



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

**CHARAKTERIZACE PEKTINU ULTRAZVUKOVOU
SPEKTROSKOPIÍ**

CHARACTERIZATION OF PECTIN BY ULTRASONIC SPECTROSCOPY

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Jan Trtek

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Andrea Kargerová, Ph.D.

BRNO 2016



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

Zadání bakalářské práce

Číslo bakalářské práce:	FCH-BAK1001/2015	Akademický rok: 2015/2016
Ústav:	Ústav fyzikální a spotřební chemie	
Student(ka):	Jan Trtek	
Studijní program:	Chemie a chemické technologie (B2801)	
Studijní obor:	Chemie pro medicínské aplikace (2808R031)	
Vedoucí práce	Ing. Andrea Kargerová, Ph.D.	
Konzultanti:	prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.	

Název bakalářské práce:

Charakterizace pektinu ultrazvukovou spektroskopií

Zadání bakalářské práce:

1. Seznámit se s metodou ultrazvukové spektroskopie s vysokým rozlišením a jejím využitím v koloidní chemii.
2. Navrhnout experimenty zkoumající vliv koncentrace a teploty na ultrazvukové parametry roztoků pektinu.
3. Realizovat a vyhodnotit experimenty.

Termín odevzdání bakalářské práce: 20.5.2016

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

Jan Trtek
Student(ka)

Ing. Andrea Kargerová, Ph.D.
Vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
Ředitel ústavu

V Brně, dne 31.1.2016

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

Abstrakt

Pomocí ultrazvukové spektroskopie s vysokým rozlišením byly zkoumány vlastnosti roztoků pektinu o různé koncentraci ve vodě. Dále byl zkoumán vliv rozpouštědla na změny chování pektinu v 0,15 M vodném roztoku chloridu sodného a pufru PBS o pH 7,4. Pro vyhodnocení vlastností roztoků byly výsledky porovnávány s roztoky pektátu. Bylo zjištěno, že pektin v různých roztocích mění své charakteristiky, které byly pozorovány díky změnám parametrů ultrazvukových vln.

Abstract

Pectin solutions of various concentration in water has been investigated using high resolution ultrasonic spectroscopy. Furthermore, the influence of solvent on the properties of solutions by dissolving pectin in 0.15 M aqueous solution of sodium chloride and buffer PBS at pH 7.4. For comparison the properties of the pectin solutions were compared with solutions of pectate. It was found that pectine changes characteristics in different solutions. These changes have been observed due to changes in the parameters of ultrasonic waves.

Klíčová slova

Pektin, pektát, ultrazvuková spektroskopie s vysokým rozlišením, denzitometrie

Keywords

Pectin, pectate, high resolution ultrasonic spectroscopy, densitometry

Citace

TRTEK, J. *Charakterizace pektinu ultrazvukovou spektroskopií*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2016. 47 s. Vedoucí bakalářské práce Ing. Andrea Kargerová, Ph.D..

Prohlášení

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

.....
Jan Trtek

Poděkování

Rád bych poděkoval vedoucí mé bakalářské práce Ing. Andrei Kargerové, Ph.D. za trpělivost a pomoc při měření, bez kterých by tato bakalářská práce nemohla vzniknout. Dále bych chtěl poděkovat prof. Ing. Miloslavu Pekařovi, CSc., díky jehož přispění jsem mohl zpracovat takto zajímavé téma a též za jeho rady.

Obsah

1	ÚVOD	6
2	TEORETICKÁ ČÁST	7
2.1	Pektin	7
2.1.1	Historie pektinu	8
2.1.2	Využití pektinu	9
2.1.3	Tvorba gelu.....	10
2.2	Ultrazvuková spektroskopie s vysokým rozlišením	11
2.2.2	Studium koncentrace cukru v roztoku	13
2.2.3	Studium krystalizační kinetiky ultrazvukovou spektroskopií.....	14
2.2.4	Tepelné přechody ve vodném roztoku karagenanu	15
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	16
3.1	Použité chemikálie.....	16
3.2	Příprava roztoků	16
3.2.1	Příprava zásobního roztoku NaCl.....	16
3.2.2	Příprava zásobního roztoku PBS	16
3.2.3	Příprava zásobních roztoků pektinu a pektátu	16
3.3	Měření ultrazvukové rychlosti.....	18
3.4	Měření hustoty a ultrazvukové rychlosti denzitometricky	19
3.5	Vyhodnocení dat a diskuze.....	20
3.5.1	Charakterizace pektinu ultrazvukem s vysokým rozlišením (HRUSem)	20
3.5.2	Charakterizace pektátu ultrazvukem s vysokým rozlišením (HRUSem)	24
3.5.3	Charakterizace pektátu denzitometrií	26
3.5.4	Porovnání metod pro stanovení ultrazvukové rychlosti pektátu ve vodě	35
4	ZÁVĚR	36
5	SEZNAM POUŽITÉ LITERATY	38
6	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK	41
7	PŘÍLOHY	42

1 ÚVOD

Pektin se řadí mezi polysacharidy, který se vyskytuje v ovoci a zelenině a hraje podstatnou roli v technologických procesech. Je důležitým z hlediska zdraví i výživy. Jedná se o látku, jenž má velký význam jako vláknina, na kterou se vážou těžké kovy. Je tedy použitelný jako protilátka při otravě těmito kovy (rtuť, olovo, arsen). Z biotechnologického hlediska se pektin využívá pro zpracování ovoce a zeleniny. [22, 23]

Pektiny jsou buď nerozpustné ve vodě (tzv. protopektiny) nebo působením protopektináz se stávají rozpustným. Rozpustnost ve vodě postupně klesá s rostoucí molekulovou hmotností a stupněm esterifikace karboxylových skupin. Tato vlastnost se projevuje při hospodaření buněk s vodou. Při zrání ovoce dochází k měknutí plodu, což se děje díky přeměně nerozpustných pektinů na rozpustné. [21]

Při zpracování ovoce vzniká mnoho odpadu, který je bohatý na pektin, ale jeho potenciál zůstává nevyužitý. Bylo by však možné tento odpad dále zpracovat a získat z něj pektin, jenž se využívá manufakturně při výrobě cukrovinek a také marmelád. V průmyslu je široce využíván právě jako želírovací sloučenina, která je izolována ze slupek citrusových plodů. Toto zahušťovadlo je obecně známo pod označením E440. [22]

Hlavním cílem této práce je popsat chování pektinu ve vodném roztoku, roztoku chloridu sodného a pufru PBS při různých koncentracích pektinu. Tato charakterizace bude provedena metodou ultrazvukové spektroskopie s vysokým rozlišením.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Pektin

Název pektin je odvozen z řeckého slova „pectos“, což znamená želírující, stávající se pevným. [1]

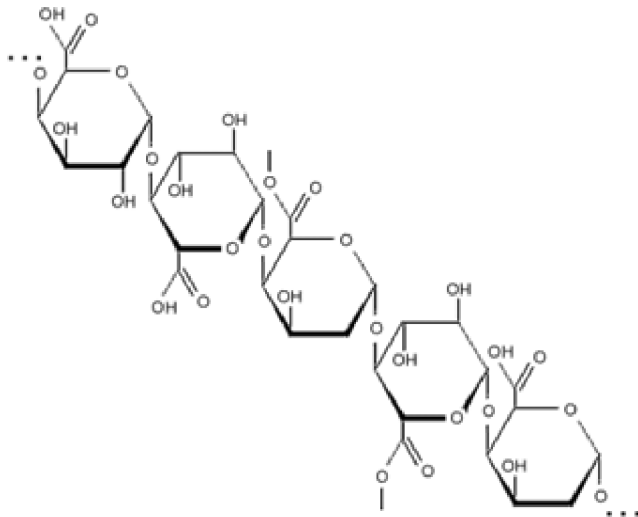
Pektiny jsou polydisperzní polysacharidy rostlinného původu, které se nacházejí především v pletivech ovoce a zeleniny. Konkrétně se vyskytují v primární stěně a střední lamelle. Největší koncentrace pektinu je zaznamenána v raném stádiu vývoje rostliny, jeho množství se v průběhu zrání snižuje. Na množství pektinu může mít vliv i způsob skladování a zpracování materiálu bohatého na pektin. Tyto aspekty se můžou podepsat na změně textury. [2, 3]

Pektinové sloučeniny zabezpečují výměnu vody a některých solí. Mezi jejich další široce využívanou vlastností je tvorba gelů. Jejich struktura závisí na mnoha faktorech a může v průběhu růstu rostliny znatelně měnit samotnou rostlinu. [4]

Je hlavní složkou primárních buněčných stěn všech rostlin. Je směsí rozvětvených heterogenních a vysoce hydratovaných polysacharidů, jehož základní řetězec je tvořen asi 25 – 100 jednotkami D-galakturonové kyseliny. Úseky této kyseliny jsou navzájem spojeny vazbou α -(1→4). Tento řetězec bývá často esterifikován metanolem nebo acetylován, a to v poloze C-2 nebo C-3. Pokud je methylace znatelná na více než polovině karboxylových skupin, potom se jedná o vysokomethoxylový nebo vysokoesterifikovaný pektin. Je-li methylace nižší než 50 %, jedná se o nízkomethoxylový neboli nízkoesterifikovaný pektin. Jednotlivé skupiny galakturonové kyseliny ukončuje jednotka L-rhamnopyranosy, která je vázána glykosidickou vazbou v poloze α -(1→2). [2, 5]

Jako rhamnogalakturonany se označují úseky polysacharidů obsahující okolo 1–4% rhamnosy. Volné skupiny obsahující karboxyl jsou hojně neutralizovány a objevují se tedy ve formě solí. Pektiny jsou tvořeny 300 – 1 000 různými monosacharidovými jednotkami, jejichž celková molekulová hmotnost je v rozsahu 50 – 150 kDa. [2, 5]

Chemická struktura a pojmenování dané sekvence pektinu je uvedena na *Obrázku 1*.



Obrázek 1: Vzorec pektinu. [6]

V postranně větvených částech struktury se často vyskytují D-galaktosa a L-arabinosa, které mají strukturu arabinanů a arabinogalaktanů různých typů. Tyto nesubstituované jednotky jsou označovány jako „vlasové a hladké“ úseky molekul. Tyto části jsou také vazebnými zónami. [5]

Rozvětvená část pektinu se skládá ze tří jednotek: rhamnogalakturonan I (RG-I), rhamnogalakturonan II (RG-II) a xylogalakturonan. Ve struktuře se vyskytují v různých poměrech, což je dáno původem pektinu. [5]

Rhamnogalakturonan I je složen z 1,4-galakturonové kyseliny ukončenou glykosidickou vazbou α -(1 \rightarrow 2) na L-rhamnopyranosu. Na RG-I jsou připojeny jednotky arabinosy, rhamnosy a galaktosy, které jsou vázány vazbou (1 \rightarrow 2). Struktura RG-II je oproti RG-I několikanásobně složitější. Je složen z galaktosy, xylosy, arabinosy, manosy, glukosy a dalších monosacharidových jednotek. Tento řetězec pektinu je také vysoce odolný vůči enzymu α -1,4-endopolygalakturonase. [4]

2.1.1 Historie pektinu

Pektin poprvé izoloval a popsal Henri Braconnot v roce 1825. Pozorováním jedné z vlastností pektinu a to gelovatěním džemů a marmelád. Tato vlastnost byla objevena již dlouho předtím. Pozoroval jen to, které ovocné plody obsahují větší koncentrace kvalitního pektinu. [7]

Firmy zabývající se výrobou džemů a marmelád se během průmyslové revoluce obrátily na výrobce jablečných džusů, aby od nich získávali jablečnou matolinu, ze které mohl být pektin povařením izolován. [7]

Ve dvacátých a třicátých letech 20. století byly postaveny továrny pro komerční extrakci pektinu ze sušené jablečné matoliny a později i z citrusových slupek. Pektin byl nejprve prodáván jako kapalný extrakt, ale v současné době se častěji používá jako suchý prášek, který se jednodušeji skladuje. [7]

2.1.2 Využití pektinu

Hlavní podíl vlákniny v citrusových plodech tvoří pektin, který zaujímá 65–70 % z celkového obsahu vlákniny. Pektin zastoupený ve stravě ovlivňuje několik metabolických a trávicích procesů, především spojených s metabolismem glukózy a hladinou cholesterolu. Výzkumy na zvířatech i lidských dobrovolnících ukazují, že zařazení pektinu do stravy významně snižuje absorpci glukózy s odpovídajícím poklesem hladiny inzulínu v séru. Dále bylo prokázáno, že konzumace pektinu z ovoce vede k významnému snížení hladiny LDL cholesterolu a ke zlepšení dalších parametrů spojených s hyperlipidémií. V lidském těle ve vodě rozpustná vláknina, jako je pektin, vytváří v zažívacím traktu gely, které zpomalují vyprazdňování žaludku a také trávení a absorpci. Tento proces zvyšuje pocit sytosti a může snížit míru absorpce glukózy. Působí tedy jako prevence vysokých hladin glukózy v krvi následně po příjmu potravy. Kolísání hladin glukózy v krvi vede buď k hyperglykémii (zvýšená hladina glukózy v krvi) nebo hypoglykémii (nízká hladina glukózy v krvi). Pektin je také vhodný pro podporu regulace tělesné hmotnosti. Konzumace pektinu vede také k narušení reabsorpce žlučových kyselin ve střevě, což patrně snižuje hladiny cholesterolu v plazmě. Doporučený příjem vlákniny se pro dospělého pohybuje od 25 do 30 gramů na den, ale v mnoha rozvinutých zemích je nižší, přibližně 15 gramů na den. Zařazení citrusových plodů do denního jídelníčku může pomoci dosáhnout doporučené hodnoty. Pokud sníte jeden středně velký pomeranč denně, získáte přibližně 3 gramy vlákniny. [8]

V *Tabulce 1* můžeme vidět obsah pektinu v sušině, který obsahují různé rostlinné materiály.

