

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

OPTIMALIZACE STANOVENÍ ROZDĚLENÍ TENZIDU PŘI FÁZOVÉ SEPARACI V SYSTÉMU POLYMER-TENZID

OPTIMIZING THE DETERMINATION OF DISTRIBUTION OF SURFACTANT AT
PHASE SEPARATION IN POLYMER-SURFACTANT SYSTEM

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Mgr. KATEŘINA SÁTOROVÁ

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. FILIP MRAVEC, Ph.D.

BRNO 2015



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

Zadání diplomové práce

Číslo diplomové práce:	FCH-DIP0891/2014	Akademický rok: 2014/2015
Ústav:	Ústav fyzikální a spotřební chemie	
Student(ka):	Mgr. Kateřina Sátorová	
Studijní program:	Spotřební chemie (N2806)	
Studijní obor:	Spotřební chemie (2806T002)	
Vedoucí práce	Ing. Filip Mravec, Ph.D.	
Konzultanti:	Ing. Tereza Venerová, Ph.D.	

Název diplomové práce:

Optimalizace stanovení rozdělení tenzidu při fázové separaci v systému polymer-tenzid

Zadání diplomové práce:

1. Provést rešerši na téma fázové separace v systému polymer-tenzid a analytického stanovení koncentrace kationaktivních tenzidů.
2. Navrhnout na základě rešerše vhodnou metodu pro stanovení obsahu tenzidu po fázové separaci.
3. Provést experimenty s modelovým systémem hyaluronan /CTAB s různým množstvím hyaluronanu a CTAB a navrhnout optimalizaci stanovení.
4. Vyhodnotit získaná data, zhodnotit použitelnost metody a formulovat prvotní závěry o rozdělení modelového tenzidu CTAB při fázové separaci za přítomnosti hyaluronanu.

Termín odevzdání diplomové práce: 11.5.2015

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

Mgr. Kateřina Sátorová
Student(ka)

Ing. Filip Mravec, Ph.D.
Vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
Ředitel ústavu

V Brně, dne 30.1.2015

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

ABSTRAKT

Tato diplomová práce se zabývá stanovením rozdělení tenzidu při fázové separaci v systému polymer-tenzid. Jako polymer byl zvolen hyaluronan sodný o třech různých molekulových hmotnostech a jako tenzid CTAB. Experimenty byly provedeny v prostředí 0,15 M NaCl. Měření koncentrace CTAB ve vzorcích bylo založeno na tvorbě barevných komplexů CTAB s kyselinou pikrovou v chloroformu. K detekci těchto komplexů byla použita UV-VIS spektroskopie. Byl stanoven obsah CTAB v gelech o čtyřech různých složeních (2 % Hya + 200 mM CTAB, 2 % Hya + 50 mM CTAB, 0,5 % Hya + 200 mM CTAB, 0,5 % Hya + 50 mM CTAB). Všechny gely byly postupně pětkrát promyty 0,15 M NaCl. Na základě dat z promývání lze usuzovat, jaké množství CTAB je v gelech vázáno elektrostaticky a stericky. Obsah CTAB byl stanoven u nově připravených gelů a u gelů po 2 a 4 měsících od přípravy. Na distribuci CTAB po fázové separaci má větší vliv původní koncentrace CTAB a hyaluronanu než molekulová hmotnost hyaluronanu. Obsah CTAB v nově připravených gelech i po 4 měsících po přípravě je velmi podobný a dokazuje stabilitu systému.

ABSTRACT

This diploma thesis is focused on the determination of distribution a surfactant at phase separation in polymer-surfactant system. Sodium hyaluronate of three molecular weights was chosen as a polymer, CTAB was used as a surfactant. The experiments were performed in an environment of 0,15 M NaCl. The measurement of the CTAB concentration in samples was based on the formation of coloured complexes of CTAB and picric acid in chloroform. UV-VIS spectroscopy was used for the detection of these complexes. The content of CTAB was determined in four gels of different composition (2% Hya + 200 mM CTAB, 2 % Hya + 50 mM CTAB, 0,5 % Hya + 200 mM CTAB, 0,5 % Hya + 50 mM CTAB). All gels were gradually washed five times with 0,15 M NaCl. The content of CTAB was determined for newly prepared gels and for gels after 2 and 4 months since the preparation. Initial concentrations of CTAB and hyaluronan have greater influence on the distribution of CTAB after phase separation, than the molecular weight of hyaluronan. The content of CTAB in newly prepared gels and after 4 months since preparation is very similar and demonstrates the stability of the system.

KLÍČOVÁ SLOVA

hyaluronan, CTAB, interakce, gel, kyselina pikrová, UV-VIS spektroskopie

KEYWORDS

hyaluronan, CTAB, interaction, gel, picric acid, UV-VIS spectroscopy

SÁTOROVÁ, K. *Optimalizace stanovení rozdělení tenzidu při fázové separaci v systému polymer-tenzid*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2015. 55 s. Vedoucí diplomové práce Ing. Filip Mravec, Ph.D..

PROHLÁŠENÍ

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

.....
podpis studenta

Poděkování

Chtěla bych poděkovat Ing. Tereze Venerové, Ph.D. a Ing. Filipu Mravcovi, Ph.D. za odborné rady, vstřícnost a čas, který mi věnovali. Dále bych chtěla poděkovat Bc. Tomáši Velcerovi, který mi svými cennými radami pomohl nejen při tvorbě této práce.

OBSAH

1	ÚVOD	7
2	TEORETICKÁ ČÁST	8
2.1	Polymery.....	8
2.1.1	Polyelektrolyty	8
2.2	Kyselina hyaluronová.....	8
2.2.1	Chemické a fyzikální vlastnosti	8
2.2.2	Struktura v roztoku.....	9
2.2.3	Polymerní struktura	9
2.2.4	Výskyt a funkce.....	9
2.2.5	Použití.....	10
2.3	Tenzidy	10
2.3.1	Kationaktivní tenzidy	11
2.3.2	Cetyltrimethylamonium bromid.....	12
2.4	Interakce polymer-tenzid	13
2.4.1	Interakce hyaluronan-tenzid.....	14
2.5	Analytické stanovení kationaktivních tenzidů.....	15
2.5.1	Kolorimetrická činidla.....	15
2.5.2	Interakce barvivo-tenzid.....	16
2.5.2.1	Iontové páry v systému barvivo-tenzid	18
2.5.2.2	Agregáty v systému barvivo-tenzid.....	19
2.6	Molekulová absorpční spektroskopie v ultrafialové a viditelné oblasti	20
2.6.1	Princip metody	20
2.6.2	Základní vztahy	20
2.6.3	Charakteristické pojmy	21
3	MATERIÁL A METODY	22
3.1	Použité chemikálie.....	22
3.2	Příprava zásobních roztoků	22
3.2.1	Zásobní roztok 0,15 M NaCl.....	22
3.2.2	Zásobní roztoky hyaluronanu.....	23
3.2.3	Zásobní roztok CTAB	23
3.2.4	Zásobní roztok 0,01% kyseliny pikrové.....	23

3.3	Příprava gelů.....	23
3.3.1	Promývání gelů	24
3.3.2	Modifikace promývání gelů	25
3.4	Modifikovaná Mahrousova metoda.....	25
3.5	Měření absorbance vzorků.....	26
3.6	Statistika	27
4	VÝSLEDKY A DISKUZE	28
4.1	Kalibrační křivka	28
4.2	Ředění a promývání vzorků.....	30
4.2.1	Ředění supernatantu	30
4.2.2	Ředění roztoku z promývání	31
4.2.3	Počet promývání gelů.....	31
4.3	Stanovení obsahu CTAB při fázové separaci za přítomnosti hyaluronanu	32
4.3.1	Výpočet obsahu CTAB ve vzorcích.....	32
4.4	Stanovení obsahu CTAB v gelech ihned po jejich přípravě.....	32
4.4.1	Obsah CTAB v původních gelech.....	32
4.4.2	Obsah CTAB v gelech po promývání	33
4.4.3	Závislost různých parametrů na celkovém látkovém množství COO ⁻ + CTAB	37
4.4.4	Vliv objemu promývacího roztoku na obsah CTAB v gelu.....	41
4.5	Stanovení obsahu CTAB ve vzorcích po 2 a 4 měsících od jejich přípravy	41
4.5.1	Obsah CTAB v původních gelech.....	41
4.5.2	Obsah CTAB v gelech po promývání	44
5	ZÁVĚR	48
6	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	50
7	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....	55

1 ÚVOD

Interakce v systému polymer-tenzid jsou oblastí, které se vědci věnují již několik desítek let. Přesto, nebo právě proto, se objevuje v této problematice stále mnoho nezodpovězených otázek a možných výzev. Výsledky studií v této oblasti nalézají uplatnění v řadě odvětví. Setkat se s nimi můžeme od potravinářství přes kosmetologii až po farmakologii a medicínu.

Především ve stádiu výzkumu a vývoje je studium těchto systémů jako nosičů léčiv. Obzvláště vhodný se pro tento účel jeví biopolymer hyaluronan sodný, který má vysokou afinitu k receptorům CD44 a RHAMM vyskytujících se na rakovinných buňkách. Hyaluronan vyniká i dalšími vlastnostmi, které jsou u nosiče pro cílenou distribuci léčiv považovány za nezbytné. Jako látka tělu vlastní je přirozeně biokompatibilní a biodegradabilní, naopak není imunogenní, cytotoxický a teratogenní. Spojení hyaluronanu a tenzidu je jedním z potenciálních způsobů přípravy cílených nosičů léčiv. Tento systém v sobě spojuje výhody obou látek. Předpokládá se, že agregát bude schopen solubilizovat léčivo prostřednictvím hydrofobní domény tvořené tenzidem, zatímco hyaluronan poslouží k zacílení na nádorovou tkáň. Před použitím takovýchto systémů při léčbě je však nejprve nutné podrobně charakterizovat interakce v systému hyaluronan-tenzid.

Tato diplomová práce se zabývá stanovením rozdělení tenzidu při fázové separaci v systému polymer-tenzid. Jako polymer byl zvolen hyaluronan o třech různých molekulových hmotnostech (340 kDa, 639 kDa, 1635 kDa). Jako vhodný kationaktivní tenzid byl vybrán CTAB. Obsah CTAB byl zkoumán pro čtyři různé gely (0,5 % Hya + 50 mM CTAB, 2 % Hya + 50 mM CTAB, 0,5 % Hya + 200 mM CTAB, 2 % Hya + 200 mM CTAB). Vzniklé gely byly následně promývány 0,15 M NaCl pro zjištění míry navázání CTAB v gelu. Pro stanovení koncentrace CTAB ve vzorcích byla použita kyselina pikrová, která s CTAB tvoří žlutý komplex, jehož intenzita zbarvení je přímo úměrná koncentraci CTAB ve vzorku. Vzorky byly následně proměřeny na UV-VIS spektrofotometru. Obsah CTAB byl u všech testovaných kombinací gelů stanoven ihned po jejich přípravě a také po dvou a čtyřech měsících od přípravy. Cílem bylo zjistit, zda se v testovaných gelech mění distribuce CTAB vlivem času.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Polymery

Polymery jsou makromolekuly, které se skládají z opakujících se strukturních jednotek, jejichž počet je velmi variabilní a v závislosti na konkrétním polymeru může dosahovat několika set tisíc. Polymery lze dělit na základě různých kritérií. Dle původu se dělí na syntetické a přírodní (biopolymery). Biopolymery se nachází v tělech rostlin a živočichů. Mezi typické zástupce patří nukleové kyseliny, bílkoviny, polysacharidy a polyterpeny. Podle druhu meru se polymery dělí na homopolymery a kopolymery. V závislosti na přítomnosti a charakteru funkčních skupin rozlišujeme polymery na neionogenní a ionogenní, označované jako polyelektrolyty [1].

2.1.1 Polyelektrolyty

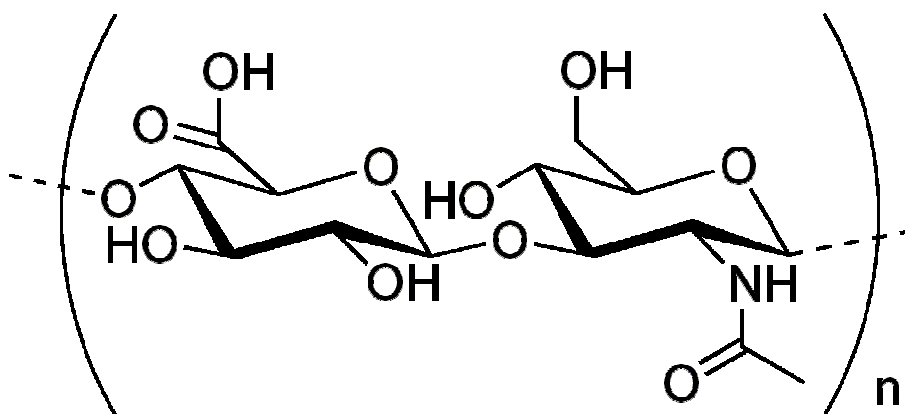
Polyelektrolyty se řadí mezi polymery, které nesou na své polymerní kostře ionizovatelné skupiny schopné disociace v polárních rozpouštědlech. Roztok polyelektrolytu je poté tvořen polymerním makroiontem a protiionty, což jsou disociované ionty. Rozlišujeme chování těchto polyelektrolytů v roztoku a na nabitém povrchu. Výsledné vlastnosti ovlivňuje např. koncentrace polyelektrolytu, frakce disociovaných iontových skupin, hustota náboje na řetězci, kvalita rozpouštědla, dielektrická konstanta roztoku či přítomnost jiných látek a jejich koncentrace [2].

2.2 Kyselina hyaluronová

Jedná se o biopolysacharid přirozeně se vyskytující v tělech savců včetně člověka, kde v závislosti na své molekulové hmotnosti plní nejrůznější funkce. V živých organismech se vyskytuje převážně v disociované podobě, pak hovoříme o sodné a draselné soli hyaluronanu. Roku 1934 byla izolována Karlem Meyerem a Johnem Palmerem z hovězího sklivce. V 50. letech dvacátého století byla stanovena její přesná chemická struktura a název odvozen ze slov „hyaloid“ (skelná) a „uronová kyselina“ [3], [4].

2.2.1 Chemické a fyzikální vlastnosti

Kyselina hyaluronová má podobu lineárního polysacharidu složeného z opakujících se disacharidových jednotek. Tento disacharid se skládá z kyseliny D-glukuronové a N-acetyl-D-glukosaminu, které jsou spojeny β -1,4 glykosidickými vazbami. Disacharidy jsou spojeny β -1,3 glykosidickou vazbou (obr. 1).



Obr. 1: Strukturální vzorec kyseliny hyaluronové

Vazby jsou dále stabilizovány intramolekulárními vodíkovými můstky. Obě sacharidové podjednotky mají jistou prostorovou podobnost s glukosou, která v beta konformaci umožňuje objemným skupinám zaujmout stericky výhodnější ekvatoriální pozice, přičemž malé atomy, jakými jsou v tomto případě vodíky, zaujmou méně výhodnou axiální pozici. Tímto je vysvětlena energetická stabilita struktury. Jelikož hyaluronan obsahuje značné množství hydroxylových skupin, jedná se o silně hygroskopickou látku [5].

2.2.2 Struktura v roztoku

Ve fyziologickém roztoku je kostra molekuly hyaluronanu rigidní díky kombinaci chemické struktury disacharidu, vnitřním vodíkovým vazbám a interakcím s rozpouštědlem. Axiální vodíkové atomy tvoří nepolární, relativně hydrofobní oblast molekuly, zatímco postranní skupiny v ekvatoriální poloze vytváří polární, hydrofilní oblast. Každá disacharidová jednotka je vůči jednotce následující otočena o 180° . Dvě jednotky tak dávají otočení o 360° a struktura řetězce nabývá tvar tzv. zkroucené stuhy.

Roztoky hyaluronanu vykazují velmi neobvyklé reologické vlastnosti a jsou mimořádně lubrikační a hydrofilní. V roztoku polymerní řetězec hyaluronanu zaujímá podobu expandovaného náhodného klubka. Tyto řetězce se mezi sebou zapletou při velmi nízké koncentraci, což může přispívat k neobvyklým reologickým vlastnostem. Při vysokých koncentracích mají roztoky extrémně vysokou viskozitu závislou na smykové rychlosti [4], [6].

2.2.3 Polymerní struktura

Enzymy hyaluronan synthasy syntetizují velké, lineární polymery s opakující se disacharidovou strukturou pomocí střídavého připojování kyseliny glukuronové a N-acetyl-D-glucosaminu do rostoucího řetězce. Počet opakujících se disacharidů v kompletní molekule hyaluronanu může být 10 000 a více, čímž se molekulová hmotnost pohybuje okolo 4 milionů Da. Molekulová hmotnost každého disacharidu se pohybuje okolo 400 Da a jeho délka je cca 1 nm [3], [4].

2.2.4 Výskyt a funkce

Kyselina hyaluronová je přirozenou součástí lidského těla. Je hlavní složkou synoviální tekutiny v mezibuněčné hmotě chrupavky, vyskytuje se v pupeční šňůře, kůži, a to především ve

škáře, dále se nachází v slzách i přední oční komoře. Nejvyšší množství hyaluronanu se u lidí a jiných obratlovců vyskytuje v extracelulární hmotě měkkých pojivových tkání [7]. Hyaluronan se nachází také u některých kmenů bakterií, není však přítomen u hub, roslin či hmyzu [8].

Podílí se na regulaci transportu tekutin a ovlivňuje difúzi makromolekulárních látek v organismu. Díky své viskoelasticitě chrání klouby, lubrikuje tkáně a chrání je před infekcí, hraje důležitou roli při struktuře a obnově kůže, udržuje hydratované okolí buněk, je součástí prostředí pro dělení, migraci a adhezi buněk, efektivně váže volné radikály a chrání pokožku před UV zářením. Kyselina hyaluronová o nižších molekulových hmotnostech plní v organismu regulační funkci, zatímco vysokomolekulární má funkci organizátorů tkáně a vyniká vysokou lubrikační aktivitou [9].

2.2.5 Použití

Hyaluronan, jakožto látka tělu vlastní, nese přirozeně řadu výhod oproti synteticky připraveným látkám. Je biokompatibilní, biodegradabilní, naopak není imunogenní, cytotoxický či teratogenní.

Díky své schopnosti penetrovat kůži a vysoce hydratačním a viskoelastickým vlastnostem je ceněnou složkou kosmetických přípravků proti stárnutí pleti. Kromě nejrůznějších krémů a sér se hyaluronan používá jako kožní výplň, která je aplikována injekčně. Pomocí tohoto zákroku pak lze na určitou dobu např. vyrovnat asymetrie obličeje, korigovat nosoretní rýhu, vyplnit úzké rty či jednotlivé vrásky. Hyaluronan je díky své schopnosti pohlcovat volné radikály používán do kosmetických přípravků na opalování [10].

Na základě schopnosti dlouhodobě ochraňovat rohovku při hojení, zvlhčovat oko a chránit ho tak před nadměrným vysycháním se používá v nejrůznějších očních přípravcích [11].

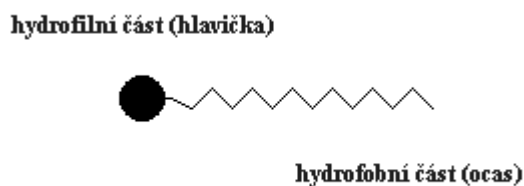
V chirurgii jsou využívány síťované deriváty hyaluronanu pod názvem hylany sloužící jako prevence pooperačních srůstů, nebo lešení pro růst buněčné hmoty při hojení tkáňových defektů. Uplatňuje se také při výrobě implantátů a roztoků pro léčbu osteoporózy [12]. Na trhu existují již komerční preparáty na bázi hyaluronanu a jódového komplexu určené k hojení chronických ran jakými jsou diabetické vředy, bércové vředy a proleženiny [13].

Hyaluronan vykazuje vysokou afinitu k receptorům CD44 a RHAMM, které jsou hojně exprimovány nádorovou tkání. Na základě toho se nabízí využití hyaluronanu jako nosiče léčiva při cílené léčbě. Nosič s léčivem by se mohl dostat k postižené tkáni a uvolnit léčivo, aniž by poškodil zdravou tkáň. Také díky svým mukoadhezivním vlastnostem a dobrou snášenlivostí organismem je potenciálně využitelný pro tuto aplikaci. Byl již použit jako cílený nosič léků parenterálně (nitrožilní a podkožní podání) i neparenterálně (např. oční a nasální podání). [14].

