



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE

INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

TEPLOTNÍ ZÁVISLOST KARAGENANU A HYALURONANU

TEMPERATURE DEPENDENCE OF CARRAGEENAN AND HYALURONAN SOLUTIONS

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Halina Poledňáková

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Andrea Kargerová, Ph.D.

BRNO 2017

Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP1014/2016
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie
Studentka: **Bc. Halina Poledňáková**
Studijní program: Spotřební chemie
Studijní obor: Spotřební chemie
Vedoucí práce: **Ing. Andrea Kargerová, Ph.D.**
Akademický rok: 2016/17

Název diplomové práce:

Teplotní závislost karagenanu a hyaluronanu

Zadání diplomové práce:

Literární rešerše na dané téma.

Na základě literární rešerše navrhnout experimenty na reometru a ultrazvuku s vysokým rozlišením.

Termín odevzdání diplomové práce: 15.5.2017

Diplomová práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí diplomové práce.

Bc. Halina Poledňáková
student(ka)

Ing. Andrea Kargerová, Ph.D.
vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2017

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

ABSTRAKT

Tato diplomová práce se zaměřuje na teplotní závislost κ -karagenanu, nízkomolekulárního hyaluronanu (250–450 kDa) a vysokomolekulárního hyaluronanu (1 500–1 750 kDa) ve vodném prostředí. Pro popis změn vlastností těchto látek v závislosti na teplotě byla použita reologická metoda. Práce je orientována na charakterizaci viskoelastických vlastností prostřednictvím měření paměťového (elastického) a ztrátového (viskózního) modulu κ -karagenanu a hyaluronanu o různé molekulární hmotnosti a koncentraci v závislosti na teplotě (20–50 °C, případně pro κ -karagenan 20–80 °C). Pro zkoumání teplotních závislostí byla dále použita technika s názvem ultrazvuková spektroskopie s vysokým rozlišením (HR-US), kde byla měřena relativní ultrazvuková rychlost vybraných koncentrací κ -karagenanu a vysokomolekulárního hyaluronanu v závislosti na teplotě ohřevu a ochlazování (20–80 °C). Měření teplotních závislostí probíhalo pro různé frekvence otáčení senzoru reometru/frekvence ultrazvukové vlny. Znalosti o teplotní závislosti jsou důležité zejména při aplikaci zkoumaných látek v medicínských aplikacích, konkrétně při degradaci vlivem vysoké teploty. Ze získaných dat byly stanoveny teploty bodu gelace a tání karagenanu.

ABSTRACT

This diploma thesis focuses on the study of temperature dependence of κ -carrageen, hyaluronan of low molecular weight (250–450 kDa) and hyaluronan of high molecular weight (1 500–1 750 kDa) in aqueous solutions. The description of temperature depending changes in properties of these substance is based on rheological method. This work concentrates on the characterization of viscoelasticity through measurement of the storage (elastic) and loss (viscous) modulus using κ -carrageen and hyaluronan solutions of different molecular weights and different concentrations depending on temperature (20–50 °C, alternatively, in carrageen, 20–80 °C). The temperature dependence was further measured using an uncommon technique called high resolution ultrasonic spectroscopy (HR-US) which measured relative velocity of selected concentrations of κ -carrageen and hyaluronan of high molecular weight depending on the temperature of heating and cooling (20–80 °C). The measurements of temperature dependence were carried out for varied oscillation frequencies of rheometer sensor/frequency of ultrasonic waves. Knowledge of temperature dependence of the investigated substances may be applied in drug chemistry, primarily with respect to degradation due to high temperatures. The measured data gives information about sol-gel temperature and gel-sol temperature of carrageen.

KLÍČOVÁ SLOVA

karagenan, hyaluronan, reologie, ultrazvuková spektroskopie s vysokým rozlišením, viskoelastické vlastnosti, ultrazvuková rychlost

KEYWORDS

carrageenan, hyaluronan, rheology, high resolution ultrasonic spectroscopy, viscoelasticity, ultrasonic velocity

CITACE

POLEDŇÁKOVÁ, H. *Teplotní závislost karagenanu a hyaluronanu*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2017. 97 s. Vedoucí diplomové práce Ing. Andrea Kargerová, Ph.D.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Diplomová 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.

.....
Bc. Halína Poledňáková

PODĚKOVÁNÍ

Největší díky patří vedoucí mé diplomové práce Ing. Andree Kargerové Ph.D., bez které by tato práce nikdy nevznikla. Především musím poděkovat za individuální přístup, cenné rady a čas, který mi věnovala. Dále bych chtěla poděkovat prof. Ing. Miloslavu Pekařovi, CSc., za inspirativní pohled na studované téma a potřebné rady. Také bych chtěla poděkovat své rodině a příteli za podporu a motivaci během studia. Své díky si zaslouží také můj notebook, jenž mě doprovází po celou dobu studia, a plánovaný odchod do křemikového nebe před dokončením práce si naštěstí rozmyslel.

Díky všem!

OBSAH

ÚVOD	6
1 TEORETICKÁ ČÁST	7
1.1 Karagenan.....	7
1.1.1 Úvod.....	7
1.1.2 Chemické složení a druhy karagenanu.....	7
1.1.3 Molekulární interakce.....	9
1.1.4 Výroba a využití karagenanu.....	11
1.2 Hyaluronan.....	11
1.2.1 Úvod.....	11
1.2.2 Struktura a vlastnosti hyaluronanu.....	12
1.2.3 Výroba a použití hyaluronanu.....	13
1.3 Reologie.....	14
1.3.1 Úvod.....	14
1.3.2 Reologické dělení látek.....	14
1.3.3 Reologie viskoelastických látek.....	15
1.3.4 Měřicí systémy.....	17
1.4 Ultrazvuková spektroskopie s vysokým rozlišením.....	18
1.4.1 Úvod a definice.....	18
1.4.2 Použití.....	20
2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	21
3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	27
3.1 Použité chemikálie.....	27
3.2 Příprava vzorků.....	28
3.2.1 Příprava vzorků karagenanu ve vodě.....	28
3.2.2 Příprava vzorků hyaluronanu ve vodě.....	30
3.2.3 Příprava vzorků pro HPLC/SEC-MALS.....	30
3.3 Použité metody a zařízení.....	30
3.3.1 Použité přístroje.....	30
3.3.2 Měření viskoelastických vlastností reometrem.....	31
3.3.3 Měření ultrazvukové rychlosti spektrometrem s vysokým rozlišením.....	34
3.4 Výsledky a diskuse.....	38
3.4.1 Reologické měření dynamických modulů karagenanu.....	38
3.4.2 Měření ultrazvukové rychlosti karagenanu.....	49
3.4.3 Porovnání použitých metod pro popis teplotních závislostí karagenanu.....	54
3.4.4 Reologické měření dynamických modulů hyaluronanu.....	54
3.4.5 Porovnání použitých metod pro popis teplotních závislostí hyaluronanu.....	63
4 ZÁVĚR	65
SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ	68
SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK	77
PŘÍLOHA	79

ÚVOD

Karagenan a hyaluronan jsou polysacharidy biologického původu, jenž se těší pozornosti ve vývoji biokompatibilních materiálů, především v souvislosti s technologií cílených nosičů léčiv a tkáňovým inženýrstvím.

Karagenan (z anglického *carrageen*) je polysacharid získaný extrakcí z červených mořských řas. Základní struktura je tvořena glykosidickými vazbami mezi deriváty galaktóz a anhydridgalaktóz s poměrně vysokým obsahem sulfátových skupin, které jsou nosičem záporného náboje. Karagenan se používá hojně v potravinářském a kosmetickém průmyslu jako emulgátor, stabilizátor a želírující látka. V neposlední řadě jeho využití nalzáme v moderních medicínských aplikacích, například pro enkapsulaci léčivých látek. V současné době jsou zkoumány procesy související s biodegradabilitou a biokompatibilitou karagenanu pro přípravu scaffoldů, jako součást matrice pro cílené dopravení kancerostatik do místa nádoru, jeho schopnost selektivně potlačit imunitní odpověď makrofágů (tvorbu zánětu) na účinek virů HIV nebo modelovat artritickou bolest.

Hyaluronan je označení pro sodnou nebo jinou sůl kyseliny hyaluronové (z anglického *hyaluronic acid*, HA) přirozeně se vyskytující v lidském těle, například jako součást výplně mezibuněčného prostoru či očního sklivce. Je zodpovědná za viskoelasticitu a hydrataci tkání a mnoho dalšího. Základní struktura je tvořena disacharidovou jednotkou tvořenou vazbou mezi kyselinou D-glukuronovou a N-acetylglukosaminem. Hyaluronan se využívá především v lékařství jako nosič léků, jako součást vlhkého krytí ran či scaffoldů, pro suplování synoviální tekutiny kloubů nebo jako dočasná výplň očního sklivce. Dále se využívá například v kosmetice a plastické chirurgii. V současné době se výzkum zaměřuje na využití specifické vazby hyaluronanu na receptor nádorové tkáně pro cílený transport léku proti rakovině.

Tato práce je zaměřena na popis teplotní závislosti karagenanu a hyaluronanu o různé molekulární hmotnosti prostřednictvím reologického měření viskoelastických vlastností v závislosti na teplotě, frekvenci a koncentraci vzorků. Dále pojednává o popisu teplotní závislosti karagenanu a haluronanu metodou ultrazvukové spektroskopie, kde je měřena relativní ultrazvuková rychlost v závislosti na teplotě, frekvenci měření a koncentraci vzorků. Obě metody zahrnují závislosti pro karagenan a hyaluronan ve vodném prostředí. Každé měření bylo provedeno nejméně dvakrát.

1 TEORETICKÁ ČÁST

1.1 Karagenan

1.1.1 Úvod

Polysacharidy označovány jako karagenany, případně zkráceně karageny (z anglického překladu carrageen) jsou přírodní látky získané extrakcí z mořských řas pěstovaných speciálně pro tyto účely, především se jedná řasy rodu *Chondrus*, *Gigartina*, *Euchema* atp. Velmi populární je druh řasy *Furcellaria* a *Phyllophora*. Původně byly karagenany získávány z přírodních zdrojů především z červené mořské řasy *Chondrus crispus*, což v překladu znamená irský mech, jak je někdy karagenanu přezdíváno. Červené mořské řasy pochází z Irska, dále je můžeme nalézt na pobřeží jižní Evropy, Jižní Ameriky, ale i v chladnějších vodách Kanady. Řasy rodu *Euchema* jsou pěstovány na Filipínách a v Indonésii [1.], [2.].

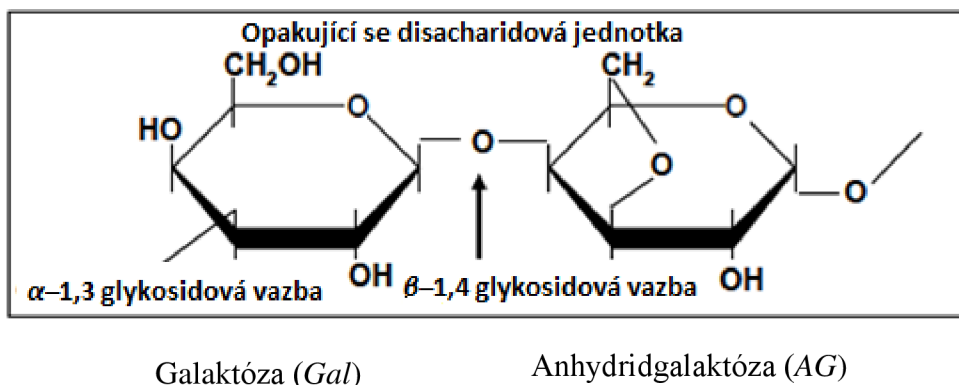
Přibližně před 600 lety lidé žijící podél jižního pobřeží Carrageen County v Irsku začali používat rostlinu známou jako Irský či karagenový mech v potravinách (především do mléčných produktů), jako hnojivo a při přípravě léčiv. První studie o schopnosti gelovatění karagenanu je datována roku 1819 Dawsonem Turnerem. V roce 1837 byly provedeny první pokusy o izolaci polysacharidového extraktu z červených mořských řas, čištění alkoholovým srážením přišlo na řadu v roce 1871 a od roku 1840 se karagenan začal vyrábět v práškové formě. Od 19. století byl karagenan již široce používán v mnoha potravinách a mléčných výrobcích [3.], [4.].

Základní struktura tohoto biopolymeru je tvořena glykosidovými vazbami mezi galaktózami a anhydridgalaktózami, Jedná se o směs polysacharidů, jejichž deriváty mají poměrně vysoké zastoupení sulfátových skupin, který zapříčiňuje záporný náboj. Díky přítomnosti sulfátové skupiny je karagenan odlišován od agaru, což je velmi podobný druh polysacharidu, jehož používání se s příchodem karagenanu částečně omezilo. Karagenan je ve vodě rozpustný hydrokoloid, který se hojně používá v potravinářském průmyslu jako emulgátor, stabilizátor a želírující látka. Rozsáhlou řadu produktů obsahujících karagenan nalezneme také v kosmetickém průmyslu, kde zastává funkci plnidla a stabilizátoru. V neposlední řadě jeho využití nalézáme v moderních medicínských aplikacích.

1.1.2 Chemické složení a druhy karagenanu

Karageny jsou deriváty polysacharidů složené z opakujících se lineárních řetězců galaktózových jednotek se záporným nábojem. Ve své základní struktuře (na rozdíl od agaru) zahrnují kromě β -D-galaktózy (D-galakopyranózy) také 3,6-anhydrid- α -D-galaktózu (3,6-anhydridgalaktózu) [5.]. Součástí derivátů jsou síranové skupiny, s obsahem přibližně (20-30 hm.%), jež jsou zodpovědné za náboj. Karagenany mají gelující vlastnosti, s vodou tvoří roztoky s vysokou viskozitou a jsou stabilní v širokém rozsahu pH. Průměrná relativní hmotnost se pohybuje od 100 do 1 000 kDa [6.]. Relativní molekulovou hmotnost ovlivňují fyzikálně-chemické a biologické vlastnosti karagenanu. Je určována monomerní kompozicí a typem funkční skupiny zabudované do makromolekul, což vysvětluje široký rozsah molekulové hmotnosti karagenanů, v některých sloučeninách dosahuje až 1 800 kDa.

Struktura je tvořena opakujícími se jednotkami D-galaktózy a 3,6-anhydrid-D-galaktózy, které jsou spojeny β -glykosidickou vazbou. Tyto dimery jsou pak propojeny α -glykosidickou vazbou, což je znázorněno na Obr. 1.



Obr. 1 Znázornění základního kopolymeru tvořeného β -1,4 glykosidovou vazbou galaktózy a anhydridgalaktózy ve struktuře karagenanu, který je vazbou α -1,3 propojen s následující disacharidovou jednotkou [5.].

Sekundární struktura má židličkovou konformaci, aby se minimalizovalo sterické odpuzování způsobené axiálními složkami [7.]. Zodpovědnost za tvorbu gelu má galaktóza, která v karagenanu umožňuje vznik terciální struktury ve tvaru pravotočivé dvoušroubovice, kdy spolu dva lineární disacharidové řetězce vytváří konformaci pravotočivé dvoušroubovice. Z toho vyplývá, že 3,6-anhydrid-D-galaktóza je zodpovědná za schopnost gelovatění.

Kromě galaktóz a síranů se karagenan skládá z dalších sacharidových zbytků (xylóz, glukóz apod.). Ve struktuře se mohou objevit i další substituenty, například methyly, ethery nebo pyruváty. Poměrně složité struktury karagenanu jsou pojmenovávány dle nejvíce zastoupené disacharidové jednotky označené řeckým písmenem, jedná se o 8 typů sekvenčních struktur (viz Tab. 1) [4.], [5.], [7.].

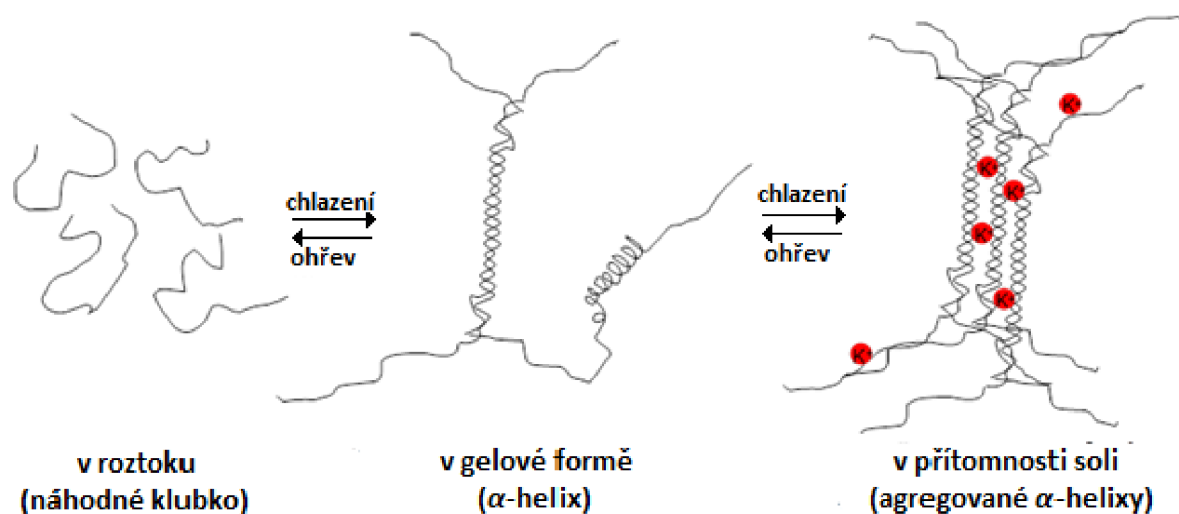
Tab. 1 Složení jednotlivých druhů monomerů v molekulách karagenanu.

Disacharidy	Stavební jednotka	
	Gal	AG
λ -karagenan	β -D-galaktóza-2-sulfát	α -D-galaktóza-2,6-disulfát
κ -karagenan	β -D-galaktóza-4-sulfát	3,6-anhydrid- α -D-galaktóza
ι -karagenan	β -D-galaktóza-4-sulfát	3,6-anhydrid- α -D-galaktóza-2-sulfát
μ -karagenan	β -D-galaktóza-4-sulfát	α -D-galaktóza-6-sulfát
θ -karagenan	β -D-galaktóza-2-sulfát	3,6-anhydrid- α -D-galaktóza-2-sulfát
ζ -karagenan	β -D-galaktóza-2-sulfát	α -D-galaktóza-2-disulfát
ν -karagenan	β -D-galaktóza-4-sulfát	α -D-galaktóza-2,6-disulfát
β -karagenan	β -D-galaktóza	3,6-anhydrid- α -D-galaktóza

má silnou schopnost vázat vodu, např. jediný gram kappa-karagenanu je schopen hydratovat 50 g [10.]. Dispergovaný karagenan se ve vodném roztoku začne hydratovat prostřednictvím elektrostatických interakcí vody s negativně nabitými skupinami síranu, a také navázáním vodíkových vazeb mezi vodou a hydroxylovými skupinami na polymerním řetězci. Zvyšováním hydratace se začnou karagenanové částice rozpouštět a vytvoří se z nich koloidní částice. Všechny karagenany jsou schopny vázat vodu a bobtnat i při pokojové teplotě, nemusí však dojít k úplnému rozpuštění, pro úplnou hydrataci kappa a iota karagenanu je potřeba vždy roztok zahřát (na 80 °C). Lambda-karagenan se rozpouští snadno i za nižších teplot (např. při teplotě 25 °C) za vzniku viskózních roztoků. Rozpustnost karagenanu ve vodě závisí také na obsahu solí, pH a teplotě. V prostředí organických rozpouštědel, olejů či tuků jsou karagenany nerozpustné.

Jak již bylo řečeno, gelotvorné jsou pouze karagenany obsahující 3,6 anhydrid-D-galaktózu schopnou tvořit vazby mezi disacharidovými řetězci. Želatinizace je vysoce závislá na koncentraci, přítomnosti kationtů a teplotě. Aby došlo ke zgelovatění, tedy vytvoření pravotočivých dvoušroubovicových struktur, jež agregují a dochází k vzniku polymerních sítí, je nutné mít karagenan v roztoku zcela rozpuštěný.

Pro vytvoření gelu z kappa-karagenanu stačí roztok ochladit, čímž dojde k vytvoření struktury pravotočivé dvoušroubovice, kde mezimolekulární interakce brání zpětnému skládání a sdužování řetězců do klubkové formace. Intramolekulární asociace dvoušroubovic tvořících pevnou gelovou strukturu však stále nejsou úplně objasněny, spekuluje se nad podílem povrchových interakcí. Vezmeme-li však v úvahu velké vzdálenosti mezi řetězci, je nepravděpodobné, že by při tvorbě dvoušroubovicových struktur hrály roli například Van der Waalsovy síly. Sdužování do pevnějších domén je usnadněno ionty. Sulfátová skupina v dvoušroubovici tíhne k interakci s jednomocnými draselnými kationty, iontová vazba mezi nimi byla prokázána pomocí infračervené spektroskopie. Pomocí těchto vazeb dochází ke spojení mezi dvěma až třemi dvoušroubovicemi (tvorba agregátů). Vznikají tak tuhé a křehké gely s vysokou mírou synerese. Princip gelovatění kappa-karagenanu znázorňuje Obr. 3. [11.], [13.].



Obr. 3 Změna struktury doprovázející mezifázový přechod mezi roztokem a gelem v κ -karagenanu v závislosti na teplotě a obsahu iontů [12.].

1.1.4 Výroba a využití karagenanu

Rafinovaný karagenan používaný jako emulgátor E 407 se získává extrakcí mořské řasy v alkalické vodě (např. hydroxidem sodným) a její následnou filtrací. Pro získání zcela čistého karagenanu v práškové formě se používá metoda alkoholového srážení (karagenan je dovoleno izolovat pouze použitím isopropanolu, methanolu či ethanolu) a následná dehydratace. Jedná se o poměrně finančně náročnou metodu [14.], [15.]. Výroba semi-rafinovaného karagenanu (SRC) neboli „mouky“, je založena na umytí mořských řas a jejich rozpuštění v alkalické vodě (např. hydroxidem draselným). Následně se nerozpustné látky (jako je celulóza a karagenanový gel) promyjí od rozpuštěných solí, proteinů a bakterií a dále se suší a melou. Jedná se o levnější a rychlejší variantu výroby. Nečištěné karagenany tvoří pevnější gely díky přítomnosti kationtů. Aby mohl být tento karagenan použitý v potravinářství, musí být přečištěn, bělen a důsledně zbavený veškerých bakterií [1.], [4.].

Karagenan se hojně používá v potravinářství jako zahušťovadlo, želírující látka, emulgátor a přírodní stabilizátor (E 407). Doporučený denní příjem karagenanu je stanoven na 0–5 mg/kg tělesné hmotnosti, jelikož vysoké dávky karagenanu způsobují vředy na střevech a další poškození u pokusných zvířat [18.], [19.], [20.]. Karagenan se používá především ke stabilizaci mléčných a pekařských výrobků, nealkoholických nápojů, sirupů, polévek a dezertů. Další široké uplatnění má karagenan v masném průmyslu, jelikož se vyznačuje optimální reaktivitou s masovými proteiny. V neposlední řadě se s karagenanem můžeme setkat v kosmetických, farmaceutických výrobcích, v chemickém průmyslu pro stabilizaci suspenzí, při výrobě barev apod. [9.], [16.], [43.]. Použití karagenanu je nyní směřováno na výrobu univerzálního nosiče např. pro imobilizaci mikroorganismů označujících tumorové tkáně, nebo jako cíleného nosiče léčiv na rakovinu. Karagenan se vyznačuje významnými schopnostmi začleňovat do své struktury více než 50 mikroorganismů. Vzniklý gel je odolný vůči změnám pH, během enzymatických reakcí se v lidském těle nerozkládá a póry gelu jsou optimálně velké, aby enzymy a buňky mikroorganismů zůstaly v gelové matici, zatímco jimi produkované nízkomolekulární látky mohou substrátem snadno projít. Karagenanové gely mají potenciál nosičů s vysokým stupněm aktivity účinné látky uvnitř gelu (40–60 hm. %) [17.].

1.2 Hyaluronan

1.2.1 Úvod

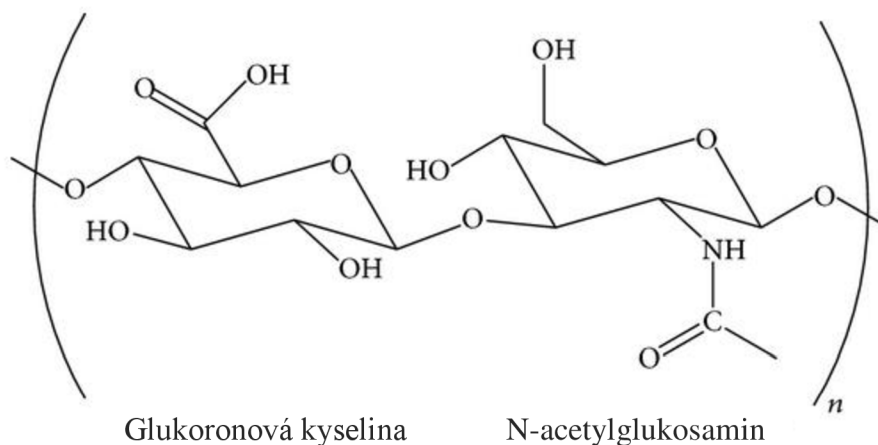
Hyaluronan je polysacharid, konkrétně nesulfátovaný glykosaminoglykan, který se vyskytuje v tkáních všech obratlovců, tvoří základ extracelulární matrix. Název hyaluronan je společné označení pro kyselinu hyaluronovou (HA) a sůl této kyseliny, jenž nese označení hyaluronát. Původně byla tato látka izolována ve formě kyseliny, nicméně *in vivo* a ve vodném roztoku se vyskytuje pouze ve formě soli (konkrétně hyaluronanu sodného). Protože tato skutečnost vedla k poměrně časté záměně názvů, byl zaveden obecný název hyaluronan.

První informace o kyselině hyaluronové jsou datovány roku 1934, kdy Karl Majer a John palmer extrahovali neznámý polysacharid z kravského očního slivce. Látku pojmenovali dle složení z řeckého slova „hyaloid“ což znamená sklo a z termínu „uronic acid“ z anglického překladu uronová kyselina [21.].

V živočišných tkáních je hyaluronan je přirozeně syntetizován hyaluronansyntetázami, které patří do třídy integrálních proteinů. Jeho odbourávání probíhá enzymaticky prostřednictvím hyaluronidázy. Molekulární hmotnost se pohybuje v rozmezí 0,1 až 12 MDa [62.]. Díky výjimečným viskoelastickým vlastnostem hyaluronanu a jeho biokompatibilitě se je široce využíván kosmetickém průmyslu a v medicínských aplikacích, jako je tkáňové inženýrství a technologie léčiv apod. [21.], [22.].

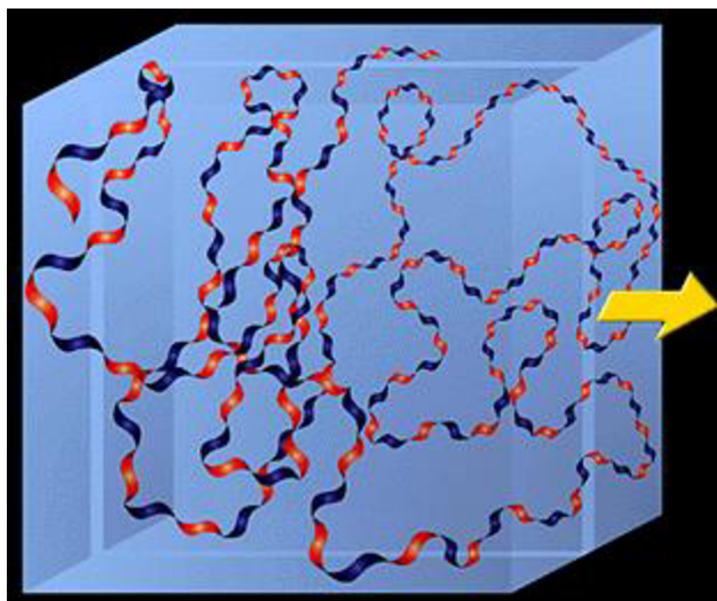
1.2.2 Struktura a vlastnosti hyaluronanu

Chemická struktura hyaluronanu byla stanovena v 60 letech 19. století v laboratořích K. Mayera, který sloučeninu objevil. Základní disacharidová jednotka střídající se ve struktuře polymeru je složena z D-glukuronové kyseliny a N-acetyl-D-glukosaminu, jenž jsou spojeny β -1,4 glykosidovou vazbou. Následuje navázání tohoto kopolymeru β -1,3 glykosidovou vazbou na další disacharidovou jednotku. Primární struktura je znázorněna na Obr. 4. [21.], [22.].



Obr. 4 Primární struktura hyaluronanu složená z glukuronové kyseliny a N-acetylglukosaminu [23.].

Ve vodném roztoku je sekundární struktura výrazně ovlivněna strukturou primární. Jednotlivé cukerné zbytky na konci každé β -glykosidické vazby mohou teoreticky rotovat o 360° , což by znamenalo takřka nekonečné množství vznikajících sekundárních struktur. Přesto bylo prokázáno, že se hyaluronan ve vodném roztoku vyskytuje jen v několika preferovaných, termodynamicky výhodných konfiguracích [21.], [22.]. Stericky nejvýhodnější konfiguraci hyaluronan nabývá ve stavu, kde jsou dlouhé molekuly v ekvatoriální pozici. Tvoří tak relativně hydrofobní část řetězce, oproti axiálním malým atomům vodíku, které zastupují hydrofilní oblast řetězce. V roztoku dochází ke stáčení řetězce (každá disacharidová jednotka je otočena o 180° vůči sousedícím jednotkám). Jakmile se řetězec otočí celkově o 360° , získá znova původní orientaci, což spolu se slabšími ne vazebnými interakcemi (vodíkové můstky, hydrofobní interakce) dává molekule tvar šroubovice (viz Obr. 5). Přítomnost hydrofilních a hydrofobních oblastí má za následek amfifilní charakter [21.].



Obr. 5 Pravidelně se opakující hydrofilní (modře) a hydrofobní (červeně) disacharidové jednotky ve struktuře polymeru [22.].

Vysokomolekulární hyaluronan zastává v lidském organismu několik důležitých funkcí. V první řadě je nezbytnou součástí extracelulárního matrix neboli mezibuněčného prostoru, kde dochází ke shromažďování proteoglykanů. Jeho silná viskoelastická a lubrikační vlastnosti se projevují v pojivových tkáních, kde je součástí synoviální tekutiny kloubů a očního sklivce. Další důležitou roli hraje v hydrataci tkání, je totiž zodpovědný proces transportu vody napříč tkání. Největší množství hyaluronanu se nachází v kůži, kde zajišťuje její elasticitu. Oproti tomu nízkomolekulární hyaluronan má opačné, negativní účinky na organismus, kdy svou specifickou interakcí s receptory hraje úlohu zprostředkovatele v buněčném dělení, mitóze, vzniku tumorů, metastáz a zánětů [24.].

1.2.3 Výroba a použití hyaluronanu

Průmyslová výroba hyaluronanu je rozdělena na dvě části, dle zdrojů, ze kterých je získávána. Prvním zdrojem jsou živočišné tkáně, v tomto případě se hyaluronan extrahuje především z kohoutích hřebínků, pupečních šňůr a dalších zdrojů měkké tkáně. Nevýhodou živočišných zdrojů je jejich degradace v průběhu extrakce, kdy se enzymatickou hydrolýzou narušuje struktura. Negativní dopad (hlavně po finanční stránce) má také poměrně obtížná purifikace hyaluronanu z tkáně (z důvodu vysoké polydisperzity). Důvodem, proč od těchto neekologických zdrojů nebylo upuštěno, je hned několik. Roli hraje především vysoká molekulární hmotnost, nezávadnost a čistota produktu. Komerčně dostupný hyaluronan může mít nejvyšší molekulární hmotnost okolo 5 MDa. Jako další zdroj jsou využívány bakterie rodu *Streptococcus*, neboli streptokoky (využívají se zejména kmeny *zoepidemicus* a *equi*), kde hyaluronan produkují bakterie k zapouzdření a napadení hostitele. Získáván je bakteriální fermentací, splňuje velkou část požadavků na hyaluronan, s rozdílem v nižší molekulární hmotnosti, ale také výrazně nižší ceně. Molekulární hmotnost hyaluronanu z mikroorganismů dosahuje přibližně 2,5 MDa [22.], [23.], [64.].

Hyaluronan je velice rozšířen v mnoha aplikacích lékařství. Ve formě injekčního podání je nativní forma hyaluronanu hojně používána v revmatologii, ortopedii, kde nahrazuje synoviální tekutinu, a dále v oftalmologii, kde se používá jako dočasná výplň očního sklivce. Také se využívá v přípravcích na mokré hojení ran, kde má schopnost například omezovat vznik koloidních jizev a napomáhat regeneraci tkání. V plastické chirurgii se využívá jeho schopnost „výplňového materiálu“.

Jeho schopnosti specifických interakcí s bílkovinami v extracelulární matrix se využívá pro výrobu nosičů léčiv a biologicky aktivních látek s cíleným transportem. Pro své hydratační vlastnosti se těší veliké oblibě v kosmetice, také jako součást scaffoldů pro tkáňové inženýrství. Momentálně se studie hyaluronanu zabývají především využití specifických interakcí hyaluronanu s buněčnými receptory nádorových tkání (konkrétně CD44 a RHAMM) pro výrobu cíleného nosiče léků na rakovinu [24.], [22.].

1.3 Reologie

1.3.1 Úvod

Reologie je věda zkoumající tvarové změny látek vznikajících působením vnějších sil. Jedná se mezioborovou disciplínu, jenž souvisí s mechanikou a fyzikální chemií. Jak naznačuje význam slova reologie z řeckého „rein“ (téct) a „logos“ (věda), vyjadřuje tento termín doslova nauku o toku látek. Z definice reologie však vyplývá, že se tento vědní obor zabývá nejen tokem kapalin, ale také deformací látek. Podle mechanických vlastností se materiály dělí na skupenství pevné, kapalné a plynné. Jejich míra deformace je matematicky popsána univerzálními modely jako ideální plyn, nestlačitelná (newtonská) kapalina a pružné (hookovské) těleso. Pro zjednodušení matematických vztahů se zavedly limitní případy, kde ideální pevná látka (tuhé těleso) má nekonečně velký modul pružnosti a ideální nestlačitelná tekutina má nulovou viskozitu a objemovou roztažnost. Jestliže účinkem vnější síly nastane deformace, která vratně vymizí po jejím odstranění, mluvíme o elastickém chování. Energie potřebná na deformaci se ukládá a po ukončení působení je zcela obnovena (dochází k relaxaci). Elastické chování je charakteristické především pro tuhé látky. Pokud vlivem vnější síly nastává nevratná deformace, kdy těleso působením síly teče a po odstranění síly se tok zastaví (a látka definitivně změní tvar) jedná se o viskózní chování. Energie potřebná k deformaci se rozptýlí v tekutině v podobě tepla. Viskózní chování je především projevem kapalin.

Zájem o definování a popis chování pevných látek a kapalin sahá již do dávné historie, například hypotézám o elasticitě a toku těles a se věnoval Galileo Galilei. Po něm dále teorie rozvíjeli Pascal, Hooke, Newton, Young, Navier, Stokes a další. Na začátku 20. století byla tato odnož vědních oborů pojmenována reologie [25.], [26.].

1.3.2 Reologické dělení látek

Zmíněné modely byly dostatečně univerzální na základní popis systémů, se snahou popsat komplikovanější jevy byla roku 1931 vydána první klasifikace možných reologických vlastností, jenž rozděluje látky do šesti skupin na základě Newtonova zákona [26.], [27.].

1. *Newtonovské kapaliny*

Jejich viskozita je při konstantní teplotě a tlaku fyzikální konstantou, platí zde přímá úměrnost mezi smykovým napětím a gradientem rychlosti (Newtonův zákon).

Ne-newtonovské kapaliny časově závislé – viskozita závisí na čase, patří zde:

2. tixotropní kapaliny – viskozita klesá s časem (po určitém čase dochází k jejich řidnutí)
3. reopetické kapalin – viskozita roste s časem (po určitém čase dochází k jejich houstnutí)

Ne-newtonovské kapaliny na čase nezávislé – viskozita závisí na teplotě, patří zde:

4. pseudoplastické kapaliny – viskozita klesá se zvyšujícím se smykovým napětím (se zvýšením napětí řidnou)
5. dilatantní – viskozita roste se zvyšujícím se tečným napětím (se zvýšením napětí houstnou)
6. plastické – k toku dochází až po překročení určitého prahového smykového napětí

1.3.3 Reologie viskoelastických látek

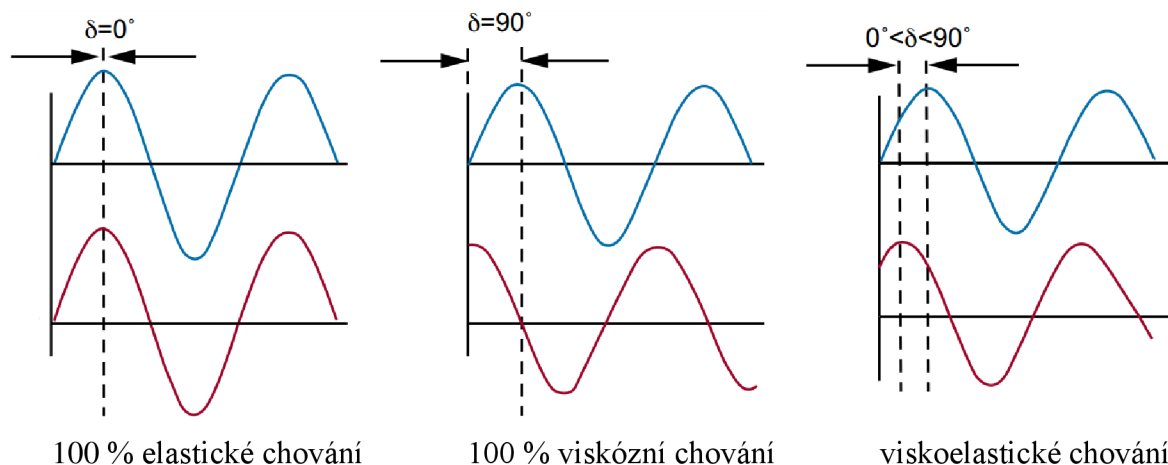
Výše popisované elastické chování (podle Hookova zákona) a viskózní (podle Newtonova zákona) chování můžeme označit jako extrémy, mezi kterými se nachází. Jedná se o látky, jejichž odezva na vnější sílu (v našem případě napětí) závisí na době, po kterou tato síla působí. Mezi viskoelastické látky mohou být řazeny v podstatě všechny materiály (které jsou vystaveny napětí po nekonečně dlouhou dobu). Projevy viskoelastivity můžeme pozorovat například u gelů, málo viskózních kapalin, roztoků polymerů apod. Vždy se však jedná o látky, jež vykazují viskózní i elastické vlastnosti zároveň. Dle svých viskoelastických vlastností se tyto látky projevují více či méně časově opožděnou reakcí na aplikaci či odstranění napětí. Pro jejich popis se využívají především *oscilační testy*. Sensor reometru se otáčí s přesně definovanou frekvencí otáčení ω (od nejvyšší frekvence po nejnižší). Měřený vzorek je vystaven působením konstantního smykového napětí τ jako funkce sinus (viz Rovnice 1):

$$\tau(t) = \tau_A \cdot \sin \omega t \quad (1)$$

Výsledkem je křivka deformace λ jako funkce sinus posunutá ve fázi (viz Rovnice 2):

$$\gamma(t) = \gamma_A \cdot \sin \omega t + \delta \quad (2)$$

Kde člen δ ($^\circ$) se nazývá úhel fázového posunu, nebo také ztrátový úhel, jehož velikost je definována intervalem $0-90^\circ$ [28.]. Na Z Obr. 6 jsou znázorněny rozdíly fází mezi oběma sinusovými vlnami (vstup a výstup) pro tři druhy chování. Čistě elastické materiály mají fázový úhel fázový úhel nulový, protože vstupní napětí a výstupní deformace jsou ve fázi. Naopak pro čistě viskózní kapaliny platí, že jsou ve fázi, fázový úhel nabývá hodnoty 90° . Pro viskoelastické materiály se fázový úhel nachází mezi těmito dvěma ideálními stavy a mění v závislosti na rychlosti deformace.



Obr. 6 Popis viskoelastického chování látek na základě fázového posunu mezi amplitudou vstupního napětí a výstupní deformace pro ideálně elastickou látku, ideální kapalinu a viskoelastickou látku [29.].

Viskoelastické vlastnosti jsou vyjádřeny pomocí viskoelastických parametrů (modulů) jenž kvantitativně vyjadřují konverzaci elastické energie a disipaci mechanické energie. Míru deformační energie uložené ve vzorku během namáhání vyjadřuje paměťový (elastický) modul G' (Pa), po odstranění namáhání se tato energie využije na částečné či úplné vykompenzování deformace. Ztrátový (viskózní) modul G'' (Pa) je mírou deformační energie, jež byla disipována na teplo v průběhu namáhání, výsledkem je pak nevratná deformace. Protože u viskoelastických materiálů se projevují oba typy chování zároveň, můžeme tuto skutečnost popsat vektorovým diagramem (viz

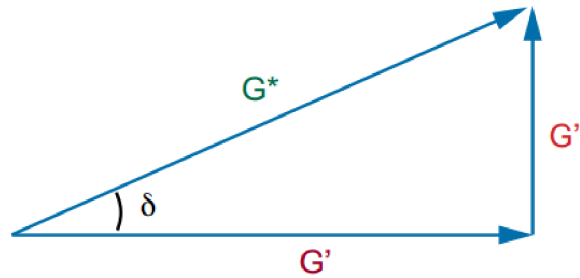
Obr. 7). Vektorový součin paměťového a ztrátového modulu (Rovnice 3) vyjadřuje celkovou charakteristiku chování viskoelastického systému a je označován jako komplexní modul G^* (Pa):

$$|G^*| = \sqrt{(G')^2 + (G'')^2} \quad (3)$$

Pro ztrátový úhel pak platí Rovnice 4:

$$\tan \delta = \frac{G''}{G'} \quad (4)$$

Z rovnice 4 vyplývá, že pokud ztrátový úhel nabývá hodnoty $\delta < 1$, pak se materiály se chovají jako kapaliny (*liquid-like*). Jakmile platí, že ztrátový úhel výrazněji převyšuje hodnotu 1, mluvíme o chování podobné tuhým látkám (*solid-like*).



Obr. 7 Vektorový diagram charakterizace viskoelastických látek [29.].

Viskoelastické parametry lze měřit jako funkci napětí (deformační amplitudy), frekvence, času a teploty. Z měření *frekvenčních oscilačních testů* získáme informace o tom, jak se viskoelastické vlastnosti mění s frekvencí, přičemž velikost a tvar křivek je závislý na molekulární struktuře. Mechanická odezva při krátkých časech deformace (vysokou frekvencí) se blíží chování pevných látek a odezva s delším časem (za nízké frekvence) odpovídá viskóznímu chování (jakmile pro nízké frekvence platí $G'' \gg G'$, pak se systém chová jako kapalina). Měření *oscilačních teplotních ramp* probíhá při lineární rychlosti ohřevu/ochlazování s konstantní amplitudou napětí. Odpověď materiálu může být sledována pro jednu nebo více frekvencí. Z měření získáváme přehled o dynamických změnách viskoelastického chování v závislosti na teplotě, například při fázových přechodech. Teplota bodu gelace je definována bodem $\tan \delta = 1$, kterému odpovídá průsečík modulů ($G' = G''$) [26.], [29.].

1.3.4 Měřicí systémy

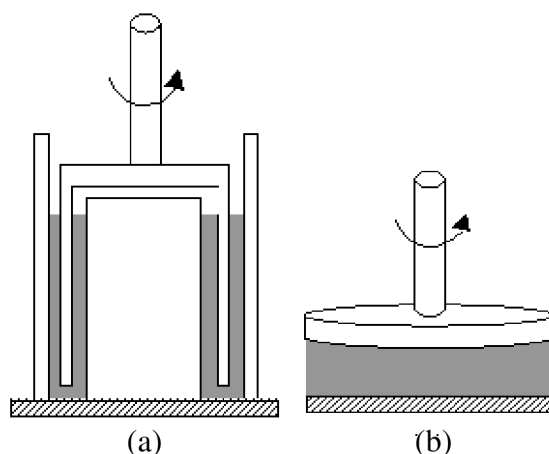
Přístroje používané na získání reologických dat se nazývají reometry a se dělí dle principu používané analýzy vzorků (statické, rotační reometry). Rotační reometr má uspořádání složené buď ze statické části a rotujícího senzoru, nebo ze dvou rotujících částí. Přístroj umožňuje měřit ve dvou různých režimech – smykovém a oscilačním. *Smykové testy* jsou založeny na měření smykové rychlosti s nastavením konstantního točivého momentu, odtud získáme hodnotu smykové rychlosti (která nedeformuje vzorek) pro následující test. Nastavením změřené konstantní smykové rychlosti je pak měřen otáčivý moment generovaný vzorkem. *Oscilační testy* probíhají analogicky. Nejprve je stanovena požadovaná hodnota napětí, kdy nedochází k deformaci vzorku (tzv. *lineární viskoelastická oblast LVO*), následně při této konstantní hodnotě napětí měří odpověď vzorku na zvyšování oscilační rychlosti (frekvence). Pomocí rotačních reometrů je možné zkoumat reologické vlastnosti širokého spektra kapalin i pevných látek. Výběr reologických testů se odvíjí od toho, jaké vlastnosti chceme pro daný vzorek charakterizovat (například viskozitu, komplexní modul, časové závislosti proměnných apod.). Zpracování dat zpravidla probíhá pomocí vhodného softwaru, jenž zprostředkovává výrobce. Podle skupenství vzorku, míry viskozity a dalších vlastností (např. velmi nízké pH, silný vliv odpařování rozpouštědla) se volí z širokého výběru měřících systémů (používá se rovněž pojmenování geometrie či senzor).

