

VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ

ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE

FACULTY OF CHEMISTRY

INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

VLIV TEPLoty NA KVALITU HYDOFOBní DOMÉNY AGREGÁTŮ V SYSTÉMU BIOPOLYMER-TENZID

INFLUENCE OF THE TEMPERATURE ON HYDROPHOBIC DOMAIN
QUALITY IN A BIOPOLYMER-SURFACTANT SYSTEM.

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

ZUZANA HNYLUCHOVÁ

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. FILIP MRAVEC, Ph.D.

BRNO 2010



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

Zadání bakalářské práce

Číslo bakalářské práce:	FCH-BAK0407/2009	Akademický rok: 2009/2010
Ústav:	Ústav fyzikální a spotřební chemie	
Student(ka):	Zuzana Hnylučová	
Studijní program:	Chemie a chemické technologie (B2801)	
Studijní obor:	Spotřební chemie (2806R002)	
Vedoucí práce	Ing. Filip Mravec, Ph.D.	
Konzultanti:	Ing. Tereza Halasová	

Název bakalářské práce:

Vliv teploty na kvalitu hydrofobní domény agregátů v systému biopolymer-tenzid

Zadání bakalářské práce:

1. Shromáždit literární poznatky o metodách studia vlivu teploty na kvalitu hydrofobní domény v systémech biopolymer-tenzid, zvláště se zaměřením na využití fluorescenční spektroskopie a hyaluronan jako modelový biopolymer.
2. Seznámit se stanovením kvality hydrofobní domény v asociativních systémech, zvláště pak na její polaritu a viskozitu.
3. Navrhnout a provést základní experimenty k ověření využití uvedené metody ve studiu interakcí hyaluronanu s tenzidy.
4. Zhodnotit výsledky ve vztahu k formulaci nosičových systémů biologicky aktivních látek na bázi hyaluronanu.

Termín odevzdání bakalářské práce: 28.5.2010

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

Zuzana Hnylučová
Student(ka)

Ing. Filip Mravec, Ph.D.
Vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
Ředitel ústavu

V Brně, dne 1.12.2009

prof. Ing. Jaromír Havlica, DrSc.
Děkan fakulty

ABSTRAKT

Pomocí fluorescenční spektroskopie byla zkoumána změna polaritv v závislosti na teplotě v systému biopolymer-tenzid, kde byla použita fluorescenční sonda pyren pro svou unikátní citlivost na polaritu prostředí. Jako biopolymer byl zvolen polyanion hyaluronan o molekulové hmotnosti 1,4 MDa a 73 kDa. Tenzidem byl kationaktivní cetyltrimethylamonium bromid. Emisní spektra pyrenu byla měřena jako funkce teploty v systému tenzid - voda a tenzid - 0,15 mol dm⁻³ NaCl. Bylo zjištěno, že přidavek určité koncentrace hyaluronanu do vzorku obsahujícího CTAB ve většině případů nemá vliv na změnu klesající tendence polaritv s měnící se teplotou.

ABSTRACT

The temperature dependence on polarity has been investigated by fluorescence spectroscopy with pyrene as a probe. Pyrene was chosen thanks to its unique sensitivity to polarity of the medium. As a biopolymer was chosen 73 kDa and 1,4 MDa hyaluronic acid. Emission spectra of pyrene were measured as a function of temperature in aqueous solution of CTAB in a presence and absence of sodium chloride. The results show, that the addition of specific concentration of hyaluronic acid to the sample with CTAB, mostly doesn't have effect to change increasing/decreasing slope of polarity with the temperature.

KLÍČOVÁ SLOVA

fluorescenční spektroskopie, teplotní závislost, pyren, hyaluronan, tenzidy

KEYWORDS

fluorescence spectroscopy, temperature dependence, pyrene, hyaluronan, surfactants

HNYLUCHOVÁ, Z. *Vliv teploty na kvalitu hydrofobní domény agregátů v systému biopolymer - tenzid*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2010. 45 s. Vedoucí bakalářské práce Ing. Filip Mravec, Ph.D.

PROHLÁŠENÍ

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

.....
podpis studenta

Poděkování:

Ráda bych poděkovala Ing. Filipu Mravcovi Ph.D. za odborný dohled. Dále bych chtěla srdečně poděkovat Ing. Tereze Halasové a Janě Cimalové za obětavou spolupráci.

OBSAH

ÚVOD	7
1 Teoretická část	8
1.1 Kyselina hyaluronová	8
1.1.1 Struktura	8
1.1.2 Výskyt:	9
1.2 Tenzidy	9
1.2.1 Cetyltrimethylamonium bromid (CTAB)	9
1.3 Tvorba micel	10
1.3.1 Kritická micelární koncentrace	10
1.3.2 Krafftova teplota	12
1.3.3 Solubilizace	12
1.4 Luminiscence	13
1.4.1 Vnitřní filtrační efekt	14
1.5 Fluorescenční sondy	14
1.5.1 Pyren	14
1.5.2 Excimer	15
2 Současný stav řešené problematiky	16
3 Materiály a metody	18
3.1 Materiály	18
3.2 Metody	19
3.2.1 Příprava vzorků	19
4 Měření a vyhodnocení dat	20
4.1 Korekce	20
4.2 Krafftova teplota	22
5 Výsledky a diskuze	23

5.1	CMC CTAB	23
5.2	Výběr koncentrací CTAB a hyaluronanu	24
5.3	CTAB v prostředí vody	25
5.4	CTAB v prostředí 0,15 mol dm⁻³ NaCl	27
5.5	1,4 MDa hyaluronan	29
5.5.1	V prostředí vody	29
5.5.2	V prostředí 0,15 molární NaCl	31
5.6	73 kDa hyaluronan	33
5.6.1	V prostředí vody	33
5.6.2	V prostředí 0,15 molární NaCl	35
6	Závěr	38
7	Seznam použitých zdrojů	40
8	Seznam použitých zkratk a symbolů	42
8.1	Seznam zkratk	42
8.2	Seznam symbolů	42
9	Seznam příloh	43
10	Přílohy	43
10.1	Příloha 1	43
10.2	Příloha 2	45

ÚVOD

Kyselina hyaluronová je látka již velmi dobře známá i široké veřejnosti. V lidském těle se velmi hojně vyskytuje již od počátečních fází života. Proto nachází obrovské uplatnění v medicíně, farmacii a také v kosmetickém průmyslu. První produkt obsahující hyaluronan byl vyvinut v 70. letech a registrován v 80. letech minulého století pro použití v očním lékařství (např. pro transplantaci rohovky, operaci zeleného zákalu aj.). Od té doby se již stala nedílnou součástí mnoha dalších produktů. V lékařství se již před delší dobou začala kyselina hyaluronová využívat v lokální léčbě popálenin a kožních vředů. V plastické chirurgii se používá k výplni vrásek, vtažených jizev či při zvětšení poprsí. Ačkoli už tento biopolymer využití našel, dále jsou zkoumány jeho vlastnosti a především interakce s ostatními biologickými molekulami. V současné době je s velkým zájmem zkoumán jako cílený nosič léčiv. V této oblasti by mohl být v budoucnu využíván při léčbě hlavně rakoviny. Nyní se podávají cytostatika zpravidla nitrožilně. Ty však nezabíjejí jen rakovinné buňky, ale postihují nepříznivě celé tělo. S tím souvisí problémy, jako jsou vypadávání vlasů, nevolnost a celkové zatížení organismu. Kyselina hyaluronová má zajistit cílení léčiva přímo k buňkám tumoru a tím tělu velmi ulevit.

Následující práce se zabývá studiem vlivu teploty na kvalitu hydrofobní domény agregátů v systému biopolymer - tenzid, kde byla jako biopolymer použita kyselina hyaluronová. Jako tenzid byl vybrán kationaktivní cetyltrimethylamonium bromid (CTAB). Vybranou metodou byla fluorescenční spektrofotometrie, při níž byl jako sonda použit pyren pro svou unikátní citlivost na polaritu prostředí. S měnící se teplotou pak byly sledovány změny vlastností vytvořeného systému hyaluronan - CTAB, a to jak ve vodném prostředí, tak také ve fyziologickém roztoku. Jako jednoduchý fyziologický roztok byl použit 0,15 molární roztok NaCl.

1 Teoretická část

1.1 Kyselina hyaluronová

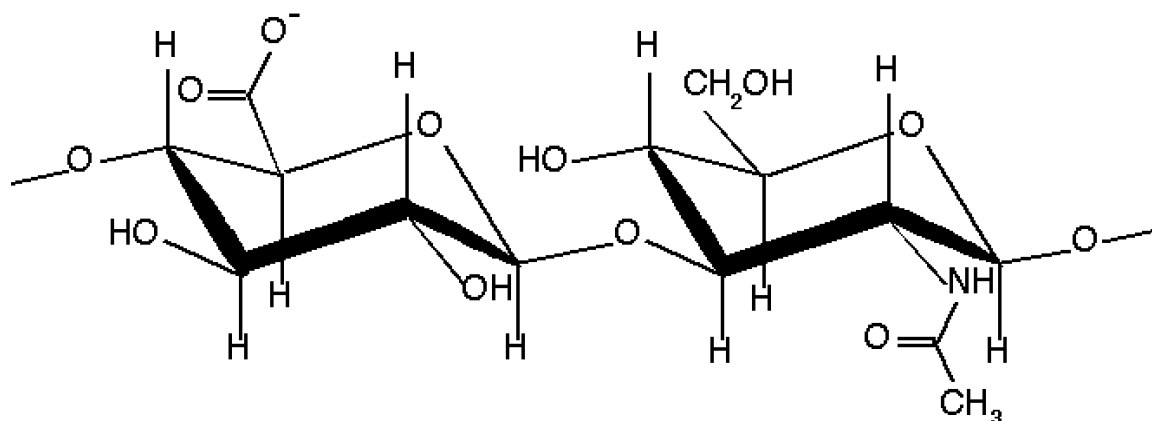
Kyselina hyaluronová - látka poprvé izolovaná v polovině čtyřicátých let devatenáctého století, která se stala jednou z nejzajímavějších a nejpoužívanějších přírodních makromolekul. Tento bílý krystalický prášek našel velké uplatnění v mnoha významných oblastech, a to především v lékařství například jako fyziologický lubrikant zamezující poškození kloubní chrupavky. Další významnou roli hraje v kosmetice při výrobě krémů proti vráskám či ve veterinární medicíně, především pro léčbu kloubních poruch u koní.

1.1.1 Struktura

Kyselina hyaluronová patří do malé skupiny mukopolysacharidů. Lineárně-polymerní molekula hyaluronanu je složena ze dvou opakujících se disacharidových podjednotek, kterými jsou kyselina D-glukuronová a N-acetylglukosamin. Tyto části jsou střídavě propojeny β -1,4 a β -1,3 glykosidickými vazbami. Glukóza v β konfiguraci, se kterou jsou spojeny oba cukry, dovoluje prostorově objemným skupinám zaujmout stericky výhodnější ekvatoriální polohu. Vodíkové atomy jsou pak umístěny na méně výhodných axiálních pozicích. Struktura disacharidu je tedy energeticky velmi stabilní [1].

Ve fyziologickém roztoku je molekula hyaluronanu zpevněna kombinací chemické struktury disacharidu, vnitřními vodíkovými vazbami a interakcemi s rozpouštědlem. Axiální vodíkové atomy tvoří nepolární hydrofobní část, kdežto odvrácená část řetězce tvoří polárnější hydrofilní část a tímto se vytváří struktura takzvané zakroucené stuhly. Roztoky hyaluronanu jsou mimořádně viskózní.

Při syntéze hyaluronanu hraje podstatnou roli enzym hyaluronansyntáza. Počet disacharidových jednotek v konečném řetězci hyaluronanu může dosáhnout i 10 000 těchto jednotek. Relativní molekulová hmotnost se pak pohybuje okolo 4 milionů. Průměrná délka disacharidu je přibližně 1 nm.



Obrázek 1: Základní strukturní jednotka molekuly hyaluronanu [2]

1.1.2 Výskyt:

Hyaluronan je látka vyskytující se ve všech živých organismech. V lidském těle se nejčastěji objevuje ve formě hyaluronátu sodného či draselného. Tato látka je jednou z komponent mimobuněčné matrix. Ve vysokých koncentracích ji můžeme nalézt také v kloubní chrupavce, kde snižuje tření a tlumí nárazy. Velké množství je přítomno i v pojivových tkáních. Dále se vyskytuje v pupeční šňůře, v očním sklivci, v plicích, ledvinách, mozku a svalové tkáni. Hyaluronan je jednou z hlavních složek kůže a plní svou funkci hlavně při obnově poškozených tkání. Při nadměrném vystavení pokožky UVB záření dochází k jejímu zarudnutí a buňky v povrchové vrstvě přestávají produkovat hyaluronan. Bez přítomnosti této látky dochází k mnohem rychlejšímu stárnutí a poškození kůže. Hyaluronan přispívá k migraci buněk a účastní se řady interakcí na buněčném povrchu. Průměrný sedmdesátikilový muž má zhruba 15 g hyaluronanu v těle. Jedna třetina tohoto množství je přeměňována každý den [3].

1.2 Tenzidy

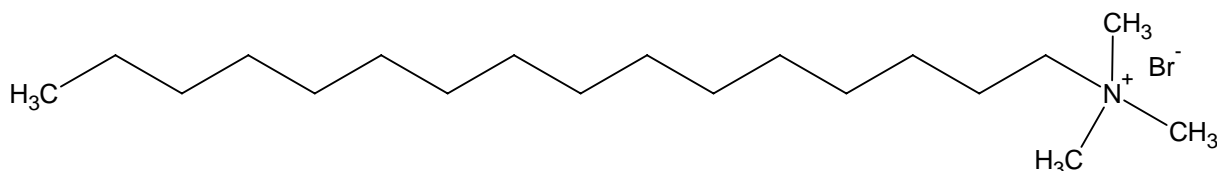
Tenzidy, jinak též surfaktanty, jsou organické molekuly difilního charakteru a představují aplikačně nejvýznamnější skupinu povrchově aktivních látek (PAL), zejména díky jejich schopnosti samovolně agregovat ve vodném roztoku do útvarů koloidní velikosti, zvaných micely. Tyto látky jsou charakteristické svou schopností adsorpce na mezifázovém rozhraní. Vykazují smáčecí, emulgační a čistící účinky. Molekula tenzidu má vždy nejméně dvě části. Jedna část je rozpustná v určitém rozpouštědle (lyofilní část) a druhá část je v daném rozpouštědle nerozpustná (lyofobní část). Pokud je tímto rozpouštědlem voda, pak mohou být jednotlivé části nazývané jako hydrofilní či hydrofobní. Podle schopnosti disociace ve vodném prostředí rozlišujeme tenzidy ionogenní a neionogenní. Ionogenní dále dělíme na kationaktivní a anionaktivní. V případě ionogenních tenzidů dochází k jejich disociaci ve vodě. Anionaktivní tenzidy jsou nejrozsáhlejší skupinou. Obvykle jsou nemísitelné s kationaktivními tenzidy a jsou velmi citlivé na tvrdost vody. Kationaktivní tenzidy se silně adsorbují k většině povrchů [4], [5].

Neionogenní tenzidy tvoří druhou nejrozsáhlejší skupinu tenzidů. Tyto sloučeniny nemají výrazně lokalizovaný náboj hydrofilní skupiny - její polární část je zde dána zejména větším počtem kyslíkových atomů v molekule [6].

Mezi ionogenní tenzidy patří například cetyltrimethylamoniumbromid (CTAB), tetradecyltrimethylamoniumbromid (TTAB), dodecylsulfát sodný (SDS) nebo kyselina cholová. K neionogenním tenzidům řadíme polyoxyetylen, oktylfenol (Triton X-100) nebo polyoxyetylen, dodekanol (Brij 35).

1.2.1 Cetyltrimethylamonium bromid (CTAB)

CTAB patří mezi kationaktivní tenzidy, které ve vodném prostředí mají kladný náboj. Molekula má jak část hydrofilní s kladným nábojem tvořenou koncovou rozvětvenou částí, kterou je kvartérní dusík, a která je rozpustná ve vodě, tak také část hydrofobní, která je tvořena řetězcem skládajícím se z 16 uhlíků a ve vodě je nerozpustná. Stejně jako všechny tenzidy tvoří ve vodném prostředí micely.

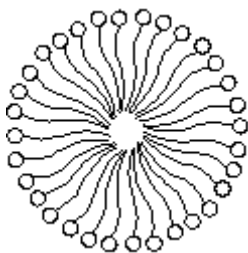


Obrázek 2: Struktura tenzidu CTAB

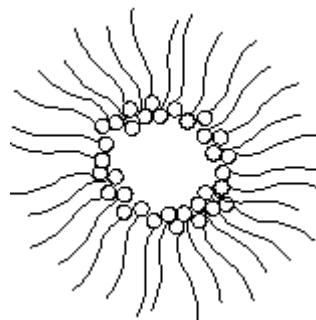
1.3 Tvorba micel

Po překročení určité koncentrace tenzidu se začínají jeho molekuly samovolně shlukovat a tvořit útvary zvané micely, jejichž jádro má opačný charakter, než použité rozpouštědlo. Uvnitř micely tenzidu ve vodě je tudíž nepolární prostředí. Tímto způsobem mohou tenzidy ve vodném prostředí udržet jinak nerozpustné látky.

