

VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ
ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE

FACULTY OF CHEMISTRY
INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

FLUORESCENCE VE VÝZKUMU HYDROFILNÍCH OBLASTÍ
ASOCIATIVNÍCH KOLOIDŮ
FLUORESCENCE STUDY OF HYDROPHILIC DOMAINS OF ASSOCIATING COLLOIDS

DIPLOMOVÁ PRÁCE
DIPLOMA THESIS

AUTOR PRÁCE
AUTHOR

MONIKA LONDINOVÁ

BRNO 2008



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ

ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE

FACULTY OF CHEMISTRY

INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

FLUORESCENCE VE VÝZKUMU HYDROFILNÍCH OBLASTÍ ASOCIATIVNÍCH KOLOIDŮ

FLUORESCENCE STUDY OF HYDROPHILIC DOMAINS OF ASSOCIATING COLLOIDS

DIPLOMOVÁ PRÁCE

DIPLOMA THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

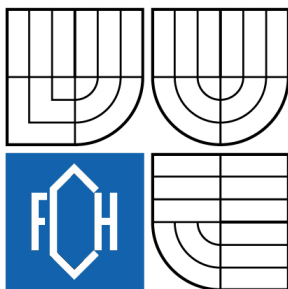
MONIKA LONDINOVÁ

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

doc. Ing. MILOSLAV PEKAŘ, CSc.

BRNO 2008



Zadání diplomové práce

Číslo diplomové práce	FCH-DIP0134/2007	Akademický rok: 2007/2008
Ústav	Ústav fyzikální a spotřební chemie	
Student(ka)	Londinová Monika	
Studijní program	Spotřební chemie (M2806)	
Studijní obor	Spotřební chemie (2806T002)	
Vedoucí diplomové práce	doc. Ing. Miloslav Pekař, CSc.	
Konzultanti diplomové práce	Ing. Filip Mravec	

Název diplomové práce:

Fluorescence ve výzkumu hydrofilních oblastí asociativních koloidů

Zadání diplomové práce:

1. Literární rešerše na téma využití fluorescenčních sond ve studiu hydrofilních oblastí zejména polyelektrolytů.
2. Návrh experimentů pro koloidy na bázi hyaluronanu, zejména alkylovaného, zahrnujících i studium vlivu způsobu substituce.
3. Provedení experimentů.
4. Vyhodnocení experimentů především z hlediska potenciální použití hyaluronanu jako nosiče aktivních substancí v medicíně či kosmetice.

Termín odevzdání diplomové práce: 16.5.2008

Diplomová práce se odevzdává ve třech exemplářích na sekretariát ústavu a v elektronické formě vedoucímu diplomové práce. Toto zadání je přílohou diplomové práce.

Monika Londinová
student(ka)

doc. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
Vedoucí práce

Ředitel ústavu

V Brně, dne 1.9.2007

doc. Ing. Jaromír Havlica, CSc.
Děkan fakulty

ABSTRAKT

Pomocí různých fluorescenčních sond byly zkoumány vlastnosti hyaluronanu, neboť je slibným nosičem aktivních substancí v medicíně a kosmetice. Zvolenými sondami byly: kationaktivní akridinová oranž, Nilská modř A, methylenová modř, amfifilní 4-Di-2-ASP a anionaktivní fluorescein. Kromě fluorescenčních a absorpčních spekter sond byly sledovány elektrostatické a hydrofobní interakce.

Sondy v různě polárních prostředích (MeOH, EtOH, DMSO) vykazovaly bathochromní posun emisního maxima a zhášení fluorescenčního záření s rostoucí polaritou roztoků.

Ve vodných roztocích chloridů byl zkoumán vliv iontové síly na fluorescenční vlastnosti sondy akridinová oranž a 4-Di-2-ASP. V případě AO se s rostoucí iontovou silou více bránilo tvorbě dimerů AO. CaCl_2 nejvíce zvýšil iontovou sílu, nejvíce bránil repulzi karboxylových skupin a tedy expanzi klubka hyaluronanu do roztoku. Naopak emise sondy 4-Di-2-ASP se nejvíce zhášela s přidavkem CaCl_2 .

Při sledování vlivu přidavku hyaluronanu na absorpční a emisní vlastnosti AO způsobily první přidavky (COO^- skupin) tvorbu dimerů AO, následovala depolymerizace dimerů a nárůst intenzity emise. Repolymerizace způsobila pokles a poté došlo k opětovnému nárůstu. V případě 4-Di-2-ASP se charakter fluorescence (intenzita emise, poloha maxima) zpočátku neměnil, ale od koncentrace $1 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$ došlo k nárůstu intenzity emise.

Sondy methylenová modř a fluorescein byly použity pro spektroskopické studium interakce mezi methylenová modř-fluoresceinovým komplexem a aniontovým a kationtovým tenzidem. Absorbance samotné methylenové modři a fluoresceinu se měnily jen s přidavkem tenzidů s opačným nábojem. Absorbance směsi MB-F se měnila s přidavkem tenzidu CTAC, přidavek SDS do směsi způsobil jen změnu absorpčního spektra MB.

KLÍČOVÁ SLOVA

hyaluronan sodný, fluorescenční sondy, asociativní vlastnosti, iontová síla, polarita

ABSTRACT

The properties of the hyaluronan were investigated by using different fluorescence probes, because hyaluronan is a hopeful carrier of an active matter in medicine and cosmetics. Selected fluorescence probes were cationic acridine orange, Nile Blue A, methylene blue, amphiphilic 4-Di-2-ASP and anionic fluorescein. Except from fluorescence and absorption spectra of the probes were observed electrostatic and hydrophobic interactions as well.

The probes in solvents with different polarity (MeOH, EtOH, DMSO) showed the bathochromic shift in the emission maximum and quenching of the fluorescence with the increasing polarity of the solvents.

The influence of the ionic strength on fluorescence properties of the probe acridine orange and 4-Di-2-ASP was investigated in aqueous solutions of chlorides. The formation of acridine orange dimer is inhibited with increasing ionic strength. CaCl_2 increased the ionic strength the most, then prevented repulsion of carboxylate groups, so it means the expansion of hyaluronan cluster into the solution. However, the emission of the probe 4-Di-2-ASP was quenched with the addition of CaCl_2 the most.

The first additions of COO^- groups cause the formation of dimers of AO shown as decreasing in extinction coefficient and fluorescence intensity. Next addition of the hyaluronan caused a depolymerization of formed dimers and the increase of the emission intensity. The repolymerization caused the decrease and then again the increase. In case of

4-Di-2-ASP was the pattern of the fluorescence (the intensity and the position of the emission) firstly the same, but at the concentration of $1 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$ the emission intensity increased.

The probes MB and F were used for spectroscopic studies of the interaction between methylene blue-fluorescein complex and anionic and cationic surfactants. The absorbance of separate MB and F changed only with the addition of surfactants with the opposite electric charge. Absorbance of the mixture MB-F changed with the addition of the CTAC surfactant, while the addition of SDS into the mixture caused only the change of MB absorption spectra.

KEYWORDS

sodium hyaluronate, fluorescence probes, associative properties, ionic strength, polarity

LONDINOVÁ, M. *Fluorescence ve výzkumu hydrofilních oblastí asociativních koloidů*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2008. 68s. Vedoucí diplomové práce doc. Ing. Miloslav Pekař, CSc.

PROHLÁŠENÍ

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

.....
podpis diplomanta

Poděkování

Chtěla bych poděkovat konzultantovi mé diplomové práce Ing. Filipu Mravci za ochotu, pomoc a cenné rady. Dále své rodině za podporu při studiu.

OBSAH

1 ÚVOD	8
2 TEORETICKÁ ČÁST	9
2.1 Hyaluronan	9
2.1.1 Struktura hyaluronanu.....	9
2.1.1.1 Chemická struktura.....	9
2.1.1.2 Polymerní struktura	10
2.1.1.3 Struktura v roztoku	10
2.1.1.4 Sekundární a terciární struktura.....	10
2.1.2 Výskyt a vlastnosti.....	11
2.1.3 Metabolismus.....	12
2.1.4 Syntéza	12
2.1.5 Aplikace.....	12
2.2 Asociační procesy	12
2.2.1 Roztoky polymerů.....	12
2.2.2 Roztoky polyelektrolytů	13
2.2.2.1 Interakce makroiontů s malými ionty	13
2.2.2.2 Iontová atmosféra	13
2.2.2.3 Konformace lineárních makroiontů.....	14
2.2.3 Asociativní (micelární) koloidy	14
2.2.3.1 Molekulární struktura vodorozpustných micelárních koloidů.....	14
2.2.3.2 Vznik micel.....	15
2.2.3.3 Reverzní micela	16
2.2.4 Solubilizace.....	16
2.2.4.1 Přímá solubilizace.....	17
2.2.4.2 Obrácená solubilizace.....	17
2.3 Nevlastní fluorescence	17
2.3.1 Fluorescenční značky.....	18
2.3.2 Fluorescenční sondy	18
2.3.2.1 Akridinová oranž (AO).....	18
2.3.2.2 4-Di-2-ASP	19
2.3.2.3 Nilská modř (NB)	20
2.3.2.4 Methylenová modř (MB).....	21
2.3.2.5 Fluorescein (F).....	22
2.4... Luminiscenční spektrometrie	23
2.4.1 Fotoluminiscence	23
2.4.1.1 Fluorescence	24
2.4.1.2 Fosforescence	24
2.4.2 Excitační a emisní spektra molekul	25
2.4.2.1 Excitační spektrum	25
2.4.2.2 Emisní spektrum.....	25
2.4.3 Zhášení fluorescence.....	26
2.4.4 Relaxace rozpouštědla	27

2.4.5	Vliv rozpouštědla na elektronová spektra a polarita.....	28
2.4.5.1	Účinky vodíkové vazby na absorpční a fluorescenční spektra.....	29
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	30
3.1	Použité chemikálie	30
3.2	Přístroje a zařízení	30
3.3	Příprava zásobních roztoků fluorescenčních sond.....	32
3.4	Rutinní vyhodnocení	32
3.4.1	Stanovení CMC.....	32
4	VÝSLEDKY A DISKUSE.....	34
4.1	Elektrostatická interakce kationtového barviva AO s negativně nabitým polyelektrolytem (HA) ve vodném roztoku	34
4.2	Elektrostatická interakce kationtového barviva AO s negativně nabitým polyelektrolytem (HA) o různé M_w ve vodném roztoku	36
4.3	Elektrostatická interakce kationtového barviva AO s negativně nabitým polyelektrolytem (HA) v $0,1 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ a $0,5 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ NaCl	37
4.4	Vliv iontové síly na intenzitu fluorescence AO ve vodném roztoku hyaluronanu	38
4.5	Studium asociace vodného roztoku SDS pomocí fluorescenční sondy AO ..	39
4.6	Vliv polarity prostředí na intenzitu fluorescence barviva 4-Di-2-ASP	42
4.7	Vliv iontové síly na intenzitu fluorescence 4-Di-2-ASP ve vodném roztoku hyaluronanu	45
4.8	Studium asociace vodného roztoku SDS pomocí fluorescenční sondy 4-Di-2-ASP	46
4.9	Vliv neutrálního tenzidu TX-100 na fluorescenční vlastnosti sondy 4-Di-2-ASP	48
4.10	Interakce amfifilní sondy 4-Di-2-ASP s polyelektrolytem hyaluronanu ve vodném roztoku.....	50
4.11	Vliv polarity prostředí na intenzitu fluorescence barviva NB	51
4.12	Studium asociace vodného roztoku SDS pomocí fluorescenční sondy NB...	54
4.13	Spektroskopické studium interakce mezi methylenová modř-fluoresceinovým komplexem a aniontovým a kationtovým tenzidem	56
4.13.1	Tvorba komplexu mezi MB a F ve vodném roztoku	56
4.13.2	Účinek tenzidů SDS a CTAC na absorpční spektra MB a F	57
4.13.3	Účinek tenzidů na absorpční spektra směsi sond MB-F.....	59
5	ZÁVĚR	62
6	LITERATURA.....	64
7	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ.....	66
8	PŘÍLOHY.....	67

1 ÚVOD

V čem je kyselina hyaluronová zajímavá? Je přirozenou součástí lidského těla. Zajišťuje dokonalou hydrataci lidské pokožky, je obsažena v našem oku, je součástí vaziva. Díky ní se naše klouby mohou hladce pohybovat. Právě proto, že se tato látka v našem těle přirozeně vyskytuje a je pro spoustu jeho funkcí nezbytná, nachází kyselina hyaluronová mnohostranné uplatnění ve farmaceutickém průmyslu.

Zvýšené množství kyseliny hyaluronové obsahuje lidské embryo. V embryonální vývojové fázi narůstá plodu jakýsi ocásek, který pozdějším vývojem zase mizí. Nikdy však za sebou nezanechá jizvy nebo jiné defekty. Na základě tohoto poznatku se předpokládá, že právě kyselina hyaluronová zajišťuje optimální organizaci pojivové tkáně v místě srůstu, jednoduše řečeno hojení.

Důležitou vlastností kyseliny je její vysoká afinita k vodě, proto má dokonalé hydratační účinky. Díky jedinečným hydratačním a elastickým vlastnostem nachází řadu uplatnění v oční chirurgii, při léčbě kloubů a některých druhů rakoviny i v kosmetice.

Hledá se možnost uplatnění v oblastech tkáňového inženýrství, hojení ran, genové terapie a cílené distribuci léků, díky níž je možné dávat pacientům nižší dávky léčiv, které tak mají stejný či vyšší účinek, než při systémovém podávání. Ideálním nosičem léků se v mnoha ohledech jeví právě kyselina hyaluronová.

Nosiče léčiv jsou v současnosti stále více studovány v kontextu vývoje nových terapeutických systémů pro léčbu mnoha typů onemocnění. Tyto nosiče by měly především umožnit prodlouženou cirkulaci účinných látek v krevním řečišti, řízenou aktivaci a účinek selektivně zaměřený na cílovou tkáň, soubor buněk (např. nádor), jednotlivou buňku nebo dokonce i jen buněčné kompartmenty. Tím lze omezit nežádoucí účinky terapie, zajistit rozpustnost ve vodě nerozpustných aktivních sloučenin, potlačit rezistenci cílové tkáně k léčivu aj.

Nejjednodušší způsob cílení účinku léčiva je lokální aplikací, kdy je účinná látka navázaná na polymerní nosič aplikována přímo na místo určení. Polymerní nosič zajistí setrvání léčiva na místě aplikace a jeho řízené uvolňování. Tento postup lze však použít jen u lokalizovaných nádorů, kde má jisté výhody, zejména určitou spolehlivost. Naopak nevýhodou je, že nelze zabránit úniku cytotoxického léčiva z nádoru do zdravé tkáně a že tento způsob mnohdy nelze užít z důvodů anatomického umístění nádoru a obecně u metastáz, kterých může být po těle mnoho.

Diplomová práce měla být zaměřená na experimenty s koloidy na bázi hyaluronanu, zejména alkylovaného, zahrnujících i studium vlivu způsobu substituce. Měření bylo prováděno jen s nativním hyaluronanem, neboť modifikovaný nebyl v dostatečném množství k dispozici.

2 TEORETICKÁ ČÁST

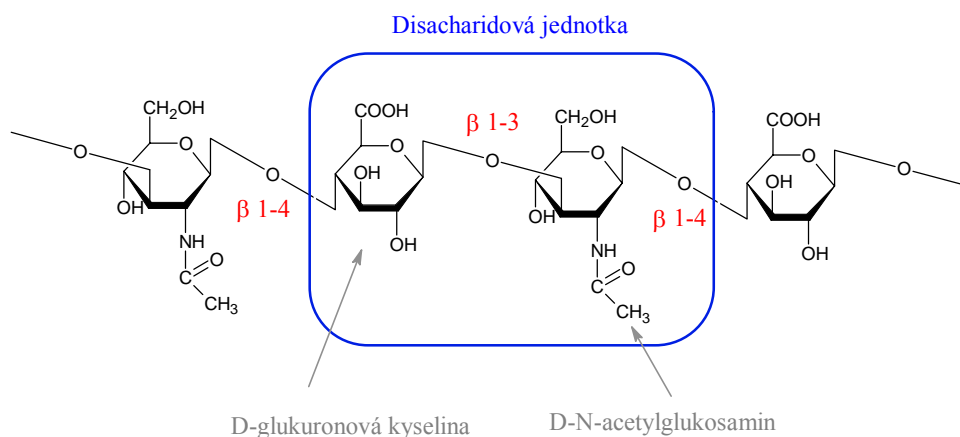
2.1 Hyaluronan

2.1.1 Struktura hyaluronanu

V roce 1934 Karl Meyer a jeho asistent John Palmer popsali postup izolování nového glykosaminoglykanu ze sklivce hovězích očí. Tato substance obsahovala uronovou kyselinu a aminosacharid, ale neobsahovala sulfoestery. Název „kyselina hyaluronová“ pochází z hyaloid (sklivce) a uronic acid (kyselina uronová). Dnes je tato makromolekula nejčastěji označována jako „hyaluronan“, neboť v živém organismu existuje jako polyanion a ne jako protonovaná kyselá forma. Další používané názvy jsou sodná sůl kyseliny hyaluronové nebo hyaluronát sodný [1].

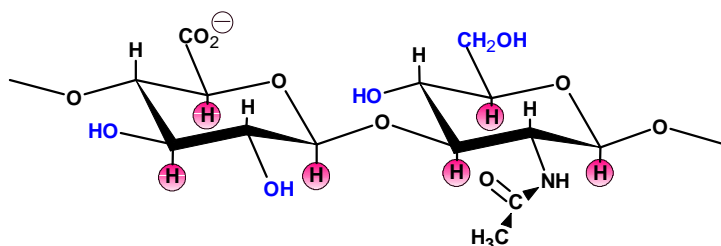
2.1.1.1 Chemická struktura

Hyaluronan (Obr. 1), poly(β -D-glukuronat-[1,3]- β -N-acetyl-D-glukosamin-[1,4]), je polymer složený ze dvou stále se opakujících sacharidových jednotek D-glukuronové kyseliny a D-N-acetylglukosaminu, které jsou spojovány přes opakující se β -1,4 a β -1,3 glykosidickou vazbu.



Obr. 1 Chemická struktura hyaluronanu, který je tvořen opakující se disacharidovou jednotkou

Energeticky je hyaluronan částečně stabilní kvůli stereochemii jeho disacharidových komponent. Objemné skupiny (karboxyly, hydroxyly) na každé molekule sacharidu jsou ve stericky výhodných ekvatoriálních pozicích, zatímco všechny malé vodíkové atomy zaujímají méně příznivé axiální pozice (Obr. 2) [2].



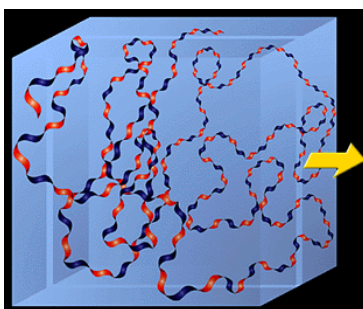
Obr. 2 H - axiální vodíkové atomy, které přispívají hydrofobnímu povrchu

2.1.1.2 Polymerní struktura

Enzymy hyaluronan syntázy produkují velké lineární polymery hyaluronanu střídavým přidavkem glukuronové kyseliny a N-acetylglukosaminu do rostoucího řetězce použitím jejich aktivovaných nukleotidových sacharidů (UDP-kyselina glukuronová a UDP-N-acetylglukosamin) jako substrátů. V dokončené molekule hyaluronanu může počet opakovaných disacharidů n (10 000 nebo více) dosáhnout molekulové hmotnosti 4 milionů daltonů (každý disacharid má 400 daltonů). Průměrná délka disacharidu je ~ 1 nm.

2.1.1.3 Struktura v roztoku

Ve fyziologickém roztoku je molekula hyaluronanu vyztužena vnitřními vodíkovými vazbami a interakcemi s rozpouštědlem. Axiální vodíkové atomy tvoří nepolární, relativně hydrofobní povrch, zatímco ekvatoriální postranní řetězce tvoří více polární, hydrofilní povrch, tím se vytváří klikatá „stužkovitá“ struktura (Obr. 3). Proto molekula hyaluronanu zaujímá ve fyziologických roztocích roztaženou, nepravidelně stočenou strukturu, která zabírá velmi velkou doménu. To znamená, že domény jednotlivých molekul by se navzájem překrývaly v koncentracích hyaluronanu $1 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ nebo vyšších [1].



Obr. 3 Model stužky hyaluronanu v 3-dimenzionální doméně. Světle modrá krychle představuje doménu molekuly v roztoku. Střídající se modré a červené oblasti znázorňují stužkovou strukturu s modrými (hydrofilními) a červenými (hydrofobními) částmi [1]

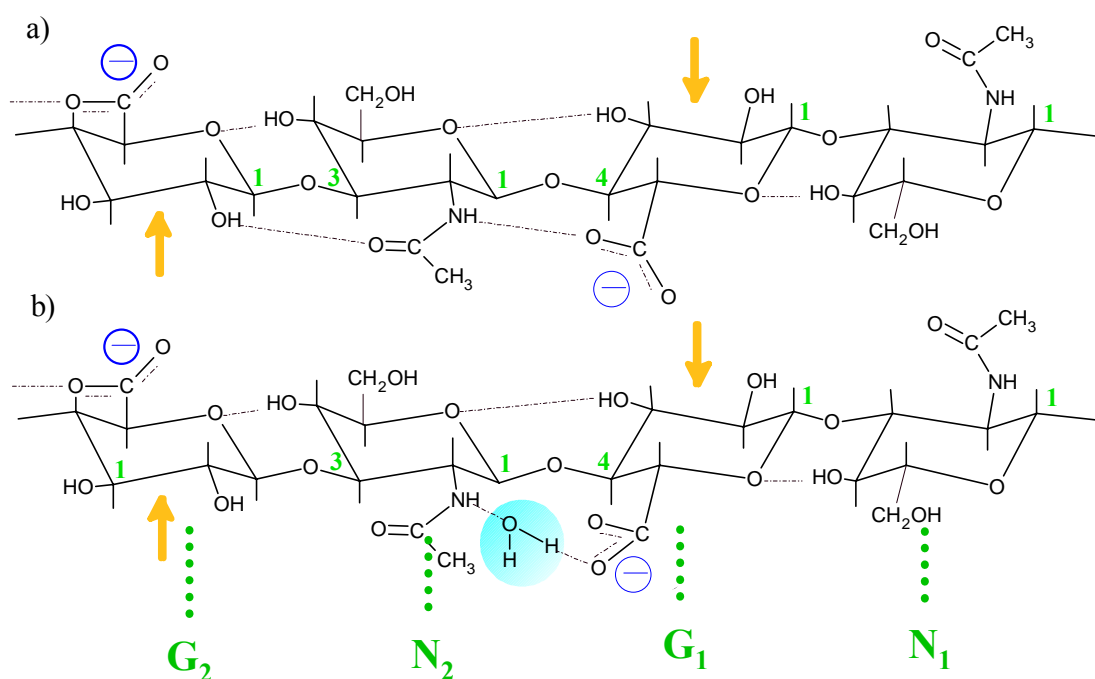
Doménová struktura hyaluronanu má zajímavé a důležité důsledky. Malé molekuly, jako je voda, elektrolyty a živiny, mohou volně pronikat přes rozpouštědlo uvnitř domény. Ale velké molekuly, jako proteiny, budou částečně vyloučeny z domény kvůli jejich hydrodynamickým velikostem v roztoku. Síť hyaluronanu v doméně poskytuje čím dál tím méně prostoru pro další molekuly, které jsou větší. To vede k pomalejšímu pronikání makromolekul přes síť a k jejich nižší koncentraci v síti ve srovnání s okolními volnými částmi hyaluronanu. Zajímavé je, že řetězce hyaluronanu se v roztoku stále pohybují a efektivní díry (průduchy) v síti spojitě mění velikost. Statisticky mohou existovat všechny velikosti průduchů, ale s různými pravděpodobnostmi. To znamená, že všechny molekuly mohou projít přes síť hyaluronanu, ale s různými stupni zpoždění v závislosti na jejich hydrodynamických objemech [1].

2.1.1.4 Sekundární a terciární struktura

Po desetiletí podporovaly klasické metody chemie polymerů ideu, že řetězce hyaluronanu byly v roztoku náhodně stočené. Avšak molekula hyaluronanu může zaujmout určité tvary. Obsahuje dva druhy spojení. První typ – sacharidové kruhy jsou relativně neměnné ve svých

tvarech. Mezi těmito neohebnými jednotkami jsou glykosidová spojení, které tvoří jednotlivé kyslíkové atomy spojující jeden sacharid k dalšímu. Tyto kyslíkové atomy přispívají dvěma vazbám, které jsou nasměrovány jako ramena písmene V. Substituenty připojené na koncích těchto ramen mohou rotovat až o 360° .

Chemické experimenty ukázaly, že části hyaluronanové struktury (glykol skupina v glukuronátovém zbytku) byly odolné proti oxidaci jodistanem, ačkoli identické struktury v podobných polymerech a prostředích byly snadno napadené. Výsledky naznačily, že v hyaluronanu byla přítomna rozsáhlá vodíková vazba (Obr. 4). Byla potvrzena přítomnost této struktury v roztoku, ve které je každá disacharidová jednotka stočena o 180° ve srovnání s předcházející a následující jednotkou v řetězci (sekundární struktura). V terciální struktuře má hyaluronan antiparalelní uspořádání řetězců (tvar dvojité spirály, ne dvojšroubovice), došlo k otočení jednotek o 360° . Stabilizaci opět zajišťují vodíkové vazby [3].



Obr. 4 Tetrasacharid z řetězce hyaluronanu, skládá se ze dvou opakujících se jednotek disacharidu. Obrázek ukazuje upřednostňované uspořádání ve vodě. G = glukuronát, N = N-acetylglukosamin. Tečkované čáry ukazují vodíkové vazby, které jsou potenciálně přítomné v každém tetrasacharidu hyaluronanu. V bezvodém rozpouštědle dimethyl sulfoxidu je vodný můstek mezi N₂ acetamidem a G₁ karboxylátem (b) nahrazen přímou vodíkovou vazbou (a). G₁, N₁ disacharid je otočen o 180° okolo osy řetězce ve srovnání s disacharidem G₂, N₂. Řetězec tvoří dvojité spirála. Šipky ukazují glykol skupiny, které jsou odolné proti oxidaci jodistanem [3]

2.1.2 Výskyt a vlastnosti

Hyaluronan je přítomen ve všech obratlovcích, v některých druzích Streptokoků, je základní složkou extracelulární matrix. Nachází se ve sklivci lidského oka, v synoviální kloubní kapalině nebo v matrix produkované nahromaděnými buňkami kolem oocyty před ovulací. Tvoří podstatnou složku pojivové tkáně a stěn kapilár, zpevňuje buněčné struktury a udržuje je v rosolovitém stavu, čímž brání pronikání cizorodých a patogenních látek

do organismu. Má unikátní hygroskopické, reologické a viskoelastické vlastnosti. Vytváří velmi viskózní gely, dokáže pohltnout až stonásobné množství kapaliny.

Největší množství hyaluronanu (asi 50 % celkového množství v těle) se nachází v kožní tkáni. Důležitou vlastností kyseliny je její vysoká afinita k vodě, proto má dokonalé hydratační účinky.

Hyaluronan interaguje s receptory na buňkách. Mezi nejznámější patří CD44 a RHAMM.

2.1.3 Metabolismus

Metabolismus hyaluronanu je velmi dynamický. Některé buňky, jako jsou chondrocyty v chrupavkách, aktivně syntetizují a katabolizují hyaluronan během života tkáně. Syntéza je obvykle vyvážena katabolismem, tím je udržena konstantní koncentrace v tkáni. Studia ukázala, že poločas rozpadu molekuly hyaluronanu v chrupavce je 2-3 týdny. Keratinocyty v pokožce jsou dalším příkladem buněk, které aktivně syntetizují a katabolizují hyaluronan. V tomto případě je poločas rozpadu molekuly překvapivě krátký, méně než den.

Bylo odhadnuto, že téměř 1/3 celkového množství hyaluronanu je v lidském těle metabolicky odbourána a nahrazena během dne [1].

2.1.4 Syntéza

Příkladem tvorby hyaluronanu může být bakteriální hyaluronanová syntéza. Během pár let došlo k značnému pokroku v porozumění struktury a funkce bakteriálních hyaluronanových syntáz a produkce hyaluronanu. Hyaluronan syntázy jsou membránově vázané enzymy v bakteriích a eukaryotických buňkách. Aktivní hyaluronan syntázy se vyskytují v buňce nebo plazmatické membráně. Jsou neobvyklé v tom, že tyto proteiny mají dvě různé glykosyltransferázové aktivity uvnitř stejného proteinu. Po každém přidavku sacharidu se stává nový produkt hyaluronanového řetězce substrátem pro další sacharidový přírůstek. Síťová reakce popisující skládání jedné disacharidové jednotky na řetězec hyaluronanu byla představena jako přírůstek nových sacharidů na neredukující konec. Vznikající polysacharid je vytlačován přes buněčnou membránu do extracelulárního prostoru [4].

