



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE

INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

**ČASOVĚ ROZLIŠENÁ FLUORESCENCE VE VÝZKUMU
INTERAKCÍ HYALURONANU A KOLOIDNÍCH SYSTÉMŮ**

TIME-RESOLVED FLUORESCENCE IN RESEARCH OF HYALURONAN-COLLOIDAL SYSTEMS
INTERACTIONS

DIZERTAČNÍ PRÁCE

DOCTORAL THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Ing. Jakub Mondek

ŠKOLITEL

SUPERVISOR

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.

BRNO 2017

Zadání dizertační práce

Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie
Student: **Ing. Jakub Mondek**
Studijní program: Fyzikální chemie
Studijní obor: Fyzikální chemie
Vedoucí práce: **prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.**
Akademický rok: 2017/18

Název dizertační práce:

Časově rozlišená fluorescence ve výzkumu interakcí hyaluronanu a koloidních systémů

Zadání dizertační práce:

Charakterizace biokoloidů na základě hyaluronanu pomocí fluorescenčních technik. Vývoj a optimalizace nových fluorescenčních metod pro charakterizaci biokoloidů.

Termín odevzdání dizertační práce: 30.11.2017

Ing. Jakub Mondek
student(ka)

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 1.9.2017

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

MONDEK, J. Časově rozlišená fluorescence ve výzkumu interakcí hyaluronanu a koloidních systémů. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2018. 162 s. Vedoucí dizertační práce prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem dizertační práci vypracoval samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citoval. 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 studenta

Rád bych poděkoval vedoucímu mé dizertační práce prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc., za vedení, trpělivost, pomoc při řešení problémů a vstřícnost. Dále bych rád poděkoval všem kolegům a kolegyním z Fakulty chemické za spolupráci, podnětné diskuze a konzultace při řešení experimentálních problémů. Dále bych chtěl poděkovat svým nejbližším za podporu při studiu.

ABSTRAKT

Cílem předložené dizertační práce bylo studium pokročilých fluorescenčních technik a jejich využití v problematice koloidních soustav, respektive systémů hyaluronan-tenzid a hydrogelových systémů založených na hyaluronanu. Časově-rozlišená fluorescence spolu se stacionární fluorescencí byly použity pro studium hyaluronanových systémů za účelem určení vlivu hydratace hyaluronanu na jeho interakce s (opačně nabitými) micelárními útvary pomocí fluorescenčních sond podstupujících deprotonaci v excitovaném stavu. Nejdříve byly diskutovány různé fluorescenční sondy podstupující deprotonaci v excitovaném stavu, z nichž byla vybrána jedna jako vhodný kandidát pro další experimenty. Na základě citlivosti deprotonace v excitovaném stavu vybrané fluorescenční sondy 1-naftolu byl určen vliv hyaluronanu na vnitřní prostředí micel a zároveň byla, na základě těchto experimentů, diskutována struktura hydratačního obalu hyaluronanu.

Další část předložené dizertační práce se věnovala metodě fluorescenční časově-rozlišené korelační spektroskopie a vývoji metody nanoreologie. Pomocí vytvořeného skriptu v softwaru MATLAB byly převedeny získané korelační funkce na střední posun fluorescenčně značených částic. Nejprve bylo potvrzeno, že fluorescenční korelační spektroskopie může být použita pro mikoreologická měření, a to srovnáním s již známými metodami videomikoreologie a mikoreologie pomocí dynamického rozptylu světla. Následně byla vyvinuta metoda nanoreologie a bylo diskutováno její použití pro studium pasivní nanoreologie v hydrogelových systémech založených na hyaluronanu. Na základě diskutovaných experimentů byla optimalizována metoda mikoreologie, respektive nanoreologie pomocí fluorescenční korelační spektroskopie až k použitelnosti této metody pro studium gelů.

KLÍČOVÁ SLOVA

Časově-rozlišená fluorescence, deprotonace v excitovaném stavu, hydratace, hyaluronan, fluorescenční korelační spektroskopie, mikoreologie, nanoreologie, hydrogel

ABSTRACT

The aim of the doctoral thesis was to study advanced fluorescence techniques and its use in colloids or hyaluronan-surfactant systems and hydrogels based on hyaluronan, respectively. Steady-state and time-resolved fluorescence were used to study excited state proton transfer fluorescence probes in hyaluronan-surfactant systems to assess the influence of hyaluronan hydration to its interactions with oppositely charged surfactants. Firstly, different excited state proton transfer fluorescence probes were discussed to choose the most suitable candidate for next research. The influence of hyaluronan on inner environment of micells was determined based on the sensitivity of excited state proton transfer of chosen fluorescence probe 1-naphtol and, based on above mentioned experiments, the structure of hyaluronan hydration shell was discussed.

The next part of doctoral thesis was focused on fluorescence lifetime correlation spectroscopy and on the development of method of nanorheology. Measured correlation functions were transformed to mean square displacement with developed MATLAB script. Firstly, the fluorescence method was compared with well described methods such as videomicroscopy and dynamic light scattering to assess the reliability of fluorescence correlation spectroscopy in microrheology. Secondly, nanorheology method was developed and its use in passive nanorheology of hyaluronan hydrogels was discussed. Based on mentioned experiments, the fluorescence correlation spectroscopy microrheology and nanorheology methods were optimized to use the methods in hydrogel research.

KEY WORDS

Time-resolved fluorescence, excited state proton transfer, hydration, hyaluronan, fluorescence correlation spectroscopy, microrheology, nanorheology, hydrogel

Obsah

ABSTRAKT.....	3
KLÍČOVÁ SLOVA	4
ABSTRACT.....	5
KEY WORDS	5
1 ÚVOD	9
2 TEORETICKÁ ČÁST.....	10
2.1 Luminiscenční spektrometrie.....	10
2.1.1 Fotoluminiscence	10
2.1.2 Fluorescence	10
2.1.3 Fosforescence.....	11
2.1.4 Doba života fluorescence a kvantový výtěžek	11
2.1.5 Anizotropie fluorescence	13
2.1.6 Zhášení fluorescence	15
2.2 Asociační procesy	21
2.2.1 Asociativní (micelární) koloidy.....	21
2.2.2 Solubilizace	23
2.3 Hyaluronan.....	24
2.3.1 Chemická struktura	24
2.3.2 Metabolismus kyseliny hyaluronové	25
2.3.3 Výskyt a vlastnosti kyseliny hyaluronové	25
2.3.4 Hydratační obal	25
2.4 Polystyren sulfonát.....	25
2.5 Polyvinyl pyrrolidon	26
2.6 Albumin hovězího séra	26
2.7 Karboxymethyl celulóza	27
2.7.1 Chemická struktura	27
2.7.2 Výskyt a vlastnosti.....	27
2.8 Mikroreologie.....	27
2.8.1 Základní principy mikroreologie	27

2.8.2	<i>Pasivní mikrореologie</i>	28
2.8.3	<i>Brownův pohyb</i>	28
2.8.4	<i>Mikrореologické metody</i>	29
3	SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	33
3.1	Kritická micelární koncentrace a agregační číslo	33
3.2	Anizotropie fluorescence	37
3.3	Deprotonace v excitovaném stavu	41
3.4	Časově rozlišená emisní spektra	47
3.5	Pasivní Mikrореologie	48
3.5.1	<i>Video-mikrореologie a dynamický rozptyl světla</i>	48
3.5.2	<i>FCS mikrореologie</i>	49
4	CHARAKTERIZACE HYDRATAČNÍHO OBALU HYALURONANU POMOCÍ 3-HYDROXY-2-NAFTOLOVÉ KYSELINY	50
4.1	experimentální část	50
4.1.1	<i>Přístrojové vybavení</i>	50
4.1.2	<i>Příprava vzorků pro charakterizaci interakcí hyaluronanu a 3HNA</i>	52
4.2	Výsledky a diskuse	53
4.2.1	<i>Stacionární fluorescence</i>	53
4.2.2	<i>Časově-rozlišená fluorescence</i>	56
4.3	Závěr	59
5	CHARAKTERIZACE INTERAKCÍ POLYMER-TENZID POMOCÍ ESPT	60
5.1.1	<i>Stanovení CMC CTAB a Septonexu pomocí ESPT</i>	60
5.2	Experimentální část	60
5.2.1	<i>Přístrojové vybavení</i>	60
5.2.2	<i>Příprava vzorků</i>	60
5.3	Výsledky a diskuse	61
5.3.2	<i>Určení pozice 1-naftolu v CTAB pomocí zhasení fluorescence</i>	67
5.3.3	<i>Studium interakcí polymeru a tenzidu pomocí ESPT</i>	68
5.4	Závěr	80
6	MIKROREOLOGIE POMOCÍ ČASOVĚ-ROZLIŠENÉ FLUORESCENČNÍ KORELAČNÍ SPEKTROSKOPIE	82
6.1	Experimentální část	82

6.1.1	<i>Přístrojové vybavení</i>	82
6.1.2	<i>Příprava vzorků</i>	89
6.2	Výsledky a diskuse.....	89
6.2.1	<i>Mikroreologie</i>	89
6.2.2	<i>Nanoreologie</i>	93
6.3	Závěr	99
7	LITERATURA.....	101
8	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ.....	114
9	SEZNAM TABULEK.....	117
10	SEZNAM OBRÁZKŮ	118
11	VĚDECKÁ A PUBLIKAČNÍ ČINNOST	121
11.1	Články v časopise.....	121
11.2	Příspěvky na mezinárodních konferencích	122
11.3	Abstrakty na mezinárodních konferencích	123
11.4	Přednášky na konferencích	124
11.5	absolvované stáže.....	124
12	PŘÍLOHY.....	124
12.1	Rychlostní konstanty deprotonace a doby života pro kapitolu charakterizace interakcí polymer-tenzid pomocí espt.....	124
12.2	Závislosti zhášení fluorescence pro kapitolu charakterizace interakcí polymer-tenzid pomocí espt.....	126
12.3	Změny dob života a relativních amplitud 1-naftolu v tenzidu pro kapitolu charakterizace interakcí polymer-tenzid pomocí espt.....	127
12.4	Skript z MATLABu pro převod korelační funkce na MSD.....	129
12.5	Články v časopisech.....	129

1 ÚVOD

Vybavení pro časově rozlišenou fluorescenci se v poslední době stalo nedílnou součástí laboratoří zabývajících se fluorescenční spektroskopií nebo například buněčným či molekulárním zobrazováním. Doba života je jednou z nejdůležitějších vlastností fluoroforu a díky pokročilým technologiím, a tedy i příznivější ceně instrumentace pro časově rozlišenou fluorescenci, respektive pro tzv. time-correlated single photon counting – neboli TCSPC – tedy detekci jediného fotonu, je tato metoda široce využívána nejen pro stanovení doby života fluoroforu.

Stacionární fluorescenci ovlivňuje vzdušný kyslík, koncentrace fluoroforu či výběr vlnové délky. Při měření časově rozlišené fluorescence můžeme tyto limitace obejít, protože doba života na výše zmíněných faktorech závislá není (kromě tedy vlnové délky při reakcích v excitovaném stavu). Samozřejmě bez stacionární fluorescence se žádný fluorescenční experiment neobejde, protože emisní spektrum patří k základním charakteristikám vzorku. Ale měření doby života nám poskytne další informace zkoumaného systému. Procesy v excitovaném stavu lze vidět sice i na emisním spektru vzhledem k tvorbě nového píku u větších vlnových délek. Příkladem může být tvorba excimeru pyrenu, exciplexu anthracenu a dimethylanilínu nebo deprotonace v excitovaném stavu, ale díky měření doby života můžeme pozorovat změnu emisního spektra s časem. Také kinetiku deexcitačních procesů lze spočítat díky měření doby života. Pokud zvážíme rozdíl mezi stacionární a časově rozlišenou anizotropií, dostáváme se s měřením vyhasínání anizotropie k mnohem širšímu měřítku možností stanovení vlastností systémů. Můžeme například definovat rotační pohyb fluoroforu v prostředí, případně v organizovaném systému nebo difuzní koeficienty pohybu fluoroforu i sledovaného systému.

Hyaluronan je v dnešní době spojován především s lékařstvím jakožto látka pro efektivnější hojení ran nebo s kosmetikou jakožto látka vyhlazující vrásky. Nesmíme však opomenout úlohu hyaluronanu při vývoji nosičových systémů pro léčiva. Jelikož hyaluronan reaguje na CD-44 receptor rakovinných buněk, byl by skvělou jednotkou pro vyhledávání těchto receptorů v organismu. Z toho důvodu je hyaluronan spojován se širokým výzkumem nosičových systémů založených na hyaluronanu jakožto způsobu dopravy a nějakého nosiče (příkladem lze uvést tenzid, dendrimer či fosfolipid) pro solubilizaci léčiva. Samozřejmě ideální cestou je vytvoření polymerní micely, čímž by se pravděpodobně docílilo vysoké stability systému, ale v úvahu připadají i nekovalentní, například elektrostatické, interakce.

Otázkou ale je, jestli ovlivňuje hydratace hyaluronanu elektrostatické interakce s opačně nabitými systémy a jak tento fakt může ovlivnit zkoumaný systém. Fluorescenční měření otvírají cestu pro výzkum vlivu hydratace polymerů na interakce s dalšími systémy. Zejména časově-rozlišená fluorescence a pokročilé metody fluorescenčních technik nám mohou pomoci tyto informace odhalit.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Luminiscenční spektrometrie

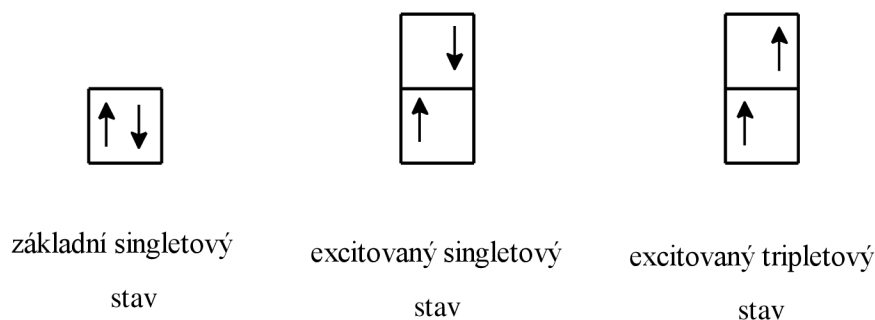
2.1.1 Fotoluminiscence

Po absorpci primárního záření molekulou může dojít k emisi sekundárního záření z excitovaných molekul. Tento jev se nazývá fotoluminiscence. Při absorpci záření přechází elektron ze základní singletové hladiny S_0 do excitovaného stavu (singlet S_1^* , případně triplet T_1^*). Obecně se elektronové stavy dělí na singletové a tripletové (Obr. 1):

Singletový stav: Dvojice elektronů má opačný (antiparalelní) spin.

Tripletový stav: Dvojice elektronů má stejný (paralelní) spin.

Podle toho, z kterého z těchto dvou stavů se elektron navrácí do základního stavu, dělíme fotoluminiscenci na *fluorescenci* a *fosforescenci*.



Obr. 1 Základní singletový, excitovaný singletový a excitovaný tripletový stav

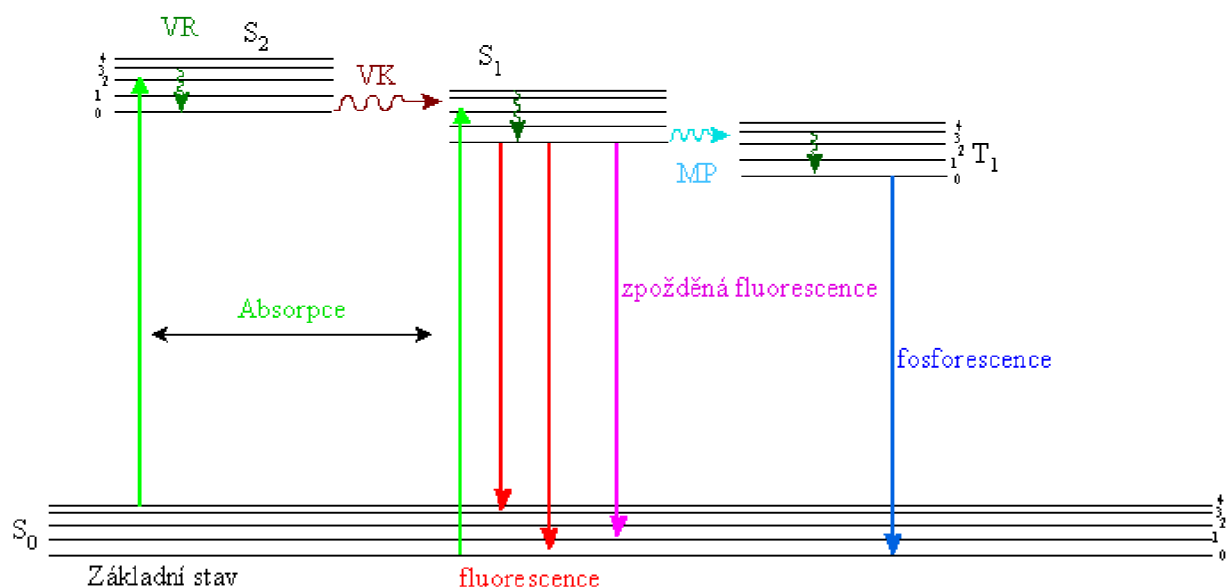
2.1.2 Fluorescence

Termín fluorescence byl poprvé použit sirem Georgem Gabrielem Stokesem v jeho práci z roku 1852. Termín fluorescence byl odvozen z názvu minerálu fluoritu, který emitoval modrou fluorescenci po excitaci UV zářením.

Po absorpci záření se excitovaná molekula navrácí do základního stavu za současného vyzáření fotonu. Tento přechod se nazývá *zářivý přechod*. Jedním z typů zářivého přechodu je přechod elektronu z excitovaného stavu do základního stavu S_0 . Tento jev se nazývá *fluorescence*. Elektron se může zářivě vrátit do základního stavu pouze z nejnižší vibrační hladiny daného excitovaného stavu. Pokud se excitovaný elektron nacházel v některé z vyšších vibračních hladin příslušného excitovaného stavu, přechází do nejnižší vibrační hladiny stejného excitovaného stavu přechodem, který je nazýván *vibrační relaxace*. Proces *vnitřní konverze* zase představuje přechod elektronu z vyššího excitovaného stavu do nižšího excitovaného stavu. Jedná se o nezářivé přechody. Excitovaný elektron, který přešel do tripletového stavu, se může dodáním energie znovu dostat do singletového stavu S_1 . Ze stavu S_1 se elektron vrací do základního stavu S_0 za současného vyzáření fotonu a je pozorována *zpožděná fluorescence* (Obr. 2). Z toho plyne, že proces zpožděné fluorescence je analogický k mezisystémovému přechodu z S_1 do T_1 , pouze probíhá opačně.

2.1.3 Fosforescence

Může nastat situace, kdy proběhne nezářivý přechod ze singletového stavu S_1 na hladinu T_1 , kdy je přechod spojen se změnou spinového stavu. Tento děj se nazývá *mezisystémový přechod* a většinou k němu dochází, pokud se překrývají nejnižší vibrační hladiny singletového stavu s vyššími hladinami tripletového stavu. Z tripletového stavu T_1 se excitovaný elektron navrácí do základního stavu S_0 za současné ztráty energie ve formě fotonu. Tento děj se nazývá *fosforescence* (Obr. 2). Tripletový stav molekuly má nižší energii než příslušný singletový excitovaný stav, takže přechod do základního stavu je spojen s emisí záření o delší vlnové délce než při fluorescenci. Protože molekula setrvává v tripletovém stavu poměrně dlouho, může ztratit svou energii snáze jinými pochody než fosforescencí, např. kolizí s molekulami rozpouštědla.



Obr. 2 Jablonskiho diagram – energetické přechody při vzniku fluorescence a fosforescence. Přechody: VR – vibrační relaxace, VK – vnitřní konverze, MP – mezisystémový přechod

Luminiscenční zářivý tok roste s množstvím absorbovaného záření, kvantovým výtěžkem luminiscence (tj. poměrem udávajícím počet emitovaných fotonů a absorbovaných fotonů). Luminiscenci nepříznivě ovlivňuje vyšší teplota, která zvyšuje pravděpodobnost nezářivých přechodů [1].

Fluorescence i fosforescence trvá i po přerušení budícího záření. Rozdíl je v tom, že fluorescence, která se vyskytuje hlavně v parách, kapalinách a roztocích, trvá 10^{-10} až 10^{-7} s po ukončení osvětlování, kdežto fosforescence trvá 10^{-6} s až sekundy [2].

2.1.4 Doba života fluorescence a kvantový výtěžek

Doba života fluorescence a jeho kvantový výtěžek patří mezi nejdůležitější vlastnosti fluoroforu. Kvantový výtěžek je poměr počtu emitovaných fotonů a počtu fotonů absorbovaných. Doba života fluoroforu určuje dobu, po kterou je fluorofor schopný interagovat nebo difundovat v excitovaném stavu v prostředí fluoroforu. Všechny interakce v excitovaném stavu se následně projeví na emisi tohoto fluoroforu. Především je soustředěna pozornost na to, jakým způsobem se

fluorofor dostane zpět do základního stavu, konkrétně jestli se fluorofor vrátí do základního stavu zářivým nebo nezářivým přechodem nebo kombinací obou přechodů. Takže se jedná o kombinaci rychlosti zářivého přechodu (k_r) a rychlosti přechodu nezářivého (k_{nr}).

Jak již bylo zmíněno výše, kvantový výtěžek představuje poměr počtu emitovaných a absorbovaných fotonů. Rychlostní konstanty k_r a k_{nr} představují depopulaci excitovaného stavu, takže podíl fluoroforu vracejícího se díky zářivému přechodu, tedy kvantový výtěžek, může být znázorněn rovnicí:

$$\Phi = \frac{k_r}{k_r + k_{nr}} \quad (1)$$

Z rovnice 1 plyne, že kvantový výtěžek se bude blížit jedné, pouze pokud rychlostní konstanta zářivého přechodu bude mnohem větší než rychlostní konstanta nezářivého přechodu. Jedna z molekul, která má kvantový výtěžek blízky jedné, je fluorescenční sonda známá jako perylen.

Doba života fluoroforu je definována jako průměrná doba strávená v excitovaném stavu vzhledem k rychlosti jeho přechodu do základního stavu. Když zde bude vycházeno z chemické kinetiky a bude zvolen zředěný roztok, který obsahuje látku A o koncentraci $[A]$ (mol/dm^3) a tento vzorek bude excitován krátkým pulzem, tak v čase 0 tento puls způsobí, že přejde určitý počet molekul A do excitovaného stavu A^* . Tyto molekuly se následně navrací do základního stavu buď zářivým, nebo nezářivým přechodem nebo oběma typy přechodů. Rychlost vyhasínání excitovaných molekul může být vyjádřena následující rovnicí:

$$-\frac{d[A^*]}{dt} = (k_r + k_{nr})[A^*] \quad (2)$$

Řešením rovnice 2 je:

$$[A^*] = [A^*]_0 \exp\left(-\frac{t}{\tau_s}\right), \quad (3)$$

kde τ_s je doba života excitovaného stavu a je dána rovnicí:

$$\tau_s = \frac{1}{k_r + k_{nr}} \quad (4)$$

Pokud jedinou možností deexcitace je zářivý přechod z hladiny S_1 do S_0 , tedy emise fluorescence, rovnice pro dobu života změní tvar na:



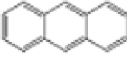
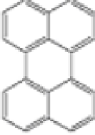

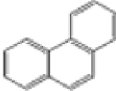
$$\tau_r = \frac{1}{k_r} \quad (5)$$

Doba života, která je určena pouze reciprokou hodnotou rychlostní konstanty zářivého přechodu, se nazývá přirozená doba života (natural nebo intrinsic lifetime). Tato doba života může být teoreticky spočítána z absorpčního spektra, extinkčního koeficientu a emisního spektra fluoroforu pomocí Strickler-Bergova vztahu [2],[3]

$$\frac{1}{\tau_r} = 2,88 \times 10^{-9} n^2 \frac{\int F_{\bar{\nu}}(\bar{\nu}_F) d\bar{\nu}_F}{\int \bar{\nu}_F^3 F_{\bar{\nu}}(\bar{\nu}_F) d\bar{\nu}_F} \int \frac{\varepsilon(\bar{\nu}_A) d\bar{\nu}_A}{\bar{\nu}_A}, \quad (6)$$

kde n je index lomu, ε je molární absorpční koeficient a pro $F_{\bar{\nu}}(\bar{\nu}_F)$ platí vztah:

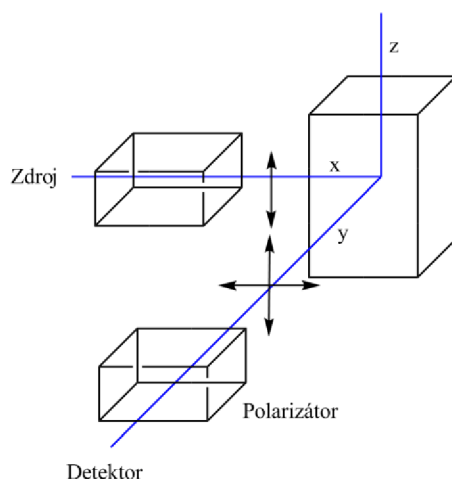
$$\int_{\infty}^0 F_{\bar{\nu}}(\bar{\nu}_F) d\bar{\nu}_F = \Phi_F \quad (7)$$

Sloučenina	Vzorec	Rozpouštědlo (teplota)	Φ_F	τ_S (ns)
Benzen		Ethanol (293 K)	0,04	31
Naftalen		Ethanol (293 K)	0,21	2,7
		Cyklohexan (293 K)	0,19	96
Antracen		Ethanol (293 K)	0,27	5,1
		Cyklohexan (293 K)	0,30	5,24
Perylen		n-Hexan	0,98	
		Cyklohexan (293 K)	0,78	6
Pyren		Ethanol (293 K)	0,65	410
		Cyklohexan (293 K)	0,65	450
Fenantren		Ethanol (293 K)	0,13	
		n-Heptan (293 K)	0,16	0,60
		Polymerní film	0,12	

Obr. 3 Příklady fluoroforů, jejich kvantové výtěžky fluorescence Φ_F a doby života (τ_S) [1]

2.1.5 Anizotropie fluorescence

Při excitaci polarizovaným světlem je emise většiny vzorků také polarizovaná. Základ anizotropie představuje existence přechodového momentu absorpce a emise, který leží podél specifického směru závislého na struktuře fluoroforu [4]. V biomolekulách se anizotropie změní vlivem rotační difuze i vnitřní flexibility. Anizotropie fluorescence se používá například pro studium denaturace proteinů, interakci proteinů s jinými makromolekulami, studium vnitřní viskozity membrán a například pro klinickou detekci proteinů zodpovědných za onemocnění.



Obr. 4 Schéma měření anizotropie fluorescence [4]

Měření anizotropie fluorescence je zobrazeno na Obr. 4. Při měření anizotropie je vzorek excitován vertikálně polarizovaným světlem. Elektrický vektor excitačního záření leží paralelně s osou z . Intenzita emise se měří přes polarizátor. Pokud je emisní polarizátor orientován paralelně vůči excitačnímu paprsku, značí se tato intenzita I_{\parallel} , pokud je orientován vertikálně, značí se I_{\perp} . Tyto intenzity se následně použijí pro výpočet anizotropie fluorescence podle rovnice:

$$r = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + 2I_{\perp}} \quad (8)$$

Rovnice 8 ale nepočítá s citlivostí detekčního systému na vertikálně a horizontálně polarizované světlo. Z toho důvodu je potřeba zavést korekční faktor, který se nazývá G faktor. Pro výpočet skutečného poměru $\frac{I_{\parallel}}{I_{\perp}}$ je potřeba zjistit právě hodnotu G faktoru. Pokud zavedeme, že S_V a S_H budou citlivosti emisního kanálu pro vertikálně a horizontálně orientovanou komponentu, I_{VV} a I_{VH} budou pozorované vertikálně a horizontálně polarizované intenzity, pak rovnice pro poměr pozorovaných intenzit bude mít tvar:

$$\frac{I_{VV}}{I_{VH}} = \frac{S_V}{S_H} \frac{I_{\parallel}}{I_{\perp}} = G \frac{I_{\parallel}}{I_{\perp}} \quad (9)$$

G faktor lze jednoduše měřit pomocí horizontálně polarizované excitace. S horizontálně polarizovanou excitací je distribuce v excitovaném stavu potočena tak, aby ležela ve stejném směru s osou pozorování. Následně horizontálně i vertikálně polarizované komponenty jsou stejné jako I_{\perp} . Shodují se, protože elektrické pole je shodně rozloženo okolo osy pozorování. Oba polarizátory se nachází kolmo k polarizaci excitovaného záření. Jakýkoli měřený rozdíl mezi I_{HV} a I_{HH} musí být způsoben vlivem detekčního systému. Z toho důvodu můžeme pro anizotropii psát rovnici:

$$r = \frac{I_{VV} - GI_{VH}}{I_{VV} - 2GI_{VH}} \quad (10)$$

Stacionární anizotropie je zjištěna za pomoci kontinuální iluminace vzorku, čímž získáme průměrnou hodnotu anizotropie za určitý časový úsek. Další informace lze získat pomocí měření časově rozlišené anizotropie. Hodnoty $r(t)$ jsou měřeny po krátkém excitačním pulzu. Vyhasínání anizotropie závisí na velikosti, tvaru a flexibilitě pozorovaného fluoroforu. Měří se tedy polarizované časově závislé vyhasínání fluorescence a jednotlivé křivky jsou použity pro výpočet časově rozlišené anizotropie:

$$r(t) = \frac{I_{\parallel}(t) - I_{\perp}(t)}{I_{\parallel}(t) + 2I_{\perp}(t)} \quad (11)$$

Následně je vypočítané vyhasínání anizotropie analyzováno pomocí různých matematických modelů a statisticky se vyhodnotí, jestli se příslušný model shoduje s vypočítaným vyhasínáním anizotropie. Z matematických modelů lze stanovit rotační korelační časy (θ), počáteční anizotropii (r_0) a limitní anizotropii (r_{∞}).

2.1.6 Zhášení fluorescence

Zhášení fluorescence představuje jakýkoli proces snížení intenzity fluorescence vzorku. Zhášení vycházející z kolizních střetů mezi molekulami fluoroforu (látka schopná fluorescence) a zhášeče se nazývá *dynamické* zhášení. Jestliže se molekuly fluoroforu váží na molekuly zhášeče, nazývá se toto zhášení *statické*. Zhášení všeobecně bylo a je intenzivně studováno v souvislosti s biochemickými systémy. Ze zhášení fluorescence v biologických systémech je možno zjistit některé informace o molekulách, mezi kterými ke zhášení dochází, nebo o prostředí, ve kterém ke zhášení dochází. V podstatě dostáváme informace o příslušném donor-akceptorovém páru, což představuje molekuly nebo charakteristické skupiny molekul, které jsou schopny darovat nebo přijmout například energii nebo elektron, z čehož donorem je molekula poskytující energii a akceptorem je molekula tuto energii přijímající. Pokud se vybere správný donor-akceptorový pár, je možno odhalit umístění látky v membráně buňky [5] nebo lze například určit vzdálenost mezi dvěma místy molekuly proteinu, čímž lze charakterizovat skládání proteinů, tzv. protein folding [6], [7].

2.1.6.1 Zhášeče fluorescence

Široká řada látek se chová jako zhášeč fluorescence. Jedním z nejznámějších zhášečů fluorescence je molekulární kyslík, který zháší téměř všechny známé fluorofory. Nejpravděpodobnějším mechanismem zhášení fluorescence kyslíkem je nezářivý přechod fluoroforu do tripletového stavu, tedy mezisystémový přechod fluoroforu. V roztocích je tripletový stav zhášen s maximální efektivitou, takže fosforescence není pozorována. Aromatické a alifatické aminy jsou také efektivními zhášeči fluorescence většiny nesubstituovaných aromatických uhlovodíků. Již dlouho a dobře známým příkladem může být antracen, který je efektivně zhášen dietylanilinem [8]. V případě antracenu a dietylanilinu se formuje excitovaný komplex zvaný exciplex. K formování exciplexu dochází proto, že fluorofor v excitovaném stavu přijme elektron z aminu. V nepolárních rozpouštědlech můžeme tento proces klasifikovat jako reakci v excitovaném stavu, protože samotná fluorescence exciplexu bývá pozorována, kdežto v polárních rozpouštědlech je fluorescence tohoto exciplexu zhášena, takže se interakce mezi antracem a dietylanilinem jeví jako klasické zhášení.

Dalším typickým procesem, při kterém dochází ke zhášení, je efekt těžkého atomu. Patří sem například jód nebo brom. Halogenované sloučeniny jako jodbenzen, trichlorethanol nebo brombenzen zháší mechanismem dynamického zhášení. Zhášení většími halogeny jako bromidy a jodidy může vyústit k mezisystémovému přechodu do tripletového stavu, který je způsoben “spin-orbit couplingem” (vzájemná interakce magnetických momentů spinového pohybu elektronů a orbitálního pohybu elektronů) excitovaného fluoroforu a halogenu [9], [10]. Mechanismus zhášení je pravděpodobně odlišný pro sloučeniny obsahující chlor. Indoly, karbazoly a jejich deriváty jsou velice citlivé na zhášení chlorovanými uhlovodíky a tzv. elektronovými “scavengery“ jako protony, histidin, cystein, fumarát, NO_3^- , Cu^{2+} , Pb^{2+} , Cd^{2+} a Mn^{2+} [11]. Zhášení těmito látkami pravděpodobně zahrnuje přenos elektronu z fluoroforu ke zhášeči.

Dalšími zhášeči fluorescence mohou být puriny, pyrimidiny, *N*-methylnikotinamid nebo *N*-alkylpyridinium. Například pyren může být zhášen cetylpyridinium chloridem. Často je u těchto aromatických sloučenin pozorováno jak statické, tak i dynamické zhášení, kde komplex v základním stavu tvořený při statickém zhášení může být velice stabilní.

Protože spousta molekul se chová jako zhášeč, může být lehce vybrán vhodný pár fluoroforu a zhášeče. Některé zhášeče mohou být vysoce selektivní pro určitý fluorofor. Selektivita často záleží na mechanismu zhášení, který zase bude záviset na chemických vlastnostech jednotlivých molekul.

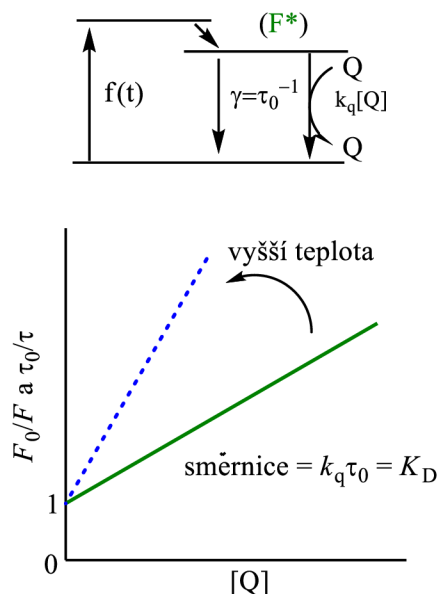
2.1.6.2 Dynamické zhášení

Dynamické zhášení může být popsáno Stern-Volmerovou rovnicí:

$$\frac{F_0}{F} = 1 + k_q \tau_0 [Q] = 1 + K_D [Q], \quad (12)$$

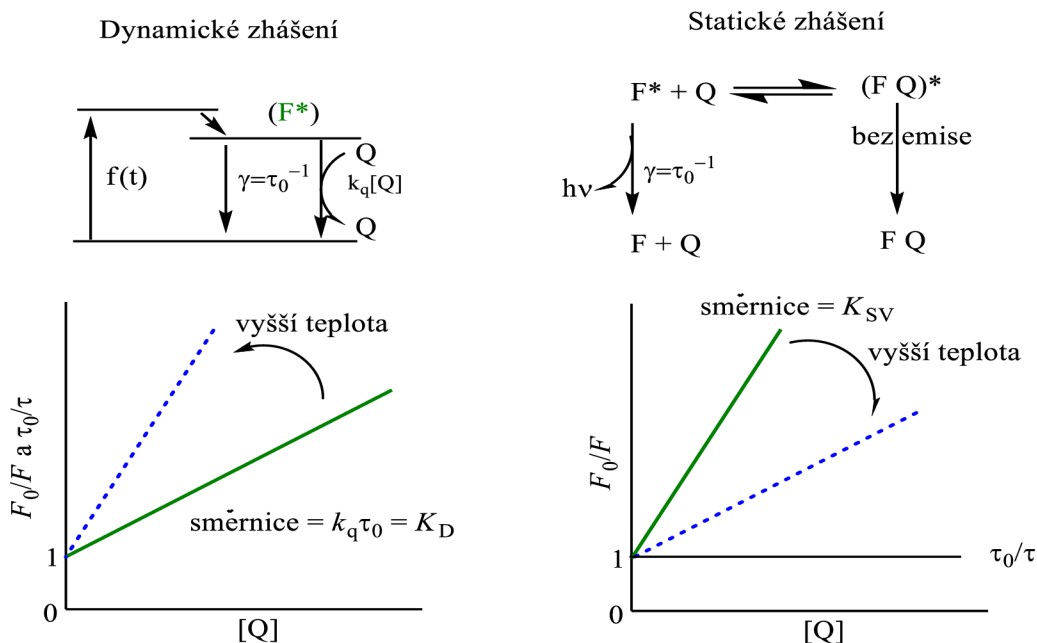
kde F_0 a F jsou intenzity fluorescence v nepřítomnosti zhášeče a v přítomnosti zhášeče, k_q je bimolekulární rychlostní konstanta zhášení, τ_0 představuje dobu života fluoroforu bez přítomnosti zhášeče a Q je koncentrace zhášeče. Stern-Volmerova konstanta zhášení pak je dána rovnicí $K_D = k_q \tau_0$. Pokud je známo, že se jedná kompletně o dynamické zhášení, bude Stern-Volmerova konstanta představována jako K_D . Pokud se na zhášení bude podílet i jiný proces deaktivace, například statické zhášení, bude Stern-Volmerova konstanta popsána K_{SV} .

Data jsou většinou prezentována jako graf závislosti poměru intenzit fluorescence bez přítomnosti zhášeče a v přítomnosti zhášeče na koncentraci zhášeče. Protože tato závislost by měla být lineární, mělo by být možno ze směrnice přímky této závislosti získat konstantu K_D (Obr. 5).



Obr. 5 Stern-Volmerův graf pro dynamické zhášení a schéma mechanismu dynamického zhášení [4]

Pokud pozorujeme Stern-Volmerův lineární průběh závislosti, nemusí to ještě znamenat, že se jedná o dynamické zhášení. Také statické zhášení dává lineární průběh závislosti. Statické a dynamické zhášení může být odlišeno závislostmi jednotlivých procesů na teplotě nebo viskozitě nebo například měřením časově rozlišené fluorescence. Vyšší teplota ústí k rychlejší difúzi, takže dynamické zhášení bude efektivnější. Vyšší teplota také způsobí disociaci slabě vázaných komplexů, což vyústí k nižšímu podílu statického zhášení, protože principem statického zhášení je tvorba nefluorescentního komplexu (Obr. 6).



Obr. 6 Porovnání dynamického a statického zhášení [4]

Stern-Volmerova rovnice může být také získána, pokud se uvaží frakce excitovaných fluoroforů v poměru k celkovému množství fluoroforů, které vykazují emisi. Tato frakce ($\frac{F}{F_0}$) je dána poměrem rychlosti vyhasínání fluorescence v nepřítomnosti zhášedce (γ) a celkové rychlosti vyhasínání fluorescence v přítomnosti zhášedce ($\gamma + k_q [Q]$):

$$\frac{F}{F_0} = \frac{\gamma}{\gamma + k_q [Q]} = \frac{1}{1 + K_D [Q]} \quad (13)$$

Rovnice 13 je opět Stern-Volmerovou rovnicí. Jelikož dynamické zhášení představuje proces, který snižuje populaci excitovaného stavu, tak doba života při absenci zhášedce (τ_0) a v přítomnosti (τ) zhášedce bude dána rovnicemi:

$$\tau_0 = \frac{1}{\gamma} \quad (14)$$

a tedy Stern-Volmerova rovnice má tvar:

$$\frac{\tau_0}{\tau} = 1 + k_q \tau_0 [Q] = 1 + K_D [Q] \quad (15)$$

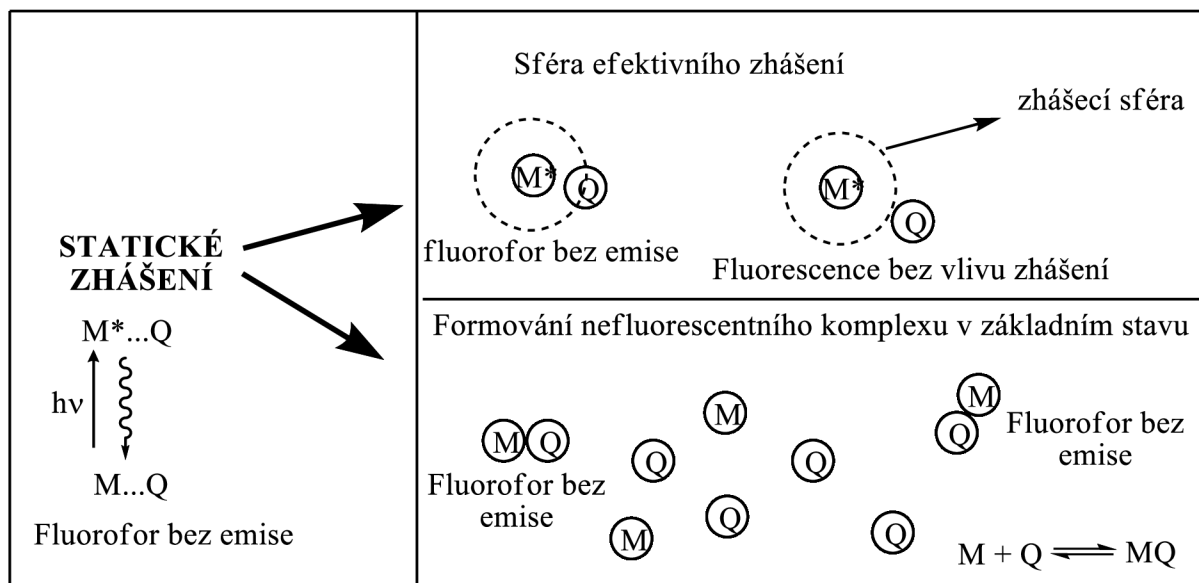
Z rovnice 16 plyne důležitá charakteristická vlastnost dynamického zhášení. Platí zde, že snížení intenzity fluorescence je přímo úměrné snížení doby života fluorescence:

$$\frac{F_0}{F} = \frac{\tau_0}{\tau} \quad (16)$$

Pokud je vynesena závislost $\frac{\tau_0}{\tau}$ na koncentraci zhášedce, tak se směrnice výsledné závislosti bude rovnat K_D a bude možno z této směrnice vypočítat rychlostní konstantu dynamického zhášení k_q . K poklesu v době života při dynamickém zhášení dochází proto, že dynamické zhášení je proces, který snižuje populaci excitovaného stavu bez emise fluorescence. Tím je snížena jak intenzita fluorescence, tak i příslušná doba života. U statického zhášení nedochází k poklesu doby života fluorescence, protože je vytvořen nefluorescentní komplex mezi fluoroforem a zhášedcem v základním stavu. Časově-rozlišenou fluorescencí jsou pozorovány pouze fluorofory v excitovaném stavu, takže všechny molekuly v excitovaném stavu mají dobu života τ_0 .

2.1.6.3 Statické zhášení

Principem statického zhášení je formace nefluorescentního komplexu. K tvorbě tohoto komplexu může dojít buď díky tzv. sféře efektivního zhášení, anebo přímou tvorbou nefluorescentního komplexu v základním stavu (Obr. 7).



Obr. 7 Schéma statického zhášení [4]

2.1.6.3.1 *Sféra efektivního zhášení*

Může nastat situace, kdy fluorofor v excitovaném stavu a zhášec nemohou měnit svou vzájemnou pozici v prostoru během doby života excitovaného stavu (například v prostředí s vysokou viskozitou nebo v rigidní matici). Pro tuto situaci navrhl Perrin model zhášení, ve kterém se molekula zhášecce nachází uvnitř sféry o objemu V_q , která obklopuje fluorofor (tento objem je nazýván sféra efektivního zhášení, aktivní sféra nebo jen sféra zhášení). Pokud se zhášec nachází mimo aktivní sféru, nemá zhášec žádný vliv na fluorofor. Pokud se ale dostane zhášec do oblasti aktivní sféry, intenzita fluorescence je snížena, avšak na dobu života fluorescence nemá zhášení žádný vliv (Obr. 7).

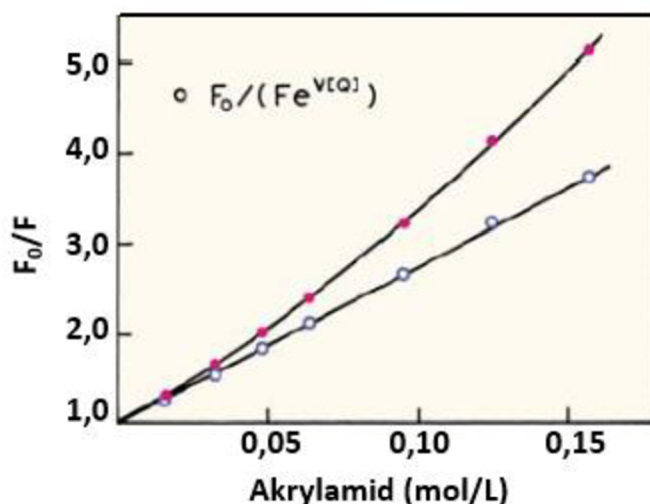
Protože intenzita emise fluorescence je přímo úměrná pravděpodobnosti, že se zhášec nachází v objemu V_q , může být tato pravděpodobnost vyjádřena rovnicí 17:

$$P_0 = \exp(-\langle n \rangle) = \exp(-V_q N_a [Q]), \quad (17)$$

kde N_a je Avogadrova konstanta a P_0 je pravděpodobnost, že se zhášec nenachází v objemu V_q . Perrinův model tedy předpokládá, že intenzita emise je přímo úměrná P_0 , z čehož vyplývá tvar pro Perrinův model:

$$\frac{F_0}{F} = \exp(V_q N_a [Q]) \quad (18)$$

V porovnání se Stern-Volmerovou rovnicí není závislost $\frac{F_0}{F}$ na koncentraci zhášecce lineární, ale vykazuje odchylku od linearity ve vysokých koncentracích zhášecce (Obr. 8). Ze směrnice této závislosti je možno vypočítat objem V_q .



Obr. 8 Příklad zhášení v aktivní sféře. Zhášení NATA (N-acetyl-L-tryptophanamide) pomocí akrylamidu [12]

2.1.6.3.2 Tvorba nefluorescentního komplexu v základním stavu

Předpokladem této teorie je tvorba nefluorescentního komplexu v základním stavu (Obr. 7) v poměru 1:1 podle rovnováhy:



Doba života excitovaného stavu zůstává neovlivněna, protože k tvorbě komplexu dochází v základním stavu. Sice se intenzita fluorescence snižuje s rostoucí koncentrací zhášeče, ale vyhasínání fluorescence po excitačním pulzu zůstává neovlivněno. Příkladem některých látek, které jsou zodpovědné za statické zhášení, jsou chinony, hydrochinony, puriny nebo pyrimidiny.

Závislost intenzity fluorescence na koncentraci zhášeče může být odvozena přes konstantu stability vzniklého nefluorescentního komplexu. Konstanta je dána z předchozí rovnice jako:

$$K_s = \frac{[MQ]}{[M][Q]} \quad (20)$$

a celková koncentrace fluoroforu $[M]_0$ je:

$$[M]_0 = [M] + [MQ], \quad (21)$$

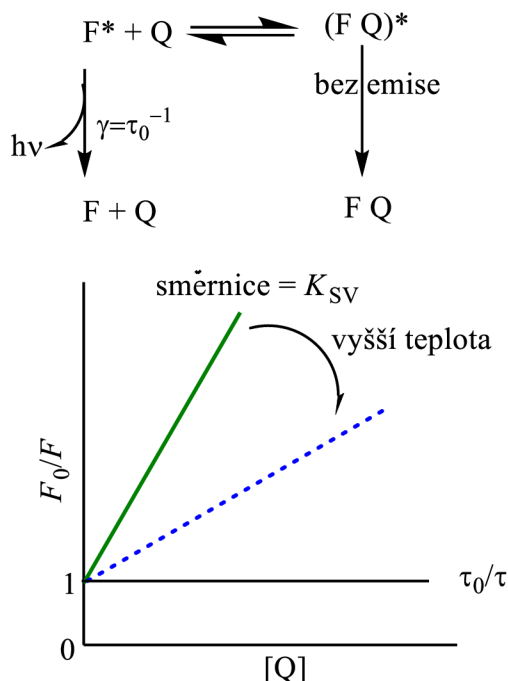
což vede k rovnici 22 pro frakci nekomplexovaného fluoroforu:

$$\frac{[M]}{[M]_0} = \frac{1}{1 + K_s [Q]} \quad (22)$$

Pokud se vezme v úvahu, že intenzita fluorescence je přímo úměrná koncentraci fluoroforu (platí pouze ve zředěných roztocích), tak rovnice 22 může být napsána jako:

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_s [Q] \quad (23)$$

Výsledná závislost $\frac{F_0}{F}$ na koncentraci zhášedce je opět lineární, stejně jako tomu bylo v případě dynamického zhášení (Obr. 9). Změnou oproti rovnici dynamického zhášení je to, že rychlostní konstanta zhášení je v případě statického zhášení konstanta stability komplexu.



Obr. 9 Schéma statického zhášení tvorbou nefluorescentního komplexu v základním stavu a schéma závislosti poměru intenzity fluorescence v nepřítomnosti a v přítomnosti zhášedce na koncentraci zhášedce [4]

2.2 Asociační procesy

2.2.1 Asociativní (micelární) koloidy

Existuje skupina látek, která jen za nízkých koncentrací tvoří pravé roztoky, ale po překročení určité koncentrace jejich molekuly asociují a vytvářejí koloidní částice. Tyto polymolekulární útvary se nazývají micely a látky, které se chovají tímto způsobem, jsou označovány jako micelární neboli asociativní koloidy [13].

Tyto soustavy bývají klasifikovány jako lyofilní, protože jsou v daném disperzním prostředí rozpustné a nepotřebují umělou stabilizaci. Velikost i fyzikální vlastnosti micel jsou určeny okamžitými stavovými veličinami (tedy teplotou, tlakem, koncentrací vlastní i koncentrací přidaných látek) a nezávisí na historii systému. Lyofilní systémy jsou reverzibilní.

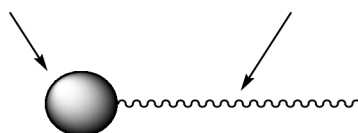
2.2.1.1 Molekulární struktura micelárních koloidů

Schopnost vytvářet micely je podmíněna zvláštní strukturou molekul, tzv. tenzidů. Molekula tenzidu je amfipatická neboli amfifilní, tj. musí se skládat z lyofilní části, která má tendenci se v daném prostředí rozpouštět, a z lyofobní části, která je naopak v témže prostředí nerozpustná (Obr. 10). Neochota lyofobní části ke kontaktu s molekulami rozpouštědla je pak příčinou asociace. Ve většině případů se jedná o povrchově aktivní látky (PAL) rozpustné ve vodě, jejichž

molekuly obsahují silně hydrofilní polární skupinu, která je schopna zajistit rozpustnost ve vodě, a silně hydrofobní nepolární část, tedy jeden nebo více uhlovodíkových řetězců. Aby docházelo k asociaci těchto látek, musí mít povrchově aktivní látky dostatečně dlouhý uhlovodíkový řetězec. Podle toho, zda a jak podléhá hydrofilní skupina elektrolytické disociaci, se dělí micelární koloidy na ionogenní a na neionogenní neboli neutrální. Ionogenní se ještě dále dělí na kationtové, aniontové a amfoterní.

hydrofilní část – hlava

hydrofobní část – uhlovodíkový řetězec



Obr. 10 Amfifilní molekula (tenzid)

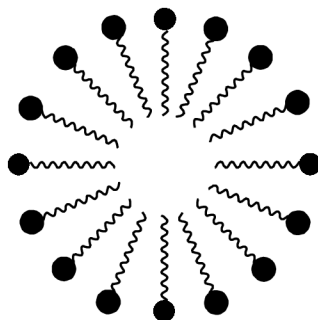
2.2.1.2 Vznik micel

Zředěné roztoky micelárních koloidů se vyznačují charakteristickým průběhem závislosti různých fyzikálních vlastností na koncentraci. Ve velkých zředěních tvoří micelární koloidy pravé roztoky. Při určité koncentraci nastávají na křivkách koncentračních závislostí různých fyzikálně-chemických vlastností ostré zlomy. Při této určité koncentraci dosahuje hydrofobní část molekuly tenzidu minimálního styku s vodou. Tato koncentrace se nazývá kritická micelární koncentrace (CMC). Je to nejvyšší možná koncentrace, při níž je asociativní povrchově aktivní látka v roztoku převážně v molekulové (iontové) formě. Nad CMC dochází k tvorbě asociátů molekul rozpuštěné látky ve větší celky, koloidní micely. Tvorbu micely také charakterizuje tzv. agregační nebo asociací číslo. Toto číslo udává, kolik molekul tenzidu se podílí na struktuře micely.

Při mnohem nižších koncentracích než je kritická micelární koncentrace, dochází k tvorbě tenzidu v agregované formě, nikoliv však k tvorbě micel. Koncentrace, při které se tvoří takovéto typy agregátů, je nazývána kritická agregační koncentrace (CAC) [14].

2.2.1.3 Struktura micel ve zředěném vodném roztoku

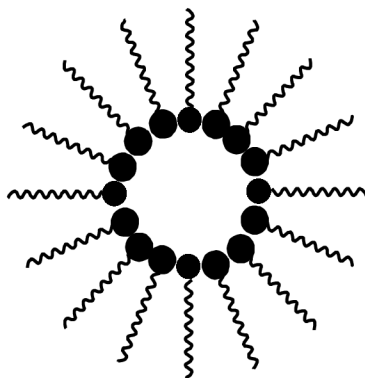
Existence micel byla potvrzena mnoha experimentálními metodami, ale o jejich velikosti a tvaru, zvláště v koncentrovanějších roztocích, existuje mnoho různých představ. Velikost a tvar micel závisí na koncentraci, teplotě, struktuře PAL, charakteru mezimolekulárních sil atd. Měřením rozptylu světla byla potvrzena domněnka, že micely ve zředěných roztocích mají kulový tvar, proto se mluví o sférických micelách (Obr. 11). Na povrchu jsou molekulám vody vystaveny hydrofilní skupiny, zatímco hydrofobní uhlovodíkové řetězce jsou sdruženy v jádru micely tak, aby jejich kontakt s vodou byl co nejmenší [15].



Obr. 11 Struktura micely

2.2.1.4 Obrácené (reverzní) micely

Některé amfifilní molekuly vytvářejí v nepolárních rozpouštědlech micely, jejichž jádro tvoří polární skupiny, zatímco uhlovodíkové řetězce směřují ven do nepolárního prostředí (Obr. 12). Kritická micelární koncentrace u obrácených micel je těžko definovatelná, protože oblast přechodu z pravého roztoku na koloidní roztok pokrývá širší interval koncentrací. Silně polární jádro micely velmi ochotně rozpouští vodu, což má za následek zvýšení hodnoty asociačního čísla (ale i přes zvýšení asociačního čísla reverzních micel bude toto číslo stále menší než asociační číslo micel vytvořených v polárním rozpouštědle). Kvůli polárnímu jádru bývá velmi obtížné připravit dokonale bezvodé roztoky. Jádro reverzní micely je vhodným prostředím pro katalýzu některých chemických reakcí.

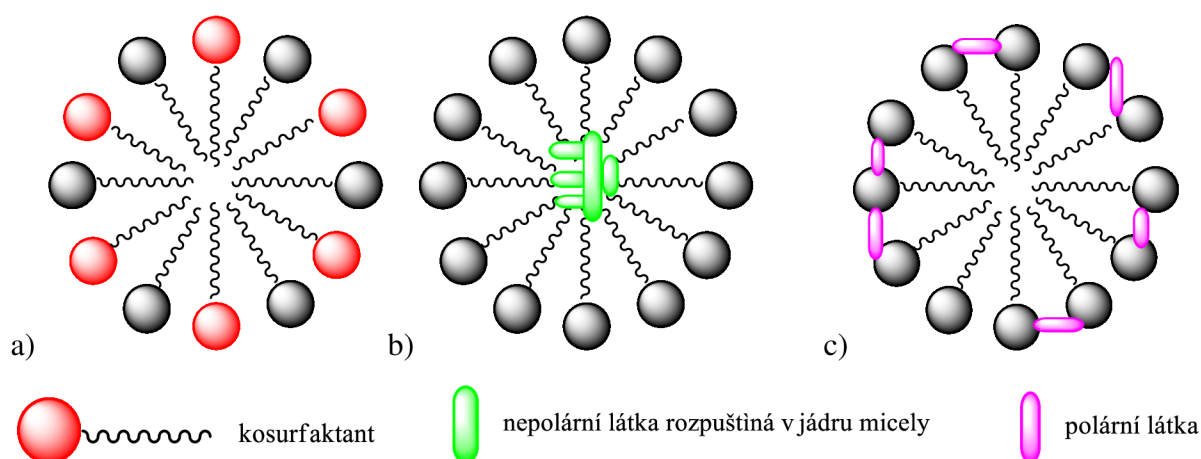


Obr. 12 Struktura obrácené (reverzní) micely

2.2.2 Solubilizace

Mnohé hydrofobní nebo amfifilní sloučeniny, které se ve vodných roztocích málo rozpouští, nebo sloučeniny, které se ve vodných roztocích nerozpouští vůbec, se rozpouští lépe v micelárním roztoku. Tento jev je nazýván solubilizace. Lze jej pozorovat pouze při koncentraci vyšší než CMC, z čehož vyplývá, že solubilizovaná látka není v koloidním roztoku přítomna v disperzním prostředí, ale je začleněna do micely.

Nepolární látky se rozpouštějí v jádru micely, amfifilní molekuly (tzv. kosurfaktanty) se rozmisťují v micelách tak, že jejich uhlovodíkové řetězce směřují dovnitř micel a polární skupiny do vodné fáze. Polární látky jsou solubilizovány na povrchu micely nebo v těsné blízkosti jejího povrchu (Obr. 13).



Obr. 13 Solubilizace a) kosurfaktantů, b) nepolárních látek, c) polárních látek solubilizovaných na povrchu micely

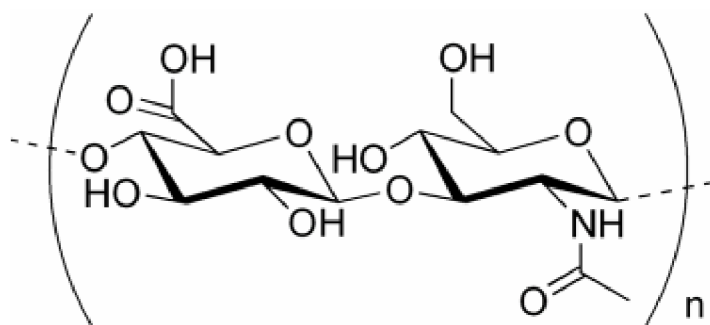
2.3 Hyaluronan

Kyselina hyaluronová je vysokomolekulární, biologicky odbouratelný, netoxický a nehořlavý lineární polysacharid, který objevili v roce 1934 Karl Meyer a jeho asistent John Palmer. Izolovali ji ze sklivce hovězích očí. Název kyselina hyaluronová vznikl ze slov hyaloid (sklivce) a uronová kyselina. Nejčastěji je tato látka označována jako *hyaluronan* [16].

Kyselina hyaluronová nabízí mnoho klinických uplatnění. První klinické použití kyseliny hyaluronové se datuje do roku 1968, kdy byly popáleniny léčeny čištěnou kyselinou hyaluronovou. Od té doby si kyselina hyaluronová našla cestu do téměř všech oblastí medicíny [17].

2.3.1 Chemická struktura

Z hlediska chemické struktury se hyaluronan skládá ze stále se opakujících sacharidových jednotek, a to z kyseliny D-glukoronové a z D-N-acetylglukosaminu. Jednotlivé sacharidové jednotky se k sobě váží beta-1,4 a beta-1,3 glykosidickými vazbami (Obr. 14).



Obr. 14 Chemická struktura kyseliny hyaluronové

2.3.2 Metabolismus kyseliny hyaluronové

Metabolismus hyaluronanu je velmi dynamický. Některé buňky, jako jsou například chondrocyty v chrupavkách, aktivně syntetizují a katabolizují hyaluronan po celý jejich život. Studie těchto metabolismů ukázaly, že poločas rozpadu hyaluronanu v chrupavkách se pohybuje okolo dvou až tří týdnů. Dalším příkladem buněk, které aktivně syntetizují a rozkládají hyaluronan, patří keratinocyty v pokožce. V tomto případě je poločas rozpadu hyaluronanu podstatně nižší. Je menší než den [16].

2.3.3 Výskyt a vlastnosti kyseliny hyaluronové

Hyaluronan se vyskytuje u všech obratlovců nebo u streptokoků. Hyaluronan je významnou měrou zastoupen v extracelulárních maticích, kde se dělí většina tkáně. U člověka se ve vysoké koncentraci vyskytuje v kožní tkáni, v kloubech nebo v očním sklivci. Má unikátní hygroscopické, reologické a viskoelastické vlastnosti. Ve většině případů je hyaluronan v extracelulární matrix organizován pomocí specifických interakcí s ostatními molekulami. Vysokomolekulární hyaluronan o vysokých koncentracích může díky sterickým interakcím tvořit zapletené molekulární sítě. Také může tvořit vlastní asociáty mezi jednotlivými molekulami nebo uvnitř těchto molekul, což se děje, pokud úsek hydrofobní části molekuly hyaluronanu reversibilně interaguje s hydrofobním povrchem jiné molekuly. Tyto asociáty vykazují jiné vlastnosti než izolované molekuly hyaluronanu. Mohou klást odpor rychlému, krátce trvajícím toku sítí a tím vykazují elastické vlastnosti, které mohou šířit různé síly uvnitř sítě. Pokud je ale na síť působeno pomalým, dlouhotrvajícím tokem, asociát může částečně separovat a srovnat molekuly, přičemž se projevují viskózní vlastnosti kapaliny.

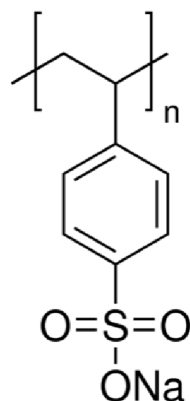
2.3.4 Hydratační obal

Hyaluronan tvoří ve vodných roztocích hustou polymerní síť, která je stabilizována vodíkovými vazbami a hydrofobními interakcemi [18], což je důvodem, spolu s polaritou hyaluronanu, vysokého zadržování vody. Zároveň se předpokládá, že zadržování vody představuje jeden z nejdůležitějších aspektů biologických funkcí hyaluronanu [19].

Nicméně se v literatuře objevují i odlišné představy o zadržování vody hyaluronanem, které tvrdí, že není nic moc zajímavého na chování hyaluronanu v roztoku. Podle [20] a [21] není hyaluronan pokrytý souvislým hydratačním obalem, ale velkými vodními klastry, které jsou vázané k hyaluronanu nebo uvězněné uvnitř řetězců hyaluronanu a mohou být tím důvodem, proč hyaluronan tvoří vysoce viskózní roztoky i v malých koncentracích.

2.4 Polystyren sulfonát

Polystyren sulfonát sodný (PSS) je z chemického pohledu sůl polykyseliny s funkčními sulfonátovými skupinami, navázanými na polymerní řetězec tvořený monomery styrenu. Struktura tedy vychází z polymeru polystyrenu, kde jednotlivé monomerní jednotky jsou sulfonovány funkčními skupinami SO_2^- (Obr. 15). Tento polymer je dobře rozpustný ve vodě a je téměř nerozpustný v nižších alkoholech. Polystyrensulfonát tak samovolně nezaujímá strukturně organizovanější formy a ve vodném roztoku tvoří náhodně organizované shluky [22], [23].

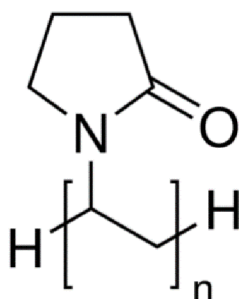


Obr. 15 Struktura PSS

Polystyren sulfonát zároveň představuje polymer s vysokou elektronovou hustotou, což z něj činí i silný polyelektrolyt. Jelikož u PSS byla prokázána interakce s kationtovými tenzidy, bude tento polymer vhodný jako srovnání biopolymeru (hyaluronan) a syntetického polymeru [22], [24].

2.5 Polyvinyl pyrrolidon

Poly (N-vinyl-2-pyrrolidone) (PVP) představuje opakující se monomerní jednotky N-vinyl pyrrolidonu. Jde o flexibilní a náhodně uspořádaný polymer, který je vysoce rozpustný ve vodě a také v organických rozpouštědlech. PVP se používá v různých aplikacích díky jeho vysoké chemické stabilitě a výrazné schopnosti formy komplexů [25], [26].



Obr. 16 Struktura PVP

2.6 Albumin hovězího séra

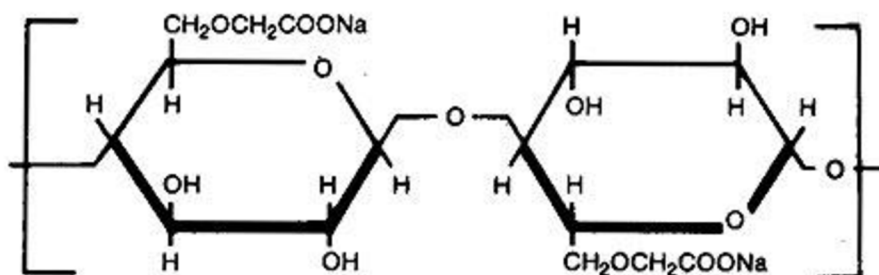
Albumin hovězího séra (BSA) je protein získaný z hovězí krevní plazmy. BSA je tvořen a-helicoidálním globulárním proteinem, který se skládá z jednoho polypeptidického řetězce s 583 aminokyselinami. Séum albuminy představují nejvíce studované proteiny v krevní plazmě a zároveň se používají v různých aplikacích v přírodních vědách nebo jako modelové systémy pro vázání proteinu a ligandu. Díky emulzifikujícím vlastnostem se BSA také používá jako aditivum v potravinářském průmyslu nebo se využívá jako nosič léčiv [27], [28].

2.7 Karboxymethyl celulóza

Karboxymethyl celulóza (dále označována jako KMC) představuje aniontový polymer rozpustný ve vodě, který je odvozený od celulózy a nejčastěji se používá ve formě sodné soli. Čistá KMC je bílý prášek bez chuti a bez zápachu. Není rozpustná v organických rozpouštědlech, ale je rozpustná ve vodě. Jedním z důležitých faktorů, který ovlivňuje viskozitu a rozpustnost karboxymethyl celulózy, je stupeň substituce.

2.7.1 Chemická struktura

Karboxymethyl celulóza je éter celulózy připravovaný reakcí celulózy a chloroctanu sodného za přesných podmínek.



Obr. 17 Ideální struktura karboxymethyl celulózy se stupněm substituce 1

2.7.2 Výskyt a vlastnosti

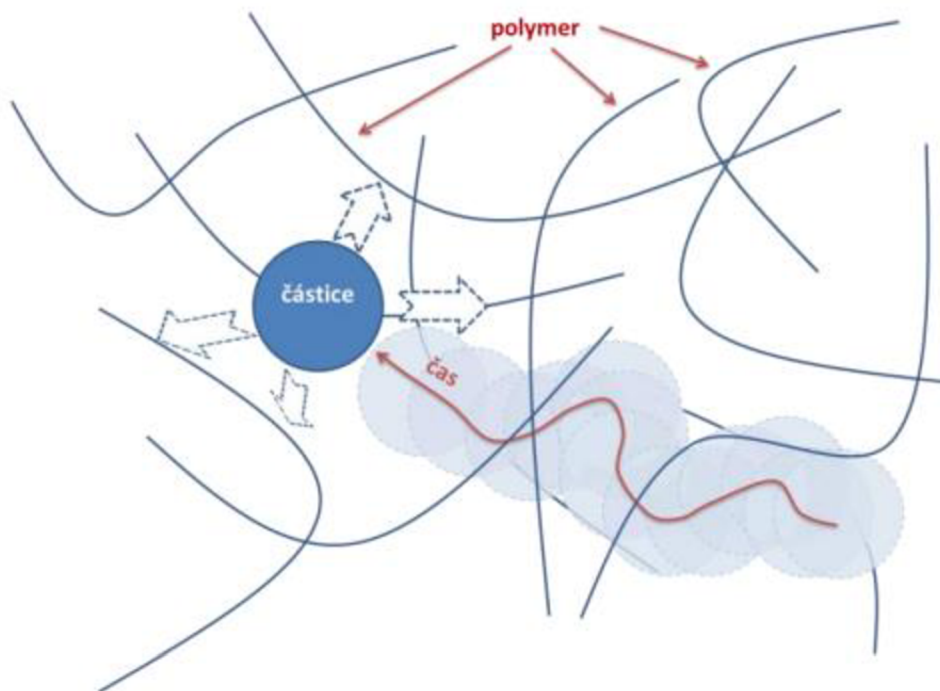
Od jejího komerčního představení v roce 1946 byla karboxymethyl celulóza použita v nejrůznějších aplikacích. Vlastnosti KMC z ní dělají ideální prostředek pro zahušťování, stabilizaci nebo tvorbu filmů. Nejvíce se jí využívá v kosmetickém průmyslu (pasty, šampóny,...), farmacii (sirupy, suspenze,...) nebo potravinářství (sirupy, jídlo pro psy, zmrzliny,...).

Jak je již zmíněno výše, viskozita karboxymethyl celulózy závisí na stupni substituce. Například produkty se stupněm substituce 1,2 nemají tak vysokou viskozitu jako produkty se stupněm substituce 0,7, i když jsou vyrobeny stejnou metodou. Nicméně všechny roztoky karboxymethyl celulózy, nehledě na typ, mají pseudoplastické chování [29], [30].

2.8 Mikroreologie

2.8.1 Základní principy mikroreologie

Klasická reologie používá externí síly, např. kužel, kterým působí silou na vzorek, a zkoumá tak viskoelastické vlastnosti roztoků. U mikroreologie se jedná o začlenění drobných částic do struktury zkoumaného materiálu (Obr. 18). Vyhodnocením pohybu těchto částic v čase je pak možné určit vlastnosti daného materiálu.



Obr. 18 Schéma pohybu začleněné částice ve vzorku

Podle zdroje pohybu rozdělujeme mikreologii do dvou základních podskupin, a to mikreologii pasivní, využívající pouze tepelného Brownova pohybu, a mikreologii aktivní, která používá aktivní manipulaci částic. Aktivní přístup spočívá ve využití magnetického či elektrického pole nebo jiných mikromechanických sil, jako je například užití optické pinzety. Tato měření jsou analogická s klasickou reologií, kde je na vzorek vkládán vnější tlak, a tedy je nutno použít pro měření externí sílu [31].

2.8.2 Pasivní mikreologie

Jak už bylo zmíněno dříve, základem pasivní mikreologie je pohyb částic pouze na základě tepelného Brownova pohybu. Typická energie Brownova tepelného pohybu představuje součin $k_B T$. Nejběžnější metodou v mikreologii je tzv. videomikreologie (VPTM – video particle tracking micreology), do které patří jednočásticová [32] a dvoučásticová mikreologie [33]. Na základě tepelného pohybu můžeme také stanovit vlastnosti materiálu použitím DLS (dynamic light scattering) či FCS (fluorescence correlation spectroscopy). Každou z těchto metod jsme schopni v zásadě určit reologické vlastnosti daného materiálu, avšak každá z nich má určité přednosti či nedostatky, čímž se stává vhodnou pro jiný typ materiálu s požadovanými parametry.

2.8.3 Brownův pohyb

Brownův pohyb je neustálý a náhodný pohyb částic suspendovaných v tekutině (v kapalině nebo v plynu), který byl poprvé systematicky sledován Robertem Brownem v roce 1827. Einstein jako první vysvětlil v roce 1905 Brownův pohyb suspendované částice jako následek termálního pohybu molekul okolní tekutiny. Einsteinova teorie Brownova pohybu je dána rovnicí:

$$\langle \Delta r^2(t) \rangle = \langle (r(t) - r(0))^2 \rangle = 2Dt \quad (24)$$

kde $\langle \Delta r^2(t) \rangle$ je střední čtverec posunu (mean-square displacement = MSD) volné brownovské částice v jedné dimenzi během času t a D je difuzní koeficient. Difuzní koeficient je dán Stokes-Einsteinovou rovnicí:

$$D = \frac{k_B T}{6\pi\eta R} \quad (25)$$

kde k_B je Boltzmannova konstanta, T je teplota, η je viskozita tekutiny a R je poloměr částice [31], [34].

2.8.4 Mikroreologické metody

V této podkapitole jsou popsány obecné principy jednotlivých metod použitých v této práci pro studium mikroreologických vlastností.

2.8.4.1 Videomikroreologie

Videomikroreologie je jednou ze stěžejních mikroreologických metod. Až stovky částic o velikosti přibližně jednoho mikrometru mohou být sledovány pomocí videomikroreologie. Tento přístup poskytuje přímou vizualizaci možných nehomogenit přítomných ve vzorku sledováním jednotlivých částic. Stejně tak jsme ale schopni určit vlastnosti vzorku jako celku zprůměrováním pohybu těchto částic [31].

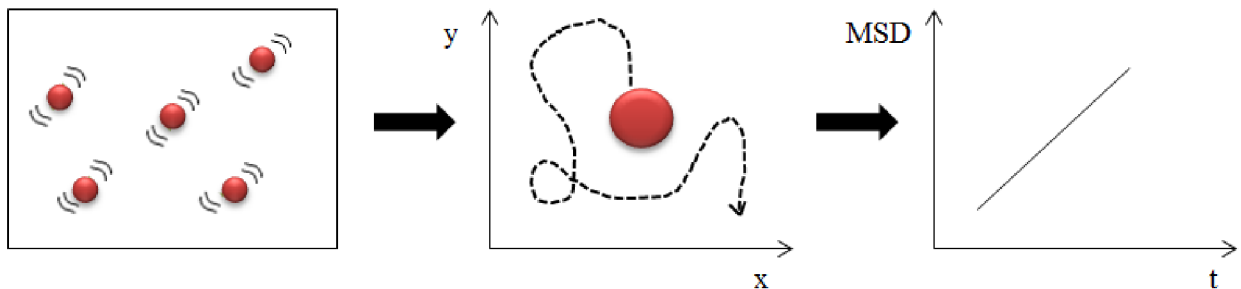
Princip této techniky spočívá ve sledování a vyhodnocování trajektorií částic odděleně. Dynamika jejich pohybu je popsána v čase pomocí korelační funkce, která je také známa jako mean squared displacement ($MSD = \langle \Delta x^2(t) \rangle$) a je definována jako:

$$\langle \Delta x^2(\tau) \rangle = \langle (x(t+\tau) - x(t))^2 \rangle \quad (26)$$

kde x je d -rozměrná pozice částice, τ je časový interval a závorky naznačují, že se jedná o průměrnou hodnotu v čase. S konstantou úměrnosti D , která je definována jako difuzní koeficient translačního pohybu:

$$\langle \Delta x^2(t) \rangle = 2dDt^\alpha \quad (27)$$

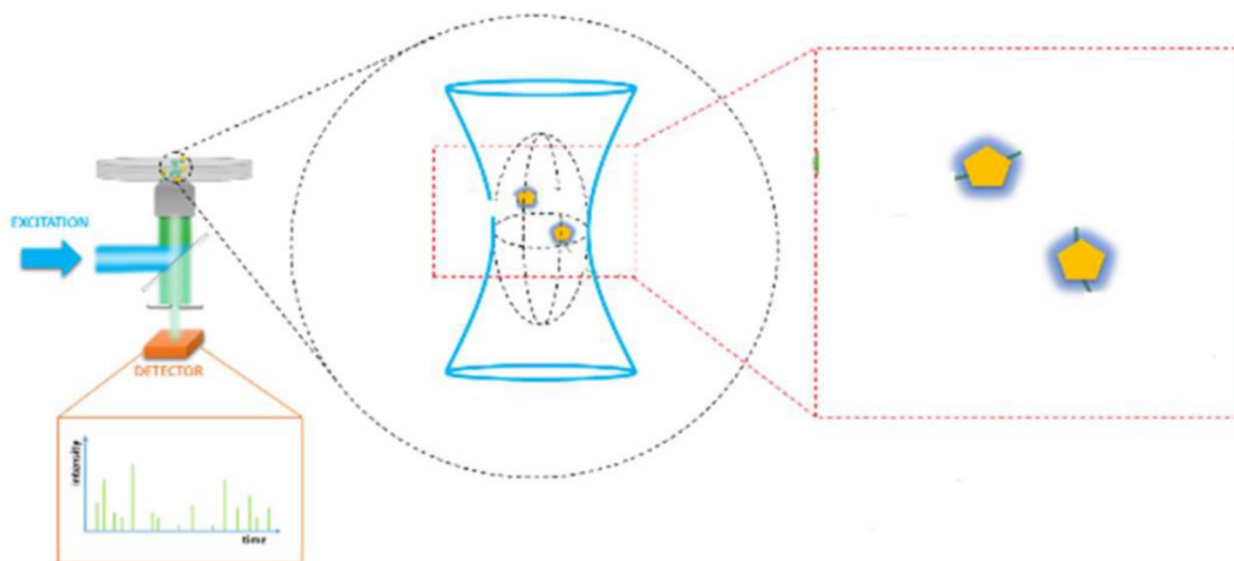
kde α je časový exponent.