Ve zředěných vodných roztocích vznikají malé tzv. Hartleyovy micely, jejichž uhlovodíkové řetězce jsou navzájem propleteny (tvoří jádro micely) a polární skupiny směřují vně (do vody). Jedná se o kulovité micely. V koncentrovanějších roztocích jsou přítomny i micely jiného tvaru než kulovité. S rostoucí koncentrací tenzidu v roztoku se zvětšuje rozměr micel a uhlovodíkové řetězce se v nich stále více orientují navzájem rovnoběžně. Pak mohou vznikat válcovité útvary a při ještě větších koncentracích micely laminární [7].



Obrázek 3: micela s hydrofilní dutinou



Obrázek 4: micela s hydrofobní dutinou

1.3.1 Kritická micelární koncentrace

Mezní koncentrace, při které se z monomeru tenzidu začínají tvořit micely, se nazývá kritická micelární koncentrace (cmc). U neionogenních tenzidů je tato koncentrace zpravidla menší než v případě ionogenních tenzidů. Kritická micelární koncentrace závisí na délce a struktuře uhlikatého řetězce. S rostoucí délkou uhlikatého řetězce hodnota kritické micelární koncentrace klesá. V homologické řadě ionogenních micelárních koloidů může být závislost cmc na počtu uhlíků n_c vyjádřena vztahem:

$$\ln \text{cmc} = A - B \cdot n_c, \quad (1)$$

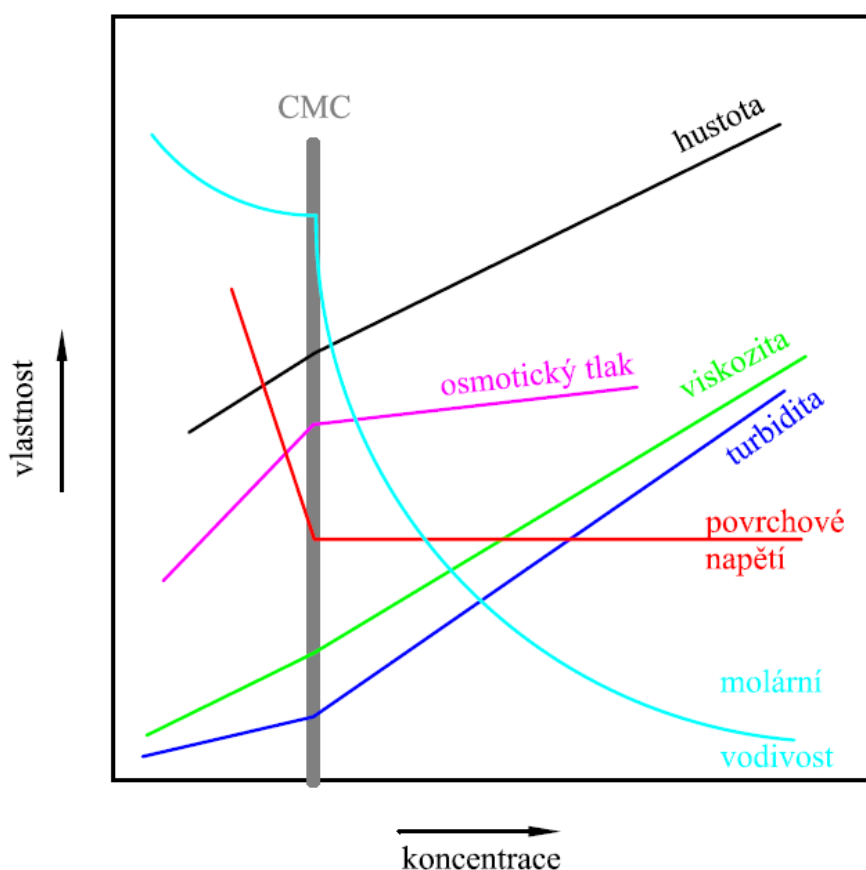
kde A je pro danou homologickou řadu konstanta závislá na teplotě, povaze a množství hydrofilních skupin a na substituentech v uhlovodíkovém řetězci. Konstanta B se mění s počtem iontových skupin.

Ke zvýšení cmc vede rozvětvení uhlovodíkového řetězce, přítomnost dvojných vazeb a přemístění iontové skupiny od konce do středu řetězce, zatímco připojení benzenového jádra k alkylovému řetězci hodnotu cmc snižuje. Hodnota cmc je ovlivňována také vlastnostmi hydrofilní skupiny. Vliv hydrofilní skupiny na cmc je dán zejména jejím nábojem. Hodnoty cmc neionogenních PAL značně závisí na rozměrech a povaze hydrofilní skupiny. U ionogenních PAL jsou mezi různými hydrofilními skupinami malé rozdíly.

Na ovlivnění hodnoty cmc se mohou podílet také vlastnosti protiiontů vzniklých disociací, přičemž cmc klesá se zvyšujícím se nábojem protiiontů.

Důležitými faktory pro hodnotu cmc jsou také teplota a tlak. S rostoucí teplotou se hodnota cmc může zvyšovat (obvykle u katioaktivních micelárních koloidů) nebo snižovat (u neionogenních typů) a teplotní závislost cmc může vykazovat i zřetelné minimum. Vliv tlaku na cmc je poměrně malý i v oblastech velmi vysokých tlaků. Důležitým faktorem ovlivňujícím hodnotu cmc je přítomnost dalších látek v roztoku. Jednoduché anorganické elektrolyty snižují hodnotu cmc a to tím více, čím vyšší je koncentrace elektrolytu a čím vyšší je mocenství opačně nabitého iontu. Vliv elektrolytů na cmc neionogenních micelárních koloidů je méně výrazný než u ionogenních typů. Přítomnost neelektrolytů se projevuje různě. Například lineární alkoholy s dlouhým řetězcem snižují cmc tím více, čím větší je koncentrace alkoholu a délka alifatického řetězce. Nepochopitelně mají na cmc většinou malý vliv [8].

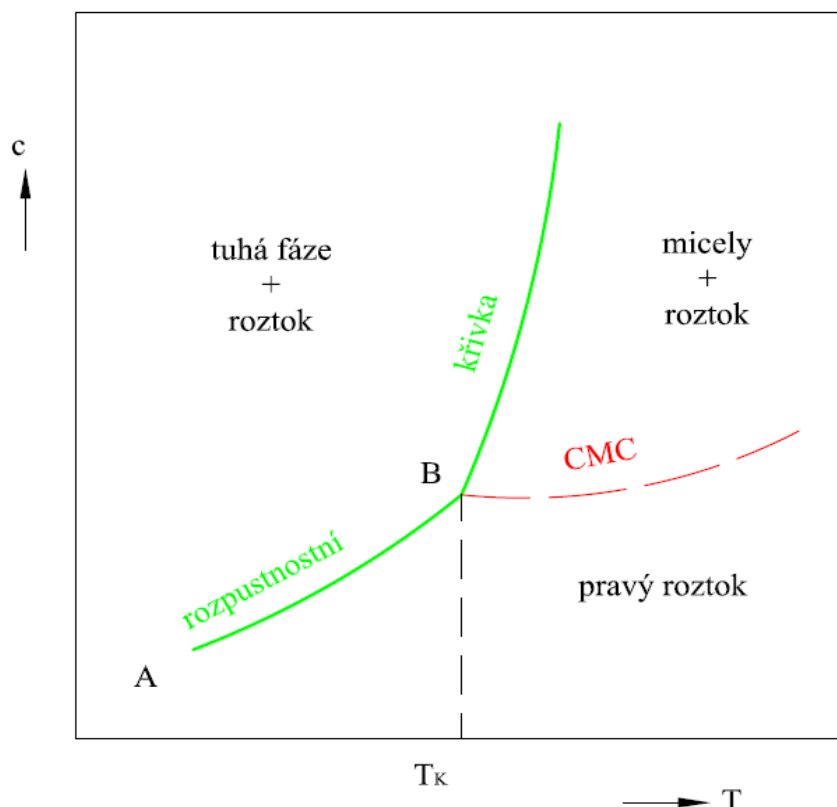
S tvorbou micel souvisí i agregační číslo, které vyjadřuje počet molekul tenzidu tvořících jednu micelu. Toto číslo se zvyšuje s délkou uhlovodíkového řetězce a klesá s velikostí plochy, kterou na povrchu micely zaujímá jedna polární skupina. Agregační číslo závisí také na teplotě a koncentraci tenzidu v roztoku.



Obrázek 5: Fyzikální vlastnosti roztoků micelárních koloidů v oblasti cmc

1.3.2 Krafftova teplota

Při nízkých teplotách je koncentrace nasyceného roztoku často nižší než kritická micelární koncentrace, proto nemůže docházet k tvorbě micel, dokud teplota nestoupne na hodnotu, při níž je rozpustnost rovna cmc. Tato teplota se nazývá Krafftova teplota T_K . Při teplotě nižší než Krafftova teplota je prostředí vzorku značně nehomogenní, a proto je vzorek nevhodný pro měření. Hodnota T_K výrazně závisí na délce hydrofobní části molekuly a druhu opačně nabitého iontu. V homologické řadě se posouvá s rostoucí molární hmotností směrem k vyšším teplotám. Přidání soli charakteristicky zvyšuje hodnotu Krafftovy teploty.



Obrázek 6: Závislost kritické micelární koncentrace a rozpustnosti PAL na teplotě, T_K - Krafftova teplota

1.3.3 Solubilizace

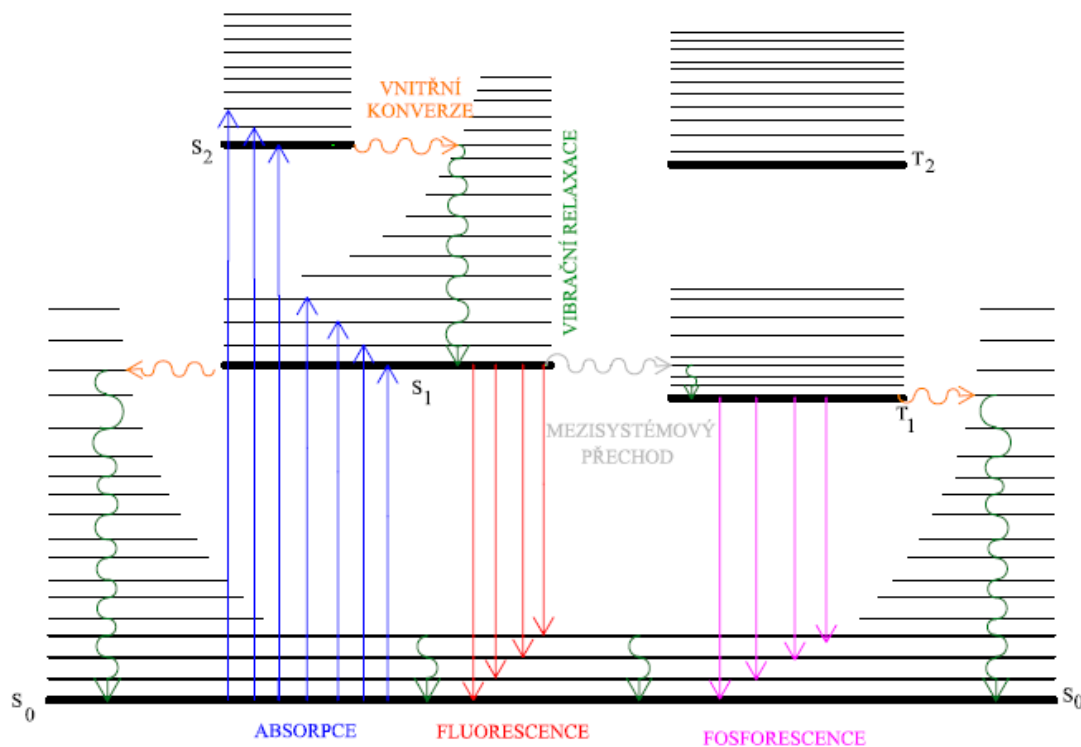
Solubilizace je schopnost micelárních roztoků rozpouštět i látky, které jsou v čistém disperzním prostředí nerozpustné. Podobně jako rozpouštění micelárního koloidu ve vodě, řídí se i solubilizace jiných látek v micelárně-koloidním roztoku zákony termodynamické rovnováhy. Solubilizaci nelze pozorovat, je-li koncentrace micelárního koloidu výrazně nižší než kritická micelární koncentrace. Z toho vyplývá, že solubilizovaná látka není v koloidním roztoku přítomna v disperzním prostředí, nýbrž je začleněna do micely. Určité množství tenzidu umožňuje solubilizaci pouze omezeného množství nerozpustné látky, které bývá označováno jako maximální aditivní koncentrace. Solubilizační děj je kromě toho ovlivňován například teplotou nebo dalšími složkami v roztoku. Vlastní mechanismus micelární solubilizace závisí kromě vlastností tenzidů i na vlastnostech molekuly solubilizované látky. V systémech s nepolárním prostředím, kde vznikají micely s hydrofilním jádrem a hydrofobním povrchem, dochází k tzv. obrácené solubilizaci.

1.4 Luminiscence

Luminiscence je jev, se kterým se setkáváme při vzájemném působení záření a analyzované látky. Hlavním požadavkem ke vzniku luminiscence je, aby látka nejdříve absorbovala záření o vhodné vlnové délce a v důsledku tohoto přešla do excitovaného stavu. Látka získanou energii může vyzářit v podobě luminiscence.

Po absorpci záření o vhodné vlnové délce se elektron excituje do vyšší energetické hladiny a po určité době dochází ke zpětnému návratu do základní energetické hladiny. Při luminiscenci je určitá část absorbované energie přeměněna na teplo, proto má emitované záření z pravidla větší vlnovou délku. Molekula látky absorbuje foton záření a elektrony přeskóčí do některého z excitovaných singletových stavů (S_1 , S_2). Doba absorpce je $1 \cdot 10^{-5}$ s. Střední doba života excitovaného stavu je $1 \cdot 10^{-7}$ – $1 \cdot 10^{-9}$ s. Po excitaci do stavu S_2 přejdou elektrony nejprve nezářivým přechodem na nejnižší vibrační hladinu S_2 , a poté vnitřní konverzí přechází do stavu S_1 . Elektrony nejdříve opět přejdou nezářivým přechodem na nejnižší vibrační hladinu S_1 . Dále probíhá deexcitace molekuly záření fluorescencí, kdy dochází k zářivému přechodu S_1 - S_0 . Elektrony z excitovaného stavu se vrací do základního stavu bez změny spinu.

Excitované elektrony mohou ze singletového stavu S_1 přejít nejen do základního stavu S_0 , ale také mezisystémovým přechodem do vyšší vibrační hladiny tripletového stavu T_1 . Poté dochází k nezářivému přechodu na nejnižší vibrační hladinu T_1 . Při přechodu do základního stavu by nebyl dodržen Pauliho vylučovací princip, a proto dochází při přechodu T_1 - S_0 ke změně elektronového spinu a doba vyzáření je mnohem delší. Tento jev se nazývá fosforescence a může trvat až několik vteřin.



Obrázek 7: Jablonského diagram

1.4.1 Vnitřní filtrační efekt

Při měření fluorescenčního spektra se nejobvykleji používá pravoúhlé uspořádání, kdy detekční systém hromadí fluorescenci emitovanou jen z centrální části kyvetového prostoru. Může zde ale dojít ke vzniku jevů, které negativním způsobem ovlivňují výsledná fluorescenční spektra. Jestliže optická hustota vzorku je dostatečně nízká, paprsek procházející vzorkem je zeslaben pouze nepatrně vlivem absorpce části fotonů fluorofory. Při vysokých hodnotách optické hustoty ve vzorku je velká část fotonů absorbována velkým množstvím fluoroforů. Do střední části kyvety se tak dostane mnohem menší počet fotonů, potřebných k excitaci přítomných fluoroforů. Tento jev se nazývá vnitřní filtrační efekt prvního druhu.

Fotony emitované ze střední části kyvety směrem k detektoru mohou být reabsorbovány fluorofory vyskytujícími se v té části kyvety, kde fotony směřují k detektoru. Dochází k excitaci molekul a následné emisi fotonů do různých směrů. Tento jev také způsobuje snížení intenzity fluorescence a nazývá se vnitřní filtrační efekt druhého druhu.

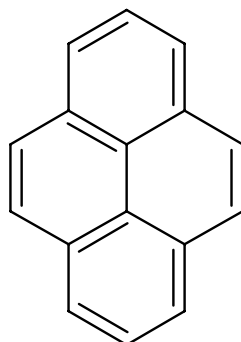
Stanovení „pravdivého“ fluorescenčního spektra a kvantového výtěžku vyžaduje užití velmi zředěných roztoků. Pokud jsou roztoky více koncentrované, dochází k nežádoucím efektům, které často velmi souvisí s geometrií použité kyvety. Intenzita fluorescence sloučeniny je úměrná koncentraci pouze v omezené míře optické hustoty.

1.5 Fluorescenční sondy

Fluorescenční sondy jsou nevlastní fluorofory, které se ke sledované struktuře vážou nekovalentně a často přitom mění své fluorescenční vlastnosti. Volba fluorescenční sondy je klíčovou součástí experimentu ve fluorescenční spektroskopii, neboť právě její vlastnosti umožňují získat potřebné informace. Fluorescenční sondy jsou rozděleny na vnitřní sondy, které jsou ale využitelné pouze v malém okruhu experimentů, vnější kovalentně vázané sondy a vnější asociující sondy. Většina měření se provádí s vnějšími nekovalentně asociujícími sondami, kvůli obtížnosti syntézy některých kovalentně vázaných sond [9].