2.1.5 Aplikace

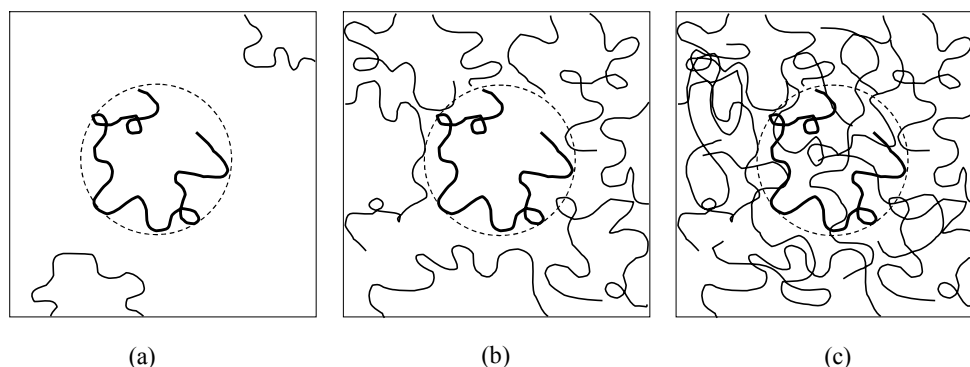
Hyaluronan našel mnoho uplatnění v medicíně. Aplikace exogenního hyaluronanu a biomateriálů vycházejících z hyaluronanu se úspěšně uplatňuje při řízení a akceleraci procesu hojení ran v celé řadě medicínských disciplín (oftalmologie, dermatologie a revmatologie). V kosmetice se zaváděním modifikovaného hyaluronanu do kůže a podkoží dosahuje vyhlazování vrásek.

2.2 Asociační procesy

2.2.1 Roztoky polymerů

Jako zředěný definujeme takový roztok polymeru, v němž jsou jednotlivá makromolekulární klubka od sebe oddělena spojitou fází rozpouštědla. Domény klubek se střídají s oblastmi nulové koncentrace polymeru (Obr. 5), takže zředěný roztok je koncentračně nestejnorodý (nehomogenní). Koncentrace polymeru v doméně klubka je větší než průměrná koncentrace roztoku.

Naopak koncentrovaný roztok polymeru je koncentračně homogenní. Doména klubka je prostoupena úseky jiných řetězců, a proto je koncentrace řetězce v jeho doméně převýšena celkovou koncentrací polymeru [5].



Obr. 5 *Struktura roztoku polymeru: (a) zředěný roztok, (b) koncentrace počínajícího překryvu, (c) koncentrovaný roztok*

2.2.2 Roztoky polyelektrolytů

Některé polymery obsahují v molekule postranní skupiny schopné elektrolytické disociace. V případě hyaluronanu to jsou karboxylové skupiny, které jsou nositelem elektronového náboje. Hyaluronan je tedy *polyelektrolytem*.

Disociací vzniká *makroion* o velkém počtu elementárních nábojů a ekvivalentní počet malých iontů opačného náboje, zvaných *protiionty*. Polymerní ion vzniklý disociací hyaluronanu je makroanion. Karboxylové skupiny hyaluronanu jsou slabě kyselé, proto jsou málo disociovány. Částečnou nebo úplnou neutralizací hydroxidem se ovšem převede do formy ionizovaného polyelektrolytu [5].

2.2.2.1 Interakce makroiontů s malými ionty

Při interakci malých iontů s disociovanými skupinami makroiontů vzniká iontová vazba, protiionty mohou vytvářet s nabitými skupinami makroiontů iontové páry. Tyto vazby vznikají v koncentrovanějších roztocích působením elektrostatických přitažlivých sil. Sklon k vytváření takových párů je tím větší, čím nižší je permitivita rozpouštědla, čím vyšší jsou valence a čím menší poloměry iontů. Všechny tyto faktory příznivě ovlivňují účinek elektrostatických přitažlivých sil [5].

2.2.2.2 Iontová atmosféra

Protiionty vzniklé disociací a ionty přidaných solí vytvářejí v elektrickém poli nabitého řetězce hyaluronanu iontovou atmosféru. Ta obsahuje centrální iont obklopený jinými ionty, jejich prostorové rozložení je dáno rovnováhou mezi elektrostatickými silami a účinkem tepelného pohybu iontů.

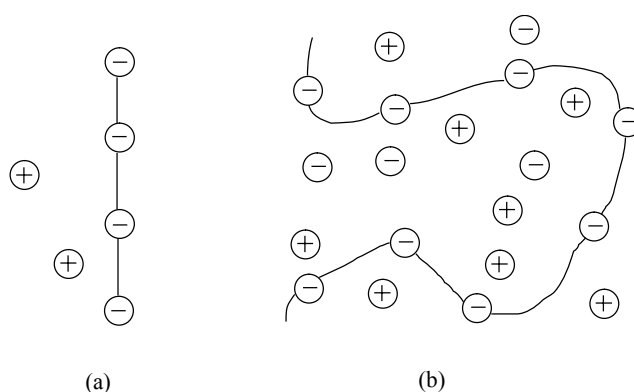
Vlivem opačně nabitě iontové atmosféry je elektrostatický potenciál v okolí centrálního iontu nižší, iontová atmosféra odstiňuje náboj centrálního iontu [5].

2.2.2.3 Konformace lineárních makroiontů

U lineárních polyelektrolytů existují elektrostatické interakce, jichž se zúčastňují náboje ionizovaných skupin řetězce a náboje malých iontů přítomných v doméně a v okolí makroiontu. Ve vodě disociuje určitý podíl ionizovatelných skupin, které se stanou nositeli elektrického náboje. Není-li elektrolyt amfoterní, mají všechny náboje stejné znaménko a navzájem se odpuzují.

Malé ionty (tj. protiionty vzniklé disociací a ionty přidaných solí) vytvářejí v elektrickém poli nabitého řetězce iontovou atmosféru, která zeslabuje odpudivý účinek nábojů řetězce a zkracuje jeho dosah tím více, čím je koncentrace malých iontů vyšší. Změna iontové síly tedy vyvolává výrazné změny konformací makroiontu.

Je-li používán velmi zředěný roztok polyelektrolytu v nepřítomnosti soli, oddisociované protiionty mají tendenci expandovat do disperzního prostředí. Koncentrace protiiontů se sníží. Nastává velmi silný odpudivý efekt záporných nábojů polyiontů. Polymerní řetězec ztrácí charakter klubka a existuje v plně natažené formě (Obr. 6). Pokud se do takového roztoku polyelektrolytu přidá sůl, dojde ke zvýšení iontové síly. Čím je větší koncentrace polymeru, tím je větší počet disociovaných skupin a tím více se klubko natahuje do tyčinkovité formy. Tento efekt je ale tlumen rostoucí koncentrací nízkomolekulární soli (např. NaCl) [5].



Obr. 6 Konformace makroiontu: (a) v krajně zředěném roztoku v nepřítomnosti soli, (b) v přítomnosti soli

2.2.3 Asociativní (micelární) koloidy

Použije-li se vhodné rozpouštědlo, některé nízkomolekulární látky poskytují ve velkých zředěních pravé roztoky, ale počínaje určitou koncentrací asociují jejich molekuly do té míry, že vytvářejí částice koloidních rozměrů. Tyto polymerní útvary se nazývají *micely* a látky, které se chovají tímto způsobem, se označují jako *micelární* nebo *asociativní koloidy*.

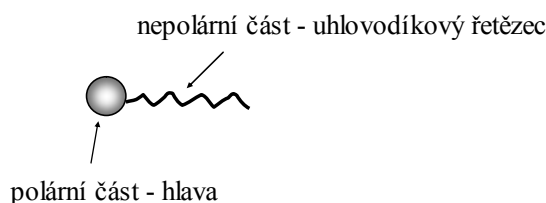
Asociativní koloidy se od lyofobních liší tím, že nepotřebují umělou stabilizaci, jejich velikost a koncentrace je určena okamžitými stavovými veličinami (teplota, tlak, koncentrace), nikoliv minulostí systému. Tyto systémy jsou termodynamicky stabilní a jsou reverzibilní [5].

2.2.3.1 Molekulární struktura vodorozpustných micelárních koloidů

Schopnost vytvářet micely je podmíněna zvláštní strukturou molekul. Molekula musí být *amfipatická* neboli *amfifilní*, tj. musí se skládat z části lyofilní, která je nositelem tendence rozpouštět se v daném prostředí, a z lyofobní části, která je sama o sobě v témže prostředí

nerozpustná (Obr. 7); její neochota ke kontaktům s molekulami rozpouštědla je pak příčinou asociace za vzniku koloidní disperze. Ve většině případů se jedná o *povrchově aktivní látky* (PAL) rozpustné ve vodě, jejichž molekuly obsahují silně hydrofilní polární skupinu. Rozpustnost PAL ve vodě klesá s délkou uhlovodíkového řetězce.

Podle toho, zda a jak hydrofilní skupina podléhá elektrolytické disociaci, dělíme micelární koloidy na *ionogenní* (kationaktivní, anionaktivní nebo amfoterní) a na *neionogenní* neboli neutrální [6].



Obr. 7 *Amfifilní molekula – lyofilní a lyofobní část*

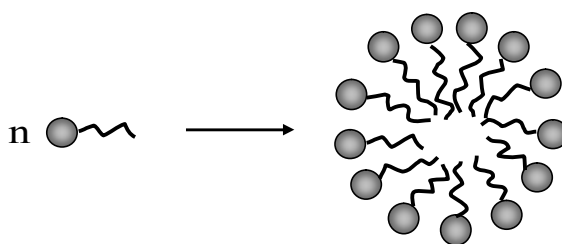
2.2.3.2 *Vznik micel*

Koloidně disperzní částice – *micely* – vznikají agregací amfipatických molekul některých nízkomolekulárních látek z jejich pravých roztoků po dosažení určité koncentrace roztoku (Obr. 8), označované jako *kritická micelární koncentrace* (CMC).

V nejjednodušším případě může být asociace popsána rovnicí:



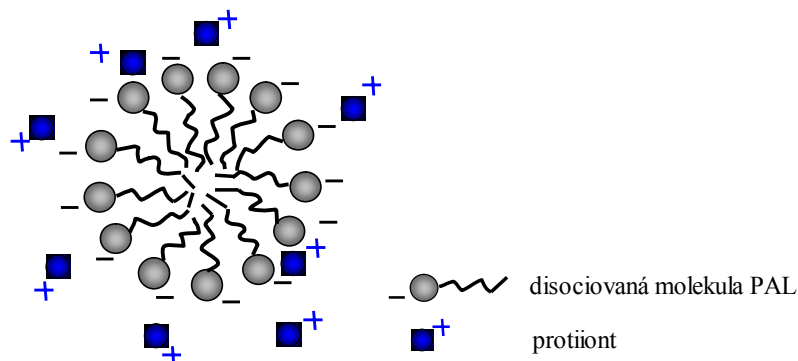
kde S_n je micela – agregát n monomerních jednotek S a n je asociační nebo agregační číslo. Asociace je vratná – zředěním se rovnováha posouvá k monomerní PAL [6].



Obr. 8 *Vznik micely asociací amfifilních molekul*

Ve vodném prostředí tvoří jádro micely navzájem propletené nepolární uhlovodíkové řetězce molekul *povrchově aktivních látek* (PAL); jejich polární skupiny jsou rozmístěny na vnějším povrchu micely. Tím je dosaženo minimálního styku mezi molekulami vody a hydrofobními částmi molekul PAL. Za základní příčinu vzniku agregátů z uhlovodíkových řetězců ve vodných roztocích jsou považovány velké kohezní síly mezi molekulami vody, které jsou daleko vyšší než vzájemná afinita uhlovodíkových řetězců i přitažlivost mezi molekulami vody a uhlovodíkovými řetězci. Molekuly vody jako by „vytěsňovaly“ uhlovodíkové řetězce z roztoku, což je spojeno s poklesem Gibbsovy energie soustavy. Jde-li o *ionogenní* PAL, polární skupiny disociují. Vznikají nabitě micely obklopené elektrickou dvojrivrstvou tvořenou disociací vzniklými protiionty. Jsou to tzv. *Hartleyovy micely* (Obr. 9),

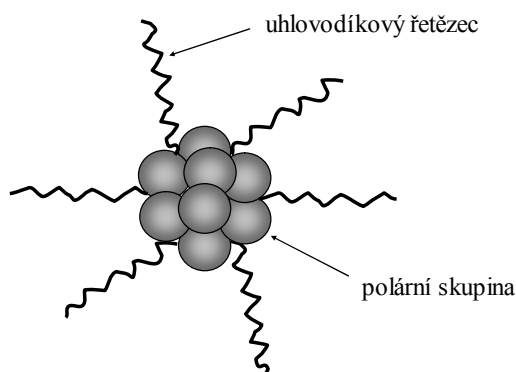
jejichž poloměr je přibližně roven délce molekuly PAL. *Asociační číslo* (počet molekul povrchově aktivní látky, které tvoří asociativní micelu) roste s délkou uhlovodíkového řetězce a klesá s velikostí plochy, kterou na povrchu micely zaujímá jedna polární skupina; pohybuje se nejčastěji mezi 50 a 150 a závisí i na fyzikálních podmínkách [7].



Obr. 9 Malá (Hartleyova) micela

2.2.3.3 Reverzní micela

Je asociativní micela vznikající v nevodném prostředí; její jádro tvoří polární skupiny, zatímco uhlovodíkové řetězce směřují ven do nepolárního prostředí (Obr. 10). Asociační číslo obrácených micel nebývá větší než 10; kritická micelární koncentrace bývá obtížně definovatelná, neboť přechod z pravého roztoku na koloidní nastává v poměrně širokém intervalu koncentrací. Silně polární jádro snadno solubilizuje vodu a umožňuje tak koloidní rozpouštění vody v oleji v přítomnosti PAL, což má významné uplatnění zvláště v potravinářském průmyslu [5].



Obr. 10 Obrácená micela

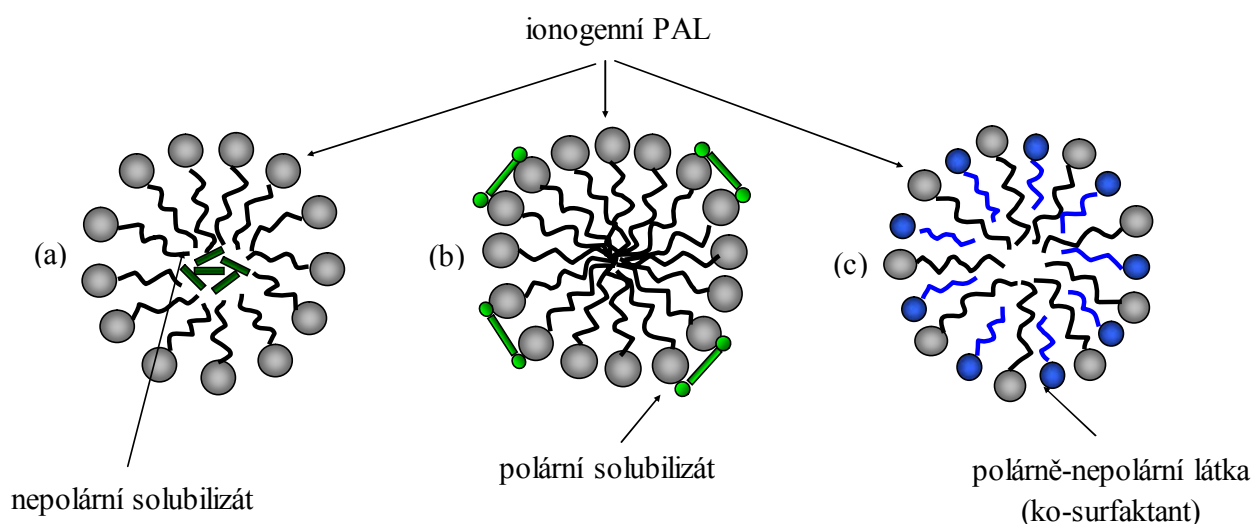
2.2.4 Solubilizace

Významnou vlastností micelárních koloidů, která souvisí se stavbou jejich micel, je *solubilizace* – schopnost rozpouštět látky v čistém disperzním prostředí nerozpustné. Je to tedy pochod, při němž jsou do micel surfaktantu (PAL) včleňovány molekuly další látky (solubilizátu). Mechanismus solubilizace může být různý. Umístění molekuly solubilizátu v micelle závisí na jeho molekulární struktuře [5].

2.2.4.1 Přímá solubilizace

Nepolární látky, které jsou v čistém vodném disperzním prostředí nerozpustné nebo slabě rozpustné, jsou zcela pohlceny hydrofobním jádrem micely.

Polární látky jsou solubilizovány na povrchu micely nebo v těsné blízkosti jejího povrchu. Polárně-nepolární organické látky (alkoholy, aminy, tzv. *ko-surfaktanty*) se rozmísťují v micelách tak, že jejich uhlovodíkové řetězce směřují dovnitř micel a polární skupiny do vodné fáze (Obr. 11).



Obr. 11 Přímá solubilizace (a) nepolárních látek, (b) polárních látek v malých ionogenních micelách, (c) polárně-nepolárních látek

2.2.4.2 Obrácená solubilizace

Obrácená solubilizace nastává v systémech s nepolárním prostředím, kde vznikají obrácené micely s hydrofilním jádrem a hydrofobním povrchem (tzv. koloidní rozpouštění vody v olejové fázi) [8].

2.3 Nevlastní fluorescence

Nevlastní fluorescence vzniká díky nevlastním fluoroforům, které se přidávají ke studovanému vzorku. Příkladem nevlastních fluoroforů jsou látky známé jako *fluorescenční sondy*, fluorochromy, nebo jednoduše barviva.

Fluorochromy, které jsou konjugovány k větší makromolekule (jako nukleová kyselina, lipid, enzym nebo protein) díky adsorpci nebo kovalentními vazbami, se nazývají *fluorofory*. Fluorofory jsou rozděleny na dvě třídy, *vlastní* (vnitřní) a *nevlastní* (vnější). Vlastní fluorofory, jako aromatické aminokyseliny, neurotransmitery, porfyriny a zelený fluorescenční protein, jsou ty, které se vyskytují přirozeně. Nevlastní fluorofory jsou umělá barviva nebo modifikované látky, které jsou přidány ke vzorku pro tvorbu fluorescence se specifickými spektrálními vlastnostmi. Pokud se na něj váží kovalentně, nazývají se fluorescenční značky, pokud se váží nekovalentně, jedná se o fluorescenční sondy [9].

2.3.1 Fluorescenční značky

Nejčastěji se používají k fluorescenčnímu značení proteinů, kdy se kovalentně vážou na jejich aminové, sulfhydrylové nebo histidinové boční řetězce, thiolové skupiny atd. Mají různé aplikace v imunologii, histochemii, afinitní chromatografii apod [10].

2.3.2 Fluorescenční sondy

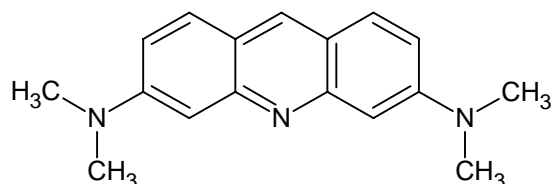
Jsou to organické molekuly, nejčastěji mají polyaromatickou strukturu. Přidávají se ke vzorkům, které nemají vhodné fluorescenční vlastnosti. Po navázání na sledovanou strukturu často mění své fluorescenční vlastnosti. Volba fluorescenční sondy je klíčovou součástí experimentu ve fluorescenční spektroskopii, neboť právě její vlastnosti umožňují získat potřebné informace [10].

2.3.2.1 Akridinová oranž (AO)

Akridinová oranž (Obr. 12) neboli 3,6-bis(dimethylamino)akridin je látka, která se používá jako fluorescenční sonda pro stanovení nukleových kyselin. Nukleotidy a nukleové kyseliny obecně nefluoreskují. Pro vizualizaci a identifikaci chromozomů se proto používá řada fluorescenčních sond, jednou z nich je akridinová oranž.

Zelená monomerová fluorescence pochází z komplexů monomerů s dvouřetězcovými DNA nebo RNA, zatímco oranžová fluorescence pochází z komplexů dimerů sondy s jednořetězcovými nukleovými kyselinami. Spektrální parametr daný poměrem intenzit oranžové a zelené fluorescence (I_{640}/I_{540}) akridinové oranže charakterizuje stupeň spirálnosti nukleových kyselin.

Toto kationtové barvivo je chemikálie, která vyvolává mutace, je citlivé na světlo, uchovává se v chladu [11].



Obr. 12 Fluorescenční sonda akridinová oranž

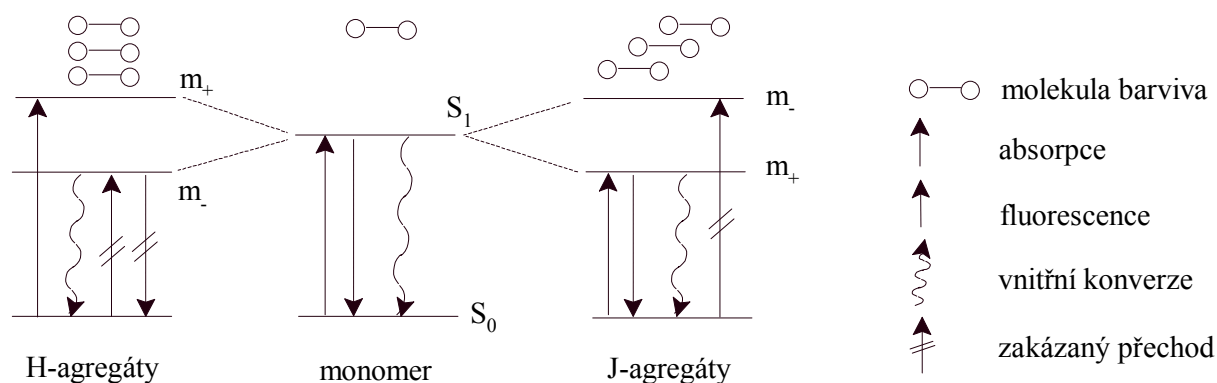
V závislosti na koncentraci barviva se akridinová oranž nachází v různých formách. Pokud koncentrace barviva vzroste, kation monomeru barviva HR^+ agreguje a stává se dimerem $(HR)_2^{2+}$. Dimer je tvořen dvěma monomery barviva, je pootočen vůči monomeru o 48° . Planární vlastnost molekuly je zničena, dochází k samozhášení [12].

Monomer akridinové oranže ve vodném roztoku excituje při vlnové délce 492 nm, tento pík odpovídá absorpci tří druhů – volný monomer, volný dimer a vázané barvivo. Dimer excituje při vlnové délce 465 nm. K emisi monomeru dochází při vlnové délce 528 nm, dimer akridinové oranže emituje při vlnové délce 650 nm [13].

Absorpční spektrum zředěné akridinové oranže má maximum v 492 nm (α pás), postupně je nahrazeno novým spektrem s maximem v 465 nm (β pás). Při vyšších koncentracích AO je pás v 465 nm nahrazen třetím pásem (γ pás) s maximem v 450 nm. α pás odpovídá barvivu

v monometní formě, β pás dimeru akridinové oranži a γ pás oligomerům barviva (vyšší asociovaná forma) [14].

Tvorba dimeru akridinové oranži je připisována *agregaci typu H*. H-agregace je způsobena přechodovými dipólovými interakcemi mezi dvěma nebo více chromofory s malým rozmístěním [15]. Interakce dvou přechodových dipólů M_1 a M_2 poskytuje energetické rozštěpení excitovaného stavu na dvě složky m_+ a m_- . Fluorescence z nižšího energetického stavu m_- je zakázána, je pouze povolena absorpce k vyššímu energetickému stavu m_+ a vnitřní konverze. Nejvýše položená energetická hladina se nachází nad energetickou hladinou monomeru. Proto u typu H-agregace dochází k *hypsochromnímu posunu* v absorpčním spektru vůči monomeru a dochází k účinnému zhášení fluorescence. *Agregace typu J* se projevuje bathochromním posunem v absorpčním spektru vůči monomeru [16]. Zde je povolena absorpce k nižšímu energetickému stavu, z něhož následně probíhá vnitřní konverze s emisí záření (Obr. 13).



Obr. 13 Model molekulové orientace a přechodových dipólových interakcí v barvivu

Protože se jedná o kationtové barvivo, na polymerech interaguje s negativně nabitými skupinami (vazebnými místy), interakce je elektrostatická.

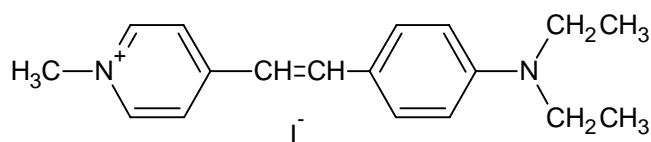
Fluorescenční sonda akridinová oranž se používá pro studium interakcí polymer-barvivo a barvivo-barvivo v biopolymerech a syntetických polyelektrolytech. Rozsah vázání tohoto barviva k polymerům a jeho hromadění v přítomnosti polyelektrolytů poskytuje informaci o chemické a fyzikální povaze vazebných míst a struktuře řetězce polymerů [13].

2.3.2.2 4-Di-2-ASP

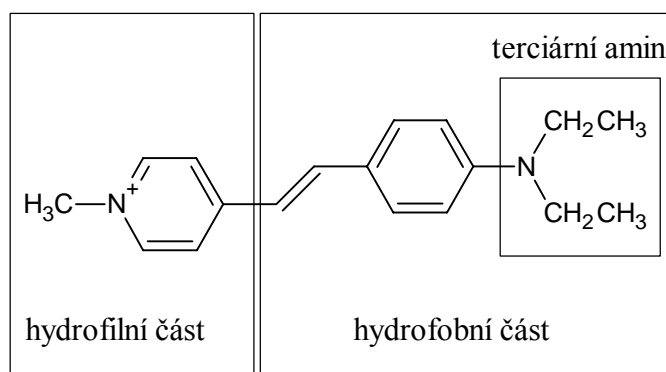
[4-(4-(diethylamino)styryl)-N-methylpyridinium jodid nebo-li 4-Di-2-ASP (Obr. 14) je hemicyaninové barvivo, které patří do skupiny styryl pyridiniových barviv.

Některá kationtová barviva, jako 4-Di-2-ASP, zbarvují presynaptická nervová zakončení nezávisle na aktivitě neuronů. 4-Di-2-ASP je světlostálé barvivo, které je netoxické k buňkám, je využíváno ke zbarvování živých nervových zakončení ve výstelkách králičích rohovek, v krysí pokožce a myších ocáscích, stejně tak je využíváno k představení si inervace lidských cévek a celého trávicího traktu. Bylo zjištěno, že toto barvivo přetrvává v živých myších celé měsíce [11].

Excitace nastává při 468 nm a emituje při 608 nm. Toto barvivo je rozpustné ve vodě a DMSO.



Obr. 14 Fluorescenční sonda 4-Di-2-ASP



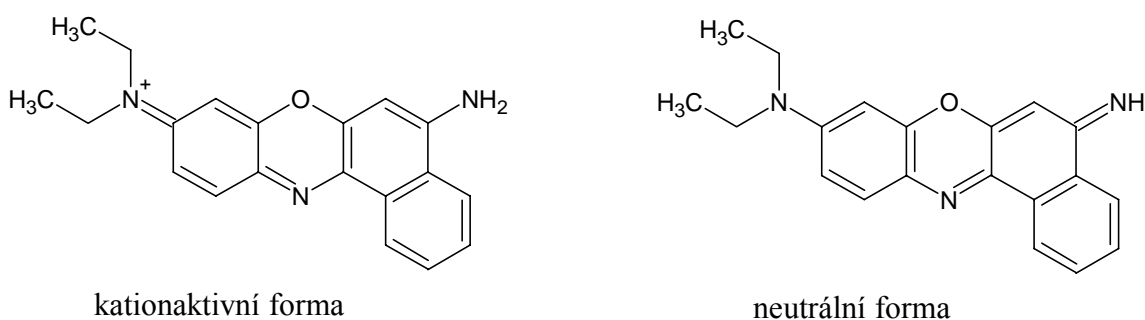
Obr. 15 Struktura amfifilní sondy 4-Di-2-ASP

2.3.2.3 Nilská modř (NB)

Patří do skupiny benzofenoxazinových barviv, která obsahují polární chromofory. Struktura barviva je tvořena donorem elektronu (diethylaminová skupina) a akceptorem elektronu (iminová skupina) [17].

Jedná se o fluorescenční barvivo, které se vyskytuje ve dvou formách - ve formě kationaktivní a formě neutrální (Obr. 16). Karmínově červená emise (při 674 nm) Nilské modři ve vodném roztoku nastává díky výskytu kationaktivní formy. Excituje při 626 nm a absorpční maximum se vyskytuje v 635 nm [18].

Je rozpustné ve vodě, ethanolu, methanolu a dalších rozpouštědlech. Oxazonová forma barviva (Nilská růžová) je tvořena spontánní oxidací Nilské modři A ve vodném roztoku nebo refluxí se zředěnou kyselinou sírovou [19].

