

VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ

ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE

FACULTY OF CHEMISTRY

INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

## VLIV PH NA KVANTITATIVNÍ STANOVENÍ ADITIV V NANOVLÁKNECH

EFFECT OF PH ON QUANTITATIVE DETERMINATION OF ADDITIVES IN NANOFIBERS

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

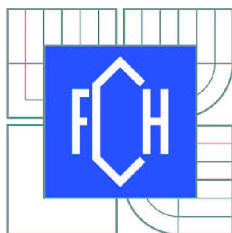
JANA GRUFÍKOVÁ

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Kateřina Knotková, Ph.D.

BRNO 2015



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

## Zadání bakalářské práce

Číslo bakalářské práce:	<b>FCH-BAK0930/2014</b>	Akademický rok: <b>2014/2015</b>
Ústav:	Ústav fyzikální a spotřební chemie	
Student(ka):	<b>Jana Grufíková</b>	
Studijní program:	Chemie a chemické technologie (B2801)	
Studijní obor:	Chemie pro medicínské aplikace (2808R031)	
Vedoucí práce	<b>Ing. Kateřina Knotková, Ph.D.</b>	
Konzultanti:	Shirin Abdulová	

### Název bakalářské práce:

Vliv pH na kvantitativní stanovení aditiv v nanovlákních

### Zadání bakalářské práce:

1. Rešerše – nanovlákná z hyaluronanu, stabilita barviv v závislosti na pH, UV Vis stanovení aditiv,
2. Metody – elektrospinning, stanovení aditiv pomocí UV-Vis spektrofotometrie
3. Experimentální část – příprava nanovláknenných vrstev s aditivou metodou elektrostatického zvlákňování, příprava pufrů, analýza vláknenných vrstev a obsahu aditiv
4. Vyhodnocení výsledků a diskuse

### Termín odevzdání bakalářské práce: **22.5.2015**

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

-----  
Jana Grufíková  
Student(ka)

-----  
Ing. Kateřina Knotková, Ph.D.  
Vedoucí práce

-----  
prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.  
Ředitel ústavu

V Brně, dne 30.1.2015

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

## **ABSTRAKT**

Cílem mé bakalářské práce bylo připravit nanovláknennou vrstvu s obsahem aditiv a kvantitativně stanovit obsah barviva v závislosti na pH. Nanovláknenné vrstvy s aditivou byly připravovány metodou elektrostatického zvlákňování. Analýza obsahu aditiv ve vzorcích byla provedena pomocí UV-VIS spektrofotometrie. Konkrétně se jednalo o erytrozin, eriochromovou čern, riboflavin a brilantní modř. Každé z těchto barviv má jinou chemickou strukturu i náboj. Hodnota pH byla definována užitím pufrů, jmenovitě acetátového pufru o pH 5, fosfátového pufru o pH 7,4 a uhličitanového pufru o pH 10. U erytrozinu a eriochromové černi byl výzkum rozšířen o studium vlivu iontové síly na kvantitativní stanovení těchto barviv.

Bylo zjištěno, že množství stanoveného aditiva závisí na pH i na iontové síle. U každého aditiva je však tato závislost jiná, což potvrzuje předpoklad vlivu chemické struktury a náboje na interakci s polymery a použitými pufrů. Přesnost vyhodnocení je ovlivněna i způsobem zpracování dat.

## **ABSTRACT**

The object of my thesis was to prepare a nanofiber layer with dye additives and to quantify the additive content in dependence on pH. The nanofiber layers with additives were prepared by means of electrospinning. The analysis of the additive content in samples was performed by UV-VIS spectrophotometry. Concretely Erythrosine, Eriochrome Black, Riboflavin and Brilliant Blue were analysed. Each of this colors has different chemical structure and charge. The pH was defined by use of buffers, namely acetate buffer (pH 5), phosphate buffer (pH 7,4) and carbonate buffer (pH 10). For Erythrosine and Eriochrome Black the research was extended to study the effect of ionic strength on the quantitative determination of these dyes.

It was found that the quantity of the determined additive depends on the pH and also on the ionic strength. However, this dependency is different for each additive. This confirms the assumption of influenced chemical structure and charge by interaction with polymers and buffers used in this experiment. The accuracy of evaluation is influenced by the way of data processing.

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

elektrospinning, nanovláknna, aditiva, kyselina hyaluronová

## **KEYWORDS**

electrospinning, nanofibers, additives, hyaluronic acid

GRUFÍKOVÁ, J. *Vliv pH na kvantitativní stanovení aditiv v nanovláknách*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2015. 32 s. Vedoucí bakalářské práce Ing. Kateřina Knotková, Ph.D..

## **PROHLÁŠENÍ**

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

.....  
podpis studenta

## **PODĚKOVÁNÍ**

Na tomto místě bych chtěla poděkovat Ing. Kateřině Knotkové, Ph.D., vedoucí mé bakalářské práce. Děkuji za její velkou pomoc, ochotu, trpělivost a odborné rady. Za pomoc a ochotu nejen při práci v laboratoři bych chtěla poděkovat i jejím kolegyním z laboratoře nanovláken ve firmě Contipro. A v neposlední řadě děkuji také firmě Contipro za to, že mi umožnila tuto bakalářskou práci naměřit a zpracovat.

## OBSAH

1	Úvod.....	5
2	Teoretická část.....	6
2.1	Elektrospinning .....	6
2.2	4SPIN® .....	6
2.3	Kyselina hyaluronová.....	7
2.4	Polyethylenoxid (PEO) .....	10
2.5	Aditiva.....	10
2.5.1	Erytrozin.....	10
2.5.2	Eriochromová čerň .....	11
2.5.3	Riboflavin.....	11
2.5.4	Brilantní modř .....	12
2.6	UV-VIS stanovení aditiv .....	13
2.7	Cíl práce .....	14
3	Experimentální část .....	15
3.1	Použité chemické látky.....	15
3.2	Použité přístroje.....	15
3.3	Pracovní postup .....	15
3.3.1	Vláknění .....	15
3.3.2	Zpracování vzorků.....	17
3.3.3	Příprava pufrů.....	18
3.3.4	Kalibrační řady .....	18
3.3.5	Měření vzorků .....	20
3.3.6	Vyhodnocení .....	20
4	Výsledky a diskuse.....	21
4.1	Erytrozin.....	21
4.2	Eriochromová čerň .....	22
4.3	Riboflavin.....	23
4.4	Brilantní modř .....	25
4.5	Porovnání se stanovením ve vodě .....	25
5	Závěr.....	27
6	Seznam použitých zdrojů .....	28
7	Seznam použitých zkratek.....	31

# 1 ÚVOD

Nanovlákná mají velký potenciál pro použití ve zdravotnictví. I proto jsou předmětem zájmu mnoha vědeckých týmů. Vlákná mohou být použita jako nosiče pro řízené uvolňování léčiv, kryty ran, ultra jemné filtry nebo neprůzvučné materiály.

Pro výrobu nanovláken pro aplikace v tkáňovém inženýrství již bylo použito mnoho syntetických i přírodních polymerů. Ze syntetických jmenujme např. poly( $\epsilon$ -kaprolakton), poly(mléčnou kyselinu), poly(glykolovou kyselinu) a poly(vinylalkohol), z biopolymerů např. kolagen, želatinu a chitosan. Tyto polymery také mohou být vzájemně kombinovány za účelem zlepšení biokompatibility a mechanických vlastností nanovláken z nich připravených [1] nebo k nim mohou být přidána nejrůznější aditiva. Tato aditiva však mohou v závislosti na své struktuře různě interagovat s použitými polymery a v případě jejich následného rozpuštění také s rozpouštědly a pufrů. Interakce pak mohou ovlivnit množství uvolněného aditiva z rozpuštěné nanovláknenné vrstvy (release). Dalšími faktory ovlivňujícími release mohou být kromě složení směsi také vlastnosti použitých polymerů (hydrofobicita, náboj), chemické a fyzikální vlastnosti použitých aditiv, vlastnosti prostředí – pH, teplota, iontová síla, apod. V této bakalářské práci jsem se zaměřila na vliv pH a iontové síly prostředí.

Jestliže se nám podaří popsat závislost množství stanoveného barviva na pH a chování těchto barviv ve zkoumaných vzorcích, mohla by být v budoucnosti tato barviva nahrazena například léčivými látkami. Nanovláknenné vrstvy s obsahem těchto léčivých látek by pak mohly být použity jako kryty ran. Při hojení rány vznikají volné radikály, které jsou kyselé. Proto by mohlo být velmi užitečné najít léčivo, které se bude v kyselém prostředí dobře uvolňovat z dané nanovláknenné vrstvy. Další oblastí využití by také mohla být tzv. suchá kosmetika, kdy se nanovláknenná vrstva s obsahem kosmeticky aktivní látky přikládá na kůži a rozpouští se na ní. Lidská kůže má pH v rozmezí 4 – 6. Proto by i zde bylo vhodné použít tu léčivou látku, která se bude nejlépe uvolňovat v mírně kyselém prostředí.

## 2 TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1 Elektrospinning

Nanovlákná mohou být připravena několika metodami – tažení, melt-blowing, self-assamby aj. Nejrozšířenější metodou je elektrospinning (zvláknování v elektrostatickém poli). Podstatou elektrospinningu je vytváření elektrického pole mezi uzemněným kolektorem (sběračem) a pozitivně nabitým emitorem naplněným polymerním roztokem. Když je elektrostatický náboj vyšší než povrchové napětí polymerního roztoku na vrcholu emitoru, vznikne proud polymeru. Vytažené vlákno se na cestě ke kolektoru dlouží a štěpí, přičemž dochází k velkému nárůstu povrchu, který je spojen s vypařováním rozpouštědel. Při vhodném uspořádání trysky a kolektoru a správné volbě rozpouštědel pak dopadají na kolektor již suchá vlákna, která mají submikronové rozměry a která mohou být sbírána v různých orientacích a vytvářet tak struktury s unikátní skladbou a mechanickými vlastnostmi [2].

### 2.2 4SPIN®

4SPIN® C4S LAB1 je stolní zařízení sloužící právě k přípravě nanovláken z roztoků polymerů metodou elektrospinningu. Jako první umožňuje vytvářet nanovlákná nejen z běžných (syntetických) materiálů, ale také z přírodních polymerů – například kyseliny hyaluronové. Přístroj je vybaven řadou elektrod – kolektorů a emitů. Dle typu zvoleného kolektoru pak lze vytvářet náhodné i pravidelné nanovláknenné vrstvy s různým stupněm uspořádání. Tento princip je možné kombinovat také s metodou elektroblowingu (zlepšení efektivity pomocí proudění vzduchu) nebo elektrospayingu (produkce nano a mikročástic namísto nanovláken) [3]. Obrázek 1 je fotografií 4SPINu, na němž byly vyrobeny nanovláknenné vrstvy potřebné pro měření bakalářské práce.



Obrázek 1: Fotografie přístroje 4SPIN®.

