

Příprava a charakterizace vodních roztoků a filmů atelokolagenu I

Bc. Petra Vyhlídalová

Diplomová práce
2010



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická
Ústav fyziky a mater. inženýrství
akademický rok: 2009/2010

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Petra VYHLÍDALOVÁ**
Studijní program: **N 2808 Chemie a technologie materiálů**
Studijní obor: **Materiálové inženýrství**

Téma práce: **Příprava a charakterizace vodných roztoků a filmů atelokolagenu I**

Zásady pro vypracování:

1. Vypracujte rešerši na téma kolagen, jeho fyzikálně-chemické vlastnosti, biochemické, fyzikální a chemické modifikace (síťování, degradace), aplikace v technické a medicíně praxi.
2. Zpracujte popis postupu přípravy vodných roztoků kolagenu.
3. Proveďte přípravu vodného roztoku atelokolagenu I, proveďte přípravu filmů atelokolagenu I nemodifikovaného a zesíťovaného.
4. Změřte vybrané fyzikálně-chemické vlastnosti roztoků atelokolagenu I: koncentrační závislost viskozity (budto průtokovým nebo rotačním viskozimetrem, případně obojí), teplotní závislost viskozity vodných roztoků atelokolagenu I, UV VIS, IČ spektra a termickou stabilitu TG DTG v atmosféře vzduchu.
5. Zpracujte naměřené údaje ve formě tabulek, grafů a schémat.
6. Proveďte vyhodnocení naměřených údajů, jejich popis a vysvětlení trendů a závěrů.
7. Zpracujte seznam použité literatury, seznam zkratk, seznam tabulek, obrázků a schémat.
8. Citujte veškerou použitou literaturu, webovské stránky, patenty, dizertační, magisterské a bakalářské práce.

Rozsah práce:

Rozsah příloh:

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

- 1) S. Maiti: *Analysis and Characterization of Polymers*. Anusandhan Prakashan, Midnapore (2003).
2. L. Lapčík, Jr., M. Raab: *Nauka o materiálech II. Učební texty vysokých škol. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, Fakulta technologická* (2004). ISBN 80-7318-229-7.
3. P.W. Atkins: *Fyzikální chemia*. Oxford University Press, Oxford, Melbourne, Tokyo (1998). Slovenská technická univerzita v Bratislave (1999). ISBN 80-227-1238-8.

Vedoucí diplomové práce: **prof. Ing. Lubomír Lapčík, Ph.D.**
Ústav fyziky a mater. inženýrství

Datum zadání diplomové práce: **15. února 2010**

Termín odevzdání diplomové práce: **19. května 2010**

Ve Zlíně dne 15. února 2010


doc. Ing. Petr Hláváček, CSc.
děkan




Mgr. Aleš Mráček, Ph.D.
ředitel ústavu

ABSTRAKT

Předložená diplomová práce se zabývá studiem vlivu chemického síťování na změnu reologického chování roztoků a gelů atelokolagenu I. Teoretická část je zaměřena na kolagen a jeho fyzikálně chemické vlastnosti. Praktická část se zabývá přípravou roztoků kolagenů, jeho ředěním, síťováním a přípravou tablet pro měření FTIR metodou KBr disků. Dalším úkolem bylo měření viskozit na průtokovém a rotačním viskozimetru, zjištění koncentrací roztoků pomocí odpařování. Dále byla měřena spektra molekul pomocí UV-VIS a obrazová spektroskopie ATR –FTIR. Z naměřených údajů byly vypočteny konstanty Markovy-Houwinkovy rovnice, limitní viskozitní číslo a hodnoty Hugginsovy konstanty.

Klíčová slova: kolagen, atelokolagen I, viskozita, Hugginsova rovnice, FTIR, UV VIS.

ABSTRACT

MSc. thesis presented studied influence of the chemical crosslinking on rheological behaviour of atelocollagen I solutions and gels. Theoretical part is focused on collagen and its physicochemical properties as observed in the literature. Experimental part is focused on solution preparation and its dissolution, crosslinking and KBr tablet preparation for FTIR measurements. As another aim, the viscosity measurements on capillary and rotational viscometers, concentration determination by means of evaporation. Furthermore UV VIS and ATR FTIR spectra of the studied solid and liquid samples were performed. From the measured data the constants of Mark-Houwink equation, intrinsic viscosity and Huggins constant were determined.

Keywords: collagen, atelocollagen I, viscosity, Huggins equation, FTIR, UV VIS.

Příjmení a jméno:

Obor:

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že

- beru na vědomí, že odevzdáním diplomové/bakalářské práce souhlasím se zveřejněním své práce podle zákona č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, bez ohledu na výsledek obhajoby ¹⁾;
- beru na vědomí, že diplomová/bakalářská práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému dostupná k nahlédnutí, že jeden výtisk diplomové/bakalářské práce bude uložen na příslušném ústavu Fakulty technologické UTB ve Zlíně a jeden výtisk bude uložen u vedoucího práce;
- byl/a jsem seznámen/a s tím, že na moji diplomovou/bakalářskou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, zejm. § 35 odst. 3 ²⁾;
- beru na vědomí, že podle § 60 ³⁾ odst. 1 autorského zákona má UTB ve Zlíně právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona;
- beru na vědomí, že podle § 60 ³⁾ odst. 2 a 3 mohu užít své dílo – diplomovou/bakalářskou práci nebo poskytnout licenci k jejímu využití jen s předchozím písemným souhlasem Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně, která je oprávněna v takovém případě ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které byly Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně na vytvoření díla vynaloženy (až do jejich skutečné výše);
- beru na vědomí, že pokud bylo k vypracování diplomové/bakalářské práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tedy pouze k nekomerčnímu využití), nelze výsledky diplomové/bakalářské práce využít ke komerčním účelům;
- beru na vědomí, že pokud je výstupem diplomové/bakalářské práce jakýkoliv softwarový produkt, považují se za součást práce rovněž i zdrojové kódy, popř. soubory, ze kterých se projekt skládá. Neodevzdání této součásti může být důvodem k neobhájení práce.

Ve Zlíně

.....

¹⁾ zákon č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, § 47 Zveřejňování závěrečných prací:

(1) Vysoká škola nevýdělečně zveřejňuje disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce, u kterých proběhla obhajoba, včetně posudků oponentů a výsledku obhajoby prostřednictvím databáze kvalifikačních prací, kterou spravuje. Způsob zveřejnění stanoví vnitřní předpis vysoké školy.

(2) Disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce odevzdané uchazečem k obhajobě musí být též nejméně pět pracovních dnů před konáním obhajoby zveřejněny k nahlížení veřejnosti v místě určeném vnitřním předpisem vysoké školy nebo není-li tak určeno, v místě pracoviště vysoké školy, kde se má konat obhajoba práce. Každý si může ze zveřejněné práce pořizovat na své náklady výpisy, opisy nebo rozmnoženiny.

(3) Platí, že odevzdáním práce autor souhlasí se zveřejněním své práce podle tohoto zákona, bez ohledu na výsledek obhajoby.

²⁾ zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 35 odst. 3:

(3) Do práva autorského také nezasahuje škola nebo školské či vzdělávací zařízení, užije-li nikoli za účelem přímého nebo nepřímého hospodářského nebo obchodního prospěchu k výuce nebo k vlastní potřebě dílo vytvořené žákem nebo studentem ke splnění školních nebo studijních povinností vyplývajících z jeho právního vztahu ke škole nebo školskému či vzdělávacího zařízení (školní dílo).

³⁾ zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 60 Školní dílo:

(1) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení mají za obvyklých podmínek právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla (§ 35 odst. 3). Odpírá-li autor takového díla udělit svolení bez vážného důvodu, mohou se tyto osoby domáhat nahrazení chybějícího projevu jeho vůle u soudu. Ustanovení § 35 odst. 3 zůstává nedotčeno.

(2) Není-li sjednáno jinak, může autor školního díla své dílo užít či poskytnout jinému licenci, není-li to v rozporu s oprávněnými zájmy školy nebo školského či vzdělávacího zařízení.

(3) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení jsou oprávněny požadovat, aby jim autor školního díla z výdělku jím dosaženého v souvislosti s užitím díla či poskytnutím licence podle odstavce 2 přiměřeně přispěl na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložily, a to podle okolností až do jejich skutečné výše; přitom se přihlédne k výši výdělku dosaženého školou nebo školským či vzdělávacím zařízením z užití školního díla podle odstavce 1.

Chtěla bych poděkovat vedoucímu své diplomové práce panu Prof. Ing. Lubomíru Lapčíkovi, PhD., za odbornou pomoc, poskytnutí cenných rad k danému tématu, konzultaci a vedení.

Prohlašuji, že jsem na diplomové práci pracovala samostatně a použitou literaturu jsem citovala. V případě publikace výsledků, je-li uvedeno na základě licenční smlouvy, budu uvedena jako spoluautorka.

Ve Zlíně

.....

Podpis diplomanta

OBSAH

ÚVOD	11
I TEORETICKÁ ČÁST	12
1.1 KOLAGEN	13
1.2 ATELOKOLAGEN.....	14
1.3 FYZIKÁLNĚ – CHEMICKÉ VLASTNOSTI.....	16
1.3.1 Polyelektrolytický charakter	16
1.3.2 Bobtnání	16
1.3.3 Degradace a denaturace.....	16
1.3.4 Hydrotermální stabilita.....	17
1.3.5 Hydratace kolagenu.....	17
1.3.6 Přeměna na želatínu	17
1.3.7 Syntéza kolagenu	18
1.4 CHEMICKÉ MODIFIKACE	18
1.4.1 Degradace kolagenu	19
1.4.2 Síťování.....	19
1.5 BIOCHEMICKÉ VLASTNOSTI	20
1.6 APLIKACE V TECHNICKÉ A MEDICINÁLNÍ PRAXI	21
2 PŘÍPRAVA VODNÍCH ROZTOKŮ KOLGENU	23
2.1 ODBĚR VZORKŮ.....	23
2.1.1 Příprava mikroskopických preparátů – základní schéma.....	23
2.2 FIXACE VZORKŮ	24
2.2.1 Zásady při fixaci :	24
2.2.1.1 Nejpoužívanější fixační tekutiny	24
2.2.2 Příklad postupu pro přípravu parafinových řezů.....	25
2.2.3 Zalévací média	26
2.2.4 Krájení bločků.....	27
2.2.5 Barvení preparátů – přehledné a cílené barvicí posupy	27
2.2.6 Uzavírání obarvených řezů	29
2.2.7 Vyšetření preparátů a hodnocení výsledků	29
2.2.8 Dokumentace.....	30
3 EXPERIMENTÁLNÍ METODY	31
3.1 PŘÍSTROJOVÁ TECHNIKA A POUŽITÉ MATERIÁLY	31
3.1.1 Termická analýza	31
3.1.2 DTA.....	32
3.1.3 DSC	32
3.1.4 Termogravimetrie (TG).....	33
3.1.5 Termomechanická analýza.....	33
3.1.6 Termická dilatometrie	33
3.1.7 Termooptická analýza	33
3.1.8 Spektrální a optické metody.....	33
3.1.9 Atomová absorpční spektrometrie	34
3.1.10 Molekulová absorpční spektrometrie.....	34

3.1.11	ATR – FT IR spektroskopie	36
3.1.12	Experimentální metody	37
3.2	REOLOGIE	38
3.2.1	Viskometrie newtonských kapalin	38
3.2.1.1	Kapilární metoda	39
3.2.1.2	Metoda padající kuličky	40
3.2.1.3	Rotační viskozimetry	41
3.2.2	Viskometrie nenewtonských kapalin	43
II	PRAKTICKÁ ČÁST	45
4	CÍL PRÁCE	46
5	METODIKA PRÁCE	47
5.1	PŘÍPRAVA ROZTOKŮ ATELOKOLAGENU I	47
5.1.1	Koloidní gel atelokolagenu	47
5.1.1.1	Měření viskozity na Ubbelohde viskozimetru	48
5.1.1.2	Měření viskozity na rotačním viskozimetru Visco Tester 6 ^L VLT – 6 Thermo Haake, UTB Zlín	49
5.1.2	Sítování atelokolagenu	50
5.1.2.1	Glutaraldehyd	50
5.1.3	Příprava filmů roztoku atelokolagenu a tablet KBr se vzorkem	51
5.1.3.1	Nemodifikovaný roztok atelokolagenu	51
5.1.3.2	Sítovaný roztok atelokolagenu	51
5.1.3.3	Příprava KBr tablet	52
5.1.4	Měření FT-IR	54
5.1.5	Měření UV – VIS	55
6	VÝSLEDKY A DISKUZE	57
6.1	VÝSLEDKY A DISKUZE ODPAŘOVÁNÍ ROZTOKŮ KOLAGENU A STANOVENÍ KONCENTRACE ROZTOKŮ	57
6.2	VÝSLEDKY A DISKUZE UBBELOHDEHO VISKOZIMETRU	58
6.2.1	Naměřené hodnoty na Ubbelohde viskozimetru při 25,3 °C	58
6.2.2	Naměřené hodnoty na Ubbelohde viskozimetru při 30 °C	60
6.2.3	Naměřené hodnoty na Ubbelohde viskozimetru při 35 °C	62
6.3	VÝSLEDKY A DISKUZE ROTAČNÍHO VISKOZIMETRU VISCO TESTER 6 ^L VLT – 6 THERMO HAAKE, UTB ZLÍN	64
6.3.1	Měření původního roztoku kolagenu na rotačním viskozimetru	64
6.3.2	Měření 1.ředěného roztoku kolagenu na rotačním viskozimetru	65
6.3.3	Měření 2.ředěného roztoku kolagenu na rotačním viskozimetru	66
6.3.4	Měření 3.ředěného roztoku kolagenu na rotačním viskozimetru	67
6.3.5	Měření 4.ředěného roztoku kolagenu na rotačním viskozimetru	68
6.4	VÝSLEDKY A DISKUZE MĚŘENÍ FT-IR	69
6.4.1	FT-IR měření původního vzorku roztoku atelokolagenu	69
6.4.2	FT-IR měření 1.ředěného roztoku atelokolagenu	70
6.4.3	FTIR měření 2. ředěného roztoku atelokolagenu	71
6.4.4	FT-IR měření 3. ředěného roztoku atelokolagenu	72
6.4.5	FT-IR měření 4. ředěného roztoku atelokolagenu	73

6.4.6	FT-IR měření síťovaného atelokolagenu glutaraldehydem v koncentraci 0,25%.....	75
6.4.7	FT-IR měření síťovaného atelokolagenu glutaraldehydem v koncentraci 0,5%.....	76
6.4.8	FT-IR měření síťovaného atelokolagenu glutaraldehydem v koncentraci 1%.....	77
6.5	VÝSLEDKY A DISKUZE MĚŘENÍ UV-VIS.....	78
6.5.1	Měření vzorků roztoků kolagenu po 1nm	78
6.5.2	Měření vzorků roztoků kolagenu po 2nm	79
6.5.3	Měřená spektra síťovaného atelokolagenu glutaraldehydem.....	80
6.5.3.1	UV-Vis síťovaný atelokolagen glutaraldehydem o koncentraci 0,25%	80
6.5.3.2	UV-Vis síťovaný atelokolagen glutaraldehydem o koncentraci 0,5%.....	81
6.5.3.3	UV-Vis síťovaný atelokolagen glutaraldehydem o koncentraci 1% ...	82
	ZÁVĚR.....	83
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	84
	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK	86
	SEZNAM OBRÁZKŮ	87
	SEZNAM TABULEK.....	92
	SEZNAM PŘÍLOH.....	94

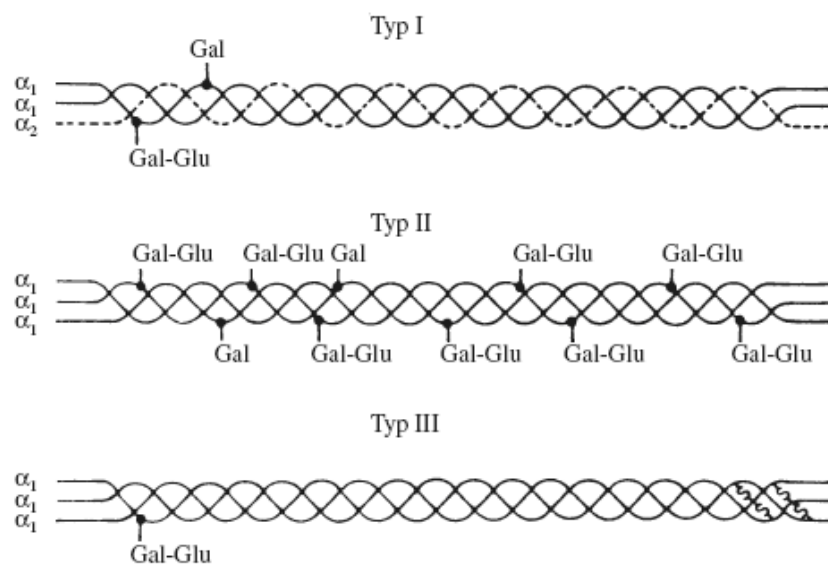
ÚVOD

Kolagen je rozšířen v celé říši živých organismů ovšem s výjimkou jednobuněčných a také patří mezi nejdůležitější vláknité bílkoviny. Kolagen je hlavní složkou pojivových tkání, u kterých zajišťuje správnou funkci, nejvíce v souvislosti s jejich mechanickými vlastnostmi. Je to dané jeho specifickou strukturou, která je charakteristická vysokým stupněm vnitřní organizace molekul. Kolagen představuje v těle 25-30% všech bílkovin. Je hlavní organickou složkou kůže, kostí, chrupavek, vaziva a šlach. Má také opěrnou a ochrannou funkci, nejčastěji jako složka mezibuněčné hmoty. Kolagen je obnovitelná surovina jehož zdroje jsou téměř neomezené [1].

I. TEORETICKÁ ČÁST

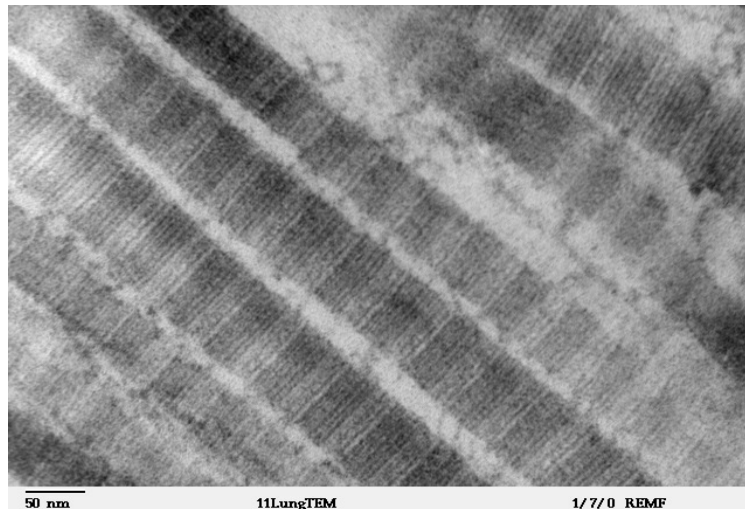
1.1 Kolagen

Kolagen je rozšířen v celé říši živých organismů. Je hlavní složkou pojivových tkání jako jsou kůže, chrupavky, cévní stěny, rohovky, zuby, kosti, kde zajišťuje správnou funkci, která souvisí s jejich mechanickými vlastnostmi. Také patří mezi technicky nejdůležitější vláknité bílkoviny. Je to dáno jeho specifickou strukturou, která je charakteristická vysokým stupněm vnitřní organizace molekul. Kolagen tvoří 25 – 30 % všech bílkovin v těle. Má funkci opěrnou a ochrannou. Je složkou mezibuněčné hmoty, která slouží jako základní protein životních pochodů ve zdravém i nemocném těle. Kolagen je obnovitelnou surovinou a jeho zdroje jsou neomezené. Proto je snaha neustále zdokonalovat preparáty z něho vyráběné a stále hledat nové možnosti jeho zpracování a vyrábění [1].



Obr. 1. Schéma tří typů kolagenu [1].

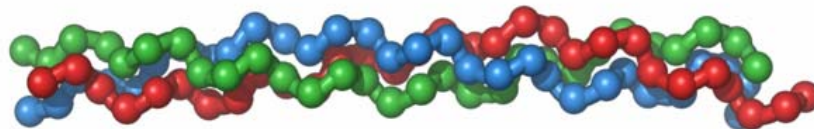
Na obrázku je patrné rozdílné zastoupení jednotlivých typů polypeptidových řetězců a různý stupeň glykosylace. Disulfidové síťování je naznačeno jen u typu III [1,2].



Obr. 2 . Kolagenová vlákna typu I v transmisním elektronovém mikroskopu [17].

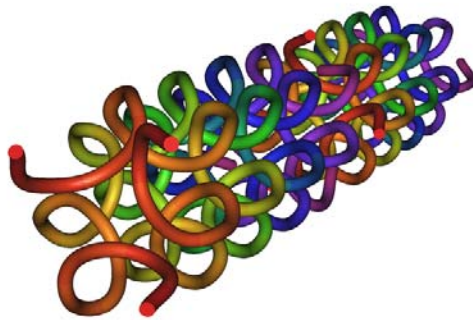
1.2 Atelokolagen

Atelokolagen je název pro kolagen, který je zbavený telopeptidů, ty mají funkci antigenních determinantů, u nichž je zachována trojhelikální konformace, která zajišťuje zablokování jeho zbývající vnitřní antigenní oblasti.



Obr. 3. Tropokolagen - spirálovité vlákno kolagenu [17].

Hydro-Sorb je vstřebatelné atelo-kolagenové hemostatikum vyrobené z vysoce čistého biopolymeru (kolagen typu I bez telopeptidů). Výhodou tohoto materiálu je nejvyšší stupeň biokompatibility, vstřebatelnost hemostatik po implantaci a výborná tolerance živé tkáně. Tyto hemostatika nepodporují růst mikroorganismů a používají se i do infikovaných ran nebo u medicínsky kompromitovaných pacientů. Mírně působí i bakteriostaticky. Skutečností je to, že aktivují kaskádu nativních koagulačních faktorů v krvi přirozeným způsobem. Tím se urychluje celý proces zástavy krvácení a také se mnohonásobně snižuje ztráta krve [2].

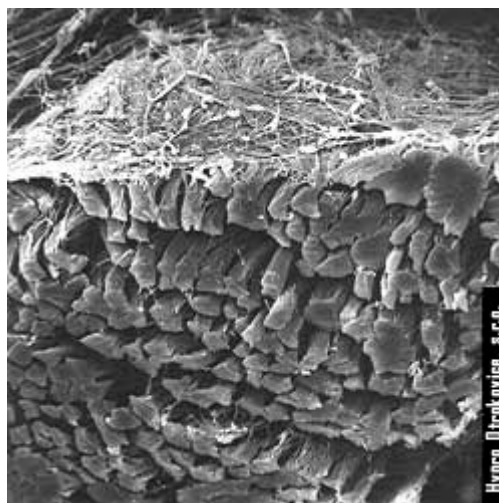


Obr. 4. Model krystalové struktury trojitě šroubovice kolagenu Pro-Pro-Gly103 [17].

Hydro-Sorb bývá indikován pro zastavení chirurgického nebo úrazového krvácení převážně tam, kde běžné postupy bývají nedostatečné nebo obtížně proveditelné. Je ideální obvaz pro povrchová zranění, pro místa kde byly odebrány kožní implantáty, také pro popáleniny a odřeniny. Hydro-Sorb velmi účinně podporuje léčení bércových vředů, dekubitů a jiných kožních lézů [3].



Obr. 5. Hydro-Sorb R [18].



Obr. 6. Hydro-Sorb R [7].

1.3 Fyzikálně – chemické vlastnosti

Do těchto vlastností zařazujeme polyelektrolytický charakter, bobtnání, denaturaci a renaturaci, hydrotermální stabilitu, hydrataci kolagenu a přeměnu na želatinu [1].

1.3.1 Polyelektrolytický charakter

Kolagen i jiné bílkoviny, mají charakter amfoterního polyelektrolytu. Iontové reakce probíhají v závislosti na pH prostředí. Znamená to, že část skupin jeho postranních řetězců se ionizuje v alkalické a část v kyselé oblasti pH. Náboj molekuly kolagenu se mění se změnou pH : v silně alkalické oblasti má náboj záporný a silně kyselá má kladný. Izoelektrický bod nezměněného kolagenu je při pH 7. Slabými účinky chemikálií se mění pH v rozsahu 4,5 – 8,0. Fyzikálně – chemické vlastnosti v této oblasti vykazují extrémní hodnoty. Izotovým bodem je označována hodnota pH, u které jsou počty protonů připojené ke skupinám $-NH_2$ bílkoviny, ta se rovná počtu protonů oddisociovaných ze skupin $-COOH$. Bílkovina se proto čistí dialýzou, aby tak neobsahovala žádné jiné ionty. Hodnota pH se charakterizuje jako izoiontový bod [1].

1.3.2 Bobtnání

Z fyzikálně – chemického hlediska se kolagen řadí mezi přechodové koloidní soustavy – gely. Schopnost bobtnat je jejich nejdůležitější vlastností. Ponořením do vody vlákno kolagenu omezeně bobtná, při tomto procesu dochází ke změně objemu, délky a pružnosti vlákna. V nabobtnalém kolagenu voda tvoří dvě části. První část je tzv. bobtnací voda, která se dá mechanickým účinkem odstranit a druhou část tvoří tzv. voda hydratační, která je koloidně vázaná a odstranitelná jen sušením. Bobtnání z mechanického hlediska rozlišujeme na osmotické a lyotropní. Sloučeniny, které způsobují tento typ bobtnání mají schopnost štěpit vodíkové vazby a v extrémních případech mohou rozpuštěn kolagen [1].

1.3.3 Degradace a denaturace

Vlivem některých chemikálií nebo tepelným účinkem ztrácejí bílkoviny své původní přirozené vlastnosti – denaturují. Denaturací vzniká želatina. Mechanismus kolagenu vzniká ve dvou stupních. V prvním nastane zborcení trojitě spirály a makromolekula tropokolagenu se stáhne do statického klubka, které jsou v jednotném řetězci spojeny. V druhém stupni se klubka rozpadají na tři frakce : frakci α - tvoří jeden polypeptický řetězec původní spirály,

frakci β – tvoří dva doposud spojené řetězce a frakce γ , tu tvoří tři řetězce v nezměněné formě statického klubka. Pokud denaturovaný roztok tropokolagenu zůstane delší dobu stát při nízké teplotě, může zčásti probíhat proces denaturace, tzv. zpětná rekonstrukce spirálové konfigurace [1].

1.3.4 Hydrotermální stabilita

Zahříváním kolagenních vláken ve vodě nastává k jejich zkrácení asi o 1/3 vlákna ve směru osy. Termická kontrakce je charakterizována teplotou smrštění T_s . Příčinou tohoto smrštění je štěpení intramolekulárních příčných vazeb a rovněž vazeb intramolekulárních. Tyto vazby udržují trojitě spirály v nativním kolagenovém vlákně v nataženém stavu. T_s kolagenu považujeme za tání kolagenu v krystalických oblastech. Kontrakci kolagenového vlákna a snižování hodnoty T_s způsobují izotropní činidla, které štěpí vodíkové vazby [1].