1.3.4.1 Měřicí systém dvojitého válce

Geometrie nesoucí název válec-válec, případně dvojitý válec (v angličtině pak *double gap cylinder*), jejíž konfigurace je znázorněna na obrázku Obr. 8 (a), se skládá z vnitřního rotujícího a vnějšího stacionárního válce, mezi nimiž je mezera pro nadávkování vzorků. Tato geometrie se používá především pro kapaliny s nízkou viskozitou, protože díky přítomnosti větší měřené plochy se zvyšuje vliv vzorku na vnitřní válec, čímž se zvyšuje přesnost měření. Nevýhodou geometrie je potřeba poměrně velkého množství vzorku a složitého čištění.

1.3.4.2 Měřicí systém deska-deska

Geometrie dvou paralelních desek (z anglického *parallel plates*) se skládá ze dvou desek s rovným povrchem, jejichž schéma je znázorněno na Obr. 8 (b), přičemž spodní deska je stacionární a horní deska je rotující. Rozměr vrchní desky je definován jejím průměrem, který musí být vždy nejméně dvakrát větší, než je velikost měřicí polohy. Danou geometrii je možné použít na měření tuhých struktur (gelů, elastomerů, past) přičemž je potřeba jen malé množství vzorku. Nevýhodou geometrie je nekonstantní napětí, jelikož se smyková rychlost zvyšuje směrem k okrajům desky. U oscilačních testů je tento jev zanedbán, protože měření probíhá při napětí z lineární viskoelastické oblasti [29.], [30.].



Obr. 8 Schéma měřicího systému dvojitého válce (a) a měřicího systému deska-deska (b) [30.].

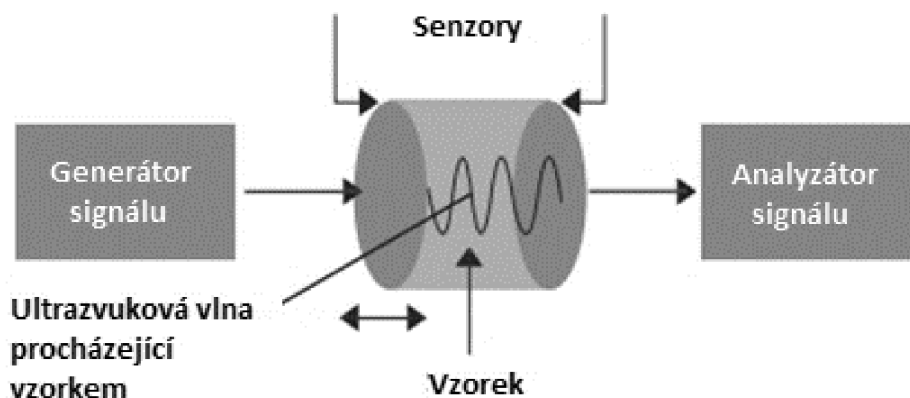
1.4 Ultrazvuková spektroskopie s vysokým rozlišením

1.4.1 Úvod a definice

Ultrazvuková spektroskopie s vysokým rozlišením (HR-US z anglického *high resolution ultrasonic spectroscopy*) je poměrně málo rozšířená, nedestruktivní metoda vhodná na analýzu široké škály látek. Ve většině klasických spektroskopických metod jsou zdrojem měřicího signálu elektromagnetické vlny neboli světelné záření. Například viditelné a ultrafialové záření (UV-VIS spektrometry), infračervené záření (infračervená spektroskopie), emitované záření (fluorescenční spektroskopie) a další. Nevýhodou těchto metod je potřeba měřit signál pro každou vlnovou délku zvlášť, což vyžaduje speciální optické prvky, které mohou být univerzální (čímž se výrazně snižuje citlivost) nebo konstruované speciálně pro určité

rozmezí vybraných vlnových délek, čímž metoda ztrácí na univerzálnosti. Kdežto ultrazvuková spektroskopie je založena na měření rychlosti elektronicky syntetizované ultrazvukové vlny a je schopná měřit v širokém rozsahu frekvencí bez šumu. Při porovnání s klasickými spektroskopickými metodami ultrazvuková spektroskopie unikátní svou univerzálností a vysokou citlivostí. Další výhodou je schopnost měřit průsvitné i zcela neprůhledné vzorky, přičemž hovoříme o neinvazivní metodě. Metodou HR-US můžeme měřit téměř všechny materiály pro vyhodnocení stavu, určení struktury či popisu termodynamického a viskoelastického chování. Dále je metoda schopná analyzovat mezimolekulární interakce, změny ve složení a fázové přechody analyzovaných látek

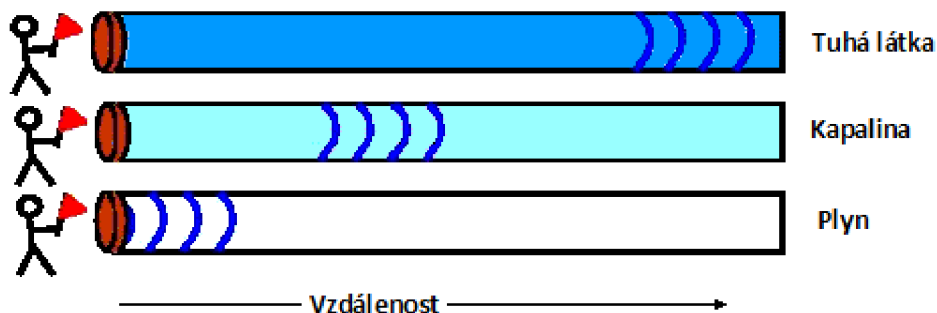
Ultrazvuková vlna je definována jako mechanické kmitání s frekvencí vyšší než 20 000 Hz, což je horní frekvenční mez slyšitelnosti lidského ucha. Ultrazvukové kmity jsou šířeny v prostředí jako vysokofrekvenční akustické vlny, přičemž každé prostředí je (z akustického hlediska) charakterizováno několika parametry, nejdůležitější z nich je **ultrazvuková rychlost** (fázová rychlost), což je rychlost, s jakou se zvuk šíří daným prostředím. Stejně důležitý parametr je **ultrazvukový útlum**, jenž vyjadřuje míru pohlcení zvuku vlivem prostředí. Útlum je závislý na kmitočtu ultrazvukových kmitů a využívá se především pro volbu vhodné zobrazovací frekvence. Ultrazvuková spektroskopie s vysokým rozlišením je založena na současném měření ultrazvukového útlumu a ultrazvukové rychlosti při průchodu analyzovaným prostředím, jenž oba parametry ovlivňuje. Jedná o komparativní metodu měření, kdy je přístroj opatřen dvěma měrnými celami, ve kterých se nachází různé prostředí (například referenční prostředí a měřený vzorek), kde měření probíhá zároveň. Výsledné hodnoty ultrazvukové rychlosti a útlumu obou prostředí se sečtou (paralelní režim), nebo se stanoví jejich rozdíl (diferenciální režim) [31.], [32.], [33.], [39.]. Princip měření ultrazvukových vln je znázorněn na Obr. 9.



Obr. 9 Schéma ultrazvukového spektrometru [38.].

Ultrazvuková rychlost je měřena prostřednictvím opakované komprese a dekomprese materiálu, kdy při stlačování a uvolňování jsou zaznamenávány přitažlivé či odpudivé interakce mezi molekulami vzorku, jenž mají za následek specifické změny mikro-elastických vlastností. Deformace je v tomto případě tak rychlá, že ve výsledku nemá destruktivní dopad na analyzovaný materiál. Rychlost průchodu ultrazvukové vlny je ovlivněna molekulovým uspořádáním, mezimolekulárními interakcemi, hustotou a reologickým chováním, přičemž

nejvíce se projevuje vliv elastické odezvy materiálu. Schopnost prostupu vlny různými druhy prostředí je znázorněno na Obr. 10. z něhož vyplývá, že ultrazvuková vlna prostupuje nejrychleji pevnými látkami díky nejvíce elastickému charakteru. Z měření ultrazvukové rychlosti jsme schopni určit molekulární uspořádání, mezimolekulární interakce ale i elasticitu a hustou, které molekulárním uspořádáním úzce souvisí [39.].



Obr. 10 Ovlivnění rychlosti průchodu ultrazvukové vlny v závislosti na druhu prostředí [36.]

Ultrazvukový útlum je měřen jako energetická ztráta ultrazvukové vlny. Energetická ztráta je zapříčiněna absorpcí a rozptylem energie. Útlum vzorku může vyjadřovat například viskozitou vzorku, při níž dochází k disipaci energie na teplo. Měřením ultrazvukového útlumu umožňuje analyzovat mikrostrukturu materiálu, včetně velikosti jejích částic. Dále umožňuje sledovat kinetiku chemických reakcí, změny struktury spojené s agregací řetězců při gelování, proces krystalizace (stanovení teploty tání) další dynamické procesy [37.], [38.], [39.].

1.4.2 Použití

V praxi je použití ultrazvukových vln široce rozšířené v oboru lékařství, kdy dochází k prostupu vlny měkkou tkání a vytvoření 3D obrazu vyšetřované oblasti. Dále ultrazvukové vlny nachází uplatnění pro vizualizaci kazů či defektů mikrostruktury uvnitř i na povrchu pevných vzorků nebo stanovení homogenity vzorku [40.]. Ultrazvuková spektroskopie s vysokým rozlišením (HR-US) se využívá například na určení kinetiky chemických reakcí, měření teplotních závislostí, sledování mezifázových přechodů, popis konformačních změn polymerů, detekci interakce antigen-protilátka a mnoho dalších aplikací. Konkrétním příkladem použití ultrazvukové spektrometrie je měření koncentrace micel v koloidních roztocích huminových kyselin, kde obsah micel zapříčiňuje pokles ultrazvukové rychlosti (zvyšuje se elastický charakter systému) [41.].

2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

Chování roztoku a sol-gel proces **karagenanu** je poměrně rozsáhle studován mnohými technikami jako je reologie, diferenciální skenovací kalorimetrie (DSC), skenovací emisní elektronová spektroskopie, termální analýza, optická otáčivost, rozptyl světla, rentgenová difrakce, dielektrická relaxace, mikroskopie atomárních sil (ATM) apod. Ve většině případů se však jedná o studium těchto polysacharidů s přidavkem iontů. Použití reologických postupů pro popis přechodu a zkoumání viskoelastických vlastností karagenanu ve vodě v širší škále koncentrací zatím nebylo popsáno. Základní principy gelovatění karagenanu už jsou známy nejméně tři desetiletí, nicméně se jedná o poměrně složitý dynamický proces, jehož průběh je ovlivněn hned několika faktory (přítomnost a druh iontů alkalických kovů, teplota, čas, pH, koncentrace karagenanu atp.). Z toho důvodu je mechanismus procesu průběžně přezkoumáván a upravován dle novějších experimentálních výsledků.

Obecně je literaturou přijímáno, že gelovatění κ -karagenanu probíhá od určité (tzv. kritické c_{krit}) koncentrace karagenanu v roztoku a mechanismus mezifázového přechodu je dvoukrokový – při vysokých teplotách se molekuly karagenanu nachází v neuspořádaném stavu náhodného klubka, při ochlazování přechází do uspořádané struktury α -helixu, tedy dvoušroubovice. Dalším krokem gelovatění je agregace dvoušroubovic do větších celků, což vede k tvorbě nekonečné trojdimenzionální sítě gelu. Mezi základní pilíře výzkumu κ -karagenanových gelů patří diagram popisující oblast náhodného klubka, oblast konformace dvoušroubovic a oblast agregované struktury gelu ze studie Rochas a Rinaudo [43.] a dále určení dynamického mechanického chování v kritickém bodě gelovatění (kritická koncentrace, kritická teplota) pomocí Winter-Chambon kritéria [45.].

Ve starších člancích byly vedeny spekulace, zda za určitých podmínek (například nižší koncentrace karagenanu, přidavek nesítujících činidel či iontů) nedochází k přechodu struktury do konformace dvoušroubovice, nýbrž jsou tvořeny lineární šroubovice.

Nickerson a další [46.] ve své studii rozebírají konformační změny κ -karagenanu metodou statického rozptylu světla, cirkulárního dichroismu a viskozimetrie, z které vyplývá, že κ -karagenan se v uspořádané konformaci vždy nachází v konformaci α -helixu. Htánh et al. [47.] potvrdili, že ve vodných roztocích gelujícího typu karagenanu (κ -, ι -, λ -, β - a θ -karagenany) dochází ke stáčení anhydridgalaktózové sekvence do konformace dvoušroubovice a objasnili vliv sulfátových skupin v tomto procesu.

Núñez-Santiago a Tecante věnovali dvě studie [48.], [49.] stanovení bodu gelace a popisu viskoelastických vlastností κ -karagenanu v přítomnosti draselných iontů metodou DSC a reologie. Z DSC testů byl bod gelace stanoven jako největší teplotní pík. Pomocí reologických testů byl sol-gel přechod stanoven ze změn dynamických modulů s měnící se teplotou a frekvencí (s využitím Winter-Chambon kritéria), prostřednictvím závislosti dynamických modulů při konstantní frekvenci a napětí na teplotě ohřívání a ochlazování a pomocí měření ztrátového úhlu, konkrétně v bodě, při němž se ztrátový uhel stává nezávislý na frekvenci. Nejpresnější stanovení bodu gelace bylo získáno metodou kritického ztrátového úhlu (tzv. *critical phase angle procedure*).

Ueda a kolektiv [50.] ve své práci popisují teplotní závislosti κ -karagenanu v prostředí KCl se sonifikovanými draselnými ionty metodou optické rotace a SEC-LALLS (gelová chromatografie kombinovaná s laserovým paprskem s malým úhlem rozptylu). Ze studie

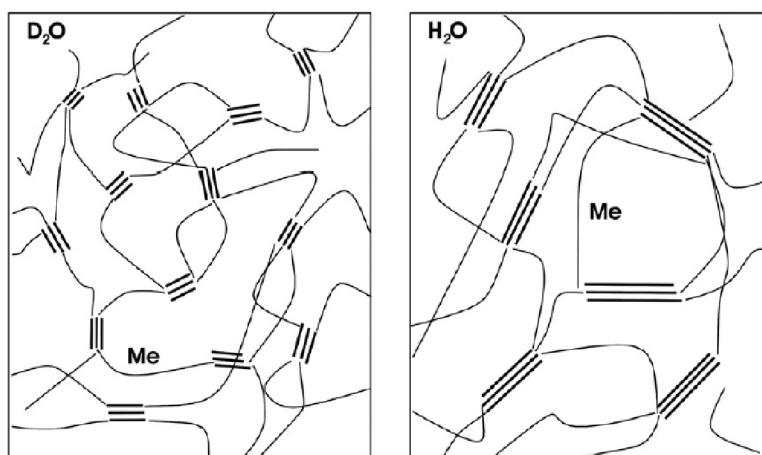
vyplývá, že v roztoku karagenanu s nízkou koncentrací solí nedocházelo ke změně molekulární hmotnosti se změnou teploty. Jakmile se však koncentrace soli ve vzorku zvýšila, docházelo ke zvýšení molekulární hmotnosti při přechodu z náhodného klubka do konformace dvoušroubovice, která měla dimerizovanou molekulární hmotnost. Při zvýšení obsahu solí docházelo navíc k agregacím dimerizovaných dvoušroubovic. Konformační přechod byl doprovázen hysterezi mezi křivkou ohřevu a křivkou chlazení optické rotace. Obdobné experimentální výsledky přítomnosti teplotní hystereze (a její zvyšování s koncentrací karagenanu a s obsahem solí) a termoreverzibilních vlastností κ -karagenanu byly popsány v několika studiích 0, [52.], [53.].

Morris et al. [54.] studovali vliv teploty na mezifázový přechod karagenanů metodou DSC a optickou rotací v prostředí různých iontů. V κ -karagenanu bylo prokázáno konformační uspořádání helikálních struktur, jenž agregují a vykazují značnou hysterezi mezi ohřevem a chlazením. Z článku vyplývá, hystereze je charakteristická vlastnost pro dvoušroubovice, u jednoduchých šroubovic je nemožné ji pozorovat. Je však potřeba zdůraznit fakt, že hystereze silně závisí na rychlosti skenování (neboli rychlosti ohřívání/ochlazování). V další části práce je uvedeno tvrzení, že entalpie spojená s agregací (sol-gel přechodem) je větší než entalpie gel-sol přechodu. Vzhledem k tomu, že mezifázový přechod je termoreverzibilní (vlastnosti na začátku a na konci měření se nemění), musí se jednat také o rovnovážný děj, jehož celková energie uvolněná při ochlazení se musí rovnat celkové energii přijímané při ohřevu. Z toho důvodu shledáváme tvrzení jako mylné.

Jak již bylo uvedeno, téměř všechny výzkumy karagenanů jsou prováděny v přítomnosti iontů. Citlivost karagenanu na přítomnost solí ovlivňující mezifázový přechod a agregační chování velmi dobře vystihuje článek Y. Chena a jeho kolegů [56.], kteří studovali zajímavé téma vlivu způsobu přípravy na chování κ -karagenanu. Výsledky ukázaly, že čistá forma karagenanu v roztoku s draselnými ionty, dostupná pro chemické účely/použití v lékařství, vykazuje velmi odlišné reologické chování oproti nečištěnému karagenanu, který je běžně dostupný pro komerční účely, například v potravinářském průmyslu. Reologické vlastnosti čištěného κ -karagenanu o koncentraci 10 g/l s obsahem draselných iontů vykazuje chování odpovídající chování slabého gelu. Také bylo prokázáno, že čištěný karagenan má výrazně menší lineární oblast viskoelastivity oproti nečištěnému κ -karagenanu stejné koncentrace.

Na podobném (zdanlivě nepatrném) rozdílu bylo založeno měření karagenanových gelů v tvrdé D_2O a měkké H_2O vodě autorů Cardoso a Cabanini [57.]. Z reologického měření frekvenčních závislostí těchto gelů vyplývá, že v přítomnosti těžké vody jsou dynamické moduly podstatně vyšší. To poukazuje na vyšší počet vytvořených zesíťovaných míst (křížovatek, případně spojovacích zón) ve struktuře gelu. Spojovací zóny jsou tvořeny především agregací dvoušroubovic karagenanu prostřednictvím columbických interakcí, přičemž D_2O poskytuje vyšší počet zesíťovaných míst, vzhledem k vyšší elektrické permitivitě. Vliv na proces přechodu konformace z náhodného klubka do dvoušroubovice může mít rozdílná délka vazeb v rozpouštědle ($D_2O < H_2O$). V tomto procesu se totiž neuspořádané segmenty polysacharidu začnou přetvářet do tvaru dvoušroubovice, jež se musí vlézt do struktury rozpouštědla (viz Obr. 11). Dle druhu a role přítomné soli je změna konformace z náhodného klubka do α -helixu indukována podle rozdílných sil interakcí mezi rozpouštědlem a zkoumanou látkou. Bylo zjištěno, že molární hmotnost spojovacích bodů karagenanového gelu v D_2O

je vždy menší než v případě H_2O . To může být vysvětleno buď větší délkou dvoušroubovice, nebo vyšší hustotou síťovacích bodů, případně oba efekty přispívají společně. Důvodem, proč se autoři nepřiklání k žádné z možností je fakt, že při přechodu do stavu gelu může být proces tvorby dvoušroubovice daleko rychlejší než proces jejich agregace, anebo mohou oba procesy probíhat zároveň. Bohužel pro mnoho biopolymerních gelů je rozlišení těchto dvou asociativních jevů prakticky nemožné.

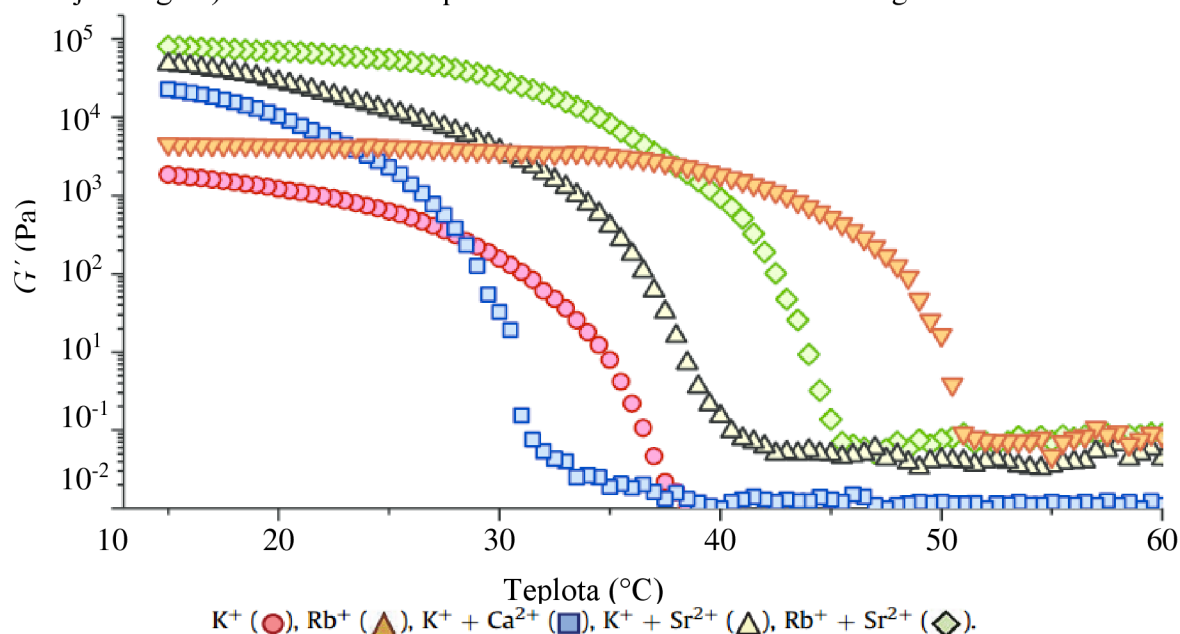


Obr. 11 Vliv použití tvrdé a měkké vody jako rozpouštědla na strukturu karagenanových gelů

Iijima et al. [58.] ve své studii zkoumali vliv tepelné historie na gel-sol přechod karagenanu pomocí vysoce citlivé diferenciální skenovací kalorimetrie (DSC). Při koncentraci nižší než 20 g/l se po ustálení vodného roztoku do rovnováhy vytvořil homogenní gel. Jakmile koncentrace přesáhla 30 %, bylo možné pozorovat vedlejší pík s nižší teplotou, než nabýval maximální pík. Tento vedlejší pík je ve větší míře pozorovatelný při exotermickém přechodu (ochlazování) oproti endotermickému přechodu. V dané studii je poměrně rozsáhle diskutován vliv rychlosti změny teploty na agregaci dvoušroubovic v průběhu mezifázového přechodu (konkrétně se rychlost ochlazování pohybovala v intervalu od 0,1 do 5 °C/min), který může výrazně ovlivnit velikost spojovací zóny. Výsledky ukazují, že při nízké rychlosti ohřevu se tvoří velké spojovací zóny (agregují velké dvoušroubovice), kdežto při rychlém ochlazování vznikají malé spojovací zóny. Důvodem je, že kvůli nadbytečnému počtu molekulárních řetězců dochází při pomalém ochlazování k agregaci již propojených dvoušroubovic karagenanu s dalšími řetězci umístěnými v určité vzdálenosti. Iijima vysvětluje přítomnost vedlejšího píku jako důsledek různých typů vad ve spojovací zóně a vznik různě velkých šroubovic. Mnoho experimentálních výsledků však naznačuje, že karagenany tvoří homogenní gely. Při porovnání výsledků z experimentální části naší práce vyplývá, že skutečně může přítomnost sub-píku znamenat vznik velkých spojovacích zón ve struktuře gelu. V našem případě má však na tento děj vliv vysoká molekulární hmotnost, nikoliv změna rychlosti ochlazování.

Aktuálně se tématem karagenanových solí zabývají vědci z týmu vedeného M. Robalem [59.]. V uvedeném článku je aplikováno několik rozličných metod pro výrobu monoionních solí κ -, ι -, a λ -karagenanu a charakterizaci jejich fyzikálně-chemických vlastností metodou nukleární magnetické rezonance, Ramanovou spektroskopií, emisní spektroskopií s indukčně vázaným plazmatem, gelovou chromatografií a reometrií. Pro κ -karagenan platí, že schopnost tvořit gely

se zvyšuje s obsahem kationtů v pořadí $\text{Li}^+ < \text{Na}^+ < \text{Mg}^{2+} < \text{Ca}^{2+} < \text{NH}_4^+ < \text{K}^+$, pro typ ι -karagenan pak platí $\text{NH}_4^+ < \text{Li}^+ < \text{Na}^+ < \text{K}^+ < \text{Ca}^{2+}$. Rovněž v této studii se autoři zabývají rozdíly v reologických vlastnostech čištěného karagenanu (s obsahem jediného kationtu) a typického komerčního karagenanu. Průběh teplotních závislostí dynamických modulů karagenanu o koncentraci 15 g/l s obsahem jednoho nebo dvou iontů je znázorněn na Obr. 12, z něhož vyplývá, že počet agregovaných molekul během procesu rozrůstání gelové sítě (a tím i rigidita vznikajícího gelu) závislí na druhu přidaného kationtu do roztoku karagenanu.



Obr. 12 Závislost paměťového modulu na teplotě ochlazování v intervalu od 60 do 10 °C pro κ -karagenan o koncentraci 15 g/l v přítomnosti různých iontů (viz legenda).

Použití ultrazvukového spektrometru s vysokým rozlišením na popis mezifázového přechodu karagenanu bylo navrženo týmem vývojářů firmy Ultrasonic Scientific, jejichž práce ([59.], [60.]) byla zaměřena na popis tání karagenanových gelů vícefrekvenční ultrazvukovou analýzou. Výsledky měření popisují, že při teplotě od 20 do 30 °C a poté od 48 °C výše, se ultrazvuková rychlost snižuje v závislosti na teplotě (z reologického pohledu je to důsledek snížení paměťového modulu G' s teplotou. Mezi tímto teplotním intervalem se nachází mezifázový přechod, který je pozorovatelný jako zvýšení ultrazvukové rychlosti následkem porušení intermolekulárních spojů mezi karagenanovými dvoušroubovicemi.

Většina studií, jenž souvisí s tématem teplotních závislostí **hyaluronanu**, je založena na popisu mezifázových přechodů či mechanických a viskoelastických vlastností pro kompozity hyaluronanu s další biokompatibilní látkou. Hlavní důvod pro začlenění hyaluronanu do matrice další sloučeniny je fakt, že samotný hydrogel hyaluronanu velmi rychle degraduje. Vhodně zvolená kombinace hyaluronanu s biopolymerem umožňuje výstavbu biomateriálu pro konkrétní architekturu, úpravu mechanických vlastností, přidání biologické signální kapacity a podobně. V případě studií kompozitů je studována především příprava a vlivy jako je teplota, pH a iontová síla.

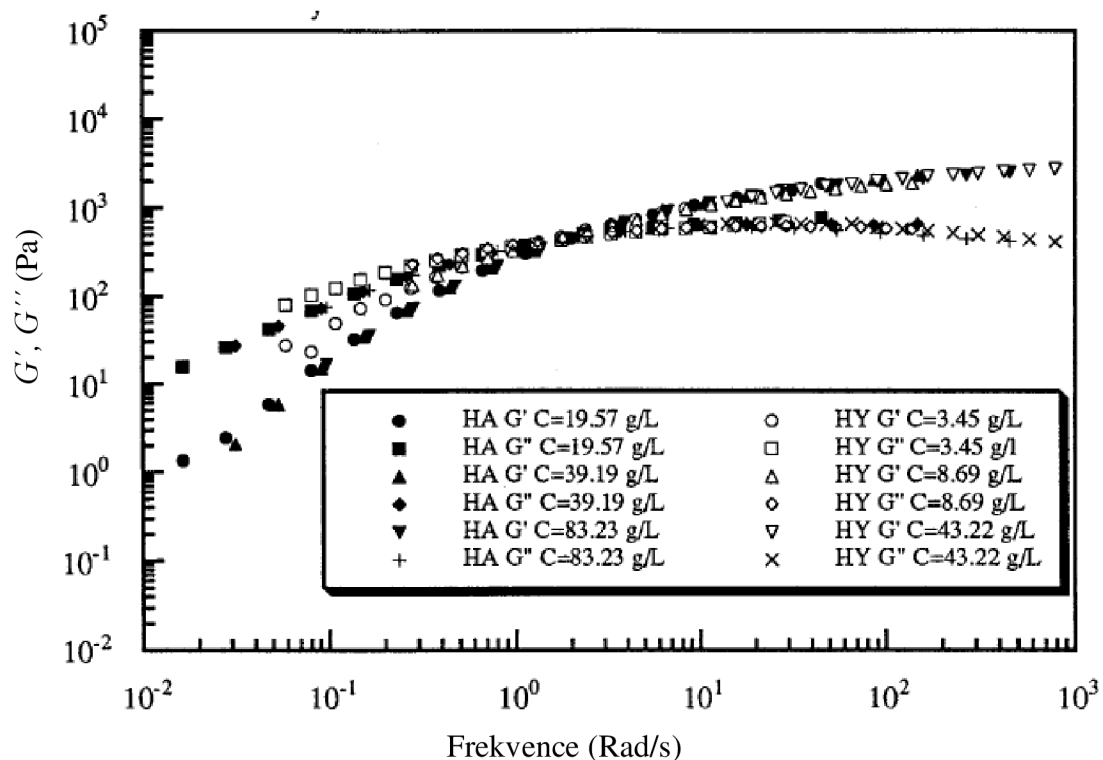
Yang a kolektiv [61.] se zabývali studiem procesu gelace kompozitů kolagen-hyaluronan pomocí časově závislé oscilační reologie (kde byla monitorována viskoelastická gelu a rozvoj

sítě) a metodou konfokální odrazivé mikroskopie (CRM). Konkrétně byly studovány vlastnosti kolagen-hyaluronanových gelů v rovnováze při konstantní teplotě 32 a 37 °C a v průběhu gelace. Ze studie vyplývá, že přidáním hyaluronanu (4 g/l) se mírně mění mechanické vlastnosti a struktura systémů jak v rovnováze, tak v průběhu gelovatění. S rostoucím poměrem hyaluronanu homogenně distribuovaného mezi kolagenovými vlákny klesá teplota gelace.

Studie Ambroso et al [62.] se zabývala reologickým měřením hyaluronanu a jeho derivátů ve vodných roztocích pro vyhodnocení stability viskozity toku a viskoelastických vlastností, na základě kterých se docílí požadovaných vlastností vytvořených materiálů dle koncentrace, molekulární hmotnosti a chemické struktury. Při nízké molekulární hmotnosti a koncentraci se roztoky hyaluronanu chovají jako viskózní kapaliny, zatímco při vyšší molekulární hmotnosti a koncentraci hyaluronanu vzorky vykazují vyšší hodnoty paměťového modulu a jejich chování je podobné měkkým gelům. Ze studie vyplývá, že zvýšení molekulární hmotnosti má větší vliv oproti koncentraci. Důvodem je podpoření zaplétání řetězců molekul hyaluronanu v systému při zvyšování molekulární hmotnosti. Porovnáním vlastností hyaluronanu s jeho deriváty se ukázalo, že je možné dle potřeb měnit reologické vlastnosti, přičemž se zachovává biologická kompatibilita materiálu.

Zhao a další se rovněž věnovali tématu chemické modifikace [63.][61.]. Je obecně známo, že molekula hyaluronanu má přirozenou dobu setrvání v tkáni jen několik dní (vlivem hyaluronidázy a degradace volnými radikály), to je ovšem nedostatečná doba například pro aplikace tkáňového inženýrství. Pro snížení biodegradace je požadována modifikace hyaluronanu, které je dosahováno chemickou derivatizací nebo chemickým zesíťováním. V závislosti na konkrétním typu činidla se mění délka spojovací zóny a také je tímto způsobem řízený stupeň zesíťování (tedy biostabilita) a odolnost vůči degradaci. V dané studii byly několika způsoby připravovány zesíťované gely z hyaluronanu (1 800 kDa) a hydrofobního epoxidu, a jejich reologické vlastnosti byly měřeny na reometru při konstantní teplotě 25 °C. Výsledky této studie prokazují, že nezesíťovaný hyaluronan se chová jako viskoelastická tekutina a dochází zde k překřížení dynamických modulů. Zatímco v případě zesíťovaného hyaluronanu jsou dynamické moduly prakticky nezávislé na frekvenci a paměťový modul je vždy vyšší než ztrátový modul (charakter blížící se pevné látce).

Kaufman et al [64.] využívali různé reologické techniky pro zkoumání chování roztoků hyaluronanu, hylanu (zesíťovaný hyaluronan) a healonu (proprietární hyaluronan) v široké škále molekulárních hmotností. Objektem studia bylo především porovnávání rozdílů mezi lineárním hyaluronanem a zesíťovaným hylanem s použitím stejných molekulárních hmotností dochází při nízké frekvenci ke zvýšení dynamických modulů. Výsledky poukazují na rozdíly ve struktuře, kde zředěný roztok hylanu má schopnost vytvářet síť. Nicméně při vyšších koncentracích hylanu (kdy je dosaženo homogenní sítě) nepozorujeme zvýšení smykové viskozity ani elastického modulu viz Obr. 13. Toto chování je přisuzováno polotuhému (semirigidnímu) charakteru hyaluronanového řetězce s převahou spojovacích bodů v polozřetěžené doméně hylanu. Ze studie dále vyplývá, že roztok vysokomolekulárního hyaluronanu vytváří vysoce zapletenou dynamickou síť, která je zesílena interakcí řetězců mezi sebou, což vede k rozvoji terciální a vyšší struktury. Rovněž zde platí, že pro zesílení struktury sítě má větší vliv spíše zvyšování molekulární hmotnosti nežli zvyšování koncentrace hyaluronanu.



Obr. 13 Křivky ztrátového (G'') a pamětového (G') modulu v závislosti na frekvenci pro hyaluronan HA a hylan HY s molekulární hmotností 1 300 kDa a koncentrací uvedenou v legendě grafu [64.].

Z uvedeného výčtu studií vyplývá, že reologické oscilační testy jsou vhodné na sledování změn viskoelastických vlastností a mezifázového přechodu biopolymerů se změnou teploty. Na základě studií popsanych v rešerši byly navrzeny vhodné oscilační testy pro popis teplotních závislostí a viskoelastického chování karagenanu a hyaluronanu. Výsledky z reologického měření byly doplněny o data z ultrazvukové spektroskopie s vysokým rozlišením.

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Použité chemikálie

κ -karagenan: Sigma Aldrich (Česká republika)

Hyaluronan sodný: Contipro Biotech s.r.o. (Česká republika)

Seznam použitých šarží je uveden v Tab. 2 a Tab. 3.

Tab. 2 *Karagenan použitý při experimentech.*

<i>κ-karagenan</i>				
<i>CAS</i>	<i>M_w</i> (<i>kDa</i>)	<i>vlhkost</i> (%)	<i>šarže</i>	<i>označení</i>
11114-20-8	316,74	6,825	BCBK1080V	šarže 1 S1
11114-20-8	539,17	8,736	BCBN9702V	šarže 2 S2

Molekulární hmotnost karagenanu byla experimentálně stanovena pomocí rozměrově vylučovací chromatografie s víceúhlovou detekcí rozptylu (HPLC/ SEC-MALS) s chybou ($316,74 \pm 5,81$) kDa pro šarži 1 a ($539,17 \pm 2,51$) kDa pro šarži 2. Odpovídající grafy (Obr. X1 a Obr. X2) jsou uvedeny v příloze.

Celkový obsah vody v karagenanu byl stanoven pomocí termogravimetrické analýzy (TGA), kde pro šarži 1 byla počáteční hmotnost 4,220 mg a pro šarži 2 bylo použito množství 4,392 mg karagenanu. Měření probíhalo v inertní atmosféře dusíku. Výsledky jsou znázorněny v příloze jako Obr. X3 a Obr. X4. Obě šarže karagenanu byly uchovávány při laboratorní teplotě 23 °C na suchém místě.

Tab. 3 *Hyaluronan sodný použitý při experimentech.*

<i>hyaluronan sodný</i>				
<i>M_w*</i> (<i>kDa</i>)	<i>M_w</i> (<i>kDa</i>)	<i>vlhkost</i> (%)	<i>šarže</i>	<i>označení</i>
250–450	249,61	6,395	230215-E1	nízkomolekulární LW
1 500–1 750	1687,63	10,990	214-9062	vysokomolekulární HW

*M_w** – molekulární hmotnost stanovená výrobcem.

Molekulární hmotnost hyaluronanu byla rovněž stanovena pomocí SEC-MALS analýzy, kde chyba měření pro nízkomolekulární hyaluronan byla stanovena na ($249,61 \pm 16,17$) kDa,

a pro měření vysokomolekulárního hyaluronanu chyba činila $(1687,63 \pm 55,77)$ kDa. SEC-MALS analýza hyaluronanu je znázorněna v příloze jako Obr. X5 a Obr. X6.

Vlhkost hyaluronanu (viz Obr. X7 a Obr. X8 v příloze) byla metodou TGA stanovena z 6,401 mg nízkomolekulárního hyaluronanu a 6,388 mg vysokomolekulárního hyaluronanu, přičemž měření také probíhalo v atmosféře N₂. Hyaluronan sodný je uchováván ve speciálním uzavřeném boxu, jenž vzorky chrání před vzdušnou vlhkostí.

3.2 Příprava vzorků

3.2.1 Příprava vzorků karagenanu ve vodě

3.2.1.1 Šarže 1

První část vzorků karagenanu šarže 1 v koncentračním rozsahu 0,5 až 20 g/l byla připravována navážením požadovaného množství pevného karagenanu na analytických vahách a jeho rozpouštěním v ultra čisté deionizované vodě z přístroje Purelab Option ELGA. Následně byly roztoky míchány na míchače v uzavřené nádobě nejméně po dobu 24 hodin, aby došlo k dokonalému rozpuštění. Roztoky byly skladovány v uzavřené nádobě v chladničce při teplotě do 5 °C. Teoretické hodnoty navážek pro danou koncentraci a objem jsou uvedeny Tab. X1 v příloze. Dle naváženého množství byl poté přepočítán potřebný objem tak, aby byla koncentrace roztoků co nejpřesnější (viz Rovnice 6). Hodnoty hmotnosti, objemu a koncentrace všech vzorků znázorňuje Tab. X2 v příloze.

Vzniklé vzorky byly za laboratorních podmínek transparentní, bez chuti a zápachu. Při nízké koncentraci se jednalo o roztok nerozeznatelný od vody, s rostoucí koncentrací rostla viskozita kapaliny, a při vyšších koncentracích (20 g/l karagenanu ve vodě) již vzorek tvořil měkký, poddajný gel se světle béžovou barvou.

3.2.1.2 Šarže 2

Druhá část vodných roztoků karagenanu o koncentraci v rozmezí 20–50 g/l byla připravována z nové šarže (S2), jelikož předchozí šarže již byla vypotřebována. Nejprve byl aplikován postup přípravy totožný s postupem pro šarži 1, nicméně připravené roztoky vykazovaly rozdílné vlastnosti a vzorky se nepodařilo tímto způsobem připravit (roztok obsahoval nerozpuštěnou část, která se již nedokázala prostřednictvím magnetické míchačky promíchat, jelikož docházelo k tvorbě velmi pevného gelu). Z toho důvodu bylo navrženo několik metod pro přípravu vzorků karagenanu o vyšších koncentracích, z nichž se jako nejoptimálnější se ukázalo použití ultrazvukové lázně s ohřevem (Obr. 14). Dalším vhodným postupem by mohlo být použití magnetické míchačky s ohřevem, kde se roztok karagenanu ohřívá ve vodní lázni po dobu nejméně 2 hodin. V tomto případě by však bylo nutné míchačku temperovat tak, aby nepřesahovala teplotu 110 °C, čímž by mohlo dojít k degradaci vzorku [57.].



Obr. 14 Ultrazvuková lázeň s ohřevem Bandelin DT510F, vhodná na sonifikaci a homogenizaci vzorků [73.].

Při samotné přípravě takto vysoce koncentrovaných roztoků karagenanu ve vodě bylo nezbytné požadované množství pevného karagenanu přidávat do objemu ultra čisté deionizované vody po menších částech. Také v tomto případě byl objem přepočítáván dle Rovnice 5 tak, aby odpovídal přesné koncentraci karagenanu ve vodě. Následně byly připravené vzorky umístěny do ultrazvukové lázně na teplotu 80 °C po dobu nejméně 60 minut, kde došlo k dokonalé homogenizaci. Poté byly dané vzorky umístěny na míchačku, dokud nedošlo k úplnému ztuhnutí gelu. Pokud měření nebylo provedeno následující den, byly vzorky skladovány v chladničce při teplotě do 5 °C. Všechny hodnoty hmotnosti, objemu a koncentrace vzorků karagenanu ve vodě znázorňuje Tab. X1 v příloze.

Vzorky karagenanu ve vodě o vysoké koncentraci se za laboratorních podmínek (23 °C, 198,15 kPa) nacházely ve formě gelu. Tento gel byl neprůhledný (až opaleskující), se světle béžovou barvou, bez chuti a bez zápachu. Zajímavé je, že oproti šarži 1 tvořil karagenan šarže 2 mnohem pevnější gely, a to i při totožné koncentraci 20 g/l. Rozdíly v přípravě vzorků karagenanu S1 a S2 jsou diskutovány v odstavci 3.4.1.4 a 3.4.2.1.

Rovnice 5 Příklad výpočtu teoretické hmotnosti navážky:

$$m_{teor.} = \frac{m_{konc.} \cdot V_{teor.}}{V_{konc.}} = \frac{20 \cdot 50}{1000} = 1 \text{ g} \quad (5)$$

Kde:

$m_{teor.}$ – teoretická hmotnost navážky pevného karagenanu/hyaluronanu (g)

$m_{konc.}$ – množství karagenanu odpovídající požadované koncentraci roztoku (g)

$V_{teor.}$ – objem odpovídající požadované koncentraci roztoku (ml)

$V_{konc.}$ – objem rozpouštědla (ml)

Rovnice 6 *Příklad přepočtu objemu rozpouštědla dle naváženého množství látky:*

$$V_{skut.} = \frac{V_{teor.} \cdot m_{skut.}}{m_{teor.}} = \frac{50 \cdot 0,9974}{1} = 49,87 \text{ ml} \quad (6)$$

Kde:

$V_{skut.}$ – objem potřebný k dosažení přesné koncentrace (ml)

$V_{teor.}$ – objem odpovídající požadované koncentraci roztoku (ml)

$m_{skut.}$ – navážené množství karagenanu/hyaluronanu (g)

$m_{teor.}$ – teoretická hmotnost navážky pevného karagenanu/hyaluronanu (g)

3.2.2 Příprava vzorků hyaluronanu ve vodě

Roztoky nízkomolekulárního a vysokomolekulárního hyaluronanu byly připravovány navážením požadovaného množství hyaluronanu sodného na analytických vahách a jeho následným přímým rozpuštěním v ultračisté deionizované vodě z přístroje Purelab Option ELGA. Hodnoty objemů a hmotností pro přípravu přesné koncentrace jsou uvedeny v Tab. X2 (v příloze), včetně výsledných koncentrací. Vzorky byly připravovány do uzavíratelných nádob, a navíc byly opatřeny izolačním Parafilmem proti vzdušné vlhkosti. Následně byly řádně promíchávány na magnetické míchače po dobu 24 hodin, aby bylo dosaženo homogenity ve vzorku. Mezi měřeními byly vzorky uchovávány v chladničce při teplotě do 5 °C, a to maximálně po dobu 5 dnů, aby se zabránilo případné degradaci [74.].

Roztoky nízkomolekulárního hyaluronanu a vysokomolekulárního hyaluronanu ve vodě o nižší koncentraci (do 10 g/l) byly za laboratorních podmínek transparentní a bez zápachu. S rostoucí koncentrací rostla i viskozita vzorků. Vzorky vysokomolekulárního hyaluronanu ve vodě s vyšší koncentrací (10–30 g/l) tvořily za laboratorních podmínek zesíťované hydrogely, které však nebyly zdaleka tak kompaktní jako pevné karagenanové gely. Výsledné gely byly průhledné, nedržely tvar a měly lepivou konzistenci.

3.2.3 Příprava vzorků pro HPLC/SEC-MALS

Vzorky karagenanu šarže 1 a 2 o koncentraci 2 g/l byly připraveny desetinásobným zředěním 1 ml roztoku karagenanu ve vodě o koncentraci 20 g/l. Vzorky nízkomolekulárního a vysokomolekulárního hyaluronanu o koncentraci 2 g/l byly připraveny přesným navážením 0,01 g hyaluronanu na analytických vahách a jeho přímým rozpuštěním v 5 ml ultra čisté deionizované vodě z přístroje Purelab Option ELGA. Všechny připravované vzorky byly míchány na magnetické míchače po dobu 24 hodin a následně změřeny.

3.3 Použité metody a zařízení

3.3.1 Použité přístroje

- Jednotka pro přípravu ultračisté deionizované vody ELGA Purelab Option

- Ultrazvuková lázeň s ohřevem BANDELIN DT510F
- Magnetická míchačka s ohřevem IKA RH Basic
- Centrifuga EPPENDORF Mini Spin
- Kombinované zařízení pro rozměrově vylučovací chromatografii SEC-MALS
- Termogravimetrický analyzátor PERKIN ELMER TGA 6
- Reometr TA INSTRUMENTS AR-G2
- Ultrazvukový spektrometr s vysokým rozlišením ULTRASONIC SCIENTIFIC HR-US 102
- Termostat Thermo HAAKE C25P

3.3.1.1 Reometr AR-G2

Reometr umožňuje sledování vlastností vzorku v několika různých režimech (např. oscilační, relaxační, tokové testy), přičemž proměnnou může být napětí, frekvence, teplota, smyková rychlost nebo čas. Při měření oscilačních testů přístroj současně zaznamenává několik veličin, např.: paměťový G' (Pa), ztrátový G'' (Pa) a komplexní G^* (Pa) modul, ztrátový uhel δ ($^\circ$), úhlový posun ω (Hz), index toku n (Pa·s). Pomocí magnetického ložiska je reometr schopen měnit velmi nízké hodnoty otáčivého momentu (od 0,03 μ Pa do 200 mPa, s rozlišením 1 μ Pa). Přístroj také umožňuje měřit smykové napětí v rozsahu $8 \cdot 10^{-4}$ –508 Pa (v závislosti na použité geometrii). Měřitelná frekvence se pohybuje v mezích $1,19 \cdot 10^{-7}$ –100 Hz a teplotu je možné měřit v intervalu od -40 až do 200 $^\circ$ C, přičemž rychlost ohřevu může být až 50 $^\circ$ C/min s přesností $0,1$ $^\circ$ C. Měřicí systém je zde temperován Peltierovou deskou či Peltierovým systémem válec-válec. Hodnota normálové síly se pohybovala od 4 N maximálně do 10 N (dle tuhosti vzorku). Vzhledem k tomu, že při měření teplotních závislostí dochází ke změnám teploty celého měřicího systému, je nutné vybranou geometrii řádně kalibrovat. Po kalibraci je přístroj sám schopen zohlednit tepelnou roztažnost materiálu, ze kterého je geometrie vyrobena. Expanze či kontrakce materiálu je automaticky kompenzována změnou polohy horní pohyblivé části geometrie ($0,6$ μ m/ $^\circ$ C) a díky tomu nedochází ke změnám hodnot nastavené měřicí mezery v průběhu měření[66.], [67.], [68.], [69.].