1.5.1 Pyren

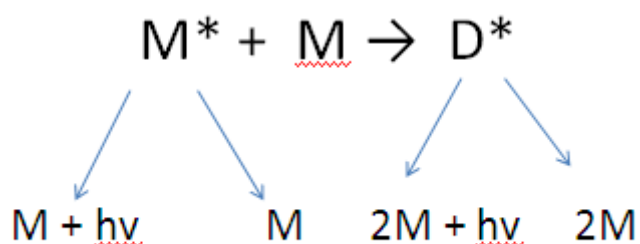
Pyren patří do skupiny polycyklických aromatických uhlovodíků. Jedná se o bezbarvou či nažloutlou pevnou látku. Intenzita fluorescenčního spektra má rostoucí tendenci s rostoucí polarizací prostředí. Pro stanovení c_{mc} se využívá právě hodnota poměru fluorescence u pásů I_1 a I_3 , jelikož tento poměr je obrazem polarizace okolí pyrenu. Je pravděpodobné, že intenzita emisního spektra se s rostoucí teplotou bude snižovat, jelikož s rostoucí teplotou je snižována polarita rozpouštědla.



Obrázek 8: Strukturální vzorec pyrenu

1.5.2 Excimer

Excimer neboli excitovaný dimer je stechiometrický komplex molekul a je tvořen při interakci excitované molekuly s molekulou v základním stavu. V jeho přítomnosti dochází ke snížení fluorescence. Excimer je v emisním spektru charakterizován vznikem emisního pásu, který se nachází ve vyšších vlnových délkách než pás monomeru. Batochromní posun je způsoben poklesem energie v důsledku interakce excitované molekuly s molekulou neexcitovanou. Intenzita tohoto emisního pásu je přímo úměrná difúznímu koeficientu a tedy nepřímo úměrná mikroviskozitě v okolí fluorescenční sondy. Doba existence excimeru je velmi krátká (v řádu nanosekund). Tyto excimery je schopno vytvořit mnoho aromatických uhlovodíků jako například naftalen nebo pyren [10].



Obrázek 9: Znázornění tvorby excimeru, kdy z excitovaného a neexcitovaného monomeru vzniká excitovaný dimer, M^* - excitovaný stav molekuly, M - neexcitovaný stav molekuly, D^* - excitovaný dimer

2 Současný stav řešené problematiky

Kyselina hyaluronová, jakožto biopolymer lidskému tělu vlastní, našla velmi rozsáhlé využití ve zdravotnictví i průmyslu. Pro své unikátní vlastnosti hledá své uplatnění také v oblasti cílené distribuce léčiv, jelikož hyaluronan vykazuje vysokou schopnost interagovat s nádorovými buňkami [11]. Aby však tato látka mohla být užívána, je potřeba důkladně znát její vlastnosti. Nejdůležitější roli zde hraje interakce hyaluronanu s ostatními biologickými molekulami v organismu.

Thalberg, K. a jeho kolektiv [12] se ve svém bádání zabývali vzájemným působením této látky s kationaktivními tenzidy. Pomocí několika metod, mezi které patřila fázové separace, NMR, vodivost či solubilizace barviv, došli k mnoha důležitým zjištěním týkajících se tohoto systému. Získanými výsledky bylo potvrzeno, že k navázání molekuly tenzidu na řetězec hyaluronanu je postačující velmi nízká koncentrace tenzidu. Mezní koncentrace k uskutečnění tohoto připojení byla zjištěna pomocí vodivosti a NMR. Tato hodnota se nachází pod kritickou micelární koncentrací a je závislá na délce uhlíkatého řetězce tenzidu, přičemž začíná na hodnotě desíti uhlíků a s rostoucím počtem uhlíků má minimální koncentrace klesající tendenci. V případě nedosažení minimální délky uhlíkatého řetězce dochází k tvorbě volných micel, jelikož tento proces je energeticky výhodnější než navázání na řetězec hyaluronanu. Bylo však také zjištěno, že vaznost tenzidu k hyaluronanu je asi desetkrát nižší než k jiným polymerům, mezi které patří například pektát či alginát.

Při stanovování vlastností systému hyaluronan-tenzid, je hojně využívanou metodou spektrofotometrie, kde se často můžeme setkat s užitím sondy pyrenu, pro jeho unikátní reakci na polaritu okolního prostředí [13]. V dřívější době vědečtí pracovníci nebrali v úvahu vliv teploty na intenzitu fluorescence, jelikož věřili, že změny probíhající v závislosti na teplotě jsou velmi malé a pro jejich výzkum bezvýznamné [12]. **J. K. Smit a spol.** [14] jako první naznačili, že teplotní závislost fluorescence může poskytnout užitečné informace týkající se systému sonda-polymer. Ve svém výzkumu se zabývali studiem teplotních závislostí pro různé sondy a rozpouštědla. Zjišťovali, jakou roli hraje struktura polymeru na teplotní závislosti luminiscence. Jako sonda byl použit β -carboline a vzorek byl měřen ve vodném prostředí v teplotním rozsahu 90-300 K. Podle naměřených výsledků tedy opravdu potvrdili závislost intenzity fluorescence na měnící se teplotě. Konkrétně se jednalo o charakteristický pokles intenzity se zvyšující se teplotou.

Později bylo také zjištěno, že intenzita I_1 emisního spektra fluorescence pyrenu roste s rostoucí polarizací okolního prostředí. Polarizace prostředí vykazuje s rostoucí teplotou klesající tendenci, a proto se předpokládá, že s rostoucí teplotou bude docházet ke snižování intenzity fluorescence [14]. Skupina japonských vědců, mezi které patří **Chikako Honda, Yumi Katsumata** či **Sanae Yamazakisi**, [15] si vzala za úkol studium fluorescenčního spektra pyrenu ve vodném prostředí v přítomnosti sond hepta- a hexa-etylenoxid monoalkyeteru ($C_{14}E_7$, $C_{16}E_7$ a $C_{16}E_6$), a to v závislosti na teplotě a koncentraci vybraného tenzidu. Zjišťovali také, zda má rostoucí teplota vliv na velikost hydrodynamického poloměru micel tenzidu. Vzorky obsahující sondu pyren a různé koncentrace tenzidu $C_{16}E_7$ ve vodném prostředí byly měřeny při různých teplotách od 25 do 45 °C. Před měřením byl udržován každý vzorek 30 minut při zvolené teplotě, aby intenzita fluorescence byla konstantní po celou dobu snímání

vzorku. Tímto experimentem bylo zjištěno, že tento hydrodynamický poloměr roste s rostoucí koncentrací tenzidu. Pouze při nízkých teplotách (20-25 °C) však zůstal téměř nepozměněn. Při vyšších teplotách hydrodynamický poloměr roste s rostoucí koncentrací tenzidu, až dosáhne konstantní hodnoty, která je charakteristická pro každý surfaktant. Pro několik koncentrací neionogenního tenzidu C₁₆E₇ byla vytvořena závislost polaritního poměru I₁/I₃ na teplotě. Konkrétně se jednalo o závislost I₁/I₃ na 1/T.1000. S rostoucí teplotou byla závislost vždy lineární. Bylo použito sedm koncentrací tenzidu v rozsahu 2.10⁻⁷-1.10⁻² mol dm⁻³. Naměřené výsledky potvrdily, že lineárně stoupající charakter má závislost připadající koncentracím vyšším než 1.10⁻³ mol dm⁻³ a koncentracím nižším než 1.10⁻⁵ mol dm⁻³. V rozmezí koncentrací 1.10⁻³ mol dm⁻³ a 1.10⁻⁵ mol dm⁻³ vykazují závislosti lineárně klesající charakter.

Krystyna Pietrucha a spol. [16] se zajímali o spojení kyseliny hyaluronové s kolagenem a následné výhodné vlastnosti kombinace těchto sloučenin. Tento výsledný systém, dále popsán jako kolagen/HA matrix, byl zkoumán pomocí reologie a také pomocí kalorimetrie. Těmito metodami byla pozorována termální stabilita systému kolagen-hyaluronan v teplotním rozsahu 20-450 °C. Výsledky naznačují, že kolagen/HA matrix, jako obdoba přírodního trojrozměrného mimobuněčného matrix může využívat ve výzkumech in vitro k podpoře připojení, množení a migraci různých micel.

Teplotní závislostí vzorků obsahujících kyselinu hyaluronovou v přítomnosti mnoha různých druhů sond zkoumá řada dalších vědců [17]-[19].

3 Materiály a metody

3.1 Materiály

Hyaluronan

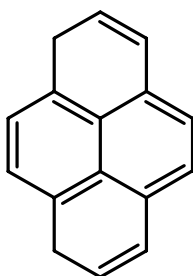
HyA $M_w = 73$ kDa, CPN s.r.o., šarže: 071207-P1
HyA $M_w = 1,4$ MDa, CPN s.r.o., šarže: 141008-E1

Tenzid

CTAB, Cetyltrimethylamonium bromide, $M_w = 364,45$ g/mol,
Sigma - Aldrich, Ultra $\geq 99,0$ %, šarže: 40808244

Fluorescenční sonda

pyren, Fluka chemie, šarže: 430166/1,



Rozpouštědla

Mili-Q voda (Milipore Academic)
acetone, Sigma - Aldrich, Assay ≥ 97 %, šarže: 1299072
propanol $M_w = 60,1$ g/mol, Sigma-Aldrich, Assay $\geq 99,8$ %, šarže: 1209744

Ostatní

NaCl, $M_w = 58,44$ g/mol, Lach-Ner s. r. o., Assay = 99,5 %, šarže: 30453

3.2 Metody

3.2.1 Příprava vzorků

Byly připraveny zásobní roztoky pyrenu v acetonu o koncentraci $c = 1 \cdot 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$ a $c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$. Dále byl připraven zásobní roztok CTAB o koncentraci $c = 20 \text{ mol dm}^{-3}$ v mili-Q vodě a zásobní roztok CTAB o stejné koncentraci v $0,15 \text{ mol dm}^{-3}$ NaCl. Byly namíchány zásobní roztoky hyaluronanu v mili-Q vodě o koncentracích $c = 5 \text{ g dm}^{-3}$ a $c = 50 \text{ mg dm}^{-3}$, zásobní roztoky hyaluronanu o stejných koncentracích byly připraveny také v prostředí $0,15 \text{ mol dm}^{-3}$ NaCl. Tyto zásobní roztoky byly připraveny v obou prostředích pro kyselinu hyaluronovou o molekulové hmotnosti 73 kDa a pro kyselinu hyaluronovou o molekulové hmotnosti 1,4 MDa. Zásobní roztok pyrenu v acetonu a zásobní roztoky hyaluronanu v různých prostředích byly uchovávány v lednici při teplotě $4 \text{ }^\circ\text{C}$. Zásobní roztoky CTAB byly uchovávány při laboratorní teplotě.

Vzorky byly připravovány do vialek o objemu 10 cm^3 . Při přípravě vzorků pro kalibrační křivky byly použity zásobní roztoky pyrenu v acetonu o $c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ a $c = 1 \cdot 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$. Potřebné množství bylo napipetováno do vialek, rozpouštědlo bylo odpařeno a bylo přidáno 5 cm^3 propanolu.

Nejdříve bylo do vialek napipetováno takové množství pyrenu v acetonu, aby celková koncentrace pyrenu ve vzorku odpovídala koncentraci $c = 1 \cdot 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$. Po odpaření veškerého rozpouštědla bylo do vialek napipetováno určené množství zásobního roztoku CTAB v potřebném prostředí. Poté bylo do vzorku přidáno takové množství mili-Q či soli, aby celkový objem vzorku byl 5 cm^3 . Při přípravě vzorků s hyaluronanem byl použit analogický postup, jako poslední komponenta a byl do vzorku přidáván zásobní roztok hyaluronanu. Celkový objem vzorku musel být opět 5 cm^3 .

Byly namíchány 3 vzorky o koncentraci CTAB $c_1 = 0,6 \text{ mol dm}^{-3}$, $c_2 = 3 \text{ mmol dm}^{-3}$ a $c_3 = 6 \text{ mmol dm}^{-3}$ ve vodě. Při přípravě bylo postupováno standardně s přidáním určité koncentrace CTAB. Stejným způsobem byly připraveny vzorky obsahující tři stejné koncentrace CTAB v prostředí $0,15 \text{ mol dm}^{-3}$ NaCl.

Pro přípravu vzorků, které obsahovaly pyren, CTAB a kyselinu hyaluronovou ve vodném prostředí či v soli, bylo potřeba najít vhodné koncentrace jednotlivých složek tak, aby nedocházelo k zakalení či vytvoření gelového lemu. Tyto podmínky musí vzorek splňovat, aby mohlo dojít k jeho proměření na spektrofotometru. Ke třem zvoleným koncentracím CTAB ($c = 0,6 \text{ mmol dm}^{-3}$, $c = 3 \text{ mmol dm}^{-3}$, $c = 6 \text{ mmol dm}^{-3}$) byly přidávány čtyři koncentrace kyseliny hyaluronové ($c = 1 \text{ 000 mg dm}^{-3}$, $c = 150 \text{ mg dm}^{-3}$, $c = 15 \text{ mg dm}^{-3}$, $c = 1 \text{ mg dm}^{-3}$) Vzorky byly namíchány pro různé molární hmotnosti hyaluronanu (1,4 MDa a 73 kDa) ve dvou různých prostředích. K lepšímu vizuálnímu porovnávání vzorků byla místo pyrenu použita sudánová červeň, což je hydrofobní barvivo. Připravené vzorky byly ponechány při laboratorní teplotě 24 hodin na třepačce. Podle výsledků uvedených v tabulkách (viz. příloha 1) byly vybrány vzorky obsahující koncentraci kyseliny hyaluronové $c = 15 \text{ mg dm}^{-3}$ a s měnící se koncentrací tenzidu CTAB. Tyto koncentrace byly vybrány pro vzorky ve vodném prostředí i v prostředí $0,15 \text{ molární NaCl}$ a pro obě molekulové hmotnosti hyaluronanu.

4 Měření a vyhodnocení dat

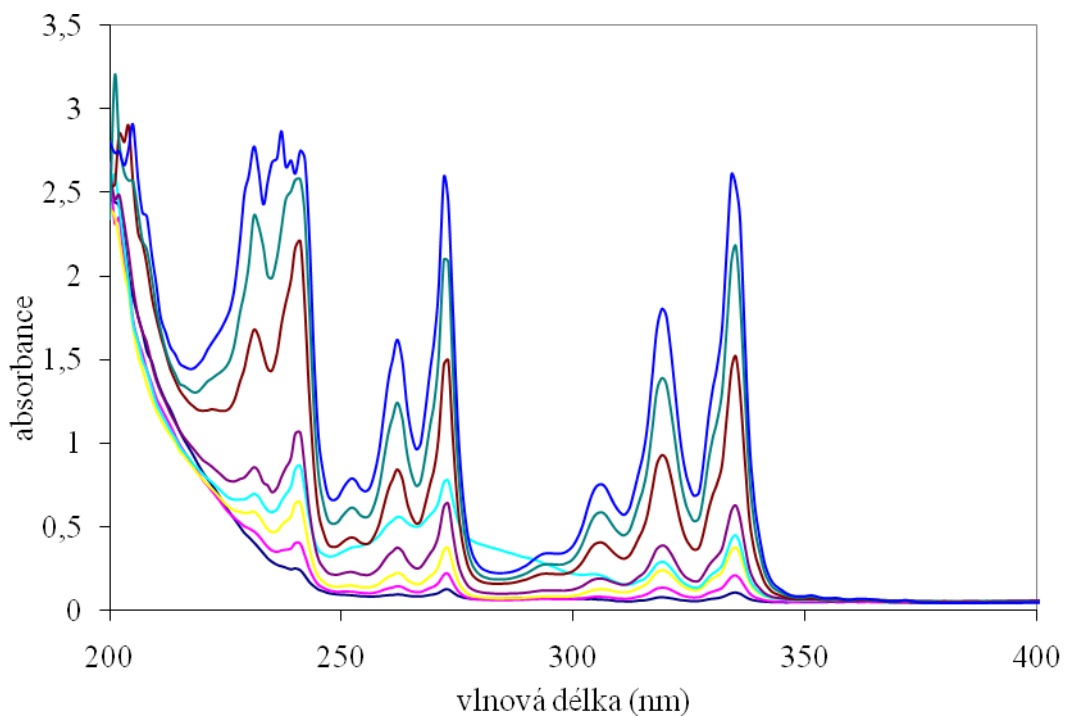
Všechny připravené vzorky byly měřeny na fluorimetru AMINCO Bowman Series 2. Při měření vzorků obsahujících pyren byl excitační monochromátor nastaven na 336 nm a emisní monochromátor na 392 nm. U všech vzorků byl měřen jak emisní, tak také excitační sken. Emisní skeny byly snímány v rozsahu 360-540 nm při rychlosti skenu 5 nm s. U emisního spektra byly sledovány hodnoty intenzit prvního (373 nm) a třetího (384 nm) maxima a z těchto dat byla zjištěna hodnota polaritního indexu (I_1/I_3). Excitační sken se pohyboval v rozmezí 300-350 nm. Rychlost snímání skenu byla nastavena opět na 5 nm s.

