

Elektroforeza w octanie celulozy CAE w badaniach komercyjnych alginianowych opatrunków aktywnych

ANNA PIELESZ

Wydział Nauk o Materiałach i Środowisku
Instytut Inżynierii Tekstyliów
i Materiałów Polimerowych,
Akademia Techniczno-Humanistyczna
w Bielsku-Białej

Streszczenie

Hydrożele zbudowane są z trójwymiarowej sieci polimerów polisacharydowych, które magazynują znaczną ilość wody, zapewniają nawilżenie i nawodnienie suchej rany. Jedną z najważniejszych właściwości hydrożeli alginianowych jest zdolność do absorpcji, uwalniania i retencji związków chemicznych, w tym głównie wody.

W pracy dokonano identyfikacji metodą elektroforezy w octanie celulozy CAE rozpuszczalnych w wodzie alginianów sodu, zawartych w opatrunkach aktywnych Medisorb A. Wykazano również obecność kwasów guluronowego (G) i manuronowego (M) w hydrolizatach wzorca kwasu alginowego AA i alginianowych opatrunkach aktywnych Medisorb A. Zaobserwowano metodą elektroforezy CAE i dokonano próby interpretacji proponowanych wcześniej w literaturze tzw. struktur „egg-box” („jajko w pudełku na jajka” lub „wytłoczka do jajek”). Stwierdzono, że metoda elektroforezy CAE powinna znaleźć szersze zastosowanie do badań biomateriałów na bazie alginianów.

Słowa kluczowe: elektroforeza w octanie celulozy CAE, alginianowe opatrunki aktywne, kwas guluronowy (G) i kwas manuronowy (M)

Electrophoresis on a cellulose acetate CAE in a study of commercial active alginate dressings

Summary

Hydrogels are cross-linked three-dimensional macromolecular networks that contain a large fraction of water within their structure. One of the most important properties of alginate hydrogels, leading to their broad versatility, is their ability for controlled uptake, release and retention of molecules. This ability, in turn, is due to specific interactions of the macromolecular network with the diffusing or retained molecule, for example ions.

In this study, water-soluble sodium alginates contained in active dressings Medisorb A were identified using electrophoresis on cellulose acetate CAE. The presence of guluronic acid (G) and mannuronic acid (M) residues in hydrolysates of alginic acid AA (used as reference substance) and active alginate dressings Medisorb A was also proved. “Egg-box” structures, earlier described in literature, were observed using the same technique and their interpretation was attempted. Electrophoresis on cellulose acetate was found to be a useful method for examining alginate-based biomaterials.

Key words: electrophoresis on a cellulose acetate CAE, active alginate dressings, guluronic acid (G) and mannuronic acid (M)

WPROWADZENIE

Alginian jest powszechnie znanym polisacharydem pozyskiwanym z alg morskich, głównie brunatnic (*Phaeophyceae*) [1–2] lub produkowanym pozakomórkowo przez niektóre bakterie, takie jak

Azotobacter vinelandii, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens* [3–5]. Struktura pierwotna alginianu zależy od źródła pochodzenia alg morskich (gatunku alg, odmian sezonowych i pochodzenia geograficznego) lub rodzaju bakterii, które je produkują.

Pozyskiwanie alginianów z brunatnic polega na tym, że alga morska jest ekstrahowana z rozcieńczonego roztworu. Wolny kwas alginowy jest otrzymywany przez obróbkę powstałej gęstej i lepkiej masy kwasami nieorganicznymi [2]. Uwodnienie kwasu alginowego prowadzi do kształtowania wysokiej lepkości „kwaśnego żelu”. Po żelowaniu cząsteczki wody są fizycznie usiłek wewnątrz matrycy alginianu, ale są jeszcze na tyle wolne, by wędrować. Ma to podstawowe znaczenie aplikacyjne [2].

