



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

STANOVENÍ ADITIV VE VÍCESLOŽKOVÉM SYSTÉMU PRO ELEKTROSPINNING

DETERMINATION OF ADDITIVES IN MULTICOMPONENT ELECTROSPINNING SYSTEMS

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE
BACHELOR'S THESIS

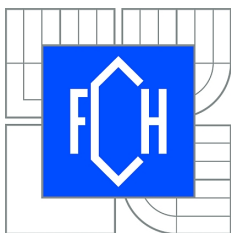
AUTOR PRÁCE
AUTHOR

BARBORA GAJDOVÁ

VEDOUCÍ PRÁCE
SUPERVISOR

Ing. Kateřina Knotková, Ph.D.

BRNO 2015



Zadání bakalářské práce

Číslo bakalářské práce: **FCH-BAK0929/2014** Akademický rok: **2014/2015**
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie
Student(ka): **Barbora Gajdová**
Studijní program: Chemie a chemické technologie (B2801)
Studijní obor: Chemie pro medicínské aplikace (2808R031)
Vedoucí práce **Ing. Kateřina Knotková, Ph.D.**
Konzultanti: prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.

Název bakalářské práce:

Stanovení aditiv ve vícesložkovém systému pro elektrospinnig

Zadání bakalářské práce:

1. Rešerše – nanovlákná z hyaluronanu, chemické vlastnosti užitých polymerů, UV Vis stanovení aditiv,
2. Metody – elektrospinning, stanovení aditiv pomocí UV-Vis spektrofotometrie,
3. Experimentální část – příprava nanovláknenných vrstev s aditivou metodou elektrostatického zvlákňování, příprava roztoků, analýza vláknenných vrstev a obsah aditiv
4. Vyhodnocení výsledků a diskuse, porovnání s předchozími výsledky

Termín odevzdání bakalářské práce: 22.5.2015

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

Barbora Gajdová
Student(ka)

Ing. Kateřina Knotková, 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 bakalářská práce pojednává o výrobě nanovláken ze směsi polymerů, popisuje metody přípravy a výroby nanovláken pomocí přístroje 4SPIN®. Experimentální část se zabývá inkorporací aditiv do zvlákněné vrstvy. Byla použita barviva brilliant green, erytrosin, riboflavin a eriochromová čerň. Množství aditiv ve vrstvě bylo měřeno pomocí UV-VIS spektrofotometrie.

ABSTRACT

This bachelor thesis deals with methods of producing nanofibres from mixture of different polymers. Different methods of preparation and production nanofibres by 4SPIN® are described in theoretical part. Experimental part deals with incorporation of additives into fibred layer. There were four different dyes used in this thesis: brilliant green, erythrosine, riboflavin and eriochrom black. UV – VIS spectrophotometry was used to measure volume of additives in nanofiber layer.

KLÍČOVÁ SLOVA

kyselina hyaluronová, nanovlákná, aditiva, polyvinylalkohol, elektrospinning

KEY WORDS

hyaluronic acid, nanofibres, additives, polyvinyl alcohol, electrospinning

GAJDOVÁ, B. Stanovení aditiv ve vícesložkovém systému pro elektrospinnig. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2015. 33 s. Vedoucí bakalářské práce Ing. Kateřina Knotková, Ph.D..

PROHLÁŠENÍ

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

.....

podpis studenta

Poděkování

Tímto bych chtěla poděkovat Ing. Kateřině Knotkové, PhD. za její trpělivost a ochotu při vedení této práce a firmě Contipro Group za umožnění měření v jejich prostorách.

Obsah

1. Úvod.....	6
2. Teoretická část.....	7
2.1. Historie	7
2.2. Metoda elektrospinningu	7
2.3. Přístroj 4SPIN®.....	8
2.3.1. Typy emitorů přístroje 4SPIN®.....	9
2.3.2. Typy kolektorů	10
2.4. Obecné využití nanovláken	11
2.5. Polymery.....	12
2.5.1. Kyselina hyaluronová (HA)	12
2.5.2. Polyethylenoxid.....	13
2.5.3. Polyvinylalkohol	13
2.5.4. Karboxymethylcelulóza	14
2.6. Aditiva	14
2.6.1. Eriochromová čern	15
2.6.2. Brilantní zeleň (Brilliant green)	15
2.6.3. Erytrosin	15
2.6.4. Riboflavin.....	16
3. Experimentální část.....	17
3.1. Materiály a přístroje.....	17
3.1.1. Použité chemikálie	17
3.1.2. Použité přístroje.....	17
3.2. Pracovní postupy	17
3.2.1. Příprava zásobních roztoků	17
3.2.2. Příprava pracovních roztoků	18
3.2.3. Zvlákňování roztoků	18

3.2.4.	Příprava vzorků pro UV-VIS spektrofotometrii.....	19
3.2.5.	Příprava roztoků pro kalibrační řady.....	19
3.2.6.	Postup analýzy vzorků	19
4.	Výsledky a diskuze.....	21
4.1.	Kalibrační řada	21
4.2.	Vyhodnocení obsahu aditiv	22
4.3.	Závislost na PEO	25
5.	Závěr.....	27
6.	Seznam zkratk	28
7.	Seznam použitých zdrojů	29
8.	Přílohy	31

1. Úvod

Nanotechnologie jsou v současné době jednou z nejpoužívanějších oblastí ke zkoumání a jsou aplikovány ve všech základních technických vědeckých disciplínách. Nanotechnologie, nanomateriály, nano-, jsou všechno názvy, které mají společný znak – velikost částic v jednom rozměru se nachází v rozpětí 1 – 100 nm. Tyto částice se mohou skládat z kovových či nekovových materiálů, organických či anorganických, z roztoků či pevných látek. Nejdůležitější charakteristikou nanočástic je jejich obrovský povrch v porovnání s částicemi větších rozměrů. Tento znak má výrazný pozitivní efekt na jejich fyzikální a mechanické vlastnosti v porovnání s konvenčními materiály. Těchto vlastností se hojně začíná využívat v medicíně, kde mohou hrát významnou roli při urychlení hojení ran. V současné době dochází k pomalému zavádění nanotechnologií do praxe a jejich průmyslové výrobě.

2. Teoretická část

2.1. Historie

Mezi průkopníky v oboru nanotechnologií patřil Richard P. Feynman, nositel Nobelovy ceny za fyziku, se svojí slavnou řečí: „Tam dole je spousta místa.“ Caltech 29. 12. 1959 [1]. Zavedl také samotný pojem *nanotechnologie*. Tento pojem představoval souhrn všech elementů, jejichž velikost nepřesahovala 1 μm . Využití nanotechnologií, ač nevědomky, se ovšem datuje hluboko do starověku. Nejznámějším příkladem jsou tzv. Lykurgovy poháry pocházející ze 4. století našeho letopočtu. Tyto poháry v sobě obsahovaly nanočástice zlata a stříbra ve formě krystalů. Pokud byl zdroj světla umístěn dovnitř poháru, jevil se červený, zatímco při osvětlení z vnějšku měl barvu zelenou [2]. První patent se objevil již v roce 1902 a obsahoval popis sprayování v elektrickém poli [3]. Tento patent můžeme považovat za počátek elektrospinningu. Další důležitý patent pochází z roku 1934, kdy Anton Formhals vynalezl přístroj, který pro tvorbu vláken využíval elektrostatické odpudivé síly mezi povrchovými náboji [5]. Pojem „elektrospinning“ jako takový popularizoval až D. Reneker v roce 1996 [4]. V dnešní době jednou z interdisciplinárních sfér, která začíná sbírat plody svojí činnosti, je rozhraní mezi biologickými vědami a nanotechnologiemi. Velké pozornosti se nanovláken dostává v tkáňovém inženýrství a genové terapii.

2.2. Metoda elektrospinningu

Stejně jako další metody tvorby nanovláken, je elektrospinning založen na jednotvárném natahování viskoelastického proudu roztoku zvláknitelného polymeru. Elektrospinningem lze připravit vlákna i z biologicky rozložitelných materiálů a tudíž nejsou pro ni takovou zátěží jako např. plasty. V současné době se pro tvorbu nanovláken využívají velmi sofistikovaná zařízení, v jejichž výrobě a konstrukci patří Česká republika mezi špičku. Na Technické univerzitě Liberec se podíleli na vzniku přístroje Nanospider®, firma Contipro Biotech vlastní patent na výrobu přístroje zvaného 4SPIN®.

Základní elektrospinningový systém obsahuje tři části:

- Zdroj vysokého napětí
- Jehlu (zvláknující trysku)
- Kolektor (sběrač)

Vysoké napětí (desítky kV) je připojeno na konec kapiláry obsahující tekutý roztok. Jakmile se zvýší intenzita elektrického pole, hemisférický povrch kapaliny na konci kapiláry se prodlouží a vytvoří kónický tvar známý jako Taylorův kužel. Dalším zvýšením elektrického pole dosáhneme kritické hodnoty, při které repulsivní elektrostatické síly překonají povrchové napětí a nabitě vlákno vytryskne ven z Taylorova kužele směrem ke kolektoru. Vlákno polymerního roztoku prochází procesem destability a prodlužování, během kterého se vypaří rozpouštědlo. Při vhodném uspořádání trysky, kolektoru a správné volbě rozpouštědla dopadají na kolektor již suchá vlákna. Uzemněný kolektor pak umožní vybití náboje, který na sobě nese vytahovaná hmota. Při klasickém nastavení dopadají vlákna na kolektor náhodně. V případě, kdy požadujeme přesné parametry výsledné vrstvy, je výhodnější či dokonce nezbytně nutné dosáhnout pravidelné a uspořádané struktury vláken [6].

