



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE

INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

STUDIUM HYDRATACE BIOKOLOIDŮ

STUDY OF HYDRATION OF BIOCOLLOIDS

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Lucie Hývnarová

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

prof. Ing. Martina Klučáková, Ph.D.

BRNO 2022

Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP1611/2020 Akademický rok: 2021/22
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie
Studentka: **Bc. Lucie Hývnarová**
Studijní program: Spotřební chemie
Studijní obor: Spotřební chemie
Vedoucí práce: **prof. Ing. Martina Klučáková, Ph.D.**

Název diplomové práce:

Studium hydratace biokoloidů

Zadání diplomové práce:

1. Seznámit se s problematikou biokoloidů a jejich hydratace.
2. Seznámit se s možností studia hydratace biokoloidů, zejména kalorimetrickými metodami a metodami termické analýzy.
3. Na základě poznatků získaných v předchozích bodech vybrat vhodné biokoloidy, navrhnout a provést experimenty.
4. Zhodnotit výsledky experimentů a formulovat závěry.

Termín odevzdání diplomové práce: 13.5.2022:

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

Bc. Lucie Hývnarová
studentka

prof. Ing. Martina Klučáková,
Ph.D.
vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 1.2.2021

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

ABSTRAKT

Předmětem studia této diplomové práce bylo prozkoumání hydratačních vlastností vybraných biokoloidů. Konkrétně byly zkoumány huminové látky (fulvinové a huminové kyseliny), hyaluronové kyseliny ve třech molekulových hmotnostech, dextran a chitosan. Hydratační vlastnosti vybraných biokoloidních látek byly zkoumány různými metodami. Byl sledován vliv obsahu vody při rozpouštění látek a různá doba, po kterou voda působila na biokoloidy. Výsledkem měření diferenční kompenzační kalorimetrie DSC byly entalpie a teploty krystalizace a tání. Při použití perfúzní kalorimetrie byly výsledkem tepelné toky. K určení vlhkosti použitých biokoloidů, po měření perfúzní kalorimetri, byla použita termogravimetrické analýza TGA.

ABSTRACT

The subject of this master's thesis was to examine the hydration properties of selected biocolloids. Specifically, humic substances (fulvic and humic acids), hyaluronic acids in three molecular weights, dextran and chitosan were investigated. Hydration properties of selected biocolloid substances were studied by various methods. The influence of water content during the dissolution of substances and the different time for which water acted on biocolloids were studied. Differential scanning calorimetry DSC measurements resulted in enthalpies and crystallization and melting points. Heat fluxes resulted in the use of perfusion calorimetry. TGA thermogravimetric analysis was used to determine the moisture content of the biocolloids used, after measuring the perfusion calorimeter.

KLÍČOVÁ SLOVA

biokoloidy, dextran, chitosan, huminové látky, hyaluronová kyselina, kalorimetrie, termogravimetrie

KEYWORDS

biocolloids, calorimetry, dextran, chitosan, humic substances, hyaluronic acid, thermogravimetry

HÝVNAROVÁ, Lucie. *Studium hydratace biokoloidů*. Brno, 2022. Dostupné také z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/131358>. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav fyzikální a spotřební chemie. Vedoucí práce Martina Klučáková.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovávala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Diplomová práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být použita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího diplomové práce.

.....

Podpis studenta

PODĚKOVÁNÍ

V první řadě bych na tomto místě chtěla především poděkovat vedoucí mé diplomové práce paní prof. Ing. Martině Klučákové, Ph.D. za poskytnuté rady, vstřícnost, pomoc a trpělivost při řešení mé diplomové práce. Také bych chtěla poděkovat paní Ing. Jitce Krouské Ph.D. a paní Leoně Kubíkové za pomoc při měření a cenné rady.

OBSAH

1	Úvod.....	7
2	Teoretická část	8
2.1	Huminové látky.....	8
2.1.1	Co to jsou huminové látky.....	8
2.1.2	Vznik huminových látek.....	8
	Teorie kondenzace cukrů s aminy	9
	Waksmanova ligninová teorie	10
	Flaigova polyfenolová teorie	11
2.1.3	Dělení huminových látek	12
2.1.4	Využití huminových látek v zemědělství	14
2.2	Kyselina hyaluronová (hyaluronan).....	14
2.2.1	Výskyt a funkce.....	15
2.3	Chitosan.....	16
2.3.1	Vlastnosti a využití.....	16
2.4	Dextran	17
2.4.1	Vlastnosti a využití.....	17
2.5	Metody měření hydratace biokoloidů.....	19
2.5.1	Diferenciální termická analýza (DTA)	19
2.5.2	DSC s kompenzací příkonu	20
2.5.3	Gravimetrická termická analýza (termogravimetrie – TG).....	20
2.6	Současný stav řešené problematiky	21
2.6.1	Huminové látky.....	21
2.6.2	Chitosan.....	22
2.6.3	Dextran	23
3	Experimentální část.....	25
3.1	Použité biopolymery.....	25
3.2	Použité přístroje	25
3.3	Diferenční kompenzační kalorimetrie DSC – vlastní měření.....	26
3.4	Perfúzní kalorimetrie	26
3.5	Termografická analýza TGA.....	26
4	Výsledky a diskuze	27
4.1	Diferenční kompenzační kalorimetrie DSC.....	27
4.2	Perfúzní mikrokolorimetrie a termogravimetrická analýza.....	40

4.3	Perfúzní kalorimetrie a diferenční kompenzační kalorimetrie.....	45
5	Závěr	48
6	Seznam zkratk	49
7	Zdroje.....	50
8	Přílohy.....	53

1 ÚVOD

V biologické funkci molekul hraje hydratace jednu z nejdůležitějších rolí. Specifické interakce mezi vodou a biokolloidem hrají klíčovou roli v jeho makroskopických vlastnostech. Voda je důležitým médiem při transportu živin a membránových procesech. Molekuly vody nejčastěji interagují s hydrofilními skupinami, například hydroxylové, karboxylové a karbonylové skupiny. Molekuly vody většinou interagují s hydrofilními skupinami, jako jsou například hydroxylové, karboxylové a karbonylové skupiny. Vazba vody na tyto skupiny obvykle vede k tvorbě trojrozměrných sítí vodíkových vazeb, ve které se spoje mohou neustále přerušovat a znovu vytvářet.

Cílem této práce bylo prostudování hydratačních vlastností vybraných biokoloidních látek, konkrétně huminových látek (fulvinové a huminové kyseliny), hyaluronové kyseliny ve třech molekulových hmotnostech, chitosanu a dextransu. Tyto látky byly vybrány, protože nachází široké uplatnění v mnoha oblastech a jejich hydratační vlastnosti zde hrají velkou roli.

Pro studium bylo použito několik metod. Hlavní využívanou metodou byla diferenční kompenzační kalorimetrie, pomocí které byly zjišťovány sorpční vlastnosti a míra hydratace vybraných biokoloidů. Další metodou byla perfúzní kalorimetrie, kde byl použit kontinuální přísun relativní vlhkosti. A poslední použitou metodou byla termogravimetrická analýza, díky které jsme zjistili vlhkost vzorku, který byl podroben kalorimetrickým měřením.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Huminové látky

Nejprve si popíšeme, co to huminové látky jsou, a poté se podíváme na vznik huminových látek dle různých teorií. Další částí této kapitoly bude dělení huminových látek. V závěru této kapitoly bude popsáno využití huminových látek v zemědělství.

2.1.1 Co to jsou huminové látky

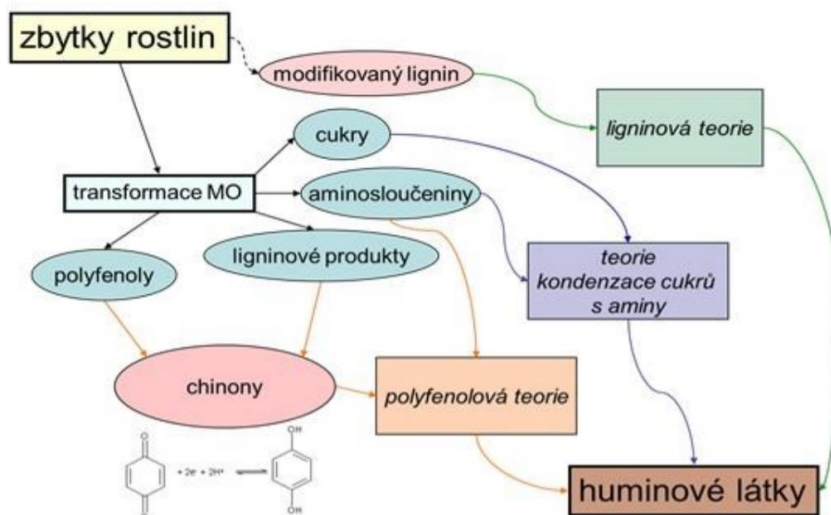
Huminové látky (HL) jsou látky organického původu (rostlinného i živočišného). Můžeme je nalézt v půdě, a to konkrétně v humusu, což je část půdy, která je nejvýživnější a vzniká rozkladem odumřelých těl rostlin a živočichů. V dostatečně vlhkém a anaerobním prostředí vznikají z ligninu a hnědého uhlí oxyhumolity, což jsou nejvýznamnější zdroje huminových látek. Lignin představuje vysokomolekulární systém, který je hlavním zdrojem huminových látek. Ty můžeme také nalézt v kompostech, léčivých bahnech, rašelině, ale lze je nalézt také v jílovitých nebo stojatých vodách, ale to pouze ve stopovém množství. Elementární zastoupení jednotlivých prvků, které obsahují huminové a fulvinové kyseliny je zaznamenáno v Tab. 1.[1][2]

Tab. 1: Prvkové složení huminových a fulvinových kyselin

prvkové složení	huminové kyseliny (hm. %)	fulvinové kyseliny (hm. %)
uhlík	53,8–58,7	40,7–50,6
kyslík	32,8–38,3	39,7–49,8
vodík	3,3–6,2	3,8–7,0
dušík	0,8–4,3	0,9–3,3

2.1.2 Vznik huminových látek

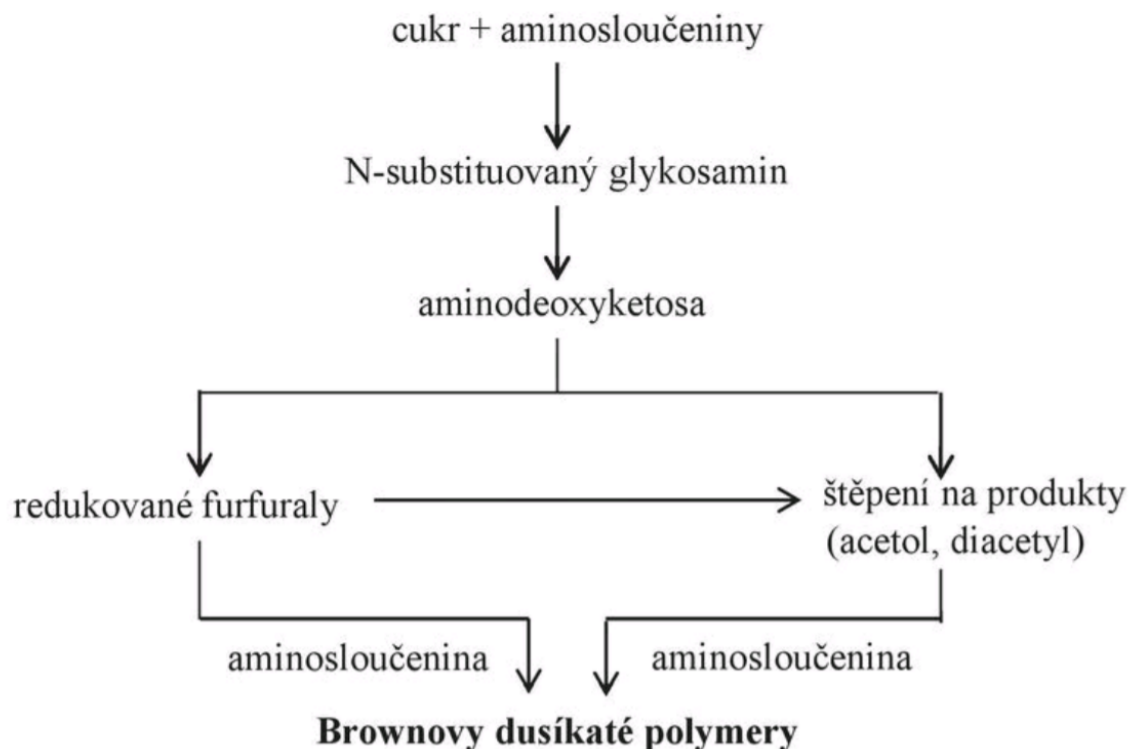
Huminové látky vznikají procesem, který je podmíněný syntézou dekompozitů hmoty organického původu. Tento proces zapříčiňují mikroorganismy a je nazýván humifikací. Při tomto procesu jsou upevňovány vazby mezi polárními a nepolárními látkami, a tím se zvyšuje jejich schopnost přijímat živiny, jako jsou stopové prvky, aminokyseliny, lipidy a tak podobně. Teorií o vzniku huminových látek existuje celá řada. V této práci se ovšem zmíním pouze o třech nejdůležitějších teoriích, které jsou vědci nejvíce přijímány. Schéma těchto tří teorií je uvedeno na Obr. 1. [3]



Obr. 1: Schéma vzniku huminových látek [9]

Teorie kondenzace cukrů s aminy

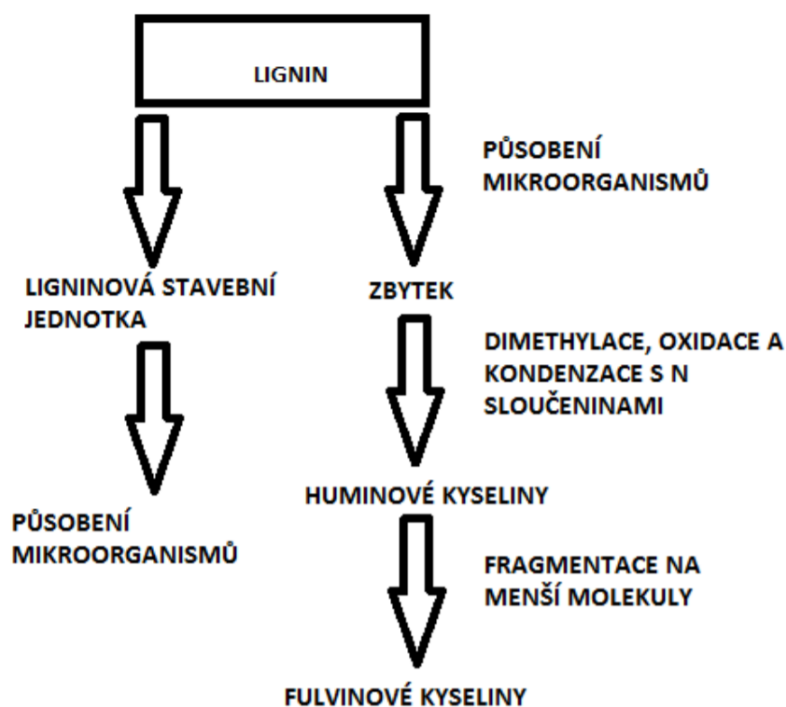
Stěžejním bodem této teorie jsou mikroorganismy, které rozkládají půdní organický materiál. Tento rozklad způsobí kondenzaci monomerů redukujících cukrů s aminokyselinami. Následuje adice aminoskupin ($-\text{NH}_2$) na karboxylové skupiny ($-\text{COOH}$) monosacharidů a vznikají N-substituované glykosylaminy. Následují reorganizace, cyklizace a dekarboxylace v molekule a vznikají tři uhlíkaté kyslíkaté zbytky (glyceraldehyd, dihydroxyaceton) a ty mohou polymerizovat v přítomnosti aminokyselin za vzniku hnědě zbarvených produktů. Schéma je uvedeno na Obr. 2. [2]



Obr. 2: Schéma vzniku huminových látek dle teorie kondenzace cukrů s aminy

Waksmanova ligninová teorie

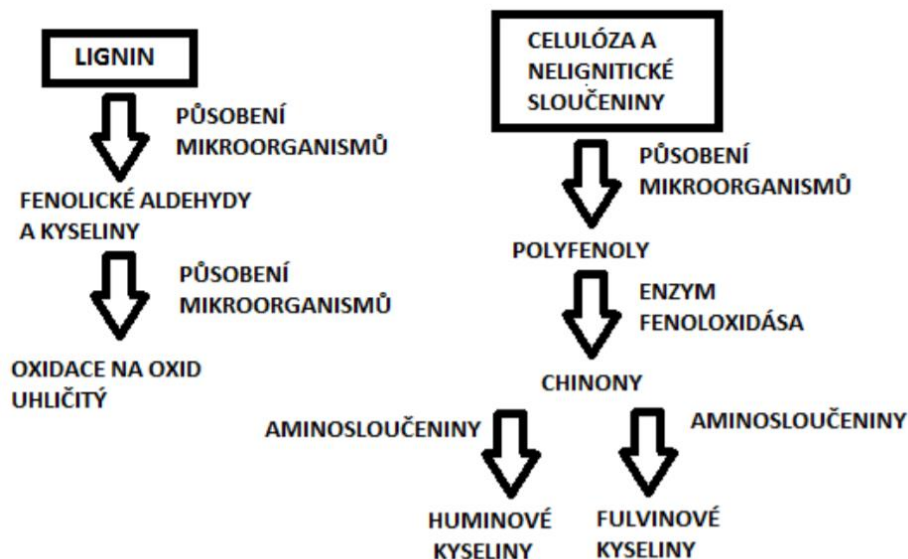
Dlouhá léta vědci předpokládali, že huminové látky byly odvozeny z ligninu. Pro mikroorganismy je, na rozdíl od ostatních rostlinných složek těžce rozložitelný. Zbytek ligninu, který mikroorganismy nevyužijí, tedy zůstane nerozložený a dochází zde k mnoha modifikacím jako například ztráta methoxylových skupin (OCH₃) doprovázená vznikem o-hydroxyfenolů a oxidací alifatických postranních řetězců za vzniku karboxylových skupin (COOH). Materiál, který vznikl touto modifikací, slouží jako předmět pro další přeměny, kdy vzniknou huminové kyseliny a poté fulvinové kyseliny. Schéma je uvedeno na Obr. 3.[4]



Obr. 3: Schéma teorie vzniku fulvinových kyselin

Flaigova polyfenolová teorie

Flaigova teorie je vědci nejvíce uznávanou metodou vzniku huminových látek. Na počátku máme nízkomolekulární látky, které tvoří velké molekuly pomocí kondenzace a polymerace. Tato teorie má dvě podoby. Jedna cesta vychází z toho, že fenolické aldehydy a kyseliny z ligninu jsou mikrobiálně atakovány, a tím dochází k přeměně na chinony. Tyto chinony dále podléhají polymerizaci za vzniku huminových makromolekul. Druhá cesta se zabývá tím, že polyfenoly jsou syntetizovány mikroorganismy např. z celulózy a ty jsou enzymaticky oxidovány na chinony, které jsou následně převedeny na huminové látky. Proces je zobrazen na Obr. 4. [5]



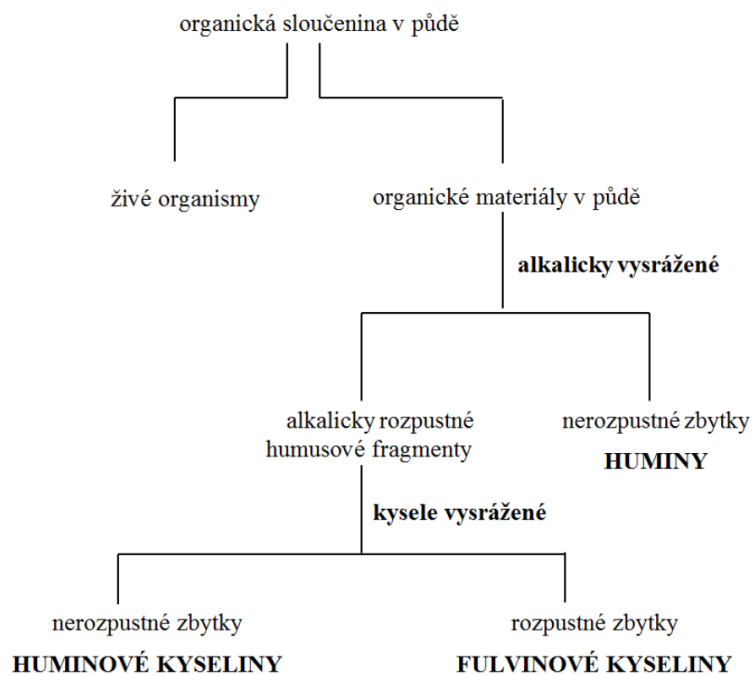
Obr. 4: Mechanismus polyfenolové kondenzace

Huminové kyseliny jsou nejdůležitější huminovou látkou, neboť huminové kyseliny pomáhají zpevňovat půdu a přenášejí živiny z půdy do rostlin. Díky tomu, že jsou huminové látky schopné udržet vodu v půdě, tak urychlují klíčení semen a také rozvíjí půdní mikroflóru. Pro půdu jsou nesmírně důležité i bakterie, protože vylučují enzymy, které katalyzují uvolňování vápníku a fosforu z nerozpustných fosfátů. [6]

2.1.3 Dělení huminových látek

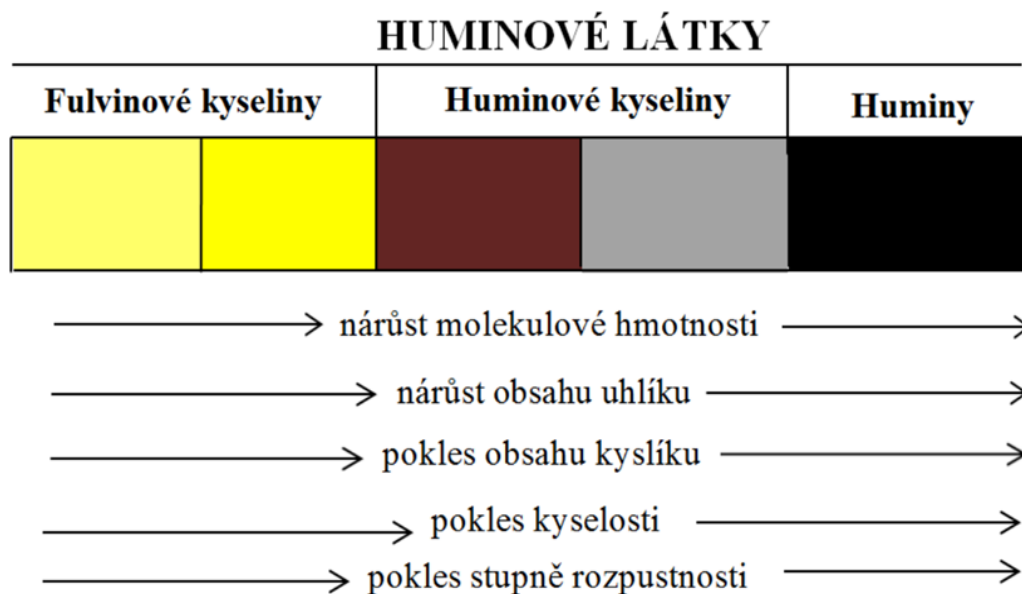
V dnešní době dělíme huminové látky na tři různé typy. Prvním typem jsou fulvinové kyseliny, ty jsou frakcí huminových látek. Tato frakce se rozpouští jak v kyselém, tak i v bazickém prostředí. Fulvinové kyseliny se tak mohou rozpouštět v celém rozsahu pH. [6]

Druhým typem huminových látek jsou huminové kyseliny. Tyto látky jsou rozpustné pouze v alkalickém prostředí, v kyselém prostředí se srážejí a vznikají koaguláty, pH ale musí být nižší než 2, protože s rostoucí hodnotou pH dochází k postupné disociaci nejdříve karboxylových a poté i fenolických skupin. Rozpustnost tedy souvisí s nízkou disociací funkčních skupin obsažených v hlavní kostře skeletu. Třetím a posledním typem jsou huminy. Huminy tvoří všechny ostatní nerozpustné látky, které jsou přítomny v půdní organické hmotě, a které nemůžeme převést do roztoku žádnou acidobazickou úpravou. Přehled vzniku všech frakcí je uveden na Obr. 5. [6]



Obr. 5: Klasifikace jednotlivých frakcí huminových látek [6]

Huminové látky nám určují kvalitu půdy a jsou nesmírně důležité pro její úrodnost. Jejich strukturu vždy tvoří: uhlík, kyslík, vodík a dusík, bez ohledu na to, jakou cestou vznikly. Huminové kyseliny, fulvinové kyseliny a huminy jsou si svou strukturou velmi blízké, ale po fyzikální stránce se odlišují. Typické vlastnosti jsou shrnuty na Obr. 6. [7]



Obr. 6: Vlastnosti huminových látek [6]

Jedním z hlavních rozdílů jednotlivých frakcí huminových látek je jejich barevná odlišnost, jak jde vidět na Obr. 6 fulvinové kyseliny jsou zbarveny do žluta, kdežto huminové kyseliny jsou tmavě hnědé, některé tedy šedé. Nejtmaší barvou se vyznačují nerozpustné zbytky huminových sloučenin neboli huminy, které jsou tmavě šedé až černé. Z Obr. 6 je taky známo, že jednotlivé frakce huminových látek mají velké rozdíly v molekulové hmotnosti. Nejnížší molekulovou hmotnost mají fulvinové kyseliny, díky tomu se označují jako nízkomolekulární frakce. Molekulová hmotnost stoupá přes huminové kyseliny až k huminům, ty označujeme jako vysokomolekulární frakce. Kromě odlišného stupně polymerace se huminy odlišují od ostatních frakcí také strukturou, počtem aromatických cyklů, nebo počtem funkčních skupin (karboxylová, hydroxylová apod.). [6]

2.1.4 Využití huminových látek v zemědělství

Huminové látky významně ovlivňují kvalitu a úrodnost půdy, tudíž jsou hojně využívány při pěstování plodin. Zlepšují její fyzikální vlastnosti, obsah vlhkosti a úrodnost. Huminové látky jsou schopny tvořit cheláty s mikroprvky a to usnadňuje příjem živin rostlinnými buňkami, toho se využívá při klíčení a růstu rostlin. [10]

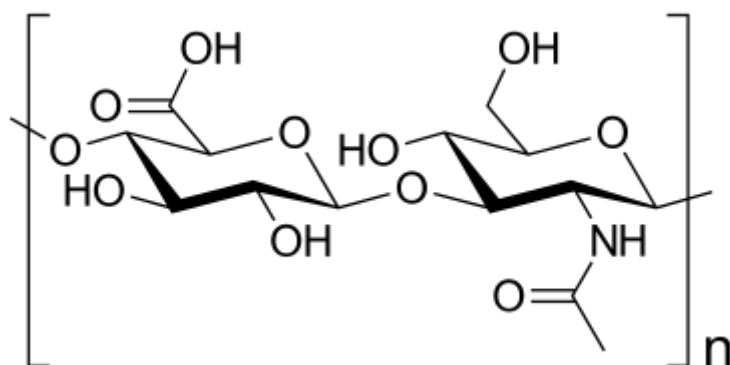
Huminové látky také zvyšují produkci biomasy především tím, že v místě kořenů udržují ve vodě rozpustná organická hnojiva a snižuje se tak jejich vyluhování. Přispívají k příjmu makroelementů (N, P, K) a mikroelementů (Fe, Zn, a další), vážou toxické látky a tím jim brání v jejich shromažďování se v rostlinách. Katalýza mnohých biologických procesů má vliv na zvýšení obsahu živin (sacharidů a lipidů) a zvýšení vitamínů jako jsou vitamín C a β -karoten v rostlinách. Jejich úkolem je také zvýšit adsorpci fotonů a CO_2 z uhlíčanů, což má pozitivní vliv na fotosyntézu. Další výhodou huminových látek je ta, že jsou na sebe schopny navázat vodu, což zapříčiní to, že rostlinné kořeny neuhnívají. Zvyšují životaschopnost rostliny, mají pozitivní vliv na rozvoj kořenové soustavy, podporují rozvoj žádoucích mikroorganismů v půdě. Dokážou ale na sebe navázat i pesticidy, těžké kovy, dioxiny a viry, což zabraňuje jejich přechodu dále do potravního řetězce. Zabraňují úniku toxických sloučenin a dusíku do spodních vod. Huminové látky tedy mají významnou roli v systému půda – rostlina – zvíře – produkt – člověk a mohou působit jako intenzifikační faktor i jako prostředek, který snižuje zdravotní rizika. [8]

2.2 Kyselina hyaluronová (hyaluronan)

Hyaluronan se řadí mezi lineární polysacharidy a patří do glykosaminoglykanové skupiny. Jeho struktura je tvořena opakujícími se disacharidickými jednotkami, z nichž jedna

disacharidická jednotka se skládá z monosacharidu kyseliny D-glukuronové, která je pomocí glykosidické vazby β 1-3 spojena s dalším monosacharidem N-acetylglukosaminem. Disacharidické jednotky jsou vzájemně pospojovány v polymer s vysokým stupněm polymerace pomocí glykosidických vazeb β 1-4. [11] [13]

Syntéza hyaluronanu v organismu je zajištěna mnoha buňkami, hlavně těmi, které se přímo zapojují do tvorby pojivové tkáně (extracelulární matrix), jsou to například fibroblasty, keratinocyty, ale i krevní destičky. Pomocí enzymu hyaluronan syntáza, který je lokalizovaný v membráně buněk, se zajišťuje syntéza hyaluronanu. Celý proces spočívá v tom, že pomocí enzymu je spojována aktivovaná kyselina glukuronová (UDP-glukuronová kyselina) s aktivovaným N-acetylglukosaminem (UDP-N-acetylglukosamin). Takto vytvořený hyaluronan je vytěsněn z buňky do extracelulárního prostoru, kde interaguje s proteoglykanovými podjednotkami, které se na hyaluronan připojují nekovalentně, ale velmi pevně, pomocí hyaluronan binding proteinu. [11] [12] [13]



Obr. 7: struktura hyaluronanu

Na Obr. 7, na kterém můžeme vidět strukturní uspořádání jednotek hyaluronanu, vidíme, že hyaluronan obsahuje velké množství hydroxylových skupin (-OH). Díky přítomnosti těchto skupin je hyaluronan schopen se dobře hydratovat, což znamená, že je schopen vázat velké množství vody, a také se ve vodě dobře rozpouští. Díky své struktuře je kyselina hyaluronová využívána v oční chirurgie, tkáňovém inženýrství či kosmetice, kde slouží k urychlení regenerace tkání. [11] [13]

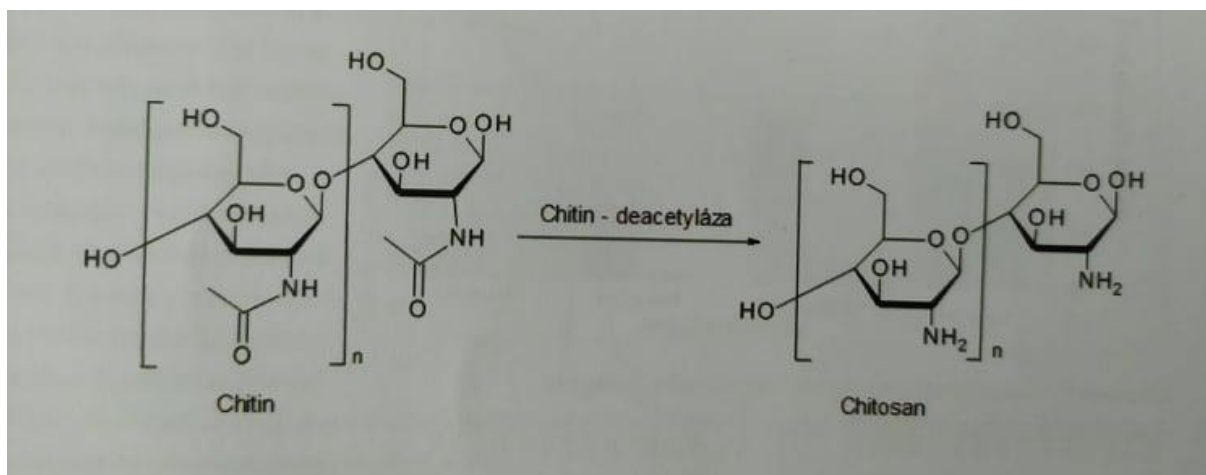
2.2.1 Výskyt a funkce

U obratlovců můžeme hyaluronan najít v podstatě ve všech tkáních, a to ve dvou druzích. První podobou je hyaluronan jako pojivo (oční sklivec a pupeční šňůra) a druhá varianta výskytu je v kloubní tekutině, kde plní funkci mazadla. Dalšími místy, kde se hyaluronan u savců

nachází jsou extracelulární matrix, svalová a nervová tkáň a kůže. Stárnutím organismu dochází k úbytku hyaluronanu, což vede k nejrůznějším kloubním onemocněním. To, jakou roli bude hyaluronan v organismu hrát, závisí na jeho molekulové hmotnosti, ta může dosahovat velikosti až 107 Da. Pokud je molekulová hmotnost vysoká, hyaluronan nejeví skoro žádnou biologickou aktivitu, tím je myšlena regulace biologických pochodů a buněk v organismu. Jeho hlavní funkcí je, že působí jako organizační, strukturální jednotka. Na druhou stranu hyaluronan s nízkou molekulovou hmotností (obecně platí pod 500 kg/mol) má velký vliv na různé pochody v tkáních a buňkách. Obecně platí, že čím nižší je molekulová hmotnost, tím vyšší je biologická aktivita. [11] [12] [13]

2.3 Chitosan

Chitosan se řadí mezi lineární polysacharidy a skládá se z 2-amino-2-deoxy-D-glukopyranózových a 2-acetamido-2-deoxy-D-glukopyranózových jednotek. [14] Chitosan se syntetizuje dvěma způsoby, první je syntéza přímo v tělech živočichů a druhý způsob je průmyslová syntéza částečnou deacetylizací chitinu viz Obr. 8. Chitin je hlavní složka schránek korýšů a mušlí. [12] [13] [14]



Obr. 8: deacylace chitinu na chitosan

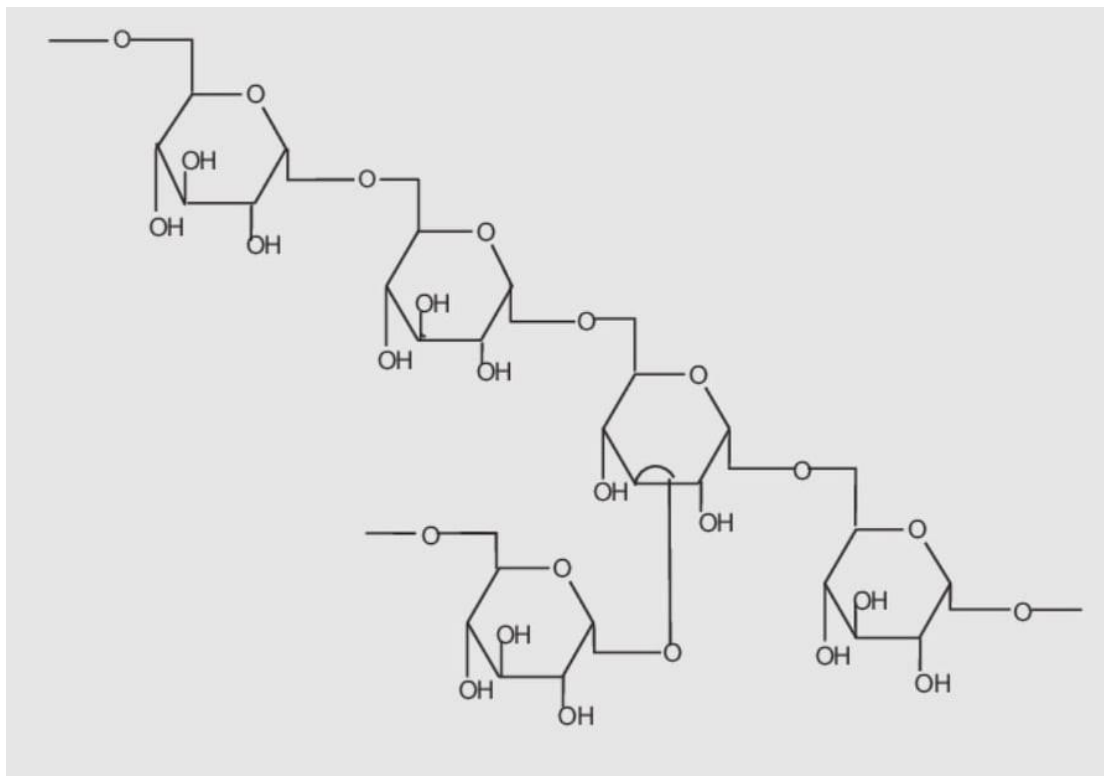
2.3.1 Vlastnosti a využití

Chitosan i jeho deriváty vykazují vynikající biologické vlastnosti jako například biodegradabilita, biokompatibilita, netoxičnost, imunologické a hojivé účinky. Díky těmto vlastnostem je využíván v kosmetickém průmyslu, tkáňovém inženýrství, potravinářství, zemědělství, nebo jako prostředek pro cílenou aplikaci léčiv v lidském těle. Poslední, ale ne méně důležitou funkcí je i jeho antimikrobiální aktivita, díky níž se využívá jako prostředek dosažení sterility umělých implantátů. [13] [14] [15]

2.4 Dextran

Dextran je větvený polysacharid, který patří mezi bakteriální polysacharidy. Dextran je syntetizován pomocí velkého množství bakterií, omezených na rodinu *Lactobacillaceae*, hlavně na *Leuconostoc mesenteroids*, *Leuconostoc dextranicum* a *Streptobacterium dextranicum*. Bakterie, které jej produkují se nazývají *Leuconostoc*. Mediem pro syntézu je nízkomolekulární dextran, sacharóza nebo jiný uhlohydrát obsahující anhydro-D-glukopyranózovou jednotku. Produkt je směs dextranových řetězců různé molekulové hmotnosti v rozmezí od oligosacharidů po makropolysacharidy. Frakce dextranu s úzkým rozsahem molekulové hmotnosti lze vyrobit pomocí kyselé nebo alkalické hydrolyzy surové směsi dextranu a opakovanou frakcionací hydrolyzátu. [17] [18] [20]

Hlavní řetězec je tvořen glukózovými jednotkami spojenými vazbami α 1-6. Větvení ve struktuře dextranu je přibližně 5 % a sestává hlavně z vazeb α 1-3. Struktura dextranu je uvedena na Obr. 9. [12] [16] [20]



Obr. 9: Struktura dextranu [17]

2.4.1 Vlastnosti a využití

Dextran je koloidní, hydrofilní a ve vodě rozpustná látka, která je inertní v biologických systémech a neovlivňuje životaschopnost buňky. Kromě vody je dextran také rozpustný ve formamidu a dimethylsulfoxidu a je nerozpustný v alkoholu a acetonu. Jeho využití je především

v lékařství, kde se používá jako expandér objemu krve, který se používá k léčbě šoku nebo hro-
zícího šoku způsobeného krvácením, popáleninami nebo traumatem. Také se využívá jako roz-
šiřovač objemu plazmy. Některé deriváty dextransu mají další důležité využití, například ko-
loidní komplex železo-dextran se využívá pro anémii z nedostatku železa. Další jeho využití
je jako nosná část pro cytotoxické léky a radioizotopy v léčbě nádorů a také může snižovat
antigenicitu biomolekul. [16] [17] [19] [20]

2.5 Metody měření hydratace biokoloidů

2.5.1 Diferenciální termická analýza (DTA)

DTA patří mezi dynamické metody a zjišťujeme pomocí ní exotermní a endotermní pochody. Tyto pochody zajišťujeme plynulým zvyšováním (častější) nebo snižováním teploty, a tím dochází k náhlým změnám teplot uvnitř zkoumaného vzorku. Současně se zkoumaným vzorkem ohříváme i srovnávací vzorek, kterým obvykle bývá korund ($\alpha\text{-Al}_2\text{O}_3$). Standard musí být stálý ve sledovaném rozsahu teplot. Teplota srovnávacího vzorku se mění lineárně a je shodná s teplotou pece, oproti tomu ve vzorku zkoumaném se teplota lineárně nemění a odpovídá termodynamickým změnám. [21] [22]

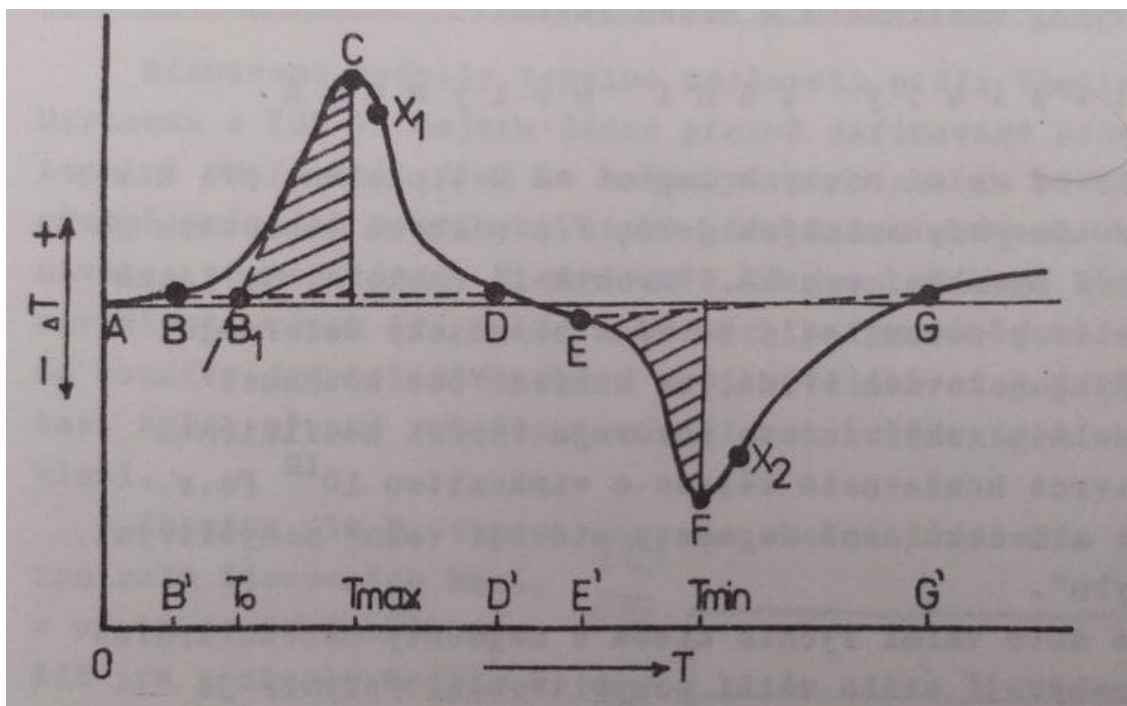
Tuto metodu můžeme využít při sledování procesů, jako je například:

- dehydratace (ztráta vody, obvykle povrchově vázané),
- dehydroxylace (rozklad jílových minerálů – ztráta konstituční vody),
- disociace (rozklad uhličitánů, například CaCO_3),
- oxidace (například spalování organických látek, oxidace sulfidické síry a tak podobně),
- vznik taveniny,
- krystalizace (například vznik $\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$ z amorfního oxidu a podobně),
- reakce v pevném stavu (například vznik belitu nebo alitu),
- přeměny enantiotropních modifikací (například přeměna β křemene \leftrightarrow α křemen).