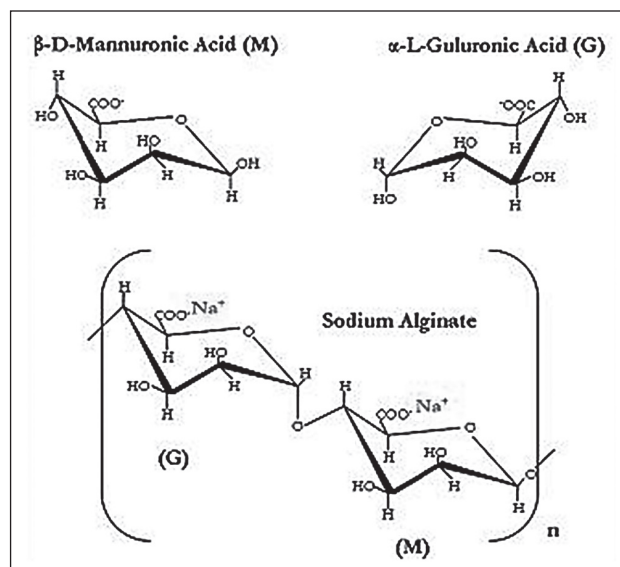
Chemicznie alginiany są naturalnie występującymi polisacharydowymi kopolimerami, składającymi się z reszt kwasu β -D-mannuronowego (bloki M) i α -L-guluronowego (bloki G), połączonych razem wiązaniami glikozydowymi (ryc. 1).

Blok D-mannuronowy jest w konformacji 4C_1 , a L-guluronowy w 1C_4 , niezależnie od ich najbliższej sąsiedniej jednostki. Bloki M i G mogą występować w różnych proporcjach i w różnych rozmieszczeniach wzdłuż łańcucha (możliwe są rozmieszczenia MMMMMM, GGGGGG, GMGMGMGM) [3, 7].

Alginiany są polisacharydami, które mają zdolność do tworzenia form żelowych (z jonami wapnia), o szeroko opisanych w literaturze właściwościach aplikacyjnych w chemii spożywczej, farmacji i medycynie.

Wzajemne oddziaływanie alginianów z dwuwartościowymi kationami, szczególnie z Ca^{2+} , prowadzi do tworzenia żeli. Wyróżniająca się struktura molekularna wynikająca z tych oddziaływań, jest określona przez model „eggs-box” („jajko w pudełku na jajka” lub „wytłoczek do jajek”), gdzie homopolimerowe bloki G tworzą trójwymiarowe uporządkowanie, w którym jony Ca^{2+} są osadzone jak jajka w tekturowym pudełku [4, 8–10].

Wzajemne oddziaływanie alginianów z jonami Ca^{2+} zostało wykorzystane przy projektowaniu i wytwarzaniu opatrunków aktywnych. Zjawisko żelowania i pęcznienia opatrunku alginianowego, jest wynikiem wymiany jonów wapniowych z powierzchni opatrunku na jony sodu znajdujące się w wydzielinie. Na powierzchni rany powstaje hydrofilowa wilgotna powłoka utrzymująca ciepło, sprzyjające gojeniu środowisko. Zawartość jonów wapnia skoncentrowanych na powierzchni rany i związany z tym wpływ na ciśnienie osmotyczne w kapilarach, daje



Ryc. 1. Budowa kwasu β -D-mannuronowego (bloki M) i α -L-guluronowego (bloki G) [6].

FIG. 1. The structure of guluronic acid (G) and manuronic acid (M) residues [6]

dodatkowy efekt hemostatyczny i wspomaga proces krzepnięcia [11].

Niezależnie od przedmiotu badań i zastosowań aplikacyjnych produktu, najważniejsze jest poznanie budowy i funkcji przedmiotu analizy. Współczesne badania podstawowe alginianów koncentrują się na poznaniu nanostruktury biopolimerów. Techniki analityczne, które znajdują tutaj zastosowanie to spektroskopia w podczerwieni FTIR i bliskiej podczerwieni NIR, spektroskopia Ramana, a także jądrowy rezonans magnetyczny NMR.

Bardzo efektywnym narzędziem analizy składu i struktury alginianów jest spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego NMR. Analiza alg metodą NMR wymaga odpowiedniego przygotowania próbek do pomiaru. Aby uzyskać dopuszczalny, z analitycznego punktu widzenia, stosunek sygnału do szumu, należy zredukować lepkość roztworów analitycznych. Dokonuje się tego przez hydrolizę w słabo kwaśnym środowisku. Efektem pomiaru jest widmo 1H NMR hydrolizatu roztworu alginianu [12], zaś widoczne na widmie protonowym NMR wartości przesunięć chemicznych informują o składzie alginianu.

