

Viskozitné a reologické merania roztokov hyaluronanu s prídavkami kvartérnych solí

Bc. Alena Pokopcová

Diplomová práca
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. Alena POKOPCOVÁ**
Studijní program: **N 2808 Chemie a technologie materiálů**
Studijní obor: **Materiálové inženýrství**

Téma práce: **Viskozitné a reologické merania roztokov hyaluronanu s prídavkami kvartérnych solí**

Zásady pro vypracování:

1. Vypracujte rešerši k zadanému tématu.
2. Podle pokynů vedoucího DP připravte vzorky pro měření.
3. Pracujte s příslušnými přístroji a proveďte měření.
4. Naměřené výsledky zpracujte a vyhodnoťte.

Rozsah práce:

Rozsah příloh:

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

1. **Mezinárodní časopisy: Biophysical Journal, Journal of Biomedical Materials Research, Chemical Reviews, Glycobiology, Carbohydrate Research, Journal of Molecular Biology, Polymer, Biomacromolecules, Annals of Biomedical Engineering, Biopolymers, atd.**

Vedoucí diplomové práce:

Mgr. Aleš Mráček, Ph.D.

Ústav fyziky a mater. inženýrství

Datum zadání diplomové práce:

15. února 2010

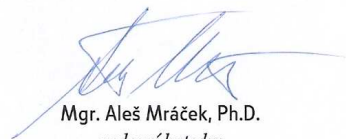
Termín odevzdání diplomové práce:

19. května 2010

Ve Zlíně dne 15. února 2010



doc. Ing. Petr Hlaváček, CSc.
děkan



Mgr. Aleš Mráček, Ph.D.
vedoucí katedry

ABSTRAKT

Kyselina hyalurónová (HA) je veľmi významný polysacharid a od svojho objavenia je predmetom rôznych výskumov. V dnešnej dobe si ľudia nevedia predstaviť život bez liekov, kozmetických výrobkov a rady iných vymožeností. HA je prírodná látka, vyskytujúca sa aj v našom tele, preto je dokonale biokompatibilná a používa sa práve na farmaceutické účely, ako sú lieky a kozmetika. Pretože sa nachádza v ľudskom tele, konkrétne napríklad v koži, v kĺboch alebo v synoviálnej tekutine a prostredníctvom kozmetických a farmaceutických preparátov sa dostáva do kontaktu s pokožkou, je veľmi dôležité vedieť jej správanie z hľadiska reologických vlastností. Táto práca je zameraná na viskozitné a reologické merania roztokov kyseliny hyalurónovej s prídavkami kvartérnej amóniovej soli. Táto soľ nám pôsobí v roztoku HA ako konzervačná látka, pretože kyselina hyalurónová v roztoku podlieha rýchlo degradácii, vďaka kontaminácii mikroorganizmami, ktorej sa veľmi ťažko zabraňuje bez použitia konzervačnej látky. Namerané hodnoty sa spracovali a uviedli v praktickej časti. Teda cieľom tejto práce bolo vyhodnotiť, ako sa správa HA v roztoku s prídavkami amóniovej soli.

Kľúčové slova: kyselina hyalurónová, kvartérna amóniová soľ, reológia

ABSTRACT

Hyaluronic acid (HYA) is a very important polysaccharide and has been the subject of intense research since its discovery. Today, people can not imagine life without medicine, cosmetics and other conveniences. HYA is a natural substance, present also in human body, therefore it is entirely biocompatible and can be used for medical and pharmaceutical purposes, e. g. drugs and cosmetics. For its presence in human body, namely in skin, joints or synovial fluids, and because it can get into contact with skin also via cosmetics and pharmaceutical preparations, it is substantive to understand its behaviour related to its rheological properties. This work has been focused on viscometric and rheological measurement of HYA solutions with addition of quaternary salts. These salts act as preservatives in aqueous solutions, as HYA undergoes rapid degradation in untreated solutions, mainly as a consequence of microbial contamination, which is difficult to avoid without the help of preservatives. Measured values have been processed in the practical part of this work.

The aim of this work was thus to evaluate the behaviour of HYA in aqueous solutions doped with quaternary salts.

Keywords: hyaluronic acid, quaternary ammonium salt, rheology

PodĎakovanie, motto

Rada by som poĎakovala svojmu vedúcemu diplomovej práce Mgr. Alešovi Mráčkovi Ph.D. za pomoc pri spracovávaní DP a pánovi doc. Dr.Ing. Vladimírovi Pavlínkovi za konzultácie a poskytnutie prístroja na meranie reológie.

Prehlasujem, že som na bakalárskej/diplomovej práci pracoval(a) samostatne a použitú literatúru som citoval(a). V prípade publikácií výsledkov, ak je to uvedené na základe licenčnej zmluvy, budem uvedený(á) ako spoluautor(ka).

V Zlíně

.....
Podpis diplomanta

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.

OBSAH

ÚVOD	11
I TEORETICKÁ ČASŤ	12
1 POLYSACHARIDY	13
2 KYSELINA HYALURÓNOVÁ	14
2.1 ŠTRUKRÚRA HA.....	15
2.1.1 Štruktúra HA v roztoku	16
2.2 VÝSKYT.....	18
2.3 IZOLÁCIA	18
2.3.1 Molekulová hmotnosť	19
2.4 VLASTNOSTI.....	19
2.5 MEDICÍNSKE APLIKÁCIE	20
2.5.1 Oftalmológia.....	20
2.5.2 Ortopedická chirurgia a revmatológia.....	21
2.5.3 Otolaryngológia.....	22
2.5.4 Dermatológia a plastická chirurgia.....	23
2.5.5 HA a rakovina	24
2.6 DEGRADÁCIA	24
3 KVARTÉRNE AMÓNIOVÉ SOLI	25
3.1 BENZALKÓNium CHLORID	26
4 REOLÓGIA A VISKOZIMETRIA	28
4.1 ÚVOD DO REOLÓGIE	28
4.2 VISKOZIMETRIA NEWTONOVSKÝCH KVAPALÍN	29
4.2.1 Prostý šmyk a prostý šmykový tok	31
4.2.2 Axiálny tok v kruhovej trubke	32
4.3 VISKOZIMETRIA NENEWTONOVSKÝCH KVAPALÍN	33
4.3.1 Sklz na stene.....	35
4.3.2 Určenie viskozity vysokomolekulárnych látok	36
4.4 VISKOELASTICITA.....	37
4.4.1 Reologické modely viskoelastických látok	38
4.5 METÓDY MERANIA	39
4.5.1 Výtokový viskozimeter	39
4.5.2 Telieskové viskozimetre.....	41
4.5.3 Rotačné viskozimetre	42
Viskozimeter typu „valec- valec“	42
Viskozimeter typu „doska- doska“	43
Viskozimeter typu „kužel'- doska“	44
II PRAKTICKÁ ČASŤ	46
5 MATERIÁLY POUŽÍVANÉ PRI MERANÍ	47

5.1	PRÍPRAVA FOSFÁTOVÉHO PUFORU	47
5.2	PRÍPRAVA ROZTOKOV HA – UBBELOHDEHO VISKOZIMETER	48
5.3	URČENIE LIMITNÉHO VISKOZITNÉHO ČÍSLA.....	51
5.4	PRÍPRAVA ROZTOKOV HA- ROTAČNÝ REOMETER	52
6	VÝSLEDKY A DISKUSIA.....	54
	<i>Kinematická viskozita.....</i>	<i>54</i>
	<i>Limitné viskozitné číslo</i>	<i>55</i>
	<i>Reometrické merania.....</i>	<i>58</i>
	ZÁVER	61
	ZOZNAM POUŽITEJ LITERATÚRY	62
	ZOZNAM POUŽITÝCH SYMBOLOV A SKRATIEK.....	69
	ZOZNAM OBRÁZKOV	71
	ZOZNAM TABULIEK	72
	ZOZNAM PRÍLOH.....	73

ÚVOD

Kyselina hyaluronová (HA) a jej sočná soľ hyaluronan, je veľmi zaujímavý a významný polysacharid. Ihneď po objavení tejto biologickej zložky, od roku 1934, sa stal predmetom mnohých výskumov. Patrí medzi polysacharidy, ktoré tvoria neodmysliteľnú funkciu v tele človeka, pretože sa nachádza napríklad v synoviálnej tekutine, v sklovci oka, v bunkách, pokožke a v iných dôležitých miestach tela. Spolu s kolagénovou zložkou tvoria v kĺbovom priestore gélovú štruktúru, ktorá udržiava tento kĺb v zdravom pohybe. Najstaršou metódou prípravy HA je z kohútieho hrebienka a v dnešnej dobe sa vyrába kyselina hyaluronová fermentáciou z baktérie *Streptococci*. Táto kyselina svojou štruktúrou vykazuje pseudoplastické vlastnosti, čo má veľký význam hlavne v kĺbovom priestore, a preto je pre nás dôležité vedieť, ako sa chová z viskozitného a reologického hľadiska. Cieľom tejto práce bolo zistiť, ako sa chová táto kyselina v zriedených roztokoch vo fosfátovom pufore s prídavkami kvartérnej amóniovej soli, konkrétne s prídavkami benzalkónia chloridu. Poskytnuté vzorky kyseliny hyaluronovej boli s farmaceutickou čistotou, pretože tento výskum je zameraný práve na takéto účely. Udržiavali sme konštantné pH na 7,36 pomocou fosfátového puforu, čo predstavuje biologické pH.

Kvartérne amóniové soli sú konzervačné látky, ktoré sa používajú v potravinárstve, ale aj vo farmaceutike. Vo väčšom množstve sa chovajú ako jedy, ale v stopovom množstve plnia svoju funkciu a nie sú vôbec škodlivé pre zdravie človeka. Úlohou bolo zistiť, ako sa chovajú roztoky HA po reologickej stránke s prídavkami práve spomínanej konzervačnej látky. Merania sa prevádzali na dvoch prístrojoch a to na Ubbelohdeho viskozimetri, a na rotačnom reometri, typu valec- valec. Výsledky sa podrobne prekonzultovali a uviedli v praktickej časti tejto práce.

I. TEORETICKÁ ČASŤ

1 POLYSACHARIDY

Polysacharidy patria medzi biologické polyméry. Sú tvorené opakujúcimi sa jednotkami monosacharidov, spojenými glykozidickými väzbami [1]. Ich funkcia v živom organizme je rôzna. Môžu byť zásobárňou energie, ako napríklad škrob a glykogén, alebo stavebnou jednotkou, ako je celulóza [2]. Celulóza je hlavná zložka bunkovej steny rastlín, a aj baktérií. Tento polysacharid je najrozšírenejšou zložkou na zemi [3]. Ďalšou veľmi významnou biologickou zložkou je „kyselina hyalurónová“, alebo jej sodná soľ „*hyaluronan*“. Je to polysacharid tvorený disacharidovými jednotkami. Nachádza sa v ľudskom tele, v tele niektorých živočíchov a v bunkách baktérií [4].

2 KYSELINA HYALURÓNOVÁ

Kyselina hyalurónová, v skratke nazývaná aj HA, je prirodzene sa vyskytujúci polysacharid s unikátnymi biologickými vlastnosťami a aplikáciami [5]. Tento polysacharid bol objavený v roku 1934, významnými vedcami Meyerom a Palmerom zo sklovca kravského oka. Zistili, že táto látka obsahuje urónovú kyselinu a amínové cukry, ale neobsahuje sulfoestery. Nazvali ju kyselina hyalurónová [6], avšak v dnešnej dobe sa používa aj názov hyaluronan, čo je sodná soľ HA [7]. Kyselina hyalurónová je lineárny, nerozvetvený, polyaniónový polysacharid, ktorý môže dosahovať vysoké molekulové hmotnosti [8]. Trvalo asi 20 rokov kým vedci dospeli k záverom, ktoré charakterizujú štruktúru HA, a to, že je tvorená opakujúcimi sa disacharidovými jednotkami D- glukurónovej kyseliny a D-N- acetylglukozamínom [7]. Tieto jednotky sú spojené striedajúcimi sa beta 1-4 a 1-3 glykozidickými väzbami [9].

Pojem „hyaluronan“ charakterizuje vlastne polysacharid izolovaný zo živočíšneho tkaniva a „kyselina hyalurónová“ už látku, vysoko čistenú s úzkou distribúciou molekulovej hmotnosti, ktorá sa používa na medicínske aplikácie [9].

Počas výskumu HA, bol tento polysacharid izolovaný z mnohých zdrojov, ako zo sklovca oka, synoviálnej tekutiny, pupočnej šnúry, kože, z kohútieho hrebienka alebo z baktérie Streptococci [10]. Veľmi významné sú vlastnosti HA v roztoku, kde sa chová ako náhodne predĺžený reťazec. Už vo veľmi zriedenom roztoku vykazuje vysokú viskozitu, pretože dokáže na seba naviazať veľké množstvo tekutiny [9]. Tieto vlastnosti jej umožňujú regulovať vodnú bilanciu, osmotický tlak, tok a odpor, interakcie s proteínmi, môže pôsobiť ako sito, mazivo a stabilizovať tak štruktúru na základe elektro- statických interakcií [11].

V súčasnosti sa veľká pozornosť venuje aj príprave a výskumu sieťovaných derivátov nazývaných „hylany“. Sú charakteristické vysokou elasticitou roztokov a ich gélov. Je možné pripraviť tieto hylany dvoma spôsobmi. A to v prvom prípade použitím formaldehydu pri neutrálnom pH. Vytvorí sa stála väzba medzi „C a OH“ skupinami polysacharidu a amino, alebo imino skupinami proteínu. Práve tento proteín potom vytvorí spojovaciu väzbu medzi dvoma molekulami polysacharidu, ktorý vytvorí elasticko- viskózny roztok. Pokiaľ sú dodržané vhodné podmienky, proces vedie k vytvoreniu nie úplne zosieťovaného systému, ale k väzbe dvoch až ôsmich molekúl kyseliny navzájom. Druhý príklad spôsobu

prípravy spočíva v reakcii vinylsulfonu s hydroxylovými skupinami HA, ktorý vytvorí výrazne zosieťovaný systém prostredníctvom priečných väzieb. Takto je potom možné pripraviť gély s premenlivým obsahom vody a molekulové hmotnosti dosahujú 8 až 24 MDa [12].

2.1 Štruktúra HA

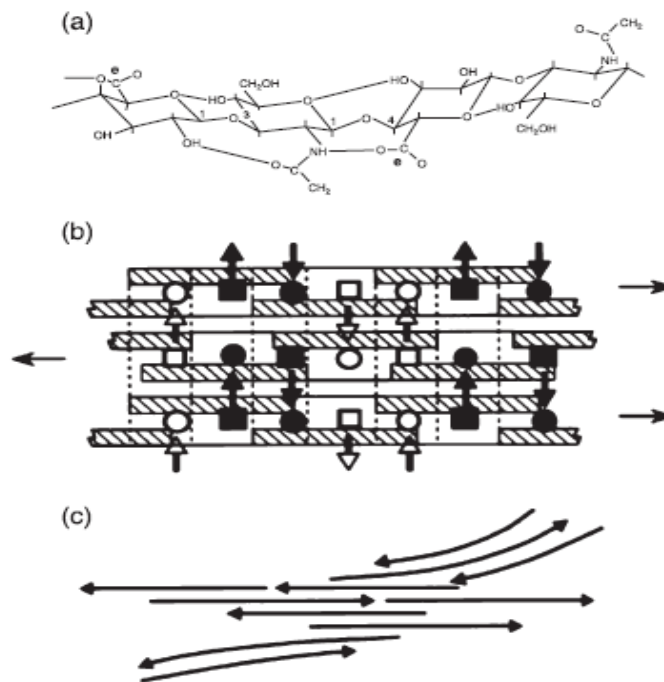
Otázka štruktúry HA bola objasnená v roku 1954 Karlom Meyerom. Hyalurónové molekuly obsahujú rovný reťazec stoviek, alebo až tisícok sacharidových jednotiek, ktoré sa striedajú už spomínanými N- acetyl glukosamínom a glukurónovou kyselinou [13]. Takto môže dosahovať veľmi vysokých molekulových hmotností, až 10^7 Dalton, kde jeden disacharid dosahuje asi 400 Daltonov [9]. Každý monomér predstavuje axiálny ne-polárny vodíkový atóm a ekvatoriálny polárnejší postranný reťazec, čo vytvára relatívne hydrofóbný, príp. hydrofilný charakter. Vzhľadom nato, že monoméry sú tvorené striedajúcimi sa glykozidickými väzbami, tak každý monomér vytvorí obrátenú časť hydrofóbnu (smerujúca do vnútra) alebo hydrofilnú (smerujúca von) k ďalšej monomérskej jednotke. Takéto usporiadanie vytvára skrútenú pásovú štruktúru a vo vodnom roztoku dochádza k uplatneniu hydrofilných a hydrofóbných vlastností [14].

Molekula HA obsahuje disociovatelné skupiny „-COOH“, preto sa vo vodných roztokoch chová ako záporne nabitý polyelektrolyt a jej konformácia, tvar, rozmery i stupeň hydratácie závisí od stupňa disociácie. Stupeň disociácie je potom určený pH, iónovou silou a prítomnosťou kladne nabitých iónov, ich povahou a mocnosťou [15].

Štúdium štruktúry ukázalo, že molekula HA sa chová viac menej ako tuhé štatistické kĺbko. Pri zmene rozpúšťadla, pH alebo iónovej sily dochádza ku zmene veľkosti molekuly HA [16].

Štruktúru HA je možné popísať pomocou primárnej, sekundárnej a terciárnej podoby. Primárna štruktúra pozostáva z opakujúcich sa disacharidových jednotiek D- glukurónovej kyseliny a N-acetyl -D-glukosaminu, až po 5 vodíkových väzieb, ktoré existujú medzi každým druhým susediacim disacharidom. Sekundárna štruktúra je formovaná pásovou dvojistou špirálou, ktorá je tvorená skrútenými disacharidovými jednotkami cez 180° navzájom. Terciárna štruktúra je energeticky stabilizovaná interakciami hydrofóbnou časťou a intermolekulárnymi vodíkovými väzbami, ktoré pozostávajú z acetamínových a karboxylo-

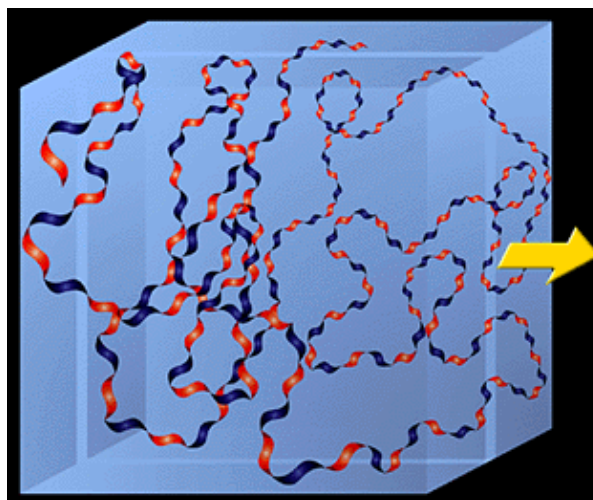
vých skupín [17]. Túto štruktúru môžeme vidieť na nasledujúcom obrázku.



Obr. 1 a. Primárna štruktúra HA, b. Sekundárna a Terciárna štruktúra, c. Schematická sieť HA ako výsledok intermolekulových agregácií [17]

2.1.1 Štruktúra HA v roztoku

V roztoku je hlavný reťazec hyalurónovej molekuly vystužený spojením chemickej štruktúry disacharidu, vnútornej vodíkovej väzby a interakcie s rozpúšťadlom. Axiálny vodíkový atóm tvorí ne-polárny, relatívne hydrofóbny povrch, zatiaľ čo postranné reťazce tvoria polárnejší, hydrofilný povrch. To má za následok vytvorenia špirálovej štruktúry [13].



Obr. 2 Znáznornenie striedajúcej časti hydrofilného a hydrofóbneho povrchu [7]

Takáto štruktúra umožní malým molekulám, ako je voda alebo elektrolyty, voľne difundovať cez rozpúšťadlo do štruktúry. Avšak veľké molekuly, ako bielkoviny, sú čiastočne vylúčené, vďaka ich hydrodynamickým veľkostiam v roztoku [7].

Hydrofóbná časť molekuly vzhľukuje vodu dokopy, čím redukuje rozhranie s rozpúšťadlom. To prispieva k stabilite molekuly v roztoku, aj keď ešte nie je sformovaná chemická väzba [7]. Roztok HA preukazuje neobvyklé reologické, lubrigačné a hydrofilné vlastnosti. V roztoku hyalurónový polymérny reťazec zaberá rozťahnutú a náhodnú špirálu. Takýto reťazec sa zapletá s každým ďalším už pri veľmi nízkej koncentrácii, čo môže prispievať k neobvyklým reologickým vlastnostiam. Pri vysokých koncentráciách je viskozita extrémne vysoká a dokáže naviazať neobvykle veľké množstvo vody [18].

HA v roztokoch má reťazec stabilizovaný pevným systémom vodíkových väzieb a meraním teplotných závislostí sa zistilo, že pri zvyšovaní teploty dochádza k postupnému trhaniu týchto väzieb. Takto dôjde k zvýšeniu flexibility celého reťazca. K rozpadu systému vodíkových väzieb dochádza aj vplyvom vysokého pH, v dôsledku ionizácie hydroxylových skupín. Prejaví sa to potom poklesom viskozity roztokov [16].

Ako už vieme, kyselina hyalurónová sa chová ako záporne nabitý polyelektrolyt a vo vodných roztokoch viaže kladné ióny s rôznym mocenstvom v blízkosti ionizovaných karboxylových skupín. Viazanie katiónov na reťazec makromolekuly ovplyvňuje zmenu celkového počtu ostatných elektrických nábojov, a tým aj zmenu veľkosti odpudivých síl medzi jednotlivými karboxylovými skupinami. Táto skutočnosť preukazuje zmenu v konformácii reťazca, teda zmenu veľkosti a tvaru molekuly [19]. Pri nízkej iónovej sile a vysokom pH kľbko expanduje a zvýši sa limitné viskozitné číslo [20].