### 2.3 Kyselina hyaluronová

Kyselina hyaluronová (HA; také hyaluronan) je nevětveným přírodně se vyskytujícím polysacharidem tvořeným opakujícími se disacharidovými jednotkami, jež jsou složeny z  $\beta$ -1,4-D-glukuronové kyseliny a  $\beta$ -1,3-N-acetyl-D-glukosaminu. Hyaluronan je hlavní složkou extracelulární matrix ve zralých tkáních, jako např. sklivec lidského oka, synoviální tekutina klouby a vaječníky. Největší množství hyaluronanu je obsaženo v kožní tkáni, kde je přítomen jak v dermis tak epidermis. Díky své biokompatibilitě a biodegradabilitě se HA a její deriváty hojně využívá ve spoustě biolékařských aplikací (tkáňové inženýrství, hojení ran, cílená distribuce biologicky aktivních látek aj.). HA již byla úspěšně elektrostaticky zvlákněna ve směsi s želatinou, polyethylenoxidem a kolagenem [4, 5, 6, 7].

Obecně je velmi těžké elektrostaticky zvláknit vodné roztoky HA. Molární hmotnost přírodní HA se pohybuje v řádech milionů. Klíčovými faktory, které znesnadňují elektrostatické zvláknění roztoků HA, jsou neobyčejně vysoká viskozita a povrchové napětí těchto roztoků [4].

Li a kol. ve svém článku konstatoval, že dalším negativním faktorem je vysoká schopnost hyaluronanu zadržovat vodu. Ta může způsobovat nedostatečné odpaření rozpouštědla v průběhu elektrospinningu vedoucí ke spájení vláken na kolektoru. Autoři zabránili tomuto splývání použitím vodného roztoku ethanolu jako kolektoru. Vodivé spojení bylo zajištěno uzemněnou hliníkovou folií ponořenou do ethanolu. Ethanol byl v tomto experimentu také

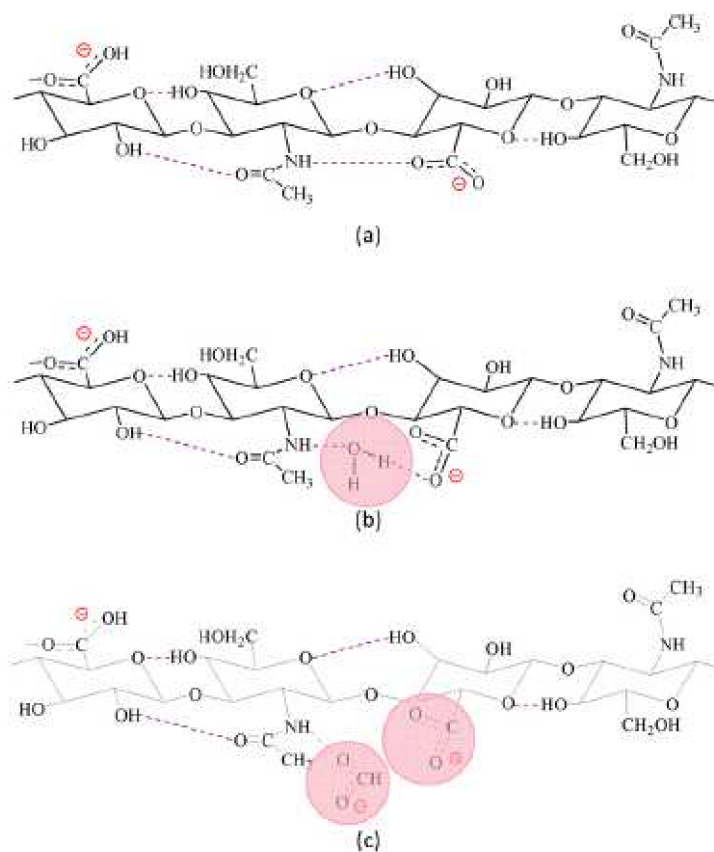


součástí rozpouštědla se záměrem snížit povrchové napětí vlákněného roztoku a zvýšit rychlost odpařování rozpouštědla. HA byla rozpuštěna ve směsi vody a ethanolu v objemovém poměru 9:1. Při zvláknění tohoto roztoku ale vznikalo množství korálkovitých struktur, které nebylo možno potlačit změnou napětí ani vzdáleností trysky od kolektoru [4].

Zmíněný článek dále popisoval výsledky vláknění hyaluronanu sodného (o průměrné relativní molekulové hmotnosti  $M_w = 2$  mil. g/mol) a směsi hyaluronanu a želatiny. V obou případech byla jako rozpouštědlo použita směs *N,N*-dimethylformamidu (DMF) a vody. Bylo zjištěno, že povrchové napětí a vodivost roztoků HA klesaly s rostoucím obsahem DMF. S poklesem povrchového napětí pak došlo ke zlepšení v procesu zvláknění a k vymizení korálkových defektů. Průměry vyrobených vláken HA rostly s rostoucí koncentrací DMF. Důvodem pro použití želatiny byla snaha o zlepšení zpracovatelnosti elektrospinningem a také snaha o dodání bílkovinného charakteru výslednému produktu. Průměr vyrobených nanovláken se pohyboval v rozmezí 190 – 500 nm. S rostoucím obsahem želatiny se průměr vláken zvyšoval a zároveň klesalo povrchové napětí a vodivost vlákněného roztoku [4].

O tři roky později na tento článek volně navázal Xu a kol.. Ten se pokusil zabránit rychlému rozkladu nanovlákněných membrán z HA ve vodě použitím chemického cross-linkingu. Hodnota  $M_w$  vlákněné HA byla 2 miliony g/mol. Jako síťovací činidlo byl použit 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)karbodiimid hydrochlorid (EDC) a směs EDC a *N*-hydroxysukcinimidu (NHS). Roztoky obsahující definované množství HA a želatiny byly zvlákněny. Poté byly vyrobené nanovlákněné membrány ponořeny na 24 hodin do crosslinkingového média (roztoku EDC, resp. EDC/NHS). Po následném promytí a vysušení byly zkoumány jejich vlastnosti. U vyrobených ultratenkých membrán z HA nebylo pozorováno významné zvýšení voděodolnosti. Tyto membrány vykazovaly větší stabilitu ve vodě než ve fosfátovém pufovaném fyziologickém roztoku (PBS). Degradační čas membrán v PBS byl menší než 1 den. U membrán vyrobených ze směsi HA a želatiny se však degradační čas podstatně zvýšil díky vytvoření vazeb CO-NH. S rostoucím obsahem želatiny se zvyšovala stabilita membrán v PBS. Díky této tendenci by mohly být vyráběny membrány pro biomedicínské aplikace, jejichž degradační časy by byly upravovány podle potřeby. Výsledky *in vitro* testů ukázaly, že membrány z HA a želatiny vykazovaly dobrou životaschopnost buněk a specifickou buněčnou adhezí [5].

Ve studii, kterou vydal Liu a kol. byl zkoumán vliv použitého rozpouštědla na schopnost elektrostatického zvláknění kyseliny hyaluronové (s  $M_w = 1$  mil. g/mol) a dále vliv elektrického pole mezi tryskou a kolektorem na ukládání jejích nabitých vláken. Jako rozpouštědlo byla v tomto výzkumu použita destilovaná voda, kyselina mravenčí, dimethylformamid (DMF) a jejich kombinace (konkrétně směs voda/kys. mravenčí, voda/DMF, kyselina mravenčí/DMF a voda/kyselina mravenčí/DMF). Obrázek 2 znázorňuje strukturu HA po rozpuštění ve vodě a ve směsi vody a kyseliny mravenčí [6].



Obrázek 1: Schématické znázornění struktury (a) HA, (b) HA rozpuštěné v destilované vodě a (c) HA rozpuštěné ve směsi vody a kyseliny mravenčí [6].

Přidáním kyseliny mravenčí do roztoku do určité míry vzrostla jeho viskozita (v důsledku rušení vodíkových vazeb mezi jednotlivými molekulami HA a vytvářením nových vazeb s kyselinou mravenčí), iontová koncentrace i vodivost. Dále bylo zjištěno, že DMF může výrazně snížit povrchové napětí a vodivost. Díky redukovanému povrchovému napětí pak lze pozorovat tvorbu proudu kapaliny s relativně nízkou hustotou povrchového náboje. Trvalý a stálý proud polymeru byl v průběhu elektrospinningu pozorován pouze při použití rozpouštědla obsahujícího vodu, kyselinu mravenčí i DMF. Zajištěním optimálních podmínek pak byla vyrobena nanovlákna s průměrnou tloušťkou menší než 100 nm [6].

Kromě porovnávání rozpouštědel se zmíněná studie zabývala také vlivem koncentrace HA na proces elektrospinningu. Byly připraveny roztoky o koncentraci hyaluronanu 0,6; 1 a 1,2 hm. % s rozpouštědlem voda/kys. mravenčí/DMF v hmotnostních poměrech 25/50/25. Při zvláknování pak byly proudy roztoků spojitě při všech těchto koncentracích. Roztok obsahující 1 hm. % hyaluronanu však udržoval tento spojitý proud nejdéle [6].

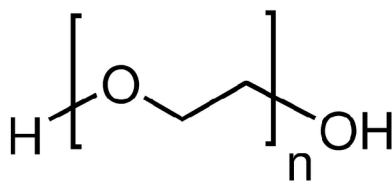
Hyaluronan ve formě elektrostaticky zvlákněných membrán dosud nebyl zcela užitečným. Množství vědeckých skupin se pokoušelo zlepšit zpracovatelnost HA elektrospinningem např. kombinací různých rozpouštědel, vyfukováním horkého proudu vzduchu (elektroblowing) při zvláknování a smíšením HA s jinými polymery. Nevýhodou hyaluronanu je jeho rozpustnost ve vodě. Abychom dostali materiál stálý i ve vodních podmínkách je nezbytné

HA (fyzikálně nebo chemicky) síťovat. Ve většině pokusů pak bylo toto síťování prováděno ve druhém kroku, po zvláknění HA [7].

V roce 2013 publikoval Arnal-Pastor a kol. článek, který se zabýval vývojem nového jednokrokového postupu výroby ve vodě nerozpustných membrán z HA. Roztok hyaluronanu (o  $M_w = 1,5 - 1,8$  mil. g/mol) byl spojen s roztokem divinylsulfonu v hydroxidu sodném, jakožto síťovacího činidla. Při samotném elektrospinningu pak byl použit ještě proud horkého vzduchu. Membrány získané touto metodou byly připravené k použití v buněčné kultuře bez potřeby dalších ošetření. Tato technika umožňuje získat velmi tenké membrány (i v nabobtnalém stavu), které jsou stabilní ve fosfátovém pufovaném fyziologickém roztoku (PBS) po dobu alespoň 28 dnů. Nanovlákná HA byla ukládána na předem připravené membrány z elektrostaticky zvlákněné poly(L-mléčné kyseliny) (PLLA) za účelem získání trvale spojených dvouvrstvých membrán s jednou stranou hydrofobní přilnavou (adherentní) a druhou hydrofilní nepřilnavou. Tyto dvouvrstvé membrány z HA a PLLA mohou být využity např. v aplikacích usilujících o transplantaci buněk na povrchu tkání a o ochranu těchto buněk před vlivy prostředí. Strana tvořená nanovláknem PLLA podporuje uchycení a šíření buněk a může tak být použita jako jejich zásobárna. Naopak strana HA brání adhezi buněk a tím např. může zabránit pooperačním srůstům. Průměrná tloušťka dvouvrstvých membrán, zde získaných po 10 minutách elektrolytického povlékání pro PLLA a 60 minutách pro HA, byla  $235 \pm 40 \mu\text{m}$ . Tato tloušťka je však závislá na délce trvání elektrospinningu [7].

