskozity zředěných roztoků hyaluronanu

Jan Trávníček

Bakalářská práce
2015



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

Fakulta technologická

Ústav fyziky a mater. inženýrství

akademický rok: 2014/2015

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Jan Trávníček**
Osobní číslo: **T12331**
Studijní program: **B2808 Chemie a technologie materiálů**
Studijní obor: **Materiálové inženýrství**
Forma studia: **prezenční**

Téma práce: **Měření viskozity zředěných roztoků hyaluronanu**

Zásady pro vypracování:

1. Nejprve vypracujte rešerši zaměřenou na základní vlastnosti a chování hyaluronanu ve zředěných roztocích, kde je rozpouštědlem demineralizovaná voda. Zaměřte se především na podstatu chování polymerních klubek z hlediska primární, sekundární a terciární struktury makromolekuly hyaluronanu. Dále teoretickou studii zaměřte na iontové roztoky polysacharidů a hyaluronanu, zejména na ionty z Hofmeisterovy řady.
2. V praktické části proveďte viskozimetrická měření zředěných roztoků hyaluronanu na Ubbelohdeho viskozimetru a jejich diskuzi.


Rozsah bakalářské práce:
Rozsah příloh:
Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**
Seznam odborné literatury: **viz příloha**

Vedoucí bakalářské práce: **doc. Mgr. Aleš Mráček, Ph.D.**
Ústav fyziky a mater. inženýrství
Datum zadání bakalářské práce: **16. ledna 2015**
Termín odevzdání bakalářské práce: **22. května 2015**

Ve Zlíně dne 10. února 2015


doc. Ing. Roman Čermák, Ph.D.
děkan




doc. Mgr. Aleš Mráček, Ph.D.
ředitel ústavu

Příloha zadání bakalářské práce

Seznam odborné literatury:

1. Kogan G. Šoltés, L., Stern R., Mendichi R. Hyaluronic acid: a biopolymer With versatile physico-chemical and biological properties. Chapter 31-Handbook 2007, ISBN:978-1-60021-652-0.
2. Scott J.E., Cummings C., Brass A., Chen Y. Secondary and tertiary structures of hyaluronan in aqueous solution, investigated by rotary shadowing-electron microscopy and computer simulation. *Biochem. J.* 1991, 274, ps: 600-705.
3. Laurent T.C., Laurent U.B.G., Fraser J.R.E. The structure and function of hyaluronan: An overview. *Immun Cell Biol* 1996, 74: A1-A7.
4. Heatley F., Scott J. E.: A water molecule participates in the secondary structure of hyaluronan. *Biochem. J.* (1998) 254, 489-493.
5. Scott J. E., Supramolecular organisation of extracellular matrix glycosaminoglycans, in vitro and in the tissues. *FASEB Journal*, 6, 2639-2645.
6. Scott J.E., Cummings C., Brass A. Chen Y.: Secondary and tertiary structures of hyaluronan in aqueous solutions, investigated by rotary shadowing-electron microscopy and computer simulation. Hyaluronan is very efficient network-forming polymer. *Biochemical Journal*, 274 (3), 699-705.
7. Cowman M. K., Matsuoka S.. Experimental approaches to hyaluronan structure. *Carbohydrate Research*. 2005, 340, ps: 791-809.
8. Gřundělová, L., Mráček, A., Kašpárková, V., Minařík, A., Smolka, P.: The hyaluronan chain-chain interactions, conformations and coils size in solutions with quaternary salt. *Carbohydrate Polymers*, 98 1039-1044 (2013).
9. Mráček, A., Varhaníková, J., Gřundělová, L., Pokopcová, A., Lehocký, M., Velebný, V.: The influence of Hofmeister series ions on Hyaluronan swelling and viscosity. *Molecules*, 13 1025-1034 (2008).

PROHLÁŠENÍ AUTORA BAKALÁŘSKÉ/DIPLOMOVÉ PRÁCE

Beru na vědomí, že

- odevzdáním bakalářské/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 bakalářská/diplomová práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému a bude dostupná k nahlédnutí;
- na moji bakalářskou/diplomovou 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⁾;
- 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;
- podle § 60 ³⁾ odst. 2 a 3 mohu užít své dílo – bakalářskou/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);
- pokud bylo k vypracování bakalářské/diplomové práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tj. k nekomerčnímu využití), nelze výsledky bakalářské/diplomové práce využít ke komerčním účelům.

Ve Zlíně
22.5.2015

Jana Trávníček

J. Trávníček

Jméno, příjmení, podpis

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, § 47b Zveřejňování závěrečných prací:

(1) Vysoká škola nevýdělečně 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 výtisky, 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 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 jim dosaženého v souvislosti s užitím díla či poskytnutím licence podle odstavce 2 přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložily, a to podle okolností až do jejich skutečné výše; přitom se přihlídí k výši výdělku dosaženého školou nebo školským či vzdělávacím zařízením z užití školního díla podle odstavce 1.

ABSTRAKT

Tato bakalářská práce se zabývá měřením viskozity zředěných roztoků sodné soli kyseliny hyaluronové (hyaluronanu) s využitím kapilárního Ubbelohdeho viskozimetru. Předložená práce popisuje chování polymerních klubek samotného hyaluronanu ve vodě, ale i v prostředí zvolených solí z Hoffmeisterovy řady iontů z pohledu primární, sekundární a terciární struktury.

Klíčová slova: hyaluronová kyselina, viskozita, polymerní klubka, Hofmeisterova řada iontů.

ABSTRACT

This bachelor thesis is focused on viscosity measurements of sodium salt hyaluronic acid (Hyaluronan) diluted solutions. These measurements are performed on Ubbelohde's viscometer. The thesis describes hyaluronan coils properties in water solutions with salts from Hofmeister's series and discussed its influence on primary, secondary and tertiary structure.

Keywords: hyaluronan acid, viscosity, polymer's coils, Hofmeister series of ions.

PODĚKOVÁNÍ

Rád bych poděkoval svému vedoucímu bakalářské práce doc. Mgr. Aleši Mráčkovi, PhD. a Ing. Lence Gřundělové, PhD. za poskytnutí veškerých podkladů a literatury ke zpracování této bakalářské práce. Dále jim chci poděkovat za výklad ohledně problematiky tématu této práce a zaučení s měřením na Ubbelohdeho viskozimetru.

OBSAH

ÚVOD	9
I TEORETICKÁ ČÁST	10
1 KYSELINA HYALURONOVÁ	11
1.1 HISTORIE HA	11
1.2 ZÁKLADNÍ VLASTNOSTI.....	12
1.3 VÝSKYT HA V ŽIVÝCH ORGANISMECH.....	12
1.3.1 Hyaladheriny	13
1.3.2 Extracelulární matrix.....	13
1.3.3 Intracelulární matrix.....	13
1.3.4 Glykokalyx	13
1.4 ZPŮSOBY ZÍSKÁVÁNÍ HA Z ŽIVÝCH TKÁNÍ	14
1.5 STRUKTURA HA.....	14
1.5.1 Historický pohled do struktury HA.....	14
1.5.2 Primární struktura HA.....	15
1.5.3 Vodíkové můstky a vazby s vodou v řetězci HA	16
1.5.4 Sekundární struktura HA.....	16
1.5.5 Struktura HA ve zředěných roztocích ve vodném prostředí	17
2 HOFMEISTEROVA ŘADA (SÉRIE) IONTŮ	23
2.1 HISTORICKÝ POHLED.....	23
2.2 ROZDĚLENÍ HOFMEISTEROVY ŘADY IONTŮ	23
2.3 INTERAKCE IONTŮ Z HOFMEISTEROVY ŘADY S VODOU	24
2.4 EFEKT IONTŮ NA INTERAKCE PROTEIN-VODA	26
2.5 VLIV NĚKTERÝCH IONTŮ Z HOFMEISTEROVY ŘADY NA HA.....	27
3 VISKOZITA	28
3.1 TEORIE	28
3.2 NEWTONSKÉ A NENEWTONSKÉ CHOVÁNÍ TEKUTIN	28
3.2.1 Newtonské chování tekutin	28
3.2.2 Nenevtonské chování tekutin	29
3.3 MĚŘENÍ VISKOZITY	30
3.4 UŽÍVANÉ TYPY VISKOZIT PŘI MĚŘENÍ HA.....	31
3.5 TYPY ROZPOUŠTĚDEL.....	32
II PRAKTICKÁ ČÁST	34
4 MĚŘENÍ VISKOZITY HA	35
4.1 ÚVOD	35
4.2 MĚŘENÍ VISKOZITY HA VE VODĚ A ROZPOUŠTĚDLECH Z HOFMEISTEROVY ŘADY.....	35
4.2.1 Použité materiály a příprava vzorků.....	35
4.2.2 Výsledky a diskuze	38
4.2.2.1 Měření viskozity HA ve vodě viskozimetrem typu II	38
4.2.2.2 Měření viskozity HA ve vodě viskozimetrem typu 0a	39
4.2.2.3 Měření viskozity HA s Na ₂ SO ₄	40
4.2.2.4 Měření viskozity HA s (NH ₄) ₂ SO ₄	41

4.2.2.5	Měření viskozity HA s NaSCN	42
4.2.2.6	Měření viskozity HA s NH ₄ SCN	43
4.2.2.7	Měření viskozity HA s NaCl	44
5	POROVNÁNÍ VŠECH SOLÍ Z HOFMEISTEROVY ŘADY IONTŮ.....	45
5.1	GRAFY A TABULKY.....	45
5.2	DISKUZE.....	46
	ZÁVĚR	48
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	49
	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....	53
	SEZNAM OBRÁZKŮ	55
	SEZNAM TABULEK.....	56
	SEZNAM PŘÍLOH.....	57
	PŘÍLOHA P I: UBBELOHDEHO VISKOZIMETR S MĚŘIČEM VISCOCLOCK.....	58
	PŘÍLOHA P II: PEVNÁ FORMA KYSELINY HYALURONOVÉ (HA)	59

ÚVOD

HA se používá v kosmetice na přípravu různých krémů, které zaručí hladkou a mladou pleť. Ovšem takovéto použití HA je jen část z mnoha použití. Práce popisuje i použití v mnoha dalších odvětvích. Například na léčení bércových vředů. V práci je dále popsáno, jaké má HA vlastnosti, kde se nachází, jaké jsou způsoby získávání a jakou plní funkci. Molekula HA je popisována z hlediska primární, sekundární, terciární struktury a jaké je chování polymerního klubka ve zředěných roztocích.

Práce se dále zabývá vysvětlením podstaty Hofmeisterovy řady (série) iontů, jaké je chování chaotropních a kosmotropních iontů a jak ovlivňuje Hofmeisterova řada chování řetězce HA. Tato řada je často popisuje chování proteinů, ale je s ní také možno vysvětlit chování řetězců polysacharidů.

Dále je vysvětlena teorie viskozity a popis chování newtonských a neneutronských kapalin a na samém konci teoretické části podstata měření viskozity a typy rozpouštědel.

V praktické části je měřena viskozita jak samotné HA, kde je použito rozpouštědlo demineralizovaná voda, tak i HA s vybranými ionty z Hofmeisterovy řady iontů. Praktická část je prokána výpočty, grafy, tabulkami a jednotlivými diskuzemi. Na konci celé práce je porovnání všech měření a jejich okomentování.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 KYSELINA HYALURONOVÁ

1.1 Historie HA

V roce 1880 francouzský chemik Portes jako první pozoroval, že látka mucin (glykoprotein) ve sklivci se chová rozdílně oproti mucinu v rohovce a chrupavce. Tuto látku nazval hyalomucin. O padesát let později (1934) izoloval Karl Mayer ze sklivce dobytka nový, vysokomolekulární polysacharid a určil, že se jedná o uronovou kyselinu a aminosacharidy. Tuto látku pojmenoval jako hyaluronová kyselina. Název nese podle slov „hyaloid“ a uronové kyseliny. Běžně používaným názvem pro sodnou sůl kyseliny hyaluronové je „hyaluronan“ [1].

Ovšem jako první si kyselinu hyaluronovou nechal patentovat v roce 1942 maďarský vědec Balazs jako komerční náhradu bílku v pekařských produktech. Zkoumal především, jak se hyaluronová kyselina chová v buňkách. Je považován za hlavního průkopníka, odborníka a výzkumníka v oblasti hyaluronové kyseliny ve 20. století. Nejdříve se hyaluronová kyselina získávala z kohoutích hřebínků, očí tučňáků a skotu nebo ze žraločích kůže. V dnešní době se získává převážně z buněčných stěn streptokoků nebo z bakterie *Escherichia coli*. Tyto biotechnologické postupy přináší jednak z hlediska etického, tak ryze praktického mnohem čistší produkt. Na druhou stranu je ale komplikovanější, a tudíž i nákladnější [2].

V 60. letech 20. století se začala kyselina hyaluronová využívat k léčbě popálenin a kožních vředů, v 70. letech pak i v očním lékařství při transplantaci rohovky. Další využití začala mít v ortopedii, kde se aplikovala hyaluronovými injekcemi do poškozených kloubů. Poté japonská farmaceutická firma začala vyrábět pilulky tzv. „anti-aging“ preparát. „Anti-aging“ je v podstatě medicína proti stárnutí. Kyselina hyaluronová se později začala stále více prosazovat v kosmetice, dermatologii a kosmetické chirurgii [2]. Dále ve farmacii k přípravě léčiv pro kloubní onemocnění a její oligosacharidy se využívají k léčbě některých druhů rakoviny [10]. V roce 2003 započala injekční aplikace kyselina jako výplň vrásek [2].

1.2 Základní vlastnosti

Kyselina hyaluronová je vysokomolekulární polysacharid. Je nejjednodušším členem skupiny látek nazvané glykosaminoglykan. Molekulová hmotnost se pohybuje okolo 10^5 - 10^7 Da. Molekulová hmotnost hraje důležitou roli při fyziologických procesech v živých organismech, jako je například hydratace pojivových tkání nebo transport vody. Makromolekula hyaluronanu může zauímat různé tvary, velikosti a konfigurace. Jako jediný glykosaminoglykan není kovalentně spojen s jádrem bílkoviny [3]. Působí také jako podpora pro vazbu s dalšími molekulami v mezibuněčném prostoru (extracelulární matrix). Roztoky hyaluronové kyseliny mají výrazné viskoelastické vlastnosti. Obsah $10 \text{ mg}\cdot\text{cm}^{-3}$ zvyšuje viskozitu vody přibližně 5 000 násobně. Při aplikaci střížných sil však viskozita klesá a HA má zde především elastické vlastnosti [14]. Jejich biofyzikální základ v neideálním chování je zdroj mnoha zajímavostí a spekulací [4].



Obrázek 1: *Viskoelastická vlastnost HA [13]*

1.3 Výskyt HA v živých organismech

Kyselina hyaluronová (HA) se může nacházet jak v lidském organismu, tak v organismu jiných živočichů. Nejdůležitější výskytem HA je mezibuněčná hmota, která se skládá z proteinů, glykoproteinů a glykosaminoglykanů [4], do níž kyselina hyaluronová patří. V lidském organismu ji můžeme najít například v synoviální tekutině (kloubní maz) a sklivci. V tělech živočichů se nachází především v hřebíncích kohoutů, žraločí kůži, sklivcích a nosní chrupavce skotu. Dále se vyskytuje v membránách a cytoplasmě bakterií (například Streptokoka) [3].