2.3 Tenzidy

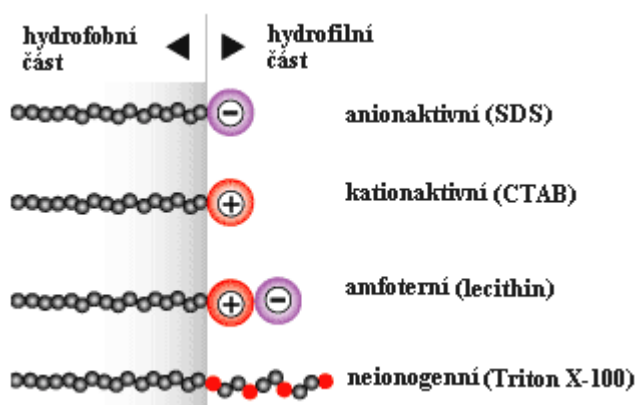
Anglický výraz pro tenzidy „surfactants“ napovídá, že se jedná o látky povrchově aktivní (PAL). Tyto látky se ochotně a samovolně koncentrují na fázovém rozhraní a přitom snižují povrchové napětí mezi fázemi. Díky své struktuře (obr. 2) se molekuly PAL nazývají amfipatické či amfifilní. Jedna část molekuly je tvořena hydrofobní (nepolární) částí, nazývanou

ocas nebo chvost a druhá část molekuly je hydrofilní (polární) hlava či hlavička. Hydrofobní část molekuly je často tvořena nasyceným uhlovodíkovým řetězcem.



Obr. 2: Molekula povrchově aktivní látky

Dle schopnosti disociovat ve vodném prostředí jsou tenzidy řazeny do několika skupin (obr. 3). Tenzidy lze dělit na neionogenní a ionogenní, ty pak dále na anionaktivní, kationaktivní a amfoterní.



Obr. 3: Rozdělení tenzidů dle povahy hydrofilní části molekuly s příklady zástupců pro jednotlivé typy tenzidů. [15].

Detergent je směs tenzidů a dalších látek, která má detergenční vlastnosti. Detergence je schopnost převádět nečistotu z pevného povrchu do objemové fáze roztoku. Molekuly povrchově aktivních látek se adsorbují na povrchu pevné látky a na vrstvě nečistot, čímž se změní velikost úhlu smáčení. Nečistoty se postupně sbalují a uvolňují z povrchu. Při přechodu do roztoku dojde ke stabilizaci uvolněných částic nečistot jejich solubilizací do micel, které mají hydrofilní povrch. Je tak zabráněno jejich zpětnému připoutání se k čistému povrchu.

Tenzidy jsou hojně využívány v mnoha odvětvích. Denně se s nimi setkáváme v kosmetice, mycích, čistících a pracích prostředcích. Díky svým amfifilním vlastnostem jsou studovány pro přípravu cílených nosičů léčiv [16], [17].

2.3.1 Kationaktivní tenzidy

U většiny kationaktivních tenzidů je kationtem kvarterní dusíkový atom, hovoříme pak o kvarterní amoniové soli. V kyselé oblasti pH se soli alkylaminů řadí rovněž k této skupině tenzidů.

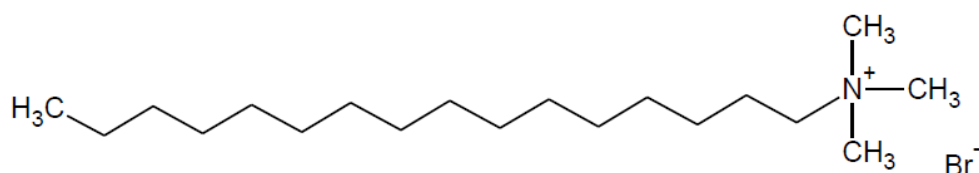
Výroba katioaktivní tenzidů je dražší a náročnější než u jiných typů tenzidů. Z toho vychází i jejich použití.

Kvarterní amoniové sloučeniny vynikají svým antimikrobiálním účinkem. V lékařství jsou proto využívány jako antiseptika a dezinfekční látky. Dále jsou účinnou složkou aviváží, které kromě vůně zajistí oděvům ze syntetických textilních vláken antistatickou úpravu. V poslední řadě bývají obsaženy ve vlasových kondicionérech a různých koupelových přípravcích.

Strukturní variabilita kationaktivních tenzidů je nepoměrně vyšší než anionaktivních, jsou to např. kvarterní soli heterocyklů, imidazolinu, pyridinu atd. Kationaktivní tenzidy nelze v různých recepturách kombinovat s anionaktivními tenzidy, protože se vzájemně srážejí na nerozpustný aglomerát. Zároveň mohou být tyto tenzidy použity jen v případě, že obsahují v molekule ionickou i neionickou část, která zajišťuje rozpustnost vzniklého aglomerátu ve vodě [18].

2.3.2 Cetyltrimethylamonium bromid

Další možná označení této sloučeniny jsou hexadecyltrimethylamonium bromid, cetrymonium bromid a CTAB. Jedná se o amfifilní molekulu, kvarterní amoniovou sloučeninu řazenou mezi kationaktivní tenzidy. Skládá se ze šestnáctiuhlíkatého řetězce (hydrofobní část) a kladně nabitého atomu dusíku, na který jsou navázány tři methylové skupiny (hydrofilní část) (obr. 4).



Obr. 4 Strukturní vzorec CTAB

Má vzhled téměř bílé až bílé pevné látky. Je málo rozpustný ve vodě (3 g/l při 20°C). Hexadecyltrimethylamoniový kationt je antiseptickým činidlem používaným proti bakteriím a houbám. Bývá využíván při izolaci DNA rostlin i různých organismů, nebo např. k amplifikaci specifických úseků rostlinné DNA. Dále se používá při stanovení molekulových hmotností proteinů, stanovení kritické micelární koncentrace (CMC) pracích prostředků. Díky svým vlastnostem je vhodnou, avšak poněkud dražší, složkou kosmetických přípravků [19].

2.4 Interakce polymer-tenzid

Studium interakcí polymer-tenzid je oblastí, které se vědci věnují již několik desítek let, a stále je v ní zaznamenáván rozvoj. S výsledky těchto studií se můžeme setkat například v potravinářství, kosmetologii, farmacii a medicíně.

Interakce tenzidů s ve vodě rozpustnými polymery byla prvně studována a publikována roku 1950 autory *Sata* a *Saito* [20]. Roku 1967 byl *Jonesem* vytvořen koncepční rámec k popisu interakcí mezi tenzidy a polymery [21].

Interakce polymer-tenzid jsou kontrolovány rovnováhou mezi hydrofobními a elektrostatickými interakcemi. Ve vodné směsi polymer-tenzid poskytuje tenzid kontrolu nad mezifázovým napětím, emulgační kapacitou a koloidní stabilitou, zatímco polymer poskytuje kontrolu nad reologickými vlastnostmi stejně jako nad koloidní stabilitou. V závislosti na povaze tenzidu (kationaktivní, anionaktivní, neiontový) a polymeru (neutrální nebo polyelektrolyt) se může vyskytovat mnoho typů interakcí polymer-tenzid. Ke studiu bylo využito široké spektrum experimentálních metod včetně měření elektrické vodivosti, viskozity, povrchového napětí, bodu zákalu a rozpustnosti, vazebné studie užívají dialýzu a ion-specifické elektrody. Oblíbenými spektroskopickými technikami jsou absorpční spektroskopie, fluorescenční spektroskopie, NMR spektroskopie, rozptyl světla, malouhlový rozptyl neutronů (SANS), dále byly provedeny termodynamické studie s využitím kalorimetrie a volumetrické metody [22], [23], [24].

Dle literatury lze usuzovat, že jsou často studovány systémy s nenabitým polymerem a nabitým tenzidem, nebo polymery a tenzidy nesoucí opačné náboje.

Konkrétními příklady často studovaných systémů nenabitý polymer-nabitý tenzid jsou PEO-SDS (polyethylenglykol-dodecylsulfát sodný) a PVP-SDS (polyvinylpyrrolidone-dodecylsulfát sodný). Nejdůležitějším faktorem ovlivňujícím navázané množství SDS na nenabitý polymer, je iontová síla prostředí. S rostoucí iontovou silou dochází ke značnému zvýšení navázaného SDS. Asociace nenabitého polymeru s anionaktivním tenzidem je spojena s konformačními změnami molekul polymeru. To má vliv zejména na viskozitu systému. K výraznějšímu nárůstu viskozity dochází pak při kritické agregační koncentraci (CAC).

Interakce mezi polyelektrolyty a opačně nabitými tenzidy jsou založeny zejména na působení elektrostatických sil. Asociace počíná již při velmi nízkých koncentracích tenzidu a CAC je často o několik řádů nižší než CMC samotného tenzidu

Interakce nenabitého polymeru s neionogenními tenzidy jsou velmi slabé a lze je měřit pouze s využitím speciálních technik. [25].

Na interakce v systému polyelektrolyt-tenzid mají důležitý vliv složení, lineární hustota, pozice náboje a dynamika kostry polymeru. Interakce polymer-tenzid zahrnují proces agregace tenzidů analogický normálnímu procesu micelizace. Počátek, kdy se molekuly tenzidu váží na polymer je označován jako CAC. Pokud je hodnota CAC vyšší než CMC, situace by mohla naznačovat, že molekuly tenzidu by mohly preferovat micelizaci sami sebe místo vzniku smíšených micel. Komplexy se mohou tvořit samovolně již při nízkých koncentracích tenzidu. Při dosažení CAC nastává tvorba micel vázaných na strukturu polyiontu. Při následném

zvyšování koncentrace dochází k tvorbě volných micel a složitějších agregátů v roztoku. Obsah NaCl v prostředí může ovlivnit tvorbu komplexů, jelikož snižuje afinitu tenzidů k polyelektrolytům a podporuje kooperativní interakce tenzidů, které následně tvoří micely [26].

Nagarajan a Kalpakci tvrdí, že hlavní hnací silou pro asociaci molekul tenzidu v přítomnosti polymeru jsou hydrofobní interakce. Dále zjistili, že kationaktivní tenzidy interagují s neiontovými polymery slaběji než anionaktivní tenzidy [27].

Dhara a Shah zjistili, že interakce mezi syntetickými polymery rozpustnými ve vodě a SDS není řízena hydrofobicitou polymerů samotných [28].

Picullel a spol. dospěli k závěru, že povaha asociace polymer-micela je silně ovlivněna povahou polymeru [29]. V další práci tento autor a *kol.* navrhli, že interakce tenzidů s hydrofobně modifikovanými polymery jsou analogické vzniku směsných micel [30].

Liu a spol. se zabývali interakcemi elektrolytů s tenzidem nesoucí opačný náboj. Ke studiu využívali molekulární modelování. Dospěli k závěru, že agregaci tenzidů značně ovlivňuje povaha elektrolytu [31].

2.4.1 Interakce hyaluronan-tenzid

Smísení hyaluronanu a tenzidu může vést ke vzniku asociátů, ve kterých jsou hydrofobní domény schopny solubilizovat hydrofobní látky a mohou se stát vhodným cíleným nosičem léčiv. *Yin a spol.* studovali fluorescenčními metodami interakce hyaluronanu s neionogenními (Cremophor EL a Tween 80) a anionaktivními (SDS) tenzidy. Zjistili, že CMC jsou téměř identické pro Cremophor EL v přítomnosti i absenci hyaluronanu. Systém hyaluronan-SDS vykazuje nižší hodnoty CMC, které indikují, že se chová podobně jako nízkomolekulární elektrolyt. Toto chování bylo ověřeno podobnými experimenty s čistým SDS v roztoku NaCl. Dle výsledků je zřejmé, že interakce mezi hyaluronanem a neionogenními tenzidy jsou extrémně slabé. To podporuje myšlenku použít ve spojení se záporně nabitým hyaluronanem kationaktivní tenzidy [32].

Problematické interakce mezi hyaluronanem a alkytrimethylammonium bromidy s různou délkou alkylového řetězce (8, 9, 10, 12, 14 a 16 uhlíků) se již v devadesátých letech dvacátého století významně věnovali *Thalberg a spol.* Nejčastěji ke svým experimentům používali tetradecylové a hexadecylové deriváty alkytrimethylammonium bromidů. Jako prostředí užívali vodné a elektrolytové roztoky (NaCl nebo NaBr).

V první studii se autoři zaměřili na zkoumání interakcí mezi hyaluronanem a různými amfifilními molekulami ve vodných roztocích. Použili sérii alkytrimethyl ammonium bromidů s řetězci dlouhými 8, 9, 10, 12, 14 a 16 atomů uhlíku v alkylové skupině. Při svých výzkumech používali vodivost, solubilizaci barviv, optickou aktivitu a ¹H NMR.

Dospěli k závěrům, že k hyaluronanu se váží tenzidy, které mají v uhlíkovém řetězci více než deset atomů a jejich vázání se započne již při malých koncentracích tenzidu. Vaznost je značně slabší než pro většinu jiných karboxylátových polyelektrolytů, vzhledem k nízké lineární nábojové hustotě hyaluronanu. U tenzidů s kratším lineárním řetězcem je tvorba volných micel energeticky upřednostňována před vázáním tenzidu na hyaluronan.

Při dosažení určitého stupně navázání tenzidu na hyaluronan již nejsou komplexy dále rozpustné ve vodě a dochází k fázové separaci a vzniku precipitátů. Precipitát je možné znovu rozpustit velkým nadbytkem tenzidu, nebo přidavkem nízkomolekulárního elektrolytu. Na základě přítomnosti nízkomolekulárního elektrolytu (NaBr) v systému hyaluronan-CTAB usoudili, že množství NaCl omezuje interakce mezi polyelektrolytem a tenzidem, což nasvědčuje tomu, že je významná část interakcí elektrostatické povahy.

Dále zjistili, že delší alkylový řetězec tenzidu přispívá k více rozsáhlému dvoufázovému regionu. Při studiu vlivu molekulové hmotnosti polymeru na chování systému usoudili, že změna molekulové hmotnosti polymeru nemá obecně výrazný vliv na fázový diagram [33-37].

Halasová studovala interakce hyaluronanu s ionogenními (kationaktivní, anionaktivní, amfoterní) i neionogenními tenzidy. Jako nejvhodnější tenzid pro potenciální aplikaci v cílené distribuci léčiv se ukázal CTAB [38].

Halasová a spol. studovali interakce hyaluronanu s různými tenzidy v prostředí NaCl. Ukázalo se, že ačkoliv NaCl může potlačovat interakce mezi opačně nabitým polyelektrolytem a tenzidem, v některých systémech tohoto typu jsou nezávisle na iontové povaze tenzidu interakce stále přítomny. Ke studiu využívali tenziometrii a fluoresční metody a dospěli k závěru, že v přítomnosti hyaluronanu se tvorba agregátů nevyskytuje při jedné konkrétní koncentraci tenzidu, ale spíše v určitém intervalu [39].

2.5 Analytické stanovení kationaktivních tenzidů

Kationaktivní tenzidy jsou užívány v lékařské praxi jako antiseptika, denně se s nimi můžeme setkat v nejrůznějších dezinfekčních, koupelových a kosmetických prostředcích. Důležitost a poměrně časté užívání kationaktivních tenzidů si vyžádaly rozvoj analytických metod pro jejich stanovování. Stanovení kationaktivních tenzidů má velký význam mimo jiné pro životní prostředí, protože se mohou tyto tenzidy a jejich degradační produkty nacházet v nejrůznějších ekosystémech. Jejich přítomnost byla potvrzena v pevných (sedimenty a kaly) i kapalných (pozemní a odpadní voda, voda rybníků, řek a moří) vzorcích životního prostředí.

Při stanovení kationaktivních tenzidů bylo využíváno celé řady metod. Analytickému stanovení kvarterních amonných kationtů se významně věnovali např. **Cross a Singer**. Především v minulosti byla v této problematice oblíbenou metodou tenkovrstvá chromatografie (TLC) a iontově párová extrakce (PIX). Dále byla používána např. plynová a vysoce účinná kapalinová chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií či NMR [40].

2.5.1 Kolorimetrická činidla

Vhodná kolorimetrická činidla pro určení nízkých koncentrací kationaktivních tenzidů ve vzorcích jsou např.: methylovaný oranž II, bromthymolová modř, bromfenolová modř, disulfonová modř a kyselina pikrová.

Kyselina pikrová, 2,4,6-trinitrofenol, je žlutá pevná látka bez charakteristického zápachu, málo rozpustná ve vodě. Vyrábí se nitrací 4-hydroxybenzen-1,3-disulfonové kyseliny nebo fenolu.

Je vysoce reaktivní s širokou paletou látek (např. aminy, báze, kovy jako olovo, zinek, měď, rtuť) s nimiž tvoří soli pikráty, které jsou mnohem reaktivnější a citlivější na náraz než samotné kyseliny. Je vysoce citlivá na teplo, náraz a tření. Musí být uchovávána pod vodou, protože při jejím vyschnutí hrozí nebezpečí výbuchu. Při manipulaci s ní musí být používány ochranné pomůcky, jelikož je pro člověka toxická při vdechnutí, požití i kožním kontaktem. Díky svým reaktivním vlastnostem se používá při výrobě trhavin. Své využití nachází také v kožedělném a textilním průmyslu, ve sklářství, či laboratorních metodách ve spojení s medicínou. Konkrétně je to např. při stanovení kreatininu v séru či kolorimetrické stanovení hladiny cukru v krvi.

Hojně se používá jako kolorimetrické činidlo a v syntézních reakcích. Je vhodným činidlem pro spektrofotometrické určení neiontových a kationaktivních tenzidů. Kyselina pikrová vytváří s kationaktivními tenzidy ve vodných roztocích při pH 4-12 stabilní, žluté komplexy, přičemž intenzita zbarvení je přímo úměrná koncentraci stanovované látky ve vzorku. Iontový pár kvarterních aminů a kyseliny pikrové se extrahuje z vodného roztoku do 1,2-dichlormethanu nebo chloroformu [41], [42].

Disulfínová modř je často užívané činidlo pro určení kationaktivních tenzidů, především v matricích ve vztahu k životnímu prostředí. Má podobu tmavěfialového prášku bez charakteristického zápachu. Kationaktivní tenzidy tvoří s tímto činidlem modře zbarvený komplex měřitelný při 625 nm. Metoda s disulfínovou modří je vhodná i pro analýzu vzorků obsahujících jiné tenzidy a interferující látky pomocí přidání iontově výměnného kroku k izolaci kationtů. Jestliže jsou ve vzorku přítomny anorganické ionty (perchlorátový, jodidový), budou soutěžit s disulfínovou modří ve vznikajících extrahovatelných komplexech s kvarterními aminy. Interference je však významná pouze při relativně vysoké koncentraci aniontů. Metoda s disulfínovou modří je oproti stanovení s bromfenolovou modří lépe reprodukovatelná a citlivější [43].

Oranž II se uplatňuje při jednoduchých testech primární biodegradability a vodní toxicity ve spojení s kationaktivními tenzidy. Má vzhled oranžové pevné látky bez charakteristického zápachu. Oranž II vytváří s kationaktivními tenzidy z chloroformu extrahovatelné 1:1 stechiometrické ion-asociující sloučeniny (maximální vlnová délka 485 nm). Toto činidlo může být využito k určení kationaktivních tenzidů obecně, nebo pouze kvarterních amoniových sloučenin ve směsích pomocí vhodného extrakčního pH. Prokázána byla také použitelnost Oranž II pro určení amfoterních tenzidů [43].

Methyloranž je oranžová pevná látka slabě charakteristického zápachu. Řadí se mezi azobarviva často používaná jako pH indikátor při titracích. Mění barvu při pH v oblasti středních kyselin, díky tomu se používá při titraci kyselin.

Většina zmíněných činidel poskytuje spolehlivé výsledky přes široké spektrum pH. Při vývoji metody k určení specifických kationaktivních tenzidů je také vhodné optimalizovat pH pro maximální extrakci a vývoj barvy [44].

2.5.2 Interakce barvivo-tenzid

Interakce barviv a tenzidů jsou důležité v textilním průmyslu stejně jako v chemickém výzkumu. Důležitý význam hrají např. v biochemii, analytické chemii a chemii životního prostředí.

Při interakcích v systému barvivo-tenzid mají významnou roli nekovalentní vazby. Hydrofobní interakce kromě agregace tenzidů ovlivňují mimo jiné molekulární rozpoznávací procesy, nebo konformaci proteinů. Důležitou roli dále hrají vodíkové můstky a elektrostatické interakce.

Tenzidy, v micelizované a premicelizované podobě, ovlivňují spektrální charakteristiky barviv, což vede k posunu ve vlnové délce maximální absorpce nebo emise. Mohou se objevit nové pásy a vymizet pásy původní. Solvatochromismus je pozorován u přírodních i syntetických (např. azo, pyridin, cyanin, akridin, trifenylmethan, antrachinon) barviv.

Pokud je k roztoku barviva přidán tenzid při submicelární koncentraci, nastávají mezi barvivem a tenzidem specifické molekulární interakce. Tyto interakce primárně nastávají s tenzidy, které jsou opačně nabitě než barvivo. V přítomnosti barviva je vznik premicelárních agregátů při koncentraci pod CMC některých tenzidů známý jev. Při koncentraci pod CMC tenzidu mohou být formovány molekulární komplexy mající specifické fyzikálně-chemické vlastnosti.