Polymérny reťazec HA v roztokoch je vo forme náhodne usporiadaného kľbka, ale v určitých podmienkach vykazuje odchýlky. To znamená, že pôsobením pevných vodíkových väzieb vykazuje makromolekulový reťazec určitú tuhosť a vzájomný kontakt medzi reťazcami potom podporuje vznik terciárnej a ďalej vyššej štruktúry. Vytvorenie vyšších štruktúr je ovplyvnené aj elektrostatickými repulziami, iónovou silou alebo pH prostredia [16].

2.2 Výskyt

HA patří do skupiny látok známych ako glykosaminglykáty (GAG), kde predstavuje najjednoduchšiu látku z tejto skupiny. Kyselina hyalurónová sa nachádza predovšetkým v ľudskom tele a v iných stavovcoch, ale aj v niektorých patogénnych baktériách, ako je *Streptococcus* sp. a *Pasteurella* [9]. Najväčšie množstvo sa nachádza v ECM mäkkých spojivových tkanivách [21]. Je súčasťou extracelulárnej matrice a postupné výskumy dokázali, že sa v tele nachádza aj intracelulárne [22]. Koncentrácia HA je obzvlášť najväčšia v kohúťom hrebienku, je to asi 7,5 mg v jednom mililitri. V ľudskom tele je najväčší obsah HA v synoviálnej tekutine, v pupočnej šnúre, sklovci oka a v koži vo forme soli [23]. Skoro polovica výskytu HA v ľudskom tele sa nachádza v intracelulárnom priestore, kde môže dosiahnuť až 2,5g v jednom litri [21].

Koža, najväčší ľudský orgán, tvorí primárnu ochranu tela pred vonkajšími vplyvmi a množstvo kyseliny hyalurónovej v nej sa odhaduje na 8g. V kožných vrstvách je to asi 0,5mg/g a v pokožke asi 0,1mg/g [24]. HA v koži pôsobí na množenie, diferenciáciu a obnovu tkaniva a chráni kožu pred vznikom voľných radikálov, ktoré sa môžu vytvoriť z ultrafialového žiarenia zo slnečného svetla. Ultrafialové žiarenie spôsobuje oxidačný tlak na bunky, čím ich môže poškodiť a následne degenerovať [21].

V chrupavke, aj cez svoj nízky obsah, pôsobí HA ako dôležitý stavebný prvok. Tvorí priestor pre agregáty a chondroitin sulfát proteoglykan, kde si zachovávajú makromolekulárny charakter v dôsledku špecifických interakcií medzi HA a proteínmi [25]. Takéto agregáty majú vysokú molekulovú hmotnosť, až 100 MDa, a sú uložené vo vnútri kolagénového systému [26]. V synoviálnej tekutine, vyššia koncentrácia HA s vysokou molekulovou hmotnosťou, poskytuje lubrigačné vlastnosti pre funkciu kĺbov a pôsobí ako tlmič nárazov. Takto potom znižuje opotrebenie kĺbových kostí. Choroby, ako revматоídna artritída alebo osteoartróza znižujú viskozitu HA v kĺbovom priestore a narúšajú tak mazacie a tlmiace vlastnosti HA. To vedie k zhoršeniu funkcie kĺbov a ich bolesti [27].

2.3 Izolácia

Ako už bolo spomenuté, HA je základnou funkčnou súčasťou takmer všetkých tkanív v organizme stavovcov. Preto sú práve tkanivá, napríklad kohúti hrebienok, žraločia koža, hovädzie bulvy, používané na izoláciu HA s vysokou molekulovou hmotnosťou [28]. Tak

isto sú komerčne využívané procesy izolácie HA zo synoviálnej tekutiny, pupočnej šnúry alebo z baktérií, pomocou fermentácie alebo priamou izoláciou [29].

Ako prvú známu metódu izolácie HA pre farmaceutické účely vyvinul Balazs. Surovina použitá na túto metódu bola pupočná šnúra a kohútie hrebienky, ktoré sa zmrazili, rozrezali na malé kúsky a extrahovali v etanole s prídavkom cetylpyridinia chloridu, chloroformu a vody. Ďalej sa extrakt čistí a upravuje na dané účely [30].

Ďalšia, komerčne používaná metóda je izolácia HA z patogénnej baktérie *Streptococcus pneumoniae*. *Streptococcus pneumoniae* je príčinou rôznych chorôb, ako je napríklad zápal pľúc, meningitída alebo zápal stredného ucha [31]. HA vzniká pri šírení baktérie, kde pri svojom rozmnožovaní produkujú túto látku. Je možné získať HA s rôznymi molekulovými hmotnosťami a ďalej upravovať [32]. Priemerná molekulová hmotnosť môže byť aj niekoľko miliónov Daltonov, čo nám samozrejme charakterizuje, že HA je vysoko viskóznym biopolymérom a svoje vlastnosti potom uplatňuje ako výborný absorbér nárazov, napríklad v kolennom kĺbe [17].

2.3.1 Molekulová hmotnosť

Molekulová hmotnosť kyseliny hyalurónovej silne závisí od zdroja, metódy izolácie a procesu čistenia. Prvé štúdie molekulovej hmotnosti HA pochádzajú z 50. rokov 20. storočia. Molekulová hmotnosť, získaná rôznymi spôsobmi, sa pohybuje v rozmedzí 10^4 až 10^7 Dalton. Na zisťovanie molekulovej hmotnosti sa používajú metódy, ako sedimentácia, rozptyl svetla, osmometria alebo kvapalinová chromatografia HPLC. Avšak najbežnejšou metódou na určenie molekulovej hmotnosti sú viskozimetrické merania. Takéto merania si vyžadujú rôzne úpravy vzoriek. [33]. Viskozimetrické merania taktiež veľmi závisia od iónovej sily vzoriek HA a od teploty. Viskozita HA so zvyšujúcou teplotou klesá ako u všetkých pseudoplastických látok.

2.4 Vlastnosti

Viskoelastické vlastnosti HA boli preštudované už roku 1950. Štúdie reologických vlastností, ktoré boli revidované Balazsom v roku 1974 ukazujú, že viskozita je komplex funkcií polyméru, koncentrácie soli, pH a šmykovej rýchlosti [30]. Vzhľadom nato, že je možné pripraviť HA s veľmi vysokými molekulovými hmotnosťami, vykazuje tak veľmi významné vlastnosti, ktoré sú v dnešnej dobe aplikovateľné hlavne v medicíne. Týka sa to

prevažne jej hydrodynamických a reologických vlastností a jej reologické vlastnosti vyplývajú zo štruktúry HA. Vo vodnom roztoku, solvatačné vlastnosti a hydrofóbne interakcie sú dôležitými faktormi a silne závisia od konformačných vlastností polymérneho reťazca. Viskozita HA silne závisí na šmykovej rýchlosti, a to hlavne vo vysokých koncentráciáchli-tyckého charakteru [19]. V mnohých prípadoch je HA organizovaná v extracelulárnom matrixe s inými makromolekulami prostredníctvom špecifických interakcií. Vo vysokých koncentráciách HA s vysokou molekulovou hmotnosťou môže tvoriť zapletenú sieť cez stérické interakcie a samotné prepojenia s jednotlivými molekulami. Ďalej môže nastať, že hydrofóbna časť štruktúrnej chrbtice reaguje reverzibilne s porovnateľným, hydrofilným úsekom na ďalšej molekule alebo v oblasti rovnakej molekuly. Takto usporiadaná sieť potom vykazuje rôzne vlastnosti. To znamená, že pri vysokých frekvenciách kľbká nemôžu meniť svoju konfiguráciu tak rýchlo, ako je zmena oscilujúceho napätia, takže sú deformované a striedavo sa stláčajú alebo elasticky uvoľňujú [34]. Rýchly tok tekutiny odoláva navzdory siete, a to vykazuje „*elastické vlastnosti*“ [21]. Naopak pri nízkych frekvenciách zmeny konfigurácie polysacharidového reťazca v dôsledku Brownovho pohybu sú dostatočne rýchle na to, aby umožnili kľbkám zaujať náhodnú konfiguráciu pod vplyvom pôso-biaceho vonkajšieho napätia [34] a kĺzať jedno po druhom, a to umožní viskózný tok, teda „*viskózne vlastnosti*“ HA [21].

Môžeme teda povedať, že HA vykazuje viskoelastické vlastnosti a patrí medzi nene-
wtovské pseudoplastické kvapaliny. Preto práve viskoelasticita a hydrofilná povaha HA umožňuje udržať si napätie a elasticitu tkaniva, v ktorom je prítomná. Vysoká molekulová hmotnosť polysachridov izolovaných zo spojivového tkaniva (ako je napríklad kyselina hyalurónová) preukazujú unikátne reologické vlastnosti, ktoré sú funkciou molekulovej hmotnosti a koncentrácie. Tieto fyzikálne- chemické vlastnosti sú spojené s biokompatibilitou a neimunogénnou povahou molekuly, ktorá umožňuje jej použitie v širokom rozsahu klinických aplikácií [35].

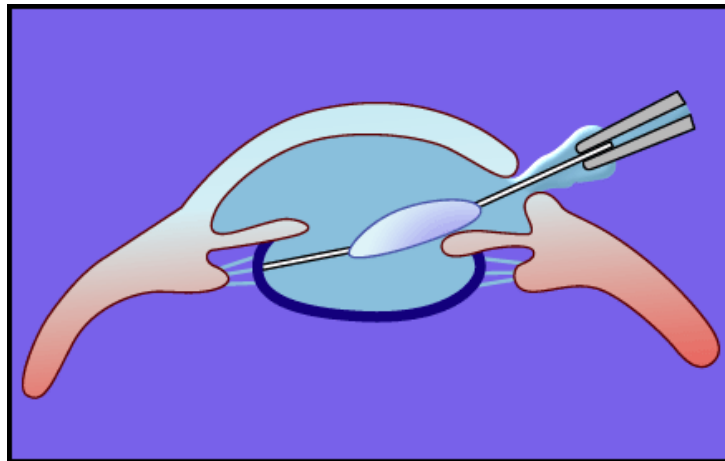
2.5 Medicínske aplikácie

2.5.1 Oftalmológia

Prvé lekárske využitie HA pre človeka pochádza z päťdesiatych rokov 20. storočia, a to v očnej chirurgii. Použitá HA bola izolovaná z pupočnej šnúry a neskôr z kohútieho

hrebienka vo vysokej čistote a s vysokou molekulovou hmotnosťou. Kyselina hyalurónová pripravená z kohútieho hrebienka sa dodnes používa v očnej chirurgii [21], je prirodzenou súčasťou sklovca oka a jej viskoelastické vlastnosti sa využívajú v rade očných operácií.

Používané prípravky z HA chránia citlivé tkanivo oka a poskytujú priestor behom chirurgických manipulácií. Avšak najčastejšie využitie hyalurónových produktov je ako náhradka stratených tekutín pri operáciách, napríklad sivého zákalu alebo šošovky, a behom operatívnych postupov [8]. Vývoj umožnil bezpečné vykonávanie zložitých operácií sivého zákalu, pričom sa výrazne znižuje poškodenie endoteliálnej vrstvy rohovky [36]. V dnešnej dobe máme k dispozícii rôzne výrobky z HA a s rôznymi molekulovými hmotnosťami. Štúdia reologických vlastností Maltesa a spol. preukázala, že zmes hyaluronátu sodného s hydroxypropylmethylénom, nazývaný VISC26, spĺňa najlepšie požiadavky pre použitie v očnej chirurgii [37].



Obr. 3 Príklad použitia HA pri operácií: vkladanie vnútroočnej šošovky pri injektovaní HA [21]

2.5.2 Ortopedická chirurgia a revmatológia

Ďalšou veľmi úspešnou aplikáciou HA je liečba ortopedických ochorení, ako je artritída alebo osteoartritída [38]. Zdravý kĺb umožňuje pohyb bez akýchkoľvek problémov a bolesti. V prípade poškodenia alebo vplyvom artritídy, zostávajú kĺby stuhnuté a bolestivé. Osteoartróza je degeneratívne ochorenie chrupavky a kostí, čo vedie k stuhnutiu a bolesti. Revматоídna artritída je klasifikovaná, ako systémové zápalové ochorenie, kde bolesť kĺbu je často sprevádzaná s degeneráciou iných orgánov, napríklad pľúc a srdca. Štatisticky sa uvádza, že práve tieto ochorenia sa najčastejšie vyskytujú u ľudí staršej generácie [25].

Zdravý kĺb u dospelého človeka v synoviálnej tekutine obsahuje HA s molekulovou hmotnosťou od 2-7 *MDa* [39]. Pri ochorení táto molekulová hmotnosť klesá. Dodávanie kyseliny hyalurónovej do kĺbového priestoru potláča degeneráciu chrupavky a umožňuje uvoľňovať proteoglykany z extracelulárnej matrice chrupavkového tkaniva. Takto chráni povrch kĺbovej chrupavky a normalizuje vlastnosti v synoviálnej tekutine [40]. Preparáty vyrobené z HA majú rôzne molekulové hmotnosti, čo sa odráža aj v liečbe chorého kĺbu. Teda produkt s vyššou molekulovou hmotnosťou má značnejšie účinky, ako produkt s nižšou molekulovou hmotnosťou [41]. Preparáty sa injektujú, pričom takéto podanie lieku je veľmi účinné a neprejavujú sa u ľudí vedľajšie účinky [42].

Viskosuplementácia je neobvyklá, bezpečná a eventuálne účinná forma lokálnej liečby osteoartritídy [43]. Viskosuplementácia je vlastne náhradka prostredia roztokom, ktorý napodobuje vlastnosti synoviálnej tekutiny. Roztoky na báze kyseliny hyalurónovej zlepšujú fyziologické prostredie v chorom kĺbe zvýšením tlmenia nárazov a lubrigačných vlastností. Základom použitia viskosuplementácie je obnovovať dostatočnú viskoelasticitu v synoviálnej tekutine, znižovať bolesť a zlepšiť pohyblivosť kĺbu. Pri aplikovaní pacientovi sa ako prvé dostaví úľava od bolesti, potom sa predpokladá obnovenie pohyblivosti transsynoviálneho toku [44].

Medzi najvýznamnejšie produkty tohto druhu je napríklad prirodzene sa vyskytujúci hyaluronan nazývaný „Hyalgan“ a syntetický hylan G-F 20. Hylany sú zosieťované formy kyseliny hyalurónovej, ktoré dosahujú vysoké molekulové hmotnosti a významnejšie viskoelastické vlastnosti. Vyššia molekulová hmotnosť hylanov môže byť efektívnejšia, ako kyselina hyalurónová, vďaka práve zvýšeným viskoelastickým vlastnostiam a dlhšie pretrváva v kĺbovom priestore [45].

2.5.3 Otolaryngológia

Ako sme sa už dočítali, tak kyselina hyalurónová je prítomná v celom tele a vo vyšších koncentráciách práve v chrupavke, synoviálnej tekutine, pupočnej šnúre, ale aj hlasových orgánoch. V týchto tkanivách ovplyvňuje niekoľko rôznych funkcií, vrátane viskozity, osmózy prietoku tkanivom, tlmenia nárazov alebo hojenia rán. Obzvlášť dôležité sú tieto funkcie v hlasových orgánoch, kde majú priamy vplyv na hrúbku a viskozitu hlasového orgánu [46]. V dnešnej dobe sa upravený hyalurónový prípravok injektuje do hlasiviek, kde nespôsobuje žiadne zápalové reakcie a pôsobí po dobu dlhšiu ako jeden rok [47].

2.5.4 Dermatológia a plastická chirurgia

Prípravky z HA v kozmetike sú známe už niekoľko rokov. Je to spojené s vyplňaním vrások, zväčšovaním niektorých oblastí tela alebo s vyhladzovaním jaziev. Práve výrobky z kyseliny hyalurónovej na kozmetické korekcie sú účinnejšie ako výrobky na báze kolagénu [48]. HA poskytuje elasticitu v danom priestore, kde je aplikovaná, a je výborne biokompatibilná [49]. Zvyšuje pružnosť pokožky a vyhladzuje nerovnosti. Ďalej sa HA veľmi dobre preukázala v implantáciách, kde má omnoho lepšie vlastnosti, ako silikónové alebo soľné implantáty [50]. Prípravky s vysokou molekulovou hmotnosťou HA, ktoré sa aplikujú lokálne na rôzne poranenia a rany, podporujú hojenie a regeneráciu tkaniva. Často sa používa aj na liečenie chronických a pooperačných rán, kde pôsobí protizápalovo a hydratačne, a má antioxidantné účinky [51]. Vytvára vlhké prostredie vďaka svojim unikátnym hygroskopickým, reologickým a viskoelastickým vlastnostiam, vstupuje do procesu hojenia a aktívne interaguje s bunkami. Urýchľuje tak samovoľné vyčistenie rany, tvorbu nového tkaniva a pomáha k rýchlejšiemu zarastaniu rany [52]. Významným produktom takého typu s antiseptickou zložkou je „*Hyiodine*®“.

Hyiodine® je liek na chronické rany, ako napríklad „diabetes mellitu“. Toto ochorenie je spojené so vznikom povrchových a kožných defektov, ktoré postihujú prevažne dolné končatiny. Rozšírenie tejto choroby môže dospieť až k amputáciám končatiny [53]. Porucha hojenia a vznik diabetických defektov je spojené s prítomnosťou produktov glykozylácie a ich prooxidatívneho pôsobenia [54]. Kyselina hyalurónová sa podieľa na modulácii zápalovej reakcii a jej nízkomolekulárne štepy stimulujú novotvorbu kapilár. Stimuluje takto delenie buniek v oblasti hojenia, a preto sa začali pokusy využívania HA pri liečbe takýchto ochorení. Dané výsledky však neboli, ako sa predpokladalo. Samotná HA sa štiepila vplyvom bakteriálnych hyaluronidáz, a preto sa HA začala kombinovať s jódom. Jód sám o sebe má dezinfekčné vlastnosti a spojením stabilizuje molekuly kyseliny hyalurónovej. Teda *Hyiodine*® je komplex biotechnologicky vyrobenej HA a jódu. Tento výrobok má unikátne antiadhezívne účinky, súčasne zabraňuje macerácii okolitej kože a zlepšuje podmienky hojenia rany [55].

Expanzný rozvoj aplikácií HA v medicíne poskytuje nové technológie a chemické procesy na výrobu rôznych liekov na báze kyseliny hyalurónovej.

2.5.5 HA a rakovina

Štúdium histologických sekcií z rôznych nádorov, použitím špecifického hyalurónového afinitného vyšetovania, bolo indikované, že prakticky všetky ľudské epiteliálne nádory sú obklopené podporným tkanivovým väzivom obohateným hyaluronanom. Teda HA je centrálnym komponentom tkaniva, ktoré obklopuje, a pravdepodobne aj podporuje nádor. Ďalej prsné, žalúdočné a črevné karcinómy vykazujú ektopický výraz hyalurónového spojenia so zhubnými bunkami, zatiaľ čo normálne odpovedajúce epiteliálne bunky nedávajú prakticky žiadny signál pre hyaluronan [56]. Napríklad nádor rakoviny mechúra sa dá zistiť prítomnosťou zvýšenej úrovne HA a hyaluronidázy v moči [57]. Zistilo sa, že HA je biopolymér s mimoriadnymi vlastnosťami, ktoré pomáhajú štruktúre extracelulárnej matrice a intersticiálnym homeostázam [56] a HA hrá teda dôležitú funkciu v bunkovom chovaní [58]. Nie je teda prekvapujúce, že chorobný proces, ktorý preukazuje nenormálne bunkové chovanie, ako je rakovina alebo arterioskleróza, si vyžaduje pozmenené hyalurónovo-bunkové interakcie. Teda inhibíciou endogénnej hyalurónovej syntézy sa redukuje rast nádoru v živom organizme. Toto chovanie avšak v dnešnej dobe ešte nie je úplne preskúmané, a práve najviac výskumov je zameraných na transdukciiu signálov vyplývajúcich z hyaluronanu- CD44 (povrch bunky glykoproteínu) a RHAMM (receptor pre kyselinu hyalurónovú sprostredkujúci pohyblivosť) interakcií [59].

2.6 Degradácia

U cicavcov dochádza k enzymatickej degradácii HA vplyvom troch rôznych enzýmov a to hyaluronidáza, β -D- glukuronidáza a β -N- acetyl- hexosaminidáza. Tieto enzýmy v tele je možné nájsť v rôznych formách. Všeobecne hyaluronidáza štiepi HA do menších oligosacharidov, zatiaľ čo β -D- glukuronidáza a β -N- acetyl- hexosaminidáza ďalej degradujú oligosacharidové jednotky odstránením neredukujúcich koncových sacharidov. Nedostatok jedného z týchto enzýmov môže viesť k smrteľnému ochoreniu [60].

Kyselina hyalurónová je biovstrebateľná a ľahko degradovateľná „*in vivo*“ vďaka pôsobeniu enzýmu a voľných radikálov. Tieto obmedzenia sú použiteľné v niektorých medicínskych aplikáciách, ktoré si vyžadujú dlhodobý efekt [61]. HA podlieha degradácii pri určitých podmienkach za zvýšenej teploty, kde dochádza k zníženiu relatívnej molekulovej hmotnosti. Fotochemická degradácia spôsobuje pokles viskozity roztokov HA a dochádza k trhaniu interglykozidických väzieb [56].

3 KVARTÉRNE AMÓNIOVÉ SOLI

Ak hovoríme o látkach, ktoré pôsobia proti infekcii, nazývame ich „*antiinfekčné látky*“. Všeobecne ich delíme na dve skupiny, a to na látky pôsobiace preventívne a látky priamo potlačujúce infekciu. Medzi preventívne patria napríklad dezinfekcie, antiseptiká, germicídy. Druhú skupinu zastupujú napríklad antibakteriálne, antifungálne, antivírusové, antiprotozoálne látky a antibiotiká, ktoré slúžia na potlačanie rozvinutých infekcií. Často sú tieto látky porovnávané a zameniteľné. Z teoretického hľadiska sa predpokladá, že antimikrobiálne látky by nemali byť toxické voči organizmu, ale toxické len pre parazity. Z praxe vieme, že to tak nie je a záleží to od koncentrácie látky, resp. liečiva. Na parazity môžu pôsobiť rôznymi spôsobmi, inhibíciou bunkovej steny alebo proteínov, ovplyvnením membránovej činnosti, inhibíciou transkripcie a translácie genetického materiálu, inhibíciou syntézy nukleových kyselín [62].