Tabulka 1: Obsah pektinu v různých typech rostlinného materiálu. [27]

Rostlinný materiál	Obsah pektinu (% sušiny)
Višně	0,4
Jahody	0,6
Meruňky	1,1
Černý rybíz	1,5
Brambory	2,0
Cibule	4,8
Trávy	2,0 – 6,5
Hrozny	6,9
Fazole	6 – 9
Jablečné slupky	19 – 20
Jablečný matolin	10 – 15
Řepné řízky	10 – 20
Okvěti lůžka slunečnice	15 – 25
Citrusové slupky	10 – 35

2.1.3 Tvorba gelu

Gel je tvořen v závislosti na stupni esterifikace pektinu. Pektiny, které jsou vysokoesterifikované podléhají gelovatění v prostředí kyselin. Voda je vázána na cukr a tím se snižuje stupeň hydratace pektinu. Zároveň kyseliny potlačují disociaci karboxylových kyselin. Obecně platí, čím je vyšší stupeň esterifikace, tím menší množství kyseliny je třeba, aby byl gel vytvořen. Ideální podmínky pro gelovatění pektinu poskytuje pH pohybující se okolo hodnoty pH 3. Některé gely mohou být ohříváním převedeny na roztok a ochlazením roztoku opět na gel, ovšem pektinový gel touto vlastností nedisponuje. [2, 10]

Pokud přidáme do směsi alginát sodný, vznikají pevnější gely při nízké koncentraci cukru a právě tyto jsou termoreverzibilní. Algináty s vyšším obsahem glukuronové kyseliny tvoří stabilnější gely zejména v kombinaci s pektiny se stupněm esterifikace okolo 70 %. [2]

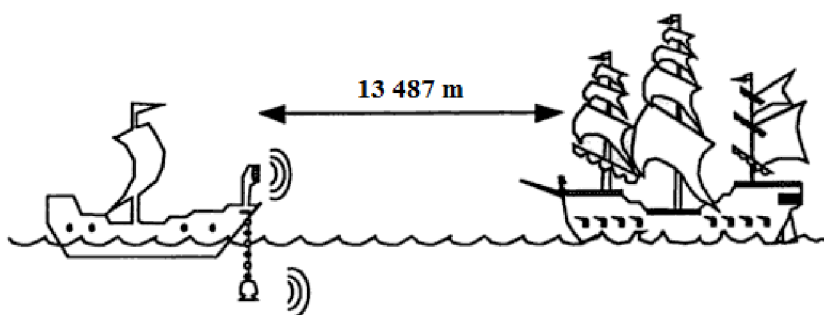
Pektiny nízkoesterifikované tvoří gely v přítomnosti iontů vápníku. Vznik gelu je poté silně závislý na teplotě, iontové síle, pH a koncentraci přidaných vápenatých iontů. V kyslejších prostředí je nutné přidat více vápníku než v prostředí méně kyselém. Tyto gely vykazují termoreverzibilitu. [10]

2.2 Ultrazvuková spektroskopie s vysokým rozlišením

Ultrazvuk se v medicíně využívá již téměř 75 let. K analýze materiálů však nebyl příliš vhodný. Mezi jeho hlavní problémy patřilo nízké rozlišení a velké množství vzorku, které bylo pro analýzu nutné. Všechny tyto nedostatky však byly odstraněny s vývojem elektronických zařízení, která dokázala ultrazvukový signál lépe zpracovat a reprodukovat výsledky. [11]

Ultrazvuková spektroskopie s vysokým rozlišením, je také často označována zkratkou HRUS (z anglického high resolution ultrasonic spectroscopy). Tato metoda je velmi podobná všem ostatním spektroskopickým, avšak proti většině spektroskopických využívá k analýze elektromagnetické záření. Ultrazvuková spektroskopie vytváří vlny zvukové a tyto vlny generuje elektronický zdroj. Oproti tomu elektromagnetické vlny jsou nejčastěji generovány zdrojem světelným. Tyto vlny je většinou nezbytné dále přečišťovat a specifikovat, na rozdíl od zvukových vln. Vlny zvukové nám umožňují zkoumat dokonce i objekt na více frekvencích najednou. Tento podstatný rozdíl dovoluje ultrazvukové spektroskopii zkoumat vzorek z jakéhokoliv materiálu, včetně objektů neprůhledných. [11]

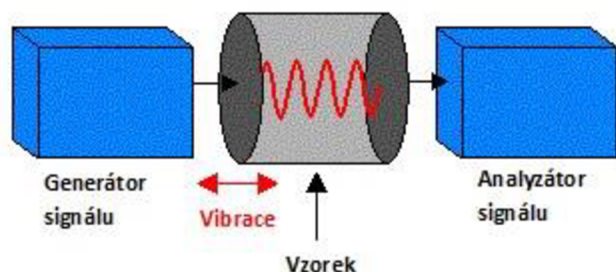
Rychlost zvuku ve vodě poprvé přesně měřili v roce 1827 Jean-Daniel Colladon a Charles Sturm. Na ženevské jezero postavili dvě loďky ve vzdálenosti 13 487 m. Jejich speciální vynález uhodil do zvonu, který byl ponořen ve vodě, a současně byla odpálena nálož střelného prachu. Na druhé loďce stál pozorovatel, který mezi akustickým a optickým signálem naměřil čas 9,4 s, což po snadném výpočtu odpovídá rychlosti 1 435 m/s. Což nebylo na tehdejší poměry nepřesné měření, jelikož ve 21. století je tabelovaná hodnota rychlosti šíření zvuku ve vodě 1 500 m/s. [12]



Obrázek 2: Schéma prvního měření rychlosti zvuku ve vodě. [12]

2.2.1.1 Princip měření na ultrazvukovém spektrometru

Drtivá většina měření v ultrazvukovém spektrometru se provádí komparativně, tj. měření probíhá jak v referenční cele naplněné čistým disperzním prostředím, tak v cele měřící, která obsahuje zkoumaný vzorek. [13]

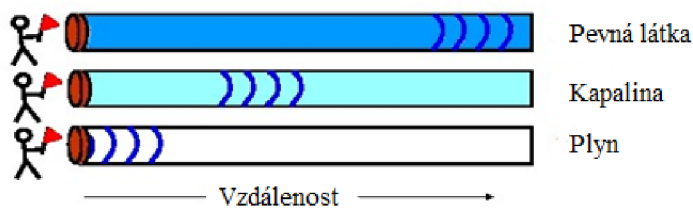


Obrázek 3: Schéma principu měření HRUS. [14]

Analýza vzorku pomocí ultrazvukové spektroskopie je založena na měření charakteristik ultrazvukových vln šířících se skrz analyzovaný materiál. Jsou zde dva piezoelektrické převodníky, které mají schopnost měnit elektrický signál na ultrazvukovou vlnu a naopak. Nejdříve jeden z převodníků změni elektrický signál na ultrazvukovou vlnu, kterou vysílá do vzorku. Na druhé straně, jak ukazuje **Obrázek 3**, je další piezoelektrický převodník, ten zachytí signál v podobě vlny a měni ji na signál elektrický, který je dále zpracován počítačem. Vlna procházející analyzovaným vzorkem při průchodu ztrácí část své energie a dochází ke změnám v rychlosti a také se změni její amplituda. Změny těchto vlastností je možné díky ultrazvukovému spektrometru zachytit a následně vyhodnocovat. [14]

Elasticita a hustota vzorku nejvíce ovlivňují rychlost a amplitudu vlny, která jím prochází. Poněkud větší roli však hraje elasticita, jenž je velmi senzitivní na intermolekulární interakce a molekulární uspořádání, a také proto, že plyny a kapaliny mají nižší modul pružnosti v tahu v porovnání s pevnými látkami. V důsledku těchto aspektů vlna prochází rychleji skrze pevné materiály, jak můžeme vidět na **Obrázku 4**. [15]

Při průchodu vlny vzorkem dochází k jeho kompresi a dekompresi. Tyto změny jsou však velmi malé, a proto se ultrazvuková spektroskopie označuje za nedestruktivní techniku. Ultrazvuková vlna je velmi citlivá na intermolekulární síly, které jsou základní stavební jednotkou materiálu. Ultrazvuková spektroskopie je jediná metoda, která je schopna tyto síly přímo měřit. [14]



Obrázek 4: Průchod ultrazvukové vlny různými prostředími. [15]

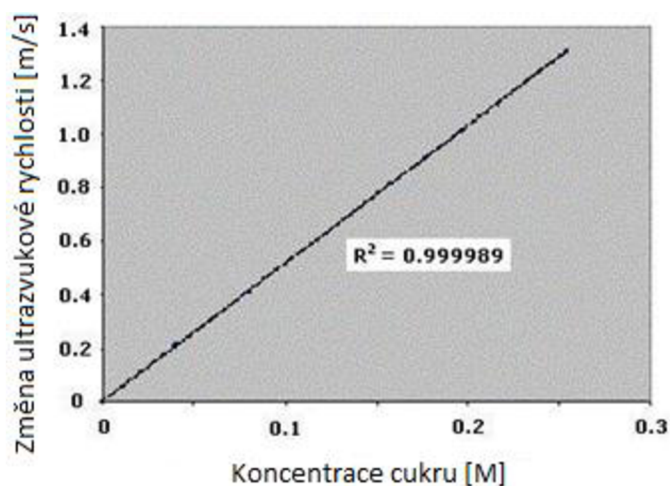
Ultrazvukovou spektroskopií s vysokým rozlišením se vzorky měří v několika frekvencích v rozsahu 2 700 – 14 900 kHz. Jednotlivé frekvence, na kterých probíhá měření, jsou charakterizovány číslem píku. [16]

2.2.1.2 Využití ultrazvukové spektroskopie

Ultrazvuková spektroskopie se velmi často využívá ke strukturní analýze a detekci chemických reakcí. Dále je možné ji použít k pozorování konformačních změn v biopolymerech a micelizaci. Vitaly Buckin popsal enzymatickou hydrolyzu maltoheptózy pomocí ultrazvukové spektroskopie s vysokým rozlišením. [17]

2.2.2 Studium koncentrace cukru v roztoku

Elementární měření na ultrazvukovém spektrometru slouží například ke stanovení určité látky v roztoku, který může obsahovat určitou látku, v tomto případě cukr. Na **Obrázku 5** můžeme vidět koncentrační závislost změny rychlosti na koncentraci cukru ve vzorku. Posléze díky této křivce můžeme určit koncentraci daného cukru v neznámém vzorku. [18]

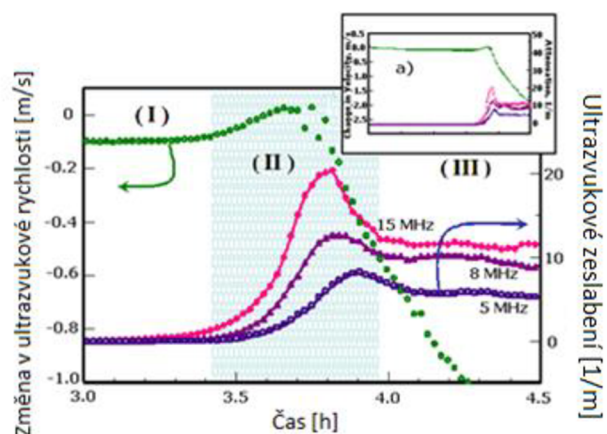


Obrázek 5: Závislost rychlosti na koncentraci cukru. [18]

2.2.3 Studium krystalizační kinetiky ultrazvukovou spektroskopií

Lysozym nás chrání před bakteriální infekcí tím, že napadne bakteriální buněčné stěny, což způsobuje jejich prasknutí. Změnou podmínek experimentu mohou být vytvořeny krystaly o různém množství a velikosti. Množství krystalů, jakožto i posouzení velikosti krystalů a interakce mezi nimi, jsou důležitou součástí rutinní analýzy ve farmaceutickém průmyslu. [19]

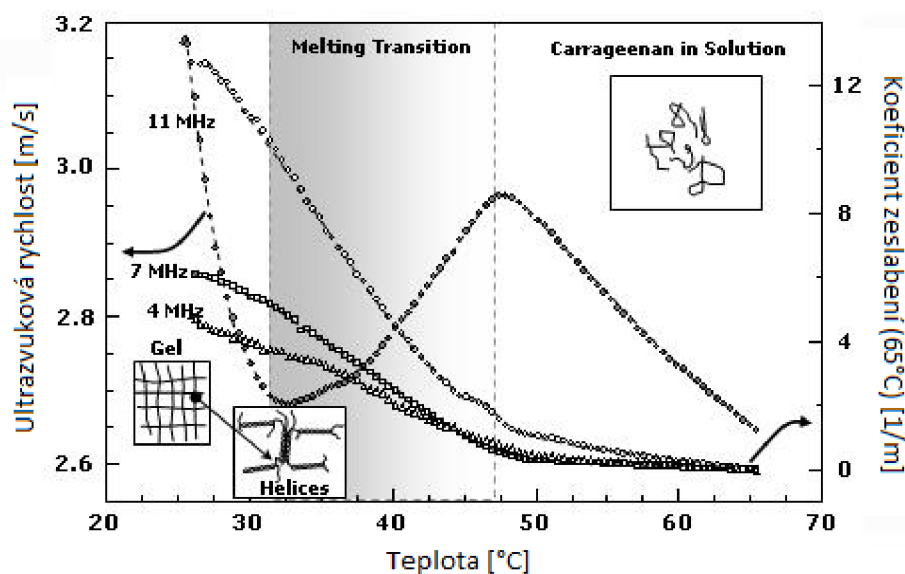
Krystalizace lysozymu byla analyzována za použití spektrometru HRUS 102. Při tomto měření byl použit 1 ml roztoku lysozymu (40 mg / ml) v 0,1 M acetátu sodného o pH 4,8. Urychlující činidlo se přidalo ke vzorku a byla pozorována kinetika krystalizace. Na **Obrázku 6** můžeme vidět 3 fáze procesu krystalizace. V průběhu prvních 205 minut reakce není detekována žádná významná změna. Na konci etapy (I) je znatelné ultrazvukové zeslabení a rychlost se začne zvyšovat v důsledku tvorby krystalů. Toto zvýšení pokračuje přes stupeň (II), jak koncentrace tak i velikost krystalů roste. Nárůst v ultrazvukové rychlosti, je způsoben zvýšením tuhosti vzorku, v důsledku tvorby krystalů. V průběhu etapy (II) ultrazvuková rychlost začíná postupně klesat a ve fázi (III) je ultrazvuková rychlost snížena, což indikuje konec tvorby krystalů, které mají velikost několik mikronů. [19]