4.1 Korekce

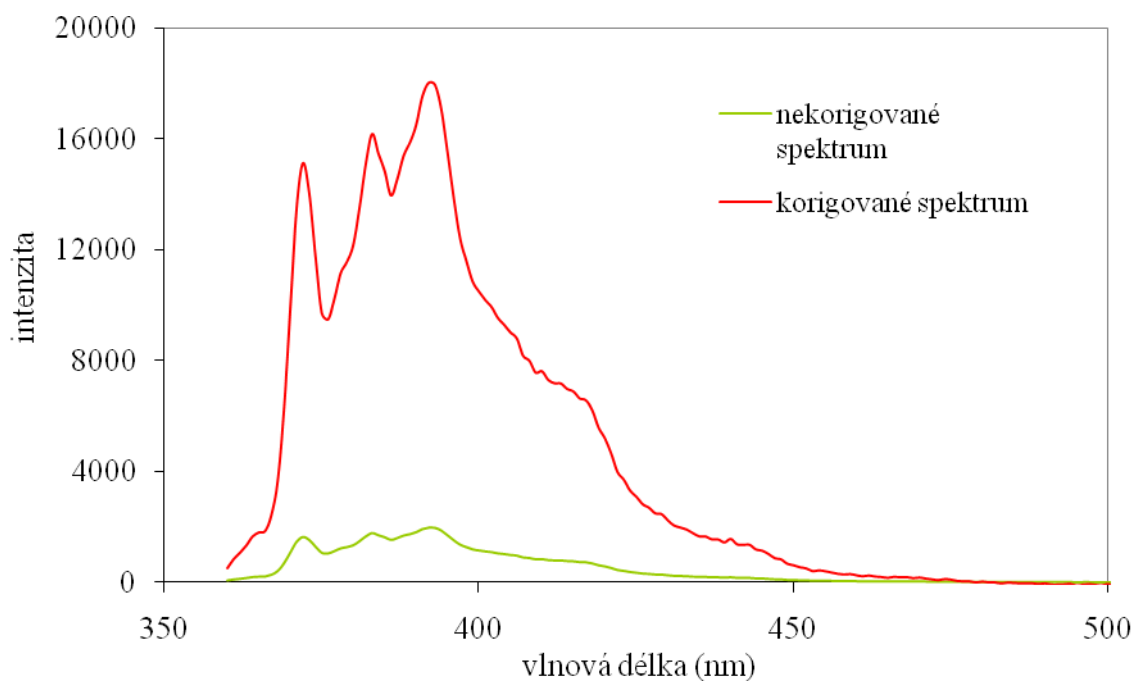
Jak bylo již zmíněno v kapitole 1.4.1, může vlivem vnitřního filtračního efektu docházet k nepřesnostem v měření intenzit fluorescence na spektrofotometru. Proto byla provedena korekce pomocí měření absorbancí na absorpčním spektrometru Varian Cary Probe 50. Pro každý vzorek kalibrační křivky, obsahující různé koncentrace pyrenu a 5 cm³ propanolu, byla změřena absorpční spektra v rozsahu od 200 nm do 800 nm. Jelikož hodnoty absorpance při optické dráze 1 cm odpovídají hodnotám optických hustot, mohlo dojít ke korekci spektra pomocí následujícího vzorce:

$$I_{kor} = I_{poz} \cdot 10^{\frac{1}{2}(OD_{ex} + OD_{em})}, \quad (2)$$

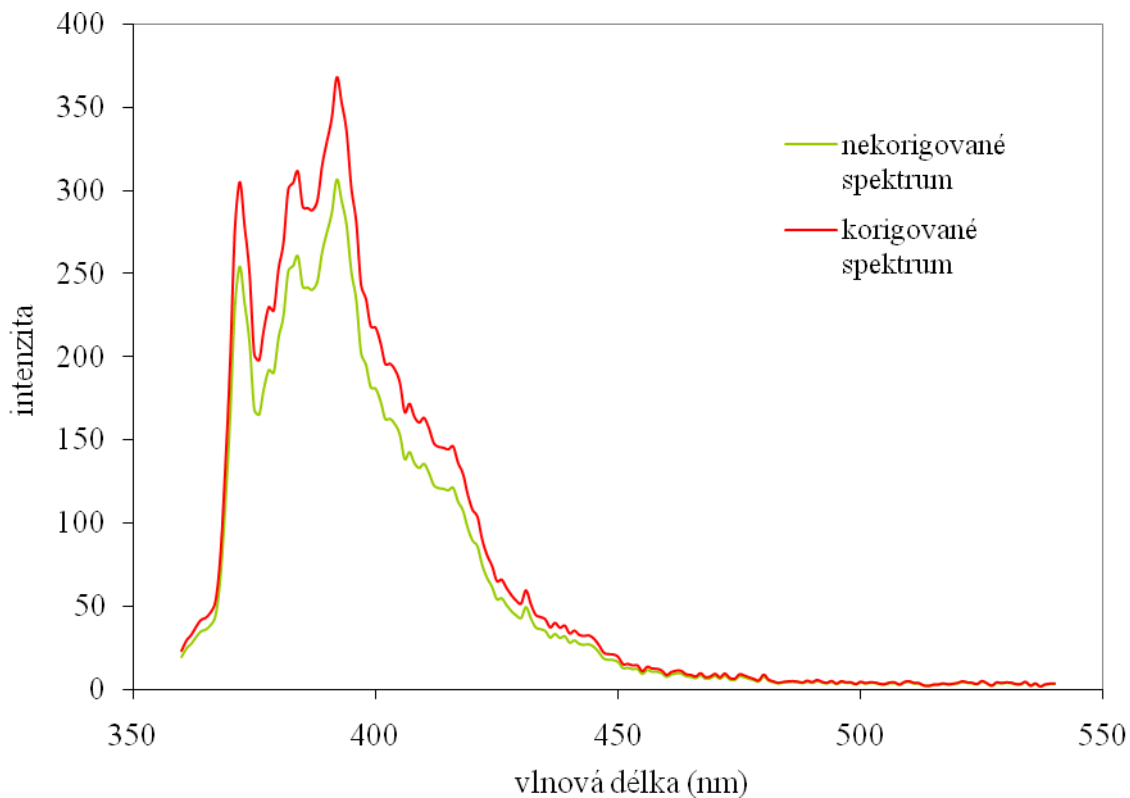
kde I_{poz} je hodnota intenzity při dané vlnové délce naměřené na fluorimetru, OD_{ex} je hodnota optické hustoty při dané vlnové délce excitace a OD_{em} je hodnota optické hustoty při vlnové délce emise. Po provedení těchto korekcí bylo však zjištěno, že hodnoty intenzit korigovaného a nekorigovaného spektra se u většiny vzorků téměř neliší. K největším rozdílům intenzit docházelo u vzorků s nejvyšší koncentrací pyrenu, jak je vidět na obrázku 11. K nejmenším rozdílům intenzit docházelo u vzorků s nejnižší koncentrací pyrenu, jak je vidět na obrázku 12. Díky tomuto měření byla pro následující vzorky vybrána jedna z koncentrací pyrenu tak, aby nedocházelo ke zkreslování fluorescence vlivem koncentrace fluoroforu. Vybraná koncentrace pyrenu byla $c = 1 \cdot 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$.



Obrázek 10: Ukázka absorpčních spekter pořízených pro osm různých koncentrací pyrenu v propanolu v rozsahu $1 \cdot 10^{-3}$ - $1 \cdot 10^{-5}$ mol dm⁻³, pořízených na absorpčním spektrometru Varian Cary Probe 50



Obrázek 11: Ukázka korekce dat emisního spektra vzorku obsahujícího pyren v propanolu o vyšší koncentraci pyrenu ($c = 5 \cdot 10^{-5}$ mol dm⁻³)



Obrázek 12: Příklad korekce dat emisního spektra vzorku obsahujícího pyren v propanolu o nízké koncentraci pyrenu ($c = 1 \cdot 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$)

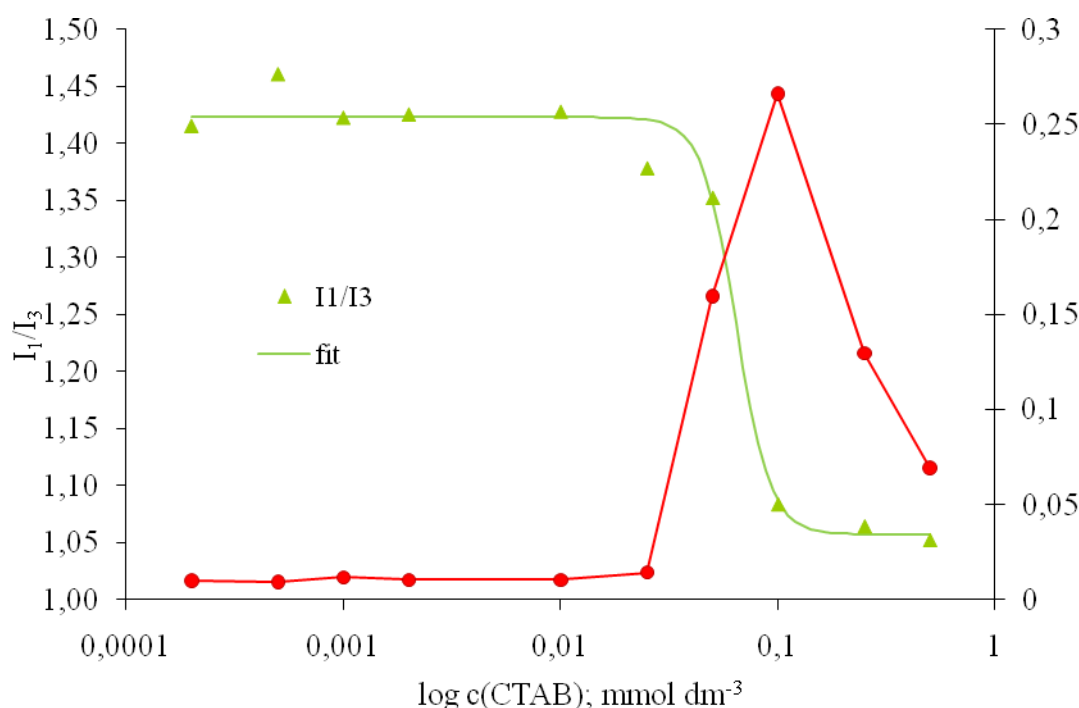
4.2 Krafftova teplota

U některých vzorků obsahujících vyšší koncentrace tenzidu CTAB ($c = 3 \text{ mol dm}^{-3}$, $c = 6 \text{ mol dm}^{-3}$) docházelo k nežádoucím jevům při měření fluorescence v důsledku vlivu Krafftovy teploty. U každého takového vzorku, kde se objevil jen slabý náznak nehomogenity, byla Krafftova teplota stanovována vizuálně. Vzorek o dané koncentraci byl namíchán pětkrát. Poté byl zchlazen v lednici na nízkou teplotu, až se vzorek stal nehomogenním. Následně byl ponechán při pokojové teplotě, případně ještě zahříván až do jeho vyčeření. Teplota vyčeření byla zaznamenávána. Průměr těchto pěti hodnot daného vzorku byl brán jako skutečná hodnota Krafftovy teploty.

5 Výsledky a diskuze

Cílem experimentální části bakalářské práce bylo prozkoumat vliv teploty na kvalitu hydrofobní domény agregátů v systému biopolymer - tenzid. Zmíněným biopolymerem byl čistý nemodifikovaný hyaluronan, který byl použit ve dvou molekulových hmotnostech (73 kDa a 1,4 MDa). Jako tenzid byl použit kationaktivní CTAB. Prostředí systému hyaluronan - CTAB tvořila mili-Q voda a jako fyziologický roztok byl použit $0,15 \text{ mol dm}^{-3}$ roztok NaCl. Teplotní závislosti jednotlivých vzorků byly měřeny v rozmezí $10-50 \text{ }^\circ\text{C}$, a to jak pro ohřev od $10-50 \text{ }^\circ\text{C}$, tak i zpětně pro chlazení od $50-10 \text{ }^\circ\text{C}$.

5.1 CMC CTAB



Obrázek 13: Výsledky měření cmc CTAB

Experimentálně byla stanovena hodnota cmc tenzidu CTAB v prostředí $0,15 \text{ mol dm}^{-3}$ NaCl. Naměřená data závislosti polaritního indexu na logaritmu koncentrace byla proložena Boltzmanovou sigmoidní křivkou. Kritická micelární koncentrace je shodná se souřadnicí na ose x, která odpovídá inflexnímu bodu sigmoidní křivky. Hodnota cmc CTAB v $0,15 \text{ mol dm}^{-3}$ NaCl byla stanovena na $c = 0,06 \text{ mol dm}^{-3}$.

5.2 Výběr koncentrací CTAB a hyaluronanu

Při smíchání určitého koncentrace tenzidu CTAB a různými koncentracemi hyaluronanu o různých molekulových hmotnostech může v mnoha případech docházet k vytvoření zákalu, případně i gelového lemu. Pro měření na spektrofotometru je však potřeba, aby ve vzorcích nevznikal zákal ani nedocházelo k vytvoření gelového lemu. Proto byla vytvořena řada vzorků, ze kterých pak byly vybrány vhodné koncentrace jednotlivých složek vhodných pro měření. Lepší vizuální stanovení bylo zajištěno použitím barviva sudánové červeně namísto pyrenu.

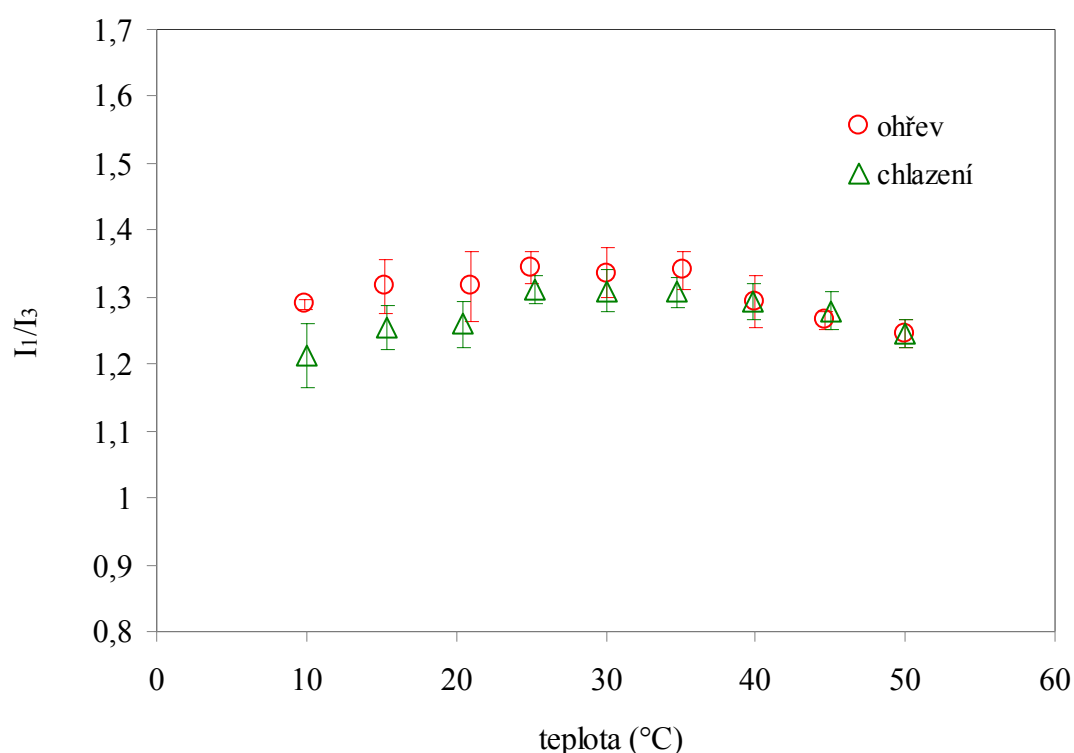
Byla vybrána řada vzorků o třech různých koncentracích tenzidu CTAB ($c = 0,6 \text{ mmol dm}^{-3}$, $c = 3 \text{ mmol dm}^{-3}$, $c = 6 \text{ mmol dm}^{-3}$) se čtyřmi koncentracemi hyaluronanu ($c = 1 \text{ g dm}^{-3}$, $c = 150 \text{ mg dm}^{-3}$, $c = 15 \text{ mg dm}^{-3}$, $c = 1 \text{ mg dm}^{-3}$). Tato dvanáctičlenná řada byla vytvořena pro 73 kDa hyaluronan (řada A) a pro 1,4 MDa hyaluronan (řada B). Obě řady byly namíchány jak v prostředí mili-Q vody, tak také v prostředí $0,15 \text{ mol dm}^{-3}$ NaCl. Po jednodenním promíchávání na třepačce byl vyhodnocen vzhled vzorků. Hlavními kritérii u sledování vzorků byly stupeň rozpuštění sudánové červeně a s tím související barevnost vzorku. Zaznamenávána byla také čirost vzorků nebo případné zakalení a v neposlední řadě vznik gelového lemu. Podle výsledků tohoto mapování byly pro měření vybrány vzorky s koncentrací hyaluronanu $c = 15 \text{ mg dm}^{-3}$ a tři měnící se koncentrace tenzidu CTAB ($c = 0,6 \text{ mmol dm}^{-3}$, $c = 3 \text{ mmol dm}^{-3}$, $c = 6 \text{ mmol dm}^{-3}$). Tyto koncentrace byly použity pro obě molekulové hmotnosti hyaluronanu v obou různých prostředích.