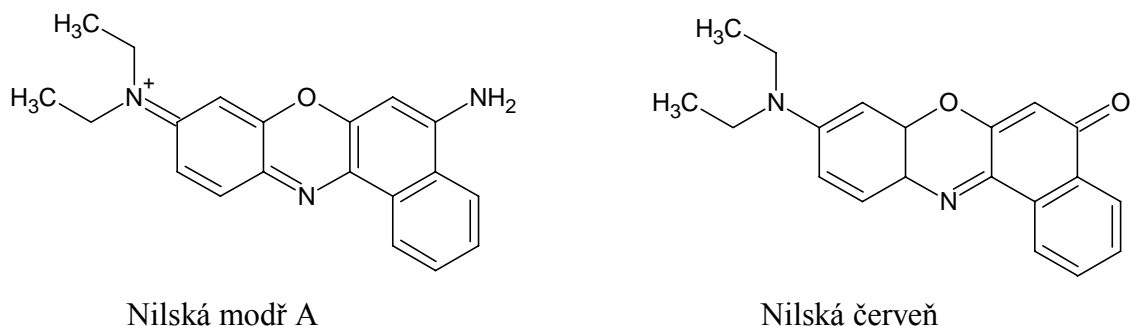


Obr. 16 Kationaktivní a neutrální forma Nilské modři

Používá se pro zkoumání DNA. Předpokládá se, že planární hydrofobní fenoxazinová část Nilské modři usnadní vsunutí do relativně nepolárního vnitřku DNA spirály [18].

Nilská modř vytváří červeně zbarvený lyzochrom – nilskou červeň, když se zahřeje se zředěnou kyselinou sírovou (Obr. 17). Během tohoto procesu je kyslík Nilské modři nahrazen aminoskupinou. Tyto látky se používají v histologii. Červený lyzochrom zůstává

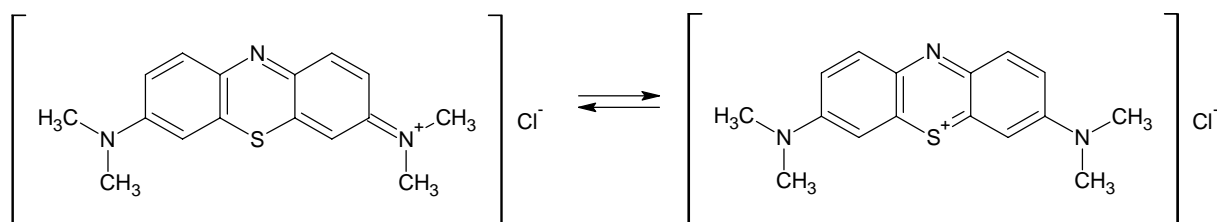
rozpuštěný v roztoku s Nilskou modří A, barví lipidy červeně. Kdežto Nilská modř barví jádra modře [20].



Obr. 17 Fluorescenční sonda Nilská modř

2.3.2.4 Methylenová modř (MB)

Methylenová modř (tetramethylthionin chlorid) nebo také Švýcarská modř je heterocyklické aromatické barvivo, které patří do skupiny thiazinových barviv.

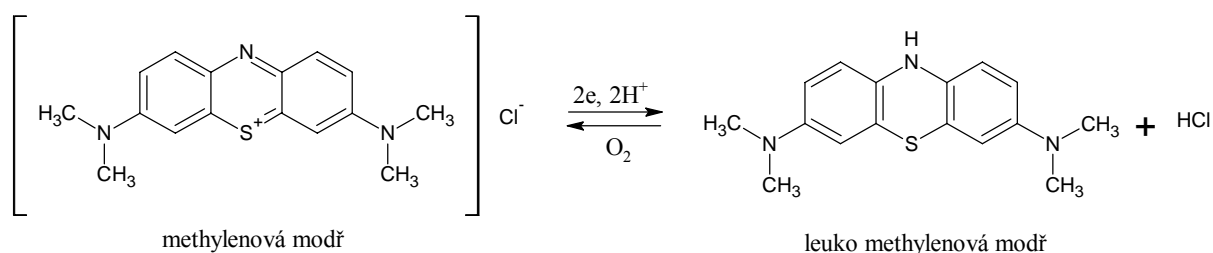


Obr. 18 Fluorescenční sonda methylenová modř

Používá se v různých odvětvích – v biologii, medicíně, chemii a průmyslu. V biologii našlo uplatnění jako barvivo pro různé barvicí procesy, např. Gramovo barvení. Může se použít jako indikátor pro určení, zda jsou buňky naživu nebo ne. Jestliže se modrý indikátor v přítomnosti aktivních enzymů mění v bezbarvý, signalizuje žijící buňky. V medicíně se využívá pro své dezinfekční vlastnosti. Redoxní vlastnosti MB dávají schopnost přijmout nebo darovat vodíkové ionty. Tyto vlastnosti se mohou využít při zacházení s jedovatými chemickými látkami jako je kyselina kyanovodíková a kyanid, oxid uhelnatý, dusitany, anilin a jeho deriváty.

V textilním průmyslu se jeho použití omezilo kvůli jeho vysoké citlivosti na světlo. Redoxní vlastnosti MB jsou také užitečné v analytické chemii. Při pokojové teplotě se vyskytuje jako pevný, tmavě červeno-hnědý prášek. Rozpuštěním ve vodě vzniká modrý roztok. V oxidačním prostředí je MB modrá, ale při působení redukovatelné látky přechází na bezbarvou formu (leuko methylenová modř) (Obr. 19). Dále má široké uplatnění v potravinářském a farmaceutickém průmyslu, kde zajišťuje čerstvost a jakostní kontrolu produktů. Vizuální barevný přechod barviva signalizuje uplynutí lhůty použití [21].

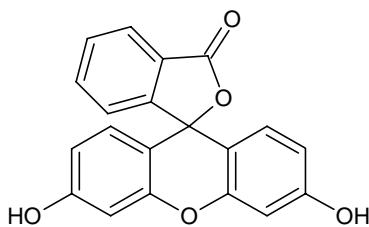
Maxima absorpčního píku se nacházejí při 668 nm a 609 nm.



Obr. 19 Přeměna methylenové modři na bezbarvou leuko formu

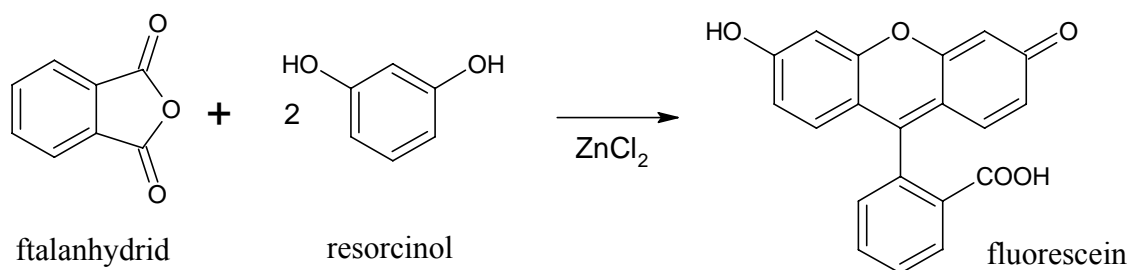
2.3.2.5 Fluorescein (F)

Fluorescein neboli kyselina 2-(6-hydroxy-3-oxo-3H-xanten-9-yl)benzoová patří mezi xanthanová barviva. Absorpční maximum se nachází při 494 nm a isosbestický bod se nachází při 460 nm (ve vodě). Fluorescence tohoto barviva je velmi intenzivní, excitace nastává při 494 nm a emituje při 521 nm [22].



Obr. 20 Fluorescenční sonda Fluorescein

Může být připraven z ftalanhydridu a resorcinolu v přítomnosti chloridu zinečnatého Friedel-Craftsovou reakcí (Obr. 21).

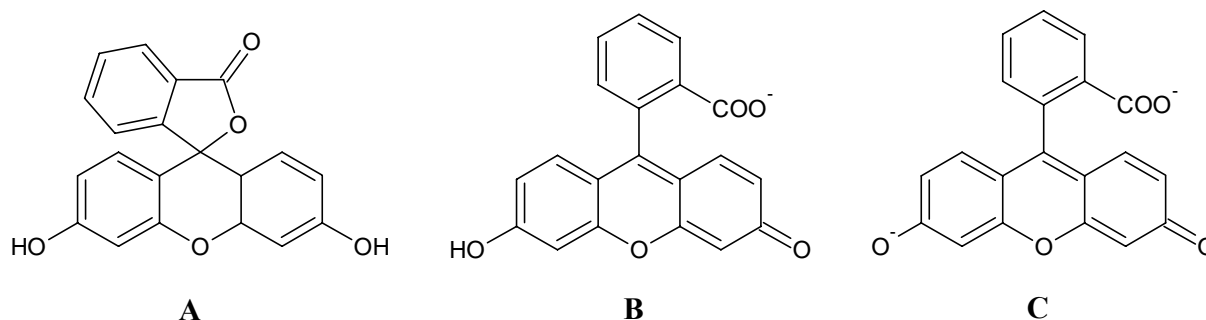


Obr. 21 Friedel-Craftsova reakce vzniku fluoresceinu

V závislosti na velikosti pH existuje v několika iontových a neutrálních formách: kationaktivní, neutrální, monoanion a dianion [23].

V neutrálním a mírně kyselém prostředí se vytváří forma laktonu (spinolaktonová forma A), proto je kvantový výtěžek fluorescence nízký. Naopak v alkalickém prostředí se laktonový kruh otevře a vzniká seskupení B (Obr. 22), které silně absorbuje záření. Vyšší pH ovlivňuje pozici emisního píku, posouvá se k vyšším vlnovým délkám. Příčinou je auxochrom $-OH$ napojený na chromofor. Ve velmi zředěném alkalickém roztoku se nachází ve formě anionu, který je stabilní díky O-můstkům a uděluje molekule tu vlastnost, že je

vysoce fluoreskující. V alkaličtějším prostředí je vytvořen dianion, který vznikne disociací hydroxyly. Dianion má nejintenzivnější fluorescenci a nejvyšší kvantový výtěžek [24].



Obr. 22 Fluorescein v neutrálním prostředí (forma A), v slabě alkalickém prostředí (forma B) a v silně alkalickém prostředí (forma C)

Fluorescein sodný se používá v lékařství pro diagnostické účely, v očním lékařství (pro odhalení poranění rohovky), ale také při operacích mozkových nádorů. Dále se využívá jako textilní barvivo.

Pro silnou fluorescenci jeho alkalických solí i při nepatrných koncentracích se využívá při stopování podzemních toků a v oceánografii [25].

2.4 Luminiscenční spektrometrie

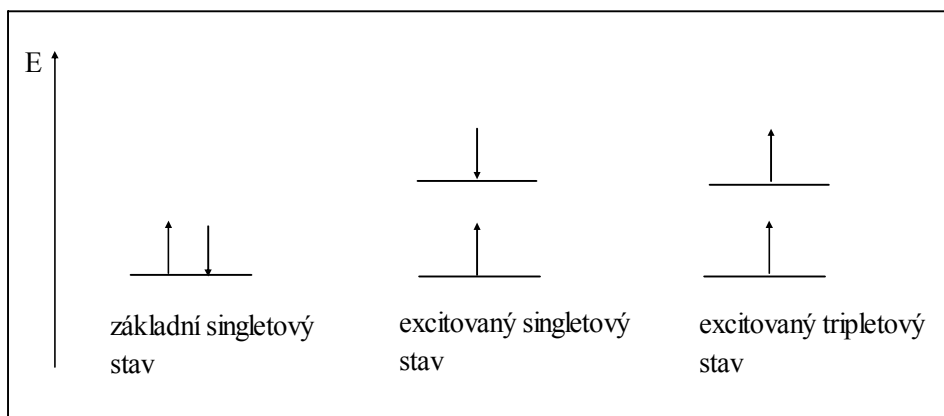
V roce 1852 byl poprvé popsán jev fluorescence britským vědcem sirem Georgem G. Stokesem. Použil modro-bílý fluoreskující minerál *fluorit* (kazivec), odtud název fluorescence. Fluorescenční metody se používají nejen v genetice a buněčné biologii, ale v mnoha dalších oborech, např. ochranné fluorescentní prvky na bankovkách [9].

2.4.1 Fotoluminiscence

Fotoluminiscence je emise světla látkou. Po absorpci primárního záření molekulou může dojít k emisi sekundárního záření z excitovaných molekul. Při absorpci záření dochází k přenosu elektronu ze základní singletové hladiny S_0 do vzbuzeného stavu (singlet S_1^*).

Elektronové stavy většiny organických molekul mohou být rozděleny na singletové a tripletové (Obr. 23).

- singletový stav: elektrony v molekule tvoří páry, ve kterých mají opačný spin
- tripletový stav: jedna dvojice elektronů má stejný spin



Obr. 23 Singletový a tripletový stav

2.4.1.1 Fluorescence

Absorpce ultrafialového záření vede k excitaci z vibračního stavu na základní elektronové hladině na jednu z mnoha vibračních hladin v elektronovém excitovaném stavu. Jde obvykle o první excitovaný singletový stav S_1 , běžně dostupné jsou i stavy S_2 a S_3 .

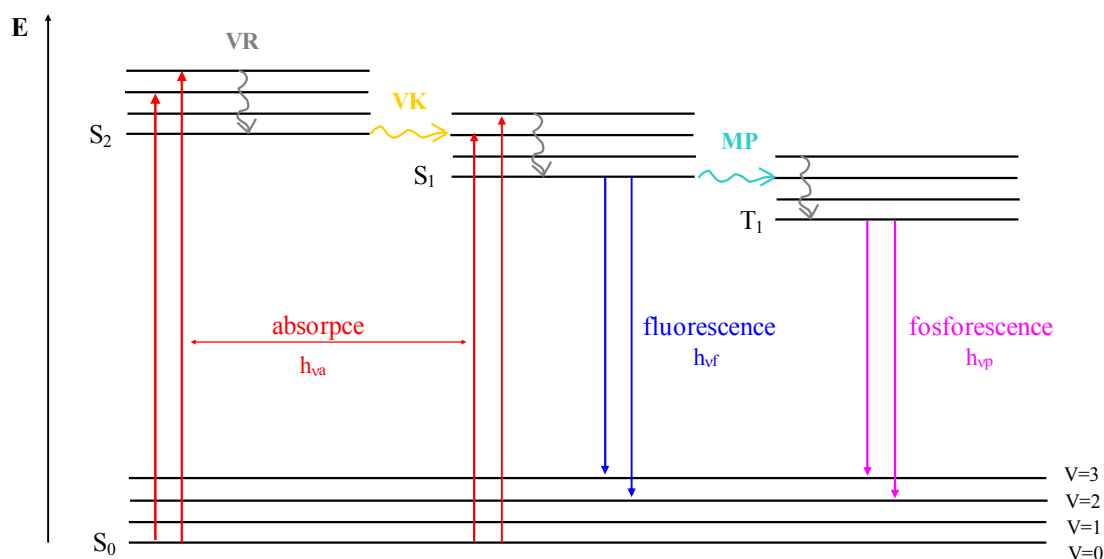
Molekula na vysoké vibrační hladině ztrácí při kolizích s okolními molekulami rychle energii a přechází na nejnižší vibrační hladinu (tzv. *vibrační relaxace molekuly*). Fluorescence se projeví, nastane-li přechod na základní elektronovou hladinu ze singletového excitovaného stavu vyzářením nadbytečné energie emisí fotonu. Hovoříme o *zářivém přechodu* na základní hladinu. Při nezářivém přechodu nastává jev nazývaný *intramolekulární konverze* energie molekuly – elektron se vrátí na základní hladinu a odevzdanou energii rozvibruje molekulu. Ta pak přechází na základní vibrační hladinu přes řadu vibračních stavů *vibrační relaxací* (Obr. 24).

Fluorescence je dána těmito vlastnostmi:

- aby látka emitovala elektromagnetické kvantum, musí světlo absorbovat
- vlnová délka fluorescenčního světla je větší než vlnová délka excitačního světla
- intenzita fluorescence je mnohem menší než intenzita excitačního světla
- intenzita fluorescence je úměrná intenzitě excitačního světla, hustotě vzorku a kvantovému výtěžku
- každá látka má své charakteristické fluorescenční spektrum
- absorpční a fluorescenční spektra tvoří zpravidla zrcadlové obrazy
- fluorescenční světlo má různý stupeň polarizace

2.4.1.2 Fosforescence

Zřídka dochází k obrácení spinu excitovaného elektronu a molekula se dostává do tripletového excitovaného stavu. Přechod může nastat, když se energeticky překrývají nejnižší singletové vibrační hladiny s vyššími vibračními hladinami tripletového stavu. Po návratu molekuly do základního vibračního stavu ztrácí elektron energii emisí fotonu a přechází do základního stavu. Jde o *fosforescenci* (Obr. 24). Doba trvání tripletového excitovaného stavu může být i větší než 10 s, ve srovnání s dobou trvání excitovaného singletového stavu, která je zpravidla 10^{-8} až 10^{-5} s. Nezářivé přenosy energie jsou usnadněny vyšší teplotou (více srážek molekul). Proto fosforescenci pozorujeme při nízkých teplotách ve vysoce viskózních médiích.



Obr. 24 Jablonskiho diagram – energetické přechody při vzniku fotoluminiscence. Nezářivé přechody: VR – vibrační relaxace, VK – vnitřní konverze, MP – mezisystémový přechod a zářivé přechody: fluorescence, fosforescence. S_1 a S_2 – jsou excitované singletové stavy, T_1 – tripletový stav, E – energie

Porovnáme-li energii absorbovaného záření a záření vyslaného fotoluminiscencí, má fluorescenční záření nižší energii, a tedy větší vlnovou délku (*Stokesův posun*). Fluorescenční spektrum je zrcadlově symetrické k absorpčnímu spektru. Při fosforescenci je vyzařováno záření ještě vyšších vlnových délek než při fluorescenci.

Luminiscenční zářivý tok roste s množstvím absorbovaného záření a kvantovým výtěžkem luminiscence (tj. poměrem udávajícím počet fotonů emitovaných ku počtu fotonů absorbovaných). U velmi zředěných látek intenzita luminiscence roste lineárně s koncentrací příslušné látky [26].

2.4.2 Excitační a emisní spektra molekul

Při měření látek schopných vykazovat luminiscenci získáváme odpovídající *emisní spektrum*, tj. závislost intenzity luminiscence na vlnové délce při konstantní excitační vlnové délce. Spektrum měřené při konstantní vlnové délce emise a různé vlnové délce excitace se nazývá *excitační* neboli *aktivační spektrum*.

2.4.2.1 Excitační spektrum

Je zjednodušené absorpční spektrum analytu, jen některá absorpční maxima vyvolávají fluorescenci. Intenzita excitačního maxima je totožná s intenzitou absorpčního maxima při konstantní intenzitě emise zdroje v daném oboru vlnových délek.

2.4.2.2 Emisní spektrum

Je v různém výtěžku excitováno kteroukoli vlnovou délkou v oblasti excitačního spektra a je ovlivněno různou citlivostí detektoru v závislosti na vlnové délce.

2.4.3 Zhášení fluorescence

Zhášení fluorescence se popisuje jako bimolekulární proces, při kterém dochází ke snižování kvantového výtěžku fluorescence beze změny fluorescenčního emisního spektra. Podle stavu fluoroforu v okamžiku zhášení lze zhášení fluorescence dělit na *dynamické* a *statické*.

Dynamické nebo-li srážkové zhášení může nastat v případě, že je fluorofor již excitován. Excitovaný fluorofor je tedy při srážce s molekulou zhášedla deaktivován a vrací se zpět na základní hladinu nezářivým přechodem. Při tomto srážkovém zhášení nedochází k chemické změně molekul. Dynamickým zhášením může docházet ke snižování časů vyhasínání luminiscence. Tzv. Sternovou-Volmerovou rovnicí je možné popsat snížení intenzity fluorescence z důvodu dynamického zhášení:

$$\frac{\Phi_0}{\Phi} = \frac{\tau_0}{\tau} = 1 + k_q \cdot \tau_0 \cdot C_q, \quad (1)$$

kde Φ_0 je kvantový výtěžek fluorescence za nepřítomnosti zhášedla (Φ za přítomnosti zhášedla) o koncentraci C_q , τ_0 je čas vyhasínání fluorescence bez zhášedla (τ za přítomnosti zhášedla), k_q je bimolekulární zhášecí konstanta nebo-li bimolekulární rychlostní konstanta určená difúzí vynásobená účinností zhášení.

V případě statického zhášení dochází k chemické změně a po kontaktu fluoroforu, který je v základním stavu, s molekulami zhášedla vznikne nefluoreskující komplex. Fluorescence jsou pak schopné pouze disociované molekuly fluoroforu, a jelikož je rychlost disociace ve srovnání se zářivými přechody mnohem pomalejší, výsledkem je neefektivnost zářivých přechodů.

Existují tyto typy zhášení fluorescence [27]:

1. Koncentrační (samo)zhášení fluorescence (Vavilov):
Od určité větší prahové koncentrace analytu c_0 dochází k poklesu kvantového výtěžku. Je to dáno neelastickými srážkami excitovaných molekul s molekulami v základním stavu; možná také asociace molekul, tyto molekuly absorbují záření, ale neemitují.
2. Vnitřní konverze molekul:
V důsledku kolizí excitovaných molekul s neexcitovanými dochází k disipaci energie excitované molekuly na nezářivé formy energie; zvyšuje se s rostoucí teplotou, závisí na koncentraci molekul, viskozitě roztoku apod.
S rostoucí vrstvou roztoku nemusí dojít k excitaci všech molekul daným primárním zářením I_0 .
3. Vnitřně filtrační efekt:
Absorpce sekundárního emitovaného záření molekuly je absorbováno v roztoku analytu (překrývání excitačního a emisního spektra).
4. Zhášení emitovaného záření nadbytkem činidla:
Absorbuje-li činidlo při blízké vlnové délce jako fluoreskující produkt analytu, absorbuje činidlo přednostně primární záření, takže již nestačí pro excitaci produktu

analytu; absorpce primárního záření jinými sloučeninami přítomnými v roztoku (také vnitřně-filtrační efekt).

5. Strukturální a konfigurační změny molekul:

Převod molekuly do tripletového stavu (tvorba volného biradikálu s nepárovými elektrony), velmi reaktivní. Přejít na složitější sloučeniny (diméry, exciméry), vzniklé sloučeniny nemusí fluoreskovat. Při strukturální a konformační změně může excitovaná molekula přejít do základního stavu bez vyzáření nového záření. K tomu jsou náchylné látky s volnější strukturou, volně otáčivé části molekul; degradace elektronové energie na vibrační energie.

6. Vliv cizích iontů:

Pokles kvantového výtěžku v přítomnosti cizích iontů a látek.

Stupeň zhášení roste s polarizovatelností, s rostoucí kovalentní charakteristikou.

Zhášení aniony: $F^- < NO_3^- < SO_4^{2-} < ac < (COO)^{2-} < Cl^- < Br^- < SCN^- < I^-$

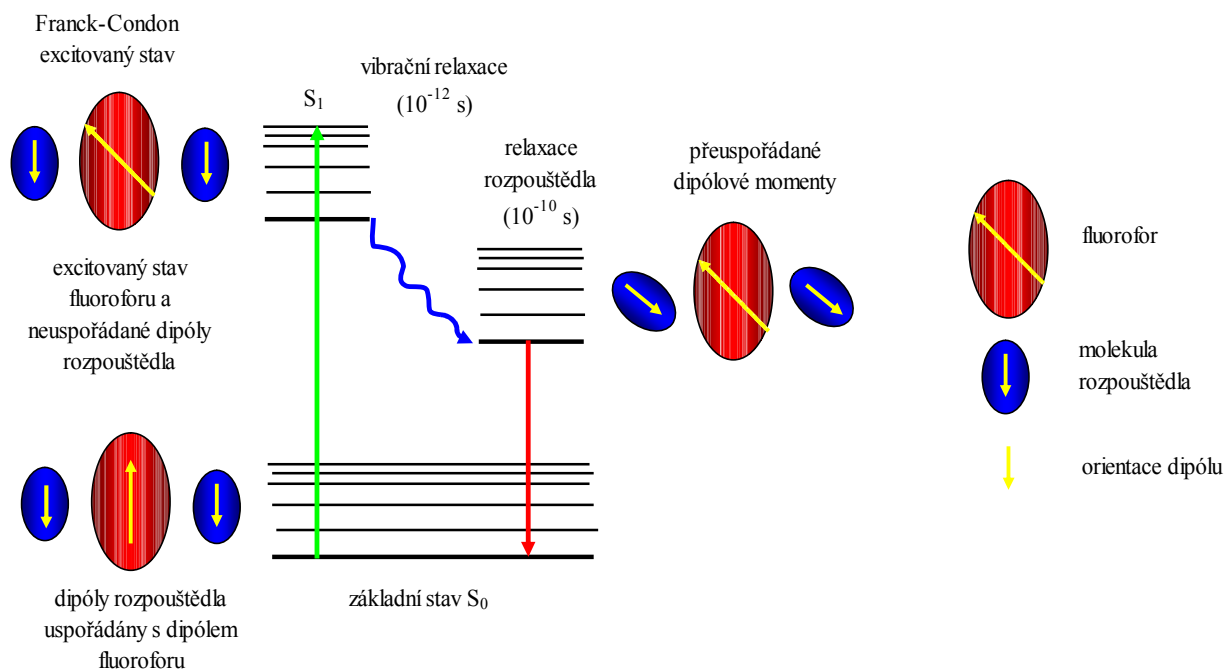
Zhášení kationy: $Cu^{2+}, Ni^{2+}, Fe^{2+}, Fe^{3+}, Mn^{2+}$ (kationy s vakantními d-orbitaly); $Mn^{2+}, Fe^{2+}, Hg^{2+} < UO_2^{2+} < Co, Ni < Fe^{3+} < Cu < Cr^{3+}$

Důsledek pohlcení elektronu ze vzbuzené hladiny fluoreskujícího chelátu analytu ve vakantním d-orbitalu – znemožnění návratu excitovaného elektronu do základní hladiny.

2.4.4 Relaxace rozpouštědla

Různorodé faktory prostředí působí na fluorescenční emisi, včetně interakcí mezi fluoroforem a obklopujícími molekulami rozpouštědla. Proto elektronová excitace ze stavu základního S_0 na vyšší elektronový excitovaný stav (jako S_1) je doprovázena změnou permanentního dipólového momentu molekuly. S novým dipólovým momentem systém rozpouštěná látka-rozpouštědlo již není v rovnováze. Molekuly rozpouštědla jsou přinuceny přizpůsobit se nové situaci. Začnou se reorientovat do energeticky příznivějších pozic s ohledem na excitované barvivo (Obr. 25). Tento dynamický proces začínající z původně nerovnovážného Frank-Condonova stavu (FC) a vedoucí postupně k nové rovnováze s excitovaným stavem látky rozpouštěné v roztoku (R) se nazývá *relaxace rozpouštědla* (SR) [28].

Molekuly rozpouštědla obklopující základní stav fluoroforu mají dipólové momenty, které mohou interagovat s dipólovým momentem fluoroforu, díky čemuž dochází k distribuci molekul rozpouštědla kolem fluoroforu. Rozdílné energetické hladiny mezi základními a excitovanými stavy ve fluoroforu vytváří změnu v molekulovém dipólovém momentu, který způsobí přeskupení molekul rozpouštědla obklopujících fluorofor. Franck-Condonův princip říká, že při excitaci fluoroforu je molekula excitována k vyšší elektronové hladině v daleko kratším časovém intervalu než molekula rozpouštědla, která podléhá reorientaci uvnitř vzájemně působícího prostředí rozpouštědlo-rozpouštěná látka. Následkem toho dochází ke zpoždění mezi excitací a přeskupením molekul rozpouštědla kolem rozpouštěného fluoroforu, který má větší dipólový moment v excitovaném stavu než ve stavu základním. Proto po excitaci nastává *relaxace solvatačního obalu* [9].



Obr. 25 Interakce fluorofor-excitovaný stav rozpouštědla

Poté, co byl fluorofor excitován k vyšším vibračním hladinám 1. excitovaného singletového stavu (S_1), nadbytek vibrační energie je rychle ztracen okolními molekulami rozpouštědla a fluorofor se pomalu uvolňuje k nejnižším vibračním energetickým hladinám. Molekuly rozpouštědla pomáhají při stabilizaci a dalším snižování energetické hladiny excitovaného stavu pomocí reorientace kolem excitovaného fluoroforu v pomalejším procesu (mezi 10 a 100 pikosekundami). Dochází ke snížení energetického rozdílu mezi základním a excitovaným stavem, což má za následek posun do červené oblasti spektra (k vyšším vlnovým délkám) fluorescenční emise. Zvýší-li se polarita rozpouštědla, způsobí to odpovídající snížení energetické hladiny excitovaného stavu. Při snížené polaritě se redukuje účinek rozpouštědla na energetickou hladinu excitovaného stavu.

Techniky relaxace rozpouštědla se využívá při sondování mikropolarity a pohyblivosti v membránách, proteinech, DNA, polymerech, micelách [9].

2.4.5 Vliv rozpouštědla na elektronová spektra a polarita

Emise fluorescence je ovlivňována různými faktory, vzájemnou interakcí mezi fluoroforem a obklopujícími molekulami rozpouštědla, anorganickými a organickými sloučeninami, teplotou, pH a lokalizovanou koncentrací fluoroforu. Účinky těchto parametrů se liší v závislosti na druhu fluoroforu. Silný vliv na absorpční a emisní spektra, stejně jako na kvantový výtěžek, má proměnné prostředí.

Základní a excitované stavy rozpuštěné látky jsou přibližně stejně stabilizovány vzájemným ovlivňováním mezi rozpouštědlem a rozpuštěnou látkou v závislosti na chemické povaze jak rozpuštěné látky, tak i rozpouštědla. Interakce mezi rozpuštěnou látkou a rozpouštědlem (sondou a molekulami rozpouštědla) jsou obvykle popisovány Van der Waalsovými silami a specifickými interakcemi jako je vodíková vazba.