Obrázek 6: Znáznornění průběhu reakce vzniku krystalů. [19]

2.2.4 Tepelné přechody ve vodném roztoku karagenanu

Karagenany jsou skupinou lineárních potravinářských polysacharidů, které se získávají z červených mořských řas. Mají jedinečnou schopnost vytvořit téměř nekonečné množství gelů za laboratorní teploty – tuhé, kompatibilní, s vysokou nebo nízkou teplotou tání. Na **Obrázku 7** můžeme vidět multi-frekvenční ultrazvukovou analýzu roztavení karagenanového gelu za použití HRUS 102 spektrometru. Pod 30 °C a nad 48 °C, ultrazvuková rychlost vykazuje lineární závislost na teplotě, která je důsledkem obvyklého (pro většinu materiálů) snížení modulu pružnosti s teplotou. Zvýšení ultrazvukové rychlosti bylo způsobeno zvýšením hydratace určitých skupin karagenanu, v důsledku tavení jeho helikální struktury a rozpadem intermolekulárních spojení mezi molekulami. Pokles ultrazvukového zeslabení v přechodném teplotním intervalu vyplývá ze ztráty polymerní sítě. Rychlost a zeslabení, který je nadále poskytován poskytuje další informace o dynamickém chování gelové sítě. Ultrazvuková spektroskopie umožňuje detekci bodu gelace, stejně jako analýzu transformací v helikální struktuře polymeru a charakterizaci struktury gelové sítě. V tomto experimentu můžeme vidět použití HRUS v teplotním režimu. [20]



Obrázek 7: Závislost ultrazvukové rychlosti na teplotě při rozpadu gelu. [20]

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Použité chemikálie

Pektin z citrusové kůry: Sigma-Aldrich Co. (Dánsko)

Pektin z citrusových plodů, esterifikovaný draselnou solí z 55-70% (Česká republika)

Chlorid sodný: Lachner (Česká republika), čistota 99,5%

Hydrogenfosforečnan didraselný: Lachner (Česká republika)

Dihydrogenfosforečnan draselný: Lachner (Česká republika)

3.2 Příprava roztoků

3.2.1 Příprava zásobního roztoku NaCl

Pro přípravu zásobního roztoku chloridu sodného o koncentraci 0,15 M bylo rozpuštěno 8,766 g NaCl v 1 l ultra čisté deionizované vody z přístroje PURELAB. Roztok byl umístěn na magnetickou míchačku a míchán po dobu 24 h.

3.2.2 Příprava zásobního roztoku PBS

Pro přípravu zásobního fosfátového pufru PBS o pH = 7,4 bylo naváženo a rozpuštěno 2,83 g hydrogenfosforečnanu didraselného, poté 0,19 g dihydrogenfosforečnanu draselného a nakonec 8,00 g chloridu sodného. Všechna tato množství jednotlivých látek byla rozpuštěna v 1 litru ultra čisté deionizované vody z přístroje PURELAB. Roztok byl uzavřen a míchán na magnetické míchačce po 24 h.

3.2.3 Příprava zásobních roztoků pektinu a pektátu

Zásobní roztoky pektinu a pektátu použité při měření byly připraveny rozpuštěním předem vypočítaného množství pektinu či pektátu v daném rozpouštědle (ultra čistá deionizovaná voda z přístroje PURELAB; 0,15 M chlorid sodný; PBS o pH 7,4). Jednotlivé složky zásobních roztoků byly váženy (pektin, rozpouštědlo), aby nedošlo k nežádoucím chybám. Následně byly tyto roztoky 24 h míchány na magnetické míchačce a teprve poté ředěny na požadované koncentrace.

Ředění zásobních roztoků probíhalo vždy až po dokonalém rozpuštění veškerého množství vzorku. Takto připravené roztoky byly opět ponechány 24 h na míchačce, aby se dosáhlo stejnoměrného zastoupení pektinu či pektátu v celém objemu roztoku. Tento postup byl podobný pro přípravu roztoků se všemi typy rozpouštědel.

Vytvořená kalibrační řada, dle které se proměřil jak pektin, tak pektát. Připraveny byly roztoky o koncentracích 0,01 g/l; 0,05 g/l; 0,1 g/l; 0,2 g/l; 0,3 g/l; 0,4 g/l; 0,5 g/l; 0,6 g/l; 0,7 g/l; 0,8 g/l; 0,9 g/l; 1 g/l; 1,25 g/l; 1,5 g/l; 2g/l; 2,5 g/l; 3 g/l; 5 g/l; 7 g/l; 10 g/l; 12,5 g/l; 15 g/l; 17,5 g/l a 20 g/l.

3.3 Měření ultrazvukové rychlosti

K měření vzorků byl využit přístroj od firmy Ultrasonic Scientific, který nese označení HRUS 102. Tyto vzorky se měřily při šesti frekvencích v rozsahu 2735 – 14 900 kHz. Každá frekvence je charakterizována číslem píku.

Pro získání správných výsledků platí, že číslo píku vzorku i referenčního roztoku musí být stejné, aby se měřilo vždy za stejných podmínek. [16]

Čísla píků, při kterých byly vzorky analyzovány, jsou 22,4; 42,4; 65,4; 93,9; 99,3 a 120,0. Každý vzorek se měřil komparativně vůči ultra čisté deionizované vodě, a to i v případě, kdy byl pektin či pektát rozpuštěn v roztoku chloridu sodného nebo pufru PBS. V referenční cele byla umístěna voda a v měřící cele se nacházel zkoumaný vzorek. Před spuštěním měření bylo nutné vzorek odplynit. Odplynění se provádělo na centrifuze, která běžela po dobu 5 minut při otáčkách 3 000 rpm. Poté se do přístroje aplikovalo přesně po 1 ml odplyněného vzorku.

Při měření v experimentální části bylo prováděno měření za konstantní teploty 25 °C, kdy se proměřily všechny vzorky koncentrační řady. Z měření se do počítače vždy ukládal protokol obsahující hodnoty ultrazvukového zeslabení a ultrazvukové rychlosti.

Každá série roztoků byla proměřena dvakrát.

3.4 Měření hustoty a ultrazvukové rychlosti denzitometricky

Všechny vzorky koncentrační řady pektátu byly proměřeny na denzitometru DSA 5000 M, který je vyráběn firmou Anton Paar. Tento přístroj velmi přesně měří hustotu vzorku (na šest desetinných míst), dále zaznamenává rychlost ultrazvukové vlny, která prochází vzorkem, a teplotu vzorku. Při vyhodnocení dat ultrazvukové rychlosti je možné porovnávat ultrazvukovou rychlost změřenou na přístroji HRUS a rychlost získanou z denzitometru DSA 5000 M. Vyhodnocovány byly hodnoty ultrazvukové rychlosti a hustoty pektátu v rozmezí 20 – 50 °C s krokem 5 °C. Každý teplotní sken vzorku obsahoval 7 hodnot ultrazvukové rychlosti a hustoty při zvyšující se teplotě. Hodnota hustoty se měřila pro výpočet stlačitelnosti vzorků, která se počítá z ultrazvukové rychlosti a hustoty.

Samotné měření probíhalo prvotním nastříknutím menšího objemu vzorku do cely (1 ml), aby se cela vyčistila od částic, které obsahoval předešlý vzorek. Poté následovala aplikace měřeného objemu analytu (3 ml). Bylo nutné, aby při nástřiku vzorek neobsahoval bublinky plynu. Tato skutečnost by mohla výrazně ovlivnit vypovídající hodnotu výsledků. Nezbytné tedy bylo, aby se vzorek odplynul pomocí podtlaku v injekční stříkačce. Denzitometr obsahuje pro ujištění o naprosté čistotě vzorku také kameru, která míří na měřicí kapiláru a pomáhá nám se ujistit, že vzorek je skutečně dokonale odplyněn. Pokud by nebyly bublinky plynu z cely vytlačeny další dávkou analytu, denzitometr by automaticky zobrazil chybovou hlášku. Vlastní měření probíhalo po nastavení parametrů pro teplotní sken v rozmezí 20 – 50 °C po dobu asi 45 min. Po úspěšném proměření vzorku se přístroj nechal chladit a měřený vzorek byl vytlačen z denzitometru proudem vzduchu. Při přechodu na jinou koncentrační řadu byl přístroj vymyt a taktéž byly zkontrolovány hodnoty pro referenční hodnoty vzduchu a vody. V případě mé experimentální části se měřila pouze hustota pektátu, jelikož hustota pektinu již byla změřena.

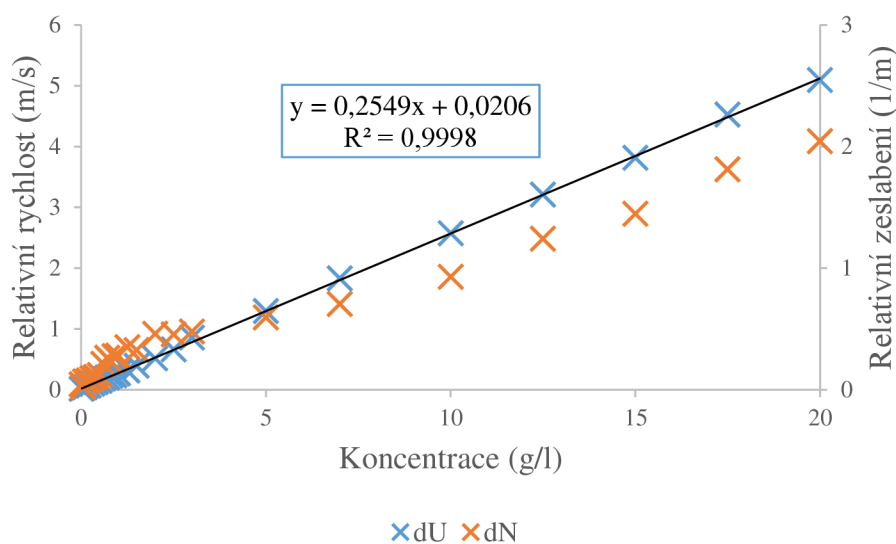
3.5 Vyhodnocení dat a diskuze

Tato kapitola je věnována vyhodnocení naměřených dat z ultrazvukového spektrometru a denzitometru. Z ultrazvukového spektrometru jsou porovnány hodnoty relativní ultrazvukové rychlosti při konstantní teplotě. Při použití metody denzitometrické jsou hodnoty hustoty a ultrazvukové rychlosti, šířící se vzorky pektátu, ovlivněny zvyšující se teplotou. Hodnoty všech sledovaných veličin jsou ovlivněny také prostředím, ve kterém jsou látky rozpuštěny.

Na závěr jsou porovnány obě použité metody.

3.5.1 Charakterizace pektinu ultrazvukem s vysokým rozlišením (HRUsem)

3.5.1.1 Ultrazvuková charakteristika pektinu ve vodě

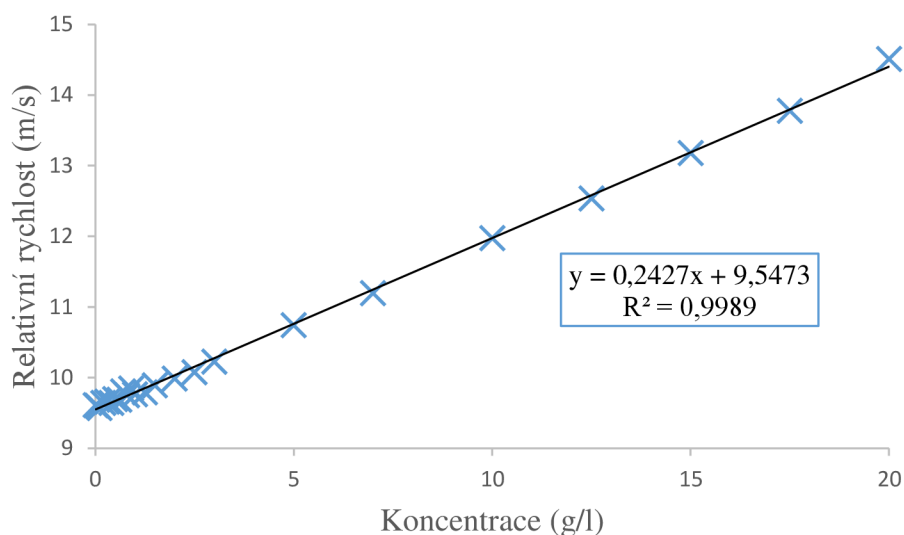


Graf 1: Závislost relativní ultrazvukové rychlosti a relativního zeslabení na koncentraci roztoku. (11 578 kHz)

Graf 1 popisuje závislost relativní ultrazvukové rychlosti procházející vzorkem (což je rychlost zvuku ve vzorku, od které je odečtena rychlost zvuku v referenční cele) a relativního zeslabení ultrazvukové vlny (což je zeslabení zvuku ve vzorku, od které je odečteno zeslabení zvuku ve srovnávací cele) v závislosti na koncentraci analytu. Výsledkem je pro každou koncentrační řadu lineární závislost. Tato závislost se sestavila z průměrů měření koncentračních řad pektinu. Zvyšováním koncentrace dochází k lineárnímu nárůstu relativní rychlosti. Proložením všech bodů každé koncentrační řady společnou přímkou, získáme rovnici regrese s vícenásobným korelačním koeficientem. Při měření pektinu ve vodě byla získána hodnota této rovnice $y = 0,2549x + 0,0206$ s vícenásobným korelačním koeficientem $R = 0,9998$.