1.3.1 Hyaladheriny

Hyaladheriny jsou látky, které jsou tvořeny proteiny a kyselinou hyaluronovou. Představují širokou škálu proteinů a glykoproteinů. Hyaladheriny se nachází v intracelulárním matrixu, kde mohou být zapojeny do intracelulárních a nukleárních funkcí HA [1]. První specifické reakce mezi hyaluronanem a proteiny byly zaznamenány Hardinghamem a Muirem [5], kteří dokázali, že proteoglykany z chrupavky dokážou vázat hyaluronan. Jsou akumulovány na agregátech, které jsou uloženy v chrupavce a jsou formovány z hyaluronanu, proteoglykanu a „link proteinu“ (spojovacího proteinu) [5]. „Link proteiny“ (spojovací proteiny) stabilizují agregáty proteoglykanu s kyselinou hyaluronovou v mezibuněčné hmotě chrupavky [6]. Proteoglykany (versican, brevican...) se také nachází i v jiných tkáních a jsou schopny tvořit agregáty s hyaluronanem. Některé hyaladheriny byly objeveny také v mozku [5]. Dalšími hyaladheriny jsou HA receptory (CD44, RHAMM). Tyto receptory zajišťují, aby řetězce HA mohly mít mnoho dalších funkcí, a vyskytují se v široké škále izoform [1].

1.3.2 Extracelulární matrix

HA s vysokou molekulovou hmotností slouží jako strukturální podpora a lešení a je důležitou molekulou v řízení extracelulárního matrixu. COS buňky, které se nachází v ledvinách afrických zelených opic, nemají prakticky žádný extracelulární matrix. Pokud dojde ke spojení matrix složek s kulturami CHO buněk a cDNA s CD44, kyselina hyaluronová váže CD44 a další matrix složky a organizuje je okolo sebe sama, což vede k vytvoření souhrnu pericelulárního matrixu. Mnoho ECM polymerů využívají vlákna HA, která jsou upoutána na povrchu buněk, na organizování komplexní struktury [1].

1.3.3 Intracelulární matrix

Funkce kyseliny hyaluronové v intracelulárním matrixu není příliš známá. Může mít funkci v regulování buněčného cyklu a modelaci specifické kinázy, a tím může regulovat chování buňky. HA se vyskytuje nejen v cytoplasmě, ale i v jádrech a jadérkách. Biosyntéza kyseliny hyaluronové je docela klamná. Není tak docela jasné, že intracelulární HA je produktem syntézy buněk, nebo se získává sekundárně [1].

1.3.4 Glykokalyx

Glykokalyx je ochranný povrch buněk, který je tvořený oligosacharidy a ty jsou tvořeny glykoproteiny a proteoglykany [7]. Má vláknitou strukturu a obsahuje také

kyselinu hyaluronovou (HA). Tato struktura obsahuje mechanické sensory a dále může fungovat jako iontoměnič. Glykokalyx může být zodpovědný za hematoencefalickou bariéru a může řídit reologii mikrocirkulace. Povaha endotelové propustnosti je závislá na kyselině hyaluronové a jejich asociovaných molekulách. Glykokalyx má mnoho adhezních molekul a ztráta přilnavosti při mitóze může být přičítána ke změně struktury a obsahu HA [1].

1.4 Způsoby získávání HA z živých tkání

První známou metodu získávání HA z živých tkání navrhnul Balazs [12]. Jako surovina používaná k izolaci HA bývá například pupeční šňůra nebo kohoutí hřebínek. Tato surovina se zmrazí (dojde k rozrušení buněčných stěn) a následně rozřeže na malé kousky. Tyto malé kousky se extrahují ethanolem s přidavkem cetylpyridinia chloridu, chloroformu a vody. Poté se extrakt čistí a upravuje se pH a iontová síla. Touto metodou je možno získat až 0,5 % hm. obsahu bílkovin, přičemž výtěžnost produktu je $0,9 \text{ g.kg}^{-1}$ výchozí suroviny.

Další metodou získávání HA je podle Galatíka, Kuběny a Blažeje [12]. Tato metoda je založena na modifikaci některých polárních iontových a thiolových skupin, které tvoří nekovalentní vazby s HA, v molekule kontaminujících bílkovin pomocí alkylačních činidel. Získaná HA touto metodou má poněkud nízkou molekulovou hmotnost.

Z praktického hlediska a nejdůležitějším získáváním HA z živých tkání z důvodu použitelnosti v kosmetickém průmyslu je biotechnologická produkce z bakterií *Streptococcus equi* a *Streptococcus zooepidemicus*. Tato metoda spočívá v kulvitaci v roztocích glukosy s obsahem kvasinek a soli při $33 \text{ }^\circ\text{C}$ a pH 8,5. Molekulová hmotnost této získané HA je okolo 1,8 až $2 \cdot 10^6$ MDa, při výtěžnosti 3 až 4 g.L^{-1} kultivované směsi [12].

1.5 Struktura HA

1.5.1 Historický pohled do struktury HA

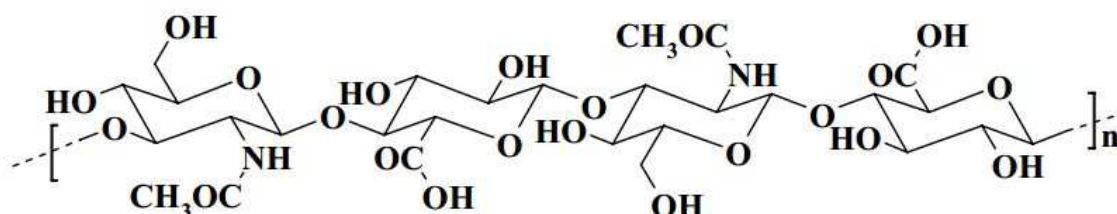
Přesná struktura HA byla nejdříve stanovena Bernardem Weissmanem a Karlem Meyerem v roce 1954 [9]. Pro ověření struktury dělali Meyer s Weissmanem různé chemické reakce jak esterifikaci disacharidů, oxidaci zbytku glukosaminu na glukosaminovou kyselinu, tak reakci uronového esteru na zbytek glukosy [9]. Vlastnosti

HA z hlediska struktury jsou diskutabilní po dobu více jak 50 let bez nějaké jasně obecně platné teorie. HA se vyskytuje ve formě náhodného klubka, které má místy značnou tuhost a docela rozsáhlou perzistenci.

Další studie prokázala, že HA má ve svém řetězci rozšířený systém vodíkových vazeb, které obsahují dvoj šroubovici („double helix“) s prvky různých interakcí, které zahrnují například vodíkové můstky mezi sousedními zbytky cukrů. Zdálo se, že tato struktura tvoří tuhé řetězce a taky bylo pozorováno, že vysoká viskozita HA se nevratně a dramaticky snižuje s rostoucím pH. Dalším zajímavým faktem je přítomnost hydrofobních částí v hlavním řetězci HA, přestože samotná molekula tohoto polymeru je samozřejmě vysoce hydrofilní. Každá část se prodlužuje přes tři jednotky sacharidů, které se střídavě opakují na obě strany přes celou délku molekuly. Byla navržena hypotéza, že tyto části mohou být báze interakcí mezi lipidovými membránami a proteiny [8].

1.5.2 Primární struktura HA

Primární struktura hyaluronové kyseliny je pravidelná [1]. Molekula kyseliny hyaluronové se skládá z lineárních, nerozvětvených řetězců glykosaminoglykanů, ve kterých se opakuje skupina disacharidu (β 1-3 D -N-acetylglukosamin, β 1-4 D -glukouronová kyselina) [3]. Tyto skupiny jsou spolu střídavě propojeny β 1,3 a β 1,4 glykosidickými vazbami [9]. Nejsou známy žádné odchylky od lineárního opakování disacharidické struktury, s možnou výjimkou, že se mohou nacházet příležitostně zbytky deacetylovaných glykosaminů [15]. Jediným možným výkyvem je nahrazení N-acetyl $-D$ -glukosaminu zbytkem deacetyl glukosaminu [1]. Na každém opakujícím se disacharidu se nachází karboxylátová skupina, a tudíž může být polyekeltrolytem [3]. Natažený řetězec molekuly s hmotností 6 MDa má okolo 15 μ m a průměr 0,5 nm [4].



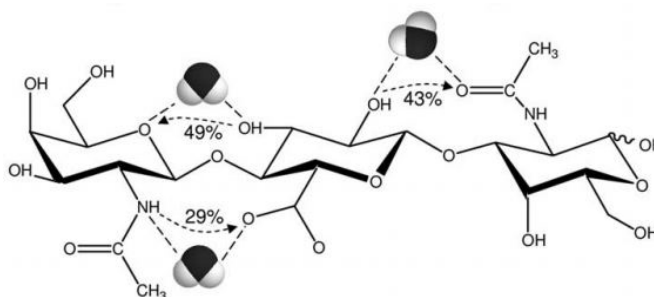
Obrázek 2: Primární struktura hyaluronanu [1]

Glukosaminoglykany představují důležité strukturní a mechanické funkce, které jsou velmi často založeny na jejich zřetelné tendenci zaujímat ve vodných roztocích

poměrně velké statistické polymerní klubko. HA reaguje s proteoglykany, buněčnou membránou a receptory velmi specificky. Z jednoduché chemické struktura HA je patrná její všestrannost a univerzálnost. Schopnost základní struktury by mohla být podpořena vstupem do sekundární, popřípadě terciární struktury ve vodných roztocích [8].

1.5.3 Vodíkové můstky a vazby s vodou v řetězci HA

Předpokládá se, že β vazby v řetězci HA mají silné intramolekulární vodíkové můstky mezi sousedními sacharidovými zbytky, zatímco α vazby dávají přednost vazebným interakcím s vodou. Nejsilnější interakce obou vazeb je vidět z hydroxyly k sousednímu kyslíkovému kruhu. Je jasné, že tyto interakce, které se běžně vyskytují u α vazeb, jsou mnohem silnější a ukazují, jak molekuly vody působí na tyto dva typy vazeb [30].

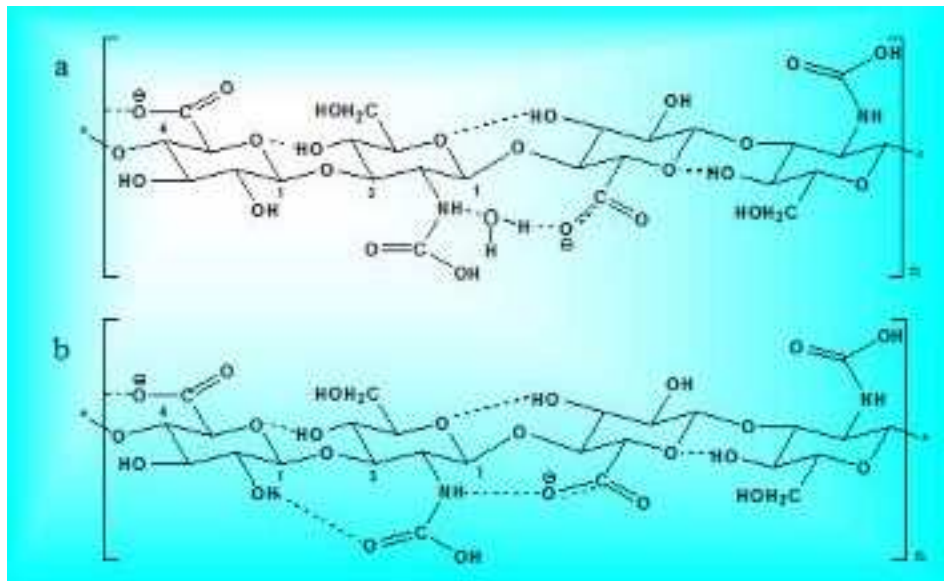


Obrázek 3: Ukázka vodíkových vazeb a vazeb s molekulou vody [30]

Obrázek 3: Ukázka vodíkových vazeb a vazeb s molekulou vody [30] ukazuje, jak působí molekula vody a vodíkové můstky na strukturu HA. Můžeme vidět dvě interakce, které zahrnují vazby s vodou, mezi vazbami β -(1 \rightarrow 3). Dále mezi vazbami β -(1 \rightarrow 4) jsou velmi silné interakce s vodou. To proto, že obě vodíkové vazby a vazby s vodou jsou častější u vazeb β -(1 \rightarrow 4). Vazby s vodou existují taky mezi amidovou skupinou a karboxylovou skupinou [30].

1.5.4 Sekundární struktura HA

Sekundární struktura je prostorové uspořádání polysacharidového řetězce na krátké vzdálenosti. S dalším rozvojem studie struktury a aplikací HA byla objevena vyšší struktura než primární, a to sekundární a terciární. V sekundární struktuře může HA tvořit dvě stabilní konfigurace v závislosti na prostředí. Jednu tvoří ve vodném prostředí a druhou v jiném než vodném. Tyto dvě konfigurace vysvětluje **Obrázek 4:** Sekundární struktura v závislosti na prostředí [9].

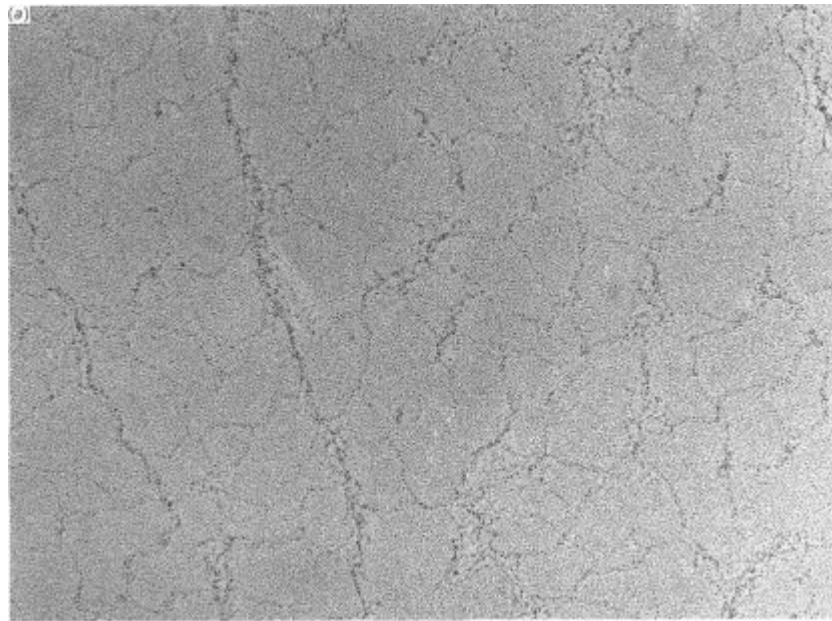


Obrázek 4: Sekundární struktura HA v závislosti na prostředí [9]

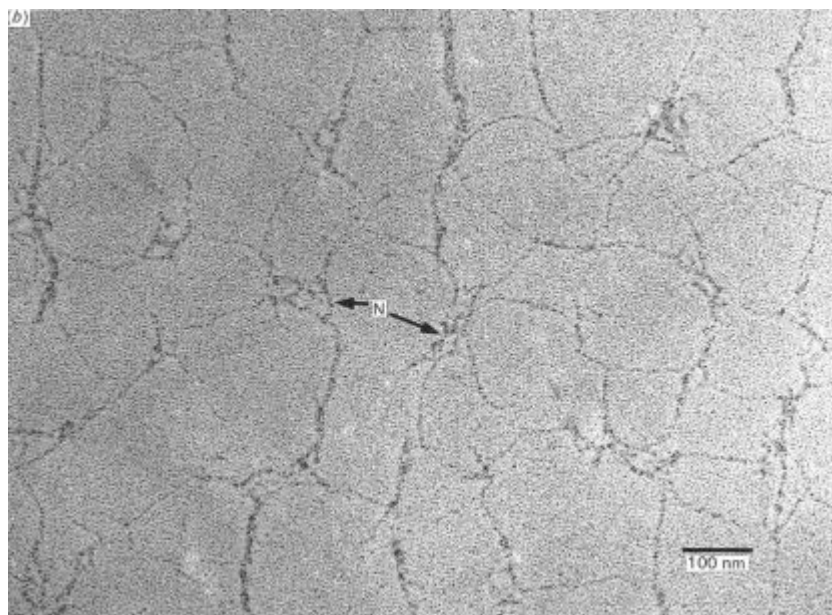
Na **Obrázek 4: Sekundární struktura HA v závislosti na prostředí [9]** můžeme vidět konfigurace ve vzorci (a) je ve vodném prostředí a ve vzorci (b) v jiném než vodném. Sekundární struktura je tvořena převážně z páskovitých dvojšroubovic [8]. Tato struktura je tvořena disacharidickými jednotkami, které se stáčí kolem osy do 180° šroubovice a tvoří řetězec [10]. V sekundární struktuře se intramolekulární vodíkové vazby vytvoří mezi funkčními skupinami jako je NH, OH a C=O. Tyto vazby pak způsobují relativní tuhost řetězce HA [10].

