

# Charakterizace hyaluronanu pomocí gelové permeační chromatografie

Bc. Zuzana Krpalová

---

Diplomová práce  
2014



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně  
Fakulta technologická

---

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně  
Fakulta technologická  
Ústav technologie tuků, tenzidů a kosmetiky  
akademický rok: 2013/2014

## ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: Bc. Zuzana Křpalová  
Osobní číslo: T12411  
Studijní program: N2901 Chemie a technologie potravin  
Studijní obor: Technologie a ekonomika výroby tuků, detergentů a kosmetiky  
Forma studia: prezenční  
Téma práce: Charakterizace hyaluronanu pomocí gelové permeační chromatografie

Zásady pro vypracování:

### I. Teoretická část

1. V teoretické části vypracujte literární rešerši na zadané téma. Charakterizujte hyaluronan, popište jeho strukturu, chemické a fyzikální vlastnosti a chování v roztocích. Rovněž se věnujte metodě gelové permeační chromatografie (GPC), jejímu principu, popisu, přístrojovému vybavení a možnostem využití pro stanovení molární hmotnosti hyaluronanu.

### II. Praktická část

1. V experimentální části nalezněte chromatografické podmínky vhodné pro charakterizaci hyaluronanu pomocí metody GPC. Metodu prakticky ověřte stanovením molární hmotnosti a distribuce molárních hmotností komerčních vzorků. Získané výsledky zpracujte, přehledně uspořádejte a diskutujte.

Rozsah diplomové práce:

Rozsah příloh:

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná/elektronická**

Seznam odborné literatury:

[1] LAPČÍK, L., et al. Hyaluronan: Preparation, Structure, Properties, and Applications. Chem. Rev., 1998, vol. 98, no. 8, p. 2663-2684.

[2] COWMAN, M.K. a S. MATSUOKA. Experimental Approaches to Hyaluronan Structure. Carbohydrate Research. 2005, vol. 340, no. 5, p. 791-809. ISSN:0008-6215.

[3] MORI, S. a H.G. BARTH. Size exclusion chromatography. Berlin: Springer, 1999, 234 s., ISBN 3-540-65635-9.

[4] CHURÁČEK, J. Analytická separace látek. 1. vyd. Praha: Státní nakladatelství technické literatury, 1990, 384 s. ISBN 8003005698.

Vedoucí diplomové práce: **doc. Ing. Věra Kašpárková, CSc.**  
Ústav technologie tuků, tenzidů a kosmetiky

Datum zadání diplomové práce: **10. února 2014**

Termín odevzdání diplomové práce: **26. května 2014**

Ve Zlíně dne 10. února 2014

  
doc. Ing. Roman Čermák, Ph.D.  
*děkan*



  
Ing. Martina Černeková, Ph.D.  
*ředitel ústavu*

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 <sup>1)</sup>;
- 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 <sup>2)</sup>;
- beru na vědomí, že podle § 60 <sup>3)</sup> 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 <sup>3)</sup> 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 .....

.....

---

<sup>1)</sup> 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 nevydělečně 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.

<sup>2)</sup> 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 vzdělávacímu zařízení (školní dílo).

<sup>3)</sup> 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.

## **ABSTRAKT**

Diplomová práce se zabývá stanovením molekulové hmotnosti a distribuce molekulových hmotností komerčních vzorků hyaluronanu. K tomuto účelu byla použita metoda gelové permeační chromatografie (GPC). Pozornost byla věnována nalezení chromatografických podmínek vhodných pro charakterizaci hyaluronanu a posouzení vlivu složení mobilní fáze na chromatografickou separaci tohoto biopolymeru. Bylo zjištěno, že chování vzorku hyaluronanu a následně hodnoty molekulových hmotností  $M_w$  a  $M_n$  jsou závislé na typu soli obsažené v mobilní fázi i na typu standardu použitého pro kalibraci chromatografické kolony.

Klíčová slova: Hyaluronan, gelová permeační chromatografie, mobilní fáze

## **ABSTRACT**

In this graduation thesis, determination of the molecular weight and molecular weight distribution of commercial samples of hyaluronan was performed. For this purpose, gel permeation chromatography (GPC) was employed. The thesis is also focused on finding the chromatographic conditions suitable for the characterization of hyaluronan by GPC and on the assessment of the influence of mobile phase composition on the chromatographic separation of this biopolymer. It was found out that the behaviour of the hyaluronan and values of  $M_w$  and  $M_n$  are dependent on the type of salts contained in the mobile phase and on the type of standard used for the calibration of the chromatographic column.

Keywords: Hyaluronan, gel permeation chromatography, mobile phase

Na tomto místě bych chtěla poděkovat vedoucí mé diplomové práce paní doc. Ing. Věře Kašpárkové, CSc. za její odborné vedení, cenné rady, připomínky a čas, který mé práci věnovala.

Ráda bych také poděkovala své rodině, která mě ve studiu podporuje.

Prohlašuji, že odevzdaná verze diplomové práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou totožné. Dále prohlašuji, že jsem na diplomové práci pracovala samostatně a použitou literaturu jsem citovala. V případě publikace výsledků, je-li to uvedeno na základě licenční smlouvy, budu uvedena jako spoluautor.

Ve Zlíně

.....

Podpis studenta

# OBSAH

<b>ÚVOD</b> .....	<b>10</b>
<b>I TEORETICKÁ ČÁST</b> .....	<b>11</b>
<b>1 KYSELINA HYALURONOVÁ</b> .....	<b>12</b>
1.1 STRUKTURA HA .....	12
1.2 PŘÍPRAVA HA .....	13
1.3 VLASTNOSTI HA .....	14
1.3.1 Chování HA v roztoku.....	15
1.3.2 Reologické vlastnosti .....	17
1.4 HYDROFOBNĚ MODIFIKOVANÁ HA .....	17
1.5 BIOLOGICKÉ FUNKCE HA .....	18
1.6 APLIKACE HA .....	18
<b>2 METODY PRO CHARAKTERIZACI HA V ROZTOCÍCH</b> .....	<b>21</b>
2.1 STŘEDNÍ MOLEKULOVÁ HMOTNOST .....	21
2.2 VISKOZIMETRIE .....	22
2.2.1 Hugginsova a Kramerova rovnice .....	24
2.2.2 Mark-Houwinkova rovnice .....	25
2.2.3 Mark-Houwinkova rovnice pro HA .....	26
2.2.4 Přístroje .....	27
2.3 ROZPTYL SVĚTLA .....	28
2.3.1 Měření rozptylu světla u HA .....	29
2.3.2 Přístroje .....	30
<b>3 GELOVÁ PERMEAČNÍ CHROMATOGRAFIE (GPC)</b> .....	<b>31</b>
3.1 PRINCIP SEPARACE .....	31
3.2 KOLONY .....	32
3.2.1 Gely na bázi dextranu.....	33
3.2.2 Gely na bázi agarózy .....	33
3.2.3 Gely na bázi polyakrylamidu a metakrylátu.....	33
3.2.4 Gely na bázi polystyrénu .....	33
3.2.5 Anorganické gely .....	34
3.3 DETEKTORY .....	34
3.3.1 Refraktometrický detektor (refraktometr) .....	34
3.3.2 Viskozitní detektor (viskozimetr) .....	35
3.4 MOBILNÍ FÁZE.....	36
3.4.1 Jednoduchá mobilní fáze.....	36
3.4.2 Smíšená (vícesložková) mobilní fáze.....	37
3.4.3 Výběr mobilní fáze.....	37
3.4.4 „Non-size exclusion“ efekt .....	37
3.5 KALIBRACE U GPC.....	39
3.5.1 Přímá kalibrace úzkými frakcemi .....	39



3.5.2	Univerzální kalibrace .....	40
<b>4</b>	<b>ODBORNÉ STUDIE ŘEŠÍCÍ PROBLEMATIKU CHARAKTERIZACE HYALURONANU POMOCÍ GPC.....</b>	<b>42</b>
<b>5</b>	<b>CÍL DIPLOMOVÉ PRÁCE .....</b>	<b>45</b>
<b>II</b>	<b>PRAKTICKÁ ČÁST .....</b>	<b>46</b>
<b>6</b>	<b>MATERIÁLY A PŘÍSTROJE.....</b>	<b>47</b>
6.1	VZORKY HYALURONANU .....	47
6.2	CHEMIKÁLIE.....	47
6.3	STANDARDY PRO KALIBRACI GPC .....	48
6.4	PŘÍSTROJE .....	49
6.4.1	Gelový permeační chromatograf PL-GPC 50 .....	49
6.4.2	Analytický vysokoúčinný kapalinový chromatograf (Shimadzu HPLC).....	50
6.4.3	Další použité přístroje .....	51
6.5	PŘÍPRAVA VZORKŮ PRO MĚŘENÍ .....	52
6.6	MOBILNÍ FÁZE.....	53
<b>7</b>	<b>VÝSLEDKY A DISKUZE .....</b>	<b>55</b>
7.1	VOLBA MOBILNÍ FÁZE .....	55
7.2	REPRODUKOVATELNOST ANALÝZY.....	56
7.3	STANOVENÍ MOLEKULOVÉ HMOTNOSTI NAHY – SHIMADZU HPLC .....	59
7.3.1	Vliv použité MF na separaci standardů.....	59
7.3.2	Molekulová hmotnost komerčních vzorků hyaluronanu.....	67
7.3.3	Vliv rychlosti průtoku mobilní fáze .....	74
7.3.4	Vliv iontů Hofmeisterovy řady na retenční chování vzorků hyaluronanu.....	75
7.4	STANOVENÍ MOLEKULOVÉ HMOTNOSTI NAHY – PL-GPC 50 .....	77
7.4.1	Vliv použité MF na separaci standardů.....	77
7.4.2	Molekulová hmotnost komerčních vzorků hyaluronanu.....	81
7.4.3	Distribuční křivky pro vzorky hyaluronanu .....	84
7.4.4	Vliv iontové síly na separaci vzorku .....	87
	<b>ZÁVĚR.....</b>	<b>89</b>
	<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY .....</b>	<b>91</b>
	<b>SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK .....</b>	<b>97</b>
	<b>SEZNAM OBRÁZKŮ .....</b>	<b>99</b>
	<b>SEZNAM TABULEK.....</b>	<b>102</b>
	<b>SEZNAM PŘÍLOH.....</b>	<b>103</b>

## ÚVOD

Kyselina hyaluronová (HA) je významný polysacharid, který se skládá z opakujících se disacharidových jednotek N-acetyl-D-glukosaminu a kyseliny D-glukuronové. Molekula HA se může vyskytovat jak v kyselé formě jako kyselina hyaluronová, tak může vytvářet i soli (hyaluronany). Dříve se pro přípravu HA používaly biologické metody, využívající živočišné tkáně, ale kvůli možnému riziku kontaminace konečného produktu surovinou živočišného původu se od biologických postupů ustoupilo. V posledních letech se HA získává převážně biotechnologickými procesy. U člověka se HA vyskytuje např. v kloubní chrupavce, synoviální tekutině, pokožce, extracelulární matrix a očním sklivci. Je důležitou složkou mezibuněčné hmoty, kde udržuje optimální vlhkost a brání nadměrnému tření. Kromě regeneračních a hydratačních účinků byla prokázána i její schopnost vázat vodu. Díky svým významným biologickým funkcím se HA používá v řadě klinických aplikací, přidává se do očních či nosních kapek a v současné době našla uplatnění i v rozvíjejícím se oboru tkáňového inženýrství a biomateriálů. Pro svou schopnost zpomalovat projevy stárnutí a obnovovat elasticitu pokožky se stala významnou kosmetickou surovinou používanou celosvětovými kosmetickými značkami.

Gelová permeační chromatografie (GPC) je typem speciální kolonové chromatografie, která je využívána v řadě analýz a uplatňuje se rovněž při stanovení molekulové hmotnosti a distribuce molekulových hmotností polymerů. Pomocí GPC, na rozdíl od jiných chromatografických metod, lze analyzovat molekuly lišící se svými rozměry. Tato metoda umožňuje separaci látek nízko- i vysokomolekulárních s molekulovou hmotností v rozmezí od  $10^2$  do  $10^7$  g.mol<sup>-1</sup>. Podmínkou však je jejich rozpustnost ve vhodném rozpouštědle.

Cílem diplomové práce je provést studie vedoucí k nalezení chromatografických podmínek vhodných ke stanovení molekulové hmotnosti a distribuce molekulových hmotností komerčních vzorků hyaluronanu. K tomuto účelu je použita metoda GPC využívající refraktometrický a viskozitní detektor. Práce se věnuje sledování vlivu složení mobilní fáze na kvalitu separace s cílem vybrat k charakterizaci hyaluronanu nejvhodnější mobilní fázi, jsou testovány rovněž podmínky rozpouštění a přípravy jak vzorků hyaluronanu, tak standardů použitých pro kalibraci přístroje.

## **I. TEORETICKÁ ČÁST**

## 1 KYSELINA HYALURONOVÁ

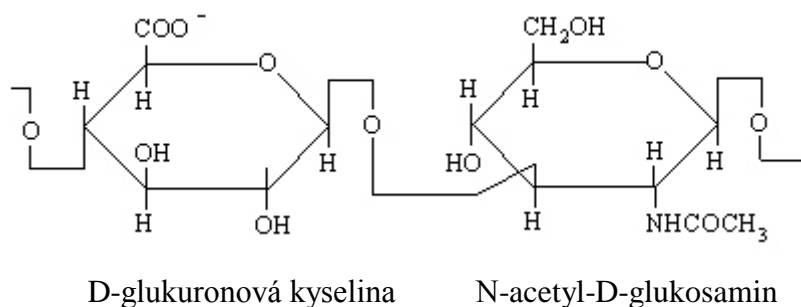
Kyselina hyaluronová (HA) je významný polysacharid, patřící do skupiny glykosaminoglykanů. Při její izolaci bylo zjištěno, že se za fyziologických podmínek chová jako sodná sůl (hyaluronan sodný) a molekula HA se tedy může vyskytovat jak v kyselé formě jako kyselina hyaluronová, tak může vytvářet i soli, které v tkáních převažují [1, s. 398-399].

HA se nachází v řadě tkání, u člověka se vyskytuje např. v kloubní chrupavce, synoviální tekutině, pokožce, extracelulární matrix a očním sklivci. Je také důležitou složkou mezi buněčné hmoty, kde udržuje optimální vlhkost a brání nežádoucímu tření. Má řadu výjimečných vlastností. Byly například prokázány její významné regenerační a hydratační účinky a je rovněž známa svou schopností vázat vodu. Tyto vlastnosti ji předurčují k tomu, že našla uplatnění v oční chirurgii, při artroskopických operacích, při terapii močové inkontinence, při osteoartróze, při endoskopických operacích a přidává se i do očních nebo nosních kapek. Díky svým viskoelastickým schopnostem snižuje pooperační přilnavost tkání, urychluje hojení ran a zánětů nejen na kůži, ale i na epitelu děložního čípku a v dutině ústní. HA je rovněž významnou kosmetickou surovinou a je známa její schopnost obnovovat pružnost pokožky a redukovat vrásky [1, s. 405-407], [2, s. 2677-2678], [3, s. 76], [4, s. 12].

### 1.1 Struktura HA

Struktura kyseliny hyaluronové byla popsána již v 50. letech minulého století. Po chemické stránce se jedná o záporně nabitý, lineární glykosaminoglykan tvořený opakující se disacharidovou jednotkou složenou z  $\beta(1,3)$ -D-glukuronové kyseliny a  $\beta(1,4)$ -N-acetyl-D-glukosaminu v poměru 1:1 [1, s. 399]. Každý z monomerů dále ve své struktuře obsahuje nepolární vodíkové atomy, které jsou umístěny ve stericky méně příznivé axiální poloze, a polárnější postranní řetězce, tvořené objemnějšími skupinami (hydroxylovými, karboxylovými), které jsou ve stericky výhodnější ekvatoriální pozici. Toto uspořádání přispívá k hydrofobně-hydrofilnímu charakteru molekuly HA a k její energetické stabilitě, která pak ovlivňuje chování kyseliny hyaluronové ve vodných roztocích [5, s. 699]. Konformace HA v pevném stavu stanovená pomocí difrakce Rentgenova záření [6, s. 792] a rentgenová analýza potvrdily, že soli HA mohou tvořit nataženou levotočivou jednovláknennou šroubovici se třemi disacharidovými jednotkami na jednu otáčku [7, s. 281].

Molekulová hmotnost řetězců kyseliny hyaluronové se pohybuje v rozmezí  $0.2 - 10 \cdot 10^6 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ , přičemž nejčastější molekulovou hmotností je  $2 - 5 \cdot 10^6 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$  [1, s. 399], [3, s. 75]. Díky tomu, že HA obsahuje zbytky kyseliny glukuronové, je schopna navázat různé kationy, jako je například  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  a  $\text{Ca}^{2+}$  [4, s. 16].



Obr. 1. Chemická struktura kyseliny hyaluronové [1]

Makromolekulu HA je možné popsat pomocí její primární, sekundární a terciární struktury.

Primární struktura, jak již bylo popsáno výše, se skládá ze střídajících se disacharidových jednotek D-glukuronové kyseliny a N-acetyl-D-glukosaminu s až pěti vodíkovými vazbami existujícími mezi dvěma sousedními disacharidy. Sekundární strukturu tvoří pásová dvojitá šroubovice, která je tvořena stočenými disacharidovými jednotkami, které jsou vůči sobě pootočený o úhel  $180^\circ$ . Terciární struktura je stabilizována interakcemi hydrofobní části a přítomností intramolekulárních vodíkových vazeb [8, s. 15]. Další zdroje [9] rovněž uvádí, že HA může být popsána z hlediska složité kvartérní i vyšší struktury, jejíž vznik je podmíněn superpozicí elektrostatických repulzí ovlivňovaných iontovou silou, či pH prostředí [9, s. 286-287].

## 1.2 Příprava HA

Kyselina hyaluronová je součástí téměř všech tkání savců, odkud je ji možno izolovat [9, s. 281]. Dříve se proto pro přípravu HA používaly především biologické zdroje, ale jelikož byl tento způsob přípravy velmi náročný a hrozilo při něm riziko možné kontaminace získané HA výchozí surovinou živočišného původu, ustoupilo se od něj. V posledních letech je HA získávána především moderními biotechnologickými postupy [10].

První známá metoda izolace a čištění HA pro farmaceutické účely je popsána v publikaci [2, s. 2663-2665], kde byla použita extrakční metoda. Ta spočívala ve zmrazení biologické suroviny (pupeční šňůry, popř. kohoutích hřebínků), kterým došlo k rozrušení buněčných stěn ve zpracovávaných tkáních. Následně byla surovina rozřezána na malé kousky. V dalším kroku byla HA extrahována vodou a vysrážena organickými rozpouštědly, např. chloroformem či ethanolem s přidavkem cetylpyridinium chloridu. Získaný produkt byl přečištěn a bylo u něj upraveno pH. Tímto způsobem byl získán konečný produkt s výtěžností až  $0.9 \text{ g.kg}^{-1}$  výchozí látky [2, s. 2663-2665], [9, s. 281-282].

V současnosti jsou preferovány biotechnologické postupy výroby HA založené na bakteriálním kvašení bakterií rodu *Streptococcus equi*, *Streptococcus zoopidemicus* a *Streptococcus pneumoniae*. Kultivace bakterií se provádí v roztoku glukózy s obsahem kvasinek a soli při teplotě  $33 \text{ }^\circ\text{C}$  a pH 8.5. Při izolaci z oslabeného kmene bakterie *Streptococcus equi* se používá proces, jehož základem je dokonalé provedení purifikace HA, která vede ke snížení obsahu bílkovin. Velkou výhodou představuje skutečnost, že výchozí surovina již není živočišného původu, což zamezí kontaminaci a omezí možné alergické reakce po použití takto připravené HA [9, s. 281-282], [10].

Další možnou metodou přípravy HA je její enzymatická syntéza. Enzym *hyaluronansyntáza* je schopen syntetizovat opakující se disacharidovou strukturu HA postupným navázáním kyseliny glukuronové a N-acetylglukosaminu na prodlužující se polymerní řetězec, který je aktivován cukry nukleotidů. Tyto cukry mají účinek substrátů reakce [11].

### 1.3 Vlastnosti HA

V organismu se HA obvykle vyskytuje ve formě sodné soli nebo soli jiných kationů a označuje se jako hyaluronát či hyaluronan. Lidské tělo o hmotnosti 70 kg obsahuje přibližně 12 – 15 g této látky, která je neustále obnovována [3, s. 75]. HA v extracelulární a pericelulární matrix vytváří podpůrné a ochranné konstrukce kolem buněk [1, s. 398-399], [6, s. 791]. Jako signální molekula se aktivně účastní imunologických procesů a ovlivňuje mobilitu a adhezi buněk v rámci jejich proliferace a diferenciací [3, s. 75].

HA má vysoké hydratační a regenerační účinky, chrání kůži proti účinkům zevních faktorů a snižuje tloušťku rohové vrstvy. Rovněž bylo potvrzeno, že působí protizánětlivě a je schopna tvořit vazbu s některými těžkými kovy z okolního prostředí. Pro svou schopnost

fungovat jako transportní nosič aktivních látek s řízeným uvolněním je výchozí složkou v řadě aplikací [10]. Vlastnosti HA úzce souvisí s jejím chováním v roztocích a jsou rovněž ovlivněny reologickými charakteristikami [12].

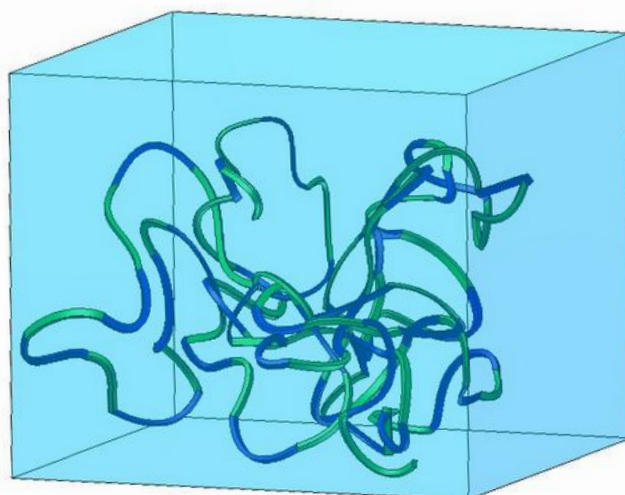
### 1.3.1 Chování HA v roztoku

Molekula HA obsahuje disociovatelné skupiny  $-\text{COOH}$ , což je důvod, proč se ve vodných roztocích chová jako negativně nabitý polyelektrolyt. Ten je schopen vázat kladné ionty o různém mocenství [9, s. 286]. Vazba kationů na řetězec molekuly HA ovlivňuje změnu celkového počtu elektrických nábojů, tedy i velikost repulzních sil mezi jednotlivými karboxylovými skupinami. Tato skutečnost se projevuje změnou konformace, a tedy změnou ve velikosti a tvaru molekuly [8, s. 17]. Dle publikace [6] vykazuje HA v roztoku velké množství konformací a specifických vazebných interakcí. Konformace, tvar, rozměry i stupeň hydratace molekuly závisí na stupni disociace, který je ovlivněn pH, iontovou silou, specifickými iontovými interakcemi, relativní permitivitou rozpouštědla a přítomností kladně nabitých iontů. K významným změnám konformace může docházet i ve směsných rozpouštědlech [6, s. 792], [9, s. 285-286].

Ve fyziologickém roztoku se řetězce tohoto biopolymeru vzájemně proplétají do náhodně uspořádaného, tuhého, statického klubka, a to již při velmi nízkých koncentracích. Studium založené na měření úhlové závislosti rozptýleného světla tuto skutečnost potvrdilo. Vzniklá klubka jsou schopna na sebe vázat až tisícinásobně více vody, než je jejich hmotnost [1, s. 399]. Chování řetězce molekuly HA v roztoku není náhodné, ale je ovlivněno mnoha faktory, jednak chemickou strukturou výchozího disacharidu, působením vnitřních vodíkových vazeb a jeho interakcemi s rozpouštědlem.

Jak již bylo uvedeno výše, axiální vodíkové atomy tvoří nepolární, relativně hydrofobní část molekuly, zatímco postranní řetězce molekuly tvoří více polární, hydrofilní část. To má za následek vytvoření typické šroubovicové struktury molekuly HA, která je znázorněna na Obr. 2 a která je klíčem k chování HA v roztocích [1, s. 399], [11].

Toto uspořádání má i praktický význam, protože umožňuje malým molekulám, jako je voda či elektrolyty, volně difundovat přes rozpouštědlo dovnitř makromolekulární struktury HA. Naopak přístup velkých molekul, jako jsou proteiny, je do struktury HA v důsledku hydrodynamické velikosti jejich molekul omezen [11].



*Obr. 2. Znárodnění hydrofilní a hydrofobní části molekuly pomocí střídajícího se modře a zeleně zbarveného vlákna [11]*

V publikaci [9] je uvedeno, že za určitých podmínek vykazuje polymerní řetězec HA od tohoto typického uspořádání v roztoku jisté odchylky. Vlivem působení vodíkových vazeb vykazuje řetězec určitý stupeň tuhosti a vlivem vzájemného kontaktu mezi řetězci dochází ke vzniku terciární a vyšší stupňové struktury [9, s. 286-287].



*Obr. 3. Fotografie z elektronového mikroskopu znázorňující propletený řetězec HA [11]*



### 1.3.2 Reologické vlastnosti

Z reologického hlediska se HA chová jako pseudoplastický materiál vykazující viskoelastické vlastnosti, přičemž viskozita roztoků závisí na působícím smykovém napětí [8, s. 20]. Při nízkých hodnotách smykového napětí vytvářejí molekuly HA spletené útvary, které ztěžují tok a polymerní roztok je vysoce viskózní. V tomto stavu jsou molekuly HA schopny vázat velké množství vody. Se vzrůstajícím smykovým napětím mají tuhé molekuly HA tendenci orientovat se ve směru toku a vykazovat nižší odpor vůči proudění [1, s. 399], [7, s. 281], [8, s. 20].

Viskozitní vlastnosti roztoků HA byly předmětem intenzivního studia. Publikované studie obecně směřují k určení vlivu proměnných, jako je koncentrace, molekulová hmotnost, teplota, iontová síla, nebo smyková rychlost na viskozitu roztoku HA. Tyto informace poskytují cenné podklady pro určení tvaru molekuly, rigidity řetězce a vlivu mezimolekulových interakcí [6, s. 792].

## 1.4 Hydrofobně modifikovaná HA

Z hlediska praktického využití je velmi významná hydrofobně modifikovaná kyselina hyaluronová (HMHA). Hydrofobně modifikované polymery jsou amfifilní, ve vodě rozpustné makromolekuly složené z hlavního hydrofilního řetězce a postranních hydrofobních skupin vázaných k řetězci pevnou, kovalentní vazbou. Zájem o tento typ makromolekul vzrostl zhruba před 50 lety v důsledku jejich unikátního asociativního chování a možných praktických aplikací [13, s. 316].

Příprava HMHA spočívá v esterifikaci primární nebo sekundární hydroxylové skupiny přítomné v molekule běžné HA. Pokud je esterifikace provedena vyšší mastnou kyselinou, je možné připravit deriváty s pozměněnou rozpustností ve vodě [14, s. 10]. Různými postupy lze připravit i takové deriváty, které jsou ve vodných roztocích schopny vytvářet složité útvary podobné micelám. Ty mají velký potenciál při přípravě nosičů schopných enkapsulovat a transportovat účinné látky [14, s. 10], [15, s. 487]. Fyzikálně-chemické vlastnosti HMHA mohou být upraveny tak, aby odpovídaly požadavkům na nosiče pro cílenou distribuci biologicky aktivních látek. Absence kladného náboje na povrchu hydrofobně modifikované molekuly zmírňuje problémy její agregace se sérovými proteiny a snižuje toxicitu. Další výhodou je vyšší odolnost vůči enzymatické degradaci [14, s.10].

## 1.5 Biologické funkce HA

Strukturní uspořádání molekuly HA úzce souvisí s biologickými funkcemi [7, s. 281]. Tyto funkce jsou spjaty s jejími fyzikálně-chemickými vlastnostmi, které se liší v závislosti na umístění v organismu [9, s. 294].

HA je součástí synoviální tekutiny, která má za úkol dodávat kloubní chrupavce potřebné živiny, kyslík a zpětně odvádět odpadní produkty metabolismu [16]. Díky viskoelastickým vlastnostem působí HA v kloubech jako lubrikans, který snižuje nadměrné tření a tlumí tlakové nárazy [17, s. 19].

V kůži, největším orgánu lidského těla, je jednou z funkcí HA vylučovat volné radikály vznikající v důsledku působení UV záření [17, s. 18-19]. Neméně důležitá je její schopnost hydratovat, udržovat elasticitu a tonus pokožky. HA se v kůži nachází společně s proteinovými agregáty, jako chondroitin sulfátem, keratin sulfátem a dermatan sulfátem. Výsledkem jejich vzájemné interakce je vznik proteoglykanového agregátu. Tento komplex mezi proteiny a HA tvoří vysoce organizovanou strukturu, která zadržuje velké množství vody a vykazuje vysokou elasticitu [18, s. 309-310].

HA je přirozenou součástí sklivce oka [1, s. 406]. Na povrchu endotelu rohovky vytváří viskózní, vodný roztok této látky souvislý film, který chrání tkáň oka před poškozením a zajišťuje dostatečnou vlhkost slzného kanálku [19, s. 355].

Ve vyšší koncentraci se HA nachází i v hlasívkách a ovlivňuje řadu jejich funkcí, například viskozitu, tkáňový průtok, tlumení nárazů nebo jejich tloušťku [17, s. 22].

Za zmínku stojí i fakt, že přítomnost HA hraje důležitou úlohu při přípravě endometria na nidaci oplodněného vajíčka a při embryogenezi během celého nitroděložního vývoje plodu. Pro nově vznikající buňky vytváří HA opěrnou síť a podílí se na udržování stálosti prostředí [3, s. 77].

## 1.6 Aplikace HA

Jak již bylo popsáno, HA má unikátní fyzikálně-chemické vlastnosti, díky kterým se stala jedinečným materiálem používaným v medicíně a kosmetice [17, s. 21]. V následující části práce jsou vybrané aplikace stručně popsány.

Kyselina hyaluronová tvoří základní složku přípravků používaných v oční chirurgii, konkrétně v tzv. viskochirurgii [9, s. 294]. U lidí trpících šedým zákalem se používá ve formě nitroočních injekcí, které pomáhají udržovat tvar přední komory oka [20]. Další uplatnění nachází HA při implantaci čoček, v keratoplastice a při operaci glaukomu [9, s. 294-295]. Mimo oční chirurgii funguje HA jako pomocná látka používaná do očních kapek určených pro léčbu tzv. syndromu suchého oka [1, s. 406].

V otolaryngologii se používají speciálně upravené deriváty HA, které zlepšují viskozitu a léčí poškozené hlasivky. Jejich velkou nevýhodou však je krátká doba účinku, a proto jsou v této oblasti zkoumány alternativní možnosti jejího využití [17, s. 22].

Další aplikační možností HA je léčba artritických onemocnění jako je osteoartróza a revmatoidní artritida. Injekce HA aplikované do vnitřního prostoru kloubu snižují poškození kloubní chrupavky, čímž chrání její povrch a normalizují i vlastnosti synoviální tekutiny [17, s. 21].

Existují rovněž studie zaměřené na využití HA u případů porušené slizniční a kožní integrity, které potvrzují, že použití přípravků obsahujících HA vede k výrazně rychlejšímu hojení poraněného místa, menší formaci krust a ke snadnější epitelizaci [3, s. 77]. Přípravky s vysokomolekulární HA se mohou aplikovat lokálně ve formě krémů nebo gelů [8, s. 23]. V oblasti chirurgie je HA možno využít i v přípravcích, které brání pooperačním srůstům a snižují adhezi tkání po operacích břicha [2, s. 2678].

Jeden z hlavních výzkumných cílů farmaceutického průmyslu je zaměřen i na použití HA jako nosiče léků. Důvodem je skutečnost, že tato sloučenina je bezpečně metabolizována v lysozomech a imunitní systém na ni nevytváří odezvu [2, s. 2677]. Přítomnost HA ve funkci nosiče aktivní látky umožňuje například průchod léků vnější kožní bariérou do krevního oběhu. Pomocí HA je možné aplikovat kortikosteroidy, imunosupresiva, antihistaminika, anestetika, pohlavní hormony, atd. [18, s. 311-314]. Ve farmacii je používána i zesíťovaná HA. Síťování je obvykle prováděno prostřednictvím karboxylových skupin. Tímto způsobem byl připraven například síťovaný hydrogel. V těchto formulacích může být HA buď přímo konjugována na lék, nebo použita k výrobě mikrokapsulí [17, s. 23].

HA je rovněž významnou kosmetickou surovinou. Přípravky na bázi HA jsou v kosmetice známy již řadu let. Jejich použití je spojeno s výplněmi vrásek, zvětšováním některých oblastí těla a s vyhlazováním jizev [8, s. 23]. V estetické medicíně se používá HA ve

formě čirého gelu v aplikační injekční stříkačce. V této formě je nejvhodnější pro injekce do povrchové a střední vrstvy dermis [21, s. 41-42]. Používají se rovněž zesíťované deriváty HA, hylany [22, s. 144].

Možnosti využití HA jako alternativního implantabilního materiálu místo silikového gelu v plastické chirurgii byly popsány v publikaci [18], která uvádí, že použití HA jako prsního implantátu poskytlo viditelně lepší výsledek než použití silikonového gelu. I když během prvního roku po implantaci nebyly pozorovány žádné vedlejší účinky, ke stanovení reálného potenciálu HA v této oblasti je nutné provést více studií [18, s. 310], [2, s. 2678].

Je potřeba se zmínit i o kosmetických produktech obsahující nízkomolekulární HA. Jejich používání dokazuje, že v nich obsažená kyselina hyaluronová má především hydratační a regenerační vlastnosti, působí při redukci vrásek a v léčbě různých kožních defektů [18, s. 310].

Kosmetické a opalovací krémy s obsahem HA rovněž chrání pokožku před nadměrnou dávkou UV záření [18, s. 310].

## 2 METODY PRO CHARAKTERIZACI HA V ROZTOCÍCH

Jednou ze základních charakteristik HA je molekulová hmotnost. Pro její určení se však nehodí klasické experimentální metody, jako je měření snížení bodu tání, zvýšení bodu varu či snížení tlaku nasycených par nad roztokem, které jsou vhodné pouze pro látky, jejichž  $M < 5000 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$  [23, s. 11]. Pro stanovení molekulové hmotnosti HA, která často leží nad hodnotou  $10^6 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ , lze využít řadu jiných, vhodnějších metod. Mezi nejpreciznější a zároveň nejpoužívanější metody patří gelová permeační chromatografie (GPC). Kromě GPC lze molekulovou hmotnost stanovit i viskozimetricky, rozptylem světla, popř. osmometricky, sedimentací a kombinací sedimentace a difúzního měření [9, s. 283]. V této práci bude pozornost věnována zejména metodě GPC, viskozimetrii a rozptylu světla.