3.3.1.2 Ultrazvukový spektrometr s vysokým rozlišením HR-US 102

Ultrazvukový spektrometr disponuje několika měřicími režimy, jako je títrační (s automatickým mícháním), kinetický (měří za konstantní teploty) či režim teplotních ramp. Zařízení je schopno současně zaznamenávat ultrazvukovou rychlost a zeslabení s vysokým rozlišením s reprodukovatelností (pro rychlost $\pm 0,2$ mm/s a pro zeslabení $0,2$ %). Přístroj disponuje dvěma celami pro paralelní či diferenciální analýzu vzorků. Rozmezí měřitelné frekvence se pohybuje v intervalu 2 – 18 MHz a teplotu je možno měřit od -20 do 120 $^\circ$ C s rozlišením $0,01$ $^\circ$ C. Přístroj je temperován externím termostatem firmy Thermo Haake s programovatelnou rychlostí ohřevu/ochlazení s nastavitelnými hodnotami teploty jednotlivých cyklů a celkového času temperace [70.], [71.].

3.3.2 Měření viskoelastických vlastností reometrem

Všechny vzorky karagenanu a hyaluronanu byly proměřovány na reometru RA-G2 (Obr. 15) od firmy TA Instruments, Spojené státy americké. Měření bylo prováděno použitím

dvou uspořádání (viz kapitola 1.3.4), první z nich – geometrie dvojitého válce – byla použita na tekutější roztoky s nižší koncentrací. Jednalo se o karagenan o koncentraci 0,5–3 g/l, nízkomolekulární hyaluronan o koncentraci 0,5–5 g/l a vysokomolekulární hyaluronan o koncentraci 1 g/l. Pro vyšší koncentrace karagenanu (10 až 50 g/l) a vysokomolekulárního hyaluronanu (5 až 30 g/l) byla použita ocelová deska typu „solvent gap“ s průměrem 40 mm. Před měřením vzorků byla zvolená geometrie vytemperována a kalibrována dle doporučení výrobce. Poté proběhlo rotační mapování pohyblivé části geometrie v celém rozsahu smykové rychlosti a byla nastavena nulová hodnota polohy geometrie. Každému testu předcházela relaxace a temperace vzorku při dané teplotě měření, tzv. *conditioning step*, po dobu 5 minut.

Vlastní měření na geometrii válec-válec probíhalo nadávkováním 7 ml vzorku do mezery mezi válci, poté byl pohyblivý válec nastaven do měřicí polohy (500 μm) a po nastavení parametrů (druh testu, interval měřené veličiny atd.) byl reometr spuštěn. Mezi jednotlivými testy byla geometrie vyšroubována z přístroje, očištěna destilovanou vodou a etanolem. Poté následovalo krátké mapování senzoru a mohlo proběhnout další měření.

Při použití geometrie deska-deska bylo na stacionární část nadávkováno množství cca 1 ml vzorku. Po nastavení měřicí polohy (500 μm) bylo odstraněno nadbytečné množství vzorku a na okraj pohyblivé desky (kde přicházel vzorek do styku s okolním prostředím) bylo aplikováno malé množství silikonového oleje, aby se zabránilo odpařování vzorku při zvýšené teplotě. Ze stejných důvodů byla na měřicí systém umístěna kovová krytka, která se nedotýkala senzoru. Po zadání všech parametrů byl přístroj spuštěn. Po ukončení testu byly obě desky očištěny destilovanou vodou a etanolem. Aby byly výsledky měření reprodukovatelné, byl každý test proveden nejméně dvakrát, a to vždy s nově nadávkovaným vzorkem. Získaná data byla vyhodnocována v programu TA Data Analysis a následně zpracována v Microsoft Excelu 2010.

Všechny vzorky byly měřeny v oscilačním režimu za použití následujících testů:

- *Strain sweep test* – měření viskoelastických vlastností v závislosti na amplitudě napětí od 0,01–200 % probíhalo při konstantní frekvenci 1 Hz (z lineární oblasti viskoelastivity) a konstantní teplotě 25 °C pro gely a 50 °C pro roztoky, proměřeno 6 bodů za dekádu. Z lineární oblasti viskoelastivity byla vybrána jako optimální amplituda napětí (deformace) hodnota 0,1 % pro všechny měřené vzorky, vyjma vzorku 10 g/l karagenanu, kde zvolená hodnota činila 0,3 %. Hodnoty napětí z této oblasti byly využity pro měření dalších oscilačních testů.
- *Frequency sweep test* – měří viskoelastické vlastnosti vzorků v rozmezí úhlové frekvence 0,01–20 Hz při konstantní amplitudě napětí (stanovené z lineární viskoelastické oblasti). Měření probíhalo při teplotě 25 a 50 °C, u vybraných vzorků navíc i při teplotě 37 °C, 6 bodů na dekádu.
- *Temperature ramp* – oscilační teplotní rampy pro sledování změn ve vzorku vlivem teploty popisují závislost viskoelastických vlastností na ohřevu/ochlazení s krokem 2 °C/min. Měření probíhalo při konstantním napětí 0,1 % (0,3 % pro karagenan 10 g/l) a konstantní frekvencí 1 Hz. Teplotní závislost zahrnovala ohřívání z 20–50 °C (gel-sol přechod), 5 minut *conditioning* a ochlazení z 50 na 20 °C (sol-gel přechod). Amplituda napětí byla nastavena na 0,1 %. Kromě toho proběhlo u vzorků 20 g/l karagenanu

a 20 g/l vysokomolekulárního hyaluronanu měření dvou teplotních ramp v intervalu 20–50 °C a 50–20 °C s konstantní frekvencí 10, 20, 40 Hz.

3.3.2.1 Optimalizace dávkování pevných gelů

Vzorky karagenanu šarže 2 (30–50 g/l) se při teplotě 25 °C (a méně) nacházely ve formě velmi pevného gelu, které nebyla geometrie deska-deska schopna stlačit do požadované velikosti měřicí mezery. Aby všechna měření probíhala za stejných podmínek a byla reprodukovatelná (stejná velikost měřicí mezery, normálové síly atd.) bylo zkoumáno několik postupů pro optimalizaci dávkování tuhých gelů. První dva způsoby, tj. rozsekání gelu na malé kousky a jejich nanesení na desku nebo nalití horkého roztoku karagenanu do formičky s požadovanou velikostí a následné ochlazení, se ukázaly jako poměrně časově náročné. Jako vyhovující postup se osvědčilo nadávkování pevného gelu na desku vytemperovanou na teplotu 75 °C, dále byla ihned snížena hlava reometru (s pohyblivou deskou) do měřicí polohy a teplota byla nastavena na 35 °C. Po dosažení této teploty byla hlava reometru zvednuta o 2 cm a vylisovaný vzorek byl zkontrolován, zda neobsahuje vzduchové bubliny. Pokud to bylo nutné, byl jemně mechanicky odlepen od vrchní pohyblivé desky a umístěn do vhodné polohy na stacionární desku. Následně byl reometr nastaven do měřicí polohy a temperován na 25 °C (v případě teplotních ramp 20 °C). Pro měření teplotních ramp se časově nejvýhodnější ukázala změna pořadí jednotlivých kroků (nejprve ochlazení, poté ohřev). Relaxace vzorku při teplotě 20 °C byla vynechána, aby nedošlo ke zmiňovanému přichycení tuhého gelu na rotující část geometrie (to by mělo za následek odskočení měřených veličin).

Pro karagenanové gely o vysoké koncentraci byl rozsah teplot 20–50 °C nedostatečný, proto byla měřena teplotní rampa s krokem 80–20 °C a následně 20–80 °C, nastavena rychlost 2 °C/min, bez *conditioning* testu. Zmíněná změna pořadí ohřívání a ochlazování usnadnila komplikované dávkování pevných gelů na desku reometru.



Obr. 15 Reometr AR-G2 od firmy TA Instruments [43.].

3.3.3 Měření ultrazvukové rychlosti spektrometrem s vysokým rozlišením

Vybrané vzorky vysokomolekulárního hyaluronanu a karagenanu byly měřeny ultrazvukovým spektrometrem s vysokým rozlišením (Obr. 16) od firmy Ultrasonic Scientific, Irsko. V módu teplotních ramp byla sledována relativní ultrazvuková rychlost vzorků karagenanu ve vodě o koncentraci 10, 20, 30, 40 a 50 g/l a následně vzorků vysokomolekulárního hyaluronanu ve vodě (koncentrace 20 a 30 g/l). Měření bylo nastaveno na diferenciální analýzu, což znamená, že přístroj zaznamenával rozdíl rychlostí zvuku procházející měrnou (1.) a srovnávací (2.) celou. V měrné cele byl nadávkován zkoumaný vzorek, ve srovnávací cele se nacházelo referenční prostředí, v našem případě se vždy jednalo o ultračistou deionizovanou vodu. Měření probíhalo pro 5 frekvencí v rozsahu 5,1–15,3 MHz, kde k jednotlivým frekvencím bylo přiřazeno harmonické číslo píku n , které je společné pro frekvenci měřeného vzorku a referenčního média. Vztah pro výpočet harmonického čísla píku (viz Rovnice 7) je definován jako frekvence píku referenčního prostředí podělena rozdílem frekvencí dvou sousedních píků vzorku a referenčního média.

Rovnice 7 Výpočet harmonického čísla píku n :

$$n = \frac{u}{\Delta u} = \frac{f_n}{f_{n+1} - f_n} \quad (7)$$

Kde:

u – ultrazvuková rychlost (m/s)

Δu – relativní ultrazvuková rychlost (m/s)

f_n – frekvence píku srovnávacího prostředí (Hz)

f_{n+1} – frekvence píku vzorku sousedícího s píkem srovnávacího prostředí (Hz)

Před samotným měřením je nutné obě cely důkladně promýt dostatečným množstvím ultračisté deionizované vody a poté přístroj kalibrovat. Kalibrace spektrometru s vysokým rozlišením probíhá ve většině případů při laboratorní teplotě 25 °C a počáteční teplota měření pro teplotní rampu se pohybuje při nižších teplotách (20 či 25 °C) [75.], [77.]. Při této teplotě však nelze měřit vzorky karagenanu o vyšší koncentraci, protože se nenachází v kapalném stavu (vzorky nelze do cely nadávkovat). Z tohoto důvodu byla počáteční teplota zvýšena na 50 °C, a rovněž byl otočen průběh teplotní rampy (nejprve došlo k ochlazení, poté až k ohřevu). Změně počáteční teploty se musela přizpůsobit kalibrace tak, aby odpovídala vstupním podmínkám. Nejprve byl nastaven termostat na teplotu 50 °C, poté byly dvě vialky typu „ependorf“ naplněny ultračistou deionizovanou vodou a vloženy do centrifugy po dobu 5 minut (3 000 ot/min), čímž došlo k odplynění. Následovalo ohřátí referenčního média ve vodní lázni na teplotu okolo 50 °C, kterého pak bylo do každé z cel napipetováno množství 1 ml. Během několika minut došlo k vytemperování přesně na 50 °C, což bylo zkontrolováno porovnáním teploty uvedené na termostatu a naměřené senzorem uvnitř cely.

Samotná kalibrace některého píku (například druhý v pořadí, zde označen jako pík 2) při 50 °C byla provedena prostřednictvím frekvenčního skenování obou cel v režimu *amplitude/frequency scan*. Po zadání vstupních hodnot pro pík 2 z měření při 25 °C uvedené v Tab. 5 (vstupní napětí, číslo píku, doporučená frekvence a variační rozpětí 70 až 150 Hz) software HR-US vykreslil závislost amplitudy výstupního signálu (mV) na frekvenci akustického signálu (Hz). Výsledkem skenu je zjištění polohy píku 2 při teplotě 50 °C, kde poloha je rovna frekvenci. Po zadání polohy (s rozpětím 20 Hz) do *analýzy profilu píku* byl získán detailní průběh píku 2 při 50 °C, jeho přesná frekvence a odpovídající harmonické číslo (viz Tab. 5). Získané hodnoty byly uloženy jako referenční hodnoty první cely (měrné) pro pík 2. Se stejným nastavením probíhalo současně skenování druhé cely a výsledky byly uloženy jako referenční hodnoty druhé cely (srovnávací) pro pík 2. Vzhledem k tomu, že v obou celách bylo totožné prostředí, ležely hodnoty na sobě. Stejným způsobem byly kalibrovány i 4 zbývající píky.

Kalibrace referenčního prostředí při 50 °C byla provedena vždy před měřením jednotlivých vzorků. Kontrola správného nastavení referenčních hodnot frekvencí a čísel píků pro ultračistou deionizovanou vodu probíhala v režimu *velocity/attenuation scan*, kde bylo nastaveno měření diferenciální závislosti ultrazvukové rychlosti při konstantní teplotě 50 °C po dobu 10 minut, s amplitudou vstupního signálu 1 V. Výsledné hodnoty ultrazvukové rychlosti a zeslabení

se pohybovaly v intervalu hodnot $(0,00 \pm 0,01)$ m/s, jelikož byly od sebe odečítány hodnoty ultrazvukové rychlosti a zeslabení stejné látky, v našem případě vody. Pokud by výsledky měření nespádaly do zmíněného intervalu, byl by to jasný indikátor pro chybné nastavení některého z píků či nedokonalé vyčištění cel.

Tab. 4 *Hodnoty frekvencí jednotlivých píků a jejich odpovídající harmonická čísla pro měření referenčního prostředí při teplotě 25 °C [75.].*

25 °C			
<i>pořadí píků</i>	<i>harmonické číslo píků</i>	<i>doporučená frekvence</i>	<i>amplituda vstupního signálu</i>
2	41	5,2 MHz	0,40 V
3	65	8,1 MHz	0,16 V
4	95	11,3 MHz	0,16 V
5	99	12,3 MHz	0,40 V
6	121	14,8 MHz	1,00 V

Tab. 5 *Hodnoty frekvencí jednotlivých píků a jejich odpovídající harmonická čísla pro měření referenčního prostředí při teplotě 50 °C.*

50 °C			
<i>pořadí píků</i>	<i>harmonické číslo píků</i>	<i>doporučená frekvence</i>	<i>amplituda vstupního signálu</i>
2	41	5,1 MHz	0,40 V
3	65	8,2 MHz	0,16 V
4	94	11,9 MHz	0,16 V
5	100	12,7 MHz	0,40 V
6	120	15,3 MHz	1.00 V

Vlastní měření zkoumaných vzorků vysokomolekulárního hyaluronanu a karagenanu probíhalo nejprve zahřátím vzorku ve vodní lázni na míchačce s ohřevem (s kontrolovanou teplotou do 75 °C), poté byl za horka nadávkován do dvou vialek typu „ependorf“ a odplyněn pomocí centrifugy s nastavenou rychlostí otáček 3 000 ot/min po dobu 5 minut. Po uplynutí této doby byl obsah vialek znovu zahříván ve vodní lázni, aby vzorek nebyl příliš tuhý na dávkování do měřicího přístroje. První část vzorku byla použita na propláchnutí měrné cely (cely 1.). Druhá vialka byla použita na měření, dávkování probíhalo odměřením 1 ml vzorku pomocí injekční stříkačky do promyté cely.

Nastavení píku (například píku 2) je založeno na stejném principu jako kalibrace, v režimu *amplitude/frequency scan* bylo provedeno frekvenční skenování měrné cely (obsahující vzorek) při teplotě 50 °C. Píky ultračisté deionizované vody ve srovnávací cele již byly přednastaveny z kalibrace. Jako vstupní data pro vykreslení frekvenčního skenu vzorku byly použity hodnoty stanovené pro kalibraci píku 2 při teplotě 50 °C (uvedené v Tab. 5) v rozmezí 70 až 150 Hz. Přiřazením harmonického čísla píku referenčního prostředí k měřenému vzorku byla zjištěna odpovídající frekvence (poloha) píku 2 při teplotě 50 °C. Prostřednictvím frekvenčního skenu vzorku bylo kontrolováno, zda zjištěná frekvence měrné cely není posunuta k nižším hodnotám, než je nastavená frekvence srovnávací cely, případně zda nedošlo k odskoku polohy a tím změně harmonického čísla píku. Z *analýzy profilu píku* při 50 °C byla zjištěna přesná frekvence a harmonické číslo píku 2 pro vzorek, kdy po jejich uložení došlo k přepsání přednastavených dat pro měrnou celu z kalibrace. Stejným způsobem byly nastaveny další 4 píky a jejich odpovídající frekvence. Pro získání správné hodnoty relativní ultrazvukové rychlosti platí, že harmonické číslo píku vzorku i referenčního prostředí musí být stejné a hodnota frekvence vzorku pro vybraný pik musí být větší než hodnota frekvence referenčního prostředí pro stejný pik. V opačném případě by relativní ultrazvuková rychlost nabývala záporných hodnot.

Měření teplotních závislostí probíhalo v režimu *velocity/attenuation scan*. Přístroj byl nastaven tak, aby zaznamenával diferenciální změny ultrazvukové rychlosti a zeslabení (rozdíly mezi první a druhou celou) při amplitudě vstupního signálu 1 V po dobu 1 200 minut. Termostat byl naprogramován na měření dvou teplotních cyklů v intervalu teplot 80–20 °C. Rychlost ochlazení či ohřevu byla nastavena na 1 °C za 5 minut, s krokem 0,01 °C.

Celkový teplotní sken zahrnoval následující kroky:

- ochlazení 80–20 °C (1. cyklus)
- ohřev 20–80 °C (1. cyklus)
- ochlazení 80–20 °C (2. cyklus)
- ohřev 20–80 °C (2. cyklus)

Průběh teplotního skenu je naznačen na Obr. X18 v příloze.

Po nastavení přístroje a termostatu byla měřena relativní ultrazvuková rychlost a zeslabení vzorků karagenanu a vysokomolekulárního hyaluronanu v závislosti na teplotě po dobu 20 hodin. V uvedené práci jsou interpretovány výsledky pouze z jednoho měření vybraných vzorků, přestože byl každý vzorek měřen nejméně dvakrát. Druhé měření sloužilo pro kontrolu správnosti výsledků, jelikož není možné zajistit, aby byl vzorek ohříván a ochlazován přesně ve stejném čase jako v prvním měření (výsledné hodnoty relativní ultrazvukové rychlosti jednotlivých měření se neprůměrují, protože jsou naměřeny za rozdílné teploty a času). Získaná data byla vyhodnocována v programu HR-US software a následně zpracována v Microsoft Excelu 2010.



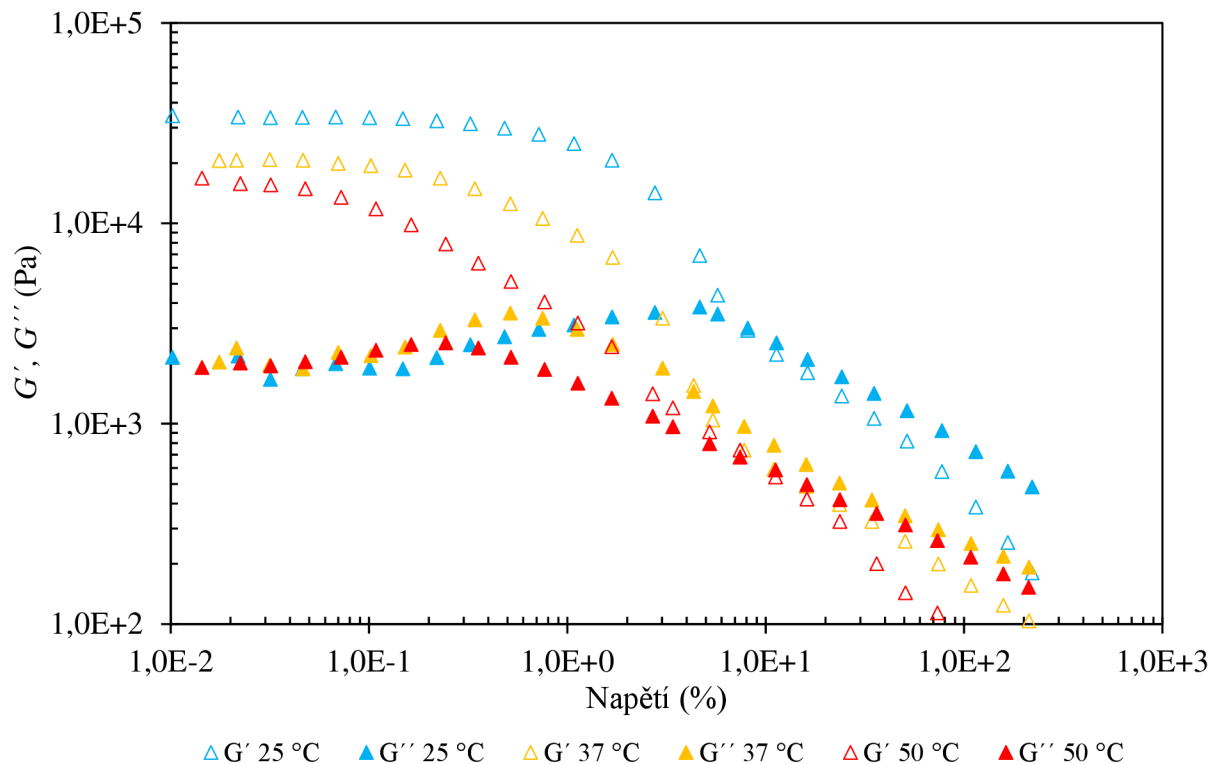
Obr. 16 *Ultrazvukový spektrometr s vysokým rozlišením HR-US 102 od firmy Ultrasonic Scientific [76.].*

3.4 Výsledky a diskuse

3.4.1 Reologické měření dynamických modulů karagenanu

Výsledky reologického měření viskoelastických vlastností vzorků karagenanu ve vodě jsou v následujících grafech popsány jako závislosti paměťového G' a ztrátového G'' modulu (případně ztrátového úhlu δ) na příslušné proměnné, která odpovídá zvolenému testu (viz odstavec 0). Na osách všech grafů, které popisují moduly, napětí či frekvenci, byla použita logaritmická stupnice se základem 10. Popsány jsou především změny těchto vlastností v závislosti na koncentraci, teplotě karagenanu a použité frekvenci měření. Další část reologického měření karagenanu se zabývá sol-gel přechodem a stanovením bodu gelace.

3.4.1.1 Stanovení lineární viskoelastické oblasti

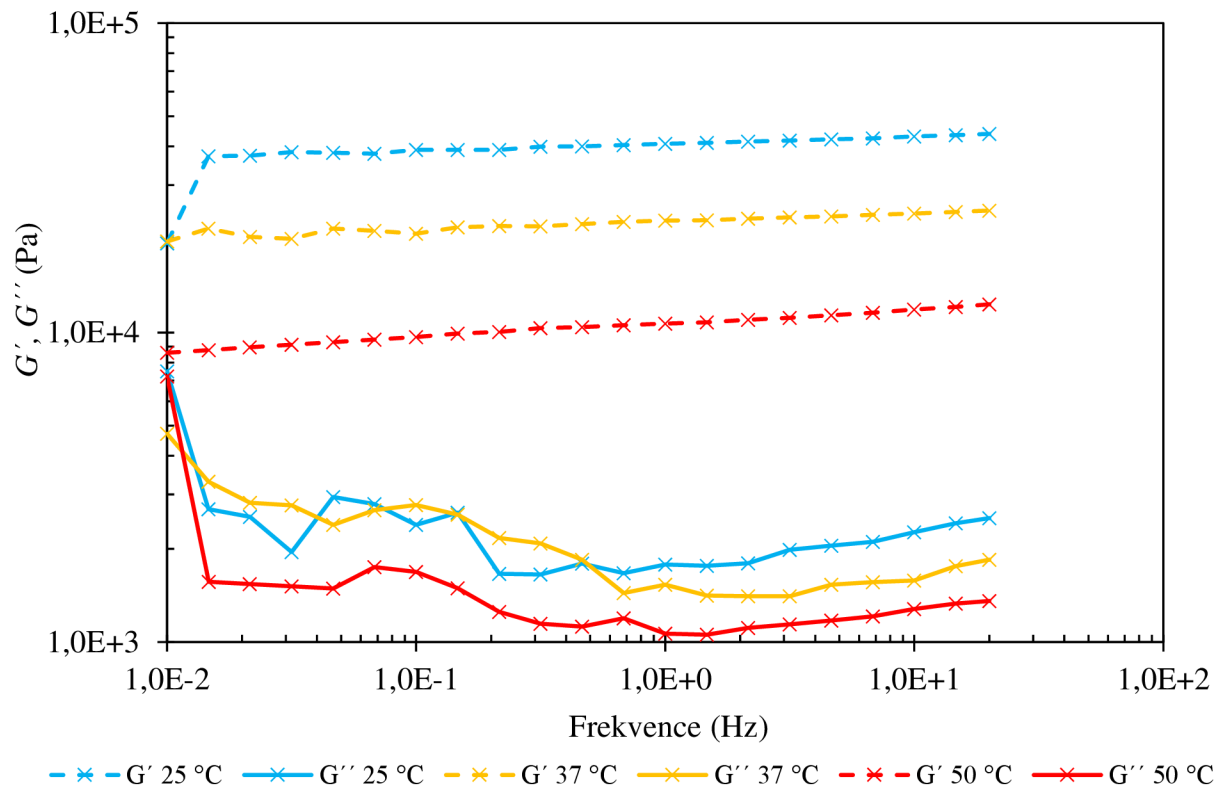


Obr. 17 Příklad znázorňující závislost paměťového G' (prázdné znaky) a ztrátového G'' (plné znaky) modulu na napětí pro karagenan ve vodě o koncentraci 50 g/l (šarže 2). Měřeno při teplotě 25, 37 a 50 °C s frekvencí 1 Hz.

U všech vzorků karagenanu byla měřena závislost paměťového G' a ztrátového modulu G'' na amplitudě napětí prostřednictvím výše popsaného deformačního testu (*strain sweep test*). Dané měření bylo využito na stanovení lineární oblasti viskoelastivity (zkráceně LVO, případně LVR z anglického linear viscoelastic region) a výsledné hodnoty vhodné amplitudy napětí byly využity pro stanovování viskoelastických vlastností dalšími testy. Měření vzorků při napětí z lineární oblasti viskoelastivity zajišťuje, že se takřka nemění jeho strukturální vlastnosti. To znamená, že se molekulární uspořádání vzorku vlivem deformace odchyluje od rovnovážného stavu minimálně, a proto je reakce vzorku na následující testy čistě odrazem vnitřních dynamických procesů. Příklad takové závislosti je znázorněn na Obr. 17 pro karagenan o koncentraci 50 g/l a při teplotě měření 25 °C (teplota, při níž je karagenan ve formě gelu), poté při 37 °C (teplota, která odpovídá teplotě živých organismů) a nakonec při 50 °C (při této teplotě se předpokládá, že již je karagenan ve formě solu). Z grafu vidíme, že oblast, kde jsou dynamické moduly nezávislé na napětí, je poměrně malá (přibližně od 0,01 po 0,2 %). Nejmenší oblast lineární viskoelastivity je pochopitelně při teplotě 50 °C, protože při zvýšené teplotě karagenan hůře odolává deformačnímu vlivu. Výsledky měření všech vzorků karagenanu ve vodě (šarže 1 a 2) o koncentraci 0,5–50 g/l při teplotě 25 °C jsou uvedeny v příloze jako Obr. X9 a měření při teplotě 50 °C je znázorněno na Obr. X10. Průměry hodnot směrodatných odchylek paměťového a ztrátového modulu pro měření napětí jsou uvedeny

v Tab. X3 v příloze. Výsledná vhodná amplituda napětí byla stanovena na hodnotu 0,1 % pro všechny vzorky karagenanu, kromě 10 g/l, kde hodnota činila 0,3 %.

3.4.1.2 Změny viskoelastických vlastností v závislosti na frekvenci



Obr. 18 Příklad znázorňující závislost paměťového G' (prázdné znaky) a ztrátového G'' (plné znaky) modulu na frekvenci pro karagenan ve vodě o koncentraci 50 g/l (šarže 2). Měřeno při teplotě 25, 37 a 50 °C s napětím 0,1 %.

Měření viskoelastických vlastností všech vzorků karagenanu probíhalo prostřednictvím *frequency sweep testu* při konstantním napětí 0,1 %. Příklad takového měření je znázorněn na Obr. 18, kde je znázorněna závislost paměťového G' a ztrátového G'' modulu karagenanu (šarže 2) o koncentraci 50 g/l na frekvenci otáčení od 0,01 do 20 Hz. Měření probíhalo při konstantní teplotě 25, 37 a poté 50 °C. Z pozorované závislosti vyplývá, že za všech teplot převládá paměťový modul G' oproti ztrátovému modulu G'' (viskóznímu), a to i v případě vyšší teploty 50 °C. Paměťový modul G' je dynamická složka odpovídající elastickému charakteru látek. Jakmile paměťový modul řádově převyšuje elastický modul a je nezávislý na frekvenci, mluvíme o chování podobající se chování pevným látkám. V našem případě se zvyšující se frekvencí hodnoty paměťového modulu velmi mírně rostou a paměťový modul má až o řád vyšší hodnoty oproti ztrátovému modulu. Platí zde rovnice $G' \gg G''$ [49.], která popisuje chování typické pro gely. Při rozboru této závislosti z pohledu teplotních rozdílů je jasné, že s rostoucí teplotou ztrácí gel svou pevnost, což se na paměťovém modulu projevuje jako jeho snížení. U ztrátového modulu je vliv rozdílné teploty podstatně menší, avšak

i zde hodnoty s rostoucí teplotou klesají. Nicméně vlivem rozdílné teploty se nemění trend závislosti, nedochází tedy v tomto případě ke strukturálním změnám ve vzorku.

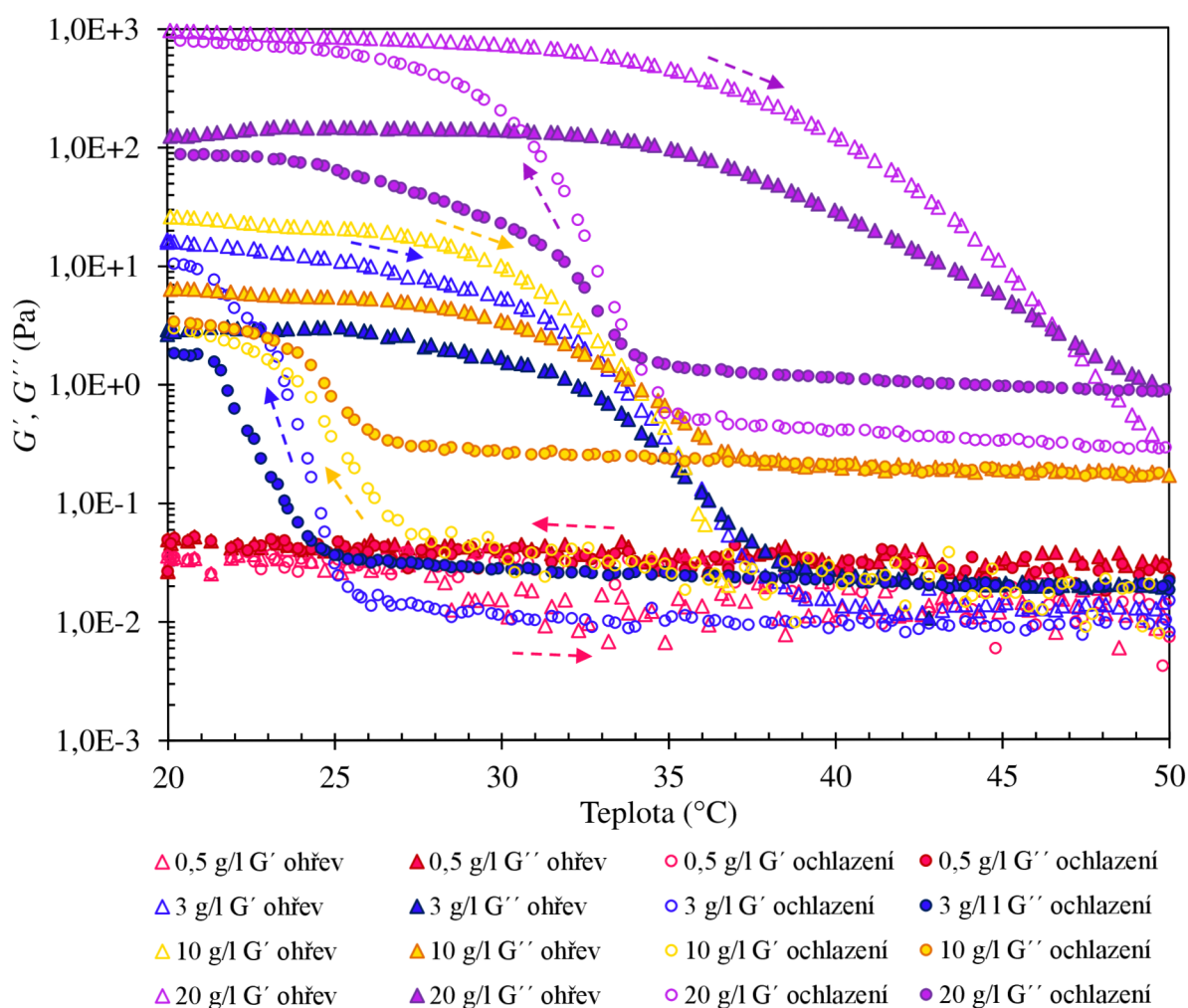
Na Obr. X11 a Obr. X12 v příloze je znázorněno měření dynamických modulů karagenanu o koncentraci 0,5–50 g/l v závislosti na frekvenci pro teplotu 25 °C a 50 °C. Příslušné průměrné hodnoty směrodatných odchylek měření obou modulů jsou uvedeny v Tab. X3 rovněž v příloze. Z grafů je patrné, že oba dynamické moduly rostou se zvyšující se koncentrací karagenanu ve vzorku. Srovnáním těchto dvou grafů lze potvrdit, že hodnoty obou modulů jsou pro měření při 25 °C vyšší než při teplotě 50 °C. U vzorků karagenanu s nižší koncentrací (0,5 až 10 g/l, šarže 1) pozorujeme velmi malé rozdíly mezi jednotlivými moduly. Na začátku měření, kdy je frekvence nízká, převládá spíše paměťový modul, vlivem deformace však v průběhu měření převládne ztrátový modul, který odpovídá spíše viskóznímu charakteru vzorků. Zároveň se hodnoty obou modulů se zvyšující se frekvencí zvyšují. Pro karagenan šarže 1 tedy platí, že dochází ke změnám strukturálních vlastností vlivem frekvence (vyjma měření 10 g/l při teplotě 25 °C). Na rozdíl od toho vzorky karagenanu šarže 2 (koncentrace od 20 do 50 g/l) mají při teplotě 25 °C i 50 °C lineární trend, který se s rostoucí frekvencí zvyšuje jen nepatrně. Navíc pro tyto vzorky můžeme v celém rozsahu měření pozorovat převahu paměťového modulu nad ztrátovým, dané vzorky mají tedy rigidní, poměrně odolnou gelovitou strukturu.

3.4.1.3 Teplotní závislosti

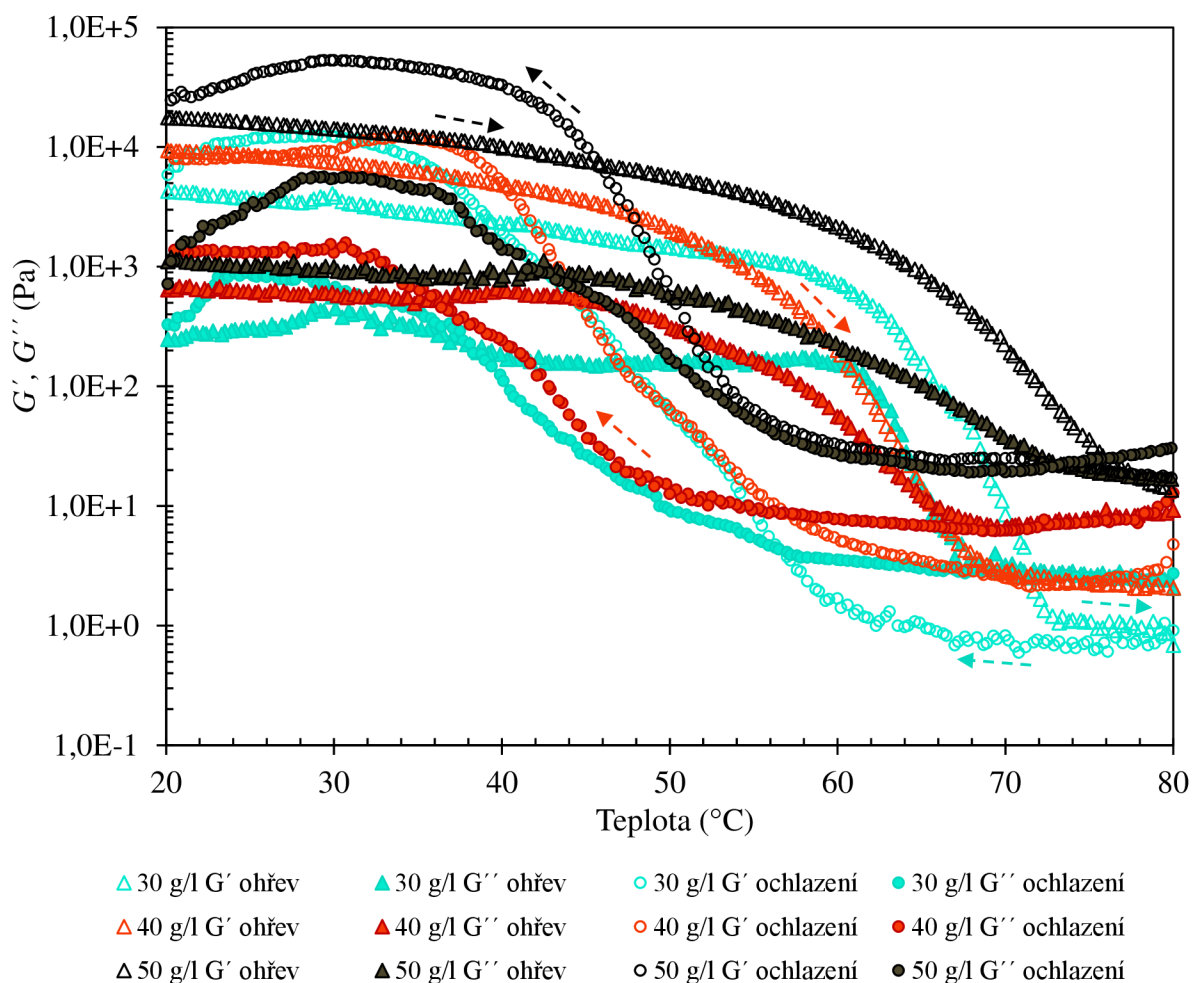
Měření teplotních závislostí karagenanu o různé koncentraci (v rozmezí 0,5 až 50 g/l) charakterizovaných prostřednictvím viskoelastických vlastností se muselo s použitím nové šarže karagenanu přizpůsobit jistým změnám vlastností. Dle výsledků z předchozích měření se předpokládalo, že se hodnoty paměťového G' a ztrátového G'' modulu budou zvyšovat se zvyšující se koncentrací karagenanu. Tento předpoklad lze aplikovat na vzorky karagenanu šarže 1 i šarže 2. Nicméně použití stejného teplotního intervalu (jako pro karagenan šarže 1, tj. 20–50 °C), se pro šarži 2 ukázalo jako nevhodné. Výsledná teplotní závislost měla rozdílné hodnoty modulů pro ohřev (konec měření) a ochlazování (začátek měření) při teplotě 50 °C, což by znamenalo, že se jedná o teplotně nestabilní gely. Mnohem pravděpodobnější vysvětlení však je, že se systém při této teplotě nacházel v termodynamické nerovnováze, jelikož zrovna probíhal proces gelace. Důvodem ke změření rozdílných hodnot jednoho z modulů na začátku a na konci měření pak bylo ukončení měření v době, kdy právě docházelo ke změně struktury z náhodného klubka do pravotočivé dvoušroubovicové struktury, a při dané teplotě byla rychlost ohřívání/ochlazování neadekvátní k probíhajícímu procesu. Je totiž všeobecně známo, že sol-gel proces je závislý nejen na koncentraci a teplotě měření, ale také na rychlosti změny teploty.

Jedním z návrhů na optimalizaci měření bylo doplnit jej o měření oscilační časové závislosti (*oscillation time sweep test*) za konstantní hodnoty teploty (zde při 50 °C) a frekvence. Z výsledné závislosti lze velmi přesně stanovit teplotu bodu gelace daného systému, přičemž získaný výsledek nezávisí na rychlosti ohřívání/ochlazování [61.]. V našem případě však nebylo cílem určit přesnou teplotu gelovatění, nýbrž jsme se zaměřovali na to, jakým způsobem se mění vlastnosti karagenanu v průběhu změny teploty (například v souvislosti reakce karagenanu na změnu teplot v tkáních při použití gelu jako součást scaffoldů [43.], nebo zkoumání vlivu karagenanu pro stabilizaci mléčných produktů atp.). Proto bylo navrženo

upravit teplotní interval měření tak, aby nedošlo ke změně rychlosti ohřevu/ochlazení, výsledkem je měření teplotních závislostí karagenanu šarže 1 v intervalu teplot od 20 do 50 °C a pro karagenan šarže 2 pak od 20 do 80 °C. Vzhledem k tomu, že se jedná o poměrně širokou škálu vzorků o různé koncentraci karagenanu (od 0,5 do 50 g/l), jejichž výsledné závislosti by vytvořily velmi nepřehledný graf, byla proto každá šarže popsána samostatně. Výsledné závislosti paměťového G' a ztrátového G'' modulu na teplotě pro dvě teplotní rampy (ohřev a ochlazení s konstantní frekvencí 1 Hz a napětím odpovídající lineární viskoelastické vlastnosti) jsou znázorněny na Obr. 19 pro karagenan šarže 1 v měřeném intervalu teplot od 20 do 50 °C a na Obr. 20, který náleží měření karagenanu šarže 2 (20–80 °C). Průběh všech koncentrací je nastíněn na Obr. X13 v příloze, v němž jsou uvedeny teplotní závislosti pouze pro měření ztrátového modulu G'' karagenanu. Z výsledných závislostí je patrné, že skutečně dochází ke zvyšování hodnot paměťového G' a ztrátového G'' modulu se zvyšující se koncentrací karagenanu ve vodě.



Obr. 19 Závislost paměťového G' (prázdné znaky) a ztrátového G'' (plné znaky) modulu na teplotě pro vzorky karagenanu šarže 1 ve vodě o koncentraci 0,5–20 g/l. Měřeno prostřednictvím dvou teplotních ramp při frekvenci 1 Hz.



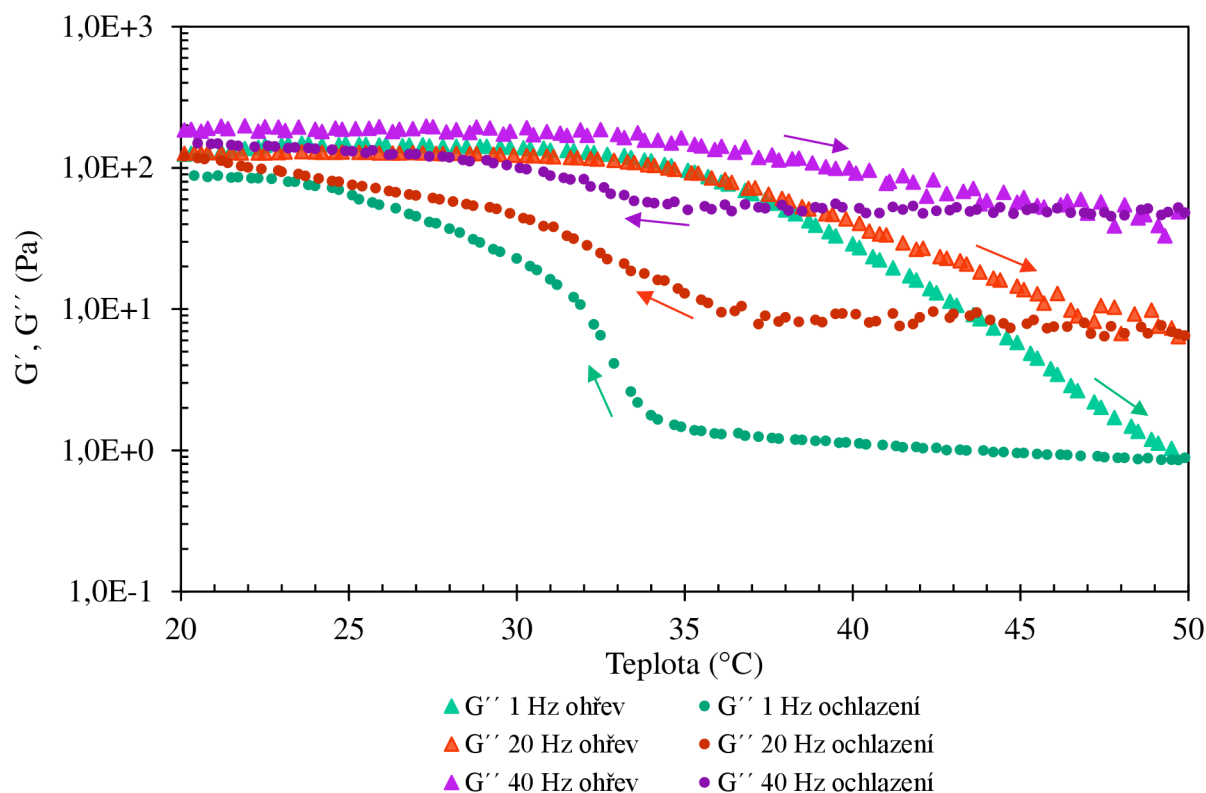
Obr. 20 Závislost paměťového G' (prázdné znaky) a ztrátového G'' (plné znaky) modulu na teplotě pro vzorky karagenamu šarže 2 ve vodě o koncentraci 30–50 g/l. Měřeno prostřednictvím dvou teplotních ramp při frekvenci 1 Hz.