Powszechnie do analizy alginianów stosuje się także metody chromatograficzne i elektroforetyczne. Należy tu wymienić wysokosprawną chromatografię ciekłą HPLC, chromatografię gazową GC

[13–14], a także elektroforezę kapilarną CE i micelną elektrokinetyczną chromatografię kapilarną MEKC [15–19].

W niniejszej pracy do oceny alginianów wybrano znacznie rzadziej stosowaną metodę elektroforezy w octanie celulozy CAE.

MATERIAŁ I METODA

Zastosowano następujące materiały i odczynniki: alginianowy opatrunek aktywny Medisorb (MA) (wyprodukowany przez TZMO SA, Toruń), kwas alginowy (AA) (Sigma, Poland); roztwory CaCl_2 o następujących stężeniach: 0.1M, 0.5M, 1M, 1.5M.

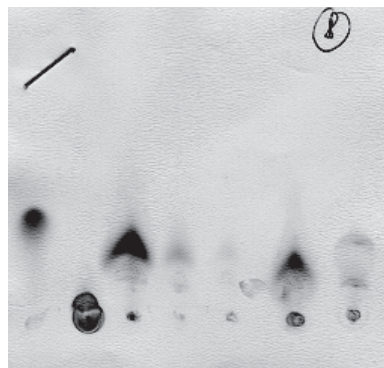
Elektroforezę prowadzono (CA-SYS-MINI Cellulose Acetate Systems) w roztworze 0.2M octanie wapnia (pH = 7.5) przez 1 godzinę. Warunki pomiaru: 7mA, max 240V, 50W.

Następnie wybarwiono płytki w 0.5% roztworze błękitu toluidyny, odpłukano w wodzie destylowanej i wysuszono na powietrzu. Część próbek (MA i AA) poddano wcześniejszej hydrolizie w 98%, 80% i 60% H_2SO_4 w temperaturze pokojowej w czasie 1–48 godzin. Wyniki badań przedstawiono na rycinach 2–8.

WYNIKI I DISKUSJA

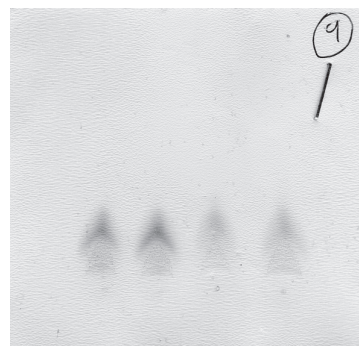
Elektroforeza w octanie celulozy CAE jest typową techniką służącą do analizy klinicznej. Standardowo przeprowadza się elektroforetyczne próby kliniczne białek zawartych w surowicy krwi. Analiza obrazu rozdziału elektroforetycznego białek surowicy ma istotne znaczenie diagnostyczne, pozwalając na wstępną ocenę zmian składu frakcji białkowych pacjenta. Przesunięcia w składzie procentowym frakcji białek osocza, świadczą o stanie zapalnym i są prostym wykładnikiem aktywności procesu zapalnego lub odpornościowego. Różnice w zawartości pomiędzy frakcjami albuminy, α_1 i α_2 – globuliny oraz β i γ -globuliny mogą wskazywać na obecność następujących chorób: szpiczaka, nerczycy, krwotoków, chorób wątroby.

Omawiana metoda nie znalazła natomiast do tej pory szerszego zastosowania [20] do analizy alginianów. Dlatego też w niniejszej pracy podjęto próbę identyfikacji metodą elektroforezy w octanie celulozy CAE alginianów, zawartych w opatrunkach aktywnych MA oraz produktach hydrolizy tychże opatrunków. W szczególności zidentyfikowano kwas alginowy AA jako substancję wzorcową i alginiany



RYC. 2. Elektroferogram alginianów na płytkach CAE. Od lewej do prawej strony: wzorzec, barwnik – Amido Black 10B; AA (0.1g); hydrolizat kwasu alginowego (0.1g; 0.01g; 0.003g); hydrolizat alginianów opatrunku MA, hydrolizat opatrunku MA, wcześniej traktowanego 1% CuSO_4

FIG. 2. Electrophoretogram of alginate on cellulose acetate film. From left to right: dye – Amido Black 10B; AA (0.1g); acid hydrolysates of alginic acid (0.1g; 0.01g; 0.003g); acid hydrolysates of alginate from MA earlier treated with 1% CuSO_4