Obr. 19 Schéma tvorby MSD

2.8.4.2 Fluorescenční (časově-rozlišená) korelační spektroskopie

Metoda fluorescenční korelační spektroskopie (FCS) je založena na pozorování fluktuací v intenzitě fluorescence. Tyto fluktuace jsou pozorovány ve velmi malých objemech (okolo 1 fl). Jde o metodu, kde je pozorován konstantní objem a sleduje se, jak v pozorovaném objemu proudí fluorofory dovnitř a ven. Právě tento pohyb je zaznamenán jako dočasná fluktuace v intenzitě fluorescence. Metoda FCS je velmi citlivá, neboť jen několik fluoroforů může být pozorováno najednou. Pokud by byl použit příliš koncentrovaný roztok, v pozorovaném objemu by se nacházelo příliš mnoho fluoroforů a bylo by vidět méně fluktuací (signál by byl konstantní). Z tohoto důvodu se používá koncentrací v řádu nanomolů.



Obr. 20 Schéma obecného principu FCS

Fluktuace fluorescence nemusí vzejít pouze z difuze fluoroforů skrz pozorovaný objem, ale může k nim dojít také například chemickou reakcí, komplexací atd. Nicméně jakékoli z těchto fluktuací jsou popsány pomocí autokorelační funkce $G(t)$:

$$G(t) = \frac{\langle I(t')I(t+t') \rangle}{\langle I(t') \rangle \langle I(t') \rangle} \quad (28)$$

Autokorelační funkce (ACF) obsahuje v podstatě dvě důležité informace. První z nich je hodnota $G(0)$ neboli $G(t)$ v $\tau = 0$, protože $G(0)$ představuje průměrný počet molekul \bar{N} v pozorovaném objemu. Čím větší je počet molekul, tím menší je hodnota $G(0)$. Přesněji $G(0) - 1$ je nepřímoúměrně závislé na \bar{N} . To tedy znamená, že citlivost FCS se zvyšuje s klesající koncentrací fluoroforu. Druhá informace je rychlost a tvar poklesu autokorelační funkce $G(t)$. Tento pokles představuje průměrné trvání fluktuace signálu [4].

Pokud budeme uvažovat jeden fluorofor pohybující se pomocí Brownova pohybu definovaným objemem s hodnotou difuzního koeficientu D_r , pak může být autokorelační funkce psána jako

$$G(t) = \frac{1}{N} \left(1 + \frac{4}{w_{xy}^2} Dt \right)^{-1} \left(1 + \frac{4}{w_z^2} Dt \right)^{-1/2} \quad (29)$$

kde w_{xy} a w_z jsou rozměry pozorovaného objemu ve směru kolmém (w_{xy}) a rovnoběžném (w_z) vůči směru laserového paprsku [2].

Rozměry pozorovaného objemu (nazývaný efektivní nebo konfokální objem) jsou ve vztahu s objemem efektivního objemu podle rovnice:

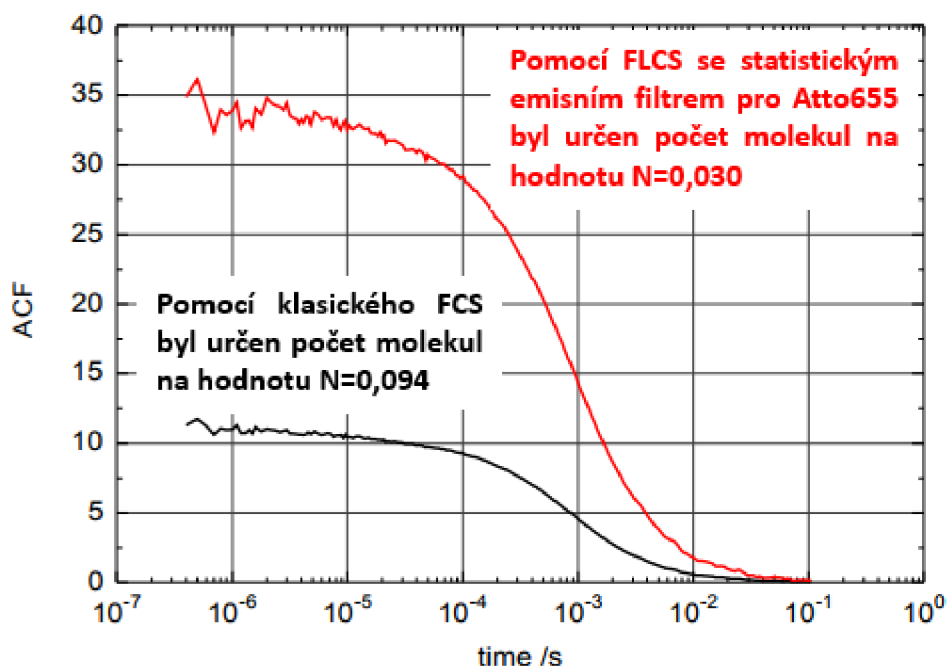
$$V_{eff} = \pi^{3/2} w_{xy}^2 w_z \quad (30)$$

Pokud je známý efektivní objem a z autokorelační funkce byl získán počet molekul, může být určena koncentrace fluoroforu podle rovnice:

$$N = C \overline{V_{eff}} \quad (31)$$

Ke klasické metodě FCS patří ještě její vylepšená verze, která spojuje výše zmíněný princip měření s metodou TCSPC (princip fungování metody je dále popsán v kapitole 4.1). Kombinace obou metod umožňuje vylepšit jisté aspekty FCS. Klasická autokorelační funkce je vypočítána na základě příchodu detekovaných fotonů. Pokud se ve vzorku nachází dva fluorofory, výsledná autokorelační funkce není jen lineární kombinací. Pokud se navíc vezme v úvahu populace v tripletovém stavu, rozptýlené excitační světlo, nečistoty atd., analýza takové autokorelační funkce je velmi komplexní. I když vezmeme v úvahu pouze jeden fluorofor, stále je autokorelační funkce ovlivněna tripletovým stavem, rozptylem atd.

Při použití FLCS je použita pulzní excitace, kde jsou zaznamenány dva nezávislé vstupy pro každý detekovaný foton. První vstup je makroskopický čas (vztažený k začátku experimentu a použitý jako u klasického FCS) a druhý je mikroskopický čas (vztažený k začátku excitačního pulzu – nová kvalitativní informace důležitá pro určení přínosu fotonu do autokorelační funkce). Oba dva příspěvky jsou vyhodnoceny samostatně při výpočtu autokorelační funkce. Díky FLCS lze oddělit ať už dva různé fluorofory, nebo vliv tripletu, rozptylu atd. a tím zvýšit přesnost určení ACF a správnost hodnot počtu molekul [36] (Obr. 21).



Obr. 21 Příklad odstranění rozptýleného světla pomocí FLCS

2.8.4.3 Dynamický rozptyl světla

V současné době je DLS jednou z nejčastěji používaných metod pro měření velikosti částic a charakterizaci distribuce velikosti částic. Principem metody je měření intenzity světla rozptýleného molekulami v daném vzorku v závislosti na čase. Fluktuační v intenzitě rozptýleného záření je převážně dána Brownovým pohybem částic. Vzhledem ke vzájemné korelaci mezi difuzním koeficientem a velikostí částic je DLS hojně využívaná nedestruktivní metoda pro určení rozměrů částic. Metoda DLS dokáže stanovit velikost částic v řádu nanometrů až po mikrometry.

Intenzita rozptýleného světla kolísá náhodně podle toho, jak se pohybují jednotlivé částice v roztoku. Tato časová závislost intenzity rozptýleného světla je analyzována pomocí autokorelační funkce (Obr. 22). Intenzitní korelační funkce je dána podle rovnice:

$$g^2(t) = \langle I(0)I(t) \rangle \quad (32)$$

Korelační funkce může být též vyjádřena pomocí Siegertova vztahu:

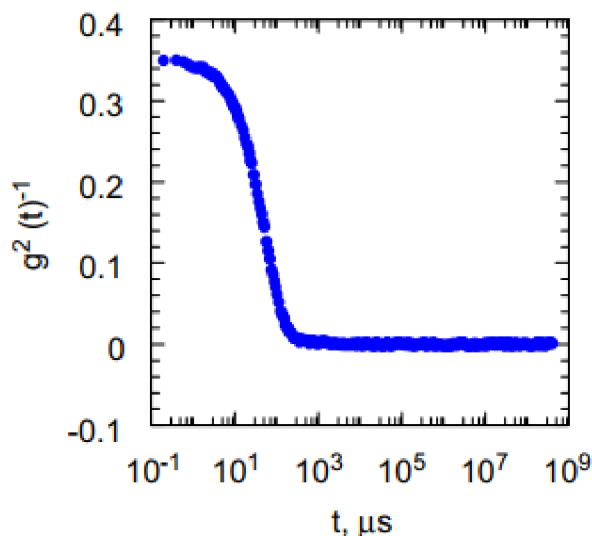
$$g^2(t) = 1 + b |g^1(t)|^2, \quad (33)$$

kde
$$g^1(t) = \exp(-t/\tau), \tau^{-1} = \Gamma = Dq^2, \quad (34)$$

kde I představuje intenzitu rozptýleného záření, q představuje rozptylový vektor a D difuzní koeficient. Z difuzního koeficientu pak může být vyjádřen hydrodynamický poloměr (R_H), který může být vyjádřen k difuznímu koeficientu podle Stokesova zákona:

$$D = \frac{k_B T}{6\pi\eta R_H}, \quad (35)$$

kde k_B představuje Boltzmannovu konstantu, T teplotu a η viskozitu rozpouštědla (disperzního prostředí) [37], [38].



Obr. 22 Autokorelační funkce intenzity rozptýleného záření v logaritmické podobě [38]

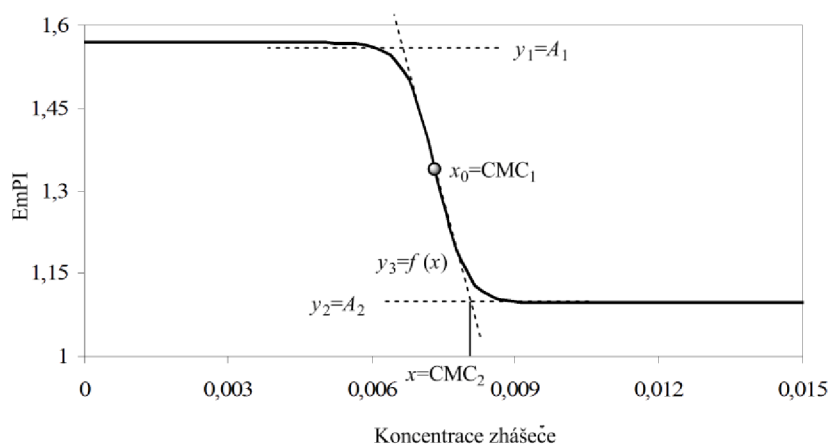
3 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

Fluorescenční spektroskopie představuje jednu z nejvíce používaných metod pro studium různých systémů vzhledem k citlivosti fluorescence na změny prostředí, jako jsou polarita, viskozita nebo pH.

3.1 Kritická micelární koncentrace a agregační číslo

Příkladem použití fluorescence jakožto polaritní závislosti v koloidních systémech může být určení kritické micelární koncentrace (CMC). Při agregaci tenzidů v micelu ve vodném disperzním prostředí můžeme pozorovat následující dvě fáze. Hydrofilní fázi a hydrofobní mikroprostředí uzavřené uvnitř micely. Při použití fluorescenční sondy schopné reagovat na změnu polaritě můžeme z příslušné závislosti stanovit kritickou micelární koncentraci. Jednou z nejpoužívanějších fluorescenčních sond pro stanovení kritické micelární (agregační) koncentrace je pyren [39]-[48]. *Kalyanasundaram* a *Thomas* v roce 1976 ukázali, že poměr prvního a třetího emisního píku pyrenu může být použit pro stanovení kritické micelární koncentrace tenzidů vlivem vysoké citlivosti vibračních přechodů pyrenu na polaritu prostředí [49]. První emisní pík odráží přechod elektronu z nultého vibračního stavu excitované hladiny do nultého vibračního stavu základní hladiny ($0 \rightarrow 0$). Tento pík představuje referenční hodnotu intenzity fluorescence. Třetí pík představuje změnu intenzity fluorescence v závislosti na polaritě, což je přechod $0 \rightarrow 2$, tedy přechod z nultého vibračního stavu excitované hladiny do druhého vibračního stavu základní hladiny [49]. Při vynesení závislosti poměru intenzity fluorescence prvního a třetího emisního píku pyrenu (emisní polaritní index – EmPI) na koncentraci CTAB získáme sigmoidní závislost, z jejíhož proložení získáme hodnotu kritické micelární koncentrace. Zde ovšem narážíme na problém, který z bodů závislosti brát jako hodnotu kritické micelární koncentrace. Nabízí se dvě možnosti, a to inflexní bod nebo bod A_2 (Obr. 23). *Aguiar* a spol. porovnávali hodnoty CMC změřené pomocí pyrenu, pomocí měření vodivosti, povrchového napětí a s hodnotami uvedenými

v další literatuře. Pomocí porovnání naměřených hodnot CMC navrhli následující postup při vyhodnocování kritické micelární koncentrace. Jestliže je poměr $\frac{x_0}{\Delta x}$ menší jak 10, inflexní bod by měl být vyhodnocen jako hodnota kritické micelární koncentrace. Při hodnotě $\frac{x_0}{\Delta x}$ větší jak 10, by se měl brát bod A_2 jako hodnota kritické micelární koncentrace [18].



Obr. 23 Závislost emisního polaritního indexu na koncentraci tenzidu (osa x je zobrazena v logaritmickém měřítku) [41]

Samozřejmě emisní polaritní index nepředstavuje jedinou metodu stanovení kritické micelární koncentrace pomocí fluorescenčních sond. Lze také například využít molekul, u kterých můžeme detekovat fluorescenci až po inkorporaci této molekuly do hydrofobního jádra micely. Příkladem takové sondy může být perylen, nilská červeň nebo například 1,6-difenyl-1,3,5-hexatrien (DPH) [50]-[53]. Ve vodném roztoku je, u výše zmíněných molekul, naměřena velmi slabá fluorescence. Avšak po solubilizaci molekuly do hydrofobního jádra micely prudce vzroste intenzita fluorescence a tento bod bývá vyhodnocen jako hodnota kritické micelární koncentrace. Dále lze využít změny doby života pro stanovení kritické micelární koncentrace. Například u pyrenu dojde ke zvýšení doby života, když jsou molekuly pyrenu solubilizovány v micely [49]. Lze takto využít i spoustu dalších sond. Pro cíl této práce bych uvedl příklad fluorescenčních sond, které podstupují deprotonaci v excitovaném stavu, například naftol. Při solubilizaci naftolu v micely dojde k rapidnímu zvýšení doby života protonované i neprotonované formy naftolu [54], [55]. Jednou z novějších technik detekce kritické micelární koncentrace je fluorescenční korelační spektroskopie. Zde se využívá schopnosti fluorescenční korelační spektroskopie měřit koncentraci fluorescenčních částic, z čehož lze následně vypočítat kritickou micelární koncentraci agregátu navázaného na molekulách fluorescenční sondy [56].

Dalším důležitým parametrem micel, který se často stanovuje pomocí fluorescenční spektroskopie, je agregační číslo neboli počet molekul tenzidu tvořících micely [4]. Agregační číslo obsahuje informace o velikosti micely či jejím tvaru, což může být důležité při stanovení stability nebo pro praktické aplikace zkoumaného systému. Nicméně agregační číslo může být

ovlivněno například teplotou, koncentrací přidaného elektrolytu, přidavkem organických molekul atd. [57]-[60] Při využití stacionární fluorescence se opět nejčastěji používá fluorescenční sonda pyren. Využívá se zhášení fluorescence pyrenu, tedy sledování poklesu intenzity fluorescence v závislosti na koncentraci zhášeče. Ze směrnice této závislosti je možno vypočítat agregační číslo. Stacionární metoda předpokládá, že se v systému nachází imobilní sonda i zhášeč, tedy že nedochází k žádné intermicelární migraci sondy a zhášeče po dobu života fluorescenční sondy. Při použití koncentrace fluorescenční sondy mnohem nižší než je koncentrace micel a pokud se podíl koncentrace zhášeče a micel bude měnit v rozmezí hodnot 0 až 2, tak změna intenzity emise fluorescence je dána rovnicí 36 [61], [62]:

$$\frac{F_0}{F} = \exp\left(\frac{[Q]}{[M]}\right) \quad (36)$$

kde [M] představuje koncentraci micel a [Q] koncentraci zhášeče. Dále kinetický poměr $\frac{k_Q}{k}$ (k_Q představuje rychlostní konstantu intramicelárního zhášení a k rychlostní konstantu intramicelárního vyhasínání fluorescence) musí být větší jak 1 a distribuce sondy a zhášeče podléhá Poissonově statistice. Pokud by k_Q bylo stejné nebo menší než k , pak by se získané hodnoty agregačního čísla výrazně lišily od hodnoty získané pomocí dalších metod [63], [64]. Jestli tedy vyneseme závislost $\ln \frac{F_0}{F}$ na koncentraci zhášeče, můžeme ze směrnice následující závislosti určit agregační číslo:

$$\ln \frac{F_0}{F} = \frac{N_{ss}}{[S] - [\text{CMC}]} [Q], \quad (37)$$

kde [S] reprezentuje celkovou koncentraci tenzidu a [CMC] hodnotu kritické micelární koncentrace.

Vzhledem k omezené možnosti použití stacionární metody pro systémy, v nichž kinetický poměr dosahuje hodnot okolo jedné, a protože intenzita fluorescence je ovlivněna zhášením vzdušným kyslíkem, je lepší použití jiné metody pro stanovení agregačního čísla tenzidů. Z fluorescenčních metod se nabízí časově-rozlišená fluorescence. Sice vzdušný kyslík ovlivňuje intenzitu fluorescence, ale neovlivňuje dobu života fluorescence. Doba života není ani závislá na koncentraci nebo vlnové délce [2]. Vzorek je v tomto případě excitován velmi krátkým světelným pulzem a vyhasínání fluorescence se zaznamenává pomocí TCSPC (time-correlated single photon counting) zařízení. Při absenci zhášeče se rychlostní konstanta vyhasínání může psát $k = \frac{1}{\tau_0}$ (τ_0 představuje dobu života fluoroforu v micelárním prostředí) a křivka vyhasínání může být popsána monoexponenciální funkcí. Přidání zhášeče způsobí, že se vyhasínání fluorescence stává biexponenciální a může být pro výpočty použita rovnice pro micelární zhášení, kterou navrhli Infelta a Tachiya [64], [65]:

$$F(t) = F(0) \exp\left\{-\frac{t}{\tau_0} - C[1 - \exp(-k_Q t)]\right\}, \quad (38)$$

kde $F(t)$ a $F(0)$ jsou intenzity fluorescence v čase t a v čase 0 a C představuje poměr koncentrace zhašeče a micel. Pokud je vynesena závislost C na koncentraci zhašeče, tak ze směrnice této závislosti může být vypočtena hodnota agregačního čísla [62], [66], [67]:

$$C = \frac{N_D}{[S] - [\text{CMC}]} [Q] \quad (39)$$

I stanovení agregačního čísla pomocí časově-rozlišené fluorescence má jednu podmínku. Experiment musí být navržen tak, aby hodnoty C byly okolo 1. Vysoká koncentrace zhašeče, tedy hodnoty C vyšší jak 2, by mohla ovlivnit strukturu micel [68].

Jedna z průkopnických prací porovnávající agregační čísla stanovená pomocí stacionární a časově-rozlišené fluorescence je publikace *Alargovy a spol.* z roku 1998. Porovnávali hodnoty samotných tenzidů (kationtové, aniontové i neiontové) a dále tenzidu dodecylsiranu sodného (SDS) v přítomnosti polyetylen glykolu. Pokud byl kinetický poměr větší jak 5, byla pomocí obou metod zjištěna podobná agregační čísla. V tomto případě šlo jak o některé iontové tenzidy tvořící relativně malé micely s nízkou mikroviskozitou, tak i o micely vázané na polymer, kde je sice mikroviskozita vyšší, ale hodnoty agregačního čísla jsou relativně nízké. Pro většinu zkoumaných systémů byly ale hodnoty zjištěné pomocí časově-rozlišené fluorescence větší než u stacionární fluorescence [62].

Používanější z obou metod bylo dříve stanovení agregačního čísla pomocí stacionární fluorescence, protože vybavení pro časově-rozlišenou fluorescenci představovalo pro běžnou laboratoř nemalou investici. V dnešní době se ale vybavení pro časově-rozlišenou fluorescenci stalo cenově dostupnou záležitostí, takže se i měření agregačního čísla pomocí této metody výrazně rozšířilo. Například *Wattebled a spol.* měřili agregační čísla kationtových oligomerních tenzidů pomocí časově-rozlišené fluorescence. Dalšími příklady může být stanovení agregačních čísel komerčních detergentů s přídavkem solí [69], studium růstu micel podvojných tenzidů [70], [71] nebo studium agregace potenciálních nosičů léčiv [72].

3.2 Anizotropie fluorescence

Další důležitou oblast fluorescence při studiu hydratace polymerů a studiu interakcí mezi agregáty a polymery představuje anizotropie fluorescence, a to opět stacionární i časově-rozlišená anizotropie. Anizotropie představuje fotoselektivní excitaci fluoroforů polarizovaným světlem. Excitovány jsou pouze ty molekuly, jejichž přechodový moment je paralelní s elektrickým vektorem excitačního záření. Tím pádem může být anizotropie fluorescence použita například pro určení viskozity mikroprostředí [73]-[75]. Nyní uvažujme hydrofilní polymer a hydrofilní fluorescenční sondu. V některých případech lze pozorovat různé hodnoty emise fluorescence nebo různé hodnoty anizotropie s rostoucí koncentrací polymeru. U některých roztoků polymerů můžeme vodu rozdělit na volnou vodu a na vodu vázanou u polymeru. Každá z nich má lehce jinou strukturu, což umožňuje rozpoznat, jestli se fluorescenční sonda například adsorbuje na polymer nebo zůstane ve volné vodě. *Pal a spol.* zkoumali emisi 3-hydroxy-2-naftolové kyseliny v přítomnosti hydrofilního polymeru poly N-vinyl-2-pyrrolidonu (PVP). Pozorovali zvýšení anizotropie fluorescence se zvyšující se koncentrací polymeru. Pomocí porovnání výsledků intenzity fluorescence, stacionární a časově-rozlišené anizotropie i výpočtem vazebných konstant usoudili, že voda vázaná u PVP se výrazně liší od volné vody [26]. Vazebnou konstantu lze tedy v tomto případě spočítat dvěma způsoby. U intenzity fluorescence lze použít modifikovanou Benesi-Hilderbrandovu rovnici [76]-[78]:

$$\frac{(F_{\infty} - F_0)}{(F_x - F_0)} = 1 + \frac{1}{K[L]}, \quad (40)$$

kde F_0 představuje intenzitu fluorescence emise fluorescenční sondy v absenci polymeru, F_x intenzitu fluorescence při střední koncentraci a F_{∞} při koncentraci, kde proběhne kompletní interakce. K představuje vazebnou konstantu a L je koncentrace polymeru. Pokud tedy vyneseme závislost $\frac{(F_{\infty} - F_0)}{(F_x - F_0)}$ na reciproké hodnotě koncentrace polymeru, získáme ze směrnice vazebnou konstantu.

Stacionární anizotropie měřená jako funkce koncentrace polymeru může být také použita pro výpočet vazebné konstanty. Je potřeba zjistit kvantové výtěžky fluorescence volné a vázané sondy, změřit anizotropii volné fluorescenční sondy při střední koncentraci polymeru a následně získat limitní hodnotu anizotropie. Následně lze vypočítat frakci vázané fluorescenční sondy podle následující rovnice:

$$F_b = \frac{(r - r_f)}{\left[(r - r_f) \right] + R(r_b - r_f)}, \quad (41)$$

kde r představuje anizotropii při střední koncentraci polymeru, r_f anizotropii volné sondy a r_b vázané sondy. R představuje poměr kvantových výtěžků. Jelikož frakci volné sondy lze spočítat z $F_f = 1 - F_b$, pak z obou frakcí lze zjistit vazebnou konstantu [4], [79]. Vazebné konstanty zjištěné pomocí stacionární fluorescence a anizotropie by se samozřejmě měly rovnat. Dále v případě PVP byly vazebné konstanty řádu 10^4 , rotační korelační čas byl mnohem menší

než při srovnání s jinými polymery (albumin hovězího a lidského séra), z čehož plyne, že se sonda adsorbuje na povrchu polymeru [79].

Stejným způsobem zkoumali *Mallick a spol.* vazebnou konstantu reakce albuminu lidského a hovězího séra s 3-acetyl-4-oxo-6,7-dihydro-12H-indolo-[2,3-a] chinolizinem. Porovnáním vazebných konstant zjistili, že se fluorescenční sonda, která zároveň podstupuje intramolekulární přenos náboje, váže silněji k lidskému serum albuminu [77]. Vypočtené hodnoty zároveň podle dalších prací spadaly do tohoto typu komplexace [78], [79].

Stejně jako platí u stacionární a časově rozlišené fluorescence, i stacionární a časově-rozlišená anizotropie se liší kontinuálním ozařováním a sledováním anizotropie za určitý časový úsek a pozorováním vyhasínání anizotropie, které následuje po krátkém excitačním pulzu. Vyhodnocením měření časově-rozlišené anizotropie je rotační korelační čas. U sférické molekuly by vyhasínání anizotropie mělo být monoexponenciální neboli by z iterativní rekonvoluce měl být získán pouze jeden rotační korelační čas. Ovšem měření časově-rozlišené anizotropie v koloidních systémech bývá většinou multiexponenciální. Pokud budou molekuly fluoroforu nesférické nebo bude populace excitovaného stavu okupována molekulami, které budou v různých prostředích, dostaneme multiexponenciální vyhasínání anizotropie. V případě micel lze také získat multiexponenciální vyhasínání anizotropie, ale nemusí to být kvůli distribuci fluorescenční sondy ve vodné fázi a uvnitř micely. Pokud se poměr relativních amplitud rychlého a pomalého rotačního korelačního času liší o dvoj- až trojnásobek od poměru frakce volné a vázané sondy k micelle (lze stanovit z vazebných konstant), pak je multiexponenciální vyhasínání anizotropie způsobeno rotační difuzí sondy vázané k micelle [80]. Pozorované biexponenciální vyhasínání anizotropie může být připsáno dvěma druhům pohybu podle tzv. „wobbling-in-cone“ modelu [81]-[83]. Tento model předpokládá, že fluorofor se pohybuje laterální difuzí po zakřiveném povrchu micely a rychlým kolíbatým pohybem (wobbling motion) v imaginárním kuželu, který je spojen s rotací micely. Pozorovaný pomalý (φ_2) a rychlý (φ_1) rotační korelační čas je spojen s časovou konstantou laterální difuze (τ_L), kolíbatého pohybu (τ_W) a celkovou rotací micely (τ_M) podle rovnic:

$$\frac{1}{\varphi_1} = \frac{1}{\tau_W} + \frac{1}{\tau_L} + \frac{1}{\tau_M} \quad (42)$$

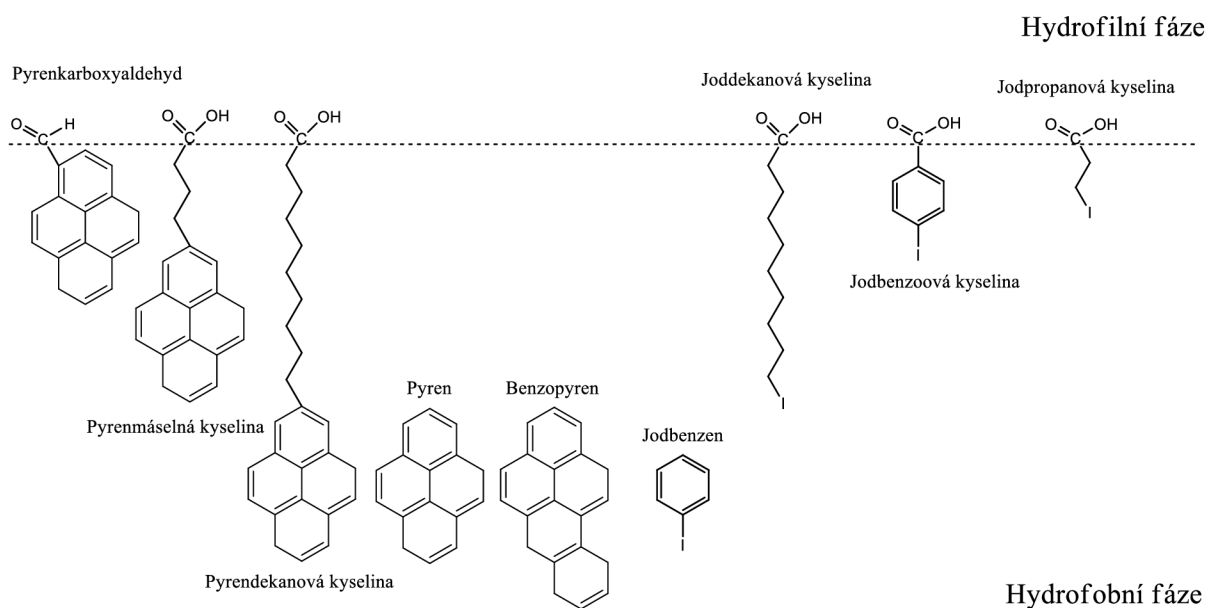
$$\frac{1}{\varphi_2} = \frac{1}{\tau_L} + \frac{1}{\tau_M}$$

Podle výše zmíněného modelu lze křivku vyhasínání anizotropie popsat rovnicí:

$$r(t) = r_0 \left[\beta \exp\left(-\frac{t}{\varphi_2}\right) + (1-\beta) \exp\left(-\frac{t}{\varphi_1}\right) \right], \quad (43)$$

kde $\beta = S^2$. Parametr S představuje prostorové omezení pohybu sondy uvnitř micely a může nabývat hodnot $0 \leq S^2 \leq 1$. S může být také použit pro lokalizaci fluorescenční sondy v micelle. Pokud platí, že $S = 0$, pak je pohyb sondy izotropický. Jestli se ale $|S| = 1$, pak je pohyb zcela omezen. Jelikož jádro micely tvoří tekuté uhlovodíky, sonda nacházející se v jádru micely by měla hodnotu $S = 0$ a kolíbatý pohyb by byl izotropický. Kdežto při S blížící se jedné bude pohyb ve velké míře omezen a sonda se bude nacházet v palisádové vrstvě micely [84], [85]. Další

možností, jak zjistit pozici fluorescenční sondy, je zhášení fluorescence. *Deumié a spol.* zkoumali pozici derivátů pyrenu pomocí zhášení fluorescence deriváty jódu (Obr. 24). Každý z příslušných derivátů by měl dosáhnout do jiné části erythrocytové membrány a podle účinnosti zhášení lze poznat, ve které části membrány se jednotlivé deriváty pyrenu nachází [5]. Lokalizace fluorescenční sondy nebo léčiva pomocí zhášení sloučeninami jódu se dále využívalo v micelách nebo fosfolipidových membránách [5], [86], [87]. Využívá se však i dalších zhášečů pro lokalizaci molekul v různých agregátech [88]-[92].



Obr. 24 Schématické zobrazení pyrenových derivátů, zhášečů a jejich předpokládané pozici ve fosfolipidové dvojvrstvě [5]

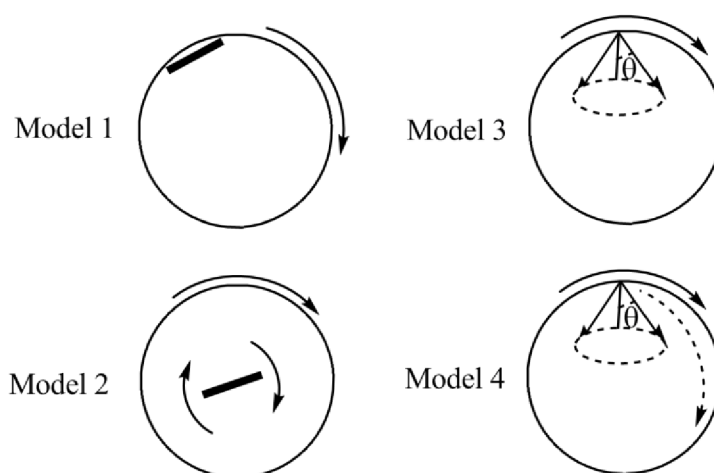
V roce 1993 publikovali *Quitevis a spol.* práci zabývající se studiem časově-rozlišené anizotropie několika iontových lipofilních sond (merocyanine 540, oktadecylrodamin B) v alkoholech a v micelách dodecylsiranu sodného, dodecyltrimethylamonium bromidu a Tritonu X-100 [83]. Při vyhodnocení vyhasínání anizotropie získali v alkoholech vždy jeden rotační korelační čas, ale v micelách dva. Při použití wobbling-in-cone modelu vypočítali, díky parametrům získaných z měření anizotropie, parametr S , difuzní koeficient laterální difuze, difuzní koeficient kolíbového pohybu atd. Z vysokých hodnot parametru S zjistili, že se sondy nachází na povrchu micel. Srovnání difuzních koeficientů vypočítaných pomocí wobbling-in-cone modelu a získaných z NMR měření vedlo k závěru, že tento model představuje vhodnou metodu pro popis dynamiky fluoroforu v micelárním prostředí [93], [94].

Následně v roce 1997 a 2001 publikovali *Periasamy a spol.* studii časově-rozlišené fluorescence několika fluorescenčních sond (nilská červeň, kresylová violet, DODCI, rhodamin B, rhodamin DPPE) v kationtových, aniontových a neiontových micelách. Výsledky měření časově-rozlišené fluorescence vyloučily 2 ze 4 možných modelů (model 1 a 2 z Obr. 25), kterými lze dynamiku uvnitř micel popsat. Nejlépe se hodil popis pro wobbling-in-cone model a translační difuzi sondy spolu s rotací micely jako celku. Opět určili parametr S , úhel θ a difuzní koeficienty translační a rotační difuze. Podle výpočtů je parametr S nepřímo úměrný difuznímu koeficientu. Hodnoty translačních a rotačních difuzních koeficientů dále použili pro ověření konceptu

„mikroviskozity“ uvnitř micel. Poměr translačního a rotačního difuzního koeficientu je ve vztahu k mikroviskozitě podle Einstein-Stokesovy rovnice:

$$\frac{D_t}{D_w} = \frac{\zeta'}{\zeta} \frac{4r^2}{3} \quad (44)$$

ζ a ζ' jsou konstanty, které představují korekční faktor pro n esférický tvar molekuly [95], r je poloměr a V molekulární objem sondy. Podle očekávání by se poměr $\frac{D_t}{D_w}$ neměl měnit s teplotou, ale podle výsledků poskytnutých z této studie se poměr mění. To znamená, že Einstein-Stokesova rovnice neplatí pro stanovení mikroviskozity uvnitř micel, což zároveň znamená, že se sonda uvnitř micely nepohybuje pomocí Brownova pohybu [96], [97].



Obr. 25 Modely molekulární dynamiky n esférických molekul v micelle. Model 1: Molekula těsně vázaná na micelu. Model 2: Molekula volně rotující v micelle. Model 3: Rotace molekuly je omezena na „kolíbání“ v omezeném prostoru micely. Model 4: Rotace molekuly je omezena, ale probíhá volná translační difuze [96], [97].

Wobbling-in-cone model se používá pro stanovení dynamických vlastností i v dalších systémech než jen micelách [98]-[101]. Například *Saito a spol.* zjišťovali, jak ovlivní fluorace strukturu fosfolipidů, a tedy i dynamiku pohybu fluorescenční sondy ve fosfolipidových dvojrstvách [102]. *Andoh a spol.* studovali molekulární dynamiku lipidových dvojrstev modelových membrán plazmy a leukemických buněk [103]. Jedním z dalších příkladů je i studium molekulární dynamiky ve fenylacetylenových dendrimerech [104].

Wobbling-in-cone modelu lze využít i při výzkumu interakcí mezi polymerem a tenzidem. Je možné použít polaritní fluorescenční sondy pro stanovení agregace tenzidů na řetězci polymeru. Ve výsledku to bude znamenat, že se kritická micelární koncentrace posune k nižším hodnotám [52], [105]-[110]. Ale pokud je interakce mezi polymerem a tenzidem slabá, můžeme vidět agregaci tenzidu pouze okolo kritické micelární koncentrace, kdežto u silnějších polyelektrolytů lze pozorovat změnu polaritní sondy již před kritickou micelární koncentrací vlivem elektrostatické interakce mezi tenzidem a polymerem. V případech slabých polyelektrolytů nelze pomocí polaritní sondy rozpoznat, jestli se vzniklé micely nachází na řetězci polymeru nebo

jsou volné v roztoku. Pomocí měření časově-rozlišené anizotropie a za předpokladu, že fluorescenční sonda podléhá wobbling-in-cone modelu je možné spočítat kolíbový pohyb i translační pohyb sondy uvnitř micely v přítomnosti polymeru. *Sen a spol.* stanovili tyto parametry pro dvě fluorescenční sondy (merocyanin 540 a oxazin 1) v SDS za přítomnosti poly-N-vinyl-2-pyrrolidonu. Přídavek poly-N-vinyl-2-pyrrolidonu způsobil zpomalení pohybu obou sond, a to jak translačního pohybu, tak i kolíbového pohybu [111].

3.3 Deprotonace v excitovaném stavu

Deprotonace v excitovaném stavu, a to intermolekulární i intramolekulární, představuje jeden z nejcitlivějších procesů pro studium hydratace mnoha různých systémů. Mechanismus deprotonace v excitovaném stavu v micelárním prostředí může být popsán například následujícím schématem [112]:

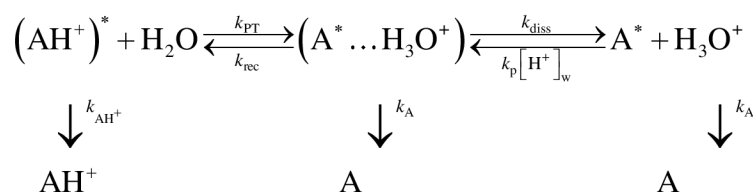


Schéma 1 Schéma kinetiky deprotonace v excitovaném stavu

Ve Schéma 1 $(\text{A}^* \dots \text{H}_3\text{O}^+)$ reprezentuje rozčleněný pár na povrchu micely. Rozčleněná reprotonace, charakterizována rychlostní konstantou k_{rec} , soutěží s rychlostní konstantou disociace rozčleněného páru (k_{diss}) a s vyhasínáním excitované molekuly A^* do základního stavu (k_{A}). Mechanismus popisující Schéma 1 může být přepsán ve smyslu diferenciální rovnice:

$$\frac{d}{dt} \begin{bmatrix} \text{AH}^+ \\ \text{A} \dots \text{H}^+ \\ \text{A} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} -X & k_{\text{rec}} & 0 \\ k_{\text{PT}} & -Y & k_{\text{p}}[\text{H}^+]_{\text{w}} \\ 0 & k_{\text{diss}} & -Z \end{bmatrix} \times \begin{bmatrix} \text{AH}^+ \\ \text{A} \dots \text{H}^+ \\ \text{A} \end{bmatrix}, \quad (45)$$

kde

$$\begin{aligned}
 X &= k_{\text{PT}} + k_{\text{AH}^+} \approx k_{\text{PT}} \\
 Y &= k_{\text{rec}} + k_{\text{diss}} + k_{\text{A}} \\
 Z &= k_{\text{p}}[\text{H}^+]_{\text{w}} + k_{\text{A}}
 \end{aligned} \quad (46)$$

Pokud disociace rozčleněného páru je nevratná, může se zanedbat $k_{\text{p}}[\text{H}^+]_{\text{w}}$, takže pro Z získáme rovnici $Z = k_{\text{p}}[\text{H}^+]_{\text{w}} + k_{\text{A}} \approx k_{\text{A}}$. Disociace rozčleněného páru je nevratná, pokud pH vzorku přesáhne hodnotu 3 [112]. Nakonec lze všechny potřebné rychlostní konstanty vypočítat podle následujících rovnic:

$$\begin{aligned}
X &= \frac{R\lambda_3 + \lambda_2}{R+1} \\
Y &= \lambda_3 + \lambda_2 - X \\
k_{pT} &= X - k_{AH^+} \approx X, \text{ kde z relativních amplitud se } R = \frac{A_3}{A_2} \text{ a } \lambda_3 = \frac{1}{\tau_3}, \lambda_2 = \frac{1}{\tau_2} \quad (47) \\
k_{rec} &= \frac{XY - \lambda_3\lambda_2}{k_{pT}} \\
k_{diss} &= Y - k_A - k_{rec}
\end{aligned}$$

Diferenciální rovnice 45 předpokládá existenci triexponenciální vyhasínací křivky, kde jednotlivé doby života by měly patřit protonované formě fluorescenční sondy, rozčleněnému páru a deprotonované formě fluorescenční sondy. Pokud ale uvažujeme, že Schéma 1 určuje přítomnost tří kineticky relevantních objektů (tedy neutrální formu, rozčleněný pár a aniontovou formu), pak by měla křivka vyhasínání neutrální formy vykazovat tetraexponenciální funkci a aniontová forma by měla vykazovat triexponenciální funkci. Ve skutečnosti ale nad pH větší jak 3 neprobíhá zpětná reakce A^* , takže pro vyhasínání při emisní vlnové délce neutrální i aniontové formy se očekává triexponenciální křivka vyhasínání.

Výše je již zmíněný případ využití 3-hydroxy-2-naftolové kyseliny (3HNA) při studiu hydratace poly-N-vinyl-2-pyrrolidonu. 3HNA podstupuje intramolekulární deprotonaci v excitovaném stavu (ESIPT) [26], [113]. V prostředí jiných použitých polymerů nedocházelo ke zvýšení ESIPT emise se zvyšující se koncentrací polymeru. Zkoumali tedy mikroprostředí fluorescenční sondy v prostředí PVP-voda a tyto výsledky srovnávali se směsí rozpouštědel acetonitril-toluen. Z anizotropie, rotačních korelačních časů a hypsochromního posunu emisních spekter usoudili, že se fluorescenční sonda 3HNA sorbuje na polymer a je obklopena vodou vázanou na polymer [26].

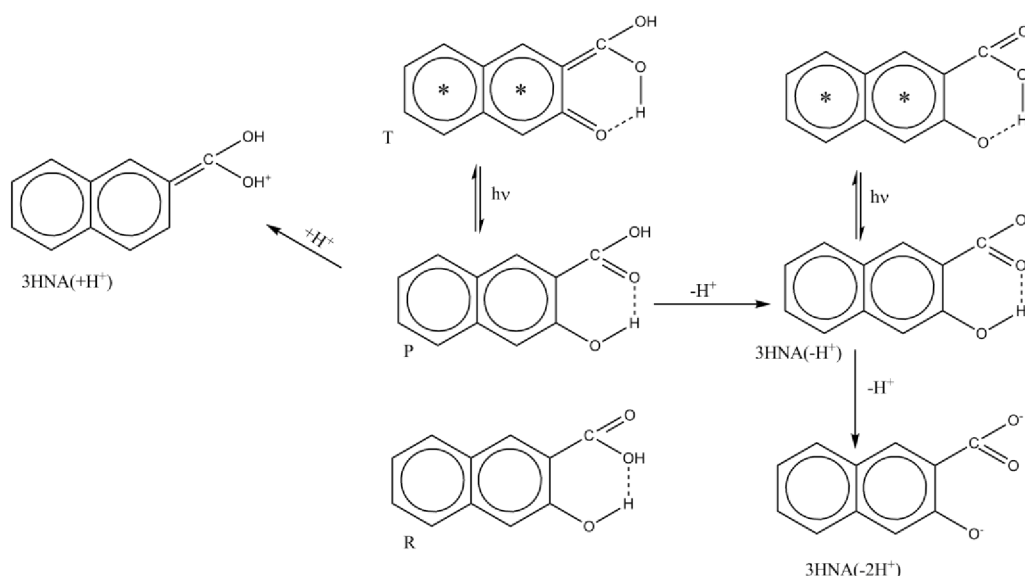
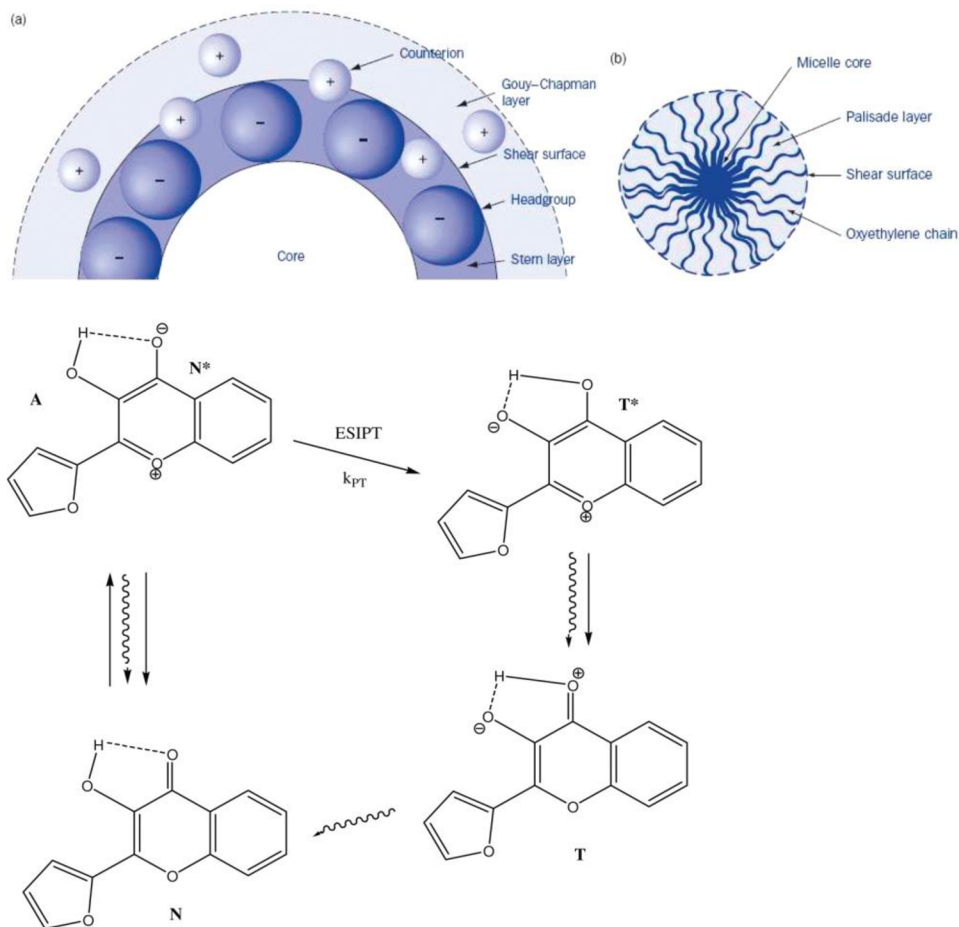


Schéma 2 Zobrazení 3HNA v jeho neutrální a aniontové formě v základním a excitovaném stavu [91]

Intramolekulární deprotonace lze také využít jako senzoru. Například *Maity a spol.* zkoumali interakci mezi albuminem hovězího a lidského séra a 3-hydroxy-2-naftolovou kyselinou a zjistili, že lze 3HNA použít jako senzor pro serum albuminy vzhledem ke zvýšení kvantového výtěžku a doby života v prostředí albuminu při srovnání s vodou. Vazebná konstanta interakce 3HNA s albuminy byla v řádu 10^5 a rotační korelační časy ukazovaly omezenější pohyb [114]. Interakce 3HNA se serum albuminy byla využita i pro studium deprotonace ze singletového stavu proteínu do ESİPT singletového stavu 3HNA [115]. Dále při tvorbě komplexu 3HNA se zirkonem a β -cyklodextrinem se zvýší intenzita fluorescence a dochází k hypsochromnímu posunu excitační vlnové délky a emisní vlnová délka se posune bathochromně. Tato studie *Canady-Canady* a *Rodriguez-Cacerese* vznikla za účelem detekovat 3HNA v říčních tocích, protože 3HNA dráždí kůži, může způsobit poškození zraku a je potenciální teratogen [116].

Das a spol. použili 2-(2'-furyl)-3-hydroxychromon (FHC) pro studium intramolekulární deprotonace v micelárních systémech [84]. Zkoumali vliv hydratace micel na intramolekulární deprotonaci FHC v závislosti na hydrofilní skupině tenzidu a velikosti řetězce hydrofobní části. Zjistili, že intramolekulární deprotonace je extrémně citlivá na hydrataci micel, s čímž souvisí i náboj hydrofilní části micely. Bylo zjištěno, že čím rychlejší byla deprotonace (nízká intenzita fluorescence u 420 nm a vysoká u 540 nm), tím méně hydratované byly micely. Nejrychlejší deprotonace se odehrávala v kationtových micelách, protože hydrofilní část micely CTAB či TTAB obsahuje hydrofobní methylové skupiny, které brání většímu přístupu molekul vody. To způsobí, že intramolekulární vodíkové vazby FHC nejsou ovlivněny intermolekulárními vodíkovými vazbami s molekulami vody ve Sternově vrstvě. U SDS je efekt přesně opačný. Protože sulfoniová skupina SDS zajišťuje silnou hydrataci Sternovy vrstvy, je FHC ovlivněno intermolekulárními vodíkovými vazbami a deprotonace je v těchto micelách nejpomalejší. Dalším faktorem ovlivňujícím dynamiku deprotonace v FHC byl náboj micely. Protože FHC nese záporný náboj, elektrostatická interakce mezi kationtovou palisádovou vrstvou micely a FHC způsobila urychlení deprotonace. Jelikož micely SDS nesou, stejně jako FHC, záporný náboj, následným odpuzováním dojde k ovlivnění intramolekulární vodíkové vazby intermolekulárními vodíkovými vazbami, což vede ke zpomalení dynamiky deprotonace. Vzhledem k poly (etylen oxidovému) řetězci neiontových micel lze popsat hydrataci přibližně na půl cesty mezi kationtovými a aniontovými micelami. Snižuje-li se délka řetězce, snižuje se i rychlost deprotonace ve všech typech micel. Kratší řetězec má za následek, že je micela méně hustě uspořádaná, čímž umožní silnější hydrataci všech druhů micel, a to vede ke snížení rychlosti deprotonace.

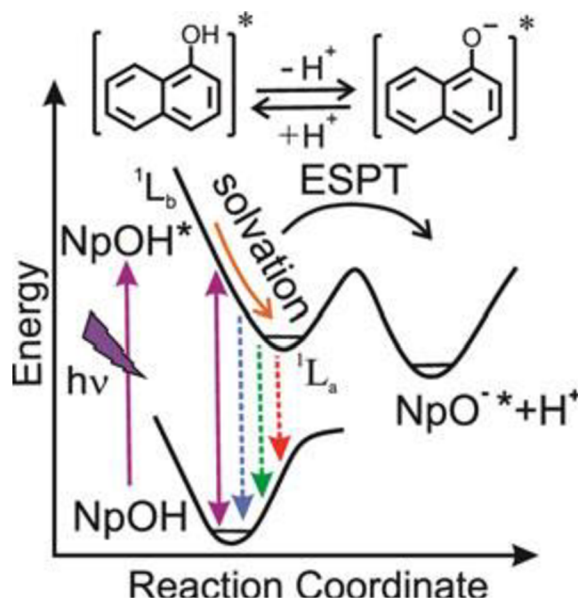


Obr. 26 Nahoře: a) Iontová b) neiontová micela. Dole: Schéma nevratné deprotonace v excitovaném stavu [84]

Pro zkoumání hydratace pomocí intermolekulární deprotonace v excitovaném stavu se využívá také fluorescenční sondy 1-naftolu. Neutrální forma naftolu má maximum emise při 350 nm a aniontová forma při 450 nm [117]-[119]. V nepřítomnosti vody převládá u 1-naftolu emisní pík neutrální formy, ale v přítomnosti vody podstupuje neutrální forma naftolu deprotonaci v excitovaném stavu a dominantním píkem se stává pík při 450 nm, tedy aniontová forma. Kumar a Mishra použili 1-naftol pro studium hydratace polyvinyl alkoholu (PVA). Po umístění PVA filmu do vody byla zaznamenávána emisní spektra každých 15 s, kde byl vidět pokles neutrálního píku u 342 nm se současným nárůstem aniontového píku u 464 nm. Zároveň byl vypočítán izoemisní bod, který značí rovnováhu mezi dvěma stavy fluorescenční sondy s rostoucí aniontovou formou na úkor neutrální formy. Pomocí fluorescenčních měření, kalorimetrických měření a použití modelu pro botnání hydrogelu usoudili, že se 1-naftol adsorbuje na vázané vodě polymeru a navrhli 1-naftol jako fluorescenční senzor pro specifickou detekci vázané vody v PVA hydrogelech [120].

Fluorescenčních měření 1-naftolu využili Pal a spol. pro studium vodních klastrů v hydrofobním rozpouštědle. Předpokladem bylo, že voda bude formovat v hydrofobním rozpouštědle nanoskopické útvary a s přibývajícím množstvím vody budou tyto útvary růst a budou solubilizovat stále větší množství 1-naftolu. Solubilizace fluorescenční sondy by se měla

projevit na emisních spektrech naftolu. Z emisních spekter 1-naftolu zjistili, že snižování intenzity fluorescence u 350 nm a vzájemný nárůst intenzity fluorescence u 450 nm je důsledkem tvorby stále větších vodních klastrů v dioxanu. Při zastoupení vody v dioxanu 79 % byla provedena časově-rozlišená měření. Bylo měřeno vyhasínání fluorescence při různých vlnových délkách, z nichž bylo následně sestaveno časově-rozlišené emisní spektrum (TRES). Z TRES byla patrná reakce v excitovaném stavu. V čase 0 ns je vidět pouze jeden pík značící neutrální formu naftolu, ale s časovým postupem se objevuje druhý pík, který představuje deprotonaci v excitovaném stavu a formování aniontu naftolu. Intenzita tohoto nového píku dále roste, z čehož je možné vypočítat kinetiku tvorby naftolového iontu. Z vyhasínání fluorescence bylo dále zjištěno, že doba života delší komponenty (kratší patří deprotonaci) se dále zvyšuje s rostoucí vlnovou délkou (z 2,4 ns na 10 ns). Doba života se zvyšuje, protože neutrální molekuly naftolu, které jsou stabilizované solvatací, musí překonat vyšší solvatační energetickou bariéru kvůli reakci v excitovaném stavu (Obr. 27). Ve vodě dochází k deprotonaci neutrálního naftolu za 35 ps [95], kdežto ve směsi voda-dioxan (79 %) za 220 ps. Zpomalení reakce má pravděpodobně 2 důvody. Jedním je lokální koncentrace molekul vody v blízkosti excitované molekuly naftolu. Aby došlo k deprotonaci v excitovaném stavu, musí být okolo sondy asi 30–50 molekul vody [121], [122]. Toto číslo bude ve vodních klastrech v dioxanu pravděpodobně menší, proto je ESIPT reakce pomalejší. Druhým důvodem je pomalejší reorganizace molekul vody do klastrů než v samotné vodě. Dále byla studována závislost teploty na proces solvatace. Bylo zjištěno, že zvýšení teploty zrychlilo solvatační proces, protože se kvůli vyšší teplotě narušily některé vodíkové vazby, což mělo za následek tvorbu menších vodních klastrů [119].



Obr. 27 Schématické znázornění solvatace v excitovaném stavu 1-naftolu při přenosu protonu [119]

Fayer a spol. studovali deprotonaci a vodné prostředí v nafionových membránách palivových článků a v reverzních micelách aerosolu OT pomocí stacionární a časově-rozlišené fluorescence sondy pyraninu (1-hydroxy-3,6,8-pyrentrisulfonová kyselina – HPTS) a metoxy derivátu HPTS – MPTS. Pomocí emisních spekter a měření doby života dospěli k závěru, že vodné prostředí

nafionu je podobné vodnému mikroprostředí reverzních micel AOT. Díky deprotonace v excitovaném stavu byli schopni zkoumat strukturu vody v závislosti na různém stupni hydratace. Zjistili, že se vodní struktura mění na rozhraní vodné a hydrofobní fáze. Voda na rozhraní je mnohem méně mobilní než voda uvnitř reverzní micely (tzv. bulk water). Pokud se fluorescenční sonda dostane do vodného prostředí na rozhraní, dojde k redukci deprotonace v excitovaném stavu. Pokud je nafion i reverzní micela AOT méně hydratovaná, sníží se její velikost a míra deprotonace díky tomu, že v dosahu jsou pouze molekuly vody u rozhraní. Použití metoxy formy HPTS (MPTS) bylo stěžejní při měření časově-rozlišené anizotropie, protože MPTS nepodstupuje v excitovaném stavu deprotonaci a jeho umístění v požadovaném systému by mělo být stejné, jako tomu bylo u HPTS. Při nízké hydrataci byla rotační difuze omezená s malou dobou vyhasínání a značnou zbytkovou anizotropií. Zvyšování hydratace vedlo k vymizení zbytkové anizotropie a rotační dynamika byla téměř stejná jako v čisté vodě [123].

Deprotonaci v excitovaném stavu lze také využít v dalších koloidních systémech [54], [84], [124], [125], cyklodextrinech [126], [127] nebo při interakci polymeru a tenzidu [55], [128]-[130]. Zásadní práce týkající se deprotonace v excitovaném stavu 1-naftolu v micelách vznikla v laboratořích okolo skupiny *Kankana Bhattacharyyi a spol.* [54] Jak již bylo známo, ESPT proces je výrazně zpomalen ve směsi vody a alkoholu a v čistém alkoholu se na emisních spektrech ukazuje pouze neutrální pík naftolu, takže je kompletně zabráněno deprotonaci této sondy [118]. Pokud se naftol solubilizuje v micelách, měla by se změnit i dynamika deprotonace. Ve vodě bude pozorován pouze pík při 450 nm, tedy emisní pík aniontu. Při solubilizaci 1-naftolu do micel dojde ke změně prostředí okolí naftolu a pozorujeme zvýšení intenzity emise neutrálního píku na úkor aniontu naftolu. Dále ukázali, že dynamika deprotonace bude jiná v různých tenzidech. V micelách CTAB narostla intenzita emise u 360 nm 20krát a u 460 nm 6krát oproti vodě. U Tritonu X-100 narostla intenzita neutrální formy (360 nm) 90krát a intenzita aniontové formy (460 nm) 1,5krát oproti vodě. U SDS micel narostla intenzita neutrální formy 66krát, ale intenzita aniontové formy dvakrát poklesla.

Pomocí časově-rozlišené fluorescence zjistili, že se doba života obou forem naftolu mění s druhem micel a že není ustavena rovnováha mezi neutrální a aniontovou formou naftolu v excitovaném stavu, když jsou jeho molekuly vázány v micelách. V CTAB je podle časově-rozlišených měření (nebyla naměřena žádná krátká doba života odpovídající neutrální formě) pouze aniontová forma naftolu. I když by micely CTAB měly obsahovat nejméně molekul vody, je v tomto prostředí pouze emise aniontové formy. Tvorba aniontové formy je přisuzována vyhasínání neutrální formy naftolu a vysoké koncentraci hydroxylových iontů v bezprostřední blízkosti micely. V Tritonu X-100 byla zaznamenána emise obou forem naftolu, protože emisní spektra vykazovala 2 píky a doba života aniontu se protáhla na 14 ns. Toto pozorování se shoduje s pozorováním deprotonace v naftolu ve směsích voda-alkohol [118]. U SDS přiřazují emisi z micel pouze neutrální formě a emisi aniontové formy z vody, protože jakmile je aniont vytvořen, okamžitě je odpuzen z micely SDS do vody. Co se týká interakcí tenzidu a polymeru, lze pomocí ESPT zkoumat i tyto interakce. Příkladem může být interakce SDS a hydroxypropyl celulózy [55]. Jakmile bylo dosaženo kritické agregační koncentrace, došlo k výraznému snížení dynamiky deprotonace, takže došlo ke zvýšení emisního píku neutrálního naftolu. Koncentrace, při které došlo k nárůstu intenzity fluorescence NpOH, byla nižší než CMC SDS.

Využití ESPT procesu při interakci polymeru a tenzidu ukázali *Sahu a spol.* také při interakci CTAB a lysozymu [128]. Jako fluorescenční sondu použili pyranin. Pomocí intenzity fluorescence neutrálního naftolu dokázali stanovit CMC CTAB a následně kritickou agregační koncentraci CTAB v prostředí lysozymu, která byla nižší jak CMC samotného CTAB. Díky kinetickým výpočtům (rovnice zobrazeny výše v textu) ještě ukázali, že lysozym ovlivňuje rychlostní konstanty deprotonace, rekombinace a disociace rozčleněného páru. Rychlostní konstanty všech procesů byly vyšší než v samotném CTAB. Výsledky tedy ukazují, že mikroprostředí v agregátu CTAB-lysozym je odlišné od mikroprostředí okolí sondy v CTAB. Dynamiku deprotonace pyraninu využil *Ghosh a spol.* při studiu supramolekulárního útvaru vzniklého z triblokového kopolymeru a cetyltrimethyl amonium chloridu (CTAC) [129]. Stejně jako v předchozím případě stacionární i časově-rozlišená fluorescence ukázali změnu v intenzitě fluorescence či dobách života v různých prostředích. Rychlostní konstanty v příslušných agregátech byly opět výrazně odlišné od čisté vody, což značí rozdíl v polaritě mikroprostředí okolí sondy. Rychlostní konstanta deprotonace v supramolekulárním útvaru se liší od rychlostní konstanty deprotonace v CTAC, ale rozdíl není tak velký jako v předchozím případě, což značí menší ovlivnění mikroprostředí kopolymerem než v případě lysozymu a CTAB.

3.4 Časově rozlišená emisní spektra

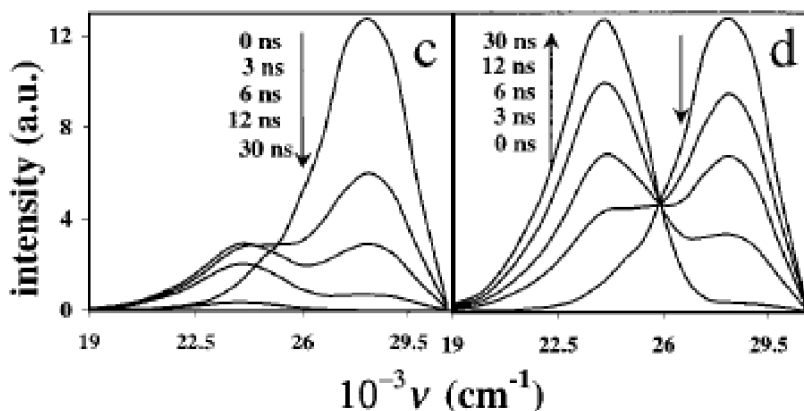
Jak již bylo zmíněno u práce *Pala a spol.*, časově-rozlišená fluorescence je schopná odhalit, zda v systému dochází k reakci v excitovaném stavu pomocí měření vyhasínání fluorescence při více emisních vlnových délkách. Z jednotlivých dob života a příslušných relativních amplitud můžeme následně vypočítat tzv. časově-rozlišená emisní spektra. Pokud budeme pozorovat změnu emisního spektra s časem, bude v systému probíhat reakce v excitovaném stavu (Obr. 28a). V těchto případech se nejedná o přímou excitaci formované molekuly, ale o formování z předešlého excitovaného stavu [4], [119]. Co se týká samotného zkonstruování časově rozlišeného emisního spektra, lze jej spočítat pomocí rovnice: [4], [131], [132]

$$I(\lambda, t) = I_{ss}(\lambda) \frac{\sum_i \alpha_i(\lambda) e^{-\frac{t}{\tau_i(\lambda)}}}{\sum_i \alpha_i(\lambda) \tau_i(\lambda)} \quad (48)$$

kde I_{ss} představuje intenzitu fluorescence, τ_i dobu života a α_i příslušnou relativní amplitudu v čase t . Časově rozlišené emisní spektrum tedy odhalí, zda v systému probíhá reakce v excitovaném stavu, či nikoli. Lze ale z časově rozlišených spekter i určit, jestli pozorovaná emise v systému je ze dvou či více emisních jednotek nebo pouze z jedné, a to výpočtem tzv. časově-rozlišených přes plochu normalizovaných emisních spekter (TRANES) [119], [133]-[137]. *Koti a spol.* experimentálně a matematicky dokázali, že dvě emisní jednotky způsobí propojení jednotlivých spekter v tzv. izoemisním bodu, který je specifický pro emisi právě ze dvou jednotek [133]. Pokud by v systému byly jednotky tři, objevily by se na TRANES dva izoemisní body. Jako příklad experimentálního potvrzení ukázali TRES a TRANES 2-naftolu v pufu. 2-naftol podstupuje deprotonaci v excitovaném stavu, takže v systému by měly být dvě samostatné emisní jednotky. Po konstrukci TRANES můžeme pozorovat izoemisní bod (Obr. 28b) [133]. TRANES lze zkonstruovat normalizací plochy pod křivkou časově rozlišených emisních spekter tak, že plocha pod křivkou v čase t se bude rovnat ploše spektra v čase $t = 0$:

$$I_N(\lambda, t) = \frac{S_0}{S_t} I(\lambda, t), \quad (49)$$

kde S_0 představuje plochu pod křivkou spektra v čase $t = 0$ a S_t plochu pod křivkou v čase $t = t$.



Obr. 28 a) Časově rozlišená emisní spektra b) časově rozlišená přes plochu normalizovaná emisní spektra 2-naftolu v pufru [133]

Koti a Periasamy dále použili TRANES v organizovaných systémech, jako jsou micely nebo fosfolipidové membrány. Použitím dvoukomorové kyvety zjistili, že simultánní excitací nilské červeně v methanolu a ethanolu dojde k tvorbě izoemisního bodu, protože se nilská červeně nachází ve dvou různých prostředích. Solubilizací nilské červeně v Tritonu X-100 získali také izoemisní bod. Stejný výsledek měla i solubilizace ve fosfatidylcholinové membráně. Existence izoemisního bodu v obou systémech znamená, že se nilská červeně solubilizovala ve dvou různých místech micely (membrány) [134].

3.5 Pasivní Mikroreologie

Mikroreologické techniky, především videomikroreologie, jsou hojně využívány v různých oblastech výzkumu, a to především díky své schopnosti neinvazivně se na vzorek jako na celek, jako v případě klasické reologie (i když často jsou mikroreologická měření použita jako doplňková ke klasické reologii [138]), ale jelikož je možné určit viskoelastické vlastnosti uvnitř vzorku. Další výhodou této metody je menší náročnost na objem vzorku.

3.5.1 Video-mikroreologie a dynamický rozptyl světla

Jak je již zmíněno výše, videomikroreologie představuje nejrozšířenější metodu pro mikroreologické měření, zatímco DLS se používá pouze u transparentních vzorků, případně je potřeba se ujistit, že začleněné částice jsou právě ty, na kterých bude probíhat rozptyl působícího paprsku, a že podmínka jednonásobného rozptylu světla bude zachována. Jelikož není snadné tuto podmínku naplnit např. v biologických systémech, DLS se pro mikroreologii příliš nevyužívá.

Nicméně videomikroreologii i dalším technikám jako DLS se věnuje přehledový článek od Thomase Moschakise, které shrnuje mikroreologii potravinových gelů a emulzí [138]. Přehledový článek shrnuje použití mikroreologických technik např. při studiu gelace pectinu [139], měření

viskozity medu a porovnávání s klasickou reologií [140] nebo studiu mikroheterogenního prostředí a agregace lipozomů [141].

Další přehledový článek od Schulze a spol. přiblíží vykonaný výzkum v oblasti mikrореologie hydrogelů [142] nebo práce Weihse a spol. přiblíží důležitost mikrореologie ve výzkumu mezibuněčného prostředí [143]. Další rozsáhlý přehledový článek se věnuje mikrореologickým technikám použitým pro studium komplexních kapalin (tekuté krystaly, proteiny, koloidy atd.) [144].

3.5.2 FCS mikrореologie

Jak již bylo zmíněno několikrát, o videomikrореologii vyšla spousta publikací a pro účel této práce si stačí shrnout použitelnost metody formou přehledových článků. Nicméně FCS mikrореologie je pravý opak. FCS se příliš nepoužívá pro studium mikrореologie, možná pro finanční náročnost dané přístrojové techniky nebo pro málo informací o tom, jak FCS mikrореologii měřit a vyhodnocovat.

Zásadní práce popisující metodu FCS mikrореologie je publikace od Rathgeber a kol. [145]. Porovnávali výsledky měření u vodných roztoků vysokomolekulárního polyethylenglykolu získané pomocí DLS, video-mikrореologie a FCS mikrореologie. Výsledky mikrореologických měření porovnávali také s konvenčními reologickými experimenty za použití klasického rotačního reometru. Z hlediska rozsahu MSD je FCS srovnatelná se standardními laserovými metodami a DLS. Na rozdíl od ostatních mikrореologických metod poskytuje FCS mnohem větší frekvenční rozsah. Navíc pozorované částice nejsou závislé na rozptylu světla, protože u FCS jsou pozorovány pouze fluorescenční částice. Tato práce nicméně nepopisuje pouze výhody či nevýhody jednotlivých metod při měření stejného vzorku. Tato práce slouží také jako návod pro způsob měření či vyhodnocení autokorelační funkce a její převod na MSD.

Další práce zabývající se přímo FCS mikrореologií je od skupiny okolo Gernota Guigase a kol. [146] Pozorovali difuzní vlastnosti fluorescenčně značených zlatých nanočástic v cytoplazmě a jádru živých buněk. Ze získaných autokorelačních křivek byli schopni získat závislosti MSD a byli také schopni určit komplexní modul pružnosti pro oba buněčné kompartmenty. Díky této technice také popsali rozdíly ve viskoelastické odezvě a anomální difuzi u buněk před a po vystavení osmotickému stresu.

Jak je zmíněno výše, i když ještě není FCS rozšířené pro měření mikrореologie, i tak na tomto poli jeví velký potenciál. Nicméně FCS se především používá pro určení difuzních koeficientů, koncentrací fluoroforů, charakterizaci interakcí fluoroforů a množství dalších aplikací. Využitelnost FCS na poli kolodní vědy a živých systémů je shrnuta v těchto dvou přehledových článcích [147], [148].

4 CHARAKTERIZACE HYDRATAČNÍHO OBALU HYALURONANU POMOCÍ 3-HYDROXY-2-NAFTOLOVÉ KYSELINY

Jak již bylo zmíněno v teoretické části, hyaluronan tvoří ve vodných roztocích hustou polymerní síť, která je stabilizována vodíkovými vazbami a hydrofobními interakcemi, což je důvodem, spolu s polaritou hyaluronanu, vysokého zadržování vody. Také bylo zmíněno, že se v literatuře objevují i odlišné představy o zadržování vody hyaluronanem, které tvrdí, že hyaluronan není pokrytý souvislým hydratačním obalem, ale velkými vodními klastry, které jsou vázané k hyaluronanu nebo uvězněné uvnitř řetězců hyaluronanu a mohou být tím důvodem, proč hyaluronan tvoří vysoce viskózní roztoky i v malých koncentracích [20], [21]. Z tohoto důvodu byla vybrána fluorescenční sonda 3HNA pro studium schopnosti této sondy navázat se na vodu vázanou k polymeru.

4.1 experimentální část

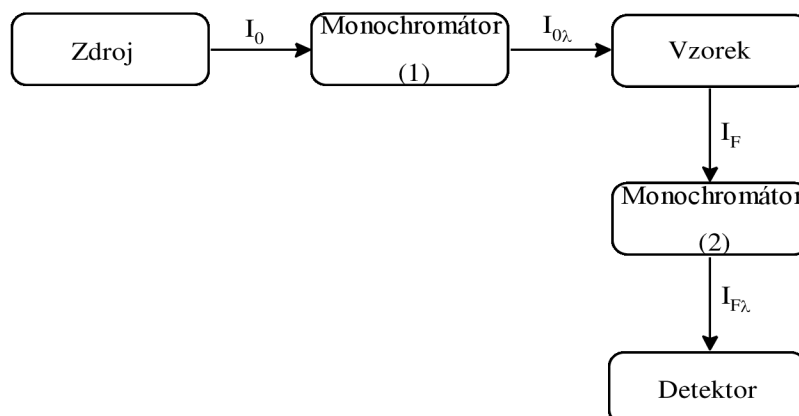
4.1.1 Přístrojové vybavení

<i>Analytické váhy</i>	Denver instrument BC-BC-100
<i>Mikropipety</i>	Finnpipette, Biohit, Vitrum
<i>Magnetické míchadlo</i>	Heidolph MR Hei-Standard
<i>Vibrační míchadlo</i>	MS2 Minishaker

Luminiscenční spektrometr, Fluorolog HORIBA Jobin Yvon

Zdroj záření	Xenonová lampa – 450 W
Monochromátor	Czerny-Turner
Rozmezí λ	0–1300 nm
Přesnost λ	0,5 nm
Rychlost skenu	150 nm/s
Detektor	S1-PMT

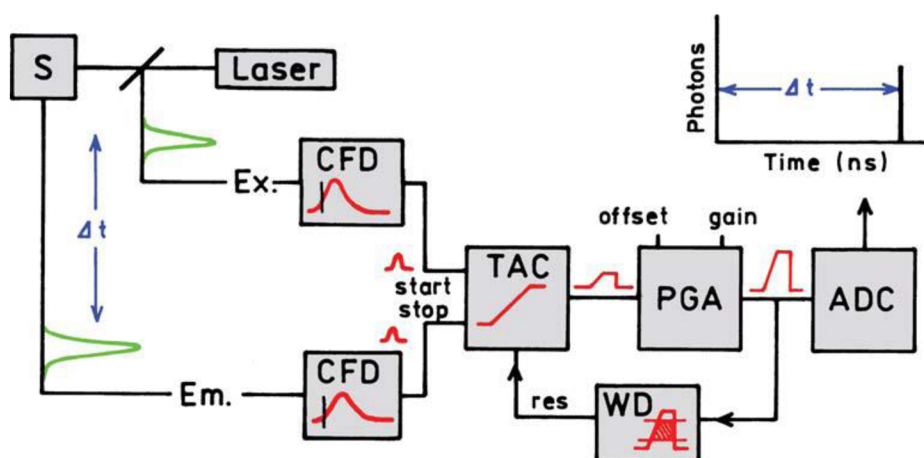
Z primárního zdroje polychromatického záření vstupuje záření do mřížkového monochromátoru 1 (excitační), kde se vybere záření o vhodné vlnové délce excitace. Selektivní paprsek o přesně definované vlnové délce prochází křemennou kyvetou se vzorkem, která je umístěna v jeho optické dráze. Dochází k excitaci elektronů zkoumaného vzorku. Fluorescence je pozorována v kolmém směru ke směru paprsku primárního záření, aby primární záření procházející kyvetou nerušilo měření fluorescence. Proto jsou druhý monochromátor (emisní) i detektor umístěny v kolmém směru ke kyvetě. Emisní záření prochází monochromátorem 2, kde je stanovena jeho vlnová délka, a pomocí detektoru je zjištěna intenzita fluorescence (Obr. 29) [4].



Obr. 29 Schéma jednopaprskového spektrofluorimetru HORIBA Jobin Yvon

Pro měření emisních spekter 1-naftolu, HPTS, 3HNA a pyrenu byly použity excitační vlnové délky 300 nm pro 1-naftol, 454 nm pro HPTS, 350 nm pro 3HNA a 335 nm pro pyren.

Fluorocube HORIBA Jobin Yvon pro časově rozlišenou fluorescenci



Obr. 30 Schéma instrumentace pro časově rozlišenou fluorescenci [4]

Z laseru je vyslán excitační puls, který excituje vzorek. a zároveň je vyslán signál do excitačního constant function discriminátoru (CFD), který zároveň zaznamená čas příchodu excitačního pulzu. Následně je signál předán time-to-amplitude convertoru (TAC), jenž generuje určité napětí, které se lineárně zvyšuje s časem. V druhém emisním kanálu je pozorován emitovaný foton, který přijde do emisního CFD, který zaznamená příchod fotonu a pošle signál do TAC, kde je zastaveno zvyšování napětí. TAC nyní obsahuje napětí úměrné časovému rozdílu mezi excitačním pulzem a příchodem emitovaného fotonu. Tento proces je opakován stále dokola a jednotlivé naměřené časy jsou zaznamenávány do histogramu, dokud není měření ukončeno. Pokud je potřeba, může být příslušné napětí zesíleno pomocí programmable gain amplifieru

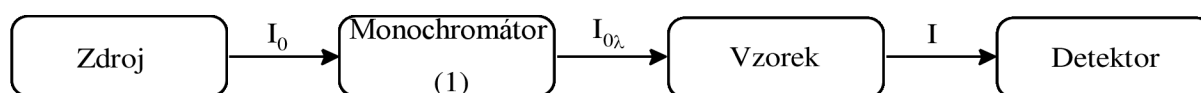
(PGA), který informace předá analog-to-digital converteru (ADC), ve kterém je příslušné napětí převedeno na numerickou hodnotu (Obr. 30).

