



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

METODY STANOVENÍ HYALURONANU

METHODS FOR DETERMINATION OF HYALURONAN

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Lucie Černá

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.

BRNO 2016



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

Zadání diplomové práce

Číslo diplomové práce:	FCH-DIP0998/2015	Akademický rok: 2015/2016
Ústav:	Ústav fyzikální a spotřební chemie	
Student(ka):	Bc. Lucie Černá	
Studijní program:	Chemie pro medicínské aplikace (N2846)	
Studijní obor:	Chemie pro medicínské aplikace (2808T031)	
Vedoucí práce	prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.	
Konzultanti:		

Název diplomové práce:

Metody stanovení hyaluronanu

Zadání diplomové práce:

Provést rešerši na téma metody stanovení hyaluronanu, vybrat metody realizovatelné na mateřském ústavu, ověřit je a vypracovat využití ke stanovení obsahu hyaluronanu ve fyzikálních gelech nebo při difúzních experimentech.

Termín odevzdání diplomové práce: 6.5.2016

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

Bc. Lucie Černá
Student(ka)

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
Vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
Ředitel ústavu

V Brně, dne 31.1.2016

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

ABSTRAKT

Tato diplomová práce se zabývá souhrnem jednotlivých analytických metod pro stanovení koncentrace hyaluronanu, především ve vodných roztocích. U vybraných metod byla na školním pracovišti porovnávána jejich funkčnost. Případné funkční metody mohou být použity na školním pracovišti ve výzkumu materiálů na bázi hyaluronanu. V této práci byla studována použitelnost ke stanovení zbytkového obsahu hyaluronanu v supernatantu gelu tvořeného z hyaluronanu a tenzidu. Mezi vybrané patří především metody spektrofotometrické, a to s pomocí UV spektroskopie a infračervené spektroskopie. Dále byly vyzkoušeny i dvě srážecí metody, pomocí dvou typů alciánových modří. Jako nejspolehlivější, nejméně náročnou a specifickou metodou se jeví metoda pomocí IČ spektroskopie, díky níž jsme schopni stanovit koncentraci HA již od 0,01 %. Díky této metodě bylo zjištěno, že pokud se v supernatantu bude nacházet nějaké množství HA, bude pod mezí detekce tohoto stanovení. Zbylé metody jsme modifikovali tak, aby se díky nim dala stanovit koncentrace HA, ale fungují pouze ve vodných roztocích. Možnou variantou pro stanovení velmi nízkých koncentrací HA může být metoda pomocí ELISA kitů. Jejich cena je ovšem vyšší než u výše zmíněných metod.

SUMMARY

This thesis deals with a summary of individual method for determining of hyaluronan concentration, especially in aqueous solutions. Selected methods were compared to their functionality in university workplace. Any functional methods may be used for many purposes in university workplace in research of materials based on hyaluronan. It has been studied usability to assess residual content of hyaluronan in supernatant of gel formed from hyaluronan and surfactant, in this thesis. We choosed sptectrophotometric methods, especially with UV spectroscopy and IR spectroscopy. Two precipitation methods using alcian blue were also tested. As the most reliable, the least demanding and specific method seems to be the method using IR spectroscopy, thanks to it we are able to determine the concentration of HA from 0.01 %. With this method, it has been found, that if there will be located some amount of HA in supernatant, it will be below the detection limit of assay. The remanining methods were modified to help determine the concentrations of HA, but works only in aqueous solutions. A possible variation for determination of very low concentrations of HA may be the method using ELISA kits. However their cost is higher than the above-mentioned methods.

KLÍČOVÁ SLOVA

hyaluronan, alciánová modř, infračervená spektroskopie, spektroskopie, ELISA

KEY WORDS

hyaluronan, alcian blue, infrared spectroscopy, spectroscopy, ELISA

PROHLÁŠENÍ

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

.....
podpis studenta

Na tomto místě chci poděkovat panu prof. Ing. Miloslavu Pekařovi, CSc. za vstřícnost, cenné rady a připomínky. Dále chci poděkovat panu Ing. Vojtěchu Enevovi za pomoc při měření a vyhodnocování dat.

OBSAH

1	ÚVOD	7
2	TEORETICKÁ ČÁST	8
2.1	Hyaluronan	8
2.1.1	<i>Historie</i>	8
2.1.2	<i>Výskyt v organismu</i>	8
2.1.3	<i>Struktura a vlastnosti</i>	8
2.1.4	<i>Využití</i>	9
2.1.5	<i>Biosyntéza a degradace</i>	9
2.2	Makromolekulární gely	10
2.2.1	<i>Hydrogel</i>	10
2.2.2	<i>Tenzidy</i>	11
2.3	Ftalocyaniny	12
2.3.1	<i>Alciánová modř</i>	13
2.4	Infračervená spektroskopie	13
2.4.1	<i>Typy vibrací</i>	15
2.4.2	<i>Typy přístrojů</i>	16
3	SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	18
3.1	Metoda s využitím thiobarbiturátu	18
3.2	Metody s využitím vazby HA na specifický protein	19
3.2.1	<i>S využitím fluorescence</i>	19
3.2.2	<i>Metoda pomocí radioaktivního značení</i>	19
3.2.3	<i>Metody s využitím ELISA</i>	20
3.3	Alciánová modř	21
3.3.1	<i>Srážecí metody</i>	21
3.3.2	<i>Stanovení dle E. W. Golda</i>	22
3.3.3	<i>Další metody</i>	23
3.3.4	<i>Alciánové modř 8GX vs. alciánové modř pyridinová varianta</i>	24
3.4	Spektroskopické stanovení koncentrace HA	25
3.4.1	<i>Metoda s využitím infračervené spektroskopie</i>	25
3.4.1	<i>Metoda s využitím UV-VIS spektroskopie</i>	26
3.4.2	<i>Metoda stanovení koncentrace HA pomocí Rayleighova rozptylu</i>	28

4	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	29
4.1	Metody využívající alciánovu modř.....	29
	<i>4.1.1 Metoda dle E. W. Golda.....</i>	<i>29</i>
	<i>4.1.2 Metoda stanovení koncentrace HA dle C. B. Little a kol.....</i>	<i>33</i>
4.2	UV-VIS spektroskopie	35
4.3	Infračervená spektroskopie s využitím ATR techniky	37
5	VÝSLEDKY A DISKUZE.....	38
5.1	Metody využívající alciánovou modř.....	38
	<i>5.1.1 Metoda dle E. W. Golda.....</i>	<i>38</i>
	<i>5.1.1 Metoda stanovení koncentrace HA dle C. B. Little a kol.....</i>	<i>49</i>
5.2	UV-VIS spektroskopie	52
	<i>5.2.1 Zhodnocení této metody.....</i>	<i>54</i>
5.3	Infračervená spektroskopie s využitím ATR techniky	54
	<i>5.3.1 Zhodnocení této metody.....</i>	<i>58</i>
6	ZÁVĚR.....	59
7	CITOVANÁ LITERATURA	60
8	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ	63
9	SEZNAM PŘÍLOH.....	65
10	PŘÍLOHY	66

1 ÚVOD

Kyselina hyaluronová, neboli sůl této kyseliny hyaluronan (HA), je polysacharid, vyskytující se přirozeně ve všech živých organismech. Hraje důležitou roli při tkáňové hydrataci, mazivové a buněčné funkci. HA je schopen udržet více vody než jakékoliv jiné přírodní látky. Jeho bezkonkurenční hydratační vlastnosti dokážou například vyhladit a snížit vrásky. Jelikož je HA přítomen v každé tkáni těla, jeho význam nelze podceňovat. Retence vody je jedním z jeho nejdůležitějších biologických funkcí, na druhém místě je poskytování živin a odstraňování odpadních látek z buněk, které nemají přímé krevní zásobení, mezi které patří například buňky chrupavky. Jestliže je v těchto místech HA snížena, buňky nemohou být vyživovány a také selhává odstraňování odpadů z těchto buněk. Hyaluronan je jedním z nejdůležitějších složek základní substance podkožních tkání, má důležitou roli při růstu, vývoji a opravě tkání. Je známo, že hladiny HA jsou zvýšené během embryonálního vývoje, při hojení ran a u vzniku nádorů. V počátečním stádiu morfogeneze, kdy převládá buněčný růst a proliferace, hladiny HA začnou charakteristicky stoupat. Jeho včasné vyšetření a eliminování jeho tvorby by se mohlo stát částečnou zbraní proti rakovině. Právě zvýšená afinita rakovinných buněk k HA může být využita při vývoji takzvaných cílených nosičových systémů. Z tohoto důvodu je velmi důležité studium metod pro stanovení koncentrace HA. Stanovení HA se nejčastěji provádí imunologickými metodami, jako jsou metody s využitím vazby HA na specifický protein, dále pomocí imunofluorescence a také pomocí spektroskopických metod.

Tato práce je zaměřená na studování jednoduchých metod pro stanovení koncentrace HA především ve vodných roztocích a v roztocích obsahující tenzid, což je v našem případě supernatant gelu tvořeného právě z hyaluronanu a tenzidu. Ověřené a funkční metody mohou být využity na školní půdě k účelům stanovení koncentrace HA v různých roztocích. Například u kvantitativní analýzy postupu přípravy nosičů léčiv nebo přípravků k hojení ran na bázi hyaluronan a tenzid.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Hyaluronan

2.1.1 Historie

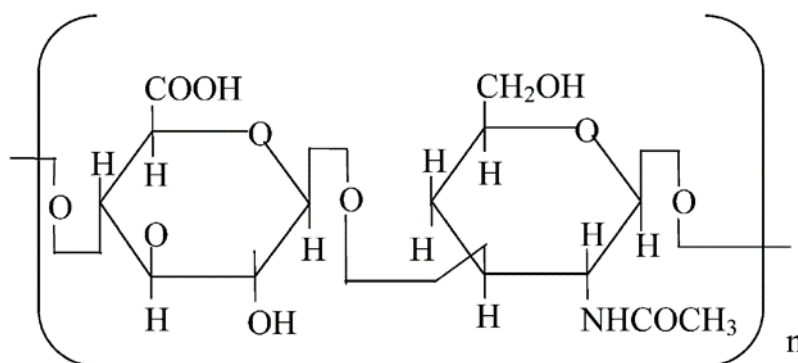
Název kyselina hyaluronová získala podle původního objevu, kdy byla poprvé izolována z očního sklivce skotu v roce 1934 Karlem Meyerem a jeho asistentem Johnem Palmerem (1). Zjistili, že glykosaminoglykan, který vyizolovali, je složený z kyseliny uronové a aminoglykanu. Jelikož nevěděli, o jakou konkrétní strukturu se jedná, pojmenovali aminoglykan podle sklivce (hyaloid) + známá kyselina uronová, tedy kyselina hyaluronová. Trvalo dalších 20 let, než Weissman a Meyer objasnili kompletní strukturu. Dnes je tato makromolekula spíše označována jako hyaluronan (dále jen HA), a to proto, že in-vivo existuje pouze ve formě polyaniontu a nikoli ve formě kyseliny (2).

2.1.2 Výskyt v organismu

U obratlovců se HA nachází nejen ve sklivci, kde slouží jako látka udržující tvar, ale velmi hojně je obsažen i v ostatních částech těla. Najdeme ho v synoviální tekutině, kde funguje jako mazivo, a tím omezuje tření kloubních ploch, v mezibuněčných prostorech, kde více než 50 % se nachází v kůži (dermis a epidermis) a 35 % je obsaženo ve svalech a skeletu, kde plní především hydratační funkci (3) (4).

2.1.3 Struktura a vlastnosti

Hyaluronan (HA) je přirozeně se vyskytující polydisperzní lineární glykosaminoglykan složený z 2 000–25 000 disacharidových podjednotek skládajících se z kyseliny glukuronové a N-acetylglukosaminu. Tyto sacharidové jednotky jsou střídavě spojeny beta-1-3 a 1-4 beta-glykosidickými vazbami: [β -1,4-glukuronová kyselina β -1,3-N-acetyl glucosamin] n jak je vidět na obrázku (Obr. 1) (2) (5).



Obr. 1: Chemická struktura základní disacharidové jednotky hyaluronanu: vlevo kyselina D-glukuronová a vpravo N-acetylglukosamin.

Primární struktura tohoto disacharidu je energeticky velmi stabilní, a tím ovlivňuje i strukturu sekundární, jelikož ve vodném roztoku je hlavní řetězec disacharidů stabilizován vnitřními vodíkovými můstky díky interakci s rozpouštědlem. Atomy vodíku tvoří axiální

nepolární, poměrně hydrofobní část, zatímco ekvatoriální postranní řetězce tvoří více polární, hydrofilní část, čímž se vytvoří struktura připomínající zkroucenou stuhu. Kvůli tomuto uspořádání se HA řadí do skupiny amfifilních látek. Roztoky hyaluronanu samotného projevují neobvyklé reologické vlastnosti, a to díky tomu, že jeho polymerní řetězec má v roztoku formu náhodného klubka (6).

Díky vysokému počtu hydroxylových skupin a objemné konformaci je hyaluronan schopen vázat velké množství vody (2). Vodný roztok HA vypadá jako voda samotná. Jedná se však o látku, která má velmi vysokou viskozitu a elasticitu, které jsou závislé na koncentraci roztoku a molekulové hmotnosti HA. Proto se u vysokých koncentrací a molekulových hmotností tento roztok chová jako gel. Už 1% roztok je jako želé, ale pod tlakem se pohybuje snadno a může být protlačen i otvorem jehly. Proto byl roztok HA nazván jako materiál pseudoplastický. Díky jeho mimořádným reologickým vlastnostem je roztok HA výborný jako ideální mazivo (6). Molekulová hmotnost HA může být různá, a to hraje významnou roli v organismu, jelikož biologická aktivita HA je na ní závislá. Čím je molekulová hmotnost nižší, tím vyšší je biologická aktivita a obráceně. Hyaluronan s nízkou molekulovou hmotností má vliv na různé pochody v tkáních a buňkách, kdežto HA s vysokou molekulovou hmotností nejeví prakticky žádnou biologickou aktivitu. Slouží hlavně jako lubrikant, humektant a dále má organizační funkci, například při syntéze různých glykoproteinů, nacházejících se v extracelulárním prostoru, jako je kolagen a další (3) (4).

2.1.4 Využití

Unikátní viskoelastický charakter HA spolu s jeho biokompatibilitou a neimunogenním chováním vede k tomu, že HA může být použit v celé řadě klinických aplikací, včetně doplnění kloubní tekutiny u artritických pacientů, dále jako výplně v oční chirurgii a také jako pomocná látka v přípravcích, které jsou určeny pro usnadnění hojení a regeneraci ran. V současné době je HA zkoumán jako nosič léčiv pro různé způsoby podávání jako jsou: oční, nasální, plicní, parenterální a topické (3).

2.1.5 Biosyntéza a degradace

Vyvážený poměr syntézy a degradace je důležitý pro udržení stálé koncentrace ve tkáních, ale i přesto může v určitých buňkách jedna funkce převažovat. Například buňky ve škáře syntetizují více hyaluronanu, než kolik katabolizují. Hyaluronan se syntetizuje v plazmatické membráně fibroblastů a dalších buněk. Je metabolizován lokálně a nesen lymfou do lymfatických uzlin nebo krevního oběhu, odkud je odstraňován endotelovými buňkami jater, prostřednictvím aktivní absorpcí zprostředkovanou receptorem v závislosti na molekulové hmotnosti HA. Pro jednotlivé buňky se doba života vysyntetizované HA liší, například u HA produkované chondrocyty je doba života 2–3 týdny, ale u keratinocytů je to pouhý jeden den. (7) (2).

Syntézu řetězce HA zajišťuje hyaluronansyntáza, jedná se o speciální transmembránový protein, který reguluje množství vysyntetizované HA. Obecný princip degradace je takový, že hyaluronidáza štěpí vysokomolekulární hyaluronan na menší oligosacharidy a poté jsou tyto vzniklé fragmenty dále degradovány β -D-glukuronidázou a β -N-acetyl-hexosaminidázou odštěpením neredukujícího konce (3).

Neideální osmotické chování hyaluronanu a podobných polymerů je činí jako účinné osmotické pufrů a dává jim roli v tkáňové homeostáze. V normální lidské plazmě je asi 30 až 40 g / l HA, v séru je ho asi o 5 % méně. Bylo prokázáno, že zvýšená koncentrace HA se nachází u pacientů s revmatoidní artritidou, to pravděpodobně v důsledku zvýšené produkce v periferních tkáních. Dále se koncentrace HA v séru zvyšuje s věkem a po cvičení (7).

2.2 Makromolekulární gely

Makromolekulární gely tvořeny disperzními částicemi, které mají schopnost gelatinizovat, tedy vytvářet gely v disperzním prostředí. Při procesu gelace vzniká trojrozměrná makromolekulární síť, která je makroskopické velikosti a vykazuje elastické vlastnosti. Po tomto spojení se částice nadále nemohou v disperzním prostředí pohybovat. Síť vzniká vytvořením dostatečného počtu spojů mezi makromolekulami lineárního polymeru. Tyto spoje mohou vzniknout dvěma způsoby. Prvním je chemická reakce, při které vznikají kovalentně síťované gely, druhým je působení fyzikálních sil, jako jsou van der Waalovy, dipolární síly a vodíkové vazby. Takto vznikají fyzikálně síťované gely (8). Toto zesíťování dává gelům tu vlastnost, že i když je disperzní prostředí kapalné, mechanické vlastnosti jsou charakteristické spíše pro tuhý stav (9).

Podle obsahu rozpouštědla můžeme dělit gely na xerogely (vysušené gely bez rozpouštědla) a lyogely, které rozpouštědlo obsahují. Lyogely se dále dělí na hydrogely nebo organogely, a to v návaznosti na zjištění, jestli se jedná o vodný roztok nebo o organické rozpouštědlo. Síťovitá struktura gelu vzniká především z částic disperzního podílu o koloidní velikosti. Je však možná tvorba gelu i v mikroheterogenním systému (gely silikátů) (10).

Gely a gelace jsou významné pro lékařství, biologii a obory průmyslu. V lidském organismu najdeme gelaci při procesu srážení krve, kdy dochází k zvyšování její viskozity, a tím k tvorbě jakéhosi gelu. V podstatě jsou gely v organizmech živočichů a rostlin všude přítomné. Ve farmaceutickém průmyslu se gelace uplatňuje při výrobě gelových kapslí, scaffoldů, nosičů léčiv a systémů pro hojení ran. I v dalších odvětvích průmyslu, jako je sklářský, kožedělný, keramický, potravinářský atd., je tvorba gelů hojně využívána (9).

2.2.1 Hydrogel

Hydrogel je síť hydrofilních polymerních řetězců ve vodném roztoku, který vyplňuje místo mezi makromolekulami. Tento systém může být dvou, nebo vícesložkový. V typicky nabobtnalém stavu je hmotnostní podíl vody v hydrogelu mnohem vyšší než hmotnostní podíl polymeru, z čehož plyne, že hydrogely jsou vysoce absorpční (mohou obsahovat více než 90 % vody) přírodní nebo syntetické polymerní sítě. Vzhledem k tomu, že mají hydrogely značný obsah vody a také určitý stupeň flexibility, jsou velmi podobné přírodním tkáním. První výskyt pojmu "hydrogel" byl zaznamenán v roce 1894 (11).

Aby se dosáhlo vysokých stupňů bobtnání, tak se v praxi běžně používají syntetické polymery, které jsou rozpustné ve vodě v nezesíťované formě. Typické jednoduché materiály používané pro univerzální hydrogely jsou polymery, jako jsou například: Polyethylenoxid, polyvinyl alkohol, polyvinylpyrrolidon a polyhydroxyethyl-methakrylát). Některé další polymery, používané pro tvorbu gelů, mohou mít ještě další speciální vlastnosti, jako je

například biokompatibilita, která je využívána v medicíně. Ačkoli většina hydrogelů pro biomedicínské účely je vyrobena ze syntetických polymerů, setkáme se i se zesíťnými přírodními polymery, zejména polysacharidy. I když hydrogely mají řadu nebiomedicínských aplikací (např. v zemědělství), zdá se, že jejich použití v oblasti medicíny a farmacie je nejuspěšnější a velmi slibné (12). Po více než 30 letech výzkumu v této oblasti jsou nyní v běžné praxi hydrogely využívány jako měkké kontaktní čočky, obvazy, nosiče léčiv a superabsorbenty. To, že mohou být hydrogely v těchto případech takto úspěšné, souvisí s tím, že mají schopnost absorbovat vodné roztoky bez ztráty tvaru a mechanické pevnosti, což vlastně napodobuje složky lidského těla, jako jsou například svaly, šlachy, chrupavky atd., a také s tím, že hydrogely obvykle vykazují dobrou biokompatibilitu s krví, tělními tekutinami a tkáněmi (11).

Existují tři hlavní typy hydrogelů – homopolymerní, multipolymerní a interpenetrující. Homopolymerní hydrogel je složen pouze z jednoho typu polymeru, na rozdíl od multipolymerního, jehož polymerní síť je složena ze dvou a více typů polymerů, které jsou navzájem zesíťované, tedy vzájemně spojeny kovalentními vazbami. Interpenetrující polymerní síť obsahuje více polymerů (homopolymerních sítí), které jsou částečně propleteny, ale nejsou spojeny kovalentními vazbami (13).

2.2.2 Tenzidy

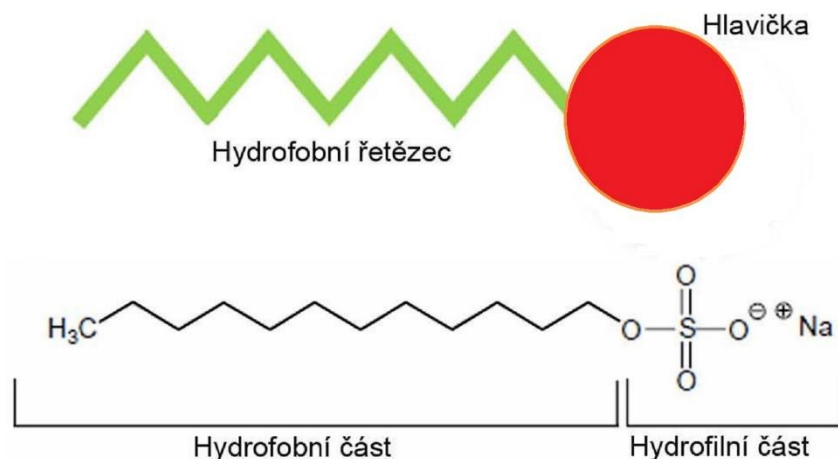
Tenzidy jsou povrchově aktivní látky, které se v malé koncentraci hromadí na rozhraní dvou fází, a tím snižují povrchové napětí. Tenzidy jsou využívány v čistících a pracích prostředcích a také jako součásti emulzních, smáčecích a změkčovacích prostředků (14). Podstatou povrchové aktivity je bipolární molekulární struktura tenzidu, která se musí skládat z lyofilní části, která je nositelem tendence rozpouštět se v daném rozpouštědle, a části lyofobní, která je samotná v daném prostředí nerozpustná. Tudíž mají tyto části tendenci se orientovat podle prostředí, které je pro ně výhodné. Jelikož k tomuto jevu dochází například na povrchu fází, kdy se lyofilní hlava orientuje směrem k lyofilnímu prostředí a lyofobní ocas směrem k lyofobní části smáčeného povrchu (např. vzduchu), dochází zde tudíž ke snížení povrchového napětí (8).

2.2.2.1 Struktura a rozdělení

Ve vodných roztocích se bude tedy jednat o části hydrofilní (polární), kdy je tato část většinou tvořena dlouhým uhlíkatým řetězcem, a hydrofobní (nepolární), která je nejčastěji tvořena ionogenními skupinami, jak je znázorněno na obrázku (Obr. 2) (8).

Tenzidy dělíme z hlediska iontového charakteru hydrofilní části na **iontové** a **neiontové**, kdy ionogenní dále dělíme na anionaktivní, kationaktivní a amfoterní. *Aniontové tenzidy* jsou sloučeniny s jednou nebo více funkčními skupinami, které většinou představuje sulfát, sulfonát, karboxylát, nebo fosfát. Ty ve vodném prostředí disociují na záporně nabitý organický ion. *Kationtové tenzidy* kromě toho, že působí jako povrchově aktivní látky (antistatická úprava), mají i významný mikrobicidní účinek. Hydrofilní hlavu zde představuje kationt, většinou kvartérní dusíkový atom, proto jsou tyto tenzidy převážně kvartérní amoniové soli (chloridy nebo methosulfáty). Mezi kationtové tenzidy se také řadí karbethependeciniumbromid (septonex), se kterým budeme v této DP pracovat. *Amfoterní*

tenzidy obsahují jak anion, tak kation (v nedisociovatelné části své molekuly). Náboj u těchto molekul určuje pH prostředí. U *neionogenních tenzidů* se jedná pouze o neutrální tenzid, který nemá žádný náboj, tudíž neionizuje prostředí a rozpustnost ve vodě je tedy dána přítomností hydrofilních skupin. Obsahují polární aminoskupiny, etherické a hydroxylové skupiny spojené s polyglykolethery, které tvoří s molekulami vody vodíkové můstky (14).



Obr. 2: Schéma struktury tenzidu ve vodě (dodecylsírán sodný).

2.3 Ftalocyaniny

Neidentifikovaná modrá látka, která je nyní známa jako ftalocyanin, byla poprvé zaznamenána v roce 1907. V roce 1927 švýcarští vědci náhodně vysyntetizovali ftalocyaniny mědi, u kterých zjistili, že mají obrovskou stabilitu. Dále však neuměli tyto modré komplexy charakterizovat (15).

Dnes již víme, že ftalocyaniny jsou modrozeleně zbarvené aromatické makrocyclické sloučeniny, které se používají k barvení. Koordinační ftalocyaniny tvoří komplexy s většinou prvků periodické tabulky. Tyto komplexy jsou také intenzivně barevné a stejně se používají jako barviva nebo pigmenty. Dále se sloučeniny ftalocyaninů a jejich deriváty dají použít v optických materiálech, v organických polovodičích, v plynových senzorech a pH senzorech, v tekutých displejích a v poslední době i jako katalyzátory v organické transformaci (15).

Tradičně jsou ftalocyaniny syntetizovány v přísných reakčních podmínkách. Je mnoho způsobů, jak je lze připravit, ale tyto syntézy mají mnohá omezení. Například extrémní zahřívání až 300 °C nebo použití velmi silné báze. V poslední době byl výzkum zaměřen na syntézu v mírných podmínkách. Úspěšná syntéza v mírných podmínkách byla úspěšně provedena na univerzitě (D'Youville College). Syntetizován byl metaloftalokyanin z 1,2-dikyanobenzenu za použití triethylaminu a kovové soli.

Mezi ftalocyaniny patří i alciánová modř, kterou se budeme dále zabývat pro využití jako možný nástroj pro stanovení koncentrace HA ve vodných roztocích.

2.3.1 Alciánová modř

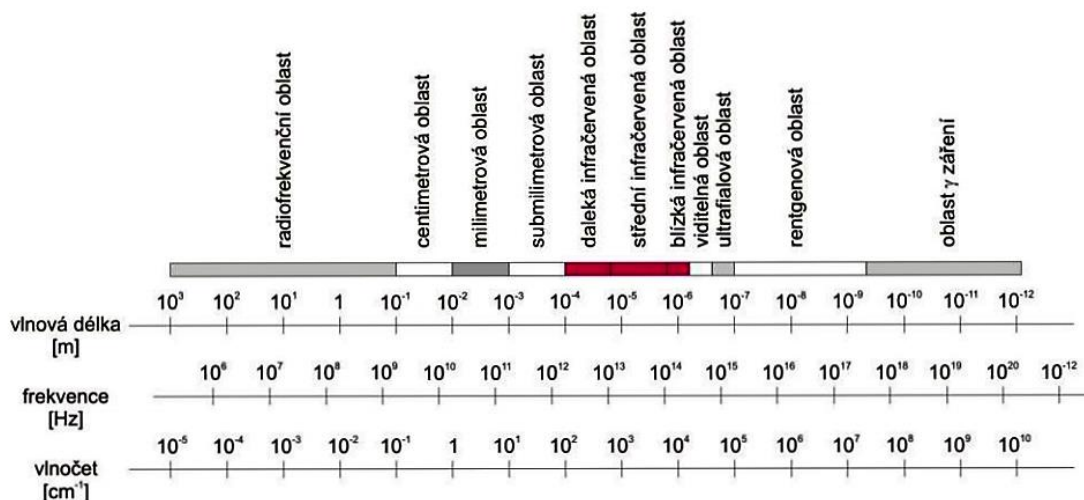
Alciánová modř nachází použití především jako barvivo pro identifikaci (rozlišení) kyselých polysacharidů, například glykosaminoglykanů, v různých tělních strukturách (například v chrupavkách a také u některých typů mukopolysacharidů v tkáňových řezech). Alciánová modř je jedna z nejvíce používaných kationtových barviv pro barvení histologických preparátů, které jsou po zalití do pryskyřice vhodné pro mikroskopické stanovení. Podle složení tkáně se tak zbarvuje histologický preparát (od modré po modro-zelenou), takto obarvené části se nazývají "Alcianophilic". Barvení alciánovou modří může být kombinováno s další technikou, kterou je například barvení hematoxylinem-eosinem s PAS (Periodic Acid Schiff) reakcí (v tomto případě se jako hlavní barvicí složka používá xylen) nebo barvení dle Weigert van Giesona (16).