## 2.4 Polyethylenoxid (PEO)

Polyethylenoxid (také polyethylenglykol) je syntetický biokompatibilní netoxický polyether, který je snadno dostupný v širokém rozmezí molekulových hmotností. Jeho vzorec je znázorněn na obrázku 3. Materiály s molekulovou hmotností do 100 000 jsou obvykle označovány jako polyethylenglykoly, materiály s vyšší molekulovou hmotností pak jako polyethylenoxidy. Tento polymer je rozpustný ve vodě i v organických rozpouštědlech [8]. Polyethylenoxid je pak užíván jako nosný polymer při vláknění kyseliny hyaluronové s vysokou i nízkou molekulovou hmotností.



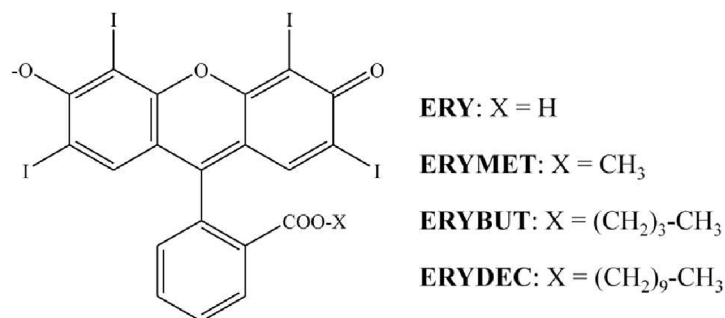
Obrázek 3: Vzorec polyethylenoxidu.

## 2.5 Aditiva

### 2.5.1 Erytrozin

Erytrozin patří mezi xanthanová barviva. Má skvělé fotodynamické vlastnosti. Jeho hydrofilita je však příčinou nízké afinity k buněčným membránám. Po přidání alkylového substituentu na karboxylovou skupinu dojde k vytvoření esteru a dalšímu zvýšení

hydrofobicity [9]. Na obrázku 4 je znázorněn vzorec erytrozinu B a jeho esterových derivátů. V našem případě byl užíván nesubstituovaný erytrozin.

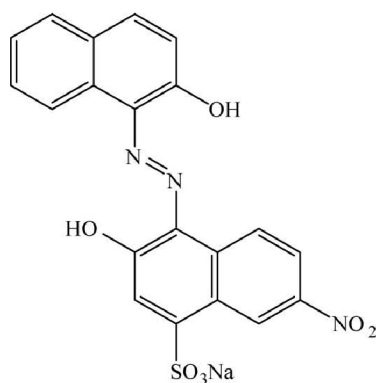


Obrázek 4: Struktura erytrozinu B a jeho esterových derivátů.

### 2.5.2 Eriochromová čern

Eriochromová čern T je používána na barvení hedvábí, vlny a nylonu. Dále je používána jako indikátor při komplexometrických titracích pro stanovení vápenatých, hořečnatých a zinečnatých iontů a pro biologické barvení. Tato látka je nebezpečná a také její degradační produkty, jako např. naftochinon, jsou karcinogenní [10].

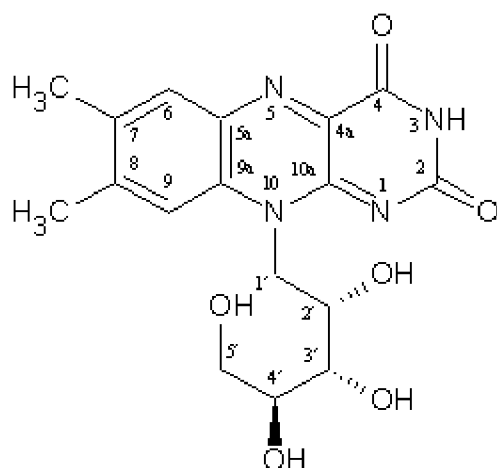
Eriochromová čern T je známým kolorimetrickým reagentem. Má dva ionizovatelné vodíkové atomy ve fenolických skupinách a její roztoky mohou mít v závislosti na pH prostředí tři různá zbarvení. V prostředí o pH nižším než 6 je roztok eriochromové černi fialový, v rozmezí pH od 8 do 12 je modrý a při pH vyšším než 13 má zbarvení oranžové [11].



Obrázek 5: Vzorec eriochromové černi T [12].

### 2.5.3 Riboflavin

Riboflavin je platný název pro 6,7-dimethyl-10-(D-1'-ribityl)isoalloxazin známý také jako vitamín B<sub>2</sub>, laktoflavin, hepatoflavin, ovoflavin nebo vitamín G. V přírodě se vyskytuje jako vitamín, 5'-fosfát (flavinmononukleotid) nebo 5'-adenosindifosfát (flavinadenindinukleotid) [13]. Vzorec riboflavinu je znázorněn na obrázku 6.



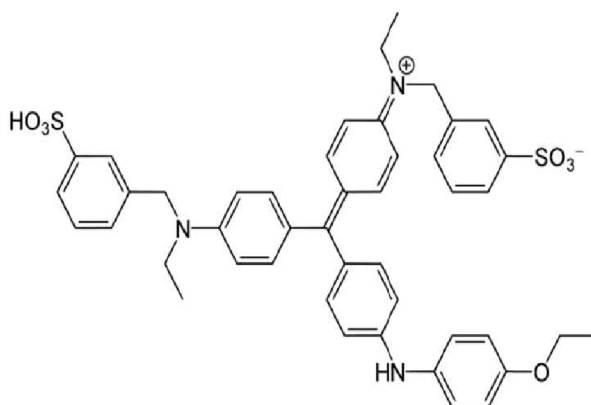
Obrázek 6: Vzorec riboflavinu [13].

Riboflavin je netoxický, nealergenní, ve vodě slabě rozpustný, není drahý a ochotně se vstřebává při orálním podání. Z těla je vylučován v moči. V té pak může být kvantitativně stanovován měřením fluorescence [14]. Riboflavin je citlivý na světlo. Jeho stabilita roste s klesajícím pH [15]. Pokusné vzorky s obsahem riboflavinu by proto měly být uchovávány v chladu a ve tmě [14].

#### 2.5.4 Brilantní modř

Brilantní modř patří mezi trifenylmethanová barviva. Jejich intenzita je způsobena konjugovaným systémem jednoduchých a dvojných vazeb, který je patrný také na obrázku 7. Tato barviva jsou velmi stálá na světle a používají se pro výrobu tiskařských barev a v textilním průmyslu na barvení tkanin [16]. Brilantní modř je také oblíbeným barvivem používaným pro detekci proteinů při gelové elektroforéze [17].

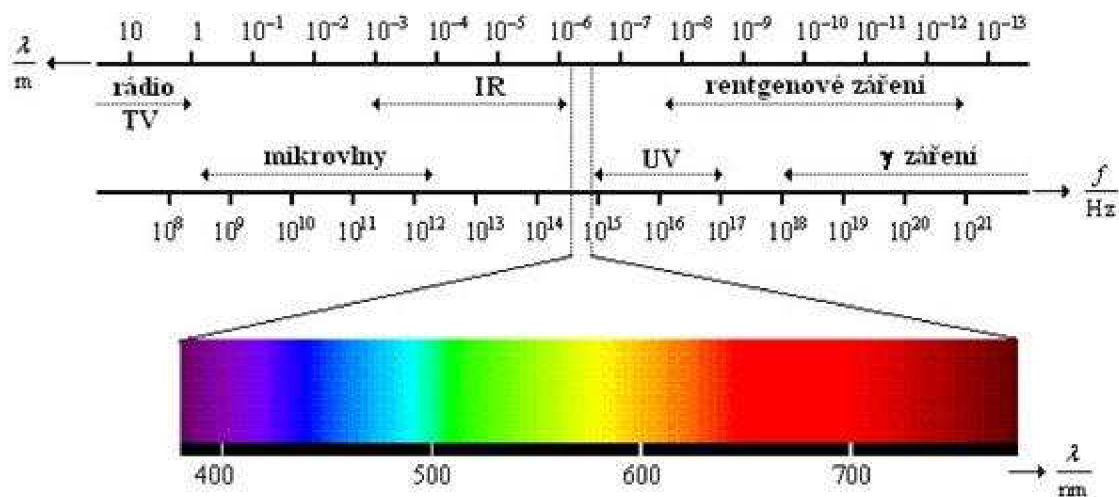
Zbarvení brilantní modři se mění v závislosti na pH jejího roztoku. Brilantní modř má červenou barvu s absorpčním maximem při vlnové délce 470 nm a nižších hodnotách pH. Při pH 1 je barvivo zelené s absorpčním maximem při 620 nm. Při pH větším než 2 je pak toto barvivo jasně modré s maximem při 595 nm [16].



Obrázek 7: Vzorec brilantní modři [16].

## 2.6 UV-VIS stanovení aditiv

Absorpce v ultrafialové (UV) a viditelné (VIS) části spektra koresponduje s přechody mezi energetickými hladinami a poskytuje užitečnou analytickou informaci o organických i anorganických vzorcích [18]. Měřením absorpčních spekter lze získat kvalitativní i kvantitativní informace o analytu obsaženém v měřeném roztoku.



Obrázek 8: Spektrum elektromagnetického záření [19].

Ultrafialová a viditelná část elektromagnetického spektra (obrázek 8) se nachází v oblasti vlnových délek přibližně od 200 do 800 nm, z toho v rozmezí vlnových délek o velikosti 380 – 780 nm se nachází viditelná část spektra [18]. Látky, které absorbují ve VIS oblasti, se jeví jako barevné. Jestliže totiž na danou látku (např. roztok riboflavinu) dopadne paprsek bílého světla, látka tento dopadající paprsek neodrazí kompletní, ale pohltí (absorbuje) z něj záření nacházející se v určitém rozmezí vlnových délek (435 – 480 nm). Oko pak zachytí odražené světlo a rozpozná, které vlnové délky v ní chybí a tedy jakou má látka barvu. Nejedná se však o barvu absorbovaného záření, ale o barvu komplementární (v našem případě žlutou). Vlnové délky náležející jednotlivým absorbovaným a komplementárním barvám se nacházejí v tabulce 1 [20].

Tabulka 1: Absorbované a komplementární barvy [20].

$\lambda$ [nm]	Absorbovaná barva	Komplementární barva
650 - 780	červená	modrozelená
595 - 650	oranžová	zelenomodrá
560 - 595	žlutozelená	purpurová
500 - 560	zelená	tmavočervená
490 - 500	modrozelená	červená
480 - 490	zelenomodrá	oranžová
435 - 480	modrá	žlutá
380 - 435	fialová	žlutozelená

Seskupení atomů, které absorbují elektromagnetické záření, se nazývá chromofor. Chromofory vytváří charakteristické absorpční pásy při specifických vlnových délkách. Jestliže dojde ke strukturálním změnám v chromoforu, změní se také intenzita a umístění příslušných absorpčních pásů [21].