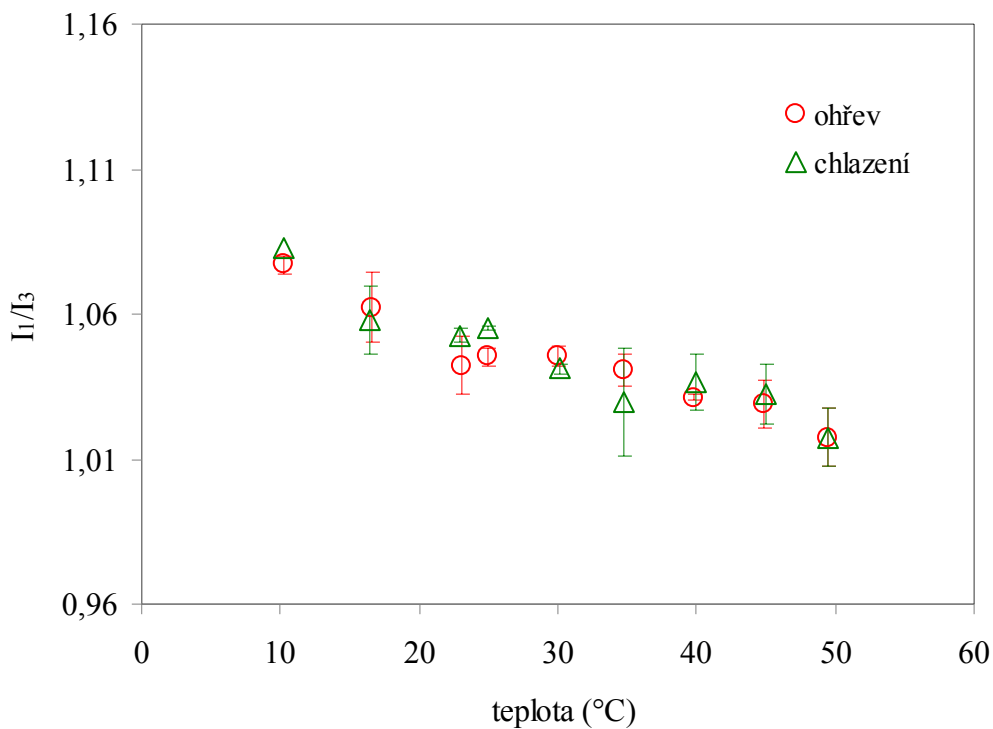
Obrázek 14: Ukázka vzniku gelových lemů u jednotlivých vzorků

Na obrázku 14 je vidět čtveřice vzorků obsahujících koncentraci CTAB $c = 3 \text{ mmol dm}^{-3}$ s klesající koncentrací hyaluronanu o molekulové hmotnosti 1,4 MDa. U vzorku s nejvyšší koncentrací hyaluronanu (5B) je velmi patrné vytvoření silného gelového lemu. Následující vzorek (6B) se velmi podobal vzorku předchozímu, avšak zde došlo k mnohem většímu rozpuštění sudánové červeně. U vzorků 7B a 8B se neprojevil vznik žádného gelového lemu ani zákalu. Docházelo zde i k úplnému rozpuštění sudánové červeně. Pro měření tedy byla vybrána koncentrace hyaluronanu $c = 15 \text{ mg dm}^{-3}$ odpovídající vzorku 7B.

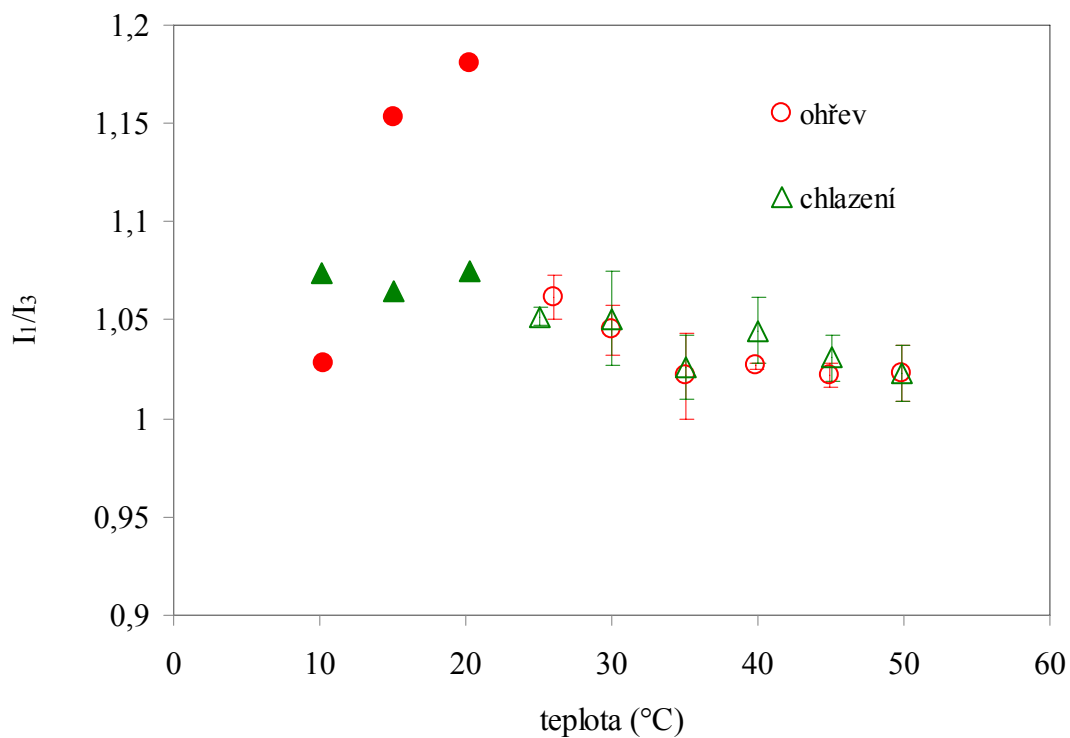
5.3 CTAB v prostředí vody



Obrázek 15: Teplotní závislost vzorku obsahujícího koncentraci CTAB $c = 0,6 \text{ mmol dm}^{-3}$ v prostředí vody



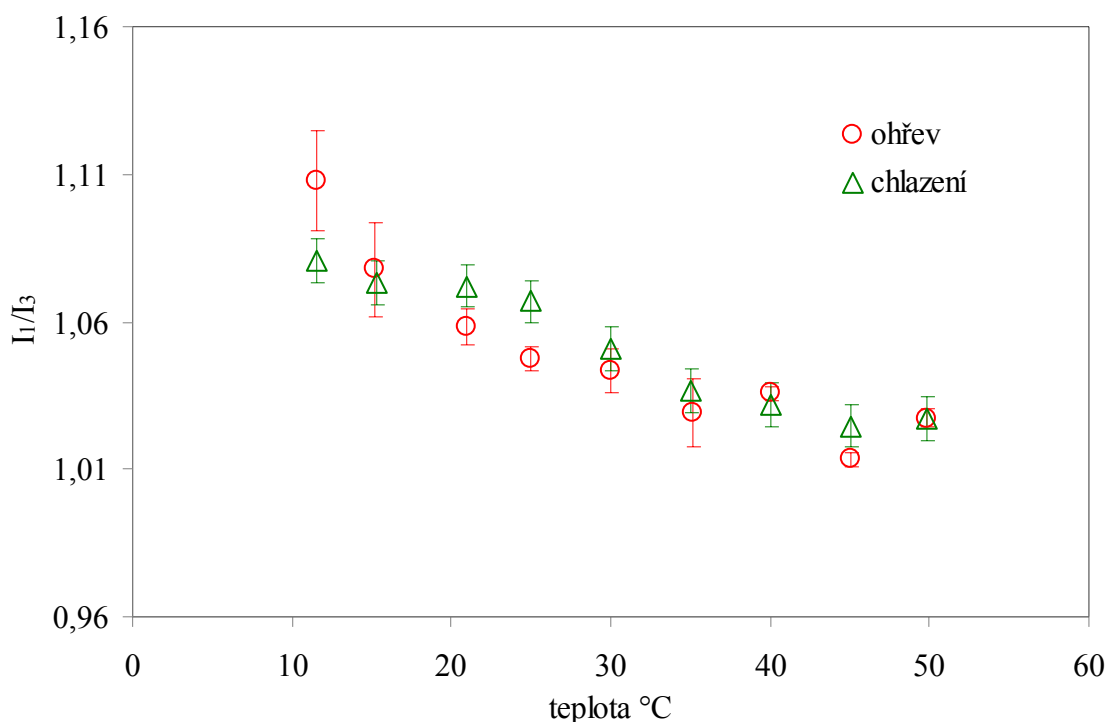
Obrázek 16: Teplotní závislost vzorku obsahujícího koncentraci CTAB $c = 3 \text{ mmol dm}^{-3}$ v prostředí vody



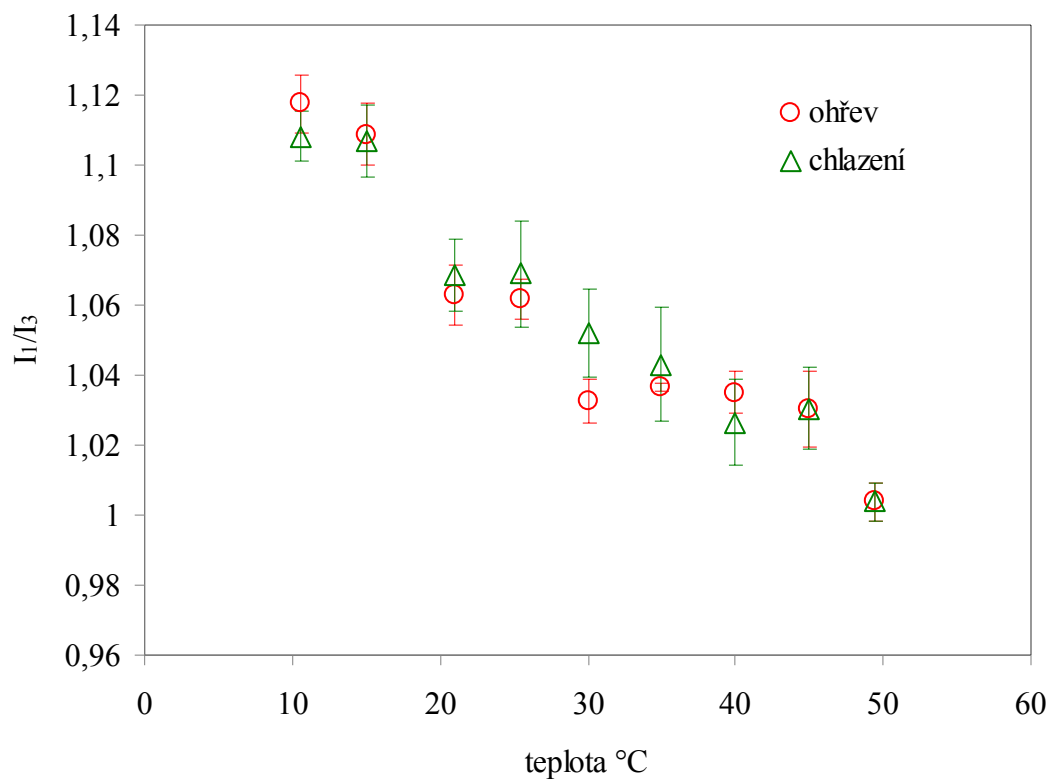
Obrázek 17: Teplotní závislost vzorku obsahujícího koncentraci CTAB $c = 6 \text{ mmol dm}^{-3}$ v prostředí vody, plné body přísluší systému před Krafftovou teplotou

Na obrázcích 15-17 je znázorněna závislost polaritního poměru I_1/I_3 pro vzorky obsahující měnící se koncentrací CTAB v prostředí vody. Pro vzorek o nejnižší koncentraci CTAB závislost mírně klesá se zvyšující se teplotou. Tyto zvýšené hodnoty byly způsobeny nízkou koncentrací CTAB, při které nedocházelo ke vzniku dostatečného množství micel. U vzorku obsahující koncentraci $c = 3 \text{ mol dm}^{-3}$ vykazovala daná závislost mírně klesající tendenci. To znamená, že s rostoucí teplotou polarita mírně klesá, mění se charakter hydrofobního jádra a agregát se pravděpodobně stává kompaktnějším. U nejvyšší koncentrace byl pozorován vznik nehomogenit vlivem působení Krafftovy teploty. Tyto hodnoty jsou v grafu znázorněny plnými body. Při ohřevu je rozptýl těchto bodů velmi dobře viditelný. U chlazení vykazují poměrně lineární trend, což je však způsobeno tím, že se jedná o průměrné hodnoty tří měření. Chybové úsečky nejsou zobrazeny, protože jejich velikost přesahovala rozsah grafu daný osou y . Krafftova teplota byla vizuálně stanovena na 22°C . Po překročení Krafftovy teploty vykazuje závislost, stejně jako u koncentrace $c = 3 \text{ mmol dm}^{-3}$ mírně klesající charakter. Pro všechny tyto systémy na sebe sedí křivky ohřevu a chlazení.

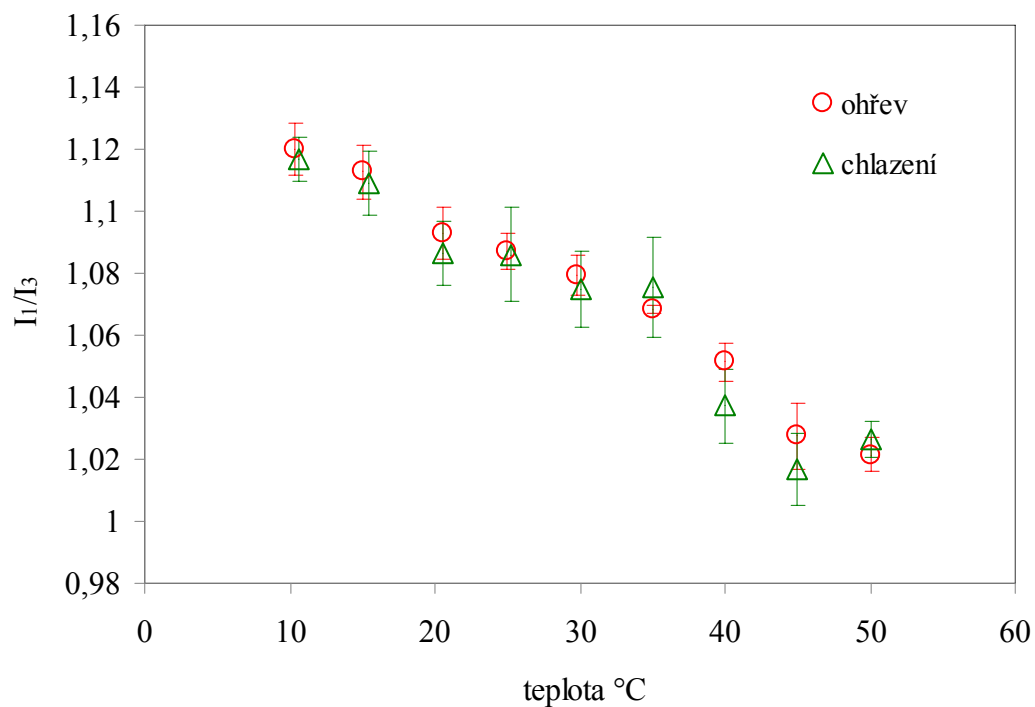
5.4 CTAB v prostředí $0,15 \text{ mol dm}^{-3} \text{ NaCl}$



Obrázek 18: Teplotní závislost vzorku obsahujícího koncentraci CTAB $c = 0,6 \text{ mmol dm}^{-3}$ v prostředí $0,15 \text{ mol dm}^{-3} \text{ NaCl}$



Obrázek 19: Teplotní závislost vzorku obsahujícího koncentraci CTAB $c = 3 \text{ mmol dm}^{-3}$ v prostředí $0,15 \text{ mol dm}^{-3}$ NaCl

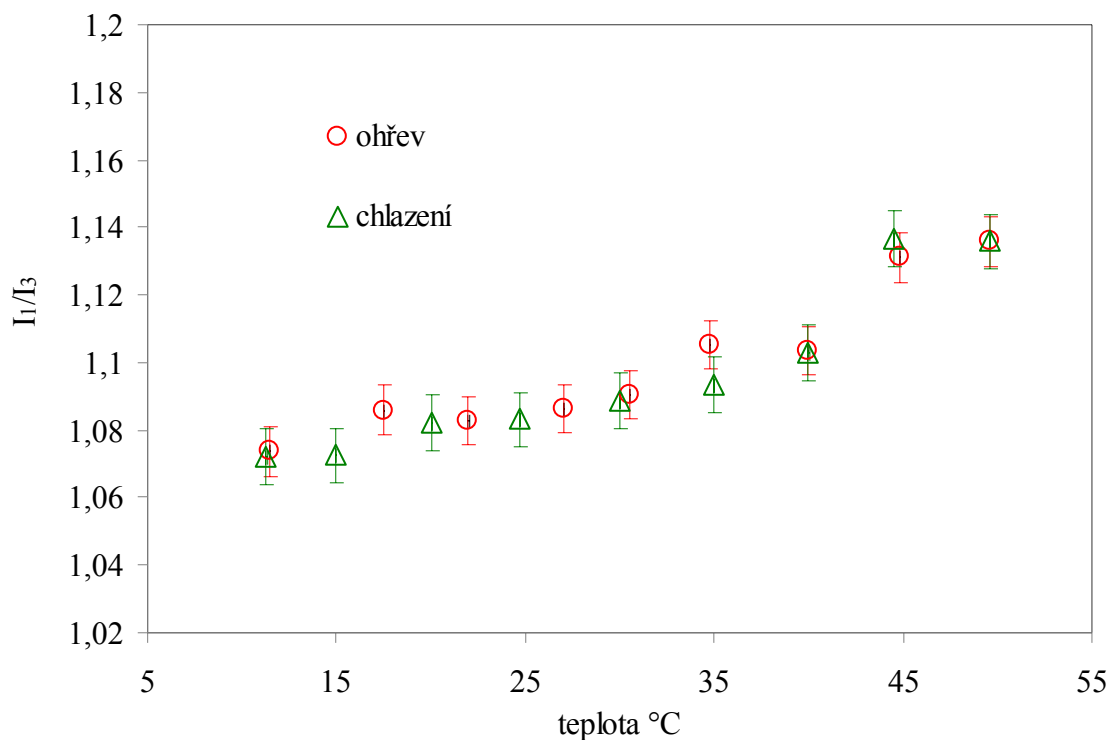


Obrázek 20: Teplotní závislost vzorku obsahujícího koncentraci CTAB $c = 6 \text{ mmol dm}^{-3}$ v prostředí $0,15 \text{ mol dm}^{-3}$ NaCl