Alciánová modř může být také použita ke kvantifikaci kyselých glykanů, jak pro barvení glykoproteinů v polyakrylamidovém gelu, tak v roztoku pro spektrofotometrické stanovení (16).

2.4 Infračervená spektroskopie

Infračervená spektroskopie je analytická metoda, díky které jsme schopni identifikovat a strukturně charakterizovat především organické sloučeniny a také stanovovat anorganické látky. Tato metoda je také vhodná pro kvantifikaci látek a hraje důležitou roli při výzkumu molekulové dynamiky. Jedná se o nedestruktivní metodu, při které není zkoumaný vzorek analýzou nijak znehodnocen, a také s jejím použitím můžeme měřit vzorky všech skupenských stavů (17) (18).

Infračervená spektroskopie funguje na bázi interakcí infračerveného záření se studovaným vzorkem, kdy při pohlcení fotonu studovanou látkou jde o absorpční infračervenou spektroskopii, a jestliže dojde k vyzáření fotonu, o emisní infračervenou spektroskopii. My se budeme bavit především o absorpční spektroskopii, kdy jejím principem je absorpce infračerveného záření, při níž dochází ke změnám rotačně vibračních energetických stavů molekuly, a to v závislosti na změnách dipólového momentu molekuly. Výstupem této metody je infračervené spektrum, které graficky zobrazuje funkční závislost energie vyjádřené v procentech transmitance (T) nebo jednotkách absorpance (A) na vlnočtu. Vlnočť $[\text{cm}^{-1}]$ je nejpoužívanější jednotkou v této metodě, jde o jeho převrácenou hodnotu vlnové délky, kdy vlnočť je roven počtu vln připadajících na jednotku délky ve směru šíření vlnění. Vlnová délka se tedy nepoužívá proto, že závislost energie na vlnové délce je logaritmická, kdežto na vlnočtu lineární. Infračervené spektrum se na stupnici elektromagnetických spekter nachází mezi viditelným a mikrovlnným zářením, jak je vidět na obrázku (Obr. 3), tedy v rozmezí vlnočtů $(13\ 000\text{--}10\ \text{cm}^{-1})$. Celou oblast ještě rozdělujeme na blízkou $(13\ 000\text{--}4\ 000\ \text{cm}^{-1})$, střední $(4\ 000\text{--}200\ \text{cm}^{-1})$ a vzdálenou infračervenou oblast $(200\text{--}10\ \text{cm}^{-1})$, kdy největší význam pro identifikaci organických sloučenin má oblast střední. V této oblasti mají organické sloučeniny největší počet absorpčních pásů. V oblasti mezi $650\text{--}1\ 500\ \text{cm}^{-1}$ je typický absorpční pás pro každou organickou látku, tudíž zde nemohou existovat různé organické sloučeniny se stejným spektrálním projevem (17) (18).



Obr. 3: Elektromagnetické spektrum (17)

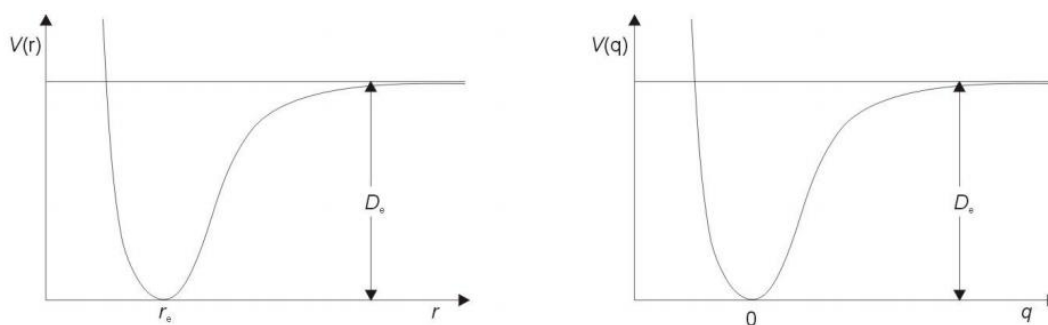
U infračerveného záření dosahuje energie fotonů 1–60 kJ/mol, tato energie je dostatečná ke změně vibračního stavu (z klasického pohledu ke zvětšení amplitudy vibrace molekuly), či rotačního stavu (zrychlení rotace molekuly), tato energie však nepostačuje pro excitaci elektronů v molekulových orbitalech. Toto může fungovat na základě faktu, že atomy ve studované molekule jsou spojeny vazbami vykazujícími určitou pružnost a ty mohou různými způsoby vibrovat (17) (18).

Rotační přechody lze měřit pouze v plynech, protože v kapalinách a pevných látkách splývají, proto jsou pro nás důležitější přechody vibrační. Vibrační pohyb si z pohledu fyziky můžeme představit jako změnu mezijaderné vzdálenosti atomů, která se opakuje s určitou periodou. Obecně má n atomová molekula $3n$ stupňů volnosti, kdy pokaždé jsou tři připisovány translačnímu pohybu těžiště molekuly v různých směrech os x , y a z a další tři jsou určeny pro popis jejího rotačního pohybu, jde-li o lineární molekulu, připadají tomuto pohybu pouze dva stupně volnosti, jelikož dva rotační momenty jsou v lineární molekule ve směru os x , y a z vždy totožné, proto u molekul obsahujících pouze 2 atomy se jedná vždy o tento stav. Na vibrační pohyby molekuly tedy zůstává $3n-6$, jde-li o lineární molekulu, tak $3n-5$. Nejmenšího vibračního stupně volnosti tedy můžeme dosáhnout u dvouatomové molekuly, kde je roven jedné a náleží pohybu oddalování a přitahování atomů, tedy natahování vazby mezi nimi. V modelu dvouatomové molekuly může být tento pohyb také popsán pomocí vibrační souřadnice q ,

$$q = r - r_e \quad (1)$$

kdy r je proměnná a r_e je rovnovážná konstanta délky vazby. Touto souřadnicí q můžeme popisovat valenční vibraci, ale pouze u této dvouatomové molekuly. Jestliže se bude jednat o víceatomovou molekulu, tak vibrační souřadnice bude lineární kombinací výchylek jednotlivých atomů. energii, která je spojená s vibračním pohybem, lze tedy vyjadřovat pomocí těchto vibračních souřadnic. K celkové vibrační energii molekuly přispívají

(z pohledu klasické fyziky) dva rozdílné energetické příspěvky, a to energie kinetická, ta vyjadřuje pohyb atomu, a energie potenciální, která je spojená s protahováním a zkracováním vazby. Při vibračním pohybu molekuly je tedy energie přenášena mezi těmito dvěma. V závislosti na hodnotě vibrační souřadnice q se tedy mění potenciální energie. Tuto závislost můžeme vidět na obrázku (Obr. 4) (17) (18).



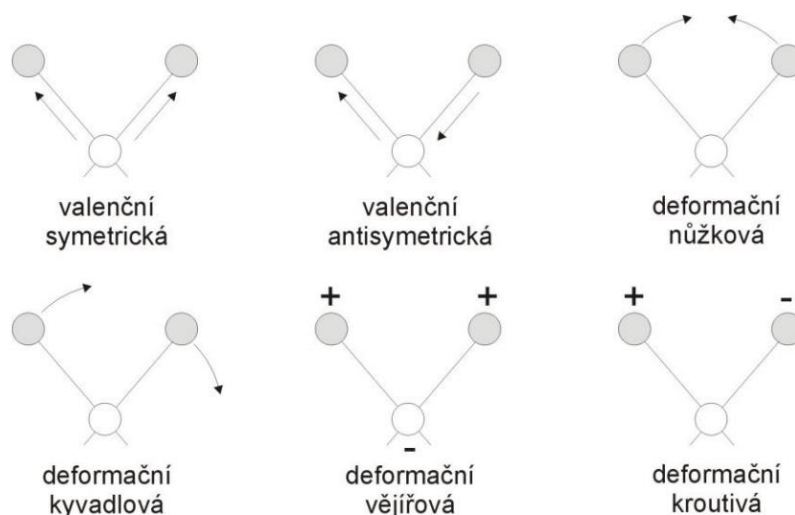
Obr. 4: Potenciální vibrační energie V na levé straně jako funkce délky vazby a na straně pravé jako funkce vibrační souřadnice (17).

V blízkosti minima (až $q = 0$) potenciálové křivky probíhají vibrační pohyby většiny dvouatomových molekul. Jestliže tato křivka potenciální energie vibrující dvouatomové molekuly může být aproximována parabolou, tak v tomto případě lze o vibračním pohybu mluvit jako o harmonickém oscilátoru, kdy jeho celková energie je dána součtem kinetické a potenciální. Z pohledu kvantové fyziky, (která se zabývá studiem mikročástic), můžeme vibrační pohyb harmonického oscilátoru popsat pomocí Hamiltonova operátoru (operátor celkové vibrační energie molekuly), z něhož plyne, že energie vibrující molekuly nemůže nabývat jakékoliv hodnoty, ale že je tato energie kvantovaná. Dále také plyne, že energie vibrujícího systému je nižší, když se jedná o těžké atomy, nebo u vazeb s menší pevností (vazby jednoduché) (17).

U víceatomových molekul na určitá jádra působí síly z více směrů, proto byl vyvinut model spřažených oscilátorů, kdy výsledkem lineární transformace je nový soubor souřadnic. Tento přístup popisuje nejnižší vibrační stavy. Díky tomu, že vibrační pohyb charakterizuje funkční skupinu nebo vazbu, byla na základě zkušeností sestavena tabulka vlnočtů charakteristických vibrací základních skupin a vazeb. Tyto tabulky jsou stále používané pro identifikaci látek (17).

2.4.1 Typy vibrací

Jestliže se na vibrující molekulu díváme z pohledu fyziky (klasické), pak dělíme typy vibrací podle změny délky, kdy se jedná o vibrace valenční, které jsou dále děleny na symetrické a antisymetrické, a podle změny úhlu vazby na deformační, které jsou dále rozdělené na rovinné a mimorovinné. Jak je vidět na obrázku (Obr. 5), pojmenování deformačních vibrací plyne z vibračního pohybu z pohledu fyziky (klasické) (18)..



Obr. 5: Vybrané vibrační pohyby molekul z pohledu fyziky (klasické) (17) .

Pomocí infračervené spektroskopie určujeme vlnočety, při kterém dochází k absorpci nebo emisi záření, což má za následek změnu vibračního stavu. Tato změna je označována jako vibrační přechod, kdy jeho uskutečnění závisí na maticovém elementu tranzitního momentu přechodu. Tento tranzitní moment lze většinou aproximovat elektrickým dipólem molekuly. Je-li nesymetrická vazba ozařována monochromatickým zdrojem světla, jehož frekvence je stejná jako dipól, pak bude interagovat s vazbou. Jelikož většina je v základním vibračním stavu $v = 0$ (při pokojové teplotě), jsou nejsilnější vibrační pásy realizovány přechody z hladiny $v = 0$ na $v = 1$ tzv. fundamentální pásy (17) (18).

2.4.2 Typy přístrojů

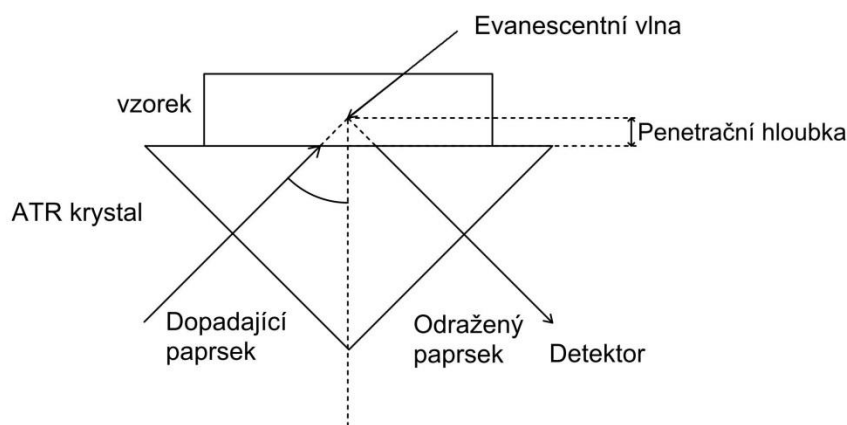
Měření se provádí na třech různých typech přístrojů. Nejvyužívanější z nich je v dnešní době interferometrický, dále existuje také disperzní a nedisperzní. U **disperzního spektrometru** se jako zdroj záření používá keramická tyčinka se žhaveným drátem, toto rozžhavené těleso emituje infračervené záření. Toto záření prochází vzorkem v transparentní kyvetě tvořené především z halogenidů alkalických kovů. Po průchodu vzorkem paprsek pokračuje k monochromátoru a poté do detektoru (termodynamický nebo pyroelektrický). **Nedisperzní spektrometr** je velmi podobný dispersnímu, s tím rozdílem, že nevyužívá monochromátor, ale vysoce monochromatické lasery jako zdroj záření. **Interferometrický spektrometr** je velmi podobný disperznímu, má i stejný zdroj záření, ale na rozdíl od něj má interferometr, který pracuje na principu Michaelsonova interferometru, kdy jeho hlavními součástmi jsou pohyblivé zrcadlo, pevné zrcadlo a dělič paprsků. Jako dělič pro střední infračervenou oblast slouží polopropustné zrcadlo. Každý zaznamenaný interferogram obsahuje veškeré spektrální informace. Interferogram se Fourierovou transformací převádí z časové škály do frekvenční nebo vlnočtové na spektrum odpovídající jednomu skenu (17).

2.4.2.1 FTIR spektrofotometr s ATR technikou

Metoda s využitím zeslabeného vnitřního odrazu (ATR – attenuated total reflectance) je založena na odrazu optického svazku paprsků na fázovém rozhraní mezi krystalem

a vzorkem, které jsou spolu v těsné blízkosti, proto se pro toto stanovení hodí kapalně vzorky. Materiál krystalu musí být v oblasti zvolených vlnových délek transparentní a musí mít vysoký index lomu, což dokonale splňuje technický diamant. Na fázové rozhraní je pomocí soustavy zrcadel přiveden svazek paprsků pod takovým úhlem, aby byl totálně odražen, viz schéma (Obr. 6). Jestliže měřený vzorek absorbuje záření o určité frekvenci, pak bude tato složka v totálně odraženém světle zeslabena. Penetrace do vzorku je závislá na vlnové délce (s vlnovou délkou se zvyšuje penetrace do vzorku) a indexu lomu jak krystalu, tak stanovovaného vzorku, proto je před samotným měřením změřen index lomu na refraktometru. Tento jev, kdy máme se zvyšujícím se vlnočtem nižší penetraci do vzorku, je vyrovnáván matematicky, kde toto matematické vyhodnocení je součástí softwarového vybavení FTIR spektrofotometrů a nazývá se ATR korekce (18)..

Tato metoda je výhodná tím, že nevyžaduje přílišnou přípravu vzorku. Dají se s ní stanovit vysoce absorbující látky, pevné látky a také plyny. V některých zařízeních může být krystal také ponořen do analyzované látky (18).



Obr. 6 Schéma FTIR spektrofotometru s ATR technikou (19).

3 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

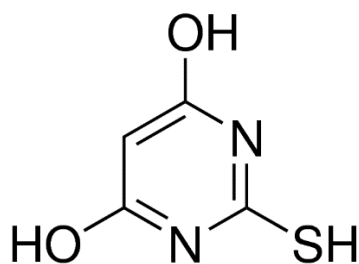
Zvyšující se zájem o využití HA v buněčné biologii a klinické praxi začal již kolem roku 1970. To vědce motivovalo k vyvinutí nových metod pro jeho specifickou analýzu. V té době však u dostupných metod chyběla specifická a citlivost pro měření HA v malém množství, které se obvykle nachází ve vzorcích tkání a biologických tekutinách.

Mikrogramové množství HA může být kvantifikováno různými způsoby. Nejstarší a nejrozsáhlejší byly založeny na kolorimetrickém principu s použitím modifikované metody a s využitím karbazolu, který je důležitý pro stanovení kyseliny hexuronové (20). V klinické analýze se HA stanovuje elektroforézou za pomoci membrány vyhotovené z acetátu celulózy. Vyhodnocení tohoto testu se může provádět pomocí vylučovací chromatografie s fotometrickou UV detekcí při nízké vlnové délce (21). Citlivost a selektivita jsou však nedostatečné pro stanovení velmi nízkých koncentrací (obsažené například v krevním vzorku). V posledních letech je kladen důraz na stanovování koncentrace HA pomocí proteinů se specifickou afinitou k HA (HAPB). Tyto proteiny byly nejdříve použity v rámci metod, které používají pro značení HAPB radioaktivní izotopy. Jelikož tyto značené proteiny nejsou komerčně dostupné, jde o poměrně složitou metodu (22). Z toho důvodu se měření HA obvykle provádí běžným radioimunotestem (RIA), který byl poprvé popsán Brandtem (a kolektivem) (23) a s malými úpravami je ho možné použít i dnes. Alternativou k RIA metodám může být „time-resolved fluoroimmunoassay“ (TRFIA). Jde o časově rozdělenou imunometodu bez použití izotopu (7). V dnešní době nachází nejčastější využití pro stanovení nízkých koncentrací v biologických vzorcích právě stanovení pomocí ELISA testů, a to především pomocí komerčně vyráběných ELISA kitů.

Dále je mnoho dalších způsobů, jak zjistit množství HA ve vodných a fyziologických roztocích s přidáním barviv, jako je alciánová modř a následné měření absorbancí (24) (25) (26). Některé metody umožňují měření vodného roztoku HA bez předchozí úpravy pouze spektrofotometricky. Většina z nich zde bude popsána a některé z nich budou součástí experimentů.

3.1 Metoda s využitím thiobarbiturátu

Metodu s využitím thiobarbiturátu rozvinul G. W. Jourdian a kol. v roce 1979 (27). Jde o kolorimetrický, enzymatický, specifický a citlivý test pro stanovení obsahu HA i ve směsi glykosaminoglykanů nebo v surových biologických extraktech. To díky tomu, že enzym není inhibován jinými glykosaminoglykany. Thiobarbiturátový test využívá čištěný enzym hyaluronidáza, který byl získán izolací z bakterie *Streptomyces hyalurolyticus*. Tímto enzymem je HA obsažený v biologických směsích štěpen na oligosacharidy a ty jsou dále oxidovány kyselinou pyrohroznovou, která vznikla při štěpící reakci. Poslední reakcí s kyselinou thiobarbiturovou získáme chromofor, který má absorpční maximum při 549 nm. Tato absorbance odpovídá koncentraci HA v roztoku. Tato metoda je citlivá na rozmezí 5–100 µg HA v reakční směsi. V článku (27) je popsán postup celého stanovení s optimálními podmínkami. Jelikož se cena thiobarbiturátu (Obr. 7) pohybuje okolo 1 500 Kč za 25 g a cena hyaluronidázy je okolo 4 500 Kč, nejedná se o příliš finančně náročný test, který by nemohl být proveden na školním pracovišti.



Obr. 7 Vzorec kyseliny 2-thiobarbiturové.

3.2 Metody s využitím vazby HA na specifický protein

3.2.1 S využitím fluorescence

Andreas Rössler v roce 1998 (7) stanovoval koncentraci HA pomocí časově rozlišené fluoroimunitní metody. Tento imunologický test je založen na agregaci hyaluronanu s monomerním proteoglykanem, s následnou vazbou monoklonální protilátky na keratan sulfát proteoglykanu a biotinovaný anti-myší IgG. Po vazbě europiem značeného streptavidinu na biotinovaný IgG je měřena fluorescence pomocí fluorometru s časovým rozlišením. Tato metoda je přesná a citlivá a lze s její pomocí změřit koncentrace pod 0,24 mg/l. Výsledky ukázaly, že způsob stanovení má vysokou přesnost, a je tedy vhodný pro měření HA v malém množství a v různých biologických tekutinách (7).

Obdobná metoda je sepsaná v článku z roku 2003 (28). Metoda spočívá v tom, že destičky jsou potaženy proteiny (získanými z chrupavek skotu), které na sebe vážou HA (HABP). Tyto navázané proteiny byly postupně inkubovány se vzorky standardních roztoků HA a se studovanými vzorky, jimiž v této studii byla séra normálních a cirhotických pacientů. Ke každému ze vzorků byly přidány biotinem konjugované HABP a europiem značený streptavidin. Po uvolnění europia ze streptavidinu s lepší rozpustností je finální fluorescence změřena na fluorometru a odpovídá množství HA ve vzorku. Tato metoda je specifická pro HA i za přítomnosti proteinů, nebo jiných glykosaminoglykanů, jako jsou chondroitin a heparin. Tato sendvičová technika ukázala vysokou přesnost a citlivost, je schopna měřit opravdu malé množství a její detekční meze jsou v rozmezí 0,2–500 µg/l HA v roztoku. Metoda umožňuje velmi přesnou detekci koncentrace HA, je časově nenáročná a nevyužívá radioaktivní materiály (28).

3.2.2 Metoda pomocí radioaktivního značení

Tengblad a B. G. Laurent (22) použili chrupavkové proteiny značené radioaktivním izotopem jodu (I^{125}) s afinitou k HA tak, aby došlo k jejich rozdělení mezi HA ve volném roztoku a HA substituovaném s agarozovým gelem. Z radioaktivity gelu bylo možné stanovit, kolik množství volného HA je v systému. Za zvolených standardních podmínek se meze detekce můžou pohybovat od 40 do 1 000 ng. Ovšem standardní chyba při tomto stanovení byla 15 až 20 %. Jako další problém můžeme považovat to, že radioaktivní značení chrupavkového proteinu má relativně krátký poločas rozpadu a test musí být prováděn z čerstvě připraveného

materiálu. Zmíněné nevýhody řadí tuto metodu mezi zastaralé a dále nevhodné k používání (22).

3.2.3 Metody s využitím ELISA

V roce 1985 B. Delpach se spolupracovníky (29) použili HA vázající protein hyaluronectin (HN) izolovaný z lidského mozku a ke stanovení koncentrace HA využili vlastností ELISA testů. Jelikož je v této metodě potřebné navázání hyaluronectinu na povrch mikrotitračních destiček, bylo třeba speciálních naplavovacích jamek s intermediátory pro jeho uchycení, neboť samotný hyaluronectin se váže nepříliš stabilně. Toto použití intermediátoru však přineslo v běžném používání další potíže, a proto byla vymyšlena metoda, která je uvedena níže (30).

V roce 1986 byla vyvinuta další metoda s použitím ELISA a to W. Kunudsonem a kol. (31). Tento test využívá protilátku anti-keratansulfát. Dále tato metoda vyžaduje úpravu HA papainem, ale tato úprava nemá žádný vliv na jeho kvantifikaci. Metoda umožňuje přesné stanovení v rozmezí 15–1 000 ng/ml, ale pouze u velkých molekul HA. U malých molekul není kvantifikace zcela přesná.

Metoda na bázi ELISA

Jedná se o metodu (Enzym-linked immunosorbent-inhibition assay), která byla vyvinuta v roce 1989 P. Ghoshem a P. Kongtawelertem (30) pro kvantifikaci HA. Princip metody závisí na specifické vazbě HA k HA-vázající oblasti (HABR) monomerů proteoglykanu. Zbývající PG monomery, které se nenavázaly, byly určeny inkubací s monoklonálními protilátkami specifickými pro vazebné místo s následným přidáním polyklonálních protilátek proti PG monomerům a enzymem konjugovaných protilátek. HA byla v testovaných vzorcích kvantifikována srovnáním jejich inhibiční kapacity se standardní inhibiční křivkou vytvořenou pomocí vysoce čištěného HA. Tato metoda byla použita pro kvantifikaci HA na úrovni nanogramů v normálním séru a synoviální tekutině (30).

Komerčně vyráběné ELISA kity

V dnešní době je nejjednodušší cestou pro stanovení koncentrace HA v roztoku sáhnout po komerčně vyráběných kitech. Jsou sice cenově dražší než metody (28) (22) (29) (30), ale díky nim je stanovení rychlejší a přesnější. Kit obsahuje všechny potřebné chemikálie, návod k použití a mikrotitrační destičku s již navázaným proteinem. Přehled kitů znázorňuje tabulka (Tab. 1).

výrobce	citlivost [ng/ml]	detekční rozsah [ng/ml]	cena [Kč]	délka stanovení [h]
Cusabio	0,039	0,156–10	výrobce neuvádí	1–4,5
Corgenix	výrobce neuvádí	výrobce neuvádí	nebyla zjištěna	2
MyBioSource	1,02	2–600	9 700	2–3
Echelon	25	12,5–3 200	14 350	2–3
Echelon	25	0–1 600	13 390	2–3
Usnc Life Science Inc.	2,5	7,4–600	11 820	2,5

Tab. 1: Přehled ELISA kitů pro stanovení koncentrace HA od různých výrobců, které se liší parametry.

3.3 Alciánová modř

3.3.1 Srážecí metody

Již v roce 1973 popsal Paul Whiteman (32) kvantitativní mikro metodu s pomocí alciánové modři 8GX (dříve jen AB) ke stanovení glykosaminoglykanů. Jelikož přišel na to, že se komplexy HA-GAG nejlépe tvoří při pH 5,8 a v přítomnosti nízkých koncentrací solí, byl připraven pracovní roztok AB o tomto pH v 0,5M octanu sodném s přidavkem $MgCl_2$. Tvoření komplexů bylo stanovováno v přítomnosti různých koncentrací $MgCl_2$. Hraniční koncentrace $MgCl_2$ v pracovním roztoku byla zvolena na 50 mM. Taková koncentrace je potřebná k maximálnímu vysrážení GAG a největšímu zabudování AB do komplexů (32).

Pracovní roztok byl dále 15 minut centrifugován a až poté přidán k roztoku GAG. Takto připravený vzorek byl po dvou hodinách reakce zcentrifugován a sražené komplexy byly dekantací odděleny a promývány etanolem a znovu centrifugovány. Barvivo ze sraženin bylo uvolněno disociačním činidlem Manoxolem IB rozpuštěným v octanu sodném. Obsah glykosaminoglykanů ve vzorku byl poté určen spektroskopicky (32).

Tato metoda se zdá být levnou, ale zato časově náročnou.

Další srážecí metodu pomocí AB popsal C. B. Little a kol. (25) v roce 1990. Jde o metodu, díky které lze kvantitativně stanovit množství jak HA, tak sulfátových glykosaminoglykanů v roztoku, který obsahuje obojí. Test je založen na principu vysrážení HA s určitým množstvím barviva z pracovního roztoku. V testu byla použita alciánová modř 8GX, rozpuštěná nejprve v ethanolu a následně převedena do roztoku octanu sodného s přidavkem $MgCl_2$. Tento pracovní roztok byl přidáván ke vzorkům s obsahem HA, následně byl míchán, a poté zcentrifugován. Supernatant byl odejmut do čisté zkumavky a naředěn. U takto připravených namodralých roztoků byla proměřena absorbance. Kalibrační křivka byla vytvořena z absorbance při vlnové délce 620 nm, což odpovídá maximu nejvyššího píku (25). Bylo zjištěno, že test je rychlý a spolehlivý v roztocích obsahujících 0 až 200mg /dl HA a 50 až 1 000 mg/dl SGAG. Dále bylo zjištěno, že přítomnost proteinů, hemoglobinu a methemoglobinu v koncentracích, ve kterých se obvykle nacházejí v synoviální tekutině, neovlivňuje stanovení (25).