1.3.5 Hydratace kolagenu

Proteiny obsahují dva typy hydrofilních center, které mají schopnost na sebe vázat vodu silami elektrostatickými a vodíkovými vazbami. Prvním typem jsou polární skupiny přítomné v bočních řetězcích některých AMK zbytků druhým typem jsou peptidické vazby dusíku kyslíku. Aby se udržely fyzikální vlastnosti kolagenu je proto nutná asociace určitého minimálního množství vody, která tvoří přibližně 20% jeho hmotnosti. V zcela hydratovaném stavu kolagenu se uvolňuje pohybové omezení peptidových řetězců protofibril – typický pro suchý stav, tím se vysvětluje elementární funkce vody pro fyzikální vlastnosti proteinu [1].

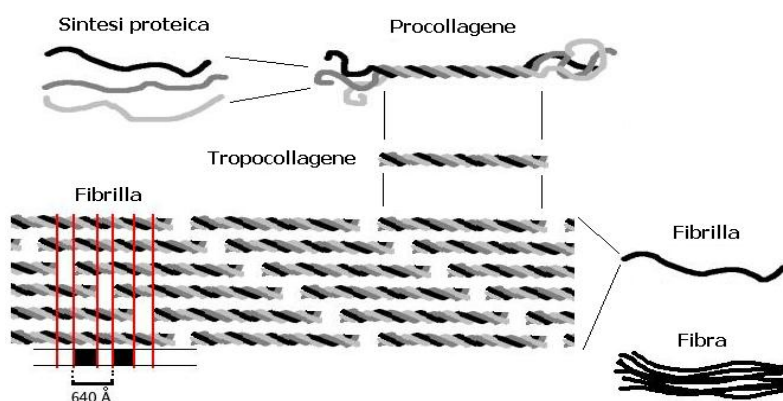
1.3.6 Přeměna na želatinu

Jestliže začneme zahřívát kolagen ve vodném prostředí, vznikne želatina. Z teoretických představ přeměny kolagenu na želatinu rozeznáváme tři pochody. V prvním pochodu dochází ke štěpení příčných kovalentních vazeb na úrovni kvartérní struktury, v druhém denaturace na úrovni terciární struktury a třetím pochodu vzniká hydrolytické štěpení peptidických vazeb polypeptidických řetězců na molekulární úrovni. Vlastností želatiny je přechod sol – gel. Za chemicky velmi čistou formu kolagenu z hlediska složení AMK považujeme želatinu. Vlivem zásahu do struktury polypeptidového řetězce má charakter de-

gradace, depolymerace a ta je nežádoucím jevem: čím méně je těchto vazeb rozpuštěno, tím lepší jsou fyzikálně - chemické vlastnosti želatiny [1].

1.3.7 Syntéza kolagenu

Syntéza kolagenu z části probíhá uvnitř buňky, částečně extracelulárně. Polypeptidový řetězec je syntetizovaný na hrubém endoplazmatickém retikulu buňky. Vzniklý protokolagen je dále vyloučen do extracelulárního prostoru kde z něj enzym prokolagenpeptidáza odštěpí tropokolagen. Ten reaguje s dalšími molekulami tropokolagenu a za přítomnosti katalyzátoru lisyoxidáza vytváří mikrofibrily. Po syntéze procházejí molekuly kolagenu postranslační modifikací, která bílkovině zajistí plnou funkčnost. Mezi tyto modifikace řadíme i hydroxylace, kde se hydroxylová skupina váže s četností jednu ku tisíci aminokyselinových molekul kolagenu. Přesto jsou hydroxylace kolagenu nenahraditelná pro jejich správnou funkci, jak dokazuje výzkum choroby osteogenesis imperfecta neboli nemoci „křehkých kostí“ [4].



Obr. 7. Souhrnné schéma syntézy kolagenu [4].

1.4 Chemické modifikace

K modifikaci vlastností a chování kolagenu se používá celá řada reakcí s výjimkou thiolových skupin. Tyto reakce se dělí do následujících kategorií: první přímá reakce bočních funkčních skupin s monofunkčními reagenty nebo druhá s polyfunkčními reagenty, vedoucí k polymerizaci, třetí kategorií jsou oxidační nebo redukční reakce měnící povahu řetězců a poslední kategorie jsou omezené enzymatické degradace, tyto degradace neporuší strukturu hlavního řetězce. Mimo tyto případy, kdy je degradace žádoucí, volíme reakční podmínky tak, aby hydrolytické reakce byly minimální během chemické degradace [1].

1.4.1 Degradace kolagenu

Hydrolytická degradace

Kolagen v roztoku podléhá progresivní hydrolytické degradaci, které jsou doprovázené ztrátou mnoha fyzikálních vlastností. Rychlost procesu je závislá na teplotě, pH systému a v malé míře na vnitřním tlaku roztoku a povaze dalších rozpouštědel, které mohou být přítomny během reakce. S rostoucí teplotou roste rychlost hydrolýzy. Degradace postupuje pomaleji při neutrálním pH, rychlost roste s pohybem na obě strany [1].

Enzymatická degradace

Část experimentálních studií ukázaly, že přirozená forma kolagenu je vůči působení proteolytických enzymů odolná, s výjimkou konkrétních enzymů bakteriálního nebo hmyzího původu – koleganasy, tyto enzymy specificky štěpí peptidové řetězce přirozeného kolagenu. Zařazujeme mezi ně enzymy izolované z bakterií *Clostridium perfringens* a *Cl.histoliticum*. Další situace nastane při vyšší teplotě, kdy sekundární struktura kolagenu se v roztoku rozpadá. Každý peptidový řetězec je pak schopen zaujmout větší množství konfigurace s přibližně stejnou energií, ale nemá stálou orientaci [1].

Oxidační štěpení

Oxidační štěpení je složitější proces než hydrolytická degradace. Vlivy oxidačních činidel, jako jsou např. peroxid vodíku, jodistan sodný, bromnan sodný a železokyanatam, prokázalo, že reakce s kolagenem se navzájem velmi liší. Degradace je založena na iniciaci příslušného činidla na sacharidy, které jsou obsažené v kolagenu. Rozklad kyselinou jodistou je doprovázeno malým úbytkem volných aminokyselin a silným poklesem hexosy. Snížený obsah hydroxylysinu v kyselé rozpustném kolagenu odpovídá ztráta aminokyselin [1].

1.4.2 Síťování

Síťovaný kolagen má vyšší odolnost vůči působení proteás a nižší stupeň nabobtnání oproti nezasíťovanému kolagenu. Také má vyšší modul pružnosti. Síťovací techniky se často používají, jelikož kolagenové preparáty při jejich použití mají nejlepší chemické, fyzikální

i materiálové vlastnosti a minimální reaktivitu s vodou, v tomto prostředí se často nacházejí. Kolagenové zesíťování může být docíleno chemickou úpravou – aldehydy, aroleiny, kyseliny, oxidačními činidly. Dále i fyzikálními vlivy – gama zářením, UV zářením [1].

1.5 Biochemické vlastnosti

Kolagen se nachází skoro ve všech pojivových tkáních – kůže, chrupavky, kosti. Pojivová tkáň tvoří velký podíl mezibuněčné hmoty, ta je tvořena převážně mukopolysacharidy. Jednotlivé buňky pojiva zvané fibroplasty odděluje mezibuněčná hmota, které fibroplasty produkují. Mechanické funkce zajišťuje pojivo, které také dává tvar organismu jako celku. Kolagenová struktura je velmi unikátní, protože dokáže vytvářet vlákna s vysokou pevností v tahu.

Základní struktura vláken kolagenu je tvořena molekulami tropokolagenu. Molekuly jsou složeny ze tří vzájemně složených stejně dlouhých vláken, ty samy agregují za vzniku kolagenních vláken. Vlákno tropokolagenu obsahuje kolem 1000 aminokyselinových zbytků a jejich relativní molekulová hmotnost je 285 kDa. Molekulu tropokolagenu tvoří trojvláknový pravotočivý nelokální prut o délce 300 nm a průměru 1,5 nm. Zvýšená stabilita je zajištěna vzájemným zapadnutím struktury prolinu a hydroxyprolinu, tvorbu vodíkových vazeb za účasti hydroxylových skupin hydroxylysinu.

Při nedostatku vitamínu C (kyselina askorbová) je vznikající kolagen nedostatečně hydroxylován, jeho stabilita klesá a může dojít až k onemocnění kůže a cévních stěn a tím i ke vzniku krvácivých stavů, typickým onemocněním je skorbut (kurděže). Oproti dalším proteinům obsahují kolageny abnormálně vysoký obsah glycinu a prolinu.

U savců existuje asi 10 různých variant kolagenů, které jsou složené minimálně z 18 odlišných polypeptidových řetězců, ty se vyskytují v různých tkáních téhož jedince.

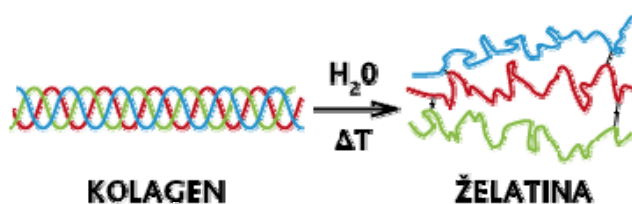
V kůži a v kostech má největší zastoupení kolagen typu I., který se skládá ze dvou řetězců α_1 kolagenu a jednoho řetězce α_2 kolagenu. Vlákna jsou zpevněna příčnými kovalentními vazbami, které se tvoří z postranních řetězců lysinu [6].

Nejrozšířenější a nejdůležitější je kolagen typu I, který obsahuje cennou surovinu pro řadu technických oborů. Důležitými jsou farmaceutické výrobky, jako jsou hemostatické plsti, pěny, chirurgické nitě, kolagenové membrány a filtry. Kolagen nachází uplatnění i u potra-

vinářských doplňků, v nichž má terapeutickou a profylaktickou úlohu u chorob pohybového aparátu jako jsou klouby a šlachy. Uplatnění nachází také v kosmetickém průmyslu v přípravcích pro potlačení projevů stárnutí pokožky [7].

Kolagen ve svalech je denaturován kyselinou mléčnou, který je hydrolyzován při zrání masa i jinými enzymy. Kolagen denaturovaný teplem je možno hydrolyzovat *pepsinem* nebo *trypsinem*. Charakteristickou vlastností je smršťování molekuly při zahřívání na určité teplotu, tyto změny můžeme pozorovat při vaření nebo pečení masa.

Při teplotě kolem 90°C se narušuje struktura molekul kolagenu, dochází k přerušení vazeb mezi polypeptidovými řetězci, k uvolnění molekul tropokolagenu a vzniká sol rozpustné želatiny. Při ochlazení dochází k obnovení vazby mezi původními částmi řetězce. Tyto struktury následovně zachycují velké množství vody a vzniká gel (želatina) [6].



Obr. 8. Chemicky indukovaná přeměna na želatinu [6,8].

Želatina vzniká při vaření, pečení a dalších tepelných úpravách masa. Potravinářská želatina je vyrobena z kolagenu kůží, kostí a to extrakcí vody po částečné alkalické nebo kyselé hydrolyze. Z kolagenu se také mohou vyrábět kličková střívká - jedlé obaly pro masné výrobky [6,8].

1.6 Aplikace v technické a medicíně praxi

Biomedicínské použití kolagenu má svůj původ ve fyziologické blízkosti nebo identitě aplikovaného kolagenu, v jeho resorbovatelnosti, která se může řídit sítovacími reakcemi a vysoké absorpční schopnosti, ta je podporována vnitřním povrchem a snadno přístupnými reakčními skupinami.

Výhodou kolagenu je, že ho můžeme vyrobit velmi čistý, zejména rozpustné kolageny. Kolageny, které se nacházejí ve stejné formě u různých druhů savců, vykazují velmi nízkou tvorbu protilátek i v organismu. Kolagen můžeme považovat i za nosič léčiv nebo také stimulační látku a baktericidní přísadu. Tyto nosiče léčiv se dostávají do rány a postupně se během hojení uvolňují.

Velkou nevýhodou systémů na bázi kolagenu je jejich nízká odolnost vůči enzymatické degradaci. Proto se tyto systémy stabilizují např. přidáním různých typů zhaševčů nebo lapačů reaktivních radikálových meziproductů enzymatických reakcí.

Pro lékařské účely se z kolagenu vyrábí tyto různé produkty. Ze střev stočená šicí vlákna, jejich resorbovatelnost se řídí zesíťováním solemi chromu, většinou jsou vyrobeny na bázi polyamidu, polyesteru nebo polymerů kyseliny mléčné. Můžeme použít i práškový kolagen ve formě spreje jako bandáž na rány. Také kolagenová vlákna na opravy cév a náhrad šlach. Vysoušení brání kombinace Goretexemu a Poromeriksemu. Hemostatika, membrány a netkané textilie se používají v medicíně na zástavu krvácení a hojení operačních ran. Netkanou textilií spolu s kožními štípenky a fixované pěny využíváme pro radiačně-chemickou sterilizaci na zakrytí ran a popálenin. Jako náhrada kostí a kloubů nám slouží kombinace kolagenu s fosforečnanem vápenatým. Na hojení ran můžeme použít produkt kolagenu, který se aplikuje vstříkáním mikrokapslí a ty jsou napuštěny účinnou látkou. V chirurgii můžeme využít i kolagenová lepidla. Kombinace kolagenu s polyakrylátem se mohou vyrobit kontaktní čočky [1].

2 PŘÍPRAVA VODNÍCH ROZTOKŮ KOLGENU

2.1 Odběr vzorků

Odběr vzorků je vždy smyslové vyšetření, zaměřené na hodnocení sledovaných znaků a specifických požadavků podle druhu suroviny. Smyslové vyšetření je určující pro odběr vlastních vyšetřovaných vzorků.

Základní principy odběru vzorků :

- minimálně 3 vzorky z různých míst suroviny, v případě suchých práškových surovin se vytvoří směsné vzorky,
- pokud se fixují, pak je velikost vzorků asi 1 cm³,
- počet vzorků se může zvýšit v případě výskytu podezřelých míst, které chceme zkoumat [9].

2.1.1 Příprava mikroskopických preparátů – základní schéma

1. Tuhé suroviny, podléhající kažení (zejména suroviny živočišného původu) :
 - se před zpracování uchovávají ve fixační tekutině a potom následuje postup, kterým získáme preparát k posouzení - odvodnění, zalití do parafínu, krájení, odparafínování, barvení a fixování,
 - vzorky se zmrazí a krájí přímo na řezy, barví se a fixují,
2. tekuté nebo roztíratelné vzorky se natírají v tenké vrstvě na podložní sklo, nechají se zaschnout a zafixují se,
3. suché materiály nevyžadují zvláštní podmínky pro uchovu :
 - lze je rovněž rozetřít v tenké vrstvě na podložní sklo,
 - další možností je jejich rozmíchání v tekutém parafínu a vytvoření parafinového bločku, ze kterého se krájí řezy, dále postupujeme jako v bodě 1. [9].

2.2 Fixace vzorků

Fixací rozumíme rychlé vysrážení (denuraci) bílkovin protoplazmy buněk a tkání fixačními prostředky, které zabraňují samovolnému rozkladu živé tkáně - autolýze. Postup fixace zahrnuje použití prostředků dvojího druhu – fyzikální a chemické. Při zpracování surovin živočišného původu využíváme zejména chemické prostředky. Jsou to roztoky organických nebo anorganických sloučenin, také jejich různé kombinace nebo směsi. Každý chemický fixační prostředek musí splňovat základní podmínky - do tkáně musí rychle pronikat, nesmí hrubě srážet cytoplazmatické proteiny, ale musí s nimi tvořit co možná nejjemnější nerozpustný gel, nesmí ovlivnit další zpracování vzorku [9].

2.2.1 Zásady při fixaci :

- odebraný vzorek musí být vložen do fixační tekutiny co nejdříve po odběru,
- dodržení vzorku krychlička v rozměru 1 cm³,
- množství fixační tekutiny musí převyšovat 20x až 50x objem fixovaného vzorku,
- tekutina musí mít přístup ke vzorku ze všech stran, proto je vhodné vzorek podložit například filtračním papírem nebo i vatou [9].

2.2.1.1 Nejpoužívanější fixační tekutiny

Formol (Formalin) - který se dodává ve 40% koncentraci, používá se jako 10% nebo 5% roztok, ředí se vodovodní vodou. Na světle se rozkládá, proto se musí uchovávat v temnu. Na dně lahve má být asi 20 mm vrstva uhličitanu vápenatého pro neutralizaci kyseliny mravenčí. Je také součástí některých fixačních směsí. Doba fixace je minimálně 24 hodin, podle velikosti vzorku, její délka není omezena. Po fixaci se vzorky obvykle vypírají pod tekoucí vodou (zamezení výskytu formolpigmentu) [9].

Další fixační tekutiny :

Bodianova tekutina- doba fixace 24 - 48 hodin. Obsah : formol 40%, kyselina octová ledová, etanol 80%.

Carnoyova tekutina - doba fixace 3 – 5 hodin (nesmí se přetáhnout – tkáně se po delší době nedají zpracovat). Tato směs je vhodná pro fixaci tkání, do kterých špatně pronikají jiné fixační tekutiny (výrobky s obsahem tuku).

Obsah: absolutní alkohol, chloroform, kyselina octovaná ledová [9].

2.2.2 Příklad postupu pro přípravu parafinových řezů

V různých laboratořích se může v některých detailech lišit . Proto je vhodné vzorky umístit do speciálních kazet, které umožňují průnik tekutiny, spolu s číslem vzorku [9].

Postup zahrnuje:

1. fixaci vzorku v 10% formalínu minimálně 24 hodin,
2. odvodnění vzorků:
 - ručně (viz tab.1),

Tab. 1. Ruční odvodnění vorků [9].

vypírání formalínu vodou	15 min
alkohol 50%	60 min
alkohol 70%	60 min
alkohol 80%	do druhého dne
alkohol 96%	60 min
alkohol 100%	2 h
methyalsalicylát	3 lázně (1 h, 2 h a do druhého dne)
xylen	3 lázně (po 20 min)
parafín	3 lázně

- v autotechnikonu (viz tab.2),

Tab. 2. Odvodnění vzorků v autotechnikonu [9].

vypírání formalínu vodou	15 min
alkohol 70%	120 min
alkohol 80%	120 min
alkohol 96%	100 min
alkohol 100%	120 min
alkohol 100%	120 min
xylen	3 lázně (po 20 min)

3. prosycení parafínem - 3 lázně.

2.2.3 Zalévací média

Zalévací média dělíme podle rozpustnosti ve vodě do dvou skupin :

- ve vodě rozpustná (želatina),
- ve vodě nerozpustná (parafín, celoidin).

Želatinu používáme u vzorků, které mají drobnou konzistenci. Zalévací proces je jednoduchý, protože se vzorek nemusí odvodňovat. Vzorky se postupně se vkládají do lázní želatiny 10% a 20% (při teplotě 37 °C), vždy na 2 hodiny a pak se zalévají rozehrátým roztokem 20% želatiny v zalévacích komůrkách. Dále se chladí se a nechávají se ztvrdnout ve formolu. Bločky upravíme a krájíme na zmrazovacím mikrotomu.

Parafín považujeme za nejčastěji používané médium. Bod tání je mezi 56 - 58 °C. Pro histologické účely je kvalitnější po přidání 5% včelího vosku (vláčnost, soudržnost). Parafín je nerozpustný ve vodě, proto je celý proces zalévání poměrně dlouhý, musí zahrnovat odvodnění vzorku (vzestupná alkoholová řada - 60, 80, 90, 96 a 100%), prosycení látkou, která rozpouští parafín a je mísitelná s alkoholem (např. xylen, metylsalicylát) - zde dochází k projasnění vzorku. Dále se vzorky postupně prosycují parafínem ve 3 lázních při teplotě 62°C, aby se odstranil xylen. Tento postup je s větší částí možno provést automa-

ticky v přístroji – autotechnikon. Prosycený vzorek se pak zalévá v zalévacích komůrkách parafínem a po zchladnutí se získá tkáňový bloček, který je připravený ke krájení. Používají se hotová zalévací média, vyráběná komerčně.

Celoidin se používá pro zalévání velmi tvrdých tkání [9].

2.2.4 Krájení bločků

Zalité tkáně ve vhodném médiu se krájí zpravidla na mikrotomech sáňkových a rotačních, oproti zmrazených bločků, které krájíme na mikrotomech zmrazovacích (kryostat). Součástí všech uvedených typů mikrotomů jsou podobné. Základní součásti : podstavec, nůž, zařízení na upevnění bloku a zařízení na posun bloku proti noži (sáňkový) nebo naopak (rotační). V kryostatu můžeme dosáhnout teploty -20 až -60°C. Tloušťku řezů volíme dle potřeby použití. Pro studijní účely jsou vhodné tenčí řezy.

Sériové řezy (používáme všechny ukrojené řezy tak, jak jdou za sebou) - zhotovují se pro získání představy o trojrozměrném uspořádání některých struktur v preparátu. Nejlépe se krájí série z parafínových bloků na rotačním mikrotomu.

Parafínové řezy, které jsou pořízené na rotačním a sáňkovém mikrotomu, se napínají na vodní hladině a přenášejí na podložní skla, která jsou opatřena jemným nátěrem směsi glycerinu s bílkem, případně s želatinou. Podložní skla sušíme na ploténce vyhřáté na 40°C a pak v termostatu, až potom se barví. Málokdy se zpracovávají jako řezy – používají se silné řezy, barví se volně v barvicím roztoku a pak se teprve zachytávají na podložní sklo – je to těžké a často se řezy poškodí. Řezy ze zmrazeného materiálu (z kryostatu) se umísťují přímo na sklo [9].

2.2.5 Barvení preparátů – přehledné a cílené barvicí posupy

Barvením získáváme přehled o všech strukturách v preparátu (přehledné barvení) nebo některé odlišit jejich zvýrazněním (cílené barvení). Speciálními barvivy se barví histologické řezy a ty se vyznačují vysokou afinitou k různým složkám. Zmrazené řezy barvíme přímo, parafínové řezy je nutné před barvením odparafínovat. Parafín se v řetězcích rozpouští rozpouštědlem (xylen) a sestupnou etanolovou řadou se řetězce převedou do vody.

Histologická barviva jsou většinou rozpustná ve vodě, v některých případech i v alkoholu. Barvení se provádí ručně ve speciálních kyvetách, nebo v barvicím automatu. Barviva aplikujeme postupně nebo se smíchávají do jednoho roztoku [9].

Přehledná barvení

Jsou založena na správné diagnostice znalosti barevných odlišností a na znalosti morfologie :

- hematoxylin –eozin,
- Van Gieson,
- Toluidinová modř.

Cílená (speciální) barvení

Je založeno na barvení jedné nebo více struktur nebo jsou zvýrazněny a ostatní se barví slabě nebo vůbec :

Tab. 3. Cílené barvení struktur [9].

na kolagen	Massonův trichrom zelený a modrý
	trichrom podle Goldnera v modifikaci Charvátka
	dle Callejy
na elastin	orcein
na retikulín	Gömöri
na tuk	sudan III, olejová červeň
na plísňe	Grocott
na kosti	Kossa
	van Gieson (modifikace)
na polysacharidy	PAS

Základní přehledné barvení

Hematoxylin - eozin se řadí mezi nejpoužívanější barvení, nepřímé, basické. Barvicí látkou je hematein (oxidační produkt hematoxylinu), důležité je spojení hemateinu s Al z kamence draselného (tzv. mořidlo). Tak vzniká potřebný barevný lak, je to silně pozitivně nabitě jádrové barvivo. Podle druhu mořidla dělíme různé druhy hematoxylinu (kamencový Mayerův, železitý Weigertův apod.). Eozin je kyselé xantenové barvivo, cytoplasmatické barvivo, eozinem obarvíme všechno, jádra se pak diferencují vodou modře. Jedná se o skupinu barviv a nejčastěji se používají erytrosin a žlutý eosin [9].

2.2.6 Uzavírání obarvených řezů

Dobře obarvený preparát uzavíráme mezi podložní a krycí sklo do vhodného média. Obvykle jsou to látky nerozpustné ve vodě, a proto je nutno řezy odvodnit a převést do rozpouštědla - xylenu. V praxi byl dříve používal kanadský balzám. V laboratořích, se dnes používají syntetická média různých značek (Solakryl, Eukitt). V určitých případech se používá fixování do glycerinové želatiny – např. při barvení tuku, protože řezy nesmí přijít do styku s organickými rozpouštědly.

Postup při fixování:

Kapka média se umístí na okraji řezu, krycí sklíčko se přiloží v úhlu 45° a opatrně se spouští (důležité je, aby nezůstaly vzduchové bubliny). Preparát se nechá zaschnout a potom se opatrně očistí okraje, například filtračním papírem nebo vatou [9].

2.2.7 Vyšetření preparátů a hodnocení výsledků

Obarvené řezy vyšetřujeme ve světelném mikroskopu při menším zvětšení (např. 40x), pro studium detailů se používají zvětšení 100x případně 200x. Většinou se jedná o kvalitativní vyšetření. Ve vyšetřovaných vzorcích popisujeme přítomnost jednotlivých druhů tkání ve zkoumaných vzorcích. Můžeme se zaměřit jen na určité druhy tkání, které jsou barveny speciálním postupem. Údaje v literatuře vyhledáváme při identifikaci tkání živočišného a rostlinného původu, pro srovnávání se používají vzorky, připravené v laboratoři a dále také schématické obrázky a fotodokumentaci ze starší literatury. Kvantitativním vyšetřením se rozumí, počítání a měření objektů s cílem vyjádřit jejich poměrné zastoupení [9].

2.2.8 Dokumentace

O všech vyšetřovaných vzorcích se vede laboratorní protokol s těmito údaji - datum odběru, druh výrobku, výrobce, složení (pokud bylo známé), postup zpracování (fixace, barvení), výsledek vyšetření. Zamezení výměny vzorků, je třeba označit nádobku názvem vzorku a číslem, pod kterým je vzorek veden v laboratorním protokolu, případně i datem odběru, také i druh použité fixační tekutiny. Všechny zhotovené preparáty se po určitou dobu uchovávají , u některých je zhotovena fotodokumentace [9].

3 EXPERIMENTÁLNÍ METODY

3.1 Přístrojová technika a použité materiály

Tab. 4. Přístrojová technika a použité materiály [12].

Metoda	Přístrojová technika	Použití
ATR FT-IR	Nicolet Impact 400 FTIR spektrometr.	Studium chemického složení.
UV-VIS	U-3300 spektrometr HITACHI.	Analýza roztoků oxidovaného kolagenu.
Modifikace plazmatu	Radiofrekvenční plazmový reaktor.	Funkcionalizace povrchu PP.
SEM	JEOL JXA 840A.	Sledování změn morfologie povrchu.
EPR	Aspect 2000, X-range Bruker ER 200E spektrometr.	Detekce vodných radikálů.
Měření kontaktních úhlů smáčecí	Oca 10 (Data Physics Instrument GmbH, Germany).	Výpočet povrchových energií – hydrofilní a hydrofobní povaha povrchu.
Peel testy	INSTRON 4301 (model TM).	Měření pevnosti adhezního spoje.
DSC	DSC-60, SCHIMADZU, Japonsko.	Kilometrická analýza.

3.1.1 Termická analýza

Je to skupina metod, které zaznamenávají fyzikální vlastnosti látek v závislosti na zvyšující se teplotě.

Fyzikální vlastnosti zahrnují specifickou tepelnou kapacitu, energetické změny, hmotnostní změny, mechanické vlastnosti (dimenze, deformace), optické vlastnosti a analýzu uvolněných plynů.

Do materiálových vlastností zařazujeme teplotu tání, teplotu skelného přechodu, expanzní koeficient, tepelnou stabilitu, krystalizační chování, teplotu materiálu a kinetiku, oxidaci, čistotu a viskoelastické vlastnosti [10,11,22] .

