

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

STUDIUM STABILITY BIOPOLYMERŮ POMOCÍ TECHNIK ROZPTYLU SVĚTLA

THE STUDY OF BIOPOLYMERS STABILITY USING LIGHT SCATTERING TECHNIQUES

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE
BACHELOR THESIS

AUTOR PRÁCE
AUTHOR

ZDENĚK KRATOCHVÍL

VEDOUCÍ PRÁCE
SUPERVISOR

Ing. MICHAL KALINA

BRNO 2015



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

Zadání bakalářské práce

| | | |
|-------------------------|---|----------------------------------|
| Číslo bakalářské práce: | FCH-BAK0935/2014 | Akademický rok: 2014/2015 |
| Ústav: | Ústav fyzikální a spotřební chemie | |
| Student(ka): | Zdeněk Kratochvíl | |
| Studijní program: | Chemie a chemické technologie (B2801) | |
| Studijní obor: | Chemie pro medicínské aplikace (2808R031) | |
| Vedoucí práce | Ing. Michal Kalina | |
| Konzultanti: | Ing. Jiří Smilek | |

Název bakalářské práce:

Studium stability biopolymerů pomocí technik rozptylu světla

Zadání bakalářské práce:

- 1) Literární rešerše zabývající se aplikací technik rozptylu světla pro studium stálosti biopolymerů
- 2) Výběr vhodných látek pro účely studia dle zadání
- 3) Optimalizace měřících technik
- 4) Vlastní měření
- 5) Zhodnocení výsledků a závěry

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.

Zdeněk Kratochvíl
Student(ka)

Ing. Michal Kalina
Vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
Ředitel ústavu

V Brně dne 30.1.2015

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

ABSTRAKT

Stabilita vybraných biopolymerů (popř. jednoduchých sacharidů a aminokyselin) byla studována pomocí metod rozptylu světla. Vzorky byly připravovány rozpuštěním dané látky v demineralizované vodě, popř. ve zředěné kyselině octové. Nejdříve byl pozorován vliv jejich rostoucí koncentrace na zeta potenciál a určena optimální koncentrace pro další měření. Posléze byla v různých časových intervalech zkoumána jejich stabilita a molekulová hmotnost při dlouhodobém skladování. Bylo zjištěno, že degradaci podléhaly chitosan, CMC, hyaluronan a alginát sodný, zatímco u BSA byl zaznamenán vzrůst molekulové hmotnosti a zeta potenciálu. Nakonec byly vzorky vystaveny několika různým vnějším vlivům, a sice působení různých teplot, UV záření a zvyšující se iontové síle. Výsledky ukázaly, že výraznější vliv na stabilitu biopolymerů má spíše vyšší teplota. UV záření však použité biopolymery s výjimkou BSA, jehož molekulová hmotnost se značně zvýšila, nijak zvlášť neovlivnilo. S rostoucí iontovou silou zpravidla docházelo k poklesu absolutních hodnot zeta potenciálu a velikosti molekul. Změna molekulové hmotnosti nebyla pozorována.

ABSTRACT

The stability of chosen biopolymers (or simple carbohydrates and amino acids) was investigated using light scattering methods. Samples were prepared by dissolving the substance in deionised water or in diluted acetic acid. Firstly, the effect of increasing concentration on zeta potential was observed and the optimal concentration for the next measurements was determined. Afterwards, the stability and the molecular weight of used substances were studied during long-time storage in different time intervals. It was found out that chitosan, CMC, hyaluronate and sodium alginate were subjected to degradation whereas increase of the molecular weight and the zeta potential was observed in case of BSA. In the end, the samples were exposed to several different external effects, namely the influence of different temperatures, UV radiation and increasing ionic strength. The results showed that rather higher temperature has a significant impact on biopolymers stability. However, used biopolymers were hardly affected by UV radiation except BSA whose molecular weight increased considerably. Decrease of the zeta potential absolute values and the molecular size usually occurred with increasing ionic strength. The change of molecular weight was not detected.

KLÍČOVÁ SLOVA

polysacharidy, proteiny, rozptyl světla, stabilita, molekulová hmotnost, zeta potenciál

KEY WORDS

polysaccharides, proteins, light scattering, stability, molecular weight, zeta potential

KRATOCHVÍL, Z. *Studium stability biopolymerů pomocí technik rozptylu světla*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2015. 54 s. Vedoucí bakalářské práce Ing. Michal Kalina.

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.

.....
podpis studenta

PODĚKOVÁNÍ

Rád bych tímto poděkoval vedoucímu mé bakalářské práce Ing. Michalu Kalinovi za odborné rady, za pomoc při práci v laboratoři a za jeho vstřícný přístup a ochotu. Dále bych chtěl poděkovat své rodině a přátelům za jejich podporu.

OBSAH

| | | |
|----------|--|-----------|
| 1 | ÚVOD | 7 |
| 2 | TEORETICKÁ ČÁST | 8 |
| 2.1 | Biopolymery..... | 8 |
| 2.1.1 | Polysacharidy | 8 |
| 2.1.2 | Proteiny | 10 |
| 2.1.3 | Nukleové kyseliny | 12 |
| 2.2 | Rozptyl světla..... | 12 |
| 2.2.1 | Statický rozptyl světla..... | 12 |
| 2.2.2 | Dynamický rozptyl světla | 16 |
| 2.2.3 | Elektroforetický rozptyl světla..... | 18 |
| 3 | SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY | 23 |
| 4 | EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST | 26 |
| 4.1 | Materiály | 26 |
| 4.1.1 | Sacharidy..... | 26 |
| 4.1.2 | Proteiny a aminokyseliny..... | 26 |
| 4.1.3 | Rozpouštědla..... | 26 |
| 4.1.4 | Ostatní látky | 26 |
| 4.2 | Použité přístroje | 26 |
| 4.3 | Příprava vzorků | 27 |
| 4.3.1 | Příprava vzorků pro koncentrační závislost..... | 27 |
| 4.3.2 | Příprava zásobních roztoků pro časovou závislost | 27 |
| 4.3.3 | Příprava zásobních roztoků pro teplotní závislost | 27 |
| 4.3.4 | Příprava zásobních roztoků pro studium vlivu UV záření..... | 27 |
| 4.3.5 | Příprava zásobních roztoků pro studium vlivu iontové síly..... | 28 |
| 4.4 | Měření | 28 |
| 4.4.1 | Koncentrační závislost | 28 |
| 4.4.2 | Časová závislost..... | 28 |
| 4.4.3 | Teplotní závislost | 29 |
| 4.4.4 | Studium vlivu UV záření | 29 |
| 4.4.5 | Studium vlivu iontové síly | 29 |

| | | |
|----------|--|-----------|
| 5 | VÝSLEDKY A DISKUSE | 30 |
| 5.1 | Koncentrační závislost a optimalizace přípravy vzorků pro další měření | 30 |
| 5.2 | Časová závislost..... | 31 |
| 5.3 | Vliv dalších parametrů..... | 34 |
| 5.3.1 | Teplotní závislost..... | 34 |
| 5.3.2 | Studium vlivu UV záření | 38 |
| 5.3.3 | Studium vlivu iontové síly | 39 |
| 6 | ZÁVĚR..... | 43 |
| 7 | SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY | 45 |
| 8 | SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ..... | 51 |
| 8.1 | Seznam zkratk | 51 |
| 8.2 | Seznam symbolů | 51 |
| 9 | PŘÍLOHY | 53 |

1 ÚVOD

Za počátek zkoumání biopolymerních látek se dá považovat první polovina minulého století, kdy se studovaly především jejich chemické a fyzikální vlastnosti (molekulová hmotnost, dělení směsí atp.). Větší objevy však byly učiněny teprve nedávno. Objasnila se hlavně jejich celková struktura a podrobněji byly popsány jejich metabolické reakce. V dnešní době je pokrok v této oblasti vědy ještě rapidnější, jelikož má výzkum k dispozici moderní měřicí přístroje a techniky, které umožňují hlouběji nahlédnout do daných problematik a lépe jim porozumět.

Jednou z takových technik může být analýza rozptylu světla. Biopolymery totiž tvoří koloidní roztoky a jejich molekuly mají přiměřenou velikost, aby byly schopné dopadající světlo rozptýlit, a to i v případě, že jsou přítomny v nízkých koncentracích. Měření má tu výhodu, že k analýze postačí i malé množství vzorku biopolymeru a že je možné jej realizovat pro široký rozsah molekulových hmotností (0,1 kDa až 10 MDa), velikostí (nm až jednotky μm) i koncentrací.

Pomocí těchto metod se dá určit např. molekulová hmotnost daného polymeru, velikost jeho molekul popř. jejich elektrostatická stabilita. Znalost těchto parametrů je rozhodujícím faktorem při studiu agregačních nebo degradačních procesů. Tyto procesy probíhající v biopolymerech, které jsou často průmyslově využívány, jsou ve většině případů nežádoucí. Mohou totiž ovlivnit čistotu, vlastnosti a výnos konečného produktu nebo mohou v oblasti výzkumu vést k nesprávným výsledkům.

Cílem této práce je především prozkoumat časovou stálost vybraných biopolymerů. Jednoduché sacharidy a aminokyseliny jsou zde použity hlavně pro srovnání a nejsou hlavním předmětem této práce. V neposlední řadě je zde nutné prostudovat i jiné vlivy na stabilitu těchto látek, např. rostoucí koncentraci, teplotu, UV záření nebo iontovou sílu.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Biopolymery

Biopolymery jsou makromolekulární sloučeniny s přesně definovanou prostorovou konfigurací. Jedná se o metabolické produkty živých organismů a jsou složeny ze stejných či různých nízkomolekulárních látek, tzv. stavebních jednotek. Díky jejich struktuře se dají považovat za biodegradovatelné a jsou nedílnou součástí koloběhu látek v přírodě. V dnešní době se rozlišují tři základní typy biopolymerů [1]:

1. polysacharidy
2. proteiny (bílkoviny)
3. nukleové kyseliny.

2.1.1 Polysacharidy

Struktura a vlastnosti

Polysacharidy jsou biopolymery složené z několika desítek až tisíců monosacharidových stavebních jednotek, obsahujících obvykle pět až šest uhlíků, nebo jejich derivátů. Jednotlivé monosacharidové jednotky jsou navzájem kovalentně spojeny O-glykosidickou vazbou, zpravidla v poloze 1→4 nebo 1→6. Podle toho, zdali jsou polysacharidy tvořeny jedním nebo více typy monomerů, se dělí na homopolysacharidy (též homoglykany) a heteropolysacharidy (též heteroglykany). Ačkoliv lze vytvořit nepřeberné množství možných kombinací mono- a disacharidů, v přírodě se nachází pouze okolo 300 druhů polysacharidů, z nichž nejčastější jsou homopolysacharidy z D-glukosy, zvané glukany. Ke kondenzaci u nich může dojít s –OH skupinou jakéhokoliv uhlíkového atomu, a to ve formě α - i β -anomerů [1].

Primární struktura polysacharidů je dána prostorovou konfigurací a konformací jednotlivých monomerních stavebních jednotek a také jejich pořadím (sekvencí). A protože glykosidická vazba může vznikat takřka na jakémkoliv –OH skupině, jsou polysacharidy schopny utvářet dva základní typy sekundární struktury. Jedná se o tzv. natažený pás (lineární struktura) a šroubovici – helix (rozvětvená struktura). Natažený pás je stabilizován vodíkovými můstky mezi –OH skupinou na třetím uhlíkovém atomu a kyslíkovým atomem v pyranosovém (furanosovém) cyklu. Jde o ideální konformaci pro vznik vláken (např. celulóza), při čemž jednotlivé rovnoběžné pásy mohou být k sobě vázány vodíkovými můstky. Šroubovice, zpravidla levotočivé, dosahují různých rozměrů. Např. u glukanu jeden závit obsahuje 6 až 8 monosacharidů. Helixy jsou stabilizovány nejen vodíkovými můstky, ale i přítomností nesacharidových molekul vyskytujících se uvnitř šroubovice. Takovým příkladem může být amylopektin.

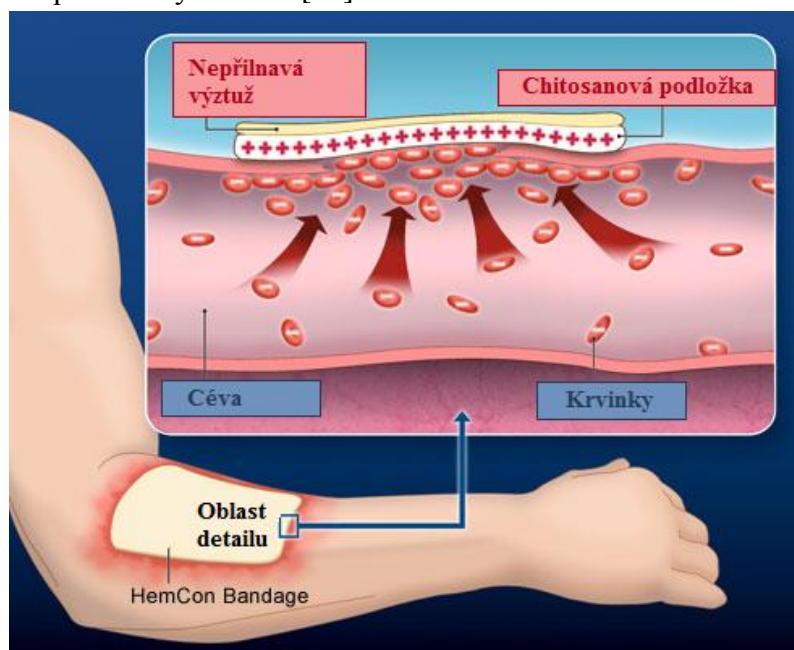
Rozložením a kombinací rozličných typů sekundárních struktur vznikají někdy i terciární struktury. Ve většině případů však dochází k větvení polysacharidových řetězců, což znemožní tvorbu sekundárních a terciárních struktur a naopak dává vznik prostorově síťovaným „stromovým“ strukturám [1], [2].

Společnou vlastností všech polysacharidů je tvorba koloidních soustav, viskózních kapalin či gelů ve vodných roztocích [3]. Polysacharidy tvoří až z 90 % sušinu rostlin, u živočichů jsou to pouze 3 %. Mohou mimo jiné obsahovat nesacharidovou složku, a tak se vyskytují i ve formě glykoproteinů nebo glykolipidů [1].

Využití

Polysacharidy nalézají široké využití v různých odvětvích spotřebního průmyslu i medicíny. Mezi nejběžněji používané patří např. celulósa, chitosan, hyaluronan, algináty aj. Celulósa je hlavní součástí papíru, vaty a obvazových či jiných materiálů v lékařství (např. hemostatika, tkáňová lepidla). V práškovité formě se používá jako zahušťovadlo v potravinářství [4], [5]. Z celulósy lze rovněž poměrně snadno vytvořit její deriváty, z nichž průmyslově nejvýznamnější jsou karboxymethylcelulósa (CMC), methylcelulósa (MC), ethylcelulósa, oxycelulósa, acetát celulósy a nitrocelulósa. Karboxymethylcelulósa se díky velké viskozitě jejích vodných roztoků a schopnosti vázat a zadržovat vodu uplatňuje jako zahušťovadlo a stabilizátor při výrobě čistících a kosmetických přípravků, v potravinářském průmyslu, jako pojivo pak ve farmaceutickém a papírenském průmyslu, při výrobě textilií a obvazových materiálů. Přidává se také do nátěrových hmot [6]. Využití methylcelulósy spočívá opět ve vysoké viskozitě jejích vodných roztoků a pěnicích vlastnostech. Proto se přidává do hygienických prostředků a kosmetiky [7], [8]. Ethylcelulósa se užívá především pro řízené uvolňování léčiv [9], ale také při výrobě izolačních fólií a nátěrů. Oxycelulósa a acetát celulósy nalézají podobná uplatnění jako předchozí tři uvedené deriváty a nitrocelulósa se přidává do střelného prachu, laků na dřevo či lepidel [4].

Dalším významným polysacharidem je chitosan, vyráběný alkalickou deacetylací chitinu. Díky obsahu volných aminoskupin má větší biologickou aktivitu než samotný chitin [10]. Jelikož je schopen vázat těžké kovy a jiné škodlivé látky, bývá často používán k čištění odpadních vod [11]. Ve farmaceutickém průmyslu nachází své uplatnění jako doplněk stravy pro redukci obsahu tuku a cholesterolu v těle a v potravinářství jako konzervant či zahušťovadlo [12]. Nejvíce se využívá v biomedicínských aplikacích. Zprvů slouží jako obvazový materiál s hemostatickými účinky (viz Obr. 1), který zvyšuje účinnost hojení ran a popálenin mimo jiné i svými antimikrobiálními schopnostmi [13], [14]. Zadržuje se z něj připravují enkapsulační materiály a nosiče, do nichž se inkorporují léčiva, která jsou posléze uvolňována do poškozených tkání [12].



Obr. 1: Princip zástavy krvácení pomocí chitosanového krytu [45]

Algináty mají velký význam ve farmacii (tvoří např. povrchový obalový materiál tablet léků) [15], při výrobě obvazů pro hojení ran [16] a v kosmetice [17]. Tyto biopolymery se často přidávají do různých mléčných výrobků, omáček, pudinků, popř. polotovarů ve formě zahušťovadel, stabilizátorů či emulgátorů pro zlepšení konzistence potravin [17], [18]. Podobné potravinářské využití jako algináty mají i pektiny a arabská guma [19].

Neméně významným polysacharidem je kyselina hyaluronová (HA). Její aplikace spadájí především do oblasti medicíny a kosmetiky. Je jednou z hlavních složek očního sklivce, a proto se používá v oční chirurgii. Rovněž se přidává do očních a nosních kapek [20]. V plastické chirurgii slouží především k výplni kloubů, kde brání opotřebením chrupavek [21]. Využívá se rovněž ve formě hydrogelů v obvazových materiálech, kde urychluje hojení ran [22], a v podobě nosičů, jejichž funkcí je cílená distribuce a uvolňování léčiv v tkáních [23]. V kosmetice zpravidla bývá součástí různých pleťových vod a hydratačních krémů [20].

2.1.2 Proteiny

Struktura a vlastnosti

Společně s nukleovými kyselinami jsou proteiny (bílkoviny) hlavními složkami soustav živých organismů, protože v nich zajišťují základní životní funkce a pochody. Jako proteiny lze definovat makromolekuly sestávající nejméně z jednoho polypeptidového řetězce o molekulové hmotnosti v řádech tisíců až milionů Daltonů [24]. Daná bílkovina může být buď monodisperzním biopolymerem, což znamená, že se jedná o soubor molekulárních celků stejné molekulové hmotnosti, anebo polydisperzním biopolymerem, tedy polymerem se soubory molekul o rozdílné molekulové hmotnosti [25].

Polypeptidové řetězce jsou složeny z aminokyselinových monomerních jednotek spojených peptidickými vazbami do lineárního sledu, označovaného jako sekvence aminokyselin. Je rovněž důležité si uvědomit, že proteiny zaujímají určitou konformaci, tedy uspořádání atomů molekuly v prostoru. Tato konformace se ovšem může měnit díky vnějším podmínkám prostředí (např. změna pH, iontové síly, teploty či vazby ligandu na receptor), což má obrovský význam ve fyziologii živých organismů.

Stejně jako u polysacharidů se i u proteinů rozlišuje jejich primární, sekundární, terciární, popř. kvartérní struktura. Primární strukturu bílkovin tvoří lineární sekvence aminokyselin v polypeptidových řetězcích, pro něž je charakteristické, že na uhlíku je jeden konec řetězce tvořen skupinou $-\text{COOH}$ a druhý konec skupinou $-\text{NH}_2$. Jsou v ní obsaženy informace potřebné pro tvorbu dalších struktur proteinů a realizaci jejich biologických funkcí.

Sekundární struktura bílkoviny je chápána jako uspořádání polypeptidového řetězce do α -šroubovice nebo β -struktury. K tomuto uspořádání dochází při procesu zvaném sbalování proteinu, kdy se polypeptidový řetězec vlivem nekovalentních vazeb (např. iontových vazeb mezi $-\text{NH}_2$ a $-\text{COOH}$ skupinou, hydrofilních či hydrofobních interakcí, vodíkových můstků nebo disulfidických můstků) doslova sbaluje během své syntézy na ribozomu do výše zmíněných struktur. α -šroubovice (α -helix) se vyznačuje spirálovitým tvarem, daným stabilním seřazením aminokyselin. β -struktura (β -skládaný list) má tvar mírně zprohýbaného řetězce, který je stabilizován vodíkovými můstky mezi sousedními řetězci.

Terciární strukturou proteinů se rozumí trojrozměrné prostorové uspořádání polypeptidového řetězce. Vzniká opět sbalováním, při němž dochází mimo jiné i k vytváření energie

ticky nejvýhodnějších interakcí mezi postranními skupinami řetězce s jinými atomovými skupinami. Podle terciární struktury se bílkoviny dělí na globulární, kterých je většina, a fibrilární. U globulárních proteinů se střídají α -šroubovice a úseky β -struktur s ostatními částmi proteinu. Výsledkem je celistvé klubko kulovitého tvaru. U mnoha globulárních proteinů byly nalezeny úseky, v nichž polypeptidový řetězec vytváří vlivem vodíkových můstků pevné smyčky. Tyto úseky se nazývají β -otáčky (β -ohyby). Fibrilární proteiny jsou tvořené uspořádanými segmenty α -šroubovice a β -struktur [24].