Pojem *polarita* zahrnuje všechny tyto typy interakcí rozpouštědlo-rozpuštěná látka (včetně vodíkové vazby) a vyjadřuje kvalitu interakce mezi molekulou a prostředím. Proto polarita nemůže být charakterizována jediným parametrem. Obecně jako polární molekulu označujeme tu, která má nenulový dipól moment. Ve fluorescenční spektroskopii neuvažujeme pouze interakce permanentních dipólů látky a rozpouštědla, ale i interakce založené na polarizovatelnosti daných molekul.

Pojem polarita (někdy mluvíme o mikropolaritě) tedy zahrnuje nescifické interakce (dipól moment, polarizovatelnost) a specifické interakce. Z toho důvodu nemůže být charakterizována pouze relativní permitivitou (makroskopické měřítko, týká se prostředí) nebo dipól momentem (mikroskopické měřítko, týká se molekuly).

Kvůli změnám solvatačního obalu kolem rozpouštěné látky dochází k rozšiřování absorpčních a emisních pásů. Rozšiřování je způsobeno existencí souvislého souboru vibračních podhladin. Také dochází i k posunu absorpčních a emisních pásů, nazývané solvatochromní posuny, které mohou být způsobeny povahou nebo změnou složení rozpouštědla a také souvisí se změnou solvatační energie.

Sloučeniny jsou solvatochromní, jestliže poloha jejich absorpčního (a emisního) spektra závisí na polaritě rozpouštědla. Bathochromní (červený, k vyšším vlnovým délkám) posun a hypsochromní (modrý, k nižším vlnovým délkám) posun se stoupající polaritou rozpouštědla se týká pozitivního a negativního solvatochromismu [29].

2.4.5.1 Účinky vodíkové vazby na absorpční a fluorescenční spektra

Interakce vodíkové vazby je považována za jeden z různých aspektů polarit a vede ke změně polohy absorpčních a emisních spekter.

V případě $n \rightarrow \pi^*$ přechodů se při excitaci elektronová hustota heteroatomu dusíku snižuje. Díky tomu dochází ke snížení schopnosti tohoto heteroatomu tvořit vodíkové vazby. Dochází ke snížení dipólového momentu, je očekáván modrý posun absorpčního spektra. Čím je vodíková vazba pevnější, tím dochází k většímu posunu. Posun spektra se může použít pro určení energie vodíkové vazby. Ve skutečnosti dusík způsobuje destrukci vodíkové vazby, protože emise nastává z $n \rightarrow \pi^*$ stavu bez vodíkových vazeb.

V případě $\pi \rightarrow \pi^*$ přechodů je často pozorováno, že heteroatom heterocyklu je v excitovaném stavu více bazický než ve stavu základním. Excitovaná molekula tak může být silněji vázána vodíkem než ve stavu základním a fluorescence je na vodíkovou vazbu více citlivější než absorpce [29].

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Použité chemikálie

<i>Kyselina hyaluronová</i>	CPN spol. s r.o., HyActive ($M_w = 106\ 000\ \text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$) CPN spol. s r.o., Hyaluronic Acid LMW ($M_w = 253\ 900\ \text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$)
<i>Fluorescenční sondy</i>	Acridine orange hydrochloride hydrate, SIGMA-ALDRICH spol. s r.o., CAS 65-61-2 Nile Blue A, SIGMA-ALDRICH spol. s r.o. Methylenová modř, SIGMA-ALDRICH, spol. s r.o., CAS 7220-79-3 4-Di-2-ASP, BioChemika, for fluorescence, $\geq 97,0\%$ (Fluka), CAS 105802-46-8
<i>Povrchově aktivní látky</i>	SDS (dodecylsírán sodný), Fluka, ultra pro molekulární biologii, gradient čistoty $\geq 99,0\%$ Triton X-100, Fluka, $\text{H}_2\text{O} \leq 0,5\%$ CTAC (cetyltrimethyl amonium chlorid), Fluka
<i>Rozpouštědla</i>	Methanol G Chromasolv, SIGMA-ALDRICH spol. s r.o., for gradient elution, čistota min 99,9% Ethanol, SIGMA-ALDRICH spol. s r.o., pro UV spektroskopii DMSO, Riedel-de Haen, spectranal, čistota min 99,7%
<i>Soli</i>	NaCl p.a., Merci s r.o. KCl p.a., Merci s r.o. LiCl bezvodý p.a., Lach-Ner s r.o. CaCl ₂ dihydrát p.a., Lach-Ner s r.o.
<i>Injekční voda</i>	KabiPac, sterilní voda „fresenius“

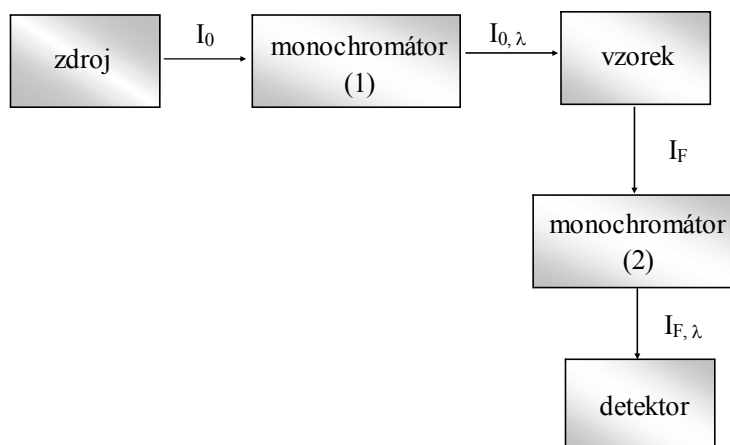
3.2 Přístroje a zařízení

<i>Analytické váhy</i>	DENVER INSTRUMENT
<i>Automatické pipety</i>	
<i>MS2 Minishaker</i>	IKA 1/min
<i>Magnetické míchadlo</i>	VARIOMAG POLY

Luminiscenční spektrometr, AMINCO-Browman, Series 2

zdroj záření	xenonová lampa (150 W), záblesková lampa (7 W)
monochromátory	mřížka konkávní holografická, iontově leptaná
rozmezí λ	220 – 850 nm
přesnost λ	$\pm 0,5\ \text{nm}$
opakovatelnost λ	$\pm 0,25\ \text{nm}$
rychlost skenu	3 – 6000 nm/min

Z primárního zdroje polychromatického záření vstupuje do mřížkového monochromátoru 1 (excitační), kde se vybere záření o vhodné vlnové délce excitace (Obr. 26). Selektivní paprsek o přesně definované vlnové délce prochází křemennou kyvetou se vzorkem, která je umístěna v jeho optické dráze. Dochází k vybuzení elektronů zkoumaného vzorku. Fluorescence je pozorována v kolmém směru ke směru paprsku primárního záření, aby primární záření procházející kyvetou nerušilo měření fluorescence. Proto druhý monochromátor (emisní) i detektor jsou umístěny v kolmém směru ke kyvetě. Emisní záření prochází monochromátorem 2, kde je stanovena jeho vlnová délka a pomocí detektoru je zjištěna intenzita fluorescence [26].



Obr. 26 Schéma jednopaprskového spektrofluorimetru Aminco Bowman, který se skládá ze zdroje záření, excitačního monochromátoru, kyvetového prostoru pro vzorek, emisního monochromátoru a detektoru

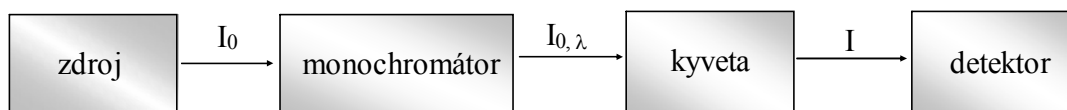
UV-VISIBLE Spektrofotometr, Cary 50 Probe

zdroj záření	Xenonová pulzní lampa
monochromátor	Czerny-Turner 0,25 m
rozmezí λ	190 – 1100 nm
opakovatelnost λ	$\pm 0,1$ nm
max rychlost skenu	24 000 nm/min
detektor	2 křemíkové diody

UV-VIS spektrofotometr je přístroj, který se používá pro měření elektronových absorpčních spekter. Pomocí monochromátoru se získá monochromatické záření (záření o určité vlnové délce) a měří se změna jeho intenzity při průchodu měřeným vzorkem. Spektrofotometr je tvořen zdrojem záření, monochromátorem, kyvetou se vzorkem a detektorem (Obr. 27).

Jako zdroj spojitého záření se pro blízkou ultrafialovou oblast nejčastěji používá deuteriová výbojka. Pro viditelnou oblast to je wolframová nebo halogenová žárovka. Monochromatické záření se získá po disperzi hranolem nebo mřížkou. Absorbujícím prostředím je roztok vzorku umístěný v kyvetě. Pro měření se používají kyvety z materiálu, který neabsorbuje záření v nastaveném rozsahu vlnových délek. Pro UV oblast se používají křemenné kyvety a pro viditelnou oblast skleněné nebo plastové. Velikost absorpce je měřena pomocí fotočlánků.

Protože se jednalo o jednopaprskový spektrofotometr, musel se nejdříve proměřit tzv. „blank“ (srovnávací roztok). Ze zdroje vychází záření, které projde kyvetou se srovnávacím roztokem, kde je zeslabeno a dopadá na detektor. Je měřen vzniklý fotoelektrický proud, kterému je přiřazena nulová hodnota absorbance. Po výměně srovnávacího roztoku za měřený je změřena absorbance neznámého vzorku.



Obr. 27 Schéma jednopaprskového UV-VIS spektrofotometru

3.3 Příprava zásobních roztoků fluorescenčních sond

Na analytických vahách bylo naváženo 9,1 mg barviva AO a kvantitativně převedeno do 100 mL odměrné baňky. Po rozpuštění byl roztok doplněn injekční vodou po rysku. Byl připraven zásobní roztok fluorescenční sondy AO o molární koncentraci $3,0 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$.

Na analytických vahách bylo naváženo 7,9 mg barviva 4-Di-2-ASP a kvantitativně převedeno do 100 mL odměrné baňky. Po rozpuštění byl roztok doplněn injekční vodou po rysku. Byl připraven zásobní roztok fluorescenční sondy 4-Di-2-ASP o molární koncentraci $2,0 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$.

Na analytických vahách bylo naváženo 151,4 mg barviva NB a kvantitativně převedeno do 1000 mL odměrné baňky. Po rozpuštění byl roztok doplněn MeOH po rysku. Byl připraven zásobní roztok fluorescenční sondy NB v MeOH o molární koncentraci $2,1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$.

Na analytických vahách bylo naváženo 7,5 mg barviva MB a kvantitativně převedeno do 100 mL odměrné baňky. Po rozpuštění byl roztok doplněn injekční vodou po rysku. Byl připraven zásobní roztok fluorescenční sondy MB o molární koncentraci $2,0 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$.

Na analytických vahách bylo naváženo 6,6 mg barviva F a kvantitativně převedeno do 100 mL odměrné baňky a kvantitativně převedeno do 100 mL odměrné baňky. Po rozpuštění byl roztok doplněn $0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ roztokem NaOH po rysku. Byl připraven zásobní roztok fluorescenční sondy F v $0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ NaOH o molární koncentraci $2,0 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$.

3.4 Rutinní vyhodnocení

3.4.1 Stanovení CMC

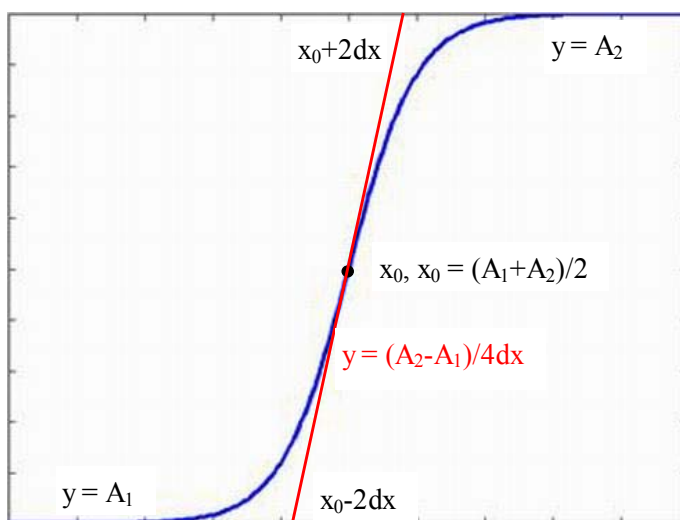
CMC může být stanovena pomocí tzv. S křivky (sigmoidní) (Obr. 28). Obecné vyhodnocení S křivky umožňuje získat 3 významné body, ve kterých dochází v experimentech ke změnám (1. zlom, inflexní bod a 2. zlom). Tyto významné body se získají z Boltzmanovy rovnice po proložení grafické závislosti zmíněnou S křivkou.

$$y = \frac{A_1 - A_2}{1 + e^{\frac{x-x_0}{dx}}} + A_2,$$

kde A_1 je minimum, A_2 maximum křivky, x_0 je inflexní bod.

V grafu se vyskytují 3 oblasti, 1. oblast je lineární, následuje nárůst s inflexním bodem (strmost závisí na velikosti změny v systému). Mezi těmito oblastmi dochází k 1. zlomu (do tohoto bodu dochází k vázání kationtových barviv na negativně nabitý tenzid). Za oblastí nárůstu se opět vyskytuje lineární oblast. Mezi nimi je 2. zlom, došlo k nasycení tenzidu sondou.

Inflexní bod se získá tak, že se druhá derivace funkce položí rovna 0. Je to bod, ve kterém graf funkce přechází z konvexního tvaru do konkávního nebo naopak. Tečna grafu v tomto bodě graf protíná. Při titrování sondy tenzidem můžeme říct, že se jedná o bod ekvivalence, který určuje shodu látkového množství titrované látky a látkového množství přidávaného činidla.



Obr. 28 Sigmoidní křivka

4 VÝSLEDKY A DISKUSE

4.1 Elektrostatická interakce kationtového barviva AO s negativně nabitým polyelektrolytem (HA) ve vodném roztoku

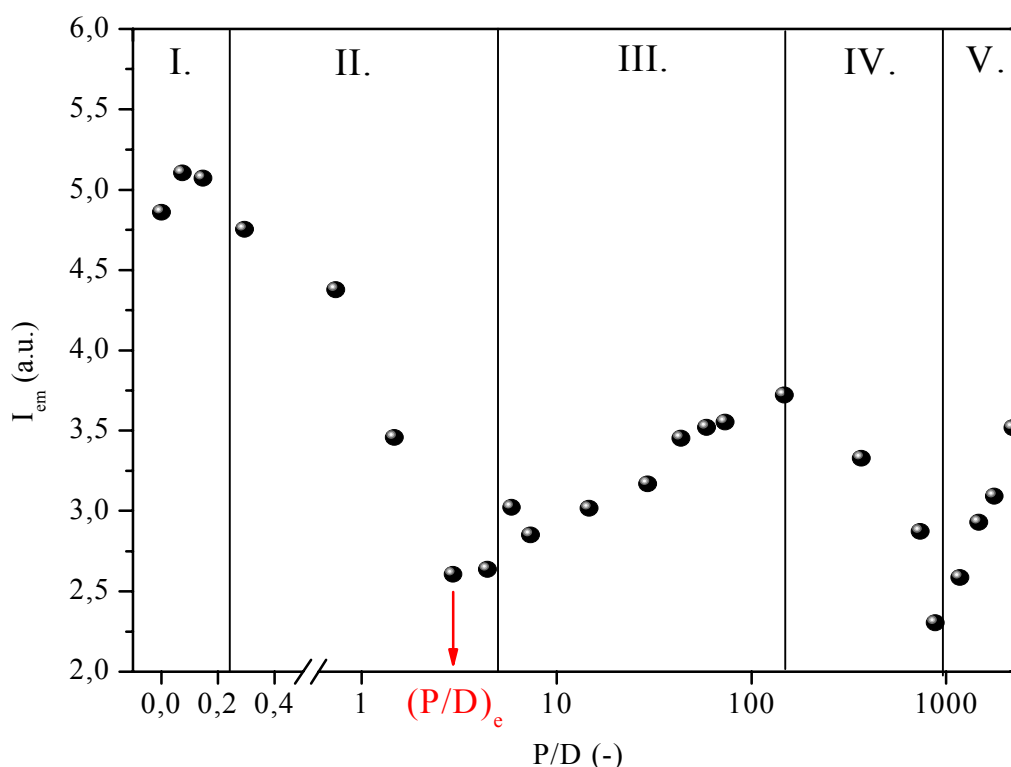
Do plastových zkumavek bylo ze zásobního roztoku napipetováno 300 μL vodného roztoku fluorescenčního barviva akridinové oranže, konečná koncentrace barviva ve zkumavce činila $1,7 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Do každé zkumavky bylo přidáno určité množství vodného roztoku hyaluronanu ze zásobního roztoku o koncentraci $15 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ a doplněno injekční vodou na objem 5,3 mL. Byla vytvořena koncentrační řada hyaluronanu o 23 vzorcích od koncentrace $0 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ po koncentraci $15 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$.

Vazebnými místy hyaluronanu pro kationtová barviva jsou záporně nabitě karboxylové skupiny podél celého řetězce, interakce barviva s hyaluronanem je elektrostatická. Interakcí dochází k vytvoření komplexu. Tato interakce byla studována pomocí měření relativní intenzity emise, která byla v grafu vynesena proti poměru P/D.

P polymer (vazebná místa hyaluronanu, koncentrace karboxylových skupin)

D barvivo (koncentrace fluorescenční sondy)

Vycházelo se z předpokladu, že 1 karboxylové skupině (COO^-) odpovídá 1 molekula dimeru AO ($P/D = 1$). Víme, že $400\,000 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ HA má asi 1000 karboxylových skupin na 1 molekulu AO.



Obr. 29 Závislost intenzity emise fluorescenční sondy AO na podílu koncentrací vazebných míst hyaluronanu a sondy. Zleva doprava roste koncentrace vazebných míst hyaluronanu, koncentrace fluorescenční sondy je konstantní. Pravá část osy x je v logaritmickém měřítku, $(P/D)_e$ je koncový bod titrace, jeho hodnota činí 2,9

$(P/D)_e$ představuje koncový bod titrace, je definován jako počet vazebných míst polymeru HA (karboxylových skupin) vázaných k jedné molekule barviva AO. Získá se extrapolací lineárních částí titrační křivky.

Oblast I: první bod představuje emisi samotného barviva ve vodném roztoku bez polyelektrolytu (Obr. 29). První přidavek vazebných míst (COO^- skupin) HA způsobí narušení rovnováhy mezi volnými monomery a dimery barviva v roztoku, molekuly AO začínají interagovat s karboxylovými skupinami.

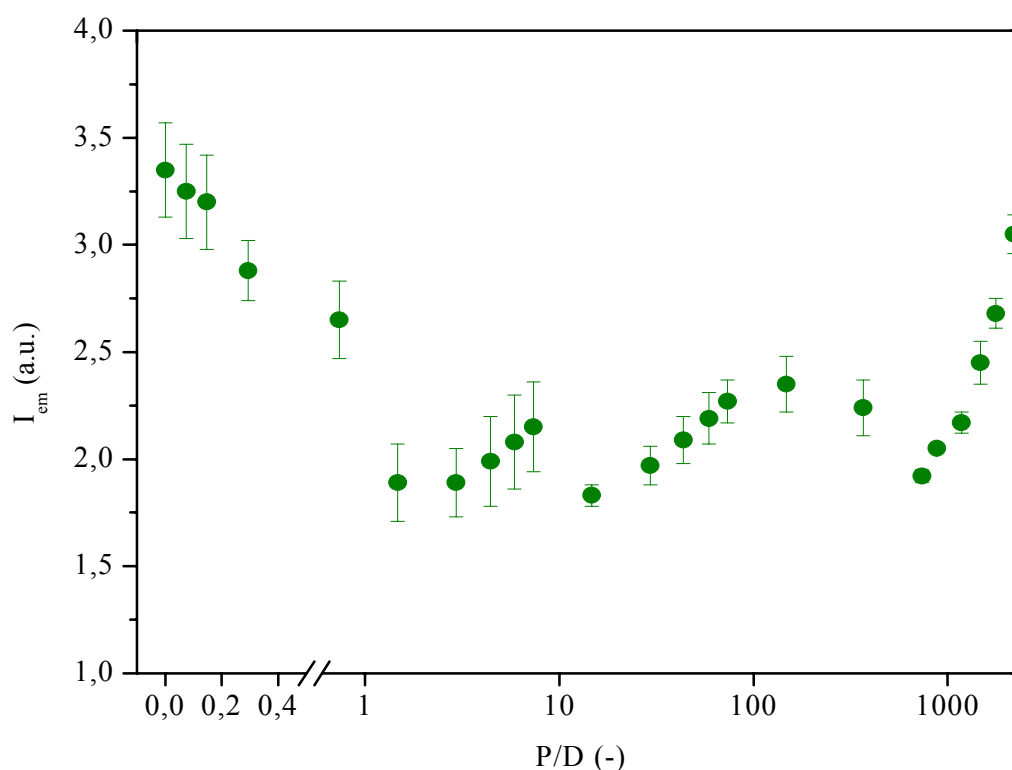
Oblast II: pokles intenzity emise do koncentrace $0,02 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$, dosaženo minima u hodnoty $P/D = 2,9$ (zároveň je tento bod koncovým bodem titrace $(P/D)_e$), v roztoku převažují volné molekuly AO v dimerní formě (tvorba H-agregátů), které nefluoreskují a spolu se samozhášením adsorbovaného AO přispívají k poklesu intenzity fluorescence.

Oblast III: nárůst intenzity emise, který je způsoben depolymerizací dimerů AO v roztoku, vznik monomerů, které zvyšují intenzitu emise, u koncentrace $1 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$ HA bylo dosaženo maxima při $P/D = 147,2$.

Oblast IV: dochází k dalšímu poklesu intenzity emise do koncentrace $6 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$ HA, který je pravděpodobně způsoben repolymerizací molekul AO (opětovný vznik dimerů AO).

Oblast V: další nárůst intenzity emise.

Ve fluorescenčním spektru AO se vyskytoval dominantní pík monomerní formy barviva při 528 nm . Byl očekáván pík dimeru AO okolo 630 nm , ovšem pík nebyl detekován.



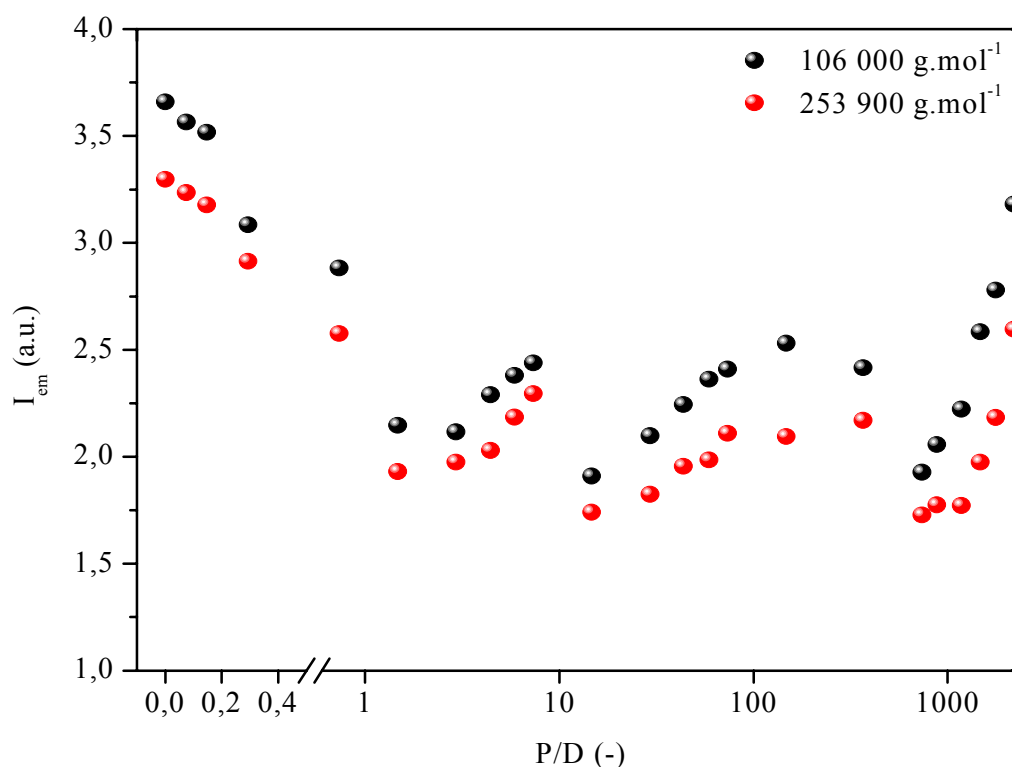
Obr. 30 Směrodatná odchylka opakovaných experimentů elektrostatické interakce hyaluronanu a fluorescenční sondy AO, pravá část osy x je v logaritmicke měřítku

Opakováním experimentů elektrostatické interakce hyaluronanu se sondou AO (Obr. 30) bylo zjištěno, že způsob přípravy vzorků (zásobní roztoky, ředění, teplota) ovlivňuje tvar křivky. Intenzity emise roztoků s malým obsahem hyaluronanu (levá část grafu) mají větší směrodatnou odchylku než roztoky s velkým obsahem hyaluronanu, kde je odchylka minimální.

4.2 Elektrostatická interakce kationtového barviva AO s negativně nabitým polyelektrolytem (HA) o různé M_w ve vodném roztoku

Do plastových zkumavek bylo ze zásobního roztoku napipetováno 300 μL vodného roztoku fluorescenčního barviva akridinové oranže, konečná koncentrace barviva ve zkumavce činila $1,7 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Do každé zkumavky bylo přidáno určité množství vodného roztoku hyaluronanu o $M_w = 106\,000 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ nebo $M_w = 253\,900 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ ze zásobního roztoku o koncentraci $15 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ a doplněno injekční vodou na objem 5,3 mL.

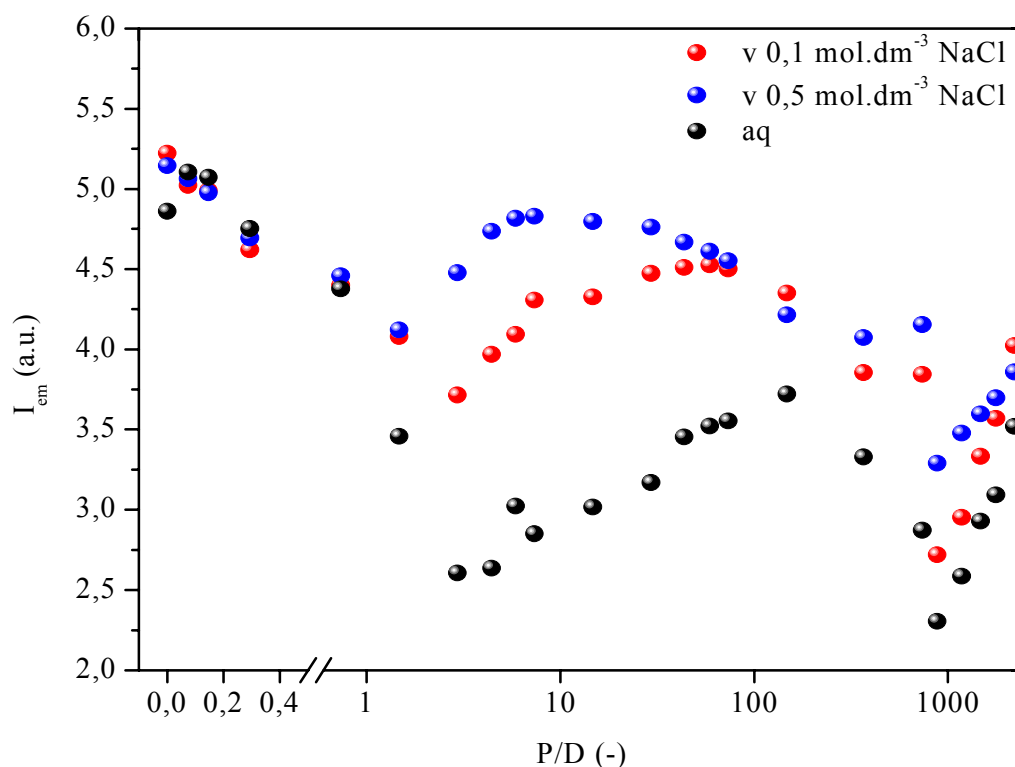
Roztoky hyaluronanu o různé molekulové váze mají stejnou koncentraci vazebných míst (karboxylových skupin). Z fluorescenčních měření vyplývá, že hyaluronan o nižší molekulové váze dosahuje vyšších intenzit emise pro dané poměry P/D.



Obr. 31 Závislost intenzity emise fluorescenční sondy AO na podílu koncentrací vazebných míst hyaluronanu (o různé M_w) a sondy. Zleva doprava roste koncentrace vazebných míst hyaluronanu, koncentrace fluorescenční sondy je konstantní. Pravá část osy x je v logaritmickém měřítku

4.3 Elektrostatická interakce kationtového barviva AO s negativně nabitým polyelektrolytem (HA) v $0,1 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ a $0,5 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ NaCl

Do plastových zkumavek bylo ze zásobního roztoku napipetováno $300 \mu\text{L}$ vodného roztoku fluorescenčního barviva akridinové oranže, konečná koncentrace barviva ve zkumavce činila $1,7\cdot 10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$. Do každé zkumavky obsahující sondu bylo přidáno určité množství hyaluronanu ze zásobního roztoku v $0,1 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ a $0,5 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ NaCl o koncentraci $15 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$ a doplněno injekční vodou na objem $5,3 \text{ mL}$.