3.1.2 DTA

U této metody zaznamenáváme změny během zahřívání vzorku ve srovnání s referentním materiálem. Změny fyzikální nebo chemické se projevují zvýšením nebo snížením jeho teploty ve srovnání s referentním materiálem. V případě srovnávací látky neprobíhá v rozmezí teplot žádný z pochodů spojený s pohlcením nebo uvolněním tepla. V případě vzorku mohou probíhat děje spojené s pohlcením nebo uvolněním energie jako je teplota tání, stupeň krystalinity, čistota materiálu, fázové přechody, polymorfismus, desorpce a odpařování, chemické reakce, tepelná stabilita.

Zařízení pro měření DTA

- zdroj tepla (odporová pícka),
- zařízení pro lineární vzestup teploty (obvykle 5-20 °C/min),
- nosič vzorku,
- srovnávací látka,
- čidlo měřící teplotu a rozdíl teplot mezi vzorkem a srovnávací látkou (termočlánek).

Příprava vzorku

Vzorek by měl mít stejné zrnění jako látka srovnávací a podobné fyzikální vlastnosti. Vzorek se upěchovává do kovových nebo keramických kelímků, kde je spolu se standardem umístěn do vyhřátého prostoru, jenž zaručuje jejich regulovaný a rovnoměrný ohřev [10,11,22].

3.1.3 DSC

U této metody měříme tepelný tok v mW v závislosti na teplotě nebo čase. Tato měřící technika má použití zejména v plastikářském, chemickém, farmaceutickém, elektronickém, automobilovém a potravinářském průmyslu. K měření se používá vysoce citlivý keramický senzor, který měří difference mezi tepelným tokem ve vzorku a referentním materiálem.

Využití aplikací této metody při sledování teploty tání k ověření čistoty látek, charakterizaci materiálu, stanovení teploty skelného přechodu T_g , krystalizaci, oxidační stabilitě, kinetiky, čistoty chemikálií a stanovení specifického tepla [10,11,22].

3.1.4 Termogravimetrie (TG)

Metoda sleduje hmotnost vzorku při rovnoměrném zvyšování teploty.

Aplikace se využívají k určení složení substancí, v gumárenské a plastikářské analýze, analýze minerálů a keramických materiálů, nachází využití i v chemickém a farmaceutickém průmyslu [10,11,22].

3.1.5 Termomechanická analýza

Metoda sleduje dimenzionální změny během zahřívání (jako funkce času). Využití aplikací především v oblasti polymerů [10,11,22].

3.1.6 Termická dilatometrie

Sleduje se závislost objemu vzorku na teplotě – roztažnost v závislosti na teplotě. Metoda sleduje velmi malé změny 10^{-4} cm. Měřicí zařízení sleduje objemové změny pomocí světelného paprsku, kde indikace je fotometrická nebo fotografická.

Aplikace se využívají při studiu polymerů, u objemové nebo dílkové roztažnosti – směrnice termodilatometrické křivky.

Termická dilatometrie je standardní metoda pro stanovení středního součinitele délkové teplotní roztažnosti kovových, keramických a skelně krystalických materiálů [10,11,22].

3.1.7 Termooptická analýza

Zjišťuje optické vlastnosti v závislosti na měnící se teplotě vzorku (Dopplerův jev).

Využití vlastností v měření propustnosti nebo odrazivosti interferenčního měření difúzní reflexe, také i pro kontrolované teplotní programování pro IČ spektroskopii [10,11,22].

3.1.8 Spektrální a optické metody

Informace o vzorku získávají měřením intenzit vlnových délek (energií) záření, které sledované částice hmoty (ionty, atomy, molekuly) vysílají, nebo které jsou různými interakcemi s těmito částicemi pozměněny. Záření, které měříme se liší nejen energií, ale často i povahou částic, které paprsek vytvářejí. Často jde o záření elektromagnetické, kde nosičem elektronického pole jsou fotony. Prakticky se využívá celé spektrum od rentgenových paprsků až k radiovým vlnám [10,11,22].

3.1.9 Atomová absorpční spektrometrie

Optická metoda založena na měření absorpce elektromagnetického záření v rozmezí vlnových délek 190 až 850 nm volnými atomy. Metoda je vhodná pro kvantitativní elementární analýzu asi šedesáti prvků, které jsou převážně kovové. Při použití této metody se předpokládá převedení této analyzované látky z vodného či nevodného roztoku na volné atomy v plynné fázi. Energetická kvanta fotonů, která jsou pohlcována při absorpci odpovídají přechodu vnějších elektronů atomu ze základních atomových orbitalů na excitované. Přechody začínají u absorpce a respektive končí u emise v základním stavu atomu, které jsou označovány jako rezonanční. Atomové orbitály na rozdíl od molekulových orbitalů jsou závislé pouze na elektronovém stavu atomu, tyto přechody optického elektronu ve spektru odpovídají velmi úzkým frekvenčním pásům, které jsou pozorovány jako spektrální čáry.

Využití aplikace

Touto metodou lze stanovit téměř všechny kovy, přičemž citlivost stanovení se pro jednotlivé kovy poměrně liší. Dalším využitím této metody lze u sériového stanovení kovů přítomných v malé koncentraci, kde se mohou aplikovat při analýze pitných a užitkových vod, v biochemii, v potravinářství, v toxikologii, ke kontrole znečištění životního prostředí kovy a stanovení kovových mikroelementů, které se dají určit v půdách, hnojivech a plastech [10,11,22].

3.1.10 Molekulová absorpční spektrometrie

Absorpční spektroskopie v ultrafialové a viditelné oblasti zkoumá interakce látky s elektromagnetickým zářením při vlnové délce 180 až 800 nm. V UV-Vis je absorpce záření spojená s přechodem molekuly ze základního do elektronově excitovaného stavu. Absorpční spektrum UV- VIS odráží elektronovou strukturu molekuly. Absorpci záření molekulami můžeme sledovat ve vzorcích všech skupenství. Při pohlcení fotonu dochází ke zvýšení celkové energie molekuly a ta přechází do excitovaného stavu. Energetický rozdíl, který je mezi oběma hladinami musí být roven přijatému kvantu záření. Podle zákonů elektrické dynamiky je absorpce záření spojena i se změnou elektrického dipólu molekuly [10,11,22].

Přístrojové vybavení

Absorpční spektrometry UV – VIS nebo také spektrofometry, kterými se měří spektra molekul a stanoví se jejich koncentrace. Rozlišujeme spektrofometry na jednopaprskové a dvoupaprskové.

Každý spektrální absorpční fotometr se skládá ze čtyř základních částí :

- zdroje záření,
- disperzního systému,
- absorpčního systému,
- fotometrického systému skládajícího se z fotoelektrického detektoru záření a měřidla absorbance nebo propustnosti.



Obr. 9. Spektrometr Helios Alpha (Thermo) umístěný na UFMI FT UTB ve Zlíně.

Metoda má rozsáhlé použití v organické i anorganické analýze, dále se využívá k řešení problémů povahy fyzikálně - chemické, ke zjištění stechiometrie komplexních sloučenin, k určování koncentrací a rovnovážných konstant při disociačních, asociačních a komplexo-
tvorných reakcích. K výpočtům se přímo nabízí Lambertův-Beerův zákon, neboť absorbanci lze relativně snadno měřit na základě její znalosti ϵ_{λ} , tak je možné velmi přesné stanovení analytu ve vzorku [10,11,22].

Lambertův-Beerův zákon : $A = \epsilon \cdot c \cdot d$

[10,11]

3.1.11 ATR – FT IR spektroskopie

Metoda je založena na interakci elektromagnetického záření o vlnočtu v rozmezí 10 až 10 000 cm^{-1} s měřeným vzorkem. Energie záření je dostačující k tomu, aby molekuly při absorpci změnily svůj rotační a vibrační stav. Infračervenými spektry se tedy sledují vibrační, rotační a rotačně – vibrační pohyby molekul. Tyto pohyby se řídí zákony kvantové mechaniky.

Úplná obrazová spektroskopie (ATR) je metoda, u které infračervené záření prochází krystalem o vysokém indexu lomu. Na rozhraní krystalu a jeho okolního prostředí dochází k úplnému odrazu. Při odrazu vzniká evanescentní vlna a ta zasahuje do prostředí vně krystalu. Infračervené záření ze spektrometru, které je vedené kolmo na krystal je zešíkmeno koncem ATR krystalu. Procházející záření krystalem proniká do vzorku a pokaždé se znovu odráží od krystalu. Paprsek je opět vyveden z krystalu jeho zešíkmeným zakončením.

Přístrojové vybavení

- IČ spektra měříme na dvoupraprskových přístrojích infračervených spektrometrech,
- svazek paprsků, který vychází ze zdroje se větví na dva rovnocenné svazky, z nichž jeden prochází kyvetou se vzorkem a druhý kyvetou s rozpouštědlem.

Tři základní prvky IČ spektrometru:

- zdroj infračerveného záření, který tvoří tuhý zářič z polovodičového materiálu (globar, Nernstova tyčinka),
- monochromátor,
- registrační zařízení.

IČ spektrometrie se využívá pro případy silně absorbující kapaliny, taveniny, látky citlivé na změnu struktury, látky práškové a látky nerozpustné. Další zvláštní význam má při analýze plastů, vláken, past, tkanin a nátěrů [10,11,12,22].



Obr. 10. FTIR – 860 1 PC.

3.1.12 Experimentální metody

V emisní spektroskopii molekula podstoupí přechod ze stavu s vyšší energií E_1 do stavu s nižší energií E_2 a rozdíl energie se emituje jako foton.

V absorpční spektroskopii se sleduje absorpce přibližně monochromatického záření při postupné změně jeho frekvence v určitém rozsahu. Energie $h\nu$ emitovaného nebo absorbovaného fotonu, je dána frekvencí ν emitovaného nebo absorbovaného záření a je dána Bohrovým vztahem:

$$h\nu = E_1 - E_2 \quad [10,11]$$

Emisní a absorpční spektroskopie dává stejné informace o rozdílech energetických hladin a o všeobecnosti praktické úvahy, která určí techniku použití. Emisní spektroskopie se obvykle používá pro spektroskopii ve viditelné a ultrafialové oblasti. Absorpční spektroskopie má častější využití. Také její spektra jsou lehce interpretovaná jako emisní spektra.

Zdroj záření

Zdroj záření obvykle produkuje záření, zahrnující určitou oblast frekvencí. Pro dalekou infračervenou oblast je zdrojem záření rtuťová oblouková lampa v křemenném skle a většina záření je generovaná právě tímto horkým křemenným sklem. Pro získání záření v blízké infračervené oblasti se používá Ernstova tyčinka. Toto zařízení se skládá ze žhavené keramické tyčinky obsahující oxidy kovů vzácných zemin (lantanoidy), které emitují záření podobající se záření absolutně černého tělesa. Pro viditelnou oblast spektra se používá wolframová / jodová lampa, která dává intenzivní bílé světlo. Deuteriová nebo xenonová

výbojka v křemenném skle se stále používá pro blízkou ultrafialovou oblast. V některých případech zdroj záření generuje monochromatické záření, které můžeme měnit v určitém rozsahu hodnot. Jedním z takových generátorů je klystrón, elektronické zařízení používané na generování mikrovln. Na pokrytí rozdílných oblastí elektromagnetického spektra se používají různé typy laserů [10,11,22].

3.2 Reologie

Viskozimetry jsou zařízení určená k měření hustoty – viskozity kapalin. Viskozita tekutin je charakteristickou vlastností reálných kapalin, oproti ideálním, u kterých se předpokládá nulové vnitřní tření při pohybu jednotlivých vrstev kapaliny. To znamená, že proudí-li kapalina, jsou její části v relativním pohybu, z čehož plyne, že dvě po sobě se posunující vrstvy mají různou rychlost a dochází mezi nimi k vnitřnímu tření [13].

3.2.1 Viskometrie newtonských kapalin

Na viskometrii newtonských kapalin pohlížíme dvojím způsobem:

- jedná se o stanovení viskozitní funkce v oblasti, kde je platná Newtonova viskozitní hypotéza $\sigma = \eta \gamma$, η je konstantní koeficient,
- jde o stanovení materiálové konstanty η , která je parametrem Navier-Stokesovy teorie.

V prvním případě je cílem stanovit experimentální měření smykové rychlosti i smykové napětí. V druhé fázi se zpracují tato primární data a údaje o viskozitě, kterou pak přiřadíme k určitému intervalu výchozích proměnných (σ , γ). Takový postup lze využít i při měření limitní viskozity η_0 pseudoplastických kapalin, neboť nedílnou součástí viskometrických dat by měl být při viskometrii newtonských kapalin i odhad proměnné oblasti smykových rychlostí.

V druhém případě nám stačí vyžít skutečnosti, že při pomalém režimu proudění je poměr (hnací síla toku)/(rychlost toku) úměrný viskozitě. Koeficient úměrnosti, který závisí převážně na geometrických parametrech přístroje, můžeme stanovit kalibračním měřením se stabilním vzorkem o známé viskozitě s viskozitním standardem. Jako viskozitní standardy se obvykle používají úzké destilační frakce alifatických olejů, jejich viskozita se stanoví na cejchovních kapilárních viskozimetrech v požadovaném teplotním rozmezí.

Při pečlivějším cejchování se stanoví i závislost zmíněného koeficientu úměry na Reynoldsově čísle (res. jiné odpovídající veličině, např. rychlosti toku) [14].

Tab. 5. Typy viskozimetrů pro technická měření [14].

Viskozimetr:	výtokový	s padající koulí	ponorný rotační
Příklad:	Engler, Saybolt, Redwood, Ford	Stokes, Hoppler	Brookfield, Ferranti-Shirley
Měřená veličina:	Objemový průtok (doba výtoku)	Rychlost pádu (doba pádu)	kroučící moment
Možnost měnit	výtokovou kapiláru	kouli	otáčky, vřeteno

3.2.1.1 Kapilární metoda

Měření viskozity je založeno na Poiseuillově rovnici. Měříme průtok kapaliny kapilárou o poloměru r a délce ℓ :

$$\eta = \frac{\pi \cdot r^4 \cdot \Delta p \cdot \tau}{8V \cdot \ell} \quad [15,16]$$

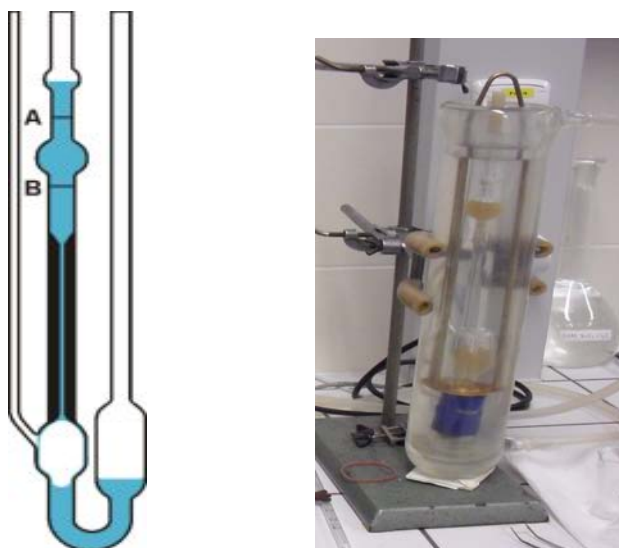
kde Δp rozdíl tlaků, ten je daný hydrostatickým tlakem kapaliny ve svislé kapiláře a je úměrný hustotě kapaliny. V objem kapaliny, který proteče kapilárou za čas τ . Viskozita je t úměrná hustotě kapaliny a době průtoku. Obvykle se provádí měření relativní, při kterém se na stejném viskozimetru porovnává viskozita měřené kapaliny η se známou viskozitou srovnávací kapaliny η_{ref} :

$$\frac{\eta}{\eta_{\text{ref}}} = \frac{\tau}{\tau_{\text{ref}}} \cdot \frac{\rho}{\rho_{\text{ref}}} \quad [15,16]$$

kde τ , τ_{ref} jsou doby průtoku určitého objemu měřené a srovnávací kapaliny, ty jsou vymezené dvěma ryskami A a B, ρ a ρ_{ref} hustoty měřené a srovnávací kapaliny. Kapilární viskozimetry mají přesnost v rozmezí od 0,01% do 0,1%, ale nemohou být použity pro newtonské kapaliny, protože rychlostní gradient není konstantní – roste se vzdáleností od

osy kapiláry. K výpočtům byla použita Hugginsova rovnice, která popisuje závislost redukované viskozity η_{sp}/c , na hmotnostní koncentraci polymeru c , pro zředěné roztoky rovnice [15,16].

Hugginsova rovnice: $\eta_{sp}/c = [\eta] + k_H[\eta]^2 c$



Obr. 11. Ubbelohdův kapilární viskozimetr s visací hladinou, UTB Zlín [16].

Ubbelohde viskozimetr

Je to měřicí přístroj, který se používá jako měřicí metoda založená na měření viskozity. Doporučuje se pro měření celulózových polymerů. Výhodou tohoto přístroje je, že získané hodnoty jsou nezávislé na koncentraci. Přístroj vynalezl německý chemik Leo Ubbelohde (1877-1964) [15,16].

3.2.1.2 Metoda padající kuličky

Měření této metody je založeno na Stokesově vztahu pro pád koule o poloměru r ve viskózní prostředí

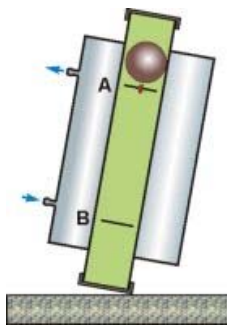
$$\eta = \frac{2}{9} \frac{r^2 \cdot g \cdot (\rho_k - \rho)}{u} \quad [15,16]$$

Höpplerův viskozimetr bývá častou variantou kuličkových viskozimetrů. Kulička se valí skleněnou trubicí o přesně známém vnitřním průměru, skloněnou v úhlu 10° , naplněnou

měřenou kapalinou, která je obklopena temperačním pláštěm. Měří se čas, který je potřebný k průchodu kuličky mezi horní ryskou A a spodní ryskou B. Obvykle bývá měřena srovnávacím způsobem:

$$\frac{\eta}{\eta_{\text{ref}}} = \frac{u_{\text{ref}}}{u} \cdot \frac{(\rho_k - \rho)}{(\rho_k - \rho_{\text{ref}})} = \frac{\tau}{\tau'} \cdot \frac{(\rho_k - \rho)}{(\rho_k - \rho_{\text{ref}})} \quad [15,16]$$

ρ_k je hustota kuličky, ρ a ρ_{ref} hustoty měřené a srovnávací kapaliny, u a u_{ref} rychlosti pádu kuličky, τ a τ_{ref} doby průchodu kuličky mezi dvěma ryskami A a B, tedy ji-li trubice naplněna standardní kapalinou [15].



Obr. 12. Höpplerův viskozimetr.

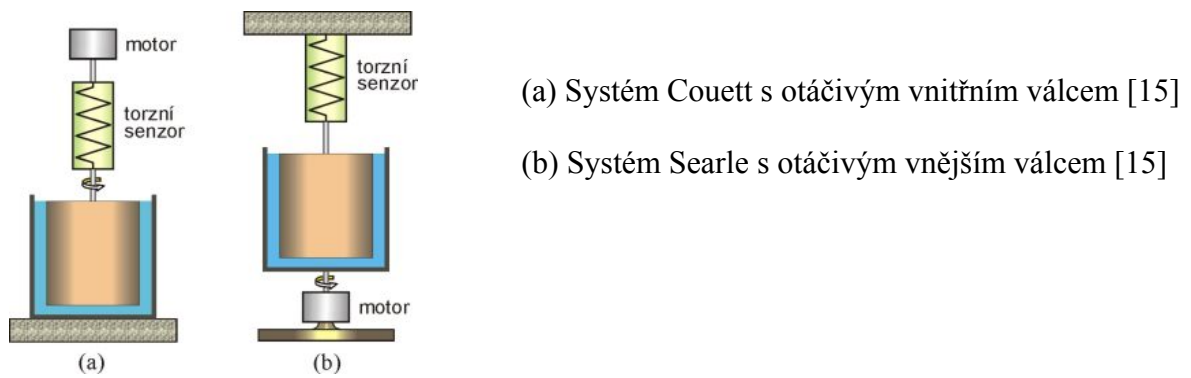
Viskozimetr může být použit jen v případě průhledné newtonské kapaliny [15].

3.2.1.3 Rotační viskozimetry

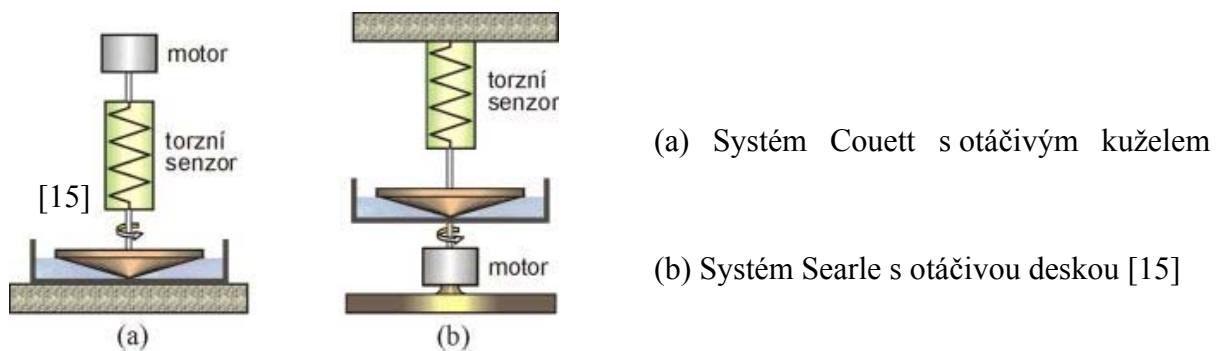
Rotační viskozimetry jsou založeny na měření torzní síly, kterou působí rotující kapalina na element zavěšený na torzním vlákně. Rotační viskozimetr je složen buď ze dvou válců, mezi kterými je úzká mezera, která je vyplněná buď měřenou kapalinou (obr.12) nebo z kužele a desky (obr.13) [15].

Jeden z elementů se otáčí konstantní úhlovou rychlostí, s vnitřním třením kapaliny je otáčivý moment přenášen na druhý element, který je zavěšený na torzním vlákně. Po ustálení rovnováhy se měří úhel pootočení elementu od původní polohy φ , ten je úměrný úhlové rychlosti ω a viskozitě kapaliny (K je konstanta přístroje) [15]:

$$\varphi = K \cdot \eta \cdot \omega$$



Obr. 13. Schéma rotačního viskozimetru se dvěma soustřednými válci [15].



Obr. 14. Schéma rotačního viskozimetru kužel-deska [15].

Rotační viskozimetry bývají používány i ke studiu nelineárních kapalin, neboť nám umožňují měřit úhel pootočení (úměrný napětí) v závislosti na rychlosti otáčení (úměrná rychlosti deformace).

Rotační viskozimetry jsou vhodné i ke studiu nelineárních kapalin, neboť umožňují měřit úhel pootočení (úměrný napětí) v závislosti na rychlosti otáčení (úměrná rychlosti deformace) [15].



Obr. 15. Rotační viskozimetr Visco Tester 6^L VLT – 6 Thermo Haake, UTB Zlín.

3.2.2 Viskometrie neneutonských kapalin

Pro viskometrii neneutonských kapalin, pro stanovení viskozitní funkce za podmínek smykového toku, se dají použít přístroje, které:

- umožňují realizovat kinetické podmínky smykového toku,
- umožňují stanovit smykovou rychlost a smykové napětí z primárních dat experimentu a kalibračních charakteristik přístroje.

Dle teorie viskometrických toků existuje poměrně rozsáhlá třída kinematically možných tokových situací, při kterých je napěťová odezva neneutonské kapaliny je stejná jako při prostém smykovém toku. Při těchto tokových situacích je možno vždy identifikovat varietu nedeformovaných, vzájemně smýkaných materiálových ploch. Smyková rychlost v okolí daného materiálového bodu je konstantní, avšak pro různé materiálové body může být různá. Mezi viskometrické toky patří např.:

- rektilineární toky – materiálové body se pohybují po rovnoběžných přímkách rychlosti,
- cirkulární toky – materiálové body se pohybují po kružnicích kolem společné osy,
- helikální toky – materiálové body se pohybují po koaxiálních šroubovicích.

U většiny prakticky zajímavých viskometrických toků jsou materiálové plochy identické se souřadnicovými plochami kartézského, cylindrického a nebo sférického souřadnicového systému.

Přísně vzato, žádný viskometrický tok nelze realizovat zcela přesně – proudění v kapiláře musí někde začínat a také někde končit, rotující válec musí mít konečné rozměry, vlastní dynamika primárního proudění (vliv setrvačnosti, povrchové napětí, normálových pnutí, gravitace), také může ovlivnit kinetiku (vznik sekundárních proudění). Kvantitativní studium proudění ve viskometrických přístrojích se proto vyžadují poměrně složité matematické metody a hlubší znalost reologických vlastností kapalin při neviskometrické kinematice proudění [14].

II. PRAKTICKÁ ČÁST

4 CÍL PRÁCE

Cílem této diplomové práce bylo změřit vybrané fyzikálně-chemické vlastnosti roztoků atelokolagenu I nemodifikovaného a zesíťovaného glutaraldehydem: koncentrační závislost viskozity (průtokovým a rotačním viskozimetrem), teplotní závislost viskozity vodních roztoků atelokolagenu I, UV VIS a IČ spektra.

Aby bylo dosaženo cíle této diplomové práce, byly nutné naplnit tyto dílčí cíle:

- zpracovat literární rešerši týkající se kolagenu a jeho fyzikálně - chemických vlastností,
- připravit vodní roztoky a filmy atelokolagenu I,
- provést měření vybraných fyzikálně chemických vlastností roztoků atelokolagenu I.

5 METODIKA PRÁCE

5.1 Příprava roztoků atelokolagenu I

Příprava roztoku kolagenu není technologicky příliš jednoduchou záležitostí. Při rozpuštění kolagenu ve vodě jsme velmi omezeni jeho rozpustností, čímž je odpovědná jeho kompaktní struktura. Vlivem mechanického působení jako je třepání a míchání můžeme dosáhnout omezeného rozpouštění kolagenu i poškození vyšších proteinových struktur. Lepší fyzikální vlastnosti kolagenní hmoty můžeme získat působením sníženého tlaku. V mnoha výzkumech bylo zjištěno, že v tlakové kolagenní hmotě vznikají nehomogenní shluky [19].

5.1.1 Koloidní gel atelokolagenu

Koloidní gel kolagenu byl připraven ze sterilní hemostatické plsti (Hypro Otrokovice).

4,7 g atelokolagenu I byly přes noc namočený v 54 ml destilované vody. Pak byl vzorek okyselen 0,25 M kyselinou octovou (Uherský brod) na pH 3 a homogenizován na průhledný gel (k důkladné homogenizaci byl použit ruční mixér), gel byl homogenizován na nejvyšší rychlost po dobu 35 sekund. Následně bylo pH zvýšeno 2 M NaOH (Uherský Brod) na 6,5pH. Byl získaný koloidní gel o celkovém objemu 250 ml. Který byl postupně rozředěn do čtyř koncentrací v poměru 1:1, původní koloidní gel a destilovaná voda, další vzorky byly ředěny z rozředěného vzorku vždy 1:1 (ředěný vzorec:destilovaná voda). Dále byla měřena viskozita na Ubbelohde a rotačním viskozimetru.



