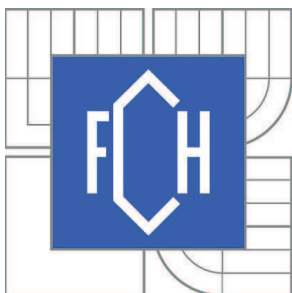


VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ

ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE

FACULTY OF CHEMISTRY

INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

ČASOVĚ ROZLIŠENÁ FLUORESCENCE VE VÝZKUMU KOLOIDNÍCH SYSTÉMŮ

TIME-RESOLVED FLUORESCENCE IN INVESTIGATION OF COLLOID SYSTEM

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

LADISLAVA ČERNÁ

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. FILIP MRAVEC, Ph.D.

BRNO 2012



Vysoké učení technické v Brně
Fakulta chemická
Purkyňova 464/118, 61200 Brno 12

Zadání bakalářské práce

Číslo bakalářské práce: **FCH-BAK0698/2011** Akademický rok: **2011/2012**
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie
Student(ka): **Ladislava Černá**
Studijní program: Chemie a chemické technologie (B2801)
Studijní obor: Spotřební chemie (2806R002)
Vedoucí práce **Ing. Filip Mravec, Ph.D.**
Konzultanti:

Název bakalářské práce:

Časově rozlišená fluorescence ve výzkumu koloidních systémů

Zadání bakalářské práce:

1. Shromáždit literární poznatky o metodách časově rozlišené fluorescence s přihlédnutím k aktuální přístrojové vybavenosti pracoviště.
2. Na základě rešerše vybrat vhodné fluorescenční sondy (minimálně 2) pro výzkum asociativních koloidů a provést u nich stanovení základních spektrálních charakteristik.
3. Pomocí metod časově rozlišené fluorescence stanovit typy interakce mezi sondami a asociativními koloidy, zvláště využít metody měření časově rozlišených emisních spekter.
4. Na základě získaných dat zhodnotit metodu časově rozlišené fluorescence z hlediska vhodnosti pro studium interakce modelových fluoreskujících látek s asociativními biokoloidy.

Termín odevzdání bakalářské práce: 4.5.2012

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

Ladislava Černá
Student(ka)

Ing. Filip Mravec, Ph.D.
Vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
Ředitel ústavu

V Brně, dne 31.1.2012

prof. Ing. Jaromír Havlica, DrSc.
Děkan fakulty

ABSTRAKT

Tato práce je zaměřena na stanovení základních spektrálních charakteristik jako maximum fluorescence a doba života u fluorescenčních sond prodan [6-propionyl-2-(dimethylamino)naftalen] a perylenu pomocí ustálené a časově rozlišené fluorescenční spektroskopie. Časově rozlišená měření byla realizována prostřednictvím metody TCSPC (time-correlated single photon counting). Charakteristiky prodanu byly zjištěny ve vodě, acetonu, n-heptanu a jejich směsích, tak aby vznikla polaritní škála prostředí. Dále byly obě zmíněné sondy zkoumány v systémech vodných roztoků kyseliny hyaluronové o molekulové hmotnosti 300 kDa a o koncentraci $10 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ spolu s kationaktivním tenzidem CTAB (cetyltrimethylamonium bromid) v rozsahu koncentrací od $0,01$ po $0,20 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ (před CMC). Cílem bylo potvrdit dosažení kritické agregační koncentrace tenzidu (CAC), zjistit základní spektrální charakteristiky zmíněných sond ve zvoleném koncentračním rozsahu a ověřit stabilitu tohoto systému v přítomnosti NaCl o koncentraci $0,15 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Metodou TCSPC byla dále získána časově rozlišená emisní spektra prodanu pro systém kyseliny hyaluronové a CTAB při jedné koncentraci CTAB ze zvoleného koncentračního rozmezí a to jak bez soli, tak se solí o koncentraci $0,15 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Získaná časově rozlišená spektra korelovala s výsledky měření v koncentračním rozsahu tenzidu. Po přidání soli se systém CAC prokázal jako nestabilní.

ABSTRACT

This thesis is focused on determination of the basic spectral characteristics, such as fluorescence maximum and lifetime, of fluorescent probes prodan [6-propionyl-2-(dimethylamino)naphthalene] and perylene by steady-state and time-resolved fluorescence spectroscopy. Time-resolved measurements were realized through TCSPC method (time-correlated single photon counting). The characteristics of prodan were found in water, acetone, n-heptane and in mixtures of these, so that a polar scale of environments would arise. Both of the mentioned probes were further investigated in systems of aqueous solutions of hyaluronic acid (300 kDa) at the concentration of $10 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ together with cationic surfactant CTAB (cetyltrimethylammonium bromide) at the concentration range from 0.01 to $0.20 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ (before CMC). The aim was to confirm the reach of critical aggregation concentration of the surfactant (CAC), to uncover the basic spectral characteristics of the mentioned probes in the chosen concentration range and to verify the stability of this system in the presence of NaCl at the concentration of $0.15 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Furthermore, by TCSPC method were obtained time-resolved emission spectra of prodan from the system of hyaluronic acid and CTAB at one concentration of CTAB from the chosen concentration interval both without salt and with salt at the concentration of $0.15 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$. The obtained time-resolved emission spectra correlated with the results of the concentration range measurement. After addition of salt the system of CAC proved to be unstable.

KLÍČOVÁ SLOVA

časově korelované čítání fotonů, prodan, perylen, cetyltrimethylamonium bromid, hyaluronová kyselina, kritická agregační koncentrace, časově rozlišená emisní spektra

KEYWORDS

time-correlated single photon counting, prodan, perylene, cetyltrimethylammonium bromide, hyaluronic acid, critical aggregation concentration, time-resolved emission spectra

ČERNÁ, L. *Časově rozlišená fluorescence ve výzkumu koloidních systémů*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2012. 60 s. Vedoucí bakalářské práce Ing. Filip Mravec, Ph.D..

PROHLÁŠENÍ

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

.....

podpis studenta

Poděkování:

Chtěla bych poděkovat vedoucímu mé bakalářské práce Ing. Filipu Mravcovi, PhD. za odborný dohled, ochotu a trpělivost. Dále bych chtěla poděkovat Ing. Tereze Halasové za cenné rady a připomínky. Rovněž bych ráda poděkovala své rodině za podporu při studiu.

OBSAH

1	Úvod	7
2	Teoretická část	8
2.1	Luminiscence	8
2.1.1	Jabloňského diagram	8
2.1.2	Franck-Condonův princip	9
2.1.3	Stokesův posun	10
2.1.4	Charakteristiky fluorescence	10
2.1.5	Ramanův a Rayleighův rozptyl	11
2.2	Fluorescenční sondy	12
2.2.1	Prodan (6-propionyl-2-(dimethylamino)naftalen)	12
2.2.2	Perylen	13
2.3	Asociativní koloidy (tenzidy)	14
2.3.1	Kritická micelární koncentrace	14
2.3.2	Kritická agregační koncentrace	15
2.4	Hyaluronová kyselina	15
2.4.1	Chemická struktura	15
2.4.2	Polymerní struktura	16
2.4.3	Struktura v roztoku	16
2.4.4	Výskyt a využití	17
2.5	Steady-state a časově rozlišená fluorescence	17
2.5.1	Význam fluorescenční spektroskopie	17
2.6	Časově rozlišené měření dob života	18
2.6.1	Význam doby života (doby poklesu)	19
2.6.2	Princip měření metodou TCSPC	20
2.6.3	Příklad TCSPC dat	22
2.6.4	Konvoluční integrál	23
2.6.5	Světelné zdroje pro TCSPC	23
2.6.6	Metoda nejmenších čtverců	23
2.6.7	Analýza multi-exponenciálních poklesů	24
2.6.8	Zákon poklesu intenzity	25
2.6.9	Globální analýza	25
2.6.10	Časově rozlišená emisní spektra	26
3	Rešerše	28
4	Experimentální část	30
4.1	Přístroje a vybavení	30
4.1.1	Systém Fluorolog	30
4.1.2	Systém Fluorocube	30
4.2	Použité programy	30
4.3	Chemikálie	30
4.4	Příprava vzorků	31
4.4.1	Charakteristiky prodanu v polaritní škále rozpouštědel	31
4.4.2	Měření kritické agregační koncentrace CTAB pomocí prodanu	32
4.4.3	Měření časově rozlišených emisních spekter prodanu	33
4.4.4	Měření kritické agregační koncentrace CTAB pomocí perylenu	33
4.5	Nastavení přístrojů	34
4.5.1	Charakteristiky prodanu v polaritní škále rozpouštědel	34
4.5.2	Měření kritické agregační koncentrace CTAB pomocí prodanu	34
4.5.3	Měření časově rozlišených emisních spekter prodanu	34

4.5.4	Měření kritické agregační koncentrace CTAB pomocí perylenu.....	35
4.6	Výsledky a diskuze.....	35
4.6.1	Charakteristiky prodanu v polaritní škále rozpouštědel.....	35
4.6.2	Měření kritické agregační koncentrace CTAB pomocí prodanu	38
4.6.3	Měření časově rozlišených emisních spekter prodanu.....	44
4.6.4	Měření kritické agregační koncentrace CTAB pomocí perylenu.....	46
5	Závěr.....	50
6	Seznam použité literatury.....	52
7	Seznam zkratk	58
8	Přílohy	59

1 ÚVOD

Aplikace léčiv je často limitována problémy jako nerozpustnost, neefektivní distribuce, enzymatická hydrolýza, nízká selektivita a vedlejší efekty vyvolávající ohrožení zdraví. Tyto problémy by mohly být vyřešeny solubilizací léčiv v biokompatibilních nosičových systémech, které léčivu pomohou dosáhnout požadovaných lokalit a působit především tam, kde je to žádoucí. Během minulých desetiletí bylo vyvinuto mnoho mikro- a nanonosičů ke zlepšení efektivity, dostupnosti a toxicitních profilů léčiv. Jako vhodný nosič léčiv se prokázala kyselina hyaluronová.

Tato látka je v oblasti biomedicíny široce používána díky své snadné komerční dostupnosti, netoxicitě, biodegradabilitě a biokompatibilitě. Původně se získávala z kohoutích hřebínků, nebo z kraviho oka. V současnosti se získává mikrobiální fermentací z průmyslově pěstovaných bakterií typu *Bacillus subtilis* a *Streptococcus equi*. Hyaluronová kyselina získaná z různých zdrojů má stejnou primární strukturu, což dává základ pro její přirozenou biokompatibilitu. Je to multifunkční polysacharid, který je z pohledu fyzikálních a biologických vlastností unikátní molekulou. Je velmi zajímavé, že tak jednoduchá molekula jako hyaluronová kyselina může uplatňovat tolik biologických funkcí. Například je hlavní extracelulární složkou pojivových tkání, hraje důležité role v regulaci buněčného chování včetně migrace buněk a rakovinového bujení tkání. Vedle cílení nalézá uplatnění i v molekulárním imagingu, opravě tkání a regeneraci. V těchto aplikacích se uplatňuje jednak její anionický charakter, který prodlužuje cirkulační čas nanonosičů v krevním řečišti, dále její mukoadhezivní vlastnosti a specifické vázání na receptory, což umožňuje její intenzivnější kontakt s cílovými tkáněmi.

Jako receptory pro hyaluronovou kyselinu byly identifikovány receptory CD44, RHAMM a LYVE-1. Z důvodu vázání na receptor CD44, který je rychle vytvářen na nádorových buňkách, se současné studie zaměřují mimo jiné na farmaceutické aplikace kyseliny hyaluronové pro vývoj léčiv proti rakovině. [1, 2, 3, 4, 5].

V této práci je studován systém kyseliny hyaluronové a kationaktivního tenzidu CTAB (cetyltrimethylamonium bromid), který má svou agregací na řetězcích kyseliny hyaluronové vytvořit hydrofóbní domény, ve kterých by bylo možno solubilizovat léčivo. To by tak bylo chráněno od inaktivace, nevyvolávalo by vedlejší účinky a vzrostla by efektivita léčby. Vznik agregátů CTAB v přítomnosti hyaluronové kyseliny byl studován pomocí ustálené a časově rozlišené fluorescenční spektroskopie. Fluorescenční spektroskopie je jednou z hlavních metod výzkumu biochemických a biofyzikálních systémů, kdy je pro získání informací o studovaném systému analyzováno emisní spektrum fluorescenční sondy vpravené do systému, popřípadě je analyzován její pokles fluorescence v závislosti na čase.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Luminiscence

Luminiscence je emise záření, která nastává z excitovaných elektronových stavů. Může být rozdělena do dvou kategorií – fluorescence a fosforescence. Lze uvádět také zpožděnou fluorescenci [6].