Vzorky byly excitovány nanosekundovou nanoLED diodou N-330 se šířkou pulzu 1,2 ns a emisní vlnová délka byla vybrána emisním monochromátorem typu Seya-Namioka s rozsahem 200 nm až 800 nm. Vyhasínání fluorescence bylo zaznamenáváno detektorem IBH TBX-04.

UV-VIS 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 zařízení, které měří absorpci záření v UV a VIS oblasti světelného spektra. Záznamem těchto měření jsou absorpční spektra měřeného vzorku. Zařízení se skládá ze zdroje záření, monochromátoru (zde se získá monochromatické záření, tedy záření o určité vlnové délce), kvivety se vzorkem a detektoru. V detektoru je zaznamenán úbytek intenzity monochromatického záření procházejícího vzorkem (Obr. 31).



Obr. 31 Schéma UV-VIS spektrofotometru

4.1.2 Příprava vzorků pro charakterizaci interakcí hyaluronanu a 3HNA

Zásobní roztoky polymerů (hyaluronanu, karboxymethylcelulózy, polyvinylpyrrolidonu a albuminu hovězího séra) byly připraveny navážením přesného množství příslušného polymeru a jeho kvantitativním převedením do odměrné baňky a doplněním Milli-Q vodou po rysku. Takto byly připraveny zásobní roztoky hyaluronanu o koncentraci $150 \mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, karboxymethylcelulózy (KMC) o koncentraci $402,975 \mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, PVP o koncentraci $401,225 \mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ a albuminu hovězího séra o koncentraci $9,559 \mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$.

Zásobní roztok fluorescenční sondy byl připraven navážením 3HNA na analytických vahách a kvantitativním převedením do odměrné baňky o objemu 50 mL pomocí ethanolu a doplněním po rysku. Takto vznikl zásobní roztok o koncentraci $2,051 \text{mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$.

Vzorky byly připraveny převedením 73 μL zásobního roztoku 3HNA a rozpouštědlo bylo odpařeno. Koncentrace 3HNA v každém vzorku byla 30 μmol . Následně byl do vialek pipetován polymer tak, aby byl, v závislosti na použitém polymeru, koncentrační rozsah následující:

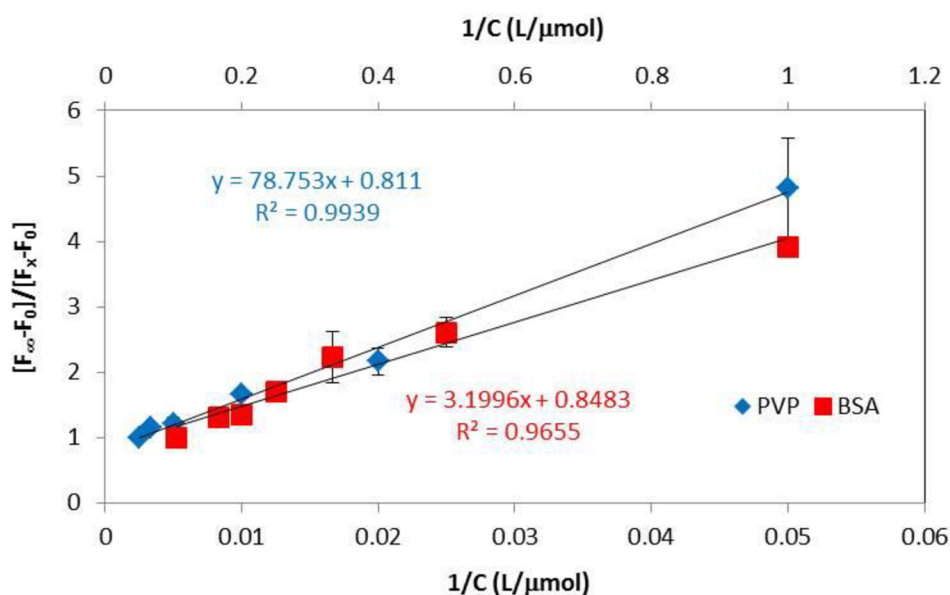
U KMC a PVP 0–400 $\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$; u HyA 0–15 $\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$; u BSA 0–9,6 $\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$. Všechny vzorky byly připraveny třikrát, aby mohla být provedena statistická analýza. Hyaluronan byl skladován a používán tak, aby nedocházelo k termální [149] nebo časové degradaci [150] polymeru. Zejména u časové degradace polymeru bez použití azidu sodného jakožto prevenci proti tvorbě mikroorganismů bylo vycházeno z naší studie zabývající se právě časovou degradací hyaluronanu bez použití jakéhokoli prostředku proti tvorbě mikroorganismů [151].

4.2 Výsledky a diskuse

Interakce 3HNA a PVP, respektive BSA byly již prokázány dříve a věnuje se jim část kapitoly 3.2 a kapitoly 3.3 v literární rešerši. V této práci byly tyto polymery použity jako kontrola správnosti použitých výpočtů. Vazebná konstanta vypočtená u všech polymerů byla určena pomocí Benesi-Hildebrandtova vztahu [76]-[78], který je také popsán v kapitole 3.2. Výzkum interakce 3HNA a hyaluronanu by měl především pomoci k pochopení struktury hydratačního obalu hyaluronanu.

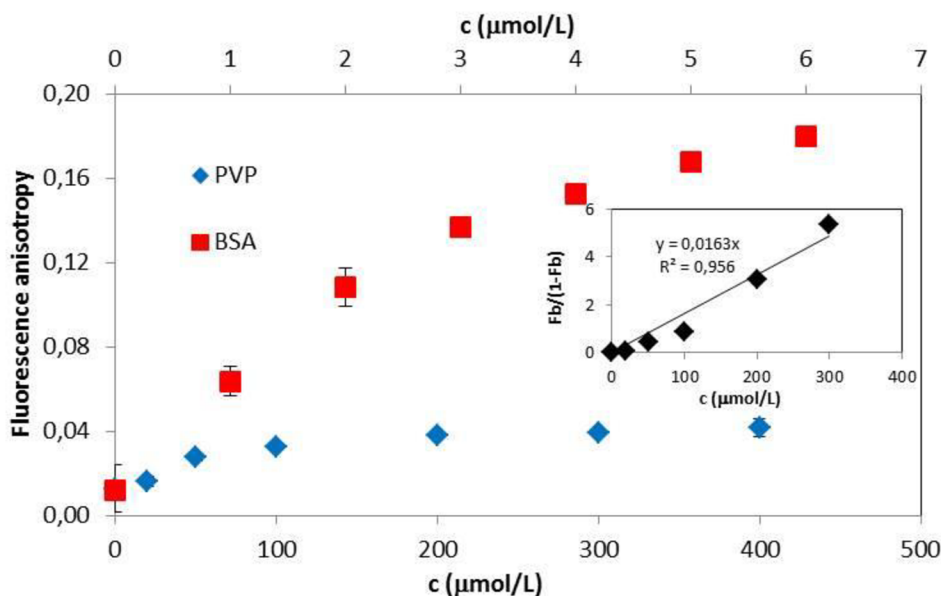
4.2.1 Stacionární fluorescence

Jak již bylo zmíněno, PVP a BSA byly použity pro kontrolu. Měřením intenzity fluorescence aniontové formy 3HNA v závislosti na reciproké hodnotě koncentrace polymeru lze stanovit vazebnou konstantu. Pro PVP byla stanovena vazebná konstanta na hodnotu $K = 1,27 \cdot 10^4 \text{M}^{-1}$ a pro BSA na hodnotu $K = 3,13 \cdot 10^5 \text{M}^{-1}$. Rozdílné vazebné konstanty znamenají, že 3HNA se lépe váže na polymer BSA než na PVP. Z literatury bylo zjištěno, že Pal a spol. stanovili vazebnou konstantu 3HNA-PVP na $K = 0,9 \cdot 10^4 \text{M}^{-1}$, což se nepatrně liší od námi stanovené hodnoty. V případě BSA *Maity a spol.* [114] stanovili hodnotu vazebné konstanty na $K = 5,3 \cdot 10^5 \text{M}^{-1}$.



Obr. 32 Závislost $[F_\infty - F_0] / [F_x - F_0]$ na reciproké koncentraci PVP a BSA monitorující ESIPT emisi 3HNA (30 $\mu\text{mol/L}$)

Stanovená hodnota vazebné konstanty byla také ověřena měřením stacionární anizotropie fluorescence. Čím víc se bude fluorescenční sonda vázat na polymer, tím pomalejší bude její rotace. Vynesením závislosti anizotropie fluorescence na koncentraci polymeru lze pozorovat zpomalení rotace fluoroforu. Důvodem rostoucí anizotropie nicméně není jen interakce mezi 3HNA a polymerem, ale také zvyšující se viskozita vzorku. Nicméně u PVP i BSA nebude mít zvyšující se viskozita velký vliv na vazebnou konstantu, protože i v koncentracích okolo 400 μM viskozita výrazně nestoupá. Na Obr. 33 lze dále pozorovat závislost anizotropie fluorescence k limitní hodnotě, což značí již kompletní interakci sondy s polymerem. Jako vložený graf je znázorněna závislost, ze které byla získána vazebná konstanta pomocí měření stacionární anizotropie. Ze samotného měření byla určena frakce molekul fluoroforu, které se vázaly na polymer. Následně poměrem frakce vázané a nevázané sondy, a tedy závislostí poměru vázané a nevázané sondy na koncentraci polymeru byla ze směrnice závislosti $K \cdot c_{\text{polymer}} = \frac{F_b}{1 - F_b}$ určena vazebná konstanta pro 3HNA-PVP na $K = 1,63 \cdot 10^4 \text{M}^{-1}$ a pro 3HNA-BSA na $K = 6,99 \cdot 10^5 \text{M}^{-1}$. Obě hodnoty se liší od hodnot naměřených pomocí stacionární fluorescence. U obou metod byly zjištěny rozdíly mezi stanovením vazebné konstanty pomocí intenzity fluorescence a anizotropií fluorescence. Důvodem je rostoucí viskozita vzorků s rostoucí koncentrací polymeru. Dále z porovnání hodnot anizotropie na Obr. 33 lze vypočítat, že hodnoty anizotropie jsou větší pro systém s BSA, což koreluje s hodnotou vazebné konstanty, která je pro BSA o řád větší než pro PVP.

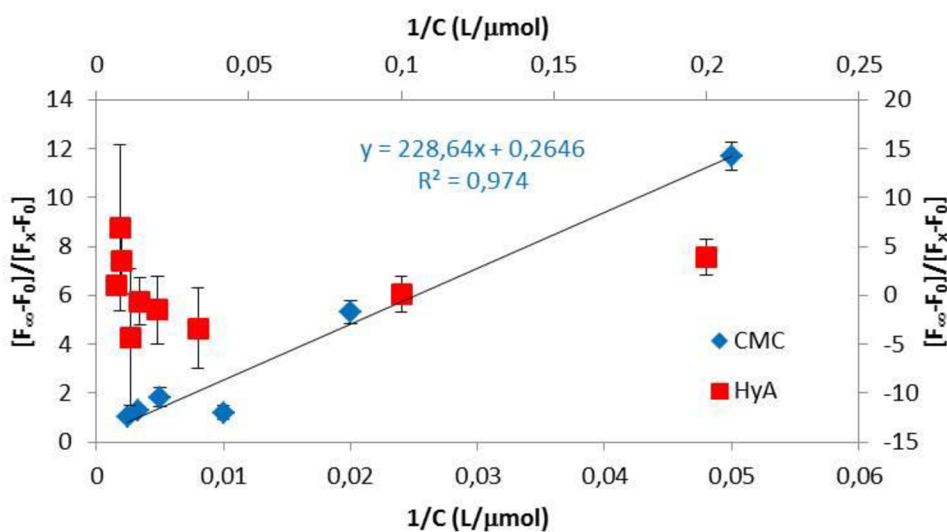


Obr. 33 Závislost hodnot anizotropie na koncentraci polymerů. Vložený graf značí závislost, ze které byla počítána vazebná konstanta.

Hyaluronan ve vodných roztocích tvoří specifické překrývající se domény, které vytvářejí síť stabilizovanou vodíkovými vazbami, vodními můstky a hydrofobními interakcemi [18]. Právě výše zmíněné interakce spolu s polárními vlastnostmi hyaluronanu, jsou důvodem vysokého

zadržování vody. V literatuře se dokonce tvrdí, že právě vysoká hydratace hyaluronanu je jednou z jeho nejdůležitějších biologických funkcí [19]. Nicméně v další literatuře se objevuje tvrzení, že není nic moc zajímavého na chování hyaluronanu v roztoku. Jinými slovy, že hyaluronan nepokrývá souvislý hydratační obal, nýbrž velké vodní klastry vázané k hyaluronanu nebo uvězněné uvnitř řetězců hyaluronanu, které mohou být tím důvodem, proč hyaluronan tvoří vysoce viskózní roztoky i v malých koncentracích [20], [21].

Při pozorování ESIPT emise 3HNA v prostředí hyaluronanu nelze určit žádný specifický trend. Intenzita fluorescence, respektive závislost $[F_{\infty} - F_0]/[F_x - F_0]$ na reciproké hodnotě koncentrace hyaluronanu kolísá, stejně tak kolísají hodnoty anizotropie v závislosti na koncentraci hyaluronanu. Sice nebylo dosaženo takových koncentrací jako v případě PVP, nicméně při koncentraci hyaluronanu 15 g/L je již roztok vysoce viskózní. Pokud budeme uvažovat záporný náboj hyaluronanu ve vodném roztoku a záporný náboj 3HNA v excitovaném stavu, můžeme usoudit, že v excitovaném stavu bude repulze nábojů 3HNA a karboxylových skupin hyaluronanu natolik vysoká, že se 3HNA hydratačnímu obalu hyaluronanu nepřiblíží. Pokud by ale hyaluronan měl mít masivní hydratační obal, i nízkou vazebnou konstantu by mělo být možno určit. Z tohoto důvodu byl hyaluronan srovnán s jiným, známým polymerem obsahujícím karboxylovou skupinu, a to s karboxymethyl celulózu. Na rozdíl od hyaluronanu se u KMC objevila rostoucí závislost $[F_{\infty} - F_0]/[F_x - F_0]$ na reciproké koncentraci KMC a pomocí Benesi-Hildebrandovy metody bylo možno stanovit vazebnou konstantu, která měla hodnotu $K = 4,37 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}$.

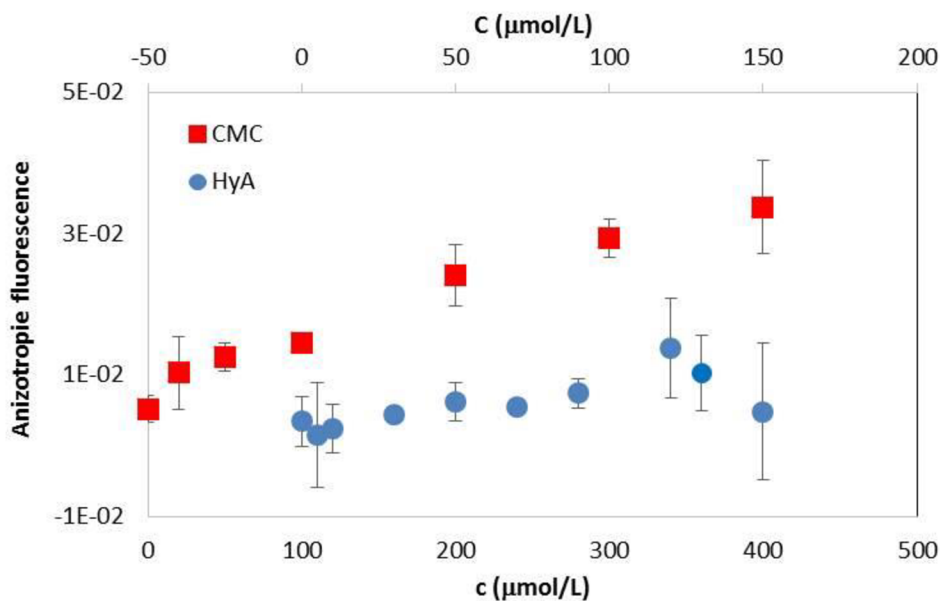


Obr. 34 Závislost $[F_{\infty} - F_0]/[F_x - F_0]$ na reciproké koncentraci HyA a KMC monitorující ESIPT emisi 3HNA (30 μmol/L)

Pro anizotropii fluorescence byly nalezeny podobné výsledky jako v případě ESIPT emise. V případě hyaluronanu nebylo možné určit trend závislosti anizotropie na koncentraci hyaluronanu a při přepočtu anizotropie na poměr volné a vázané sondy k polymeru došlo k poklesu do záporných hodnot. V případě KMC byl sledován rostoucí trend anizotropie v závislosti na

koncentraci polymeru a ze závislosti $K \cdot c_{polymer} = \frac{F_b}{1 - F_b}$ mohla být vypočítána vazebná konstanta,

kteřá měla hodnotu $K = 6,87 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}$. Stejně jako v předešlých případech je odchylka mezi vazebnou konstantou stanovenou pomocí Benesi-Hildebrandovy metody a vazebnou konstantou stanovenou pomocí anizotropie fluorescence způsobena zvyšující se viskozitou vzorku s rostoucí koncentrací polymeru.



Obr. 35 Závislost hodnot anizotropie na koncentraci polymerů

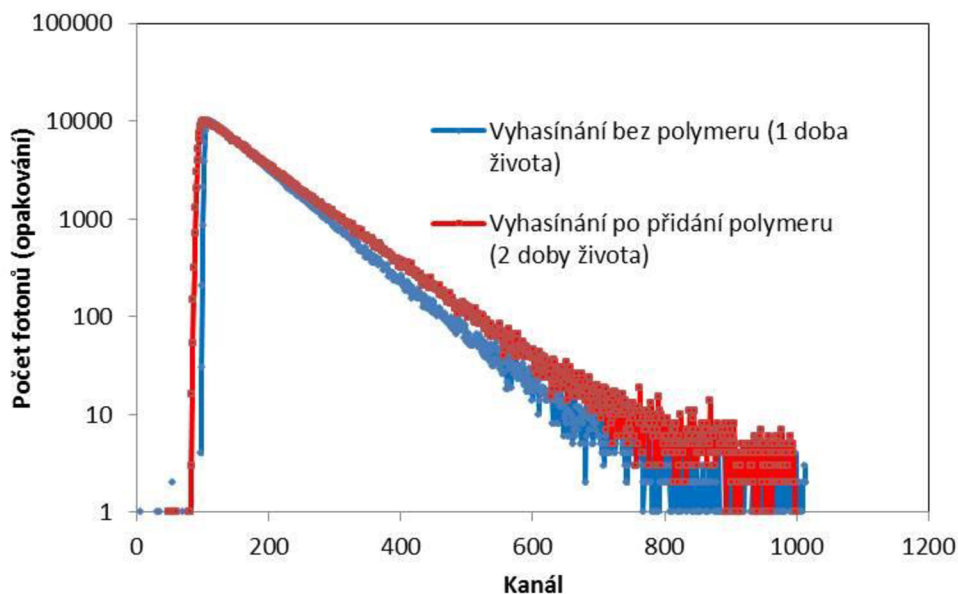
Ve srovnání s PVP a BSA je tato hodnota o řád nižší, respektive o dva. Tato skutečnost ale není překvapující, protože u KMC hraje velkou roli právě záporný náboj karboxylové skupiny. Nicméně ve srovnání s hyaluronanem je vidět, že karboxylová skupina není úplnou překážkou pro navázání 3HNA na vodu vázanou k polymeru. Výše uvedená zjištění podporují právě ty myšlenky, že se voda k hyaluronanu váže buď v určitých klastrech a na určitých místech, nebo jsou vodní klastry zachycené uvnitř řetězců hyaluronanu [153].

4.2.2 Časově-rozlišená fluorescence

Při měření doby života bylo vycházeno z faktu, že 3HNA má ve vodě jednu dobu života, a to 1,65 ns. Jakmile je do roztoku přidán polymer, určitá frakce populace fluorescenční sondy by se měla navázat na polymer, čímž by se měla změnit i průměrná doba života. Pokud by na polymer byla navázána tedy jen určitá frakce populace 3HNA a zbytek populace by byl v roztoku, měl by se změnit tvar vyhasinací křivky a měly by být získány alespoň dvě doby života.

Výše popsany předpoklad se potvrdil v měření s PVP a BSA. Jakmile byl do systému přidán polymer, došlo ke změně tvaru vyhasinací křivky (Obr. 36). Z monoexponenciální funkce se stala biexponenciální s dobami života 1,7 ns a 6,57 ns. U koncentrace PVP $20 \mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, tedy po prvním přidání polymeru, bylo relativní zastoupení doby života volné sondy majoritní a vázané sondy minoritní (přibližně 70 % : 30 %). S rostoucí koncentrací polymeru rostlo i relativní

zastoupení vázané sondy, a to až k 70 % podílu vázané sondy. U BSA byl průběh podobný, ale nebylo dosaženo majoritního podílu vázané sondy. Při nejvyšší koncentraci BSA se relativní zastoupení vázané sondy zastavilo na 40 %. Důvodem je nižší koncentrace BSA v porovnání s PVP, protože stacionární fluorescenci byla určena vyšší vazebná konstanta pro BSA než pro PVP. Nicméně z výše popsaného plyne, že pomocí doby života lze také zjistit, jestli 3HNA bude interagovat s molekulami vody vázanými k hyaluronanu.



Obr. 36 Porovnání vyhasínacích křivek 3HNA bez a v přítomnosti polymeru. Osa x je zobrazena jako kanál (1 kanál představuje 0,22 ns pro 1 exponenciální pokles a 0,11 ns pro 2 exponenciální pokles) kvůli jednoduššímu srovnání obou tvarů obou křivek.

Při měření doby života 3HNA v prostředí hyaluronanu bylo zjištěno, že se doba života 3HNA s rostoucí koncentrací hyaluronanu nemění a vyhasínání fluorescence je stále monoexponenciální. Stejně jako u stacionární fluorescence se zdá, že se 3HNA nenaváže na hydratační obal hyaluronanu, spíše to opět vypadá, že převládá repulze nábojů. Při srovnání s KMC je ale vidět, že 3HNA může interagovat s molekulami vody vázanými k polymeru, který obsahuje karboxylovou skupinu. Po přidání KMC do roztoku se změnil tvar vyhasínací křivky a tato křivka byla popsána biexponenciální funkcí. Sice hodnoty relativního zastoupení delší doby života (tedy doby života vázané sondy k polymeru) nedosahovaly hodnot určených pro PVP nebo BSA, ale i s 15% zastoupením vázané sondy je patrné, že se 3HNA dokáže navázat na KMC i přes značnou repulzi nábojů. To neplatí pro hyaluronan, kde se po přidání polymeru k 3HNA nezměnil počet dob života a se zvyšující se koncentrací hyaluronanu nedochází ke zvyšování doby života. To potvrzují data ze stacionární fluorescence, že se voda k hyaluronanu váže buď v určitých klastrech a na určitých místech, nebo jsou vodní klastry zachycené uvnitř řetězců hyaluronanu.

Tabulka 1 Doby života a příslušné relativní amplitudy 3HNA (30 $\mu\text{mol/L}$) v prostředí PVP a BSA

c_{PVP} ($\mu\text{mol/L}$)	τ_1 (ns)	A_1 (%)	τ_2 (ns)	A_2 (%)	$\tau_{\text{průměr}}$ (ns)
0	1.65	100	-	-	1.65
20	1.70	67.42	6.57	32.58	3.29
50	1.82	47.31	6.58	52.69	4.32
100	2.00	36.72	6.58	63.28	4.90
200	2.22	30.35	6.61	69.65	5.28
300	2.51	30.48	6.73	69.52	5.44
400	2.63	29.96	6.76	70.04	5.52
c_{BSA} ($\mu\text{mol/L}$)	τ_1 (ns)	A_1 (%)	τ_2 (ns)	A_2 (%)	$\tau_{\text{průměr}}$ (ns)
0	1.68	100	-	-	1.65
1	1.69	86.10	5.69	13.90	2.25
2	1.79	77.62	6.08	22.38	2.75
3	1.89	68.94	6.30	31.06	3.26
4	2.00	64.88	6.49	35.12	3.58
5	2.03	63.95	6.46	36.05	3.63
6	2.15	61.38	6.61	38.62	3.88
10	2.28	59.20	6.63	40.80	4.05

Tabulka 2 Doby života a příslušné relativní amplitudy 3HNA (30 $\mu\text{mol/L}$) v prostředí hyaluronanu a KMC

C_{HyA} ($\mu\text{mol/L}$)	τ_1 (ns)	A_1 (%)	τ_2 (ns)	A_2 (%)	$\tau_{\text{průměr}}$ (ns)
0	1,67	100	-	-	1,67
5	1,66	100	-	-	1,66
10	1,66	100	-	-	1,66
30	1,67	100	-	-	1,67
50	1,67	100	-	-	1,67
70	1,67	100	-	-	1,67
90	1,69	100	-	-	1,69
120	1,69	100	-	-	1,69
130	1,69	100	-	-	1,69
150	1,70	100	-	-	1,70
C_{KMC} ($\mu\text{mol/L}$)	τ_1 (ns)	A_1 (%)	τ_2 (ns)	A_2 (%)	$\tau_{\text{průměr}}$ (ns)
0	1,66	100	-	-	1,66
20	1,69	100	-	-	1,69
50	1,62	96	6,30	4	1,80
100	1,63	94	7,18	6	1,97
200	1,68	91	8,74	9	2,32
300	1,70	87	8,89	13	2,63
400	1,73	85	9,35	15	2,87

4.3 Závěr

Účelem této kapitoly bylo prozkoumat možnost navázání fluorescenní sondy 3HNA v excitovaném stavu na polymer (vodu vázanou k polymeru). Byly použity 4 polymery (PVP, BSA, KMC a HyA). PVP a BSA byly použity z kontrolního důvodu, jelikož tyto polymery byly pomocí 3HNA již zkoumány. KMC zase byla použita z důvodu podobnosti k hyaluronanu, a to díky přítomnosti karboxylových skupin. Ze strukturního hlediska je jasné, že vazebnou konstantu excitovaného aniontu 3HNA budou ovlivňovat v roztoku disociované karboxylové skupiny obou polymerů. Nicméně vzhledem k teoriím o velkém a souvislém hydratačním obalu hyaluronanu by disociované karboxylové skupiny neměly být pro 3HNA překážkou.

Experimenty s PVP a BSA ukázaly, že 3HNA se váže k vodě vázané k polymeru. Vazebné konstanty byly stanoveny pomocí stacionární fluorescence. Podobné hodnoty vazebné konstanty byly stanoveny jak pomocí intenzity fluorescence, tak i pomocí anizotropie fluorescence. Hodnoty vazebné konstanty pro komplex 3HNA-BSA se pohybovaly v řádu 10^5 M^{-1} a pro komplex 3HNA-PVP v řádu 10^4 M^{-1} . To znamená, že se 3HNA lépe váže na polymer BSA. Vazba 3HNA na obal polymeru byla také potvrzena pomocí časově rozlišené fluorescence. Ve vodě má 3HNA

pouze jednu dobu života. V případě navázání na polymer by se měla objevit víceexponenciální vyhasínací křivka. Tato domněnka se při měření potvrdila. Po přidání polymeru do roztoku vzrostl počet dob života na dvě a při zvyšování koncentrace polymeru rostla průměrná doba života.

V případě aniontových polymerů KMC a HyA byla závislost intenzity fluorescence na koncentraci polymeru odlišná od PVP a BSA. U KMC ještě bylo možné vazebnou konstantu pomocí intenzity fluorescence a anizotropie fluorescence stanovit, ale u hyaluronanu nebylo možné tuto konstantu vypočítat. U KMC byla určena hodnota vazebné konstanty v řádu 10^3 M^{-1} , takže vazebná konstanta mohla být ovlivněna disociovanými karboxylovými skupinami, nicméně je vidět, že i přes přítomnost karboxylových skupin byla pozorována vazba 3HNA k vodě vázané k polymeru. V případě hyaluronanu nebylo možné určit trend závislosti a při přepočtu do Benesi-Hildebrandova vztahu hodnoty dosahovaly záporných hodnot. To znamená, že v případě hyaluronanu 3HNA neinteragovala s polymerem nebo s molekulami vody vázanými k polymeru. Časově rozlišená fluorescence potvrdila data ze stacionární fluorescence. V případě KMC se po přidání polymeru do roztoku zvýšil počet dob života na dvě a se zvyšující se koncentrací KMC rostla průměrná doba života. V případě hyaluronanu se po přidání polymeru do roztoku nezvýšil počet dob života a ani se doba života nezvyšovala s rostoucí koncentrací polymeru. Data získaná pomocí stacionární a časově rozlišené fluorescence naznačují, že hyaluronan nemá žádný monstrózní hydratační obal, ale že se voda k hyaluronanu váže buď v určitých klastrech a na určitých místech, nebo jsou vodní klastry zachycené uvnitř řetězců hyaluronanu.

5 CHARAKTERIZACE INTERAKCÍ POLYMER-TENZID POMOČÍ ESPT

Tato kapitola se zabývá deprotonací v excitovaném stavu a jejím využití pro výzkum interakcí hyaluronanu a tenzidů. Účelem je zjistit použitelnost ESPT v koloidních systémech a zaměřit se na citlivost ESPT na přítomnost molekul vody, což by mělo určit, jakým způsobem ovlivňuje hydratace hyaluronanu interakce s (opačně nabitými) micelárními útvary.

5.1.1 Stanovení CMC CTAB a Septonexu pomocí ESPT

Stanovení CMC je rutinní záležitost, která se ve fluorescenci nejčastěji provádí pomocí fluorescenční sondy pyrenu. Nicméně v tomto případě jde nejen o určení CMC (určení metody výpočtu CMC pro jednotlivé sondy – viz rozdílné výpočty v kapitole 3.1), ale i o ESPT charakteristiky jednotlivých sond v micelárním systému a o vyhodnocení, která ze sond bude dále použita pro studium micelárních systémů s polymery.

5.2 Experimentální část

5.2.1 Přístrojové vybavení

Viz kapitola 4.1.1

5.2.2 Příprava vzorků

Zásobní roztoky polymerů (hyaluronanu, polystyren sulfonátu) byly připraveny navážením přesného množství příslušného polymeru a jeho kvantitativním převedením do odměrné baňky a doplněním Milli-Q vodou po rysku. Takto byly připraveny zásobní roztoky hyaluronanu o koncentraci $70 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$.

Zásobní roztoky fluorescenčních sond byly připraveny navážením příslušného množství 1-naftolu, HPTS a 3HNA na analytických vahách a kvantitativním převedením do odměrných baněk o objemu 50 mL pomocí ethanolu a doplněním po rysku.

Vzorky byly připraveny převedením příslušného množství zásobního roztoku fluorescenční sondy do skleněných vialek a rozpouštědlo bylo odpařeno. Koncentrace naftolu v každém vzorku byla 10 μmol . Následně byl do vialek pipetován tenzid (CTAB, septonex) tak, aby vznikla koncentrační řada tenzidu o 16 vzorcích s koncentračním rozsahem od $2 \cdot 10^{-4}$ mol/L do $6 \cdot 10^{-3}$ mol/L v případě stanovení CMC pomocí ESPT a $1 \cdot 10^{-6}$ mol/L do $2 \cdot 10^{-2}$ mol/L v případě pozorování interakce polymeru a tenzidu. Všechny vzorky byly připraveny třikrát, aby mohla být provedena statistická analýza. Hyaluronan byl skladován a používán tak, aby nedocházelo k termální [149] nebo časové degradaci [150] polymeru. Zejména u časové degradace polymeru bez použití azidu sodného jakožto prevenci proti tvorbě mikroorganismů bylo vycházeno z naší studie zabývající se právě časovou degradací hyaluronanu bez použití jakéhokoli prostředku proti tvorbě mikroorganismů [151].

Zásobní roztoky zhášeců byly připraveny převedením příslušného množství zhášeče do odměrné baňky a doplněny po rysku vodou (DMSO v případě jodbenzenu) tak, aby vznikly zásobní roztoky o koncentraci 0,02 M pro jodid draselný, jodpropan a jodbenzen a 0,01 M roztok pro cetylpyridinium chlorid (CPC).

Vzorky byly připraveny převedením příslušného množství zásobního roztoku fluorescenční sondy do skleněných vialek a rozpouštědlo bylo odpařeno. Koncentrace naftolu v každém vzorku byla 10 μmol . Následně byl do jednotlivých skleněných vialek pipetován tenzid a zhášeč tak, aby koncentrace tenzidu ve všech vzorcích byla 20 mM a poměr koncentrace zhášeče a koncentrace micel byl v rozmezí 0,5 až 1,5. Vzorky byly následně doplněny vodou na výsledný objem 5 ml.

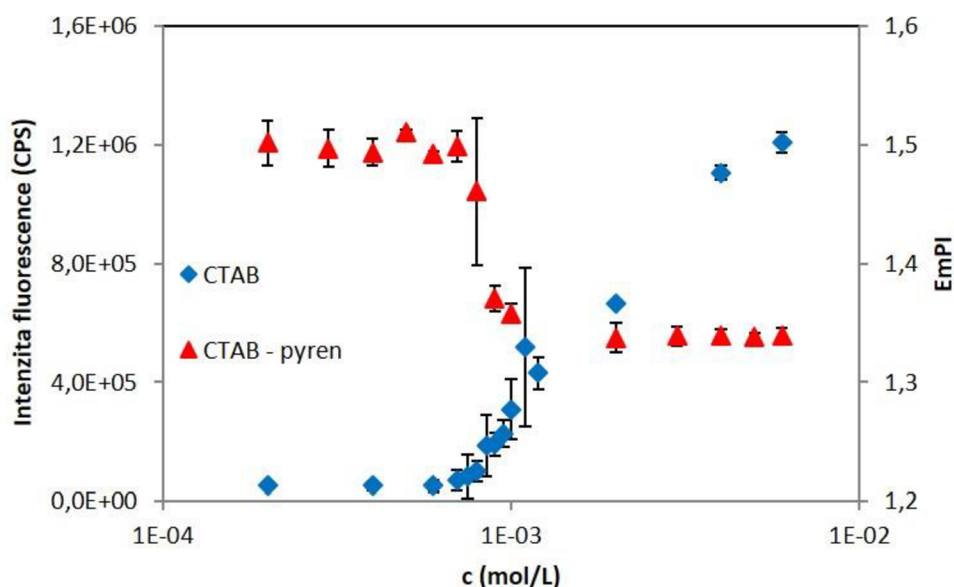
5.3 Výsledky a diskuse

5.3.1.1 1-naftol

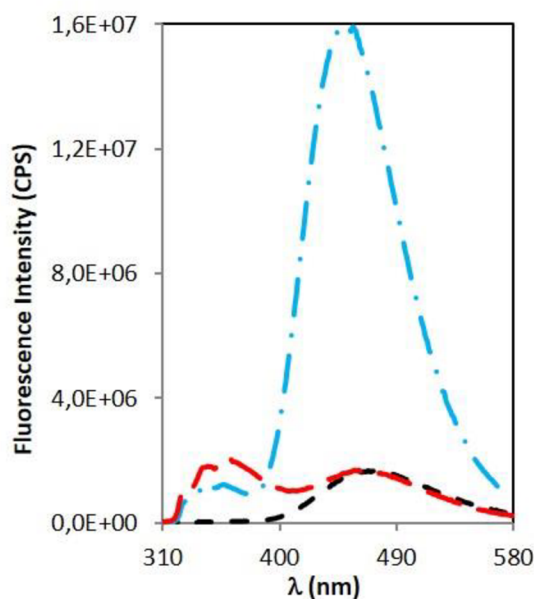
Na Obr. 37 je vidět, že data z měření s pyrenem korelují s měřením s 1-naftolem. Dále graf ukazuje, že intenzita fluorescence neutrální formy naftolu roste v závislosti na koncentraci tenzidu. Zvýšení intenzity fluorescence neutrální formy naftolu značí omezení deprotonace v excitovaném stavu, což znamená solubilizaci 1-naftolu do vznikajících micel tenzidu. To také znamená, že CMC může být vypočítána také pomocí sondy 1-naftolu. Jak již ale bylo zmíněno výše, CMC může být určena ze tří bodů této závislosti. Z inflexního bodu byla hodnota CMC určena na 1,18 mM, pro minimum funkce na 1,01 mM a pro maximum funkce byla určena na 1,35 mM. CMC stanovená pomocí pyrenu byla určena na 1,03 mM. S touto hodnotou nejlépe koreluje CMC určená pomocí minima funkce.

Z Obr. 37 plyne, že se 1-naftol solubilizuje v micelách, ale neříká nic o tom, v jakých místech micely by se sonda mohla rozpouštět. To dále napoví emisní spektra naftolu. Fluorescenční sonda se může vázat v různých částech micely, a to na jejím povrchu, ve Sternově vrstvě nebo v hydrofobním jádře micely (kapitola 2.2.2 a 3.3). Emisní spektrum 1-naftolu v CTAB ukázalo, že i v koncentracích za kritickou micelární koncentrací převažuje aniontová forma 1-naftolu nad neutrální, takže se nebude solubilizovat v hydrofobním jádře micel. Hydrofobní jádro micely je v podstatě tvořeno kapalnými uhlovodíky, takže ESPT by, v případě solubilizace sondy v jádře, byl

výrazně omezen nebo úplně zastaven, jak je tomu například v prostředí methanolu, což by mělo za následek převahu píku neutrální formy naftolu nad aniontovou. Z tohoto pozorování plyne, že se 1-naftol v CTAB pravděpodobně nachází ve Sternově vrstvě, a proto převažuje aniontová forma 1-naftolu ve srovnání s neutrální formou. S tímto zjištěním koresponduje také měření časově rozlišené fluorescence, respektive výpočet rychlostní konstanty deprotonace. Rychlostní konstanta se snižuje v závislosti na tvorbě micel a nakonec rychlostní konstanta deprotonace v micelách dosahuje hodnot okolo $1,7 \text{ ns}^{-1}$. To znamená, že rychlostní konstanta nedosahuje tak nízkých hodnot jako v případě směsi methanol-voda, takže se nenachází v blízkosti nebo uvnitř jádra micely (viz Přílohy Tabulka 7).



Obr. 37 Závislost intenzity neutrální formy naftolu ($\lambda = 350 \text{ nm}$) a EmPI na koncentraci tenzidu



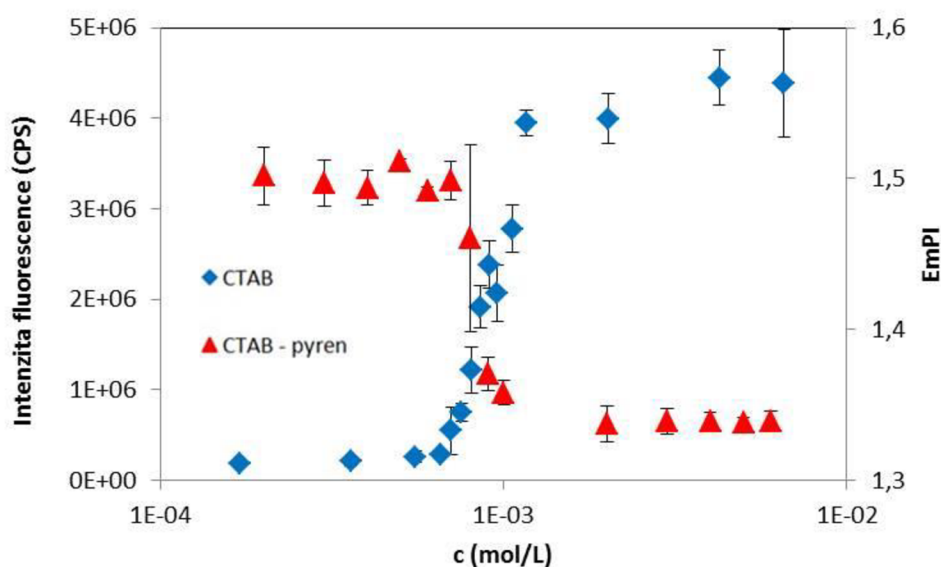
Obr. 38 Emisní spektra 1-naftolu ve vodě (- -), 6 mM CTAB (- • -) a v 80% směsi methanol-voda (- - -)

Vzhledem k pozici 1-naftolu v micelle se naftol jeví jako ideální kandidát pro výzkum vlivu hydratace (hydratačního obalu) na prostředí uvnitř micely, protože by se naftol mohl nacházet právě na výše zmíněném rozhraní.

5.3.1.2 HPTS

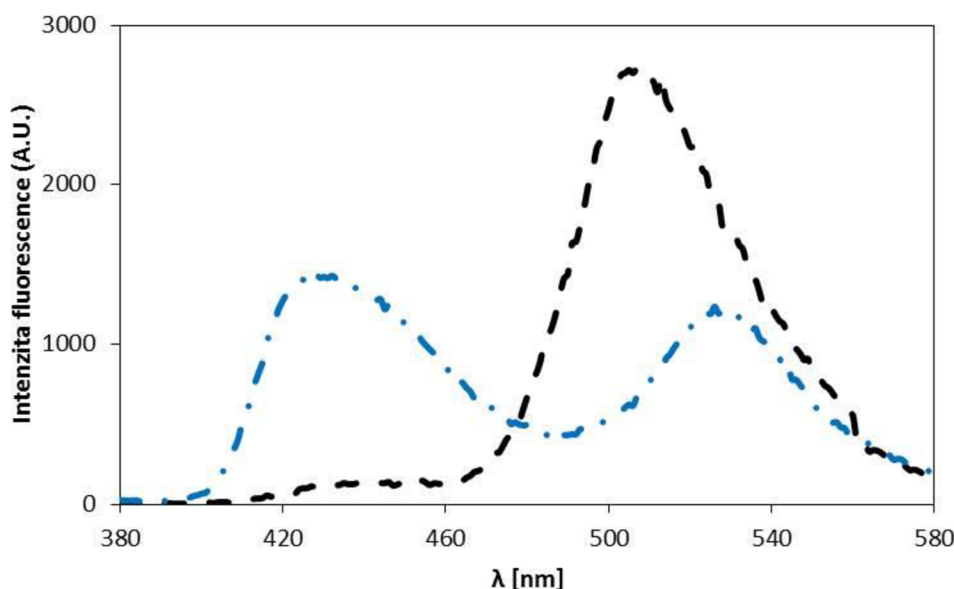
Obr. 39 znázorňuje závislost intenzity fluorescence neutrální formy HPTS na koncentraci tenzidu. Zvýšení intenzity fluorescence neutrální formy HPTS značí omezení deprotonace v excitovaném stavu, což opět znamená solubilizaci sondy do vznikajících micel tenzidu. Průběh závislosti se dobře shoduje s EmPI pyrenu, takže i HPTS může být použito pro stanovení CMC. Jak již ale bylo zmíněno výše, CMC může být určena ze tří bodů této závislosti. Z inflexního bodu byla hodnota CMC určena na 0,97 mM, pro minimum funkce na 0,85 mM a pro maximum funkce byla určena na 1,10 mM. CMC stanovená pomocí pyrenu byla určena na 1,03 mM. S touto hodnotou nejlépe koreluje CMC určená pomocí inflexního bodu funkce.

Stejně jako v předchozím případě (1-naftolu) lze pozorovat solubilizaci HPTS do micel, takže jde také o potenciálního kandidáta pro další výzkum interakce polymeru a tenzidu. Nicméně v tomto případě se HPTS pravděpodobně solubilizuje v odlišné části micely než 1-naftol. Plyne to z porovnání emisních spekter HPTS ve vodě a v micelách. Na Obr. 40 lze pozorovat převahu neutrální formy HPTS v micelách nad formou aniontovou. V případě 1-naftolu tomu bylo právě naopak, tedy aniontová forma převažovala nad neutrální. V případě HPTS se tedy sonda pravděpodobně nachází hlouběji v micelách, a to pravděpodobně na rozhraní jádra micely a Sternovy vrstvy. To potvrzuje i časově rozlišená fluorescence. Rychlostní konstanta deprotonace HPTS v micelách dosahuje hodnot menších než 1 ns^{-1} , konkrétně tedy $0,8 \text{ ns}^{-1}$. To znamená, že rychlostní konstanta dosahuje podobně nízkých hodnot jako v případě směsi methanol-voda, takže i podle rychlostní konstanty deprotonace je deprotonaci výrazně bráněno (viz Přílohy Tabulka 8).



Obr. 39 Závislost intenzity neutrální formy HPTS ($\lambda = 420\text{nm}$) a EmPI na koncentraci tenzidu

Výše je zmíněno, že HPTS je také potenciální sondou pro výzkum vlivu hydratace hyaluronanu na micelární prostředí. Nicméně tato sonda se nachází hlouběji v micelle, takže jako vhodnější sonda pro tuto aplikaci se jeví 1-naftol.



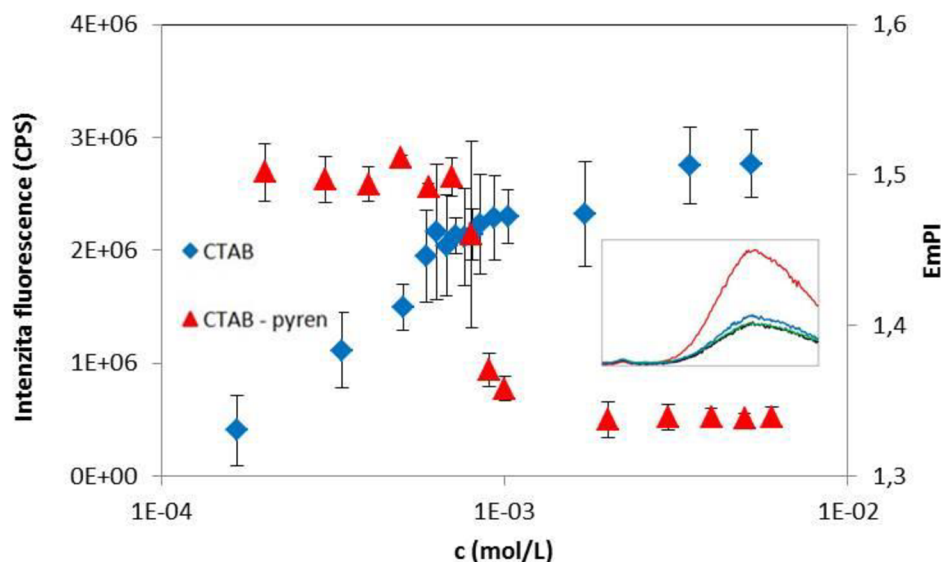
Obr. 40 Emisní spektra HPTS ve vodě (- -), 6 mM CTAB (- • -)

5.3.1.3 3HNA

Fluorescenční sonda 3HNA byla v tomto případě zvolena kvůli citlivosti aniontové formy na vázanou vodu. Pokud by bylo možné sledovat závislost změny intenzity aniontové formy 3HNA na koncentraci tenzidu, mohla by být tato sonda použita pro výzkum vlivu hydratace hyaluronanu na jeho interakce s (opačně nabitými) micelárními útvary.

Obr. 41 nicméně ukazuje, že intenzita fluorescence sice s rostoucí koncentrací tenzidu roste, ale roste již od prvního přidání tenzidu, tedy před kritickou micelární koncentrací. Intenzita fluorescence roste v podstatě lineárně, takže nelze určit, kdy dochází k tvorbě jakýchkoli agregátů tenzidu. Způsobuje to pravděpodobně okamžité navázání aniontového 3HNA na kationtový tenzid, což vede ke zvýšení intenzity fluorescence. Nejde tedy o zvýšení intenzity fluorescence vlivem tvorby micel. Ke stejnému závěru lze dojít pomocí časově rozlišené fluorescence, protože hned při prvním přidání tenzidu o koncentraci $2 \cdot 10^{-4}$ M došlo ke skokovému zvýšení průměrné doby života z 1,6 ns na 4,4 ns (viz Přílohy Tabulka 9), což, z předchozích experimentů s 3HNA, znamená navázání 3HNA na jinou molekulu. Z toho plyne, že se 3HNA bude vázat elektrostaticky na tenzid a v případě přidání záporně nabitého polymeru by mohlo dojít k vytlačení 3HNA, a tedy ke změně spektrálních vlastností. Tento jev by činil 3HNA zajímavou pro výzkum interakcí tenzidu a polymeru, nicméně tento experiment byl již proveden s akridinovou oranží [154],

takže v případě výzkumu vlivu hydratace hyaluronanu nebude 3HNA v dalších experimentech zvažena.

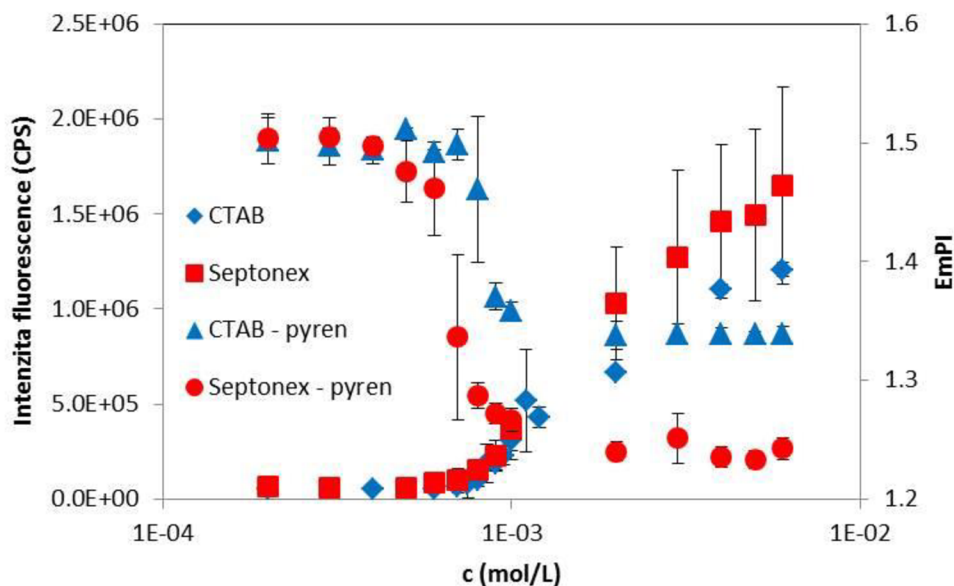


Obr. 41 Závislost intenzity aniontové formy 3HNA ($\lambda = 510\text{nm}$) a EmPI na koncentraci tenzidu. Vložený graf znázorňuje emisní spektra 3HNA ve vodě a v micelách CTAB.

5.3.1.4 Charakterizace fluorescenční sondy 1-naftolu v Septonexu

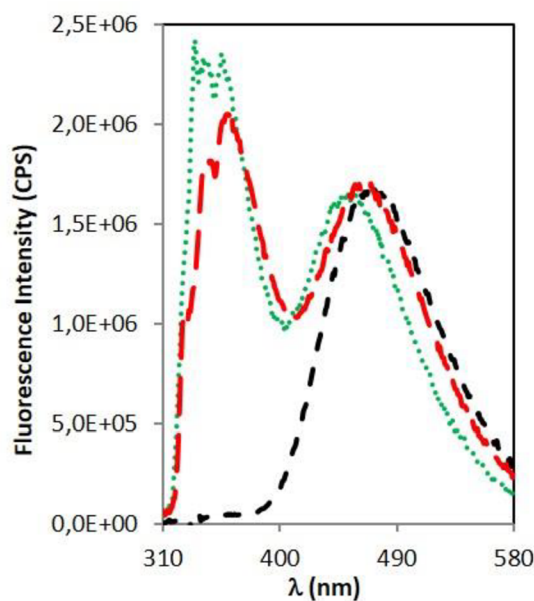
CMC Septonexu je opět hodnota, kterou lze vyčíst z literatury (0,77 mmol [155]), ale v tomto případě byla potřeba stanovit především charakteristiku ESPT v Septonexu, abychom ověřili, že je tuto metodu možno právě na Septonex aplikovat, proto byla hodnota CMC stanovena podobně jako pro CTAB v předchozí kapitole. Hodnota CMC Septonexu stanovená pomocí pyrenu (0,67 mmol) se, v rámci směrodatné odchylky, shodovala s hodnotou CMC stanovenou pomocí 1-naftolu (0,60 mmol). Septonex pro tyto účely zatím v literatuře použitý nebyl. Důvodem je další srovnání CTAB a Septonexu při výzkumu vlivu hydratace hyaluronanu na prostředí micel.

Na Obr. 42 je vidět, že data z měření s pyrenem korelují s měřením s 1-naftolem (pro srovnání jsou v grafu i data pro CTAB). Dále graf ukazuje, že intenzita fluorescence neutrální formy naftolu roste v závislosti na koncentraci tenzidu. Zvýšení intenzity fluorescence neutrální formy naftolu značí omezení deprotonace v excitovaném stavu, což znamená solubilizaci 1-naftolu do vznikajících micel tenzidu.



Obr. 42 Závislost intenzity neutrální formy naftolu ($\lambda = 350\text{nm}$) na koncentraci tenzidu

V případě 6 mM Septonexu převažuje neutrální forma naftolu nad aniontovou a je vidět, že emisní spektrum 1-naftolu v 6 mM Septonexu má prakticky stejný tvar jako emisní spektrum 1-naftolu ve směsi methanol-voda. V Septonexu se tedy 1-naftol pravděpodobně nachází na rozmezí Sternovy vrstvy a hydrofobního jádra, neboli v místech, kde je méně molekul vody, což brání deprotonaci. Nemůžeme tvrdit, že se 1-naftol nachází absolutně v hydrofobním jádře micely, protože intenzita fluorescence aniontové formy je stále výrazná. V případě, že by se NpOH nacházel v hydrofobním jádře Septonexu, aniontová forma by zcela vymizela.



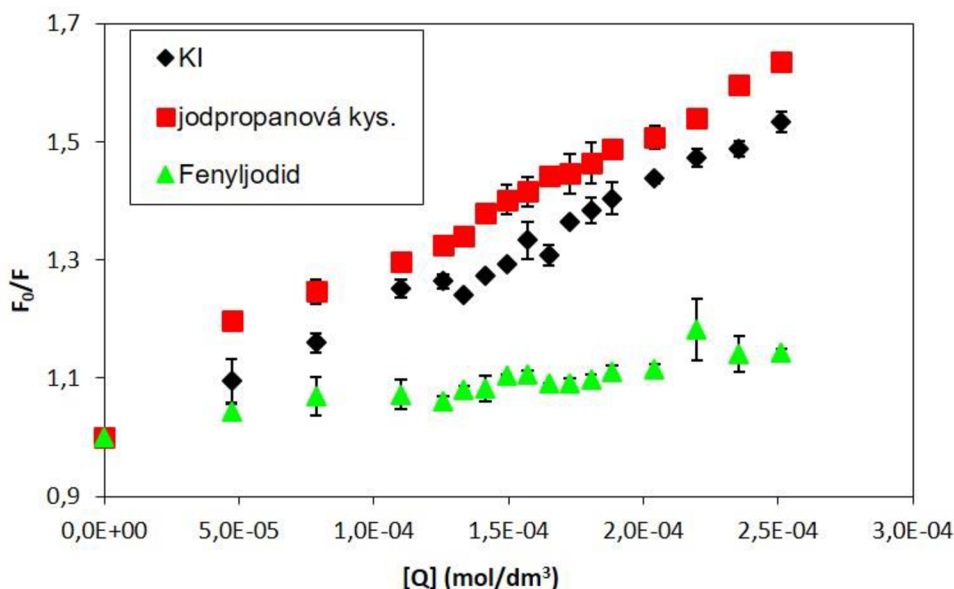
Obr. 43 Emisní spektra 1-naftolu ve vodě (- -), 6 mM Septonexu (●●●) a v 80% směsi methanol-voda (-.-)

Z výše uvedených dat plyne, že Septonex může být použit jako další tenzid pro výzkum vlivu hydratace hyaluronanu na jeho interakce s (opačně nabitými) micelárními útvary.

5.3.2 Určení pozice 1-naftolu v CTAB pomocí zhášení fluorescence

Tato část práce se zabývá zhášením fluorescence 1-naftolu za účelem potvrzení pozice naftolu v micelách CTAB a Septonexu.

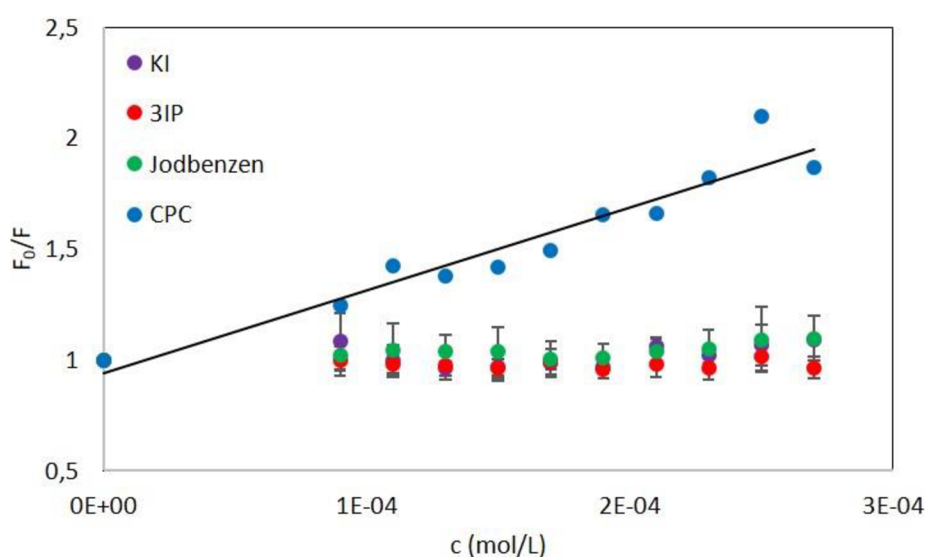
Jak bylo zmíněno v kapitole 3.2, pozice fluorescenční sondy může být určena pomocí zhášení jodových derivátů. V předchozí práci byla pomocí této metody zkoumána pozice pyrenu v micelách CTAB pomocí jodidu draselného, jodpropanové kyseliny a jodbenzenu. Jodid draselný se nachází v roztoku a na rozhraní micela-voda, jodpropanová kyselina se nachází na rozhraní Sternovy vrstvy micely a hydrofobního jádra a jodbenzen se nachází v hydrofobním jádře micely. Co se týče zhášení pyrenu, bylo zjištěno, že se pyren nachází ve Sternově vrstvě micely, protože účinnost zhášení byla podobná jak pro jodid draselný, tak pro jodpropanovou kyselinu. Pozice pyrenu byla potvrzena následně pomocí časově rozlišené fluorescence (graf pro měření časově rozlišené fluorescence je v kapitole přílohy - Obr. 66).



Obr. 44 Emisní data pro zhášení pyrenu v CTAB pomocí jodidu draselného, 3 jodpropanové kyseliny a fenyljodidu, koncentrace CTAB byla konstantní

Stejný experiment, který byl popsán výše, byl proveden pro 1-naftol v CTAB a v Septonexu. Při použití jodových derivátů nebylo pozorováno žádné zhášení stacionární fluorescence, a to ani jedním z výše uvedených derivátů. Neznamená to, že by se 1-naftol nenacházel v micelách, jen není zhášen jodovými deriváty. Měření stacionární fluorescence byla potvrzena i časově rozlišenou fluorescence, kdy nebyla pozorována žádná změna doby života. Samozřejmě u časově rozlišené fluorescence se může jednat pouze o absenci dynamického zhášení, nicméně v kombinaci s nulovou změnou intenzity fluorescence to znamená, že jodové deriváty 1-naftol nezháší. Stejná závislost byla pozorována i pro 1-naftol v micelách Septonexu.

Jelikož použitím jodových derivátů nedocházelo ke zhášení fluorescence, byl použit další dostupný zhášec, který se svou strukturou začlení do Sternovy vrstvy micely. Jedná se o cetypyridinium chlorid. Tento tenzid se díky své struktuře vnoří do struktury micely tak, že hydrofobní řetězec se nachází v jádře micely a pyridiniový iont se nachází ve Sternově vrstvě, respektive na pomezí hydrofobní vrstvy micely a Sternovy vrstvy. Obr. 45 zobrazuje závislost změny intenzity fluorescence na koncentraci zhášече (graf pro Septonex v kapitole Přílohy – Obr. 67). Lze pozorovat lineárně rostoucí závislost, což znamená, že CPC 1-naftol zháší. Znamená to také, že pomocí CPC byla potvrzena pozice 1-naftolu v micelách CTAB a Septonexu. Účinnost zhášení v kombinaci s emisními daty z předchozí kapitoly říká, že se 1-naftol v obou případech nachází ve Sternově vrstvě, případně na pomezí Sternovy vrstvy a hydrofobního jádra micely.



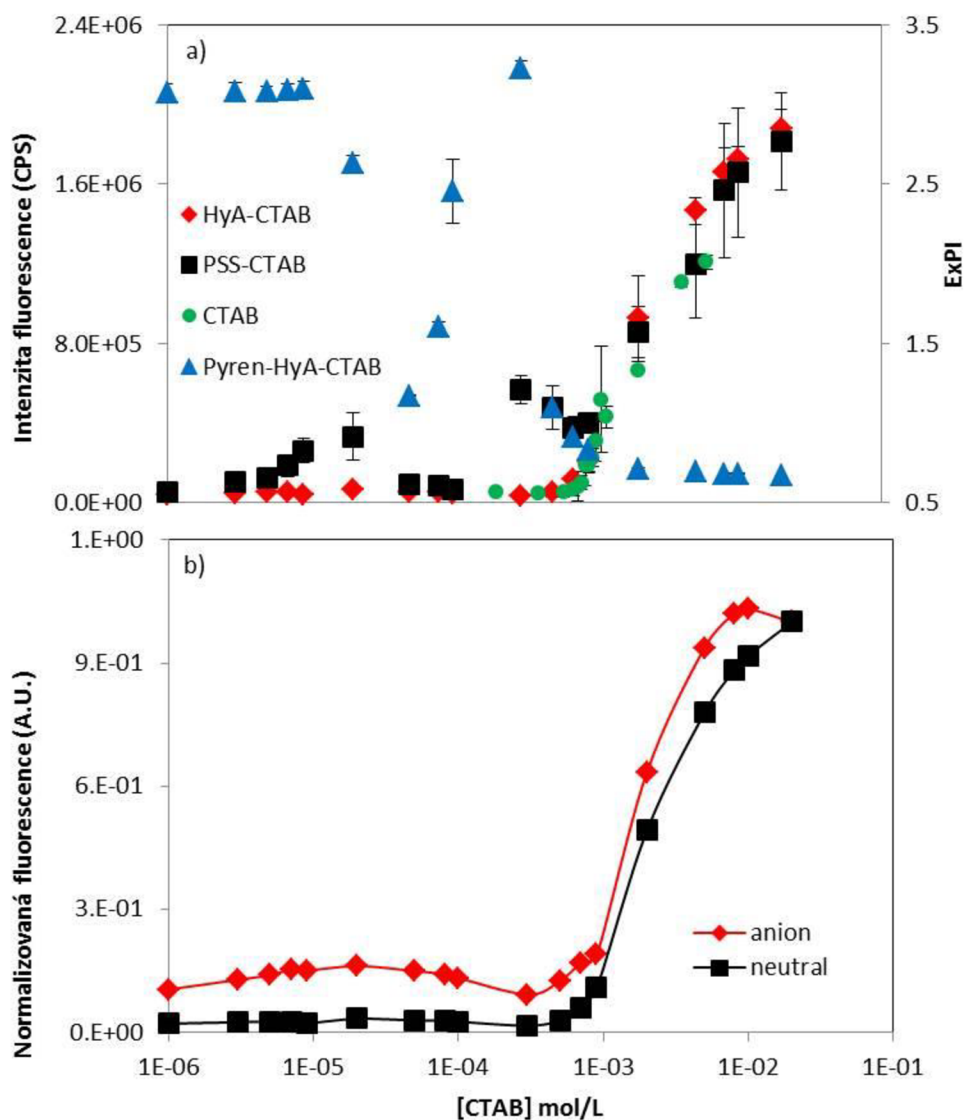
Obr. 45 Emisní data pro zhášení 1-naftolu v CTAB pomocí KI, 3-jodpropanové kyseliny, jodbenzenu a CPC, koncentrace CTAB byla konstantní

5.3.3 Studium interakcí polymeru a tenzidu pomocí ESPT

V předchozí sekci bylo zjištěno, že 1-naftol a HPTS mohou být použity pro stanovení agregační koncentrace CTAB kvůli jejich schopnosti solubilizace v těchto agregátech. Ze dvou fluorescenčních sond byl vybrán 1-naftol proto, že se v CTAB nachází ve Sternově vrstvě a v Septonexu se nachází blíž k hydrofobnímu jádru micely. Tato sekce má za úkol zjistit, jestli se budou měnit emisní charakteristiky 1-naftolu, tedy jestli je 1-naftol ovlivněn přítomností hyaluronanu, respektive hydratačním obalem hyaluronanu. Pro srovnání polymeru s významnými hydratačními vlastnostmi byl vybrán vysyntetický polystyren sulfonátem (PSS). Cílem je srovnat polymer s významnou elektronovou hustotou (PSS) a biopolymer hyaluronan. Dalším cílem je potvrdit interakce hyaluronanu a tenzidu před kritickou micelární koncentrací a využít vysoké citlivosti ESPT na přítomnost vody (nebo naopak na přítomnost uhlovodíků). PSS byl pro srovnání použit především proto, že je to dobře definovaný polyelektrolyt a nebyl u něj v literatuře pozorován žádný hydratační obal, kdežto hyaluronan je známý humektant.

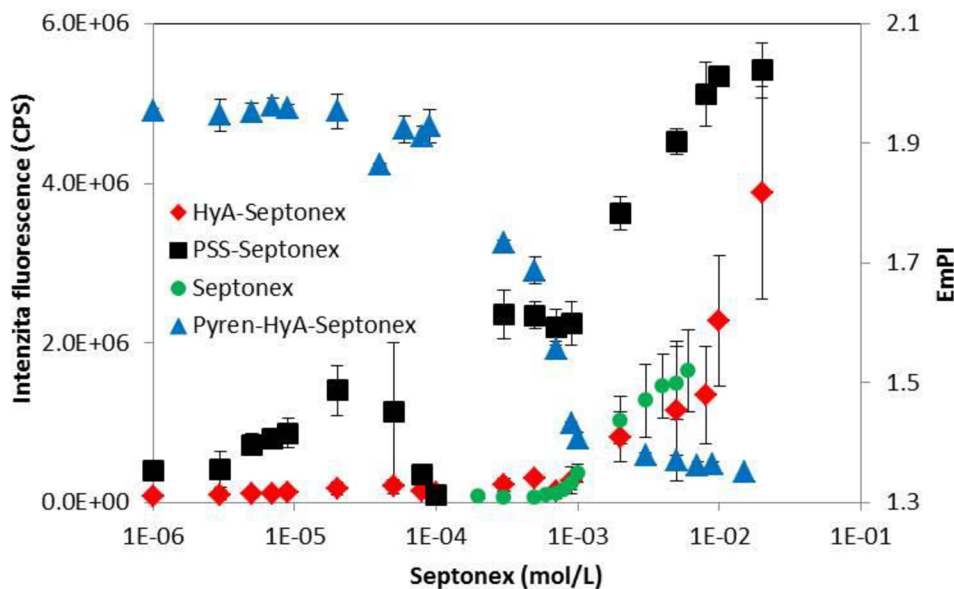
V literatuře je interakce tenzidů a polyelektrolytů již popsána. Předpokladem tedy bylo, že před kritickou micelární koncentrací bude možné pozorovat zvýšení intenzity fluorescence neutrální formy naftolu u kritické agregační koncentrace a zároveň by se měla kritická micelární koncentrace snížit. Po přidání hyaluronanu o koncentraci 7 mg/L do roztoku tenzidu je vidět, že intenzita fluorescence neutrální formy 1-naftolu se začíná zvyšovat přibližně ve stejných koncentracích jako při absenci hyaluronanu (Obr. 46), takže to vypadá, že k žádné interakci hyaluronanu a CTAB nedochází. Při srovnání s PSS můžeme pozorovat zvýšení intenzity fluorescence neutrální formy naftolu u koncentrace $2 \cdot 10^{-5}$ mol/L, což představuje kritickou agregační koncentrací. Dále je vidět druhé zvýšení intenzity fluorescence u koncentrace tenzidu $3 \cdot 10^{-4}$ mol/L, což představuje kritickou micelární koncentrací v přítomnosti PSS. V tomto srovnání bychom mohli říct, že hyaluronan v nízké koncentraci s CTAB neinteraguje, takže se netvoří žádné agregáty. Nicméně po vynesení závislosti excitačního polaritního indexu (ExPI) pyrenu na koncentraci CTAB je vidět prudký pokles ExPI u koncentrace $5 \cdot 10^{-5}$ mol/L, což značí tvorbu agregátů hyaluronanu a CTAB. Zároveň lze pozorovat snížení hodnoty kritické micelární koncentrace na hodnotu $5 \cdot 10^{-4}$ mol/L kvůli posunu inflexního bodu sigmoidní závislosti k nižším hodnotám. Pokud by k žádné interakci nedocházelo, hodnota CMC by byla přibližně $8 \cdot 10^{-4}$ mol/L a především by nedošlo ke snížení ExPI jeden řád před CMC.

Porovnáním normalizované intenzity fluorescence neutrální a aniontové formy naftolu v závislosti na koncentraci CTAB byl zjištěn rozdíl mezi průběhem závislosti neutrální a aniontové formy na koncentraci CTAB. Intenzita fluorescence aniontové formy má první maximum okolo koncentrace $2 \cdot 10^{-5}$ mol/L a druhé okolo $5 \cdot 10^{-4}$ mol/L. Závislost aniontové formy 1-naftolu na koncentraci CTAB koreluje s měřením, které bylo provedeno s pyrenem. Přitom intenzita fluorescence neutrální formy 1-naftolu by se měla měnit stejně jako intenzita fluorescence aniontové formy kvůli zjevné solubilizaci naftolu v agregátech hyaluronanu a CTAB. Jelikož není pozorována žádná změna intenzity fluorescence neutrálního naftolu před kritickou micelární koncentrací, bude naftol ovlivněn větším zastoupením molekul vody v micelárním prostředí neboli větší hydratací Sternovy vrstvy.



Obr. 46 a) Titrace systémů 1-naftol, naftol-hyaluronan, naftol-PSS a pyrene-hyaluronan pomocí CTAB. Intenzitu fluorescence představuje intenzita neutrální formy naftolu (350 nm). b) Závislost normalizované intenzity fluorescence neutrální a aniontové formy 1-naftolu na koncentraci CTAB

U Septonexu byla situace podobná jako v případě CTAB (Obr. 47). Hodnota kritické micelární koncentrace se nezměnila s přidáním hyaluronanu při měření intenzity fluorescence neutrální formy 1-naftolu. Jak se ale již ukázalo u CTAB, po přidání syntetického PSS, který má větší nábojovou hustotu než hyaluronan, došlo k výraznému zvýšení intenzity fluorescence neutrální formy 1-naftolu (NpOH) okolo koncentrace $2 \cdot 10^{-5}$ mol/L, což značí kritickou agregační koncentraci systému PSS-Septonex. K dalšímu zvýšení intenzity fluorescence NpOH došlo u koncentrace $3 \cdot 10^{-4}$ mol/L, což je připisováno tvorbě agregátů PSS-Septonex a volným micelám. Jako kontrolní měření v případě hyaluronanu byla opět použita fluorescenční sonda pyren. U koncentrace $4 \cdot 10^{-5}$ mol/L došlo k poklesu ExPI, takže k tvorbě agregátů hyaluronanu a Septonexu dochází již před kritickou micelární koncentrací, ale molekuly 1-naftolu jsou pravděpodobně opět ovlivněny větším zastoupením molekul vody v micelárním prostředí.



Obr. 47 Titrace systémů 1-naftol, naftol-hyaluronan, naftol-PSS a pyrene-hyaluronan pomocí CTAB. Intenzitu fluorescence představuje intenzita neutrální formy naftolu (350 nm).

Jelikož se charakteristiky fluorescence neutrální formy naftolu v obou tenzidech v přítomnosti hyaluronanu a PSS liší, nebude důvodem jen zastoupení molekul vody ve Sternově vrstvě micely, ale pravděpodobně hydratace jednotlivých polymerů. PSS se podle předpokladu jeví jako polymer, který nemá hydratační vrstvu, takže neovlivňuje vnitřní prostředí micel. Kdežto hyaluronan by jistou hydratační vrstvu mít měl, případně, jak bylo diskutováno v sekci 4, vodní klastry vázané k hyaluronanu. Tyto vodní klastry by mohly zasahovat dovnitř Sternovy vrstvy a ovlivnit tak molekuly 1-naftolu. Jelikož kinetika ESPT je vysoce citlivá právě na přítomnost molekul vody, lze rychlostní konstanty popsané v kapitole 3.3 vypočítat z křivek vyhasínání fluorescence. Právě časově-rozlišené fluorescenci a kinetice ESPT se věnují další odstavce této kapitoly.

Vyhasinací křivky neutrální formy naftolu byly vždy proloženy triexponenciální funkcí (což je v souladu s rovnicí 45, která předpokládá existenci triexponenciální vyhasinací křivky), takže byly získány 3 doby života s příslušnými relativními zastoupeními. Vyhasínání neutrální formy naftolu se skládá z krátkého času patřícímu rychlé deprotonaci (54 ps) a ze dvou delších časů (1346 ps a 8504 ps). První delší čas představuje tzv. rise time a druhý čas představuje vyhasínání neutrální formy naftolu. Po přidání polymeru k naftolu jsou vidět změny dob života i relativních amplitud, a to jak v případě hyaluronanu, tak v případě PSS (Tabulka 10). V obou případech to jsou změny kvůli interakcím 1-naftolu s polymerem.