Obr. 16. Připravené a ředěné vzorky roztoku atelokolagenu.

5.1.1.1 Měření viskozity na Ubbelohde viskozimetru

U připravených roztoků atelokolagenu byla měřena viskozita na kapilárním Ubbelohde viskozimetru v daných teplotách 25,3°C, 30 °C a 35 °C.

K měření byla použita tato zařízení a pomůcky:

- ubbelohde viskozimetr, typové označení Ua, o průměru kapiláry 0,534mm,
- termostat, stopky , nálevka, balonek,
- připravené roztoky atelokolagenu nemodifikovaného a síťovaného.

Postup měření:

Ubbelohde viskozimetr spolu s daným roztokem byl temperován na určitou teplotu po dobu 20min. Po temperaci bylo prováděno měření průtoku kapaliny kapilárou. Každý ředěný vzorek byl 5 krát měřen. Po změření vzorků, byla zvýšena zadaná teplota termostatu a měření bylo opakováno i u dalších dvou teplot.

Vyhodnocení:

Všechny průtokové časy byly zaznamenány do tabulek a grafů.



Obr. 17. Termostat a Ubbelohde viskozimetr.

5.1.1.2 Měření viskozity na rotačním viskozimetru Visco Tester 6^L VLT – 6 Thermo Haake, UTB Zlín

Připravené a zředěné roztoky atelokolagenu 250ml, byly měřeny na rotačním viskozimetru Visco Tester 6^L VLT. Měření bylo prováděno při teplotě 25,5°C.

K měření byla použita tato zařízení a pomůcky:

- rotační viskozimetru Visco Tester 6^L VLT – 6 Thermo Haake, UTB Zlín,
- 250 ml kádinka, teploměr, elektrický ohříváč, připravené roztoky atelokolagenu,
- PC připojený k Visco Tester 6^L VLT – 6 Thermo Haake,
- element L1.

Postup měření:

Na rotační viskozimetr byl připevněn element L1 a byl proveden autotest. Roztoky atelokolagenu byly zahřátý na teplotu 25,5 °C. Poté byl roztok kolagenu v 250ml kádince vložen pod rotační viskozimetr. Do kádinky byl spuštěn element zavěšený na torzním vlákně, dále byly navoleny rychlosti otáčení na displeji viskozimetru v rozmezí RPM 0,3 - 200. Stejný postup byl použit i u dalších ředěných roztoků atelokolagenu.

Vyhodnocení:

Byly měřeny hodnoty smykového napětí na smykové rychlosti, které byly zaznamenány do tabulek a grafů.



Obr. 18. Visco Tester 6^L VLT – 6 Thermo Haake, UTB Zlín.

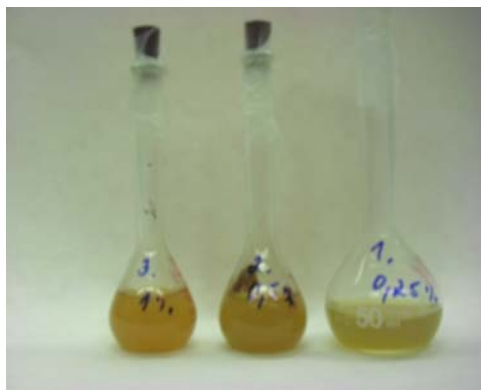
5.1.2 Síťování atelokolagenu

Původní roztok atelokolagenu upravený na pH 6,5, byl síťovaný vodným roztokem GTA (SIGMA – ALDRICH, Glutaraldehyde Solution, 50 wt.% in H₂O) v koncentracích 0,25%, 0,5% a 1% w/v po dobu 3,5 hod při laboratorní teplotě 22,5 °C.

5.1.2.1 Glutaraldehyd

Bezbarvá kapalina štiplavého zápachu, která se používá k desinfekci povrchů a předmětů. Také se používá při průmyslové úpravě vody a jako konzervant. Je toxický a způsobuje podráždění očí, nosu, krku, plic, bolest hlavy, ospalost a závratě. Glutaraldehyd je mísitelný s vodou, ethanolem, benzenem a používá se jako fixativ pro tkáně při elektronové mikroskopii a k balzamování. Také jako složka pro činění kůží a meziproduct při výrobě některých průmyslových chemikálií. Často se používá v biochemických aplikacích jako síťovadlo [5].

Glutaraldehyd rychle ničí buňky zesíťováním jejich bílkovin a často se používá samostatně nebo ve směsi formaldehydu, kdy je jako první ze dvou fixačních procesů ke stabilizaci vzorků např. rostlinných materiálů, bakterií a lidských buněk. Jako druhý se používá oxid osmičelý k síťování, stabilizaci buněk a membránových lipidů v organelách. Po fixaci následuje dehydratace tkáně buď ethanolem nebo acetonem, poté tkáň zalijeme do epoxidové nebo akrylové pryskyřice. Izomer polymeru glutaraldehydu, který je známý jako poly-cykloglutaracetal je fertilizérem vodních rostlin. Je biologicky využitelným zdrojem uhlíku pro vyšší rostliny, ne však pro řasy. Jeho používání je zakázáno, proto není dostupný na trhu [5].



Obr. 19. Sít'ovaný atelokolagen v koncentracích 1%, 0,5% a 0,25%.

U sít'ovaných roztoků atelokolagenu byla měřena viskozita na Ubbelohde viskozimetru. Získané hodnoty byly zpracovány do tabulek a grafů

5.1.3 Příprava filmů roztoku atelokolagenu a tablet KBr se vzorkem

5.1.3.1 Nemodifikovaný roztok atelokolagen

Z každého ředěného vzorku byl odpipetován 1,5ml roztoku do Petriho misky. Dále bylo prováděno odpařování v sušárně při teplotě 60°C. Výsledné hodnoty byly zpracovány do tabulky, byl sestaven graf odpařování a vypočítané koncentrace roztoků.

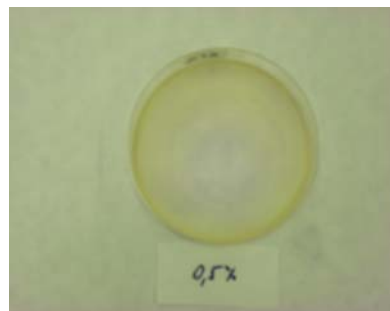
Vysušené filmy roztoku kolagenu nebylo možné oddělit z Petriho misek, proto byly filmy seškrabány skalpelem a použity na výrobu tablet s KBr na měření FT-IR.

5.1.3.2 Sít'ovaný roztok atelokolagenu

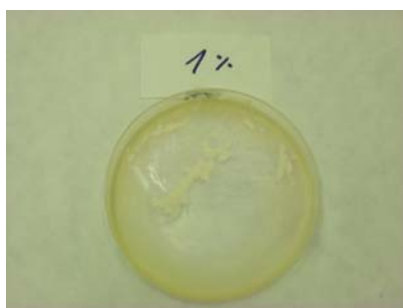
3 ml sít'ovaného roztoku bylo odpipetováno do polystyrénové misky. Misky byly ponechány schnout 3 dny v laboratoři při laboratorní teplotě 22,5°C. Byly získány flexibilní filmy, které nebylo možné snadno oddělit od polystyrénové misky, proto byly filmy opatrně seškrabány skalpelem a použity na výrobu tablet s KBr na měření FT-IR.



Obr. 20. Síťovaný roztok atelokolagenu na polystyrénové misce o koncentraci 0,25%.
0,5%.



Obr. 21 Síťovaný roztok kolagenu na polystyrénové misce o koncentraci



Obr. 22. Síťovaný roztok atelokolagenu na polystyrénové misce o koncentraci 1%.

5.1.3.3 Příprava KBr tablet

K přípravě byla použita tato zařízení a pomůcky:

- KBr, seškrabané vzorky atelokolagenu nemodifikovaného a síťovaného,
- sušárna, exsikátor,
- analytické váhy, achátová miska, ocelová raznice TRYSTOM Olomouc,
- uzavírací sáčky na tablety.

Postup přípravy tablet:

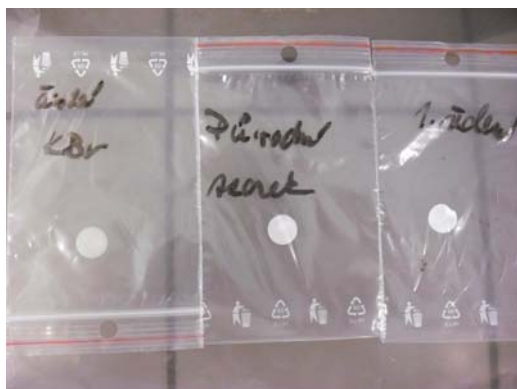
5g KBr bylo sušeno 4 hodiny v sušárně při teplotě 120 °C. Poté bylo KBr přemístěno do exikátoru a ponecháno přes noc.

- Odvážený sypký vzorek byl smíšen s vysušeným KBr (191mg) a pečlivě rozetřen v achátové misce.



Obr. 23. Achátová třecí miska.

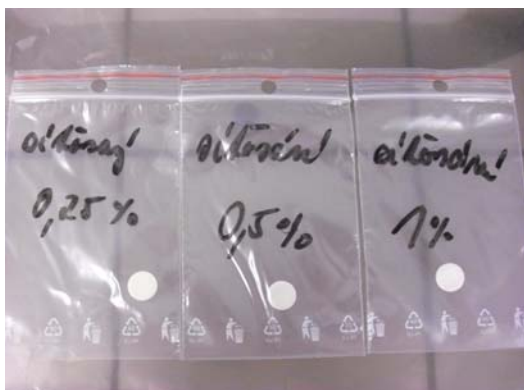
- Do ocelové raznice byl vložen ocelový kotouček hladkou stranou vzhůru. Na lesklou plochu byl rovnoměrně nasypán rozetřený KBr se vzorkem. Na tuto vrstvu byl položen druhý ocelový kotouček opět hladkou stranou k prášku.
- Raznice byla umístěna do lisu, přesně na střed a ručně byla dotažena až na doraz. Lis byl zaaretován (páčka vlevo dole byla posunuta doprava).
- Lis byl natlakován na 40 kN, dále byl dotlačován na 70 kN.
- Lis byl uvolněn (odaretován).
- Raznice byla uvolněna z lisu pomocí horního šroubu. Tableta byla z raznice uvolněna pomocí plastového nástavce a umístěna do držáku přístroje [20] [21].



Obr. 24. Připravené tablety - čistý KBr, Původní vzorek a 1.ředění.



Obr. 25. Připravené tablety z KBr a vzorku.



Obr. 26. Připravené tablety ze síťovaného kolagenu 0,25%, 0,5% a 1%.



Obr. 27. Ocelová raznice TRYSTOM Olomouc.

5.1.4 Měření FT-IR

Metoda IČ spektroskopie je založena na měření absorpce elektromagnetického záření v oblasti vlnových délek 0,8-1000 μm .

K měření byla použita tato zařízení a pomůcky:

- FTIR - 860 1 PC,
- připravené tablety KBr se vzorkem.



Obr. 28. FTIR - 860 1 PC.

Postup měření:

Po zapnutí přístroje byly zkontrolovány parametry analýzy a bylo poměřeno pozadí vzorku – čistá tableta KBr. Při stejném nastavení přístroje byly změřeny tablety připravené z KBr a vzorku.

Vyhodnocení:

Látky byly identifikovány pomocí charakteristických pásů, tedy přiřazením analyzované látky do skupiny. Byly získány IČ spektra, kde byly znázorněny grafy závislosti absorpce na vlnočtu.

5.1.5 Měření UV – VIS

Metoda je založena na interakci elektromagnetického záření o vlnočtu v rozmezí 10 až 10 000 cm^{-1} s měřeným vzorkem.

K měření byla použita tato zařízení a pomůcky:

- dvoupaprskový spektrometr Helios Alpha UTB ve Zlíně,
- plastové kyvety, připravené roztoky kolagenu nemodifikovaného a síťovaného.
-



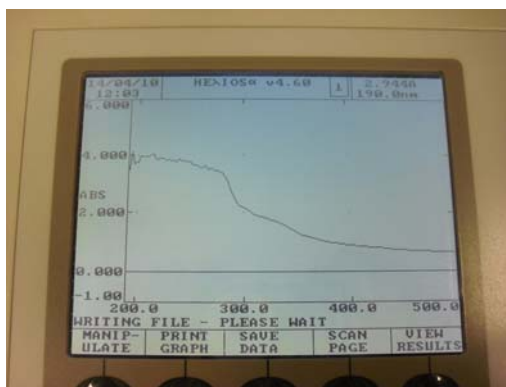
Obr. 29. Plastové kyvety.



Obr. 30. Spektrometr Helios Alpha zásobník na více kyvet.

Postup měření:

Byly vybrány dvě čisté kyvety, do jedné kyvety byla nalita destilovaná voda a do druhé kyvety byl nalit původní vzorek kolagenu. Kyvety byly vloženy do zásobníku kyvet, měření bylo prováděno proti slepému vzorku (destilovaná voda). Dále bylo navoleno absorpční spektrum v rozsahu 190 – 500 nm s krokem 1 nm a dále 2 nm. U síťovaných roztoků kolagenu bylo navoleno absorpční spektrum v rozsahu 190 – 700 nm, s krokem 1 nm, 2 nm.



Obr. 31. Spektrometr Helios Alpha – průběh měření vzorku roztoku kolagenu.

Vyhodnocení :

Roztoky byly nalévány do kyvet od vyšší koncentrace k nižším koncentracím, aby se zabránilo případné chyby, vzniklé postupným vyplachováním starých standardů výměnou za nové. Ze získaných hodnot byly vypracovány grafy v závislosti absorbance na vlnové délce. Dále byly odečítány hodnoty absorbance všech ředěných roztoků při vlnové délce 290 nm a vypočteny hodnoty Lambert - Beerova zákona.

6 VÝSLEDKY A DISKUZE

6.1 Výsledky a diskuze odpařování roztoků kolagenu a stanovení koncentrace roztoků

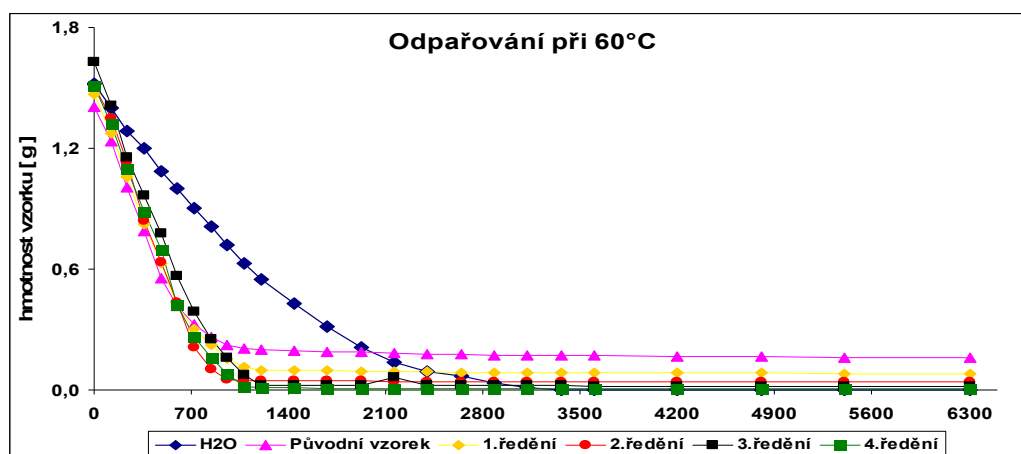
Tab. 6. Hmotnost Petriho misek a vzorků roztoků.

Hmotnost Petriho misek (g)	Bez vzorku	se vzorkem 1,5 ml	vzorek(g)	úbytek sušením(g)
H₂O	15,9554	17,4779	1,5225	celkové odpaření
Původní vzorek	14,7929	16,2004	1,4075	0,1626
1.ředění	15,8524	17,3237	1,4713	0,082
2.ředění	16,1397	17,6511	1,5114	0,0375
3.ředění	15,7054	17,3316	1,6262	0,0186
4.ředění	15,6675	17,1754	1,5079	0,0064

Tab. 7. Naměřené hodnoty při odpařování vzorků při 60 C°.

čas(s)/vzorek	H ₂ O	Původní vzorek	1. ředění	2. ředění	3. ředění	4. ředění
0	1,522	1,408	1,471	1,511	1,626	1,508
120	1,401	1,232	1,272	1,347	1,413	1,320
240	1,287	1,008	1,059	1,132	1,153	1,097
360	1,200	0,788	0,825	0,842	0,964	0,884
480	1,088	0,555	0,628	0,636	0,778	0,700
600	0,999	0,418	0,416	0,432	0,568	0,424
720	0,903	0,328	0,304	0,211	0,386	0,261
840	0,810	0,262	0,223	0,101	0,253	0,160
960	0,718	0,222	0,157	0,049	0,158	0,078
1080	0,626	0,206	0,116	0,048	0,072	0,016
1200	0,551	0,201	0,100	0,046	0,025	0,009
1440	0,428	0,195	0,096	0,044	0,023	0,009
1680	0,317	0,191	0,095	0,043	0,023	0,008
1920	0,212	0,187	0,094	0,043	0,023	0,008
2160	0,138	0,182	0,091	0,041	0,063	0,008
2400	0,090	0,179	0,090	0,041	0,021	0,008
2640	0,066	0,175	0,088	0,040	0,020	0,008
2880	0,033	0,174	0,088	0,040	0,020	0,008
3120	0,012	0,172	0,087	0,039	0,020	0,008
3360	0,000	0,171	0,087	0,040	0,020	0,008
3600	0,000	0,169	0,086	0,040	0,020	0,008
4200	0,000	0,166	0,084	0,038	0,019	0,007
4800	0,000	0,165	0,083	0,038	0,019	0,007
5400	0,000	0,163	0,082	0,037	0,019	0,006
6300	0,000	0,163	0,082	0,037	0,019	0,006

Obr. 32. Grafické znázornění odpařování roztoků atelokolagenu při 60 °C.



Z obrázku lze vypočítat odpařování roztoků a destilované vody při 60°C. Po celkovém odpaření vzorků roztoků, byly zjištěny celkové úbytky hmotnosti vzorků kolagenu tab. 6. Z těchto naměřených hodnot byly vypočítány koncentrace ředěných roztoků kolagenu tab.8.

Tab. 8. Výpočty koncentrace roztoků atelokolagenu.

	m [g]	c [g/ml]
Původní roztok	0,163	0,108
1.ředění	0,082	0,055
2.ředění	0,038	0,025
3.ředění	0,019	0,012
4.ředění	0,006	0,004

6.2 Výsledku a diskuze Ubbelohdeho viskozimetru

6.2.1 Naměřené hodnoty na Ubbelohde viskozimetru při 25,3 °C

Tab. 9. Průtokové časy roztoků kolagenu a síťovaného kolagenu, měřené na Ubbelohde viskozimetru pro vzorek temperovaný na 25,3 °C.

průtok kapaliny kapilárou (s)	Voda	Původní vzorek	ředění 1	ředění 2	ředění 3	ředění 4	síťování 0,25%	síťování 0,5%	síťování 1%
t 1 (s)	167,0	388,0	262,0	202,0	189,0	182,0	362,0	363,0	363,0
t 2 (s)	165,0	382,0	257,0	219,0	188,0	181,0	362,0	363,0	362,0
t 3 (s)	164,0	388,0	258,0	208,0	188,0	183,0	361,0	362,0	363,0
t 4 (s)	165,0	381,0	255,0	210,0	188,0	180,0	363,0	364,0	362,0
t 5 (s)	163,0	378,0	260,0	207,0	188,0	179,0	361,0	363,0	368,0
Průměr t (s)	164,8	383,4	258,4	209,2	188,2	181,0	361,8	363,0	363,6

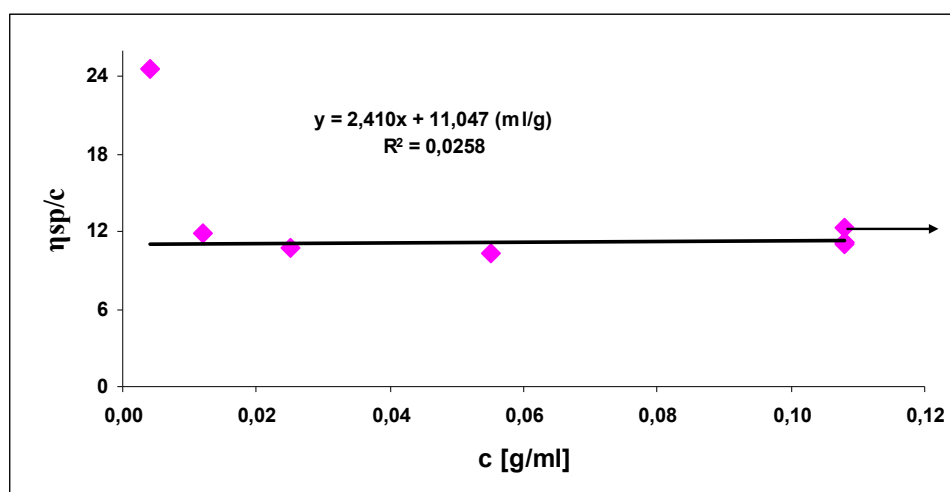
Měřením byly získané průtokové časy roztoků kolagenu na Ubbelohde viskozimetru s průměrem kapiláry 0,534 při teplotě 25,3 °C.

Tab. 10. Výpočet kinematické viskozity ν (mm²/s) pro vzorek temperovaný na 25,3 °C.

k	ν H ₂ O (mm ² /s)	V vzorek (mm ² /s)	ν_1 (mm ² /s)	ν_2 (mm ² /s)	ν_3 (mm ² /s)	ν_4 (mm ² /s)	ν 0,25% (mm ² /s)	ν 0,5% (mm ² /s)	ν 1% (mm ² /s)
0,004993	0,834	1,937	1,308	1,009	0,944	0,909	1,807	1,812	1,812
0,004993	0,824	1,907	1,283	1,093	0,939	0,904	1,807	1,812	1,807
0,004993	0,819	1,937	1,288	1,039	0,939	0,914	1,802	1,807	1,812
0,004993	0,824	1,902	1,273	1,049	0,939	0,899	1,812	1,817	1,807
0,004993	0,814	1,887	1,298	1,034	0,939	0,894	1,802	1,812	1,837
	0,823	1,914	1,290	1,045	0,940	0,904	1,806	1,812	1,815

Tab. 11. Výpočty specifické a relativní viskozity pro vzorek temperovaný na 25,3 °C.

	Vzorek-H ₂ O	η_{sp}	η_{sp}/c	c[g/ml]	η_{rel}	$\ln \eta_{rel}/c$
původní vzorek	218,6	1,326	12,282	0,108	2,326	7,818
ředění 1	93,6	0,568	10,327	0,055	1,568	8,178
ředění 2	44,4	0,269	10,777	0,025	1,269	9,542
ředění 3	23,4	0,142	11,833	0,012	1,142	11,064
ředění 4	16,2	0,098	24,575	0,004	1,098	23,441
sítování 0,25%	197,0	1,195	11,068	0,108	2,195	7,281
sítování 0,5%	198,2	1,203	11,136	0,108	2,203	7,312
sítování 1%	198,8	1,206	11,170	0,108	2,206	7,327



Obr. 33. Grafické znázornění závislosti η_{sp}/c na koncentraci pro vzorek temperovaný na 25,3 °C. Šipka: vynesená data pro sítované vzorky.

Z lineární regrese byla získána hodnota limitního viskozitního čísla 11,047 (ml/g) a $\text{tg } \alpha$ 2,410 ze kterých byla vypočtena hodnota Hugginsova koeficientu 0,0196 [g²/ml²].

Hugginsova rovnice

$$k_H = \frac{\text{tg } \alpha}{[\eta]^2}$$

Tab. 12. Výpočet Hugginsova koeficientu pro vzorek temperovaný na 25,3 °C.

$[\eta]$ [ml/g]	$[\eta]^2$ [ml ² /g ²]	$\text{tg } \alpha$	k_H [g ² /ml ²]
11,047	122,0	2,410	0,0196

6.2.2 Naměřené hodnoty na Ubbelohde viskozimetru při 30 °C

Tab. 13. Průtokové časy roztoků kolagenu a síťovaného kolagenu, měřené na Ubbelohde viskozimetru pro vzorek temperovaný na 30 °C.

průtok kapaliny kapilárou (s)	Voda	Původní vzorek	ředění 1	ředění 2	ředění 3	ředění 4	síťování 0,25%	síťování 0,5%	síťování 1%
t 1 (s)	159,0	316,0	217,0	186,0	171,0	165,0	320,0	320,0	320,0
t 2 (s)	159,0	312,0	215,0	186,0	171,0	164,0	323,0	329,0	329,0
t 3 (s)	160,0	303,0	215,0	185,0	170,0	164,0	318,0	322,0	319,0
t 4 (s)	159,0	301,0	214,0	186,0	169,0	164,0	325,0	318,0	321,0
t 5 (s)	160,0	305,0	215,0	185,0	170,0	164,0	319,0	321,0	323,0
Průměr t (s)	159,4	307,4	215,2	185,6	170,2	164,2	321	322	322,4

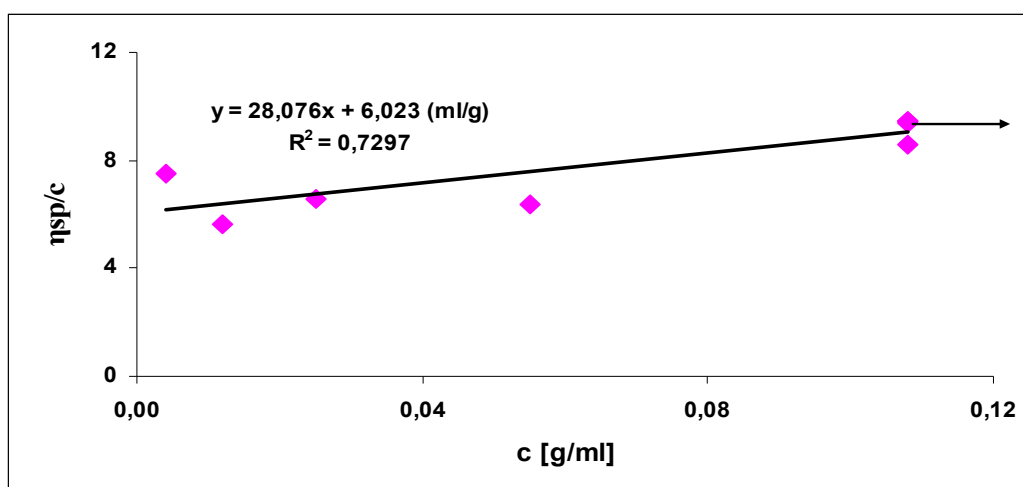
Měřením byly získané průtokové časy roztoků kolagenu na Ubbelohde viskozimetru s průměrem kapiláry 0,534 při teplotě 30°C.

Tab. 14. Výpočet kinematické viskozity ν (mm²/s) pro vzorek temperovaný na 30 °C.

k	ν H ₂ O (mm ² /s)	ν vzorek (mm ² /s)	ν_1 (mm ² /s)	ν_2 (mm ² /s)	ν_3 (mm ² /s)	ν_4 (mm ² /s)	ν 0,25% (mm ² /s)	ν 0,5% (mm ² /s)	ν 1% (mm ² /s)
0,004993	0,794	1,578	1,083	0,929	0,854	0,824	1,598	1,598	1,598
0,004993	0,794	1,558	1,073	0,929	0,854	0,819	1,613	1,643	1,643
0,004993	0,799	1,513	1,073	0,924	0,849	0,819	1,588	1,608	1,593
0,004993	0,794	1,503	1,069	0,929	0,844	0,819	1,623	1,588	1,603
0,004993	0,799	1,523	1,073	0,924	0,849	0,819	1,593	1,603	1,613
	0,796	1,535	1,074	0,927	0,850	0,820	1,603	1,608	1,610

Tab. 15. Výpočty specifické a relativní viskozity pro vzorek temperovaný na 30 °C.