### 2.1 Střední molekulová hmotnost

Polymery jsou látky, které obvykle obsahují řadu frakcí přítomných makromolekul, lišících se hmotností. Je tedy možné říct, že mají širokou distribuci molekulových hmotností a jsou polydisperzní. Při jejich popisu hraje důležitou roli střední molekulová hmotnost ( $M$ ). V závislosti na použité metodě stanovení je však možné získat různé hodnoty této střední molekulové hmotnosti. Nejčastěji to jsou hmotnostní ( $M_w$ ) a číselný ( $M_n$ ) průměr molekulové hmotnosti.  $M_w$  může být stanoven měřením rozptylu světla nebo sedimentační metodou. Obdobně použitím koligativních metod (např. měřením osmotického tlaku nebo analýzou koncových skupin) lze získat  $M_n$  [24, s. 139], [25, s. 91], [26, s. 1], [27, s. 8].

Aby mohla být definována polydisperzita, je nutné si představit, že  $M_n$  je vždy menší než  $M_w$ . Důvodem je skutečnost, že v polydisperzní směsi se při sčítání molekul pro získání  $M_n$  uplatňují spíše menší molekuly, než při metodách vedoucích k výpočtu  $M_w$ , kde je vliv nízkomolekulárních podílů potlačen. Poměr  $M_w/M_n$  je pak měřítkem polydisperzity (šířky distribuce) daného polymeru. Pouze pro striktně monodisperzní látky dává tento poměr hodnotu 1 a pro polymery s velmi úzkou distribucí leží hodnoty polydisperzity v rozmezí 1.05 – 1.2 [24, s. 139], [26, s. 1], [27, s. 8].

K charakterizaci určitého polymeru však číselné hodnoty polydisperzity nepostačují. Poskytují sice představu o tom, jakou oblast  $M$  pokrývají v něm obsažené polymerní frakce,

ale neukazují, jak jsou v této oblasti rozděleny. Tato informace může být získána pouze z distribuční křivky molekulových hmotností [24, s. 139].

Jestliže jsou známy hmotnostní podíly molekul ( $c_i$ ) a jejich molekulová hmotnost ( $M_i$ ), je možné vypočítat střední molekulové hmotnosti dle definičních rovnic (1) a (2):

$$M_w = \frac{\sum w_i \cdot M_i}{\sum w_i} = \frac{\sum c_i \cdot M_i^2}{\sum c_i \cdot M_i} \quad (1)$$

kde:  $w_i$  je hmotnostní zlomek

$M_i$  je molekulová hmotnost  $i$ -té frakce

$c_i$  je molekulová koncentrace  $i$ -té frakce

$$M_n = \frac{\sum N_i \cdot M_i}{\sum N_i} = \frac{\sum c_i \cdot M_i}{\sum c_i} \quad (2)$$

kde:  $N_i$  je počet částic  $i$ -tého druhu

$M_i$  je molekulová hmotnost  $i$ -té frakce

$c_i$  je molekulová koncentrace  $i$ -té frakce

Kromě hmotnostního a číselného průměru molekulové hmotnosti se lze setkat i s dalším průměrem označovaným  $M_z$ , který je možné stanovit sledováním sedimentační rovnováhy při ultracentrifugaci. Mezi jednotlivými průměry platí nerovnost  $M_n \leq M_w \leq M_z$  [24, s. 140], [26, s. 4], [28, s. 24], [29, s. 7-12].

## 2.2 Viskozimetrie

Ve výzkumných i průmyslových laboratořích je jednou z běžných metod určování molekulové hmotnosti HA viskozimetrie, zavedená H. Staudingerem. Z viskozimetrických dat lze však stanovit pouze změny molekulové hmotnosti. Pokud je potřeba znát i její absolutní hodnoty, vyžaduje tato metoda „kalibraci“ pomocí grafu, který dává do vzájemného

vztahu viskozitu a molekulovou hmotnost (viz. část 2.2.2). Pro všechny důležité makromolekulární látky lze tyto grafy, nebo jejich matematické vyjádření, najít v literatuře [9, s. 283], [30, s. 390].

Základní charakteristikou viskozimetrických měření je limitní viskozitní číslo  $[\eta]$ , které představuje mezní hodnotu specifické viskozity  $\eta_{sp}$  a koncentrace  $c$  nekonečně zředěného roztoku polymeru.

Prakticky lze stanovení viskozity provést pomocí měření doby průtoku  $t$  při různých koncentracích polymeru. Průtokové doby pak slouží k výpočtu relativní viskozity  $\eta_{rel}$ , dle vztahu (3):

$$\eta_{rel} = \frac{\eta}{\eta_0} = \frac{t}{t_0} \quad (3)$$

Z  $\eta_{rel}$  lze pak určit viskozitu specifickou:

$$\eta_{sp} = \eta_{rel} - 1 = \frac{\eta - \eta_0}{\eta_0} \quad (4)$$

Stanovené hodnoty specifické viskozity pro příslušnou koncentraci ve tvaru  $\frac{\eta_{sp}}{c}$  jsou vyneseny do grafu proti koncentraci  $c$  a extrapolací získané křivky na  $c = 0$  se podle rovnice (5) vypočte limitní viskozitní číslo  $[\eta]$ :

$$[\eta] = \lim_{c \rightarrow 0} \frac{\eta_{sp}}{c} \quad (5)$$

Makromolekulární roztoky se nechovají vždy jako newtonské kapaliny, je proto třeba počítat s tím, že viskozita může záviset na gradientu rychlosti toku, tedy na podmínkách experimentu. Je zřejmé, že měření frakcí s úzkou distribucí  $M$  poskytuje mnohem přesnější výsledky než hodnoty pro polymery s širokou molekulovou distribucí [30, s. 402].

### 2.2.1 Hugginsova a Kramerova rovnice

Koncentrační závislost limitního viskozitního čísla byla popsána pomocí Hugginsovy (6) a Kramerovy rovnice (7):

$$\frac{\eta_{sp}}{c_{HA}} = [\eta] + k_1 \cdot [\eta]^2 \cdot c_{HA} \quad (6)$$

$$\frac{\ln \eta_{rel}}{c_{HA}} = [\eta] + k_2 \cdot [\eta]^2 \cdot c_{HA} \quad (7)$$

kde:  $\eta_{sp}$ ,  $\eta_{rel}$  a  $[\eta]$  jsou definovány rovnicemi (3), (4) a (5)

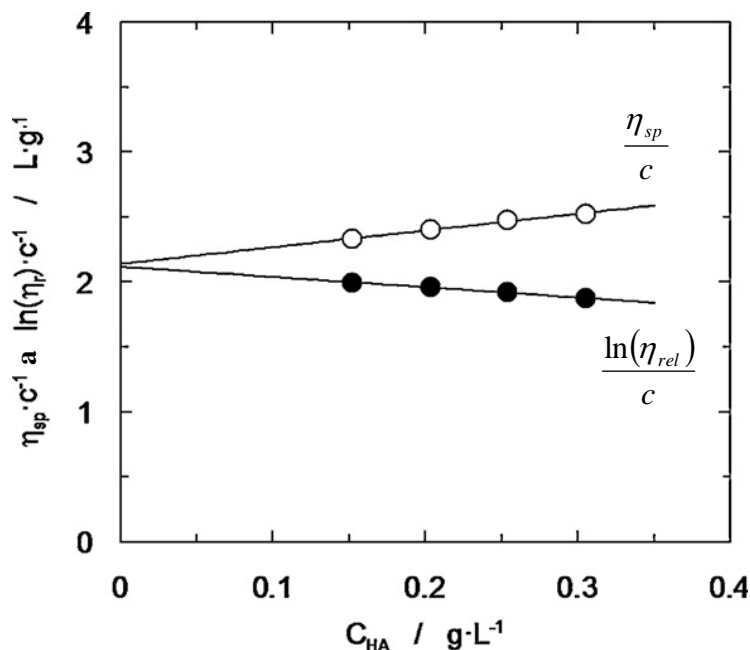
$c$  je koncentrace polymerního roztoku

$k_1$  je Hugginsův koeficient a  $k_2$  je Kramerův koeficient.

Koeficienty  $k_1$  a  $k_2$  vypovídají o způsobu chování makromolekulárního klubka v daném rozpouštědle. Podle toho, jaký stupeň sbalení makromolekulární klubko vykazuje, rozlišujeme rozpouštědla dobrá a špatná. V dobrém rozpouštědle se makromolekula snaží vystavit působení rozpouštědla co nejvíce, zatímco ve špatném rozpouštědle je klubko více sbalené.

Na Obr. 4 je znázorněna lineární závislost  $\frac{\eta_{sp}}{c}$  event.  $\frac{\ln(\eta_{rel})}{c}$  pro vodný roztok HA, která pro horní přímkou odpovídá Hugginsově rovnici (6), pro přímkou spodní Kramerově rovnici (7) [31, s. 501]. Z obrázku je patrné, že viskozita zředěných roztoků je měřena při různých koncentracích a extrapolací křivek na  $c = 0$  je získáno ve společném průsečíku  $[\eta]$ . V praxi lze pro stanovení  $[\eta]$  použít buď jednu z koncentračních závislostí, pro přesnější stanovení pak obě [30, s. 399].





Obr. 4. Závislost viskozitního poměru  $\frac{\eta_{sp}}{c}$  a

$\frac{\ln(\eta_{rel})}{c}$  roztoku HA na koncentraci  $c_{HA}$  [31]

### 2.2.2 Mark-Houwinkova rovnice

Jak již bylo uvedeno, viskozimetrie není absolutní metoda. Proto je pro určení molekulové hmotnosti z viskozimetrických dat potřeba provést kalibraci pomocí jiné, absolutní metody, která je schopná molekulovou hmotnost stanovit.

Střední viskozimetrická molekulová hmotnost se tedy určí z hodnot limitního viskozitního čísla pomocí Mark-Houwinkovy rovnice (8), která vyjadřuje empirický vztah mezi limitním viskozitním číslem a molekulovou hmotností:

$$[\eta] = K \cdot M^a \quad (8)$$

kde:  $[\eta]$  je limitní viskozitní číslo

$M$  je molekulová hmotnost

$K$ ,  $a$  jsou empirické parametry rovnice (8)

Parametry Mark-Houwinkovy rovnice ( $K$ ,  $a$ ) jsou pro většinu polymerů závislé na systému polymer – rozpouštědlo [2, s. 2672], [9, s. 284]. Hodnoty  $a$  se obvykle pohybují v rozmezí od 0.5 (sbalené polymerní klubko) do 1.7 (tuhé expandované tyčinky) [23, s. 5].

Závisí rovněž na iontové síle roztoku, pH a při vyšších molekulových hmotnostech i na smykovém napětí. Podle závěrů publikovaných v [9] je třeba počítat s tím, že logaritmická závislost  $[\eta]$  a  $M$  nebývá u HA lineární v širokém rozsahu molekulových hmotností, takže parametry Mark-Houwinkovy rovnice do jisté míry závisí i na molekulových hmotnostech studovaného polymeru. Při výpočtech molekulové hmotnosti z limitního viskozitního čísla je třeba tuto skutečnost zohlednit [9, s. 284].

V některých případech může být hodnota  $a = 0$ . Tato situace nastane, pokud rozpuštěná makromolekula v roztoku netvoří klubko, ale kompaktní, uvnitř nesolvatovanou nebo jen málo solvatovanou částici. Jako příklad takových makromolekul je uváděn glykogen a globulární proteiny. Na druhé straně pak existují makromolekulární látky (celulosa, pektin), jejichž řetězec je poměrně tuhý, a proto v roztoku tvoří řídká klubka. V prvním případě ( $a = 0$ ) je hodnota  $[\eta]$  nízká a nezávislá na  $M$ , v druhém případě ( $a = 1$ ) je hodnota  $[\eta]$  vysoká a přibližně přímo úměrná  $M$  [6, s. 793], [30, s. 395].

### 2.2.3 Mark-Houwinkova rovnice pro HA

V souvislosti se vztahem mezi molekulovou hmotností a viskozitou pro HA je zajímavá studie Japonských autorů [32]. V roce 1994 Yanaki a Yamaguchi zavedli pro roztoky s vysokomolekulární HA vztah vyjadřující závislost smykového napětí na limitním viskozitním čísle  $[\eta]$ . Vzorky byly rozpuštěny v 0.2 M vodném roztoku NaCl. Pro měření viskozity byly použity různé typy kapilárních viskozimetrů. Molekulová hmotnost vzorků HA se pohybovala od  $401 \times 10^3 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$  do  $2\,660 \times 10^3 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ . Hodnota  $[\eta]$  extrapolovaná na nulové smykové napětí  $[\eta]_0$  byla použita pro výpočet Mark-Houwinkovy rovnice (9):

$$[\eta]_0 = 1.99 \cdot 10^{-4} \{M\}^{0.829} \quad (9)$$

Jak publikovali Japonští vědci, tento vztah lze použít pro stanovení přesné  $M$  u všech roztoků HA, jejichž hodnota  $[\eta]$  je extrapolována na nulové smykové napětí [33, s. 291].

Hodnoty  $K$  a  $a$  pro HA stanovené v různých rozpouštědlech pak publikovali ve svých pracích autoři Cowman [6], Lath [33], Mendichi [34], Rinaudo [35] a Podzimek [36] a jsou uvedeny v Tab. 1.

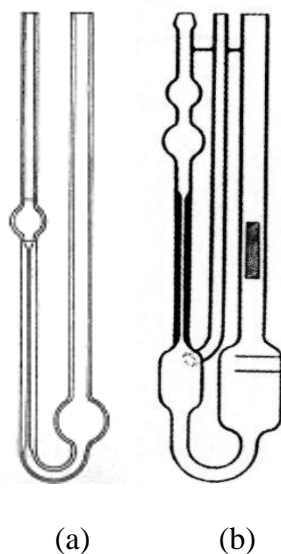
Tab. 1. Parametry Mark-Houwinkovy rovnice pro HA

Rozpouštědlo	Teplota	$K$ [ $\text{ml}\cdot\text{g}^{-1}$ ]	$a$	Autor
0.10 M NaCl	25 °C	0.0160	0.841	Podzimek
0.15 M NaCl	25 °C	0.0570	0.750	Podzimek
0.15 M NaCl	37 °C	0.0339	0.778	Podzimek
0.20 M NaCl	25 °C	0.0228	0.816	Lath
0.20 M NaCl	25 °C	0.0199	0.829	Podzimek
0.20 M NaCl	20 °C	0.0508	0.716	Podzimek
0.50 M NaCl	25 °C	0.0397	0.601	Mendichi
0.10 M NaNO <sub>3</sub>	25 °C	0.0278	0.780	Podzimek
0.10 M NaNO <sub>3</sub>	30 °C	0.0336	0.790	Rinaudo
0.15 M PBS* pH 7.3	20 °C	neuveďeno	0.730	Podzimek
0.20 M PBS* pH 7.3	37 °C	0.0570	0.760	Podzimek

\* PBS (Phosphate Buffered Saline) – fosfátem puřrovaný fyziologický roztok

#### 2.2.4 Přístroje

Pro stanovení viskozity zředěných polymerních roztoků slouží viskozimetry [37, s. 666]. Protože k viskozimetrickému stanovení molekulové hmotnosti HA není třeba znát absolutní hodnoty viskozit, může být měření provedeno v jednoduchém Ostwaldově viskozimetru znázorněném na Obr. 5a. Vzhledem k tomu, že při vysokých rychlostních gradientech v kapiláře vykazují makromolekulární roztoky nenevtonské chování, jsou voleny takové rozměry viskozimetru, aby rychlost průtoku kapilárou byla co možná nejmenší. Podle publikace [30] má být průměr kapiláry takový, aby při rozdílu hladin 10 cm byla doba průtoku 100-150 sekund [30, s. 402]. Dalším typem je Ubbelohdeho kapilární viskozimetr, který se od předchozího typu liší složitější konstrukcí (Obr. 5b). Kapilární viskozimetry jsou poměrně přesné (0.01 až 0.1 %), avšak jejich nevýhodou je nevhodnost pro měření nenevtonských kapalin [38].



Obr. 5. (a) Ostwaldův a  
(b) Ubbelohdeho visko-  
zimetr [30], [38]

Vedle kapilárních lze použít i jiných typů viskozimetrů. Častou variantou kuličkových viskozimetrů je viskozimetr Höpplerův. Kulička se pohybuje skleněnou trubicí skloněnou v úhlu  $10^\circ$ . Zaznamenává se čas potřebný k průchodu kuličky mezi horní (A) a spodní (B) rýskou [38].

Mimo výše zmíněné typy je možné stanovit viskozitu pomocí rotačních viskozimetrů. Tyto přístroje však bývají nákladnější. Pro měření závislosti viskozity na gradientu rychlosti je výhodný rotační viskozimetr vybavený různě velkými válcovými vložkami s nastavitelným počtem otáček a šířkou štěrbinu mezi oběma válci [30, s. 403].

### 2.3 Rozptyl světla

Měření rozptylu světla patří mezi klasické metody určování molekulových hmotností roztoků makromolekulárních látek. Rozptyl světla poskytuje přesné údaje o  $M$  polymerů v řádu  $10^3$  až  $10^6$  g.mol<sup>-1</sup> [39, s. 14]. Jestliže je rozptyl měřen v závislosti na úhlu dopadajícího světla, je možné usuzovat i na sekundární strukturu polymerů [23, s. 11].

Kromě výše uvedených informací slouží metoda rozptylu světla ke stanovení druhého viriálního koeficientu, podává informace o stupni disperzity kopolymerů a depolarizovaný rozptyl světla může poskytnout i cenné informace o anizotropii molekul hlavního řetězce tekutých polymerních krystalů. Avšak při těchto speciálních aplikacích přináší me-

toda řadu obtíží, například při měření rozptylu světla u kopolymerů musí být použita nejméně tři rozpouštědla lišící se indexem lomu [40, s. 297].

Při měření musí být pozornost věnována zejména tomu, aby roztok polymeru byl dostatečně čistý a zředěný. Neméně důležitá je také volba rozpouštědla. Nejlepších výsledků je dosaženo při měření s rozpouštědly, která se liší indexem lomu od polymeru, a která mají sama o sobě nízký index lomu [39, s. 14].

Nechá-li se svazek světelných paprsků procházet koloidním roztokem nebo suspenzí, může být ze strany pozorována jeho dráha. Příčinou jevu je, že část vstupujícího světla se na disperzních částicích rozptyluje. Toto světlo, jehož intenzita bude ve srovnání se zářením vstupujícím velmi malá, se rozptýlí do všech směrů [30, s. 356], [41]. V roztocích polymerních látek vzniká rozptyl světla přítomností molekul rozpuštěné látky a je závislý na jejich koncentraci, velikosti i tvaru [42, s. 29-30]. Pokud bude jako primární zdroj použito světlo polarizované kolmo k rovině pozorování, pak u částic s průměrem menším než  $\lambda/20$ , kde  $\lambda$  je vlnová délka dopadajícího záření, bude intenzita rozptýleného světla ve všech směrech stejně velká. Protože jsou částice v roztocích makromolekul tvořeny malými klubky, která jsou tak nabitá, že obsahují až 99 % rozpouštědla, liší se v tomto případě index lomu částice od indexu lomu rozpouštědla jen minimálně. Pro makromolekuly s průměrem klubka větším než  $\lambda/20$  již rozptylová funkce není kulově symetrická. Dochází zde k zeslabení rozptýleného záření vlivem interference. Důvodem je, že u větší částice jsou rozptylová centra více vzdálena od sebe. Záření vycházející z těchto center je koherentní, tudíž schopné interference [30, s. 356-359].

Zpracování rozptylových měření při různých úhlech pozorování a různých koncentracích navrhl B. Zimm, jehož metoda vyhodnocení dat poskytuje vedle molekulové hmotnosti i průměr klubka a druhý viriální koeficient [30, s. 362-364].

### 2.3.1 Měření rozptylu světla u HA

Molekulová hmotnost HA byla pomocí rozptylu světla stanovena v řadě publikací. Následující část práce uvádí příklady a podmínky těchto stanovení. Vzorky HA byly analyzovány v 0.15 M roztoku NaCl při teplotě 25 °C pomocí víceúhlového rozptylu světla (MALLS) za použití fotometru Dawn DSP-F (Wyatt). Některé vzorky byly analyzovány i při vyšší iontové síle rozpouštědla, v 0.5 M NaCl. Fotometr s vertikálně polarizovaným

He-Ne laserem byl nastaven na vlnovou délku 632.8 nm a intenzita rozptýleného světla byla detekována při 18 úhlech. Kalibrační konstanta přístroje byla určena s použitím toluenu jako standardu. Normalizace fotodiody byla provedena měřením intenzity rozptýleného světla roztoku sérového albuminu (BSA). Předpokládá se, že BSA působí jako izotropní rozptylující látka. Všechny roztoky s HA byly pro měření rozptylu světla důkladně rozpuštěny v použitém rozpouštědle. Pro srovnání  $M$  byly některé vzorky analyzovány také pomocí malouhlového rozptylu světla (LALLS) fotometrem KMX-6 (LDC Milton Roy). Změna indexu lomu  $dn/dc$ , potřebná pro výpočet molekulové hmotnosti, byla zaznamenána diferenciálním refraktometrem. Hodnota  $dn/dc$  ( $0.150 \text{ ml.g}^{-1}$ ) stanovená pro roztoky HA v 0.15 M a 0.5 M NaCl, který byl použit jako rozpouštědlo, ležela v rámci experimentální chyby [34, s. 6611-6612], [43, s. 1806].

Podle experimentu publikovaného v [6] byl rozptyl světla u roztoků HA měřen v 0.1 – 0.2 M roztoku NaCl a v  $\text{CaCl}_2$ . Cílem práce bylo určit druhý viriální koeficient. Jeho hodnota byla u krátkých řetězců HA velmi nízká nebo dokonce záporná. Autoři prokázali, že úhlová závislost rozptýleného světla odpovídá závislosti pozorované u statistického polymerního klubka. Tato studie byla také zaměřena na zhodnocení výsledků analýz HA v alkalických roztocích. Bylo zjištěno, že za daných podmínek se HA řetězce sbalují, což bylo vysvětleno možným narušením vodíkových vazeb v molekule. Došlo tedy ke snížení velikosti makromolekuly a hodnoty druhého viriálního koeficientu [6, s. 800].

### 2.3.2 Přístroje

Pro měření úhlové závislosti intenzity rozptýleného záření se používají přístroje, goniofotometry, ve kterých je jako zdroj primárního záření využit laser [30, s. 366]. Vlivem vysoké intenzity jeho záření je pak možné měřit rozptyl světla nejen pro malé rozptylové úhly, ale i pro zředěné roztoky polymerů [42, s. 30], [44, s. 856].

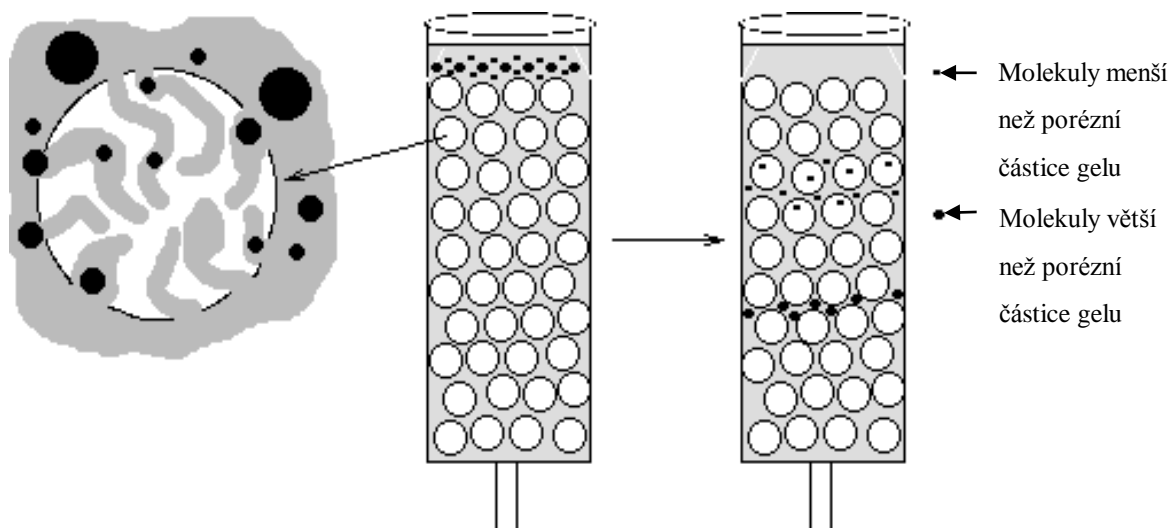
Nároky na vybavení jsou u rozptylové metody mnohem vyšší než např. u osmometrie. Přesto se však tato metoda stanovení  $M$  zředěných roztoků polymerů používá v poměrně velkém rozsahu. Důvodem je to, že rozptyl světla je metodou absolutní, tzn. že poskytuje nejen relativní změny  $M$ , ale existuje i přímý vztah mezi měřenou intenzitou rozptýleného záření a molekulovou hmotností. Další výhodou je, že ze série měření se dá úspěšně stanovit nejen  $M$  a druhý viriální koeficient, ale též průměr klubka, což nelze určit žádným jiným způsobem [30, s. 367-368], [41], [42, s. 30].

### 3 GELOVÁ PERMEAČNÍ CHROMATOGRRAFIE (GPC)

Gelová permeační chromatografie (v odborné literatuře se častěji používá název Size exclusion chromatography – SEC) je typem speciální kolonové chromatografie odlišující se od chromatografie adsorpční a rozdělovací. V současné době je metoda GPC využívána v řadě analýz, uplatňuje se však především při stanovení molekulových hmotností, distribuce molekulových hmotností a k analýze směsí oligomerních sloučenin syntetických polymerů a biopolymerů. Široké využití nachází tato metoda v analýze proteinů, biologických makromolekul a v biochemii. Pomocí GPC lze analyzovat jakékoliv molekuly lišící se rozměry. Metoda umožňuje separaci látek nízko- i vysokomolekulárních s molekulovou hmotností v rozmezí od  $10^2$  do  $10^7$  g.mol<sup>-1</sup>. Podmínkou je jejich rozpustnost ve vhodném rozpouštědle [45, s. 276], [46, s. 151-152], [47].

#### 3.1 Princip separace

Při GPC analýze jsou molekuly polymeru separovány dle velikosti na základě tzv. molekulově síťového efektu [41]. Zředěný roztok polymeru je vpraven do chromatografické kolony naplněné gelem obsahujícím porézní částice různých rozměrů (stacionární fáze). Prostory mezi póry a zrny gelové náplně jsou vyplněny vhodným rozpouštědlem (mobilní fáze). Po nanesení vzorku na vstup do kolony dochází k separaci analyzovaných látek mezi mobilní a stacionární fází. Molekuly jsou při průchodu kolonou zadržovány vlivem pronikání do pórů naplněných rozpouštědlem, a to tak, že nejmenší molekuly mohou difundovat až dovnitř gelové náplně, čímž se zpomaluje jejich průchod kolonou. Naopak, středně velké molekuly se dostanou pouze do větších pórů gelu a difundují až do jeho nitra. Molekuly, jejichž velikost přesahuje rozměry pórů, procházejí kolonou bez zadržení a jsou z gelové náplně vyloučeny [41], [45, s. 276-277], [47]. Princip separace vzorku pomocí GPC je znázorněn na Obr. 6. Čím větší je zadržení molekul analytu ve stacionární fázi, tím později daná složka vychází z kolony a má tudíž vyšší retenční čas. Koncentrace analyzovaného vzorku v eluátu je zaznamenána na výstupu z kolony vhodným detektorem [42, s. 36], [45, s. 277], [47].



Obr. 6. Princip separace polymeru pomocí GPC [41]

Kromě výše zmíněného principu separace odborná literatura [28, 45, 48] popisuje několik dalších teorií separačního mechanismu. Jsou to „rovnovážná teorie“, „teorie omezené difúze“ a „separace tokem“. Jedná se však o teoretické přístupy, které přesahují rámec této práce.

### 3.2 Kolony

Volba správné kolony je rozhodujícím faktorem, který určuje kvalitu separace daného analytu. Je třeba správně zvolit jak velikost částic gelové náplně a velikost pórů, tak její materiál. Pokud je rozměr pórů gelu příliš malý nebo naopak příliš velký, může docházet jen k minimální separaci molekul. Z tohoto důvodu je při výběru náplně kolon klíčovou charakterizací distribuce velikosti pórů [42, s. 36].

Jako náplně do kolon slouží různé typy gelů. Požadavky na jejich vlastnosti jsou poměrně náročné. Gely pro GPC jsou v zásadě dvojího typu: xerogely a aerogely.

Xerogely jsou tvořeny makromolekulami s póry různé velikosti. V rozpouštědle bobtnají na mnohonásobně vyšší objem, avšak při změně rozpouštědla může dojít k jejich odbočení až znehodnocení. Naproti tomu aerogely jsou tvořeny maticí s pevnou inertní strukturou obsahující póry různé velikosti vyplněné vzduchem. Při naplnění kolony nedochází k objemovým změnám, jelikož rozpouštědlo vytěsňuje z pórů vzduch. Příkladem takové-



ho gelu je silikagel. Jeho výhodnou je vhodnost použití pro všechny typy rozpouštědel [45, s. 281], [46, s. 152], [49, s. 313].

Níže jsou stručně popsány nejčastěji používané typy gelů sloužící jako náplně do kolon pro GPC analýzu.

### **3.2.1 Gely na bázi dextranu**

Jako první náplň do kolony byl použit zesíťovaný dextran. Jedná se o bakteriální produkt získaný přeměnou sacharózy, síťovaný epichlorhydrinem v alkalickém prostředí [47]. Komerčně jsou dextranové gely známy pod názvem Sephadex. Jednotlivé typy Sephadexu jsou označeny podle toho, zda botnají v lipofilních nebo hydrofilních rozpouštědlech. Sephadex může být použit pro separaci proteinů a mnohých dalších polymerů [45, s. 282], [49, s. 312].

### **3.2.2 Gely na bázi agarózy**

Agarózové gely vytvářejí řetězce s velkým počtem volných hydroxylových skupin. Ty dávají gelu typický charakter, v němž je příčné zesíťení tvořeno navzájem propojenými vodíkovými můstky. Komerčně jsou tyto gely dodávány pod názvy Sepharose B a Bio-Gel A [45, s. 282].

### **3.2.3 Gely na bázi polyakrylamidu a metakrylátu**

Gely na bázi syntetické matrice v současnosti tvoří podstatnou část využívaných náplní do kolon. Jsou připravovány kopolymerací akrylamidu s N,N'-metylenbis(akrylamidem). Obchodní označení těchto gelů je známé jako Bio-Gel P. Metakrylátové gely se dodávají například pod názvem Separon. Jsou vyráběny polymerací, pomocí které je dosaženo požadovaného stupně pórovitosti gelu [45, s. 283].

### **3.2.4 Gely na bázi polystyrénu**

Často využívaným gelem je i kopolymer styrenu a divinylbenzenu. Tento typ gelů je rozšířený při analýze polymerů v organických rozpouštědlech. Dodávají se pod označením Bio-Gel S, Poragel nebo Styragel a vyznačují se vysokou chemickou odolností [45, s. 283].

### 3.2.5 Anorganické gely

Anorganické gely používané v GPC jsou typu silikagelu a pórovitých skel. V poslední době jsou tyto gely vyráběny s porézními částicemi definovaných rozměrů. Silikagely jsou dodávány pod označením Spherosil a Porasil. Hlavní výhodou silikagelů je nestlačitelnost a mechanická odolnost. Jejich negativní účinek spočívá ve vzájemné nežádoucí interakci s polymerem [45, s. 283], [49, s. 313].

## 3.3 Detektory

Detektory pro GPC jsou až na výjimky totožné s detektory pro ostatní metody kapalinové chromatografie. Vyžaduje se od nich rychlá odezva, vysoká citlivost a stabilita detekovaného signálu [24, s. 50], [28, s. 100-101], [29, s. 146-147].

Pro GPC analýzu slouží detektory několika druhů. Jsou to např. refraktometry, fotometry, detektory rozptylu světla, viskozitní detektory, kombinované a další detektory (elektrochemické, vodivostní, kapacitní, hustotní, atd.) [28, s. 103-112].

V experimentální části diplomové práce byl k detekci vzorků použit refraktometrický a viskozitní detektor, proto budou v této kapitole rozebrány podrobněji tyto dva typy.

### 3.3.1 Refraktometrický detektor (refraktometr)

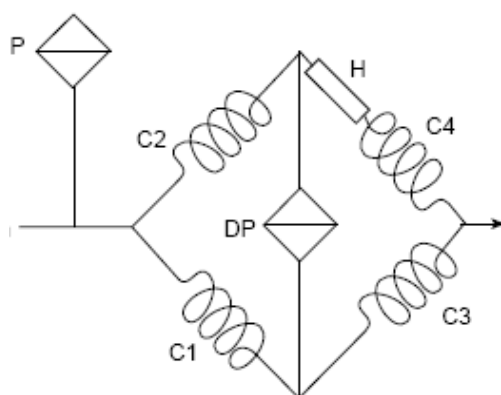
Princip měření spočívá v určení rozdílného indexu lomu eluátu v závislosti na koncentraci analytu. Refraktometry jsou konstruovány v diferenčním vyhotovení, aby se zvýšila citlivost měření a byly omezeny rušivé vlivy [24, s. 52], [28, s. 103].

Podle toho, na jakém principu je měření diferenciálním refraktometrem založeno, je možné rozlišit následující typy přístrojů: deflexní refraktometr, reflexní refraktometr, refraktometr založený na Christiansenově jevu a interferometr [24, s. 52], [28, s. 104-105], [46, s. 153-154].

Obecně platí, že refraktometry jsou nejpoužívanější detektory v GPC. Jsou schopny detekovat všechny látky, jejichž index lomu se liší od indexu lomu mobilní fáze. Jistý problém představuje silná závislost indexu lomu na teplotě a tlaku, ale i jejich relativně nízká citlivost [28, s. 105].