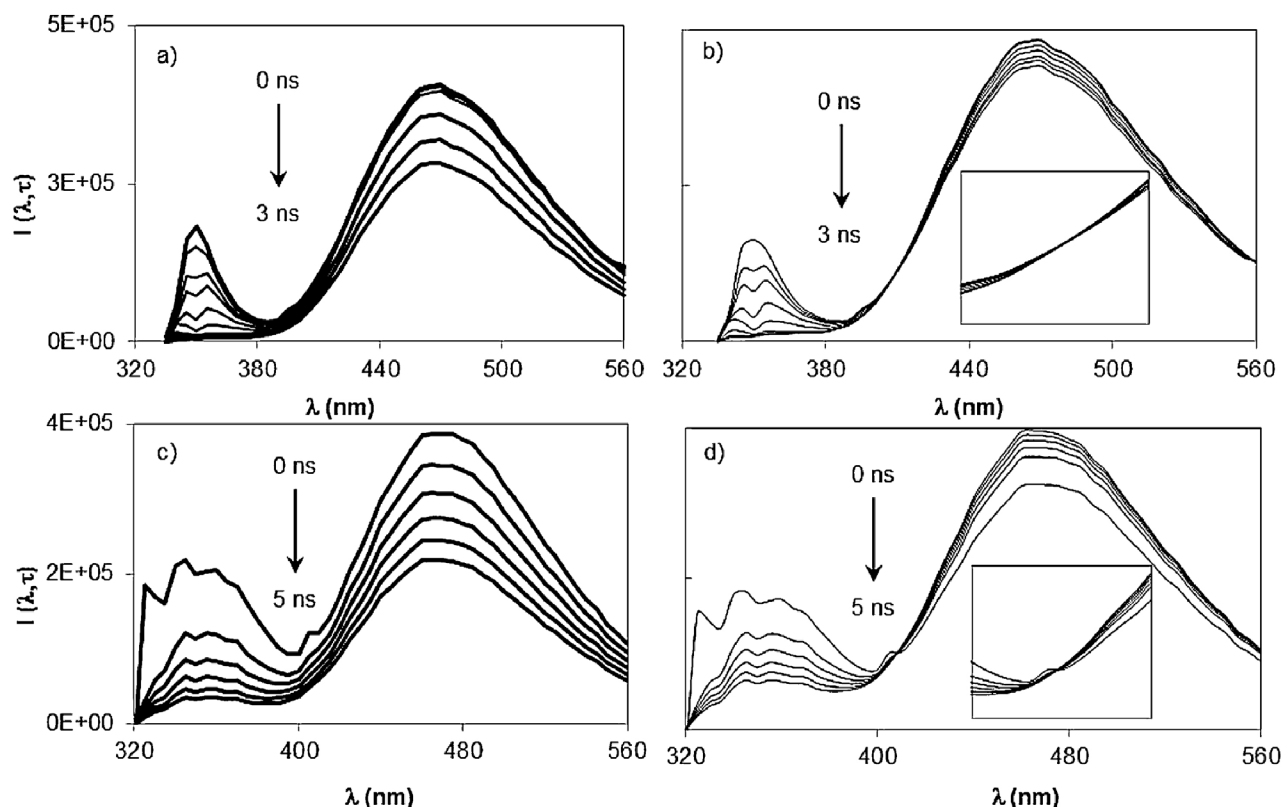
Tabulka 3 Rychlostní konstanty deprotonace (k_{pt}), rekombinace (k_{rec}) a disociace (k_{diss}) a rychlostní konstanty vyhasínání neutrální (k_{ROH}) a aniontové formy (k_{RO-}) 1-naftolu

CTAB	Hyaluronan (PSS*)	$k_{pt} \times 10^9$	$k_{rec} \times 10^9$	$k_{diss} \times 10^9$	$k_{ROH} \times 10^9$	$k_{RO-} \times 10^9$
mM	mg/L	s^{-1}	s^{-1}	s^{-1}		
0	0	17,31	1,16	0,67	0,12	0,12
2		1,48	0,02	3,53	0,07	0,05
0	7	11,65	0,79	0,66	0,07	0,12
0,05		9,92	0,87	0,91	0,12	0,05
0,5		13,25	1,52	1,33	0,13	0,06
2		2,47	0,20	1,71	0,09	0,05
0	7*	9,8	5,11	0,71	0,10	0,12
0,05		7,2	3,56	0,74	0,18	0,07
0,5		1,18	1,72	1,37	0,16	0,05
2		1,70	0,23	0,60	0,10	0,05
Septonex	Hyaluronan (PSS*)	$k_{pt} \times 10^9$	$k_{rec} \times 10^9$	$k_{diss} \times 10^9$	$k_{ROH} \times 10^9$	$k_{RO-} \times 10^9$
mM	mg/L	s^{-1}	s^{-1}	s^{-1}		
0	0	17,31	1,1	0,67	0,12	0,12
2		3,71	1,20	1,69	0,16	0,13
0	7	11,65	0,79	0,66	0,07	0,12
0,05		12,55	0,44	1,37	0,18	0,14
0,5		6,28	0,14	0,91	0,20	0,14
2		2,01	0,31	1,49	0,22	0,14
0	7*	9,8	5,11	0,71	0,10	0,12
0,02		1,79	2,69	1,04	0,14	0,12
0,3		2,44	4,06	1,21	0,18	0,12
2		1,65	0,25	0,7	0,17	0,12
MeOH - watter	80%	1,28	0,15	1,68	0,17	0,15

Po přidání tenzidu k hyaluronanu došlo u koncentrace CTAB $5 \cdot 10^{-5}$ mol/L ke změně tvaru vyhasínací křivky, která byla proložena již triexponenciální funkcí. Nový čas s hodnotou okolo 20 ns je připisován vyhasínání aniontové formy 1-naftolu z hyaluronan-CTAB agregátů. Pomocí časově-rozlišené fluorescence aniontové formy 1-naftolu můžeme také sledovat změnu CMC CTAB. U koncentrace CTAB $5 \cdot 10^{-4}$ mol/L v absenci hyaluronanu byly zjištěny 2 časy 1293 ps a 8191 ps, kdežto v přítomnosti hyaluronanu byly tyto dva časy vypočítány také, ale s nemalým

zastoupením další a delší doby života (17 ns), která je opět připisována vyhasínání aniontové formy 1-naftolu v hyaluronan-CTAB agregátech. Neutrální forma naftolu vykazuje u koncentrace CTAB $5 \cdot 10^{-5}$ mol/L podobné parametry vyhasínání fluorescence jako při absenci tenzidu. Doby života i relativní amplitudy mají, ve srovnání s 2 mM CTAB v přítomnosti hyaluronanu, velmi podobné hodnoty jako v případě samotného hyaluronanu. Jak již bylo popsáno výše, vyhasínání aniontové formy naftolu není ovlivněno samotným polymerem, takže změny v dobách života aniontové formy naftolu mohou být použity jako indikátor solubilizace naftolu v micelách. Z toho plyne, že pouze vyhasínání fluorescence neutrální formy naftolu je ovlivněno hydratací hyaluronanu a že se naftol nachází ve Sternově vrstvě micely. To zároveň koreluje s výsledky z experimentů stacionární fluorescence, kde bylo zjištěno, že se naftol ve Sternově vrstvě nachází. Když porovnáme doby života dlouhých komponent neutrální formy naftolu v přítomnosti CTAB a v přítomnosti hyaluronanu a PSS, můžeme vidět změnu doby života dlouhé komponenty 1-naftolu v přítomnosti PSS. Jelikož stejným způsobem jsou tvořeny agregáty i v případě CTAB a hyaluronanu, což bylo prokázáno pomocí pyrenu, měla by se podobně měnit i doba života neutrální formy naftolu v systému CTAB-hyaluronan. Jelikož se to neděje, bude pravděpodobně důvodem ovlivnění naftolu hydratační vrstvou hyaluronanu (nebo vodními klastry), která zasahuje do Sternovy vrstvy micely a ovlivňuje tím dobu života neutrální formy 1-naftolu.

Vyhasínání fluorescence 1-naftolu v 0,5 mM CTAB v přítomnosti polymerů bylo měřeno přes emisní spektrum 1-naftolu (320 nm až 560 nm). Doby života a relativní amplitudy byly použity pro rekonstrukci časově-rozlišených emisních spekter podle rovnice 48 a časově-rozlišených normalizovaných emisních spekter podle rovnice 49. TRES 1-naftolu v 0,5 mM CTAB v prostředí hyaluronanu (Obr. 48a) ukazují, že v čase $t = 0$ ns jsou vidět oba píky představující neutrální a aniontovou formu 1-naftolu a s rostoucím časem se intenzita píků snižuje. Neutrální forma vymizí už 1 ns po excitaci, neboli 1 ns po excitaci lze pozorovat již pouze aniontovou formu 1-naftolu. Konstrukcí TRANES spekter z TRES spekter byl následně zjištěn izoemisní bod (Obr. 48b), který potvrzuje existenci obou forem naftolu v agregátech 0,5 mM CTAB a hyaluronanu. U PSS byla situace podobná, ale opět více výrazná. V čase $t = 0$ ns jsou vidět oba píky představující neutrální a aniontovou formu 1-naftolu a s rostoucím časem se intenzita píků snižuje. V případě hyaluronanu již po 1 ns po excitaci vymizela neutrální forma 1-naftolu, ale u PSS jsou vidět obě formy 1-naftolu i 5 ns po excitaci (Obr. 48c). Při pohledu na TRANES spektra 1-naftolu v 0,5 mM CTAB v prostředí PSS lze opět sledovat izoemisní bod (Obr. 48d), který potvrzuje existenci dvou emisních jednotek neboli aniontové a neutrální formy 1-naftolu v agregátech PSS a CTAB. TRES a TRANES spektra ukázala, že i přes stínění neutrální formy naftolu nebo přes slabou interakci hyaluronanu a tenzidu lze pomocí TRANES spekter pozorovat obě formy 1-naftolu neboli formování hyaluronan-CTAB agregátů před kritickou micelární koncentrací.



Obr. 48 a) TRES 1-naftolu v 0,5 mM CTAB v přítomnosti hyaluronanu, b) TRANES 1-naftolu v 0,5 mM CTAB v přítomnosti hyaluronanu, c) TRES 1-naftolu v 0,5 mM CTAB v přítomnosti PSS, d) TRANES 1-naftolu v 0,5 mM CTAB v přítomnosti PSS. Vložené grafy v případe b) a d) ukazují detail izoemisního bodu.

Časově-rozlišená data fluorescenčních sond podstupujících deprotonaci v excitovaném stavu se dají použít také pro výpočet kinetiky procesů probíhajících v excitovaném stavu. Jak bylo popsáno v kapitole 3.3 a zobrazeno ve Schéma 1, procesy v excitovaném stavu 1-naftolu začínají vyhasínáním fluorescence neutrální formy naftolu s rychlostní konstantou k_{NpOH} . Ten může kromě zářivé deexcitace podstoupit rychlou deprotonaci na iontový pár s rychlostní konstantou deprotonace k_{pt} . Ionťový pár může dále disociovat na jednotlivé ionty s rychlostní konstantou disociace k_{diss} nebo rekombinovat zpět na neutrální naftol a vodu s rychlostní konstantou rekombinace k_{rec} . V případě disociace mohou ionty přejít zpět na ionťový pár s rychlostní konstantou $k_p [H^+]_w$. Ionťový pár nebo anionťová forma 1-naftolu v excitovaném stavu mohou deexcitovat s rychlostní konstantou k_{NpO^-} . V této práci bylo možné zanedbat zpětnou reakci ionťů na ionťový pár (rychlostní konstantu $k_p [H^+]_w$), protože pH vzorků bylo okolo 6,5. Tato hodnota pH způsobí, že se přechod ionťů na jeden ionťový pár v excitovaném stavu stane kineticky zanedbatelným [112], [128].

Tabulka 3 ukazuje rozdíl mezi rychlostmi deprotonace mezi roztoky tenzidu a směsí tenzidu a polymeru. Rychlostní konstanta deprotonace 1-naftolu ve 2 mM CTAB se oproti vodě snížila skoro dvanáctkrát kvůli solubilizaci 1-naftolu v micelách. Hodnota rychlostní konstanty je podobná hodnotě k_{pt} ve směsi methanol-voda, kde byla anionťová forma výrazně potlačena.

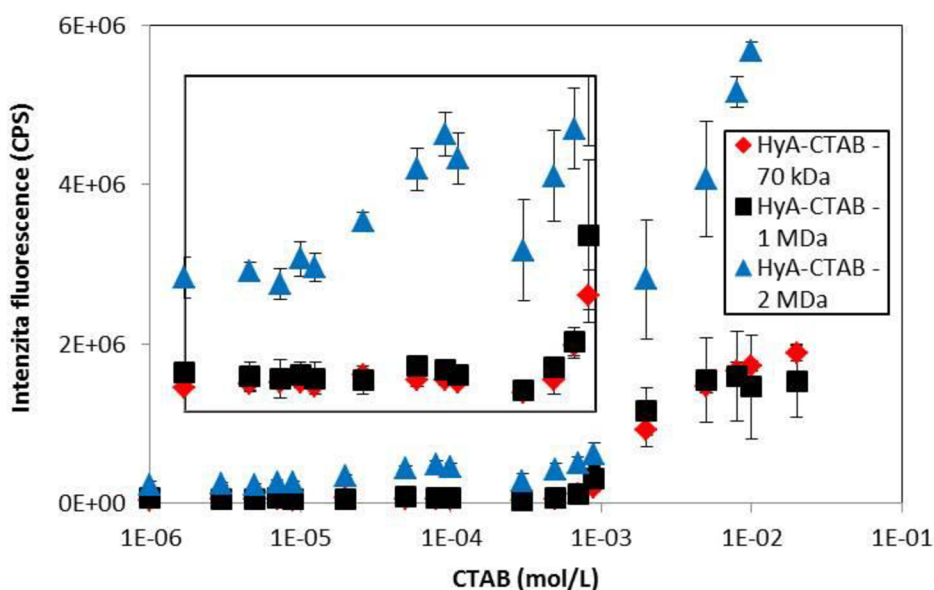
Výpočty rychlostních konstant deprotonace 1-naftolu v prostředí CTAB naznačují agregaci při všech zmíněných koncentracích CTAB v Tabulka 3 kvůli snížení k_{pt} v porovnání s 1-naftolem ve vodě. Nicméně rychlosti deprotonace určené pro systémy s hyaluronanem a PSS vykazují značné rozdíly. Rychlostní konstanta deprotonace v prostředí HyA a PSS se u kritické agregační koncentrace liší nepatrně. Jakmile se ale koncentrace tenzidu dostane ke kritické micelární koncentraci v přítomnosti polymeru, liší se rychlostní konstanty deprotonace více jak desetkrát. Naftol solubilizovaný v CTAB-PSS agregátech měl rychlost deprotonace podobnou jako v 2 mM CTAB nebo ve směsi methanol-voda. Kdežto naftol solubilizovaný v CTAB-hyaluronan agregátech měl rychlost deprotonace $13,25 \text{ s}^{-1}$. Takto vysoká hodnota rychlosti deprotonace představuje značné ovlivnění prostředí okolo molekul 1-naftolu. Jakmile je CMC překročena, rychlost deprotonace se mnohonásobně zpomalí. Pravděpodobně dochází ke tvorbě větších agregátů, kde hydratace hyaluronanu nebo vodní klastry na něj navázané nemají takový vliv na molekuly 1-naftolu. Rychlost deprotonace ve 2 mM CTAB v absenci hyaluronanu má navíc téměř dvakrát nižší hodnotu než v 2 mM CTAB v přítomnosti hyaluronanu. I tato skutečnost značí nemalé ovlivnění hyaluronan-CTAB agregátů.

V případě 2 mM Septonexu se také několikanásobně snížila hodnota rychlostní konstanty deprotonace 1-naftolu kvůli solubilizaci 1-naftolu v micelách Septonexu. Po přidání PSS k 0,02 mM a 0,3 mM Septonexu klesla hodnota k_{pt} více než 4krát. Jasně to značí solubilizaci molekul fluorescenční sondy do agregátů vzniklých před kritickou micelární koncentrací. U hyaluronanu byla situace opačná. V prostředí 0,05 mM Septonexu, tedy při koncentraci tvorby agregátů, byla rychlost deprotonace stejná jako v případě absence tenzidu. V 0,5 mM Septonexu následně klesla rychlostní konstanta deprotonace také dvojnásobně, ale stále je hodnota podobná rychlosti deprotonace v absenci Septonexu. Ve 2 mM Septonexu již rychlostní konstanta deprotonace klesla na hodnotu srovnatelnou se 2 mM Septonexem v prostředí PSS. Jak je již výše popsáno, u 0,04 mM a 0,5 mM Septonexu v prostředí hyaluronanu dochází ke tvorbě agregátů. Takto vysoké rychlostní konstanty deprotonace mohou být vysvětleny právě ovlivněním prostředí v okolí molekul 1-naftolu, tedy zásahem hydratace hyaluronanu do Sternovy vrstvy micel. Pokud srovnáme CTAB a Septonex s koncentrací za CMC v prostředí hyaluronanu můžeme pozorovat rozdíl v rychlostní konstantě deprotonace. Z rozdílu těchto hodnot vyplývá, že hyaluronan více ovlivňuje vnitřní prostředí CTAB nebo se molekuly naftolu nachází hlouběji v micelách, takže je hydratace hyaluronanu nemůže takovou měrou ovlivnit jako v micelách CTAB. Hodnota k_{pt} pro CTAB je 1,5krát větší než pro Septonex a navíc má k_{pt} v Septonexu v prostředí hyaluronanu podobnou hodnotu jako v prostředí Septonexu a PSS a zároveň i CTAB a PSS.

5.3.3.1.1 Vliv molekulové hmotnosti polyelektrolytu

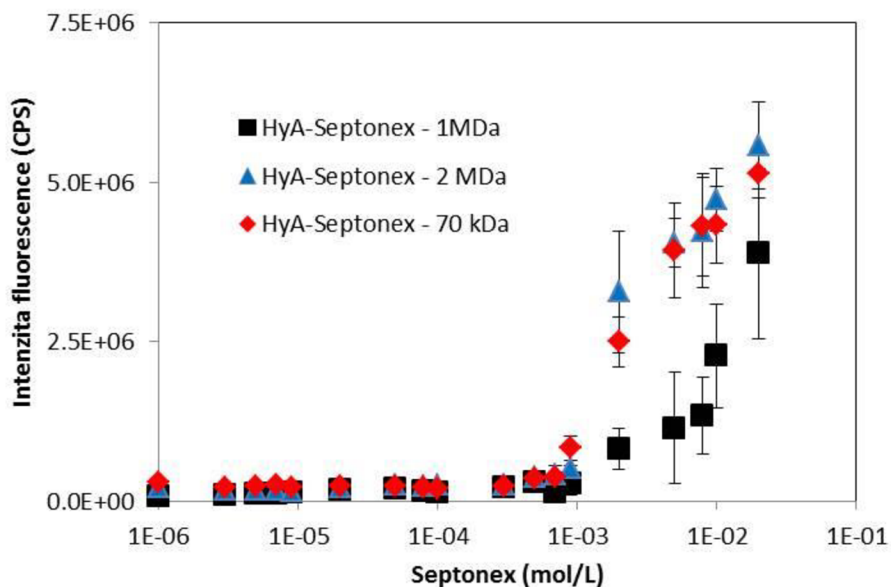
Délka řetězce polymeru by mohla také mít vliv na vlastnosti ESPT v micelárním prostředí, tedy na interakce mezi polymerem a tenzidem. Při studiu interakcí hyaluronanu a tenzidu byly použity 3 molekulové hmotnosti (nízká, střední a vysoká – viz experimentální část). U CTAB lze pozorovat změnu průběhu závislosti intenzity fluorescence neutrální formy 1-naftolu v závislosti na CTAB při použití vysokomolekulárního hyaluronanu. Změna je nejvíce viditelná ve vloženém grafu na Obr. 49, kde je přiblížený koncentrační rozsah CTAB $1 \mu\text{M}$ až 1 mM . U nižších molekulových hmotností můžeme pozorovat přibližně shodný průběh intenzity fluorescence po celý průběh závislosti, ale u nejvyšší molekulové hmotnosti pozorujeme vyšší intenzitu fluorescence neutrální

formy 1-naftolu. Při srovnání rychlosti deprotonace vzorků u kritických agregačních koncentrací nebo i kritických micelárních koncentrací nedochází k žádným výrazným změnám. Nicméně pokud se srovnají hodnoty rychlostních konstant deprotonace v absenci tenzidu a v přítomnosti tenzidu okolo agregační koncentrace je patrné, že k největšímu poklesu oproti vzorkům při absenci tenzidu dochází právě u vysokomolekulárního hyaluronanu (pokles okolo 30 % oproti 20 % v případě 1 MDa hyaluronanu). Z toho plyne, že vlivem molekulové hmotnosti hyaluronanu dochází k ovlivnění kinetiky deprotonace a zároveň dochází k ovlivnění intenzity fluorescence. Dále byla ovlivněna kritická agregační koncentrace, která se v případě 2 MDa hyaluronanu posunula z 0,05 mM na 0,08 mM.



Obr. 49 Titrace systémů obsahujících naftol a hyaluronan o různých molekulových hmotnostech pomocí CTAB. Intenzitu fluorescence představuje intenzita neutrální formy naftolu (350 nm). Vložený graf představuje zaostření na koncentrace CTAB před CMC.

V případě Septonexu nelze pozorovat podobný průběh jako v případě CTAB. Všechny závislosti mají velmi podobný průběh a agregační nebo micelární koncentrace nejsou v tomto případě ovlivněny ani vysokomolekulárním hyaluronanem. To napovídá, že ovlivnění vlastností 1-naftolu v případě CTAB a vysokomolekulárního hyaluronanu bylo způsobeno způsobem, jakým se naftol solubilizuje do micel. Pokud je 1-naftol solubilizován ve Sternově vrstvě, může být ovlivněn formováním méně kompaktnějšími agregáty, tedy vliv hyaluronanu neboli formování agregátů není tak silné, rychlé a žádoucí jako při použití menších molekulových hmotností. V případě Septonexu ovlivnění nepozorujeme, protože 1-naftol již je solubilizován hlouběji do micel, takže nemůže být takovou měrou ovlivněn (neovlivněn) jako v případě HyA-CTAB.

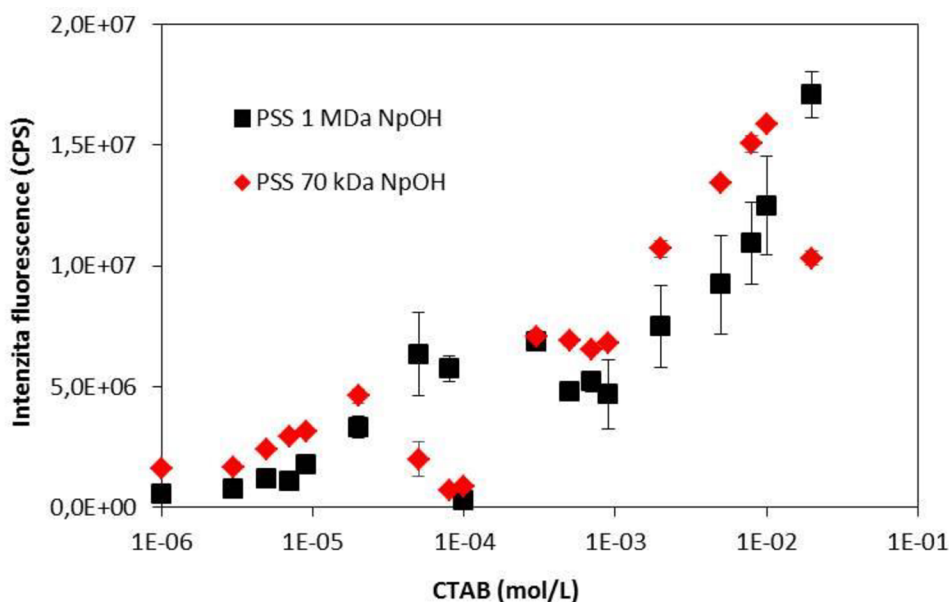


Obr. 50 Titrace systémů obsahujících naftol a hyaluronan o různých molekulových hmotnostech pomocí Septonexu. Intenzitu fluorescence představuje intenzita neutrální formy naftolu (350 nm)

Tabulka 4 Rychlostní konstanty deprotonace (k_{pt}), rekombinace (k_{rec}) a disociace (k_{diss}) a rychlostní konstanty vyhasínání neutrální (k_{ROH}) a aniontové formy (k_{RO-}) 1-naftolu

CTAB mM	Hyaluronan Mw	$k_{pt} \times 10^9$ s^{-1}	$k_{rec} \times 10^9$ s^{-1}	$k_{diss} \times 10^9$ s^{-1}	$k_{ROH} \times 10^9$ s^{-1}	$k_{RO-} \times 10^9$ s^{-1}
0	0	17,31	1,16	0,67	0,12	0,12
2		1,48	0,02	3,53	0,07	0,05
0	70 kDa	11,65	0,79	0,66	0,13	0,12
0,05		9,92	0,87	0,91	0,12	0,05
0,5		13,25	1,52	1,33	0,13	0,06
2		2,47	0,20	1,71	0,09	0,05
0	1 Mda	15,05	0,15	0,36	0,12	0,12
0,05		12,01	0,75	0,78	0,14	0,06
0,5		11,07	0,40	0,44	0,12	0,07
2		1,72	0,10	1,24	0,09	0,05
0	2 Mda	19,91	0,35	0,96	0,14	0,12
0,08		14,07	0,30	0,39	0,11	0,11
0,5		13,66	0,28	0,45	0,11	0,11
2		2,39	0,67	2,12	0,07	0,07

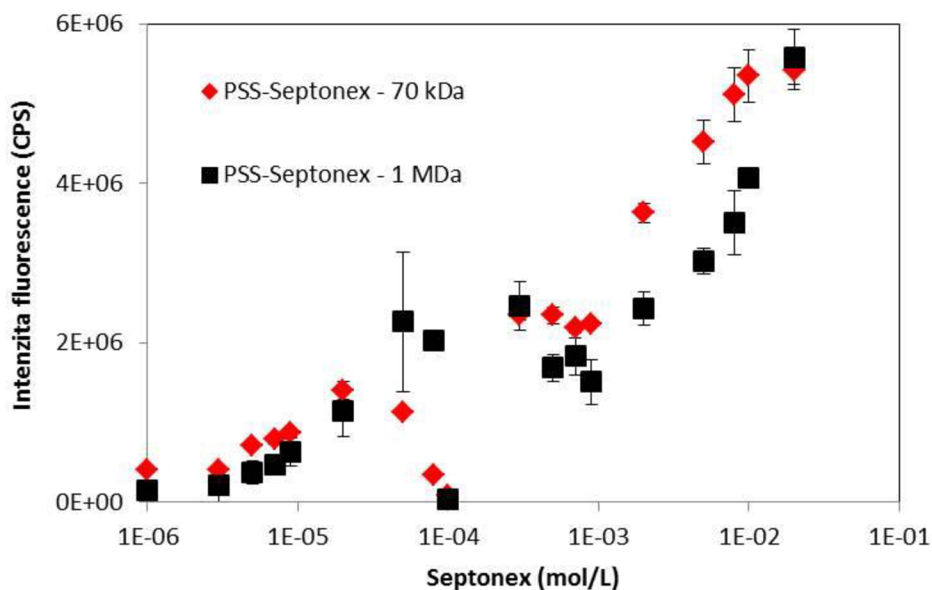
Septonex mM	Hyaluronan Mw	$k_{pt} \times 10^9$ s^{-1}	$k_{rec} \times 10^9$ s^{-1}	$k_{diss} \times 10^9$ s^{-1}	$k_{ROH} \times 10^9$ s^{-1}	$k_{RO-} \times 10^9$ s^{-1}
0	70 kDa	11,65	0,79	0,66	0,07	0,12
0,05		12,55	0,44	1,37	0,18	0,14
0,5		6,28	0,14	0,91	0,20	0,14
2		2,01	0,31	1,49	0,22	0,14
0	1 Mda	15,0 5	0,15	0,36	0,12	0,12
0,02		10,9 5	1,03	0,69	0,14	0,12
0,5		6,96	0,98	0,81	0,13	0,12
2		1,79	0,23	0,32	0,11	0,13
0	2 Mda	19,91	0,35	0,96	0,14	0,12
0,05		13,35	1,65	1,15	0,15	0,10
0,5		11,91	2,71	1,37	0,17	0,12
2		1,23	0,53	0,44	0,16	0,11
MeOH - watter	80 %	1,28	0,15	1,68	0,17	0,15



Obr. 51 Titrace systémů obsahujících naftol a PSS o různých molekulových hmotnostech pomocí CTAB. Intenzitu fluorescence představuje intenzita neutrální formy naftolu (350 nm).

Tabulka 5 Rychlostní konstanty deprotonace (k_{pt}), rekombinace (k_{rec}) a disociace (k_{diss}) a rychlostní konstanty vyhasínání neutrální (k_{ROH}) a aniontové formy (k_{RO-}) 1-naftolu

CTAB	PSS	$k_{pt} \times 10^9$	$k_{rec} \times 10^9$	$k_{diss} \times 10^9$	$k_{ROH} \times 10^9$	$k_{RO-} \times 10^9$
mM	Mw	s^{-1}	s^{-1}	s^{-1}	s^{-1}	s^{-1}
0	70 kDa	9,8	5,11	0,71	0,10	0,12
0,02		7,2	3,56	0,74	0,18	0,07
0,3		1,18	1,72	1,37	0,16	0,05
2		1,70	0,23	0,60	0,10	0,05
0	1 Mda	17,03	1,78	0,41	0,10	0,14
0,05		9,52	7,71	0,53	0,16	0,14
0,5		3,93	3,85	0,89	0,20	0,14
2		1,57	0,24	0,31	0,13	0,14
Septonex	PSS	$k_{pt} \times 10^9$	$k_{rec} \times 10^9$	$k_{diss} \times 10^9$	$k_{ROH} \times 10^9$	$k_{RO-} \times 10^9$
mM	Mw	s^{-1}	s^{-1}	s^{-1}	s^{-1}	s^{-1}
0	70 kDa	9,8	5,11	0,71	0,10	0,12
0,02		1,79	2,69	1,04	0,14	0,12
0,3		2,44	4,06	1,21	0,18	0,12
2		1,65	0,25	0,7	0,17	0,12
0	1 Mda	22,67	1,49	0,43	0,1	
0,05		7,04	6,09	0,69	0,19	
0,7		6,06	4,48	0,81	0,2	
2		2,03	0,38	0,72	0,21	
MeOH - watter	80 %	1,28	0,15	1,68	0,17	0,15



Obr. 52 Titrace systémů obsahujících naftol a PSS o různých molekulových hmotnostech pomocí Septonexu. Intenzitu fluorescence představuje intenzita neutrální formy naftolu (350 nm).

5.4 Závěr

Tato kapitola měla za účel prozkoumat a popsat vliv micelizace na vybrané fluoreescenční sondy podstupující deprotonaci v excitovaném stavu, a to jak použitelnost těchto sond pro určení CMC, tak i určení pozice vybraných sond v micelách CTAB, případně Septonexu. Další část této kapitoly se zabývá interakcemi mezi polymerem a tenzidem a vlivem těchto interakcí na solubilizovanou fluoreescenční sondu.

Pro studium micelárních roztoků byly vybrány 3 fluoreescenční sondy, a to 1-naftol, HPTS a 3HNA. Všechny tři fluoreescenční sondy zkoumaly micelizaci známého tenzidu CTAB. Účelem tohoto experimentu bylo zjistit, jestli se sondy do micel solubilizují, případně jestli se změni emisní charakteristiky jednotlivých fluoreescenčních sond po interakci s CTAB. V případě 1-naftolu a HPTS bylo zjištěno pomocí stacionární fluorescence, že intenzita neutrální formy fluoreescenční sondy se zvyšuje v závislosti na koncentraci tenzidu od chvíle, kdy se začínají tvořit v roztoku micely. Časově rozlišená fluorescence potvrdila data z měření stacionární fluorescence, protože rychlostní konstanta deprotonace klesala s rostoucí koncentrací micel, jakmile se micely začaly tvořit. V případě 3HNA nebyl pozorován sigmoidní nárůst intenzity fluorescence jako v předchozích dvou případech. Ke zvýšení intenzity fluorescence došlo od prvního přídavku tenzidu a intenzita fluorescence rostla v podstatě lineárně. Ke skokovému nárůstu průměrné doby života 3HNA došlo také při prvním přídavku tenzidu a doba života se již s dalším přídavkem tenzidu neměnila. Vzhledem k povaze dalších experimentů byla 3HNA z výběru sond vyloučena. Jak již bylo zmíněno výše, další vhodné sondy jsou 1-naftol a HPTS. Vzhledem ke kombinaci stacionárních a časově rozlišených měření byla stanovena pravděpodobná pozice obou sond v micelách CTAB. 1-Naftol se pravděpodobně nachází blíže k povrchu micely, takže do dalších experimentů byl zvolen právě 1-naftol.

Potvrzení předpokládané pozice 1-naftolu v micelle CTAB a nyní i v Septonexu probíhalo pomocí zhášení fluorescence jodovými (chlorovými) deriváty. Jelikož při použití jodových derivátů bylo dosaženo nulové účinnosti zhášení, byl zvolen cetylpyridinium chlorid, který se díky své struktuře vnoří do struktury micely. Díky CPC bylo stanoveno, že 1-naftol se v CTAB a Septonexu nachází ve Sternově vrstvě, případně na jejím pomezí.

Díky určení vlastností a pozice 1-naftolu v CTAB a v Septonexu byl dále zkoumán vliv hyaluronanu a PSS na emisní vlastnosti této sondy a také bylo využito citlivosti ESPT na výzkum interakce polymer-tenzid. Stacionární i časově-rozlišená studie deprotonace 1-naftolu ukázala, že hyaluronan ovlivňuje prostředí 1-naftolu. Experiment s pyrenem ukázal, že hyaluronan a CTAB (Septonex) tvoří agregáty před kritickou micelární koncentrací, nicméně intenzita fluorescence ani rychlostní konstanty deprotonace nic podobného neukázaly. To znamená, že 1-naftol byl ovlivněn přítomností hyaluronanu do té míry, že nešla poznat agregace polymeru a tenzidu před CMC. Stejný případ nastal, pokud bylo CTAB nahrazeno Septonexem. V případě Septonexu byl průběh velmi podobný a opět nebylo možné pomocí 1-naftolu pozorovat agregaci okolo kritické agregační koncentrace. Vzhledem k tomu, že 1-naftol se v Septonexu nachází hlouběji v micelle než v případě CTAB, ovlivňuje hyaluronan prostředí micely i v tomto případě, tedy ve větší hloubce. Že se 1-naftol nachází hlouběji v micelle i v případě agregátu hyaluronan-Septonex, lze usoudit z rozdílu rychlostních konstant deprotonace. V případě agregátů hyaluronan-Septonex jsou rychlostní konstanty deprotonace nižší než v případě hyaluronan-CTAB. To bylo následně potvrzeno výměnou hyaluronanu za PSS, u kterého žádná hydratační vrstva nebyla pozorována. V případě PSS byly pozorovány změny intenzity fluorescence a rychlostních konstant deprotonace 1-naftolu.

Na závěr lze konstatovat, že hyaluronan obrovskou měrou ovlivňuje vnitřní prostředí micel a při další práci s hyaluronanem a koloidy by mělo být počítáno s tím, že prostředí okolí Sternovy vrstvy může být hyaluronanem ovlivněno. Tyto výsledky byly publikovány v časopise *Carbohydrate Polymers* [152].

6 MIKROREOLOGIE POMOCÍ ČASOVĚ-ROZLIŠENÉ FLUORESCENČNÍ KORELAČNÍ SPEKTROSKOPIE

Tato kapitola má za účel zjistit, jestli může být fluorescenční korelační spektroskopie použita pro měření mikroreologie a nanoreologie a také jaké výhody nebo nevýhody má tato metoda v porovnání s klasickou video mikroreologií a mikroreologií pomocí dynamického rozptylu světla. Nakonec bylo účelem určit, jestli je některá z metod vhodná pro studium pasivní mikroreologie v hydrogelech.

6.1 Experimentální část

6.1.1 Přístrojové vybavení

6.1.1.1 Fluorescenční časově-rozlišená korelační spektroskopie (FLCS)

Měření probíhala na přístroji MicroTime 200 od společnosti Picoquant s imerzním mikroskopem Olympus s objektivem s vodní imerzí. Malé množství vzorku (okolo 30 mL) bylo umístěno na krycí sklíčko držáku a vzorek byl ozářen laserem o specifické vlnové délce (510 nm pro fluorescenčně značené 100 nm částice a 470 nm pro fluorescenčně značené částice s velikostí 30 nm). Fluorescenční signál byl usměrněn přes objektiv, dichroické zrcátko a clonku do dělicích věží, kde byl signál rozdělen na dva τ -SPAD detektory, aby mohla být provedena kroskorelace.

Korelační funkce byla získána kroskorelací dvou nezávislých signálů kvůli rozdělení signálu 50% zrcátkem. Korelační funkce $G(t)$ byla vypočítána jako [145]:

$$G(t) = \frac{\langle I_1(t')I_2(t+t') \rangle}{\langle I_1(t') \rangle \langle I_2(t') \rangle} \quad (50)$$

kde I_1 a I_2 představují intenzitu fluorescence prvního a druhého detektoru. Pokud budeme předpokládat, že lze fluktuace v intenzitě fluorescence převést na fluktuace v koncentraci, může být rovnice 50 přepsána jako [145]

$$G(t) = \frac{\iint \text{PSF}(\vec{r}) \text{PSF}(\vec{r}') \langle \delta c_T(\vec{r}, t=0) \delta c_T(\vec{r}', t) \rangle d\vec{r} d\vec{r}'}{\left[\bar{c}_T \int \text{PSF}(\vec{r}) d\vec{r} \right]^2} \quad (51)$$

kde $\text{PSF}(\vec{r})$ značí rozptylovou funkci (point spread function) a c_T představuje koncentraci fluoroforu. Pokud má rozptylová funkce Gaussovský tvar, ozářený objem (efektivní objem) může být určen pomocí vzorku se známým difuzním koeficientem podle následující rovnice [2]:

$$G(t) = \frac{1}{V \bar{c}_T} \left(1 + \frac{4}{w_{xy}^2} Dt \right)^{-1} \left(1 + \frac{4}{w_z^2} Dt \right)^{-1/2} \quad (52)$$

Jmenovatelé v závorkách rovnice 52 představují rozměry efektivního objemu v kolmém (w_{xy}) a rovnoběžném (w_z) směru vůči směru laserového paprsku. Určení efektivního objemu (V) představuje důležitou část FCS měření. Nesprávná hodnota efektivního objemu vede ke špatným hodnotám difuzních koeficientů (D) a koncentrací určených proložení naměřených dat rovnicí

$$G(t) = \frac{1}{V\bar{C}_T} \left(1 + \frac{4}{w_{xy}^2} Dt\right)^{-1} \left(1 + \frac{4}{w_z^2} Dt\right)^{-1/2} \quad (52. \text{ Z mikroeologického hlediska má nesprávná}$$

hodnota efektivního objemu vliv na tvar závilosti MSD na čase. Příkladem může být závislost MSD na čase pro 100 nm částice ve vodě (Obr. 53), kde lze pozorovat rozdíl mezi výše zmíněnou závislostí pro správně a nesprávně určený efektivní objem v porovnání s teoretickou hodnotou vypočítanou podle rovnice 53:

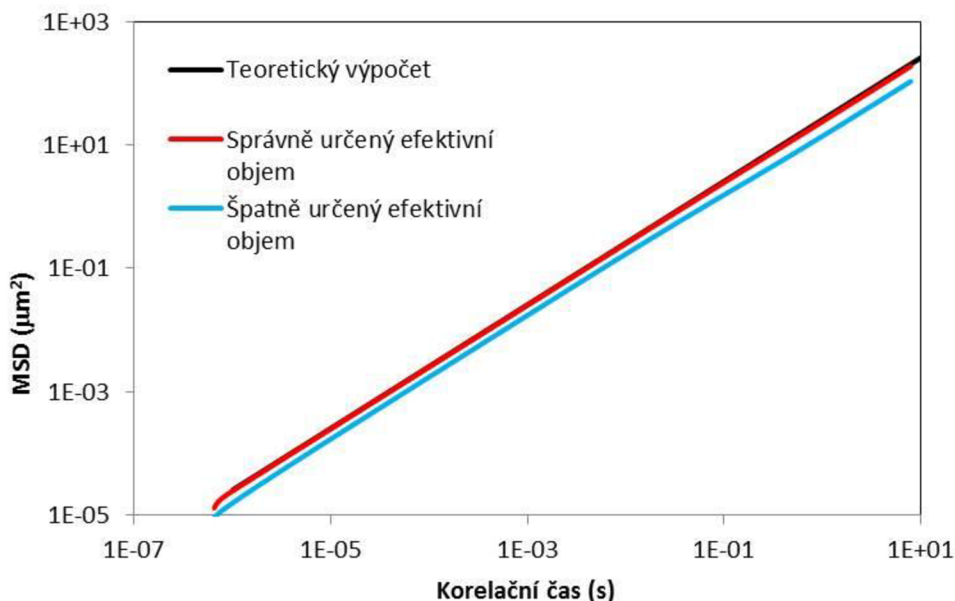
$$MSD = 6Dt \quad (53)$$

kde t představuje korelační čas. Difuzní koeficient je možné vyjádřit přes Einstein-Stokesovu rovnici a rovnice 53 pak nabývá tvaru:

$$MSD = \frac{k_B \cdot T}{\pi \cdot \eta \cdot d_c} \cdot t \text{ [m}^2\text{]} \quad (54)$$

kde k_B je Boltzmannova konstanta, T termodynamická teplota, η dynamická viskozita disperzního prostředí a d_c představuje průměr sledovaných částic. Pokud máme Newtonskou kapalinu a známe dynamickou viskozitu disperzního prostředí a průměr sledovaných částic, můžeme sestavit MSD v závislosti na korelačním čase.

Určení efektivního objemu je možné pomocí tří metod. Skenováním 100 nm částic, měřením korelační funkce fluoroforu s přesně známou koncentrací nebo měřením korelační funkce fluoroforu se známým difuzním koeficientem. V této práci byla pro kalibraci efektivního objemu zvolena poslední ze zmíněných metod, tedy vzorek se známým difuzním koeficientem – rodamin 6G. Müller a kol. určili difuzní koeficient rodaminu 6G pomocí dvouohňkové FCS při 25°C na hodnotu $414 \pm 5 \mu\text{m}^2/\text{s}$ [156]. Pokud vezmeme v úvahu změnu difuzního koeficientu s teplotou, která činí 2,6 % na stupeň [157], při 23°C bude hodnota difuzního koeficientu rodaminu 6G $392.5 \mu\text{m}^2/\text{s}$. Proložení korelační funkce rodaminu 6G rovnicí 52 byla získána hodnota efektivního objemu $V_{eff} = 0.831 \pm 0.036 \text{ fL}$ s rozměry $w_{xy} = 0.265 \mu\text{m}$ pro rozměr kolmý vůči směru laserového paprsku a $w_z = 2.125 \mu\text{m}$ pro rozměr rovnoběžný vůči směru laserového paprsku. Kalibrace byla dále testována měřením difuzního koeficientu 100 nm částic, u nichž byl pomocí dynamického rozptylu světla zjištěn difuzní koeficient o hodnotě $D = 4.03 \pm 0.03 \mu\text{m}^2/\text{s}$. Pomocí FCS byl změřen difuzní koeficient s hodnotou $D = 4.01 \pm 0.04 \mu\text{m}^2/\text{s}$, což představuje dobrou shodu s DLS měřením.



Obr. 53 Závislost MSD na čase pro 100 nm fluorescenčně značené částice ve vodě při správném a špatném určení efektivního objemu

Jelikož difuzní koeficient je ve vztahu s MSD podle rovnice 53, můžeme rovnici 52 psát jako:

$$G(t) = \frac{1}{N} \left(1 + \frac{2}{3w_{xy}^2} MSD \right)^{-1} \left(1 + \frac{2}{3w_z^2} MSD \right)^{-1/2} \quad (55)$$

Rovnice 55 může být vyřešena analyticky, kdy je skrz kubickou rovnici vyjádřeno MSD:

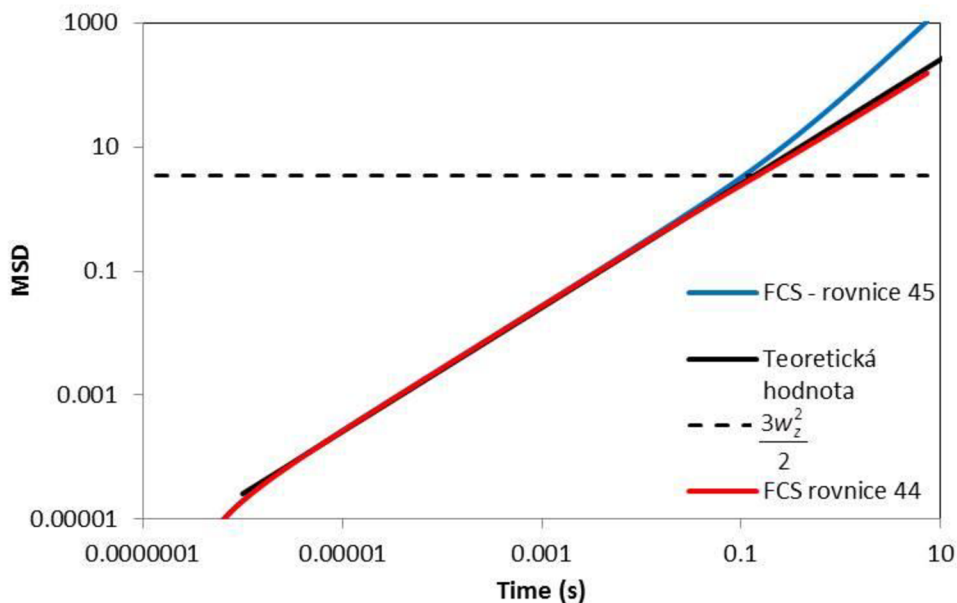
$$MSD = \frac{1}{3w_{xy}^4 w_z^2} x^3 + \left(\frac{8}{9w_{xy}^2 w_z^2} + \frac{4}{9w_{xy}^4} \right) x^2 + \left(\frac{4}{3w_{xy}^2} + \frac{2}{3w_z^2} \right) x + 1 - \frac{1}{N^2 G(t)^2} = 0 \quad (56)$$

Řešením rovnice 56 je vždy získán pouze jeden reálný kořen, který je možné použít pro zobrazení závislosti MSD na čase. Všechny výpočty byly prováděny v programu MATLAB.

Rovnice 56 ale není jediným způsobem, jak lze MSD vypočítat. Pokud uvážíme, že $MSD \ll \frac{3w_z^2}{2}$, pak je možné zanedbat pravou stranu rovnice 55, ze které lze jednoduše vyjádřit MSD [145]:

$$MSD = \frac{3}{2} w_{xy}^2 \left(\frac{1}{NG(t)} - 1 \right) \quad (57)$$

Nicméně použití rovnice 57 má jistá omezení. Pokud je $MSD > \frac{3w_z^2}{2}$, pak se u závislosti MSD na čase projevuje (přibližně od hodnoty MSD odpovídající $\frac{3w_z^2}{2}$) vychýlení této závislosti od teoretických hodnot (Obr. 54). Proto byla v této práci při vyhodnocování využívána jen rovnice 56.



Obr. 54 Závislost MSD na čase pro 100 nm fluorescenčně značené částice ve vodě při použití rovnice 56 a rovnice 57

6.1.1.1.1 Závislost FCS na indexu lomu

Kalibrace FCS měření probíhá přes kapku vody na podložním sklíčku. Od tohoto prostředí je tedy závislý tvar konfokálního objemu. Pokud se bude následně měřit vzorek o odlišném prostředí, tedy o odlišném indexu lomu, bude se měnit i tvar a velikost konfokálního objemu [158]. Jelikož výpočet difuzního koeficientu a rozměrů konfokálního objemu při kalibraci je použit dále pro vyhodnocování, mohou změny v prostředí (indexu lomu) vést ke zkreslení výsledných hodnot. Pro správnou interpretaci dat je ideální zvolit takové vzorky, které budou indexem lomu co nejbližší indexu lomu prostředí použitému při kalibraci, tedy ideálně vodě.

Z důvodů zmíněných výše byly naměřeny hodnoty indexu lomu pro vodu, 40% a 80% glycerol, různě koncentrované vzorky hyaluronanu o různých molekulových hmotnostech a v hyaluronanovém hydrogelu. Indexy lomu byly měřeny na standardním Abbeho refraktometru. Z Tabulka 6 vyplývá, že se index lomu v hyaluronanových vzorcích téměř rovná vodě a mění se pouze zanedbatelně, a to i v případě vzorku s koncentrací 15 g/l hyaluronanu. Odlišný případ nastává v případě glycerolu, kde se roztoky glycerolu v porovnání s vodou liší o 0,05 až 0,1. V případě hydrogelu hyaluronanu a CTAB se index lomu změnil přibližně o 0,03. Z těchto výsledků plyne, že k mírným deformacím konfokálního objemu může docházet u vzorků glycerolu a u hydrogelů hyaluronanu.

Tabulka 6 Naměřené hodnoty indexu lomu pro vzorky hyaluronanu, vody a glycerolu

Molekulová hmotnost HA	Index lomu		
	90–130 kDa	500–750 kDa	1500–1750 kDa
Koncentrace HA [g/l]			
0,01	1,330	1,330	1,330
0,1	1,330	1,330	1,330
1	1,330	1,330	1,330
3	1,331	1,331	1,331
5	1,332	1,332	1,332
7	1,332	1,332	1,332
10	1,334	1,334	1,334
15	1,334	1,334	1,334
Hydrogely HA (10 g/l) + CTAB	1,363	1,363	1,365
Vzorek	voda	40% glycerol	80% glycerol
Index lomu	1,331	1,388	1,444

6.1.1.2 Video-mikroreologie

Pro částice pohybující se pomocí Brownova pohybu v Newtonské kapalině se MSD v čase zvyšuje lineárně a difuzní koeficient může být určen ze směrnice následujícího vztahu:

$$MSD = 2dD\tau^\alpha \quad (58)$$

kde d představuje dimenzi, t čas a α je exponent. Pokud jsou známy velikost částice, difuzní koeficient a teplota měření, lze pomocí Einstein-Stokesovy rovnice vypočítat viskozitu sledovaného materiálu:

$$D = \frac{k_B T}{6\pi\eta R_H} \quad (59)$$

V případě Newtonské kapaliny neroste MSD lineárně a vlastnosti vzorku musí být určeny pomocí viskózního a elastického modelu v závislosti na frekvenci. Viskoelastické vlastnosti vzorku se určí z obecné Stokes-Einsteinovy rovnice.

6.1.1.3 Dynamický rozptyl světla

Měření mikroreologie pomocí DLS bylo prováděno na přístroji Zetasizer Nano ZS s laserem o vlnové délce 633 nm. Měření DLS mikroreologie představuje dvoufázový proces:

a) Měření zeta potenciálu a velikosti částic:

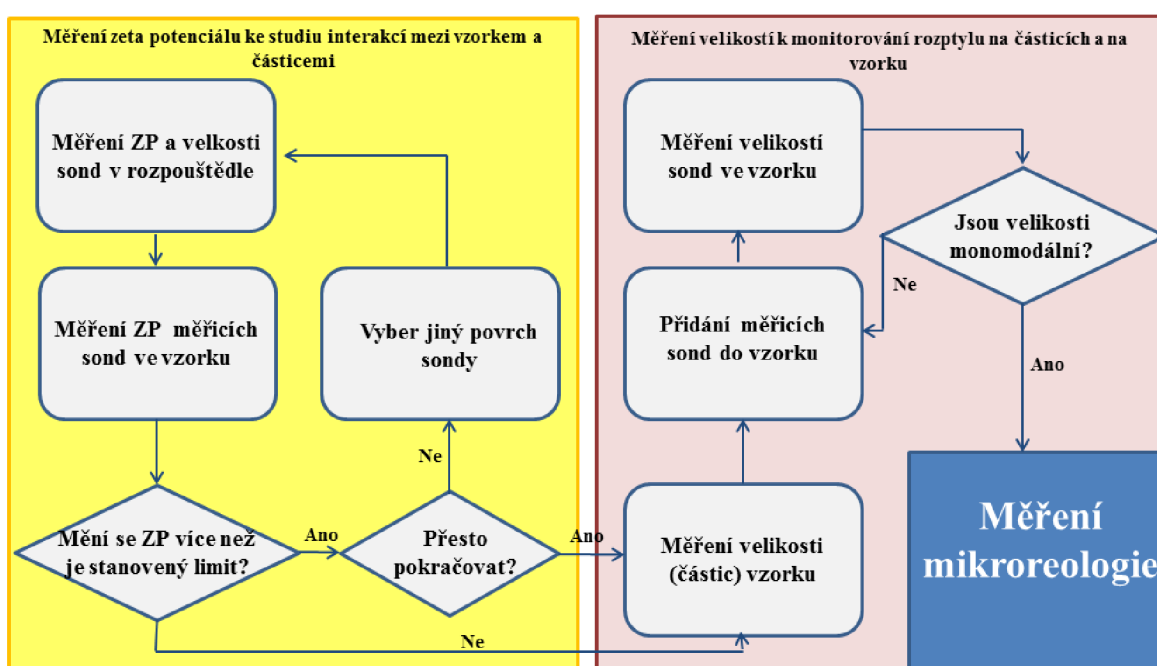
- Měření zeta potenciálu slouží k zjištění, zda dochází k interakcím mezi částicemi a samotným vzorkem. Pro mikroreologická měření je důležité zvolit částice, které

neinteragují se zkoumaným vzorkem, aby výsledky odrážely vlastnosti samotného okolního prostředí.

- Měření velikosti částic odhalí, zda dochází ve vzorku ke shlukování částic nebo zda signal částic vzorku překrývá signál mikrereologických částic.
- Pro porovnání byly částice změřeny nejprve v rozpouštědle a poté v samotném vzorku. Pokud by se výsledek diametrálně lišil, je třeba zvolit částice s vhodnějším povrchem nebo do vzorku přidat větší množství částic, aby byl signál částic intenzivnější.

b) Měření mikrereologie:

- V případě, že byla potvrzena správná volba mikrereologických částic pomocí měření zeta potenciálu a velikosti částic, lze měřit samotnou mikrereologii. Pohyb částic ve vzorku je sledován pomocí laserového paprsku a poté MSD křivky a hodnoty viskozity jsou z pohybu vyhodnoceny pomocí softwaru.

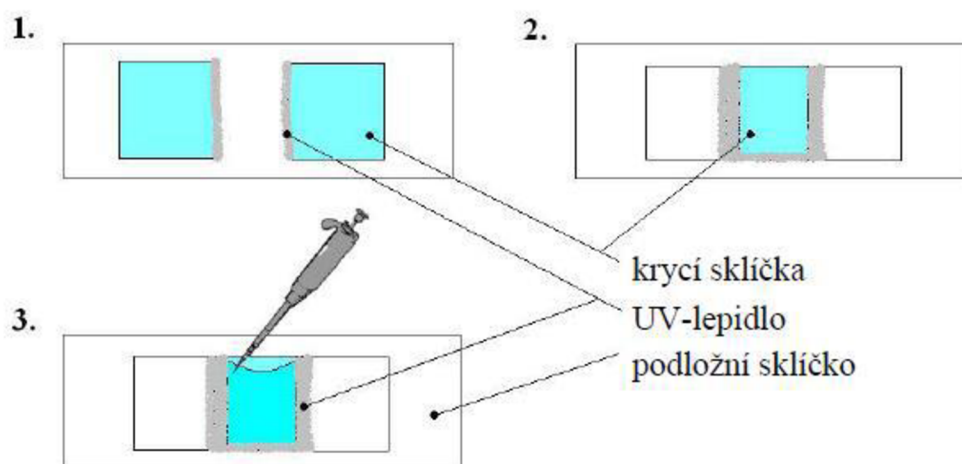


Obr. 55 Schéma měření mikrereologie pomocí DLS

6.1.1.4 Video-mikrereologie

Měření videomikrereologie bylo prováděno na optickém mikroskopu NIKON Eclipse Ci s kamerou Canon EOS 550D.

Přípravené vzorky (viz Kapitola 6.1.2) byly před měření aplikovány do speciálně vytvořeného mikroskopického sklíčka, kde bylo nutno pomocí krycích sklíček a UV lepidla vytvořit kapsli pro nadávkování vzorku. Tato kapsle byla zaplněna vzorkem pomocí pipety Eppendorf (20 µm), a zabraňovala tak nechtěnému pohybu vzorku na podložním sklíčku.



Obr. 56 Příprava podložního sklíčka pro měření VPT mikrorheologie

Základem úspěšného zpracování dat a získání kvalitních výsledků je použití mikroskopu, ať už klasického optického či fluorescenčního. Nejdůležitější součástí měřicího systému je však kamera, jejíž kvalita může významně ovlivňovat kvalitu nahraného videa, a tím i výsledky samotné. Rozlišení zvolené kamery má vliv na poměr signál/šum. Podstatnou roli hraje i rychlost snímání vzorků, která určuje minimální frekvenční rozsah výsledných funkcí.

Délka pořízeného videa je variabilní a měla by být zvolena vzhledem k rychlosti snímání videa a charakteru vzorku. U viskoelastických látek je pohyb částic mnohdy velmi nepatrný a je nutno pořídit delší záznam, aby byl i tento velmi pomalý pohyb zaznamenán. Délka získaného videa samozřejmě také ovlivňuje rychlost a komplikovanost zpracování dat. U viskózních vzorků, mezi které patří Newtonské kapaliny a kde tepelný pohyb probíhá plynule, je vhodné pořízení kratšího videa, aby se tak zabránilo zbytečně zdlouhavému procesu zpracování dat.

Použitím klasického optického mikroskopu získáme obraz tmavých částic na světlém pozadí na rozdíl od fluorescenčního mikroskopu, kde jsou výstupem světlé částice na tmavém pozadí. Tento druhý případ je žádoucí pro zpracování získaných videí v IDL softwaru. Pokud však máme k dispozici pouze klasický optický mikroskop, pak je možnost videa jednoduše invertovat pro získání požadovaného formátu v samotném softwaru.

Po nahrání kvalitního videa jsou data zpracována pomocí postupů v softwaru IDL. Celý proces vyhodnocování dat může být rozdělen do tří základních fází, jak je znázorněno níže:

1) *Identifikace částice*

- Načtení videa do software
- Filtrace pozadí snímků
- Identifikace částic (poloměr, světlost)
- Určení polohy částic v každém snímku

2) *Sledování částic*

- Odstranění driftingu (pohyb částice se nejeví náhodný, ale převažuje v jednom směru – může vést k zavedení velké chyby měření)
- Vytvoření trajektorií spojením sledovaných bodů

3) *Výstupy*

- Výpočet MSD

6.1.2 Příprava vzorků

Zásobní roztoky polymerů (hyaluronanu, karboxymethylcelulózy, polyvinylpyrrolidonu a albuminu hovězího séra) byly připraveny navážením přesného množství příslušného polymeru a jeho kvantitativním převedením do odměrné baňky a doplněním Milli-Q vodou po rysku. Takto byly připraveny zásobní roztoky hyaluronanu o koncentraci 1, 3, 5, 10 a 20 g/L. Pro měření byl ze zásobního roztoku vždy odebrán 1 ml roztoku, ve kterém byly dispergovány 2 μ l fluorescenčně značených částic.

Hydrogely hyaluronanu byly připraveny rozpuštěním příslušného množství hyaluronanu o molekulové hmotnosti 1500 kDa v 0,15 M NaCl (vznikl tak roztok hyaluronanu o koncentraci 10 g/l) a přidáním 200 mM roztoku CTAB v poměru 1 : 1. Před přidáním CTAB byly do roztoku hyaluronanu (3 ml) přidány 3 ml fluorescenčně značených částic. Roztok byl po smíchání s CTAB ponechán 24 hodin při laboratorní teplotě, až vznikl fázově separovaný gel.

Hydrogely alginátu a PSS byly připraveny pomocí termoreverzibilního hydrogelu agarózy. Vzorky byly připraveny na objem 20 ml, kdy do kádinek bylo převedeno 0,1 g agarózy, voda, 10 ml fluorescenčně značených částic a navážka polymeru tak, aby byla v roztoku koncentrace polymeru 0,1 hm %. Vzorky byly zahřívány na 85°C, což je teplota potřebná pro rozpuštění agarózy. Následně byly vzorky převedeny do příslušné formy (nástavce), ve které probíhalo měření.

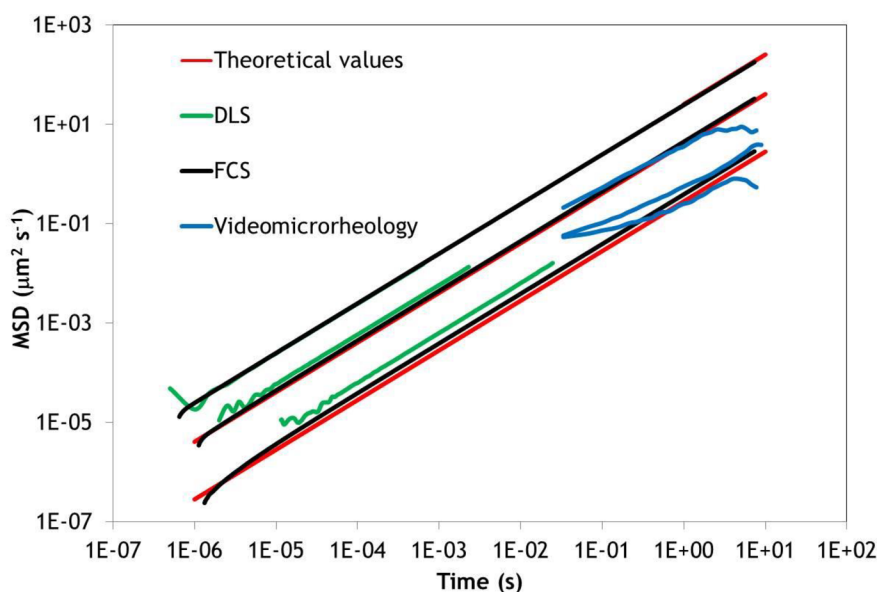
6.2 Výsledky a diskuse

6.2.1 Mikroreologie

6.2.1.1 Newtonské kapaliny

Jak již bylo zmíněno v předchozí sekci, bylo nejprve potřeba ověřit použitelnost rovnice 56. Byly použity dvě Newtonské kapaliny. Voda, glycerol a jejich směsi. Změna MSD v čase v Newtonských kapalinách nevykazuje elastickou složku, takže MSD roste v čase lineárně. Teoretické hodnoty pro vodu, glycerol a jejich směsi byly získány pomocí rovnice 54. Při porovnání naměřených a teoretických hodnot MSD v čase (Obr. 57) můžeme tvrdit, že rovnice 56 může být použita pro měření se 100 nm částicemi, protože hodnoty naměřené pomocí FCS se, co se týče průběhu, shodují v celém rozsahu s teoretickými hodnotami. Mírná odchylka ve směru rovnoběžném s průběhem teoretických hodnot pro 40% a 80% glycerol je pravděpodobně

způsobena změnou indexu lomu směsi glycerol-voda. Z výsledků je ale patrné, že změna indexu lomu způsobí deformaci konfokálního objemu pouze v rozměru w_{xy} , protože odchylka je ve směru rovnoběžném s teoretickou hodnotou. V případě DLS je situace podobná, ale rozsah času, ve kterém je MSD možno měřit, není tak široký jako v případě FCS. U klasické mikrorheologie lze pozorovat, že se křivky neshodují s teoretickými závislostmi. Důvodem je především velikost částic, protože vyhodnocení videomikrorheologie 100 nm částic spoléhá na záznam pohybu částic na videu a software není schopný pohyb tak malých částic přesně vyhodnotit. Z tohoto porovnání tedy vyplývá, že videomikrorheologie nemůže být použita pro zkoumání viskoelastických vlastností pomocí 100 nm částic, ale může být použito FCS a DLS. Z těchto dvou metod se jako nejperspektivnější jeví FCS, a to díky nejdelšímu časovému rozsahu.



Obr. 57 Závislost MSD na čase pro 100 nm fluorescenčně značené částice ve vodě, 40% glycerolu a 80% glycerolu

6.2.1.2 Mikrorheologie 100 nm částic v roztocích hyaluronanu měřených pomocí FCS a DLS

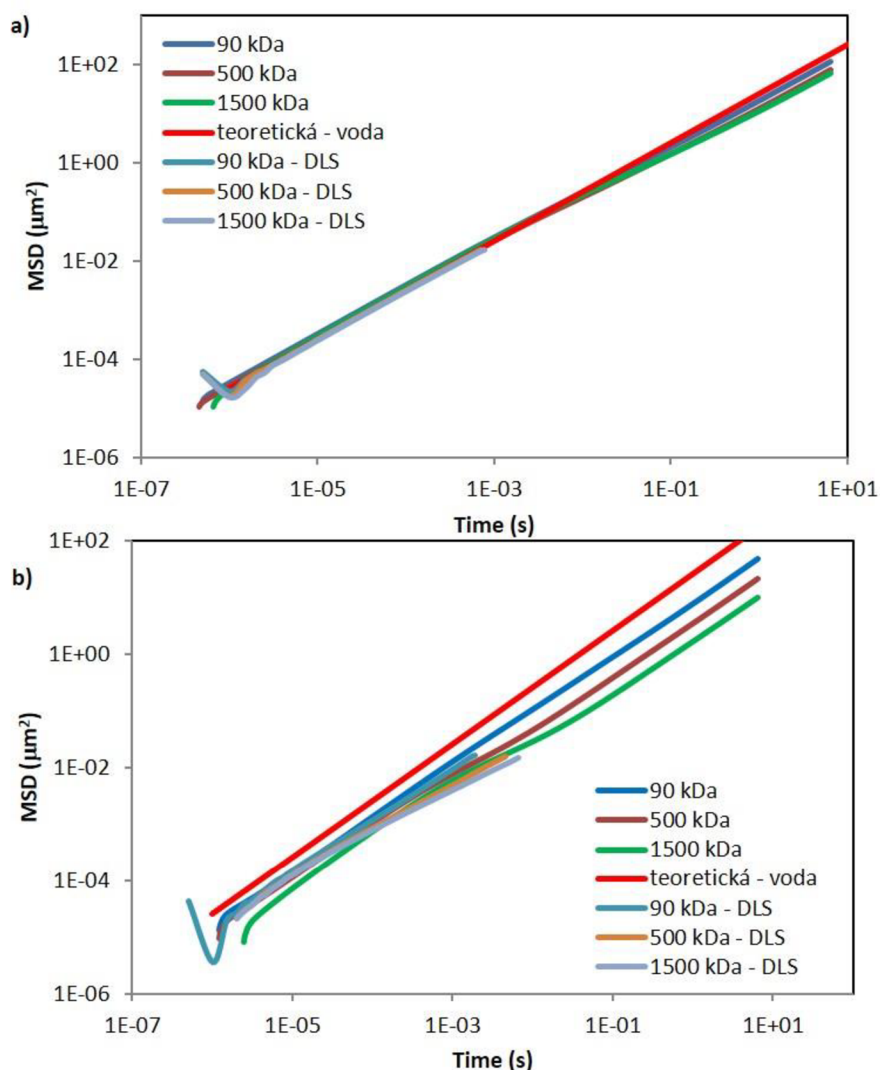
Jako Newtonské kapaliny byly použity roztoky polymeru hyaluronanu, a to především kvůli relativně vysoké viskozitě při nízkých koncentracích a zároveň se zanedbatelnou změnou indexu lomu (viz kapitola 6.1.1.1). Dále se tato kapitola zabývá vlivem molekulové hmotnosti a koncentrace hyaluronanu na MSD a je diskutována použitelnost FCS a DLS pro měření mikrorheologie polymerních systémů pomocí 100 nm částic.

6.2.1.2.1 Vliv molekulové hmotnosti hyaluronanu na MSD

Při stejné koncentraci jednotlivých vzorků by zvyšující se molekulová hmotnost měla mít za následek zvýšení viskozity, tedy i zpomalení difuze 100 nm částic. Zvyšování viskozity by mělo vést k odchýlení naměřených MSD hodnot od teoretických, a to v rovnoběžném směru, jak tomu bylo ukázáno v případě porovnání měření vody a směsi glycerolu. Nicméně se zde jedná o neNewtonské kapaliny, takže by mělo být také pozorováno viskoelastické chování.

Z Obr. 58a plyne, že 100 nm částice se v hyaluronanu o koncentraci 0,01 g/l pohybují téměř shodně jako ve vodě, což platí pro všechny 3 použité molekulové hmotnosti. Lze pozorovat pouze malé zakřivení vypočítaných MSD křivek v čase okolo $1 \cdot 10^{-2}$ s. Do této doby se jednotlivé křivky prakticky shodují s teoretickou hodnotou pro vodu. To znamená, že i při takto zředěném roztoku se viskoelastické vlastnosti, i když v malé míře, projevují. Navíc se viskoelastická více projevuje u vzorku s nejvyšší molekulovou hmotností. Podle experimentální části výše a porovnání mikrologie vody a roztoků glycerolu by se mohlo zdát, že takto nepatrné odchýlení od teoretické hodnoty pro rozpouštědlo by mohlo být způsobeno změnou indexu lomu roztoků hyaluronanu. Nicméně index lomu jednotlivých vzorků se shoduje s indexem lomu vody, takže k deformaci konfokálního objemu nedochází a tvary MSD křivek jsou určeny viskoelastickým chováním a rostoucí molekulovou hmotností.

Zajímavé je, že výše popsané platí pouze pro měření pomocí FCS. Při zkoumání DLS výsledků je patrné, že data určená pomocí DLS končí u hodnoty $1 \cdot 10^{-3}$ s, takže lze pozorovat pouze ten úsek závislosti, kde data kopírují závislost MSD prostředí. Nicméně data z DLS v tomto případě kopírují FCS data, což naznačuje použitelnost obou metod.



Obr. 58 Závislost MSD na čase pro 100 nm fluorescenčně značené částice v roztocích hyaluronanu o různé molekulové hmotnosti a koncentraci a) 0,01 g/l a b) 1 g/l

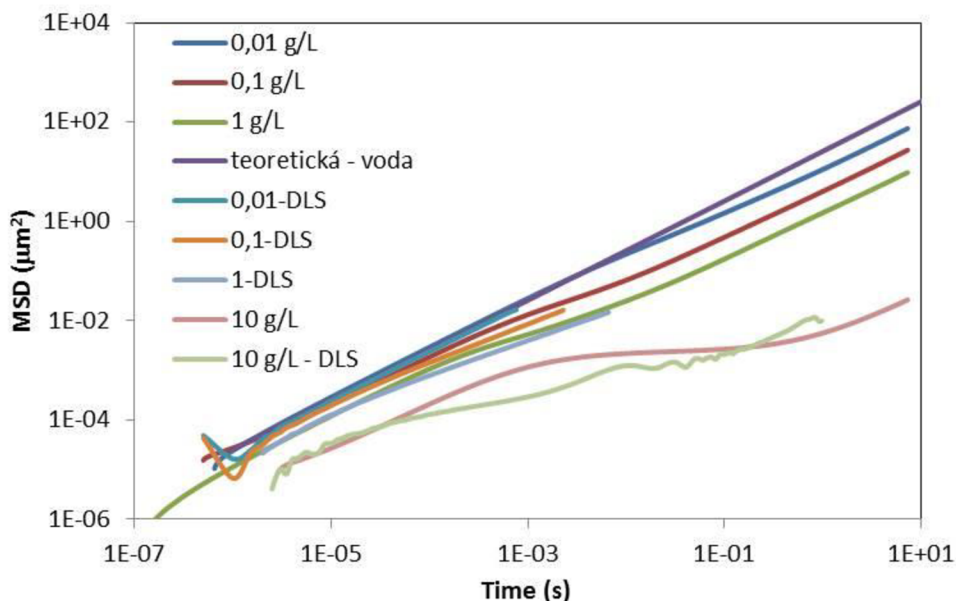
Při vyšší koncentraci hyaluronanu jsou patrné větší rozdíly v jednotlivých molekulových hmotnostech. V předchozím případě se viskoelasticita jednotlivých vzorků projevila až okolo času $1 \cdot 10^{-2}$ s. Při zvýšení koncentrace vzorků na 1 g/l se viskoelasticita projevuje již v čase okolo $1 \cdot 10^{-3}$ s (Obr. 58b). Stejně jako u koncentrace 0,01 g/l, tak i u této koncentrace lze sledovat rozdíly mezi jednotlivými molekulovými hmotnostmi. Podle předpokladů roste viskozita s rostoucí molekulovou hmotností jednotlivých vzorků. Nicméně zakřivení MSD křivky naznačující viskoelastické chování je patrné až u vysokomolekulárního hyaluronanu. To znamená, že je potřeba vyšší koncentrace, abychom mohli pozorovat výrazné viskoelastické chování roztoků hyaluronanu. Tato data nicméně již ukazují, že je možné FCS použít pro měření mikreologie.

Při srovnání DLS měření s FCS lze pozorovat odchylky dat DLS od FCS měření. Odchylky rostou s rostoucí molekulovou hmotností. Z principů obou metod plyne, že odchylky budou způsobeny u DLS metody, protože u DLS dochází k rozptylu světla nejen na 100 nm částicích, ale i na řetězci polymeru. Tedy předpokladem je, že čím víc polymeru v roztoku bude, tím větší bude odchylka. FCS pozoruje pouze fluorescenční částice, takže signál není ovlivněn přítomností polymeru.

6.2.1.2.2 Vliv koncentrace hyaluronanu na MSD

V předchozí kapitole bylo ukázáno, že FCS i DLS mohou být použity pro měření mikreologie. Jak ale ukazuje Obr. 59, v roztocích polymerů se MSD určené pomocí FCS a DLS s rostoucí koncentrací více odchyluje. Největší rozdíl panuje u nejkonzentrovanejšího vzorku, kde u MSD určeného pomocí DLS nelze najít viskoelastickou závislost (data jsou zašumněná). U koncentrovaných roztoků dochází k rozptylu nejen na polystyrenových částicích, ale i na polymerním klubku, které znemožní určení MSD polystyrenových částic. U zředěných roztoků se jako důvod odchylek u DLS nabízí vliv rozptylu na řetězcích polymeru, kde není ovlivnění MSD tak značné jako u koncentrovaných roztoků a v podstatě se MSD určené pomocí DLS shodují s MSD určenými pomocí FCS. Z výše popsaného tedy plyne, že pro koncentrované roztoky polymeru (případně i gely) nebude metoda DLS vhodná, protože bude ovlivněna rozptylem na řetězcích či klubcích polymeru, kdežto FCS sleduje pouze difundující fluorescenční částice.

Viskoelastické vlastnosti jsou patrnější s rostoucí koncentrací a lze pozorovat předpokládaný nárůst viskozity opět s rostoucí koncentrací. Nejvýraznější změnu oproti teoretické hodnotě pro vodu (byla použita pro srovnání s roztoky hyaluronanu, protože tuto teoretickou hodnotu pro rozpouštědlo nesmí závislosti MSD překročit – měření by nedávalo smysl) představuje samozřejmě nejkonzentrovanejší vzorek. Na průběhu MSD křivky pro roztok o koncentraci 10 g/L je patrné, že se průměrně po dobu pozorování po nějaký čas částice nehýbaly a prodíraly se polymerním klubkem. I to může značit změnu konformace polymeru z nataženého řetězce na polymerní klubko. Tato úvaha vychází z předchozího výzkumu, kde jsme již zkoumali pomocí videomikreologie změnu konformace hyaluronanu a ta se začíná měnit okolo 5 g/L [151].



Obr. 59 Závislost MSD na čase pro 100 nm fluorescenčně značené částice v roztocích vysokomolekulárního (1500 kDa) hyaluronanu měřená pomocí DLS a FCS

Na výše zmíněných výsledcích bylo ukázáno, že fluorescenční korelační spektroskopie může být použita jako prostředek pro zkoumání pohybu 100 nm částic v různě koncentrovaných roztocích hyaluronanu. Nicméně účelem této kapitoly je vývoj metody pro mikrореologické měření v hydrogelových systémech pomocí FCS. Výše je uvedeno, že 100 nm částice a FCS jsou použitelné pro mikrореologické měření, ale už měření při koncentraci 10 g/l dosahuje své limity. Proto je další část práce věnována měření FCS s 30 nm částicemi.

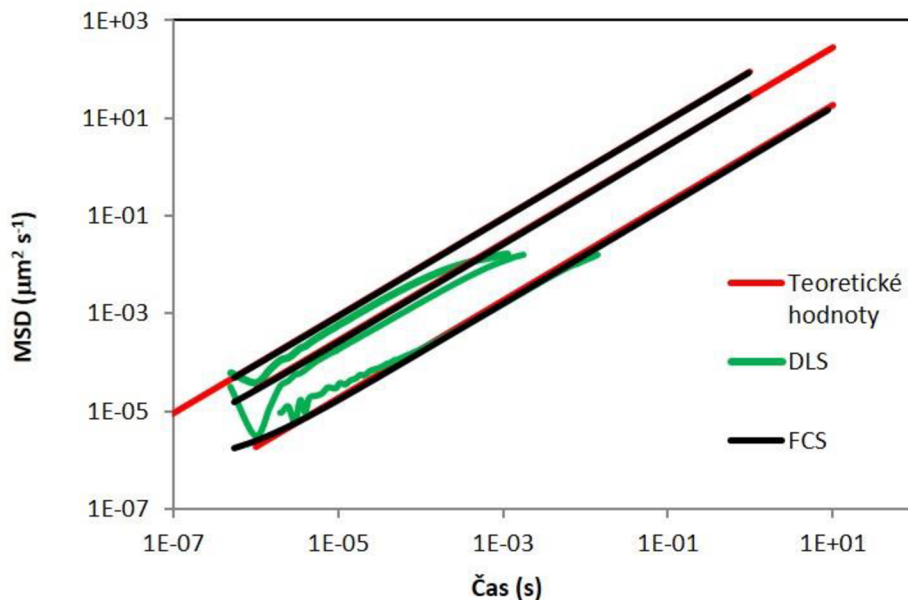
6.2.2 Nanoreologie

Nanoreologie se svojí metodou nijak neliší od použití 100 nm nebo 300 nm částic pomocí FCS, nicméně kvůli velikosti použitých částic a faktu, že pohyb 30 nm částic nemůžeme zachytit klasickým mikroskopem používaným pro mikrореologii, můžeme tuto metodu nazývat nanoreologie.

6.2.2.1 Newtonské kapaliny

Stejně jako v případě 100 nm částic, tak i u 30 nm částic muselo být nejdříve ověřeno, jestli je rovnice 56 použitelná i pro takto malé částice. Stejně jako v předchozím případě byla i nyní použita voda, 40% glycerol a 80% glycerol. Teoretické hodnoty byly opět získány pomocí rovnice 54. I v případě 30 nm částic se hodnoty získané pomocí rovnice 56 shodují s teoretickými hodnotami. Můžeme tedy říci, že rovnice 56 je použitelná i pro 30 nm částice. Mírná odchylka ve směru rovnoběžném s průběhem teoretických hodnot pro 80% glycerol je pravděpodobně způsobena změnou indexu lomu směsí glycerol-voda (kapitola 6.1.1.1). Při porovnání 30 nm a 100 nm částic lze pozorovat, že pro glycerol jsou odchylky od teoretických hodnot větší při použití 100 nm částic než při použití 30 nm částic. Tento rozdíl může být způsoben odchylkou při stanovení efektivního objemu (viz sekce 6.1.1.1). Další možností je, že použití různě velkých částic je jinak ovlivněno změnou indexu lomu. V případě DLS je situace podobná, ale rozsah času, ve kterém je MSD možno měřit, není tak široký jako v případě FCS. Dynamický rozptyl světla je

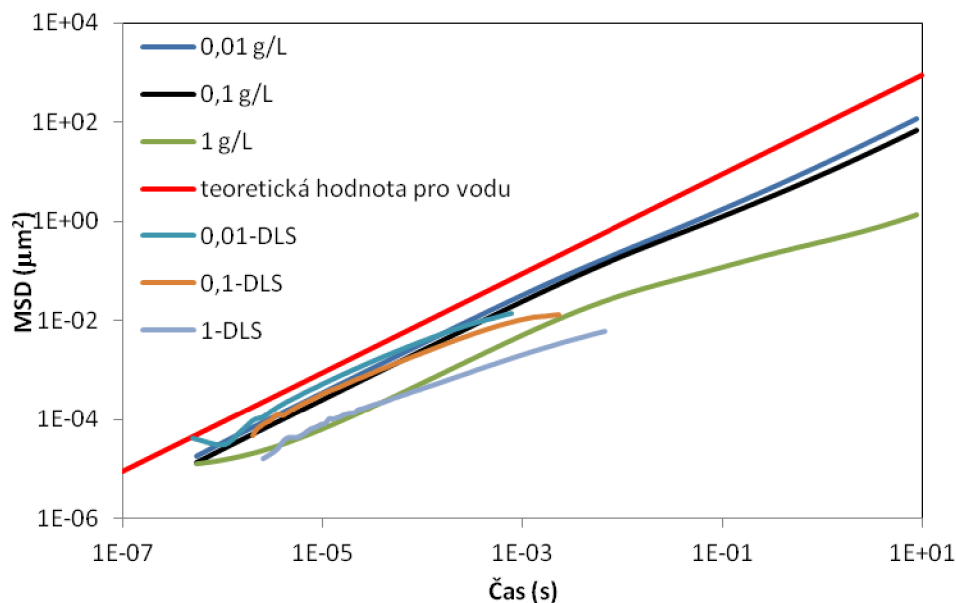
svým použitím při sledování částic podobný FCS, takže i 30 nm částice lze touto metodou pozorovat. Jak již bylo zmíněno výše, u videomikroreologie již nejsme schopni 30 nm částice pozorovat, takže budeme opět srovnávat pouze metody FCS a DLS.