	Vzorek- H ₂ O	η_{sp}	η_{sp}/c	c [g/ml]	η_{rel}	$\ln \eta_{rel}/c$
původní vzorek	148,0	0,928	8,597	0,108	1,928	6,081
ředění 1	55,8	0,350	6,365	0,055	1,350	5,457
ředění 2	26,2	0,164	6,575	0,025	1,164	6,087
ředění 3	10,8	0,068	5,646	0,012	1,068	5,463
ředění 4	4,8	0,030	7,528	0,004	1,030	7,417
sít'ování 0,25%	161,6	1,014	9,387	0,108	2,0138	6,482
sít'ování 0,5%	162,6	1,020	9,445	0,108	2,0201	6,511
sít'ování 1%	163,0	1,023	9,468	0,108	2,0226	6,522



Obr. 34. Grafické znázornění závislosti η_{sp}/c na koncentraci pro vzorek temperovaný na 30 °C. Šipka: vynesená data pro sít'ované vzorky.

Z lineární regrese byla získána hodnota limitního viskozitního čísla 6,023 (ml/g) a $\text{tg } \alpha$ 28,281 ze kterých byla vypočtena hodnota Hugginsova koeficientu 0,774 [g²/ml²].

Hugginsova rovnice

$$k_H = \frac{\text{tg } \alpha}{[\eta]^2}$$

Tab. 16. Výpočet Hugginsova koeficientu pro vzorek temperovaný na 30 °C.

$[\eta]$ [ml/g]	$[\eta]^2$ [ml ² /g ²]	$\text{tg } \alpha$	k_H [g ² /ml ²]
6,023	36,281	28,076	0,774

6.2.3 Naměřené hodnoty na Ubbelohde viskozimetru při 35 °C

Tab.17. Průtokové časy roztoků kolagenu a síťovaného kolagenu, měřené na Ubbelohde viskozimetru pro vzorek temperovaný na 35 °C.

průtok kapaliny kapilárou (s)	Voda	vzorek	ředění 1	ředění 2	ředění 3	ředění 4	síťování 0,25%	síťování 0,5%	síťování 1%
t 1 (s)	150,0	261,0	209,0	169,0	154,0	146,0	276,0	279,0	278,0
t 2 (s)	144,0	262,0	196,0	166,0	154,0	147,0	272,0	275,0	279,0
t 3 (s)	145,0	260,0	195,0	165,0	152,0	147,0	272,0	279,0	276,0
t 4 (s)	146,0	258,0	191,0	165,0	151,0	147,0	271,0	275,0	275,0
t 5 (s)	145,0	257,0	191,0	166,0	151,0	147,0	272,0	275,0	279,0
Průměr t (s)	146,0	259,6	196,4	166,2	152,4	146,8	272,6	276,6	277,4

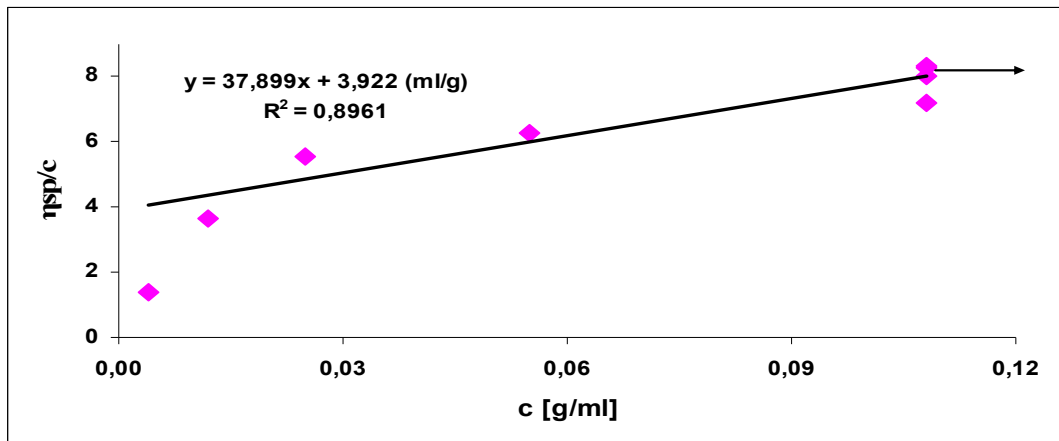
Měřením byly získané průtokové časy roztoků kolagenu na Ubbelohde viskozimetru s průměrem kapiláry 0,534 při teplotě 35°C.

Tab. 18. Výpočet kinematické viskozity ν (mm²/s) pro vzorek temperovaný na 35 °C.

k	ν H ₂ O (mm ² /s)	ν vzorek (mm ² /s)	ν_1 (mm ² /s)	ν_2 (mm ² /s)	ν_3 (mm ² /s)	ν_4 (mm ² /s)	ν 0,25% (mm ² /s)	ν 0,5% (mm ² /s)	ν 1% (mm ² /s)
0,00499	0,749	1,303	1,044	0,844	0,769	0,729	1,378	1,393	1,388
0,00499	0,719	1,308	0,979	0,829	0,769	0,734	1,358	1,373	1,393
0,00499	0,724	1,298	0,974	0,824	0,759	0,734	1,358	1,393	1,378
0,00499	0,729	1,288	0,954	0,824	0,754	0,734	1,353	1,373	1,373
0,00499	0,724	1,283	0,954	0,829	0,754	0,734	1,358	1,373	1,393
	0,729	1,296	0,981	0,830	0,761	0,733	1,361	1,381	1,385

Tab.19. Výpočty specifické a relativní viskozity pro vzorek temperovaný na 35 °C.

	Vzorek-H ₂ O	η_{sp}	η_{sp}/c	c[g/ml]	η_{rel}	$\ln \eta_{rel}/c$
Původní vzorek	113,6	0,778	7,204	0,108	1,778	5,329
ředění 1	50,4	0,345	6,276	0,055	1,345	5,392
ředění 2	20,2	0,138	5,534	0,025	1,138	5,183
ředění 3	6,4	0,044	3,653	0,012	1,044	3,575
ředění 4	0,8	0,005	1,370	0,004	1,005	1,366
síťování 0,25%	126,6	0,867	8,029	0,108	1,867	5,781
síťování 0,5%	130,6	0,895	8,283	0,108	1,895	5,916
síťování 1%	131,4	0,900	8,333	0,108	1,900	5,943



Obr. 35. Grafické znázornění závislosti η_{sp}/c na koncentraci pro vzorek temperovaný na 35 °C. Šipka: vynesená data pro síťované vzorky.

Z lineární regrese byla získána hodnota limitního viskozitního čísla 3,922 (ml/g) a $\text{tg } \alpha$ 37,899 ze kterých byla vypočtena hodnota Hugginsova koeficientu 2,464 [g²/ml²].

Hugginsova rovnice

$$k_H = \frac{\text{tg } \alpha}{[\eta]^2}$$

Tab. 20. Výpočet Hugginsova koeficientu pro vzorek temperovaný na 35 °C.

$[\eta]$ [ml/g]	$[\eta]^2$ [ml ² /g ²]	$\text{tg } \alpha$	k_H [g ² /ml ²]
3,922	1,382	37,899	2,464

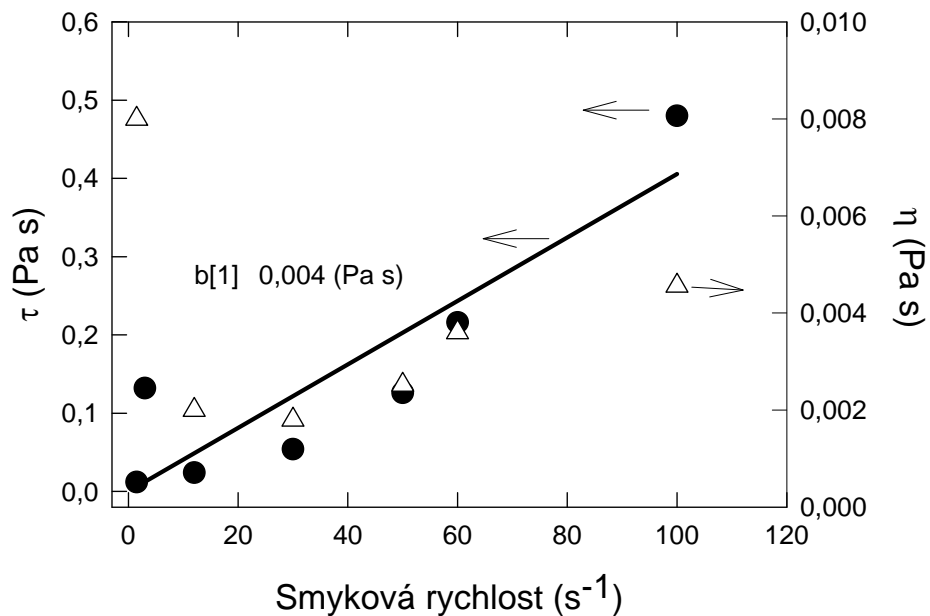
6.3 Výsledky a diskuze rotačního viskozimetru Visco Tester 6^L VLT – 6 Thermo Haake, UTB Zlín

6.3.1 Měření původního roztoku kolagenu na rotačním viskozimetru

Roztoky kolagenu byly měřeny při teplotě 25,5°C.

Tab. 21. Naměřené hodnoty závislosti smykového napětí na smykové rychlosti pro původní vzorek roztoku atelokolagenu. Měřeno při teplotě 25,5 °C.

RPM	$\dot{\gamma}$ [s ⁻¹]	τ [Pa]	η [Pas]
1,5	1,500	0,012	0,008
3	3,000	0,132	0,044
12	12,000	0,024	0,002
30	29,999	0,054	0,002
50	49,998	0,126	0,003
60	59,998	0,216	0,004
100	99,997	0,480	0,005



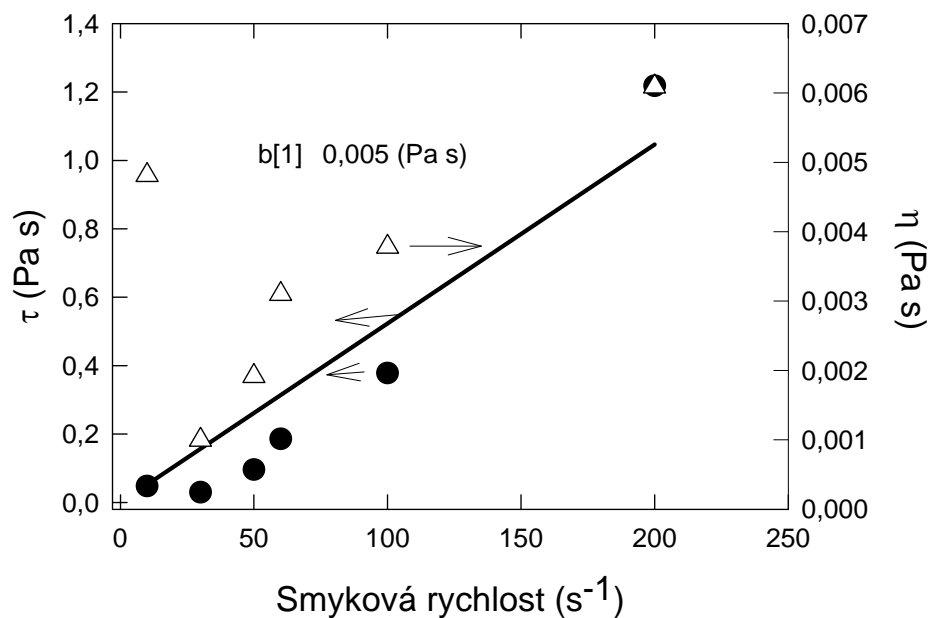
Obr. 36. Grafické znázornění závislosti smykového napětí a viskozity na smykové rychlosti původního vzorku roztoku atelokolagenu I. Měřeno při teplotě 25,5 °C.

Z lineární regrese smykového napětí byla zjištěna hodnota viskozity roztoku atelokolagenu 0,004 Pa s.

6.3.2 Měření 1.ředěného roztoku kolagenu na rotačním viskozimetru

Tab. 22. Naměřené hodnoty závislosti smykového napětí a dynamické viskozity na smykové rychlosti pro vzorek roztoku atelokolagenu 1. ředění 1:1. Měřeno při teplotě 25,5 °C.

RPM	$\dot{\gamma}$ [s ⁻¹]	τ [Pa]	η [Pa s]
10	10,000	0,048	0,005
30	29,999	0,030	0,001
50	49,998	0,096	0,002
60	59,998	0,186	0,003
100	99,997	0,378	0,004
200	199,990	1,218	0,006



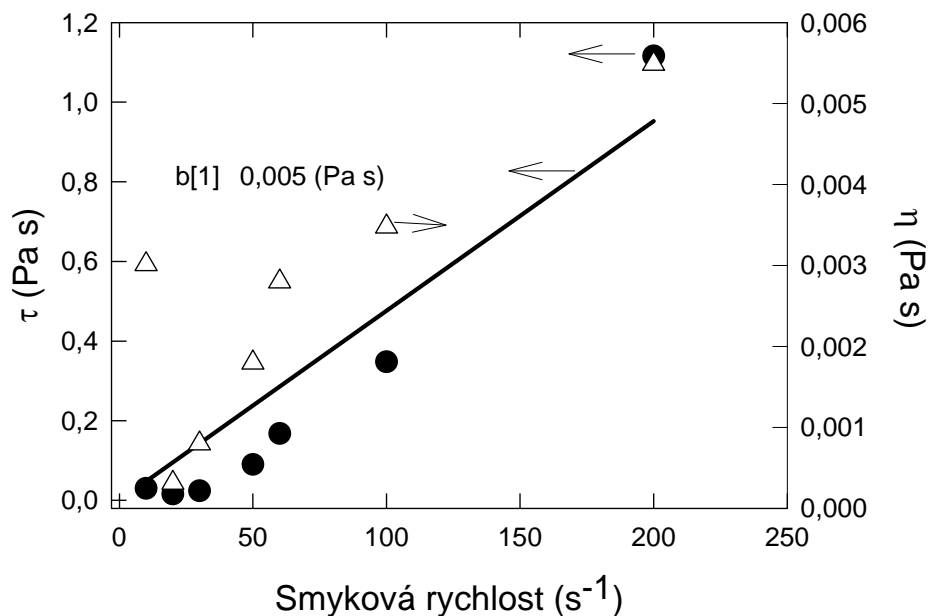
Obr. 37. Grafické znázornění závislosti smykového napětí a viskozity na smykové rychlosti.

Z lineární regrese smykového napětí byla zjištěna hodnota viskozity 1.ředěného roztoku atelokolagenu 0,005 Pas.

6.3.3 Měření 2.ředěného roztoku kolagenu na rotačním viskozimetru

Tab. 23. Naměřené hodnoty závislosti smykového napětí a dynamické viskozity na smykové rychlosti pro vzorek roztoku atelokolagenu 2. ředění 1:1. Měřeno při teplotě 25,5 °C.

RPM	$\dot{\gamma}$ [s ⁻¹]	τ [Pa]	η [Pas]
10	10,000	0,030	0,00301
20	19,999	0,016	0,00031
30	29,999	0,024	0,00080
50	49,999	0,090	0,00180
60	59,999	0,168	0,00280
100	99,997	0,348	0,00348
200	199,990	1,116	0,00549



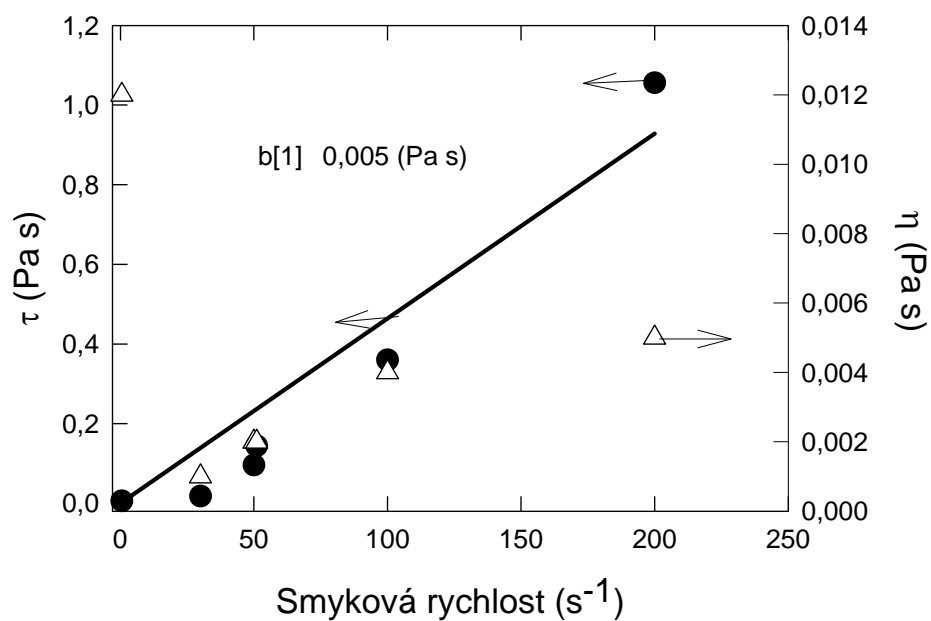
Obr. 38. Grafické znázornění závislosti smykového napětí a viskozity na smykové rychlosti.

Z lineární regrese smykového napětí byla zjištěna hodnota viskozity 2. ředěného roztoku atelokolagenu 0,005Pas.

6.3.4 Měření 3.ředěného roztoku kolagenu na rotačním viskozimetru

Tab. 24. Naměřené hodnoty závislosti smykového napětí a dynamické viskozity na smykové rychlosti pro vzorek roztoku atelokolagenu 3. ředění 1:1. Měřeno při teplotě 25,5 °C.

RPM	$\dot{\gamma}$ [s ⁻¹]	τ [Pa]	η [Pas]
0,5	0,500	0,006	0,012
30	29,999	0,018	0,001
50	49,998	0,096	0,002
60	50,998	0,144	0,002
100	99,997	0,360	0,004
200	199,990	1,056	0,005



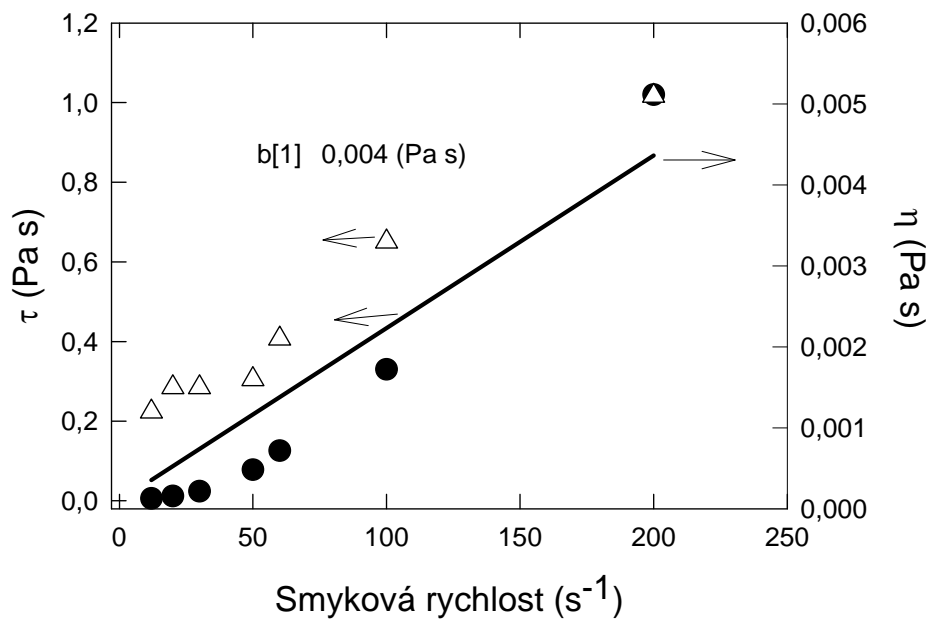
Obr. 39. Grafické znázornění závislosti smykového napětí a viskozity na smykové rychlosti.

Z lineární regrese smykového napětí byla zjištěna hodnota viskozity 3.ředěného roztoku atelokolagenu 0,005 Pas.

6.3.5 Měření 4.ředěného roztoku kolagenu na rotačním viskozimetru

Tab. 25. Naměřené hodnoty závislosti smykového napětí a dynamické viskozity na smykové rychlosti pro vzorek roztoku atelokolagenu 4. ředění 1:1. Měřeno při teplotě 25,5 °C.

RPM	$\dot{\gamma}$ [s ⁻¹]	τ [Pa]	η [Pas]
12	12,0000	0,0060	0,0012
20	19,9990	0,0120	0,0015
30	29,9990	0,0240	0,0015
50	49,9990	0,0780	0,0016
60	59,9990	0,1260	0,0021
100	99,9970	0,3300	0,0033
200	199,9900	1,0200	0,0051

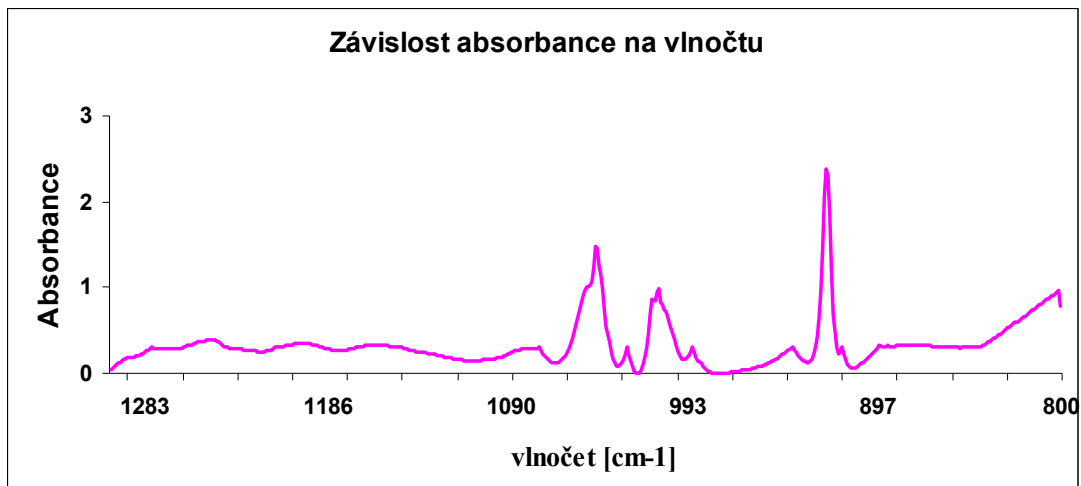


Obr. 40. Grafické znázornění závislosti smykového napětí a viskozity na smykové rychlosti.

Z lineární regrese smykového napětí byla zjištěna hodnota viskozity 4.ředěného roztoku atelokolagenu 0,004 Pas.

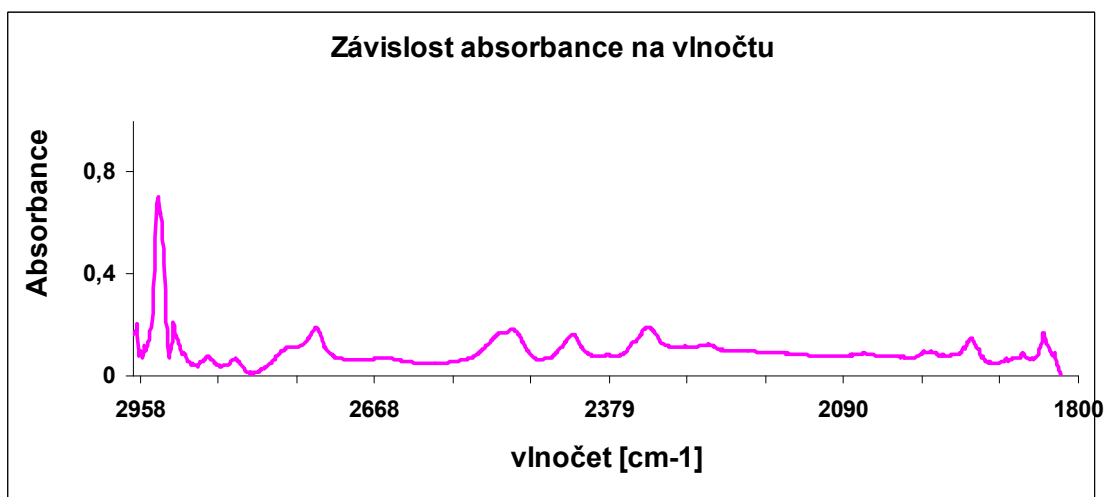
6.4 Výsledky a diskuze měření FT-IR

6.4.1 FT-IR měření původního vzorku roztoku atelokolagenu



Obr. 41. Grafické znázornění závislosti absorbance na vlnočtu měřeného u tablet z původního vzorku.

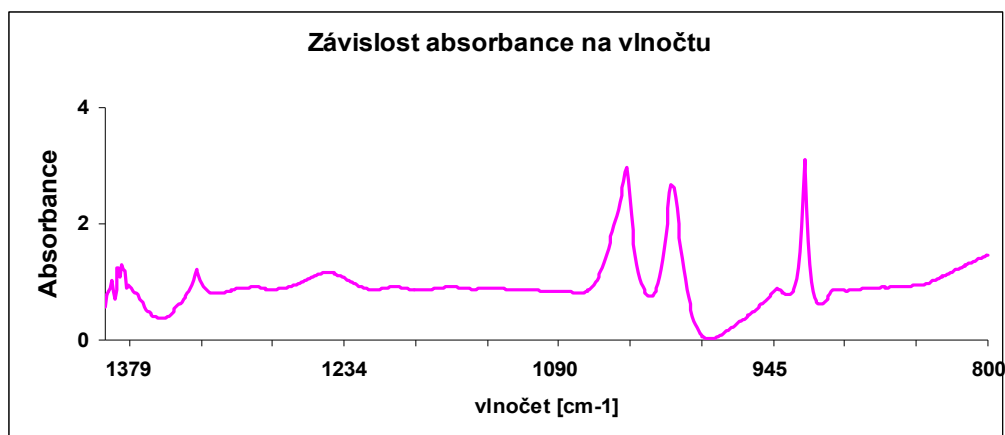
Měření bylo prováděno na předem připravených tabletách z KBr a původního vzorku atelokolagenu v hmotnostním poměru 10:1.



Obr. 42. Grafické znázornění závislosti absorbance na vlnočtu měřeného u tablet z původního vzorku.