Ve finále lze říct, že pomocí DTA můžeme sledovat reakce, při nichž se odevzdává nebo pohlcuje teplo (exotermní nebo endotermní pochody). [21]

Výsledky získáváme z DTA křivky neboli termogramu zkoumaného vzorku, je to křivka ΔT závislé na teplotě srovnávacího vzorku. Na křivce se nachází minimum a maximum, maximum odpovídají exotermické reakci a minimum endotermické reakci. Plocha každého píku pak odpovídá reakčnímu teplu. Schématický průběh reakce můžeme vidět na Obr. 10, kde jsou vidět dva píky (exotermní a endotermní). Body A a B značí průběh, kdy reakce ještě neprobíhá, v bodě B se začíná projevovat exotermní reakce, uvolněné teplo rychleji zvyšuje teplotu zkoumaného vzorku, než je plynulé zvyšování teploty srovnávacího vzorku. Maximum značí bod C, od kterého se od zkoumaného vzorku odvádí více tepla do okolí, než se ho ve vzorku uvolňuje. A to se projeví poklesem teploty, ta klesá až do bodu D, kdy se teploty

srovnávacího vzorku a zkoumaného vzorku vyrovnají. Podobně je tomu i u endotermní reakce, která je na Obr. 10 označena píkem EFG. [21] [22]



Obr. 10: schématický průběh reakce [22]

2.5.2 DSC s kompenzací příkonu

Tato metoda analýzy se také někdy nazývá „obrácená“ DTA. Principem je měření energie (elektrického příkonu), která je potřebná k udržování stejné teploty zkoumaného a srovnávacího vzorku. Touto metodou měříme přímo entalpie přeměn, které probíhají v zahříváném vzorku. Křivky, které získáme jsou velmi podobné křivkám z DTA, píky mají ale opačnou polohu k ose x. Tuto metodu využíváme především při studiu fázových přeměn zejména u polymerů. [22]

2.5.3 Gravimetrická termická analýza (termogravimetrie – TG)

Tuto metodu také řadíme mezi dynamické metody analýzy. Principem je sledování hmotnosti vzorku, při rovnoměrném zvyšování či snižování teploty. Někdy zachováváme i další podmínky jako je například tlak atmosféry, její složení a tak podobně. Zaznamenáváme hmotnostní změny zkoumané látky v závislosti na teplotě. Ze získané křivky poté můžeme přímo vyčíst změny odpovídající určitému rozmezí teplot a vyvodit z nich závěry o složení nebo termické stálosti zkoumané látky. Dále můžeme určit hodnoty veličin, které charakterizují kinetiku probíhajících reakcí. Jelikož zaznamenáváme změny hmotnosti, využíváme TG převážně u polymerů při sledování destrukčních pochodů, sledování destrukčních reakcí a tak podobně. [21] [22]

Hlavní součástí přístrojů pro termogravimetrii jsou analytické váhy, které jsou upravené pro soustavné sledování změn hmotnosti, dále jsou pak součástí elektrické pece s programovým řízením teploty, do které se zasunuje nosič s analyzovaným vzorkem a registrační zařízení. [22]

2.6 Současný stav řešené problematiky

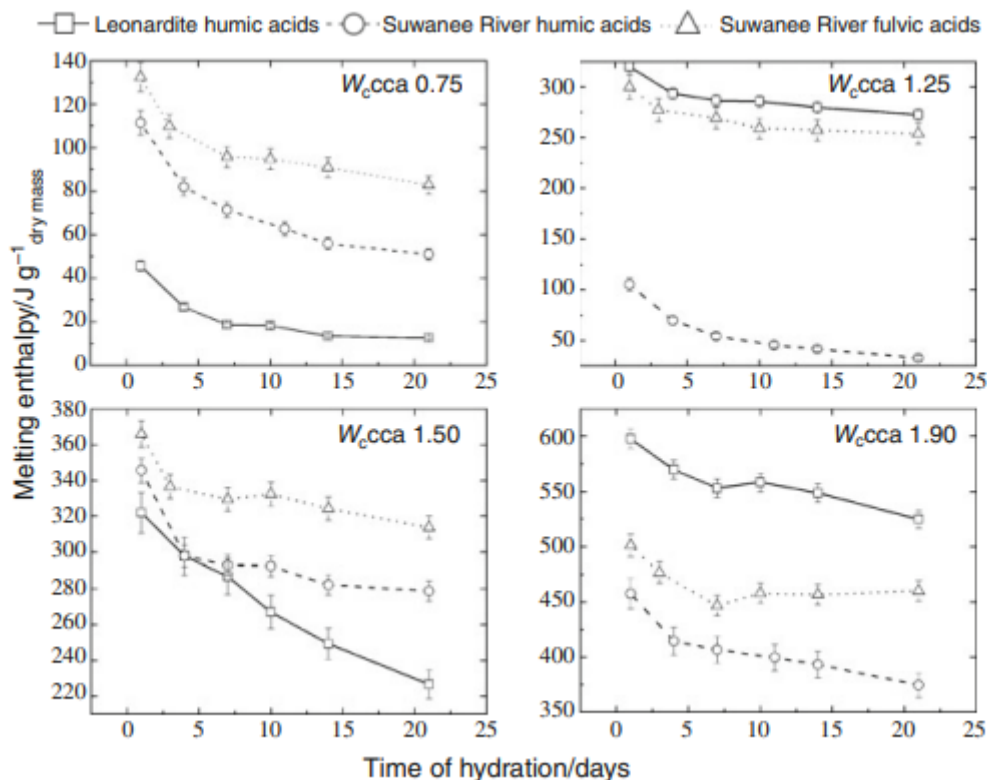
V této kapitole byl řešen současný stav vybraných použitých látek.

2.6.1 Huminové látky

V práci [25] se autoři zabývali studiem hydratace huminových látek pomocí metody DSC. Jako zástupce huminových látek byly vybrány čtyři huminové kyseliny o různé molekulové hmotnosti a tři fulvinové kyseliny o různé molekulové hmotnosti, měření probíhalo po dobu 21 dní.

Autoři se v této práci snažili studovat charakter hydratační vody v systémech voda – huminová látka. Jejich cílem bylo zjistit kvantitativní a kvalitativní aspekty hydratace HL v pevné a kapalné fázi prostřednictvím jejich chování při zmrazování a tání a prozkoumat rozdíly ve vlastnostech vody v kontaktu s HL pomocí metody DSC.

Na Obr. 11 jsou znázorněny výsledky entalpií tání pro čtyři vybrané huminové látky zobrazené jako funkce času. Z Obr. 11 můžeme vyčíst, že s rostoucí dobou hydratace entalpie tání klesá. Během prvních 7 dní se entalpie u všech vzorků rychle snižovala, později již byl pokles entalpií mírnější, nebo téměř žádný. Rozhodujícím faktorem při rozlišování mezi HK a FK se zdá být rozdílná rozpustnost jednotlivých molekul. U FK je většina molekul hydrofilních, proto jejich hydratace připomíná hydrofilní biopolymery. Naproti tomu HK je složena ze směsi molekul různé polarity, a tedy různé smáčivosti. Složitější struktura HK s vyšší porózitou umožňuje molekulám vody hydratovat větší povrch než v případě FK. Autoři usoudili, že se zdá, že čím je huminová látka mladší (nebo méně humózní), tak tím snazší a rychlejší je jejich změna fyzikální struktury. [25]



Obr. 11: Vývoj entalpie tání ledu v hydratovaných huminových látkách jako funkce času pro čtyři různé obsahy vody (osa y: entalpie tání (J/g), osa x: čas hydratace (dny) [25]

2.6.2 Chitosan

V práci [27] se autoři zabývali vývojem bioprotonových zařízení, které by mohly nahradit sodno-draselné pumpy, které se vyskytují v lidském těle. Standartní bioprotonická zařízení se skládají z vodivé polymerní membrány nanesené na inertním substrátu (typicky SiO_2), který leží mezi dvěma protony hydridu paládia. Zařízení se zapne, když je na jeho elektrodu přivedeno napětí a je zahájen tok protonového proudu. Protože tok protonového proudu v těchto zařízeních závisí na transportních vlastnostech polymerní membrány, je pro pokrok bioprotoniky zásadní navrhnout membránu s vhodnými molekulárními/iontovými transportními vlastnostmi a biokompatibilitou. Jako vhodný kandidát se jeví právě chitosan, deacetylovaný derivát chitinu. Vhodným je právě díky své dostupnosti, kdy se dá extrahovat z krunýřů korýšů. Struktury chitosanových membrán byly studovány při šesti různých úrovních hydratace (0–64 hm.%). U všech uvažovaných systémů bylo dosaženo konvergence s ohledem na průměrný objem jednotkové buňky. Hustotu každé hydratované membrány vypočetli z hmotnosti polymeru a molekul vody a průměrného objemu buněk $\rho = \frac{m}{V}$. Hustotu nehydratovaného chitosanu odhadovali na $1,38 \text{ g/cm}^3$, tento odhad byl v souladu s experimentální studií [27], která uvádí hustotu chitosanových filmů v rozmezí $1,36\text{--}1,47 \text{ g/cm}^3$. Na Obr. 12

můžeme vidět jejich zjištěná data, ze kterých lze vyčíst, že hustota membrány se zmenšuje s rostoucím obsahem vody a blíží se objemové hustotě vody. Vizuálním zkoumáním každého hydratovaného systému odhalili tvorbu vodních kanálků kolmých na pyranózové prstence v chitosanových vláknech. Autoři výpočty prováděli s vysoce krystalickými polymery – tyto modelové systémy tedy představují ideální membrány.

Waters per dimer	Water wt%	Overall density [g cm ⁻³]	D [Å ² ps ⁻¹]	Standard error [Å ² ps ⁻¹]
4	18	1.31	1.67×10^{-1}	9.01×10^{-2}
8	31	1.43	4.35×10^{-2}	1.12×10^{-2}
16	47	1.32	7.00×10^{-2}	2.99×10^{-2}
24	57	1.20	5.96×10^{-2}	7.96×10^{-3}
32	64	1.18	7.19×10^{-2}	1.16×10^{-2}

Obr. 12: Vypočtené hodnoty hustoty hydratovaných membrán (první sloupec: voda na dimer, druhý sloupec: voda (hm. %), třetí sloupec: celková hustota (g/cm³), pátý sloupec: standardní chyba [26])

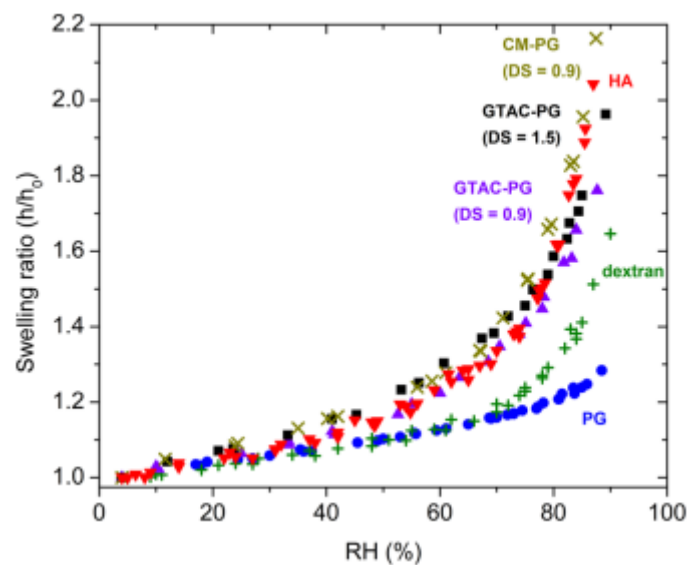
Jejich výsledky ukazují, že nehydratovaná membrána je stabilizována vodíkovou vazbou mezi chitosanovými řetězci a po hydrataci si chitosanová membrána zachovává své vodíkové vazby, ale navíc se tvoří i vodní kanály. [26]

2.6.3 Dextran

V práci [28] autoři objasňují hydratační strukturu, hydratační síly a mechanické vlastnosti různých polysaharidových filmů: nanočástice nativního a modifikovaného fytyglykogenu (PG, dextranu a kyseliny hyaluronové. V práci se autoři zaměřují na studium rovnovážného bobtnání těchto ultratenkých polysaharidových filmů. Experimenty prováděli pomocí elipsometrie při různých relativních vlhkostech (RH) a za pomocí infračervené spektroskopie zeslabeného úplného odrazu (ATR-IR), která jim umožnila určit stupeň vodíkové vazby hydratační vody v polysaharidových filmech.

Pro studium pomocí elipsometrie si nejdříve připravili ultratenké filmy. Jako substrát byly použity křemíkové destičky s nativní vrstvou oxidu, aby se zabránilo kontaminaci, pak byly destičky ošetřeny UV/ozonem po dobu 20 minut, opláchnuty destilovanou vodou a usušeny pod proudem suchého dusíku. Roztok dextranu byl taktéž připraven pomocí destilované vody. Polysaharidové filmy byly na destičky nanášeny pomocí spin-coateru za použití techniky drop-the-spin. Tloušťka takto vytvořených filmů se pohybovala v rozmezí 40-100 nm.

Elipsometrická měření probíhala pomocí na zakázku vyrobeného elipsometru s jednou vlnovou délkou ($\lambda=632,8$ nm) a s pevným úhlem dopadu ($60,000\pm 0,005^\circ$), to umožnilo přesné měření úhlů polarizátoru P a analyzátoru A ($\pm 0,002^\circ$). K výpočtu tloušťky a indexu lomu filmu byly užity Fresnelovy rovnice. Na Obr. 13 je zobrazena závislost tloušťky polysacharidového filmu (normalizované na tloušťku v suchém stavu h_0 měřenou s $RH < 4\%$ na relativní vlhkosti. Každý soubor dat odpovídá údajům naměřeným na alespoň dvou různých filmech, s počáteční tloušťkou v rozsahu $40\text{ nm} < h_0 < 100\text{ nm}$. Autoři článku z naměřených hodnot zjistili, že bobtnání bylo jednotné pro daný rozsah hodnot. Z Obr. 13 vyčteme, že u všech vzorků došlo k nárůstu hodnot poměru bobtnání při $RH \sim 70\%$, což je běžně pozorováno u hydrofilních polysacharidových filmů. Bobtnání polysacharidového filmu při $RH = 70\%$ je řízeno odpudivými hydratačními silami (nebo tlaky), které exponenciálně klesají se separací mezi monomerními jednotkami. Autoři se v této práci zaměřovali především na studium bobtnání s vysokou RH. Největší nárůst při vysoké RH nastal u hyaluronové kyseliny. [28]



Obr. 13: Dto pro fytogen (modré kroužky), dextran (zelené křížky), GTAC -PG (DS=0,9) (fiolové trojúhelníky), GTAC -PG (DS=1,5) (černé čtverce), CM-PG (DS=0,9) (zlatý křížek) a kyselinu hyaluronovou (červené obrácené trojúhelníky)

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Použité biopolymery

Z řady huminových látek byly vybrány huminové kyseliny (HK) a fulvinové kyseliny (FK), tyto kyseliny byly izolovány z řeky Suwannee (HK SR a FK SR), která protéká americkými státy Georgie a Florida, a z rašeliniště z Pahokee (HK PP a FK PP), které se nachází na Floridě. Všechny huminové látky pocházejí ze společnosti International Humic Substances Society (IHSS).

- FK Suwannee River; 2S101F,
- HK Suwannee River; 2S101H,
- FK Pahokee Peat; 2S103F,
- HK Pahokee Peat; 2S103H.

Jako další zástupce biopolymerů byl vybrán hyaluronan sodný, a to rovnou ve třech molekulových hmotnostech. Hyaluronan pochází od firmy Contipro Biotech s.r.o.

- Hyaluronan sodný 130–300 kDa; číslo šarže 213-6213,
- Hyaluronan sodný 500-750 kDa; číslo šarže 213-4245,
- Hyaluronan sodný 1500-1750 kDa; číslo šarže 160218-1.

Dále byl vybrán Dextran z *Leuonostoc mesenteroides*; číslo šarže D5376-100G, tento Dextran pocházel od firmy Sigma-Aldrich s.r.o.

A jako poslední zástupce biopolymerů byl vybrán Chitosan taktéž od firmy Sigma-Aldrich s.r.o.; číslo šarže MKBH 7256V.

3.2 Použité přístroje

- izotermický mikrokolorimetr TAM III (TA instruments),
- termogravimetrický analyzátor TGA Q5000 (TA instruments),
- mikrokolorimetr DSC Q2000 (TA instruments),

3.3 Diferenční kompenzační kalorimetrie DSC – vlastní měření

Nejdříve bylo naváženo 20 mg vzorku biokoloidů, které byly poté smíchány s 1 ml destilované vody a důkladně promíchány, poté byly aplikovány na hliníkové pánvičky mikrokalorimetru DSC Q2000 od společnosti TA instruments. Do cely tohoto mikrokalorimetru byl přiváděn inertní dusík. Vzorek o teplotě 25 °C, byl nejprve chlazen na teplotu –50 °C, kdy krok chlazení byl 3 °C za minutu a poté byl vzorek opět ohříván až na teplotu 25 °C se stejným krokem ohřevu (tj. 3 °C/minutu). Stejným způsobem byly vzorky měřeny i po 24 hodinách, 48 hodinách a po týdnu (tj. po 168 hodinách).

Dále bylo váženo taktéž 20 mg vzorku biokoloidů, ale tentokrát byly vzorky smíchány pouze s 0,6 ml destilované vody a také důkladně promíchány. Postup měření byl stejný jako v případě smíchání s 1 ml destilované vody a počet opakování byl také zachován (tj po 24 hodinách, po 48 hodinách a po 168 hodinách).

3.4 Perfúzní kalorimetrie

Před začátkem experimentu byly zvlhčovací komory naplněny destilovanou vodou a bylo naměřeno cca 20 mg vzorku biokoloidu (tak aby bylo pokryto dno ampule), přesná váha byla zaznamenána v programu. Ampule se vzorkem byla následně vložena do cely a celá byla poté zasunuta do mikrokalorimetru TAM III od společnosti TA Instruments. Proud dusíku byl ke vzorku přiváděn rychlostí 4,5 obj. %/hod. Měření probíhalo při laboratorní teplotě (22 °C). Proud dusíku byl ke vzorku přiváděn od hodnoty RH 10 obj. % až do hodnoty RH 100 obj. % a to po dobu 24 hodin. Po této době byl vzorek přenesen na TGA a byla změřena jeho vlhkost, abychom si ověřili, jestli se vzorek působením dusíku o definované RH opravdu nasytil.

3.5 Termografická analýza TGA

Vzorek byl vložen do platinové pánvičky. Měření probíhalo v atmosféře dusíku od laboratorní teploty po teplotu 400 °C s krokem 10 °C za minutu. Naměřená data se zaznamenávala v počítači, který byl propojen s přístrojem. Z úbytku hmotnosti byl stanoven počáteční obsah vlhkosti.

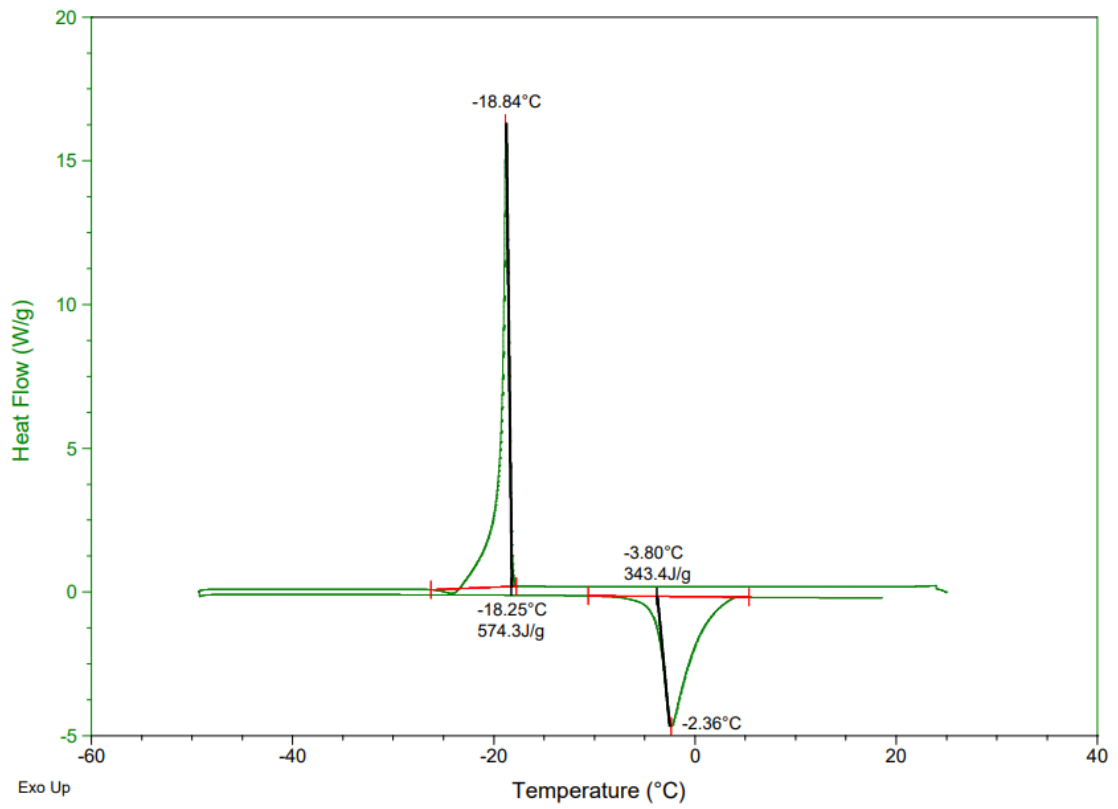
4 VÝSLEDKY A DISKUZE

4.1 Diferenční kompenzační kalorimetrie DSC

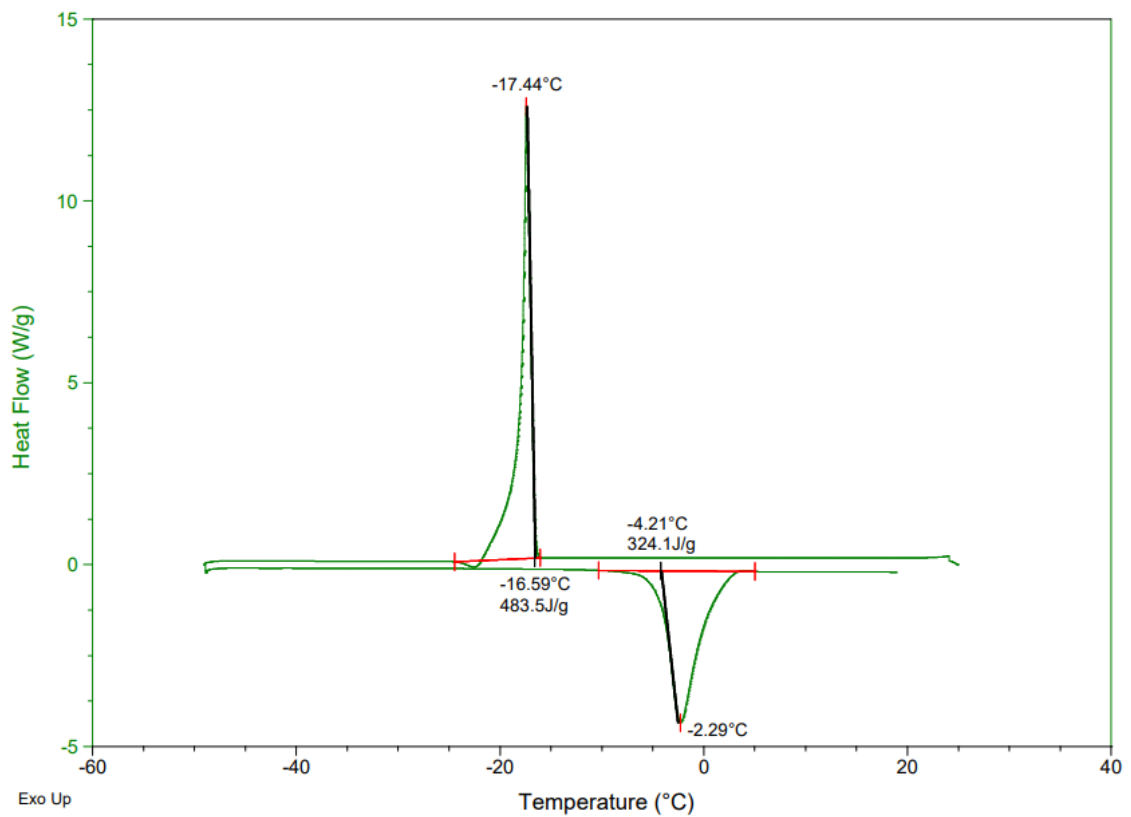
Jako metodu při studiu hydratace biopolymerů byla využita metoda DSC, kdy bylo vždy 20 mg biokoloidního vzorku smícháno s 1 ml nebo 0,6 ml destilované vody a tyto vzorky byly měřeny v intervalech: ihned po smíchání s vodou, po 24 hodinách, po 48 hodinách, a nakonec po týdnu (tj. 168 hodinách).

V grafech můžeme vidět dva píky, jeden exotermní a druhý endotermní. První pík vznikl díky tomu, že jsme vzorek nejdříve ochlazovali na teplotu -30° , tento pík se nazývá exotermní a je směrem nad základní linii a znázorňuje nám proces tuhnutí nebo krystalizace. U tohoto píku můžeme také vidět teplotu počátku tuhnutí a hodnotu entalpie. Hodnota entalpie vyznačuje kolik energie bylo odevzdáno okolí. Druhý pík vznikl díky ohřívání vzorku až na teplotu 25°C a nazýváme jej endotermní a nachází se směrem pod základní linii. Stejně jako u prvního píku i zde máme vyznačenou teplotu počátku tání a hodnotu entalpie. Entalpie nám u druhého píku značí, kolik energie musel vzorek spotřebovat. Výška píku je přímo úměrná rychlosti změny teploty reakce.

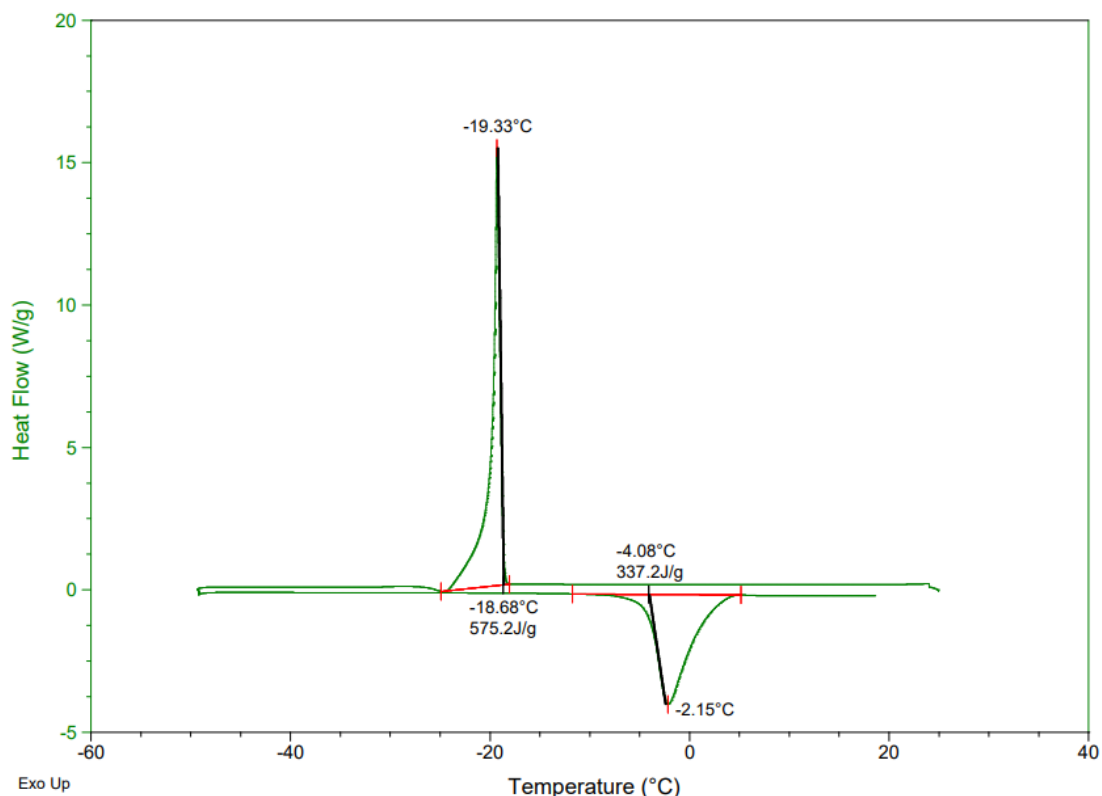
V mé práci jsem pro studium hydratace biopolymerů vyhodnotila jak pík exotermní, který odpovídá krystalizaci, tak také pík endotermní, který se odpovídá tání. Z příložených obrázků a tabulek můžeme zjistit, že po různé době od smíchání s vodou, může docházet ke změnám teplot počátku tání/krystalizace, také může docházet ke změnám hodnot entalpií. Všechny tyto změny jsou zaznamenány v DSC záznamech. Teploty tání a krystalizace v záznamech odpovídají vrcholům píků. Všechny tyto změny jsou zapříčiněny změnou v systému biopolymer – voda, kdy dochází ke změnám u molekul vody, které se podílí na hydrataci vzorku.



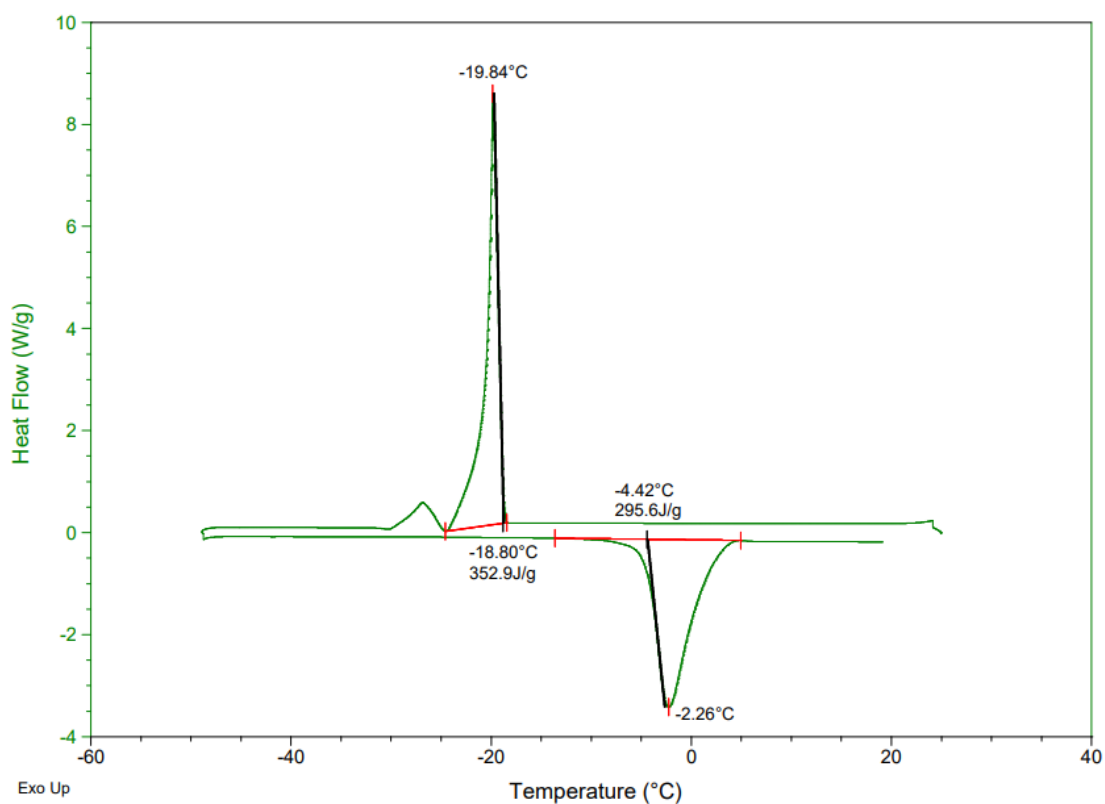
Obr. 14: HYAL 500-750 kDa v 0,6 ml ihned po smíchání s vodou



Obr. 15: HYAL 500-750 kDa v 0,6 ml po 24 hodinách



Obr. 16: HYAL 500-750 kDa v 0,6 ml po 48 hodinách



Obr. 17: HYAL 500-750 kDa v 0,6 ml po 168 hodinách (tj. sedmi dnech)

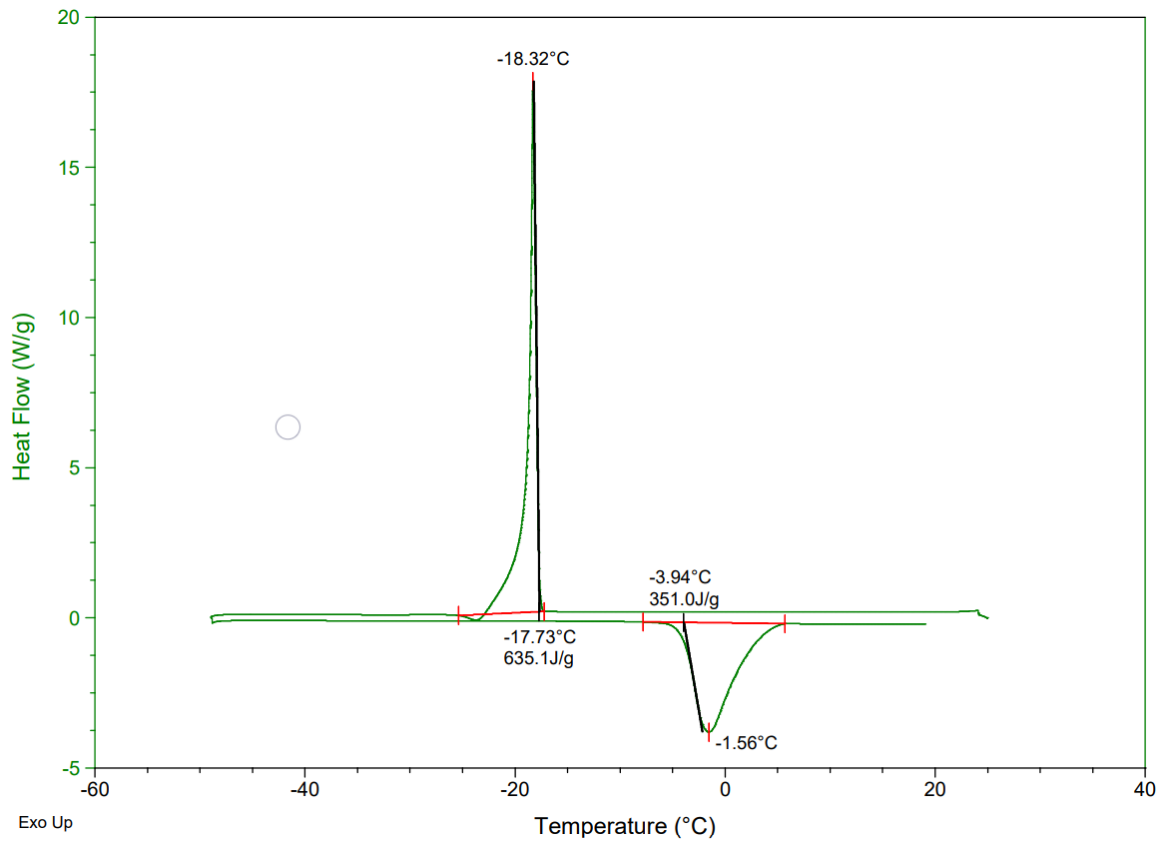
Na Obr. 14 je DSC záznam pro hyaluronan sodný s molekulovou hmotností 500-750 kDa ihned po smíchání s 0,6 ml vody, na Obr. 15 je pak DSC záznam, kdy byl vzorek měřen po

24 hodinách od smíchání s vodou, na Obr. 16 je DSC záznam měření po 48 hodinách a na Obr. 17 je pak záznam po týdnu, kdy byl hyaluronan sodný ponechán ve vodě. Plocha exotermního píku (směrem nad základní linii) je připisována entalpii krystalizace volné vody v systému biopolymer – voda a její hodnota byla stanovena na 574,3 J/g, po 24 hodinách byla hodnota entalpie stanovena na 483,5 J/g. Došlo zde k poměrně velkému snížení hodnoty. Po 48 hodinách byla hodnota entalpie stanovena na 575,2 J/g, kdy zde naopak došlo k růstu hodnoty entalpie na téměř stejnou hodnotu jako v případě měření ihned po smíchání s vodou. Toto by se dalo vysvětlit tím, že v průběhu 48 hodin mohlo dojít ke změně ve struktuře molekuly, nebo k zániku některých vazeb, či ke změnám v uspořádání řetězců, a tím by se vysvětlovala větší přítomnost volné vody. Po týdnu byla hodnota entalpie stanovena na 352,9 J/g a došlo tedy k velkému poklesu entalpie oproti původní hodnotě, která byla naměřena ihned po smíchání s vodou. To znamená, že došlo k vyššímu stupni hydratace. Tento efekt by se dal vysvětlit tím, že po 48 hodinách mohlo dojít k rozpadu některých vazeb, změnám ve struktuře molekul, či změnám v uspořádání řetězců, mohla se voda právě díky těmto změnám mnohem lépe nahydratovat do struktury hyaluronanu.

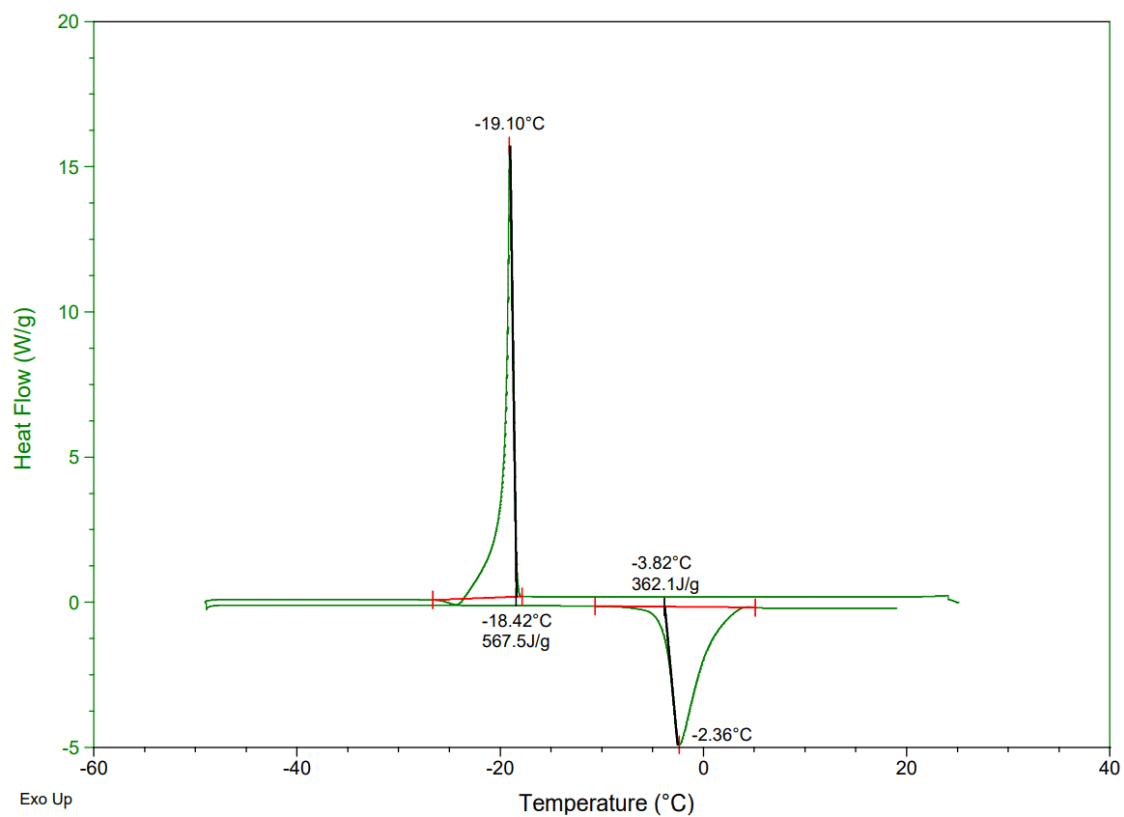
Teplota počátku krystalizace byla ihned po smíchání s vodou stanovena na $-18,3$ °C a teplota krystalizace na $-18,8$ °C. Po 24 hodinách došlo k nárůstu obou teplot, teplota počátku krystalizace byla stanovena na $-16,6$ °C a teplota krystalizace na $-17,4$ °C. Po 48 hodinách došlo k poklesu obou hodnot, teplota počátku krystalizace klesla na hodnotu $-18,7$ °C a teplota krystalizace klesla na $-19,3$ °C. Když byl vzorek přeměřen po týdnu, došlo již pouze k mírným změnám, teplota počátku krystalizace klesla na hodnotu $-18,8$ °C a teplota krystalizace klesla na hodnotu $-19,8$ °C.