Na absorpční charakteristiky chromoforů má velký vliv přítomnost konjugovaných dvojných vazeb. Molekuly s konjugovanými dvojnými vazbami a dlouhými řetězci absorbují ve viditelné oblasti s vysokým absorpčním koeficientem  $\varepsilon$ . Platí zde pravidlo, že čím delší je chromofor, tím větší je vlnová délka, při které absorbuje a dále, že chromofory s několika konjugovanými dvojnými vazbami mají intenzivní absorpční pásy [18].

Podle tvaru změřeného UV-VIS absorpčního spektra lze odhadnout, jaká je struktura molekuly analytu. Jestliže se v UV oblasti nenachází žádný absorpční pás, lze usuzovat, že daná molekula obsahuje pouze jednoduché vazby nebo izolované dvojně vazby. Aromatické kruhy naopak absorbují silně, a to mezi 200 a 250 nm ( $\varepsilon \sim 1000$ ). Posledním příkladem jsou karbonylové sloučeniny, které slabě absorbují v okolí 300 nm ( $\varepsilon \sim 1$ ) [18].

Základním kamenem kvantitativní analýzy je Bouguer-Lambert-Beerův zákon. V absorpční spektrometrii excitační záření interaguje s atomy nebo molekulami a tím iniciuje jejich energetické přechody. V důsledku těchto interakcí je intenzita excitačního záření zeslabována. Míra zeslabení pak závisí na koncentraci aktivních složek a na délce dráhy, na které interakce probíhají [18]. Obě tyto závislosti vyjadřuje Lambert-Beerův zákon:

$$A = \varepsilon \cdot l \cdot c, \quad (1)$$

kde  $A$  je hodnota absorbance vzorku při specifické vlnové délce  $\lambda$ ,  $\varepsilon$  je molární absorpční koeficient [ $\text{l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ],  $l$  délka optické dráhy v cm a  $c$  je koncentrace analytu ve vzorku v jednotkách [ $\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ].

Molární absorpční koeficient vyjadřuje pravděpodobnost, s jakou analyt absorbuje foton a tím se dostane do excitovaného stavu. Jeho hodnota tedy závisí na vlnové délce elektromagnetického záření. V praxi ji lze dohledat v literatuře nebo určit jako směrnici kalibrační přímky [22].

Z Lambert-Beerova zákona vyplývá, že je absorbance lineárně závislá na koncentraci analytu ve vzorku. Jestliže tedy známe hodnotu molárního absorpčního koeficientu, můžeme změřením absorbance a následným jednoduchým výpočtem určit koncentraci rozpuštěné látky ve vzorku.

## 2.7 Cíl práce

Z literatury vyplývá, že kyselina hyaluronová je zvláknitelný polymer v širokém rozsahu molekulových hmotností. Je vhodným nosičem pro cílenou distribuci látek a řízené uvolňování. Primárním úkolem je připravit nanovákennou vrstvu s obsahem aditiv, která musí být kvantitativně stanovitelná. Na kvantitativní stanovení má vliv celá řada faktorů, patří mezi ně složení směsi, vlastnosti použitých polymerů (hydrofobicita, náboj), chemické a fyzikální vlastnosti použitých aditiv, vlastnosti prostředí – pH, teplota, iontová síla, apod. Cílem bakalářské práce bylo připravit nanovláknennou vrstvu s obsahem modelových aditiv a kvantitativně stanovit obsah barviva v závislosti na pH.

## 3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 3.1 Použité chemické látky

Název	$M_w$	Výrobce
Kyselina hyaluronová	83,2 kDa	Contipro Biotech
Polyethylen oxid	400 kDa	Scientific polymer products, inc.
Erytrozin	879,86 g/mol	Aroco spol. s.r.o.
Eriochromová černě	461,38 g/mol	PENTA s.r.o.
Riboflavin	376,36 g/mol	Sigma-Aldrich
Brilantní modř	825,97 g/mol	Sigma-Aldrich
Kyselina octová 99%	60,05 g/mol	Lach-Ner s.r.o.
Trihydrát octanu sodného	136,08 g/mol	Sigma-Aldrich
Dodekahydrát hydrogenfosforečnanu disodného	358,14 g/mol	Lach-Ner s.r.o.
Dihydrogenfosforečnan sodný	156,01 g/mol	Lach-Ner s.r.o.
Uhličitan sodný	105,99 g/mol	Lach-Ner s.r.o.
Hydrogenuhlíčan sodný	84,01 g/mol	Lach-Ner s.r.o.

### 3.2 Použité přístroje

4SPIN

Spektrofotometr Varian Cary 100 Conc.

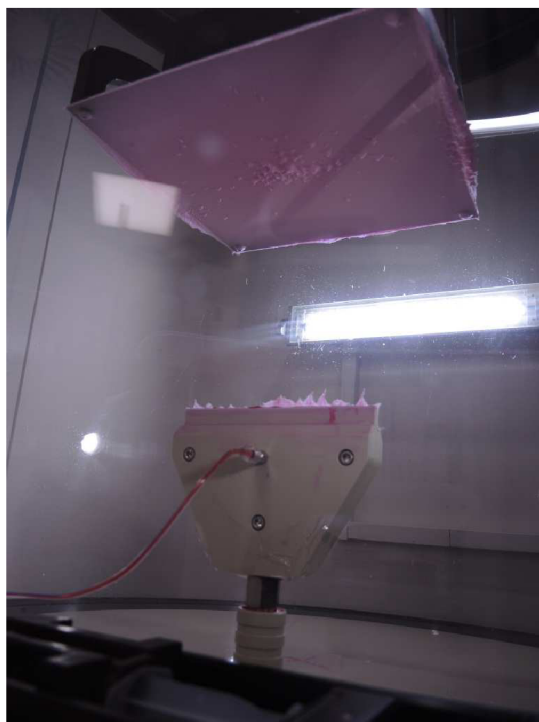
pH metr InoLab 720

### 3.3 Pracovní postup

#### 3.3.1 Vlákňení

Byl vytvořen 6 hm. % roztok kyseliny hyaluronové (HA) a polyethylenoxidu (PEO) v hmotnostním poměru HA/PEO 80/20. K tomuto roztoku bylo přidáno 0,08 hm. % barviva (tedy erytrozinu, eriochromové černi, brilantní modři nebo riboflavinu). Roztok byl umístěn minimálně na 16 hodin na třepačku a po řádném promíchání byl zvlákňován pomocí přístroje 4SPIN®. Jako zvlákňovací elektroda byla použita bezjehlová lineární multitryska (označení E5) a jako sběrná elektroda byl použit statický kontinuální kolektor (označení C1). Obrázek 9 je fotografií emitoru a kolektoru v průběhu zvlákňování. Vzdálenost mezi elektrodami byla 18 cm a napětí mezi nimi bylo udržováno na 59 kV. Podrobnější informace o podmínkách vlákňení ukazuje tabulka 2.

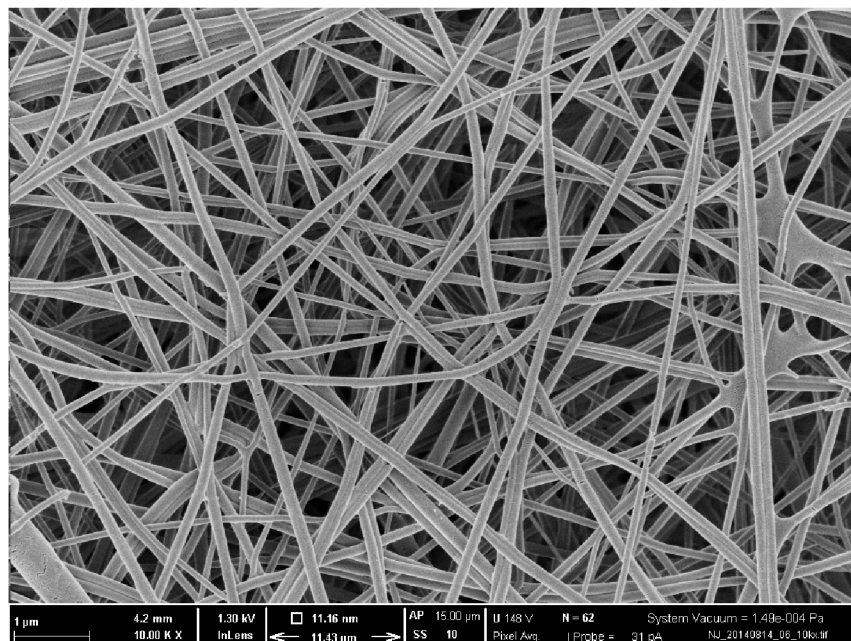




Obrázek 9: Fotografie emitoru a kolektoru 4SPINu při zvlákňování polymerního roztoku HA/PEO s obsahem erytrozinu.

Tabulka 2: Zvlákňovací protokol polymerní směsi HA/PEO s erytrozinem.

<b>Datum zvlákňování</b>	14. 8. 2014
<b>Elektrostatické zvlákňování na 4SPINU</b>	
Teplota [°C]	24 - 26
Vlhkost [%RH]	18 - 29
Zvlákňovací elektroda (emitor)	E5
Sběrná elektroda (kolektor)	C1
Vzdálenost elektrod [cm]	18
Napětí [kV]	59
Dávkování [ $\mu$ l/min]	200
Proudění vzduchu (l/min)	40
Proud [ $\mu$ A]	60 - 70
Podkladová vrstva	x
Kontinuálně/staticky	staticky
Počet vrstev	1
Stáří roztoku	1 den
Metoda měření	Kvantitativní stanovení aditiv v nanovlákněch - stabilizace pH
čas zvlákňování [min]	120
Elektronický mikroskop	ano
<b>Označení vzorku</b>	<b>NJ_20140814_04</b>
<b>Hodnocení:</b>	Vláknění probíhalo dobře.



Obrázek 10: Fotografie zvlákněného vzorku z elektronového mikroskopu.

### 3.3.2 Zpracování vzorků

Vyrobená nanovláknenná vrstva byla sejmuta z kolektoru, zvážena a poté podložena silikonovým papírem, aby z ní bylo možné nastříhat vzorky pomocí kruhových nůžek. Jeden takový vzorek z každé vyrobené vrstvy byl odevzdán na skenovací elektronový mikroskop kvůli kontrole výsledné vrstvy. Obrázek 10 je fotografií z elektronového mikroskopu zvlákněného polymerního roztoku HA/PEO s erytrozinem.

Plocha každého vystřiženého vzorku byla  $4,906 \text{ cm}^2$ . Jeho průměrná hmotnost se pohybovala v rozmezí od 2 do 15 mg v závislosti na druhu zvlákněného polymerního roztoku a na lokaci daného kolečka v polymerní vrstvě, kdy byl nejsilněji navlákněn střed a kraje byly pokryty slabší vrstvou (obrázek 11).