2.3. Přístroj 4SPIN®

4SPIN® C4S LAB1 je stolní zařízení sloužící k přípravě nanovláken z roztoků polymerů. Umožňuje vytvářet nanovlákná nejen z běžných (syntetických) materiálů, ale také z přírodních polymerů - například kyseliny hyaluronové. Výroba nanovláknenných vrstev je založená na technice elektrospinningu (zvlákňování v elektrostatickém poli). Tento princip je možné kombinovat s metodou elektroblowingu (zlepšení efektivity díky proudění vzduchu) nebo elektrosprayingu (produkce nano a mikročástic namísto nanovláken). Přístroj je vybaven řadou elektrod - kolektorů a emitörů. Dle typu zvoleného kolektoru pak lze vytvářet náhodné i pravidelné nanovláknenné vrstvy s různým stupněm uspořádání [6].

Ovlivnění uspořádání nanovláken ve vrstvě:

- Změna tvaru a uspořádání sběrné elektrody (otáčivý válec, dva vodivé pásy, diskový kolektor)
- Změna tvaru a uspořádání zvlákňovací trysky
- Seskupení mnoha jehel – tvorba více vláken najednou [6]

2.3.1. Typy emitorů přístroje 4SPIN®

E1 – jednoduchá tryska

Tento emitor je primárně používán při zkoušení nových roztoků a materiálů, kdy se optimalizuje morfologie vláken a různé vlastnosti roztoku. Díky malé ploše lze roztok velmi snadno zvláknit. Nevýhodou je tvorba jen jednoho Taylorova kuželu, výrobnost je tedy velmi nízká. Kolem trysky lze připojit nástavec, kterým je přiváděn suchý vzduch na použití elektroblowingu.



Obrázek 1 Jednoduchá tryska

E2 – multitryska

Tento typ emitoru je složen ze šesti jednoduchých jehel. Díky tomu je významně zvýšena výrobnost. Nevýhodou je však obtížné čištění a nemožnost zapojení elektroblowingu.

E3 – bezjehlová tryska = trn

Trn sice oplývá nižší schopností vláknit než jehlové elektrody, ale v jiných ohledech je dalece převyšuje. Vyznačuje se značnou výrobností, jednoduchou konstrukcí a snadnou omyvatelností. Typické dávkování pro tento emitor je 60-80 $\mu\text{l}/\text{min}$. Navíc k němu lze připojit nástavec na elektroblowing.



Obrázek 2: bezjehlová tryska.

E4 – kruhová bezjehlová multitryska

Na povrch emitoru je přiváděno relativně velké množství roztoku. Početné množství kuželů se tvoří po obvodu. Tento emitor se často používá na optimalizaci roztoku a vlastností materiálů, kdy hlavním cílem je maximální výtěžnost v nejkratším čase.

E5 – bezjehlová lineární multitryska

Tento typ emitoru byl v bakalářské práci používán nejčastěji. Je založen na předchozím typu – bezjehlové multitrysce a má všechny její výhody. Lineární tvar trysky umožňuje dosažení maximální homogenity zvlákněného vzorku. Elektrobloving je možný bez přídavku speciálního nástavce.

2.3.2. Typy kolektorů

Typ kolektoru velmi ovlivňuje strukturu a orientaci vytvořených nanovláken.

- C1 – statický

Statický kolektor byl v bakalářské práci používán nejčastěji. Jedná se o základní kolektor, na který je možné pomocí magnetů připevnit vodivý či nevodivý substrát (např. aluminiová folie, silikonový papír, tkaná textilie). Výsledná vrstva nanovláken má velký povrch, ale vlákna jsou neuspořádaná.

- C2 – statický dělený

Tento typ kolektoru vytváří vlákna seřazená dle jedné osy. Stupeň uspořádanosti lze měnit v závislosti na technických parametrech kolektoru. Výhodou je, že nemá žádné pohyblivé části a je jednoduchý na konstrukci.

- C3 – rotační kontinuální

Rotační kolektor má tvar bubny a jeho povrch je ještě větší než u kolektoru C1, a proto, je vhodný pro zvláknování většího množství roztoku. V závislosti na zvyšující se rychlosti otáček se zvyšuje také uspořádanost vyrobených vláken.

- C4 – rotační dělený

Rotační dělený kolektor je složen z tenkých kovových drátů uspořádaných ve stejném směru a ve stejné vzdálenosti od středu otáčení. Díky této konstrukci jsme schopni vyrobit extrémně uspořádaná nanovlákná.



Obrázek 3 C1-C4 kolektory

2.4. Obecné využití nanovláken

Za nanovlákná je považováno vše, co má průměr menší než 1 μ m (zmněno v kapitole 2.1) a pokud délka nřkolinásobně převyšuje šířku. Běžné průměry vláken dosahují hodnot mezi 50 až 500 nm, i když při elektrospinningu mohou vznikat vlákna v tloušťce od dvou nanometrů do několika mikrometrů. Pro optický mikroskop jsou tato vlákna neviditelná, lze je pozorovat pouze pod rastrovacím elektronovým mikroskopem (SEM).

I přes malé rozměry se rozmáhá užití nanovláken v průmyslu. Hlavními oblastmi využití nanovláken jsou filtrační systémy (antibakteriální filtry), bariérové materiály (definovaná velikost pórů – propustnost), hygiena (absorpční výrobky – pleny, utěrky), Z pohledu medicíny jsou nanovlákná využívána např. ve farmacii a tkáňovém inženýrství. Mezi nejvýznamnější oblasti výzkumu využití nanovláken a nanomateriálů patří tkáňové inženýrství, regenerační medicína a systémy uvolňování léčiv. V tkáňovém inženýrství se předpokládá náhrada živé tkáně uměle syntetizovanou tkání nesoucí všechny znaky a atributy tkáně původní [7]. Velká plocha nanovláken a jejich porozita z nich činí ideální matrix, na kterém se zachytí rostoucí buňky náhradní tkáně. Nanovlákná použitá v tkáňovém inženýrství by měla být biokompatibilní a biodegradovatelná, netoxická, sterilizovatelná a mechanicky odolná. Vzhledem k těmto vysokým nárokům v současné době existuje pouze pár polymerů, které jsou vhodné pro výrobu těchto nanovláken. Dalším slibným oborem pro využití je onkologie – cílená likvidace nádorů. Využívá se absorpční schopnosti nanočástic cíleně

usazených v nádorových tkáních – po ozáření infračerveným, laserovým nebo vysokofrekvenčním elektromagnetickým zářením dochází k destrukci nádorové tkáně.

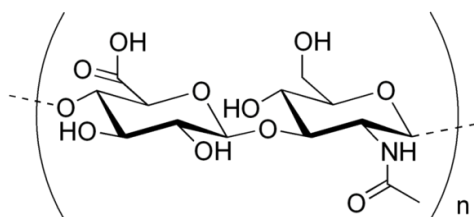
2.5. Polymery

2.5.1. Kyselina hyaluronová (HA)

Jedná se o polymer-polysacharid, složený z opakujících se disacharidových jednotek (kyselina *D*-glukoronová a *N*-acetyl-*D*-glukosamin). Nejčastěji se v organismu vyskytuje ve formě směsi hyaluronanu sodného a kyseliny hyaluronové. Je to tělu vlastní látka – není cytotoxická, imunogenní ani teratogenní. Je nezbytnou komponentou extracelulárního matrixu. Buňky v závislosti na jeho koncentraci hyaluronan buď syntetizují nebo katabolizují [8]. Hyaluronan je v lidském těle důležitý vzhledem k jeho vlastnostem. Celkově je extrémně hydrofilní molekula – výborný humektant a lubrikant. Skládá se z hydrofobní a hydrofilní části – jeho molekula tak dostává specifický tvar „stočené“ pásky.

Dělení hyaluronové kyseliny dle molekulové hmotnosti:

- Vysokomolekulová hyaluronová kyselina, tzn. více než 1 000 kDa, nemá extra biologickou funkci. Používá se jako kloubní lubrikant, k hojení ran, při očních operacích a působí protizánětlivě,
- Hyaluronan 200 - 1 000 kDa, chrání před UV zářením, je nosič biologicky aktivních látek a podněcuje účinek cytostatik,
- Hyaluronan 10 - 200 kDa, podporuje produkci melaninu a hojení diabetických defektů, aktivuje imunitní buňky,
- Hyaluronan pod 10 kDa má negativní účinky na lidský organismus, způsobuje apoptózu nádorových buněk [9].

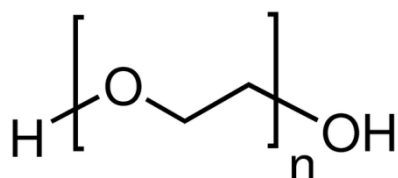


Obrázek 4 Strukturní jednotka kyseliny hyaluronové

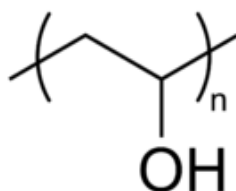
Příprava nanovláken formou elektrospinningu z vodných roztoků hyaluronanu je velmi obtížná. Jeho hlavní překážkou je neobvykle vysoká viskozita a povrchové napětí. Použití PVA a povrchově aktivních látek vedlo k výraznému snížení povrchového napětí a zároveň, v případě alkoholů, také k mnohem rychlejšímu odpařování rozpouštědla během zvlákňování [12].

2.5.2. Polyethylenoxid

Známý také jako polyethylglykol (PEG) nebo polyoxyethylen v závislosti na molekulové hmotnosti polymeru (300-10 000 000 Da). PEO a PEG se liší fyzikálními vlastnostmi – např. viskozitou, ale jejich chemické vlastnosti jsou téměř totožné. PEO se vyrábí pomocí suspenzní polymerace – je nezbytné udržet rostoucí polymerní řetězec v roztoku ve směru polykondenzačního procesu. Reakce je katalyzována pomocí hořečnatohlinito- nebo vápenato-organoprvkových sloučenin. Polymer je využíván jako lubrikující a coatovací vrstva pro různé povrchy ve vodném i nevodném prostředí [11]. Také se velmi často využívá jako stacionární fáze pro plynovou chromatografii.