1.5.5 Struktura HA ve zředěných roztocích ve vodném prostředí

HA a její soli s alkalickými kovy (Na^+ , Mg^{2+} , NH_4^+) jsou velmi dobře rozpustné ve vodě, dokonce i v malých koncentracích tvoří vysoce viskózní vodné roztoky. Při vysokých koncentracích se HA formuje do takzvaného pseudo gelu. Tento gel je roztok s enormě vysokou viskozitou. V neutrálních roztocích je molekula HA nabitá záporně díky karboxylovým skupinám. Tato vlastnost je důležitá pro funkci HA v extracelulárním matrixu [17].

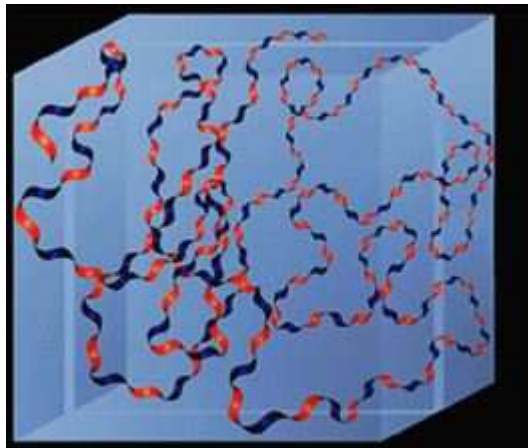


Obrázek 5: Terciární struktura HA ve vodném roztoku (a) [8]



Obrázek 6: Terciární struktura HA ve vodném roztoku (b) [8]

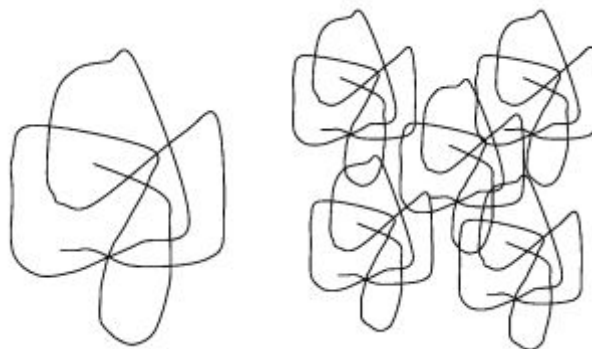
Na **Obrázek 5:** Terciární struktura HA ve vodném roztoku (a) [8] a **Obrázek 6:** Terciární struktura HA ve vodném roztoku (b) [8] můžeme vidět síť řetězců HA ve vodném roztoku 0,5M octanu amonném. **Obrázek 5:** Terciární struktura HA ve vodném roztoku (a) [8] poukazuje na HA získanou z kouhoutích hřebínků a **Obrázek 6:** Terciární struktura HA ve vodném roztoku (b) [8] na HA získanou ze streptokoka.



Obrázek 7: *Uspořádání řetězce HA
ve vodném prostředí[11]*

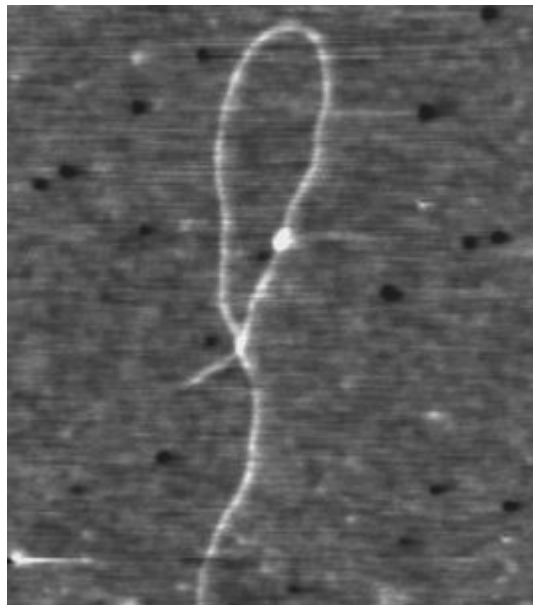
Řetězce HA ve zředěných roztocích expandují z důvodu vzájemného odpuzování mezi karboxylovými skupinami, a proto molekula zaujímá velký objem s vodou, která je uzavřena uvnitř struktury. V koncentrovaných roztocích se molekuly HA zaplétají a tvoří souvislé porézní síť. Vytvořená síť způsobuje takzvaný „swelling pressure“ (vnitřní tlak způsobující bobtnání klubka HA) z důvodu zvýšeného vzájemného odpuzování mezi a uvnitř molekul. Pokud vnější tlak působí na síť HA, začne se smršťovat. Při snižujícím se tlaku síť HA znovu expanduje do svého původního tvaru. Tato vlastnost poskytuje odolnost a ohebnost mnoha tkáním. Kromě tohoto dokáže vytvořit pomocí vnitřních tlaků specifický prostor pro migraci buněk [11].

Na následujících obrázcích můžeme vidět, jak se chová náhodné klubko HA ve zředěném a koncentrovaném roztoku.



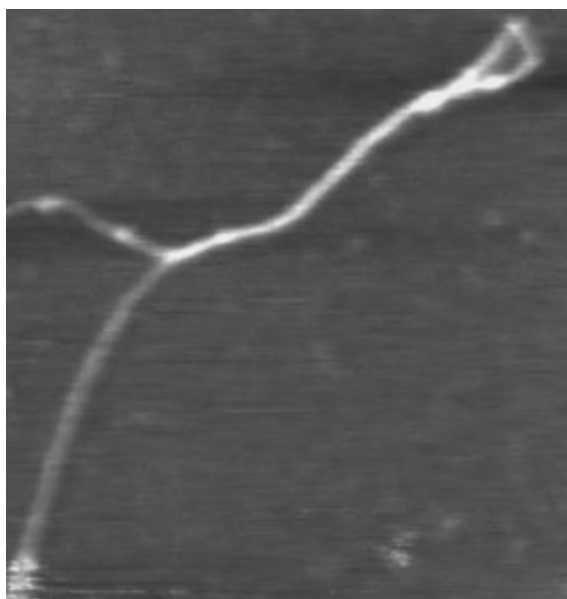
Obrázek 8: *Ve zředěných roztocích vlevo a v koncentrovaných vpravo [5]*

Ve zředěných roztocích při fyziologickém pH a iontové síle se HA chová jako tuhé náhodné klubko s velkým hydrodynamickým objemem [5]. V důsledku tuhosti řetězců a vysoké molekulové hmotnosti ($2 \cdot 10^6 - 6 \cdot 10^6$ MDa) se řetězce dotýkají a začínají se vzájemně proplétat. Například u HA s molekulovou hmotností $3 \cdot 10^6$ dochází k zapletení jednotlivých řetězců již při koncentraci $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$. Jak intramolekulární, tak intermolekulární sebe sdružování řetězce může silně ovlivnit tekutost. Je také pravděpodobné, že propletence řetězců HA mění termodynamiku a kinetiku interakcí mezi vázanými proteiny. Z výsledků z rozptylu z rentgenových paprsků (x-ray diffraction), lze vidět, že HA tvoří jednotlivé šroubovice, které jsou zabalovány antiparalelním způsobem. Dvojitě spirálovité struktury s antiparalelními řetězy byly pozorovány za neobvyklých podmínek díky přítomnosti protiiontů (Rb^+ , K^+ ...) [16].



Obrázek 9: Smyčka řetězce HA bezintramolekulárního
sebesdružení [16]

Na **Obrázek 9:** Smyčka řetězce HA bezintramolekulárního
sebesdružení [16] můžeme vidět izolovanou a rozšířenou molekulu HA s viditelnou smyčkou na konci řetězce. Délka tohoto řetězce je okolo $6 \text{ } \mu\text{m}$ a obsahuje asi 6500-8125 disacharidových jednotek [16].



Obrázek 10: Zapletení řetězce bezintramolekulárního sebesdružení [16]

Co se týče řetězců s intramolekulárním sebesdružením, tak jsou častější než řetězce rozšířené. Na **Obrázek 11:** Zapletení řetězce s intramolekulárním sebesdružením [16] můžeme vidět izolovanou molekulu HA [16].



Obrázek 11: Zapletení řetězce s intramolekulárním sebesdružením [16]

Antiparalelní sdružení řetězce je také zodpovědné za vytvoření velké smyčky (asi 600 nm), kterou můžeme vidět na **Obrázek 11: Zapletení řetězce s intramolekulárním sebesdružením [16]**. Při porovnání **Obrázek 10: Zapletení řetězce bez intramolekulárního sebesdružení [16]** a **Obrázek 11: Zapletení řetězce s intramolekulárním sebesdružením [16]** můžeme vidět, jak se od sebe liší řetězce s intramolekulárním sebesdružením a bez intramolekulárního sebesdružení [16].

V koncentrovaných roztocích tuhé náhodné klubko ukazuje, jak je molekula propletená. Koncentrované roztoky vykazují viskoelastické vlastnosti a udržují viskoelastický tok, čímž se nestávají gely [5]. Metoda umožňující detailní charakterizaci z hlediska pohybu a difúze řetězců HA v koncentrovaných roztocích se nazývá „Confocal-FRAP“ (konfokální mikroskopie v kombinaci s „fluorescence recovery after photobleaching“). Tato metoda se provádí v nepřítomnosti průtoků a smykových sil a s žádnými koncentračními gradienty. Při vyšších koncentracích začínají být řetězce méně pohyblivé z důvodu interakcí mezi sousedními řetězci [3].

2 HOFMEISTEROVA ŘADA (SÉRIE) IONTŮ

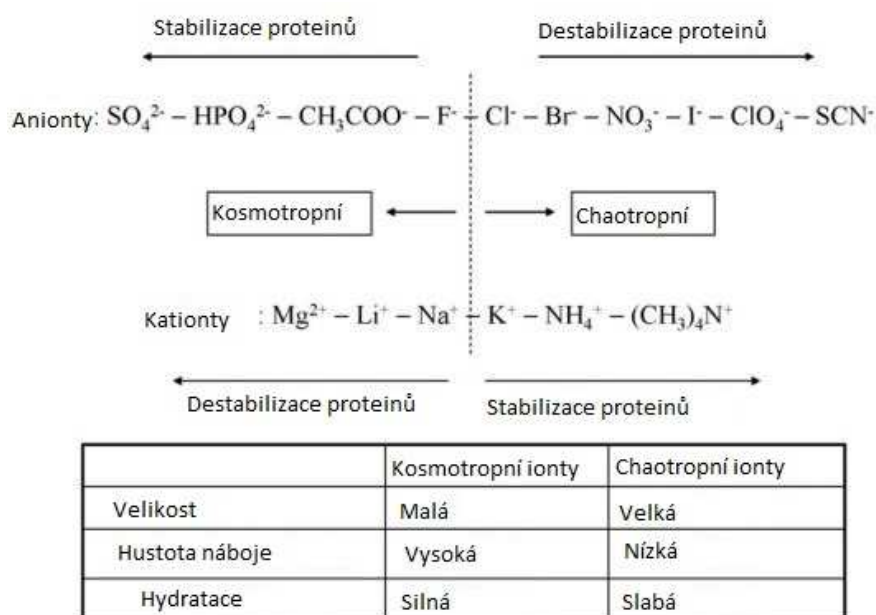
2.1 Historický pohled

Hofmeisterova řada (série) iontů byla v roce 1888 [18] poprvé představena veřejnosti profesorem Karlem Hofmeisterem a Lewithem na německé části Karlo – Ferdinandovy university (dnešní Univerzita Karlova). Tuto řadu nejdříve pojmenoval jako lyotropní, později se stala Hofmeisterovou řadou iontů [19].

Protože v oblasti fyzikální chemie proteinů se jednalo o poměrně průlomový objev a řada vědců experimentovala i s dalšími ionty, tak se postupně Hofmeisterova řada rozšířila. Nejvíce se o to zasloužili Collins a Washabaugh [20]. Původně se myslelo, že vliv iontů na makromolekulární vlastnosti byl způsoben alespoň zčásti vodní strukturou [18]. Dnes je Hofmeisterova řada používána k vysvětlení celé řady efektů solí na biomolekuly včetně denaturace bílkovin [19].

2.2 Rozdělení Hofmeisterovy řady iontů

Ionty z Hofmeisterovy řady mají významný vliv na rozpustnost makromolekulárních látek a také na stabilitu svých sekundárních, terciárních a kvartérních struktur. Hofmeisterova řada je považována za ionty, které mají typický iontově-specifický vliv na polymery ve vodných roztocích [21].



Obrázek 12: Hofmeisterova řada a rozdělení iontů [22]

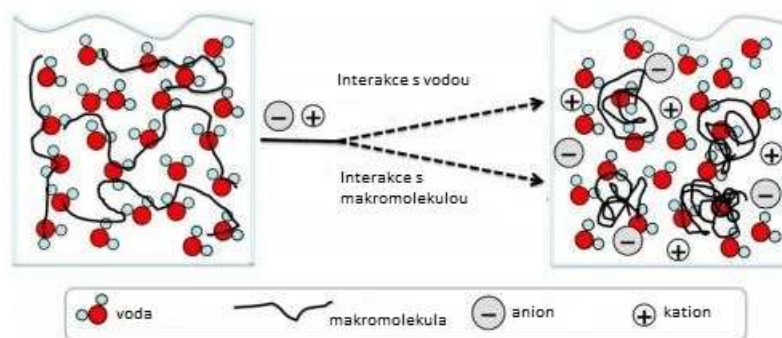
Obrázek 12: Hofmeisterova řada a rozdělení iontů [22] nám ukazuje typické rozdělení Hofmeisterovy řady na ionty s chaotropním charakterem a kosmotropním charakterem.

2.3 Interakce iontů z Hofmeisterovy řady s vodou

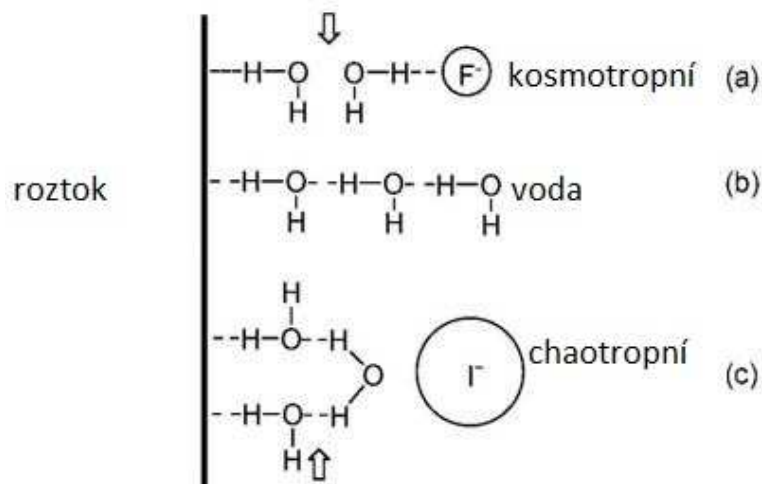
Efekt iontů Hofmeisterovy řady se nejvíce projevuje v experimentech, kde je použito rozpouštědel s vyšší koncentrací iontů [21]. Pojmy kosmotropie a chaotropie původně označovaly rozpuštěné látky, které stabilizovaly nebo destabilizovaly proteiny a membrány. Ionty jsou považovány za kosmotropní a chaotropní v závislosti na jejich schopnosti interagovat s vodou a schopnosti měnit strukturu vody. První pokusy vysvětlit účinky Hofmeisterovy řady byly založeny na změně objemu struktury vody vyvolané ionty přes iontovou hydrataci. Specifičnost iontů závisí na schopnosti podporovat (kosmotropní ionty) nebo rozrušovat (chaotropní ionty) vodíkové vazby ve vodě [22].