Ďalej je možné tieto liečivá rozdeliť ešte na látky, ktoré svojim pôsobením závisia od spoluúčasti obranných mechanizmov. Takéto látky nazývame „*baktériostatiká*“ alebo látky, ktoré rovno usmrcujú mikroorganizmy, nazývané „*baktericídne liečivá*“ [62].

Antiseptiká patria do skupiny látok s nešpecifickým účinkom, ktoré pôsobia podľa okolností bakteriostaticky alebo baktericídne. Používajú sa v rôznych koncentráciách, pôsobia efektívne proti mikroorganizmom inhibíciou ich rozmnožovania. Pri kontakte s tkanivom alebo telovými tekutinami sa deaktivujú, a preto je potrebné zaisťovať opakovanú aplikáciu. Antiseptiká sú spojené s chirurgiou, kde plnia dôležité funkcie pri chirurgických zákrokoch [63].

Dezinfekcie majú taktiež široké spektrum využitia, avšak v kontakte s tkanivom sú toxické. Z tohto dôvodu sú využívané viac menej na sterilizáciu predmetov, podláh, nástrojov a iných pomôcok. Používajú na zabíjanie alebo inhibíciu chorobno- pôsobiacich baktérií a iných mikroorganizmov [62].

Kvartérne amóniové zmesi patria do skupiny amóniových solí, u ktorých organické radikály boli substituované pre všetky vodíky z pôvodných amóniových kationov. Obsahujú centrálny dusíkový atóm, ktorý je spojený so štyrmi radikálmi a jedným kyselinovým radikálom. Organický radikál môže byť napríklad alkyl, aryl (všeobecne deriváty aromatických zlúčenín) alebo aralkyl (alkylový radikál, kde jeden alebo viac vodíkov je nahradený arylovou skupinou) a dusík môže byť časťou kruhovej siete. Môžu byť pripravené úpravou

nejakého amínu s alkylačným činidlom. Takéto zmesi preukazujú rôzne fyzikálne, chemické a biologické vlastnosti a väčšina zmesí sú rozpustné vo vode [63].

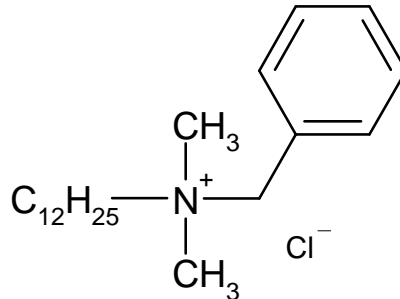
Katiónické tenzidy, ktoré nazývame „*amfifilné kvartérne amóniové soli*“, poznáme už niekoľko rokov. V dnešnej dobe predstavujú významnú súčasť chemickej a dezinfekčnej antiseptickej. Podľa štruktúry týchto látok je možné ich deliť do niekoľkých skupín, a to monokvartérne amóniové soli, bikvartérne soli, biguanidiny a polymérne biguanidiny. Ak porovnáваме mechanizmus účinkov jednotlivých skupín, tak vykazujú isté podobnosti. Vlastne kladne nabité molekuly amóniovej soli sa viažu na záporne nabité molekuly buniek a membrán baktérií. Dôjde k ovplyvneniu permeability týchto buniek a k ich zániku. Samostatný priebeh účinku sa líši od antiseptika a jednotlivých druhov baktérií [62]. Z hľadiska interakcií kladných iónov amóniovej soli so zápornými iónami (napríklad HA) silne závisia od dĺžky reťazca soli a zásadne nezávisia od molekulovej hmotnosti polyméru nad určitou minimálnou hodnotou. Potom viazanie katiónov na reťazec makromolekuly polyméru dokáže meniť veľkosť odpudivých síl medzi jednotlivými karboxylovými alebo inými skupinami a podporuje zmenu v konformácii reťazca, a aj jeho veľkosti a tvaru [20].

3.1 Benzalkónium chlorid

Medzi monokvartérne amóniové soli zaradujeme napríklad benzalkónium chlorid, cetyltrimethylamonium bromid, cetylpyrídium chlorid, benzethonium chlorid, cetrimid atď. Obsahujú jeden kvartérny dusík a súčasne jeden veľký hydrofóbny substituent. Pri aplikáciách týchto látok dochádza k narušeniu bunkových membrán mikroorganizmu, a to vedie k zániku buniek. Účinok na bakteriálne bunky sú rôzne pri nižšej koncentrácii, kde dôjde k narušeniu osmoregulačnej funkcie membrány. Pri strednej koncentrácii už narúšajú fyziologické pochody bunky. Ešte vyššie koncentrácie vedú k rozpusteniu bunkovej membrány a strate bunkového obsahu [62].

Benzalkónium chlorid je organická látka nazývaná presnejšie alkyl dimethylbenzylamónium chlorid, zmes alkylbenzylu dimethylamónia chloridu a rôznych dĺžok alkylových reťazcov. Patrí medzi najbezpečnejšie syntetické biocídy a je už dlho efektívne používaný. Jeho aplikácie sú široké, napríklad v očných roztokoch, na umývanie rúk a tváre, spermicídne krémy, v liekoch, na chirurgické nástroje a v rôznych iných dezinfekčných prostriedkoch [64].

Postupom času sa však objavili aj nepriaznivé účinky benzalkónia chloridu v liekoch z dôvodu precitlivenosti pacienta. Preto sa nahrádza inými zložkami, na ktoré pacient nie je alergický [64].



Obr. 4 Štruktúrny vzorec benzalkónia chloridu [63]

Benzalkónium chlorid je dobre rozpustný vo vode, alkohole a acetóne. Pri používaní sa však nemôže dostať do kontaktu s tenzidmi alebo organickými zlúčeninami (mydlo), pretože jeho účinok inhibujú. Vodné roztoky benzalkónia chloridu sú neutrálne až slabo zásadité a bez zafarbenia. Aplikovaním roztoku rýchlo aktivuje svoje účinky po relatívne dlhú dobu [64].

4 REOLÓGIA A VISKOZIMETRIA

Všeobecne, na makroskopickej úrovni, prevláda názor na vnímanie hmoty ako materiál, spojito vyplňujúci priestor. Takýto prístup vedie k uspokojivému popisu a predpokladu väčšiny termomechanických javov [65].

Podľa mechanických vlastností rozdeľujeme materiály na tri základné skupenstvá, a to plynné, kvapalné a pevné. Každé skupenstvo charakterizuje určitý matematický model na popis ich mechanických vlastností. Každý z nich postupom času prešiel komplikovanejším rozborom a dnes v rámci odboru na pomedzí mechaniky a fyzikálnej chémie patria pod vedu nazývanú „reológia“ [66]. Rýchly rozvoj reológie v druhej polovici 20. storočia je spojený s hromadným používaním pevných a kvapalných polymérnych systémov a s vývojom chemicko- inžinierskych prístupov a technologických zariadení [65].

4.1 Úvod do reológie

Reológia sa zaoberá štúdiom deformácie hmoty. Je to náuka o pohybe vazkých kvapalín a pretvárania hmoty, ktoré nie sú dokonale pružné, ani úplne tvárne či vláčne, ale u ktorých sa vyskytujú kombinácie týchto vlastností. Hlavnou úlohou tejto vedy je nájsť vzťahy medzi napätím, deformáciou a rýchlosťou deformácie. Výsledkom je vytvorenie reologických modelov, ktoré sa snažia vystihnúť chovanie rôznych typov látok [65].

Vazká kvapalina je charakterizovaná, ako látka, ktorá sa odlišuje od pružného materiálu niekoľkými vlastnosťami. Pri šmykovom namáhaní nedochádza u kvapalín ku koncovej deformácii, ale „*k toku*“. Po uvoľnení pôsobiacej sily sa kvapalná látka nevracia do pôvodného stavu, preto považujeme kvapalinu za izotropnú a nestlačiteľnú látku. Napriek tomu je tak pohyblivá, prenáša súčasne tlak všetkými smermi či už je v pokoji, alebo za toku [66].

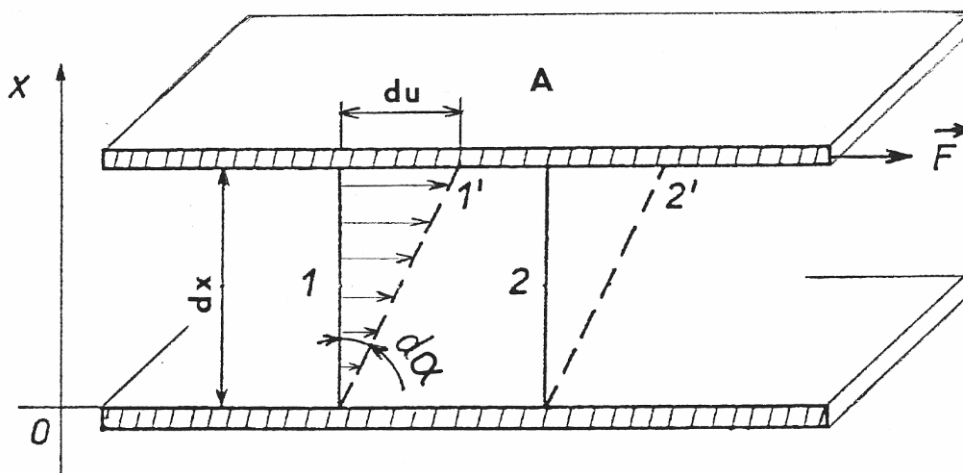
Závislosť medzi mikroštruktúrou a reologickými vlastnosťami skúma „mikroreológia“ a pre potreby chemického inžinierstva má význam „makroreológia kvapalín“, ktorá formuluje zákonitosti viskózneho toku. Znalosť základných reologických veličín, ako je viskozita, medze toku a moduly pružnosti, je potrebná nielen na charakterizáciu surovín a produktov, ale aj k riešeniu mnohých technických a dopravných zariadení. Matematickým vyjadrením tokových vlastností kvapalín sú reologické stavové rovnice, ktoré spravidla

vyjadrujú vzťah medzi deformačným šmykovým napätím a deformáciou kvapaliny. Ich grafickým znázornením sú „*tokové krivky*“ [65].

4.2 Viskozimetria newtonovských kvapalín

Za newtonovské kvapaliny považujeme ideálne kvapaliny, teda dokonale tekuté, kde pri pohybe nevznikajú tangenciálne (šmykové) sily medzi stýkajúcimi sa vrstvami. V reálnej kvapaline sa rýchlejšia vrstva snaží strhnúť susednú pomalšiu vrstvu a naopak, pomalšia vrstva brzdí pohyb rýchlejšej [67].

Otázkou silového pôsobenia medzi vrstvami reálnej kvapaliny, teda aj otázkou vnútorného trenia kvapalín sa zaoberal I. Newton. Jeho poznatky je možné dobre zobrazit' na obrázku, kde sa pohybujú jednotlivé vrstvy tekutiny po sebe [67].



Obr. 5 Znázornenie toku kvapaliny medzi dvoma paralelnými doskami [65]

Šmykové napätia, teda podiel šmykovej sily a veľkosti styčnej plochy, sú nenulové. Šmykové napätie, ktoré je kompenzované premennou rýchlosťou kvapaliny, je tým väčšie, čím viac sa mení rýchlosť od vrstvy k vrstve. Zmena rýchlosti, ktorú by sme pozorovali pri postupe vrstvy kolmo ku smeru prúdenia, môžeme charakterizovať podielom „ du/dx “, ktorý nazývame šmyková rýchlosť v smere prúdenia. V tomto smere prebiehajú prúdové vlákna súbežne a kvapalina sa nepremiešava [68].

Viskózne kvapaliny môžeme charakterizovať viskozitou. Viskozita je mierou vnútorného odporu pri toku [69], a ak uvažujeme ideálne viskózne materiál, potom pre šmykové napätie klasický Newtonov zákon je znázornený vzťahom

$$\tau = \eta \cdot \frac{du}{dx} = \eta \dot{\gamma}, \quad (1)$$

kde „ η “ je dynamická viskozita (materiálová konštanta), ktorá charakterizuje vnútorné trenie newtonovskej kvapaliny, „ $\frac{du}{dx}$ “ je rýchlostný gradient, ktorý charakterizuje tvarové zmeny v prúdiacej tekutine a teda charakterizuje šmykovú rýchlosť [65].

Viskozitný zákon charakterizuje kompletne mechanické aspekty jednofázového prúdenia za danej teploty a tlaku. Z rovnice (1) kde „ τ “ je šmykové napätie a „ $\dot{\gamma}$ “ je šmyková rýchlosť, vyplýva fyzikálny rozmer [65]

$$[\eta] = Pa \cdot s = N \cdot s \cdot m^{-2} = kg \cdot m^{-1} \cdot s^{-1} = 10g \cdot cm^{-1} \cdot s^{-1} = 10P \text{ (Poise)}. \quad (2)$$

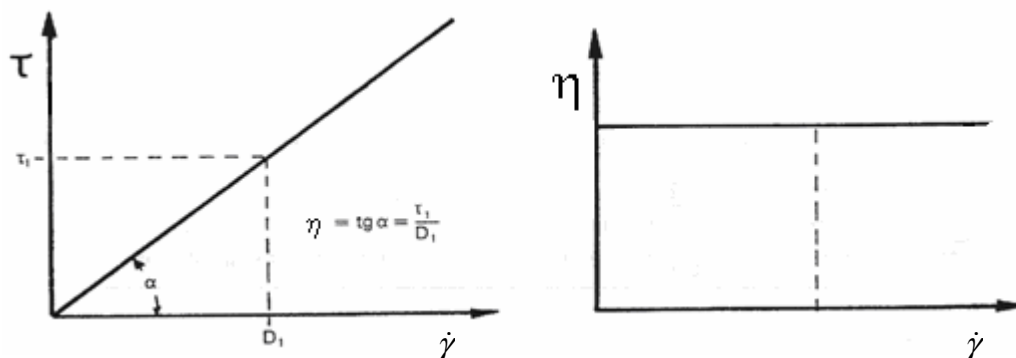
Konštanta úmernosti „ η “ závisí od druhu kvapaliny, a ako materiálová charakteristika nám predstavuje „*koeficient vnútorného trenia*“ [67].

Pokiaľ pôsobia na látku len zotrvačné, trecie a gravitačné sily, je výhodnejšie na charakterizáciu používať „*kinematickú viskozitu*“, ktorú dostaneme zo vzťahu

$$\nu = \frac{\eta}{\rho}, \quad (3)$$

a príslušná jednotka kinematickej viskozity je $[\nu] = m^2 \cdot s^{-1}$. (4)

Kinematickú viskozitu je tiež vhodné používať u dejov závisiacich na viskozite a hustote „ ρ “, napríklad pri popise hydrodynamiky kvapalín. Tekutiny, ktoré sa riadia Newtonovým zákonom označujeme ako „*newtonovské*“ a sú to prevažne nízkomolekulárne látky alebo veľmi zriedené roztoky, ktorých toková krivka je znázornená na obrázku



Obr. 6 Toková a viskozitná krivka newtonovskej kvapaliny [65]

Grafické znázornenie nám ukazuje lineárnu závislosť napätia alebo viskozity na šmykovej rýchlosti. Viskozita je silno závislá na teplote a už pri zmene o 1°C je zmena, napríklad pri vode, značná. Teda so zvyšujúcou teplotou viskozita klesá [70].

Pokiaľ chceme dôkladnejšie rozobrať viskozimetriu newtonovských kvapalín, prihliadame na dva základné aspekty. Stanovujeme viskozitné funkcie v oblasti, kde platí Newtonova viskozitná hypotéza a stanovujeme materiálovú konštantu „ η “, ktorá je parametrom „*Navier-Stokesovej teórie*“. Experimentálne sa stanovujú šmykové rýchlosti a šmykové napätia a potom sa spracovávajú primárne dáta na údaj o viskozite. Takto je možné postupovať aj v prípade merania limitnej viskozity pseudoplastických látok [66]. Materiálová konštantu „ η “ v Newtonovom viskozitnom zákone

$$\tau_{ij} = \eta(\partial v_i / \partial x_j + \partial v_j / \partial x_i). \quad (5)$$

Táto rovnica charakterizuje mechanické aspekty jednofázového prúdenia za danej teploty a tlaku. Konštanty sú potom parametrami mechanickej teórie, reprezentovanej Navier-Stokesovými rovnicami [66]

$$\rho(\partial v_i / \partial t + v_j \partial v_j / \partial x_j - g_i) = -\partial p / \partial x_i + \eta \partial^2 v_i / \partial x_j^2. \quad (6)$$

4.2.1 Prostý šmyk a prostý šmykový tok

Prostá šmyková deformácia je jedným z najjednoduchších kinematických prototypov konečnej deformácie [66]. Newton sformuloval predstavu o vnútornom trení na základe tejto myšlienky a dodnes nám slúži na realizáciu prístrojov na meranie viskozity [71]. Prostý šmyk môžeme popísať, ako tok kvapaliny medzi dvoma paralelnými doskami, vzdialenými od seba konštantnou vzdialenosťou; viz obr. (6). Dosky sú umiestnené v systéme s tromi navzájom na seba kolmými rovinami. Jedna doska je fixovaná a druhá pohyblivá. Pôsobením vonkajších síl dochádza k vychýleniu v jednom smere a vzniká šmyk. Pri prostom šmyku pôsobia na teleso štyri zložky nenulových napätí. To spôsobuje väčšinou deformáciu v smere pôsobenia sily a na vyrovnanie tejto deformácie sa používajú prídavné „*normálové pnútia*“ označované „ N_1, N_2 “. Potom u pevného telesa závislosť veličín „ τ, N_1, N_2 “ na šmyku sú „*materiálové funkcie*“, ktoré charakterizujú reologické vlastnosti daného materiálu. U kvapalín sú materiálové funkcie „ τ, N_1, N_2 “ funkciami šmykovej

rýchlosti a nazývame ich „viskometrické materiálové funkcie“. Pre vazké kvapaliny sú „ N_1, N_2 “ zanedbateľne malé vzhľadom na „ τ “ potom platí [66]

$$\tau(\dot{\gamma}) = \eta(\dot{\gamma})\dot{\gamma}, \quad (7)$$

kde „ η “ je šmyková viskozita, ktorá je závislá na šmykovej rýchlosti, resp. na šmykovom napätí [71]. Pre newtonovské kvapaliny je „ η “ materiálovou konštantou pri dostatočne nízkych šmykových rýchlostiach.

4.2.2 Axiálny tok v kruhovej trubke

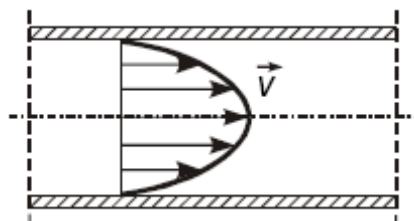
Pri popise prúdenia newtonovskej látky v trubici zavádzame určité predpoklady, že v kvapaline neexistujú elastické normálové pnutia a potom jediné nenulové zložky tenzoru napätia zodpovedajú izotropnému tlaku a šmykovému napätiu [66]. Ak prúdi newtonovská kvapalina malou rýchlosťou úzkou trubicou, je rozloženie vektoru rýchlosti v osovom reze parabolické a prúdenie je potom „laminárne“. Za predpokladu týchto podmienok „Poiseuille“ odvodil vzťah pre dynamickú viskozitu medzi objemom kvapaliny a úbytkom tlaku na trubici s polomerom „ R “ a dĺžkou „ L “

$$V = \frac{\pi R^4}{8\eta} \frac{\Delta p}{L} t. \quad (8)$$

Ak prúdi kvapalina s hustotou „ ρ “ kapilárou dĺžky „ L “ účinkom vlastného hydrostatického tlaku, je možné tlakový úbytok určiť z hydrostatického tlakového rozdielu. Tlakový úbytok odpovedá vnútornému treniu v kvapaline a tlakový rozdiel musí byť zmenšený o kinematickú energiu objemovej jednotky v ústí kapiláry. Vzťah vychádza z Bernoulliovej rovnice [68]

$$\Delta p = \rho h g - \frac{1}{2} \rho \bar{v}^2, \quad (9)$$

kde „ \bar{v} “ je stredná rýchlosť prúdenia.



Obr. 7 Laminárne prúdenie kvapaliny v trubici [68].

Pri pohybe telesa v kvapaline kladie kvapalina odpor voči pohybu tohto telesa. Tento pohyb je pri pomalom prúdení priamo úmerný rýchlosti. „Stokes“ odvodil vzťah, resp. pohybové rovnice pre odpor, ktorý kladie kvapalina s viskozitou „ η “ pohybu gule s polomerom „ r “

$$F = 6\pi\eta rv . \quad (10)$$

Tento vzťah platí pre nie príliš veľké rýchlosti pohybu gule. Ak padá guľa s hustotou „ ρ_k “ v kvapaline s hustotou „ ρ “ a platí, že „ $\rho < \rho_k$ “, pôsobí na ňu tiažová sila zmenšená o vztlak

$$F' = mg - V\rho g = \frac{4}{3}\pi r^3(\rho_k - \rho)g . \quad (11)$$

Rýchlosť „ v “ bude teoreticky vzrastať, až kým nedosiahne maximálnej hodnoty, teda medznej hodnoty, pri ktorej sa vyrovnajú sily „ $F = F'$ “, potom pohyb gule bude rovnomerný [68].

4.3 Viskozimetria neneutronovských kvapalín

Popri newtonovských kvapalín existujú reologicky zložitejšie látky, ktoré sa neriadia Newtonovým zákonom. Historicky, ako prvé boli štúdie reologických vlastností koloidných sústav, pretože pri meraní viskozity vykazovali rozdielne výsledky vzhľadom na rozdielnom spôsobe merania. Ide o nelineárnu závislosť šmykového napätia „ τ “ a šmykovej rýchlosti „ $\dot{\gamma}$ “. Označujeme ich „*neneutronovské kvapaliny*“. Medzi takéto látky patria prevažne roztoky, polymérne taveniny, rôzne pasty ai [65].