Obrázek 6: Vzorec polyethylen oxidu.



Obrázek 5 Strukturální jednotka polyvinyl alkoholu

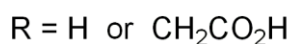
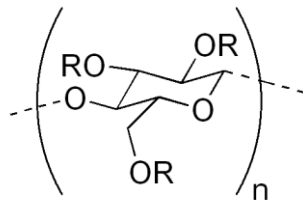
2.5.3. Polyvinylalkohol

Polyvinylalkohol (PVA) je ve vodě rozpustný, syntetický a biodegradabilní polymer. Jeho odolnost vůči rozpouštědlům závisí na střední molekulové hmotnosti, teplotě a také na obsahu nezhydrolyzovaného polyvinylacetátu. Jeho vlastnosti se mění

podle počtu vinylacetátových jednotek. PVA má skvělé fyzikální vlastnosti např. viskozitu, tvorbu filmů, emulzifikaci, adhezni sílu či flexibilitu. Díky jeho vlastnostem se začalo zkoumat, jestli kombinací PVA a jiného polymeru (chitosan, kyselina hyaluronová, kolagen) nedojde ke zlepšení vlastností zkoumaného polymeru. Předpokládá se využití těchto systémů pro výrobu scaffoldů [12].

2.5.4. Karboxymethylcelulóza

Karboxymethylcelulóza (CMC) je derivát celulózy, který obsahuje karboxymethylové skupiny vázané na některé hydroxylové skupiny glukopyranozového monomeru. Připravuje se alkalicky katalyzovanou reakcí celulózy s kyselinou chloroctovou. Funkční vlastnosti CMC závisí na stupni substituce hydroxylových skupin. CMC se používá v potravinářském průmyslu pod označením E466 jako stabilizátor, zahušťovadlo a modifikátor viskozity. Dále má velmi široké využití v medicíně, zvláště v kombinaci s kyselinou hyaluronovou, jakožto adhezni bariéra zabraňující infekcím a napomáhající hojení [13].



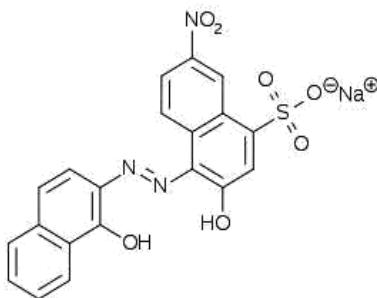
Obrázek 7 Strukturální jednotka karboxymethylcelulózy

2.6. Aditiva

Cílem práce bylo stanovit obsah jednotlivých aditiv v nanovlákněné vrstvě. Pro navržený experiment byla zvolena čtyři aditiva - barviva, u kterých se očekávalo, že se systémem chemicky neutrálního PVA a anionického polymeru hyaluronanu, budou různě reagovat. Z toho důvodu byla vybrána eriochromová čern jako anionické barvivo, brilantní zeleň, jakožto barvivo nesoucí kladný náboj, a erytrosin s riboflavinem – zastupující neutrální barviva, ovšem s různou mírou hydrofobicity a schopností tvořit komplexy s daným polymerovým systémem.

2.6.1. Eriochromová čerň

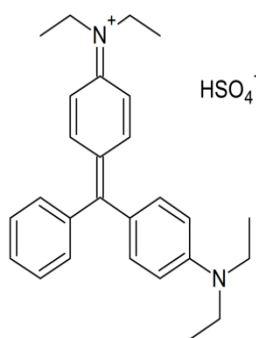
Eriochromová čerň (EC) je azolátka používaná jako indikační činidlo v chelatometrii. Je dobře rozpustná ve vodě a v ethanolu. Obsahuje dva dusíkaté donorové atomy a dvě hydroxy skupiny, které se stávají donory elektronů až po deprotonizaci. Má tři barevné přechody vínová – modrá – oranžová. Modrá forma se vyskytuje při rozsahu pH 7,5-10,5. Používá se jako indikátor při titraci EDTA a k důkazu kovů v půdě.



Obrázek 8 Struktura eriochromové čerňi

2.6.2. Brillantní zeleň (Brilliant green)

Patří mezi triarylmethanové barviva. Velmi se podobá malachitové zeleni. Je efektivní proti G+ bakteriím, má také antiseptické vlastnosti. Roztok 1 % brilantní zeleně a elastického kolodia v ethanolu je používán jako tekutý obvaz. Po požití je toxická a způsobuje zvracení. Dříve byla používána na barvení hedvábí a bavlny. Vzhledem k její toxicitě se v dnešní době používá v průmyslu pouze ve východní Evropě a v zemích bývalého Sovětského svazu [10].

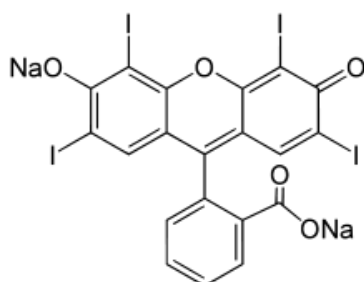


Obrázek 9 Vzorec brilliant green

2.6.3. Erytrosin

Jedná se o disodnou sůl 2,4,5,7-tetraiodofluoresceinu. Používá se jako potravinářské barvivo pod označením E 127, součást cartridge do tiskáren nebo jako činidlo na odhalování

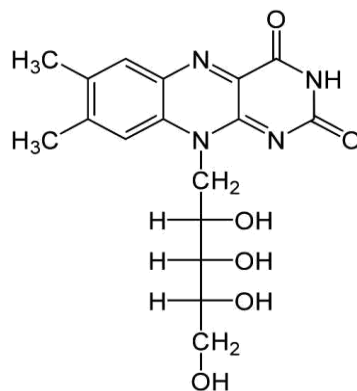
zubního plaku. Ve Spojených státech je zakázána pro použití v potravinovém průmyslu vzhledem k možné spojitosti se vznikem rakoviny [14]. Ve vodě absorbuje při 530 nm.



Obrázek 10 Vzorec erytrosinu

2.6.4. Riboflavin

Neboli vitamin B2, v potravinářském průmyslu pod označením E 101, je žluté barvivo špatně rozpustné ve vodě. Je nemožné se tímto barvivem předávkovat, jelikož se z těla vylučuje v moči. Je součástí kofaktorů flavinadeninmononukleotidu (FAD) a flavinmononukleotidu (FMN). Protože pod UV světlem fluoreskuje, používají se jeho roztoky na kontrolu úniků látek z průmyslových systémů.



Obrázek 11 Vzorec riboflavinu

3. Experimentální část

3.1. Materiály a přístroje

3.1.1. Použité chemikálie

Název	Molekulová hmotnost	Výrobce
Kyselina hyaluronová- HySilk	0,26 MDa	ContiproBiotech
Polyethylen oxid	400 kDa, 4000 kDa	Scientific polymer products, inc.
Erytrosin	879,96 g/mol	Aroco spol. s.r.o.
Eriochromová čern	461,39 g/mol	Penta
Brilliant green	482,63 g/mol	Sigma-Aldrich
Riboflavin	376,36 g/mol	Sigma-Aldrich
Carborxymethylcelulóza		Ashland
Polyvinylalkohol	125 kDa	Scientific polymer products, inc.

3.1.2. Použité přístroje

4SPIN®

Spektrofotometr Varian Cary 100 Conc®

Analytické váhy Mettler Toledo®.

3.2. Pracovní postupy

3.2.1. Příprava zásobních roztoků

Pro zvláknění byly připraveny dva roztoky – A a B. Zásobní roztok hyaluronanu A obsahoval 4 hm. % sušiny skládající se ze směsi polymerů HA/PEO/CMC/PVA v poměru 4,5 : 38,2 : 38,2 : 19,1. Zásobní roztok polymerů byl promícháván a zahříván na 65°C (pro lepší rozpouštění jednotlivých složek) na hřídelové míchačce 12 h.

Zásobní roztok hyaluronanu B obsahoval 5 hm. % sušiny směsi polymerů HA/PEO/CMC/PVA v poměru 4,2 : 1 : 19 : 75,8. PEO byl ve směsi obsažen ve dvou různých molekulových hmotnostech – 400 000 a 4 000 000 Da v poměru 1 : 1. Roztok byl míchán a zahříván na hřídelové míchačce po dobu 12 h.

3.2.2. Příprava pracovních roztoků

Z každého zásobního roztoku bylo odebráno vždy 90 g do nových zásobních lahví. Do těchto lahví bylo poté přidáno 0,1 g barviva (riboflavin, erytrosin, brilantní zeleň nebo eriochromová čern) rozpuštěného v 10 g vody. Pro lepší rozpustnost samotného aditiva, bylo barvivo rozpuštěno zvlášť. Roztok samostatného barviva se nechal vždy min. 12 h třepat na třepače.

3.2.3. Zvlákňování roztoků

Roztoky byly zvlákňeny na přístroji 4SPIN®. Jako zvlákňovací elektroda byla vždy použita lineární bezjehlová multitryska E5 a jako sběrná elektroda statický kolektor C1. Vzdálenost elektrod při zvlákňování roztoků typu A byla vždy 18 cm. U roztoků typu B se v závislosti na podmínkách (vlhkost vzduchu, teplota a použité barvivo) vzdálenost měnila v rozmezí 14 až 20 cm. O každém zvlákňování byl veden protokol.