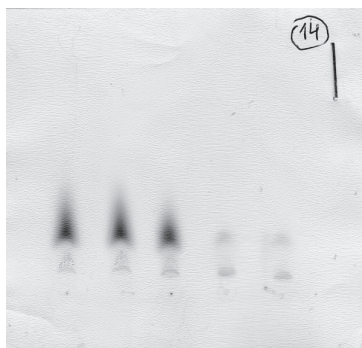


RYC. 3. Elektroferogram hydrolizatów. Od lewej do prawej strony: hydrolizat kwasu alginowego AA (0.1 g $\times$ 2), hydrolizat alginianu z opatrunku MA (0.1 g $\times$ 2)

FIG. 3. Electrophoretogram of acid hydrolysates. From the left side: acid hydrolysates of alginic acid (0.1 g $\times$ 2), acid hydrolysates of alginate from MA (0.1 g $\times$ 2)

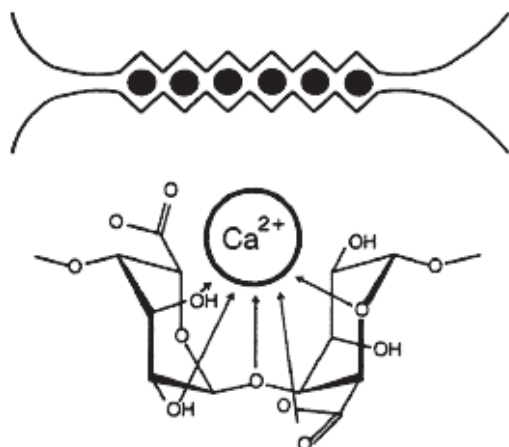
w opatrunkach aktywnych MA. Wyniki badań elektroforetycznych przedstawione na rycinie 2 pokazują skrótowo przebieg dalszej, omawianej kolejno procedury analitycznej.

Przedstawione na rycinie 2 próbki poddano hydrolizie w 0.5 cm³ 98% H_2SO_4 w temp. pokojowej przez 24 godziny. Do wszystkich próbek dodano po



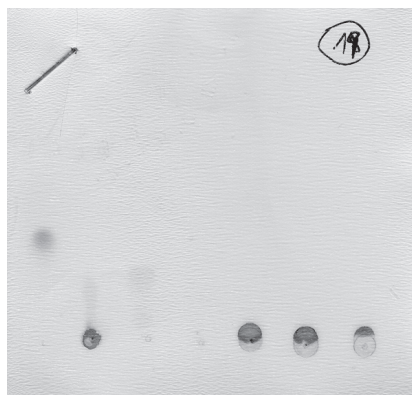
Ryc. 4. Elektroferogram hydrolizatów kwasu alginowego. Od lewej do prawej strony: 1 μ l – 80% H_2SO_4 (2 $\times$); 1 μ l – 60% H_2SO_4 ; 1 μ l – 40% H_2SO_4 (2 $\times$)

FIG. 4. Electrophoretogram of acid hydrolysates of AA (0.1g). Samples from the left side: 1 μ l – 80% H_2SO_4 (2 $\times$); 1 μ l – 60% H_2SO_4 ; 1 μ l – 40% H_2SO_4 (2 $\times$)



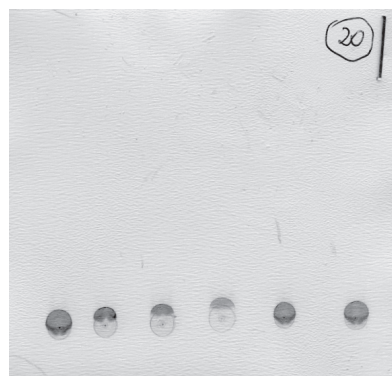
Ryc. 5. Prawdopodobne połączenie jonu wapnia z resztami guluronowymi [22]

FIG. 5. A probably binding site of Ca cation to polymeric blocks of guluronate residues [22]