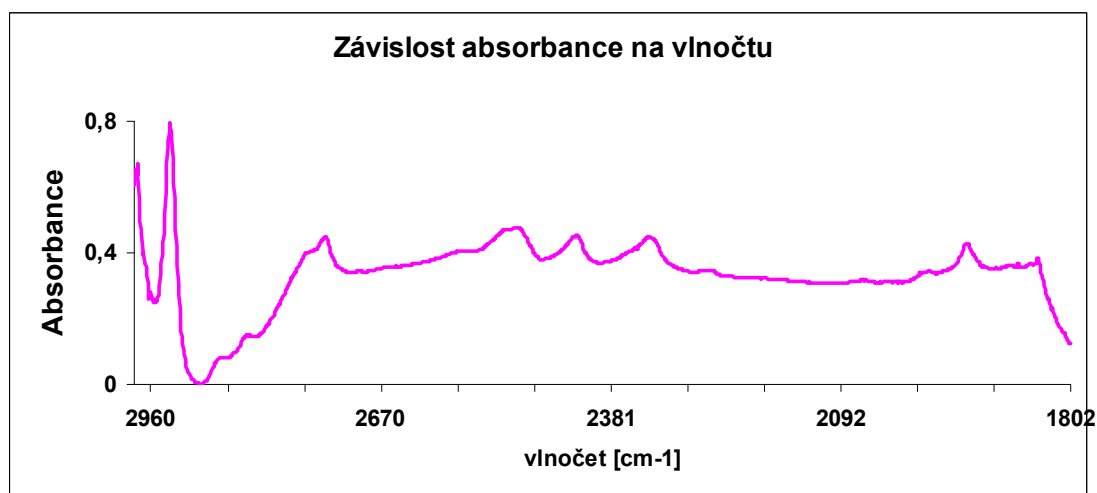
Měření bylo prováděno na předem připravených tabletách z KBr a původního vzorku atelokolagenu v hmotnostním poměru 10:1.

6.4.2 FT-IR měření 1.ředěného roztoku atelokolagenu



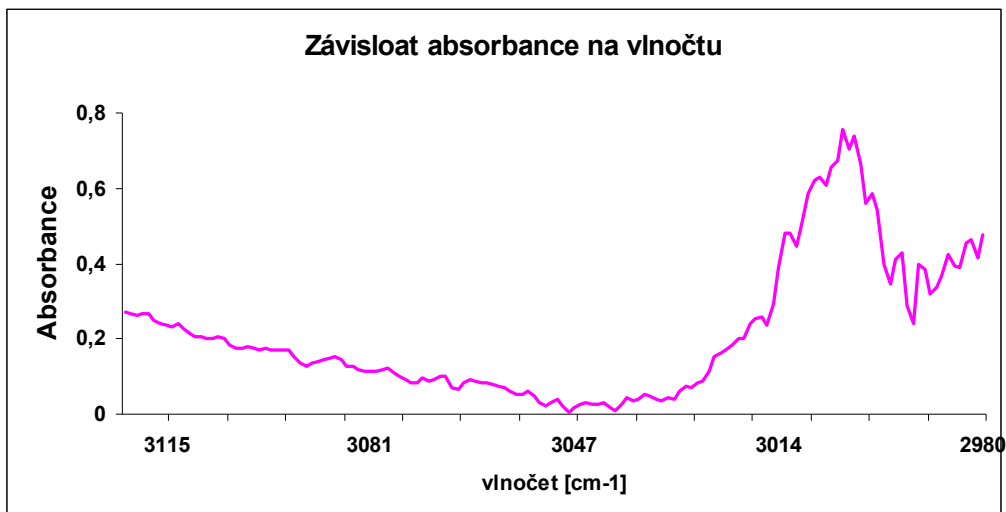
Obr. 43. Grafické znázornění závislosti absorbance na vlnočtu měřeného u tablet z 1. ředěného vzorku.

Měření bylo prováděno na předem připravených tabletách z KBr a 1. ředěného roztoku atelokolagenu v poměru 10:1.



Obr. 44. Grafické znázornění závislosti absorbance na vlnočtu měřeného u tablet z 1. ředěného vzorku.

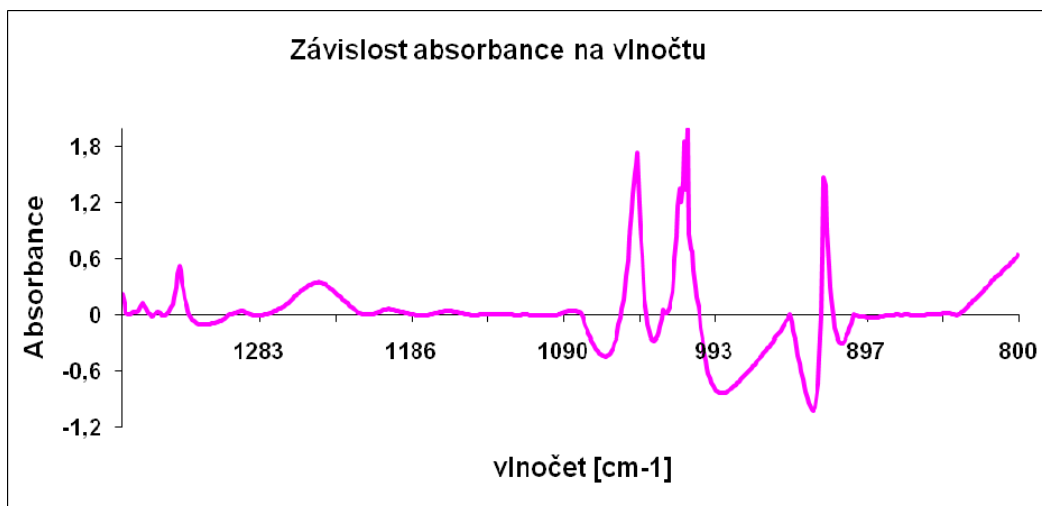
Měření bylo prováděno na předem připravených tabletách z KBr a 1. ředěného roztoku atelokolagenu v poměru 10:1.



Obr. 45. Grafické znázornění závislosti absorbance na vlnočtu měřeného u tablet z 1. ředěného vzorku.

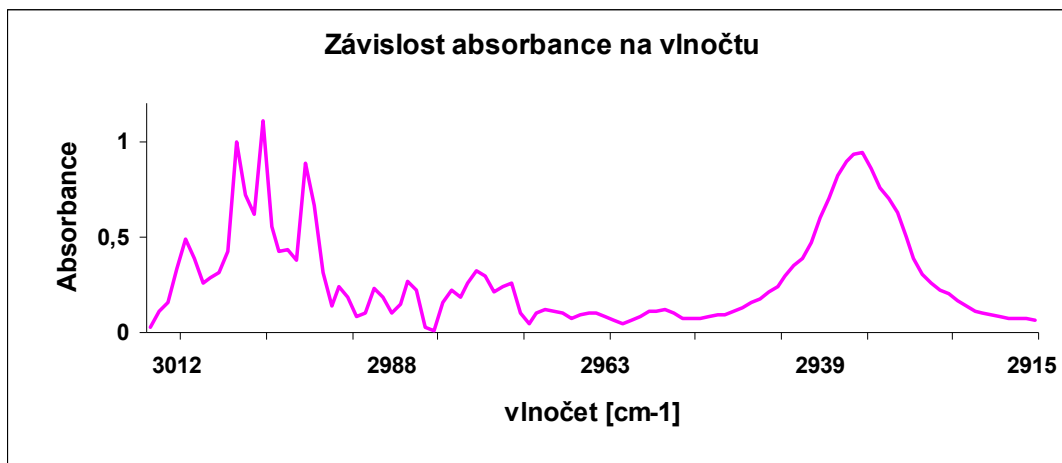
Měření bylo prováděno na předem připravených tabletách z KBr a 1. ředěného roztoku atelokolagenu v poměru 10:1.

6.4.3 FTIR měření 2. ředěného roztoku atelokolagenu



Obr. 46. Grafické znázornění závislosti absorbance na vlnočtu měřeného u tablet z 2. ředěného vzorku.

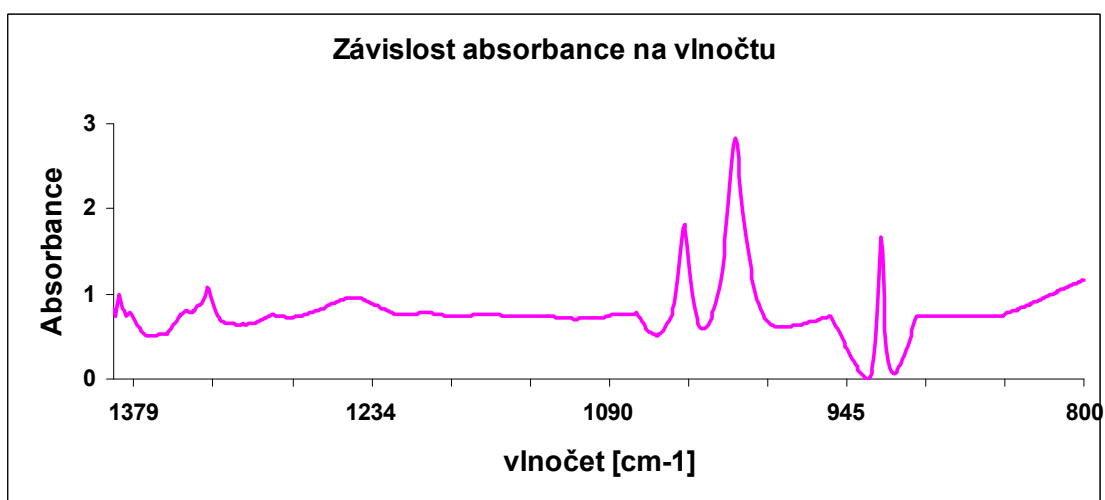
Měření bylo prováděno na předem připravených tabletách z KBr a 2. ředěného roztoku atelokolagenu v poměru 10:1.



Obr. 47. Grafické znázornění závislosti absorbance na vlnočtu měřeného u tablet z 2. ředěného vzorku.

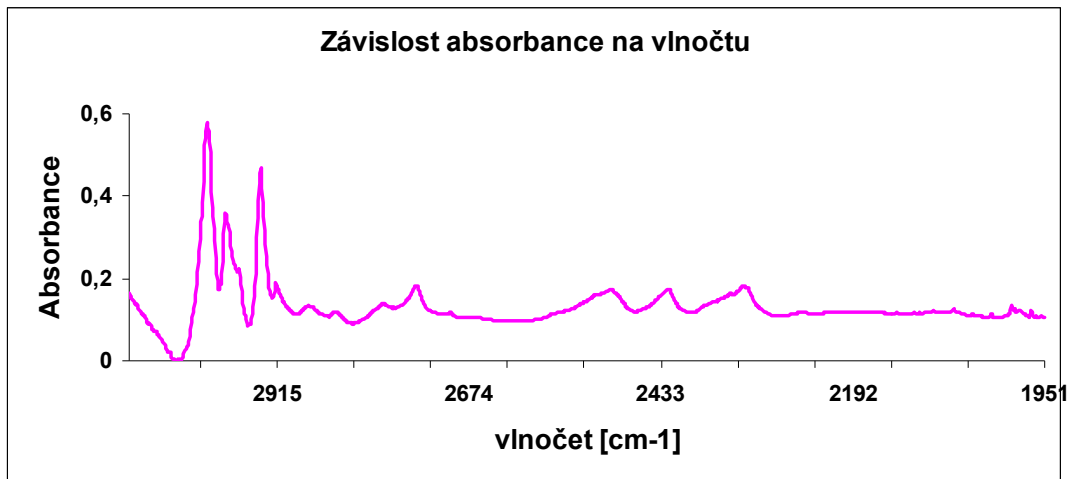
Měření bylo prováděno na předem připravených tabletách z KBr a 2. ředěného roztoku atelokolagenu v poměru 10:1.

6.4.4 FT-IR měření 3. ředěného roztoku atelokolagenu



Obr. 48. Grafické znázornění závislosti absorbance na vlnočtu měřeného u tablet z 3. ředěného vzorku.

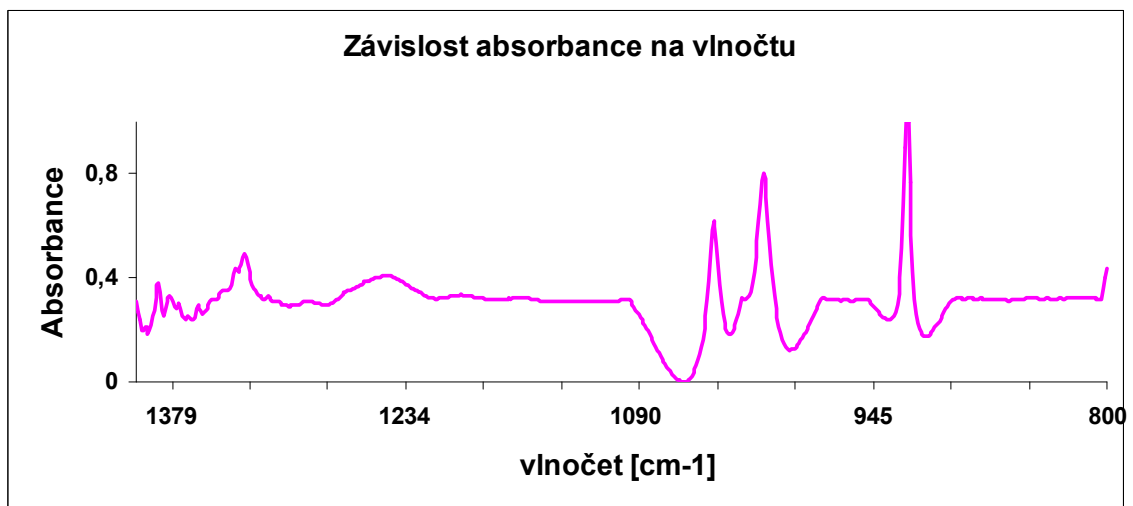
Měření bylo prováděno na předem připravených tabletách z KBr a 3. ředěného roztoku atelokolagenu v poměru 10:1.



Obr. 49. Grafické znázornění závislosti absorbance na vlnočtu měřeného u tablet z 3. ředěného vzorku.

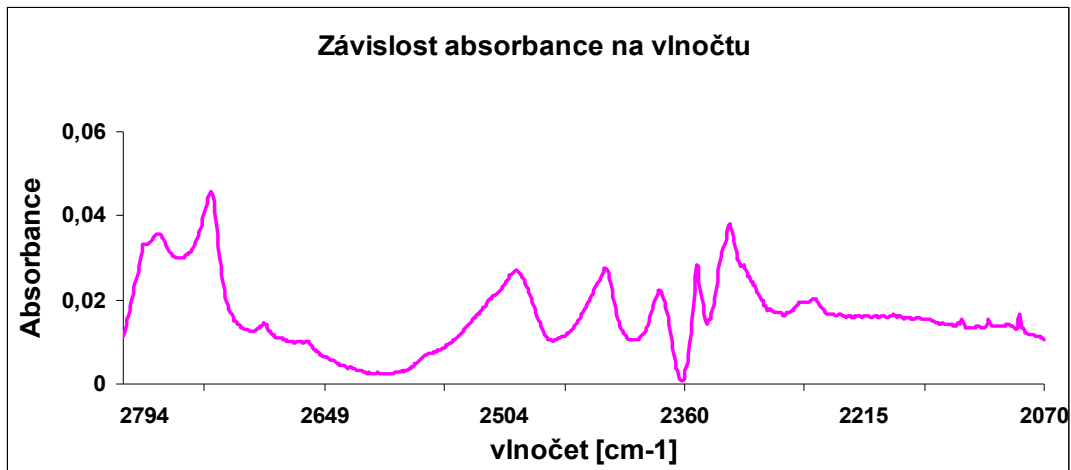
Měření bylo prováděno na předem připravených tabletách z KBr a 3. ředěného roztoku atelokolagenu v poměru 10:1.

6.4.5 FT-IR měření 4. ředěného roztoku atelokolagenu



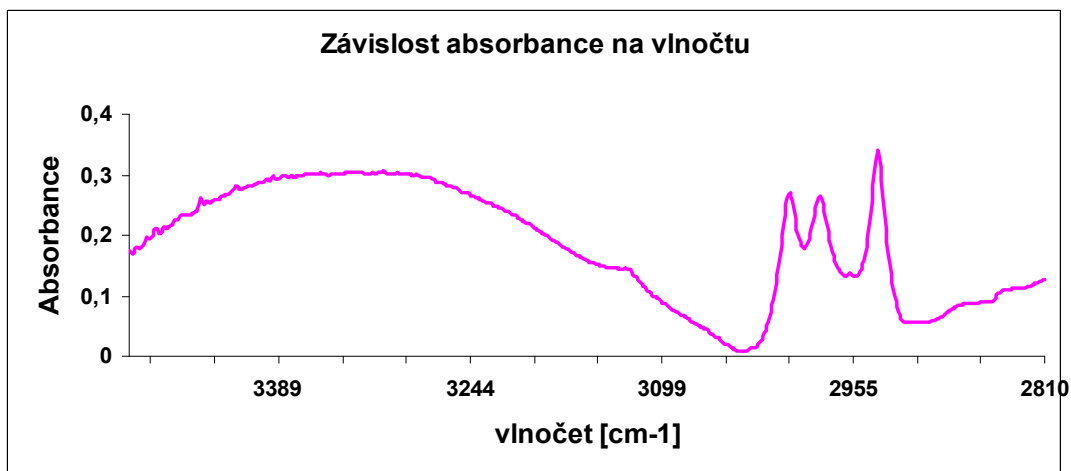
Obr.50. Grafické znázornění závislosti absorbance na vlnočtu měřeného u tablet z 4. ředěného vzorku.

Měření bylo prováděno na předem připravených tabletách z KBr a 4. ředěného roztoku atelokolagenu v poměru 10:1.



Obr. 51. Grafické znázornění závislosti absorbance na vlnočťu měřeného u tablet z 4. ředěného vzorku.

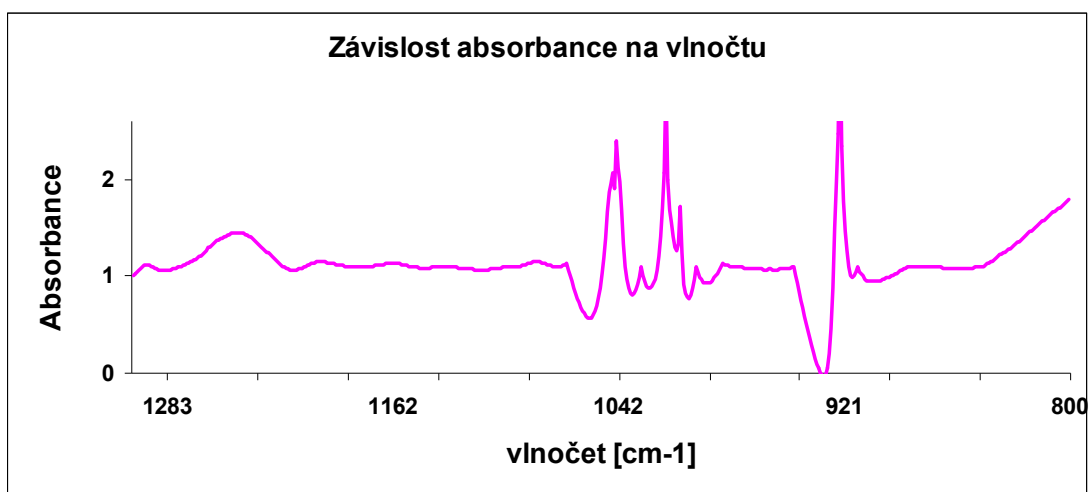
Měření bylo prováděno na předem připravených tabletách z KBr a 4. ředěného roztoku atelokolagenu v poměru 10:1.



Obr. 52. Grafické znázornění závislosti absorbance na vlnočťu měřeného u tablet z 3. ředěného vzorku.

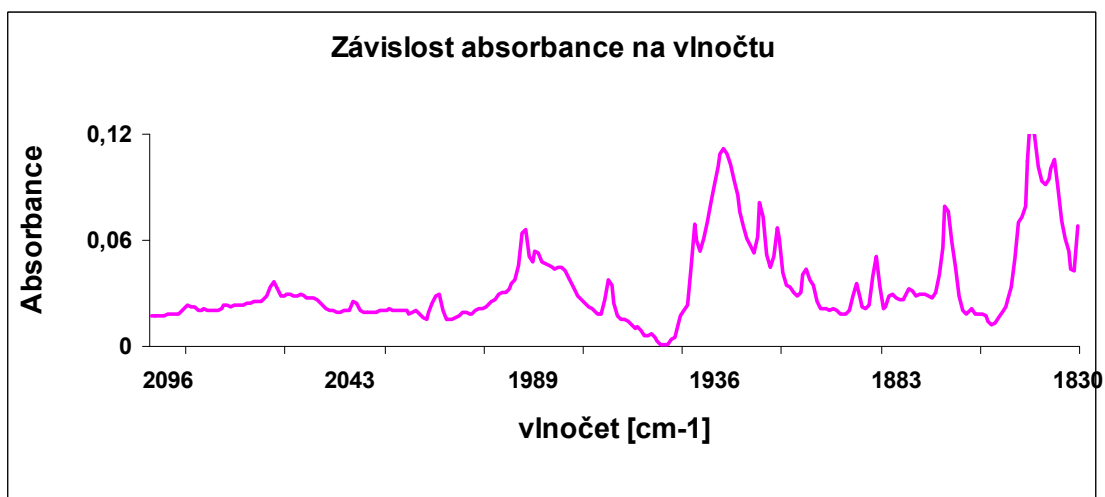
Měření bylo prováděno na předem připravených tabletách z KBr a 3. ředěného roztoku atelokolagenu v poměru 10:1.

6.4.6 FT-IR měření síťovaného atelokolagenu glutaraldehydem v koncentraci 0,25%



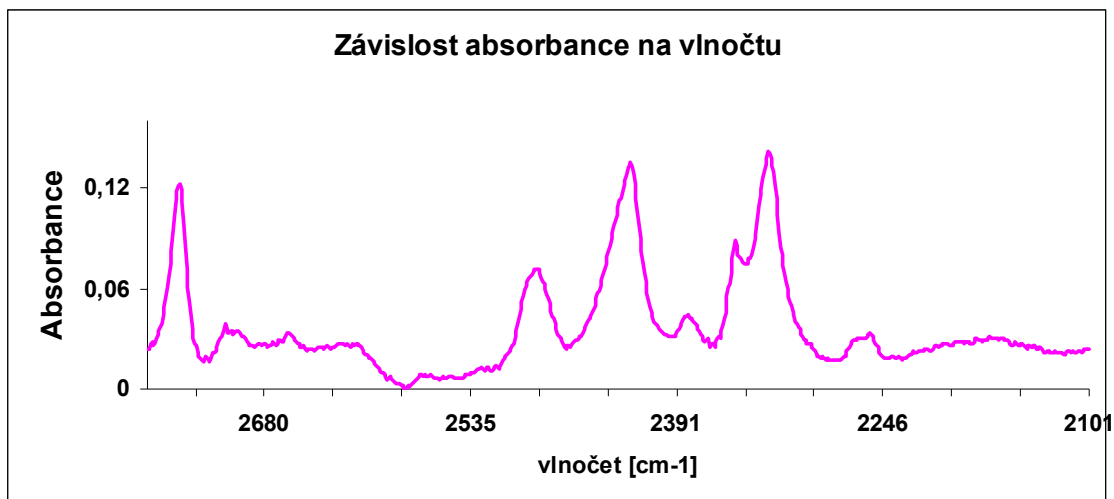
Obr. 53. Grafická znázornění závislosti absorbance na vlnočtu měřeného u síťovaného atelokolagenu glutaraldehydem o koncentraci 0,25%.

Měření bylo prováděno na předem připravených tabletách z KBr a síťovaného atelokolagenu 0,25% v poměru 10:1.



Obr. 54. Grafická znázornění závislosti absorbance na vlnočtu měřeného u síťovaného atelokolagenu glutaraldehydem o koncentraci 0,25%.

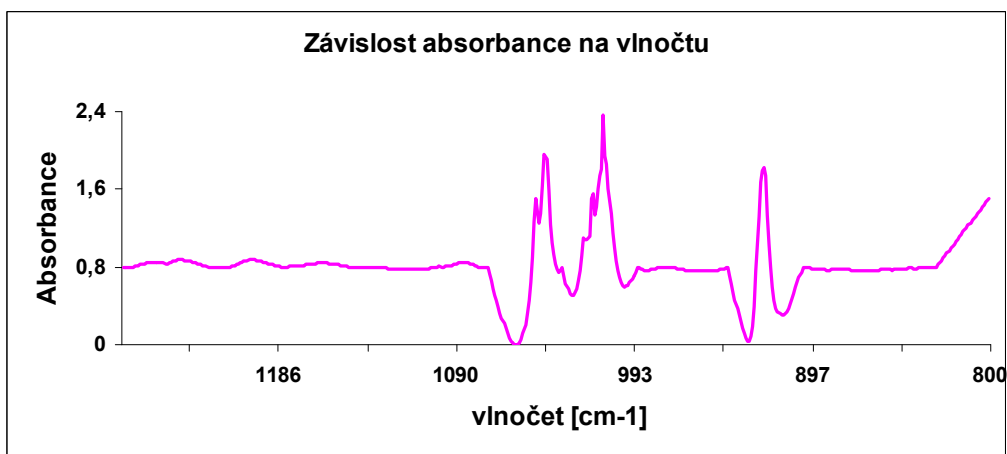
Měření bylo prováděno na předem připravených tabletách z KBr a síťovaného atelokolagenu 0,25% v poměru 10:1.



Obr. 55. Grafická znázornění závislosti absorbance na vlnočtu měřeného u síťovaného atelokolagenu glutaraldehydem o koncentraci 0,25%.

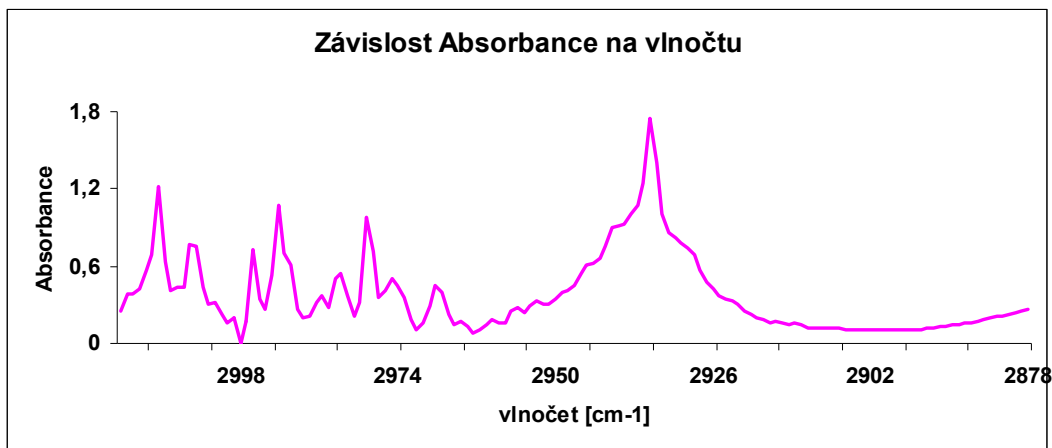
Měření bylo prováděno na předem připravených tabletách z KBr a síťovaného atelokolagenu 0,25% v poměru 10:1.