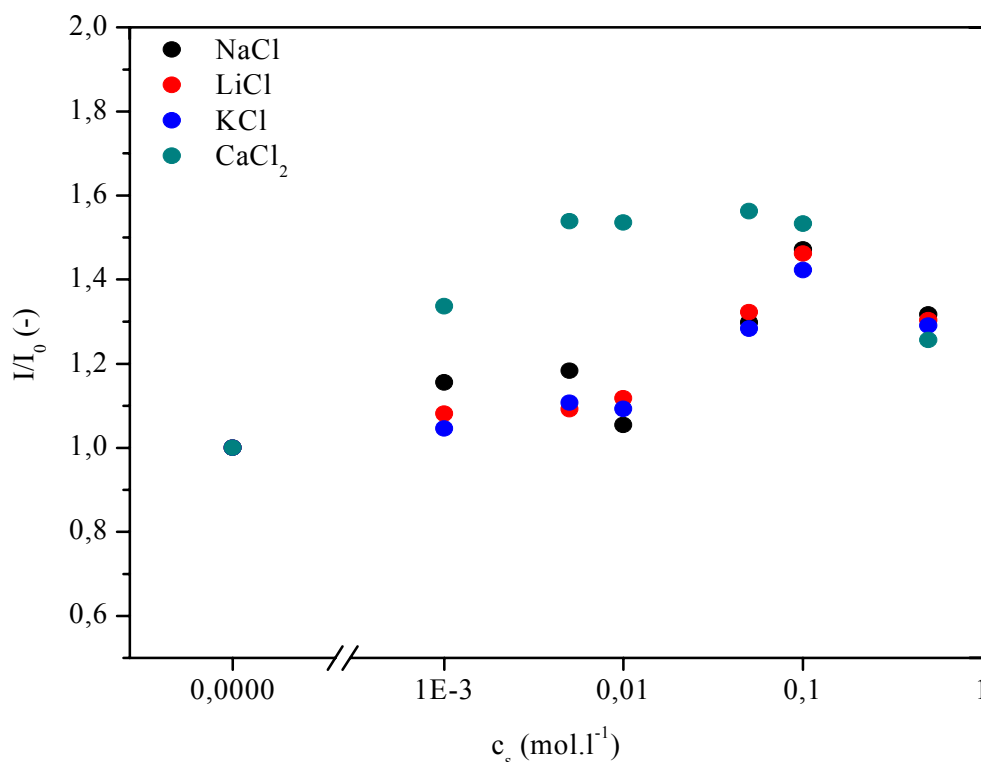
Obr. 32 Závislost intenzity emise fluorescenční sondy AO na podílu koncentrací vazebných míst hyaluronanu a sondy v různých prostředích. Zleva doprava roste koncentrace vazebných míst hyaluronanu, koncentrace fluorescenční sondy je konstantní. Pravá část osy x je v logaritmickém měřítku

V tomto experimentu (Obr. 32) docházelo ke stejným dějům jako u AO v HA ve vodném roztoku (černá křivka), ale prostředí soli tento průběh mírně změnilo. Protože je v roztoku hyaluronanu sůl (NaCl), vytvoří se kolem makroaniontu HA iontová atmosféra malých iontů (oddisociované protiiionty H^+ a ionty soli). Tato atmosféra snižuje odpuzivý účinek karboxylových skupin a dochází ke konformační změně polymeru (z rovného řetězce na stočený). Čím je koncentrace soli vyšší, tím více je schopen se hyaluronan stočit. Efektivní náboj na každém vazebném místě se snižuje s nárůstem koncentrace soli, elektrostatické přitahování mezi vazebným místem a molekulou barviva se snižuje, a proto může být více vazebných míst umístěno kolem dané molekuly barviva. Roztok $0,5 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ NaCl má větší iontovou sílu než $0,1 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ roztok, proto více brání tvorbě dimeru AO, intenzita emise je vyšší.

Co se týče koncových bodů titrace $(P/D)_e$, v roztoku $0,1 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ NaCl má hodnotu 2,9 (stejně jako ve vodě), v roztoku $0,5 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ NaCl je asi 1,5. To znamená, že v případě $0,5 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ NaCl je k dispozici na vytvoření komplexu AO-HA méně vazebných míst než v roztoku s menším obsahem soli.

4.4 Vliv iontové síly na intenzitu fluorescence AO ve vodném roztoku hyaluronanu

Do plastových zkumavek bylo ze zásobního roztoku napipetováno $300 \mu\text{L}$ vodného roztoku fluorescenčního barviva akridinové oranže, konečná koncentrace barviva ve zkumavce činila $1,13\cdot 10^{-6} \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$. Do každé zkumavky byl přidán hyaluronan o $M_w = 106\,000 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, výsledná koncentrace hyaluronanu činila $0,94 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$. Nakonec bylo přidáno určité množství roztoku chloridu sodného, lithného, draselného nebo vápenatého a roztoky byly doplněny injekční vodou na objem $5,3 \text{ mL}$. Byly vytvořeny 4 koncentrační řady solí o různě velké iontové síle.



Obr. 33 Účinek iontové síly roztoků solí na intenzitu emise normalizovanou k intenzitě při nulové koncentraci vodného roztoku soli, pravá část osy x je v logaritmickém měřítku

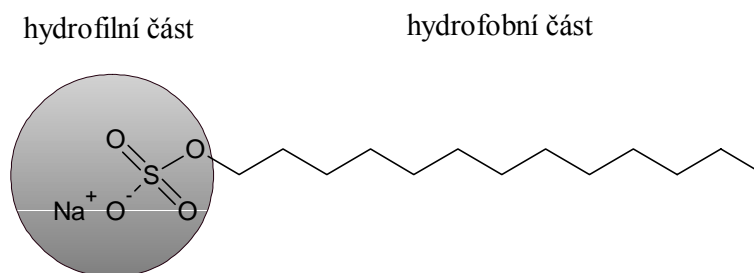
Intenzita emise sondy rostla do koncentrace solí $0,1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$, od této koncentrace docházelo ke zhášení fluorescence v důsledku přesycení iontů. Chloridy obecně zhášejí fluorescenci. Z hlediska velikosti má Ca^{2+} větší iontový poloměr než kationy Na^+ , K^+ nebo Li^+ . Z lyotropní řady plyne, že ionty Na^+ přitahují velké množství dipólů vody a mají tedy větší solvatační obal než Ca^{2+} . Kationy Ca^{2+} zvyšují iontovou sílu (větší stínění) více než Na^+ a tlumí tak expanzi klubka do roztoku, neboť snižuje repulzi karboxylových skupin na řetězci HA.

Z Hofmeisterovy řady také vyplývá, že hydratovanější Na^+ se hůř dostává do klubka HA v roztoku (má vyšší hodnoty hydratační entalpie ΔH). Intenzita emise v přítomnosti CaCl_2 je vyšší než v ostatních solích, protože má slabší hydratační obal a o to více brání tvorbě dimeru AO.

4.5 Studium asociace vodného roztoku SDS pomocí fluorescenční sondy AO

Do plastových zkumavek bylo ze zásobního roztoku napipetováno 300 μL vodného roztoku fluorescenčního barviva akridinové oranže, konečná koncentrace barviva ve zkumavce činila $1,7 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Do každé zkumavky obsahující sondu bylo přidáno určité množství tenzidu SDS ze zásobního roztoku o koncentraci $0,02 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ a $0,05 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ a doplněno injekční vodou na objem 5,3 mL. Byla vytvořena koncentrační řada SDS, první roztok neobsahoval tenzid.

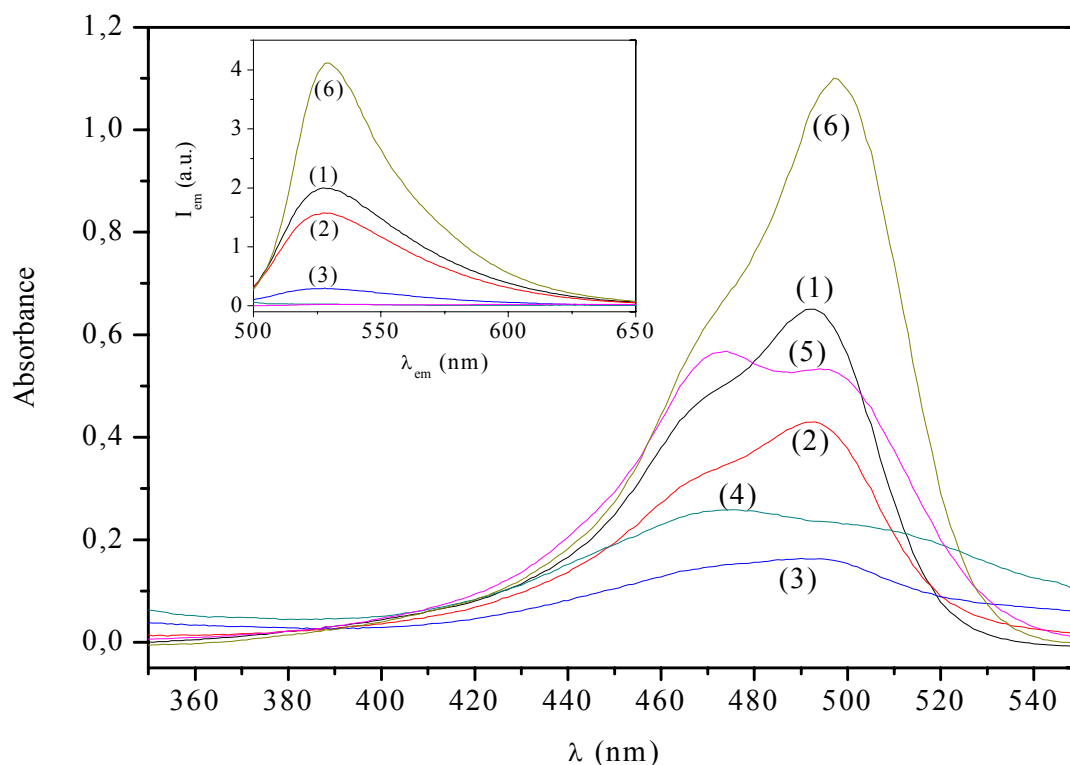
AO je hydrofilní sonda, která se vyskytuje u okraje polární části micely. Byl sledován vliv tenzidu na absorpční a fluorescenční spektra této sondy. Tenzid dodecyl síran sodný (SDS) tvoří ve vodě micelární agregáty, jehož hydrofilní částí je síranová skupina a hydrofobní jádro micely tvoří uhlovodíkový řetězec (dodecyl) (Obr. 34).



Obr. 34 Tenzid dodecylsírán sodný

Fluorescenční sonda AO je kationaktivní barvivo a tenzid SDS je nositelem záporného náboje, působí mezi nimi elektrostatická interakce. Protože se jedná o micelární prostředí, hydrofobní interakce zde hrají také roli.

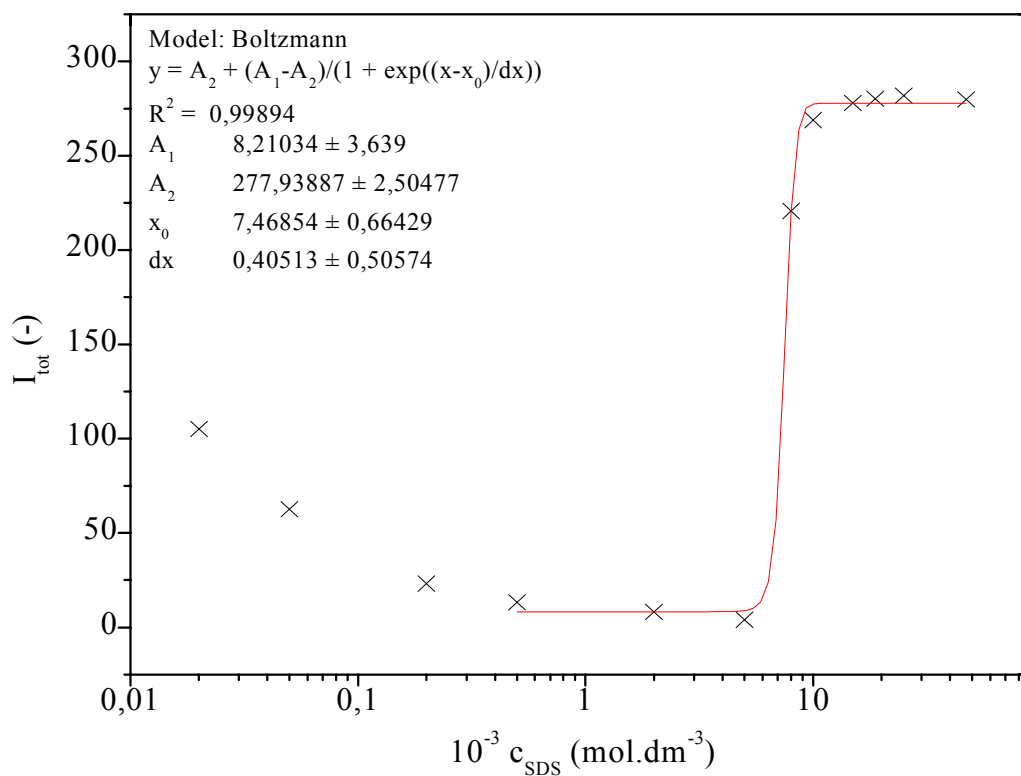
Z absorpčního spektra (Obr. 35) můžeme vyčíst, že dominantní pík AO ve vodném roztoku (graf křivka 1) se nachází při 441 nm. Pík přísluší AO v monomerní formě. Objevení nového píku ve spektru při 420 nm ukazuje na tvorbu komplexu barviva s tenzidem. Tento pík odpovídá absorpci AO v dimerní formě. Tvorba dimeru akridinové oranže je připisována agregaci typu H. U typu H-agregace dochází k hypsochromnímu posunu v absorpčním spektru vůči monomeru a dochází k účinnému zhášení fluorescence. Nový pík mizí při koncentraci tenzidu $8 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, jedná se o kritickou micelární koncentraci SDS.



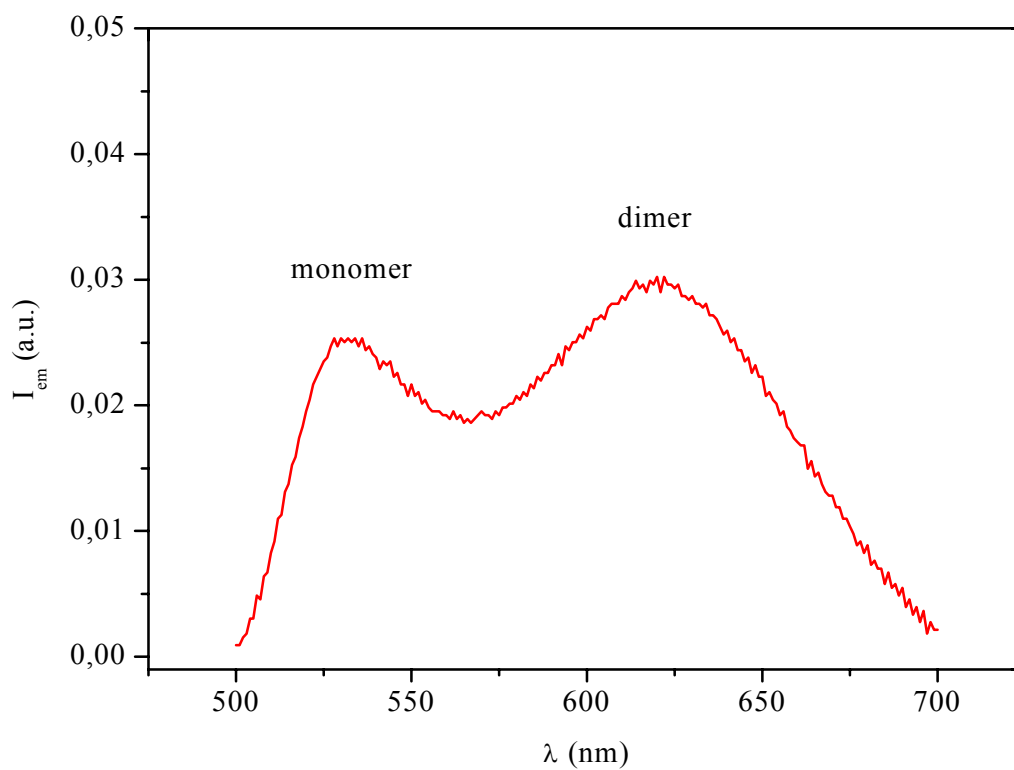
Obr. 35 Absorpční a fluorescenční spektra sondy AO ve vodném roztoku SDS o proměnné koncentraci: (1) 0, (2) $0,02$, (3) $0,2$, (4) 2 , (5) 5 a (6) $8 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$

Na fluorescenčním spektru sondy vidíme pokles intenzity emise, který byl způsoben agregací monomerů AO na dimery pod kritickou micelární koncentrací SDS. Dimery nefluoreskují, proto docházelo ke zhášení fluorescence a to už při prvním přidavku povrchově aktivní látky (Obr. 36). Pokles intenzity emise byl pozorován do koncentrace tenzidu $5 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Za touto koncentrací došlo k prudkému nárůstu intenzity emise, což odpovídá rozmezí koncentrací, kde dochází u SDS k tvorbě micel (při CMC). Pravděpodobně došlo k přerozdělení molekul AO do monomerní formy, což způsobilo ostrý nárůst intenzity emise. Nadmolekulární útvary zřejmě umožnily iontovou interakci mezi sondou a micelárním povrchem, aniž by docházelo k tvorbě dimeru. Nad CMC se intenzita emise ustálila na konstantní hodnotě.

Podle rutinního vyhodnocení (Obr. 28) bylo z Boltzmanovy rovnice určeno (Obr. 36), že CMC tenzidu SDS je $7,47 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ (inflexní bod), 1. zlom nastal při koncentraci $6,65 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, 2. zlom (stav nasycení) se objevil při koncentraci $8,89 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Tabulková hodnota CMC tenzidu SDS činí $8,2 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. CMC tenzidu byla zvolena v inflexním bodě, neboť tato hodnota je správnější (porovnáním s tabulkovou hodnotou).



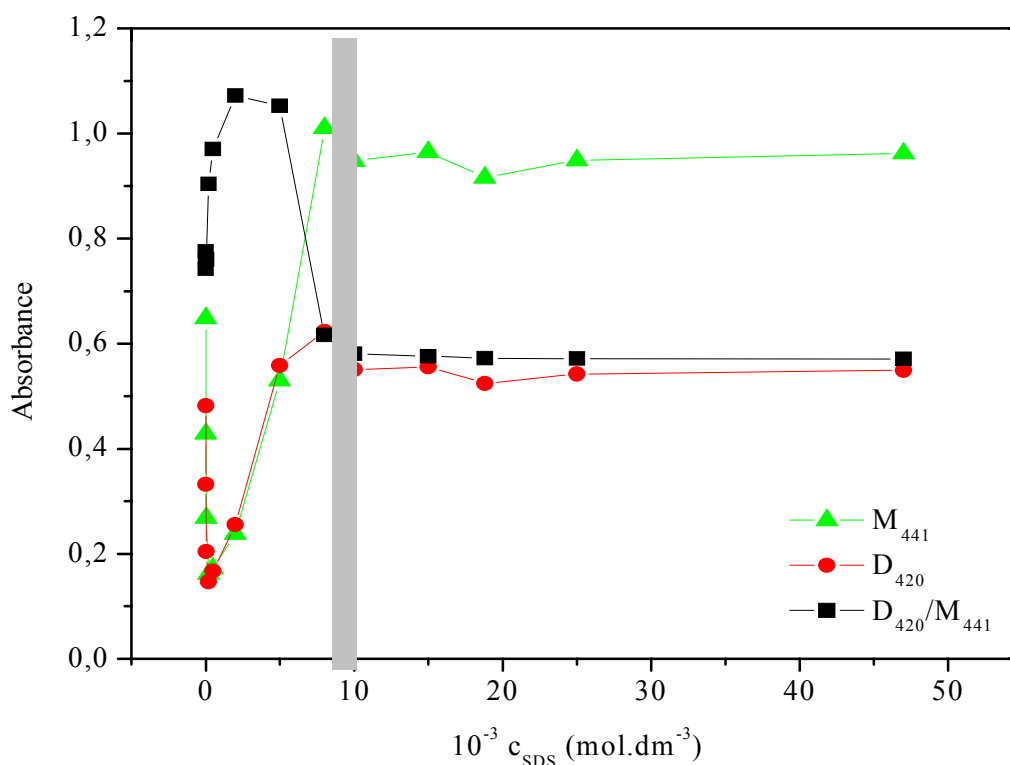
Obr. 36 Graf závislosti plochy pod křivkou emisního záření na koncentraci tenzidu SDS



Obr. 37 Fluorescenční spektrum AO ve vodném roztoku $5 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ tenzidu SDS

Ve fluorescenčním spektru AO se kromě dominantního píku monomerní formy barviva při 528 nm objevil nový pík AO v dimerní formě při 625 nm (Obr. 37). Tento pík byl zaznamenán v roztoku obsahující $5 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ tenzid SDS. Intenzita dimeru byla velmi malá.

Absorbance monomerní formy barviva AO ve vodném roztoku bez SDS byla vyšší než absorbance dimerní formy AO (Obr. 38). Do koncentrace $0,2 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ absorbance monomeru i dimeru klesala (tvorba komplexu AO-SDS) a poté vzrostla do CMC. Došlo k nárůstu absorpčního maxima dimeru. Za CMC tenzidu (asi $8 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$) se absorbance ustálila na konstantní hodnotě. Došlo k značnému oslabení píku dimeru, převažoval pík monomerní formy barviva.



Obr. 38 Závislost absorbance na rostoucí koncentraci vodného roztoku tenzidu SDS s konstantní koncentrací sondy AO, šedý svislý sloupec označuje oblast CMC tenzidu

4.6 Vliv polaroty prostředí na intenzitu fluorescence barviva 4-Di-2-ASP

Do plastových zkumavek bylo ze zásobního roztoku napipetováno 300 μL vodného roztoku fluorescenčního barviva 4-Di-2-ASP, konečná koncentrace barviva ve zkumavce činila $1,13 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Za účelem zjistit vliv polaroty na intenzitu a polohu emisního píku byla vybrána dvě organická rozpouštědla. Rozpouštědla byla smíchána s injekční vodou v různém objemovém poměru.

Polarita roztoku je charakterizována fyzikální aditivní veličinou relativní permitivitou. Pro relativní permitivitu směsi platí:

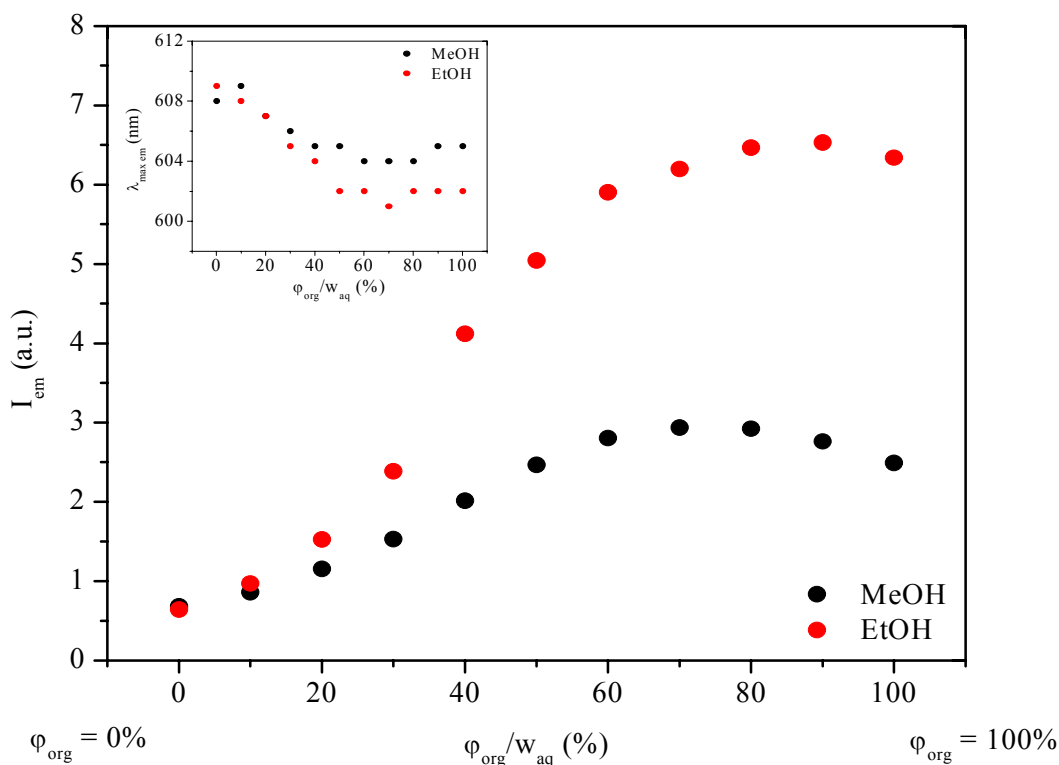
$$\varepsilon_{r,AB} = \varepsilon_{r,A} \cdot \mu_A + \varepsilon_{r,B} \cdot \mu_B,$$

kde $\varepsilon_{r,AB}$ je relativní permitivita směsi, $\varepsilon_{r,A}$ relativní permitivita rozpouštědla A, $\varepsilon_{r,B}$ relativní permitivita rozpouštědla B, μ_A molární zlomek rozpouštědla A ve směsi, μ_B molární zlomek rozpouštědla B ve směsi.

rozpuštědlo	ε_r (při 25°C)
voda	78,59
MeOH	32,70
EtOH	24,55

Z tabulky plyne, že nejvíce polárním rozpouštědlem je voda, nejméně EtOH.

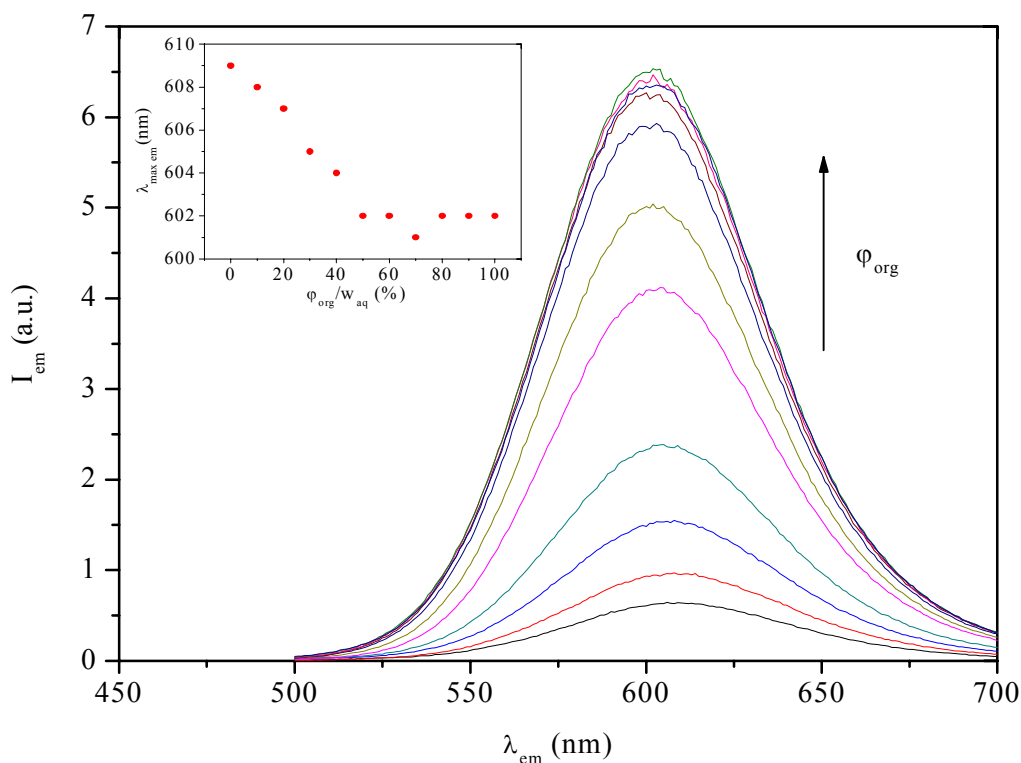
S rostoucí relativní permitivitou prostředí a tedy s rostoucí polaritou dochází ke zhasení intenzity emitovaného záření a k bathochromnímu posunu emisního maxima (Obr. 39). Směs organického rozpouštědla MeOH/voda má vyšší relativní permitivitu než směs EtOH/voda. Z toho vyplývá, že MeOH je více polárním rozpouštědlem než EtOH. Proto u směsi MeOH/voda je intenzita fluorescence zhasena více než u směsi EtOH/voda. To mohlo být způsobeno snížením doby života excitovaného stavu.