Je velmi důležité si uvědomit, že na začátku a na konci měření (tedy při teplotě 20 a 50 °C) jsou hodnoty jednotlivých modulů stejné. To znamená, že karagenanové gely jsou *termoreverzibilní* a interakce, při nichž dochází k tvorbě trojrozměrné sítě, jsou fyzikálního charakteru. Dané interakce, které jsou spojené se změnou molekulárního uspořádání a tvorbou/zánikem gelu, se v reologickém měření projevují jako změny v trendu ztrátového a paměťového modulu. Mezifázový přechod mezi koloidním roztokem a gelem (označován také jako sol-gel proces) je poměrně komplikovaný dynamický děj, který nenastává při jedné, přesně určené teplotě (jako je tomu u chemicky čistých látek), nýbrž v širším teplotním intervalu. Aby byl popis sol-gel procesu zjednodušen, stanovují se dvě teploty – teplota tuhnutí (neboli bod gelace, odpovídá sol-gel přechodu) a teplota tání (odpovídá gel-sol přechodu). Pro měření viskoelastických závislostí se tyto body stanovují v bodě, kde fázový úhel δ nabývá hodnoty 45 stupňů [45.],[48.]. Tomu odpovídá průsečík paměťového G' a ztrátového G'' modulu, kdy $G' = G''$ (získáme hodnotu tzv. charakteristického modulu). Pokud je elastický charakter tak výrazný, že nedojde k protnutí modulů, stanovuje se bod gelace z inflexního bodu.

Z průběhu ohřívání karagenanových roztoků vyplývá, že na začátku měření (při teplotě 20 °C) převažuje řádově paměťový modul nad ztrátovým, vzorek má elastický charakter (nachází se ve formě gelu). S rostoucí teplotou dochází ke snižování elastického modulu G' až do bodu, kdy se vyrovná ztrátovému modulu G'' . Tento bod odpovídá teplotě tání, při níž dochází k narušení mezimolekulárních interakcí, a tím k prvnímu porušení nekonečné sítě gelu. S dalším zvýšením teploty dochází k převaze ztrátového G'' modulu nad paměťovým, převažuje tedy viskózní charakter a vzorek se nachází ve formě solu.

Pokud se zaměříme na průběh obou modulů při ochlazování, tedy od 50 °C (případně od 80 °C pro šarži 2) do 20 °C, vidíme, že na začátku měření převyšuje ztrátový modul G'' , vzorek se nachází ve formě solu. S klesající teplotou dochází ke zvyšování paměťového modulu G' , při teplotě, kdy se moduly překříží, nastává bod gelace. Tento bod udává stav, při kterém dochází k prvním strukturním změnám v roztoku vlivem teploty. Jedná o přechod ze struktury náhodného klubka do pravotočivé dvoušroubovice díky intramolekulárním interakcím 3,6-anhydrid-D-galaktózy (konkrétně dochází k tvorbě disacharidových vazeb). Při ochlazování karagenanu šarže 2, čemuž odpovídá koncentrace 30–50 g/l, můžeme navíc pozorovat snižování paměťového modulu G' , kde má ve výsledku závislost tvar sub-píku (jeho přítomnost byla zaznamenána také ve studii [58.]). Domníváme se, že tato změna souvisí s tvorbou intramolekulárních interakcí v průběhu gelace, které mají za následek agregaci pravotočivých dvoušroubovic do větších celků. Tomu by odpovídala také vyšší pevnost karagenanových gelů (šarže 2). Z měření dynamických modulů karagenanu vyplývá, že se s rostoucí koncentrací teplota gelace i tuhnutí karagenanu zvyšuje. Pro všechny vzorky karagenanu ve vodě byly stanoveny průměrné hodnoty směrodatné odchylky dynamických modulů naměřených při ohřevu a ochlazování, viz Tab. X3 v příloze.

Z teplotních závislostí karagenanu můžeme dále pozorovat, že v určitém intervalu teplot se průběh křivky ochlazování od průběhu křivky ohřevu liší, jedná se však o vratné změny. Tento děj, který se projevuje přítomností „oka“ v teplotní závislosti karagenanu (dobře viditelné na Obr. X13 v příloze), se nazývá *teplotní hystereze* neboli teplotní prodleva. Obecně se takové chování vyskytuje u dynamického systému, kde proměnná nezávisí pouze na současném stavu systému, ale je ovlivněna i stavem minulým (tzv. paměťový efekt). V našem případě je teplota odpovídající tvorbě karagenanového gelu nižší než teplota, která odpovídá procesu tání gelu. Z časového hlediska lze říci, že k procesu tání dochází dříve než ke gelovatění. U pevných gelů se jedná o poměrně častý jev, kdy se rozdíl teplot tání a gelace pohybuje v intervalu 10 až 20 °C. Domníváme se, že výše popsané chování je důsledkem toho, absorbovaná energie při tání (která odpovídá zániku interakcí a porušení trojdimenzionální sítě gelu) je oproti energii uvolňované při sol-gel přechodu, který odpovídá vzniku nových interakcí a tvorbě makromolekulární sítě [52.], je větší, jelikož zahrnuje také energii odpovídající ohřívání vzorku do oblasti přechodu. Celková vnitřní energie sol-gel přechodu musí být stejná, protože se jedná o termoreverzibilní, rovnovážný děj.



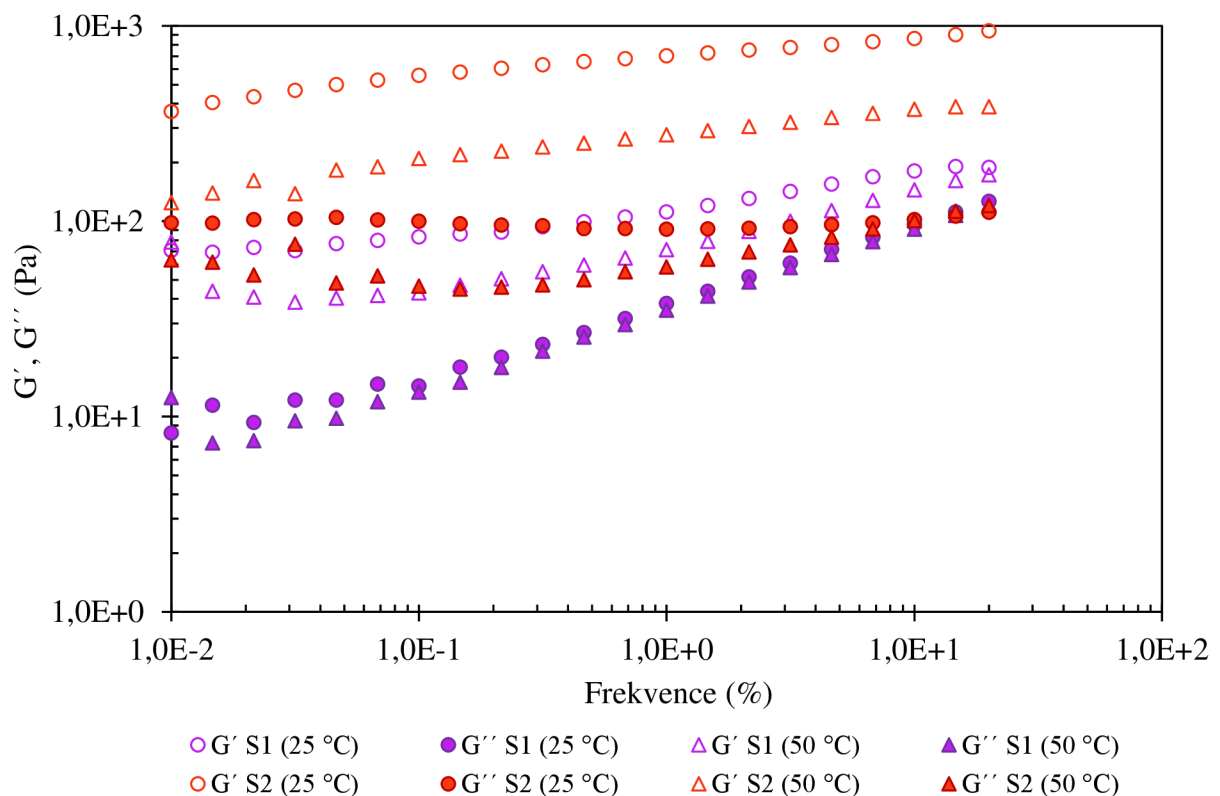
Obr. 21 Příklad znázorňující závislost ztrátového modulu G'' na teplotě pro karagenan ve vodě o koncentraci 20 g/l (šarže 1). Měřeno prostřednictvím dvou teplotních ramp při frekvenci 1, 20 a 40 Hz.

Předchozí závislost popisovala teplotní průběh karagenanu prostřednictvím paměťového G' a ztrátového G'' modulu pro jednu měřenou frekvenci 1 Hz. Pro získání povědomí o tom, jak se mění průběh teplotních závislostí vzorků karagenanu se změnou frekvence, byly navíc měřeny dynamické moduly v závislosti na teplotě při konstantní frekvenci 20 a 40 Hz pro vzorek karagenanu šarže 1 o koncentraci 20 g/l. Teplotní závislost byla měřena také při frekvenci 60 Hz, jenže po vynesení do grafu byly výsledné hodnoty nepřehledné kvůli vysokému šumu, proto jej v práci neuvádíme. Pro měření byl použit záměrně karagenan šarže 1 (bez přítomnosti sub-píku), aby výsledné grafy byly dobře čitelné. Měření obou modulů karagenanu 20 g/l je pak vidět na Obr. X14 v příloze. Z tohoto grafu vyplývá, že čím je nastavená větší frekvence otáčení, tím více se k sobě hodnoty paměťového G' a ztrátového G'' modulu přibližují. Z pohledu na viskoelastické chování dochází ke snížení pomyslné hranice mezi elastickým a viskózním charakterem vzorku vlivem zvyšující se frekvence, což má za následek hůře rozeznatelný průběh mezifázového přechodu. Určování teploty tání a teploty gelace je proto z výsledků měření při vysokých frekvencích poměrně nepřesné, ale se zvyšující se frekvencí se hodnoty markantně nemění. Teplota gelace se pohybuje v rozmezí od 33 do 36 °C a teplota tání v intervalu 42–47 °C.

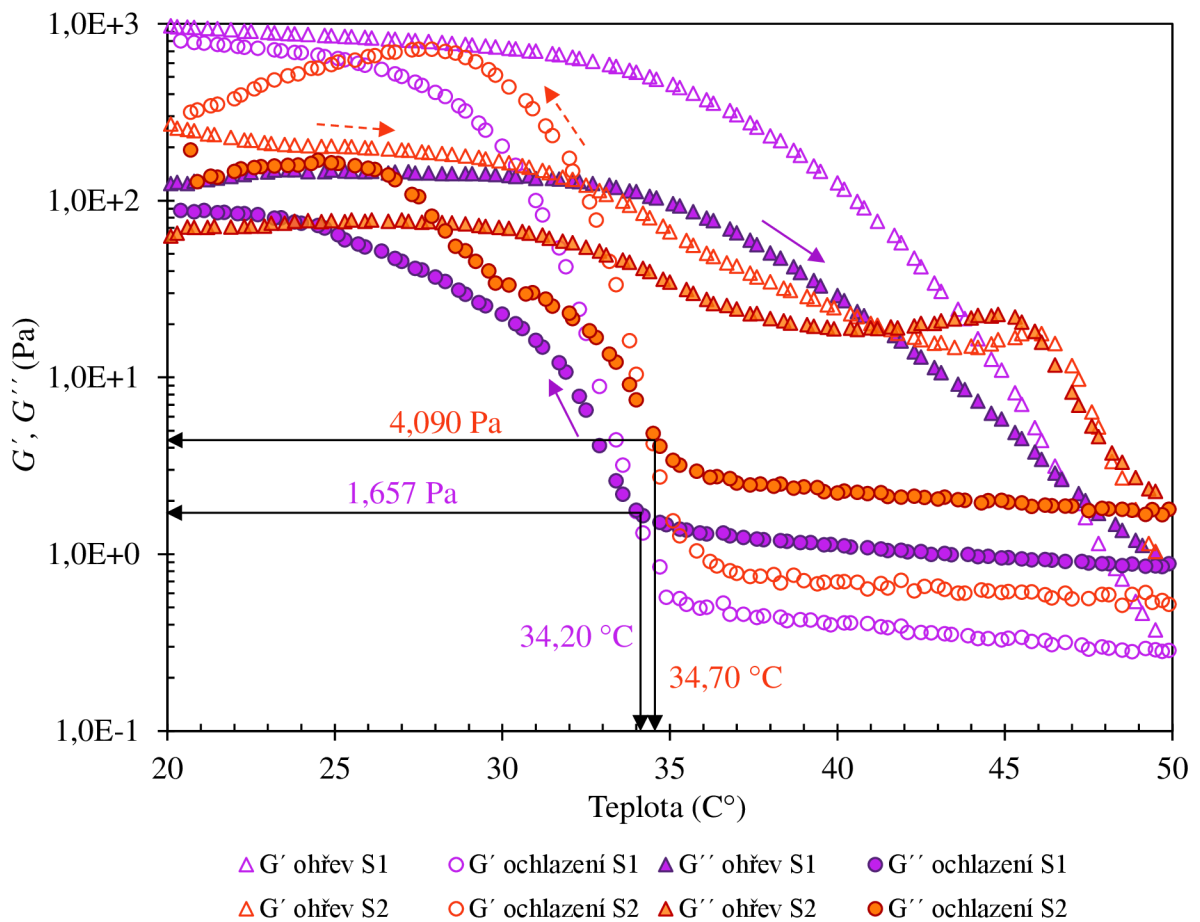
Obr. 21, který znázorňuje (pro větší přehlednost) pouze průběh ztrátového modulu G'' při ohřevu a ochlazování v intervalu 20–50 °C, vykresluje taktéž rozdíly mezi teplotní závislostí karagenanu ve vodě o koncentraci 20 g/l při frekvenci 1, 20 a 40 Hz. V tomto grafu můžeme pozorovat, že při zvýšení frekvence se zvyšují hodnoty ztrátového modulu. Na začátku měření

(při teplotě 20 °C) je rozdíl hodnot modulu pro dané frekvence poměrně malý, v průběhu sol-gel procesu se rozdíly mezi hodnotami měřeného modulu prohlubují a na konci měření (50 °C) jsou nejmarkantnější. V případě ztrátového modulu jsou trendy se zvyšující se frekvencí posunuty k hodnotám téměř o řád vyšší. To samé chování platí také pro paměťový modul (viz Obr. X14 v příloze), kde trend odpovídající frekvenci 1 Hz je dokonce o dva řády nižší oproti 20 Hz. Z tohoto grafu a výše popsaného chování můžeme rovněž vyvodit, že se zvyšující se hodnotou frekvence se zmenšují rozdíly mezi průběhem ohřevu a ochlazení (tedy dochází ke zmenšení hysterezního oka). To samé můžeme pozorovat také pro závislost paměťového modulu při ohřevu a ochlazení. Dále vidíme, že počáteční a konečné hodnoty ztrátového modulu jsou stejné, takže i v tomto případě nedochází k nevratným změnám struktury karagenanu vlivem teploty.

3.4.1.4 Rozdíly mezi vzorky karagenanu S1 a S2



Obr. 22 Graf znázorňující rozdíly mezi první (S1) a druhou (S2) šarží karagenanu ve vodě o koncentraci 20 g/l prostřednictvím závislosti paměťového G' (prázdné znaky) a ztrátového G'' (plné znaky) modulu na frekvenci. Měřeno při teplotě 25 °C (kolečka) a 50 °C (trojúhelníky) s napětím 0,1 %.

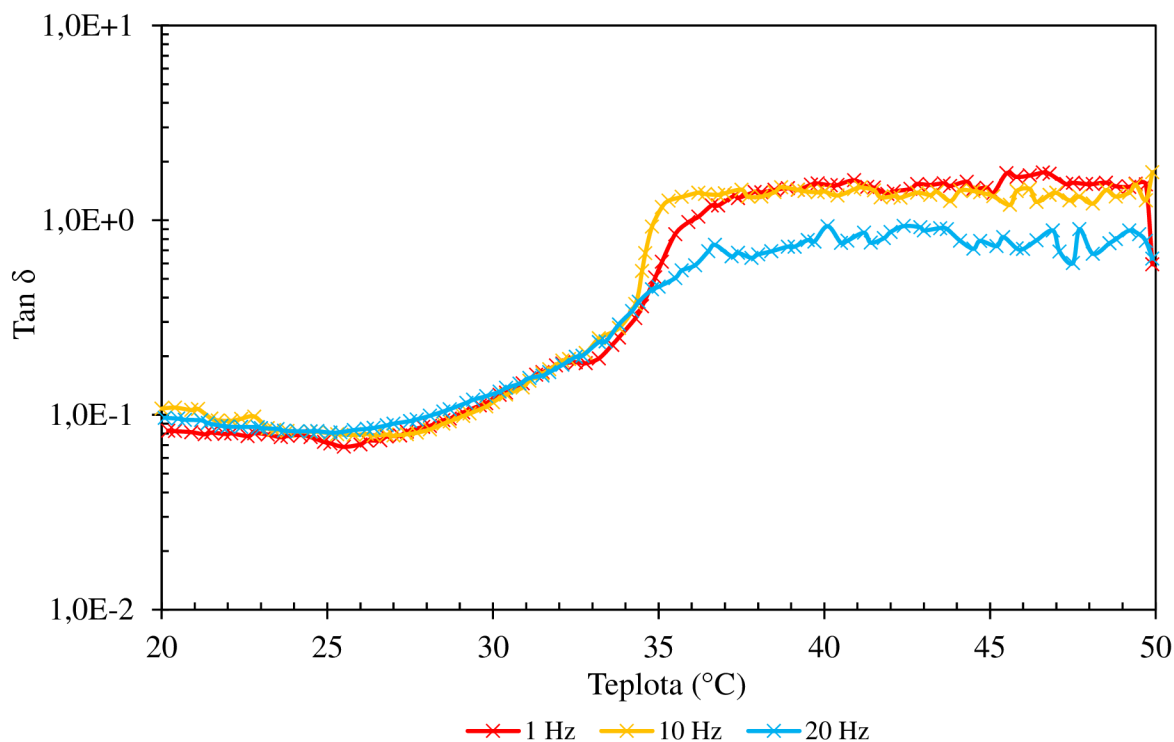


Obr. 23 Graf znázorňující rozdíly mezi první (S1) a druhou (S2) šarží karagenanu ve vodě o koncentraci 20 g/l prostřednictvím závislosti paměťového G' (prázdné znaky) a ztrátového G'' (plné znaky) modulu na teplotě. Měřeno pomocí dvou teplotních ramp při frekvenci 1 Hz.

Již v kapitole přípravy vzorků karagenanu byl diskutován rozdíl mezi vzorky karagenanu šarže 1 a 2, konkrétně že karagenan šarže 2 tvoří pevnější gely. Toto rozdílné chování karagenanu pro vědecké účely od jediného dodavatele je velmi neočekávané a nebyla nalezena žádná studie, jež by se této problematice věnovala. Na Obr. 22 a Obr. 23 jsou zkoumány rozdíly mezi vzorky karagenanu ve vodě o koncentraci 20 g/l první (S1) a druhé (S2) šarže. První graf, znázorňující změnu viskoelastických vlastností karagenanu S1 oproti S2 v závislosti na zvyšování frekvence otáčení, ukazuje že největší rozdíl je pozorovatelný pro paměťový modul G'' jak při nízké, tak při vysoké teplotě. Hodnoty paměťového modulu karagenanu S1 se při teplotě 25 °C liší jen velmi málo od hodnot naměřených při 50 °C a po celou dobu měření je závislost konstantně rostoucí se zvyšující se frekvencí. Z toho důvodu můžeme pozorovat, že na začátku měření převládá paměťový modul (převládá tedy elastický charakter látky) se zvýšením frekvence se rozdíly mezi moduly zmenšují. Kdežto u karagenanu šarže S2 vidíme, že při 25 °C je ztrátový modul vyšší než při 50 °C (přibližně do frekvence 8 Hz) a závislost je téměř lineární. Navíc pro obě teploty převládá vždy paměťový modul G' nad ztrátovým G'' , z čehož vyplývá, že vlivem zvýšení frekvence převládá spíše elastický charakter zkoumané látky. Z tohoto rozboru závislosti vyplývá, že karagenan šarže 1 hůře odolává deformacím vlivem zvýšení frekvence otáčení oproti karagenanu šarže 2, jehož odpověď na deformaci je téměř nulová.

Tento fakt je potvrzen také na Obr. X15 (viz příloha), kde je oblast lineární viskoelastivity u karagenanu šarže 1 mnohem menší než u karagenanu šarže 2. Z toho vyplývá, že karagenan šarže 2 tvoří pevnější strukturu, což svědčí buď o vyšší pevnosti vazeb nebo o vyšším počtu interakcí ve struktuře karagenanu. Domníváme se, že důvodem jsou rozdílné molekulární hmotnosti karagenanu. Tato hypotéza je dále diskutována v odstavci 0.

Prostřednictvím Obr. 23 je popisován rozdíl teplotních závislostí karagenanu o koncentraci 20 g/l šarže 1 a 2. Z měření paměťového a ztrátového modulu vzorků v intervalu teplot od 20 °C do 50 °C byla stanovena teplota tuhnutí (bod gelace) pro šarži 1 na 34,2 °C, tomu odpovídá zkrřížení modulů $G' = G''$ v bodě 1,657 Pa. Pro karagenan šarže 2 se průsečík dynamických modulů nachází v bodě 4,090 Pa při teplotě 34,7 °C. Na teplotní závislosti (viz Obr. 23) pozorujeme, že u karagenanu šarže 2 se na křivce ochlazování vyskytuje sub-pík (který byl diskutován na obrázku Obr. 20). Z grafu rozdílů teplotních ramp můžeme pozorovat, že pro paměťový modul G' je pík vyšší oproti píku náležícímu ztrátovému modulu G'' a maximální hodnoty dosahuje přibližně při teplotě 27 °C (oproti maximální hodnotě závislosti ztrátového modulu při teplotě 25 °C).



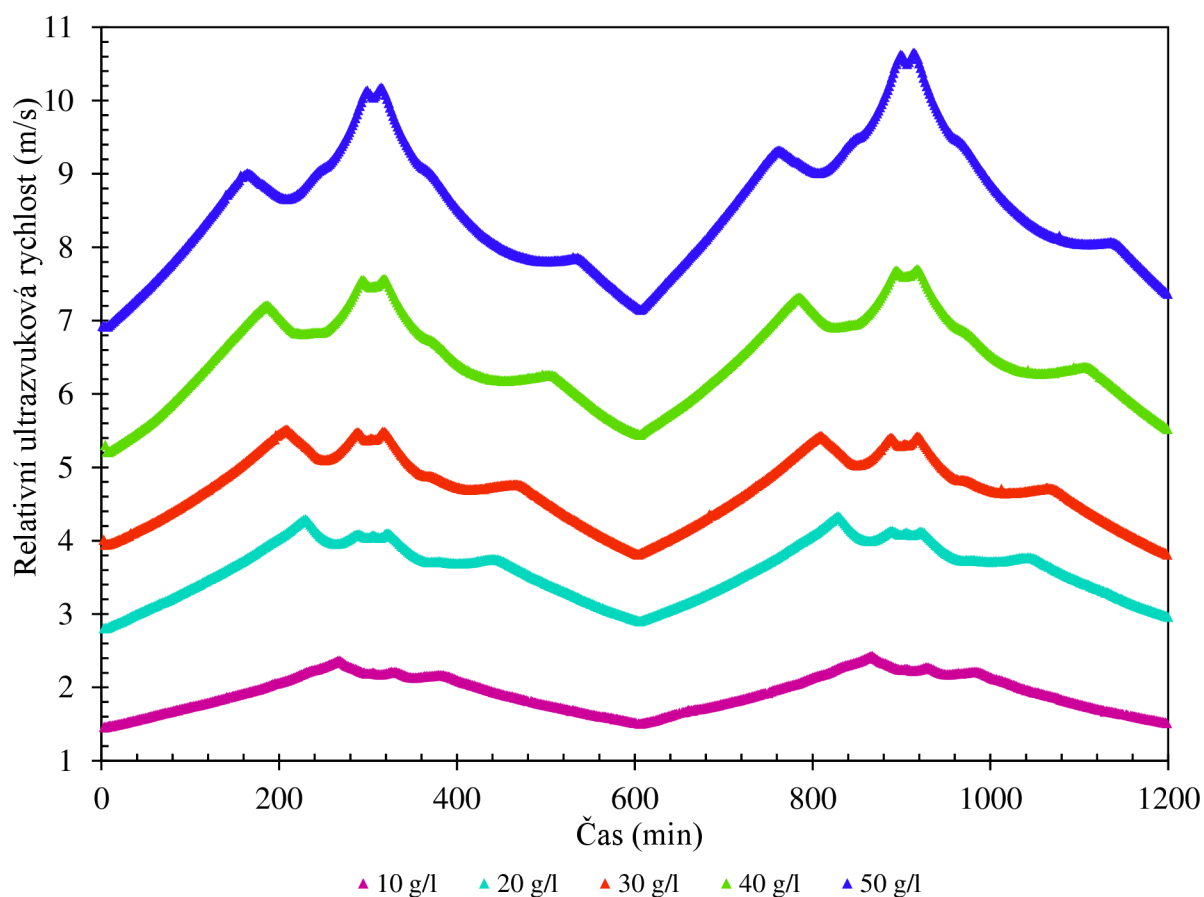
Obr. 24 Graf pro výpočet bodu gelace ze závislosti tangens ztrátového úhlu δ na teplotě pro karagenan ve vodě o koncentraci 20 g/l (šarže 1). Měřeno v intervalu teplot od 50 do 20 °C (ochlazení) s frekvencí 1, 10 a 20 Hz.

Při určování přesné teploty bodu gelace je nutné neopomenout fakt, že jeho hodnota je závislá na koncentraci stanovované látky, ale také na rychlosti změny teploty. V našem případě k sol-gel přechodu dochází při ochlazování, přičemž rychlost ochlazování je 2 °C/min. Z námi naměřených teplotních závislostí jsme získali informace o sol-gel procesu pouze ze změny

teploty, nikoliv reálnou odezvu mezifázového přechodu na změnu teploty v čase. Z kapitoly 2 vyplývá, že nejpřesnější metoda pro získání teploty gelace, jež není závislá na průběhu přechodu v čase, metodou kritického fázového úhlu δ [48.], například měřením multifrekvenčních teplotních ramp. Bod gelace odpovídá hodnotě fázového úhlu $\delta = 45$, v grafu jej pozorujeme jako překřížení hodnot. Z měření závislosti fázového úhlu karagenanu na teplotních rampách pro ochlazování při konstantní frekvenci 1, 10 a 20 Hz byla stanovena teplota tuhnutí (neboli bod gelace) nezávislá na rychlosti ochlazování pro karagenan šarže 1 ve vodě o koncentraci 20 g/l na 34,40 °C.

3.4.2 Měření ultrazvukové rychlosti karagenanu

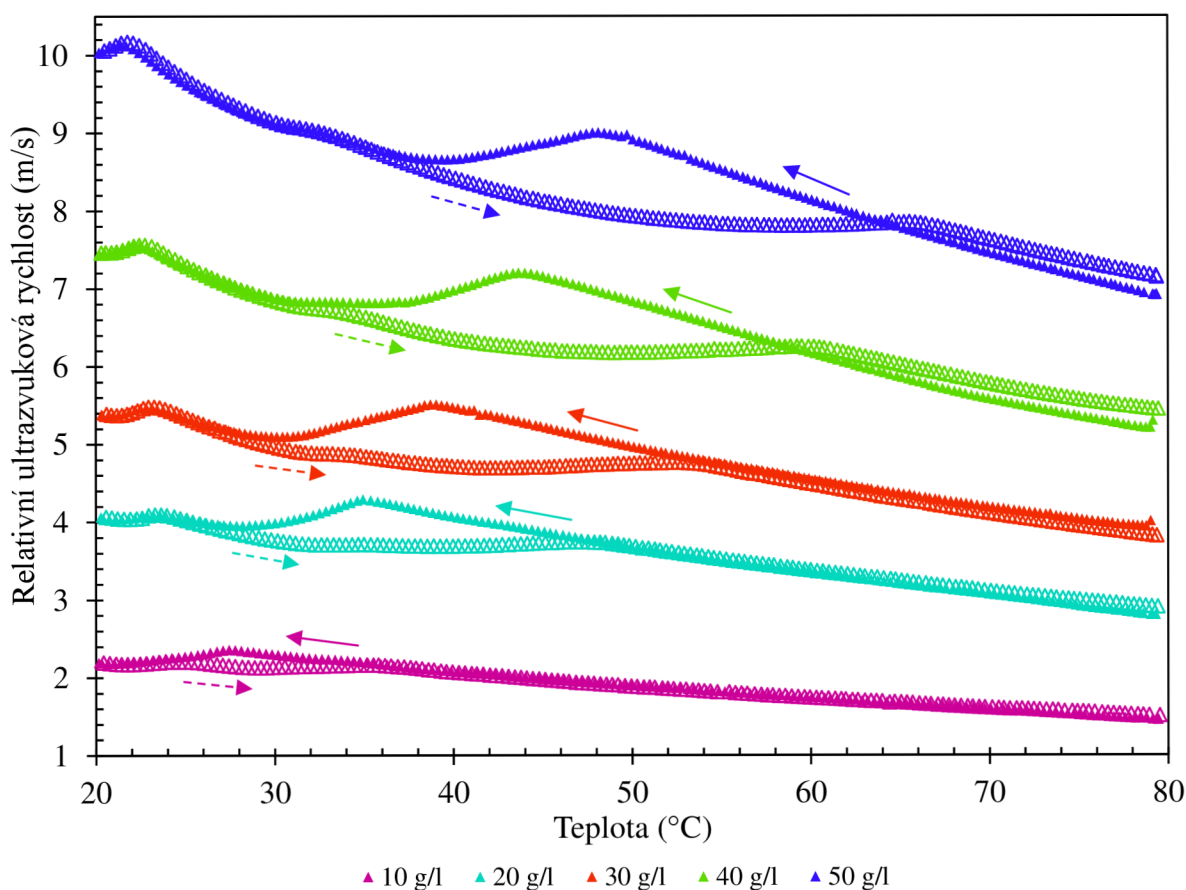
Získané teplotní závislosti z měření na ultrazvukovém spektrometru zahrnují ohřev a ochlazení vzorků karagenanu v rozsahu teplot 20–80 °C. Získaná data obsahovala výsledky měření dvou veličin – relativní ultrazvukové rychlosti a zeslabení. V uvedené práci byla vyhodnocována pouze data relativní ultrazvukové rychlosti vybraných koncentrací karagenanu, jelikož výsledné závislosti pro zeslabení jsou hůře interpretovatelné (kvůli nezanedbatelné přítomnosti šumu). Grafy uvedené v této práci popisují teplotní závislost pouze pro vybranou frekvenci 12,7 MHz (která odpovídá píku 5) z celkem pěti naměřených. Z Obr. X16 v příloze vyplývá, že závislosti všech pěti frekvencí, při nichž měření probíhalo, jsou stejné, proto není nutné je zde uvádět všechny.



Obr. 25 *Závislost relativní ultrazvukové rychlosti na čase pro vzorky karagenanu ve vodě o koncentraci 10–50 g/l znázorňující dva po sobě jdoucí cykly teplotního skemu v intervalu teplot 20 až 80 °C. Měřeno při frekvenci 12 697 kHz.*

Hodnoty uvedené v Obr. 25 znázorňují závislost ultrazvukové vlny vzorků karagenanu ve vodě o koncentraci 10 až 50 g/l na čase. Celková délka měření 1 200 minut zahrnuje dva teplotní cykly, kde každý z nich trvá 600 minut. Pro jednotlivé koncentrace je průběh obou cyklů podobný. První cyklus začíná při 80 °C v čase 0 minut, s ochlazováním dochází ke konstantnímu zvyšování relativní ultrazvukové rychlosti až do bodu prvního maxima, které se nachází v intervalu od 158 do 260 minut dle měřené koncentrace. Tento bod je označován jako bod gelace. S dalším ochlazováním hodnoty relativní ultrazvukové rychlosti klesají a je zaznamenán pík, jehož maximální hodnoty jsou označovány jako sub-pík. Přibližně v čase 300 minut je dosaženo teploty 20 °C. Při ohřívání z 20 na 80 °C má relativní ultrazvuková rychlost klesající tendenci. Nejprve je zaznamenán totožný sub-pík jako při ochlazení a v intervalu od 381 do 530 minut (dle měřené koncentrace) dochází k nepatrnému zvýšení hodnot relativní ultrazvukové rychlosti, jež následně konstantně klesá až do konce prvního cyklu v čase 600 minut. Druhý cyklus zahrnuje ochlazování z 80 na 20 °C v časovém rozmezí 600–900 minut a poté následuje ohřívání z 20 na 80 °C po dobu přibližně 300 minut. Z grafu je patrné, že s rostoucí koncentrací karagenanu ve vodě roste relativní ultrazvuková rychlost, přičemž čím vyšší koncentrace vzorky nabývají, tím strmější je získaná závislost. Důvodem je, že s rostoucí koncentrací roste ve vzorku počet molekul na daný objem (tj. hustota) a tím i počet mezimolekulárních interakcí. Takové prostředí klade větší odpor ultrazvukovému vlnění (brání vzniku vysokých vln). Výsledná ultrazvuková vlna projde vzorkem rychleji než v případě vzorku s nižší koncentrací (a nižší hustotou). Zajímavé však je, že s rostoucí koncentrací se mění velikost píku odpovídající bodu gelace a sub-píku (tedy maximální hodnoty relativní ultrazvukové rychlosti). Pro koncentraci 10 g/l karagenanu je oproti bodu gelace sub-pík takřka zanedbatelný, naopak při koncentraci 50 g/l je naopak hodnota maxima odpovídající bodu gelace nejméně dvakrát menší, než je maximální hodnota relativní ultrazvukové rychlosti převažujícího sub-píku. Také můžeme pozorovat, že hodnoty bodu gelace neleží nad sebou, ale s rostoucí koncentrací karagenanu se hodnoty maxima posunují směrem k ose y. To znamená, že při ochlazování dochází například při koncentraci 50 g/l karagenanu mnohem dříve, než u 10 g/l karagenanu, tomu odpovídá i vyšší teplota bodu gelace pro vyšší koncentraci.

Z Obr. X17 v příloze lze snadno vyčíst, že průběh ochlazení a ohřevu je různý, zatímco při srovnání prvního a druhého cyklu vidíme, že se téměř shodují. Po vynesení dat z obou teplotních cyklů do jednoho grafu (viz Obr. X18 v příloze), je zřejmé, že rozdíly ve vykreslené závislosti jsou prakticky zanedbatelné, což platí pro všechny koncentrace karagenanu. Pro větší přehlednost je v následujících grafech popisujících závislost relativní ultrazvukové rychlosti na teplotě vykreslen vždy pouze první teplotní cyklus (tedy ochlazení a následně ohřev) měření dané koncentrace karagenanu. Ze všech výše popsanych závislostí vyplývá, že nedochází ke změnám v průběhu trendu relativní ultrazvukové rychlosti pro ohřívání a ochlazování vlivem teplotní/termální historie. Pomocí této velice citlivé metody můžeme potvrdit, že je karagenan termoreverzibilní, tedy nedochází k jeho degradaci či k trvalé změně struktury vlivem teploty.



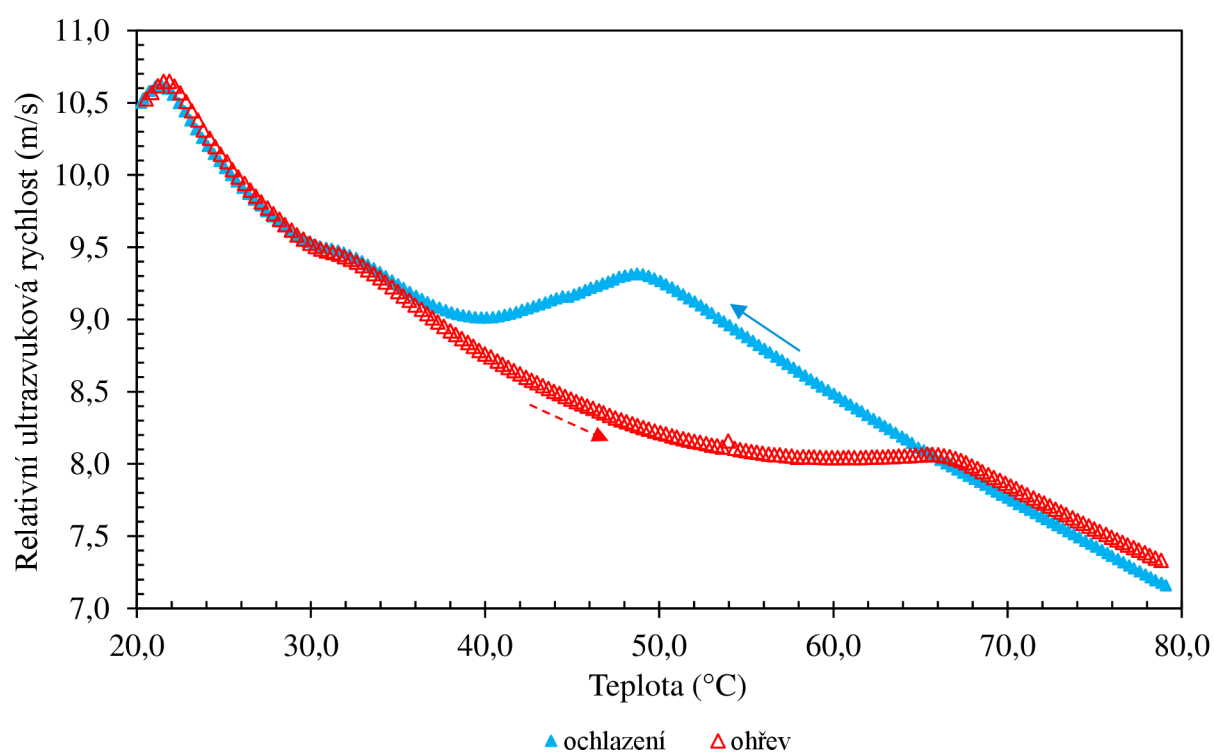
Obr. 26 Závislost relativní ultrazvukové rychlosti na teplotě pro vzorky karagenanu ve vodě o koncentraci 10–50 g/l (šarže 2). Znáznorněn první teplotní cyklus v intervalu 20–80 °C měřený při frekvenci 12 697 kHz. Prázdné znaky znázorňují ohřev, plné znaky ochlazení.

Teplotní průběh relativní ultrazvukové rychlosti pro karagenan ve vodě o koncentraci 10 g/l (šarže 1) a 20 až 50 g/l (šarže 2) je znázorněn na Obr. 26. Jak již bylo nastíněno, daný graf zobrazuje pouze první teplotní cyklus s ochlazením od 80 do 20 °C a ohřevem z 20 °C na 80 °C jednoho měření dané koncentrace při frekvenci 12,7 MHz. V tomto grafu můžeme pozorovat, že s rostoucí koncentrací karagenanu se zvyšují hodnoty relativní ultrazvukové rychlosti. V teplotním intervalu, při kterém dochází k tvorbě či tání gelu, je relativní ultrazvuková rychlost vždy při ochlazování vyšší než při ohřevu, tudíž i v tomto případě měření můžeme pozorovat jev teplotní hystereze (přítomnost „oka“, které odpovídá průběhu sol-gel procesu). Interval teplotní hystereze je určován rozdíly mezi teplotou zániku gelu a teplotou gelovatění a jeho velikost se zvětšuje s rostoucí koncentrací karagenanu. Pro zjednodušení popisu tohoto dynamického děje je stanovován bod gelace, tedy teplota T_{sg} , při které koloidní roztok tuhne v gel a teplota tání T_{gs} , která odpovídá opačnému přechodu. I v tomto případě platí, že obě stanovované teploty jsou závislé na koncentraci a na rychlosti.

Tab. 6 Hodnoty teplot, při nichž dochází k mezifázovému přechodu karagenanu ve vodě o koncentraci 10 až 50 g/l. Stanovené prostřednictvím ultrazvukové spektroskopie s vysokým rozlišením.

karagenan ve vodě	10 g/l	20 g/l	30 g/l	40 g/l	50 g/l
T_{sg} (°C)	27,76	35,79	39,95	44,03	49,38
T_{gs} (°C)	34,77	47,53	54,14	58,88	65,06
interval hystereze (°C)	24,64–34,77	26,94–47,53	29,62–54,14	31,12–58,88	36,47–65,06

Z Obr. 26 vidíme, že v intervalu od 21 do 23 °C je přítomen sub-pík. Jeho velikost roste se zvyšující se koncentrací a hodnoty relativní ultrazvukové rychlosti pro ohřev a ochlazení jsou stejné. Pro všechny koncentrace karagenanu platí, že na začátku a na konci jednotlivých měření jsou hodnoty relativní ultrazvukové rychlosti pro ohřev a ochlazení stejné. Z toho vyplývá, že sol-gel proces karagenanu je *termoreverzibilní* a interakce vznikající při síťování gelu jsou fyzikálního charakteru [52.].

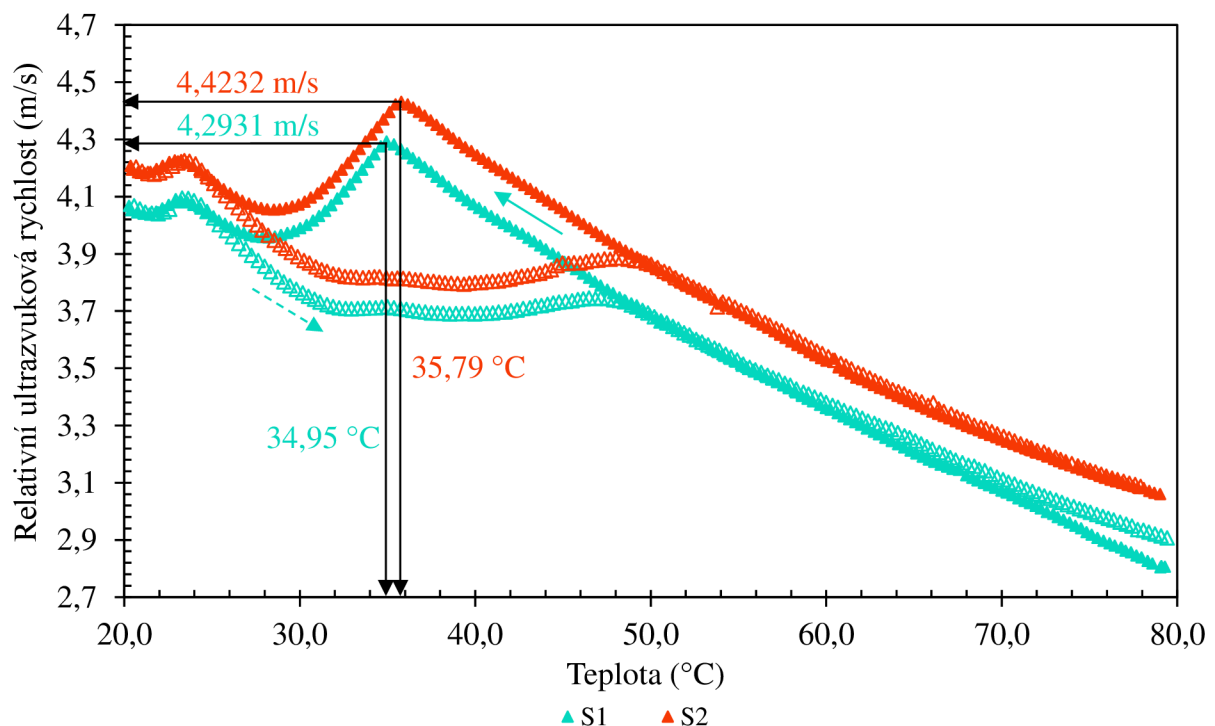


Obr. 27 Příklad závislosti relativní ultrazvukové rychlosti na teplotě pro karagenan ve vodě o koncentraci 50 g/l (šarže 2). Znárodněn první teplotní cyklus měřený při frekvenci 12 697 kHz. Ohřev je označen červeně, ochlazení modře.

Detail závislosti relativní ultrazvukové rychlosti je popsán na příkladu měření pro vzorek karagenanu o koncentraci 50 g/l na Obr. 27, kde ochlazení je naznačeno modře (plné znaky) a ohřev červeně (prázdné znaky). V tomto případě má interval teplotní hystereze hodnoty od 36,47 °C do 65,06°C. Při teplotě sol-gel přechodu (49,38 °C) relativní ultrazvuková rychlost dosahuje 9,3003 m/s. Poté začne rychlost klesat až do hodnoty 9,0123 m/s, v tomto rozmezí dochází k přechodu z konformace náhodného klubka na strukturu dvoušroubovice. Vzhledem k tomu, že se jedná o přechod do uspořádanějšího systému, může se mezi molekulami dočasně vytvořit volný prostor, což ve výsledku průchod vlny zpomalí.

Domníváme se, že následné zvyšování relativní ultrazvukové rychlosti má za následek agregace dvoušroubovic do větších celků – mezimolekulárními interakcemi se tvoří vazby (tzv. uzly), které propojují jednotlivé dvoušroubovice a znesnadňují průchod ultrazvukové vlny, proto je její rychlost vyšší. Přítomnost sub-píku v měřené závislosti karagenanových vzorků (při teplotě do 30 °C) pak nejspíše souvisí s počtem agregovaných dvoušroubovic do trojdimenzionální sítě gelu a velikostí spojovací zóny. Konkrétně se s vyšší molekulární hmotností karagenanu šarže 2 zvýší také počet spojovacích zón v síti gelu, což má za následek větší rigiditu gelu. Případně může být molekulární hmotnost příčinou vyššího počtu řetězců, jejichž interakcí se tvoří velké spojovací zóny ve struktuře karagenanového gelu. Přítomnost sub-píku byla měřena metodou diferenciální skenovací kalorimetrie [57.]. Jeho podstata byla připisována defektům v trojdimenzionální síti gelu a jako důsledek rozdílné rychlosti gelovatění. Ačkoliv námi naměřené výsledky odpovídají výsledkům této práce, v našem případě nebyla přítomnost sub-píku zapříčiněna změnou rychlosti ochlazování. Přesná změna struktury a význam jednotlivých vlivů při procesu gelovatění karagenanu nejsou v tomto případě dokonale objasněny.