Jako kvartérní struktura proteinu se označuje způsob vzájemného uspořádání jednotlivých polypeptidových řetězců. Je důležitá např. u enzymů pro regulaci jejich aktivity. Proteiny ovšem mohou obsahovat i nebílkovinnou složku (prostetickou skupinu), vázanou většinou kovalentně. Nazývají se pak složené nebo konjugované proteiny. Jedná se tedy o nukleoproteiny, glykoproteiny, fosfoproteiny, chromoproteiny, metaloproteiny či lipoproteiny.

O proteinech je dále známo, že jako enzymy katalyzují chemické reakce v živých organismech, zajišťují transport látek, regulují průběh dějů, uplatňují se jako protilátky a receptory aj. Na základě rozpustnosti se bílkoviny rozlišují jednak na nerozpustné ve vodných roztocích solí (kolagen, elastin) a jednak na rozpustné ve vodných roztocích solí (enzymy, proteinové hormony), které se řadí mezi globulární proteiny. Globulární proteiny lze pak rozdělit na histony (bazické proteiny), albuminy (proteiny rozpustné ve vodě) a globuliny (proteiny nerozpustné ve vodě) [25].

Při působení vysokých teplot, při nízkých či vysokých hodnotách pH nebo v koncentrovaných roztocích určitých látek dochází k denaturaci proteinu, což znamená ztrátu jeho sekundární a terciární struktury a tím i jeho biologické funkce. Opačným procesem je renaturace, tedy obnova původní konformace proteinu. Ve většině případů je však tato změna nevratná. Záleží totiž na šetrnosti provedení denaturace [24].

Využití

Proteiny jsou stejně jako polysacharidy hojně využívané v mnoha odvětvích spotřebního průmyslu a medicíny. V oblasti vědy a výzkumu se mnohdy uplatňují jako standardy. Kolagen a keratin všeobecně patří mezi nejpoužívanější vláknité proteiny (skleroproteiny). Zahříváním hydrolyzovaného kolagenu vzniká želatina. Jak kolagen, tak želatina se ve formě kapslí uplatňují při výrobě potravinových doplňků zajišťujících výživu a regeneraci kloubů [26]. Keratinové hydrolyzáty (zpracovaný keratinový materiál) jsou užívány jako hnojiva a krmiva v zemědělství [27], ale hlavně se přidávají do textilií a obvazových materiálů sloužících k léčbě hojení ran a jsou z nich připravovány mikročástice pro řízené uvolňování léčiv [28]. Dále slouží k výrobě kosmetických přípravků (péče o vlasy a pokožku) a různých obalových materiálů v potravinářství [29].

V laboratořích je dále díky svým výhodným vlastnostem rozšířen hovězí (bovinní) sérový albumin (BSA), velmi blízký lidskému sérovému albuminu. Tento sferoprotein (globulární protein) bývá odebírán z hovězí krve. Vyznačuje se vysokou odolností při změně pH a také tím, že u něj po vytvoření vazby s ligandy nedochází k denaturaci při vyšší teplotě. Z toho důvodu je využíván jako významný nosič a stabilizátor při enzymatických reakcích [30].

2.1.3 Nukleové kyseliny

Struktura a vlastnosti

Jako nukleové kyseliny se označují makromolekuly, které zodpovídají za uložení informací v genetické výbavě organismu, nezbytných pro řízení všech životních procesů, jejich přenos a vlastní uplatnění [25]. Jedná se o polynukleotidy, tedy o polymery nukleotidů. Nukleotid je tvořen celkem třemi složkami. První složkou je dusíkatá báze – derivát pyrimidinu (cytosin, uracil, thymin), nebo derivát purinu (adenin, guanin). Druhou složkou je pětiuhlíkatý cukr (pentosa). V RNA se vyskytuje β -D-ribosa a v DNA pak 2'-deoxy- β -D-ribosa. Dále nukleotid obsahuje kyselinu trihydrogenfosforečnou. Jednotlivé monomerní jednotky jsou vzájemně spojeny fosfodiesterovými vazbami [1].

Podle druhu polynukleotidového řetězce lze rozlišit dva typy nukleových kyselin: kyselina ribonukleová (RNA) a kyselina deoxyribonukleová (DNA). RNA je zpravidla tvořena jedním polynukleotidovým řetězcem. Výjimkou ovšem mohou být dva komplementární polyribonukleotidové řetězce vyskytující se u některých virů [24]. Buněčná RNA je tvořena třemi hlavními typy: transferovou RNA (tRNA), mediátorovou (mRNA) a ribosomální (rRNA). tRNA má ve srovnání s DNA relativně malou molekulovou hmotnost, a tudíž je lze snáze izolovat.

DNA se skládá z jednoho či dvou komplementárních polydeoxyribonukleotidových řetězců. Její relativní molekulová hmotnost dosahuje až k 10^{12} Daltonům (přibližně 10^{10} nukleotidů), takže délka jejího řetězce může odpovídat i desítkám centimetrů. Z tohoto důvodu je dosti složité izolovat celou molekulu DNA a přesně definovat její primární strukturu. DNA řetězce lze obecně považovat za jakási centra replikace genetické informace. Úseky DNA, jež nesou informace pro syntézu jednoho konkrétního typu proteinu, se nazývají geny. Souboru všech genů se pak říká genom [1].

Využití

V dnešní době mnoho studií dokazuje, že analýza RNA se vedle analýzy DNA začíná stále více aplikovat ve forenzní genetice, a to především na základě rozkladu RNA. Tímto způsobem lze určit např. stáří zranění [31], dobu úmrtí [32], popř. rozpoznat a analyzovat tělní tekutiny [33]. V kriminalistice a forenzní genetice se ovšem hojněji využívá analýza DNA. Další využití analýzy DNA je možné nalézt např. v diagnostice genetických mutací jedince v prenatálním i postnatálním vývoji [34].

2.2 Rozptyl světla

Obecně je rozptyl světla brán jako jev, kdy v určité soustavě dochází k interakci světla s molekulami či částicemi, které jsou menší než vlnová délka dopadajícího záření. Světelné paprsky se při této interakci odchýlí od přímého směru do více různých směrů. V případě, že se jedná o částice větší, pozorujeme tzv. Tyndallův jev, při němž se paprsky procházející disperzním prostředím stávají viditelnými v podobě kužele [35].

2.2.1 Statický rozptyl světla

Teorie SLS

Podle klasické teorie statického rozptylu světla vyslovené Rayleighem se částice chovají jako oscilující dipóly, jež rozptylují pohlcenou světelnou energii do všech směrů, aniž by

se změnila vlnová délka záření. Ta je podstatně větší než samotná velikost částic. Intenzita rozptýleného světla I_s pak závisí na intenzitě dopadajícího záření I_0 , jeho vlnové délce λ , polarizovatelnosti částice α , velikosti částice r a úhlu rozptylu θ . Tuto závislost vyjadřuje následující vztah (1):

$$I = \frac{I_0 \cdot 8\pi^4 \cdot \alpha^2}{r^2 \cdot \lambda^4} (1 + \cos^2 \theta). \quad (1)$$

Pro částice s velikostí srovnatelnou s vlnovou délkou dopadajícího záření přestává Rayleighova teorie platit, a proto Debye vytvořil nadstavbovou teorii, podle níž je nutné upravit původní Rayleighovu rovnici vynásobením vhodným korekčním faktorem. Pro případ velikosti částic větší, než je vlnová délka použitého záření, vypracoval Mie teorii, která je poměrně komplikovaná, jelikož uvažuje interferenci světla rozptýleného z různých částí téže částice (molekuly), tedy i fázové rozdíly světelného vlnění. Z tohoto důvodu je závislost intenzity rozptýleného světla na pozorovacím úhlu značně nelineární a není použitelná pro výpočet rozměru rozptylující částice [36].

Princip SLS a možnosti měření

Po dopadu laserového paprsku na makromolekuly v nich oscilující elektrické pole světla vyvolá oscilující dipól, který znovu vyzáří světlo. Intenzita vyzařovaného světla závisí na velikosti tohoto dipólu. Čím je makromolekula polarizovatelnější, tím je větší indukovaný dipól v ní, tzn., že i intenzita rozptýleného světla bude větší. Z tohoto důvodu je nejprve nutné znát polarizovatelnost pozorovaných makromolekul, aby posléze bylo možné na nich charakterizovat rozptyl. Tento problém lze vyřešit pomocí měření změn indexu lomu roztoku se změnou jeho koncentrace. Větší počet makromolekul v roztoku dá vznik více oscilujícím dipólům, které bude více rozptylovat dopadající záření. Intenzita rozptýleného světla je tedy přímo úměrná koncentraci makromolekul v roztoku.

Nyní však uvažujme případ, kdy se dvě monomerní molekuly v roztoku spojí v dimer. Spojené molekuly se tedy nebudou pohybovat samostatně každá zvlášť jiným směrem, jako tomu bylo v případě předchozím, nýbrž obě společně. Rozptýlené světlo z dimeru je potom dvakrát tak intenzivní než z oddělených monomerů. Zjednodušeně lze tedy říci, že zdvojnásobením hmotnosti molekuly při zachování stejné koncentrace roztoku se zdvojnásobí intenzita rozptýleného světla. Díky této přímé úměrnosti lze sledovat tvorbu či přítomnost polymerních agregátů v roztocích [37].

Z praktického hlediska se využívá průměrné intenzity rozptýleného světla za určitou dobu. Při použití přístroje Zetasizer Nano ZS se celé měření provádí pouze pod jedním rozptylovým úhlem a pro různé koncentrace roztoků, přičemž intenzita rozptylu analyzovaných vzorků se porovnává s intenzitou rozptylu čistého standardu, tj. toluenem. Extrapolací na nulové hodnoty lze ze závislosti intenzity rozptýleného světla na koncentraci vzorků určit výslednou hodnotu molekulové hmotnosti (Zimmova metoda) [38].

Kromě molekulové hmotnosti můžeme pomocí statického rozptylu světla stanovit také druhý viriální koeficient, což je vlastnost popisující míru interakce mezi částicemi a rozpouštědlem. Jestliže druhý viriální koeficient nabývá kladných hodnot, částice jsou plně rozpouštěny v rozpouštědle. Pokud je druhý viriální koeficient záporný, částice budou inklinovat k agregaci. V případě, že je druhý viriální koeficient roven nule, částice budou mít

stejnou afinitu k rozpouštědлу i k ostatním částicím. Takové rozpouštědlo se pak nazývá rozpouštědlo „theta“ [38], [39].

U makromolekul o velikosti menší, než je vlnová délka dopadajícího záření, je rozptýlené světlo v rovině kolmé k polarizaci dopadajícího paprsku nezávislé na úhlu rozptylu. Pro větší makromolekuly však existují rozdíly ve fázi rozptýleného světla z různých částí makromolekuly, což může vést k destruktivní či konstruktivní interferenci rozptýleného světla v určitých směrech. Každá makromolekula se totiž skládá z malých prvků, z nichž každý rozptyluje světlo nezávisle na ostatních. Jednotlivá vlnění rozptýleného světla se pak skládají.

Z měření úhlové závislosti rozptýleného světla lze stanovit velikost molekuly. Jde o střední kvadratický poloměr (root mean square radius – RMS radius), zvaný též gyrační poloměr, který je měřítkem rozdělení hmoty kolem těžiště molekuly. RMS tedy souvisí s jejím geometrickým uspořádáním [40].

SEC-MALS

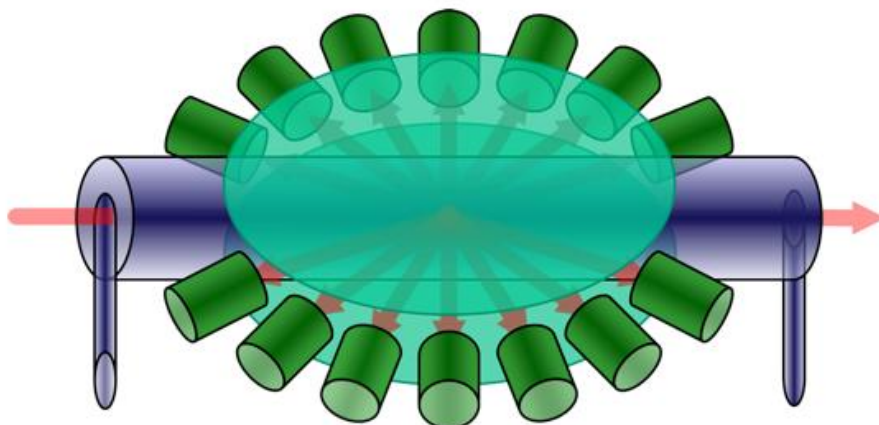
V praxi se však více než klasický statický rozptyl světla, měřený většinou pouze pod jedním úhlem, uplatňuje statický rozptyl světla, měřený ve více úhlech (Multi-Angle Light Scattering – MALS). Analýze rozptylu světla tímto MALS detektorem ale zpravidla předchází průchod roztoku makromolekul chromatografickým nebo jiným separačním či frakcionačním systémem. Pro tyto účely se nejčastěji využívá velikostně vylučovací chromatografie (Size Exclusion Chromatography – SEC). Spojení těchto dvou technik se potom říká SEC-MALS [41].

Samotný chromatograf sestává ze zásobníku kapalné mobilní fáze, která proudí celým systémem, odplyňovače mobilní fáze, komory, do nichž se vkládají vzorky v malých vialkách, ze kterých je automatickým dávkovačem nasáto určité množství (většinou v řádech jednotek až stovek μl) a vstříknuto do proudící mobilní fáze. Tato směs potom putuje ke koloně, v níž se vyskytuje stacionární fáze, zpravidla ve formě gelu. Výběr kolony včetně její naplně je klíčovým faktorem pro správné provedení celé separace. V koloně totiž dochází k separaci molekul vzorku na základě molekulového síta, tj. malé molekuly procházejí póry uvnitř gelu, a proto se jejich průchod kolonou značně zpomalí (jejich retenční čas je větší), zatímco velké molekuly, které se do těchto pórů díky své velikosti nedostanou, projdou kolonou nejrychleji, takže je jejich retenční čas menší. Kolona musí být tedy zvolena tak, aby byly póry uvnitř jejího gelu dostatečně velké. V případě, že je jejich rozměr příliš malý nebo naopak příliš velký, účinnost separace makromolekul značně klesá [42].

Separované makromolekuly postupně vstupují do MALS detektoru, kde jsou ozářeny laserovým paprskem. Součástí systému MALS je hned několik detektorů statického rozptylu světla, které snímají intenzitu rozptýleného světla v různých úhlech (viz Obr. 2) [41]. Takové uspořádání detektorů umožňuje po převodu signálu do příslušného softwaru v počítači vytvořit závislost rozptýleného světla na úhlu detekce, z níž je posléze pomocí extrapolace na nulovou hodnotu tohoto úhlu a rovnice (2) automaticky vypočítána molekulová hmotnost.

$$\frac{K \cdot c}{R(\theta)} = \frac{1}{M_w \cdot P(\theta)} + 2 \cdot A_2 \cdot c, \quad (2)$$

kde K je optická konstanta závislá na indexu lomu rozpouštědla a jeho inkrementu, vlnové délce záření a Avogadrově konstantě, c je koncentrace vzorku, $R(\theta)$ představuje přebytečnou intenzitu rozptýleného světla, M_w je molekulová hmotnost, $P(\theta)$ vyjadřuje komplexní funkci popisující úhlovou závislost na rozptýleném světle a A_2 je druhý viriální koeficient. Obecně platí, že čím vyšší je počet detektorů, tím se předpokládá vyšší přesnost experimentu. Mimo molekulovou hmotnost dává MALS detektor informaci o prostorovém uspořádání dané molekuly, vyjádřeném jako hodnota středního kvadratického poloměru [43], [43].



Obr. 2: Rozptyl světla v podélné průtokové cele snímaný detektory v různých úhlech [43]

Na systém SEC-MALS často bývají napojeny i jiné detektory. Příkladem může být viskozimetr, jehož součástí je zpravidla systém čtyř kapilár, ve kterém je měřena změna tlaku. Jestliže se ve všech kapilárách nachází čisté rozpouštědlo, výstupní tlak je totožný se vstupním. V případě přítomnosti polymerního roztoku dojde k tlakové nerovnováze systému, způsobené zvýšením viskozity v kapilárách. Kromě údajů o specifické viskozitě vzorku však viskozimetr rovněž poskytuje informace o molekulové hmotnosti [46]. Pro rozbor vlastností analytů separovaných v systému SEC se používá také diferenční refraktometr. Jeho princip spočívá v měření změn indexu lomu eluátu v závislosti na koncentraci analytu (označovaných jako inkrementy indexu lomu) [39], [47].

Jednou z výhod techniky SEC-MALS je fakt, že poskytuje absolutní měření, protože nevyžaduje srovnání s molárními hmotnostmi standardů ani kalibraci [48].

Využití SLS a SEC-MALS

Jak již bylo výše popsáno, klasický statický rozptyl světla bývá nejčastěji aplikován pro stanovení molekulové hmotnosti, která nám mj. může poskytnout informace o případné tvorbě agregátů v roztocích, dále pro popis míry interakce částic a rozpouštědla prostřednictvím druhého viriálního koeficientu. V neposlední řadě lze pomocí této metody určit gyrační poloměr a tedy částečně i geometrické uspořádání makromolekuly.

Systém SEC-MALS společně s viskozimetrem a diferenčním refraktometrem nabízí velmi užitečné prostředky pro stanovení absolutní molekulové hmotnosti, velikosti, struktury, konformace a větvení řetězců všech typů makromolekul (biopolymerů či syntetických polymerů) a částic v roztoku (liposomů, micel, koloidů apod.). Znalost molekulové hmot-

nosti s ostatními molekulovými parametry umožňuje kontrolu vlastností produktů z mnoha odvětví průmyslu. Příkladem může být kontrola pevnosti, trvanlivosti a odolnosti plastů či jiných syntetických polymerů anebo řízení vlastností a chuti polysacharidů v potravinách. Své uplatnění nalézá i při regulaci degradace a odhadu rychlosti uvolňování léčiv z polymerů, při kontrole plniv a maziv ve farmaceutickém či kosmetickém průmyslu (např. kyselina hyaluronová, deriváty celulosy) nebo zkoumání účinnosti a agregace bílkovin a biofarmaceutik [39], [48], [49].

2.2.2 Dynamický rozptyl světla

Princip DLS

Dynamický rozptyl světla (DLS), též foton korelační spektroskopie, je definován jako metoda sledující Brownův pohyb částic v roztoku. Ten způsobený jejich náhodnými srážkami s molekulami rozpouštědla. Obecně platí fakt, že malé částice se pohybují rychleji a velké pomaleji. Na základě difúzního koeficientu lze určit velikost částic (jejich hydrodynamický poloměr). K tomu se používá laserový paprsek, po jehož dopadu na částice dochází k interferenci. Díky neustálému pohybu částic (přibližování a oddalování) vůči detektoru se mění frekvence rozptýleného světla. Z těchto fluktuací intenzity rozptýleného světla je získána autokorelační funkce (11) znázorňující podobnosti signálů za určitý časový úsek.

$$g(\tau) = \frac{\langle I(t)I(t+\tau) \rangle}{\langle I(t) \rangle^2}, \quad (3)$$

kde $I(t)$ určuje intenzitu rozptýleného světla v čase t a výrazy v závorkách vyjadřují zprůměrování celkového času. Autokorelační funkce tedy závisí na časové prodlevě.

Difúzní koeficient je potom dán následujícím vztahem (4):

$$D = \frac{\Gamma}{q^2}, \quad (4)$$

kde Γ je rychlost poklesu korelace a q je velikost rozptylového vektoru, který je závislý na indexu lomu disperzního prostředí n_0 , vlnové délce dopadajícího světla ve vakuu λ_0 a úhlu rozptylu θ dle rovnice (5):

$$q = \frac{4\pi \cdot n_0}{\lambda_0} \cdot \sin\left(\frac{\theta}{2}\right). \quad (5)$$

Ze Stokes-Einsteinovy rovnice (6) lze pak na základě hodnoty difúzního koeficientu vypočítat hydrodynamický poloměr částic:

$$r_h = \frac{k_B \cdot T}{6\pi \cdot \eta \cdot D}, \quad (6)$$

kde k_B je Boltzmannova konstanta, T je termodynamická teplota a η je viskozita rozpouštědla. Hydrodynamický poloměr je poloměr koule, kterou definuje molekula rotující ve všech směrech a její hydratační vrstva. Je měřítkem toho, jak snadno se molekula dokáže v rozpouštědle pohybovat [50].

Instrumentace DLS a podmínky měření

Jednu z možností, jak měřit dynamický rozptyl světla, nabízí přístroj Zetasizer Nano ZS. Pro stanovení velikosti či distribuce koloidních částic se užívá plastová, v lepším případě

však skleněná nebo křemenná kyveta, jejímž středem prochází laserový paprsek. Ten je rozptýlený částicemi zkoumaného vzorku v kyvetě. Následně je rozptýlené světlo detekováno a signál jde přes digitální korelátor uvnitř přístroje, kde je porovnávána podobnost dvou světelných signálů za určitý časový úsek. Po krátké časové prodlevě (v řádu nanosekund až mikrosekund) jsou intenzity těchto signálů poměrně podobné (korelace se blíží 1). Později se však objeví rozdíly a korelace se postupně začne blížit k nule, což znamená, že mezi signály není rozpoznána téměř žádná shoda. Stane se tak díky Brownovu pohybu částic [38].