*Obrázek 11: Fotografie připravených nanovláčkových vrstev s obsahem erytrozinu a s obsahem riboflavinu. Na Petriho misce se nachází vzorky nanovláčkové vrstvy s obsahem erytrozinu nastříhané pomocí kruhových nůžek.*

### 3.3.3 Příprava pufrů

Každý vzorek byl následně zvážen a ve vialce doplněn pufrům do celkové hmotnosti 4 g. Pro měření byly namíchány tři pufrů pro tři různé hodnoty pH.

Pro kyselou oblast pH byl připraven pufr z kyseliny octové a octanu sodného. Rozpuštěním 6,81 g octanu sodného v 1 dm<sup>3</sup> destilované vody byl připraven jeho 0,05M roztok. Ten byl smíchán s 0,05M roztokem kyseliny octové, který byl připraven z 1,82 g kyseliny octové 99% a 0,6 dm<sup>3</sup> vody. Hodnota pH připravovaného pufru byla průběžně kontrolována pH metrem. Vzniklý octanový pufr měl pH 5 a objem 1,6 dm<sup>3</sup>.

Druhý pufr vzniklý smícháním 0,1M hydrogenfosforečnanu disodného a 0,1M dihydrogenfosforečnanu sodného měl pH 7,4. Pro měření však bylo třeba i 0,05M pufru. Ten byl připraven smícháním 0,1M pufru s destilovanou vodou v objemovém poměru 1:1.

Pro zásaditou oblast byl připraven pufr o pH 10. Navážka uhličitanu sodného o hmotnosti 2,65 g byla rozpuštěna v 0,5 dm<sup>3</sup> vody. Do takto připraveného roztoku byl postupně přilíván druhý roztok vzniklý rozpuštěním 2,10 g hydrogenuhličitanu sodného v 0,5 dm<sup>3</sup> vody. Přitom byla opět kontrolována hodnota pH pomocí pH metru. Výsledný roztok pufru měl pH 10 a objem 0,8 dm<sup>3</sup>.

### 3.3.4 Kalibrační řady

Pro přípravu kalibračních vzorků byl připraven 0,6 hm. % roztok HA/PEO (80 : 20) ve vodě a dále roztok obsahující 1,2 mg barviva ve 25 g pufru. Tyto roztoky pak byly spolu se samotným pufrům odměřovány do vialek podle údajů v tabulce 3. Každý vzorek kalibrační řady obsahoval vždy 1 ml roztoku HA/PEO, zadané množství roztoku barviva a na celkovou hmotnost 4 g byl doplněn pufrům. Tímto způsobem bylo připraveno celkem 14 kalibračních

řad (vždy jedna řada pro jednu kombinaci barviva a pufru). Jedna z připravených kalibračních řad je vyfotografována na obrázku 12.

Tabulka 3: Hmotnosti jednotlivých složek kalibračních bodů.

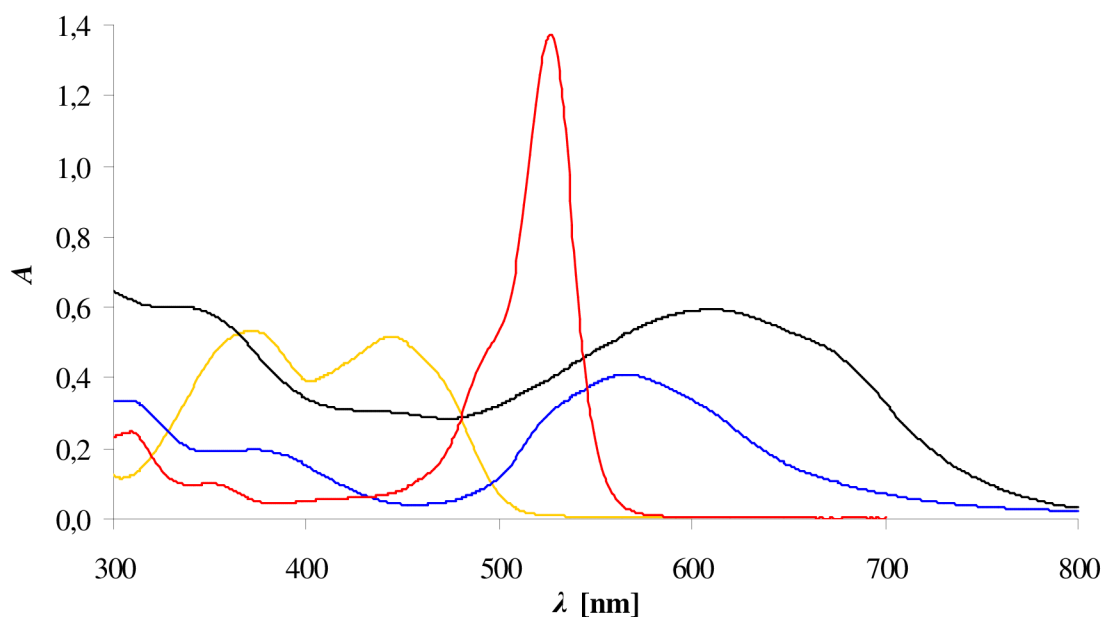
Kalibrační bod	$m_{\text{aditiva}}$ [g]	$m_{0,6\% \text{ HA/PEO}}$ [g]	$m_{\text{pufr}}$ [g]
1	0,00	1	3,00
2	0,25	1	2,75
3	0,50	1	2,50
4	0,75	1	2,25
5	1,00	1	2,00
6	1,25	1	1,75
7	1,50	1	1,50
8	2,00	1	1,00
9	2,50	1	0,50
10	3,00	1	0,00



Obrázek 12: Fotografie jedné z připravených kalibračních řad eriochromové černi.

Pro všechny kalibrační body byla změřena absorpční spektra pomocí UV-VIS spektrofotometru v rozsahu vlnových délek 200 – 800 nm. Při měřeních byla použita křemenná kyveta 1x1x5 cm – délka optické dráhy byla 1 cm. Jako blank byl vždy použit kalibrační bod číslo 1. Naměřená data byla exportována do programu Microsoft Office Excel, kde byla následně i vyhodnocována.

Naměřená data byla vynesena do grafu (ukázka viz obrázek 13) znázorňujícího závislost absorbance ( $A$ ) na vlnové délce  $\lambda$ . V tomto grafu pak byla u každého kalibračního bodu odečtena hodnota absorbance při vlnové délce  $\lambda_{\text{max}}$ , při které křivka dosahovala maximální výšky. Takto zjištěné hodnoty absorbancí kalibračních bodů byly vyneseny do kalibračního grafu proti příslušným koncentracím. Dosazením odečtených hodnot absorbancí vzorků do rovnice regresní přímky byla vypočtena koncentrace barviva ve vzorku.



Obrázek 13: Absorpční spektra jednotlivých barviv při pH 7,4 a koncentraci pufru 0,05 M. Žlutě je označen riboflavin, červeně erytrozin, modře brilantní modř a černě eriochromová čerň.

### 3.3.5 Měření vzorků

Navážka vzorků se pohybovala v rozmezí 2 - 15 mg. Vzorek byl rozpuštěn v pufru (octanový, fosfátový a uhličitanový), protřepán na třepačce a změřen na UV-VIS spektrofotometru. Pro všechny vzorky byla změřena absorpční spektra pomocí UV-VIS spektrofotometru v rozsahu vlnových délek 200 – 800 nm. Naměřená data byla exportována do programu Microsoft Office Excel, kde byla následně i vyhodnocována.

U vzorků obsahujících erytrozin a eriochromovou čerň byla studována také závislost kvantitativního stanovení aditiva na iontové síle pufru. Vzorky byly rozpuštěny ve fosfátových pufrách o pH 7,4 a koncentracích 0,05 M a 0,1 M.

### 3.3.6 Vyhodnocení

Z absorpčního spektra byla odečtena hodnota absorbance při vlnové délce  $\lambda_{\max}$ . Dalšími výpočty z regresní rovnice pak byla zjištěna koncentrace barviva v původní zvlákněné vrstvě a ta byla konečně porovnávána se skutečnou koncentrací barviva v polymerním roztoku.

Pro zpřesnění výsledků byl zaveden ještě druhý způsob odečítání hodnot absorbancí a to pomocí integrace plochy absorpčního pásu. Brilantní modř byla integrována v rozsahu 450 – 800 nm, erytrozin 380 – 600 nm, riboflavin od 300 nm do 525 nm a eriochromová čerň od 455 nm do 800 nm. Výsledná hodnota koncentrace barviva pak byla vztažena na navážku nanovlákněného vzorku.

## 4 VÝSLEDKY A DISKUSE

Byly navlákány čtyři vrstvy nanovlákných materiálů obsahující vždy jednotlivě erytrozin, eriochromovou čern, riboflavin a brilantní modř. Ve zvlákněném materiálu bylo teoreticky přítomno 0,08 hm. % aditiva. Jeho plošná hustota se pohybovala v rozmezí od 0,408 mg/cm<sup>2</sup> do 3,057 mg/cm<sup>2</sup>. Nanovlákná vrstva byla rozstříhána na kolečka o definované ploše 4,906 cm<sup>2</sup>. Poté byly od každého aditiva vytvořeny minimálně 3 sady po cca 10 kusech (1 sada pro jednu kombinaci barviva a pufru), které byly rozpuštěny ve 4 ml pufrů o různém pH a sady vzorků byly proměřeny pomocí UV-VIS spektroskopie. Jednotlivá aditiva budou rozebrána v následujících kapitolách.

### 4.1 Erytrozin

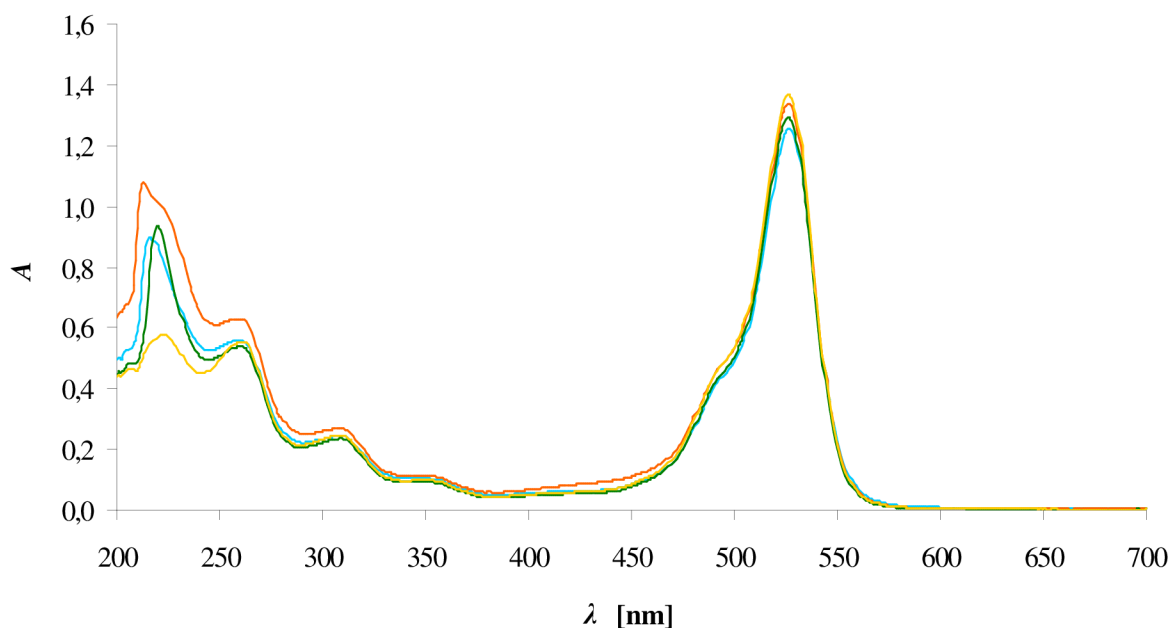
Absorpční spektrum rozpuštěného vzorku s obsahem erytrozinu (obrázek 14) vykazuje 2 výrazné píky. Pík na 219 nm je připisán kyselině hyaluronové. Poloha maxima píku erytrozinu je na 526 nm. Při porovnání absorpčních spekter měřených v různém pH vyplynulo, že změna pH neovlivňuje tvar absorpčního spektra erytrozinu.