3.4.2.1 Rozdíly mezi vzorky karagenanu šarže S1 a S2



Obr. 28 Graf znázorňující rozdíly mezi první (S1) a druhou (S2) šarží karagenanu ve vodě o koncentraci 20 g/l prostřednictvím závislosti relativní ultrazvukové rychlosti na teplotě (1 cyklus). Měřeno při frekvenci 12 697 kHz. Prázdné znaky znázorňují ohřev, plné znaky ochlazení.

Prostřednictvím Obr. 28 je popsán rozdíl mezi karagenanem šarže 1 (S1) a šarže 2 (S2). Z měření relativní ultrazvukové rychlosti vzorků karagenanu ve vodě při teplotě od 80 °C do 20 °C byl stanoven bod gelace pro šarži 1 a poté pro šarži 2. Sol-gel proces karagenanu šarže 1 má počátek při teplotě 34,95 °C (tomu odpovídá relativní ultrazvuková rychlost 4,2931 m/s). Pro karagenan šarže 2 byl bod gelace stanoven na 35,79 °C s relativní ultrazvukovou rychlostí 4,4232 m/s. Z teplotní závislosti vyplývá, že po celou dobu měření je ultrazvuková rychlost pro druhou šarži vyšší než pro první šarži. Důvodem je pravděpodobně rozdílná molekulární hmotnost pevného karagenanu, kde šarže 1 měla menší molekulární hmotnost (316,74 kDa), oproti nové várce karagenanu šarže 2 (539,74 kDa). Domníváme se, že u karagenanu šarže 1 mohlo s postupem času dojít k degradaci (stárnutí). Další možná příčina menší molekulární hmotnosti může souviset s výrobou κ -karagenanu. Jelikož se jedná o poměrně složitý polysacharid extrahovaný z živých organismů, je prakticky nemožné, aby byl vždy připraven karagenan s identickou strukturou a molární hmotností.

3.4.3 Porovnání použitých metod pro popis teplotních závislostí karagenanu

U porovnávání získaných hodnot teploty bodu gelace karagenanu (šarže 1) o koncentraci 20 g/l z měření na reometru a na spektrometru musíme zohlednit to, že ultrazvuková spektrometrie s vysokým rozlišením je přesnější metoda. Konkrétně byl bod gelace stanoven metodou ultrazvukové spektroskopie na 34,95 °C a pomocí reometrického měření na hodnotu 34,40 °C. Při měření karagenanu šarže 2 byla pozorována změna trendu oproti karagenanu šarže 1. Jednalo se o přítomnost sub-píku, jenž byl zaznamenán v trendu ochlazování jak při reologii, tak pomocí ultrazvukového spektrometru, se vždy nacházel při nižší teplotě, kde se vzorky karagenanu nachází ve formě gelu. Na křivce ohřívání můžeme přítomnost sub-píku vidět pouze při měření na ultrazvukovém spektrometru. Pravděpodobně je opět důvodem vyšší citlivost metody. Doposud nebyla zveřejněna studie, jež by zkoumala vliv rozdílných molekulárních hmotností jednoho typu karagenanu (κ -karagenanu), která nejspíše stojí za vznikem sub-píku. Získané informace o fenoménu sub-píku jsou významným podmětem pro další studii tohoto jevu.

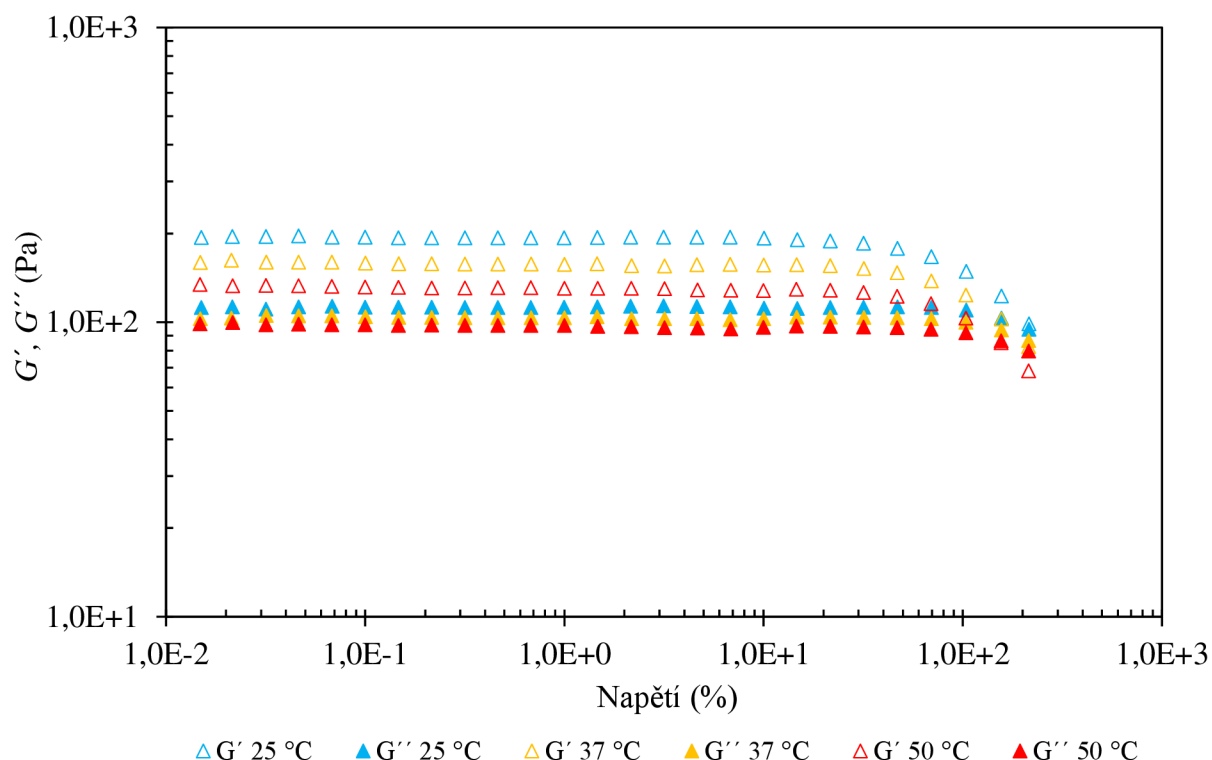
3.4.4 Reologické měření dynamických modulů hyaluronanu

Dle výše popsaných testů (viz odstavec 0) byly měřeny viskoelastické vlastnosti (paměťový a ztrátový modul) vzorků nízkomolekulárního a vysokomolekulárního hyaluronanu o různé koncentraci v závislosti na napětí, frekvenci a teplotě. Hodnoty napětí, frekvence, paměťového a ztrátového modulu byly v grafech vynášeny jako logaritmické (se základem 10).

Lineární viskoelastická oblast byla stanovována pro nízkomolekulární hyaluronan ve vodě o koncentraci 0,5; 2,5; 5,0 a 10,0 g/l při teplotě 25 °C Obr. X19 v příloze) a při teplotě 50 °C (viz Obr. X20 v příloze), dále byly pro tyto koncentrace měřeny také frekvenční oscilační testy, jejich výsledky jsou uvedeny na Obr. X21 (odpovídá měření při 25 °C) a na Obr. X22

(odpovídá měření při 50 °C). Pro vzorky nízkomolekulárního hyaluronanu byly rovněž měřeny závislosti viskoelastických oblastí na teplotě při ohřevu a ochlazování v intervalu 20–50 °C viz Obr. X23 v příloze. Průměrné hodnoty směrodatných odchylek paměťového a ztrátového modulu všech měřených testů vzorky nízkomolekulárního hyaluronanu ve vodě o koncentraci 0,5 až 10 g/l jsou uvedeny v Tab. X4 v příloze. Vzhledem k tomu, že výsledná data z měření vzorků nízkomolekulárního hyaluronanu mají vysokou míru šumu, nejsou výsledky reologického měření ve větší míře diskutovány. Z přiložených grafů lze však odvodit, že se hodnoty dynamických modulů zvyšují s rostoucí koncentrací. Pro analýzu struktury nízkomolekulárního hyaluronanu v závislosti na teplotě by bylo vhodné použít odlišnou metodu, která má větší citlivost, například elektronovou mikroskopii.

3.4.4.1 Stanovení lineární viskoelastické oblasti

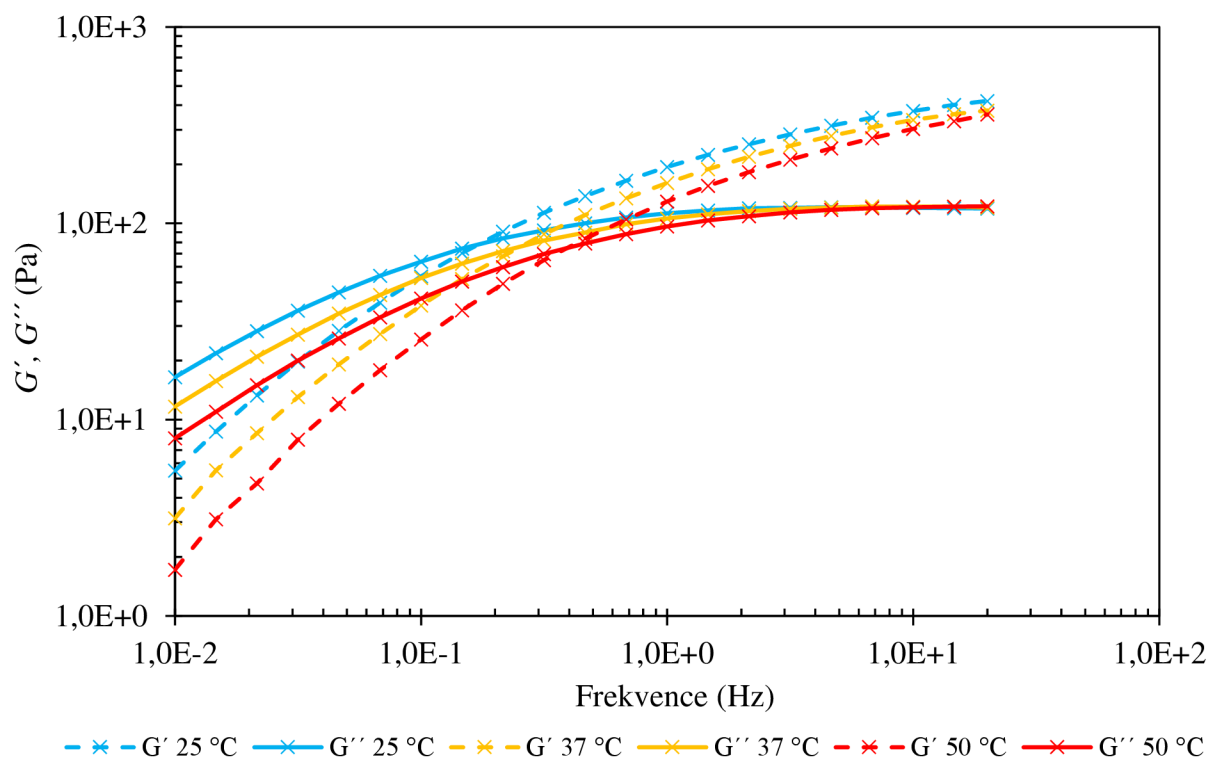


Obr. 29 Příklad znázorňující závislost paměťového G' (prázdné znaky) a ztrátového G'' (plné znaky) modulu na napětí pro vysokomolekulární hyaluronan ve vodě o koncentraci 20 g/l. Měřeno při teplotě 25, 37 a 50 °C s frekvencí 1 Hz.

Pro vysokomolekulární hyaluronan ve vodě o koncentraci 1, 5, 10, 15, 20 a 30 g/l byla lineární viskoelastická oblast stanovována na stejném principu jako pro karagenan (viz odstavec 0), to znamená, že byly zaznamenávány hodnoty paměťového a ztrátového modulu HW hyaluronanu v závislosti na amplitudě napětí při teplotě 25 °C (viz Obr. X24 v příloze) a při teplotě 50 °C (viz Obr. X25 v příloze). V tomto případě se jedná o velmi jednoduchou závislost, kdy jsou v podstatě po celou dobu viskoelastické vlastnosti vzorků vysokomolekulárního hyaluronanu nezávislé na zvyšujícím se napětí (průběh ztrátového i paměťového modulu je konstantní). Můžeme říci, že působením napětí (deformace) nedochází k významným změnám ve struktuře

vzorku a téměř celý rozsah měření lze nazývat lineární oblastí viskoelasticity. Hodnota stanovená pro další oscilační testy byla nastavena na 0,01 %, stejně jako v případě měření karagenanu. V tabulce Tab. X4 (v příloze) jsou uvedeny průměrné hodnoty směrodatných odchylek paměťového a ztrátového modulu pro deformační testy vzorků vysokomolekulárního hyaluronanu ve vodě o koncentraci 1 až 30 g/l. Na příkladu měření LW hyaluronanu o koncentraci 20 g/l (viz Obr. X16) vidíme, že po celou dobu měření převládá paměťový modul G' oproti ztrátovému modulu G'' , nejedná se však o velké rozdíly. Dále můžeme říci, že se zvyšující se teplotou dochází ke snížení hodnot dynamických modulů.

3.4.4.2 Změny viskoelastických vlastností v závislosti na frekvenci

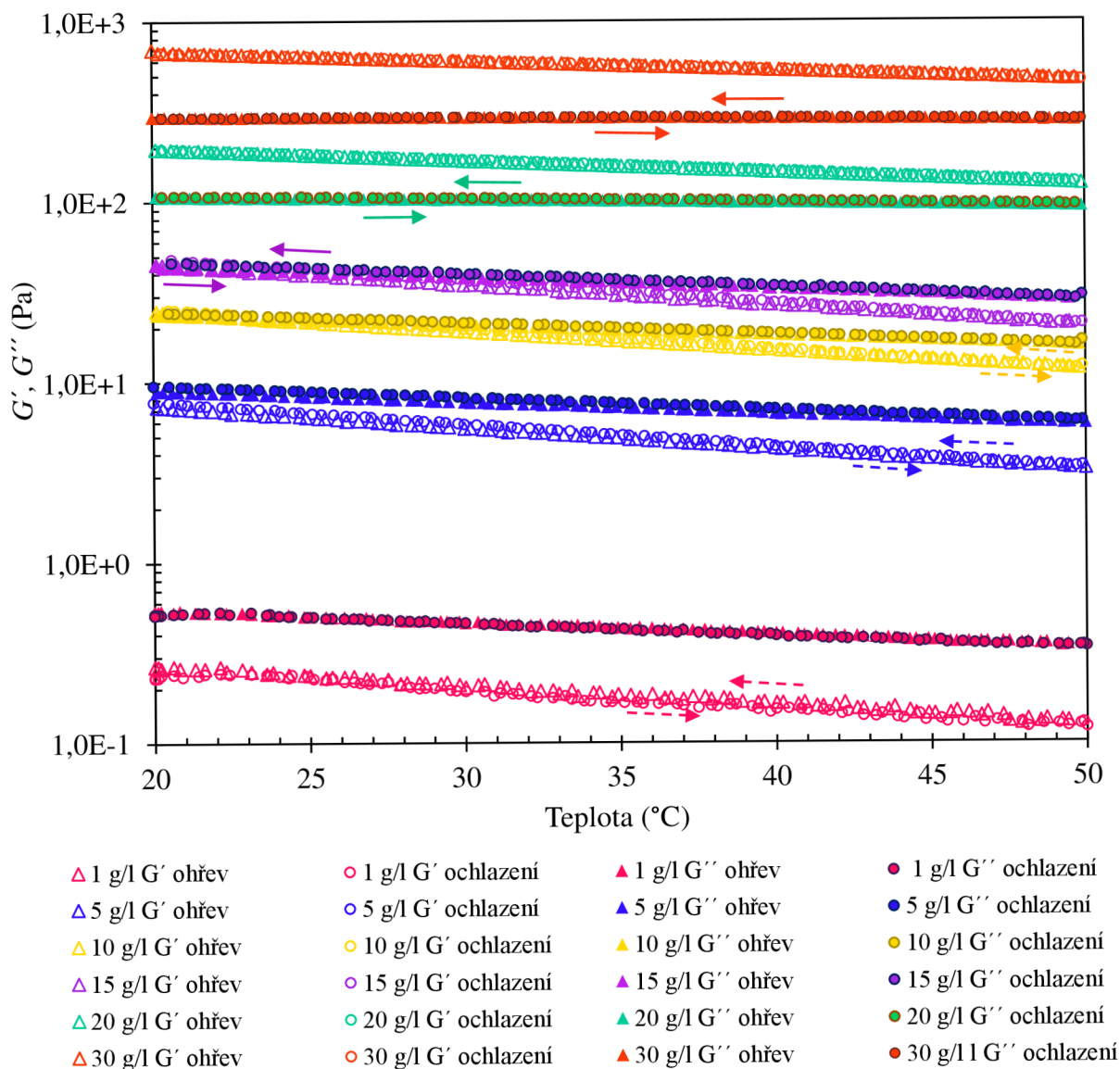


Obr. 30 Příklad znázorňující závislost paměťového G' (prázdné znaky) a ztrátového G'' (plné znaky) modulu na frekvenci pro vysokomolekulární hyaluronan ve vodě o koncentraci 20 g/l. Měřeno při teplotě 25, 37 a 50 °C s napětím 0,1 %.

Jakým způsobem se mění viskoelastické vlastnosti vysokomolekulárního hyaluronanu v závislosti na frekvenci, znázorňují výsledky *frequency sweep testu* (jehož nastavení je popsáno v odstavci 0) na Obr. 30. Ze závislosti můžeme pozorovat, že rozdíly mezi dynamickými moduly jsou malé (ve srovnání s oscilačními závislostmi karagenanu). Z měření dále vyplývá, že s rostoucí teplotou jsou hodnoty obou modulů menší (vyjma při vysoké frekvenci). Se zvyšováním frekvence mají hodnoty dynamických modulů tendenci se zvyšovat, na začátku měření (frekvence 0,01 Hz) převažuje ztrátový modul G'' nad paměťovým modulem G' , nachází se ve stavu viskoelastické kapaliny (vzorek má spíše viskózní charakter vlastnostmi podobnými kapalině). Následně dojde k překřížení modulů a se zvyšující se frekvencí začne převládat paměťový modul G' , což je projev elastického charakteru látek

(tedy chování vzorku připomíná chování gelu). Tento jev je důsledkem zaplétání řetězců hyaluronanu. Při nižších frekvencích (s delší dobou deformace) mají makromolekuly hyaluronanu dostatek času se rozplétáním přizpůsobit konformaci segmentů řetězce, jeví se tedy jako viskózní. Při vysokých frekvencích, kdy jsou řetězce hyaluronanu vystaveny rychlé deformaci, se rozpletená síťová struktura velmi rychle vrací do původního zapleteného stavu, což vede k elastické odezvě materiálu. Celkový vývoj trendu ztrátového modulu je pozoruhodný, se zvyšující se frekvencí má podobný průběh jako logaritmická funkce. S rostoucí frekvencí nejprve roste a okolo frekvence 20 Hz dochází k jeho vyrovnání na jednu hodnotu, tedy ztrátový modul je při teplotě 25, 37 a 50 °C roven 120 Pa. U vysoce koncentrovaného hyaluronanu (HW) jsou pravděpodobně tyto vlastnosti projevem dilatantního chování (kdy při namáhání vzorek tuhne), tedy v průběhu oscilační deformace otáčením hřídele reometru dochází k přiblížení do stavu podobnému chování pevných látek. Na Obr. X26 (pro teplotu 25 °C) a Obr. X27 (pro teplotu 50 °C) v příloze je znázorněna závislost paměťového a ztrátového modulu vysokomolekulárního hyaluronanu o koncentraci 1–30 g/l na frekvenci. U nižších koncentrací LW hyaluronanu (1–10 g/l) v analyzované závislosti (jak při 25 °C, tak při 50 °C) můžeme vidět, že do frekvence 1 Hz platí rovnice $G'' > G'$, převládá tedy viskózní charakter systému. Průměrné hodnoty směrodatných odchylek pro frekvenční závislost dynamických modulů jsou uvedeny v Tab. X4 v příloze.

3.4.4.3 Teplotní závislosti



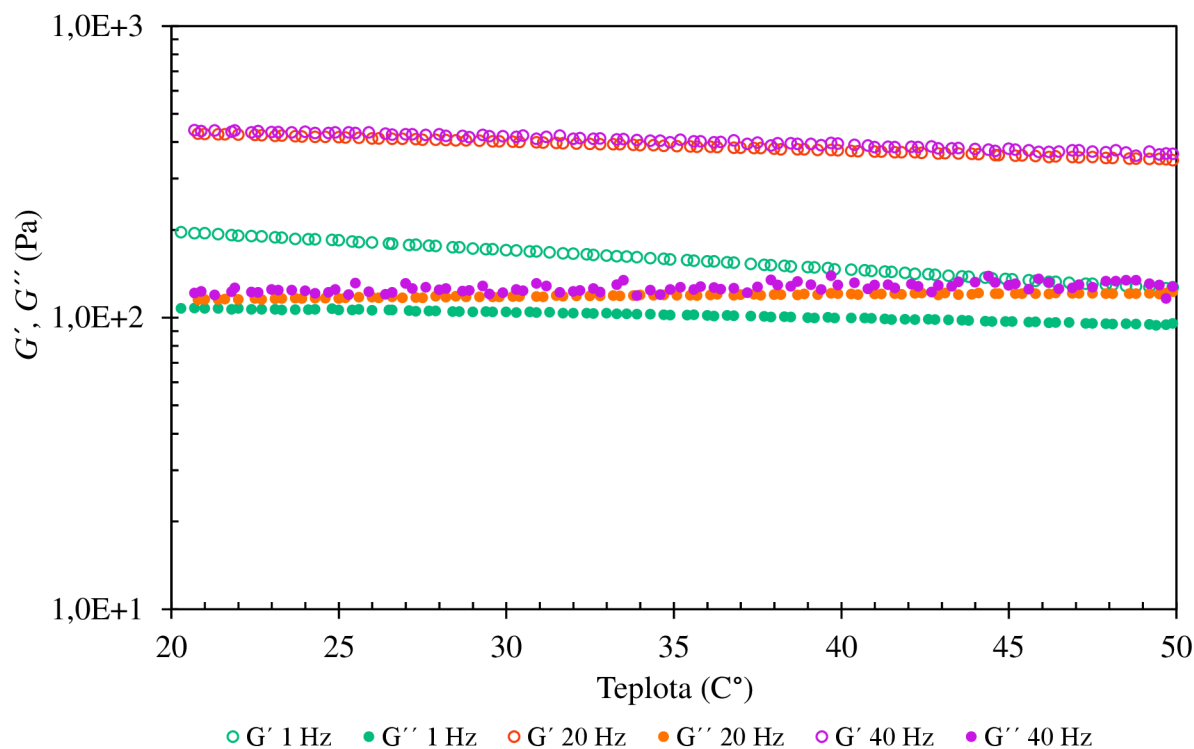
Obr. 31 Závislost paměťového G' (prázdné znaky) a ztrátového G'' (plné znaky) modulu na teplotě pro vzorky vysokomolekulárního hyaluronanu ve vodě o koncentraci 1–30 g/l. Měřeno prostřednictvím dvou teplotních ramp při frekvenci 1 Hz.

Z teplotních závislostí viskoelastických vlastností vysokomolekulárního hyaluronanu ve vodě (1–30 g/l) vyplývá, že nedochází k pozorovatelným změnám trendu při ohřevu ani při ochlazení. Z toho důvodu je nemožné pro vysokomolekulární hyaluronan definovat teplotu bodu gelace nebo teplotu tání (nepozorujeme stav, při kterém by se křivky modulů překřížily nebo tvořily pík). Na Obr. 31 vidíme, že teplotní průběh závislosti paměťového a ztrátového modulu je lineární, v případě měření rampy ohřevu (od 20 do 50 °C) jsou hodnoty obou modulů nižší, ale jedná se o velmi malé rozdíly. Tyto vlastnosti jsou platné pro všechny měřené koncentrace, přičemž pro měření obou modulů platí, že se jejich hodnoty zvyšují vlivem zvyšování koncentrace hyaluronanu. Je známo, že při zvýšené koncentraci hyaluronanu dochází

k zapletení řetězců, čímž vznikají nové (dočasné) zesíťující body, jejichž rozvolňování závisí na mobilitě řetězců. Čím vyšší je koncentrace, tím omezenější je pohyb a rozplétající rychlost, což způsobuje zvýšení obou modulů [63.]. Příslušné průměrné hodnoty směrodatné odchylky modulu G' a G'' jsou uvedeny v Tab. X4 jak pro ohřívání, tak pro ochlazování.

Pokud se zaměříme na průběh přímky paměťového modulu G' , můžeme pozorovat, že se zvyšující teplotou má paměťový modul totožný klesající trend pro všechny měřené koncentrace hyaluronanu. Klesání paměťového modulu (souvisí s elastickou složkou chování) oproti ztrátovému modulu (viskózní složka chování) vlivem zvýšení teploty pravděpodobně souvisí se zeslabením interakcí, které udržují hyaluronan v termodynamicky výhodné struktuře. Taková struktura je tvořena agregovanými molekulami, jež mají prostřednictvím vodíkových můstků tendenci tvořit síťové struktury [64.]. Z daného měření lze situaci popsat tak, že se zvyšující teplotou dochází ke ztekucování/ztrátě rigidní struktury vzorku. Ze závislosti můžeme vidět, že se zvýšením koncentrace se mění postavení paměťového modulu vůči ztrátovému modulu (konkrétně se jeho hodnoty zvyšují). Z průběhu přímky odpovídajícího měření ztrátového modulu G'' je vidět, že má také klesající tendence (platí pro všechny měřené koncentrace), nejsou však tak očividné jako v případě paměťového modulu. Například rozdíl mezi počáteční a konečnou hodnotou G' pro ohřev vysokomolekulárního hyaluronanu o koncentraci 30 g/l činí pouze 13,6 Pa.

Z měření viskoelastických závislostí můžeme přibližně určit, v jaké fázi se měřené vzorky hyaluronanu nachází – pro koncentraci 1 g/l převládá v celém intervalu teplot 20–50 °C ztrátový modul, vzorek se tedy chová podobně jako viskózní kapalina. Pro koncentraci 5 g/l také platí $G' < G''$, nicméně viskózní charakter látky již není tolik v převaze. U koncentrace 10 a 15 g/l pozorujeme, že hodnoty ztrátového a paměťového modulu se rovnají až do teploty 40 °C. Takový systém se nachází ve stavu, ve kterém není upřednostněn viskózní či elastický charakter a svým chováním připomíná stejnou mírou jak chování ideální viskózní kapaliny (*liquid-like*), tak chování ideální pružné pevné látky (*solid-like*). Koncentraci, při níž dochází k vyrovnání hodnot elastických modulů, můžeme označit jako kritickou koncentraci c_{krit} [45.] v našem případě se jedná o 10–15 g/l. Při překročení tohoto intervalu koncentrací platí rovnice $G' > G''$, tedy vždy převládá elastický charakter systému a vysokomolekulární hyaluronan se vždy nachází ve formě gelu. Tento předpoklad potvrzuje měření viskoelastických závislostí hyaluronanu o koncentraci 20 a 30 g/l, kde po celou dobu ohřevu i ochlazování převládá paměťový modul nad ztrátovým.

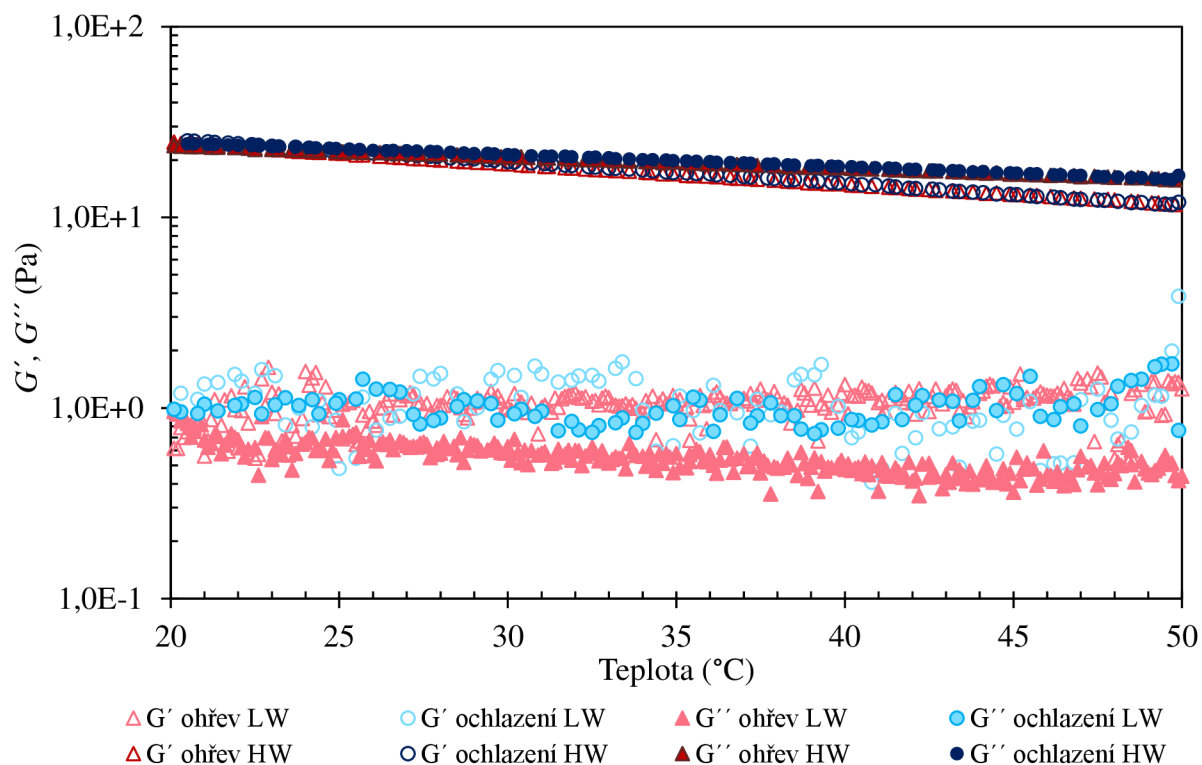


Obr. 32 Příklad znázorňující závislost paměťového (G') a ztrátového (G'') modulu na teplotě pro vysokomolekulární hyaluronan ve vodě o koncentraci 20 g/l. Měřeno v intervalu teplot od 50 do 20 °C (ochlazení) s frekvencí 1, 20 a 40 Hz.

Měření teplotních závislostí vzorků hyaluronanu (viz Obr. 31) probíhalo při konstantní frekvenci 1 Hz. Jak vypadají teplotní závislosti měřené při různých frekvencích je ukázáno na příkladu vysokomolekulárního hyaluronanu o koncentraci 20 g/l. Průběh ztrátového a paměťového modulu na teplotě při frekvenci měření 1, 20 a 40 Hz je znázorněn na obrázku Obr. X28 v příloze. Vzhledem k tomu, že rovněž v tomto případě mají teplotní rampy ohřevu a ochlazení stejný průběh dynamických modulů, jsou na Obr. 32 znázorněny výsledky měření paměťového a ztrátového modulu pouze při ochlázování (50–20 °C). Krom tohoto společného znaku s měřením při frekvenci 1 Hz vidíme, že ani v tomto případě nebyly reologickým měřením zaznamenány odchylky od lineárního průběhu trendu. Pro danou koncentraci byly měřeny teplotní rampy také při zvolené frekvenci měření 60 Hz, nicméně v tomto případě výsledná data byla nečitelná kvůli šumu ve výsledcích. Pro diskutovanou závislost platí, že se změnou frekvence z 1 Hz na 20 Hz dochází ke zvýšení hodnot obou modulů, přičemž pro paměťový modul se jedná o významné zvýšení (až o 400 Pa) a pro ztrátový modul jsou rozdíly menší (maximální zvýšení o 40 Pa). Oproti tomu rozdíl mezi trendem obou modulů odpovídající frekvenci 20 Hz a 40 Hz je prakticky zanedbatelný. Za předpokladu, že závislost zobrazená na Obr. 30 nekončí měřením při frekvenci 20 Hz, nýbrž pokračuje dále (až do frekvence 40 Hz) a její trend se výrazně nezmění, předpokládáme, že se přímky dynamických modulů přibližují na stejnou hodnotu (pro $G'=360$ Pa a pro $G''=120$ Pa). Můžeme tedy říci, že výsledky měření dynamických modulů v závislosti na frekvenci (pro tři různé teploty) a měření dynamických modulů v závislosti na teplotě (pro tři různé

frekvence) spolu korelují. Jejich společným znakem pro vysokomolekulární hyaluronan o koncentraci 20 g/l je, že přibližně od frekvence 20 Hz a výše je výsledná teplotní závislost nezávislá na zvyšování frekvence. Se zvýšením teploty můžeme pozorovat, že hodnoty obou modulů měřené při frekvenci 1 Hz se snižují ve větší míře než hodnoty dynamických modulů měřené při 20 a 40 Hz.

3.4.4.4 Rozdíly mezi nízkomolekulárním a vysokomolekulárním hyaluronanem



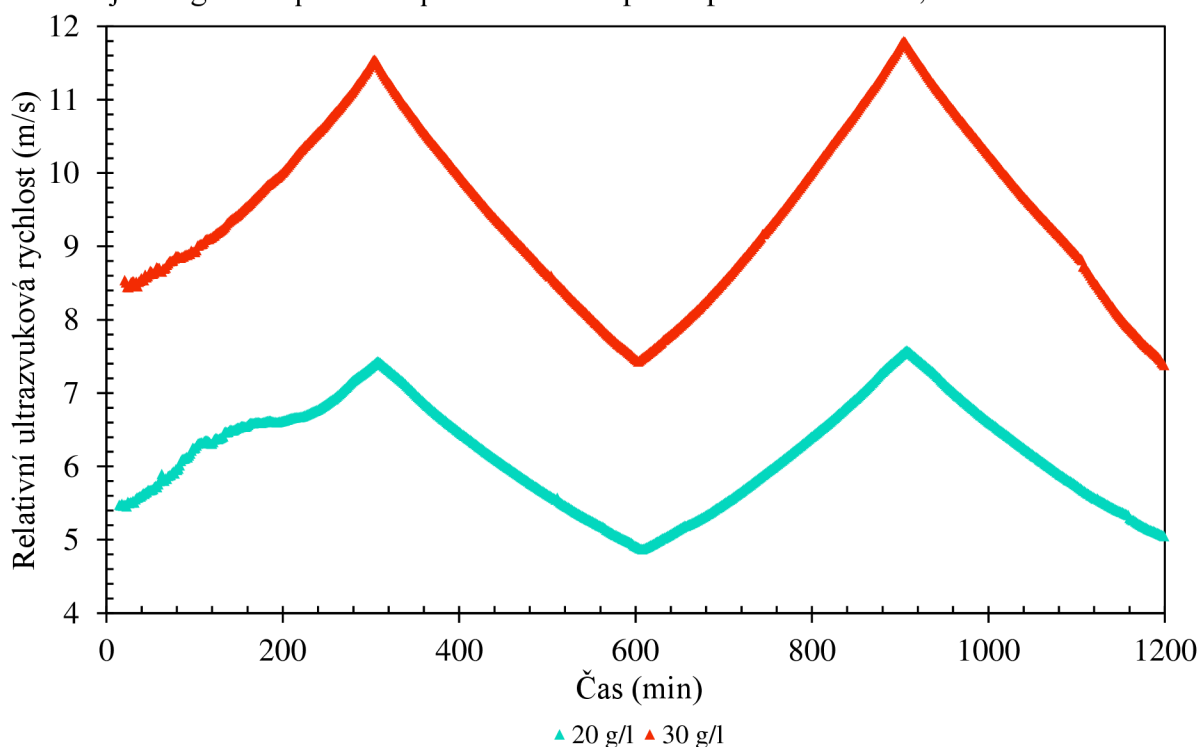
Obr. 33 Graf znázorňující rozdíly mezi nízkomolekulárním (LW) a vysokomolekulárním (HW) hyaluronanem ve vodě o koncentraci 10 g/l prostřednictvím závislosti paměťového G' (prázdné znaky) a ztrátového G'' (plné znaky) modulu na teplotě. Měřeno prostřednictvím dvou teplotních ramp při frekvenci 1 Hz.

Porovnání vlastností nízkomolekulárního (LW) a vysokomolekulárního (HW) hyaluronanu ze závislosti viskoelastických vlastností na frekvenci (Obr. X30 v příloze), napětí (Obr. X29 v příloze) a na teplotě (Obr. 33) je znázorněno na příkladu měření vzorků hyaluronanu (LW a HW) ve vodě o koncentraci 10 g/l. Z prvního obrázku vyplývá, že dynamické moduly HW hyaluronanu mají téměř stejné hodnoty, které jsou v celém rozsahu měření oscilační deformace vyšší než u měření LW hyaluronanu. Z trendu LW hyaluronanu navíc pozorujeme, že platí rovnice $G' < G''$. Ze závislosti dynamických modulů LW a HW hyaluronanu na frekvenci otáčení vyplývá, že také v tomto grafu jsou hodnoty dynamických modulů měření HW hyaluronanu větší než hodnoty pro měření LW hyaluronanu (platí téměř v celém rozsahu měření kromě měření za nízké frekvence, kde je znát poměrně silný vliv šumu). Trend G' a G'' v závislosti na frekvenci pro vysokomolekulární hyaluronan již byl

popisován výše, trend odpovídající nízkomolekulárnímu hyaluronanu má zdánlivě opačný charakter. Nejprve je ztrátový modul nezávislý na frekvenci, poté začne s frekvencí stoupat a dojde k protnutí s paměťovým modulem (ten na konci měření naopak spíše klesá). Výsledky teplotních závislostí LW a HW hyaluronanu o koncentraci 10 g/l vypovídají o tom, že paměťový G' a ztrátový G'' modul pro nízkomolekulární hyaluronan je vždy nižší než pro vysokomolekulární hyaluronan.

3.4.4.5 Měření ultrazvukové rychlosti hyaluronanu

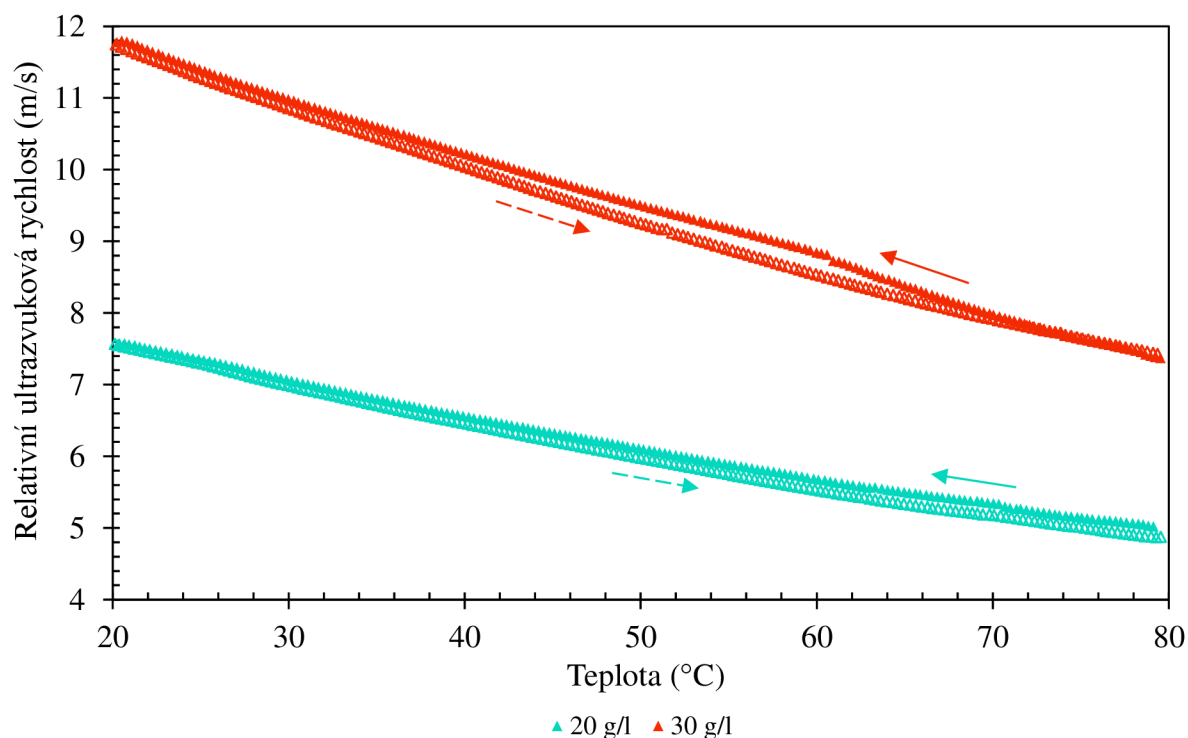
Pomocí ultrazvukového spektrometru byly měřeny teplotní závislosti dvou koncentrací vysokomolekulárního hyaluronanu v intervalu od 80 po 20 °C, přičemž měření zahrnovalo dva cykly s ochlazením a následným ohřevem. Následující grafy znázorňují pouze výsledky měření relativní ultrazvukové rychlosti, protože měřený trend je lépe čitelný nežli v případě výsledků měření zeslabení. Z měření závislosti relativní ultrazvukové rychlosti na teplotě při pěti různých frekvencích vyplývá, že nezávisí na frekvenci (viz Obr. X31). Z toho důvodu byla v následujících grafech použita teplotní závislost pouze pro frekvenci 12,8 MHz.



Obr. 34 Závislost relativní ultrazvukové rychlosti na čase pro vzorky vysokomolekulárního hyaluronanu ve vodě o koncentraci 20 a 30 g/l znázorňující dva po sobě jdoucí cykly teplotního skenu v intervalu teplot 20 až 80 °C. Měřeno při frekvenci 12 778 kHz.

Byla měřena relativní ultrazvuková rychlost vysokomolekulárního hyaluronanu ve vodě o koncentraci 20 a 30 g/l při dvou teplotních cyklech (v intervalu teplot 20–80 °C) po dobu 1 200 minut. Výsledná závislost je znázorněna na Obr. 34. První teplotní cyklus má počátek při teplotě 80 °C v čase $t = 0$ min. Ochlazováním na 20 °C pozorujeme zvyšování relativní ultrazvukové rychlosti až do bodu maxima okolo 300 minut. V měrné cele ultrazvukového

spektrometru docházelo k tuhnutí vzorku hyaluronanu ve vodě, čímž se zvyšovala jeho hustota a v důsledku toho ultrazvuková vlna procházela vzorkem rychleji (jak již bylo diskutováno pro karagenan). Druhá část teplotního cyklu v časovém rozmezí 300 až 600 minut zahrnovala ohřev z 20 na 80 °C, přičemž relativní ultrazvuková rychlost vzorku lineárně klesala. Následující cyklus kopíroval trend prvního teplotního cyklu, ačkoliv průběh ochlazení druhého cyklu se oproti prvnímu zvyšoval konstantně (to platí pro obě koncentrace hyaluronanu). Ze závislosti vidíme, že se zvyšující se koncentrací roste relativní ultrazvuková rychlost, přičemž u vyšší koncentrace 30 g/l byla rychlost naměřena v širším intervalu hodnot od 7,4212 m/s do 11,7455 m/s (oproti 20 g/l hyaluronanu v rozmezí 4,9243 m/s 7,5498 m/s), z toho důvodu je její výsledná závislost strmější.



Obr. 35 Závislost relativní ultrazvukové rychlosti na teplotě pro vzorky vysokomolekulárního hyaluronanu ve vodě o koncentraci 20 a 30 g/l. Znáznorněn první teplotní cyklus měřený při frekvenci 12 778 kHz.

Ze závislosti relativní ultrazvukové rychlosti vysokomolekulárního hyaluronanu na teplotě v měřeném intervalu od 20 do 80 °C (první teplotní cyklus) na Obr. 35 vidíme, že při zvyšování teploty vzorku rychlost konstantně klesá. Na rozdíl od karagenanu v tomto případě nepozorujeme významné rozdíly mezi relativní rychlostí pro ohřev a ochlazování, trend nevykazuje žádné maximální hodnoty, proto zde není možné určit teplotu gelovatění či tání.

3.4.5 Porovnání použitých metod pro popis teplotních závislostí hyaluronanu

Data naměřená na ultrazvukovém spektrometru s vysokým rozlišením byla použita jako doplňkové měření k reologii. Záměrně byly použity vzorky o vysoké koncentraci

vysokomolekulárního hyaluronanu, aby se předešlo opakování již proběhlých experimentů, které byly vyhodnocovány kolegy [77.]. Zároveň však byla právě vyšší koncentrace hyaluronanu (HW) komplikace, která nás nutila změnit zavedený postup měření na spektrometru, konkrétně bylo potřeba nejprve vzorky ohřát na požadovanou teplotu (okolo 80 °C), aby bylo možné je nadávkovat do měrné cely. Dále bylo nutné změnit počáteční teplotu měření (od 80 °C) čemuž se přizpůsobila také kalibrace měření. Z vyhodnocení reologického měření a měření na ultrazvukovém spektrometru vyplývá, že od frekvence 20 Hz a vyšší je vysokomolekulární hyaluronan nezávislý na použité frekvenci měření. Při srovnání teplotních závislostí z měření obou metod (viz Obr. 31 a Obr. 35) lze říci, že spolu výsledky korelují. V našem případě nebyly pozorovány výrazné změny vlivem teploty na vzorky vysokomolekulárního hyaluronanu, měřené veličiny měly v obou případech stejné hodnoty při ohřevu jako při ochlazení. Výsledky z ultrazvukové spektroskopie v této práci však neodpovídají výsledkům studie charakterizace medicínských biopolymerů ultrazvukovou spektroskopií [77.], kde byl zkoumán mimo jiné také vysokomolekulární hyaluronan s molekulární hmotností 1 500–1 700 kDa, u kterého byla pozorována hystereze pro koncentrace odpovídající 1, 3 a 5 g/l. Důvodů může být hned několik. Například změna postupu, kdy začátek měření byl nastaven na 80 °C. Jelikož se jedná o velmi citlivé měření, tak metoda vyžaduje minimální zásah do pracovního procesu. S tím souvisí nutnost ohřevu vzorku před samotným měřením na poměrně vysokou teplotu, kde by teplotní historie mohla mít vliv na tvorbu oka. Dále se může projevovat vliv rozdílné molekulární hmotnosti nebo rozdílné koncentrace použité v aktuální a starší studii vysokomolekulárního hyaluronanu.