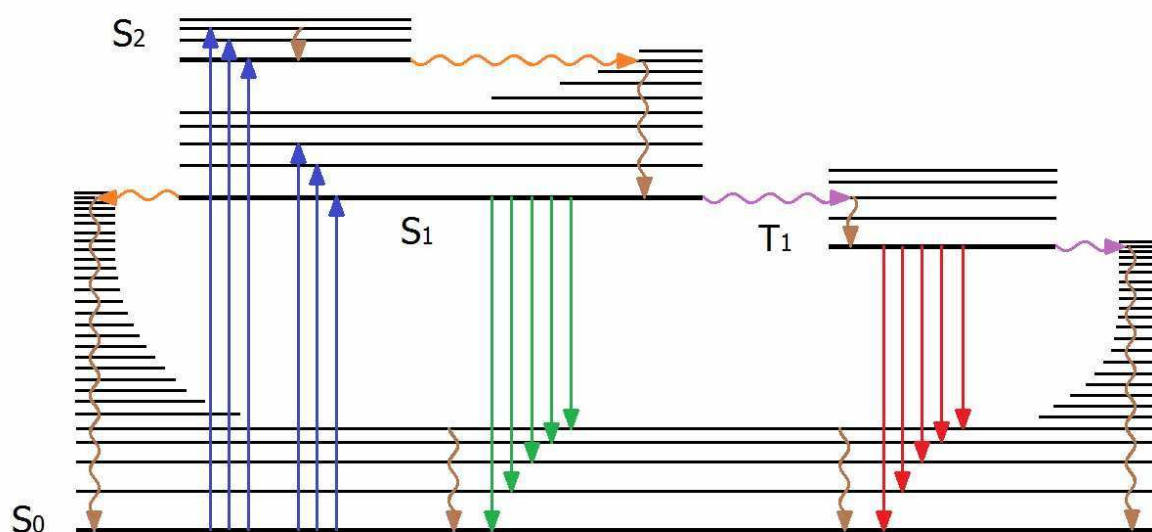
K fluorescenci dochází, jestliže excitovaná molekula emituje ze singletového stavu (elektron v excitovaném orbitalu má opačný spin než elektron v párovém orbitalu v základním stavu). Přechod excitovaného elektronu zpět na základní hladinu tedy není spinově zakázaný a nastává poměrně rychle, řádově v časech 10^{-8} s. Typická doba života excitovaného stavu se pohybuje okolo 10 ns [7]. Látky, které vykazují fluorescenci, jsou nazývány fluorofory nebo též fluorescenční barviva. Radíme mezi ně hlavně aromatické sloučeniny, jako jsou polyaromatické uhlovodíky nebo heterocykly [6].

Fosforescence je emise fotonu z tripletového excitovaného stavu, kde má elektron v excitovaném orbitalu stejný spin jako párový elektron v orbitalu základním. Přechod excitovaného elektronu zpět na základní hladinu je tedy kvantově zakázaný a tedy pomalejší – v řádech $10^{-3} - 10^0$ s. Doby života excitovaných stavů se pohybují v řádech milisekund až sekund nebo i v delších časech [7]. Obvykle ji nelze pozorovat v roztocích při pokojové teplotě.

Zpožděná fluorescence je zářivý přechod z téhož singletního stavu (S_1) jako při fluorescenci, ale s delší dobou dohasínání danou časem, po který je molekula v metastabilním tripletovém stavu. Emisní spektrum zpožděné fluorescence je totožné s emisním spektrem fluorescence [6].

2.1.1 Jabloňského diagram

Procesy objevující se mezi excitací a deexcitací jsou popisovány Jabloňského diagramem. Ten je znázorněn na následujícím obrázku:



Obrázek 1: Jabloňského diagram: Modře – absorpce, zeleně – fluorescence, červeně – fosforescence, hnědě – vibrační relaxace, oranžově – vnitřní konverze, fialově – mezisystémový přechod

Základní elektronový stav je označen jako S_0 (energeticky nejnižší elektronová hladina). Vyšší elektronové hladiny, které jsou obsazovány excitovanými elektrony, jsou označeny S_1 , S_2 atd. Tyto hladiny reprezentující energetické stavy o postupně vyšších energiích. Každý takový stav zahrnuje jistý počet vibračně - rotačních hladin, které jsou označeny např. S_0^1 nebo S_0^5 . Přechody mezi jednotlivými stavy jsou v diagramu znázorněny čarami. Rychlost absorpce je řádově zhruba 10^{-15} s.

Při excitaci se elektron dostává na vyšší elektronovou hladinu, v rámci které může zaujmout různou z možných vibračních hladin. Následují deexcitační procesy, které mohou být buď zářivé (luminiscence) nebo nezářivé (vnitřní konverze, mezisystémový přechod, vibrační relaxace, intramolekulární přenos náboje, konformační změna, interakce s jinými molekulami – přenos elektronu, přenos protonu, přenos energie, vytvoření excimeru nebo exciplexu, fotochemická přeměna). Zářivé a nezářivé přechody spolu mohou "soupeřit", jejich uplatnění záleží na době života excitovaného stavu [6, 8].

Bezprostředně po excitaci elektron přechází na nejnižší vibrační hladinu elektronového stavu, ve kterém se nachází. Část energie excitované molekuly se přitom ztratí ve formě tepla. Tento jev se nazývá vibrační relaxace. Její rychlost se pohybuje v řádu 10^{-12} s i méně. Dochází k ní tedy ještě dříve, než nastane emise.

Vnitřní konverze je přechod mezi elektronovými stavy se stejnou multiplicitou spinu. Elektron se tak dostane zpravidla na nenulovou vibrační hladinu jiného elektronového stavu a následuje proces vibrační relaxace. K vnitřní konverzi dochází častěji, jestliže nejnižší vibrační hladina excitovaného stavu se nachází energeticky na stejné úrovni jako některá z vibračních hladin nižšího elektronového stavu. Například přechod z S_2 do S_1 je častější než z S_1 do S_0 z důvodu větší energetické blízkosti elektronových stavů S_1 a S_2 [8]. Vnitřní konverze trvá řádově $10^{-6} - 10^{-12}$ s [6].

Při mezisystémovém přechodu dochází k obrácení spinu excitovaného elektronu a systém přechází do tripletového stavu. Následkem tohoto jevu je zpravidla fosforescence. Energie takového záření je obecně nižší než fluorescence a emise se proto objevuje v delších vlnových délkách. Příčinou této ztráty energie je právě nezářivý přechod do nižšího tripletového stavu [7]. K mezisystémovému přechodu dochází rychlostí řádově $10^{-4} - 10^{-12}$ s [6].

Po návratu do základního elektronového stavu se elektron obvykle nachází na některé z vyšších vibračně rotačních hladin, ze kterých se prostřednictvím vibrační relaxace dostává zpět do výchozího stavu S_0^0 . Vibrační relaxací se systém dostává do termodynamické rovnováhy.

2.1.2 Franck-Condonův princip

Základem Franck-Condonova principu je rozdíl v rychlosti pohybu elektronů a jader. Pohyb elektronů je mnohonásobně rychlejší (10^{-15} s), než čas charakteristický pro vibrace molekul ($10^{-10} - 10^{-12}$ s). Přechod elektronu do jiné elektronové hladiny se díky jeho rychlosti děje beze změny pozice jádra molekuly a molekul prostředí. Tento stav je termodynamicky nestabilní, proto dochází k excitaci elektronu na takovou vibračně-rotační hladinu vyššího elektronového stavu, aby následně nemuselo dojít ke změnám pozic jádra molekuly a molekul prostředí. Obdobně je tomu při deexcitaci, kdy elektron zpravidla nepřechází přímo do nejnižší vibračně-rotační hladiny základního elektronového stavu [8]. Většina absorbujících i emitujících molekul se nachází v rovnovážném vibračním stavu [6].

2.1.3 Stokesův posun

Z Jablůnského diagramu vyplývá, že energie emise bude ve většině případů menší než energie, která byla absorbována, protože vlivem nezářivých deexcitačních procesů dochází ke ztrátě části energie excitované molekuly. To znamená posun emisního záření směrem k delším vlnovým délkám neboli Stokesův posun. Jednou z hlavních příčin Stokesova posunu je ztráta energie prostřednictvím vibrační relaxace. Dalším důvodem je fakt, že při fluorescenci nedochází k přesunu elektronu až na hladinu S_0^0 . Navíc zde hraje významnou roli rozpouštědlo, reakce excitovaných stavů, tvoření komplexů a přenos energie [7].

2.1.4 Charakteristiky fluorescence

Mezi charakteristiky fluorescence řadíme absorpční, excitační nebo emisní spektra, kvantový výtěžek a dobu života [6].

Fluorescenční emisní spektra jsou spektrální intenzity fluorescence v závislosti na vlnové délce (nebo energii, vlnočtu či frekvenci). Přináší informaci o distribuci pravděpodobnosti různých přechodů z nejnižší vibrační hladiny S_1 do různých vibračních hladin S_0 . Jsou závislá na chemické struktuře fluoroforu a na prostředí, které ho obklopuje. [7, 8].

Fluorescenční emisní spektra jsou většinou považována za nezávislé na excitační vlnové délce, což je důsledek **Kashova pravidla**. To popisuje, že sice dochází k excitaci do různých vibračních hladin stavu S_1 , ale poté vždy nastane disipace energie a přechod elektronu až na nejnižší vibrační hladinu excitovaného stavu S_1 . Odtud se teprve realizuje zářivý přechod a emisní záření pak má stejnou energii a tedy i vlnovou délku [7].

Pro velké množství organických molekul platí zákon zrcadlové symetrie mezi absorpčním a emisním spektrem. To je způsobeno tím, že absorpce i emise z odpovídajících si vibračních hladin mají stejnou relativní pravděpodobnost. Výjimky z pravidla zrcadlové symetrie jsou obvykle důsledkem rozdílného geometrického uspořádání atomových jader v excitovaném stavu oproti uspořádání ve stavu základním [6].

Kvantový výtěžek je definován jako poměr počtu emitovaných fotonů k počtu absorbovaných fotonů. Pro fluorofory deexcitující zářivě platí:

$$Q = \frac{\Gamma}{\Gamma + k_{nr}}, \quad (1)$$

kde Q je kvantový výtěžek a Γ a k_{nr} jsou rychlostní konstanty značící rychlost depopulace excitovaného stavu. Konstanta Γ zastupuje zářivý přechod, konstanta k_{nr} potom přechody nezářivé. Vysoké kvantové výtěžky se blíží jednotkové hodnotě, jsou však vždy nižší než jedna kvůli Stokesově posunu [7].

Kvantový výtěžek lze také definovat následujícím vztahem:

$$\int_0^{\infty} F_{\lambda}(\lambda_F) d\lambda_F = \Phi_F, \quad (2)$$

kde $F_{\lambda}(\lambda_F)$ reprezentuje emisní spektrum. Intenzita fluorescence (steady-state) $I_F(\lambda_F)$ měřená při vlnové délce λ_F je přímo úměrná $F_{\lambda}(\lambda_F)$ a množství absorbovaných fotonů o jisté

excitační vlnové délce λ_E . Vlnové délky λ_F i λ_E jsou vybrány monochromátorem v jistém pásu $\Delta\lambda$.

Počet fotonů bývá zpravidla nahrazován intenzitou absorbovaného záření $I_A(\lambda_E)$, která je definována jako rozdíl mezi intenzitou dopadajícího záření $I_0(\lambda_E)$ a intenzitou prošlého (neabsorbovaného) záření $I_T(\lambda_E)$:

$$I_A(\lambda_E) = I_0(\lambda_E) - I_T(\lambda_E) \quad (3)$$

Pro intenzitu fluorescence potom platí:

$$I_F(\lambda_E, \lambda_F) = kF_\lambda(\lambda_F)I_A(\lambda_E) \quad (4)$$

Faktor k závisí na několika parametrech, především na prostorovém úhlu pozorování a na šířce pásů monochromátorů. Intenzita prošlého záření může být také vyjádřena Lambert-Beerovým zákonem:

$$I_T(\lambda_E) = I_0(\lambda_E)\exp[-2,3\varepsilon(\lambda_E)lc] \quad (5)$$

kde $\varepsilon(\lambda_E)$ je absorpční koeficient fluoroforu při vlnové délce λ_E ($l \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$), l značí délku optické dráhy vzorku (cm) a c je koncentrace fluoroforu ($\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$). Výraz $\varepsilon(\lambda_E) \cdot l \cdot c$ je definován jako absorbance $A(\lambda_E)$ při vlnové délce λ_E .

Intenzita fluorescence je ovšem přímo úměrná koncentraci jen při nízkých hodnotách absorbance [8].

Rovnice (2), (3) a (4) lze vyjádřit jako:

$$I_F(\lambda_E, \lambda_F) = kF_\lambda(\lambda_F)I_0(\lambda_E)\{1 - \exp[-2,3\varepsilon(\lambda_E)lc]\} \quad (6)$$

Další charakteristikou fluorescence je doba života excitovaného stavu fluoroforu, která je definována jako průměrný čas, po který molekula setrvává v excitovaném stavu, než se vrátí do stavu základního.

Pro výběr vhodného fluoroforu je vhodné znát jak jeho kvantový výtěžek, tak jeho dobu života [7].

2.1.5 Ramanův a Rayleighův rozptyl

Při měření emisních spekter může být pozorován rozptyl excitačního záření odrazem, kdy se v klasickém emisním spektru příslušného fluoroforu zobrazí další maximum.

Většina odraženého záření nezmění svou vlnovou délku. Jde o rozptyl, který je nazýván Rayleighův rozptyl. U malé části odraženého záření dochází ke změně vlnové délky, tento rozptyl je označován jako Ramanův.

Rozptyl vzniká srážkou fotonů excitačního záření s molekulami vzorku. V případě Rayleighova rozptylu se molekula po srážce dostane na virtuální excitovanou vibrační energetickou hladinu a téměř okamžitě klesne na původní základní hladinu. Energie fotonu se během tohoto procesu nezmění, vlnová délka odraženého záření se tedy také nezmění. Takové srážky jsou popisovány jako pružné. V případě nepružných srážek dochází ke vzniku Ramanova rozptylu, kdy foton odevzdá část své energie molekule a jeho vlnová délka se prodlouží. Rozdíl ve vlnové délce fotonu je označován jako Ramanův posun. Tento posun může být jak červený (popsán výše), tak modrý, kdy se foton sráží s molekulou ve vyšším

vibračním stavu. Při vyzáření fotonu klesne molekula do základního energetického stavu a část své předešlé energie předá fotonu [9].

Pro odstranění rozptylu lze použít například excitaci zářením o jiné vlnové délce nebo odečíst intenzitu fluorescence vzorku bez fluoroforu od primárního vzorku s fluoroforem.