Výchozím bodem k určení toho, zda se jedná o kosmotropní ionty, nebo chaotropní ionty, slouží Jones-Dole viskozitní koeficient B [24]. Chaotropní ionty, které jsou v Hofmeisterově řadě od Cl^- až po SCN^- (napravo) a od K^+ až po $(\text{CH}_3)_4\text{N}^+$ (napravo), jsou ionty, které jsou velké, jednotlivě nabitě ionty s nízkou hustotou náboje (Cl^- , HSO_4^- , K^+ , NH_4^+ ...). Tyto ionty vykazují slabší interakce s vodou než voda se sebou sama, a tudíž méně ovlivňují vodíkové vazby a oslabují hydrofobní interakce s polymery [22]. Mají tedy nízký stupeň hydratace [24].

Zatímco kosmotropní ionty, které jsou v Hofmeisterově řadě od F^- až po SO_4^{2-} (nalevo) a od Na^+ až po Mg^{2+} (nalevo), jsou ionty, které jsou malé, vícenásobně nabitě ionty s vysokou hustotou náboje (SO_4^{2-} , HPO_4^{2-} , Mg^{2+} , Li^+ ...). Tyto ionty vykazují silnější interakce s molekulami vody než interakce voda-voda, a proto jsou schopny porušovat interakce voda-voda a vodíkové vazby a zvyšují hydrofobní interakce s polymery [23]. Mají tedy vysoký stupeň hydratace.



Obrázek 13: Interakce aniontů a kationtů s vodou a makromolekulou [25]



Obrázek 14: Interakce kosmotropních a chaotropních iontů s vodou [25]

Na **Obrázek 14:** *Interakce kosmotropních a chaotropních iontů s vodou* [25] můžeme vidět chápání podstaty, jak kosmotropní, respektive chaotropní ionty působí na molekuly vody a rozpuštěnou látku. Můžeme vidět, jak malý kosmotropní iont interaguje s vodíkovými vazbami ve vodě a zvyšuje lokální uspořádání molekul vody. Zatímco chaotropní iont neinteraguje s vodíkovými vazbami skoro vůbec, neporušuje interakce voda-voda a snižuje lokální uspořádání molekul vody [25].

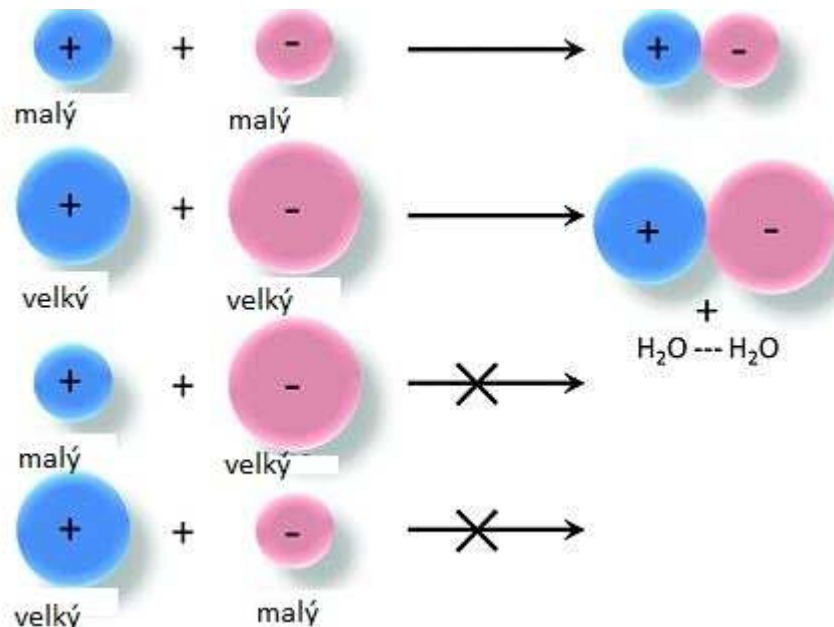
Kationty obecně vykazují méně dominantní účinek ve srovnání s anionty se stejnou hustotou náboje, poněvadž anionty jsou více polarizovatelné a více se hydratují. Zdá se, že kosmotropní chování aniontů by mohlo být sníženo v přítomnosti kosmotropních kationtů. Kosmotropní kationty, na rozdíl od chaotropních, mají větší tendenci iontového párování

s kosmotropními anionty, čímž se snižuje počet interagujících aniontů v roztoku. Ve vodných roztocích solí jsou interakce mezi jednotlivými ionty následující [22]:

Kosmotropní-kosmotropní > kosmotropní – voda > voda – voda > chaotropní – voda > chaotropní – chaotropní

Obrázek 15: Snižující se interakce mezi kosmotropními a chaotropními ionty

Tato řada na **Obrázek 15: Snižující se interakce mezi kosmotropními a chaotropními ionty** naznačuje, že opačně nabitě ionty mají tendenci tvořit kontaktní iontové páry v roztoku, pokud vykazují rozdílnou afinitu k vodě [22].



Obrázek 16: Spojování jednotlivých iontů ve vodném roztoku [25]

Na **Obrázek 16: Spojování jednotlivých iontů ve vodném roztoku [25]** můžeme vidět, jak ve vodném roztoku se kosmotropní anion a kosmotropní kation slučují dohromady v důsledku silnějších interakcí mezi sebou ve srovnání s interakcemi voda - voda. Chaotropní aniont a chaotropní kationt mají také tendenci tvořit iontový pár, poněvadž silnější interakce voda-voda vytvoří dva chaotropy dohromady [22].

2.4 Efekt iontů na interakce protein-voda

Stabilizační efekt kosmotropních aniontů se dobře vysvětluje hydratací. Vzhledem k jeho silné interakci s vodou je kosmotropní aniont (jako SO₄²⁻) efektivně spojen s molekulami vody, které byly původně spojené s enzymem, a poté je společně vyloučen

z povrchu enzymu. To podporuje molekuly enzymu minimalizovat jejich povrch, který je vystaven rozpouštědlům. Kosmotropní anionty tedy stabilizují proteiny. Nicméně, chaotropní aniont (jako SCN^-) má nejen nízkou afinitu k molekule vody, ale i vysokou polarizovatelnost, čímž se spíše váže na rozhraní protein-voda a tím protein destabilizuje [22].

2.5 Vliv některých iontů z Hofmeisterovy řady na HA

Vliv iontů z Hofmeisterovy řady na chování HA v roztoku může být sledováno interferometrickými metodami. Tyto vlivy byly zkoumány na solích KI, KF, MgCl_2 a NaCl. Zjistilo se, že existuje jistá závislost difusního koeficientu na schopnosti vody solvátovat hyaluronan. Sůl KF s HA vykazuje významnou klesající rychlost botnání oproti HA s čistou vodou. Naopak soli KI, MgCl_2 a NaCl s HA vykazují vyšší rychlost botnání [21].

Rozdíly mezi jednomocnými kationty a dvojmocnými při iontové síle $I = 0,1$ je v tom, že dvojmocné kationty jsou větší. Dvojmocné ionty způsobují elektrostaticky indukované změny HA v porovnání s jednomocnými. Jednotlivé dvojmocné ionty mohou koordinovat dvě karboxylové skupiny ze sekundární struktury HA, a podporovat tak kontrakce řetězce HA. V důsledku tohoto jevu by dvojmocné kationty mohly vyvolat významné snížení tuhosti řetězce HA. Vliv aniontů jako je (F^- , Cl^- , I^-) je zřejmý. Ionty F^- nebo Cl^- mohou měnit koordinaci molekul vody s HA, čímž se poruší vodíkové vazby v molekule vody. F^- iont způsobuje silnou redukci interakce hydrofilního řetězce a vytváří ostré smyčky řetězce HA. Pokud vezmeme nižší iontovou sílu, vykazuje podobné účinky [21].

Difúzní proces botnání může být porovnán s měřením kinematické viskozity. Přídavky iontů z Hofmeisterovy řady jsou úzce spojeny s poklesem kinematické viskozity. Nicméně, F^- ionty, které zvyšují tuhost řetězce, vykazují pak vyšší kinematickou viskozitu [21].

Na téma vlivu Hofmeisterovy řady na chování HA existuje velice málo literatury. Vliv Hofmeisterovy řady na polymery chovající se v roztoku jako náhodné statistické klubko je předmětem dalších výzkumů a taky mé praktické části této bakalářské práce.

3 VSKOZITA

3.1 Teorie

Viskozita je vnitřní tření tekutin. V ideální tekutině neexistují smyková (tečná) napětí. Tato ideální tekutina ovšem neexistuje. Pokud dochází k proudění reálných tekutin, jejich jednotlivé molekuly jsou v pohybu a dvě sousední vrstvy nemají stejnou rychlost, pak na rozhraní dvou vrstev dochází k tření a vzniku tečného napětí. Příčinou tohoto jevu je viskozita tekutiny [26]. Rychlost tečení kapaliny je tím větší, čím větší je vnější síla a čím menší jsou vnitřní síly, ale nemusí to obecně platit. Tyto vnitřní síly vznikají v kapalině pomocí tepelného pohybu a mezimolekulových sil. Viskozita také velice závisí na teplotě [27].

3.2 Newtonské a nenewtonské chování tekutin

3.2.1 Newtonské chování tekutin

Newtonova tekutina se obecně označuje jako ta tekutina, jejíž viskozita je v každém časovém okamžiku nezávislá na napětíovém a deformačním stavu tekutiny. To znamená, že u těchto tekutin dochází k vzájemné interakci poměrně malých molekul. Viskozita zde vystupuje jako skalární parametr (konstanta) [29]. V roce 1687 upozorňuje Newton ve své knize *Philosophiae Naturalis Principia Mathematica* na proudění tekutin jako na jeden z mnoha fyzikálních jevů [28]. Newton označil tečné napětí jako přímoúměrné gradientu (růstu) rychlosti podle rovnice (1), což je přírůstek rychlosti mezi dvěma vrstvami dělené vzdáleností vrstev [27]:

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

kde η je dynamická viskozita

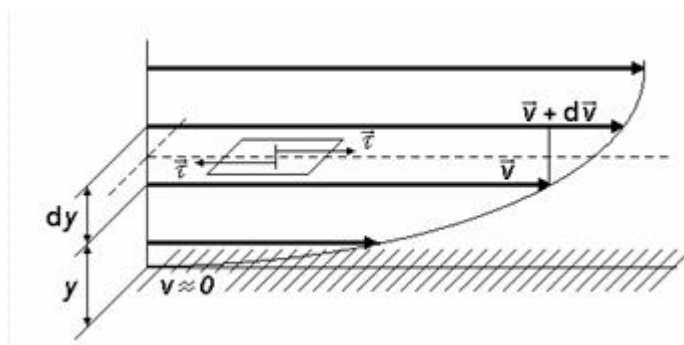
$$[\eta] = Pa \cdot s = N \cdot s \cdot m^{-2},$$

$\frac{dv}{dy}$ je gradient rychlosti ve směru kolmém na rychlost

$$\left[\frac{dv}{dy} \right] = s^{-1},$$

τ je tečné napětí

$$[\tau] = Pa$$



Obrázek 17: Rychlostní model proudící kapaliny [27]

Tato Newtonova rovnice (1) představuje Newtonův zákon viskozity.

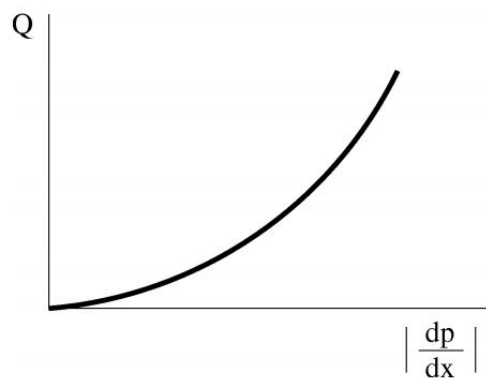
Tekutiny s newtonským chováním se řídí podle rovnice (1) [27]. Většina běžných tekutin jako je voda, organické látky, oleje, vzduch, pára atd. jsou newtonské tekutiny v širokém rozsahu teplot a tlaků [28].

3.2.2 Neneutonské chování tekutin

Neneutonské chování vykazují ty tekutiny, jejichž chování nelze popsat podle Newtonovy rovnice (1). Obecně můžeme říct, že jako neneutonské efekty v tekutinách se označují takové jevy a vlastnosti, které nejsou pozorovatelné v tekutinách, jejichž viskozita je zcela nezávislá na stavu napjatosti a deformace tekutiny. Zde viskozita není skalárním parametrem, ale je třeba zohlednit více viskozitních koeficientů. Můžeme je v podstatě definovat jako tekutiny, jejichž křivky tečení nejsou přímky procházející počátkem souřadnicového systému. Příkladem takovýchto tekutin jsou polymerní roztoky, taveniny, disperzní roztoky, barviva, synoviální tekutiny (HA) atd. [27]

Při laminárním proudění v rotačně symetrické trubce vykazuje Newtonův model tekutiny výsledky, které říkají, že průtočné množství tekutiny je úměrné konstantnímu tlakovému gradientu v osovém směru a čtvrté mocnině průměru trubky. Zatímco je dokázáno, že neneutonské chování tekutin je při konstantním průměru trubky a závislosti průtočného množství na tlakovém gradientu nelineární [29]. Neneutonské chování tekutin popisuje několik rovnic, které mohou mít lineární, parabolickou, logaritmickou či hyperbolickou závislost [29]. Tuto nelinearitu vysvětluje **Obrázek 18: Nelineární závislost průtoku na**

tlakovém gradientu [29] [29]:



Obrázek 18: *Nelineární závislost průtoku na tlakovém gradientu [29]*

Další vlastností neneutonských tekutin je schopnost akumulovat elastickou energii. To znamená, že neneutonské tekutiny mají nenulovou relaxační dobu. Zatímco newtonské tekutiny ji mají nulovou. Neneutonské efekty jsou vyvolané na úrovni makroskopických i mikroskopických struktur, a tudíž u nich dochází k velkým strukturním změnám [29].

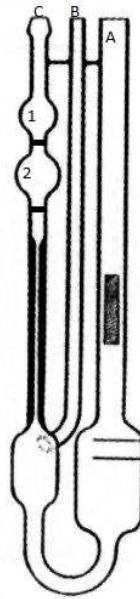
Neneutonské tekutiny lze rozdělit do tří hlavních skupin:

- časově nezávislé neneutonské tekutiny – pod tuto kategorii spadají Binghamova plastická kapalina, pseudoplastická kapalina, dilatantní kapalina a Cassonova plastická kapalina [29]
- časově závislé neneutonské tekutiny – pod tuto kategorii spadají tixotropní kapaliny a reopektické kapaliny [29]
- viskoelastické kapaliny – například Maxwellova kapalina [29]

3.3 Měření viskozity

V této práci byl používán k měření viskozity zředěných roztoků hyaluronanu kapilární viskozimetr, konkrétně Ubbelohdeho kapilární viskozimetr, který je vidět na

Obrázek 19: *Ubbelohdeho viskozimetr [31].*



Obrázek 19: Ubbelohdeho viskozimetr [31]

Princip tohoto viskozimetru spočívá v tom, že se trubicí vpravo (A) nalije měřený roztok až mezi dvě rysky. Poté následuje temperace měřeného roztoku na danou teplotu. Po vytemperování se nasaje měrná kapalina do poloviny baňky (1) trubice (C), která je zcela nahoře, přičemž malá trubička (B) uprostřed je velmi dobře uzavřena, aby mohlo dojít k nasátí roztoku. Poté se uvolní prostřední trubička (B) a roztok se nechá volně stékat. Měří se doba průtoku mezi ryskami, které jsou mezi baňkami (1) a (2). Viskozimetry se vyrábí s různým průměrem kapilár. Každá z kapilár je vhodná pro určitý rozsah kinematických viskozit. Příslušná kinematická viskozita se poté vypočte podle času průtoku roztoku a konstanty kapiláry viskozimetru podle rovnice (2) [26]:

$$v = k \cdot \tau \quad [v] = \text{mm}^2 \cdot \text{s}^{-1} \quad (2)$$

$$\text{kde } k \text{ je konstanta viskozimetru} \quad [k] = \text{mm}^2 \cdot \text{s}^{-2}$$

$$\tau \text{ je čas průtoku mezi dvěma ryskami} \quad [\tau] = \text{s}$$

Dalšími typy viskozimetrů jsou výtokové, kuličkové (tělískové), rotační, vibrační. Dále se mohou použít i výtokové kelímky nebo metoda konzistence rozlivu [26].