Obr. 39 Závislost intenzity emise sondy 4-Di-2-ASP na měnícím se podílu objemových zlomků organické a vodné fáze, zleva doprava roste objemový zlomek organického rozpouštědla, objem vody se zmenšuje, v příloze závislost posunu vlnové délky emise fluorescence na podílu objemových zlomků organické a vodné fáze

Se snižujícím se obsahem organického rozpouštědla se narůstající polarita prostředí kolem sondy projevila i posunem vlnové délky emisního maxima k nižším energiím (Obr. 39 příloha). Emise fluorescence sondy 4-Di-2-ASP v MeOH o $\varphi_{\text{org}} = 100\%$ vykazovala posun o 3 nm vůči fluoroforu v EtOH o $\varphi_{\text{org}} = 100\%$. Znamená to, že větší posun emisního maxima byl pozorován u směsi MeOH/voda než EtOH/voda.

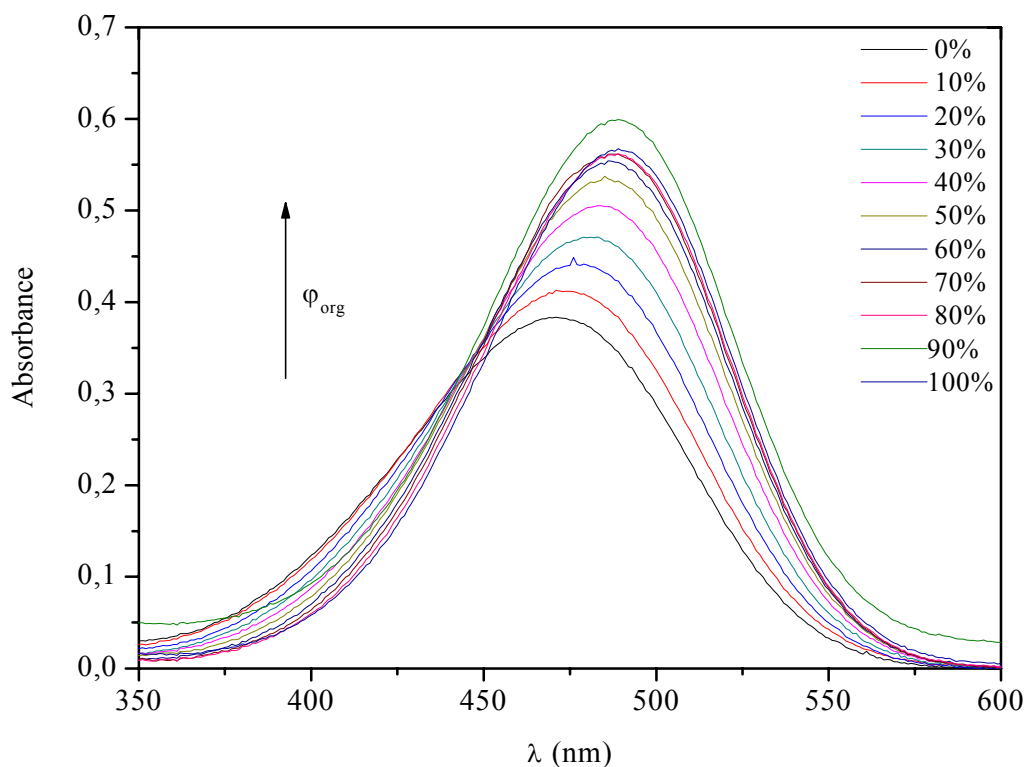
Obr. 40 ukazuje posun emisního maxima v prostředí EtOH o 7 nm ke kratším vlnovým délkám s rostoucím objemovým zlomkem EtOH.



Obr. 40 Posun hlavního emisního maxima fluorescence 4-Di-2-ASP v EtOH k nižším vlnovým délkám

V absorpčních spektrech sondy v prostředí MeOH došlo k posunu absorpčního maxima k větším vlnovým délkám s rostoucím objemovým zlomkem organického rozpouštědla (Obr. 41). Při 445 nm se v grafu objevil isosbestický bod.

Dochází k tomu, že látka, která má určité spektrum, se mění v průběhu na jinou látku s jiným spektrem. Obě spektra látek se překrývají. Všechna spektra pro různé poměry těchto látek se při celkové konstantní koncentraci kříží. Je to způsobeno tím, že při vlnové délce 445 nm mají stejný extinkční koeficient. Průsečík spekter se nazývá isosbestický bod.

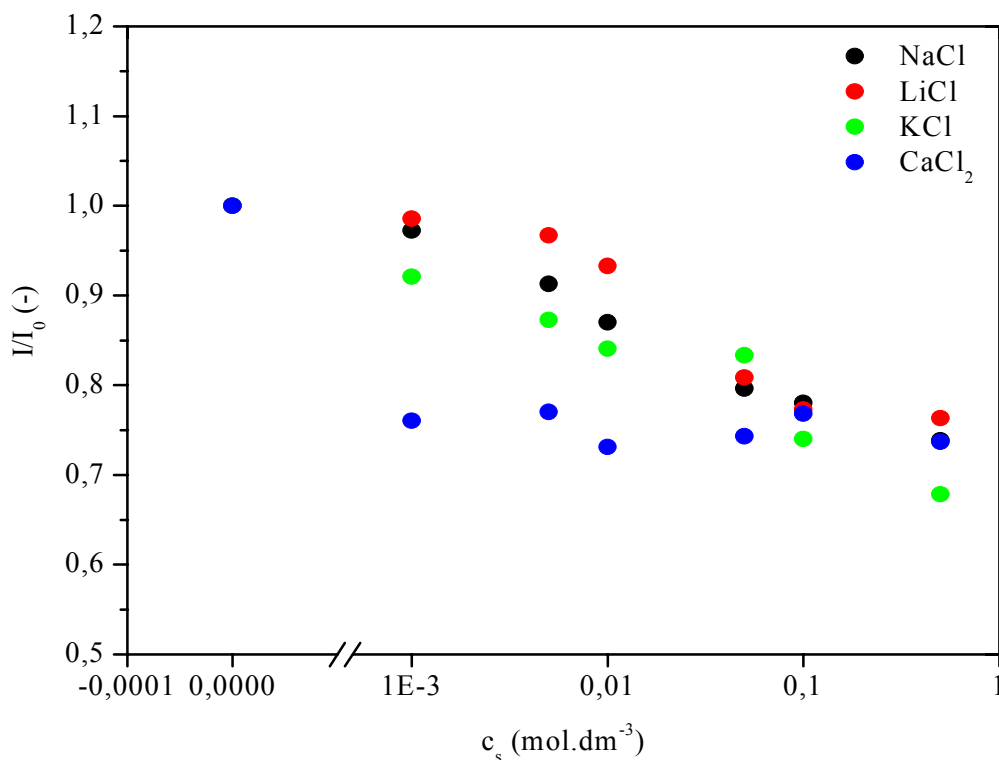


Obr. 41 Závislost absorbance na vlnové délce v prostředí MeOH

4.7 Vliv iontové síly na intenzitu fluorescence 4-Di-2-ASP ve vodném roztoku hyaluronanu

Do plastových zkumavek bylo ze zásobního roztoku napipetováno 300 μL vodného roztoku fluorescenčního barviva 4-Di-2-ASP, konečná koncentrace barviva činila $1,13 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Do každé zkumavky byl přidán hyaluronan o $M_w = 106\,000 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$, výsledná koncentrace hyaluronanu činila $0,94 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$. Nakonec bylo přidáno určité množství roztoku chloridu sodného, lithného, draselného nebo vápenatého a roztoky byly doplněny injekční vodou na objem 5,3 mL. Byly vytvořeny 4 koncentrační řady solí o různé velké iontové síle.

Obr. 42 ukazuje pokles relativní intenzity emise sondy 4-Di-2-ASP s rostoucí koncentrací solí, dochází ke zhášení emitovaného záření. Vodný roztok se sondou má nejvyšší intenzitu emise. Už první přidavek soli způsobí pokles intenzity. V případě LiCl je pokles intenzity nejmenší a to asi o 1%. Naopak v případě CaCl_2 došlo k poklesu o 24%. Srovnáním grafu (Obr. 33) s grafem (Obr. 42) dojdeme k závěru, že v případě AO v solích CaCl_2 způsobila největší nárůst intenzity emise, kdežto v případě 4-Di-2-ASP emise zhášela nejvíce. Pravděpodobně je to dáno charakterem sond, AO je kationtové barvivo, 4-Di-2-ASP má amfifilní charakter.

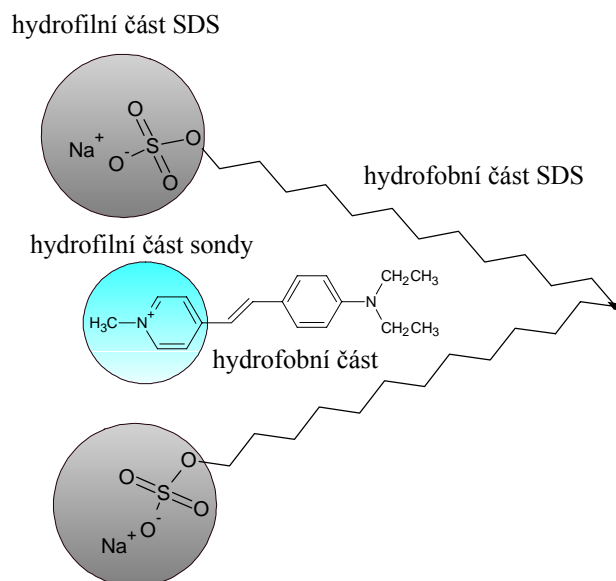


Obr. 42 Účinek iontové síly roztoků solí na intenzitu emise normalizovanou k intenzitě při nulové koncentraci vodného roztoku soli, pravá část osy x je v logaritmickém měřítku

4.8 Studium asociace vodného roztoku SDS pomocí fluorescenční sondy 4-Di-2-ASP

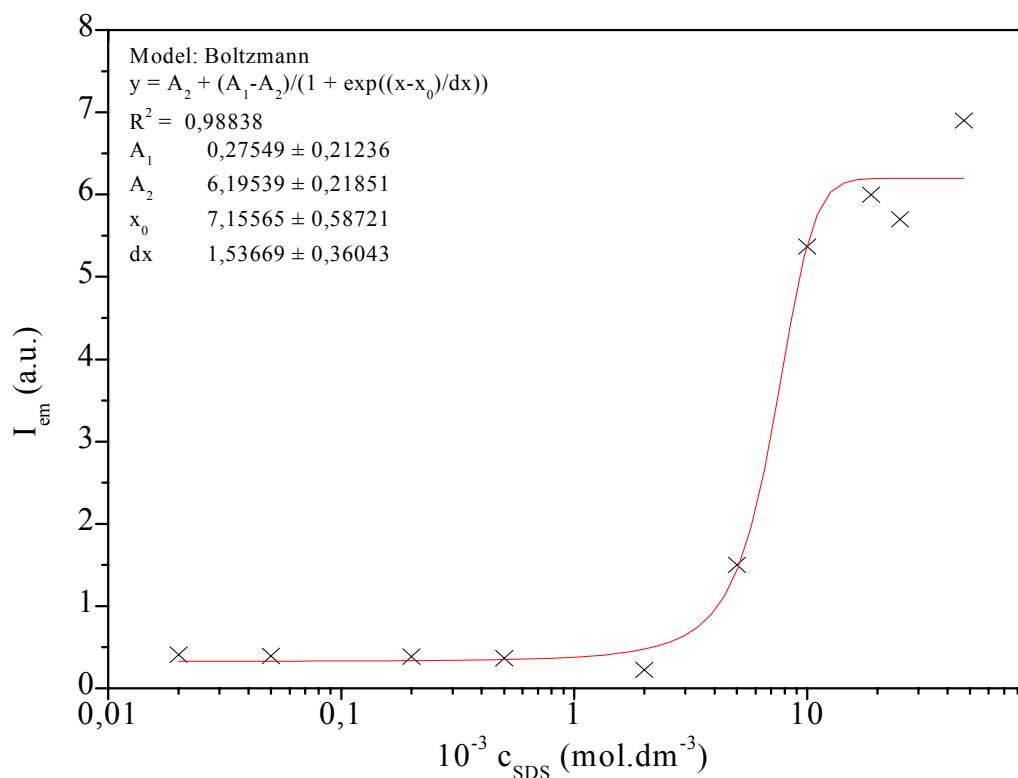
Do plastových zkumavek bylo ze zásobního roztoku napipetováno 300 μL vodného roztoku fluorescenčního barviva 4-Di-2-ASP, konečná koncentrace barviva ve zkumavce činila $1,13 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Do každé zkumavky obsahující sondu bylo přidáno určité množství tenzidu SDS ze zásobního roztoku o koncentraci $0,02 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ a $0,05 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ a doplněno injekční vodou na objem 5,3 ml. Byla vytvořena koncentrační řada SDS, první roztok byl bez tenzidu.

Sonda 4-Di-2-ASP je amfifilní, skládá se z části hydrofobní a části hydrofilní (Obr. 43). S tenzidem SDS interaguje hydrofobně a to tak, že se svou hydrofobní částí začlení do nepolárního jádra micely SDS.



Obr. 43 Začlenění amfifilní sondy 4-Di-2-ASP do hydrofobního jádra micely SDS

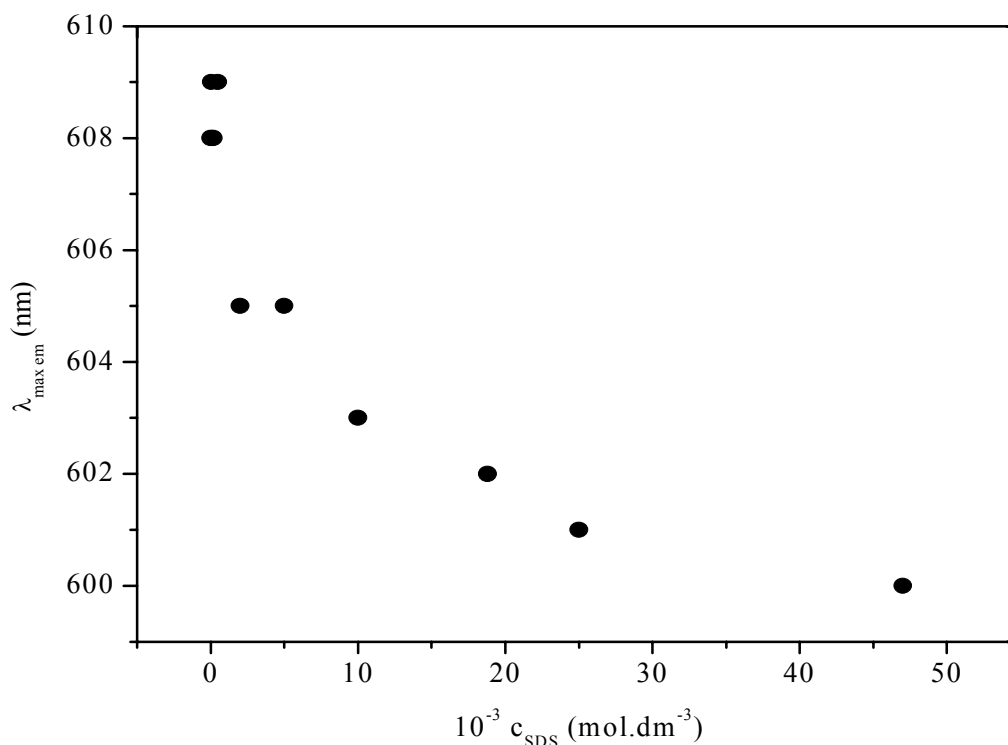
Na obrázku (Obr. 44) je vidět pokles intenzity emise (zhášení) s rostoucí koncentrací tenzidu. Pokles do koncentrace SDS $2 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ je způsoben hydrofobní interakcí sondy s molekulami SDS. Po dosažení CMC tenzidu, kdy dochází ke vzniku micel, se sonda začlení svou hydrofobní částí do nepolárního jádra micely. Za CMC dojde ke stavu nasycení sondou, intenzita fluorescence se ustaví na konstantní hodnotě.



Obr. 44 Graf závislosti relativní intenzity emise na koncentraci tenzidu SDS, osa x je v logaritmickém měřítku

Po proložení bodů tzv. S křivkou byla z Boltzmanovy rovnice určena CMC tenzidu SDS. Její hodnota činí $7,16 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ (inflexní bod), 1. zlom nastal při koncentraci $4,08 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, 2. zlom (stav nasycení) se objevil při koncentraci $10,23 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Tabulková hodnota CMC tenzidu SDS činí $8,2 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. CMC tenzidu SDS byla zvolena v inflexním bodě, neboť tato hodnota je správnější (viz tabulková hodnota).

Nejen že došlo ke změně v relativních intenzitách emise, ale také k posunu emisního maxima ke kratším vlnovým délkám asi o 8 nm (Obr. 45). Vizualně byla pozorována změna zbarvení roztoků ve zkumavkách.

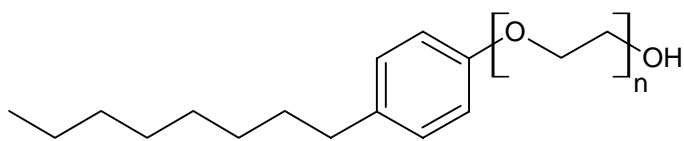


Obr. 45 Graf závislosti emisního maxima na koncentraci tenzidiu SDS, posun emisního maxima fluorescence ke kratším vlnovým délkám

4.9 Vliv neutrálního tenzidu TX-100 na fluorescenční vlastnosti sondy 4-Di-2-ASP

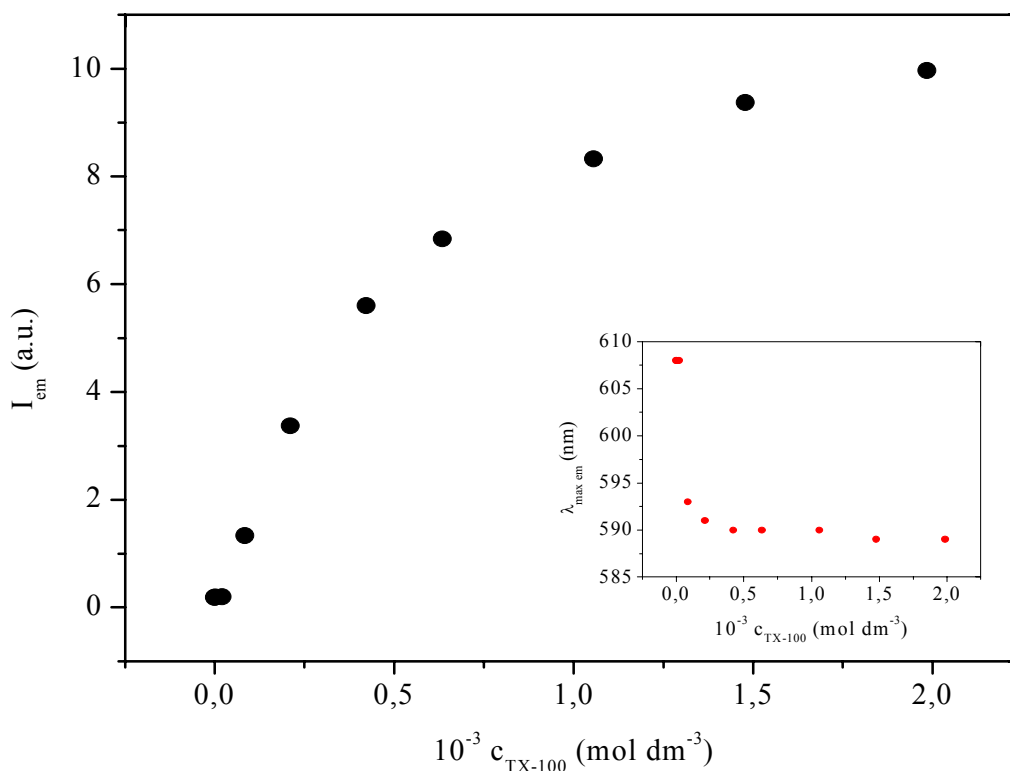
Do plastových zkumavek bylo ze zásobního roztoku napipetováno 300 μL vodného roztoku fluorescenčního barviva 4-Di-2-ASP, konečná koncentrace barviva ve zkumavce činila $1,13 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Do každé zkumavky obsahující sondu bylo přidáno určité množství neutrálního tenzidu TX-100 ze zásobního roztoku o koncentraci $2,11 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ a doplněno injekční vodou na objem 5,3 mL. Byla vytvořena koncentrační řada tenzidu TX-100, první roztok neobsahoval tenzid.

Sonda 4-Di-2-ASP interaguje (stejně jako v případě SDS) s tenzidem TX-100 hydrofobně.



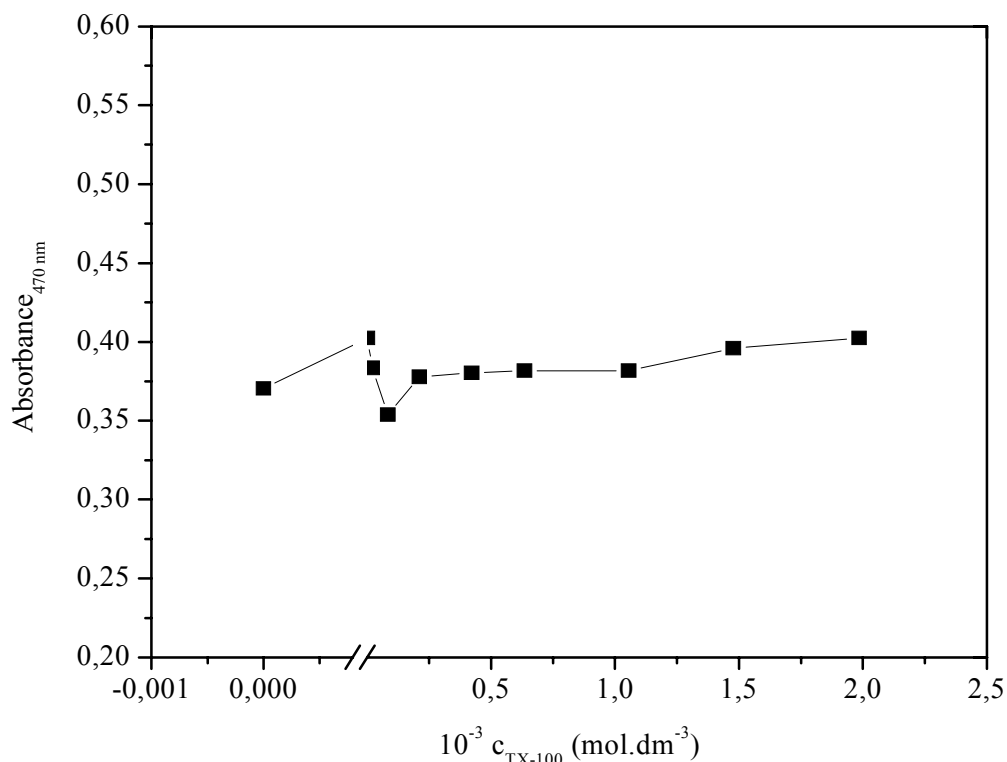
Obr. 46 Schéma neutrálního tenzidu TX-100

Fluorescenční měření (Obr. 47) ukázalo nárůst relativní intenzity emise s rostoucí koncentrací tenzidu TX-100. Sonda s tenzidem interagovala hydrofobně, shlukovala se kolem molekul tenzidu. Po dosažení CMC TX-100 došlo k vytvoření micel, do kterých se sonda se svou hydrofobní částí začlenila, hydrofilní část zůstala v polárním prostředí. Intenzita fluorescence se při CMC mění skokem. Za CMC se micely nasýtily molekulami sondy. Kromě změny v intenzitě emisního záření byl pozorován posun emisního maxima ke kratším vlnovým délkám (k vyšším energiím) o 19 nm (Obr. 47 příloha). Srovnáme-li toto měření s měřením sondy v SDS (Obr. 44, Obr. 45), dojdeme k závěru, že sonda v SDS dosáhla nižších hodnot emisního záření a došlo k menšímu posunu emisního maxima k nižším vlnovým délkám. Pravděpodobně je tenzid TX-100 méně polární než SDS a sonda 4-Di-2-ASP tedy více „svítala“ v neutrálním tenzidu.



Obr. 47 Graf závislosti relativní intenzity emise na koncentraci neutrálního tenzidu TX-100, v příloze graf závislosti vlnové délky emisního maxima na koncentraci tenzidu

Absorpční měření ukázalo (Obr. 48), že se absorbance sondy s rostoucí koncentrací tenzidu měnila minimálně. První přidávek tenzidu způsobil nepatrný nárůst absorbance.



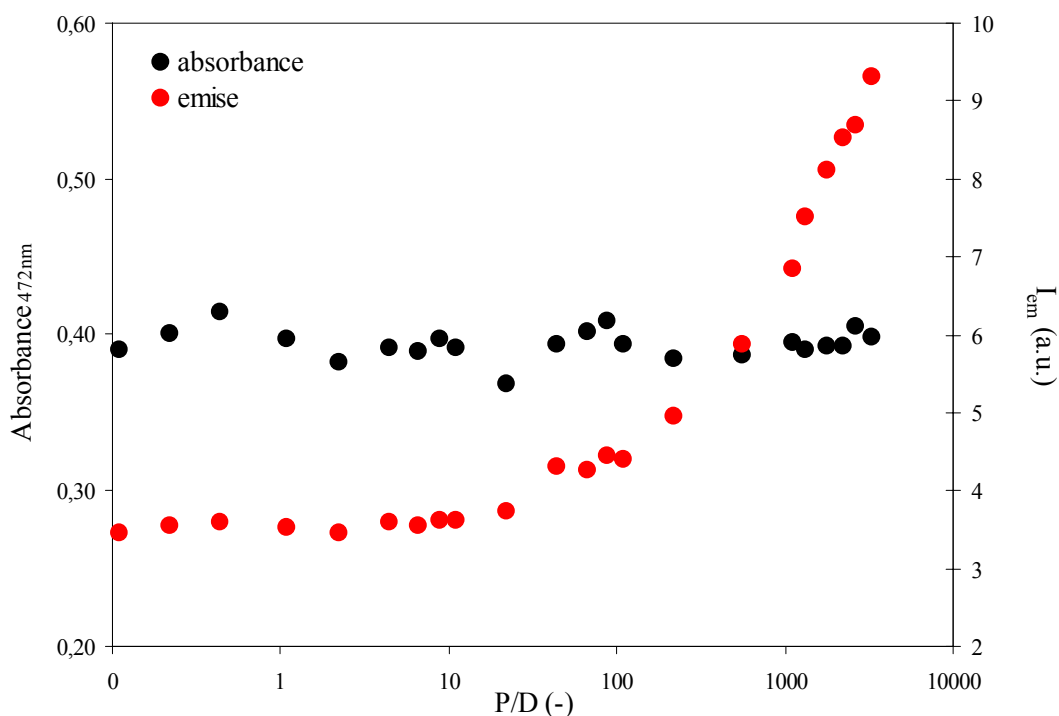
Obr. 48 Závislost absorpčního maxima při 470 nm na rostoucí koncentraci tenzidu TX-100

4.10 Interakce amfifilní sondy 4-Di-2-ASP s polyelektrolytem hyaluronanu ve vodném roztoku

Do plastových zkumavek bylo ze zásobního roztoku napipetováno 300 μL vodného roztoku fluorescenčního barviva 4-Di-2-ASP, konečná koncentrace barviva ve zkumavce činila $1,13 \cdot 10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$. Do každé zkumavky obsahující sondu bylo přidáno určité množství vodného roztoku hyaluronanu ze zásobního roztoku o koncentraci $15 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$ a doplněno injekční vodou na objem 5,3 mL. Byla vytvořena koncentrační řada hyaluronanu o 23 vzorcích od koncentrace $0 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$ po koncentraci $15 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$.

Amfifilní sonda 4-Di-2-ASP interaguje s hyaluronanem hydrofobně.

Změna v absorbancích sondy s rostoucím poměrem P/D byla minimální (Obr. 49), ale v případě fluorescenčního měření došlo k nárůstu relativní intenzity emise s rostoucím poměrem P/D. První přidávky HA nezpůsobily změnu v intenzitě emisního záření, ale po dosažení koncentrace $1 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$ došlo k nárůstu. Možná je to dáno tím, že intenzita emise sondy 4-Di-2-ASP je funkcí viskozity měřeného roztoku.