2.2 Fluorescenční sondy

Zkoumané látky lze obecně definovat jako látky schopné fluorescence - vnitřní (přirozené) fluorofory a látky které nefluoreskují. Aby takové látky mohly být zkoumány pomocí fluorescence, jsou "označovány" vnějšími fluorofory. Ty mohou být rozděleny na dvě skupiny - kovalentně vázané vnější fluorofory (fluorescenční značky) a asociační vnější fluorofory (fluorescenční sondy). Ideálním případem jsou vnitřní fluorofory (např. tryptofan v proteinech). Předností kovalentně vázaných vnějších fluoroforů je jejich dopředu známá pozice v systému. Stěžejní vlastností asociačních vnějších fluoroforů je jejich schopnost se samovolně rozmístit do zkoumaných mikroprostředí [8].

Fluorescenčních sondy lze rozdělit na iontové, polaritní, membránové, na sondy pro membránový potenciál, pro nukleové kyseliny a pro přenos energie.

Membránové sondy lze rozdělit do dvou skupin:

1. fluorescenční analogy přirozených lipidů (fosfolipidy, sfingolipidy, mastné kyseliny, triglyceridy, steroidy)

2. malé amfifilní a lipofilní organické fluorofory [6]

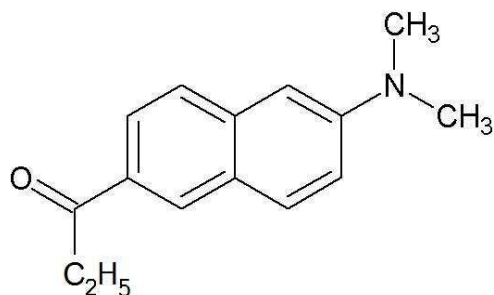
2.2.1 Prodan (6-propionyl-2-(dimethylamino)naftalen)

Prodan (Obrázek 2) se řadí mezi lipofilní membránové fluorescenční sondy. Jeho fluorescenční chování silně závisí na polaritě prostředí. Je používán hlavně ve výzkumu fyzikálních a chemických vlastností membrán a biologických makromolekul [10]. Důležitou vlastností prodanu je jeho rozpustnost v široké škále rozpouštědel. Emisní spektrum prodanu tak může být vytvořeno molekulami prodanu emitujícími různě - z různých prostředí. Takto získané spektrum lze pomocí dekonvoluce rozdělit na příslušný počet Gaussových peaků a určit tak počet a kvalitu mikroprostředí [11].

Prodan je schopen vykazovat nezvykle velký Stokesův posun. Tento posun je silně závislý na vzrůstu dipólového momentu prodanu (ten je významný) v excitačním stavu. Číselně je vyjádřen jako 11,7 D oproti prodanu v základním stavu – 4,7 D [8]. Absorpcí energie dochází k přenosu náboje z dimethylaminu k propionyl naftalenu a tím dochází k nárůstu dipólového momentu [12]. V hydrofilním (polárním) prostředí dochází k intenzivnějšímu přesunu energie z excitované molekuly prodanu k sousedním molekulám rozpouštědla. Čím více energie je takto odebráno, tím výraznější je posun maxima emise směrem k delším vlnovým délkám. V prostředí o hydrofóbnějším charakteru je tento jev méně intenzivní [13].

Emisní maximum prodanu ve vodě je zhruba 520 nm, v uhlovodících zhruba 410 nm, což znamená, že Stokesův posun (v termínech vlnových délek) je při absorpci při 360 nm asi 160 nm ve vodném prostředí a asi 50 nm v prostředí nepolárním [14]. Kvantový výtěžek fluorescence prodanu v polárním prostředí je menší než v nepolárním. Vyšší hodnoty intenzity fluorescence jsou získány v přítomnosti protických rozpouštědel oproti rozpouštědlům aprotickým, což může souviset s vlastnostmi vodíkových vazeb prodanu [12].

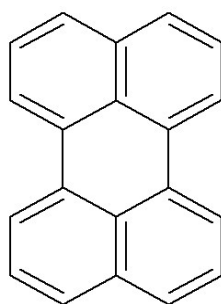
Prodan vykazuje v nepolárních prostředích a aprotických prostředích jednu dobu života. Naopak v polárních protických rozpouštědlech vykazuje dvě doby života. Chování prodanu je zde složitější. Příkladem takového prostředí je voda, kde prodan vykazuje doby života $\sim 0,7$ ns (60 %) a ~ 2 ns (40 %). Kratší čas vzniká díky tvoření komplexu prodanu s vodou prostřednictvím vodíkových můstků. Další doby života prodanu jsou například 3,35 ns (aceton) a 0,15 ns (n-heptan) [15, 16].



Obrázek 2: *Struktura prodanu*

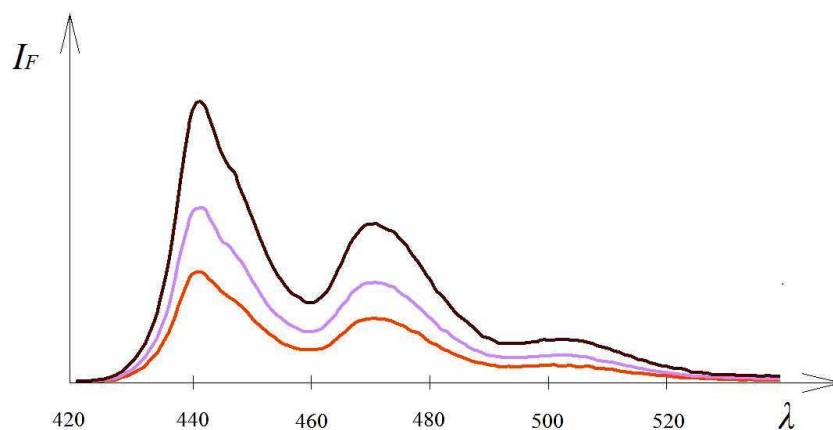
2.2.2 Perylen

Tato sonda je polycyklický aromatický uhlovdík (Obrázek 3). Stejně jako prodan se řadí mezi membránové lipofilní sondy [17].



Obrázek 3: *Struktura perylenu*

Emisní spektrum perylenu má charakteristickou strukturu, což je způsobeno jednotlivými vibračními stavy základních a excitovaných stavů (Obrázek 4).



Obrázek 4: *Emisní spektrum perylenu*

Perylen je schopen vytvářet excimery, tedy komplexy dvou molekul perylenu, z nichž jedna byla v excitovaném stavu. Míra tvoření excimerů je závislá na rozpouštědle a na počáteční koncentraci perylenu [7].

Doby života excimerů perylenu byly zjištěny v řádech nanosekund až pikosekund [18]. Doba života perylenu v nepolárním prostředí (cyklohexan) je 6 ns [8].

2.3 Asociativní koloidy (tenzidy)

V systémech asociativních koloidů se vyskytují koloidně disperzní částice – micely, které vznikají vratnou asociací z pravých roztoků některých nízkomolekulárních látek. Takové látky se označují jako tenzidy, surfaktanty nebo povrchově aktivní látky (PAL). Tyto látky musí nutně obsahovat skupinu atomů s velkou afinitou k rozpouštědлу, čímž bude zaručena dostatečná rozpustnost, a zároveň musí obsahovat část v daném rozpouštědle nerozpustnou. Obsahují tedy polární (hydrofilní) a nepolární (hydrofóbní) část, jinými slovy jsou amfifilní.

Termínem koloidní povrchově aktivní látky lze označit také PAL, které jsou v roztocích schopny přecházet z molekulární disperze do koloidní, neboli jsou schopny asociace a tvorby micel. To je podmíněno dostatečně dlouhým uhlovodíkovým řetězcem, který ve většině případů reprezentuje část molekuly v rozpouštědle nerozpustnou.

Na části molekuly s afinitou k rozpouštědлу může docházet k ionizaci. Takové PAL jsou potom označovány jako ionogenní. V opačném případě jde o neionogenní PAL. Ionogenní PAL se rozděluje do tří skupin - anionaktivní, kationaktivní a amfoterní.

U anionaktivních PAL dochází při jejich rozpuštění ke vzniku záporného náboje na disociovaných polárních skupinách. Analogicky je tomu u kationaktivní PAL, jejichž povrch nese po rozpuštění náboj kladný. Micely amfoterních PAL získávají náboj v závislosti na pH. Příkladem aniontových PAL jsou přirozená (alkalické soli vyšších mastných kyselin) a umělá mýdla (soli alkylsulfonových kyselin). Používají se jako smáčedla, emulgátory, detergenty, penetrátory, aj. Typickou vlastností kationaktivních PAL je schopnost adsorbovat se na negativně nabitě povrchy, jako jsou bílkoviny nebo kyselina hyaluronová. Použití nalézají v antistatických přípravcích, v prostředcích pro inhibici koroze, v baktericidních přípravcích nebo textilních změkčovadlech. Jejich charakteristickým znakem je přítomnost dusíku v molekule. Nejdůležitějšími zástupci kationaktivních tenzidů jsou kvartérní aminy.

Struktura nedisociujících neionogenních PAL obsahuje zpravidla delší uhlovodíkový řetězec a polární část jako je hydroxylová nebo esterová skupina [19, 20].

2.3.1 Kritická micelární koncentrace

Obecně lze říci, že PAL vytváří pravé roztoky jen do jisté koncentrace. Tu nazýváme kritická micelární koncentrace (CMC). Ve zředěnějších roztocích se molekuly PAL shromažďují na fázovém rozhraní rozpouštědlo-vzduch, kde zaujímají termodynamický stav o nižší energii (snižují mezifázovou energii). Ve volném roztoku je jich přitom nepatrné množství. Po překročení CMC dochází k nasycení fázového rozhraní a dojde ke vzniku nových rozhraní uvnitř rozpouštědla. Molekuly PAL vytvoří útvary kulovitého či jiného tvaru – micely. Jejich povrch, který je v kontaktu s rozpouštědlem, je tvořen polárními částmi PAL, prostor uvnitř micel je vyplněn nepolárními částmi (v případě polárního rozpouštědla).

Kritická micelární koncentrace pro jednotlivé PAL se stanovuje na základě změny směrnice koncentračních závislostí mnohých fyzikálně-chemických vlastností roztoků PAL jako je povrchové napětí, hustota, viskozita, osmotický tlak, turbidita, molární velikost a optické vlastnosti jako je např. rozptyl světla.

Hodnotu CMC ovlivňuje délka uhlovodíkového řetězce PAL a vlastnosti hydrofilní skupiny. U ionogenních PAL mají vliv i vlastnosti protiiontů vzniklých disociací. Hodnota CMC klesá s rostoucím uhlovodíkovým řetězcem, stoupá s rozvětveností řetězce a s přítomností nenasycených vazeb nebo polárních skupin uprostřed řetězce. Hydrofilní skupiny ionogenních PAL nemají značný vliv na hodnotu CMC, u neionogenních PAL záleží na rozměrech a povaze polární skupiny. U protiiontů má vliv jejich mocností. Se zvyšujícím se nábojem klesá hodnota CMC. Dalším faktorem je přítomnost jednoduchých anorganických elektrolytů v roztoku, které se svou zvyšující se koncentrací snižují CMC [19]. V neposlední řadě má na hodnotu CMC vliv i teplota a tlak [20].

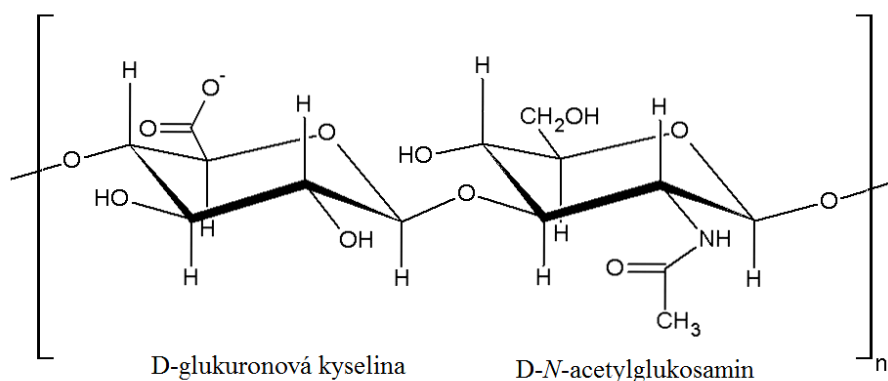
2.3.2 Kritická agregační koncentrace

K organizaci PAL v roztoku může docházet i při nižších koncentracích, než je CMC. Těmito koncentracemi jsou kritické agregační koncentrace (CAC), kdy se molekuly PAL asociují na nějakém fázovém rozhraní v roztoku - například na kyselině hyaluronové, aby tak zaujaly stav o termodynamicky nižší energii. Agregací dalších PAL dojde ke vzniku micel, které mají menší rozměry, hovoříme o minimicelách. Volné micely v roztoku nevznikají.

2.4 Hyaluronová kyselina

2.4.1 Chemická struktura

Hyaluronová kyselina (nověji hyaluronan) patří mezi lineární glykosaminoglykany, v rámci kterých patří mezi nejjednodušší. Jako jediná z glykosaminoglykanů není kovalentně spojená s proteiny, není syntetizována v Golgiho aparátu a jako jediná není sulfonovaná [21]. Skládá se z opakující se disacharidové jednotky, která je složena z D-glukuronové kyseliny a D-N-acetylglukosaminu (Obrázek 5) [22]. Ty jsou k sobě připojeny přes beta-1,4 a beta-1,3 glykosidickou vazbu v posloupnosti: D-glukuronová kyselina – beta-1,3 – D-N-acetylglukosaminu – beta-1,4 [23]. Oba cukry jsou prostorově příbuzné glukóze, která v beta poloze umožňuje všem svým prostorově objemnějším skupinám, být ve stericky výhodné vodorovné poloze. Malé vodíkové atomy zaujímají stericky méně výhodné vertikální polohy. Toto uspořádání skupin zajišťuje energetickou stálost disacharidové jednotky [23].



Obrázek 5: Struktura kyseliny hyaluronové

2.4.2 Polymerní struktura

Jedna molekula hyaluronanu může obsahovat i více než 10 000 disacharidových jednotek. To znamená, že molekulová hmotnost jedné molekuly může dosahovat hodnoty mezi 10^6 a 10^7 Da. Průměrná délka disacharidové jednotky je asi 1 nm, Celková délka molekuly může být více než 10 μm [22, 23].