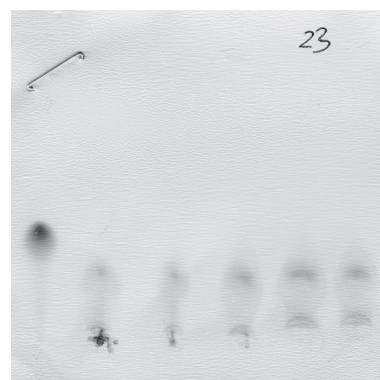
Ryc. 6. Elektroferogram alginianów. Od lewej do prawej strony: wzorec – barwnik, AA w 0.1M $CaCl_2$ + 2% Na_2CO_3 , AA w 0.5M $CaCl_2$ + 2% Na_2CO_3 , AA w 1M $CaCl_2$ + 2% Na_2CO_3 , AA w 0.1M $CaCl_2$ + 1M Na_2CO_3 , AA w 0.5M $CaCl_2$ + 1M Na_2CO_3 , AA w 1M $CaCl_2$ + 1M Na_2CO_3

FIG. 6. Electrophoretogram of alginate on cellulose acetate film. From the left side: dye, AA in 0.1M $CaCl_2$ + 2% Na_2CO_3 , AA in 0.5M $CaCl_2$ + 2% Na_2CO_3 , AA in 1M $CaCl_2$ + 2% Na_2CO_3 , AA in 0.1M $CaCl_2$ + 1M Na_2CO_3 , AA in 0.5M $CaCl_2$ + 1M Na_2CO_3 , AA in 1M $CaCl_2$ + 1M Na_2CO_3



Ryc. 7. Elektroferogram alginianów. Od lewej do prawej strony: MA w 0.1M $CaCl_2$ + 1M Na_2CO_3 , MA w 0.5M $CaCl_2$ + 1M Na_2CO_3 , MA w 1M $CaCl_2$ + 1M Na_2CO_3 , MA w 1.5M $CaCl_2$ + 1M Na_2CO_3

FIG. 7. Electrophoretogram of alginate on cellulose acetate film. From the left side: MA in 0.1M $CaCl_2$ + 1M Na_2CO_3 , MA in 0.5M $CaCl_2$ + 1M Na_2CO_3 , MA in 1M $CaCl_2$ + 1M Na_2CO_3 , MA in 1.5M $CaCl_2$ + 1M Na_2CO_3



Ryc. 8. Elektroferogram hydrolizatów opatrunku MA. Od lewej do prawej strony: wzorec – barwnik, 0.1M $CaCl_2$ + 80% H_2SO_4 (2 μ l); 0.5M $CaCl_2$ + 80% H_2SO_4 (2 μ l); 1M $CaCl_2$ + 80% H_2SO_4 (2 μ l); 1.5M $CaCl_2$ + 80% H_2SO_4 (2 μ l) (2 $\times$)

FIG. 8. Electrophoretogram of acid hydrolysates of MA (0.1 g). Samples from the left side: dye, 0.1M $CaCl_2$ + 80% H_2SO_4 (2 μ l); 0.5M $CaCl_2$ + 80% H_2SO_4 (2 μ l); 1M $CaCl_2$ + 80% H_2SO_4 (2 μ l); 1.5M $CaCl_2$ + 80% H_2SO_4 (2 μ l) (2 $\times$)

20cm³ 2% Na₂CO₃, umieszczono na 15 minut w suszarce laboratoryjnej, w temp. 80°C. Po ostudzeniu poddano elektroforezie w warunkach jak wyżej.

Elektroferogram kwasu alginowego AA przedstawia pojedyncze pasmo, pozostające na linii startowej. Hydrolizaty natomiast uwidaczniają się w postaci dwóch pasm, z których drugie, bardziej intensywne, podlega wyraźnej migracji. Pasma startowe należy łączyć z resztami kwasu α -L-guluronowego (bloki G), natomiast drugie z resztami kwasu β -D-mannuronowego (bloki M).

Kolejną przeprowadzono analizę porównawczą hydrolizatów AA i MA. Elektroforezę prowadzono w warunkach doświadczalnych jak wyżej, do hydrolizy zastosowano tym razem 1cm³ 80% H₂SO₄. Wyniki badań przedstawiono na rycinie 3. Można stwierdzić zadowalającą powtarzalność prób, tak w przypadku wzorca, jak analizowanej próbki opatrunku. Wyraźniejsze pasmo można zauważyć dla reszt kwasu β -D-mannuronowego (bloki M).

Sledzono także proces hydrolizy kwasu alginowego AA w zależności od stężenia i ilości H₂SO₄. Wyniki badań zestawiono na rycinie 4. Próby, których wyniki przedstawiono na rycinie 4 były hydrolizowane 1cm³ H₂SO₄ (80%, 60%, 40%) w temp. pokojowej przez 1 godzinę. Pozostałe warunki pomiaru zachowano jak wyżej. Zaobserwowano dobrą odtwarzalność jednostek M i G w trakcie hydrolizy wzorca, co stanowi istotną informację technologiczną.