Taktéž byl vyhodnocen i pík endotermní, kdy byla vyhodnocena plocha píku, tedy entalpie tání. U endotermního píku byl stejný trend jako u exotermního, kdy byla hodnota entalpie ihned po smíchání s vodou stanovena na 343,4 J/g, po 24 hodinách došlo k mírnému poklesu na hodnotu 324,1 J/g, poté došlo stejně jako u exotermního píku k nárůstu entalpie, nyní ovšem pouze k mírnému nárůstu, a to na hodnotu 337,2 J/g a po týdnu kdy byl hyaluronan ponechán ve vodě došlo opět ke snížení hodnoty entalpie na hodnotu 295,6 J/g. To že došlo k poklesu entalpií nám říká, že bylo zapotřebí menší množství energie k tomu, aby vzorek začal tát. Pokles entalpií tání také znamená to, že došlo k vyššímu stupni hydratace, a tudíž vzniklo větší množství vázané vody, která je měřením DSC nedekovatelná. Teploty počátku tání byly stanoveny na $-3,8$ °C ihned po smíchání s vodou, $-4,3$ °C po 24 hodinách, $-4,1$ °C po 48 hodinách a po týdnu byla teplota počátku tání stanovena na $-4,4$ °C. Teplota krystalizace byly stanovena

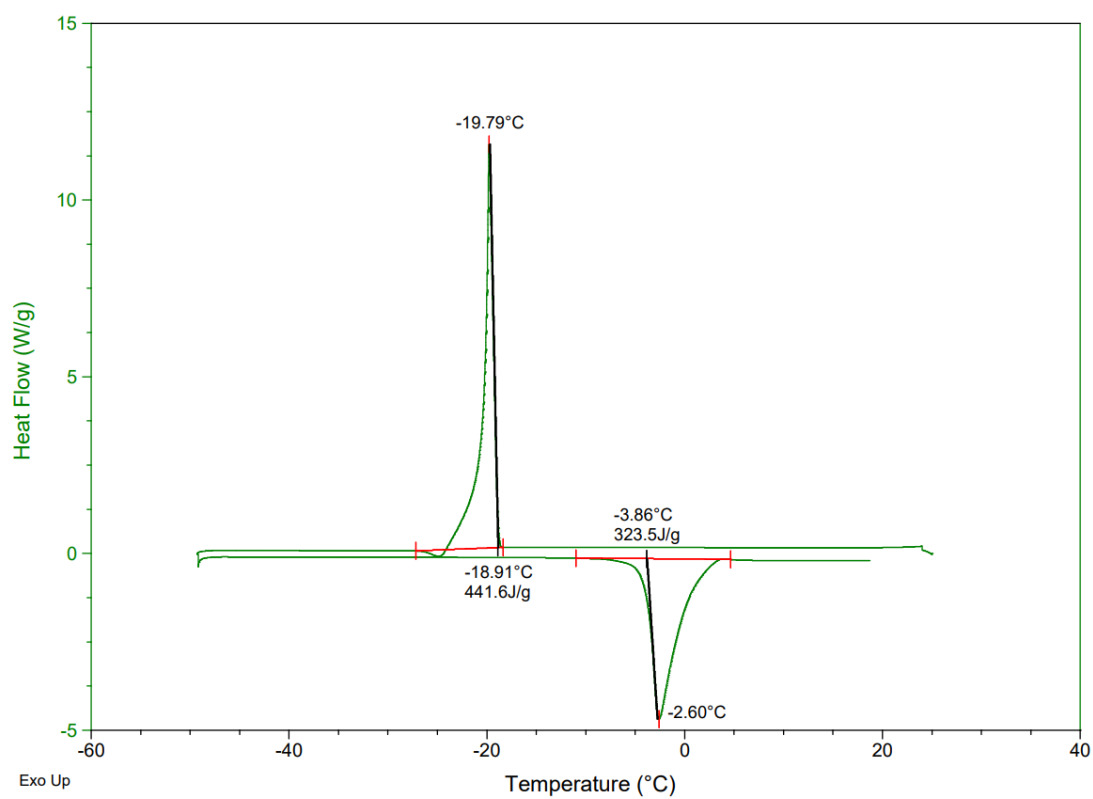
na $-2,4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ihned po smíchání s vodou, po 24 hodinách se teplota krystalizace změnila na $-2,3\text{ }^{\circ}\text{C}$, po 48 hodinách byla stanovena na $-2,2\text{ }^{\circ}\text{C}$ a po týdnu byla teplota krystalizace stanovena na $-2,3\text{ }^{\circ}\text{C}$.



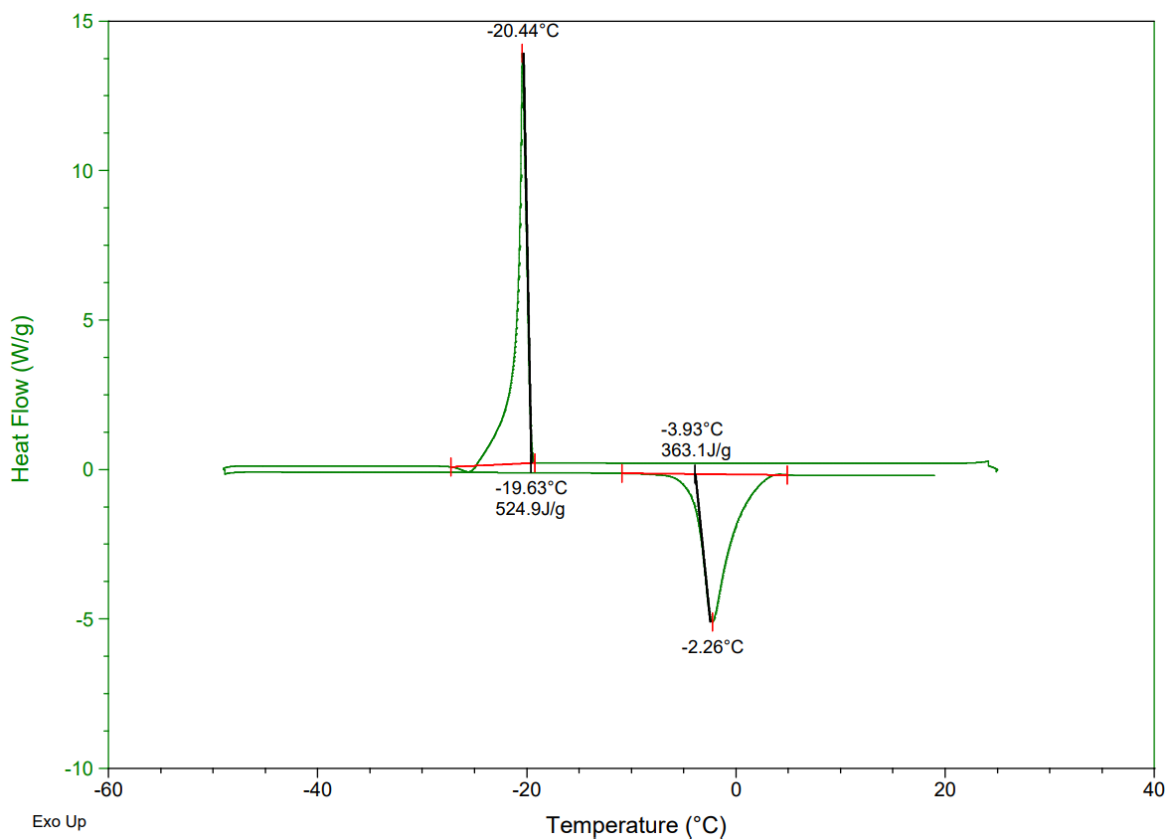
Obr. 18: HYAL 500-750 kDa v 1 ml ihned po smíchání s vodou



Obr. 19: HYL 500-750 kDa v 1 ml po 24 hodinách



Obr. 20: HYL 500-750 kDa v 1 ml po 48 hodinách



Obr. 21: HYAL 500-750 kDa v 1 ml po 168 hodinách (tj. sedmi dnech)

K porovnání si vezmeme hyaluroan sodný o stejné molekulové hmotnosti, tj. hmotnost 500-750 kDa, ale rozmíchaném v 1 ml destilované vody. Grafické výsledky jsou zobrazeny na Obr. 18 - Obr. 21. Nejprve budeme porovnávat trendy exotermního píku. Z obrázků můžeme vyčíst, že po 24 hodinách od smíchání s vodou vykazuje hyaluronan smíchaný s 1 ml vody stejný trend poklesu entalpie jako v předchozím případě hyaluronan smíchaný s 0,6 ml. Ovšem teplota počátku krystalizace a teplota krystalizace klesly, na rozdíl od přechozího případu, kdy naopak tyto hodnoty mírně vzrostly. Po 48 hodinách od smíchání s vodou se již trend poklesu hodnoty entalpie neopakoval, jelikož hodnota entalpie v případě hyaluronanu s 1 ml opět klesla, kdežto u hyaluronanu s 0,6 ml vody hodnota entalpie mírně vzrostla. Nastal zde však stejný trend hodnot počátku teplot krystalizace a teplot krystalizace, kdy tyto hodnoty v obou případech poklesly. Trend poklesu těchto hodnot se opakoval i v případě měření po týdnu, v případě smíchání s 0,6 ml byl zaznamenán pouze nepatrný pokles. Při porovnání hodnot entalpií po týdnu zjistíme, že v případě smíchání s 0,6 ml vody hodnota entalpie klesla, kdežto v případě 1 ml vody vzrostla.

V celkovém porovnání jsou hodnoty entalpií exotermního píku hyaluronanu sodného s 1 ml vody vyšší než u smíchání s 0,6 ml vody. Pravděpodobně je to zapříčiněno vyšším výskytem

volné vody, která je pomocí DSC detekovatelná, a tudíž bylo zapotřebí většího přísunu energie ke krystalizaci. V případě smíchání s 1 ml vody navíc nedošlo k tak velkému rozdílu entalpií mezi měřeními ihned po smíchání a po týdnu od smíchání s vodou, na rozdíl od vzorku, který byl rozmíchán v 0,6 ml vody. Jak jsem již zmínila výše, pravděpodobně to bude souviset s výskytem volné vody, kdy vzorek v případě smíchání s 0,6 ml byl lépe hydratován, a proto se zde nevyskytovalo tolik volné vody, která by mohla být pomocí měření DSC zachycena.

Pokud porovnáme všechny tři použité hyaluronany, které byly smíchány s 1 ml vody, zjistíme, že každý má jiný trend hydratace. Při porovnání hodnot entalpií po 24 hodinách zjistíme, že při nejnižší a nejvyšší (tj. 130-300 kDa a 1500-1750 kDa) se hodnota entalpií krystalizace zvýšila, narozdíl od střední molekulové hmotnosti (500-750 kDa), kdy hodnota entalpie po 24 hodinách klesla. Hodnota počátku teplot krystalizace a teplot krystalizace u nejnižší a nejvyšší molekulové hmotnosti se snížila a u střední molekulové hmotnosti naopak vzrostla. Po dalších 24 hodinách (tj. 48 hodinách od smíchání) můžeme z Tab. 2 vyčíst, že se hodnota entalpií u všech třech hyaluronanů snížila. Teplota počátku krystalizace se u střední a nejvyšší molekulové hmotnosti také snížila, ale u nejmenší molekulové hmotnosti mírně stoupla. A ve stejném trendu následovala i teplota krystalizace. Po týdnu, kdy byly vzorky ponechány ve vodě, se nám hodnoty entalpií opět změnilly a to tak, že u nejnižší molekulové hmotnosti entalpie opět klesla, ale pokud budeme hodnotu entalpie porovnávat s měřeními ihned po smíchání, tak po týdnu ponechání vzorku ve vodě je entalpie mírně vyšší. Kdežto u střední a nejvyšší molekulové hmotnosti nám hodnota entalpie oproti předchozímu měření vzrostla. Ovšem při porovnání s hodnotou entalpie naměřenou ihned po smíchání s vodou zjistíme, že po týdnu, kdy byly vzorky ponechány ve vodě, nám hodnota entalpie klesla pouze u střední molekulové hmotnosti.

Vzhledem k tomu, že pomocí metody DSC měříme obsah volné vody, tak to znamená, že po týdnu byl obsah volné vody nižší než ihned po smíchání s vodou a vzorek byl tak více nahydratován. K největší míře hydratace, ale došlo po 48 hodinách od smíchání s vodou, při dlouhodobějším působení vody na vzorek se již pravděpodobně začínají rozpadat vazby, či dochází ke změnám ve struktuře nebo k agregaci. Je možné, že pokud bychom vodu na vzorek nechali působit ještě další týden, dospěli bychom ke stejné hodnotě entalpie jako ihned po smíchání s vodou, ovšem jsou to pouze mé domněnky, které by mohly být součástí dalších experimentů. Když zhodnotíme data získaná u nejmenší a nejvyšší molekulové hmotnosti, tak zjistíme, že k nejvyšší míře hydratace došlo pravděpodobně ihned po smíchání s vodou.

Delší působení vody na vzorek pravděpodobně opět způsobuje rozpad vazeb a změny ve struktuře a dochází tedy k vyššímu obsahu volné vody ve vzorku.

Když vezmeme k porovnání vzorky hyaluronanu, které byly rozmíchány v menším obsahu vody, tedy v 0,6 ml, tak vidíme, že změny entalpií nevykazují stejné trendy jako v případě rozmíchání v 1 ml. U nejnižší molekulové hmotnosti vidíme, že se hodnoty entalpií v průběhu času významným způsobem nemění. Z tohoto můžeme usoudit, že k nejvyšší míře hydratace došlo ihned po smíchání s vodou a volná voda ve vzorku byla po celou dobu téměř neměnná. Ovšem při porovnání se střední molekulovou hmotností můžeme říct, že delší kontakt vzorku hyaluronanu o hmotnosti 500-750 kDa s vodou měl na hydrataci pozitivní vliv, jelikož se hodnota entalpie byla po týdenním měření mnohem nižší než při měření ihned po smíchání s vodou. Došlo zde tedy k vyšší míře hydratace, kdy se voda absorbovala do struktur molekuly, a proto jsme pomocí metody DSC změřili nižší obsah volné vody.

U nejvyšší molekulové hmotnosti, která byla smíchána s 0,6 ml vody, došlo vlivem týdenního působení vody na vzorek také nejspíše k rozpadu vazeb a změnám ve struktuře. Jelikož po týdenním měření byla opět naměřena vyšší hodnota entalpie než ihned po smíchání s vodou.

Dle těchto výsledků můžeme zhodnotit, že pouze u hyaluronanu o střední molekulové hmotnosti (500-750 kDa), došlo vlivem týdenního působení vody na vzorek k vyšší míře hydratace. Nezáleželo na tom, jestli byl vzorek smíchán s velkým nebo malým obsahem vody, trend snížení entalpie po týdenním působení nastal vždy. Na rozdíl od nejnižší a nejvyšší molekulové hmotnosti, kdy delší kontakt vzorku s vodou neměl na hydrataci žádný vliv (míra hydratace byla v průběhu času stejná), nebo začalo docházet ke změnám ve struktuře či rozpadu vazeb a obsah volné vody se nám tudíž zvýšil.

Nyní porovnáme huminové látky mezi sebou. V Tab. 2 - Tab. 5 vidíme hodnoty entalpií použitých huminových látek. Z poznatků, které jsme již výše popsali, můžeme usoudit, že k vyššímu stupni hydratace dochází u všech fulvinových kyselin a u jedné huminové kyseliny, která pochází z řeky Suwanee a byla rozmíchána v 0,6 ml vody. K tomuto závěru jsme dospěli proto, že hodnoty entalpií, kdy vzorek byl ponechán ve vodě po dobu jednoho týdne, jsou mnohem nižší než hodnoty entalpií změřené ihned po smíchání s vodou. Stejný trend změn hodnot entalpie vykazují fulvinové kyseliny pocházející z rašeliniště Pahokee a FK z řeky Suwanee. Hodnoty entalpií nám po 24 hodinách nejdříve vzrostly a po 48 hodinách od smíchání s vodou zase klesly. Jak již bylo zmíněno, je to nejspíše zapříčiněno tím, že delším působením

vody na látku mohlo dojít ke změnám ve struktuře, či k rozpadu některých vazeb, a díky těmto změnám, pak mohla volná voda prostoupit lépe do struktury látek a stát se tak vázanou vodou.

U fulvinových kyselin si také můžeme všimnout, že hodnoty tepel ihned po smíchání s vodou a po týdnu, kdy byl vzorek ponechán ve vodě, jsou vždy nižší při smíchání s 0,6 ml vody, než při smíchání s 1 ml vody. Je to pravděpodobně zapříčiněno zase nižším obsahem volné vody, která je pomocí metody DSC detekovatelná.

Tab. 2: exotermní pík v 1 ml

vzorek	ihned po smíchání s vodou			po 24 hodinách		
	entalpie [J/g]	T _{onset} [°C]	T _k [°C]	entalpie [J/g]	T _{onset} [°C]	T _k [°C]
dextran	590,1	-17,4	-18,0	1003,0	-11,4	-11,6
chitosan	575,8	-19,3	-19,9	610,5	-18,3	-18,9
HK PP	633,9	-13,5	-14,1	815,8	-11,8	-12,1
HK SR	579,8	-11,0	-11,6	780,0	-6,1	-6,5
FK PP	906,9	-12,2	-12,5	957,4	-12,8	-13,0
FK SR	869,4	-11,9	-12,2	953,4	-12,3	-12,6
HYAL 130–300 kDa	520,3	-18,8	-19,5	658,4	-14,7	-15,2
HYAL 500–750 kDa	635,1	-17,7	-18,3	567,5	-18,4	-19,1
HYAL 1500–1750 kDa	530,5	-16,3	-17,1	579,8	-11,7	-12,4
vzorek	po 48 hodinách			po týdnu		
	entalpie [J/g]	T _{onset} [°C]	T _k [°C]	entalpie [J/g]	T _{onset} [°C]	T _k [°C]
dextran	1105,0	-18,9	-19,1	590,2	-16,6	-17,2
chitosan	589,8	-19,6	-20,3	677,5	-14,4	-14,9
HK PP	588,0	-13,2	-13,8	706,5	-13,0	-13,5
HK SR	747,2	-9,6	-9,9	591,6	-11,6	-12,3
FK PP	939,0	-8,7	-8,9	358,2	-15,0	-16,6
FK SR	1060,0	-12,0	-12,2	384,8	-11,1	-12,6
HYAL 130–300 kDa	588,0	-14,4	-15,0	558,5	-18,6	-19,2
HYAL 500–750 kDa	441,6	-18,9	-19,8	524,9	-19,6	-20,4
HYAL 1500–1750 kDa	527,8	-15,7	-16,6	634,7	-16,7	-17,2

V Tab. 2 jsou uvedena všechna naměřená data pro exotermní pík, který odpovídá tuhnutí či krystalizaci, kdy byl vzorek smíchán s 1 ml destilované vody, v časech ihned po smíchání s vodou, po 24 hodinách ponechání ve vodě, po 48 hodinách, a nakonec po týdnu působení

vody. V tabulce jsou uvedeny hodnoty entalpií, které byly získány integrací plochy píku, dále jsou zde uvedeny teploty počátku krystalizace.

Z hodnot v Tab. 2 můžeme vyčíst, že u některých vzorků došlo vlivem delšího časového působení vody na matrici k poklesu hodnot entalpií a hodnot teplot počátku tání/tuhnutí a teplot tuhnutí/krystalizace. Z těchto hodnot můžeme usoudit, že vlivem delšího časového úseku došlo k větší sorpci vody do struktury biopolymeru. K největšímu poklesu došlo u fulvinové kyseliny, která pochází z rašeliniště Pahokee, a to při porovnání hodnot ihned po smíchání s vodou, kdy byla naměřena hodnota entalpie na 906,9 J/g s měřením po týdnu, kdy byla hodnota entalpie stanovena na 358,2 J/g. Jak již bylo zmíněno dříve, tak z těchto dat můžeme usoudit, že po týdnu došlo k velké sorpci vody do struktury biokoloidu.

Tab. 3: endotermní pík v 1 ml

vzorek	ihned po smíchání s vodou			po 24 hodinách		
	entalpie [J/g]	T _{onset} [°C]	T _t [°C]	entalpie [J/g]	T _{onset} [°C]	T _t [°C]
dextran	391,3	-2,5	-1,3	413,2	-2,4	-1,2
chitosan	346,2	-3,5	-1,1	409,9	-2,9	-2,0
HK PP	387,3	-1,2	0,3	347,8	-1,7	0,6
HK SR	345,8	-1,2	0,4	409,0	-1,1	-0,1
FK PP	368,6	-1,5	0,0	418,6	-1,4	-0,4
FK SR	371,6	-1,3	0,0	369,6	-1,6	0,1
HYAL 130–300 kDa	314,8	-4,4	-1,4	341,5	-3,8	-1,9
HYAL 500–750 kDa	351,0	-3,9	-1,6	362,1	-3,8	-2,4
HYAL 1500–1750 kDa	358,6	-3,8	-2,4	328,0	-4,2	-1,6
vzorek	po 48 hodinách			po týdnu		
	entalpie [J/g]	T _{onset} [°C]	T _t [°C]	entalpie [J/g]	T _{onset} [°C]	T _t [°C]
dextran	407,8	-2,3	-1,4	347,0	-3,8	-1,7
chitosan	383,0	-3,1	-1,8	383,4	-3,1	-1,8
HK PP	363,0	-1,1	0,3	367,2	-1,4	0,3
HK SR	349,2	-1,5	0,6	349,5	-1,9	0,6
FK PP	357,4	-2,0	0,2	343,1	-1,9	-0,3
FK SR	382,1	-1,4	0,0	341,9	-1,6	0,1
HYAL 130–300 kDa	334,7	-3,9	-1,8	316,2	-4,1	-1,4
HYAL 500–750 kDa	324,5	-3,9	-2,6	363,1	-3,9	-2,3
HYAL 1500–1750 kDa	371,7	-3,6	-2,3	335,6	-3,9	-2,2

V Tab. 3 můžeme vidět naměřená data pro endotermní pík pro vzorky, které byly smíchány s 1 ml destilované vody.

Tab. 4: exotermní pik v 0,6 ml

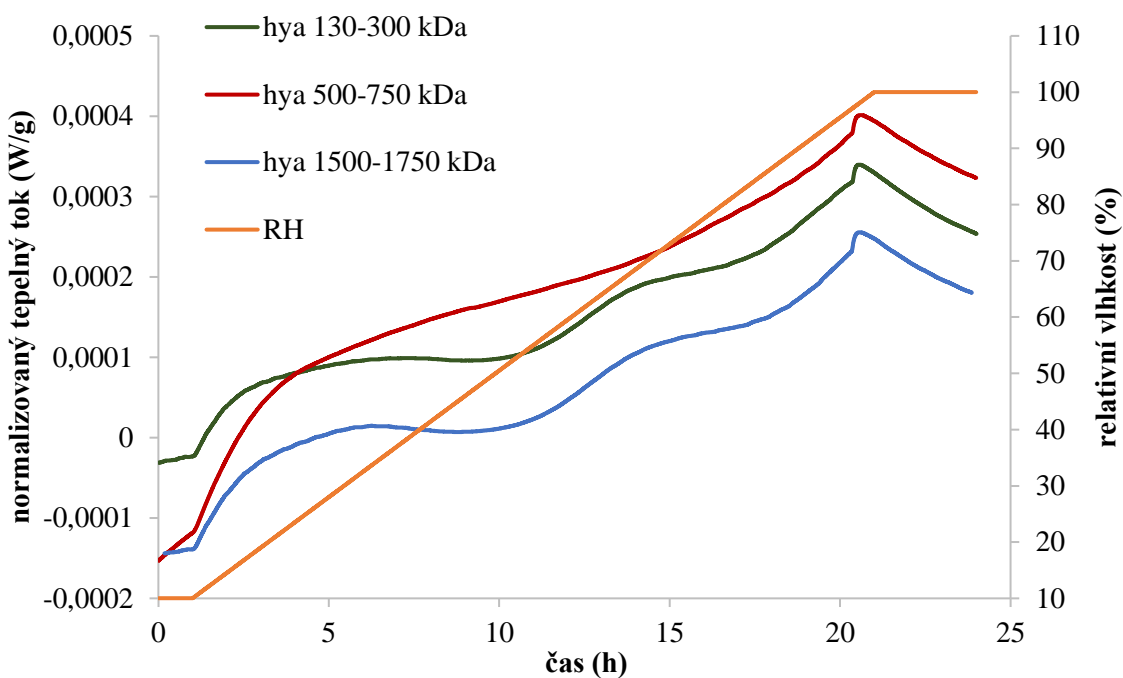
vzorek	ihned po smíchání s vodou			po 24 hodinách		
	entalpie [J/g]	T _{onset} [°C]	T _k [°C]	entalpie [J/g]	T _{onset} [°C]	T _k [°C]
dextran	462,8	-20,9	-21,8	644,4	-16,1	-16,7
chitosan	596,6	-20,6	-21,3	780,5	-15,9	-16,3
HK PP	419,8	-11,3	-12,1	361,0	-11,3	-12,3
HK SR	699,1	-10,0	-10,4	586,0	-10,8	-11,4
FK PP	678,2	-10,4	-10,9	735,8	-11,7	-12,1
FK SR	737,2	-11,8	-12,3	1085	-10,7	-10,8
HYAL 130–300 kDa	540,6	-16,7	-17,3	530,9	-15,5	-16,2
HYAL 500–750 kDa	574,3	-18,3	-18,8	483,5	-16,6	-17,4
HYAL 1500–1750 kDa	627,5	-14,0	-14,5	515,1	-19,2	-20,0
vzorek	po 48 hodinách			po týdnu		
	entalpie [J/g]	T _{onset} [°C]	T _k [°C]	entalpie [J/g]	T _{onset} [°C]	T _k [°C]
dextran	587,8	-16,9	-17,5	626,0	-19,3	-19,9
chitosan	653,7	-18,3	-18,8	671,1	-16,0	-16,5
HK PP	574,6	-12,4	-13,0	578,8	-11,5	-12,1
HK SR	526,0	-10,1	-10,8	518,1	-8,9	-9,5
FK PP	683,7	-14,4	-14,8	880,7 mJ/g	-13,8	-15,6
FK SR	636,2	-12,2	-12,6	362,2	-12,3	-14,0
HYAL 130–300 kDa	513,1	-17,8	-18,5	549,9	-15,2	-15,9
HYAL 500–750 kDa	575,2	-18,7	-19,3	352,9	-18,8	-19,8
HYAL 1500–1750 kDa	768,3	-13,0	-13,4	705,8	-16,8	-17,3

Tab. 5: endotermní pík v 0,6 ml

vzorek	ihned po smíchání s vodou			po 24 hodinách		
	entalpie [J/g]	T _{onset} [°C]	T _t [°C]	entalpie [J/g]	T _{onset} [°C]	T _t [°C]
dextran	315,8	-3,9	-1,2	336,8	-3,8	-1,3
chitosan	418,1	-3,0	-2,0	402,3	-3,4	-2,0
HK PP	291,9	-1,2	0,7	273,2	-1,1	0,8
HK SR	348,4	-1,4	0,3	343,1	-1,2	0,4
FK PP	361,1	-1,6	-0,1	359,1	-1,6	-0,1
FK SR	363,8	-1,5	-0,1	361,8	-1,5	-0,0
HYAL 130–300 kDa	301,1	-4,3	-1,5	304,4	-4,3	-1,9
HYAL 500–750 kDa	343,4	-3,8	-2,4	324,1	-4,2	-2,3
HYAL 1500–1750 kDa	345,9	-3,8	-1,9	330,3	-4,3	-2,2
vzorek	po 48 hodinách			po týdnu		
	entalpie [J/g]	T _{onset} [°C]	T _t [°C]	entalpie [J/g]	T _{onset} [°C]	T _t [°C]
dextran	321,9	-3,8	-1,3	354,6	-3,6	-1,9
chitosan	360,4	-3,6	-1,4	403,9	-3,4	-2,3
HK PP	365,4	-1,2	0,2	335,9	-1,1	0,8
HK SR	320,3	-1,3	0,4	315,6	-1,7	0,9
FK PP	335,2	-1,7	0,5	844,1 mJ/g	-1,9	0,0
FK SR	344,2	-1,4	0,4	329,4	-2,2	-0,3
HYAL 130–300 kDa	308,4	-4,6	-1,8	304,9	-4,3	-1,7
HYAL 500–750 kDa	337,2	-4,1	-2,2	295,6	-4,4	-2,3
HYAL 1500–1750 kDa	356,9	-4,0	-2,4	341,3	-4,3	-2,2

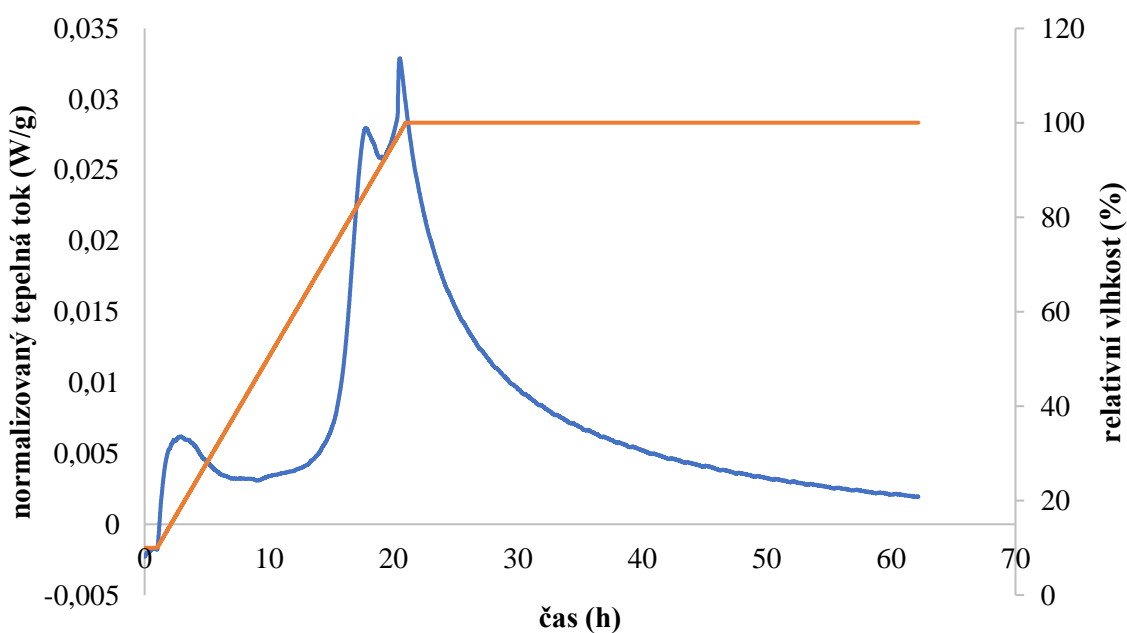
4.2 Perfúzní mikrokolorimetrie a termogravimetrická analýza

Pro studium pomocí této metody byli vybráni pouze zástupci z výše použitých biopolymerů. Konkrétně byly vybrány tyto látky: huminová a fulvinová kyselina pocházející z rašeliniště Pahokee a tři hyaluronany a molekulové hmotnosti 130-300 kDa, 500-750 kDa a 1500-1750 kDa.

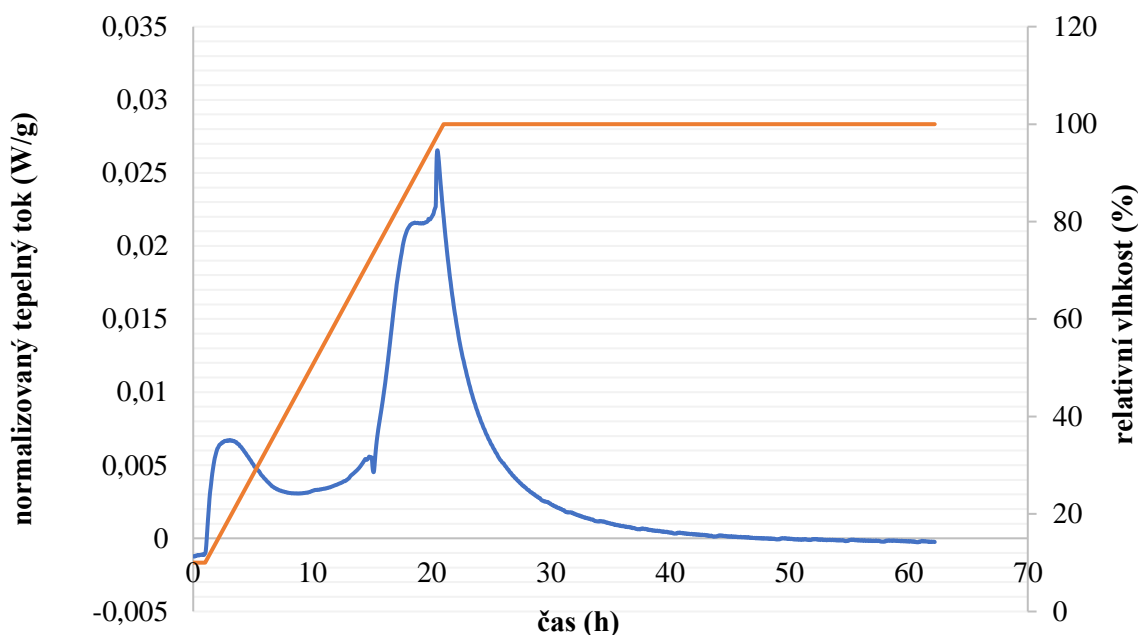


Obr. 22: Křivka tepelného toku pro tři molekulové hmotnosti hyaluronanu sodného

Na Obr. 22 vidíme křivky tepelného toku pro všechny tři použité hyaluronany. Můžeme si všimnout, že křivky vykazují stejný trend chování při interakci s přiváděným plynem. Vidíme, že křivka celou dobu roste to nám dokazuje, že zde dochází k sorpci vody materiálem. Dochází buď k adsorpci nebo absorpci vody.



Obr. 23: Křivka tepelného toku pro fulvinovou kyselinu z rašeliniště Pahokee

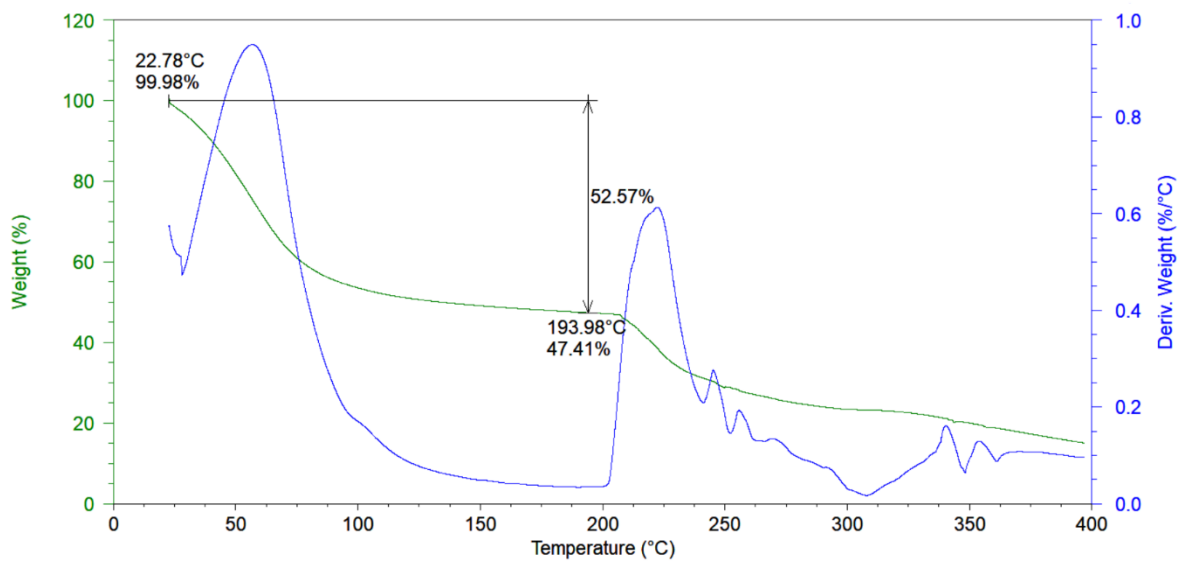


Obr. 24: Křivka tepelného toku pro huminovou kyselinu z rašeliniště Pahokee

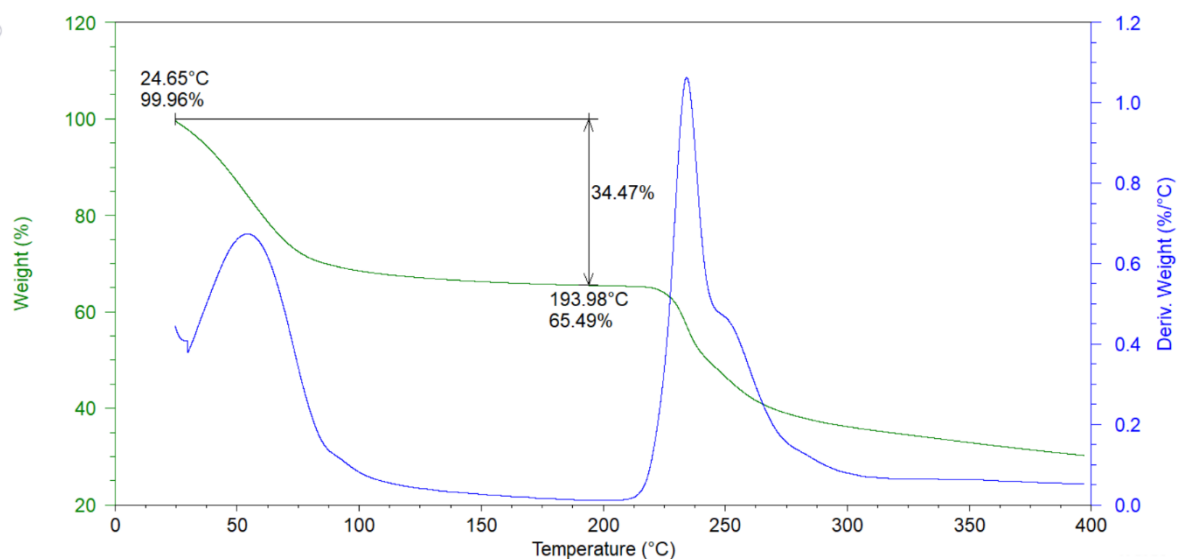
Při porovnání Obr. 22, Obr. 23 a Obr. 24 vidíme, že trend tepelného toku je u fulvinové a huminové kyseliny zcela jiný oproti hyaluronanům. V případě hyaluronanů je růst tepelného toku pozvolný, kdežto u fulvinové a huminové kyseliny došlo po cca 15 hodinách k prudkému nárůstu. Bude to pravděpodobně zapříčiněno rozdílnou strukturou a různým sorbováním vody do struktury vzorku.