Obr. 60 Závislost MSD na čase pro 30 nm fluorescenčně značené částice ve vodě, 40% glycerolu a 80% glycerolu

6.2.2.2 Nanoreologie 30 nm částic v roztocích hyaluronanu

Při srovnání MSD v závislosti na čase měřených pro zředěné roztoky vysokomolekulárního (1,5 MDa) hyaluronanu pomocí FCS a DLS je patrné, že MSD měřené pomocí obou metod se rozchází. Nízké koncentrace hyaluronanu byly na začátek zvoleny kvůli předpokladu, že u metody rozptylu světla budou u vyšších koncentrací hyaluronanu výsledky ovlivněny rozptylem světla na řetězcích nebo klucích hyaluronanu. Z grafu níže to vypadá (Obr. 61), že DLS metoda je ovlivněna již v nízkých koncentracích polymeru rozptylem světla na řetězcích polymeru. Důvodem je, že FCS metoda sleduje pouze fluorescenčně značené částice, ale DLS metoda sleduje rozptyl na jakýchkoli částicích (v tomto případě i řetězcích polymeru). Z toho důvodu budou dále diskutovány pouze výsledky získané metodou FCS.



Obr. 61 Závislost MSD na čase pro 30 nm fluorescenčně značené částice v roztocích hyaluronanu měřené pomocí FCS a DLS

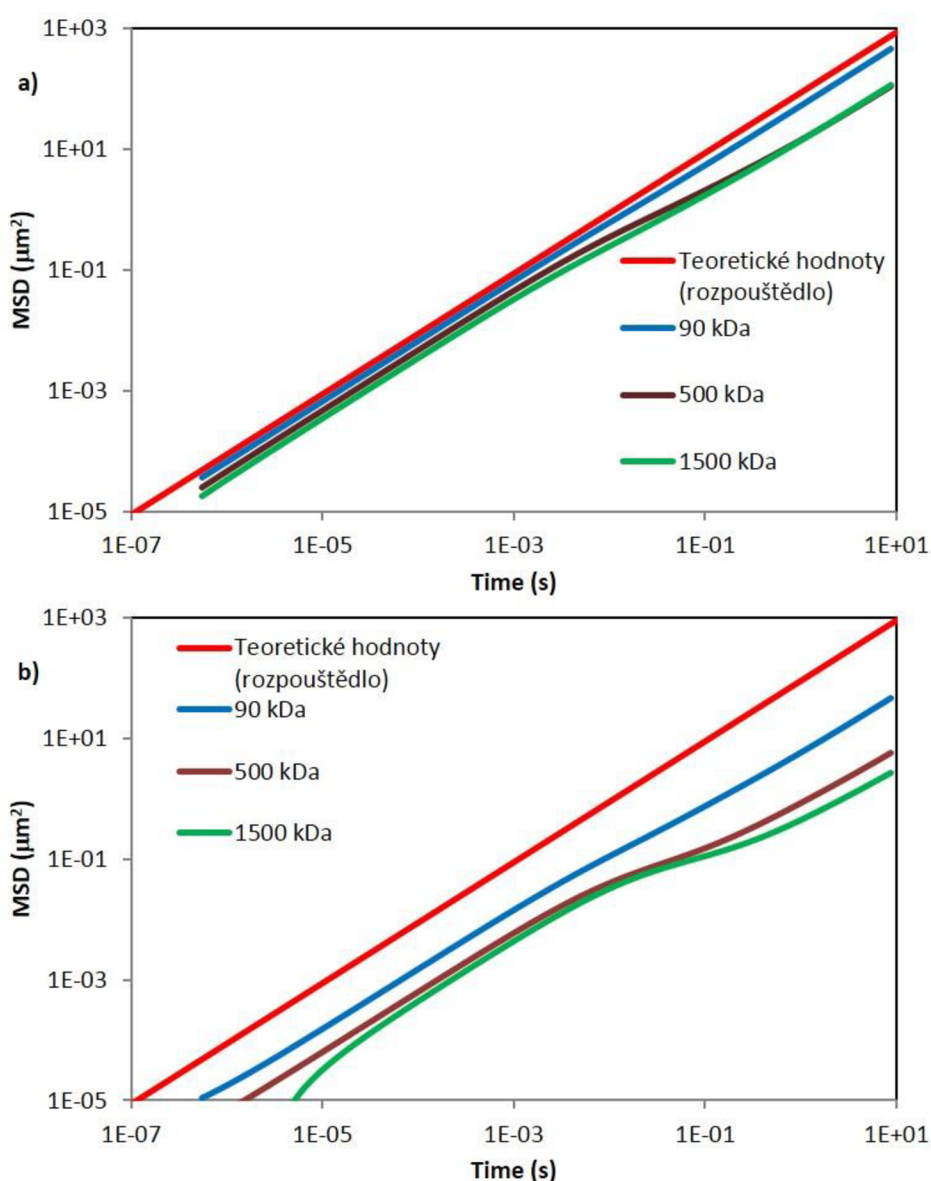
6.2.2.2.1 Vliv molekulové hmotnosti hyaluronanu

Stejně jako v případě 100 nm částic, tak při stejné koncentraci jednotlivých vzorků by zvyšující se molekulová hmotnost měla mít za následek zvýšení viskozity, tedy i zpomalení difuze 30 nm částic. Zvyšování viskozity by mělo vést k odchylení naměřených MSD hodnot od teoretických, a to v rovnoběžném směru, jak tomu bylo ukázáno v případě porovnání měření vody a směsi glycerolu. Nicméně se zde jedná o neNewtonské kapaliny, takže by mělo být také pozorováno viskoelastické chování. Nicméně jde o více než třikrát menší částice, takže se ve stejně koncentrovaných roztocích hyaluronanu budou pohybovat 30 nm částice rychleji v porovnání se 100 nm částicemi, takže je i větší pravděpodobnost, že během pozorování pohybu částic dojde k bránění pohybu částic řetězci polymeru.

Z Obr. 62 Obr. 58a plyne, že 30 nm částice se v hyaluronanu o koncentraci 0,01 g/l a molekulové hmotnosti 90 kDa pohybují téměř shodně jako ve vodě. Nicméně pro vyšší molekulové hmotnosti o stejné koncentraci, tedy 0,1 g/L, lze pozorovat viskoelastické chování. Lze pozorovat pouze zakřivení vypočítaných MSD křivek v čase okolo $1 \cdot 10^{-2}$ s. Do této doby se jednotlivé křivky prakticky shodují s teoretickou hodnotou pro vodu. To znamená, že i při takto zředěném roztoku se viskoelastické vlastnosti hyaluronanu projevují a projevují se výrazněji než při použití větších částic. I v tomto případě byly měřeny indexy lomu jednotlivých vzorků a naměřené indexy lomu se zanedbatelně odlišovaly od indexu lomu vody, takže nedocházelo k deformaci konfokálního objemu vlivem indexu lomu.

Při vyšší koncentraci hyaluronanu jsou patrné větší rozdíly v jednotlivých molekulových hmotnostech. V předchozím případě se viskoelastická jednotlivých vzorků projevila až okolo času $1 \cdot 10^{-2}$ s. Jelikož při použití 100 nm částic v hyaluronanu o koncentraci 10 g/L docházelo k bránění pohybu částic řetězcem, a jelikož cílem této metody je studium nanoreologie hydrogelů, byla dále zvolena koncentrace hyaluronanu 10 g/L. Při zvýšení koncentrace vzorků na 10 g/l se

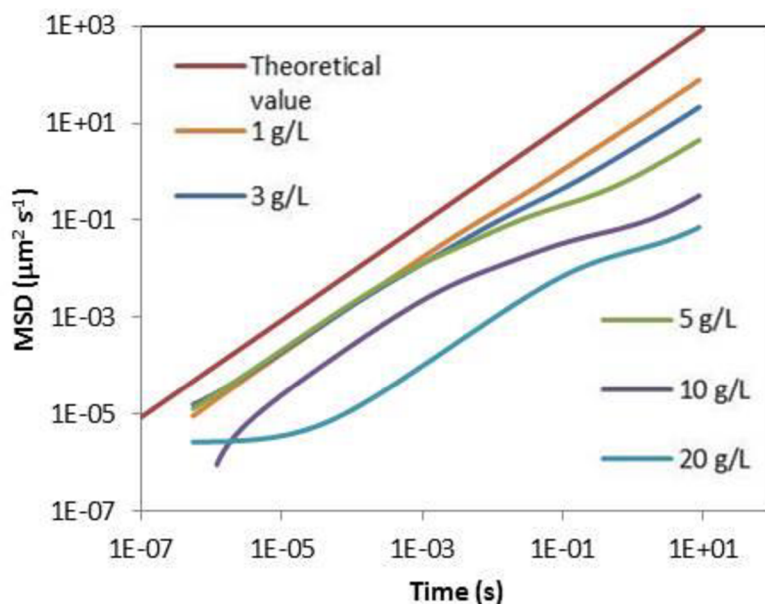
viskoelastická projevuje již v čase okolo $1 \cdot 10^{-3}$ s (Obr. 62b). Stejně jako u koncentrace 0,01 g/l, tak i u této koncentrace lze sledovat rozdíly mezi jednotlivými molekulovými hmotnostmi. Podle předpokladů roste viskozita s rostoucí molekulovou hmotností jednotlivých vzorků. Nicméně zakřivení MSD křivky naznačující viskoelastické chování není patrné u molekulové hmotnosti 90 kDa, ale je již znatelné pro molekulové hmotnosti 500 kDa a 1500 kDa. Při srovnání MSD křivky pro 100 nm a 30 nm částice o koncentraci 10 g/L a vysokomolekulární hyaluronan je patrné, že pohyb 30 nm částic není tak bráněn jako v případě 100 nm částic. Toto srovnání naznačuje použitelnost jednotlivých částic v hydrogelech. Vzhledem k průběhu závislosti pohybu 100 nm částic na čase je patrné, že pohyb 100 nm částic bude velmi těžko detekovatelný v hydrogelech hyaluronanu, kdežto u 30 nm částic je stále prostor pro pozorování jejich pohybu ve vyšších koncentracích polymeru a pravděpodobně i v hydrogelových systémech.



Obr. 62 Závislost MSD na čase pro 30 nm fluorescenčně značené částice v roztocích hyaluronanu o různé molekulové hmotnosti a koncentraci a) 0,1 g/l a b) 10 g/l

6.2.2.2 Vliv koncentrace hyaluronanu na MSD

V předchozí kapitole bylo zmíněno, že při použití 30 nm částic je stále prostor pro zvyšování koncentrace polymeru, aniž by byly při měření pozorovány v podstatě nehybné částice.



Obr. 63 Závislost MSD na čase pro 30 nm částice v roztocích vysokomolekulárního hyaluronanu o různých koncentracích

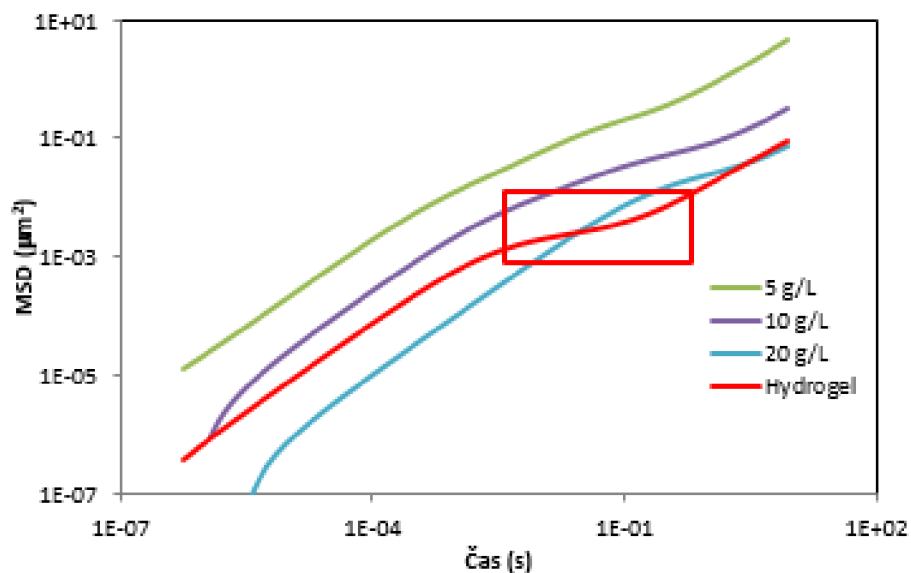
Obr. 63 zobrazuje pohyb částic v různě koncentrovaných roztocích vysokomolekulárního hyaluronanu s rostoucí koncentrací hyaluronanu. Z grafu je patrný typický posun jednotlivých závislostí k nižším hodnotám MSD kvůli zvyšující se koncentraci hyaluronanu, a tedy rostoucí viskozity roztoků. Tento posun je doprovázen změnou ve viskoelastických vlastnostech hyaluronanu. V roztocích hyaluronanu o koncentraci 1 g/l a 3 g/l není 30 nm částicím nijak významně bráněno, což se projevuje tím, že nelze pozorovat žádné významné zakřivení těchto dvou závislostí. Spíše lze pozorovat rovnoběžnou závislost s teoretickými hodnotami pro vodu. To znamená, že vlivem posunu jednotlivých závislostí k nižším MSD mají tyto vzorky vyšší viskozitu, ale řetězce polymeru netvoří žádnou významnou překážku pro fluorescenční částice. Od koncentrace 5 g/l se v MSD závislostech začínají více projevovat viskoelastické vlastnosti jednotlivých vzorků. S dále rostoucí koncentrací hyaluronanu se viskoelastická složka projevuje čím dál větší měrou.

Výrazný viskoelastický projev je způsoben právě přechodem řetězců polymeru z nataženého řetězce na polymerní klubko. Výsledky FCS nanoreologie potvrzují výsledky zkoumání změny konformace hyaluronanu pomocí videomikroreologie [154]. Důležitým faktem je, že roztoky hyaluronanu tvoří vysoce viskózní roztoky při nízkých koncentracích, což představuje důvod, proč byl hyaluronan pro vývoj této metody vybrán (vysoká viskozita a neměnný index lomu). Přesně takovým případem je hyaluronan o koncentraci 20 g/l, což představuje pouze 2% roztok

hyaluronanu. Při této nízké koncentraci má hyaluronan již konzistenci gelu a pomocí jiných metod je velmi obtížné mikroprostředí uvnitř gelu definovat. Dále také stojí za zmínku, že 2% hyaluronan je velmi obtížné měřit pomocí klasické videomikroreologie, protože 1 mm částice se v takovém prostředí téměř nehýbou a takové pozorování v mikroreologii nemá smysl. V takovém případě se musí použít externí síly, aktivní mikroreologie, aby se částice mohly pohybovat. Nicméně z výše popsaných pozorování plyne, že pomocí FCS a 30 nm částic můžeme pozorovat pasivní mikroreologii částic i v prostředí podobnému gelu, případně přímo hydrogelu.

6.2.2.3 Nanoreologie hydrogelů

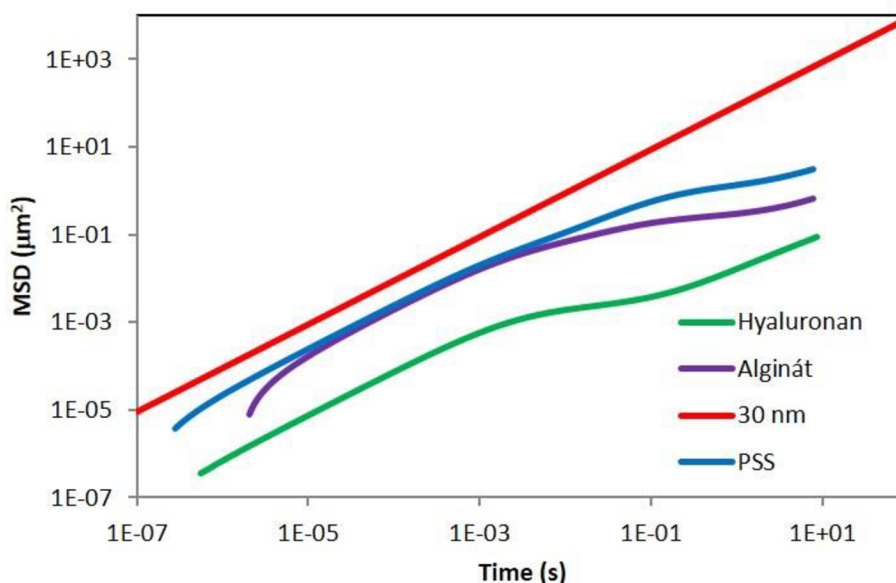
Předchozí kapitoly popisovaly pohyb fluorescenčně značených částic o různé velikosti částic, různé molekulové hmotnosti použitého polymeru a různé koncentraci polymeru. Z těchto pozorování vyplynulo, že pro výzkum mikroprostředí hydrogelů se jeví nejlépe 30 nm fluorescenčně značené částice, které byly dále použity pro hydrogely.



Obr. 64 Závislost MSD na čase pro 30 nm částice v roztocích vysokomolekulárního hyaluronanu o různých koncentracích a v hydrogelu

Samotný hylauronan o koncentraci 20 g/L vykazuje konzistenci podobnou gelu. Nicméně u koncentrovaného roztoku hyaluronanu jde o propletené řetězce polymeru a u hydrogelu hyaluronanu jde o síť vzniklou interakcí polymeru a tenzidu o opačném náboji. Mikroprostředí roztoku hyaluronanu a hydrogelu se bude tedy lišit a 30 nm částice budou procházet prostředím rozdílně. Obr. 64 znázorňuje rozdíl pohybu mezi různě koncentrovanými roztoky hyaluronanu a hydrogelem hyaluronanu. U roztoků hyaluronanu s rostoucí koncentrací je možné pozorovat posun křivek vlivem rostoucí viskozity a viskoelastické složky, jako to bylo popsáno v kapitole výše. Nicméně nanoreologie hydrogelu vykazuje typický průběh závislosti MSD na čase pro hydrogel. V nízkých časech roste MSD lineárně v závislosti na čase a tato oblast znázorňuje

mikroviskozitu prostředí okolí částic. Červený rámeček na Obr. 64 znázorňuje zpomalený pohyb částic, které se prodírají hydrogelovou strukturou. Jakmile se částice opět mohou volně pohybovat, MSD roste rychleji.



Obr. 65 Srovnání MSD v závislosti na čase pro hydrogel hyaluronanu a gely připravené chemickou metodou (Alginát a PSS)

Na Obr. 64 bylo ukázáno, že 30 nm částice mohou být použity pro studium hydrogelů hyaluronanu, které byly připraveny fyzikální interakcí polymeru a tenzidu s opačnými náboji. Obr. 65 ukazuje použití nanoreologie v hydrogelech, které jsou připraveny chemickou metodou. Křivky se liší podle toho, v jakém mikroprostředí se částice pohybují a jak je hustá síť, na kterou částice narážejí. V případě chemicky připravených gelů se také projevil zpomalený pohyb částic při průchodu gelovou sítí, což naznačuje, že pasivní nanoreologie je použitelná i v chemicky připravených gelech.

6.3 Závěr

V této kapitole byla představena metoda fluorescenční korelační spektroskopie, která byla použita pro měření pasivní mikrorologie. Použitelnost této metody byla stanovena měřením změny MSD v závislosti na čase pro Newtonské kapaliny. MSD se v těchto případech má měnit lineárně v závislosti na čase, což bylo potvrzeno pro obě velikosti částic (100 nm a 30 nm) ve všech zkoumaných prostředích (voda a směsice voda–glycerol). Měření Newtonských kapalin bylo srovnáno s dalšími mikrorologickými metodami, DLS a videomikrorologií. Videomikrorologie nebyla v podstatě použitelná pro jakékoli měření už se 100 nm částicemi, protože mikroskop nedokázal dostatečně zaznamenat dráhu nanometrových částic, takže při výpočtu MSD docházelo k výrazným odchylkám od spočítaných teoretických hodnot. Nicméně DLS vykazovalo téměř shodný trend s FCS a teoretickými hodnotami, a to jak pro 100 nm částice, tak i 30 nm částice, takže DLS mohlo být dále také použito pro měření neNewtonských kapalin.

Co se týče použitelnosti této metody a různé velikosti částic v neNewtonských kapalinách, tak pro charakterizaci pasivní (nano)mikrorologie pomocí FCS byl zvolen hyaluronan kvůli

zanedbatelným změnám indexu lomu roztoků hyaluronanu vůči vodě a kvůli viskozitě roztoků i v nízkých koncentracích hyaluronanu. Nejprve byly zkoumány roztoky hyaluronanu pomocí 100 nm částic, kdy byl zkoumán vliv molekulové hmotnosti a koncentrace na MSD. Podle předpokladu se viskoelastické vlastnosti projevovaly více u vyšších molekulových hmotností a také u roztoků s vyšší koncentrací. Dále bylo potvrzeno proplétání řetězců hyaluronanu u koncentrace okolo 5 g/L, což vede k výrazné změně tvaru MSD závislosti na čase, tedy k nárůstu viskoelastické složky. Nicméně u koncentrace hyaluronanu okolo 10 g/L bylo pozorováno výrazné zpomalení pohybu 100 nm částic, takže měření ve více koncentrovaných polymerech by mohlo být problematické. Proto bylo v dalších experimentech přistoupeno k použití 30 nm částic. Při srovnání FCS a DLS byla nalezena výrazná odchylka mezi oběma metodami. Tato odchylka byla způsobena u DLS, protože z principu metody plyne, že nebyl sledován pouze pohyb polystyrenových částic, ale také byl sledován rozptyl na řetězcích polymeru. Tato odchylka se zvětšovala s rostoucí koncentrací polymeru. Z toho plyne, že DLS nemůže být použito jako důvěryhodná metoda pro měření mikrorologie koncentrovaných polymerů nebo gelů.

Pomocí 30 nm částic byl také zkoumán vliv molekulové hmotnosti a koncentrace polymeru. Tyto experimenty vedly logicky ke stejným závěrům jako v případě 100 nm částic (zvyšující se viskozita a viskoelastická složka s rostoucí molekulovou hmotností polymeru a s rostoucí koncentrací polymeru). Nicméně pomocí 30 nm částic byly zkoumány i koncentrovanější roztoky než v případě 100 nm částic. Jako nejkonzentrovanější roztok byl použit hyaluronan o koncentraci 20 g/L, který má již konzistenci podobnou gelu. Z výsledků plyne, že i v takto koncentrovaném roztoku mohl být vliv MSD v závislosti na čase zaznamenán, aniž by bylo pohybu částic kompletně bráněno (byla by vidět pouze konstantní hodnota MSD v závislosti na čase), proto byly 30 nm částice dále využity pro studium gelů.

Účelem této kapitoly byl právě vývoj metody pasivní nanoreologie pro výzkum mikroprostředí hydrogelu. Výše zmíněné experimenty vedly optimalizaci FLCS metody až k použitelnosti této metody pro studium gelů. V případě hydrogelů byla pozorována typická změna MSD v závislosti na čase (S-křivka s přechodem z volného pohybu do stavu, kdy se částice prodírá gelem až zase do stavu volného pohybu). Z toho plyne, že nanoreologie může být použita pro výzkum pasivní nanoreologie hydrogelů, tedy bez použití jakéhokoli jiného vnějšího zásahu.

7 LITERATURA

- [1] KLOUDA, P., *Moderní analytické metody*. Pavel Klouda: Ostrava, 1996; p 203.
- [2] VALEUR, B., *Molecular Fluorescence: Principles and Applications*. Wiley-VCH: Weinheim, 2001; p 381.
- [3] STRICKLER, S. J.; BERG, R. A., Relationship between Absorption Intensity and Fluorescence Lifetime of Molecules. *The Journal of Chemical Physics* 1962, 37, (4), 814-822.
- [4] LAKOWICZ, J. R., *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. Third ed.; Springer: New York, 2006; p 954.
- [5] DEUMIÉ, M.; EL BARAKA, M.; QUINONES, E., Fluorescence quenching of pyrene derivatives by iodide compounds in erythrocyte membranes: an approach of the probe location. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* 1995, 87, (2), 105-113.
- [6] LAKOWICZ, J. R.; GRZYCZYNSKI, I.; WICZK, W.; LACZKO, G.; PRENDERGAST, F. C.; JOHNSON, M. L., Conformational distributions of melittin in water / methanol mixtures from frequency-domain measurements of nonradiative energy transfer. *Biophysical Chemistry* 1990, 36, (2), 99-115.
- [7] XIE, Y.; MAXSON, T.; TOR, Y., Fluorescent Ribonucleoside as a FRET Acceptor for Tryptophan in Native Proteins. *Journal of the American Chemical Society* 2010, 132, (34), 11896-11897.
- [8] KNIBBE, H.; REHM, D.; WELLER, A., Intermediates and Kinetics of Fluorescence Quenching by Electron Transfer. *Berichte der Bunsengesellschaft für physikalische Chemie* 1968, 72, (2), 257-263.
- [9] KASHA, M., Collisional Perturbation of Spin-Orbital Coupling and the Mechanism of Fluorescence Quenching. A Visual Demonstration of the Perturbation. *The Journal of Chemical Physics* 1952, 20, (1), 71-74.
- [10] SUPPAN, P., *Chemistry and Light*. The Royal Society of Chemistry: Cambridge, 1994; p 295.
- [11] STEINER, R. F.; KIRBY, E. P., Interaction of the ground and excited states of indole derivatives with electron scavengers. *The Journal of Physical Chemistry* 1969, 73, (12), 4130-4135.
- [12] EFTINK, M. R.; GHIRON, C. A., Fluorescence quenching of indole and model micelle systems. *The Journal of Physical Chemistry* 1976, 80, (5), 486-493.
- [13] POUCHLÝ, J., *Fyzikální chemie makromolekulárních a koloidních soustav*. Vysoká škola chemicko-technologická v Praze: Praha, 2001; p 198.
- [14] BORUAH, B.; SAIKIA, P. M.; GOHAIN, B.; DUTTA, R. K., Partition equilibrium of phenol red in aqueous polymer-surfactant system: Determination of critical aggregation concentration. *Journal of Molecular Liquids* 2010, 151, (1), 81-85.
- [15] BARTOVSKÁ, L.; ŠIŠKOVÁ, M., *Fyzikální chemie povrchů a koloidních soustav*. Vysoká škola chemicko-technologická v Praze: Praha, 2002; p 192.
- [16] HASCALL, Vincent C.; LAURENT, Torvard C. Glycoforum.gr.jp [online]. 15.12.2007 [cit. 2010-03-13]. Hyaluronan: Structure and Physical Properties. Dostupné z WWW: <http://www.glycoforum.gr.jp/science/hyaluronan/HA01/HA01E.html#VIII>

- [17] KAKEHI, Kazuaki, Mitsuhiro KINOSHITA a Shin-ichi YASUEDA. Hyaluronic acid: separation and biological implications. *Journal of Chromatography B*. 2003, roč. 797, 1-2, s. 347-355. ISSN 15700232. DOI: 10.1016/S1570-0232(03)00479-3
- [18] DAVIES, A., J. GORMALLY, E. WYN-JONES, D.J. WEDLOCK a G.O. PHILLIPS. A study of hydration of sodium hyaluronate from compressibility and high precision densitometric measurements. *International Journal of Biological Macromolecules*. 1982, 4(7): 436-438. DOI: 10.1016/0141-8130(82)90091-5. ISSN 01418130. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0141813082900915>
- [19] KUČERÍK, J., A. PRŮŠOVÁ, A. ROTARU, K. FLIMEL, J. JANEČEK a P. CONTE. DSC study on hyaluronan drying and hydration. *Thermochimica Acta*. 2011, 523(1-2): 245-249. DOI: 10.1016/j.tca.2011.04.034. ISSN 00406031. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0040603111002632>
- [20] RINAUDO, Marguerite. Polyelectrolyte properties of a plant and animal polysaccharide. *Structural Chemistry*. 2009, 20(2): 277-289. DOI: 10.1007/s11224-009-9426-z. ISSN 1040-0400. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s11224-009-9426-z>
- [21] KARGEROVÁ, A., M. PEKAŘ. Densitometry and ultrasound velocimetry of hyaluronan solutions in water and in sodium chloride solution. *Carbohydrate Polymers*. 2014, 106(1-2): 453-459. DOI: 10.1016/j.carbpol.2014.01.020. ISSN 01448617. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0144861714000228>
- [22] PEYRATOUT, Claire, Edwin DONATH a Lars DAEHNE. Electrostatic interactions of cationic dyes with negatively charged polyelectrolytes in aqueous solution. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*. 2001, 142(1), 51-57. DOI: 10.1016/S1010-6030(01)00490-7. ISSN 10106030. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1010603001004907>
- [23] MAUCK, Christine K, Debra H WEINER, Susan A BALLAGH, et al. Single and multiple exposure tolerance study of polystyrene sulfonate gel: a phase I safety and colposcopy study. *Contraception* [online]. 2004,70(1), 77-83 [cit. 2016-03-25]. DOI: 10.1016/j.contraception.2004.02.016. ISSN 00107824. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0010782404000812>
- [24] VITAGLIANO, V., L. COSTANTINO a A. ZAGARI. Interaction between Acridine Orange and poly(styrenesulfonic acid). *The Journal of Physical Chemistry*. 1973, 77(2), 204-210. DOI: 10.1021/j100621a012. ISSN 0022-3654. Dostupné také z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/j100621a012>
- [25] KITANO, Hiromi, Susumu TADA, Takayuki MORI, Kohei TAKAHA, Makoto GEMMEI-IDE, Masaru TANAKA, Mitsuhiro FUKUDA a Yoshiyuki YOKOYAMA. Correlation between the Structure of Water in the Vicinity of Carboxybetaine Polymers and Their Blood-Compatibility. *Langmuir*. 2005, 21(25), 11932-11940. DOI: 10.1021/la0515571. ISSN 0743-7463. Dostupné také z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/la0515571>
- [26] PAL, A.; SUNDAR MAITY, S.; SAMANTA, S.; SAHA SARDAR, P.; GHOSH, S., Interaction of the excited state intramolecular proton transfer probe 3-hydroxy-2-naphthoic acid with poly N-vinyl-2-pyrrolidone polymer in water: An insight into the

- water structure in the binding region. *Journal of Luminescence* 2010, 130, (11), 1975-1982
- [27] HE, Xiao Min, Daniel C. CARTER a A. ZAGARI. Atomic structure and chemistry of human serum albumin. *Nature*. 1992, 358(6383), 209-215. DOI: 10.1038/358209a0. ISSN 0028-0836. Dostupné také z: <http://www.nature.com/doi/10.1038/358209a0>
- [28] MINIC, Simeon, Dragana STANIC-VUCINIC, Mirjana RADOMIROVIC, Milica RADIBRATOVIC, Milos MILCIC, Milan NIKOLIC a Tanja CIRKOVIC VELICKOVIC. Characterization and effects of binding of food-derived bioactive phycocyanobilin to bovine serum albumin. *Food Chemistry*. 2017, , -. DOI: 10.1016/j.foodchem.2017.07.066. ISSN 03088146. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814617312104>
- [29] STEINBÜCHEL, A. a M. HOFRIKTER. *Biopolymers*. Chichester: Wiley-VCH, 2003. ISBN 978-3-527-30227-7
- [30] KÄUPER, P., KULICKE, W.-M., HORNER, S., SAAKE, B., PULS, J., KUNZE, J., FINK, H.-P., HEINZE, U., HEINZE, T., KLOHR, E.-A., THIELKING, H. and KOCH, W., Development and evaluation of methods for determining the pattern of functionalization in sodium carboxymethylcelluloses. *Angew. Makromol. Chem.* 1998, 260 (1): 53–63. doi:10.1002/(SICI)1522-9505(19981101)260:1<53::AID-APMC53>3.0.CO;2-Q
- [31] Bekah, D.: Measurement of viscoelastic properties of treated and untreated cancer cells using passive microrheology. Toronto, 2010. Dizertační práce na Ryerson University. Vedoucí práce: Michael C. Kolios.
- [32] MASON, T. G., K. GANESAN, J. H. VAN ZANTEN, D. WIRTZ a S. C. KUO. Particle Tracking Microrheology of Complex Fluids. *Physical Review Letters*. 1997, 79(17), 3282-3285. DOI: 10.1103/PhysRevLett.79.3282. ISSN 0031-9007. Dostupné také z: <https://link.aps.org/doi/10.1103/PhysRevLett.79.3282>
- [33] CROCKER, John C., M. T. VALENTINE, Eric R. WEEKS, T. GISLER, P. D. KAPLAN, A. G. YODH a D. A. WEITZ. Two-Point Microrheology of Inhomogeneous Soft Materials. *Physical Review Letters*. 2000, 85(4), 888-891. DOI: 10.1103/PhysRevLett.85.888. ISSN 0031-9007. Dostupné také z: <https://link.aps.org/doi/10.1103/PhysRevLett.85.888>
- [34] W., Bradley, Stephen KEEN, Philipus J., Yacine HEMAR a Martin A.K. A Practical Review of Microrheological Techniques. *Rheology - New Concepts, Applications and Methods*. InTech, 2013. DOI: 10.5772/53639. ISBN 978-953-51-0953-2. Dostupné také z: <http://www.intechopen.com/books/rheology-new-concepts-applications-and-methods/a-practical-review-of-microrheological-techniques>
- [35] Bekah, D.: Measurement of viscoelastic properties of treated and untreated cancer cells using passive microrheology. Toronto, 2010. Disertační práce na Ryerson University. Vedoucí práce: Michael C. Kolios
- [36] KAPUSTA, Peter, Michael WAHL, Aleš BENDA, Martin HOF a Jörg ENDERLEIN. FLCS - Fluorescence Lifetime Correlation Spectroscopy: Application Note. PicoQuant GmbH, 2006. Dostupné také z: https://www.picoquant.com/images/uploads/page/files/7272/appnote_flcs.pdf

- [37] PODZIMEK, Stepan. Light scattering, size exclusion chromatography, and asymmetric flow field flow fractionation: powerful tools for the characterization of polymers, proteins and nanoparticles. Hoboken, N.J.: Wiley, c2011. ISBN 978-0-470-38617-0
- [38] HOLOUBEK, Jaroslav. Some applications of light scattering in materials science. *Journal of Quantitative Spectroscopy and Radiative Transfer*. 2007, 106(1-3), 104-121. DOI: 10.1016/j.jqsrt.2007.01.013. ISSN 00224073. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022407307000246>
- [39] GODDARD, E. D.; TURRO, N. J.; KUO, P. L.; ANANTHAPADMANABHAN, K. P., Fluorescence probes for critical micelle concentration determination. *Langmuir* 1985, 1, (3), 352-355.
- [40] DOMINGUEZ, A.; FERNANDEZ, A.; GONZALEZ, N.; IGLESIAS, E.; MONTENEGRO, L., Determination of Critical Micelle Concentration of Some Surfactants by Three Techniques. *Journal of Chemical Education* 1997, 74, (10), 1227.
- [41] AGUIAR, J.; CARPENA, P.; MOLINA-BOLÍVAR, J. A.; CARNERO RUIZ, C., On the determination of the critical micelle concentration by the pyrene 1:3 ratio method. *Journal of Colloid and Interface Science* 2003, 258, (1), 116-122.
- [42] CARNERO RUIZ, C.; AGUIAR, J., Mixed micelles of triton X100: Interaction, composition, stability and micro-environmental properties of the aggregates. *Molecular Physics* 1999, 97, (10), 1095-1103.
- [43] RUIZ, C. C.; AGUIAR, J., Interaction, Stability, and Microenvironmental Properties of Mixed Micelles of Triton X100 and n-Alkyltrimethylammonium Bromides: Influence of Alkyl Chain Length. *Langmuir* 2000, 16, (21), 7946-7953.
- [44] CAO, J.; LU, A.; LI, C.; CAI, M.; CHEN, Y.; LI, S.; LUO, X., Effect of architecture on the micellar properties of poly (ε-caprolactone) containing sulfobetaines. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 2013, 112, 35-41.
- [45] ALI, A.; BHUSHAN, V.; MALIK, N. A.; BEHERA, K., Study of mixed micellar aqueous solutions of sodium dodecyl sulfate and amino acids. *Colloid Journal* 2013, 75, (4), 357-365.
- [46] LIU, J.; SHI, J.; LI, J.; YUAN, X., Characterization of the interaction between surfactants and enzymes by fluorescence probe. *Enzyme and Microbial Technology* 2011, 49, (4), 360-365.
- [47] CAMBÓN, A.; ALATORRE-MEDA, M.; JUÁREZ, J.; TOPETE, A.; MISTRY, D.; ATTWOOD, D.; BARBOSA, S.; TABOADA, P.; MOSQUERA, V., Micellisation of triblock copolymers of ethylene oxide and 1,2-butylene oxide: Effect of B-block length. *Journal of Colloid and Interface Science* 2011, 361, (1), 154-158.
- [48] HUMPHRY-BAKER, R.; GRÄTZEL, M.; MOROI, Y., Pyrene fluorescence at air/sodium dodecyl sulfate solution interface. *Langmuir* 2006, 22, (26), 11205-11207.
- [49] KALYANASUNDARAM, K.; THOMAS, J. K., Environmental effects on vibronic band intensities in pyrene monomer fluorescence and their application in studies of micellar systems. *Journal of the American Chemical Society* 1977, 99, (7), 2039-2044.
- [50] MAST, R. C.; HAYNES, L. V., The use of the fluorescent probes perylene and magnesium 8-anilinonaphthalene-1-sulfonate to determine the critical micelle concentration of

- surfactants in aqueous solution. *Journal of Colloid and Interface Science* 1975, 53, (1), 35-41.
- [51] MRAVEC, F.; PEKAŘ, M.; VELEBNÝ, V., Aggregation behavior of novel hyaluronan derivatives—a fluorescence probe study. *Colloid and Polymer Science* 2008, 286, (14-15), 1681-1685.
- [52] IATRIDI, Z.; DAKTILOUDIS, A.; BOKIAS, G., Investigation of binary polymer/surfactant or ternary polymer/surfactant/Cu²⁺ complexes in aqueous solution through Nile red probing. *Polymer International* 2010, 59, (8), 1168-1174.
- [53] SUBUDDHI, U.; MISHRA, A. K., Micellization of bile salts in aqueous medium: A fluorescence study. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 2007, 57, (1), 102-107.
- [54] MANDAL, D.; PAL, S. K.; BHATTACHARYYA, K., Excited-State Proton Transfer of 1-Naphthol in Micelles. *The Journal of Physical Chemistry A* 1998, 102, (48), 9710-9714.
- [55] DUTTA, P.; HALDER, A.; MUKHERJEE, S.; SEN, P.; SEN, S.; BHATTACHARYYA, K., Excited State Proton Transfer of 1-Naphthol in a Hydroxypropylcellulose/Sodium Dodecyl Sulfate System. *Langmuir* 2002, 18, (21), 7867-7871.
- [56] YU, L.; TAN, M.; HO, B.; DING, J. L.; WOHLAND, T., Determination of critical micelle concentrations and aggregation numbers by fluorescence correlation spectroscopy: Aggregation of a lipopolysaccharide. *Analytica Chimica Acta* 2006, 556, (1), 216-225.
- [57] BINANA-LIMBELÉ, W.; ZANA, R., Effect of temperature on the aggregation behavior of the nonionic surfactant C12E8 in H₂O and D₂O solutions. *Journal of Colloid and Interface Science* 1988, 121, (1), 81-84.
- [58] ALARGOVA, R.; PETKOV, J.; PETSEV, D.; IVANOV, I. B.; BROZE, G.; MEHRETEAB, A., Light scattering study of sodium dodecyl polyoxyethylene-2-sulfate micelles in the presence of multivalent counterions. *Langmuir* 1995, 11, (5), 1530-1536.
- [59] LIANOS, P.; LANG, J.; STRAZIELLE, C.; ZANA, R., Fluorescence probe study of oil-in-water microemulsions. 1. Effect of pentanol and dodecane or toluene on some properties of sodium dodecyl sulfate micelles. *Journal of Physical Chemistry* 1982, 86, (6), 1019-1025.
- [60] LIANOS, P.; LANG, J.; ZANA, R., Fluorescence probe study of oil-in-water microemulsions. 2. Effect of the nature of alcohol, oil, and surfactant on the surfactant aggregation number in the aggregates. *Journal of Physical Chemistry* 1982, 86, (24), 4809-4814.
- [61] TURRO, N. J.; YEKTA, A., Luminescent probes for detergent solutions. A simple procedure for determination of the mean aggregation number of micelles. *Journal of the American Chemical Society* 1978, 100, (18), 5951-5952.
- [62] ALARGOVA, R. G.; KOCHIJASHKY, I. I.; SIERRA, M. L.; ZANA, R., Micelle Aggregation Numbers of Surfactants in Aqueous Solutions: A Comparison between the Results from Steady-State and Time-Resolved Fluorescence Quenching. *Langmuir* 1998, 14, (19), 5412-5418.
- [63] INFELTA, P. P., Fluorescence quenching in micellar solutions and its application to the determination of aggregation numbers. *Chemical Physics Letters* 1979, 61, (1), 88-91.

- [64] INFELTA, P. P.; GRATZEL, M.; THOMAS, J. K., Luminescence decay of hydrophobic molecules solubilized in aqueous micellar systems. Kinetic model. *The Journal of Physical Chemistry* 1974, 78, (2), 190-195.
- [65] TACHIYA, M., Application of a generating function to reaction kinetics in micelles. Kinetics of quenching of luminescent probes in micelles. *Chemical Physics Letters* 1975, 33, (2), 289-292.
- [66] GEHLEN, M. H.; DE SCHRYVER, F. C., Time-resolved fluorescence quenching in micellar assemblies. *Chemical Reviews* 1993, 93, (1), 199-221.
- [67] WATTEBLED, L.; LASCHEWSKY, A.; MOUSSA, A.; HABIB-JIWAN, J.-L., Aggregation Numbers of Cationic Oligomeric Surfactants: A Time-Resolved Fluorescence Quenching Study. *Langmuir* 2006, 22, (6), 2551-2557.
- [68] ALMGREN, M.; LEOFROTH, J. E.; VAN STAM, J., Fluorescence decay kinetics in monodisperse confinements with exchange of probes and quenchers. *The Journal of Physical Chemistry* 1986, 90, (18), 4431-4437.
- [69] FRIEDRICH, L. C.; SILVA, V. O.; MOREIRA, P. F.; TCACENCO, C. M.; QUINA, F. H., Time-Resolved Fluorescence Quenching Studies of Sodium Lauryl Ether Sulfate Micelles. *Journal of the Brazilian Chemical Society* 2013, 24, (2), 241-245.
- [70] TEHRANI-BAGHA, A. R.; KARNBRATT, J.; LOFROTH, J. E.; HOLMBERG, K., Cationic ester-containing gemini surfactants: Determination of aggregation numbers by time-resolved fluorescence quenching. *Journal of Colloid and Interface Science* 2012, 376, 126-132.
- [71] TEHRANI-BAGHA, A. R.; HOLMBERG, K.; NYDEN, M.; NORDSTIERNA, L., Micelle growth of cationic gemini surfactants studied by NMR and by time-resolved fluorescence quenching. *Journal of Colloid and Interface Science* 2013, 405, 145-149.
- [72] NASKAR, B.; DAN, A.; GHOSH, S.; ASWAL, V. K.; MOULIK, S. P., Revisiting the self-aggregation behavior of cetyltrimethylammonium bromide in aqueous sodium salt solution with varied anions. *Journal of Molecular Liquids* 2012, 170, 1-10.
- [73] KOMAROMY-HILLER, G.; VONWANDRUSZKA, R., Anisotropy changes of a fluorescent probe during the micellar growth and clouding of a nonionic detergent. *Journal of Colloid and Interface Science* 1996, 177, (1), 156-161.
- [74] RUIZ, C. C., Fluorescence anisotropy of probes solubilized in micelles of tetradecyltrimethylammonium bromide: Effect of ethylene glycol added. *Journal of Colloid and Interface Science* 2000, 221, (2), 262-267.
- [75] ZHANG, X. G.; KIRSCH, L. E., Correlation of the thermal stability of phospholipid-based emulsions and the microviscosity measurements using fluorescence polarization. *Pharmaceutical Development and Technology* 2004, 9, (2), 219-227.
- [76] BENESI, H. A.; HILDEBRAND, J. H., A Spectrophotometric Investigation of the Interaction of Iodine with Aromatic Hydrocarbons. *Journal of the American Chemical Society* 1949, 71, (8), 2703-2707.
- [77] MALLICK, A.; HALDAR, B.; CHATTOPADHYAY, N., Spectroscopic Investigation on the Interaction of ICT Probe 3-Acetyl-4-oxo-6,7-dihydro-12H Indolo-[2,3-a] Quinolizine with Serum Albumins. *The Journal of Physical Chemistry B* 2005, 109, (30), 14683-14690

- [78] FENG, X.-Z.; LIN, Z.; YANG, L.-J.; WANG, C.; BAI, C.-l., Investigation of the interaction between acridine orange and bovine serum albumin. *Talanta* 1998, 47, (5), 1223-1229.
- [79] PAL, B.; BAJPAI, P. K.; BASU BAUL, T. S., Binding of 5-(2'-carboxyphenyl)azoquinolin-8-ol to bovine serum albumin: a spectroscopic study. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 2000, 56, (12), 2453-2458.
- [80] LESSING, H. E.; VON JENA, A., Rotational diffusion of dyes in micellar media from transient absorption. *Chemical Physics* 1979, 41, (3), 395-406.
- [81] KAWATO, S.; KINOSITA Jr, K.; IKEGAMI, A., Dynamic structure of lipid bilayers studied by nanosecond fluorescence techniques. *Biochemistry* 1977, 16, (11), 2319-2324.
- [82] KINOSITA Jr, K.; IKEGAMI, A.; KAWATO, S., On the wobbling-in-cone analysis of fluorescence anisotropy decay. *Biophysical Journal* 1982, 37, (2), 461-464.
- [83] QUITEVIS, E. L.; MARCUS, A. H.; FAYER, M. D., Dynamics of ionic lipophilic probes in micelles: Picosecond fluorescence depolarization measurements. *Journal of Physical Chemistry* 1993, 97, (21), 5762-5769.
- [84] DAS, R.; DUPORTAIL, G.; RICHERT, L.; KLYMCHENKO, A.; MÉLY, Y., Sensing Micelle Hydration by Proton-Transfer Dynamics of a 3-Hydroxychromone Dye: Role of the Surfactant Headgroup and Chain Length. *Langmuir* 2012, 28, (18), 7147-7159.
- [85] HINK, M. A.; VAN HOEK, A.; VISSER, A., Dynamics of phospholipid molecules in micelles: Characterization with fluorescence correlation spectroscopy and time-resolved fluorescence anisotropy. *Langmuir* 1999, 15, (4), 992-997.
- [86] BOLDYREV, I. A.; ZHAI, X.; MOMSEN, M. M.; BROCKMAN, H. L.; BROWN, R. E.; MOLOTKOVSKY, J. G., New BODIPY lipid probes for fluorescence studies of membranes. *Journal of Lipid Research* 2007, 48, (7), 1518-1532.
- [87] PATEL, A. B.; KHUMSUPAN, P.; NARAYANASWAMI, V., Pyrene fluorescence analysis offers new insights into the conformation of the lipoprotein-binding domain of human apolipoprotein E. *Biochemistry* 2010, 49, (8), 1766-1775.
- [88] BORISSEVITCH, I. E.; BORGES, C. P. F.; YUSHMANOV, V. E.; TABAK, M., Localization of dipyrindamole molecules in ionic micelles: Effect of micelle and drug charges. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes* 1995, 1238, (1), 57-62.
- [89] ZUCKER, S. D.; GOESSLING, W.; BOOTLE, E. J.; STERRITT, C., Localization of bilirubin in phospholipid bilayers by parallax analysis of fluorescence quenching. *Journal of Lipid Research* 2001, 42, (9), 1377-1388.
- [90] DE CASTRO, B.; GAMEIRO, P.; LIMA, J.; MATOS, C.; REIS, S., Location and partition coefficients of anti-inflammatory drugs in EPC liposomes. A fluorescence quenching study using n-(9-anthroyloxy)-stearic probes. *Colloids and Surfaces a-Physicochemical and Engineering Aspects* 2001, 190, (1-2), 205-212.
- [91] FERREIRA, H.; LUCIO, M.; DE CASTRO, B.; GAMEIRO, P.; LIMA, J.; REIS, S., Partition and location of nimesulide in EPC liposomes: a spectrophotometric and fluorescence study. *Anal Bioanal Chem* 2003, 377, (2), 293-298.

- [92] SANCHEZ, J. M.; TURINA, A. D.; PERILLO, M. A., Spectroscopic probing of ortho-nitrophenol localization in phospholipid bilayers. *Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology* 2007, 89, (1), 56-62.
- [93] AHLNAES, T.; SOEDERMAN, O.; HJELM, C.; LINDMAN, B., Carbon-13 nuclear magnetic resonance relaxation in microemulsions. Aggregation in the extensive solution phase of the sodium octanoate-octanoic acid-water system. *The Journal of Physical Chemistry* 1983, 87, (5), 822-828.
- [94] WALDERHAUG, H.; SOEDERMAN, O.; STILBS, P., Micellar dynamics and organization. A multifold carbon-13 NMR spin-lattice relaxation and {proton} carbon-13 nuclear Overhauser effect study. *The Journal of Physical Chemistry* 1984, 88, (8), 1655-1662.
- [95] EDWARD, J. T., Molecular volumes and the Stokes-Einstein equation. *Journal of Chemical Education* 1970, 47, (4), 261.
- [96] MAITI, N. C.; KRISHNA, M. M. G.; BRITTO, P. J.; PERIASAMY, N., Fluorescence Dynamics of Dye Probes in Micelles. *The Journal of Physical Chemistry B* 1997, 101, (51), 11051-11060.
- [97] PERIASAMY, N., Molecular dynamics of guest molecules in micelles: Models based on fluorescence polarization dynamics. *Journal of Fluorescence* 2001, 11, (3), 161-166.
- [98] BERNSDORFF, C.; WOLF, A.; WINTER, R.; GRATTON, E., Effect of hydrostatic pressure on water penetration and rotational dynamics in phospholipid-cholesterol bilayers. *Biophysical Journal* 1997, 72, (3), 1264-1277.
- [99] HOMMA, R.; KOUYAMA, T.; YAMADA, M.; NIIMURA, Y.; KRIVOSHEEV, A. V.; HARA, T.; KAWATO, S., Time-resolved study of effect of chlorpromazine on mobility of cytochrome P-450 and phospholipids in the inner membrane of adrenocortical mitochondria. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 1997, 15, (9-10), 1215-1222.
- [100] PRAZERES, T. J. V.; FEDOROV, A.; MARTINHO, J. M. G., Dynamics of oligonucleotides adsorbed on thermosensitive core-shell latex particles. *Journal of Physical Chemistry B* 2004, 108, (26), 9032-9041.
- [101] CHOUDHURY, S. D.; KUMBHAKAR, M.; NATH, S.; PAL, H., Photoinduced bimolecular electron transfer kinetics in small unilamellar vesicles. *Journal of Chemical Physics* 2007, 127, (19).
- [102] SAITO, H.; SHINODA, W.; MIKAMI, M., Fluorination effects on structure and dynamics of phospholipid bilayer: A molecular dynamics study. *Chemical Physics Letters* 2009, 468, (4-6), 260-263.
- [103] ANDOH, Y.; OKAZAKI, S.; UEOKA, R., Molecular dynamics study of lipid bilayers modeling the plasma membranes of normal murine thymocytes and leukemic GRSL cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 2013, 1828, (4), 1259-1270.
- [104] SWALLEN, S. F.; ZHU, Z.; MOORE, J. S.; KOPELMAN, R., Correlated Excimer Formation and Molecular Rotational Dynamics in Phenylacetylene Dendrimers†. *The Journal of Physical Chemistry B* 2000, 104, (16), 3988-3995.

- [105] KIM, J.-H.; DOMACH, M. M.; TILTON, R. D., Pyrene Micropartitioning and Solubilization by Sodium Dodecyl Sulfate Complexes with Poly(ethylene glycol). *The Journal of Physical Chemistry B* 1999, 103, (48), 10582-10590.
- [106] QIU, Q.; SOMASUNDARAN, P.; PETHICA, B. A., Hydrophobic complexation of poly(vinyl caprolactam) with sodium dodecyl sulfate and dodecyltrimethylammonium bromide in solution. *Langmuir* 2002, 18, (9), 3482-3486.
- [107] NIZRI, G.; MAGDASSI, S., Solubilization of hydrophobic molecules in nanoparticles formed by polymer–surfactant interactions. *Journal of Colloid and Interface Science* 2005, 291, (1), 169-174.
- [108] PRASAD, K.; TRIVEDI, K. P.; SIDDHANTA, A. K.; BHATTACHARYA, A., Surface tension and fluorescence studies of polysaccharide-surfactant solutions: Agar-CTAB. *Indian Journal of Chemistry Section a-Inorganic Bio-Inorganic Physical Theoretical & Analytical Chemistry* 2005, 44, (12), 2445-2449.
- [109] FELIPPE, A. C.; SCHWEITZER, B.; DAL BO, A. G.; EISING, R.; MINATTI, E.; ZANETTE, D., Self-association of sodium cholate with poly(ethylene oxide) cooperatively induced by sodium dodecyl sulfate. *Colloids and Surfaces a-Physicochemical and Engineering Aspects* 2007, 294, (1-3), 247-253.
- [110] BELLETTINI, I. C.; NANDI, L. G.; EISING, R.; DOMINGOS, J. B.; MACHADO, V. G.; MINATTI, E., Properties of aqueous solutions of hydrophobically modified polyethylene imines in the absence and presence of sodium dodecylsulfate. *Journal of Colloid and Interface Science* 2012, 370, 94-101.
- [111] SEN, S.; SUKUL, D.; DUTTA, P.; BHATTACHARYYA, K., Fluorescence Anisotropy Decay in Polymer–Surfactant Aggregates. *The Journal of Physical Chemistry A* 2001, 105, (32), 7495-7500.
- [112] GIESTAS, L.; YIHWAN, C.; LIMA, J. C.; VAUTIER-GIONGO, C.; LOPES, A.; MAÇANITA, A. L.; QUINA, F. H., The Dynamics of Ultrafast Excited State Proton Transfer in Anionic Micelles†. *The Journal of Physical Chemistry A* 2003, 107, (18), 3263-3269.
- [113] MISHRA, H.; JOSHI, H. C.; TRIPATHI, H. B.; MAHESHWARY, S.; SATHYAMURTHY, N.; PANDA, M.; CHANDRASEKHAR, J., Photoinduced proton transfer in 3-hydroxy-2-naphthoic acid. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* 2001, 139, (1), 23-36.
- [114] MAITY, S. S.; SAMANTA, S.; SARDAR, P. S.; PAL, A.; DASGUPTA, S.; GHOSH, S., Fluorescence, anisotropy and docking studies of proteins through excited state intramolecular proton transfer probe molecules. *Chemical Physics* 2008, 354, (1-3), 162-173.
- [115] SARDAR, P. S.; SAMANTA, S.; MAITY, S. S.; DASGUPTA, S.; GHOSH, S., Energy transfer photophysics from serum albumins to sequestered 3-hydroxy-2-naphthoic acid, an excited state intramolecular proton-transfer probe. *Journal of Physical Chemistry B* 2008, 112, (11), 3451-3461.
- [116] CANADA-CANADA, F.; RODRIGUEZ-CACERES, M. I., Spectrofluorimetric determination of 3-hydroxy-2-naphthoic acid by use of its ternary complex with

- zirconium (IV) and beta-cyclodextrin: Application to determination in river water. *Journal of Fluorescence* 2007, 17, (1), 23-28.
- [117] WEBB, S. P.; YEH, S. W.; PHILIPS, L. A.; TOLBERT, M. A.; CLARK, J. H., Ultrafast excited-state proton transfer in 1-naphthol. *Journal of the American Chemical Society* 1984, 106, (23), 7286-7288.
- [118] LEE, J.; ROBINSON, G. W.; WEBB, S. P.; PHILIPS, L. A.; CLARK, J. H., Hydration dynamics of protons from photon initiated acids. *Journal of the American Chemical Society* 1986, 108, (21), 6538-6542.
- [119] RAKSHIT, S.; SAHA, R.; VERMA, P. K.; PAL, S. K., Role of Solvation Dynamics in Excited State Proton Transfer of 1-Naphthol in Nanoscopic Water Clusters Formed in a Hydrophobic Solvent. *Photochemistry and Photobiology* 2012, 88, (4), 851-859.
- [120] KUMAR, A. C.; MISHRA, A. K., 1-Naphthol as an excited state proton transfer fluorescent probe for sensing bound-water hydration of polyvinyl alcohol. *Talanta* 2007, 71, (5), 2003-2006.
- [121] KNOCHENMUSS, R.; LEUTWYLER, S., Proton transfer from 1-naphthol to water: Small clusters to the bulk. *The Journal of Chemical Physics* 1989, 91, (2), 1268-1278.
- [122] YOSHINO, R.; HASHIMOTO, K.; OMI, T.; ISHIUCHI, S.-i.; FUJII, M., Structure of 1-Naphthol–Water Clusters Studied by IR Dip Spectroscopy and Ab Initio Molecular Orbital Calculations. *The Journal of Physical Chemistry A* 1998, 102, (31), 6227-6233.
- [123] SPRY, D. B.; GOUN, A.; GLUSAC, K.; MOILANEN, D. E.; FAYER, M. D., Proton Transport and the Water Environment in Nafion Fuel Cell Membranes and AOT Reverse Micelles. *Journal of the American Chemical Society* 2007, 129, (26), 8122-8130.
- [124] SOLNTSEV, K. M.; IL'ICHEV, Y. V.; DEMYASHKEVICH, A. B.; KUZMIN, M. G., Excited-state, proton-transfer reactions of substituted naphthols in micelles. Comparative study of reactions of 2-naphthol and its long-chain alkyl derivatives in micellar solutions of cetyltrimethylammonium bromide. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* 1994, 78, (1), 39-48.
- [125] COHEN, B.; HUPPERT, D.; SOLNTSEV, K. M.; TSFADIA, Y.; NACHLIEL, E.; GUTMAN, M., Excited State Proton Transfer in Reverse Micelles. *Journal of the American Chemical Society* 2002, 124, (25), 7539-7547.
- [126] MONDAL, S. K.; ROY, D.; SAHU, K.; SEN, P.; KARMAKAR, R.; BHATTACHARYYA, K., Hydration dynamics of 4-aminophthalimide in a substituted β -cyclodextrin nanocavity. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* 2005, 173, (3), 334-339.
- [127] PAHARI, B.; CHAKRABORTY, S.; SENGUPTA, P. K., Encapsulation of 3-hydroxyflavone in γ -cyclodextrin nanocavities: Excited state proton transfer fluorescence and molecular docking studies. *Journal of Molecular Structure* 2011, 1006, (1–3), 483-488.
- [128] SAHU, K.; ROY, D.; MONDAL, S. K.; KARMAKAR, R.; BHATTACHARYYA, K., Study of protein–surfactant interaction using excited state proton transfer. *Chemical Physics Letters* 2005, 404, (4–6), 341-345.

- [129] GHOSH, S.; DEY, S.; MANDAL, U.; ADHIKARI, A.; MONDAL, S. K.; BHATTACHARYYA, K., Ultrafast Proton Transfer of Pyranine in a Supramolecular Assembly: PEO–PPO–PEO Triblock Copolymer and CTAC. *The Journal of Physical Chemistry B* 2007, 111, (48), 13504-13510.
- [130] KOMBAROVA, S. V.; ILICHEV, Y. V., Excited-State Proton Transfer in Complexes of Poly(methacrylic acid) with Dodecyltrimethylammonium Chloride. *Langmuir* 2004, 20, (15), 6158-6164.
- [131] FRAHN, M. S.; LUTHJENS, L. H.; WARMAN, J. M., Time-resolved emission spectra of fluoroprobe and maleimido-fluoroprobe before, during, and after sudden vitrification of radiation-polymerized methyl methacrylate. *Journal of Physical Chemistry B* 2004, 108, (9), 2839-2845.
- [132] KUBICKI, A. A., Time-resolved emission spectra of stilbene derivatives in various solvents. *Chemical Physics Letters* 2009, 483, (4-6), 268-272.
- [133] KOTI, A. S. R.; KRISHNA, M. M. G.; PERIASAMY, N., Time-Resolved Area-Normalized Emission Spectroscopy (TRANES): A Novel Method for Confirming Emission from Two Excited States. *The Journal of Physical Chemistry A* 2001, 105, (10), 1767-1771.
- [134] KOTI, A. S. R.; PERIASAMY, N., TRANES analysis of the fluorescence of Nile Red in organized molecular assemblies confirms emission from two species. *J Chem Sci* 2001, 113, (2), 157-163.
- [135] KOTI, A. S. R.; PERIASAMY, N., Application of time resolved area normalized emission spectroscopy to multicomponent systems. *Journal of Chemical Physics* 2001, 115, (15), 7094-7099.
- [136] IRA; KOTI, A. S. R.; KRISHNAMOORTHY, G.; PERIASAMY, N., TRANES Spectra of Fluorescence Probes in Lipid Bilayer Membranes: An Assessment of Population Heterogeneity and Dynamics. *Journal of Fluorescence* 2003, 13, (1), 95-103.
- [137] OTOSU, T.; NISHIMOTO, E.; YAMASHITA, S., Fluorescence Decay Characteristics of Indole Compounds Revealed by Time-Resolved Area-Normalized Emission Spectroscopy. *Journal of Physical Chemistry A* 2009, 113, (12), 2847-2853.
- [138] MOSCHAKIS, Thomas. Microrheology and particle tracking in food gels and emulsions. *Current Opinion in Colloid*. 2013, 18(4), 311-323. DOI: 10.1016/j.cocis.2013.04.011. ISSN 13590294. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S135902941300068X>
- [139] VINCENT, R. R., D. N. PINDER, Y. HEMAR a M. A. K. WILLIAMS. Microrheological studies reveal semiflexible networks in gels of a ubiquitous cell wall polysaccharide. *Physical Review E*. 2007, 76(3), -. DOI: 10.1103/PhysRevE.76.031909. ISSN 1539-3755. Dostupné také z: <https://link.aps.org/doi/10.1103/PhysRevE.76.031909>
- [140] COHEN, Itai a Daphne WEIHS. Rheology and microrheology of natural and reduced-calorie Israeli honeys as a model for high-viscosity Newtonian liquids. *Journal of Food Engineering*. 2010, 100(2), 366-371. DOI: 10.1016/j.jfoodeng.2010.04.023. ISSN 02608774. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0260877410002190>

- [141] CRIELAARD, B.J., A. YOUSEFI, J.P. SCHILLEMANS, C. VERMEHREN, K. BUYENS, K. BRAECKMANS, T. LAMMERS a G. STORM. An in vitro assay based on surface plasmon resonance to predict the in vivo circulation kinetics of liposomes. *Journal of Controlled Release*. 2011, 156(3), 307-314. DOI: 10.1016/j.jconrel.2011.07.023. ISSN 01683659. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168365911005025>
- [142] SCHULTZ, Kelly M. a Eric M. FURST. Microrheology of biomaterial hydrogelators. *Soft Matter*. 2012, 8(23), 6198-. DOI: 10.1039/c2sm25187f. ISSN 1744-683x. Dostupné také z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=c2sm25187f>
- [143] WEIHS, Daphne, Thomas G. MASON a Michael A. TEITELL. Bio-Microrheology: A Frontier in Microrheology. *Biophysical Journal*. 2006, 91(11), 4296-4305. DOI: 10.1529/biophysj.106.081109. ISSN 00063495. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006349506721439>
- [144] WAIGH, Thomas Andrew. Advances in the microrheology of complex fluids. *Reports on Progress in Physics*. 2016, 79(7), 074601-. DOI: 10.1088/0034-4885/79/7/074601. ISSN 0034-4885. Dostupné také z: <http://stacks.iop.org/0034-4885/79/i=7/a=074601?key=crossref.8ebdbf7bce18e765429ed7964c6bf245>
- [145] RATHGEBER, Silke, Hans-Josef BEAUVISAGE, Hubert CHEVREAU, Norbert WILLENBACHER a Claude OELSCHLAEGER. Microrheology with Fluorescence Correlation Spectroscopy. *Langmuir*. 2009, 25(11): 6368-6376. DOI: 10.1021/la804170k. ISSN 0743-7463
- [146] GUIGAS, Gernot, Claudia KALLA a Matthias WEISS. Probing the Nanoscale Viscoelasticity of Intracellular Fluids in Living Cells. *Biophysical Journal*. 2007, 93(1), 316-323. DOI: 10.1529/biophysj.106.099267. ISSN 00063495. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006349507712845>
- [147] KOYNOV, Kaloian a Hans-Jürgen BUTT. Fluorescence correlation spectroscopy in colloid and interface science. *Current Opinion in Colloid*. 2012, 17(6), 377-387. DOI: 10.1016/j.cocis.2012.09.003. ISSN 13590294. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1359029412000994>
- [148] MACHÁŇ, Radek a Thorsten WOHLAND. Recent applications of fluorescence correlation spectroscopy in live systems. *FEBS Letters*. 2014, 588(19), 3571-3584. DOI: 10.1016/j.febslet.2014.03.056. ISSN 00145793. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1016/j.febslet.2014.03.056>
- [149] MONDEK, Jakub, Michal KALINA, Vasile SIMULESCU a Miloslav PEKAŘ. Thermal degradation of high molar mass hyaluronan in solution and in powder; comparison with BSA. *Polymer Degradation and Stability*. 2015, 120: 107-113. DOI: 10.1016/j.polymdegradstab.2015.06.012. ISSN 01413910. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0141391015300239>
- [150] SIMULESCU, Vasile, Jakub MONDEK, Michal KALINA a Miloslav PEKAŘ. Kinetics of long-term degradation of different molar mass hyaluronan solutions studied by SEC-MALLS. *Polymer Degradation and Stability*. 2015, 111: 257-262. DOI: 10.1016/j.polymdegradstab.2014.12.005. ISSN 01413910. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0141391014004388>

- [151] SIMULESCU, Vasile, Michal KALINA, Jakub MONDEK a Miloslav PEKAŘ. Long-term degradation study of hyaluronic acid in aqueous solutions without protection against microorganisms. *Carbohydrate Polymers*. 2016, 137, 664-668. DOI: 10.1016/j.carbpol.2015.10.101. ISSN 01448617. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0144861715010814>
- [152] MONDEK, Jakub a Miloslav PEKAŘ. The change in excited-state proton transfer kinetics of 1-naphthol in micelles upon the binding of polymers: The influence of hyaluronan hydration. *Carbohydrate Polymers*. 2015, 129, 168-174. DOI: 10.1016/j.carbpol.2015.04.060. ISSN 01448617. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0144861715003768>
- [153] KARGEROVÁ, A. a M. PEKAŘ. Densitometry and ultrasound velocimetry of hyaluronan solutions in water and in sodium chloride solution. *Carbohydrate Polymers*. 2014, 106, 453-459. DOI: 10.1016/j.carbpol.2014.01.020. ISSN 01448617. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0144861714000228>
- [154] MONDEK, Jakub, Filip MRAVEC, Tereza HALASOVÁ, Zuzana HNYLUCHOVÁ a Miloslav PEKAŘ. Formation and Dissociation of the Acridine Orange Dimer as a Tool for Studying Polyelectrolyte–Surfactant Interactions. *Langmuir*. 2014, 30(29): 8726-8734. DOI: 10.1021/la502011s. ISSN 0743-7463. Dostupné také z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/la502011s>
- [155] ČERMÁKOVÁ, Ludmila, Jitka ROSENDORFOVÁ a Miroslav MALÁT. Determination of critical micelle concentration of 1-carbethoxypentadecyltrimethylammonium bromide. *Collection of Czechoslovak Chemical Communications* [online]. 1980, 45(1), 210-213 [cit. 2017-10-05]. DOI: 10.1135/cccc19800210. ISSN 0010-0765. Dostupné z: <http://cccc.uochb.cas.cz/45/1/0210/>
- [156] MÜLLER, C. B., A. LOMAN, V. PACHECO, F. KOBERLING, D. WILLBOLD, W. RICHTERING a J. ENDERLEIN. Precise measurement of diffusion by multi-color dual-focus fluorescence correlation spectroscopy. *EPL (Europhysics Letters)*. 2008, 83(4): 46001-. DOI: 10.1209/0295-5075/83/46001. ISSN 0295-5075.
- [157] DERTINGER, Thomas, Victor PACHECO, Iris VON DER HOCHT, Rudolf HARTMANN, Ingo GREGOR a Jörg ENDERLEIN. Two-Focus Fluorescence Correlation Spectroscopy: A New Tool for Accurate and Absolute Diffusion Measurements. *ChemPhysChem*. 2007, 8(3): 433-443. DOI: 10.1002/cphc.200600638. ISSN 14394235
- [158] ENDERLEIN, Jörg, Ingo GREGOR, Digambara PATRA, Thomas DERTINGER a U. Benjamin KAUPP. Performance of Fluorescence Correlation Spectroscopy for Measuring Diffusion and Concentration. *ChemPhysChem*. 2005, 6(11), 2324-2336. DOI: 10.1002/cphc.200500414. ISSN 1439-4235. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/cphc.200500414>

8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

PAL	povrchově aktivní látky
CMC	kritická micelární koncentrace
CAC	kritická agregační koncentrace
CTAB	cetyltrimethylamonium bromid
CTAC	cetyltrimethylamonium chlorid
SDS	dodecylsírán sodný
Triton X-100	polyoxyethylen(9,5)oktylfenol
PVP	poly(vinylpyrrolidonu)
TCSPC	time-correlated single photon counting
EmPI	emisní polaritní index
k_r	rychlost zářivého přechodu
k_{nr}	rychlost nezářivého přechodu
Φ	kvantový výtěžek fluorescence
τ_s	doba života excitovaného stavu
τ_r	přírodní doba života
λ	vlnová délka
S0	základní singletová hladina
S*	excitovaný singlet
T*	excitovaný triplet
[A]	koncentrace látky A
[A*]	koncentrace látky A v excitovaném stavu
r	anizotropie fluorescence
I_{\parallel}	intenzita fluorescence při paralelní orientaci polarizátoru
I_{\perp}	intenzita fluorescence při vertikální orientaci polarizátoru
G	G faktor
S_v	citlivost emisního kanálu pro vertikálně orientovanou komponentu
S_H	citlivost emisního kanálu pro horizontálně orientovanou komponentu
I_{VV}	vertikálně polarizovaná intenzita fluorescence

I_{VH}	horizontálně polarizovaná intenzita fluorescence
r_0	počáteční anizotropie
r_∞	limitní anizotropie
θ	rotační korelační čas
F	intenzita fluorescence v přítomnosti zhášedce
F0	intenzita fluorescence v nepřítomnosti zhášedce (polymeru)
k_q	rychlostní konstanta zhášení
τ_0	doba života fluoroforu bez přítomnosti zhášedce
[Q]	koncentrace zhášedce
K_D	Stern-Volmerova konstanta zhášení
V_q	objem zhášedcí sféry
N_a	Avogadrova konstanta
K_S	konstanta stability nefluorescentního komplexu = Stern-Volmerova konstanta statického zhášení tvorbou nefluorescentního komplexu
γ	rychlost vyhasínání fluorescence v nepřítomnosti zhášedce
x	celková koncentrace tenzidu
A_1	horní limita sigmoidní křivky
A_2	dolní limita sigmoidní křivky
x_0	inflexní bod sigmoidní křivky
Δx	gradient sigmoidní křivky
[S]	koncentrace tenzidu
N_{SS}	agregační číslo určené pomocí stacionární metody
C	poměr koncentrace zhášedce a micel
N_D	agregační číslo určené pomocí časově-rozlišené metody
F(0)	intenzita fluorescence v čase 0
F(t)	intenzita fluorescence v čase t
F_x	intenzita fluorescence při vzrůstající koncentraci polymeru
F_∞	intenzita fluorescence při limitní koncentraci polymeru
[L]	koncentrace polymeru

K	vazebná konstanta
F_b	frakce vázané fluorescenční sondy
F_f	frakce volné fluorescenční sondy
r_x	anizotropie při vzrůstající koncentraci polymeru
r_f	anizotropie volné sondy
r_b	anizotropie vázané sondy
R	poměr kvantových výtěžků volné a vázané sondy
τ_w	časová konstanta kolíbatého pohybu
τ_L	časová konstanta laterální difuze
τ_M	časová konstanta rotace micely
S	prostorové omezení pohybu
α	relativní amplituda
D_t	difuzní koeficient translační difuze
D_w	difuzní koeficient rotačního pohybu
ζ, ζ'	korekční faktor pro n esf érick é molekuly
$(A^* \dots H_3O^+)$	rozčleněný pár
k_{rec}	rychlostní konstanta rekombinace
k_{PT}	rychlostní konstanta deprotonace
k_{diss}	rychlostní konstanta disociace rozčleněného páru
$k_p [H^+]_w$	zpětná protonace excitovaného stavu
k_A	rychlostní konstanta vyhasínání excitované molekuly A^*
ESIPT	intramolekulární deprotonace v excitovaném stavu
ESPT	intermolekulární deprotonace v excitovaném stavu
3HNA	3-hydroxy-2-naftolová kyselina
FHC	2-(2'-furyl)-3-hydroxychromon
PVA	polyvinyl alkohol
TRES	časově-rozlišené emisní spektrum
TRANES	časově-rozlišené přes plochu normalizované emisní spektrum

HPTS	1-hydroxy-3,6,8-pyrentrisulfonová kyselina
MPTS	1-metoxy-3,6,8-pyrentrisulfonová kyselina
AOT	aerosol OT
$I(\lambda, t)$	intenzita fluorescence v určitém čase po excitaci při určité emisní vlnové délce
$I_{ss}(\lambda)$	intenzita fluorescence při určité emisní vlnové délce
$I_N(\lambda, t)$	normalizovaná intenzita fluorescence v určitém čase po excitaci při určité emisní vlnové délce
S_0	plocha pod křivkou v čase $t = 0$
S_t	plocha pod křivkou v čase $t = t$
KMC	Karboxymethyl celulóza
FCS	Fluorescenční korelační spektroskopie
FLCS	Časově-rozlišená fluorescenční korelační spektroskopie
PSF	Rozptylová funkce (point spread function)
MSD	Střední posuv částic
DLS	Dynamický rozptyl světla

9 SEZNAM TABULEK

- Tabulka 1: Doby života a příslušné relativní amplitudy 3HNA (30 $\mu\text{mol/L}$) v prostředí PVP a BSA
- Tabulka 2: Doby života a příslušné relativní amplitudy 3HNA (30 $\mu\text{mol/L}$) v prostředí hyaluronanu a KMC
- Tabulka 3: Rychlostní konstanty deprotonace (k_{pt}), rekombinace (k_{rec}) a disociace (k_{diss}) a rychlostní konstanty vyhasínání neutrální (k_{ROH}) a aniontové formy (k_{RO^-}) 1-naftolu
- Tabulka 4: Rychlostní konstanty deprotonace (k_{pt}), rekombinace (k_{rec}) a disociace (k_{diss}) a rychlostní konstanty vyhasínání neutrální (k_{ROH}) a aniontové formy (k_{RO^-}) 1-naftolu
- Tabulka 5: Rychlostní konstanty deprotonace (k_{pt}), rekombinace (k_{rec}) a disociace (k_{diss}) a rychlostní konstanty vyhasínání neutrální (k_{ROH}) a aniontové formy (k_{RO^-}) 1-naftolu
- Tabulka 6: Naměřené hodnoty indexu lomu pro vzorky hyaluronanu, vody a glycerolu

Tabulka 7: Rychlostní konstanty deprotonace (k_{pt}), rekombinace (k_{rec}) a disociace (k_{diss}) a rychlostní konstanty vyhasínání neutrální (k_{ROH}) a aniontové formy (k_{RO^-}) 1-naftolu v CTAB

Tabulka 8: Rychlostní konstanty deprotonace (k_{pt}), rekombinace (k_{rec}) a disociace (k_{diss}) a rychlostní konstanty vyhasínání neutrální (k_{ROH}) a aniontové formy (k_{RO^-}) pro sondu HPTS v micelách CTAB

Tabulka 9: Doby života fluorescenční sondy 3HNA v micelách CTAB

10 SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. 1 Základní singletový, excitovaný singletový a excitovaný tripletový stav

Obr. 2 Jablůnskiho diagram – energetické přechody při vzniku fluorescence a fosforescence. Přechody: VR – vibrační relaxace, VK – vnitřní konverze, MP – mezisystémový přechod

Obr. 3 Příklady fluoroforů, jejich kvantové výtěžky fluorescence Φ_F a doby života (τ_s) [1]

Obr. 4 Schéma měření anizotropie fluorescence [4]

Obr. 5 Stern-Volmerův graf pro dynamické zhášení a schéma mechanismu dynamického zhášení [4]

Obr. 6 Porovnání dynamického a statického zhášení [4]

Obr. 7 Schéma statického zhášení [4]

Obr. 8 Příklad zhášení v aktivní sféře. Zhášení NATA (N-acetyl-L-tryptophanamide) pomocí akrylamidu [12]

Obr. 9 Schéma statického zhášení tvorbou nefluorescentního komplexu v základním stavu a schéma závislosti poměru intenzity fluorescence v nepřítomnosti a v přítomnosti zhášeče na koncentraci zhášeče [4]

Obr. 10 Amfifilní molekula (tenzid)

Obr. 11 Struktura micely

Obr. 12 Struktura obrácené (reverzní) micely

Obr. 13 Solubilizace a) kosurfaktantů, b) nepolárních látek, c) polárních látek solubilizovaných na povrchu micely

Obr. 14 Chemická struktura kyseliny hyaluronové

Obr. 15 Struktura PSS

Obr. 16 Struktura PVP

Obr. 17 Ideální struktura karboxymethyl celulózy se stupněm substituce 1

Obr. 18 Schéma pohybu začleněné částice ve vzorku

- Obr. 19 Schéma tvorby MSD
- Obr. 20 Schéma obecného principu FCS
- Obr. 21 Příklad odstranění rozptýleného světla pomocí FLCS
- Obr. 22 Autokorelační funkce intenzity rozptýleného záření v logaritmické podobě [38]
- Obr. 23 Závislost emisního polaritního indexu na koncentraci tenzidu (osa x je zobrazena v logaritmickém měřítku) [41]
- Obr. 24 Schématické zobrazení pyrenových derivátů, zhášeců a jejich předpokládané pozice ve fosfolipidové dvojvrstvě [5]
- Obr. 25 Modely molekulární dynamiky n esféric kých molekul v micelle. Model 1: Molekula těsně vázaná na micelu. Model 2: Molekula volně rotující v micelle. Model 3: Rotace molekuly je omezena na „kolíbání“ v omezeném prostoru micely. Model 4: Rotace molekuly je omezena, ale probíhá volná translační difuze [96], [97]
- Obr. 26 Nahoře: a) Iontová b) neiontová micela. Dole: Schéma nevratné deprotonace v excitovaném stavu [84]
- Obr. 27 Schématické znázornění solvatace v excitovaném stavu 1-naftolu při přenosu protonu [119]
- Obr. 28 a) Časově rozlišená emisní spektra b) časově rozlišená přes plochu normalizovaná emisní spektra 2-naftolu v pufru [133]
- Obr. 29 Schéma jednopaprskového spektrofluorimetru HORIBA Jobin Yvon
- Obr. 30 Schéma instrumentace pro časově rozlišenou fluorescenci [4]
- Obr. 31 Schéma UV-VIS spektrofotometru
- Obr. 32 Závislost $[F_{\infty} - F_0]/[F_x - F_0]$ na reciproké koncentraci PVP a BSA monitorující ESIPT emisi 3HNA (30 $\mu\text{mol/L}$)
- Obr. 33 Závislost hodnot anizotropie na koncentraci polymerů. Vložený graf značí závislost, ze které byla počítána vazebná konstanta
- Obr. 34 Závislost $[F_{\infty} - F_0]/[F_x - F_0]$ na reciproké koncentraci HyA a KMC monitorující ESIPT emisi 3HNA (30 $\mu\text{mol/L}$)
- Obr. 35 Závislost hodnot anizotropie na koncentraci polymerů
- Obr. 36 Porovnání vyhasinacích křivek 3HNA bez a v přítomnosti polymeru. Osa x je zobrazena jako kanál (1 kanál představuje 0,22 ns pro 1 exponenciální pokles a 0,11 ns pro 2 exponenciální pokles) kvůli jednoduššímu srovnání obou tvarů obou křivek.
- Obr. 37 Závislost intenzity neutrální formy naftolu ($\lambda = 350 \text{ nm}$) a EmPI na koncentraci tenzidu
- Obr. 38 Emisní spektra 1-naftolu ve vodě (- -), 6 mM CTAB (- • -) a v 80% směsi methanol-voda (---)
- Obr. 39 Závislost intenzity neutrální formy HPTS ($\lambda = 420 \text{ nm}$) a EmPI na koncentraci tenzidu

- Obr. 40 Emisní spektra HPTS ve vodě (- -), 6 mM CTAB (- • -)
- Obr. 41 Závislost intenzity aniontové formy 3HNA ($\lambda = 510\text{nm}$) a EmPI na koncentraci tenzidu. Vložený graf znázorňuje emisní spektra 3HNA ve vodě a v micelách CTAB.
- Obr. 42 Závislost intenzity neutrální formy naftolu ($\lambda = 350\text{nm}$) na koncentraci tenzidu
- Obr. 43 Emisní spektra 1-naftolu ve vodě (- -), 6 mM Septonexu (•••) a v 80% směsi methanol-voda (---)
- Obr. 44 Emisní data pro zhášení pyrenu v CTAB pomocí jodidu draselného, 3-jodpropanové kyseliny a fenyljodidu, koncentrace CTAB byla konstantní
- Obr. 45 Emisní data pro zhášení 1-naftolu v CTAB pomocí KI, 3-jodpropanové kyseliny, jodbenzenu a CPC, koncentrace CTAB byla konstantní
- Obr. 46 a) Titrace systémů 1-naftol, naftol-hyaluronan, naftol-PSS a pyrene-hyaluronan pomocí CTAB. Intenzitu fluorescence představuje intenzita neutrální formy naftolu (350 nm). b) Závislost normalizované intenzity fluorescence neutrální a aniontové formy 1-naftolu na koncentraci CTAB
- Obr. 47 Titrace systémů 1-naftol, naftol-hyaluronan, naftol-PSS a pyrene-hyaluronan pomocí CTAB. Intenzitu fluorescence představuje intenzita neutrální formy naftolu (350 nm)
- Obr. 48 a) TRES 1-naftolu v 0,5 mM CTAB v přítomnosti hyaluronanu, b) TRANES 1-naftolu v 0,5 mM CTAB v přítomnosti hyaluronanu, c) TRES 1-naftolu v 0,5 mM CTAB v přítomnosti PSS, d) TRANES 1-naftolu v 0,5 mM CTAB v přítomnosti PSS. Vložené grafy v případech b) a d) ukazují detail izoemisního bodu.
- Obr. 49 Titrace systémů obsahujících naftol a hyaluronan o různých molekulových hmotnostech pomocí CTAB. Intenzitu fluorescence představuje intenzita neutrální formy naftolu (350 nm). Vložený graf představuje zaostření na koncentrace CTAB před CMC
- Obr. 50 Titrace systémů obsahujících naftol a hyaluronan o různých molekulových hmotnostech pomocí Septonexu. Intenzitu fluorescence představuje intenzita neutrální formy naftolu (350 nm)
- Obr. 51 Titrace systémů obsahujících naftol a PSS o různých molekulových hmotnostech pomocí CTAB. Intenzitu fluorescence představuje intenzita neutrální formy naftolu (350 nm).
- Obr. 52 Titrace systémů obsahujících naftol a PSS o různých molekulových hmotnostech pomocí Septonexu. Intenzitu fluorescence představuje intenzita neutrální formy naftolu (350 nm).
- Obr. 53 Závislost MSD na čase pro 100 nm fluorescenčně značené částice ve vodě při správném a špatném určení efektivního objemu
- Obr. 54 Závislost MSD na čase pro 100 nm fluorescenčně značené částice ve vodě při použití rovnice 56 a rovnice
- Obr. 55 Schéma měření mikroreologie pomocí DLS
- Obr. 56 Příprava podložního sklíčka pro měření VPT mikroreologie

- Obr. 57 Závislost MSD na čase pro 100 nm fluorescenčně značené částice ve vodě, 40% glycerolu a 80% glycerolu
- Obr. 58 Závislost MSD na čase pro 100 nm fluorescenčně značené částice v roztocích hyaluronanu o různé molekulové hmotnosti a koncentraci a) 0,01 g/l a b) 1 g/l
- Obr. 59 Závislost MSD na čase pro 100 nm fluorescenčně značené částice v roztocích vysokomolekulárního (1500 kDa) hyaluronanu měřená pomocí DLS a FCS
- Obr. 60 Závislost MSD na čase pro 30 nm fluorescenčně značené částice ve vodě, 40% glycerolu a 80% glycerolu
- Obr. 61 Závislost MSD na čase pro 30 nm fluorescenčně značené částice v roztocích hyaluronanu měřené pomocí FCS a DLS
- Obr. 62 Závislost MSD na čase pro 30 nm fluorescenčně značené částice v roztocích hyaluronanu o různé molekulové hmotnosti a koncentraci a) 0,1 g/l a b) 10 g/l
- Obr. 63 Závislost MSD na čase pro 30 nm částice v roztocích vysokomolekulárního hyaluronanu o různých koncentracích
- Obr. 64 Závislost MSD na čase pro 30 nm částice v roztocích vysokomolekulárního hyaluronanu o různých koncentracích a v hydrogelu
- Obr. 65 Srovnání MSD v závislosti na čase pro hydrogel hyaluronanu a gely připravené chemickou metodou (Alginát a PSS)
- Obr. 66 Časově rozlišená data pro zhášení pyrenu v CTAB pomocí jodidu draselného, 3-jodpropanové kyseliny a fenyljodidu, koncentrace CTAB byla konstantní
- Obr. 67 Emisní data pro zhášení 1-naftolu v Septonexu pomocí KI, 3-jodpropanové kyseliny, jodbenzenu a CPC, koncentrace CTAB byla konstantní

11 VĚDECKÁ A PUBLIKAČNÍ ČINNOST

11.1 Články v časopise

MONDEK, Jakub, Filip MRAVEC, Tereza HALASOVÁ, Zuzana HNYLUCHOVÁ a Miloslav PEKAŘ. Formation and Dissociation of the Acridine Orange Dimer as a Tool for Studying Polyelectrolyte–Surfactant Interactions. *Langmuir*. 2014, 30(29): 8726-8734. DOI: 10.1021/la502011s. ISSN 0743-7463. Dostupné také z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/la502011s>

MONDEK, Jakub a Miloslav PEKAŘ. The change in excited-state proton transfer kinetics of 1-naphthol in micelles upon the binding of polymers: The influence of hyaluronan hydration. *Carbohydrate Polymers*. 2015, 129, 168-174. DOI: 10.1016/j.carbpol.2015.04.060. ISSN 01448617. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0144861715003768>

MONDEK, Jakub, Michal KALINA, Vasile SIMULESCU a Miloslav PEKAŘ. Thermal degradation of high molar mass hyaluronan in solution and in powder; comparison with BSA. *Polymer Degradation and Stability*. 2015, 120: 107-113. DOI: 10.1016/j.polymdegradstab.2015.06.012. ISSN 01413910. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0141391015300239>

SIMULESCU, Vasile, Jakub MONDEK, Michal KALINA a Miloslav PEKAŘ. Kinetics of long-term degradation of different molar mass hyaluronan solutions studied by SEC-MALLS. *Polymer Degradation and Stability*. 2015, 111: 257-262. DOI: 10.1016/j.polymdegradstab.2014.12.005. ISSN 01413910. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0141391014004388>

SIMULESCU, Vasile, Michal KALINA, Jakub MONDEK a Miloslav PEKAŘ. Long-term degradation study of hyaluronic acid in aqueous solutions without protection against microorganisms. *Carbohydrate Polymers*. 2016, 137, 664-668. DOI: 10.1016/j.carbpol.2015.10.101. ISSN 01448617. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0144861715010814>

11.2 Příspěvky na mezinárodních konferencích

MONDEK, J.; MRAVEC, F. Time-Resolved Fluorescence in Hyaluronan- Surfactant Interactions. In *Studentská konference Chemie je život*. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Purkyňova 464/118, 612 00 Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2012. p. 387-393. ISBN: 978-80-214-4644- 1.