Je rovněž nutné podotknout, že může nastat případ, kdy fluktuace intenzity rozptýleného světla bude nepatrná. Příčinou tohoto jevu je přítomnost větších, téměř nijak na sebe nepůsobících částic v koncentrovaných roztocích. Proto je vhodné, aby mezi zkoumanými částicemi byly vzdálenosti přinejmenším o řád větší než jejich průměr [36].

Velká část různých měření a výzkumů však ukázala, že se hodnota velikosti částic (hydrodynamický průměr) stanovená pomocí DLS lišila od té reálné a že závisí na podmínkách disperzního prostředí. Důležitou roli zde totiž hraje iontová síla rozpouštědla (a tím pádem i vodivost roztoku), způsobená přidáním elektrolytu. Do určité míry zapříčiní zmenšení hydrodynamického průměru částic. Při vyšších koncentracích elektrolytu však dochází k agregaci a zvětšení velikosti částic. Výsledky celkového měření mohou být dále ovlivněny přítomností prachových částic, bublinek v roztoku, obecně tedy čistotou přípravy roztoků a intenzitou rozptýleného záření, což souvisí s koncentrací. S rostoucí koncentrací dochází k vysokému nárůstu hodnot intenzity rozptýleného světla a rovněž také absorpci laserového paprsku částicemi ve vzorku [38], [58].

Využití DLS

Od konce 80. let minulého století začaly být komerční DLS detektory používány v biofyzikálních laboratořích po celém světě. Umožnily měření velikosti částic a molekul v malém objemu a v relativně nízkých koncentracích. Díky přímočarému provedení měření a možnosti obnovy vzorku se staly tyto nástroje a vůbec samotná technika DLS velmi populárními [50].

Měření velikosti molekul se dá využít v řadě oblastí vědy i výzkumu. To platí zejména pro polymerní a biopolymerní látky. Při zkoumání proteinů pomocí DLS lze předpovědět, zda daný protein bude mít tendenci agregovat či nikoliv. To má značný význam při výrobě léčiv, popř. nosičových systémů na bázi proteinů. Agregáty totiž mohou snížit účinnost těchto léčiv a mohou vést k různým imunologickým reakcím organismu, v krajním případě i k toxicitě [56]. Mimo to může tato metoda určit teplotu denaturace, pozorovat sbalování a rozbíjení jeho struktury nebo prověřit jeho čistotu. Dále z porovnání s molekulovou hmotností (v kombinaci se statickým rozptylem světla) je velikost molekuly schopna poskytnout informaci o struktuře daného polymeru. Pomocí DLS mohou být rovněž monitorovány změny konformace molekuly při změně podmínek prostředí. Například při zvýšení teploty polymerního roztoku mají molekuly analytu tendenci nepatrně zvětšit svůj rozměr (nikoliv však agregací), což vede k většímu rozevření jejich konformace [57].

Při studiu částic umožňuje metoda DLS stanovit kritickou micelární koncentraci, tedy minimální koncentraci, při níž povrchově aktivní látka (surfaktant) v pravém roztoku micelárního koloidu začne tvořit micely, kritickou micelární teplotu, tedy teplotu, při které roz-

pustnost ve vodě omezeně rozpustného surfaktantu dosáhne kritické micelární koncentrace, popř. agregační číslo, které udává průměrný počet surfaktantů v jedné micelle. Pomocí DLS bývají také charakterizovány liposomy, které společně s micelami a jinými částicemi nalézají využití v problematice regulovaného uvolňování léčiv (léčiva jsou v nich enkapsulovány) [50].

V neposlední řadě lze na základě stanovení velikosti částic studovat reaktivitu či rychlost rozpouštění dané látky, stabilitu suspenze, homogenitu roztoku, účinnost dodání léčiva na cílené místo, různé mechanické vlastnosti materiálů (charakter povrchu, pórovitost), viskozitu a hustotu roztoků nebo např. míru znečištění jednotlivých složek životního prostředí [50], [58].

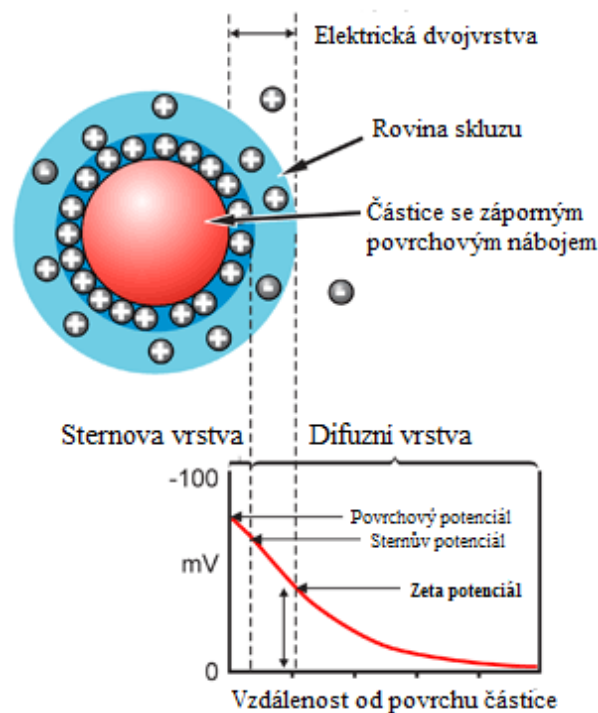
2.2.3 Elektroforetický rozptyl světla

Elektrická dvojrstva a zeta potenciál

Pro správné pochopení principu elektroforetického rozptylu světla je důležité nejprve objasnit pojmy elektrická dvojrstva a zeta potenciál. Stejně jako u malých jednoduchých iontů obklopených vrstvou iontů opačného náboje se i okolo nabitých koloidních částic vytvářejí tyto „obaly“ protiiontů, což vede ke vzniku dvou protikladně nabitých vrstev na povrchu těchto částic. Tyto dvě vrstvy bývají nazývány jako elektrická dvojrstva.

Model elektrické dvojrstvy jako první znázornil Hermann von Helmholtz, který popsal, že jde o dvě rovnoběžné desky nabitého kondenzátoru, jež k sobě navzájem přiléhají. Ionty, které se vyskytují na povrchu pevné fáze a které určují potenciál této vrstvy, tvoří jednu desku, zatímco součástí druhé desky jsou opačně nabití ionty pocházející z kapalné fáze. Helmholtzova představa o elektrické dvojrstvě ovšem neuvažovala tepelný pohyb molekul v disperzním prostředí, takže byla o několik let později přepracována Gouyem a Chapmanem. Ti nezávisle na sobě vytvořili teorii o difúzní dvojrstvě, která ale měla také mnoho nedostatků, a proto ji zkorigoval německý fyzik Otto Stern. V současnosti je tato teorie považována za nejpřesnější [51], [52].

Podle Sterna elektrickou dvojrstvu určují dvě základní části. V kompaktní části (Sternově vrstvě) bližší k povrchu částice působí adsorpční a elektrostatické síly, kdežto v difúzní vrstvě vzdálenější od povrchu částice lze adsorpční i elektrostatické síly zanedbat. Za rozhraním těchto dvou vrstev se nachází oblast zvaná rovina skluzu. Mezi kapalnou fází a povrchem koloidních částic se díky jejich povrchovému náboji nachází jistý potenciálový rozdíl. Z Obr. 3 je patrné, že existují tři druhy těchto rozdílů potenciálů. Zaprvé se jedná o elektrochemický (povrchový) potenciál, udávající hodnotu rozdílu potenciálů na povrchu částice a v objemu kapaliny. Dále lze na rozhraní Sternovy a difúzní vrstvy určit tzv. Sternův potenciál. Třetím potenciálem je elektrokinetický potenciál, označovaný rovněž jako ζ potenciál (zeta potenciál), daný potenciálovým rozdílem mezi objemem kapaliny a rovinou skluzu [51], [53].



Obr. 3: Schéma elektrické dvojvrstvy částic dle Sterna [38]

Zeta potenciál závisí na rozpouštědle a jeho pH, popřípadě na iontové síle roztoku, poněvadž struktura a tloušťka elektrické dvojvrstvy je ovlivněna koncentrací volných iontů. Po přidání elektrolytu do systému dojde ke smrštění difúzní vrstvy, zatímco protiionty se budou shromažďovat ve Sternově vrstvě. Zeta potenciál se proto bude blížit nule, tzn., že částice bude takřka bez náboje a nastane agregace. V bodě, kdy je zeta potenciál roven 0 mV, se ustaví adsorpční rovnováha H^+ a OH^- iontů. Tento okamžik bývá nazýván tzv. izoelektrickým bodem. V opačném případě (při ředění roztoku) se tloušťka difúzní vrstvy zvětší, takže vzroste i zeta potenciál a částice budou mít menší tendenci se shlukovat [38], [51].

Stabilita roztoku

Stabilita roztoků nanočástic a koloidních systémů se nejčastěji určuje právě pomocí zeta potenciálu, který souvisí s elektrostatickým odpuzováním jednotlivých částic. Pokud jsou od sebe částice dostatečně vzdáleny, působí na ně přitažlivá van der Waalsova síla, zatímco odpuzivá síla je zanedbatelná. Po překrytí jejich elektrických dvojvrstev se značně zvětší síla odpuzivá. Na tom, jestli se částice budou shlukovat nebo naopak budou dispergovat, záleží, jaké z těchto dvou typů sil budou převažující. V případě, že by součet energií všech částic v roztoku byl kladný, bude docházet k agregaci. Když by naopak suma těchto energií vycházela záporně, částice se rozptýlí po roztoku a vytvoří se mezi nimi tzv. energetická bariéra, která znemožní jejich další aglomeraci [36], [51].

Pro celkové shrnutí lze tedy říci, že stabilní koloidní roztok vykazuje odolnost vůči změnám při působení různých sil (gravitační, odstředivá, přitažlivá apod.). Zeta potenciál jeho částic má vysokou zápornou nebo kladnou hodnotu, a proto dochází k jejich dispergaci. U nestabilního koloidního roztoku dochází k maximálnímu snížení volné energie na fázovém rozhraní, což se projevuje agregací částic, popřípadě koagulací (nevratným shluková-

ním) či sedimentací. Zeta potenciál částic takového roztoku má nízkou absolutní hodnotu zeta potenciálu (blíží se tedy nule).

Pro studium stability roztoků je mezi těmito dvěma rozdílnými stavy obecně dána hranice hodnot zeta potenciálů, a to ± 30 mV [51], [54].

Proces elektroforézy

Zeta potenciál je mírou náboje roviny skluzu v difúzní části elektrické dvojvrstvy. Díky elektrokinetickým jevům (kinetickým jevům zapříčiněným působením elektrického pole na koloidní soustavu), bývá často nazýván jako elektrokinetický potenciál. Rozlišují se čtyři základní typy elektrokinetických jevů, kterými lze elektrokinetický potenciál stanovit, a sice elektroforéza, elektroosmóza, sedimentační potenciál a potenciál proudění. Elektroforetická měření jsou však aplikována nejhodněji.

Elektroforézou se rozumí jev, při kterém vlivem elektrického pole dochází k pohybu nabitých částic kapalinou k elektrodě s nábojem opačného znaménka. Jejich rychlost se označuje jako elektroforetická pohyblivost a ovlivňuje ji několik faktorů. Rovnici pro výpočet elektroforetické rychlosti odvodil holandský fyzikální chemik Peter Debye a německý fyzik Erich Hückel. Následující vztah (7) uvažuje ideální kulovité částice s poloměrem r , pohybující se působením určitého napětí.

$$v = \frac{2 \cdot D_e \cdot \zeta \cdot U}{3 \cdot \eta \cdot l}, \quad (7)$$

kde D_e je dielektrická konstanta, ζ je elektrokinetický potenciál a η je viskozita prostředí.

Podíl $\frac{U}{l}$ představuje intenzitu elektrického pole (tedy napětí vložené na kyvetu o dané délce) [51], [55].

Metoda pro stanovení elektrokinetického (zeta) potenciálu pomocí elektroforetické pohyblivosti částic v roztoku s využitím rozptylu světla na těchto částicích se nazývá elektroforetický rozptyl světla (Electrophoretic Light Scattering – ELS), v některých zdrojích známá rovněž pod pojmem laserová Dopplerova velocimetrie [36].

Instrumentace ELS

Při použití přístroje Zetasizer Nano ZS je zeta potenciál měřen opticky využitím laserového paprsku (nejčastěji argonový iontový laser a He-Ne laser). Ze zdroje záření je světelný paprsek dále směřován do děliče, kde je dělicí optikou rozložen na dva paprsky, které pak putují odlišnými směry, jeden jako referenční paprsek a druhý jako paprsek směřující ke kyvetě se vzorkem.

Před kyvetou se nachází tzv. zeslabovač, jehož úkolem je snížení intenzity záření laserového paprsku (tedy i intenzity rozptýleného světla), aby detektor, který toto rozptýlené světlo zachytí, nebyl přetížen. Výhodou přístroje Zetasizer Nano ZS je fakt, že všechno funguje automaticky. Pokud jsou navíc analyzovány málo koncentrované vzorky či vzorky s velmi malými částicemi, lze automaticky intenzitu rozptýleného světla i zvýšit.

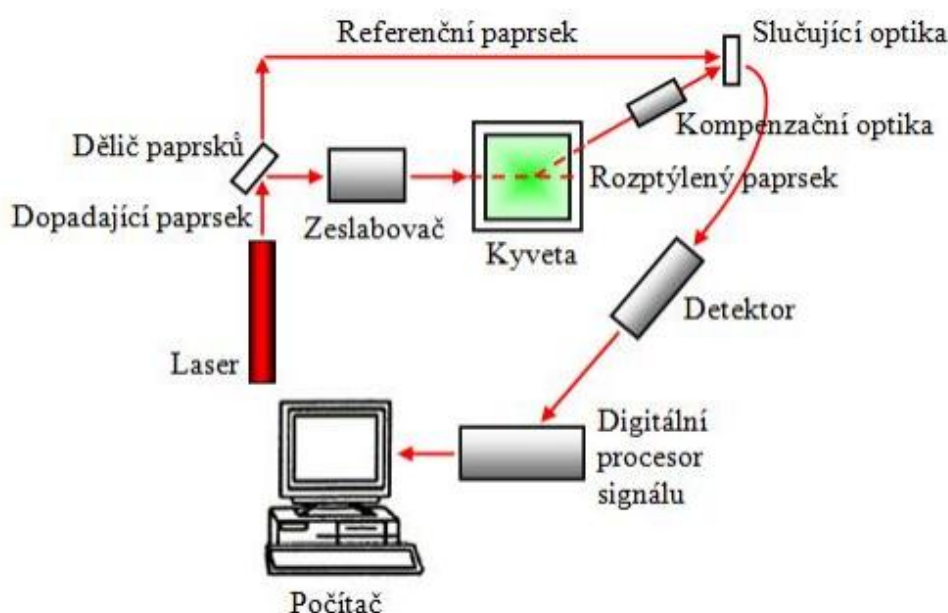
Po proniknutí laserového paprsku středem kyvety dojde na částicích ve zkoumaném vzorku k jeho rozptýlení, které je snímáno pod úhlem 17° . Pakliže se do roztoku vzorku vloží elektrické pole, stane se, že snímaná intenzita rozptýleného světla bude díky pohybu-

jícím se částicím fluktuovat. Frekvence této fluktuace by měla úměrně odpovídat rychlosti částic.

Referenční a rozptýlený laserový paprsek dále putují do slučující optické soustavy sestávající z několika čoček, které jej dopraví na místo detektoru. Ten dále doručí informaci o světelném paprsku do digitálního procesoru signálu a posléze do počítače, kde na základě Dopplerova frekvenčního posunu laserového paprsku dojde k výpočtu elektroforetické pohyblivosti i zeta potenciálu. Úlohu detektorů v tomto případě zpravidla zastávají fotodiody nebo fotonásobiče.

Při měření zeta potenciálu pomocí přístroje Zetasizer Nano ZS se nejčastěji užívá skleněných či křemenných kyvet, do nichž se oproti měření velikosti a distribuce částic a molekulové hmotnosti mimo jiné vpravuje Zeta Dip cela s elektrodami [38].

Schéma celého systému pro měření zeta potenciálu pomocí přístroje Zetasizer Nano ZS je znázorněno na Obr. 4.



Obr. 4: Schéma fungování přístroje Zetasizer Nano ZS při měření zeta potenciálu [38]

Využití zeta potenciálu

Měření zeta potenciálu např. pomocí elektroforetického rozptylu světla lze využít ve farmaceutickém průmyslu. Cílem většinou bývá připravit fyzikálně stabilní disperze léčiv, jejichž stabilita výrazně ovlivňuje dávkování a trvanlivost, popřípadě různé enkapsulační materiály a nosiče. Zeta potenciál je také užitečný pro stanovení optimálních podmínek při čištění v řadě chemických procesů (např. po odstranění nečistot ze surové šťávy cukrové třtiny vysrážením). Významnou roli také hraje při čištění odpadních vod. Pro usnadnění filtrace kontaminujících látek se používají malá množství flokulačních činidel k rychlejšímu usazování nerozpuštěných látek. Měření zeta potenciálu je pak založeno na optimálním stavu koagulace pro odstranění částic a organických barviv z těchto odpadních vod [59].

Sledování zeta potenciálu nachází své využití rovněž při nanášení barviva na textilní vlákno. V důsledku disociace molekul na povrchu vlákna je jeho povrch nabitý, a proto se barvivo s dalšími molekulami z roztoku ukládají na povrch tohoto vlákna ve formě iontů.

Při tom se zeta potenciál výrazně mění v závislosti na koncentraci molekul nanášeného barviva. Monitorováním těchto změn můžeme detailně sledovat depozici barviva na vlákno [60]. Na podobném principu funguje i nanášení barvy na kovové předměty (např. na automobilové karoserie) nebo různých nátěrových hmot na různé typy materiálů. V této oblasti je měření zeta potenciálu užitečné pro kontrolu stability nátěrové hmoty v průběhu zpracování, schnutí a při skladování [59].

Kromě toho nalézá měření zeta potenciálu uplatnění v několika dalších oblastech, např. při sledování vzdušnosti či průtoku půd, popř. zadržování vlhkosti a živin v půdách, vrtných výpláších, při výrobě plstěné keramiky, dále pro stanovení stability polymerních roztoků pro přípravu nanovláken elektrostatickým zvlákňováním, pro sledování stability emulzí (užívaných třeba v potravinářství, kosmetice apod.) nebo při čiření vína a piva [51], [59]. Zeta potenciál má též obzvláště velký biologický význam. Poskytuje totiž informace o povrchu různých biologických systémů (tkání, buněk, bakterií atp.), na nichž probíhají důležité biologické děje. Změny zeta potenciálu krevních elementů, tkáňových buněk, cévních stěn nebo složek tělních tekutin mohou způsobit metabolické změny, změny ve vlastnostech průtoku krve nebo buněčnou agregaci [59].

3 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

Stabilita biopolymerních látek je velmi podstatným parametrem v oblasti jejich výzkumu. Agregační nebo naopak degradační procesy probíhající v těchto látkách, používaných v průmyslových výrobcích, mohou totiž způsobit vážné problémy, jako např. různé výnosy získaných produktů, jejich nedostatečnou čistotu či nepříznivé vlastnosti. Pro studium takového chování se nabízí metody analýzy založené na detekci rozptylu světla.

Předmětem jedné studie [61] bylo sledování časové stability roztoků vybraných biopolymerů (alginátu sodného, karboxymethylcelulosity, hyaluronanu a BSA) o různých koncentracích. Zeta potenciál, charakterizující stabilitu vzorku proti agregaci, byl stanovován na základě elektroforetického rozptylu světla s použitím přístroje Zetasizer Nano ZS. Pro určení změn molekulové hmotnosti jednotlivých biopolymerů byla zvolena technika SEC-MALS v kombinaci s diferenčním refraktometrem. Výsledky z měření elektroforetického rozptylu světla ukázaly, že zeta potenciál všech zkoumaných roztoků byl po celou dobu pozorování záporný. Jeho hodnoty se navíc v průběhu stárnutí vzorků začaly v závislosti na konkrétním biopolymeru blížit k nule. Podle definice stability roztoků (viz kapitola 2.2.3) byly všechny vzorky kromě alginátu sodného brzy po jejich přípravě nestabilní. Nejvyšší stabilita byla po delším pozorování zjištěna u roztoku karboxymethylcelulosity. Naopak nejmenší stabilitu po celou dobu experimentu vykazoval roztok proteinu BSA. Dále byla stanovena molekulová hmotnost těchto biopolymerů, a sice na samotném začátku experimentu pro srovnání s daty, uvedenými výrobcem, a na konci experimentu (po 80 dnech). Výsledky téměř přesně odpovídaly měřením elektroforetického rozptylu světla. Během celé doby pozorování došlo k nejmenšímu poklesu molekulové hmotnosti v případě CMC. Molekulová hmotnost hyaluronanu za 80 dní klesla o 35 % své původní hodnoty. Ještě větší degradace pak byla pozorována pouze u alginátu sodného, kdy se jeho molekulová hmotnost snížila na desetinu. Naopak ke zvýšení molekulové hmotnosti téměř o 27 % došlo u proteinu BSA, což bylo pravděpodobně způsobeno agregačními procesy.