Tabulka 1 Příklad zvlákňovacího protokolu

Datum zvlákňování	15. 8. 2014
Elektrostatické zvlákňování na 4SPINU	
Teplota [°C]	25
Vlhkost [%RH]	20-40
Zvlákňovací elektroda (emitor)	E5
Sběrná elektroda (kolektor)	C1
Vzdálenost elektrod [cm]	18,16,14
Napětí [kV]	59
Dávkování [μl/min]	200,150
Proudění vzduchu (l/min)	50,00
Proud [μA]	30,00
Podkladová vrstva	silikonový papír
Kontinuálně/staticky	staticky
Počet vrstev	1
Stáří roztoku	2 dny
Metoda měření	UV-VIS riboflavin
čas zvlákňování [min]	40
Elektronický mikroskop	x
Označení vzorku	NJ_20140815_01
Hodnocení:	Nezvlákňeno, roztok přetékal Na kolektoru vlhké skvrny roztoku

3.2.4. Příprava vzorků pro UV-VIS spektrofotometrii

Při kontaktu samonosné nanovlákně vrstvy s vlhkostí dochází k rozpouštění, proto bylo nezbytně nutné pracovat v rukavicích. Pro lepší manipulaci byla nanovláknina přenesena na silikonový papír. Kruhovými nůžkami, o ploše 4,906 m², byly vystříhány vzorky, které měly průměrně 4 mg (přesná navážka byla stanovena). Rozpuštěny byly v přesném množství demi vody, aby celková hmotnost roztoku činila 4 g.

3.2.5. Příprava roztoků pro kalibrační řady

Roztoky jednotlivých kalibračních bodů po naředění obsahovaly 0,15 hm. % sušiny a stejný poměr polymerů jako zásobní roztoky pro zvláknění. 1,25 mg aditiva bylo rozpuštěno v 25 ml demi vody. Po úplném rozpuštění barviva (4 hod na třepačce) byla ze zásobního roztoku připravena kalibrační řada, ke které byl přidán 1 g 0,6 hm. % směsi polymerů (stejná jako v analyzovaných vzorcích) a doplněno rozpouštědlem – demi vodou do celkové hmotnosti 4 g roztoku.

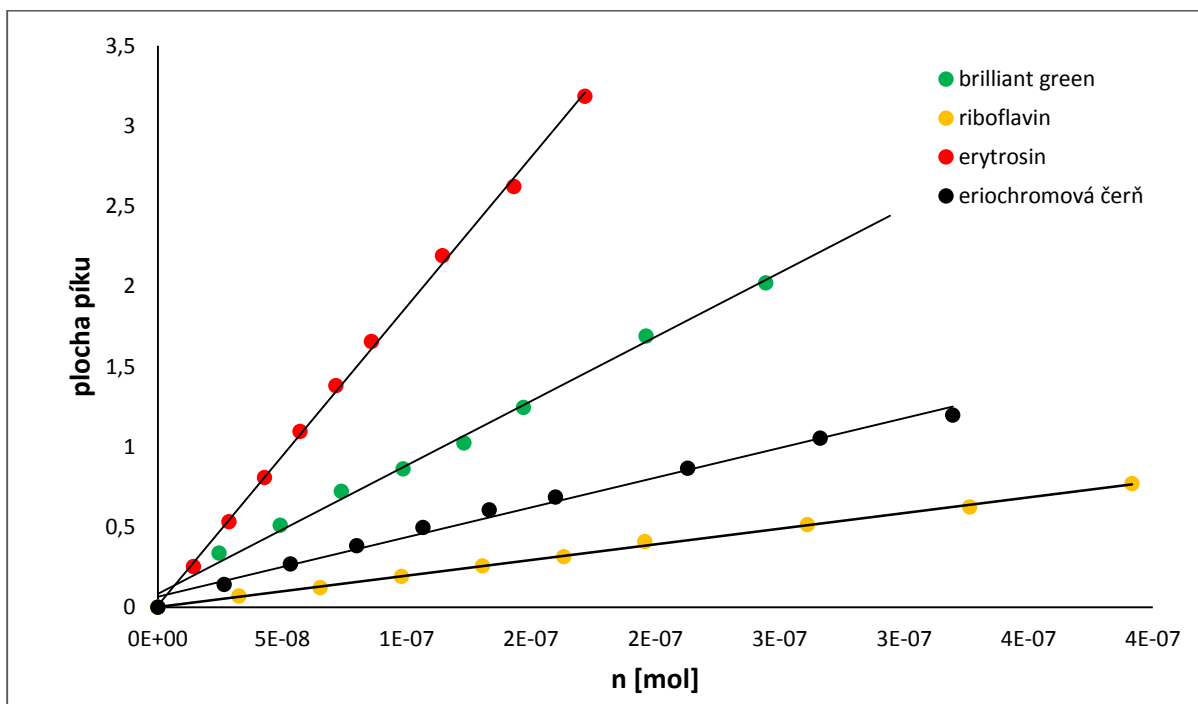
Tabulka 2 Ředění pro kalibrační řadu

Kalibrační bod	Zásobní roztok [g]	0,6 hm. % směs [g]	rozpuštědlo [g]
1	0	1	3
2	0,25	1	2,75
3	0,5	1	2
4	0,75	1	2,25
5	1	1	2
6	1,25	1	1,75
7	1,5	1	1,5
8	2	1	1
9	2,5	1	0,5
10	3	1	0

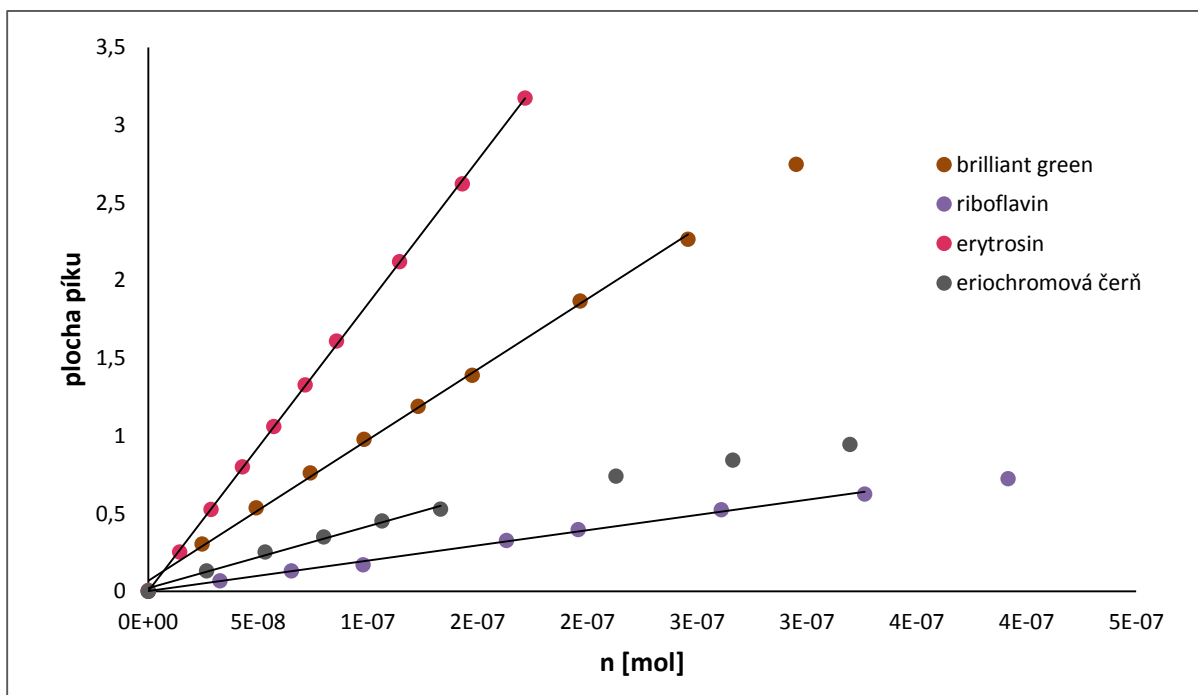
3.2.6. Postup analýzy vzorků

Získané vzorky a kalibrační řada byly proměřeny na UV-VIS spektrofotometru. Spektrum se proměřovalo v rozmezí 200 až 800 nm proti 0,15 hm. % roztoku směsi polymerů (1 kalibrační bod). Pro měření byla použita křemenná kyveta. Data byla poté zpracována v programu Microsoft Office Excel 2010. Hodnoty směrnice a úseku byly získány z kalibračního grafu. Z naměřených dat a z regresivní rovnice kalibrační křivky byly dopočítány procentuální obsahy barviv v jednotlivých vzorcích ve zvlákněné vrstvě oproti původnímu roztoku. Křivky absorpčních spekter byly odečítány mimo oblast absorpce

polymerů, aby s analýzou neinterferovalo jejich absorpční spektrum. Erytrosin dosahoval maxima v rozsahu 600 až 400 nm, riboflavin 530 až 310 nm, brilliant green 720 až 500 nm a eriochromová čerň v rozsahu 775 až 460 nm.



Graf 1 Kalibrační křivky roztok A- absorpance aditiv podle plochy píku – měřeno proti 0,15 hm. % směsi polymerů



Graf 2 Kalibrační křivky roztok B- absorpance aditiv podle plochy píku – měřeno proti 0,15 hm. % směsi polymerů

4. Výsledky a diskuze

Cílem práce bylo připravit nanovláknennou vrstvu s obsahem aditiv a stanovit rozložení aditiva (plošnou homogenitu) v nanovláknenné vrstvě. V analytické části byly připraveny zásobní roztoky jednotlivých aditiv, ze kterých následně byla připravená kalibrační řada. Z kalibrační křivky byl vypočítán obsah aditiva ve vrstvě. Tento experiment byl prováděn se dvěma různými koncentracemi roztoků o různých zastoupeních polymerů, protože se očekávalo, že poměr vláknících polymerů HA/PVA/PEO/CMC bude mít na výtěžnost aditiva vliv. Bakalářská práce navazuje na práci Vojtěcha Linhy z roku 2014 nazvanou Homogenita aditiv v nanovlákních [15]. Porovnáním jeho výsledků s mými bude možné zjistit závislost procentuálního výtěžku aditiva na koncentraci PEO. Kvantitativní stanovení bylo provedeno pomocí metody UV-VIS spektrofotometrie.