Graf 1 znázorňuje závislost průměru hodnot z naměřené koncentrační řady pektinu ve vodě při frekvenci 11 578 kHz. Tato frekvence je typická pro pík, který se vyznačuje charakteristickým číslem 65,4. Nejvyšší hodnoty relativní ultrazvukové rychlosti (5,090 7 m/s) bylo dosaženo při měření roztoku pektinu ve vodě o koncentraci 20 g/l. Nejnižší hodnota relativní rychlosti (0,014 3 m/s) byla změřena u roztoku s nejnižší hmotnostní koncentrací, tedy u roztoku o koncentraci 0,01 g/l. Můžeme také vypočítat, že relativní zeslabení nevykazuje přímý lineární trend a proto jej v dalších částech této práce nebude relativní zeslabení do grafů vynášeno. V příloze je možné nalézt **Graf X 1**, který zobrazuje stejnou závislost, jenom měření na ultrazvukovém spektrometru probíhalo při frekvenci 12 193 kHz.

3.5.1.2 Ultrazvuková charakteristika pektinu v chloridu sodném

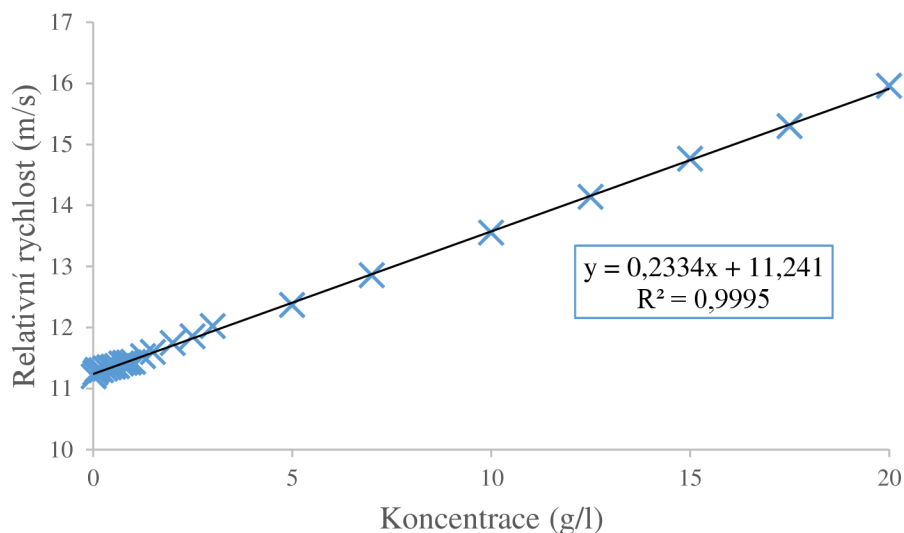


Graf 2: Závislost relativní ultrazvukové rychlosti na koncentraci roztoku pektinu v chloridu sodném. (11 578 kHz)

V **Grafu 2** je znázorněna závislost relativní ultrazvukové rychlosti na koncentraci pektinu v chloridu sodném. Chlorid sodný má vyšší hustotu než ultra čistá deionizovaná voda. Na základě tohoto předpokladu bylo již před měřením jisté, že se hodnoty relativní rychlosti posunou do vyšších hodnot. Ultrazvuková vlna se totiž šíří rychleji v prostředí, které má vyšší hustotu. Nejnižší hodnotu ultrazvukové rychlosti (14,505 0 m/s) vykazoval roztok o koncentraci 20 g/l. Nejnižší hodnota šíření ultrazvuku vzorkem vztažená na rychlost v referenční cele (9,605 7 m/s) byla zjištěna u vzorku o koncentraci 0,01 g/l.

Při měření pektinu v chloridu sodném byla získána hodnota rovnice regrese $y = 0,2427x + 9,5473$ s vícenásobným korelačním koeficientem $R = 0,9989$. Graf měření pro frekvenci 12 193 kHz je uveden v příloze v **Grafu X 2**.

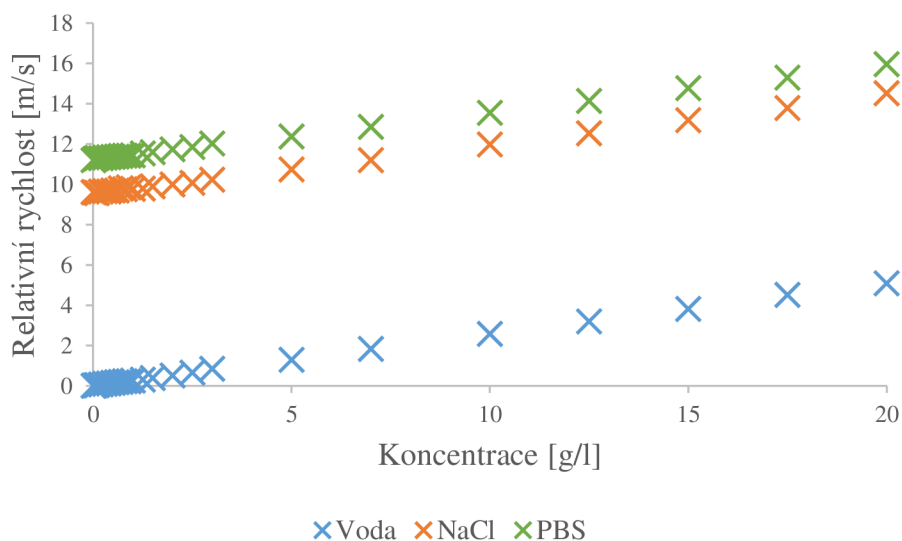
3.5.1.3 Ultrazvuková charakteristika pektinu v PBS



Graf 3: Závislost relativní ultrazvukové rychlosti na koncentraci roztoku pektinu v PBS. (11 578 kHz)

Naměřená data (**Graf 3**) popisují závislost relativní rychlosti ultrazvukové vlny na koncentraci roztoku pektinu v PBS. Nejvyšší hodnoty ultrazvukové rychlosti (15,951 2 m/s) dosahoval opět nejvíce koncentrovaný roztok. Nejnižší hodnota (11,197 5 m/s) byla naměřena u roztoku o nejnižší koncentraci. Nejnižší i nejvyšší hodnota ultrazvukové rychlosti byly znovu posunuty do vyšších hodnot. Z tohoto faktu můžeme usoudit, že PBS vykazuje vyšší hustotu než ultra čistá deionizovaná voda i chlorid sodný. Při měření pektinu v PBS byla získána rovnice regrese ve tvaru $y = 0,2334x + 11,241$ s vícenásobným korelačním koeficientem $R = 0,9995$. Výsledný graf pro měření o frekvenci 12 193 kHz je uveden v příloze pod označením **Graf X 3**.

3.5.1.4 Porovnání relativní ultrazvukové rychlosti pektinu ve vodě s hustotou pektinu v chloridu sodném a pektinu v PBS

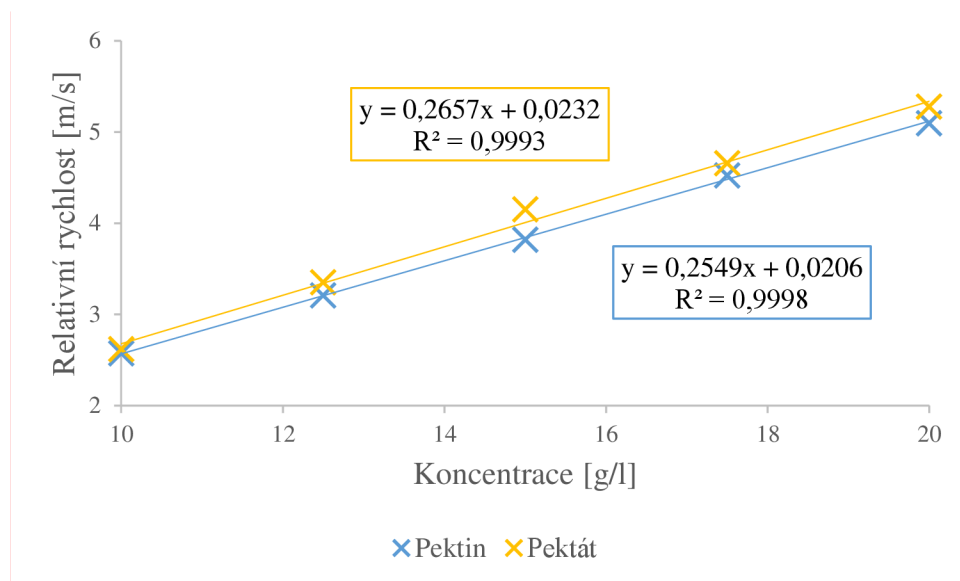


Graf 4: Porovnání ultrazvukových rychlostí v závislosti na prostředí v koncentrační řadě pektinu od 0,01 g/l do 20 g/l. (11 578 kHz)

Graf 4 porovnává relativní ultrazvukové rychlosti pektinu ve vodném prostředí, v prostředí chloridu sodného a PBS. Je zřetelné, že hodnoty naměřené v prostředí chloridu sodného a PBS dosahují vyšších hodnot než je tomu v případě pektinu rozpuštěného v ultra čisté deionizované vodě. Tento fakt je způsoben hustotou prostředí. Tomuto jevu ovšem přispělo také to, že v referenční cele byla vždy přítomna ultra čistá deionizovaná voda, vůči které se měřilo u všech koncentračních řad.

3.5.2 Charakterizace pektátu ultrazvukem s vysokým rozlišením (HRUSem)

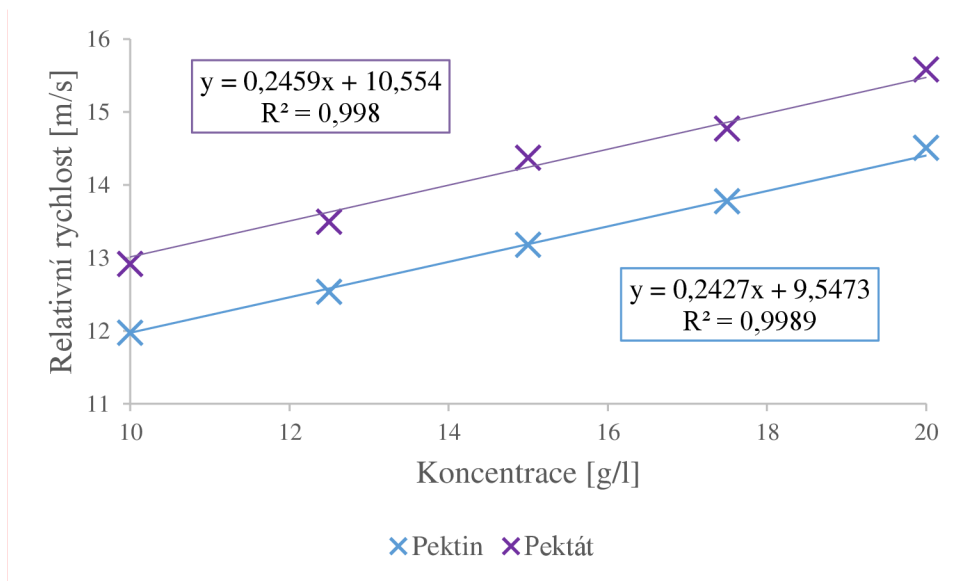
3.5.2.1 Ultrazvuková charakteristika pektátu ve vodě



Graf 5: Porovnání relativní ultrazvukové rychlosti vzorků pektinu a pektátu rozpuštěných ve vodě o koncentraci 10 g/l, 12,5 g/l, 15g/l, 17,5 g/l a 20 g/l při konstantní teplotě 25 °C. (11 578 kHz)

Graf 5 znázorňuje závislost relativní ultrazvukové rychlosti na koncentraci pektinu a pektátu rozpuštěného ve vodě. Měření bylo provedeno pro celou koncentrační řadu pektátu v ultra čisté deionizované vodě (0,01 g/l – 20 g/l). V grafech pro jednotlivá měření roztoků v různých rozpouštědlech jsou zobrazeny jen hodnoty pěti nejvyšších koncentrací. Tento krok byl proveden z důvodu větší přehlednosti jednotlivých grafů. Nejvyšší hodnoty relativní ultrazvukové rychlosti (5,275 8 m/s) dosahuje opět nejkoncentrovanější roztok pektátu ve vodě. Velikost této rychlosti je o 0,185 1 m/s větší než tomu bylo v případě stejně koncentrovaného pektinu ve vodě. Tento rozdíl může způsobovat jiná struktura samotného pektátu, která ovlivní jeho chování v roztoku a ultrazvuková vlna se šíří vzorkem větší rychlostí. Pokud body proložíme regresní přímkou, dostaneme rovnici regrese ve tvaru $y = 0,265 7 x + 0,023 2$ s vícenásobným korelačním koeficientem $R = 0,999 3$.