3.4 Užívané typy viskozit při měření HA

- relativní viskozita

$$v_r = \frac{v}{v_0}, \quad [v_r] = \text{bezrozměrná} \quad (3)$$

kde ν je viskozita roztoku HA

$$[\nu] = \text{mm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$$

ν_0 je viskozita rozpouštědla

$$[\nu_0] = \text{mm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$$

- specifická viskozita

$$\nu_{spec} = \nu_r - 1 = \frac{\nu - \nu_0}{\nu_0}$$

$$[\nu_{spec}] = \text{bezrozměrná} \quad (4)$$

Tato specifická viskozita udává poměrný přírůstek viskozity.

- redukováná viskozita (viskozitní číslo)

$$\nu_{red} = \frac{\nu_{spec}}{c}$$

$$[\nu_{red}] = \text{L} \cdot \text{g}^{-1} \quad (5)$$

kde c je koncentrace roztoku HA $[c] = \text{g} \cdot \text{L}^{-1}$

- limitní viskozitní číslo (vnitřní viskozita)

$$[\nu] = \lim_{c \rightarrow 0} \frac{\nu_{spec}}{c}$$

$$[\nu] = \text{L} \cdot \text{g}^{-1} \quad (6)$$

[27]

Limitní viskozitní číslo (LVČ) se získá z grafu závislosti redukové viskozity na koncentraci extrapolací k nulové hodnotě koncentrace a určuje, jakou viskozitu by mělo mít čisté rozpouštědlo [32].

Další důležitou veličinou při měření viskozity roztoků HA je Hugginsova konstanta (H_K). Tato konstanta udává, zda se jedná o dobré, špatné či theta rozpouštědlo vzhledem k HA. Konstanta nabývá hodnot 0,25-1, kde záleží na typu rozpouštědla.

Tabulka 1: Typy rozpouštědel v závislosti na Hugginsově konstantě

Typ rozpouštědla	Dobré	Theta	Špatné
H_K [1]	0,25-0,5	0,5-0,55	0,55-1

Hugginsova konstanta se určuje ze vztahu pro redukovanou viskozitu podle rovnice (7) [32]:

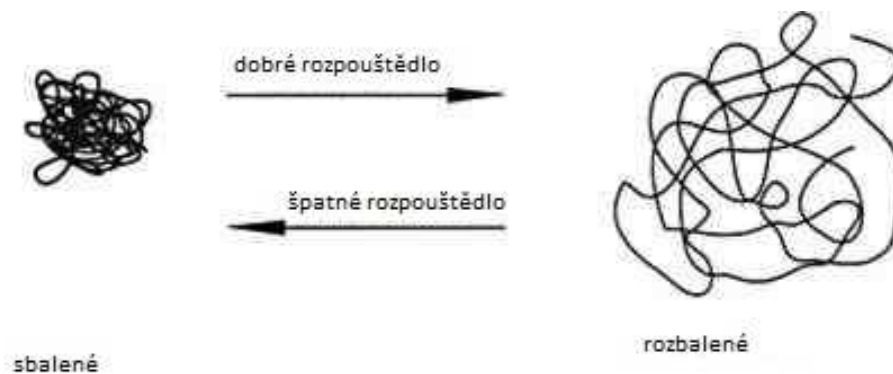
$$\frac{\nu_{spec}}{c} = [\nu] + H_K \cdot [\nu]^2 \cdot c$$

$$[H_K] = \text{bezrozměrná} \quad (7)$$

3.5 Typy rozpouštědel

V dobrých rozpouštědlech se makromolekula snaží vystavit působení rozpouštědla. Proto vzdálenost konců a tedy i objem klubka se zvětšuje. Do klubka proniká další rozpouštědlo a klubko botná. Co se týče špatných rozpouštědel, tak v nich je klubko více

svinuté, protože dochází spíše k vytváření kontaktů mezi jednotlivými částmi klubka než ke styku s molekulami rozpouštědla. A nakonec indiferentní (theta) rozpouštědla. V těchto rozpouštědlech jsou interakce makromolekuly a rozpouštědla vyrovnané. Tyto řetězce makromolekuly se chovají jako hmotné body, při setkání s molekulami rozpouštědla spolu nijak neinteragují [34].



Obrázek 20: *Dobré a špatné rozpouštědlo [35]*

Obrázek 20: *Dobré a špatné rozpouštědlo [35]* popisuje, jak klubko makromolekuly botná v dobrém rozpouštědle. Naopak ve špatném rozpouštědle je klubko svinuté.

PRAKTICKÁ ČÁST

4 MĚŘENÍ VISKOZITY HA

4.1 Úvod

Tato experimentální část je zaměřena na studium vlivu iontů z Hofmeisterovy řady (HŘ) iontů na chování HA ve vodném roztoku při určité iontové síle roztoku. Byla sledována viskozita roztoků HA v závislosti na jednotlivých iontech z HŘ a na teplotě. Použité soli z HŘ byly Na_2SO_4 , NaSCN , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, NH_4SCN a NaCl . Při měřeních HA s rozpouštědlem z HŘ iontů se používal výhradně viskozimetr typu I, který byl po pilotních experimentech shledán jako vhodný k měření. Při měřeních HA s destilovanou vodou se používal viskozimetr typu II a 0a. Používané teploty měření byly 25 °C a 37 °C.

Hlavním cílem bakalářské práce bylo zjišťování limitního viskozitního čísla (LVČ) a Hugginsovy konstanty (H_K), se kterou poté souvisí, zda se jedná o dobré, špatné či theta (indiferentní) rozpouštědlo. Hodnoty Hugginsových konstant v souvislosti s typem rozpouštědla můžeme vidět v **Tabulka 1: Typy rozpouštědel v závislosti na Hugginsově konstantě** (viz teoretická část). Při měřeních se pracovalo s třemi typy viskozimetrů podle **Tabulka 2: Typy viskozimetrů**:

Tabulka 2: Typy viskozimetrů

Typ viskozimetru	Konstanta k ($\text{mm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$)
I	0,00967
II	0,10240
0a	0,03086

4.2 Měření viskozity HA ve vodě a rozpouštědlech z Hofmeisterovy řady

4.2.1 Použité materiály a příprava vzorků

- demineralizovaná voda s vodivostí 18,2 μS
- sodná sůl HA, $M = 1,8\text{-}2,1 \text{ MDa}$ ($1,8\text{-}2,1 \text{ Mg} \cdot \text{mol}^{-1}$), Contipro Ltd., Česká republika
- síran sodný ($\geq 99 \%$), Sogma Aldrich
- síran amonný ($\geq 99 \%$), Sogma Aldrich
- thiokyanatan sodný ($\geq 99 \%$), Sogma Aldrich
- thiokyanatan amonný ($\geq 99 \%$), Sogma Aldrich

- chlorid sodný ($\geq 99\%$), Sogma Aldrich, BIO kvalita

Nejdříve se vypočítala navážka sodné soli HA podle následujícího postupu:

Roztok HA byl 0,1 hm. %, což odpovídá hodnotě 0,001 v jednotkovém rozměru. Použitý objem byl 40 mL.

$$m_{HA} = 0,001 \cdot 40 = 0,04g \quad (8)$$

Tato navážka kyseliny byla rozpuštěna ve 40 mL destilované vody. Toto rozpouštění probíhalo při 50 °C za stálého míchání po dobu minimálně 24 h. Ke stanovení limitního viskozitního čísla (LVČ) a Hugginsovy konstanty 0,1 hm. % roztoku HA rozpuštěného v destilované vodě byl roztok zředěn do pěti různých koncentrací: 1 g.L⁻¹; 0,7 g.L⁻¹; 0,5 g.L⁻¹; 0,25 g.L⁻¹ a 0,1 g.L⁻¹. Měření probíhalo při teplotě 37 °C a 25 °C.

Následovala pipetace objemů zásobního roztoku, který byl připraven rozpuštěním 0,04g HA ve 40 mL destilované vody. Celkový objem, do kterého se pipetovalo, byl 15 mL.

$$V_{0,7} = \frac{c \cdot V}{c} = \frac{0,7g \cdot L^{-1} \cdot 0,015L}{1g \cdot L^{-1}} = 0,0105 L = 10,5mL \quad (9)$$

$$V_{0,5} = \frac{c \cdot V}{c} = \frac{0,5g \cdot L^{-1} \cdot 0,015L}{1g \cdot L^{-1}} = 0,0075 L = 7,5mL \quad (10)$$

$$V_{0,25} = \frac{c \cdot V}{c} = \frac{0,25g \cdot L^{-1} \cdot 0,015L}{1g \cdot L^{-1}} = 0,00375 L = 3,75mL \quad (11)$$

$$V_{0,1} = \frac{c \cdot V}{c} = \frac{0,1g \cdot L^{-1} \cdot 0,015L}{1g \cdot L^{-1}} = 0,0015 L = 1,5mL \quad (12)$$

Tyto jednotlivé objemy se odpipetovaly do zásobní lahvičky a doplnily destilovanou vodou do celkového objemu 15 mL. Následně se měřila viskozita jednotlivých koncentrací.

Pro měření s jiným rozpuštědlem než destilovanou vodou, se postupovalo následovně:

Nejdříve se vypočítala navážka použité soli podle následující rovnice (uveden příklad pro síran sodný):

Vychází se z iontové síly roztoku, která byla $I = 0,1$.



$$I = 0,5 \cdot (c_i \cdot z_i^2) \quad (14)$$

$$I = 0,5 \cdot (2 \cdot c_{Na} \cdot 1^2 + 1 \cdot c_{Sir} \cdot 2^2)$$

$$I = 0,5 \cdot (6 \cdot c)$$

$$c = \frac{I}{6 \cdot 0,5} = \frac{0,1}{6 \cdot 0,5} = 0,033 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$$

$$M_{Siran} = 142,04 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}, V = 100 \text{ mL}$$

$$m_{Siran} = c \cdot V \cdot M = 0,033 \cdot 0,1 \cdot 142,04 = 0,4687 \text{ g}$$

Tento výpočet byl proveden u každé použité soli. Iontová síla zůstala u každé soli stejná, ale měnily se náboje a molární hmotnosti.

Tato navážka se rozpustila ve 100 mL destilované vody a sloužila jako zásobní roztok (rozpuštědlo) pro HA.

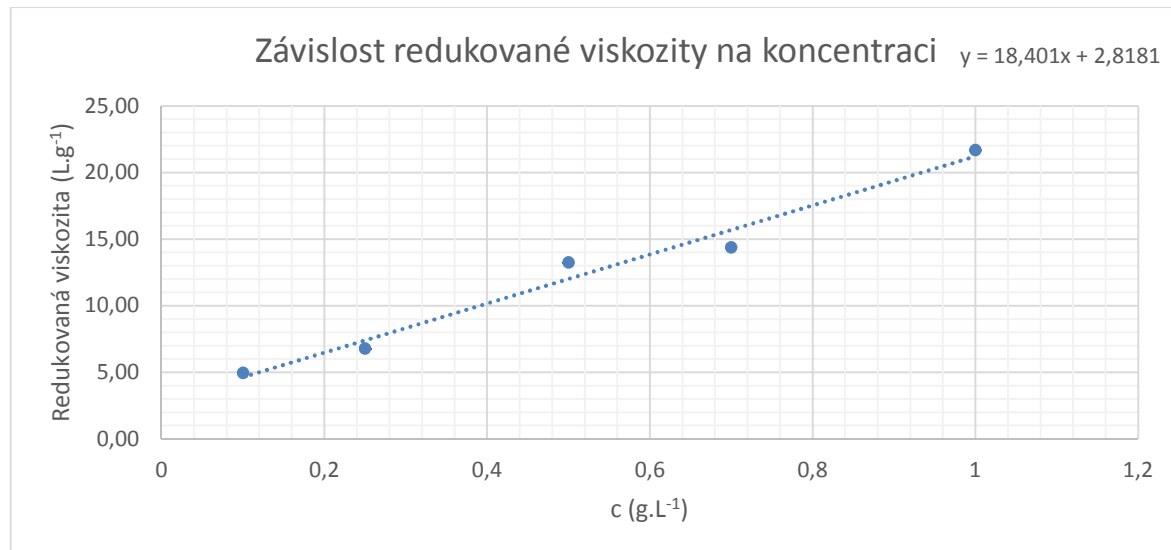
Dále se vypočítala navážka HA podle rovnice číslo (8). Tato navážka HA byla rozpuštěna ve 40 mL roztoku použitého rozpuštědla. Rozpuštění probíhalo také při 50 °C za stálého míchání po dobu minimálně 24 h. Ke stanovení limitního viskozitního čísla (LVČ) a Hugginsovy konstanty 0,1 hm.% roztoku HA rozpuštěného v roztoku soli byl roztok následně zředěn do pěti různých koncentrací: 1 g.L⁻¹; 0,7 g.L⁻¹; 0,5 g.L⁻¹; 0,25 g.L⁻¹ a 0,1 g.L⁻¹. Měření probíhalo při teplotě 25 °C a 37 °C.

Následovala pipetace objemů zásobního roztoku, který byl připraven rozpuštěním 0,04 g HA ve 40 mL roztoku použitého rozpuštědla podle rovnic (9, 10, 11, 12). Celkový objem, do kterého se pipetovalo, byl 15 mL.

Tyto jednotlivé objemy se odpipetovaly do zásobní lahvičky a doplnily destilovanou vodou do celkového objemu 15 mL. Následně se měřila viskozita jednotlivých koncentrací.