U micelárních tenzidů je známo, že rozpouští i jinak nerozpustná barviva. Dezintegruje barvivové agregáty na monomery, nebo rozdělí rozpustná barviva prostřednictvím začlenění do tenzidových micel. Obecně platí, že jsou pozorovány hypsochromní a bathochromní posuny původních barvivových pásů při interakci barviva s opačně nabitými micelami. Micely ovlivňují nejen elektronovou strukturu barviva, ale také pKa indikátorů.

Z různých metod užívaných ke studiu interakcí barvivo-tenzid v micelárním mediu je vhodné zmínit především konduktometrickou metodu, Jobsovu metodu, Stark effect spektroskopii, metodu kontinuální variace, potenciometrické metody, elektrickou odporovou spektroskopii i jiné spektroskopické a termodynamické metody [40], [24].

Kubíček a Němcová studovali interakce CTAB a jiných tenzidů s methylovanou kyselinou pikrovou pomocí UV-VIS spektrofotometrie a iontově-párové extrakční spektrofotometrie. Autoři ve svých experimentech vychází z prací **Buwaldy**, který se zabýval interakcemi tenzidů a azobraviv. Při experimentech autoři sledovali vliv vzrůstajícího molárního přebytku barviv nad molárním množstvím tenzidu. Zjistili, že kyselina pikrová a methylovaná interagují s tenzidy odlišným způsobem. U systémů methylovaná-tenzid byly zaznamenány výrazné změny ve spektrech. Kyselina pikrová tvoří ve vodných roztocích se studovanými tenzidy iontové páry, přičemž žádné složitější asociáty nebyly pozorovány, ani v případě, když byla kyselina pikrová použita v molárním přebytku. Její chování je tedy odlišné od methylované, toto zjištění potvrzují výsledky z extrakční spektrofotometrie.

Rozdílné chování obou barviv je připisováno jejich strukturním odlišnostem. Kyselina pikrová je schopna tvořit intramolekulární můstky mezi hydroxyly a nitroskupinou. Její tendence k hydrofobním interakcím je značně redukována vlivem vysoké elektronové hustoty na nitroskupinách. Není splněn předpoklad tvorby asociátů, tedy silná hydrofobicita části molekuly. Naopak methylovaná obsahuje část hydrofobní i iontovou a splňuje tak podmínky nutné pro asociaci.

Pomocí iontově-párové extrakční spektrofotometrie byl detekován hypochromní posun při zvyšujícím se molárním poměru methylovanž-tenzid. Autoři usuzují, že v systému vzniká ve vodě rozpustný asociát, který negativně ovlivňuje tvorbu iontového páru. V chloroformu je pak extrahováno jeho menší množství. Za nepravděpodobné považují, že by hypochromní posun způsobovalo samotné barvivo, inverzní micely tenzidu, nebo premicelární asociáty v chloroformové vrstvě. Při použití UV-VIS spektrofotometrie byl zjištěn stejný posun ve spektru při měnící se koncentraci tenzidu, jako v pracích Buwaldy. Dále bylo zjištěno, že asociáty obsahující barvivo i tenzid jsou nerozpustné v chloroformu, mají iontový charakter a jejich tvorba je v kompetici s tvorbou iontových párů. Autoři vyloučili možnost posunu ve spektru tvorbou samotných dimerů barviva [45].

Simón a spol. provedli stanovení koncentrace kationaktivních tenzidů ve tkáních mořských organismů, kalamárech. Kationaktivní tenzidy, zpětně získané extrakcí z tkáně ethanolem, jsou odděleny od vodné fáze do chloroformu. Metoda má detekční limit přibližně 1 mg/kg [46].

Wurster a Werawatganone studovali systém neionogenního polymeru, hydroxypropylmethylcelulosa (MPMC) s kationaktivním tenzidem, CTAB. Cílem bylo stanovení koncentrace tenzidu CTAB ve vzorcích. Základem metody je extrakce CTAB do chloroformového roztoku kyseliny pikrové, která tvoří s CTAB žlutý komplex, jehož intenzita zbarvení je přímo úměrná koncentraci CTAB ve vzorku. Ke stanovení byla použita UV-VIS spektroskopie [47].

Šejnohová studovala systém hyaluronan-CTAB ve vodě i NaCl. Ke stanovení koncentrace CTAB použila Mahrousovu metodu, kterou modifikovala pro své experimenty. Pomocí dialyzační techniky studovala stabilitu systému hyaluronan-CTAB. Ke studiu používala UV-VIS spektroskopii. Zjistila, že přítomnost Hya v roztoku snižuje množství volných molekul CTAB, které mohou být ve vzorku stanoveny nezávisle na použitém prostředí. Prokázala interakce hyaluronan-CTAB a větší afinitu CTAB k hyaluronanu než ke kyselině pikrové [48].

Po přidání opačně nabitých iontových tenzidů (v nižší koncentraci než CMC) do vodných roztoků iontových barviv je pozorována variabilita ve spektrálním chování těchto roztoků. Tato variabilita může být přisuzována např. tvorbě iontového páru, tvorbě soli barvivo-tenzid, vzniku molekulárního komplexu, indukovaným agregátům z molekul barviva, agregaci barvivo-tenzidového komplexu, nebo změnám v mikroprostředí chromoforu barviva. Původ interakcí se může měnit v závislosti na konkrétním typu systému barvivo-tenzid [49].

2.5.2.1 Iontové páry v systému barvivo-tenzid

Pro vznik iontových párů je v tomto systému potřebná existence opačně nabitých molekul barviva a tenzidu.

Dutta a spol. studovali vliv kationaktivních tenzidů na spektrální vlastnosti methylovanže. Zjistili, že hypochromní posun absorpčního pásu methylovanže nastává díky změnám v mikroprostředí chromoforu, kde jsou dipóly vody obklopující barvivo částečně nahrazeny tenzidovými hydrofobními řetězci. Síla interakcí závisí na typu iontové skupiny i protiiontu a délce alkylového řetězce. Kationaktivní tenzidy mohou tvořit iontové páry, toho se využívá při následné detekci spektroskopickými metodami. Ionově výměnná chromatografie byla dlouho

užívána, aby se vyhnulo nedostatkům přímé analýzy iontových párů, kterou je necitlivost metody k nízkým koncentracím detekovaných látek ve vzorku [50].

2.5.2.2 Agregáty v systému barvivo-tenzid

Při velmi nízkých koncentracích tenzidů dochází k agregaci iontových tenzidů a barviv. Díky přítomnosti chromoforu v molekule barviva lze sledovat proces agregace spektroskopickými metodami. Interakce lze pozorovat, jestliže barvivo nese opačný náboj než tenzid [24].

Buwalda a spol. studovali interakce kationaktivních tenzidů a azobarviv. Dospěli k závěru, že interakce pozorované v těchto systémech závisí na délce řetězce tenzidu, přítomnosti elektrolytů, typu a pozici substituentů v barvivu. Dále tvrdí, že tvorba iontových párů výhradně při nízkých koncentracích tenzidů není zcela jednoznačná.

Ve vodných roztocích byla pozorována fázová separace agregátů barviva s tenzidem ještě pod CMC. To připisují solím barviv s tenzidem, precipitáty se pak skládají z ekvimolárního množství obou komponent.

Citlivost barviv k polaritě prostředí, ve kterém jsou rozpuštěny, je činí extrémně vhodné pro vykazování přítomnosti hydrofobních mikrodomén ve vodném roztoku. Barviva jsou často používána k určení CMC tenzidů. Často používaná barviva pro určení CMC jsou např. bromfenolová modř a pyren. Kritické micelární koncentrace určené metodou solubilizace barviv jsou obvykle nižší než měření v nepřítomnosti barviv. Absorpční spektra barviv často vykazují anomálie při koncentracích hluboko pod CMC tenzidů, když jsou náboje iontové skupiny barviv a tenzidů opačné [51].

2.6 Molekulová absorpční spektroskopie v ultrafialové a viditelné oblasti

UV-VIS spektroskopie je metoda, která má využití především v kvantitativní analýze. Vhodná je též jako doplňková metoda k jiným spektrometrickým technikám při identifikaci a strukturní analýze organických materiálů.

2.6.1 Princip metody

Podstatou této metody je absorpce ultrafialového (200 až 400 nm) a viditelného záření (400 až 800 nm) zředěnými roztoky molekul. Při absorpci je vyvolána změna energetického stavu molekuly. Nejčastěji dochází ke změně elektronového stavu ΔE_e (150-600 kJ·mol⁻¹) a vibračního stavu ΔE_v (2-60 kJ·mol⁻¹), nejmenší příspěvek tvoří změna rotačního stavu molekuly ΔE_r (cca 3 kJ·mol⁻¹). Vztah energií k vlnové délce absorbovaného záření lze zapsat:

$$\Delta E = \Delta E_e + \Delta E_v + \Delta E_r = h\nu = h \frac{c}{\lambda} \quad (1)$$

kde h je Planckova konstanta, c rychlost světla a λ vlnová délka. Ve vzdálené UV oblasti ($\lambda < 190$ nm) absorbují nasycené a monoenové sloučeniny. V blízké ultrafialové oblasti (190-380 nm) absorbují polynenasycené a aromatické sloučeniny. Ve viditelné oblasti (380-780 nm) absorbují všechny barevné látky [52].

2.6.2 Základní vztahy

Při dopadu záření na povrch tělesa může dojít k odrazu záření, pohlcení, nebo k průchodu záření objektem. Jestliže měřená látka záření absorbuje, dochází ke snížení jeho intenzity. Poměr intenzity záření o určité vlnové délce po průchodu látkou I a intenzity dopadajícího záření I_0 se nazývá propustnost, neboli transmitance T .

$$T = \frac{I}{I_0} \quad (2)$$

Transmitance T se nachází v intervalu $<0;1>$ a je obvykle uváděna v procentech. Její hodnota závisí na vlastnostech absorbující látky, vlnové délce procházejícího světla, koncentraci látky v roztoku a na tloušťce kyvety. Závislost transmitance na těchto veličinách lze vyjádřit vztahem:

$$T = 10^{-\varepsilon \cdot l \cdot c} \quad (3)$$

kde ε je molární absorpční koeficient, l je délka kyvety a c je koncentrace měřené látky.

Velikost absorpce lze definovat rovněž pomocí absorbance A . Ta vyjadřuje záporný logaritmus transmitance. Lze také říct, že udává logaritmický poměr intenzity záření dopadajícího a intenzity záření prošlého vzorkem:

$$A = -\log T = -\log \frac{I}{I_0} \quad (4)$$

Při měření je možné snímat celá spektra nebo pouze absorbance při konkrétní vlnové délce. Úpravami dvou přechodících rovnic (3) a (4) lze získat vztah známý jako Lambert-Beerův zákon. Zákon vyjadřuje vztah mezi absorbancí a koncentrací stanovované látky:

$$A = \varepsilon \cdot c \cdot l \quad (5)$$

kde ε značí molární absorpční koeficient, c je látková koncentrace a l tloušťka absorbující vrstvy [53].

2.6.3 Charakteristické pojmy

V této metodě se objevuje několik specifických pojmů, jejichž význam je vhodné objasnit. Chromofory jsou skupiny zodpovědné za absorpci záření, zatímco auxochromy jsou skupiny způsobující posun absorpčních maxim. Bathochromní (červený) posun je posun λ_{max} k delším vlnovým délkám vyvolaný chemickou modifikací molekuly nebo vlivem rozpouštědla. Hypsochromní (modrý) posun je posun λ_{max} ke kratším vlnovým délkám. Hypochromní efekt způsobuje snížení hodnoty ε_{max} , a tedy snížení intenzity absorpce. Hyperchromní efekt způsobuje zvýšení hodnoty ε_{max} , a tedy zvýšení intenzity absorpce [52].

3 MATERIÁL A METODY

3.1 Použité chemikálie

Hyaluronan sodný	Contipro Biotech s.r.o. M = 341 kDa Batch No.: 213-6349 Expiry date: 2015-10-23	Contipro Biotech s.r.o. M = 639 kDa Batch No.: 213-4245 Expiry date: 2015-04-04	Contipro Biotech s.r.o. M = 1635 kDa Batch No.: 213-5226 Expiry date: 2015-06-29
Cetyltrimethylamonium bromid (CTAB)	Sigma Aldrich; čistota $\approx 99\%$ $C_{19}H_{42}BrN$ M = 364, 46 g.mol ⁻¹ CAS: 57-09-0		
Kyselina pikrová	Sigma Aldrich; čistota $\geq 98\%$ $C_6H_3N_3O_7$ M = 229,1 g.mol ⁻¹ CAS: 88-89-1		
Chloroform	Sigma Aldrich; čistota $\geq 99,84 \%$ $CHCl_3$ M = 119, 38 g.mol ⁻¹ CAS: 67-66-3		
Chlorid sodný	Merci s.r.o.; Čistota $\approx 99,5 \%$ NaCl M = 58,44 g.mol ⁻¹ CAS: 7647-14-5		

3.2 Příprava zásobních roztoků

3.2.1 Zásobní roztok 0,15 M NaCl

Na analytických vahách bylo naváženo příslušné množství NaCl. Látka byla kvantitativně převedena do odměrné baňky a následně doplněna po rysku ultračistou deionizovanou vodou ze systému Purlab. Celý obsah baňky byl řádně rozmíchán s využitím magnetické míchačky. Výsledný roztok byl uchováván při laboratorní teplotě.

3.2.2 Zásobní roztoky hyaluronanu

Byly připraveny 0,5 % a 2 % roztoky pro každou ze tří molekulových hmotností hyaluronanu sodného. Koncentrace Hya jsou v celém textu uvedeny v hmotnostních procentech. Na analytických vahách bylo naváženo potřebné množství hyaluronanu a doplněno 0,15 M NaCl na požadovaný objem. Zásobní lahve byly pro optimální rozpuštění navážky umístěny po dobu 24 hodin na magnetickou míchačku. Všechny připravené zásobní roztoky hyaluronanu byly uchovávány v ledničce při maximální teplotě 5 °C.

3.2.3 Zásobní roztok CTAB

Byly připraveny 50 mM a 200 mM roztoky CTAB. Na analytických vahách bylo naváženo potřebné množství CTAB a rozpuštěno pouze v části výsledného objemu 0,15 M NaCl. Zásobní lahve byly pro optimální rozpuštění navážky umístěny na magnetickou míchačku. Po rozpuštění byl roztok kvantitativně převeden do odměrné baňky a doplněn po rysku 0,15 M NaCl na požadovaný objem. Zásobní roztoky byly opět umístěny na magnetickou míchačku. Výsledné zásobní roztoky byly uchovávány při laboratorní teplotě.

3.2.4 Zásobní roztok 0,01 % kyseliny pikrové

Do zcela čisté a suché zásobní lahve bylo na analytických vahách naváženo potřebné množství kyseliny pikrové, přičemž její hmotnost nesměla přesahovat 0,03 g na 100 ml zásobní lahev. Při manipulaci s kyselinou pikrovou je nutné používat rukavice a ochranné brýle. Kyselinu pikrovou je nutné uchovávat pod vodou, jelikož se jedná o potenciálně výbušnou látku. Navážka byla odebrána z co nejspodnější části zásobní lahve, aby byla odebrána požadovaná kyselina a ne pouze její směs s vodou. Příslušná navážka byla v zásobní lahvi doplněna vypočteným množstvím chloroformu. Zásobní roztok byl umístěn pro optimální rozmíchání na 24 hodin na magnetickou míchačku. Výsledné zásobní roztoky byly uchovávány při laboratorní teplotě.

3.3 Příprava gelů

Pro každou ze tří molekulových hmotností hyaluronanu sodného byly připraveny gely o následujícím složení:

2 % Hya + 200 mM CTAB

2 % Hya + 50 mM CTAB

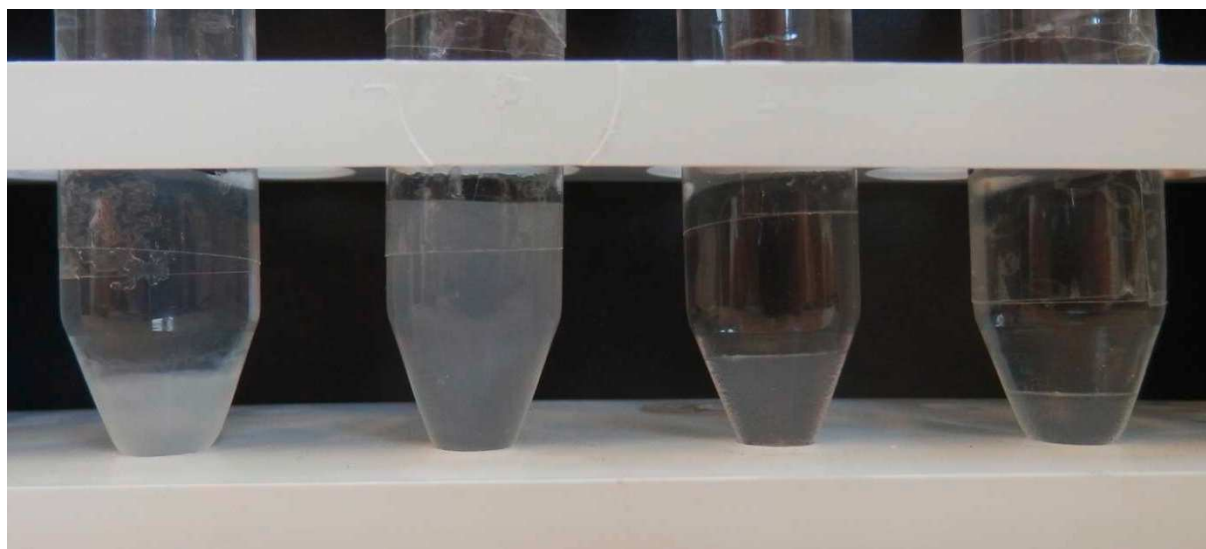
0,5 % Hya + 50 mM CTAB

0,5 % Hya + 200 mM CTAB

K přípravě gelů byly použity skleněné centrifugační zkušavky. U těchto zkušavek byl ryskami vyznačen objem, který zaujmají 3 + 3 ml vody. Tento krok byl zařazen, protože v závislosti na koncentraci mění hyaluronan také svojí viskozitu a pipetovaný objem by mohl být nepřesný. Tyto zkušavky byly zváženy na analytických vahách a údaje zaznamenány. Do suchých a řádně poznačených zkušavek byly pipetovány 3 ml (po rysku) příslušného zásobního roztoku hyaluronanu. Následně byly přidány 3 ml (po rysku) příslušného zásobního roztoku CTAB. Zkušavky byly následně uzavřeny a poté několik sekund vortexovány. Následně byly

všechny zkumavky centrifugovány 15 minut při 3500 rpm na centrifuze ROTOFIX 32 Hettich Zentrifugen.

Ve zkumavce dojde k vytvoření gelu a supernatantu (obr. 5). Vzniklý supernatant byl slit do odměrného válce postaveného na analytických vahách. Tím byly získány objem i hmotnost supernatantu. Následně byla také zvážena zkumavka s gelem. Všechny hodnoty byly zaznamenány a na konci použity ke stanovení obsahu CTAB v gelech. Supernatant byl pro další použití zředěn 50x na výsledný objem 5 ml pomocí 0,15 M NaCl.



Obr. 5: Zkumavky s gely (Hya o $M_r = 639$ kDa). Zleva: 0,5 % Hya + 200 mM CTAB, 2 % Hya + 200 mM CTAB, 2 % Hya + 50 mM CTAB, 0,5 % Hya + 50 mM CTAB.

3.3.1 Promývání gelů

Následovala fáze promývání gelů. Do každé zkumavky obsahující gel bylo napipetováno 5 ml 0,15 M NaCl. Obsah zkumavky byl opatrně, ale důkladně rozdispergován kopistkem, uzavřen zátkou a opět několik sekund vortexován (obr. 6). Následně byly všechny zkumavky centrifugovány 15 minut při 3500 rpm. Vzniklý roztok z promývání byl slit do odměrného válce postaveného na analytických vahách. Tím byly získány objem i hmotnost roztoku z promývání. Následně byla také zvážena zkumavka s gelem. Všechny hodnoty byly zaznamenány a na konci použity ke stanovení obsahu CTAB v gelech. Roztok z promývání byl pro další použití zředěn 10x na výsledný objem 5 ml pomocí 0,15 M NaCl. Celý proces promývání gelů byl stejným způsobem proveden pětkrát.



Obr. 6: Zkumavka s gelem 2 % Hya + 200 mM CTAB po rozdispergování

3.3.2 Modifikace promývání gelů

Průměrná hmotnost gelů připravených dle kapitoly 3.3 byla cca 1 g. Na průměrnou hmotnost 1 g gelu bylo zvoleno při promývání 5 ml 0,15 M NaCl. S využitím hodnot přesných hmotností vzniklých gelů byly změněny objemy 0,15 M NaCl při promývání (tab. I). Cílem bylo zjistit, jaký vliv má objem promývacího roztoku na obsah CTAB v gelech.