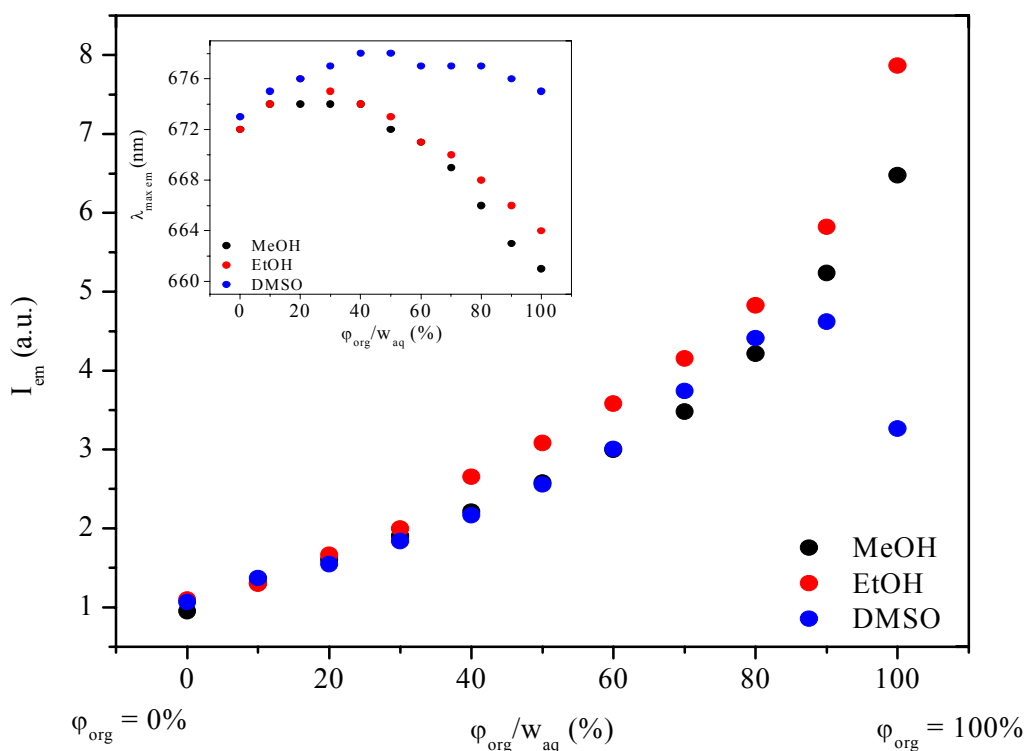
Obr. 49 Závislost absorbance při 472 nm a intenzity emise sondy 4-Di-2-ASP na podílu koncentrací vazebných míst hyaluronanu a sondy. Zleva doprava roste koncentrace vazebných míst hyaluronanu, koncentrace fluorescenční sondy je konstantní, osa x je v logaritmickém měřítku

4.11 Vliv polaroty prostředí na intenzitu fluorescence barviva NB

Do plastových zkumavek bylo ze zásobního roztoku sondy NB v MeOH napipetováno 100 μL , konečná koncentrace této sondy ve zkumavce byla $4,14 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Rozpouštědlo bylo odpařeno za atmosférického tlaku a poté bylo přidáno určité množství rozpouštědla MeOH, EtOH nebo DMSO a roztoky byly doplněny injekční vodou na objem 5,0 mL. Byly vytvořeny 3 koncentrační řady 3 rozpouštědel, první roztoky obsahaly jen vodný roztok sondy.

V grafu (Obr. 50) je pozorován exponenciální pokles intenzity emise se snižujícím se objemovým zlomkem organického rozpouštědla. Změna objemu vody ve směsi org. rozpouštědlo/voda od 0% ke 100% vody způsobila zvýšení polaroty prostředí, čímž se podpořil děj zhášení emitovaného záření. To mohlo být způsobeno snížením doby života excitovaného stavu.

Se snižujícím se objemovým zlomkem organického rozpouštědla (Obr. 50 příloha) se narůstající polarita okolního prostředí kolem sondy projevila i posunem emisního maxima k vyšším vlnovým délkám. Emisní maximum sondy v MeOH o $\varphi_{\text{org}} = 100\%$ oproti roztoku bez rozpouštědla o $\varphi_{\text{org}} = 0\%$ se posunulo o 11 nm, v EtOH o 8 nm a v DMSO o 2 nm. Největší posun maxima byl zaznamenán v MeOH.



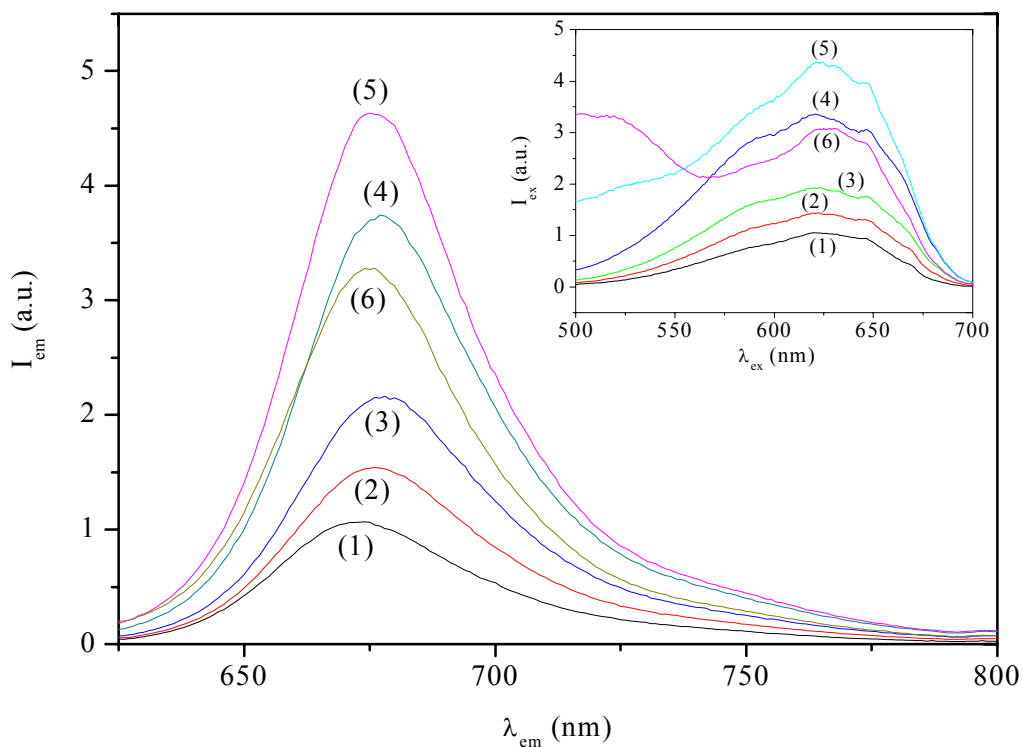
Obr. 50 Závislost intenzity emise sondy NB na měnícím se podílu objemových zlomků organické a vodné fáze

Zajímavostí je, že s klesající polaritou roztoků (při $\phi_{\text{org}} = 90\%$ a 100%) došlo ke změně zbarvení (Příloha 3). Změna zbarvení těchto 2 roztoků se projevila ve fluorescenčním a absorpčním spektru (Obr. 51, Obr. 52). Můžeme to vysvětlit tím, že v DMSO o $\phi_{\text{org}} = 100\%$ (zcela bezvodé prostředí) se nemohou vytvořit vodíkové můstky, což způsobí změnu zbarvení roztoku a posun fluorescenčních a absorpčních maxim.

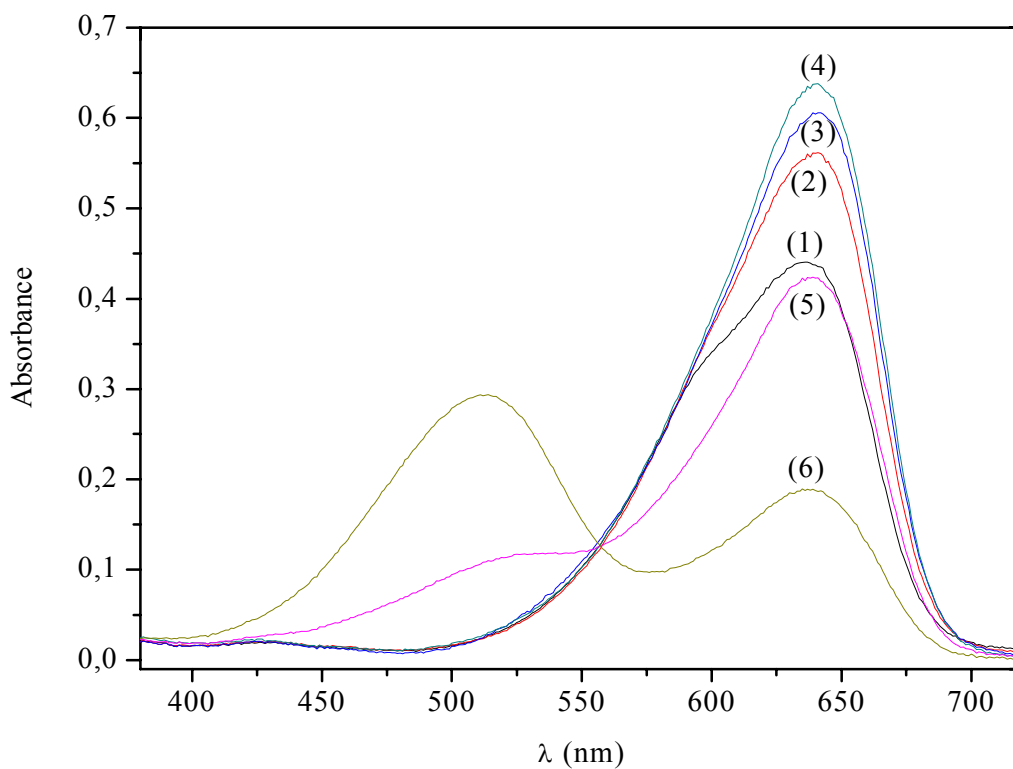
V excitačním spektru 100% DMSO se objevil kromě dominantního píku při 628 nm nový pík při 492 nm (Obr. 51).

V absorpčním spektru se nachází dominantní pík v 638 nm, u 90% roztoku DMSO se začíná objevovat nový pík při 510 nm, u 100% roztoku DMSO dojde k jeho nárůstu. V grafu se objevil isosbestický bod při 555 nm.

Dochází k tomu, že látka, která má určité spektrum, se mění v průběhu na jinou látku, která má jiné spektrum. Obě spektra látek se překrývají. Všechna spektra pro různé poměry těchto látek se při celkové konstantní koncentraci kříží. Je to způsobeno tím, že při vlnové délce 555 nm mají stejný extinkční koeficient. Průsečík spekter se nazývá isosbestický bod.



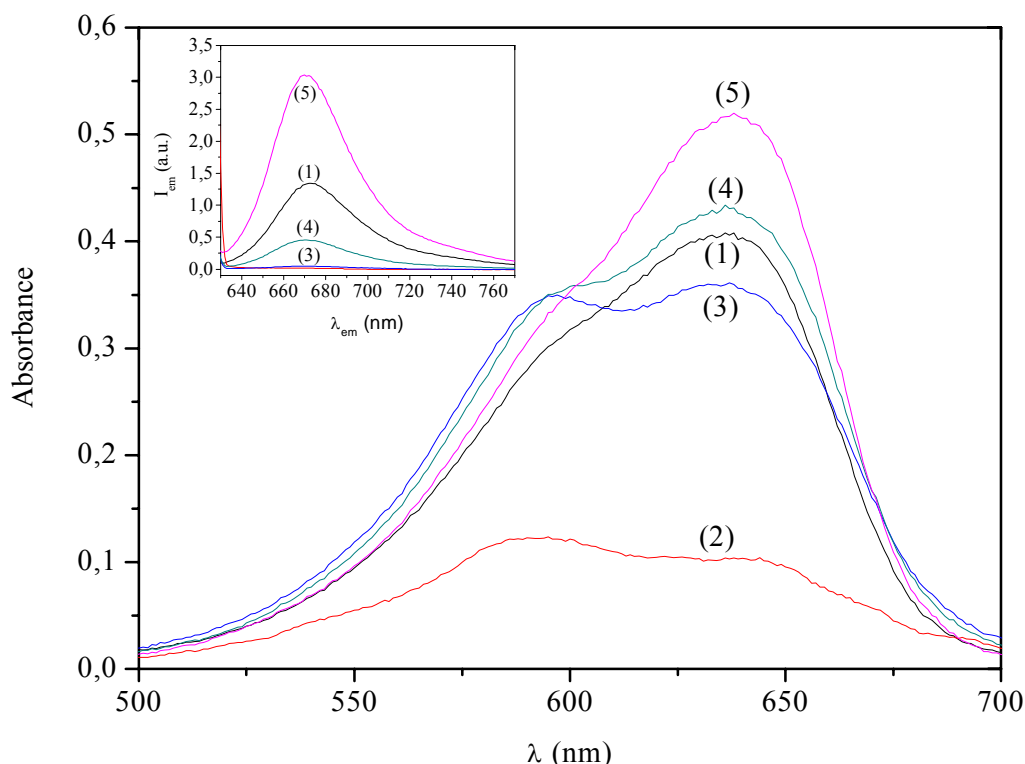
Obr. 51 Emisní a excitační spektra sondy NB v DMSO s proměnným objemovým zlomkem: (1) 0, (2) 20, (3) 40, (4) 70, (5) 90 a (6) 100%



Obr. 52 Absorpční spektra sondy NB v DMSO s proměnným objemovým zlomkem: (1) 0, (2) 20, (3) 40, (4) 70, (5) 90 a (6) 100%, v 555 nm se objevil isosbestický bod

4.12 Studium asociace vodného roztoku SDS pomocí fluorescenční sondy NB

Do plastových zkumavek bylo ze zásobního roztoku sondy NB v MeOH napipetováno 100 μL , konečná koncentrace této sondy ve zkumavce byla $4,14 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Rozpouštědlo bylo odpařeno za atmosférického tlaku a poté bylo přidáno určité množství tenzidu SDS ze zásobního roztoku o koncentraci $0,02 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ a $0,05 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ a doplněno injekční vodou na objem 5,0 mL. Byla vytvořena koncentrační řada SDS, první roztok neobsahoval tenzid.



Obr. 53 Absorpční a emisní spektra sondy NB ve vodném roztoku SDS o proměnné koncentraci: (1) 0, (2) 5, (3) 6, (4) 7 a (5) $8 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$

Z obrázku (Obr. 53) můžeme vyčíst, že absorpční maximum sondy NB ve vodě (křivka 1) se nachází při 635 nm, toto maximum je posunuto do modré oblasti spektra k 590 nm v přítomnosti $5 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ tenzidu SDS (graf křivka 2). Objevení nového píku ve spektru ukazuje na tvorbu komplexu barviva s tenzidem. Stejná interakce vede k tvorbě dimeru barviva. Při vyšší koncentraci SDS ($6 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$) se objeví 2 absorpční píky, jeden při 595 nm a druhý při 635 nm. Nový pík při 595 nm je oslaben, když se koncentrace SDS zvýší na $7 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Naopak pík v 635 nm vzroste. Pík v 595 nm mizí při koncentraci SDS $8 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ (kritická micelární koncentrace, CMC_{SDS}). Pík v 590 nm má vyšší absorbanční než samotný vodný roztok barviva (křivka 1).

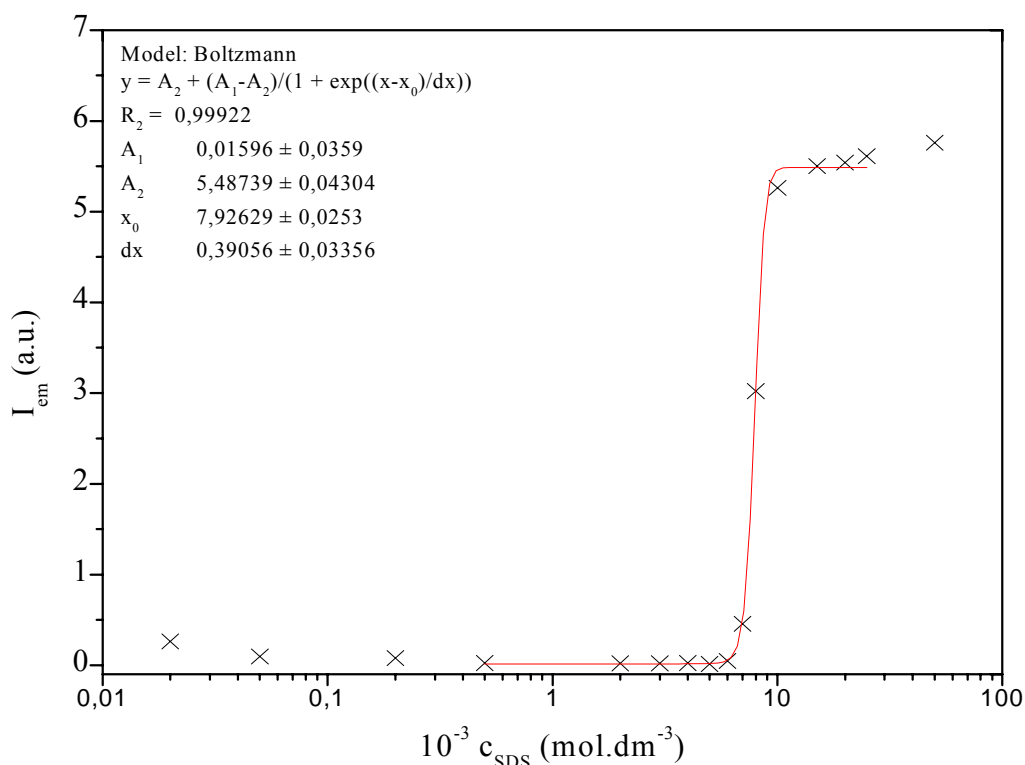
Fluorescenční spektra ukazují posun emisního maxima asi o 10 nm ke kratším vlnovým délkám oproti samotnému barvivu ve vodě (maximum při 673 nm) při koncentraci SDS menší

než jeho CMC. Intenzita emise postupně klesá. Při CMC tenzidu SDS dochází k posunu asi o 4 nm k vyšším vlnovým délkám, dochází k extrémnímu nárůstu intenzity emise.

Při koncentraci tenzidu SDS menší než CMC pokles intenzity emise ukazuje značné zhášení fluorescence. Zhášení fluorescence NB pod touto koncentrací je způsobeno tvorbou tenzid-barvivového iontového páru (kladně nabitě barvivo a záporně nabitě monomery tenzidu), který postupně asociuje na agregáty (Obr. 54).

S nárůstem koncentrace SDS intenzita emise prudce vzrůstá a dosahuje konstantní hodnoty za CMC_{SDS} . Nárůst intenzity emise za CMC může být vysvětlen tak, že všechny molekuly barviva jsou přerozděleny v micelách do monomerní formy a chráněny před protonovým přenosovým zhášením. Značný nárůst v intenzitě emise doprovázený posunem do modré oblasti spektra svědčí o pravděpodobném umístění sondy v nepolárním jádru micel s hydrofobní částí sondy vtěsnané do uhlovodíkového jádra micely. Intenzita emise NB ve vodě je mnohem nižší než intenzita emise v nepolárních rozpouštědlech (MeOH, EtOH), což potvrzuje začlenění sondy do nepolárního jádra micely.

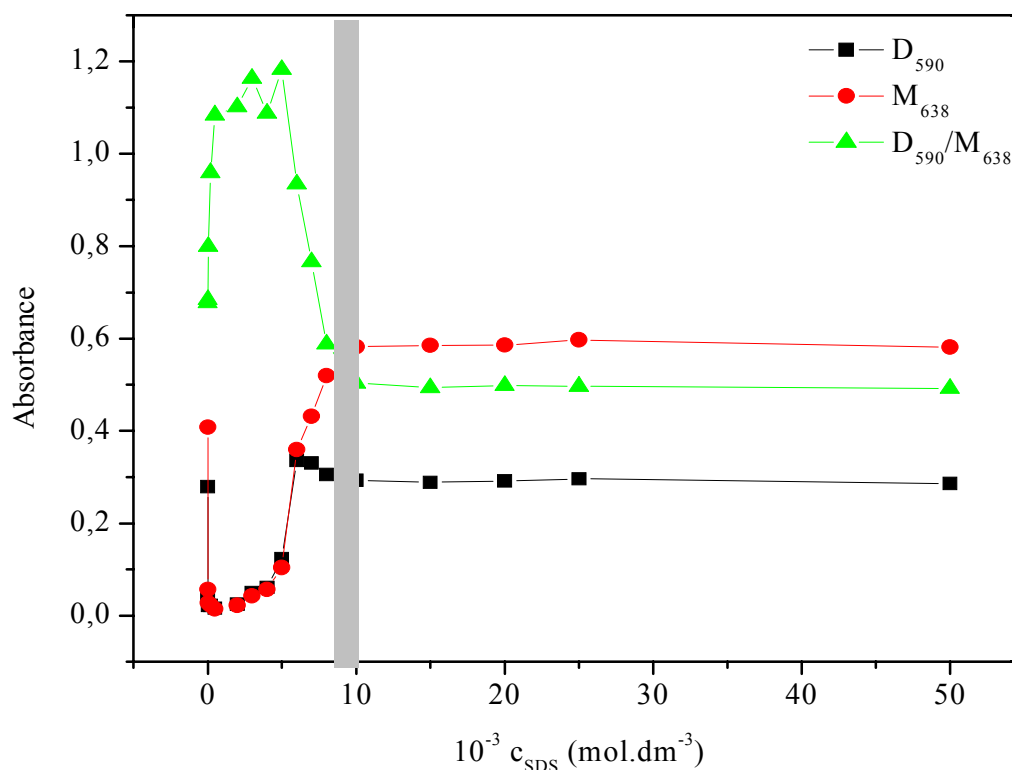
Z Boltzmanovy rovnice bylo určeno, že CMC tenzidu SDS činí $7,93 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ (inflexní bod), 1. zlom nastal při koncentraci $7,15 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, 2. zlom se objevil při koncentraci $8,71 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Tabulková hodnota CMC tenzidu SDS má hodnotu $8,2 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$.



Obr. 54 Průběh agregace povrchově aktivní látky SDS studovaný pomocí sondy NB

Absorbance monomerní formy barviva NB ve vodném roztoku bez SDS byla vyšší než absorbance dimerní formy AO (Obr. 55). Do koncentrace $0,5 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ absorbance monomeru i dimeru klesala (tvorba komplexu NB-SDS) a poté rostla až do CMC. Došlo

k nárůstu absorpčního maxima dimeru. Za CMC tenzidu (asi $8 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$) se absorbance ustálila na konstantní hodnotě. Došlo k značnému oslabení píku dimeru, převažoval pík monomerní formy barviva.



Obr. 55 Závislost absorbance monomeru a dimeru NB na koncentraci povrchově aktivní látky SDS, šedý svislý sloupec označuje oblast CMC tenzidu

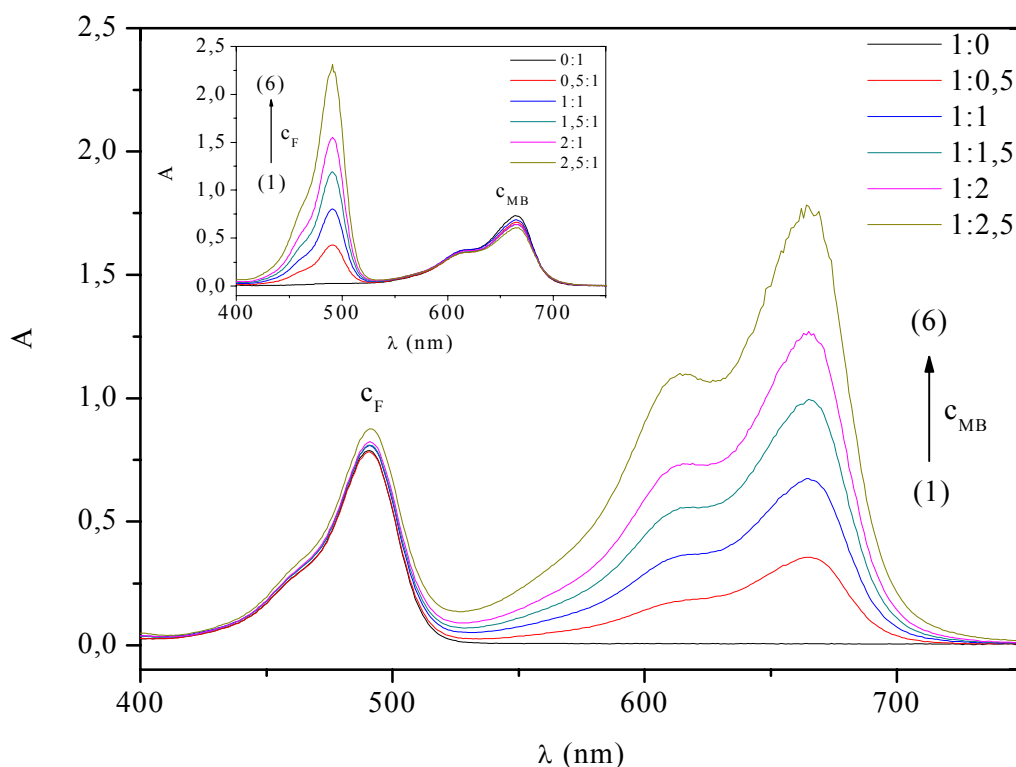
4.13 Spektroskopické studium interakce mezi methylenová modř-fluoresceinovým komplexem a aniontovým a kationtovým tenzidem

4.13.1 Tvorba komplexu mezi MB a F ve vodném roztoku

Do plastových zkumavek byla napipetována sonda fluorescein (o konečné koncentraci $1,0 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$) a sonda methylenová modř o proměnné koncentraci a roztok byl doplněn injekční vodou na objem 5 mL.

Sonda methylenová modř je kationaktivní barvivo, u kterého se ve směsi s aniontovým barvivem fluoresceinem předpokládá elektrostatická interakce. Ve vodném roztoku očekáváme tvorbu komplexu $[\text{MB}^{(+)}\text{-F}^{(-)}]^0$.

Na obrázku (Obr. 56) jsou ukázána absorpční spektra roztoku F obsahující proměnnou koncentraci MB. Roztok obsahující jen F ukázal absorpční maximum při 488 nm. Při prvním přidavku MB se objevil pík této sondy při 663 nm (pík monomeru barviva) a při 612 nm (pík dimeru barviva). Nebyla pozorována změna ve velikosti absorpce nebo posun absorpčního maxima, isobestický bod rovněž nebyl zpozorován. S rostoucí koncentrací MB rostla absorbance, absorbance F se měnila nepatrně. Vznik komplexu se nepodařilo prokázat.



Obr. 56 Absorpční spektra fluoresceinu ($1,0 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$) ve vodném roztoku obsahující proměnné množství methylenové modři: (1) 0, (2) 0,5, (3) 1,0, (4) 1,5, (5) 2,0 a (6) $3,0 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ a absorpční spektra methylenové modři ($1,0 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$) ve vodném roztoku obsahující proměnné množství fluoresceinu: (1) 0, (2) 0,5, (3) 1,0, (4) 1,5, (5) 2,0 a (6) $3,0 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$

4.13.2 Účinek tenzidů SDS a CTAC na absorpční spektra MB a F

Do plastových zkumavek byla napipetována sonda fluorescein, konečná koncentrace činila $1,0 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Dále bylo přidáno určité množství tenzidu SDS nebo CTAC a doplněno injekční vodou na objem 5 mL. Stejným způsobem byla připravena koncentrační řada SDS a CTAC se sondou methylenová modř.

Barva roztoku se sondou se změnila jen při přidavku tenzidu, který měl opačný náboj než molekula barviva (Příloha 4). V tomto případě tenzid ovlivňuje elektronová absorpční spektra barviv.

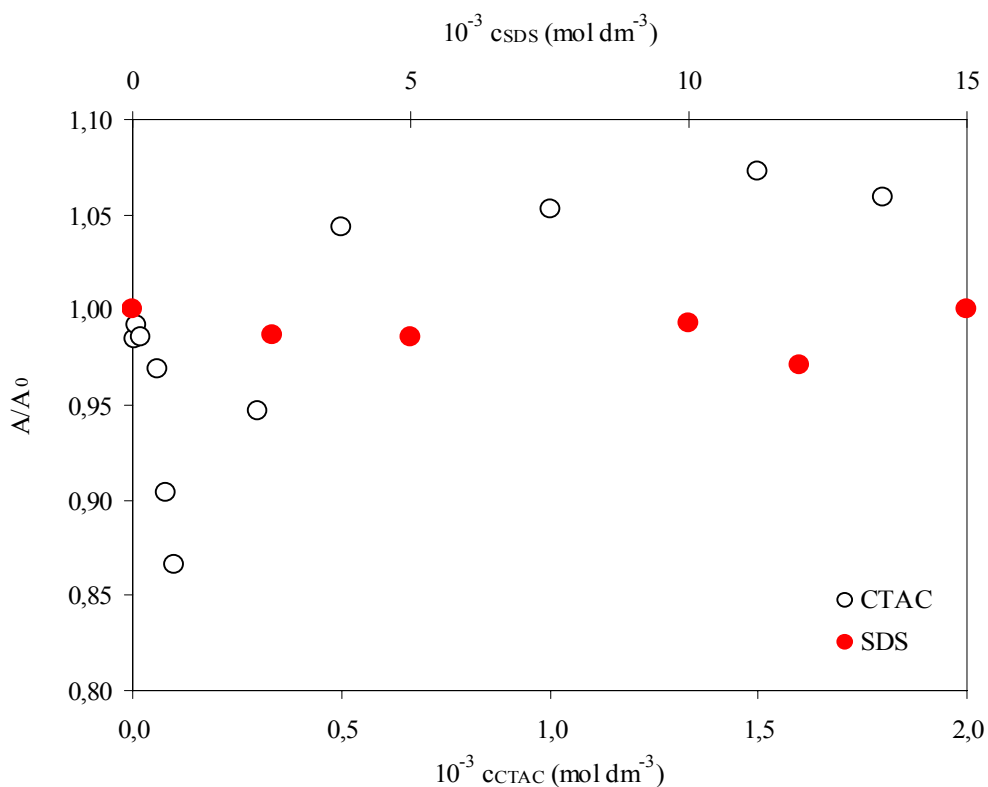
Obr. 57 a Obr. 58 ukazují změny v absorbancích F a MB při absorpčních maximech s přidavkem tenzidu SDS nebo CTAC.