Tento způsob stanovení bude experimentálně vyzkoušen v této diplomové práci.

3.3.2 Stanovení dle E. W. Golda

Edward W. Gold v roce 1979 (24) vyvinul spektrometrickou metodu, kdy díky alciánové modři je schopen jednoduše rychle a spolehlivě určit množství mikrogramů glykosaminoglykanů v roztoku (biologické tekutiny). Tato metoda je založena na odlišnosti absorpčních spekter barviva samotného a komplexů barviva s glykosaminoglykanem. Kalibrační křivka byla vytvořena z absorbancí při 480 nm, kdy lineární nárůst byl v rozsahu 5–75 $\mu\text{g/ml}$. Tato metoda, na rozdíl od jiných metod, nevyžaduje vysoké teploty, odstředování, ani sofistikované přístroje, které jsou u jiných metod omezující (24).

Nejvhodnějším rozpouštědlem pro alciánovou modř byl po testování různých látek vybrán octan sodný. To proto, že se v něm dobře rozpouští jak barvivo samotné, tak i jeho komplex barviva s HA. Roztok barviva v 0,5M octanu sodném má však malou stabilitu. V roztoku dochází k postupné agregaci barviva, proto by se měl takto připravený roztok zpracovat co nejdříve. Absorpční spektrum roztoku samotného barviva se v návaznosti na stáří roztoku zvyšuje. A proto čím vyšší stáří roztoku AB bude, tím větší bude měřitelná absorbance u slepého vzorku. Kvůli těmto agregátům se po několika hodinách stáří roztoku setkáváme s potížemi. Během 24 hodin se agregované barvivo zcela vysráží z roztoku, a tudíž je po této době roztok barviva nepoužitelný. Roztok, který již obsahuje komplex barviva s HA, také vykazuje postupné zvýšení absorbance při 480 nm. Toto zvyšování absorbance lze snadno eliminovat měřením každého vzorku oproti slepému vzorku, který představuje barvivo samotné (24).

U této metody bylo zjištěno, že stanovení neovlivňují jednoduché cukry albumin ani chloridové ionty nízkých koncentrací, jako například fyziologický roztok 0,9%. Vyšší koncentrace těchto iontů však mohou ovlivnit výsledek (24).

Tato metoda byla v minulosti ověřována na školním pracovišti s využitím alciánové modře 8GX. V experimentu bylo pracováno přesně podle Goldova postupu. Výsledky této metody však nebyly vyhovující. V absorpčním spektru tohoto experimentu byly sice jisté podobnosti s Goldovými výsledky (píky minima okolo 480 nm), nicméně z hodnot absorbance získaných při určitém minimu (př. 490 nm) nebylo možné vytvořit kalibrační přímku. Z výsledných grafů bylo také patrné, že nejnížší možná koncentrace, která je schopna dát kladnou absorpenci v nejnížším bodě, je 0,04% roztok HA, což odpovídá 40 $\mu\text{g/ml}$. To také neodpovídalo Goldově absorpčnímu rozmezí (19).

Proto byla dále proměřena stálost roztoku alciánové modře v čase. Vzhledem k tomu, že Gold ve své metodě popisuje to, že je barvivo stabilní po dobu jedné hodiny, toto měření jeho tvrzení nepotvrdilo. Po patnácti minutách měření se totiž absorbance radikálně změnila, což bylo způsobeno tvořením agregátů octanu s barvivem. Nelze tedy konstatovat, že by AB v octanu byla stabilní (19).

Dále byla proměřena a vizuálně sledována rozpustnost AB jak v octanu sodném, tak ve vodě. Z výsledků vyplývá, že AB je daleko stabilnější ve vodě než v octanu sodném, což můžeme vidět na obrázku (Obr. 8).



Obr. 8: Roztoky AB třetí den po rozpuštění, ve vodě je roztok stále čirý (vlevo), kdežto roztok AB v octanu sodném sedimentoval (vlevo) (19).

Na základě toho byla proměřena koncentrační řada roztoků HA ve vodě s vodným roztokem alciánové modře. Při použití slepého vzorku vodného roztoku barviva vyšly všechny absorbance záporné, což byl důsledek odbarvování roztoku AB se zvyšující se koncentrací HA. Proto byla celá koncentrační řada proměřena proti samotné vodě. Výsledek byl takový, že v grafu nebyly pouze píky minima (480 nm), ale i maxima (625 nm). Ani z těchto výsledků však nebylo možné sestavit kalibrační křivku. Hodnoty sice klesaly s rostoucí koncentrací, ale nerovnoměrně (19).

Má diplomová práce se bude zabývat rozšířením a vylepšením této metody, jelikož se zdá velice jednoduchou, rychlou a levnou. Pro použití na školním pracovišti by byla tato metoda ideálním řešením.

3.3.3 Další metody

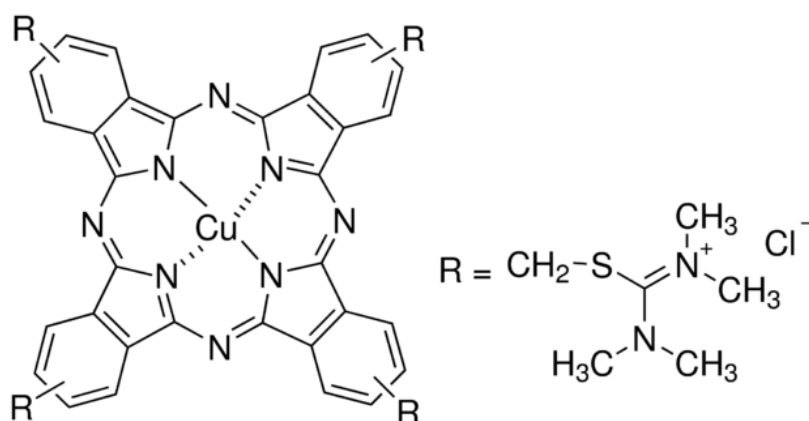
Alciánovou modř také využil N. Seno a kolektiv (26) k zjištění množství individuálních glykosaminoglykanů ve vzorcích pomocí elektroforézy. Jde o kolorimetrickou metodu, kdy se alciánovou nebo toluidinovou modří barví foretogram. Po odbarvení foretogramu vzniknou komplexy barvivo-glykosaminoglykan, a ty jsou následně izolovány, rozpuštěny a disociovány do roztoku. Množství barviva v roztoku je - podle intenzity zbarvení a schopnosti pohlcovat dané záření - spektrofotometricky určeno. Výsledná absorbance odpovídá koncentraci glykosaminoglykanů ve vzorku (26). Pro běžné stanovení množství GAG však tato metoda není úplně jednoduchá a rychlá.

Dále lze také stanovovat měď obsazenou v komplexech GAG-barvivo atomovou absorpční spektroskopií. Tato metoda je poměrně citlivá, ale vyžaduje technicky náročnější vybavení laboratoře (24).

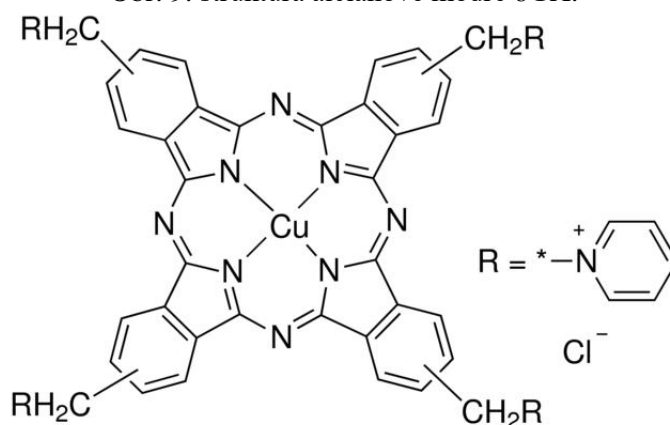
3.3.4 Alciánová modř 8GX vs. alciánová modř pyridinová varianta

V práci (Ch. J. Churukaina a kol.) (33) byly porovnávány dvě varianty barviva alciánové modři, a to barvivo alciánová modř 8GX (dále jen AB) se sumárním vzorcem $C_{56}H_{68}N_{16}S_4C_{14}Cu$ (Obr. 9) a pyridinová varianta tohoto barviva (dále jen ABp) se sumárním vzorcem $C_{56}H_{40}C_{14}CuN_{12}$ (Obr. 10). U těchto barviv byl pozorován barvicí výkon, obsah barviva v tkáňovém vzorku, rozpustnost a vizuální maximum absorpce u dvou šarží ABp a u pěti šarží AB.

Z výsledků této studie plyne, že obě šarže ABp byly stabilní, uspokojivé rozpustnosti a s dobrou barvicí schopností. Z pěti šarží AB nebyla 2 barviva dostatečně stabilní a 3 šarže měly neuspokojivý barvicí výkon a jejich rozpustnost byla omezena. Rozdíly ve stabilitě jsou způsobeny různým množstvím stabilizátoru v určitých šaržích. Dále je také AB méně stabilní proto, že je náchylnější k hydrolyze. Na základě této studie lze říci, že ABp je vynikající náhradou za AB (33).



Obr. 9: struktura alciánové modře 8GX.



Obr. 10: struktura pyridinové varianty alciánové modře.

V předchozích studiích ve výše zmíněných člancích bylo použito barvení pomocí AB. Z článku (33) vychází lépe barvení pomocí ABp. Z tohoto důvodu budou v této práci při ověřování metod (24) a (25) použity obě varianty barvení (AB i ABp).

3.4 Spektroskopické stanovení koncentrace HA

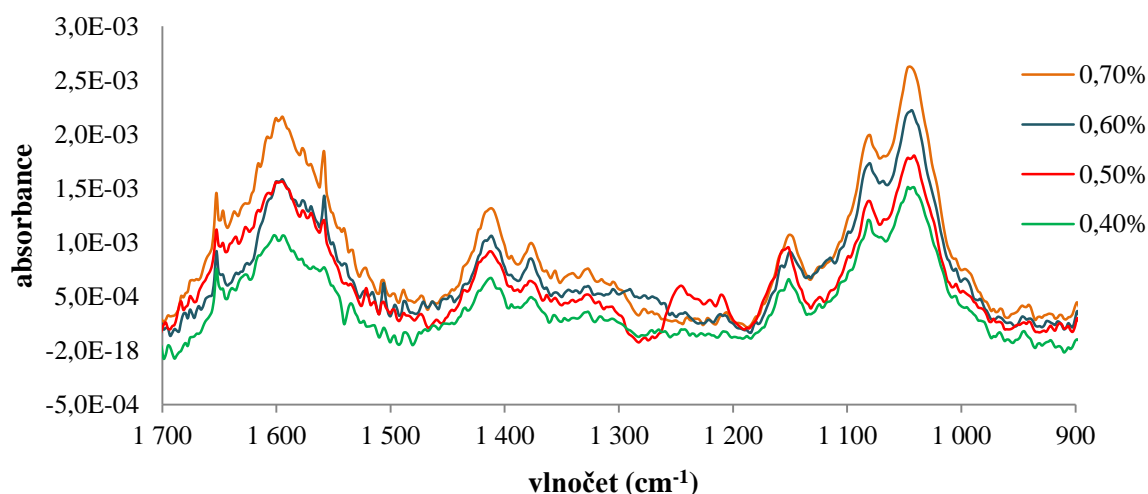
3.4.1 Metoda s využitím infračervené spektroskopie

V roce 1976 Cael (34) popsal infračervené spektrum HA pomocí FTIR. Mimo jiné bylo touto metodou možné zjistit orientaci molekul ve vláknech polymeru. Následně Gilli (35) použil zařízení FTIR s technikou ATR (attenuated total reflectance) „útlum totálního odrazu“ pro zkoumání struktury nebo konformačních vlastností několika polysacharidů včetně HA, a to jak v pevném stavu, tak i ve vodném roztoku. Výhodou spektra vodného roztoku je potlačení zbytkového efektu krystalizace (36).

Jako příklad této metody je uveden experiment z roku 2006, kdy byl roztok HA s ultračistou vodou skenován pomocí FTIR spektroskopie s ATR technikou. Byly provedeny 3 skeny při teplotě 20 °C a vlnové délce 180 nm a 250 nm. Pro určení pozadí bylo provedeno 64 skenů při vlnovce mezi 4 000 a 400 cm^{-1} s rozlišením 4 cm^{-1} . Světelným zdrojem FTIR byl He-Ne laser o vlnové délce 632,8 nm a výkonu 3 mW (37).

V bakalářské práci (19) byla na základě předchozích studií stanovována koncentrace HA právě pomocí FTIR s ATR technikou. Měření bylo prováděno dvakrát. První měření bylo s roztoky v rozmezí koncentrací 0,25–0,4 %, které nebyly před samotným měřením zcentrifugovány. Druhé měření probíhalo po zcentrifugování vzorků, jejichž koncentrace byla v rozmezí 0,4–0,7 %. Měření probíhalo tak, že bylo nejprve změřeno spektrum pozadí, v tomto případě deionizované vody. Následně byly proměřeny vzorky samotné (19).

V prvním měření se nepodařilo získat dostatečné výsledky pro vytvoření kalibrační přímky. Spektra absorbancí při druhém měření vyšla lépe. Jak je vidět na obrázku (Obr. 11), byly zde znatelné vzrůstající píky, a proto mohly být vytvořeny kalibrační přímky při vlnovkách 1 083,798 cm^{-1} a 1 043,301 cm^{-1} . Díky tomu je tato metoda vhodná pro stanovení koncentrací HA v rozmezí 0,4–0,7 % (19).



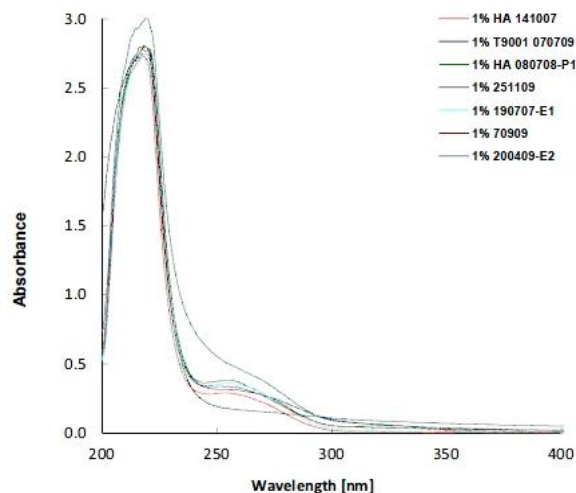
Obr. 11: Výsek z celkového spektra závislosti absorbance na vlnočtu u druhého měření, tedy u vyšších koncentrací vodných roztoků HA, z infračervené spektroskopie (19).

V této diplomové práci se k metodě stanovení pomocí FTIR s ATR technikou vrátíme a pokusíme se rozšířit naše poznání především v mezích detekce.

3.4.2 Metoda s využitím UV-VIS spektroskopie

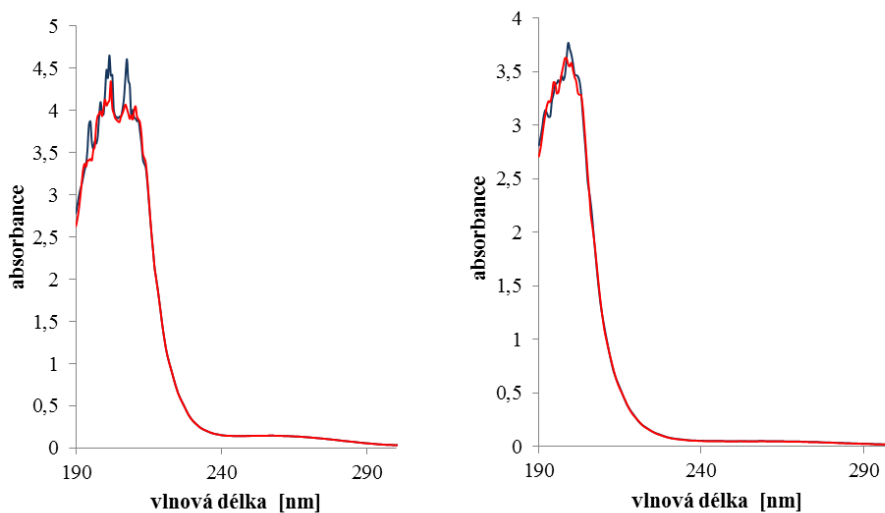
V knize z roku 2006, kterou napsal J.W. Kuo, je sepsána metoda, díky které lze stanovit koncentraci roztoku HA ve vodě pomocí UV-VIS spektroskopie. Čistá kyselina hyaluronová je sice bezbarvá, ale údaje získané z UV-VIS mohou nést určitou informaci o koncentraci vzorku. Jelikož má hyaluronan poměrně silnou UV absorbanci v okolí 220 nm, můžeme touto metodou použít pro kvantitativní rozbor čistého HA při UV spektroskopii (36).

V roce 2012 H. Bílerová (38) měřila 1% roztoky HA. Na obrázku (Obr. 12) se nachází výstup z UV-VIS spektrofotometru, kde píky při 220 nm korespondují s čistým hyaluronanem. Lokální píky při 260 nm poukazují na výskyt nečistot. Měření probíhalo pravděpodobně u předem zfiltrovaného roztoku HA na mikrometrovém filtru o velikosti pórů 0,22 při pH 7,0 (38).



Obr. 12: Graf závislosti absorbance na vlnové délce u různých roztoků, především 1% roztok HA v BPS (38).

V roce 2014 byly v bakalářské práci (19) zkoumány roztoky HA různých koncentrací pomocí UV-VIS. Absorpční spektra však při 220 nm nevykazovala žádný pík. Vyšší absorbance byla znatelná okolo 200 nm, ale znatelný pík byl s velkým šumem, jak je vidět na obrázku (Obr. 13). Přesto byla vytvořena kalibrační přímka z absorbancí při 220 nm. Tato kalibrační přímka byla lineární v rozmezí koncentrací HA 0,05–0,35 %. Dále bylo zjištěno, že 0,5 M NaCl neovlivňují stanovení (19).



Obr. 13: Příklady grafů absorpčního spektra u roztoků, vpravo 0,3% HA ve vodě a vlevo 0,05% HA ve vodě (19).

V této diplomové práci se budu dále zabývat tím, jak toto nespecifické stanovení mohou ovlivnit jiné látky, jako jsou tenzidy CTAB a septonex.

3.4.3 Metoda stanovení koncentrace HA pomocí Rayleighova rozptylu

Metoda s využitím Rayleighova rozptylu (Resonance Rayleigh scattering - RRS) poskytuje mnoho informací o studované látce, jako například informace o molekulární struktuře, velikosti, tvaru a rozložení náboje. Tato metoda byla úspěšně použita ke studiu agregace chromoforů u biologických makromolekul. Koncentrace HA se dá stanovit právě díky agregaci HA s chromoforem. V této metodě byla zvolena ethyl-violet (EV) (39).

Bylo zjištěno, že intenzita RRS je závislá na pH, koncentraci EV a HA, iontové síle a teplotě. Experiment byl tedy tvořen při pH 4,4–8,0 (Britton-Robinson pufr). Dále bylo prokázáno, že EV a HA mají sice velmi slabou intenzitu RRS, ale pokud je HA ve stopovém množství, tvoří díky elektrostatickým a hydrofobním silám s EV komplexy. RRS intenzita těchto komplexů je vyšší a objevuje se nové spektrum. Na základě tohoto jevu byla vyvinuta jednoduchá a vysoce citlivá RRS metoda pro stanovení HA, kdy intenzita RRS je přímo úměrná koncentraci HA (39).

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

Práce v laboratoři spočívala v ověřování vybraných nalezených metod pro stanovení koncentrace HA a jejich případném vylepšení. Poté byly tyto metody zkoumány i z hlediska možného ovlivnění výsledných spekter určitým tenzidem a dále byl zkoumán samotný vzorek supernatantu nad námi připraveným gelem. Celkem byly ověřeny čtyři metody, a to dvě s využitím alciánové modře, jedna s využitím FTIR a poslední s využitím měření UV spektra. Všechny metody se opírají o studie (*viz kapitola 3*) a také o výsledky, které byly naměřeny v mé bakalářské práci (BP) (19). Některé metody budou pouze pokračováním naměřených dat z již zmíněné BP.

Všechna procenta jsou uvedena v hmotnosti na objem roztoku (w/v). Veškeré vodné roztoky jsou připravovány v ultračisté deionizované vodě. U všech měření UV a viditelných spekter byl použit dvoupaprskový spektrofotometr Hitachi U-3900/3900H. Zásobní roztoky HA byly používány 24 hodin po namíchání, kdy byly po celých 24 hodin umístěny na míchače a poté byly skladovány v lednici. Všechny centrifugace, není-li uvedeno jinak, byly prováděny při 4 000 otáčkách po dobu 3 minut.

4.1 Metody využívající alciánovu modř

S pomocí alciánové modře byly zkoumány hned dvě metody. První metoda je pokračováním BP (19), kdy bylo vycházeno z experimentu E. W. Golda (24). Tato metoda však nevycházela podle očekávání, protože roztok alciánové modře v 0,5M octanu sodném byl příliš nestálý. Proto se v této práci budeme zabývat vylepšením této metody se dvěma variantami alciánové modře. Druhým stanovením je metoda, kterou jsme doposud nezkoušeli. Jedná se o srážecí metodu, kterou popsal C. B. Little a kol. (25).

4.1.1 Metoda dle E. W. Golda

E. W. Gold (24) pracoval s roztokem alciánové modři o koncentraci 1,4 mg/ml v 0,5M octanu sodného. Jelikož se nám zdál roztok příliš tmavý a výsledné absorbance byly příliš vysoké, rozhodli jsme se, že tuto koncentraci snížíme na polovinu a dále budeme studovat oba roztoky o koncentraci 1,4 mg/ml a 0,7 mg/ml. V BP jsme pracovali především s roztokem alciánové modři 8GX (AB). V této práci budeme používat i druhou variantu alciánové modře, a to pyridinovou variantu (ABp). Dále budeme také studovat, jak by v této metodě fungovala deionizovaná voda jako rozpouštědlo pro alciánovou modř.

Použité chemikálie:

- Hyaluronan sodný od firmy Contipro: 750–1 000 kDa (šarže: 214-7794)
- Alciánová modř 8 GX od spol. Sigma-Aldrich s.r.o. (šarže: 75881-23-1)
 $C_{56}H_{68}N_{16}S_4C_{14}Cu$

- Alciánová modř pyridinová varianta od spol. Sigma-Aldrich s.r.o.
 $C_{56}H_{40}C_{14}CuN_{12}$
- Octan sodný trihydrát p.a. od spol. Lach-Ner s.r.o. (šarže: PP/2008/12787)
 $C_2H_3NaO_2 \cdot 3H_2O$
- Karbethodeciniumbromid (Septonex) od firmy GNB chem,a.s. (šarže: 910SEP002)
 $C_{21}H_{44}BrNO_2$

4.1.1.1 Studium využití vody jako rozpouštědla pro alciánovou modř

1. Postup – stanovení stálosti roztoků AB a ABp

Nejprve byla stanovena stálost roztoků, a to tak, že byly namíchány 4 roztoky alciánové modře v deionizované vodě, tedy roztoky AB a ABp o koncentracích 0,7 mg/ml a 1,4 mg/ml. U těchto roztoků byla proměřena absorbance na spektrofotometru Hitachi v rozmezí vlnových délek 400–700 nm, a to každých 5 minut po dobu jedné hodiny a poté po 14 dnech. Jako slepý vzorek byla použita deionizovaná voda.

2. Postup – stanovení stálosti roztoků AB a ABp s HA

Dále byly znovu připraveny vzorky barviva AB a ABp o koncentraci 0,7 mg/ml s přídatkem 0,03% roztoku HA (2,4 ml roztoku barviva + 0,2 ml HA) přímo do plastové měřicí kyvety. Takto připravené vzorky jsme 10 s mixovali na vortexu. Následně měla být proměřena absorbance, abychom zjistili, jak moc jsou tyto vzorky stabilní. Jelikož se však ve vzorcích objevily sraženiny, byly oba vzorky centrifugovány a teprve poté byla proměřena jejich absorbance na spektrofotometru Hitachi v rozmezí vlnových délek 400–700 nm. Centrifugace byla provedena po 15 minutách reakce roztoku barviva s HA. Dále byly supernatanty vzorků měřeny po 5 minutách po dobu 25 minut, abychom zjistili, zda nenastane v roztocích změna. Jako slepý vzorek byla použita deionizovaná voda.

3. Postup – kalibrační roztoky

Následně byla vytvořena kalibrační řada roztoků HA ve vodě (0,01%, 0,03%, 0,05%, 0,07%, 0,08%). Každý roztok z kalibrační řady jsme postupně nechali reagovat s roztoky barviva AB a ABp o koncentraci 0,7 mg/ml v poměru 2,4 ml barviva + 0,2 ml roztoku HA. U všech takto vytvořených roztoků z kalibrační řady byla změřena absorbance. Jako slepý vzorek byla použita voda.

4.1.1.2 STUDIUM S VYUŽITÍM OCTANU SODNÉHO JAKO ROZPOUŠTĚDLA PRO ALCIÁNOVOU MODŘ

Postup stanovení:

1. Postup – stanovení stálosti roztoků AB a ABp

Nejprve byla stanovena stálost roztoků, a to tak, že byly namíchány čtyři roztoky alciánové modře. Roztoky AB a ABp o koncentracích 0,7 mg/ml a 1,4 mg/ml v 0,5M octanu sodném, dále jen (OcS). Roztok octanu sodného byl připraven v deionizované vodě čerstvě před samotnou přípravou roztoků AB a ABp. U těchto roztoků byla proměřena absorbance na spektrofotometru Hitachi v rozmezí vlnových délek 400–700 nm, a to každých 5 minut po dobu jedné hodiny. Jako slepý vzorek byl použit 0,5M roztok octanu sodného. Jelikož se po určité době objevily u všech roztoků sraženiny, byly tyto roztoky zcentrifugovány (4 000 ot. po dobu 3 minut) a poté byla po 5 minutách proměřena absorbance supernatantů. U roztoků AB 15 minut a u roztoků ABp pouze 10 minut. Měření probíhalo v rozmezí vlnových délek 400–700 nm.

2. Postup – stanovení stálosti roztoků AB a ABp s HA

Dále byl k zcentrifugovaným roztokům AB přidán 0,03% roztok HA v poměru 0,3 ml barviva a 0,2 ml HA. Znovu byla proměřena absorbance v čase $t = 0$ a 5 minut na spektrofotometru Hitachi v rozmezí vlnových délek 400–700 nm, abychom zjistili, jak se tento roztok chová s přidavkem HA. Jelikož se barvivo s HA začalo ihned srážet, byly tyto roztoky centrifugovány a znovu byla proměřena jejich absorbance v čase $t = 0$ a 5 minut.

3. Postup – stanovení ideální reakční doby roztoků AB a ABp s HA

Abychom zjistili, jestli reakční doba HA s barvivem ovlivňuje stabilitu či konečné výsledky absorpčních spekter, byl z části každého čerstvě připraveného pracovního roztoku AB nebo ABp (dále jen PRAB a PRABp) o koncentraci 0,7 mg/ml v roztoku 0,5M OcS připraven jeden vzorek s 0,03% HA (2,4 ml roztoku AB nebo ABp a 0,2 ml HA). Tyto dva vzorky a připravené roztoky byly míchány po dobu 17 hodin. Po této době byly znovu připraveny vzorky s 0,03% HA z roztoků AB a ABp. Tímto jsme vytvořili celkem 4 vzorky (dva před 17 hodinami a dva poté), které jsme zcentrifugovali (4000 otáček po dobu 3 min.). Poté byla změřena absorbance (v rozmezí 400–700 nm) supernatantů a původních roztoků AB a ABp po 17 hodinách. Jako slepý vzorek byl použit 0,5M roztok OcS.