4.2.2 Výsledky a diskuze

4.2.2.1 Měření viskozity HA ve vodě viskozimetrem typu II



Obrázek 21: Graf závislosti redukované viskozity na koncentraci

Určení limitního viskozitního čísla z rovnice grafu:

$$v_{red} = kc + [\eta] \quad (15)$$

$$v_{red} = 18,401c + 2,8181 \quad (16)$$

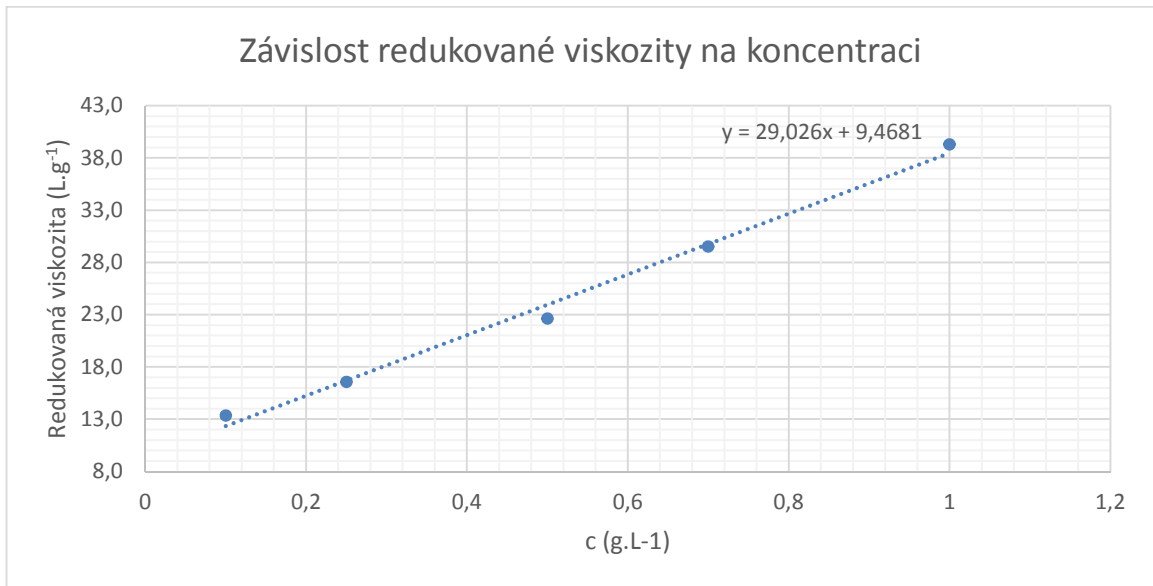
$$[\eta] = (2,8 \pm 0,9) \text{ L.g}^{-1}$$

Výpočet Hugginsovy konstanty (H_K):

$$H_K = \frac{k}{[\eta]^2} = \frac{18,401}{2,8181^2} = (2,4 \pm 1,7) \quad (17)$$

Viskozita byla měřena na viskozimetru typu II, který nebyl shledán jako vhodný z důvodu průtoku rozpouštědla, které má být 90 – 100 s. V tomto případě byl 10 s. Hugginsova konstanta je $(2,4 \pm 1,7)$, což odpovídá špatnému rozpouštědlu pro HA. Tento viskozimetr byl shledán jako nevhodný pro další měření a je uveden do práce jen pro srovnání.

4.2.2.2 Měření viskozity HA ve vodě viskozimetrem typu 0a

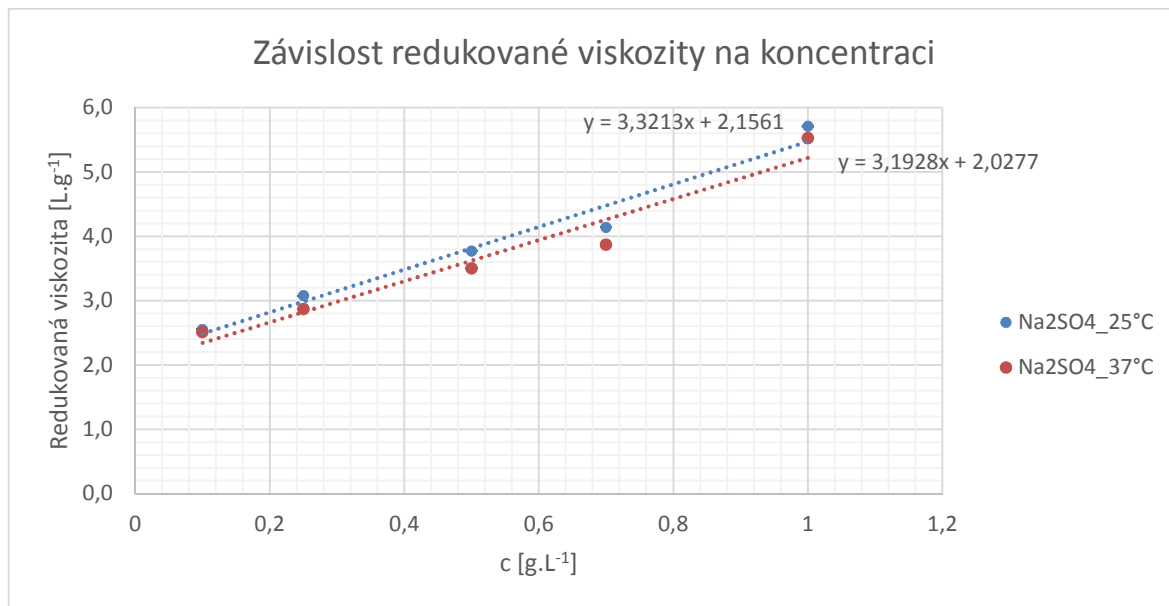


Obrázek 22: *Graf závislosti redukované viskozity na koncentraci*

Tabulka 3: *Vypočítané hodnoty LVČ a Hugginsovy konstanty*

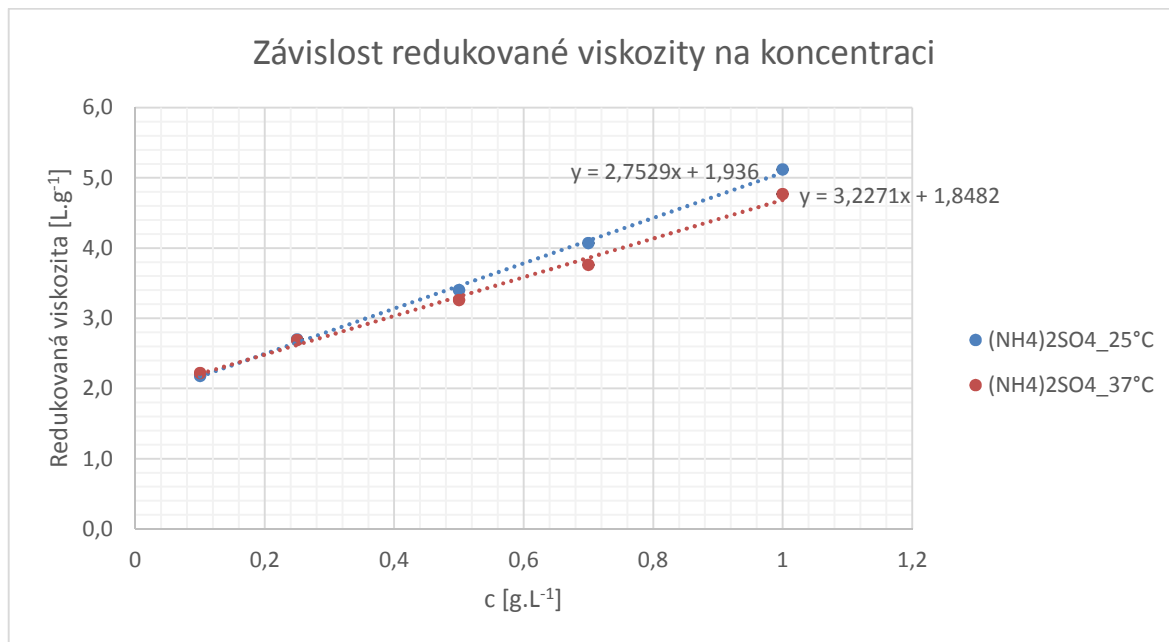
LVČ [L.g ⁻¹]	(9,5±0,9)
H _K [1]	(0,4±0,2)

Viskozita byla měřena na viskozimetru typu 0a. V tomto případě byl průtok rozpouštědla okolo 30 sekund, což je o něco lepší než v předchozím případě. Ovšem v tomto případě Hugginsova konstanta vyšla (0,4±0,2), což odpovídá dobrému rozpouštědлу. Tento viskozimetr není pro měření HA příliš vhodný, ale výsledky jsou reprodukovatelnější než v případě měření viskozimetrem typu II.

4.2.2.3 Měření viskozity HA s Na_2SO_4 Obrázek 23: Graf závislosti redukované viskozity na koncentraci (Na_2SO_4)Tabulka 4: Vypočítané hodnoty LVČ a Hugginsovy konstanty (Na_2SO_4)

LVČ (25 °C) [$\text{L}\cdot\text{g}^{-1}$]	(2,2±0,2)
H_K (25 °C) [1]	(0,7±0,2)
LVČ (37 °C) [$\text{L}\cdot\text{g}^{-1}$]	(2,1±0,3)
H_K (37 °C) [1]	(0,8±0,3)

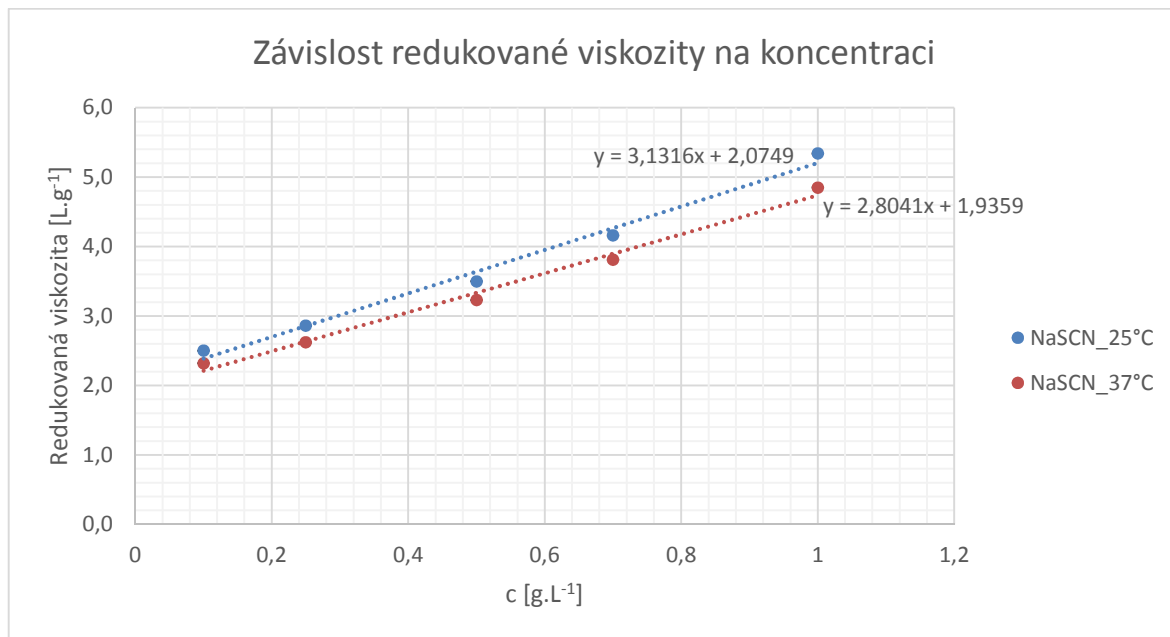
Viskozita byla měřena na viskozimetru typu I. V tomto případě byl průtok rozpouštědla okolo 90 sekund, což je v pořádku, a tento viskozimetr byl shledán jako vhodný pro měření. Hugginsova konstanta při 37 °C vyšla (0,8±0,3) a při 25 °C (0,7±0,2), což odpovídá špatnému rozpouštědлу. Při tomto měření byly porovnány výsledky měření jak při 25 °C, tak při 37 °C. Viskozita významně závisí na teplotě, tudíž viskozita je při 37 °C nižší, což dokazuje křivka na **Obrázek 23: Graf závislosti redukované viskozity na koncentraci (Na_2SO_4)**.

4.2.2.4 Měření viskozity HA s $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ Obrázek 24: Graf závislosti redukované viskozity na koncentraci $((\text{NH}_4)_2\text{SO}_4)$ Tabulka 5: Vypočítané hodnoty LVČ a Hugginsovy konstanty $((\text{NH}_4)_2\text{SO}_4)$

LVČ (25 °C) [L.g ⁻¹]	(1,85±0,05)
H _K (25 °C) [1]	(0,95±0,06)
LVČ (37 °C) [L.g ⁻¹]	(1,94±0,08)
H _K (37 °C) [1]	(0,74±0,09)

Viskozita byla měřena na viskozimetru typu I. V tomto případě byl průtok rozpouštědla okolo 90 sekund, což je v pořádku, a tento viskozimetr byl shledán jako vhodný pro měření. Hugginsova konstanta při 37 °C vyšla (0,74±0,09) a při 25 °C (0,95±0,06), což odpovídá špatnému rozpouštědлу. Při tomto měření byly porovnány výsledky měření jak při 25 °C, tak při 37 °C. Viskozita významně závisí na teplotě, tudíž viskozita je při 37 °C nižší, což dokazuje křivka na **Obrázek 24: Graf závislosti redukované viskozity na koncentraci $((\text{NH}_4)_2\text{SO}_4)$.**

4.2.2.5 Měření viskozity HA s NaSCN

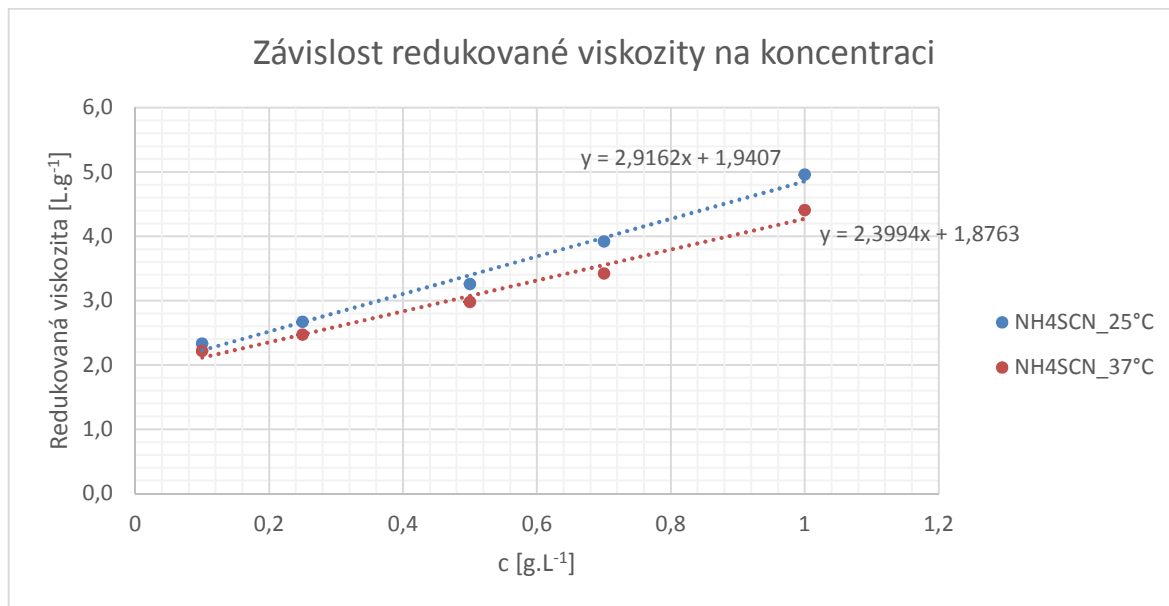


Obrázek 25: Graf závislosti redukované viskozity na koncentraci (NaSCN)

Tabulka 6: Vypočítané hodnoty LVČ a Hugginsovy konstanty (NaSCN)

LVČ (25 °C) [$\text{L}\cdot\text{g}^{-1}$]	(2,1±0,2)
H _K (25 °C) [1]	(0,8±0,2)
LVČ (37 °C) [$\text{L}\cdot\text{g}^{-1}$]	(2,0±0,1)
H _K (37 °C) [1]	(0,8±0,1)

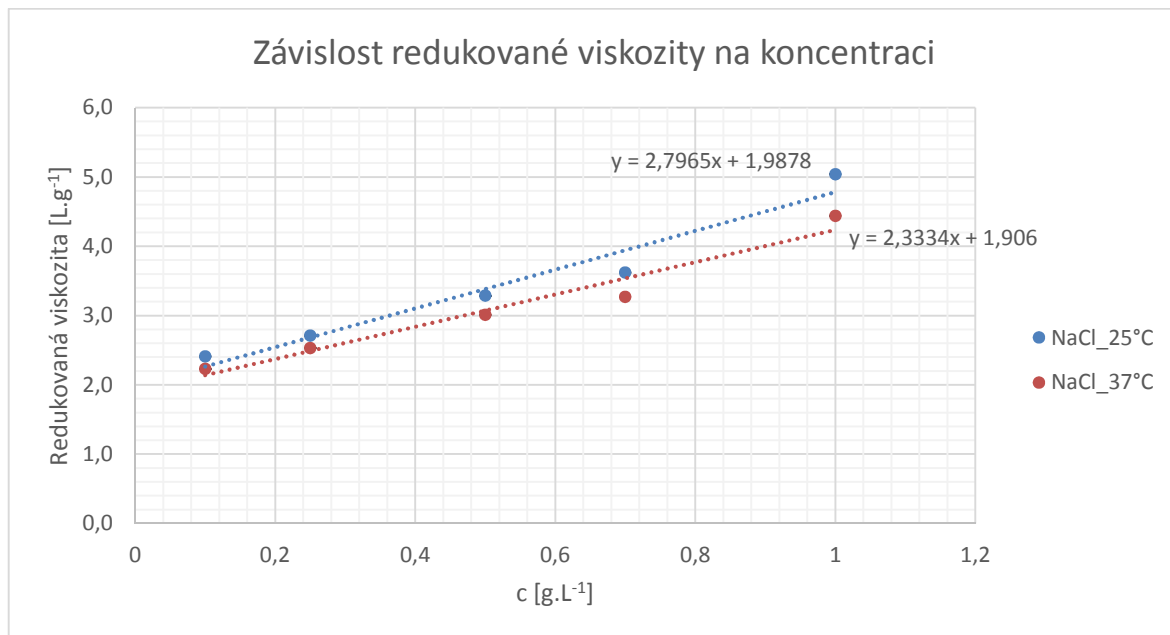
Viskozita byla měřena na viskozimetru typu I. V tomto případě byl průtok rozpouštědla okolo 90 sekund, což je v pořádku, a tento viskozimetr byl shledán jako vhodný pro měření. Hugginsova konstanta při 37 °C vyšla (0,8±0,1) a při 25 °C (0,8±0,2), což odpovídá špatnému rozpouštědлу. Při tomto měření byly porovnány výsledky měření jak při 25 °C, tak při 37 °C. Viskozita významně závisí na teplotě, tudíž viskozita je při 37 °C nižší, což dokazuje křivka na **Obrázek 25: Graf závislosti redukované viskozity na koncentraci (NaSCN)**.