Z punktu widzenia poznawczego ważne jest zrozumienie mechanizmu reakcji wymiany jonów Na⁺ z jonami Ca²⁺ (lub Mn²⁺, Zn²⁺).

Na podstawie doniesień literaturowych [21] wiadomo, że tlen z grupy karboksylowej i grupa hydroksylowa z alginianu, uczestniczą w reakcji dołączania kationów z roztworu i powstania struktur typu „egg-box” (ryc. 5).

Kation działa jako czynnik sieciujący pomiędzy łańcuchami polimeru. Lepkość i pierwotna struktura polimeru są ważnymi cechami określającymi jego pęcznienie i właściwości żelujące. Pierwotna struktura jest często wyznaczana przez wartość F_G, która jest frakcją reszt kwasu guluronowego w polimerze. Znaczenie ma także ilość i charakter czynnika sieciującego [3].

Na rycinie 6 przedstawiono proces sorpcji jonów metali, w zależności od stężenia jonów Ca²⁺ oraz proces wymiany jonowej, w zależności od stężenia jonów Na⁺. Do prób dodano po 5cm³ roztworów CaCl₂ o stężeniach 0.1M, 0.5M, 1M. Pozostawiono próbki na 15 min w temp. pokojowej, a następnie dodano po 10 cm³ roztworów 2% lub 1M Na₂CO₃.

Umieszczono próbki w suszarce laboratoryjnej na 15 min w 80°C. Naniesiono po 1μl próbek na płytki i prowadzono elektroforezę w warunkach jak wyżej.

Z analizy danych przedstawionych na rycinie 6 widać, że rozpuszczalny w wodzie alginian sodu udało się zidentyfikować wówczas, gdy CaCl₂ pułkuje tylko część dostępnych wiązań w strukturze alginianu (drugie pasmo na rycinie). Większość alginianu sodu pozostaje w formie rozpuszczalnego w wodzie widocznego w procesie elektroforetycznym pasma. Jeżeli zastosuje się do reakcji wymiany 1M Na₂CO₃ zamiast 2% Na₂CO₃ (ryc.6), wówczas pasma elektroforetyczne są widoczne, niezależnie od stężenia użytej soli.

Jony Na⁺ tworzą rozpuszczalne sole z alginianem, podczas gdy dwuwartościowe i wielowartościowe kationy (z wyjątkiem Mg²⁺) tworzą sole nierozpuszczalne w wodzie. Różne kationy wykorzystują inne powinowactwo do alginianu, a selekcyjny jon wiążący jest podstawą, aby alginian miał zdolność do wymiany jonów. Od typu tworzonego żelu zależą właściwości fizykochemiczne systemu polimerowego i proces pęcznienia [2]. W kolejnych próbach przeprowadzano analogiczne obserwacje dla próbek MA (ryc. 7).

W przypadku próbek, w których doszło do absorpcji największej ilości jonów Ca²⁺ (1M i 1.5M CaCl₂), obserwuje się niewielką migrację próbek z linii startu, co może świadczyć o wzmocnieniu pasma od kwasu guluronowego (G) i wskazywać na właściwe miejsce wymiany jonowej.

Podobne zjawisko selektywnej wymiany jonowej było sygnalizowane we wcześniejszych pracach [23, 24]. Wówczas zastosowano jednak inne metody badań: NMR oraz absorpcję atomową AA.

Obserwowano także proces hydrolizy modyfikowanych solami Ca²⁺ próbek MA (ryc. 8). Zastosowano po 5cm³ 0.1M, 0.5M, 1M i 1.5M CaCl₂. Próbkę MA pozostawiono w roztworach soli przez 24 godz w temp. pokojowej, następnie dodano po 1 cm³ 80% H₂SO₄, zdekantowano roztwór soli przed dodaniem 80% H₂SO₄. Ponownie pozostawiono próbki na 24 godz. w kwasie. Następnie dodano po 10 cm³ 1M Na₂CO₃, pozostawiono próbki w suszarce na 15 min w temp. 80°C. Elektroforezę prowadzono jak wyżej.