Na obrázku 4 vidíme, že je v molekule erytrozinu pouze jedna funkční skupina, která může interagovat s použitým pufrům a s nosným polymerem. Je to karboxylová skupina, jejíž vodíkový atom může být v neutrálním a alkalickém prostředí nahrazen sodným kationtem. V roztoku o kyselém pH tedy molekula neinteraguje s pufrům (nedochází k vázání sodného iontu na karboxyl erytrozinu), a proto nedochází ke stínění a je možné stanovit reálný obsah erytrozinu ve směsi. Jednotlivá stanovená množství pro všechna pH jsou uvedena v tabulce 4.

Experimentálně bylo zjištěno, že lze stanovení erytrozinu ovlivnit změnou iontové síly pufru. S rostoucí iontovou silou totiž klesá množství stanoveného aditiva ve vzorku.

Tabulka 4: Stanovený procentuální obsah erytrozinu v nanovlákných vrstvách v závislosti na metodě stanovení a pH. Data jsou uvedena v hmotnostních procentech.

	obsah erytrozinu [hm. %]	
	výška píku	integrace
<b>pH 5</b>	74,35	79,23
<b>pH 7,4 0,05M</b>	72,76	75,98
<b>pH 7,4 0,1M</b>	59,97	63,55
<b>pH 10</b>	74,02	75,86



Obrázek 14: Absorpční spektra nanovláčkových vrstev obsahujících HA/PEO s erytrozinem po rozpuštění v pufrch o pH 5 (červeně), pH 7,4 a koncentraci 0,05 M (žlutě) a 0,1 M (zeleně) a pH 10 (modře).

V tabulce 4 je také patný rozdíl mezi výslednými hmotnostními procenty vypočtenými metodou odečítání výšek píků a integrace ploch pod píkы (viz kapitola 3.3.6). Integrační metoda se zdá být přesnější (korelační koeficienty kalibračních přímk jsou ve většině případů vyšší v porovnání s metodou odečítání výšek píků). Důvodem je fluktuace hodnot vlnových délek maxim pásů  $\lambda_{\max}$  lišících se o jednotky nanometrů, což stačí ke zpřesnění výsledné hodnoty vypočtené metodou odečítání výšek píků. Další důvod tohoto tvrzení bude dále diskutován v části zabývající se stanovením riboflavinu.

## 4.2 Eriochromová čerň

Eriochromová čerň T je kolorimetrickým reagentem, neboť je její zbarvení závislé na hodnotě pH. Změna pH tedy ovlivňuje i její absorpční spektrum a dochází k posunu  $\lambda_{\max}$ , tedy vlnové délky, při níž je hodnota absorbance maximální (viz obrázek 15). Množství stanoveného barviva je v případě této látky závislé na hodnotě pH.

Z tabulky 5 je patrné, že bylo nejvíce barviva stanoveno v prostředí o pH 5 a nejméně v prostředí o pH 7,4. Příčinou menšího stanoveného množství může být interakce tohoto barviva s pufrы.

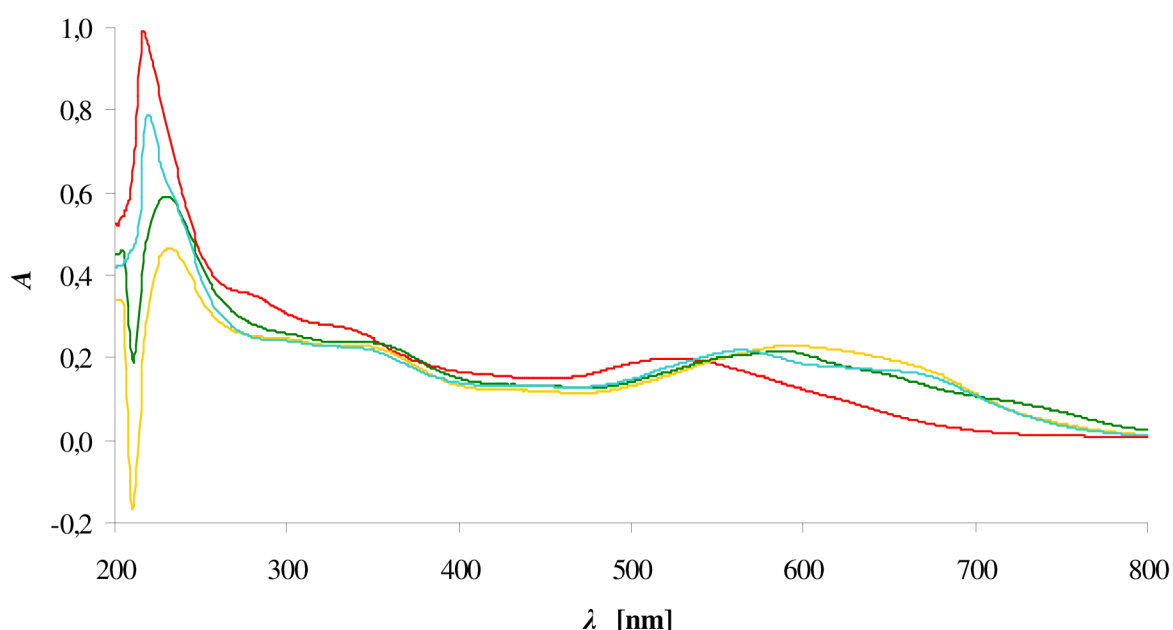
Z práce Linhy [23] vyplývá, že eriochromová čerň jakožto komplexotvorné barvivo interagovala s ionty obsaženými v polymeru a měnila svoje absorpční spektrum. V případě užití pufru jako prostředí dochází k navýšení těchto interakcí navíc se solemi v pufru.

Mnohem méně je stanovení eriochromové černi závislé na iontové síle pufru. Při vyhodnocování pomocí integrace plochy pod píkem bylo při použití pufru o větší koncentraci a tedy vyšší iontové síle detekováno o 0,53 % méně aditiva oproti příslušnému měření s pufrы o nižší koncentraci. Množství stanoveného aditiva tedy pravděpodobně také

v případě tohoto aditiva klesá s rostoucí iontovou silou, protože (jak již bylo zmíněno výše) nabývá možností fyzikálně-chemických interakcí s ionty a tudíž i stínění a posunů maxima.

Tabulka 5: Stanovený procentuální obsah eriochromové černi v nanovlákněných vrstvách v závislosti na metodě stanovení a pH. Data jsou uvedena v hmotnostních procentech.

	obsah eriochromové černi [hm. %]	
	výška píku	integrace
<b>pH 5</b>	90,41	75,99
<b>pH 7,4 0,05M</b>	47,71	56,99
<b>pH 7,4 0,1M</b>	54,39	54,80
<b>pH 10</b>	66,89	67,61



Obrázek 15: Absorpční spektra nanovlákněných vrstev obsahujících HA/PEO s eriochromovou černí a rozpuštěných v pufrách o pH 5 (červeně), pH 7,4 a koncentraci 0,05 M (žlutě) a 0,1 M (zeleně) a pH 10 (modře).

### 4.3 Riboflavin

U riboflavinu bylo dosaženo nejlepších výsledků. V porovnání s ostatními použitými barvivy bylo ve vzorcích v každé ze zkoumaných oblastí pH stanoveno největší množství riboflavinu. Jak ve své práci uvádí Linha, příčinou vysokého stanoveného obsahu aditiva mohla být nižší rozpustnost riboflavinu ve vodě. Částice riboflavinu mohly agregovat do větších zrn, která se snáze vytrhovala s vlákněnými polymery. Další příčinou mohla být interakce silně polárního necyklického zbytku riboflavinu ( $C_5H_{10}O_4$ ) s hyaluronanem [23].

S rostoucí hodnotou pH množství stanoveného riboflavinu klesalo. Molekula riboflavinu obsahuje čtyři hydroxylové skupiny. Hodnota pH prostředí ovlivňuje tvar hydrofobní části molekuly riboflavinu. Proto je stanovení riboflavinu velmi závislé na pH.

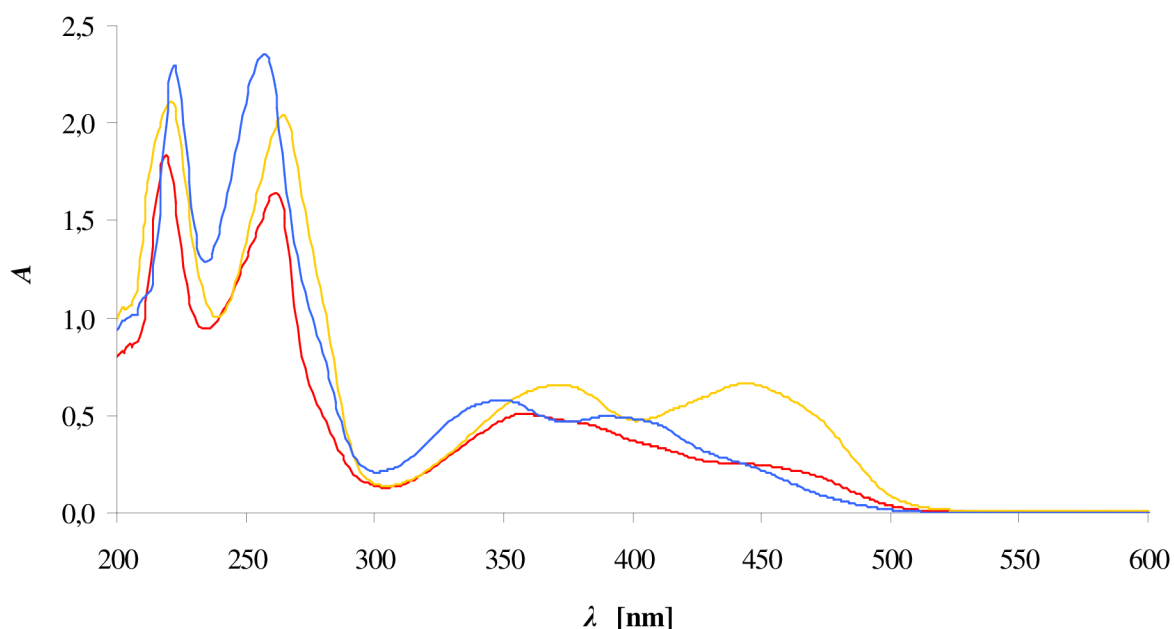


Také u tohoto barviva hodnota pH použitého pufru ovlivňovala tvar absorpčního spektra. Při použití pufru o pH 10 došlo k posunu  $\lambda_{\max}$  asi o 20 nm směrem k vyšším energiím oproti stanovením za použití ostatních dvou pufrů (viz obrázek 16).