Tab. 6: přehled naměřených vlhkostí

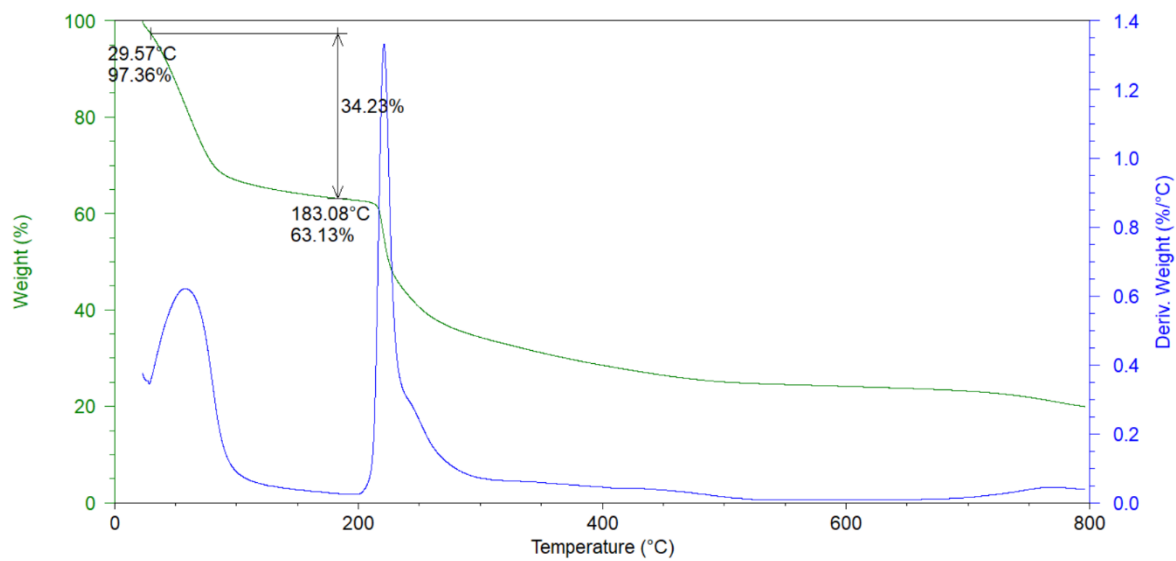
prvek	hyaluronan 130-300 kDa	hyaluronan 500-750 kDa	hyaluronan 1500-1750 kDa	fulvinová kyselina	huminová kyselina
původní vlhkost [hm. %]	52,6	34,5	34,2	24,7	12,9



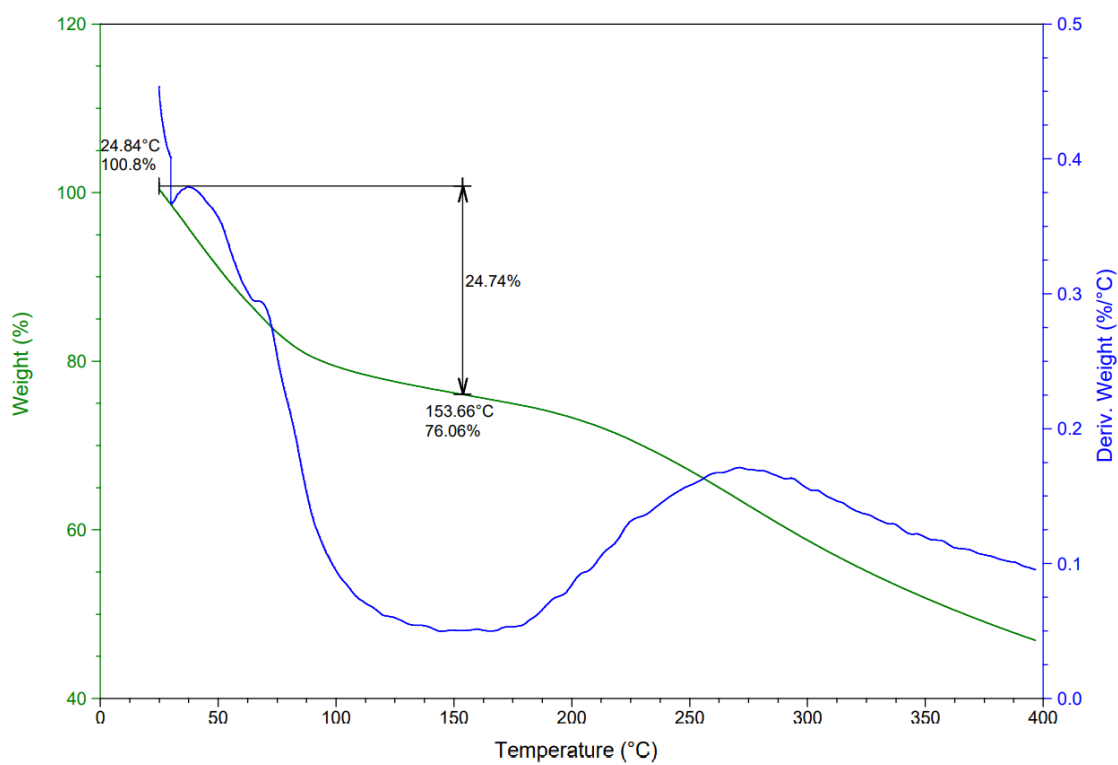
Obr. 25: TGA křivka hyaluronanu o molekulové hmotnosti 130-300 kDa



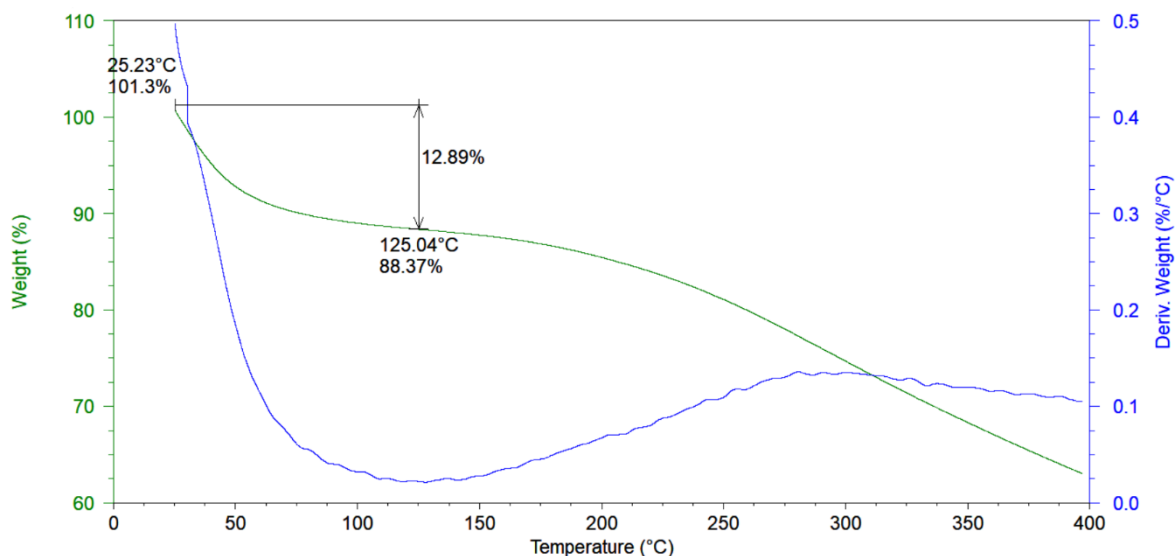
Obr. 26: TGA křivka hyluronanu o molekulové hmotnosti 500-750 kDa



Obr. 27: TGA křivka hyaluronanu o molekulové hmotnosti 1500-1750 kDa



Obr. 28: TGA křivka fulvinové kyseliny z rašeliniště Pahokee



Obr. 29: TGA křivka huminové kyseliny z rašeliniště Pahokee

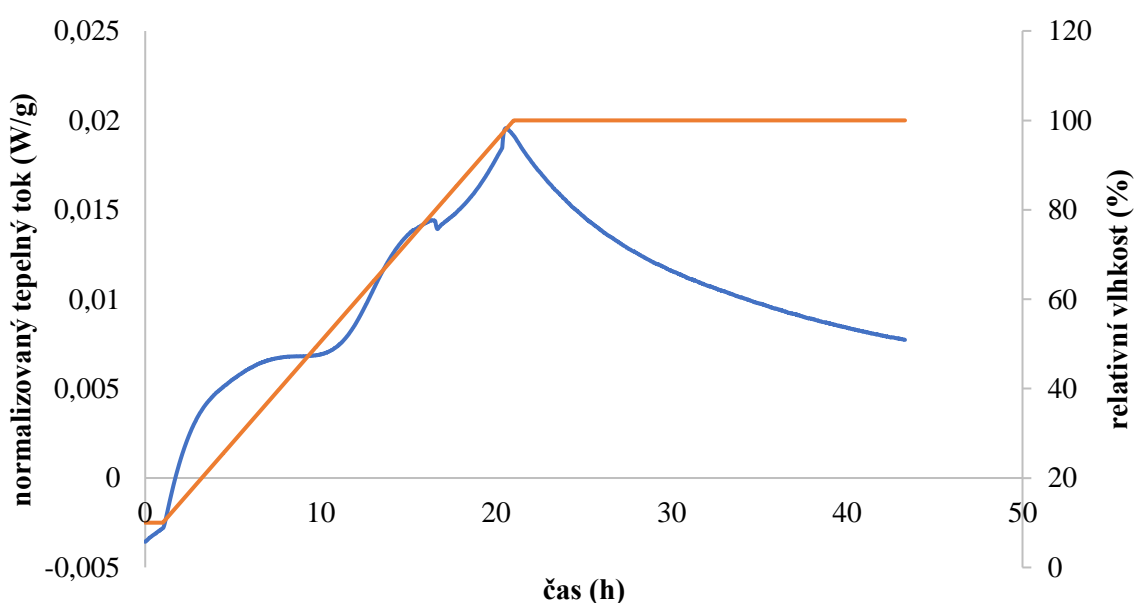
K tomu abychom mohli určit, který vzorek se pomocí perfúzní kalorimetrie nahydratoval více, byly vzorky podrobeny termogravimetrické analýze. Výsledky termogravimetrických křivek můžeme vidět na Obr. 25 až Obr. 29 a souhrnný přehled naměřených vlhkostí v Tab. 6. Z těchto hodnot jsme zjistili, že k nejvyšší míře hydratace došlo u vzorku nízkomolekulárního hyaluronanu, kde byla naměřena vlhkost 53 %. Větší míra hydratace zde byla naměřena pravděpodobně z důvodu toho, že nízkomolekulární hyaluronan je tvořen kratšími řetězci než hyaluronan vysokomolekulární. Jelikož pracujeme se stejnou navážkou, obsahuje navážka nízkomolekulárního hyaluronanu větší množství kratších řetězců a tudíž má i více koncových skupin, na které se mohla voda navázat.

4.3 Perfúzní kalorimetrie a diferenční kompenzační kalorimetrie

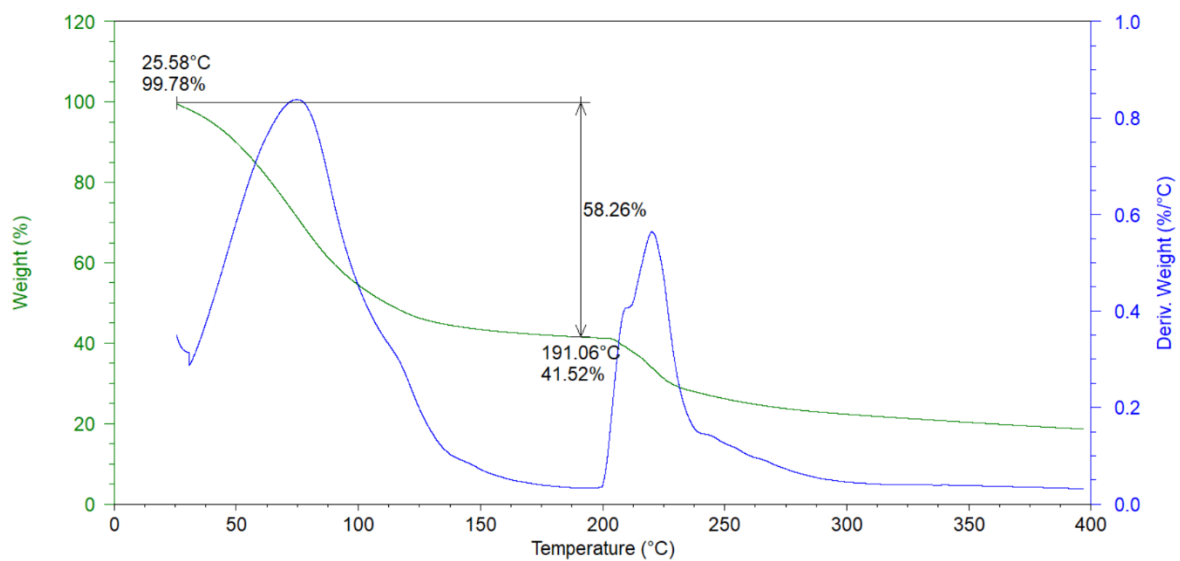
Pro pilotní experiment byl zvolen hyaluronan sodný o molekulové hmotnosti 130-300 kDa, protože při termogravimetrické analýze bylo zjištěno, že tento vzorek obsahoval nejvyšší vlhkost. Pilotní experiment spočíval tom, že jsme vzorek nejprve podrobili perfúzní kalorimetrii po dobu 24 hodin a poté jsme vzorek vložili na DSC. Tímto experimentem se pokoušíme zjistit, zdali se při perfúzní kalorimetrii, kdy je vzorek podroben kontinuálnímu přísunu RH, vzorek nahydratoval natolik, že se voda naborovala do struktury vzorku a vzorek tak obsahuje méně volné vody, která je pomocí DSC detekovatelná.

Na Obr. 30 vidíme křivku tepelného toku růstu je obdobný jako při předchozím měření (Obr. 22), jen s tím rozdílem, že při tomto experimentu jsme vzorek ponechali přísunu RH 100 % po delší časový úsek, abychom si ověřili, že již nevznikne žádný další pík. Hodnota

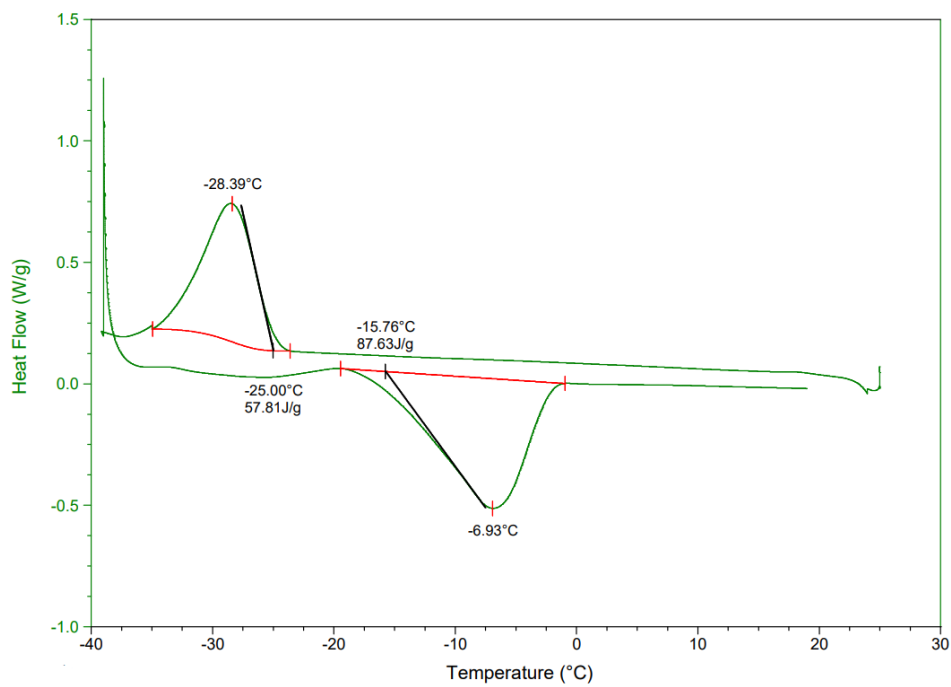
vlhkosti byla po provedení perfúzní kalorimetrie stanovena na 58,3 obj.%. Po provedení perfúzní kalorimetri byl tedy vzorek vložen na DSC. Na Obr. 32 máme záznam z tohoto měření a můžeme vidět, že hodnota entalpií se nám ve srovnání s předchozími měřeními rapidně snížily. Hodnota entalpie exotermního píky byla stanovena na 57,81 J/g v předchozích měřeních byla hodnota entalpie exotermního píku, jak v případě smíchání s 0,6 ml, tak v případě smíchání s 1 ml okolo 520 J/g. Jde tedy o obrovský pokles. Z těchto výsledků můžeme tedy usuzovat, že při perfúzní kalorimetrii, kdy byl vzorek podroben přísunu relativní vlhkosti, se voda nasorbovala do struktury vzorku a vzorek tedy obsahoval pouze malé množství volné vody, kterou jsme poté pomocí metody DSC detekovali.



Obr. 30: Křivka tepelného toku pro hyaluronan o hmotnosti 130-300 kDa



Obr. 31: TGA křivka hyaluronanu sodného o hmotnosti 250 kDa



Obr. 32: DSC záznam pro hyaluronan o hm. 130-300 kDa po perfúzní kalorimetrii

5 ZÁVĚR

Tato diplomová práce se zabývá studiem hydratace biokoloidů. V experimentální části bylo ke studiu použito několik kalorimetrických metod. První metodou byla diferenční kompenzační kalorimetrie. Experiment probíhal tak, že bylo 20 mg vzorku smícháno v prvním případě s 0,6 ml vody a podruhé s 1 ml vody a vzorky byly podrobeny DSC měření. Měřilo se vždy ihned po smíchání s vodou, po 24 hodinách, po 48 hodinách a nakonec po 168 hodinách (tj. týden), kdy po celou tuto dobu voda na vzorek působila. Byly zde vyhodnocovány entalpie tání a krystalizace volné vody. Byly zkoumány změny hodnot entalpií a počátků tání a krystalizace. Největší změny byly zaznamenány u fulvinových kyselin a u hyaluronanu o molekulové hmotnosti 500-750 kDa. kDa.

Další metodou, která byla v této práci využita byla perfúzní kalorimetrie, kdy byla ke vzorku kontinuálně přiváděna relativní vlhkost. Touto metodou byly zkoumány pouze vybrané vzorky biokoloidů. Huminová a fulvinová kyselina pocházející z rašeliniště Pahokee a tři hyaluronové kyseliny. Z výsledků bylo zjištěno, že huminové látky vykazují stejný trend tepelného toku, kdy po cca 15 hodinách začalo docházet k prudkému nárůstu, kdežto u hyaluronanů byl nárůst pozvolný.

Jako poslední metoda, která byla při studiu využita, byla termogravimetrická analýza. Při této metodě byla měřena vlhkost vzorku poté, co byl podroben perfúzní kalorimetrii. Bylo zjištěno, že nejvyšší vlhkosti dosahuje hyaluronan sodný o molekulové hmotnosti 130-300 kDa.

6 SEZNAM ZKRATEK

FK PP – fulvinová kyselina z Pahokee Peak

FK SR – fulvinová kyselina z Suwannee River

kDa – kilodaltony

HK PP – huminová kyselina z Pahokee Peak

HK SR – huminová kyselina ze Suwannee River

Hyal – hyaluronan sodný

T_k – teplota krystalizace

T_{onset} – teplota počátku tání/krystalizace

T_t – teplota tání

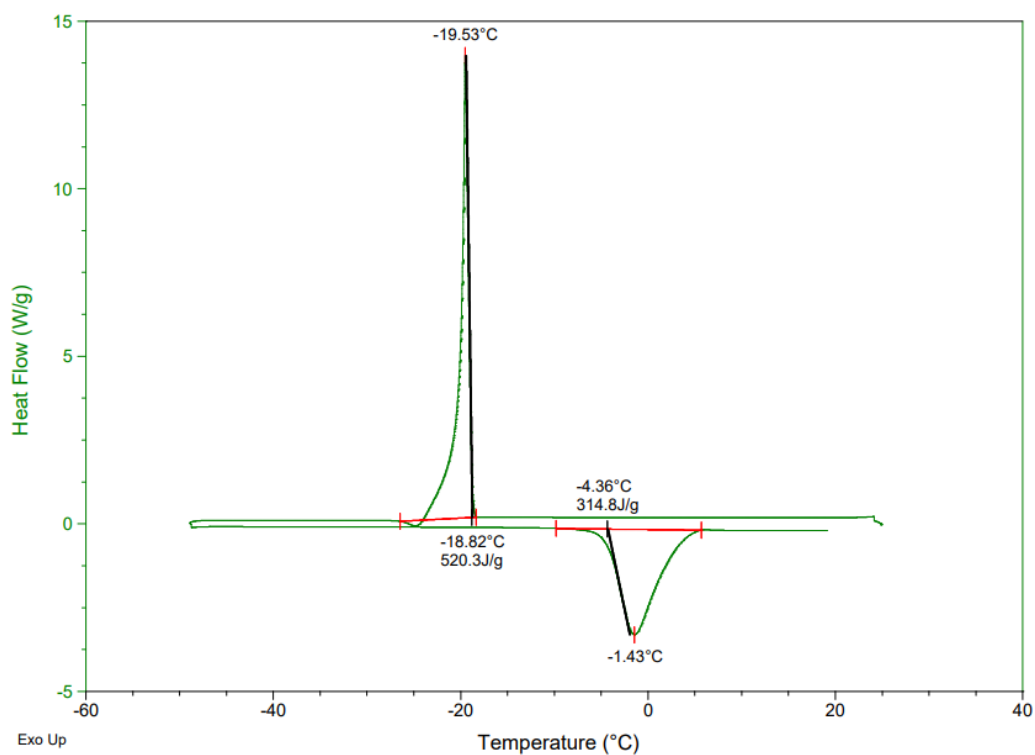
7 ZDROJE

1. PICCOLO, Alessandro. The supramolecular structure of humic substances: A novel understanding of humus chemistry and implications in soil science. *Advances in Agronomy* [online]. Elsevier, 2002, s. 57 [cit. 2020-12-12]. DOI: 10.1016/S0065-2113(02)75003-7
2. STEINBERG, C. E. W., T. MEINELT, M. A. TIMOFEYEV, M. BITTNER a R. MENZEL. Humic substances. *Environ Sci Pollut Res Int.* 2008(15), 128-135.
3. GHABBOUR, Elham A a Geoffrey DAVIES. *Understanding Humic Substances: Advanced Methods, Properties and Applications.* Cambridge: Royal Society of Chemistry, 1999, 286 s. ISBN 0-85404-799-9
4. Soil humic substances. Jerzy Weber [online]. Wrocław: Agricultural University of Wrocław [cit. 2021-01-02]. Dostupné z: <http://karnet.up.wroc.pl/~weber/powstaw2.htm>
5. STEVENSON, F. J. *Humus chemistry: Genesis, composition, reactions.* 2. New York: Wiley, 1994. ISBN 9780471594741
6. O huminových látkách. International humic substances society (IHSS) [online]. AG TOP TIP [cit. 2020-12-28]. Dostupné z: <http://www.ihss-cz.cz/o-huminovychlatkach.html>
7. WEBER, Jerzy, Yona CHEN, Elzbieta JAMROZ a Teodoro MIANO. Humic substances in the environment. *Journal of soils and sediments*[online]. 2018, 18(8), 2665-2667 [cit. 2019-05-03]. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11368-018-2052-x>. Dostupné z: <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs11368-018-2052-x>
8. Huminové látky [online]. Praha: Enviproduct, 2019 [cit. 2020-11-03]. Dostupné z: <http://www.enviproduct.cz/huminove-latky>
9. MIKULÁŠKOVÁ, Barbora, Lubomír LAPČÍK a Ivan MAŠEK. Lignite: Structure, properties and applications. *Chemické listy* [online]. 1997, 91(3), 160-168 [cit. 2020-11-12]. Dostupné z: <http://www.chemicke-listy.cz/ojs3/index.php/chemickelisty/article/view/2787/2774>
10. Huminové látky [online]. Praha: Enviproduct, 2019 [cit. 2020-10-15]. Dostupné z: <http://www.enviproduct.cz/huminove-latky>

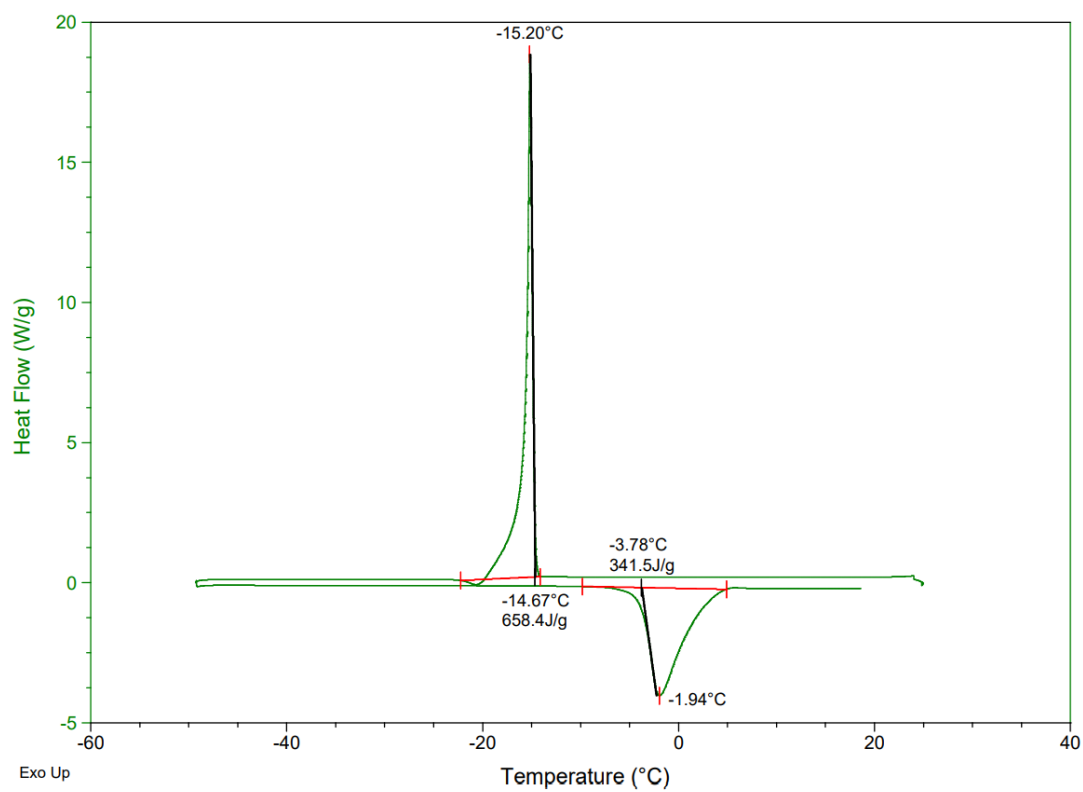
11. VELEBNÝ, Vladimír. *Hyaluronan - biopolymer pro tkáňové inženýrství*. Brno, 2012. Teze habilitační práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemické, Ústav fyzikální a spotřební chemie.
12. ČOPÍKOVÁ, Jana. *Chemie a analytika sacharidů*. 1. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 1997. ISBN 80-708-0306-1.
13. KOPEL, Pavel, Dagmar CHUDOBOVÁ, Lukáš NEJDL, et al. *Metodika pro vývoj a inovace nových materiálů pro cílenou modifikaci cévních náhrad: certifikovaná metodika*. 1. Brno: Mendelova univerzita v Brně, 2013, 36 s. ISBN 978-80-7375-876-9
14. GHOSH, Arun a M. Azam ALI. Studies on physicochemical characteristics of chitosan derivatives with dicarboxylic acids. *Journal of Materials Science* [online]. 2012, **47**(3), 1196-1204 [cit. 2021-04-08]. ISSN 0022-2461. Dostupné z: doi:10.1007/s10853-011-5885-x
15. VOJTOVÁ, Lucy. *Advanced functionalized polymers and composites: from synthesis to application*. Brno, 2015. Teze habilitační práce. Brno University of Technology.
16. LINDSTRÖM, Annelie. Targeting to EGF receptors: preparation of EGF-dextran conjugates and analysis of their metabolism in vitro and in vivo. Uppsala: Annelie Lindström, 1993. Acta Universitatis Upsaliensis. ISBN 91-554-3054-6.
17. DHANESHWAR, SuneelaS, Mini KANDPAL, Neha GAIROLA a SS KADAM. Dextran: A promising macromolecular drug carrier. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences* [online]. 2006, **68**(6), 705-714 [cit. 2021-04-12]. ISSN 0250-474X. Dostupné z: doi:10.4103/0250-474X.31000
18. HAGLUND, Asa. *Solute affinity in dextran gels*. Uppsala, 1982. Doctoral thesis. Uppsala University.
19. MARSDEN, Nigel V B. The role of water in the interaction of some solutes in aqueous dextran gel systems. Uppsala, 1972. Doctoral thesis. Uppsala University.
20. ZHAO, Qinghai. Targeting to EGF receptors: preparation and experimental Analysis of end-end coupled mEGF-dextran conjugates. 1. Uppsala: Uppsala University, 1998. Acta Universitatis Upsaliensis. ISBN 91-554-4211-0.
21. BRANDŠTETR, Jiří. *Chemie stavebních látek*. 2. přeprac. vyd. Brno: Vysoké učení technické, 1993. ISBN 80-214-0512-0.

22. JARUŠEK, Jaroslav. *Metody zkoumání polymerů. 2.*, nezm. vyd. Pardubice: Vysoká škola chemicko-technologická, 1989. ISBN 80-851-1301-5.
23. TALIK, Przemysław a Urszula HUBICKA. The DSC approach to study non-freezing water contents of hydrated hydroxypropylcellulose (HPC). *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*. 2018, 132(1), 445-451. ISSN 1388-6150. Dostupné z: doi:10.1007/s10973-017-6889-9
24. LIU, Wen Guang a Kang De YAO. What causes the unfrozen water in polymers: hydrogen bonds between water and polymer chains?. *Polymer*. 2001, 42(8), 3943-3947. ISSN 00323861. Dostupné z: doi:10.1016/S0032-3861(00)00726-6
25. KUČERÍK, Jiří, Petra BURSÁKOVÁ, Alena PRŮŠOVÁ, Lucie GREBÍKOVÁ a Gabriele Ellen SCHAUMANN. Hydration of humic and fulvic acids studied by DSC. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*. 2012, 110(1), 451-459. ISSN 1388-6150. Dostupné z: doi:10.1007/s10973-011-2178-1
26. BAZARGAN, Gloria, Sean A. FISCHER a Daniel GUNLYCKE. Effect of Structure and Hydration Level on Water Diffusion in Chitosan Membranes. *Macromolecular Theory and Simulations*. 2021, 30(4). ISSN 1022-1344. Dostupné z: doi:10.1002/mats.202000064
27. CARTIER, Noël, Alain DOMARD a Henri CHANZY. Single crystals of chitosan. *International Journal of Biological Macromolecules*. 1990, 12(5), 289-294. ISSN 01418130. Dostupné z: doi:10.1016/0141-8130(90)90015-3
28. GROSSUTTI, Michael a John R. DUTCHER. Hydration Water Structure, Hydration Forces, and Mechanical Properties of Polysaccharide Films. *Biomacromolecules*. 2020, 21(12), 4871-4877. ISSN 1525-7797. Dostupné z: doi:10.1021/acs.biomac.0c01098

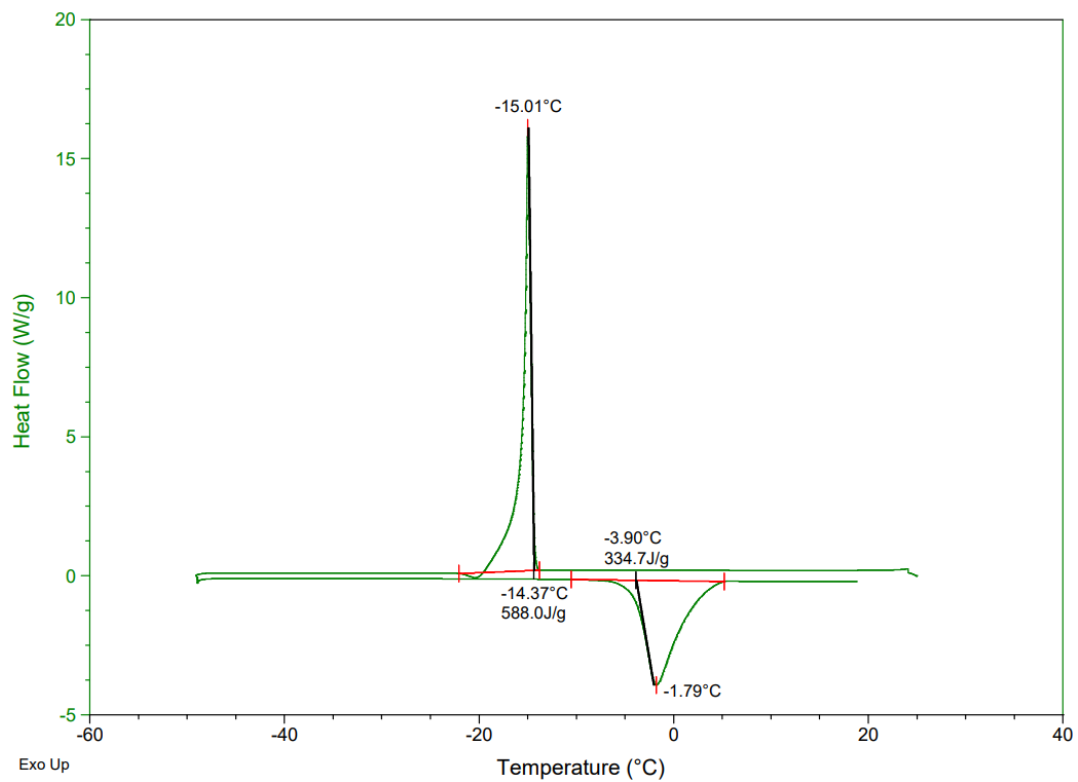
8 PŘÍLOHY



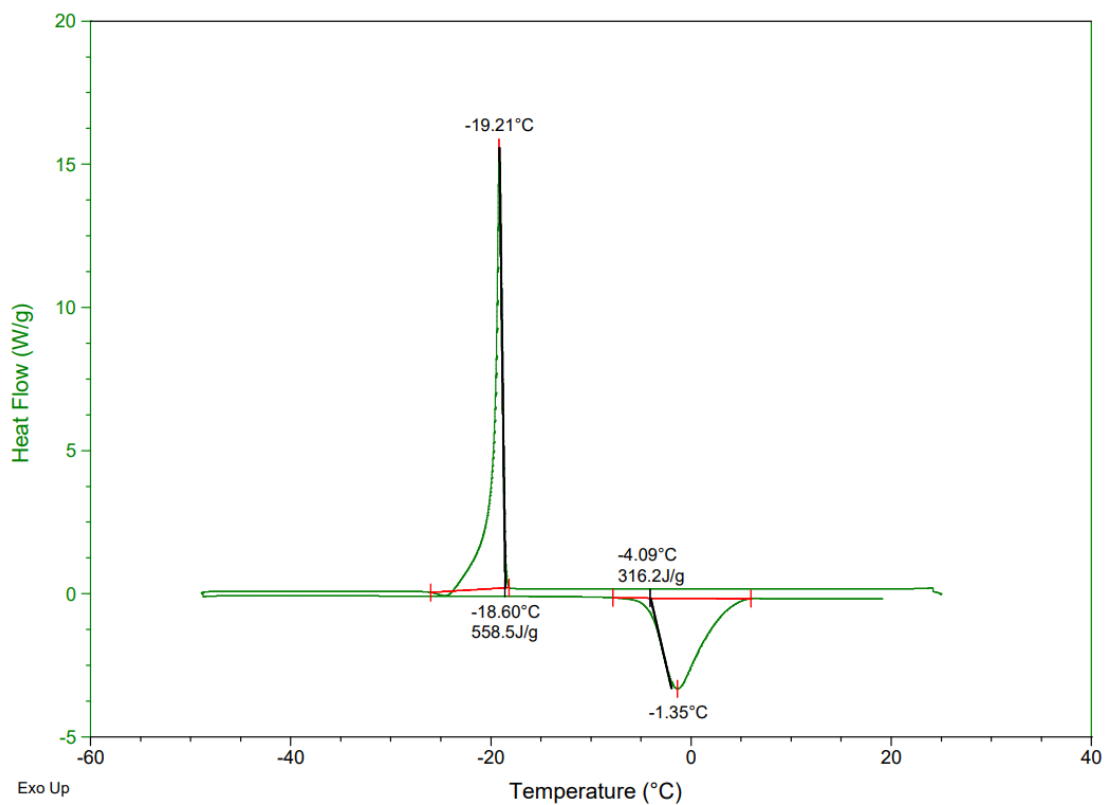
Příloha 1: HYL 130-300 kDa v 1 ml ihned po smíchání s vodou



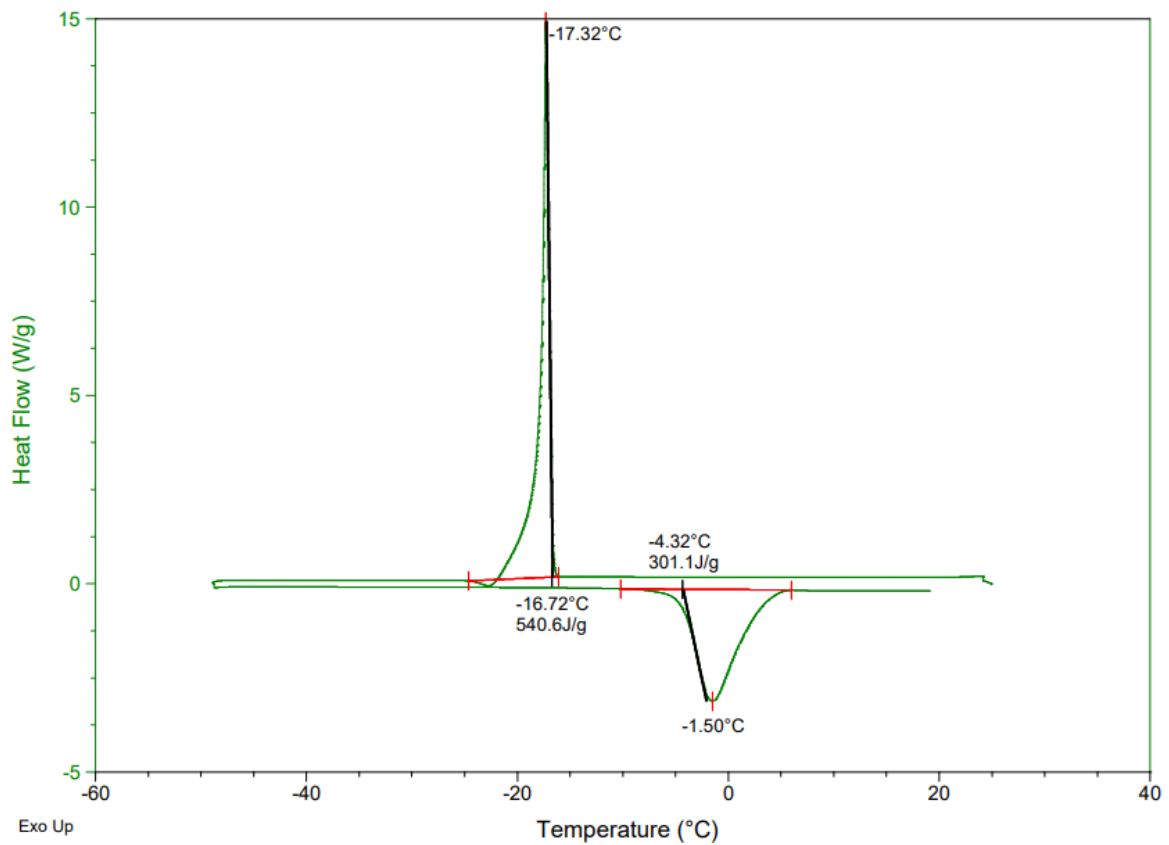
Příloha 2: HYL 130-300 kDa v 1 ml po 24 hodinách



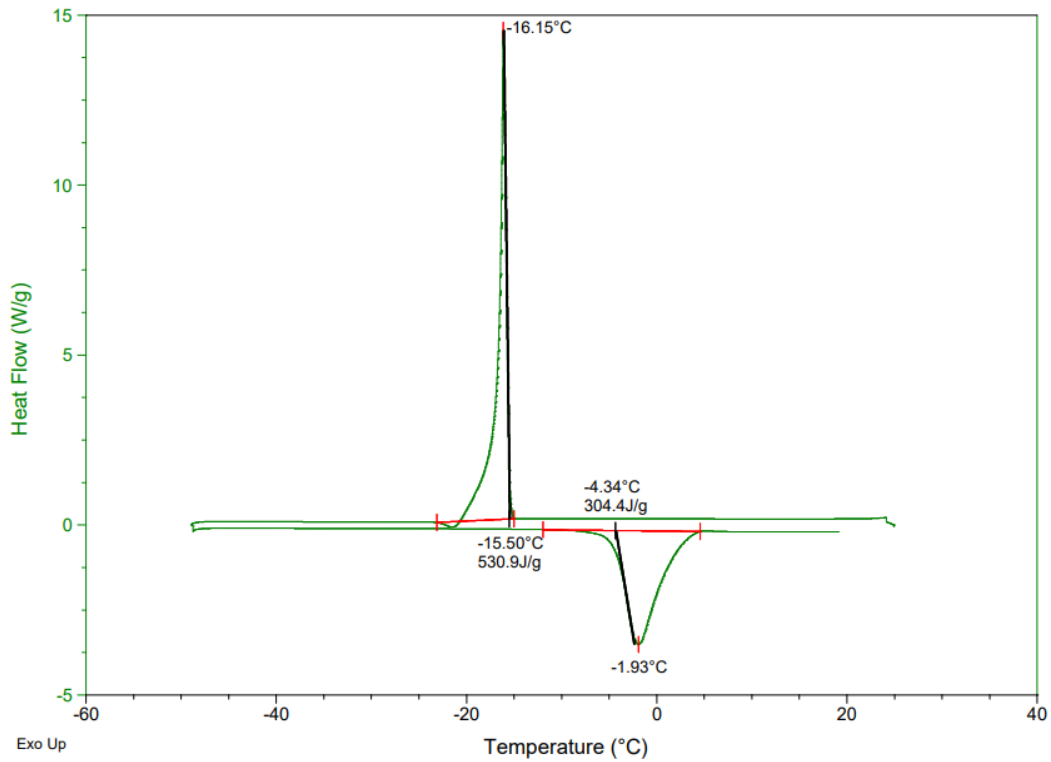
Příloha 3: HYL 130-300 kDa v 1 ml po 48 hodinách



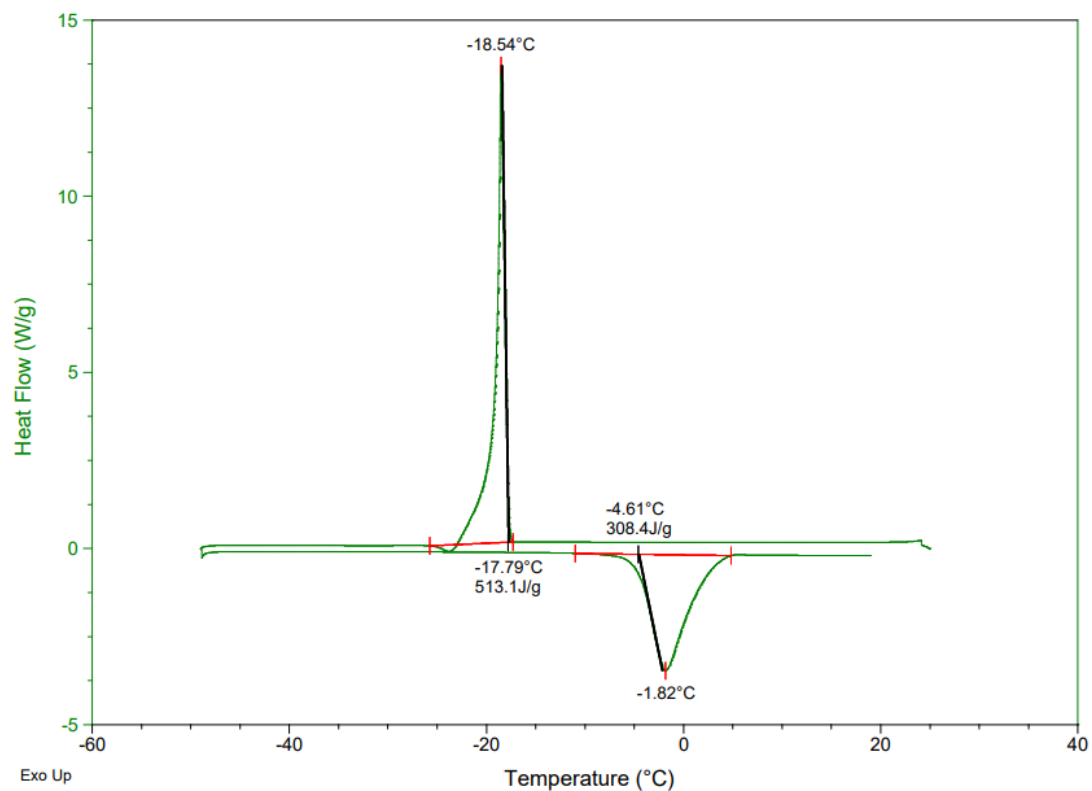
Příloha 4: HYL 130-300 kDa v 1 ml po 168 hodinách (tl. sedmi dnech)