4. Postup – kalibrační roztoky

Dále byla vytvořena kalibrační řada vzorků HA (0,01%, 0,03%, 0,05%, 0,07%, 0,08%). Tuto kalibrační řadu jsme nechali reagovat s PRABp vytvořeným v předchozím bodě, (tedy 17 hodiny starým roztokem) v poměru 2,4 ml PRABp + 0,2 ml roztoku HA. U všech takto vytvořených roztoků z kalibrační řady byla změřena absorbance. Jako slepý vzorek byl použit 0,5M roztok OcS.

Pozn. ABp se špatně rozpouští v roztoku octanu sodného, proto byl roztok ABp míchán na míchačce s ohřevem po dobu 40 minut s nastavením na 40 °C.

5. Postup – stanovení stálosti roztoku PRABp

Poté bylo provedeno stanovení stability PRABp v čase, a to proměřením absorpčních spekter supernatantu (centrifugace 2,6 ml PRABp) po určitých časech.

6. Postup – určení vlivu molekulové hmotnosti a stáří HA na stanovení pomocí PRABp

Následně byly proměřeny roztoky HA o různé molekulové hmotnosti a stáří v návaznosti na zjištění, zda nedojde k ovlivnění průběhu kalibrační přímky. Absorpční spektra byla tedy proměřena u roztoků HA o koncentraci 0,05 % o molekulových hmotnostech (130–300; 300–500; 750–1 000; 1 500–1 750 kDa) a u roztoků HA o standardní molekulové hmotnosti 750–1000kDa, jejichž stáří bylo 2, 17 a 108 dní.

7. Postup – kalibrační roztoky (rozšířené)

Po tomto stanovení byla znovu proměřena spektra kalibračních vzorků, tentokrát však tato řada byla rozšířena o krajní koncentrace (tedy celá koncentrační řada obsahovala roztoky o koncentracích: 0,1; 0,08; 0,07; 0,05; 0,04; 0,02; 0,01; 0,005; 0,0025; 0,001 %) pro zjištění mezi stanovení. S ohledem na to, abychom zjistili směrodatnou odchylku tohoto stanovení, byla tato řada připravena a proměřena s PRABp celkem třikrát. Vyhodnocení bylo provedeno v programu TriloByte QC. Expert 3.3. funkcí lineární regrese. Výsledný graf byl doplněn chybovými úsečkami v programu microsoft excel 2013, které byly vytvořeny pomocí funkce směrodatné odchylky (Smodch. výběr).

8. Postup – stanovení vlivu tenzidu na stanovení pomocí PRABp

Dále byl stanoven vliv tenzidu při použití této metody. V našem případě jsme zvolili septonex, jelikož tento tenzid je na této fakultě hojně využíván k přípravě antiseptických gelů s HA. Právě pro analytický rozbor těchto gelů jsou zkoumány tyto metody stanovení koncentrace HA.

Byla tedy vytvořena kalibrační řada roztoku septonexu v 0,15M NaCl (o koncentracích 0,5; 10; 50 a 200 mM), která byla proměřena stejně jako roztoky HA v předchozích bodech, tedy s PRABp. Roztok septonexu byl připraven v 0,15M NaCl proto, jelikož gely jsou připravovány právě v tomto roztoku z důvodu zajištění vyšší iontové síly, a v tomto případě i gelace.

Pro vytvoření kalibrační přímky roztoků septonexu a zjištění standardní chyby jsme si znovu vytvořili širší sadu roztoků septonexu, tentokrát ve vodě, a to o koncentracích (0,5; 5; 10; 50; 150; 200 mM). Všechny tyto roztoky byly smíseny s PRABp třikrát a dále jsme pokračovali stejně jako u předchozích stanovení.

9. Postup – stanovení vzorku SG

Dále byl také pro porovnání vytvořen vzorek gelu. Ten byl připraven smícháním 2 ml 200 mM roztoku septonexu s 1 % roztokem HA. Oba tyto roztoky byly připraveny v 0,15M roztoku NaCl. Dále byl tento vzorek vortexován po dobu 15 sekund, poté byl centrifugován

po dobu 10 minut při 4 000 otáčkách a nakonec byl od gelu oddělen supernatant (SG), který jsme dále stanovovali stejnou metodou jako septonex samotný (s PRABp).

4.1.2 Metoda stanovení koncentrace HA dle C. B. Little a kol.

C. B. Little a kol. (25) vyvinuli metodu, pomocí které lze kvantitativně stanovit množství jak HA, tak sulfátových glykosaminoglykanů v roztoku, který obsahuje obojí. Princip testu je založen na vysrážení HA s určitým množstvím barviva z pracovního roztoku. U tohoto pracovního roztoku s úbytkem barviva je měřeno absorpční spektrum, které využívá na rozdíl od Golda maximum absorpčního spektra. Kalibrační křivka byla vytvořena z absorbance při vlnové délce 620 nm, což odpovídá maximu nejvyššího píku. Toto stanovení využívá rozpuštění alciánové modře 8GX (AB) v etanolu. V této práci jsme chtěli vyzkoušet i druhou variantu této modře (ABp), ale jelikož se v etanolu velmi špatně rozpouští, od této varianty stanovení jsme nakonec upustili. Následně jsme tuto metodu vyzkoušeli bez etanolu, čili jsme pracovní roztok vytvořili pomocí rozpuštění AB a ABp v octanu sodném. Toto stanovení se liší od toho Goldova především přidávkem $MgCl_2$.

Toto stanovení by mohlo být vhodnějším řešením než předchozí s PRABp, jelikož má být citlivé, jak je patrné ze článku (25), v roztocích obsahujících 0 až 200 mg/dl HA, což odpovídá 0 až 0,02% roztoku HA. V našem stanovení jsme však proměřili kalibrační řadu až do 0,1% roztoku HA. Díky takto nízkým mezím stanovení bychom mohli odhadnout koncentraci HA ve vzorku supernatantu nad stanovovaným gelem.

Použité chemikálie:

Chemikálie v tomto stanovení jsou stejné jako u předchozí metody dle Golda a navíc zde máme ještě chemikálie popsané níže.

- Chlorid hořečnatý hexahydrát p.a. od spol. Lach-Ner s.r.o (šarže: 30601 0503)
 $MgCl_2 \cdot 6H_2O$
- Absolutní etanol 100% od firmy VWR International S.A.S (šarže:15F180515)

4.1.2.1 Etanol jako rozpouštědlo pro alciánovou modř

Postup stanovení

Jelikož všechny roztoky pro tuto metodu byly v původním článku připravované v roztoku PBSS, taktéž i my jsme všechny roztoky takto připravovali. Proto jsme nestanovovali koncentraci HA ve vodě, ale ve fosfátovém pufru (dále jen PBSS). Nejprve byl připraven roztok 0,1% HA v PBSS, který jsme nechali 24 hodin míchat, po této době byl roztok rozředěn v PBSS na kalibrační řadu o koncentracích (0,001; 0,0025; 0,005; 0,0075; 0,01; 0,02; 0,03; 0,05; 0,07 a 0,1 %).

Pro přípravu pracovního roztoku byla použita alciánová modř 8GX, která byla rozpuštěná ve 100% etanolu tak, aby výsledný roztok alciánové modře v etanolu (dále jen ABE) byl 2%. Tento roztok může být podle článku předpřipravený o tři týdny před samotným stanovením.

Další roztok, který byl připraven, byl 0,5M octan sodný právě v roztoku PBSS a dalším vzorkem byl 1M MgCl₂, taktéž v PBSS. Pracovní roztok (dále jen PRAB) byl vytvořen smícháním roztoků v objemovém poměru roztok octanu sodného : ABE : roztok MgCl₂ (18:1:1). Takto vytvořený PRABe ve fosfátovém pufru byl dále přidáván k předem připravené kalibrační řadě roztoků HA.

Příprava vzorku k vlastnímu stanovení absorpčního spektra byla následující: Do entrifugačních zkumavek bylo napipetováno 200 µl vzorku roztoku HA (v PBSS) + 1 ml pracovního roztoku. Takto připravené vzorky byly 30 sekund vortexovány a následně byly na 15 minut postaveny na míchačku. Poté byly tyto vzorky zcentrifugovány, tentokrát 3 000 otáček po dobu 3 minut. Ze zcentrifugovaných vzorků bylo odebráno 500 µl supernatantu do předem připravených čistých a suchých vialek. Do těchto vialek byly dále přidány 3 ml PBSS pro naředění stávajícího supernatantu, aby výsledná absorpční spektra měla nižší absorbanci. Tyto výsledné roztoky byly vortexovány 15 sekund a poté nechány 5 minut stát v pokojové teplotě 20 °C. U takto připravených roztoků kalibrační řady byla dále měřena absorbanční spektra. Kalibrační přímka byla sestavena z absorbancí při vlnové délce 620 nm. Jako slepý vzorek jsme zde zvolili PBSS.

Tato metoda byla opakována s tím, že všechny vzorky HA a veškeré roztoky pro přípravu PRABe byly připravené ve vodě a nikoli ve fosfátovém pufru. To z toho důvodu, že se zajímáme především o stanovení koncentrace HA právě ve vodném roztoku. Jako slepý vzorek u měření absorpčních spekter roztoků byla v tomto stanovení použita deionizovaná voda.

4.1.2.2 Octan sodný jako rozpouštědlo pro alciánovou modř

Jelikož se nám nepodařilo dosáhnout výsledků a citlivosti, jak uvádí článek (25), rozhodli jsme se, že celé stanovení provedeme ještě jednou s tím rozdílem, že AB nebudeme rozpouštět v etanolu, ale v octanu sodném. Dále jsme při této obměně vyzkoušeli i druhou variantu alciánové modře (ABp), a to díky tomu, že se v octanu na rozdíl od etanolu rozpouští lépe.

Postup stanovení:

Tento postup je stejný jako v předchozím bodě (přípravy s PBSS), s výjimkou přípravy roztoku AB, který nebyl rozpuštěn v etanolu, ale v 0,5M octanu sodném. Pracovní roztok byl tedy připraven smícháním jednoho mililitru 1M MgCl₂ a 19 mililitrů roztoku AB v octanu sodném. Koncentrace AB byla zvolena tak, aby výsledná koncentrace v pracovním roztoku byla stejná jako u předchozího stanovení, tedy 0,1% AB ve výsledném pracovním roztoku (dále jen PRABo).

S pomocí tohoto PRABo, který byl přidán k předem připravené kalibrační řadě roztoků HA o koncentracích (0,002 5; 0,005; 0,01; 0,03; 0,07 %), byla stanovena jejich spektra a dále byla snaha o vytvoření kalibrační přímky ze zvolené absorbance.

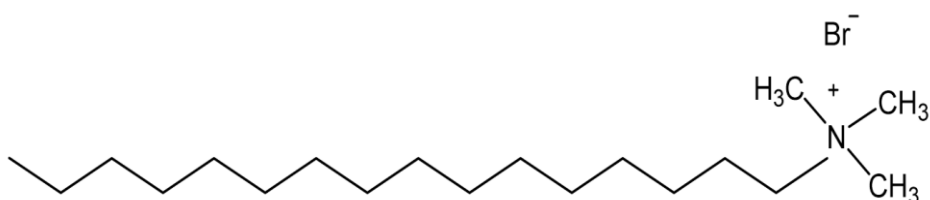
Tento postup byl znovu zopakován s tím rozdílem, že AB byla zaměněna za ABp, čímž vznikl pracovní roztok PRABpo.

4.2 UV-VIS spektroskopie

Experiment byl proveden k doplnění informací, jelikož nevíme, jaký vliv má na stanovení (*kapitola 3.4.2*) centrifugace roztoků HA, molekulová hmotnost HA a také jak by mohla stanovení ovlivnit případná existence tenzidů, v našem případě CTAB a septonexu.

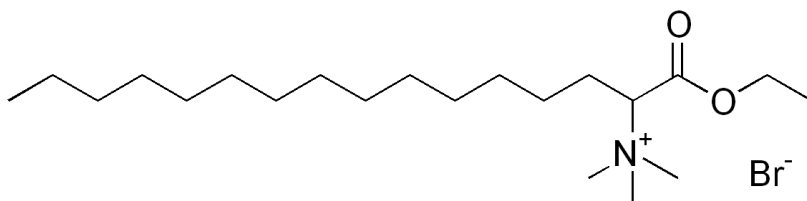
Použité chemikálie:

- Hyaluronan sodný od firmy Contipro: 15–30 kD (šarže: 213-6481)
100–300 kDa (šarže: 214-7794)
750–1 000 kDa (šarže: 214-7794)
1 500–750 kDa (šarže: 213-5226)
- Cetyltrimethylammonium bromid (CTAB)
 $C_{19}H_{42}BrN$



Obr. 14: Chemická struktura cetyltrimethylammoniumbromidu (CTAB).

- Karbethopendeciniumbromid (Septonex) od firmy GNB chem,a.s. (šarže: 910SEP002)
 $C_{21}H_{44}BrNO_2$



Obr. 15: Chemická struktura karbethopendeciniumbromidu (Septonex).

Postup stanovení:

Abychom zjistili, jestli stanovení koncentrace HA s využitím měření UV spektra neovlivňuje její molekulová délka, bylo provedeno měření absorbance v UV oblasti u roztoků z různou molekulovou délkou. Dále byla provedena centrifugace pro zjištění vlivu rozpuštěných plynů ve vzorku. Stejně měření bylo provedeno i u vodných roztoků CTAB a septonexu.

1. Postup – určení vlivu molekulové hmotnosti HA na stanovení

Připravili jsme vodné roztoky HA o různých molekulových hmotnostech (15 kDa, 100 kDa, 750 kDa a 1,5 MDa) o koncentraci 0,1 %. U těchto roztoků byla proměřena absorbance na přístroji Hitachi v rozmezí vlnových délek (190–400 nm). Následně byly tyto roztoky zcentrifugovány (3 min 4000 ot.) a znovu došlo k proměření jejich absorbance.

2. Postup – určení vlivu tenzidů na stanovení

Byly připraveny vodné roztoky CTAB a septonexu o různých koncentracích: 10 mM, 0,5 mM, 0,2 mM a 0,1 mM. U těchto roztoků byla proměřena absorbance na spektrofotometru Hitachi v rozmezí vlnových délek (190–400 nm). Poté byly roztoky centrifugovány a znovu proměřeny.

3. Postup – metoda standardního přídatku

Následně byla provedena metoda standardního přídatku, kdy do vzorku SG byl pipetován stejný objem kalibračních koncentrací HA. Tato metoda byla zvolena proto, aby septonex, který se pravděpodobně v SG vyskytuje a ovlivňuje stanovení HA, vnesl do celého stanovení standardní chybu, a tím jsme mohli určit skutečnou koncentraci HA.

Byly tedy připraveny 4 standardní přídatky HA o koncentracích (0,02; 0,04; 0,06; 0,8 %) a tyto přídatky byly přidávány ke stanovovanému vzorku v poměru 1:1. Poté byla u těchto vzorků proměřena absorbance v oblasti UV.

4.3 Infračervená spektroskopie s využitím ATR techniky

V bakalářské práci jsme se tímto stanovením zabývali též. Absorpční spektra koncentrací byla proměřena v rozmezí 0,4–0,8% HA. Jelikož jsme vyšší koncentrace neproměřovali a nižší koncentrace byly sice proměřeny, ale před samotným měřením nebyly, na rozdíl od ostatních vzorků, centrifugovány, byla mez stanovení koncentrace HA u těchto kalibračních vzorků stanovena právě na rozmezí koncentrací 0,4–0,8% HA s pravděpodobností, že by mohla tato metoda být především vhodná pro vyšší koncentrace.

Na základě tohoto stanovení jsme se rozhodli rozšířit kalibrační řadu roztoků a proměřit i nižší koncentrace, které sice v BP do kalibrační přímky nezapadaly, ale to mohlo být způsobeno právě nezcentrifugováním roztoků. Proto námi rozšířená kalibrační řada roztoků HA bude zcela zcentrifugována. Dále bylo naším cílem proměřit absorpční spektra kalibračních roztoků tenzidu a také změřit absorpční spektrum u vzorku SG.

Použité chemikálie:

- Hyaluronan sodný od firmy Contipro: 750–1 000 kDa (šarže: 214-7794)
- Karbethodeciniumbromid (Septonex) od firmy GNB chem,a.s. (šarže: 910SEP002)
 $C_{21}H_{44}BrNO_2$

Postup stanovení:

Byla připravena kalibrační řada roztoků HA o koncentracích (0,005; 0,01; 0,02; 0,04; 0,06; 0,08; 0,1; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 a 1 %) v deionizované vodě. Tato kalibrační řada byla naředěna z předem (den míchání) připraveného roztoku HA o koncentraci 1%. Obdobně byla připravena i kalibrační řada roztoků septonexu (také v deionizované vodě) o zastoupení koncentrací (0,5; 5; 10; 50; 150 mM). Do centrifugačních zkumavek byly odpipetovány 2 ml od každého roztoku HA, septonexu i vzorku SG, poté byly zcentrifugovány po dobu 3 minut při 4 000 otáčkách.

Zcentrifugované vzorky byly postupně proměřeny na FTIR spektrofotometru s ATR technikou. Nejprve bylo změřeno spektrum pozadí tak, že bylo na ATR krystal (technický diamant) kápnuto 200 μ l, v našem případě, deionizované vody tak, aby byl vzorek v dokonalém kontaktu s tímto krystalem s ohledem na dostatečný průnik záření ve formě evalescentní vlny do vzorku. Následně bylo proměřeno absorpční spektrum v rozmezí vlnočtů 4 000–0 cm^{-1} . Po proměření pozadí byla z krystalu setřena voda buničitou vatou a následně byl krystal očištěn ethanolem. Měření kalibračních řad HA, septonexu a vzorku SG probíhalo obdobně.

Velmi důležité je, aby byly roztoky před stanovením odstředěny, abychom docílili co nejmenší koncentrace rozpuštěných plynů v stanovovaném vzorku, protože tyto plyny mohou zkreslovat spektrum, a to především méně koncentrovaných vzorků.

5 VÝSLEDKY A DISKUZE

5.1 Metody využívající alciánovou modř

5.1.1 Metoda dle E. W. Golda

5.1.1.1 Studium využití vody jako rozpouštědla pro alciánovou modř

1. Stanovení stálosti roztoků AB a ABp

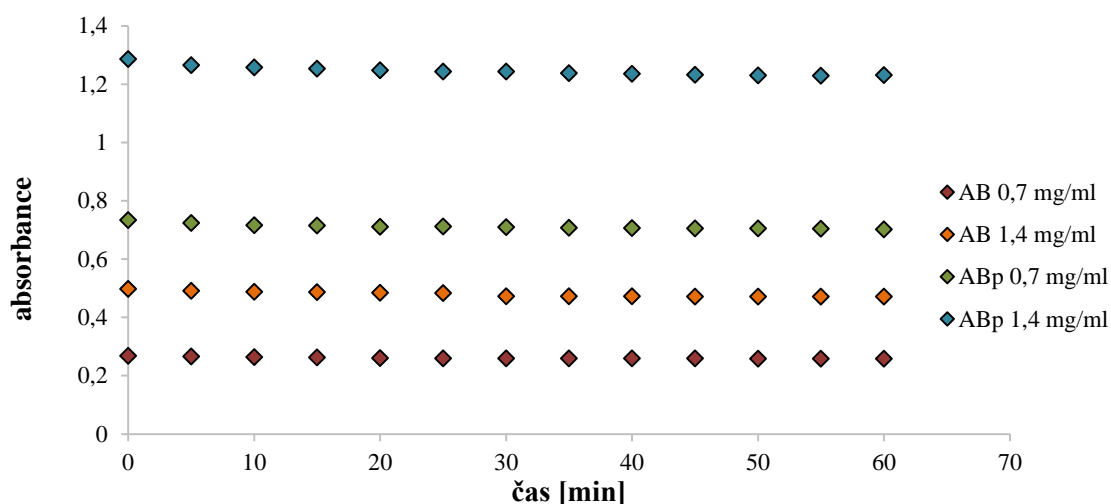
Oba vodné roztoky (AB a ABp) byly po namíchání modré a čiré, viz (Obr. 16). AB se ve vodě rozpouští velmi dobře na rozdíl od ABp, která se nepodařila ani při opakovaném zahřívání a třepání dokonale rozpustit a vždy zůstaly malé krystalky na dně vialky. Díky naměřené absorbanci obou roztoků můžeme konstatovat, že roztoky zůstávají stabilní nejen po dobu jedné hodiny, jak je vidět na grafu (Obr. 17), ale i po 14 dnech, jelikož je jejich absorbance stále stejná a v čase se nemění.

2. Stanovení stálosti roztoků AB a ABp s HA

Dále byly používány pouze roztoky o koncentraci 0,7 g/ml, jelikož mají nižší absorbanci (pod 1). Do těchto roztoků byla přidána 0,03% HA v poměru: 2,4 ml roztoku barviva + 0,2 ml roztoku HA. Jelikož se v roztocích hned po přidání roztoku HA objevily cucky, staly se roztoky obtížně měřitelné a z tohoto důvodu bylo nutné roztok centrifugovat. Po centrifugaci byl supernatant stále namodralý, proto mohlo být změřeno jeho absorpční spektrum. Z grafu (Obr. p. 1) vyplývá, že žádná změna v roztoku nenastává, a to je způsobeno tím, že veškerá HA byla vysrážena ve formě sraženin (komplexů) a dále byla oddělena centrifugací. V roztoku tedy nadále nemá co reagovat.



Obr. 16: Vlevo roztok AB a vpravo roztok ABp (roztoky o koncentraci 0,7 mg/ml ve vodě).

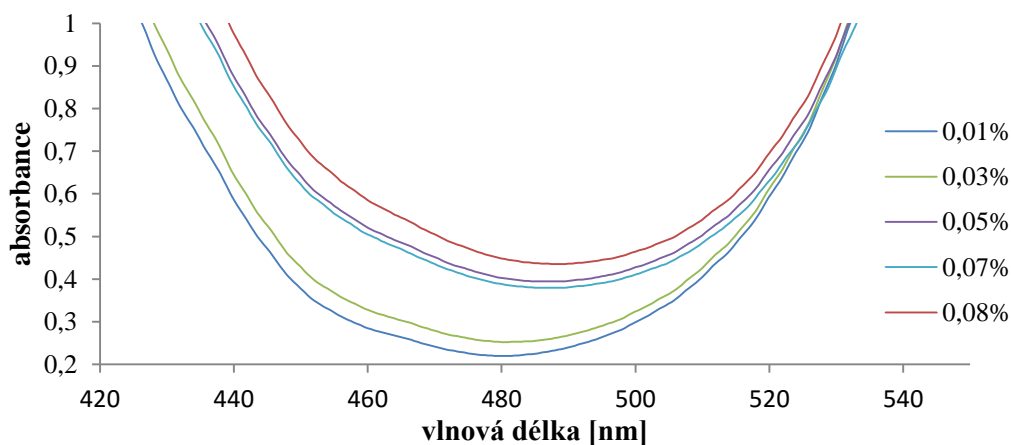


Obr. 17: Graf závislosti absorbance (při 480 nm) na čase u vodných roztoků AB a ABp o koncentraci 0,7 mg/ml a 1,4 mg/ml.

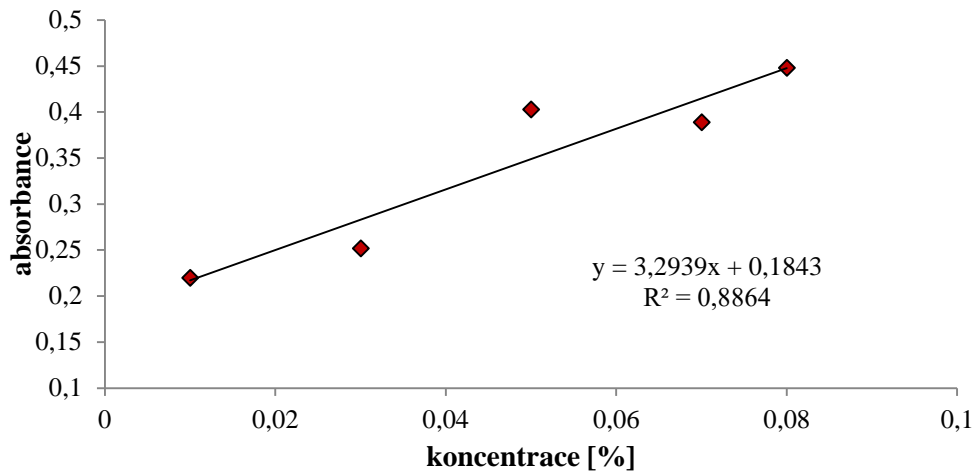
3. Kalibrační roztoky

Po proměření absorpčních spekter roztoků HA (0,01%, 0,03%, 0,05%, 0,07%, 0,08%) s roztoky AB a ABp o koncentraci 0,7 mg/ml byla snaha o vytvoření kalibračních přímek. Na grafu (Obr. 18) vidíme křivky koncentrační řady roztoků HA s vodným roztokem AB. Už z tohoto grafu je patrné, že kalibrační řada nebude vycházet lineárně. Přesto jsme kalibrační přímkou vytvořili, a to z absorbancí při 480 nm (dle Golda) viz graf (Obr. 19). Z tohoto grafu lze usoudit, že tato metoda nebude vhodná pro stanovení koncentrace HA.

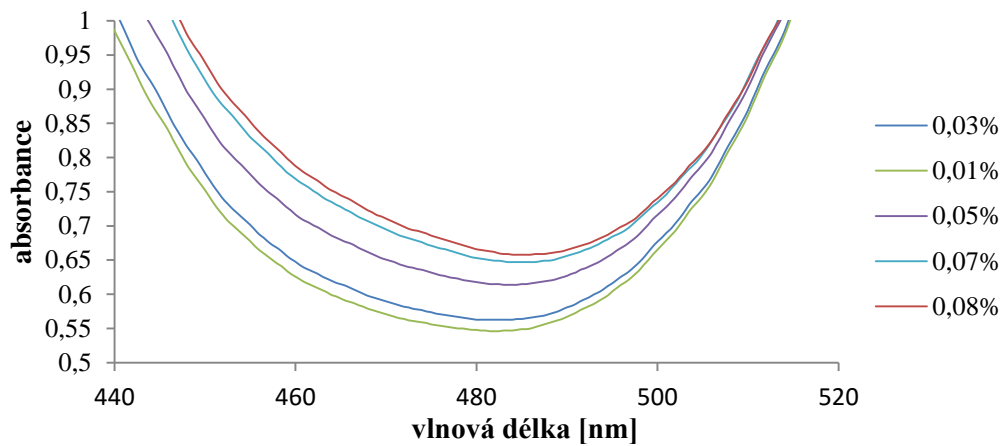
Dále byl vytvořen stejný graf (jako u roztoku AB) pro roztok ABp, viz graf (Obr. 20). V tomto grafu si můžeme všimnout, že kalibrační řada bude vycházet lineárně, avšak záleží na vhodném vybrání vlnové délky pro vytvoření kalibrační přímkou, protože křivky ubíhají k jedné straně natolik, že dochází u některých z nich k protnutí. V našem experimentu byla vybrána vlnová délka 480 nm (dle Golda) viz graf (Obr. 21). Při této vlnové délce vychází kalibrační řada vcelku lineárně, ale hodnota spolehlivosti $R^2 = 0,974$ pro správné stanovení koncentrace HA by měla být vyšší.



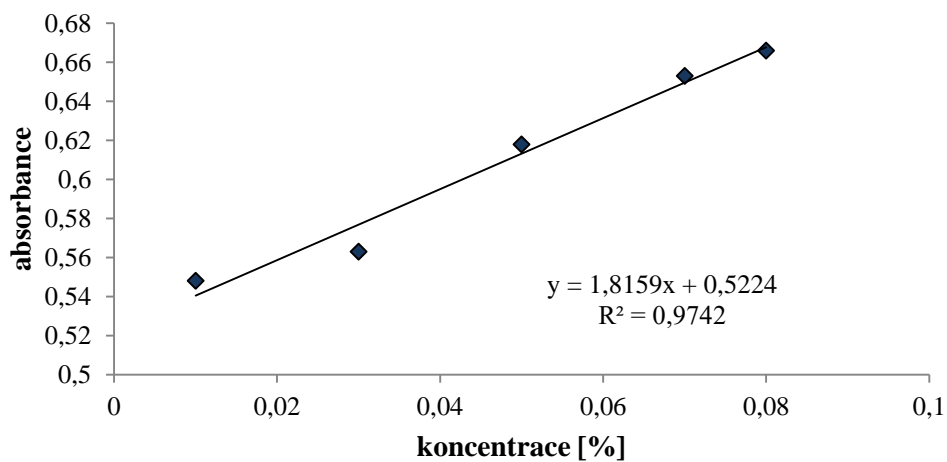
Obr. 18: Graf absorpčních spekter vodných roztoků AB (0,7 mg/ml) s různými koncentracemi HA (viz legenda).