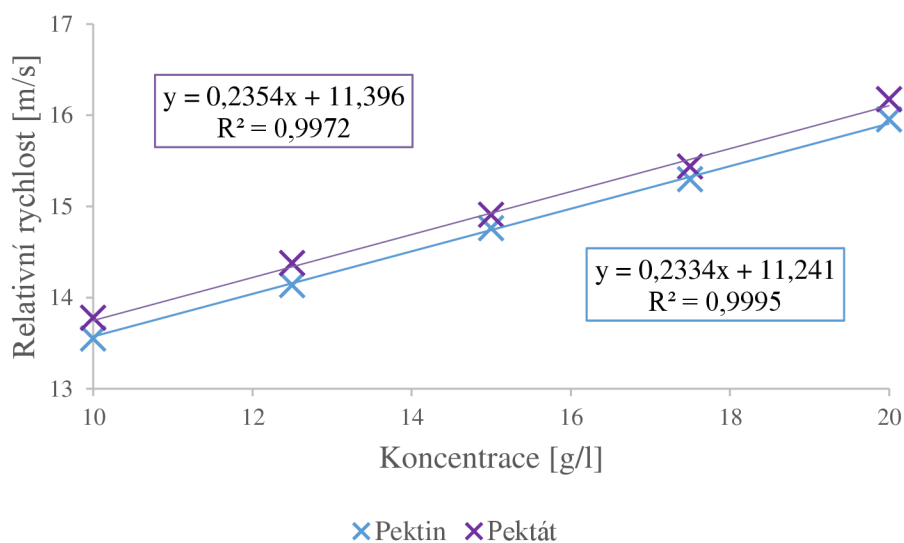
3.5.2.2 Ultrazvuková charakteristika pektátu v chloridu sodném



Graf 6: Porovnání relativní ultrazvukové rychlosti vzorků pektinu a pektátu rozpuštěných v chloridu sodném o koncentraci 10 g/l, 12,5 g/l, 15g/l, 17,5 g/l a 20 g/l při konstantní teplotě 25 °C. (11 578 kHz)

V **Grafu 6** je znázorněna závislost relativní rychlosti ultrazvuku na koncentraci v roztocích pektátu a pektinu v chloridu sodném. Opět je možné vyhledat nejvyšší hodnotu rychlosti ultrazvuku (15,580 1 m/s) ve vzorku pektátu v chloridu sodném, která se od nejvyšší rychlosti šíření ultrazvukové vlny pektinem v chloridu sodném liší o 1,075 1 m/s. Což je větší rozdíl než tomu bylo při porovnání vzorků pektinu a pektátu ve vodě. Proložení regresní přímkou, dostaneme rovnici regrese ve tvaru $y = 0,2459x + 10,554$ s vícenásobným korelačním koeficientem $R = 0,998$.

3.5.2.3 Ultrazvuková charakteristika pektátu v PBS



Graf 7: Porovnání relativní ultrazvukové rychlosti vzorků pektinu a pektátu rozpuštěných v PBS o koncentraci 10 g/l, 12,5 g/l, 15g/l, 17,5 g/l a 20 g/l při konstantní teplotě 25 °C. (11 578 kHz)

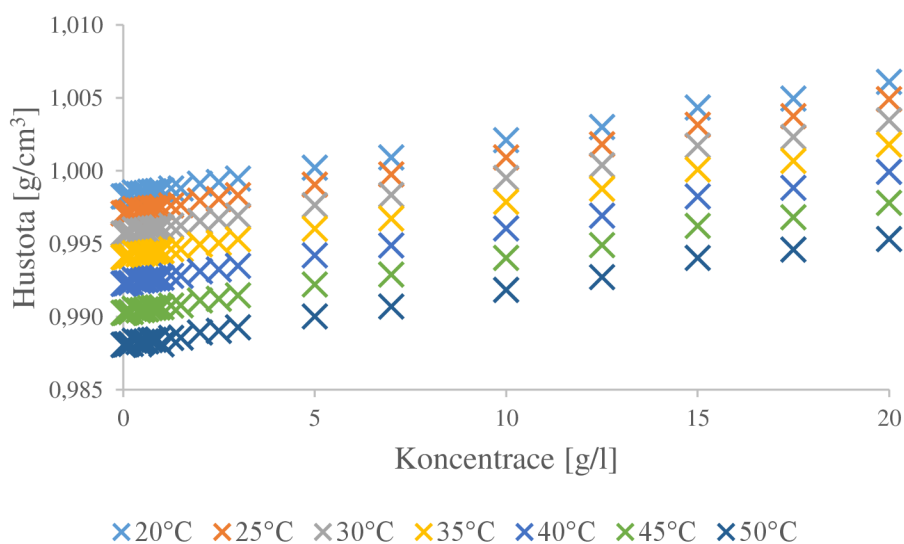
Graf 7 popisuje závislost relativní rychlosti ultrazvuku na koncentraci roztoků pektinu a pektátu rozpuštěných v PBS. Nejvyšší hodnota rychlosti šíření ultrazvukové rychlosti vztahená na rychlost v referenční cele (16,171 7 m/s) byla naměřena u nejvíce koncentrovaného pektátu (20 g/l). Tato rychlost se liší od nejvyšší dosažené rychlosti při měření pektinu v PBS o 0,220 5 m/s. Regresní přímka má v tomto případě tvar $y = 0,235 4x + 11,396$ s vícenásobným korelačním koeficientem $R = 0,997 2$. Při porovnání všech tří prostředí je vidět, že největší rozdíl je znatelný u rozpouštědla, kterým byl 0,15 M chlorid sodný. Tento jev je možné vidět na **Grafu X 4** (příloha).

3.5.3 Charakterizace pektátu denzitometrií

Pomocí denzitometru DSA 5000M byla měřena hustota a rychlost ultrazvukových vln procházejících vzorky pektátu, které byly rozpuštěny ve vodném prostředí, v prostředí 0,15 M NaCl a také PBS. Hlavní podstata měření spočívala v tom, že nadávkovaný vzorek v U trubici se rozkmital na specifickou frekvenci, která je přímo závislá na jeho vlastnostech. Podle této frekvence dokáže přístroj velmi přesně dopočítat rychlost procházejícího zvuku a hustotu analytu. Teplotní sken se zvyšující se teplotou byl proveden pro všechny kalibrační křivky v rozsahu od 20 °C do 50 °C s krokem 5 °C.

3.5.3.1 Pektát ve vodě

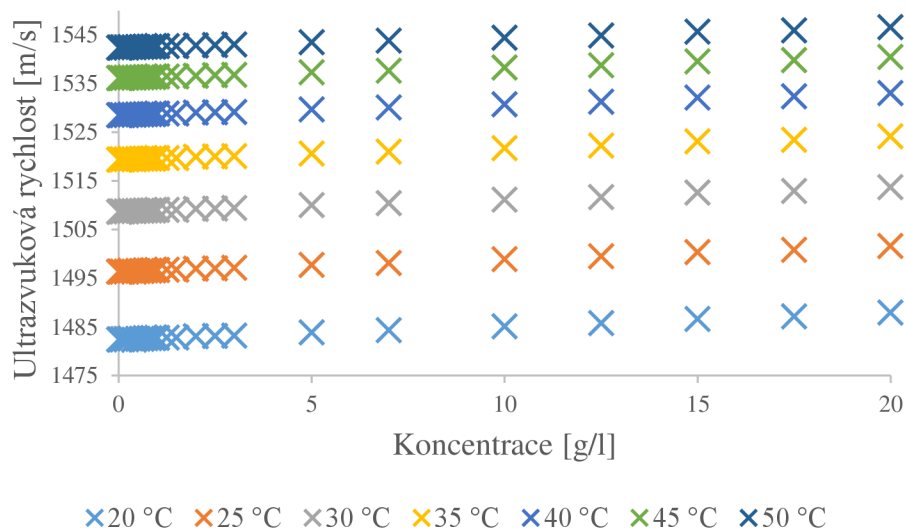
Výsledné hodnoty teplotního skenu ultrazvukové rychlosti a hustoty všech roztoků pektátu ve vodě o koncentraci 0,01 – 20 g/l jsou graficky zaznamenány. Hodnoty hustoty pro teplotu 20 °C jsou uvedeny v *Tabulce X 1* a pro teplotu 50 °C v *Tabulce X 2* (v příloze). Hodnoty ultrazvukové rychlosti pro teplotu 20 °C jsou uvedeny v *Tabulce X 3* a pro teplotu 50 °C v *Tabulce X 4* (taktéž v příloze).



Graf 8: Závislost hustoty na koncentraci pektátu ve vodě v koncentračním rozmezí od 0,01 g/l do 20 g/l při teplotě 20 – 50 °C.

Data, která jsou vynesena v *Grafu 8*, znázorňují lineární závislost hustoty na koncentraci pektátu ve vodě v rozmezí teplot od 20 °C do 50 °C s krokem 5 °C. Po analýze grafu lze usoudit, že se zvyšující koncentrací roste lineárně i hustota pektátu. Je tedy zřejmé, že nejvyšší hodnotu hustoty (1,006 081 g/cm³) má vzorek o koncentraci 20 g/l při teplotě 20°C. Nejnižší hustota (0,988 073 g/cm³) je pozorována u vzorku o koncentraci 0,01 g/l při teplotě 50 °C.

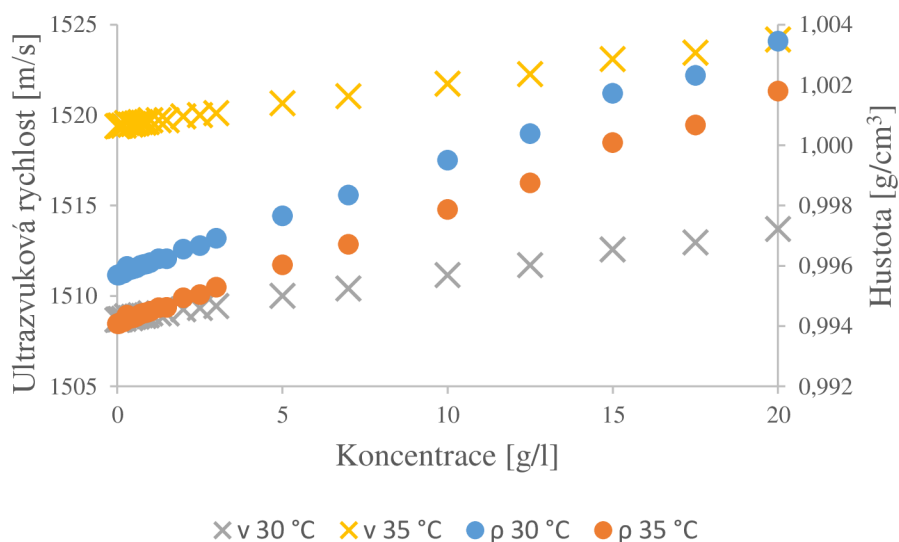
Po detailním přezkoumání *Grafu 8* je zřejmé, že rozestupy mezi jednotlivými hodnotami teplotních skenů nejsou vždy stejné, ale zvětšují se s rostoucí teplotou. Tento jev je možné lépe pozorovat na *Grafu 9*, kde je rychlost ultrazvukové vlny vztažena na koncentraci. Největší rozdíl naměřené hustoty pro jednotnou koncentraci je v rozmezí teploty 45 – 50 °C, zatímco nejmenší je pro teploty 20 – 25 °C.



Graf 9: Závislost ultrazvukové rychlosti na koncentraci pektátu ve vodě v koncentračním rozmezí od 0,01 g/l do 20 g/l při teplotě 20 – 50 °C.

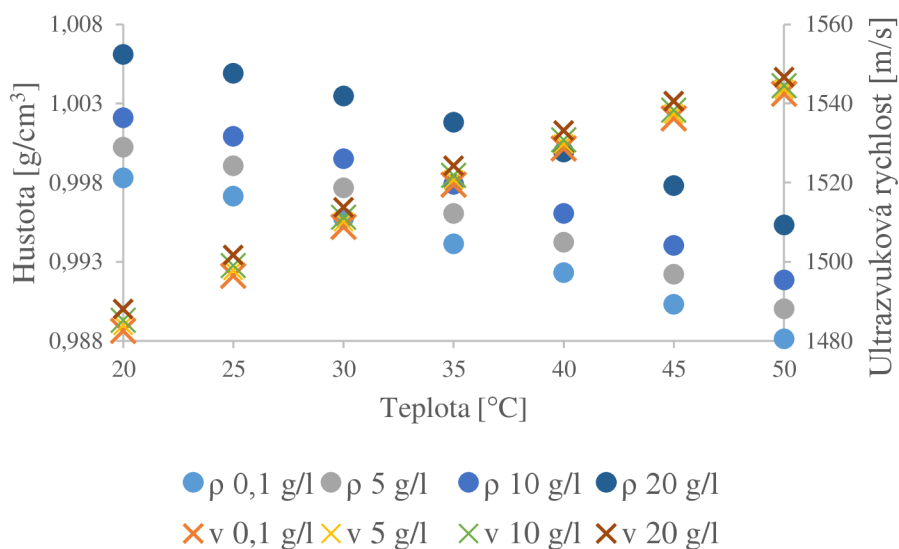
Jak bylo již zmíněno, tak denzitometr DSA 5000M měří současně s hustotou také ultrazvukovou rychlost. Závislost ultrazvukové rychlosti na koncentraci při různé teplotě je zobrazena v **Grafu 9**. Rychlost zvuku roste lineárně s koncentrací, stejně tak je tomu i v případě hustoty (viz. **Graf 8**). Nejvyšších hodnot ultrazvukové rychlosti (1 546,56 m/s) dosahuje roztok pektátu o koncentraci 20 g/l při 50 °C, rychlost se poté snižuje se snižující se koncentrací a primárně teplotou vzorku. Nejnižší hodnota rychlosti zvuku (1 482,39 m/s) byla naměřena při 20 °C u roztoku o koncentraci 0,01 g/l.

Pokud tedy porovnáme závislost hustoty na koncentraci a závislost ultrazvukové rychlosti na koncentraci, můžeme usoudit, že je zde pozorovatelný opačný trend. Ultrazvuková rychlost při zvyšování teploty roste, zatímco hustota klesá. Taktéž neplatí ekvidistantní vzdálenost mezi jednotlivými teplotními skeny, protože při ohřívání dochází ke zvětšování rozdílu ultrazvukové rychlosti při stejné koncentraci. Tento fakt platí i pro případ hustoty.



Graf 10: Závislost ultrazvukové rychlosti a hustoty na koncentraci pektátu ve vodě v koncentračním rozmezí od 0,01 g/l do 20 g/l při teplotě 30 °C a 35 °C.