### 3.3.2 Viskozitní detektor (viskozimetr)

Důležité údaje o molekulové hmotnosti a viskozitě analytu poskytují viskozimetrické detektory. První viskozitní detektor používaný v GPC obsahoval šest průtokových kapilár, do kterých vtékal eluát postupně. Později byl nahrazen viskozimetrem s jedinou kapilárou. Tento typ je v dnešní době stále komerčně dostupný a používaný [28, s. 110], [29, s. 162]. Mimo tento nejjednodušší typ viskozimetrů se pro on-line měření viskozit v GPC používají i přístroje tvořené čtyřmi kapilárami, které jsou sestaveny do „můstku“ znázorněného na Obr. 7 [50, s. 7].



Obr. 7. Viskozitní detektor se čtyřmi kapilárami [50]

V publikaci [50] bylo navrženo průtokového měření viskozity, které vychází z Darcyho zákona: Pokles tlaku při průtoku kapaliny kapilárou je za konstantních podmínek funkcí viskozity. Pro velmi nízké koncentrace polymeru platí vztah (10):

$$[\eta] = \frac{\ln(\Delta P_1 / \Delta P_0)}{c} \quad (10)$$

kde:  $[\eta]$  je limitní viskozitní číslo

$\Delta P_1$  a  $\Delta P_0$  značí pokles tlaku při průtoku roztoku kapilárou

$c$  je koncentrace polymeru v eluátu

Při použití výše uvedeného principu měření jsou však kladeny vysoké nároky na konstantní teplotu eluátu a činnost čerpadla zabezpečujícího stabilní průtok [28, s. 110-111].

Spojení refraktometrického a viskozitního detektoru poskytuje cenné informace pro stanovení molekulových hmotností všech polymerů a přímou charakterizaci polymerů z hlediska jejich stupně větvení. Při použití samotného refraktometrického detektoru tyto údaje nejsou dostupné. Data z obou detektorů lze aplikovat na univerzální kalibraci v GPC [28, s. 110-111], [29, s. 163-164].

### 3.4 Mobilní fáze

Na mobilní fázi (MF) v GPC je kladena řada požadavků. Je důležité, aby MF rozpouštěla separovaný vzorek polymeru. Někdy je tohoto požadavku dosaženo až při vyšší teplotě nebo při použití vícesložkového eluentu. MF musí být rovněž kompatibilní s gelovou náplní kolony a použitými detektory, měla by za dané teploty vykazovat minimální viskozitu, být co nejméně hygroskopická a lehce se odplyňovat. Po chemické stránce by MF měla být minimálně toxická, hořlavá a výbušná, na druhé straně maximálně stabilní vůči vnějším vlivům. V neposlední řadě by MF měla být inertní k separovaným látkám a snadno dostupná. Všechny požadavky nelze za žádných podmínek splnit, proto je třeba volit kompromis [28, s. 147-149].

Z praktického hlediska je často uváděn dvojitý typ dělení MF, a to na vodnou a nevodnou [26], nebo na jednoduchou a smíšenou [28]. V této práci bude popsán druhý typ klasifikace.

#### 3.4.1 Jednoduchá mobilní fáze

*Tetrahydrofuran* (THF) je nejčastěji používané organické rozpouštědlo v GPC, protože rozpouští mnoho syntetických a přírodních polymerů. Práce s THF ale přináší řadu komplikací: THF má vysokou tenzi par, které jsou ve směsi se vzduchem výbušné a jedovaté [28, s. 149-150].

*Dimethylformamid* (DMFA) dobře rozpouští především polární soluty. Nevýhodou této MF je její vysoká polarita, viskozita, hygroskopicitata a toxicita [28, s. 151].

Výhodou použití *alkoholů* jako MF je výborná UV transparentnost a nízká cena. Naopak k nevýhodám patří vysoká viskozita, u methanolu vysoká toxicita, v případě ethylalkoho-

lu problémy se sušením a poměrně nízká rozpustnost makromolekulárních látek v daných typech alkoholů [28, s. 152].

*Toluen* rozpouští středně polární a nepolární látky. Oproti THF je méně jedovatý a má nižší tenzi par. Často nahrazuje THF při analýze polymerů, které mají podobný index lomu jako toto rozpouštědlo [28, s. 152].

Voda a vodné roztoky neutrálních anorganických solí, jako *chlorid sodný*, *chlorid draselný* a *tlumivé roztoky* (např. fosfátový pufr) jsou nejčastěji používané vodné eluenty v GPC [26, s. 68].

### 3.4.2 Smíšená (vícesložková) mobilní fáze

Smíšené MF se v GPC používají z více důvodů. Především kvůli tomu, že některé polymery jsou rozpustné pouze ve vícesložkových eluentech. Dalšími důvody jsou stabilizace MF a omezení negativních jevů při separaci. Často jsou smíšené MF použity nezáměrně, a to tehdy, pokud příměsemi v polymeru bývají nečistoty, včetně vody. V důsledku své polaritě může voda značnou mírou ovlivnit získané výsledky. Přítomnost nežádoucí složky zhoršuje kvalitu základní linie i tvar a polohu chromatografických píků [28, s. 153].

### 3.4.3 Výběr mobilní fáze

Jak již bylo uvedeno, důležitým kritériem při výběru MF je její vhodnost pro analyzovaný materiál. Pro charakterizaci biopolymerů slouží výlučně vodné mobilní fáze, které budou použity rovněž pro analýzu HA.

Mezi biopolymery existují různé typy látek, které jsou stabilní pouze při vyšších hodnotách pH, jiné se zase rozkládají při vyšších koncentracích solí a jsou stabilní jen v určitém rozmezí pH. Proto je nutné volit takové pH a koncentraci solí, aby odpovídaly požadavkům na stabilitu separované látky. Pro zajištění reprodukovatelnosti prostředí a stálosti rozpuštěných polymerů se v řadě případů používají i tlumivé roztoky [26, s. 68], [28, s. 254].

### 3.4.4 „Non-size exclusion“ efekt

Jak již bylo uvedeno, princip GPC spočívá v separačním mechanismu makromolekul na základě jejich velikosti. Hovoří se o tzv. vylučovacím, neboli „size exclusion“ mecha-

nismu. Vzhledem k tomu, že mnoho biopolymerů se řadí mezi polyelektrolyty, vykazuje jejich separační mechanismus od tohoto standardního chování odchylky, označované jako „non-size exclusion“ efekt. Mezi ně se řadí intermolekulární elektrostatické interakce mezi solutem a náplní kolony (iontová exkluze, iontová inkluze a iontová výměna), intramolekulární elektrostatické interakce a adsorpce (hydrofobní interakce a vodíkové vazby). Uvedené nežádoucí efekty mohou být potlačeny vlivem zvýšené iontové síly a změnou pH elučního činidla, čímž je dosaženo sníženého stupně disociace iontových skupin přítomných v analyzovaném polymeru [26, s. 168-169], [51, s. 220], [52, s. 28].

**a) Iontová výměna.** Polymerní náplně a náplně na bázi oxidu křemičitého obsahují na svém povrchu zbytky silanolových nebo  $-\text{COOH}$  skupin. Kationické polyelektrolyty jsou na tyto anionické skupiny adsorbovány vlivem iontové výměny, která se projevuje tak, že analyzovaná látka není separována, nebo k eluci dochází až po vymytí celého objemu MF z kolony. Efekt iontové výměny lze omezit snížením pH MF pod hodnotu 4, přidávkem elektrolytu do MF nebo přidávkem kationické směsi pro anionické náplně [26, s. 168].

**b) Iontová inkluze.** Iontová inkluze je způsobena ustavením Donnanovy membránové rovnováhy. Během separace mají protiionty polyelektrolytu tendenci difundovat do pórů náplně, zatímco polyelektrolyt je vylučován z kolony. Mezi částicemi v pórech a částicemi v objemu pórů dojde k ustanovení rovnováhy. Tímto způsobem je polymer vtlačen do náplně kolony, což je označováno jako iontová inkluze. Vlivem tohoto efektu dochází ke zpomalení separace polyelektrolytů. Lze mu zabránit přidávkem elektrolytu do MF nebo použitím kolony s náplní obsahující menší póry [26, s. 168, 169].

**c) Iontová exkluze.** Elektrostatické odpuzivé síly působící mezi anionickou náplní a anionickým polyelektrolytem brání pronikání rozpuštěné látky do pórů náplně, což se projevuje elucí v exkluzním limitu kolony nebo rychlejším vymytím analytu z kolony. Iontová exkluze může být potlačena snížením pH MF pod hodnotu 4 nebo přidávkem elektrolytu [26, s. 168].

**d) Intramolekulární elektrostatické interakce.** V důsledku pevně navázaných nábojů polyelektrolytů způsobují elektrostatické odpuzivé síly mezi sousedními iontovými místy rozbalení polymerního řetězce a zvětšení hydrodynamického objemu. Omezení těchto elektrostatických interakcí a sbalení polymerního klubka lze dosáhnout přidávkem elektrolytu do systému [26, s. 169].

e) **Adsorpce.** Existují tři způsoby, prostřednictvím kterých může být analyzovaná látka adsorbována na povrch náplně kolony: iontová výměna, hydrofobní interakce a vodíkové vazby. Hydrofobní interakci lze eliminovat snížením iontové síly přidávkem povrchově aktivní látky nebo organického rozpouštědla do MF. Vodíkové vazby pak mohou být eliminovány přidávkem močoviny či guanidinu [26, s. 169].

### 3.5 Kalibrace u GPC

GPC není absolutní metodou pro charakterizaci polymerů. Aby bylo možné chromatogram správně interpretovat a stanovit molekulovou hmotnost analyzovaných vzorků, včetně její distribuce, je nutné kolonu kalibrovat, tedy stanovit závislost mezi retenčním objemem ( $V_R$ ) a molekulovou hmotností ( $M$ ). Kalibrační křivku lze sestavit na základě hodnot  $V_R$  stanovených pro řadu úzkých frakcí polymeru se známými hodnotami  $M$ . Často se však využívá i metody univerzální kalibrace. Oba zmíněné kalibrační postupy jsou popsány v kapitole 3.5.1 a 3.5.2 [28, s. 44].

Problémem při kalibraci může být volba vhodných kalibračních standardů. Ve skupině vinylových polymerů je dostupné široké spektrum syntetických polystyrenů (PS) s úzkou distribucí  $M$ , které jsou ke kalibraci GPC kolon vhodné. Kromě PS standardů jsou dostupné i další polymery: polyethylenoxid a polymethylmethakrylát. Mezi biopolymery zaujímají zvláštní postavení také proteiny, protože se vyskytují v přírodě s již definovanou molekulovou hmotností. Z tohoto důvodu se používají ke kalibraci systémů pracujících ve vodných mobilních fázích. Dalšími vhodnými standardy používanými pro vodorozpustné polymery jsou pullulany, dextransy a sulfonované polystyreny [24, s. 123-124].

#### 3.5.1 Přímá kalibrace úzkými frakcemi

Standardy polymerů určené ke kalibraci GPC kolon by měly pokrývat co nejširší rozmezí  $M$  a zároveň by měly mít velmi úzkou distribuci, aby bylo možné položit  $M_n \cong M_w \cong M_{GPC}$ , kde  $M_{GPC}$  je molekulová hmotnost odpovídající retenčnímu objemu maxima příslušného píku v chromatogramu [28, s. 45].

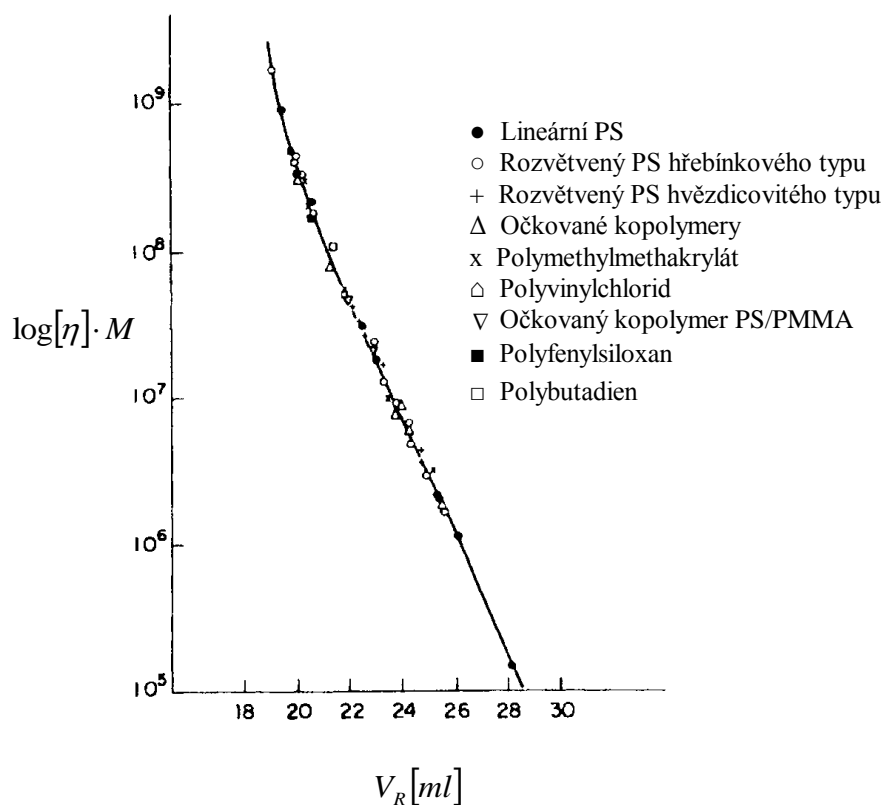
Vlastní kalibrace spočívá ve změření chromatogramů řady úzkých frakcí polymeru o známých hodnotách  $M$ . Kalibrace je prováděna za stejných podmínek, při kterých je analyzován neznámý vzorek.  $V_R$  jednotlivých frakcí jsou vyneseny do grafu proti  $\log M$  a

získaným bodovým polem je pomocí standardní statistické metody proložena křivka. Aby byla pokryta co nejširší oblast  $M$ , je možné do série zapojit několik kolon naplněných částicemi gelu s různým rozměrem pórů, přičemž je volena taková kombinace kolon, aby byla kalibrační křivka v co nejširším intervalu  $V_R$  lineární [28, s. 45].

Pokud se nepodaří dosáhnout linearitu v celém rozsahu  $M$ , je možné údaje zpracovat pomocí regresní analýzy proložením polynomu vyššího stupně [28, s. 45].

### 3.5.2 Univerzální kalibrace

Metoda univerzální kalibrace, zavedená do praxe H. Benoitem [27], vychází ze zjištění, že pokud jsou retenční objemy ( $V_R$ ) polymerů vyneseny do grafu proti součinu  $[\eta] \cdot M$ , leží na jediné křivce. Z Einsteinova viskozitního zákona vyplývá, že součin  $[\eta] \cdot M$  je přímo úměrný hydrodynamickému objemu polymerního klubka. Obecně tedy platí, že kalibrační křivku pro různé polymery lze sloučit do jednoho grafu, kde jsou kalibrační data vynesena jako závislost  $\log[\eta] \cdot M$  na  $V_R$  (Obr. 8). Z viskozimetrických parametrů lze pro kalibrační standardy použít Mark-Houwinkovu rovnici (viz. kapitola 2.2.2) [27, s. 200], [29, s. 291-292].



Obr. 8. Křivka univerzální kalibrace [27]



Univerzální kalibrační křivku lze použít jak pro homopolymery, tak i pro kopolymery různého chemického složení a různé struktury – lineární i rozvětvené [28, s. 48].

Univerzální kalibraci je třeba provádět ve zvoleném rozpouštědle a při určité teplotě, které jsou použity pro analýzu sledovaného polymeru. Pokud se některý z těchto parametrů změní, musí být provedena kalibrace nová. Dobrých výsledků je dosaženo při paralelním zapojení viskozitního a koncentračního detektoru, například refraktometrického [25, s. 107-108], [27, s. 200-201], [29, s. 293]. Metoda univerzální kalibrace byla v praxi využita k vyhodnocení údajů o neznámých polymerech řadou autorů, například v publikacích [27, 28, 29].

## 4 ODBORNÉ STUDIE ŘEŠÍCÍ PROBLEMATIKU

### CHARAKTERIZACE HYALURONANU POMOCÍ GPC

V této kapitole bude shrnut současný stav problematiky charakterizace hyaluronanu pomocí GPC. Současně bude uveden stručný popis chromatografických podmínek, včetně typu kolon, detektorů a mobilních fází použitých různými autory pro stanovení molekulové hmotnosti HA pomocí GPC.

V literatuře lze najít řadu prací zabývajících se charakterizací hyaluronanu pomocí GPC. V práci Lapčíka [15] byla GPC použita pro analýzu hydrofobně modifikovaných derivátů HA. Výchozí látkou byl hyaluronan sodný (NaHY) (Diosynth) extrahovaný z kohoutích hřebínků. Chromatografický systém se skládal z kolon Ultrahydrogel 1000 a Ultrahydrogel 2000 (Millipore) připojených na čerpadlo Waters 510. 0.5M NaCl představoval mobilní fázi, jejíž průtok byl nastaven na  $1 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ . Nástřikový objem vzorku byl  $300 \mu\text{l}$ . Pro detekci byl použit diferenciální refraktometr (Waters 410). GPC kolony byly kalibrovány metodou univerzální kalibrace, pomocí standardů pullulanů (Sigma) [15, s. 489].

Ve své práci [43] Mendichi použil chromatografickou metodu ke stanovení gyračního poloměru a molekulové hmotnosti hyaluronanu. Ve studii bylo použito devět vzorků NaHY o rozdílné molekulové hmotnosti. Jako mobilní fáze sloužil vodný roztok 0.15M NaCl s průtokem  $0.2 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ . Do dávkovacího ventilu bylo nastříknuto  $200 \mu\text{l}$  vzorku. Chromatografický systém se skládal ze dvou kolon TSK G6000 PW a TSK G5000 PW (TosoHaas) uložených v kolonovém termostatu. Detekce byla zprostředkována třemi detektory: kapilárním viskozimetrem, MALS fotometrem Dawn DSP-F (Wyatt) a koncentračním detektorem UV 996 [43, s. 1806].

Práce Chytila [44] se zabývá možností interakce hydrofobně modifikovaného hyaluronanu  $\text{C}_8\text{NH-HA100}$  se surfaktanty SDS a DTAB a zkoumá i charakter vzniklého derivátu pomocí GPC. Ve studii byl použit nativní hyaluronan (NaHY), vyrobený bakteriální syntézou, a  $\text{C}_8\text{NH-HA100}$ . Zásobní roztoky 0.1 a 0.2% NaHY a 0.5%  $\text{C}_8\text{NH-HA100}$  byly připraveny navážením příslušného množství polysacharidu a jeho rozpuštěním v Milli-Q vodě. Pro lepší rozpustnost byl vzorek po dobu 24 hodin míchán. Chromatografický systém byl složen ze zásobníku mobilní fáze, odplyňovače, izokratického čerpadla, injektoru s nástřikovým ventilem, předkolony a systému tří, do série spojených, kolon: TSK G6000 PWXL, TSK G5000 PWXL a TSK G4000 PWXL. Výstupní kolona byla připojena na

MALLS fotometr (Wyatt), následoval diferenciální refraktometr (Optilab) a viskozitní detektor (Viscotek). Průtok mobilní fáze kolonou byl  $0.4 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ . Nástřikový objem vzorku činil  $100 \mu\text{l}$ . Před vlastním nástřikem byly vzorky filtrovány přes filtr s póry o velikosti  $0.80 \mu\text{m}$ . Data z analýzy byla zpracována pomocí Astra a TriSec softwaru (Wyatt) [44, s. 856-857].

V práci [46] byl uveden přehled podmínek pro separaci polysacharidů s využitím metody GPC. Jedná se o souhrnnou práci, která je věnována nejen hyaluronanu, ale obecně všem významným polysacharidům [46, s. 161].

Studiem hyaluronanu v synoviální tekutině se zabýval Kvam se svými spolupracovníky [53], který analyzoval jak komerční vzorky NaHY (Fidia Research Laboratories), tak vzorky NaHY izolované ze synoviální tekutiny kolenního kloubu. Pro GPC analýzu byla použita kolona na bázi polymethakrylátu. Další součástí systému byly tři detektory, konkrétně se jednalo o diferenciální refraktometr, fotometr pracující při vlnových délkách 210 a 260 nm a LALLS detektor. Vzhledem k přítomnosti iontových skupin u glykosaminoglykanů bylo nutné vhodně zvolit iontovou sílu a pH mobilní fáze. Často je volen  $0.02 - 0.15\text{M}$  roztok NaCl, avšak podle autorů [51] je pro tyto účely vhodný i fosfátový pufr o pH 7.4. Pro dosažení lepší rozpustnosti vzorku v mobilní fázi byla využita ultrazvuková lázeň [53, s. 44-45].

Autorka Harmon [54] věnuje ve své studii pozornost analýze hyaluronanu pomocí GPC, a to především z hlediska jeho možných aplikací v oční chirurgii. Komerčně dostupné vzorky NaHY určené pro přípravu očních kapek byly charakterizovány dvěma různými GPC systémy. Prvním z nich byl GPC s víceúhlovým rozptylovým detektorem (MALLS, Heleos II, Wyatt Technologies), druhým přístrojem byl PL-GPC 50 Plus (Varian) s trojitou detekcí (diferenciální refraktometr, viskozimetr a rozptylový detektor měřící při dvou úhlech  $45$  a  $90^\circ$ ). Vzorky NaHY o koncentraci  $0.25 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$  byly připraveny rozpuštěním v borátovém pufru. Rozpuštění trvalo tři dny. K separaci vzorku docházelo na kolonách Shodex SB-807HQ a Shodex SB-806HQ. Eluentem byl roztok  $0.15\text{M}$  NaCl a  $0.02\%$   $\text{NaN}_3$ . Chromatografický systém byl kalibrován standardy polyethylenoxidu (koncentrace  $0.5 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ ). Autoři této práce rovněž uvádí, že z důvodů nelinearity Mark-Houwinkovy závislosti nebyla při vyhodnocení získaná data proložena přímkou, ale polynomem vyššího stupně [54, s. 1956].

Studie [55] se zabývá charakterizací vysokomolekulárního hyaluronanu, kdy bylo analyzováno několik komerčních vzorků NaHY od různých dodavatelů. V chromatografickém systému byly k detekci využity kapilární viskozimetr, koncentrační detektor a rozptylový detektor MALLS Dawn DSP-F (Wyatt). Podmínky experimentu byly následující: jako mobilní fáze byl použit vodný roztok obsahující 0.15 nebo 0.5M NaCl, teplota byla 37 °C, průtok mobilní fáze 0.2 ml.min<sup>-1</sup> a nástřikový objem představoval 200 µl. Byly testovány čtyři typy kolon: (1) TSK G6000 PW a G5000 PW; (2) OHpak Shodex, KB-806 a KB-805; (3) PL aquagel-OH 60 15 µm; (4) Ultrahydrogel 2000 a 1000 A [55, s. 6116].

Z výše uvedeného přehledu je zřejmé, že často využívanými kolonami jsou kolony typu TSK PW dodávané společností Tosoh Bioscience. Jejich náplň je tvořena hydrofilními, tuhými, kulovými, porézními methakrylátovými částicemi se stabilitou v rozmezí pH 2 až 12 a pracující při teplotách do 80 °C. Detekci analytu je vhodné provádět minimálně dvěma detektory, a to jedním koncentračním (UV nebo RI) a jedním citlivým na změny molekulové hmotnosti (kapilární viskozimetr, detektor rozptylu světla). Tato kombinace pak dává možnost stanovení absolutní molekulové hmotnosti, ať již pomocí metody rozptylu světla nebo metodou univerzální kalibrace (viz. dále).

## 5 CÍL DIPLOMOVÉ PRÁCE

Cíle diplomové práce byly stanoveny následovně:

- vypracovat rešerši na zadané téma s cílem charakterizovat hyaluronan, popsat jeho strukturu, chemické a fyzikální vlastnosti i chování v roztocích;
- popsat konkrétní metody pro charakterizaci hyaluronanu v roztocích se zaměřením na metodu gelové permeační chromatografie (GPC);
- u GPC vysvětlit její princip, možnosti přístrojového vybavení a jejího využití pro stanovení molekulové hmotnosti hyaluronanu;
- nalézt chromatografické podmínky vhodné pro charakterizaci hyaluronanu pomocí metody GPC a posoudit vliv různého složení mobilní fáze na chromatografickou separaci tohoto polymeru;
- metodu GPC prakticky ověřit stanovením molekulové hmotnosti a distribuce molekulových hmotností u komerčních vzorků.

## II. PRAKTICKÁ ČÁST

## 6 MATERIÁLY A PŘÍSTROJE

### 6.1 Vzorky hyaluronanu

V experimentální části bylo studováno několik komerčních vzorků hyaluronanu (NaHY) lišících se molekulovou hmotností. Vzorky byly dodány společností Contipro Group s.r.o., Dolní Dobrouč. Seznam použitých vzorků je uveden v Tab. 2.

Tab. 2. Seznam použitých vzorků hyaluronanu (NaHY)

Označení	Nominální molekulová hmotnost* [g.mol <sup>-1</sup> ]	Číslo šarže, komentář
NaHY <sub>30K</sub>	29.60 x 10 <sup>3</sup>	240805
NaHY <sub>50K</sub>	50.28 x 10 <sup>3</sup>	100106/250205/42, HyActive
NaHY <sub>0.35M</sub>	0.15 – 0.35 x 10 <sup>6</sup>	neuveďeno
NaHY <sub>0.5M</sub>	500 x 10 <sup>3</sup>	neuveďeno
NaHY <sub>2.1M</sub>	1.8 – 2.1 x 10 <sup>6</sup>	Cosmetic quality
NaHY <sub>2.4M</sub>	2.38 x 10 <sup>6</sup>	040711

\* informace výrobce; neuvedeno, jakou metodou byla molekulová hmotnost stanovena

### 6.2 Chemikálie

Pro přípravu mobilní fáze byly použity chemikálie, jejichž přehled je uveden v Tab. 3.

Tab. 3. Chemikálie použité na přípravu mobilní fáze

Název	Vzorec	Výrobce/Dodavatel
Chlorid sodný	NaCl	LACH-NER, s.r.o.
Síran sodný	Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	PENTA, Ing. Petr Švec
Síran amonný	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	LACHEMA, n.p. Brno
Thiokyanatan sodný	NaSCN	LACH-NER, s.r.o.
Thiokyanatan amonný	NH <sub>4</sub> SCN	LACHEMA, n.p. Brno

### 6.3 Standardy pro kalibraci GPC

Ke kalibraci přístroje byly použity komerčně dostupné standardy. Jednak to byly standardy polysacharidů – pullulanů s úzkou distribucí molekulových hmotností (Polymer Laboratories, UK). Dále byly použity standardy polyethylenoxidu (PEO) a polyethylenglykolu (PEG) (oba Polymer Laboratories, UK). Přehled všech použitých standardů je uveden v Tab. 4 a 5.

Tab. 4. Přehled použitých standardů pullulanů

$M_p$ [g.mol <sup>-1</sup> ]	$M_w/M_n$	Číslo šarže
$5.9 \times 10^3$	1.09	20901-4
$22.8 \times 10^3$	1.07	20903-2
$47.3 \times 10^3$	1.06	20904-2
$112 \times 10^3$	1.12	20905-2
$212 \times 10^3$	1.13	20906-2
$404 \times 10^3$	1.13	20907-2
$788 \times 10^3$	1.23	20908-3

Tab. 5. Přehled použitých standardů PEO a PEG

$M_p$ [g.mol <sup>-1</sup> ]	$M_w/M_n$	Číslo šarže
$1.01 \times 10^3$	1.04	20705-5
$7.92 \times 10^3$	1.04	20708-5
$21.03 \times 10^3$	1.07	20711-7
$50.63 \times 10^3$	1.06	20833-16
$116.3 \times 10^3$	1.04	20836-9
$278.1 \times 10^3$	1.05	20838-16
$442.8 \times 10^3$	1.07	20839-11
$895.5 \times 10^3$	1.10	20841-22



## 6.4 Přístroje

### 6.4.1 Gelový permeační chromatograf PL-GPC 50

Molekulová hmotnost a distribuce molekulových hmotností komerčních vzorků hyaluronanu byly stanoveny na přístroji PL-GPC 50 s refraktometrickou a viskozitní detekcí (Obr. 9), dodaném firmou Polymer Laboratories. K analýze byla použita série dvou kolon sestávající z kolony Agilent PL aquagel-OH 40 a Agilent PL aquagel-OH 60 s velikostí částic 15  $\mu\text{m}$ , které se liší ve velikosti pórů (Agilent Technologies). Kolony typu PL aquagel-OH jsou vyrobeny z kopolymeru vinylu s polymerizovanou  $-\text{OH}$  skupinou, jsou stabilní v rozmezí hodnot pH 2 – 10 a kompatibilní s organickými rozpouštědly až do 50 obj. % metanolu. Stanovení byla prováděna při stálé teplotě 30  $^{\circ}\text{C}$ , nástřikový objem vzorku činil 100  $\mu\text{l}$  při průtokové rychlosti mobilní fáze kolonou 0.8  $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$ . Data byla vyhodnocena pomocí programu Cirrus GPC Multi Detektor Software (Polymer Laboratories). Tento typ přístroje s duální detekcí umožňuje stanovit metodou univerzální kalibrace absolutní molekulové hmotnosti studovaných polymerů.



Obr. 9. Přístroj PL-GPC 50

#### 6.4.2 Analytický vysokoúčinný kapalinový chromatograf (Shimadzu HPLC)

Vzhledem k počátečním instrumentálním problémům s výše uvedeným přístrojem byla molekulová hmotnost komerčních vzorků hyaluronanu stanovena rovněž na přístroji Shimadzu High Performance Liquid Chromatograph (Shimadzu Handels GmbH) s refraktometrickým detektorem (Obr. 10). Tento přístroj není explicitně určen pro analýzu molekulových hmotností polymerů, ale jedná se o klasický kapalinový chromatograf, vybavený GPC softwarem. Po připojení GPC kolony jej lze tedy použít, vzhledem k přítomnosti koncentračního detektoru, pouze ke stanovení relativních molekulových hmotností. Výhodou tohoto přístroje oproti předchozímu byla přítomnost autosampleru obsahujícího standardně 105 pozic pro vialky. K analýze byly použity stejné kolony jako na přístroji PL-GPC 50. Stanovení byla prováděna při stálé teplotě 30 °C, nástřikový objem vzorku činil opět 100 µl při průtokové rychlosti mobilní fáze kolonou 0.8 ml.min<sup>-1</sup> a 0.5 ml.min<sup>-1</sup>. Pro vyhodnocení byl použit software s GPC příslušenstvím LC Solution Multi PDA/GPC (Shimadzu Handels GmbH).

Skutečnost, že analýza vzorků byla provedena na obou přístrojích, umožnila srovnání konvenční a univerzální kalibrace.



Obr. 10. Přístroj Shimadzu High Performance Liquid Chromatograph

K analýze byly použity mobilní fáze, které se od sebe nelišily iontovou silou, ale pouze chemickým složením. Složení všech použitých mobilních fází je uvedeno v Tab. 6. Kalibrační křivka byla pro každou použitou mobilní fázi sestavena pomocí dvou sérií výše jmenovaných standardů, a to jak pullulanů (Tab. 4), tak i standardů polyethylenoxidu (Tab. 5).

### 6.4.3 Další použité přístroje

#### Ultrazvuková čistička

Název:	POWERSONIC
Typ:	PS 03000A
Výrobce:	MERCI
Sériové číslo:	35078

#### Laboratorní analytické váhy

Název:	Denver Summit
Typ:	SI-234 A
Výrobce:	MERCI
Sériové číslo:	22003408

#### Magnetické míchadlo

Název:	Heidolph
Typ:	MR 3001 K
Výrobce:	Sigma-Aldrich
Sériové číslo:	049827701

**Vývěva**

Typ:	RV 15 / 11
Výrobce:	MEZ Mohelnice
Sériové číslo:	22417

**6.5 Příprava vzorků pro měření**

Pro vlastní analýzu byly vzorky připraveny navážením polymeru a jeho rozpuštěním v dané mobilní fázi, která současně sloužila jako eluent pro GPC. Jelikož rozpustnost vzorků může ovlivnit koncentraci roztoku používaného při analýze, bylo nutné nalézt vhodné podmínky, při kterých se vzorky hyaluronanu v použité mobilní fázi optimálně rozpouštějí. V diplomové práci byla testována rozpustnost vzorků za běžné laboratorní teploty. Tento postup se ukázal být neefektivní, a to i v případě, že rozpouštění trvalo 24 hodin. Jako nejvýhodnější způsob se jevil postup, kdy byly vzorky NaHY po dobu 20 hodin zahřívány za současného míchání při teplotě 50 °C na magnetickém míchadle (Obr. 11). Před měřením na přístroji pak byly vzorky naředěny v 10 ml odměrných baňkách tak, že se jejich výsledná koncentrace, v závislosti na molekulové hmotnosti, pohybovala v rozmezí 0.25 až 2 mg.ml<sup>-1</sup>. Následně byly vzorky filtrovány přes stříkačkový filtr PTFE s velikostí pórů 0.45 μm (VWR International). Poté byla provedena jejich analýza.

Vzorky standardů byly připraveny odlišným způsobem. Po navážení standardu a jeho rozpuštění v mobilní fázi byly vzorky v 5 ml odměrných baňkách umístěny na míchadlo a přes noc (minimálně však 12 hodin) byly bez zahřívání intenzivně míchány, aby bylo usnadněno rozpouštění. Druhý den byla provedena analýza. Koncentrace jednotlivých standardů se pohybovaly, v závislosti na molekulové hmotnosti, v rozmezí od 1.2 do 2.6 mg.ml<sup>-1</sup>.



*Obr. 11. Rozpuštění vzorků hyaluronanu pomocí ohřevu na magnetickém míchadle při teplotě 50 °C*

## 6.6 Mobilní fáze

V rámci diplomové práce bylo testováno několik mobilních fází (MF), které se lišily chemickým složením, respektive solí, která v nich byla obsažena. Iontová síla všech použitých roztoků byla stejná a činila 0.1 M. Jejich přehled je uveden v Tab. 6. Mobilní fáze byly připraveny navážením a rozpuštěním příslušných solí v demineralizované vodě. Před analýzou bylo nezbytné, aby byla mobilní fáze přefiltrována přes fritu S1, čímž byly odstraněny přítomné nečistoty. Mobilní fáze byla rovněž odplyněna.