4.2.2.6 Měření viskozity HA s NH_4SCN Obrázek 26: Graf závislosti redukované viskozity na koncentraci (NH_4SCN)Tabulka 7: Vypočítané hodnoty LVČ a Hugginsovy konstanty (NH_4SCN)

LVČ (25 °C) [L.g ⁻¹]	(2,0±0,2)
HK (25 °C) [1]	(0,8±0,1)
LVČ (37 °C) [L.g ⁻¹]	(1,9±0,2)
HK (37 °C) [1]	(0,7±0,2)

Viskozita byla měřena na viskozimetru typu I. V tomto případě byl průtok rozpouštědla okolo 90 sekund, což je v pořádku, a tento viskozimetr byl shledán jako vhodný pro měření. Hugginsova konstanta při 37 °C vyšla (0,7±0,2) a při 25 °C (0,8±0,1), což odpovídá špatnému rozpouštědлу. Při tomto měření byly porovnány výsledky měření jak při 25 °C, tak při 37 °C. Viskozita významně závisí na teplotě, tudíž viskozita je při 37 °C nižší, což dokazuje křivka na **Obrázek 26: Graf závislosti redukované viskozity na koncentraci (NH_4SCN)**.

4.2.2.7 Měření viskozity HA s NaCl



Obrázek 27: Graf závislosti redukované viskozity na koncentraci (NaCl)

Tabulka 8: Vypočtené hodnoty LVČ a Hugginsovy konstanty (NaCl)

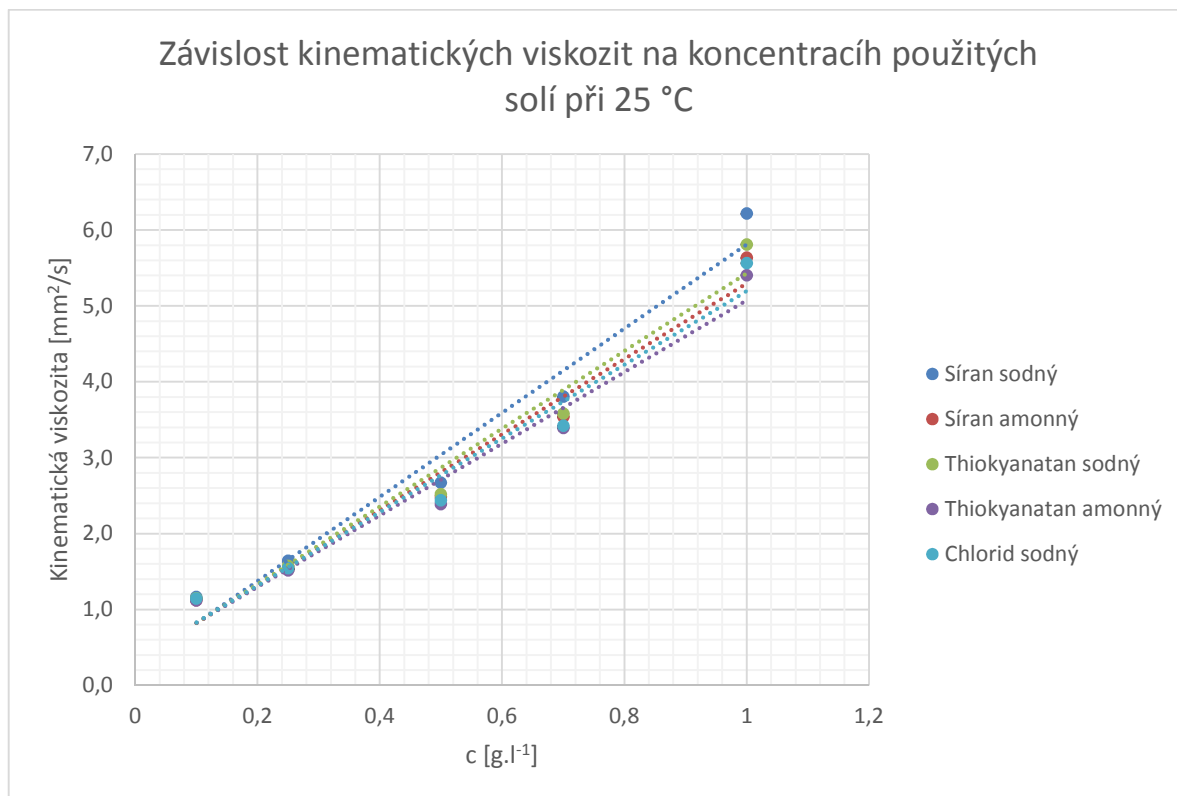
LVČ (25 °C) [L.g ⁻¹]	(2,0±0,3)
H _K (25 °C) [1]	(0,7±0,3)
LVČ (37 °C) [L.g ⁻¹]	(1,9±0,2)
H _K (37 °C) [1]	(0,7±0,2)

Viskozita byla měřena na viskozimetru typu I. V tomto případě byl průtok rozpouštědla okolo 90 sekund, což je v pořádku, a tento viskozimetr byl shledán jako vhodný pro měření. Hugginsova konstanta při 37 °C vyšla (0,7±0,2) a při 25 °C (0,7±0,3), což odpovídá špatnému rozpouštědлу. Roztok NaCl byl shledán jako nejideálnější na rozpouštění HA, poněvadž jeho H_K je ze všech solí, které byly použity na rozpouštění HA, nejnižší. Při tomto měření byly porovnány výsledky měření jak při 25 °C, tak při 37 °C. Viskozita významně závisí na teplotě, tudíž viskozita je při 37 °C nižší, což dokazuje křivka na **Obrázek 27: Graf závislosti redukované viskozity na koncentraci (NaCl)**.

5 POROVNÁNÍ VŠECH SOLÍ Z HOFMEISTEROVY ŘADY IONTŮ

V této kapitole byla vyhodnocena a mezi sebou porovnána všechna měření viskozity HA.

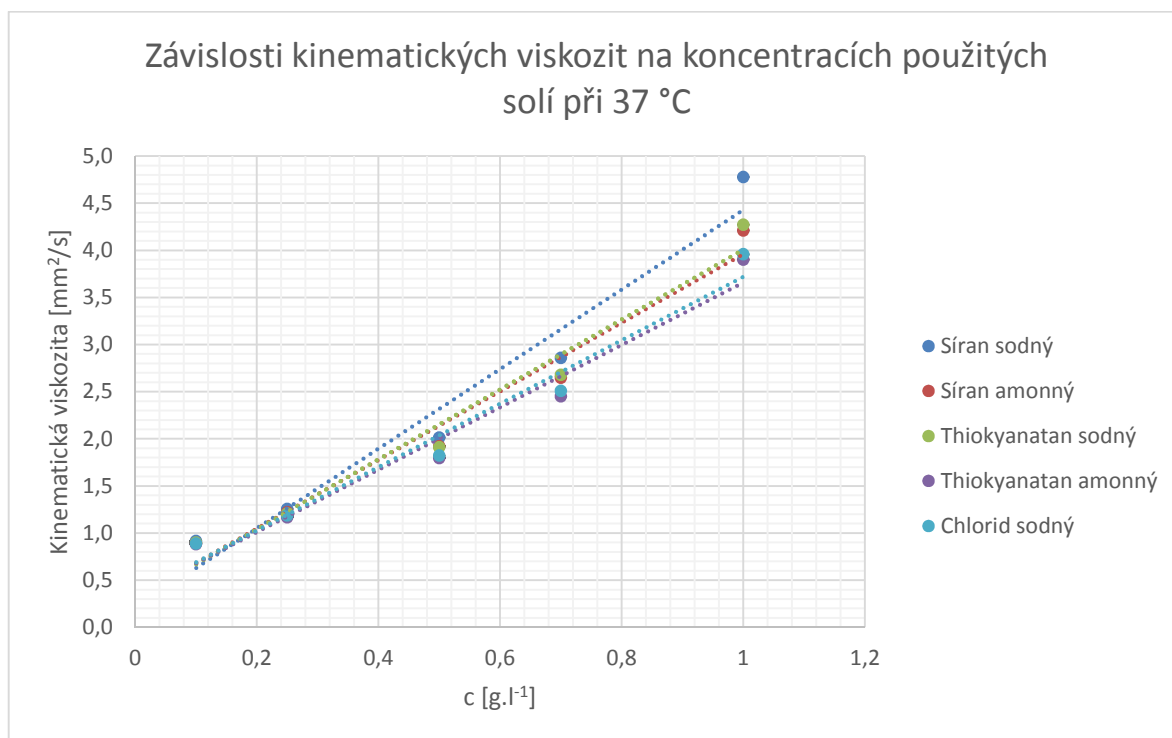
5.1 Grafy a tabulky



Obrázek 28: Graf závislosti kinematických viskozit na koncentracích použitých solí (25 °C)

Tabulka 9: Hodnoty Hugginsovy konstanty a LVČ (25 °C)

	LVČ [L.g ⁻¹]	H _K [1]
Na ₂ SO ₄	(2,2±0,2)	(0,8±0,2)
(NH ₄) ₂ SO ₄	(1,85±0,05)	(0,95±0,06)
NaSCN	(2,1±0,2)	(0,8±0,2)
NH ₄ SCN	(2,0±0,1)	(0,8±0,1)
NaCl	(2,0±0,3)	(0,7±0,3)



Obrázek 29: Graf závislosti kinematických viskozit na koncentracích použitých solí (37 °C)

Tabulka 10: Hodnoty Hugginsovy konstanty a LVČ (37 °C)

	LVČ [L.g ⁻¹]	H _K [1]
Na ₂ SO ₄	(2,1±0,3)	(0,8±0,3)
(NH ₄) ₂ SO ₄	(1,94±0,08)	(0,74±0,09)
NaSCN	(2,0±0,1)	(0,8±0,1)
NH ₄ SCN	(1,9±0,2)	(0,7±0,2)
NaCl	(1,9±0,2)	(0,7±0,2)

5.2 Diskuze

Při této experimentální práci byly použity ionty z HŘ iontů, konkrétně Na⁺, NH₄⁺, SO₄²⁻, SCN⁻ a Cl⁻. Z těchto iontů byla utvořena rozpouštědla Na₂SO₄, NaCl, NaSCN, NH₄SCN a (NH₄)₂SO₄. Z hlediska rozdělení iontů na kosmotropní a chaotropní poté plyne chování polymerního řetězce, a tudíž i jejich viskozita.

Rozpouštědlo Na_2SO_4 je složeno z obou kosmotropních iontů, tudíž tyto ionty mají vysoký stupeň hydratace a zvyšují hydrofobní interakci s polymerem (HA). V řetězci tak nepřevládají interakce s molekulami rozpouštědla, ale interakce polymeru samého se sebou. Polymer (HA) se tak dobře nerozpouští, a viskozita tohoto roztoku je tudíž nejvyšší. Při $37\text{ }^\circ\text{C}$ bylo nejhorsí ze všech rozpouštědel.

Dalším rozpouštědlem byl NaSCN . Iont Na^+ je kosmotropní a SCN^- je chaotropní. Zde existují jak interakce polymeru (HA) s molekulami rozpouštědla (chaotropní iont), tak i interakce polymeru samého se sebou (kosmotropní iont). Viskozita je nižší než v případě rozpouštědla Na_2SO_4 .

Třetím rozpouštědlem byl $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Iont NH_4^+ je chaotropní a SO_4^{2-} je kosmotropní. Zde existují jak v předchozím případě interakce polymeru (HA) s molekulami rozpouštědla i interakce polymeru samého se sebou. Viskozita je podobná viskozitě v případě rozpouštědla NaSCN . Toto rozpouštědlo bylo shledáno jako nejhorsí při $25\text{ }^\circ\text{C}$.

Jako předposlední rozpouštědlo bylo použito NaCl . Iont Na^+ je kosmotropní a iont Cl^- je chaotropní. Zde jsou jak interakce polymeru (HA) samého se sebou, tak i interakce s rozpouštědlem. Tyto oba ionty jsou ale v řadě nejbliže středu rozdělení, proto rozpouštědlo NaCl vyšlo v případě měření při $25\text{ }^\circ\text{C}$ i $37\text{ }^\circ\text{C}$ jako nejlepší ze všech. Viskozita je tedy nižší než v případě prvních tří rozpouštědel.

A na závěr rozpouštědlo NH_4SCN . Oba ionty jsou chaotropní. Probíhají zde převážně interakce polymeru (HA) s rozpouštědlem než interakce polymeru (HA) se sebou samým. Viskozita je proto nejnížší ze všech.

Obecně porovnání rozpouštění HA ve vodě a v rozpouštědlech z HŘ iontů je jasné. Viskozita při použití rozpouštědel z HŘ se radikálně sníží, a to právě z důvodu přítomnosti jednotlivých iontů, které ovlivňují právě interakce s vodou a polymerem (HA). Takže po shrnutí je při $25\text{ }^\circ\text{C}$ i při $37\text{ }^\circ\text{C}$ nejvhodnější rozpouštědlo NaCl . Jako nejhorsí rozpouštědlo bylo shledáno při $25\text{ }^\circ\text{C}$ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ a při $37\text{ }^\circ\text{C}$ Na_2SO_4 .

ZÁVĚR

Bakalářská práce se skládá z teoretické části zaměřené na molekulu HA, dále pochopení podstaty HŘ a měření viskozity. Měření viskozity je popsáno v experimentální části. Hlavní problematikou experimentální části bylo stanovení LVČ a H_K . H_K udává, jaké je rozpouštědlo vůči molekule HA a LVČ udává, jakou viskozitu má mít čisté rozpouštědlo.

Nejhorší rozpouštědlo je při teplotě 25 °C $(NH_4)_2SO_4$ a při teplotě 37 °C Na_2SO_4 . Zato nejlepší bylo shledáno NaCl při 37 °C i při 25 °C. Z teoretické části plyne, že viskozita opravdu velmi závisí na teplotě.