MONDEK, J.; PEKAŘ, M. Kinetic Study of Excited State Proton Transfer Probe 1-Naphthol in Hyaluronan- Surfactant System. In *XIII. Pracovní setkání fyzikálních chemiků a elektrochemiků*. Brno: Mendelova univerzita v Brně, 2013. p. 119-120. ISBN: 978-80-7375-757- 1.

MONDEK, J.; PEKAŘ, M. Excited-State Proton Transfer Study in Potential Hyaluronan-Surfactant Drug Nanocarriers. In *NANOCON 2013 Conference proceedings*. 2013. p. 1-7. ISBN: 978-80-87294-44- 4.

MONDEK, J.; SIMULESCU, V.; PEKAŘ, M. New Kinetic Models in Biopolymer Degradation: Long- Term Study of Hyaluronan Samples. In *XIV. Pracovní setkání fyzikálních chemiků a elektrochemiků*. 2014. p. 99-102. ISBN: 978-80-210-6842- 1.

MONDEK, J.; HNYLUCHOVÁ, Z.; PEKAŘ, M. From Micro to Nanorheology: Basic Principles of Microrheology Measurements with Fluorescence Correlation Spectroscopy. In *Nanocon 2014: Conference Proceedings*. Tanger Ltd., 2014. p. 1-5. ISBN: 978-80-87294-55- 0.

HNYLUCHOVÁ, Z.; MONDEK, J.; PEKAŘ, M. DLS Microrheology of biopolymer solution, Probe size effect. In *Nanocon 2014 Conference Proceedings*. 1. 2014. p. 1-5. ISBN: 978-80-

87294-55- 0.

MONDEK, J.; HNYLUCHOVÁ, Z.; PEKAŘ, M. Comparison of Microrheological Measurements by Three Techniques. In *Chemie je život: Sborník příspěvků*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2014. p. 337-342. ISBN: 978-80-214-5078- 3.

MONDEK, J.; MRAVEC, F.; PEKAŘ, M. Binding of Surfactant to Polyelectrolyte in Non-Standard Conditions - Fluorescence Study. In *Chemistry and Life 2015. Czech Chemical Society Symposium Series*. 2015. p. 110-113. ISBN: 978-80-214-5228- 2. ISSN: 2336-7210.

MONDEK, J.; SIMULESCU, V.; KALINA, M.; PEKAŘ, M. The Self- Degradation of Hyaluronan. In *Studentská odborná konference Chemie je život 2015*. 2015. p. 276-282. ISBN: 978-80-214-5290- 9.

11.3 Abstrakty na mezinárodních konferencích

MRAVEC, F.; STŘONDALOVÁ, H.; HALASOVÁ, T.; MONDEK, J. *Interaction between amphiphilic fluorescent probes and biopolymer*. Strasbourg: University of Strasbourg, 2011. p. 233-233.

MONDEK, J.; MRAVEC, F. *Time-Resolved Fluorescence in Hyaluronan- Surfactant Interactions*. Studentská konference Chemie je život: Sborník abstraktů. Purkyňova 464/118, 61200 Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2012. p. 117-117. ISBN: 978-80-214-4545- 8.

MONDEK, J.; PEKAŘ, M. *Hyaluronan-CTAB Interactions Studied by Excited- State Proton Transfer*. Sapienza Universita di Roma: 2013. p. 18-18.

MONDEK, J.; PEKAŘ, M. *Aggregation of Hyaluronan and Surfactant Studied by Fluorescence Cross- Correlation Spectroscopy*. ISLS 2014- RODOS. 2014. p. 1 (1 s.).

MONDEK, J.; PEKAŘ, M. *The Use of Excited-State Proton Transfer in Observation of The Interaction of Potential Hyaluronan- Surfactant Drug Nanocarriers*. 1st European Conference on Pharmaceutics: Drug Delivery. 2015. p. 1-2.

MONDEK, J.; DOSKOČIL, L.; SZEWIECZKOVÁ, J.; ENEV, V.; WASSERBAUER, J. *Using the analytical centrifuge to characterize of magnetic particles*. CEITEC PHD RETREAT. 2015. p. 105-105. ISBN: 978-80-210-7825- 3.

MONDEK, J.; HNYLUCHOVÁ, Z.; KÁBRTOVÁ, P.; PEKAŘ, M. *The Advantage of Microrheology Measurements Performed by Fluorescence Lifetime Correlation Spectroscopy - Comparison with Video Microrheology and Dynamic Light Scattering*. The 14th Conference on Methods and Applications in Fluorescence. 2015. p. 68-68.

MONDEK, J.; HNYLUCHOVÁ, Z.; PEKAŘ, M. *Nanorheology of Hyaluronan Solutions*. Nanocon 2015 - Proceedings of Abstracts. 2015. p. 117-117. ISBN: 978-80-87294-59- 8.

MONDEK, J.; PEKAŘ, M. *FCS nanorheology of biopolymeric hydrogels - a novel approach to study passive rheology of hydrogels*. 20th European Symposium on Polymer Spectroscopy - Book of abstracts. 2016. p. 1 (1 s.). ISBN: 978-3-9816007-4- 2.

11.4 Přednášky na konferencích

Chemie je život 2012 (Brno, Česká Republika)

XIII. Pracovního setkání fyzikálních chemiků a elektrochemiků (Brno, Česká Republika) 2013

Škola molekulové spektrometrie 2013 (Brno, Česká Republika)

XIV. Pracovního setkání fyzikálních chemiků a elektrochemiků (Brno, Česká Republika) 2014

Chemistry and life 2015 (Brno, Česká Republika)

Chemie je život 2015 (Brno, Česká Republika)

The 14th Conference on Methods and Applications in Fluorescence 2015 (Würzburg, Německo)

11.5 absolvované stáže

07/2010-1/2011 Stáž na Universidade Técnica de Lisboa, Portugalsko

12 PŘÍLOHY

12.1 Rychlostní konstanty deprotonace a doby života pro kapitulu charakterizace interakcí polymer-tenzid pomocí espt

Tabulka 7 Rychlostní konstanty deprotonace (k_{pt}), rekombinace (k_{rec}) a disociace (k_{diss}) a rychlostní konstanty vyhasínání neutrální (k_{ROH}) a aniontové formy (k_{RO^-}) 1-naftolu v CTAB

CTAB	$k_{pt} \times 10^9$	$k_{rec} \times 10^9$	$k_{diss} \times 10^9$	$k_{ROH} \times 10^9$	$k_{RO^-} \times 10^9$
mM	s^{-1}	s^{-1}	s^{-1}	s^{-1}	s^{-1}
0	21,55	0,50	0,70	0,13	0,14
0,2	8,69	3,43	2,27	0,09	0,14
0,75	2,09	0,40	2,55	0,04	0,14
1	2,22	0,93	4,04	0,05	0,14
6	1,72	0,28	2,16	0,09	0,14
MeOH - watter	1.28	0.15	1.68	0.17	0.15

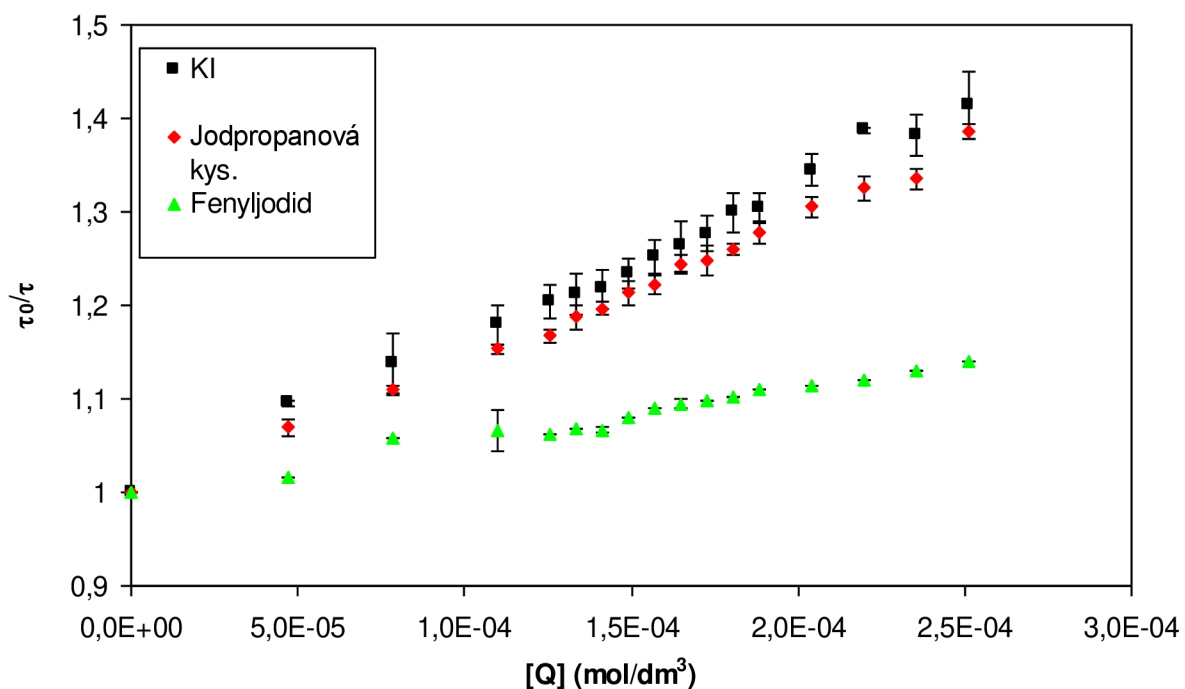
Tabulka 8 Rychlostní konstanty deprotonace (k_{pt}), rekombinace (k_{rec}) a disociace (k_{diss}) a rychlostní konstanty vyhasínání neutrální (k_{ROH}) a aniontové formy (k_{RO-}) pro sondu HPTS v micelách CTAB

CTAB	$k_{pt} \times 10^9$	$k_{rec} \times 10^9$	$k_{diss} \times 10^9$	$k_{ROH} \times 10^9$	$k_{RO-} \times 10^9$
mM	s^{-1}	s^{-1}	s^{-1}	s^{-1}	s^{-1}
0	5,51	0,94	0,94	0,20	0,14
0,2	6,05	0,38	1,32	0,32	0,14
0,75	2,41	0,94	2,00	0,58	0,14
1	0,80	0,29	1,37	0,36	0,14
6	0,79	0,42	1,99	0,34	0,14

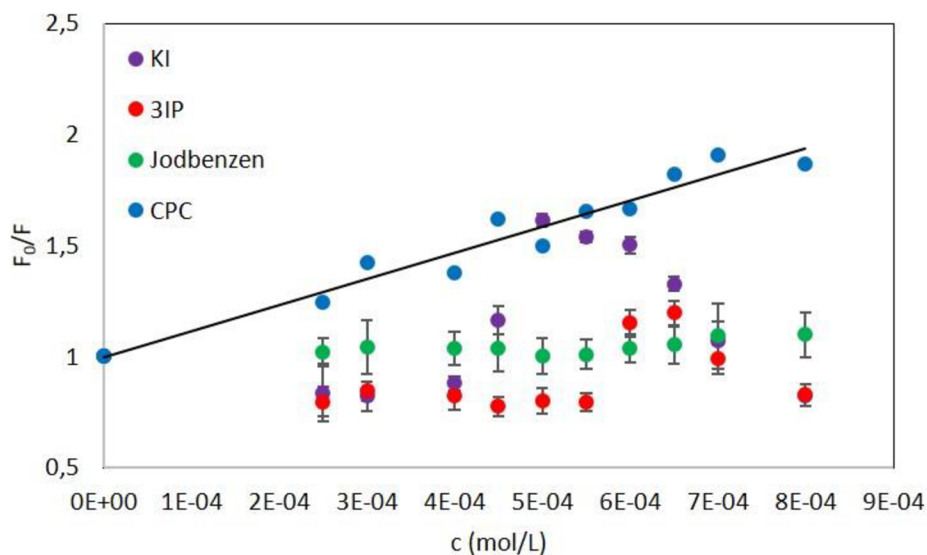
Tabulka 9 Doby života fluorescenční sondy 3HNA v micelách CTAB

CTAB	τ
mM	ns
0	1,60
0,2	4,40
0,75	4,90
1	5,00
6	5,50

12.2 Závislosti zhášení fluorescence pro kapitolu charakterizace interakcí polymer-tenzid pomocí espt



Obr. 66 Časově rozlišená data pro zhášení pyrenu v CTAB pomocí jodidu draselného, 3-jodpropanové kyseliny a fenyljodidu, koncentrace CTAB byla konstantní



Obr. 67 Emisní data pro zhášení 1-naftolu v Septonexu pomocí KI, 3-jodpropanové kyseliny, jodbenzenu a CPC, koncentrace CTAB byla konstantní

12.3 Změny dob života a relativních amplitud 1-naftolu v tenzidu pro kapitolu charakterizace interakcí polymer-tenzid pomocí espt

Tabulka 10 Doby života a relativní amplitudy vyhasínání neutrální a aniontové formy naftolu v CTAB a Septonexu v absenci a po přidání polymeru

CTAB	Hyaluronan (PSS*)	ROH emission						RO ⁻ emission					
		mM	mg/L	τ_1 (ps)	τ_2 (ps)	τ_3 (ps)	A ₁ (%)	A ₂ (%)	A ₃ (%)	τ_1 (ps)	τ_2 (ps)	τ_3 (ps)	A ₁ (%)
0	0	54	1346	8504	87,79	6,42	5,79	-	1608	8191	-	2,15	97,85
0,3		77	1270	8565	87,94	3,94	8,13	-	1016	8166	-	1,63	98,37
0,5		78	1289	8303	85,53	6,24	8,23	-	1263	8191	-	1,90	98,10
2		277	682	13997	35,32	61,94	2,75	516	13971	21254	-1,75	18,94	82,81
0	7	80	1362	7880	80,00	6,20	13,80	-	1515	8052	-	1,89	98,11
0,05		92	1140	8125	78,94	8,34	12,73	-	7470	15052	-	81,19	18,81
0,3		64	1001	7969	84,27	5,16	10,57	-	2284	8122	-	2,96	97,04
0,5		67	813	7752	80,00	11,16	8,84	1147	7904	17139	1,41	16,84	81,75
2		337	684	11777	63,91	31,49	4,59	439	9626	20191	-1,59	15,41	86,18
0	7*	69	1924	10486	52,9	33,5	13,6	-	1387	8185	-	2,39	97,61
0,05		92	1928	5715	49,08	29,02	21,9	-	4466	8814	-	12,2	87,8
0,3		314	2559	6960	15,75	61,63	22,62	-	7825	18150	-	79,78	20,22
0,5		257	2310	6425	16,16	58,3	25,54	-	7853	18332	-	80,95	19,05
2		489	1836	10129	71,81	21,11	7,08	510	10823	20527	-1,56	20,19	81,37
Septonex	Hyaluronan (PSS*)	ROH emission						RO ⁻ emission					
mM	mg/L	τ_1 (ps)	τ_2 (ps)	τ_3 (ps)	A ₁ (%)	A ₂ (%)	A ₃ (%)	τ_1 (ps)	τ_2 (ps)	τ_3 (ps)	A ₁ (%)	A ₂ (%)	A ₃ (%)
0	0	54	1346	8504	87,79	6,42	5,79	-	1608	8191	-	2,15	97,85

0,3		31	1442	8148	91,96	2,23	5,81	-	752	8076	-	1,60	98,40
0,5		24	1731	8354	93,33	2,10	4,58	-	1058	8071	-	2,67	97,33
2		182	817	6152	49,93	36,12	13,95	-	1220	7952	-	50,68	49,32
0		80	1362	7880	80,00	6,20	13,80	-	1515	8052	-	1,89	98,11
0,02		43	1131	7178	88,34	3,66	8,00	-	3844	8336	-	6,12	93,88
0,3	7	39	1122	6190	88,14	6,01	5,85	-	1001	8126	-	3,01	96,99
0,5		72	1139	6296	76,78	13,18	10,05	-	1020	8076	-	3,22	96,78
2		422	1161	6020	48,08	32,75	19,17	251,45	1273	6751	-12,91	97,94	14,97
0		69	1924	10486	52,90	33,50	13,60		1387	8185		2,39	97,61
0,02		190	2479	6945	20,80	52,30	26,90						
0,3	7*	144	2213	5651	21,30	48,46	30,24						
0,5		130	2073	5536	21,14	46,24	32,61						
2		485	1479	5839	56,36	24,01	19,63						

12.4 Skript z MATLABu pro převod korelační funkce na MSD

```
1
2
3 -   n = 220;
4 -   wxy = 0.248^2*ones(n,1);
5 -   wz = 1.689^2*ones(n,1);
6 -   N = 1.9711*ones;
7
8
9
10 -  a = 1./(3.*(wxy.^2).*wz);
11 -  b = (8./(9.*wxy.*wz))+(4./(9.*(wxy.*wxy)));
12 -  c = (4./(3.*wxy))+(2./(3.*wz));
13 -  d = 1-(1./(N*Gt).^2);
14
15 -  r = zeros(n,3);
16 -  for i = 1:n
17 -      p = roots([a(i), b(i), c(i), d(i)]);
18 -      r(i,:) = p;
19 -  end
20
21
22
23 -  plot(real(r(:,3)), 'r')
24
```

n – počet řádků (dat z korelační funkce)

wxy – rozměr efektivního objemu v kolmém směru vůči směru laserového paprsku

wz – rozměr efektivního objemu v rovnoběžném směru vůči směru laserového paprsku

N – počet molekul v konfokálním objemu stanovený pomocí fitování korelační funkce

a, b, c, d – kubický člen, kvadratický člen, lineární člen a absolutní člen kubické rovnice

r – výpočet kořenů kubické rovnice

12.5 Články v časopisech

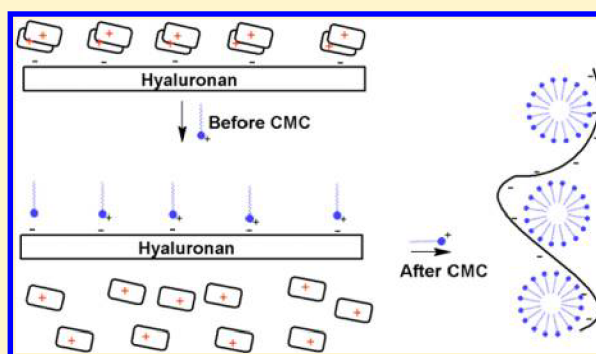
Formation and Dissociation of the Acridine Orange Dimer as a Tool for Studying Polyelectrolyte–Surfactant Interactions

Jakub Mondek,* Filip Mravec, Tereza Halasová, Zuzana Hnylučová, and Miloslav Pekař

Brno University of Technology, Faculty of Chemistry, Institute of Physical and Applied Chemistry and Materials Research Centre, Purkyňova 464/118, 612 00 Brno, Czech Republic

Supporting Information

ABSTRACT: Steady-state and time-resolved fluorescence and UV–vis techniques were used to study the formation and dissociation of acridine orange dimer in order to investigate hyaluronan–acridine orange, hyaluronan–CTAB (cetyltrimethylammonium bromide), polystyrenesulfonate–acridine orange, and polystyrenesulfonate–CTAB interactions in aqueous solution. Steady-state and time-resolved fluorescence and the dimer:monomer absorbance ratio of acridine orange (AO) were used to determine dimer formation on polymer chains of polyelectrolytes. Acridine orange clearly formed dimers on polystyrenesulfonate chains as well as on hyaluronan, but we show that the electrostatic interaction is much weaker in the case of hyaluronan. After the addition of surfactant, we observed an enhancement of fluorescence intensity, indicating the dissociation of AO dimers into monomers and the replacement of acridine orange on polymer chains by surfactant molecules. Importantly, we show that surfactant molecules bind to polymer chains before the critical micelle concentration is reached and form the so-called “bottle-brush” structure.



1. INTRODUCTION

The solubilization of hydrophobic molecules in water–micellar environments is a very well known phenomenon^{1–3} which enables further investigation of micelle microenvironments or interfaces by fluorescence techniques. For example, critical micelle concentrations (CMC)^{4–7} and micellar aggregation numbers^{8–10} are widely studied by steady-state or time-resolved fluorescence spectroscopy. The aggregation of acridine dyes is also a well-described phenomenon.^{11–14} Negative charge, represented for example by a polyelectrolyte or surfactant, added to a solution of acridine dye causes the aggregation of these molecules into dimers due to van der Waals forces and the strong coupling of molecular transition dipole moments. Coupling causes a wavelength shift in the absorption spectrum. When a red or blue shift occurs, aggregates are called J-aggregates or H-aggregates, respectively.¹² The H-type aggregates have forbidden radiative decay from the excited state, and their absorption band is blue-shifted. From a spectroscopic point of view, the fluorescence of the sample at nearly 530 nm decreases with an increasing amount of dye aggregate; the probability of absorption at 492 nm (monomer band, the α -band) decreases with a concomitant increase in absorption at 465 nm (dimer band, β -band) and at 450 nm (oligomer band, the γ -band). The formation of dye aggregates is, of course, concentration-dependent, and in the case of acridine orange (AO) the aggregates appear at and above its concentration of $5 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ in aqueous solution.¹¹ In the presence of a negative binding site, for example, the negative

charge of a surfactant or a polyanion, monomers of AO condense on these sites and the dimer form of AO is preferred, which changes its fluorescence intensity and a dimer fluorescent peak appears in the fluorescence spectrum at around 657 nm.¹² This depends on the concentration of both AO and binding sites, and above a critical concentration, AO starts to form nonfluorescent condensate dimers or even oligomers.^{11–16} Acridine orange aggregates were used to study negatively charged polyelectrolytes,¹² probe–DNA interactions,^{15–17} and probe–protein or protein–surfactant interactions.^{18,19}

In this study, acridine orange was used as a fluorescent label which is physically attached to the oppositely charged polyelectrolyte. Physical (electrostatic) binding is supposed to provide an advantage over traditional chemical (covalent) fluorescence labeling in the study of interactions between (labeled) polyelectrolytes and oppositely charged surfactants. The label is attached directly to the interaction site, but its weak physical bond should not prevent interactions with the surfactant, which can be detected by changes in the aggregation behavior of the acridine orange label. Systems comprising oppositely charged polyelectrolytes and surfactants are of growing interest not only as a subject of pure research but also due to their various practical applications. For an overview of this area see several excellent reviews.^{20–23}

Received: May 23, 2014

Revised: July 7, 2014

Published: July 8, 2014

Hyaluronan (more precisely, the sodium salt of hyaluronic acid), one of the most important polysaccharides originating from the mammalian body, was selected as the anionic polyelectrolyte for this study due to our long-term interest in its behavior and its potential applications in delivery systems. The understanding of its importance has increased dramatically over the last two decades. Many studies have focused on its physical–chemical behavior, its role in tissues, and its cell proliferation capacity, and methods have been developed to use this polysaccharide in the healing of injuries, drug delivery systems, antiaging applications, and so on. Hyaluronan is a biocompatible and biodegradable polysaccharide consisting of disaccharide units *D*-glucuronic acid and *N*-acetyl-*D*-glucosamine²⁴ (Figure 1). Hyaluronan–surfactant or hyaluronan–

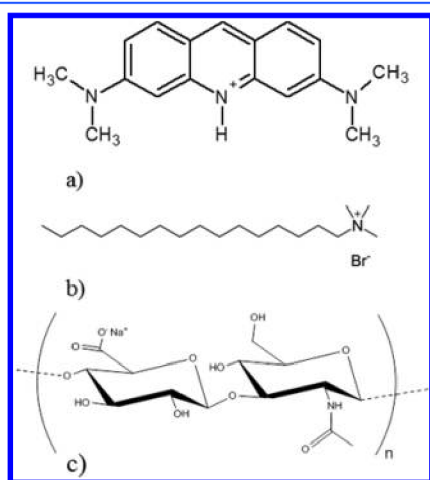


Figure 1. Structure of (a) acridine orange, (b) CTAB, and (c) hyaluronic acid.

liposome interactions provide a useful model for anticancer drug delivery systems based on hyaluronan sensitivity to the CD44 receptor.^{25–27} Delivery systems based on hyaluronan should be quite selective for tumor cells because CD44 is overexpressed in cancer cells.²⁸ Micelles provide, in this model, a good environment for drug solubilization and controlled release, and hyaluronan provides controlled targeting of the drug.

The paper is organized as follows. In the first part, we present a study of the interaction between hyaluronan and acridine orange in the absence of surfactant; in the following part, the interaction between cationic surfactant and a hyaluronan–AO system is presented. Then, a comparative study of the interaction between polystyrenesulfonate (PSS) and acridine orange in the presence of cationic surfactant is added to compare a synthetic polymer with a higher charge density (a “stronger polyelectrolyte”) and hyaluronan biopolymer. PSS was selected because it is a well-known and defined polymer and a strong polyelectrolyte and because interactions between PSS and cationic surfactants have been proven and investigated in other studies.^{12,29} On the other hand, hyaluronan is known to have a low charge density and to interact relatively weakly with cationic surfactants.³⁰

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Materials. All reagents and solvents were used as received, and their purity was higher than 97%. Hyaluronan (molecular weight of 300 kDa) was purchased from CPN spol. s.r.o. (Czech Republic). Polystyrenesulfonate (molecular weight 70 kDa), CTAB, and acridine

orange hydrochloride hydrate were purchased from Sigma-Aldrich. Stock solutions of hyaluronan, polystyrenesulfonate, surfactant, and acridine orange were prepared in deionized water. For experiments in the presence of NaCl, 0.15 or 0.5 M NaCl solution was used. Samples for acridine orange and polyelectrolyte interaction were prepared as follows: 25 μL of acridine orange stock solution were added to plastic vials and a fluorescent probe was diluted with an appropriate volume of hyaluronan and solvent to achieve a concentration range for hyaluronan from 5×10^{-4} to $15 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ and that for polystyrenesulfonate from 1.25×10^{-5} to $3.6 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$. Samples for polymer–surfactant interaction were prepared with a constant concentration of acridine orange and polymer (respective equivalence point for each polymer determined by the formation of acridine orange dimer) and with an increasing concentration of surfactant ranging from 3×10^{-7} to $4 \times 10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$. All samples were stirred overnight to ensure equilibration. The concentration of the fluorescent probe (AO) in all samples was $1.7 \times 10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ to avoid the presence of the dimer absorption band in the bulk solution.¹¹ The determined pH of all hyaluronan samples varied between 6.6 and 5.6 (see examples in Supporting Information, Table S1), which is well above the hyaluronan intrinsic pK_a (3.2^{31}). It can therefore be reasonably expected that hyaluronan was fully dissociated. PSS is fully ionized in the 6.2–8.9 pH range.³² The determined pH of all PSS samples varied between 6.7 and 4.6, but pH was, in most cases, below 6.2 (see Supporting Information, Table S1). It can be expected that PSS was not fully dissociated. All measurements were made at $22 \text{ }^\circ\text{C}$.

2.2. UV–Vis and Fluorescence Spectroscopy. Absorption spectra were recorded on a Varian Cary 50 UV–vis spectrophotometer with a wavelength range from 200 to 700 nm, and fluorescence spectra were recorded on a FluoroLog Horiba Jobin Yvon spectrofluorimeter. Fluorescence spectra were recorded with the excitation monochromator at 492 nm and in the emission wavelength range of 500 to 650 nm. Because of the inner filter effect, the correction of emission spectra was made according to the equation³³

$$F_{\text{corr}} = F_{\text{obs}} \times 10^{1/2(A_{\text{ex}} + A_{\text{em}})} \quad (1)$$

where F_{corr} and F_{obs} are the corrected and observed fluorescence intensities, respectively, and A_{ex} and A_{em} represent absorbance at the excitation and emission wavelengths, respectively. Time-resolved measurements were performed with a Fluorocube Horiba Jobin Yvon spectrometer by means of a time-correlated single photon counting technique. A 469 nm LED was used as the excitation source. Fluorescence decays were collected with a 495 nm cut-off filter. A time-to-amplitude (TAC) converter was set to the 50 ns window for the measurement of acridine orange and the acridine orange–hyaluronan system. During measurements of polystyrenesulfonate–acridine orange, the TAC range was changed from the 50 ns to the 200 ns window because of the increase in the fluorescence lifetime. The repetition rate was set to 1 MHz, and the delay of the signal caused by the cable path was always set 15 ns higher than the respective TAC range.

Time-resolved fluorescence decays were analyzed by the iterative reconvolution procedure of fitting the model function to experimental data, and the fit was judged by nonlinear least-squares analysis.^{34,35} Time-resolved data analyses were performed with DAS6 software from Horiba Jobin Yvon using models for multiexponential decay with n components using the equation

$$I(t) = \sum_{i=1}^n \alpha_i \exp(-t/\tau_i) \quad (2)$$

where α_i is a preexponential factor which relates to the amount of each fluorescent component present in the system and τ_i is the fluorescence lifetime of the i th component. The goodness of fit was judged by reduced χ_R^2 , which evaluates a mismatch between the data and the fitted function and is independent of the number of degrees of freedom.³³

2.3. Microrheology. For microrheology experiments, a concentration series of hyaluronan solutions in water was prepared by diluting a stock solution. Ten microliters of a $1 \mu\text{m}$ polystyrene particle 2.5%

suspension obtained from Sigma-Aldrich was added to 5 mL of sample. Samples were stirred using a vortex stirrer for 10 s and then were left to stand for 1 h.

Hardware for the microrheology experiments consisted of a Nikon Eclipse e200 microscope and a Canon digital camera. Particle movement in samples was recorded for 10 s at 50 fps and at a resolution of 1280×720 in a dark field. Open source program ImageJ with the ParticleTracking plugin was used for image analysis and the determination of particle trajectories. This program yielded the x and y coordinates of particle position as a function of time, which are used to determine the dependency of the mean square displacement (MSD) on time. The MSD is given by

$$\text{MSD} = \langle [x(t + \tau) - x(t)]^2 + [y(t + \tau) - y(t)]^2 \rangle = 2dDt \quad (3)$$

where d is the dimensionality or spatial extent³⁶ (in our case two dimensions), D is the diffusion coefficient, $x(t)$ and $y(t)$ are the positions of particle i at time t , and $\langle \rangle$ represents an average over time. For the determination of the microviscosity of the medium in the vicinity of tracer particles, the Stokes–Einstein equation was used.^{37,38}

$$D = \frac{k_B T}{6\pi\eta r} \quad (4)$$

As the hydrodynamic radius (r), the radius of tracer particles reported by the manufacturer was used ($0.5 \mu\text{m}$). The final viscosity is the mean value of the viscosities obtained from the MSD of at least 30 particles.

3. RESULTS AND DISCUSSION

Results are displayed as the dependency of the studied physical quantity on the polymer/dye ratio (P/D). The P/D ratio represents moles of binding sites (carboxylic groups of hyaluronan or sulfonate groups of polystyrenesulfonate) per moles of dye. For hyaluronan, the molecular weight of its basic dimer unit bearing one carboxyl group is 401.299 g/mol .

3.1. Interaction of Hyaluronan with Acridine Orange.

The spectral properties of AO are shown in Figure 2. At a

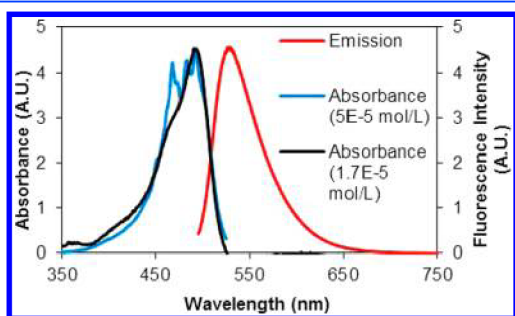


Figure 2. Spectral properties of acridine orange in aqueous solution at a concentration of $5 \times 10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ of the dye and the absorption spectrum for the aqueous solution at a concentration of $1.7 \times 10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$.

concentration of around $5 \times 10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, it is clearly shown that the monomer absorption band is joined by the dimer absorption band. The absorption band of the dye oligomers appears as a shoulder at 450 nm. These results also determined the experimental setup of measurements with AO. To avoid the formation of AO dimers in solution, we used a lower concentration of acridine orange in samples ($1.7 \times 10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$); the absorption spectrum is shown in Figure 2. To cover a wide range of P/D, our experiments were carried out with a constant amount of dye and with changing polyelectrolyte concentration.

Figure 3a shows the dependency of the relative fluorescence intensity measured at 527 nm (the emission maximum shown

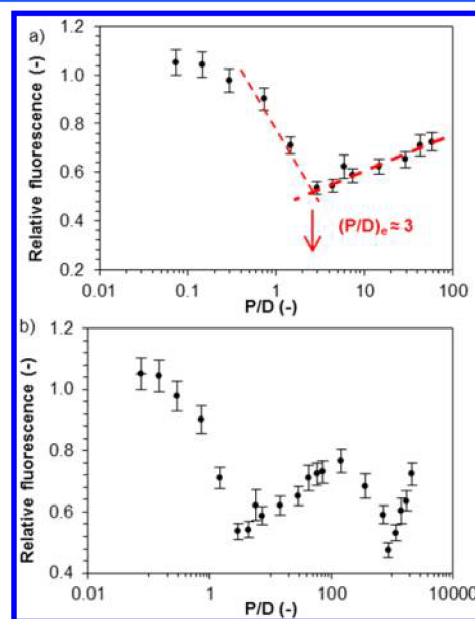


Figure 3. Dependency of the relative fluorescence intensity on the P/D of the system with a constant concentration of acridine orange of $1.7 \times 10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$. Fluorescence is relative to the sample in which hyaluronan is not present. The concentration of hyaluronan in (a) covers the range from 0.5 to $400 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$. In (b), we expanded the concentration range up to $15 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$.

in Figure 2) on the P/D. (A table of P/D values and the respective hyaluronan concentrations is shown in the Supporting Information.) Relative fluorescence was relative to the fluorescence of the sample without hyaluronan. It is necessary to take into account the fact that the displayed data are not obtained as titration curves. Rather, all points from this dependency were prepared as separate samples, measured at least three times and averaged.

The minimum in the relative fluorescence intensity can be found in the dependency in Figure 3a. This minimum is considered to be a point of equivalence, the point where all probe molecules condense as dimers on the accessible binding sites of the polymer. If all carboxylic groups are taken into account as possible binding sites and the acridine orange molecules condense to form dimers, then a value of 0.5 for the point of equivalence can easily be predicted (for each carboxylic anion, two probe molecules are necessary). As is obvious from Figure 3a, the fluorescence intensity starts to decrease only at a P/D of 0.5, and the experimental value of the equivalence point is found at around $P/D = 3$ and is denoted as $(P/D)_e$.

The high value of the equivalence point can be explained in three different ways. First, hyaluronan is not fully dissociated under these experimental conditions, but the pH of samples suggests the full dissociation of hyaluronan. Second, some carboxylic groups are not accessible for AO molecules, or AO dimer formation is prevented probably because of interchain interactions. Third, interactions between AO and hyaluronan are weak, which contributes to the high value of the equivalence point. It is possible that AO dimers are formed via interchain interactions which could cause the inaccessibility of other carboxylic groups. The value $P/D = 3$ means that only (100/6)% of polymer binding sites (carboxylic groups) are accessible

for the formation of acridine orange dimers. The calculation of the accessibility of polymer binding sites is based on the assumption that, for fully dissociated polymer, each carboxylic group possesses two molecules of acridine orange to form dimers and to obtain the minimum in fluorescence intensity. In other words, $P/D = 3$ represents a 6-fold less efficient degree of AO dimer formation when compared to the ideal case. It should be noted that the real concentration of hyaluronan in the sample at this equivalence point is 20 mg L^{-1} . At this concentration we are dealing with a highly diluted polymer regime; therefore, the polyelectrolyte hyaluronan should be stretched and fully dissociated.³⁹ However, in the presence of oppositely charged acridine orange, a similar phenomenon of a partial collapse may occur, as observed in polyelectrolyte–surfactant systems²² in which the chain extension is decreased, which may also result in the hiding of hyaluronan carboxylic groups. If this is the case, then the hyaluronan concentration for such collapse in the presence of AO should be around 0.02 g/L . The relatively high $(P/D)_e$ value is also consistent with the observation of no phase separation in hyaluronan–AO systems, which again indicates some similarity with polyelectrolyte–surfactant systems in which the formation of electrostatically stabilized colloidal dispersions was observed at high polyelectrolyte-to-surfactant ratios.²²

Above the $(P/D)_e$, the number of available polymer binding sites increases with a concomitant increase in the fluorescence intensity because of the dissociation of acridine orange dimers. It is remarkable that when the concentration of binding sites, in fact, of sodium hyaluronate, increases nearly 30 times (from $P/D \approx 3$ –90), the fluorescence intensity measured for $P/D \approx 90$ is lower than the values at low P/D . This suppressed fluorescence intensity may be caused by conformational changes in hyaluronan.

If we expand the P/D range to the higher concentrations of hyaluronan, then unexpected results are obtained. As can be seen in Figure 3b, above a P/D of 147 (when the hyaluronan concentration is exactly 1 g L^{-1}) another decrease in fluorescence intensity is observed; a second minimum can be found at $P/D = 882$ (when the concentration of hyaluronan is around 6 g L^{-1}).

At first sight it seems that this decrease cannot be easily explained by dimer condensation because the theoretical number of polymer binding sites is too high. On the other hand, the decrease and subsequent increase in fluorescence is statistically relevant. Because of the sensitivity of the excited state with respect to many conditions (e.g., viscosity, polarity, the presence of ions,...) another method to confirm the obtained results would be useful. In the case of AO, absorption spectroscopy can yield important information.

The absorption maximum of the monomeric form of AO is located at 492 nm and is often called the α -band. In absorption spectra, another two peaks can be found. The first, the β -band, is located at 465 nm and is related to the dimer peak. Between the α - and β -bands, an isosbestic point can be found at around 470 nm . At a high concentration of AO in the system, the β -band is replaced by the γ -band at $\sim 450 \text{ nm}$. This band is related to the absorption band for AO oligomers.¹¹

In our study we compared fluorescence and absorption data (Figure 4). For the absorption spectra we used the ratio of dimer to monomer absorbance determined at 465 and 492 nm , respectively (in Figure 4 depicted as dimer:monomer, which directly reflects changes in dimer presence in the sample). Despite the fact that the fluorescence and absorption data were

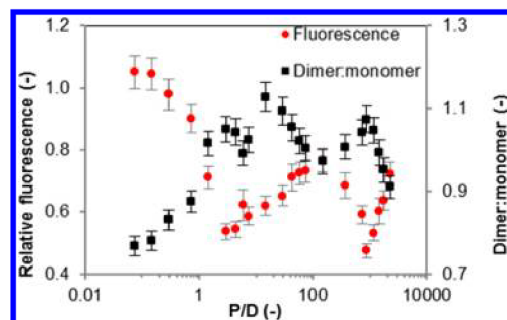


Figure 4. Comparison of dependencies of the relative fluorescence intensity and dimer:monomer ratio on the P/D . The concentration of hyaluronan covers the range from 0.5 mg L^{-1} to 15 g L^{-1} . Fluorescence is relative to the sample in which hyaluronan is not present.

collected according to different photophysical processes, they exhibit correlation behavior. In the region where fluorescence decreases, an increasing dimer:monomer ratio can be found and vice versa.

It can also be shown that interactions between acridine orange and hyaluronan have an electrostatic origin. In this case, the addition of low-molecular-weight salt can directly suppress the interaction via the shielding of charges. Figure 5

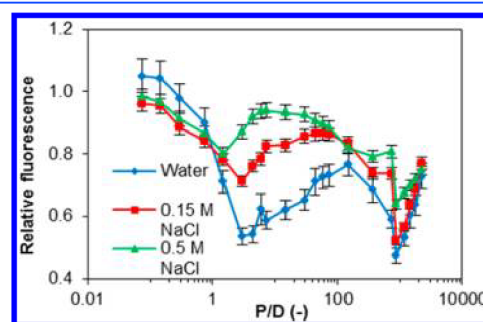


Figure 5. Dependencies of relative fluorescence intensity on P/D at different ionic strengths of the solution. The ionic strength was influenced by sodium chloride. Fluorescence is relative to the sample in which hyaluronan is not present.

summarizes the results from these experiments. At first sight, the addition of sodium chloride to the environment leads to suppression of the interaction between probe and polymer. This is manifested in higher values of relative fluorescence around $(P/D)_e$ with increasing ionic strength. The value of $(P/D)_e$ remains roughly the same for 0.15 M and decreases slightly from 3 to 2 for 0.5 M NaCl . Also, for the region between $(P/D)_e$ and a P/D of around 147, values of relative fluorescence follow changes in ionic strength.

A remarkable phenomenon occurs in the second-decrease region. This decrease is still present, and for 0.15 M NaCl , it seems not to be suppressed as much as the decrease around $(P/D)_e$. This phenomenon is interesting because hyaluronan occurs in mammalian tissue in units of grams per liter, and 0.15 M is the ionic strength of the human physiological environment. However, the mechanism behind it is open to discussion.

Thus, it can be concluded that the obtained results from the fluorescence measurements are a relevant reflection of dimer:monomer proportions in solution and that changes in fluorescence intensities are not caused by probe concentration fluctuations. AO labels at least a portion of hyaluronan

carboxylic groups with the equivalence point of $(P/D)_e = 3$, which corresponds to some saturation of the label on the labeled groups. However, these results do not directly explain the second decrease or rather the second region where the amount of AO dimer significantly increases.

One of the possible explanations of this phenomenon could be found in conformational changes in hyaluronan chains in solution or intrachain interactions. In units of grams per liter, hyaluronan should take a conformation that makes most binding sites inaccessible for electrostatic interaction with acridine orange. We showed changes in conformation using microrheology. This method allows the determination of the mean viscosity of the microstructure of a sample because small sensors used for microrheology determine the microviscosity of the microenvironment in contrast to macroscopic rheology or viscosity measurements. These small sensors better reflect small conformational changes in a sample. Of course, hyaluronan solutions, especially at concentrations above tens of milligrams per liter, are non-Newtonian fluids, so the obtained microviscosity values from microrheology are relevant only for comparison between them. The microrheology method was calibrated to the viscosity of water.

Figure 6 compares the obtained fluorescence and viscosity data. Both types of data were obtained for hyaluronan with a

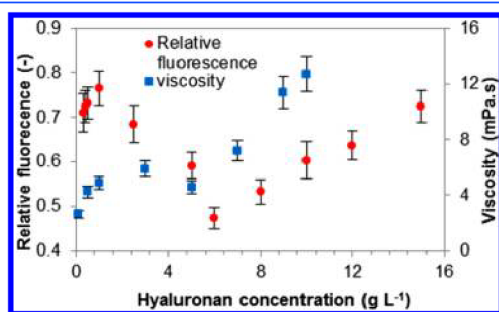


Figure 6. Dependencies of the fluorescence intensity and viscosity obtained from microrheology experiments on the hyaluronan concentration. Fluorescence is relative to the sample in which hyaluronan is not present.

molecular weight of 300 kg mol^{-1} in aqueous solution. The dependency of viscosity on concentration increases steeply at first and then shows a leveling off with a weak maximum within the range of roughly 3–5 g of hyaluronan per liter. It then exhibits an abrupt increase, which corresponds to the reincrease in relative fluorescence (after the second minimum in Figure 4).

More accurately, after $(P/D)_e = 3$ (hyaluronan concentration of 0.02 g L^{-1} , cf. Table S1), there is a region where the viscosity as well as fluorescence intensity (or dimer:monomer ratio) increases. This can be explained by the increasing concentration of polymer in solution, with more polymer chains meaning more binding sites and more barriers. An increase in viscosity is hindered in the region around 1 g L^{-1} hyaluronan, and at this point, the fluorescence starts to decrease significantly with increasing hyaluronan concentration. Thus, in the concentration region of 1 to 5 or 6 g L^{-1} , it appears that more chains in solution mean fewer binding sites and a smaller effect on the viscosity of the solution. In the region between 5 and 6 g L^{-1} both dependencies have their minimum, and above this region the viscosity as well as fluorescence intensity increases linearly. This increase can be explained by interchain interactions of

hyaluronan because at this concentration the chain domains start to overlap.

Here it can be concluded that changes in the occupation of polymer binding sites by cationic probes are commensurate with changes in viscosity. Especially in the region from 1 to 5 or 6 g L^{-1} it seems that polymer chains added to the solution form some kind of aggregate which does not affect the microviscosity and shields charged binding sites against interactions with cationic probes.

3.2. Interaction of CTAB with the Acridine Orange–Hyaluronan System. In this part of our study we were interested in whether the cationic surfactant CTAB is able to replace acridine orange dimers attached to the hyaluronan chain. We used a constant concentration of hyaluronan and acridine orange corresponding to the equivalence point determined in the previous section.

The absorption spectra showed a significant increase in absorbance when even $10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ CTAB was added to the acridine orange–hyaluronan system (spectra are shown in Supporting Information; they are represented also by the dimer:monomer ratio in Figure 7, see further in the text). In the

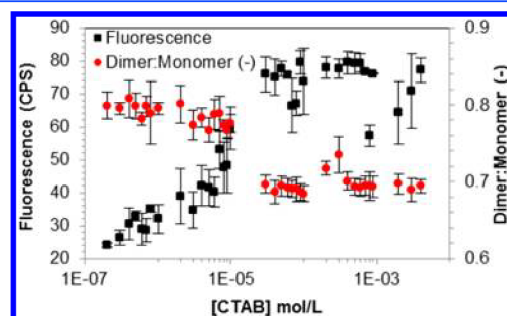


Figure 7. Dependencies of the fluorescence intensity and dimer:monomer ratio as a function of CTAB concentration in the AO–hyaluronan–CTAB system (concentrations of AO and hyaluronan correspond to the equivalence point $(P/D)_e = 3$).

absence of hyaluronan, there was no change in absorption spectra when CTAB was added to the AO solution; thus, the changes in absorption spectra in the presence of hyaluronan and with increasing CTAB concentration were caused by the electrostatic interaction of CTAB with hyaluronan. CTAB started to replace the acridine orange dimers, the dimers dissociated, and the dimer:monomer ratio decreased (i.e., the absorbance increased), especially around the CTAB concentration of 10^{-5} M . An interesting phenomenon occurred around the critical micelle concentration (in the literature, the CMC of CTAB is $0.92\text{--}1 \text{ mM}^6$) as the dimer:monomer ratio increased again (i.e., the absorbance decreased). CTAB probably started to form free micelles, which led to electrostatic attraction between acridine orange monomers in bulk solution and dissociated carboxylic groups. Acridine orange dimers were formed again, which was the reason for the increase in the dimer:monomer ratio. The reaggregation of acridine orange dimers caused both an increase in absorbance and a change in the dimer:monomer ratio.

The interaction of CTAB with the AO–hyaluronan system was further studied by steady-state fluorescence (Figure 7). The fluorescence intensity of acridine orange in a sample at the equivalence point $(P/D)_e$ without the addition of CTAB was significantly smaller than the fluorescence intensity in the presence of CTAB at the lowest concentration used, which

indicates that, at the equivalence point, there should be significant occupation of carboxylic groups of hyaluronan by AO dimers. The AO dimer has a reported emission band at around 650 nm.^{16,12,40} In our case, no such peak appeared around this region in any sample, which would suggest either no or very weak aggregation of AO on carboxylic groups of hyaluronan. However, the dependency of both relative fluorescence and the dimer:monomer ratio on P/D depicted in Figure 4 shows changes in the fluorescence intensity and dimer:monomer ratio, respectively, and confirms the formation of AO dimers.

After the addition of surfactant at a concentration lower than its CMC, the fluorescence intensity increased rapidly (Figure 7). This increase in fluorescence intensity (as well as the decrease in absorbance described above in the text) could be ascribed to the electrostatic interaction between hyaluronan and CTAB and to the dissociation of AO dimers. When the surfactant concentration was close to its CMC, the fluorescence intensity decreased (Figure 7). Such a phenomenon may be caused by the aggregation of some AO monomers into dimers again. Before the critical micelle concentration was reached, the electrostatic interaction caused the molecules of the surfactant not to remain at the air–water interface but to bind to carboxylic groups of hyaluronan.^{20–23} When the CMC of CTAB was reached, the surfactant molecules formed micelles not only on the hyaluronan chain but also in bulk water, which may again have led to the reavailability of some binding sites for AO. We believe that after the formation of micelles there are again some free binding sites on the hyaluronan chain where acridine orange forms dimers and that this is the reason that the fluorescence intensity decreased. This situation was seen also in absorption spectra, where the ratio of acridine orange dimer and monomer absorption increased when the CMC of CTAB was reached. In our study, the polyelectrolyte caused the single surfactant molecules to be pulled electrostatically into the water environment and to bind to the polymer chain before the critical micelle concentration was reached. Therefore, in general, electrostatic interactions must be stronger than repulsion between the surfactant chain and bulk water. Molecular dynamics simulations performed by Liu et al.⁴¹ showed the formation of the so-called “bottle-brush” structure caused by the adsorption of surfactants on the polyelectrolyte chain. We believe that this structure can also explain our results with AO. This hypothesis is supported by (unpublished) data from our other fluorescence study, which used traditional fluorescent probe pyrene to investigate the polarity of the microenvironment of the probe. The pyrene excitation polarity index (ExPI) as a function of surfactant concentration was used to evaluate this measurement. The ExPI is based on the fact that in the ground state the pyrene absorption band is shifted bathochromically in a nonpolar environment. The ExPI is obtained when the fluorescence intensities at two positions of the excitation monochromator (333 and 338 nm) are measured while the position of the emission monochromator (392 nm) remains constant.⁴² An example of data collected for hyaluronan is shown in Figure S3 in the Supporting Information, together with the data from this work. At low surfactant concentrations (before the critical aggregation concentration) we can see no change in ExPI when compared to water, while the fluorescence intensity of AO increases (cf. Figure 7). This means that surfactants bind to the polyelectrolyte chain but do not form any micellelike aggregates (i.e., they probably form the bottle-brush structure). The

formation of aggregates is detected at higher concentrations by decreasing ExPI (and by the leveling-off of the AO fluorescence intensity).

Fluorescence lifetimes were determined in the pure AO solution and in hyaluronan–AO and hyaluronan–AO–surfactant systems. In a diluted solution of acridine orange, we assumed monoexponential decay; in the AO–hyaluronan system, we assumed bi- or triexponential decay according to the formation of the AO dimer and/or oligomer with longer lifetimes than that of the monomer because fluorescence from the AO dimer excited state is a forbidden process.¹² Then, we assumed that after the addition of surfactant there should be an increase in the relative amplitude of the acridine orange monomer lifetime and that the decay should be monoexponential after the dissociation of all of the dimers. We obtained a monoexponential decay for diluted pure acridine orange solution with a lifetime of 1.75 ns as expected. The lifetime calculated from the decay curve of the equivalence point in hyaluronan–AO was 1.78 ns (i.e., very close to the value determined for pure AO). The equivalence point was determined by steady-state fluorescence as described in the previous section, where we also showed that the decrease in fluorescence intensity suggests the formation of AO aggregates. Lifetime measurements do not confirm the formation of AO dimers, but fluorescence from acridine orange aggregates is a forbidden process, which means that the lifetimes of acridine orange aggregates may not appear in the fluorescence decay. We assume that in steady-state measurements of samples around the equivalence point all we can see is the weak fluorescence of remaining nonaggregated acridine orange monomers. This was also assumed from the fluorescence spectra, where no dimer fluorescence peak appeared. The interaction between acridine orange and hyaluronan is probably not as strong as we assumed (also we have to consider that only 16% of binding sites appear to be available); however, there is still a weak electrostatic interaction and the dimers are still formed, which could be the reason that the fluorescence intensity decreased so rapidly before the equivalence point (Figure 4). Yet, the probability of fluorescence in these aggregates is low; thus, we do not see any other (dimer or oligomer) fluorescence peak in addition to the monomer lifetime. But if we had observed no increase in fluorescence intensity, it would have meant that the surfactant had not replaced acridine orange. It is also possible that the hydrophilic head of CTAB is too large to bond electrostatically to carboxylic groups of hyaluronan because of the hydration of the hyaluronan chain; however, we believe that this is not the case because we see changes in fluorescence intensities as a function of surfactant concentration. The hyaluronan hydration shell was probably the reason that acridine orange formed dimers with no significant fluorescence and why we saw only decreasing (or increasing in the case of interaction with the surfactant) fluorescence from acridine orange monomers.

3.3. Interaction of CTAB with an Acridine Orange–Polystyrenesulfonate System. According to the fluorescence and absorption spectra of acridine orange in the presence of polystyrenesulfonate (PSS), we assume that acridine orange forms dimers in the presence of polystyrenesulfonate (Figure 8). As in the case of hyaluronan, the fluorescence intensity of AO decreased with a concomitant increase in PSS concentration; the minimum was very shallow (Figure 8a) and it was not easy to determine the equivalence point. Apparently, the break point is at a P/D close to 1, in agreement with Peyratout

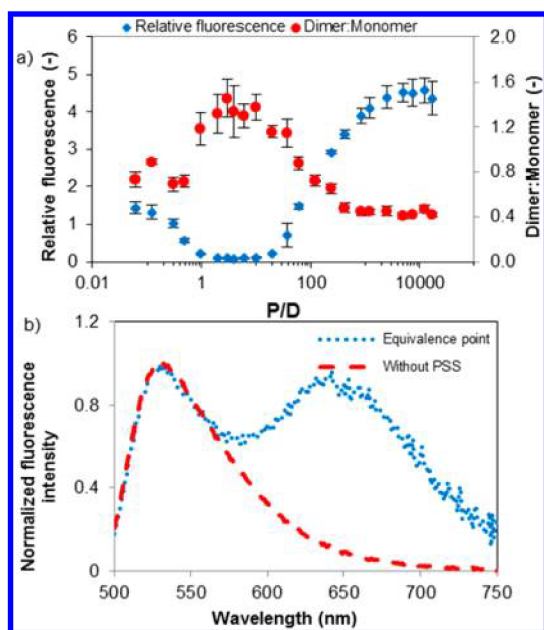


Figure 8. (a) Ratio of relative fluorescence and absorbance (D:M) of acridine orange monomer and dimer in the PSS–AO system. Fluorescence is relative to the sample in which PSS is not present. (b) Emission spectrum of acridine orange from a sample without PSS and with PSS (at the equivalence point determined in this section, $P/D = 4$).

et al.¹² in which, however, a very narrow range of P/D was used. Taking into account the numerical values of fluorescence intensities at P/D above 1 (and up to 20–30), their error bars, the corresponding D:M absorbance, and the relative representation of dimer fluorescence lifetimes (see further in the text), the equivalence point for $(P/D)_e$ was determined to be around 4 (0.825 mg/L). We assume that this value and the shallow minimum are a result of stronger AO interactions with PSS because of the formation of AO oligomers, which were determined using time-resolved fluorescence as described further in the text. Fluorescence spectra also showed the formation of a new (dimer) peak at around 650 nm (see the example of the system at the equivalence point in Figure 8b) when the PSS concentration was increased.^{12,19} This result suggests that AO dimer formation is much stronger in the presence of polystyrenesulfonate than in the presence of hyaluronan. At a P/D of around 10, there was an increase in fluorescence intensity accompanied by a decrease in the dimer:monomer absorbance ratio, which was obviously caused by the dissociation of acridine orange dimers due to the existence of too many binding sites to occupy. At this moment, acridine orange binds to the PSS chain, preferably in monomeric form.

After the addition of a premicellar concentration of surfactant (10^{-5} mol/L) to the PSS–AO system, the absorbance of the dimer:monomer ratio rapidly decreased, which suggests the dissociation of acridine orange dimers. Most importantly, however, the dimer peak at around 650 nm disappeared and the fluorescence intensity increased rapidly (results not shown). This means that the surfactant replaced the acridine orange dimers on the polystyrenesulfonate chain. The acridine orange dimers dissociated, which caused an increase in fluorescence intensity and the disappearance of the emission band of the AO dimer. Fluorescence lifetime measurements confirmed steady-state data. The fluorescence decay of acridine orange at the

determined equivalence point of $(P/D)_e = 4$ exhibited a lifetime of 1.66 ns for monomer, 15.94 ns for dimer, and 6.15 ns probably for other AO aggregates or the formation of an acridine orange–PSS complex, as reported for acridine orange–DNA complexes.⁴³ We assumed that the lifetime of 15.94 ns was the dimer lifetime because iterative reconvolution recovered the majority of long-lived components when we set the emission monochromator to 650 nm, where the emission maximum of the AO dimer is located. According to Ito et al., the lifetime of the AO dimer in the PVA film was around 10 ns.¹⁶ The relative representation of AO dimers increased with increasing P/D , and the maximum was recovered at around $P/D = 4$. Then, the relative representation of AO dimers decreased with the increasing representation of AO oligomers. A triexponential function to fit data around the equivalence point was used because the correlation between the measured data and fitting parameters was poor for a biexponential function (Figure S2 in Supporting Information). When a triexponential function was used, standard deviation values were randomly distributed around zero (Figure S2) and the χ_R^2 value decreased from 2.3 to 1.2 when compared to the biexponential function. After the addition of the above-mentioned concentration of surfactant (10^{-5} mol/L), fluorescence decay became monoexponential with a lifetime of 1.8 ns.

On the basis of the above results, the titration of acridine orange and PSS solution with CTAB was performed with an automatic titrator, and the emission spectrum of acridine orange was measured after every addition of surfactant. We managed to obtain a micro- to millimolar concentration range with minimized human error during the preparation of such small concentrations and the pipetting of such small volumes. From the plot of fluorescence intensity as a function of CTAB concentration, it is obvious that after the addition of a micromolar concentration the fluorescence intensity increased (Figure 9a). The increase in fluorescence intensity means that monomeric surfactant molecules replaced acridine orange dimers. These assumptions are confirmed in a plot of the monomer:dimer fluorescence intensity ratio as a function of CTAB concentration (Figure 9b). The monomer:dimer fluorescence intensity ratio increased after the first addition of surfactant until this ratio stabilized. The stabilization suggests the replacement of most of the AO dimers with surfactant molecules. Figure 9b suggests that the monomer:dimer ratio was stable after the addition of more than 1×10^{-5} M concentration of surfactant. This means that, as suggested in Figure 9a, the decrease in fluorescence intensity was caused by the dilution of the sample while the system was titrated by the surfactant.

3.4. Comparison of the Two Polyelectrolytes. A comparison of Figures 4 and 8a shows that labeling the two polyelectrolytes with acridine orange initially followed the same pattern (at low values of P/D) except for the first two or three points where the polymer concentration was very low, when the fluorescence intensity decreased with increasing P/D , and the absorbance ratio of dimer:monomer decreased in the same time. After the equivalence (saturation) point was reached, the fluorescence intensity in the case of PSS (the polyelectrolyte with higher charge density) started to increase and the dimer:monomer ratio decreased, which corresponded to the increasing number of AO bound in monomeric form to the increased number of available sulfonate groups. In the case of hyaluronan, the polyelectrolyte with low charge density, the

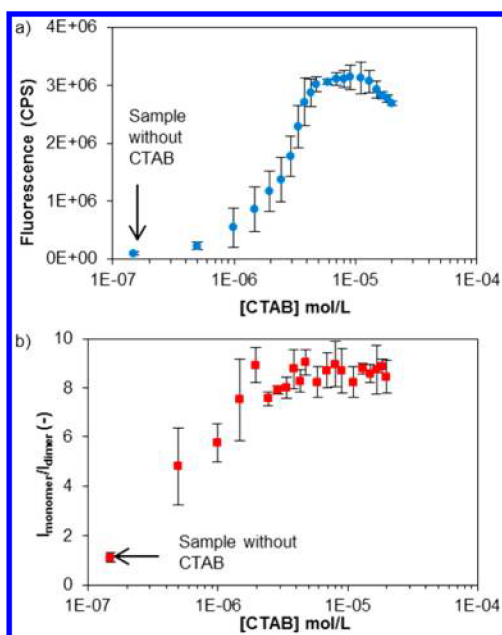


Figure 9. (a) Plot of the acridine orange fluorescence intensity as a function of increasing CTAB concentration. (b) Plot of the AO monomer/dimer fluorescence intensity ratio as a function of surfactant concentration. The concentrations of AO and PSS were held constant in all samples.

situation above the equivalence point was more complex. The fluorescence intensity showed a second minimum accompanied by a maximum in the dimer:monomer ratio dependence. This was probably caused by overlapping hydrated biopolymer chains and related microrheological effects at high hyaluronan concentrations. In the hyaluronan-containing systems, no fluorescence characteristics (either stationary or time-resolved) corresponding to the AO dimer were detected. In these systems, AO dimer fluorescence was quenched by effects of the dimer microenvironment, and dimer existence could be followed by absorption spectroscopy only. Both hyaluronan- and PSS-based systems prepared at the equivalence point composition responded to the addition of CTAB already at very low concentrations. The fluorescence intensity increased in comparison to both the surfactant-free system and with increasing surfactant concentration, and at the same time, the proportion of AO dimer decreased (which was more pronounced for the PSS-based systems). This demonstrated interactions between (AO-labeled) polyelectrolyte and surfactant. The changes in spectroscopic characteristics with surfactant concentration leveled off at a CTAB concentration of about 3×10^{-5} M for hyaluronan and 4×10^{-6} M for PSS, which are believed to correspond to the replacement of AO by the surfactant. These concentrations can be viewed as kinds of critical aggregation concentrations determined by the fluorescence method; as expected on the basis of charge density, the value for the PSS-based system was significantly lower than that for the hyaluronan-based system. These conclusions are also supported by the experiments with pyrene mentioned above and are illustrated for hyaluronan in Figure S3 and for PSS in Figure S4 in the Supporting Information. At the stated concentrations, the pyrene excitation polarity index started to decrease, indicating the formation of aggregates with hydrophobic domains. The value for PSS was significantly lower than characteristic values reported in the literature on the basis of

surface tension measurements,²¹ but the value for hyaluronan was in excellent agreement with the critical binding concentration determined from NMR self-diffusion measurements.³⁰ The fluorescence method presented in this work, like the NMR measurements, is more sensitive to interactions on the molecular level than methods such as surface tension.

4. CONCLUSIONS

Acridine orange was used as a fluorescent label attached to oppositely charged functional groups of biopolymer or synthetic polyelectrolyte–hyaluronan and polystyrenesulfonate, respectively. The labeling changed the fluorescence and absorption properties of dye molecules due to the formation of AO dimers. The ratio of the number of polymer binding sites to the number of dye molecules (P/D) at the equivalence point was determined at the point of the fluorescence intensity minimum. In the case of hyaluronan, a second minimum was detected at a much higher P/D value, probably caused by hyaluronan conformational changes at high concentrations. The dissociation of the AO dimer upon the addition of surfactant to the system corresponding to the equivalent P/D value was then used to study polymer–surfactant interactions. The interactions between hyaluronan and AO or surfactant were found to be weaker than the interactions with polystyrenesulfonate, probably due to the high hydration of hyaluronan chains. Critical aggregation concentrations of CTAB determined by the fluorescence method were 3×10^{-5} M for hyaluronan and 4×10^{-6} M for PSS. In the presence of both polyelectrolytes, surfactant molecules were pulled into the solution before the critical micelle concentration was reached. The formation and dissociation of acridine orange dimer exhibited the formation of the bottle-brush structure caused by the adsorption of surfactants on the polyelectrolyte chain.

■ ASSOCIATED CONTENT

📄 Supporting Information

Hyaluronan and PSS concentrations and respective P/D and pH values. UV–vis spectra of acridine orange in the presence of hyaluronan with increasing concentration of CTAB. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

■ AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*E-mail: xcmondek@fch.vutbr.cz.

Notes

The authors declare no competing financial interest.

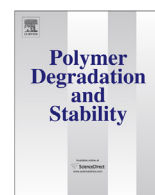
■ ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by project no. LO1211 (Ministry of Education, Czech Republic).

■ REFERENCES

- (1) Hiemenz, P. C.; Rajagopalan, R. *Principles of Colloid and Surface Chemistry*, 3rd ed.; Marcel Dekker: New York, 1997; p 650.
- (2) Kabanov, A. V.; Nazarova, I. R.; Astafieva, I. V.; Batrakova, E. V.; Alakhov, V. Y.; Yaroslavov, A. A.; Kabanov, V. A. Micelle Formation and Solubilization of Fluorescent Probes in Poly(oxyethylene-b-oxypropylene-b-oxyethylene) Solutions. *Macromolecules* **1995**, *28*, 2303–2314.
- (3) Weiss, J.; Coupland, J. N.; McClements, D. J. Solubilization of Hydrocarbon Emulsion Droplets Suspended in Nonionic Surfactant Micelle Solutions. *J. Phys. Chem.* **1996**, *100*, 1066–1071.