Před přípravou mobilní fáze bylo nutné vypočítat potřebné množství příslušné soli tak, aby byla zachována stejná iontová síla  $I$  použitých roztoků ( $I = 0.1$  M). Příklad výpočtu navážky pro přípravu roztoku s obsahem  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  je uveden v rovnici (12) a (13). V rovnici (12) je  $I$  iontová síla,  $c_i$  je molární koncentrace jednotlivých iontů ( $\text{mol.l}^{-1}$ ) a  $z_i$  jejich náboj:



$$I = \frac{1}{2} \cdot \sum c_i \cdot 2z_i^2 \quad (12)$$

$$0.1 = \frac{1}{2} \cdot (2 \cdot 1^2 + 1 \cdot 2^2) \cdot c$$

$$0.1 = 3 \cdot c$$

$$c = 0.0333 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$$

$$m = c \cdot M_{\text{Na}_2\text{SO}_4} \cdot V \quad (13)$$

$$m = 0.0333 \cdot 142 \cdot 1$$

$$m = 4.7 \text{ g Na}_2\text{SO}_4$$

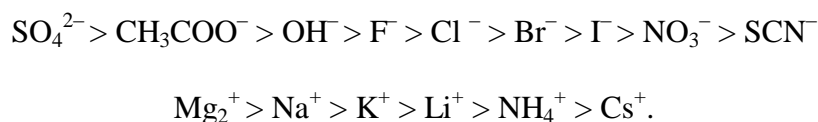
Tab. 6. Složení použitých mobilních fází (MF) s iontovou silou  $I = 0.1 \text{ M}$

Označení pro MF	Složení	Navážka [g]
MF <sub>1</sub>	NaCl	5.8
MF <sub>2</sub>	Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	4.7
MF <sub>3</sub>	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	4.4
MF <sub>4</sub>	NaSCN	8.1
MF <sub>5</sub>	NH <sub>4</sub> SCN	7.6

## 7 VÝSLEDKY A DISKUZE

### 7.1 Volba mobilní fáze

Dle odborné literatury je nejběžnější mobilní fází pro charakterizaci hyaluronanu pomocí GPC vodný roztok NaCl. Nejčastěji jsou k analýze voleny 0.1 a 0.15 M roztoky [36]. Někteří z autorů použili ve svých pracích rovněž 0.2 a 0.5 M roztoky NaCl nebo 0.1 M roztok NaNO<sub>3</sub> [33], [34], [36]. V diplomové práci byla řada testovaných MF rozšířena o vodné roztoky solí obsahující vybrané ionty z Hofmeisterovy řady. Hofmeisterova série, neboli lyotropická řada, definuje řadu anionů a kationů na základě minimální koncentrace neutrálních solí potřebné k vysrážení proteinů. Pořadí anionů a kationů je následující:



Pozice iontu v této lyotropické řadě Hofmeisterových iontů je určena velikostí interakce proteinu a soli, která závisí na tom, jak je daná sůl schopná měnit povrchové napětí roztoku, do kterého je přidána. Ionty jsou pak řazeny podle snižujícího se povrchového napětí. Podle pozice v lyotropické řadě jsou rozlišovány tzv. kosmotropy a chaotropy. Na levé straně řady se nacházejí kosmotropy. Mezi takové ionty se řadí například SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>. Tyto soli snižují rozpustnost nepolárních molekul a vykazují vysolovací (salting out) efekt, při kterém zesilují hydrofobní interakce. Silně interagují s vodou a molekuly vody, které obklopují ionty soli, jsou lépe uspořádány než voda v okolním objemu. V lyotropické řadě na pravo se nachází vsolovací (salting in) ionty, označované jako chaotropy. Typickým příkladem chaotropů je SCN<sup>-</sup>. Tyto soli zvyšují rozpustnost nepolárních molekul a způsobují rozrušení struktury vody kolem iontů soli [56, s. 248 ], [57, s. 369]. Efekt anionů je přitom silnější než efekt kationů. Anion Cl<sup>-</sup> se nachází přibližně uprostřed řady, ostatní soli pro MF pak byly vybrány tak, aby obsahovaly aniony z protilehlých konců Hofmeisterovy řady. Z kationů pak byly testovány Na<sup>+</sup> a NH<sub>4</sub><sup>+</sup>. Konkrétně tedy mobilní fáze obsahovaly následující soli: NaCl, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, NaSCN a NH<sub>4</sub>SCN.

## 7.2 Reprodukovatelnost analýzy

Vzhledem ke skutečnosti, že GPC analýza je časově náročná, nebyly všechny studované vzorky hyaluronanu analyzovány opakovaně. U vybraného vzorku NaHY<sub>50K</sub> byl však proveden test reprodukovatelnosti stanovení molekulových hmotností  $M_n$ ,  $M_w$  i  $M_p$ , které byly vypočítány pomocí kalibračních závislostí získaných z 1. a 3. polynomu proloženého jednotlivými body kalibrační závislosti. Výsledky získané měřením na obou přístrojích jsou přehledně shrnuty v Tab. 7 a 8.

Tab. 7. Reprodukovatelnost hodnot molekulových hmotností vybraného vzorku NaHY stanovených na přístroji Shimadzu HPLC

Vzorek	$M_n$ [g.mol <sup>-1</sup> ]		$M_w$ [g.mol <sup>-1</sup> ]	
	lineární	3. polynom	lineární	3. polynom
<b>MF Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></b>				
NaHY <sub>50K-1</sub>	103800	107800	158200	167400
NaHY <sub>50K-2</sub>	104900	110800	170500	178500
NaHY <sub>50K-3</sub>	108000	107800	175700	182600
Ø	105600	108800	168100	176100
SD	1800	1400	7300	6400
RSD [%]	1.7	1.3	4.3	3.6
<b>MF (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></b>				
NaHY <sub>50K-1</sub>	101100	105000	164000	171900
NaHY <sub>50K-2</sub>	101200	104500	168600	175900
NaHY <sub>50K-3</sub>	101500	104700	170300	177400
Ø	101300	104700	167600	175000
SD	170	200	2700	2300
RSD [%]	0.2	0.2	1.6	1.3

Pozn.: Použitý software neumožňoval výpočet  $M_p$

SD – směrodatná odchylka, RSD – relativní směrodatná odchylka



Tab. 8. Reprodukovatelnost hodnot molekulových hmotností vybraného vzorku NaHY stanovených na přístroji PL-GPC 50

Vzorek	$M_p$ [g.mol <sup>-1</sup> ]		$M_n$ [g.mol <sup>-1</sup> ]		$M_w$ [g.mol <sup>-1</sup> ]	
	lineární	3. polynom	lineární	3. polynom	lineární	3. polynom
<b>MF NaCl</b>						
NaHY <sub>50K-1</sub>	51600	66800	29700	40300	72100	98200
NaHY <sub>50K-2</sub>	52000	66800	35600	54700	74800	92900
NaHY <sub>50K-3</sub>	49600	66000	32000	47400	73000	88600
Ø	51000	66500	32400	47500	73300	93200
SD	1000	400	2400	5900	1100	3900
RSD [%]	2.0	0.6	7.4	12.4	1.5	4.2
<b>MF Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></b>						
NaHY <sub>50K-1</sub>	35700	45600	16600	25700	77900	80200
NaHY <sub>50K-2</sub>	35500	45500	21400	31800	59600	66000
NaHY <sub>50K-3</sub>	36000	45300	17500	26800	77200	80000
Ø	35700	45500	18500	28100	71600	75400
SD	200	120	2100	2700	8500	6600
RSD [%]	0.6	0.3	11.4	9.6	11.9	8.8

SD – směrodatná odchylka, RSD – relativní směrodatná odchylka

Z údajů uvedených v Tab. 7 a 8 je zřejmé, že reprodukovatelnost stanovení molekulové hmotnosti NaHY pomocí přístroje Shimadzu HPLC je lepší ve srovnání s přístrojem PL-GPC 50 ( $RSD_{HPLC}$  je ve všech případech menší než 5 %,  $RSD_{GPC}$  je pak menší než 12 %). Důvod je možno hledat ve skutečnosti, že prvně jmenovaný přístroj zaznamenává data pouze z jednoho, a to koncentračního detektoru, a k výpočtu molekulové hmotnosti je potřebný pouze jeden typ signálu. Reprodukovatelnost stanovení molekulové hmotnosti na přístroji PL-GPC 50 s koncentračním a viskozitním detektorem závisí na tom, je-li stanovována hodnota  $M_p$  nebo ostatní průměry molekulových hmotností. Pro  $M_p$  je velmi dobrá, protože tato hodnota odpovídá jednomu bodu, a to maximu na distribuční křivce a je jednoznačně určena. Pro výpočet  $M_w$  a  $M_n$  je však třeba stanovit začátek a konec chromatografického píku ze záznamu koncentračního a viskozitního detektoru, což nemusí

být vždy jednoznačné a ovlivní to výsledné hodnoty  $M_w$ ,  $M_n$  a reprodukovatelnost jejich stanovení.

Je nutné rovněž uvést, že reprodukovatelnost chromatografické analýzy je primárně určena reprodukovatelností retenčních časů ( $R_T$ ) jednotlivých standardů a analytů na příslušném přístroji. Ta byla ověřena sledováním hodnot  $R_T$  u vybraného vzorku NaHY v mobilních fázích obsahujících  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  a NaCl. Výsledky s průměrnou hodnotou, směrodatnou odchylkou a relativní směrodatnou odchylkou jsou pro oba přístroje sumarizovány v Tab. 9 a 10.

Tab. 9. Reprodukovatelnost  $R_T$  maxima chromatografického píku vzorku NaHY analyzovaného v MF s uvedenými solemi (HPLC Shimadzu)

Vzorek	$R_T$ [min]	
	$\text{Na}_2\text{SO}_4$	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
NaHY <sub>50K</sub>	19.62	19.64
	19.69	19.65
	19.67	19.64
Ø	19.66	19.64
SD	0.03	0.01
RSD [%]	0.15	0.05

SD – směrodatná odchylka, RSD – relativní směrodatná odchylka

Tab. 10. Reprodukovatelnost  $R_T$  maxima chromatografického píku vzorku NaHY analyzovaného v MF s uvedenými solemi (PL-GPC 50)

Vzorek	$R_T$ [min]	
	NaCl	$\text{Na}_2\text{SO}_4$
NaHY <sub>50K</sub>	19.77	19.63
	19.68	19.88
	19.68	19.65
Ø	19.71	19.72
SD	0.04	0.11
RSD [%]	0.20	0.56

SD – směrodatná odchylka, RSD – relativní směrodatná odchylka

Data v Tab. 9 a 10 naznačují, že reprodukovatelnost retenčních časů zaznamenaných na přístroji Shimadzu HPLC je lepší ve srovnání s GPC-PL 50. Pro MF s obsahem  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  je  $\text{RSD}_{\text{HPLC}} < 0.15 \%$  a  $\text{RSD}_{\text{GPC}} < 0.56 \%$ . Tato skutečnost rovněž přispívá k rozdílné reprodukovatelnosti ve stanovení molekulových hmotností na obou přístrojích.

Na základě výše uvedených výsledků lze předpokládat, že pro zbývající polymery bude reprodukovatelnost obdobná.

### 7.3 Stanovení molekulové hmotnosti NaHY – Shimadzu HPLC

#### 7.3.1 Vliv použité MF na separaci standardů

K vyhodnocení výsledků analýz provedených na přístroji Shimadzu HPLC byla použita metoda konvenční kalibrace úzkými standardy. Jako standardy sloužily polysacharidy pullulany (PUL), a také standardy polyethylenoxidu (PEO) a polyethylenglykolu (PEG), což jsou nejznámější polyétery. Oba typy standardů jsou rozdílné, ať už co se týká chování polymerního klubka v roztoku, tak strukturní podobnosti s NaHY (polysacharid). Proto bylo dílčím cílem práce zjistit, jak ovlivní kalibrace těmito dvěma typy standardů molekulovou hmotnost vzorků NaHY.

V experimentální části byly studovány vzorky NaHY, jejichž molekulová hmotnost ležela v rozmezí  $29.60 \times 10^3$  až  $2.38 \times 10^6 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ . K dispozici byl však pouze standard PUL  $788 \times 10^3 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$  a standard PEO  $895.5 \times 10^3 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ . Rozdíl mezi předpokládanou molekulovou hmotností studovaných vzorků (cca  $2.4 \times 10^6 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ ) a molekulovou hmotností nejvyššího dostupného standardu byl tedy značný. Z těchto důvodů byly testovány kalibrační závislosti, které byly vyhodnoceny proložením 1. a 3. polynomického stupně.

Na příkladu standardů PUL a PEO s obdobnou molekulovou hmotností je pomocí srovnání hodnot retenčních časů maxim chromatografických píků ilustrován vliv použité MF na jejich separaci.

Tab. 11. Retenční čas ( $R_T$ ) maxima chromatografických píků stanovený pro vybrané standardy ve všech použitých MF (Shimadzu HPLC)

Standard	$M_p$ [g.mol <sup>-1</sup> ]	$R_T$ [min]				
		NaCl	Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	NaSCN	NH <sub>4</sub> SCN
PUL	404 x 10 <sup>3</sup>	18.06	18.19	18.09	17.99	17.92
PUL	112 x 10 <sup>3</sup>	20.12	20.26	20.17	20.09	19.97
PUL	47.3 x 10 <sup>3</sup>	21.16	21.31	21.22	21.15	20.99
PEO	442.8 x 10 <sup>3</sup>	17.30	17.57	17.53	17.10	17.07
PEO	116.3 x 10 <sup>3</sup>	19.45	20.02	19.76	19.07	19.11
PEO	50.63 x 10 <sup>3</sup>	20.92	21.66	21.38	20.40	20.47

V Tab. 11 jsou uvedeny pouze jednotlivé hodnoty bez směrodatných odchylek, které nebyly vzhledem k časové náročnosti stanoveny. Lze však předpokládat, že relativní směrodatné odchylky opakovatelnosti retenčních časů, jak pro standardy, tak pro NaHY, budou menší než 0.15 % (Tab. 9, diskuze v části 7.2.).

Při porovnání PUL a PEO standardů lze konstatovat, že pro PUL byly zaznamenány menší rozdíly v  $R_T$  maxim chromatografických píků stanovených v jednotlivých použitých mobilních fázích. Tvary píků pak byly symetričtější ve srovnání se standardy PEO. Čím byla molekulová hmotnost standardu nižší, tím symetričtější byl daný pík. Jako zajímavá se dále jevila skutečnost, že u standardů s nejvyššími molekulovými hmotnostmi (788 x 10<sup>3</sup>, 895.5 x 10<sup>3</sup> a 442.8 x 10<sup>3</sup> g.mol<sup>-1</sup>) bylo patrné chvostování (tailing), které se výrazněji projevilo u PEO.

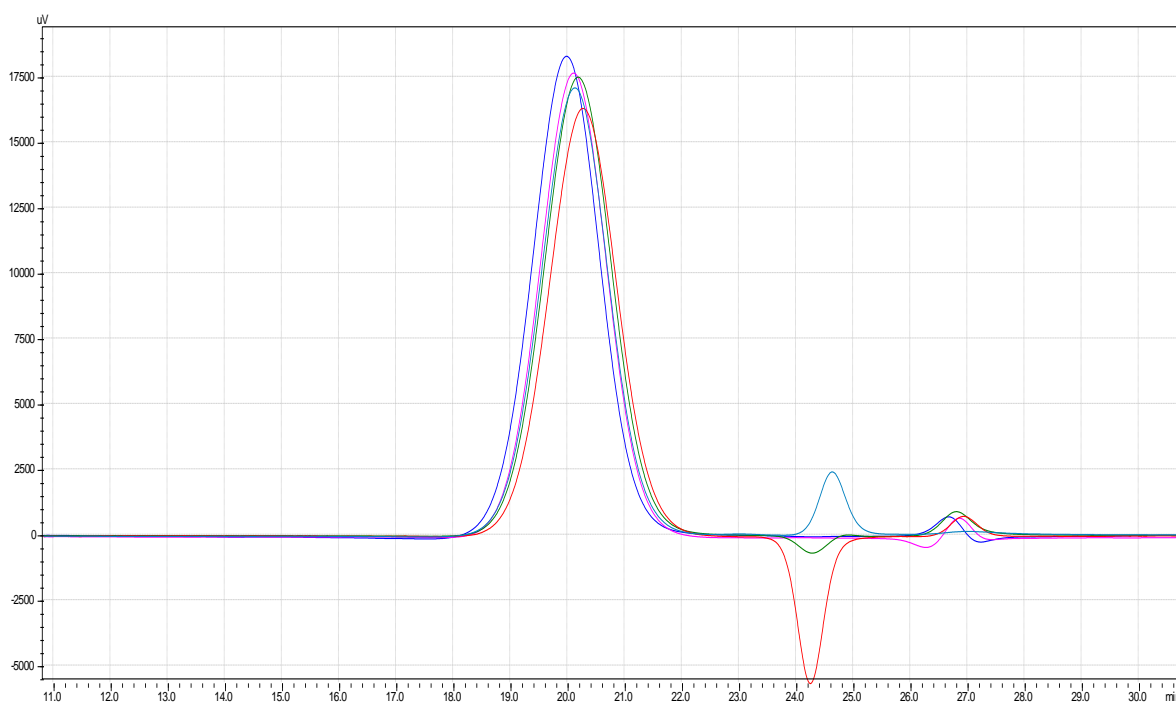
Hodnoty v Tab. 11 dále indikují, že při použití NaSCN a NH<sub>4</sub>SCN v MF byly obecně  $R_T$  maxim píků u PUL standardů nejkratší a při stejných koncentracích byla rovněž zaznamenána největší plocha píků. Naopak při použití Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> pak byly  $R_T$  nejdelší a plocha píků nejmenší. Toto pravidlo platilo pro všechny PUL standardy.

U PEO standardů bylo zaznamenáno, že oproti PUL byly chromatografické píky asymetrické a v oblasti vyšších molekulových hmotností u nich bylo patrné výrazné chvostování. Obdobně jako pro PUL standardy platilo, že nejkratší  $R_T$  byly zaznamenány v MF při použití thiokyanatanů, v přítomnosti síranů pak byly  $R_T$  nejdelší a pro MF s obsahem

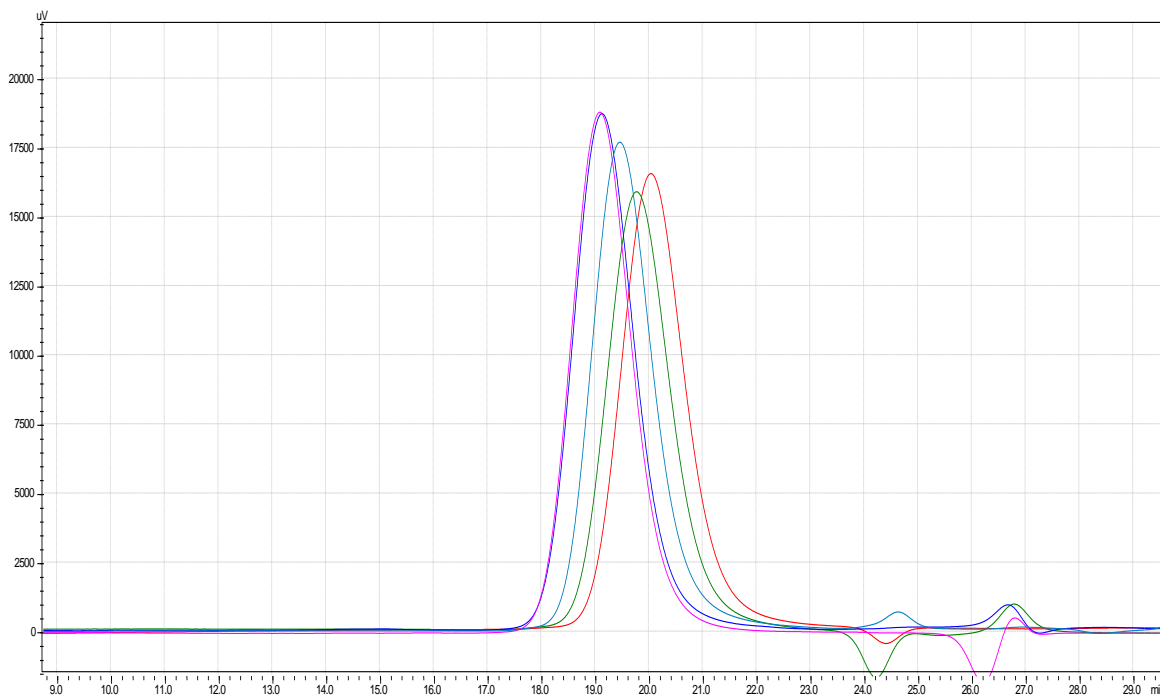
chloridu sodného ležel  $R_T$  zhruba uprostřed mezi retencí síranů a thiokyanatanů. Nejvíce zřetelné chvostování pak bylo patrné pro MF s obsahem  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (Obr. 17).

Níže na Obr. 12 a 13 je pro ilustraci uvedeno srovnání chromatogramů PUL standardu s molekulovou hmotností  $112 \times 10^3 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$  a PEO standardu s  $116 \times 10^3 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$  zaznamenaných ve všech použitých MF. Tyto obrázky velmi dobře znázorňují vliv složení mobilní fáze na oba polymery. Zatímco vliv přidané soli na retenci PUL standardů není tak patrný, PEO standardy jsou v tomto ohledu daleko náchylnější a vliv jednotlivých solí přidaných do vodné mobilní fáze je na chromatogramech zřejmý.

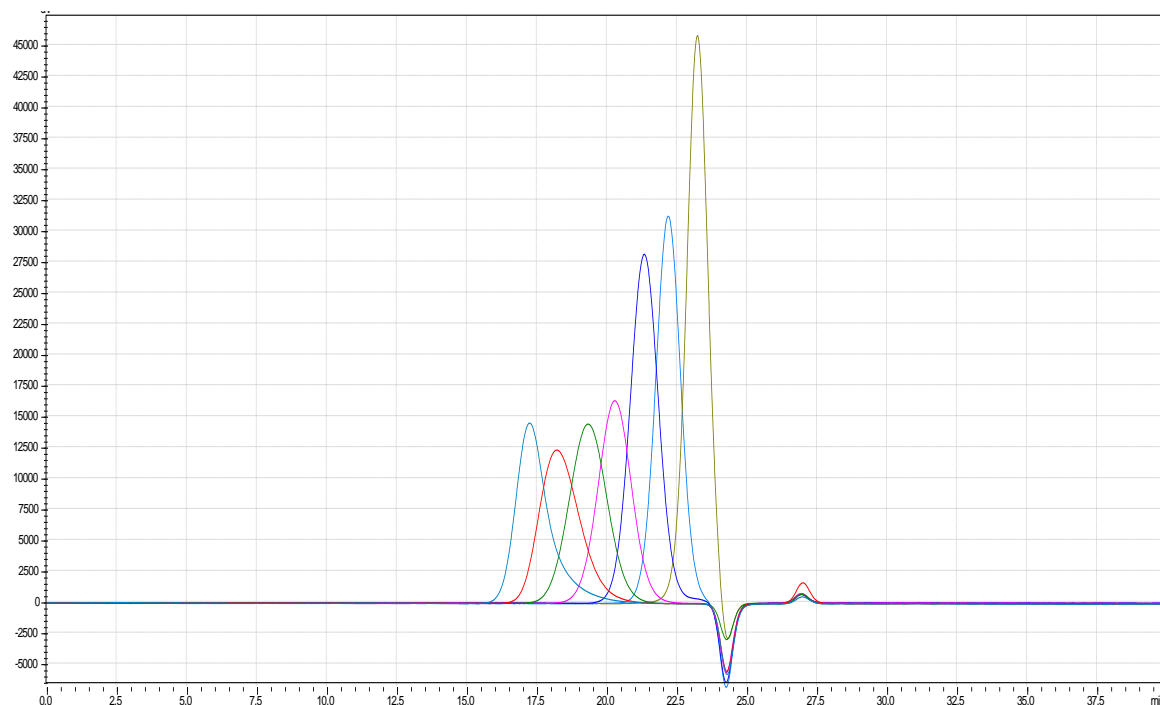
Pro názornost bylo rovněž provedeno srovnání všech kalibračních standardů PUL a PEO ve dvou vybraných MF obsahujících sůl se stejným anionem  $\text{SO}_4^{2-}$ , a to  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  a  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . Toto srovnání je uvedeno na Obr. 14 až 17.



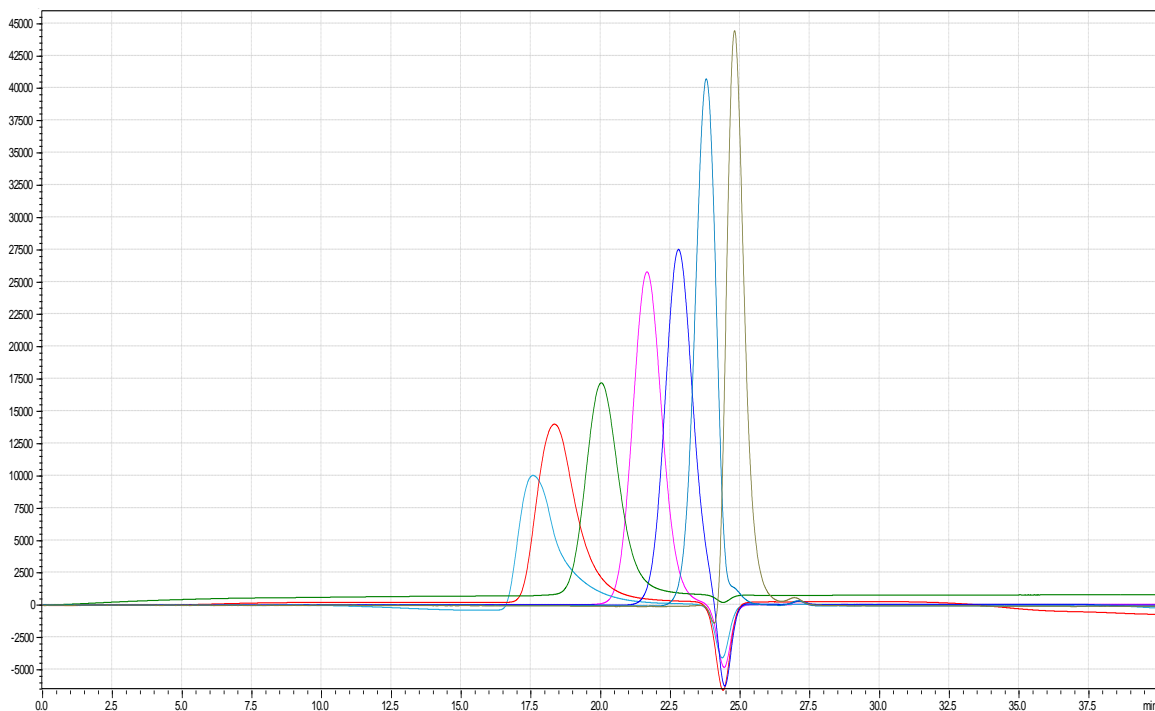
Obr. 12. Analýza standardu PUL  $112 \times 10^3 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$  ve všech MF; tmavě modrá – NaSCN, fialová –  $\text{NH}_4\text{SCN}$ , světle modrá – NaCl, zelená –  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  a červená –  $\text{Na}_2\text{SO}_4$



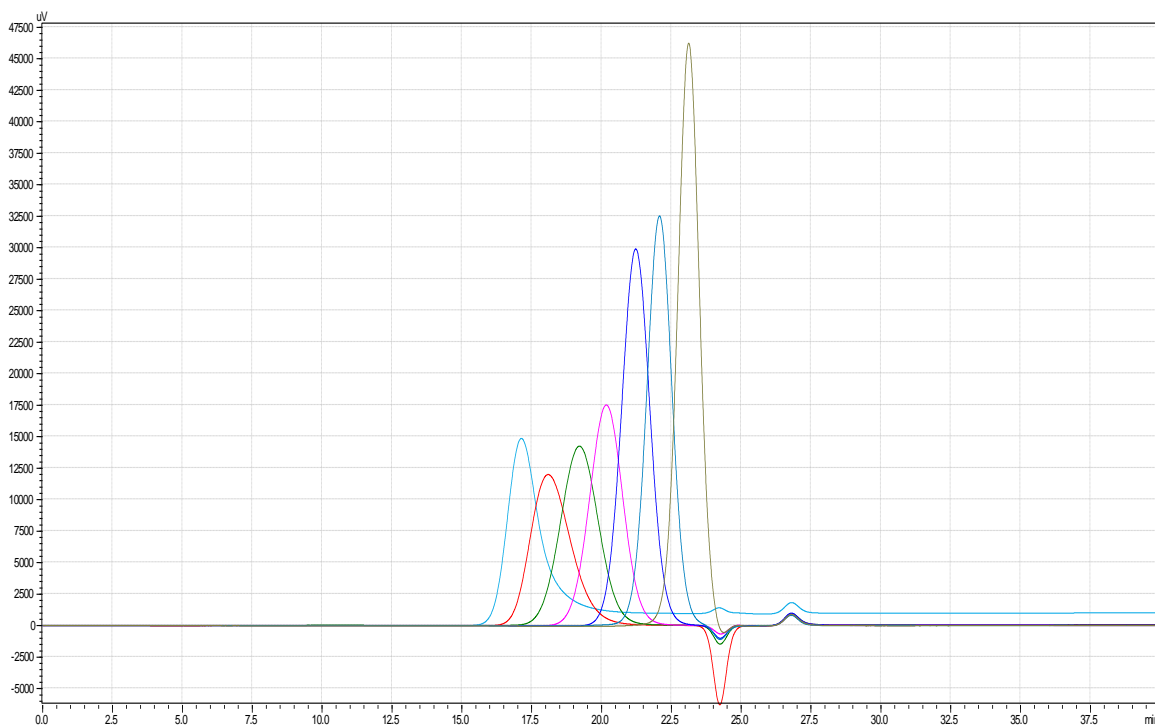
Obr. 13. Analýza standardu PEO  $116.3 \times 10^3 \text{ g.mol}^{-1}$  ve všech MF; tmavě modrá – NaSCN, fialová –  $\text{NH}_4\text{SCN}$ , světle modrá – NaCl, zelená –  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  a červená –  $\text{Na}_2\text{SO}_4$



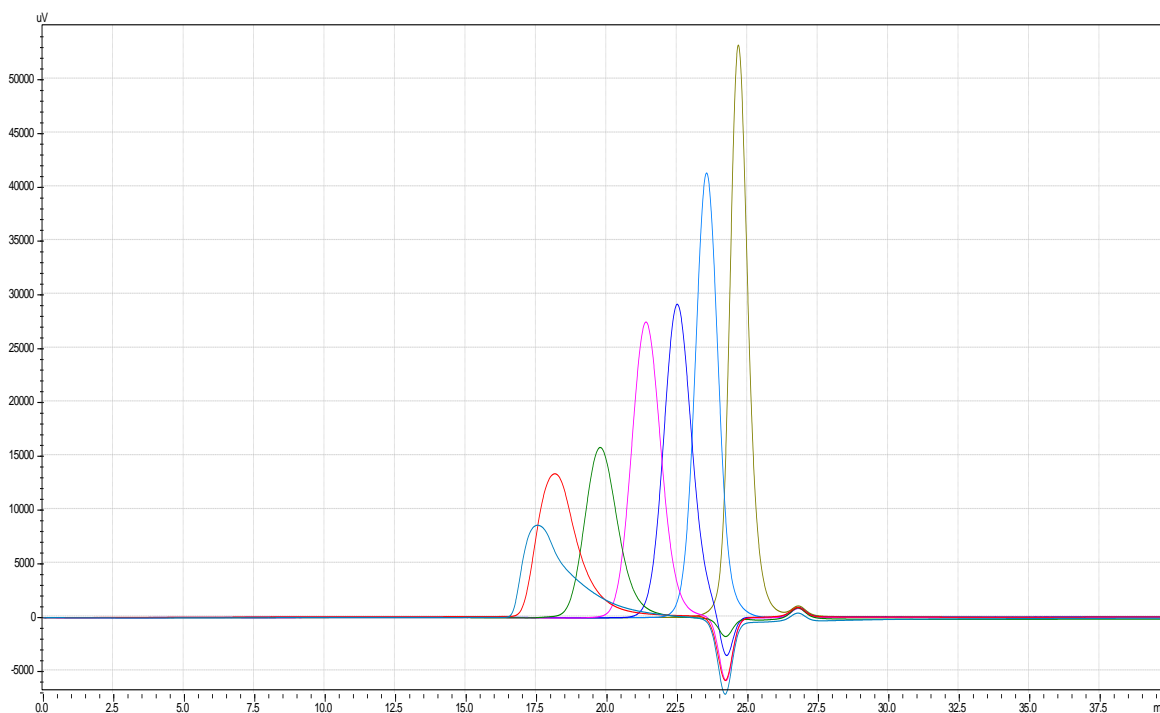
Obr. 14. Analýza standardů PUL v MF s  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ; šedomodrá –  $788 \times 10^3$ , červená –  $404 \times 10^3$ , zelená –  $212 \times 10^3$ , fialová –  $112 \times 10^3$ , tmavě modrá –  $47.3 \times 10^3$ , světle modrá –  $22.8 \times 10^3$ , žlutozelená –  $5.9 \times 10^3 \text{ g.mol}^{-1}$



Obr. 15. Analýza standardů PEO v MF s  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ; šedomodrá –  $442.8 \times 10^3$ , červená –  $278.1 \times 10^3$ , zelená –  $116.3 \times 10^3$ , fialová –  $50.63 \times 10^3$ , tmavě modrá –  $21.03 \times 10^3$ , světle modrá –  $7.92 \times 10^3$ , žlutozelená –  $1.01 \times 10^3 \text{ g.mol}^{-1}$



Obr. 16. Analýza standardů PUL v MF s  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ; šedomodrá –  $788 \times 10^3$ , červená –  $404 \times 10^3$ , zelená –  $212 \times 10^3$ , fialová –  $112 \times 10^3$ , tmavě modrá –  $47.3 \times 10^3$ , světle modrá –  $22.8 \times 10^3$ , žlutozelená –  $5.9 \times 10^3 \text{ g.mol}^{-1}$

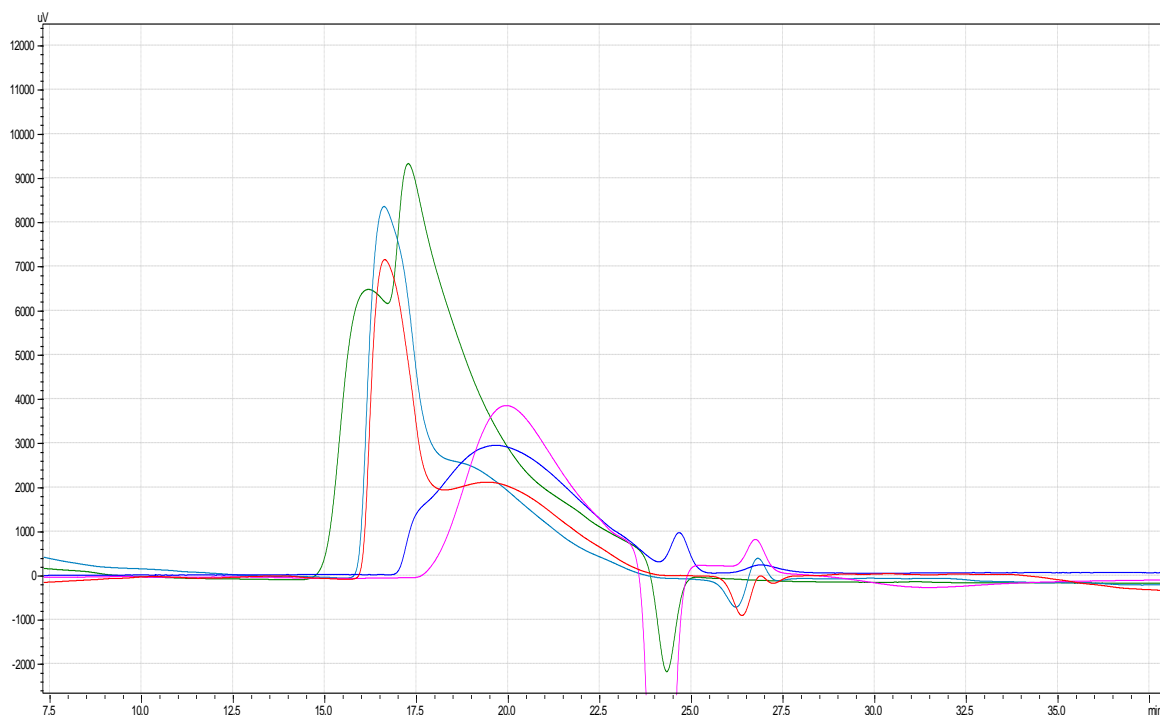


Obr. 17. Analýza standardů PEO v MF s  $(NH_4)_2SO_4$ ; šedomodrá –  $442.8 \times 10^3$ , červená –  $278.1 \times 10^3$ , zelená –  $116.3 \times 10^3$ , fialová –  $50.63 \times 10^3$ , tmavě modrá –  $21.03 \times 10^3$ , světle modrá –  $7.92 \times 10^3$ , žlutozelená –  $1.01 \times 10^3 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$

Uvedené obrázky rovněž názorně ukazují rozdíly mezi PUL a PEO v symetrii píků. Tailing se více objevuje u PEO, a to především u vysokomolekulárních standardů. Se snižující se molekulovou hmotností byly píky symetričtější. Tailing byl nejvíce patrný u vzorků PEO  $442.8 \times 10^3 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$  a  $278.1 \times 10^3 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$  analyzovaných v MF s  $Na_2SO_4$ . Srovnáním s PUL bylo zjištěno, že chvostování se objevilo pouze u polysacharidu s nejvyšší molekulovou hmotností ( $788 \times 10^3 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ ), ostatní píky byly symetrické.