4 ZÁVĚR

Cílem diplomové práce bylo seznámit se s reologií, ultrazvukovou spektroskopií a s jejich využitím v praxi. Na základě rešerše byla navrhována vhodná metodika vybraných měřicích metod k charakterizaci teplotních závislostí karagenanu a hyaluronanu ve spektru několika koncentrací, případně molárních hmotností a frekvencí. Teoretická část poskytuje především informace o karagenanu, hyaluronanu a jejich vlastnostech. Rovněž je zaměřena na popis použitých metod k měření zkoumaných látek. V další části je diskutován současný stav řešené problematiky. V experimentální části práce byly prostřednictvím reologické metody charakterizovány změny viskoelastických vlastností v závislosti na teplotě, frekvenci a měřené koncentraci vodných vzorků karagenanu a hyaluronanu. Následně byla metodou ultrazvukové spektrometrie s vysokým rozlišením (HR-US) měřena relativní ultrazvuková rychlost karagenanu ve vodě a hyaluronanu ve vodě v závislosti na teplotě, frekvenci a měřené koncentraci.

Před samotným měřením oscilačních závislostí karagenanu byla stanovena lineární oblast viskoelastivity. Charakterizace viskoelastických vlastností karagenanu, konkrétně měření paměťového (elastického) modulu G' a ztrátového (viskózního) modulu G'' probíhalo měřením teplotní rampy pro ohořev v intervalu teplot od 20 do 50 °C, a poté byla teplotní rampa měřena opačně, tedy při ochlazení. Z teplotních závislostí je zřejmé, že se vzrůstající koncentrací se hodnoty ztrátového a paměťového modulu zvyšují. Z průběhu dynamických modulů vyplývá, že při ochlazení dochází ke gelovatění karagenanových roztoků, a naopak při ohřevu dochází k tání gelu. Rovněž je ze závislostí patrné, že je přítomen vliv teplotní hystereze, jenž má za následek nižší hodnoty teploty tání oproti teploty bodu gelace pro danou koncentraci. U měření vyšších koncentrací (30–50 g/l) byl teplotní rozsah shledán nedostatečným, protože ke gelaci docházelo okolo 50 °C. Z toho důvodu byly dané vzorky karagenanu měřeny v teplotním intervalu od 20 do 80 °C. Důvodem je s největší pravděpodobností vliv vyšší molekulární hmotnosti karagenanu, jenž byl použit při přípravě vzorků o koncentraci 30–50 g/l. Molekulární hmotnost může být rozdílná z důvodu použití rozdílných surovin při přípravě pevného karagenanu, případně mohlo u zásobní látky dojít k degradaci vlivem stárnutí. Výsledné teplotní závislosti měly stejné rysy jako u měření v nižším intervalu teplot, s tím rozdílem, že v průběhu ochlazení bylo v okolí teploty 25 °C zaznamenáno zvýšení a následné snížení dynamických modulů, tzv. sub-pík. Měření teplotních ramp pro ohřev a ochlazení bylo dokázáno, že strukturální změny, k nimž dochází vlivem teploty, jsou reverzibilní a nedochází k trvalým změnám vlastností karagenanu působením zvýšené teploty. Z měření dynamických modulů v závislosti na frekvenci vyplývá, že elastický charakter systému roste se zvýšením koncentrace, a naopak klesá se zvýšením teploty. Pro vzorky karagenanu s vyšší molekulární hmotností bylo potvrzeno, že tvoří pevnější strukturu a nachází se ve formě gelu při teplotě 25 a 50 °C.

Měření relativní ultrazvukové rychlosti vzorků karagenanu ve vodě o vybrané koncentraci probíhalo na ultrazvukovém spektrometru s vysokým rozlišením. Celková délka měření činila 1 200 minut zahrnovala měření dvou cyklů teplotního skenu, kde jeden cyklus představoval ochlazení z 80 na 20 °C a ohřev z 20 °C zpět na 80 °C. Porovnatelný průběh obou cyklů v závislosti relativní ultrazvukové rychlosti na čase dokazuje termostabilitu karagenanu. Z průběhu teplotních závislostí vyplývá, že se relativní ultrazvuková rychlost s rostoucí

koncentrací karagenanu zvyšuje. Opačný trend má v závislosti na teplotě, kdy rychlost zvuku (po dosažení maxima) se rostoucí teplotou klesá, jelikož dochází k rozvolňování a rozestupu molekul a ultrazvuková vlna se takovouto strukturou šíří snáze. Pozorujeme srovnatelné vlastnosti, jaké byly stanoveny z reologického měření. Rovněž v tomto případě můžeme vidět rozdílný průběh pro ohřev a ochlazení, v trendu se vytváří viditelné hysterezní oko, jenž se s rostoucí koncentrací zvětšuje. Z křivky ochlazení vidíme, že v bodě okolo 25 °C je přítomen sub-pík. Další maximum na této křivce odpovídá bodu gelace T_{s-g} . Křivka ohřevu znázorňuje sub-pík (o velikosti totožné jako při ochlazování) a následující maximum této křivky znázorňuje teplotou tání T_{g-s} . Teplota bodu gelace i teplota tuhnutí se s rostoucí koncentrací posouvají k vyšším teplotám a jejich přesné hodnoty byly stanoveny pro koncentrace karagenanu 10–50 g/l. Teplotní stálost karagenanu potvrzuje fakt, že hodnoty relativní ultrazvukové rychlosti při ochlazování se na začátku (20 °C) a na konci (80 °C) vrátí ke stejným hodnotám, jaké byly naměřené během ohřevu. Můžeme tedy potvrdit, že během změny teploty bylo možné pozorovat nějaké změny ve struktuře, ale ve výsledku je relativní rychlost zvuku stejná při ohřevu i ochlazení, nedochází tedy k trvalé změně vlastností působením teploty.

Měření viskoelastických vlastností nízkomolekulárního hyaluronanu (250–450 kDa) a vysokomolekulárního hyaluronanu (1 500–1 750 kDa) v závislosti na teplotě a frekvenci bylo měřeno na přístroji reometru. Před samotným měřením byla stanovena oblast lineární viskoelasticity zkoumaných vzorků. Pro popis teplotních závislostí hyaluronanu byl měřen ohřev a ochlazení v intervalu 20–50 °C. Z měření vyplývá, že zvolená instrumentace není dostatečně citlivá na měření nízkomolekulárního hyaluronanu. Pro vysokomolekulární hyaluronan nebyly pozorovány výrazné změny v průběhu ohřívání a ochlazování, což znamená, že hodnoty dynamických modulů byly při ohřevu a ochlazení téměř stejné. Z toho důvodu nebylo možné pro vybrané koncentrace hyaluronanu (0,5–30 g/l) stanovit teplotu bodu gelace či teplotu tání. Z teplotních závislostí vysokomolekulárního hyaluronanu vyplývá, že s rostoucí teplotou se hodnoty paměťového modulu G' snižují razantněji než u ztrátového modulu G'' . V obou případech je však tendence lineárně klesající. Při zvyšování koncentrace měřených roztoků hyaluronanu se zvyšují hodnoty dynamických modulů a zároveň se mění poloha trendu paměťového modulu vůči poloze trendu ztrátového modulu. Výsledkem této změny je, že přibližně od koncentrace 15 g/l se vysokomolekulární hyaluronan vyskytuje ve formě gelu. Z frekvenčních závislostí bylo zjištěno, že s rostoucí frekvencí hyaluronanu roste elastický charakter látek vlivem zapletení řetězců hyaluronanu. Přibližně od frekvence 20 Hz výše je vysokomolekulární hyaluronan téměř nezávislý na použité frekvenci měření a se změnou teploty se mění jen minimálně. Takové chování bylo potvrzeno také u měření teplotních závislostí relativní ultrazvukové rychlosti. Ultrazvuková spektroskopie s vysokým rozlišením byla v tomto případě použita jako doplňující metoda k reologii. Konkrétně byla měřena relativní ultrazvuková rychlost vysokomolekulárního hyaluronanu o koncentraci 20 a 30 g/l v závislosti na ohřevu a ochlazení v intervalu 20–80 °C po dobu 1 200 minut. Z teplotních závislostí vyplývá, že s rostoucí koncentrací se hodnota relativní ultrazvukové rychlosti zvyšuje, a s rostoucí teplotou lineárně klesá, přičemž průběh ohřevu i ochlazení je stejný. Výsledky měření ultrazvukových vln vysokomolekulárního hyaluronanu odpovídají výsledkům získaným z reologie.

Nejméně očekávaný závěr této práce je skutečnost, že stejný typ karagenanu (v našem případě κ -karagenan) se může projevovat různými vlastnostmi a odlišnou teplotní závislostí (tj. přítomnost sub-píku) pouze na základě rozdílných molekulárních hmotností. Přítomnost sub-píku v měřené závislosti karagenanových gelů o vyšší molekulární hmotnosti nejspíše souvisí s vyšším počtem agregovaných dvoušroubovic do trojdimenzionální sítě gelu, případně s rostoucí velikostí spojovací zóny ve struktuře sítě gelu. Vzhledem k tomu, že se jedná o poměrně pozoruhodnou hypotézu, bylo by vhodné se tomuto tématu věnovat v budoucnu. Především zjistit, od jaké koncentrace v roztoku karagenanu ve vodě (bez přítomnosti iontů) dochází k agregaci dvoušroubovic ve struktuře a zda tento děj nastává v rozmezí teplot, při nichž byl pozorován sub-pík. Dle uvážení by bylo na místě také měření nižší koncentrace karagenanu s vyšší molekulární hmotností, a tím dokázat, zda se tyto rozdíly ve vlastnostech projevují i v širší škále koncentrací. Rovněž by bylo vhodné se věnovat studii měření silně koncentrovaných roztoků hyaluronanu ve vodě pro stanovení konkrétních hodnot, při nichž dochází k tvorbě nekonečné sítě gelu, tedy stanovení teploty bodu gelace a tání. Na základě naměřených dat je možné karagenan považovat za teplotně stálý. Karagenan aplikovaný jako nosič léků, nebo součást scaffoldu v živém organismu, případně použitý v potravinách, nebude podléhat degradaci vlivem změny teploty. Z měření vyplývá, že vysokomolekulární hyaluronan je nezávislý na frekvenci od 20 Hz výše, například použitím terapeutického ultrazvuku ke snížení artritické bolesti nedochází k degradaci či snížení účinku hyaluronanu jako léčiva podávaného injekčně do postiženého kloubu.

SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1.] 2003. MCHUGH, by Dennis J. *A guide to the seaweed industry*. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations, s. 61-71. ISBN 9251049580.
- [2.] VALDERRAMA, Diego, Junning CAI, Nathanaël HISHAMUNDA a Neil B RIDLER. 2003. *Social and economic dimensions of carrageenan seaweed farming*. Rome: FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS, 204 pages. FAO fisheries and aquaculture technical paper, 580. ISBN 92-510-7746-0.
- [3.] Carrageenans. *The Seaweed Site: information on marine algae* [online]. 2014 [cit. 2017-01-04]. Dostupné z: http://www.seaweed.ie/uses_general/carrageenans.php
- [4.] 2002. *Biopolymers*. Weinheim: Wiley-VCH, s. 247-257. ISBN 3-527-30227-1.
- [5.] ROSA, M. Biological properties of carrageenan. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 1972, vol. 24, issue 2. ISSN 00223573.
- [6.] LESNICHAYA, M. V., G. P. ALEKSANDROVA, B. G. SUKHOV a A. V. ROKHIN. 2013. Molecular-weight characteristics of galactomannan and carrageenan. *Chemistry of Natural Compounds*.**49**(3): 405-410. DOI: 10.1007/s10600-013-0625-x.
- [7.] CAMPO, Vanessa Leiria, Daniel Fábio KAWANO, Dílson Braz da SILVA a Ivone CARVALHO. 2009. Carrageenans: Biological properties, chemical modifications and structural analysis – A review. *Carbohydrate Polymers*. **77**(2): 167-180. DOI: 10.1016/j.carbpol.2009.01.020.
- [8.] *Hydrocolloid Applications Gum Technology in the Food and Other Industries*. Tullamore, Ireland: Springer Verlag, 2013, s. 41-45. ISBN 9781461379331.
- [9.] DE RUITER, Gerhard A., Brian RUDOLPH, M. MILAS, M. RINAUDO a S. PEREZ. Carrageenan biotechnology: A biological overview. *Trends in Food Science*. 1997, vol. 8, issue 12, s. 389-395.
- [10.] HARDING, Stephen E., Kathryn DAY, Rajesh DHAMI a Philip M. LOWE. 1997. Further observations on the size, shape and hydration of kappa-carrageenan in dilute solution. *Carbohydrate Polymers*. **32**(2): 81-87. DOI: 10.1016/S0144-8617(96)00167-1. ISSN 01448617. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0144861796001671>
- [11.] REES, D. A. 1981. Polysaccharide shapes and their interactions - some recent advances. *Pure and Applied Chemistry*.**53**(1): 1-14. DOI: 10.1351/pac198153010001.

- [12.] SYED K. H. Gulrez, Saphwan AL-ASSAF and Glyn O PHILLIPS (2011). Hydrogels: Methods of Preparation, Characterisation and Applications, Progress in Molecular and Environmental Bioengineering - From Analysis and Modeling to Technology Applications, Prof. Angelo Carpi (Ed.), s. 126-127. ISBN: 978-953-307-268-5.
- [13.] SPAGNUOLO, P, D DALGLEISH, H GOFF, E MORRIS, Y. SANO a T. HIYOSHI. 2005. Kappa-carrageenan interactions in systems containing casein micelles and polysaccharide stabilizers. *Food Hydrocolloids*. **19**(3): 183-188. DOI: 10.1016/b978-044450178-3/50083-4.
- [14.] WEBBER, Vanessa, Sabrina Matos de CARVALHO, Paulo José OGLIARI, Leila HAYASHI a Pedro Luiz Manique BARRETO. 2012. Optimization of the extraction of carrageenan from *Kappaphycus alvarezii* using response surface methodology. *Food Science and Technology (Campinas)*. **32**(4): 812-818. DOI: 10.1590/s0101-20612012005000111.
- [15.] ALI, Majid Khan Majahar, Ahmad FUDHOLI, Jumat SULAIMAN, Mohd Hafidz RUSLAN a Suhaimi Md. YASIR. 2014. Sauna Technique, Drying Kinetic Modeling and Effectiveness on Solar Drying Compared with Direct Drying in Drying Process of *Kappaphycus striatum* in Selakan Island Malaysia. *Energy and Power Engineering*. **06**(09): 117-131. DOI: 10.1002/9781118105818.ch7.
- [16.] VELÍŠEK, Jan. 1999. *Chemie potravin I*. 1. vyd. Tábor: OSSIS, 328 s. ISBN 80-902-3912-9.
- [17.] DAVIDENKO, T I, G I BONDARENKO, Shirley Y. R. PUGH, Sascha CEYLAN a Andreas KIRSCHNING. 1990. The use of microorganism cells immobilised in carrageenan for the synthesis of organic substances. *Russian Chemical Reviews*. **59**(3): 379-410. DOI: 10.1002/9780470682005.ch13.
- [18.] THOMSON, A. W. THOMSON, E. F FOWLER. *Carrageenan: a review of its effects on the immune system*. bern: Birkhäuser-Verlag, 1981, s. 265-266. ISBN 1023-3830.
- [19.] Byla revidována bezpečnost karagenanu. 2003. *Informační centrum bezpečnosti potravin* [online]. [cit. 2015-03-13]. Dostupné z: <http://www.bezpecnostpotravin.cz/byla-revidovana-bezpecnost-karagenanu.aspx>
- [20.] Přídavné látky povolené při výrobě potravin. *Státní zemědělská a potravinářská inspekce* [online]. 2015 [cit. 2014-12-30]. Dostupné z: <http://www.szpi.gov.cz/docDetail.aspx?docid=1000105&docType=ART&nid=11324>

- [21.] NECAS, BARTOSIKOVÁ, BRAUNER a KOLAR. Hyaluronic acid (hyaluronan): A review [online]. *Veterinarni Medicina*. 2008. 53. 397-411. [cit. 2017-04-15]. Dostupné z: <http://www.agriculturejournals.cz/publicFiles/02029.pdf>
- [22.] Hyaluronan: Structure and Physical Properties. *GlycoForum: Science of Hyaluronan* [online]. 1997 [cit. 2017-04-26]. Dostupné z: <http://www.glycoforum.gr.jp/science/hyaluronan/HA01/HA01E.html>
- [23.] BOERIU, Carmen G., Jan SPRINGER, Floor K. KOOY, Lambertus A. M. VAN DEN BROEK a Gerrit EGGINK. *Production Methods for Hyaluronan* [online]. [cit. 2017-04-15]. DOI: 10.1155/2013/624967. ISBN 10.1155/2013/624967. Dostupné z: <http://www.hindawi.com/journals/ijcc/2013/624967/>
- [24.] GIRISH, K.S. a K. KEMPARAJU. The magic glue hyaluronan and its eraser hyaluronidase: A biological overview. *Life Sciences*. 2007, **80**(21), 1921-1943. DOI: 10.1016/j.lfs.2007.02.037. ISSN 00243205. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S002432050700210X>
- [25.] WEIN, O. Úvod do reologie. Brno: Malé centrum, Vyd. 1, 1996. 84 s.
- [26.] *The Rheology Handbook: For users of rotational and oscillatory rheometers* [online]. Hanover, Německo: Vincentz Network, 2011 [cit. 2017-05-15]. ISBN 978-3-86630-890-9. Dostupné z: <http://download.e-bookshelf.de/download/0000/8392/19/L-G-0000839219-0002900288.pdf>
- [27.] HOLUBOVÁ, Renata. *Základy reologie a reometrie kapalin* [online]. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci, 2014 [cit. 2017-04-11]. ISBN 978-80-244-4178-8.
- [28.] Viskoelastická materiálu. In: *Ústav fyziky a materiálového inženýrství: Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně* [online]. 2005 [cit. 2017-05-15]. Dostupné z: http://ufmi.ft.utb.cz/texty/env_fyzika/EF_06.pdf
- [29.] ARES-G2 RHEOMETER. In: *TA Instruments* [online]. TA Instruments, 2017 [cit. 2017-05-10]. Dostupné z: <http://www.tainstruments.com/wp-content/uploads/BROCH-ARES-G2-2017-EN.pdf>
- [30.] Rotational Methods: Rotational Rheometer. In: *National Institute of Standards and Technology* [online]. [cit. 2017-05-10]. Dostupné z: <https://ciks.cbt.nist.gov/~garbocz/SP946/node14.htm>
- [31.] CIBULKA, Ivan, Lubomír HNĚDKOVSKÝ a Vladimír HYNEK. Základní fyzikálně-chemické veličiny a jejich měření. Praha, 2006. Dostupné z: http://www.vscht.cz/fch/cz/pomucky/FCHV_all_7.pdf

- [32.] DAVIES, Adrian a Adrian DAVIES. *The Focal digital imaging A-Z* [online]. 2nd ed. Boston: Elsevier Focal Press, 2005 [cit. 2015-01-08]. ISBN 0240519809.
- [33.] Anton paar. *GE Healthcentre* [online]. 2014 [cit. 2015-01-04]. Dostupné z: <http://www.anton-paar.com/us-en/>
- [34.] KARGEROVÁ, A. a M. PEKAŘ. Densitometry and ultrasound velocimetry of hyaluronan solutions in water and in sodium chloride solution. *Carbohydrate Polymers*. 2014, vol. 106, s. 453-459.
- [35.] Lunar iDXA for Bone Health. *GE Healthcentre* [online]. 2014 [cit. 2015-01-04]. Dostupné z: http://www3.gehealthcare.com/en/products/categories/bone_health/dxa/lunar_idxa_for_bone_health
- [36.] The Ultrasonic wave: Direct probing of intermolecular forces. *Ultrasonic Scientific: The wave of the future* [online]. 2007 [cit. 2017-04-14]. Dostupné z: <http://www.ultrasonicscientific.com/Technology/Technology%20-%20US%20wave.htm>
- [37.] O'DRISCOLL, B., C. SMYTH, A.C. ALTING, R.W. VISSCHER a V. BUCKIN. Recent applications for high – resolution ultrasonic spectroscopy. *American Laboratory*. 2003, s. 54-57.
- [38.] High-Resolution Ultrasonic Spectroscopy: Analysis of Microemulsions. *Spektroskopy*. 2007, **20**(2). Dostupné také z: http://images.alfresco.advanstar.com/alfresco_images/pharma/2014/08/22/532810dc-bafc-4111-919b-7d9594c62ae6/article-146490.pdf
- [39.] *Ultrasonic scientific* [online]. 2007. [cit. 2015-01-02]. Dostupné z: <http://www.ultrasonic-scientific.com/index.htm>
- [40.] Ultrasonic Testing (UT). 2012. *Advanced technologic testing* [online]. [cit. 2015-04-11]. Dostupné z: <http://www.atg.cz/ndt-121&display=UT>
- [41.] PEKAŘ, Miloslav, Jiří KUČERÍK a Daniela ŠMEJKALOVÁ. Nové možnosti ultrazvukové spektroskopie v koloidní chemii. *CHEMagazin*. 2005. **15**(1). 12-14. [cit. 2017-05-04].
- [42.] APARICIO, C., L. ELVIRA, C. DURÁN, F. MONTERO a P. RESA. *Low volume ultrasonic resonator for liquid characterization under continuous flow conditions* [online]. 2014. **25**(11) [cit. 2017-05-04]. DOI: <https://doi.org/10.1088/0957-0233/25/11/115302>. **32**(4): 812-818.

- [43.] KIM, Hyeongmin, Jaehwi LEE, P. A. NETTI a L. NICOLAIS. Strategies to Maximize the Potential of Marine Biomaterials as a Platform for Cell Therapy. *Marine Drugs* [online]. 2016, **14**(2), 29- [cit. 2017-05-14]. DOI: 10.3390/md14020029. ISSN 1660-3397. Dostupné z: <http://www.mdpi.com/1660-3397/14/2/29>
- [44.] ROCHAS, Cyrille, Marguerite RINAUDO a Marc VINCENDON. Structural and conformational investigation of carrageenans. *Biopolymers* [online]. 1980, **19**(12), 2165-2175 [cit. 2017-05-04]. DOI: 10.1002/bip.1980.360191203. ISSN 0006-3525. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/bip.1980.360191203>
- [45.] WINTER, H. Henning a Francois CHAMBON. Analysis of Linear Viscoelasticity of a Crosslinking Polymer at the Gel Point. *Journal Of Rheology*. 1986, **30**(2), 267-382. DOI: <http://dx.doi.org/10.1122/1.549853>.
- [46.] NICKERSON, M.T., A.T. PAULSON a F.R. HALLET. Dilute solution properties of kappa-carrageenan polysaccharides: effect of potassium and calcium ions on chain conformation. *Carbohydrate polymers*. 2004, **58**(1), 25-33. [cit. 2017-05-03]. ISSN 0144-8617.
- [47.] THÁNH, T. T. T., YUGUCHI, Y., MIMURA, M., YASUNAGA, H., TAKANO, R., URAKAWA, H. and KAJIWARA, K. (2002), Molecular Characteristics and Gelling Properties of the Carrageenan Family, 1. Preparation of Novel Carrageenans and their Dilute Solution Properties [online]. *Macromolecular Chemistry and Physics*. 2002, **203**(1),15–23 [cit. 2017-05-03]. DOI:10.1002/1521-3935(20020101)203:1<15::AID-MACP15>3.0.CO;2-1. Dostupné z: [http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/1521-3935\(20020101\)203:1%3C15::AID-MACP15%3E3.0.CO;2-1/abstract](http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/1521-3935(20020101)203:1%3C15::AID-MACP15%3E3.0.CO;2-1/abstract)
- [48.] NÚÑEZ-SANTIAGO, María del Carmen a Alberto TECANTE. Rheological and calorimetric study of the sol–gel transition of κ -carrageenan. *Carbohydrate Polymers* [online]. 2007, **69**(4), 763-773 [cit. 2017-05-04]. DOI: 10.1016/j.carbpol.2007.02.017. ISSN 01448617. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0144861707001257>
- [49.] NÚÑEZ-SANTIAGO, M.C., Alberto TECANTE, Catherine GARNIER a Jean Louis DOUBLIER. Rheology and microstructure of κ -carrageenan under different conformations induced by several concentrations of potassium ion. *Food Hydrocolloids* [online]. 2011, **25**(1), 32-41 [cit. 2017-05-04]. DOI: 10.1016/j.foodhyd.2010.05.003. ISSN 0268005x. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0268005X10000949>
- [50.] UEDA, Kazuyoshi, Miyuki ITOH, Yuka MATSUZAKI, Hiroshi OCHIAI a Akira IMAMURA. Observation of the Molecular Weight Change during the Helix–Coil Transition of κ -Carrageenan Measured by the SEC–LALLS

- Method. *Macromolecules* [online]. 1998, **31**(3), 675-680 [cit. 2017-05-03]. DOI: 10.1021/ma970846w. ISSN 0024-9297. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ma970846w>
- [51.] DANIEL-DA-SILVA, A.L., F. PINTO, J.A. LOPES-DA-SILVA, T. TRINDADE, B.J. GOODFELLOW a A.M. GIL. Rheological behavior of thermoreversible κ -carrageenan/nanosilica gels. *Journal of Colloid and Interface Science* [online]. 2008, **320**(2), 575-581 [cit. 2017-05-03]. DOI: 10.1016/j.jcis.2008.01.035. ISSN 00219797. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021979708000763>
- [52.] TANAKA, Fumihiko. Thermoreversible Gelation Driven by Coil-to-Helix Transition of Polymers. *Macromolecules* [online]. 2003, **36**(14), 5392-5405 [cit. 2017-05-03]. DOI: 10.1021/ma021688y. ISSN 0024-9297. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ma021688y>
- [53.] Mechanical Properties of Thermo-Reversible Gels in Relation to their Structure and the Conformations of their Macromolecules. *Food macromolecules and colloids*. Cambridge, Velká Británie: Royal Society of Chemistry, 1995, s. 28. ISBN 9780854047000.
- [54.] MORRIS, Edwin R., David A. REES, Ian T. NORTON a David M. GOODALL. Calorimetric and chiroptical evidence of aggregate-driven helix formation in carrageenan systems [online]. 1980, **80**(2), 317-323 [cit. 2017-05-03]. DOI: 10.1016/S0008-6215(00)84870-3. ISSN 00086215. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0008621500848703>
- [55.] KARA, Selim, Candan TAMERLER a Onder PEKCAN. Cation effects on swelling of κ -carrageenan: A photon transmission study. *Biopolymers*. 2003, **70**(2), 240-251. DOI: 10.1002/bip.10467. ISSN 0006-3525. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/bip.10467>
- [56.] CHEN, Yu, Ming-Long LIAO a Dave E DUNSTAN. The rheology of κ -carrageenan as a weak gel. *Carbohydrate Polymers* [online]. 2002, **50**(2), 109-116 [cit. 2017-05-03]. DOI: 10.1016/S0144-8617(02)00009-7. ISSN 01448617. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0144861702000097>
- [57.] CARDOSO, Marcus Vinícius Cangussu a Edvaldo SABADINI. The gelling of κ -carrageenan in light and heavy water: the origin, evolution, and impact of *doi moi*. *Carbohydrate Research* [online]. 2010, **345**(16), 2368-2373 [cit. 2017-05-14]. DOI: 10.1016/j.carres.2010.08.015. ISSN 00086215. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0008621510003654>
- [58.] IJIMA, Mika, Tatsuko HATAKEYAMA, Masato TAKAHASHI a Hyoe HATAKEYAMA. Effect of thermal history on kappa-carrageenan hydrogelation by differential scanning calorimetry: the origin, evolution, and impact of *doi moi*. *Thermochimica Acta* [online]. 2007, **452**(1), 53-58 [cit. 2017-05-14]. DOI:

10.1016/j.tca.2006.10.019. ISSN 00406031. Dostupné z:
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0040603106005326>

- [59.] *Innovators in Ultrasonic Analytical Technology: High-resolution Ultrasonic Spectroscopy as a powerful tool for analysis of pre-gelation, gelation and post-gelation processes*. Dublin, Irsko. Dostupné také z: http://www.ultrasonic-scientific.com/Applications/pdf/gelation_poster.pdf
- [60.] ULTRASONIC MONITORING OF GELATION PROCESSES. In: *Ultrasonic Scientific: the wave of the future* [online]. Dublin, Irsko [cit. 2017-05-14]. Dostupné z: http://www.ultrasonic-scientific.com/Applications/html/gelation_flyer.htm
- [61.] YANG, Ya-li a Laura J. KAUFMAN. *Rheology and Confocal Reflectance Microscopy as Probes of Mechanical Properties and Structure during Collagen and Collagen/Hyaluronan Self-Assembly* [online]. [cit. 2017-05-14]. DOI: 10.1016/j.bpj.2008.10.063. ISBN 10.1016/j.bpj.2008.10.063. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006349508032244>
- [62.] AMBROSIO, L., A. BORZACCHIELLO, P. A. NETTI a L. Synthesis and characterization of a novel hyaluronic acid hydrogel. *Journal of Macromolecular Science, Part A* [online]. 1999, **36**(7-8), 419-433 [cit. 2017-05-14]. DOI: 10.1080/10601329908951195. ISSN 1060-1325. Dostupné z: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1163/156856206776374115>
- [63.] ZHAO, X. Synthesis and characterization of a novel hyaluronic acid hydrogel. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition* [online]. 2006, **17**(4), 419-433 [cit. 2017-05-14]. DOI: 10.1163/156856206776374115. ISSN 0920-5063. Dostupné z: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1163/156856206776374115>
- [64.] KAUFMAN, Laura J., Marguerite MILAS a další. Comparative rheological behavior of hyaluronan from bacterial and animal sources with cross-linked hyaluronan (hylan) in aqueous solution. *Biopolymers* [online]. 2001, **59**(4), 192-204 [cit. 2017-05-14]. DOI: 10.1002/1097-0282(20011005)59:4<191::AID-BIP1018>3.0.CO;2-M. ISBN 10.1016/j.bpj.2008.10.063. ISSN 1097-0282. Dostupné z: [http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/1097-0282\(20011005\)59:4%3C191::AID-BIP1018%3E3.0.CO;2-M/full](http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/1097-0282(20011005)59:4%3C191::AID-BIP1018%3E3.0.CO;2-M/full)
- [65.] ROBAL, Marju, Tom BRENNER, Shingo MATSUKAWA, Hiroo OGAWA, Kalle TRUUS, Brian RUDOLPH a Rando TUVIKENE. Monocationic salts of carrageenans: Preparation and physico-chemical properties. *Food Hydrocolloids* [online]. 2017, **63**, 656-667 [cit. 2017-05-03]. DOI: 10.1016/j.foodhyd.2016.09.032. ISSN 0268005x. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0268005X1630460X>

- [66.] *TA INSTRUMENTS: AR Rheometer Temperature Systems and Accessories* [online]. 2009. New Castle, USA: Ta Instruments, 2009 [cit. 2017-05-03]. Dostupné z: <http://web.engr.oregonstate.edu/~rochefow/MSI%202016%20Polymer%20Course%20Web/Polymer%20Labs%202016%20web/Rheology%202016/TA%20Instruments%20Information/AR%20Accessory%20brochure%202009.pdf>
- [67.] VANANROYE, Anja. SMART – AR-G2 (TA Instruments). In: *KU LEUVEN: SMART* [online]. 2016 [cit. 2017-05-03]. Dostupné z: <http://cit.kuleuven.be/smart/infrastructure/documents/AR-G2.pdf>
- [68.] Controlled-Stress Rheometry. *AOCS Lipid Library* [online]. Ontario, Canada: Department of Food Science, 2017 [cit. 2017-05-03]. Dostupné z: <http://lipidlibrary.aocs.org/Biochemistry/content.cfm?ItemNumber=40883>
- [69.] *AR 500/1000 Rheometers: Hardware Manual* [online]. January 2000. New Castle, USA: TA Instruments, 2000 [cit. 2017-05-03]. Dostupné z: <http://regmed.musc.edu/atbc/files/TAManual/TA%20AR%201000%20Manual.pdf>
- [70.] High-Resolution Ultrasonic Spectrometer HR-US 102: Technical parameters of the model. *Ultrasonic Scientific: the wave of the future* [online]. Dublin, Irsko: Sonas Technologies [cit. 2017-05-03]. Dostupné z: http://www.ultrasonic-scientific.com/Products/hrus_102.htm
- [71.] Thermo / HAAKE C25P Refrigerated Bath With Phoenix II Controller. In: *Artisan: Technology Group* [online]. Champaign, USA: Artisan Technology Group [cit. 2017-05-03]. Dostupné z: https://www.artisan-g.com/Scientific/60953-15/Thermo_HAAKE_C25P_Refrigerated_Bath_With_Phoenix_II_Controller
- [72.] TOBACMAN, Joanne. *Toxic considerations related to ingestion of carrageenan* [online]., 204 [cit. 2017-05-03]. DOI: 10.1201/9780203634523.ch10. Dostupné z: <http://www.crcnetbase.com/doi/abs/10.1201/9780203634523.ch10>
- [73.] Bandelin: Sonorex Digitec DT510 F. *Maneko: Laboratorní přístroje a technika* [online]. Praha, 2005 [cit. 2017-05-03]. Dostupné z: <http://www.maneko.cz/data/Bandelin/dt510f.pdf>
- [74.] SIMULESCU, Vasile, Michal KALINA, Jakub MONDEK a Miloslav PEKAŘ. Long-term degradation study of hyaluronic acid in aqueous solutions without protection against microorganisms. *Carbohydrate Polymers*. 2016, **137**, 664-668. DOI: 10.1016/j.carbpol.2015.10.101. ISSN 01448617. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0144861715010814>

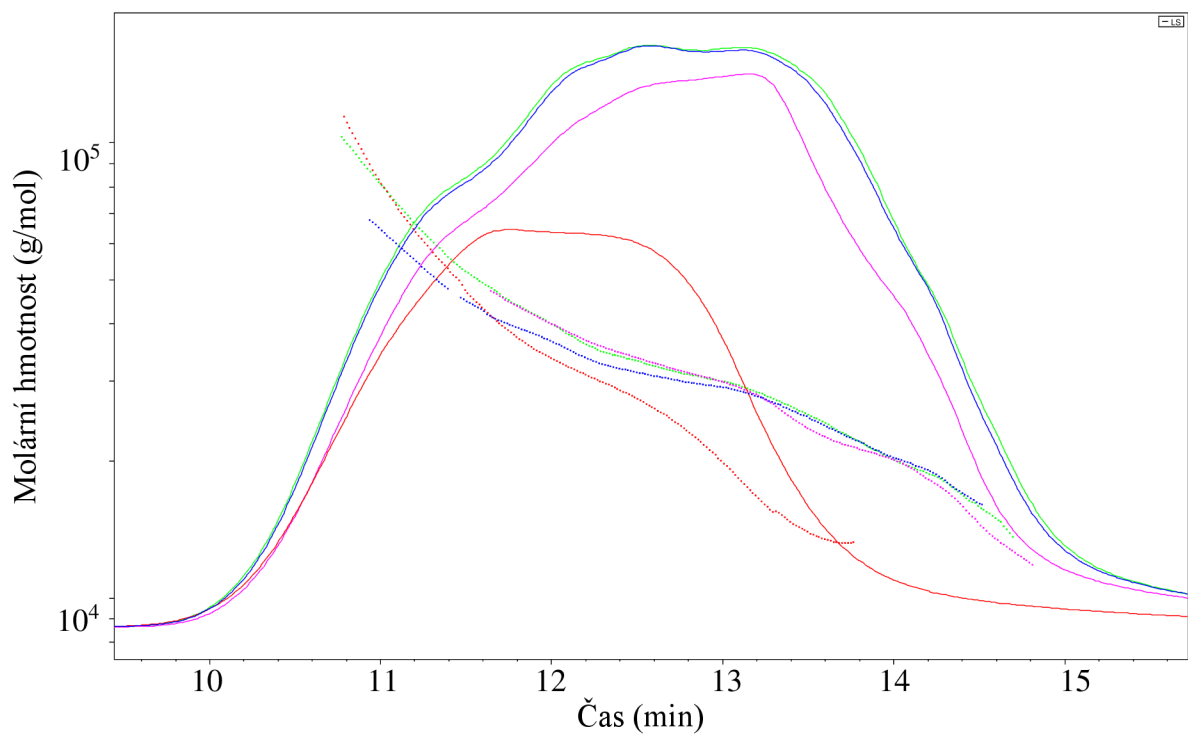
- [75.] POLEDŇÁKOVÁ, H. *Charakterizace karagenanu densitometrií*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2015. 51 s. Vedoucí bakalářské práce Ing. Andrea Kargerová, Ph.D.
- [76.] KARGEROVÁ, A. *Charakterizace hyaluronanu a jeho interakcí s tenzidy ultrazvukovou spektroskopií a densitometrií*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2014. 213 s. Vedoucí dizertační práce prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
- [77.] JUGL A. *Charakterizace medicínských biopolymerů ultrazvukovou spektroskopií*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2014. 41 s. Vedoucí bakalářské práce Ing. Andrea Kargerová

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

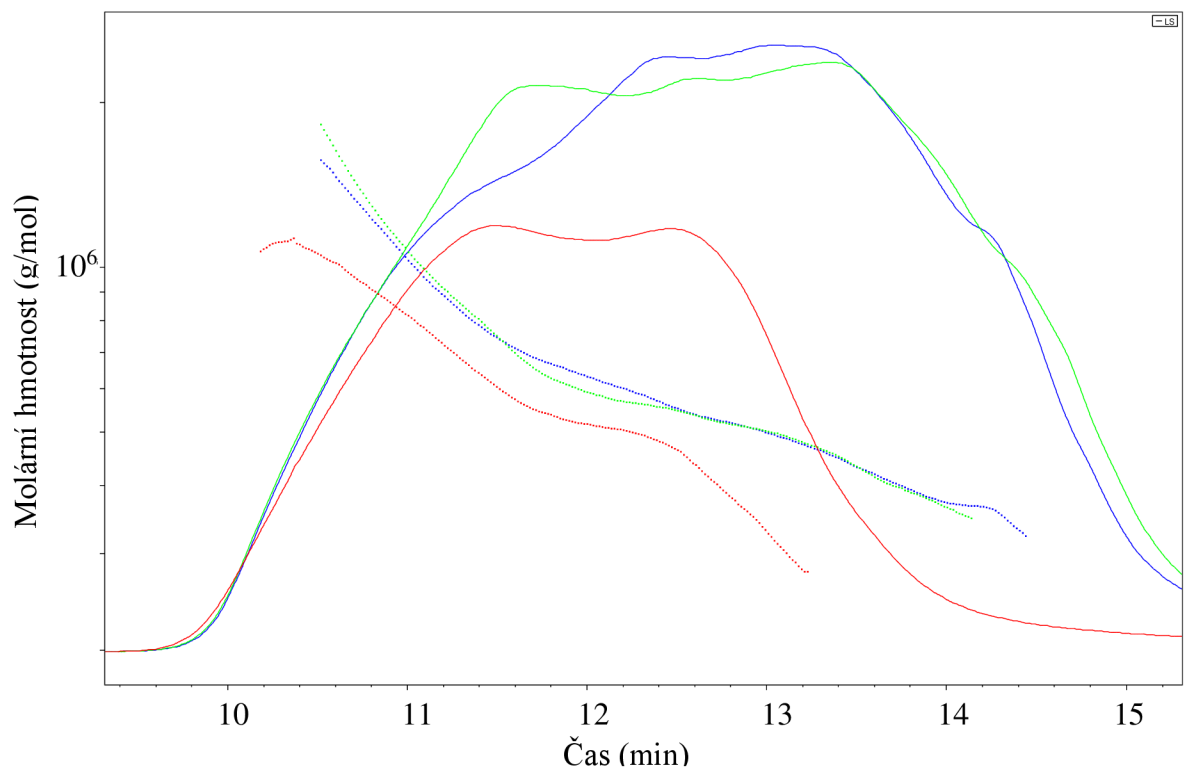
λ -karagenan	lambda-karagenan
κ -karagenan	kappa-karagenan
ι -karagenan	jota-karagenan
μ -karagenan	mí-karagenan
Θ -karagenan	théta-karagenan
ξ -karagenan	ksí-karagenan
ν -karagenan	ný-karagenan
β -karagenan	beta-karagenan
Gal	galaktóza
GL	anhydridgalaktóza
α -helix	jiné označení pro konfiguraci dvoušroubovice
E 407	označení karagenanu jako stabilizátoru potravin
hm. %	hmotnostní procento, jednotka koncentrace
Da	dalton, jednotka molekulární hmotnosti (1 Da = 1 g/mol)
g/mol	gramy na mol, jednotka molární hmotnosti
g/l	garamz na litr, jednotka hmotnostní koncentrace
pH	záporný dekadický logaritmus aktivity oxoniových iontů
SRC	semi-rafinovaný karagenan (<i>semi-refined carrageenan</i>)
HIV	retrovirus (<i>human immunodeficiency virus</i>)
Hz	hertz, jednotka frekvence
3D	trojdimenzionální, trojrozměrný
HA	hyaluronan (<i>hyaluronic acid</i>)
HY	hylan
G'	paměťový (elastický) modul
G''	ztrátový (viskózní) modul
G^*	komplexní modul
δ	uhel fázového posunu neboli ztrátový uhel
λ	deformace
τ	smykové napětí
ω	oscilační frekvence, zde v hertzech
n (Pa·s)	index toku
°	stupeň, jednotka úhlu
Pa	pascal, jednotka tlaku (odpovídá N/m ²)
Pa·s	pascal za sekundu, jednotka indexu toku a viskozity (odpovídá N/m ² ·s)
C_{krit}	kritická koncentrace
Na ⁺	sodný kation
Li ⁺	lithný kation
Mg ²⁺	měďnatý kation
NH ⁴⁺	amonný kation
Ca ²⁺	vápenatý kation
K ⁺	draselný kation
D ₂ O	těžká voda

H ₂ O	lehká voda
KCl	chlorid draselný
HR-US	ultrazvuková spektroskopie s vysokým rozlišením (<i>high resolution ultrasonic spectroscopy</i>)
HPLC	vysokoučinná kapalinová chromatografie (<i>high performance liquid chromatography</i>)
SEC-MALS	gelová chromatografie kombinovaná s víceúhlovým rozptylem světla (<i>size-exclusion chromatography combined with multiangle light scattering</i>)
TGA	termogravimetrická analýza (<i>thermogravimetric analysis</i>)
DSC	diferenciální skenovací mikroskopie (<i>differential scanning calorimetry</i>)
ATM	mikroskopie atomárních sil (<i>atomic force microscopy</i>)
CRM	konfokální odrazová mikroskopie (<i>confocal reflection microscopy</i>)
S1	označení šarže 1 pro karagenan
S2	označení šarže 2 pro karagenan
LW	označení pro nízkomolekulární hyaluronan (250–450 kDa)
HW	označení pro vysokomolekulární hyaluronan (1 500–1 7500 kDa)
SEC-LALLS	gelová chromatografie kombinovaná s laserovým paprskem s malým úhlem rozptylu (<i>size-exclusion chromatography combined with multiangle laser light scattering</i>)
<i>c</i>	koncentrace
<i>m</i>	hmotnost
<i>V (l)</i>	objem
<i>n</i>	harmonické číslo píku
°C/min	stupeň celsia za minutu, jednotka rychlosti změny teploty
%	procento, zde také jednotka napětí
N	newton, jednotka síly (odpovídá kg·m·s ⁻²)
m/°C	metry za stupeň celsia, jednotka tepelné roztažnosti
LVO, LVR	lineární viskoelastická oblast (<i>linear viscoelastic region</i>)
<i>u</i>	ultrazvuková rychlost
Δu	relativní ultrazvuková rychlost
f_n	frekvence píku srovnávacího prostředí
f_{n+1}	frekvence píku vzorku sousedícího s píkem srovnávacího prostředí
m/s	metry za sekundu, jednotka rychlosti
ot/min	počet otáček za minutu, jednotka rychlosti oscilace
V	volt, jednotka napětí (amplitudy vstupního signálu)
$\overline{S_{G'G''}}$	průměrné hodnoty směrodatných odchylek reologického měření paměťového a ztrátového modulu

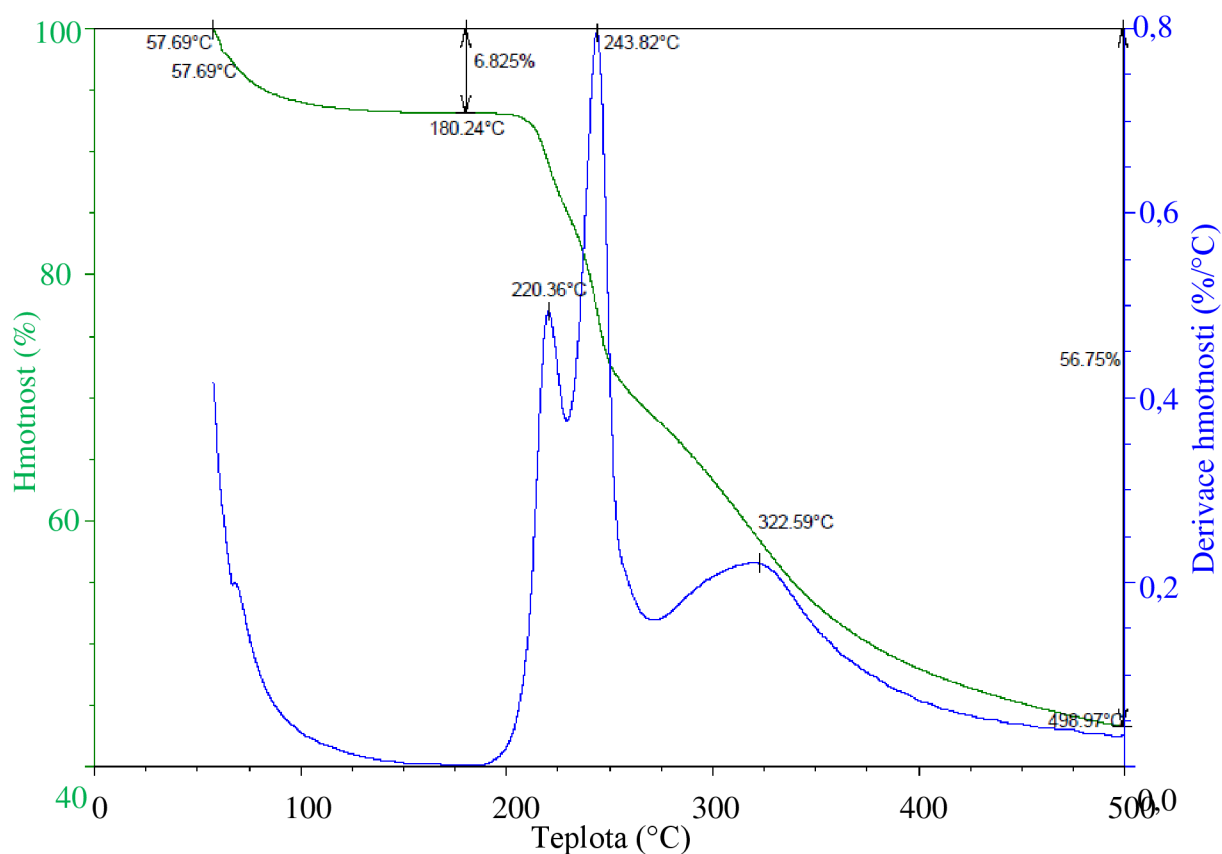
PŘÍLOHA



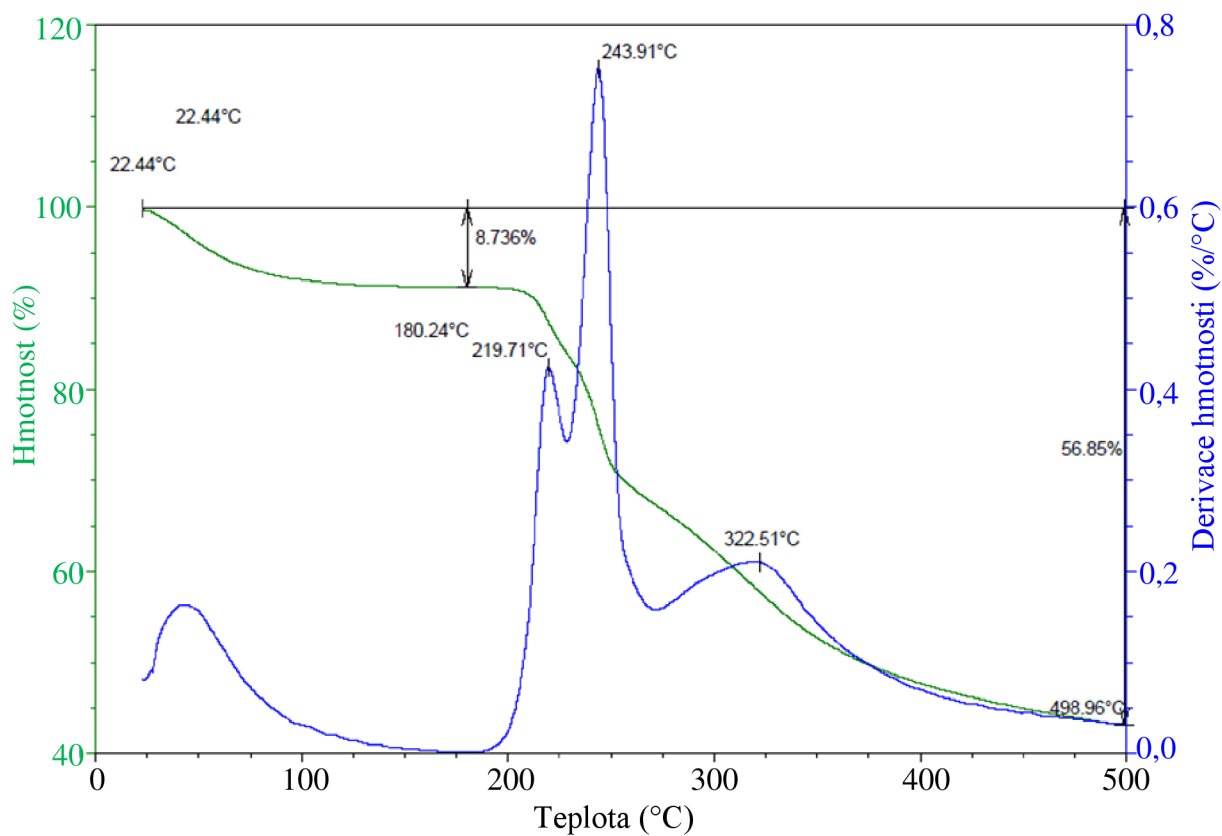
Obr. X1 Závislost molární hmotnosti karagenanu šarže 1 o koncentraci 2 g/l na čase. Růžová–1. nástřik 100 μ l, zelená–2. nástřik 100 μ l, modrá–3. nástřik 100 μ l, červená–4. nástřik 50 μ l.