2.4.3 Struktura v roztoku

Ve fyziologickém roztoku je struktura hyaluronanu přirovnatelná k otáčející se páse, která zaujímá tvar expandované nahodilé šroubovice a v roztoku zabírá velký prostor. Vod rovne umístěné skupiny na hyaluronanu tvoří hydrofilní část, vertikálně situované atomy vodíku zas vytváří hydrofóbní část. Faktický obsah hyaluronanu v prostoru, který jeho molekula zaujímá, je velice malý – asi 0,1 % (hmotnost hyaluronanu/objem vody) nebo i méně, jestliže je přítomna v malých koncentracích v solném roztoku. Domény jednotlivých molekul se tedy mohou překrývat při koncentracích asi $1 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ a větších [23].

Řetězce hyaluronanu se v roztoku neustále pohybují a vytváří tím ve své struktuře neustále nové, různě velké póry. Statisticky mohou existovat póry všech velikostí, ale s různou pravděpodobností vzniku. Molekuly o různé velikosti tedy mohou strukturou hyaluronanu procházet, ale s různým stupněm retardace v závislosti na svém hydrodynamickém objemu [23].

Hyaluronan v roztoku lze považovat za polyelektrolyt, který lze definovat jako vysokomolekulární látku obsahující postranní skupiny schopné elektrolytické disociace. Polyelektrolyty pak v roztoku nesou elektrický náboj v závislosti na tom, jestli obsahuje kyselé (-COO-, -OSO₃) nebo zásadité (-NH₃) postranní skupiny. Jestliže makromolekula obsahuje kyselé i zásadité skupiny, jejichž náboj se vzájemně vyruší, hovoříme o amfoterních elektrolytech. Jejich zástupci jsou například některé bílkoviny [12]. Hyaluronan nese ve fyziologickém roztoku záporný náboj díky svým karboxylovým skupinám. Obvykle jeho řetězec obsahuje stovky záporných nábojů. Tyto náboje jsou kompenzovány pohyblivými kationty jako Na⁺, K⁺, Ca²⁺ a Mg²⁺.

Přítomnost nábojů je podmínkou rozpustnosti hyaluronanu ve vodě. Jestliže dojde k modifikaci hyaluronanu esterifikací jeho hydroxylových skupin, dojde ke ztrátě schopnosti rozpouštět se ve vodě [24].

Molekula hyaluronanu obsahuje dva typy vazeb. Prvním typem je vazba pomocí kyslíkového atomu v cukerných jednotkách, která je relativně rigidní. Druhým typem vazby je glykosidická vazba mezi jednotlivými cukernými jednotkami, obsahující atom kyslíku. Okolo této vazby mohou cukerné jednotky rotovat o 360°. Hyaluronan je ale v roztoku více uspořádán. Každá disacharidová jednotka je otočena o 180° vůči sousedním jednotkám. Po dvou otočeních se tedy struktura dostává do původní orientace. Strukturou hyaluronanu je tedy dvojnásobná šroubovice, kde dvě spojené molekuly hyaluronanu jsou identické, ale vůči sobě antiparalelní [24]. Prostřednictvím hydroxylové skupiny vznikají v řetězci hyaluronanu také intramolekulární vodíkové vazby.

Důležitým znakem uspořádání struktury hyaluronanu je existence hydrofóbních oblastí, nazývaných také "hydrofobic patch". Vznikají shlukováním hydrofóbních částí řetězce z důvodu minimalizování styku s vodným prostředím. Tyto hydrofóbní oblasti mohou mít pro hyaluronan ve vodném prostředí významné důsledky [24].

2.4.4 Výskyt a využití

Hyaluronová kyselina je látka vlastní prakticky všem obratlovcům. Nachází se v celém organismu, protože je hlavní složkou pojivových tkání. Asi polovina hyaluronové kyseliny obsažené v těle se nachází v kůži a asi jedna čtvrtina v kostře, šlachách a kloubech. Je také nedílnou součástí očního sklivce [25]. Tento glykosaminoglykan je esenciální látkou pro strukturu a organizaci extracelulární matrice. Tvoří síť interagující s proteiny, receptory a povrchy buněk [22].

V medicíně je hyaluronan používán jako ukazatel rakovinového onemocnění, revmatické artritidy a patologií jater. Dále je využíván pro doplňování synoviální tekutiny při artritidě pomocí injekcí aplikovaných do kloubů. Využití nalézá také v oftalmologii, otologii, v kosmetice a při rekonstrukcích měkkých tkání [21].

2.5 Steady-state a časově rozlišená fluorescence

2.5.1 Význam fluorescenční spektroskopie

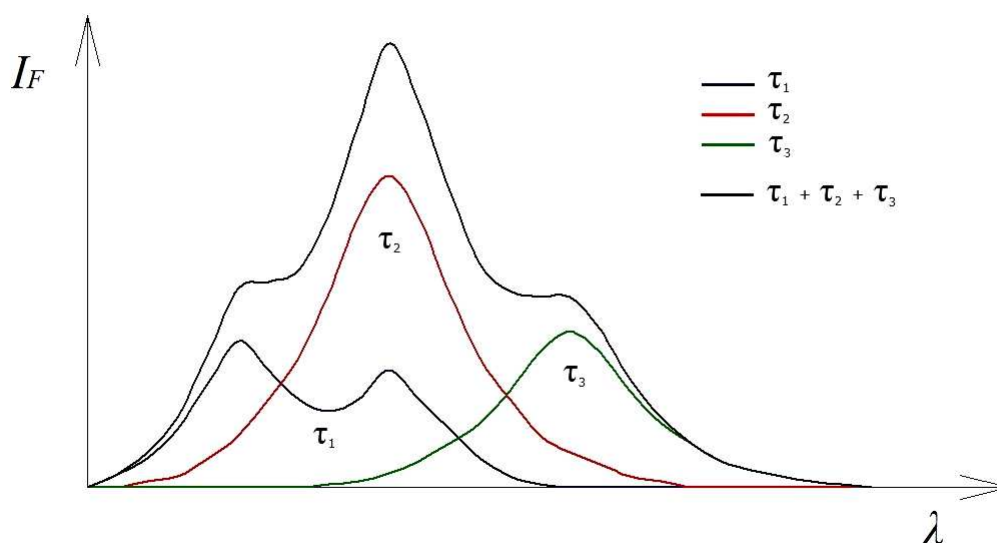
Fluorescenční spektroskopie může být použita v široké škále problematik v chemii i biologii. Měření může poskytnout informace o molekulárních procesech včetně interakcí mezi rozpouštědlem a fluoroforem, rotačním rozptylem biomolekul, vzdáleností částí v biomolekule, konformačních změn a vazebných interakcí.

Molekulární informace z fluorescence je založena na citlivosti většiny fluoroforů vůči jejich okolnímu prostředí. U vnějších fluoroforů jsou získaná emisní spektra a poklesy intenzit často používány k určení lokalizace sondy na makromolekule [7].

Měření fluorescence může být rozděleno na dva typy: steady-state měření a časově rozlišené měření. Steady-state měření (ustálená fluorescence) jsou běžným typem měření a jsou prováděna za konstantní excitace a pozorování. Vzorek je osvětlen kontinuálním paprskem záření a současně je zaznamenáno emisní spektrum.

Druhým typem je časově rozlišené měření, které se používá pro měření poklesů intenzity emise nebo pro pokles anizotropie. Na základě těchto poklesů se zjišťuje doba života fluoroforu. Při těchto měřeních je vzorek vystaven pulzu záření, jehož délka je typicky kratší, než je doba života vzorku. Pokles intenzity je zaznamenáván vysokorychlostním detektorovým systémem, který umožňuje změřit intenzitu emise nebo anizotropii v řádech nanosekund [7].

Fluorescenční steady-state spektrum může být výsledkem více překrývajících se spekter pocházejících z více fluoroforů nebo z jednoho typu fluoroforu v různých formách. Mnoho informací o molekule dostupné z fluorescence je tak ztraceno. Tyto informace o molekule jsou dostupné pouze z časově rozlišených měření, kde poklesy intenzity mohou odhalit více dob života fluoroforu. Steady-state intenzita poskytne pouze průměrné intenzity závislé na váženém průměru všech dob života. Jestliže je každý fluorofor přispívající k emisnímu spektru nebo jeho forma charakterizován jednou dobou života, je možno rozložit celkové spektrum na více komponentů. To je ilustrováno na obrázku 6 [8].



Obrázek 6: Celkové a dílčí steady-state spektra

Existuje mnoho dalších důvodů pro měření časově rozlišené fluorescence. Jestliže dochází k přenosu energie, poklesy intenzity odhalí, jak jsou akceptory rozmístěny v okolí donorů. Časově rozlišená měření mohou také ukázat, jestli je zhášení způsobeno rozptylem nebo vytvořením komplexu s fluoroforem v základním stavu [7].

Propojení mezi steady-state intenzitou (I_{ss}) a dobou života může být popsáno jako:

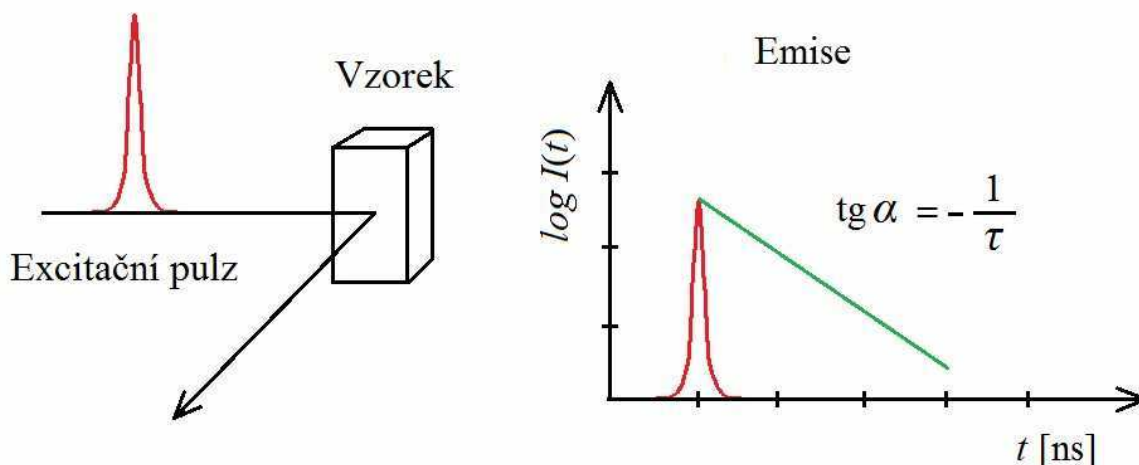
$$I_{ss} = I_0 \cdot \tau, \quad (7)$$

kde I_0 je parametrem závislým na koncentraci fluoroforu a na instrumentálních parametrech měřících přístrojů. Jinak řečeno, steady-state intenzita je přímo úměrná době života [7].

2.6 Časově rozlišené měření dob života

Časově rozlišená měření jsou ve fluorescenční spektroskopii široce používána. Dominují zde dvě metody: pulzní metoda (time-domain) a metoda fázově modulovaného budícího záření (frequency-domain).

U pulzní metody (Obrázek 7) dochází k excitaci vzorku pulzem záření. Šířka pulzu by měla být co možná nejmenší a nejlépe je výrazně kratší než doba života – τ vzorku. Po excitačním pulzu následuje měření intenzity fluorescence v závislosti na čase. Doba života potom může být vypočítána ze směrnice závislosti $\log I(t)$ na t , nebo z času, ve kterém intenzita poklesne na $1/e$ z intenzity v čase $t = 0$ s [7].



Obrázek 7: Pulzní metoda

2.6.1 Význam doby života (doby poklesu)

Jestliže je vzorek excitován nekonečně ostrým pulzem záření (δ -pulzem), dojde k excitaci určité počáteční populace fluoroforů (n_0). Velikost této populace klesá rychlostí $\Gamma + k_{nr}$ podle rovnice:

$$\frac{dn(t)}{dt} = -(\Gamma + k_{nr})n(t) \quad (8)$$

kde $n(t)$ je počet excitovaných molekul v čase t po excitaci, Γ je rychlost charakterizující úbytek excitované populace fluoroforů prostřednictvím emise, k_{nr} je rychlost spojená s nezářivými deexcitacemi. Emise je náhodná událost, každý excitovaný fluorofor má vlastní pravděpodobnost emise v daném časovém rozmezí, což má za následek exponenciální pokles populace excitovaných molekul. Jedná se o kinetiku prvního řádu. To lze popsat rovnicí:

$$n(t) = n_0 \exp(-t/\tau) \quad (9)$$

Ve fluorescenčním experimentu není sledován počet excitovaných molekul, ale intenzita, která je přímo úměrná hodnotě $n(t)$. Proto (9) může být také zapsána pomocí časově závislé intenzity $I(t)$. Integrací (8) s intenzitou místo molekulového počtu dostáváme obvyklý výraz pro jedno-exponenciální pokles:

$$I(t) = I_0 \exp(-t/\tau) \quad (10)$$

kde I_0 je intenzita v čase $t = 0$ s. Doba života τ je převrácenou hodnotou celkové rychlosti poklesu:

$$\tau = (\Gamma + k_{nr})^{-1} \quad (11)$$

Neboli převrácením hodnoty doby života dostáváme souhrn všech rychlostí, které způsobují depopulaci excitovaných molekul. Doba života fluoroforu je statistická událost, některé fluorofory emitují v kratším čase, než je doba života, jiné naopak v delším. Tato časová distribuce emitovaných fotonů je pokles intenzity. Doba života může být definována jako průměrný čas setrvání fluoroforu v excitovaném stavu, což ale platí pouze pro jedno-exponenciální poklesy:

$$\langle t \rangle = \tau \quad (12)$$

Toto neplatí pro složitější poklesy jako multi- nebo non-exponenciální poklesy.