Tab. I: Objem 0,15 M NaCl použitý při promývání jednotlivých typů gelů.

Typ gelu	Objem 0,15 M NaCl při promývání (ml)
2 % Hya + 200 mM CTAB	8
2 % Hya + 50 mM CTAB	3
0,5 % Hya + 50 mM CTAB	1,5
0,5 % Hya + 200 mM CTAB	2

3.4 Modifikovaná Mahrousova metoda

Na všechny připravené vzorky byla aplikována Modifikovaná Mahrousova metoda. Do zcela suché, označené zkumavky byly napipetovány 3 ml příslušně zředěných supernatantů či roztoků z promývání, ke kterým bylo přidáno 6 ml 0,01% kyseliny pikrové v chloroformu. Konkrétní objemy se mohou lišit, důležité je však dodržení poměru 1:2. Zkumavka byla ihned uzavřena zátkou opatřenou teflonovou páskou a 1 minutu intenzivně třepána. Následně byla zkumavka ponechána 2 minuty v klidu pro optimální oddělení fází (obr. 7). Pomocí pipety o objemu 5 ml byla odebrána horní, vodná fáze systému. Spodní, chloroformová fáze byla následně

přefiltrována přes filtrační papír za normálního tlaku. První 1–2 ml filtrátu byly odebrány do odpadní kádinky a následně zlikvidovány. Zbýlý roztok byl filtrován do označené vialky a ihned uzavřen, aby nedocházelo k odpařování chloroformu, čímž by byly získány nepřesné výsledky. Takto připravený vzorek byl proměřen na UV-VIS spektrofotometru HITACHI U-3900H. U všech vzorků bylo proměřeno absorpční spektrum v rozsahu vlnových délek 300–700 nm. Jako pozadí (blank) byl použit čistý chloroform. Jako detekční vlnová délka byla zvolena hodnota 415, 5 nm [47], [48].



Obr. 7: Ve zkumavce vpravo vzorek 2% Hya + 50 mM CTAB ($A = 0,074$). Ve zkumavce vlevo vzorek 0,5 % Hya + 200 mM CTAB ($A = 2,264$). Oba vzorky pochází z 2. promývání příslušných gelů připravených z Hya o $M_r = 639$ kDa.

3.5 Měření absorbance vzorků

Pro zjištění koncentrace CTAB ve vzorcích, na které byla aplikována Modifikovaná Mahrousova metoda, byla zvolena absorpční spektroskopie. Absorbance vzorků byly změřeny na dvoupráskovém UV-VIS spektrofotometru HITACHI U-3900H. U tohoto typu spektrofotometru jsou při měření použity dvě kyvety, přičemž v jedné je měřený vzorek a ve druhé blank. Zdrojem světla jsou lampy, pro viditelnou oblast slouží wolframová lampa, pro

ultrafialovou oblast lampa deuteriová. Světlo ze světelného zdroje dopadá na monochromátor, dále je pomocí rotačních zrcadel rozděleno na dva svazky, které prochází květami. Po průchodu paprsku vzorkem dopadne světlo na detektor. Výstupní zařízení zobrazuje absorpční spektrum.

U všech vzorků bylo změřeno absorpční spektrum v rozmezí vlnových délek 300–700 nm. Jako blank byl použit chloroform. Hodnoty absorbance byly odečítány při hodnotě 415,5 nm.

3.6 Statistika

Experimenty v kapitolách 4.4.1 a 4.4.2 byly provedeny minimálně třikrát. V kapitole 4.4.4 byly experimenty s ohledem na množství použitého materiálu provedeny pouze jednou. Experimenty v kapitole 4.5 byly s ohledem na množství použitého materiálu provedeny pouze dvakrát. Hodnoty v následujících grafech jsou průměrem všech měření příslušných vzorků, pro které byly stanoveny směrodatné odchylky pomocí funkce SMODCH. programu MS EXCEL.

Přesnost kalibrační křivky byla vypočítána jako rozptyl hodnot závisle proměnných kolem regresní přímky, který charakterizuje směrodatná odchylka $s_{y,x}$ a je dána vztahem:

$$s_{y,x} = \sqrt{\frac{1}{n-2} \left(\sum y_i^2 - a \sum y_i - b \sum x_i y_i \right)} = \sqrt{\frac{\sum (y_i - Y_i)^2}{n-2}} \quad (6)$$

kde Y_i je hodnota vypočtená z regresní rovnice (6) pro příslušné x_i .

$$y = bx + a \quad (7)$$

Ke směrodatným odchylkám měření byla připočtena i směrodatná odchylka kalibrační křivky a celkové chyby v grafech byly znázorněny jako chybové úsečky.

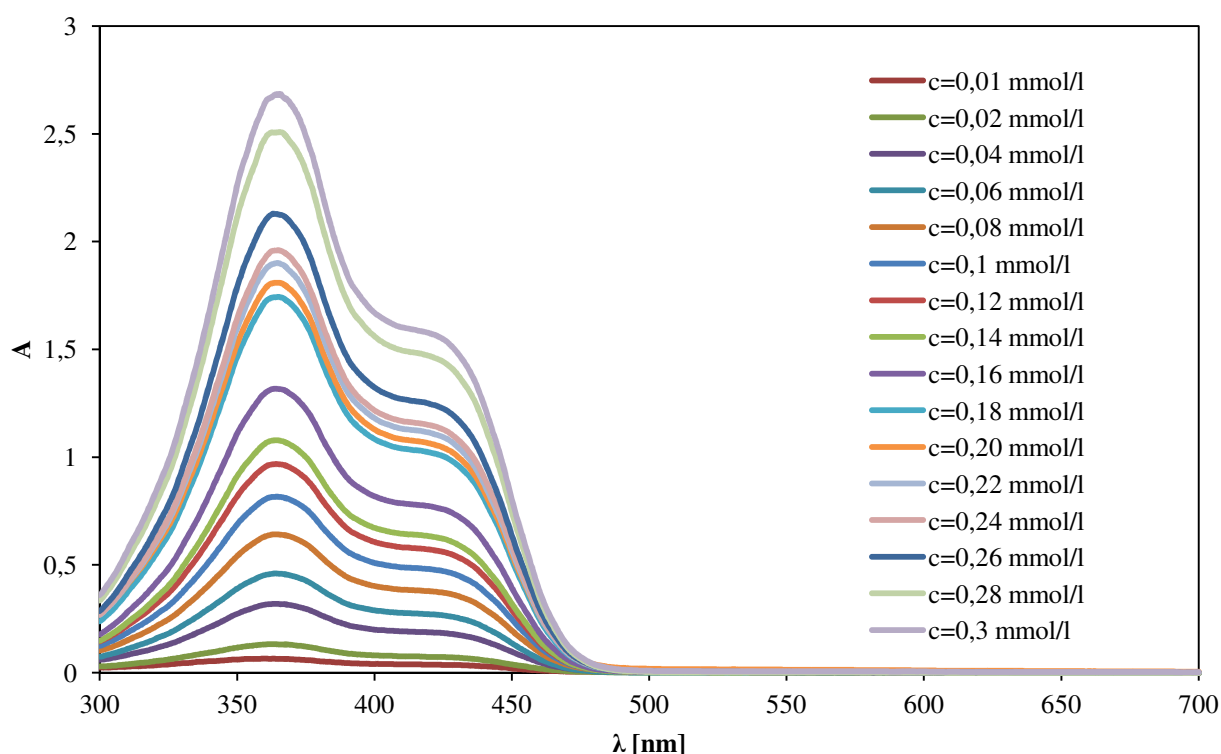
4 VÝSLEDKY A DISKUZE

Cílem práce je stanovit distribuci tenzidu při fázové separaci v systému polymer-tenzid. Pro všechny následující experimenty byl použit tenzid CTAB a jako polymer byl zvolen hyaluronan sodný.

4.1 Kalibrační křivka

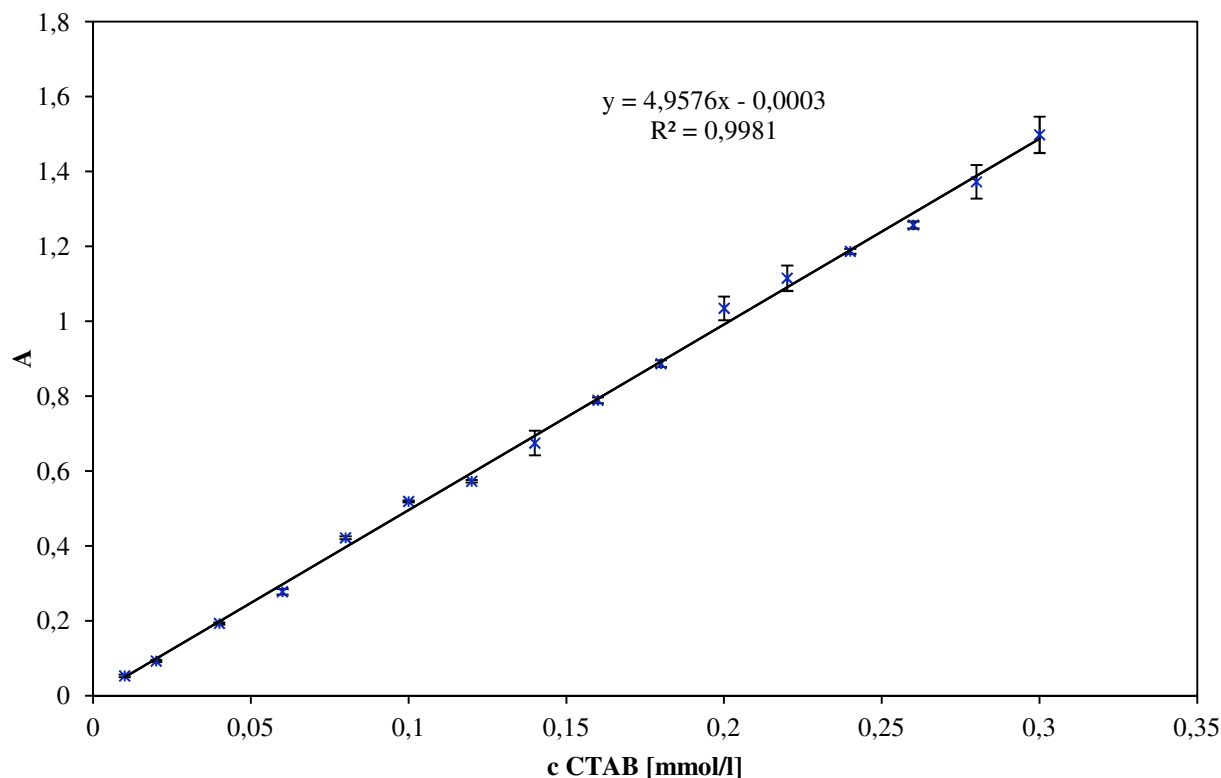
Pro možnost zjištění koncentrací CTAB ve vzorcích bylo nejprve nutné stanovit závislost absorbance v daném koncentračním rozmezí.

Absorpční spektrum koncentrační řady CTAB v komplexu s 0,01% kyselinou pikrovou vyextrahovaného do chloroformu je znázorněno na obr. 8. Z tvaru křivek je zřejmé, že se zvyšující se koncentrací tenzidu vzrůstá absorbance. Tento fakt vyplývá z Lambert-Beerova zákona. Maximum absorpčního spektra vzorků se pohybuje v rozmezí 360 až 364 nm. V pracích [47] a [48] zvolili autoři detekční vlnovou délku 415,5 nm, kdy je absorbance nižší a je možné vyhodnotit i vzorky s vyšší koncentrací, než při vlnové délce 360 nm. Stejná detekční vlnová délka byla vybrána pro následující experimenty, jelikož se na počátku experimentální činnosti nabízelo jako možné srovnání výsledků s jinými autory.



Obr. 8: Absorpční spektrum koncentrační řady CTAB v komplexu s kyselinou pikrovou vyextrahovaného do chloroformu.

Pro určení koncentrace CTAB ve vzorcích byla sestavena koncentrační řada vzorků CTAB v 0,15 M NaCl. Rozmezí měřených koncentrací CTAB bylo zvoleno s ohledem na výslednou absorbanci vzniklého komplexu. Následně byla z naměřených dat získána závislost absorbance na koncentraci CTAB při vlnové délce 415,5 nm (obr. 9).



Obr. 9: Kalibrační křivka CTAB v 0,1 M NaCl

Následně se však ukázalo jako výhodné nalézt optimální ředění vzorků tak, aby absorbance měřených vzorků nepřesáhla rozmezí hodnot 0,1–1,0. Provedme krátkou úvahu, proč je důležité, aby se absorbance vzorků pohybovala v tomto rozmezí. Absorbance A je dekadický logaritmus poměru intenzity záření, které na vzorek dopadá a intenzity záření, které vzorkem prochází. Jestliže je $A = 2$, pak

$$\text{antilog}_{10}2 = 10^2 = \frac{I_0}{I} \quad (8)$$

$$100 = \frac{I_0}{I} \quad (9)$$

Jestliže je I_0 značen jako 1, pak

$$100 = \frac{1}{I} \quad (10)$$

$$I = \frac{1}{100} \quad (11)$$

Absorbance $A = 2$ znamená, že pouze 1 % dopadajícího světla je pohlceno a 99 % je absorbováno vzorkem. $A = 1$ pak odpovídá 10 % pohlceného dopadajícího světla a 90 % absorbovaného. $A = 0,1$ znamená, že přibližně 79 % dopadajícího světla je pohlceno a přibližně

21 % světla je absorbováno vzorkem. Při $A = 0,01$ je 97,9 % dopadajícího světla pohlceno a jen 2,3 % světla absorbováno. Z uvedeného vyplývá, že ideálně by měl mít vzorek takovou koncentraci, aby se absorbance pohybovala v rozmezí 0,1–1. Roztoky vykazující absorbanci 2 nebo vyšší je nutné zředit tak, aby jejich absorbance nepřesahovala toto požadované rozmezí [54].

4.2 Ředění a promývání vzorků

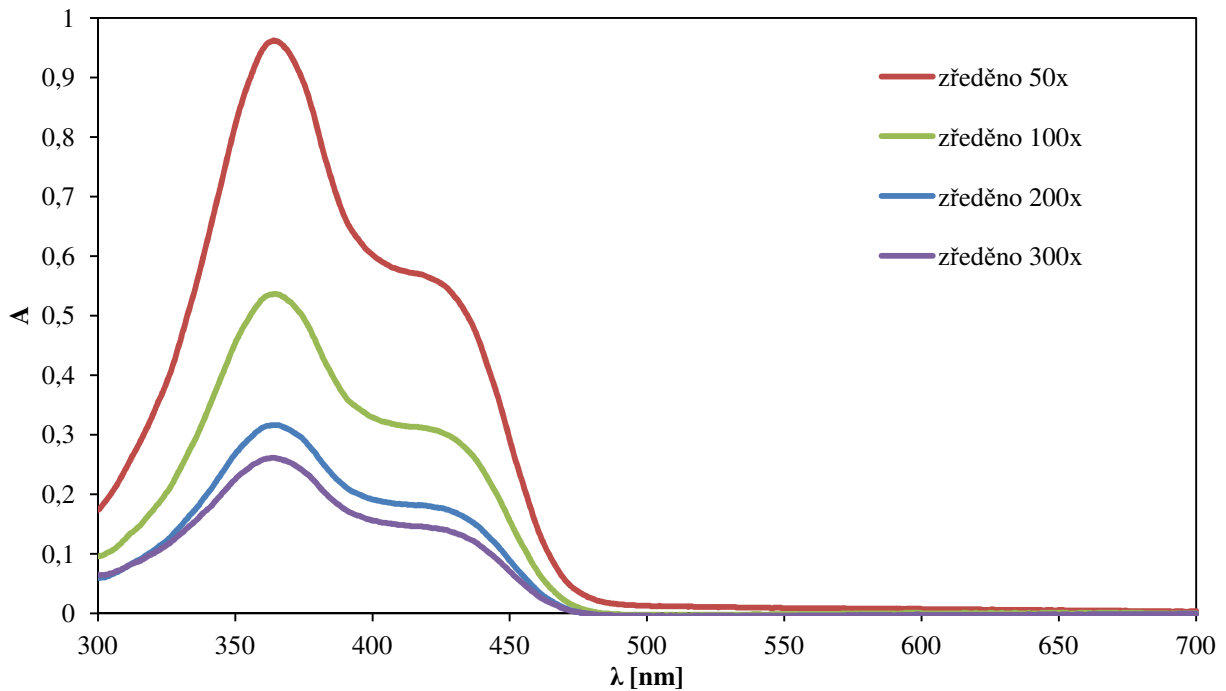
4.2.1 Ředění supernatantu

Mahrousova metoda je vhodná pro stanovení nízkých koncentrací kationaktivních tenzidů ve vzorcích [47], [48]. Pro přípravu gelů byly použity několikrát vyšší koncentrace CTAB, než pro které je metoda ověřená jako spolehlivá. Pro platnost Lambert-Beerova zákony musí být splněny následující podmínky:

- Záření musí být monochromatické
- Měřené roztoky musí být zředěné
- Absorbující prostředí nesmí podléhat žádným změnám
- V roztoku musí být jen jedna absorbující složka. Jestliže je v měřeném roztoku přítomno více složek, absorbance je sumou absorbancí jednotlivých složek

Pro nízké koncentrace vzorků platí lineární závislost absorbance na koncentraci. U vysoce koncentrovaných vzorků nastávají odchylky od linearit Lambert-Beerova zákona [53]. Pro použitelnost metody a reprodukovatelnost výsledků je výhodné pohybovat se v oblasti, kde Lambert-Beerův zákon platí bez výjimky.

Bylo nutné zředit supernatant na koncentraci odpovídající kalibrační křivce CTAB v NaCl. Příslušný supernatant byl u zkušebních vzorků zředěn 10x, 50x, 100x, 200x, 300x, 500x, 800x, 1000x, 2000x, 10000x, 100000x. Pro naměření optimální absorbance se ukázalo jako vhodné zředit supernatant 50x (obr. 10).



Obr. 10: Absorpční spektrum supernatantu z gelu 2 % Hya + 200 mM CTAB, který byl ředěn za účelem dosažení optimální absorbance

4.2.2 Ředění roztoku z promývání

Vhodné ředění muselo být nalezeno ze stejných důvodů i pro roztoky z promývání. Všechny zkušební vzorky byly zředěny 10x, 100x, 300x, 500x, 800x, 1000x, 2000x, 10000x, 100000x. Pro naměření optimální absorbance se ukázalo jako vhodné zředit roztoky z promývání 10x.

4.2.3 Počet promývání gelů

CTAB je v gelu vázáno dvěma způsoby, a to elektrostaticky a stericky. Konkrétní koncentrace CTAB v gelech jsou neznámé a v rámci experimentální části budou stanoveny. Postupné promývání bylo zařazeno pro zjištění, kolik CTAB je v gelu vázáno elektrostaticky a díky tomu se promýváním již neuvolňuje. Gely byly při počátečních experimentech promývány 8x. Stanovená koncentrace se již příliš nelišila od hodnot zjištěných při pětinasobném promytí, které bylo aplikováno u všech následujících experimentů. Lze usuzovat, že rozdíl mezi obsahem CTAB v původním gelu a obsahem CTAB v gelu po 5. promytí tvoří CTAB, které je v daných gelech vázáno stericky.

4.3 Stanovení obsahu CTAB při fázové separaci za přítomnosti hyaluronanu

4.3.1 Výpočet obsahu CTAB ve vzorcích

Nejprve bylo s využitím objemu supernatantu a koncentrace CTAB v něm obsažené vypočítáno látkové množství (n_1) pro příslušný supernatant. Na základě původního obsahu CTAB a objemu vzorku ve zkumavce bylo vypočítáno látkové množství (n_2). Procentuální rozložení částic CTAB v supernatantu a gelu bylo získáno dle vztahu $(n_1/n_2)*100$. Od původního počtu částic CTAB ve vzorku byl odečtením počtu částic CTAB v supernatantu získán počet částic CTAB v gelu.

Pro každý roztok z promývání bylo vypočítáno látkové množství (n_3 až n_7) s využitím hodnot koncentrace a objemu promývacího roztoku. Od počtu částic CTAB v gelu byl odečten počet částic, které se vymyly z gelu do supernatantu. Tímto byl získán počet částic, které zůstaly v gelu po 1. promytí. Při 2. promývání byl od počtu částic CTAB, které zůstaly v gelu po 1. promytí odečten počet částic, které se vymyly z gelu do supernatantu. Tím byl získán počet částic, které zůstaly v gelu po 2. promytí. Postup byl stejným způsobem opakován až do 5. promytí.

Tento postup byl aplikován při výpočtu obsahu CTAB pro všechny gely, jejichž výsledky jsou uvedeny v této práci.