Metodika měření viskozity na Ubbelohdeho viskozimetru patří mezi jednodušší. Mezi další metody sledování chování polymerního klubka HA patří například měření tekutosti (reologie), gelová permeační chromatografie, rentgenová difrakce a mnoho jiných. Polymerní klubko HA není zatím dokonale probádáno a je předmětem mnoha výzkumů. Jako další metodiku na navazující výzkum v této práci by bylo možné použít právě reologická měření dynamické viskozity a neomezovat se pouze na vysoce zředěné roztoky.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] *Hyaluronic acid: A biopolymer with Versatile Physico-chemical and biological properties*. USA: Nova Science Publishers, Inc., 2007. ISBN 978-1-60021-652-0.
- [2] Kyselina hyaluronová - molekula mládí. *Něco málo z historie* [online]. 2014 [cit. 2014-11-15]. Dostupné z: <http://www.molekula-mladi.cz/neco-malo-z-historie>
- [3] *Chemistry and biology of hyaluronan*. 1st ed. Amsterdam: Elsevier, 2004, 605 s. ISBN 00-804-4382-6.
- [4] Wikipedie. *Extracelulární matrix* [online]. 2013 [cit. 2014-11-30]. Dostupné z: http://cs.wikipedia.org/wiki/Extracelul%C3%A1rn%C3%AD_matrix
- [5] LAURENT, Torvard C, Ulla BG LAURENT a J Robert E FRASER. The structure and function of hyaluronan: An overview. *Immunology and Cell Biology* [online]. 1996, vol. 74, issue 2, A1-A7 [cit. 2015-03-16]. DOI: 10.1038/icb.1996.32.
- [6] UniProt. *HAPLN1: Hyaluronan and proteoglycan link protein 1* [online]. 2014 [cit. 2014-12-23]. Dostupné z: <http://www.uniprot.org/uniprot/P10915>
- [7] Wikipedie. *Glykokalyx* [online]. 2013 [cit. 2014-12-25]. Dostupné z: <http://cs.wikipedia.org/wiki/Glykokalyx>
- [8] SCOTT, John E., Yuan CHEN a Andy BRASS. Secondary and tertiary structures involving chondroitin and chondroitin sulphates in solution, investigated by rotary shadowing/electron microscopy and computer simulation. *European Journal of Biochemistry* [online]. 1992, vol. 209, issue 2, s. 675-680 [cit. 2015-03-16]. DOI: 10.1111/j.1432-1033.1992.tb17335.x.
- [9] Bloomage Freda Biapharm Co., Ltd. *Sodium Hyaluronate-Bloomage Freda Biapharm Co., Ltd.* [online]. 2014 [cit. 2015-03-08]. Dostupné z: <http://www.bloomagefreda.com/tech01en/id/36.html>
- [10] Chempoint. *Známý neznámý hyaluronan* [online]. 2011 [cit. 2015-03-08]. Dostupné z: <http://www.chempoint.cz/znamy-neznamy-hyaluronan>
- [11] Nature. *Structure and synthesis of hyaluronan* [online]. 2004 [cit. 2015-03-08]. Dostupné z: http://www.nature.com/nrc/journal/v4/n7/box/nrc1391_BX1.html
- [12] LAPČÍK, Ľubomír. *Nauka o materiálech II*. 1. vyd. Zlín: Univerzita Tomáše Bati, 2000, 115 s. ISBN 80-238-6527-7.

- [13] Hyaluronic-acid-sm.jpg. In: *Hyaluronic Acid Provides the Ideal Hydration in a Sunscreen For Rich Complexions* [online]. 2012 [cit. 2015-03-17]. Dostupné z: <http://extrashade.com/wp-content/uploads/2012/06/hyaluronic-acid-sm.jpg>
- [14] Hyaluronát – nejen pasivní pozorovatel, nýbrž aktivní modulátor imunitních reakcí. *Neumm* [online]. 2009, č. 2 [cit. 2015-03-17]. Dostupné z: http://www.neumm.cz/public/img/neumm_09_12/pdf/sliva_minarik_hyaluronat.pdf
- [15] COWMAN, Mary K., Shiro MATSUOKA, Naoki ITANO, Katia HAXAIRE, Eric BUHLER, Michel MILAS, Serge PEREZ, Marguerite RINAUDO a Bryan TOOLE. Experimental approaches to hyaluronan structure. *Carbohydrate Research* [online]. 2005, vol. 340, issue 5, s. 69-86 [cit. 2015-03-19]. DOI: 10.1201/9780203909720.ch4.
- [16] COWMAN, Mary K., Min LI, Endre A. BALAZS, Mary K. COWMAN, Min LI, Ansil DYAL a Sonoko KANAI. Tapping Mode Atomic Force Microscopy of Hyaluronan: Extended and Intramolecularly Interacting Chains. *Biophysical Journal* [online]. 1998, vol. 75, issue 4, s. 109-116 [cit. 2015-03-20]. DOI: 10.1533/9781845693121.117.
- [17] SELYANIN, Petr Ya. BOKOV a Vladimir N. KHABAROV. *Hyaluronic Acid: Preparation, Properties, Application in Biology and Medicine*. West Sussex: John Wiley nad sons, 2015. ISBN 978-1-118-63379-3.
- [18] ZHANG, Y a P CREMER. Interactions between macromolecules and ions: the Hofmeister series. *Current Opinion in Chemical Biology* [online]. 2006, vol. 10, issue 6, s. 658-663 [cit. 2015-03-23]. DOI: 10.1016/j.cbpa.2006.09.020.
- [19] Moderní pohled na Hofmeisterovu iontovou řadu. *Scienceworld* [online]. 2014 [cit. 2015-03-23]. Dostupné z: http://www.scienceworld.cz/aktuality/moderni-pohled-na-hofmeisterovu-iontovou-radu/?switch_theme=desktop
- [20] CACACE, M. G., E. M. LANDAU a J. J. RAMSDEN. The Hofmeister series: salt and solvent effects on interfacial phenomena. *Quarterly Reviews of Biophysics* [online]. 1997, vol. 30, issue 3, s. 241-277 [cit. 2015-03-26]. DOI: 10.1017/s0033583597003363.

- [21] MRÁČEK, Aleš, Júlia VARHANÍKOVÁ, Marián LEHOCKÝ, Lenka GŘUNDĚLOVÁ, Alena POKOPCOVÁ a Vladimír VELEBNÝ. The Influence of Hofmeister Series Ions on Hyaluronan Swelling and Viscosity. *Molecules* [online]. 2008, vol. 13, issue 5, s. 1025-1034 [cit. 2015-03-26]. DOI: 10.1163/2352-0248_edn_a1727000.
- [22] YANG, Zhen, Maja HABULIN, Mateja PRIMOI, eljko KNEZ a Roger A. SHELDON. Hofmeister effects: an explanation for the impact of ionic liquids on biocatalysis. *Journal of Biotechnology* [online]. 2009, vol. 144, issue 1, s. 20-43 [cit. 2015-03-26]. DOI: 10.1039/9781849737210-00020.
- [23] *Water structure and science* [online]. 2015 [cit. 2015-03-26]. Dostupné z: http://www1.lsbu.ac.uk/water/water_structure_science.html
- [24] SALIS, Andrea a Barry W. NINHAM. Models and mechanisms of Hofmeister effects in electrolyte solutions, and colloid and protein systems revisited. *Chem. Soc. Rev* [online]. 2014, vol. 43, issue 21, s. 7358-7377 [cit. 2015-03-28]. DOI: 10.1039/c4cs00144c.
- [25] Hofmeister Ion Series and Its Mechanism of Action on Affecting the Behavior of Macromolecular Solutes in Aqueous Solution. *Progchem* [online]. 2014, č. 26 [cit. 2015-03-28]. DOI: 10.7536/PC140436. Dostupné z: <http://www.progchem.ac.cn/EN/abstract/abstract11398.shtml#>
- [26] Vsb.cz. *Viskozita a její měření* [online]. 2010, č. 1 [cit. 2015-03-30]. Dostupné z: www.338.vsb.cz/PDF/TEXTviskozitaPDF.pdf
- [27] Vscht.cz. *Stanovení viskozity* [online]. 2010 [cit. 2015-03-30]. Dostupné z: http://old.vscht.cz/met/stranky/vyuka/labcv/labor/res_stanoveni_viskozity_roztoku/teorie.htm
- [28] Rheology. *The Newtonian fluid* [online]. 2004, č. 1 [cit. 2015-03-30]. Dostupné z: <http://www.eolss.net/sample-chapters/c06/e6-197-03-00.pdf>
- [29] Katedra mechaniky. FAV, ZČU v Plzni. In: *4 Neneutonské kapaliny* [online]. 2004 [cit. 2015-03-30]. Dostupné z: www.kme.zcu.cz/granty/biofrvs/pdf/4-01FRVS-03.pdf
- [30] Carbohydrate research. *Towards understanding the interaction between oligosaccharides and water molecules* [online]. 2005, č. 1 [cit. 2015-03-31]. Dostupné z: www.sciencedirect.com

- [31] Helago-cz. In: *12919.jpg* [online]. 2012 [cit. 2015-03-31]. Dostupné z: <http://www.helago-cz.cz/public/content-images/cz/set/12919.jpg>
- [32] *Laboratorní návody do Fyzikální Chemie II*. Zlín, 2014.
- [33] POUCHLÝ, Julius. *Fyzikální chemie makromolekulárních a koloidních soustav*. Vyd. 3. Praha: Vydavatelství VŠCHT, 2008, 205 s. ISBN 978-80-7080-674-6.
- [34] Vscht.cz. *Roztoky makromolekul* [online]. 2010 [cit. 2015-04-07]. Dostupné z: http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_es-001/hesla/roztoky_makromolekul.html
- [35] Snipview. In: *Theta solvent* [online]. [cit. 2015-04-07]. Dostupné z: <http://cool.conservation-us.org/jaic/img/jaic30-02-008-fig001.jpg>

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

MDa Megadalton, jednotka molární hmotnosti.

Da Dalton, jednotka molární hmotnosti.

HA Kyselina hyaluronová.

mg Miligram, jednotka hmotnosti.

g Gram, jednotka hmotnosti.

kg Kilogram, jednotka hmotnosti.

°C Stupeň Celsia, jednotka teploty.

pH Stupeň kyselosti/zásaditosti.

cm³ Centimetr krychlový, objemová jednotka.

dm³ Decimetr krychlový, objemová jednotka.

nm Nanometr, jednotka délky.

μm Mikrometr, jednotka délky.

mm² Milimetr čtverečný, jednotka plochy.

m² Metr čtverečný, jednotka plochy.

I Iontová síla.

η Dynamická viskozita.

dv Změna rychlosti.

dy Změna ve směru y.

Pa Pascal, jednotka tlaku.

s Sekunda, jednotka času.

N Newton, jednotka síly.

τ Značení času.

v Rychlost.

k Konstanta viskozimetru.

ν	Kinematická viskozita.
c	Koncentrace.
mol	Látkové množství.
μS	MikroSiemens, jednotka vodivosti.
V	Objem.
LVČ	Limitní viskozitní číslo.
H_K	Hugginsova konstanta.
hm.	Hmotnostní.
Ltd.	Limited company.
HŘ	Hofmeisterova řada

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: <i>Viskoelastická vlastnost HA [13]</i>	12
Obrázek 2: <i>Primární struktura hyaluronanu [1]</i>	15
Obrázek 3: <i>Ukázka vodíkových vazeb a vazeb s molekulou vody [30]</i>	16
Obrázek 4: <i>Sekundární struktura HA v závislosti na prostředí [9]</i>	17
Obrázek 5: <i>Terciární struktura HA ve vodném roztoku (a) [8]</i>	18
Obrázek 6: <i>Terciární struktura HA ve vodném roztoku (b) [8]</i>	18
Obrázek 7: <i>Uspořádání řetězce HA ve vodném prostředí[11]</i>	19
Obrázek 8: <i>Ve zředěných roztocích vlevo a v koncentrovancých vpravo [5]</i>	19
Obrázek 9: <i>Smyčka řetězce HA bezintramolekulárního sebesdružení [16]</i>	20
Obrázek 10: <i>Zapletení řetězce bezintramolekulárního sebesdružení [16]</i>	21
Obrázek 11: <i>Zapletení řetězce s intramolekulárním sebesdružením [16]</i>	21
Obrázek 12: <i>Hofmeisterova řada a rozdělení iontů [22]</i>	23
Obrázek 13: <i>Interakce aniontů a kationtů s vodou a makromolekulou [25]</i>	25
Obrázek 14: <i>Interakce kosmotropních a chaotropních iontů s vodou [25]</i>	25
Obrázek 15: <i>Snižující se interakce mezi kosmotropními a chaotropními ionty</i>	26
Obrázek 16: <i>Spojování jednotlivých iontů ve vodném roztoku [25]</i>	26
Obrázek 17: <i>Rychlostní model proudící kapaliny [27]</i>	29
Obrázek 18: <i>Nelineární závislost průtoku na tlakovém gradientu [29]</i>	30
Obrázek 19: <i>Ubbelohdeho viskozimetr [31]</i>	31
Obrázek 20: <i>Dobré a špatné rozpouštědlo [35]</i>	33
Obrázek 21: <i>Graf závislosti redukované viskozity na koncentraci</i>	38
Obrázek 22: <i>Ggraf závislosti redukované viskozity na koncentraci</i>	39
Obrázek 23: <i>Graf závislosti redukované viskozity na koncentraci (Na₂SO₄)</i>	40
Obrázek 24: <i>Graf závislosti redukované viskozity na koncentraci ((NH₄)₂SO₄)</i>	41
Obrázek 25: <i>Graf závislosti redukované viskozity na koncentraci (NaSCN)</i>	42
Obrázek 26: <i>Graf závislosti redukované viskozity na koncentraci (NH₄SCN)</i>	43
Obrázek 27: <i>Graf závislosti redukované viskozity na koncentraci (NaCl)</i>	44
Obrázek 28: <i>Graf závislosti kinematických viskozit na koncentracích použitých solí (25 °C)</i>	45
Obrázek 29: <i>Graf závislosti kinematických viskozit na koncentracích použitých solí (37 °C)</i>	46

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: <i>Typy rozpouštědel v závislosti na Hugginsově konstantě</i>	32
Tabulka 2: <i>Typy viskozimetrů</i>	35
Tabulka 3: <i>Vypočítané hodnoty LVČ a Hugginsovy konstanty</i>	39
Tabulka 4: <i>Vypočítané hodnoty LVČ a Hugginsovy konstanty (Na₂SO₄)</i>	40
Tabulka 5: <i>Vypočítané hodnoty LVČ a Hugginsovy konstanty ((NH₄)₂SO₄)</i>	41
Tabulka 6: <i>Vypočítané hodnoty LVČ a Hugginsovy konstanty (NaSCN)</i>	42
Tabulka 7: <i>Vypočítané hodnoty LVČ a Hugginsovy konstanty (NH₄SCN)</i>	43
Tabulka 8: <i>Vypočtené hodnoty LVČ a Hugginsovy konstanty (NaCl)</i>	44
Tabulka 9: <i>Hodnoty Hugginsovy konstanty a LVČ (25 °C)</i>	45
Tabulka 10: <i>Hodnoty Hugginsovy konstanty a LVČ (37 °C)</i>	46

SEZNAM PŘÍLOH

PŘÍLOHA P I: Ubbelohdeho viskozimetr s měřičem viscoclock.

PŘÍLOHA P II: Pevná forma kyseliny hyaluronové (HA).

PŘÍLOHA P I: UBBELOHDEHO VISKOZIMETR S MĚŘIČEM VISCOCLOCK



PŘÍLOHA P II: PEVNÁ FORMA KYSELINY HYALURONOVÉ (HA)