W porównaniu z przedstawionymi wcześniej, na rycinie 3 wynikami hydrolizy opatrunków MA, próbki opatrunku modyfikowane przed hydrolizą solami wapnia wykazują rozmycie pasm.

Oddziaływanie manganu (II) z polimannuronianem głównie opiera się na przyciąganiu elektrostatycznym. Jony manganu formują stałe kompleksy

z polimannuronianem. W poliguluronianie kwasy uronowe są połączone osiowo, co prowadzi do kształtowania się sfałdowanych tasiemek, które są zdolne do formowania stałych kompleksów chelatowych z jonami Ca^{2+} . Widmo NMR poliguluronianu w obecności Mn^{2+} wykazuje silne powinowactwo kationu do karboksylowego węgla C-6 i do jego sąsiada C-5. Charakterystyczna struktura łańcucha w postaci zygzaka pozwala na lepsze oddziaływanie kationu i na bardziej stałe połączenie. To wyjaśnia dużo silniejszą tendencję poliguluronianu (w porównaniu do polimannuronianu) do tworzenia kompleksów w obecności dwuwartościowych kationów.

Przeprowadzono także badania oddziaływania pomiędzy kationami Mn^{2+} a przemiennymi blokami MG. Wykorzystano alginiany pozyskane z alg. Otrzymane serie widm NMR również wykazują, że najsilniejszy efekt jest zlokalizowany na węglu C-6.

W przypadku alginianów pozyskiwanych z bakterii najsilniejszy efekt zlokalizowano na węglu C-6. Nawet gdy stężenie manganu jest niskie, sygnał C-6 zmienia się w bardzo szeroki pik i jest trudny do wykrycia. W tym samym czasie węglowy pik, odnoszący się do grupy karbonylowej reszty acetylowej, pozostaje praktycznie niezmieniony.

Bezpośrednie porównanie wyników oddziaływania jonów metali alginianu z alg z wynikami oddziaływania jonów w alginianach bakteryjnych jest trudne, ponieważ oba polisacharydy różnią się strukturalnie (stopień acetylacji) [4].

Zilustrowane elektroferogramami (ryc. 2-8) badania alginianów zawartych w komercyjnych opatrunkach aktywnych MA, chociaż trudne do jednoznacznej interpretacji, będą kontynuowane.

WNIOSKI

1. Na podstawie przeprowadzonych badań z zastosowaniem elektroforezy w octanie celulozy CAE można stwierdzić, że niniejsza metoda może być z powodzeniem stosowana jako dobra, relatywnie tania technika aplikacyjna. Można ją także stosować do wstępnej oceny mechanizmu złożonych zjawisk fizykochemicznych.
2. Należy pokreślić przydatność elektroforezy CAE w badaniach niehomogenicznych, trudnych do analizy biomateriałów jakimi są alginiany.
3. W niniejszej pracy wykazano zadowalającą powtarzalność analiz próbek tak wzorca AA, jak i niejednorodnego opatrunku MA.

LITERATURA

- [1] PEREIRA L., SOUSA A., COELHO H., AMOLO A. M., RIBEIRO-CLARO P. J. A.: Use of FTIR, FT Raman and C – NMR spectroscopy for identification of some seaweed phycocolloids. *Biomolecular Engineering* (2003) 20, 223–228.
- [2] TONNESEN H. H., KARLSEN J.: Alginate in drug delivery system. *Drug Development and Industrial Pharmacy* (2002) 28 (6), 621 – 630.
- [3] HOLTE O., ONSOYEN E., MYRVOLD R., KARLSEN J.: Sustained release of water – soluble drug from directly compressed alginate tablets. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* (2003) 20, 403–407.
- [4] EMMERICH N., J., WINGENDER H. C., FLEMING C.: Interaction between alginates and manganese cations: identification of preferred cation binding sites. *International Journal of Biological Macromolecules* (2004) 34, 73–79.
- [5] NIVENS D. E., OHMAN D. E., WILLIAMS J., FRANKLIN M. J.: Role of Alginate and Its O Acetylation in Formation of *Pseudomonas aeruginosa* microcolonies and biofilms. *Journal of Bacteriology* (2001) (3), 183.
- [6] KHALIL SAIF EL DIN.: Deposition and Structural Formation of 3D Alginate Tissue Scaffolds. thesis 2005.
- [7] SARTORI C., DUDLEY S. F., RALPH B., GILDING K.: Determination of the cation content of alginate thin films by FTIR. *Spectroscopy. Polymer* (1997) 38, 1, 43–51.
- [8] TU J., BALLA S., BARR J., MIEDEMA J., LI X., JASTI B.: Alginate microparticles prepared by spray – coagulation method: Preparation, drug loading and release characterization. *International Journal of Pharmaceutics* (2005) 303.
- [9] LATTNER D., FLEMMING H.C., MAYERA CH.: ^{13}C -NMR study of the interaction of bacterial alginate with bivalent cations. *International Journal of Biological Macromolecules* (2003) 33, 81–88.
- [10] KIKUCHI A., KAWABUCHI M., SUGIHARA M., SAKURAI Y., OKANO T.: Pulsed dextran release from calcium – alginate gel beads. *Journal of Controlled Release* (1997) 47.
- [11] SZEWCZYK M. T., CWAJDA J.: Opatrunki nowej generacji. *Zakażenia* 5, 2005.
- [12] SALOMONSEN T., JENSEN H.M., STENBÆK D., ENGELSEN S.B.: Rapid determination of alginate monomer composition using raman spectroscopy and chemometrics., In: P. A. Williams &