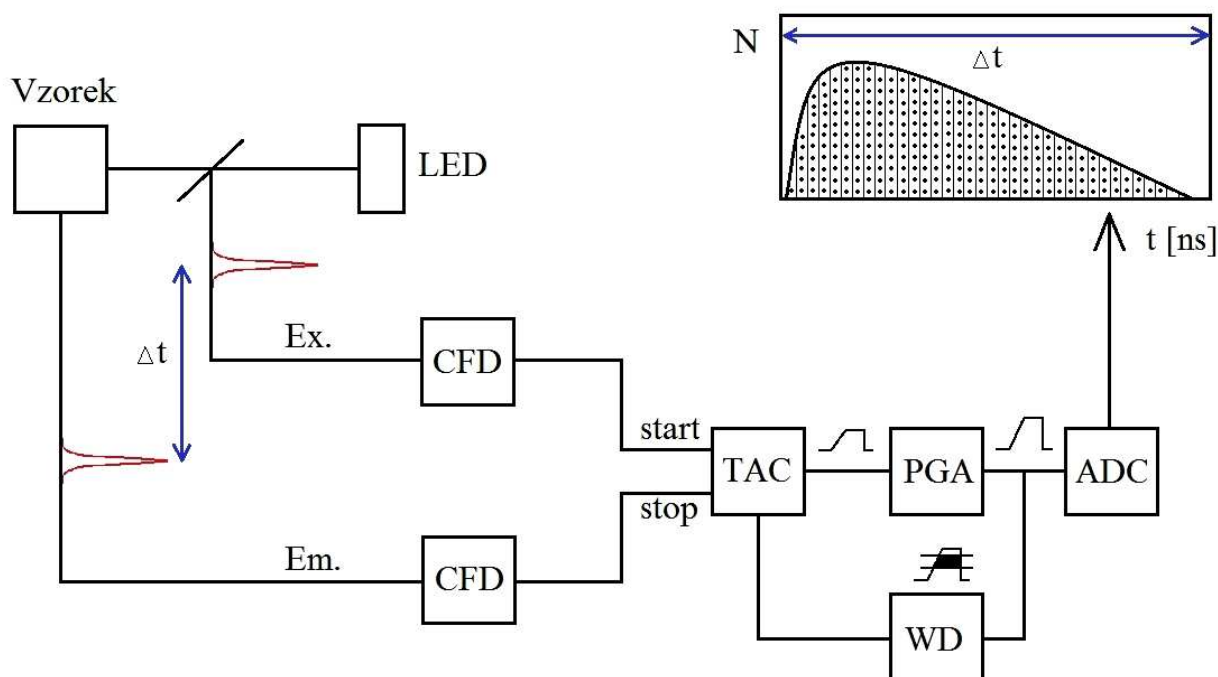
Fluorescenční doba života může být určena ze sklonu závislosti $\log I(t)$ na t , ale častěji se zjišťuje prokládáním dat předpokládanými modely poklesu [7].

2.6.2 Princip měření metodou TCSPC

TCSPC neboli time-correlated single photon counting je metoda časově korelovaného čítání fotonů. Mnoho měření pomocí pulzní metody je uskutečněno použitím právě této metody. Její základní princip je založen na faktu, že pravděpodobnost detekce jednoho fotonu v čase t po excitačním pulzu je úměrná intenzitě fluorescence v tom čase. Čím větší počet událostí bude zaznamenán, tím větší bude přesnost poklesové křivky [8].

Nyní se TCSPC používá v analytické chemii, ke snímání buněk, k detekci jedné molekuly a ve fluorescenční korelační spektroskopii. V těchto aplikacích jsou doby života použity pro rozlišení různých fluoroforů v různých prostředích. Pro rychlý odhad průměrné doby života je potřeba nejmenší možné množství pozorovaných fotonů. V těchto případech jsou pro analýzu používány metody s největší pravděpodobností.

Princip je vysvětlen následovně:



Obrázek 8: Princip měření metodou TCSPC

K excitaci vzorku dochází pulzem záření, což má za následek pokles ukázaný na obrázku 8 nahoře vpravo. Tento tvar vlny bude pozorován, jestliže mnoho fluoroforů bude excitováno a mnoho fotonů bude pozorováno. Měření TCSPC je realizováno tak, že na jeden excitační pulz je detekován méně než jeden foton. Typicky bývá detekován 1 foton na 100 excitačních pulzů. Měření je čas mezi excitačním pulzem a zaznamenáním fotonu a tento je pak zaznamenán v histogramu. Osa x v histogramu představuje časové intervaly (kanály) a osa y

počet fotonů detekovaných v určitém kanálu. Jestliže je splněna podmínka méně než jednoho fotonu detekovaného na 100 excitačních pulzů, histogram vykazuje tvar vlny.

Pro měření zpoždění času mezi excitací a emisí se používá specializovaná elektronika (Obrázek 8). Experiment začíná excitačním pulzem, který excituje fluorofory ve vzorku a zároveň posílá signál elektronice. Tento signál jde do prvního kanálu, prochází "diskriminátorem konstantní funkce" (constant function discriminator – CFD), který přesně změří čas příchodu pulzu. Tento signál je veden dále přes převodník času na amplitudu (time-to-amplitude convertor – TAC), na kterém se začne generovat schodek napětí, což je napětí lineárně rostoucí s časem na nanosekundové škále. Druhý kanál zaznamenává signál z detekce fotonu vyzářeného ze vzorku. Čas dopadu fotonu je opět přesně určen druhým CFD, který tímto posílá stop-signal do TAC, kde zatím rostlo napětí. TAC se tímto přestane nabíjet a obsahuje jisté napětí, které je úměrné časovému zpoždění mezi excitačním a emisním signálem. Napětí je podle potřeby zesíleno na "programovatelném výsledném zesilovači" (programmable gain amplifier – PGA) a převedeno na numerickou hodnotu pomocí analogově digitálního převodníku (analog-to-digital converter – ADC). Pro minimalizování chybného čtení je signál omezen daným rozsahem napětí. Jestliže signál do tohoto rozpětí nespadá, je tato událost potlačena pomocí diskriminátoru (window discriminator – WD). Napětí převedené do digitální podoby je uloženo jako jedna událost s naměřeným časovým zpožděním. Histogram je získán opakováním tohoto procesu mnohokrát po sobě [7, 8].

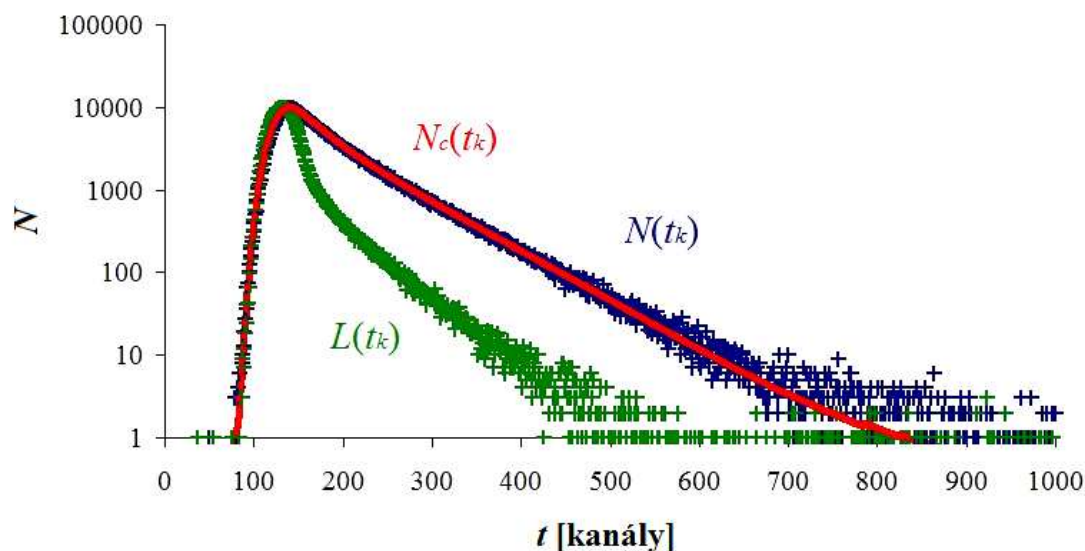
V současnosti se prakticky všechna TCSPC měření uskutečňují v reverzním módu. Proces je stejný, jak bylo popsáno výše, jen s tím rozdílem, že pulz emise je používán pro iniciaci nabíjení TAC a následný excitační pulz pro zastavení nabíjení TAC. Excitační pulzy tedy musí být generovány v pravidelných intervalech. Tento proces je používán díky vysoké rychlosti opakování pulzů moderních zdrojů pulzního záření. Protože TAC musí být resetován a nastaven na nulovou hodnotu před každým startovacím pulzem, je při měření v reverzním módu elektronika méně namáhána. Jak už bylo řečeno, emisní signál se objeví asi po 100 excitačních pulzech, startovacích pulzů je tedy výrazně méně a pouze malá část excitačních pulzů vyúsťuje ve stop pulzy [7, 8].

V TCSPS může být detekován vždy jen první foton následující po excitačním pulzu, aby nedošlo ke zkreslení histogramu. Toto omezení je způsobeno jistými limity elektronického aparátu. Více fotonů naráz může být měřeno pouze pro doby života blížíící se mikrosekundám a delším. Po detekci fotonu vždy následuje mrtvý čas neboli čas, kdy systém není schopen detekce. Tyto časy jsou o mnoho delší, než je čas poklesu intenzity. Jejich funkcí je zabránit detekci jiného fotonu vyzářeného díky stejnému excitačnímu pulzu. Mrtvé časy jsou v rozpětí 10 μ s ve starších systémech a asi 120 ns v moderní TCSPC elektronice.

Je důležité, aby počet emisních pulzů byl o mnoho menší než počet excitačních pulzů, takže pravděpodobnost detekce dvou emisních pulzů na jeden excitační pulz je zanedbatelná. V opačném případě bude v TAC zaznamenán pouze první (rychlejší) fluorescenční pulz a naměřený histogram bude zkreslený. Pokles bude kratší, než ve skutečnosti je. Tento jev je nazýván "pile-up efekt". Aby histogram časů detekce reprezentoval opravdový pokles intenzity, musely by být zaznamenány všechny fotony [8].

2.6.3 Příklad TCSPC dat

Data poklesu intenzity se typicky skládají ze tří křivek. Jsou to naměřená data $N(t_k)$, funkce přístrojové odezvy $L(t_k)$ a proložená funkce poklesu $N_c(t_k)$. Na ose x je vynesena čas v kanálech, z nichž je každý charakterizován známou hodnotou času (t_k) a šířkou (Δt).



Obrázek 9: TCSPC data

Funkce přístrojové odezvy (instrument response function – IRF) je odezva zařízení na nulovou dobu života vzorku. Na obrázku 9 je znázorněna zeleně. Tato křivka je typicky zjištěna pomocí zředěného roztoku, který rozptyluje záření. Takovým roztokem může být koloidní oxid křemičitý (Ludox). Tento pokles potom reprezentuje profil nejkratšího času, který může být daným uspořádáním zařízení změřen. Šířka IRF je ovlivněna jak charakteristikou detektoru, tak časovou elektronikou. Charakteristickým parametrem IRF je její šířka v půlce maxima neboli FWHM (the full width of the half maximum intensity).

Naměřený pokles intenzity $N(t_k)$ je v histogramu na obrázku 9 znázorněn modře. Výška bodů na ose y reprezentuje počet fotonů, které byly detekovány v časovém rozmezí od t_k do $t_k + \Delta t$, kde Δt je šířka časového kanálu. Největší počet detekovaných fotonů je v kanálu maxima intenzitního poklesu. Tento počet může být například 3 000 nebo 10 000 i více fotonů. Počet detekovaných fotonů v maximu poklesu bývá zadán pro každé měření. V logaritmickém měřítku tvoří jedno-exponenciální pokles rovnou čáru.

Poslední křivkou je proložená funkce poklesu $N_c(t_k)$, obvykle označovaná jako fitovaná funkce. Na obrázku je znázorněna červenou čarou. Tato křivka reprezentuje konvoluci naměřeného poklesu intenzity s IRF. Fitovaná funkce je předpokládaným časovým profilem pro daný pokles intenzity. Pro jedno-exponenciální pokles je dobou života taková hodnota τ , která poskytuje nejlepší shodu mezi naměřenými daty $N(t_k)$ a fitovanou funkcí $N_c(t_k)$. Při multi-exponenciálním poklesu vyúsťuje analýza v hodnoty α_i a τ_i , které nejvíce souhlasí s naměřenými daty. α_i je pre-exponenciální faktor a souvisí se zastoupením jednotlivých časů.

Použitím logaritmického měřítko zde dochází ke zveličení intenzity křivek v oblasti nízkých intenzit. Vzhledem k celkovému počtu detekovaných fotonů je počet fotonů v této oblasti zanedbatelný [7].

2.6.4 Konvoluční integrál

Je důležité si uvědomit, že čas roven nule není v TCSPC experimentu definován. Není zde žádný nulový čas, protože neexistuje jednoduchá δ -funkce iniciující pokles (nekonečně krátký excitační pulz). Získaná IRF nikdy není definována v čase $t = 0$ s. Excitační pulz je na časové ose umístěn blízko nuly jen pro větší přehlednost.

Pokles podle zákona o poklesu intenzity (viz dále) je to, co by bylo pozorováno s δ -funkční excitací a s δ -funkcí pro odpověď přístroje. Bohužel většina IRF jsou široké 0,5 až 2 ns. Excitační pulz si lze potom představit jako sérii δ -funkcí s odlišnými amplitudami. Každá z těchto funkcí pak iniciuje jeden pokles s intenzitou úměrnou výšce δ -funkce. Naměřená funkce $N(t_k)$ je potom sumou všech těchto exponenciálních poklesů, začínajících s odlišnou amplitudou a v odlišné časy. Poklesy intenzity jsou ve vzorku tvořeny tak dlouho, dokud intenzita IRF neklesne na nulu. Toto je důvod, proč pokles intenzity přebírá tvar po IRF [7].