4.1. Kalibrační řada

Na přípravu samonosné nanovláknenné vrstvy A byl použit 4 hm. % roztok HA/PVA/PEO/CMC s obsahem 0,08 hm. % aditiva. Obsah aditiva vůči suchému podílu je tedy 1,96 hm. %, což je zároveň i maximální dosažitelná hodnota aditiva ve stanovování aditiva ve zvlákněné vrstvě.

Na přípravu nanovrstvy B byl použit 5 hm. % roztok HA/PVA/PEO/CMC s obsahem 0,1 hm. % aditiva. Obsah aditiva vůči suchému podílu je tedy stejný jako u vrstvy A 1,96 hm. % vztaženo na sušinu.

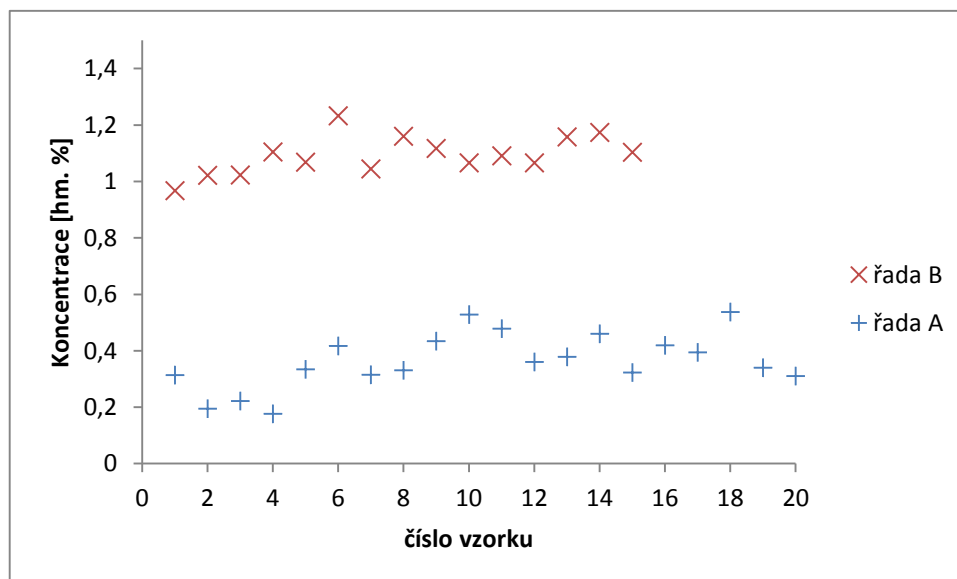
Vzhledem k jinému pozadí při rozpouštění samonosné nanovláknenné vrstvy A a B v demi vodě bylo nutno připravit pro každé stanovení zvlášť kalibrační řadu (celkem 8 kalibračních křivek). Se vzrůstající koncentrací aditiva vzrůstala i plocha absorpčního pásu. Přibližně od 5. kalibračního bodu u eriochromové černi – roztok B dochází k odchylce od linearit, a proto bylo pro získání hodnot směrnic použito pouze prvních 5 bodů kalibrační křivky metodou nejmenších čtverců. Hodnoty kalibračních přímek a korelačních koeficientů jsou uvedeny v Tabulce 3.

Tabulka 3 Tabulka kalibračních přímek plocha píku na koncentraci [mg/g]

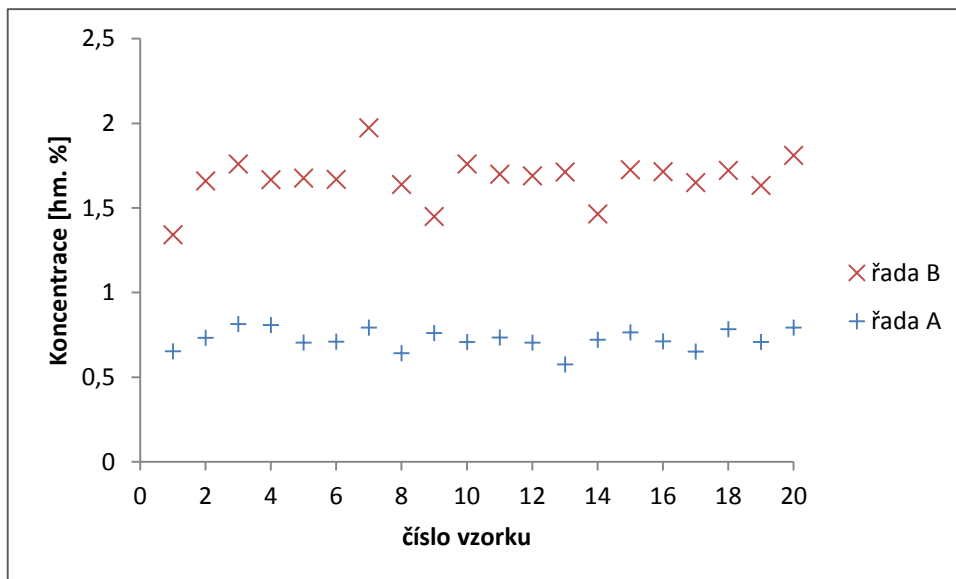
Aditivum	Kalibrační přímky	Roztok A	Roztok B
Erytrosin	Rovnice	$y = 86,168 \cdot x$	$y = 85,82 \cdot x$
	R ²	0,9987	0,9998
Riboflavin	Rovnice	$y = 21,014 \cdot x$	$y = 20,612 \cdot x$
	R ²	0,9983	0,9959
Eriochromová čern	Rovnice	$y = 41,165 \cdot x$	$y = 36,737 \cdot x$
	R ²	0,9937	0,9867
Brilliant green	Rovnice	$y = 70,82 \cdot x$	$y = 85,638 \cdot x$
	R ²	0,9876	0,9915

4.2. Vyhodnocení obsahu aditiv

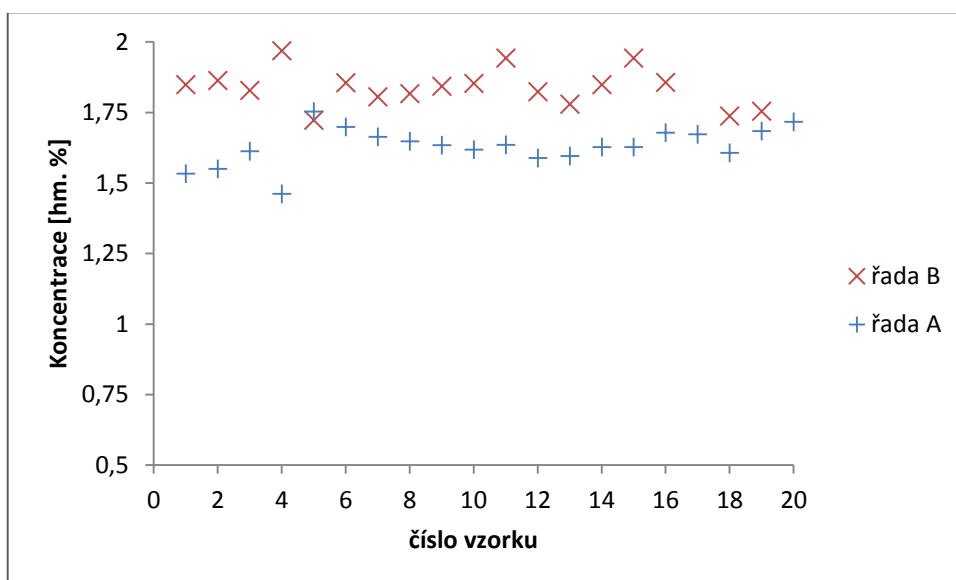
Z hodnot plochy píků vzorků jednotlivých barviv byl pomocí kalibračních přímek určen obsah barviva ve zvlákněné vrstvě. Obsah byl udáván v jednotkách hm. % na sušinu. Každá vrstva byla měřena na 20 různých místech – pouze u brilliant green řady B byla vrstva měřena na 15 místech z důvodu nedostatku materiálu. Je potřeba říct, že všechny vzorky byly měřeny dvakrát pro zpřesnění výsledků. V bakalářské práci budou brány v potaz průměry výsledků z obou měření. Níže jsou uvedeny grafy s výslednou analýzou jednotlivých vzorků.



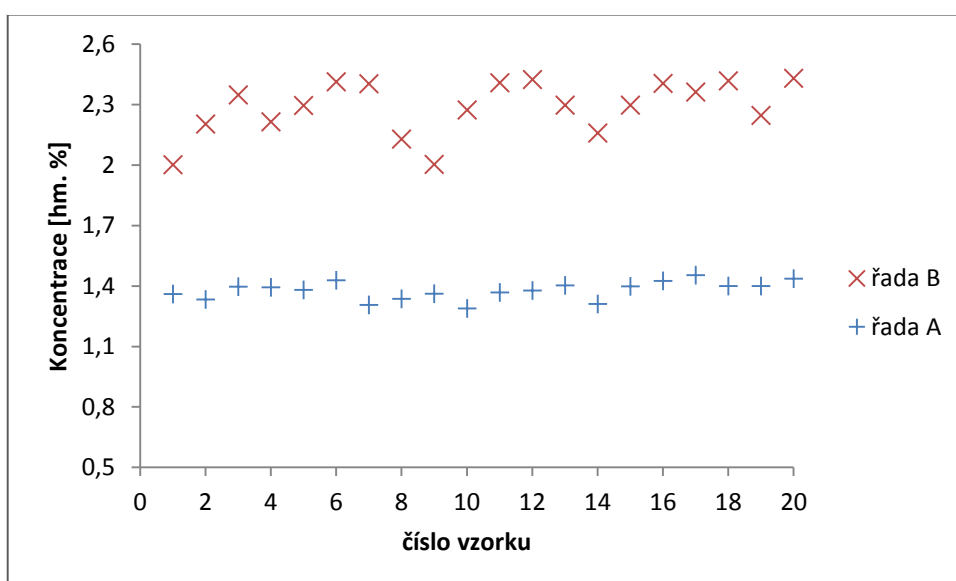
Graf 3 Obsah brilliant green ve vrstvě A a B



Graf 4 Obsah eriochromové černí v řadě A a B



Graf 5 Obsah erytrosinu v řadě A a B



Graf 6 Obsah riboflavinu ve vrstvě A a B

Tabulka 4 Obsah aditiv ve zvlákněné vrstvě

Aditivum		Erytrosin	Riboflavin	Eriochromová čern	Brilliant green
vrstva A	[hm. %]	1,63	1,378	0,723	0,363
	sm. odch. [hm. %]	0,065	0,044	0,06	0,097
	% teor. maxima	83,16	70,28	36,9	18,53
vrstva B	[hm. %]	1,857	2,287	1,67	1,093
	sm. odch. [hm. %]	0,085	0,131	0,131	0,066
	% teor. maxima	94,76	116,66	85,19	55,76

Z porovnání výsledků vidíme, že je výrazný rozdíl mezi vrstvou A a B. Ve všech případech je obsah barviva ve vrstvě B výrazně vyšší. To podporuje naši tezi ohledně závislosti výtěžku na složení nanovlákněné vrstvy, nejspíš koncentraci PEO, jelikož ve vrstvě B je koncentrace PEO nižší.