Samotné časové degradaci hyaluronanu se věnuje publikace [62]. Zabývá se jeho rozkladem v pevném skupenském stavu (ve formě prášku) a jednak ve formě kapalných roztoků. V této studii byly pozorovány čtyři vzorky hyaluronanu o různých molekulových hmotnostech: 1 MDa, 0,75 MDa, 200–300 kDa a 10–150 kDa. Molekulová hmotnost byla měřena pomocí systému SEC-MALS obsahující také viskozimetrický detektor a diferenční refraktometr. Všechny čtyři vzorky byly také skladovány při různých podmínkách. Degradace hyaluronanu v pevném stavu byla s výjimkou posledního vzorku potvrzena analýzou SEC-MALS čerstvě připravených roztoků z těchto vzorků. Tyto roztoky posléze sloužily jako výchozí body pro studium degradace ve formě kapalných roztoků. Porovnáním s hodnotami molekulových hmotností uvedenými výrobcem bylo zjištěno, že míra degradace hyaluronanu v pevné fázi je vyšší při delším skladování a při vyšší teplotě. Po prvním proměření byl každý roztok vzorku rozdělen na poloviny, přičemž jedna část byla udržována při laboratorní teplotě a druhá část uchovávána v ledničce. Při laboratorní teplotě byl u všech vzorků zaznamenán exponenciální až hyperbolický pokles molekulové hmotnosti v čase, zatímco při skladování v ledničce byl pozorován pokles spíše lineární a ne tak značný.

Mnoho publikací se rovněž zabývá studiem stability chitosanu při různých podmínkách. Příkladem může být experiment výzkumných pracovníků z Huddersfieldské univerzity [63], který sleduje jeho chování při skladování při různých teplotách. Chitosany o nízké, střední a vysoké molekulové hmotnosti byly rozpuštěny v acetátovém pufru a poté skladovány při teplotách 4 °C, 25 °C a 40 °C po dobu jednoho roku. Stabilita těchto roztoků pak byla kromě jiných metod vyhodnocena také měřením molekulové hmotnosti pomocí SEC-MALS. Bylo jasně prokázáno, že k degradaci byly nejnáchylnější roztoky skladované při 40 °C, naopak u roztoků skladovaných při 4 °C depolymerizace probíhala v daleko menší míře. Největší pokles molekulové hmotnosti byl zaznamenán u roztoku chitosanu s nejvyšší molekulovou hmotností skladovaného při 40 °C.

Další studie [64] objasňuje chování chitosanu v roztoku kyseliny octové v závislosti na její koncentraci. Vzorky byly připraveny rozpuštěním různých množství chitosanu v různě koncentrovaných roztocích kyseliny octové. Před samotným měřením byly převedeny přes filtr s póry o velikosti 0,8 μm. Chování molekul bylo pozorováno na základě měření DLS a SLS. Výsledky z měření DLS ukázaly, že se zvyšující se koncentrací kyseliny octové vzrostla koncentrace NH_3^+ skupin na chitosanových řetězcích, a tím se tyto řetězce v důsledku zvýšeného elektrostatického odpuzování NH_3^+ skupin více rozevřely. Tento jev byl potvrzen i stanovením gyračního poloměru z výsledků měření SLS, který se rovněž při zvyšování koncentrace kyseliny octové zvětšoval. Vzrůst koncentrace NH_3^+ skupin měl také vliv na druhý viriální koeficient, tedy i na rozpustnost chitosanu ve vodě, která se s každým přídatkem kyseliny octové zvýšila. Při poklesu pH roztoků byl zaznamenán nárůst hodnot střední molekulové hmotnosti chitosanových řetězců, zjištěné rovněž pomocí SLS.

Degradaci chitosanu lze provést i jinými způsoby, např. ultrazvukem, o čemž pojednává studie Thsaiha a Chena [65]. V ní bylo dokázáno, že proces depolymerizace probíhal ve větší míře u vzorků s vyšší molekulovou hmotností a že se rychlost tohoto procesu postupně zmenšovala s rostoucí dobou působení ultrazvuku.

Naopak agregační procesy chitosanu v roztocích byly pozorovány v publikaci M. W. Anthonsena [66], kde na přítomnost agregátů měla vliv koncentrace tohoto biopolymeru.

Sledováním degradačních a agregačních procesů proteinů se ve svém článku zabývá Hongping Ye [67]. V této studii byl použit protein BSA, glykoproteinový hormon choriogonadotropin, enzym glycerinaldehyd-3-fosfát dehydrogenáza (GAPDH) a protilátky Herceptin a ReoPro. Následně bylo zkoumáno chování těchto proteinů při různých podmínkách. Zaprvé byly vzorky po dobu 15 minut inkubovány při teplotách 40 °C, 50 °C, 60 °C, 65 °C a 70 °C, dále byly skladovány při laboratorní teplotě a při 4 °C po dobu několika dní. U proteinu BSA bylo také studováno jeho chování při zvyšování koncentrace, při různém pH s použitím kyseliny fosforečné a hydroxidu sodného a po přidavku detergentu. V průběhu skladování popř. po jeho skončení byla u všech vzorků stanovena molekulová hmotnost pomocí systému SEC-MALS v kombinaci s diferenčním refraktometrem. Výsledky měření teplotní závislosti BSA ukázaly, že tento protein je odolný vůči agregaci do teploty 60 °C. Při vyšších teplotách množství agregátů v roztoku bez detergentu značně vzrostlo, zatímco zvyšující se koncentrací detergentu byla tvorba agregátů postupně potlačována. V pufrch o pH 5,0 a pH 10,0 s přídatkem detergentu i bez něj zůstalo množství

agregátů BSA po celou dobu inkubace (57 dní) téměř stejné, a to jak při skladování v ledničce (4 °C) tak při laboratorní teplotě. V pufru s hodnotou pH 2,0 uchovávaném při laboratorní teplotě došlo nejen k agregaci, ale i ke znatelnému rozkladu tohoto proteinu, zatímco ve stejném pufru skladovaném při teplotě 4 °C k agregaci biopolymeru nedošlo a jeho rozklad proběhl pouze z 5 %. Rostoucí koncentrace BSA ve fosfátovém pufru neměla na zvyšující se množství agregátů žádný vliv. Při analýze stability choriogonadotropinu bylo zjištěno, že se tento glykoproteinový hormon při rostoucí teplotě spíše rozkládá. Při dlouhodobém skladování při laboratorní teplotě byla pozorována tvorba agregátů, zatímco při nižších teplotách přítomnost agregátů prokázána nebyla. Výsledky analýzy GAPDH ukázaly, že vzorky uchovávané při vyšších teplotách agregaci nepodléhaly, naopak při zvýšení teploty z 25 °C na 50 °C se celková molekulová hmotnost tohoto enzymu snížila o 11 %. Roztoky protilátek ReoPro a Herceptin vykazovaly při zvyšující se teplotě odlišné chování. Zatímco se v roztoku protilátky Reopro vytvořily při vyšších teplotách agregáty, roztok protilátky Herceptin zůstal vůči agregaci i degradaci stabilní. Při dlouhodobém skladování po dobu 42 dnů při laboratorní teplotě byla jasně dokázána odolnost obou zkoumaných protilátek proti agregaci i degradaci.

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Materiály

4.1.1 Sacharidy

| | |
|--------------------|---|
| Hyaluronan | Sodium hyaluronate, $M_w = 300\text{--}500$ kDa, CAS 9004-61-9, CPN spol. s r.o. |
| Alginát sodný | Sodium alginate, $M_w = 410$ kDa, CAS 9005-38-3, Sigma-Aldrich spol. s r.o., č. šarže MKBL7997V |
| Chitosan | Chitosan, low molecular weight, CAS 9012-76-4, Sigma-Aldrich spol. s r.o., č. šarže MKBH7256V |
| CMC | Sodium carboxymethyl cellulose, $M_w = 700$ kDa, CAS 9004-32-4, Sigma-Aldrich spol. s r.o., č. šarže MKBP6344V |
| Monohydrát glukosy | D-glucose monohydrate, $M_w = 198,17$ g·mol ⁻¹ , CAS 5996-10-1, Lach-Ner s.r.o., č. šarže PP/2014/01866 |
| Bezvodá glukosa | D-glucose anhydrous, $M_w = 180,16$ g·mol ⁻¹ , CAS 492-62-6, Lach-Ner s.r.o., č. šarže PP/2013/15465 |
| Sacharosa | Sacharosa, $M_w = 342,30$ g·mol ⁻¹ , CAS 57-50-7, PENTA s.r.o., č. šarže 1703270212F |

4.1.2 Proteiny a aminokyseliny

| | |
|---------|---|
| BSA | Bovine serum albumin, $M_w = 66$ kDa, CAS 9048-46-8, Sigma-Aldrich spol. s r.o., č. šarže SLBK0931V |
| Lysin | L-lysine, $M_w = 146,19$ g·mol ⁻¹ , CAS 56-87-1, Sigma-Aldrich spol. s r.o., č. šarže BCBD4131V |
| Cystein | L-cysteine, $M_w = 121,16$ g·mol ⁻¹ , CAS 52-90-4, Sigma-Aldrich spol. s r.o., č. šarže MKBF2663V |

4.1.3 Rozpouštědla

| | |
|-----------------|--|
| Voda | demineralizovaná voda Purelab flex ELGA |
| Kyselina octová | Acetic acid 99% g. r., $M_w = 60,05$ g·mol ⁻¹ , CAS 64-19-7, Lach-Ner s.r.o. |

4.1.4 Ostatní látky

| | |
|---------------|--|
| Chlorid sodný | Sodium chloride, $M_w = 58,44$ g·mol ⁻¹ , CAS 7647-14-5, Lach-Ner s.r.o. |
|---------------|--|

4.2 Použité přístroje

| | |
|------------------------------|---|
| Zetasizer Nano ZS | Malvern Instruments Ltd. |
| MPT-2 Multi Purpose Titrator | Malvern Instruments Ltd. |
| SEC-MALS | Agilent Technologies Ltd. – SEC chromatograf – pumpa – odplynovač – autosampler |

- UV-VIS detektor
- kolona PL aquagel-OH MIXED-H 8 μm ,
300 \times 7,5 mm, 6 000 – 10 000 000 Da

Wyatt Technology Ltd.

- MALS detektor
- diferenční viskozimetr
- diferenční refraktometr

Sušárna Durocell

UV lampa POLYLUX 4000

Váhy Scaltec SPB 42

BMT Medical Technology s.r.o.

Thorn EMI Ltd., výkon 20 W, vlnová délka záření
~306 nm

Scaltec Instruments s.r.o., max. 150 g, přesnost 0,001 g

4.3 Příprava vzorků

4.3.1 Příprava vzorků pro koncentrační závislost

Navážením příslušného množství daného biopolymeru (popř. glukos, sacharosy a obou aminokyselin) na laboratorních vahách s přesností 1/1 000 g, rozpuštěním v patřičném množství demineralizované vody v odměrných baňkách (při přípravě roztoku chitosanu byl použit jako rozpouštědlo 5% roztok kyseliny octové) a následným rozředěním těchto roztoků byly vytvořeny koncentrační řady o koncentracích 0,1; 0,5; 1; 2; 5 a 10 $\text{g}\cdot\text{dm}^{-3}$. V případě hyaluronanu byly připraveny pouze roztoky o koncentraci 0,1; 0,5 a 1 $\text{g}\cdot\text{dm}^{-3}$. Takto připravené roztoky byly míchány na magnetické míchače po dobu 48 hodin.

4.3.2 Příprava zásobních roztoků pro časovou závislost

Navážením přesně 0,200 g daného biopolymeru (popř. glukos, sacharosy a obou aminokyselin) na laboratorních vahách s přesností 1/1 000 g, rozpuštěním v patřičném množství demineralizované vody ve 100 cm^3 odměrných baňkách (při přípravě roztoku chitosanu byl použit jako rozpouštědlo 5% roztok kyseliny octové) byly vytvořeny zásobní roztoky o koncentraci 2 $\text{g}\cdot\text{dm}^{-3}$. V případě hyaluronanu bylo naváženo pouze 0,120 g a vytvořen roztok o koncentraci 1,2 $\text{g}\cdot\text{dm}^{-3}$. Takto připravené roztoky byly míchány na magnetické míchače po dobu 24 hodin a poté skladovány ve tmě při laboratorní teplotě.

4.3.3 Příprava zásobních roztoků pro teplotní závislost

Navážením přesně 0,100 g daného biopolymeru (popř. glukos, sacharosy a obou aminokyselin) na laboratorních vahách s přesností 1/1 000 g, rozpuštěním v patřičném množství demineralizované vody v 50 cm^3 odměrných baňkách (při přípravě roztoku chitosanu byl použit jako rozpouštědlo 5% roztok kyseliny octové) byly vytvořeny zásobní roztoky o koncentraci 2 $\text{g}\cdot\text{dm}^{-3}$. V případě hyaluronanu bylo naváženo pouze 0,050 g a vytvořen roztok o koncentraci 1 $\text{g}\cdot\text{dm}^{-3}$. Takto připravené roztoky byly míchány na magnetické míchače po dobu 24 hodin.

4.3.4 Příprava zásobních roztoků pro studium vlivu UV záření

Navážením přesně 0,100 g daného biopolymeru a monohydrátu glukosy na laboratorních vahách s přesností 1/1 000 g, rozpuštěním v patřičném množství demineralizované vody v 50 cm^3 odměrných baňkách (při přípravě roztoku chitosanu byl použit jako rozpouštědlo

5% roztok kyseliny octové) byly vytvořeny zásobní roztoky o koncentraci $2 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$. V případě hyaluronanu bylo naváženo pouze 0,050 g a vytvořen roztok o koncentraci $1 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$. Takto připravené roztoky byly míchány na magnetické míchačce po dobu 24 hodin.

4.3.5 Příprava zásobních roztoků pro studium vlivu iontové síly

Zásobní roztoky daných biopolymerů byly připraveny stejným způsobem jako v předchozím případě. V případě CMC byl tento roztok kvůli své poměrně velké viskozitě ještě desetkrát zředěn.

Zásobní roztok chloridu sodného o koncentraci $1 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ byl připraven navážením přesně 5,844 0 g na analytických vahách a rozpuštěním v patřičném množství demineralizované vody ve 100 cm^3 odměrné baňce.

4.4 Měření

4.4.1 Koncentrační závislost

U všech vzorků byl proměřen zeta potenciál na přístroji Zetasizer Nano ZS (výrobce Malvern Instruments Ltd.), který vytemperoval každý roztok po 70 s na teplotu $25 \text{ }^\circ\text{C}$. Měření bylo realizováno ve skleněných kyvetách, do nichž byla vždy vložena Dip cela s elektrodami, přes které na vzorek působilo elektrické napětí. Na základě změny intenzity rozptýleného světla pohyblivými se nabitými částicemi ve vzorku pak byla stanovena nejprve elektroforetická pohyblivost a následně při znalosti viskozity prostředí η a teploty měření T aplikací rovnice (7) hodnota zeta potenciálu. Každý vzorek byl proměřen celkem třikrát a mezi jednotlivými měřeními byla nastavena časová prodleva 20 s.

Naměřené hodnoty zeta potenciálů byly v programu MS Excel zprůměrovány a byly stanoveny jejich směrodatné odchylky, které jsou v grafech znázorněny v podobě chybových úseček.

4.4.2 Časová závislost

Vzorek byl ze zásobních roztoků každého biopolymeru (popř. glukos, sacharosy a obou aminokyselin) odebírán v časových intervalech 1 den, 2 dny, 3 dny, 1 týden, 2 týdny, 3 týdny, 4 týdny a 7 týdnů. Měření bylo uskutečněno při stejném nastavení přístroje Zetasizer Nano ZS a při stejných podmínkách jako v předchozím případě. Naměřené hodnoty zeta potenciálů byly v programu MS Excel zprůměrovány a byly stanoveny jejich směrodatné odchylky, které jsou v grafech znázorněny v podobě chybových úseček.

Dále byly vzorky všech použitých biopolymerů převedeny přes stříkačkový filtr s póry o velikosti $0,45 \text{ }\mu\text{m}$ a analyzovány pomocí SEC-MALS ve stejných časových intervalech (kromě intervalu po 7 týdnech skladování) jako při měření zeta potenciálu. Měřeným parametrem byla molekulová hmotnost. Jako mobilní fáze byl použit roztok dusičnanu sodného o koncentraci $0,1 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ a průtok celým systémem byl nastaven na $0,6 \text{ cm}^3$ za minutu. Objem nástřiku jednoho vzorku do kolony činil 100 mm^3 . Každý vzorek byl proměřen minimálně dvakrát. Doba analýzy jednoho vzorku byla 55 minut. Naměřená data byla vyhodnocena pomocí softwaru Astra 6.1 a následně exportována do programu MS Excel, kde byla zprůměrována a dále zpracována.

4.4.3 Teplotní závislost

Z každého zásobního roztoku byla odebrána část pro proměření zeta potenciálu na přístroji Zetasizer Nano ZS vytemperovaném na různé teploty (5 °C, 25 °C, 37 °C a 50 °C). Každý vzorek byl přístrojem temperován 3 až 5 minut, proměřen celkem třikrát a doba mezi jednotlivými měřeními činila 5 s. Naměřené hodnoty zeta potenciálů byly statisticky zpracovány stejně jako v předchozím případě.

Dále byly zásobní roztoky uloženy do sušárny vytemperované při každém měření na jinou teplotu (37 °C, 50 °C a 90 °C). Jednotlivé vzorky byly k analýze odebírány vždy v časových intervalech po 1 hodině, 3 hodinách a 5 hodinách. U každého vzorku byl proměřen zeta potenciál na přístroji Zetasizer Nano ZS a u vzorků biopolymerů molekulová hmotnost na přístroji SEC-MALS. Použité nastavení obou přístrojů bylo stejné jako v případě měření časové závislosti. Naměřená data z obou částí měření byla statisticky vyhodnocena stejným způsobem jako v případě časové závislosti.

4.4.4 Studium vlivu UV záření

Vzorek byl ze zásobních roztoků všech studovaných biopolymerů a monohydrátu glukosy, převedených přes stříkačkový filtr s póry o velikosti 0,45 μm, odebrán nejprve před ozáření UV světlem a posléze po ozáření UV světlem v časových intervalech 1 hodina, 3 hodiny a 5 hodin. Pro tuto část experimentu byla použita UV lampa s vlnovou délkou záření přibližně 306 nm. Zeta potenciál byl na přístroji Zetasizer Nano ZS měřen pouze u vzorků monohydrátu glukosy, CMC, chitosanu a BSA, zatímco molekulová hmotnost byla pomocí systému SEC-MALS analyzována u všech použitých biopolymerů. Oba přístroje byly nastaveny stejně jako v případě měření časové závislosti. Naměřená data z obou částí měření byla statisticky vyhodnocena stejným způsobem jako v předchozích případech.

4.4.5 Studium vlivu iontové síly

Ze zásobních roztoků biopolymerů bylo odebráno vždy 10 cm³ vzorku a převedeno přes stříkačkový filtr s póry o velikosti 5 μm. Takto připravené vzorky byly titrovány roztokem chloridu sodného o koncentraci 1 mol·dm⁻³ pomocí automatického titrátoru propojeného se Zetasizerem Nano ZS. Bylo nastaveno celkem 11 bodů měření pro každou látku v rozmezí koncentrací chloridu sodného ve výsledném roztoku od 0 mol·dm⁻³ do 0,1 mol·dm⁻³ s krokem přibližně 0,01 mol·dm⁻³. Analyzovanými parametry byly zeta potenciál, měřený pro každý bod třikrát, a objemový střed velikosti částic, měřený pro každý bod dvakrát.