2.6.5 Světelné zdroje pro TCSPC

Nejdůležitějšími světelnými zdroji pro TCSPC jsou pulzní laserové diody (pulsed-laser diodes - LDs) a pulzní záření-emitující diody (light-emitting diodes - LEDs) jako jednoduché zdroje v pevném stavu. Tato zařízení mají nízkou spotřebu energie a jsou jednoduché pro obsluhu. Navíc nevyžadují téměř žádnou údržbu. Pulzní LD a LED jsou schopné dosáhnout frekvence opakování pulzu až 40 MHz. Pro obě varianty je k dispozici široká škála vlnových délek [7].

2.6.6 Metoda nejmenších čtverců

Časově rozlišená data jsou komplexní a obecně nemohou být analyzována použitím grafických metod. Pro analýzu TCSPC byly od sedmdesátých let navrženy mnohé metody. Zahrnovaly metodu nejmenších čtverců (nonlinear least squares - NLLS), metodu momentů, Laplaceho transformaci, metodu maximální entropie, atd. Během devadesátých let došlo k rozšíření používání metody NLLS. Tento důraz byl způsoben biochemickými a biofyzikálními aplikacemi TCSPC.

Cílem metody NLLS je otestovat, do jaké míry je daný matematický model poklesu sladěn s naměřenými daty, a určit parametry tohoto modelu, u kterých je největší pravděpodobnost, že budou správné. Nejmenší čtverce poskytují nejlepší odhad parametrů za předpokladu, že data splňují jisté hypotézy. Těmi jsou:

1. Neurčitost celého experimentu leží v závislé ose y .
2. Neurčitosti v závislé proměnné mají Gaussovské rozdělení, jehož střed se nachází na správné hodnotě.
3. Není zde žádná systematická chyba, ani v ose y ani v ose x .
4. Předpokládaná fitovaná funkce je správným matematickým popisem systému. Nesprávné modely vyúsťují v nesprávné parametry.
5. Jednotlivé body dat jsou nezávislá pozorování.
6. Je naměřeno dostatečné množství dat.

Potřebné korelace fitované funkce s daty je dosaženo minimalizováním "goodness-to-fit" parametru, který je vyjádřen následovně:

$$\chi^2 = \sum_{k=1}^n \frac{1}{\sigma_k^2} [N(t_k) - N_c(t_k)]^2 = \sum_{k=1}^n \frac{[N(t_k) - N_c(t_k)]^2}{N(t_k)} \quad (13)$$

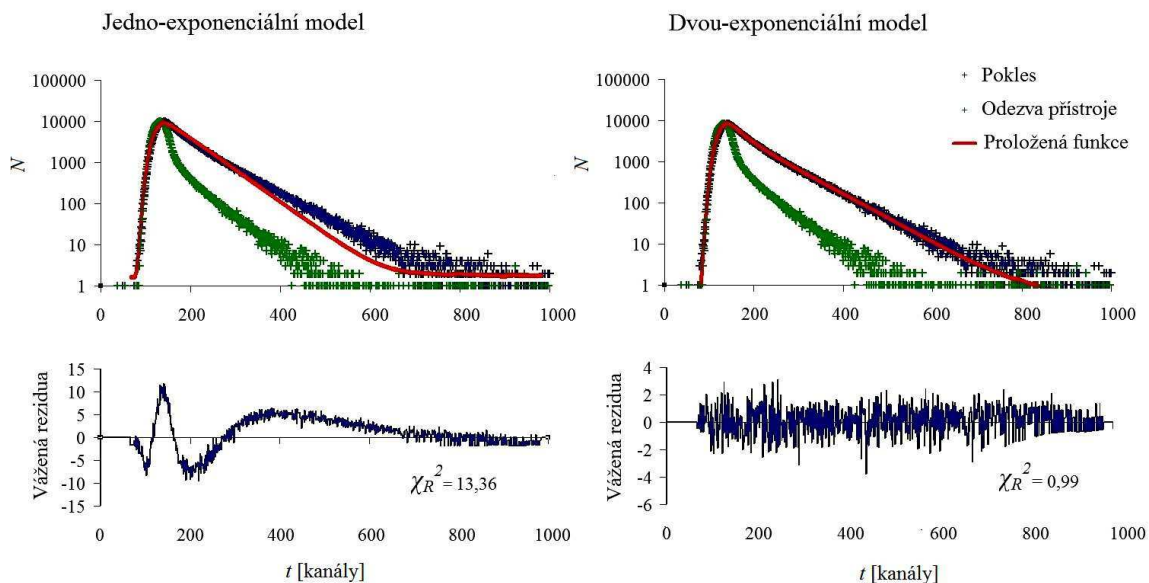
V tomto výrazu se suma rozkládá přes počet kanálů (n) nebo bodů dat použitých pro určitou analýzu a σ_k je standardní odchylka každého bodu dat. Není příliš pohodlné interpretovat hodnoty χ^2 , protože závisí na počtu bodů dat. Pro data s více body bude hodnota χ^2 větší. Z tohoto důvodu se používá redukovaná hodnota χ_R^2 , která je vyjádřena vztahem:

$$\chi_R^2 = \frac{\chi^2}{n-p} = \frac{\chi^2}{\nu} \quad (14)$$

kde (n) je počet bodů dat, (p) je počet volitelných parametrů a ($\nu = n - p$) je počet stupňů volnosti. V TCSPC je počet bodů dat typicky větší než počet parametrů, takže ($n - p$) je zhruba rovno (n). Jestliže jediným příspěvkem pro hodnotu χ_R^2 jsou náhodné chyby, potom bude tato hodnota přibližně jednotková [7].

2.6.7 Analýza multi-exponenciálních poklesů

Vzorek, který obsahuje více typů fluoroforů, emituje ve více dobách života. Řešení multi-exponenciálních poklesů může být popsáno následovně:



Obrázek 10: Analýza TCSPC dat

Pokles na obrázku 10 je získán z měření emise dvou fluoroforů, každý s jednou dobou života. Analýza začíná volením počtu dob života. To, že vzorek neemituje v jedné době života je zřejmé ze zakřivení závislosti $I(t)$ na čase. Jedno-exponenciální pokles (vlevo na obrázku) není korektní. Jedno-exponenciální křivka (vypočítaný konvoluční integrál) nevykazuje dostatečnou shodu s naměřenými daty.

Spodní panel ukazuje odchylky (rezidua - D_k) mezi naměřenými daty a vypočteným poklesem:

$$D_k = \frac{I(t_k) - I_c(t_k)}{\sqrt{I(t_k)}} \quad (15)$$

Závislost vážených odchylek je používána pro jednodušší zhodnocení rozdílů mezi $I(t_k)$ a $I_c(t_k)$. Rezidua jsou vážena vzhledem ke standardní odchylce každého bodu. Pro dobré proložení jsou tyto hodnoty symetricky a zároveň náhodně rozmístěné okolo nuly a jejich průměrná hodnota je tedy přibližně nulová. Zároveň parametr χ^2 by měl být přibližně jednotkový. Toto je splněno v případě použití dvou-exponenciálního modelu poklesu [7].

U jedno-exponenciálních poklesů může být doba života většinou určena s potřebnou přesností i pro malý počet pozorovaných fotonů. V případě multi-exponenciálních poklesů je ale potřeba naměřit co možná nejvíce fotonů, aby bylo dosaženo vysokého rozlišení hodnot parametrů.

Rozlišení dvou časů, které od sebe nejsou příliš vzdáleny, je složitější. V těchto případech jedno-exponenciální pokles vykazuje jen nepatrné rozdíly od naměřených dat. Reziduální analýza by však měla ukázat systematickou odchylku a tedy, že proložení neodpovídá. Odchytky by tím pádem neměly být rozmístěny náhodně okolo nulové hodnoty.

Parametry poklesu jsou v tomto případě určeny méně přesně než u časů vzájemně vzdálených [7].

2.6.8 Zákon poklesu intenzity

U více-exponenciálních poklesů předpokládáme pokles intenzity jako sumu jednotlivých jedno-exponenciálních poklesů. To je popsáno následující rovnicí:

$$I(t) = \sum_{i=1}^n \alpha_i \exp(-t / \tau_i) \quad (16)$$

kde τ_i je doba života, α_i je pre-exponenciální faktor, který reprezentuje amplitudu komponentů v čase $t = 0$ s, n je počet dob života. Toto je nejčastěji používaný model, který je aplikován hlavně pro měření směsi fluoroforů, z nichž každý emituje v jedné ze dvou dob života. Častý je také případ, kdy vzorek obsahuje jen jeden fluorofor a ten vykazuje dvě nebo i více dob života, což je způsobeno rozmístěním fluoroforu do více prostředí. Každému prostředí, ze kterého sonda emituje, je pak možno přiřadit jednu dobu života.

Nastavitelným parametrem v multi-exponenciální analýze je počet dob života. Parametry α_i a τ_i jsou závislé na systému, který je studován. Tyto parametry jsou úměrné ploše pod křivkou poklesu pro každou dobu života. Význam pre-exponenciálního faktoru je různý pro směs fluoroforů a pro jeden fluorofor vykazující komplexní pokles. Ve většině poklesových analýz není měřena totální intenzita, suma α_i je normalizována na jedničku [7].

2.6.9 Globální analýza

V globální analýze jsou příbuzná data z určité skupiny dat analyzována současně. To zaručuje větší přesnost určení parametrů [8]. Metoda spočívá v kombinování dvou a více experimentů, ve kterých jsou některé parametry stejné a některé odlišné. Příkladem globálního experimentu je měření poklesů intenzity při několika vlnových délkách na rozdíl od měření jednoho poklesu při jedné vlnové délce, kde emitují všechny fluorofory. Poklesy

intenzity při jednotlivých vlnových délkách jsou analyzovány současně, výsledkem je pak zjištění hodnot τ_i a $\alpha_i(\lambda)$. U dob života se předpokládá, že nezávisí na vlnové délce [7].

Tento princip analýzy je využit při měření časově rozlišených emisních spekter (TRES).

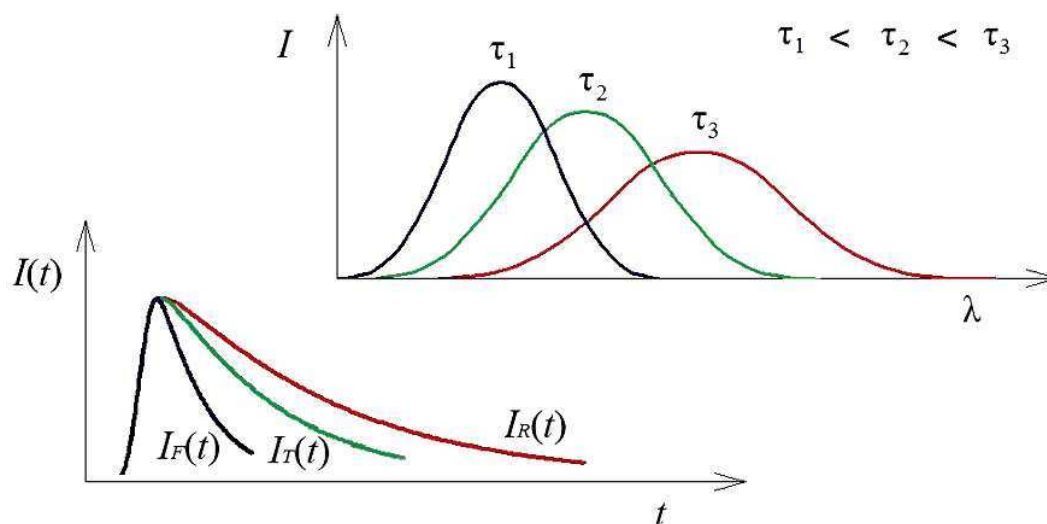
2.6.10 Časově rozlišená emisní spektra

Pomocí časově rozlišených emisních spekter (time-resolved emission spectra - TRES) jsou často studovány procesy excitovaného stavu. Typickým příkladem pro využití TRES je relaxace rozpouštědla okolo excitovaného fluoroforu. Relaxace způsobuje ztrátu energie fluoroforu a tím postupný červený posun emisního spektra. Tímto je získána informace o polaritě mikroprostředí v okolí fluoroforu [8].

TRES jsou emisní spektra, která by byla pozorována v určitém časovém okamžiku následně po excitaci pulzem záření.

Výsledkem měření TRES je soubor časově závislých poklesů intenzity, které jsou měřeny při různých vlnových délkách napříč emisním spektrem. Při různých vlnových délkách se doby života excitovaného stavu projevují různě. Poklesy intenzity jsou závislé na vlnové délce, což je způsobeno časem přechodu ze stavu Franck-Condonova do stavu relaxovaného nebo do některého stavu mezi těmito dvěma limitními, ze kterého potom fluorofor emituje. Podle doby, za kterou fluorofor emituje, ztratí jistou část své energie. Fluorofory emitující po delší době obecně ztrácejí více energie do okolního prostředí a poskytují tak záření o delších vlnových délkách [7].

Situaci lze ilustrovat následovně:



Obrázek 11: Poklesy intenzity měřené při různých vlnových délkách (vlevo) a emisní spektra jednotlivých dob života fluoroforu

$I_T(t)$ reprezentuje pokles celkové emise nebo pokles, který by byl pozorován v případě, kdy by nedocházelo k procesům excitovaného stavu. $I_F(t)$ a $I_R(t)$ jsou poklesy intenzity pozorované na modré a červené straně emisního spektra. Horní schéma na obrázku 11 ukazuje emisní spektra v časech přiřazené k jednotlivým poklesům.