Obr. 19: Graf závislosti absorbancí na koncentracích roztoků HA s roztokem AB (0,7 mg/ml) po centrifugaci při 480 nm (proloženo lineární regresí).



Obr. 20: Graf absorpčních spekter vodných roztoků ABp (0,7 mg/ml) s různými koncentracemi HA (viz legenda).



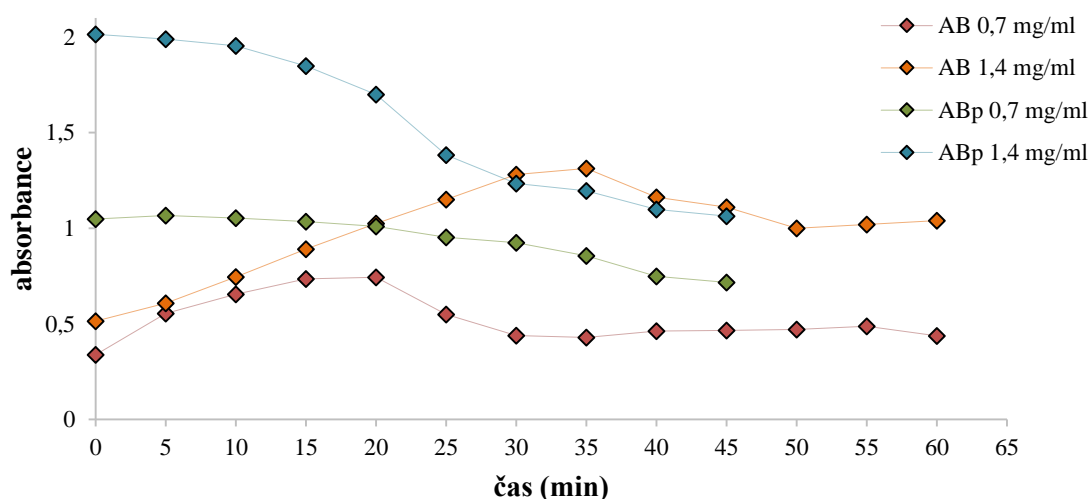
Obr. 21: Graf závislosti absorbancí na koncentracích roztoků HA s roztokem ABp (0,7 mg/ml) po centrifugaci při 480 nm (proloženo lineární regresí).

5.1.1.2 Studium s využitím octanu sodného jako rozpouštědla pro alciánovou modř

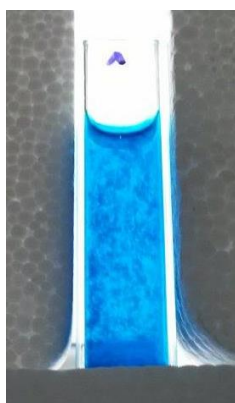
1. Stanovení stálosti roztoků AB a ABp

Při studii stálosti 4 roztoků (AB a ABp o koncentracích 0,7 mg/ml a 1,4 mg/ml) v 0,5M octanu sodném bylo zjištěno, že jsou tyto roztoky velmi nestálé. Z grafu absorbancí při 480 nm (Obr. 22) je patrné, že se roztoky v čase mění. U absorbancí roztoků AB je vidět, že s časem se zvyšují až do určitého bodu, kde nastává zlom a absorbance začne klesat. U roztoku AB $c = 0,7$ mg/ml je viditelný zlom v 20. minutě, to je způsobeno vznikajícími sraženinami (Obr. 23). U roztoku s vyšší koncentrací (AB $c = 1,4$ mg/ml) byl tento zlom pozorován až v 35. minutě. U výsledků absorbancí roztoků ABp je vidět, že u roztoku koncentrací 1,4 mg/ml je viditelná malá odchylka, ale u roztoku o koncentraci 0,7 mg/ml žádný posun nevidíme. Také při vizuálním stanovení nebyly identifikovány sraženiny jako u roztoků AB, ale roztok byl pouze zakalený.

Z důvodů vytvoření sraženin a zákalu byly všechny čtyři roztoky zcentrifugovány.



Obr. 22: Graf závislosti absorbancí na čase při vlnové délce 480 nm u roztoků (AB a ABp) o koncentracích 0,7 mg/ml a 1,4 mg/ml v 0,5M octanu sodném.



Obr. 23: Roztok AB $c = 0,7$ mg/ml po 20 minutách reakce v 0,5M octanu sodném.

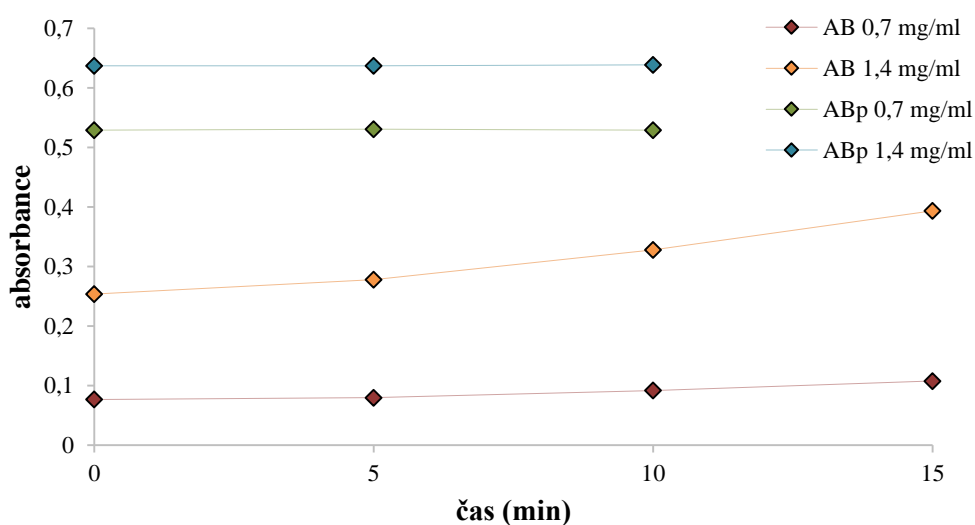
Díky tomu, že po centrifugaci byly supernatanty roztoků stále namodralé (Obr. 24), jak je vidět na obrázku, mohla být proměřena absorbance (opět v čase). Z grafu (Obr. 25) je očividné, že roztoky ABp jsou po centrifugaci stabilní, kdežto u roztoků AB absorbance stále roste. Vizualně však roztoky neprojevovaly žádné změny.

2. Postup – stanovení stálosti roztoků AB a ABp s HA

Po přidání 0,03% vodného roztoku HA k zcentrifugovaným roztokům bylo zjištěno, že tento roztok není stabilní, jelikož HA začalo s roztokem barviva hned reagovat ve formě vysrážených vloček. Proto byly roztoky opět centrifugovány. Po proměření takto připravených vzorků bylo zjištěno, že tyto roztoky jsou stabilní po dobu nejméně 15 minut. Proto jsme došli ke stanovisku, že po centrifugaci roztoků by mohla být stanovena koncentrace HA.



Obr. 24: Vlevo roztok AB 1,4 g/ml a vpravo roztok AB 0,7 g/ml v 0,5M octanu sodném po centrifugaci.



Obr. 25 Graf závislosti absorbancí na čase při vlnové délce 480 nm u roztoků (AB a ABp o koncentracích 0,7 mg/ml a 1,4 mg/ml) v 0,5M octanu sodném po centrifugaci.

3. Stanovení ideální reakční doby roztoků AB a ABp s HA

Roztoky AB a ABp ($c = 0,7\text{mg/ml}$) byly zakalené hned po namíchání. Po 17 hodinách byl roztok ABp stále celý zakalený, kdežto roztok AB se začal rozdělovat, jak je patrné z obrázku (Obr. 26). Z tohoto důvodu byly oba roztoky roztřepány ještě před pipetováním do vzorků HA.

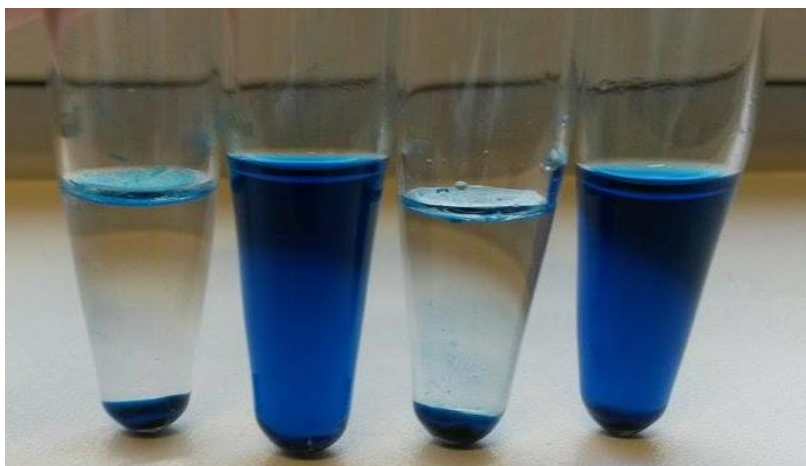
Po centrifugaci 4 vzorků (AB a ABp s 0,03% HA, po 17 hodinách a 40 minutách reakce) bylo zjevné, že u vzorků s AB se vysrážel HA s veškerým barvivem, jak je vidět na obrázku (Obr. 27). Jelikož supernatant zůstal čirý, byla absorbance zjištěna pouze orientačně a změřen byl pouze vzorek, který reagoval s HA 40 minut. Absorbance vzorků s AB byly po centrifugaci rovné nule, proto jsme s touto variantou modře dále nepracovali. S ABp byly i po centrifugaci supernatanty vzorků stále modré, proto byla proměřena absorbance u obou vzorků, jak u vzorku ABp s HA, které reagovaly 17 hodin, tak u vzorku ABp s HA, které reagovaly 40 minut. U každého z těchto vzorků byla ještě dvakrát proměřena absorbance v čase, aby bylo dokázáno, že je supernatant stabilní. Z grafu (Obr. 28) je zřejmé, že vzorek s ABp po centrifugaci je stabilní po minimální dobu 30 minut, jelikož se spektra absorbancí po tuto dobu stále překrývají. Díky stabilitě tohoto vzorku jsme přešli k vytvoření kalibrační řady roztoků HA.

4. Kalibrační roztoky

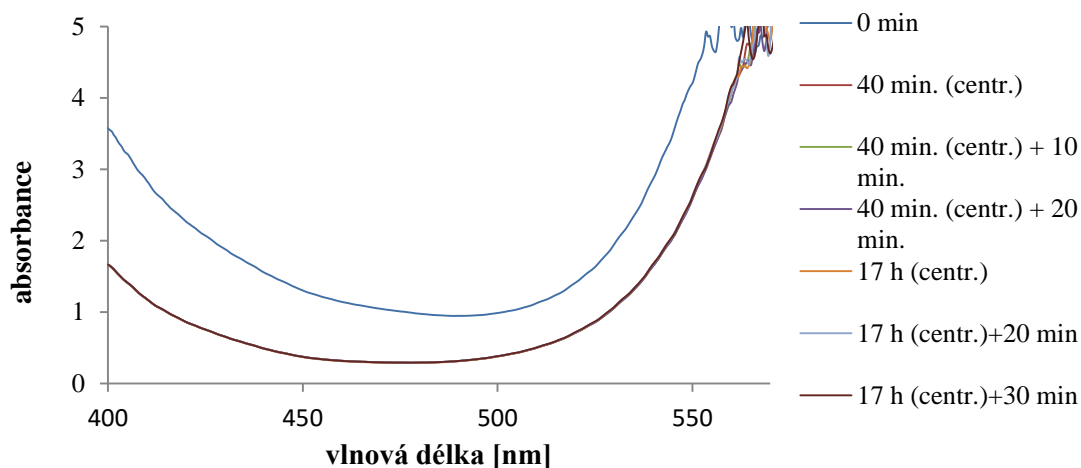
Kalibrační přímka byla vytvořena z absorbancí roztoků HA ($c = 0,01\%$, $0,03\%$, $0,05\%$, $0,07\%$, $0,08\%$) při vlnové délce 480 nm (dle Golda). Byla vynechána poslední koncentrace ($0,08\%$ HA), jelikož bychom dostali nelineární kalibrační řadu, viz grafy (Obr. 29, Obr. 30). Z hodnoty spolehlivosti kalibrační přímky $R^2 = 0,9999$ lze říci, že kalibrační řada při použití této metody je velice spolehlivá, jelikož se hodnota velmi blíží jedné. V grafu (Obr. 29) je na křivce absorpčních spekter patrný malý pík při vlnové délce 515 nm. Při této vlnové délce byla vytvořena kalibrační řada, která byla také lineární. Tento pík by mohl být jako specifický pro tuto metodu, nicméně ho musíme brát s rezervou, jelikož u předchozího měření, viz (Obr. 28), není tento pík znám.



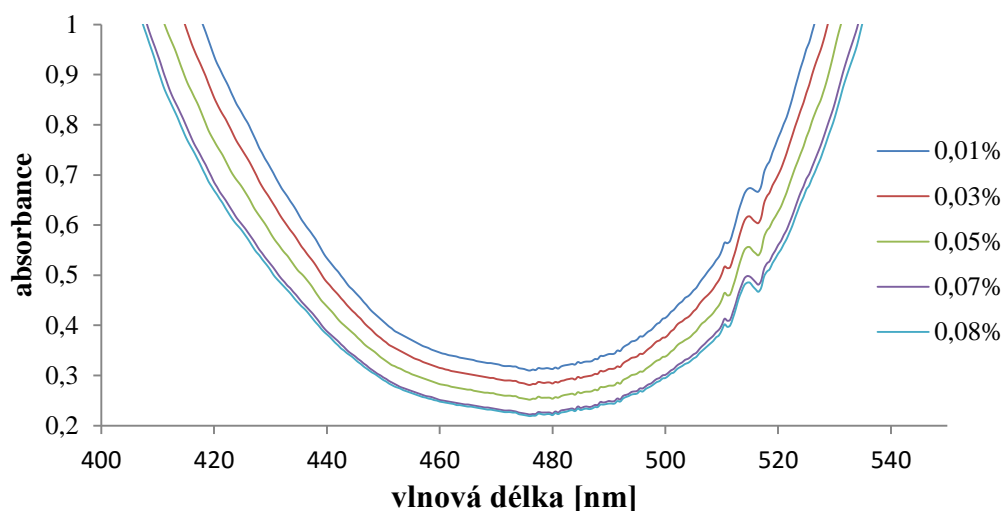
Obr. 26: Vlevo roztok AB a vpravo roztok ABp (roztoky o koncentraci $0,7\text{ g/ml}$ v $0,5\text{ M}$ octanu sodném) po 1h od namíchání.



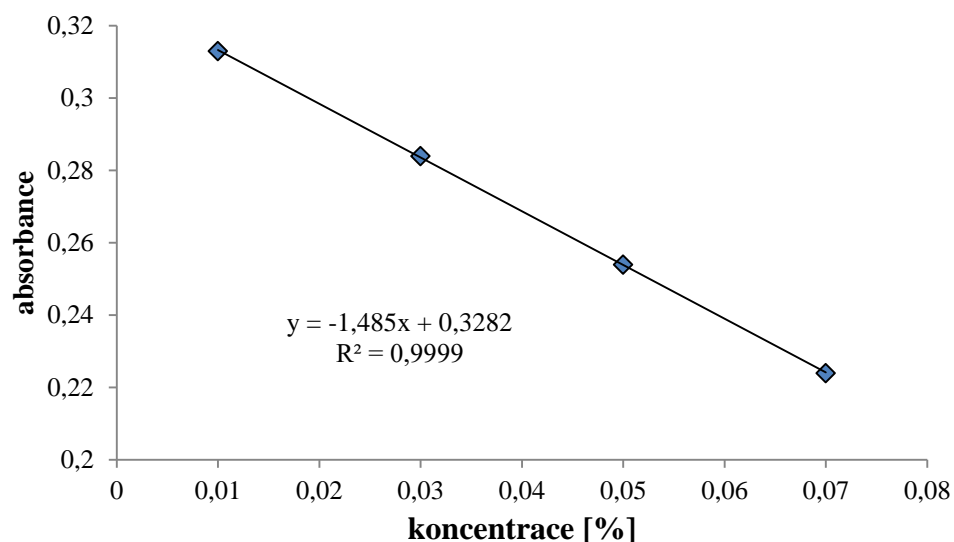
Obr. 27: Zkumavky se vzorky 0,7 mg/ml AB a ABp v octanu sodném s 0,03% roztokem HA. První dvě zleva jsou vzorky zcentrifugované po 40 min od přidání HA a další dvě jsou vzorky zcentrifugované po 17 h od přidání HA, kde čiré roztoky patří AB a modré ABp.



Obr. 28: Graf závislosti absorbance na vlnové délce rozpuštěné ABp v 0,5 M octanu sodném o celkové koncentraci 0,7 mg/ml s přídatkem 0,03% HA. Křivka v 0 min vypovídá o roztřepaném roztoku ABp po 17 hodinách bez HA. Ostatní křivky patří supernatantu, vychází stejně bez ohledu na dobu reakce ABp s HA.



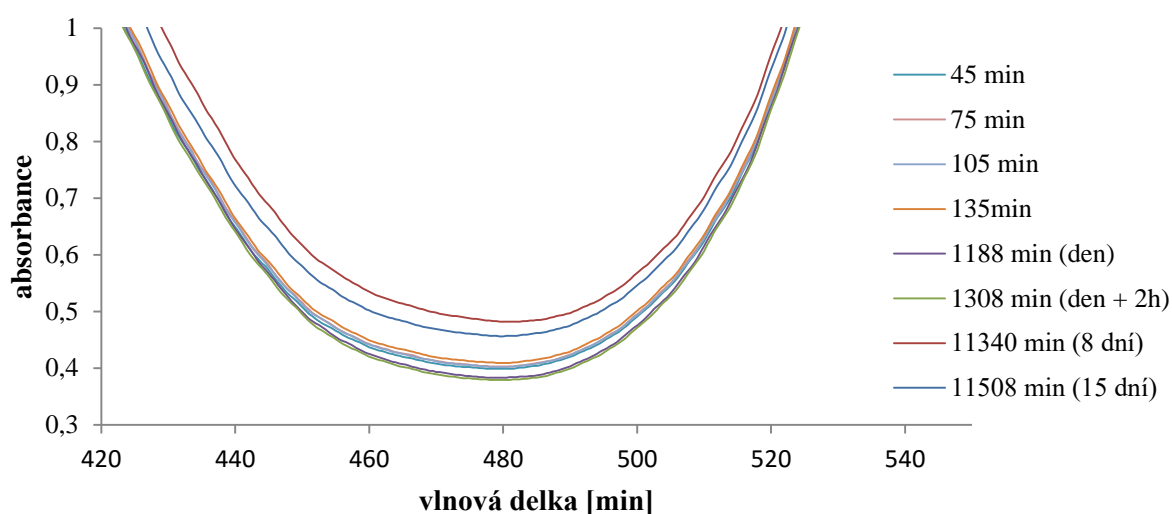
Obr. 29: Graf závislosti absorbančí na vlnové délce rozpuštěné ABp v 0,5M octanu sodném o celkové koncentraci 0,7 mg/ml s přidavkem HA o různé koncentraci.



Obr. 30: Graf závislosti absorbančí PRABp s HA při vlnové délce 480 nm na koncentraci, proložena lineární regresí, kdy výsledné R^2 odpovídá spolehlivosti této kalibrace.

5. Stanovení stálosti roztoku PRABp

Při stanovení stability roztoku jsme díky naměřeným absorpčním spektrům, viz graf (Obr. 31), přišli na to, že se roztok v čase mění, a to nelineárně. Se stářím roztoku absorbance stoupá, což může být způsobeno větším rozptýlením částic barviva v roztoku, a po několika dnech zpátky klesá. To může být spojeno s usazováním části roztoku. Z těchto výsledků a výsledků průběžných měření můžeme říci, že PRABp je nejvhodnější používat den po jeho přípravě, kdy je tento roztok po rozpuštění ABp v octanu sodném 40 minut míchán na míchačce s ohřevem na 40 °C a dále byl ponechán při pokojové teplotě do druhého dne.



Obr. 31: Graf znázorňující absorpční spektra supernatantů PRABp v různých časových intervalech. Legenda udává, v jakém čase byl roztok proměřen od jeho připravení.

6. Určení vlivu molekulové hmotnosti a stáří HA na stanovení pomocí PRABp

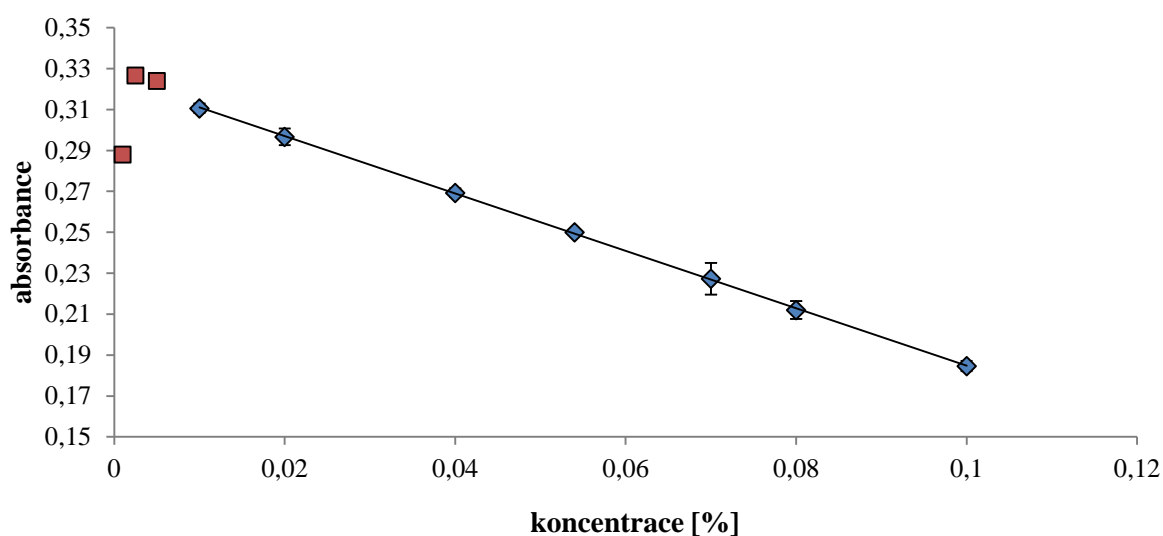
Úsudek pro proměření roztoků o různé molekulové hmotnosti a stáří plynul z předchozích zjištění, kdy jsme měřili různě staré roztoky HA, u kterých absorpance kalibračních přímek se stářím roztoku rostla, jak je vidět na grafu (Obr. p. 2). Tento vzrůst byl s časem sice lineární, jak je vidět na grafu (Obr. p. 3), ale to mohlo být nejspíše způsobeno tím, že jsme pro každé měření kalibrační přímky používali jiný PRABp. Proto jsme proměřili absorpční spektra 0,05% roztoků HA o různém stáří v jednom roztoku PRABp ve stejném čase, abychom zjistili, jak skutečně ovlivní naše stanovení. Přišli jsme na to, že stáří částečně spektrum ovlivňuje, jak je vidět na grafu (Obr. p. 4). Toto ovlivnění však není lineární, tudíž se nám teorie o lineárním ovlivnění nepotvrdila. Následně bylo také stanoveno ovlivnění molekulovou hmotností roztoků HA, které opět výsledek lehce ovlivňuje, jak je vidět na grafu (Obr. p. 5). Avšak tato ovlivnění (jak stářím, tak molekulovou hmotností) mohou být zahrnuta do standardní chyby stanovení, jelikož směrodatná odchylka u stanovení vlivu stáří HA byla 0,003 06 a u stanovení vlivu stáří molekulové hmotnosti byla 0,007 14. Proto byla tato metoda s využitím PRABp provedena znovu pro stanovení standardní chyby.

7. Kalibrační roztoky (rozšířené)

Pro stanovení standardní chyby byly kalibrační vzorky, rozšířené o krajní koncentrace, připraveny a proměřeny přesně 3 krát. Výsledná kalibrační přímka absorpance je vidět na grafu (Obr. 32), kdy jsme do ní nezahrnuli krajní koncentrace 0,005; 0,002 5 a 0,001% roztok HA, jelikož by tyto koncentrace nepokračovaly v linearitě. Z těchto dat, která byla vyhodnocena pomocí programu QC Expert, jsme stanovili rovnici přímky lineární regrese, která zní: $y = (-1,400\ 3 \pm 0,028\ 2)x + 0,324\ 1 \pm 0,001\ 7$, kdy hodnoty za znakem \pm odpovídají standardní chybě tohoto stanovení. Nejvyšší směrodatná odchylka u tohoto stanovení byla stanovena na 0,007 8 a to u koncentrace 0,07%. V grafu (Obr. 32) můžeme při této koncentraci pozorovat největší chybovou úsečku. Průměrná odchylka tohoto stanovení

byla 0,0034 4. Z tohoto výsledku můžeme usoudit, že vliv stáří a molekulové hmotnosti, viz předchozí bod mohou být kvůli této chybě stanovení zanedbatelné.

Z výsledků také plyne, že stanovení koncentrace HA je možné od koncentrace 0,01%, neboť od této koncentrace je kalibrační přímka lineární. Jelikož roztoky byly proměřeny pouze do koncentrace 0,1% , můžeme říci, že do této hodnoty můžeme bez problémů měřit koncentraci HA ve vodných roztocích.

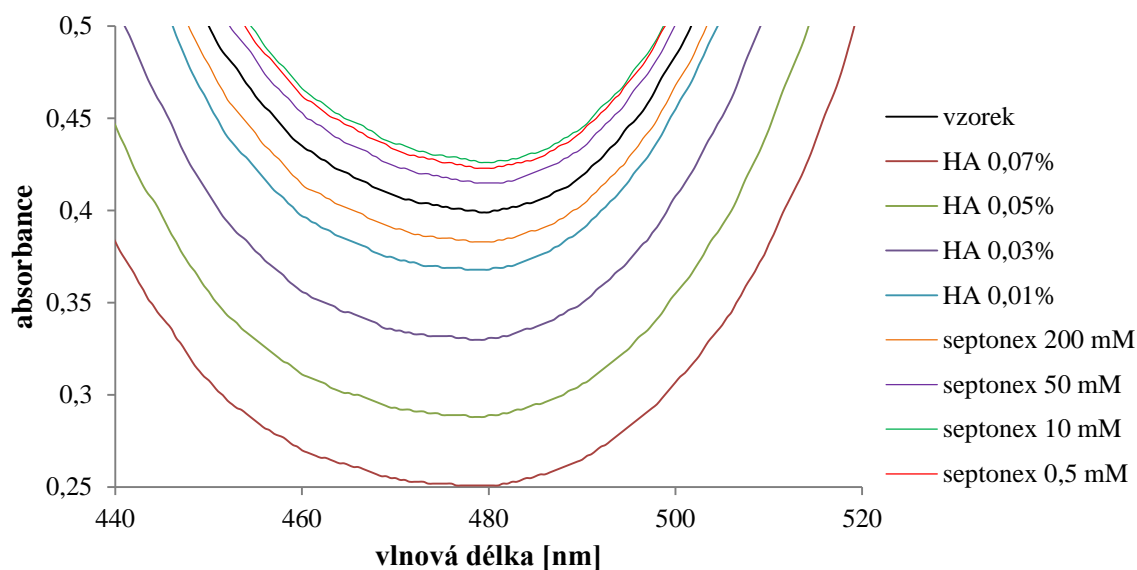


Obr. 32: Graf závislosti absorbancí průměru tří roztoků PRABp s HA na koncentraci HA, proložený kalibrační přímkou, s vynechanými body nejnižších koncentrací. Kalibrační body jsou opatřeny chybovými úsečkami, kde nejvyšší chybu můžeme vidět u koncentrace 0,07%.