- (4) Goddard, E. D.; Turro, N. J.; Kuo, P. L.; Ananthapadmanabhan, K. P. Fluorescence probes for critical micelle concentration determination. *Langmuir* **1985**, *1*, 352–355.
- (5) Dominguez, A.; Fernandez, A.; Gonzalez, N.; Iglesias, E.; Montenegro, L. Determination of Critical Micelle Concentration of Some Surfactants by Three Techniques. *J. Chem. Educ.* **1997**, *74*, 1227.
- (6) Aguiar, J.; Carpena, P.; Molina-Bolívar, J. A.; Carnero Ruiz, C. On the determination of the critical micelle concentration by the pyrene 1:3 ratio method. *J. Colloid Interface Sci.* **2003**, *258*, 116–122.
- (7) Yu, L.; Tan, M.; Ho, B.; Ding, J. L.; Wohland, T. Determination of critical micelle concentrations and aggregation numbers by fluorescence correlation spectroscopy: Aggregation of a lipopolysaccharide. *Anal. Chim. Acta* **2006**, *556*, 216–225.
- (8) Gehlen, M. H.; De Schryver, F. C. Time-resolved fluorescence quenching in micellar assemblies. *Chem. Rev.* **1993**, *93*, 199–221.
- (9) Alargova, R. G.; Kochijashky, I. I.; Sierra, M. L.; Zana, R. Micelle Aggregation Numbers of Surfactants in Aqueous Solutions: A Comparison between the Results from Steady-State and Time-Resolved Fluorescence Quenching. *Langmuir* **1998**, *14*, 5412–5418.
- (10) Wattedled, L.; Laschewsky, A.; Moussa, A.; Habib-Jiwan, J.-L. Aggregation Numbers of Cationic Oligomeric Surfactants: A Time-Resolved Fluorescence Quenching Study. *Langmuir* **2006**, *22*, 2551–2557.
- (11) Costantino, L.; Guarino, G.; Ortona, O.; Vitagliano, V. Acridine orange association equilibrium in aqueous solution. *J. Chem. Eng. Data* **1984**, *29*, 62–66.
- (12) Peyratout, C.; Donath, E.; Daehne, L. Electrostatic interactions of cationic dyes with negatively charged polyelectrolytes in aqueous solution. *J. Photochem. Photobiol., A* **2001**, *142*, 51–57.
- (13) Lamm, M. E.; Neville, D. M. The Dimer Spectrum of Acridine Orange Hydrochloride. *J. Phys. Chem.* **1965**, *69*, 3872–3877.
- (14) Antonov, L.; Gergov, G.; Petrov, V.; Kubista, M.; Nygren, J. UV-Vis spectroscopic and chemometric study on the aggregation of ionic dyes in water. *Talanta* **1999**, *49*, 99–106.
- (15) Lauretti, F.; Lucas de Melo, F.; Benati, F.; amp, x; cio, J.; de Mello Volotão, E.; Santos, N.; Linhares, R. E. C.; Nozawa, C. Use of acridine orange staining for the detection of rotavirus RNA in polyacrylamide gels. *J. Virol. Methods* **2003**, *114*, 29–35.
- (16) Ito, F.; Kakiuchi, T.; Nagamura, T., Excitation Energy Migration of Acridine Orange Intercalated into Deoxyribonucleic Acid Thin Films. *J. Phys. Chem. C* **2007**, *111*, 6983–6988.
- (17) Sarkar, D.; Misra, T. N. Electrical conduction in some nucleic acid base complexes with acridine orange dye: study of localized levels. *Biomaterials* **1989**, *10*, 202–205.
- (18) Smal, J.; Kathuria, S.; De Meyts, P. Acridine orange, an inhibitor of protein kinase C, abolishes insulin and growth hormone stimulation of lipogenesis in rat adipocytes. *FEBS Lett.* **1989**, *244*, 465–468.
- (19) Wang, F.; Yang, J.; Wu, X.; Wang, X.; Feng, L.; Jia, Z.; Guo, C. Study on the formation and depolymerization of acridine orange dimer in acridine orange–sodium dodecyl benzene sulfonate–protein system. *J. Colloid Interface Sci.* **2006**, *298*, 757–764.
- (20) Goddard, E. D. Polymer/Surfactant Interaction: Interfacial Aspects. *J. Colloid Interface Sci.* **2002**, *256*, 228–235.
- (21) Taylor, D. J. F.; Thomas, R. K.; Penfold, J. Polymer/surfactant interactions at the air/water interface. *Adv. Colloid Interface Sci.* **2007**, *132*, 69–110.
- (22) Bain, C. D.; Claesson, P. M.; Langevin, D.; Meszaros, R.; Nylander, T.; Stubenrauch, C.; Titmuss, S.; von Klitzing, R. Complexes of surfactants with oppositely charged polymers at surfaces and in bulk. *Adv. Colloid Interface Sci.* **2010**, *155*, 32–49.
- (23) Goddard, E. D.; Ananthapadmanabhan, K. P. Applications of Polymer-Surfactant Systems. In *Polymer-Surfactant Systems*; Kwak, J. C. T., Ed.; Marcel Dekker: New York, 1998; Vol. 77, pp 21–65.
- (24) Lapčič, L.; De Smedt, S.; Demeester, J.; Chabreček, P. Hyaluronan: Preparation, Structure, Properties, and Applications. *Chem. Rev.* **1998**, *98*, 2663–2684.
- (25) Di Meo, C.; Panza, L.; Capitani, D.; Mannina, L.; Banzato, A.; Rondina, M.; Renier, D.; Rosato, A.; Crescenzi, V. Hyaluronan as Carrier of Carboranes for Tumor Targeting in Boron Neutron Capture Therapy. *Biomacromolecules* **2007**, *8*, 552–559.
- (26) Qhattal, H. S. S.; Liu, X. Characterization of CD44-Mediated Cancer Cell Uptake and Intracellular Distribution of Hyaluronan-Grafted Liposomes. *Mol. Pharmaceutics* **2011**, *8*, 1233–1246.
- (27) Oh, E. J.; Park, K.; Kim, K. S.; Kim, J.; Yang, J.-A.; Kong, J.-H.; Lee, M. Y.; Hoffman, A. S.; Hahn, S. K. Target specific and long-acting delivery of protein, peptide, and nucleotide therapeutics using hyaluronic acid derivatives. *J. Controlled Release* **2010**, *141*, 2–12.
- (28) Platt, V. M.; Szoka, F. C. Anticancer Therapeutics: Targeting Macromolecules and Nanocarriers to Hyaluronan or CD44, a Hyaluronan Receptor. *Mol. Pharmaceutics* **2008**, *5*, 474–486.
- (29) Vitagliano, V.; Costantino, L.; Zagari, A. Interaction between Acridine Orange and poly(styrenesulfonic acid). *J. Phys. Chem.* **1973**, *77*, 204–210.
- (30) Thalberg, K.; Lindman, B. Interaction between hyaluronan and cationic surfactants. *J. Phys. Chem.* **1989**, *93*, 1478–1483.
- (31) Cowman, M. K.; Matsuoka, S. Experimental approaches to hyaluronan structure. *Carbohydr. Res.* **2005**, *340*, 791–809.
- (32) Francius, G.; Hemmerlé, J.; Voegel, J. C.; Schaaf, P.; Senger, B.; Ball, V. Anomalous Thickness Evolution of Multilayer Films Made from Poly-L-lysine and Mixtures of Hyaluronic Acid and Polystyrene Sulfonate. *Langmuir* **2006**, *23*, 2602–2607.
- (33) Lakowicz, J. R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, 3rd ed.; Springer: New York, 2006; p 954.
- (34) Periasamy, N. Analysis of Fluorescence Decay by the Nonlinear Least Squares Method. *Biophys. J.* **1988**, *54*, 961–967.
- (35) Grinvald, A.; Steinberg, I. Z. On the analysis of fluorescence decay kinetics by the method of least-squares. *Anal. Biochem.* **1974**, *59*, 583–598.
- (36) Gardel, M. L.; Valentine, M. T.; Weitz, D. A. *Microrheology. In Microscale Diagnostic Techniques*; Springer: Berlin, 2005; pp 1–50.
- (37) Mason, T. G.; Weitz, D. A. Optical Measurements of Frequency-Dependent Linear Viscoelastic Moduli of Complex Fluids. *Phys. Rev. Lett.* **1995**, *74*, 1250–1253.
- (38) Wirtz, D. Particle-Tracking Microrheology of Living Cells: Principles and Applications. *Annu. Rev. Biophys.* **2009**, *38*, 301–326.
- (39) Matteini, P.; Dei, L.; Carretti, E.; Volpi, N.; Goti, A.; Pini, R. Structural Behavior of Highly Concentrated Hyaluronan. *Biomacromolecules* **2009**, *10*, 1516–1522.
- (40) Byrne, C. D.; de Mello, A. J.; Barnes, W. L. Variable-Angle Time-Resolved Evanescent Wave-Induced Fluorescence Spectroscopy (VATR-EWIFS): A Technique for Concentration Profiling Fluorophores at Dielectric Interfaces. *J. Phys. Chem. B* **1998**, *102*, 10326–10333.
- (41) Liu, Z.; Shang, Y.; Feng, J.; Peng, C.; Liu, H.; Hu, Y. Effect of Hydrophilicity or Hydrophobicity of Polyelectrolyte on the Interaction between Polyelectrolyte and Surfactants: Molecular Dynamics Simulations. *J. Phys. Chem. B* **2012**, *116*, 5516–5526.
- (42) Astafieva, I.; Zhong, X. F.; Eisenberg, A. Critical micellization phenomena in block polyelectrolyte solutions. *Macromolecules* **1993**, *26*, 7339–7352.
- (43) Kononov, A. I.; Moroshkina, E. B.; Tkachenko, N. V.; Lemmetyinen, H. Photophysical Processes in the Complexes of DNA with Ethidium Bromide and Acridine Orange: A Femtosecond Study. *J. Phys. Chem. B* **2000**, *105*, 535–541.



Kinetics of long-term degradation of different molar mass hyaluronan solutions studied by SEC-MALLS



Vasile Simulescu^{*}, Jakub Mondek, Michal Kalina, Miloslav Pekař

Materials Research Centre, Faculty of Chemistry, Brno University of Technology, Purkyňova 118, 612 00 Brno, Czech Republic

ARTICLE INFO

Article history:

Received 7 October 2014
Received in revised form
27 November 2014
Accepted 7 December 2014
Available online 16 December 2014

Keywords:

Hyaluronic acid
Degradation
SEC-MALLS
Polymer conformation

ABSTRACT

The degradation of hyaluronan of four molecular weights in aqueous solutions containing sodium azide as a protectant was studied by SEC-MALLS determination of molecular mass and polydispersity and conformation parameters. The solutions were stored either at laboratory or refrigerator temperatures for up to seven months. After this time the molar mass decreased in 9–15% (room temperature) or 5–10% (fridge) depending also on the storage conditions of solid samples from which the solutions were prepared. Two degradation phases were observed at room temperature conditions. Two kinetic models were employed to fit the data – zero order and exponential with no statistical preferences of any of them. The polydispersity of all samples was low and remained unaltered during the whole degradation at both temperatures which indicates non-random mechanism of degradation.

© 2014 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

One of the most important polysaccharide originated in mammal body is sodium salt of hyaluronic acid (HA). Its importance strongly increased in the last two decades. A lot of studies have focused on its physical-chemical behaviour, role in tissue, cell proliferation and developed ways how to use this polysaccharide in wound healing, drug delivery system, anti-ageing application and so on.

Hyaluronan is a linear natural polysaccharide of the glycosaminoglycans family. Its chemical structure comprises disaccharide units composed of D-glucuronic acid and N-acetyl-D-glucosamine, which are alternatively linked through 1,3 and 1,4 glycosidic bonds [1].

Different molar mass hyaluronan has different role in body. For example high molar mass hyaluronan organizes extracellular matrix and low molar mass hyaluronan can be found in injured tissue or in certain tumours [2,3]. This means, that high molar mass hyaluronan in human body reflects normal tissue, but low molar mass hyaluronan reflects damaged or stressed tissue [4].

For the above mentioned reasons many scientific groups reported studies how to influence hyaluronan molar mass or what can cause its degradation. Most of methods how to cleave

hyaluronan is summarized in review from Stern et al. published in 2007 [4]. They describe enzymatic degradation and non-enzymatic degradation of hyaluronan. Enzymatic degradation seems to be most suitable for preparation of hyaluronan fragments with lower molar mass. One of the important reasons is scission of the glycosidic linkages exclusively without modification of primary structure of hyaluronan.

Low or high pH conditions have obvious effect on hyaluronan. Hydrolysis occurs in acid solution on the glucuronic acid residue and the hemiacetal ring remains. In basic solution, hydrolysis occurs on N-acetylglucosamine residue. The hydrolysis obeys first order kinetics [5]. Other important observation suggested that random chain scission occurs during hydrolytic degradation [1,5,6]. As well as random chain scission occurs during hydrolytic degradation, the same mechanism was proposed for thermal degradation of hyaluronan [7,8]. The opposite conclusion to hydrolysis and thermal degradation was made to ultrasonication. Hyaluronan degrades in a non-random way when exposed to ultrasound resulting in a bimodal molar mass distribution [9]. Ultrasonication is preferable to other applied degradative procedures (i.e. conventional heating and microwave irradiation), because ultrasonication can reduce molar mass up to 100 kDa without significant changes in primary structure of hyaluronan [10].

Other possible ways of hyaluronan degradation can be presented, such as interaction with hydrogen peroxide [11], ozone [12], singlet oxygen and so on, but it would be beyond the scope of this paper and all of these methods are summarized in the review by

^{*} Corresponding author. Tel.: +420 541149411.
E-mail address: simulescu@fch.vutbr.cz (V. Simulescu).

Stern et al. [4] or some of these aspects are also in the review from Lapčík et al. [1]. Hyaluronan is a strongly hydrophilic molecule [13].

There is very little information on the stability of hyaluronan molecular mass in solutions after hyaluronan powder is dissolved in water. In other words, little information on degradation of hyaluronan solutions prepared and stored in laboratory for various purposes. This is the first report on this issue.

2. Materials and methods

The degradation of hyaluronan samples of four different molar masses was studied by SEC-MALLS technique in order to observe the changes of molar mass, polydispersity and polymer conformation in time. All hyaluronic acid samples which were at disposal for this study were obtained from Contipro (Czech Republic) where were produced by fermentation (*Streptococcus equi*, subsp. *Zooepidemicus* bacterial strain). The product names and their actual weight averaged molar masses, given by the producer who had measured it also with SEC-MALLS when the fresh solid powder of hyaluronan was obtained by fermentation, were as follows:

- HA 1 MDa: $M_w = 1$ MDa;
- HA 0.75 MDa: $M_w = 752$ kDa;
- HA 200–300 kDa: $M_w = 267$ kDa;
- HA 10–150 kDa: $M_w = 17$ kDa.

These solid materials were kept in different conditions before used for this study and were thus subjected to some potential degradation in the solid state:

- HA 1 MDa: 6 years old, kept in the fridge (5–7 °C) during this period;
- HA 0.75 MDa: one year old, kept in fridge during this period;
- HA 200–300 kDa: one year old, kept in desiccator at room temperature during this period;
- HA 10–150 kDa: the powder was obtained just few weeks before this study and kept in fridge prior to analysis.

Thus also some information on the degradation during the storage in the solid state could be obtained besides the main goal – study of degradation in solution.

The SEC-MALLS equipment used in the present work was produced by Wyatt (USA; the detector part) and by Agilent (USA; the chromatography part). It included MALLS detector (Dawn Heleos II), viscometric detector (ViscoStar II) and RI detector (Optilab T-rEX). The multi angle laser light scattering detector had 18 angles of detection, ranging from 10° to 160°. Astra 6 software package was used for data collection and analysis.

The chromatograph contained degasser, isocratic pump, auto-sampler, column for size exclusion chromatography (one PL aquagel-OH MIXED-H 8 μm PL1149-6800 produced by Agilent was used), and thermostat. The mobile phase used was 0.1 M NaNO₃ aqueous solution, containing 3 mM NaN₃ to prevent microorganism growing. Sodium azide is commonly used protectant of hyaluronan solutions. All SEC-MALLS measurements were performed at 25 °C.

The solutions of hyaluronic acid were prepared with the same solvent as the mobile phase. We used solutions of different concentrations, ranging from 1 mg/ml for high molar mass samples hyaluronan up to 5 mg/ml for low molar mass samples.

SEC-MALLS technique allows:

- the separation of different polymeric compounds (fractions) according to their molar masses
- the determination of absolute molar mass averages from 10² Da to 10⁹ Da

- the calculation of polydispersity
- the determination of the root mean square radius (RMS), also known as “radius of gyration” (R_g)
- the determination of conformation plot and Mark-Houwink-Sakurada (MHS) plot

From the slope of the conformation plot $RMS = f(M_w)$ the shape of the polymer can be found [14–16]. The shape of the polymer can be obtained as well from Mark-Houwink-Sakurada plot [14,17–20].

For molar mass calculation Zimm model was used [21,22]. The refractive index increment (dn/dc) value used to calculate the molar mass was 0.165 mL/g [23,24].

3. Results and discussions

As noted in the preceding section, the degradation of hyaluronan samples could occur first in the solid state during the storage of the powdered samples before this study and then occurred in aqueous solutions prepared for this study. The degradation in the solid state really occurred, except for HA 10–150 kDa (the shortest storage in the solid state), as was confirmed by the SEC-MALLS analysis of the fresh prepared solutions which served as initial points for this study (Table 1).

The degradation in the solid state expressed as the molar mass loss relatively to the value given by the producer was as follows: 47.4% for HA 1 MDa, 15.8% for HA 0.75 MDa, 34.2% for HA 200–300 kDa. The degradation corresponds to the storage conditions as expected – higher molar mass loss is observed for the longer storage and/or for the storage at higher temperature. From these values an overall degradation rate of solid preparations could be estimated in %/year: 7.9 for HA 1 MDa, 15.8 for HA 0.75 MDa, 34.2 for HA 200–300 kDa. We will come back to degradation kinetics below but it is clear that the degradation is faster during the storage at laboratory temperature.

As an example, the SEC-MALLS record obtained for the fresh solution of HA 10–150 kDa sample is shown in Fig. 1 (in this case concentration was 2.5 mg/ml). The standard deviation of the results obtained with SEC-MALLS for the same sample at the same conditions was around 1%.

After measuring the fresh solutions, an amount of the prepared solutions was kept at room temperature, and other amount was kept in the fridge. The solutions were then analyzed after one week, one month, 3, 5 and 7 months (the low molar mass samples were also measured at one month and a half). In Table S1 (supplementary information) are the values of weight average molar mass (M_w) and mass loss for all solutions measured at different periods.

At room temperature, we observed an exponential or perhaps hyperbolic decrease of M_w in time (Figs. 2 and 3). We can see that after certain period of fast decrease of molar mass, the degradation rate at room temperature is very small.

After more than 90 days in the fridge, only a small decrease in molar mass was observed, especially for the samples with higher molar masses. The values of molar mass found after 90 days for the samples kept in the fridge were still higher than the values of molar

Table 1
Weight averaged molar mass (M_w) and polydispersity determined for fresh hyaluronan solutions.

Sample name	M_w kDa	Polydispersity
HA 1 MDa	526	1.20
HA 0.75 MDa	633	1.30
HA 200–300 kDa	176	1.25
HA 10–150 kDa	17.1	1.10

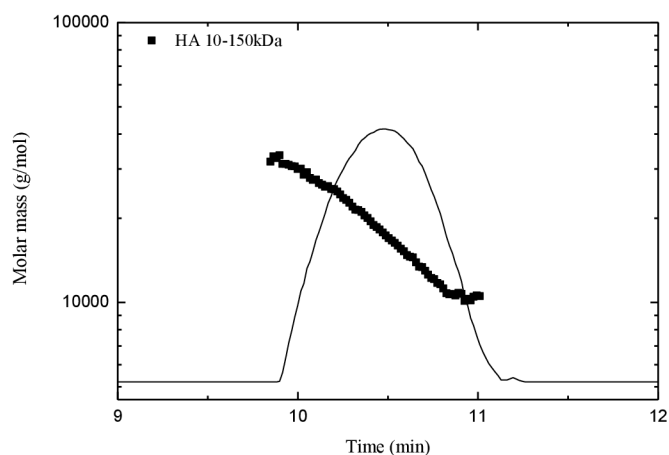


Fig. 1. SEC-MALLS record obtained for fresh solution of the HA 10–150 kDa sample.

mass found for the samples kept at room temperature. This proved that the degradation is much slower for the samples kept in the fridge than for the same samples kept at room temperature, in accord with Arrhenius law.

The conformation plots for HA 1 MDa, HA 0.75 MDa and HA 200–300 kDa (given as an example in Fig. 4) samples at different

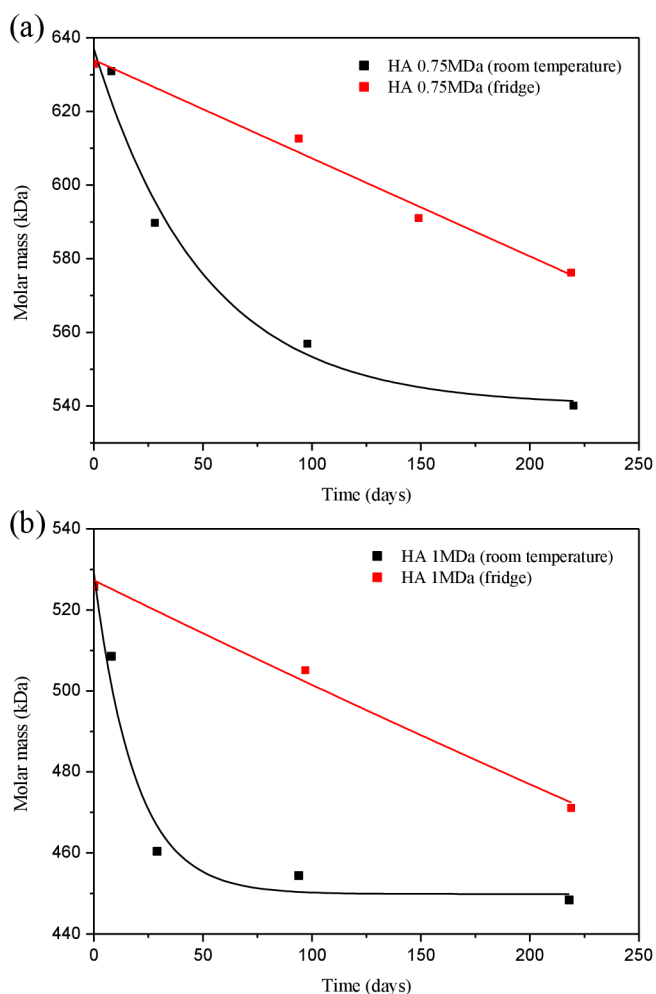


Fig. 2. The degradation of HA 0.75 MDa (a) and HA 1 MDa (b) in time at room temperature and in the fridge.

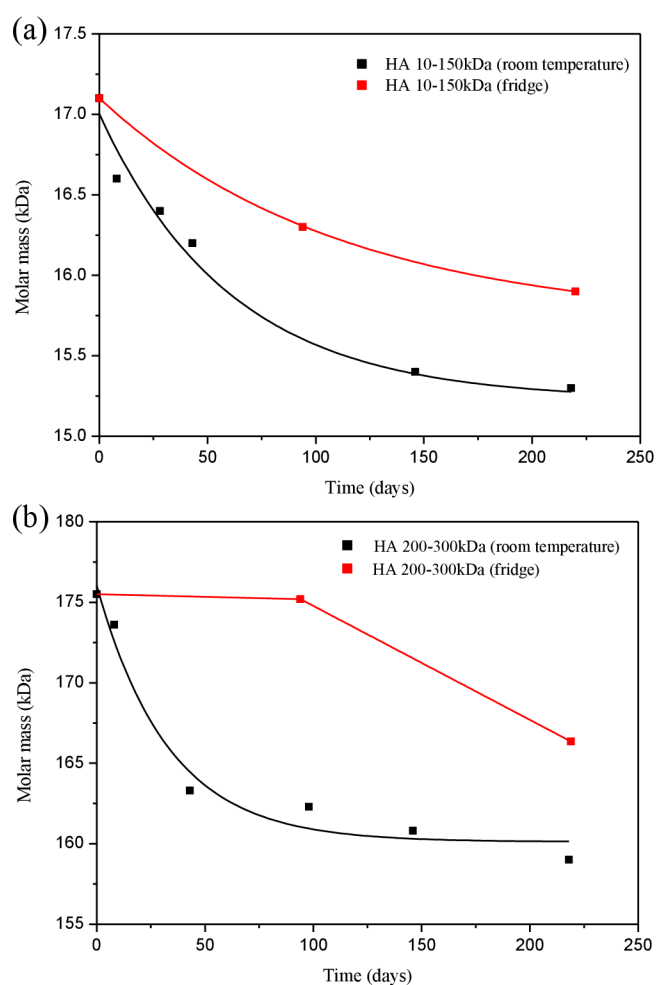


Fig. 3. The mass decrease of HA 10–150 kDa (a) and 200–300 kDa (b) in time at room temperature and in the fridge.

periods, at room temperature and in the fridge, gave the value of α coefficient between 0.5 and 0.7. This value indicates that the polymer shape is random coil and it was not changed during storage and degradation during the storage.

The Mark-Houwink-Sakurada plots (MHS, example see Fig. 5) confirmed the random coiled shape of HA 1 MDa, HA 0.75 MDa and

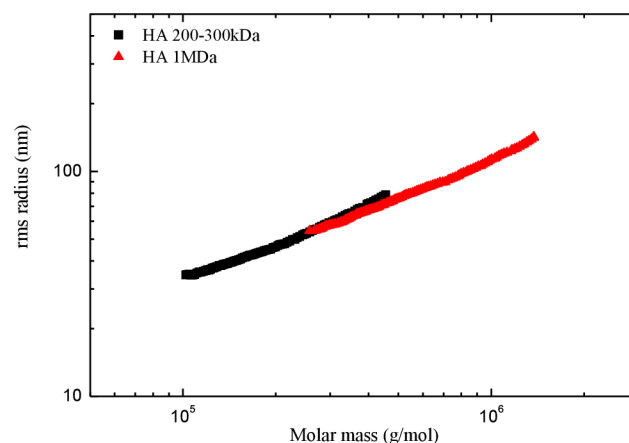


Fig. 4. The conformation plot of HA 1 MDa and HA 200–300 kDa fresh solutions.

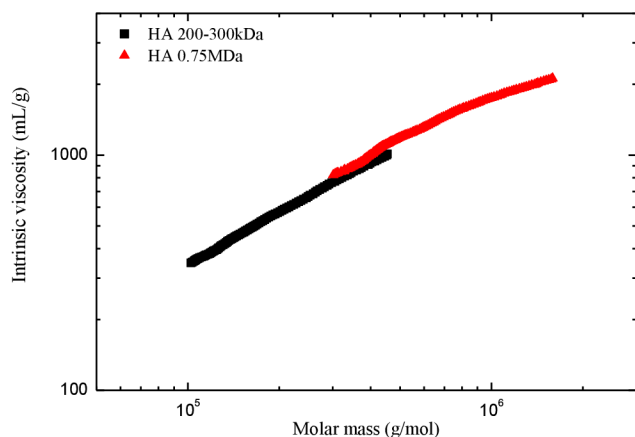


Fig. 5. MHS plot for HA 0.75 MDa and HA 200–300 kDa fresh solutions.

HA 200–300 kDa samples. For these samples the coefficients found from the MHS slopes (a) showed values ranging from 0.5 to 0.8 as expected for random coiled polymers.

In the case of the shortest hyaluronan chains, sample HA 10–150 kDa, the coefficients found from the MHS plot (Fig. 6) showed different values, between 1.2 and 1.54, not changing during the storage. All the coefficients found from MHS plot for HA 10–150 kDa are higher than for the other hyaluronan samples analyzed.

The maximum value of this coefficient for random coiled polymer is 0.8 and the value expected for rigid rod is 1.8. MHS thus proved that the shape of HA 10–150 kDa is between random coil and rigid rod. The results obtained from MHS plot for HA 10–150 kDa samples were also confirmed by the conformation plot (example see in Fig. 7). In this case the very low molar mass does not allow the formation of random coil conformation. In other words, the polymer of a very low molar mass is too short to form a random coil conformation, and for this reason it behaves more like a rod. This behaviour is not changed during the storage, naturally. MHS and conformation plots are collected in Supplementary information (Figs. S1–7).

The curves given in Figs. 2 and 3 clearly show kinetic differences between the storage at room temperature and in the fridge. The degradation at the room temperature occurred in two phases – fast phase followed by slow phase. In fridge the degradation resulted in essentially linear or slightly curved decrease of molar mass.

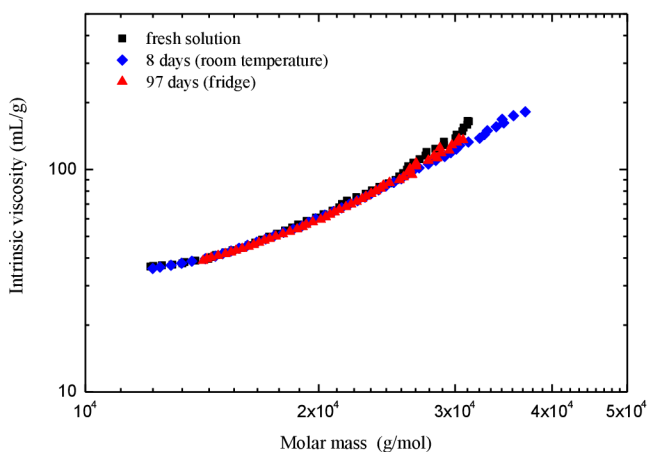


Fig. 6. MHS plot for HA 10–150 kDa samples at different periods of storage.

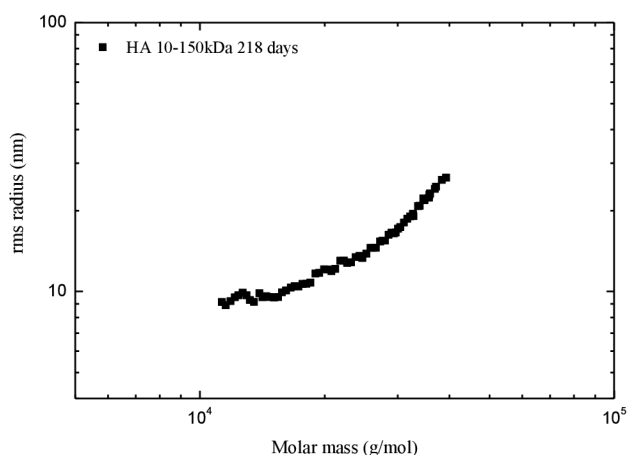


Fig. 7. The conformation plot for HA 10–150 kDa stored at room temperature after 218 days.

However, the slight curvature shows that it cannot be excluded that after yet longer period the second phase will appear also for the fridge-stored solutions. According to Tokita and Okamoto [5], degradation of hyaluronan obeys first order kinetics. Dependencies of molar mass on time, determined in samples kept at room temperature, may suggest exponential decay of the first order kinetics. By plotting the data in the form of linearized first order kinetic equation,

$$\ln M_w = -kt + \ln M_{w0} \quad (1)$$

we found out that dependencies are not linear (k is the slope, t is the time, M_{w0} is the initial molar mass at zero time).

We proposed two degradation models for the rate of hyaluronan degradation. First model was based on fitting straight lines through data points shown in Figs. 2 and 3. In the case of room temperature degradation, two linear fits were applied – one for each of the two detected phases. In fact, this is a zero order kinetic model (two such models in the case of the room temperature storage) – the linear decrease of molar mass:

$$M_w = M_{w0} + k_0 t \quad (2)$$

gives by differentiation:

$$\frac{dM_w}{dt} = k_0 \quad (3)$$

Table 2

Parameters of kinetic models, adjusted R-square values and time of the end of the first degradation phase (t_e), Samples stored at room temperature* and in the fridge**.

Sample name	10–150 kDa	200–300 kDa	0.75 MDa	1 MDa
k^* (h^{-1})	-6.2×10^{-4}	-1.3×10^{-3}	-8.3×10^{-4}	-2.2×10^{-3}
adj. R-square _{exp} *	0.97	0.96	0.96	0.95
M_{inf} (kDa)	15.2	160	540	450
M_{diff} (kDa)	1.8	16	97	80
k_{01}^* (kDa h^{-1})	-7.6×10^{-4}	-1.2×10^{-2}	-6.8×10^{-2}	-9.4×10^{-2}
k_{02}^* (kDa h^{-1})	-2.2×10^{-4}	-1.1×10^{-3}	-1.0×10^{-2}	-2.6×10^{-3}
t_e (h)	1073	1022	808	706
adj. R-square ₀₁ *	0.78	0.99	0.89	1.00
adj. R-square ₀₂ *	0.80	0.98	0.78	0.94
k_0^{**} (kDa h^{-1})	-2.2×10^{-4}	-2.9×10^{-3}	-1.1×10^{-2}	-1.1×10^{-2}
adj. R-square ₀ **	0.85	1.00	0.98	0.99

which is zero order kinetic equation with the rate constant k_0 . Rate constants evaluated from data are collected in Table 2. Rate constants for the first degradation phase at room temperature decreased (in absolute values) with decreasing molar mass but for the samples with some previous storage history (HA 1 and 0.75 MDa and 200–300 kDa) were of the same order of magnitude and in two orders of magnitude higher than for the fresh sample (HA 10–150 kDa). Thus the age of solid preparation seems to be more important than its specific molar mass. Rate constants in the second phase at room temperature (k_{02}) are about 3–30 times lower comparing to the first stage (k_{01}).

Rate constants for the zero order model and samples stored in the fridge were several times lower than constants determined for the first stage of the storage of corresponding samples at the room temperature. The highest absolute values were found for the two samples of the highest molecular weight whereas the slowest degradation was found for the sample HA 10–150 kDa (fresh powder). In the latter case the dependence of M_w on time was slightly curved but the linear fitting was still acceptable at least for the purpose of comparison. For the sample HA 200–300 kDa no degradation was observed during the first 100 days. Calculation of degradation rate constant of this sample was thus based on two points only for the sake of comparison.

The second degradation model, applicable only for samples stored at the room temperature, was designed empirically taking into account the exponential decrease of the molar mass:

$$M_w = M_\infty + M_{diff}e^{-kt}, \quad (4)$$

where the parameter M_∞ represents the theoretical asymptotic value at $t \rightarrow \infty$ ($\Rightarrow e^{-\infty} \rightarrow 0 \Rightarrow M_w \rightarrow M_\infty$) and the second parameter M_{diff} represents the difference between the initial molar mass and the asymptotic value. Fit of $M_w = f(t)$ with equation (4) yields the overall rate constant k . Parameters of the second model determined by data fitting are summarized in Table 2. The rate constants of the two models cannot be compared due to the differences in their units. However, the highest value of the overall rate constant was found for the sample HA 1 MDa whereas the lowest value for the sample HA 10–150 kDa as in the case of zero order model in the first phase. Comparison of adjusted R-squares determined by Origin software indicates no clear preference of one of the two models.

If the degradation of solid samples given in the beginning of this section (%/year) is recalculated to kDa lost per hour the resulting numbers are between the absolute values of k_{01} and k_{02} of corresponding samples. Probably also in the solid state storage two degradation phases can be expected. Thus the solid sample HA 1 MDa was already in the second phase whereas the samples HA 200–300 kDa and 0.75 MDa in the transition between the two phases.

The polydispersity of all samples remained practically unaltered during the storage degradation. This indicates that the degradation could not proceed via random scission of hyaluronan chains to fragments of various lengths which is usually the mechanism of chemical, non-enzymatic breakdown [4]. We can therefore hypothesize that the observed degradation was caused by residual microbial exo-products released and contained in aqueous medium (or as production residue in the solid sample) before the addition of protectant.

All chains were progressively degraded in a synchronous way by releasing very small fragments which were not detected in SEC-MALLS technique. Actually, the RI detector showed some very small fluctuations of the baseline at retention times behind the light scattering peak (around 0.5% of sample peak intensity, see Fig. S8 in Supplementary information) which can indicate presence

of these fragments (but it could be also a consequence of noise or impurities coming from the column).

This would also explain the relatively small decrease of molecular weight and the significant deceleration of degradation observed in the second phase during the storage at laboratory temperature – the degrading agents were mostly consumed in the first phase.

4. Conclusions

As expected the degradation of hyaluronic acid dissolved in water, as evaluated by the decrease of its average molecular mass, was faster at room temperature than in the fridge for all samples analyzed in this work. After about 7 months of storage of solutions the molar mass decreased in 9–15% (room temperature) or 5–10% (fridge) depending also on the storage conditions of solid samples from which the solutions were prepared. Thus, on average, the decrease of hyaluronan molar mass during storage of its solutions in water (added with antimicrobial agent) was relatively small even after several months. The storage conditions of solid hyaluronan used to prepare solutions seem to outweigh the effect of molecular mass on the degradation rate.

At room temperature the degradation showed two phases – fast initial phase followed after 1–1.5 month by slow phase. The data at the room temperature could be satisfactorily fitted by two kinetic models – two-part zero order model and exponential model. The data collected for the fridge storage showed essentially a linear decrease of molecular mass with time and were fitted with single zero order model.

From the conformation and Mark-Houwink-Sakurada plots, the random coiled shape was confirmed for all samples except the sample of the lowest molecular mass and was retained during the degradation. The conformation of the sample of the lowest molecular mass (17 kDa) was found to be between random coil and rod and also retained during the degradation.

The polydispersity of all samples was low and remained unaltered during the whole degradation at both temperatures. This excludes random scission mechanism of degradation.

Acknowledgement

The authors acknowledge the financial support of project Excellent Teams – CZ.1.07/2.3.00/30.0005 and the project LO 1211 Ministry of Education, Youth and Sports of Czech Republic.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data related to this article can be found at <http://dx.doi.org/10.1016/j.polyimdegradstab.2014.12.005>.

References

- [1] Lapcik L, De Smedt S, Demeester J, Chabreck P. Hyaluronan: preparation, structure, properties, and applications. *Chem Rev* 1998;98:2663–84.
- [2] Qhattal HSS, Liu X. Characterization of CD44-mediated cancer cell uptake and intracellular distribution of hyaluronan-grafted liposomes. *Mol Pharm* 2011;8:1233–46.
- [3] Noble PW. Hyaluronan and its catabolic products in tissue injury and repair. *Matrix Biol* 2002;21:25–9.
- [4] Stern R, Kogan G, Jedrzejewski MJ, Soltés L. The many ways to cleave hyaluronan. *Biotechnol Adv* 2007;25:537–57.
- [5] Tokita Y, Okamoto A. Hydrolytic degradation of hyaluronic acid. *Polym Degrad Stab* 1995;48:269–73.
- [6] Reed CE, Reed WF. Light scattering power of randomly cut random coils with application to the determination of depolymerization rates. *J Chem Phys* 1989;91:7193–9.
- [7] Bothner H, Waaler T, Wik O. Limiting viscosity number and weight average molecular weight of hyaluronate samples produced by heat degradation. *Int J Biol Macromol* 1988;10:287–91.

- [8] Reháková M, Bakos D, Soldán M, Vizárová K. Depolymerization reactions of hyaluronic acid in solution. *Int J Biol Macromol* 1994;16:121–4.
- [9] Vercruyse KP, Lauwers AR, Demeester JM. Absolute and empirical determination of the enzymatic-activity and kinetic investigation of the action of hyaluronidase on hyaluronan using viscometry. *Biochem J* 1995;306:153–60.
- [10] Dřimalová E, Velebný V, Sasinková V, Hromádková Z, Ebringerová A. Degradation of hyaluronan by ultrasonication in comparison to microwave and conventional heating. *Carbohydr Polym* 2005;61:420–6.
- [11] Soltés L, Brezová V, Stankovská M, Kogan G, Gemeiner P. Degradation of high-molecular-weight hyaluronan by hydrogen peroxide in the presence of cupric ions. *Carbohydr Res* 2006;341:639–44.
- [12] Wu Y. Preparation of low-molecular-weight hyaluronic acid by ozone treatment. *Carbohydr Polym* 2012;89:709–12.
- [13] Cowman MK, Matsuoka S. Experimental approaches to hyaluronan structure. *Carbohydr Res* 2005;340:791–809.
- [14] Harding SE. Sedimentation analysis of polysaccharides. *Analytical ultracentrifugation in biochemistry and polymer science*. Cambridge: Royal Society of Chemistry; 1992. p. 495–513.
- [15] Harding SE. On the hydrodynamic analysis of macromolecular conformation. *Biophys Chem* 1995;55:69–93.
- [16] Harding SE. Some recent developments in the size and shape analysis of industrial polysaccharides in solution using sedimentation analysis in the analytical ultracentrifuge. *Carbohydr Polym* 1995;28:227–37.
- [17] Wagner HL, Verdier PH. The characterization of linear polyethylene SRM's 1482, 1483, and 1484. IV. Limiting viscosity numbers by capillary viscometry. *J Res Natl Bureau Stand* 1978;83:195–201.
- [18] Han CC. Molecular weight and temperature dependence of intrinsic viscosity of polymer solutions. *Polymer* 1979;20:1083–6.
- [19] Hiemenz PC, Timothy LP. *Polymer chemistry*. 2nd ed. vol. 336. Marcel Dekker Inc.; 2007. p. 338–9.
- [20] Harding SE. The intrinsic viscosity of biological macromolecules. *Progress in measurement, interpretation and application to structure in dilute solution*. *Prog Biophys Mol Biol* 1997;68:207–62.
- [21] Zimm BH. The scattering of light and the radial distribution function of high polymer solutions. *J Chem Phys* 1948;16:1093–9.
- [22] Wyatt PJ. Light scattering and the absolute characterization of macromolecules. *Anal Chim Acta* 1993;272:1–40.
- [23] Huglin MB. *Specific refractive index increments of polymers in dilute solution*. New York: John Wiley & Sons; 1989. VII/409.
- [24] Literature data base – dn/dc data; 2014 www.wyatt.de.



Contents lists available at ScienceDirect

Carbohydrate Polymers

journal homepage: www.elsevier.com/locate/carbpol

Short communication

Long-term degradation study of hyaluronic acid in aqueous solutions without protection against microorganisms

Vasile Simulescu^{a,b,*}, Michal Kalina^a, Jakub Mondek^a, Miloslav Pekař^a^a Materials Research Centre, Faculty of Chemistry, Brno University of Technology, Purkyňova 118, 612 00 Brno, Czech Republic^b Institute of Chemistry Timisoara of the Romanian Academy, 24 Mihai Viteazul Bvd., Timisoara 300223, Romania

ARTICLE INFO

Article history:

Received 7 May 2015

Received in revised form 27 October 2015

Accepted 31 October 2015

Available online 3 November 2015

Keywords:

Hyaluronic acid

Degradation

SEC-MALLS

MHS plot

Polymer conformation

ABSTRACT

The degradation of hyaluronan (HA) of different molecular weights (M_w 14.3, 267.2 and 1160.6 kDa, measured for fresh solutions, before degradation) was studied in aqueous solutions by SEC-MALLS determination of molecular mass, polydispersity and conformation parameters. The solutions were stored either at laboratory or refrigerator temperatures for two months. After this period the weight average molecular weight decreased by 90% for 14.3 kDa, 95% for 267.2 kDa and 71% for 1160.6 kDa hyaluronan (room temperature) or 5.6% for 14.3 kDa, 6.2% for 267.2 kDa and 7.7% for 1160.6 kDa hyaluronan (refrigerator temperature).

The hyaluronan aqueous solutions studied did not contain sodium azide or other protectants against microorganisms, because the aim of our study was to assess the degradation in solutions to be used in medicine or cosmetics (without any compounds that are poisonous or toxic for the human body). The solvent used to prepare the samples was pure water.

The polydispersity of all the samples remained unaltered during the entire degradation at both temperatures. This indicates a non-random mechanism of degradation.

© 2015 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Hyaluronan (HA) is a linear natural polysaccharide of the glycosaminoglycans family. Its chemical structure comprises disaccharide units composed of β -D-glucuronic acid and N-acetyl β -D-glucosamine, which are alternately linked through (1 \rightarrow 3) and (1 \rightarrow 4) glycosidic bonds [\rightarrow 4)- β -D-GlcA-(1 \rightarrow 3)- β -D-GlcNAc-(1 \rightarrow)] (Lapčík, De Smedt, Demeester, & Chabreck, 1998). Hyaluronan occurs naturally in the synovial fluid that surrounds the joints. It is one of the most important polysaccharides originated in mammalian bodies. Hyaluronic acid has many applications in medicine and cosmetics. The consistency of hyaluronan becomes thinner in individuals with osteoarthritis. Hyaluronic acid has been used for osteoarthritis treatment, by direct injection into the knee joint.

It is important to know details of hyaluronic acid degradation in aqueous solutions to be used in medicine and cosmetics, without any protection against microorganisms. In other words, it is important to know how long such solutions can be stored without significant degradation of the polymer.

Hyaluronic acid of different molecular weight plays different roles in the human body. High molecular weight hyaluronan organizes the extracellular matrix, while low molecular weight hyaluronan can be found in injured tissues or in tumours (Qhatal & Liu, 2011; Noble, 2002; Stern, Kogan, Jędrzejak, & Šoltés, 2007; Kogan, Šoltés, Stern, & Gemeiner, 2007). For this reason it is important to study the degradation of both high and low molecular weight hyaluronan in aqueous solutions without the addition of other compounds which prevent the growth of microorganisms (such as sodium azide).

In our study we used three hyaluronan samples of different molecular weight:

- HA 90–130 kDa (Producer determined weight average molecular weight M_w = 117 kDa)
- HA 300–500 kDa (Producer determined weight average molecular weight M_w = 458 kDa)
- HA 1750 kDa (Producer determined weight average molecular weight M_w = 1669 kDa)

All samples studied were produced by Contipro, Czech Republic. Many research teams have reported on studies of hyaluronic acid degradation (Lapčík et al., 1998; Tokita & Okamoto, 1995; Reed & Reed, 1989; Bothner, Waaler, & Wik, 1988; Reháková, Bakoš,

* Corresponding author at: Faculty of Chemistry, Brno University of Technology, Materials Research Centre, Purkyňova 118, 612 00 Brno, Czech Republic. Tel.: +420541149411.

E-mail address: simulescu@fch.vutbr.cz (V. Simulescu).

Table 1

Number and weight average molecular weight and polydispersity (M_w/M_n) determined for fresh hyaluronan solutions.

Sample name	M_n kDa	M_w kDa	M_w/M_n
HA 90–130 kDa	10.6	14.3	1.35
HA 300–500 kDa	250.8	267.2	1.07
HA 1750 kDa	1132.3	1160.6	1.03

Soldán, & Vizárová, 1994; Verduyck, Lauwers, & Demeester, 1995; Dřimalová, Velebný, Sasinková, Hromádková, & Ebringerová, 2005). However, there is little information on the stability of hyaluronan degradation in aqueous solutions stored in laboratories for various purposes.

Hyaluronan degrades in a non-random way when exposed to ultrasound (Verduyck et al., 1995; Dřimalová et al., 2005). We observed the same for the long-term degradation of hyaluronan in aqueous solutions, in our previous studies (Mondek, Kalina, Simulescu, & Pekař, 2015; Simulescu, Mondek, Kalina, & Pekař, 2015; Mondek, Simulescu, & Pekař, 2014) and also in the present study; the polydispersity of all samples remained unaltered throughout the entire degradation, at both temperatures (room temperature and refrigerator temperature). This excludes the random scission mechanism of degradation.

We studied the degradation of hyaluronic acid by molecular weight determination, using the SEC-MALLS method (Zimm, 1948; Wyatt, 1993). All SEC-MALLS measurements were performed at 25 °C. The solutions of hyaluronic acid were prepared with pure water. The mobile phase used was 0.1 M NaNO₃ aqueous solution. All the measurements were repeated at least four times, for each period of degradation, as well as for the fresh solutions.

The SEC-MALLS method allows the determination of molecular weight, polydispersity and polymer conformation. The shape of the polymer can be obtained from a Mark–Houwink–Sakurada plot (Harding, 1992; Wagner & Verdier, 1978; Han, 1979; Hiemenz & Timothy, 2007; Harding, 1997). For molecular weight calculation the Zimm model was used (Zimm, 1948; Wyatt, 1993). The refractive index increment (dn/dc) value used to calculate the molecular weight was 0.165 mL/g (Huglin, 1989; www.wyatt.de, 2015).

When the fresh solutions of the samples were measured, lower molecular weight values were obtained for all samples studied (Table 1).

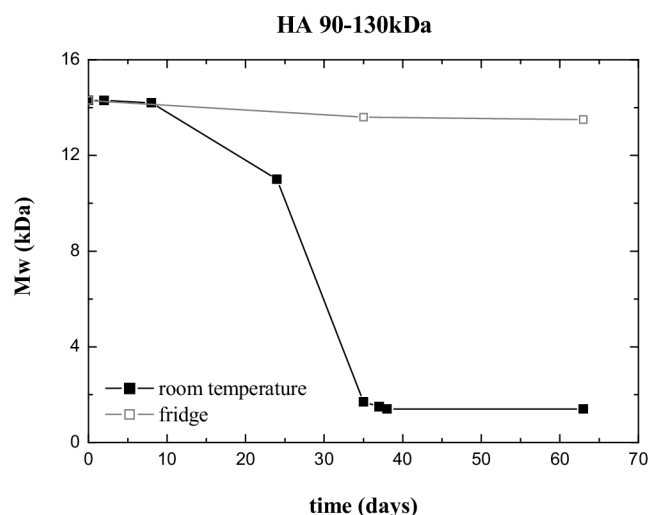


Fig. 2. The weight average molecular weight decrease of HA 90–130 kDa at room temperature and refrigerated.

The degradation of hyaluronan samples first occurred in the solid state during the storage. A significant difference was observed when the values obtained for the fresh measured solutions (Table 1) were compared with the weight average molecular weight values given by the producer. For example, for the highest molecular weight hyaluronan studied here (HA 1750 kDa), the mass loss in powder form during the storage was 34% of the initial value. It should be mentioned that all solid materials were kept at refrigerator temperature prior to analysis (4 °C). After measuring the fresh hyaluronic acid solutions, a quantity of the prepared solutions was kept at room temperature and another quantity was kept in the refrigerator. Several chromatograms obtained by using the SEC-MALLS method for the analyzed samples are shown in Fig. 1.

The difference in the intensity of the peaks shown in Fig. 1 was caused by M_w and concentration. We used a concentration of 5 mg/ml for HA 90–130 kDa and for HA 300–500 kDa samples, and a concentration of 1 mg/ml for HA 1750 kDa sample.

At room temperature the degradation showed three phases (Figs. 2–4):

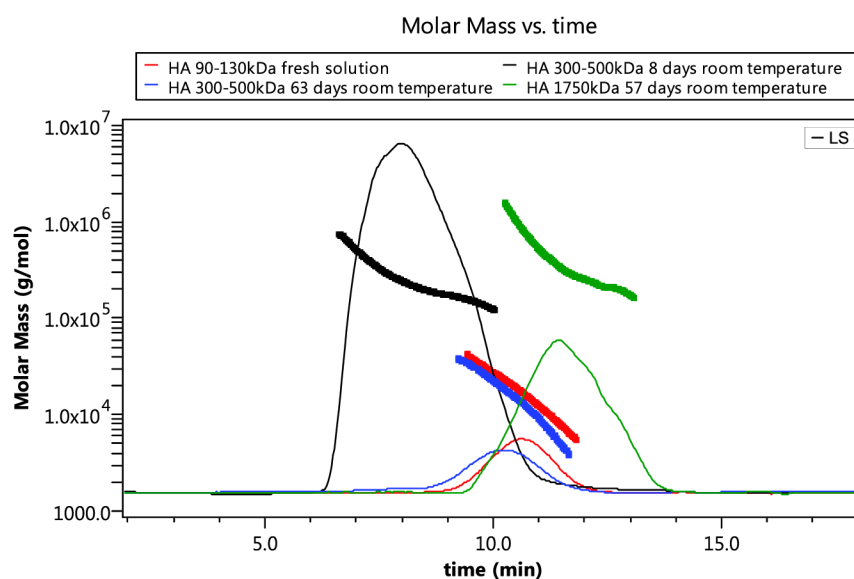


Fig. 1. Examples of chromatograms obtained with SEC-MALLS for some of the analyzed samples.

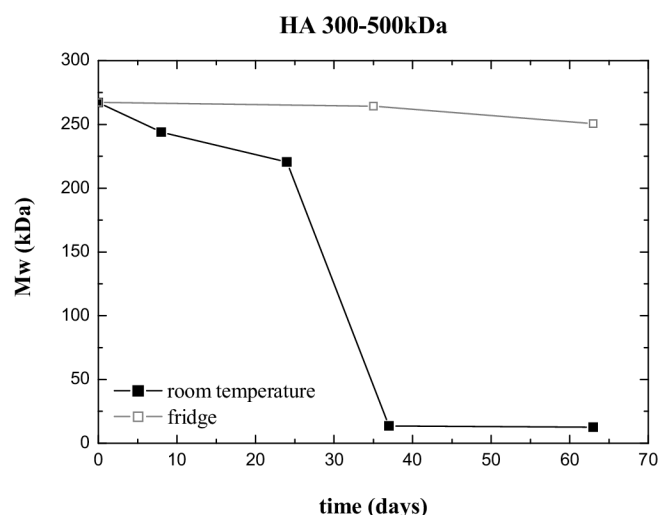


Fig. 3. The weight average molecular weight decrease of HA 300–500 kDa over time.

- first phase of moderate degradation (up to 8–11 days)
- fast molecular weight decrease (over 11 days)
- the weight average molecular weight plateau (over 40 days for HA 90–130 kDa and HA 300–500 kDa, and over 60 days for the HA 1750 kDa sample)

The degradation of the HA 90–130 kDa sample at room temperature showed a plateau in the first 8 days. The weight average molecular weight measured after 8 days (Table 2) was lower by only 0.1 kDa than the weight average molecular weight initially measured for its fresh solution.

The HA 90–130 kDa sample was the most stable to degradation out of all the samples used in the present study. After around 10 days at room temperature, the microorganisms were developed enough to degrade the polymer very rapidly, up to a weight average molecular weight of 1.7 kDa after 35 days and of 1.4 kDa after 60 days (a percentage change in weight average molecular weight – the percentage of hyaluronan degradation between initial

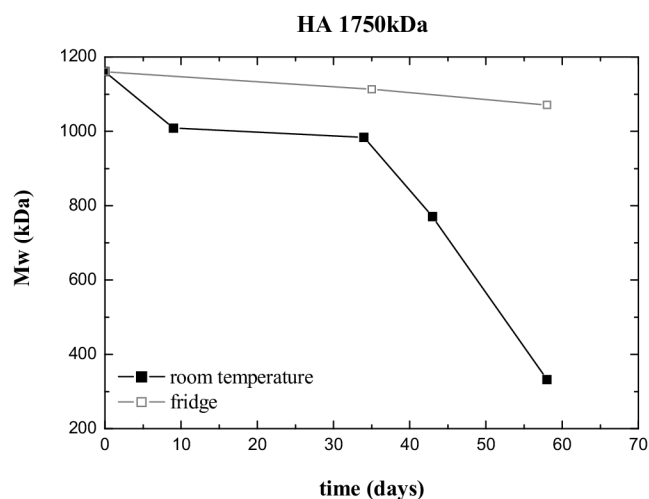


Fig. 4. The weight average molecular weight decrease of HA 1750 kDa at room temperature and refrigerated.

measured weight average molecular weight and M_w measured after 60 days – of 90% of the initial value).

For the HA 300–500 kDa sample we observed a faster degradation (percentage change in weight average molecular weight of 95% of the initial value after only 35 days). For the HA 90–130 kDa and HA 300–500 kDa samples the degradation had almost stopped after 40 days, and it showed a second plateau (Figs. 2 and 3).

In the case of HA 1750 kDa sample (Fig. 4), the degradation was slower at the beginning (percentage change in weight average molecular weight of only 15% of the initial value after 30 days). Its degradation increased later, and it showed a percentage change in weight average molecular weight of 71% of the initial value after 60 days. The second plateau for HA 1750 kDa was reached after more than 2 months of storage at room temperature.

On the other hand, the percentage change in weight average molecular weight in the refrigerator after 60 days was very small in comparison with the mass loss observed at room temperature:

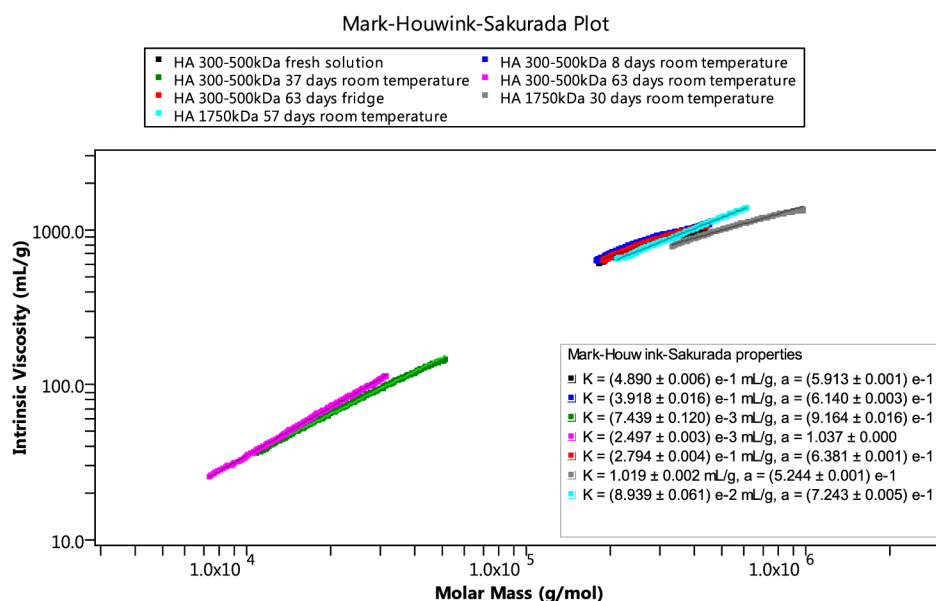


Fig. 5. MHS plots of the HA 300–500 kDa and HA 1750 kDa samples.

Table 2

Number and weight average molecular weight determined after different periods of degradation for the samples studied.

Sample name	HA 90–130 kDa	HA 90–130 kDa	HA 300–500 kDa	HA 300–500 kDa	HA 1750 kDa	HA 1750 kDa
Molecular weight	M_n (kDa)	M_w (kDa)	M_n (kDa)	M_w (kDa)	M_n (kDa)	M_w (kDa)
Room temperature						
8 days	10.5	14.2	199.2	244	982.4	1008.4
1 month	1.4	1.7	7.9	13.6	950.9	983.4
2 months	1.1	1.4	6.5	12.6	244	332.2
Refrigerated						
1 month	9.9	13.6	196.3	264.4	1082.2	1112.7
2 months	8.3	13.5	192.7	250.7	1027.1	1071.1

- 5.6% of the initial value for HA 90–130 kDa
- 6.2% of the initial value for HA 300–500 kDa
- 7.7% of the initial value for HA 1750 kDa

Even without any protection against microorganisms, the hyaluronan solutions could be stored in the refrigerator for 60 days without significant weight average molecular weight change. The degradation is much slower for the samples kept in the refrigerator than for the same samples kept at room temperature, in accordance with the Arrhenius law, as we have also observed in our previous work (Simulescu et al., 2015; Mondek et al., 2014). The degradation is due both to the effect of temperature and the action of microorganisms. For a comparison with the present study, in the above-cited previous study we used solutions with an added antimicrobial agent (sodium azide); we observed a relatively small weight average molecular weight decrease even after several months (9–15% of the initial value at room temperature after 220 days). We can state that the difference between the two studies is the presence or absence of degradation caused by microorganisms.

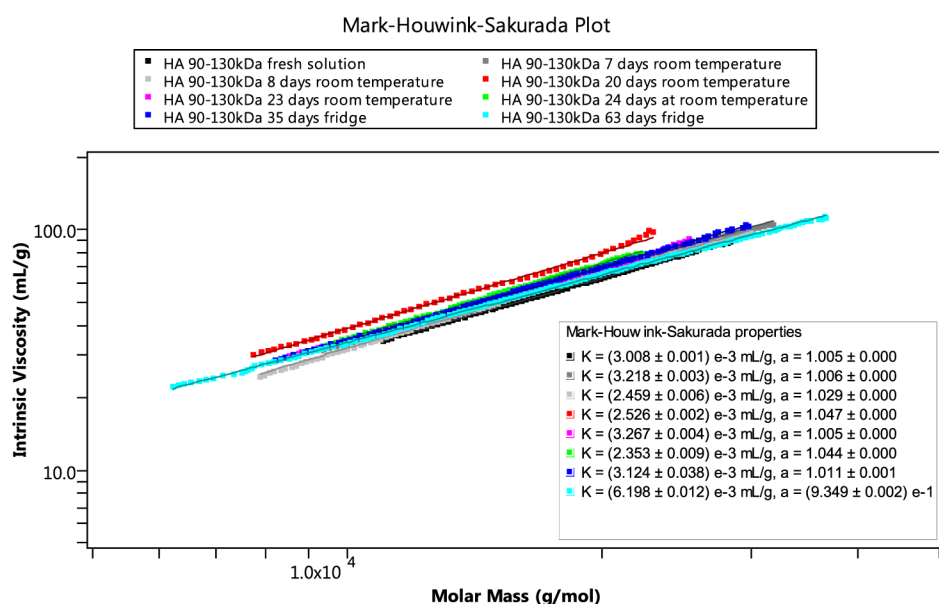
From the Mark–Houwink–Sakurada plots, a randomly coiled shape was confirmed for the HA 1750 kDa samples throughout the entire degradation process (Fig. 5). The plot slope coefficients were between 0.5 and 0.8, as expected for randomly coiled polymers.

Assessing the HA 300–500 kDa sample, we can observe that the random coil conformation was also proved for its fresh solution, for the solutions stored in the refrigerator and for the solution degraded at room temperature for 8 days (MHS coefficients between 0.59 and 0.63). However, when the degradation was more rapid, after more than 8 days at room temperature (significant

percentage change in weight average molecular weight), the HA 300–500 kDa sample was already too short to form a random coil conformation, and the MHS coefficients increased more (0.91 after 37 days and 1 after 63 days, Fig. 4). In this case the conformation of HA 300–500 kDa was between random coil and rod. On the other hand, the conformation of the HA 90–130 kDa sample was between random coil and rod from the beginning (Fig. 6). The coefficients obtained from the MHS plots were around 1 for the HA 90–130 kDa sample throughout the entire degradation process, because it is too short to allow the formation of a random coil conformation.

In conclusion, the aqueous solutions of hyaluronic acid could be stored at room temperature for 8 days without protection against microorganisms. After this period, the microorganisms were developed enough to degrade hyaluronan very rapidly (percentage change in weight average molecular weight of 90% for 14.3 kDa, 95% for 267.2 kDa and 71% for 1160.6 kDa hyaluronan after 60 days). In the refrigerator, the hyaluronan samples were very stable to degradation even up to 60 days of storage (percentage change in weight average molecular weight of just 5.6% for 14.3 kDa, 6.2% for 267.2 kDa and 7.7% for 1160.6 kDa hyaluronan).

The random coil conformation was confirmed for the HA 1750 kDa sample throughout the entire degradation process, as well as for the HA 300–500 kDa sample fresh solution, stored in the refrigerator or degraded at room temperature, but only up to 8 days in this case. For the more degraded HA 300–500 kDa sample, and for HA 90–130 kDa, the conformation obtained from Mark–Houwink–Sakurada plots was between random coil and rod, because those polymers are already too short to form a random coil conformation.

**Fig. 6.** The MHS plots for HA 90–130 kDa fresh solution and after degradation.

Acknowledgments

The authors acknowledge the financial support of project Excellent Teams—CZ.1.07/2.3.00/30.0005 and the project LO 1211 of the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic.

References

- Bothner, H., Waaler, T., & Wik, O. (1988). Limiting viscosity number and weight average molecular weight of hyaluronate samples produced by heat degradation. *International Journal of Biological Macromolecules*, *10*, 287–291.
- Dřimalová, E., Velebný, V., Sasínková, V., Hromádková, Z., & Ebringerová, A. (2005). Degradation of hyaluronan by ultrasonication in comparison to microwave and conventional heating. *Carbohydrate Polymers*, *61*, 420–426.
- Han, C. C. (1979). Molecular weight and temperature dependence of intrinsic viscosity of polymer solutions. *Polymer*, *20*, 1083–1086.
- Harding, S. E. (1992). *Analytical ultracentrifugation in biochemistry and polymer science*, pp. 495–513. *Biochemistry and polymer science* Cambridge: Royal Society of Chemistry.
- Harding, S. E. (1997). The intrinsic viscosity of biological macromolecules. Progress in measurement, interpretation and application to structure in dilute solution. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, *68*, 207–262.
- Hiemenz, P. C., & Timothy, L. P. (2007). (2nd ed., pp. 338–339). *Polymer chemistry* (336) Boca Raton, Florida, USA: Marcel Dekker Inc.
- Huglin, M. B. (1989). *Specific refractive index increments of polymers in dilute solution*. New York, NY: John Wiley & Sons (VII/409).
- Kogan, G., Šoltés, L., Stern, R., & Gemeiner, P. (2007). Hyaluronic acid: A natural biopolymer with a broad range of biomedical and industrial applications. *Biotechnology Letters*, *29*, 17–25.
- Lapčík, L., De Smedt, S., Demeester, J., & Chabreck, P. (1998). Hyaluronan: Preparation, structure, properties, and applications. *Chemical Reviews*, *98*, 2663–2684.
- Mondek, J., Simulescu, V., & Pekař, M. (2014). New kinetic models in biopolymer degradation: Long-term study of hyaluronan samples. In *XIV. Workshop of physical chemists and electrochemists* (pp. 102–199). ISBN 978-80-210-6842.
- Mondek, J., Kalina, M., Simulescu, V., & Pekař, M. (2015). Thermal degradation of high molar mass hyaluronan in solution and in powder; comparison with BSA. *Polymer Degradation and Stability*, *120*, 107–113.
- Noble, P. W. (2002). Hyaluronan and its catabolic products in tissue injury and repair. *Matrix Biology*, *21*, 25–29.
- Qhattal, H. S. S., & Liu, X. (2011). Characterization of CD44-mediated cancer cell uptake and intracellular distribution of hyaluronan-grafted liposomes. *Molecular Pharmaceutics*, *8*, 1233–1246.
- Reed, C. E., & Reed, W. F. (1989). Light scattering power of randomly cut random coils with application to the determination of depolymerization rates. *Journal of Chemical Physics*, *91*, 7193–7199.
- Reháková, M., Bakoš, D., Soldán, M., & Vizárová, K. (1994). Depolymerization reactions of hyaluronic acid in solution. *International Journal of Biological Macromolecules*, *16*, 121–124.
- Simulescu, V., Mondek, J., Kalina, M., & Pekař, M. (2015). Kinetics of long-term degradation of different molar mass hyaluronan solutions studied by SEC-MALLS. *Polymer Degradation and Stability*, *111*, 257–262.
- Stern, R., Kogan, G., Jedrzejewski, M. J., & Šoltés, L. (2007). The many ways to cleave hyaluronan. *Biotechnology Advances*, *25*, 537–557.
- Tokita, Y., & Okamoto, A. (1995). Hydrolytic degradation of hyaluronic acid. *Polymer Degradation and Stability*, *48*, 269–273.
- Vercruyssen, K. P., Lauwers, A. R., & Demeester, J. M. (1995). Absolute and empirical determination of the enzymatic-activity and kinetic investigation of the action of hyaluronidase on hyaluronan using viscometry. *Biochemical Journal*, *306*, 153–160.
- Wagner, H. L., & Verdier, P. H. (1978). The characterization of linear polyethylene SRM's 1482, 1483, and 1484. IV. Limiting viscosity numbers by capillary viscometry. *Journal of Research of the National Bureau of Standards*, *83*, 195–201.
- Wyatt, P. J. (1993). Light scattering and the absolute characterization of macromolecules. *Analytica Chimica Acta*, *272*, 1–40.
- www.wyatt.de. (2015). *Literature data base—dn/dc data*.
- Zimm, B. H. (1948). The scattering of light and the radial distribution function of high polymer solutions. *Journal of Chemical Physics*, *16*, 1093–1099.



The change in excited-state proton transfer kinetics of 1-naphthol in micelles upon the binding of polymers: The influence of hyaluronan hydration

Jakub Mondek*, Miloslav Pekař

Brno University of Technology, Faculty of Chemistry, Institute of Physical and Applied Chemistry and Materials Research Centre, Purkyňova 464/118, 612 00 Brno, Czech Republic

ARTICLE INFO

Article history:

Received 17 January 2015
Received in revised form 20 April 2015
Accepted 29 April 2015
Available online 7 May 2015

Keywords:

Hyaluronan
Excited-state proton transfer
Fluorescence
Hydration

ABSTRACT

The fast deprotonation of 1-naphthol was studied in aqueous solution and in polymer–cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) mixtures using picosecond fluorescence spectroscopy to study the influence of hyaluronan hydration in polymer–surfactant interactions. The aqueous micelle solution showed the expected change of proton transfer rate around the reported critical micelle concentration (~1 mM). The proton transfer rate dependence on CTAB concentration in the hyaluronan–CTAB and polystyrenesulfonate–CTAB systems differed significantly from that in the aqueous micelle solution. The dynamic study of excited state proton transfer (ESPT) revealed the significant influence of hyaluronan hydration in CTAB micelles. When hyaluronan–CTAB aggregates were formed at the CTAB concentration of 0.5 mM, a tenfold decrease in the rate of deprotonation was observed when compared to polystyrenesulfonate–CTAB aggregates due to hyaluronan hydration. In 2 mM CTAB–hyaluronan aggregates, the rate of deprotonation was found to be almost two times faster than in the 2 mM CTAB or polystyrenesulfonate–CTAB system. Furthermore, the study of excited-state proton transfer of 1-naphthol confirmed that hyaluronan hydration layer penetrates into the micelle and changes the emission characteristics of 1-naphthol.

© 2015 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Hyaluronan–surfactant (liposome) interactions provide a useful model for an anticancer drug delivery system based on hyaluronan sensitivity to the CD44 receptor (Di Meo et al., 2007; Oh et al., 2010; Qhattal & Liu, 2011). Hyaluronan is a biocompatible and biodegradable polysaccharide consisting of disaccharide repeat units (β -D-(1 \rightarrow 4)-glucuronic acid and β -N-(1 \rightarrow 3)-acetyl-D-glucosamine) (Lapčik, De Smedt, Demeester, & Chabreček, 1998). Delivery systems based on hyaluronan are known to be quite selective for tumor cells because the CD44 receptor is overexpressed in cancer cells (Platt & Szoka, 2008). In this model, the micelle likely provides a good environment for drug solubilization, stabilization, or controlled release, and hyaluronan provides controlled targeting of the drug. Hyaluronan in aqueous solution forms specific overlapping domains creating meshwork which is stabilized by specific H-bonds, water bridges and hydrophobic

interactions (Davies, Gormally, Wyn-Jones, Wedlock, & Phillips, 1982). In combination with polarity of hyaluronan, this is thought to be the reason for high water-retention capacity. The hydration or water-retention capacity is probably one of the most important aspects of the biological functions of hyaluronan (Kučerik et al., 2011). Hyaluronan–cationic surfactant interactions have been described in many previous papers (Bjoerling, Hersloef-Bjoerling, & Stilbs, 1995; Halasová, Krouská, Mravec, & Pekař, 2011; Hersloef, Sundeloef, & Edsman, 1992; Thalberg & Lindman, 1989; Thalberg, Lindman, & Karlstroem, 1990) but, to date, no reports about the influence of hyaluronan hydration in hyaluronan–surfactant interaction have been reported. It is known that polyelectrolytes, such as polystyrenesulfonate or hyaluronan, form so-called “pearl necklace” aggregates (Bjoerling et al., 1995) with surfactants due to the induced aggregation of surfactant molecules on polymer chain above certain surfactant and polymer concentrations. However, there is no study on interactions of pre-formed micelles (especially those containing solubilized hydrophobic substance) with hyaluronan and on the effect of the binding of polymer to the micelle. Is there some change in the micelle environment which affects solubilized species? The hydration of hyaluronan could probably change

* Corresponding author. Tel.: +420 736779649.
E-mail address: xmondek@fch.vutbr.cz (J. Mondek).

the conditions for solubilization; or, alternatively, the position of the solubilized species (such as a drug or fluorescence probe) could be affected.

The excited state proton transfer of aromatic dyes has been widely studied in bulk water or systems such as micelles (Giestas et al., 2003; Mandal, Pal, & Bhattacharyya, 1998; Solntsev, Il'ichev, Demyashkevich, & Kuzmin, 1994), proteins (Jankowski, Dobryszycski, Lipiński, & Stefanowicz, 1998; Jankowski, Wiczak, & Janiak, 1995), reverse micelles (Cohen et al., 2002), cyclodextrins (Mondal et al., 2005; Pahari, Chakraborty, & Sengupta, 2011), nafions (Spry, Goun, Glusac, Moilanen, & Fayer, 2007) and polymer–surfactant interactions (Dutta et al., 2002; Mukherjee, Lahiri, & Datta, 2007; Sahu, Roy, Mondal, Karmakar, & Bhattacharyya, 2005). The excited state proton transfer fluorescence probe 1-naphthol exhibits dual fluorescence with emission peaks of neutral form (NpOH) at ~350 nm and an emission peak of anionic form (NpO⁻) at ~450 nm. The emission of NpO⁻ is dominant in a water environment and NpOH emission is dominant in a hydrophobic environment or in alcohols (Lee, Robinson, Webb, Philips, & Clark, 1986; Rakshit, Saha, Verma, & Pal, 2012). In bulk water, 1-naphthol undergoes excited state proton transfer in 35 ps and almost the entire excited state population is in anionic form. This causes an extremely low fluorescence intensity of the neutral 1-naphthol form. When 1-naphthol is solubilized into micelles, the proton transfer rate is retarded and neutral fluorescence intensity is significantly increased (Mandal et al., 1998). When an ESPT (excited state proton transfer) fluorescence probe adsorbs onto a polymer, the proton transfer rate changes as well as the fluorescence intensity of its emission peaks. This phenomenon was used to study the hydration of some polymers such as poly *N*-vinyl-2-pyrrolidone (Pal, Sundar Maity, Samanta, Saha Sardar, & Ghosh, 2010) and polyvinyl alcohol (Kumar & Mishra, 2007). Spry et al. (2007) used proton transfer dynamics as a tool to study the water environment in nafion fuel cell membranes and in the anionic surfactant aerosol OT in heptane as a solvent. The rate of proton transfer differed with the size of nafions or aerosol OT. The proton transfer was influenced by a change in the hydrogen bonding network of water, as the water pools were reduced in size, which allowed the fluorescence probe to get closer to the nonpolar solvent. Das, Duportail, Richert, Klymchenko, and Mély (2012) studied proton transfer dynamics in anionic, cationic and non-ionic micelles. Their results suggest that proton transfer in cationic micelles is the slowest because $-\text{N}(\text{CH}_3)_3^+$ headgroups inhibit the approach of water molecules close to the Stern layer of cationic micelles.

In this study, ESPT was used to study interactions of cationic micelles with hyaluronan and to address the above stated questions. In the first part, the formation of polymer–surfactant aggregates was studied. In this part, we compared a synthetic polymer with a higher charge density (a “stronger polyelectrolyte”) and a hyaluronan biopolymer. However, the aim of this work was not to report on the formation of hyaluronan–cationic surfactant aggregates, because we demonstrated this in our previous study with acridine orange (Mondek, Mravec, Halasová, Hnyluchová, & Pekař, 2014). Chiefly, we wanted to characterize the usefulness of the ESPT of 1-naphthol in hyaluronan–surfactant interactions. In the second part, we studied changes to the inner environment of cationic surfactant micelles due to binding of hyaluronan and its hydration shell. This involved the use of time-resolved fluorescence and kinetic calculations. The extreme sensitivity of ESPT to the presence of water molecules makes the fluorescence study of ESPT convenient for studying the environment of the probe and also polymer–micelle interactions. Again, we compared the synthetic polymer polystyrenesulfonate (PSS), for which there is no report of any significant hydration layer, with the biopolymer hyaluronan, which is a well-known humectant.

There is very little information on how is the inner part of the micelle influenced by the hydration layer of the attached polymer. The penetration of hyaluronan hydration layer into the micelle could significantly affect solubilized species. This is the first report on this issue.

2. Materials and methods

2.1. Materials

1-Naphthol and pyrene fluorescence probes, the surfactant cetyltrimethylammonium bromide ($\geq 99\%$), and sodium polystyrenesulfonate ($M_w = 70$ kDa) were purchased from Sigma–Aldrich and used as received. Sodium hyaluronate ($M_w = 116$ kDa) was purchased from Contipro Group s.r.o. and used as received. Stock solutions of surfactant and polymers were prepared in deionized water (PURELAB flex from ELGA LabWater). Stock solutions of fluorescence probes were prepared in methanol. A small quantity of fluorescence probe solution (50 μL) was transferred to a vial and the solvent was gently vaporized. The concentration of 1-naphthol in all samples was 10 μM . Samples were prepared by the addition of appropriate volumes of polymer solution, water, and surfactant solution to form a concentration range of surfactant from 1×10^{-6} to 2×10^{-2} mol L^{-1} . In the pyrene study, samples were prepared with a constant concentration of pyrene (5×10^{-6} mol L^{-1}) and polymer (7 mg/L) and with an increasing concentration of surfactant ranging from 1×10^{-6} mol L^{-1} to 2×10^{-2} mol L^{-1} . All samples were stirred overnight to ensure equilibration. A low concentration of polymers was chosen to avoid coagulation and turbid samples. The pH of all samples was around 6.5.