Trendy obou veličin (hustoty a ultrazvukové rychlosti) v závislosti na koncentraci zobrazuje **Graf 10** při teplotách 30 °C a 35 °C. Z grafu je patrné, že obě závislosti jsou lineární. Se zvyšující se koncentrací hustota roste, u ultrazvukové rychlosti také dochází k růstu, ale při srovnání s průběhem pro hustotu není nárůst tak markantní.

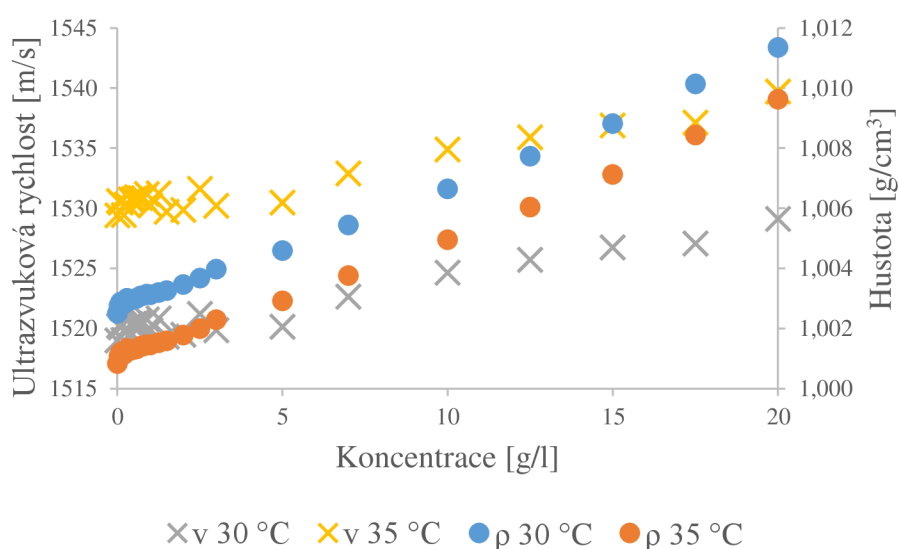


Graf 11: Závislost hustoty a ultrazvukové rychlosti na teplotě od 20 °C do 50 °C s krokem 5 °C pektátu ve vodě o koncentraci 0,1 g/l, 5g/l, 10 g/l a 20 g/l.

Graf 11 vypovídá o tom, že ultrazvuková rychlost s rostoucí teplotou roste, zatímco hustota klesá. Usuzuje se, že částice tvořící pektát po ohřevu začínají kmitat a pohybovat se rychleji. Původní rozestup jednotlivých molekul se zvětšuje a to způsobuje pokles hodnot hustoty.

3.5.3.2 Pektát v chloridu sodném

Měření pektátu v chloridu sodném probíhalo za stejných podmínek jako měření pektátu ve vodě. Všechny získané hodnoty teplotního skenu ultrazvukové rychlosti a hustoty všech vzorků pektátu v chloridu sodném o koncentraci 0,01 – 20 g/l jsou vyhodnoceny graficky.



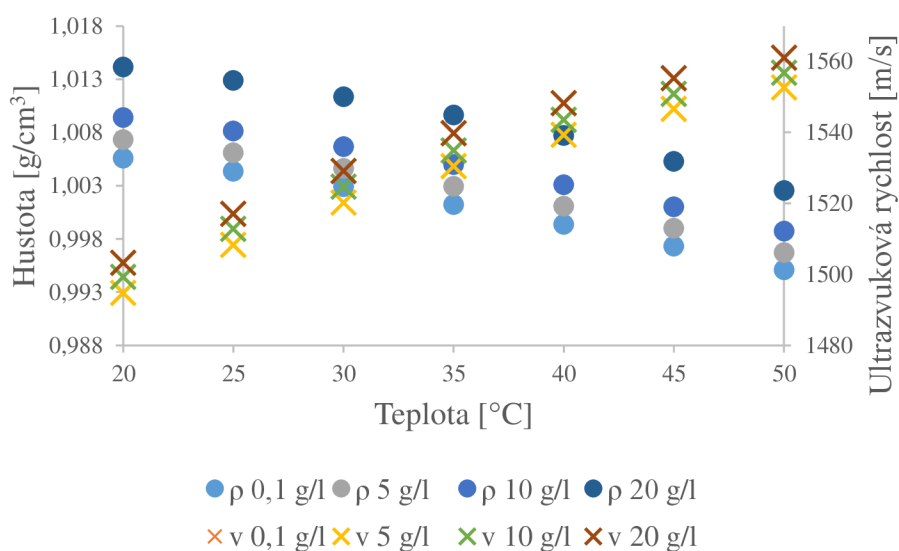
Graf 12: Závislost ultrazvukové rychlosti a hustoty na koncentraci pektátu v chloridu sodném od 0,1 g/l do 20 g/l při teplotě 30 °C a 35 °C.

Pektát v chloridu sodném vykazuje jen málo změn oproti prostředí vodnému. Jak bylo zjištěno při měření na HRUSu je zřejmé, že hustota roztoku chloridu sodného je větší než hustota vody a proto budou hodnoty hustoty posunuty do vyšších hodnot a hodnoty ultrazvukové rychlosti naopak do nižších.

Graf 12 znázorňuje závislost ultrazvukové rychlosti a hustoty na koncentraci pouze pro dvě teploty. Z grafu je zřejmé, že hustota pektátu v chloridu sodném taktéž lineárně roste se zvyšující se koncentrací. Vše je však znovu ovlivněno faktorem teploty, který hodnotu hustoty se zvyšující se teplotou posouvá do hodnot nižších. Platí, že nejnižší měřenou hustotu ($0,994\ 720\ \text{g/cm}^3$) vykazuje vzorek při $50\ ^\circ\text{C}$ o koncentraci $0,01\ \text{g/l}$. Naopak nejvyšší hustota ($1,014\ 131\ \text{g/cm}^3$) je charakteristická pro vzorek o koncentraci $20\ \text{g/l}$ při teplotě $20\ ^\circ\text{C}$.

Současně měřená rychlost šíření se ultrazvuku s rostoucí koncentrací také roste lineárně. Ovšem na rozdíl od vodného prostředí jsou zde výchyly, které naprosto přesně nesplňují lineární trend této závislosti. Nejnižší hodnota ultrazvukové rychlosti ($1493,29\ \text{m/s}$) byla naměřena u vzorku o koncentraci $0,01\ \text{g/l}$ při teplotě $20\ ^\circ\text{C}$. Maximální hodnota ultrazvukové rychlosti ($1561,00\ \text{m/s}$) byla pozorována u vzorku o hmotnostní koncentraci $20\ \text{g/l}$ při teplotě $50\ ^\circ\text{C}$.

I pro pektát v chloridu sodném platí neekvidistantní rozestupy mezi zkoumanými veličinami. Tento rozestup se zvětšuje s rostoucí teplotou. Z tohoto faktu lze usoudit, že pro stejné koncentrace se při zahřívání rozdíly mezi hodnotami hustoty a ultrazvukové rychlosti zvětšují. Pro teploty $20\ ^\circ\text{C}$ a $25\ ^\circ\text{C}$ je tento rozdíl nejmenší a pro teploty $45\ ^\circ\text{C}$ a $50\ ^\circ\text{C}$ je největší.

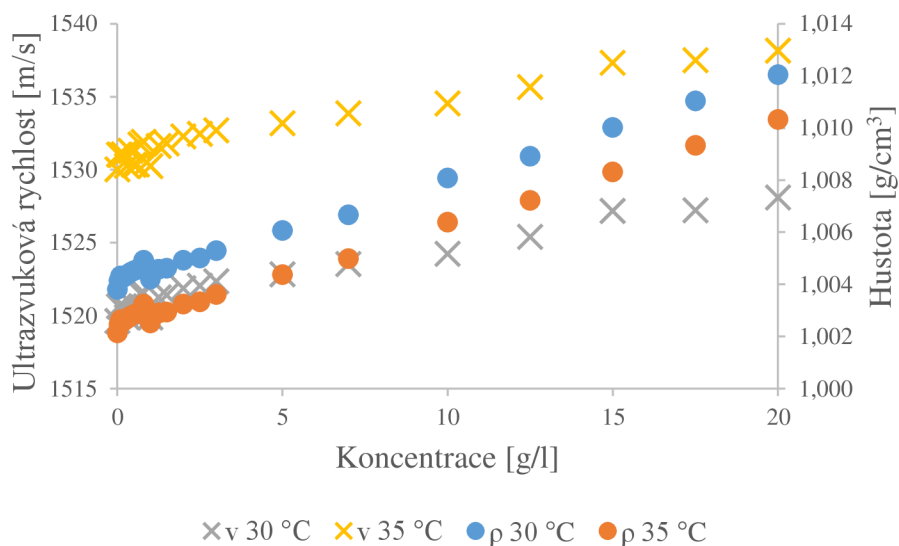


Graf 13: Závislost hustoty a ultrazvukové rychlosti na teplotě v teplotním rozmezí od $20\ ^\circ\text{C}$ do $50\ ^\circ\text{C}$ s krokem $5\ ^\circ\text{C}$ pektátu v chloridu sodném o koncentraci $0,1\ \text{g/l}$, $5\ \text{g/l}$, $10\ \text{g/l}$ a $20\ \text{g/l}$.

Graf 13 znázorňuje, že rychlost šíření ultrazvukové vlny roztokem pektátu v chloridu sodném při zvyšující se teplotě roste a hustota naopak klesá.

3.5.3.3 Pektát v PBS

Měření pektátu v PBS bylo opět provedeno totožně, jako tomu bylo i v předešlých dvou měřeních. Naměřené hodnoty teplotního skenu ultrazvukové rychlosti a hustoty všech vzorků pektátu v PBS o koncentraci 0,1 g/l – 20 g/l jsou vyhodnoceny graficky.

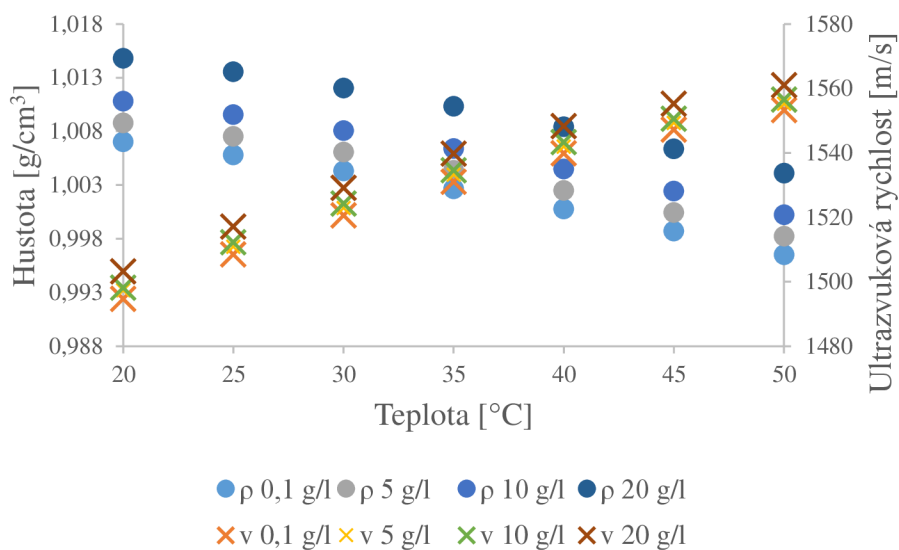


Graf 14: Závislost ultrazvukové rychlosti a hustoty na koncentraci pektátu v PBS od 0,1 g/l do 20 g/l při teplotě 30 °C a 35 °C.

Pektát v PBS se chová podobně jako vzorky pektátu v prostředí chloridu sodného nebo prostředí vodném. Průběh závislosti ultrazvukové rychlosti a hustoty znázorňuje **Graf 14**, který je však pro větší přehlednost omezen pouze na teploty 30 °C a 35 °C. Naměřená ultrazvuková rychlost dosahuje své maximální hodnoty (1 559,59 m/s) u vzorku o koncentraci 20g/l při teplotě 50 °C. Nejnížší hodnotu ultrazvukové rychlosti (1 494,15 m/s) vykazuje roztok o koncentraci 0,01 g/l při teplotě 20 °C. Tyto hodnoty jsou oproti měření v ionizované vodě méně přesné a přesně nedodržují lineárně rostoucí trend této závislosti.

Paralelně měřená hustota pektátu v PBS opět roste s rostoucí koncentrací. Nejvyšší hodnotu hustoty (1,014 802 g/cm³) vykazoval roztok o koncentraci 20 g/l při teplotě 20 °C. Naopak nejnížší hustota (0,995 999 g/cm³) byla naměřena u roztoku o hmotnostní koncentraci 0,01 g/l při teplotě 50 °C. Jelikož je opět hustota PBS větší než hustota vody i chloridu sodného, jsou i hodnoty hustoty a ultrazvukové rychlosti vyšší.