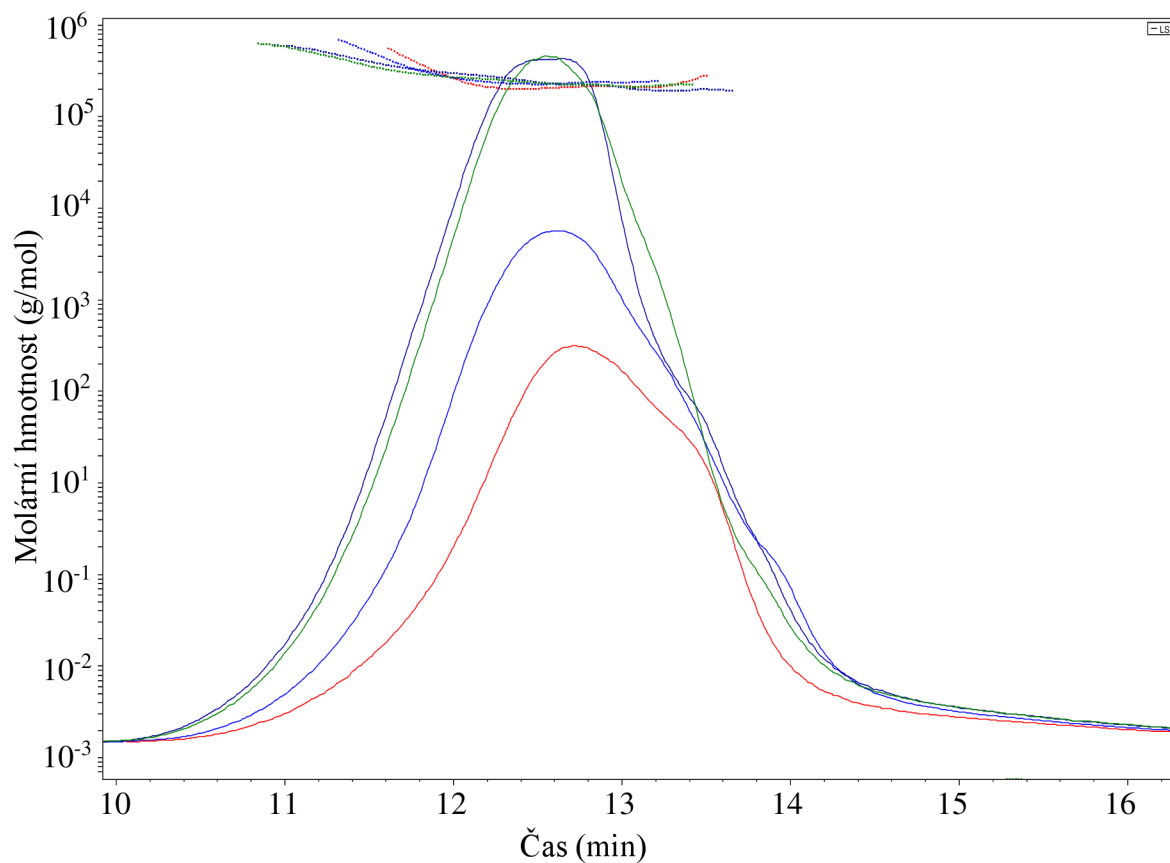
Obr. X2 Závislost molární hmotnosti karagenanu šarže 2 o koncentraci 2 g/l na čase. Zelená–1. nástřik 100 μ l, modrá–2. nástřik 100 μ l, červená–3. nástřik 50 μ l.



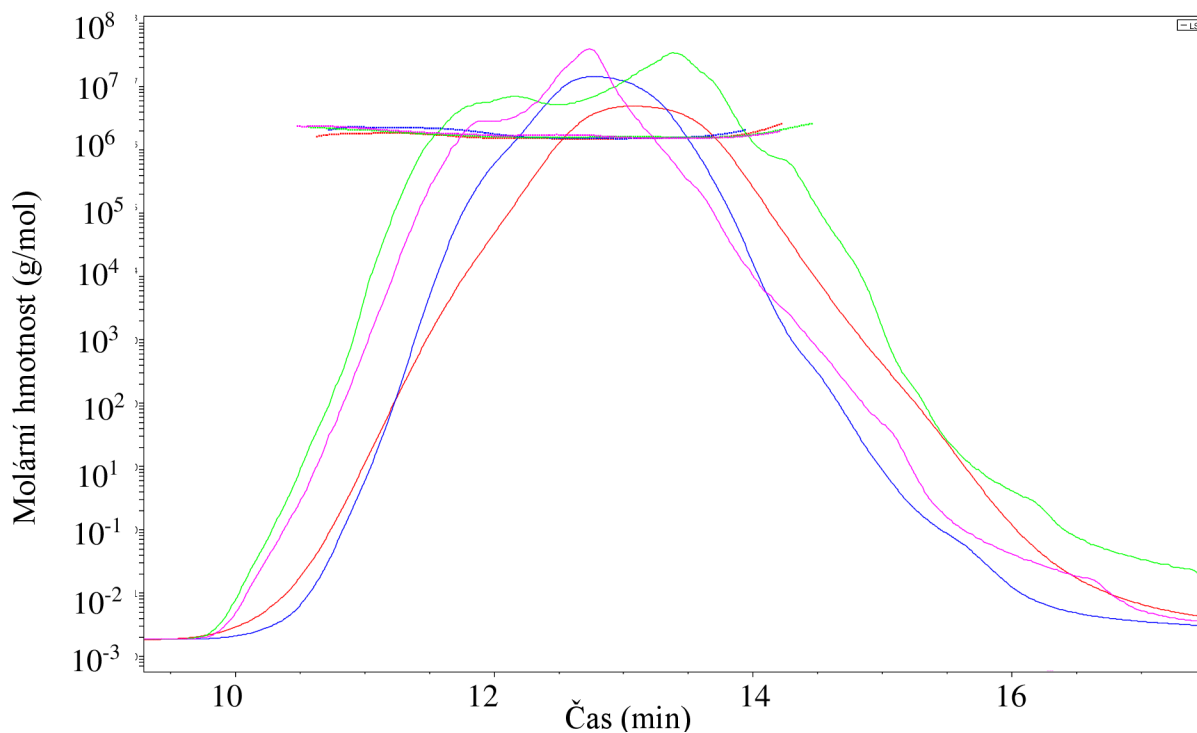
Obr. X3 Teromgravimetrická analýza pevného karagenanu šarže 1.



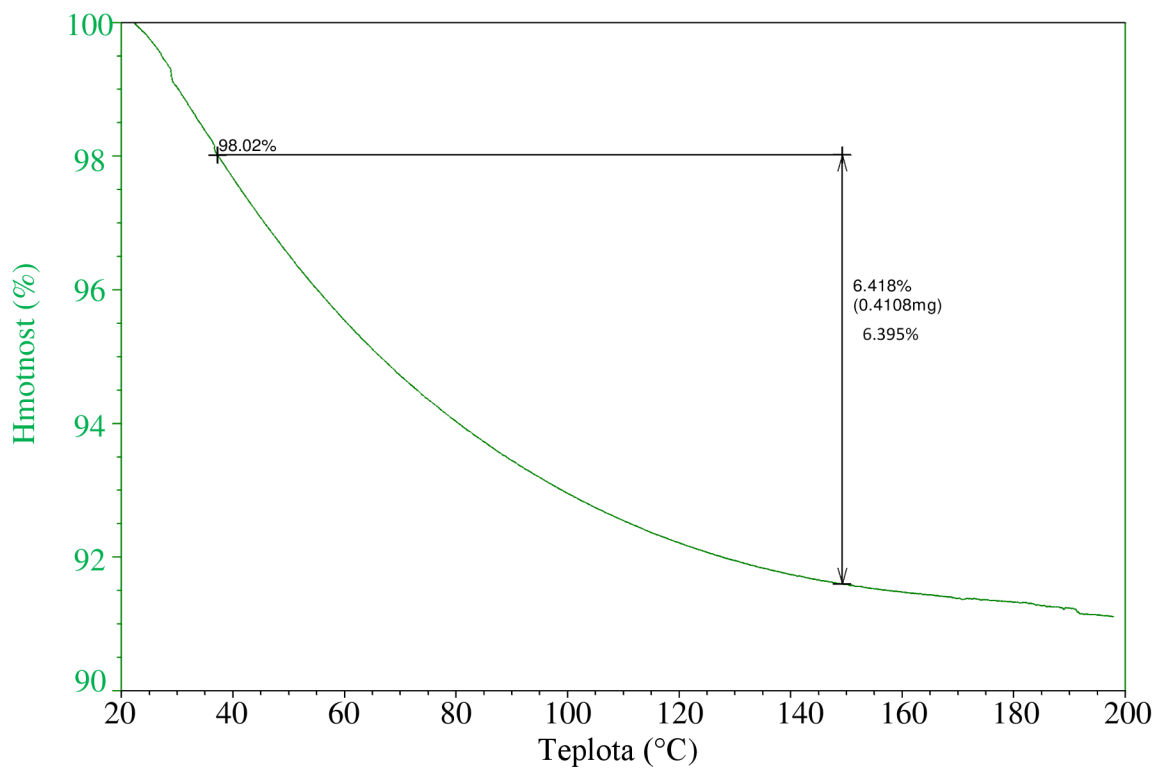
Obr. X4 Teromgravimetrická analýza pevného karagenanu šarže 2.



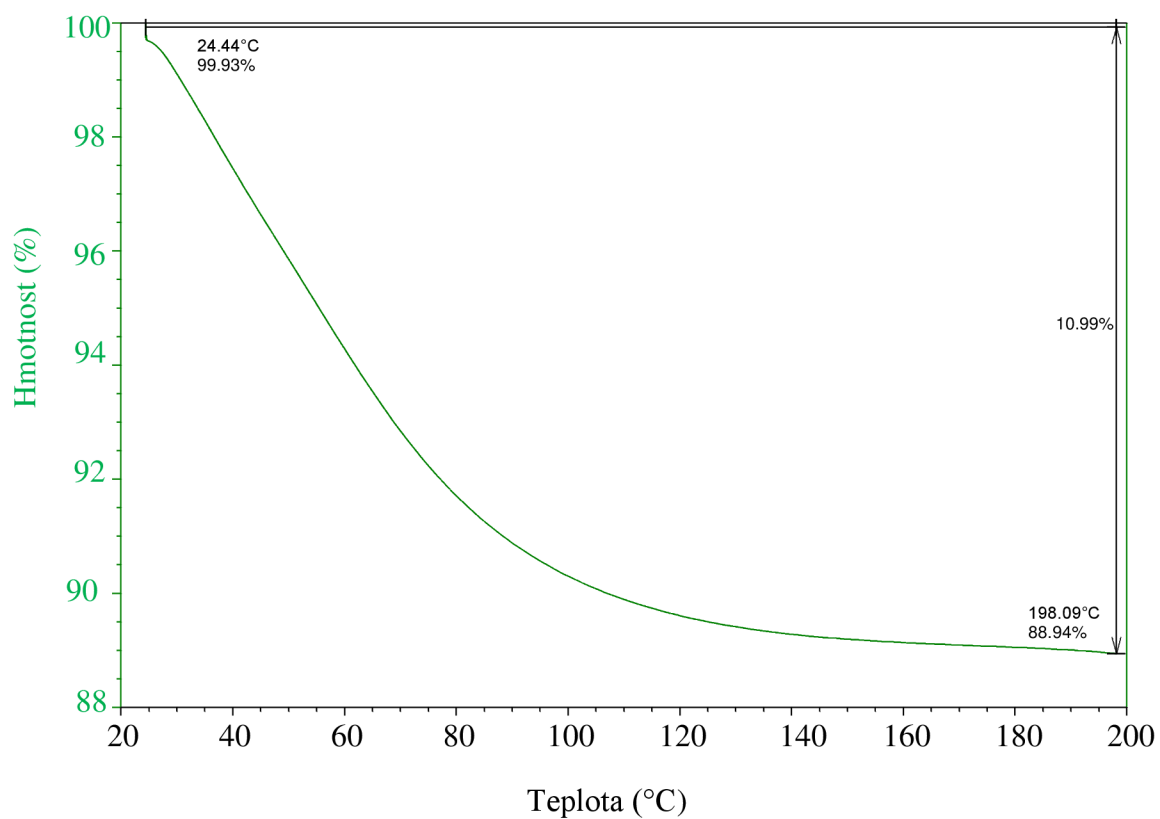
Obr. X5 Závislost molární hmotnosti nízkomolekulárního hyaluronanu o koncentraci 2 g/l na čase. Fialová–1. nástřik 100 μ l standardu, zelená–2. nástřik 100 μ l standardu, modrá–3. nástřik 100 μ l vzorku, červená–4. nástřik 100 μ l vzorku.



Obr. X6 Závislost molární hmotnosti vysokomolekulárního hyaluronanu koncentraci 2 g/l na čase. Růžová–1. nástřik 100 μ l standardu, zelená–2. nástřik 100 μ l standardu, modrá–3. nástřik 100 μ l vzorku, červená–4. nástřik 100 μ l vzorku.



Obr. X7 Termogravimetrická analýza nízkomolekulárneho hyaluronamu.



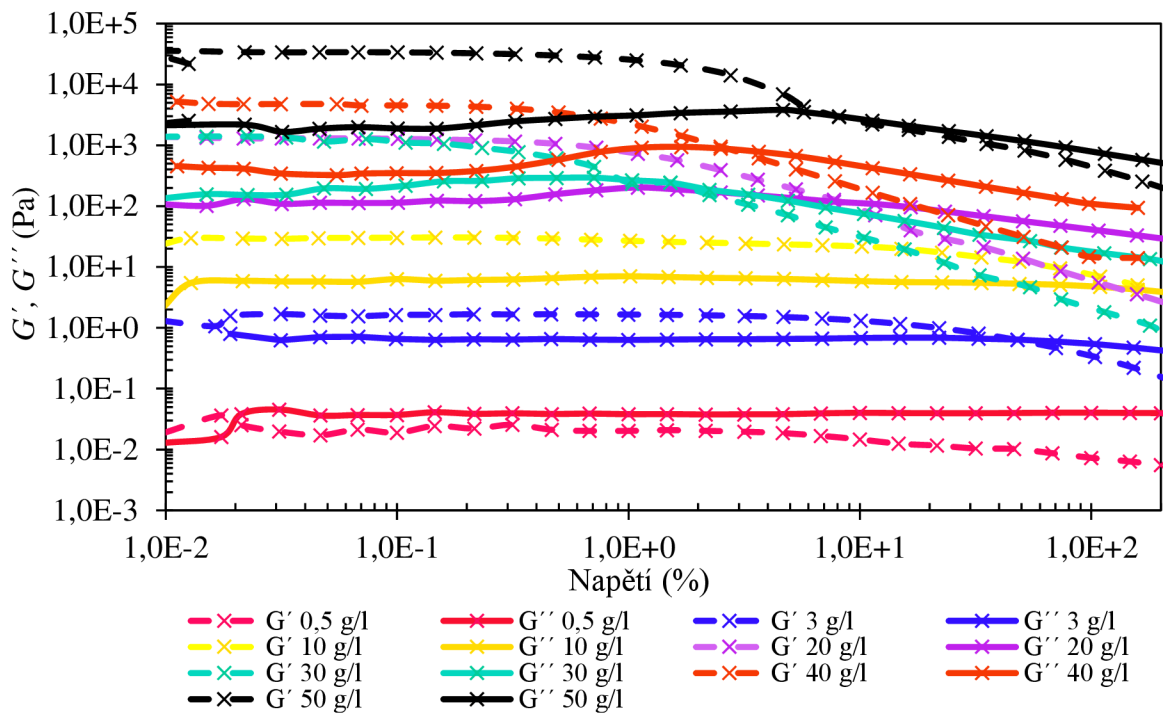
Obr. X8 Termogravimetrická analýza vysokomolekulárneho hyaluronamu.

Tab. X1 Přesná koncentrace připravovaných vzorků karagenanu šarže 1 a 2 ve vodě.

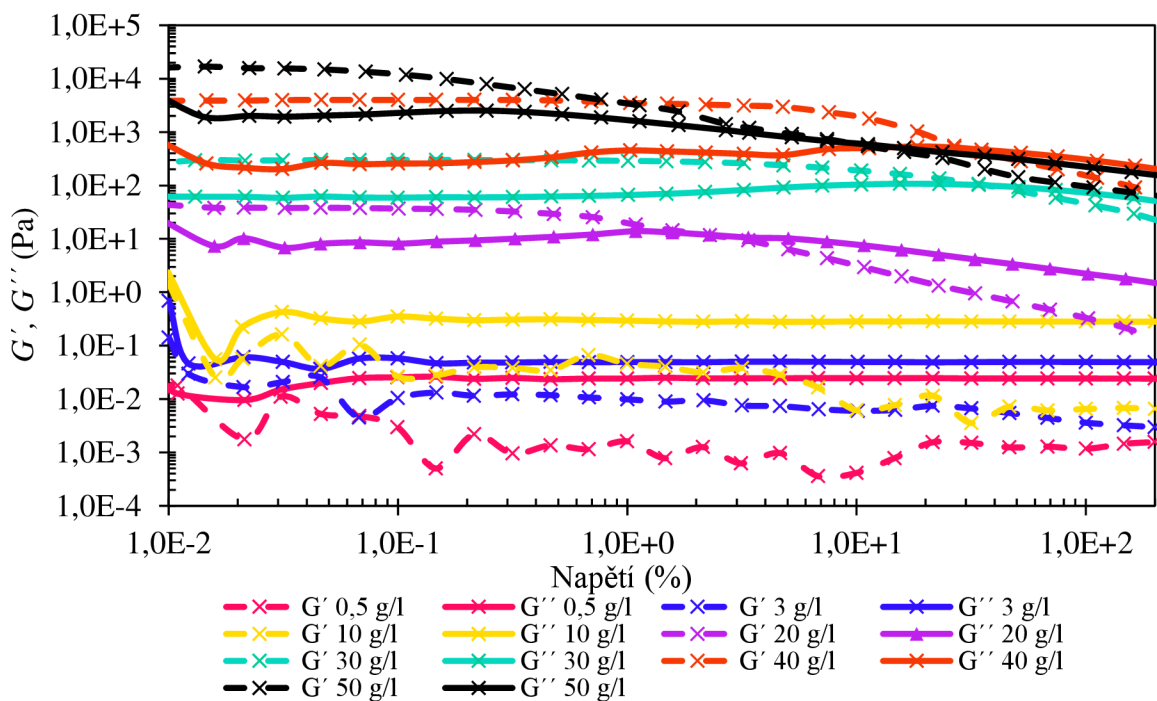
<i>šarže</i>	<i>m_{teor.}</i> (g)	<i>V_{teor.}</i> (ml)	<i>m_{skut.}</i> (g)	<i>V_{skut.}</i> (ml)	<i>c_{skut.}</i> (g/l)	<i>vlhkost</i> (%)	<i>C_{přesná}</i> (g/l)
S1	0,05	100	0,0502	100,4	0,5	6,825	0,4659
S1	0,03	100	0,0300	100,0	3,0	6,825	2,7953
S1	0,50	50	0,4994	49,94	10,0	6,825	9,3175
S1	0,50	50	0,5011	50,11	10,0	6,825	9,31750
S1	1,00	50	1,0023	50,12	20,0	6,825	18,6350
S2	1,00	50	0,9974	49,87	20,0	8,736	18,2528
S2	1,50	50	1,5039	50,13	30,0	8,736	27,3792
S2	2,00	50	1,9946	49,87	40,0	8,736	36,5056
S2	2,50	50	2,5024	50,24	50,0	8,736	45,6320

Tab. X2 Přesná koncentrace připravovaných vzorků nízkomolekulárního a vysokomolekulárního hyaluronanu ve vodě.

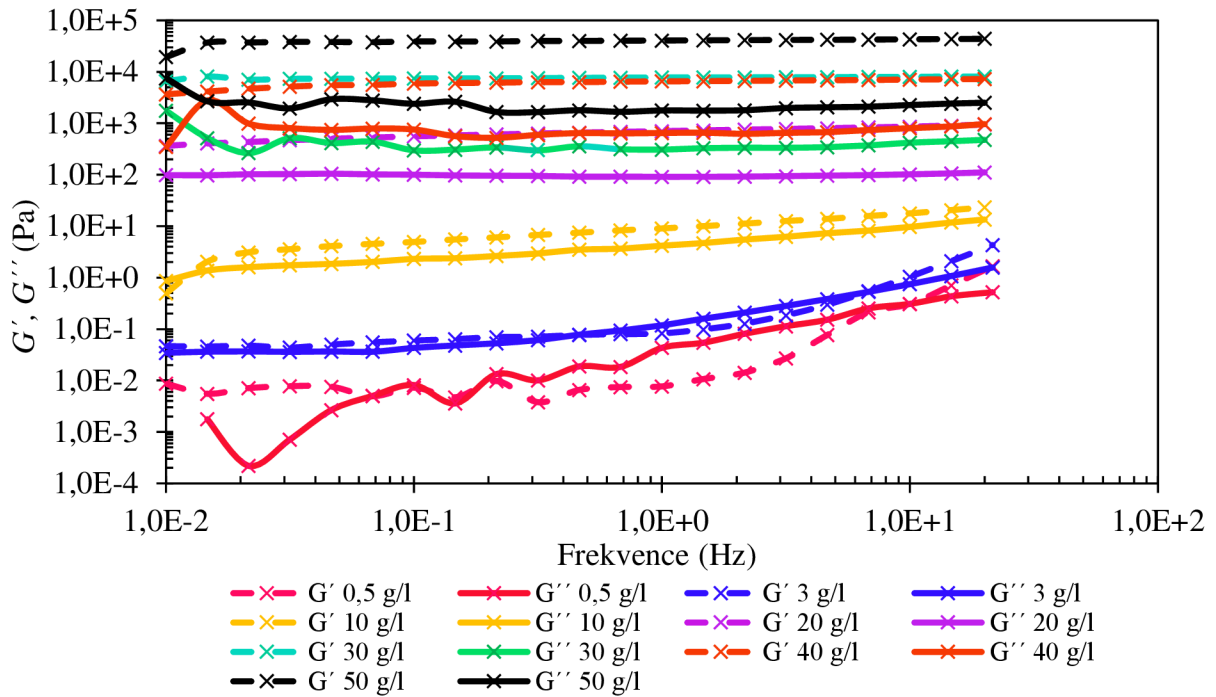
<i>M_w</i>	<i>m_{teor.}</i> (g)	<i>V_{teor.}</i> (ml)	<i>m_{skut.}</i> (g)	<i>V_{skut.}</i> (ml)	<i>c_{skut.}</i> (g/l)	<i>vlhkost</i> (%)	<i>C_{přesná}</i> (g/l)
LW	0,0250	50	0,0232	46,40	0,5	6,395	0,4680
LW	0,1250	50	0,1307	52,28	2,5	6,395	2,3401
LW	0,1500	30	0,1501	30,02	5,0	6,395	4,6803
LW	0,0800	8	0,0779	7,79	10	6,395	9,3605
HW	0,0500	50	0,0471	47,10	1,0	10,990	0,8901
HW	0,0375	8	0,0375	7,50	5,0	10,990	4,4505
HW	0,0800	8	0,0784	7,84	10	10,990	8,9010
HW	0,1500	10	0,1419	9,46	15	10,990	13,3515
HW	0,4000	20	0,4008	20,04	20	10,990	17,8020
HW	0,7500	25	0,7532	25,11	30	10,990	26,7030



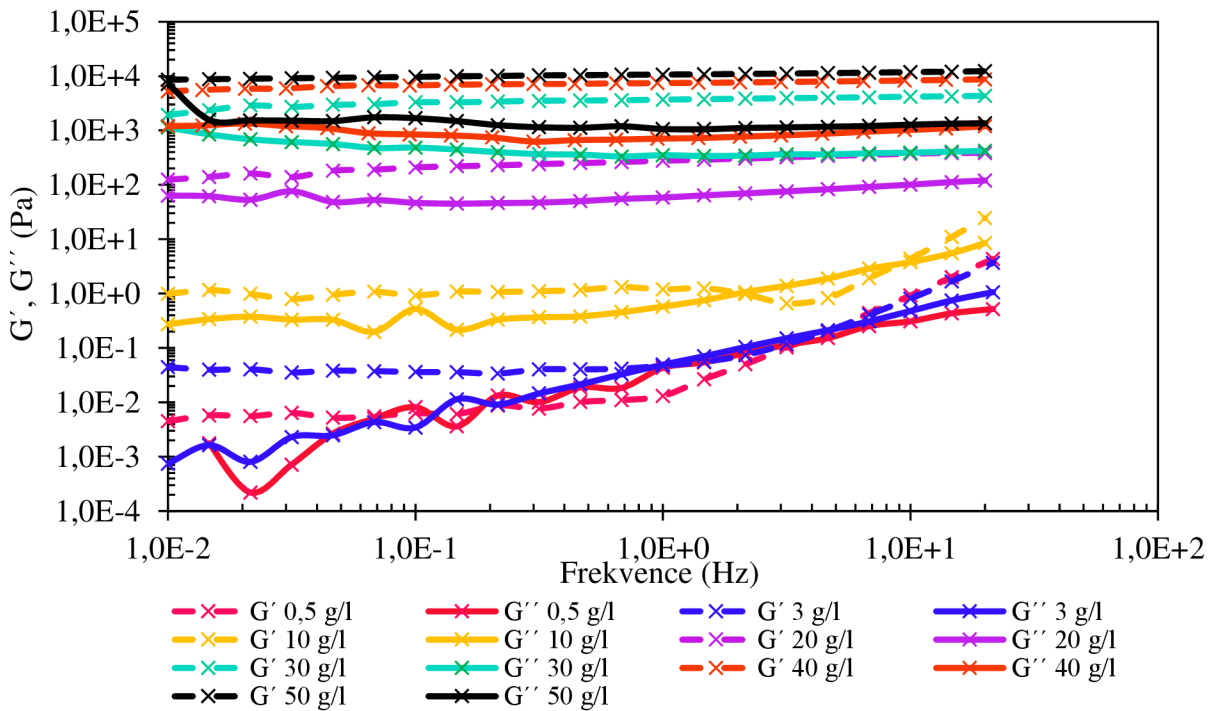
Obr. X9 Závislost pamětového G' (prázdné znaky) a ztrátového G'' (plné znaky) modulu na napětí pro vzorky karagenamu šarže 1 a 2 ve vodě o různé koncentraci (viz legenda). Měřeno při teplotě 25 °C s frekvencí 1 Hz.



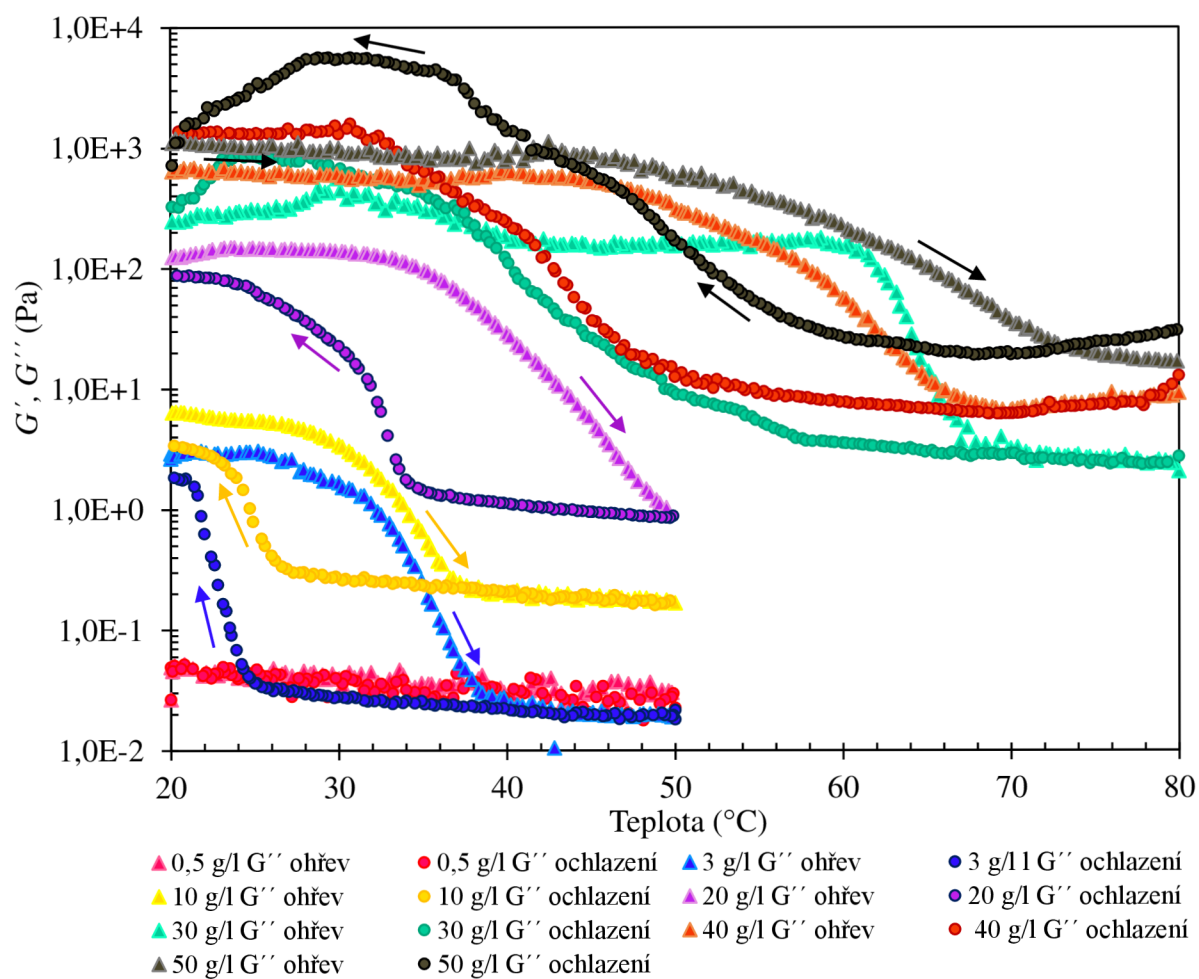
Obr. X10 Závislost pamětového G' (prázdné znaky) a ztrátového G'' (plné znaky) modulu na napětí pro vzorky karagenamu šarže 1 a 2 ve vodě o různé koncentraci (viz legenda). Měřeno při teplotě 50 °C s frekvencí 1 Hz.



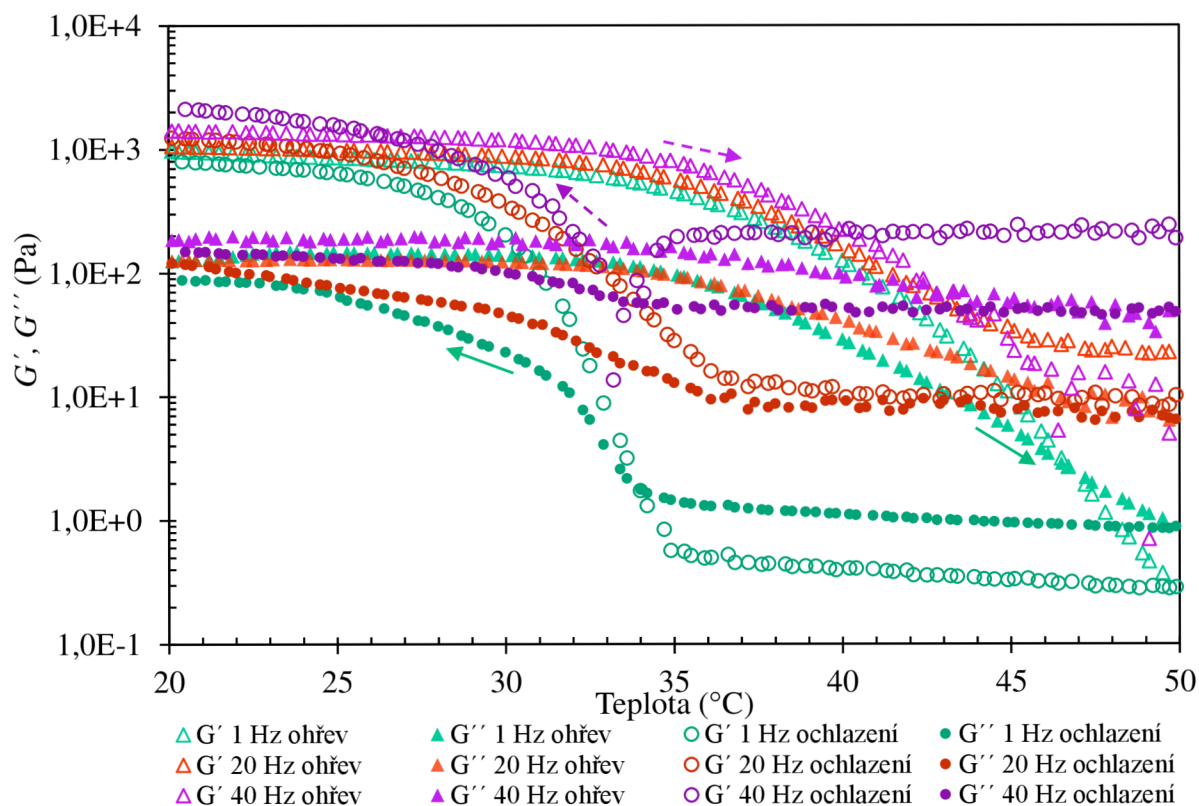
Obr. X11 Závislost pamětového G' (prázdné znaky) a ztrátového G'' (plné znaky) modulu na frekvenci pro vzorky karagenamu šarže 1 a 2 ve vodě o různé koncentraci (viz legenda). Měřeno při teplotě 25 °C s napětím 0,1 % (případně 0,3 %).



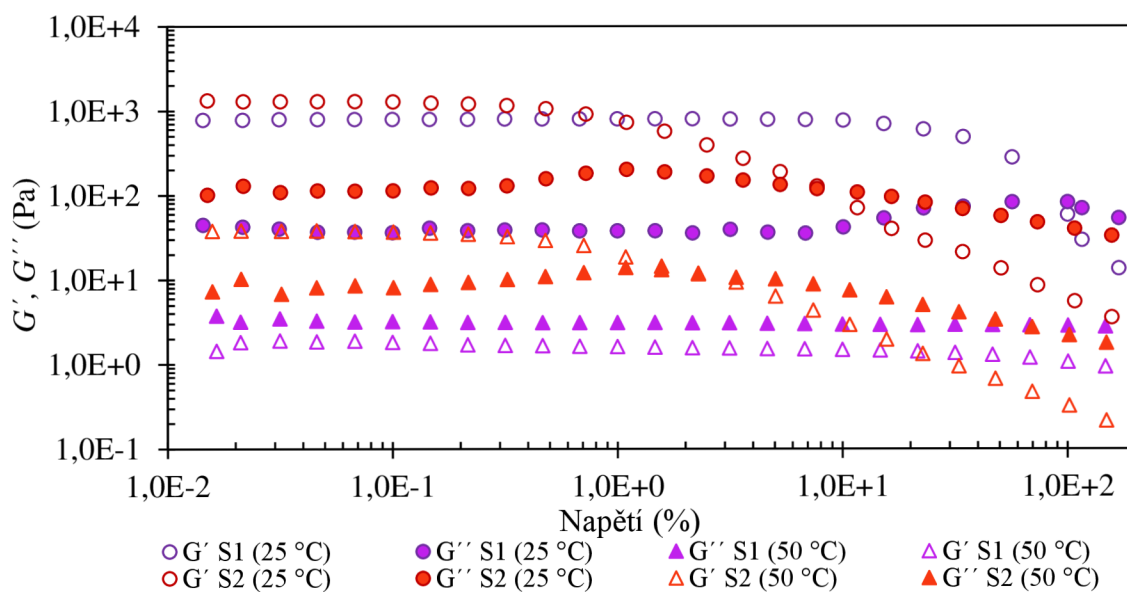
Obr. X12 Závislost pamětového G' (prázdné znaky) a ztrátového G'' (plné znaky) modulu na frekvenci pro vzorky karagenamu šarže 1 a 2 ve vodě o různé koncentraci (viz legenda). Měřeno při teplotě 50 °C s napětím 0,1 % (případně 0,3 %).



Obr. X13 Závislost ztrátového modulu G'' na teplotě pro vzorky karagenami šarže 1 a 2 ve vodě o různé koncentraci (viz legenda). Měřeno prostřednictvím dvou teplotních ramp při frekvenci 1 Hz.



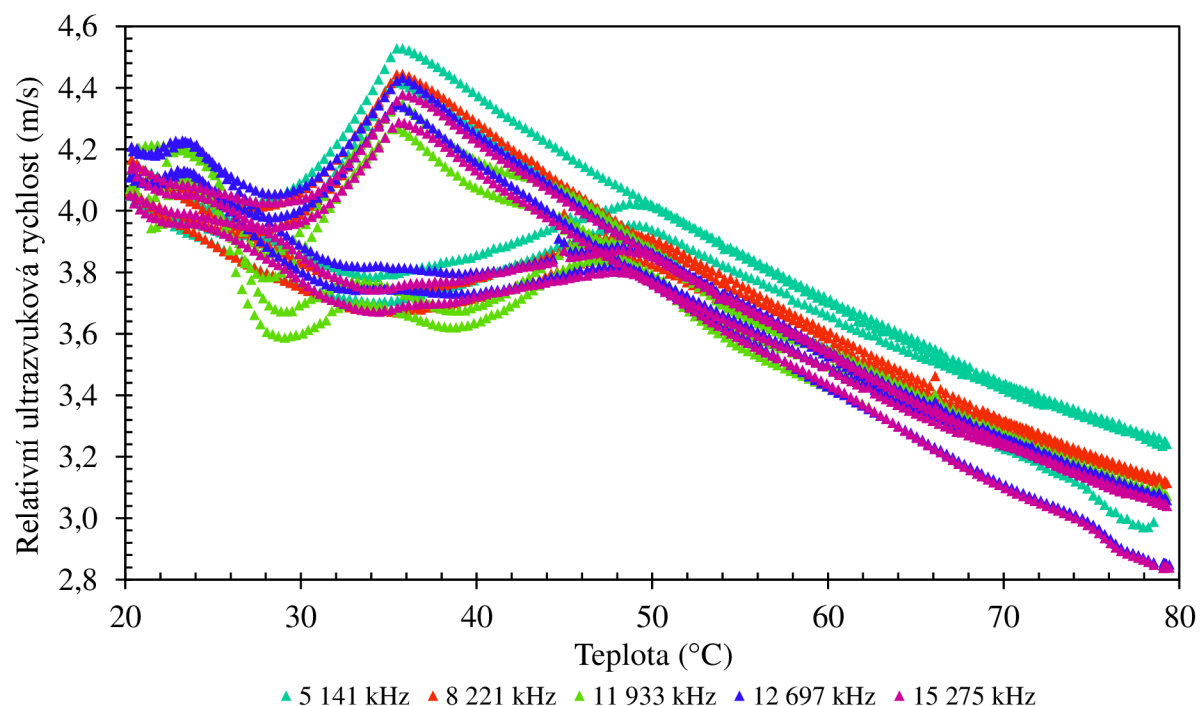
Obr. X14 Příklad závislosti pamětového G' (prázdné znaky) a ztrátového G'' (plné znaky) modulu na teplotě pro karagenan ve vodě o koncentraci 20 g/l (šarže 1). Měřeno prostřednictvím dvou teplotních ramp při frekvenci 1, 20 a 40 Hz.



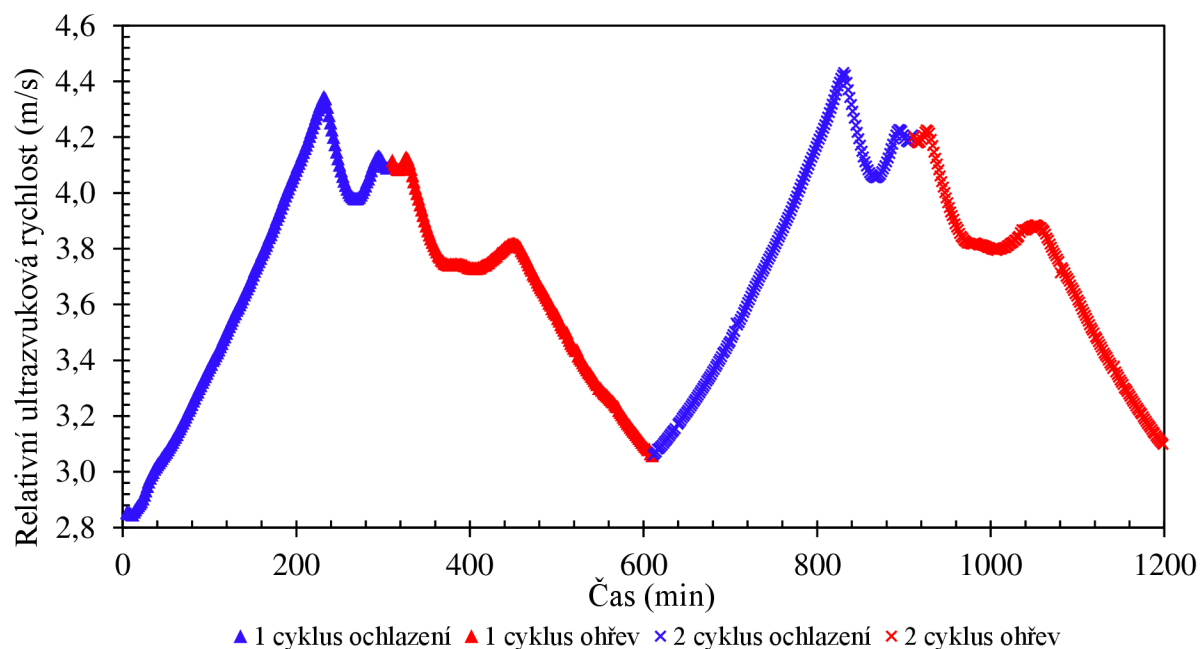
Obr. X15 Graf znázorňující rozdíly mezi první (S1) a druhou (S2) šarží karagenanu ve vodě o koncentraci 20 g/l prostřednictvím závislosti pamětového G' (prázdné znaky) a ztrátového G'' (plné znaky) modulu na napětí. Měřeno při teplotě 25 a 50 °C s frekvencí 1 Hz.