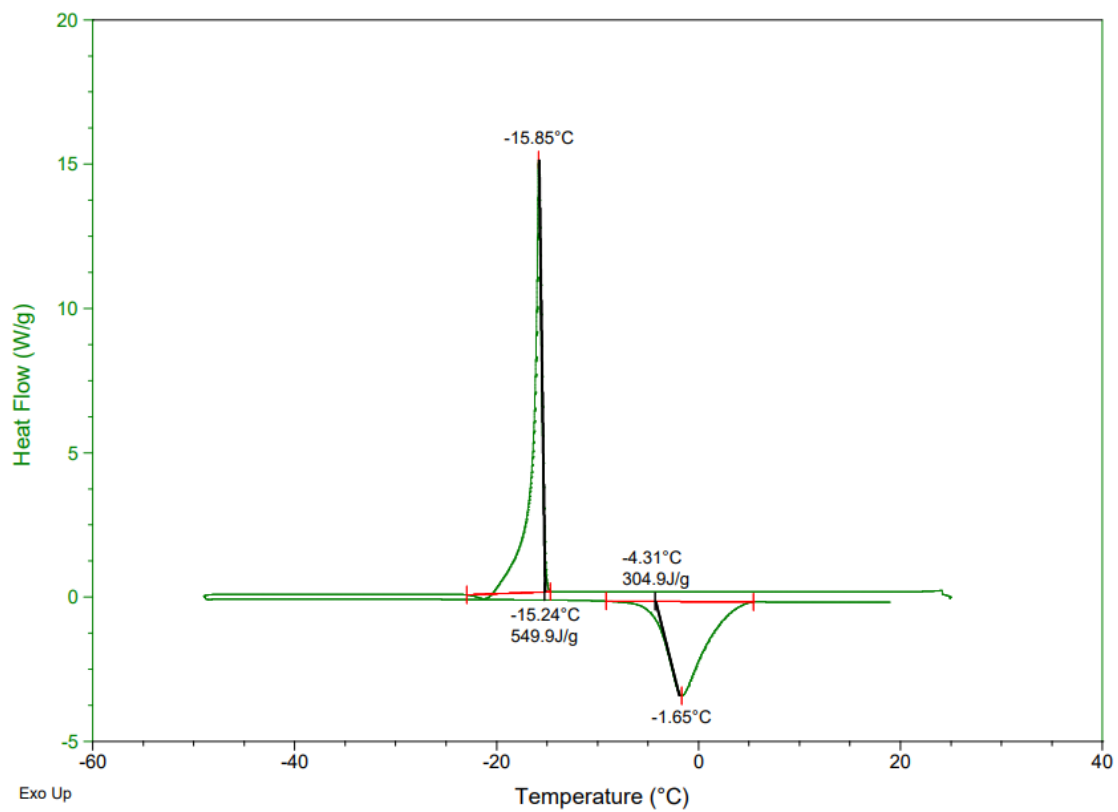
Příloha 5: HYL 130-300 kDa v 0,6 ml ihned po smíchání s vodou



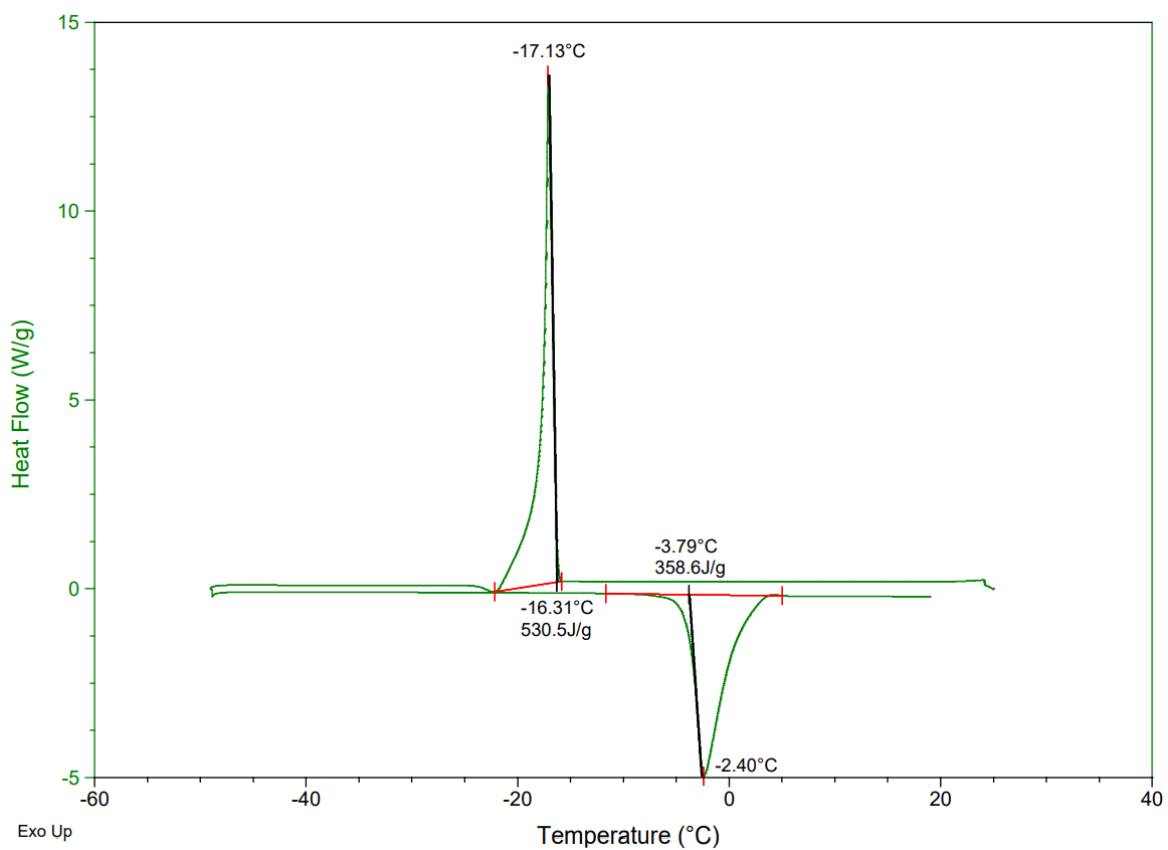
Příloha 6: HYL 130-300 kDa v 0,6 ml po 24 hodinách



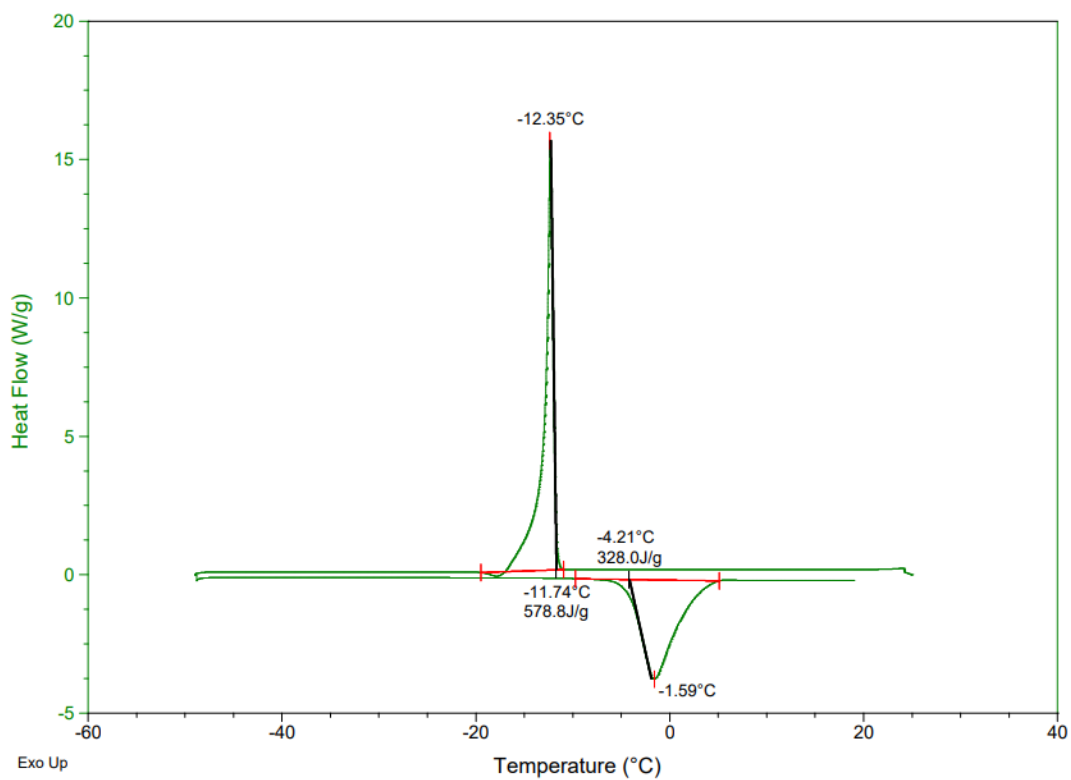
Příloha 7: HYLAL 130-300 kDa v 0,6 ml po 48 hodinách



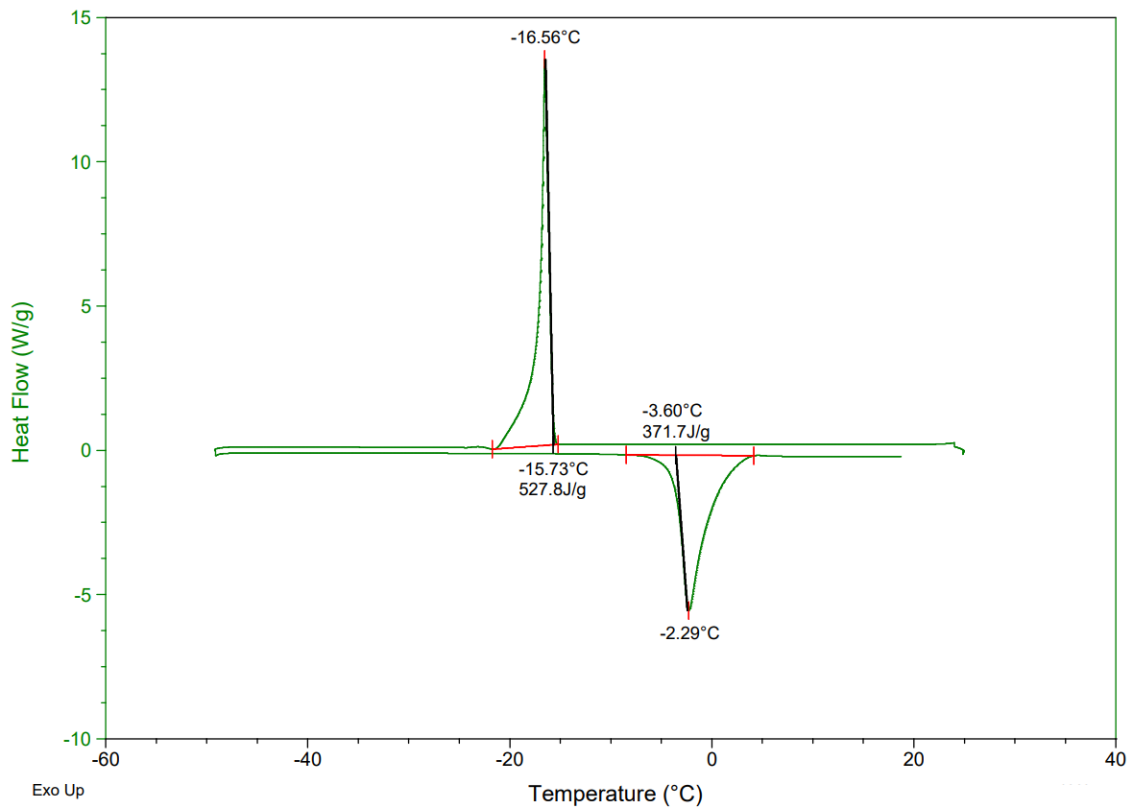
Příloha 8: HYLAL 130-300 kDa v 0,6 ml po 168 hodinách (tj. sedmi dnech)



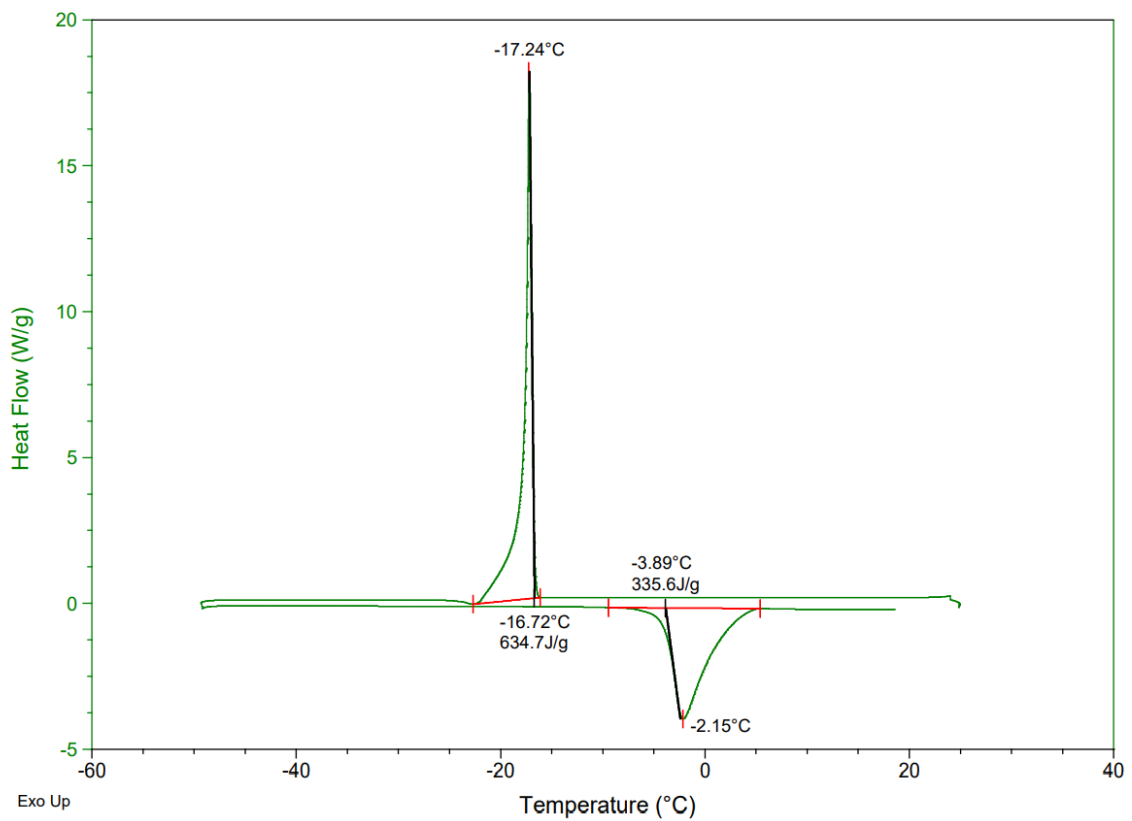
Příloha 9: HYL 1500-1750 kDa v 1 ml ihned po smíchání s vodou



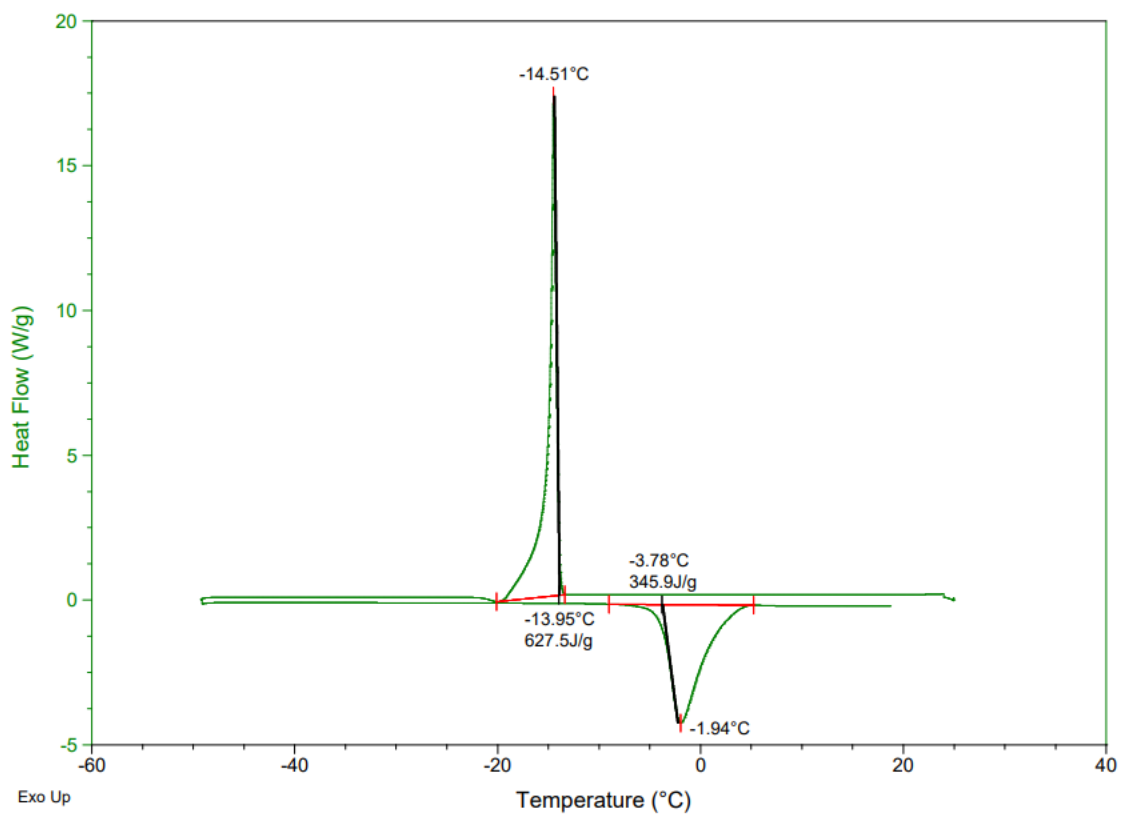
Příloha 10: HYL 1500-1750 kDa v 1 ml po 24 hodinách



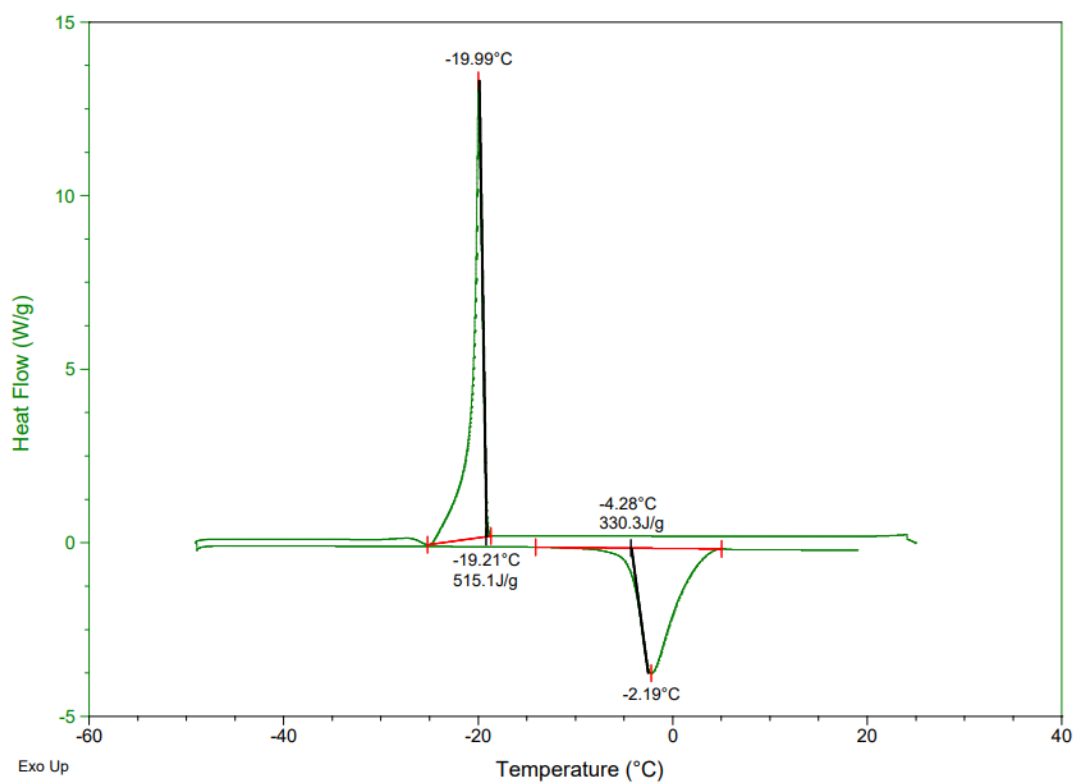
Příloha 11: HYL 1500-1750 kDa v 1 ml po 48 hodinách



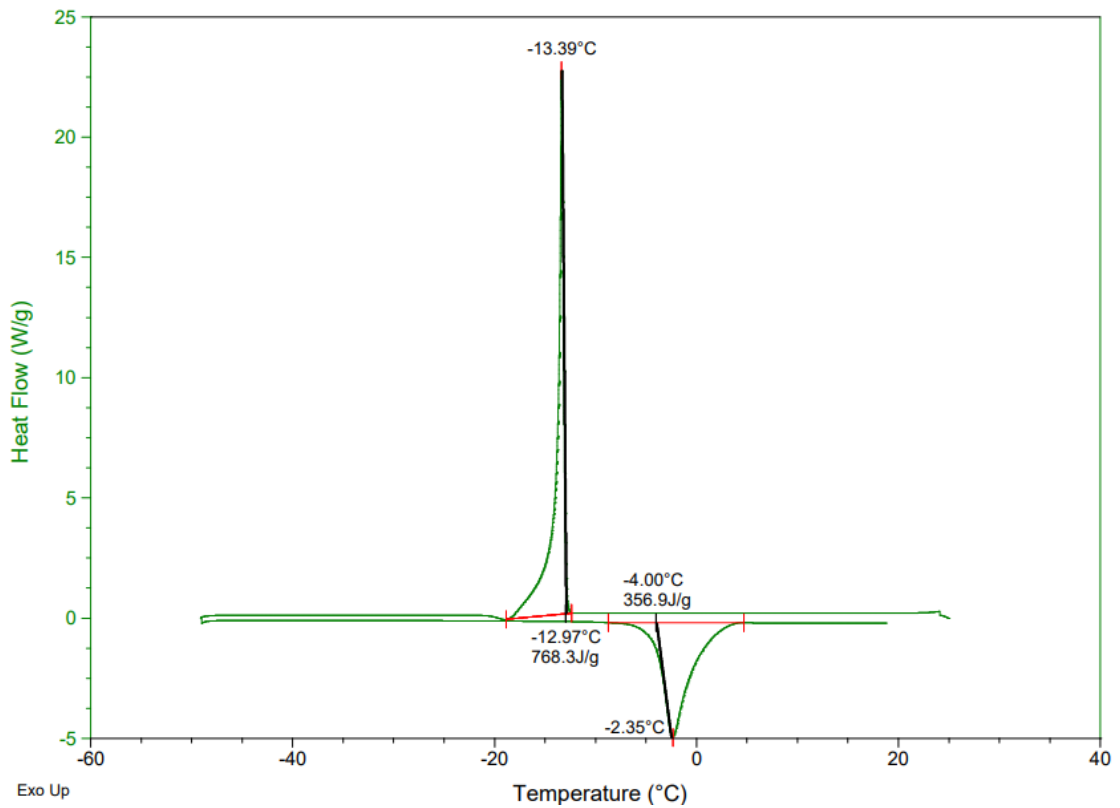
Příloha 12: HYL 1500-1750 kDa v 1 ml po 168 hodinách (tj. sedmi dnech)



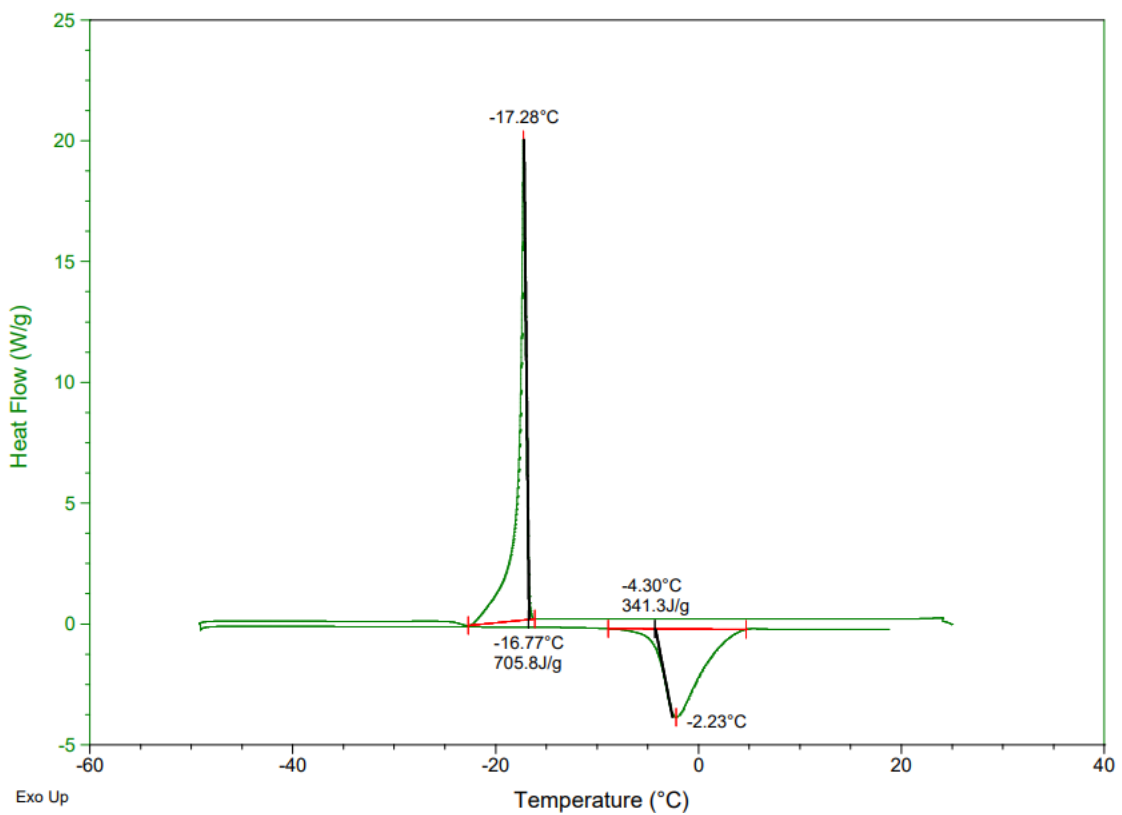
Příloha 13: HYAL 1500-1750 kDa v 0,6 ml ihned po smíchání s vodou



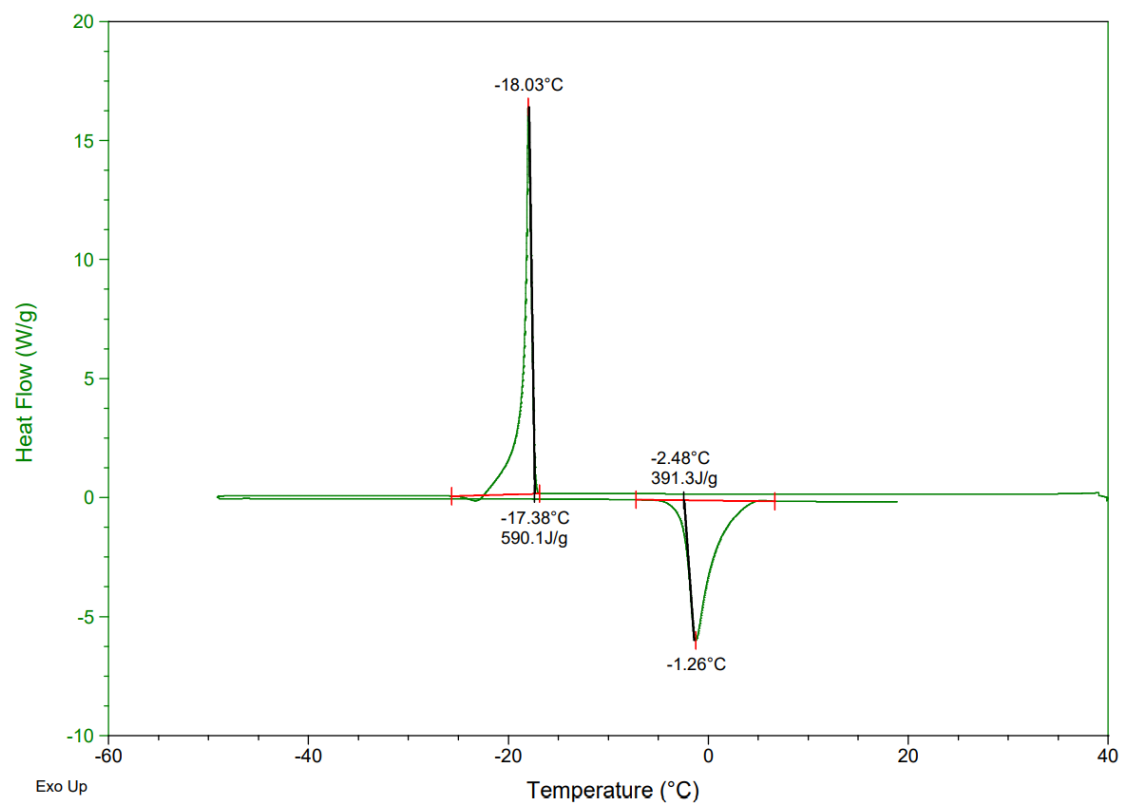
Příloha 14: HYAL 1500-1750 kDa v 0,6 ml po 24 hodinách



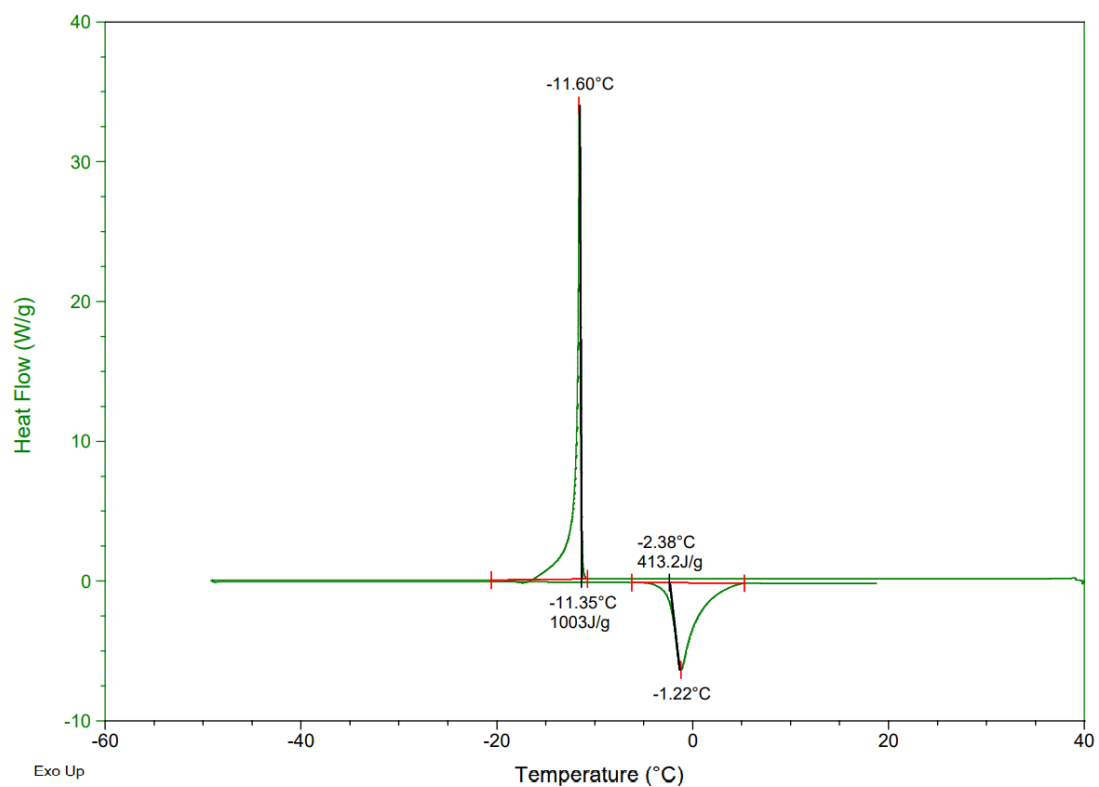
Příloha 15: HYL 1500-1750 kDa v 0,6 ml po 48 hodinách



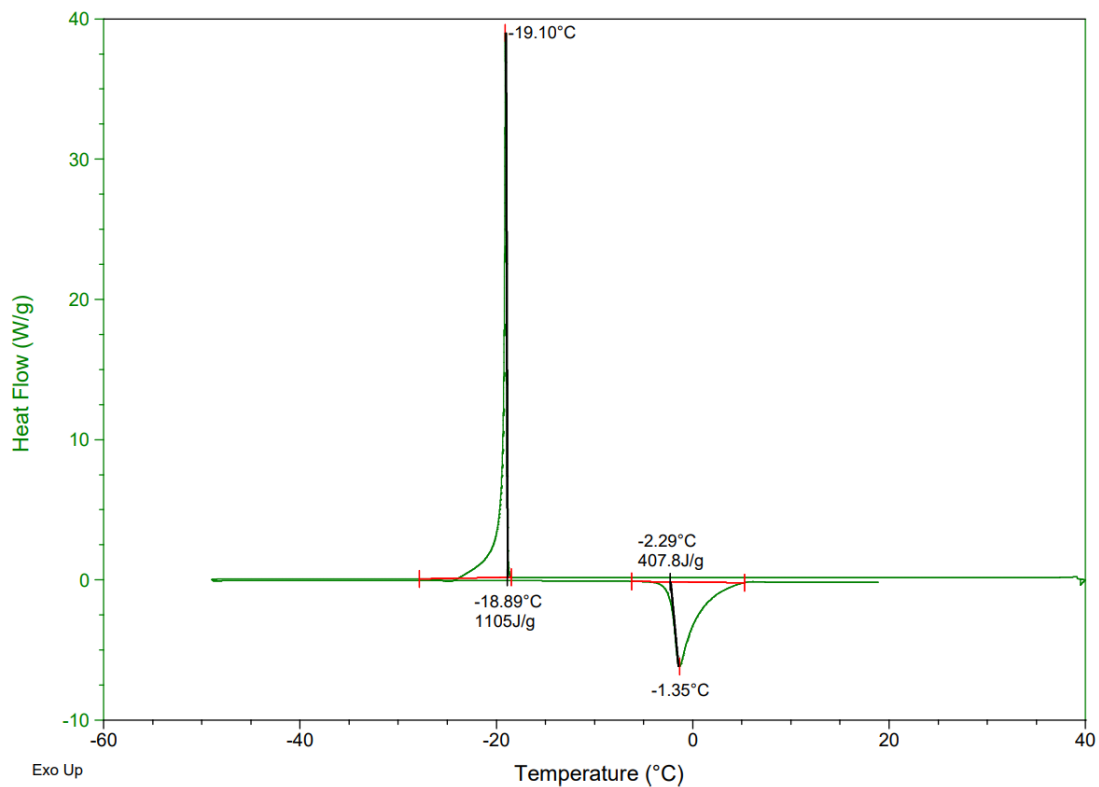
Příloha 16: HYL 1500-1750 kDa v 0,6 ml po 168 hodinách (tj. sedmi dnech)



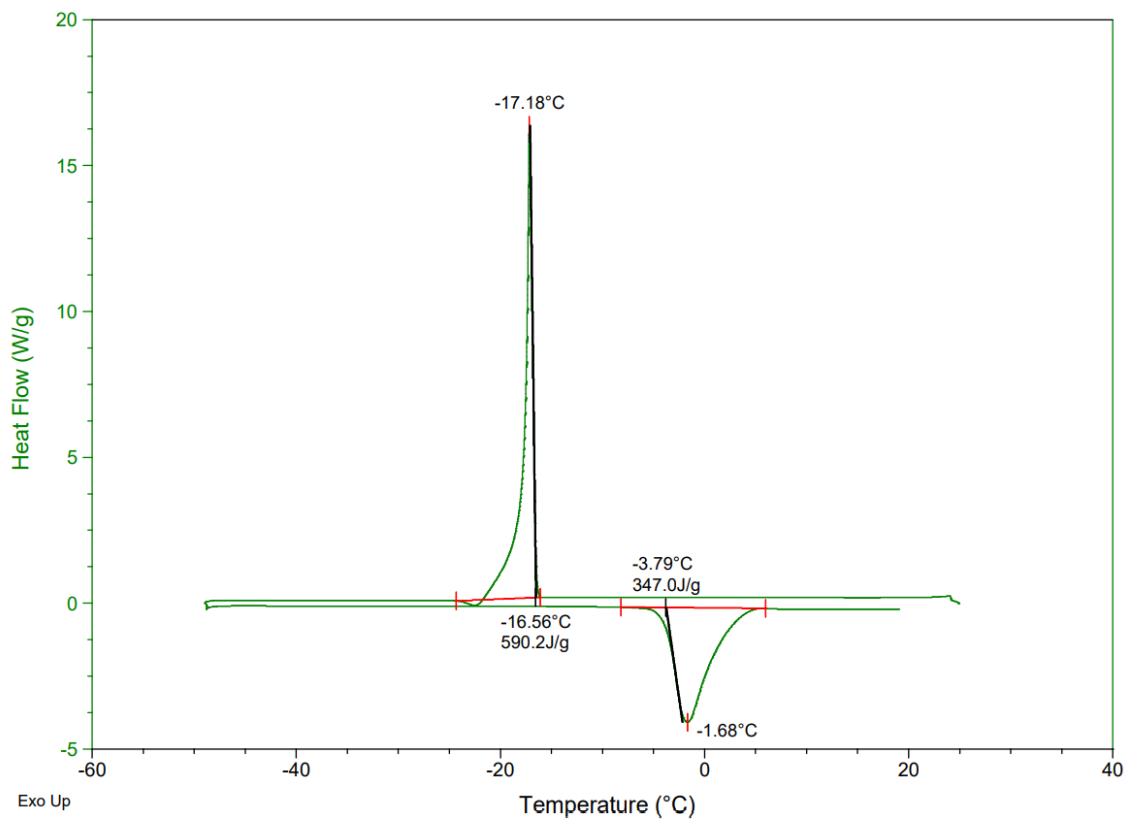
Příloha 17: dextran v 1 ml vody ihned po smíchání



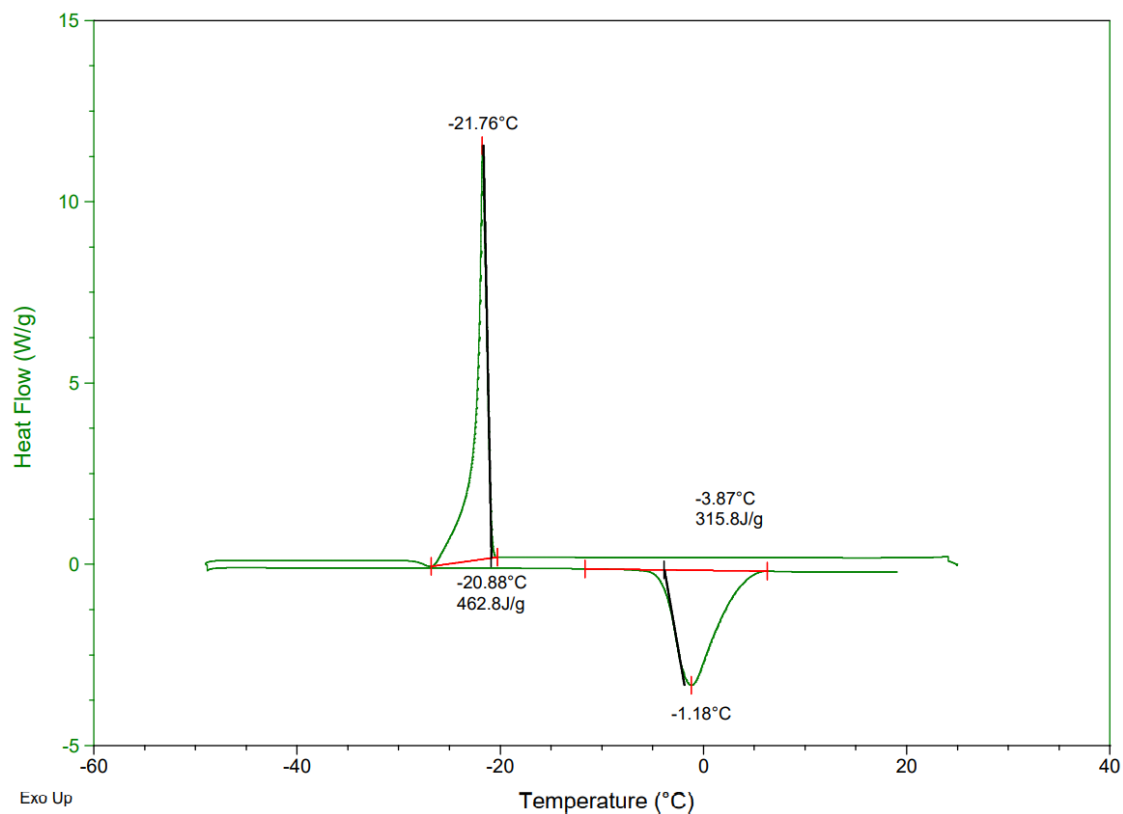
Příloha 18: dextran v 1 ml vody po 24 hodinách



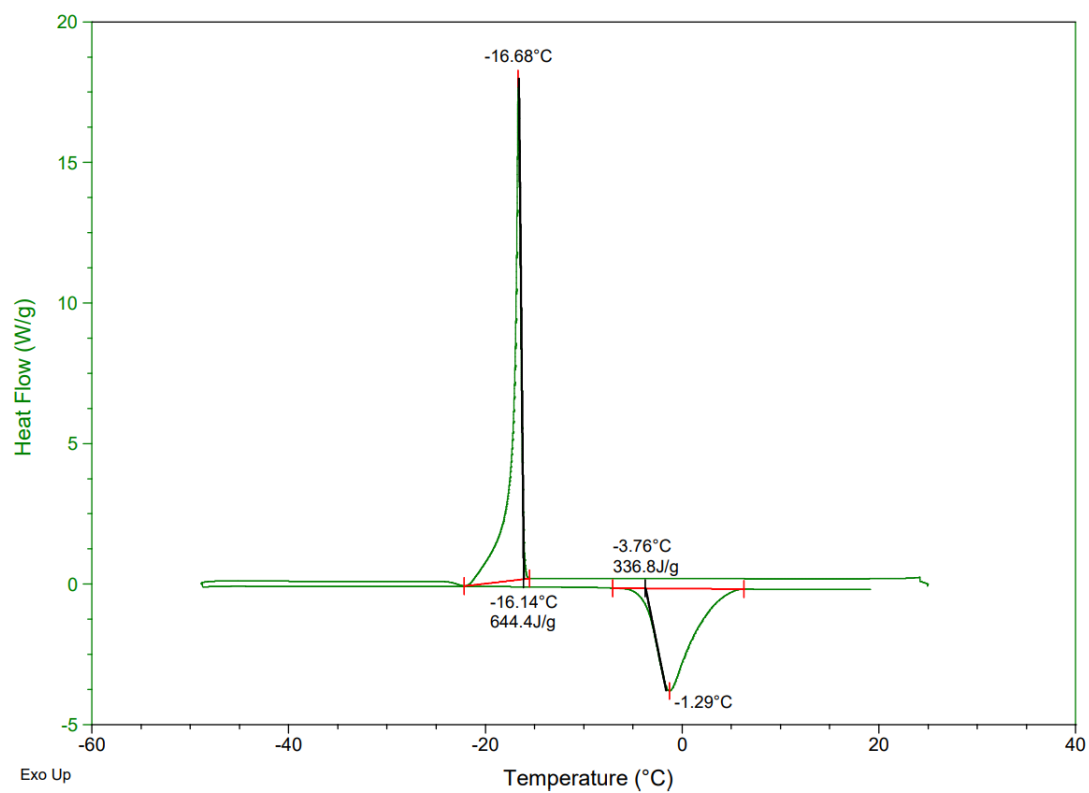
Příloha 19: dextran v 1 ml vody po 48 hodinách