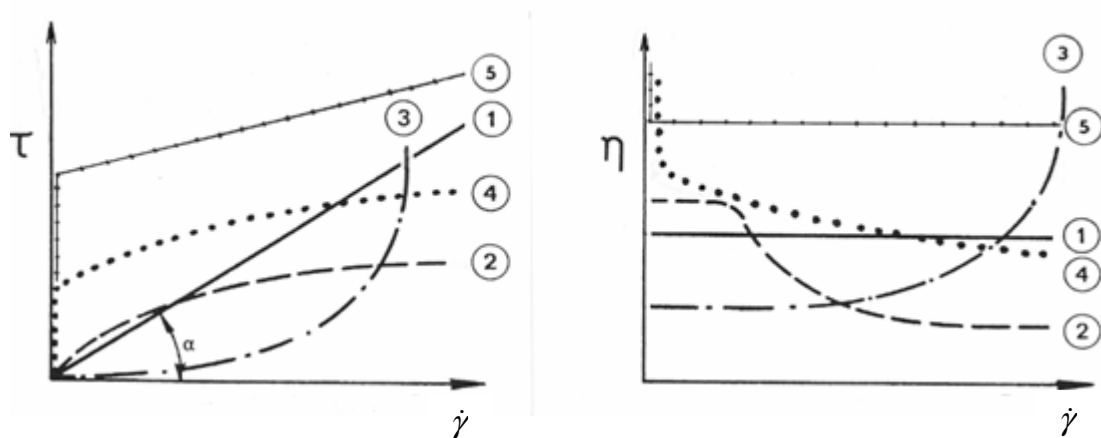
Platí pre nich obdobná rovnica, vis. vzťah (1), ako pre newtonovské kvapaliny, kde však „ η “ je „*zdanlivá viskozita*“, ktorá nie je látkovou konštantou, ale závisí na rýchlosti deformácie alebo šmykovom napätí. U takýchto látok je dôležité poznať priebeh závislosti zdanlivej viskozity na šmykovej rýchlosti [71].

Neneutronovské chovanie je možné odvodiť z reologického modelu. Tento reologický model je funkčná závislosť medzi šmykovou rýchlosťou a šmykovým napätím, pričom táto funkčná závislosť obsahuje najmenej dva parametre, ktoré je nutné pre danú látku určiť experimentálne na základe merania reologických vlastností tejto látky. Najjednoduchším reologickým modelom pre viskózne látky je „*mocninový model*“

$$\tau = K\dot{\gamma}^n, \quad (12)$$

kde „ K “ je koeficient konzistencie a „ n “ je index toku [72].

Výhodou mocninového modelu je jeho jednoduchosť, pretože obsahuje len dva parametre a dajú sa ľahko určiť experimentálne. Avšak jednou nevýhodou je, že konštanty „ K a „ n ““ aproximujú experimentálne získané veličiny „ τ a „ $\dot{\gamma}$ “ iba v relatívne úzkom rozsahu hodnôt šmykových rýchlostí. Použitím zložitejšieho reologického modelu je možné túto nevýhodu eliminovať [72]. Najčastejším typom čisto viskózných nenenewtonovských kvapalín sú pseudoplastické kvapaliny, dilatantné, binghamské, tixotropné a reopexné.



Obr. 8 Tokové a viskózne charakteristiky niektorých nenenewtonovských látok, 1- newtonovská látka, 2- štruktúrne viskózna látka, 3- dilatantná látka, 4- pseudo- plastická látka, 5- binghamská látka [65]

Na grafickom znázornení môžeme vidieť chovanie spomínaných nenenewtonovských látok v závislosti napätia alebo viskozity na rýchlostnom gradiente (resp. na šmykovej rýchlosti).

Pseudoplastická kvapalina je charakterizovaná tak, že jej zdanlivá viskozita sa s rastúcou šmykovou rýchlosťou znižuje. Ide o látky prevažne polymérnej povahy, detergenty a suspenzie, u ktorých je práve pseudoplasticita vítanou vlastnosťou hlavne pri spracovávaní. Napríklad pri miešaní sa znižuje energetická náročnosť, tak isto ako pri toku potrubím [65]. Práve kyselina hyalurónová patrí medzi nenenewtonovské pseudoplastické látky, resp. biopolyméry [66].

Dilatantné kvapaliny môžeme charakterizovať ako látky, u ktorých zdanlivá viskozita rastie s rastúcou šmykovou rýchlosťou. Takéto chovanie je zriedkavé, vyskytuje sa

u vysoko koncentrovaných suspenziách (pasty PVC) a komplikuje technologické procesy [71].

U binghamských kvapalín dochádza k toku až po prekročení prahového šmykového napätia, teda „medze toku“. Látky takého typu sú napríklad koncentrované priemyslové a odpadové kaly, kašovité suspenzie, krieda alebo vápno [71].

Medzi látky, ktoré menia svoje chovanie v závislosti na čase patria dva základné typy, a to tixotropné a reopexné. Tixotropné látky sú látky, u ktorých zdanlivá viskozita klesá s dobou pôsobenia napätia. Toto chovanie je veľmi žiaduce u náterových hmôt [66]. Druhý typ sú reopexné látky, kde zdanlivá viskozita behom šmykového namáhania s časom rastie. Môžeme sa s takýmto chovaním stretnúť zriedkakedy, avšak charakteristickým reprezentantom sú betónové zmesi [66].

Pri meraní neneutronovských kvapalín je dôležité používať prístroje, ktoré nám umožnia realizovať kinematické podmienky šmykového toku, stanoviť šmykovú rýchlosť a napätie z primárnych dát experimentu.

4.3.1 Sklz na stene

Neneutronovské látky sú charakteristické svojim mikrodisperzným charakterom, ktorý spôsobuje odchýlky od newtonského chovania, štruktúrnú nestabilitu a taktiež nehomogénnosť v blízkosti steny. To môže byť spôsobené stericnými, mechanickými, elektrochemickými alebo inými príčinami [73]. Ak uvažujeme extrémny prípad, môže nastať, že na stene sa nachádza čisté rozpúšťadlo, resp. disperzné prostredie. Je tu podstatne znížená koncentrácia dispergovanej fázy a z tohto dôvodu je znížená viskozita. Z makroskopického hľadiska je tento jav pri spracovávaní viskozimetrických dát kvantitatívne charakterizovaný prídavnou materiálovou funkciou, ktorá udáva zdanlivú viskozitu v závislosti na šmykovom napätí [74].

Zdanlivý sklz na stene môže spôsobiť desinterpretáciu viskozitných meraní, hlavne napríklad pri použití veľmi tenkých kapilár. Najvýznamnejší sklz sa objavuje u látok koagulujúcich koloidných suspenzií. U polymérov býva sklz zanedbateľný a nedetekovateľný [74].

4.3.2 Určenie viskozity vysokomolekulárnych látok

Roztoky vysokomolekulárnych látok sú tvorené spojitou fázou, ktorú nazývame aj disperzné prostredie a rozptýlenou fázou, nazývanou tiež disperzným podielom. Z hľadiska toku sa takéto systémy považujú za neneutronovské kvapaliny, kde ich zdanlivá viskozita môže s rastúcou rýchlosťou deformácie klesať alebo stúpať, čo sme si popísali vyššie [75]. Na určenie viskozity neneutronovských látok sa používajú reometrické merania, kde získame meraním dynamickú viskozitu a z nej je možné vypočítať pomocou príslušných vzťahov limitné viskozitné číslo. Tak isto je možné dosiahnuť rovnaké výsledky meraním na Ubbelohdeho viskozimetri, kde sa merajú roztoky vysokomolekulárnej látky, dostatočne zriedené, aby sa dosiahlo roztokov s newtonovými vlastnosťami. Princípom merania je, že sa určí niekoľko koncentrácií roztokov, zmerajú sa časy prietoku týchto roztokov a roztoku rozpúšťadla. Pomocou daných vzťahov je potom možné vypočítať limitní viskozitné číslo. Vzhľadom nato, že používame veľmi zriedené roztoky, tak relatívnu viskozitu je možné vypočítať zo vzťahu

$$\eta_{rel} = \frac{\eta}{\eta_0} = \frac{\rho \cdot t}{\rho_0 \cdot t_0} = \frac{t}{t_0}, \quad (13)$$

kde „ η_{rel} “ je *relatívna viskozita*, „ η “ je dynamická viskozita roztoku vysokomolekulárnej látky, „ η_0 “ je dynamická viskozita rozpúšťadla, „ t, t_0 “ sú časy prietoku roztoku vysokomolekulárnej látky a rozpúšťadla.

Bezrozmerná veličina popisujúca zmenu viskozitného koeficientu roztoku „ η “ proti viskozitnému koeficientu rozpúšťadla „ η_0 “ charakterizuje *špecifická viskozita*

$$„\eta_{sp} = \frac{\eta - \eta_0}{\eta_0} = \eta_{rel} - 1“, \text{ tiež nazývaná „inkrement viskozitného pomeru.}.$$

Redukovanú viskozitu získame podielom špecifickej viskozity a hmotnostnej koncentrácie polyméru, teda vzťahom

$$\eta_{red} = \frac{\eta_{sp}}{c}, \quad (14)$$

a udávaná v jednotkách „ cm^3 / g “.

Limitné viskozitné číslo vykazuje veľmi jednoduchú závislosť na objeme zaujímavom plymálnom kĺbkom (hydrodynamický objem) a získame ho grafickým vynesiením

hodnôt redukovanej viskozity na hmotnostnej koncentrácii. Preložením bodov priamkou až na nulovú koncentráciu získame hodnotu „limitného viskozitného čísla“, čo predstavuje vzdialenosť na ose „y“ od priamky po nulu [75]. Limitné viskozitné číslo reprezentuje jednu z najdôležitejších premenných popisujúcich vlastnosti zriedeného roztoku polyméru. Udáva nám mieru hydrodynamického rozsahu makromolekuly v roztoku, a teda aj jej veľkosť [76]. U zriedených polymérnych roztokov je zvýšenie viskozity v porovnaní s viskozitou rozpúšťadla prejavom interakcií polymérnych kĺbek s podstatne menšími molekulami rozpúšťadla. Na vyjadrenie závislosti redukovanej viskozity na koncentrácii bolo navrhnutých niekoľko rovníc, pričom najjednoduchší a najpoužívanejší je „Hugginsov vzťah“. Tento vzťah platí prevažne pre nižšie koncentrácie roztokov a má tvar lineárnej rovnice

$$\eta_{red} = [\eta] + k_H [\eta]^2 c, \quad (15)$$

kde: „ k_H “ je bezrozmerný koeficient, nazývaný Hugginsová konštanta, ktorého hodnota závisí na intenzite interakcií medzi makromolekulami polyméru a molekulami rozpúšťadla. Tak isto závisí na rozpúšťadle, molekulovej váhe polyméru, na teplote a na vetvení reťazca polyméru.

4.4 Viskoelasticita

Reológia, ako taká, študuje tvarové zmeny látok pri pôsobení vonkajších síl. Rozumieme teda pod týmto pojmom náuku o toku látok. Látky s viskoelastickými vlastnosťami sú charakteristické tým, že vykazujú elastický aj viskózný tok. Pri malých deformáciách sa elastické telesá riadia „Hookovým zákonom“. Rovnováha medzi napätím a deformáciou pri šmyku je vyjadrená vzťahom

$$\tau = G\gamma, \quad (16)$$

kde „ τ “ je šmykové napätie a „ G “ modul pružnosti.

Pôsobením konštantného napätia na jednoduché kvapaliny, tieto kvapaliny tečú a ich šmyková deformácia s časom lineárne rastie. A ako už vieme, podľa Newtonovho zákona šmyková rýchlosť je úmerná šmykovému napätiu a viskozita predstavuje konštantu úmernosti; viz. vzťah (7). Potom elasticitu a viskózný tok považujeme za medzné prípady reologického chovania a látky sa môžu viac či menej k týmto prípadom približovať [77].

Prihliadnutím na všeobecné vlastnosti látok okolo nás je možné skonštatovať, že väčšina látok vykazuje komplikované viskoelastické vlastnosti. Na charakterizáciu takýchto látok sa používajú jednoduché kombinácie elasticity a toku a môžeme si znázorňovať kombinácie pomocou reologických modelov. Základnými prvkami modelov je piest a oceľová pružina. Piest charakterizuje viskóznym tok a pružina elasticitu [77].

4.4.1 Reologické modely viskoelastických látok

Reologický model vytvorený paralelným spojením prvkov dostávame model „Kelvinov“. Pohyb pružiny z jedného deformačného stavu do druhého je brzdený viskóznym prvkom. Z tohto pohľadu nie je elasticita okamžitá, ale časovo závislá, resp. spomalená. Odvodenie rovníc pre Kelvinov model vychádza za podmienok, že deformácia oboch prvkov je rovnaká, a že napätie oboch prvkov prispieva aditívne k celkovému napätiu. Potom platí [77]

$$\gamma_{pruž} = \gamma_{piest} = \gamma, \quad (17)$$

$$\tau_{pruž} + \tau_{piest} = \tau, \quad (18)$$

kde „ τ “ je celkové napätie a „ γ “ deformácia.

Dosadením rovníc (1) a (16) do rovnice (18) dostávame diferenciálnu rovnicu Kelvinovho modelu

$$G\gamma + \eta \frac{d\gamma}{dt} = \tau. \quad (19)$$

„Maxwellov model“ popisuje tok komplikovaný elasticitou, teda elasticita, ktorá doznieva tokom. Je to sériové spojenie prvkov a deformácia je potom rovná súčtu jednotlivých deformácií a napätie oboch sa rovná celkovému napätiu

$$\gamma_{pruž} + \gamma_{piest} = \gamma, \quad (20)$$

$$\tau_{pruž} = \tau_{piest} = \tau. \quad (21)$$

Ak uvažujeme, že deformácia je časovo závislá, potom po dosadení rovníc (1) a (16) do rovnice (20), dostávame diferenciálnu rovnicu pre *Maxwellov model* [77]

$$\frac{d\tau}{dt} + \frac{\tau}{\delta} = \frac{d\gamma}{dt} G, \quad (22)$$

kde „ $\delta = \eta / G$ “ je *relaxačná doba*.

Tuckettov model charakterizuje deformáciu lineárne amorfného polyméru určeného troma základnými mechanizmami, a to ideálne elasticou deformáciou valenčných uhlov, väzieb a medzimolekulových vzdialeností, spomalene elasticou deformáciou polymérnych klbkiek a tokom. Kvantitatívne popisuje viskoelastické chovanie polyméru, sériovým spojením oboch základných modelov Kelvinového a Maxwellového [77].

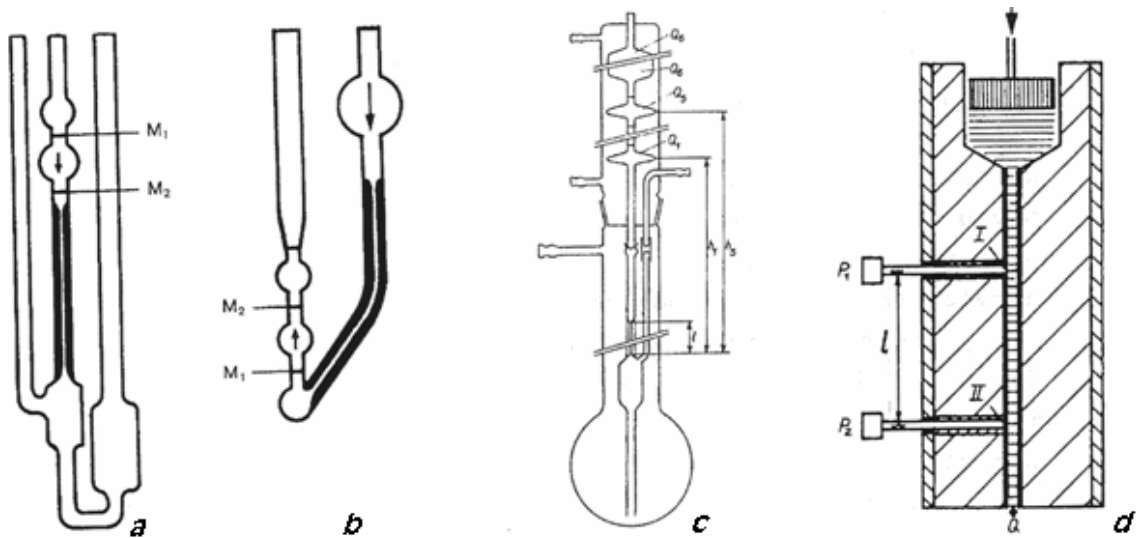
4.5 Metódy merania

Na meranie viskozity bol zostrojený veľký počet prístrojov rozličných druhov. Tieto prístroje nazývame viskozimetre. Základnou podmienkou merania u všetkých typov viskozimetrou je, že prúdenie kvapaliny musí byť laminárne. Prístroje na meranie viskozity môžeme rozdeliť na tri základné typy, a to výtokové, ktoré sa riadia Poiseuillovým vzťahom, telieskové, založené na Stokesových vzorcoch a rotačné, kde viskozita sa určuje na základe odporu kvapaliny, ktorú kladie pri otáčavom pohybe [68].

Merania na kapilárnych viskozimetroch dávajú presné výsledky, ale sú zdĺhavé. Rýchlejšie výsledky nám poskytujú rotačné viskozimetre (resp. reometre), pričom tieto výsledky sú v prijateľných medziach presnosti. Z tohto dôvodu sa častejšie používajú na meranie viskozity práve rotačné viskozimetre, prípadne reometre [72].

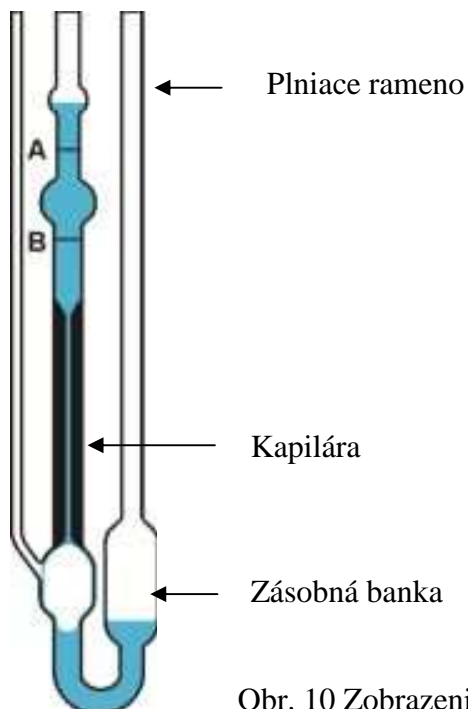
4.5.1 Výtokový viskozimeter

Medzi výtokové viskozimetre zaradujeme Englerov, Oswaldov, Kohlov a Ubbelohdeov [65]. Ubbelohdeho viskozimeter je založený na vzťahu medzi objemom, ktorý prejde pri danom pretlaku tenkou trubicou (kapilárou) za jednotku času a viskozitou kvapaliny. Priemer kapiláry určuje rýchlosť prúdenia kvapaliny. Tento priemer závisí od meranej látky, viac menej aby bolo zachované laminárne prúdenie. Dynamickú viskozitu určuje Poiseuilleov vzťah, ako už bolo spomenuté [78]. Na meranie tokových kriviek newtonovských kvapalín je nutné používať prietokové kapilárne viskozimetre s nastaviteľným tlakovým spádom (obr.10). Potom je možné priamo merať objemový prietok „ V “ a tlakový spád „ Δp “. Presnosť merania závisí hlavne od výberu vhodnej kapiláry a na meraní tlakového rozdielu [65].



Obr. 9 Příklady výtokových viskozimetrov, a. Ubbelohdeho, c. s nastaviteľným tlakovým spádom [78].

Ubbelohdeho viskozimeter je používaný na presnejšie meranie viskozity newtonovských kvapalín v rozsahu od $2 \cdot 10^{-4}$ do $20 \text{ Pa}\cdot\text{s}$. Podstatou samotného merania je doba „ t “ potrebná na výtok určitého objemu „ V “ testovanej kvapaliny s hustotou „ ρ “. Kvapalina preteká kapilárou s priemerom „ R “ a s dĺžkou „ L “ vplyvom tiaže [66].



Obr. 10 Zobrazenie Ubbelohdeho viskozimetru [79]

Viskozimeter má tri ramená, ako je možné vidieť na obrázku. Meraná kvapalina sa naleje plniacim ramenom do viskozimetra tak, aby množstvo testovanej kvapaliny bolo medzi ryskami na skle, vyznačenými na spodnej časti zásobnej banky. Na druhom ramene hore je možné vidieť mernú banku, ktorá ústi do kapiláry. Kvapalinu sa nasaje pomocou balóniku tak, že sa uzavrie vzduchová trubica a nasaje sa kvapalina nad rysku vyznačenú na mernej banke. Po nasatí sa vzduchová trubica otvorí a meria sa prietok tekutiny presne od rysku po rysku (od „A“ po „B“) [79].

Výrobca prikladá ku každému viskozimetru list, ktorý obsahuje „svetlost“, teda priemer kapiláry a kalibračnú konštantu. Kalibračná konštantka je určená meraním výtokových časov pre vhodnú kvapalinu [66].

Englerov technický viskozimeter má namiesto kapiláry úzku kovovú rúrku, ktorou vyteká meraná kvapalina do nádoby. Preto sa Englerov viskozimeter hodí na meranie viskóznejších minerálnych olejov. Skladá sa z valcovitej mosadznej nádobky, ktorá je spravidla pozlátená alebo pochrómovaná. Uprostred polovypuklého dna je výtoková rúrka s určenou svetlosťou. Nádobka má tri hroty 25mm vysoké na určenie výšky skúšanej kvapaliny. Nádobka sa uzatvára vekom a do aparatúry sa dá zasunúť teplomer na zisťovanie presnej teploty [80].

Ostwaldov viskozimeter sa skladá zo sklenenej trubice v tvare „U“, ako všetky výtokové viskozimetre a meranie je porovnateľné s ostatnými. U tohto viskozimetru sa však používa „porovnávací metóda“. Potom meranie je založené na porovnávaní testovanej kvapaliny s kvapalinou, ktorej viskozitu poznáme. U Ostwaldovho viskozimetra sa vychádza z „Hagen-Poiseuilleovej“ rovnice, ktorá po zjednodušení má tvar

$$v = t.A, \quad (23)$$

kde „v“ je kinematická viskozita a „A“ je konštantka viskozimetra [80].