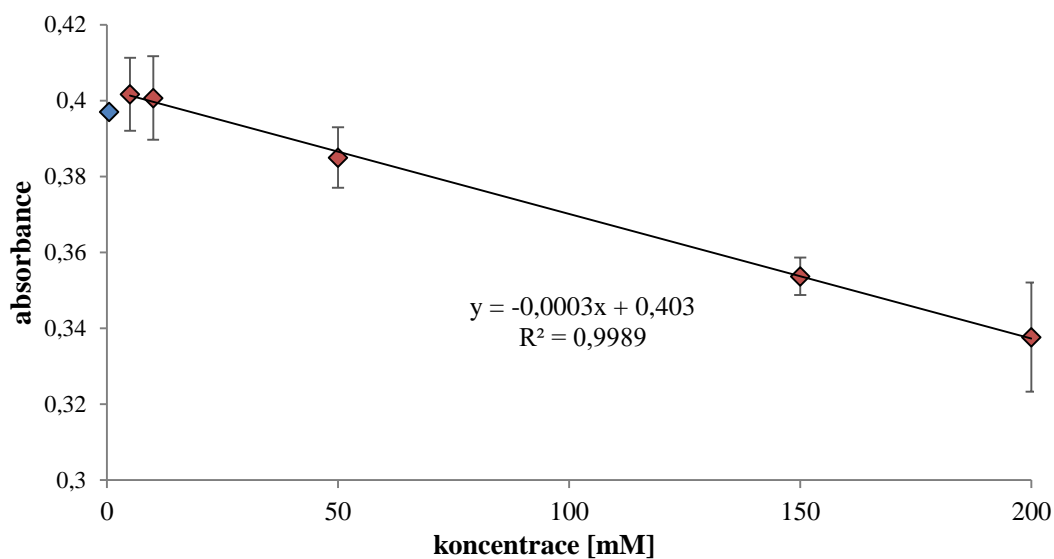
8. Stanovení vlivu tenzidu na stanovení pomocí PRABp a Stanovení vzorku SG

U proměření tenzidu pro zjištění, zda neovlivňuje výsledné kalibrační spektrum, jsme přišli na to, že ani septonex o koncentraci 200 mM neovlivňuje kalibrační spektra o koncentrací HA $c = 0,01\%$ a vyšší. Ta je v této metodě určena jako dolní mez pro stanovení koncentrace HA. Tato zjištění jsou patrná z grafu (Obr. 33). Z téhož grafu je také možné vyčíst, že absorpční spektrum vzorku (supernatantu nad gelem) se nachází mezi absorpčními spektry 50mM a 200mM roztoku. Z tohoto zjištění vyplývá, že touto metodou nebude možné určit koncentraci HA ve vzorku, avšak jsme již schopni určit, že se tato koncentrace bude nacházet pod hodnotou $c = 0,01\%$.

Toto měření nám přineslo zjištění, že touto metodou (s PRABp) lze stanovit koncentraci septonexu, a to díky tomu, že septonex na sebe váže barvivo stejně jako HA. Proto mohla být vytvořena kalibrační přímka roztoků septonexu při vlnové délce 480 nm. Z grafu (Obr. 34) je patrné, že hodnoty tvořící kalibrační přímku vychází téměř lineárně, s výjimkou prvního kalibračního bodu, který je $c = 0,05\text{ mM}$, a tudíž byl u vytvoření lineární regrese vynechán. Lze tedy říci, že stanovení septonexu pomocí této metody lze provést od koncentrace septonexu $c = 5\text{ mM}$ s průměrnou odchylkou posunu v absorbancích o 0,009 7.



Obr. 33: Graf výseku absorpčních spekter roztoků HA, septonexu a studovaného vzorku, kde roztoky HA mají spektra nejnižší absorbanci, roztoky septonexu nejvyšší a studovaný vzorek se nachází mezi absorpčními spektry septonexu o koncentracích 200 mM a 50 mM.



Obr. 34: Graf závislosti absorbancí průměru tří roztoků PRABp se septonexem na koncentraci septonexu v mM, proložený kalibrační přímkou, s vynechaným bodem nejnižších koncentrace. Kalibrační body jsou opatřeny chybovými úsečkami, kdy průměrná odchylka posunu v absorbancích je 0,009 2.

5.1.1.3 Zhodnocení této metody

Při zkoumání této metody jsme přišli na to, že voda jako rozpouštědlo pro alciánovou modř je sice vhodná pouze pro rozpouštění jako takové, ale nikoliv pro stanovení koncentrace HA, jelikož HA s alciánovou modří tvoří ve vodě velmi rychle agregáty. Jelikož u této metody záleží na tom, kolik barviva na sebe HA naváže, tak u vodného roztoku alciánové modře a HA dochází k tomu, že se HA hned po přidání vysráží a s barvivem mohou reagovat pouze povrchové molekuly. Proto je výsledek náhodný (jak se zrovna molekula HA zabalí).

Z tohoto důvodu je pro reakci HA s alciánovou modří vhodnějším rozpouštědlem octan sodný, jelikož zvyšuje iontovou sílu roztoku a napomáhá HA, aby se v roztoku alciánové modře rovnoměrně rozprostřel.

Jelikož se nám nepodařilo obdržet kvalitní výsledky pomocí Goldovy metody, byla tato metoda upravena tak, že jsme roztoky před proměřením centrifugovali. Pro toto stanovení se však alciánová modř 8GX neosvědčila, neboť po centrifugaci zůstal supernat (u kterého jsme měli měřit absorbanci) čirý. Vhodnější je alciánová modř pyridinová varianta, jelikož i po centrifugaci zůstala část barviva v supernatantu a ten se tím pádem stal měřitelným.

Zjistili jsme tedy, že tato nová metoda má meze stanovitelnosti koncentrace HA v rozmezí 0,01–0,1 %, kdy horní hranice může být vyšší, ale v našem stanovení jsme s vyššími koncentracemi nepracovali. Dále jsme také zjistili, že roztok septonexu (který se na naší fakultě používá k přípravě gelů s HA) také reaguje s ABp velmi podobně jako HA. Ale jeho absorpční spektra jsou u roztoků do 200 mM položena mimo meze stanovitelnosti HA. Náš stanovovaný vzorek (supernatant nad připraveným zcentrifugovaným gelem HA x septonex) měl absorpční spektrum pod mezi stanovitelnosti HA. Díky tomuto výsledku jsme usoudili, že je velmi pravděpodobné, že se ve vzorku nachází spíše septonex než HA. Také můžeme říci, že tato metoda je nedostačující pro měření stopového množství HA, které by se ve vzorku supernatantu mohlo nacházet.

Vedlejším zjištěním této metody bylo, že díky ní můžeme stanovit koncentraci septonexu v zatím námi zkoušeném koncentračním rozmezí 5–200 mM.

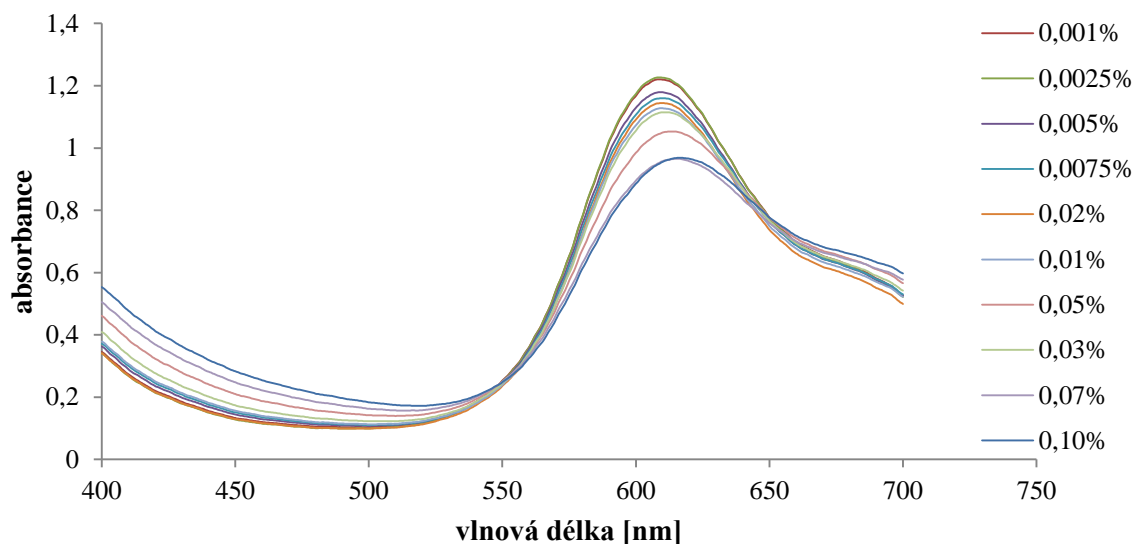
5.1.1 Metoda stanovení koncentrace HA dle C. B. Little a kol.

5.1.1.1 Ethanol jako rozpouštědlo pro alciánovou modř

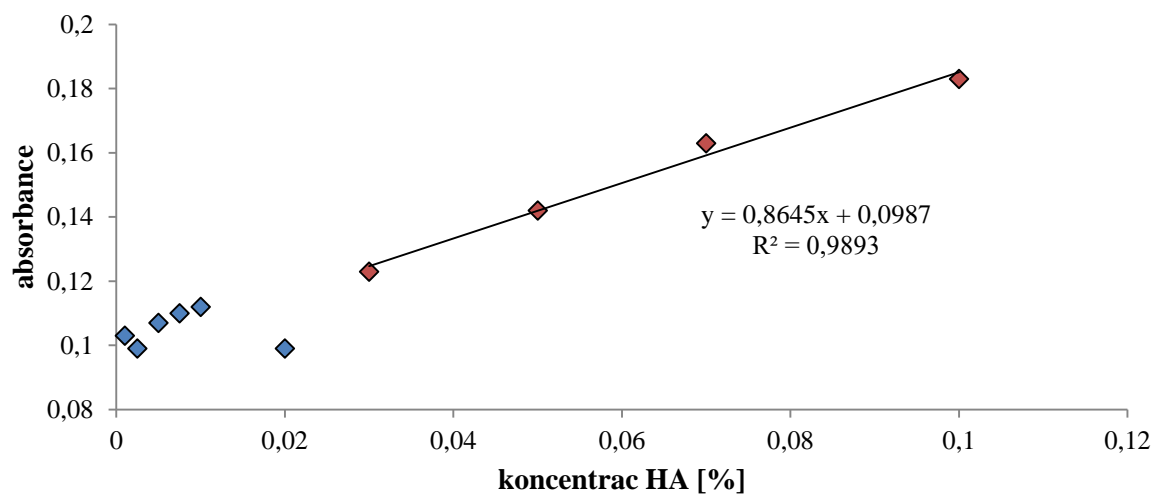
Po proměření absorbancí roztoků HA jsme zjistili, že výsledná spektra mají opravdu znatelný absorpční pík okolo vlnové délky 620 nm, jak je vidět na grafu (Obr. 35). Maximum píků však neleží u všech spekter ve stejné hodnotě, ale se zvyšující se koncentrací HA ubíhá maximum od vlnové délky 610 nm k 618 nm. I přesto, že nebylo možné určit přesné maximum, jsme se pokusili sestavit kalibrační přímku, jak při vlnové délce 610 nm (námi určené maximum), tak i při vlnové délce 620 nm (jak je uvedeno v článku). Bohužel body kalibrační řady zdaleka nevykazovaly jakoukoli známku linearitu nebo exponenciální funkce, jak je vidět na grafech (Obr. p. 6) Proto jsme se pokusili vytvořit kalibrační přímku z minima, což je 500 nm. Při této vlnové délce jsou kalibrační body částečně lineární v rozmezí koncentrací 0,03–0,1 % HA viz graf (Obr. 36). Toto rozmezí koncentrací však neodpovídá koncentračnímu rozmezí, pro které byla tato metoda vybrána.

Dále jsme toto stanovení opakovali s výjimkou použití PBSS. Místo něj byla použita voda. Výsledky spekter tohoto stanovení můžeme vidět v grafu (Obr. 37). U těchto spekter si můžeme všimnout píku při vlnové délce 610 nm (u nižších koncentrací HA) až 614 nm (u vyšších koncentrací). Při vlnové délce 500 nm se nachází minimum, ve kterém se však všechna absorpční spektra slévají, takže při této vlnové délce nemohla být sestrojena žádná kalibrační přímka. Ta byla vytvořena právě při vlnové délce 610 nm z koncentrací v rozmezí 0,01–0,075 % HA, jelikož ostatní body kalibrační řady do této linearitu nespádaly, jak je vidět na grafu (Obr. p. 7). Hodnota spolehlivosti této kalibrační přímky je 0,990 3, což můžeme označit za méně spolehlivou. Navíc toto rozmezí koncentrací nám už pokrývá metoda

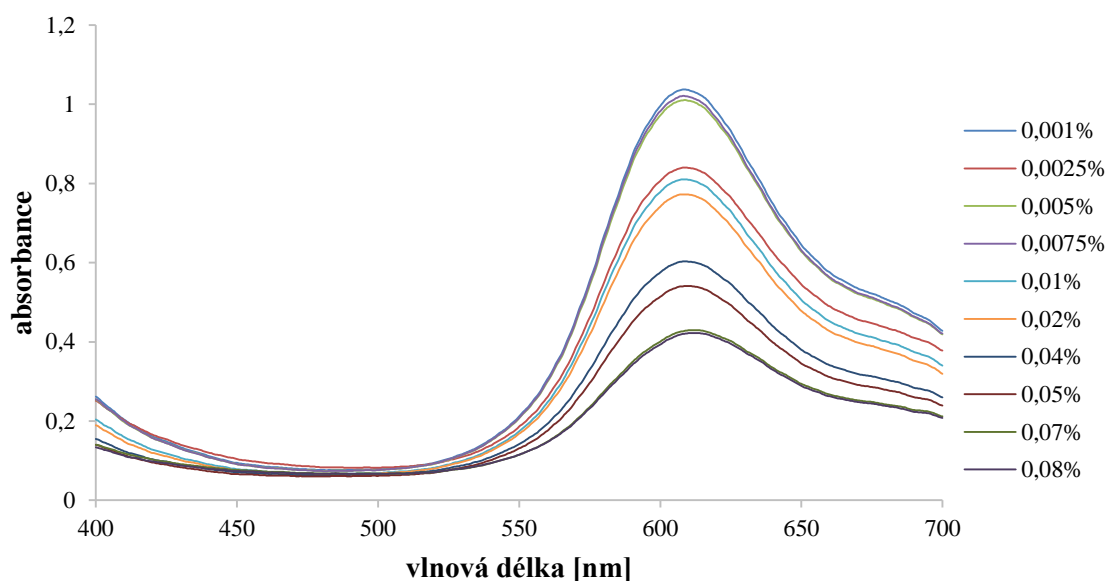
s využitím PRABp. Pro ověření spolehlivosti této metody bychom toto měření museli provést vícekrát.



Obr. 35: Graf absorpčních spekter roztoků HA (o různých koncentracích viz legenda) s PRABe v fosfátovém pufru, s viditelným píkem při 620 nm.



Obr. 36: Graf závislosti absorbancí na koncentraci HA (roztoků HA a PRABe v fosfátovém pufru) při vlnové délce 500 nm. Body v rozmezích koncentrací 0,03–0,1 % jsou proloženy lineární regresí s výslednou hodnotou spolehlivosti 0,989 7.



Obr. 37: Graf absorpčních spekter roztoků HA (o různých koncentracích viz legenda) s PRABe ve vodě, s viditelným píkem při 610 nm.

5.1.1.2 Octan sodný jako rozpouštědlo pro alciánovou modř

Po proměření absorbancí kalibračních roztoků HA jsme zjistili, že výsledná spektra mají také znatelný absorpční pík okolo vlnové délky 620 nm. Při této vlnové délce byla sestavena kalibrační přímka z koncentrací v rozmezí 0–0,01 % HA, jelikož ostatní body kalibrační řady do této linearit nespádaly, jak je vidět na grafu (Obr. p. 8). Hodnota spolehlivosti této kalibrační přímky je 0,995 4.

Proměřena byla také absorpční spektra HA u metody s využitím PRABpo. Tato spektra měla taktéž velmi významný pík s maximem již při 600 nm, tyto píky však byly v maximu rozšumělé, jak je vidět na grafu (Obr. p. 9), proto z těchto hodnot absorbancí nemohla být sestavena kalibrační přímka. Toto mohlo být pravděpodobně způsobeno tím, že se hodnoty absorbancí maxima píku pohybovaly okolo 2,5 abs. jednotek. Proto by měl být roztok před samotným měřením naředěn.

5.1.1.3 Zhodnocení této metody

Tato metoda měla být podle dostupné literatury účinná pro stanovení koncentrací HA v rozmezí 0–0,02%. Při přesném zopakování jsme však těchto mezí stanovení nedosáhli, a dokonce ani při vytvoření kalibrační závislosti jsme nedosáhli linearit absorbancí kalibračních bodů (koncentrací) při vlnové délce, kterou popisuje literatura (620 nm). Lineární odezvu jsme u tohoto stanovení zaznamenali při vlnové délce 500 nm, rozmezí koncentrací HA 0,03–0,1 %.

U stanovení ve vodě jsme se dostali na koncentrační rozmezí 0,01–0,075 % HA s hodnotou spolehlivosti 0,990 3. Při opuštění ethanolu jako rozpouštědla ve stanovení jsme zaznamenali lineární odezvu absorbancí právě v rozmezí koncentrací 0–0,01 %, což spadá do mezí stanovení původního článku (25). Hodnota spolehlivosti u tohoto stanovení byla 0,995 4, což by se dalo považovat za poměrně spolehlivé stanovení.

Z tohoto měření tedy plyne, že by se jím dala stanovit koncentrace HA i v nižších koncentracích než je 0,01%. Před samotným proměřováním vzorku (supernatantu) by se muselo ověřit, jak je opravdu tato metoda spolehlivá a citlivá. Toto bychom provedli vícečetným stanovením stejné kalibrační řady. Dále by bylo vhodné proměřit, jak by mohl stanovení ovlivnit septonex.

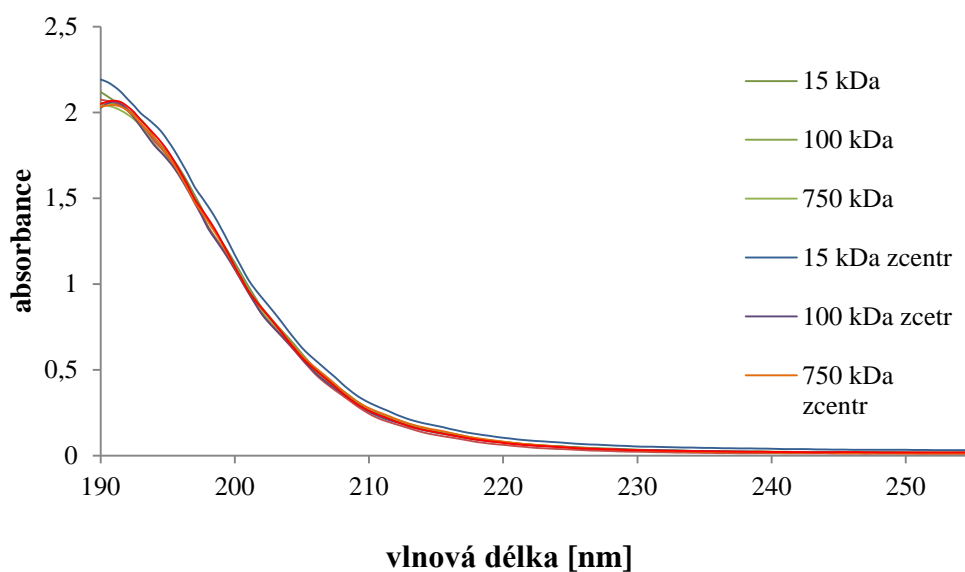
5.2 UV-VIS spektroskopie

1. Určení vlivu molekulové hmotnosti HA na stanovení

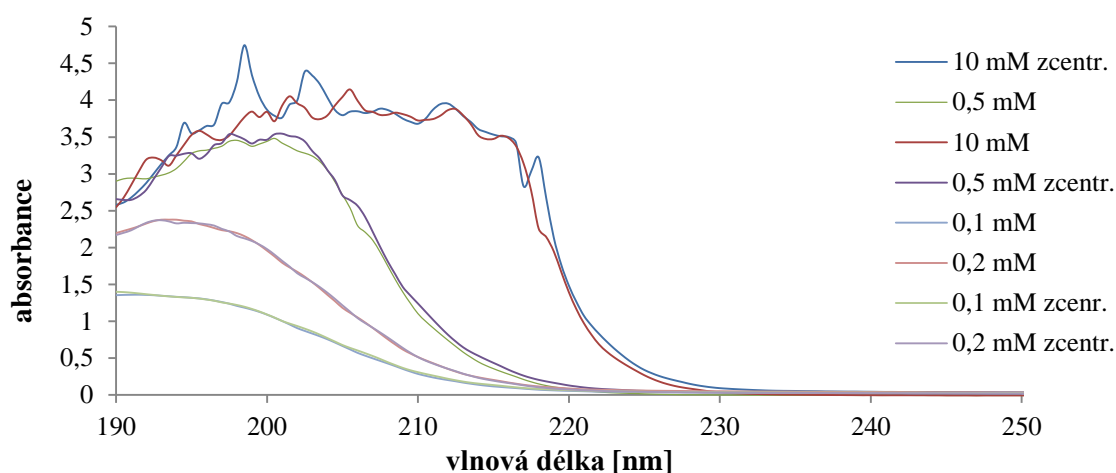
Z grafu absorbancí roztoků HA ve vodě (Obr. 38) je patrné, že všechny roztoky mají stejnou absorbanci. Z toho plyne, že u tohoto stanovení nezáleží na molekulové délce HA a stanovení neovlivňují rozpuštěné plyny.

2. Určení vlivu tenzidů na stanovení

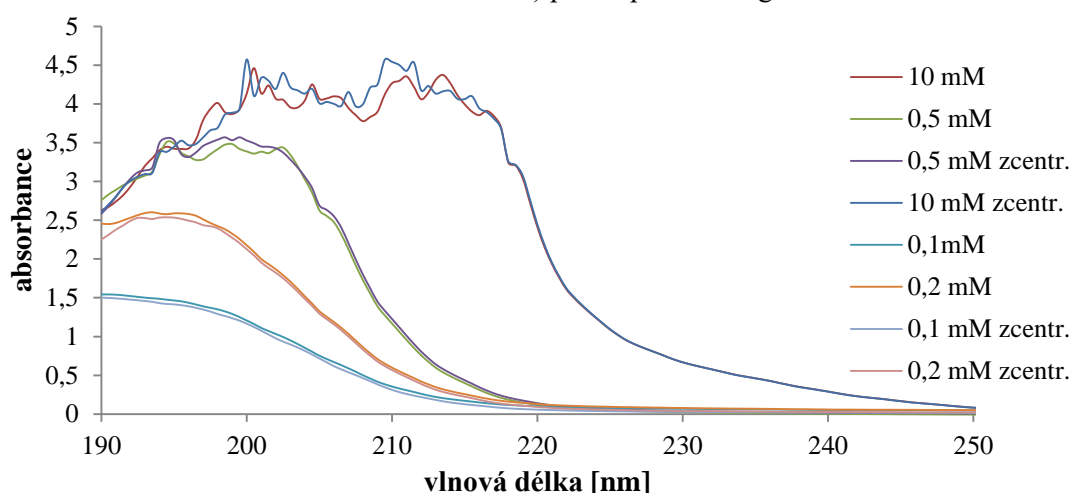
Z grafů (Obr. 39 a Obr. 40) absorbancí roztoků CTAB a septonexu je patrné, že absorbují při podobných vlnových délkách jako HA, proto by se při měření roztoku Septonexu s HA překrývaly a nedostali bychom kvantitativní výsledek o množství HA v roztoku. Z grafu je také patrné, že centrifugace nemá na toto stanovení žádný vliv.



Obr. 38: Graf absorpčního spektra vodných 0,1 % roztoků HA různých molekulových délek (15 kDa, 100 kDa, 750 kDa a 1,5 Mda) před a po centrifugaci.



Obr. 39: Graf absorpčního spektra vodných roztoků CTAB o různých koncentracích (10 mM, 0,5 mM, 0,2 mM a 0,1 mM) před a po centrifugaci.



Obr. 40: Graf absorpčního spektra vodných roztoků septonexu o různých koncentracích (10 mM, 0,5 mM, 0,2 mM a 0,1 mM) před a po centrifugaci.

3. Metoda standardního přídavku

U provedení kalibrace pomocí standardního přídavku jsme se setkali s problémem, že vzorek SG s přídavkem HA se začal ihned zakalovat, jak je vidět na obrázku (Obr. 41). Jelikož původní naměřený roztok SG je čirý, tento zákal by velice ovlivnil toto stanovení. Již při přídavku o koncentraci 0,04 % HA po 30 sekundách se HA z roztoku vysrážel ve formě vloček, jak je vidět na obrázku (Obr. 42). Můžeme tedy konstatovat, že tvoření kalibrace pomocí standardního přídavku je pro tento vzorek SG velice nevhodné. Toto se týká i stanovení výsledku s roztoky alciánových modří.

Toto vyhodnocení tedy vypovídá o tom, že ve vzorku SG je v převaze septonex, jelikož s HA reaguje velmi rychle a výsledkem je opravdu výrazný zákal. Také zde můžeme pochybovat o případném výskytu HA v tomto vzorku.



Obr. 41: Vzorky SG se standardním přídatkem HA o koncentraci (zleva) 0,02; 0,04; 0,06 a 0,8 % v poměru 1:1.



Obr. 42: Vzorek SG s 0,04% HA v poměru 1:1 po 30 sekundách reakce, kdy byl tento roztok roztřepán.

5.2.1 Zhodnocení této metody

Z výsledků plyne, že na stanovení koncentrace HA s využitím UV spektra nemá vliv molekulová délka HA, ale toto stanovení nelze provádět v přítomnosti tenzidů. Doufali jsme, že s odstředěním roztoků by výsledné spektrum mohlo být specifitější ve formě čistého píku bez šumu. Tato teorie se však nepotvrdila, protože odstředění plynů z roztoku nemá na stanovení žádný vliv. Dále jsme zjistili, že zkoumání vzorku SG pomocí kalibrační metody pomocí standardního přídatku je nevhodné, protože se s přídatkem HA ihned sráží. Díky tomuto zjištění je patrné, že ve vzorku se bude nacházet větší množství tenzidu.

Jelikož je tato metoda málo specifická a tenzidy ji mohou rušit, není vhodná pro přední účely na školním pracovišti, ale hodí se pro stanovení koncentrací HA v čistých vodných roztocích.