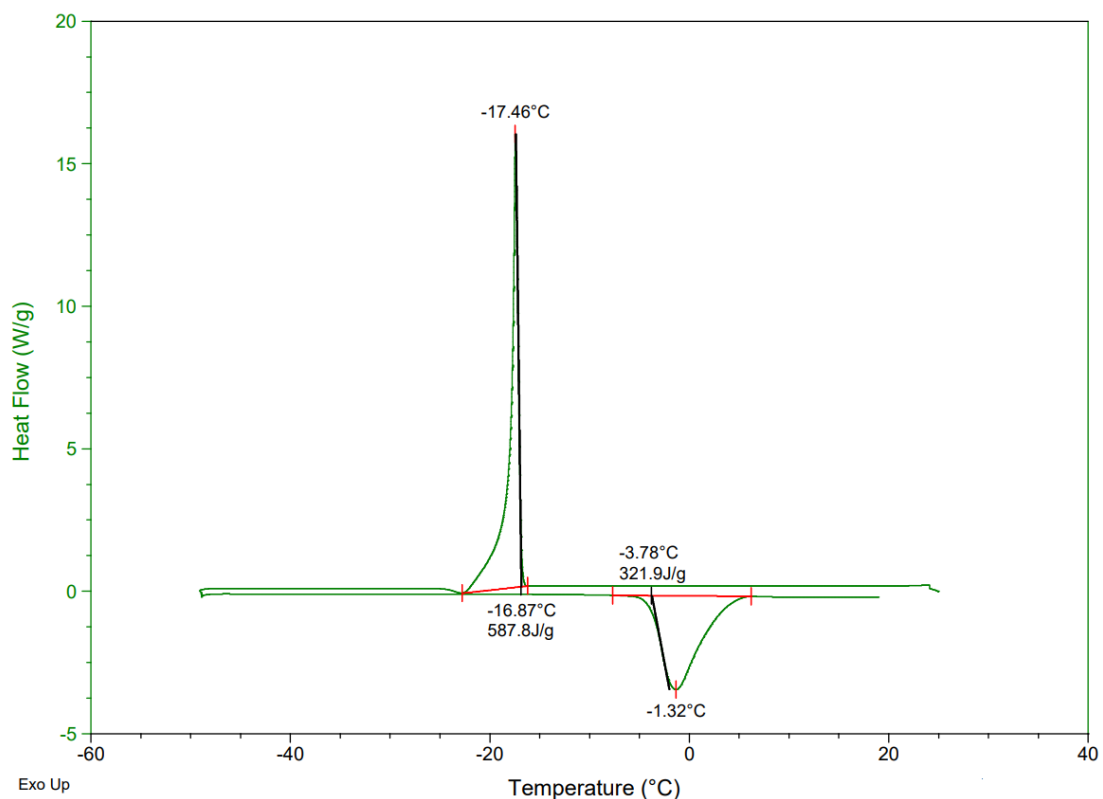
Příloha 20: dextran v 1 ml vody po 168 hodinách



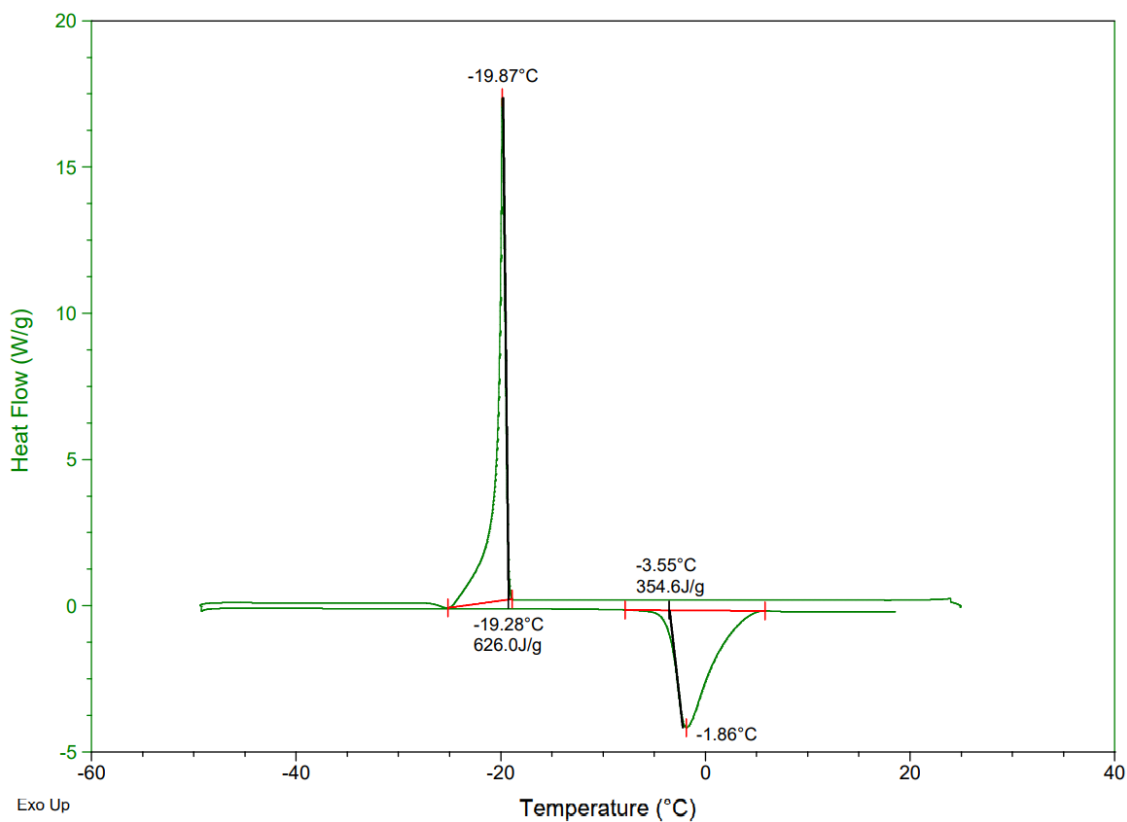
Příloha 21: dextran v 0,6 ml vody ihned po smíchání



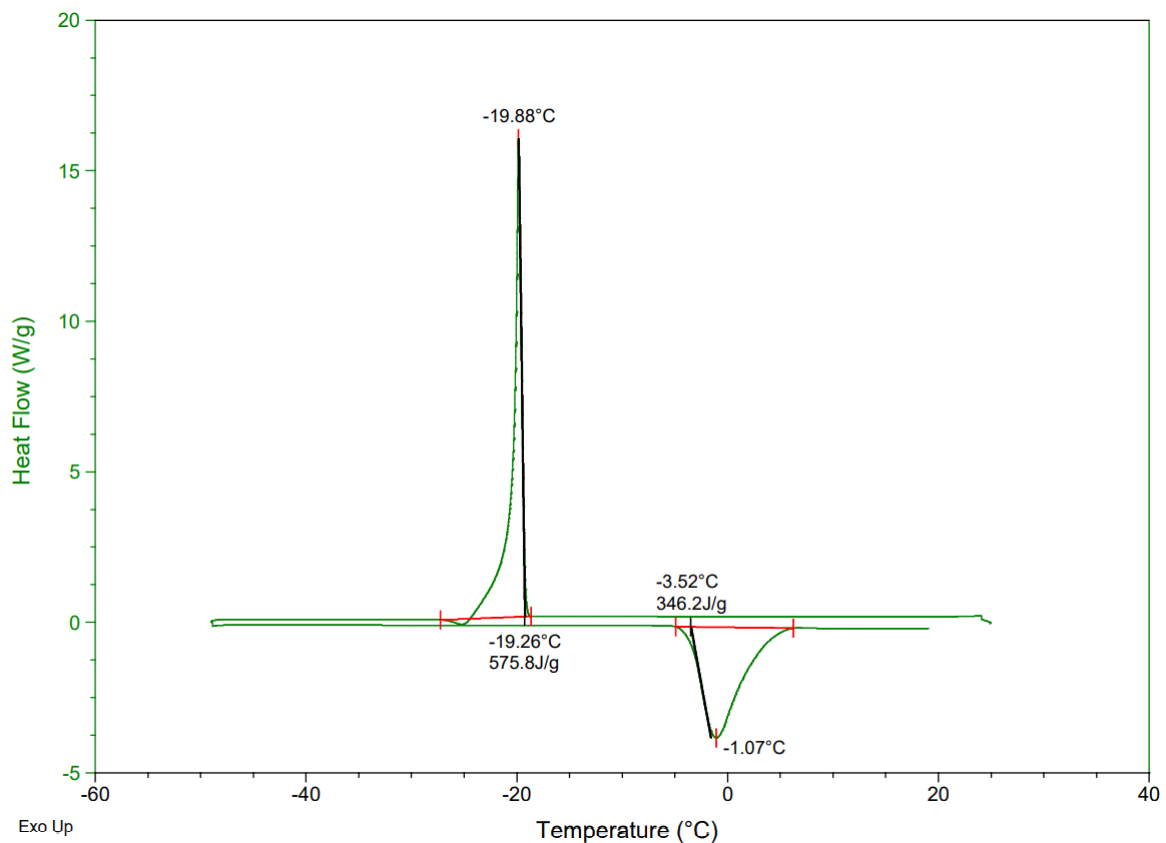
Příloha 22: dextran v 0,6 ml vody po 24 hodinách



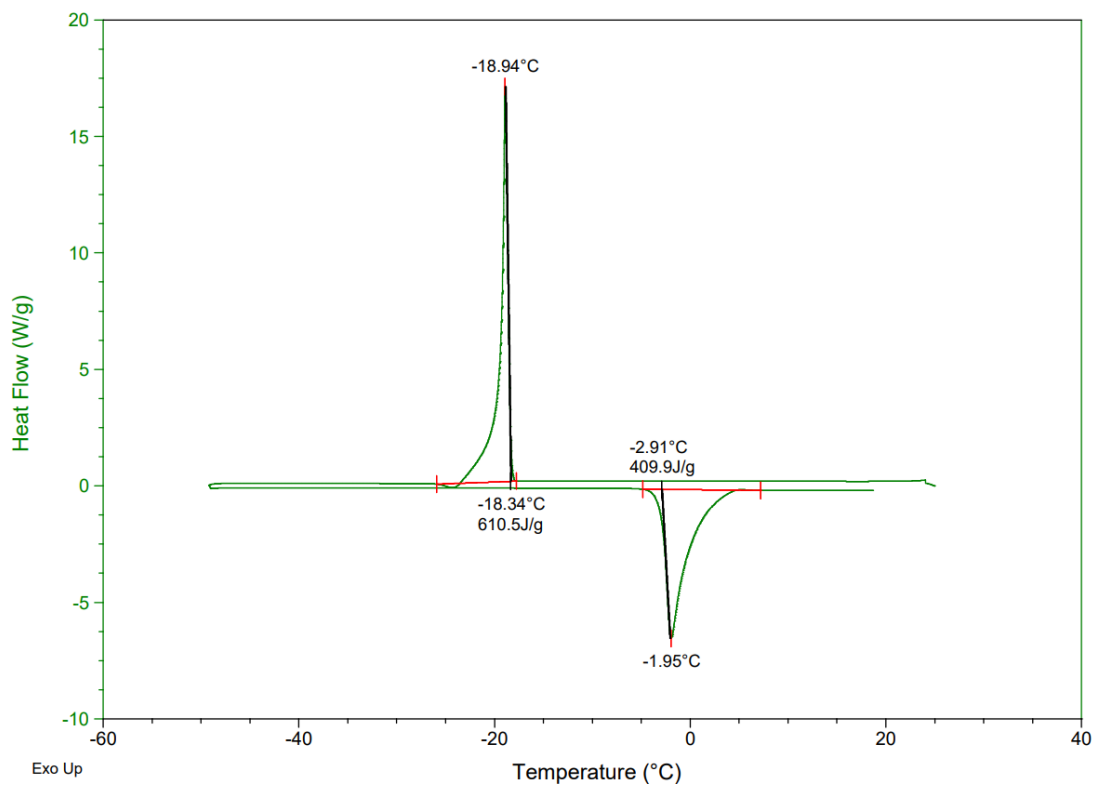
Příloha 23: dextran v 0,6 ml vody po 48 hodinách



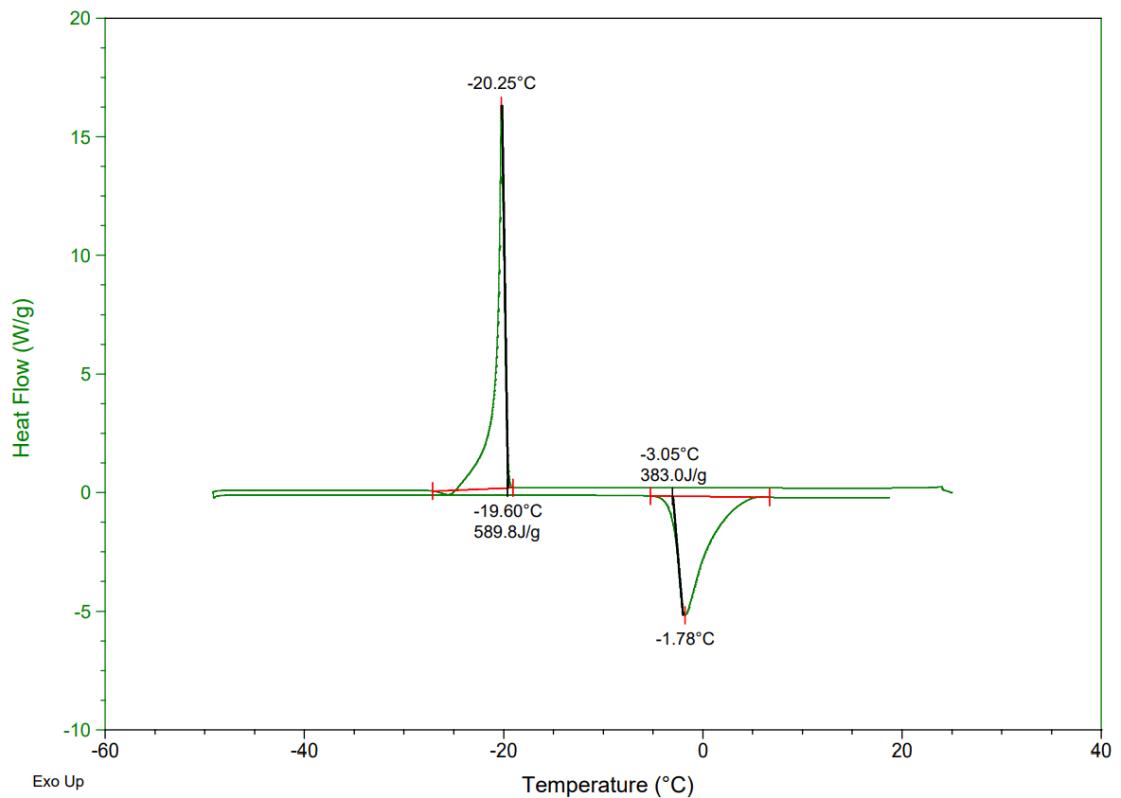
Příloha 24: dextran v 0,6 ml vody po 168 hodinách



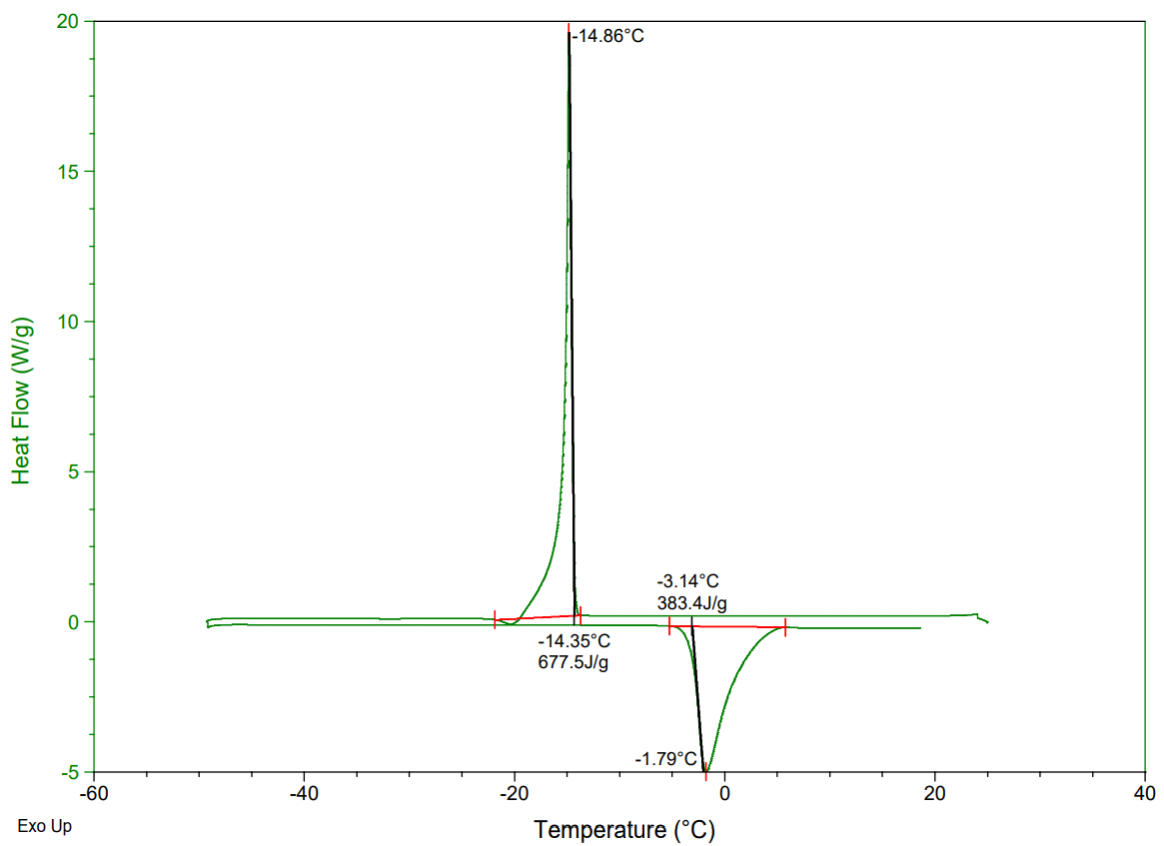
Příloha 25: chitosan v 1 ml vody ihned po smíchání



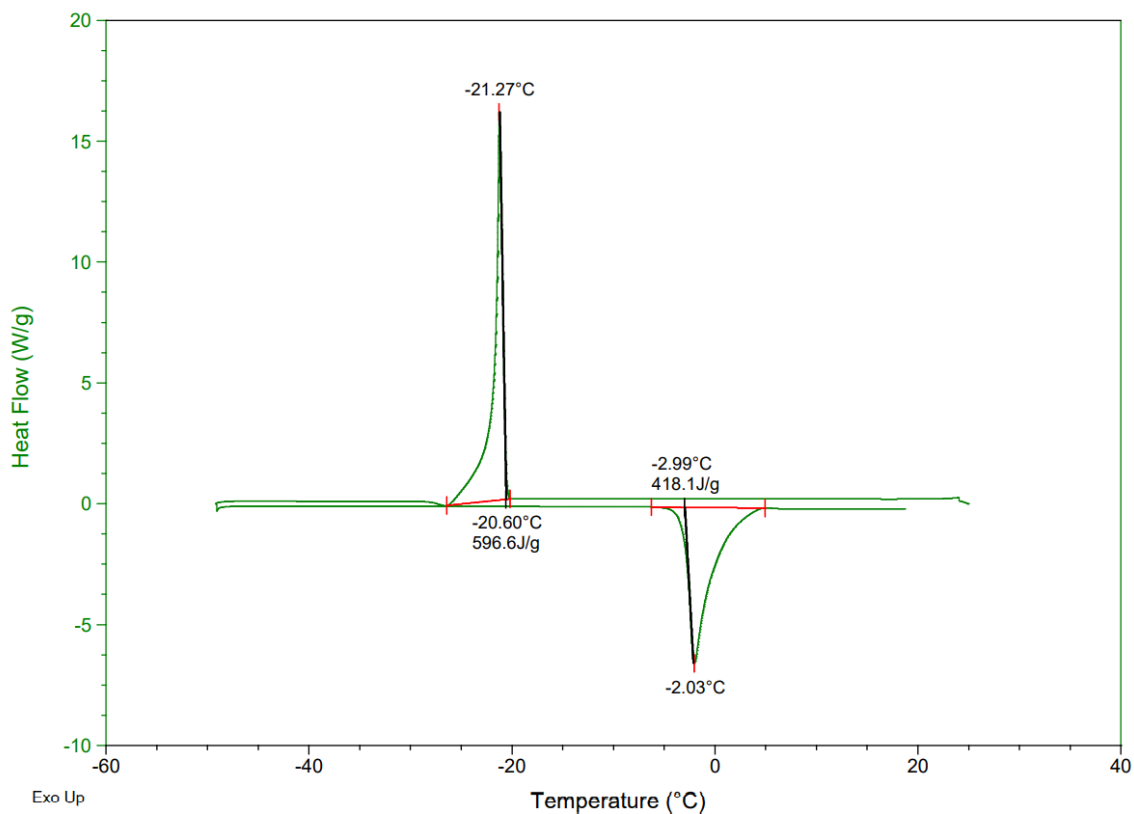
Příloha 26: chitosan v 1 ml po 24 hodinách



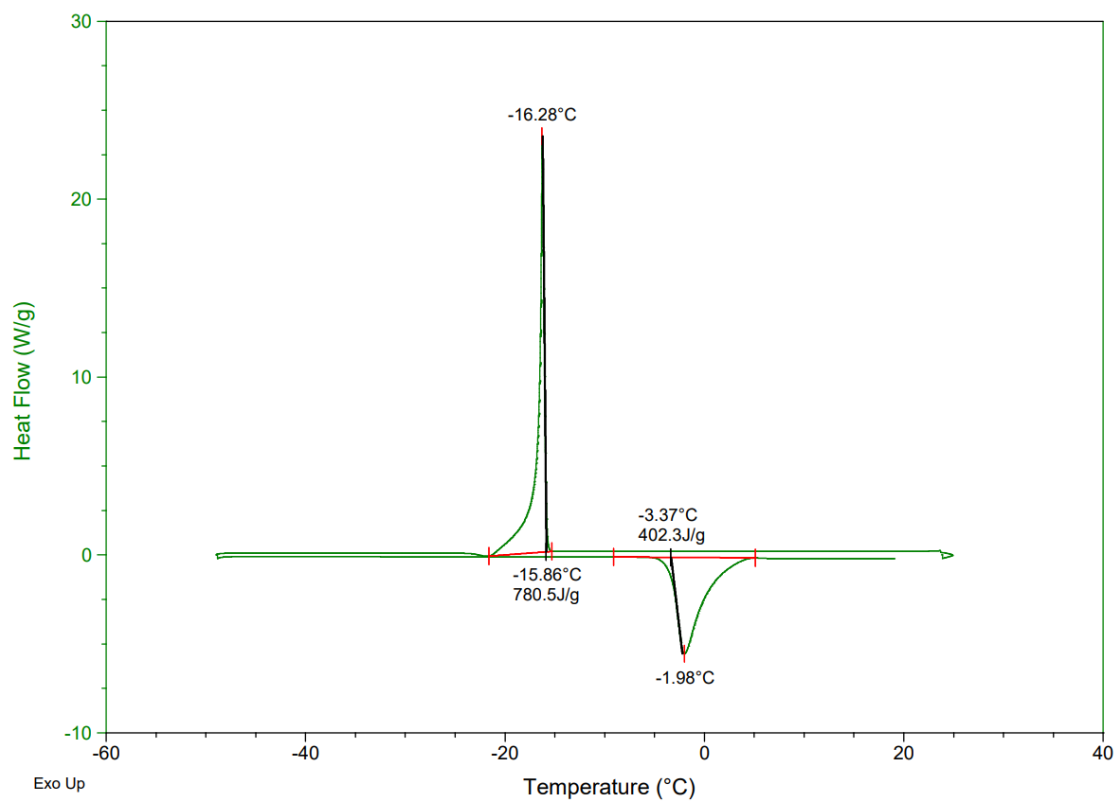
Příloha 27: chitosan v 1 ml po 48 hodinách



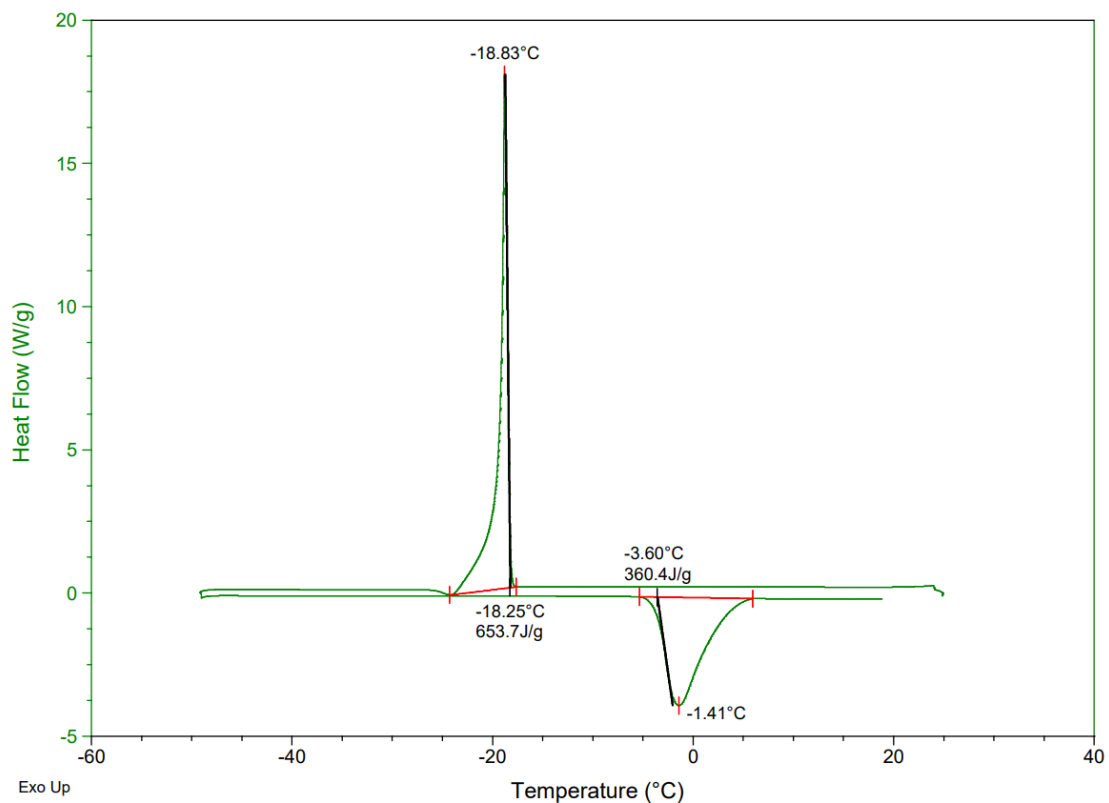
Příloha 28: chitosan v 1 ml po 168 hodinách



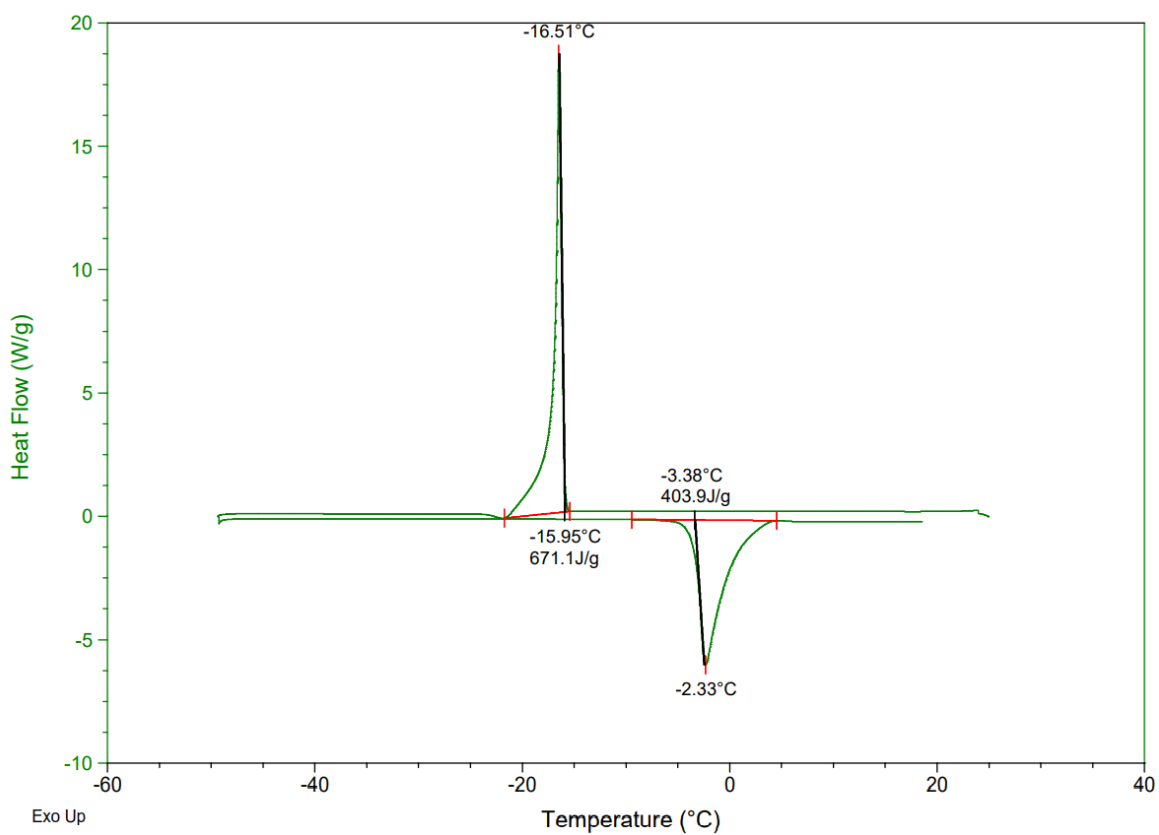
Příloha 29: chitosan v 0,6 ml vody ihned po smíchání



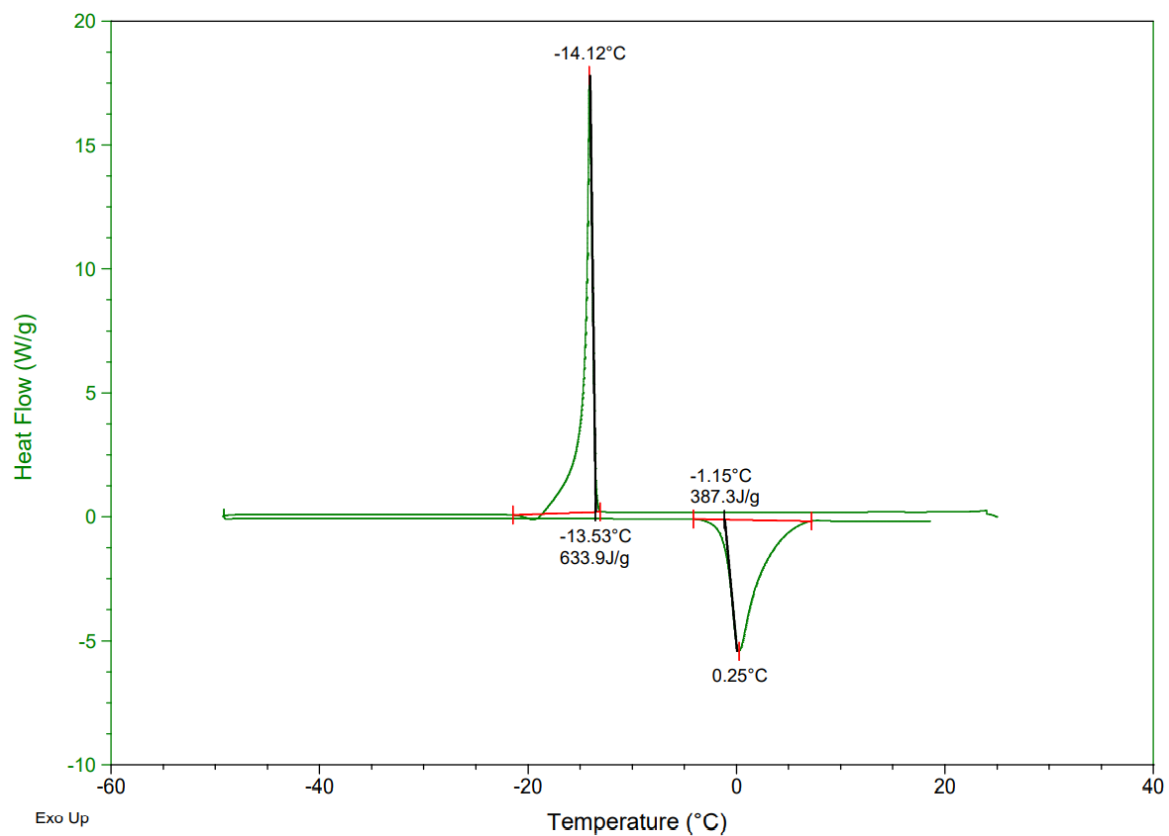
Příloha 30: chitosan v 0,6 ml po 24 hodinách



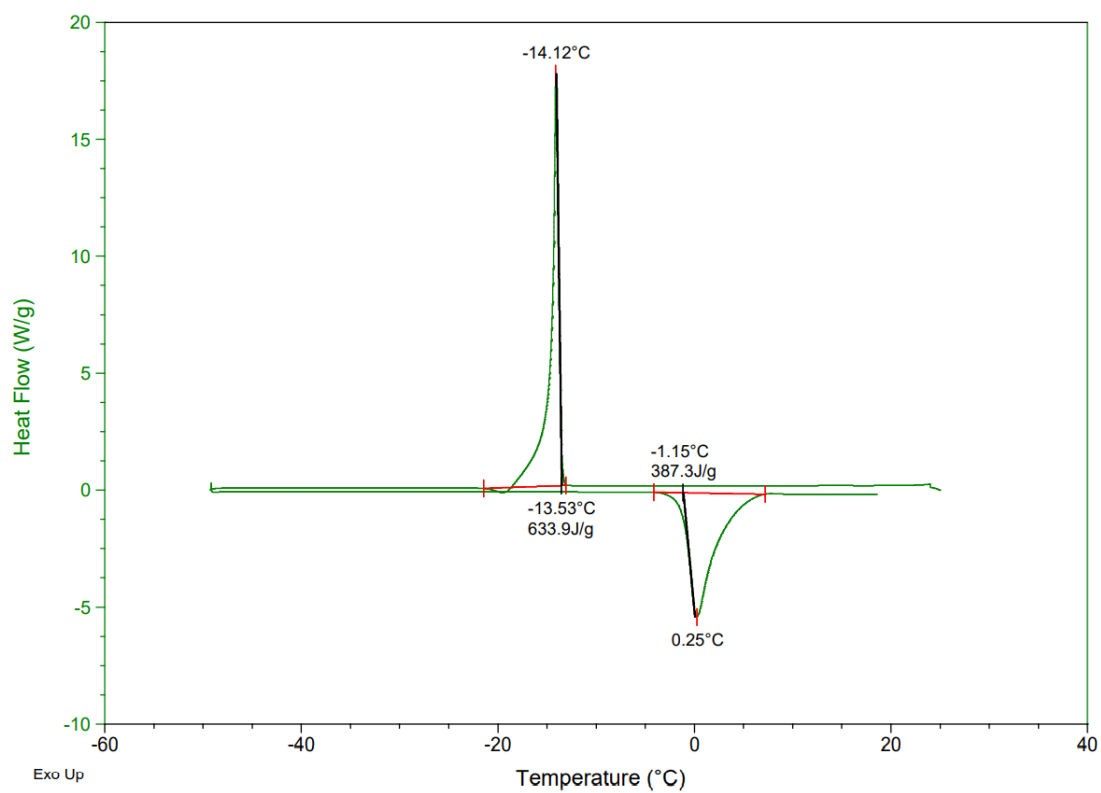
Příloha 31: chitosan v 0,6 ml po 48 hodinách



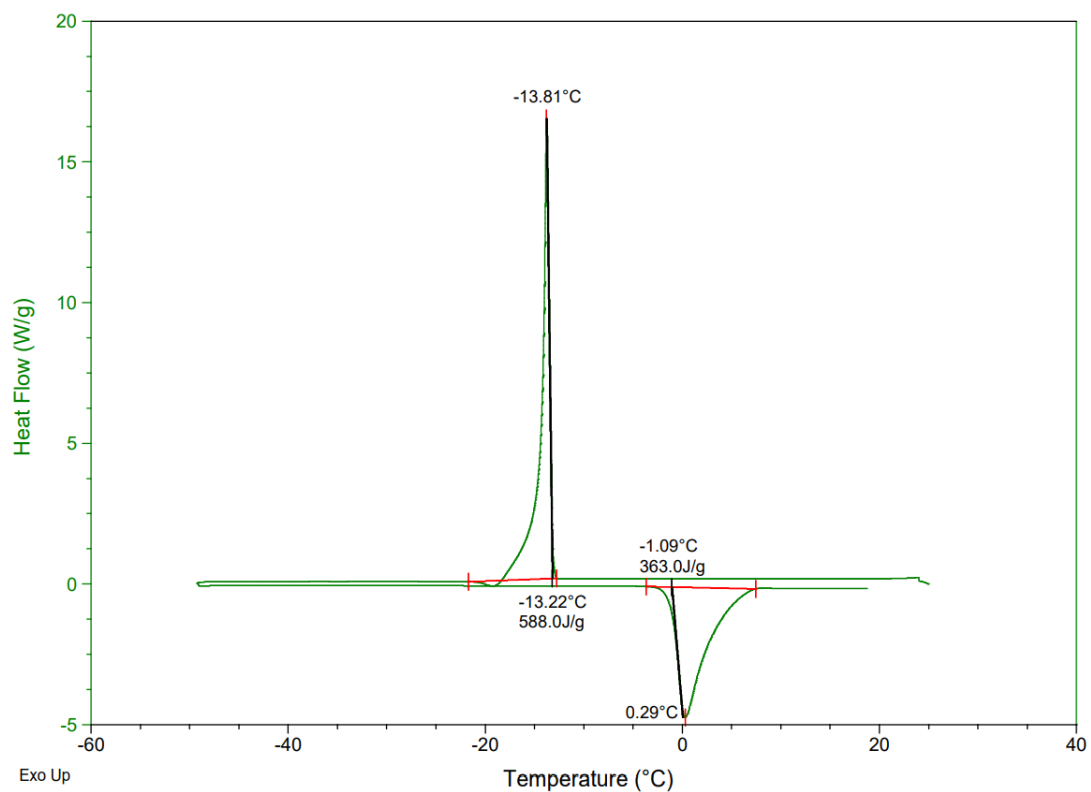
Příloha 32: chitosan v 0,6 ml po 168 hodinách



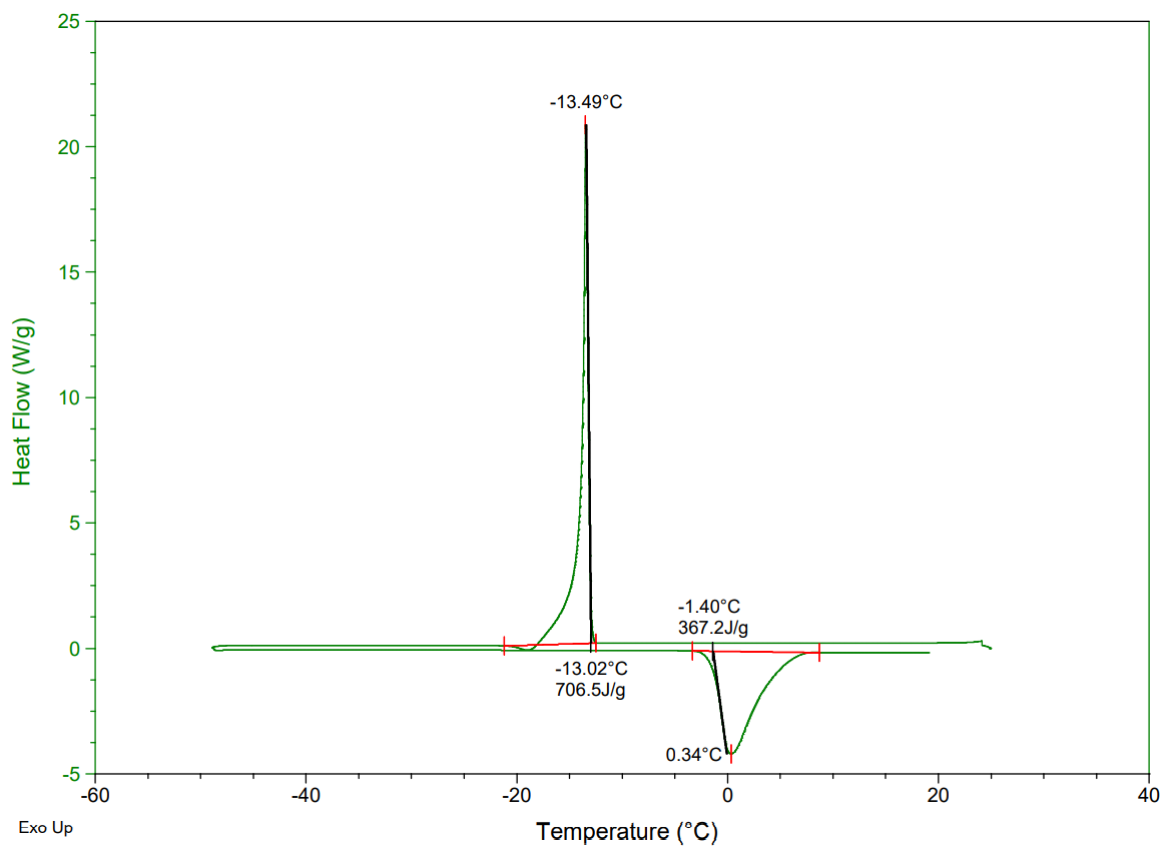
Příloha 33: HK PP v 1 ml ihned po smíchání s vodou