Obr. 57 znázorňuje na počátku ostrý pokles absorbance s rostoucí koncentrací CTAC do koncentrace $0,1 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, poté dochází k nárůstu a od koncentrace $0,5 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ se absorbance ustálila na konstantní hodnotě. Aniontové barvivo F elektrostaticky interaguje s kationtovým tenzidem CTAC, barevná změna roztoků. Došlo k posunu absorpčního maxima k vyšším vlnovým délkám (červený posun) od 490 nm (samotná sonda ve vodě) k 501 nm. V případě F v SDS tento tenzid neměl na absorbanci F téměř žádný vliv, neboť obě tyto látky

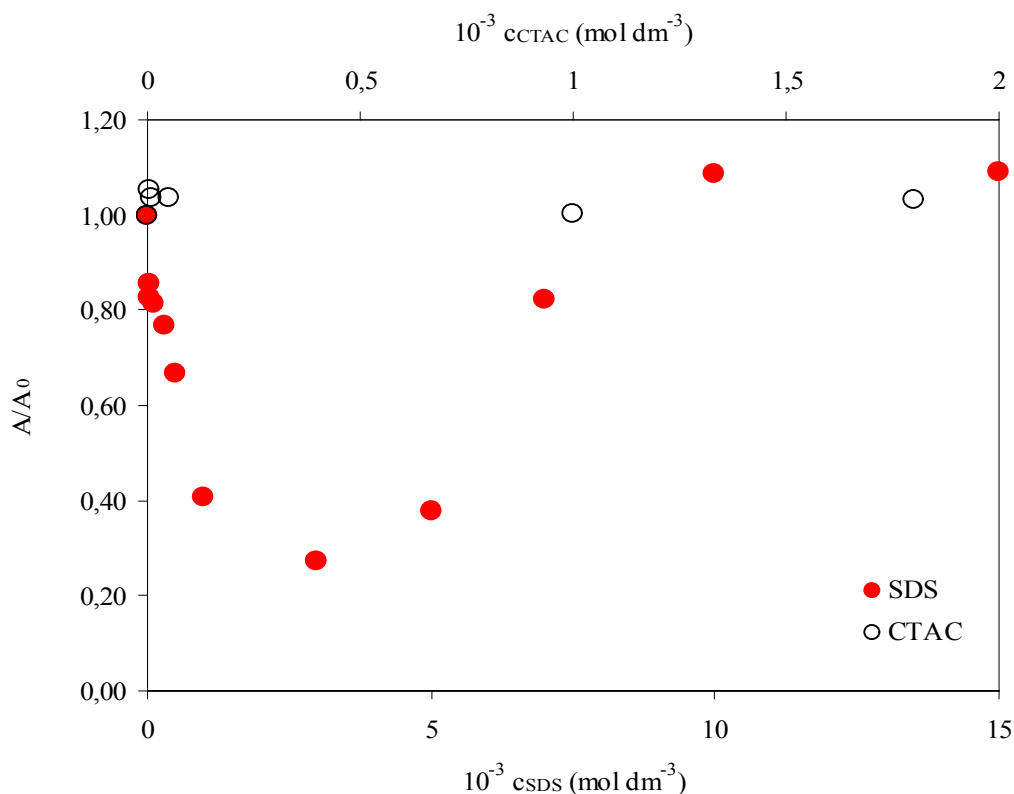
jsou nositelem záporného náboje a tudíž spolu neinteragují (nedošlo k barevné změně roztoků).

Obr. 58 ukazuje, že absorpce MB ostře klesá s rostoucí koncentrací SDS, dosahuje minima, pak postupně roste do koncentrace $10 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Absorpce MB nezávisela na koncentraci CTAC.

Když koncentrace tenzidu postupně roste, absorpce barviv s opačným nábojem zpočátku klesá a pak postupně roste. Při velmi nízké koncentraci tenzidu (daleko pod CMC) tvorba tenzid-barvivových agregátů se započne iontovými páry $(D^+ \bullet S^-)$ a $(D^- \bullet S^+)$ a pokračuje k tenzid-barvivovým agregátům, které jsou reprezentovány $(D^+ \bullet S^-)_n$ a $(D^- \bullet S^+)_n$. Těsně pod CMC se $(D^+ \bullet S^-)_n$ a $(D^- \bullet S^+)_n$ agregáty reorganizují do premicel v monomerní formě D^+ a D^- . To má za následek zvýšení absorpce barviv v této premicelární oblasti (právě pod CMC). Při dalším zvýšení koncentrace tenzidu absorpce dosahuje mezní hodnoty a všechny molekuly barviva jsou již umístěné do normálních micel jako monomerní molekuly.



Obr. 57 Závislost absorpce F vztážené k absorpenci při nulové koncentraci tenzidů jako funkce koncentrace tenzidů SDS a CTAC, brána absorpce při absorpčních maximech



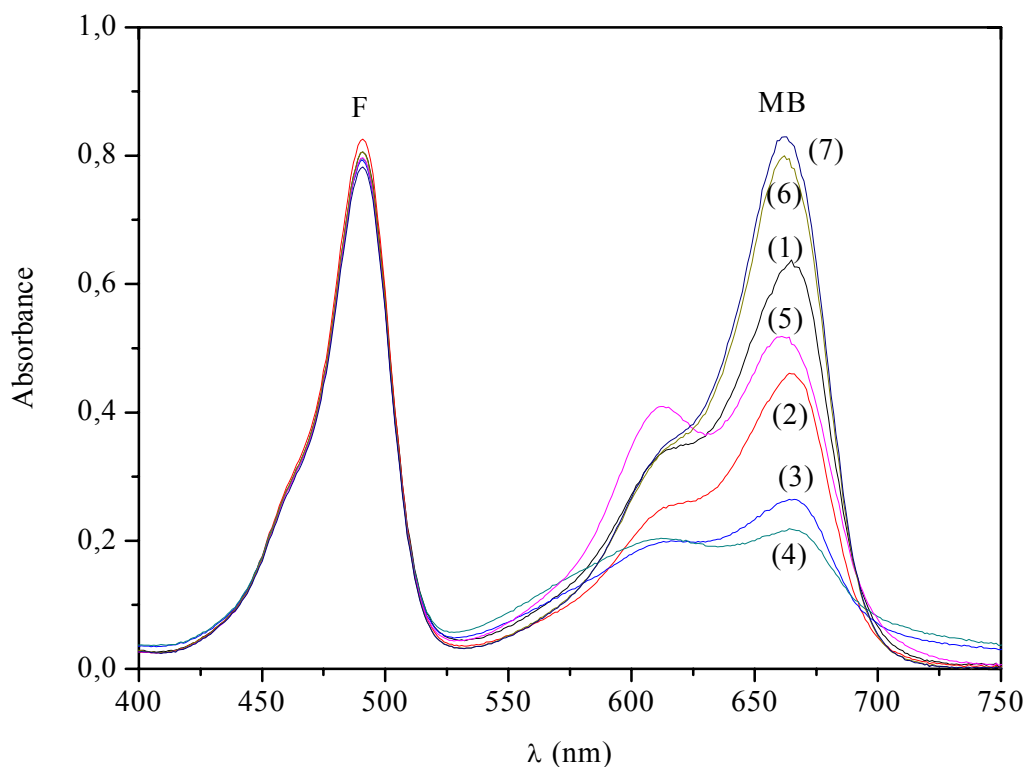
Obr. 58 Závislost absorbance MB vztažené k absorbanci při nulové koncentraci tenzidů jako funkce koncentrace tenzidů SDS a CTAC, brána absorbance při absorpčních maximech

4.13.3 Účinek tenzidů na absorpční spektra směsi sond MB-F

Do plastových zkumavek byla napipetována sonda fluorescein a methylenová modř v poměru 1:1, konečná koncentrace sond činila $1,0 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Dále bylo přidáno určité množství tenzidu SDS nebo CTAC a doplněno injekční vodou na objem 5 mL.

Očekává se, že aniontové i kationtové tenzidy ovlivní absorpční spektra komplexu mezi kationtovým a aniontovým barvivem skrz interakci mezi aniontovou částí barviva v komplexu a kationtovým tenzidem a kationtovou částí barviva v komplexu a aniontovým tenzidem (Příloha 5).

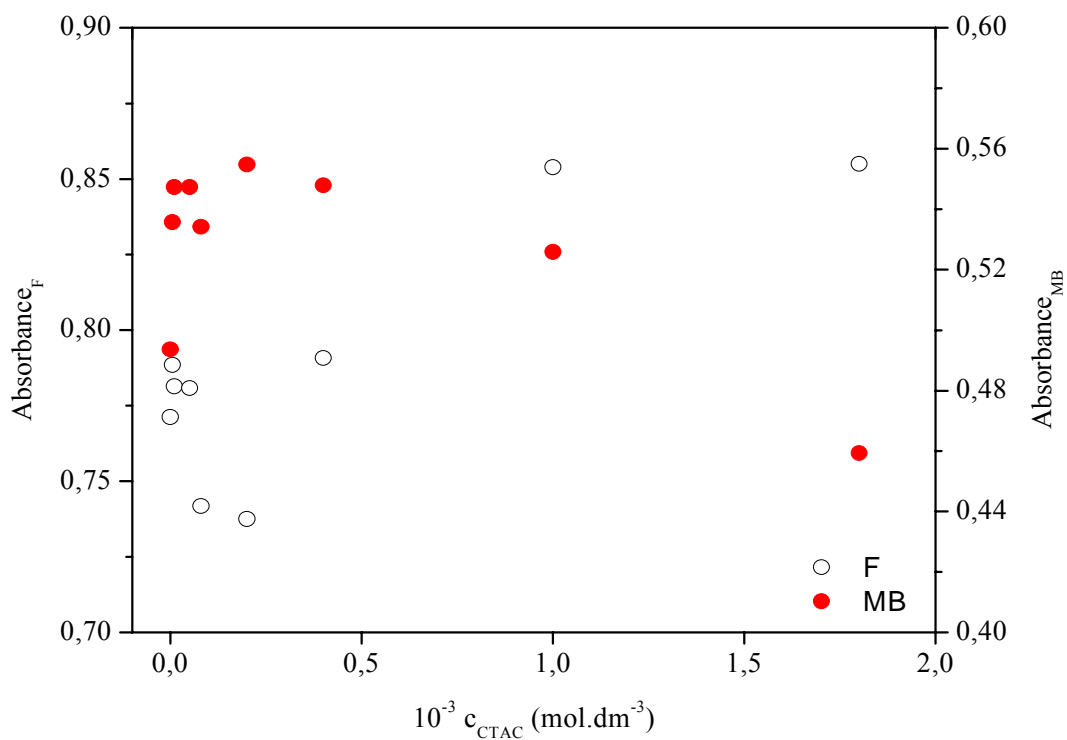
Absorpční spektrum F ve směsi sond se s rostoucí koncentrací SDS téměř neměnilo, naopak kationtové barvivo MB interagovalo s aniontovým tenzidem SDS stejně jako Obr. 58.



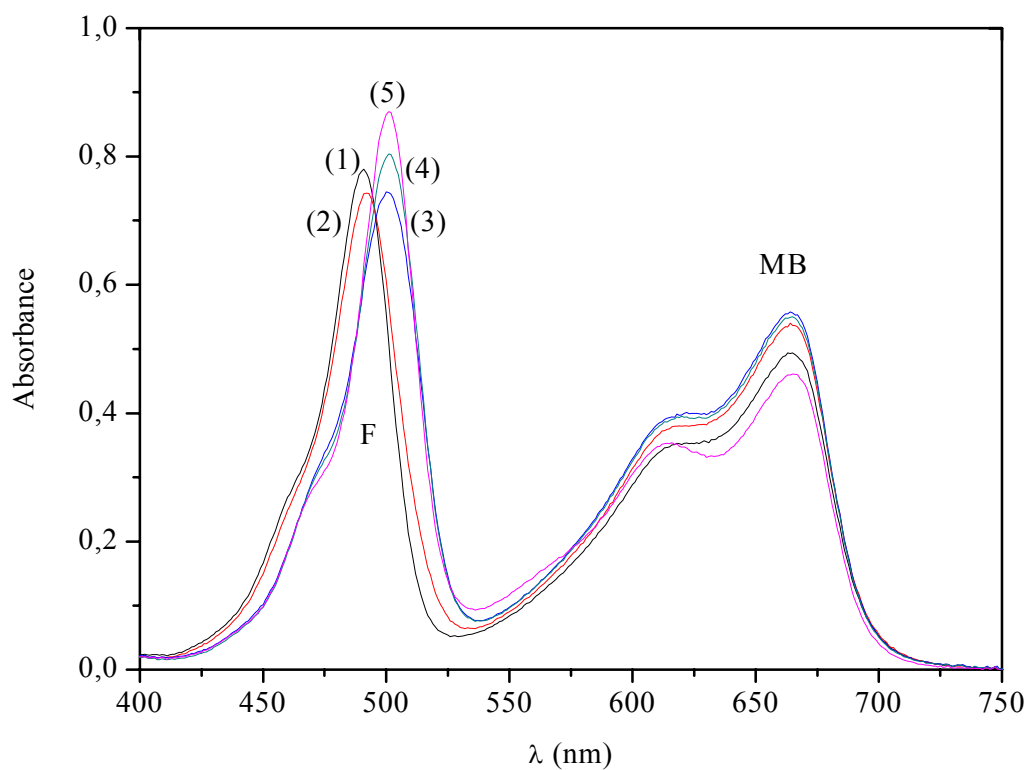
Obr. 59 Absorpční spektra směsi sond fluoresceinu ($1,0 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$) a methylenové modři ($1,0 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$) ve vodném roztoku obsahující proměnné množství tenzidu SDS: (1) 0, (2) 0,5, (3) 1,5, (4) 2,5, (5) 5,0, (6) 10 a (7) $15 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$

Když koncentrace CTAC rostla, absorbance F postupně klesala a pak rostla s dalším nárůstem koncentrace tenzidu (Obr. 60). Oproti tomu absorbance MB rostla s rostoucí koncentrací tenzidu, pak došlo k poklesu. Srovnáním s obrázky Obr. 57 a Obr. 58 dojdeme k závěru, že se v tomto pokusu měnily absorbance obou sond při přidávku tenzidů (Obr. 61).

Absorbance F klesá a v případě MB roste s rostoucí koncentrací CTAC. V této oblasti jsou tvořeny iontové páry mezi F a CTAC a agregáty iontových párů s rostoucí koncentrací CTAC. Za touto oblastí absorbance F dále roste a ustavuje se na konstantní hodnotě, zatímco absorbance MB klesá.



Obr. 60 Závislost absorbance barviv na koncentraci CTAC



Obr. 61 Absorpční spektra směsi sond fluoresceinu ($1,0 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$) a methylenové modři ($1,0 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$) ve vodném roztoku obsahující proměnné množství tenzidu CTAC: (1) 0, (2) 0,08, (3) 0,2, (4) 0,4 a (5) $1,8 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$

5 ZÁVĚR

Diplomová práce měla být zaměřená na experimenty s koloidy na bázi hyaluronanu, zejména alkylovaného, zahunujících i studium vlivu způsobu substituce. Měření bylo prováděno jen s nativním hyaluronanem, neboť modifikovaný nebyl v dostatečném množství k dispozici.

Pro studování hydrofilních oblastí zejména polyelektrolytů byly použity fluorescenční sondy, které se na studovanou látku vážou nekovalentně a mění přitom své fluorescenční vlastnosti.

Byl zkoumán vliv iontové síly na fluorescenční vlastnosti kationaktivní sondy AO a amifilní sondy 4-Di-2-ASP. V případě AO s rostoucí iontovou silou rostla intenzita fluorescence, od koncentrace $0,1 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ docházelo ke zhášení z důvodu přesycení ionty solí. Sůl CaCl_2 nejvíce zvyšovala iontovou sílu a nejvíce brzdila tvorbu dimeru AO. Navíc tato sůl nejvíce bránila repulzi karboxylových skupin a expanzi klubka HA do roztoku. Naopak emise barviva 4-Di-2-ASP se nejvíce zhášela s přidavkem CaCl_2 .

Vliv polarity byl zkoumán pomocí sond 4-Di-2-ASP a NB v organických rozpouštědlech MeOH, EtOH a DMSO. Tato rozpouštědla byla míchána v různém objemovém poměru s vodou od 0 do 100 obj.%, byla tak vytvořena polaritní škála. Okolní prostředí způsobilo nárůst dipólového momentu v excitovaném stavu a reorientaci molekul rozpouštědla kolem 4-Di-2-ASP. Došlo k bathochromnímu posunu emisního maxima, v MeOH/voda byl větší než u směsi EtOH/voda. Emisní záření bylo více zhášeno v roztoku MeOH/voda, což mohlo být způsobeno snížením doby života excitovaného stavu. U sondy NB došlo také ke zhášení emise s rostoucí polaritou prostředí a bathochromnímu posunu. Největší posun byl zaznamenán v MeOH, nejmenší v DMSO. Zajímavostí je, že s rostoucí polaritou došlo ke změně zbarvení roztoků. Roztok DMSO s objemovým zlomkem 100% je zcela bezvodé prostředí a proto nemohou být vytvořeny vodíkové můstky. Díky tomu se v absorpčním spektru objevil isosbestický bod.

Sondy AO, 4-Di-2-ASP a NB byly použity pro studium asociativních vlastností v jednoduchém micelárním systému povrchově aktivních látek SDS a TX-100. Kationaktivní sonda AO elektrostaticky interaguje s tenzidem a drží se u povrchu micely. Naopak sondy 4-Di-2-ASP a NB se se svou hydrofobní částí začlenily do nepolárního jádra micely SDS. Proložení bodů v grafu tzv. S křivkou byly z Boltzmanovy rovnice určeny hodnoty CMC tenzidu SDS. V případě systému AO v SDS její hodnota činí $7,47\cdot 10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$, tabulková hodnota CMC tenzidu činí $8,2\cdot 10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$. Pro systém 4-Di-2-ASP v SDS je $7,16\cdot 10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ a pro systém NB v SDS má hodnotu $7,93\cdot 10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$.

Při titraci sondy AO hyaluronanem způsobily první přídatky vazebných míst (COO^- skupin) tvorbu dimerů AO, byla narušena rovnováha mezi volnými monomery a dimery AO v roztoku. V průběhu interakce sondy s hyaluronanem bylo v grafu dosaženo dvou minim, jedno odpovídá nasycení barvivem a o výskytu druhého se spekuluje. Roztoky hyaluronanu o různé molekulové váze mají stejnou koncentraci vazebných míst (karboxylových skupin). Z fluorescenčních měření vyplývá, že hyaluronan o nižší molekulové váze dosahuje vyšších intenzit emise pro dané poměry P/D. Co se týče hyaluronanu v roztoku solí, $0,5 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ NaCl má větší iontovou sílu než $0,1 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ roztok, proto více brání tvorbě dimeru AO, intenzita emise je vyšší. Z grafů byly získány koncové body titrace $(P/D)_e$, v roztoku $0,1 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ NaCl má hodnotu 2,9 (stejně jako ve vodě), v roztoku $0,5 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ NaCl je asi 1,5. To znamená, že v případě $0,5 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ NaCl je k dispozici na vytvoření komplexu AO-HA méně vazebných míst než v roztoku s menším obsahem soli. V případě 4-Di-2-ASP

v roztoku hyaluronanu se fluorescence zpočátku neměnila, ale od koncentrace $1 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$ došlo k nárůstu intenzity emise.

Sondy methylenová modř a fluorescein byly použity pro spektroskopické studium interakce mezi methylenová modř-fluoresceinovým komplexem a aniontovým a kationtovým tenzidem. U směsi sond ve vodném roztoku se nepodařilo prokázat tvorbu komplexu. Je možné, že komplex nebyl vytvořen kvůli nízké koncentraci sond nebo ze stérických důvodů. Teoreticky by se vytvořením komplexu snížila energie systému a došlo by k posunu do červené oblasti spektra, což nebylo zaznamenáno. Absorbance samotné methylenové modři a fluoresceinu se měnily jen s přidavkem tenzidů s opačným nábojem. Absorbance směsi MB-F se měnila s přidavkem tenzidu CTAC, přidavek SDS do směsi způsobil jen změnu absorpčního spektra MB.

6 LITERATURA

- [1] Hascall, C. V., Laurent, C. T.: *Hyaluronan: Structure and Physical Properties* [online]. 1997, poslední revize 15.12.1997 [cit. 2007-12-3]. Dostupné z: <http://www.glycoforum.gr.jp/science/hyaluronan/HA01/HA01E.html>.
- [2] *Hyaluronan* [online], poslední revize 20.1.2007 [cit. 2007-11-9]. Dostupné z: <http://en.wikipedia.org/wiki/Hyaluronan>.
- [3] Scott, J. E.: *Secondary and Tertiary Structures of Hyaluronan in Aqueous Solution. Some biological Consequences* [online]. 1998, poslední revize 15.3.1998 [cit. 2007-12-3]. Dostupné z: <http://www.glycoforum.gr.jp/science/hyaluronan/HA02/HA02E.html>.
- [4] Weigel, H. P.: *Bacterial Hyaluronan Synthases* [online]. 1998, poslední revize 15.8.1998 [cit. 2007-12-3]. Dostupné z: <http://www.glycoforum.gr.jp/science/hyaluronan/HA06/HA06E.html>.
- [5] POUCHLÝ, J.: *Fyzikální chemie makromolekulárních a koloidních soustav*. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 1998. ISBN 80-7080-422-X.
- [6] BARTOVSKÁ, L., ŠIŠKOVÁ, M.: *Fyzikální chemie povrchů a koloidních soustav*. Praha: VŠCHT, 2005. ISBN 80-7080-579-X.
- [7] *Micela (asociativní): micelle* [online]. [cit. 2007-12-8]. Dostupné z: http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_es-001/hesla/micela_-asociativni-.html.
- [8] *Obrácená micela: inverted (reverse) micelle* [online]. [cit. 2007-12-8]. Dostupné z: http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_es-001/hesla/obracena_micela.html.
- [9] *Fluorescence Microscopy: Basic Concepts in Fluorescence* [online]. C 2000-2008 [cit. 2007-10-10]. Dostupné z: <http://www.olympusmicro.com/primer/techniques/fluorescence/fluorescenceintro.html>
- [10] *Fluorofory v biomedicíně* [online]. [cit. 2007-11-9]. Dostupné z: <http://psych.lf1.cuni.cz/fluorescence/soubory/fluorofory.htm>.
- [11] *The Handbook A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies*. 10th edition. Invitrogen Corp., 2005. ISBN 0-9710636-4-8.
- [12] Yao, H., Kobayashi, K., Komára, K.: Self-assembly of akridine orange dye at a mica/solution interface: Formation of nanostripe supramolecular architectures. *Journal of Colloid and Interface Science*, 2007, vol. 307, pp. 272-279.
- [13] Tan, J. S., Schneider, R. L.: Dye Binding and Its Relation to Polyelectrolyte Conformation. *The Journal of Physical Chemistry*, 1975, vol. 79, No. 14, pp. 1380.
- [14] Constantino, L., Guarino, G., Ortona, O., Vitagliano, V.: Acridine Orange Association Equilibrium in Aqueous Solution. *Journal of Chemical and Engineering Data*, 1984, vol. 29, No. 1.
- [15] Peyratout, C., Donath, E., at all: Electrostatic interactions of cationic dyes with negatively charge polyelectrolytes in aqueous solution. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 2001, vol. 142, pp. 51-57.
- [16] Bi, S., Qiao, Ch., Song, D., at all: Study of interactions of flavonoids with DNA using acridine orange as a fluorescence probe. *Senzore and Actuators B*, 2006, vol. 119. pp. 199-208.
- [17] Tajalli, H., Gilani, A. G., at all: The photophysical properties of Nile Red and Nile Blue in ordered anisotropic media. *Dyes and Pigments*, 2008, vol. 78, Issue 1, pp. 15-24.
- [18] Mitra, R. K., Sinha, S. S., Pal, S. K.: Interactions of Nile Blue with Micelles, Reverse Micelles and a Genomic DNA. *Journal of Fluorescence*, 2008, vol. 18, No. 2.

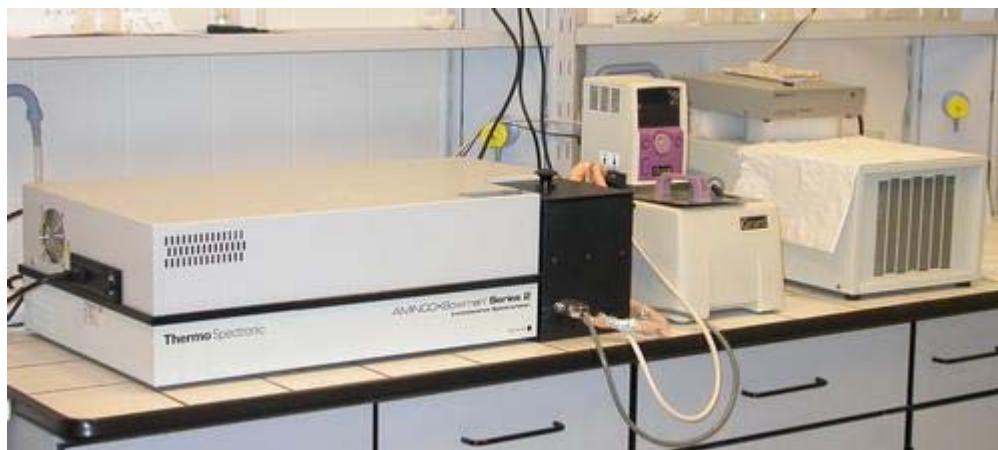
- [19] Ostle, A. G., Holt, J. G.: Nile Blue A as a Fluorescent Stain for Poly- β -Hydroxybutyrate. *Applied and Environmental Mikrobiology*, 1982, vol. 44, No. 1, pp. 238-241.
- [20] Nile Blue A [online]. [cit. 2008-10-4]. Dostupné z: <http://stainsfile.info/StainsFile/dyes/51180.htm>.
- [21] Galagan, Y., Su, W. F.: Reversible photoreduction of methylene blue in acrylate media containing benzyl dimethyl ketal. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 2008, vol. 195, pp. 378-383.
- [22] Fluorescein: [online]. [cit. 2007-13-4]. Dostupné z: <http://en.wikipedia.org/wiki/Fluorescein>.
- [23] Kurian, A., Sajan, D. G., at all: Thermal lens technique to study the effect of pH on electronic energy transfer in organic dye mixture. *Spectrochimica Acta Part A*, 2007, vol. 67, Issues 3-4, pp. 678-682.
- [24] Sjöback, R., Nygren, J., Kubista M.: Absorption and fluorescence properties of fluorescein. *Spectrochimica Acta Part A*, 1995, vol. 51, Issue 6, pp. L7-L21.
- [25] Fluorescein [online]. [cit. 2007-13-4]. Dostupné z: <http://encyklopedie.seznam.cz/heslo/42310-fluorescein>.
- [26] KLOUDA, P.: *Moderní analytické metody*. Ostrava: Pavel Klouda, 2003. ISBN 80-86369-07-2.
- [27] SOMMER, L.: *Analytická spektrometrie I*. Praha 1: Státní pedagogické nakladatelství, n. p., 1986. Vydavatel – Univerzita J. E. Purkyně v Brně.
- [28] HOF, M., FIDLER, V., at all: *Fluorescence Spectroscopy in Biology*. Springer, 2005. ISBN:354022338X. Dostupné z: <http://books.google.com/books?id=2022edTHMMEC&printsec=frontcover&dq=%2solvent+relaxation%22&hl=cs - PRA1-PA17,M1>.
- [29] VALEUR, B.: *Molecular Fluorescence: Principles and Applications*. Wiley-VCH Verlag GmbH, 2001. ISBNs: 3-527-29919-X.

7 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

PAL	povrchově aktivní látka
CMC	kritická micelární koncentrace
M_w	molekulová hmotnost
E	energie
A	absorbance
φ_{org}	objemový zlomek organické fáze
w_{aq}	objemový zlomek vodné fáze
I_{tot}	totální integrál
I_{em}	relativní intenzita emise
P	polymer (vazebná místa)
D	„dye“ (barvivo, fluorescenční sonda)
S	„surfactant“ (tenzid)
FC	Frank-Condonův stav
SR	relaxace rozpouštědla
Φ_0	kvantový výtěžek fluorescence za nepřítomnosti zhasěla
Φ	kvantový výtěžek fluorescence za přítomnosti zhasěla
τ_0	čas vyhasínání fluorescence bez zhasěla
τ	čas vyhasínání fluorescence za přítomnosti zhasědla
k_q	bimolekulární zhasěcí konstanta
C_q	koncentrace zhasěla
S_i	singletový základní nebo excitovaný stav
D	dimer barviva
M	monomer barviva

8 PŘÍLOHY

Příloha 1 *Luminiscenční spektrometr, AMINCO-Browman, Series 2*



Příloha 2 *UV-VISIBLE Spektrofotometr, Cary 50 Probe*



Příloha 3 *Sonda NB v DMSO s proměnným objemovým zlomkem (φ_{org})*



Příloha 4 Sonda F v tenzidu CTAC, zleva doprava roste koncentrace CTAC



Příloha 5 Směs sond F-MB v CTAC, zleva doprava roste koncentrace CTAC