- G. O. Phillips. Gums and Stabilisers for the Food Industry (2008) 14, 541–551.
- [13] CAMPA C., HOLTAN S., NILSEN N., BJERKAN T. M. et al.: Biochemical analysis of the processive mechanism for epimerization of alginate by mannuronan C-5 epimerase AlgE4. *Biochem. J.* (2004) 381, 155–164.
- [14] CAMPA C., OUST A., SKJÅK-BRAEK G., PAULSEN B. S.: Determination of average degree of polymerisation and distribution of oligosaccharides in a partially acid-hydrolysed homopolysaccharide: A comparison of four experimental methods applied to mannuronan. *J. Chromatogr. A* (2004) 1026, 271–281.
- [15] GRIMSHAW J.: Analysis of glycosaminoglycans and their oligosaccharide fragments by capillary electrophoresis. *Electrophoresis* (1997) 18, 2408–2414.
- [16] KOKETSU M., LINHARDT R. J.: Electrophoresis for the Analysis of Acidic Oligosaccharides. *Anal. Biochem.* (2000) 283, 136–145.
- [17] VYNIOS D. H., KARAMANOS N. K., TSIGANOS C. P.: Advances in analysis of glycosaminoglycans: its application for the assessment of physiological and pathological states of connective tissues. *J. Chromatogr. B* (2002) 781, 21–38.
- [18] VOLPI N., MACCARI F.: Electrophoretic approaches to the analysis of complex polysaccharides. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* (2006) 834, 1–13.
- [19] VOLPI N.: Micellar electrokinetic capillary chromatography determination of alginic acid in pharmaceutical formulations after treatment with alginate lyase and UV detection., *Electrophoresis* (2008), 29, 3504–3510.
- [20] NISHIDE E., TSUKAYAMA K., CHIDA N., NISIZAWA K.: Isolation of water-soluble alginate from brown algae. *Hydrobiologia* (1984) 116/117, 557–562.
- [21] DRAGET K.I., STRAND, B., HARTMANN M., VALLA S., SMIDSRØD O., SKJÅK-BRÆK G.: Ionic and acid gel formation of epimerised alginates; the effect of AlgE4. *International J. of Biolog. Macromolecules* (2000) 27, 117.
- [22] DRAGET K I., SMIDSRØD O., SKJÅK-BRAEK G.: Polysaccharides and Polyamides in the Food Industry, Properties, Production, and Patents. chapter1, vol 1, Alginates from Algae in 2005 Wiley-VCH.
- [23] QIN Y.: Ion-exchange properties of alginate fibers. *Text Res J* (2005) 75(2), 165.
- [24] MORRIS E.R., REES D.A., THOM D: Characterization of alginate composition and block-structure by circular dichroism. *Carbohydr. Res.* (1980) 81, 305.

Adres autorki

Akademia Techniczno–Humanistyczna
Wydział Nauk o Materiałach i Środowisku
Instytut Inżynierii Tekstyliów
i Materiałów Polimerowych
ul. Willowa 2, 43–309 Bielsko–Biała,
tel. *48 33 82–79–150
e-mail: apielesz@ath.bielsko.pl