6.4.7 FT-IR měření síťovaného atelokolagenu glutaraldehydem v koncentraci 0,5%



Obr. 56. Grafická znázornění závislosti absorbance na vlnočtu měřeného u síťovaného atelokolagenu glutaraldehydem o koncentraci 0,5%

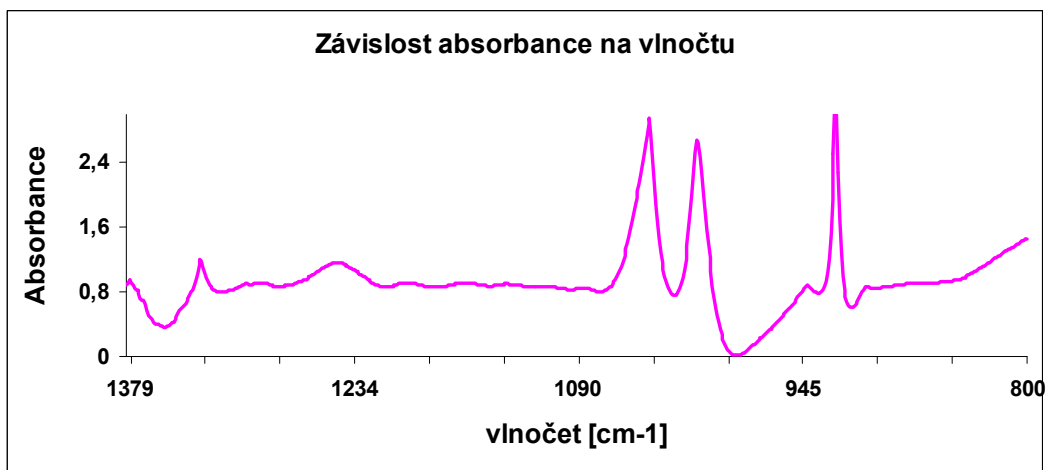
Měření bylo prováděno na předem připravených tabletách z KBr a síťovaného kolagenu 0,5% v poměru 10:1.



Obr. 57. Grafická znázornění závislosti absorbance na vlnočť měřeného u síťovaného atelokolagenu glutaraldehydem o koncentraci 0,5%.

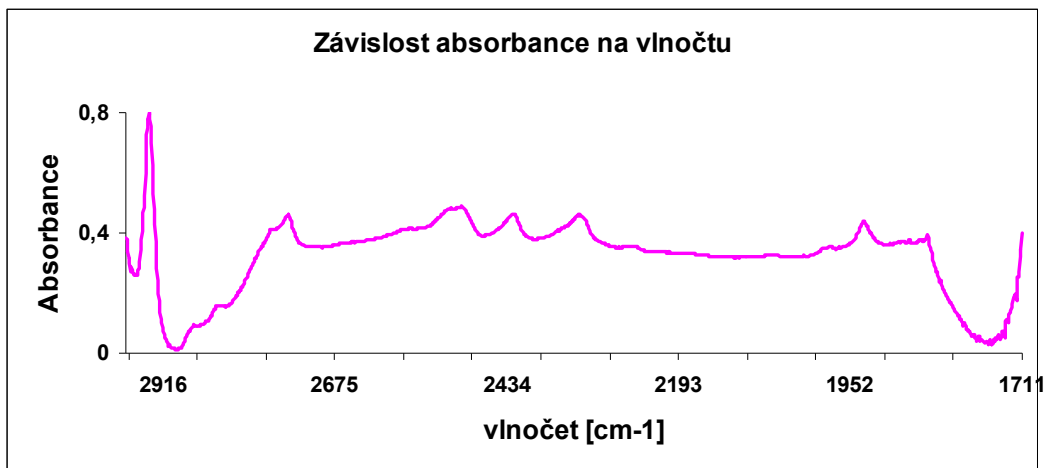
Měření bylo prováděno na předem připravených tabletách z KBr a síťovaného atelokolagenu 0,5% v poměru 10:1.

6.4.8 FT-IR měření síťovaného atelokolagenu glutaraldehydem v koncentraci 1%



Obr. 58. Grafická znázornění závislosti absorbance na vlnočť měřeného u síťovaného atelokolagenu glutaraldehydem o koncentraci 1%.

Měření bylo prováděno na předem připravených tabletách z KBr a síťovaného atelokolagenu 1% v poměru 10:1.



Obr. 59. Grafická znázornění závislosti absorpance na vlnočtu měřeného u síťovaného atelokolagenu glutaraldehydem o koncentraci 1%.

Měření bylo prováděno na předem připravených tabletách z KBr a síťovaného atelokolagenu 0, 5% v poměru 10:1.

6.5 Výsledky a diskuze měření UV-VIS

6.5.1 Měření vzorků roztoků kolagenu po 1nm

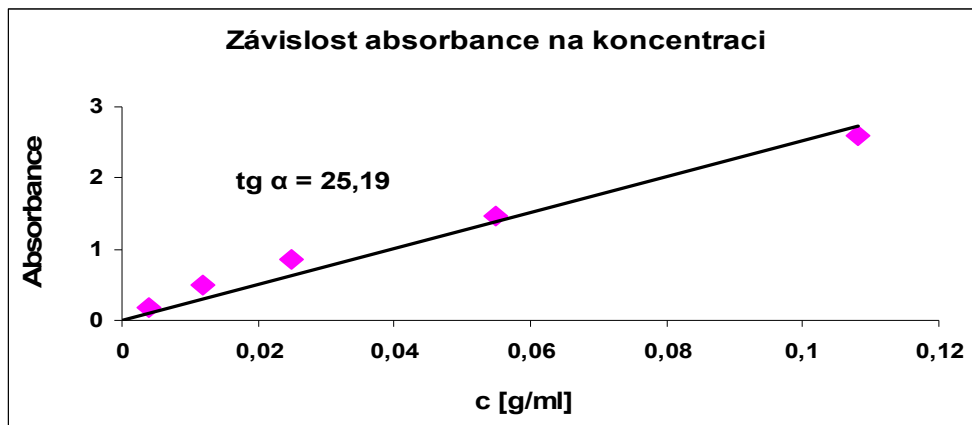
Lambert - Beerův zákon :

$$A = \varepsilon \cdot c \cdot d$$

Tab. 26. Hodnoty absorpance pro píky při vlnové délce 290 nm, výsledky vyhodnocení parametrů Lambert-Beerova zákona. Měřené hodnoty vzorků po 1nm.

Měření po 1nm	λ [nm]	Abs	tg α	c[g/ml]	d [cm]	ε [g mol ⁻¹ cm ⁻¹]
původní vzorek	290	2,601	25,19	0,108	1,00	233,24
1.ředění	290	1,469		0,055	1,00	
2.ředění	290	0,865		0,025	1,00	
3.ředění	290	0,488		0,012	1,00	
4.ředění	290	0,189		0,004	1,00	

Naměřené hodnoty ze spekter ředěných roztoků.



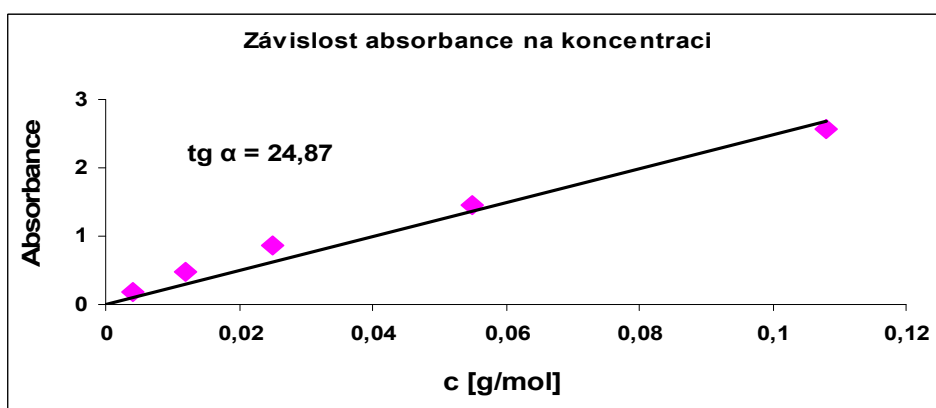
Obr. 60. Grafické znázornění závislosti absorbance na koncentraci, měřené po 1 nm.

Z naměřených spekter roztoků byly odečteny absorbance při 290 nm a byl sestaven graf závislosti absorbance na koncentraci. Z lineární regrese grafu byl získán molární absorpční koeficient a byly vypočítány hodnoty Lambert – Beerova zákona.

6.5.2 Měření vzorků roztoků kolagenu po 2nm

Tab. 27. Hodnoty absorbance pro píky při vlnové délce 290 nm, výsledky vyhodnocení parametrů Lambert-Beerova zákona. Měřené hodnoty vzorků po 1 nm.

Měření po 2nm	λ [nm]	Abs	tg α	c[g/ml]	d [cm]	ϵ [g mol ⁻¹ cm ⁻¹]
původní vzorek	290	2,569	24,87	0,108	1,00	230,28
1.ředění	290	1,445		0,055	1,00	
2.ředění	290	0,855		0,025	1,00	
3.ředění	290	0,485		0,012	1,00	
4.ředění	290	0,186		0,004	1,00	

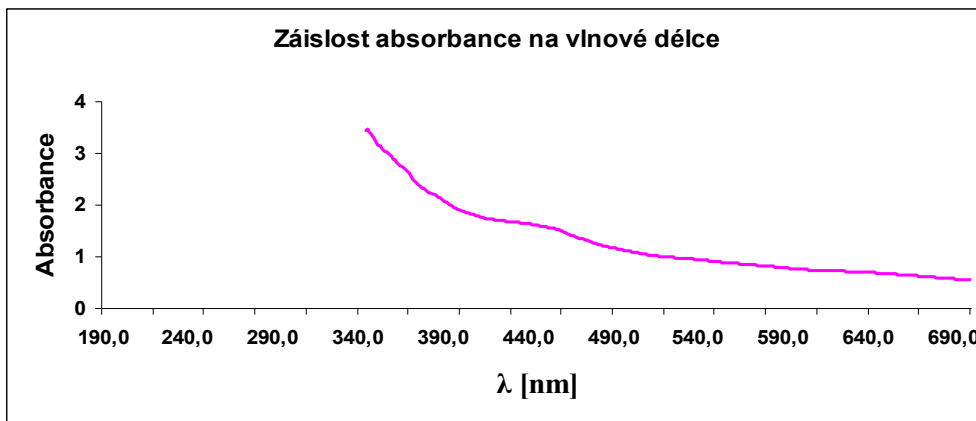


Obr. 61. Grafické znázornění závislosti absorpance na koncentraci, měřené po 2nm.

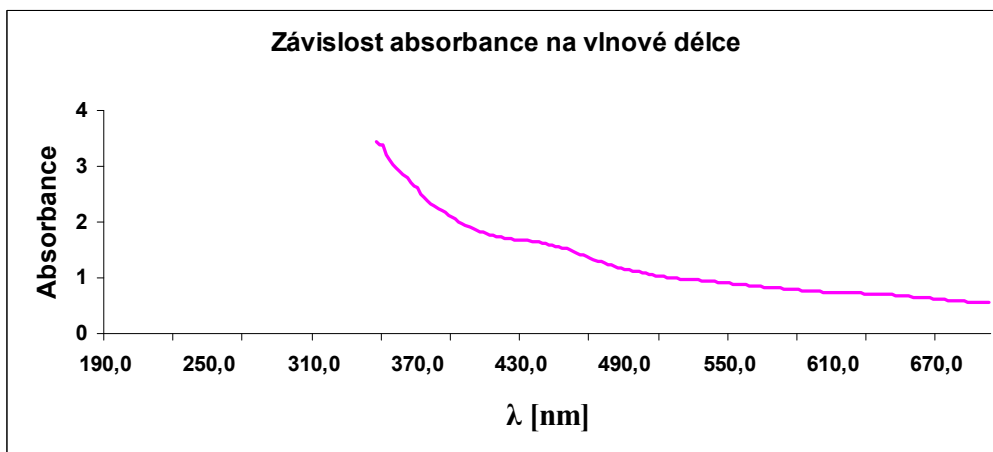
Z naměřených spekter roztoků byly odečteny absorpance při 290 nm a byl sestaven graf závislosti absorpance na koncentraci. Z lineární regrese grafu byl získán molární absorpční koeficient a byly vypočítány hodnoty Lambert – Beerova zákona.

6.5.3 Měření spektra síťovaného atelokolagenu glutaraldehydem

6.5.3.1 UV-Vis síťovaný atelokolagen glutaraldehydem o koncentraci 0,25%

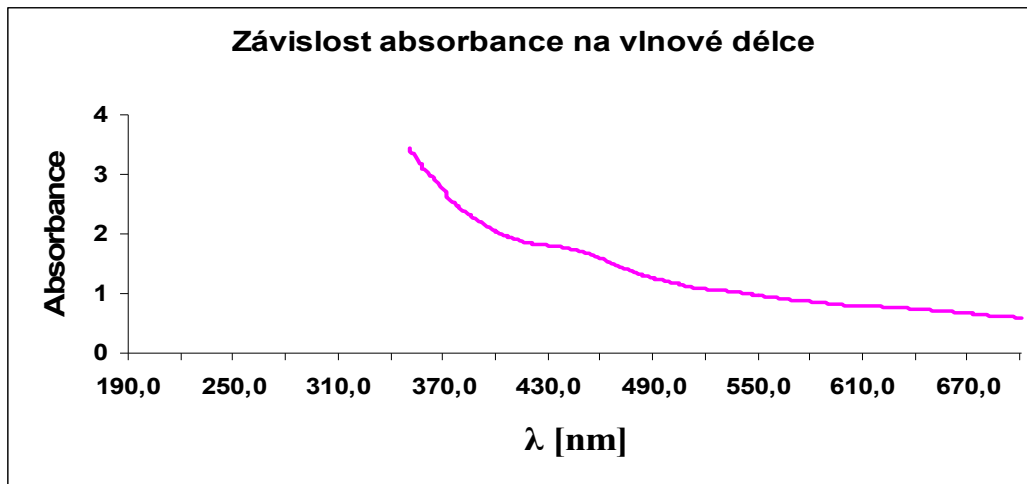


Obr. 62. Grafické znázornění závislosti absorpance na vlnové délce měřený po 1 nm u síťovaného kolagenu glutaraldehydem o koncentraci 0,25%.

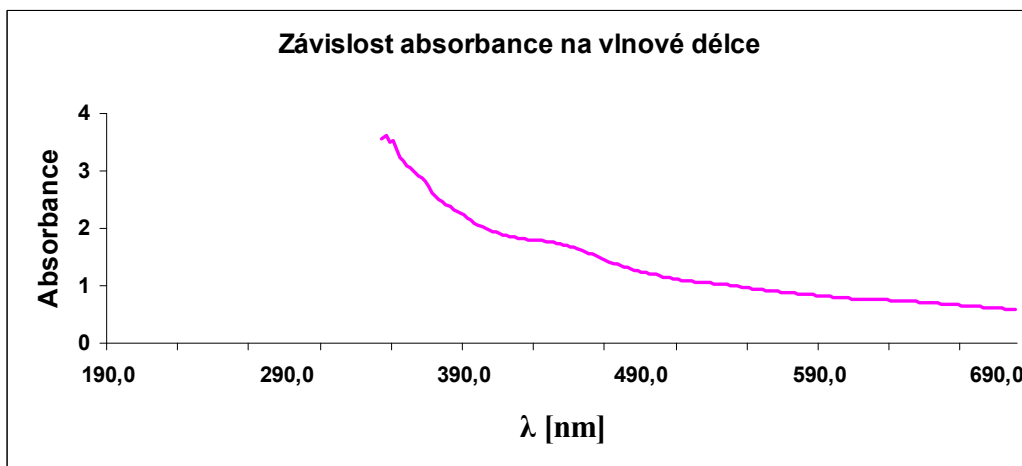


Obr. 63. Grafické znázornění závislosti absorpance na vlnové délce měřený po 2 nm u síťovaného kolagenu glutaraldehydem o koncentraci 0,25%..

6.5.3.2 UV-Vis síťovaný atelokolagen glutaraldehydem o koncentraci 0,5%

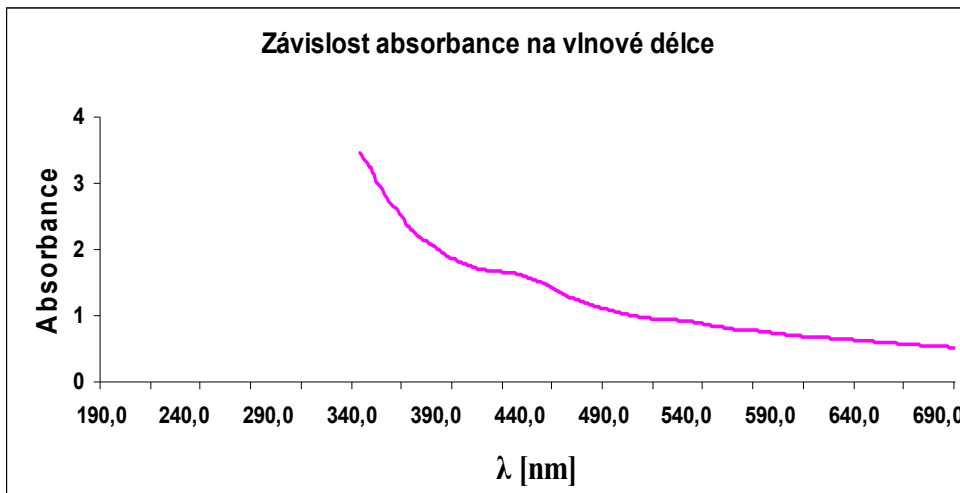


Obr. 64. Grafické znázornění závislosti absorbance na vlnové délce měřené po 1 nm u síťovaného kolagenu glutaraldehydem o koncentraci 0,5%..

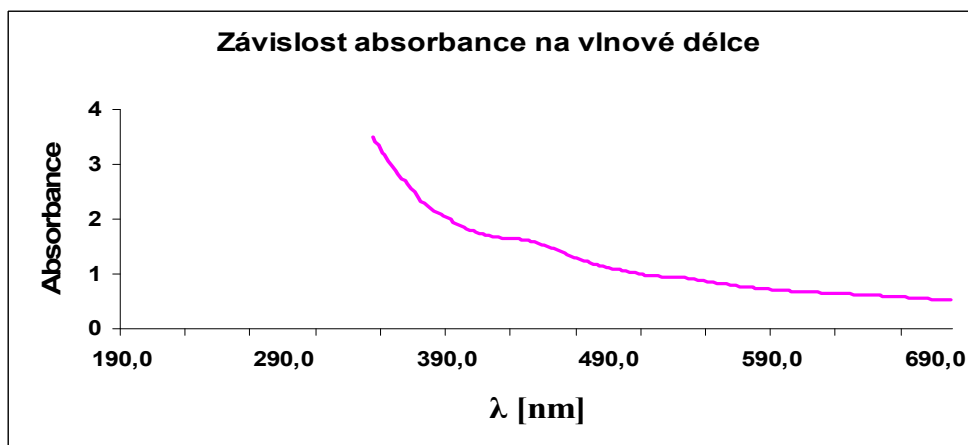


Obr. 65. Grafické znázornění závislosti absorbance na vlnové délce měřené po 2 nm u síťovaného kolagenu glutaraldehydem o koncentraci 0,5%.

6.5.3.3 UV-Vis síťovaný atelokolagen glutaraldehydem o koncentraci 1%



Obr. 66. Grafické znázornění závislosti absorpance na vlnové délce měřené po 1 nm u síťovaného kolagenu glutaraldehydem o koncentraci 1%.



Obr. 67. Grafické znázornění závislosti absorpance na vlnové délce měřené po 2 nm u síťovaného kolagenu glutaraldehydem o koncentraci 1%.

ZÁVĚR

V rámci této diplomové práce bylo prováděno měření kinematické viskozity připravených roztoků atelokolagenu I nemodifikovaných a síťovaných glutar aldehydem v rozmezí teplot 25,3°C, 30°C a 35°C. Ve všech studovaných případech a koncentračních rozmezí 0,108 – 0,004 [g/ml], byla zjištěna platnost lineární závislosti $\eta_{sp}/c = f(c)$ vodních roztoků biopolymeru. Ze získané hodnoty úseku a směrnice pak byly stanoveny: limitní viskozitní číslo $[\eta]$, jehož hodnoty se zvyšující teplotou klesaly, hodnoty Hugginsovy konstanty k_H [g²/ml²], jejíž hodnoty se zvyšující teplotou narůstaly. Tyto změny svědčí o nárůstu molární hmotnosti v důsledku vzniku příčných vazeb.

Dále byla provedena měření dynamické viskozity vzorků na rotačním viskozimetru při teplotě 25,5°C. Byla zjištěna lineární závislost τ [Pa] a η [Pas] na **smykové rychlosti** [s⁻¹] a ze získaných hodnot byly stanoveny viskozity ředěných roztoků atelokolagenu I. Linearita těchto závislostí svědčí o Newtonském charakteru toku těchto systémů.

Byly proměřeny FTIT spektra původních a zesíťovaných vzorků metodou KBr disku. Byly identifikovány příslušné funkční skupiny náležící jednak vlastní struktuře biopolymeru tak také snovadlu.

Studiem UV – VIS spekter byly z měření koncentrační závislosti absorbance pro vybrané absorpční pásy určeny hodnoty molárního absorpčního koeficientu z lineární závislosti Lambertova - Beerova zákona.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] Lapčík, L., Raab, M.: *Nauka o materiálech II*, Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, 2004, ISBN 80-7318-229-7
- [2] Peterková, P., Lapčík, L. Attachment of collagen Type I to Polypropylene. *J. Polymer Materials* 20, 67-74 (2003).
- [3] Elektrochemie jako nástroj studium interakce matrixové metaloproteázy – 9 a kolagenu
dostupná na Internetu: [cit:2010-02-15] <http://kalch.upce.cz/merck09/pdf/Zitka.pdf>
- [4] Kolagen; dostupný na Internetu: [cit:2010-02-16];
<http://cs.wikipedia.org/wiki/Kolagen>
- [5] Glutaraldehyd; dostupný na Internetu: [cit:2010-03-15];
<http://cs.wikipedia.org/wiki/Glutaraldehyd>
- [6] Hoza, I., Kramářová, D.: *Potravinářská biochemie I*,
Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně 2006, ISBN 80-7318-495-8
- [7] Vstřebatelná atelo-kolagenová hemostatická plst, dostupná na Internetu,
[cit:2010-01-20];
<http://www.samoleceni.cz/8595144000068/hypro-sorb-r-vstrebatel.vypln-cyst-10x10x10mm-10ks>
- [8] Hypro – Sorb, dostupný na Internetu: [cit:2010-01-20], Bratislavské listy 1999,
<http://www.hypro.cz/hyRubrIn.aspx?intRubrKis=1251&intLang=0>
- [9] Mikroskopické vyšetření potravinových surovin, dostupné na Internetu,
[cit:2010-01-23], <http://vfu-www.vfu.cz/vegetabilie/bc/cv01.htm>
- [10] Instrumentální metody, dostupné na Internetu: [cit:2010-01-23],
<http://www.fjfi.cvut.cz/kjch/pc/predmety/15ins.htm>
- [11] Pospíšil, P.,: *Instrumentální metody výzkumu a analýzy 2*, Vydavatelství ČVUT, Praha 1996

- [12] Peterková, P.: *Modifikace povrchových vlastností polypropylenu a jeho biokompatibilizace, Systémy na bázi Ateokolagenu*, Dizertační práce: [cit:2010-03-05]
- [13] Sitaservis, dostupný na Internetu: [cit:2010-03-15]
<http://www.sitaservis.cz/produkty/pomocna-zarizeni/viskozimetry.html>
- [14] Wein, O.: *Úvod do reologie*, Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická 1996
- [15] Viscosity measurements, dostupný na Internetu: [cit:2010-03-17],
http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_es-001/hesla/mereni_viskozity.html
- [16] Ubbelohde viscometer, dostupný na Internetu: [cit:2010-03-22],
http://en.wikipedia.org/wiki/Ubbelohde_viscometer
- [17] Struktura, dostupná na Internetu: [cit:2010-03-22]
<http://cs.wikipedia.org/wiki/Kolagen>
- [18] Hypro-Sorb R, dostupný na Internetu: [cit:2010-03-26]
<http://www.lekarna.cz/hypro-sorb-r-hemostat-obvaz-200x150mm-1ks/>
- [19] Mertlová, J.: *Teorie přenosu a rozvodu elektrické energie*, Plzeň, Západočeská univerzita, 2004
- [20] Klučáková, M.: *FT-IR Spektroskopie*, dostupná na Internetu: [cit:2010-04-05]
www.fch.vutbr.cz/home/klucakova/navodIC.doc
- [21] Laboratoř molekulové spektroskopie, VŠCHT Praha, dostupná na Internetu:
[cit:2010-04-08], <http://lms.vscht.cz/>
- [22] Atkins, P. W.: *Fyzikální chemie*, Slovenská technická univerzita v Bratislave 1999
ISBN 80 – 227 – 1238 - 8

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

AMK	Aminokyseliny
ATR FT - IR	Attenuated Total Reflectance Fourier transform infrared (spectroscopy)
DSC	Diferenční skenovací kalorimetrie
DTA	Diferenční termická analýza
GTA	Glutaraldehyde Solution
Hypro – Sorb R	Je čistý nativní 99,9% krystalický vstřebatelný bovinní sterilní atelokolagen
IČ	Infračervená spektroskopie
KBr	Bromid draselný
UV - VIS	Ultraviolet-visible spectroscopy or ultraviolet-visible spectrophotometry

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1. Schéma tří typů kolagenu.....	13
Obrázek 2 . Kolagenová vlákna typu I v transmisním elektronovém mikroskopu.....	14
Obrázek 3. Tropokolagen - spirálovité vlákno kolagenu.....	14
Obrázek 4. Model krystalové struktury trojitě šroubovice kolagenu Pro-Pro-Gly103.....	15
Obrázek 5. Hypro-Sorb R.....	15
Obrázek 6. Hypro-Sorb R.....	15
Obrázek 7. Souhrnné schéma syntézy kolagenu.....	18
Obrázek 8. Chemicky indukovaná přeměna na želatinu.....	21
Obrázek 9. Spektrometr Helios Alpha UTB ve Zlíně.....	35
Obrázek 10. FTIR – 860 1 PC.....	37
Obrázek 11. Ubbelohdeův kapilární viskozimetr s visací hladinou.....	40
Obrázek 12. Höpplerův viskozimetr.....	41
Obrázek 13. Schéma rotačního viskozimetru se dvěma soustřednými válci.....	42
Obrázek 14. Schéma rotačního viskozimetru kužel-deska.....	42
Obrázek 15. Rotační viskozimetr Visco Tester 6 ^L VLT – 6 Thermo Haake, UTB Zlín.....	43
Obrázek 16. Připravené a naředěné vzorky roztoku atelokolagenu.....	47
Obrázek 17. Termostat a Ubbelohde viskozimetr.....	49
Obrázek 18. Rotační viskozimetr Visco Tester 6 ^L VLT – 6 Thermo Haake, UTB Zlín.....	50
Obrázek 19. Síťovaný atelokolagen v koncentracích 1%, 0,5% a 0,25%.....	51
Obrázek 20. Síťovaný roztok atelokolagenu na polystyrénové misce o koncentraci 0,25%...	52

Obrázek 21. Sít'ovaný roztok atelokolagenu na polystyrénové misce o koncentraci 0,5%..	52
Obrázek 22. Sít'ovaný roztok atelokolagenu na polystyrénové misce o koncentraci 1%.....	52
Obrázek 23. Achátová třecí mis- ka.....	53
Obrázek 24. Připravené tablety, čistý KBr, směs KBr a vzorku.....	53
Obrázek 25. Připravené tablety z KBr a vzorku.....	53
Obrázek 26. Připravené tablety ze sít'ovaného atelokolage- nu.....	54
Obrázek 27. Ocelová raznice TRYSTOM Olomouc.....	54
Obrázek 28. FTIR - 860 1 PC.....	54
Obrázek 29. Plastové kyvety.....	55
Obrázek 30. Spektrometr Helios Alpha – zásobník na více kyvet.....	55
Obrázek 31. Spektrometr Helios Alpha – průběh měření vzorku roztoku atelokolage- nu...56	56
Obrázek 32. Grafické znázornění odpařování roztoků atelokolagenu při 60C°.....	58
Obrázek 33. Grafické znázornění závislosti η_{sp}/c na koncentraci pro vzorek temperovaný na 25,3°C.	59
Obrázek 34. Grafické znázornění závislosti η_{sp}/c na koncentraci pro vzorek temperovaný na 30 °C	61
Obrázek 35. Grafické znázornění závislosti η_{sp}/c na koncentraci pro vzorek temperovaný na 35 °C	63
Obrázek 36. Grafické znázornění závislosti smykového napětí a viskozity na smykové rychlosti původního vzorku roztoku atelokolagenu I. Měřeno při teplotě 25,5 °C.....	64
Obrázek 37. Grafické znázornění závislosti smykového napětí a viskozity na smykové rychlosti.....	65