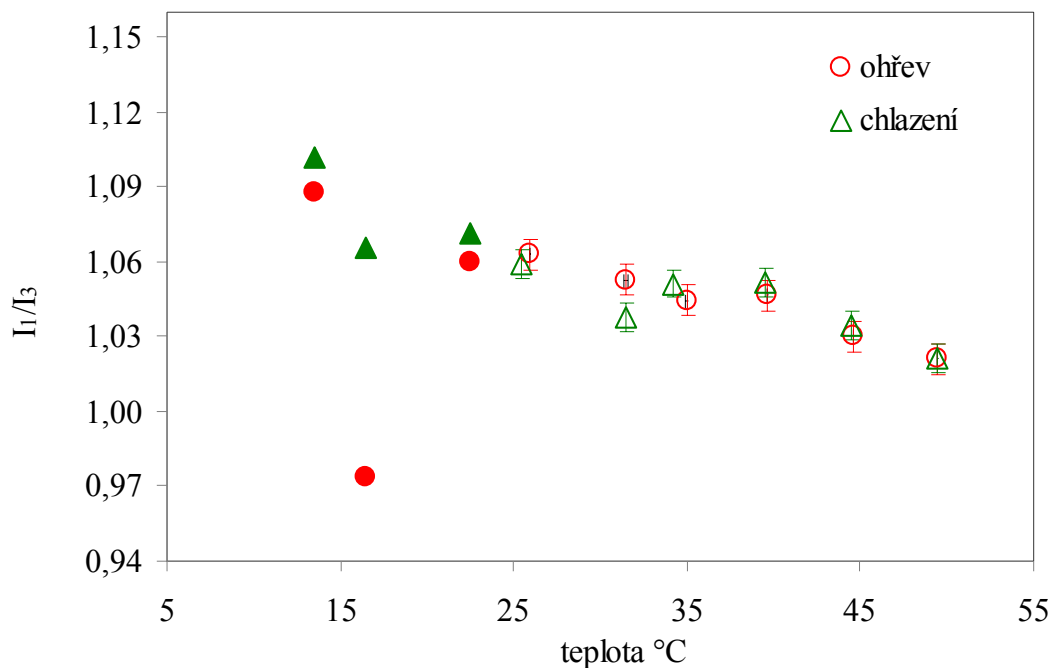
Obázky 18 až 20 ukazují teplotní závislost vzorků pro měnící se koncentraci CTAB v prostředí $0,15 \text{ mol dm}^{-3} \text{ NaCl}$. U všech těchto vzorků byla patrná klesající tendence. Změna polaritního indexu s rostoucí teplotou byla přibližně 0,1. Vzhledem k tomu, že se polaritní index pohybuje v rozmezí od cca 0,9 do 1,5, tak změna o desetinu je poměrně významná [20]. Na rozdíl od prostředí vody nedocházelo ani při nejvyšší koncentraci CTAB ke vzniku nehomogenit vlivem Krafftovy teploty. Opět u všech systémů si závislosti ohřevu a zchlazení odpovídají, takže agregát se po zchlazení vrací do původního stavu.

5.5 1,4 MDa hyaluronan

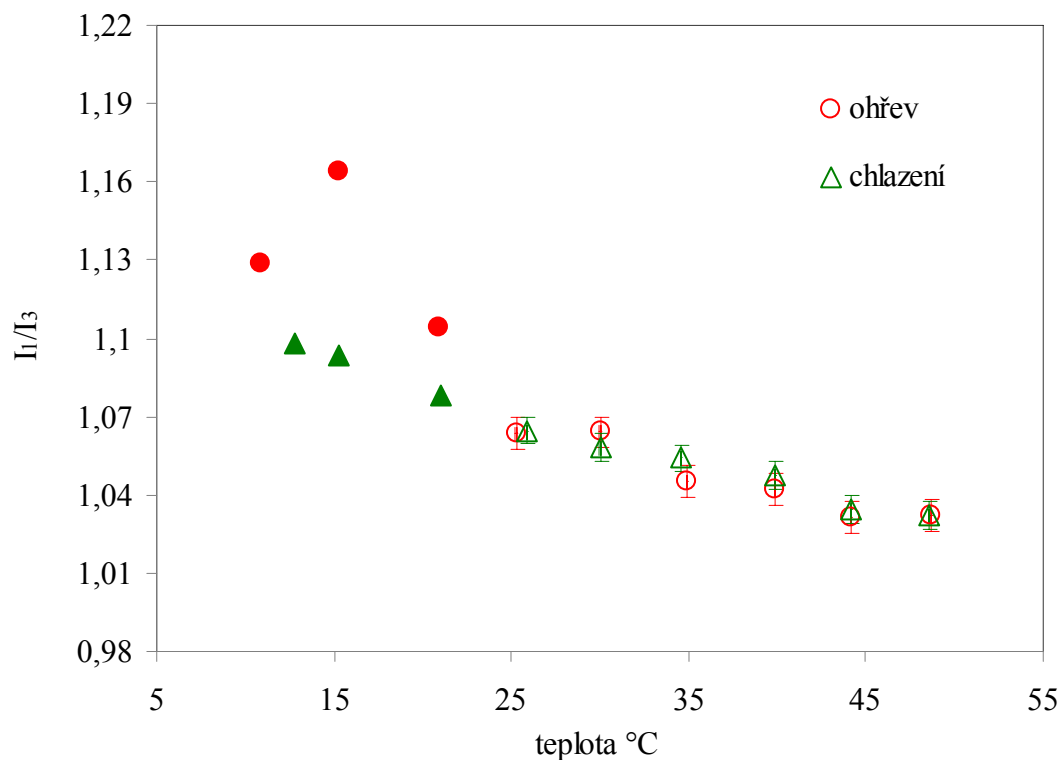
5.5.1 V prostředí vody



Obrázek 21: Teplotní závislost vzorku obsahujícího 1,4 MDa hyaluronanem o koncentraci $c = 15 \text{ mg dm}^{-3}$, koncentrace CTAB $c = 0,6 \text{ mmol dm}^{-3}$



Obrázek 22: Teplotní závislost vzorku obsahujícího 1,4 MDa hyaluronanem o koncentraci $c = 15 \text{ mg dm}^{-3}$, koncentrace CTAB $c = 3 \text{ mmol dm}^{-3}$, plné body přísluší systému před Krafftovou teplotou



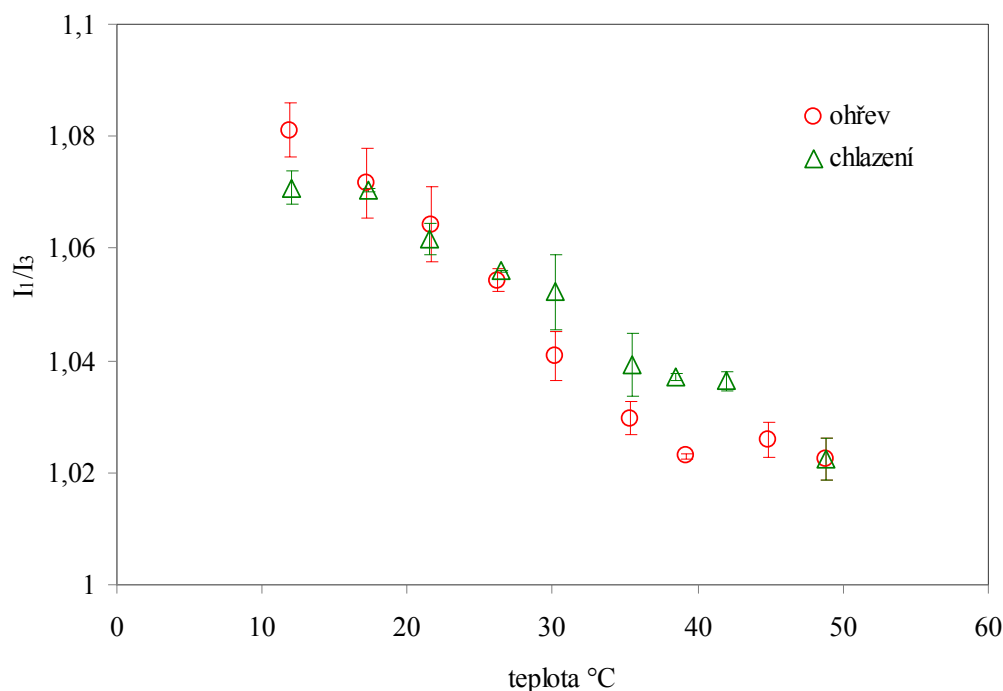
Obrázek 23: Teplotní závislost vzorku obsahujícího 1,4 MDa hyaluronanem o koncentraci $c = 15 \text{ mg dm}^{-3}$, koncentrace CTAB $c = 6 \text{ mmol dm}^{-3}$, plné body přísluší systému před Krafftovou teplotou

Na obrázcích 21-23 jsou zobrazeny grafy teplotních závislostí připravených vzorků s konstantní koncentrací 1,4 MDa hyaluronanu ($c = 15 \text{ mg dm}^{-3}$) a měnící se koncentrací CTAB v prostředí vody. Vzorek s koncentrací CTAB $c = 0,6 \text{ mmol dm}^{-3}$ na obrázku 21 vykazoval se zvyšující se teplotou rostoucí tendenci. Tímto se liší od vzorků tenzidu bez obsahu hyaluronanu i od ostatních vzorků obsahujících hyaluronan 1,4 MDa s vyššími koncentracemi CTAB. Při ochlazování pak docházelo ke zpětnému poklesu polaritního poměru po stejné linii jako při ohřevu. Celkový rozdíl poměru I_1/I_3 mezi 10°C a 50°C odpovídal hodnotě 0,07.

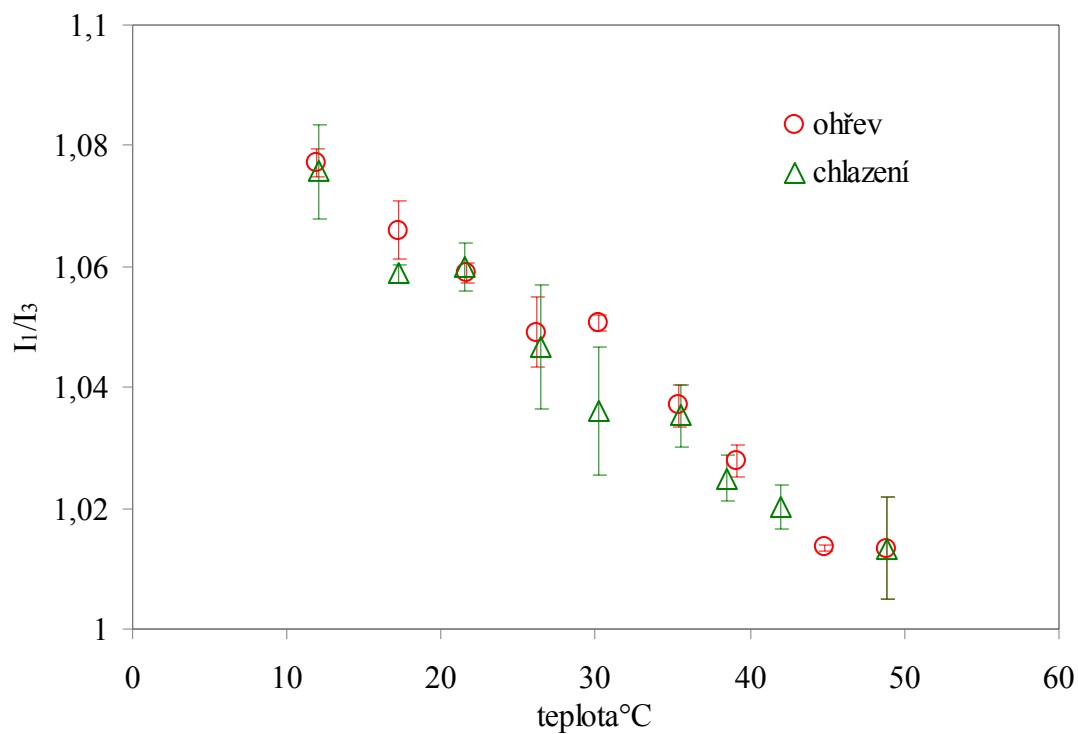
Vzorek na obrázku 22 na rozdíl od vzorku předchozího vykazoval s rostoucí teplotou klesající tendenci. Při ochlazení na 10°C se vzorek stal značně nehomogenním, jelikož při dané koncentraci obsahujících látek se při této teplotě systém nacházel pod kritickou micelární koncentrací. Nehomogenita přetrvávala ještě při měření při 15°C , při 25°C již vymizela. Přesněji byla hodnota Krafftovy teploty stanovena na $23,8^\circ\text{C}$. Hodnoty pod touto hranicí byly v grafu vyznačeny plnými body jak pro ohřev, tak také pro chlazení. Polaritní index se z teploty 25°C do teploty 50°C snížil o 0,05.

Vzorek na obrázku 23 vykazuje stejně jako vzorek předchozí s rostoucí teplotou klesající průběh závislosti polaritního parametru. Při nejnižších teplotách se také projevil vliv Krafftovy teploty. Nehomogenita ve vzorku při měření přetrvávala až do teploty 20°C . Krafftova teplota byla stanovena na $24,5^\circ\text{C}$. Pod touto teplotou odpovídající body opět vyznačeny plnou značkou. Při chlazení tyto plné body plynule pokračují v rostoucí tendenci polaritního poměru. To je však pouze průměrná hodnota rozptylu bodů, které náhodně vykazují shodu se závislostí nad Krafftovou teplotou.

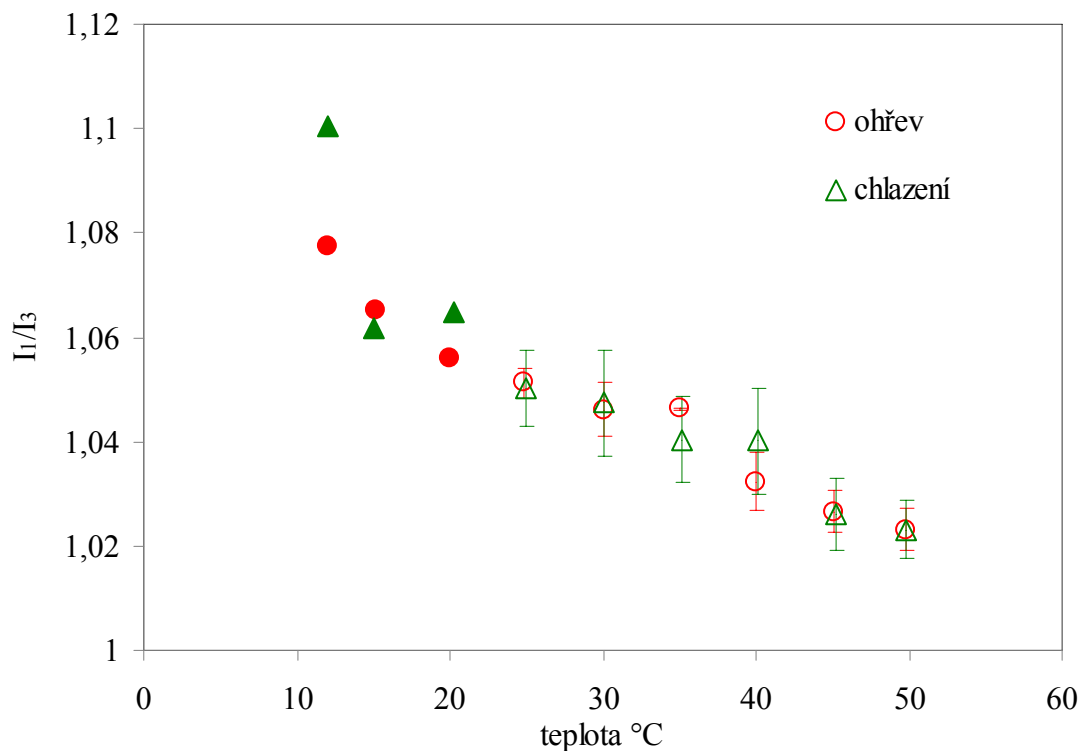
5.5.2 V prostředí 0,15 molární NaCl



Obrázek 24: Teplotní závislost vzorku obsahujícího 1,4 MDa hyaluronanem o koncentraci $c = 15 \text{ mg dm}^{-3}$, koncentrace CTAB $c = 0,6 \text{ mmol dm}^{-3}$



Obrázek 25: Teplotní závislost vzorku obsahujícího 1,4 MDa hyaluronanem o koncentraci $c = 15 \text{ mg dm}^{-3}$, koncentrace CTAB $c = 3 \text{ mmol dm}^{-3}$