4.4 Stanovení obsahu CTAB v gelech ihned po jejich přípravě

4.4.1 Obsah CTAB v původních gelech

Bylo určeno, kolik procent z CTAB použitého při přípravě je obsaženo v každém typu gelu (tab. II) připravených dle kapitoly 3.3. Následující experimenty byly minimálně třikrát opakovány.

Tab II: Procentuální obsah CTAB v gelech připravených ze tří různých molekulových hmotností Hya

Typ gelu	% CTAB v gelu		
	340 kDa	639 kDa	1635 kDa
0,5 % Hya + 50 mM CTAB	89,79 ± 1,69	91,64 ± 1,44	84,08 ± 2,18
2 % Hya + 50 mM CTAB	88,48 ± 1,49	85,76 ± 2,06	92,83 ± 1,39
0,5 % Hya + 200 mM CTAB	33,29 ± 3,18	33,89 ± 3,8	35,89 ± 2,32
2 % Hya + 200 mM CTAB	95,31 ± 0,37	94,81 ± 1,62	86,58 ± 3,64

Nejvyšší průměrný obsah CTAB byl naměřen u gelu 2 % Hya + 200 mM CTAB. Minimálně $86,58 \pm 3,64$ % CTAB z 200 mM CTAB použitých pro přípravu je obsaženo v gelu z Hya o $M_r = 1635$ kDa. Vysvětlením je pravděpodobně vysoký počet vazných míst u 2 % Hya a zároveň vysoký obsah CTAB, který má vhodné podmínky se do těchto míst navázat.

Odlišné a poměrně překvapivé chování vykazoval gel 0,5 % Hya + 200 mM CTAB. Z dat vyplývá, že v gelech je obsaženo maximálně $35,89 \pm 2,32$ % CTAB (pro gel z Hya o $M_r = 1635$ kDa) z původních 200 mM CTAB, které byly použity při přípravě. Většina CTAB, které je použito pro přípravu tohoto gelu, se nachází v supernatantu, a zůstává proto nevyužito. U supernatantů byly naměřeny vysoké absorbance (cca $A = 2,5$). Z toho důvodu byly příslušné vzorky zředěny ještě 10x oproti ředění 50x, které bylo aplikováno na všechny ostatní vzorky supernatantů. Výsledné ředění tohoto vzorku bylo 500x. V supernatantech 0,5 % Hya + 200 mM CTAB byly naměřeny několikanásobně vyšší koncentrace CTAB než u všech ostatních kombinací gelů. I přesto se však tento gel řadí v obsahu CTAB na druhou příčku mezi testovanými gely. Příčinou tohoto chování je pravděpodobně nízká koncentrace Hya, díky tomu nižší počet vazných míst v gelu, které neumožní dostatečné navázání CTAB, které je k dispozici.

Obsah CTAB v gelech 0,5 % Hya + 50 mM CTAB (gel z Hya o $M_r = 1635$ kDa obsahuje $84,08 \pm 2,18$ % CTAB z původních 50 mM) a 2 % Hya + 50 mM CTAB (gel z Hya o $M_r = 639$ kDa obsahuje $85,76 \pm 2,06$ % CTAB z původních 50 mM) je cca čtyřikrát nižší než u 2 % Hya + 200 mM CTAB. Což odpovídá předpokladu, že jestliže je při přípravě gelu použito čtyřikrát méně CTAB, bude i cca čtyřikrát menší obsah CTAB v gelu. Podobné hodnoty pro tyto dva gely nasvědčují tomu, že při původním obsahu 50 mM CTAB nemá na výsledné zastoupení CTAB v gelu zásadní vliv, zda je Hya 0,5 % nebo 2 %.

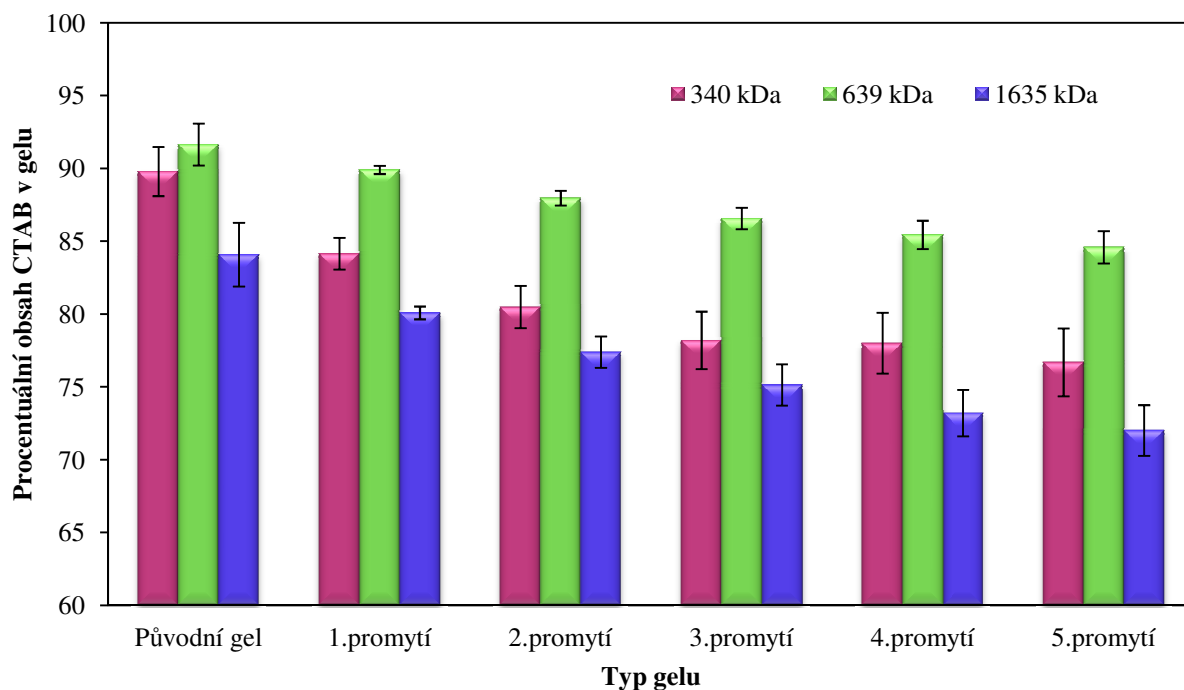
Obsah CTAB se u všech čtyřech typů gelů liší pro jednotlivé molekulové hmotnosti Hya pouze v rámci jednotek procent. Z výsledků je patrné, že molekulová hmotnost použitého Hya nemá zásadní vliv na obsah CTAB v gelu. Na distribuci CTAB po fázové separaci má mnohem větší vliv původní koncentrace CTAB a Hya, které byly použity k přípravě.

4.4.2 Obsah CTAB v gelech po promývání

Všechny připravené gely byly následně promývány dle kapitoly 3.3.1

V obr. 11 je znázorněno, kolik CTAB z původních 50 mM použitých při přípravě je obsaženo v gelu 0,5 % Hya + 50 mM CTAB. V tomto i všech následujících grafech je vždy uveden procentuální obsah CTAB v původním gelu bezprostředně po přípravě a dále obsah CTAB v gelech, které byly postupně promývány celkem pětkrát. Je zřetelné, že obsah CTAB s promýváním klesá u všech gelů připravených ze tří různých molekulových hmotností Hya uvedených v legendě. Promýváním se CTAB z gelu uvolňuje do promývacího roztoku. Pokles obsahu CTAB v gelech odpovídá spíše exponenciální závislosti než lineární. Při prvním promytí se uvolní nejvyšší množství CTAB, přičemž s dalšími promytími toto množství klesá. Při experimentech se ukázalo, že po 5. promytí naměřený obsah CTAB již významně neklesá. Nejnižší pokles obsahu CTAB je zaznamenán u gelu 0,5 % Hya + 50 mM CTAB připraveného z Hya o molekulové hmotnosti 639 kDa. Nejvyšší rozdíl mezi obsahem CTAB v původním gelu a v gelu po pátém promytí byl zaznamenán u gelu připraveného z Hya o $M_r = 1635$ kDa.

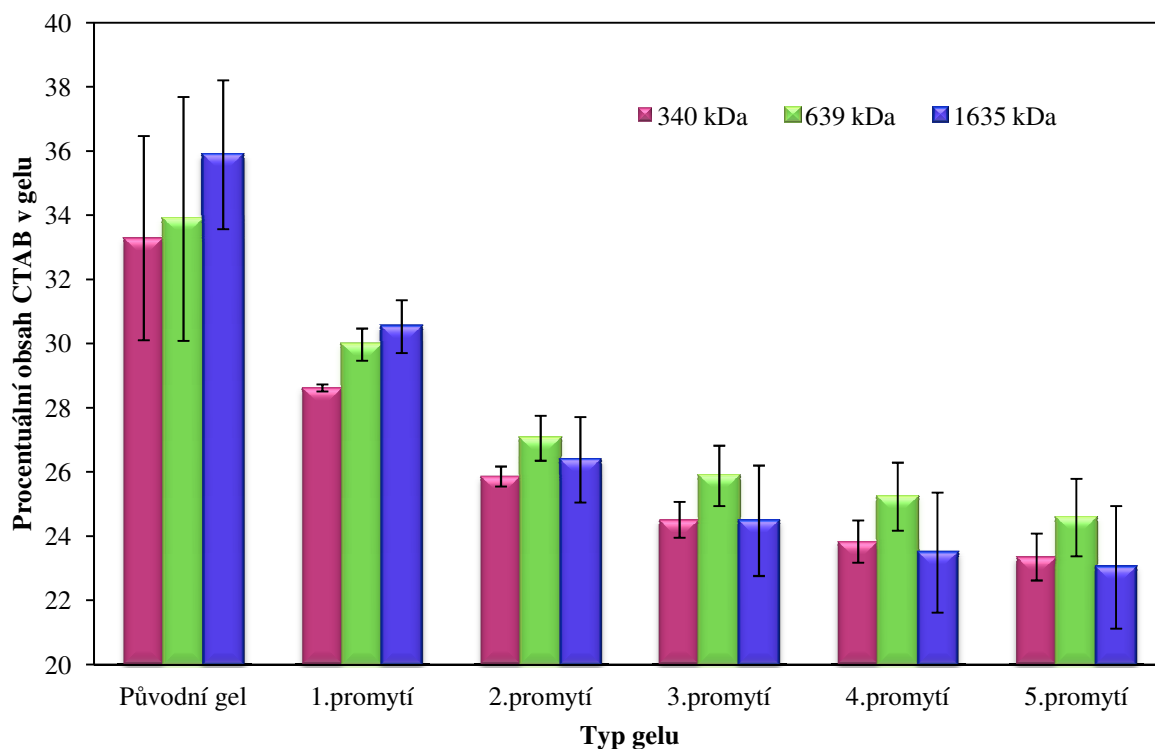
V původním gelu z Hya o Mr = 340 kDa bylo maximálně 45,74 mM CTAB. Po 5. promytí bylo v tomto gelu obsaženo maximálně 39,51 mM CTAB. V původním gelu z Hya o Mr = 639 kDa bylo maximálně 46,54 mM CTAB. Po 5. promytí bylo v tomto gelu obsaženo maximálně 42,55 mM CTAB. V původním gelu z Hya o Mr = 1635 kDa bylo maximálně 43,13 mM CTAB. Po 5. promytí bylo v tomto gelu obsaženo maximálně 36,87 mM CTAB. Promytím se z gelů uvolnilo cca 4–6 mM CTAB.



Obr. 11: Procentuální obsah CTAB v původním gelu 0,5 % Hya + 50 mM CTAB a po jeho pěti postupných promytí

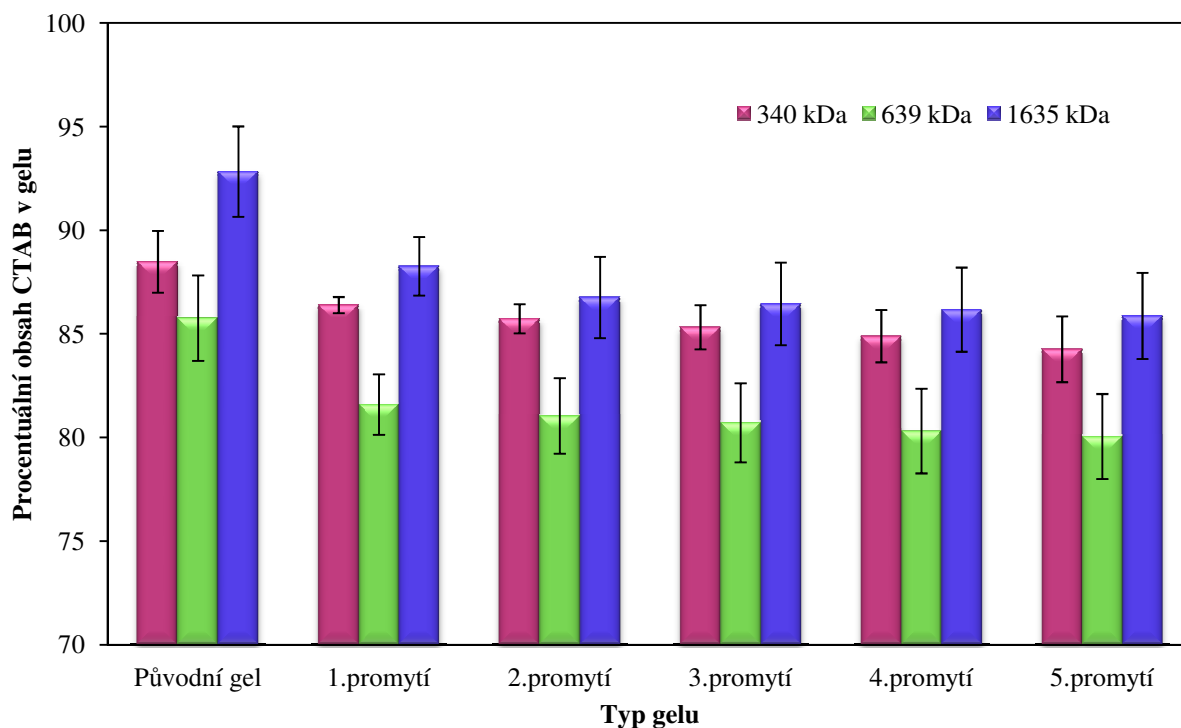
Vobr. 12 je znázorněno, kolik CTAB z původních 200 mM použitých při přípravě je obsaženo v gelu 0,5 % Hya + 200 mM CTAB. U tohoto typu gelu jsou naměřené hodnoty velmi podobné pro všechny tři použité molekulové hmotnosti Hya.

Nejvyšší rozdíl mezi obsahem CTAB v původním gelu a po pátém promytí byl zaznamenán u gelu, pro který byl použit Hya o Mr = 1635 kDa. V původním gelu z Hya o Mr = 340 kDa bylo maximálně 72,94 mM CTAB. Po 5. promytí bylo v tomto gelu obsaženo maximálně 48,16 mM CTAB. V původním gelu z Hya o Mr = 639 kDa bylo maximálně 75,38 mM CTAB. Po 5. promytí bylo v tomto gelu obsaženo maximálně 51,58 mM CTAB. V původním gelu z Hya o Mr = 1635 kDa bylo maximálně 76,42 mM CTAB. Po 5. promytí bylo v tomto gelu obsaženo maximálně 49,88 mM CTAB. Promytím se z každého gelu uvolnilo více než 20 mM CTAB, což je značná část původního obsahu CTAB v gelu.



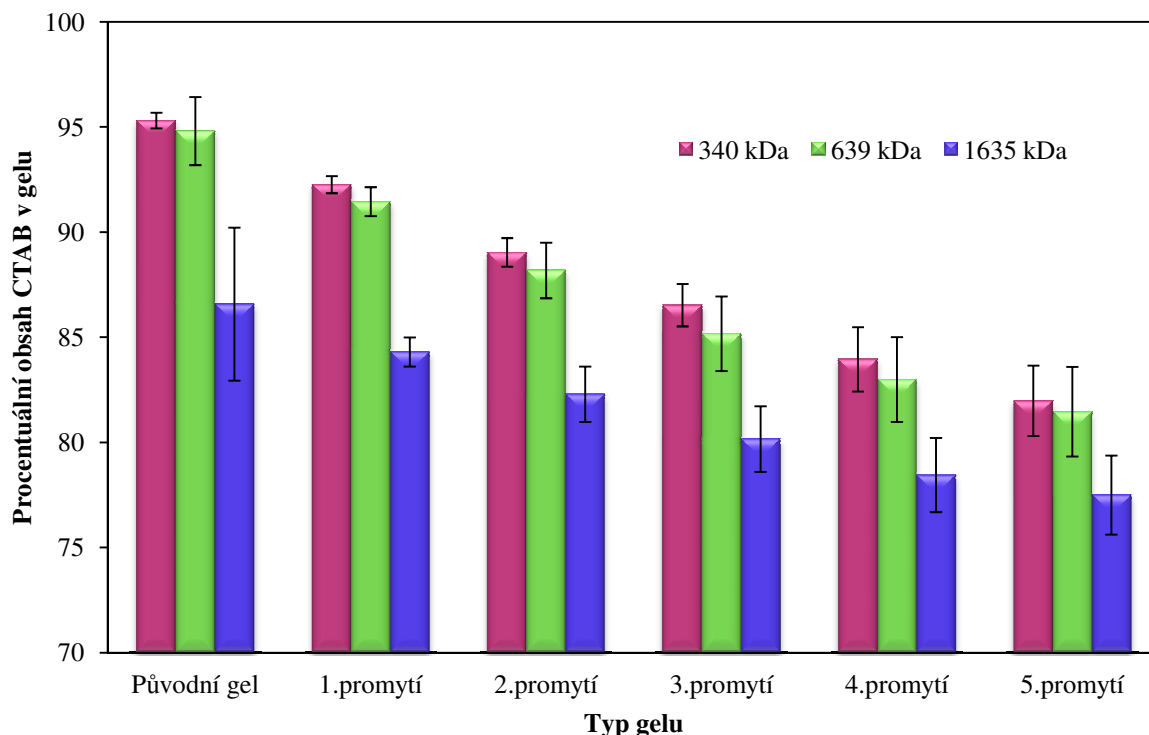
Obr. 12: Procentuální obsah CTAB v původním gelu 0,5 % Hya + 200 mM CTAB a po jeho pěti postupných promytí

V obr. 13 je znázorněno, kolik CTAB z původních 50 mM použitých při přípravě je obsaženo v gelu 2 % Hya + 50 mM CTAB. U tohoto typu gelu můžeme pozorovat nejnížší rozdíly v obsahu CTAB v původních gelech a po pátém promytí. Lze usuzovat, že díky vysoké koncentraci Hya, respektive počtu vazných míst v takto koncentrovaném Hya, je CTAB pevněji vázán a při promývání se uvolňuje nejméně ze všech testovaných gelů. Přičemž nejvyšší rozdíl mezi obsahem CTAB v původním gelu a po pátém promytí byl zaznamenán u gelu, pro který byl použit Hya o $M_r = 1635$ kDa. Rozdíly v obsahu CTAB v původním gelu a po pátém promytí jsou nejmenší mezi všemi testovanými kombinacemi gelů, u kterých byl obsah CTAB měřen ihned po jejich přípravě. U ostatních kombinací gelů je rozdíl mezi původním obsahem CTAB v gelu a po 5. promytí až dvakrát vyšší než u 2 % Hya + 50 mM CTAB. V původním gelu z Hya o $M_r = 340$ kDa bylo maximálně 44,98 mM CTAB. Po 5. promytí bylo v tomto gelu obsaženo maximálně 42,92 mM CTAB. V původním gelu z Hya o $M_r = 639$ kDa bylo maximálně 43,91 mM CTAB. Po 5. promytí bylo v tomto gelu obsaženo maximálně 41,05 mM CTAB. V původním gelu z Hya o $M_r = 1635$ kDa bylo maximálně 47,50 mM CTAB. Po 5. promytí bylo v tomto gelu obsaženo maximálně 43,97 mM CTAB. Promytím se z každého gelu uvolnilo cca 2–3,5 mM CTAB, což je velmi malá část původního obsahu CTAB v gelu.



Obr. 13: Procentuální obsah CTAB v původním gelu 2% Hya + 50 mM CTAB a po jeho pěti postupných promytí

V obr. 14 je znázorněno, kolik CTAB z původních 200 mM použitých při přípravě je obsaženo v gelu 2 % Hya + 200 mM CTAB. Rozdíly mezi obsahem CTAB v původních gelech a po pátém promytí jsou pro gely připravené z Hya o třech různých molekulových hmotnostech podobné. Nejnižší obsah CTAB v původním gelu byl naměřen pro gel připravený z Hya o $M_r = 1635$ kD, pro tento gel pak byl také naměřen nejnižší obsah po 5. promytí. V původním gelu z Hya o $M_r = 340$ kDa bylo maximálně 191,36 mM CTAB. Po 5. promytí bylo v tomto gelu obsaženo maximálně 167,32 mM CTAB. V původním gelu z Hya o $M_r = 639$ kDa bylo maximálně 192,86 mM CTAB. Po 5. promytí bylo v tomto gelu obsaženo maximálně 167,18 mM CTAB. V původním gelu z Hya o $M_r = 1635$ kDa bylo maximálně 180,44 mM CTAB. Po 5. promytí bylo v tomto gelu obsaženo maximálně 158,76 mM CTAB. Promytím se z každého gelu uvolnilo více než 20 mM CTAB. Přesto tento typ gelu obsahuje nejvíce CTAB mezi ostatními typy gelů i po promývání.