2.2. Fluorescence measurements

Fluorescence spectra were measured with a Fluorolog Horiba Jobin Yvon spectrofluorimeter. In the case of 1-naphthol, the excitation monochromator was set to 300 nm and the emission scan was in the range of 310–580 nm. In the case of pyrene measurements, the excitation monochromator was set to 335 nm and the emission scan was set in the range of 360–550 nm. For lifetime measurements, the 1-naphthol and pyrene samples were excited with 301 nm nanoLED and 329 nm nanoLED, respectively, with a pulse width of less than 1 ns. Fluorescence decays were collected under magic angle polarization conditions in a Horiba Jobin Yvon Fluorocube instrument using a time-correlated single photon counting technique (Lakowicz, 2002, 2006). Emissions were collected at 350 nm for the neutral 1-naphthol form, 450 nm for the anionic 1-naphthol form, and 381 nm for pyrene. A TBX-PS detector was used as a detection module containing all the electronics (photomultiplier, constant fraction discriminator) necessary to detect single photons with picosecond accuracy. The time range in a time-to-amplitude converter was changed using a Fluorohub instrument. The typical FWHM of the system was 250 ps. The time-resolved fluorescence decays were analyzed by iterative deconvolution and the fit was judged according to goodness of fit using non-linear least-squares (NLLS) analysis with reduced χ_R^2 (Grinvald & Steinberg, 1974; Lakowicz, 2006; Periasamy, 1988). Iterative deconvolution and NLLS analysis were performed in the DAS6 program with models for multiexponential decay with n components using the equation

$$I(t) = \sum_{i=1}^n \alpha_i \exp(-t/\tau_i) \quad (1)$$

where α_i represents a pre-exponential factor which relates to the amount of each component present in the system and τ_i is the lifetime of the i -th component. Time-resolved emission spectra (TRES)

were constructed from the measurement of decays at multiple emission wavelengths and steady-state spectra according to the equation (Koti, Krishna, & Periasamy, 2001)

$$I(\lambda, t) = I_{SS}(\lambda) \frac{\sum_i \alpha_i(\lambda) e^{-t/\tau_i(\lambda)}}{\sum_i \alpha_i(\lambda) \tau_i(\lambda)} \quad (2)$$

where I_{SS} represents steady-state fluorescence intensity. Time-resolved area-normalized emission spectra (TRANES) were constructed from TRES for time $t=t$ according to the equation (Koti et al., 2001; Koti & Periasamy, 2001)

$$I_N(\lambda, t) = \frac{S_0}{S_t} I(\lambda, t) \quad (3)$$

where S_0 and S_t represent the area of the time-resolved emission spectrum at $t=0$ and $t=t$, respectively.

3. Results and discussion

3.1. Steady-state fluorescence study of the CTAB and CTAB–hyaluronan systems

Fig. 1 shows the steady-state emission spectra of 1-naphthol in water, hyaluronan, CTAB, hyaluronan–CTAB, and water–methanol mixtures. The fluorescence intensity ratio of neutral and anionic 1-naphthol in water was 1:42. The addition of 2 mM CTAB increased the fluorescence intensity of anionic emission with a concomitant increase in the neutral emission peak. The NpOH:NpO[−] intensity ratio changed to 1:16. This intensity ratio was significantly smaller than in bulk water, which would suggest that significant inhibition of the excited-state proton transfer reaction occurred due to the solubilization of 1-naphthol molecules into micelles. As described by Kim et al., 30–50 molecules of water are needed to promote the ESPT reaction (Kim et al., 1995). The fluorescence spectrum of 1-naphthol in CTAB showed a major peak at 450 nm. In a hydrophobic environment, the emission of anionic 1-naphthol would be significantly inhibited, because there are not enough water molecules around 1-naphthol to promote ESPT. Our observation suggests that 1-naphthol was located in the Stern layer of CTAB micelles and the fluorescence spectrum was influenced by the hydration of the Stern layer, because, in the case of solubilization in the micelle core, the fluorescence intensity of neutral 1-naphthol would be significantly higher when compared to the anionic form. On the other hand, proton transfer was most effective in the hyaluronan system. The NpOH:NpO[−] ratio in hyaluronan increased to 1:56. The fluorescence intensity ratio in hyaluronan was significantly different from that of bulk water. The increase in proton transfer efficiency suggests the adsorption of 1-naphthol in the hyaluronan-bound water

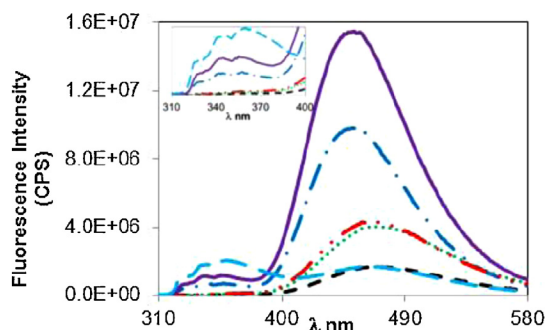


Fig. 1. Steady-state fluorescence emission spectra of 1-naphthol in water (---), 7 mg/L hyaluronan (●●●), 2 mM CTAB (●●●), 0.5 mM CTAB-7 mg/L hyaluronan (●●●), 2 mM CTAB-7 mg/L hyaluronan (●●●) and 80% methanol–water mixture (—). The inset depicts the range of neutral 1-naphthol emission. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

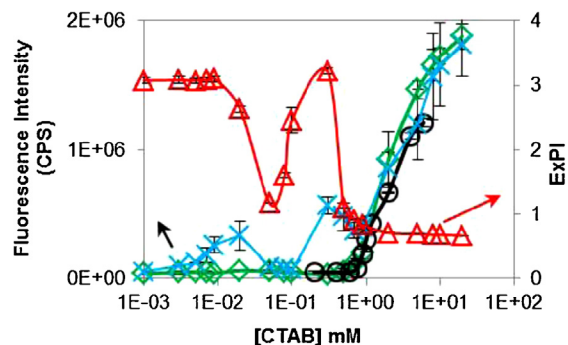


Fig. 2. Titration of the 1-naphthol (○), pyrene–hyaluronan (△), naphthol–hyaluronan (◇) and naphthol–PSS (×) systems with CTAB. The lines do not represent fits; they are only for guidance. The fluorescence intensity is the intensity of neutral 1-naphthol measured at 350 nm. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

region, as similarly reported for poly (*N*-vinyl-2-pyrrolidone) (PVP) (Pal et al., 2010). The fluorescence spectrum of 1-naphthol in the 80% water–methanol mixture depicts an example of the effective inhibition of ESPT. The ratio of the fluorescence bands of the neutral and anionic 1-naphthol forms was 1:0.9, suggesting the significant inhibition of proton transfer in this system. The retardation of proton transfer by the presence of alcohols is described elsewhere (Lee et al., 1986).

The steady-state emission intensity of both neutral and anionic 1-naphthol increased in 7 mg/L hyaluronan solution after the addition of 2 mM CTAB. The NpOH:NpO[−] ratio decreased to 1:15, which suggests the solubilization of 1-naphthol into micelles, as in the case of 2 mM CTAB in the absence of hyaluronan. When 0.5 mM CTAB was added to 7 mg/L hyaluronan solution, the NpOH:NpO[−] fluorescence intensity ratio decreased to 1:45, when compared to hyaluronan in the absence of CTAB, which represents a water-like ratio. According to Thalberg and Lindman, the electrostatic interaction between hyaluronan and CTAB forms hyaluronan–CTAB aggregates before the critical micelle concentration of CTAB (~1 mM) is reached (Thalberg & Lindman, 1989). A 5 nm shift in the emission wavelength maximum was observed in the hyaluronan–0.5 mM CTAB system when compared to the hyaluronan solution, which indicates the solubilization of 1-naphthol to CTAB aggregates (Table S1 in Supporting information), but no significant increase in NpOH fluorescence intensity occurred. When titrations of the 1-naphthol, naphthol–hyaluronan, and pyrene–hyaluronan systems with CTAB were compared, no significant difference between the 1-naphthol and naphthol–hyaluronan systems was observed (Fig. 2) and, from the plot of NpOH fluorescence intensity as a function of CTAB concentration, it seems that no hyaluronan–CTAB aggregates were formed before the critical micelle concentration of CTAB. A comparison of the plot of the excitation polarity index (ExPI) of pyrene against CTAB concentration indicates the formation of CTAB–hyaluronan aggregates at the 0.05 mM concentration (the critical aggregation concentration); also, CMC would appear to decrease to 0.5 mM due to a shift of the inflection point of ExPI dependence to a lower concentration (when no interaction occurs, the inflection point of the ExPI curve would lie around 1 mM). The comparison of normalized NpOH and NpO[−] fluorescence intensities as functions of CTAB concentration shows a difference between the plots (Fig. 3). NpO[−] fluorescence intensity has a first maximum at around 0.02 mM. The second increase begins at the 0.5 mM concentration of CTAB. The dependence of anionic fluorescence intensity on CTAB concentration from Fig. 3 correlates with the results of the titration of the pyrene–hyaluronan

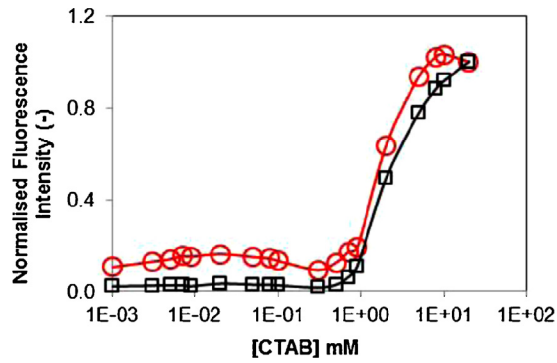


Fig. 3. Normalized fluorescence intensities of neutral (□) and anionic (○) 1-naphthol in hyaluronan solution as a function of CTAB concentration. The lines do not represent fits; they are only for guidance. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

system from Fig. 2. The fluorescence intensity of the NpOH form should change as well as NpO⁻ emission when aggregation of the surfactant occurs, but the neutral 1-naphthol emission is probably influenced by a higher representation of water molecules in the micellar environment. 1-Naphthol in hyaluronan–CTAB aggregates is likely to be affected by the greater hydration of the micelle’s Stern layer. In the following section, the effect of hyaluronan on the fluorescence decay of 1-naphthol in hyaluronan–CTAB aggregates is discussed.

3.2. Fluorescence decay study of the hyaluronan–CTAB system

The fluorescence decay of NpOH was always fitted with a triexponential function. Fluorescence lifetimes are summarized in Table 1. The decay of neutral 1-naphthol in the presence of hyaluronan consists of a fast time of deprotonation and two slower times of 1362 ps and 7880 ps (Table 1). The fast component is 1.5 times higher than in bulk water, the first slow component is a water-like component, and the second slow component represents the decay of NpOH. The fluorescence decay suggests influence from the adsorption of 1-naphthol onto hyaluronan, because the deprotonation rate is influenced by polymer bound water, not by bulk water. Also, the average fluorescence lifetime increased two times in the presence of hyaluronan, which was also the case with PVP, resulting from adsorption of the probe onto polymer bound water (Pal

et al., 2010). The significant change in the relative amplitudes of the two slow decay components, when compared to water, also suggests that the fluorescence decay of NpOH does not belong to 1-naphthol in bulk water but to adsorbed 1-naphthol. NpO⁻ decay in the presence of hyaluronan was fitted with a biexponential function with a bulk water-like rise time of 1515 ps and a decay time of 8052 ps. The adsorption of 1-naphthol to hyaluronan bound water did not affect NpO⁻ decay, because the decay of NpO⁻ in water and in the presence of hyaluronan had comparable lifetimes and relative amplitudes.

The NpO⁻ decay in 0.05 mM CTAB and in the presence of hyaluronan was fitted with a triexponential function with two rise times of 1270 ps and 8074 ps and a decay time of 20 ns. The increase in NpO⁻ decay time may be ascribed to a decay from hyaluronan–CTAB aggregates. The shift in the critical micelle concentration from 1 mM down to 0.5 mM (see earlier in the text) is similarly shown in Table 1. Comparison of the NpO⁻ decay parameters of 0.5 mM CTAB in the absence and presence of hyaluronan shows a sevenfold increase in the rise time and an increase in the decay time to 17 ns in the presence of hyaluronan. Again, the decay time of the 1-naphthol form may be explained by solubilization in hyaluronan–CTAB aggregates. In hyaluronan–CTAB aggregates ([CTAB]=0.05 mM), the fluorescence decay of neutral 1-naphthol exhibits comparable decay parameters to NpOH decay in the absence of surfactant. Fluorescence lifetimes and relative amplitudes would appear to be hyaluronan-like components when compared to 2 mM CTAB in the presence of hyaluronan. As described earlier in the text, NpO⁻ decay parameters are not influenced by polymer bound water; thus, NpO⁻ fluorescence lifetimes may indicate 1-naphthol solubilization. From the discussion above, the results indicate that the decay of NpOH is probably influenced by the hydration shell of hyaluronan. Also, steady-state experiments suggest that 1-naphthol is solubilized in the Stern layer of the CTAB micelle. When hyaluronan–CTAB aggregates are formed, the hyaluronan hydration shell probably reaches the Stern layer of the micelle and changes the fluorescence lifetimes of neutral 1-naphthol. The influence of hyaluronan hydration also seems to be observed in the CTAB concentration after CMC (2 mM). The lifetimes of NpOH in the absence and presence of hyaluronan are comparable, but the major component in the presence of hyaluronan becomes the fast component of 337 ps, which is related to the rate constant of deprotonation; the major component becoming the fast component may be ascribed to the change in the environment of the Stern layer.

Table 1

Fluorescence decay parameters of 1-naphthol in CTAB, hyaluronan, hyaluronan–CTAB, PSS, and PSS–CTAB systems. τ_1 and A_1 describe the fluorescence lifetimes and their relative amplitudes, respectively. NP – not present, which describes the situation in which only two lifetimes were recovered by reconvolution.

CTAB (mM)	Hyaluronan (*PSS) (mg/L)	NpOH emission						NpO ⁻ emission					
		τ_1 (ps)	τ_2 (ps)	τ_3 (ps)	A_1 (%)	A_2 (%)	A_3 (%)	τ_1 (ps)	τ_2 (ps)	τ_3 (ps)	A_1 (%)	A_2 (%)	A_3 (%)
0	0	54	1346	8504	87.79	6.42	5.79	NP	1608	8191	NP	2.15	97.85
0.3	0	77	1270	8565	87.94	3.94	8.13	NP	1016	8166	NP	1.63	98.37
0.5	0	78	1289	8303	85.53	6.24	8.23	NP	1263	8191	NP	1.90	98.10
2	0	277	682	13,997	35.32	61.94	2.75	516	13,971	21,254	-1.75	18.94	82.81
0	7	80	1362	7880	80.00	6.20	13.80	NP	1515	8052	NP	1.89	98.11
0.05	7	92	1140	8125	78.94	8.34	12.73	1270	8074	19,986	1.59	89.93	8.47
0.3	7	64	1001	7969	84.27	5.16	10.57	839	4298	8143	1.04	3.08	95.88
0.5	7	67	813	7752	80.00	11.16	8.84	1147	7904	17,139	1.41	81.75	16.84
2	7	337	684	11,777	63.91	31.49	4.59	439	9626	20,191	-1.59	15.41	86.18
0	7*	69	1924	10,486	52.9	33.5	13.6	NP	1387	8185	NP	2.39	97.61
0.05	7*	92	1928	5715	49.08	29.02	21.9	118	7788	14,720	1.97	86.33	11.70
0.3	7*	314	2559	6960	15.75	61.63	22.62	779	8239	20,395	1.39	83.91	14.70
0.5	7*	257	2310	6425	16.16	58.3	25.54	720	8200	20,398	1.41	85.21	13.38
2	7*	489	1836	10,129	71.81	21.11	7.08	510	10,823	20,527	-1.56	20.19	81.37

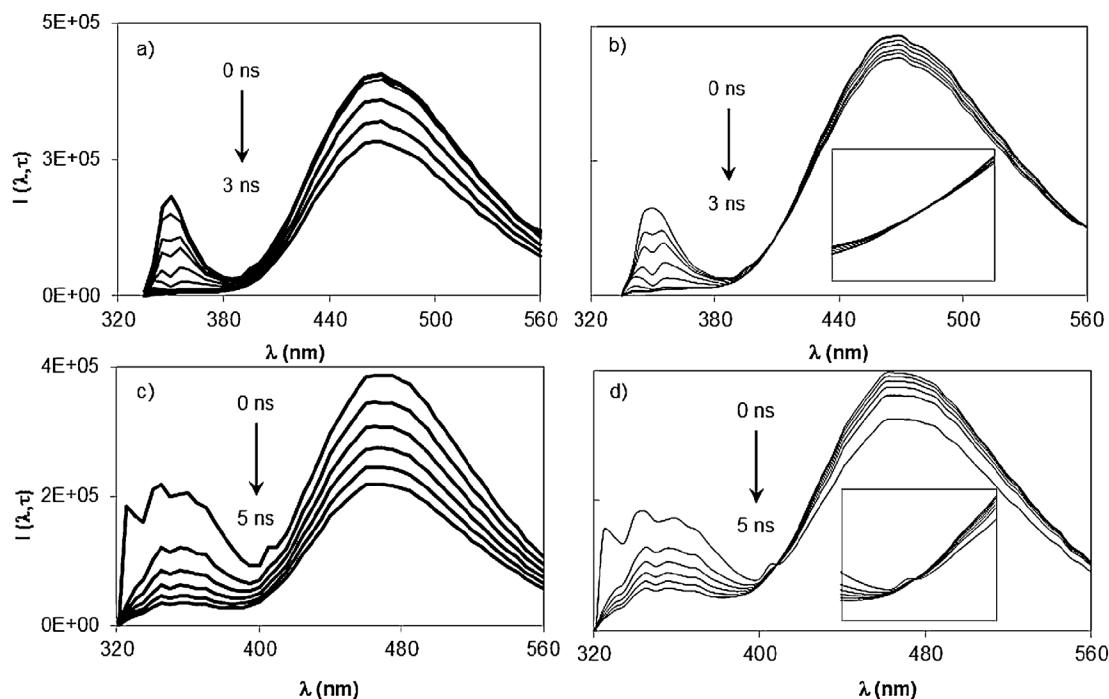


Fig. 4. (a) TRES of 1-naphthol in 0.5 mM CTAB in the presence of hyaluronan, (b) TRANES of 1-naphthol in 0.5 mM CTAB in the presence of hyaluronan, (c) TRES of 1-naphthol in 0.5 mM CTAB in the presence of PSS, (d) TRANES of 1-naphthol in 0.5 mM CTAB in the presence of PSS. The insets of (b) and (d) show isoemissive points in greater detail.

Fluorescence decays of 1-naphthol in 0.5 mM CTAB in the presence of hyaluronan were measured at multiple wavelengths across the whole emission spectrum (Fig. 4a). Time-resolved emission spectra show the disappearance of NpOH^* emission 1 ns after excitation, meaning that only the NpO^{*-} peak is apparent afterwards. TRANES spectra were constructed from TRES. The isoemissive point was found at 390 nm. The isoemissive point indicates two emissive species which belong to both 1-naphthol forms present in hyaluronan–CTAB aggregates.

3.3. Polystyrenesulfonate study

Comparison of hyaluronan with the synthetic polymer polystyrenesulfonate was performed to compare fluorescence data on 1-naphthol in the hyaluronan–CTAB system with fluorescence data on 1-naphthol in the PSS–CTAB system. Steady-state fluorescence spectra show a significant difference between the two systems (Fig. 5). Comparison of the fluorescence intensity of 1-naphthol in the CTAB–PSS and hyaluronan–CTAB systems as a function of CTAB concentration suggests the formation of PSS–CTAB aggregates around 0.01 mM CTAB concentration (Fig. 2). The difference in fluorescence spectra between 1-naphthol emission in the PSS–CTAB and hyaluronan–CTAB systems is depicted in the inset of Fig. 5. NpOH^* emission intensity in the PSS–CTAB system is much higher than in the hyaluronan–CTAB system, even when both systems contain aggregates, as described higher in the text. The time-resolved study yielded the same results and the fluorescence lifetimes are summarized in Table 1. TRANES spectra confirmed the emissions of both 1-naphthol forms, because the isoemissive point is observed (Fig. 4b, d). Both the steady-state and time-resolved study indicate the serious interference of hyaluronan hydration in the CTAB micelle, which has an impact on molecules solubilized in the Stern layer.

3.4. Kinetic study of the ESPT process

The excited state processes of 1-naphthol depicting proton transfer (Scheme 1) start with the decay of the excited neutral form. $(\text{NpOH})^*$ can also undergo fast deprotonation to form the compartmentalized ion pair $(\text{NpO}^{*-}\dots\text{H}_3\text{O}^+)$ with a rate constant of deprotonation k_{PT} . The compartmentalized ion pair dissociates into individual ions NpO^{*-} and H_3O^+ with the rate constant k_{diss} or recombines into $(\text{NpOH})^*$ and H_2O with the rate constant k_{rec} . Individual ions can be transferred back into the compartmentalized ion pair with the rate constant $k_{\text{p}}[\text{H}^+]_{\text{w}}$. Compartmentalized ion pairs and individual ion pairs can decay to form NpO^- . In this work, $k_{\text{p}}[\text{H}^+]_{\text{w}}$ was negligible, because the pH of samples was around 6.5. This relatively high pH value causes the transfer of individual ions

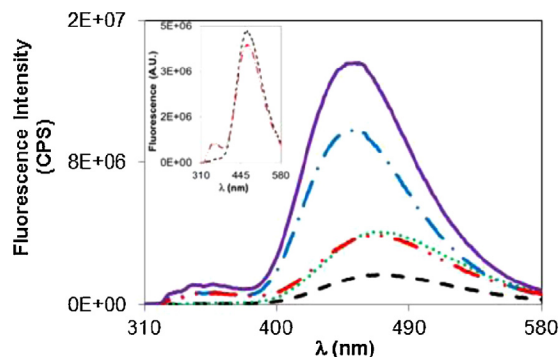
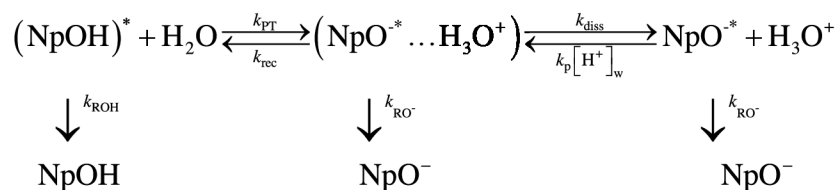


Fig. 5. Steady-state fluorescence emission spectra of 1-naphthol in water (—), 7 mg/L PSS (●●●), 2 mM CTAB (---), 0.5 mM CTAB-7 mg/L PSS (●●●), 2 mM CTAB-7 mg/L PSS (—). The inset shows the comparison of emission spectra of hyaluronan (---) and PSS (●●●) with 0.5 mM CTAB. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)



Scheme 1. Kinetic scheme of excited state proton transfer in 1-naphthol.

Table 2

Rate constants of the deprotonation (k_{PT}), recombination (k_{rec}) and dissociation (k_{diss}) of 1-naphthol forms at 298 K.

CTAB (mM)	Hyaluronan (PSS*) (mg/L)	$k_{\text{PT}} \times 10^9$ (s ⁻¹)	$k_{\text{rec}} \times 10^9$ (s ⁻¹)	$k_{\text{diss}} \times 10^9$ (s ⁻¹)
0	0	17.31	1.16	0.67
2	0	1.48	0.02	3.53
0	7	11.65	0.79	0.66
0.05	7	9.92	0.87	0.91
0.5	7	13.25	1.52	1.33
2	7	2.47	0.20	1.71
0	7*	9.8	5.11	0.71
0.05	7*	7.2	3.56	0.74
0.5	7*	1.18	1.72	1.37
2	7*	1.70	0.23	0.60
MeOH–water	80%	1.28	0.15	1.68

into one compartmentalized ion pair in the excited state to become kinetically unimportant (Giestas et al., 2003; Sahu et al., 2005).

The mechanism of Scheme 1 can be written as a differential equation as follows (Giestas et al., 2003):

$$\frac{d}{dt} \begin{bmatrix} \text{NpOH} \\ \text{NpO}^* \cdots \text{H}^+ \\ \text{NpO}^- \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} -X & k_{\text{rec}} & 0 \\ k_{\text{PT}} & -Y & 0 \\ 0 & k_{\text{diss}} & -Z \end{bmatrix} \times \begin{bmatrix} \text{NpOH} \\ \text{NpO}^* \cdots \text{H}^+ \\ \text{NpO}^- \end{bmatrix} \quad (4)$$

where

$$X = k_{\text{PT}} + k_{\text{NpOH}} \approx k_{\text{PT}}$$

$$Y = k_{\text{rec}} + k_{\text{diss}} + k_{\text{NpO}^-} \quad (5)$$

$$Z = k_{\text{p}}[\text{H}^+]_{\text{w}} + k_{\text{NpO}^-} \approx k_{\text{NpO}^-}$$

These equations suggest tri-exponential decay of the protonated and deprotonated forms of 1-naphthol. The individual rate constants for the CTAB, hyaluronan–CTAB, and PSS–CTAB systems were obtained from the lifetimes and corresponding relative amplitudes of both 1-naphthol forms (Table 2).

The rate of deprotonation in the 2 mM micelle solution was almost twelve times lower than in bulk water due to 1-naphthol solubilization. Table 2 shows the difference in deprotonation rate between hyaluronan–CTAB and PSS–CTAB aggregates. The results indicate aggregation at all CTAB concentrations depicted in Table 2 due to the reduction in the deprotonation rate constant; however, the deprotonation rates exhibit remarkable differences. The deprotonation rates of 0.05 mM CTAB in the presence of hyaluronan and PSS differed only by a factor of 1.4. At the 0.05 mM concentration, both systems exhibited a reduction in proton transfer approximately by a factor of two when compared to bulk water. At the 0.5 mM CTAB concentration, the PSS–CTAB system indicated a micelle-like or methanol-and-water mixture-like deprotonation rate; however, the hyaluronan–CTAB system exhibited a higher deprotonation rate constant than at the 0.05 mM concentration. The rate of deprotonation in hyaluronan–CTAB aggregates probably slows down when the critical micelle concentration is exceeded, possibly due to the formation of larger aggregates, where hyaluronan hydration has a smaller influence than in the CTAB concentration before CMC. The deprotonation rate

in 2 mM CTAB in the presence of hyaluronan showed an almost twice faster deprotonation rate than in micelles, the PSS–CTAB system, or 80% methanol–water, which suggests the influence of hyaluronan hydration in the Stern layer of CTAB micelles. PSS had a greater influence on the recombination rate than hyaluronan. Recombination was faster in the PSS solution and was almost five times faster than in bulk water. With the formation of aggregates, the recombination rate in the presence of PSS decreases and in 2 mM CTAB it is comparable to 2 mM CTAB in the presence of hyaluronan. The dissociation rate of ion pair increases with the formation of aggregates in both the hyaluronan and PSS–CTAB systems. 2 mM CTAB in the presence of PSS showed the slowest dissociation of compartmentalized ion pairs.

4. Conclusions

The dynamics of ESPT is extremely sensitive to the water environment. In water, the ESPT of 1-naphthol is extremely fast, which correlates with the extremely low fluorescence intensity of the neutral form of 1-naphthol. When 1-naphthol solubilizes in micelles, the rate of deprotonation is retarded with a concomitant increase in the fluorescence intensity of NpOH. The addition of PSS to the CTAB solution with a concentration below the critical micelle concentration causes the formation of aggregates and the retardation of the deprotonation rate of 1-naphthol due to the solubilization of 1-naphthol in PSS–CTAB aggregates. The solubilization of 1-naphthol also occurs in the hyaluronan–CTAB system, but the proton transfer rate is much faster than in the PSS–CTAB system or in micelles with the absence of polymer. The PSS study suggests, that PSS has no significant hydration layer. On the other hand, the influence of hyaluronan hydration caused the deprotonation rate of 1-naphthol in 0.5 mM CTAB–hyaluronan aggregates to be ten times faster than the rates in the CTAB or 0.5 mM CTAB–PSS system. The same occurred in 2 mM CTAB, but the proton transfer rate of 1-naphthol was twice faster in the hyaluronan–CTAB system than in the CTAB or PSS–CTAB systems. The results of the pyrene study correlate with the assumption that hyaluronan–CTAB aggregates are formed before the critical micelle concentration, while the time-resolved and proton transfer dynamic study demonstrated

the difference between the environments in hyaluronan–CTAB and PSS–CTAB aggregates.

Excited-state proton transfer represents a unique method in observing the changes in the inner micelle environment, e.g. the influence of the hydration layer of polymer interacting with micelle on the solubilized species. The study of excited state proton transfer in hyaluronan–CTAB aggregates showed that hyaluronan can affect solubilized species in micelles, e.g. the species change their position or their emission properties are directly influenced by the hydration shell of hyaluronan.

Conflict of interest

The authors declare no competing financial interest.

Acknowledgments

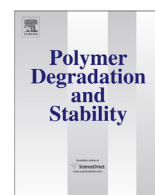
This work was supported by the Materials Research Centre at FCH BUT- Sustainability and Development, REG LO1211, with financial support from the National Programme for Sustainability I (Ministry of Education, Youth and Sports).

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.04.060>

References

- Bjoerling, M., Hersloef-Bjoerling, A., & Stilbs, P. (1995). An NMR self-diffusion study of the interaction between sodium hyaluronate and tetradecyltrimethylammonium bromide. *Macromolecules*, 28(20), 6970–6975.
- Cohen, B., Huppert, D., Solntsev, K. M., Tsfadia, Y., Nachliel, E., & Gutman, M. (2002). Excited state proton transfer in reverse micelles. *Journal of the American Chemical Society*, 124(25), 7539–7547.
- Das, R., Dupontail, G., Richert, L., Klymchenko, A., & Mély, Y. (2012). Sensing micelle hydration by proton-transfer dynamics of a 3-hydroxychromone dye: Role of the surfactant headgroup and chain length. *Langmuir*, 28(18), 7147–7159.
- Davies, A., Gormally, J., Wyn-Jones, E., Wedlock, D. J., & Phillips, G. O. (1982). A study of hydration of sodium hyaluronate from compressibility and high precision densitometric measurements. *International Journal of Biological Macromolecules*, 4(7), 436–438.
- Di Meo, C., Panza, L., Capitani, D., Mannina, L., Banzato, A., Rondina, M., et al. (2007). Hyaluronan as carrier of carboranes for tumor targeting in boron neutron capture therapy. *Biomacromolecules*, 8(2), 552–559.
- Dutta, P., Halder, A., Mukherjee, S., Sen, P., Sen, S., & Bhattacharyya, K. (2002). Excited state proton transfer of 1-naphthol in a hydroxypropylcellulose/sodium dodecyl sulfate system. *Langmuir*, 18(21), 7867–7871.
- Giestas, L., Yihwa, C., Lima, J. C., Vautier-Giongo, C., Lopes, A., Maçanita, A. L., et al. (2003). The dynamics of ultrafast excited state proton transfer in anionic micelles. *The Journal of Physical Chemistry A*, 107(18), 3263–3269.
- Grinvald, A., & Steinberg, I. Z. (1974). On the analysis of fluorescence decay kinetics by the method of least-squares. *Analytical Biochemistry*, 59(2), 583–598.
- Halasová, T., Krouská, J., Mravec, F., & Pekař, M. (2011). Hyaluronan-surfactant interactions in physiological solution studied by tensiometry and fluorescence probe techniques. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 391(1–3), 25–31.
- Hersloef, A., Sundeloef, L. O., & Edsman, K. (1992). Interaction between polyelectrolyte and surfactant of opposite charge: Hydrodynamic effects in the sodium hyaluronate/tetradecyltrimethylammonium bromide/sodium chloride/water system. *The Journal of Physical Chemistry*, 96(5), 2345–2348.
- Jankowski, A., Dobryszycycki, P., Lipiński, J., & Stefanowicz, P. (1998). Excited-state proton transfer in hydroxynaphthaldehydes covalently bound to proteins. *Journal of Fluorescence*, 8(2), 103–113.
- Jankowski, A., Wiczak, W., & Janiak, T. (1995). Mechanism of proton transfer in proteins II. Relationship between local properties of solvent and rate of excited state proton transfer for 2-naphthol derivatives bound to selected sites of proteins. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 85(1–2), 69–75.
- Kim, S. K., Breen, J. J., Willberg, D. M., Peng, L. W., Heikal, A., Syage, J. A., et al. (1995). Solvation ultrafast dynamics of reactions. 8. Acid–base reactions in finite-sized clusters of naphthol in ammonia, water, and piperidine. *The Journal of Physical Chemistry*, 99(19), 7421–7435.
- Koti, A. S. R., Krishna, M. M. G., & Periasamy, N. (2001). Time-resolved area-normalized emission spectroscopy (TRANES): A novel method for confirming emission from two excited states. *The Journal of Physical Chemistry A*, 105(10), 1767–1771.
- Koti, A. S. R., & Periasamy, N. (2001). TRANES analysis of the fluorescence of Nile red in organized molecular assemblies confirms emission from two species. *Journal of Chemical Sciences*, 113(2), 157–163.
- Kumar, A. C., & Mishra, A. K. (2007). 1-Naphthol as an excited state proton transfer fluorescent probe for sensing bound-water hydration of polyvinyl alcohol. *Talanta*, 71(5), 2003–2006.
- Kučerík, J., Průšová, A., Rotaru, A., Flimel, K., Janeček, J., & Conte, P. (2011). DSC study on hyaluronan drying and hydration. *Thermochimica Acta*, 523(1–2), 245–249.
- Lakowicz, J. R. (2002). *Topics in fluorescence spectroscopy, Vol 1: Techniques*. New York: Kluwer Academic Publisher.
- Lakowicz, J. R. (2006). *Principles of fluorescence spectroscopy*. New York: Springer.
- Lapčík, L., De Smedt, S., Demeester, J., & Chabreček, P. (1998). Hyaluronan: Preparation, structure, properties, and applications. *Chemical Reviews*, 98(8), 2663–2684.
- Lee, J., Robinson, G. W., Webb, S. P., Philips, L. A., & Clark, J. H. (1986). Hydration dynamics of protons from photon initiated acids. *Journal of the American Chemical Society*, 108(21), 6538–6542.
- Mandal, D., Pal, S. K., & Bhattacharyya, K. (1998). Excited-state proton transfer of 1-naphthol in micelles. *The Journal of Physical Chemistry A*, 102(48), 9710–9714.
- Mondal, S. K., Roy, D., Sahu, K., Sen, P., Karmakar, R., & Bhattacharyya, K. (2005). Hydration dynamics of 4-aminophthalimide in a substituted β -cyclodextrin nanocavity. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 173(3), 334–339.
- Mondek, J., Mravec, F., Halasová, T., Hnyluchová, Z., & Pekař, M. (2014). Formation and dissociation of the acridine orange dimer as a tool for studying polyelectrolyte-surfactant interactions. *Langmuir*, 30(29), 8726–8734.
- Mukherjee, T. K., Lahiri, P., & Datta, A. (2007). 2-(2'-Pyridyl)benzimidazole as a fluorescent probe for monitoring protein-surfactant interaction. *Chemical Physics Letters*, 438(4–6), 218–223.
- Oh, E. J., Park, K., Kim, K. S., Kim, J., Yang, J.-A., Kong, J.-H., et al., & Hoffman, A. S. (2010). Target specific and long-acting delivery of protein, peptide, and nucleotide therapeutics using hyaluronic acid derivatives. *Journal of Controlled Release*, 141(1), 2–12.
- Pahari, B., Chakraborty, S., & Sengupta, P. K. (2011). Encapsulation of 3-hydroxyflavone in γ -cyclodextrin nanocavities: Excited state proton transfer fluorescence and molecular docking studies. *Journal of Molecular Structure*, 1006(1–3), 483–488.
- Pal, A., Sundar Maity, S., Samanta, S., Saha Sardar, P., & Ghosh, S. (2010). Interaction of the excited state intramolecular proton transfer probe 3-hydroxy-2-naphthoic acid with poly N-vinyl-2-pyrrolidone polymer in water: An insight into the water structure in the binding region. *Journal of Luminescence*, 130(11), 1975–1982.
- Periasamy, N. (1988). Analysis of fluorescence decay by the nonlinear least squares method. *Biophysical Journal*, 54(5), 961–967.
- Platt, V. M., & Szoka, F. C. (2008). Anticancer therapeutics: Targeting macromolecules and nanocarriers to hyaluronan or CD44, a hyaluronan receptor. *Molecular Pharmaceutics*, 5(4), 474–486.
- Qhatal, H. S. S., & Liu, X. (2011). Characterization of CD44-mediated cancer cell uptake and intracellular distribution of hyaluronan-grafted liposomes. *Molecular Pharmaceutics*, 8(4), 1233–1246.
- Rakshit, S., Saha, R., Verma, P. K., & Pal, S. K. (2012). Role of solvation dynamics in excited state proton transfer of 1-naphthol in nanoscopic water clusters formed in a hydrophobic solvent. *Photochemistry and Photobiology*, 88(4), 851–859.
- Sahu, K., Roy, D., Mondal, S. K., Karmakar, R., & Bhattacharyya, K. (2005). Study of protein-surfactant interaction using excited state proton transfer. *Chemical Physics Letters*, 404(4–6), 341–345.
- Solntsev, K. M., Il'ichev, Y. V., Demyashkevich, A. B., & Kuzmin, M. G. (1994). Excited-state, proton-transfer reactions of substituted naphthols in micelles. Comparative study of reactions of 2-naphthol and its long-chain alkyl derivatives in micellar solutions of cetyltrimethylammonium bromide. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 78(1), 39–48.
- Spry, D. B., Goun, A., Glusac, K., Moilanen, D. E., & Fayer, M. D. (2007). Proton transport and the water environment in nafion fuel cell membranes and AOT reverse micelles. *Journal of the American Chemical Society*, 129(26), 8122–8130.
- Thalberg, K., & Lindman, B. (1989). Interaction between hyaluronan and cationic surfactants. *The Journal of Physical Chemistry*, 93(4), 1478–1483.
- Thalberg, K., Lindman, B., & Karlstroem, G. (1990). Phase diagram of a system of cationic surfactant and anionic polyelectrolyte: Tetradecyltrimethylammonium bromide-hyaluronan-water. *The Journal of Physical Chemistry*, 94(10), 4289–4295.



Thermal degradation of high molar mass hyaluronan in solution and in powder; comparison with BSA



Jakub Mondek, Michal Kalina, Vasile Simulescu*, Miloslav Pekař

Materials Research Centre, Faculty of Chemistry, Brno University of Technology, Purkyňova 118, 612 00 Brno, Czech Republic

ARTICLE INFO

Article history:

Received 15 May 2015

Received in revised form

11 June 2015

Accepted 13 June 2015

Available online 18 June 2015

Keywords:

Bovine serum albumin

Hyaluronic acid

Thermal degradation

SEC-MALLS

Electrophoretic light scattering

ABSTRACT

The aim of the present work was to compare the thermal degradation of bovine serum albumin and hyaluronic acid of different molar masses by determining the loss in molecular weight by means of SEC-MALLS (size exclusion chromatography – multi angle laser light scattering). For all measured samples, the results obtained by this method were compared with the results for stability determined by electrophoretic light scattering. The degradation study was performed in solution and in powder.

Bovine serum albumin (also known as BSA) is a protein derived from cows, which has many biochemical applications. Hyaluronic acid (hyaluronan or HA) is an anionic nonsulfated glycosaminoglycan distributed widely throughout connective, epithelial, and neural tissues.

The powder and solutions of BSA and HA were heated at different temperatures ranging from 37 °C to 120 °C for certain periods (the highest temperature was used only for the powder). The observed degradation increased with the duration of heating and with temperature for all hyaluronic acid samples analyzed in this work, in accord with Arrhenius law.

At 37 °C and 60 °C, only moderate degradation was observed for hyaluronic acid solutions. For BSA at 37 °C no degradation was observed and at 60 °C significant aggregation occurred.

© 2015 Published by Elsevier Ltd.

1. Introduction

Hyaluronic acid, in the form of a sodium salt (hyaluronan or HA) is one of the most important polysaccharides originating in the mammalian body. During the last few decades, many studies have focused on its role in tissues, body fluids, and cell proliferation, and developed ways to use this polysaccharide in wound healing, drug delivery systems, and anti-aging applications. Hyaluronan is a linear natural polysaccharide of the glycosaminoglycans family. Its chemical structure comprises disaccharide units composed of D-glucuronic acid and N-acetyl-D-glucosamine, which are alternatively linked through 1,3 and 1,4 glycosidic bonds [1]. Hyaluronic acid can be synthesized via polymerization reactions [2], as in the case of other polymers obtained by different synthetic processes (co-polymerization, polymerization in solution, enzymatic polymerization etc) [3–6].

Hyaluronan of different molar masses has different roles in the body. For example, high molar mass hyaluronan organizes the

extracellular matrix and low molar mass hyaluronan can be found in injured tissue or in certain tumors [7,8]. The stability of hyaluronan and its molar mass are important not only from the point of view of its physiological functions but also in the development of its applications (e.g. tailoring its molar mass to a specific application) and in how it is handled, both in its solid and dissolved form. Many methods of how to cleave hyaluronan were summarized in the review by Stern et al. [9].

Low or high pH conditions have obvious effects on hyaluronan. In acid solution, hydrolysis occurs on the glucuronic acid residue and the hemiacetal ring remains. In basic solution, hydrolysis occurs on the N-acetylglucosamine residue. Such hydrolysis obeys first order kinetics [10]. Other observations suggest that random chain scission occurs during hydrolytic degradation [1,10,11], and this same mechanism has also been proposed for the thermal degradation of hyaluronan [12–14]. The degradation of hyaluronic acid powder using different methods (electron beam irradiation, gamma ray irradiation, microwave irradiation, and thermal treatment) was reported in a study by Choi et al. [15]. The thermal degradation of hyaluronan has not been investigated from the point of view of the decrease in its molar mass. This, therefore, was the main focus of this work, in which the thermal behavior of

* Corresponding author.

E-mail address: simulescu@fch.vutbr.cz (V. Simulescu).

hyaluronan was compared with that of bovine serum albumin, another important biopolymer, well known for its denaturation at elevated temperatures.

Bovine serum albumin (also known as BSA) is a serum albumin protein derived from cows. It is often used as a protein concentration standard in lab experiments (also as M_w standard, for SEC-MALLS normalization). The full-length BSA precursor protein has 607 amino acids (in its length), while the mature BSA protein contains 583 amino acids. Bovine serum albumin (BSA), one of the major components in plasma protein, plays an important role in transporting and metabolizing many endogenous and exogenous compounds in metabolism [15]. Bovine serum albumin can also be synthesized via condensation followed by polymerization reactions, as described in Ref. [16].

We are the first to report a comparative study of the thermal degradation of hyaluronic acid and BSA, in aqueous solution and in solid powder form, using SEC-MALLS. As for BSA in solution, degradation could not be studied at temperatures above 60 °C, because of the significant aggregation which occurred.

In the work published in a study of Yohannes et al. [17], the authors showed that the particle size is relatively stable up to 60 °C, but that above 63 °C aggregation occurs (growth of the hydrodynamic diameter). The heat-induced aggregation of BSA is dependent on temperature, concentration, incubation time, and salt concentration. All these parameters affect the particle sizes of the aggregates, the molar masses, the zeta potential, and the conformational structure of BSA.

For example, the smallest BSA concentration at which aggregates were observed at 80 °C was 0.1 mg/mL¹⁷. Above this concentration, the sizes of the aggregates were proportionally dependent on BSA concentration. The smallest time for 1 mg/mL BSA solution to aggregate at 80 °C was about 2 min [17].

2. Materials

The hyaluronan samples (sodium salt) used in the present work were purchased from Contipro (Czech Republic). These samples were products of bacterial fermentation (*Streptococcus equi*, subsp. *Zooepidemicus* bacterial strain):

- HA 1.67 MDa (1669 kDa): $M_w = 1145.3$ kDa
- HA 1.8 MDa (1800 kDa): $M_w = 1351.5$ kDa

The hyaluronan samples of 1669 and 1800 kDa were 1 year old and 3 years old, respectively. The hyaluronan samples were kept in a refrigerator at 4 °C before use.

The BSA samples used in the present study were purchased from Sigma Aldrich:

- BSA 82 kDa: $M_w = 82.3$ kDa;
- BSA 87 kDa: $M_w = 87$ kDa.

The used BSA samples of 82 and 87 kDa were 2 years old and 4 years old, respectively, and were also kept in the refrigerator at 4 °C prior to analysis.

3. Methods

The principal technique used to study thermal degradation in this study was SEC-MALLS, which gives detailed information on polymer molar mass and conformation.

The SEC-MALLS apparatus used in the present work was produced by Wyatt (USA; the detector part) and by Agilent (USA; the chromatography part). It included a MALLS detector (Dawn Heleus II), a viscometric detector (ViscoStar II), and a refractive index

detector (Optilab T-rEX). The multi angle laser light scattering (MALLS) detector had 18 angles of detection, ranging from 10° to 160°. The Astra 6 software package was used for data collection and analysis.

The chromatograph contained a degasser, an isocratic pump, an autosampler, a column for size exclusion chromatography (one PL aquagel-OH MIXED-H 8 μm PL1149–6800 produced by Agilent), and a thermostat. The used mobile phase was 0.1 M NaNO₃ aqueous solution, containing 3 mM NaN₃ to prevent the growth of microorganisms. All SEC-MALLS measurements were performed at 25 °C.

The solutions were prepared using the same solvent as that used for the mobile phase. Concentrations of 1 mg/mL for hyaluronan and 5 mg/mL for BSA were used. All samples were filtered before injection using Millipore Durapore Membrane filters 0.1 μm.

The SEC-MALLS technique allows:

- the separation of different polymeric compounds (fractions) according to their molar masses
- the determination of absolute molar mass averages from 10² Da to 10⁹ Da
- the calculation of polydispersity
- the determination of the root mean square radius (RMS), also known as the “radius of gyration” (R_g)
- the determination of the conformation plot and Mark–Houwink–Sakurada (MHS) plot

From the slope of the conformation plot $RMS = f(M_w)$, the shape of the polymer can be found [18–20]. The shape of the polymer can also be obtained from the Mark–Houwink–Sakurada plot [18,21–24].

For molar mass calculation, the Zimm model was used [25,26]. The refractive index increment (dn/dc) values used to calculate the molar mass were 0.185 mL/g for BSA and 0.165 mL/g for hyaluronic acid [27,28].

The results obtained from SEC-MALLS were supplemented with the charge characterization of the colloidal stability of dissolved samples, as measured by the method of electrophoretic light scattering (ELS) on a Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments). The ELS method measures the movement of charged colloidal particles in the sample after the application of an electric field. First, the electrophoretic mobility of particles in the sample is determined and this value is recalculated to zeta potential using the Henry equation [29]. The value of the zeta potential is used to estimate the stability of the sample resisting aggregation (the colloidal stability due to the electrostatic repulsion). If the value of the zeta potential is between –30 and 30 mV, the charge of the particles is not sufficient to ensure the stabilization of repulsive forces; that is, particles can approach each other closely and aggregation occurs. In this case, the sample is non-stable. If the zeta potential is higher than 30 mV or lower than –30 mV, particles have sufficient surface charge and these systems are considered to be stable against aggregation.

Electrophoretic light scattering measurements for all studied samples were performed using similar settings as in the SEC-MALLS method (temperatures of 37, 60, or 90 °C in solution; total time of heating ranging from 1 to 12 h). All measurements were conducted four times and the obtained results are presented as mean value ± standard deviation.

4. Results and discussion

We analyzed two hyaluronan samples of different molar mass and two BSA samples of different molar mass after their thermal degradation in powder form and in solution. Thermal treatment of the analyzed samples was performed at different temperatures for certain periods.

The novelty of the present work is the use of SEC-MALLS technique together with electrophoretic light scattering (ELS) method, to study the thermal degradation of hyaluronan and BSA samples, in powder and also in solution. Our study shows how the molar mass of the analyzed samples is affected by the temperature.

The results obtained for the fresh solutions of hyaluronan and BSA used in this work are shown in Table 1, together with the mass loss calculated on the basis of the product molar mass given by the producer:

A non-negligible decrease in molar mass in the solid state was observed for both hyaluronan samples. The observed molar masses for the fresh hyaluronan solutions were lower than expected. The same tendency of molar mass loss was observed in our previous study on the long-term degradation of hyaluronic acid [30].

This degradation in the solid state (Table 1) was due to the age of the samples and to their storage conditions. Both hyaluronan samples were kept in the refrigerator at 4 °C prior to analysis.

In contrast, the results obtained for fresh BSA solutions showed the expected values for molar mass (no degradation was observed before analysis in the solid state).

Subsequently, the prepared solutions of BSA and HA were heated in an oven at 37 °C, 60 °C and 90 °C, for periods ranging from 1 h to 12 h. For the thermal degradation study in the solid state, the powders were heated in an autoclave at 60 °C, 90 °C and 120 °C, for 3, 6 and 9 h at each temperature. The same thermal treatment procedure was employed for all samples in this study, except for BSA powder, which was not heated at 120 °C, and for BSA solutions, which were not heated at 90 °C because of the significant aggregation which occurred.

We observed no significant degradation for BSA in solution at 37 °C; the BSA solutions studied exhibited the same molar mass, even after 12 h of thermal treatment (Fig. 1).

During thermal treatment at 37 °C, the polydispersity was in the range 1.01–1.03 for both BSA solutions. As for molar mass, we observed no significant modifications in polydispersity or in the gyration radius even after 12 h at 37 °C.

When heated at 60 °C, the BSA samples showed an increase in molar mass in solution (Fig. 1) and also in powder form (Fig. 2). The molar mass increased with time of heating, due to BSA aggregation.

For BSA samples in solution, the increase in molar mass was faster during the first 6 h of thermal treatment at 60 °C. Above 6 h at this temperature, the molar mass of both BSA samples remained almost constant (at around 100 kDa after 9 h and at around 103 kDa after 12 h at 60 °C).

For the BSA 87 kDa solution, the polydispersity was in the same range (from 1.01 to 1.03) after 9 h of heating at 60 °C. Only after 12 h at 60 °C did the polydispersity of BSA 87 kDa in solution exhibit a small increase to 1.06.

For the BSA 82 kDa solution, the polydispersity increased with time of heating at 60 °C as follows: it was already 1.06 after 3 h, 1.13 after 6 h, and 1.2 after 12 h. The radius of gyration also increased. This was also a consequence of BSA aggregation.

The BSA solutions were also heated at 90 °C, but at this temperature significant aggregation occurred after only a few minutes.

Table 1

Weight averaged molar mass and degradation in solid state determined for HA and BSA samples.

Sample name	M_w [kDa]	Molar mass loss %
BSA 82 kDa	82.3	—
BSA 87 kDa	87	—
HA 1.67 MDa	1145.3	31.4
HA 1.8 MDa	1351.5	24.9

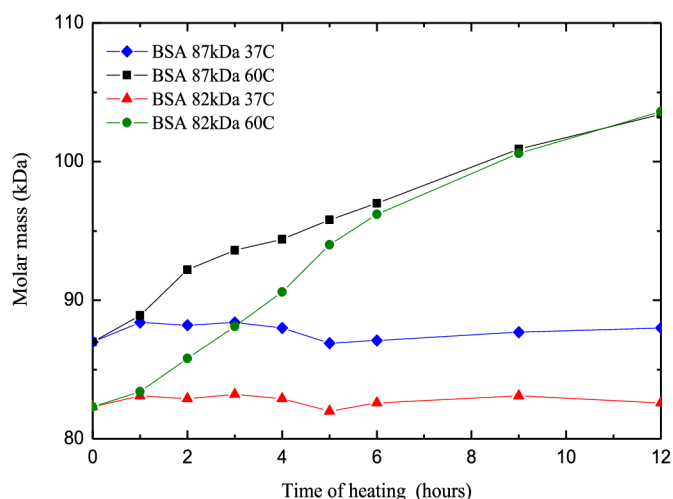


Fig. 1. The molar masses of BSA samples in solution during thermal treatment.

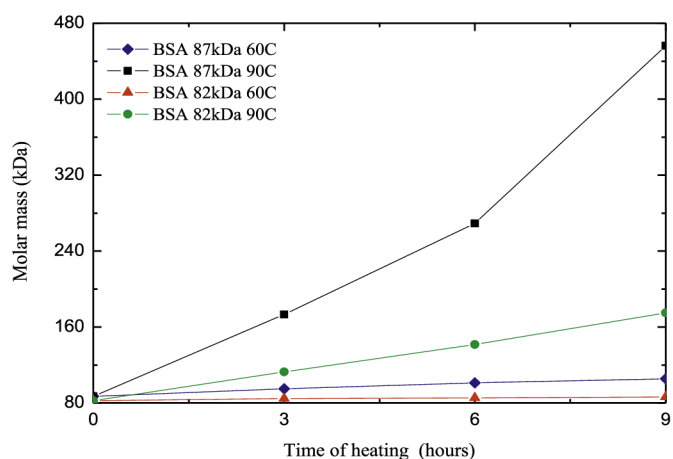


Fig. 2. The molar masses of BSA samples in powder form during thermal treatment.

It was not therefore possible to inject or to measure the obtained samples (nor was it even possible to filter them). More data on the weight-averaged molar masses of the BSA samples studied here are shown in Table S1 in Supplementary Files.

We observed that the increase in BSA molar mass in powder form (Fig. 2) showed a linear dependence on the time of heating, except in the case of BSA 87 kDa above 6 h of thermal treatment at 90 °C.

The polydispersity of BSA 82 kDa in powder form at 60 °C remained in the same range from 1.01 to 1.03. As for BSA 87 kDa powder, polydispersity increased to 1.05 after 6 h and to 1.07 after 9 h at 60 °C. When the temperature was increased to 90 °C, the polydispersity increased more (after 9 h, the polydispersity was already 2 for BSA 87 kDa and 1.3 for BSA 82 kDa in powder form). As mentioned before, because of significant aggregation, BSA in powder form could not be measured at 120 °C.

For study of the temperature degradation of both BSA samples and for broader investigation of their tendency to form aggregates in solution, the method of electrophoretic light scattering was utilized (Figs. S1 and S2 in Supplementary Files). Both BSA solutions were subjected to the same heating procedure as described for the SEC-MALLS measurements. The zeta potential of fresh 87 kDa BSA solution was found to be -26.7 mV, which was similar to the zeta potential of 82 kDa BSA solution (-23.8 mV). Both measured values

indicate the quite high electrostatic stability of colloidal particles resisting their aggregation (slightly higher for the 87 kDa BSA solution). The time development of the measured zeta potential values for both BSA solutions at 37 °C showed almost no changes in their stability during heating. After 12 h, the values of the zeta potential for 87 kDa BSA and 82 kDa BSA increased by 11.9% and 10.9%, respectively. These results were in good agreement with the SEC-MALLS determination of molecular weight changes at the same temperature. At 60 and 90 °C, a significant change in zeta potential was observed for both BSA solutions. The values of the zeta potential after 12 h of heating at 60 °C increased by 61.6% for the 87 kDa BSA solution and by 73.9% for the 82 kDa BSA solution. After heating at 90 °C, the zeta potentials for both BSA solutions were almost the same as the values at 60 °C (74.9% and 75.6% for the 87 kDa and 82 kDa BSA solutions, respectively), indicating that the highest destabilization occurs probably at around 60 °C. After 12 h of heating at 60 and 90 °C, the final values of the zeta potentials for the 87 kDa and 82 kDa BSA solutions were -6.7 mV and -5.8 mV, respectively. These values are close to zero zeta potential, indicating almost no charge on BSA particles, their high destabilization, and the beginning of aggregation processes. Again, these results correlate perfectly with the above described increase in the molecular weight of BSA in solutions at temperatures higher than 60 °C and also with data already published in literature [17].

For hyaluronan samples, a decrease in molar mass was observed after thermal treatment, both in powder form and also in solution (Figs. 3 and 4, and Figs. S3–S9 in Supplementary Files). The thermal degradation of HA samples increased with temperature and with time of heating, as expected. This proved that the heat transfer degrades the samples significantly during this period. The adsorbed water in such short period (maximum 12 h) has no significant degradation effect, in comparison with the thermal degradation itself.

We observed an exponential decrease in M_w over time for the HA samples analyzed in the present work. At physiological human body temperature, both hyaluronan samples studied exhibited only moderate degradation in solution (Fig. 3, and Fig. S3 in Supplementary files). The molar mass loss in solution at 37 °C after 1 h of heating was 3% for HA 1.67 MDa and just 0.6% in the case of HA 1.8 MDa.

The same behavior was observed after longer periods of heating: HA 1.67 MDa showed faster degradation than HA 1.8 MDa in solution at 37 °C. For example, after 4 h at 37 °C, the molar mass loss was 8.6% for HA 1.67 MDa and only 3% for HA 1.8 MDa. More data

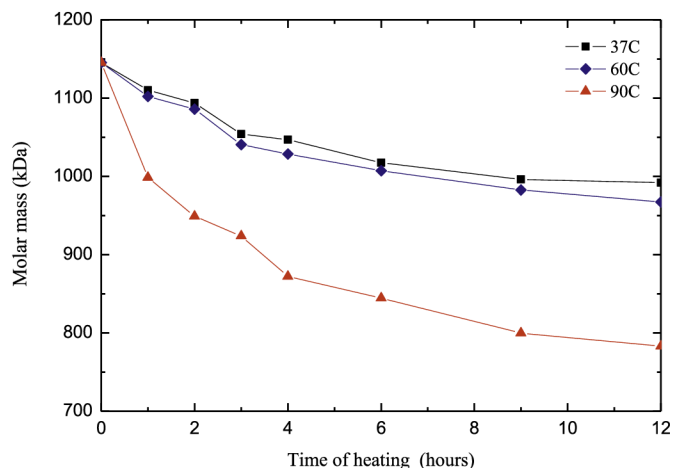


Fig. 3. Thermal degradation of HA 1.67 MDa in solution.

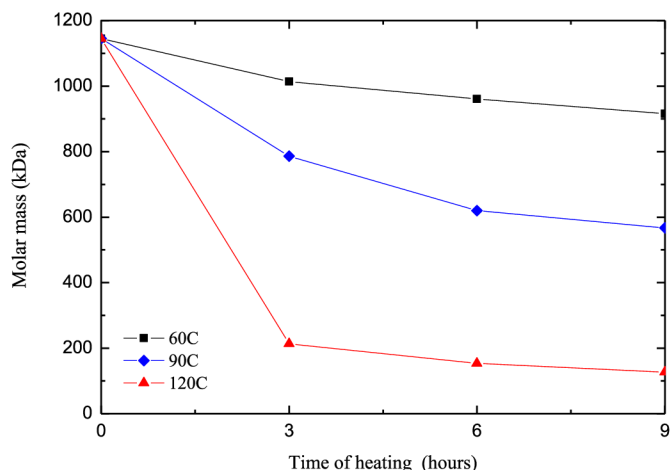


Fig. 4. Thermal degradation of HA 1.67 MDa in powder form.

are available in Table S2 (Supplementary Files).

While after 1 h of thermal treatment the degradation in solution at 37 °C was five times faster for HA 1.67 MDa than for HA 1.8 MDa, after 12 h the molar mass loss was only two times higher for HA 1.67 MDa.

The hyaluronan samples, both in solution and in powder form, were studied at 60 and 90 °C. For hyaluronan solutions, the observed degradation at 60 °C was very similar to the degradation at 37 °C (Fig. 3, and Fig. S3 in Supplementary Files). After 1 h at 60 °C, the molar mass loss for the HA 1.67 MDa solution was 3.7%, while at 37 °C after the same period the molar mass loss was 3%. Similar molar mass losses at different temperatures were observed after longer periods of heating. After 6 h, for example, the molar mass loss for the HA 1.67 MDa solution was around 11–12% at both temperatures. Only after 12 h of thermal degradation at 60 °C did the molar mass loss increase above that observed after 12 h of thermal degradation at 37 °C – i.e. up to 15.5%, in comparison with 13.4% at 37 °C.

For the HA 1.8 MDa sample in solution, degradation at 60 °C and 37 °C also yielded similar degrees of molar mass loss. When both hyaluronan samples were compared at 60 °C, the degradation in solution was faster for HA 1.67 MDa than for HA 1.8 MDa (two times faster after 12 h of heating).

After 3 h at 60 °C, the HA 1.67 MDa sample lost 11.4% of its initial molar mass in powder form and just 7.7% in solution. The molar mass loss for the HA 1.8 MDa sample was 7.3% in powder form and 3.4% in solution at the same temperature and after the same period of heating (3 h at 60 °C). The same tendency was observed after 6 and 9 h.

Hyaluronan samples in both powder form and in solution were also degraded at 90 °C, as mentioned before. At 37 °C and 60 °C, hyaluronan solutions exhibited only moderate degradation and almost the same behavior and stability. However, when the solutions were heated at 90 °C, significant degradation occurred. After one hour, the thermal degradation of the HA 1.67 MDa and HA 1.8 MDa samples in solution at 90 °C was similar, with a molar mass loss of around 12% in each case.

After just two hours at 90 °C, the HA 1.67 MDa solution already exhibited a higher level of degradation (a molar mass loss of 17.2%) than after 12 h at 60 °C. The thermal degradation at 90 °C was faster in powder form than in solution for both hyaluronan samples, as was observed at 60 °C.

The degradation in powder form was also studied at 120 °C for both hyaluronan samples (Fig. 4 and Fig. S4 in Supplementary

Files). We can see that for both HA samples, the degradation after just 3 h of heating at 120 °C was already higher than after 9 h at 60 °C or 90 °C.

The hyaluronan samples exhibited a very high molar mass loss in powder form at 120 °C (81.3% after 3 h and 88.9% after 9 h for HA 1.67 MDa; 79% after 3 h and 89.3% after 9 h for HA 1.8 MDa). It was also observed that the degradation was much faster in the first 3 h of thermal treatment. From Fig. 4 and Fig. S4 it can be seen that the degradation of HA samples in powder form at 120 °C has two different degradation rates (before and after 3 h).

The molar mass losses were very similar for both samples at this high temperature, which was different from the behavior at the lower temperatures studied (where the degradation was clearly higher for HA 1.67 MDa). After 6 h at 120 °C, the degradation was even faster for the HA 1.8 MDa sample than for the HA 1.67 MDa sample, but the difference was very small.

Using the same procedure as for the BSA samples, the ELS method was employed to determine the stability of both HA samples in solution. The measured values of the zeta potential for fresh solutions of HA 1.67 MDa and HA 1.8 MDa were −41.9 mV and −51.1 mV, respectively. Both these values confirmed the high electrostatic stability of fresh solutions of HA. Data obtained on the time development of the zeta potentials for both HA samples in solution at three different temperatures (37, 60 and 90 °C) are listed in Fig. S10 in Supplementary Files. Contrary to the above-described effects of thermal treatment on the stability of BSA samples in solution, in the case of both HA samples, thermal treatment did not yield any significant changes in zeta potential with increasing temperature. The obtained increases in the zeta potential for 1.67 MDa HA after 12 h of heating at 37, 60 and 90 °C were 3.1%, 3.9% and 6.4%, respectively. After 12 h of heating at 37, 60 and 90 °C, the determined increases in the zeta potential for 1.8 MDa HA were 2.1%, 4.1% and 6.3%, respectively. These findings can be attributed to the above observed decrease in the molecular weight of HA during thermal heating of the solution. The zeta potential is an indicator of sample stability resisting particle aggregation, but it cannot provide any information about sample degradation [29]. Therefore, no significant decrease in zeta potential could be observed. This conclusion also indicates no significant change in the HA particle surface layer during thermal treatment. These results are in contrast to the thermal degradation of BSA solutions, in which aggregation occurred. In the case of these solutions, a significant increase in zeta potential to values close to zero was observed, which caused significant destabilization and the aggregation of both BSA samples in solution.

From their RMS conformation plots (gyration radius vs molar mass) for all periods and for all temperatures used, a random coil shape was confirmed for both of the hyaluronic acid samples studied here. Several examples of conformation plots for thermally degraded HA samples in powder form are shown in Fig. 5.

For all hyaluronan samples used, the slope of the conformation plot yielded values ranging between 0.5 and 0.7, as expected for randomly coiled polymers. The lowest molar mass observed in our study was 79 kDa, for HA 1.8 MDa after thermal degradation for 9 h at 120 °C. This value of molar mass was still high enough to obtain a random coil conformation. In our previous studies we observed the transition to a conformation between a random coil and a rod only for HA samples with a molar mass of 17 kDa [30]. In this case, the mass was too low to form a randomly coiled conformation. More examples of conformation plots are shown in Figs. S11–S17.

The polydispersity of fresh hyaluronan solutions showed values of 1.08 for HA 1.67 MDa and 1.02 for HA 1.8 MDa. Because of the thermal treatment, the polydispersity increased for both hyaluronan samples studied. The maximum PD increase that we observed was around 40% after 9 h at 120 °C.

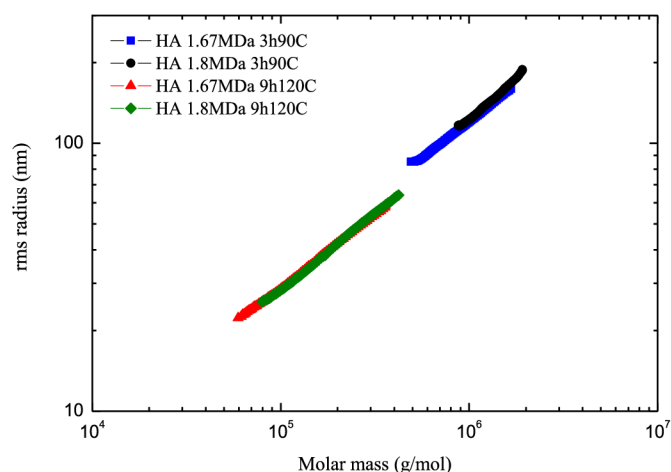


Fig. 5. Examples of conformation plots for thermally degraded HA samples in powder form.

During thermal degradation at 37 and 60 °C, the polydispersity did not change significantly. For HA 1.67 MDa in solution at 37 °C, the polydispersity increased up to 1.11 only after 9 h and up to 1.13 after 12 h. For HA 1.8 MDa in solution at 37 °C, we observed an increase in polydispersity only up to 1.3 after thermal treatment for 12 h.

A more significant increase in polydispersity was observed for both hyaluronan samples at 90 °C and 120 °C. For example, after 12 h at 90 °C, PD increased up to 1.39 for HA 1.67 MDa in solution and up to 1.2 for the same sample in powder form.

For HA in powder form at 120 °C, the polydispersity increased even more: up to 1.4 for HA 1.8 MDa and up to 1.53 for HA 1.67 MDa after 9 h of thermal treatment.

5. Kinetic evaluation of hyaluronan degradation

The dependence of molar mass on time, determined for all hyaluronan samples, may suggest the exponential decay of first order kinetics. By plotting data in the form of the following linearized first order kinetic equation,

$$\ln M_w = kt + \ln M_{w0} \quad (1)$$

We found that the dependence was non-linear, as we discovered in our previous study on the long-term degradation of hyaluronan samples [30]. In the same work, we presented new kinetic models for hyaluronan degradation. We applied our exponential model also to the data concerning thermal degradation obtained in this study:

$$M_w = M_\infty + M_{diff} e^{kt} \quad (2)$$

The fit of $M_w = f(t)$ with Equation (2) yields the overall rate constant k , the parameter M_∞ (the theoretical asymptotic value at $t \rightarrow \infty$), and the second parameter M_{diff} (the difference between the initial molar mass and the asymptotic value). The rate constants, both parameters, and the adjusted R-square values are summarized in Table 2.

As is obvious from Table 2, all adjusted R-square values are close to 1, which is a sign of a good fit. When we compare the degradation of 1.67 MDa hyaluronan in solution at various temperatures, we can see that the degradation rate constants and both molar mass-related parameters are similar at 37 °C and 60 °C. Above 60 °C, the degradation rate evidently increases, which is illustrated in Table 2 by the data determined for 90 °C. The degradation rate increased to $0.36 \pm 0.06 \text{ h}^{-1}$, and M_∞ decreased to $789 \pm 16 \text{ kDa}$. We

Table 2
Fitted parameters (Equation (2)) for the degradation of hyaluronan samples at 37, 60, and 120 °C (indicated in subscripts).

Sample name	1.67 MDa solution	1.67 MDa powder	1.8 MDa solution	1.8 MDa powder
k_{37} (h^{-1})	0.24 ± 0.03	—	0.12 ± 0.02	—
$M_{\text{inf}37}$ (kDa)	979 ± 8	—	1241 ± 11	—
$M_{\text{diff}37}$ (kDa)	168 ± 8	—	113 ± 10	—
Adj. R-square ₃₇	0.99	—	0.99	—
k_{60} (h^{-1})	0.24 ± 0.03	0.22 ± 0.05	0.18 ± 0.02	0.21 ± 0.08
$M_{\text{inf}60}$ (kDa)	959 ± 9	883 ± 26	1230 ± 6	1123 ± 38
$M_{\text{diff}60}$ (kDa)	186 ± 9	262 ± 25	124 ± 6	230 ± 37
Adj. R-square ₆₀	0.99	0.99	0.99	0.98
k_{90} (h^{-1})	0.36 ± 0.06	0.29 ± 0.02	0.38 ± 0.03	0.249 ± 0.004
$M_{\text{inf}90}$ (kDa)	789 ± 16	515 ± 19	776 ± 15	672 ± 5
$M_{\text{diff}90}$ (kDa)	340 ± 21	632 ± 21	578 ± 21	680 ± 5
Adj. R-square ₉₀	0.97	1.00	0.99	1.00
k_{120} (h^{-1})	—	0.85 ± 0.08	—	0.72 ± 0.02
$M_{\text{inf}120}$ (kDa)	—	136 ± 11	—	146 ± 5
$M_{\text{diff}120}$ (kDa)	—	1009 ± 19	—	1206 ± 7
Adj. R-square ₁₂₀	—	1.00	—	1.00

can see a similar pattern also for the 1.8 MDa hyaluronan solution. Another interesting phenomenon is that both hyaluronan samples have practically the same degradation rate constant at 90 °C.

For 1.67 MDa and 1.8 MDa hyaluronan in powder form, the degradation parameters are similar at 60 °C. However, at 90 °C, the degradation is faster in 1.67 MDa hyaluronan than in 1.8 MDa hyaluronan. Also M_{∞} is smaller for 1.67 MDa hyaluronan, which suggests deeper degradation. The same occurs after another increase in temperature to 120 °C, but more significantly. The degradation rate increases rapidly and M_{∞} decreases.

What is interesting is that lower molecular weight hyaluronan degraded faster than higher molecular weight hyaluronan. This is not in agreement with our previous study, in which low molecular weight hyaluronan degraded more slowly than higher molecular weight hyaluronan at the same temperature. However, the explanation for this may be connected to the fact that these two molecular weights are only separated by approximately 200 kDa; thus, the rate of degradation should be similar, and when we take into account the standard deviations of the rate constants, all the rate constants at the respective temperatures are similar for both molecular weights.

In a previous work [30], we performed a time-dependent study of the degradation of hyaluronan solutions at room temperature (25 °C) and in the refrigerator (4 °C). Even at these temperatures, we observed molecular weight changes, and these were assigned to temperature degradation. When we compare the degradation rate constants determined in both studies, we can see that those determined in the previous study were 10 to a 100 times smaller than those obtained in the present work for degradation at 37 °C or higher. On the basis of Arrhenius law, this difference in rate constants at different temperatures is expected.

6. Conclusions

- The degradation of HA samples increased with temperature and with time of heating, as expected.
- For HA samples in solution at 37 °C and 60 °C, only a moderate level of degradation was observed, which was similar across all samples.
- At 90 °C and 120 °C the degradation of HA samples was significant.
- In powder form at 120 °C, similar levels of thermal degradation were observed for both HA samples studied.
- At lower temperatures, the degradation was faster for HA 1.67 MDa than for HA 1.8 MDa.

- A random coil shape was confirmed for all hyaluronic acid samples used in this study (for fresh samples, as well as for thermally degraded ones).
- Both BSA samples in solution showed no degradation at 37 °C (the molar mass, polydispersity, and radius of gyration exhibited the same values during thermal treatment, even after 12 h).
- An increase in molar mass was observed for both BSA samples studied (in solution and in powder) at 60 °C, because of the aggregation which occurred.
- At 90 °C, the polydispersity increased for both BSA samples in powder form; after 9 h of heating, PD was already 2 for BSA 87 kDa and 1.3 for BSA 82 kDa.

Acknowledgment

The authors acknowledge the financial support of project Excellent Teams – CZ.1.07/2.3.00/30.0005 and the project LO 1211 Ministry of Education, Youth and Sports of Czech Republic.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data related to this article can be found at <http://dx.doi.org/10.1016/j.polymdgradstab.2015.06.012>.

References

- [1] L. Lapčík, S. De Smedt, J. Demeester, P. Chabreck, Hyaluronan: preparation, structure, properties, and applications, *Chem. Rev.* 98 (1998) 2663–2684.
- [2] H. Ochiai, M. Ohmae, T. Mori, S. Kobayashi, Bottom-up synthesis of hyaluronan and its derivatives via enzymatic polymerization: direct incorporation of an amido functional group, *Biomacromolecules* 6 (2005) 1068–1084.
- [3] S. Popa, C. Csunderlik, V. Jascanu, D. Jurcau, N. Plesu, Influence of temperature on the polymerization solution of acrylates in a bubble column reactor, *Chim. Data. ISSN: 0025-5289* (2004) 62–65.
- [4] S. Popa, C. Csunderlik, V. Jascanu, D. Jurcau, N. Plesu, Bubble gas column reactors used for polymerization, *Chim. Data. ISSN: 0025-5289* (2003) 177–181.
- [5] S. Popa, V. Jascanu, D. Jurcau, N. Plesu, The influence of some parameters on the column copolymerization with bubbling, *Rev. Chim.* (2003) 595–598.
- [6] S. Popa, C. Csunderlik, S. Florea, V. Jascanu, D. Jurcau, N. Plesu, The solution copolymerization of acrylates with styrene, *Rev. Chim.* (2002) 259–263.
- [7] H.S.S. Qhattal, X. Liu, Characterization of CD44-mediated cancer cell uptake and intracellular distribution of hyaluronan-grafted liposomes, *Mol. Pharm.* 8 (2011) 1233–1246.
- [8] P.W. Noble, Hyaluronan and its catabolic products in tissue injury and repair, *Matrix Biol.* 21 (2002) 25–29.
- [9] R. Stern, G. Kogan, M.J. Jedrzejewski, L. Soltés, The many ways to cleave hyaluronan, *Biotechnol. Adv.* 25 (2007) 537–557.
- [10] Y. Tokita, A. Okamoto, Hydrolytic degradation of hyaluronic acid, *Polym. Degrad. Stab.* 48 (1995) 269–273.
- [11] C.E. Reed, W.F. Reed, Light scattering power of randomly cut random coils with application to the determination of depolymerization rates, *J. Chem. Phys.* 91 (1989) 7193–7199.

- [12] H. Bothner, T. Waaler, O. Wik, Limiting viscosity number and weight average molecular weight of hyaluronate samples produced by heat degradation, *Int. J. Biol. Macromol.* 10 (1988) 287–291.
- [13] M. Reháková, D. Bakos, M. Soldán, K. Vizárová, Depolymerization reactions of hyaluronic acid in solution, *Int. J. Biol. Macromol.* 16 (1994) 121–124.
- [14] K.P. Vercruyse, A.R. Lauwers, J.M. Demeester, Absolute and empirical determination of the enzymatic-activity and kinetic investigation of the action of hyaluronidase on hyaluronan using viscometry, *Biochem. J.* 306 (1995) 153–160.
- [15] J.-I. Choi, J.-K. Kim, J.-H. Kim, D.-K. Kweon, J.-W. Lee, Degradation of hyaluronic acid powder by electron beam irradiation, gamma ray irradiation, microwave irradiation and thermal treatment: a comparative study, *Carbohydr. Polym.* 79 (2010) 1080–1085.
- [16] M.K. Prashanth, M. Madaiah, H.D. Revanasiddappa, K.N. Amruthesh, Synthesis, characterization, and BSA binding studies of some new benzamides related to Schiff base, *Int. Sch. Res. Notices Org. Chem.* (2013), <http://dx.doi.org/10.1155/2013/791591>.
- [17] G. Yohannes, S.K. Wiedmer, E. Matti, J. Matti, V. Aseyev, M.-L. Riekkola, Thermal aggregation of bovine serum albumin studied by asymmetrical flow field-flow fractionation, *Anal. Chim. Acta* 675 (2010) 191–198.
- [18] S.E. Harding, *Sedimentation Analysis of Polysaccharides*, Analytical Ultracentrifugation in Biochemistry and Polymer Science, Royal Society of Chemistry, Cambridge, 1992, pp. 495–513.
- [19] S.E. Harding, On the hydrodynamic analysis of macromolecular conformation, *Biophys. Chem.* 55 (1995) 69–93.
- [20] S.E. Harding, Some recent developments in the size and shape analysis of industrial polysaccharides in solution using sedimentation analysis in the analytical ultracentrifuge, *Carbohydr. Polym.* 28 (1995) 227–237.
- [21] H.L. Wagner, P.H. Verdier, The characterization of linear polyethylene SRM's 1482, 1483, and 1484. IV. Limiting viscosity numbers by capillary viscometry, *J. Res. Natl. Bur. Stand* 83 (1978) 195–201.
- [22] C.C. Han, Molecular weight and temperature dependence of intrinsic viscosity of polymer solutions, *Polymer* 20 (1979) 1083–1086.
- [23] P.C. Hiemenz, L.P. Timothy, *Polymer Chemistry*, second ed., vol. 336, Marcel Dekker Inc., 2007, pp. 338–339.
- [24] S.E. Harding, The intrinsic viscosity of biological macromolecules. Progress in measurement, interpretation and application to structure in dilute solution, *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 68 (1997) 207–262.
- [25] B.H. Zimm, The scattering of light and the radial distribution function of high polymer solutions, *J. Chem. Phys.* 16 (1948) 1093–1099.
- [26] P.J. Wyatt, Light scattering and the absolute characterization of macromolecules, *Anal. Chim. Acta* 272 (1993) 1–40.
- [27] *Literature Data Base – dn/dc Data*, 2015. www.wyatt.de.
- [28] M.B. Huglin, *Specific Refractive Index Increments of Polymers in Dilute Solution*, John Wiley & Sons, New York, 1989. VII/409.
- [29] X.U. Rensheng, *Particle Characterization: Light Scattering Methods*, in: Powder Technology Series, Kluwer Academic, Dordrecht, 2000, ISBN 07-923-6300-0 xv, 397s.
- [30] V. Simulescu, J. Mondek, M. Kalina, M. Pekař, Kinetics of long-term degradation of different molar mass hyaluronan solutions studied by SEC-MALLS, *Polym. Degrad. Stab.* 111 (2015) 257–262.