Obrázek 38. Grafické znázornění závislosti smykového napětí a viskozity na smykové rychlosti.....	66
Obrázek 39. Grafické znázornění závislosti smykového napětí a viskozity na smykové rychlosti.....	67
Obrázek 40. Grafické znázornění závislosti smykového napětí a viskozity na smykové rychlosti.....	68
Obrázek 41. Grafické znázornění závislosti absorbance na vlnočtu měřeného u tablet z původního vzorku	69
Obrázek 42. Grafické znázornění závislosti absorbance na vlnočtu měřeného u tablet z původního vzorku	69
Obrázek 43. Grafické znázornění závislosti absorbance na vlnočtu měřeného u tablet z 1. řaděného vzorku.	70
Obrázek 44. Grafické znázornění závislosti absorbance na vlnočtu měřeného u tablet z 1. řaděného vzorku.	70
Obrázek 45. Grafické znázornění závislosti absorbance na vlnočtu měřeného u tablet z 1. řaděného vzorku.	71
Obrázek 46. Grafické znázornění závislosti absorbance na vlnočtu měřeného u tablet z 2. řaděného vzorku	71
Obrázek 47. Grafické znázornění závislosti absorbance na vlnočtu měřeného u tablet z 2. řaděného vzorku	72
Obrázek 48. Grafické znázornění závislosti absorbance na vlnočtu měřeného u tablet z 3. řaděného vzorku.....	72
Obrázek 49. Grafické znázornění závislosti absorbance na vlnočtu měřeného u tablet z 3. řaděného vzorku.....	73
Obrázek 50. Grafické znázornění závislosti absorbance na vlnočtu měřeného u tablet z 4. řaděného vzorku.....	73

Obrázek 51. Grafické znázornění závislosti absorbance na vlnočtu měřeného u tablet z 4. řadě vzorku.....	74
Obrázek 52. Grafické znázornění závislosti absorbance na vlnočtu měřeného u tablet z 4. řadě vzorku.....	74
Obrázek 53. Grafická znázornění závislosti absorbance na vlnočtu měřeného u síťovaného atelokolagenu glutaraldehydem o koncentraci 0,25%.....	75
Obrázek 54. Grafická znázornění závislosti absorbance na vlnočtu měřeného u síťovaného atelokolagenu glutaraldehydem o koncentraci 0,25%.....	75
Obrázek 55. Grafická znázornění závislosti absorbance na vlnočtu měřeného u síťovaného atelokolagenu glutaraldehydem o koncentraci 0,25%.....	76
Obrázek 56. Grafická znázornění závislosti absorbance na vlnočtu měřeného u síťovaného atelokolagenu glutaraldehydem o koncentraci 0,5%.....	76
Obrázek 57. Grafická znázornění závislosti absorbance na vlnočtu měřeného u síťovaného atelokolagenu glutaraldehydem o koncentraci 0,5%.....	77
Obrázek 58. Grafická znázornění závislosti absorbance na vlnočtu měřeného u síťovaného atelokolagenu glutaraldehydem o koncentraci 1%.....	77
Obrázek 59. Grafická znázornění závislosti absorbance na vlnočtu měřeného u síťovaného atelokolagenu glutaraldehydem o koncentraci 1%.....	78
Obrázek 60. Grafické znázornění závislosti absorbance na koncentraci, měřené po 1 nm	79
Obrázek 61. Grafické znázornění závislosti absorbance na koncentraci, měřené po 2 nm	79
Obrázek 62. Grafické znázornění závislosti absorbance na vlnové délce měřené po 1 nm u síťovaného kolagenu glutaraldehydem o koncentraci 0,25%.....	80
Obrázek 63. Grafické znázornění závislosti absorbance na vlnové délce měřené po 2 nm u síťovaného kolagenu glutaraldehydem o koncentraci 0,25%.....	80

Obrázek 64. Grafické znázornění závislosti absorpance na vlnové délce měřené po 1 nm u síťovaného kolagenu glutaraldehydem o koncentraci 0,5%.....81

Obrázek 65. Grafické znázornění závislosti absorpance na vlnové délce měřené po 2 nm u síťovaného kolagenu glutaraldehydem o koncentraci 0,5%.....81

Obrázek 66. Grafické znázornění závislosti absorpance na vlnové délce měřené po 1 nm u síťovaného kolagenu glutaraldehydem o koncentraci 1%.....82

Obrázek 67. Grafické znázornění závislosti absorpance na vlnové délce měřené po 2 nm u síťovaného kolagenu glutaraldehydem o koncentraci 1%.....82

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Ruční odvodnění vorků.....	25
Tabulka 2: Odvodnění vzorků autotechnikou.....	26
Tabulka 3: Cílené barvení struktur.....	28
Tabulka 4: Přístrojová technika a použité materiály.....	31
Tabulka 5: Typy viskozimetrů pro technická měření.....	39
Tabulka 6. Hmotnost Petriho misek a vzorků roztoků.....	57
Tabulka 7. Naměřené hodnoty při odpařování vzorků při 60°C.....	57
Tabulka. 8. Výpočty koncentrace roztoků atelokolagenu.....	58
Tabulka 9. Průtokové časy roztoků kolagenu a síťovaného kolagenu, měřené na Ubbelohde viskozimetru pro vzorek temperovaný na 25,3 °C	58
Tabulka 10. Výpočet kinematické viskozity ν (mm ² /s) pro vzorek temperovaný na 25,3 °C.....	59
Tabulka 11. Výpočty specifické a relativní viskozity pro vzorek temperovaný na 25,3 °C... ..	59
Tabulka 12. Výpočet Hugginsova koeficientu pro vzorek temperovaný na 25,3 °C	60
Tabulka 13. Průtokové časy roztoků kolagenu a síťovaného kolagenu, měřené na Ubbelohde viskozimetru pro vzorek temperovaný na 30 °C.....	60
Tabulka 14. Výpočet kinematické viskozity ν (mm ² /s) pro vzorek temperovaný na 30°C... ..	60
Tabulka 15. Výpočty specifické a relativní viskozity pro vzorek temperovaný na 30 °C... ..	61
Tabulka 16. Výpočet Hugginsova koeficientu pro vzorek temperovaný na 30 °C	61

Tabulka 17. Průtokové časy roztoků kolagenu síťovaného kolagenu, měřené na Ubbelohde viskozimetru pro vzorek temperovaný na 35 °C.....	62
Tabulka 18. Výpočet kinematické viskozity V (mm^2/s) pro vzorek temperovaný na 35 °C...	62
Tabulka 19. Výpočty specifické a relativní viskozity pro vzorek temperovaný na 35 °C...	62
Tabulka 20. Výpočet Hugginsova koeficientu pro vzorek temperovaný na 35 °C.....	63
Tabulka 21. Naměřené hodnoty závislosti smykového napětí na smykové rychlosti pro původní vzorek roztoku atelokolagenu. Měřeno při teplotě 25,5 °C	64
Tabulka 22. Naměřené hodnoty závislosti smykového napětí a dynamické viskozity na smykové rychlosti pro vzorek roztoku atelokolagenu 1. ředění 1:1. Měřeno při teplotě 25,5°C.....	65
Tabulka 23. Naměřené hodnoty závislosti smykového napětí a dynamické viskozity na smykové rychlosti pro vzorek roztoku atelokolagenu 2. ředění 1:1. Měřeno při teplotě 25,5°C.....	66
Tabulka 24. Naměřené hodnoty závislosti smykového napětí a dynamické viskozity na smykové rychlosti pro vzorek roztoku atelokolagenu 3. ředění 1:1. Měřeno při teplotě 25,5°C.....	67
Tabulka 25. Naměřené hodnoty závislosti smykového napětí a dynamické viskozity na smykové rychlosti pro vzorek roztoku atelokolagenu 4. ředění 1:1. Měřeno při teplotě 25,5°C.....	68
Tabulka 26. Hodnoty absorpance pro píky při vlnové délce 290 nm, výsledky vyhodnocení parametrů Lambert-Beerova zákona. Měřené hodnoty vzorků po 1 nm	78
Tabulka 27. Hodnoty absorpance pro píky při vlnové délce 290 nm, výsledky vyhodnocení parametrů Lambert-Beerova zákona. Měřené hodnoty vzorků po 2 nm	79

SEZNAM PŘÍLOH

Příloha I: UV – VIS spektra původního roztoku atelokolagenu

Příloha II: UV – VIS spektra 1. ředěného roztoku atelokolagenu

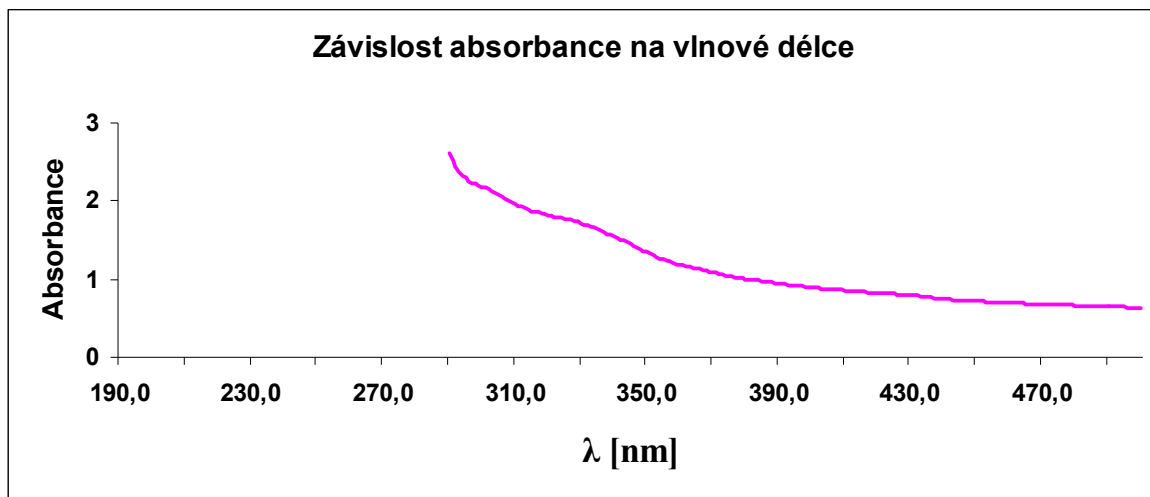
Příloha III: UV – VIS spektra 2. ředěného roztoku atelokolagenu

Příloha IV: UV – VIS spektra 3. ředěného roztoku atelokolagenu

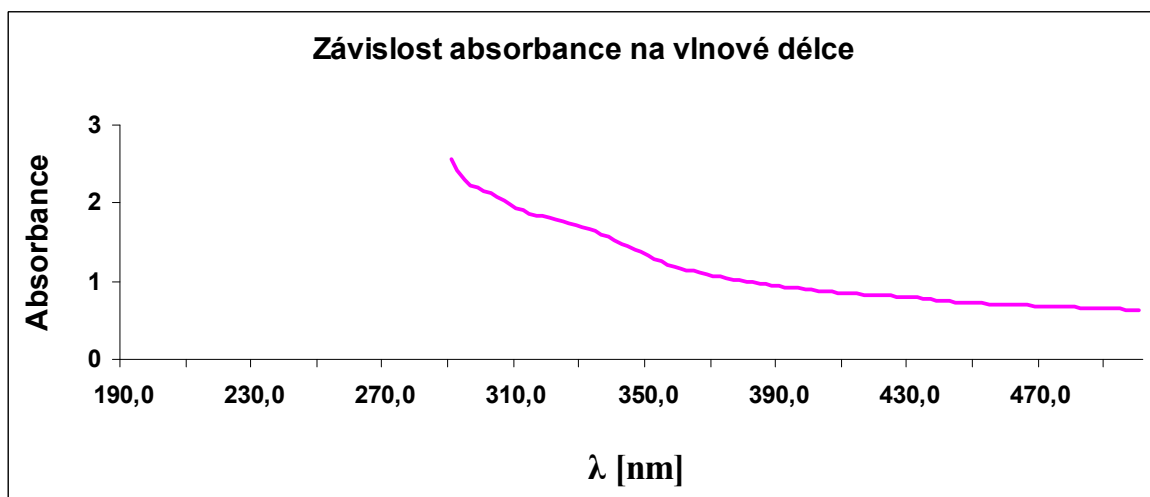
Příloha V: UV – VIS spektra 4. ředěného roztoku atelokolagenu

PŘÍLOHA P I: UV – VIS SPEKTRA PŮVODNÍHO ROZTOKU ATELOKOLAGENU

Závislost absorbance na vlnové délce u původního vzorku, měřeného po 1 nm.

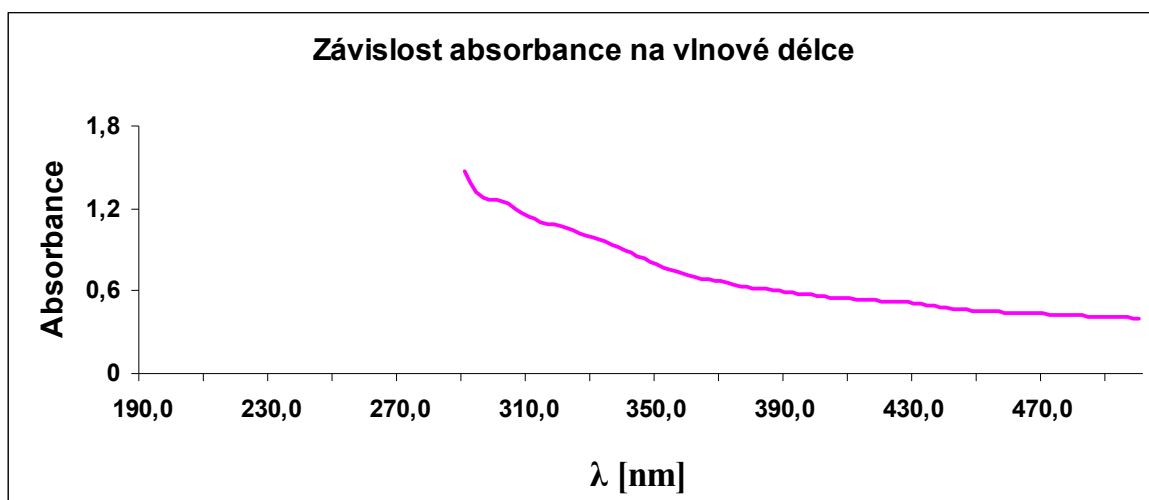


Závislost absorbance na vlnové délce u původního vzorku měřeného po 2 nm.

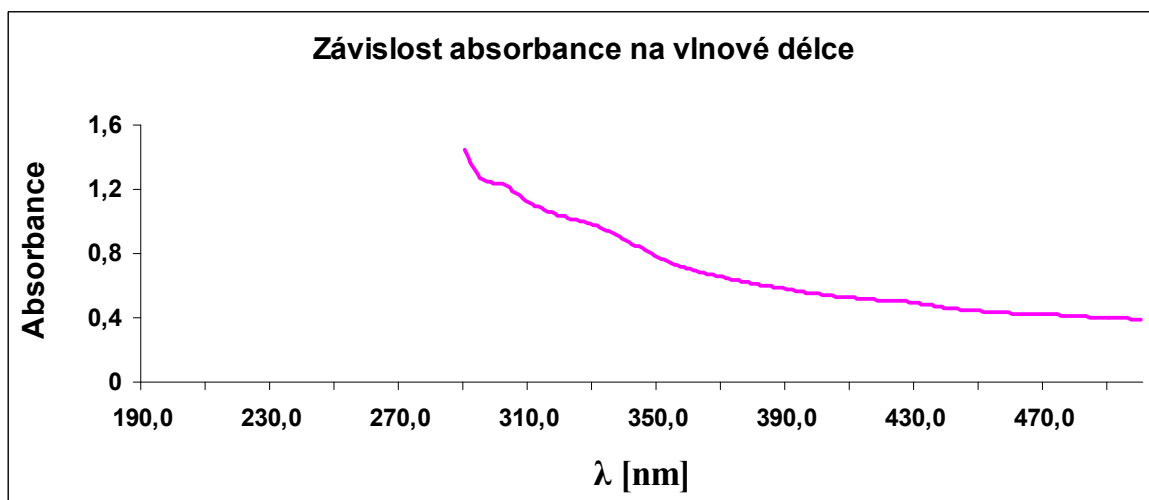


PŘÍLOHA P II: UV – VIS SPEKTRA 1. ŘEDĚNÉHO ROZTOKU ATELOKOLAGENU

Závislost absorpance na vlnové délce 1. ředěného roztoku, měřeného po 1 nm.

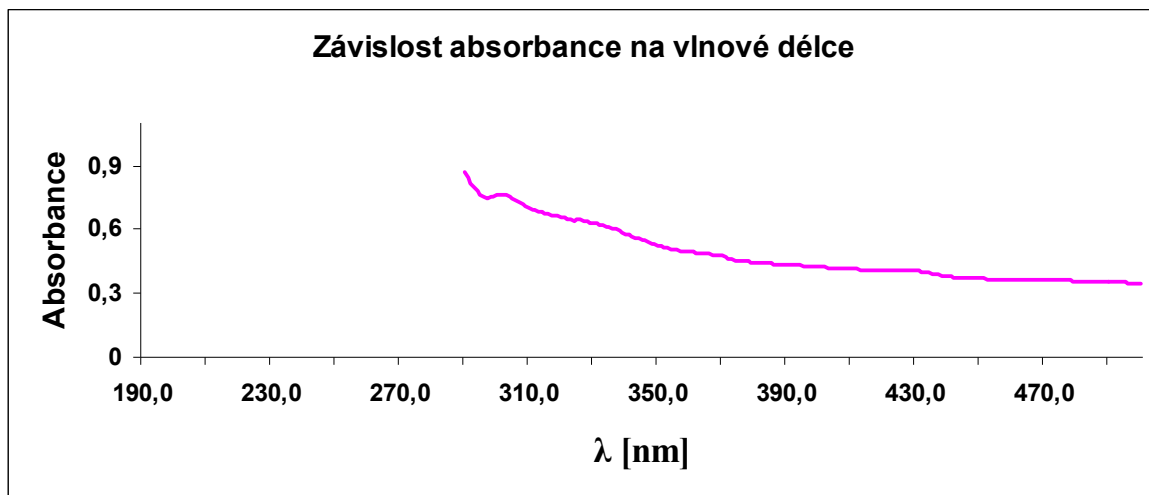


Závislost absorpance na vlnové délce 1. ředěného roztoku, měřeného po 2 nm.

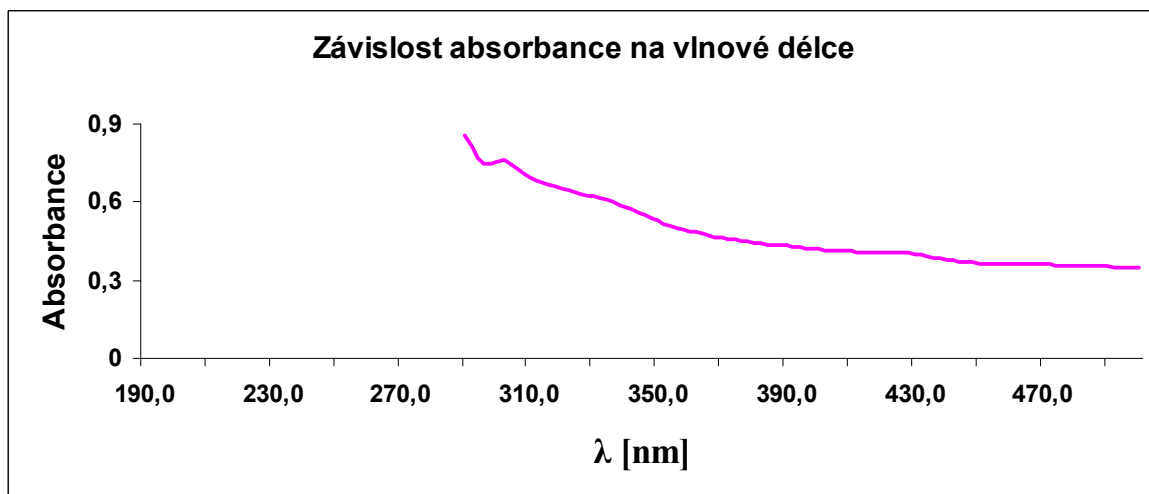


PŘÍLOHA P III: UV – VIS SPEKTRA 2. ŘEDĚNÉHO ROZTOKU ATELOKOLAGENU

Závislost absorbance na vlnové délce 2. ředěného roztoku, měřeného po 1 nm.

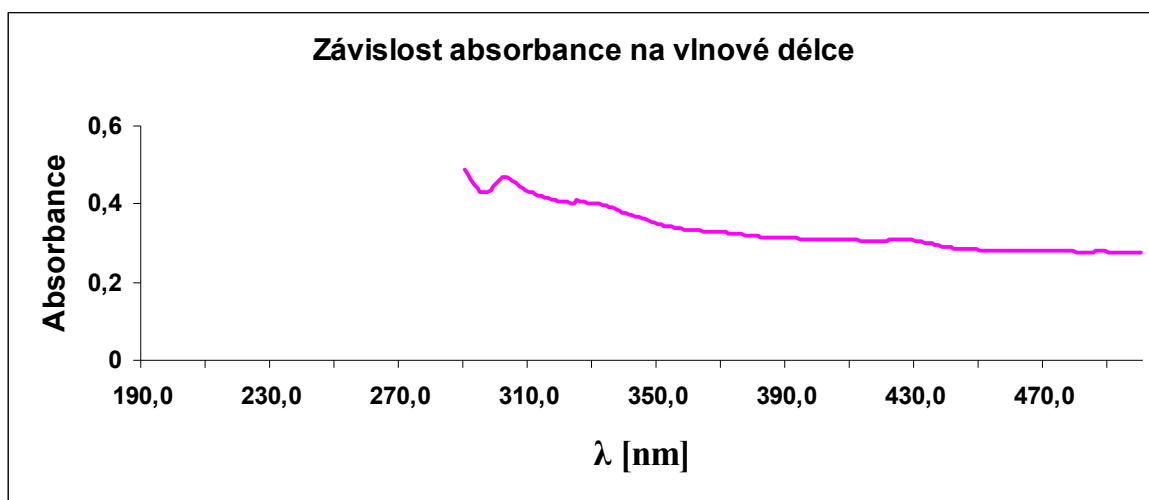


Závislost absorbance na vlnové délce 2. ředěného roztoku, měřeného po 2 nm.

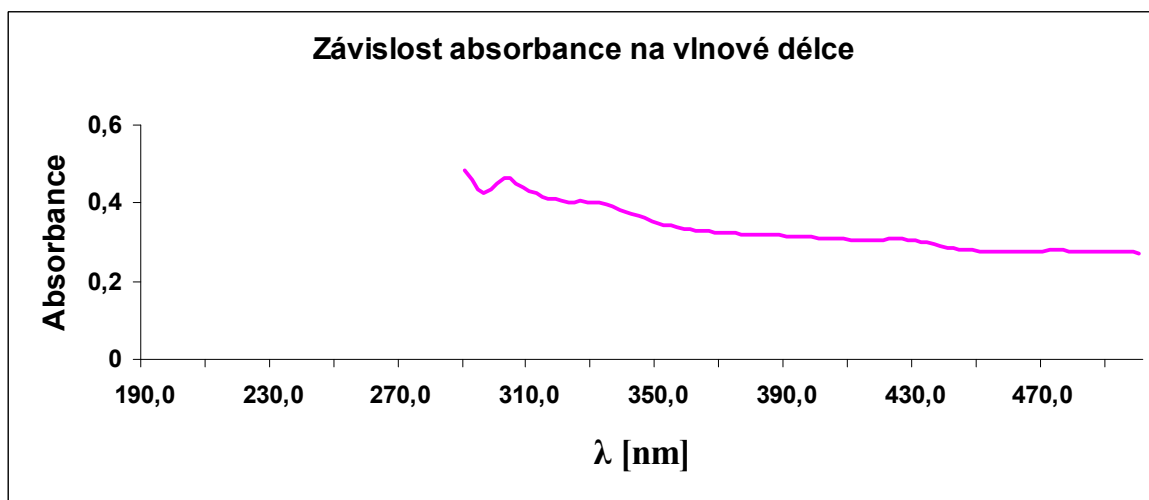


PŘÍLOHA P IV: UV – VIS SPEKTRA 3. ŘEDĚNÉHO ROZTOKU ATELOKOLAGENU

Závislost absorpance na vlnové délce 3. ředěného roztoku, měřeného po 1 nm.

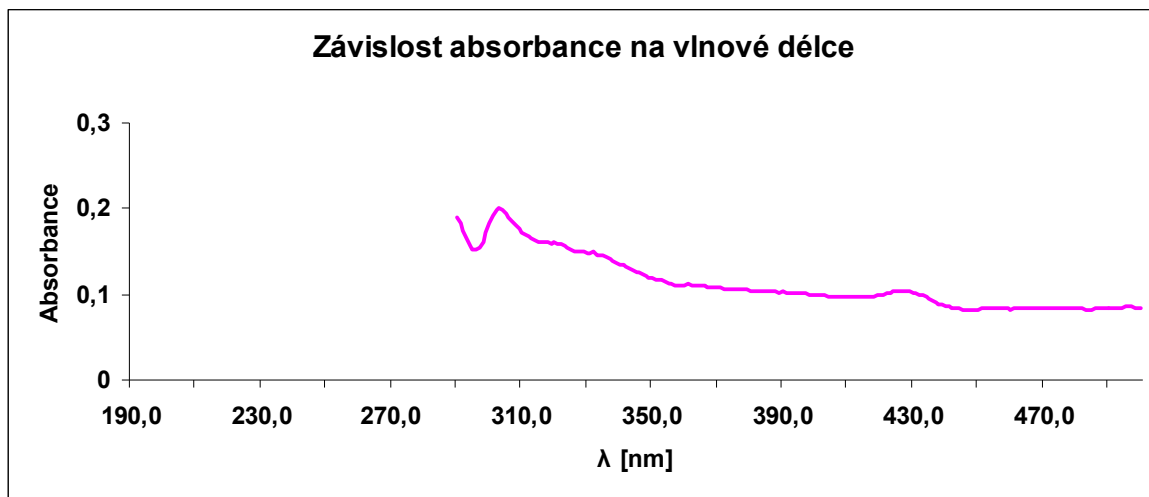


Závislost absorpance na vlnové délce 3. ředěného roztoku, měřeného po 2 nm.



PŘÍLOHA P V: UV – VIS SPEKTRA 4. ŘEDĚNÉHO ROZTOKU ATELOKOLAGENU

Závislost absorpance na vlnové délce 4. ředěného roztoku, měřeného po 1 nm.



Závislost absorpance na vlnové délce 4. ředěného roztoku, měřeného po 2 nm.