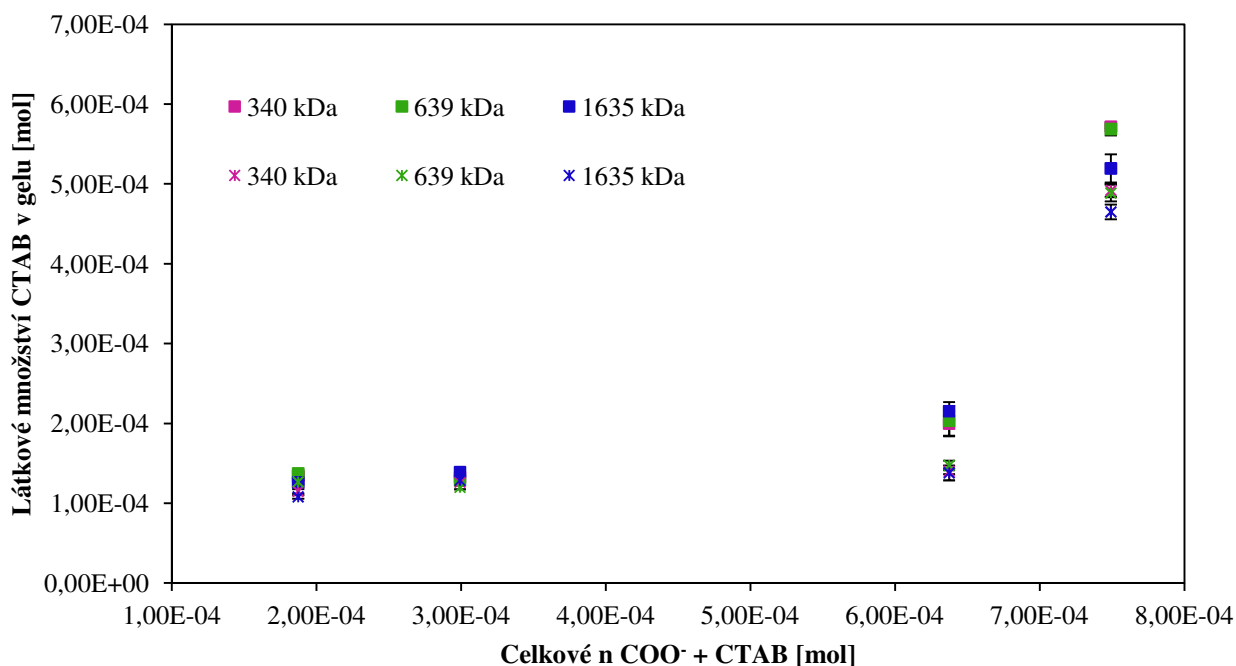


Obr. 14 Procentuální obsah CTAB v původním gelu 2 % Hya + 200 mM CTAB a po jeho pěti postupných promytí

4.4.3 Závislost různých parametrů na celkovém látkovém množství COO^- + CTAB

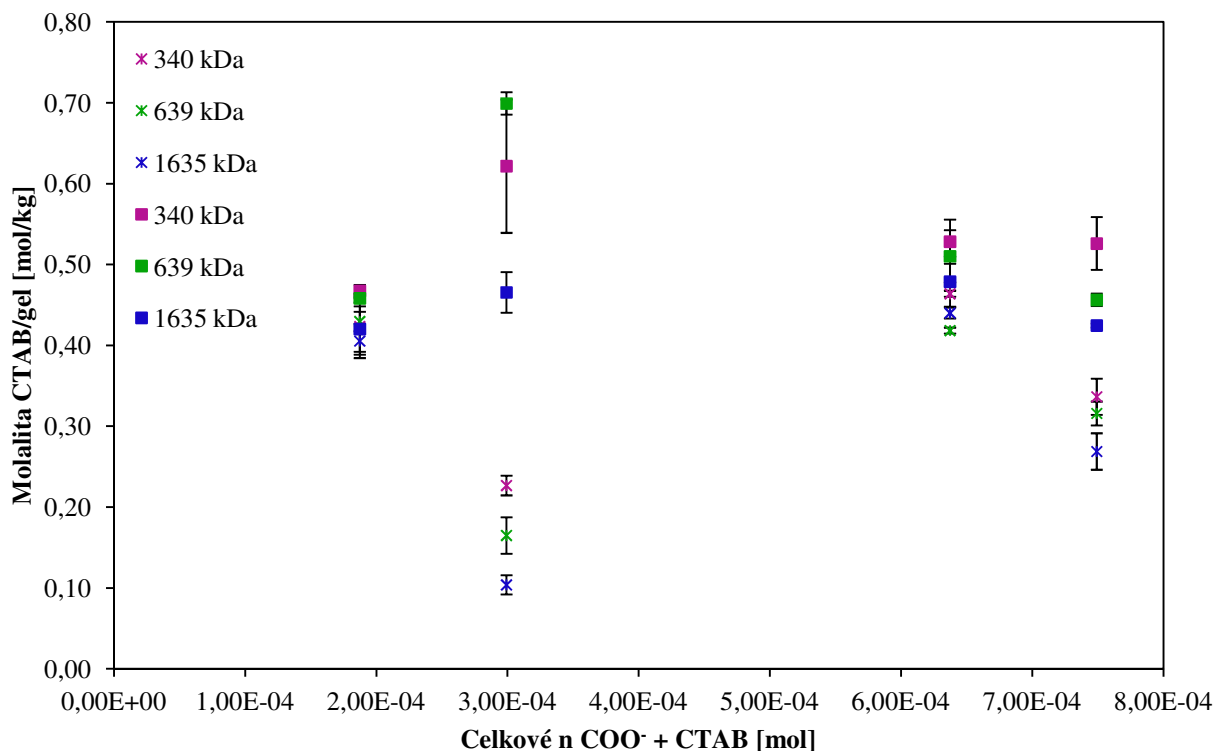
V následujících grafech jsou vyneseny závislosti pro látkové množství CTAB v gelu, molalitu CTAB v gelu a hmotnost gelu oproti celkovému látkovému množství COO^- + CTAB pro původní gely a gely po 5. promytí.

Na obr. 15 je zobrazena závislost látkového množství CTAB v gelu pro každou ze tří molekulových hmotností Hya vůči celkovému látkovému množství COO^- + CTAB ve vzorku. Se vzrůstajícím celkovým látkovým množstvím COO^- + CTAB exponenciálně vzrůstá látkové množství CTAB v gelu. Tento trend je pozorován nezávisle na molekulové hmotnosti Hya, ze které byly gely připraveny. Pro 0,5 % Hya + 200 mM CTAB a 2 % Hya + 200 mM CTAB jsou patrné rozdíly vynesných hodnot pro původní gel a gel po pátém promytí. Gely 0,5 % Hya + 50 mM CTAB a 2% Hya + 50 mM CTAB vykazují podobnou závislost látkového množství CTAB v gelu na celkovém látkovém množství COO^- + CTAB pro původní gel i pro gel po pátém promytí. U této dvojice gelů nejsou rozdíly v hodnotách pro původní gel a po 5. promytí tak zřetelné, jako u předchozí dvojice gelů.



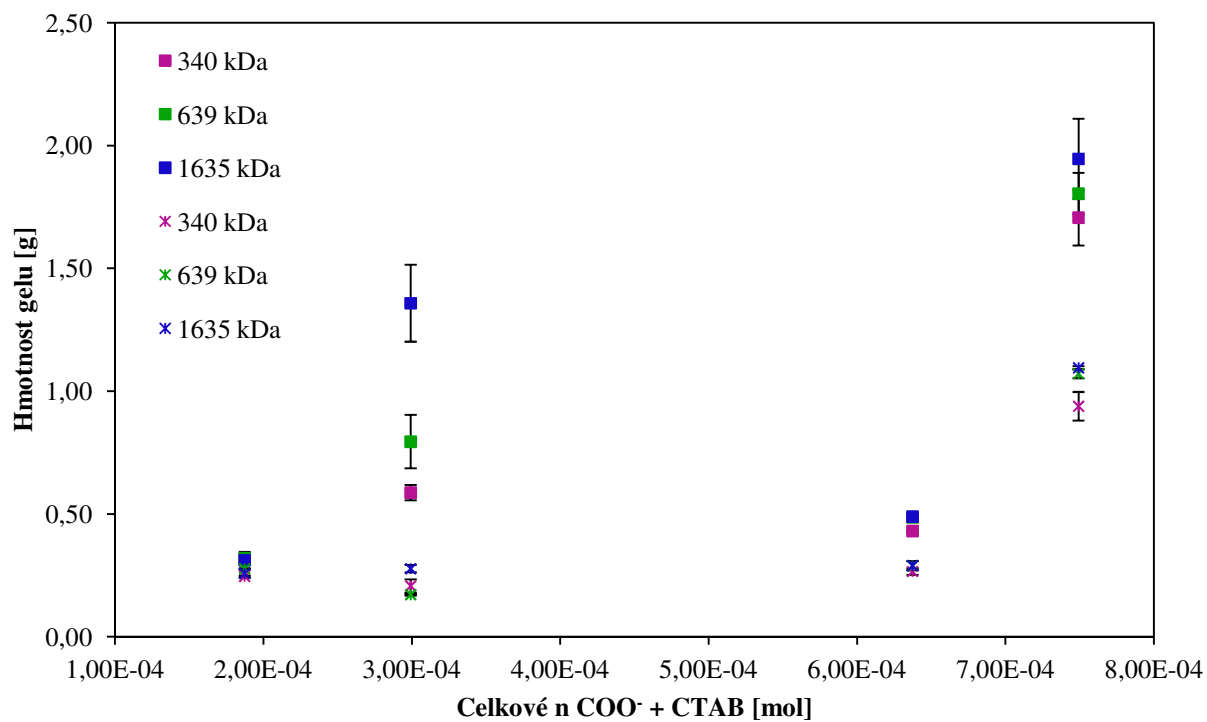
Obr. 15: Závislost látkového množství CTAB v gelu pro každou ze tří molekulových hmotností Hya vůči celkovému látkovému množství COO⁻ + CTAB ve vzorku. Zleva: 0,5 % Hya + 50 mM CTAB, 2 % Hya + 50 mM CTAB, 0,5 % Hya + 200 mM CTAB, 2 % Hya + 200 mM CTAB. Čtverečky značí původní gel, křížky značí gel po 5. promytí.

Na obr. 16 je zobrazena závislost molality CTAB v gelu pro každou ze tří molekulových hmotností Hya vůči celkovému látkovému množství COO⁻ + CTAB ve vzorku. Data získaná pro 0,5 % Hya + 50 mM CTAB a 0,5 % Hya + 200 mM CTAB jeví jistou podobnost. Podobnost lze také pozorovat u gelů 2 % Hya + 50 mM CTAB a 2 % Hya + 200 mM CTAB. 2 % Hya + 50 mM CTAB vykazuje nejvyšší rozdíly mezi původním gelem a gelem po 5. promytí v závislosti molality CTAB v gelu na celkovém látkovém množství COO⁻ + CTAB ve vzorku.



Obr. 16: Závislost molality CTAB v gelu pro každou ze tří molekulových hmotností Hya vůči celkovému látkovému množství COO⁻ + CTAB ve vzorku. Zleva: 0,5 % Hya + 50 mM CTAB, 2 % Hya + 50 mM CTAB, 0,5 % Hya + 200 mM CTAB, 2 % Hya + 200 mM CTAB. Čtverečky značí původní gel, křížky značí gel po 5. promytí.

Na obr. 17 je zobrazena závislost hmotnosti gelu pro každou ze tří molekulových hmotností Hya vůči celkovému látkovému množství COO⁻ + CTAB ve vzorku. Závislost hmotnosti vzniklého gelu na celkovém látkovém množství COO⁻ + CTAB ve vzorku je pro 0,5 % + 50 mM CTAB a 0,5 % + 200 mM CTAB velmi podobná. Pro oba gely je snížení jejich hmotností po 5. promytí poměrně nízké. Uvažujme, že 0,5 % Hya má určitý počet vazných míst. Jestliže je při přípravě gelu použito 50 mM CTAB, většina se naváže na Hya a obsadí tato vazná místa. V případě použití 200 mM CTAB se naváže na 0,5 % Hya podobné množství CTAB jako v předchozím případě, protože není k dispozici více vazných míst. Což znamená, že většina použitého CTAB není přítomna v gelu, ale je v supernatantu. U 2% Hya + 50 mM CTAB předpokládáme, že 2 % Hya má vyšší počet vazných míst, na které se může CTAB navázat. Při použití 50 mM CTAB nebudou obsazena všechna potenciální vazná místa. U gelu 2 % Hya + 200 mM CTAB dojde k obsazení většího počtu vazných míst než v předchozím případě. Hmotnost vzniklého gelu je nejvyšší mezi všemi testovanými kombinacemi gelů. Hmotnost 2 % Hya + 200 mM CTAB a 2% Hya + 50 mM CTAB klesla po 5. promytí cca na polovinu. I po 5. promytí měl gel 2% Hya + 200 mM CTAB nejvyšší hmotnost mezi ostatními gely po 5. promytí.



Obr. 17: Závislost hmotnosti gelu pro každou ze tří molekulových hmotností Hya vůči celkovému látkovému množství COO⁻ + CTAB ve vzorku. Zleva: 0,5 % Hya + 50 mM CTAB, 2 % Hya + 50 mM CTAB, 0,5 % Hya + 200 mM CTAB, 2 % Hya + 200 mM CTAB. Čtverečky značí původní gel, křížky značí gel po 5. promytí.

4.4.4 Vliv objemu promývacího roztoku na obsah CTAB v gelu

Tento experiment byl proveden s Hya o Mr = 639 kDa. S ohledem na množství použitého materiálu byl proveden pouze jedenkrát, proto nejsou u výsledných hodnot uvedeny odchylky. Všechny gely byly připraveny dle kapitoly 3.3. Ihned po přípravě gelů byl na vzorky aplikován postup dle kapitoly 3.4. Následně bylo určeno, kolik procent z CTAB použitého při přípravě je obsaženo v gelech (tab. III).

Promývání bylo provedeno dle kapitoly 3.3.2. K promývání zde byl použit individuálně určený objem 0,15 M NaCl zvolený na základě hmotnosti vzniklého gelu. Z výsledků je patrné, že tato modifikace postupu dle kapitoly 3.3.2 významně neovlivňuje obsah CTAB v gelech. Naměřený obsah CTAB leží v možném rozmezí hodnot, které byly naměřeny v kapitolách 4.4.1 a 4.4.2.

Tab III: Procentuální obsah CTAB v gelech připravených z Hya o Mr = 639 kDa, které byly promývány 0,15 M NaCl, jehož objem byl pro každý typ gelu zvolen na základě jeho hmotnosti.

Typ gelu	% CTAB v gelu					
	Původní gel	1. promytí	2. promytí	3. promytí	4. promytí	5. promytí
0,5 % Hya + 50 mM CTAB	92,00	90,01	88,40	87,30	86,4	85,65
2 % Hya + 50 mM CTAB	86,95	82,91	82,59	82,48	82,01	81,70
0,5 % Hya + 200 mM CTAB	37,20	30,40	27,15	26,76	26,18	25,54
2 % Hya + 200 mM CTAB	96,40	92,10	89,50	86,90	85,01	83,50

Při výpočtu je nutné nejprve určit hodnoty koncentrací CTAB a objemu supernatantu pro každý gel. Tato data byla shodná s výchozími daty pro výsledky uvedenými v kapitole 4.4.1 Modifikace postupu se projevila při promývání. Např. U gelu 0,5 % Hya + 50 mM CTAB měl roztok z promývání menší objem a vyšší koncentraci CTAB, než které byly zjištěny u totožného gelu, na který byl aplikován postup dle kapitoly 3.3.1. Vynásobením těchto hodnot při výpočtu látkového množství však došlo k vyrovnání hodnot. Při následném odečítání od původních hodnot zjištěných ze supernatantu se dospělo aplikací dvou různých postupů ke stejným výsledkům.

4.5 Stanovení obsahu CTAB ve vzorcích po 2 a 4 měsících od jejich přípravy

4.5.1 Obsah CTAB v původních gelech

Následující experimenty byly s ohledem na množství použitého materiálu provedeny pouze dvakrát. Všechny gely byly připraveny dle kapitoly 3.3 a následně rozděleny do dvou sérií.

Zkumavky s gely byly uzavřeny zátkou a opatřeny parafilmem, následně byly uchovány v temnu a za laboratorní teploty. Na všechny vzorky byl aplikován postup dle kapitoly 3.4 a následně bylo určeno, kolik procent z CTAB použitého při přípravě je obsaženo v gelech. V 1. sérii vzorků byl obsah CTAB stanoven po 2 měsících od přípravy gelů (tab. IV).

Tab. IV: Procentuální obsah CTAB v gelech připravených ze tří různých molekulových hmotností Hya, u kterých byla distribuce CTAB stanovena po 2 měsících od přípravy.

Typ gelu	% CTAB v gelu		
	340 kDa	639 kDa	1635 kDa
0,5 % HYA + 50 mM CTAB	88,19 ± 1,90	91,80 ± 1,94	89,08 ± 2,01
2 % HYA + 50 mM CTAB	87,41 ± 1,10	83,96 ± 1,60	90,83 ± 1,90
0,5 % HYA + 200 mM CTAB	32,90 ± 2,70	32,80 ± 2,70	33,70 ± 1,99
2 % HYA + 200 mM CTAB	93,21 ± 1,37	93,81 ± 1,52	90,18 ± 1,60

Ve druhé sérii vzorků byl obsah CTAB stanoven po 4 měsících od přípravy gelů (tab. V).

Tab V: Procentuální obsah CTAB v gelech připravených ze tří různých molekulových hmotností Hya, u kterých byla distribuce CTAB stanovena po 4 měsících od přípravy.

Typ gelu	% CTAB v gelu		
	340 kDa	639 kDa	1635 kDa
0,5 % HYA + 50 mM CTAB	87,89 ± 1,50	88,10 ± 1,49	87,03 ± 1,59
2 % HYA + 50 mM CTAB	86,11 ± 1,60	85,00 ± 0,80	93,04 ± 0,30
0,5 % HYA + 200 mM CTAB	32,20 ± 1,70	31,70 ± 2,70	32,60 ± 1,70
2 % HYA + 200 mM CTAB	94,06 ± 0,88	93,06 ± 1,10	88,50 ± 1,80

Při srovnání obsahu CTAB v gelech, u kterých byl obsah CTAB měřen ihned po přípravě a po 2 a 4 měsících od přípravy, jsou po zahrnutí možných odchylek patrné buď žádné, nebo velmi malé rozdíly v obsahu CTAB. Je nutno brát v potaz, že tyto rozdíly mohou být navíc způsobeny počtem opakování experimentu, chybami při přípravě gelů (nepřesný pipetovaný objem Hya nebo CTAB), nebo při aplikaci Modifikované Mahrousovy metody (nepřesný přírůstek 0,01% kyseliny pikrové).

I po 4 měsících byl naměřen nejvyšší obsah CTAB u gelu 2 % Hya + 200 mM CTAB. Minimálně 88,50 ± 1,80 % CTAB z 200 mM CTAB použitých pro přípravu je obsaženo v gelu z Hya o Mr = 1635 kDa.