4.5.2 Telieskové viskozimetre

Najbežnejším zastupiteľom telieskových viskozimetrov je „Höpplerov viskozimeter“. Viskozitu zisťujeme Stokesovou metódou, kde viskozita sa určuje z rýchlosti pádu guľičky v mernej trubici. Trubica je naplnená skúmanou kvapalinou a udržiavaná Höpplerovým termostatom na požadovanú teplotu. Zariadenie je naklonené o 10° od zvislej osy. Guľku volíme tak, aby jej pohyb v kvapaline bol rovnomerný, potom na ňu pôsobia sily

tiažová, vztlaková a odporová. Odvođením a dosadením dostávame rovnicu pre dynamickú viskozitu [68]

$$\eta = \frac{Vg(\rho_k - \rho) \cos \alpha}{6\pi r v} = K(\rho_k - \rho)t, \quad (24)$$

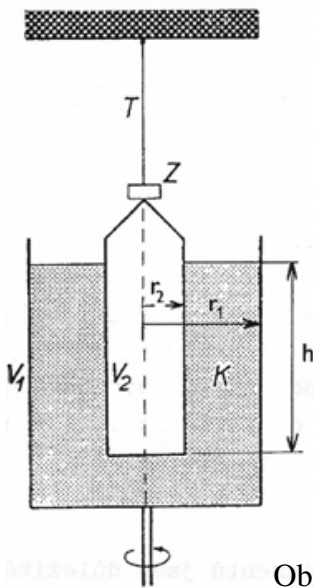
kde „ ρ_k “ je hustota guľky, „ ρ “ hustota skúmanej kvapaliny, „ α “ je uhol naklonenia, „ V “ je objem, „ r “ polomer guľky, „ t “ čas pádu guľky, „ K “ konštanta guľky pre danú vzdialenosť „ s “ a polomer „ r “ [68].

4.5.3 Rotačné viskozimetre

Rotačné viskozimetre určujú viskozitu zo silových účinkov. Tieto silové účinky sú dôsledkom pôsobenia dvoch valcových plôch, medzi ktorými sa nachádza skúmaná kvapalina. Celý systém sa nachádza v temperovanej nádobe [68].

Viskozimeter typu „valec- valec“

V prvom rade môžeme charakterizovať prúdenie medzi koaxiálnymi valcami. Rovnováha radiálnych a axiálnych síl pri čisto rotačnom prúdení medzi koaxiálnymi valcami a pri existencii elastických normálových pnutiami je zaručená symetriou toku a normálovými reakciami stien. Potom dynamika toku vyplýva z momentovej rovnováhy vo vnútri deformovanej kvapaliny. Moment, ktorý je vytvorený vonkajšími silami na hriadeli rotujúceho valca je na každom mieste kompenzovaný a prenášaný šmykovým napätím. Toto šmykové napätie pôsobí lokálne vždy v smere angulárneho pohybu materiálovej plochy [66]. Koaxiálne valce sú dva súosé valce, medzi ktorými je meraná kvapalina. Vonkajší valec je stacionárny a druhý sa otáča rotačným pohybom stálou uhlovou rýchlosťou „ ω “ a zaznamenáva sa moment sily „ M “, ktorý pôsobí na vnútorný valec.



Obr. 11 Znárodnenie rotačného viskozimetra typu valec-valec [78]

Ak sú polomery „ r_1, r_2 “ a výška vrstvy kvapaliny „ h “, je možné vypočítať viskozitu

$$\eta = \frac{M \cdot (1/(r_1^2 - r_2^2))}{4\pi \cdot h \cdot \omega} = B \frac{M}{\omega}, \quad (25)$$

kde „ B “ je prístrojová konštanta [78].

Táto rovnica bola odvodená za predpokladu laminárneho toku podľa „*Couette*“ a pri zanedbaní koncových a hranových efektov korekciami. Problémy nastávajú pri samotnom meraní kvapaliny, kde vo valcovej medzere môže dôjsť k rôznej šmykovej deformácii alebo k ohrevu vzorky pri zvýšení viskozity a rýchlosti otáčania. Meraním na rotačnom viskozimetri dostávame ľahko hodnoty napätia pre rôzne hodnoty šmykovej rýchlosti ($\dot{\gamma}$), kde hodnota „ $\dot{\gamma}$ “ je daná rýchlosťou otáčania a polomerom valcov [78].

Viskozimeter typu „doska- doska“

Tento typ viskozimetra je založený na rotačnom toku medzi koaxiálnymi diskami. Navzájom šmykanými materiálovými plochami sú rovnobežné roviny, ktoré rotujú okolo spoločnej osy s rôznymi uhlovými rýchlosťami. Kvapalina sa nachádza medzi týmito doskami, kde jedna je v pokoji a druhá rotuje konštantnou uhlovou rýchlosťou. Základom je skutočnosť, že rýchlosť šmykovej deformácie je závislá na vzdialenosti medzi doskami, potom platí vzťah

$$\dot{\gamma} = r \frac{d\omega}{dz}. \quad (26)$$

Ak zanedbávame zotrvačnosť a elastické pnutie, je možné pohybové rovnice redukovat' a dostávame tvar [66]

$$\partial_z \tau_{\phi z} = 0, \quad (27)$$

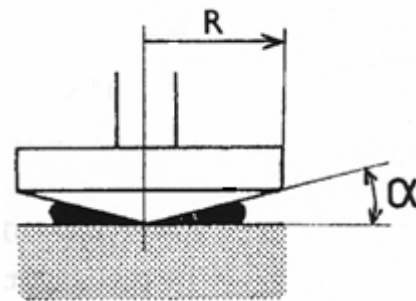
kde „ $\tau_{\phi z} = \tau(r)$ “ je šmykové napätie uvažovaného viskozimetrického toku.

Šmykové napätie získame z meranej veličiny, teda z krútiaceho momentu [66]

$$\tau = \frac{2M}{\pi R^3}. \quad (28)$$

Viskozimeter typu „kužel'- doska“

Konfigurácia viskozimetra kužel'- doska sa líši od konfigurácie koaxiálnych diskov profilom rotujúceho vretena. Navzájom šmykanými materiállovými plochami sú koaxiálne kužele so spoločným vrcholom, ktoré rotujú okolo spoločnej osy s rôznymi uhlovými rýchlosťami [66].



Obr. 12 Znáozornenie rotačného viskozimetra typu kužel'- doska [78]

Priestor medzi doskou a kužel'om je vyplnený viskóznou kvapalinou. Pri otáčaní dosky uhlovou rýchlosťou sa prostredníctvom kvapaliny prenáša krútiaci moment „ M “. Kužel' je zavesený na tórnom drôte so známou tórnou tuhosťou a hodnota momentu sa vypočíta zo zmeraného uhlu „ α “ a skrutu drôtu v ustálenom stave. Elementárna vrstva kvapaliny má tvar kužel'ovitej plochy s diferenciálnou hrúbkou a spolu s doskou sa otáča okolo osy uhlovou rýchlosťou. Ak je uhol medzi kužel'om a doskou malý, klesá uhlová rýchlosť vrstiev od dosky ku kužel'u lineárne. Šmyková rýchlosť „ $\dot{\gamma}$ “ je potom v celom systéme konštantná [77]

$$\dot{\gamma} = \frac{r\omega}{r\alpha} = \frac{\omega}{\alpha}. \quad (29)$$

Z tohto predpokladu je potom aj šmykové napätie, pôsobiace na jednotlivých vrstvách, prakticky rovnaké. Na doske pôsobí vo vzdialenosti „ r “ na elementárnej ploche „ $2\pi r dr$ “ šmyková sila „ $2\pi r dr \tau$ “ a moment „ $dM = 2\pi r^2 dr \tau$ “, potom po integrácií dostávame vzťah medzi meraným momentom a pôsobiacim šmykovým napätím [77]

$$\tau = \frac{3M}{2\pi R^3}. \quad (30)$$

Zo zmeranej závislosti „ M na ω “ môžeme získať informáciu o závislosti „ τ na $\dot{\gamma}$ “. Taktiež je možné merať normálové napätie a sledovať elastické zmeny pri toku a po zastavení toku [77].

II. PRAKTICKÁ ČASŤ

5 MATERIÁLY POUŽÍVANÉ PRI MERANÍ

Táto práca, respek. výskum, bol zameraný na zisťovanie reologických vlastností hyaluronanu. Hyaluronan bol poskytnutý od firmy CPN spol. s. r.o., Dolní Dobrouč, s molekulovou hmotnosťou $1,7\text{ MDa}$. Ako rozpúšťadlo sa používal fosfátový pufor, ktorý sa pripravoval v laboratóriu. Fosfátový pufor sa používal na udržanie určitého stáleho pH, ktoré bolo žiadané. Vzhľadom nato, že HA sa používa prevažne na medicínske aplikácie, a aj tento výskum bol zameraný práve na tieto účely. pH sa udržiavalo na fyziologické pH, čo je 7,36. V teoretickej časti je možné sa dočítať, že hyaluronan podlieha rýchlo degradácii pod vplyvom okolitého prostredia. Aby sa udržali roztoky HA dlhšie bez degradácie, pridávajú sa do týchto roztokov rôzne prídavky kvartérnej amóniovej soli, konkrétne benzalkónium chlorid. Týmito prídavkami sa predchádza degradácii HA v roztoku a merali sa reologické vlastnosti na Ubbelohdeho viskozimetri a na rotačnom reometri.

Používané chemikálie na prípravu roztokov:

- Hyaluronan- šarža 831107, kvalita pre farmáciu
- Benzalkónium chlorid- Fluka, Dánsko, Assay > 95,0%
- Hydrogenfosforečnej disodný (Na_2HPO_4)- Sigma- Aldrich, Švajčiarsko, Assay > 95,5%
- Dihydrogenfosforečnej sodný (NaH_2PO_4)- Sigma- Aldrich, USA, Assay > 95,5 %
- Chlorid sodný (NaCl) - Fluka, Španielsko, Assay > 99,5%
- Destilovaná voda

5.1 Príprava fosfátového pufru

Fosfátový pufor sa pripravoval podľa zadaných inštrukcií. Používali sa zlúčeniny fosforu, ktoré sú charakteristickými zložkami na prípravu roztoku s pevným pH. Pripravil sa 1l roztoku za predpokladu, že NaH_2PO_4 bolo 20% a Na_2HPO_4 bolo 80% z celkového roztoku. Výsledná koncentrácia mala byť $0,15\text{ mol.dm}^3$ a pomocou molekulovej hmotnosti a koncentrácie sa dopočítali navážku jednotlivých chemikálií.

$$NaH_2PO_4: \quad m = c.V.M$$

$$m = 0,1.0,2.156,01$$

$$m = 3,12g$$

$$Na_2HPO_4: \quad m = c.V.M$$

$$m = 0,1.0,8.177,99$$

$$m = 14,24g$$

kde: „ c “ je koncentrácia ($mol.dm^{-3}$), „ V “ je objem (l) a „ M “ molekulová hmotnosť (g/mol).

Fosforečnany sa rozpustili v destilovanej vode a dôkladne premiešali. Na pHmetri sa nakalibrovala podľa normy sonda. Pripravené roztoky sa zlievali spolu do sklenenej kádinky a dbalo sa nato, aby sa dosiahlo pH 7,36. Potom sa zmeral objem výsledného roztoku a pomocou obdobného výpočtu sa vypočítal prídavok $NaCl$. Chlorid sodný vo fosfátovom pufori pôsobí ako stabilizátor

$$NaCl: \quad m = c.V.M$$

$$m = 0,15.V.58,44$$

$$m = _ g$$

kde: „ c “ je výsledná koncentrácia roztoku, „ V “ je objem výsledného roztoku a „ M “ je molekulová hmotnosť $NaCl$.

5.2 Príprava roztokov HA – Ubbelohdeho viskozimeter

Na viskozimetrické merania sa pripravovali 1% roztoky HA vo fosfátovom pufori. Podľa potreby sa namiešali 25ml alebo 10ml roztoku a pridávali sa zadané prídavky kvartérnej amóniovej soli, teda benzalkónia chloridu (BAC). Roztoky sa pripravovali v laboratóriu, kde sa nechali miešať 24 hodín (po väčšinou cez noc) pri laboratórnej teplote a vlhkosti. Vzorky boli vždy uzatvorené a riadne označené. Podľa vzťahu sa vypočítala molárna koncentrácia roztoku HA za predpokladu, že $m = 0,25g$, $V = 0,025l$ (puforu) a $M_{HA} = 1,7.10^6 g/mol$

$$m = c.V.M \Rightarrow c_{HA} = \frac{m}{V.M} = \frac{0,25}{0,025.1,7.10^6} = 5,88.10^{-6} mol.dm^{-3}$$

Zásobný roztok benzalkónia chloridu (BAC) sa zvolil 0,5%, kde navážka tejto chemikálie bola vždy „ $m = 0,25g$ “ do objemu „ $V = 0,05l$ “. Zásobný roztok sa skladoval

v chladničke a z tohto zásobného roztoku sa pridávali príslušné prídavky do roztokov HA. Potom molárna koncentrácia zásobného roztoku:

$$m = c \cdot V \cdot M \Rightarrow c = \frac{m}{V \cdot M} = \frac{0,25}{0,05 \cdot 340} = 14,71 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$$

Zvolili sa rôzne množstvá prídavkov benzalkónia chloridu a podľa toho sa vypočítali výsledné koncentrácie BAC v roztoku. Pri meraní kinematickej viskozity HA sa pracovalo so 6 rôznymi roztokmi a výslednými koncentraciami, ktoré sa počítali pomocou vzťahu:

$$\frac{c_1}{V_1} = \frac{c_2}{V_2} \Rightarrow c_1 = \frac{c_2}{V_2} \cdot V_1 = \frac{14,71 \cdot 10^{-3}}{50 \cdot 10^{-3}} \cdot 0,15 \cdot 10^{-3} = 0,44 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$$

Vzťah predstavuje konkrétny prípad prídavku BAC pre vzorku „1“. Potom jednotlivé molárne koncentrácie, počet častíc a príslušné prídavky BAC vzťahnuté na objem roztoku HA 25ml

1% roztoky HA	1	2	3	4	5	6
prídavok BAC(μl)	75	150	300	400	500	1000
molárna koncentrácia BAC($\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$) v jednotlivých roztokoch	$0,44 \cdot 10^{-4}$	$0,88 \cdot 10^{-4}$	$1,76 \cdot 10^{-4}$	$2,35 \cdot 10^{-4}$	$2,94 \cdot 10^{-4}$	$5,88 \cdot 10^{-4}$
počet častíc BAC na 1molekulu HA	7,5	15	30	40	50	100
počet častíc BAC na 1mer HA	$0,17 \cdot 10^{-2}$	$0,35 \cdot 10^{-2}$	$0,70 \cdot 10^{-2}$	$0,93 \cdot 10^{-2}$	$1,16 \cdot 10^{-2}$	$2,33 \cdot 10^{-2}$

Tab. 1 Výpočty molárnej koncentrácie a počtu častíc BAC k HA pri viskozimetrických meraniach

Počet častíc v roztoku HA za predpokladu, že $m = 0,25 \text{ g}$, $V = 0,025 \text{ l}$ (puforu) a $M_{HA} = 1,7 \cdot 10^6 \text{ g/mol}$, sa vypočíta pomocou vzťahu:

$$n = \frac{m}{M} = \frac{0,25}{1,7 \cdot 10^6} = 1,47 \cdot 10^{-7} \text{ mol},$$

$$n = \frac{N}{N_A} \Rightarrow N = n \cdot N_A = 1,47 \cdot 10^{-7} \cdot 6,022 \cdot 10^{23} = 8,86 \cdot 10^{16} \text{ častíc},$$

kde: „ N_A “ je Avogadrova konštanta, „ N “ je počet častíc v roztoku.

Počet častíc v zásobnom roztoku BAC za predpokladu, že $m = 0,25 \text{ g}$, $V = 0,05 \text{ l}$ (puforu) a $M_{BAC} = 340 \text{ g/mol}$

$$n = \frac{m}{M} = \frac{0,25}{340} = 7,35 \cdot 10^{-4} \text{ mol},$$

$$n = \frac{N}{N_A} \Rightarrow N_{z\acute{a}s} = n \cdot N_A = 7,35 \cdot 10^{-4} \cdot 6,022 \cdot 10^{23} = 4,43 \cdot 10^{20} \text{ \u010dast\u00edc.}$$

\u010calej je mo\u017en\u00e9 prepo\u010d\u00edta\u0165 pomocou troj\u010denky po\u010det \u010dast\u00edc v konkr\u00e9tnom pr\u00eddavku BAC, napr\u00edklad pr\u00eddavok $75 \mu\text{l}$, keď $N_{z\acute{a}s} = 4,43 \cdot 10^{20}$ \u010dast\u00edc v objeme $V = 0,05\text{l}$

$$0,05\text{l} \dots\dots\dots 4,43 \cdot 10^{20} \quad \text{\u010dast\u00edc}$$

$$75 \cdot 10^{-6}\text{l} \dots\dots\dots x \quad \text{\u010dast\u00edc}$$

$$x = \frac{75 \cdot 10^{-6}}{0,05} \cdot 4,43 \cdot 10^{20} = 6,64 \cdot 10^{17} \text{ \u010dast\u00edc}$$

Nasledovne sa vypo\u010d\u00edta po\u010det \u010dast\u00edc BAC na jednu \u010dasticu HA tak, \u017e dan\u00e9 hodnoty podel\u00edme

$$\frac{6,64 \cdot 10^{17}}{8,86 \cdot 10^{16}} = 7,5 \text{ \u010dast\u00edc BAC na 1 \u010dasticu HA.}$$

Za predpokladu, \u017e jedna monom\u00e9rna jednotka, teda D- glukur\u00f3nov\u00e1 kyselina a D-N- acetyl glukozam\u00edn majú molekulov\u00fa hmotnos\u0165 „ $M = 395,316\text{g/mol}$ “ je mo\u017en\u00e9 vypo\u010d\u00edta\u0165 po\u010det m\u00e9rov v hyalur\u00f3novej molekule.

$$p.m\u00e9rov = \frac{1,7 \cdot 10^6}{395,316} = 4300,36 \text{ m\u00e9rov}$$

Potom ak sa vyn\u00e1sob\u00ed po\u010det \u010dast\u00edc HA po\u010dtom m\u00e9rov a n\u00e1sledne sa podel\u00ed po\u010det \u010dast\u00edc BAC po\u010dtom \u010dast\u00edc HA, dostaneme prepo\u010det \u010dast\u00edc BAC na 1 mer HA.

$$p.m_{HA} = 8,86 \cdot 10^{16} \cdot 4300,36 = 3,81 \cdot 10^{20} \text{ \u010dast\u00edc v jednom m\u00e9re}$$

$$\frac{6,64 \cdot 10^{17}}{3,81 \cdot 10^{20}} = 0,17 \cdot 10^{-2} \text{ \u010dast\u00edc BAC v 1 m\u00e9re}$$

Nachystan\u00e9 roztoky sa e\u0161te riedili tak, \u017e sa odobral 1ml HA+BAC a zriedil sa s 24ml puforu. Takto pripraven\u00e1 vzorka sa pou\u017eila na viskozimetrick\u00e9 meranie na Ubbelohdeho viskozimetri. Meranie sa prev\u00e1dzalo pri teplot\u00e1ch $25, 30, 35, 40$ a 45°C s opakovan\u00edm sedemkr\u00e1t. Pou\u017eit\u00e1 aparat\u00far a sa vopred pripravila. Roztok sa vli\u00e1l do viskozimetra, ktor\u00fd bol umiestnen\u00fd v tempera\u010dnej v\u00e1ni. Sledoval sa prietok kvapaliny od rysky po rysku, dan\u00fd

čas sa zaznamenával a ďalej používal na výpočty kinematickej viskozity. Výsledky sú uvedené v diskusii.

5.3 Určenie limitného viskozitného čísla

Na určenie limitného viskozitného čísla sa pripravovali 0,3% roztoky HA rozpustené vo fosfátovom pufori. Samozrejme sa pracovalo za stáleho konštantného pH. Prídavky BAC sa volili tak, aby sa dosiahli približné pomery molekúl BAC na molekulu HA, ako u predchádzajúcich meraniach. Na tieto merania sa používali väčšie prídavky BAC, aby zmena viskozity bola lepšie pozorovateľná, pretože u viskozimetrických meraniach je najlepšie badateľná zmena u najvyššieho prídavku BAC. Obdobne sa podľa vzťahu vypočíta molárna koncentrácia roztoku HA za predpokladu, že $m = 0,075 \text{ g}$, $V = 0,025 \text{ l}$ (puforu) a $M_{HA} = 1,7 \cdot 10^6 \text{ g/mol}$, potom

$$m = c \cdot V \cdot M \Rightarrow c_{HA} = \frac{m}{V \cdot M} = \frac{0,075}{0,025 \cdot 1,7 \cdot 10^6} = 1,76 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$$

Nachystalo sa 5 vzoriek HA, ktoré sa miešali 24 hodín pri laboratórnej teplote a tlaku. Pridali sa príslušné prídavky BAC a roztoky sa ďalej upravovali na meranie na Ubbelohdeho viskozimetri. Nachystané vzorky sme označili číslami „1-5“. Tabuľka nám ukazuje príslušné prídavky BAC na 25ml, 0,3% roztoku HA, molárnu koncentráciu a počet molekúl BAC na molekulu HA a na jeden mér.