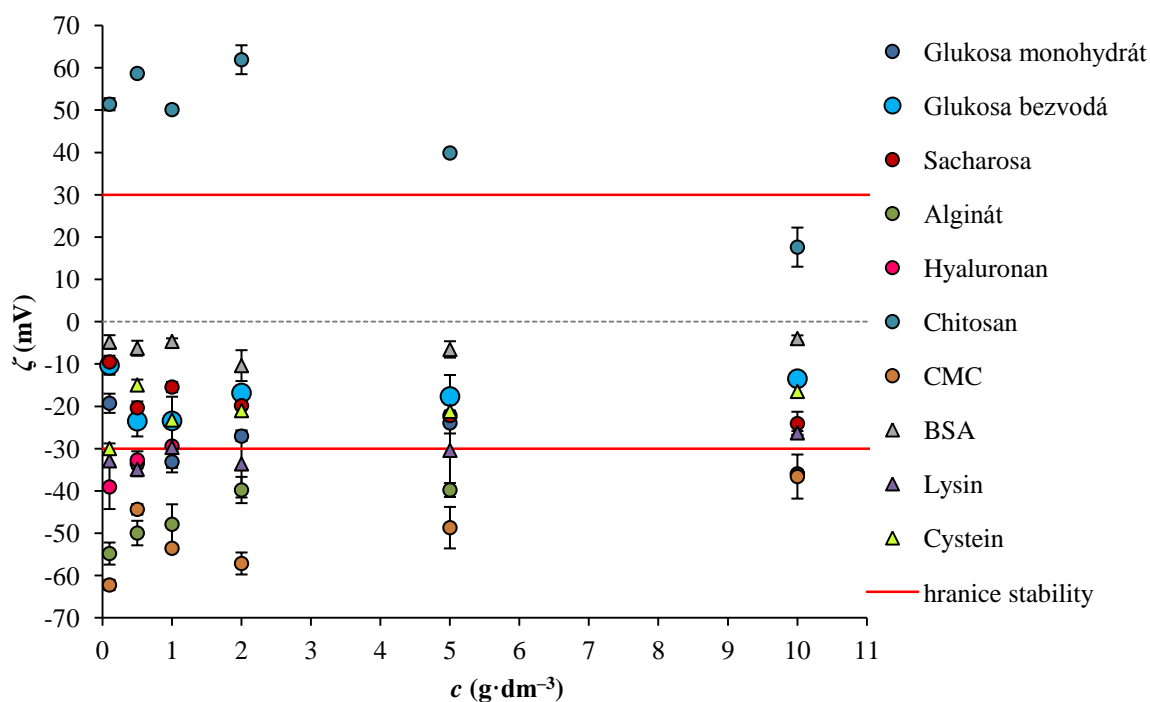
Pro sledování vlivu iontové síly na molekulovou hmotnost byly zásobní roztoky každého biopolymeru nejdříve převedeny přes stříkačkový filtr s póry o velikosti 0,45 μm a posléze rozděleny na třetiny. První roztok obsahoval samotný biopolymer. V druhém roztoku bylo k biopolymeru přidáno takové množství zásobního roztoku chloridu sodného, aby jeho výsledná koncentrace činila 0,1 mol·dm⁻³ (tedy hodnota posledního bodu titrace). Třetí roztok byl připraven tak, aby v něm koncentrace chloridu sodného odpovídala zhruba polovině jeho konečné koncentraci (tedy 0,05 mol·dm⁻³). Takto připravené roztoky byly analyzovány pomocí systému SEC-MALS při obdobném nastavení jako v předchozích případech.

Naměřená data z obou částí měření byla statisticky vyhodnocena stejným způsobem jako v předchozích případech.

5 VÝSLEDKY A DISKUSE

5.1 Koncentrační závislost a optimalizace přípravy vzorků pro další měření

Stabilita jednotlivých vzorků o různých koncentracích byla stanovena na základě zprůměrovaných hodnot zeta potenciálů, měřených technikou elektroforetického rozptylu světla, z nichž byla vytvořena závislost zeta potenciálu na koncentraci zkoumané látky.



Obr. 5: Závislost zeta potenciálu na koncentraci jednotlivých látek

Na Obr. 5 jsou znázorněny hodnoty zeta potenciálů pro jednotlivé vzorky při různých koncentracích. Je patrné, že stabilní v celém voleném rozsahu koncentrací zůstávají pouze roztoky CMC, alginátu sodného a hyaluronanu. Roztoky chitosanu po koncentraci $5 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$ se vyskytují výrazně nad horní hranicí stability, avšak při koncentraci $10 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$ je chitosan již nestabilní. V blízkosti dolní hranice stability se pohybují roztoky aminokyseliny lysinu, případně monohydrátu glukosy. Nestabilní v celém voleném rozsahu koncentrací jsou pak roztoky bezvodé glukosy, sacharosy, cysteinu a proteinu BSA.

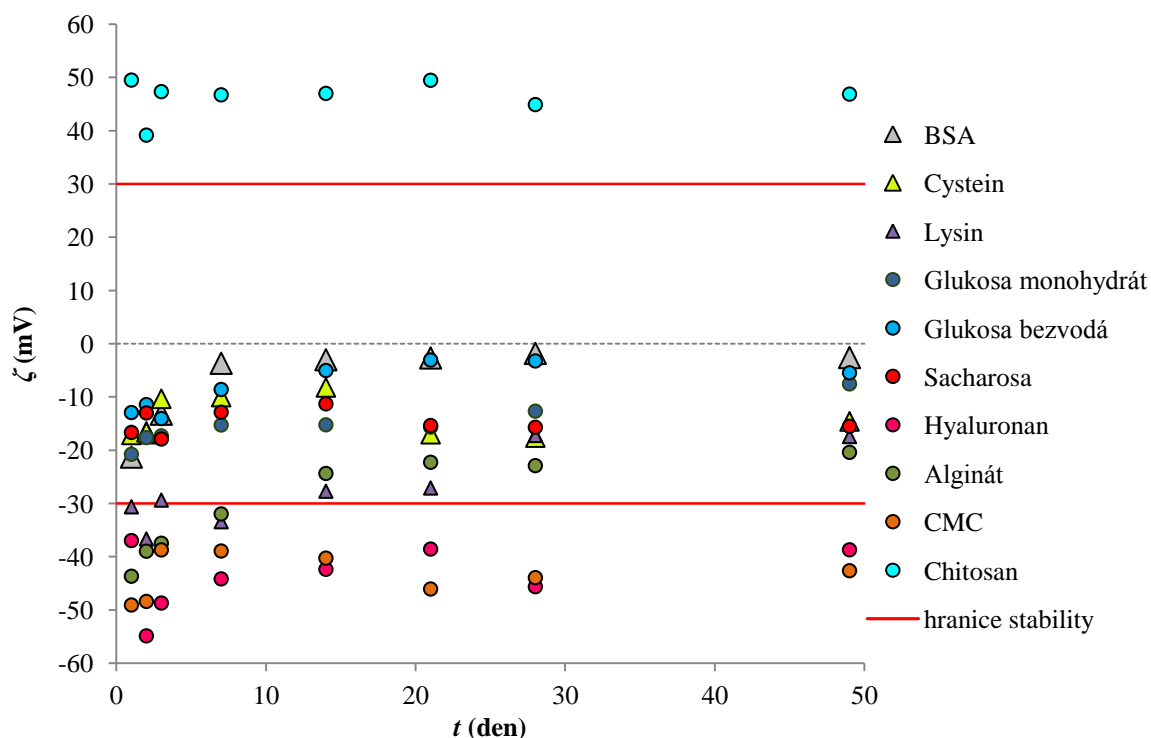
Cílem sestrojení této závislosti však bylo především určit optimální koncentraci pro všechny studované látky k dalším měřením se zřetelem na manipulaci se vzorky a meze detekce měřících přístrojů. Pro tyto účely byla určena koncentrace $2 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$. Vzorky biopolymerů o této koncentraci byly pro kontrolu následně proměřeny na SEC-MALS. Porovnání naměřených hodnot molekulových hmotností s hodnotami deklarovanými výrobcí je uvedeno v Tab. 1.

Tab. 1: Porovnání molekulových hmotností stanovených pomocí SEC-MALS s certifikovanými hodnotami

| biopolymer | $M_{w, \text{certifikovaná}}$ (kDa) | $M_{w, \text{stanovená}}$ (kDa) | ΔM_w (%) |
|---------------|-------------------------------------|---------------------------------|------------------|
| CMC | ~700 | 690,87 | -1,3 |
| hyaluronan | 300–500 | 380,95 | ~0,0 |
| alginát sodný | 410 | 65,46 | -84,0 |
| BSA | 66 | 66,21 | 0,3 |
| chitosan | ~20 | 2,02 | -89,9 |

5.2 Časová závislost

Na základě zprůměrovaných hodnot zeta potenciálů, měřených technikou elektroforetického rozptylu světla, byla v daných časových intervalech stanovena stabilita roztoků skladovaných ve tmě, z čehož byla následně vytvořena závislost zeta potenciálu na čase odběru vzorku (viz Obr. 6).



Obr. 6: Závislost zeta potenciálu na čase odběru vzorku z jednotlivých roztoků

Po celou dobu skladování zůstaly stabilní roztoky chitosanu, hyaluronanu a CMC. Během prvního týdne skladování vykazovaly stabilitu i roztoky alginátu sodného a lysinu, po dvou týdnech však v nich došlo ke vzrůstu zeta potenciálu nad hraniční hodnotu -30 mV, a staly se tak nestabilní. Roztoky obou glukos, sacharosy, cysteinu a BSA byly nestabilní již od počátku skladování. Výkyvy některých bodů v grafu souvisejí spíše s experimentální chybou.

Následně byly pomocí extrapolace na nulové hodnoty času vypočítány hodnoty ζ_0 (zeta potenciály v nulovém čase). Dále byla data podrobena vyhodnocení pomocí rovnice kinetiky prvního řádu (8)

$$\zeta = \zeta_0 \cdot e^{-k_a t}, \quad (8)$$

ze které posléze byla zjištěna rovnice přímky (9)

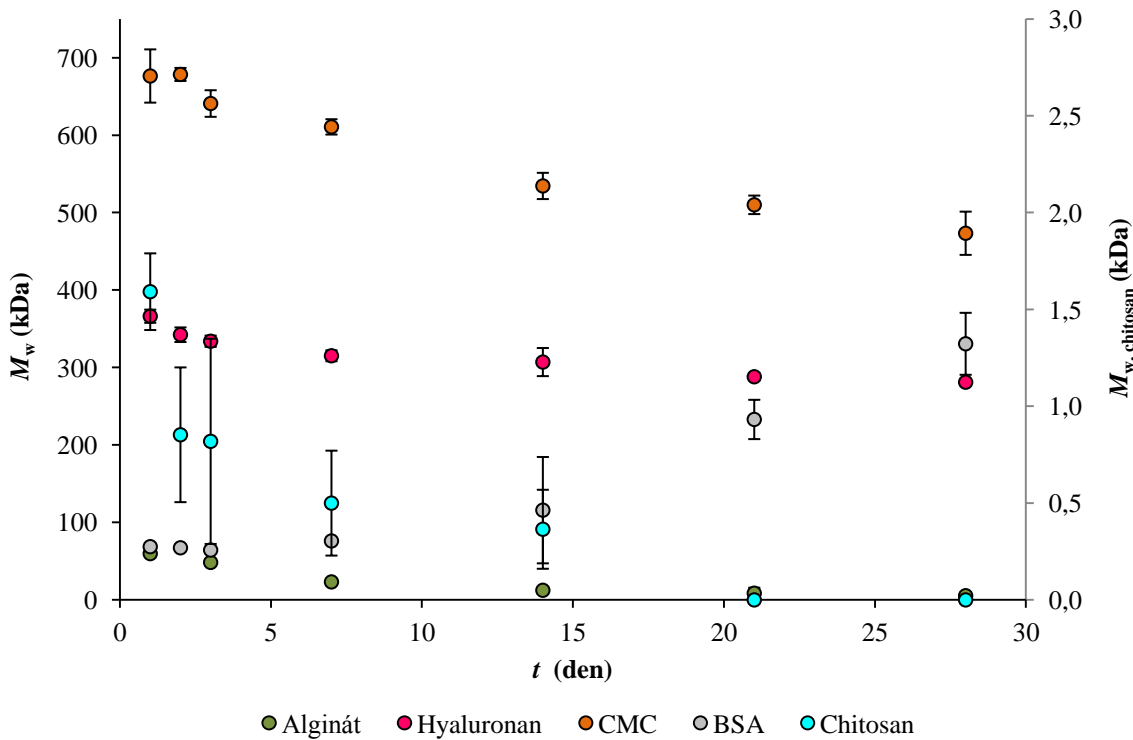
$$\ln \frac{\zeta}{\zeta_0} = -k_a \cdot t. \quad (9)$$

Z ní byla nakonec pomocí lineární regrese určena hodnota k_a , která odpovídá hodnotě rychlostní konstanty agregace. Vyjadřuje, jak rychle se zeta potenciál blíží k nule. Jinými slovy jde o míru vzniku aglomerátů v roztocích. Studované látky jsou v Tab. 2 seřazeny dle klesající rychlostní konstanty agregace. Je zřejmé, že agregaci nejvíce podléhaly BSA, bezvodá glukosa a cystein. Naopak téměř konstantní hodnotu zeta potenciálu po celou dobu skladování měly chitosan, CMC a sacharosa.

Tab. 2: Vypočtené hodnoty rychlostních konstant agregace pro každou látku

| studovaná látka | k_a (den ⁻¹) |
|--------------------|----------------------------|
| BSA | 0,0924 |
| bezvodá glukosa | 0,0722 |
| cystein | 0,0619 |
| monohydrát glukosy | 0,0508 |
| alginát sodný | 0,0358 |
| lysin | 0,0255 |
| hyaluronan | 0,0155 |
| sacharosa | 0,0052 |
| CMC | 0,0038 |
| chitosan | 0,0031 |

Molekulová hmotnost všech použitých biopolymerů byla v daných časových intervalech stanovena na základě zprůměrovaných hodnot, z nichž byla vytvořena závislost molekulové hmotnosti na čase odběru vzorku (viz Obr. 7).



Obr. 7: Závislost molekulové hmotnosti na čase odběru vzorku z jednotlivých roztoků

Výsledky měření ukázaly, že výraznější pokles molekulové hmotnosti během 4 týdnů skladování nastal u alginátu sodného, CMC a chitosanu. K mírné degradaci došlo také v případě hyaluronanu. Naopak molekulová hmotnost proteinu BSA se za tuto dobu několikanásobně zvýšila. U chitosanu a alginátu sodného byly naměřeny výrazně nižší molekulové hmotnosti, než uvádí jejich výrobce, což mohlo být způsobeno nedostatečným rozpuštěním biopolymeru v rozpouštědle a následným zachycením na filtru před samotným měřením nebo také degradací biopolymerů v pevné formě (viz publikace [62]).

Obdobným způsobem jako při vyhodnocení zeta potenciálu byly opět pomocí extrapolace na nulové hodnoty času vypočítány hodnoty M_{w0} (molekulové hmotnosti v nulovém čase). Následně byla data podrobena vyhodnocení pomocí rovnice kinetiky prvního řádu (10)

$$M_w = M_{w0} \cdot e^{-k_d t}, \quad (10)$$

ze které byla zjištěna rovnice přímky (11)

$$\ln \frac{M_w}{M_{w0}} = -k_d \cdot t. \quad (11)$$

Z ní byla nakonec pomocí lineární regrese určena hodnota k_d , která odpovídá hodnotě rychlostní konstanty degradace. Ta vyjadřuje, jak rychle docházelo k poklesu molekulové hmotnosti daného biopolymeru. Studované biopolymery jsou v Tab. 3 seřazeny dle klesající rychlostní konstanty degradace. Je patrné, že degradaci nejvíce podléhal chitosan a alginát sodný. V případech obou těchto biopolymerů však z výše uvedeného důvodu nelze získané výsledky považovat za příliš přesné. Hodnota rychlostní konstanty degradace

BSA má oproti ostatním biopolymerům zápornou hodnotu, která vypovídá o agregaci tohoto proteinu, což potvrzuje výsledky získané měřením zeta potenciálu.

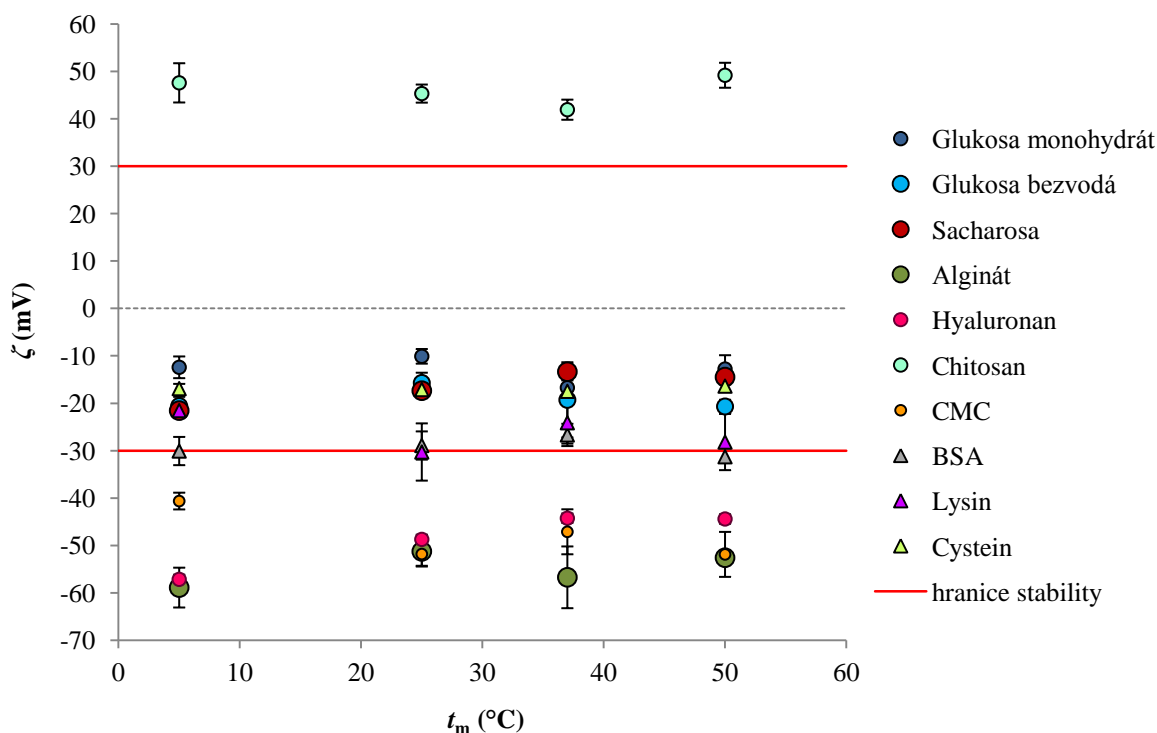
Tab. 3: Vypočtené hodnoty rychlostních konstant degradace pro každý biopolymer

| studovaný biopolymer | k_d (den ⁻¹) |
|----------------------|----------------------------|
| chitosan | 0,1119 |
| alginát sodný | 0,0907 |
| CMC | 0,0138 |
| hyaluronan | 0,0096 |
| BSA | -0,0597 |

5.3 Vliv dalších parametrů

5.3.1 Teplotní závislost

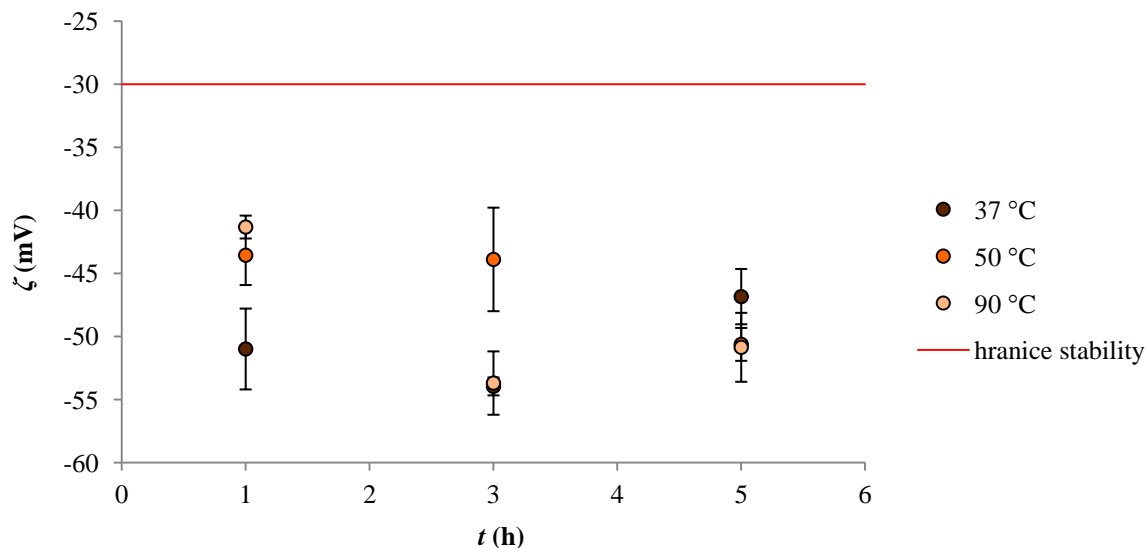
Podle zprůměrovaných hodnot zeta potenciálů byla stanovena stabilita jednotlivých vzorků vytemperovaných pomocí přístroje Zetasizer Nano ZS na různou teplotu, z čehož byla vytvořena závislost zeta potenciálu na teplotě měření (viz Obr. 8).