5.3 Infračervená spektroskopie s využitím ATR techniky

Po změření absorpčních spekter kalibračních roztoků HA jsme zjistili, že nejspolehlivější charakteristické pásy se nacházejí v rozmezí vlnočtů $1\ 130\text{--}1\ 065\ \text{cm}^{-1}$ a $1\ 085\text{--}1\ 020\ \text{cm}^{-1}$. První rozmezí odpovídá vibraci C-OH v sekundárních alkoholech a také vibraci C-O-C v glykosidu, druhé rozmezí odpovídá vibraci C-OH v primárních alkoholech. V grafu (Obr. 43) jsou tyto pásy ve formě píku velmi znatelné hlavně u koncentrací od 0,2 % HA, absorpční

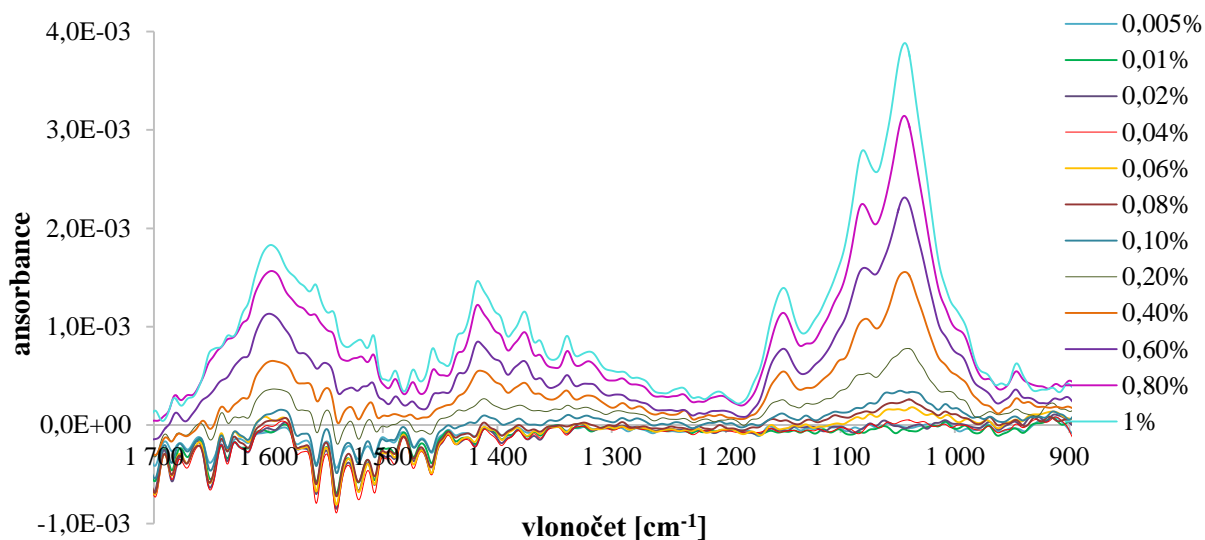
spektra pod touto koncentrací jsou již méně specifická. Celkové spektrum absorbancí můžeme vidět v příloze (Obr. p. 10), kde jsou znatelné i další, ale ne tolik specifické píky absorbancí. Z maxim specifických píků byly vytvořeny kalibrační přímky, viz graf (Obr. 44). Lineární kalibrace byla vytvořena z maxim píků v rozmezí koncentrací 0,06–1 %, jelikož v tomto rozmezí byla kalibrační přímka zcela lineární. Z grafu lineární funkce můžeme vyčíst, že toto stanovení je celkem přesné, jelikož hodnota spolehlivosti R^2 vychází u obou přímek (přímky při vlnočtu $1\ 041,372\ \text{cm}^{-1}$, který patří vibracím primárního alkoholu a při vlnočtu $1\ 076,085\ \text{cm}^{-1}$, který patří vibracím sekundárních alkoholů a C-O-C) nad 0,999. Pro prověření opravdové přesnosti bychom museli toto stanovení provést vícekrát, abychom určili odchylku tohoto stanovení. Nyní však můžeme konstatovat, že touto metodou jsme přinejmenším schopni určit koncentraci neznámého vzorku HA ve vodě v rozmezí 0,06–1 % a s velkou pravděpodobností i vyšší koncentrace.

Následně byly změřeny absorpční spektra roztoků septonexu. Z výsledků tohoto měření plyne, že nejspolehlivější charakteristické pásy se nacházejí v rozmezí vlnočtů $1\ 750\text{--}1\ 690\ \text{cm}^{-1}$ a $1\ 300\text{--}1\ 150\ \text{cm}^{-1}$, kdy oba tyto pásy odpovídají vibraci nasyceného esteru. Tyto dva pásy můžeme vidět jak na grafu celkového spektra (kdy druhý z těchto pásů obsahuje dva píky), který najdeme v příloze (Obr. p. 11), nebo na grafu výseku absorpčních spekter (Obr. 45), kde mimo spekter septonexu můžeme také vidět absorpční spektra roztoku HA o koncentraci 1 % (červené). Toto spektrum bylo do grafu přidáno proto, abychom názorněji viděli, jak velký je rozdíl absorpčních spekter u těchto dvou látek. Dále bylo také do tohoto grafu přidáno proměřené spektrum stanovovaného vzorku SG (černé), a to ze stejného důvodu jako spektrum HA. Díky tomuto seskupení abs. spekter můžeme vidět značnou podobnost abs. spekter septonexu se stanovovaným vzorkem SG. Mohlo by se zdát, že ve vzorku SG se nachází pouze septonex, ale jelikož pomocí infračervené spektroskopie umíme změřit koncentraci HA pouze od 0,06 % a u předchozího měření pomocí alciánové modře jsme stanovili to, že jestli se ve vzorku vyskytuje nějaké množství HA, tak bude menší než 0,01 %. Proto můžeme pouze konstatovat fakt, že pokud je ve vzorku nějaké množství HA, je bohužel touto metodou neidentifikovatelné.

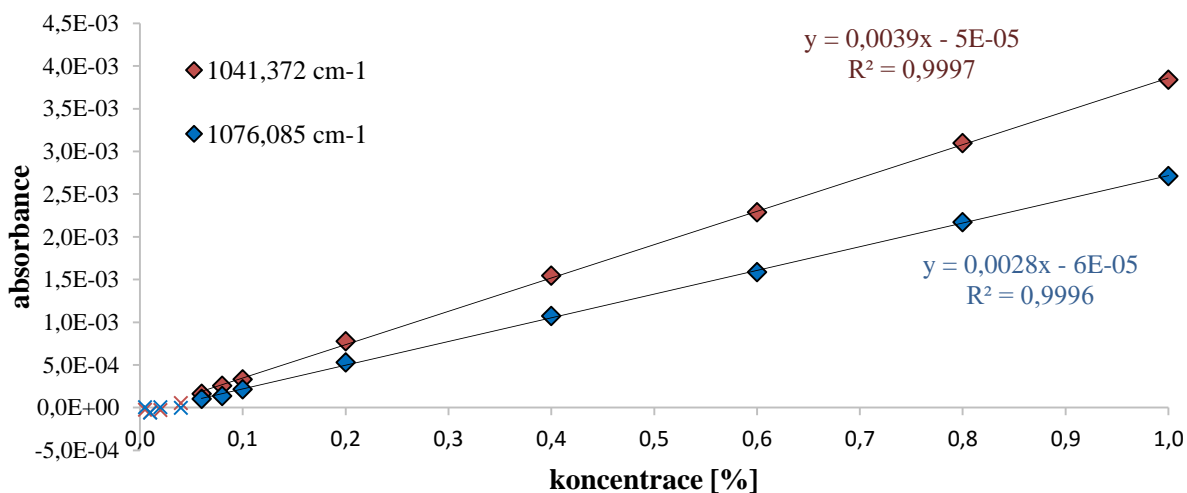
Pro možné stanovení koncentrace roztoků septonexu byly z proměřených absorbancí vytvořeny kalibrační přímky, a to z maxim píků, které leží ve specifických pásech, přesně tedy z vlnočtů $1\ 740,442$; $1\ 250,611$ a $1\ 199,506\ \text{cm}^{-1}$. Tyto kalibrační přímky můžeme vidět na grafu (Obr. 46), u přímky z vlnočtu $1\ 740,442\ \text{cm}^{-1}$ byl vynechán nejnižší bod kalibrační řady, a to absorbance při koncentraci septonexu 0,5 mM z důvodu velkého odchýlení od kalibrační přímky, a tím velkého snížení koeficientu spolehlivosti. Tímto vynecháním však nedošlo ke změně rovnice této přímky. Z grafu lineárních funkcí můžeme vyčíst, že toto stanovení je celkem přesné, jelikož hodnota spolehlivosti R^2 vychází u všech přímek nad 0,999. Pro prověření opravdové přesnosti bychom museli toto stanovení provést vícekrát, abychom určili odchylku tohoto stanovení. Teď však můžeme říci, že touto metodou jsme přinejmenším schopni určit koncentraci neznámého vzorku septonexu ve vodě v rozmezí 5–150 mM a s velkou pravděpodobností i vyšší koncentrace.

Za předpokladu, že by se ve vzorku SG nacházel pouze septonex, by se dala jeho koncentrace stanovit z rovnice přímek, které jsou ve tvaru: $y = 0,000\ 06x + 0,000\ 6$ pro přímku při vlnočtu $1\ 740,442\ \text{cm}^{-1}$, $y = 0,000\ 02x + 0,000\ 09$ pro přímku při vlnočtu

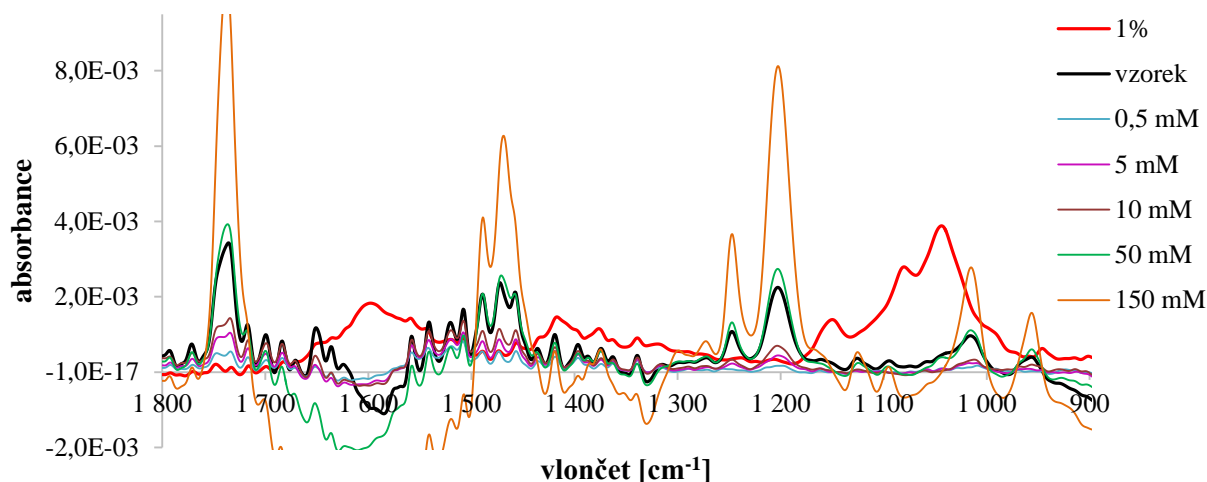
$1\ 250,611\ \text{cm}^{-1}$ a $y = 0,000\ 05x + 0,000\ 1$ pro přímku při vlnočtu a $1\ 199,506\ \text{cm}^{-1}$. Z průměru těchto přímk byla stanovena možná koncentrace septonexu ve vzorku SG na $41,86 \pm 1,225\ \text{mM}$.



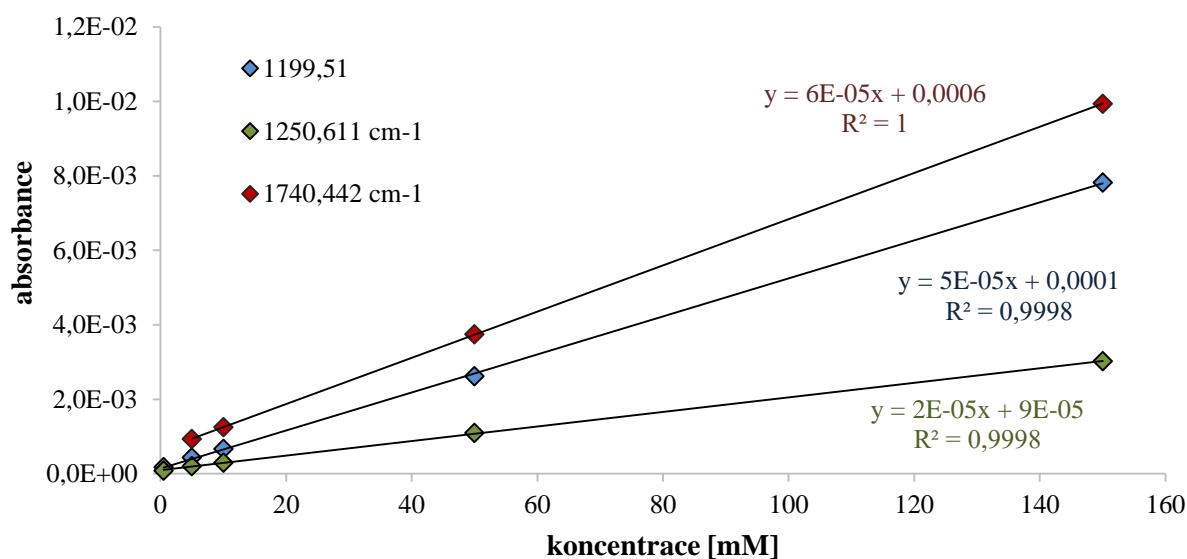
Obr. 43: Graf výseku absorpčních spekter kalibračních roztoků HA s viditelnými píky v oblasti specifických pásů v rozmezí vlnočtů $1\ 130\text{--}1\ 065\ \text{cm}^{-1}$ a $1\ 085\text{--}1\ 020\ \text{cm}^{-1}$.



Obr. 44: Graf závislosti absorbancí na koncentracích kalibračních roztoků HA. Jsou zde znázorněny dvě řady, z nichž každá je vytvořena z maxima píku při jiném vlnočtu ($1\ 041,372$ a $1\ 076,085\ \text{cm}^{-1}$). Tyto řady jsou proloženy funkcí lineární regrese, kdy výsledná hodnota spolehlivosti je u obou vyšší než 0,999. Prostřednictvím křížků jsou v grafu znázorněny koncentrace roztoků, které nebyly do regrese zahrnuty.



Obr. 45: Graf výseku absorpčních spekter kalibračních roztoků septonexu s viditelnými píky v oblasti specifických pásů v rozmezí vlnočtů 1 750–1 690 cm^{-1} a 1 300–1 150 cm^{-1} , kde ve druhém pásu můžeme pozorovat píky dva. Dále se v grafu nachází spektrum roztoku HA o koncentraci 1 % (červeně) a také spektrum vzorku SG (černé). To především pro porovnání absorpčních spekter vzorku se spektra septonexu a roztoku HA.



Obr. 46: Graf závislosti absorbancí na koncentracích kalibračních roztoků septonexu. Jsou zde znázorněny tři řady, z nichž každá je vytvořena z maxima píku při jiném vlnočtu (1 740,442; 1 250,611 a 1 199,506 cm^{-1}). Tyto řady jsou proloženy funkcí lineární regrese, kdy výsledná hodnota spolehlivosti je u všech vyšší než 0,999. U kalibrační řady při vlnočtu 1 740,442 cm^{-1} byla vyřazena první hodnota.

5.3.1 Zhodnocení této metody

Z výsledků této metody plyne, že pomocí IČ spektroskopie jsme schopni určit koncentraci HA ve vodě v rozmezí koncentrací 0,06–1 % a s velkou pravděpodobností i s vyšší. Zjistili jsme také to, že touto metodou je možné stanovit koncentraci vodných roztoků septonexu, a to v rozmezí 5–150 mM. Jelikož jsme neproměřili i vyšší koncentrace, můžeme pouze předpokládat, že tato metoda bude spolehlivá i pro koncentrace vyšší než 150 mM. Dále jsme přišli na to, že absorpční spektrum vzorku SG se velmi podobá absorpčnímu spektru septonexu, proto z tohoto výsledku soudíme, že ve vzorku SG bude septonex v převaze. Pokud se ve vzorku nachází alespoň nějaké množství HA, bude pravděpodobně ve stopovém množství a je touto metodou neidentifikovatelné.

6 ZÁVĚR

Cílem této práce bylo nejenom shrnutí a popis jednotlivých analytických metod pro stanovení kvantity hyaluronanu a vyzkoušení části z nich na školním pracovišti, ale také zkoumání vlivu tenzidu na toto stanovení a následné proměření jednotlivých vzorků. U každé z metod jsou popsány její principy, způsoby stanovení, rozsah detekce a určité meze, za kterých jsou tyto metody funkční. Metody, které byly vyzkoušeny na školním pracovišti, jsou tyto: dvě metody pomocí alciánové modře (dle E. W. Golda a C. B. Little a kol.), metoda pomocí UV spektroskopie a dále metoda pomocí IČ spektroskopie s ATR technikou.

Tato práce byla zaměřena především na možné stanovení koncentrace HA v supernatantu nad zcentrifugovaným gelem, který byl připraven smícháním septonexu a roztoku HA. Bohužel jsme pomocí zkoušených metod nebyli schopni určit, zda se v supernatantu nějaké množství HA nachází. Pomocí IČ spektroskopie jsme však došli k závěru, že pokud se v supernatantu bude nacházet nějaké množství HA, bude pouze stopové. Jelikož nejnižší možnou koncentraci, kterou jsme těmito metodami schopni spolehlivě stanovit, je 0,01% HA, a to díky námi optimalizované metodě s PRABp, která je postavena na základě článku E. W. Golda, není možné stopové množství určit. Bylo sice docíleno detekce HA v koncentračním rozmezí 0–0,01 %, a to modifikovanou metodou (bez využití enthanolu) na základě článku C. B. Little a kol., avšak hodnota spolehlivosti kalibrační přímky byla 0,995 4, což není zcela spolehlivé stanovení. Navíc byla uvedená metoda provedena pouze experimentálně a bez dalšího zkoumání. Jelikož tato metoda nebyla opakována a nebylo zjištěno, jaký má vliv například na stanovení tenzid, nemůžeme ji uzavřít jako spolehlivou při stanovení koncentrace HA. Mohlo se jednat o pouhou náhodu. Pro určení těchto stopových množství by byly více úspěšné imunometody s využitím vazby HA na specifický protein, neboť tyto metody mají meze stanovení obvykle v řádu ng/ml, například výrobce (ELIZA kitu) Echelon deklaruje rozsah detekce v rozmezí 0–1 600 ng/ml. Tyto postupy však na školním pracovišti nebyly realizovány z důvodu jejich finanční náročnosti.

U proměrování roztoků septonexu, jako možného rušitele stanovení koncentrace HA jsme přišli na to, že můžeme stanovit i jeho koncentraci, a to stejnými metodami, jako stanovujeme koncentraci HA. Pomocí modifikované metody s PRABp, která je postavena na základě článku E. W. Golda, jsme schopni určit koncentraci septonexu v rozmezí 5–200 mM. Toto rozmezí jsme také schopni určit pomocí IČ spektroskopie s ATR technikou.

Závěrem můžeme konstatovat, že jako nejspecifičtější metoda se nám jeví kvantifikace pomocí IČ spektroskopie, jelikož jako u jediné metody je zde rozeznatelné spektrum roztoku septonexu a roztoku HA. U všech ostatních metod se tato spektra slévají v jedno. Na základě toho se toto stanovení hodí jak pro roztoky kontaminované septonexem, tak i pro samotné vodné roztoky. Ostatní metody kvantifikace byly modifikovány do podoby, kdy s nimi můžeme také stanovovat koncentraci HA, ale pouze ve vodných roztocích.

7 CITOVANÁ LITERATURA

1. **PALMER, KARL M. and JOHN W.** The polysaccharide of the vitreous humor. *J. Biol. Chem. The journal of biological chemistry*. 1934, 107, stránky 629–634.
2. **HASCALL, V. C. a LAURENT, T. C.** Hyaluronan Structure and Physical Properties. *Glycoforum*. [Online] Copyright (C), 15. December 1997. [Citace: 15. duben 2016.] <http://www.glycoforum.gr.jp/science/hyaluronan/HA01/HA01E.html>.
3. **NECAS, J., BARTOSIKOVA, L. a KOLAR, J.** Hyaluronic acid (hyaluronan): a review. *Veterinarni Medicina*. 2008, Sv. 8, 53, stránky 397–411.
4. **CHONG, B. F., a další.** Microbial hyaluronic acid production. *Microbiol Biotechnology*. MINI-REVIEW, 2005, 66, stránky 341–351.
5. **VELEBNÝ, V.** Hyaluronan – biopolymer pro tkáňové inženýrství. *fch.vut.cz*. [Online] 2012. [Citace: 5. únor 2016.] http://www.fch.vut.cz/media/docs/vr/Velebny_teze.pdf.
6. **COWMAN, M. K. a MATSUOKA, S.** Experimental approaches to hyaluronan structure. *Carbohydrate Research*. 11. duben 2005, Sv. 5, 340, stránky 791–809.
7. **RÖSSLER, A.** An ultrasensitive, nonisotopic immunoassay for hyaluronan using the streptavidin–biotin system. *Clinica Chimica Acta*. 23. 2 1998, Sv. 2, 270, stránky 101–114.
8. **POUCHÝ, J.:** *Fyzikální chemie makromolekulárních soustav*. Praha : VŠCHT, 2001. 80-7080-422-X.
9. **BARTOVSKÁ, L. a ŠIŠKOVÁ, M.** *Fyzikální chemie povrchů a koloidních soustav*. Praha : VŠCHT, 2005. 80-7080-475-0.
10. **NOVÁK, J.** *Fyzikální chemie – bakalářský a magisterský kurz*. Praha : VŠCHT, 2008. 978-80-7080-675-3.
11. **ROSIK, J.M., a další.** *RADIATION FORMATION OF HYDROGELS FOR BIOMEDICAL APPLICATION*. Lodz : IAEA, 2002. stránky 5-47. 92-0-119702-0.
12. **HOFFMAN, ALLAN S.** Hydrogels for biomedical applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*. Supplement, 2012, Sv. 64, 10.1016/j.addr.2012.09.010, stránky 18–23.
13. **BENEŠ, M., a další.** Slovník z kladných pojmů vztahujících se k polymerům. *Chemické listy*. 2004, 94, stránky 406–416.
14. **ŠMIDRKAL, J.** Tenzidy a detergenty dnes. *Chemické listy*. 1999, 93, stránky 421–427.
15. **VENTURA, DOMINIC, L., a další.** Mild Synthesis of Metallophthalocyanines. *International Journal of Applied Science and Technology*. March 2014, Sv. 2, 4.
16. **SCHENK, E.** Notes on Technic: Note from the Biological Stain Commission a Newly Certified Dye—Alcian Blue 8GX. *Notes on Technic*. 1981, Sv. 2, 56, stránky 129-131.
17. **KANIA, P.** INFRAČERVENÁ SPEKTROMETRIE. www.vscht.cz. [Online] [Citace: 15. Duben 2016.] <https://www.vscht.cz/files/uzel/0005766/Infra%C4%8Derven%C3%A1+spektrometrie.pdf>.
18. **ROUESSAC, F. a ROUESSAC, A.** *Chemical Analysis - Modern Instrumentation Methods and Techniques*. Second. Chichester : John Wiley & Sons, Ltd, 2007. 978-0-470-85903-2 (.
19. **ČERNÁ, L.** Metody stanovení hyaluronanu. Brno : autor neznámý, 2014 Vedoucí bakalářské práce prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc. str. 36.s.

20. **BITTER, T. a MUIR, H. M.** A modified uronic acid carbazole reaction. *Analytical biochemistry*. 1962, Sv. 4, 4, stránky 330-334.
21. **IRIMURA, T., a další.** High-speed gel-permeation chromatography of glycosaminoglycans: its application to the analysis of heparan sulfate of embryonic carcinoma and its degradation products by tumour cell-derived heparanase. *Analytical biochemistry*. 1983, Sv. 2, 130, stránky 461-468.
22. **LAURENT, U. B. G. a TENGBLAD, A.:** Determination of hyaluronate in biological samples by a specific radioassay technique. *Analytical Biochemistry*. 12 1980, Sv. 2, 109, stránky 386-394.
23. **BRANDTA, R., a další.** A Convenient Radiometric Assay for Hyaluronan. *Acta Oto-Laryngologica*. 1987, Sv. 104, 442, stránky 31-35.
24. **GOLD, E.W.** A simple spectrophotometric method for estimating glycosaminoglycan concentration. *Analytical biochemistry*. 1979, 99, stránky 183-188.
25. **LITTLE, CB., a další.** Quantitative microanalysis of equine synovial fluid glycosaminoglycan concentration. *American journal of veterinary research*. 1990, Sv. 10, 51, stránky 1534-1539.
26. **SENO, N., a další.** Improved method for electrophoretic separation and rapid quantitation of isomeric chondroitin sulfates on cellulose acetate strips. *Analytical Biochemistry*. 9 1970, Sv. 1, 37, stránky 197-202.
27. **GEORGE W. JOURDIAN, MELINDA WOLFMAN, ROBERT SARBER, AND JACK DISTLER.** A Specific, Sensitive Method for the Determination of Hyaluronate. *Analytical biochemistry*. 1979, 96, stránky 474-480.
28. **MARTINSA, J.R.M., a další.** Practical determination of hyaluronan by a new noncompetitive fluorescence-based assay on serum of normal and cirrhotic patients. *Analytical Biochemistry*. 1, 1. 8 2003, Sv. 319, stránky 65-72.
29. **DEPLECH, B., BERTRAND, P. a MANIGONNAT, C.** Immunoenzymoassay of the hyaluronic acid-hyaluronectin interaction: Application to the detection of hyaluronic acid in serum of normal subjects and cancer patients ☆. *Analytical Biochemistry*. 1985, Sv. 2, 149, stránky 555-565.
30. **KONGTAWELERT, P. a GHOSH, P.** An enzyme-linked immunosorbent-inhibition assay for quantitation of hyaluronan (hyaluronic acid) in biological fluids. *Analytical biochemistry*. 1. 5 1989, Sv. 2, 178, stránky 367-372.
31. **LI, XQ., THONAR, EJ. a KNUDSON, W.** Accumulation of hyaluronate in human lung carcinoma as measured by a new hyaluronate ELISA. *Connect Tissue Res*. 1989, Sv. 2-4, 19, stránky 243-253.
32. **WHITEMAN, P.** The quantitative measurement of Alcian Blue-glycosaminoglycan complexes. *Biochemical Journal*. 2 1973, Sv. 2, 131.
33. **CHURUKIAN, CJ. a FRANK, M. H.** Alcian blue pyridine variant--a superior alternative to alcian blue 8GX: staining performance and stability. *Biotechnic and Histochemistry*. 2000, Sv. 3, 75, stránky 147-150.
34. **CAEL, J., a další.** Polarized infrared spectra of crystalline glycosaminoglycans. *Carbohydr Research*. 1976, Sv. 2, 50, stránky 169-179.

35. **GILLI, R., a další.** FTIR studies of sodium hyaluronate and its. *Carbohydrate Research*. 1994, 263, stránky 315–326.
36. **KUO, J.W.** *Practical aspects of hyalronan based medical products*. NY : CRP Press, 2006. 0-8493-3324-5.
37. **DONGUI, FAN, a další.** Determination of Hyaluronan by Spectroscopic Methods. *Journal of Wuhan University of Technolog. Mater. Sci. Ed.*, 2006, Sv. 3, 21.
38. **BILEROVA, H.** *Rheology of hyaluronan solutions*. [The thesis on faculty of chemistry, Brno University of Technology, Institute of Physical and Applied Chemistry. The head of the thesis Prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.] Brno : autor neznámý, 2012.
39. **LUO, HONG QUN, LI, NIAN BING a LIU:, SHAO PU.** Resonance Rayleigh scattering study of interaction of hyaluronic acid with ethyl violet dye and its analytical application. *Biosensors and Bioelectronics*. 15. January 2006, Sv. 7, 21, stránky 1189–1194.