Byla rovněž provedena chromatografická analýza PEO standardu s molekulovou hmotností  $895.5 \times 10^3 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ . Pro sestavení kalibrační závislosti však tento standard nebyl použit, neboť jeho chromatografická separace byla neuspokojivá. Tvar chromatografických píků byl asymetrický a tailing příliš velký. Navíc byla jeho separace výrazně ovlivněna typem soli použité v mobilní fázi. Pro ukázkou jsou na Obr. 18 znázorněny chromatogramy tohoto polymeru zaznamenané analýzou v MF s obsahem studovaných solí.

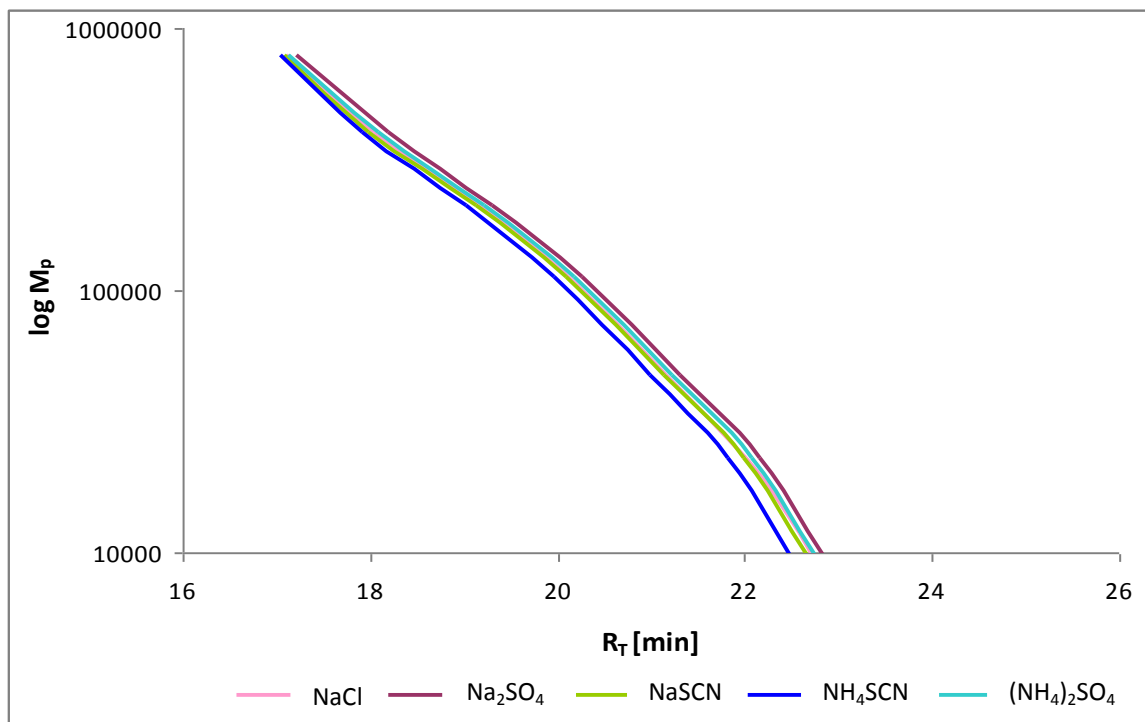




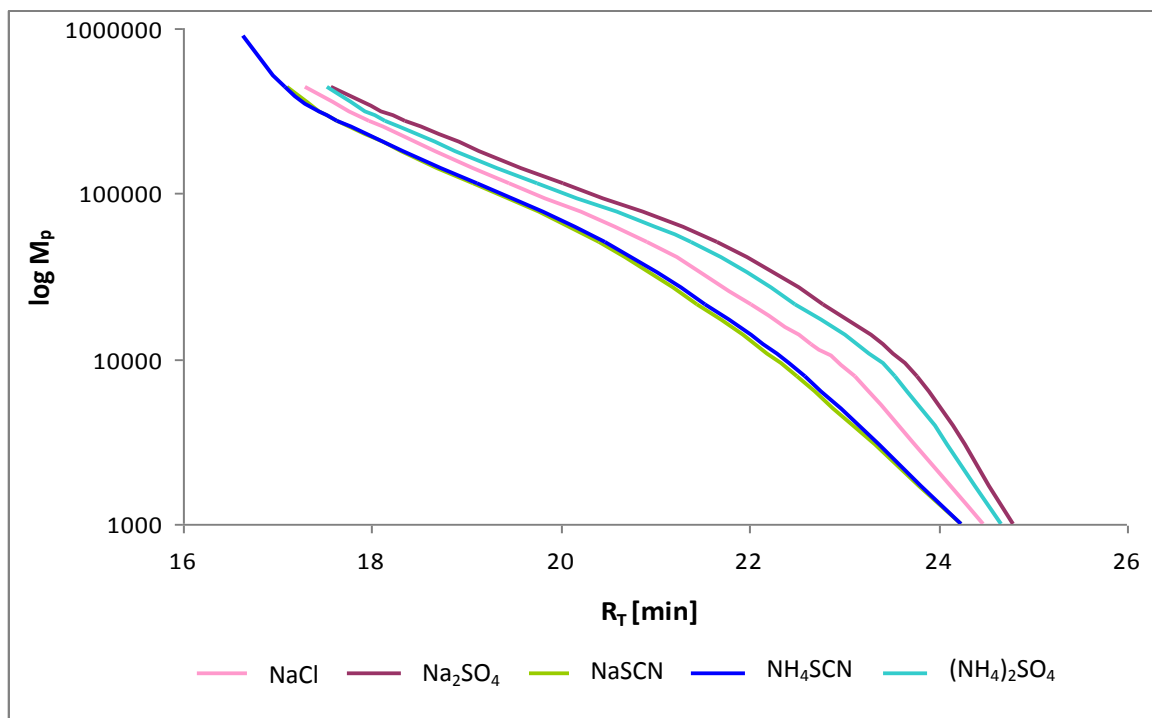
Obr. 18. Chromatografická analýza standardu PEO  $895.5 \times 10^3 \text{ g.mol}^{-1}$  v různých MF; zelená – NaCl, červená – NaSCN, světle modrá –  $\text{NH}_4\text{SCN}$ , fialová –  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , tmavě modrá –  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

Rozdíly v separaci standardů analyzovaných v MF obsahujících studované soli se následně projeví i na kalibračních závislostech, které byly sestaveny z hodnot retenčních časů získaných pro jednotlivé PUL nebo PEO při chromatografické analýze a ze známých hodnot molekulových hmotností. Srovnání kalibračních křivek sestavených ze standardů analyzovaných v různých mobilních fázích je pro PUL znázorněno na Obr. 19 a pro PEO na Obr. 20.

Tyto obrázky názorně ilustrují skutečnost diskutovanou výše a znázorněnou na Obr. 12 a Obr. 13, a to významný vliv solí použitých v MF, který se projeví ve zcela odlišném tvaru kalibračních závislostí sestavených z PEO a PUL.



Obr. 19. Srovnání kalibračních křivek v závislosti na použité MF pro PUL standardy



Obr. 20. Srovnání kalibračních křivek v závislosti na použité MF pro PEO standardy

### 7.3.2 Molekulová hmotnost komerčních vzorků hyaluronanu

Molekulové hmotnosti vzorků NaHY byly stanoveny jak pomocí standardů PUL, tak i PEO. K analýze pak byla použita data zaznamenaná při analýze vzorků NaHY ve všech sledovaných mobilních fázích. Při vyhodnocení výsledků ( $M_w$ ,  $M_n$ ) bylo posuzováno, která série standardů je ke kalibraci vhodnější a které hodnoty vypočtených molekulových hmotností NaHY se blíží uváděným nominálním hodnotám. Součástí práce bylo rovněž posouzení výpočtu molekulových hmotností NaHY po kalibraci kalibrační závislostí vyhodnocenou dvěma způsoby, a to proložením bodů přímkou nebo polynomem.

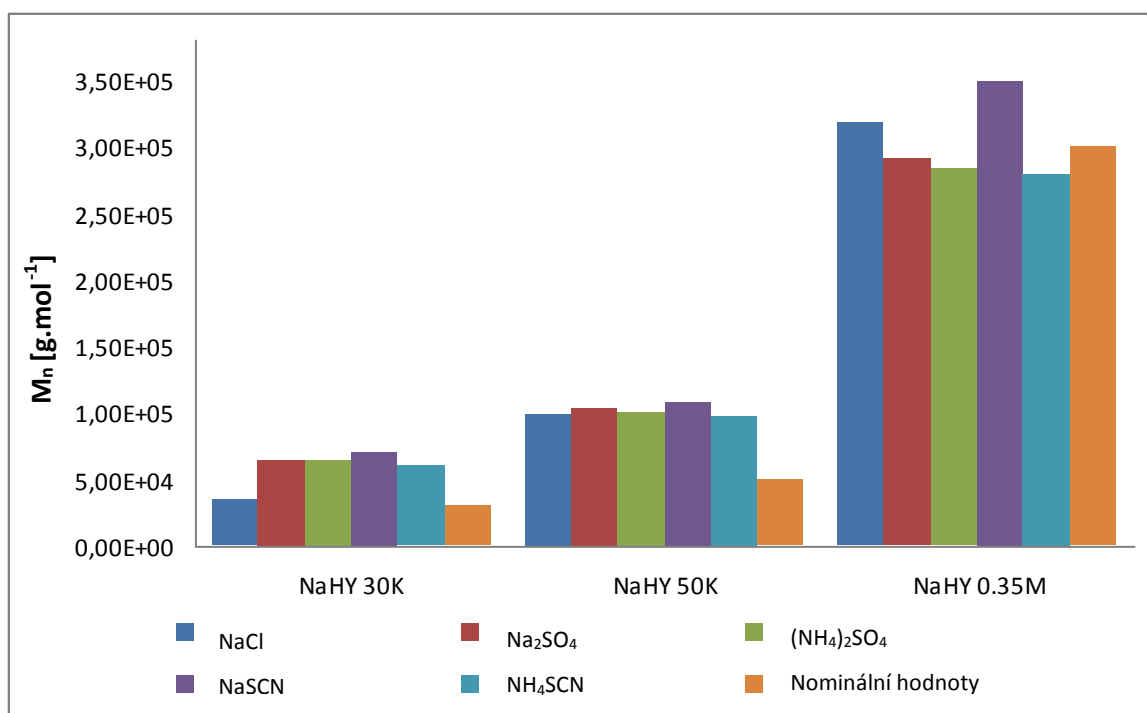
Při použití mobilní fáze s obsahem NaCl a po kalibraci PUL standardy bylo zjištěno, že kalibrační závislost proložená lineárně poskytuje hodnoty molekulových hmotností, které jsou bližší hodnotám nominálním, než když bylo použito kalibrační závislosti vyhodnocené 3. polynomem. Hodnoty číselného průměru molekulové hmotnosti  $M_n$  jsou pak obecně bližší hodnotám nominálním než hmotnostní průměr  $M_w$ . Při použití kalibrace vytvořené z PEO standardů je situace obdobná. Lze rovněž konstatovat, že hodnoty molekulových hmotností NaHY stanovené pomocí PEO standardů odpovídají nominálním hodnotám lépe, než hodnoty stanovené pomocí kalibrace ze standardů PUL.

U mobilní fáze obsahující  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  a po kalibraci jak PUL, tak PEO standardy platí, že stanovené hodnoty  $M_n$  leží opět blíže hodnotám nominálním než  $M_w$ . Pro tuto MF je rovněž charakteristické, že zde nejsou pozorovány tak patrné rozdíly mezi hodnotami molekulových hmotností získanými po kalibraci kolony oběma použitými typy standardů. Je-li v MF obsažen druhý ze síranů,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , jsou hodnoty molekulových hmotností pro vzorky NaHY<sub>30K</sub> až NaHY<sub>0.5M</sub> stanovené v této MF obdobné, jako v MF s  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . Rozdíly jsou potom patrné až u hyaluronanů s vysokými molekulovými hmotnostmi (NaHY<sub>2.1M</sub> a NaHY<sub>2.4M</sub>), kdy MF s  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  poskytuje vyšší hodnoty  $M_w$  a  $M_n$  ve srovnání s  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , a to bez rozdílu, které standardy byly použity ke kalibraci.

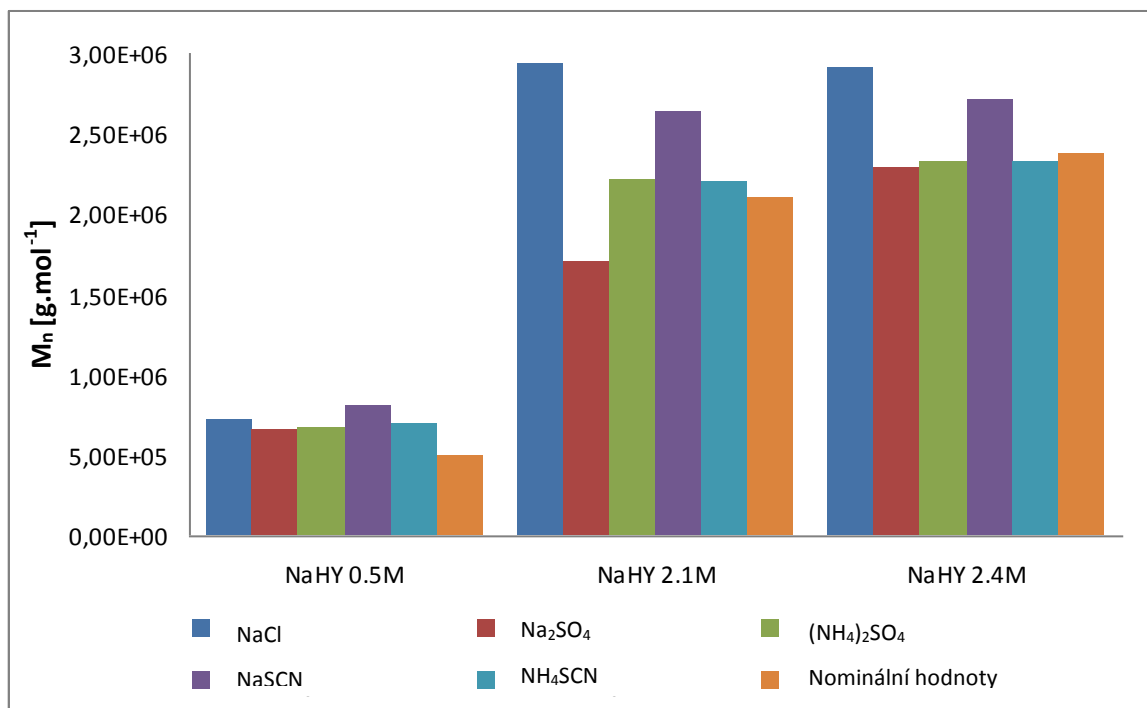
Při použití obou MF obsahujících thiokyanatany ( $\text{NaSCN}$  a  $\text{NH}_4\text{SCN}$ ) a při kalibraci kolon PUL standardy byly hodnoty  $M_w$  a  $M_n$  stanovené pro NaHY obdobné jako v případě MF s NaCl. Naopak po kalibraci PEO standardy se tyto hodnoty výrazně lišily a byly podstatně nižší než hodnoty nominální, což bylo především patrné u vysokomolekulárních vzorků NaHY (NaHY<sub>2.1M</sub> a NaHY<sub>2.4M</sub>).

Skutečnost, že PUL standardy jsou při chromatografické separaci mnohem méně citlivé na změnu mobilní fáze, respektive na typ soli, který tato MF obsahuje než standardy PEO, se následně projeví v menší variabilitě stanovených hodnot molekulových hmotností studovaných NaHY. To je v dobrém souladu s informacemi z části 7.3.1, kde je na Obr. 12 a Obr. 13 dokumentován vliv složení MF na kalibrační závislost získanou jak pomocí PUL, tak i PEO standardů.

Na příkladu hodnot  $M_n$  je v další části práce pomocí grafů znázorněn vliv MF na hodnoty molekulových hmotností NaHY získané vyhodnocením po kalibraci kolon oběma typy použitých standardů.

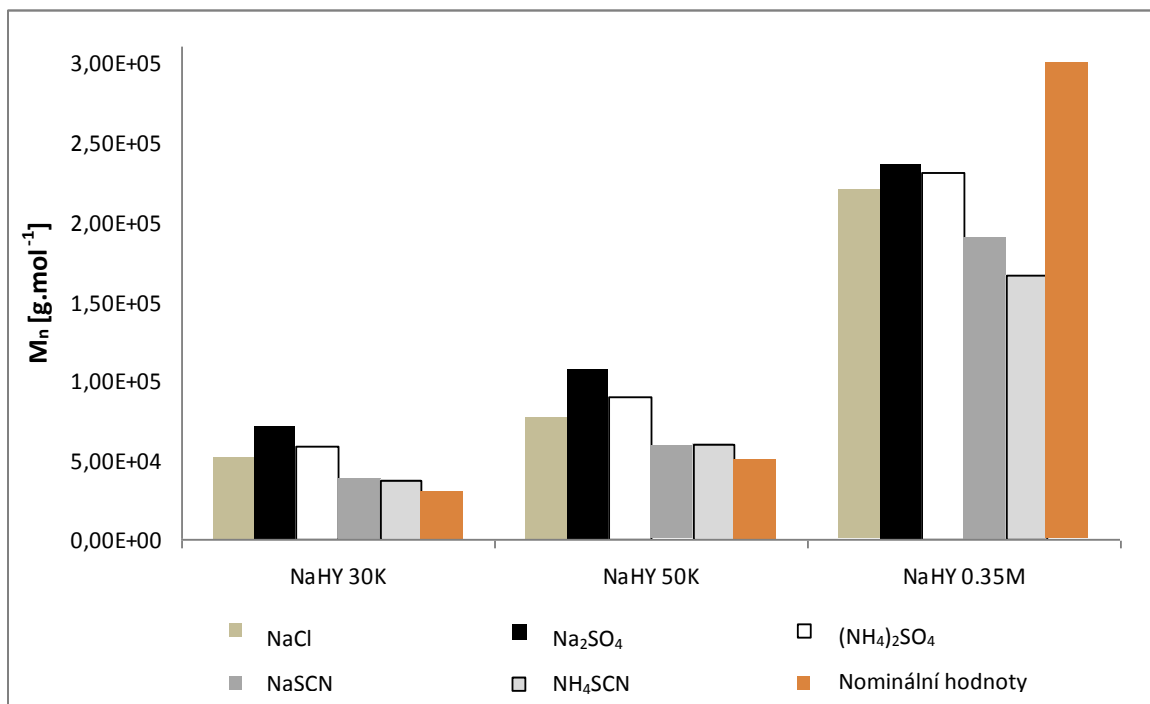


Obr. 21. Hodnoty  $M_n$  vzorků  $NaHY_{30K}$ ,  $NaHY_{50K}$  a  $NaHY_{0.35M}$  stanovené za použití standardů PUL, vyhodnocené pomocí kalibrace získané lineární regresí

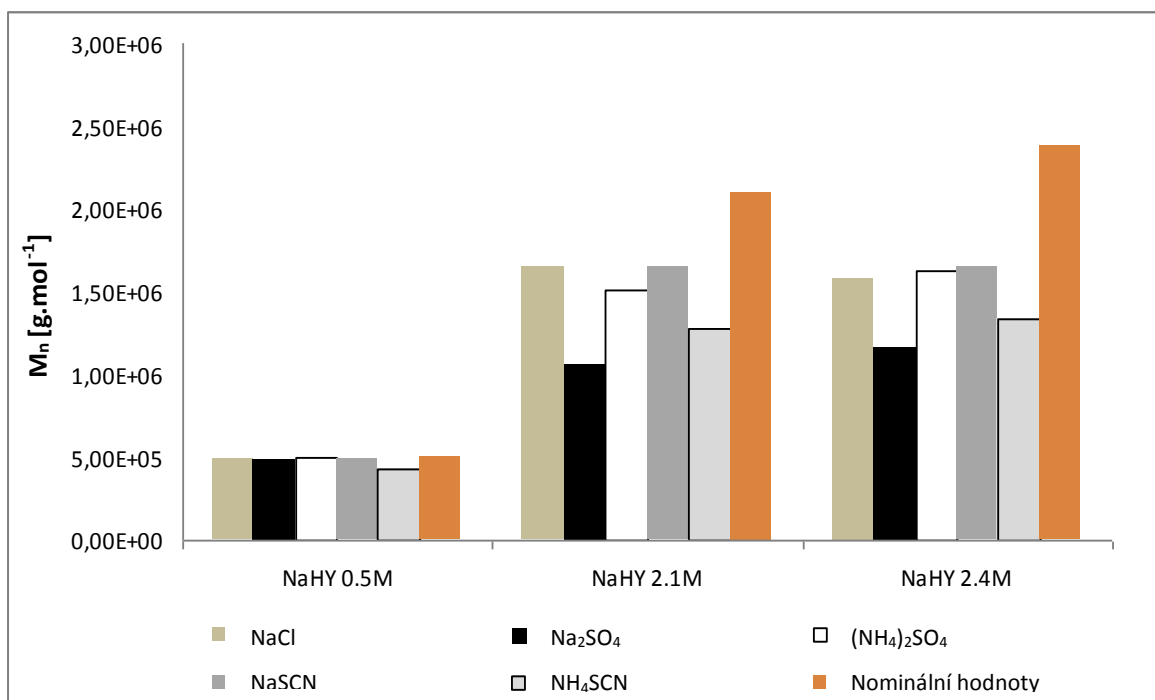


Obr. 22. Hodnoty  $M_n$  vzorků  $NaHY_{0.5M}$ ,  $NaHY_{2.1M}$  a  $NaHY_{2.4M}$  stanovené za použití standardů PUL, vyhodnocené pomocí kalibrace získané lineární regresi

Grafy znázorněné na Obr. 21 a 22 ilustrují diskutovanou skutečnost, že hodnoty  $M_n$  pro vzorky NaHY stanovené pomocí lineární kalibrace (PUL) závisí na složení mobilní fáze, ve které jsou studované polymery rozpuštěny. Pro  $NaHY_{30K}$  a  $NaHY_{50K}$  ležely hodnoty  $M_n$  v rozmezí  $33.7 \times 10^3$  až  $71.7 \times 10^3$  a  $97.8 \times 10^3$  až  $108.3 \times 10^3 \text{ g.mol}^{-1}$  a s výjimkou MF s NaCl byly vyšší než nominální. U vysokomolekulárních vzorků NaHY ( $NaHY_{2.1M}$ ,  $NaHY_{2.4M}$ ) byly hodnoty  $M_n$  výrazně vyšší v MF s NaCl a NaSCN, naopak u MF s  $Na_2SO_4$  byla hodnota  $M_n$  pro vzorek  $NaHY_{2.1M}$  nižší než nominální. Hodnoty hmotnostního průměru molekulových hmotností  $M_w$  pak byly pro všechny studované vzorky NaHY signifikantně vyšší ve srovnání s hodnotami uváděnými výrobcem. Výsledky stanovených hodnot  $M_w$  a  $M_n$  jsou shrnuty v Tab. 20 až 25 v Příloze I a leží v rozmezí  $2.8 \times 10^6$  až  $4.3 \times 10^6 \text{ g.mol}^{-1}$ .



Obr. 23. Hodnoty  $M_n$  vzorků  $NaHY_{30K}$ ,  $NaHY_{50K}$  a  $NaHY_{0.35M}$  stanovené za použití standardů PEO, vyhodnocené pomocí kalibrace získané lineární regresi



Obr. 24. Hodnoty  $M_n$  vzorků  $NaHY_{0.5M}$ ,  $NaHY_{2.1M}$  a  $NaHY_{2.4M}$  stanovené za použití standardů PEO, vyhodnocené pomocí kalibrace získané lineární regresi

Při srovnání hodnot  $M_n$  získaných pomocí standardů PEO je z grafů na Obr. 23 a 24 zřejmé, že hodnoty číselného průměru molekulových hmotností byly nižší než nominální, s výjimkou NaHY<sub>30K</sub> a NaHY<sub>50K</sub>. Tento efekt se projevil především u vysokomolekulárních vzorků NaHY. Jsou-li však srovnávány hodnoty  $M_w$ , lze v případě kalibrace PEO standardy konstatovat, že tyto hodnoty jsou sice rovněž závislé na typu soli použité v MF, ale mnohem lépe odpovídají hodnotám nominálním, především u vzorků s vysokými molekulovými hmotnostmi (NaHY<sub>2.1M</sub>, NaHY<sub>2.4M</sub>), jak je dokumentováno v Tab. 12 a 13.

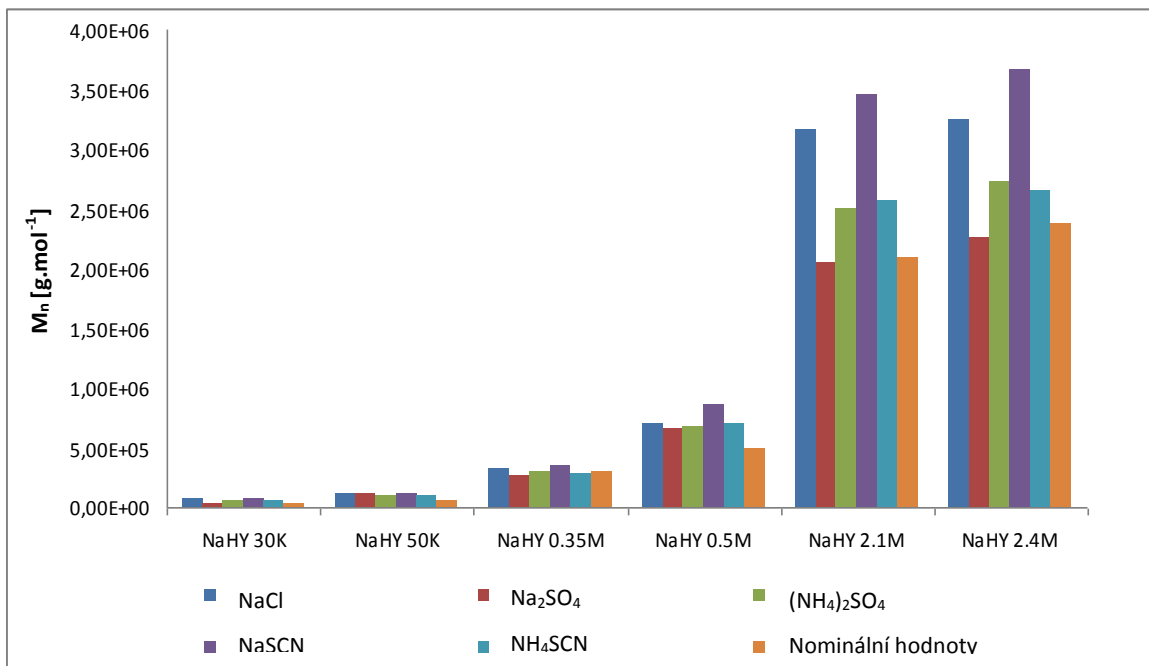
Tab. 12. Hodnoty  $M_n$  a  $M_w$  stanovené pomocí PUL i PEO standardů pro vzorek NaHY<sub>2.1M</sub>

NaHY <sub>2.1M</sub>	PUL		PEO	
	$M_n$ [g.mol <sup>-1</sup> ]	$M_w$ [g.mol <sup>-1</sup> ]	$M_n$ [g.mol <sup>-1</sup> ]	$M_w$ [g.mol <sup>-1</sup> ]
NaCl	2933000	4307000	1648000	2177000
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1704000	2902000	1054000	1444000
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	2215000	3307000	1512000	2047000
NaSCN	2645000	3647000	1656000	2167000
NH <sub>4</sub> SCN	2200000	3312000	1276000	1832000

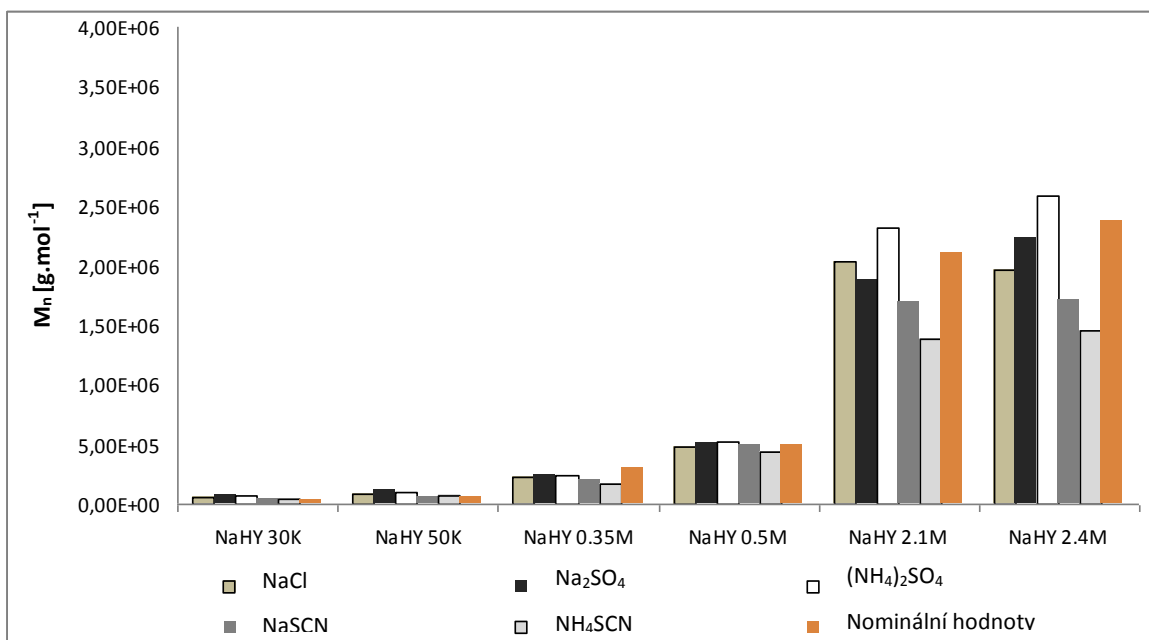
Tab. 13. Hodnoty  $M_n$  a  $M_w$  stanovené pomocí PUL i PEO standardů pro vzorek NaHY<sub>2.4M</sub>

NaHY <sub>2.4M</sub>	PUL		PEO	
	$M_n$ [g.mol <sup>-1</sup> ]	$M_w$ [g.mol <sup>-1</sup> ]	$M_n$ [g.mol <sup>-1</sup> ]	$M_w$ [g.mol <sup>-1</sup> ]
NaCl	2912000	4118000	1583000	2803000
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	2287000	3329000	1162000	1562000
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	2323000	3335000	1630000	2100000
NaSCN	2710000	3677000	1650000	2150000
NH <sub>4</sub> SCN	2330000	3364000	1340000	1850000

Hodnoty číselného průměru molekulové hmotnosti  $M_n$  vzorků NaHY vypočítané pomocí kalibrace proložené 3. polynomickým stupněm jsou pro PUL standardy souhrnně uvedeny na Obr. 25 a pro PEO standardy na Obr. 26.



Obr. 25. Hodnoty  $M_n$  vzorků NaHY stanovené za použití standardů PUL, vyhodnocené pomocí kalibrace proložené 3. polynomickým stupněm



Obr. 26. Hodnoty  $M_n$  vzorků NaHY stanovené za použití standardů PEO, vyhodnocené pomocí kalibrace proložené 3. polynomickým stupněm



Výsledky získané při tomto vyhodnocení byly ve srovnání s výsledky získanými proložením lineární závislosti méně přesné. Stanovené hodnoty  $M_n$  pak byly většinou nadhodnoceny ve srovnání s nominálními hodnotami. Velké rozdíly mezi nominálními a stanovenými hodnotami byly získány pro vysokomolekulární vzorky, nejvyšší hodnoty  $M_n$  pak byly určeny v MF obsahující NaSCN a NaCl, naopak hodnota  $M_n$  stanovená v MF s Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> odpovídala nejlépe hodnotě nominální. Hodnoty  $M_w$  stanovené pomocí kalibrace vyhodnocené proložením 3. polynomu byly vyšší než hodnoty nominální.