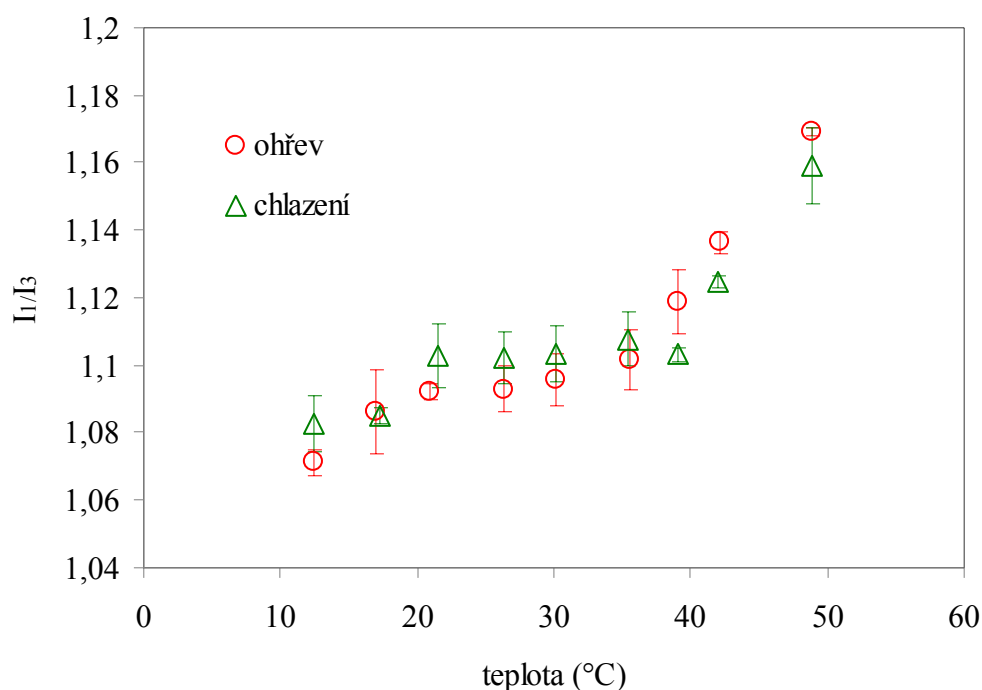


Obrázek 26: Teplotní závislost vzorku obsahujícího 1,4 MDa hyaluronanem o koncentraci $c = 15 \text{ mg dm}^{-3}$, koncentrace CTAB $c = 6 \text{ mmol dm}^{-3}$, plné body přísluší systému před Krafftovou teplotou

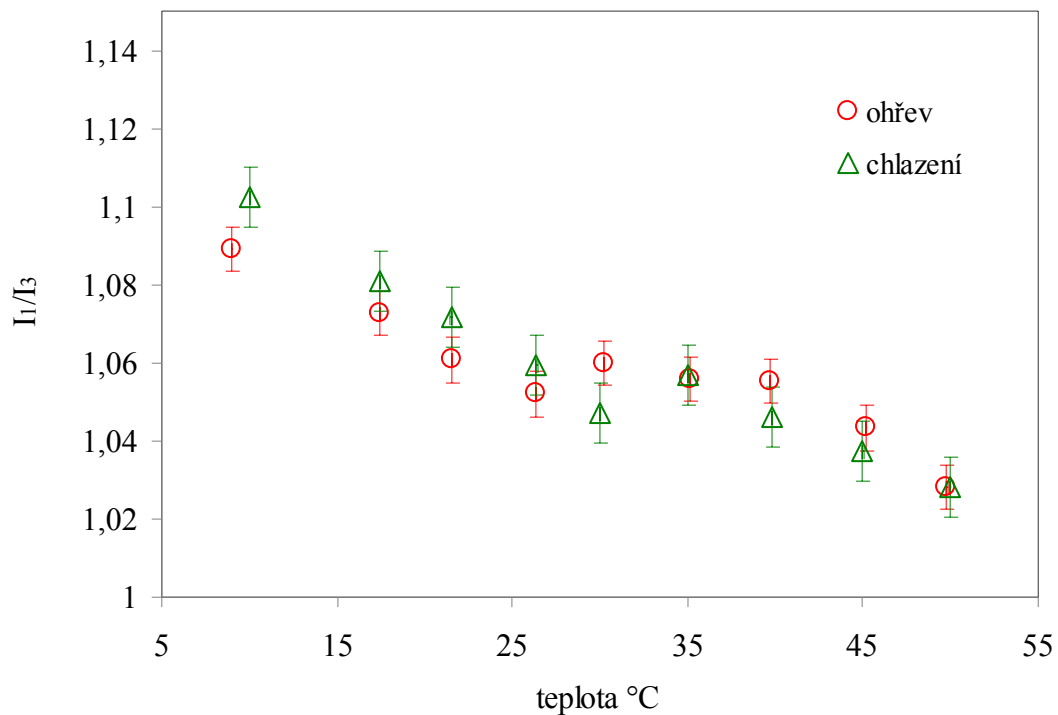
Na obrázcích 24-26 jsou znázorněny teplotní závislosti vzorků obsahujících konstantní koncentraci hyaluronanu a proměnlivou koncentraci CTAB v prostředí $0,15 \text{ mol dm}^{-3} \text{ NaCl}$. U těchto vzorků měl poměr I_1/I_3 s rostoucí teplotou klesající tendenci, stejně jako u totožných vzorků v prostředí vody U vzorku na obrázku 24 docházelo s rostoucí teplotou ke zvyšování polaritního indexu. Vzorek na obrázku 24 ani na obrázku 25 nevykazoval při nízkých teplotách žádné nehomogenity vlivem Krafftovy teploty. Pouze u vzorku na obrázku 26 se tento jev objevil od teploty $20 \text{ }^\circ\text{C}$. Vizuálně byla tato teplota přesněji stanovena na $24,4 \text{ }^\circ\text{C}$. Pro vzorek na obrázku 24 byla změna polaritního poměru 0,06, u vzorku na obrázku 25 byla tato hodnota 0,07 a u vzorku na obrázku 26 0,04, jelikož u tohoto vzorku byly jako použitelné hodnoty brány hodnoty odpovídající teplotám od 25°C .

5.6 73 kDa hyaluronan

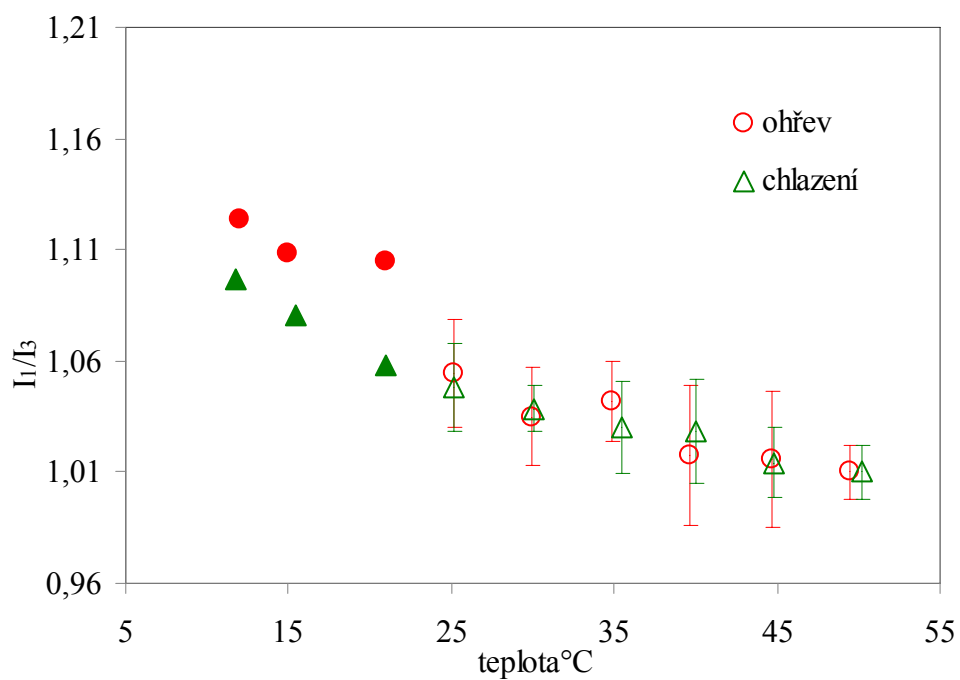
5.6.1 V prostředí vody



Obrázek 27: Teplotní závislost vzorku obsahujícího 73 kDa hyaluronanem o koncentraci $c = 15 \text{ mg dm}^{-3}$, koncentrace CTAB $c = 0,6 \text{ mmol dm}^{-3}$



Obrázek 28: Teplotní závislost vzorku obsahujícího 73 kDa hyaluronanem o koncentraci $c = 15 \text{ mg dm}^{-3}$, koncentrace CTAB $c = 3 \text{ mmol dm}^{-3}$



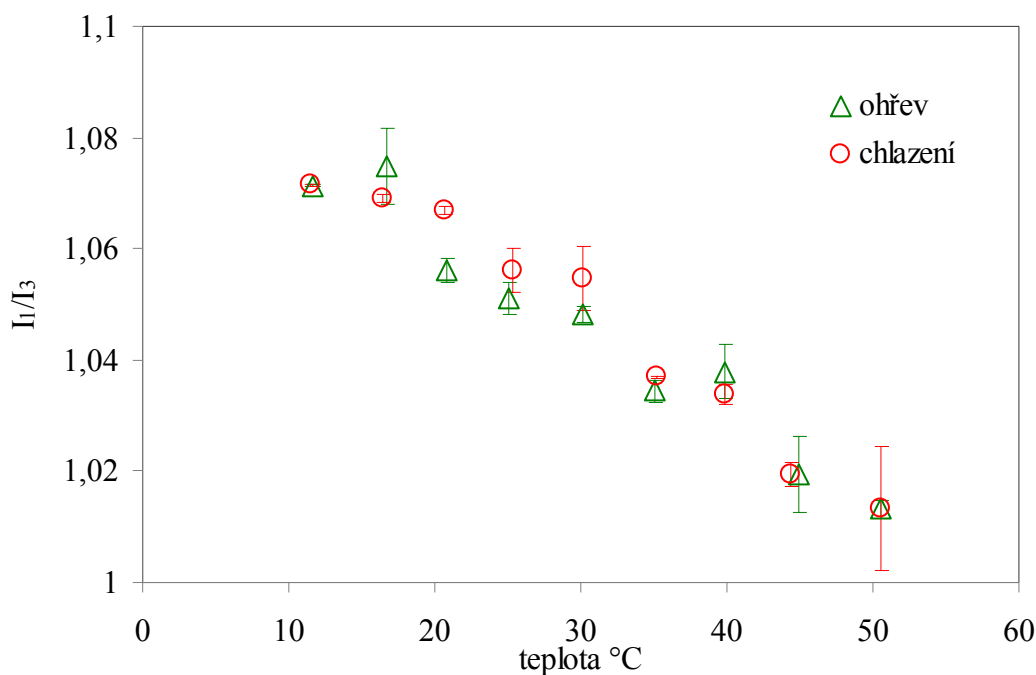
Obrázek 29: Teplotní závislost vzorku obsahujícího 73 kDa hyaluronanem o koncentraci $c = 15 \text{ mg dm}^{-3}$, koncentrace CTAB $c = 6 \text{ mmol dm}^{-3}$

Obrázky 27-29 znázorňují teplotní závislost polaritního poměru pro hyaluronan o molekulové hmotnosti 73 kDa v prostředí vody. U vzorku na obrázku 27 stejně jako u vzorku na obrázku 21, který má stejnou koncentraci hyaluronanu i CTAB v prostředí vody, pouze se jedná o 1,4 MDa hyaluronan, vykazuje teplotní závislost rostoucí tendenci. U tohoto vzorku došlo při ohřevu ke změně poměru I_1/I_3 o 0,1. Vznik nehomogenit vlivem Krafftovy teploty zde nebyl zaznamenán.

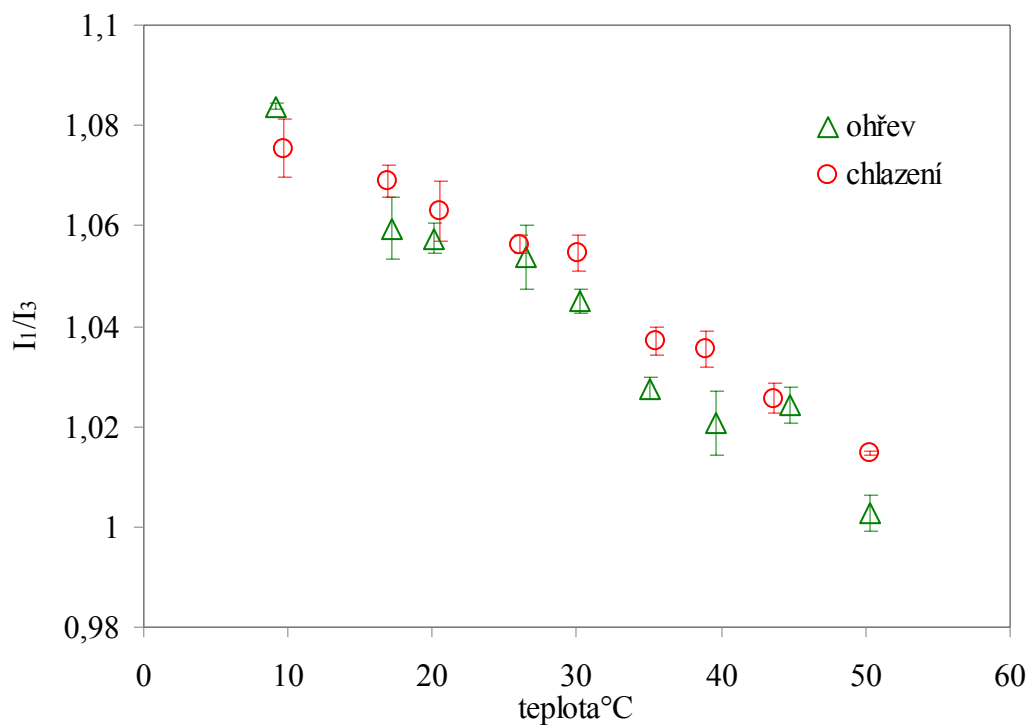
U vzorku na obrázku 28 je opět patrná klesající tendence s rostoucí teplotou. Při ochlazování opět body téměř kopírují závislost získanou při ohřevu. Ani u toho vzorku se Krafftova teplota neprojevila. Zde byl při ohřevu na 50 °C polaritní index snížen o 0,08.

U vzorku na obrázku 29 sejně jako u předchozích dvou vzorků (obr. 27 a 28) teplotní závislost poměru I_1/I_3 se projevovala klesajícím trendem. Zde se projevil vliv Krafftovy teploty, která byla vizuálně pozorována při 22 °C. Body získané pod touto teplotou byly do grafu zaznamenány jako plné body, u kterých se na první pohled neprojevují žádné zvláštní nepravidelnosti. Ve skutečnosti se však jedná o průměrné hodnoty tří měření, které náhodně vykazují linearitu. Při vytvoření chybových úseček by jejich velikost přesahovala rozsah grafu daný osou y. Polaritní poměr se v rozmezí teplot 25 °C-50 °C snížil o 0,04.

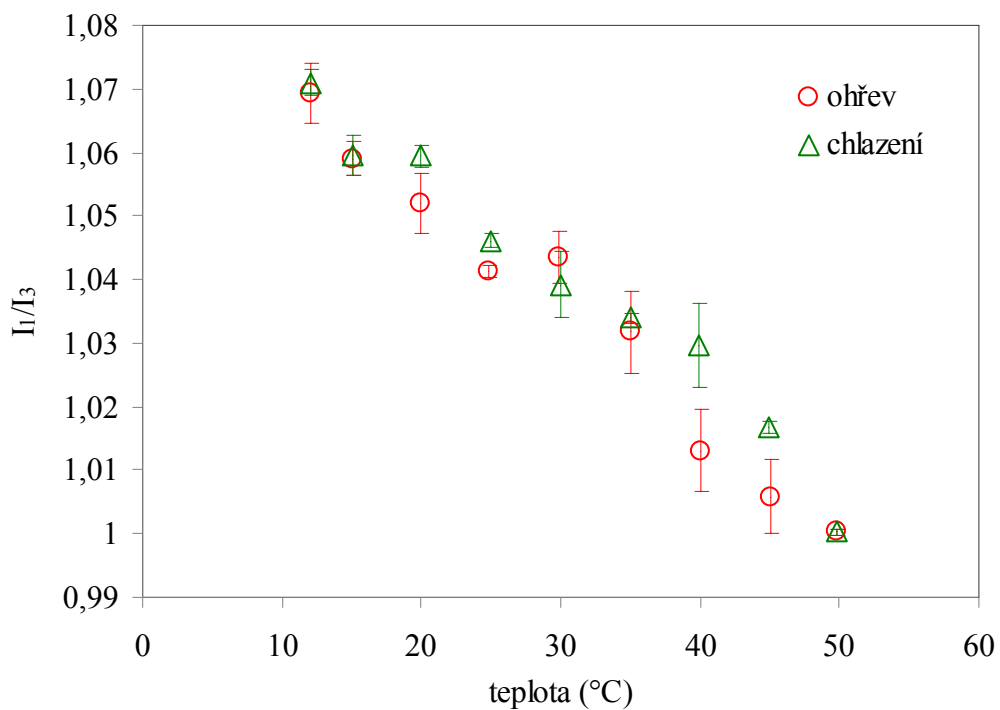
5.6.2 V prostředí 0,15 molární NaCl



Obrázek 30: Teplotní závislost vzorku obsahujícího 73 kDa hyaluronanem o koncentraci $c = 15 \text{ mg dm}^{-3}$, koncentrace CTAB $c = 0,6 \text{ mmol dm}^{-3}$



Obrázek 31: Teplotní závislost vzorku obsahujícího 73 kDa hyaluronanem o koncentraci $c = 15 \text{ mg dm}^{-3}$, koncentrace CTAB $c = 3 \text{ mmol dm}^{-3}$



Obrázek 32: Teplotní závislost vzorku obsahujícího 73 kDa hyaluronanem o koncentraci $c = 15 \text{ mg dm}^{-3}$, koncentrace CTAB $c = 6 \text{ mmol dm}^{-3}$

Teplotní závislosti u vzorků pro 73 kDa hyaluronan v prostředí $0,15 \text{ mol dm}^{-3}$ NaCl jsou zaznamenány na obrázcích 30-32. U všech těchto vzorků opět docházelo k charakteristickému poklesu polaritního indexu s rostoucí teplotou. Polaritní index se po dosažení nejvyšší teploty snížil u vzorku s koncentrací CTAB $c = 0,6 \text{ mmol dm}^{-3}$ o 0,7, u vzorku s koncentrací CTAB $c = 3 \text{ mmol dm}^{-3}$ o 0,8 a u vzorku s koncentrací CTAB $c = 6 \text{ mmol dm}^{-3}$ o 0,7. Ani u nejkonzentrovanejšího vzorku zde nedocházelo ke vzniku nehomogenit vlivem Krafftovy teploty.