8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

A	absorbance
AB	Alciánová modř 8GX
ABE	2 % roztok alciánové modři 8GX v ethanolu
ABp	Alciánová modř pyridinová varianta
ATR	infračervená spektroskopie, měření na krystalu, využití
BP	bakalářská práce (19)
CTAB	cetyltrimethylammonium bromid
Da	Dalton, jednotka molekulové hmotnosti, 1 Da odpovídá 1 g/mol
ELISA	(Enzym-linked immunosorbent-inhibition assay) imunologická metoda
EV	ethyl-viloleť
PBSS	fosfátový pufr
PRAB	pracovní roztok alciánové modři 8GX v 0,5 M octanu sodném o konečné koncentraci 0,7mg/ml
PRABe	pracovní roztok vzniklý smícháním: alciánové modři 8GX ve 100% ethanolu o konečné koncentraci 2% s 1 M roztokem MgCl ₂ a s 0,5 M octanu sodném v poměru 1:1:18
PRABo	pracovní roztok vzniklý smícháním: alciánové modři 8GX 0,5 M octanu sodném o konečné koncentraci 2% s 1 M roztokem MgCl ₂ a s 0,5 M octanu sodném v poměru 1:1:18
PRABp	pracovní roztok alciánové modři pyridonová varianta v 0,5 M octanu sodném o konečné koncentraci 0,7mg/ml
PRABpo	pracovní roztok vzniklý smícháním: alciánové modři pyridinové varianty 0,5 M octanu sodném o konečné koncentraci 2% s 1 M roztokem MgCl ₂ a s 0,5 M octanu sodném v poměru 1:1:18
FTIR	infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací
GAG	glykosaminoglykan
HA	hyaluronan sodný – kyselina hyaluronová
HABP	protein se specifickou afinitou k HA
I	intenzita
IČ	infračervená spektroskopie
nm	nanometr
OcS	roztok octanu sodného 0,5 M

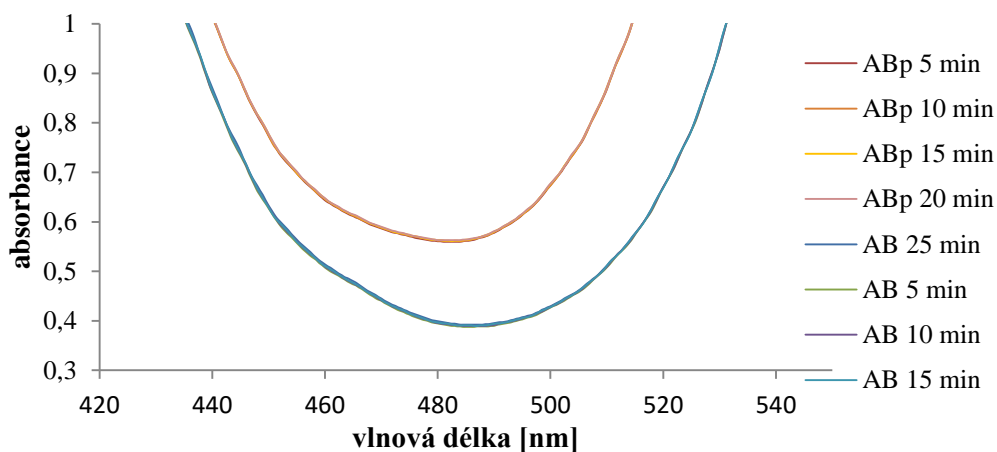
q	vibrační souřadnice
r_e	rovnovážná konstanta délky vlny
RIA	radioimunotest
RRS	Rayleighův rozptyl (Resonance Rayleigh scattering)
SG	stanovovaný vzorek supernatant nad námi připraveným gelem (HA se septonexem)
T	transmitance
TRFIA	časově rozlišená fluoroimunometoda (time-resolved fluoroimmunoassay)
UV	ultrafialové záření
UV-VIS	spektroskopie v oblasti ultrafialové a viditelné oblasti

9 SEZNAM PŘÍLOH

- Příloha 1: Graf závislosti absorpance na vlnové délce vodných roztoků AB a ABp s přídavkem 0,03% HA po centrifugaci. Měřeno v časových intervalech po 5 minutách od doby centrifugace
- Příloha 2: Graf závislosti absorpance roztoků PRABp s HA při 480 nm na koncentraci (HA). Rozdílné řady určují stáří roztoku HA v počtu dní od doby přípravy. Všechny řady jsou proloženy lineární regresí, kdy výsledné R2 vycházející z této regrese určuje spolehlivost a přesnost dané kalibrační řady.
- Příloha 3: Graf závislosti absorpance roztoků PRABp s 0,03% roztokem HA při 480 nm, na stáří roztoku HA (ovlivněno jinými roztoky PRABp). Řada je proložena lineární regresí, která nám vypovídá o tom, že se stářím roztoku absorpance lineárně roste.
- Příloha 4: Graf závislosti absorpance roztoků PRABp s 0,05% roztokem HA při 480 nm, na stáří roztoku HA. Zde absorpance se stářím nestoupá. Rozdíly absorpance jsou se směrodatnou odchylkou 0,0031.
- Příloha 5: Graf závislosti absorpance roztoků PRABp s 0,05% roztokem HA při 480 nm, na molekulové hmotnosti roztoku HA. Absorpance u těchto roztoků sice mění, ale tato odchylka může být zahrnuta do standardní chyby stanovení.
- Příloha 6: Graf závislosti absorpance na koncentraci u kalibračních roztoků HA s PRABe v PBSS při vlnových délkách 620 nm a 610 nm. Absorpance nejsou lineární, proto nemohly být proloženy přímkou linregrese.
- Příloha 7: Graf závislosti absorpance na koncentraci HA (roztoků HA a PRABe ve vodě) při vlnové délce 610 nm. Body v rozmezích koncentrací 0,01–0,075 % jsou proloženy lineární regresí s výslednou hodnotou spolehlivosti 0,990 3.
- Příloha 8: Graf závislosti absorpance na koncentraci HA (roztoků HA a PRABe v PBSS) při vlnové délce 620 nm. Body v rozmezích koncentrací 0–0,01 % jsou proloženy lineární regresí s výslednou hodnotou spolehlivosti 0,995 4.
- Příloha 9: Graf výseku absorpčních spekter roztoků HA (o různých koncentracích, viz legenda) s PRABpo, s viditelnými rozšumělými píky při 600 nm.
- Příloha 10: Graf celých absorpčních spekter kalibračních roztoků HA především s viditelnými píky v oblasti specifických pásů v rozmezí vlnočtů $1\ 130\text{--}1\ 065\ \text{cm}^{-1}$ a $1\ 085\text{--}1\ 020\ \text{cm}^{-1}$.
- Příloha 11: Graf celých absorpčních spekter kalibračních roztoků septonexu s viditelnými píky v oblasti specifických pásů v rozmezí vlnočtů $1\ 750\text{--}1\ 690\ \text{cm}^{-1}$ a $1\ 300\text{--}1\ 150\ \text{cm}^{-1}$, kde ve druhém pásu můžeme pozorovat píky dva. Dále jsou zde také vidět píky okolo vlnočtu $2\ 900\ \text{cm}^{-1}$, ale ty pro naše stanovení nejsou tolik specifické.

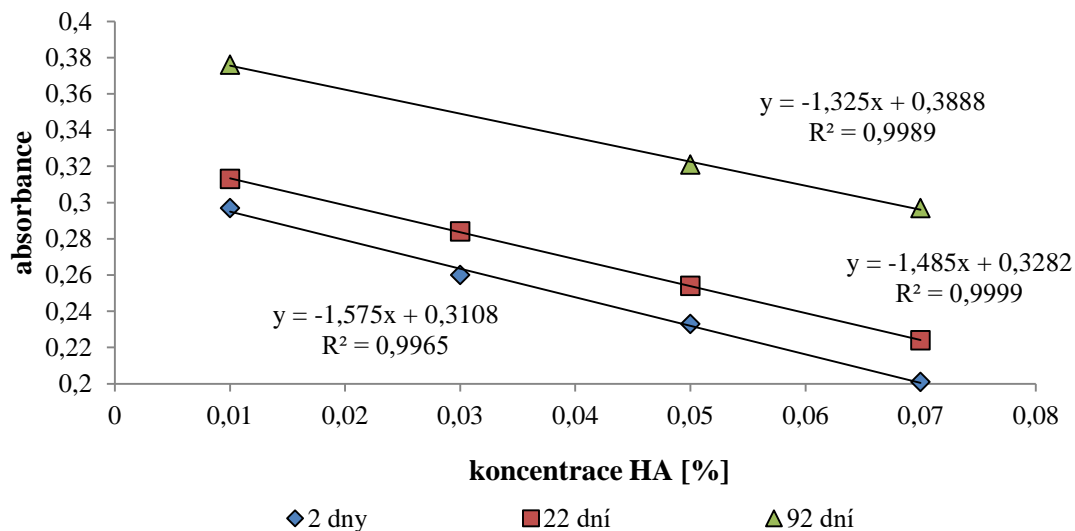
10 PŘÍLOHY

Příloha 1:



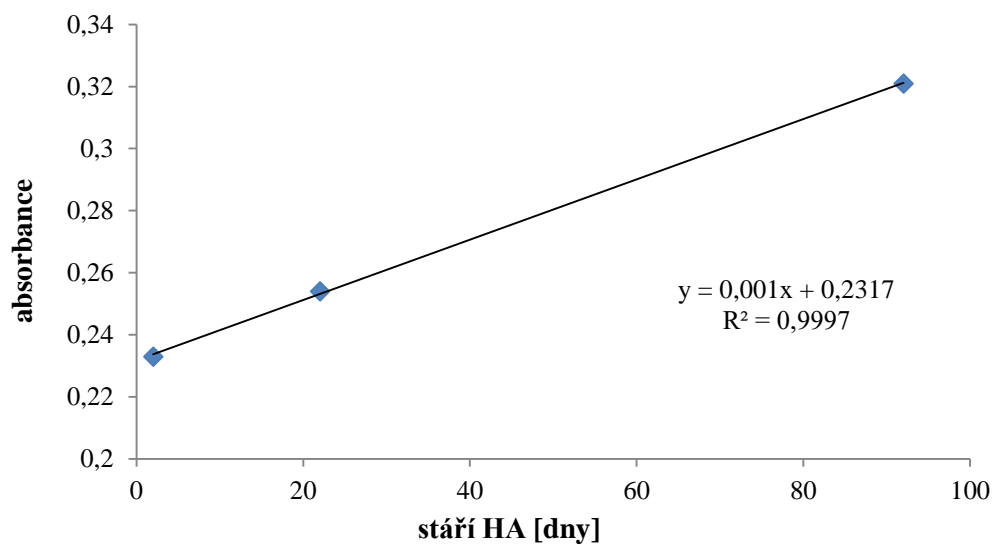
Obr. p. 1: Graf závislosti absorpance na vlnové délce vodných roztoků AB a ABp s přidavkem 0,03% HA po centrifugaci. Měřeno v časových intervalech po 5 minutách od doby centrifugace.

Příloha 2:



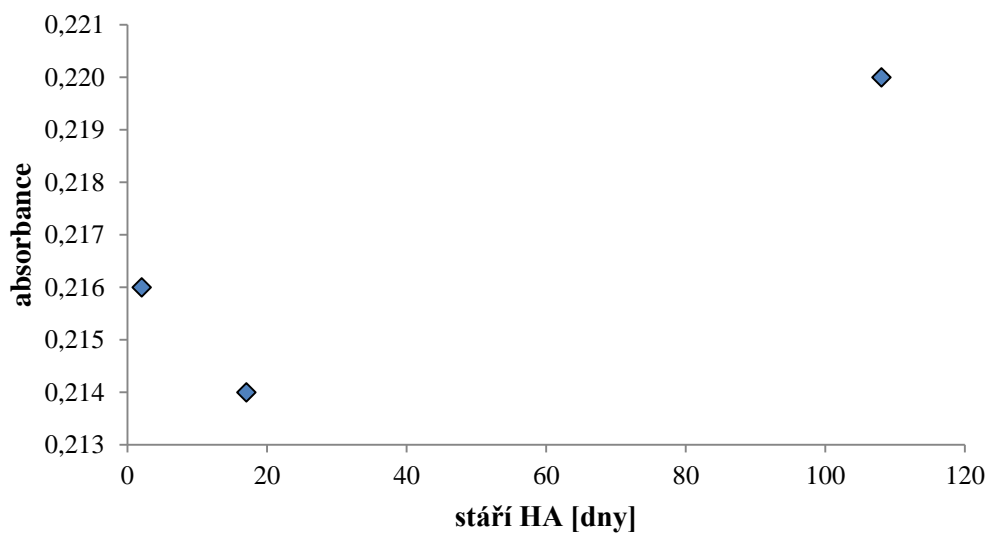
Obr. p. 2: Graf závislosti absorpance roztoků PRABp s HA při 480 nm na koncentraci (HA). Rozdílné řady určují stáří roztoku HA v počtu dní od doby přípravy. Všechny řady jsou proloženy lineární regresí, kdy výsledné R^2 vycházející z této regrese určuje spolehlivost a přesnost dané kalibrační řady.

Příloha 3:



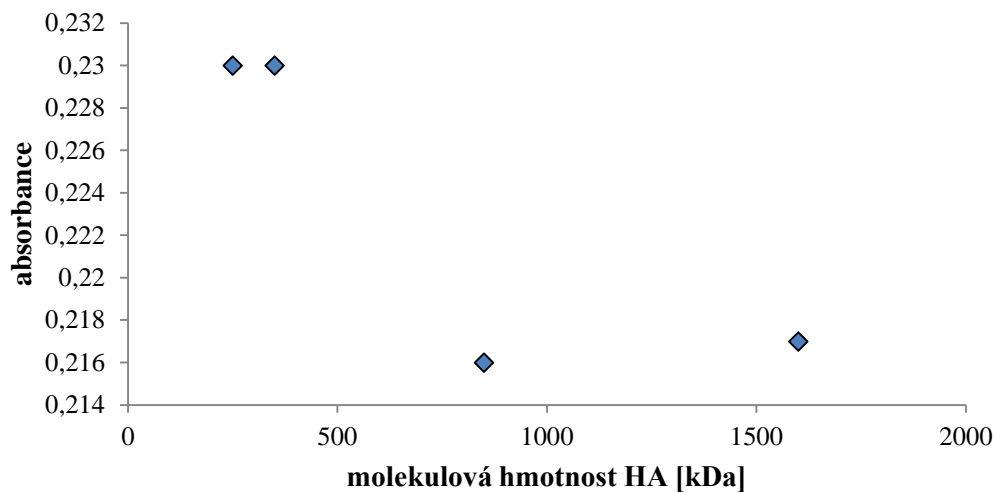
Obr. p. 3: Graf závislosti absorbancí, roztoků PRABp s 0,03% roztokem HA při 480 nm, na stáří roztoku HA (ovlivněno jinými roztoky PRABp). Řada je proložena lineární regresí, která nám vypovídá o tom, že se stářím roztoku absorbance lineárně roste.

Příloha 4:



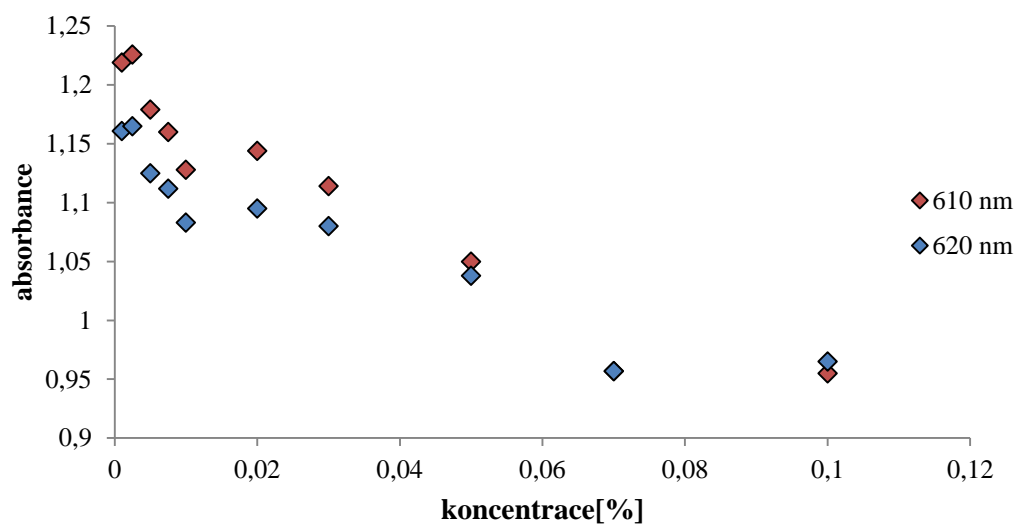
Obr. p. 4: Graf závislosti absorbancí, roztoků PRABp s 0,05% roztokem HA při 480 nm, na stáří roztoku HA. Zde absorbance se stářím nestoupá. Rozdíly absorbancí jsou se směrodatnou odchylkou 0,0031.

Příloha 5:



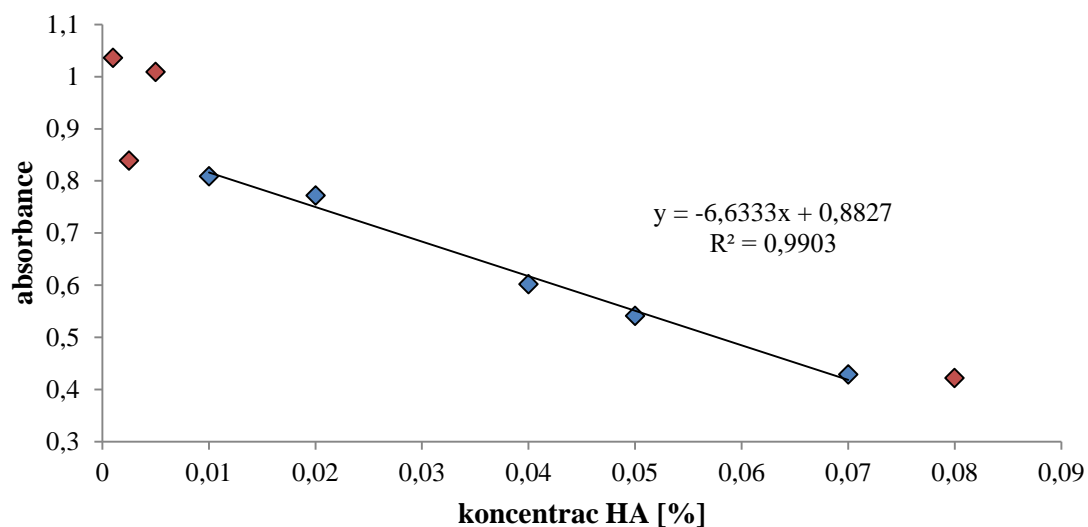
Obr. p. 5: Graf závislosti absorbančí, roztoků PRABp s 0,05% roztokem HA při 480 nm, na molekulové hmotnosti roztoku HA. Absorbance u těchto roztoků sice mění, ale tato odchylka může být zahrnuta do standardní chyby stanovení.

Příloha 6:



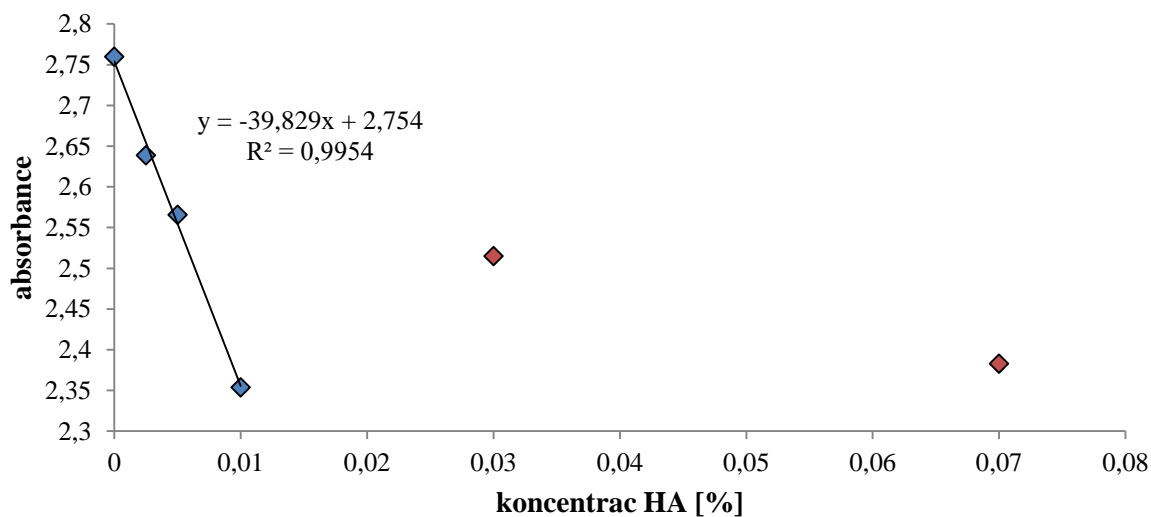
Obr. p. 6: Graf závislosti absorbančí na koncentraci u kalibračních roztoků HA s PRABe v PBSS při vlnových délkách 620 nm a 610 nm. Absorbance nejsou lineární, proto nemohly být proloženy přímkou linregrese.

Příloha 7:



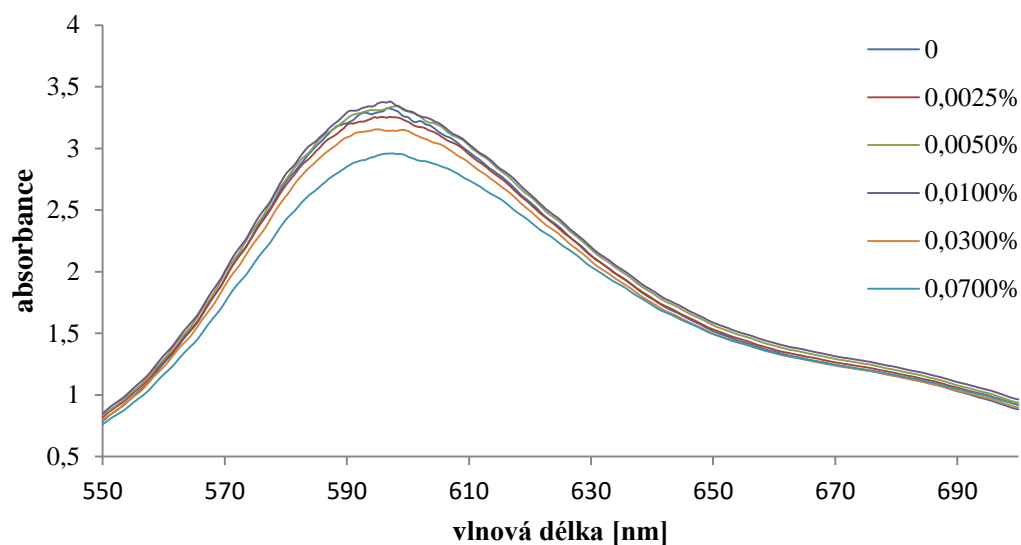
Obr. p. 7: Graf závislosti absorbancí na koncentraci HA (roztoků HA a PRABe ve vodě) při vlnové délce 610 nm. Body v rozmezích koncentrací 0,01–0,075 % jsou proloženy lineární regresí s výslednou hodnotou spolehlivosti 0,990 3.

Příloha 8:



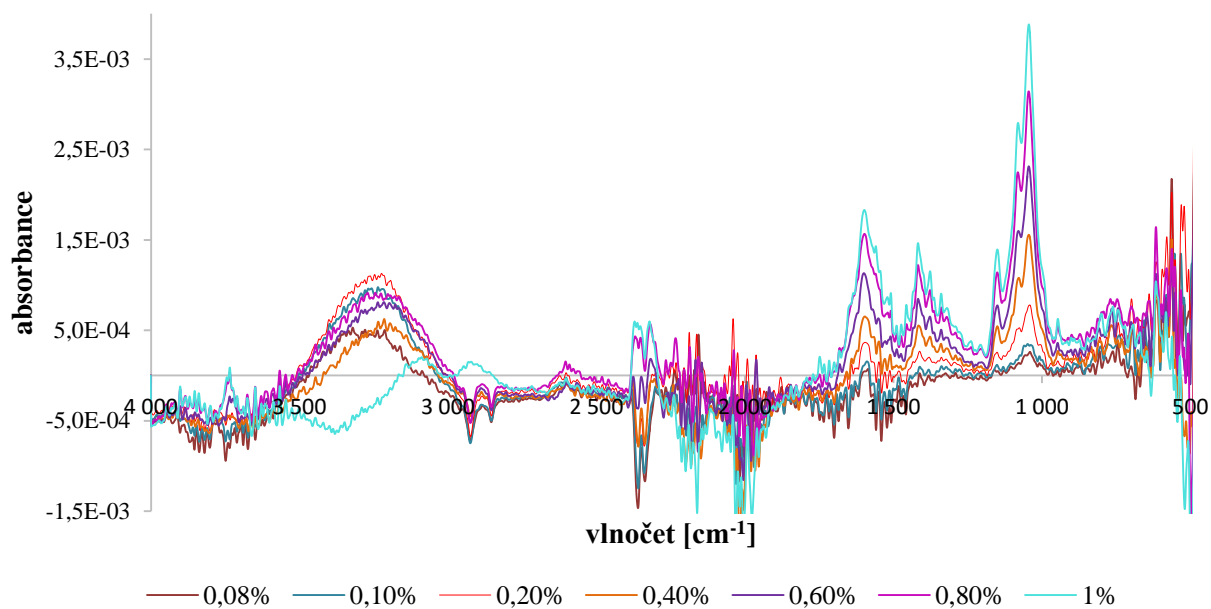
Obr. p. 8: Graf závislosti absorbancí na koncentraci HA (roztoků HA a PRABo v PBSS) při vlnové délce 620 nm. Body v rozmezích koncentrací 0–0,01 % jsou proloženy lineární regresí s výslednou hodnotou spolehlivosti 0,995 4.

Příloha 9:



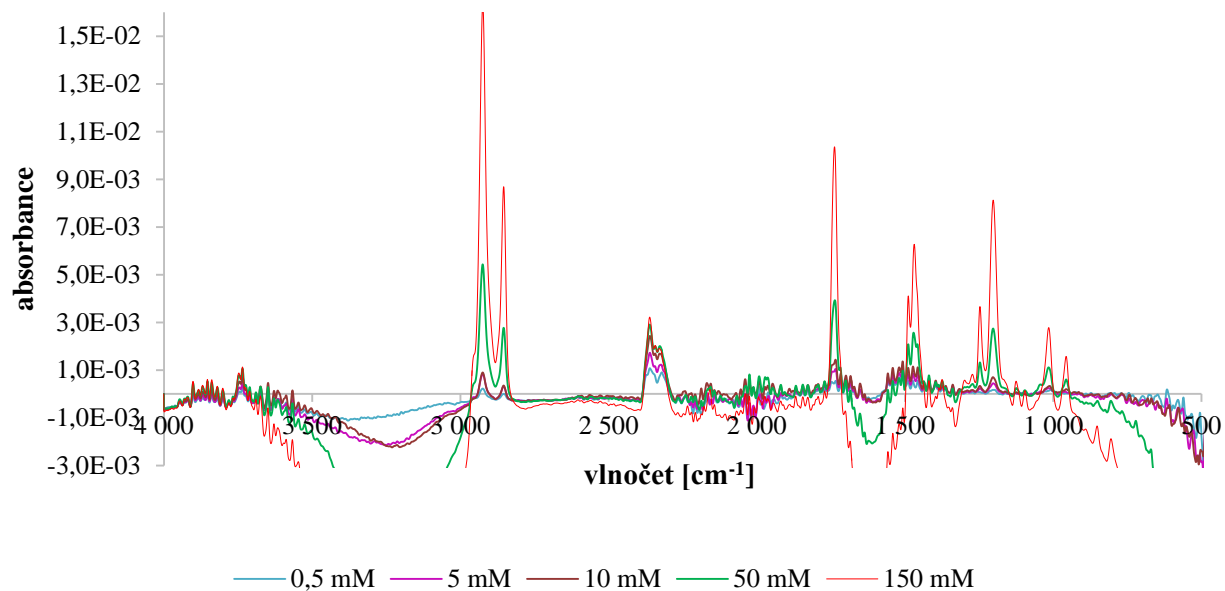
Obr. p. 9: Graf výseku absorpčních spekter roztoků HA (o různých koncentracích viz legenda) s PRABpo, s viditelnými rozšumělými píky při 600 nm.

Příloha 10:



Obr. p. 10: Graf celých absorpčních spekter kalibračních roztoků HA především s viditelnými píky v oblasti specifických pásů v rozmezí vlnočtů 1 130–1 065 cm^{-1} a 1 085–1 020 cm^{-1} .

Příloha 11:



Obr. p. 11: Graf celých absorpčních spekter kalibračních roztoků septonexu s viditelnými píky v oblasti specifických pásů v rozmezí vlnočtů $1\ 750\text{--}1\ 690\ \text{cm}^{-1}$ a $1\ 300\text{--}1\ 150\ \text{cm}^{-1}$, kde ve druhém pásu můžeme pozorovat píky dva. Dále jsou zde také vidět píky okolo vlnočtu $2\ 900\ \text{cm}^{-1}$, ale ty pro naše stanovení nejsou tolik specifické.