V případě riboflavinu lze nejvýrazněji pozorovat vliv způsobu vyhodnocování dat na hodnoty dosažených výsledků. Jak je uvedeno v tabulce 6, při pH 5 bylo metodou odečítání výšek pod píky stanoveno 113,02 hm. % riboflavinu. Důvodem tohoto příliš vysokého výsledku je skutečnost, že se hodnoty  $\lambda_{\max}$  jednotlivých kalibračních bodů i vzorků v této sadě lišily až o 16 nm. Dalším důvodem je, že absorpční spektrum riboflavinu vykazuje pro toto barvivo dva píky. První z nich (na 373 nm) byl u vzorků vyšší, než druhý pík na 444 nm. U absorpčních spekter kalibračních vzorků tomu však bylo naopak. Pro vyhodnocování se pak použily hodnoty absorbancí kalibračních bodů i vzorků při vlnové délce 373 nm. Naproti tomu při vyhodnocování metodou integrace byla integrována plocha pod oběma těmito píky (konkrétně v rozmezí 305 – 525 nm). Tímto způsobem pak byla získána hodnota 99,59 hm. % teoretického maximálního množství.

Tabulka 6: Stanovený procentuální obsah riboflavinu v nanovlákněných vrstvách v závislosti na metodě stanovení a pH. Data jsou uvedena v hmotnostních procentech.

	obsah riboflavinu [hm. %]	
	výška píku	integrace
<b>pH 5</b>	113,02	99,59
<b>pH 7,4 0,05M</b>	94,34	95,86
<b>pH 10</b>	91,45	84,74



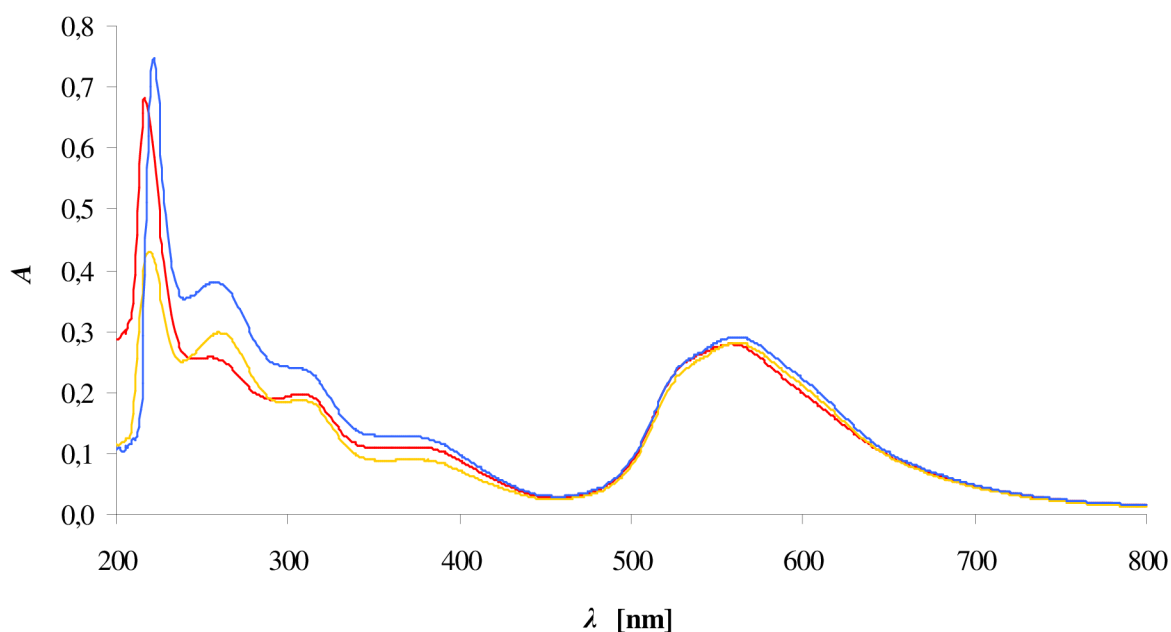
Obrázek 16: Absorpční spektra nanovlákněných vrstev obsahujících HA/PEO s riboflavinem a rozpuštěných v pufrách o pH 5 (červeně), pH 7,4 (žlutě) a pH 10 (modře).

#### 4.4 Brilantní modř

V porovnání s ostatními zkoumanými aditivy bylo brilantní modři ve vzorcích stanoveno nejméně (resp. při pH 7,4 srovnatelně s eriochromovou černí). Jak je vidět na obrázku 17, tvar absorpčního spektra brilantní modři zůstal nezměněný při měření ve všech pufrch. Změna pH ovlivňovala množství stanoveného barviva jen minimálně. Při použití pufrů pro neutrální a alkalickou oblast bylo stanoveno stejné množství barviva. Při použití pufru o pH 5 bylo detekováno asi o 5 % barviva více.

Tabulka 7: Stanovený procentuální obsah brilantní modři v nanovlákněných vrstvách v závislosti na metodě stanovení a pH. Data jsou uvedena v hmotnostních procentech.

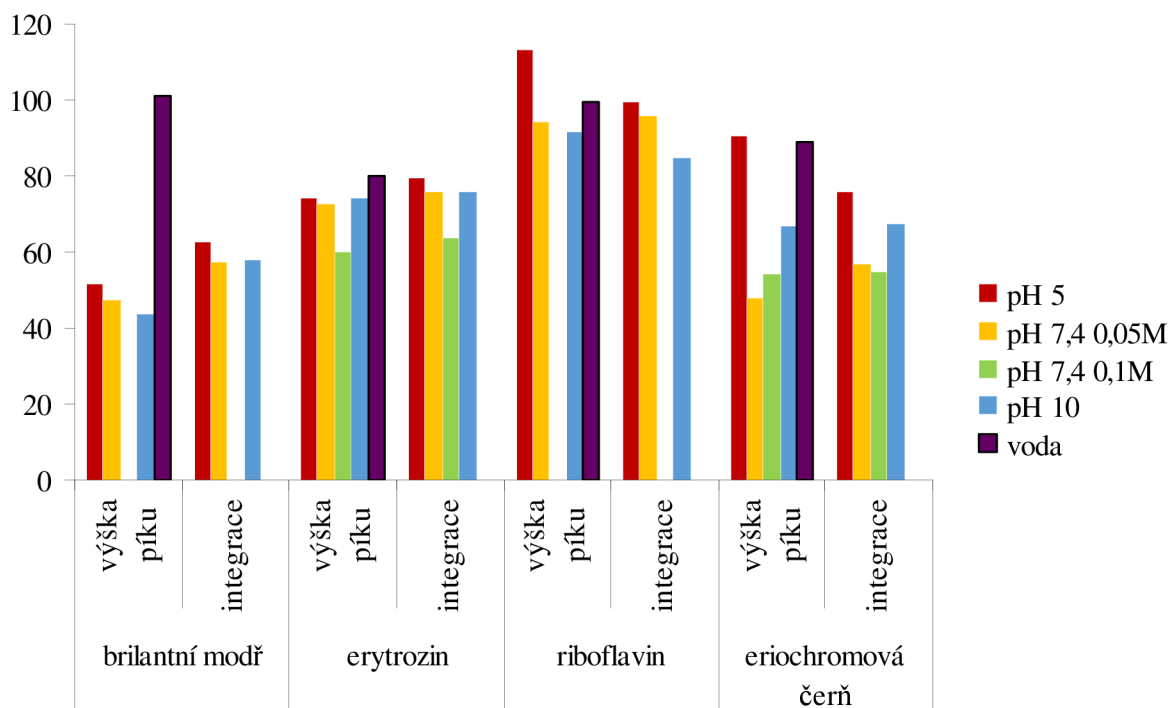
	obsah brilantní modři [hm. %]	
	výška píku	integrace
<b>pH 5</b>	51,34	62,64
<b>pH 7,4 0,05M</b>	47,26	57,62
<b>pH 10</b>	43,83	57,67



Obrázek 17: Absorpční spektra nanovlákněných vrstev obsahujících HA/PEO s brilantní modří a rozpuštěných v pufrch o pH 5 (červeně), pH 7,4 (žlutě) a pH 10 (modře).

#### 4.5 Porovnání se stanovením ve vodě

Linha ve své práci [23] stanovoval obsah stejných aditiv, avšak pouze v destilované vodě. Stanovení tedy nebylo ovlivňováno dalšími ionty a změnou pH. Voda (reverzní osmóza) má nízkou iontovou sílu a malou vodivost. Rozdíl mezi množstvím aditiva stanoveným ve vodě a v pufrch tak ukazuje, jak je dané aditivum závislé na iontové síle rozpouštědla, jak silně interaguje s použitými pufrů a případně také jak pH porušuje interakci aditivum-HA a mění samotnou strukturu aditiva, podobně jako je tomu u acidobazických indikátorů.



Obrázek 18: Sloupcový graf znázorňující závislost kvantitativního stanovení jednotlivých barviv na rozpouštědlu, pH, způsobu vyhodnocení a iontové síle.

V této práci [23] se ve vodě podařilo stanovit nejvíce brilantní modři v porovnání s ostatními použitými barvivy (erytrozinem, riboflavinem a eriochromovou černí). Konkrétně to bylo dokonce 101 % teoretického maxima. Tento výsledek ostře kontrastuje s mými hodnotami, které jsou výrazně nižší. Brilantní modř tedy silně interaguje s pufrů a pravděpodobně je také závislá na iontové síle.

V případě riboflavínu bylo ve vodě stanoveno 99,4 % teoretického maximálního množství. Já jsem v pufru o pH 5 dospěla k velmi podobným výsledkům. S rostoucím pH množství stanoveného obsahu riboflavínu klesá. Vysvětlení je podané v kapitole 4.3, kdy pH ovlivňuje stav barviva a tudíž i jeho chování v roztoku.

Množství eriochromové černi bylo stanoveno [23] na 89 % teoretického výtěžku. Při použití pufrů se výsledky pohybují v rozmezí 57 – 76 %. Jak již bylo diskutováno výše, iontová síla ovlivňuje stanovené množství eriochromové černi. Tento vliv však není příliš výrazný. Proto je rozdíl mezi množstvími barviva stanoveného ve vodě a v pufrách způsoben především vzájemnými interakcemi mezi barvivem a jednotlivými pufrů.

Erytrozinu se při použití vody jako rozpouštědla podařilo stanovit nejméně (80 %). Při použití pufrů jako rozpouštědel pak bylo dosaženo podobných, ale trochu nižších výsledků. Tento rozdíl je pravděpodobně způsoben pouze odlišnou iontovou silou.