Nejvyšší obsah aditiva ve vrstvě obsahují vzorky s erytrosinem. Toto barvivo nese záporný náboj, který neinteraguje se směsí polymerů, netvoří komplexy a dobře se rozpouští ve vodě.

Druhý nejvyšší obsah vykazovaly vzorky s riboflavinem. Takto vysoký obsah pravděpodobně souvisí se špatnou rozpustností barviva ve vodě – barvivo se agreguje do větších zrn, které se odtrhují s vláknícím polymerem a poté způsobují vysoký výtěžek. Překročení maximálního množství aditiva je pouze experimentální chyba – můžeme pozorovat i vysokou směrodatnou odchylku.

Aditivum o třetím nejvyšším obsahu byla eriochromová čern. Velká odchylka výsledků a výrazná odchylka hodnot jednotlivých vzorků (naznačující nehomogenitu materiálu) je dána vlastnostmi eriochromové černi – jakožto komplexotvorné barvivo vytváří komplexy s ionty kovů a hyaluronan, jakožto sodná a draselná sůl kyseliny hyaluronové, tyto ionty poskytuje. Barvivo interagovalo s ionty a měnilo své absorpční spektrum. Vliv složení se nejspíš projevuje i v hodnotě pH (nebylo ověřeno), protože změna barvy u eriochromové černi je spojená se změnou pH.

Nejnižší obsah aditiva měla vrstva s brilliant green. Zelené barvivo tvoří s HA komplexy a odbarvuje se. Proto je výtěžek tak nízký. Barvivo by bylo možné stanovit v UV oblasti, ale stanovení by nebylo přesné, jelikož pík HA jej překryje – viz níže grafy z UV-VIS spektrofotometru.

Homogenita vrstvy se zjišťovala pro všechny vzorky z 20 různých míst. Plocha jednoho vzorku byla přesně 4,906 m² a homogenita se určovala jako průměr směrodatných odchylek obsahu aditiva v sušině. Z Tabulka 4 Obsah aditiv ve zvlákněné vrstvě lze vyčíst, že nejhomogenněji byl dispergován erytrosin (průměrná směrodatná odchylka 0,075 hm. %). Ten se jako neutrální molekula rozptýlil rovnoměrně ve zvlákněující kapalině. Nejméně homogenní vrstvou byla vrstva s eriochromovou černí (průměrná směrodatná odchylka 0,096), která reagovala s Na⁺ a K⁺ ionty, které nebyly v roztoku zastoupeny rovnoměrně.

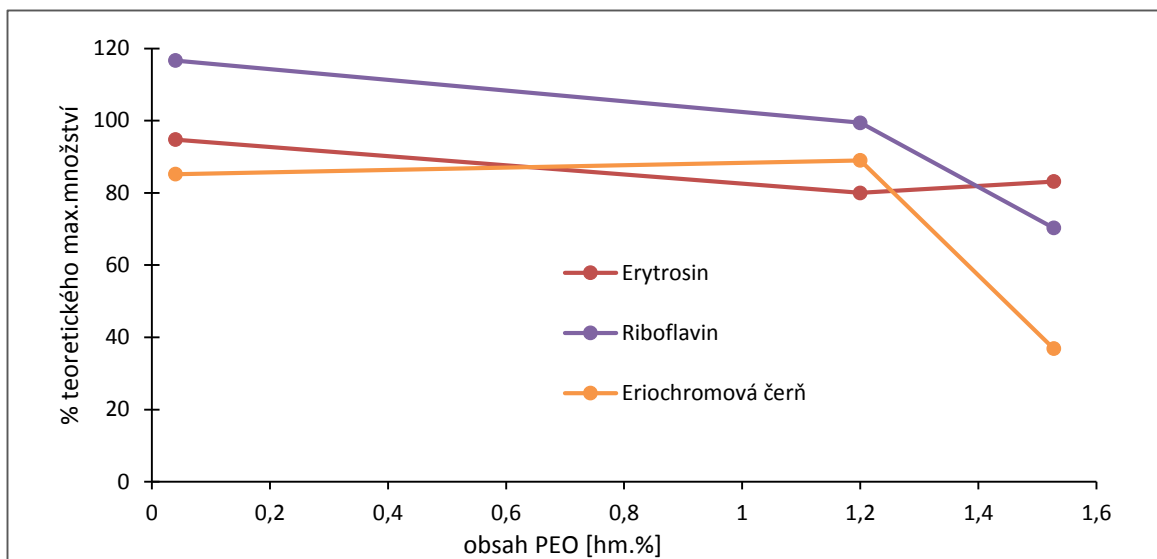
4.3. Závislost na PEO

V řadě A byl PEO zastoupen 38,5 % v sušině – celkově tedy 1,528 hm. % roztoku. V řadě B obsahovala sušina 1 % polyethylenu oxidu – tedy 0,05 hm. % celkové hmotnosti roztoku. Linha ve své práci používal roztok s 20% PEO v sušině – což bylo 1,2 hm. % roztoku. Níže uvedeno srovnání výtěžku na PEO. Linha ve své práci používal barvivo brilliant blue, zatímco v mé práci bylo použito barvivo brilliant green. Obecně lze říci, že se jedná o barviva s velmi podobnými vlastnostmi a strukturou.

Tabulka 5 Porovnání výtěžků s obsahem PEO

Aditivum		Erytrosin	Riboflavin	Eriochromová čern	Brilliant green (blue)
vrstva A 38,5 % PEO	[hm. %]	1,63	1,378	0,723	0,363
	sm.odch [hm. %]	0,065	0,044	0,06	0,097
	% teor. maxima	83,16	70,28	36,9	18,53
Linha 20 % PEO	[hm. %]	1,34	1,67	1,5	1,7
	sm.odch [hm. %]	0,05	0,02	0,2	0,1
	% teor. maxima	80	99,4	89	101
vrstva B 1 % PEO	[hm. %]	1,857	2,287	1,67	1,093
	sm.odch [hm. %]	0,085	0,131	0,131	0,066
	% teor. maxima	94,76	116,66	85,19	55,76

Jak již bylo zmíněno, největší problémy byly se stanovením brilliant green (respektive blue), proto jsou data uvedena pouze v tabulce 5. V grafu 5 jsou uvedeny závislosti stanoveného obsahu barviv na obsahu PEO ve zvlákněné vrstvě potažmo ve zvlákněvacím roztoku. Z grafu 5 je patrné, že nejen kyselina hyaluronová, která má v molekule záporný náboj, ale i polyethylen oxid ovlivňuje množství aditiv v nanovlákněné vrstvě. Do 20 hm. % PEO v sušině je pokles aditiv velice pozvolný nebo je hodnota téměř konstantní. Vyšší



Graf 7 Závislost výtěžku na koncentraci PEO

koncentrace PEO už znamená značný pokles ve stanovené koncentraci aditiv. Výjimku tvoří erytrosin, který se vyznačuje téměř konstantní závislostí na obsahu PEO a složení směsi.

5. Závěr

Cílem této práce bylo stanovit obsah aditiv v samonosné nanovlákněné vrstvě, která byla vyrobená ze směsi několika různých polymerů v daném poměru. Roztoky polymerů s aditivem (barvivo) byly zvlákněny a ze vzniklých vrstev byly odebrány vzorky. Tyto vzorky byly poté měřeny metodou UV-VIS spektrofotometrie, pomocí které byl stanoven obsah jednotlivých aditiv ve vrstvě.

Obsah červeného barviva erytrosinu byl ve vrstvě A stanoven na 83,16 hm. % celkové hmotnosti nanovlákněné vrstvy HA/PEO/CMC/PVA. Ve vrstvě B byl obsah 94,76 hm. %. Při porovnání výsledků s V. Linhou můžeme pozorovat lineární závislost mezi obsahem aditiva a koncentrací PEO ve vrstvě. Toto barvivo má záporný náboj, který neinteraguje se směsí polymerů, netvoří komplexy a dobře se rozpouští ve vodě. Lze jej tedy považovat za modelové barvivo, a proto s ním lze porovnat ostatní barviva, vliv struktury a koncentrace PEO na procentuální výtěžek zvlákněné vrstvy.

Riboflavinu se ve vrstvě A nacházelo 70,28 hm. %, ve vrstvě B 116,66 hm. %. Výtěžek větší než 100 % je způsoben experimentální chybou a vlastnostmi aditiva, které se velmi špatně rozpouští ve vodě, má tendenci agregovat a tedy se nedistribuuje do vrstvy rovnoměrně.