Podle obrázku je zřetelné, že pro fluorofory emitující dříve bude pokles kratší a jejich emise bude na modré straně emisního spektra. Tento pokles je více rapidní, protože v sobě zahrnuje jak proces emise, tak proces relaxace excitovaných fluoroforů. Naopak fluorofory emitující po delším čase tíhnou k emisi v delších vlnových délkách, protože již ztratily část své energie relaxací [7].

TRES mohou být získána metodou TCSPC, kdy dochází k zaznamenávání fotonů přicházejících v malých časových intervalech. Emisní spektrum je pak zaznamenáno pomocí monochromátoru. Je to jednoduchý postup, ale ne příliš účinný. Přímé zaznamenávání TRES je jednoduché pro představu, ale tato metoda se nepoužívá. TRES jsou obvykle získávána nepřímo. Proces začíná měřením časově rozlišených poklesů při několika vlnových délkách napříč emisním spektrem. Z dat shromážděných při určité vlnové délce a analyzovaných ve smyslu multi-exponenciálního poklesu jsou získány fitovací parametry, které jsou potom použity pro vypočítání intenzit fluorescence v různých časech. Tento proces je opakován pro každou pozorovanou vlnovou délku. Následně je jednoduché rekonstruovat spektra v různých časech [7].

3 REŠERŠE

Tato bakalářská práce se zabývá studiem vzniku hydrofóbních domén tenzidu CTAB asociovaných na řetězci kyseliny hyaluronové v případě bez přítomnosti i s přítomností NaCl. Pro studium byly použity metody ustálené a časově rozlišené fluorescenční spektroskopie. Použitými fluorescenčními sondami byl prodan a perylen.

Kerry K. Karukstis a spol. v roce 2004 zkoumali pomocí *prodanu* mikrostruktury kationaktivních a anionaktivních tenzidů ve vodných roztocích. Zvláště demonstrovali, že polaritně citlivý prodan může být použit k vymezení mikrostruktur tenzidu ternárního systému cetyltrimethylamonium bromidu, octyl-síran sodný a vody. Pro vyhodnocení fluorescenčních dat zde bylo použito dekonvoluce celkového emisního spektra *prodanu* na Gaussovské peaky, podobně jako v mnoha dalších studiích [26, 14]. Peak s maximem v 493 – 509 byl přiřazen *prodanu* situovanému na povrchu micel, kde byl držen slabou dipólovou interakcí s hlavami tenzidu [27]. Tito autoři v roce 2005 použili *prodan* pro další studii, kde charakterizovali novou skupinu molekul surfaktantů (N-alkyl-N-methylpyrrolidinium bromidy) použitím fluorescenční spektroskopie a světlo-rozptylujících technik. Výsledky ukázaly, že formování agregátů s C₁₆ surfaktanty se objevuje při výrazně nižších koncentracích (0,10 mmol·l⁻¹). Při této koncentraci se celkové emisní spektrum skládá ze tří Gaussovských peaků s maximy v 517, 459 a 416 nm. V nepřítomnosti agregátů tenzidu dominuje emise fluorescence z volného *prodanu* v 520 nm [14].

Fernando, M. Moyano a spol. v roce 2006 studovali chování *prodanu* v homogenním prostředí a v rozsáhlých unilamelárních útvarech fosfolipidu (1,2-di-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphatidylcholin) pomocí absorpční, emisní, depolarizační a časově-rozlišené spektroskopie. Výsledky ukazují, že v homogeních médiích je absorpční pás *prodanu* citlivý na polaritu a schopnost prostředí vytvářet vodíkové můstky a že *prodan* v excitovaném stavu je na tyto parametry ještě více citlivý. Z absorpčních a emisních pásů je dokázáno, že *prodan* vytváří ve vodě agregáty, což ale neplatí v případě, když je ve fosfolipidové dvojvrstvě. Monomer má dvě doby života, 2,27 a 0,65 ns, agregát má dobu života 14,6 ns. Agregát vzniká pouze při koncentraci *prodanu* vyšší než 3·10⁻⁵ mol·l⁻¹ [28].

Ustálená a časově rozlišená měření fluorescence *prodanu* byla provedena autory **Radken Šachlem a spol.** v roce 2008. V této práci byl zkoumán systém obsahující agregáty vytvořené amfifilním diblokovým kopolymerem poly(ϵ -kaprolakton)-*blok*-poly(ethylenoxid) (PCL-PEO) ve směsích vody a tetrahydrofuranu. Bylo zjištěno, že jak ustálená, tak časově rozlišená emisní spektra *prodanu* byla složena ze dvou dílčích spekter korespondujících s emisí *prodanu* situovaném v poměrně rigidní (viskózní) a hydrofóbní doméně agregátů blízko PCL/PEO povrchu a ve více polárním a méně viskózním prostředí volného roztoku. Tato studie mimo jiné ukazuje, že analýza časově rozlišené emise sondy rozmístěné ve dvou médiích je možná, ale poměrně komplexní a znatelně méně přesná [29].

K. A. Kozyra a spol. vydali v roce 2005 práci, kde jsou zjišťovány spektrální vlastnosti *prodanu* a laurdanu a také zhášení excitovaných stavů oktadecyl rhodaminem B. Prostřednictvím metody TCSPC byla provedena měření dob života [30].

Lukasz Cwiklik a spol. v roce 2011 zkoumali vliv prostředí fosfolipidových membrán na emisní vlastnosti *prodanu* pomocí porovnávání simulovaných spekter s naměřenými absorpční a emisními spektry v homogenních rozpouštědlech a v systémech fosfolipidových

útvary. Zvláště zde byla řešena otázka geometrie excitovaného stavu prodanu v membráně [31].

Tapan K. Khan a spol. v roce 2008 použili techniky měření nanosekundové fluorescence pro charakterizování struktury PLFE liposomů (polární lipidová frakce E) z termoacidofilní archebakterie *Sulfolobus acidocaldarius* s využitím *perylenu* jako často používané membránové fluorescenční sondy [32].

Torsten Wallin a Per Linse v roce 1997 studovali *komplexaci nabitých micel s opačně nabitým polyelektrolytem* použitím jednoduchých modelových systémů. Strukturální data komplexu micela-polyelektrolyt a termodynamických veličin komplexace jako funkce micelárního agregačního čísla byly získány použitím techniky Monte Carlovy simulace a termodynamické integrace. Byly zjištěny poměry CAC/CMC pro různé tenzidy, kde CAC je nejnižší koncentrace tenzidu, při které se tenzid shlukuje v přítomnosti polyelektrolytu. Výsledky ukázaly, že poměr CAC/CMC klesá se zvětšující se délkou řetězce tenzidu, závisí na flexibilitě polyelektrolytu, na jeho lineární hustotě náboje a na délce řetězce tenzidu [33].

Kazuhiro Fukada a spol. v roce 1999 vydali práci, která se soustředila na efekt přidání decyltrimethylamonium bromnudu ($C_{10}TAB$) na reologické vlastnosti roztoku *hyaluronanu sodného*. Pomocí studie fázového chování, viskozity a dynamického modulu pružnosti ve smyku byly získány informace o konformačních změnách a interakcích mezi polyiony. Když koncentrace $C_{10}TAB$ byla mezi 0,03 a 0,35 mol·l⁻¹ a koncentrace polymeru byla nad 0,05 g·l⁻¹, systém se rozdělil na dvě fáze [34].

Chi-Ching Lin a spol. v roce 2009 se zabývali *gelací* systémů kationaktivních tenzidů s polymery. Jedním z výstupů práce je poznatek, že polymer s náboji a hydrofóbní modifikací může díky přítomnosti opačně nabitých kationaktivních útvarů vytvořit silné gely [35].

Katalin Pojžák a spol. v roce 2011 ve své práci poukázali na to, že nerovnovážený charakter systémů *polyelektrolyt/tenzid* hraje zásadní roli v interpretaci efektu *přidané soli*. Experimentální zkoumání směsí polystyrensulfonátu sodného a CTAB odhaluje dva odlišné efekty přidaného NaCl na asociaci polyelektrolyt/tenzid. Hlavním důsledkem přidání elektrolytu ve středních koncentracích je redukce rozsahu, ve kterém jsou směsi v koloidně disperzním stavu stabilizovaném nábojem [36].

Vliv NaCl na systém *polyelektrolyt/tenzid* studovala také práce **T. Halasové a spol.** z roku 2011. Byly zde studovány interance hyaluronanu o dvou molekulových hmotnostech s tenzidy odlišných typů v roztocích NaCl. Tyto interakce byly studovány hlavně technikou fluorescenčních sond [37].

Metoda *časově rozlišených emisních spekter (TRES)* byla použita ve studii z roku 2009, kterou zpracoval **Aleksander A. Kubicki** a ve které byly studovány spektroskopické vlastnosti 4-dimethylamino-4'-bromo-stilbenu a 4-dimethylamino-4'-chloro-stilbenu v různých rozpouštědlech [38]. V jiné práci z roku 1998 (**P. Guptasarma**) byla TRES použita při studiu chování jedno-triptofanového měďnatého proteinu azurinu, v hydrochloridu guanidinu [39]. V práci autorů **Dmitri Topygin a spol.** jsou TRES použita pro výpočet mikroskopické dielektrické odezvy prostředí reziduí tryptofanu v proteinech E21W a F3W [40].

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

Prvním cílem měření bylo získat spektrální charakteristiky fluorescenční sondy prodanu, který byl pro měření vybrán na základě rešerše jako vhodná sonda. Charakteristiky prodanu byly zkoumány v prostředích s různou polaritou. Dále byl prodan použit pro zkoumání interakcí mezi CTAB a kyselinou hyaluronovou (HA). Tento systém obsahoval konstantní koncentraci HA a proměnnou koncentraci tenzidu. Předpokladem bylo zjištění agregace CTAB (vzniku minimicel) na řetězci HA před dosažením CMC. Těsně před dosažením CMC by mělo dojít ke vzniku gelu obsahujícím minimicely a tím k vymizení těchto agregátů z roztoku. Při existenci agregátů CTAB asociovaných s HA v roztoku by měl prodan vykazovat tři doby života, v opačném případě a při vzniku gelu by měl vykazovat pouze dvě doby života, které jsou charakteristické pro prodan rozpuštěný ve vodě. Při koncentraci CTAB, kdy by mělo docházet k agregaci, by získané časově rozlišené emisní spektrum mělo potvrdit existenci tří dob života prodanu a popřípadě zjistit i čtvrtou dobu života prodanu umístěného v palisádové vrstvě (oblast nábojů) agregátů CTAB. Pro zjištění agregátů CTAB na HA bylo měření provedeno i s jinou fluorescenční sondou, kterou byl perylen. Ten měl na rozdíl od prodanu vykazovat fluorescenci převážně jen z hydrofóbních domén.

Popsaný systém CTAB – HA byl zkoumán také v přítomnosti NaCl, který simuloval prostředí fyziologického roztoku ($0,15 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$). Předpokladem bylo získání obdobných výsledků jako u vodného prostředí.

4.1 Přístroje a vybavení

4.1.1 Systém Fluorolog

Tento přístroj je vyroben firmou Horiba Scientific. Přístroj byl použit k měření steady-state fluorescence, která byla detekována v pravém úhlu. Excitace byla zajištěna xenonovou výbojkou (450 W). Fluorolog obsahuje dva dvojité monochromátory.

4.1.2 Systém Fluorocube

Výrobcem je opět firma Horiba Scientific. Tento přístroj používá metodu TCSPC, obsahuje sadu excitačních NanoLED s pracovní frekvencí 1 MHz. TBX pikosekundový detektor umožňuje rozlišení měření 20 ps/kanál. Přístroj obsahuje také emisní monochromátor. Rozsah měřených dob života je $10^{-10} - 10^{-6}$ s.

4.2 Použité programy

FluorEssence - software pro získání steady-state dat (HORIBA Jobin Yvon Inc.)

OriginPro 8 - software pro vyhodnocení steady-state dat (HORIBA Jobin Yvon Inc.)

DataStation v2.4 - software pro získání TCSPC dat (HORIBA Jobin Yvon Inc.)

DAS6 - software pro analýzu fluorescenčních poklesů (HORIBA Jobin Yvon Inc.)

4.3 Chemikálie

Prodan [6-propionyl-2-(dimethylamino)naftalen]
Sigma-Aldrich

CAS: 70504-01-7
Č. šarže: 101 128 093

Perylen	Sigma-Aldrich (Fluka Chemie GmbH)	CAS: 77392-71-3 Č. šarže: 53904259
n-heptan	Lach-Ner, s.r.o.	CAS: 142-82-5 Č. šarže: 30275
Aceton	PENTA - Ing. Petr Švec	CAS: 67-64-1 Č. šarže: 1212021209
Milli Q voda	Milipore academic	
CTAB	(cetyltrimethylamonium bromid), M = 364,45 Sigma-Aldrich	CAS: 57-09-0 Č. šarže: 059K0041
Hyaluronan sodný, nativní (HySilk powder), M = 300 kDa	CPN spol. s.r.o.	CAS: 9004-61-9 Č. šarže: 160708-E1
NaCl	(chlorid sodný) Lach-Ner, s.r.o.	CAS: 4647-14-5 Č. šarže: 06278

4.4 Příprava vzorků

4.4.1 Charakteristiky roztoku v polaritní škále rozpouštědel

Polaritní škála prostředí o deseti různých polaritách byla vytvořena ze směsi tří primárních rozpouštědel – vody, acetonu a n-heptanu. Objemové zlomky (f_A , f_B , f_C) potřebné pro vytvoření škály byly navrženy a poté byla spočítána polarita příslušných směsí na základě indexu lomu (n) a dielektrické konstanty (ϵ) primárních rozpouštědel (Tabulka 1).