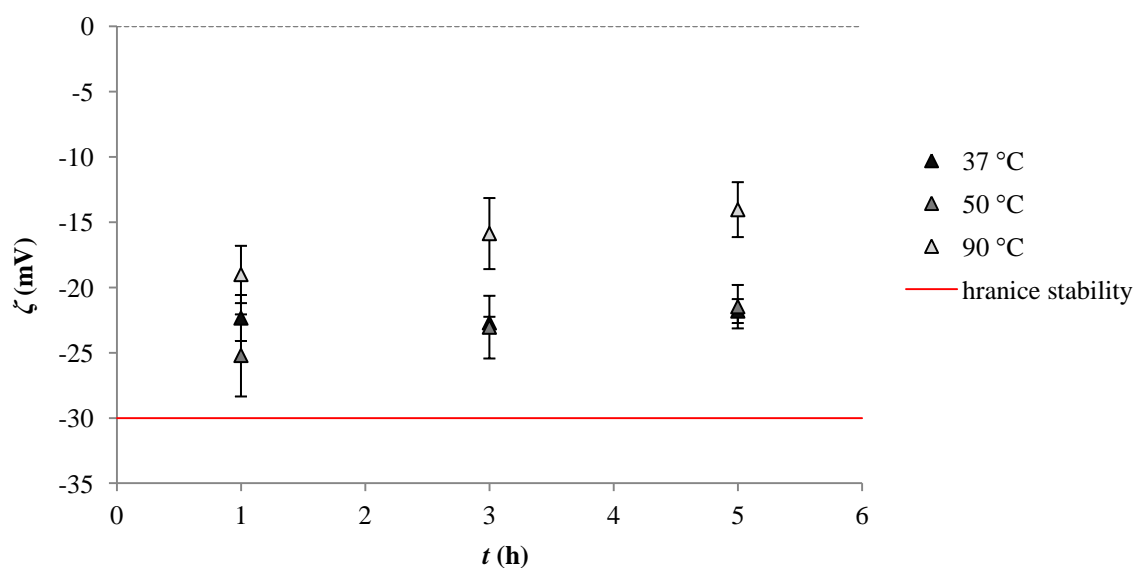
Obr. 8: Závislost zeta potenciálu na teplotě jednotlivých látek

Při všech měřených teplotách zůstaly stabilní roztoky alginátu sodného, hyaluronanu, chitosanu a CMC. V blízkosti dolní hranice stability se pohybují roztoky aminokyseliny lysinu a proteinu BSA. Nestabilní při všech měřených teplotách jsou roztoky obou glukos, sacharosy a cysteinu. Patrnější závislost zeta potenciálu na teplotě lze však pozorovat pouze u hyaluronanu, kdy zeta potenciál s rostoucí teplotou vzrostl, a CMC, kdy zeta potenciál s rostoucí teplotou mírně klesl. Výkyvy některých bodů v grafu souvisejí s experimentální chybou.

Dále byla stanovována stabilita jednotlivých látek uchovávaných v sušárně vyhřáté na různou teplotu. Ze zprůměrovaných hodnot zeta potenciálů byla sestrojena závislost zeta potenciálu na čase odběru vzorku pro každou studovanou látku při třech různých teplotách, které v grafech odpovídají jednotlivým řadám. Pro příklad jsou v hlavní části této práce na Obr. 9 a Obr. 10 uvedeny závislosti pro CMC a BSA.



Obr. 9: Závislost zeta potenciálu na čase odběru vzorku z roztoku CMC zahřátého na různé teploty

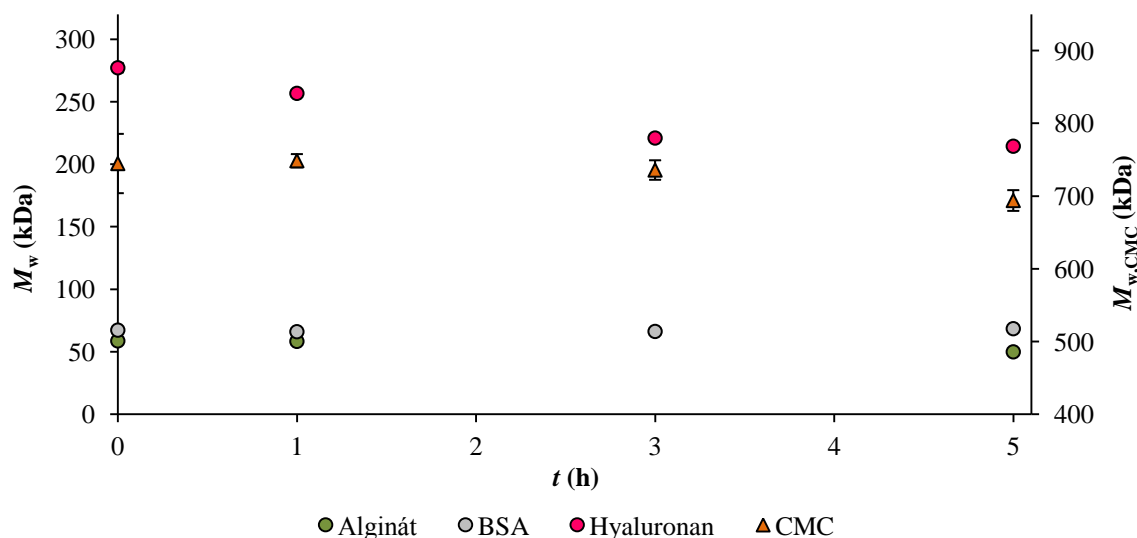


Obr. 10: Závislost zeta potenciálu na čase odběru vzorku z roztoku BSA zahřátého na různé teploty

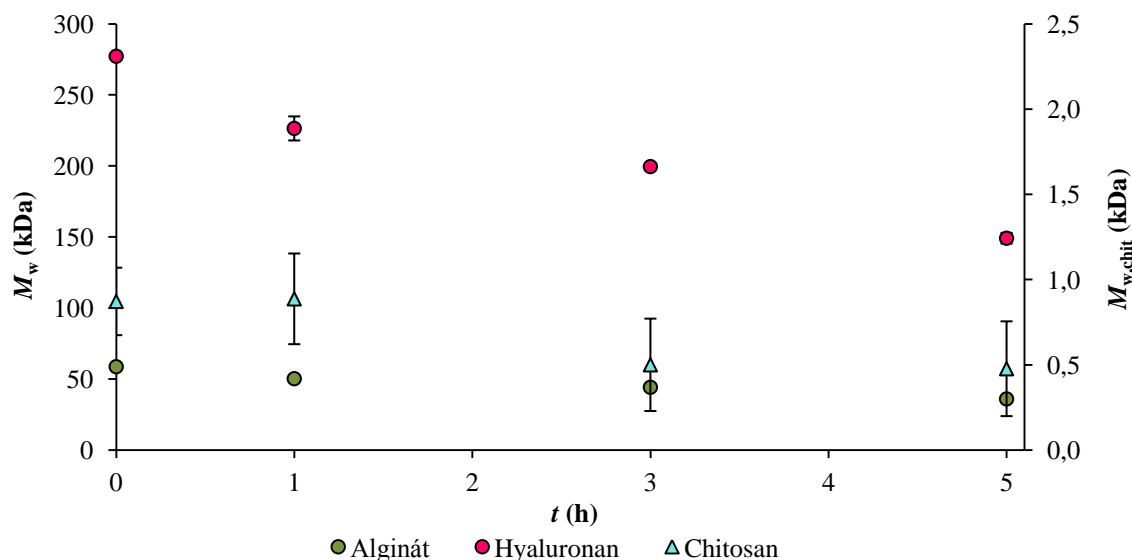
Z Obr. 9 lze usoudit, že roztok CMC zůstal vůči agregaci stabilní, protože v grafu nebyl zaznamenán jednotný klesající nebo rostoucí trend hodnot zeta potenciálu. Obdobné chování bylo pozorováno i u roztoků alginátu sodného, chitosanu a hyaluronanu. Na Obr. 10 je vidět nepatrný vzrůst záporného zeta potenciálu se zvyšující se teplotou roztoku BSA. Tento roztok zůstal při všech teplotách po celou dobu jejich působení vůči agregaci nestabilní. Po celou dobu působení všech tří teplot zůstaly nestabilní také roztoky jednoduchých sa-

charidů a aminokyseliny lysinu a závislost zeta potenciálu na rostoucí teplotě u nich byla spíše minimální. Roztok cysteinu rovněž nevykazoval stabilitu, ovšem jeho zeta potenciál se s delší dobou působení těchto teplot blížil k nule. Ve všech grafech je možné pozorovat výkyvy některých bodů, které však pravděpodobně souvisejí s experimentální chybou.

Molekulová hmotnost všech studovaných biopolymerů byla stanovena pouze při teplotách 50 °C a 90 °C. Ze zprůměrovaných hodnot pak byly sestrojeny závislosti molekulové hmotnosti na čase odběru vzorku pro každou teplotu.



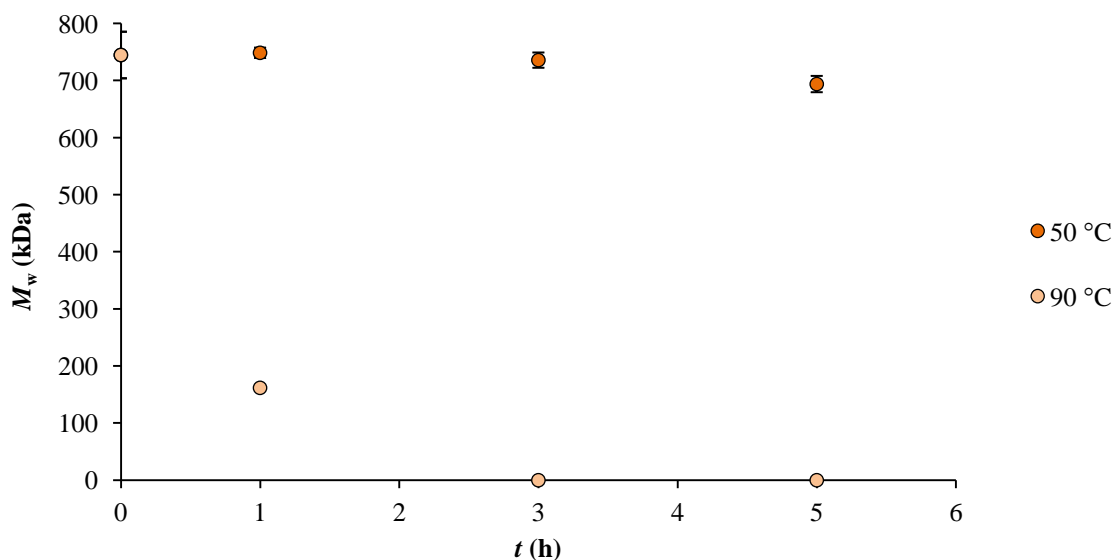
Obr. 11: Závislost molekulové hmotnosti na čase odběru vzorků zahřátých na 50 °C (hodnoty molekulové hmotnosti CMC jsou pro větší přehlednost v grafu uvedeny na vedlejší ose)



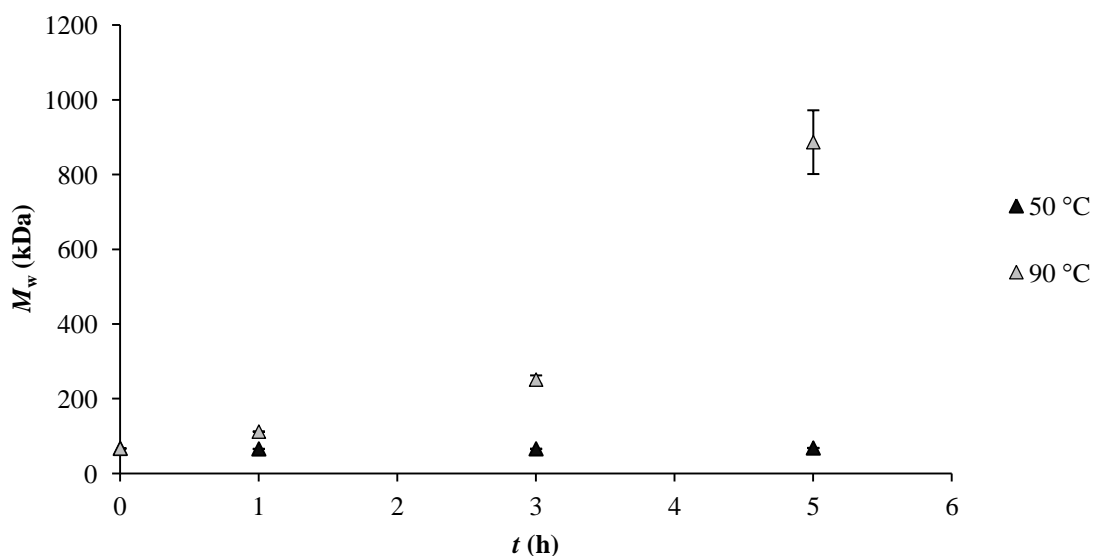
Obr. 12: Závislost molekulové hmotnosti na čase odběru vzorků zahřátých na 90 °C (hodnoty molekulové hmotnosti chitosanu jsou pro větší přehlednost v grafu uvedeny na vedlejší ose)

Z Obr. 11 lze vyčíst, že molekulovou hmotnost zkoumaných biopolymerů působení příslušné teploty po dobu 5 hodin nijak neovlivňuje. Výjimkou je pouze hyaluronan, jehož molekulová hmotnost se za tuto dobu nepatrně snížila. Hodnoty pro chitosan v grafu chybí, jelikož se ze softwaru Astra 6.1 nepodařilo získat reprodukovatelná data. Na Obr. 12 jsou zobrazeny pouze ty biopolymery, jejichž hodnoty molekulových hmotností se s časem působení dané teploty neměnily anebo jen mírně klesaly. Za zmínku stojí fakt, že u chitosanu a alginátu sodného byly naměřeny výrazně nižší hodnoty molekulové hmotnosti, než uvádí jejich výrobce, což mohlo být způsobeno nedostatečným rozpuštěním biopolymeru v rozpouštědle a následným zachycením na filtru před samotným měřením.

Závislosti molekulové hmotnosti na době působení různých teplot pro roztoky CMC a BSA jsou znázorněny samostatně na Obr. 13 a Obr. 14, jelikož lze na nich pozorovat velmi výraznou změnu molekulové hmotnosti při teplotě 90 °C oproti 50 °C. V případě CMC se jedná o exponenciální pokles molekulové hmotnosti a v případě BSA o exponenciální vzrůst. Tyto výsledky v podstatě odpovídají i měření zeta potenciálu při těchto teplotách. Proces degradace biopolymeru totiž zeta potenciál nijak zvlášť neovlivní, zatímco v případě agregace se zeta potenciál začne blížit nule.



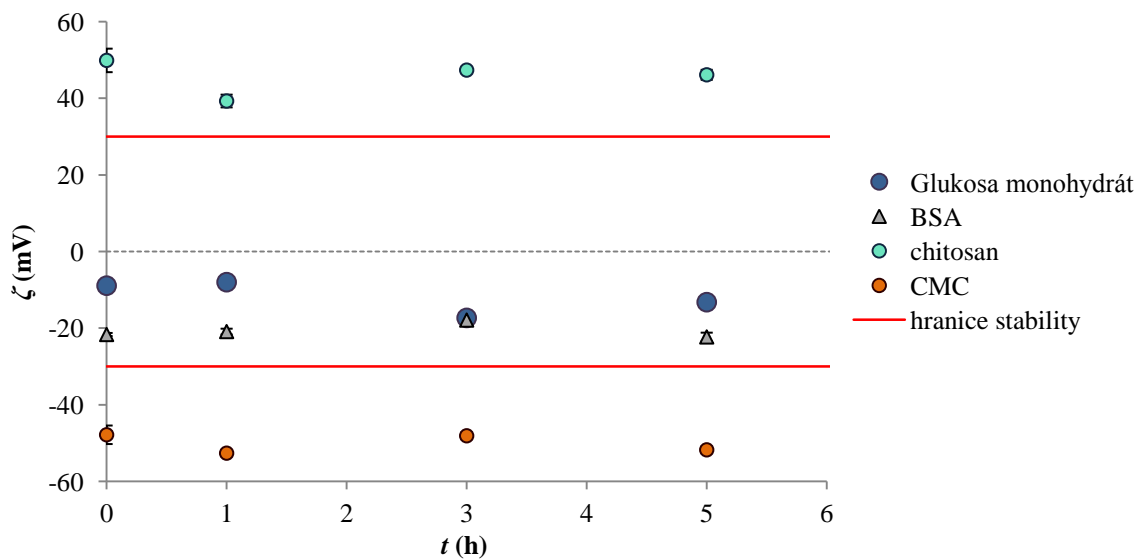
Obr. 13: Závislost molekulové hmotnosti na čase odběru vzorku z roztoku CMC zahřátého na různé teploty



Obr. 14: Zavislost molekule hmotnosti na čase odběru vzorku z roztoku BSA zahřátého na různé teploty

5.3.2 Studium vlivu UV záření

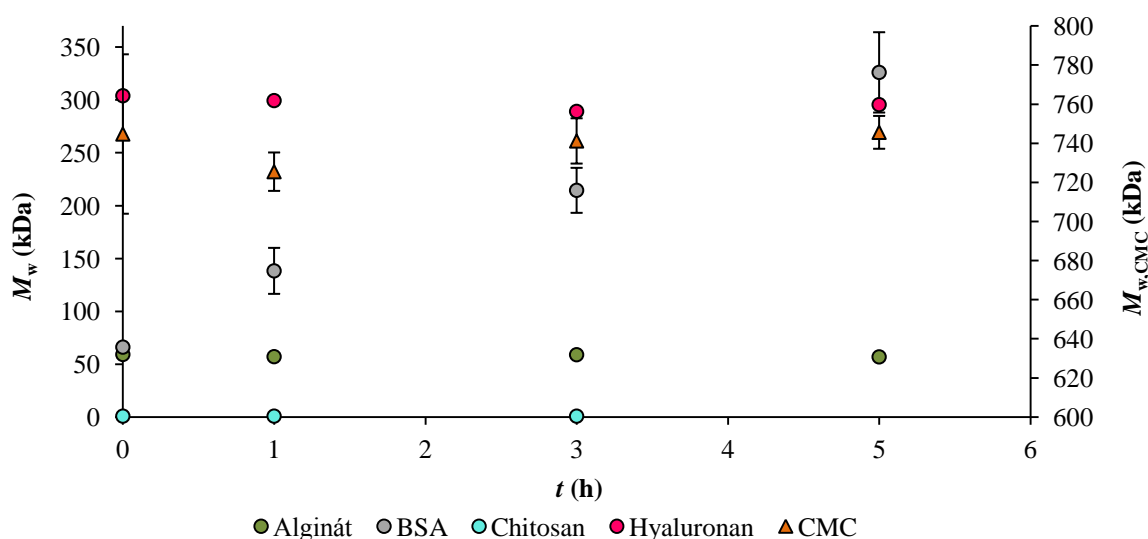
Stabilita vzorků monohydrátu glukosy, BSA, chitosanu a CMC po ozáření UV světlem byla stanovena na základě zprůměrovaných hodnot zeta potenciálů, z nichž byla vytvořena závislost zeta potenciálu na době působení UV záření.



Obr. 15: Zavislost zeta potenciálu na době působení UV záření

Na Obr. 15 jsou znázorněny hodnoty zeta potenciálů zkoumaných vzorků měřených při různých časech působení UV záření. Po celou dobu působení zůstal roztok chitosanu a CMC stabilní, zatímco roztok BSA a monohydrátu glukosy byly nestabilní. Lze usoudit, že UV záření takřka nemá v časovém úseku 5 hodin působení na tyto vzorky žádný vliv a jejich zeta potenciál je přibližně konstantní. Výkyvy některých bodů v grafu souvisejí s experimentální chybou.

Molekulová hmotnost všech použitých biopolymerů byla stanovena na základě zprůměrovaných hodnot, ze kterých byla vytvořena závislost molekulové hmotnosti na době působení UV záření znázorněná na Obr. 16.



Obr. 16: Závislost molekulové hmotnosti na době působení UV záření (hodnoty molekulové hmotnosti CMC jsou pro větší přehlednost v grafu uvedeny na vedlejší ose)

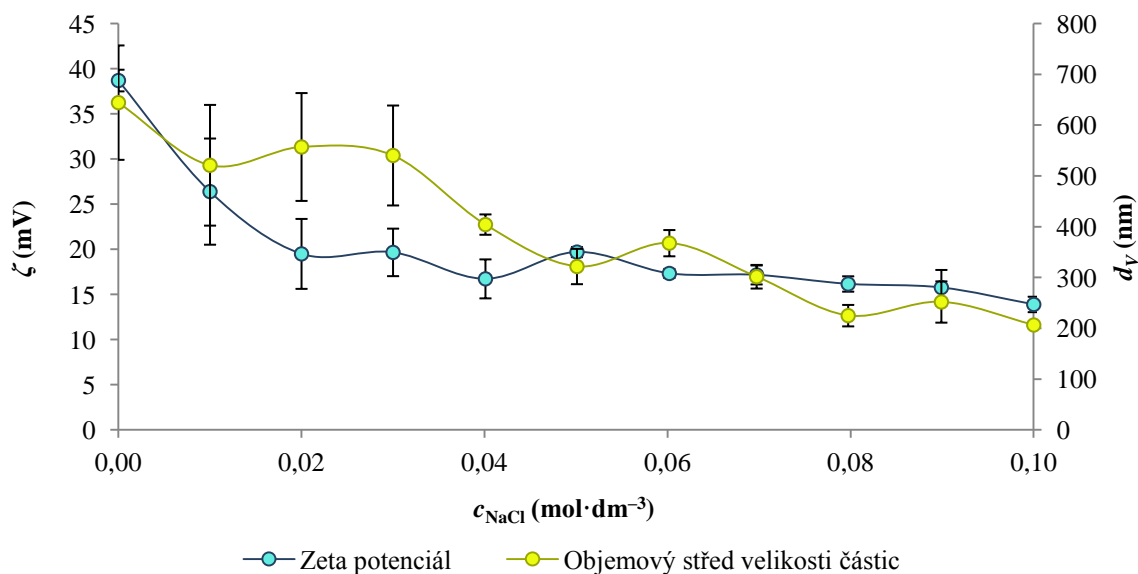
Z tohoto grafu lze usoudit, že stejně jako v případě měření zeta potenciálu nemá UV záření po dobu 5 hodin působení na molekulovou hmotnost téměř žádný vliv. Výjimku tvoří pouze protein BSA, jehož molekulová hmotnost se za tuto dobu několikanásobně zvýšila. Je rovněž důležité podotknout, že u chitosanu a alginátu sodného byly naměřeny výrazně nižší hodnoty molekulové hmotnosti, než uvádí jejich výrobce. To mohlo být způsobeno nedostatečným rozpuštěním biopolymeru v rozpouštědle a následným zachycením na filtru před samotným měřením. Přírůstky (popř. úbytky) molekulových hmotností jednotlivých biopolymerů po uplynutí celé doby působení UV záření uvádí Tab. 4.