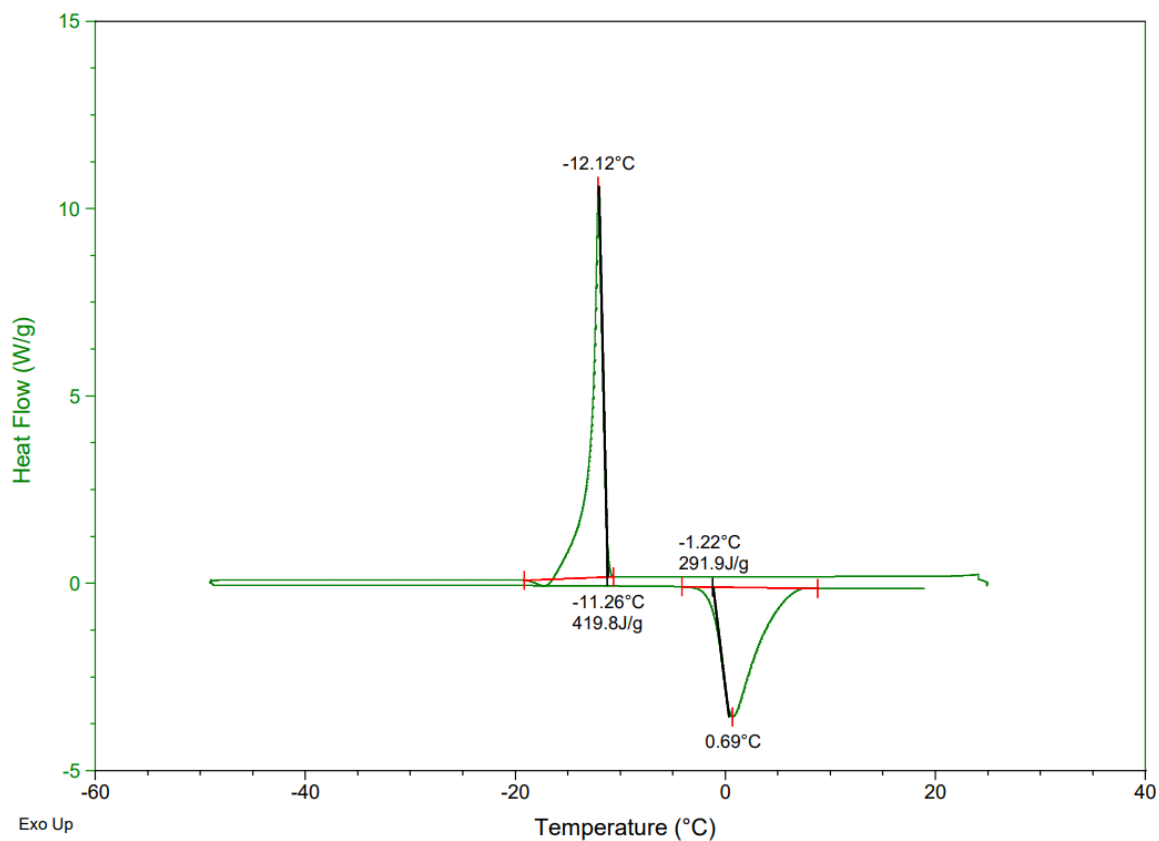
Příloha 34: HK PP v 1 ml po 24 hodinách



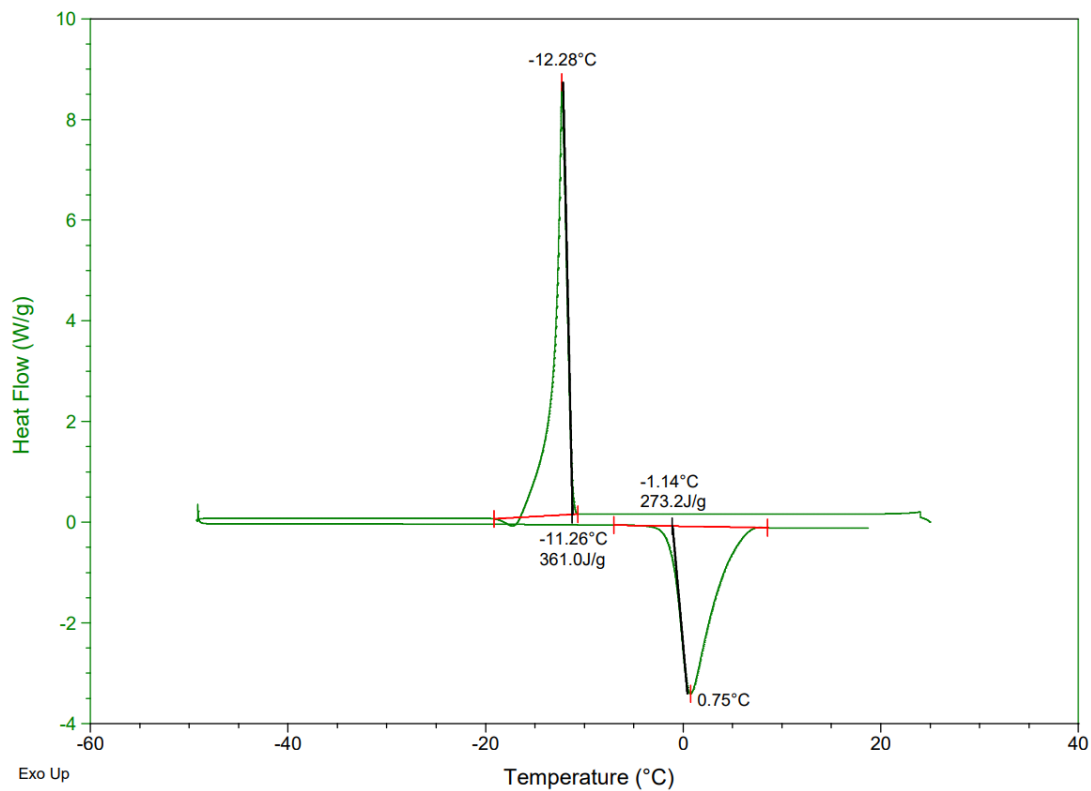
Příloha 35: HK PP v 1 ml po 48 hodinách



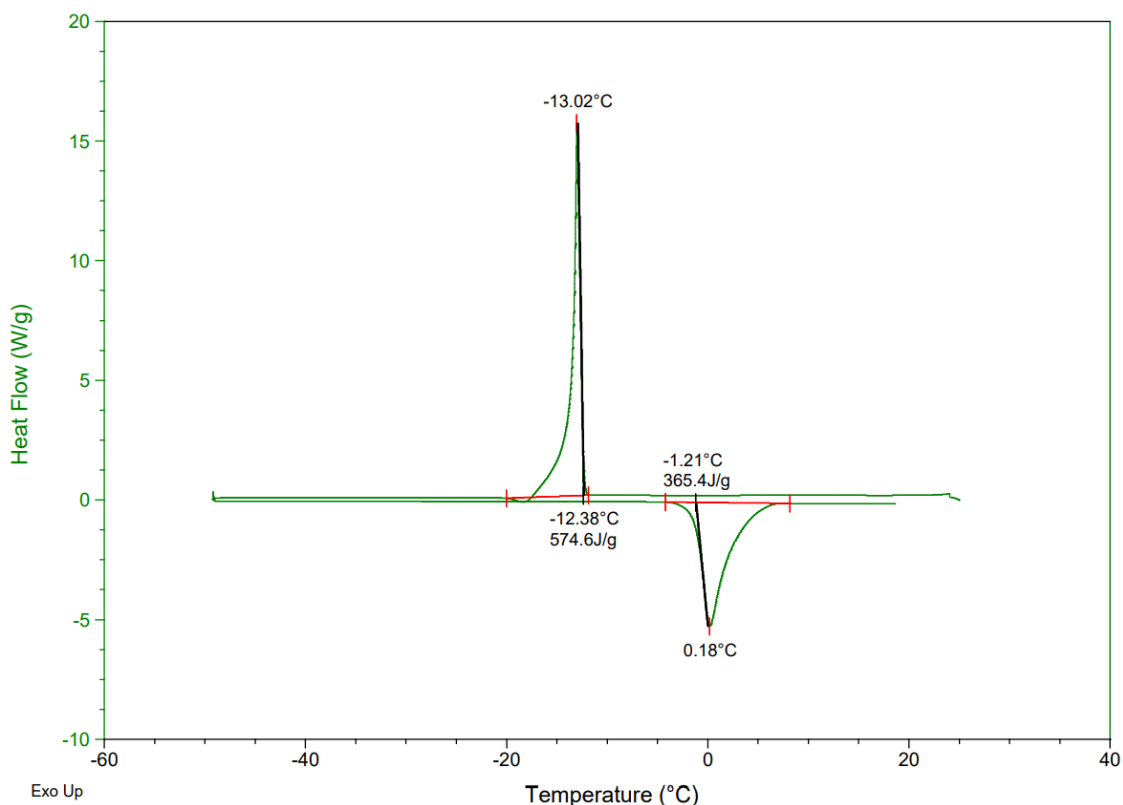
Příloha 36: HK PP v 1 ml po 168 hodinách



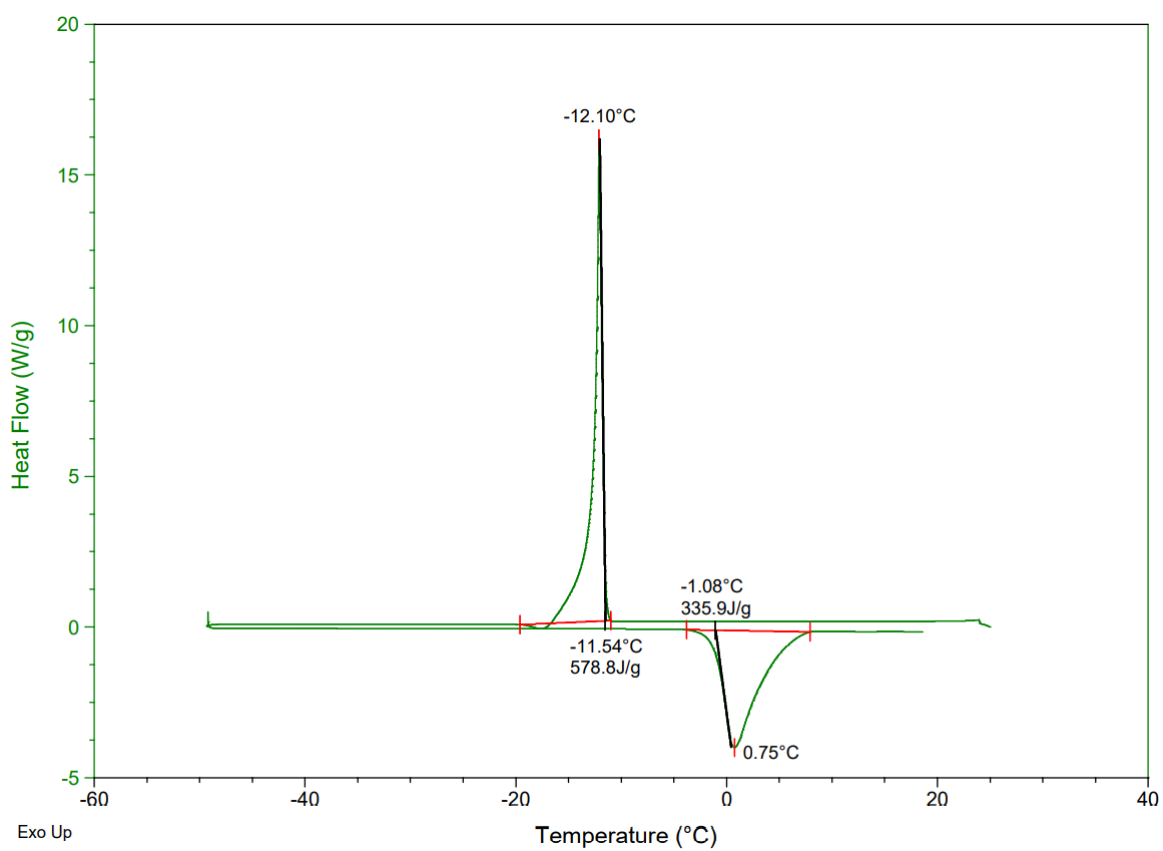
Příloha 37: HK PP v 0,6 ml ihned po smíchání s vodou



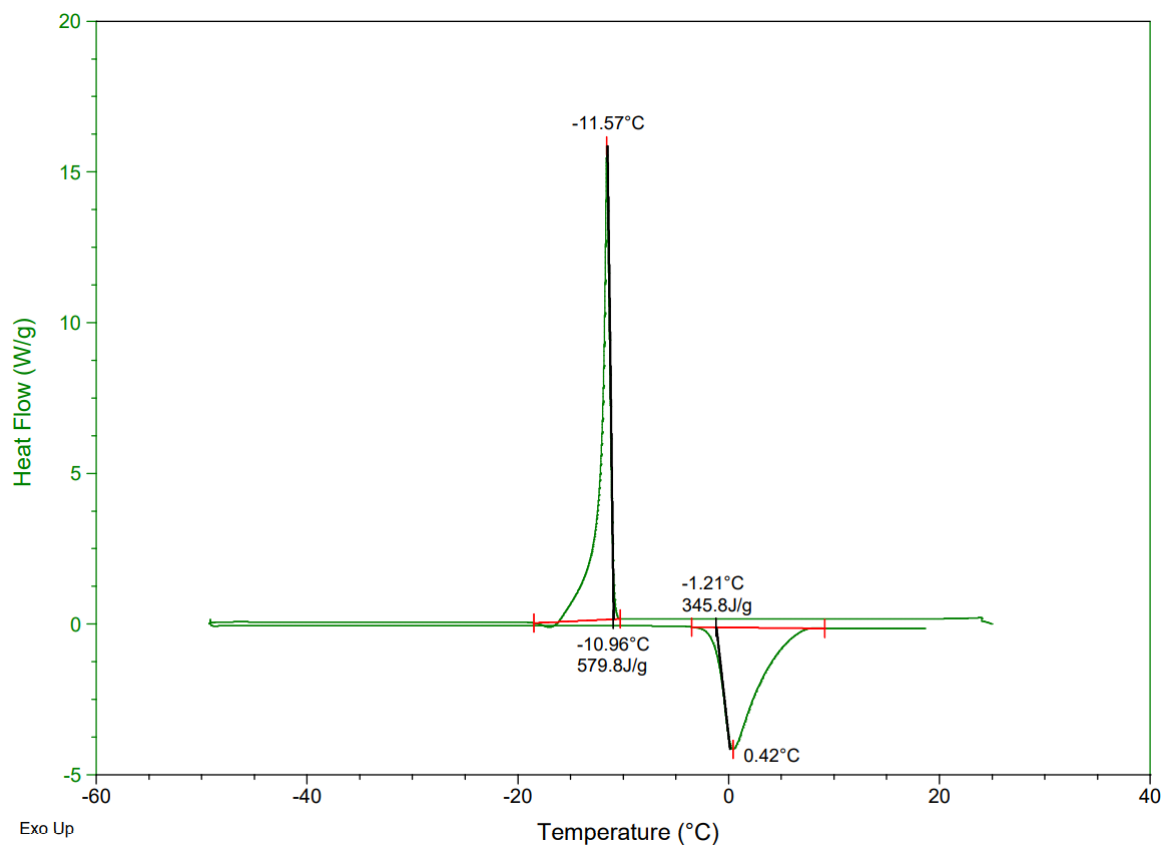
Příloha 38: HK PP v 0,6 ml po 24 hodinách



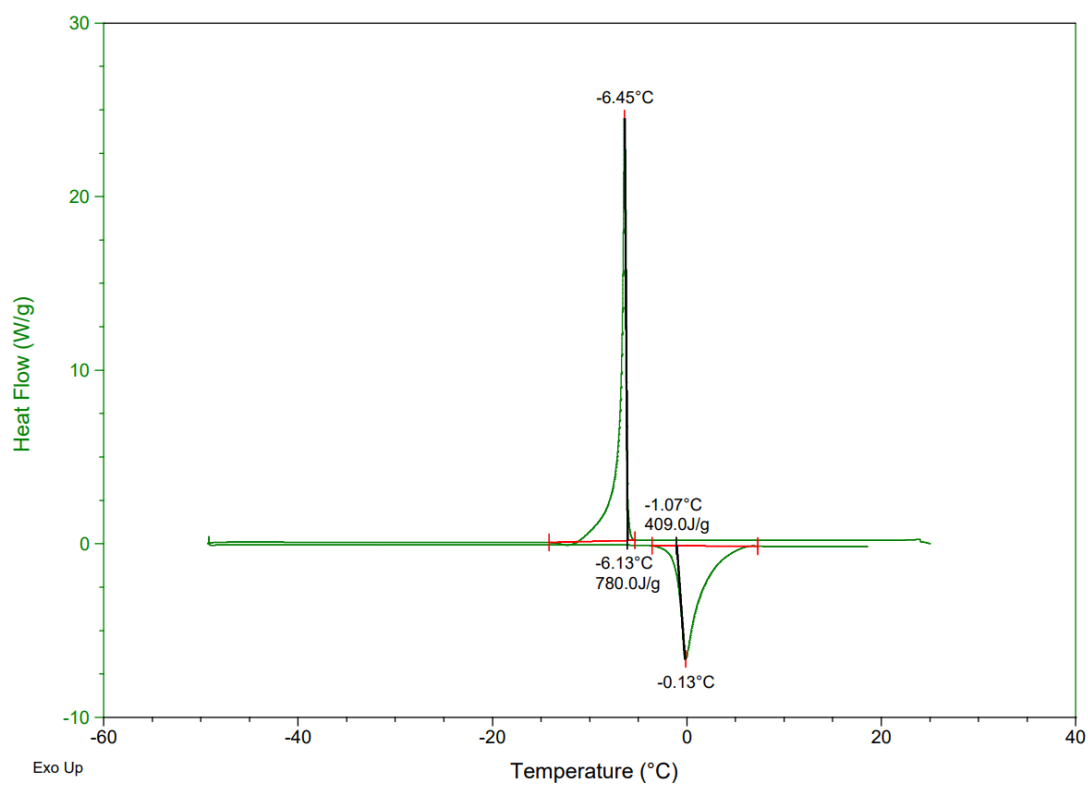
Příloha 39: HK PP v 0,6 ml po 48 hodinách



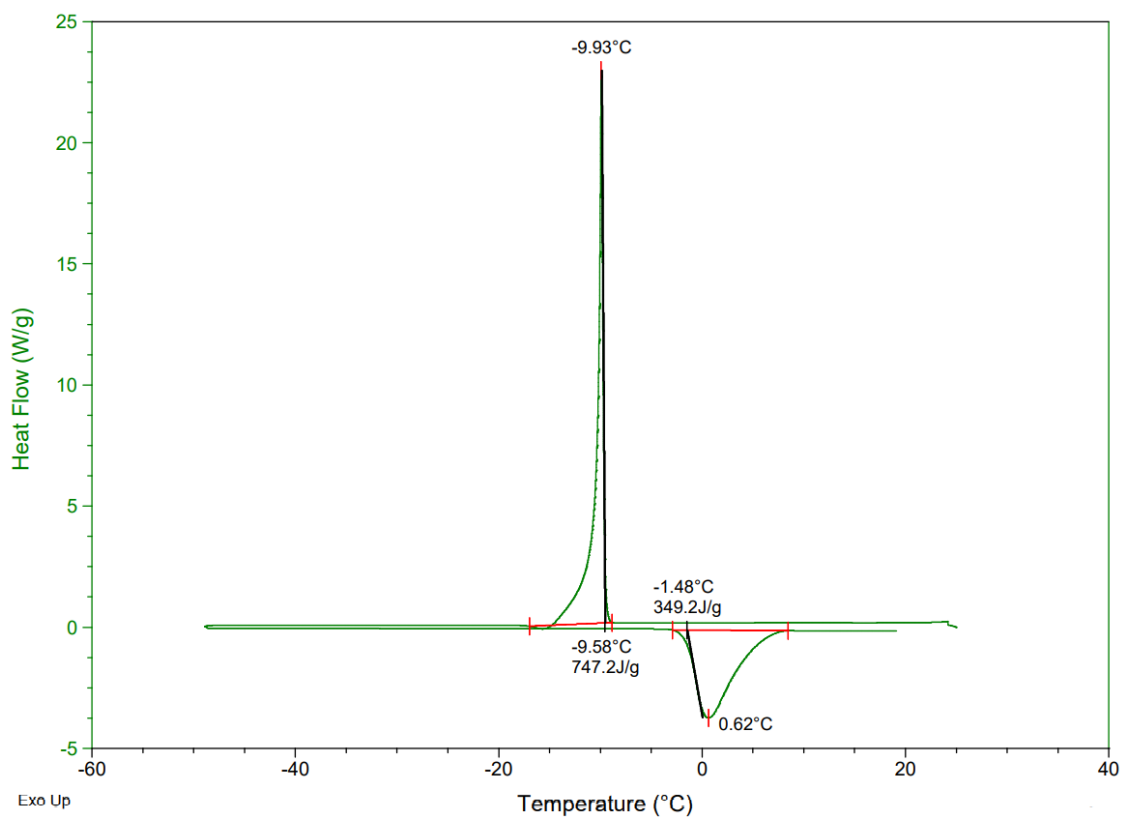
Příloha 40: HK PP v 0,6 ml po 168 hodinách



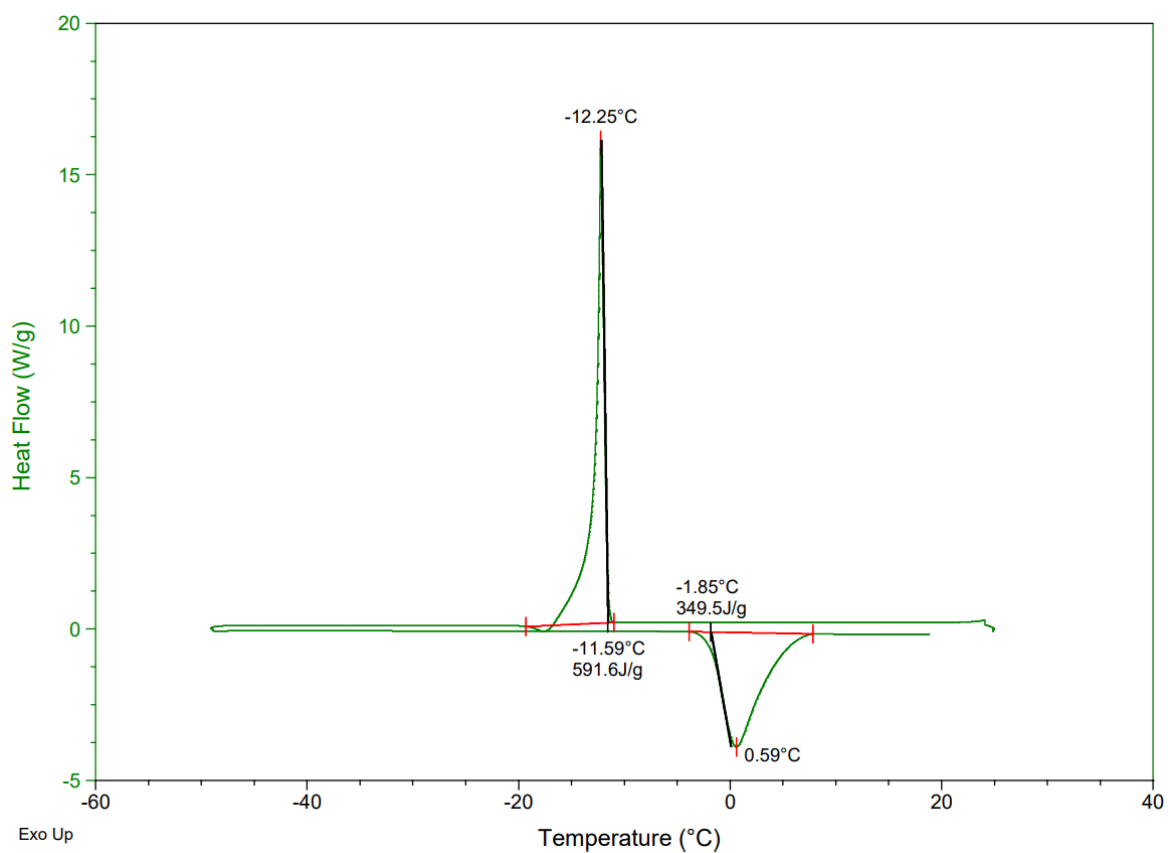
Příloha 41: HK SR v 1 ml ihned po smíchání s vodou



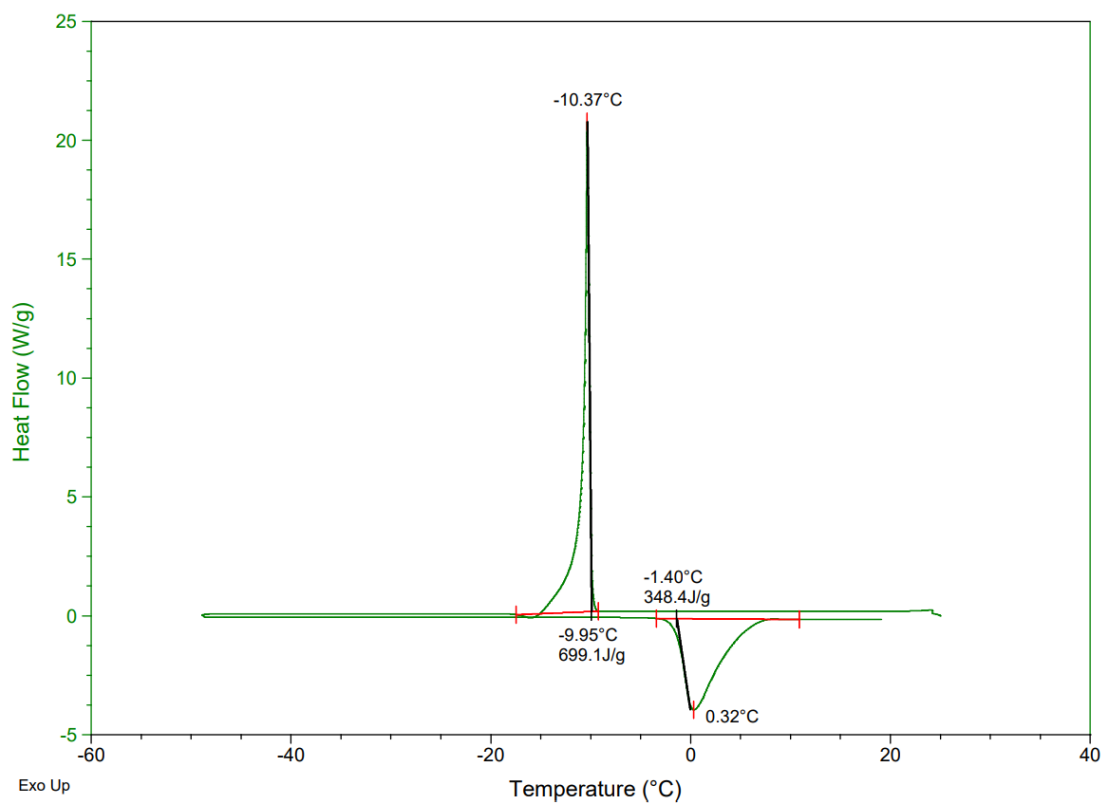
Příloha 42: HK SR v 1 ml po 24 hodinách



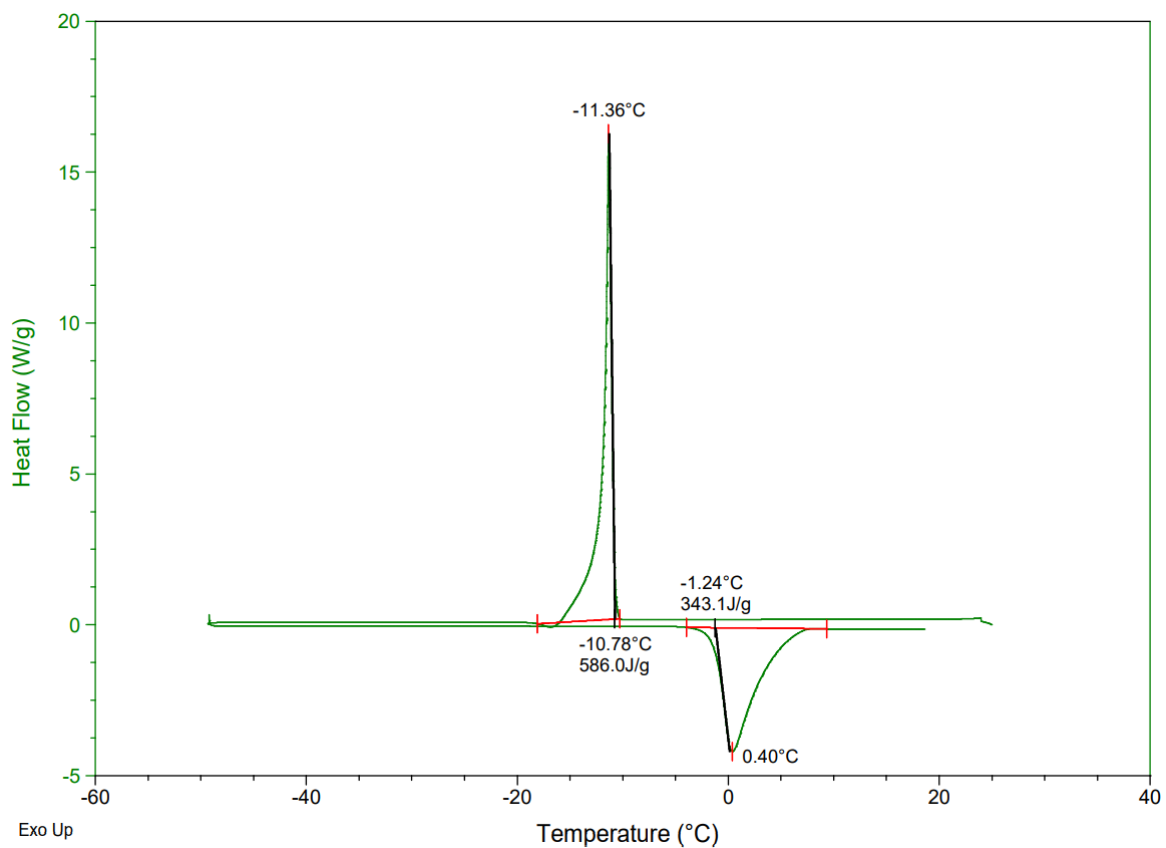
Příloha 43: HK SR v 1 ml po 48 hodinách



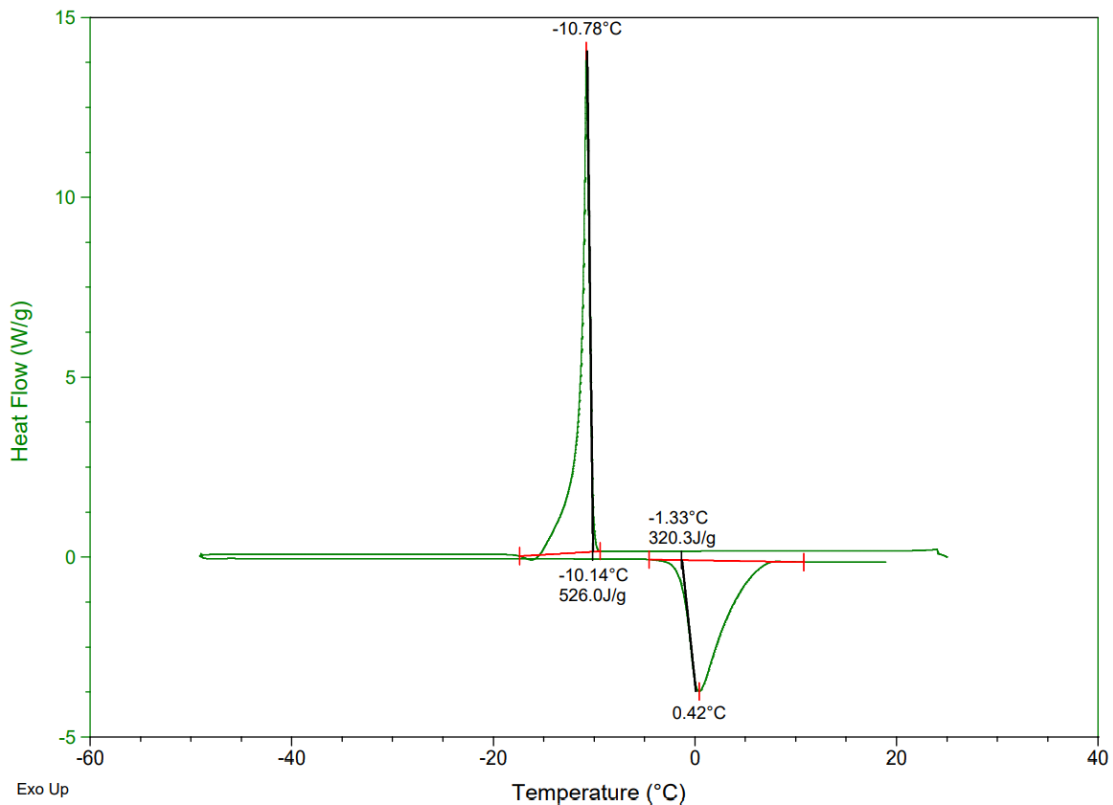
Příloha 44: HK SR v 1 ml po 168 hodinách



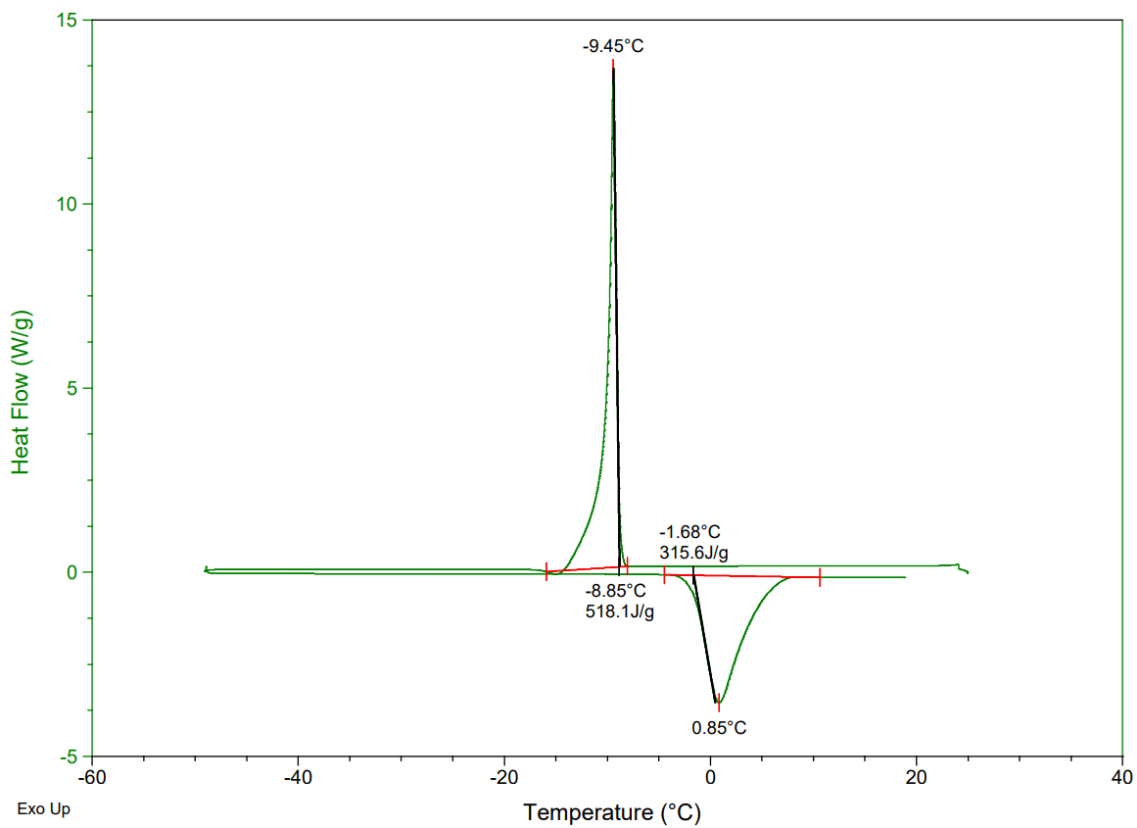
Příloha 45: HK SR v 0,6 ml ihned po smíchání s vodou



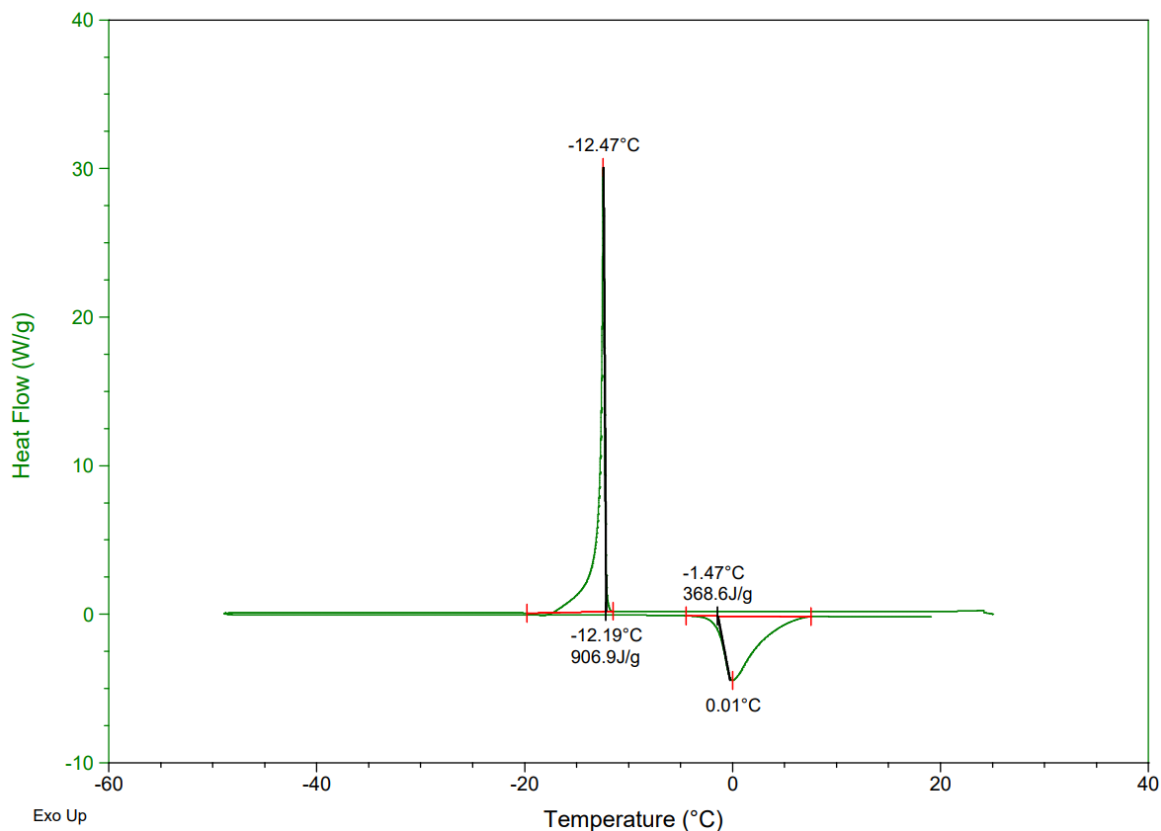
Příloha 46: HK SR v 0,6 ml po 24 hodinách



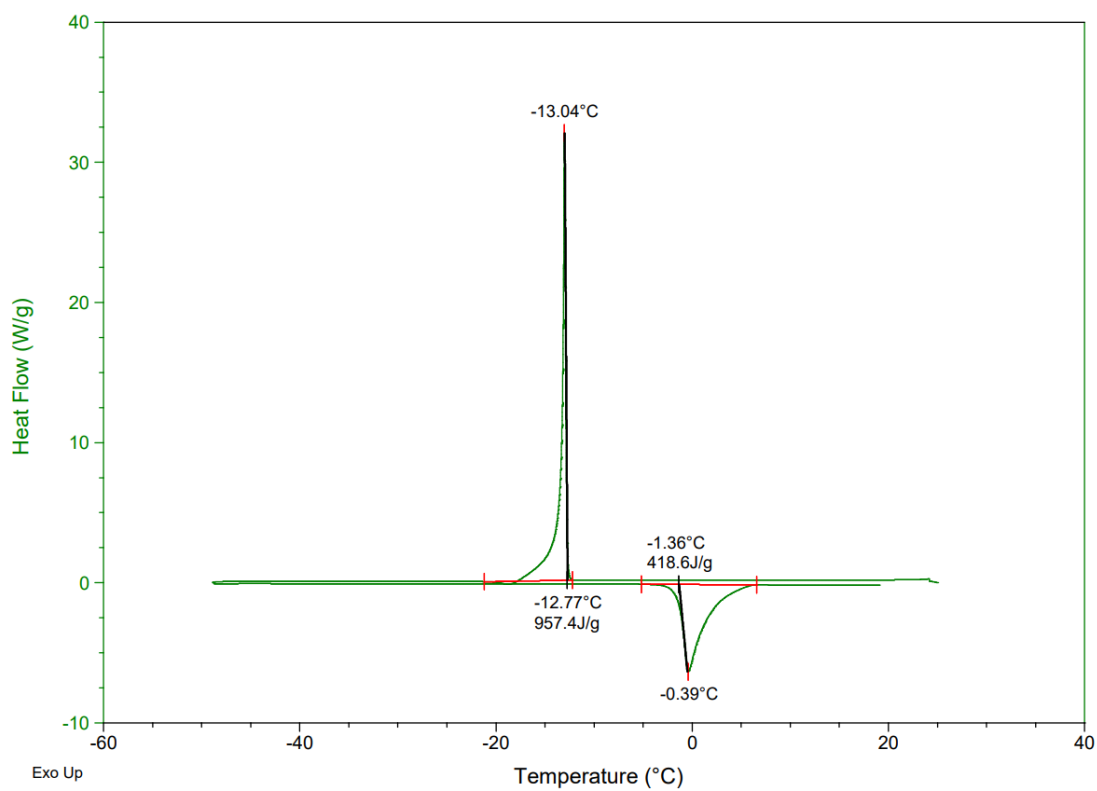
Příloha 47: HK SR v 0,6 ml po 48 hodinách