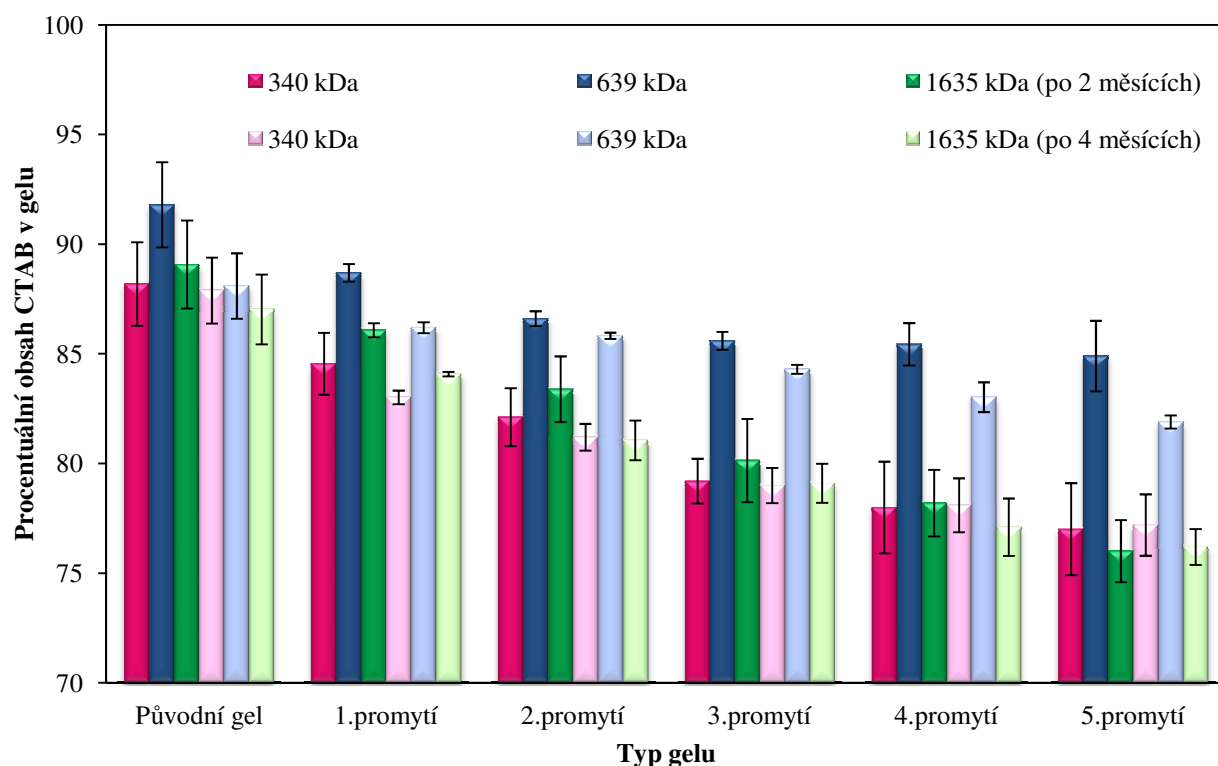
Druhý nejvyšší obsah CTAB měl i po 4 měsících gel 0,5 % Hya + 200 mM CTAB. Zároveň se však v tomto gelu navázalo procentuálně nejméně CTAB, které bylo použito při přípravě gelů. Většina CTAB, které bylo použito pro přípravu tohoto gelu, není navázáno v gelu, ale zůstává nevyužito v supernatantu.

Obsah CTAB v gelech 0,5 % Hya + 50 mM CTAB a 2 % HYA + 50 mM CTAB je po 2 i 4 měsících podobný. Tyto dva gely se mohou dělit o pomyslnou třetí příčku v obsahu CTAB.

Potvrdilo se, že obsah CTAB se u všech čtyřech typů gelů liší mezi jednotlivými molekulovými hmotnostmi Hya pouze v rámci jednotek procent a molekulová hmotnost Hya tak nemá zásadní vliv na obsah CTAB v gelu. Distribuci CTAB po fázové separaci ovlivňuje především původní koncentrace CTAB a Hya.

4.5.2 Obsah CTAB v gelech po promývání

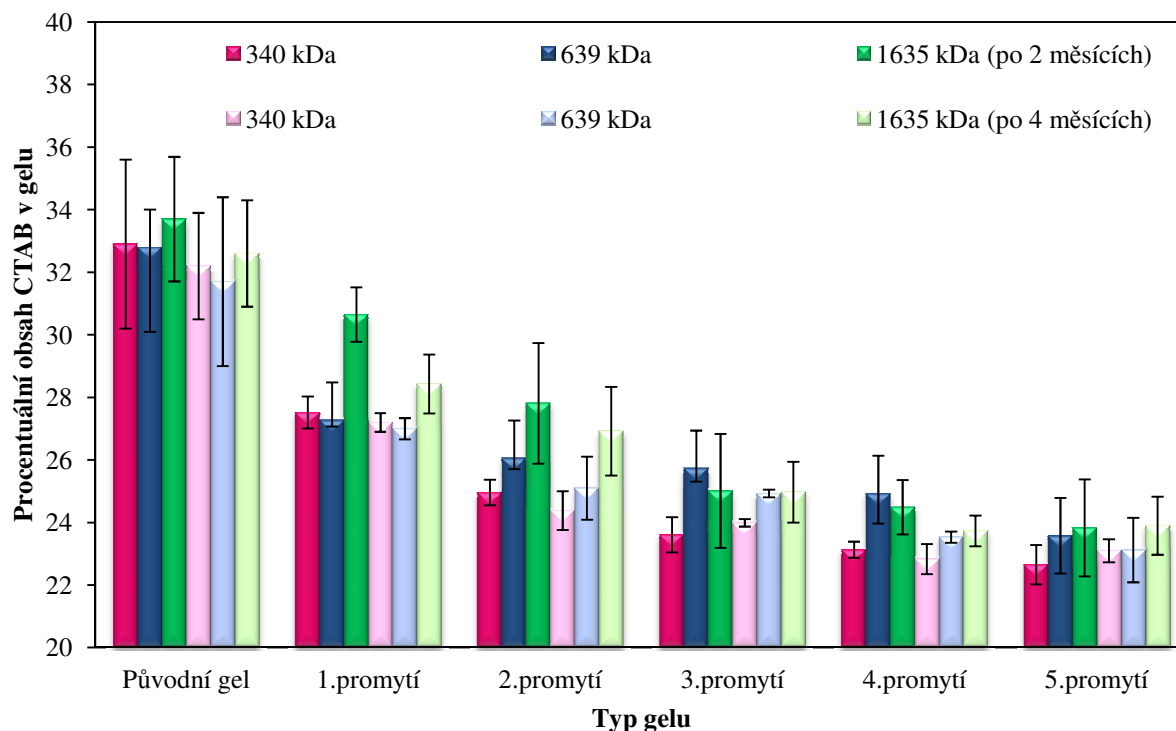
V obr. 18 je znázorněno, kolik CTAB z původních 50 mM použitých při přípravě je obsaženo v gelu 0,5 % Hya + 50 mM CTAB. U gelů, ve kterých byl stanoven obsah CTAB po 2 měsících i 4 měsících od přípravy, byl zaznamenán nejnižší pokles obsahu CTAB připraveného z Hya o Mr = 639 kDa, obdobně jako tomu bylo pro tento typ gelu, u kterého byl měřen obsah CTAB ihned po přípravě. Stejně tak byl nejvyšší rozdíl mezi obsahem CTAB v původním gelu a po pátém promytí zaznamenán u gelu, pro který byl použit Hya o Mr = 1635 kDa. Pro gely o stáří 4 měsíců nebyl tento rozdíl tak velký, jako u gelu, u nichž byl obsah CTAB měřen ihned po přípravě. Promývání mělo podobnou účinnost u gelů o stáří 2 i 4 měsíců. U gelů připravených z Hya o Mr = 639 kDa byl rozdíl v obsahu CTAB mezi hodnotou původního gelu a po 5. promytí cca 7,2 %. U dalších dvou molekulových hmotností byl rozdíl vyšší než 10 %. V gelech připravených z Hya o Mr = 340 kDa a Mr = 1635 kDa bylo po 5. promytí maximálně cca 39 mM CTAB. V gelu připraveného z Hya o Mr = 639 kDa pak bylo po 5. promytí maximálně cca 43 mM CTAB (po 2. měsících) a cca 41 mM CTAB po 4 měsících. Po 5. promytím se z gelů uvolnilo cca 4–6 mM CTAB, tedy podobné množství jako u gelů, u nichž byl obsah CTAB stanovován ihned po přípravě.



Obr. 18: Procentuální obsah CTAB v původním gelu 0,5 % Hya + 50 mM CTAB a po jeho pěti postupných promytí, která byla provedena po 2 měsících (první tři sloupce v tmavých tónech barev) a 4 měsících (sloupce ve světlých tónech barev) od přípravy gelu.

V obr. 19 je znázorněno, kolik CTAB z původních 200 mM použitých při přípravě je obsaženo v gelu 0,5 % Hya + 200 mM CTAB. U tohoto typu gelu jsou po 2 i 4 měsících naměřené hodnoty velmi podobné pro všechny tři použité molekulové hmotnosti Hya. Podobně tomu bylo pro tento typ gelu, u něhož byl obsah CTAB měřen ihned po přípravě. U gelů o stáří

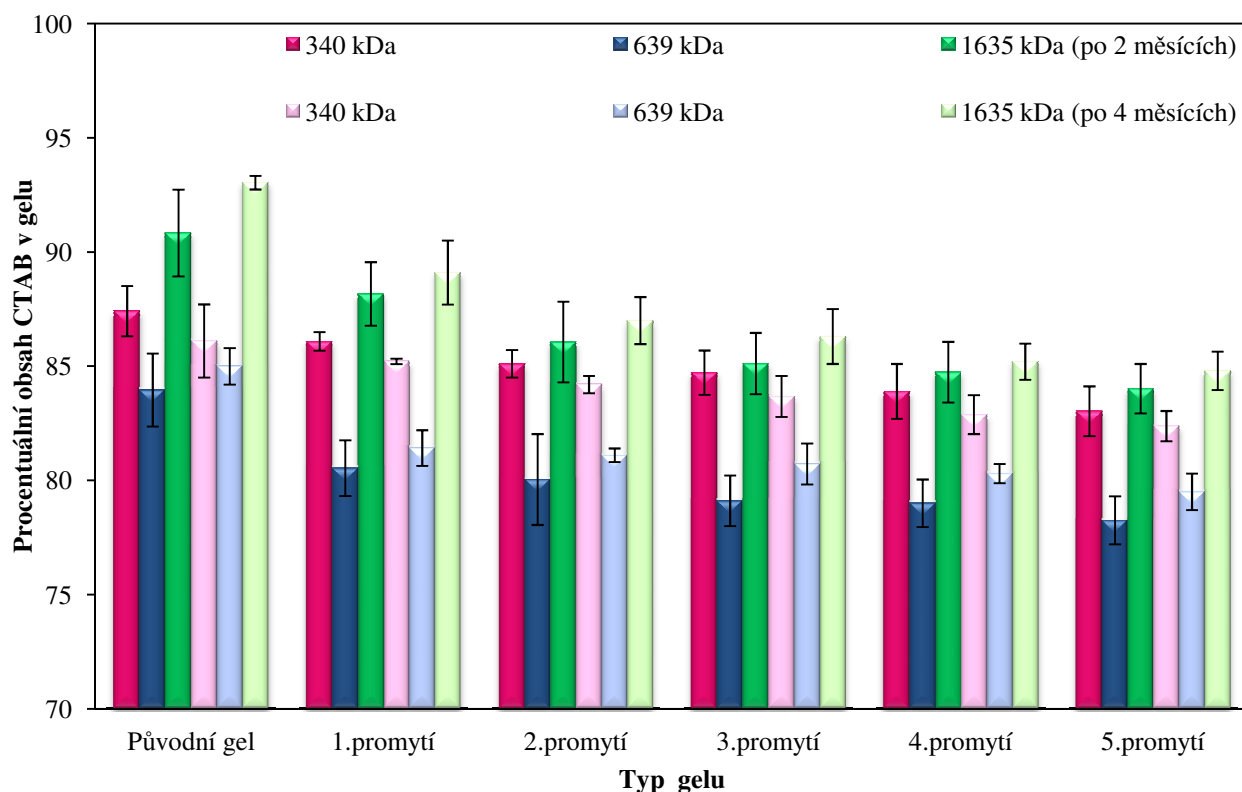
4 měsíců byl nejvyšší rozdíl mezi obsahem CTAB v původním gelu a po 5. promytí zaznamenán u gelu připraveného z Hya o $M_r = 340$ kDa. U gelů byl po 4 měsících zaznamenán pro všechny molekulové hmotnosti menší rozdíl mezi obsahem CTAB v původním gelu a po pátém promytí, než u gelů o stejném složení, u nichž byl obsah CTAB měřen ihned a po 2 měsících. Počáteční obsah CTAB se u všech typů gelů pohyboval okolo 70 mM, po 5. promytí pak poklesnul o cca 19–25 mM CTAB. Okolo 1/3 původního obsahu CTAB se z gelů vymylo mechanickým promýváním. Lze předpokládat, že toto značné množství tvoří CTAB, které je v gelu vázáno stericky.



Obr. 19: Procentuální obsah CTAB v původním gelu 0,5 % Hya + 200 mM CTAB a po jeho pěti postupných promytí, která byla provedena po 2 měsících (první tři sloupce v tmavých tónech barev) a 4 měsících (sloupce ve světlých tónech barev) od přípravy gelu.

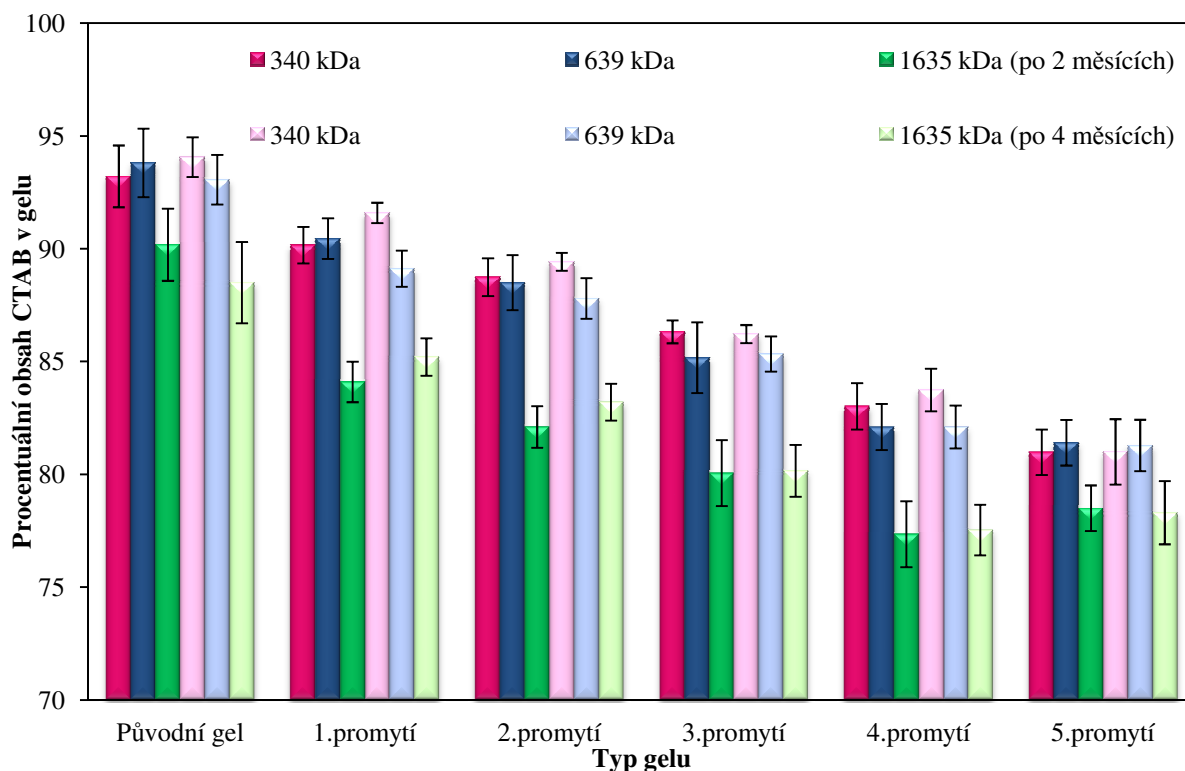
V obr. 20 je znázorněno, kolik CTAB z původních 50 mM použitých při přípravě je obsaženo v gelu 2 % Hya + 50 mM CTAB. U tohoto typu gelu můžeme po 2 i 4 měsících pozorovat nejmenší rozdíly v obsahu CTAB u původních gelů a gelů po 5. promytí. Původní obsah CTAB se pohyboval okolo 43–46 mM CTAB, po 5. promytí pak klesl na cca 39,5–42,5 mM. Podobné hodnoty byly naměřeny pro stejný typ gelu, u něhož byl obsah CTAB měřen ihned po přípravě. Opět lze usuzovat, že díky vysoké koncentraci Hya, respektive počtu vazných míst v takto koncentrovaném Hya, je CTAB pevněji vázán a při promývání se uvolňuje nejméně ze všech testovaných gelů. Nejvyšší rozdíl v obsahu CTAB původního gelu a po 5. promytí byl zaznamenán u gelu připraveného z Hya o $M_r = 1635$ kDa. Po 2 i 4 měsících se tento rozdíl pohyboval okolo 3,8 mM CTAB. Rozdíly v obsahu CTAB původního gelu a po pátém promytí jsou nejmenší mezi všemi testovanými kombinacemi gelů. U ostatních kombinací gelů, u kterých byl obsah CTAB měřen po 2 měsících od přípravy je rozdíl mezi původním obsahem

CTAB v gelu a po 5. promytí až dvakrát vyšší než u 2 % Hya + 50 mM CTAB. Stejné chování bylo zaznamenáno i u gelů, u nichž byl obsah CTAB stanoven ihned po přípravě.



Obr. 20: Procentuální obsah CTAB v původním gelu 2 % Hya + 50 mM CTAB a po jeho pěti postupných promytí, která byla provedena po 2 měsících (první tři sloupce v tmavých tónech barev) a 4 měsících (sloupce ve světlých tónech barev) od přípravy gelu.

V obr. 21 je znázorněno, kolik CTAB z původních 200 mM použitých při přípravě je obsaženo v gelu 2 % Hya + 200 mM CTAB. Rozdíly mezi obsahem CTAB v původních gelech a po pátém promytí jsou pro gely připravené z Hya o třech různých molekulových hmotnostech podobné. I po 4 měsících byl v tomto typu gelu naměřen nejvyšší obsah CTAB. V původních gelech bylo obsaženo cca 180–190 mM CTAB. Nejnižší obsah CTAB v původním gelu byl naměřen pro gel připravený z Hya o $M_r = 1635$ kDa. Po 2 měsících to bylo maximálně 183,56 mM a po 4 měsících byl maximální obsah CTAB 180,6 mM. Pro tento gel pak byl také naměřen nejnižší obsah CTAB po 5. promytí. Po 5. promytí obsah CTAB poklesl u všech gelů cca o 21–26 mM.



Obr. 21: Procentuální obsah CTAB v původním gelu 2 % Hya + 200 mM CTAB a po jeho pěti postupných promytí, která byla provedena po 2 měsících (první tři sloupce v tmavých tónech barev) a 4 měsících (sloupce ve světlých tónech barev) od přípravy gelu.

Gely, u kterých byl obsah CTAB měřen po 2 a 4 měsících od přípravy vykazují podobné chování při promývání jako gely, u kterých byl obsah CTAB měřen ihned po přípravě. Lze předpokládat, že je obsah CTAB v těchto gelech po dobu 4 měsíců konstantní a po tuto dobu je systém stabilní. Významný vliv na tento fakt má zřejmě samotný CTAB, který svými antibakteriálními a antimykotickými účinky přispívá ke konzervaci a mikrobiální stabilitě gelů.

5 ZÁVĚR

Diplomová práce se zabývala rozdělením tenzidu při fázové separaci v systému polymer-tenzid. Jako polymer byl zvolen hyaluronan o třech různých molekulových hmotnostech (340 kDa, 639 kDa, 1635 kDa). Na základě povahy interakcí mezi hyaluronanem a tenzidy byl zvolen jako vhodný kationaktivní tenzid CTAB. Nejprve byla zpracována literární rešerše, ve které jsou hyaluronan a CTAB blíže představeni. Následně byly shrnuty vybrané poznatky autorů, kteří studovali systémy polymer-tenzid a hyaluronan-CTAB. V rámci rešerše bylo také studováno stanovení kationaktivních tenzidů. Byly nastíněny analytické metody používané ke stanovení kationaktivních tenzidů a k tomuto účelu často užívaná kolorimetrická činidla se zaměřením na kyselinu pikrovou, která byla použita v této práci. Dále byly shrnuty vybrané poznatky autorů o interakcích v systémech barvivo-tenzid.

Dalším cílem práce bylo na základě rešerše navrhnout vhodnou metodu pro stanovení obsahu CTAB v gelech. Stanovení koncentrace CTAB ve vzorcích vycházelo z experimentů Wurster a Werawatganone [47] a diplomové práce Šejnohové [48]. Autoři ve svých pracích provedli extrakci tenzidu do chloroformového roztoku kyseliny pikrové a koncentraci tenzidu ve vzorcích následně stanovili pomocí UV-VIS spektrofotometrie. Stanovení je založeno na tvorbě žlutého komplexu, který tvoří kyselina pikrová s CTAB. Intenzita zbarvení tohoto komplexu je úměrná koncentraci CTAB ve vzorku.