0,3% roztoky HA	1	2	3	4	5
prídavok BAC(μl)	90	290	600	900	1200
molárna koncentrácia BAC($\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$) v jednotlivých roztokoch	$0,26 \cdot 10^{-4}$	$0,85 \cdot 10^{-4}$	$1,76 \cdot 10^{-4}$	$2,65 \cdot 10^{-4}$	$3,53 \cdot 10^{-4}$
počet častíc BAC na 1molekulu HA	30	96,66	200	300	400
počet častíc BAC na 1mer HA	$0,70 \cdot 10^{-2}$	$2,25 \cdot 10^{-2}$	$4,65 \cdot 10^{-2}$	$6,98 \cdot 10^{-2}$	$9,30 \cdot 10^{-2}$

Tab. 2 Výpočty molárnej koncentrácie a počtu častíc BAC k HA pri reometrických

meraniach

Prepočty častíc sa počítali obdobne, ako u predošlých meraniach s tým, že rozdiel bol len v koncentrácii HA. Potom počet molekúl v roztoku HA za predpokladu, že $m = 0,075 \text{ g}$, $V = 0,025 \text{ l}$ (puforu) a $M_{HA} = 1,7 \cdot 10^6 \text{ g/mol}$, sa vypočíta pomocou vzťahu

$$n = \frac{m}{M} = \frac{0,075}{1,7 \cdot 10^6} = 4,41 \cdot 10^{-8} \text{ mol},$$

$$n = \frac{N}{N_A} \Rightarrow N = n \cdot N_A = 4,41 \cdot 10^{-8} \cdot 6,022 \cdot 10^{23} = 2,66 \cdot 10^{16} \text{ částic},$$

kde: „ N_A “ je Avogadrova konštanta, „ N “ je počet částic v roztoku.

Prepočty na počet částic BAC na jednu časticu HA a na jeden mér sa počítali obdobne, ako u predchádzajúcich výpočtov. Všetky vypočítané hodnoty je možné vidieť v tabuľke číslo „1“ a „2“.

Na grafické určenie limitného viskozitného čísla je potreba najmenej aspoň dvoch koncentrácií, aby sa dala určiť táto hodnota. Samozrejme pri viacerých koncentráciách dostávame presnejšie výsledky, preto sa volilo 5 koncentrácií na jednu vzorku. Vzhľadom nato, že 0,3% roztok HA je ešte stále dostatočne viskózny, riedil sa tento roztok tak, že sa dosiahlo piatich rôznych koncentrácií, ktoré je možné vidieť v tabuľke č.3 v diskusii. Meranie sa prevádzalo na Ubbelohdeho viskozimetri pri teplote 37°C, kde sa zaznamenával čas prietoku kvapaliny. Príslušnými vzťahmi sa vypočítali hodnoty relatívnej, špecifickej a redukovanej viskozity. Špecifická viskozita vzťahnutá na hmotnostnú koncentráciu „ η_{red} / c “ sa vynesie na osu „y“ a hmotnostná koncentrácia na osu „x“. Preložením bodov na „nulovú koncentráciu“ dostaneme limitné viskozitné číslo pre daný systém. Výsledné hodnoty a grafické znázornenia sú uvedené vo výsledkoch a diskusii.

5.4 Príprava roztokov HA- rotačný reometer

Na reologické merania sa používali 0,3% roztoky HA rozpustené vo fosfátovom pufovi. Nachystané vzorky boli presne pripravené ako pri meraní limitného viskozitného čísla a hodnoty molárnej koncentrácie, prídavkov BAC a prepočty částic je možné vidieť v tabuľke číslo „2“. Používaný prístroj na meranie dynamickej viskozity, Reometer, Bohlin INSTRUMENTS GEMINI, Advanced Rheometer, sa podľa pokynov pripravil a nakalibroval. Typ geometrie na meranie sa vyberá podľa predbežného odhadu viskozity a volil sa typ valec- valec. Z príslušnej normy sa zistilo, aké množstvo sa dáva na meranie testovanej kvapaliny, čo bolo „13ml“. Pomocou striekačky sa odobralo príslušné množstvo a vlialo do stacionárnej časti reometra. Po uzavretí nestacionárnym valcom sa nechali roztoky temperovať vždy 2 minúty a potom sa prevádzalo samotné meranie. Volil sa rozsah

merania šmykovej rýchlosti pri prvom meraní „ $1 - 500s^{-1}$ “, pri teplote $37C^{\circ}$ a po dobu asi $90s$. Tieto isté vzorky sa merali neskôr aj s hysteréznou krivkou a s určením miery tixotropie.

6 VÝSLEDKY A DISKUSIA

Kinematická viskozita

Kinematická viskozita získaná z meraní na Ubbelohdeho viskozimetre, typu *U0*, sa vypočíta pomocou už uvedeného vzťahu „ $\nu = t.A$ “, kde „*A*“ predstavuje konštantu viskozimetra, charakteristickú pre každý viskozimeter. V nasledujúcej tabuľke je možné vidieť spriemerované namerané časy prietoku kvapaliny a vypočítané hodnoty kinematickej viskozity u šiestich rôznych vzorkách s prídavkami benzalkónia chloridu a čistej HA.

vzorka	teplota	25°C	30°C	35°C	40°C	45°C
čistá HA	čas (s)	569 (±2)	506 (±3)	454 (±4)	407 (±3)	369 (±2)
	ν (mm ² /s)	1,700 (±0,001)	1,520 (±0,002)	1,360 (±0,002)	1,220 (±0,002)	1,105 (±0,001)

vzorka	teplota	25°C	30°C	35°C	40°C	45°C
1	čas (s)	571 (±2)	509 (±2)	462 (±2)	414 (±3)	377 (±4)
	ν (mm ² /s)	1,710 (±0,006)	1,520 (±0,005)	1,380 (±0,007)	1,24 (±0,01)	1,130 (±0,014)

vzorka	teplota	25°C	30°C	35°C	40°C	45°C
2	čas (s)	570 (±3)	510 (±2)	455 (±1)	413 (±1)	370 (±2)
	ν (mm ² /s)	1,710 (±0,008)	1,530 (±0,005)	1,360 (±0,004)	1,240 (±0,004)	1,110 (±0,005)

vzorka	teplota	25°C	30°C	35°C	40°C	45°C
3	čas (s)	572 (±2)	511 (±4)	459(±1)	414 (±2)	373 (±1)
	ν (mm ² /s)	1,710 (±0,006)	1,530 (±0,012)	1,370 (±0,004)	1,240 (±0,005)	1,120 (±0,002)

vzorka	teplota	25°C	30°C	35°C	40°C	45°C
4	čas (s)	568 (±2)	505 (±8)	452 (±9)	411 (±3)	366 (±1)
	ν (mm ² /s)	1,700 (±0,007)	1,510 (±0,024)	1,350 (±0,028)	1,230 (±0,001)	1,100 (±0,004)

vzorka	teplota	25°C	30°C	35°C	40°C	45°C
5	čas (s)	573 (±2)	508 (±2)	455 (±2)	409 (±2)	371 (±3)
	ν (mm ² /s)	1,720 (±0,007)	1,520 (±0,005)	1,360 (±0,005)	1,230 (±0,006)	1,110 (±0,008)

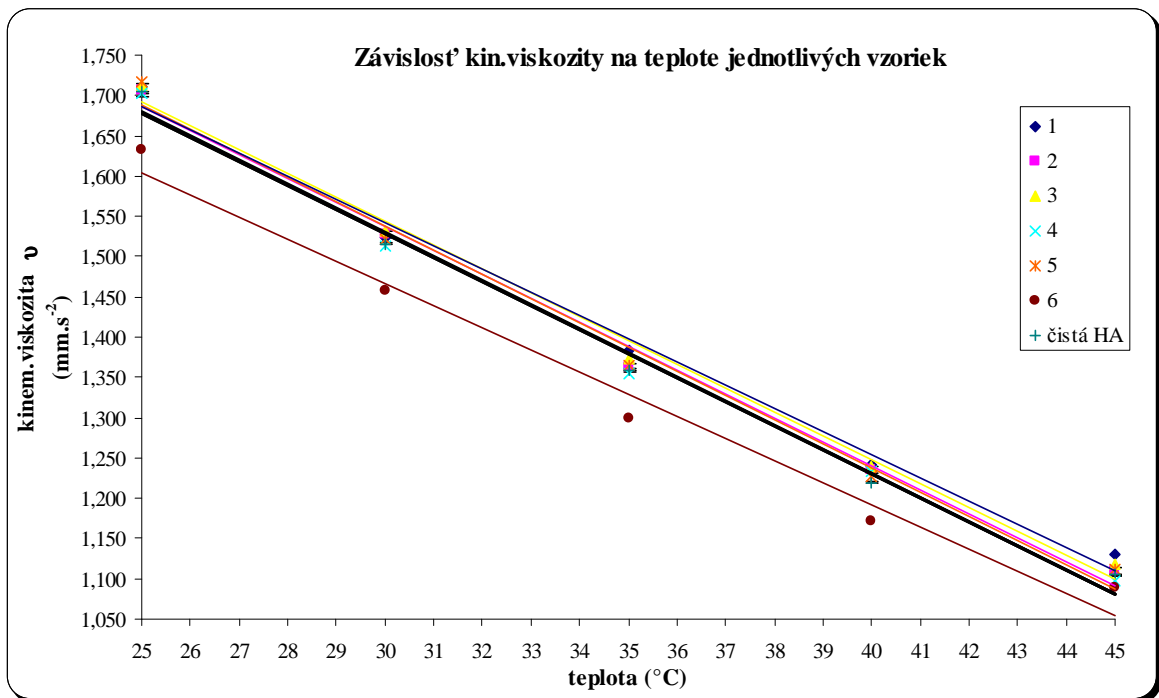
vzorka	teplota	25°C	30°C	35°C	40°C	45°C
6	čas (s)	545 (±2)	486 (±4)	433 (±1)	391 (±2)	363 (±3)
	ν (mm ² /s)	1,630 (±0,007)	1,460 (±0,013)	1,300 (±0,004)	1,170 (±0,005)	1,088 (±0,008)

Tab. 3 Namerané a vypočítané hodnoty kinematickej viskozity u 6 rôznych roztokov HA a čistej HA

Všetky merania boli opakované 7-krát a tabuľka obsahuje už len spriemerované hodnoty. Množstvá prídavkov, molárna koncentrácia BAC v roztoku HA a výpočty molekúl sú uvedené v tabuľke č.1.

Príklad výpočtu kinematickej viskozity: $\nu = t.A = 569,2.0,00294 = 1,7042\text{mm}^2 / \text{s}$,

kde: „ $A = 0,002994\text{mm}^2 / \text{s}^2$ “.



Graf. 1 Vyhodnotenie kinematickej viskozity

Na grafickom znázornení je možné sledovať jednotlivé závislosti roztokov HA s prídavkami BAC a samotnej, čistej HA. Je vidieť nepatrný trend v klesaní viskozity, ale výraznejší rozdiel je viacmenej len u roztoku s najväčším prídavkom BAC. Pri nižších koncentráciách BAC nie je pozorovateľná nejaká zmena a nie je teda možné vyhodnotiť, ako sa mení viskozita v závislosti na koncentrácii BAC. Rozdiely nie sú výrazné, ale je patrné, že pri vyššom prídavku BAC sa viskozita znižuje. Vzhľadom nato, že kyselina hyalurónová je silný polyelektrolyt a používaný BAC je látka s kladnými nábojmi, je možné, že prídavok tejto látky ovplyvňuje zapletenie kĺbka a konformáciu reťazca.

Limitné viskozitné číslo

V teoretickej časti je možné sa dočítať, že limitné viskozitné číslo je určujúcou premennou hydrodynamických vlastností vysokomolekulárnej látky. Toto limitné viskozitné

číslo sa určuje preto, aby bolo možné lepšie pochopiť, čo sa deje s roztokom HA pri prídavkoch benzalkónia chloridu. Každé meranie na Ubbelohdeho viskozimetri sa prevádzalo sedemkrát a priemerované jednotlivé hodnoty sú uvedené v tabuľke č. 4.

hmotnostná koncentrácia		$c=0,00075$ g/cm^3	$c=0,000525$ g/cm^3	$c=0,00039$ g/cm^3	$c=0,0003$ g/cm^3	$c=0,00015$ g/cm^3
čistá HA	čas (s)	663 (± 3)	502 (± 2)	423 (± 2)	376 (± 1)	305 (± 1)
	η_{red}	2183	1900	1706	1653	1409

hmotnostná koncentrácia		$c=0,00075$ g/cm^3	$c=0,000525$ g/cm^3	$c=0,00039$ g/cm^3	$c=0,0003$ g/cm^3	$c=0,00015$ g/cm^3
I	čas (s)	692 (± 2)	513 (± 2)	442 (± 1)	390 (± 1)	314 (± 1)
	η_{red}	2336	1985	1900	1841	1655

hmotnostná koncentrácia		$c=0,00075$ g/cm^3	$c=0,000525$ g/cm^3	$c=0,00039$ g/cm^3	$c=0,0003$ g/cm^3	$c=0,00015$ g/cm^3
2	čas (s)	656 (± 1)	500 (± 1)	430 (± 1)	378 (± 1)	313 (± 1)
	η_{red}	2147	1885	1776	1680	1621

hmotnostná koncentrácia		$c=0,00075$ g/cm^3	$c=0,000525$ g/cm^3	$c=0,00039$ g/cm^3	$c=0,0003$ g/cm^3	$c=0,00015$ g/cm^3
3	čas (s)	644 (± 1)	497 (± 1)	427 (± 1)	379 (± 1)	312 (± 1)
	η_{red}	2083	1860	1749	1686	1599

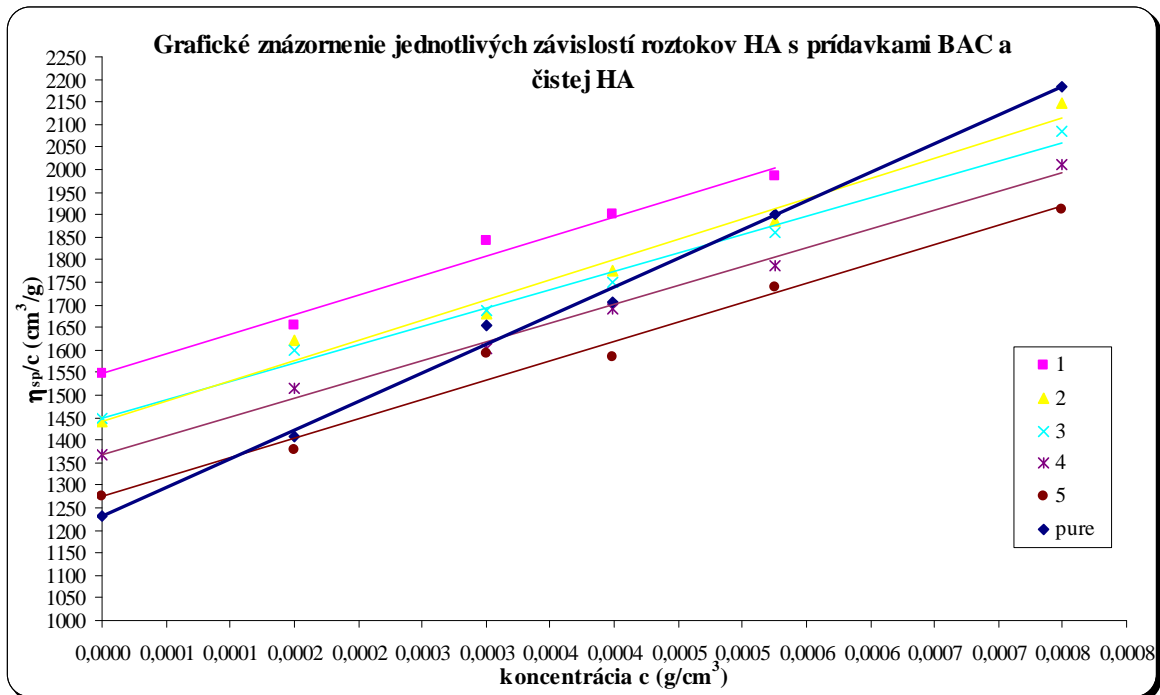
hmotnostná koncentrácia		$c=0,00075$ g/cm^3	$c=0,000525$ g/cm^3	$c=0,00039$ g/cm^3	$c=0,0003$ g/cm^3	$c=0,00015$ g/cm^3
4	čas (s)	631 (± 1)	487 (± 1)	421 (± 1)	372 (± 1)	309 (± 1)
	η_{red}	2012	1787	1692	1604	1515

hmotnostná koncentrácia		$c=0,00075$ g/cm^3	$c=0,000525$ g/cm^3	$c=0,00039$ g/cm^3	$c=0,0003$ g/cm^3	$c=0,00015$ g/cm^3
5	čas (s)	622 (± 2)	481 (± 1)	417,1 ($\pm 0,4$)	372 (± 1)	308 (± 1)
	η_{red}	1913	1740	1584	1593	1379

Tab. 4 Namerané a vypočítané hodnoty piatich vzoriek s prídavkom BAC a čistá HA pri piatich rôznych koncentráciách

Kompletnú tabuľku s výpočtami hodnotami je možné si prezrieť v prílohe tejto práce.

Viskozimetria je metóda, ktorá poskytuje informácie o veľkosti a tvare rozpučených makromolekúl. A taktiež touto metódou sa dá zistiť zmena molekulovej hmotnosti. Vynešením redukovanej viskozity proti hmotnostnej koncentrácii dostávame závislosť bodov, ktoré preložíme priamkou a určíme rovnicu regresie. Rovnica regresie predstavuje preloženie niekoľkých bodov v grafe takou priamkou, aby súčet druhých odmocnín odchýlok jednotlivých bodov bol minimálny. Preložením na nulovú koncentráciu sa získajú limitné viskozitné čísla (LVČ) pre dané systémy.



Graf. 2 Zobrazenie jednotlivých nameraných hodnôt vymenit graf

Na grafickom znázornení je možné vidieť jednotlivé limitné viskozitné čísla. Zvyšovanie a znižovanie limitného viskozitného čísla zodpovedá, a aj koreluje s výsledkami reologických meraní. V tabuľke č. 5 je vidieť prehľad výsledných a vypočítaných hodnôt. Z týchto výsledkov je patrné, že hodnoty limitného viskozitného čísla u vzorkov „2 a 3“ sú veľmi blízke. Tak isto je možné vidieť túto tendenciu aj na reologických meraniach týchto istých vzoriek. Ďalej je zaujímavé, že priamky roztokov HA s benzalkónium choriidu majú klesajúcu lineárnu tendenciu a v porovnaní s HA je ich uhol kriviek iný, ako uhol krivky HA. Z toho vyplýva, že aj Hugginsov koeficient u HA a ostatných kriviek bude rozdielny. Hugginsov koeficient u kriviek „1-5“ je v rozmedzí $8,5 \cdot 10^6$, pričom u HA je táto hodnota vyššia. Je možné povedať, že klbko čistej HA sa chová inak, ako klbko už s pridanými prídavkami BAC.

		redukovaná viskozita (η_{red}) pri daných koncentráciách roztoku					Lim. visk. číslo
vzorka	Molár. konce. BAC v roztoku (10^{-6}) mol/dm ³	$c=0,00075$ g/cm ³	$c=0,000525$ g/cm ³	$c=0,00039$ g/cm ³	$c=0,0003$ g/cm ³	$c=0,00015$ g/cm ³	$[\eta]$ (cm ³ /g)
čistá HA	1,76	2183	1900	1706	1653	1409	1233
1	26,47	2336	1985	1900	1841	1655	1548
2	85,29	2147	1885	1776	1680	1621	1441
3	176,48	2083	1860	1749	1686	1599	1449
4	264,71	2012	1787	1692	1604	1515	1368
5	352,94	1913	1740	1584	1593	1379	1277

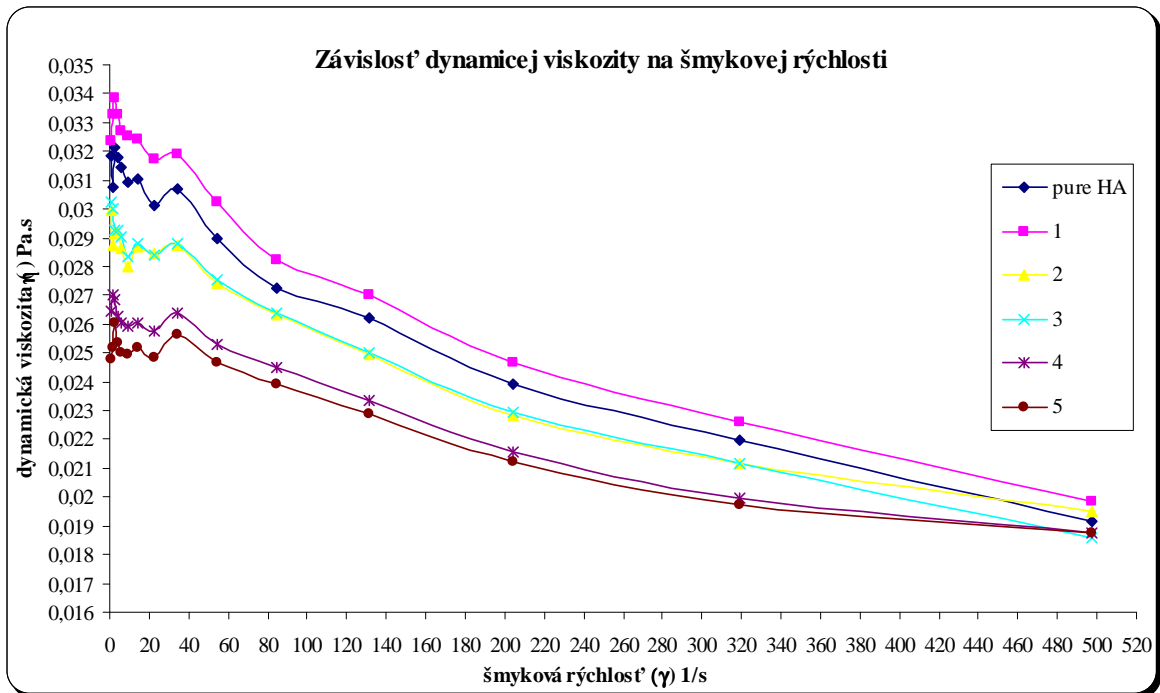
Tab. 5 Výsledky limitného viskozitného čísla

Jednotlivé grafické znázornenia limitného viskozitného čísla je možné si prezrieť v prílohe č. 1. V tabulke č. 5 je vidieť, že LVČ čistej HA je „1232 cm³/g“ a hodnota LVČ napríklad u vzorky s prídavkom 600 μl BAC je „1449 cm³/g“. V prvom prídavku (90 μl) sa LVČ zvýši na hodnotu „1548 cm³/g“ a postupne so zvyšujúcim prídavkom BAC hodnoty LVČ klesajú až k hodnote čistej HA. Namerané výsledky korelujú s výsledkami Bc. Lenky Grundělovej [81], kde rovnaký trend môžeme pozorovať i u veľkosti častíc a z toho plynie logický záver, že veľkosť častíc ovplyvňuje limitné viskozitné číslo.