Při porovnání Obr. 25 a Obr. 26 je na první pohled patrné, že hodnoty  $M_n$  určené pomocí PEO standardů jsou výrazně nižší než ty, které byly získány z kalibrace PUL standardy.

I když je v diplomové práci použito srovnání vypočtených molekulových hmotností komerčních vzorků NaHY ( $M_n$ ) s hodnotami nominálními, je třeba poznamenat, že není zřejmé, jakou metodou a pomocí jakého přístroje byly hodnoty uvedené výrobcem stanoveny. Proto je nutné brát je pouze jako hodnoty orientační. Ve dvou případech je výrobcem dokonce uveden pouze rozsah molekulových hmotností, které by měl daný polymer obsahovat, místo obvyklého číselného vyjádření  $M_n$  nebo  $M_w$ . Navíc konvenční kalibrace dostupná na přístroji Shimadzu HPLC, který pracuje s jediným, a to koncentračním detektorem, poskytuje pouze „relativní“ hodnoty molekulových hmotností, které jsou závislé na typu standardu použitého ke kalibraci kolony. Prakticky to znamená, že v případě, kdy je analyzován vzorek NaHY a kolona je kalibrována řadou úzkých pullulanových standardů, molekulové hmotnosti NaHY stanovené po integraci odpovídají molekulovým hmotnostem pullulanu a jsou pro NaHY nesprávné. A toto samozřejmě platí i pro vyhodnocení pomocí standardů polyethylenoxidu. Tato metodika je zcela postačující pro prosté porovnání molekulových hmotností a často není ani důležité, jestli jsou tyto hodnoty opravdu „absolutní“ a odpovídají reálné hodnotě  $M_w$  či  $M_n$ . Lze tedy předpokládat, že molekulové hmotnosti studovaných vzorků NaHY se mění v závislosti na typu použitého standardu, protože roztokové chování, ve smyslu botnání polymerního klubka, polysacharidu pullulanu a polyethylenoxidu v MF s obsahem různých solí je rozdílné.

Numerické hodnoty  $M_w$  a  $M_n$  jsou souhrnně uvedeny v Příloze I v Tab. 20 až 25 (kalibrace proložená lineární regresí) a Příloze II v Tab. 26 až 31 (kalibrace proložená 3. polynomickým stupněm).

### 7.3.3 Vliv rychlosti průtoku mobilní fáze

Dalším cílem diplomové práce bylo zjistit, jak se od sebe budou lišit hodnoty molekulových hmotností, pokud bude analýza provedena při jiné rychlosti průtoku mobilní fáze kolonou. Konkrétně byly srovnávány dva průtoky, a to  $0.8 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$  a  $0.5 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ . V Tab. 14 a Tab. 15 jsou jako příklad shrnuty výsledky molekulových hmotností NaHY stanovené při obou průtocích ve vybraných MF, a to  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  a NaSCN. Kalibrace byla provedena PUL standardy.

Tab. 14. Hodnoty molekulových hmotností NaHY stanovené při rozdílných průtocích MF obsahující  $\text{Na}_2\text{SO}_4$

Vzorek	$M_n [\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}]$		$M_w [\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}]$		$M_w/M_n$	
	$0.8 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$	$0.5 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$	$0.8 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$	$0.5 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$	$0.8 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$	$0.5 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$
NaHY <sub>30K</sub>	63900	68800	89600	96000	1.40	1.40
NaHY <sub>50K</sub>	103800	112000	158200	170900	1.52	1.53
NaHY <sub>0.35M</sub>	291100	349600	500900	565000	1.72	1.62
NaHY <sub>0.5M</sub>	663300	783600	1090200	1305000	1.64	1.67
NaHY <sub>2.1M</sub>	1704100	2195600	29021200	3537000	1.70	1.61
NaHY <sub>2.4M</sub>	2286600	2416300	3329500	3704200	1.46	1.53

Tab. 15. Hodnoty molekulových hmotností NaHY stanovené při rozdílných průtocích MF obsahující NaSCN

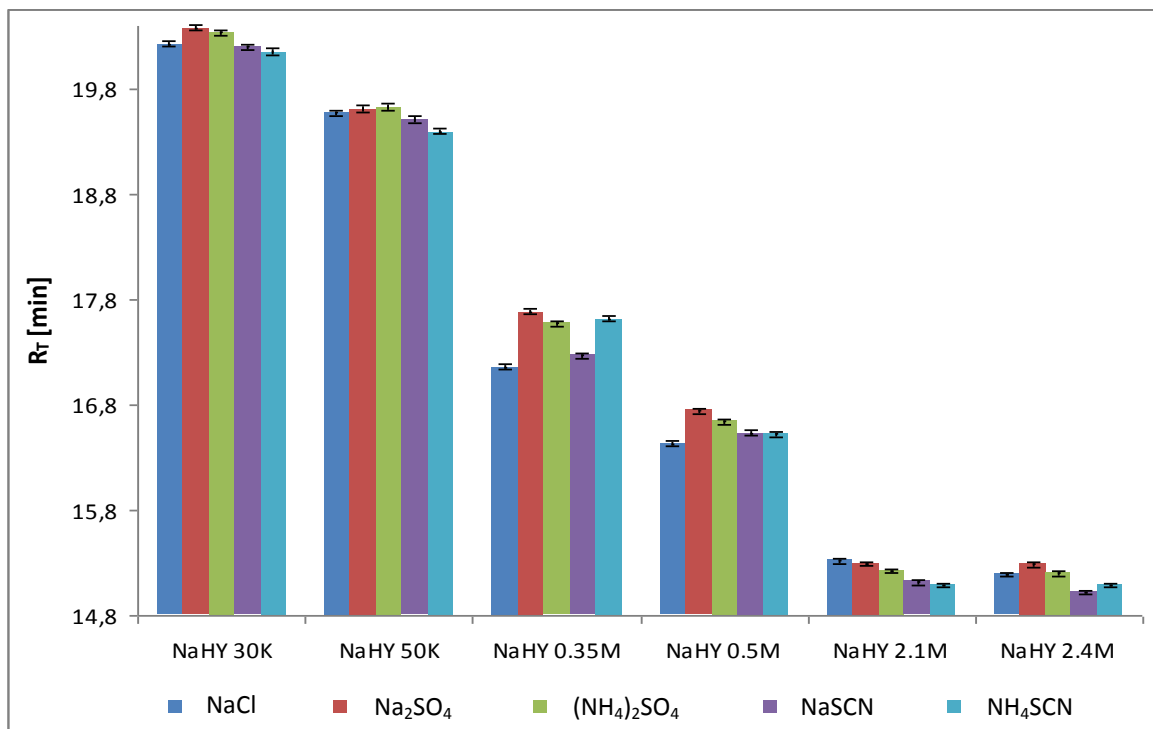
Vzorek	$M_n [\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}]$		$M_w [\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}]$		$M_w/M_n$	
	$0.8 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$	$0.5 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$	$0.8 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$	$0.5 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$	$0.8 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$	$0.5 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$
NaHY <sub>30K</sub>	71200	70300	107200	109900	1.51	1.56
NaHY <sub>50K</sub>	108300	106500	176000	179900	1.62	1.69
NaHY <sub>0.35M</sub>	350000	333800	628300	667000	1.80	2.00
NaHY <sub>0.5M</sub>	807000	846700	1264900	1320000	1.57	1.56
NaHY <sub>2.1M</sub>	2645200	2925600	3646700	3969700	1.38	1.36
NaHY <sub>2.4M</sub>	2710200	3112100	3676600	4292300	1.36	1.38

Výsledky z Tab. 14 pro MF s  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  indikují, že při průtoku mobilní fáze rychlostí  $0.5 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$  byly stanovené hodnoty  $M_n$  i  $M_w$  vždy vyšší než při průtoku  $0.8 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ . Jiná situace nastává u MF s  $\text{NaSCN}$  (Tab. 15). Zde již není vliv rychlosti průtoku MF na molekulovou hmotnost tak jednoznačný. U nízkomolekulárních vzorků NaHY analyzovaných při průtoku  $0.5 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$  jsou hodnoty  $M_n$  nižší než při průtoku  $0.8 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ . U vysokomolekulárních vzorků je situace opačná, tedy průtok  $0.5 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$  poskytuje vyšší hodnoty  $M_n$ . Pro  $M_w$  platí, že průtok  $0.5 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$  přispívá k vyšším hodnotám  $M_w$ . Problematika vlivu rychlosti průtoku mobilní fáze je často diskutována i v literatuře a někteří z autorů míní, že průtoková rychlost by měla být co nejmenší, především u vysokomolekulárních vzorků, aby se předešlo jejich možné smykové degradaci.

#### 7.3.4 Vliv iontů Hofmeisterovy řady na retenční chování vzorků hyaluronanu

Na Obr. 27 jsou znázorněny hodnoty retenčních časů maxim chromatografických pík studovaných vzorků NaHY v testovaných MF. Výhodou tohoto srovnání je skutečnost, že představuje základní chromatografická data popisující pohyb polymerního klubka v koloně, která nejsou ovlivněna následným výpočtem molekulové hmotnosti polymeru pomocí kalibračních závislostí.

Z obrázku je možno vyčíst trend, že retenční časy zaznamenané pro vzorky  $\text{NaHY}_{30\text{K}}$  a  $\text{NaHY}_{50\text{K}}$  byly obecně delší při analýze v MF obsahující sírany, naopak kratší v MF s thiokyanatany. Rozdíly mezi  $R_T$  stanovenými u těchto dvou vzorků ve jmenovaných MF však nebyly velké. Zajímavý byl i výsledek pro vysokomolekulární vzorky  $\text{NaHY}_{2.1\text{M}}$  a  $\text{NaHY}_{2.4\text{M}}$ . V MF s thiokyanatany byly opět  $R_T$  nejkratší a v porovnání se sírany byl zde tento rozdíl nejvýraznější. Podrobněji jsou hodnoty retenčních časů diskutovány dále v textu.



Obr. 27. Retenční časy maxim chromatografických pík ( $R_T$ ) vzorků NaHY ve studovaných MF

Srovnáním vzorků analyzovaných v mobilních fázích s  $\text{NH}_4\text{SCN}$  a  $\text{NaSCN}$ , které obsahují stejný anion  $\text{SCN}^-$  bylo zjištěno, že jednotlivé dvojice chromatografických pík zaznamenané vždy pro vzorky se stejnou molekulovou hmotností byly tvarově velmi podobné, píky byly symetrické a měly stejnou plochu. Výjimkou byl vzorek  $\text{NaHY}_{2.1\text{M}}$ , jehož chromatogramy se od sebe odlišovaly tvarem i plochou. Chromatografický pík zaznamenaný v MF s  $\text{NaSCN}$  byl podstatně vyšší s patrným chvostováním ve srovnání s píkem zaznamenaným v MF s  $\text{NH}_4\text{SCN}$ , který byl symetričtější. Retenční čas pík pak byl podobný, výjimkou byla hodnota  $R_T$  zaznamenaná pro vzorek  $\text{NaHY}_{0.35\text{M}}$ , kde byl  $R_T$  v MF s  $\text{NH}_4\text{SCN}$  o něco delší než v MF s  $\text{NaSCN}$ .

Srovnání analýz v mobilních fázích s  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  a  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , obsahujících stejný anion  $\text{SO}_4^{2-}$  ukázalo, že zaznamenané chromatogramy byly velmi podobné, symetrické s obdobnou plochou. Výjimkou byly opět vysokomolekulární polymery  $\text{NaHY}_{2.1\text{M}}$  a  $\text{NaHY}_{2.4\text{M}}$ . Obecně bylo také pozorováno, že v MF s  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  byly  $R_T$  pík delší než v MF s  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ .

Při srovnání chování NaHY v mobilních fázích s  $\text{NH}_4\text{SCN}$  a  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , obsahujících stejný kation  $\text{NH}_4^+$  stejně jako v mobilních fázích s  $\text{NaSCN}$  a  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , obsahujících stej-

ný kation  $\text{Na}^+$  nebyly zjištěny mezi dvojicemi chromatografických píků výrazné rozdíly. Výjimkou byly vzorky  $\text{NaHY}_{0.35\text{M}}$  a  $\text{NaHY}_{2.1\text{M}}$ . Ty se v jednotlivých MF odlišovaly především plochou píků.

Z obrázku i z diskuze lze učinit závěr, že vliv iontů Hofmeisterovy řady na průběh separace vzorků hyaluronanu je následující:

- Vsolovací a vysolovací ionty Hofmeisterovy řady přítomné v MF ovlivňují retenční chování  $\text{NaHY}$  v průběhu chromatografické separace. Na základě této skutečnosti lze konstatovat, že je ovlivněna rozpustnost polymeru, a tedy i rozměry makromolekulárního klubka.
- Vsolovací ionty (např.  $\text{SCN}^-$ ) způsobují, dle teorie, zvýšení rozpustnosti polymerů, tedy i  $\text{NaHY}$ . To je v dobré shodě s výsledky získanými při analýze. V mobilní fázi obsahující thiokyanatany byly retenční časy maxim chromatografických píků nejkratší, z čehož je možno usoudit, že polymerní klubka v přítomnosti této soli byla nejvíce rozbalená a polymery se eluovaly dříve.
- Vysolovací ionty (např.  $\text{SO}_4^{2-}$ ) naopak působily opačným efektem a rozpustnost polymeru snižovaly, polymerní klubka byla více sbalená, tedy menší a k eluci docházelo v delších retenčních časech.

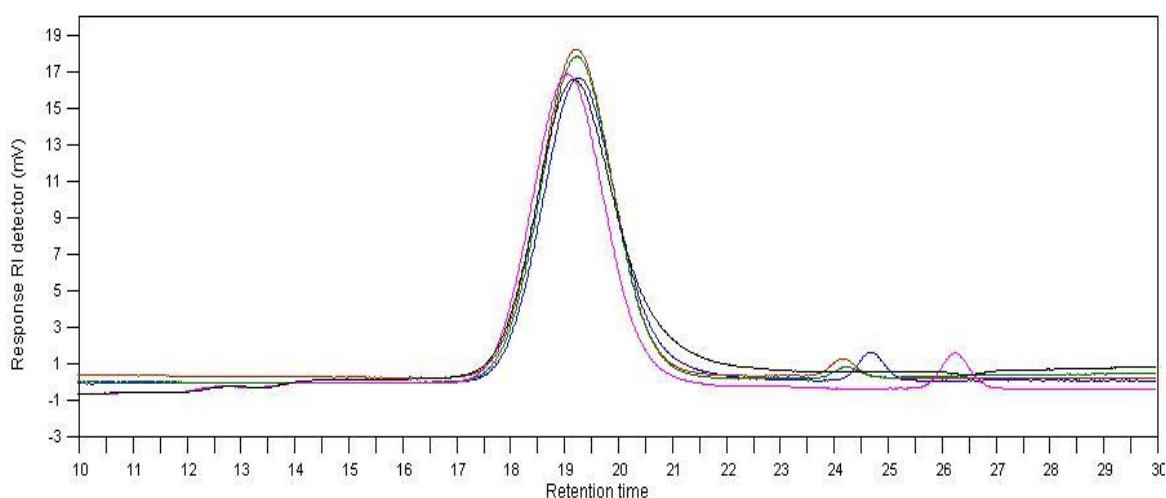
## 7.4 Stanovení molekulové hmotnosti $\text{NaHY}$ – PL-GPC 50

Ke stanovení molekulových hmotností vzorků  $\text{NaHY}$  byl použit i přístroj PL-GPC 50. K vyhodnocení výsledků analýz provedených na tomto přístroji byla použita metoda univerzální kalibrace. Pomocí této metody, která kombinuje data z koncentračního (RI) a viskozitního (VIS) detektoru byly stanoveny tzv. absolutní hodnoty průměrů molekulových hmotností  $M_p$ ,  $M_n$  a  $M_w$ . Z důvodu nedostatku času bylo provedeno pouze stanovení pomocí kalibrace PUL standardy pro všechny studované MF. Kompletní test s PEO standardy bude předmětem další studie.

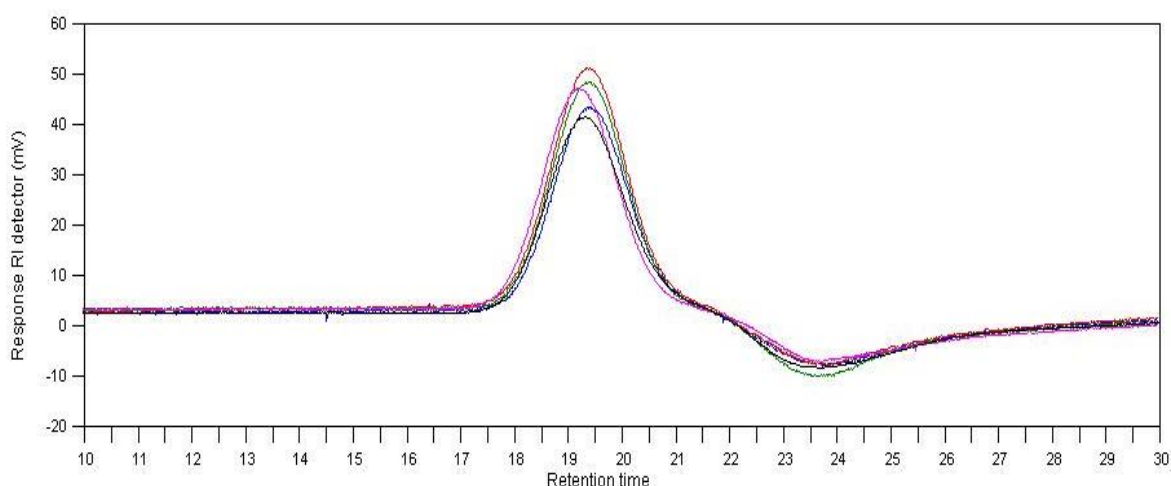
### 7.4.1 Vliv použité MF na separaci standardů

Na příkladu standardu PUL s molekulovou hmotností  $212 \times 10^3 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$  (pro RI detektor na Obr. 28, pro VIS detektor na Obr. 29) je popsán vliv použité mobilní fáze na analýzu použitých standardů. Retenční časy maxim chromatografických píků zaznamenané RI

detektorem v MF obsahující  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  a  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  byly obdobné a shodoval se rovněž tvar píků. Mobilní fáze s  $\text{NaCl}$  pak poskytovala podobný  $R_T$  jako MF s  $\text{NH}_4\text{SCN}$ . Nejkratší retenční čas byl zaznamenán u chromatografického píku tohoto standardu analyzovaného v MF s obsahem  $\text{NaSCN}$ . Obdobné závěry týkající se rozdílů v  $R_T$  je možno učinit i pro data z viskozitního detektoru. V Tab. 16 jsou pro ilustraci uvedeny hodnoty  $R_T$  zaznamenané VIS detektorem pro standardy  $\text{PUL } 212 \times 10^3$  a  $5.9 \times 10^3 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ , které dokumentují výše uvedené rozdíly v retenci a je možno tedy konstatovat, že chování PUL pozorované při separaci na přístroji Shimadzu HPLC bylo těmito analýzami potvrzeno.



Obr. 28. Analýza  $\text{PUL } 212 \times 10^3$  na RI detektoru ve všech MF; modrá –  $\text{NaCl}$ , hnědá –  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , zelená –  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , fialová –  $\text{NaSCN}$  a černá –  $\text{NH}_4\text{SCN}$



Obr. 29. Analýza  $\text{PUL } 212 \times 10^3$  na VIS detektoru ve všech MF; modrá –  $\text{NaCl}$ , hnědá –  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , zelená –  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , fialová –  $\text{NaSCN}$  a černá –  $\text{NH}_4\text{SCN}$

Tab. 16. Hodnoty  $R_T$  maxim chromatografických píků pro PUL zaznamenané viskozitním detektorem v MF se studovanými solemi

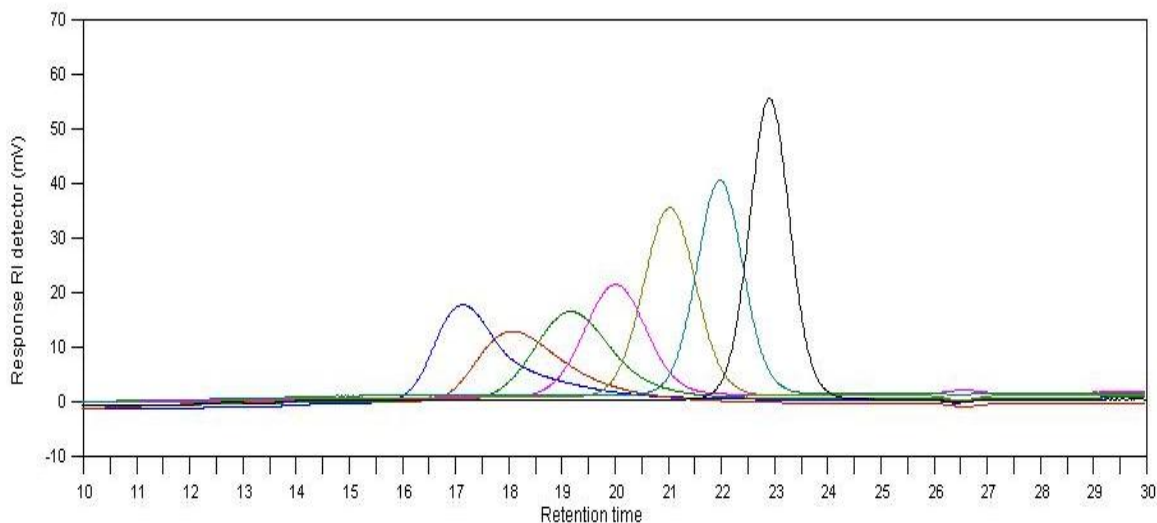
Sůl přítomná v MF	$212 \times 10^3 \text{ g.mol}^{-1}$ $R_T$ [min]	$5.9 \times 10^3 \text{ g.mol}^{-1}$ $R_T$ [min]
NaCl	19.38	23.32
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	19.22	23.08
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	19.30	23.08
NaSCN	19.37	23.35
NH <sub>4</sub> SCN	19.40	23.40

Na Obr. 30 a 31 je srovnán průběh separace řady PUL standardů v MF obsahující NH<sub>4</sub>SCN.

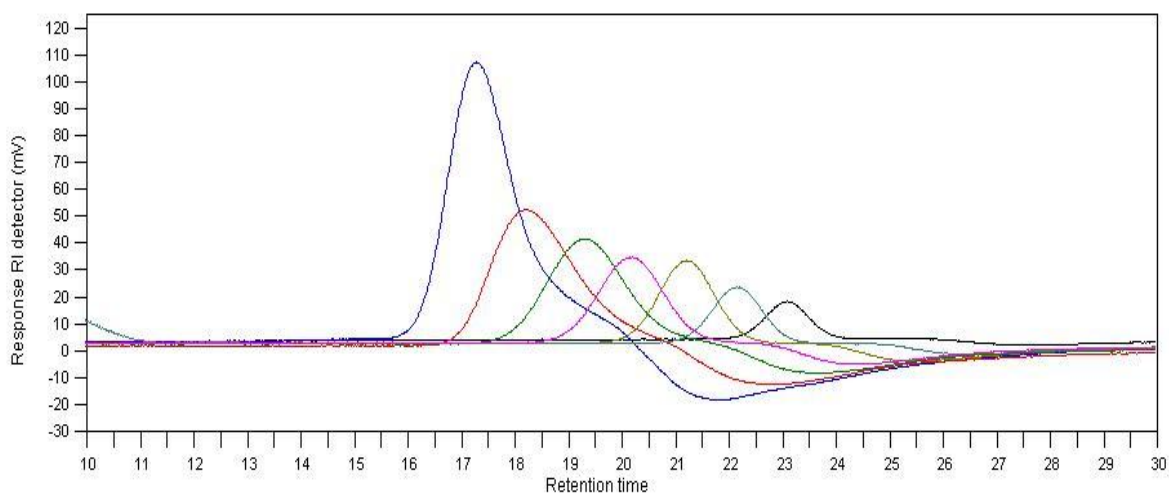
Obr. 30 představuje data zaznamenaná RI detektorem. Je zřejmé, že se jedná o typický záznam z koncentračního detektoru, na kterém je viditelná klesající plocha píku jednotlivých PUL standardů, jejichž molekulová hmotnost roste. Důvodem je skutečnost, že standardy s vyššími molekulovými hmotnostmi byly pro usnadnění rozpouštění připraveny v nižších koncentracích.

Na Obr. 31 je pak pro stejné standardy znázorněn záznam z viskozitního (VIS) detektoru. Zde je dobře patrné, že se zvyšující se molekulovou hmotností standardů viskozita rostla, přestože jejich koncentrace klesala. Tato skutečnost dokumentuje funkci viskozitního detektoru, který je schopen postihnout změny viskozity, respektive molekulové hmotnosti studovaného polymeru.

Záznam z obou detektorů rovněž prokazuje, že pro PUL standardy s molekulovou hmotností  $788 \times 10^3 \text{ g.mol}^{-1}$  a  $404 \times 10^3 \text{ g.mol}^{-1}$  byly chromatografické píky asymetrické a vykazovaly chvostování, ostatní chromatografické píky pak byly symetrické.



Obr. 30. Separace standardů v MF s  $\text{NH}_4\text{SCN}$  na RI detektoru; tmavě modrá –  $788 \times 10^3$ , hnědá –  $404 \times 10^3$ , zelená –  $212 \times 10^3$ , fialová –  $112 \times 10^3$ , žlutá –  $47.3 \times 10^3$ , zelenomodrá –  $22.8 \times 10^3$  a černá –  $5.9 \times 10^3$

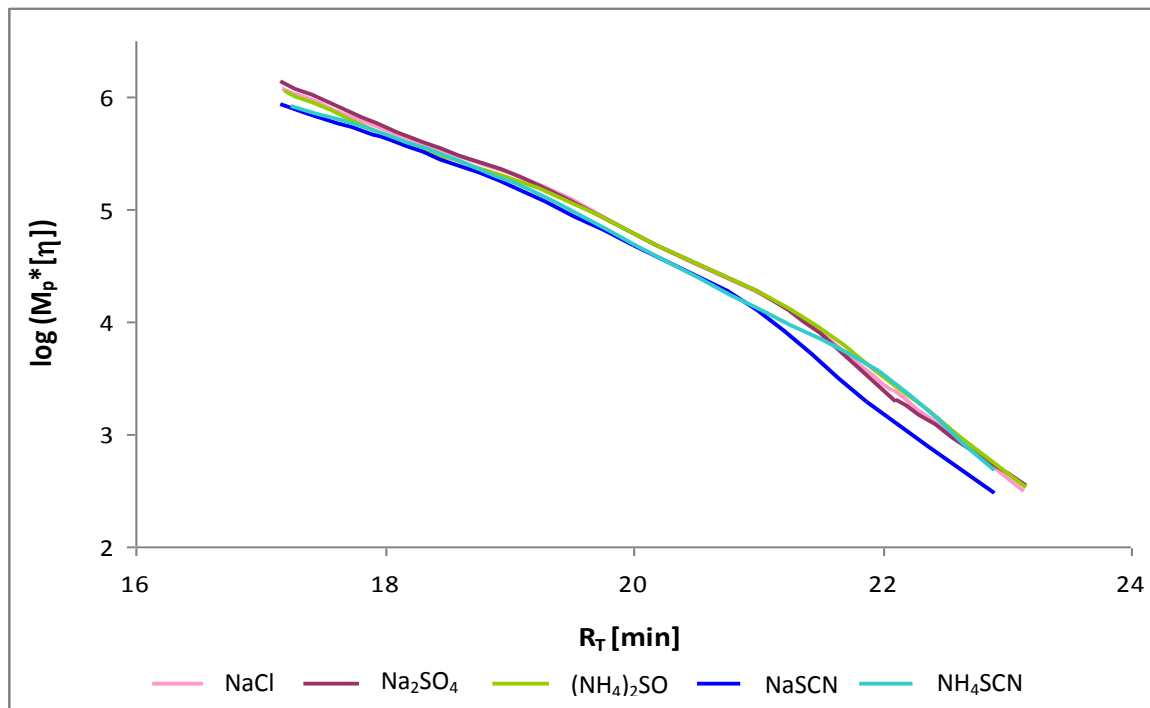


Obr. 31. Separace standardů v MF s  $\text{NH}_4\text{SCN}$  na VIS detektoru; tmavě modrá –  $788 \times 10^3$ , hnědá –  $404 \times 10^3$ , zelená –  $212 \times 10^3$ , fialová –  $112 \times 10^3$ , žlutá –  $47.3 \times 10^3$ , zelenomodrá –  $22.8 \times 10^3$  a černá –  $5.9 \times 10^3$ . Pozn. Negativní pík na signálu viskozitního detektoru odpovídá vyprázdnění tzv. zadržovací kapiláry v použitém viskozimetru

Hodnoty limitního viskozitního čísla změřené viskozitním detektorem ( $[\eta]$ ) a známé hodnoty molekulových hmotností  $M_p$  standardů byly použity k sestavení kalibrační závislosti  $\log(M_p^*[\eta])$ , která je znázorněna na Obr. 32. Obrázek ilustruje, že obdobně jako



v případě kalibrační závislosti sestavené z dat získaných na přístroji Shimadzu HPLC (Obr. 19 a 20) je i zde pozorován vliv mobilní fáze na kalibrační závislost, který však nelze v tomto okamžiku jednoznačně interpretovat.



Obr. 32. Kalibrační závislost  $\log(M_p^* [\eta])$  pro různé MF

#### 7.4.2 Molekulová hmotnost komerčních vzorků hyaluronanu

Jak již bylo uvedeno výše, molekulová hmotnost vzorků NaHY byla pomocí univerzální kalibrace stanovena pouze po kalibraci kolon PUL standardy. Analýza byla provedena při jediné rychlosti průtoku mobilní fáze  $0.8 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ . Obdobně jako při vyhodnocení výsledků z relativní kalibrace (Shimadzu HPLC) bylo provedeno srovnání experimentálně stanovených molekulových hmotností vzorků NaHY s nominálními hodnotami uváděnými výrobcem. Kalibrační závislost byla, stejně jako na přístroji Shimadzu HPLC, vyhodnocena dvěma způsoby, a to proložením bodů přímkou nebo polynomem 3. stupně.

Na příkladu hodnot  $M_n$ ,  $M_w$  je níže pomocí grafů a tabulek znázorněn vliv MF na výsledné hodnoty molekulových hmotností NaHY.

Z Tab. 17 až 19, které shrnují výsledné hodnoty  $M_n$  a  $M_w$  stanovené pomocí výše uvedených kalibračních závislostí, je patrné, že nominálním hodnotám udaným výrobcem lépe odpovídají hodnoty  $M_w$ . Vzhledem ke skutečnosti, že hmotnostní průměr molekulové

hmotnosti obvykle lépe vystihuje reálné hodnoty molekulových hmotností polymerů, lze předpokládat, že výrobcem uvedené hodnoty jsou právě  $M_w$ . V tabulkách jsou shrnuty pouze výsledky pro vybrané vzorky NaHY (NaHY<sub>30K</sub>, NaHY<sub>0.35M</sub>, NaHY<sub>2.1M</sub>), kompletní tabulky jsou vloženy do Přílohy III.