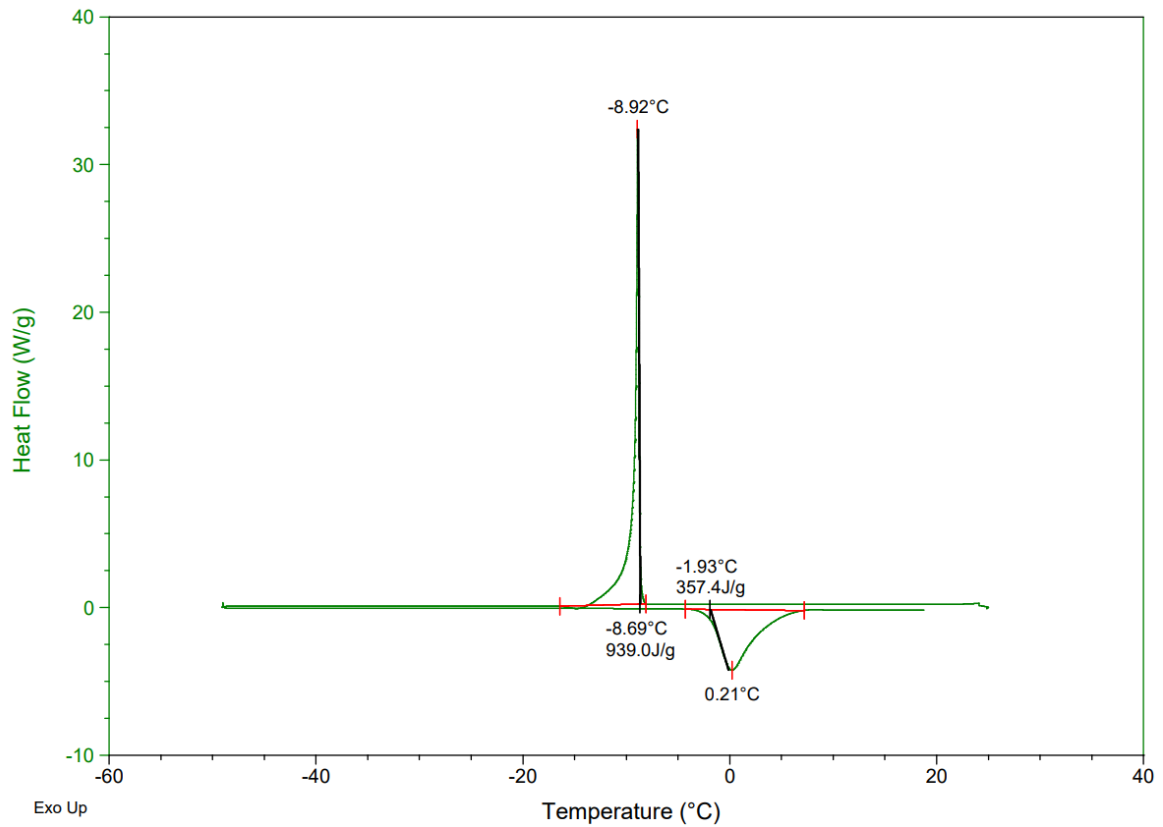
Příloha 48: HK SR v 0,6 ml po 168 hodinách



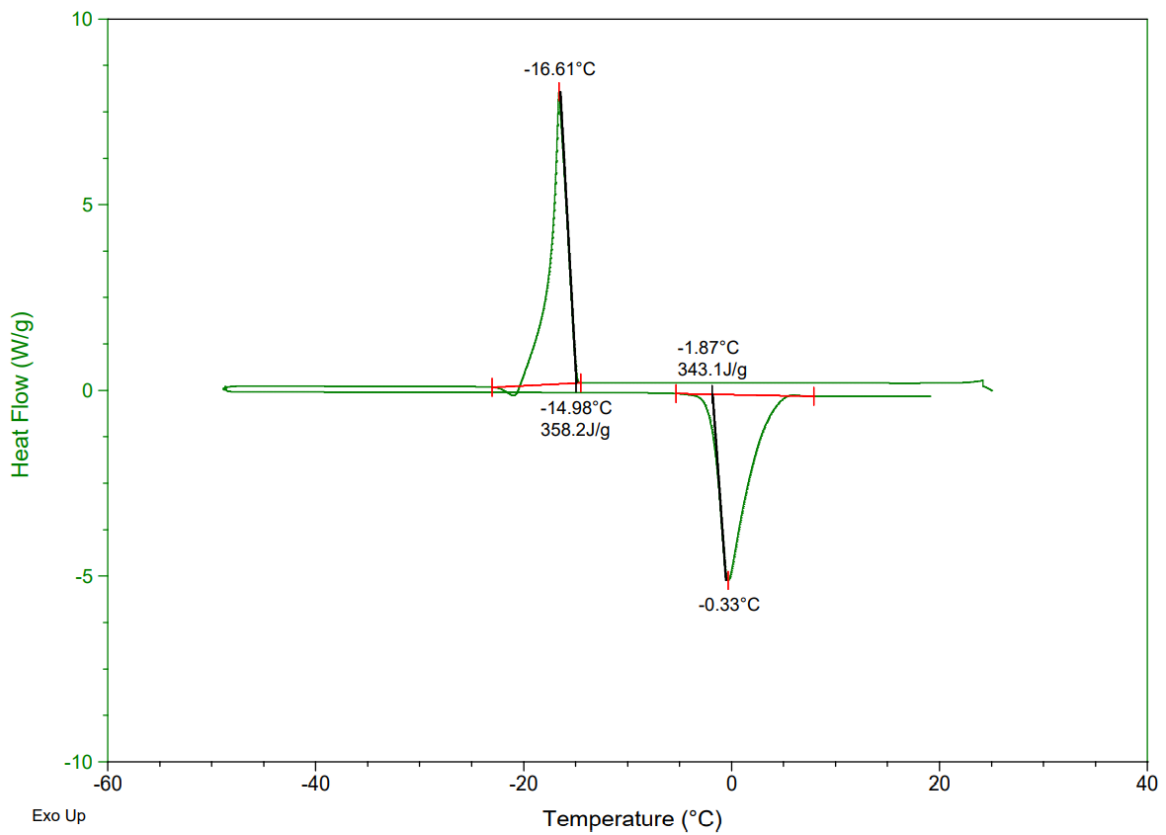
Příloha 49: FK PP v 1 ml ihned po smíchání s vodou



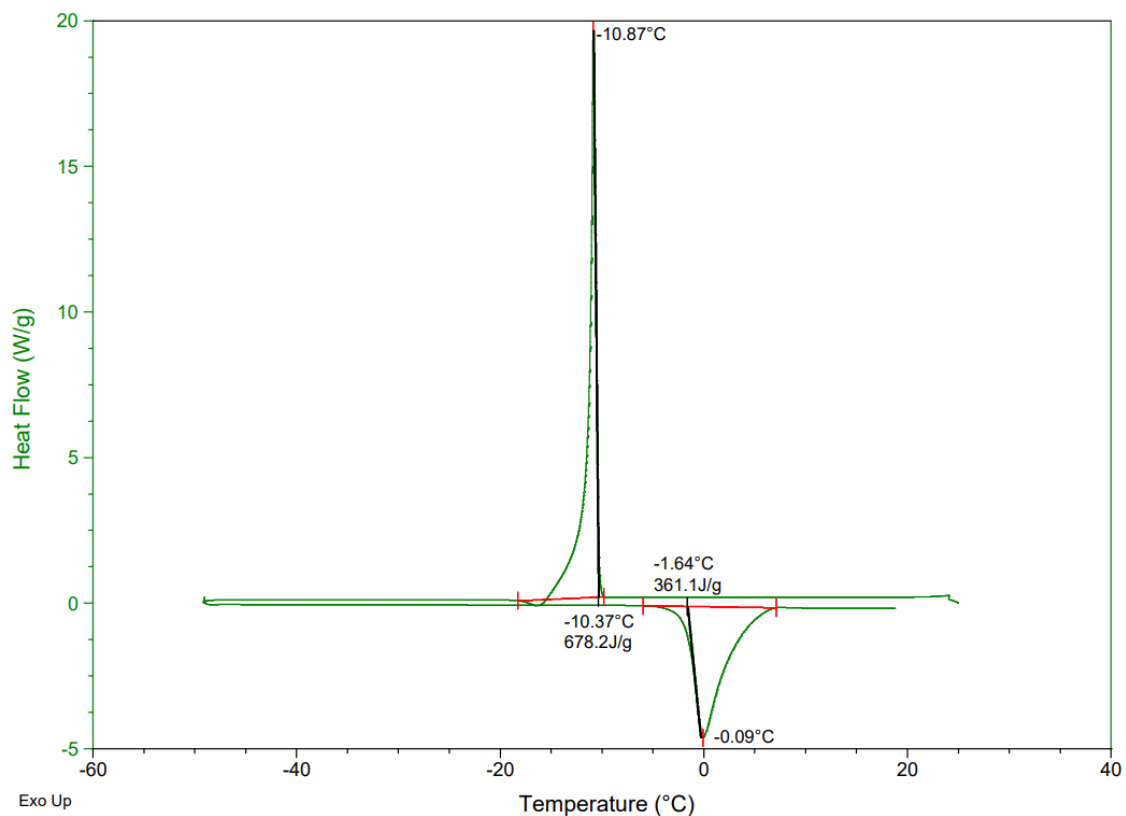
Příloha 50: FK PP v 1 ml po 24 hodinách



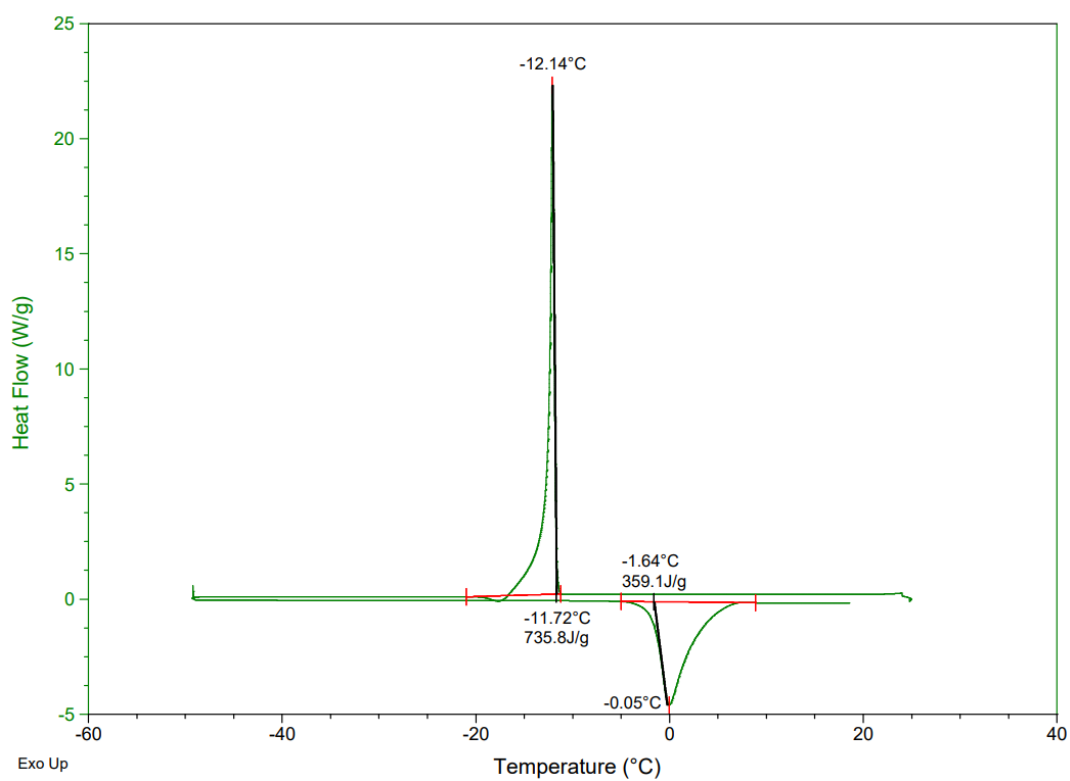
Příloha 51: FK PP v 1 ml po 48 hodinách



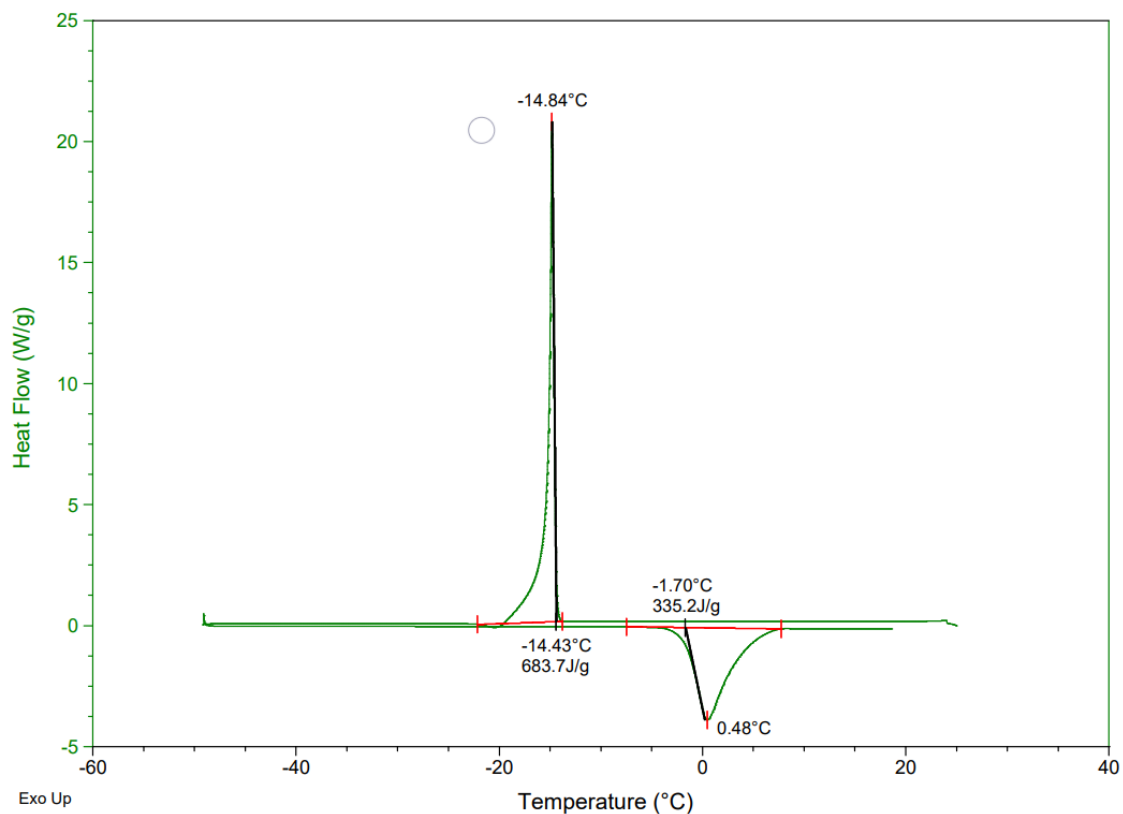
Příloha 52: FK PP v 1 ml po 168 hodinách



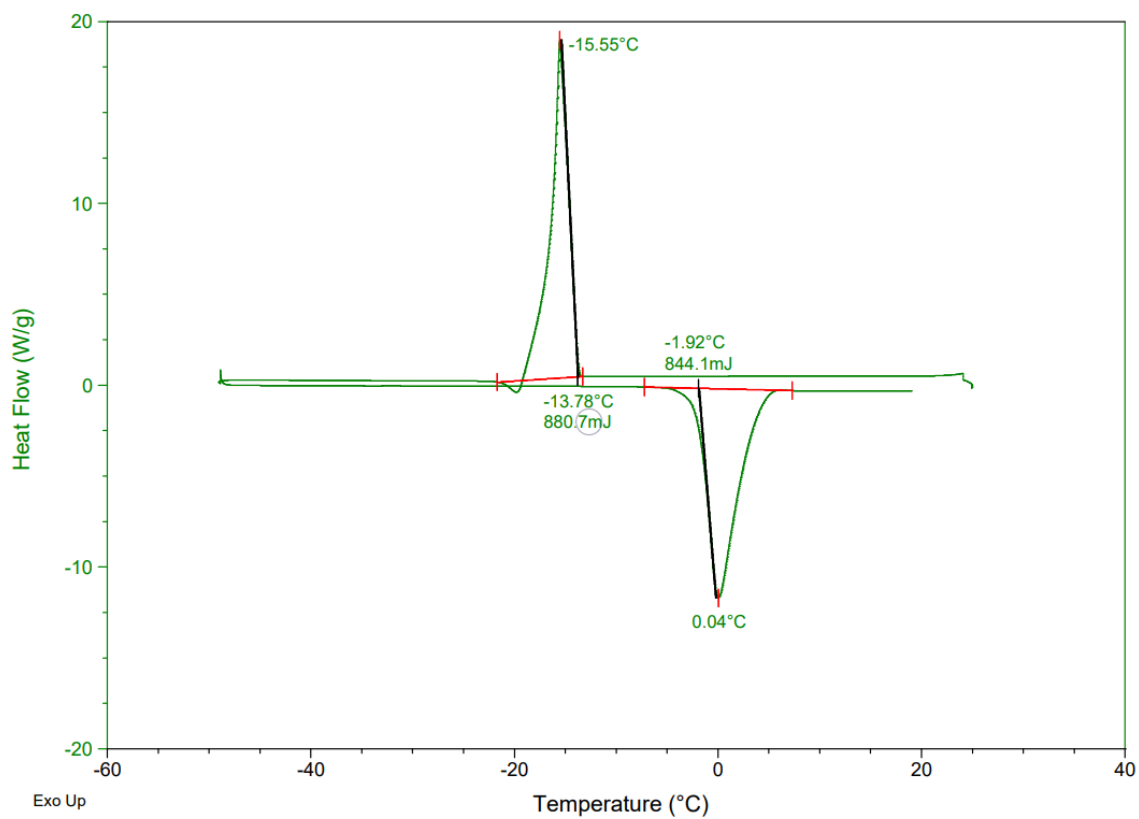
Příloha 53: FK PP v 0,6 ml ihned po smíchání s vodou



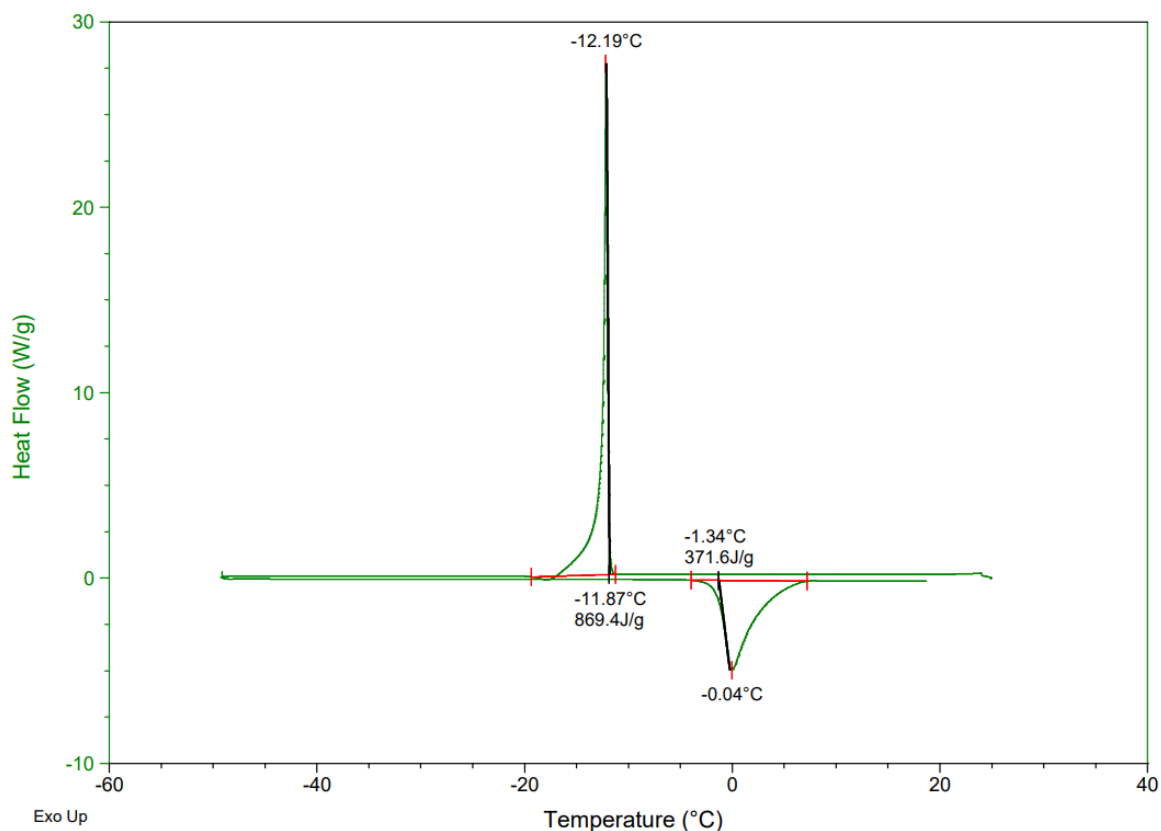
Příloha 54: FK PP v 0,6 ml po 24 hodinách



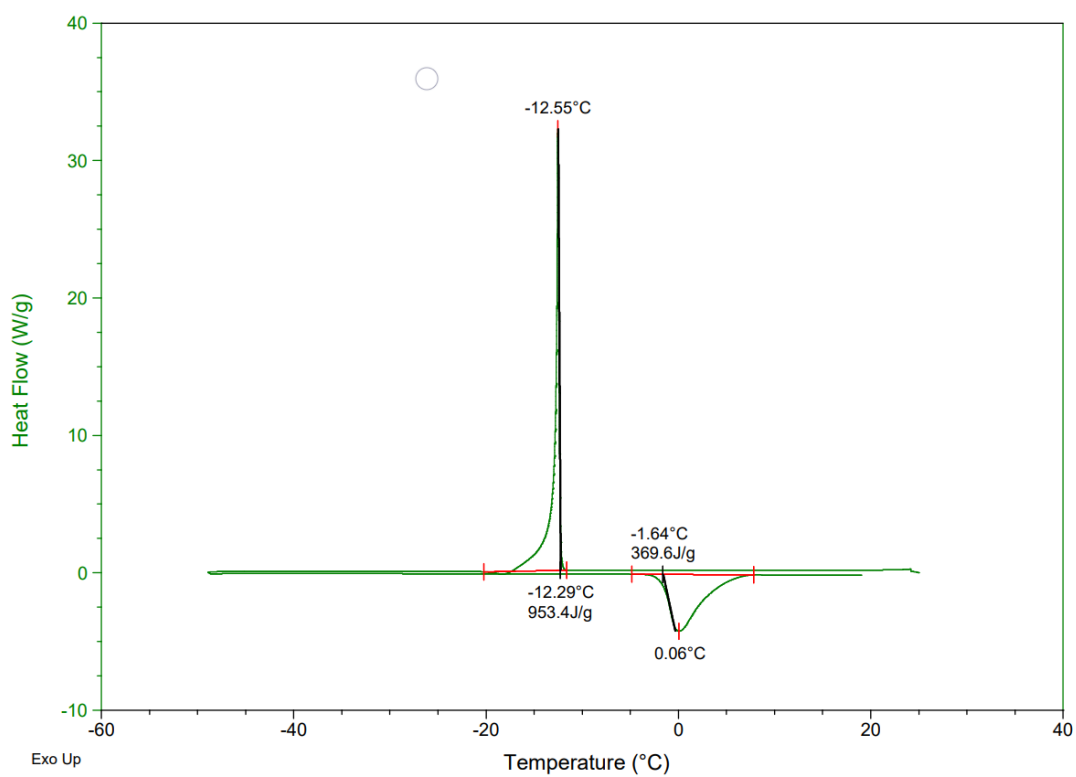
Příloha 55: FK PP v 0,6 ml po 48 hodinách



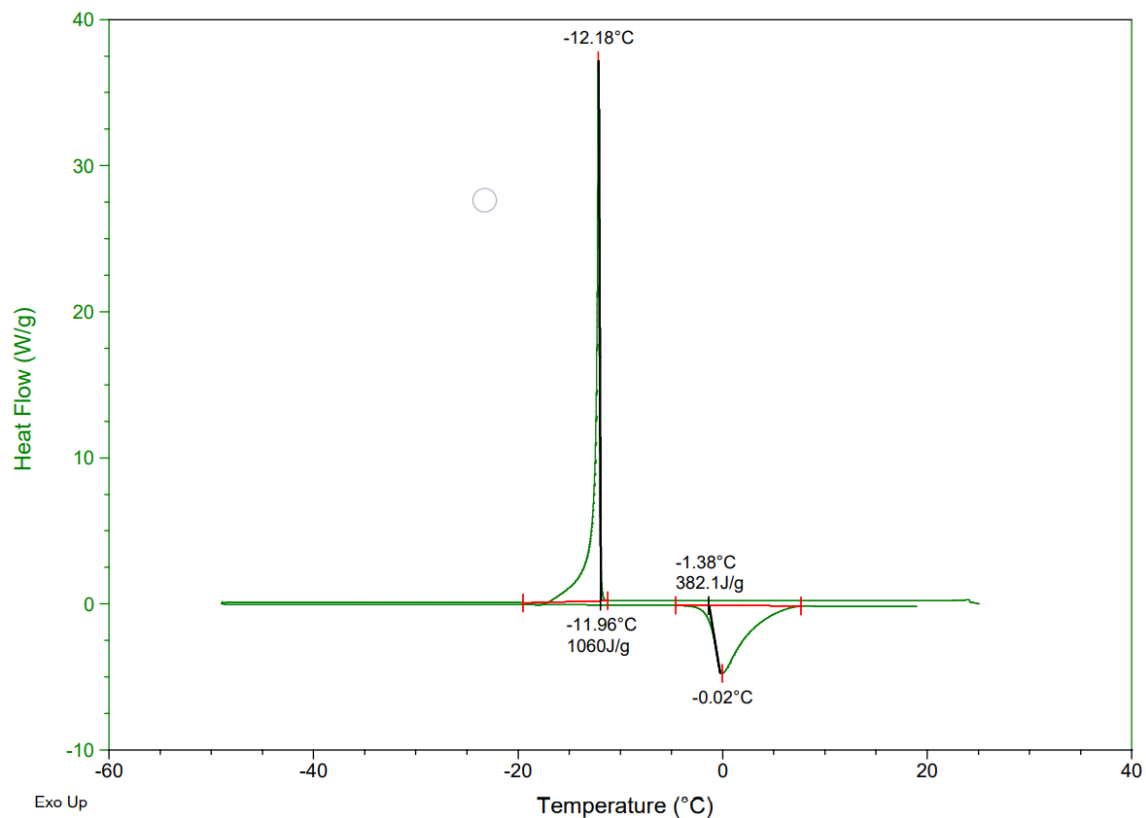
Příloha 56: FK PP v 0,6 ml po 168 hodinách



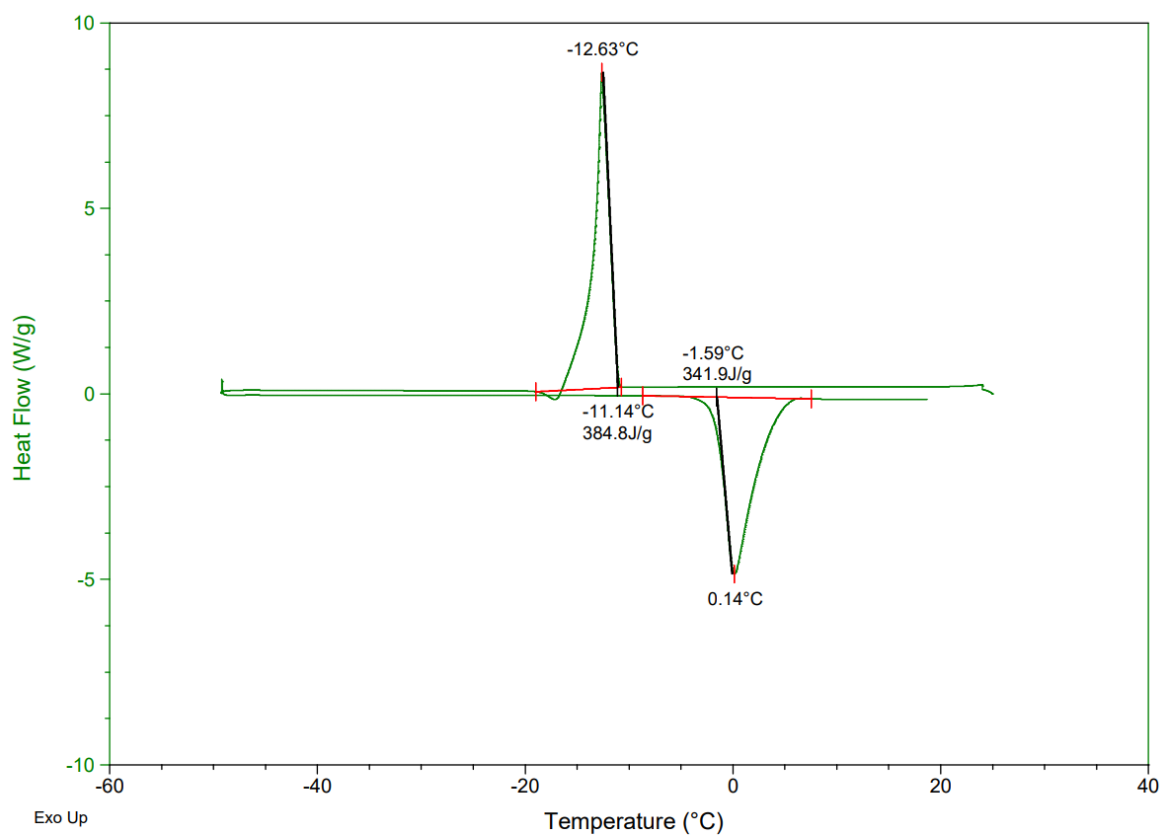
Příloha 57: FK SR v 1 ml ihned po smíchání s vodou



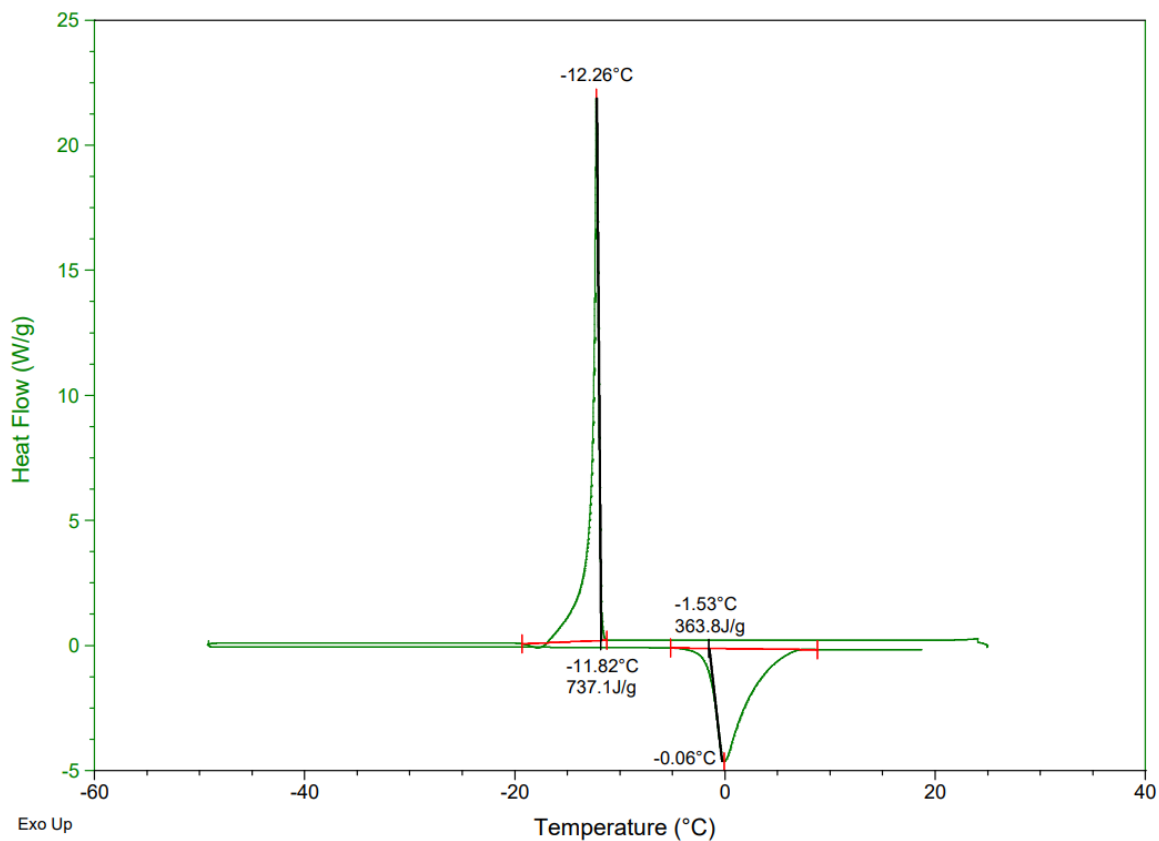
Příloha 58: FK SR v 1 ml po 24 hodinách



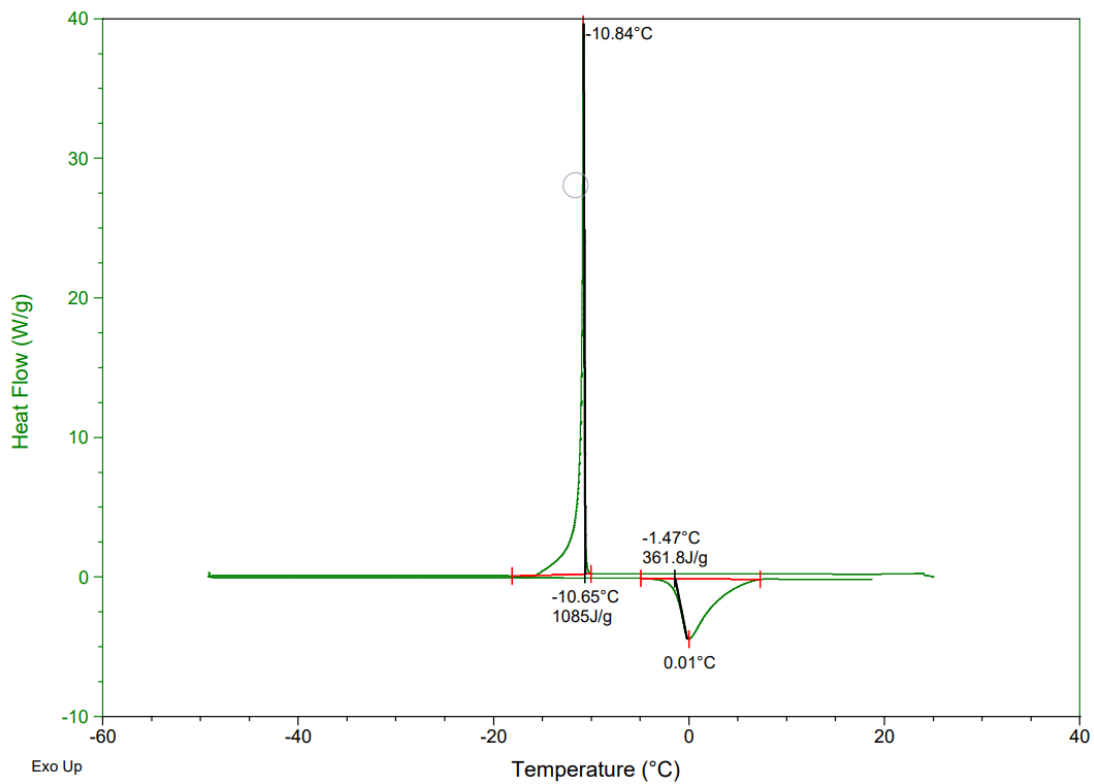
Příloha 59: FK SR v 1 ml po 48 hodinách



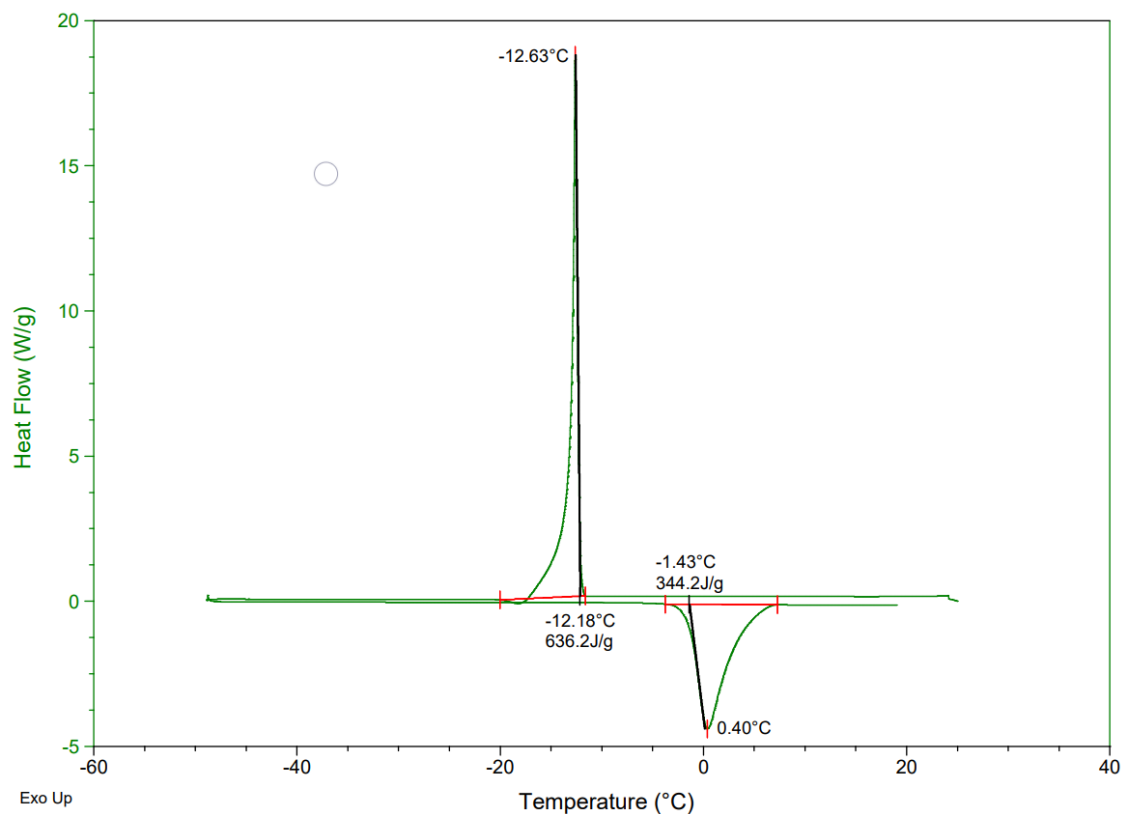
Příloha 60: FK SR v 1 ml po 168 hodinách



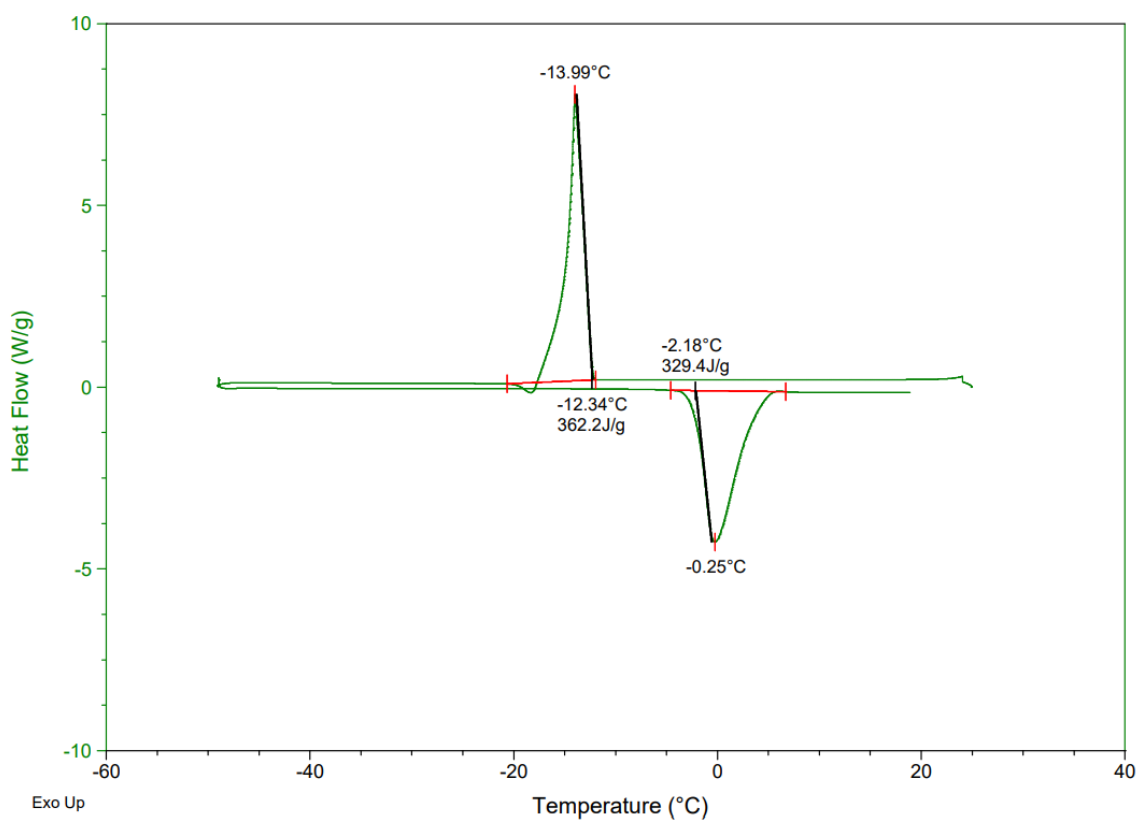
Příloha 61: FK SR v 0,6 ml ihned po smíchání s vodou



Příloha 62: FK SR v 0,6 ml po 24 hodinách



Příloha 63: FK SR v 0,6 ml po 48 hodinách



Příloha 64: FK SR v 0,6 ml po 168 hodinách