Reometrické merania

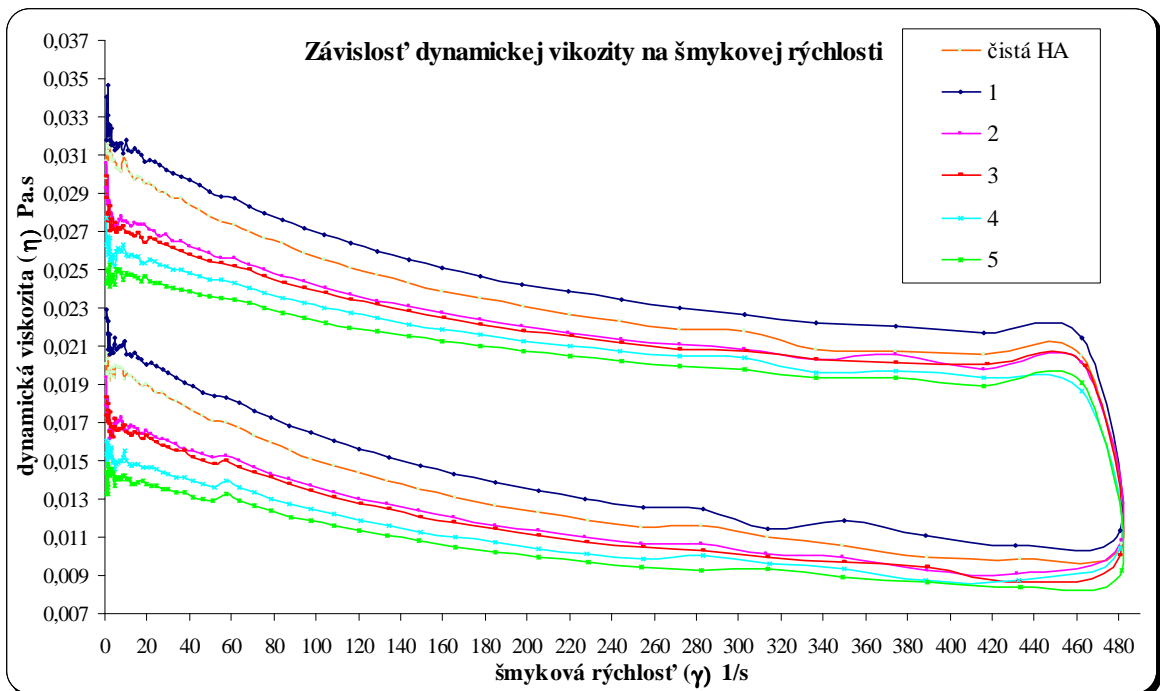
Reológia je metóda, resp. veda, ktorá študuje tvarové zmeny látok pri pôsobení vonkajších síl. Reometrické merania sú prevádzané na rotačných reometroch, kde je možné sledovať deformáciu v čase a zaznamenávať dynamickú viskozitu. Predmetom skúmania bolo zistiť závislosť dynamickej viskozity na šmykovej rýchlosti. Pri tomto meraní boli zaznamenávané hodnoty dynamickej viskozity po ustálení celého systému a na grafickom znázornení je dobre vidieť pseudopastické vlastnosti HA. Danú závislosť predstavuje uvedený graf č.3.

Z tohto grafického znázornenia je vidieť, že viskozita s prídavkami BAC sa mení rôzne. Napríklad pri najmenšom prídavku BAC (90 μl) sa dynamická viskozita zvýši nad hodnotu čistej HA. Tak isto, ako sa spomína pri LVČ, aj tu vzorky „2 a 3“ vykazujú výsledky vedúce k rovnakým záverom. Je možné sa domnievať, že by to mohlo byť spojené s „kritickou micelárnou koncentráciou“ (koncentrácia, nad ktorou sa v roztoku začnú tvoriť micely). Práve vzorky „2 a 3“ by mohli byť prechodom medzi touto koncentráciou. Dá sa skonštatovať, že krivky na tomto grafickom znázornení majú klesajúcu tendenciu u vzoriek s prídavkami BAC a korelujú s výsledkami limitného viskozitného čísla.



Graf. 3 Dynamická viskozita jednotlivých vzoriek HA s BAC a čistá HA

Merania na rotačnom reometri sa prevádzali znovu s tým, že sa zaznamenávala aj hysterézia a tixotropia. Pri tomto meraní sa však dynamická viskozita zaznamenávala ako „okamžitá viskozita“, nie po ustálení systému. Na grafickom zázornení je možné vidieť jednotlivé vzorky.



Graf. 4 Zázornenie priebehu dynamickej viskozity v závislosti na šmykovej rýchlosti

Tak isto, ako u predchádzajúceho grafu je vidieť klesajúcu tendenciu kriviek. Popri meraní sa zaznamenávala a následne určila hodnota tixotropie, ktorá u všetkých vzoriek vykazovala podobné hodnoty. Teda je možné povedať, že miera tixotropie u všetkých vzoriek, vrátane čistej HA sa nemení. Pri spätnom zaznamenávaní dynamickej viskozity, je patrné, že vplyvom šmykovej deformácie kvapaliny sa látka nestihne zrelaxovať, čo má za následok pseudoplasticita a tixotropia kvapaliny.

ZÁVER

Úlohou tejto práce bolo zistiť, aký má vplyv prídavok benzalkónia chloridu na roztoky HA. Merania boli prevádzané na dvoch rôznych prístrojoch, a to na Ubbelohdeho viskozimetri a na rotačnom reometri, typu „valec-valec“. Vyhodnocovali sa hodnoty kinematickej viskozity a limitného viskozitného čísla, ktoré sa dostali meraním na Ubbelohdeho viskozimetri. Z daných výsledkov je patrné, že prídavky BAC oplyvňujú roztoky HA. Pretože je kyselina hyalurónová silný polyelektrolyt a BAC obsahuje kladné ióny, dochádza k interakciám medzi molekulami daných látok a pod týmto vplyvom sa mení viskozita celého systému. Dosiiahnuté výsledky LVČ dokonale korelujú s výsledkami získanými na rotačnom reometri, kde tendencia zvyšovania a poklesu dynamickej a kinematickej viskozity je podobná. Túto skutočnosť je možné si pozrieť na grafoch č. 2 a 3. Na rotačnom reometri sa zaznamenávala aj hysterézia a miera tixotropie, ktorá vykazuje veľmi podobné hodnoty u všetkých meraných vzoriek. Teda tixotropia sa nemení s prídavkom BAC. Je možné skonštatovať z daných výsledkov, že kľbká v čistom roztoku HA sa chovajú inak, ako kľbká roztokov HA s prídavkami benzalkónia chloridu. Pochopiť presne, čo sa deje s molekulami HA v roztoku pri prídavkoch BAC je veľmi komplikované. Zatiaľ sa dá povedať, že limitné viskozitné číslo, a teda aj viskozita je ovplyvnená veľkosťou častíc a podrobnejšia charakterizácia interakcií kyseliny kyalurónovej s BAC je predmetom ďalších výskumov.

ZOZNAM POUŽITEJ LITERATURY

- [1] *Polysaccharides*: [online]. 2009 [cit. 2010-02-02] Dostupný z WWW: <<http://molecular-biology.suite101.com/article.cfm/polysaccharides>>.
- [2] *Carbohydrates: Polysaccharides*, [online]. 2010 [cit. 2010-02-02] Dostupný z WWW: <<http://employees.csbsju.edu/HJAKUBOWSKI/classes/ch331/cho/complexoligosacch.htm>>.
- [3] *Cellulose*: [online]. 2009 [cit. 2010-02-03] Dostupný z WWW:<<http://www.david-darling.info/encyclopedia/C/cellulose.html>>.
- [4] Prehm P. Biosynthesis of Hyaluronan. *Biochem. J.*: 2006 (398) 469-473.
- [5] Falcone J. S., Palmeri M. D., Berg A. R., Rheological and cohesive properties of hyaluronan acid, *Wiley InterScience*, 2005.
- [6] Meyer, K., Palmer, J. W., *J. Biol. Chem.*: 1934, 107, 629.
- [7] Hascall V., Laurent T. Hyaluronan: *Structure and Physical Properties*. [online]. 1997 [cit. 2010-02-05] Dostupné z WWW: <<http://www.glycoforum.gr.jp/science/hyaluronan/HA01/HA01E.html>>.
- [8] Lapčík L. Jr., Lapčík L., De Smedt S., Demester J., Chabreček J. Hyaluronan: Preparation, Structure, Properties and Applications. *Chemical Reviews*, Volume 98, N. 8, December 1998, 2663-2684.
- [9] *Hyaluronic acid: Background and Biology*: [online]. [cit. 2010-02-06] Dostupný z WWW: <<http://www.trbchemedica.co.uk/pdf/HYALURONIC%20ACID%20background%20&%20biology.pdf>>.
- [10] Kendall F., Heidelberger M, Dawson M. *J.Biol. Chem.*: 1937 (118) 61-69.
- [11] Comper W. D., Laurent T. Physiological function of connective tissue polysaccharides., *Physiol. Rev.*: 1978, Jan: 58 (1) 255-315.
- [12] Lapčík L., Bohdanecký M., Lapčík L., Bakoš D. Kyselina Hyaluronová: Struktura, vlastnosti a aplikace. *Chem. Listy* 85: 1991 (3) 281-299.
- [13] Meyer K., Weissman B. The structure of hyalobiuronic acid and of hyaluronic acid from umbilical cord. *J. Am. Chem. Soc.*: 1954 (76) 1753-1757.

- [14] Scott E. J., Cummings C., Brass A., Chen Y. Secondary and tertiary structures of hyaluronan in aqueous solution, investigated by rotary shadowing- electron microscopy and computer simulation. *Biochem.*: 1991 (274) 699-705.
- [15] Arnott S., Mitra A. K., Raghunathan S. *J. Mol. Biol.*; 1983 (169) 861.
- [16] Ogston, A. G., Phelps C. F. *Biochem. J.*: 1960 (78) 827.
- [17] Laurent T.C., Balazs E.A. Structure of hyaluronic acid. *In Chemistry and Molecular Biology of the Intercellular Matrix 2.*: 1970 Academic Press. 703–732.
- [18] Cowman M.K., Matsuoka S. Experimental approaches to hyaluronan structure. *Carbohydrate Research*: 2005 (340) 791–809.
- [19] Balazs E. A., Garg H. G., Hales C. A. Viscoelastic properties of hyaluronan and its therapeutic use. *Chemistry and Biology of hyaluronan*: 2004, p.415.
- [20] Preston B. N., Davies M., Ogston A. G. *Biochem. J.*: 1965 (96) 449-471.
- [21] Juhlin L. Hyaluronan in skin. *J. Intern Med.*: 1997 (242) 61–66.
- [22] Evanko S, Wight T. Intracellular hyaluronan. *In: Hyaluronan: synthesis, function, catabolism*: [online]. 2001 [cit. 2010-02-10] Dostupné z WWW: <<http://www.glycoforum.gr.jp/science/hyaluronan/HA20/HA20E.html>. Cited 30 Jul 2001>
- [23] Evanko S. E., Wight T. N. Intracellular Localization of Hyaluronan in Proliferating Cells, *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*: 1999 (47) 1331-1342.
- [24] Laurent T. C. The Chemistry, Biology and Medical Applications of Hyaluronan and its Derivatives. *Wenner-Gren International Series*: 1998 (72) Portland Press, London.
- [25] Prehm P. Hyaluronan. *In: Vandamme EJ, De Baets S, Steinbüchel A (eds) Biopolymers: biology, chemistry, biotechnology, applications.* 2000 (5) Polysaccharides I. Polysaccharides from prokaryotes. Wiley-VCH, Weinheim, pp 379–404.
- [26] Schiller J., Fuchs B., Arnhold J., Arnold K. Contribution of reactive oxygen species to cartilage degradation in rheumatic diseases: molecular pathways, diagnosis and potential therapeutic strategies. *Curr Med Chem.*: 2003 (10) 2123–2145.

- [27] Šoltés L., Mendichi R., Kogan G., Schiller J., Stankovská M., Arnhold J. Degradative action of reactive oxygen species on hyaluronan. *Biomacromolecules*: 2006 (7) 659–668.
- [28] Mendichi R, Šoltés L. Hyaluronan molecular weight and polydispersity in some commercial intra-articular injectable preparations and in synovial fluid. *Inflamm Res.*: 2002 (51) 115–116.
- [29] Milas M., Rinaudo M., Roure I., et al. Comparative behaviour of hyaluronan from bacterial and animal sources with cross-linked hyaluronan (hylan) in aqueous solution. *Biopolymers*: 2001 (59) 191-204.
- [30] Balazs E. A , Helfet T. B. The physical properties of synovial fluid and the special role of hyaluronic acid. *Disorders of the Knee*, Lippincott Company, Philadelphia 1974 63–75.
- [31] Boulnois G. J. Pneumococcal proteins and the pathogenesis of disease caused by *Streptococcus pneumoniae* . *J Gen Microbiol.*: 1992 (138) 249–259.
- [32] Berry A.M., Lock R.A., Thomas S.M., Rajan D.P., Hansman D., Paton J.C. Cloning and nucleotide sequence of the *Streptococcus pneumoniae* hyaluronidase gene and purification of the enzyme from recombinant *Escherichia coli* . *Infect Immun.*: 1994 (62) 1101–1108.
- [33] Birkhäuser B. Hyaluronan molecular weight and polydispersity in some commercial intra-articular injectable preparations and in synovial fluid. *Biomedical and Life Sciences*: 2001 (50) N.6; 294-299.
- [34] Anseth K.S., Bowman C.N., BrannonPeppas L. Mechanical properties of hydrogels and their experimental determination. *Biomaterials*: 1996 (17) 1647–1657.
- [35] Vercruyse K.P., Prestwich G. D., Crit. Rev. Ther. Drug. *Carrier Syst.*: 1998 (15) 513.
- [36] Liesegang T. J. Viscoelastic substances in ophthalmology. *Surv. Ophthalmol.*: 1990 (34) 268-293.
- [37] Maltese A., Borzacchiello A., Mayol L., Bucolo C., Maugeri F., Nicolais L., Ambrosio L. Novel polysaccharides-based viscoelastic formulations for ophthalmic surgery: rheological characterization. *Biomaterials*: 2006 (27) 5134–5142.

- [38] Balazs E.A., Denlinger J.L. Clinical uses of hyaluronan. *Ciba Foundation Symposium*: 1989 (143) 265-275.
- [39] Dahl L.B., Dahl I.M., Engstrom-Laurent A., Granath K. Concentration and molecular weight of sodium hyaluronate in synovial fluid from patients with rheumatoid arthritis and other arthropathies. *Ann Rheum Dis.*: 1985 (44) 817-822.
- [40] Fukuda K., Dan H., Takayama M., Kumano F., Saitoh M., Tanaka S. Hyaluronic acid increases proteoglycan synthesis in bovine articular cartilage in the presence of interleukin-1. *J Pharmacol Exp Ther.*: 1996 (277) 1672-1675.
- [41] Chong B.F., Blank L.M., McLaughlin R., Nielsen L. Microbial hyaluronic acid production. *Appl Microbiol Biotechnol.*: 2005 (66) 341–351.
- [42] Evanich J.D., Evanich C.J., Wright M.B., Rydlewicz J.A. Efficacy of intraarticular hyaluronic acid injections in knee osteoarthritis. *Clin Orthop.*: 2001 (390) 173–181.
- [43] Uthman I., Raynauld J.P., Haraoui B. Intra-articular therapy in osteoarthritis. *Postgraduate Medicine Journal*: 2003 (79) 449–453.
- [44] Wang C.T., Lin J., Chang C.J., Lin Y.T., Hon S.M. Therapeutics effects of hyaluronic acid on osteoarthritis of the knee. *The Journal of Bone and Joint Surgery – American*: 2004 (3) 538–545.
- [45] Wen D.Y. Intra-articular hyaluronic acid injections for knee osteoarthrosis. *American Family Physician*: 2000 (62) 565–570.
- [46] Butler J.E., Hammond T.H., Gray S.D. Gender-related differences of hyaluronic acid distribution in the human vocal fold. *Laryngoscope*: 2001 (111) 907–911.
- [47] Hertegard S., Hallen L., Laurent C., Lindstrom E., Olofsson K., Testad P., Dahlgvist A. Cross-linked hyaluronan used as augmentation substance for treatment of glottal insufficiency: safety aspects and vocal fold function. *Laryngoscope*: 2002 (112) 2211–2219.
- [48] Narins R.S., Brandt F., Leyden J., Lorenc Z.P., Rubin M., Smith S. A randomized, double-blind, multicenter comparison of the efficacy and tolerability of Restylane versus Zyplast for the correction of nasolabial folds. *Dermatol Surg.*: 2003 (29) 588–595.

- [49] Manuskiatti W., Maibach H. Hyaluronic acid and skin: wound healing and aging. *Int. J. Dermatol.*: 1996 (35) 539-544.
- [50] Lin K., Bartlett S.P., Matsuo K et al. Hyaluronic acid – filled mammary implants-an experimental study. *Plast Reconstr.Surg.*: 1994 (94) 306-315.
- [51] Moseley R., Walker M., Waddington R.J., Chen W.Y.J. Comparison of the antioxidant properties of wound dressing materials—carboxymethylcellulose, hyaluronan benzyl ester and hyaluronan, towards polymorphonuclear leukocyte-derived reactive oxygen species. *Biomaterials.*: 2003 (24) 1549–1557.
- [52] Chen W.Y.J., Abatangelo G. Functions of hyaluronan in wound repair. *Wound Repair Regen.*: 1999 (7) 79-89.
- [53] Piaggese A. Research development the pathogenesis of neuropathic diabetic foot ulceration. *Curr Diab. Rep.*: 2004 (4) 419-423.
- [54] Ahmed N. Advanced glycation endproducts-role in pathology of diabetic complications. *Diabetes Res. Clin. Pract.*: 2005 (67) 3-21.
- [55] Sobotka L., Velebný V., Šmahelová A., Kusalová M. Komplex hyaluronanu a jodu-Hyiodine[®] - nová metoda při terapii diabetických defektů. 7. celostátní diabetologické symposium: 2006 (52) 167-172.
- [56] Ropponen K., Tammi M., Parkkinen J., Eskelinen M., Tammi R., Lipponen P., Agren U., Alhava E., Kosma V. M. *Cancer Res.*: 1998 (58) 342-347.
- [57] Lokeshwar V. B., Obek C., Pham H. T., Wei D., Young M. J., Duncan R. C., Soloway M. S., Block M. L. *J. Urol.*: 2000 (163) 348-356.
- [58] Phillips G. O., Kennedy J. F. Hyaluronan 2000. *Woodhead Publishing, Cambridge UK*: 2001.
- [59] Turley E. A., Noble P. W., Bourgiugnon L. Y. W. *J. Biol. Chem.*: 2000 (277) 4589-4592.
- [60] Leach J.B., Schmidt C.E. Hyaluronan. *Encyclopedia of Biomaterials and Biomedical Engineering*: 2004 779–789.
- [61] Bell E., *Tissue, Eng.*: 1995 (1) 163.
- [62] Gilbert P., Moore L.E. Cationic antiseptics: diversity of action under common epithet. *J Appl Microbiol.*: 2005 (99) 703-715.

- [63] Benzalkonium chloride: [online]. 2009 [cit. 2010-02-21] Dostupný z WWW: <<http://chemicalland21.com/lifescience/phar/BENZALKONIUM%CHLORIDE.htm>>
- [64] Benzalkónium chlorid. [online]. 2008 [cit. 2010-02-21]. Dostupný z WWW: <www.medic.8.com/medicines/Benzalkonium-chloride.html>.
- [65] Pirkl S. Reologie a reometrie kapalin, Skripta, *Univerzita Pardubice*.
- [66] Wein, Ondřej. Úvod do reologie. *Malé Centrum*:1996, 84.
- [67] Veselský J. Fyzika. *STU v Bratislave*: 2006.
- [68] Měření viskozity. Dostupný z WWW: <<http://docs.google.com/viewer?a=v&q=cache:mnYn2h2-VYsJ:www.vscht.cz/ufmt/cs/pomucky/uhrovah/skripta/Uloha%25203.pdf+M%C4%9A%C5%98EN%C3%8D+VISKOZITY&hl=cs&gl=cz&sig=AHIEtbRN8THYZAA8h29tZadTPeNJzL5JnA>>
- [69] Maňas M., Vlček J. Aplikovaná reologie. *Univerzita T. Bati ve Zlíně*: 2001.
- [70] Barnes H. A., Hutton J. F., Walters K. An Introduction to Rheology, *Elsevier, Amsterdam*: 1989.
- [71] Coleman B. D., Merkovitz H., Noll W. Viscometric Flows of Non-Newtonian Fluids, *Springer, Berlin*, 1966.
- [72] Dzianik, František, Reologické vlastnosti látek: 2008, 1-23.
- [73] Barnes H. A. A Review of the Slip (Wall Depletion) of Polymer Solutions, Emulsions and Particle Suspensions in Viscometers: its Cause, Charakter and Cure. *Journal of Non-Newtonian Fluid Mechanics*: 1995 (56) 221-251.
- [74] Wein O., Tovchigrechko V. Rotational Rheometry under Presence of Wall Slip Effects. *Journal of Rheology*: 1992 (36) 821-844.
- [75] Stanovení viskozity roztoků. Laboratorní práce, VŠCHT [online] 2010 [cit. 2010-03-29]. Dostupný z WWW: <http://www.vscht.cz/met/stranky/vyuka/labcv/labov/res_stanoveni_viskozity_roztoku/index.htm>.
- [76] Podzimek S., Hermanova M., Bilerova H., Bezakova Z. Solution Properties of Hyaluronic Acid and Comparison of SEC-MALS-VIS Data with Off-Line Capillary Viscometry. *Journal of Applied Polymer Science*.2010 (116) 3013-3020.
- [77] Meissner B., Zilvar V. Fyzika polymerů, 1987, *SNTL*.