Tab. 17. Hodnoty  $M_n$  a  $M_w$  stanovené pro vzorek NaHY<sub>30K</sub> (PL-GPC 50)

NaHY <sub>30K</sub>	PUL lineární		PUL 3. polynom	
	$M_n$ [g.mol <sup>-1</sup> ]	$M_w$ [g.mol <sup>-1</sup> ]	$M_n$ [g.mol <sup>-1</sup> ]	$M_w$ [g.mol <sup>-1</sup> ]
NaCl	21300	41700	11300	49100
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	14400	39500	20000	48600
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	24300	43100	33200	54100
NaSCN	22600	45000	17600	5300
NH <sub>4</sub> SCN	17600	45300	21200	58500

Tab. 18. Hodnoty  $M_n$  a  $M_w$  stanovené pro vzorek NaHY<sub>0.35M</sub> (PL-GPC 50)

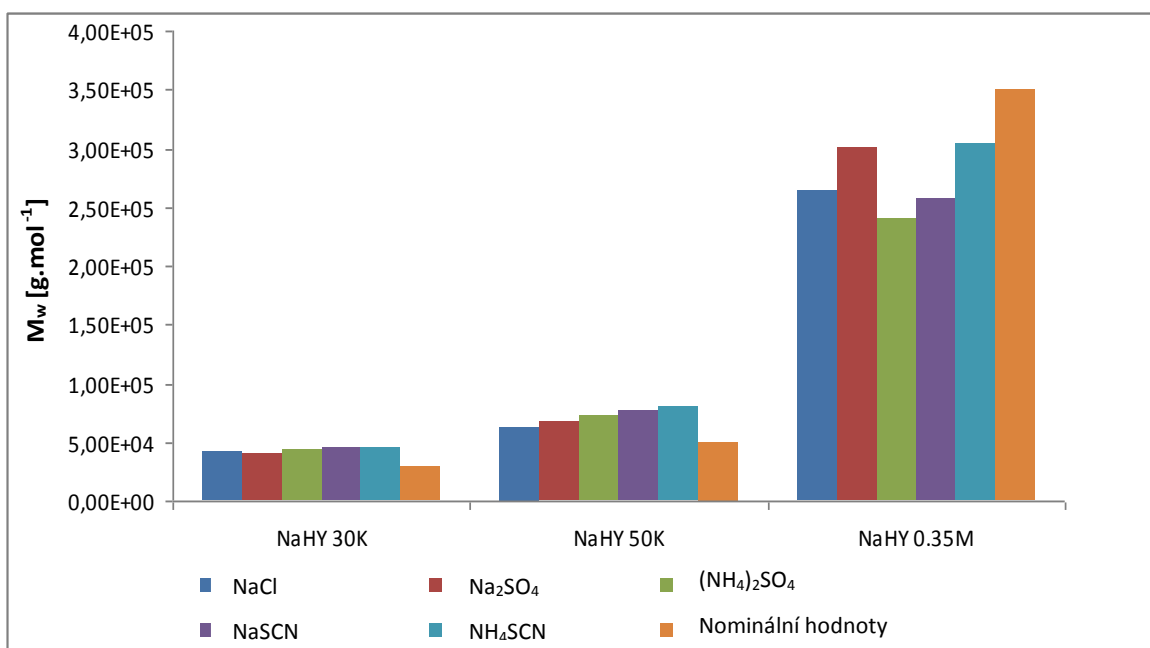
NaHY <sub>0.35M</sub>	PUL lineární		PUL 3. polynom	
	$M_n$ [g.mol <sup>-1</sup> ]	$M_w$ [g.mol <sup>-1</sup> ]	$M_n$ [g.mol <sup>-1</sup> ]	$M_w$ [g.mol <sup>-1</sup> ]
NaCl	92700	263600	130000	253600
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	60800	301100	130100	203000
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	87000	240300	116800	190400
NaSCN	69400	258000	nestanoveno	nestanoveno
NH <sub>4</sub> SCN	136800	303300	nestanoveno	nestanoveno

Tab. 19. Hodnoty  $M_n$  a  $M_w$  stanovené pro vzorek NaHY<sub>2.1M</sub> (PL-GPC 50)

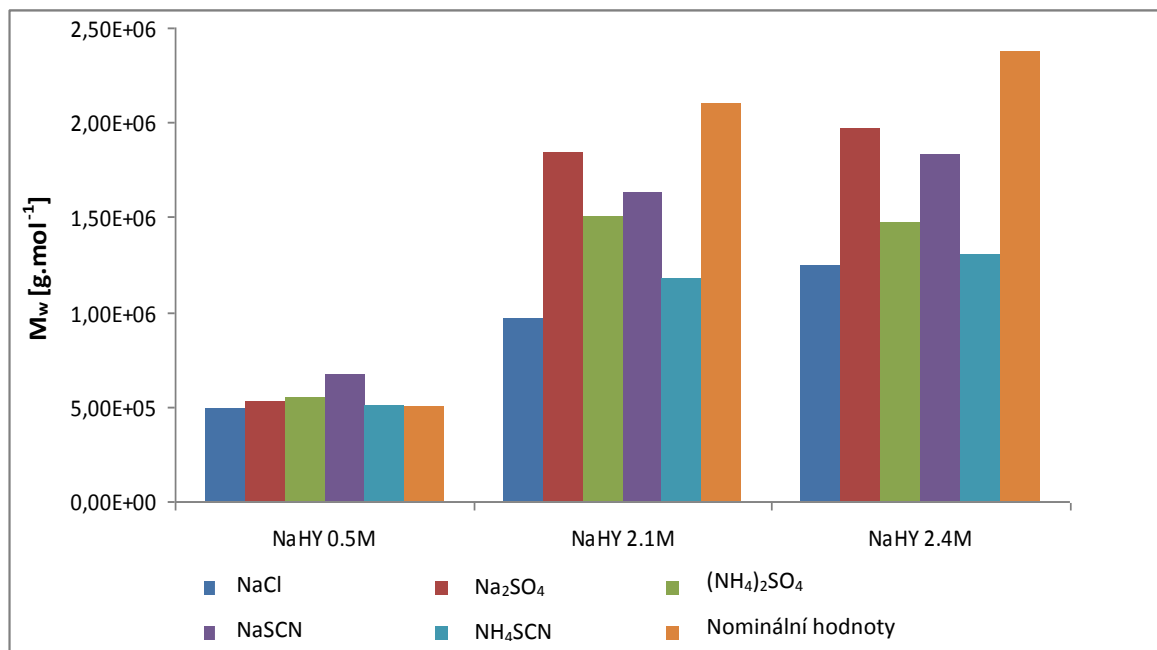
NaHY <sub>2.1M</sub>	PUL lineární		PUL 3. polynom	
	$M_n$ [g.mol <sup>-1</sup> ]	$M_w$ [g.mol <sup>-1</sup> ]	$M_n$ [g.mol <sup>-1</sup> ]	$M_w$ [g.mol <sup>-1</sup> ]
NaCl	317300	970700	212400	415000
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	861000	1843000	304000	458400
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	730000	1502000	408500	1209000
NaSCN	657000	1637000	nestanoveno	nestanoveno
NH <sub>4</sub> SCN	416100	1176600	nestanoveno	nestanoveno

Hodnoty  $M_n$  vysokomolekulárních vzorků NaHY<sub>2.1M</sub> a NaHY<sub>2.4M</sub> byly nejvyšší v MF s Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a NaSCN. Výsledky analýz v ostatních MF byly srovnatelné. Naopak u vzorků se střední molekulovou hmotností přispívaly tyto MF k nejnižším hodnotám  $M_n$ . Při vyhodnocení výsledků  $M_n$  pomocí kalibrace proložené polynomem 3. stupně bylo zjištěno, že se hodnoty velmi odchyľují od nominálních, a to dokonce výrazněji, než tomu bylo u kalibrace lineární. Hodnoty  $M_n$  jsou pak nejvíce podhodnoceny pro vysokomolekulární vzorky.

Na Obr. 33 a 34 jsou do grafů shrnuty hodnoty  $M_w$  vyhodnocené pomocí kalibrace získané proložením lineární závislosti. Z grafů je opět zřejmé, že experimentální výsledky  $M_w$  jsou v některých případech nižší než hodnoty nominální. Nejvíce se nominálním hodnotám blíží  $M_w$  stanovená v MF obsahující Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a NaSCN, naopak nejméně MF s (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Výsledky pro polymery analyzované v MF s NaCl a NH<sub>4</sub>SCN jsou velmi podobné. U níže molekulárních vzorků jsou výsledné  $M_w$  blízké nominálním hodnotám.



Obr. 33. Hodnoty  $M_w$  vzorků NaHY<sub>30K</sub>, NaHY<sub>50K</sub> a NaHY<sub>0.35M</sub> stanovené za použití standardů PUL, vyhodnocené pomocí kalibrace získané lineární regresi



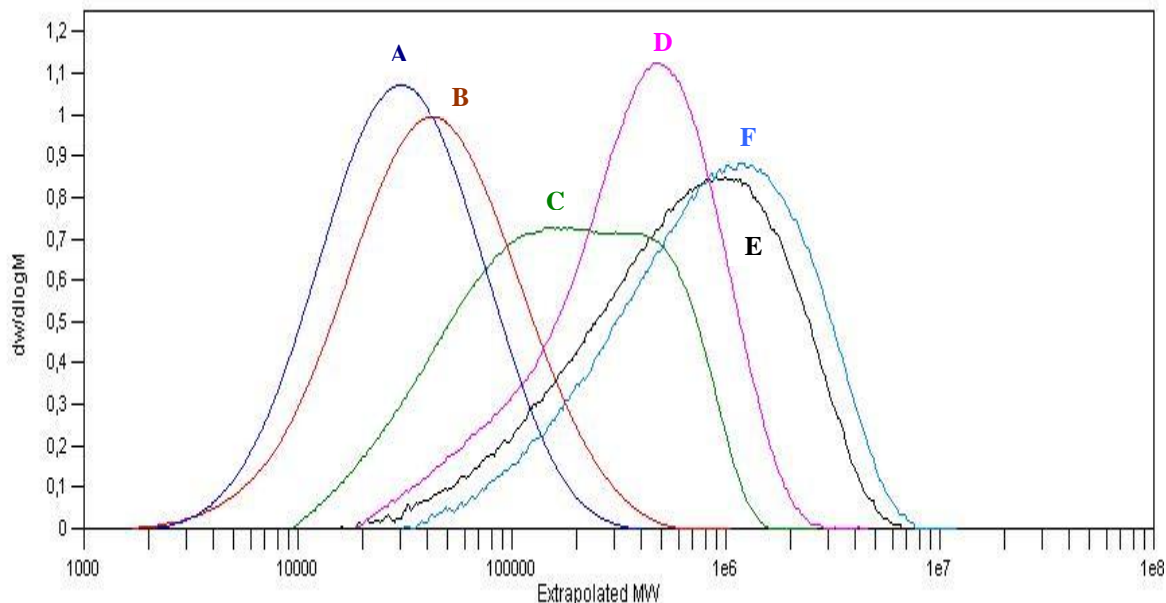
Obr. 34. Hodnoty  $M_w$  vzorků  $NaHY_{0.5M}$ ,  $NaHY_{2.1M}$  a  $NaHY_{2.4M}$  stanovené za použití standardů PUL, vyhodnocené pomocí kalibrace získané lineární regresi

Srovnáním údajů z tabulek uvedených v Příloze III lze soudit, že hodnoty  $M_w$  získané pomocí kalibrační závislosti proložené 3. polynomem jsou výrazně nižší než ty, které byly stanoveny pomocí lineární kalibrace. Hodnoty  $M_w$  se odchyľují od nominálních, což se nejvíce projevilo u vysokomolekulárních vzorků. Nejvyšší, a tedy nejpřesnější hodnoty  $M_w$  byly získány analýzou v MF s  $(NH_4)_2SO_4$ , nejnižší pak v MF s NaSCN. Existenci rozdílů mezi výsledky získanými z obou kalibrací lze zdůvodnit tím, že reálně byl k dispozici pouze standard PUL o molekulové hmotnosti  $788 \times 10^3 \text{ g.mol}^{-1}$ , tudíž extrapolace kalibračních bodů do vysokomolekulární oblasti, potřebné pro výpočet vzorků  $NaHY_{2.1M}$  a  $NaHY_{2.4M}$  pomocí 3. polynomu, byla značně nespolehlivá. To se následně projevilo v tom, že pro polymery s milionovou molekulovou hmotností byly stanoveny výrazně nižší hodnoty  $M_w$ . Proložení kalibračních bodů lineární závislostí se pak ukázalo vhodnějším.

### 7.4.3 Distribuční křivky pro vzorky hyaluronanu

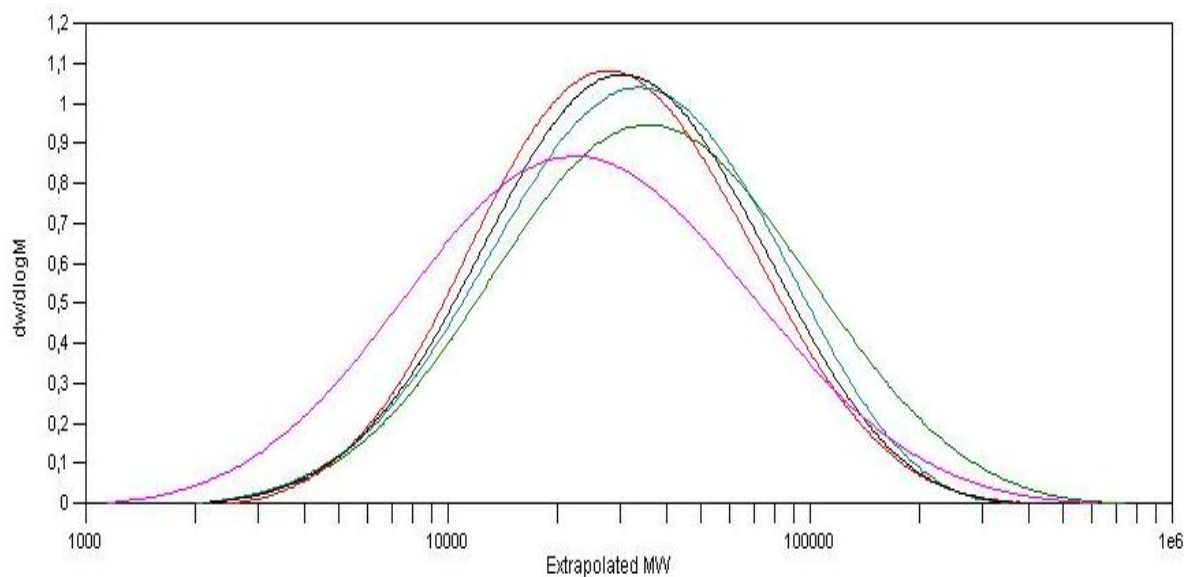
Důležitou charakteristikou řady polymerů je jejich distribuce molekulových hmotností. Při analýze vzorků NaHY byl také určován index polydisperzity  $M_w/M_n$ , který slouží jako orientační kritérium pro stanovení šířky distribuce polymerů. Hodnoty  $M_w/M_n$  stanovené na přístroji Shimadzu HPLC ležely v rozmezí 1.3 až 2.3, na přístroji PL-GPC 50 pak

v rozmezí od 1.6 do 4.9 a ukazují na širokou distribuci molekulových hmotností sledovaných vzorků NaHY. Metoda GPC rovněž umožňuje sestrojení distribučních křivek, které jsou pro MF obsahující NaCl srovnány na Obr. 35.

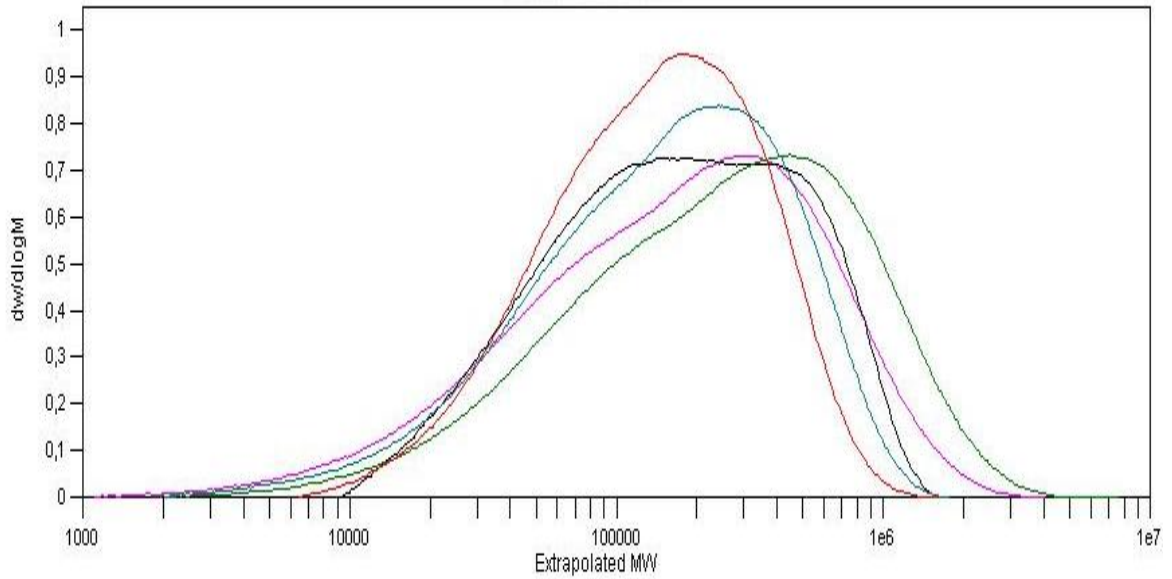


Obr. 35. Grafické znázornění distribučních křivek pro vzorky NaHY v MF s NaCl; A – NaHY<sub>30K</sub>, B – NaHY<sub>50K</sub>, C – NaHY<sub>0.35M</sub>, D – NaHY<sub>0.5M</sub>, E – NaHY<sub>2.1M</sub>, F – NaHY<sub>2.4M</sub>

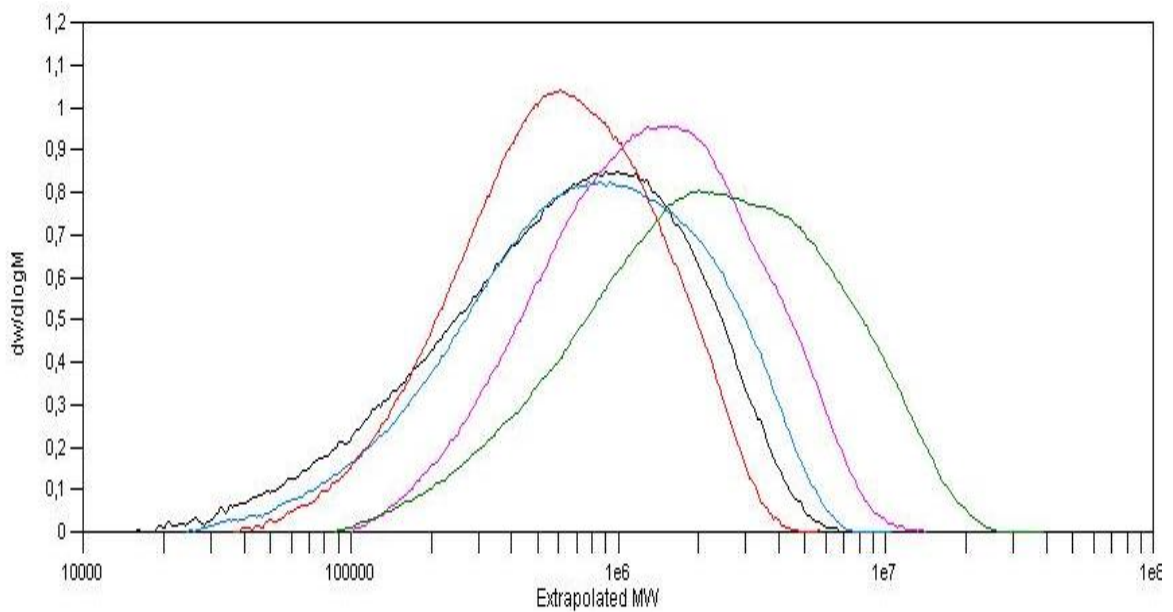
Pro představu jsou distribuční křivky vybraných vzorků hyaluronanu NaHY<sub>30K</sub> (Obr. 36), NaHY<sub>0.35M</sub> (Obr. 37) a NaHY<sub>2.1M</sub> (Obr. 38) také porovnány v závislosti na použité MF.



Obr. 36. Grafické znázornění distribučních křivek pro vzorek NaHY<sub>30K</sub>; černá – NaCl, fialová – Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, červená – (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, zelená – NaSCN a modrá – NH<sub>4</sub>SCN



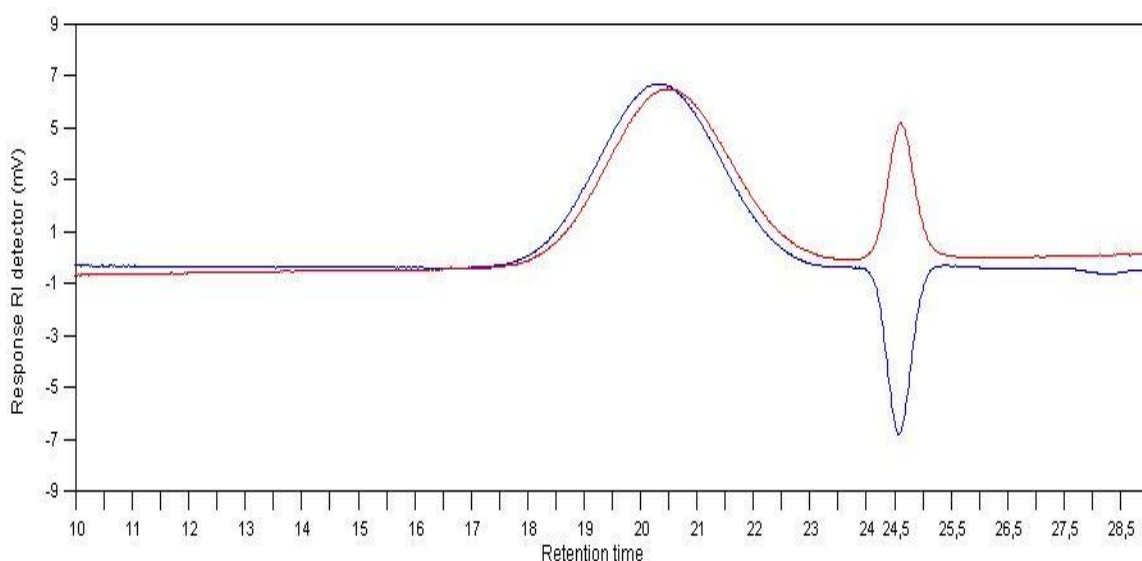
Obr. 37. Grafické znázornění distribučních křivek pro vzorek  $\text{NaHY}_{0.35\text{M}}$ ; černá –  $\text{NaCl}$ , fialová –  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , červená –  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , zelená –  $\text{NaSCN}$  a modrá –  $\text{NH}_4\text{SCN}$



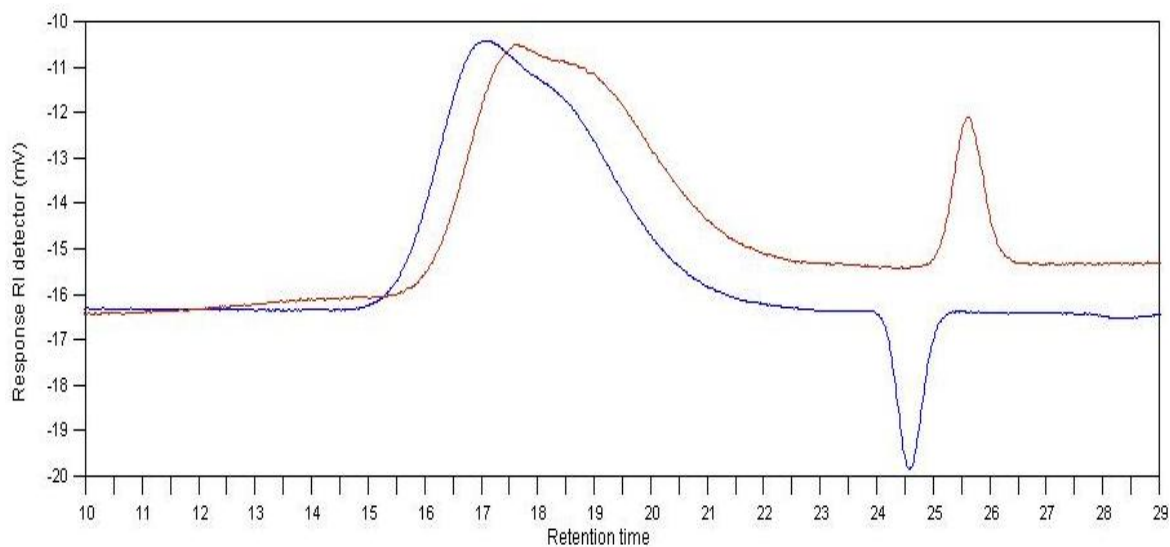
Obr. 38. Grafické znázornění distribučních křivek pro vzorek  $\text{NaHY}_{2.1\text{M}}$ ; černá –  $\text{NaCl}$ , fialová –  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , červená –  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , zelená –  $\text{NaSCN}$  a modrá –  $\text{NH}_4\text{SCN}$

#### 7.4.4 Vliv iontové síly na separaci vzorku

V rámci času vyhrazeného pro zpracování diplomové práce byl proveden ještě krátký test, ve kterém byl sledován vliv iontové síly na kvalitu chromatografické separace vzorků NaHY rozpuštěných v MF obsahující NaCl. Na základě informací z odborné literatury byly připraveny MF s NaCl o koncentraci 0.15 M a 0.45 M. Vliv iontové síly na analýzu vzorku NaHY<sub>30K</sub> je srovnán na Obr. 39 a pro NaHY<sub>0.35M</sub> na Obr. 40.



Obr. 39. Vliv iontové síly na separaci vzorku NaHY<sub>30K</sub>; 0.15 M NaCl (modrá) a 0.45 M (červená)



Obr. 40. Vliv iontové síly na separaci vzorku NaHY<sub>0.35M</sub>; 0.15 M NaCl (modrá) a 0.45 M (červená)

Z obrázků je možno usuzovat, že zvýšením iontové síly se plocha chromatografického píku zvětší a eluce začne později, což je patrné z hodnot retenčního času  $R_T$ . Srovnáním Obr. 39 a 40 bylo zjištěno, že pro polymery s vyšší molekulovou hmotností jsou rozdíly v eluci větší. Tento trend se tedy dá očekávat i u zbývajících vzorků NaHY. To je v dobrém souladu se závěry publikace [43], ve které autoři studovali chování NaHY v MF s obsahem NaCl o dvou různých iontových silách a zjistili, že zvýšením iontové síly mobilní fáze se zmenšují rozměry klubka hyaluronanu, které je pak eluováno v delších retenčních časech.



## ZÁVĚR

Cílem diplomové práce bylo stanovit molekulové hmotnosti a distribuce molekulových hmotností komerčních vzorků hyaluronanu. K tomuto účelu byla použita metoda gelové permeační chromatografie, která byla testována na dvou dostupných přístrojích, a to Shimadzu HPLC a PL-GPC 50. Dílčí část práce byla věnována problematice volby mobilní fáze pro charakterizaci hyaluronanu, jejímu vlivu na separaci tohoto polymeru a rovněž vlivu typu standardů vhodných ke kalibraci kolony. Z provedených experimentů lze učinit následující závěry.

Stanovení molekulové hmotnosti hyaluronanu pomocí gelové permeační chromatografie není triviální a jednoznačnou záležitostí. Platí to zcela obecně a zvláště pak pro vzorky s vysokými molekulovými hmotnostmi ( $> 10^6 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ ). Je známo, že makromolekuly hyaluronanu jsou ve vodných rozpouštědlech velmi zbotnalé a předpokládá se, že mají polotuhou konzistenci a jsou velké. Rozměry hyaluronanu s velmi vysokou molekulovou hmotností dokonce leží na hranici mezi velikostí makromolekuly a částice. V principu každé měření takových vzorků s sebou nese komplikace.

Prvním z problematických bodů byla nedostupnost vhodných kalibračních standardů, ať už PEO nebo PUL, s dostatečně vysokou molekulovou hmotností, která by pokrývala stanovovaný rozsah hodnot  $M_w$  a  $M_n$  vysokomolekulárních vzorků hyaluronanu.

Posouzením výsledků analýz, provedených na Shimadzu HPLC pomocí konvenční kalibrace, kdy byly stanoveny relativní hodnoty molekulových hmotností, lze dojít k závěru, že tato metoda je poměrně rychlá a jednoduchá a lze ji použít pro relativní porovnání analyzovaných vzorků. Absolutní hodnoty molekulových hmotností jsou však nesprávné a liší se významně od údajů reálných.

Srovnání retenčního chování standardů naznačilo, že jejich chromatografická separace je významně závislá na typu soli použité v mobilní fázi. PEO standardy vykazovaly tuto závislost mnohem významněji než standardy PUL.

Obdobný efekt byl pozorován i u studovaných hyaluronanů, jejichž chromatografická separace byla rovněž závislá na typu použité mobilní fáze.

Analýza na přístroji PL-GPC 50 s koncentračním a viskozitním detektorem, kdy byla pro stanovení molekulových hmotností použita univerzální kalibrace, poskytla hodnoty

hmotnostních průměrů molekulových hmotností  $M_w$ , které lépe odpovídaly hodnotám nominálním. Na vyhodnocení měl značný vliv způsob zpracování kalibrační závislosti, především pak použití 1. nebo 3. polynomického stupně proloženého kalibračními body. V tomto případě byly kolony kalibrovány pouze pomocí PUL standardů.

Z práce vyplývá, že při stanovení molekulových hmotností hyaluronanu pomocí GPC nelze při výpočtu nijak oddělit vliv retenčního chování kalibračních standardů a vliv vlastního chování polymerního klubka hyaluronanu ve vodných roztocích různých solí. Optimálním řešením pro stanovení molekulových hmotností hyaluronanů by proto bylo použití GPC přístroje vybaveného detektorem rozptylu světla, který kalibraci nevyžaduje.

**SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY**

- [1] NEČAS, J., et al. Hyaluronic acid (hyaluronan): a review. *Vet. Med. (Prague)*. 2008, vol. 53, no. 8, s. 397-411.
- [2] LAPČÍK, L., et al. Hyaluronan: Preparation, Structure, Properties, and Applications. *Chem. Rev.* 1998, vol. 98, no. 8, s. 2663-2684. ISSN:0009-2665.
- [3] SLÍVA, J. a J. MINÁRIK. Hyaluronát – nejen pasivní pozorovatel, nýbrž aktivní modulátor imunních reakcí. *New EU Magazine of Medicine*. 2009, roč. 1, č. 2, s. 75-79.
- [4] GŘUNDĚLOVÁ, L. *Chování klubek Hyaluronanu v roztocích s přídavky kvartérních solí* [online]. Zlín, 2010 [cit. 2013-10-05]. Diplomová práce. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, Fakulta technologická. Vedoucí práce Aleš Mráček. Po přihlášení dostupné z aplikace: portal.utb.cz
- [5] SCOTT, J. E., et al. Secondary and tertiary structures of hyaluronan in aqueous solution, investigated by rotary shadowing-electron microscopy and computer simulation. Hyaluronan is a very efficient network-forming polymer. *Biochem J.* 1991, vol. 274, no. 3, s. 699-705.
- [6] COWMAN, M. K. a S. MATSUOKA. Experimental Approaches to Hyaluronan Structure. *Carbohydrate Research*. 2005, vol. 340, no. 5, s. 791-809. ISSN:0008-6215.
- [7] VOET, D. a J. G. VOETOVÁ. *Biochemie*. Nakladatelství Victoria Publishing a.s., Praha 1995, 1362 s. ISBN 80-85605-44-9.
- [8] POKOPCOVÁ, A. *Viskozitné a reologické merania roztokov hyaluronanu s prídavkami kvartérnych solí* [online]. Zlín, 2010 [cit. 2013-10-08]. Diplomová práce. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, Fakulta technologická. Vedoucí práce Aleš Mráček. Po přihlášení dostupné z aplikace: portal.utb.cz
- [9] LAPČÍK, L. Jr., et al. Kyselina hyalurónová – príprava, štruktúra, vlastnosti, aplikácia. *Chemické Listy* 85. 1991, s. 281-299.
- [10] Viscoderm<sup>®</sup> [online]. [cit. 2013-10-15]. Dostupné z: <<http://www.viscoderm.cz/viscoderm/index.php?mid=503>>.

- [11] HASCALL, C. V. a C. T. LAURENT. Hyaluronan: Structure and Physical Properties [online]. [cit. 2013-10-15]. Dostupné z: <<http://glycoforum.gr.jp/science/hyaluronan/HA01/HA01E.html>>.
- [12] Sodium Hyaluronate. What does sodium hyaluronate do? [online]. [cit. 2013-10-18]. Dostupné z: <<http://www.trbchemedica.co.uk/article.asp?article=162&section=2>>.
- [13] HENNI, W., et al. Aggregation of Hydrophobically Modified Polysaccharides in Solution and at the Air-water Interface. *Journal of Colloid and Interface Science*. 2005, vol. 281, no. 2, s. 316-324. ISSN:0021-9797.
- [14] PIHÍKOVÁ, D. *Biopolymerem značené koloidní částice* [online]. Brno, 2013 [cit. 2013-10-20]. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická. Vedoucí práce Filip Mravec. Dostupné z aplikace: dspace.vutbr.cz
- [15] LAPČÍK, L., et al. Chemical Modification of Hyaluronic Acid: Alkylation. *International Journal of Polymer Analysis and Characterization*. 2010, vol. 15, no. 8, s. 486-496. ISSN:1023-666X.
- [16] HYALURONIC ACID (HA): Background & Biology [online]. [cit. 2013-10-20]. Dostupné z: <<http://www.footconsultant.com/documents/Ostenil.pdf>>.
- [17] KOGAN, G. a L. ŠOLTÉS. Hyaluronic acid: a natural biopolymer with a broad range of biomedical and industrial applications. *Biotechnology Letters*. 2007, vol. 29, no. 1, s. 17-25. ISSN:0141-5492.
- [18] BROWN, M. B. a S. A. JONES. Hyaluronic acid: A Unique Topical Vehicle for the Localized Delivery of Drugs to the Skin. *European Academy of Dermatology and Venerology*. 2005, vol. 19, no. 3, s. 308-318. ISSN:0926-9959.
- [19] LONGAS, O. M. Hyaluronan in Aging. *Chemistry and Biology of Hyaluronan*, edit. Garg H. a Hales C., Elsevier Ltd., 2004, s. 351-366.
- [20] HOEKSTRA, D. Hyaluronan as a Versatile Biomaterial for Surface Treatment of Medical Device [online]. [cit. 2013-10-24]. Dostupné z: <<http://www.docstoc.com/docs/92580965/Hyaluronan-as-Versatile-Biomaterial-for-Surface-Treatment-of>>.

- [21] ROHRICH, R., A. GHAVAMI a M. CROSBY. The Role of Hyaluronic Acid Fillers (Restylane) in Facial Cosmetic Surgery: Review and Technical Considerations. *Plastic and Reconstructive Surgery*. 2007, vol. 120, no. 6, s. 41S-54S.
- [22] MONHEIT, G. D. a K. M. COLEMAN. Hyaluronic Acid Fillers. *Dermatologic Therapy*. 2006, vol. 19, no. 3, s. 141-150. ISSN:1396-0296.
- [23] VISKOZIMETRIE – aplikace. *Návody do laboratorního cvičení*. [online]. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, [cit. 2013-11-01]. Dostupné z: <<http://www.vscht.cz/fch/cz/pomucky/Viskozimetrie-aplikace.pdf>>.
- [24] DETERMANN, H. *Gelová chromatografie*. 1. vyd. Praha: Academia, 1972, 218 s.
- [25] PROVIDER, T. *Size exclusion chromatography (GPC): based on a symposium sponsored by the Division of Analytical Chemistry at the 178th National Meeting of the American Chemical Society, Washington, D.C., 10-14 September 1979*. Washington: American Chemical Society, 1980, 312 s. ISBN:0-8412-0586-8.
- [26] MORI, S. a H. G. BARTH. *Size exclusion chromatography*. Berlin: Springer, 1999, 234 s. ISBN:3-540-65635-9.
- [27] STRIEGEL, A. M., et al. *Modern Size-Exclusion Liquid Chromatography: Practice of Gel Permeation and Gel Filtration Chromatography*. John Wiley & Sons, 2009, 494 s. ISBN: 978-0-471-20172-4.
- [28] BEREK, D. *Gelová chromatografia*. Bratislava: Veda, 1983, 310 s.
- [29] YAU, W., J. KIRKLAND a D. BLY. *Modern size-exclusion liquid chromatography: practice of gel permeation and gel filtration chromatography*. John Wiley & Sons, 1979, 476 s. ISBN:0-471-03387-1.
- [30] VOLLMERT, B. *Základy makromolekulární chemie*. 1. vyd. Praha: Academia, 1970, 773 s.
- [31] ABUÍN, A. G., et al. Viscosimetric Behaviour of Hyaluronic Acid in Different Aqueous Solutions. *Carbohydrate Polymers*. 2011, vol. 85, no. 3, s. 500-505. ISSN:0144-8617.