Tab. 4: Přírůstky (popř. úbytky) molekulových hmotností studovaných biopolymerů v procentech

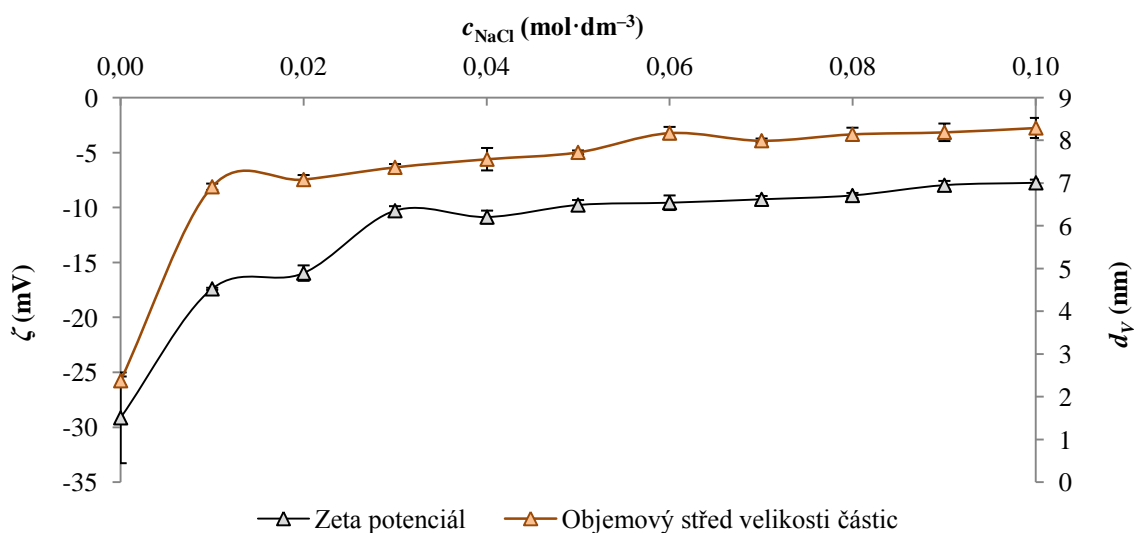
| studovaná látka | ΔM_w (%) |
|-----------------|------------------|
| BSA | 392,9 |
| CMC | 0,1 |
| hyaluronan | -2,8 |
| alginát sodný | -3,9 |
| chitosan | -4,7 |

5.3.3 Studium vlivu iontové síly

Na základě zprůměrovaných hodnot zeta potenciálů a objemových středů velikosti částic byla sestrojena závislost těchto dvou parametrů na koncentraci chloridu sodného ve výsledném roztoku pro každý biopolymer. V hlavní části této práce jsou pro příklad znázorněny závislosti pouze pro chitosan a BSA (viz Obr. 17 a Obr. 18). Ostatní grafy jsou uvedeny v přílohách (viz kap. 9).



Obr. 17: Závislost zeta potenciálu a objemového středu velikosti částic na koncentraci chloridu sodného v roztoku chitosanu (hodnoty objemového středu velikosti částic jsou uvedeny na vedlejší ose)

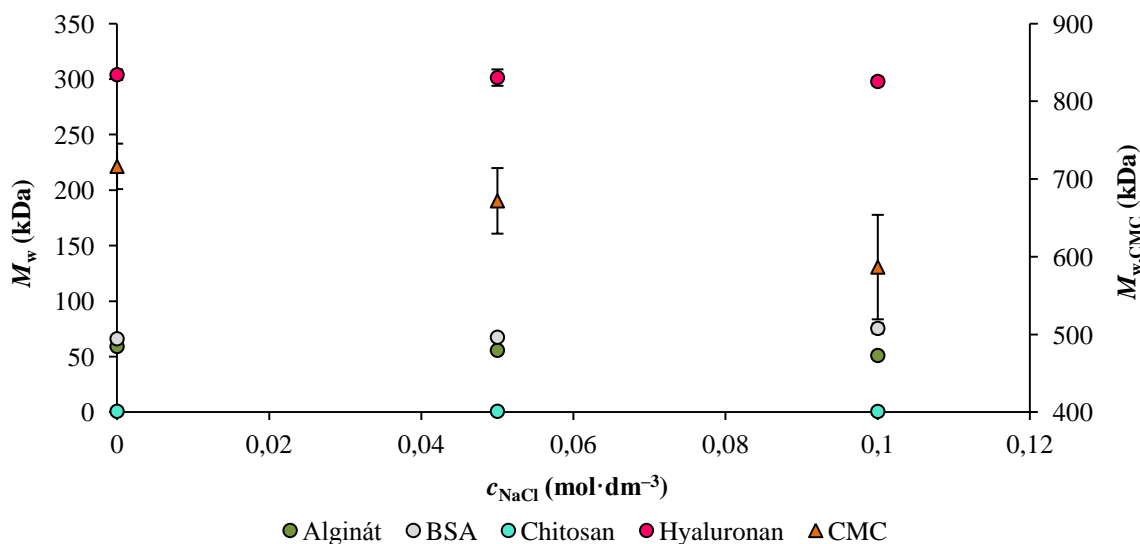


Obr. 18: Závislost zeta potenciálu a objemového středu velikosti částic na koncentraci chloridu sodného v roztoku BSA (hodnoty objemového středu velikosti částic jsou uvedeny na vedlejší ose)

Z Obr. 17 je patrné, že s rostoucí koncentrací chloridu sodného v roztoku chitosanu klesá jak zeta potenciál, tak pozvolna i objemový střed velikosti částic. Nevýraznější pokles zeta potenciálu je pak zaznamenán po prvním a druhém přidavku chloridu sodného, kdy se roztok chitosanu stal nestabilní. Podobný trend lze pozorovat i v případě alginátu sodného (viz Příloha č. 1) s tím rozdílem, že pokles absolutních hodnot zeta potenciálu nebyl v počáteční oblasti grafu tolik výrazný a jeho roztok se stal nestabilní až po pátém přidavku chloridu sodného. Na Obr. 18 lze pozorovat nejdříve výrazný vzrůst objemového středu velikosti částic BSA a záporného zeta potenciálu (již po prvním přidavku chloridu sodného). Při vyšších koncentracích chloridu sodného měly však oba studované parametry spíše

tendenci ustálit se na konstantních hodnotách. Při titraci CMC (viz Příloha č. 2) došlo také nejprve k nápadnějšímu vzrůstu záporného zeta potenciálu, zatímco při vyšší koncentraci soli byl jeho vzrůst pozvolný, ovšem výsledný roztok již stabilitu nevykazoval. Velikost částic v tomto roztoku se měnila nezávisle na rostoucí iontové síle, ale z grafu lze usoudit, že docházelo spíše ke zvětšování objemového středu velikosti částic, třebaže měření bylo zatíženo poměrně velkou chybou. V případě hyaluronanu (viz Příloha č. 3) opět došlo ke vzrůstu záporného zeta potenciálu (výraznějšímu po prvním a pátém přidavku) nad dolní hranici stability. Velikost částic v tomto roztoku se v počáteční fázi titrace nejdříve prudce snížila a poté náhle vzrostla. Při posledních přidavcích chloridu sodného bylo opět zaznamenáno zmenšení částic. Molekuly hyaluronanu však mají tvar podlouhlých tyčinek, zatímco technika DLS uvažuje spíše kulovité částice, proto nelze toto poslední měření považovat za přesné.

Molekulová hmotnost všech studovaných biopolymerů byla stanovena celkem ve třech bodech titrace podle zprůměrovaných hodnot, ze kterých byla vytvořena závislost molekulové hmotnosti na koncentraci chloridu sodného ve výsledném roztoku, která je zobrazena na Obr. 19.



Obr. 19: Závislost molekulové hmotnosti na koncentraci chloridu sodného v roztoku biopolymeru (hodnoty molekulové hmotnosti CMC jsou pro větší přehlednost v grafu uvedeny na vedlejší ose)

Z grafu na Obr. 19 lze říci, že zvýšení iontové síly přidavkem chloridu sodného do roztoku má vliv na molekulovou hmotnost jen některých studovaných biopolymerů. Jedná se hlavně o BSA, jehož molekulová hmotnost se mírně zvýšila, což alespoň částečně odpovídá i výsledkům z měření zeta potenciálu a objemového středu velikosti částic. Výrazná změna molekulové hmotnosti je pozorovatelná i u CMC, kde však bylo samotné měření zatíženo poměrně značnou chybou, jelikož vzorky měly vysokou polydisperzitu, která byla pravděpodobně zapříčiněna nedostatečným rozpuštěním tohoto biopolymeru v rozpouštědle. Tato skutečnost by mohla vysvětlit i střídavě se měnící velikost částic při samotné titraci roztoku CMC. Stejně jako v předchozích případech, tak i v této části experimentu byly naměřeny výrazně nižší molekulové hmotnosti chitosanu a alginátu sodného, než uvádí jejich výrobce, což opět mohlo být způsobeno nedostatečným rozpuštěním biopolymeru

v rozpouštědle a následným zachycením na filtru před samotným měřením. Přírůstky (popř. úbytky) molekulových hmotností jednotlivých biopolymerů po přidavku chloridu sodného odpovídajícímu výsledné koncentraci $0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ uvádí Tab. 5.

Tab. 5: Přírůstky (popř. úbytky) molekulových hmotností studovaných biopolymerů v procentech

| studovaná látka | ΔM_w (%) |
|-----------------|------------------|
| BSA | 14,1 |
| hyaluronan | -2,0 |
| alginát sodný | -13,6 |
| chitosan | -17,7 |
| CMC | -18,1 |

6 ZÁVĚR

Tato bakalářská práce je zaměřena na studium stability roztoků zkoumaných biopolymerů látek při různých podmínkách měření s využitím technik rozptylu světla. Nejdříve byly popsány jednotlivé skupiny biopolymerů samostatně a posléze byly shromážděny poznatky o zkoumání těchto látek pomocí různých druhů rozptylu světla. Dále byla provedena literární rešerše týkající se současného stavu této problematiky se zaměřením na analýzu polysacharidů a proteinů.

V rámci experimentální části práce byly použity metody elektroforetického rozptylu světla, SEC-MALS a dynamického rozptylu světla. Zkoumanými parametry byly zeta potenciál, molekulová hmotnost a velikost částic vybraných biopolymerů (hyaluronanu, alginátu sodného, chitosanu, CMC a BSA). Jednoduché sacharidy a aminokyseliny byly studovány pouze pro srovnání a byly použity jen při některých měřeních. Nejdříve však bylo nutné stanovit optimální koncentraci zkoumaných látek pro další měření. To bylo učiněno na základě závislosti zeta potenciálu na koncentraci dané látky, kdy s ohledem na manipulaci se vzorky byla vybrána hodnota $2 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$.

Hlavním předmětem této části práce bylo studium agregačního a degradačního chování vybraných látek v roztocích skladovaných ve tmě za laboratorní teploty, přičemž vzorky byly k analýze odebírány v různých časových intervalech. Z naměřených hodnot zeta potenciálů a molekulových hmotností byly stanoveny rychlostní konstanty agregace a degradace. Odolné vůči agregaci zůstaly chitosan, CMC a hyaluronan. Tyto biopolymery však podléhaly depolymerizaci. U proteinu BSA se naopak výrazně projevila agregace, tedy i značný nárůst jeho molekulové hmotnosti, což bylo možné rozpoznat i vizuálně. Během skladování se totiž postupně v roztoku vytvářela rosolovitá sraženina. Tento jev potvrzovaly i naměřené hodnoty zeta potenciálu blízké k nule, což vypovídá o tom, že molekuly této látky během procesu skladování téměř ztratily svůj povrchový náboj. Obecně lze říci, že výsledky měření zeta potenciálu byly ve většině případů potvrzeny výsledky měření molekulové hmotnosti.

Vedle dlouhodobého skladování byl také prozkoumán vliv různých teplot na roztoky vybraných látek. Bylo zjištěno, že zvyšující se teplota měla na dané vzorky pouze minimální vliv. Zajímavější ovšem byly výsledky měření vzorků uchovávaných při různých teplotách po dobu 5 hodin. Při teplotě $50 \text{ }^\circ\text{C}$ docházelo nanejvýš k mírnému poklesu molekulové hmotností a absolutních hodnot zeta potenciálů. Po zvýšení teploty na $90 \text{ }^\circ\text{C}$ však byly změny těchto parametrů znatelnější, a to zejména v případě CMC, jejíž molekulová hmotnost klesla na pouhý zlomek své původní hodnoty, a BSA, který podléhl agregaci, a tudíž se jeho molekulová hmotnost několikanásobně zvýšila. U hyaluronanu, alginátu sodného a chitosanu bylo zaznamenáno pouze mírné snížení molekulové hmotnosti, zatímco zeta potenciál se při této teplotě výrazně neměnil.

Dále byly roztoky biopolymerů vystaveny UV záření po dobu 5 hodin. Během této doby expozice byl zeta potenciál každého vzorku přibližně konstantní. Obdobných výsledků bylo dosaženo i po proměření molekulové hmotnosti. V případě BSA nicméně došlo k jejímu výraznému nárůstu, což opět vypovídá o agregaci jeho molekul. UV záření by mohlo mít větší vliv na pevné vzorky biopolymerů. Je totiž teoreticky možné, že bude docházet ke změnám struktury těchto látek.

Nakonec byly vzorky biopolymerů podrobeny vlivu iontové síly. To bylo uskutečněno pomocí titrace vzorku biopolymeru roztokem chloridu sodného. Hodnoty zeta potenciálů měly pro každý biopolymer přibližně stejný trend. Po prvních přídavcích chloridu sodného došlo k výraznějšímu poklesu jeho absolutních hodnot, při vyšší koncentraci soli již byl tento pokles spíše pozvolný. Po ukončení titrace byly všechny studované roztoky nestabilní. Velikost částic zde byla měřena v podobě jejich objemového středu a s rostoucí iontovou silou roztoku zpravidla klesala. Na molekulové hmotnosti se rostoucí koncentrace chloridu sodného ve studovaných roztocích biopolymerů překvapivě nijak zdatelně nepodpsala. K jejímu nepatrnému vzrůstu došlo pouze u BSA a ke slabému snížení u alginátu sodného, chitosanu a CMC.

Na závěr je důležité připomenout fakt, že všechny části experimentu byly provedeny pouze jednou a mnohá měření byla zatížena poměrně značnou chybou. Některá data dokonce nebyla vůbec reprodukovatelná (např. data pro molekulovou hmotnost chitosanu při 50 °C). Důvěryhodnější výsledky by proto byly získány po opakovaném měření. Přesto se použité techniky rozptylu světla ukázaly pro studium stálosti biopolymerů při různých podmínkách jako vhodné a lze je aplikovat při průmyslovém využití pro analýzu agregačních nebo degradačních procesů probíhajících v těchto látkách.

7 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] KOMERS, Karel. *Biofyzikální chemie: (vybrané kapitoly)*. 1. vyd. Pardubice: Univerzita Pardubice, 2003, 150 s. ISBN 80-719-4534-X.
- [2] POTÁČEK, Milan. *Organická chemie pro biology*. 2. uprav.vyd. Brno: MU, 1997, 208 s. ISBN 80-210-1558-6.
- [3] VELÍŠEK, Jan. *Chemie potravin. Rozš. a přeprac.* 3. vyd. Tábor: OSSIS, 2009, xxii, 580 s. ISBN 978-80-86659-17-6.
- [4] ZÁMORSKÝ, Z., *Nauka o makromolekulárních materiálech, syntetické polymery, jejich výroba, struktura a vlastnosti*, VUT Brno, 1968.
- [5] KIRK, Raymond E, Donald F OTHMER a Arza SEIDEL. *Food and feed technology*. Hoboken: Wiley-Interscience, 2008, 897 s. ISBN 0-470-17448-X.
- [6] BY JEAN-LUC WERTZ, Olivier Bédué and Jean P. *Cellulose science and technology*. 1st ed. Switzerland: EPFL Press, 2010. ISBN 978-294-0222-414.
- [7] THE CHEMISTRY STORE. *Methylcellulose*. Cayce, 2007. Dostupné z: <http://www.chemistrystore.com/methylcellulose.pdf>.
- [8] SARKER, Dipak K, Monique AXELOS a Yves POPINEAU. Methylcellulose-induced stability changes in protein-based emulsions. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 1999, vol. 12, 3-6, s. 147-160. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S0927-7765\(98\)00071-x](http://dx.doi.org/10.1016/S0927-7765(98)00071-x).
- [9] JONES, David. *Pharmaceutical applications of polymers for drug delivery*. Shawbury, U.K.: Rapra Technology Ltd., 2004, 124 p. Rapra review reports, v. 15, no. 6. ISBN 9781859574799.
- [10] KHOR, Eugene. Chitin: a biomaterial in waiting. *Current Opinion in Solid State and Materials Science* [online]. 2002, vol. 6, issue 4, s. 313-317. DOI: 10.1016/S1359-0286(02)00002-5.
- [11] M. Rinaudo, A. Domard: Solution properties of chitosan, vyšlo v G. Skjåk-Braek, T. Anthonsen, P. Sandford: *Chitin and chitosan*, 1988, vyd. Elsevier science publishing co., inc., ISBN 1-85166-395-9, s. 71-86.
- [12] VAVŘÍKOVÁ, Eva a Jarmila VINŠOVÁ. Chitosan a jeho farmaceutické aplikace. *Chemické listy* [online]. Praha: Česká společnost chemická, 2009. ISSN 0009-2770.
- [13] Khan T, Peh K, Ch'ng H., Mechanical, bioadhesive strength and biological evaluations of chitosan films for wound dressing, *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences*. 2000, vol. 3, s. 303-311.
- [14] PUSATERI, Anthony E., Simon J. MCCARTHY, Kenton W. GREGORY, Richard A. HARRIS, Luis CARDENAS, Albert T. MCMANUS a Cleon W. GOODWIN. Effect of a Chitosan-Based Hemostatic Dressing on Blood Loss and Survival in a Model of Severe Venous Hemorrhage and Hepatic Injury in Swine. *The Journal of*

Trauma: Injury, Infection, and Critical Care. 2003, vol. 54, issue 1, s. 177-182. DOI: 10.1097/00005373-200301000-00023.

- [15] SRIAMORNSAK, Pornsak, Mark A. BURTON a Ross A. KENNEDY. Development of polysaccharide gel coated pellets for oral administration. *International Journal of Pharmaceutics*. 2006, vol. 326, 1-2, s. 80-88. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2006.07.004>.
- [16] QIN, Yimin, Huiqun HU a Aixiang LUO. The conversion of calcium alginate fibers into alginic acid fibers and sodium alginate fibers. *Journal of Applied Polymer Science*. 2006, vol. 101, issue 6, s. 4216-4221. DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/app.24524>.
- [17] DRAGET, K. I. Alginates, vyšlo v Phillips, G. O.; Williams, P. A.: Handbook of hydrocolloids (2nd Edition). 2009, s. 807-828. ISBN 978-1-84569-4142.
- [18] IMESON, A. *Food stabilisers, thickeners and gelling agents*. Ames, Iowa: Wiley-Blackwell Pub., 2010, xiii, 352 p. ISBN 14-051-3267-1.
- [19] BOUYER, Eléonore, Ghazlene MEKHLLOUFI, Véronique ROSILIO, Jean-Louis GROSSIORD a Florence AGNELY. Proteins, polysaccharides, and their complexes used as stabilizers for emulsions: Alternatives to synthetic surfactants in the pharmaceutical field?. *International Journal of Pharmaceutics*. 2012, vol. 436, 1-2, s. 359-378. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2012.06.052.
- [20] KOGAN, Grigorij, Ladislav ŠOLTÉS, Robert STERN, Peter GEMEINER, J. SCHILLER, N. VOLPI, E. HRABÁROVÁ a L. ŠOLTÉS. Hyaluronic acid: a natural biopolymer with a broad range of biomedical and industrial applications. *Biotechnology Letters*. 2006, vol. 29, issue 1, s. 1-34. DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/9781118164792.ch1>.
- [21] COLEN, Sascha, Michel P.J. VAN DEN BEKEROM, Michiel MULIER a Daniël HAVERKAMP. Hyaluronic Acid in the Treatment of Knee Osteoarthritis. *BioDrugs*. 2012, vol. 26, issue 4, s. 257-268. DOI: 10.2165/11632580-000000000-00000.
- [22] CHEN, W. Y. JOHN a GIOVANNI ABATANGELO. Functions of hyaluronan in wound repair. *Wound Repair and Regeneration*. 1999, vol. 7, issue 2, s. 79-89. DOI: 10.1046/j.1524-475x.1999.00079.x.
- [23] SLÍVA, J., MINÁRIK, J. Hyaluronát - nejen pasivní pozorovatel, nýbrž aktivní modulátor imunních reakcí. *New EU Magazine of Medicine*. 2009, vol. 2, issue 1, s. 75-79.
- [24] ROSYPAL, Stanislav. *Úvod do molekulární biologie*. 4. inovované vyd. Brno. 2006, 289 s. ISBN 80-902-5625-2.
- [25] KLOUDA, Pavel. *Základy biochemie*. 2. přeprac. vyd. Ostrava: Nakladatelství Pavel Klouda, 2005, 144 s. ISBN 80-863-6911-0.
- [26] BLAŽEJ, A. et al. *Štruktúra a vlastnosti vláknitých bielkovín*. 1. vyd. Bratislava: Veda, 1978, 453 s. ISBN 71-156-78.