- [78] Stanovení viskozity kapalin. Skripta Technickej fakulty, Praha [online] 2008 [cit. 2010-04-16]. Dostupný z WWW: <<http://209.85.129.132/search?q=cache:vQD45KzvoXgJ:wwwold.tf.czu.cz/scripta/u20a.doc+%C3%9Aloha+20+a&cd=2&hl=cs&ct=clnk&gl=cz>>
- [79] Zusková I. a kolektiv. Praktikum z fyzikálnej chémie. *Univerzita Karlova, Přírodovědecká fakulta*. Praha: 2009.
- [80] Laboratorní práce z biofyziky: Měření viskozity. [online]. [cit. 2010-03-10]. Dostupný z WWW. <http://docs.google.com/viewer?a=v&q=cache:-DWAEng8wGsJ:is.muni.cz/th/150590/prif_b/Priloha_MT.pdf+Ostwald%C5%AFv+viskozimetr&hl=cs&gl=cz&pid=bl&srcid=ADGEEsi8jWL5TcxnlGjsXf22BMcvIc7h24_AXFDAVx1J7-EClelRLF57GNDCNixuV7md-5ONLbtgTXruTAY7XZBIYcv5_TUPZ5uQEf-M5LfRjat07nkn2SaoGkBGkucFgyqxerm_yuaM&sig=AHIEtbS_zgYJmNSmdT338t_vvbV2Lj-NQw>
- [81] Gřundělová L. Diplomová práce: Chování klubek Hyaluronanu v roztocích s přísadkou kvartérních solí. *UTB, Fakulta technologická*, 2010.

ZOZNAM POUŽITÝCH SYMBOLOV A SKRATIEK

HA	Kyselina hyalurónová
MDa	MegaDalton
-COOH	Karboxylová skupina
CD44	Povrch bunky glykoproteínu
RHAMM	Receptor pre kyselinu hyalurónovú sprostredkujúci pohyblivosť
$du/dx, \dot{\gamma}$	Rýchlostný gradient (s^{-1}), Šmyková rýchlosť (s^{-1})
η	Dynamický viskozita ($Pa \cdot s$)
τ	Šmykové napätie (Chyba! Objekty sa nedajú vytvoriť úpravami kódov polí.)
ν	Kinematická viskozita (Chyba! Objekty sa nedajú vytvoriť úpravami kódov polí.)
ρ	Hustota (g/cm^3)
N_1, N_2	Normálové pnutia
Δp	Tlakový rozdiel
h	Výška (m)
g	Gravitačné zrýchlenie (m/s^2)
\bar{v}	Stredná rýchlosť prúdenia kvapaliny
F	Odpor kvapaliny
r	Polomer
K	Koeficient konzistencie
n	Index toku taveniny
η_0	Dynamický viskozita rozpúšťadla
t	Čas prietoku roztoku
t_0	Čas prietoku rozpúšťadla
η_{rel}	Relatívna viskozita

η_{sp}	Špecifická viskozita
η_{red}	Redukovaná viskozita
c	Molárna, hmotnostná koncentrácia ($mol / dm^3, g / cm^3$)
G	Modul pružnosti
δ	Relaxačná doba
A	Konštanta viskozimetra (mm^2 / s^2)
ρ_K	Hustota guľky (g / cm^3)
α	Uhol naklonenia
V	Objem roztoku (l, dm^3)
K	Konštanta guľky (v Stokesovej rovnici)
ω	Uhlová rýchlosť (rad / s)
M	Moment sily
B	Prístrojová konštanta
Na_2HPO_4	Hydrogenfosforečnan Disodný
NaH_2PO_4	Dihydrogenfosforečnan Sodný
$NaCl$	Chlorid sodný
M	Molárna hmotnosť (g / mol)
m	Hmotnosť (g)
BAC	Benzalkónium chlorid
n	Látkové množstvo (mol)
N	Počet častíc
N_A	Avogadrova konštanta ($6,022 \cdot 10^{23} mol^{-1}$)
k_H	Hugginsov koeficient

ZOZNAM OBRÁZKOV

Obr. 1 a. Primárna štruktúra HA, b. Sekundárna a Terciárna štruktúra, c. Schematická sieť HA ako výsledok intermolekulových agregácií [17].....	16
Obr. 2 Znázornenie striedajúcej časti hydrofilného a hydrofóbneho povrchu [7]	16
Obr. 3 Príklad použitia HA pri operácií: vkladanie vnútroočnej šošovky pri injektovaní HA [21].....	21
Obr. 4 Štruktúrny vzorec benzalkónia chloridu [63]	27
Obr. 5 Znázornenie toku kvapaliny medzi dvoma paralelnými doskami [65].....	29
Obr. 6 Toková a viskozitná krivka newtonovskej kvapaliny [65]	30
Obr. 7 Laminárne prúdenie kvapaliny v trubici [68].	32
Obr. 8 Tokové a viskózne charakteristiky niektorých nenewtonovských látok, 1- newtonovská látka, 2- štruktúrne viskózna látka, 3- dilatantná látka, 4- pseudoplastická látka, 5- binghamská látka [65].....	34
Obr. 9 Príklady výtokových viskozimetrov, a. Ubbelohdeho, c. s nastaviteľným tlakovým spádom [78].....	40
Obr. 10 Zobrazenie Ubbelohdeho viskozimetru [79]	40
Obr. 11 Znázornenie rotačného viskozimetra typu valec-valec [78]	43
Obr. 12 Znázornenie rotačného viskozimetra typu kužel- doska [78]	44

ZOZNAM TABULIEK

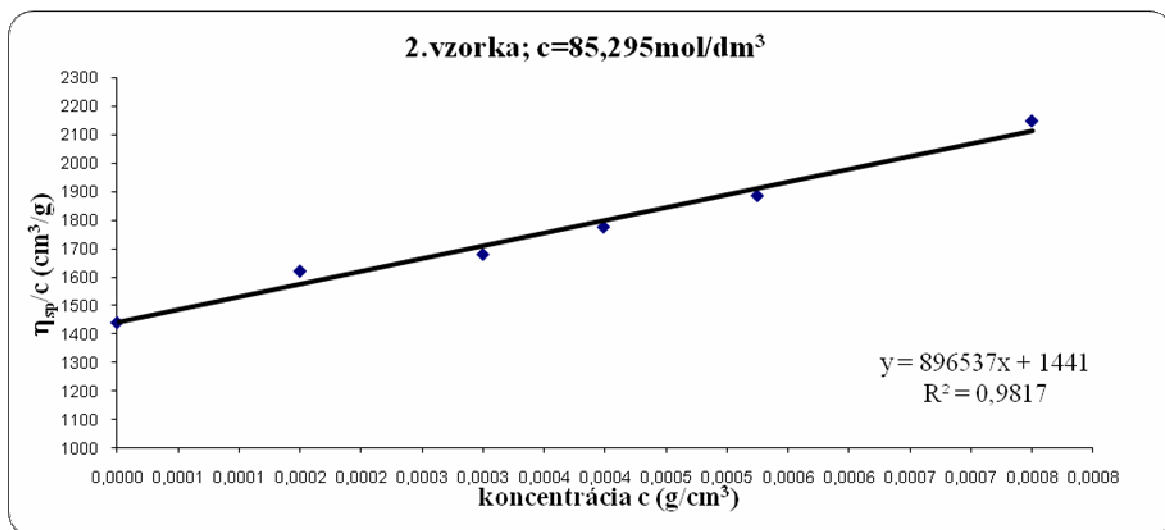
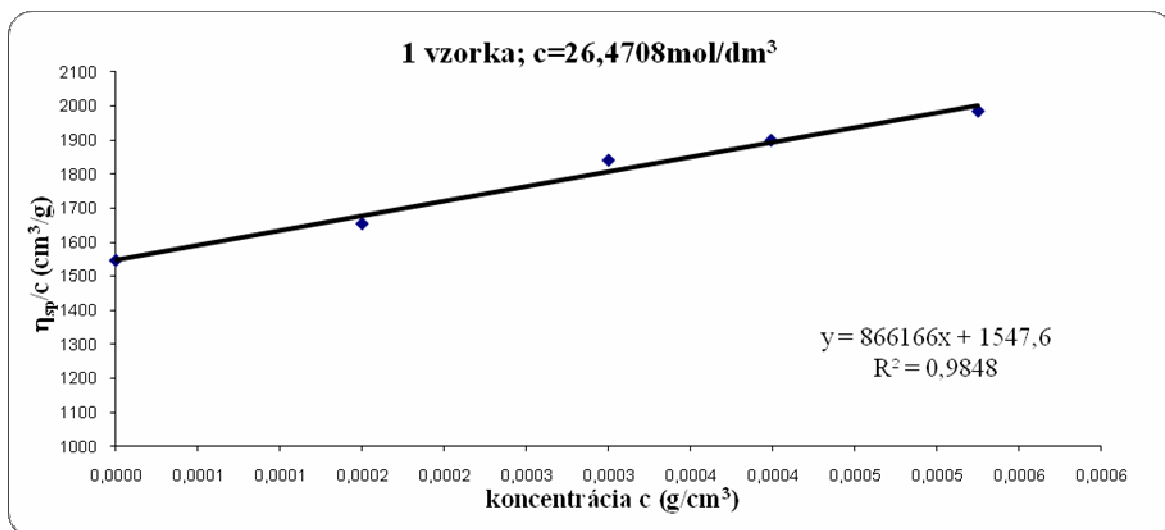
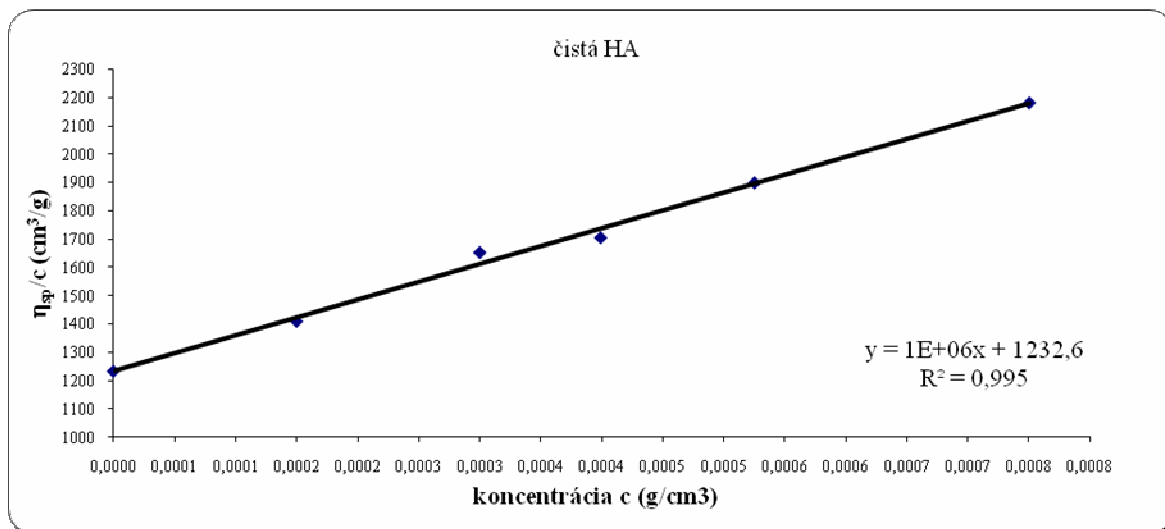
Tab. 1 Výpočty molárnej koncentrácie a počtu častíc BAC k HA pri viskozimetrických meraniach	49
Tab. 2 Výpočty molárnej koncentrácie a počtu častíc BAC k HA pri reometrických	51
Tab. 3 Namerané a vypočítané hodnoty kinematickej viskozity u 6 rôznych roztokov HA a čistej HA	54
Tab. 4 Namerané a vypočítané hodnoty piatich vzoriek s prídavkom BAC a čistá HA pri piatich rôznych koncentrácií	56
Tab. 5 Výsledky limitného viskozitného čísla	58

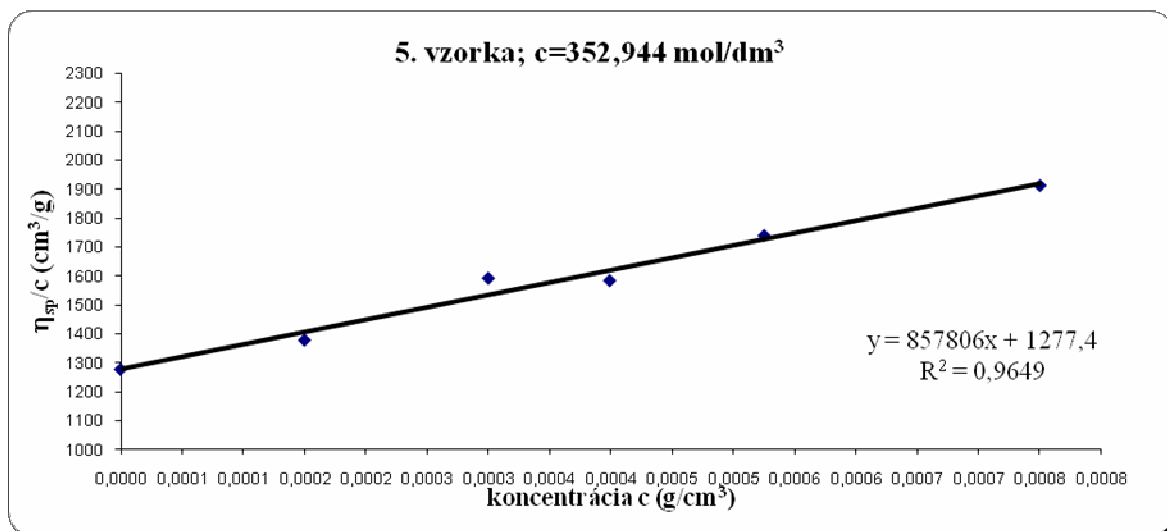
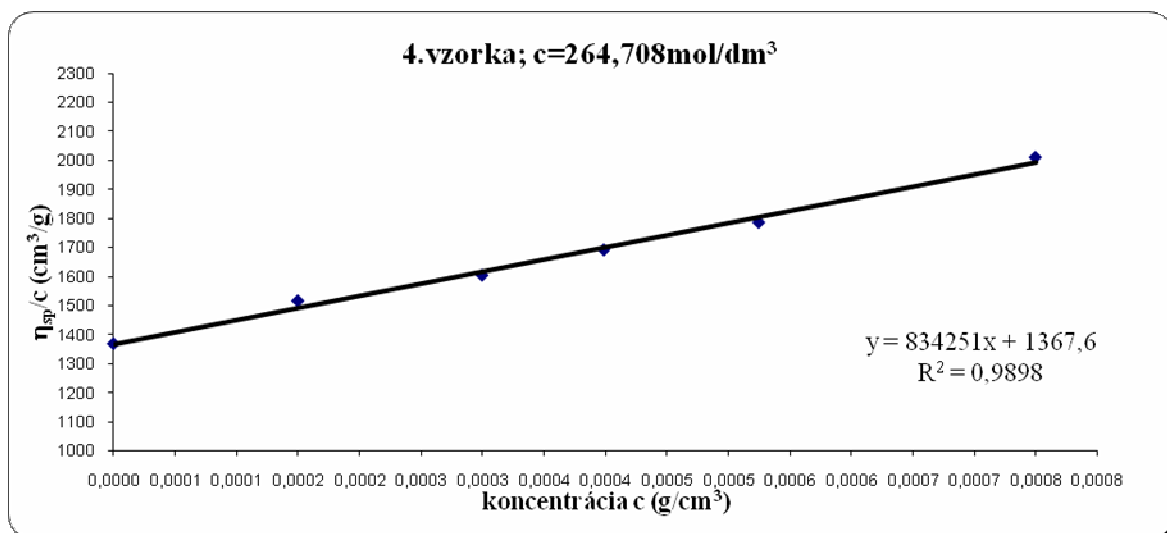
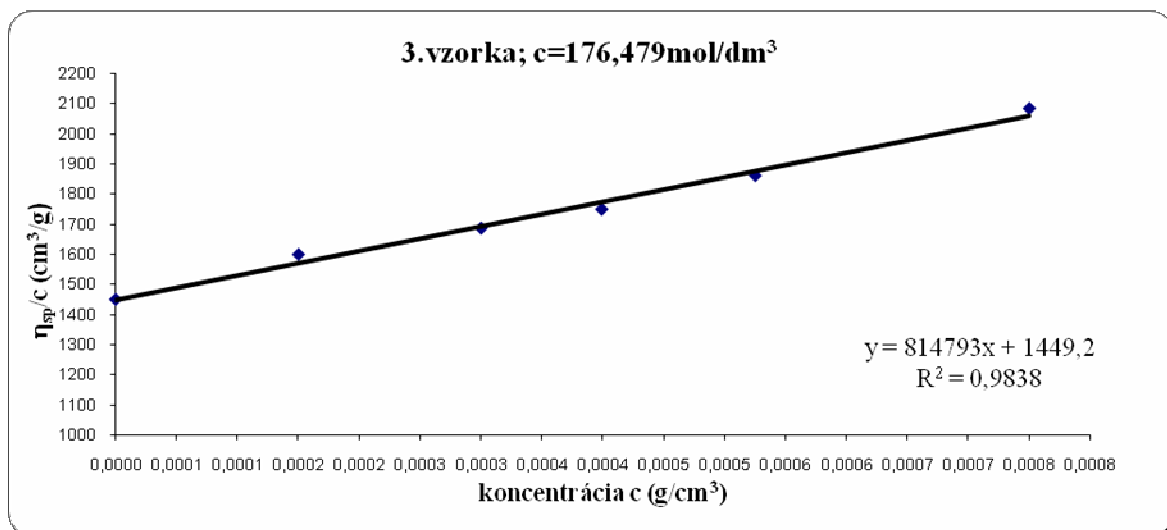
ZOZNAM PRÍLOH

Príloha P I: Grafy limitného viskozitného čísla

Príloha P II: Tabuľka výpočtov na lim. číslo

PRÍLOHA P I: GRAFY LIMITNÉHO VISKOZITNÉHO ČÍSLA





PRÍLOHA P II. TABUĽKA VÝPOČTOV NA LIM.ČÍSLO

hmotnostná koncentrácia		$c=0,00075$ g/cm^3	$c=0,000525$ g/cm^3	$c=0,00039$ g/cm^3	$c=0,0003$ g/cm^3	$c=0,00015$ g/cm^3
čistá HA	čas (s)	663,14 ($\pm 3,24$)	502,29 ($\pm 1,60$)	422,57 ($\pm 2,37$)	376,14 ($\pm 0,90$)	304,57 ($\pm 0,53$)
	η_{rel}	2,64	2,00	1,68	1,50	1,21
	η_{spe}	1,64	1,00	0,68	0,50	0,21
	η_{red}	2183,33	1900,38	1706,02	1653,33	1409,33

hmotnostná koncentrácia		$c=0,00075$ g/cm^3	$c=0,000525$ g/cm^3	$c=0,00039$ g/cm^3	$c=0,0003$ g/cm^3	$c=0,00015$ g/cm^3
1	čas (s)	691,86 ($\pm 1,77$)	513,43 ($\pm 1,62$)	442 (± 1)	390,29 ($\pm 0,95$)	313,86 ($\pm 0,90$)
	η_{rel}	2,75	2,04	1,76	1,55	1,25
	η_{spe}	1,75	1,04	0,76	0,55	0,25
	η_{red}	2335,60	1984,76	1899,50	1841,00	1655,33

hmotnostná koncentrácia		$c=0,00075$ g/cm^3	$c=0,000525$ g/cm^3	$c=0,00039$ g/cm^3	$c=0,0003$ g/cm^3	$c=0,00015$ g/cm^3
2	čas (s)	656,29 ($\pm 0,95$)	500,29 ($\pm 0,96$)	429,57 ($\pm 0,79$)	378,14 ($\pm 0,69$)	312,57 ($\pm 0,53$)
	η_{rel}	2,57	1,96	1,68	1,48	1,22
	η_{spe}	1,57	0,96	0,68	0,48	0,22
	η_{red}	2146,93	1885,33	1775,69	1680,00	1621,33

hmotnostná koncentrácia		$c=0,00075$ g/cm^3	$c=0,000525$ g/cm^3	$c=0,00039$ g/cm^3	$c=0,0003$ g/cm^3	$c=0,00015$ g/cm^3
3	čas (s)	644,29 ($\pm 0,76$)	497 ($\pm 0,58$)	426,86 ($\pm 0,90$)	378,57 ($\pm 0,98$)	311,71 ($\pm 0,76$)
	η_{rel}	2,56	1,98	1,70	1,51	1,24
	η_{spe}	1,56	0,98	0,70	0,51	0,24
	η_{red}	2083,33	1860,38	1748,62	1685,67	1598,67

hmotnostná koncentrácia		$c=0,00075$ g/cm^3	$c=0,000525$ g/cm^3	$c=0,00039$ g/cm^3	$c=0,0003$ g/cm^3	$c=0,00015$ g/cm^3
4	čas (s)	630,86 ($\pm 0,90$)	487,29 ($\pm 0,95$)	421,14 ($\pm 0,69$)	372,43 ($\pm 0,79$)	308,57 ($\pm 0,77$)
	η_{rel}	2,51	1,94	1,68	1,48	1,23
	η_{spe}	1,51	0,94	0,68	0,48	0,23
	η_{red}	2012,13	1786,86	1691,73	1604,00	1515,33

hmotnostná koncentrácia		$c=0,00075$ g/cm^3	$c=0,000525$ g/cm^3	$c=0,00039$ g/cm^3	$c=0,0003$ g/cm^3	$c=0,00015$ g/cm^3
5	čas (s)	622,29 ($\pm 1,98$)	481,14 ($\pm 1,07$)	417,14 ($\pm 0,38$)	371,57 ($\pm 1,27$)	308,43 ($\pm 1,13$)
	η_{rel}	2,43	1,91	1,63	1,48	1,21
	η_{spe}	1,43	0,91	0,63	0,48	0,21
	η_{red}	1913,20	1740,19	1584,46	1592,67	1378,67