- [32] YANAKI, T. a M. YAMAGUCHI. Shear-rate dependence of the intrinsic viscosity of sodium hyaluronate in 0.2 M sodium chloride solution. *Chem. Pharm. Bull.* 1994, vol. 42, s. 1651-1654.
- [33] LATH, D., et al. Molar Mass – Intrinsic Viscosity Relationship of High-Molar-Mass Hyaluronans: Involvement of Shear Rate. *Chemical Papers.* 2005, vol. 59, no. 5, s. 291-293. ISSN:1336-9075.
- [34] MENDICHI, R., et al. Characterization of Ultra-high Molar Mass Hyaluronan: 1. Off-line Static Methods. *Polymer.* 1998, vol. 39, no. 25, s. 6611-6620. ISSN:0032-3861.
- [35] RINAUDO, M. Main Properties and Current Applications of Some Polysaccharides as Biomaterials. *Polymer International.* 2008, vol. 57, no. 3, s. 397-430. ISSN:0959-8103.
- [36] PODZIMEK, Š., et al. Solution Properties of Hyaluronic Acid and Comparison of SEC-MALS-VIS Data with Off-line Capillary Viscometry. *Journal of Applied Polymer Science.* 2010, vol. 116, no. 5, s. 3013-3020. ISSN:0021-8995.
- [37] FOURNE, F. *Synthetic Fibers - Machines and Equipment Manufacture, Properties.* Hanser Publishers. [online]. [cit. 2013-11-01]. ISBN:978-3-446-40133-4. Po přihlášení dostupné z aplikace: <http://app.knovel.com>
- [38] BARTOVSKÁ, L. a M. ŠIŠKOVÁ. *Co je co v povrchové a koloidní chemii. Měření viskozity.* Vydavatelství VŠCHT Praha. [online]. [cit. 2013-11-03]. Dostupné z: <[http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid\\_es-001/hesla/mereni\\_viskozity.html](http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_es-001/hesla/mereni_viskozity.html)>.
- [39] FORREST, M. J. *Rubber Analysis - Polymers, Compounds and Products.* ChemTec Publishing. [online]. [cit. 2013-11-03]. ISBN:978-1-85957-305-1. Po přihlášení dostupné z aplikace: <http://app.knovel.com>
- [40] RICHARDS, R. *Light Scattering from Polymer Systems.* In: FAWCETT, A. H. *Polymer Spectroscopy.* John Wiley & Sons. [online]. [cit. 2013-11-03]. ISBN: 978-1-59124-746-3. Po přihlášení dostupné z aplikace: <http://app.knovel.com>
- [41] FIŠERA, M. *Analýza a hodnocení potravin.* Přednáška. Zlín: Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, Fakulta technologická, rok 2012.

- [42] HASÁKOVÁ, I. *Možnosti stanovení molekulové hmotnosti bílkovinných hydrolyzátů* [online]. Zlín, 2006 [cit. 2013-11-03]. Diplomová práce. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, Fakulta technologická. Vedoucí práce Svatopluk Sukop. Po přihlášení dostupné z aplikace: portal.utb.cz
- [43] MENDICHI, R., L. ŠOLTÉS a A. G. SCHIERONI. Evaluation of Radius of Gyration and Intrinsic Viscosity Molar Mass Dependence and Stiffness of Hyaluronan. *Biomacromolecules*. 2003, vol. 4, no. 6, s. 1805-1810. ISSN:1525-7797.
- [44] CHYTIL, M., et al. Calorimetric and Light Scattering Study of Interactions and Macromolecular Properties of Native and Hydrophobically Modified Hyaluronan. *Carbohydrate Polymers*. 2010, vol. 81, no. 4, s. 855-863. ISSN:0144-8617.
- [45] CHURÁČEK, J. *Analytická separace látek*. 1. vyd. Praha: Státní nakladatelství technické literatury, 1990, 384 s. ISBN:8003005698.
- [46] CHURMS, S. C. Recent Progress in Carbohydrate Separation by High-performance Liquid Chromatography Based on Hydrophilic Interaction. *Journal of Chromatography*. 1996, vol. 720, no. 1, s. 75-91. ISSN:0021-9673.
- [47] KHANNA, S. Size Exclusion Chromatography. *Pharmaceutical Reviews*. 2005, vol. 3, no. 5. ISSN:1918-5561.
- [48] MOORE, J. C. a L. H. TUNG. *Gel Permeation Chromatography*. In: *Fractionation of Synthetic Polymers*. Red. Tung, L. H., New York, M. Dekker, 1977.
- [49] MEYERHOFF, G. Application of gel chromatography. *Pure and Applied Chemistry*. 1969, vol. 20, no. 3, s. 309-328.
- [50] TRATHNIGG, B. Size-exclusion Chromatography of Polymers. In: *Encyclopedia of Analytical Chemistry*. John Wiley & Sons, 2000, s. 8008-8034.
- [51] CLAESSENS, H. A., et al. Technetium Speciation: Non-size Effects in Size-exclusion Chromatography. *Journal of Chromatography*. 1996, vol. 755, no. 2, s. 219-225. ISSN:0021-9673.
- [52] BOYMIRZAEV, A. S. a A. S. TURAEV. Non-Exclusion Effects in Aqueous Size-Exclusion Chromatography of Polysaccharides. *Chinese Medicine*. 2010, vol. 1, no. 1, s. 28-29. ISSN:2151-1918.

- [53] KVAM, C. Purification and Characterization of Hyaluronan from Synovial-fluid. *Analytical Biochemistry*. 1993, vol. 211, no. 1, s. 44-49. ISSN:0003-2697.
- [54] HARMON, P. S., E. P. MAZIARZ a X. M. LIU. Detailed Characterization of Hyaluronan Using Aqueous Size Exclusion Chromatography with Triple Detection and Multiangle Light Scattering Detection. *Journal of Biomedical Materials Research. Part B, Applied Biomaterials*. 2012, vol. 100, no. 7, s. 1955-1960. ISSN:1552-4973.
- [55] MENDICHI, R. a A. G. SCHIERONI. Fractionation and Characterization of Ultra-high Molar Mass Hyaluronan: 2. On-line Size Exclusion Chromatography Methods. *Polymer*. 2002, vol. 43, no. 23, s. 6115-6121. ISSN:0032-3861.
- [56] HOFMEISTER, F. Zur Lehre von der Wirkung der Salze. *Arch. Exp. Pathol. Pharmacol.* 1888, vol. 24, s. 247-260.
- [57] CURTIS, R.A. a J. ULRICH. Protein-protein Interactions in Concentrated Electrolyte Solutions: Hofmeister-series Effects. *Biotechnology and Bioengineering*. 2001, vol. 79, no. 4, s. 367-380. ISSN:0006-3592.



**SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK**

a	Empirická konstanta Mark-Houwinkovy rovnice
BSA	Bovine serum albumin (sérový albumin)
c	Koncentrace
$c_i$	Molární koncentrace i-té frakce
$\text{CaCl}_2$	Chlorid vápenatý
COOH	Karboxylová skupina
DMFA	Dimethylformamid
DTAB	Dodecyltrimethyl amonium bromid
GPC	Gelová permeační chromatografie
HA	Kyselina hyaluronová
He	Helium
HMHA	Hydrofobně modifikovaná kyselina hyaluronová
I	Iontová síla
K	Empirická konstanta Mark-Houwinkovy rovnice
$K_D$	Distribuční konstanta
LALS	Nízkoúhlový rozptyl světla
LALLS	Nízkoúhlový laserový rozptyl světla
M	Střední molekulová hmotnost
$M_i$	Molekulová hmotnost i-té frakce
$M_n$	Číselný průměr molekulové hmotnosti
$M_w$	Hmotnostní průměr molekulové hmotnosti
MALS	Víceúhlový rozptyl světla
MALLS	Víceúhlový laserový rozptyl světla
MF	Mobilní fáze

---

NaCl	Chlorid sodný
NaHY	Hyaluronan sodný
NaN <sub>3</sub>	Azid sodný
NaSCN	Thiokyanatan sodný
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Síran sodný
Ne	Neon
NH <sub>4</sub> SCN	Thiokyanatan amonný
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Síran amonný
N <sub>i</sub>	Počet částic i-tého druhu
NMR	Nukleární magnetická rezonance
PBS	Fosfátový pufr
PEG	Polyethylenglykol
PEO	Polyethylenoxid
PUL	Pullulanový standard
RI	Refraktometrický detektor
R <sub>T</sub>	Retenční čas
SDS	Dodecylsulfát sodný
THF	Tetrahydrofuran
VIS	Viskozitní detektor
V <sub>R</sub>	Retenční (eluční) objem
w <sub>i</sub>	Hmotnostní zlomek i-té frakce
z <sub>i</sub>	Náboj iontů
η <sub>sp</sub>	Specifická viskozita
[η]	Limitní viskozitní číslo
[η] <sub>0</sub>	Nulové smykové napětí

## SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. 1. Chemická struktura kyseliny hyaluronové [1] .....	13
Obr. 2. Znázornění hydrofilní a hydrofobní části molekuly pomocí střídajícího se modře a zeleně zbarveného vlákna [11] .....	16
Obr. 3. Fotografie z elektronového mikroskopu znázorňující propletený řetězec HA [11].....	16
Obr. 4. Závislost viskozitního poměru $\frac{\eta_{sp}}{c}$ a $\frac{\ln(\eta_{rel})}{c}$ roztoku HA na koncentraci $c_{HA}$ [31].....	25
Obr. 5. (a) Ostwaldův a (b) Ubbelohdeho viskozimetr [30], [38] .....	28
Obr. 6. Princip separace polymeru pomocí GPC [41] .....	32
Obr. 7. Viskozitní detektor se čtyřmi kapilárami [50].....	35
Obr. 8. Křivka univerzální kalibrace [27].....	40
Obr. 9. Přístroj PL-GPC 50.....	49
Obr. 10. Přístroj Shimadzu High Performance Liquid Chromatograph .....	50
Obr. 11. Rozpouštění vzorků hyaluronanu pomocí ohřevu na magnetickém míchadle při teplotě 50 °C.....	53
Obr. 12. Analýza standardu PUL $112 \times 10^3 \text{ g.mol}^{-1}$ ve všech MF; tmavě modrá – NaSCN, fialová – $\text{NH}_4\text{SCN}$ , světle modrá – NaCl, zelená – $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ a červená – $\text{Na}_2\text{SO}_4$ .....	61
Obr. 13. Analýza standardu PEO $116.3 \times 10^3 \text{ g.mol}^{-1}$ ve všech MF; tmavě modrá – NaSCN, fialová – $\text{NH}_4\text{SCN}$ , světle modrá – NaCl, zelená – $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ a červená – $\text{Na}_2\text{SO}_4$ .....	62
Obr. 14. Analýza standardů PUL v MF s $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ; šedomodrá – $788 \times 10^3$ , červená – $404 \times 10^3$ , zelená – $212 \times 10^3$ , fialová – $112 \times 10^3$ , tmavě modrá – $47.3 \times 10^3$ , světle modrá – $22.8 \times 10^3$ , žlutozelená – $5.9 \times 10^3 \text{ g.mol}^{-1}$ .....	62
Obr. 15. Analýza standardů PEO v MF s $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ; šedomodrá – $442.8 \times 10^3$ , červená – $278.1 \times 10^3$ , zelená – $116.3 \times 10^3$ , fialová – $50.63 \times 10^3$ , tmavě modrá – $21.03 \times 10^3$ , světle modrá – $7.92 \times 10^3$ , žlutozelená – $1.01 \times 10^3 \text{ g.mol}^{-1}$ .....	63

- Obr. 16. Analýza standardů PUL v MF s  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ; šedomodrá –  $788 \times 10^3$ , červená –  $404 \times 10^3$ , zelená –  $212 \times 10^3$ , fialová –  $112 \times 10^3$ , tmavě modrá –  $47.3 \times 10^3$ , světle modrá –  $22.8 \times 10^3$ , žlutozelená –  $5.9 \times 10^3 \text{ g.mol}^{-1}$  ..... 63
- Obr. 17. Analýza standardů PEO v MF s  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ; šedomodrá –  $442.8 \times 10^3$ , červená –  $278.1 \times 10^3$ , zelená –  $116.3 \times 10^3$ , fialová –  $50.63 \times 10^3$ , tmavě modrá –  $21.03 \times 10^3$ , světle modrá –  $7.92 \times 10^3$ , žlutozelená –  $1.01 \times 10^3 \text{ g.mol}^{-1}$  ..... 64
- Obr. 18. Chromatografická analýza standardu PEO  $895.5 \times 10^3 \text{ g.mol}^{-1}$  v různých MF; zelená – NaCl, červená – NaSCN, světle modrá –  $\text{NH}_4\text{SCN}$ , fialová –  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , tmavě modrá –  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  ..... 65
- Obr. 19. Srovnání kalibračních křivek v závislosti na použité MF pro PUL standardy ..... 66
- Obr. 20. Srovnání kalibračních křivek v závislosti na použité MF pro PEO standardy ..... 66
- Obr. 21. Hodnoty  $M_n$  vzorků NaHY<sub>30K</sub>, NaHY<sub>50K</sub> a NaHY<sub>0.35M</sub> stanovené za použití standardů PUL, vyhodnocené pomocí kalibrace získané lineární regresí ..... 68
- Obr. 22. Hodnoty  $M_n$  vzorků NaHY<sub>0.5M</sub>, NaHY<sub>2.1M</sub> a NaHY<sub>2.4M</sub> stanovené za použití standardů PUL, vyhodnocené pomocí kalibrace získané lineární regresí ..... 69
- Obr. 23. Hodnoty  $M_n$  vzorků NaHY<sub>30K</sub>, NaHY<sub>50K</sub> a NaHY<sub>0.35M</sub> stanovené za použití standardů PEO, vyhodnocené pomocí kalibrace získané lineární regresí ..... 70
- Obr. 24. Hodnoty  $M_n$  vzorků NaHY<sub>0.5M</sub>, NaHY<sub>2.1M</sub> a NaHY<sub>2.4M</sub> stanovené za použití standardů PEO, vyhodnocené pomocí kalibrace získané lineární regresí ..... 70
- Obr. 25. Hodnoty  $M_n$  vzorků NaHY stanovené za použití standardů PUL, vyhodnocené pomocí kalibrace proložené 3. polynomickým stupněm ..... 72
- Obr. 26. Hodnoty  $M_n$  vzorků NaHY stanovené za použití standardů PEO, vyhodnocené pomocí kalibrace proložené 3. polynomickým stupněm ..... 72
- Obr. 27. Retenční časy maxim chromatografických piků ( $R_T$ ) vzorků NaHY ve studovaných MF ..... 76
- Obr. 28. Analýza PUL  $212 \times 10^3$  na RI detektoru ve všech MF; modrá – NaCl, hnědá –  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , zelená –  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , fialová – NaSCN a černá –  $\text{NH}_4\text{SCN}$  ..... 78
- Obr. 29. Analýza PUL  $212 \times 10^3$  na VIS detektoru ve všech MF; modrá – NaCl, hnědá –  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , zelená –  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , fialová – NaSCN a černá –  $\text{NH}_4\text{SCN}$  ..... 78

- Obr. 30. Separace standardů v MF s  $\text{NH}_4\text{SCN}$  na RI detektoru; tmavě modrá –  $788 \times 10^3$ , hnědá –  $404 \times 10^3$ , zelená –  $212 \times 10^3$ , fialová –  $112 \times 10^3$ , žlutá –  $47.3 \times 10^3$ , zelenomodrá –  $22.8 \times 10^3$  a černá –  $5.9 \times 10^3$  ..... 80
- Obr. 31. Separace standardů v MF s  $\text{NH}_4\text{SCN}$  na VIS detektoru; tmavě modrá –  $788 \times 10^3$ , hnědá –  $404 \times 10^3$ , zelená –  $212 \times 10^3$ , fialová –  $112 \times 10^3$ , žlutá –  $47.3 \times 10^3$ , zelenomodrá –  $22.8 \times 10^3$  a černá –  $5.9 \times 10^3$  ..... 80
- Obr. 32. Kalibrační závislost  $\log(M_p^*[\eta])$  pro různé MF ..... 81
- Obr. 33. Hodnoty  $M_w$  vzorků  $\text{NaHY}_{30K}$ ,  $\text{NaHY}_{50K}$  a  $\text{NaHY}_{0.35M}$  stanovené za použití standardů PUL, vyhodnocené pomocí kalibrace získané lineární regresí ..... 83
- Obr. 34. Hodnoty  $M_w$  vzorků  $\text{NaHY}_{0.5M}$ ,  $\text{NaHY}_{2.1M}$  a  $\text{NaHY}_{2.4M}$  stanovené za použití standardů PUL, vyhodnocené pomocí kalibrace získané lineární regresí ..... 84
- Obr. 35. Grafické znázornění distribučních křivek pro vzorky  $\text{NaHY}$  v MF s  $\text{NaCl}$ ; A –  $\text{NaHY}_{30K}$ , B –  $\text{NaHY}_{50K}$ , C –  $\text{NaHY}_{0.35M}$ , D –  $\text{NaHY}_{0.5M}$ , E –  $\text{NaHY}_{2.1M}$ , F –  $\text{NaHY}_{2.4M}$  ..... 85
- Obr. 36. Grafické znázornění distribučních křivek pro vzorek  $\text{NaHY}_{30K}$ ; černá –  $\text{NaCl}$ , fialová –  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , červená –  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , zelená –  $\text{NaSCN}$  a modrá –  $\text{NH}_4\text{SCN}$  ..... 85
- Obr. 37. Grafické znázornění distribučních křivek pro vzorek  $\text{NaHY}_{0.35M}$ ; černá –  $\text{NaCl}$ , fialová –  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , červená –  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , zelená –  $\text{NaSCN}$  a modrá –  $\text{NH}_4\text{SCN}$  ..... 86
- Obr. 38. Grafické znázornění distribučních křivek pro vzorek  $\text{NaHY}_{2.1M}$ ; černá –  $\text{NaCl}$ , fialová –  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , červená –  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , zelená –  $\text{NaSCN}$  a modrá –  $\text{NH}_4\text{SCN}$  ..... 86
- Obr. 39. Vliv iontové síly na separaci vzorku  $\text{NaHY}_{30K}$ ; 0.15 M  $\text{NaCl}$  (modrá) a 0.45 M (červená) ..... 87
- Obr. 40. Vliv iontové síly na separaci vzorku  $\text{NaHY}_{0.35M}$ ; 0.15 M  $\text{NaCl}$  (modrá) a 0.45 M (červená) ..... 87

## SEZNAM TABULEK

<i>Tab. 1. Parametry Mark-Houwinkovy rovnice pro HA .....</i>	<i>27</i>
<i>Tab. 2. Seznam použitých vzorků hyaluronanu (NaHY) .....</i>	<i>47</i>
<i>Tab. 3. Chemikálie použité na přípravu mobilní fáze .....</i>	<i>47</i>
<i>Tab. 4. Přehled použitých standardů pullulanů .....</i>	<i>48</i>
<i>Tab. 5. Přehled použitých standardů PEO a PEG .....</i>	<i>48</i>
<i>Tab. 6. Složení použitých mobilních fází (MF) s iontovou silou <math>I = 0.1 M</math> .....</i>	<i>54</i>
<i>Tab. 7. Reprodukovatelnost hodnot molekulových hmotností vybraného vzorku NaHY stanovených na přístroji Shimadzu HPLC .....</i>	<i>56</i>
<i>Tab. 8. Reprodukovatelnost hodnot molekulových hmotností vybraného vzorku NaHY stanovených na přístroji PL-GPC 50 .....</i>	<i>57</i>
<i>Tab. 9. Reprodukovatelnost <math>R_T</math> maxima chromatografického píku vzorku NaHY analyzovaného v MF s uvedenými solemi (HPLC Shimadzu) .....</i>	<i>58</i>
<i>Tab. 10. Reprodukovatelnost <math>R_T</math> maxima chromatografického píku vzorku NaHY analyzovaného v MF s uvedenými solemi (PL-GPC 50) .....</i>	<i>58</i>
<i>Tab. 11. Retenční čas (<math>R_T</math>) maxima chromatografických píků stanovený pro vybrané standardy ve všech použitých MF (Shimadzu HPLC) .....</i>	<i>60</i>
<i>Tab. 12. Hodnoty <math>M_n</math> a <math>M_w</math> stanovené pomocí PUL i PEO standardů pro vzorek NaHY<sub>2.1M</sub> .....</i>	<i>71</i>
<i>Tab. 13. Hodnoty <math>M_n</math> a <math>M_w</math> stanovené pomocí PUL i PEO standardů pro vzorek NaHY<sub>2.4M</sub> .....</i>	<i>71</i>
<i>Tab. 14. Hodnoty molekulových hmotností NaHY stanovené při rozdílných průtocích MF obsahující Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> .....</i>	<i>74</i>
<i>Tab. 15. Hodnoty molekulových hmotností NaHY stanovené při rozdílných průtocích MF obsahující NaSCN .....</i>	<i>74</i>
<i>Tab. 16. Hodnoty <math>R_T</math> maxim chromatografických píků pro PUL zaznamenané viskozitním detektorem v MF se studovanými solemi .....</i>	<i>79</i>
<i>Tab. 17. Stanovené hodnoty <math>M_n</math> a <math>M_w</math> pro vzorek NaHY<sub>30K</sub> (PL-GPC 50) .....</i>	<i>82</i>
<i>Tab. 18. Stanovené hodnoty <math>M_n</math> a <math>M_w</math> pro vzorek NaHY<sub>0.35M</sub> (PL-GPC 50) .....</i>	<i>82</i>
<i>Tab. 19. Stanovené hodnoty <math>M_n</math> a <math>M_w</math> pro vzorek NaHY<sub>2.1M</sub> (PL-GPC 50) .....</i>	<i>82</i>

**SEZNAM PŘÍLOH**

**Příloha P I: Výsledky stanovených molekulových hmotností na přístroji Shimadzu HPLC – kalibrace proložená lineární regresí**

**Příloha P II: Výsledky stanovených molekulových hmotností na přístroji Shimadzu HPLC – kalibrace proložená 3. polynomičtým stupněm**

**Příloha P III: Výsledky stanovených molekulových hmotností na přístroji PL-GPC 50**

**PŘÍLOHA P I: VÝSLEDKY STANOVENÝCH MOLEKULOVÝCH  
HMOTNOSTÍ NA PŘÍSTROJI SHIMADZU HPLC – KALIBRACE  
PROLOŽENÁ LINEÁRNÍ REGRESÍ**

*Tab. 20. Hodnoty  $M_n$  a  $M_w$  stanovené pro vzorek NaHY<sub>30K</sub>*

NaHY <sub>30K</sub>	PUL		PEO	
	$M_n$ [g.mol <sup>-1</sup> ]	$M_w$ [g.mol <sup>-1</sup> ]	$M_n$ [g.mol <sup>-1</sup> ]	$M_w$ [g.mol <sup>-1</sup> ]
NaCl	33700	60500	50800	78000
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	55900	89600	71000	88800
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	64400	97100	59300	83000
NaSCN	71200	107200	38100	57900
NH <sub>4</sub> SCN	60200	85500	37400	51700

*Tab. 21. Hodnoty  $M_n$  a  $M_w$  stanovené pro vzorek NaHY<sub>50K</sub>*

NaHY <sub>50K</sub>	PUL		PEO	
	$M_n$ [g.mol <sup>-1</sup> ]	$M_w$ [g.mol <sup>-1</sup> ]	$M_n$ [g.mol <sup>-1</sup> ]	$M_w$ [g.mol <sup>-1</sup> ]
NaCl	99300	126700	77200	126700
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	103800	158200	106300	139600
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	101100	164000	89600	133100
NaSCN	108300	176000	58800	95900
NH <sub>4</sub> SCN	97800	151900	59800	90600

*Tab. 22. Hodnoty  $M_n$  a  $M_w$  stanovené pro vzorek NaHY<sub>0.35M</sub>*

NaHY <sub>0.35M</sub>	PUL		PEO	
	$M_n$ [g.mol <sup>-1</sup> ]	$M_w$ [g.mol <sup>-1</sup> ]	$M_n$ [g.mol <sup>-1</sup> ]	$M_w$ [g.mol <sup>-1</sup> ]
NaCl	318400	717900	220500	425400
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	291100	500900	235600	346400
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	284000	551400	230600	397200
NaSCN	350000	628300	190500	347400
NH <sub>4</sub> SCN	251600	457500	150300	263900



Tab. 23. Hodnoty  $M_n$  a  $M_w$  stanovené pro vzorek  $\text{NaHY}_{0.5M}$

$\text{NaHY}_{0.5M}$	PUL		PEO	
	$M_n$ [g.mol <sup>-1</sup> ]	$M_w$ [g.mol <sup>-1</sup> ]	$M_n$ [g.mol <sup>-1</sup> ]	$M_w$ [g.mol <sup>-1</sup> ]
NaCl	725400	1450800	492000	824700
$\text{Na}_2\text{SO}_4$	663300	1090200	486500	565100
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	675300	1167500	502700	786200
NaSCN	807000	1264900	492900	723700
$\text{NH}_4\text{SCN}$	699600	1195300	426200	677800

Tab. 24. Hodnoty  $M_n$  a  $M_w$  stanovené pro vzorek  $\text{NaHY}_{2.1M}$

$\text{NaHY}_{2.1M}$	PUL		PEO	
	$M_n$ [g.mol <sup>-1</sup> ]	$M_w$ [g.mol <sup>-1</sup> ]	$M_n$ [g.mol <sup>-1</sup> ]	$M_w$ [g.mol <sup>-1</sup> ]
NaCl	2933000	4307000	1648000	2177000
$\text{Na}_2\text{SO}_4$	1704000	2902000	1054000	1444000
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	2215000	3307000	1512000	2047000
NaSCN	2645000	3647000	1656000	2167000
$\text{NH}_4\text{SCN}$	2200000	3312000	1276000	1832000

Tab. 25. Hodnoty  $M_n$  a  $M_w$  stanovené pro vzorek  $\text{NaHY}_{2.4M}$

$\text{NaHY}_{2.4M}$	PUL		PEO	
	$M_n$ [g.mol <sup>-1</sup> ]	$M_w$ [g.mol <sup>-1</sup> ]	$M_n$ [g.mol <sup>-1</sup> ]	$M_w$ [g.mol <sup>-1</sup> ]
NaCl	2912000	4118000	1583000	2803000
$\text{Na}_2\text{SO}_4$	2287000	3329000	1162000	1562000
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	2323000	3335000	1630000	2100000
NaSCN	2710000	3677000	1650000	2150000
$\text{NH}_4\text{SCN}$	2330000	3364000	1340000	1850000

**PŘÍLOHA P II: VÝSLEDKY STANOVENÝCH MOLEKULOVÝCH  
HMOTNOSTÍ NA PŘÍSTROJI SHIMADZU HPLC – KALIBRACE  
PROLOŽENÁ 3. POLYNOMICKÝM STUPNĚM**

*Tab. 26. Hodnoty  $M_n$  a  $M_w$  stanovené pro vzorek NaHY<sub>30K</sub>*

NaHY <sub>30K</sub>	PUL		PEO	
	$M_n$ [g.mol <sup>-1</sup> ]	$M_w$ [g.mol <sup>-1</sup> ]	$M_n$ [g.mol <sup>-1</sup> ]	$M_w$ [g.mol <sup>-1</sup> ]
NaCl	67700	118500	56900	84200
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	62000	97900	76000	93600
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	63200	105400	68600	89400
NaSCN	72200	115500	40800	63100
NH <sub>4</sub> SCN	93300	58500	40700	57500

*Tab. 27. Hodnoty  $M_n$  a  $M_w$  stanovené pro vzorek NaHY<sub>50K</sub>*

NaHY <sub>50K</sub>	PUL		PEO	
	$M_n$ [g.mol <sup>-1</sup> ]	$M_w$ [g.mol <sup>-1</sup> ]	$M_n$ [g.mol <sup>-1</sup> ]	$M_w$ [g.mol <sup>-1</sup> ]
NaCl	109700	191700	85500	130000
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	107800	167400	111700	134700
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	105000	171900	99300	133300
NaSCN	113500	182100	63100	100300
NH <sub>4</sub> SCN	100000	160400	65300	96100

*Tab. 28. Hodnoty  $M_n$  a  $M_w$  stanovené pro vzorek NaHY<sub>0.35M</sub>*

NaHY <sub>0.35M</sub>	PUL		PEO	
	$M_n$ [g.mol <sup>-1</sup> ]	$M_w$ [g.mol <sup>-1</sup> ]	$M_n$ [g.mol <sup>-1</sup> ]	$M_w$ [g.mol <sup>-1</sup> ]
NaCl	327100	678400	224900	427800
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	272300	476500	266600	402700
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	294100	539200	235900	427000
NaSCN	350600	622700	197500	334000
NH <sub>4</sub> SCN	259300	444400	173600	334600

Tab. 29. Hodnoty  $M_n$  a  $M_w$  stanovené pro vzorek  $\text{NaHY}_{0.5M}$

$\text{NaHY}_{0.5M}$	PUL		PEO	
	$M_n$ [g.mol <sup>-1</sup> ]	$M_w$ [g.mol <sup>-1</sup> ]	$M_n$ [g.mol <sup>-1</sup> ]	$M_w$ [g.mol <sup>-1</sup> ]
NaCl	706900	1526000	482300	937900
$\text{Na}_2\text{SO}_4$	657400	1108600	506400	866300
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	680600	1264900	529500	1211200
NaSCN	857800	1430900	494500	719800
$\text{NH}_4\text{SCN}$	709000	1333200	435900	699100

Tab. 30. Hodnoty  $M_n$  a  $M_w$  stanovené pro vzorek  $\text{NaHY}_{2.1M}$

$\text{NaHY}_{2.1M}$	PUL		PEO	
	$M_n$ [g.mol <sup>-1</sup> ]	$M_w$ [g.mol <sup>-1</sup> ]	$M_n$ [g.mol <sup>-1</sup> ]	$M_w$ [g.mol <sup>-1</sup> ]
NaCl	3164200	8120600	2034200	4380000
$\text{Na}_2\text{SO}_4$	2062900	5061200	1885300	5275200
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	2513500	6374400	2318700	10719900
NaSCN	3469800	8404200	1693400	2790800
$\text{NH}_4\text{SCN}$	2579000	6978400	1378700	2596300

Tab. 31. Hodnoty  $M_n$  a  $M_w$  stanovené pro vzorek  $\text{NaHY}_{2.4M}$

$\text{NaHY}_{2.4M}$	PUL		PEO	
	$M_n$ [g.mol <sup>-1</sup> ]	$M_w$ [g.mol <sup>-1</sup> ]	$M_n$ [g.mol <sup>-1</sup> ]	$M_w$ [g.mol <sup>-1</sup> ]
NaCl	3255400	7401500	1964800	3998300
$\text{Na}_2\text{SO}_4$	2270100	5893100	2348400	43909500
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	2729700	6462700	2582800	10693300
NaSCN	3674000	8495400	1704500	2794400
$\text{NH}_4\text{SCN}$	2657900	6950200	1461200	2661100

## PŘÍLOHA P III: VÝSLEDKY STANOVENÝCH MOLEKULOVÝCH HMOTNOSTÍ NA PŘÍSTROJI PL-GPC 50

Tab. 32. Hodnoty  $M_n$  a  $M_w$  stanovené pro vzorek  $\text{NaHY}_{30K}$

$\text{NaHY}_{30K}$	PUL 1. polynom		PUL 3. polynom	
	$M_n$ [g.mol <sup>-1</sup> ]	$M_w$ [g.mol <sup>-1</sup> ]	$M_n$ [g.mol <sup>-1</sup> ]	$M_w$ [g.mol <sup>-1</sup> ]
NaCl	21300	41700	11300	49100
$\text{Na}_2\text{SO}_4$	14400	39500	20000	48600
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	24300	43100	33200	54100
NaSCN	22600	45000	17600	5300
$\text{NH}_4\text{SCN}$	17600	45300	21200	58500

Tab. 33. Hodnoty  $M_n$  a  $M_w$  stanovené pro vzorek  $\text{NaHY}_{50K}$

$\text{NaHY}_{50K}$	PUL 1. polynom		PUL 3. polynom	
	$M_n$ [g.mol <sup>-1</sup> ]	$M_w$ [g.mol <sup>-1</sup> ]	$M_n$ [g.mol <sup>-1</sup> ]	$M_w$ [g.mol <sup>-1</sup> ]
NaCl	27100	61900	45400	78100
$\text{Na}_2\text{SO}_4$	19000	67400	29400	69200
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	30200	72000	62088	87962
NaSCN	32400	76800	53200	85100
$\text{NH}_4\text{SCN}$	35700	80500	40500	74100

Tab. 34. Hodnoty  $M_n$  a  $M_w$  stanovené pro vzorek  $\text{NaHY}_{0.35M}$

$\text{NaHY}_{0.35M}$	PUL 1. polynom		PUL 3. polynom	
	$M_n$ [g.mol <sup>-1</sup> ]	$M_w$ [g.mol <sup>-1</sup> ]	$M_n$ [g.mol <sup>-1</sup> ]	$M_w$ [g.mol <sup>-1</sup> ]
NaCl	92700	263600	130000	253600
$\text{Na}_2\text{SO}_4$	60800	301100	130100	203000
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	87000	240300	116800	190400
NaSCN	69400	258000	nestanoveno	nestanoveno
$\text{NH}_4\text{SCN}$	136800	303300	nestanoveno	nestanoveno

Tab. 35. Hodnoty  $M_n$  a  $M_w$  stanovené pro vzorek  $\text{NaHY}_{0.5M}$

$\text{NaHY}_{0.5M}$	PUL 1. polynom		PUL 3. polynom	
	$M_n [\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}]$	$M_w [\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}]$	$M_n [\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}]$	$M_w [\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}]$
NaCl	217700	491500	351900	542600
$\text{Na}_2\text{SO}_4$	129400	526700	202900	266000
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	256400	544300	193300	337200
NaSCN	162300	666700	nestanoveno	nestanoveno
$\text{NH}_4\text{SCN}$	274100	508500	nestanoveno	nestanoveno

Tab. 36. Hodnoty  $M_n$  a  $M_w$  stanovené pro vzorek  $\text{NaHY}_{2.1M}$

$\text{NaHY}_{2.1M}$	PUL 1. polynom		PUL 3. polynom	
	$M_n [\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}]$	$M_w [\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}]$	$M_n [\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}]$	$M_w [\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}]$
NaCl	317300	970700	212400	415000
$\text{Na}_2\text{SO}_4$	861000	1843000	304000	458400
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	730000	1502000	408500	1209000
NaSCN	657000	1637000	nestanoveno	nestanoveno
$\text{NH}_4\text{SCN}$	416100	1176600	nestanoveno	nestanoveno

Tab. 37. Hodnoty  $M_n$  a  $M_w$  stanovené pro vzorek  $\text{NaHY}_{2.4M}$

$\text{NaHY}_{2.4M}$	PUL 1. polynom		PUL 3. polynom	
	$M_n [\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}]$	$M_w [\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}]$	$M_n [\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}]$	$M_w [\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}]$
NaCl	460000	1246000	284900	518500
$\text{Na}_2\text{SO}_4$	929600	1977000	352700	496200
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	668000	1472000	339000	1189000
NaSCN	677400	1836000	nestanoveno	nestanoveno
$\text{NH}_4\text{SCN}$	456200	1302900	nestanoveno	nestanoveno