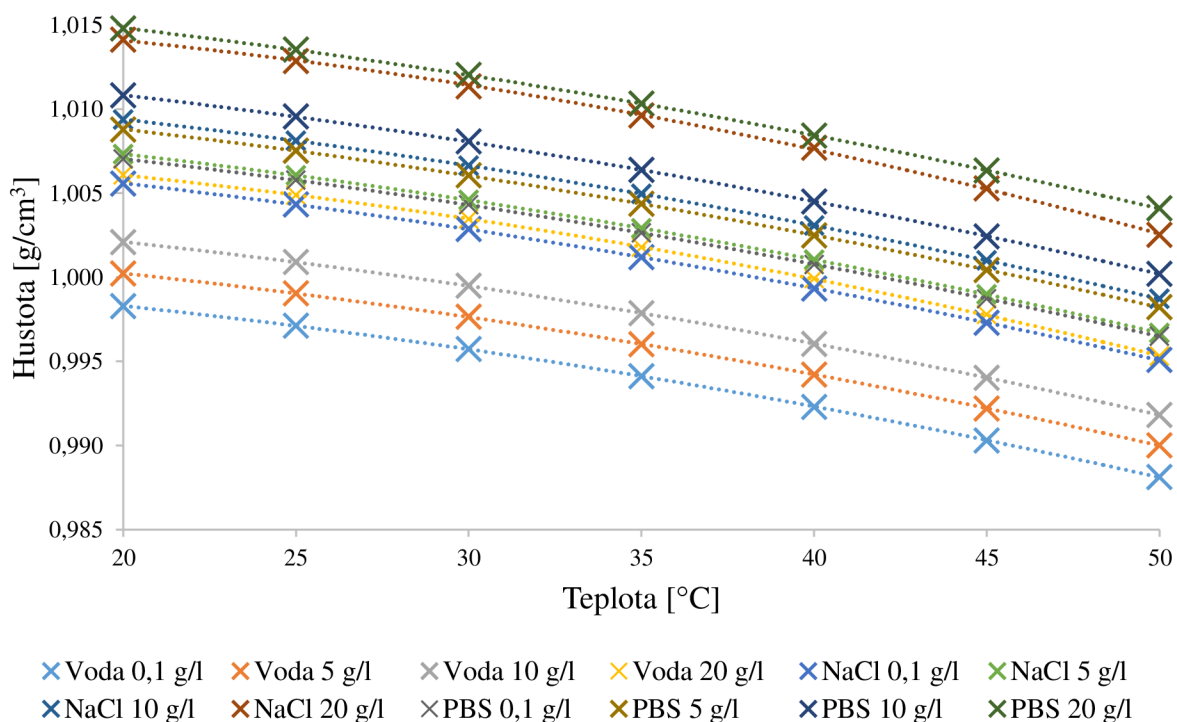
Jako v předchozím měření na denzitometru platí, že jednotlivé teplotní řady nejsou od se ekvidistantně vzdáleny a tento rozestup se zvětšuje s rostoucí teplotou. Pro teploty 20 °C a 25 °C je tento rozdíl nejmenší a pro teploty 45 °C a 50 °C je největší.



Graf 15: Závislost hustoty a ultrazvukové rychlosti na teplotě v teplotním rozmezí od 20 °C do 50 °C s krokem 5 °C pektátu v PBS o koncentraci 0,1 g/l, 5 g/l, 10 g/l a 20 g/l.

Hustota pektátu v PBS klesá lineárně s rostoucí teplotou, což je možné vidět v **Grafu 15**. Oproti tomu rychlost ultrazvukové vlny při zvyšování teploty vzorku pektátu v PBS roste.

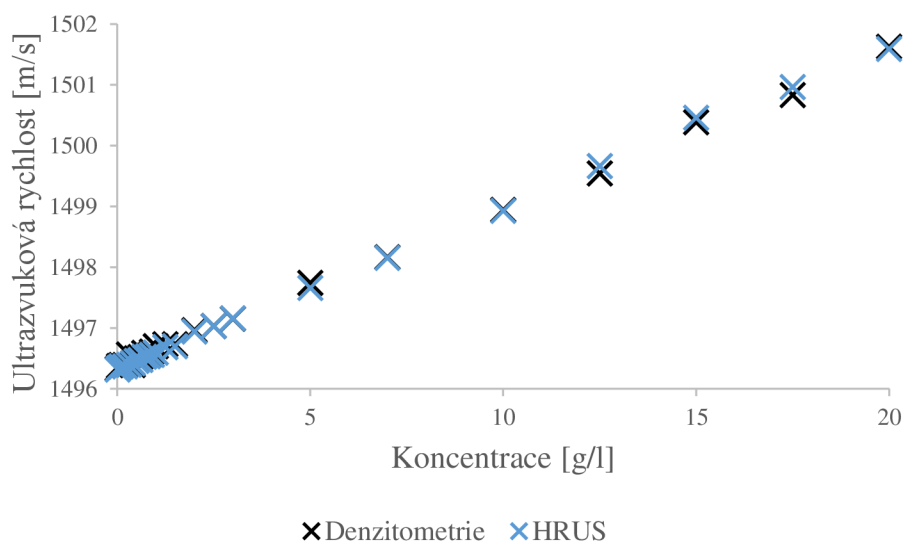
3.5.3.4 Porovnání hustoty pektátu ve vodě s hustotou pektátu v chloridu sodném a pektátu v PBS



Graf 16: Závislost hustoty pektátu ve vodě, v NaCl a PBS o koncentraci 0,1 g/l, 5 g/l, 10 g/l a 20 g/l na teplotě.

Z **Grafu 16** je zřetelně patrné, že pektát v PBS vykazuje nejvyšší hodnoty hustoty, druhé nejvyšší hodnoty vykazuje pektát v chloridu sodném a nejnižší pektát v ultra čisté deionizované vodě. Rozdíl nejnižší naměřené hustoty pektátu ve vodě a pektátu v PBS je $0,007\ 926\ \text{g/cm}^3$. Rozdíl nejvyšších hustot těchto dvou prostředí činí $0,008\ 721\ \text{g/cm}^3$. Jelikož průběh rychlosti ultrazvukové vlny zůstává pro všechna tři prostředí beze změn, tak i rychlost šíření této vlny vzorkem se zvýší v závislosti na hustotě prostředí. Rozdíl mezi nejvyšší hodnotou ultrazvukové rychlosti pektátu v PBS oproti pektátu ve vodě je $13,03\ \text{m/s}$. Naopak rozdíl mezi nejnižší hodnotou rychlosti těchto dvou prostředí činí $11,76\ \text{m/s}$.

3.5.4 Porovnání metod pro stanovení ultrazvukové rychlosti pektátu ve vodě



Graf 17: Porovnání metod při měření ultrazvukové rychlosti na ultrazvukovém spektrometru a denzitometru roztoků pektátu ve vodě.

Graf 17 ukazuje porovnání výsledků měření skutečné ultrazvukové rychlosti na obou přístrojích, které byly v této práci použity. Při měření ultrazvukové rychlosti vzorků koncentrační řady pektátu v ultra čisté deionizované vodě bylo zjištěno, že oba použité přístroje změřily stejnou hodnotu ultrazvukové rychlosti. Rozdíl v použitých metodách je v přesnějších hodnotách ultrazvukové rychlosti (šestnáct desetinných míst) při použití přístroje HRUS. Tuto skutečnost je možné využít při přesnějších měřeních, kdy rozsahy koncentrací analyzovaných roztoků jsou minimální. Avšak svoji výhodu skýtá také použitý denzitometr, který měří velmi přesně hustotu roztoku (šest desetinných míst), která se použije na výpočet stlačitelnosti. Vedle hustoty poskytuje také hodnotu ultrazvukové rychlosti, která prochází vzorkem. Tato hodnota ovšem již není dostatečně přesná pro použití, kdy se koncentrace roztoků liší nepatrně.

4 ZÁVĚR

Jako cíl mé bakalářské práce bylo seznámit se s analytickou metodou ultrazvukové spektroskopie s vysokým rozlišením a jejím využitím v koloidní chemii. Díky doporučení a následnému studiu odborných materiálů byla navrhována koncentrační řada pro měření ultrazvukových charakteristik roztoků pektinu a pektátu při konstantní teplotě. V experimentální části byly zkoumány dva parametry ultrazvuku, a to relativní ultrazvuková rychlost a ultrazvukové zeslabení.

Měření pomocí ultrazvuku s vysokým rozlišením (HRUSem) probíhalo za konstantní teploty 25 °C, která byla udržována termostatem. Pro všechny koncentrační řady pektinu i pektátu byly zvoleny identické koncentrace. Bylo zjištěno, že pro každou koncentrační řadu je charakteristická lineární závislost ultrazvukové rychlosti na koncentraci roztoku. Nejvyšších hodnot bylo dosaženo vždy u nejvíce koncentrovaných roztoků (20 g/l). V prostředích 0,15 M chloridu sodného a PBS byly hodnoty relativní rychlosti posunuty do vyšších hodnot, což bylo způsobeno vyšší hustotou rozpouštědla proti ultra čisté deionizované vodě z přístroje PURELAB. Relativní ultrazvukové zeslabení nevykazovalo znatelný trend.

Při měření relativní ultrazvukové rychlosti pektátu v různých rozpouštědlech bylo zjištěno, že všechny hodnoty jsou v daném prostředí vždy vyšší. Tento fakt je pravděpodobně způsoben vyšší molekulovou hmotností pektátu, což posouvá hodnoty ultrazvukové rychlosti do vyšších hodnot. Největší nárůst oproti hodnotám získaných měření pektinu v daném prostředí byl získán v prostředí chloridu sodného.

Denzitometricky probíhalo měření hustoty a ultrazvukové rychlosti současně. Tento experiment byl prováděn v režimu teplotního skenu od 20 °C po 50 °C s krokem 5 °C. Proměřením tří koncentračních řad bylo zjištěno, že hustota i ultrazvuková rychlost jsou na koncentraci analytu lineárně závislé. Při zvyšování teploty klesá hodnota hustoty pektátu, avšak při zvyšování koncentrace dochází ke zvýšení hodnot hustoty.

Paralelně s hustotou byla proměřena i ultrazvuková rychlost, avšak tato hodnota není tak přesná, jako hodnota naměřená pomocí ultrazvukového spektrometru. Ultrazvuková rychlost roste lineárně se zvyšující se koncentrací roztoku, což potvrdilo již při měření na HRUSu. Rozdílný trend má ultrazvuková rychlost v závislosti na teplotě, kdy s rostoucí teplotou rychlost ultrazvuku roste. Tento fakt je způsoben zvětšováním rozestupu mezi molekulami a rozvolňováním vzájemných vazeb.

Lineární závislosti pektátu byly naměřeny i v prostředí 0,15 M chloridu sodného a PBS. Zde jsou však hodnoty obou veličin zvýšeny, protože samotná rozpouštědla vykazují vyšší hustotu než voda. Pro všechna tři prostředí platí, že při zvyšování teploty dochází ke zvětšení rozdílu ultrazvukové rychlosti a hustoty při stejné koncentraci.

Výsledky měření nachází praktické uplatnění především v popisu teplotního průběhu pektátu, dále využití konkrétních hodnot naměřené hustoty a ultrazvukové rychlosti pektinu i pektátu pro různé koncentrace. Je možné konstatovat, že pektát je teplotně stálý, lze jej tedy použít jako nosič léků, protože při vstupu do organismu nedojde k degradaci či změně struktury vlivem teploty.

V bakalářské práci bylo úspěšně dosaženo všech předem stanovených cílů. Výsledkem této práce je charakterizace pektinu a pektátu, popis chování ultrazvukových vlastností v různých prostředích (voda, NaCl, PBS) dvěma různými metodami. Další částí experimentální práce bylo měření ultrazvukových vlastností a hustoty pektinu. Poté byly tyto dvě látky vzájemně porovnány. V budoucí práci by bylo možné pektin v interakci s hyaluronanem a jeho teplotní sken v této interakci.

5 SEZNAM POUŽITÉ LITERATY

- [1] *Potravinářské aktuality* [online]. 2002 [cit. 2016-05-11]. Dostupné z: http://www.slpk.sk/eldo/pa/pa-01_02.pdf
- [2] J. VELÍŠEK. *Chemie potravin*. Tábor: OSSIS, 1999. ISBN 80-902-3914-5.
- [3] GUILLOTIN, Stéphanie. *Studies on the intra- and intermolecular distributions of substituents in commercial pectins*. Wageningen: Wageningen Universiteit, 2005. ISBN 90-850-4265-8.
- [4] OVODOV, Yu. S. Current views on pectin substances. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*. 2009, vol. 35, issue 3, s. 269-284.
- [5] OPLETAL, Lubomír. *Přírodní látky a jejich biologická aktivita*. Praha: Karolinum, 2010. ISBN 978-80-246-1884-5.
- [6] Ingredients: Pectin. *Sci-toys* [online]. 2016 [cit. 2016-05-08]. Dostupné z: <http://sci-toys.com/ingredients/pectin.html>
- [7] What is pectin: Discovery & History. *International pectin producers association* [online]. 2001 [cit. 2016-05-08]. Dostupné z: http://www.ippa.info/history_of_pectin.htm
- [8] MADAR, Zechariah a Marek SVÍTEK. Dietní a zdravotní aspekty citrusových plodů. *Exotické rostliny* [online]. 2006 [cit. 2016-05-11]. Dostupné z: <http://www.exotickerostliny.cz/cs/rady-a-informace-mainmenu-30/17-dietni-a-zdravotni-aspekty-citrusovych-plod.html>
- [9] VELÍŠEK, Jan a Jana HAJŠLOVÁ. *Chemie potravin*. Rozš. a přeprac. 3. vyd. Tábor: OSSIS, 2009. ISBN 978-80-86659-17-6.
- [10] CARPITA, N.C., M. CAMPBELL a M. TIERNEY. *Plant cell walls*. Dordrecht: Springer, 2001. ISBN 978-940-1006-682.
- [11] Introduction: High resolution ultrasonic spectroscopy. *Ultrasonic Scientific: The wave of the future* [online]. 2007 [cit. 2016-05-08]. Dostupné z: <http://www.ultrasonic-scientific.com/Technology/Technology - intro.htm>
- [12] FAUKNER, Rudolf. *Moderní fyzika: mechanika - vlnění - termika - elektřina a magnetismus - atomistika*. 4. rozš. vyd. V Praze: Josef Hokr, 1947.