Průměrný obsah eriochromové černi byl stanoven ve vrstvě A na 36,90 hm. %, ve vrstvě B 85,19 hm. %. Nelze (při porovnání s výsledky kolegy Linhy) pozorovat jednoznačnou lineární závislost výtěžku na koncentraci PEO, ale stále je patrný trend lepšího výtěžku aditiva z vrstvy B. Analýza eriochromové černi (vzhledem k velkému rozpětí výsledků) může být nepřesná, jelikož se jedná o komplexotvorné barvivo, které reaguje s kovovými ionty hyaluronanu.

Průměrný obsah brilliant green ve vrstvě A byl 18,53 hm. %, ve vrstvě B byl pozorován zásadní nárůst výtěžku až na průměrných 55,76 hm. %. Vzhledem k degradační povaze barviva byla manipulace s ním velmi obtížná, jelikož stojící vzorek se již po krátkém čase začal odbarvovat a hodnoty získané z UV-VIS mohly být tedy velmi nepřesné.

Z hlediska průměrně nejvyššího procentuálního výsledku, se jako nejlepší barvivo jeví erytrosin, jelikož se distribuoval nejhomogenněji, velmi dobře se rozpouštěl ve směsi polymeru a zůstával na světle stálý.

Změna poměru jednotlivých polymerů v roztoku (i samotného PEO) a zakoncentrování roztoku ze 4 hm. % (řada A) na 5 hm. % roztok (řada B) měla za následek výrazné zvýšení výtěžku aditiva ve zvlákněné vrstvě.

6. Seznam zkratek

HA – kyselina hyaluronová (hyaluronic acid)

PVA – polyvinylalkohol

CMC – karboxymethylcelulóza

PEO – polyethylen oxid

UV-VIS – ultrafialové-viditelné (ultraviolet-visible) záření

PEG – polyethylenglykol

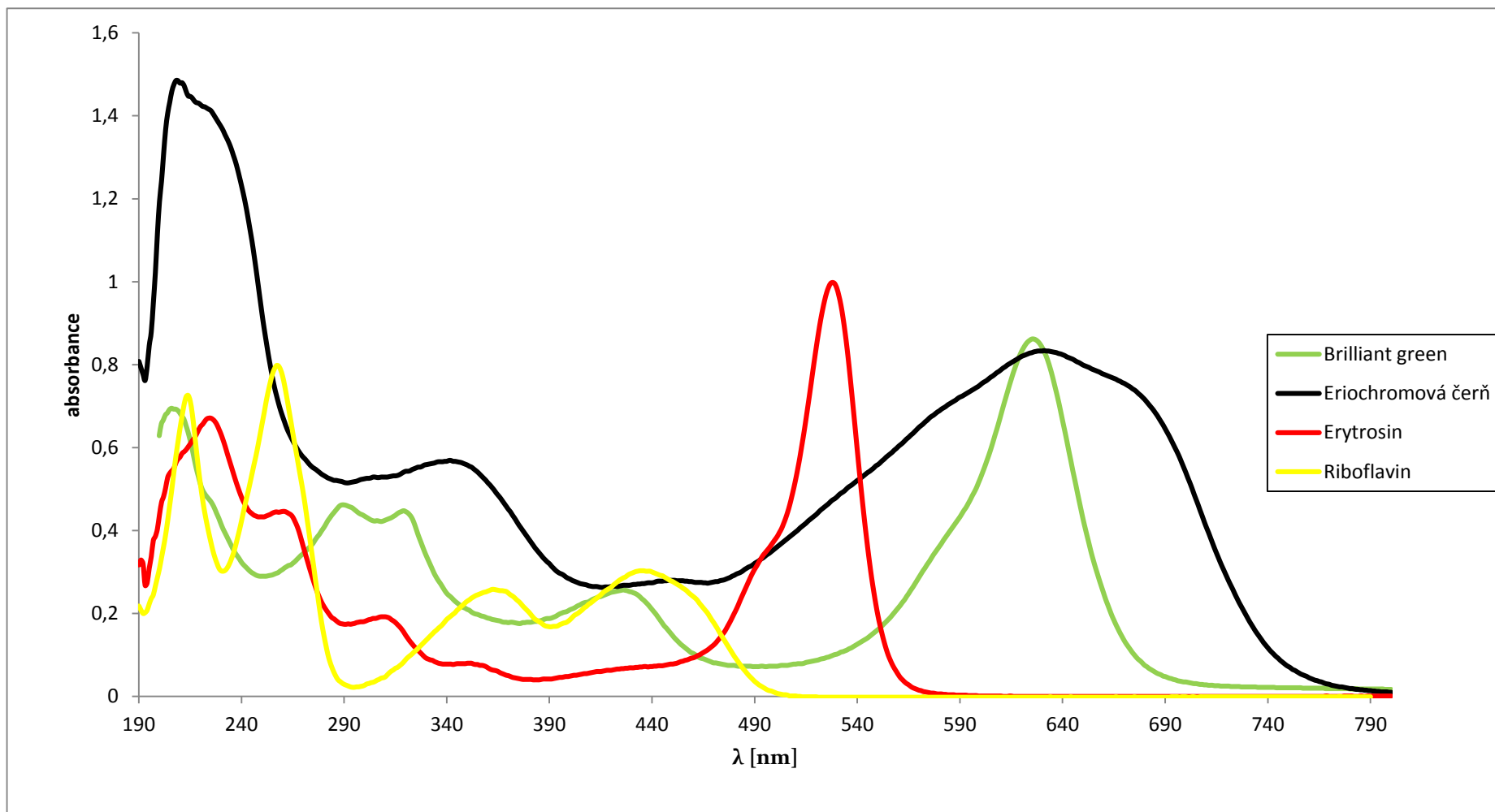
SEM – rastrovací elektronový mikroskop (scanning electron microscope)

7. Seznam použitých zdrojů

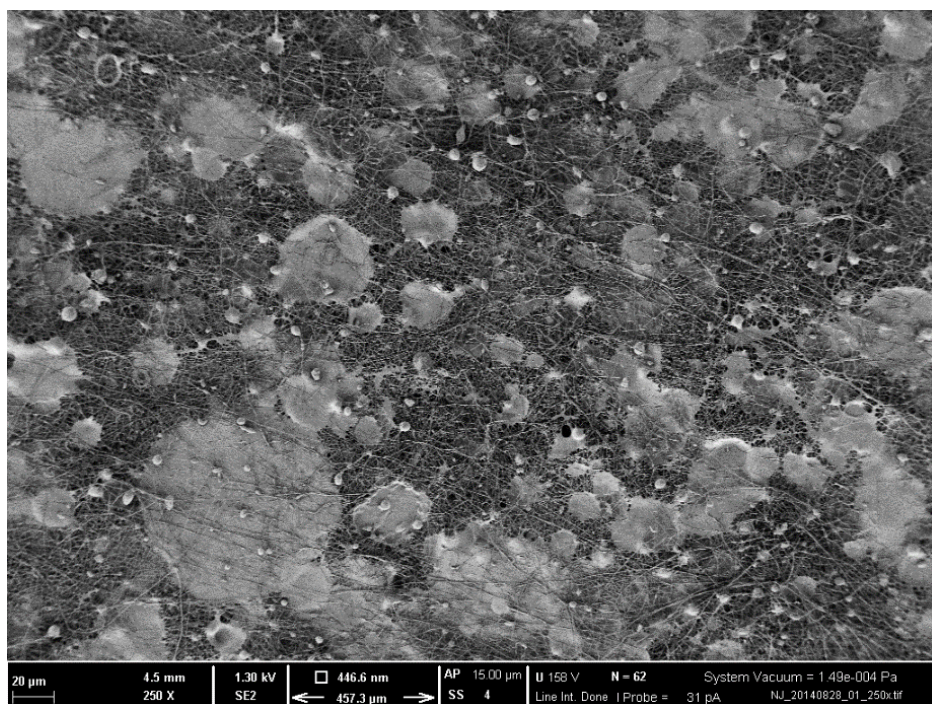
1. MAREK, Vlastimil. Historie moderních technologií. <http://nanotechnologie.vsb.cz/index.html> [online]. 2007 [cit. 2014-05-08]. Dostupné z: http://nanotechnologie.vsb.cz/Historie/nano_historie.pdf
2. The Lycurgus Cup. *The British Museum* [online]. 2012 [cit. 2014-05-08]. Dostupné z: https://www.britishmuseum.org/explore/highlights/highlight_objects/pe_mla/t/the_lycurgus_cup.aspx
3. COOLEY, John F. *Apparatus for electrically dispersing fluids* [patent]. USA. US692631, A. Uděleno 4. 2. 1902. Dostupné z: <http://1url.cz/b0dk>
4. TUCKER, Nick. The History of the Science and Technology of Electrospinning from 1600 to 1995. *Journal of engineered fibers and fabrics* [online]. Cary, N.C.: INDA, TAPPI, theFiber Society, and AATCC, 2006- [cit. 2015-04-09]. Dostupné z: <http://www.jeffjournal.org/papers/Volume7/7.2b.10N.Tucker.pdf>
5. UM, In Chul, Dufei FANG, Benjamin S. HSIAO, Akio OKAMOTO a Benjamin CHU. Electro-Spinning and Electro-Blowing of Hyaluronic Acid. *Biomacromolecules* [online]. 2004, vol. 5, issue 4, s. 1428-1436 [cit. 2015-04-09]. DOI: 10.1021/bm034539b. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/bm034539b>
6. Electronic device for preparing nanofibres layers. CONTIPRO BIOTECH, s.r.o. [online]. [cit. 2015-04-09]. Dostupné z: <https://www.4spin.info/>
7. HUANG, Zheng-Ming, Y.-Z. ZHANG, M. KOTAKI a S. RAMAKRISHNA. A review on polymer nanofibers by electrospinning and their applications in nanocomposites. *Composites Science and Technology* [online]. Oxford: Elsevier, 2003, vol. 63, issue 15, s. 2223-2253 [cit. 2015-04-09]. DOI: 10.1016/s0266-3538(03)00178-7. Dostupné z: [http://www.thefutureisnear.org/student_research/current_research/documents/filtration/281103dulezite\(Filtration\).pdf](http://www.thefutureisnear.org/student_research/current_research/documents/filtration/281103dulezite(Filtration).pdf)
8. VASITA, Rajesh, Dharendra S KATTI, Yee-Shuan LEE, TreenaLivingston ARINZEH, J. A. KLUGE, R. L. MAUCK, M.M.R. KHAN a M. TSUKADA. Nanofibers and their applications in tissue engineering. *International Journal of Nanomedicine* [online]. Darmstadt: Selbstverlag der Hessischenhistorischen Kommission, 2006, vol. 1, issue 1, s. 125-156 [cit. 2015-04-09]. DOI: 10.1533/9780857097064.1.125. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2426767/>
9. VELEBNÝ, Vladimír: *Biopolymerie v medicíně*, přednáška VUT Brno, 24. 9. 2013