Ze sloupcového grafu, označeného jako obrázek 18, je patrné, že největší množství barviva bylo stanoveno vždy při pH 5. Konkrétní stanovené hodnoty se však vzájemně velmi liší. Důvody, proč tomu tak je, jsou diskutovány výše v subkapitolách věnovaných jednotlivým aditivům.

## 5 ZÁVĚR

Předmětem mé bakalářské práce bylo zjistit, jak složení rozpouštědla, jeho pH a iontová síla ovlivňuje kvantitativní stanovení jednotlivých aditiv v připravených nanovlákných vrstvách. Experimentálně bylo zjištěno, že množství stanoveného aditiva opravdu závisí na pH, na zvoleném způsobu vyhodnocení i na iontové síle. Dále bylo zjištěno, že molekuly erytrozinu a riboflavinu neinteragují s pufrů, které byly použity jako rozpouštědla. Naopak eriochromová černá a brilantní modř s nimi interagují silně.

Dále bylo zjištěno, že kvantitativní stanovení erytrozinu je ovlivněno pouze iontovou silou rozpouštědla. Stanovené množství eriochromové černi je závislé na hodnotě pH a méně na iontové síle rozpouštědla. Stanovení riboflavinu lze ovlivnit pouze změnou pH rozpouštědla. Naopak na stanovení brilantní modři má pH jen malý vliv, ale mnohem důležitější roli hrají iontová síla a složení rozpouštědla.

## 6 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] KIM, Jang Ho, Pill-Hoon CHOUNG, In Yong KIM, et al. Electrospun nanofibers composed of poly( $\epsilon$ -caprolactone) and polyethylenimine for tissue engineering applications. *Materials Science & Engineering C* [online]. 2009, roč. 29, č. 5, s. 1725-1731 [cit. 2015-04-29]. DOI: 10.1016/j.msec.2009.01.023.  
Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0928493109000368>
- [2] BARNES, Catherine P., Scott A. SELL, Eugene D. BOLAND, Gary L. BOWLIN a David G. SIMPSON. Nanofiber technology: Designing the next generation of tissue engineering scaffolds. *Advanced Drug Delivery Reviews* [online]. 2007, roč. 59, č. 14, s. 1413-1433 [cit. 2015-04-29]. DOI: 10.1016/j.addr.2007.04.022. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com.ezproxy.lib.vutbr.cz/science/article/pii/S0169409X0700186X>
- [3] O Contipru. *Contipro* [online]. CONTIPRO GROUP, 2011 [cit. 2014-08-27]. Dostupné z: <http://www.contipro.cz/>
- [4] LI, Junxing, Aihua HE, Charles C. HAN, et al. Electrospinning of hyaluronic acid (HA) and HA/gelatin blends. *Macromolecular Rapid Communications* [online]. WILEY-VCH VERLAG GMBH, 2006, roč. 27, č. 2, s. 114-120 [cit. 2015-04-29]. DOI: 10.1002/marc.200500726. Dostupné z: <http://onlinelibrary.wiley.com.ezproxy.lib.vutbr.cz/doi/10.1002/marc.200500726/pdf>
- [5] XU, Shanshan, Junxing LI, Aihua HE, et al. Chemical crosslinking and biophysical properties of electrospun hyaluronic acid based ultra-thin fibrous membranes. *Polymer* [online]. 2009, roč. 50, č. 15, s. 3762-3769 [cit. 2015-04-29]. DOI: 10.1016/j.polymer.2009.06.009. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com.ezproxy.lib.vutbr.cz/science/article/pii/S0032386109004844#>
- [6] LIU, Yang, Dawei FANG, Juan XU, Hongwen ZHANG, Guiping MA a Jun NIE. Effects of solution properties and electric field on the electrospinning of hyaluronic acid. *Carbohydrate Polymers* [online]. 2011, roč. 83, č. 2, s. 1011-1015 [cit. 2015-04-29]. DOI: 10.1016/j.carbpol.2010.08.061. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com.ezproxy.lib.vutbr.cz/science/article/pii/S0144861710007071>
- [7] ARNAL-PASTOR, M., C. MARTÍNEZ RAMOS, M. PÉREZ GARNÉS, M. MONLEÓN PRADAS a A. VALLÉS LLUCH. Electrospun adherent-antiadherent bilayered membranes based on cross-linked hyaluronic acid for advanced tissue engineering applications. *Materials Science & Engineering C* [online]. 2013, roč. 33, č. 7, s. 4086-4093 [cit. 2015-04-29]. DOI: 10.1016/j.msec.2013.05.058. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com.ezproxy.lib.vutbr.cz/science/article/pii/S0928493113003585>
- [8] Poly(ethylene glycol) and Poly(ethylene oxide). *Sigma-Aldrich* [online]. Sigma-Aldrich, 2014 [cit. 2014-08-27]. Dostupné z: [http://www.sigmaaldrich.com/materials-science/material-science-products.html?TablePage=20204110%209\)%20](http://www.sigmaaldrich.com/materials-science/material-science-products.html?TablePage=20204110%209)%20)

- [9] PELLOSI, Diogo Silva, Bianca Martins ESTEVÃO, Camila Fabiano FREITAS, Tayana Mazin TSUBONE, Wilker CAETANO a Noboru HIOKA. Photophysical properties of erythrosin ester derivatives in ionic and non-ionic micelles. *Dyes and Pigments* [online]. 201301, roč. 99, č. 3, s. 705-712 [cit. 2015-04-29]. DOI: 10.1016/j.dyepig.2013.06.026. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com.ezproxy.lib.vutbr.cz/science/article/pii/S0143720813002404>
- [10] MOEINPOUR, Farid, Asma ALIMORADI a Maryam KAZEMI. Efficient removal of Eriochrome black-T from aqueous solution using NiFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> magnetic nanoparticles. *Journal of Environmental Health Science and Engineering* [online]. BioMed Central Ltd, 2014, roč. 12, č. 1 [cit. 2015-04-29]. DOI: 10.1186/s40201-014-0112-8. Dostupné z: <http://www.ijehse.com/content/12/1/112>
- [11] GETTAR, Raquel T., Eduardo A. GAUTIER, Roberto E. SERVANT a Daniel A. BATISTONI. Eriochrome Black T as a post-column reagent for the ion chromatographic determination of rare earths. *Journal of Chromatography A* [online]. 1999, roč. 855, č. 1, s. 111-119 [cit. 2015-04-29]. DOI: 10.1016/S0021-9673(99)00694-9. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com.ezproxy.lib.vutbr.cz/science/article/pii/S0021967399006949>
- [12] BEDOUI, A., M. F. AHMADI, N. BENSALAH a A. GADRI. Comparative study of Eriochrome black T treatment by BDD-anodic oxidation and Fenton process. *Chemical Engineering Journal* [online]. 2009, roč. 146, č. 1, s. 98-104 [cit. 2015-04-29]. DOI: 10.1016/j.cej.2008.05.029. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com.ezproxy.lib.vutbr.cz/science/article/pii/S1385894708003161>
- [13] MACK, Matthias a Simon GRILL. Riboflavin analogs and inhibitors of riboflavin biosynthesis. *Applied Microbiology and Biotechnology* [online]. 2006, roč. 71, č. 3, s. 265-275 [cit. 2015-04-29]. DOI: 10.1007/s00253-006-0421-7. Dostupné z: <http://link.springer.com.ezproxy.lib.vutbr.cz/article/10.1007/s00253-006-0421-7>
- [14] HERRON, Abigail J., John J. MARIANI, Martina PAVLICOVA, et al. Assessment of riboflavin as a tracer substance: Comparison of a qualitative to a quantitative method of riboflavin measurement. *Drug and Alcohol Dependence* [online]. 2013, roč. 128, 1-2, s. 77-82 [cit. 2015-04-29]. DOI: 10.1016/j.drugalcdep.2012.08.007. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com.ezproxy.lib.vutbr.cz/science/article/pii/S0376871612003201>
- [15] LAMBERT, W. E., P. M. CAMMAERT a A. P. DE LEENHEER. Liquid-chromatographic measurement of riboflavin in serum and urine with isoriboflavin as internal standard. *Clinical Chemistry* [online]. 1985, roč. 31, č. 8, s. 1371-1373 [cit. 2015-04-29]. Dostupné z: <http://www.clinchem.org/content/31/8/1371>
- [16] TAHIR, Hajira, Uroos ALAM a Hajira TAHIR. Lignocellulosic: Non-Conventional Low Cost Biosorbent for the Elution of Coomassie Brilliant Blue (R-250). *International Journal of Chemistry* [online]. 2014, roč. 6, č. 2, s. 56-72 [cit. 2015-04-29]. DOI: 10.1605/01.301-0027081325.2014.

- Dostupné z: <http://ccsenet.org/journal/index.php/ijc/article/view/34940/20405>
- [17] KUNDU, Samar K., W. Gerard ROBEY, Priscilla NABORS, Martin R. LOPEZ a Alexander BUKO. Purification of commercial Coomassie brilliant blue R-250 and characterization of the chromogenic fractions. *Analytical Biochemistry* [online]. 1996, roč. 235, č. 2, s. 134-140 [cit. 2015-04-01]. DOI: 10.1006/abio.1996.0105. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com.ezproxy.lib.vutbr.cz/science/article/pii/S0003269796901050>
- [18] KEALEY, D. a P. J. HAINES. 2002. *Analytical chemistry*. Oxford: BIOS, x, 342 p. Instant notes series. ISBN 18-599-6189-4.
- [19] Záření absolutně černého tělesa. 2015. REICHL, Jaroslav a Martin VŠETIČKA. *Encyklopedie fyziky* [online]. [cit. 2015-05-06]. Dostupné z: <http://fyzika.jreichl.com/main/article/view/719-zareni-absolute-cerneho-telesa>
- [20] LÁZNÍČKOVÁ, Alice a Vladimír KUBÍČEK. 2014. *Základy fyzikální chemie: vybrané kapitoly pro posluchače Farmaceutické fakulty*. 3. vyd. V Praze: Karolinum, 168 s. ISBN 978-80-246-2791-5.
- [21] WORKMAN, Jerry a Art W. SPRINGSTEEN. 1998. *Applied Spectroscopy a Compact Reference for Practitioners*. San Diego: Academic Press, 539 s. ISBN 01-276-4070-3.
- [22] HARVEY, David. 2000. *Modern analytical chemistry*. 1st. Boston: McGraw-Hill, xvi, 798 p., 8 p. of col. plates. ISBN 00-711-6953-9.
- [23] LINHA, V. *Homogenita aditiv v nanovláknách*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2014. 44 s.

## 7 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

HA	kyselina hyaluronová/ hyaluronan
DMF	<i>N,N</i> -dimethylformamid
EDC	1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)karbodiimid hydrochlorid
NHS	<i>N</i> -hydroxysukcinimid
PBS	fosfátový pufovaný fyziologický roztok
PLLA	poly(L-mléčná kyselina)
PEO	polyethylenoxid
UV-VIS	Ultraviolet-Visible
$M_w$	relativní molekulová hmotnost