Tab. X3 Průměrné hodnoty směrodatných odchylek reologického měření paměťového a ztrátového modulu $\bar{S}_{G'G''}$ pro vzorky karagenanu šarže 1 a 2. Rozdělení dle použitého testu a teploty.

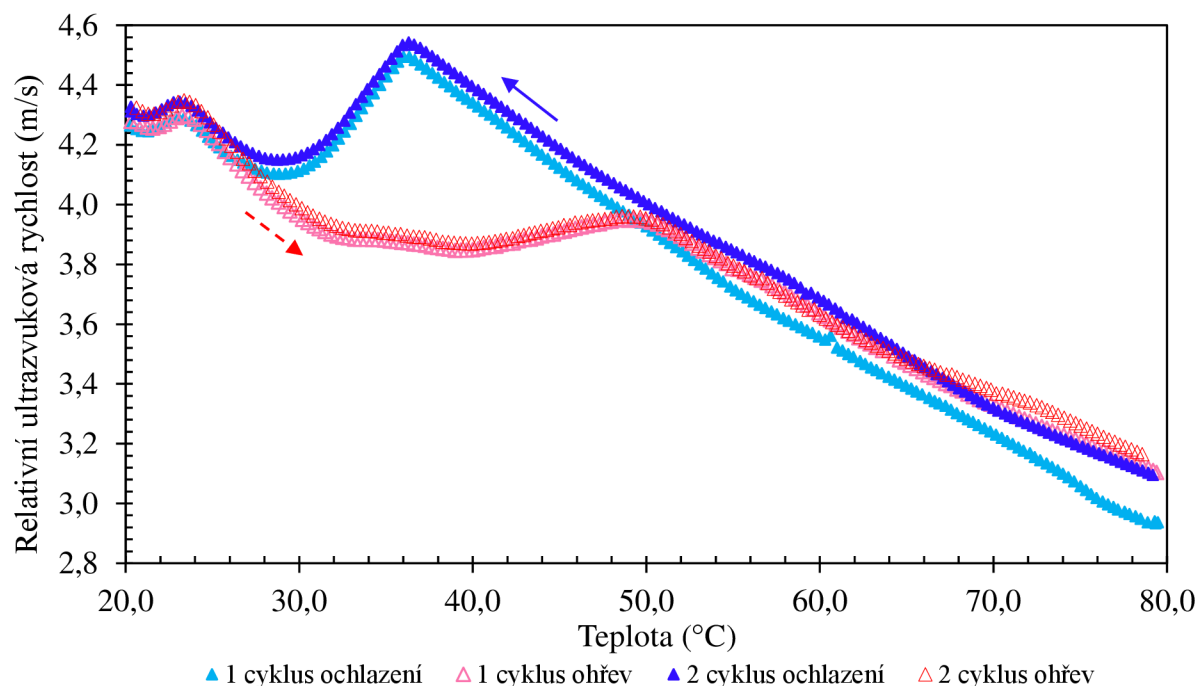
		25 °C		50 °C		ohřev	ochlazení
<i>S1/</i>	<i>C_{přesná}</i>	<i>strain</i>	<i>frequency</i>	<i>strain</i>	<i>frequency</i>	<i>temp.</i>	<i>temp.</i>
<i>S2</i>	(g/l)	<i>sweep</i>	<i>sweep</i>	<i>sweep</i>	<i>sweep</i>	<i>ramp</i>	<i>ramp</i>
		$\bar{S}_{G'G''}$	$\bar{S}_{G'G''}$	$\bar{S}_{G'G''}$	$\bar{S}_{G'G''}$	$\bar{S}_{G'G''}$	$\bar{S}_{G'G''}$
		(Pa)	(Pa)	(Pa)	(Pa)	(Pa)	(Pa)
S1	0,4659	0,0135	0,0386	0,0069	0,0633	0,0050	0,0074
S1	2,7953	0,5165	0,0329	0,0141	0,0364	0,0485	0,0855
S1	9,3175	1,6277	2,2117	0,0567	0,3555	0,2681	0,1254
S1	18,6350	92,3602	15,3891	13,5449	13,6521	19,7028	6,4888
S2	27,3792	118,1943	320,7727	17,5425	278,7981	228,6305	542,7450
S2	36,5056	424,9406	560,0182	475,7299	753,5603	912,1740	1558,0108
S2	45,6320	2253,2531	4884,4957	2481,5723	5098,7449	651,6227	2238,4225



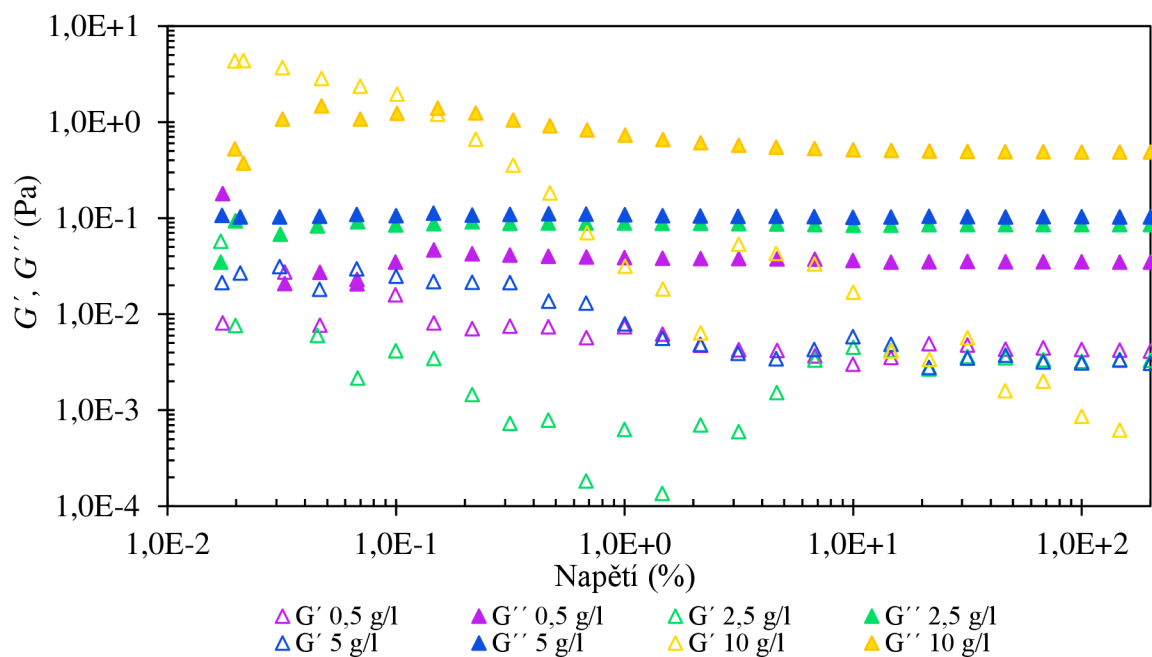
Obr. X16 Příklad závislosti relativní ultrazvukové rychlosti na teplotě pro karagenan ve vodě o koncentraci 20 g/l (šarže 2). Měřeno současně při frekvenci 5 141 kHz, 8 221 kHz, 11 933 kHz, 12 697 kHz a 15 275 kHz.



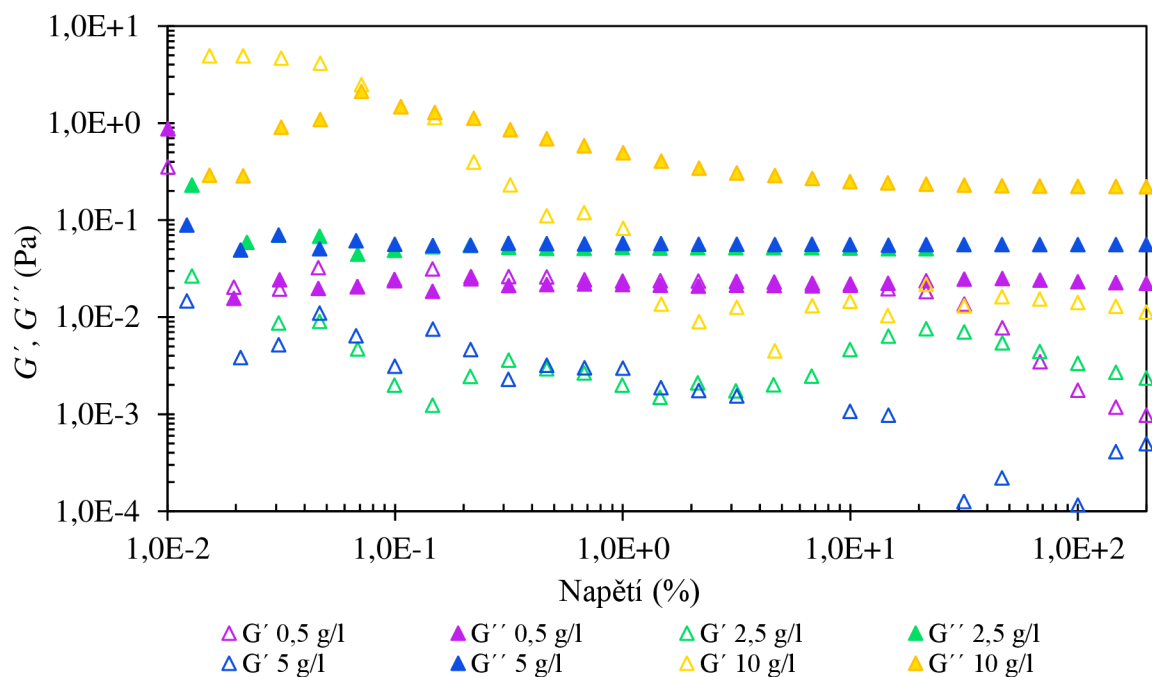
Obr. X17 Příklad závislosti relativní ultrazvukové rychlosti na čase pro karagenan šarže 2 ve vodě o koncentraci 20 g/l znázorňující dva po sobě jdoucí cykly teplotního skenu v intervalu teplot 20–80 °C. Měřeno při frekvenci 12 697 kHz. Ohřev je označen červeně, ochlazení modře.



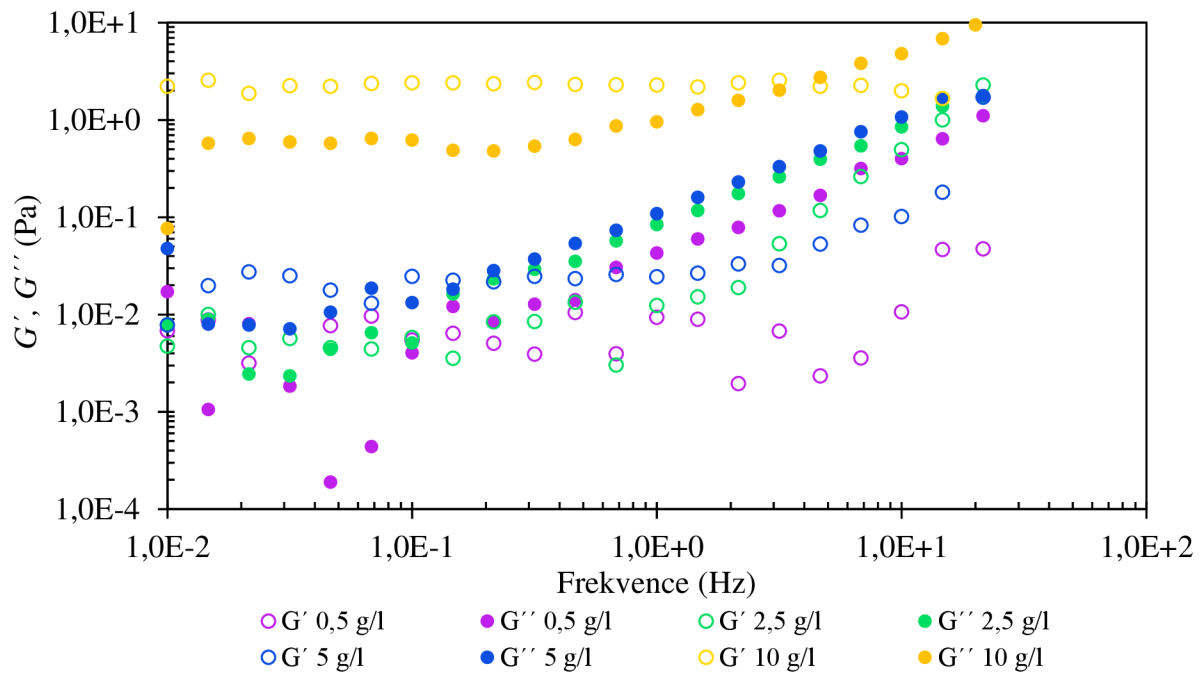
Obr. X18 Příklad závislosti relativní ultrazvukové rychlosti na teplotě pro karagenan šarže 2 ve vodě o koncentraci 20 g/l znázorňující dva po sobě jdoucí cykly teplotního skenu. Měřeno při frekvenci 12 697 kHz. Ohřev je označen červeně, ochlazení modře.



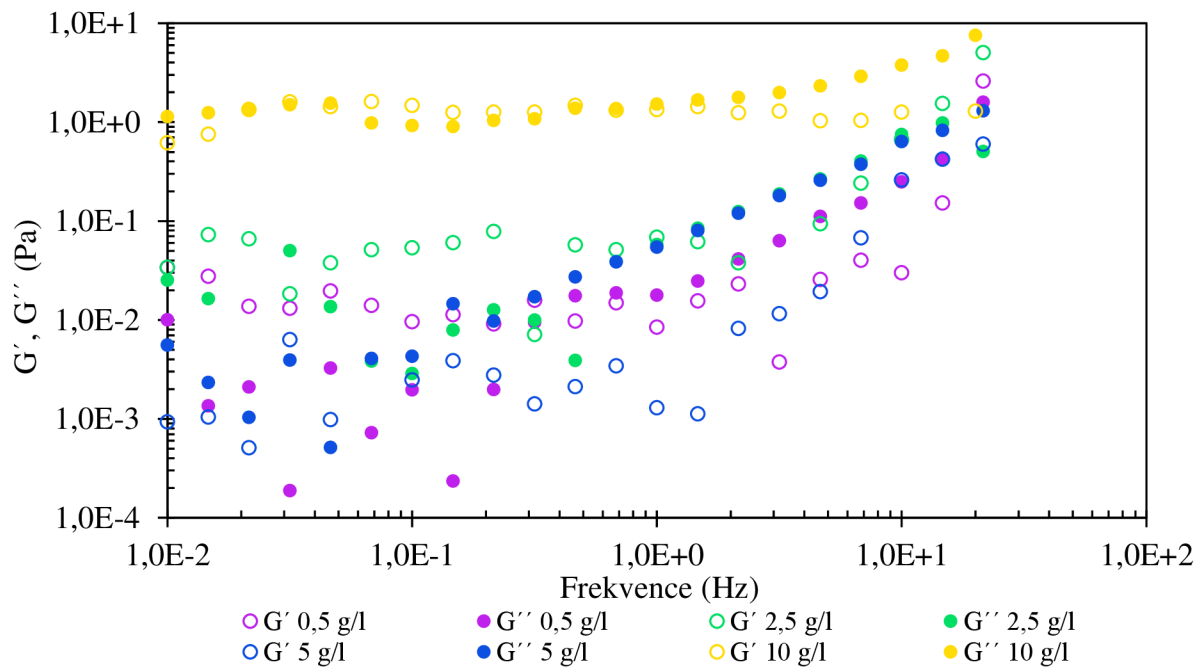
Obr. X19 Závislost pamětového G' (prázdné znaky) a ztrátového G'' (plné znaky) modulu na napětí pro vzorky nízkomolekulárního hyaluronanu ve vodě o různé koncentraci (viz legenda). Měřeno při teplotě 25 °C s frekvencí 1 Hz.



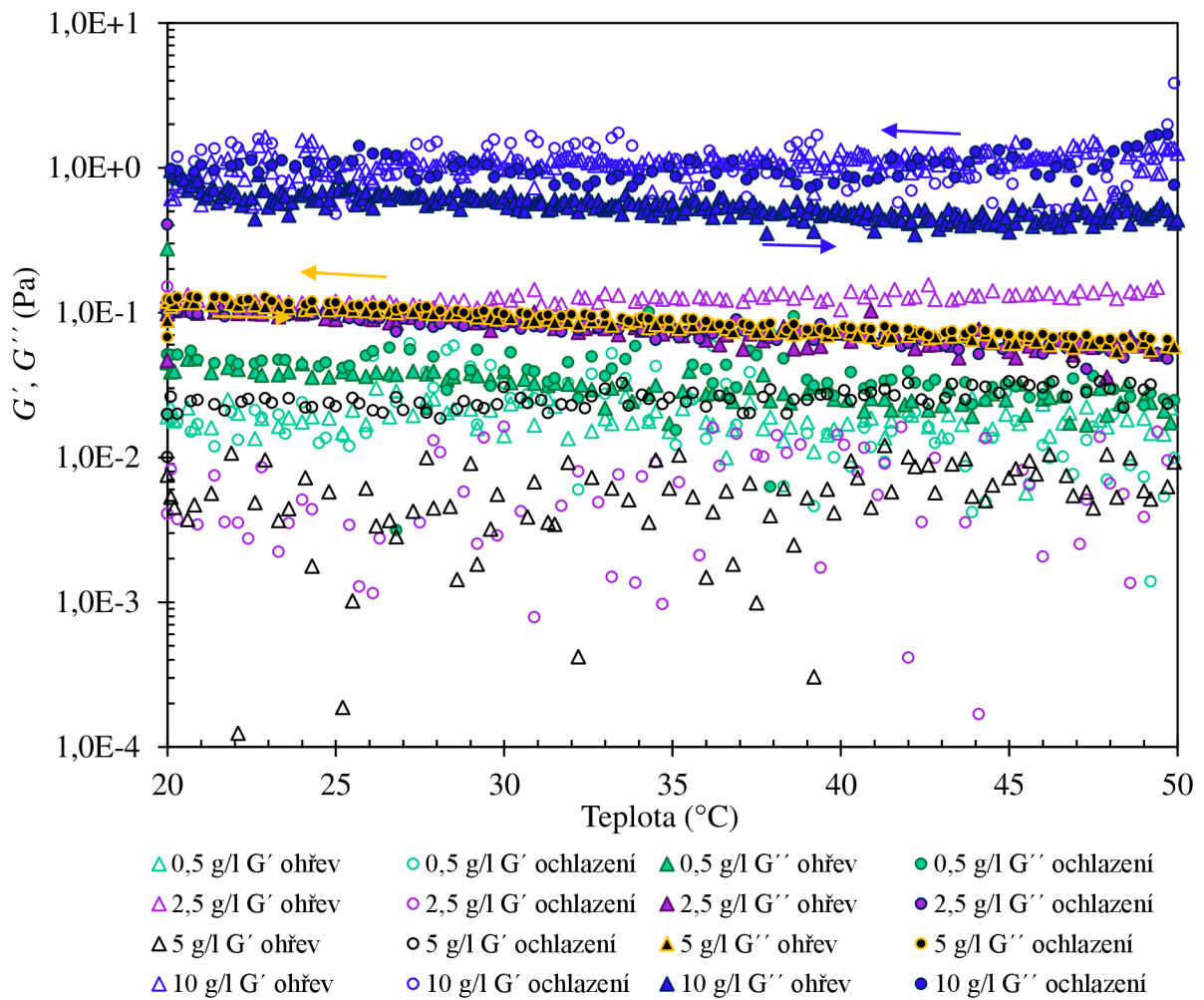
Obr. X20 Závislost pamětového G' (prázdné znaky) a ztrátového G'' (plné znaky) modulu na napětí pro vzorky nízkomolekulárního hyaluronanu ve vodě o různé koncentraci (viz legenda). Měřeno při teplotě 50 °C s frekvencí 1 Hz.



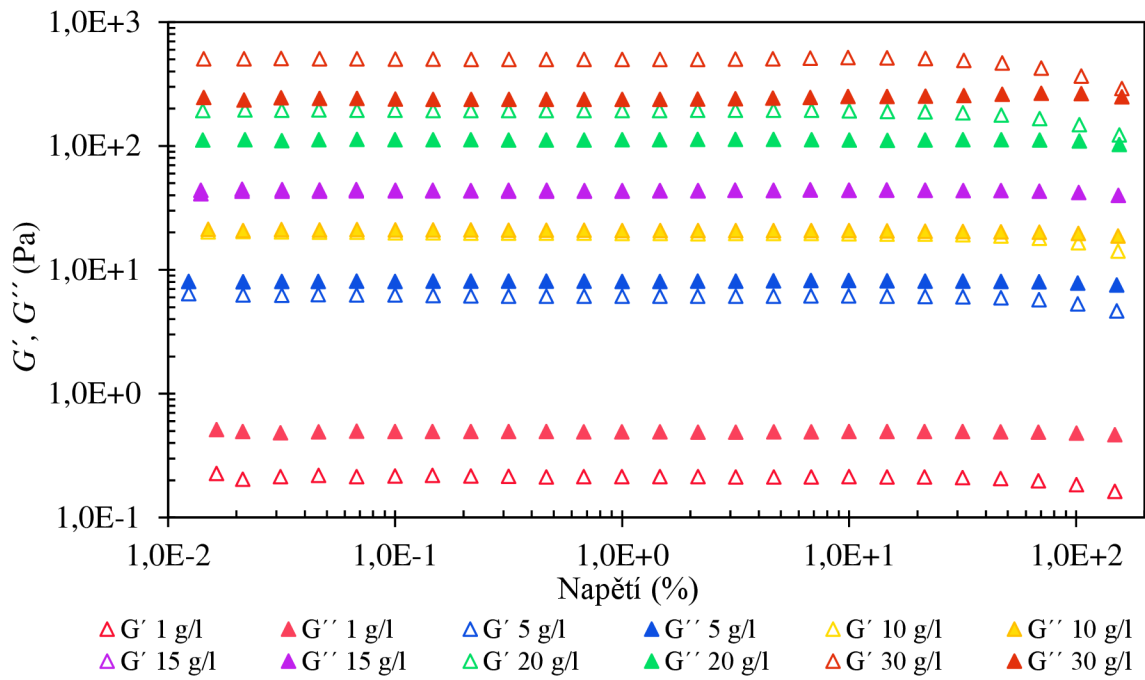
Obr. X21 Závislost pamětového G' (prázdné znaky) a ztrátového G'' (plné znaky) modulu na frekvenci pro vzorky nízkomolekulárního hyaluronanu ve vodě o různé koncentraci (viz legenda). Měřeno při teplotě 25 °C s napětím 0,1 %.



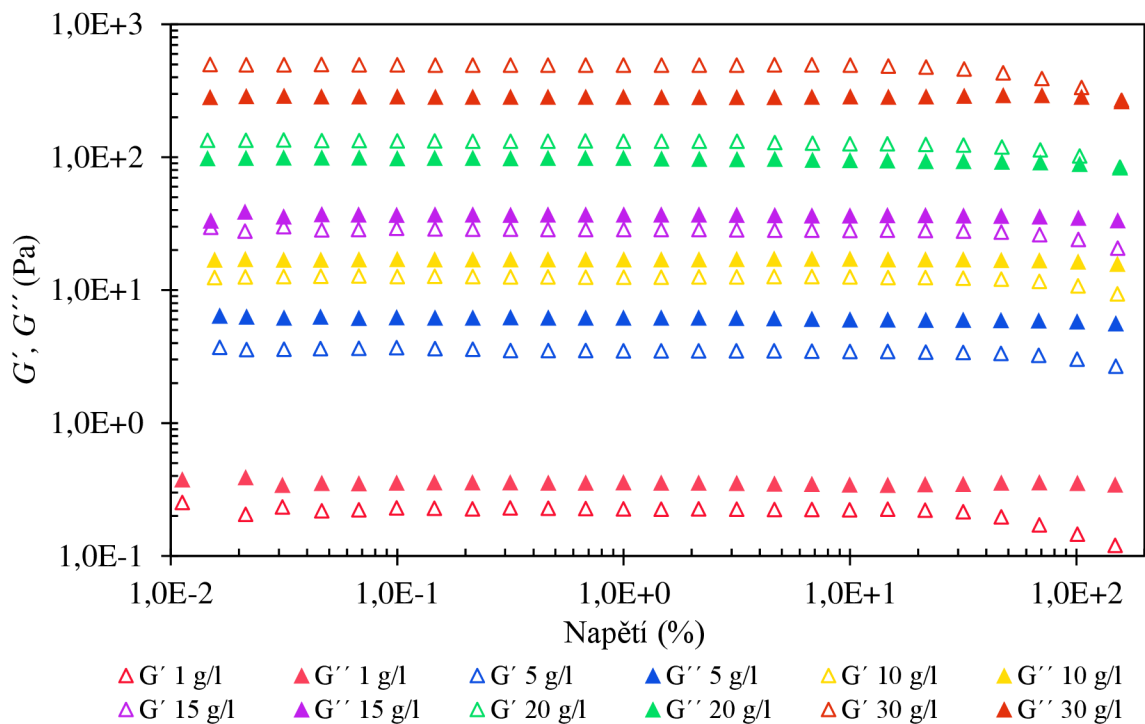
Obr. X22 Závislost pamětového G' (prázdné znaky) a ztrátového G'' (plné znaky) modulu na frekvenci pro vzorky nízkomolekulárního hyaluronanu ve vodě o různé koncentraci (viz legenda). Měřeno při teplotě 50 °C s napětím 0,1 %.



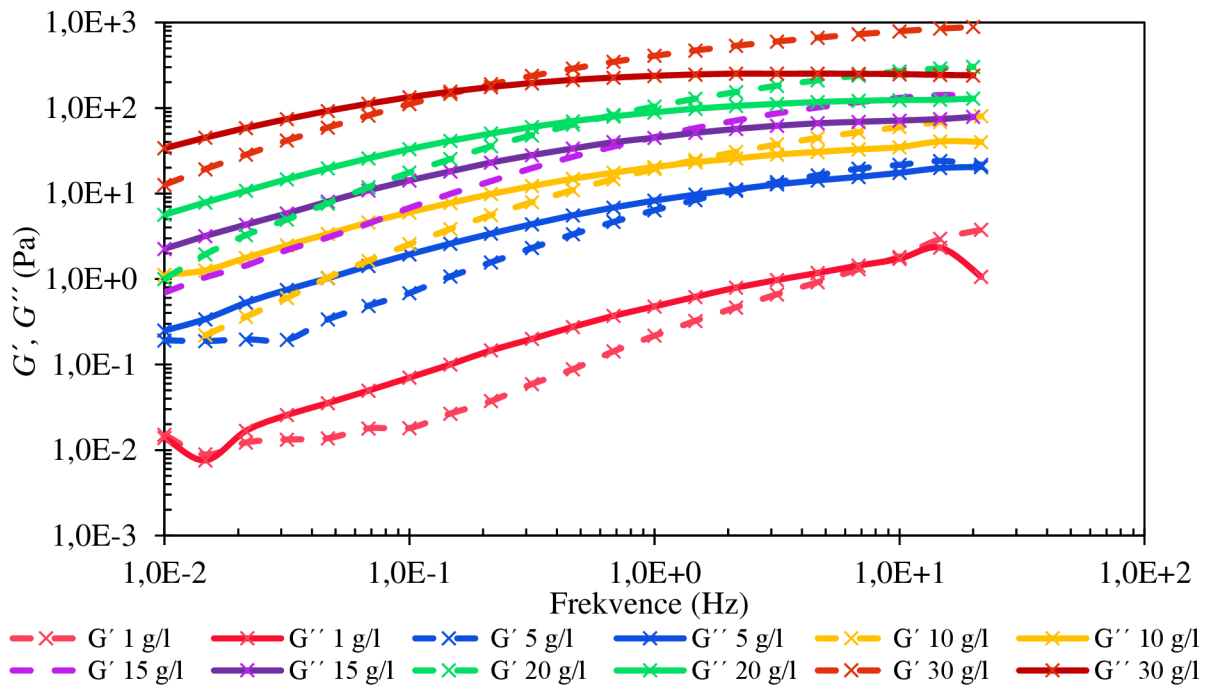
Obr. X23 Závislost paměťového G' (prázdné znaky) a ztrátového G'' (plné znaky) modulu na teplotě pro vzorky nízkomolekulárního hyaluronanu ve vodě o koncentraci 0,5–10 g/l. Měřeno prostřednictvím dvou teplotních ramp při frekvenci 1 Hz.



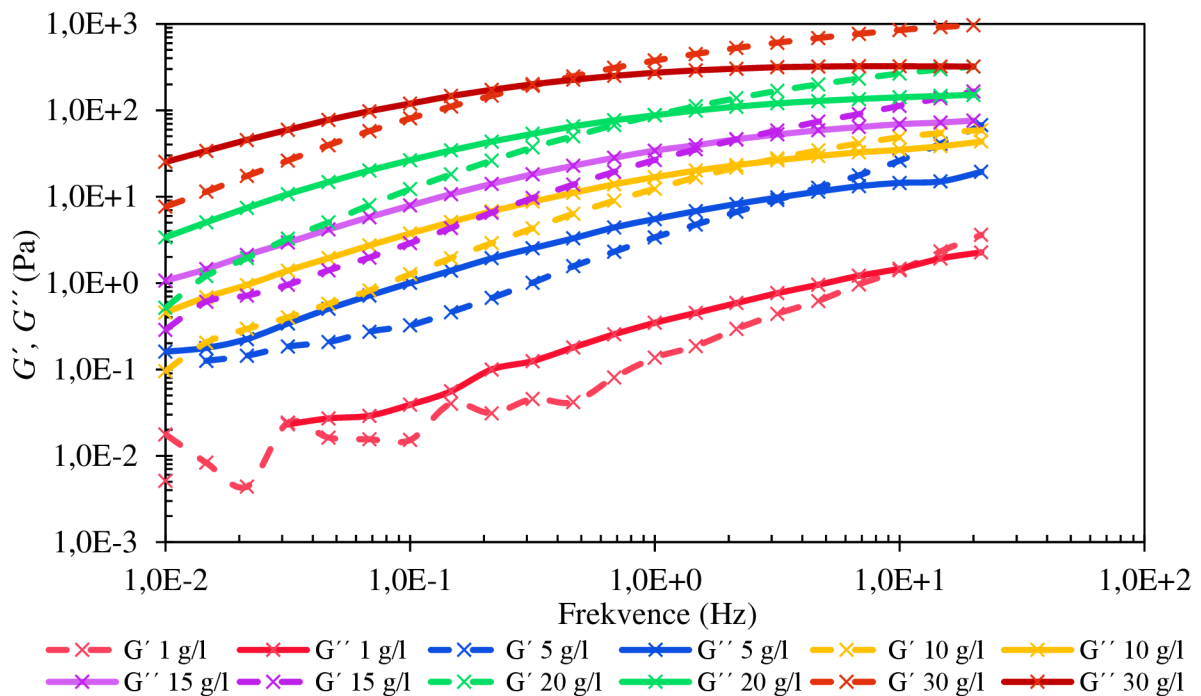
Obr. X24 Závislost pamětového G' (prázdné znaky) a ztrátového G'' (plné znaky) modulu na napětí pro vzorky vysokomolekulárního hyaluronamu ve vodě o různé koncentraci (viz legenda). Měřeno při teplotě 25 °C s frekvencí 1 Hz.



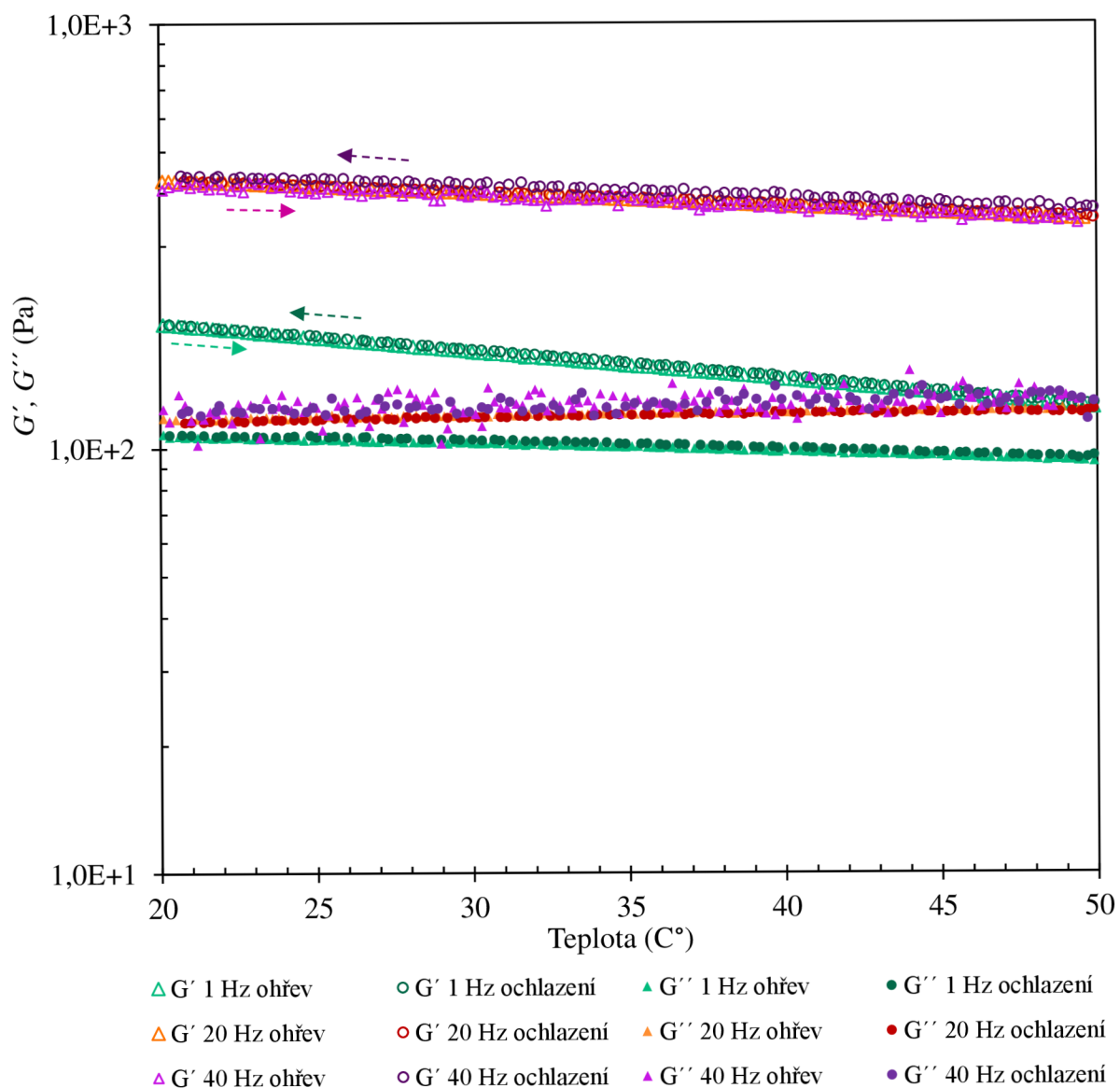
Obr. X25 Závislost pamětového G' (prázdné znaky) a ztrátového G'' (plné znaky) modulu na napětí pro vzorky vysokomolekulárního hyaluronamu ve vodě o různé koncentraci (viz legenda). Měřeno při teplotě 50 °C s frekvencí 1 Hz.



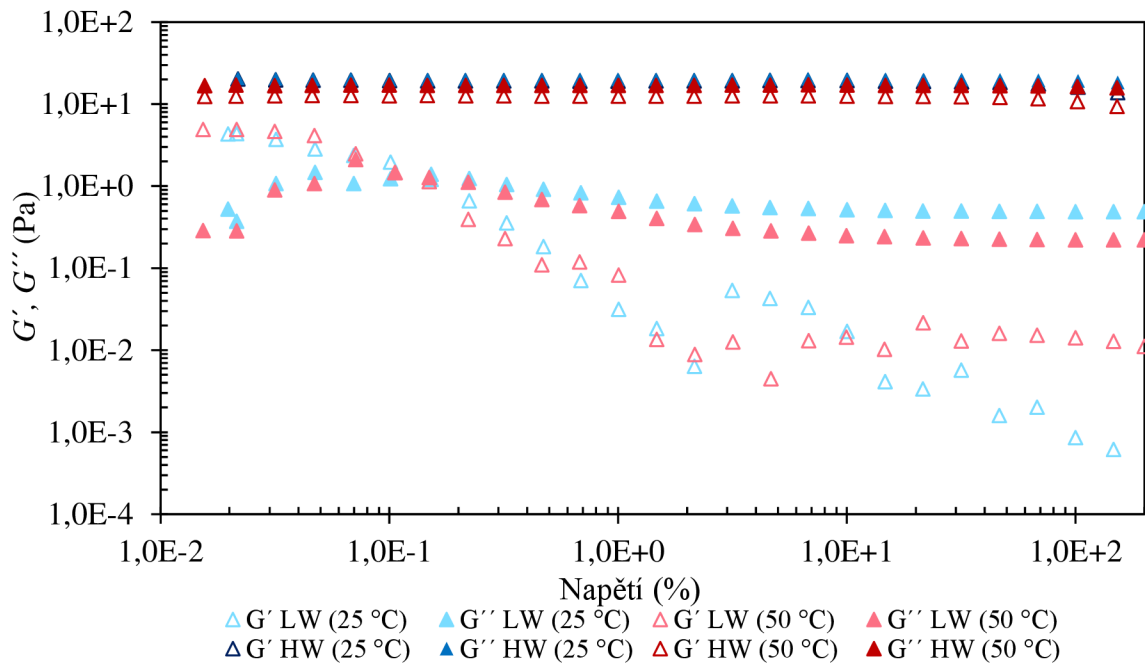
Obr. X26 Závislost pamětového G' (prázdné znaky) a ztrátového G'' (plné znaky) modulu na frekvenci pro vzorky vysokomolekulárního hyaluronanu ve vodě o různé koncentraci (viz legenda). Měřeno při teplotě 25 °C s napětím 0,1 %.



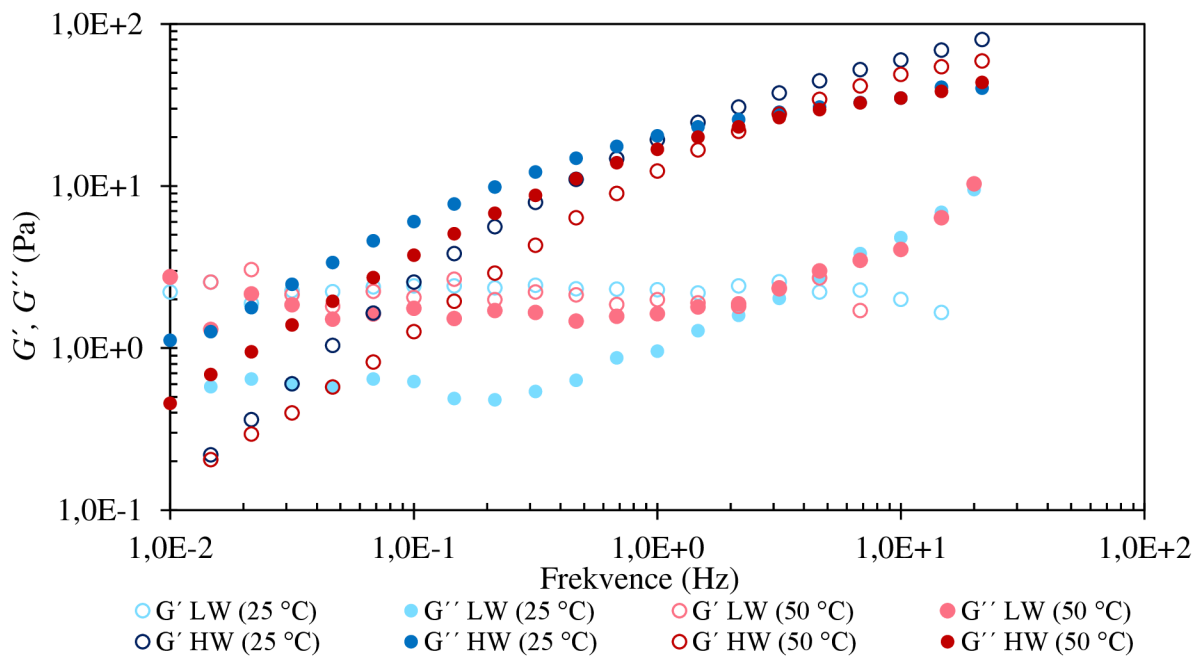
Obr. X27 Závislost pamětového G' (prázdné znaky) a ztrátového G'' (plné znaky) modulu na frekvenci pro vzorky vysokomolekulárního hyaluronanu ve vodě o různé koncentraci (viz legenda). Měřeno při teplotě 50 °C s napětím 0,1 %.



Obr. X28 Příklad závislosti paměťového G' (prázdné znaky) a ztrátového G'' (plné znaky) modulu na teplotě pro vysokomolekulární hyaluronan ve vodě o koncentraci 20 g/l. Měřeno prostřednictvím dvou teplotních ramp při frekvenci 1, 20 a 40 Hz.



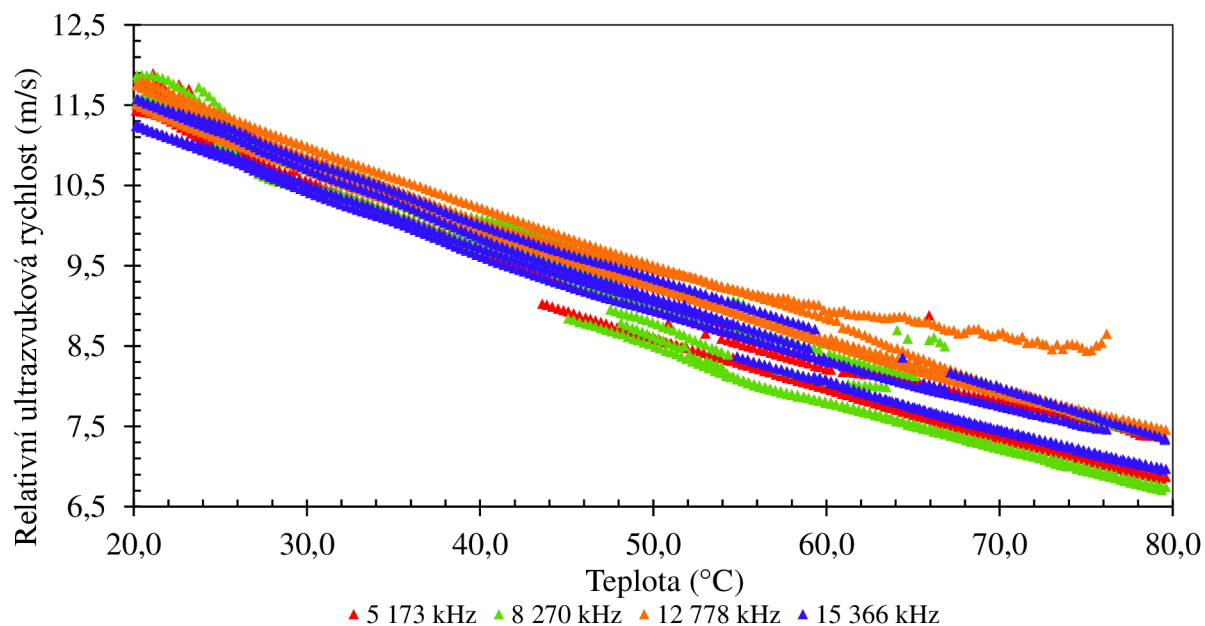
Obr. X29 Graf znázorňující rozdíly mezi nízkomolekulárním (LW) a vysokomolekulárním (HW) hyaluronanem ve vodě o koncentraci 10 g/l prostřednictvím závislosti paměťového G' (prázdné znaky) a ztrátového G'' (plné znaky) modulu na napětí. Měřeno při teplotě 25 a 50 °C s frekvencí 1 Hz.



Obr. X30 Graf znázorňující rozdíly mezi nízkomolekulárním (LW) a vysokomolekulárním (HW) hyaluronanem ve vodě o koncentraci 10 g/l prostřednictvím závislosti paměťového G' (prázdné znaky) a ztrátového G'' (plné znaky) modulu na frekvenci. Měřeno při teplotě 25 a 50 °C s napětím 0,1 %.

Tab. X4 Průměrné hodnoty směrodatných odchylek reologického měření paměťového a ztrátového modulu $\bar{S}_{G'G''}$ pro vzorky vysokomolekulárního a nízkomolekulárního hyaluronanu. Rozdělení dle použitého testu a teploty.

M_w	$c_{\text{přesná}}$ (g/l)	25 °C		50 °C		ohřev	ochlazení
		strain sweep $\bar{S}_{G'G''}$ (Pa)	frequency sweep $\bar{S}_{G'G''}$ (Pa)	strain sweep $\bar{S}_{G'G''}$ (Pa)	frequency sweep $\bar{S}_{G'G''}$ (Pa)	temperature ramp $\bar{S}_{G'G''}$ (Pa)	temperature ramp $\bar{S}_{G'G''}$ (Pa)
LW	0,4680	0,0062	0,1275	0,0045	0,0218	0,0078	0,0036
LW	2,3401	0,0218	0,1276	0,0349	0,0304	0,0468	0,0379
LW	4,6803	0,0433	0,1856	0,0237	0,0902	0,0100	0,0119
LW	9,3605	0,4088	1,4986	0,1680	0,4921	0,4151	0,4331
HW	0,8901	0,0184	0,1766	0,0342	0,2386	0,0112	0,0187
HW	4,4505	0,8368	0,9509	0,0780	1,4164	0,1235	0,1150
HW	8,9010	0,7997	0,8933	0,6112	0,5991	2,0442	0,2864
HW	13,3515	2,1713	1,7193	4,3487	2,4971	2,6261	4,7215
HW	17,8020	5,2559	4,8953	1,1157	1,2453	2,5563	2,2490
HW	26,7030	6,4059	3,4222	21,9135	20,8782	11,0215	10,7267



Obr. X31 Příklad závislosti relativní ultrazvukové rychlosti na teplotě pro vysokomolekulární hyaluronan ve vodě o koncentraci 30 g/l. Měřeno současně při frekvenci 5 173 kHz, 8 270 kHz, 12 778 kHz a 15 366 kHz.