- [13] Principles of the ultrasonic measurement. *Ultrasonic Scientific: The wave of the future* [online]. 2007 [cit. 2016-05-08]. Dostupné z: <http://www.ultrasonic-scientific.com/Technology/Technology - principles.htm>
- [14] The ultrasonic wave: Direct probing of intermolecular forces. *Ultrasonic Scientific: The wave of the future* [online]. 2007 [cit. 2016-05-08]. Dostupné z: <http://www.ultrasonic-scientific.com/Technology/Technology%20-%20US%20wave.htm>
- [15] Ultrasonic velocity. *Ultrasonic Scientific: The wave of the future* [online]. 2007 [cit. 2016-05-08]. Dostupné z: <http://www.ultrasonic-scientific.com/Technology/Technology%20-%20velocity.htm>
- [16] PEKAŘ, M., J. KUČERÍK a D. ŠMEJKALOVÁ. Nové možnosti ultrazvukové spektroskopie v koloidní chemii. *CHEMmagazín*. 2005, roč. 15, č. 1, s. 12-14.
- [17] BUCKIN, V., B. O'DRISCOLL a C. SMYTH. Ultrasonic spectroscopy for materials analysis: Recent advances. *Spectroscopy Europe*, 2003, vol. 15, issue 1, s. 20-25.
- [18] Concentration analysis employing ultrasonic spectroscopy. *Ultrasonic Scientific: The wave of the future* [online]. 2007 [cit. 2016-05-08]. Dostupné z: <http://www.ultrasonic-scientific.com/Applications/Apps/concentration.htm>
- [19] Investigating crystallisation kinetics with ultrasonic spectroscopy. *Ultrasonic Scientific: The wave of the future* [online]. 2007 [cit. 2016-05-08]. Dostupné z: <http://www.ultrasonic-scientific.com/Applications/Apps/crystallisation.htm#Application 2: Crystallisation of Lysozyme>
- [20] Conformational changes investigated with ultrasonic spectroscopy. *Ultrasonic Scientific: The wave of the future* [online]. 2007 [cit. 2016-05-08]. Dostupné z: <http://www.ultrasonic-scientific.com/Applications/Apps/conformation.htm#Application 2: Thermal transitions in aqueous carrageenan solution>
- [21] NOVÁČEK, František. *Fytochemické základy botaniky*. Vyd. 2., dopl. Olomouc: Fontána, 2008. ISBN 978-80-7336-457-1.

- [22] E440 - Pektiny. *Zdravá potravina* [online]. 2015 [cit. 2016-05-08]. Dostupné z: <http://www.zdravapotravina.cz/seznam-ecek/E440>
- [23] KARTEL, M. T., L. A. KUPCHIK a B. K. VEISOV. Evaluation of pectin binding of heavy metal ions in aqueous solutions. *Chemosphere*. 1999, vol. 38, issue 11, s. 2591-2596.
- [24] 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.
- [25] KARGEROVÁ, A. a M. PEKAŘ. High-Resolution Ultrasonic Spectroscopy Study of Interactions between Hyaluronan and Cationic Surfactants. *Langmuir*. 2014, vol. 30, issue 40, s. 11866-11872.
- [26] SUSLICK, K. S. a G. J. PRICE. APPLICATIONS OF ULTRASOUND TO MATERIALS CHEMISTRY. *Annual Review of Materials Science*. 1999, vol. 29, issue 1, s. 295-326.
- [27] DOBIÁŠ, Jaroslav. *Technologie zpracování ovoce a zeleniny II*. 1. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2004.

6 SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

HRUS	ultrazvuková spektroskopie s vysokým rozlišením (high resolution ultrasonic spectroscopy)
E 440	označení pektinu jako stabilizátoru potravin
RG-I	rhamnogalakturonan I
RG-II	rhamnogalakturonan II
Hm %	hmotnostní procento (jednotka koncentrace)
Da	dalton, jednotka molekulové hmotnosti
M	mol na litr, jednotka molární koncentrace
pH	záporný dekadický logaritmus aktivity oxoniových iontů
Hz	hertz, jednotka frekvence
g/cm³	gram na centimetr krychlový, jednotka hustoty
g/l	gram na litr, jednotka hmotnostní koncentrace
rpm	otáčky za minutu, jednotka, vedlejší jednotka frekvence
<i>dU</i>	relativní ultrazvuková rychlost
<i>dN</i>	relativní ultrazvukové zeslabení
°C	stupeň Celsia, vedlejší jednotka teploty
<i>c</i>	koncentrace
<i>v</i>	ultrazvuková rychlost
ρ	hustota

7 PŘÍLOHY

Tabulka X 1: Hodnoty hustoty pektátu ve vodě naměřené při 20 °C.

c [g/l]	ρ [g/cm ³]
0,01	0,998235
0,05	0,998237
0,10	0,998280
0,20	0,998301
0,30	0,998526
0,40	0,998417
0,50	0,998449
0,60	0,998484
0,70	0,998565
0,80	0,998591
0,90	0,998609
1,00	0,998654
1,25	0,998781
1,50	0,998787
2,00	0,999107
2,50	0,999222
3,00	0,999469
5,00	1,000216
7,00	1,000914
10,00	1,002086
12,50	1,002982
15,00	1,004331
17,50	1,004931
20,00	1,006081

Tabulka X 2: Hodnoty hustoty pektátu ve vodě naměřené při 50 °C.

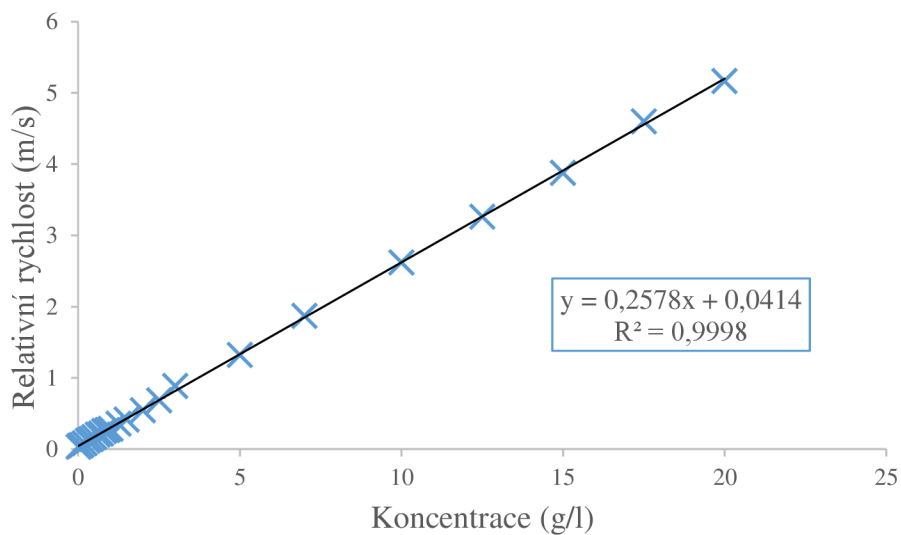
<i>c</i> [g/l]	<i>v</i> [m/s]
0,01	0,988073
0,05	0,988077
0,10	0,988118
0,20	0,988139
0,30	0,988358
0,40	0,988255
0,50	0,988282
0,60	0,988315
0,70	0,988397
0,80	0,988425
0,90	0,988441
1,00	0,988106
1,25	0,988547
1,50	0,988572
2,00	0,988925
2,50	0,989039
3,00	0,989281
5,00	0,990012
7,00	0,990685
10,00	0,991826
12,50	0,992702
15,00	0,994016
17,50	0,994597
20,00	0,995310

Tabulka X 3: Hodnoty ultrazvukové rychlosti pektátu ve vodě naměřené při 20 °C.

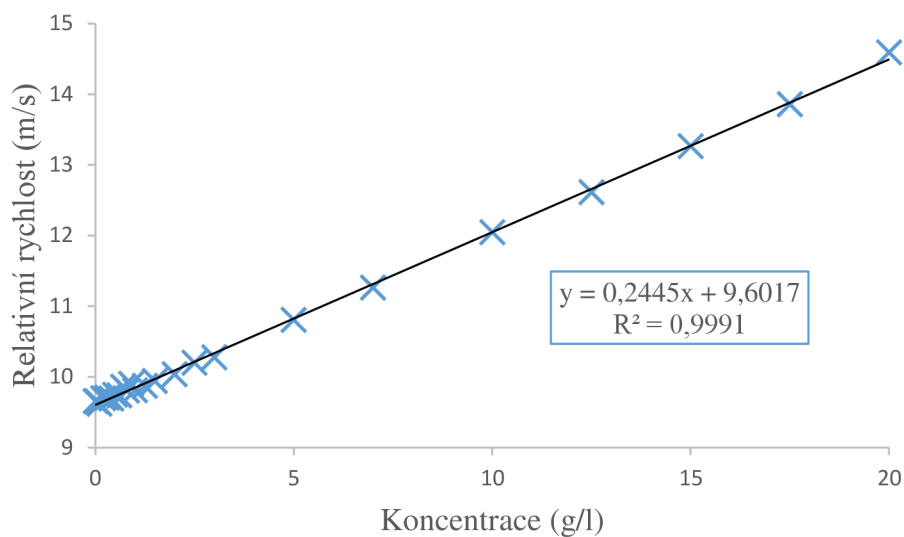
<i>c</i> [g/l]	<i>v</i> [m/s]
0,01	1482,39
0,05	1482,43
0,10	1482,45
0,20	1482,45
0,30	1482,64
0,40	1482,36
0,50	1482,55
0,60	1482,57
0,70	1482,66
0,80	1482,66
0,90	1482,70
1,00	1482,75
1,25	1482,80
1,50	1482,79
2,00	1483,06
2,50	1483,12
3,00	1483,24
5,00	1483,87
7,00	1484,31
10,00	1485,12
12,50	1485,77
15,00	1486,60
17,50	1487,14
20,00	1487,96

Tabulka X 4: Hodnoty ultrazvukové rychlosti pektátu ve vodě naměřené při 50 °C.

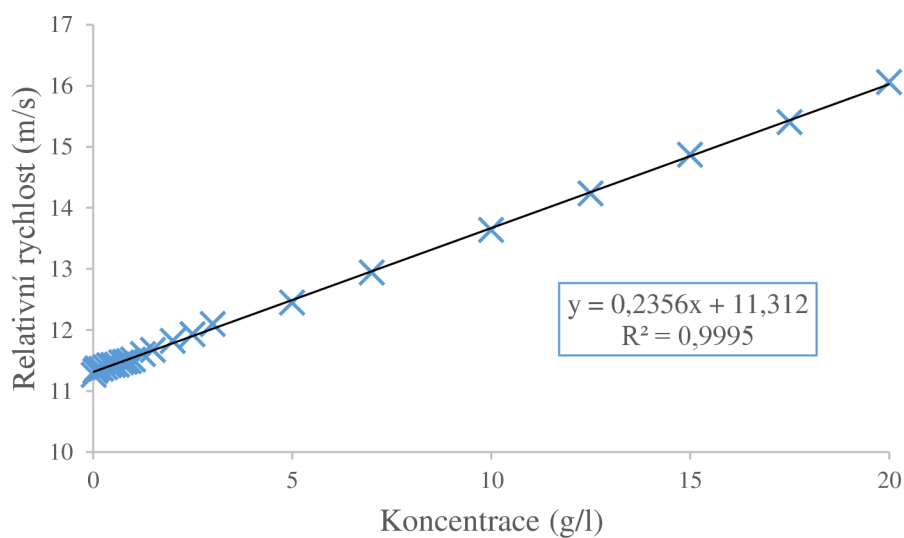
c [g/l]	v [m/s]
0,01	1542,38
0,05	1542,39
0,10	1542,42
0,20	1542,41
0,30	1542,53
0,40	1542,47
0,50	1542,50
0,60	1542,54
0,70	1542,59
0,80	1542,57
0,90	1542,58
1,00	1542,71
1,25	1542,68
1,50	1542,72
2,00	1542,85
2,50	1542,93
3,00	1543,02
5,00	1543,48
7,00	1543,85
10,00	1544,42
12,50	1544,87
15,00	1545,69
17,50	1545,92
20,00	1546,56



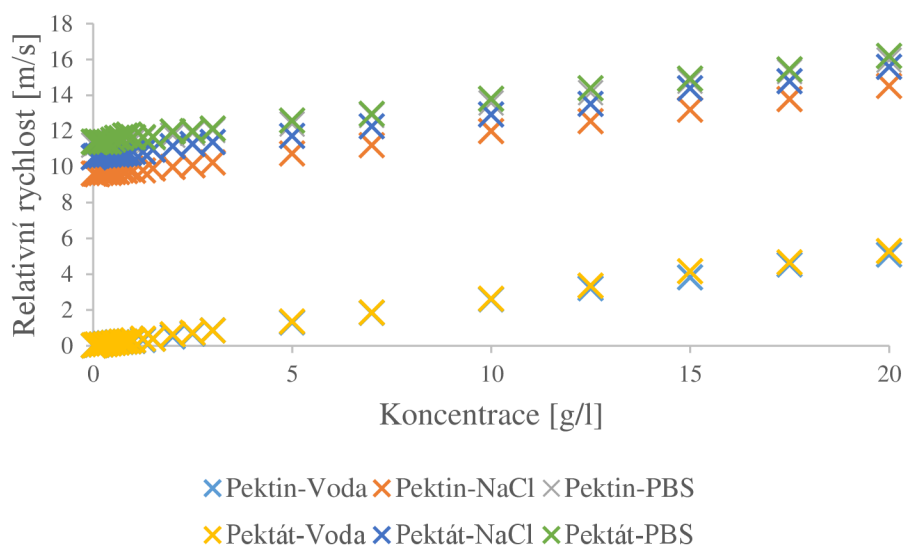
Graf X 1: Závíslost relativní ultrazvukové rychlosti na koncentraci roztoku pektinu ve vodě. (12 193kHz)



Graf X 2: Závíslost relativní ultrazvukové rychlosti na koncentraci roztoku pektinu v chloridu sodném. (12 193kHz)



Graf X 3: Závislost relativní ultrazvukové rychlosti na koncentraci roztoku pektinu v PBS. (12 193kHz)



Graf X 4: Závislost relativní ultrazvukové rychlosti na koncentraci ve všech proměřených koncentračních řadách pektinu a pektátu v různých rozpouštědlech. (11 578 kHz)