Z naměřených výsledků bylo patrné, že dochází ke změnám Krafftovy teploty vlivem přidání 73 kDa či 1,4 MDa hyaluronanu. Jednotlivé hodnoty pro připravené vzorky byly zpracovány do tabulky (viz. příloha 2).

6 Závěr

Cílem bakalářské práce bylo stanovení vlivu teploty na kvalitu hydrofobní domény agregátů v systému biopolymer - tensid. Jako nejvhodnější metoda pro stanovení teplotní závislosti polaritách změn vzorků byla určena fluorescenční spektrofotometrie. Pro tento postup byla vybrána sonda pyren pro svou unikátní citlivost na změnu polaritativy prostředí vzorku. Tenzidem byl kationaktivní cetyltrimethylamonium bromid, jelikož je oficiálně doporučován pro využití v systémech zaměřených na cílené nosiče léčiv. Modelovým polymerem byl nativní hyaluronan o molekulové hmotnosti 73 kDa a 1,4 MDa.

Počátečním experimentem bylo stanovení kritické micelární koncentrace tenzidu CTAB v prostředí 0,15 M NaCl, jejíž hodnota byla určena na $c = 0,06 \text{ mmol dm}^{-3}$. Pro další měření pak byly vybrány koncentrace odpovídající desetinásobku ($c = 0,6 \text{ mmol dm}^{-3}$), padesátinásobku ($c = 3 \text{ mmol dm}^{-3}$) a stonásobku ($c = 6 \text{ mmol dm}^{-3}$) cmc. Pro tyto koncentrace byly stanoveny teplotní závislosti polaritního poměru, a to jak v prostředí vody, tak také v prostředí $0,15 \text{ mol dm}^{-3}$ NaCl. Teplota se pohybovala od 10°C do 50°C . V prostředí vody pro koncentraci CTAB $c = 0,6 \text{ mmol dm}^{-3}$ přibližně konstantní závislost, pro koncentrace $c = 3 \text{ mmol dm}^{-3}$ a $c = 6 \text{ mmol dm}^{-3}$ s rostoucí teplotou polaritní poměr klesal.

Se systémem hyaluronan - CTAB byly provedeny doplňující experimenty za použití barviva sudánové červeně, kde byly pozorovány vlastnosti vzorku jako zákal, zabarvení či tvorba gelového lemu. Na základě těchto výsledků byly vybrány nejpříjemnější koncentrace tenzidu a hyaluronanu pro měření na spektrofluorimetru. Jako nejvhodnější se jevila koncentrace hyaluronanu 15 mg dm^{-3} s měnicími se koncentracemi tenzidu CTAB. Při experimentech s 1,4 MDa hyaluronanem ve vodě byl pro nejnižší koncentraci CTAB zjevný stoupající trend polaritního poměru s rostoucí teplotou. Při následujících dvou koncentracích měl tento poměr klesající tendenci. Pro 73 kDa hyaluronan ve vodě byly grafy odpovídající jednotlivým koncentracím CTAB téměř totožné s 1,4 MDa hyaluronanem. Změna však nastala pro koncentraci CTAB ($c = 3 \text{ mmol dm}^{-3}$), kde nedocházelo ke vzniku nehomogenit vlivem Krafftovy teploty. Teplotní závislosti prováděné s CTAB v prostředí $0,15 \text{ mol dm}^{-3}$ NaCl vykazovaly pro všechny koncentrace CTAB totožné klesající tendence. Po přidavku 15 mg 1,4 MDa hyaluronanu nedošlo k velkým změnám polaritního indexu s měnicí se teplotou. Ani vzorky obsahující 73 kDa hyaluronan v prostředí $0,15 \text{ mol dm}^{-3}$ NaCl nevykazovaly žádné odlišnosti ve srovnání s vzorkem ve stejných podmínkách pouze bez přidání hyaluronanu.

U některých vzorků obsahujících větší koncentrace CTAB docházelo ke vzniku nehomogenit vlivem Krafftovy teploty. Pro 1,4 MDa hyaluronan v prostředí vody byla u vzorku obsahující koncentraci CTAB $c = 3 \text{ mmol dm}^{-3}$ vizuálně stanovena hodnota Krafftovy teploty na $23,8^\circ \text{C}$ a pro koncentraci $c = 6 \text{ mmol/dm}^{-3}$ byla tato teplota zaznamenána u $24,8^\circ \text{C}$. Pro 73 kDa hyaluronan ve vodě byla Krafftova teplota pozorována pouze u koncentrace CTAB $c = 6 \text{ mmol dm}^{-3}$, kde byla hodnota Krafftovy teploty stanovena na 22°C . Pro 1,4 MDa hyaluronan v prostředí soli se pouze u nejvyšší koncentrace objevily u nízkých teplot očekávané nehomogenity. Krafftova teplota byla vizuálně stanovena

na 24,4 °C. U 73 kDa hyaluronanu v prostředí soli se nehomogenity neobjevily ani při nejvyšší koncentraci CTAB.

Byl stanoven vliv teploty na kvalitu hydrofobní domény v systému biopolymer - tenzid ve dvou různých prostředích. Cíl bakalářské práce je možno považovat za splněný.

7 Seznam použitých zdrojů

- [1] Atkins E. D., Sheehan J. K.: *The molecular structure of hyaluronic acid.*, 1971, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1178299/?page=1>
- [2] Hascall, C. V., Laurent, C. T.: *Hyaluronan: Structure and Physical Properties.* Glycoforum [online], 1997, [cit. 3. 1. 2010], <http://www.glycoforum.gr.jp/>
- [3] Harrison, K., Hyaluronan. *Hyaluronan @ 3Dchem.com* [online], 2008, [cit. 2. 2. 2010] <http://www.3dchem.com/molecules.asp?ID=425#>
- [4] Holmberg, K., Jonsson, B., Kronberg, B., Lindin, B., *Surfactants and Polymers in Aqueous Solution.* John Wiley & Sons, Ltd., 2002. ISBN: 0-471-49883-1
- [5] *Surfactants: Surface Active Agents* [online]. 1998, poslední revize 20. 1. 2008 [cit. 30. 3. 2010]. Dostupné z: <http://www.chemistry.co.nz/surfactants.htm>
- [6] Mittal, K. L., Lendler, E. J.: *Solution Behaviour of Surfactants (Theoretical and Applied Aspects)*, Vol. 1 and 2, Plenum Press, New York 1982.
- [7] Atkins E. D., Sheehan J. K.: *The molecular structure of hyaluronic acid.*, 1971, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1178299/?page=1>
- [8] Bartovská, L., Šišková, M.: *Co je co v povrchové a koloidní chemii.* [online], 2005, http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_es-001/
- [9] Necas J., Bartosiková L., Brauner P., Kolar J.: *Hyaluronic acid (hyaluronan): a review*, 2008, <http://www.vri.cz/docs/vetmed/53-8-397.pdf>
- [10] Valeur, B.: *Molecular Fluorescence: Principles and Applications.* Eley - VCH Verlag GmbH, 2001. ISBN 3-527-29919-X
- [11] Kyyrönen, K., Hume, L., Benedetti, L., Urtti, A., Topp, E., Stell, V.: Methylprednisolone esters of hyaluronic acid in ophthalmic drug delivery: in vitro and in vivo release studies. *International Journal of Pharmaceutics*, 1992, vol. 1-3, 161-169 p.
- [12] Thalberg, K., Lindman, B.: Interaction between hyaluronan and cationic surfactants. *Journal of Physical Chemistry*, 1989, vol. 93, 1478-1483 p.
- [13] Stegemeyer H., Hasse, J., Laarhoven, W.: Polarization of the monomer and excimer fluorescence of pyrene derivatives in liquid-crystalline hosts. *Chemical Physics Letters*, 1987, vol. 6, 516-520 p.

- [14] Smit, K. J., Sakurovs, R., Ghiggino, K. P.: *Temperature dependence of fluorescence and phosphorescence from probe molecules in polymer substrates*. European Polymer Journal, 1982, vol. 1, 49-53 p.
- [15] Honda, Ch., Katsumata, Y., Yasutome, R., Yamazaki, S., Ishii, S.: *Temperature dependence of pyrene fluorescence spectra in aqueous solutions of CnEm nonionic surfactant micelles*. Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemismy, 2006, vol. 2, 151-157 p.
- [16] Pietrucha, K.: *Changes in denaturation and rheological properties of collagen-hyaluronic aci scaffolds as a reset of temperature dependencies*. International Hournal of Biological Macromolecules, 2005, vol. 5, 299-304 p.
- [17] Sung, J., Chang, T.: *Temperature dependence of probe diffusion in polymer matrix*. Polymer, 1993, vol. 17, 3741-3743 p.
- [18] Fang, J., Y., Chen, J. P., Leu, Y. L., Hu, J. W.: *Temperature-sensitive hydrogels composed of chitosan and hyaluronic acid as injectable carriers for drug delivery*, Polymer, 2008, vol. 3, 626-636 p.
- [19] Sicińska, W., Adams, B., Lerner, L.: *A detailed 1H and 13C NMR study of a repeating disaccharide of hyaluronan: the effects of temperature and counterion type*, Polymer, 1993, vol. 242, 29-51 p.
- [20] Ray, G. B., Chakraborty, I., Moulik, S. P.: *Pyrene absorption can be a convenient method for probing critical micellar concentration (cmc) and indexing micellar polarity* Journal of Colloid and Interface Science, 2006, vol. 1, 248-254 p.

8 Seznam použitých zkratek a symbolů

8.1 Seznam zkratek

PAL	Povrchově aktivní látka
CMC	Kritická micelární koncentrace
Da	Dalton, jednotka molekulové hmotnosti, 1 Da odpovídá 1 g/mol

8.2 Seznam symbolů

C	koncentrace látky v roztoku
M	$\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$
S ₀	základní stav molekuly
S ₁	první excitovaný singletový stav molekuly
S ₂	druhý excitovaný singletový stav molekuly
T ₁	první excitovaný tripletový stav molekuly
T ₂	druhý excitovaný tripletový stav molekuly
I ₁	intenzita fluorescence monomeru
I ₃	intenzita fluorescence třetího vibračního pásu
I _{KOR}	korigovaná hodnota intenzity
I _{POZ}	nekorigovaná hodnota intenzity
OD _{EX}	hodnota optické hustoty při dané vlnové délce excitace
OD _{EM}	hodnota optické hustoty při dané vlnové délce emise
HA	hyaluronan
T _K	Krafftova teplota
M	základní stav molekuly
M*	excitovaný stav molekuly
D*	excitovaný dimer

9 Seznam příloh

Příloha 1: Tabulky složení a vzhledu jednotlivých vzorků při experimentu se sudánovou červí

Příloha 2: Hodnoty Krafftovy teploty stanoveny vizuálně pro jednotlivé vzorky

10 Přílohy

10.1 Příloha 1

Tabulka 1: Obsahuje složení vzorků o 3 různých koncentracích CTAB, do nichž byly přidávány 4 různé koncentrace hyaluronanu o molekulové hmotnosti 73 kDa v mili - Q a jejich možné zakalení či vytvoření gelového lemu

Kyselina hyaluronová 73 kDa						
vzorek	c CTAB (mmol dm ⁻³)	c kys. hyal. (mg dm ⁻³)	barva	gelový lem	sudánová červeň (rozpuštění)	čiré/zakalené
1A	0,6	1000	bezbarvý	ano	neúplné	čirý
2A	0,6	150	bezbarvý	ano	neúplné	čirý
3A	0,6	15	bezbarvý	ne	neúplné	čirý
4A	0,6	1	narůžovělý	ne	neúplné	čirý
5A	3	1000	bezbarvý	ano	neúplné	čirý
6A	3	150	růžový	ne	úplné	zakalený
7A	3	15	růžový	ne	neúplné	čirý
8A	3	1	růžový	ne	neúplné	čirý
9A	6	1000	růžový	ano/ malý	úplné	zakalený/silně
10A	6	150	růžový	ne	úplné	zakalený/mírně
11A	6	15	růžový	ne	úplné	čirý
12A	6	1	růžový	ne	úplné	čirý

Tabulka 2: Obsahuje složení vzorků o 3 různých koncentracích CTAB, do nichž byly přidávány 4 různé koncentrace hyaluronanu o molekulové hmotnosti 1,4 MDa v mili-Q a jejich možné zakalení či vytvoření gelového lemu

Kyselina hyaluronová 1,4 MDa						
vzorek	c CTAB (mmol dm⁻³)	c kys. hyal. (mg dm⁻³)	barva	gelový lem	sudánová červeň (rozpuštění)	čiré/zakalené
1B	0,6	1000	bezbarvý	ano	neúplné	čirý
2B	0,6	150	bezbarvý	ano	neúplné	čirý
3B	0,6	15	bezbarvý	ne	neúplné	čirý
4B	0,6	1	bezbarvý	ne	neúplné	čirý
5B	3	1000	bezbarvý	ano/ silný	neúplné	čirý
6B	3	150	růžový	ano	ano	čirý
7B	3	15	růžový	ne	úplné	čirý
8B	3	1	růžový	ne	úplné	čirý
9B	6	1000	narůžovělý	ano/ silný	úplné	zakalený/mírně
10B	6	150	růžový	ano	úplné	čirý
11B	6	15	růžový	ne	úplné	čirý
12B	6	1	růžový	ne	úplné	čirý

Tabulka 3: Obsahuje složení vzorků o 3 různých koncentracích CTAB, do nichž byly přidávány 4 různé koncentrace hyaluronanu o molekulové hmotnosti 73 kDa v 0,15 mol dm⁻³ NaCl a jejich možné zakalení či vytvoření gelového lemu

Kyselina hyaluronová 73 kDa						
vzorek	c CTAB (mmol dm⁻³)	c kys. hyal. (mg dm⁻³)	barva	gelový lem	sudánová červeň (rozpuštění)	čiré/zakalené
1A	0,6	1000	narůžovělý	ne	neúplné	čirý
2A	0,6	150	narůžovělý	ne	neúplné	čirý
3A	0,6	15	narůžovělý	ne	neúplné	čirý
4A	0,6	1	narůžovělý	ne	neúplné	čirý
5A	3	1000	narůžovělý	ano	neúplné	zakalený/mírně
6A	3	150	růžový	ano	neúplně	zakalený
7A	3	15	růžový	ne	úplně	čirý
8A	3	1	růžový	ne	úplně	čirý
9A	6	1000	narůžovělý	ano	neúplné	zakalený
10A	6	150	růžový	ano	úplné	čirý
11A	6	15	růžový	ne	úplně	čirý
12A	6	1	růžový	ne	úplně	čirý

Tabulka 4: Obsahuje složení vzorků o 3 různých koncentracích CTAB, do nichž byly přidávány 4 různé koncentrace hyaluronanu o molekulové hmotnosti 73 kDa v $0,15 \text{ mol dm}^{-3}$ NaCl a jejich možné zakalení či vytvoření gelového lemu

Kyselina hyaluronová 1,4 MDa						
vzorek	c CTAB (mmol dm^{-3})	c kys. hyal. (mg dm^{-3})	barva	gelový lem	sudánová červeň (rozpuštění)	čiré/zakalené
1B	0,6	1000	narůžovělé	ne	neúplné	zakalený/mírně
2B	0,6	150	bezbarvý	ano	neúplné	čirý
3B	0,6	15	bezbarvý	ano	neúplné	čirý
4B	0,6	1	narůžovělé	ne	neúplné	čirý
5B	3	1000	narůžovělé	ano/ silný	neúplné	zakalené
6B	3	150	narůžovělé	ano/ silný	neúplné	čirý
7B	3	15	růžový	ne	úplně	čirý
8B	3	1	růžový	ne	úplně	čirý
9B	6	1000	narůžovělé	ano/ silný	neúplné	čirý
10B	6	150	narůžovělé	ano/ silný	neúplné	čirý
11B	6	15	růžový	ne	úplně	čirý
12B	6	1	růžový	ne	úplně	čirý

10.2 Příloha 2

Tabulka 5: Hodnoty Krafftových teplot pro 1,4 MDa hyaluronan

1,4 Mda	hodnota Krafftovy teploty ($^{\circ}\text{C}$)			
	voda	Voda + hyaluronan	$0,15 \text{ mol dm}^{-3}$ NaCl	$0,15 \text{ mol dm}^{-3}$ NaCl + hyaluronan
0,6	–	–	–	–
3	–	23,8	–	–
6	22	24,5	–	24,4

Tabulka 6: Hodnoty Krafftových teplot pro 73 kDa hyaluronan

73 kDa	hodnota Krafftovy teploty ($^{\circ}\text{C}$)			
	voda	voda+hyaluronan	$0,15 \text{ mol dm}^{-3}$ NaCl	$0,15 \text{ mol dm}^{-3}$ NaCl + hyaluronan
0,6	–	–	–	–
3	–	–	–	–
6	22	22	–	–