Pro možnost stanovení koncentrací CTAB ve vzorcích bylo nejprve nutné sestavit kalibrační křivku CTAB v prostředí 0,15 M NaCl, která vykazovala lineární závislost. Na supernatanty byla aplikována Modifikovaná Mahrousova metoda. Ta se v pracích [47], [48] ukázala vhodná pro stanovení nízkých koncentrací kationaktivních tenzidů ve vzorcích. Pro přípravu gelů byly použity několikrát vyšší koncentrace CTAB, než pro které je metoda ověřená jako spolehlivá. Bylo tedy nutné nalézt vhodné ředění supernatantů. Pro naměření optimální absorbance se ukázalo jako výhodné ředit supernatanty 50x. Následně byl stanoven obsah CTAB ve čtyřech různých gelech (0,5 % Hya + 50 mM CTAB, 2 % Hya + 50 mM CTAB, 0,5 % Hya + 200 mM CTAB, 2 % Hya + 200 mM CTAB). Každý typ gelu byl připraven z hyaluronanu o třech různých molekulových hmotnostech (340 kDa, 639 kDa, 1635 kDa). Ukázalo se, že gel 2 % Hya + 200 mM CTAB má nejvyšší obsah CTAB mezi testovanými kombinacemi gelů. Gel 0,5 % Hya + 200 mM CTAB má 2. nejvyšší obsah CTAB mezi testovanými gely. Bylo však zjištěno, že z 200 mM CTAB, které byly použity k přípravě gelu se pouze cca 30–35 % naváže v gelu. Zbytek CTAB, tedy většina původního množství, je obsažen v supernatantu a zůstává nevyužit. Naměřená data mohou mít praktické využití, jelikož toto zjištění může přinést finanční úsporu při přípravě gelů. Obsah CTAB v gelech 0,5 % Hya + 50 mM CTAB a 2 % Hya + 50 mM CTAB je cca čtyřikrát nižší než u 2 % Hya + 200 mM CTAB. Zjištění odpovídá předpokladu, že jestliže je při přípravě gelu použito čtyřikrát méně CTAB, bude ho i cca čtyřikrát méně obsaženo v gelu. Podobné hodnoty pro tyto dva gely nasvědčují tomu, že při původním obsahu 50 mM CTAB nemá na výsledné zastoupení CTAB v gelu zásadní vliv, zda je Hya 0,5 % nebo 2 %.

Obsah CTAB se u všech čtyřech typů gelů liší pro jednotlivé molekulové hmotnosti Hya pouze v rámci jednotek procent. Z výsledků je patrné, že molekulová hmotnost použitého Hya

nemá zásadní vliv na obsah CTAB v gelu. Distribuci CTAB po fázové separaci ovlivňuje především původní koncentrace CTAB a Hya.

Při stanovení obsahu CTAB v gelech se jeví jako výhodné stanovit i obsah CTAB po promývání gelů. Koncentrace CTAB v promývacích roztocích byly také poměrně vysoké, proto bylo třeba nalézt vhodné ředění i pro roztoky z promývání. Pro naměření optimální absorbance se ukázalo jako výhodné zředit roztoky z promývání 10x. Zkušební gely byly promyty osmkrát, přičemž bylo zjištěno, že nejvyšší vyloučení CTAB do roztoku z promývání nastává při prvním promytí. Na všechny reálné vzorky pak bylo aplikováno pět promytí, protože po páté promytí je již uvolňování CTAB z gelu minimální. Na základě dat z promývání gelů lze usuzovat, kolik CTAB je v gelu vázáno elektrostaticky a stericky. Bylo potvrzeno, že většina CTAB obsaženého v gelu, je vázáno elektrostaticky a mechanickým promýváním se uvolňuje zpravidla menší část CTAB v gelu obsaženého.

Byl také testován vliv objemu promývacího roztoku na účinnost promývání. Příslušný objem 0,15 M NaCl byl zvolený v závislosti na hmotnosti vzniklého gelu. Bylo zjištěno, že tato modifikace postupu významně neovlivňuje naměřený obsah CTAB v gelech.

Všechny kombinace gelů byly podrobeny testům stability. Zkumavky s gely byly uzavřeny zátkou, opatřeny parafilmem a uchovány v temnu za laboratorní teploty. Bylo zjištěno, že po dvou ani čtyřech měsících nedochází k velkým změnám v distribuci CTAB. Naměřené hodnoty se s přihlédnutím ke směrodatným odchylkám liší velmi málo, nebo vůbec od hodnot pro čerstvě připravené gely. Příčinou je pravděpodobně přítomnost samotného CTAB, který v systému působí antibakteriálně a přispívá k jeho stabilitě.

Metoda se ukázala jako vhodná pro stanovení distribuce CTAB při fázové separaci v systému hyaluronan-CTAB. Prostor pro optimalizaci se zde však stále nachází. Již při přípravě gelů může být možným zdrojem chyb tzv. pipetování Hya po rysku (viz kapitola 3.3), kdy i malý rozdíl v objemu pipetovaného Hya může ovlivnit přesnost získaných výsledků. U vytřepávání je využíván 0,01% roztok kyseliny pikrové v chloroformu. Při manipulaci s ním je nutné dodržovat přísně bezpečnostní pravidla a zajistit, aby se nevypařoval. Vypařování chloroformu jednak ovlivňuje koncentraci použitého roztoku a při nevhodné manipulaci může negativně ovlivnit zdraví lidí. Zajímavé by proto bylo např. použití jiného kolorimetrického činidla ve spojení s jiným rozpouštědlem a srovnání dosavadních výsledků. Nespornou výhodou stávající metody je však její rychlost a nenáročnost na instrumentální vybavení při přípravě vzorků. Naměřená data mohou přispět k pochopení chování testovaných gelů a být podkladem pro další experimenty.

6 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] POUCHLÝ, J. *Fyzikální chemie makromolekulárních a koloidních soustav*. 1. vyd. Praha: VŠCHT, 1998. 198 s. ISBN 80-708-0331-2.
- [2] DAUTZENBERG, H. *Polyelectrolytes: Formation, Characterization and Application*. Munich: Hanser Publishers, 1994. 343 s. ISBN 15-699-0127-9.
- [3] MEYER, K., PALMER J. W. *The polysaccharide of the vitreous humor*. *Journal of Biology and Chemistry*. 1934, č. 107, s. 629-634.
- [4] COWMAN, M. K., S. MATSUOKA, N. ITANO, K. HAXAIRE, E. BUHLER, M. MILAS, S. PEREZ, M. RINAUDO, F. PEREK a B. TOOLE. *Experimental approaches to hyaluronan structure*. *Carbohydrate Research*. 2005, roč. 340, č. 5, s. 69-86. DOI: 10.1201/9780203909720.ch4.
- [5] HASCALL, C. V., LAURENT, C. T. *Hyaluronan: Structure and Physical Properties*. *Glycoforum* [online], [cit. 2015-04-25], Dostupné z: <http://www.glycoforum.gr.jp/>
- [6] SCOTT, J. E. *Secondary and Tertiary Structures of Hyaluronan in Aqueous Solutions. Some Biological Consequences*. *Glycoforum* [online], [cit. 2015-04-25], Dostupné z: <http://www.glycoforum.gr.jp/>
- [7] LAURENT, T. *The chemistry, biology, and medical applications of hyaluronan and its derivatives*. London; Miami: Portland Press, 1998. 341s. ISBN 18-557-8119-0.
- [8] KOGAN, G., L. ŠOLTÉS, R. STERN, P. GEMEINER, J. SCHILLER, N. VOLPI, E. HRABÁROVÁ a L. ŠOLTÉS. *Hyaluronic acid: a natural biopolymer with a broad range of biomedical and industrial applications*. *Biotechnology Letters*. 2006, roč. 29, č. 1, s. 1-34. DOI: 10.1002/9781118164792.ch1.
- [9] GARG, H. G., HALES, CH. A. *Chemistry and biology of hyaluronan*. 1st ed. Amsterdam: Elsevier, 2004. 605 s. ISBN 00-804-4382-6.
- [10] *Hyaluronic Acid: The Ultimate Skin Hydrating Agent*. [online], [cit. 2015-04-25]. Dostupné z: <http://www.makingcosmetics.com/articles/17-hyaluronic-acid-hydrating-agent.pdf>
- [11] RAH, M. J. a E. A. BALAZS. A review of hyaluronan and its ophthalmic applications. *Optometry - Journal of the American Optometric Association*. 2011, roč. 82, č. 1, s. 293-310. DOI: 10.1007/978-1-4615-3858-5_29.
- [12] LUKÁČOVÁ, O. a J. LUKÁČ. *Farmakologická léčba osteoartrózy*. [online], [cit. 2015-04-25]. Dostupné z: <http://www.edukafarm.sk/data/soubory/casopisy/mediNEWS/02-2014/10.pdf>
- [13] *Hyiodine*. [online], [cit. 2015-04-25]. Dostupné z: <https://www.hyiodine.cz/>

- [14] JIN, Y.-J., T. UBONVAN, D.-D. KIM, P NETTI, L AMBROSIO, L NICOLAIS, J. RICHARDSON a T. ARMSTRONG. Thermodynamics of Water Sorption in Hyaluronic Acid and Its Derivatives. *Journal of Pharmaceutical Investigation*. 2010, roč. 40, č. spc, s. 563-599. DOI: 10.1201/b14099-22.
- [15] *Dispersing process*. [online], [cit. 2015-04-25]. Dostupné z: <http://www.inkline.gr/inkjet/newtech/tech/dispersion/>
- [16] MACHAŇOVÁ, D. *Povrchově aktivní látky*. [online], [cit. 2014-12-25] Dostupné z: <http://www.ft.tul.cz/depart/ktm/files/20130311/TCH-%C3%BAloha3-Povrchov%C4%9B%20aktivn%C3%AD%20%C3%A1tky.pdf>
- [17] *Detergence*. [online], [cit. 2015-04-25]. Dostupné z: http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_es-001/hesla/detergence.html
- [18] ŠMIDRKAL, J. *Tenzidy a detergenty dnes*. *Chemické listy*. 1999, roč. 93, č. 7, s. 421-427. ISSN 0009-2770
- [19] *Cetyltrimethylammonium bromide*. [online], [cit. 2015-04-25]. Dostupné z: <http://www.mpbio.com/product.php?pid=02195029>
- [20] SATA, N. a S. SAITO. Die Solubilisation von Polyvinylazetat. *Kolloid-Zeitschrift*. 1952, roč. 128, č. 3, s. 154-158. DOI: 10.1007/bf01519513.
- [21] JONES, M. N. The interaction of sodium dodecyl sulfate with polyethylene oxide. *Journal of Colloid and Interface Science*. 1967, roč. 23, č. 1, s. 36-42. DOI: 10.1016/0021-9797(67)90082-3.
- [22] GODDARD, E. D. a R. B. HANNAN. Polymer/surfactant interactions. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 1977, roč. 54, č. 12, s. 561-566. DOI: 10.1007/bf03027636.
- [23] GODDARD, E. D., I. NAHRINGBAUER, B. BROOKS a H. PASCH. Polymer/Surfactant Interaction: Interfacial Aspects. *Journal of Colloid and Interface Science*. 2002, roč. 256, č. 1, s. 387-434. DOI: 10.1201/9780203909867.ch10.
- [24] BUWALDA, R.T. *Molecular Aggregation in Water: The Interplay of Hydro-phobic and Electrostatic Interactions* [online]. Groningen, 2001. 159 s. Dissertation at University of Groningen. Faculty of Mathematics and Natural Sciences. ISBN 90-367-1434-6. [citováno 2010-04-05]. Dostupné z: <<http://irs.ub.rug.nl/ppn/229410448>>
- [25] TAM, K. C. a E. WYN-JONES. Insights on polymer surfactant complex structures during the binding of surfactants to polymers as measured by equilibrium and structural techniques. *Chemical Society Reviews*. 2006, roč. 35, č. 8, s. 693-709. DOI: 10.1039/b415140m.

- [26] GOHAIN, B., P. M. SAIKIA, S. SARMA, S. N. BHAT a R. K. DUTTA. Hydrophobicity-induced deprotonation of dye in dye-submicellar surfactant systems. *Physical Chemistry Chemical Physics*. 2002, roč. 4, č. 12, s. 2617-2620. DOI: 10.1039/b201274j.
- [27] NAGARAJAN, R.; KALPAKCI, B. Viscometric investigation of complexes between polyethyleneoxide and surfactant micelles. In: *Microdomains in Polymer Solutions*. Springer US, 1985, roč. 4, s. 369-381.
- [28] DHARA, D. a D. O. SHAH. Stability of Sodium Dodecyl Sulfate Micelles in the Presence of a Range of Water-Soluble Polymers: A Pressure-Jump Study. *The Journal of Physical Chemistry B*. 2001, roč. 105, č. 29, s. 7133-7138. DOI: 10.1021/jp003072l.
- [29] PICULELL, L., F. GUILLEMET, K. THURESSON, V. SHUBIN a O. ERICSSON. Binding of surfactants to hydrophobically modified polymers. *Advances in Colloid and Interface Science*. 1996, roč. 63, s. 1-21. DOI: 10.1016/0001-8686(95)00272-3
- [30] PICULELL, L., K. THURESSON a B. LINDMAN. Mixed solutions of surfactant and hydrophobically modified polymer. *Polymers for Advanced Technologies*. 2001, roč. 12, č. 1-2, s. 44-69. DOI: 10.1002/1099-1581(200101/02)12:1/2<44::aid-pat944>3.0.co;2-o.
- [31] LIU, Z., Y. SHANG, J. FENG, Ch. PENG, H. LIU a Y. HU. Effect of Hydrophilicity or Hydrophobicity of Polyelectrolyte on the Interaction between Polyelectrolyte and Surfactants: Molecular Dynamics Simulations. *The Journal of Physical Chemistry B*. 2012, roč. 116, č. 18, s. 5516-5526. DOI: 10.1021/jp212089d.
- [32] YIN, D.-S., W.-Y. YANG, Z.-Q GE a Y.-J. YUAN. A fluorescence study of sodium hyaluronate/surfactant interactions in aqueous media. *Carbohydrate Research*. 2005, roč. 340, č. 6, s. 1201-1206. DOI: 10.1016/j.carres.2005.01.017.
- [33] THALBERG, K. a B. LINDMAN. Interaction between hyaluronan and cationic surfactants. *The Journal of Physical Chemistry*. 1989, roč. 93, č. 4, s. 1478-1483. DOI: 10.1021/j100341a058.
- [34] THALBERG, K. a B. LINDMAN. Gel formation in aqueous systems of a polyanion and an oppositely charged surfactant. *Langmuir*. 1991, roč. 7, č. 2, s. 277-283. DOI: 10.1021/la00050a013.
- [35] THALBERG, K., B. LINDMAN a G. KARLSTROEM. Phase behavior of a system of cationic surfactant and anionic polyelectrolyte: the effect of salt. *The Journal of Physical Chemistry*. 1991, roč. 95, č. 15, s. 6004-6011. DOI: 10.1021/j100168a053.
- [36] THALBERG, K., B. LINDMAN a G. KARLSTROEM. Phase behavior of systems of cationic surfactant and anionic polyelectrolyte: influence of surfactant chain length

- and polyelectrolyte molecular weight. *The Journal of Physical Chemistry*. 1991, roč. 95, č. 8, s. 3370-3376. DOI: 10.1021/j100161a073.
- [37] THALBERG, K., B. LINDMAN a G. KARLSTROEM. Phase diagram of a system of cationic surfactant and anionic polyelectrolyte: tetradecyltrimethylammonium bromide-hyaluronan-water. *The Journal of Physical Chemistry*. 1990, roč. 94, č. 10, s. 4289-4295. DOI: 10.1021/j100373a075.
- [38] HALASOVÁ, T. Interakce a agregace v systémech hyaluronan-aminokyseliny-tenzid. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2009. 60 s. Vedoucí diplomové práce doc. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
- [39] HALASOVÁ, T., J. KROUSKÁ, F. MRAVEC a M. PEKAŘ. Hyaluronan-surfactant interactions in physiological solution studied by tensiometry and fluorescence probe techniques. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 2011, roč. 391, č. 1-3, s. 25-31. DOI: 10.1016/j.colsurfa.2011.05.035.
- [40] CROSS, J. a E. J. SINGER. *Cationic surfactants: analytical and biological evaluation*. New York: M. Dekker, 1994, 373 s. ISBN 08-247-9177-0.
- [41] SHEN, J., R. HE, H. YU, L. WANG, J. ZHANG, X. SUN, J. LI, W. HAN a L. XU. Biodegradation of 2,4,6-trinitrophenol (picric acid) in a biological aerated filter (BAF). *Bioresource Technology*. 2009, roč. 100, č. 6, s. 1922-1930. DOI: 10.1016/j.biortech.2008.10.018.
- [42] SHEIHAM, I. a T. A. PINFOLD. The spectrophotometric determination of cationic surfactants with picric acid. *The Analyst*. 1969, roč. 94, č. 1118, s. 387-388. DOI: 10.1039/an9699400387.
- [43] KAWASE, J. a M. YAMANAKA. Continuous solvent-extraction method for the spectrophotometric determination of cationic surfactants. *The Analyst*. 1979, roč. 104, č. 1241, s. 750-755. DOI: 10.1039/an9790400750.
- [44] WANG, L. a D. LANGLEY. Determining Cationic Surfactant Concentration. *Industrial*. 1975, roč. 14, č. 3, s. 210-212. DOI: 10.1021/i360055a601.
- [45] KUBÍČEK, V.; NĚMCOVÁ, K. Study of the interaction phenomena of cetyltrimethyl-ammonium bromide, cetylpyridinium chloride and benzethonium chloride with CI Acid Orange 52 and picric acid by two spectral methods. *Dyes and pigments*, 2006, roč. 68, č. 2-3, s. 183-189. DOI: 10.1016/j.dyepig.2005.01.006
- [46] SIMÓN, M. M. BONILLA, A. D. E. CÓZAR a L. M. P. DIEZ. Spectrophotometric determination of cationic surfactants in frozen and fresh squid by ion-pair formation with Methyl Orange. *The Analyst*. 1990, roč. 115, č. 3, s. 768-773. DOI: 10.1039/an9901500337.

- [47] WURSTER, D. E. a P. WERAWATGANONE. Influence of the polymer-micelle interaction on micelle-substrate binding. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2009, roč. 99, č. 3, s. 1440-1451. DOI: 10.1002/jps.21889.
- [48] ŠEJNOHOVÁ, M. *Studium interakcí hyaluronan-tenzidy dialyzační technikou*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2014. 64 s. Vedoucí diplomové práce prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc
- [49] GOHAIN, B., P. M. SAIKIA, S. SARMA, S. N. BHAT, R. K. DUTTA a M. HATANO. Hydrophobicity-induced deprotonation of dye in dye-submicellar surfactant systems. *Physical Chemistry Chemical Physics*. 2002, roč. 4, č. 12, s. 1-121. DOI: 10.1007/bfb0071112.
- [50] DUTTA, R. K., S. N. BHAT, R. L. REEVES a S. A. HARKAWAY. Interaction of Methyl Orange with Submicellar Cationic Surfactants. *Bulletin of the Chemical Society of Japan*. 1993, roč. 66, č. 9, s. 819-834. DOI: 10.1007/978-1-4613-4157-4_19
- [51] BUWALDA, R. T., J. M. JONKER a J. B. F. N. ENGBERTS. Aggregation of Azo Dyes with Cationic Amphiphiles at Low Concentrations in Aqueous Solution. *Langmuir*. 1999, roč. 15, č. 4, s. 1083-1089. DOI: 10.1021/la980824i.
- [52] KOPLÍK R. *Molekulová absorpční spektrometrie v ultrafialové a viditelné oblasti*. [online], [cit. 2015-04-24]. Dostupné z: http://web.vscht.cz/~koplikr/UV_VIS_spektrometrie.pdf
- [53] ROUESSAC, F. a A. ROUESSAC. *Chemical analysis: modern instrumentation methods and techniques*. 2nd ed. Chichester: John Wiley, 2007. 574 s. ISBN 978-0-470-85903-2.
- [54] HIGSON, S. P. *Analytical chemistry*. Oxford: Oxford University Press, 2004. 453 s. ISBN 978-0-19-850289-0.

7 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

A	absorbance
CAC	kritická agregační koncentrace
CD44	specifický receptor pro hyaluronan
CMC	kritická micelární koncentrace
CTAB	cetyltrimethylammonium bromide
Da	dalton
DNA	deoxyribonukleová kyselina
g	gram
Hya	hyaluronan
kDa	kilodalton
M	$\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$
mM	$\text{mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$
ml	mililitr
mg/kg	miligram na kilogram
MPMC	hydroxypropylmethyl celulosa
Mr	molekulová hmotnost
n	látkové množství
nm	nanometr
NMR	nukleární magnetická rezonance
PAL	povrchově aktivní látky
PEO-SDS	polyethylenglykol-dodecylsulfát sodný
PIX	iontově párová extrakce
PVP-SDS	polyvinylpyrrolidone-dodecylsulfát sodný
RHAMM	specifický receptor pro hyaluronan
rpm	otáčky za minutu
SANS	maloúhlový rozptyl neutronů
SDS	dodecylsulfát sodný
TLC	tenkovrstvá chromatografie
Triton X-100	polyoxyethylen(9,5)oktylfenol
tzv.	takzvaný
UV-VIS	ultrafialová a viditelná oblast elektromagnetického spektra