- [27] DALEV, Pencho G. Utilisation of waste feathers from poultry slaughter for production of a protein concentrate. *Bioresource Technology*. 1994, vol. 48, issue 3, s. 265-267. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/0960-8524\(94\)90156-2](http://dx.doi.org/10.1016/0960-8524(94)90156-2).
- [28] GENNADIOS, Aristippos. *Protein-based films and coatings*. Boca Raton: CRC Press, 2002, xx, 650 p. ISBN 15-871-6107-9.
- [29] MOKREJŠ, Pavel a Ferdinand LANGMAIER. *Aplikace přírodních polymerů*. Vyd. 1. Zlín: Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, 2008, 90 s. ISBN 978-80-7318-674-6.
- [30] SHEN, Haibo, Zhengqin GU, Kang JIAN a Juan QI. In vitro study on the binding of gemcitabine to bovine serum albumin. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2013, vol. 75, s. 86-93. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpba.2012.11.021>.
- [31] OHSHIMA, T a Raymond C. MURRAY. Forensic wound examination. *Forensic Science International*. 2000, vol. 113, 1-3, s. 109-130. DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/9781118062241.ch4>.
- [32] BAUER, Martin, Ira GRAMLICH, Silke POLZIN a Dieter PATZELT. Quantification of mRNA degradation as possible indicator of postmortem interval—a pilot study. *Legal Medicine*. 2003, vol. 5, issue 4, s. 220-227. DOI: 10.1016/j.legalmed.2003.08.001.
- [33] JUUSOLA, Jane a Jack BALLANTYNE. Messenger RNA profiling: a prototype method to supplant conventional methods for body fluid identification. *Forensic Science International*. 2003, vol. 135, issue 2, s. 85-96. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/s0379-0738\(03\)00197-x](http://dx.doi.org/10.1016/s0379-0738(03)00197-x).
- [34] Efficacy and mechanism evaluation programme. EACH study: Evaluation of Array Comparative genomic Hybridisation and non-invasive prenatal diagnosis using cell free fetal DNA in prenatal diagnosis of fetal anomalies [online]. [cit. 2013-05-04]. Dostupné z: http://www.eme.ac.uk/funded_projects/PDFs/106003info.pdf.
- [35] JONASZ, Mirosław a G FOURNIER. *Light scattering by particles in water: theoretical and experimental foundations*. London, UK: Academic Press, 2007, x, 704 p.
- [36] XU, By Renliang. *Particle characterization: light scattering methods*. Digital print. Dordrecht [u.a.]: Kluwer, 2001. ISBN 14-020-0357-9.
- [37] Intensity of Scattered Light and Molar Mass. *WYATT Technology Europe* [online]. © 2014 [cit. 2015-01-28]. Dostupné z: http://www.wyatt.eu/index.php?id=molar_mass.
- [38] *Zetasizer Nano Příručka pro uživatele*. 3. vydání. Malvern instruments Ltd., Spojené království, 2007, 191 s.

- [39] WYATT, Philip J., Stephen E. HARDING a G. C. BERRY. Light scattering and the absolute characterization of macromolecules. *Analytica Chimica Acta*. 1993, vol. 272, issue 1, s. 41-131. DOI: 10.1007/978-1-4020-4465-6_2.
- [40] Angular Dependence of Scattered Light and Size. *WYATT Technology Europe* [online]. © 2014 [cit. 2015-01-28]. Dostupné z: http://www.wyatt.eu/index.php?id=rms_radius&L=0%22onfocus%3D%22blurLink%28this%29%27%27.
- [41] Absolute Molar Mass Characterisation. *WYATT Technology Europe* [online]. © 2014 [cit. 2015-01-29]. Dostupné z: http://www.wyatt.eu/index.php?id=static_light_scattering.
- [42] KHANNA, S. Size Exclusion Chromatography. *Pharmaceutical Reviews*. 2005, vol. 3, no. 5. ISSN 1918-5561.
- [43] POTHECARY, M. When only a MALS detector will do.... *The Analytical Scientist* [online]. 2014, č. 514 [cit. 2015-01-30]. Dostupné z: <https://theanalyticalscientist.com/issues/0514/when-only-a-mals-detector-will-do/>.
- [44] Equations and Data Analysis. *WYATT Technology* [online]. © 2014 [cit. 2015-01-30]. Dostupné z: <http://www.wyatt.com/theory/rayleighscattering/equations-and-data-analysis.html>.
- [45] Biopolymeros marinos. *Ciencia Marina y otros asuntos* [online]. © 2015 [cit. 2015-02-18]. Dostupné z: http://www.madrimasd.org/blogs/ciencia_marina/2009/09/01/124042.
- [46] TRATHNIGG, B. Size-exclusion Chromatography of Polymers. In: *Encyclopedia of Analytical Chemistry*. John Wiley & Sons, 2000, s. 8008-8034.
- [47] AU, W., J. KIRKLAND a D. BLY. *Modern size-exclusion liquid chromatography: practice of gel permeation and gel filtration chromatography*. New York: Wiley, c1979, xv, 476 p. ISBN 04-710-3387-1.
- [48] Absolute Molar Mass Determination by Multi-Angle Light Scattering. *WYATT Technology Europe* [online]. © 2014 [cit. 2015-02-02]. Dostupné z: <http://www.wyatt.eu/index.php?id=multi-angle-light-scattering&L=0%22onfocus%3D%22blurLink%28this%29%27%27>.
- [49] Molecular weight. *Malvern Instruments Ltd.* [online]. © 2015 [cit. 2015-02-02]. Dostupné z: <http://www.malvern.com/en/products/measurement-type/molecular-weight/default.aspx>.
- [50] Size Determination by Dynamic Light Scattering. *WYATT Technology Europe* [online]. © 2014 [cit. 2015-02-02]. Dostupné z: <http://www.wyatt.eu/index.php?id=dynamic-light-scattering>.
- [51] COSGROVE, T. *Colloid science: principles, methods and applications*. 2nd ed. Chichester, West Sussex: Wiley, 2010, xiv, 375 p. ISBN 978-144-4320-206.
- [52] SRINIVASAN, Supramaniam. *Fuel cells from fundamentals to applications*. 1. Ed. New York: Springer, 2006. ISBN 978-038-7354-026.

- [53] GRAHAME, David C. The Electrical Double Layer and the Theory of Electrocapillarity. *Chemical Reviews*. 1947, vol. 41, issue 3, s. 441-501. DOI: 10.1021/cr60130a002.
- [54] Malvern Instruments Ltd.: Stabilita suzpenzí a disperzí – Proč jsou parametry jako velikost částic, zeta potenciál a reologické vlastnosti tak důležité?. *Chemagazín*, 2011, vol. 21, issue 4, s. 14–16.
- [55] HUNTER, Robert J. *Zeta potential in colloid science: principles and applications*. New York: Academic Press, 1981, xi, 386 p. Colloid science (London, England: 1976), 2. ISBN 01-236-1960-2.
- [56] LI, Shaoxin, Da XING, Junfeng LI, D. W. SCHAEFER, C. C. HAN, J. G. H. JO-OSTEN, H. M. FIJNAUT, Klaus GAST, Klaus GAST a Christian FIEDLER. Dynamic Light Scattering Application to Study Protein Interactions in Electrolyte Solutions. *Journal of Biological Physics*. 2004, vol. 30, issue 4, s. 313-324. DOI: 10.1007/s10867-004-0997-z.
- [57] Molecular size. *Malvern Instruments Ltd.* [online]. © 2015 [cit. 2015-02-08]. Dostupné z: <http://www.malvern.com/en/products/measurement-type/molecular-size/default.aspx>.
- [58] PECORA, Robert. *Dynamic light scattering: applications of photon correlation spectroscopy*. New York: Plenum Press, c1985, xiv, 420 p. ISBN 03-064-1790-1.
- [59] Zeta potential applications. *Brookhaven Instruments Corporation* [online]. © 2015 [cit. 2015-02-13]. Dostupné z: <http://www.brookhaveninstruments.com/literature/library/zeta-potential-applications>.
- [60] POLČÍK, M. Sledování nanášení barviva pomocí měření zeta-potenciálu. *Chemagazín*. 2010, vol. 20, issue 4, s. 28–29. Dostupné z: http://www.chemagazín.cz/userdata/chemagazín_2010/file/CHXX_4_cl9.pdf.
- [61] KALINA, M.; SMILEK, J.; KLUČÁKOVÁ, M. Aging of biopolymers and biocolloids studied by light scattering techniques. In *Studentská konference Chemie je život – Sborník příspěvků*. Brno: VUT v Brně, 2013. s. 300-305. ISBN: 978-80-214-4823-0.
- [62] SIMULESCU, Vasile, Jakub MONDEK, Michal KALINA a Miloslav PEKAŘ. Kinetics of long-term degradation of different molar mass hyaluronan solutions studied by SEC-MALLS. *Polymer Degradation and Stability*. 2015, vol. 111, s. 257-262. DOI: 10.1016/j.polymdegradstab.2014.12.005.
- [63] MORRIS, Gordon A., Jonathan CASTILE, Alan SMITH, Gary G. ADAMS a Stephen E. HARDING. The kinetics of chitosan depolymerisation at different temperatures. *Polymer Degradation and Stability*. 2009, vol. 94, issue 9, s. 1344-1348. DOI: 10.1016/j.polymdegradstab.2009.06.001.
- [64] PA, Jeng-Hsan a T. Leon YU. Light Scattering Study of Chitosan in Acetic Acid Aqueous Solutions. *Macromolecular Chemistry and Physics*. 2001, vol. 202, issue 7, s. 985-991. DOI: 10.1002/1521-3935(20010401)202:7<985::aid-macp985>3.0.

co;2-2.

- [65] TSAIH, Min Larnng a Rong Huei CHEN. Effect of degree of deacetylation of chitosan on the kinetics of ultrasonic degradation of chitosan. *Journal of Applied Polymer Science*. 2003-12-20, vol. 90, issue 13, s. 3526-3531. DOI: 10.1002/app.13027.
- [66] ANTHONSEN, M., K. VARUM, A. HERMANSSON, O. SMIDSROD a D. BRANT. Aggregates in acidic solutions of chitosans detected by static laser light scattering. *Carbohydrate Polymers*. 1994, vol. 25, issue 1, s. 13-23. DOI: 10.1016/0144-8617(94)90157-0.
- [67] YE, Hongping. Simultaneous determination of protein aggregation, degradation, and absolute molecular weight by size exclusion chromatography–multiangle laser light scattering. *Analytical Biochemistry*. 2006, vol. 356, issue 1, s. 76-85. DOI: 10.1016/j.ab.2006.05.025.

8 Seznam použitých zkratek a symbolů

8.1 Seznam zkratek

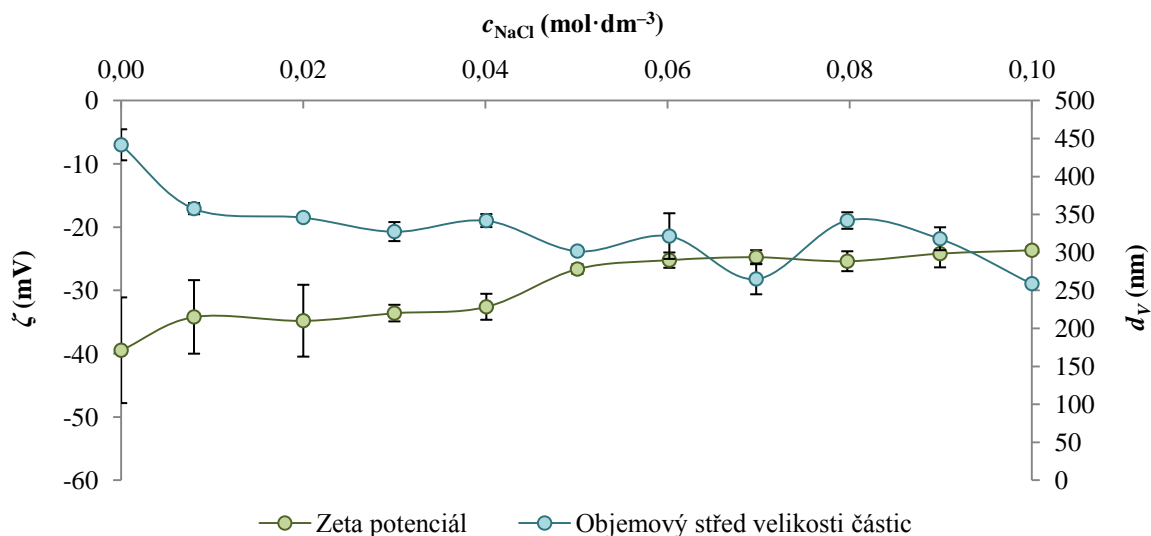
| Zkratka | Význam |
|----------|--|
| UV | ultrafialový (ultraviolet) |
| CMC | karboxymethylcelulosa (carboxymethyl cellulose) |
| MC | methylcelulosa (methyl cellulose) |
| HA | kyselina hyaluronová (hyaluronic acid) |
| BSA | hovězí sérový albumin (bovine serum albumin) |
| RNA | kyselina ribonukleová (ribonucleic acid) |
| tRNA | transferová RNA |
| mRNA | mediátorová RNA |
| rRNA | ribosomální RNA |
| DNA | kyselina deoxyribonukleová (deoxyribonucleic acid) |
| SLS | statický rozptyl světla (static light scattering) |
| RMS | střední kvadratický též gyrační (root mean square) |
| SEC-MALS | Size Exclusion Chromatography-Multi Angle Light Scattering |
| DLS | dynamická rozptyl světla (dynamic light scattering) |
| ELS | elektroforetický rozptyl světla (electrophoretic light scattering) |
| GAPDH | glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenáza |
| UV-VIS | ultrafialová a viditelná oblast spektra (ultraviolet-visible) |

8.2 Seznam symbolů

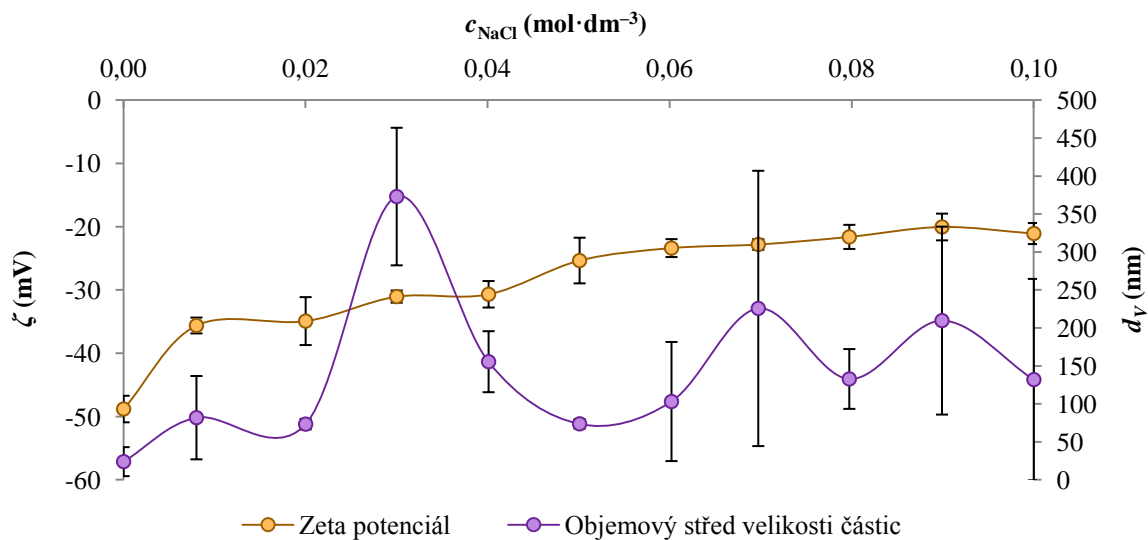
| Symbol | Význam |
|--------------------|---|
| kDa | kilodalton |
| MDa | megadalton |
| nm | nanometr |
| μm | mikrometr |
| mm | milimetr |
| cm | centimetr |
| dm | decimetr |
| mV | milivolt |
| $^{\circ}\text{C}$ | stupeň Celsia |
| g | gram |
| s | sekunda |
| h | hodina |
| W | watt |
| I | intenzita rozptýleného světla |
| I_0 | intenzita dopadajícího záření |
| λ | vlnová délka záření |
| λ_0 | vlnová délka dopadajícího záření ve vakuu |
| α | polarizovatelnost částice |
| r | poloměr částice |

| | |
|--------------|---|
| θ | úhel rozptylu |
| K | optická konstanta |
| c | koncentrace |
| $R(\theta)$ | přebytečná intenzita rozptýleného světla |
| $P(\theta)$ | komplexní funkce popisující úhlovou závislost na rozptýleném světle |
| M_w | molekulová hmotnost |
| ΔM_w | přírůstek molekulové hmotnosti |
| M_{w0} | molekulová hmotnost v nulovém čase |
| A_2 | druhý viriální koeficient |
| $g(\tau)$ | autokorelační funkce |
| t | čas |
| D | difúzní koeficient |
| Γ | rychlost poklesu korelace |
| q | velikost rozptylového vektoru |
| n_0 | index lomu disperzního prostředí |
| k_B | Boltzmannova konstanta |
| T | termodynamická teplota |
| t_m | teplota měření |
| η | viskozita |
| π | Ludolfovo číslo |
| r_h | hydrodynamický poloměr částice |
| ν | elektroforetická pohyblivost |
| D_e | dielektrická konstanta |
| ζ | zeta potenciál |
| ζ_0 | zeta potenciál v nulovém čase |
| U | napětí |
| l | délka kyvety |
| k_a | rychlostní konstanta agregace |
| k_d | rychlostní konstanta degradace |
| e | Eulerovo číslo |
| d_v | objemový střed velikosti částic (volume mean) |

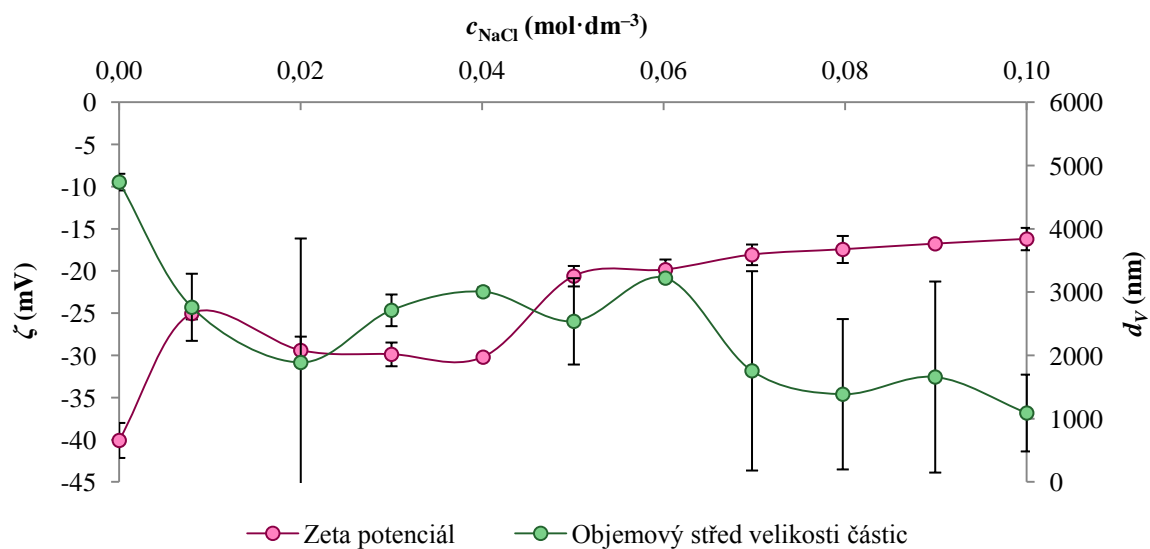
9 PŘÍLOHY



Příloha č. 1: Závislost zeta potenciálu a objemového středu velikosti částic na koncentraci chloridu sodného v roztoku alginátu sodného (hodnoty objemového středu velikosti částic jsou uvedeny na vedlejší ose)



Příloha č. 2: Závislost zeta potenciálu a objemového středu velikosti částic na koncentraci chloridu sodného v roztoku CMC (hodnoty objemového středu velikosti částic jsou uvedeny na vedlejší ose)



Příloha č. 3: Závislost zeta potenciálu a objemového středu velikosti částic na koncentraci chloridu sodného v roztoku hyaluronanu (hodnoty objemového středu velikosti částic jsou uvedeny na vedlejší ose)