10. GESSNER, Thomas a Udo MAYER. Triarylmethane and Diarylmethane Dyes. *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH, 2000-06-15. DOI: 10.1002/14356007.a27_179. Dostupné z: http://doi.wiley.com/10.1002/14356007.a27_179
11. NALAM, Prathima C., Jarred N. CLASOHM, Alireza MASHAGHI a Nicholas D. SPENCER. Macrotribological Studies of Poly(L-lysine)-graft-Poly(ethyleneglycol) in Aqueous Glycerol Mixtures. *Tribology Letters*. 2010, vol. 37, issue 3, s. 541-552. DOI: 10.1007/s11249-009-9549-9. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s11249-009-9549-9>
12. LEE, So Young, Da Hyun JANG, Yun Ok KANG, O Bok KIM, Lim JEONG, HyunKi KANG, Seung Jin LEE, Chong-Heon LEE, Won Ho PARK a Byung-Moo MIN. Cellular response to poly(vinylalcohol) nanofibers coated with biocompatible proteins and polysaccharides. *Applied Surface Science*. 2012, vol. 258, issue 18, s. 6914-6922. DOI: 10.1016/j.apsusc.2012.03.135. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0169433212005740>
13. TAN, Annie, Peter ARGENTA, Rose RAMIREZ, Robin BLISS a Melissa GELLER. The Use of Sodium Hyaluronate–Carboxymethylcellulose (HA-CMC) Barrier in Gynecologic Malignancies: A Retrospective Review of Outcomes. *Annals of Surgical Oncology* [online]. New York: Springer-Verlag, 200902, roč. 16, č. 2, s. 499-505 [cit. 2015-04-25]. DOI: 10.1245/s10434-008-0235-1. Dostupné z: <http://link.springer.com.ezproxy.lib.vutbr.cz/article/10.1245/s10434-008-0235-1/fulltext.html>
14. JENNINGS, Anthony S., Sorell L. SCHWARTZ, Nancy J. BALTER, David GARDNER a Raphael J. WITORSCH. Effect of oral erythrosine (2',4',5',7'-tetraiodofluorescein) on the pituitary-thyroid axis in rats. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 1990, vol. 103, issue 3, s. 549-556. DOI: 10.1016/0041-008x(90)90327-q. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2160137>
15. LINHA, Vojtěch. *Homogenita aditiv v nanovláknách* [online]. Brno, 2014 [cit. 2015-05-03]. 44 l. Dostupné z: <http://hdl.handle.net/11012/31387>. Bakalářská práce. Vysoké učení technické v Brně.

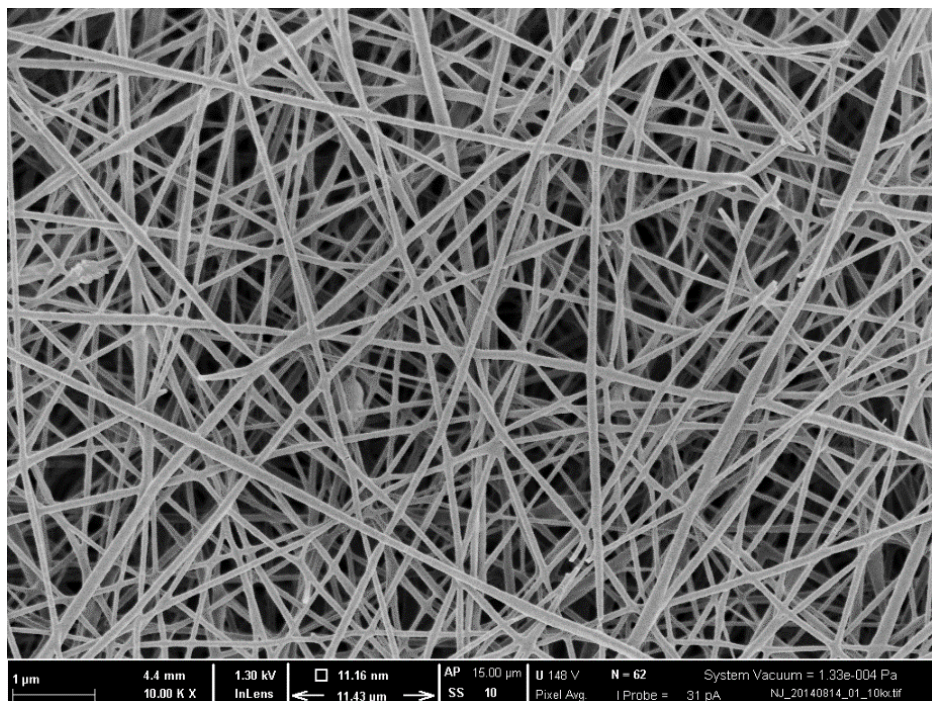
8. Přílohy



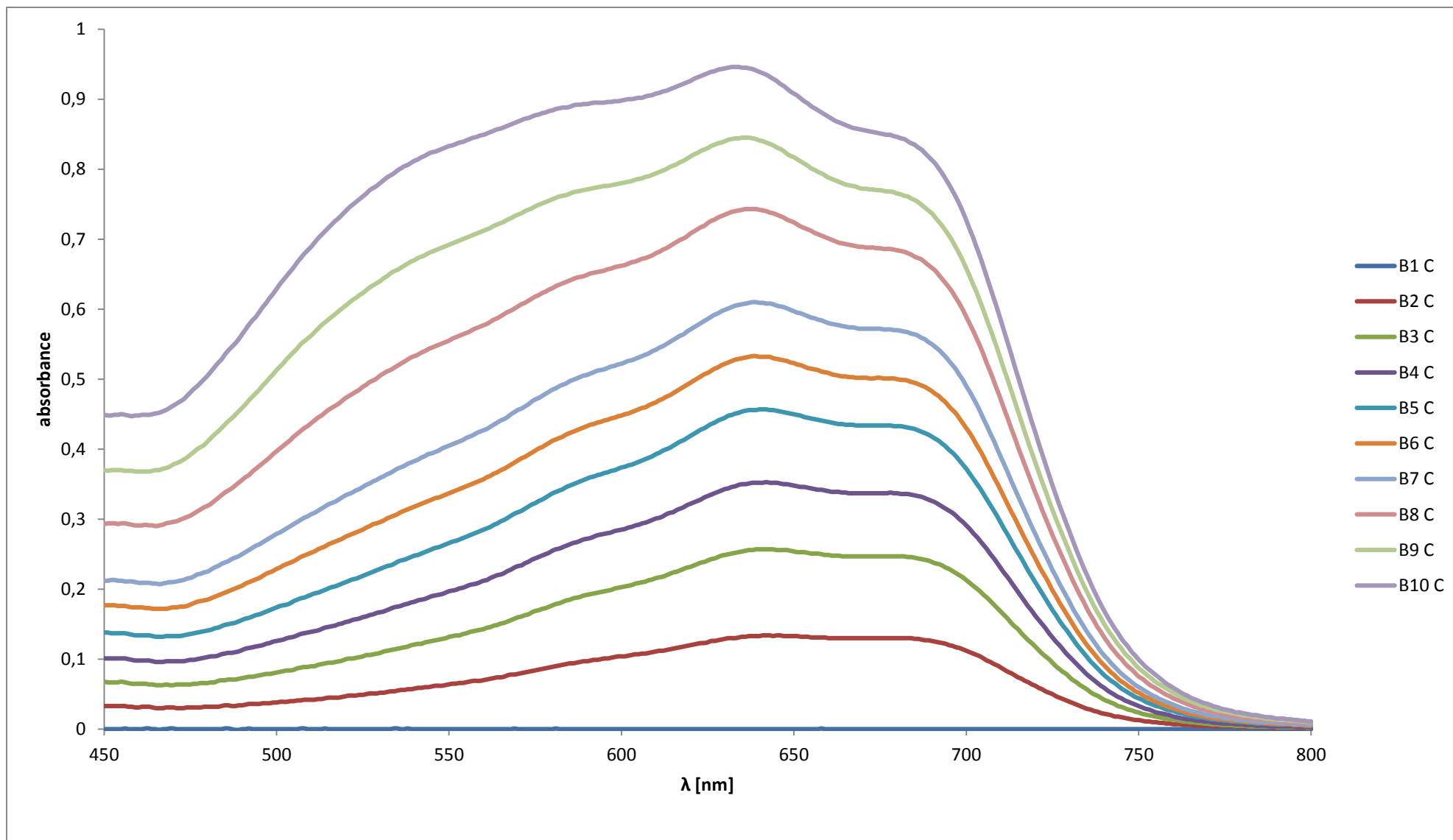
Graf 2 Graf absorpčních pásů jednotlivých aditiv v kalibračním roztoku A



Obrázek 12 Ukázka nedokonale zvlákněného vzorku eriochromové černi řady A



Obrázek 13 Detail nanovláken – vzorek brilliant green řady A



Graf 3 Graf posunu absorpčního spektra erichromové černi v kalibračním roztoku B