Tabulka 1: Charakteristiky primárních rozpouštědel potřebné pro výpočet polarit směsí [42, 43, 44]

	Index lomu - n (20°C)	Dielektrická konstanta - ϵ (20°C)
Voda (A)	1,333	80,1
Aceton (B)	1,3586	20,96
n-heptan (C)	1,3876	1,924

Rovnice pro výpočet polarit směsí byly převzaty z práce, jejíž autory jsou Satpati Kumar a spol [41].

Index lomu a dielektrická konstanta pro směsi rozpouštědel byly spočítány podle rovnic:

$$\epsilon_{sm} = f_A \epsilon_A + f_B \epsilon_B, \quad (17)$$

$$n_{sm}^2 = f_A n_A^2 + f_B n_B^2, \quad (18)$$

kde ϵ_{sm} a n_{sm} jsou charakteristiky směsí, ϵ_A , ϵ_B , n_A , n_B jsou charakteristiky primárních rozpouštědel (ve škále byla použita samotná primární rozpouštědla nebo jejich binární směsi)

Lippert-Matagův polaritní parametr (Δf) rozpouštědel byl spočítán podle:

$$\Delta f = \frac{\varepsilon - 1}{2\varepsilon + 1} - \frac{n^2 - 1}{2n^2 + 1}, \quad (19)$$

kde ε a n jsou charakteristiky směsí. Výsledky jsou obsaženy v tabulce 2.

Tabulka 2: Objemové zlomky, směsný index lomu, směsná dielektrická konstanta a Lippert-Matagův polaritní parametr pro jednotlivé vzorky

	Vzorek	f_A	f_B	f_C	n_{SM}	ε_{SM}	Δf
Voda (A)	1	1	0		1,3330	80,100	0,320
	2	0,5	0,5		1,3459	50,530	0,310
	3	0,25	0,75		1,3522	35,745	0,301
Aceton (B)	4	0	1	0	1,3586	20,960	0,285
	5		0,5	0,5	1,3732	11,442	0,252
	6		0,2	0,8	1,3818	5,731	0,191
	7		0,1	0,9	1,3847	3,828	0,137
	8		0,05	0,95	1,3862	2,876	0,088
	9		0,02	0,98	1,3870	2,305	0,042
n-heptan (C)	10		0	1	1,3876	1,924	0,000

Míchání vzorků:

Do deseti vialek bylo napipetováno 25 μl zásobního roztoku prodanu v acetonu o koncentraci $2 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$. Celkový objem roztoků ve vialkách byl 5 ml, tedy koncentrace prodanu ve výsledném vzorku byla $10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$. Napipetovaný aceton byl odpařen za sníženého tlaku při laboratorní teplotě a následně byly pipetovány frakce zmíněných tří rozpouštědel, které vycházely z navržených objemových zlomků (Tabulka 2). Vzorky byly následně míchány na míchačce.

4.4.2 Měření kritické agregační koncentrace CTAB pomocí prodanu

Bylo připraveno deset vzorků o stejné koncentraci prodanu ($5 \cdot 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) a kyseliny hyaluronové ($0,01 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$) a s různou koncentrací CTAB ($0,01 - 0,2 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$). Vzorky byly připraveny pomocí zásobních roztoků:

Zásobní roztok prodanu (v acetonu): $2 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$

- Roztok byl skladován při teplotě $4 \text{ }^\circ\text{C}$

Zásobní roztok kyseliny hyaluronové (HA): $1 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$

- Připraven rozpuštěním $0,05 \text{ g}$ HA (analytické váhy) v 50 ml Milli Q vody, nádoba byla uzavřena, roztok byl skladován při teplotě $4 \text{ }^\circ\text{C}$.

Zásobní roztok CTAB: $0,002 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$

- Připraven rozpuštěním $0,0364 \text{ g}$ CTAB (analytické váhy) v 50 ml Milli Q vody, nádoba byla uzavřena, roztok byl skladován při laboratorní teplotě.

Koncentrační rozsah CTAB byl rozdělen do deseti koncentrací (Tabulka 3). Příprava vzorků ze zásobních roztoků probíhala následovně:

- Přidání $12,5 \mu\text{l}$ zásobního roztoku prodanu do každého vzorku a následné odpaření rozpouštědla (acetonu) za sníženého tlaku při laboratorní teplotě

- Přidání 50 μl zásobního roztoku HA do každého vzorku
- Přidání 25 – 500 μl zásobního roztoku CTAB do příslušných vzorku
- Přidání takového objemu vody Milli Q, aby celkový objem každého vzorku byl 5 ml

Následně byly vzorky míchány na míchače.

Tabulka 3: Koncentrace jednotlivých látek ve vzorcích a pipetované objemy zásobních roztoků

Vzorek	$c_{\text{M HA}} [\text{g}\cdot\text{l}^{-1}]$	$c_{\text{CTAB}} [\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}]$	$V_{\text{HA}} [\mu\text{l}]$	$V_{\text{CTAB}} [\mu\text{l}]$	$V_{\text{voda}} [\mu\text{l}]$
1	0,01	0,01	50	25	4925
2	0,01	0,02	50	50	4900
3	0,01	0,03	50	75	4875
4	0,01	0,04	50	100	4850
5	0,01	0,05	50	125	4825
6	0,01	0,07	50	175	4775
7	0,01	0,08	50	200	4750
8	0,01	0,1	50	250	4700
9	0,01	0,15	50	375	4575
10	0,01	0,2	50	500	4450

Celkem byly namíchány dvě analogické řady těchto vzorků (celkem 20 vzorků), kdy druhá řada sloužila jako blank (neobsahovala prodan) a byla použita k eliminaci nežádoucích jevů v emisních spektrech (např. Ramanova rozptylu).

Po proměření na přístrojích Fluorolog a Fluorocube bylo do každého vzorku přidáno 121 μl nasyceného roztoku NaCl ($6,173 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$), aby koncentrace NaCl ve vzorcích byla $0,15 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Vzorky byly po promíchání proměřeny stejným způsobem.

Měření bylo provedeno třikrát, tedy příprava sady vzorků (20 vzorků) byla provedena třikrát.

4.4.3 Měření časově rozlišených emisních spekter prodanu

Pro tento experiment byly namíchány dva vzorky složením shodné se vzorkem č. 5 z předchozího měření, přičemž do jednoho z nich bylo přidáno 121 μl nasyceného roztoku NaCl.

4.4.4 Měření kritické agregační koncentrace CTAB pomocí perylenu

Postup přípravy vzorků byl analogický způsobu přípravy vzorků u měření kritické agregační koncentrace pomocí prodanu. Rozdílem zde byla použitá fluorescenční sonda a její koncentrace. Použitou sondou byl perylen, jehož zásobní roztok měl koncentraci $10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$, rozpouštědlem byl aceton. Pipetovaný objem roztoku sondy byl 50 μl , výsledná koncentrace perylenu ve vzorcích tedy byla $10^{-6} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Přidávání soli nebylo realizováno. Toto měření také nevyžadovalo měření paralelních vzorků. Koncentrační řada byla zmenšena o vzorek s koncentrací tenzidu $0,04 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$.

4.5 Nastavení přístrojů

4.5.1 Charakteristiky prodanu v polaritní škále rozpouštědel

Fluorolog:

<i>Excitace</i>	<i>Excitace - štěrbina</i>	<i>Emise</i>	<i>Emise - štěrbina</i>
360 nm	2 nm	380 – 650 nm	2 nm

Fluorocube:

Před měřením vlastních vzorků byla zjištěna odezva lampy za použití záření rozptylujícího koloidního roztoku oxidu křemičitého při nastavení emisního monochromátoru na vlnovou délku excitačního zdroje, kterým byla NanoLED lampa o vlnové délce 361 nm. Vlastní měření proběhlo s vyřazeným monochromátorem za použití cut-of filtru pro 400 nm. Dále byly použity neutrální filtry, pro snížení intenzity záření lampy u vzorků, které emitovaly s větší intenzitou a které by tak zahltily detektor.

<i>Získ dat</i>		<i>Excitační zdroj</i>	
Coaxial Delay	95 ns	Repetition rate	1 MHz
Rozpětí TAC	100 ns	Sync Delay	0 s
Peak Preset	0 s		
Počet fotonů v maximu poklesu	10 000	Štěrbiny	8 nm
		Reverzní uspořádání	ano

4.5.2 Měření kritické agregační koncentrace CTAB pomocí prodanu

Fluorolog: viz Charakteristiky prodanu v polaritní škále rozpouštědel

Fluorocube:

Před měřením vlastních vzorků byla zjištěna odezva lampy za použití záření rozptylujícího koloidního roztoku oxidu křemičitého při nastavení emisního monochromátoru na vlnovou délku excitačního zdroje, kterým byla NanoLED lampa o vlnové délce 361 nm. Vlastní měření proběhlo s vyřazeným monochromátorem za použití cut-of filtru pro 400 nm. Dále byly použity neutrální filtry, pro snížení intenzity záření lampy u vzorků, které emitovaly s větší intenzitou.

<i>Získ dat</i>		<i>Excitační zdroj</i>	
Coaxial Delay	65 ns	Repetition rate	1 MHz
Rozpětí TAC	50 ns	Sync Delay	0 s
Peak Preset	0 s		
Počet fotonů v maximu poklesu	10 000	Štěrbiny	16 nm
		Reverzní uspořádání	ano

4.5.3 Měření časově rozlišených emisních spekter prodanu

Fluorocube:

Před měřením vlastních vzorků byla zjištěna odezva lampy za použití záření rozptylujícího koloidního roztoku oxidu křemičitého při nastavení emisního monochromátoru na vlnovou délku excitačního zdroje, kterým byla NanoLED lampa o vlnové délce 361 nm. Vlastní měření proběhlo bez použití filtrů. Bylo měřeno celkem 16 poklesů intenzity při nastavení emisního monochromátoru na vlnové délky od 410 do 635 nm s krokem 15 nm.

<i>Získ dat</i>		<i>Excitační zdroj</i>	
Coaxial Delay	65 ns	Repetition rate	1 MHz
Rozpětí TAC	50 ns	Sync Delay	0 s
Peak Preset	0 s		
Počet fotonů v maximu poklesu	4 000	Štěrbiny	16 nm
		Reverzní uspořádání	ano

Pozn.: Pro variantu se solí byla upravena velikost štěrbin na 32 nm z důvodu nižší intenzity emise vzorku.

4.5.4 Měření kritické agregační koncentrace CTAB pomocí perylenu

Fluorolog:

<i>Excitace</i>	<i>Excitace - štěrbina</i>	<i>Emise</i>	<i>Emise - štěrbina</i>
410 nm	2 nm	420 – 540 nm	2 nm

Fluorocube:

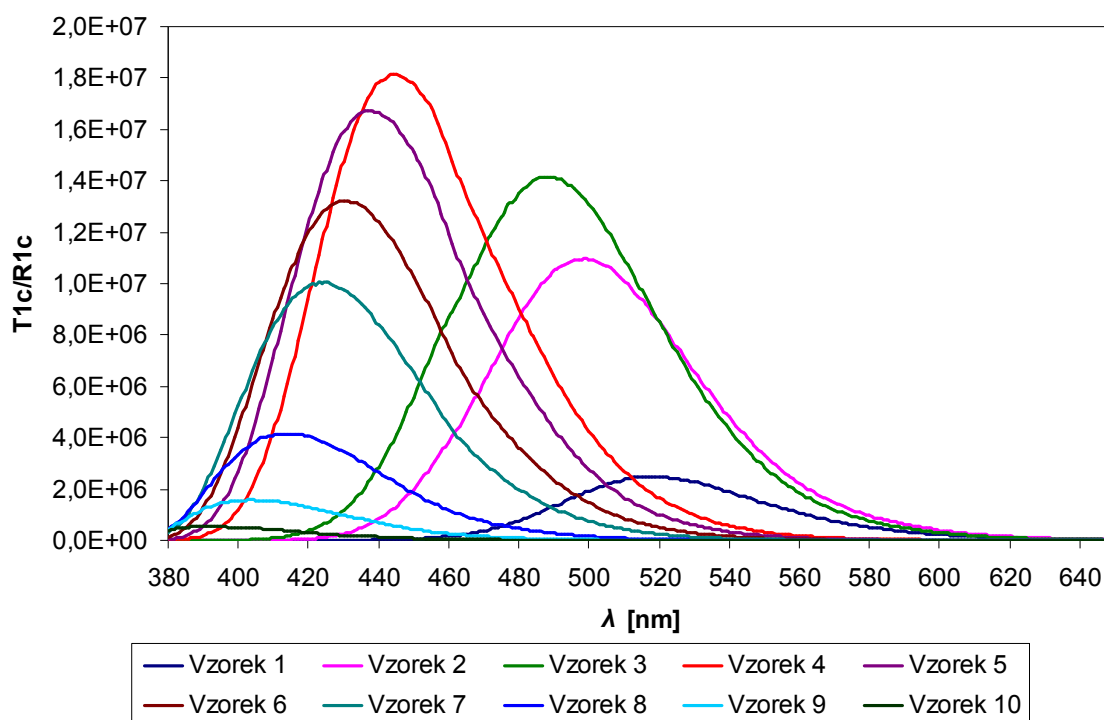
Před měřením vlastních vzorků byla zjištěna odezva lampy za použití záření rozptylujícího koloidního roztoku oxidu křemičitého při nastavení emisního monochromátoru na vlnovou délku excitačního zdroje, kterým byla NanoLED lampa o vlnové délce 389 nm. Vlastní měření proběhlo s vyřazeným monochromátorem za použití cut-of filtru pro 400 nm. Dále byly použity neutrální filtry, pro snížení intenzity záření lampy u vzorků, které emitovaly s větší intenzitou.

<i>Získ dat</i>		<i>Excitační zdroj</i>	
Coaxial Delay	65 ns	Repetition rate	1 MHz
Rozpětí TAC	50 ns	Sync Delay	0 s
Peak Preset	0 s		
Počet fotonů v maximu poklesu	10 000	Štěrbiny	32 nm
		Reverzní uspořádání	ano

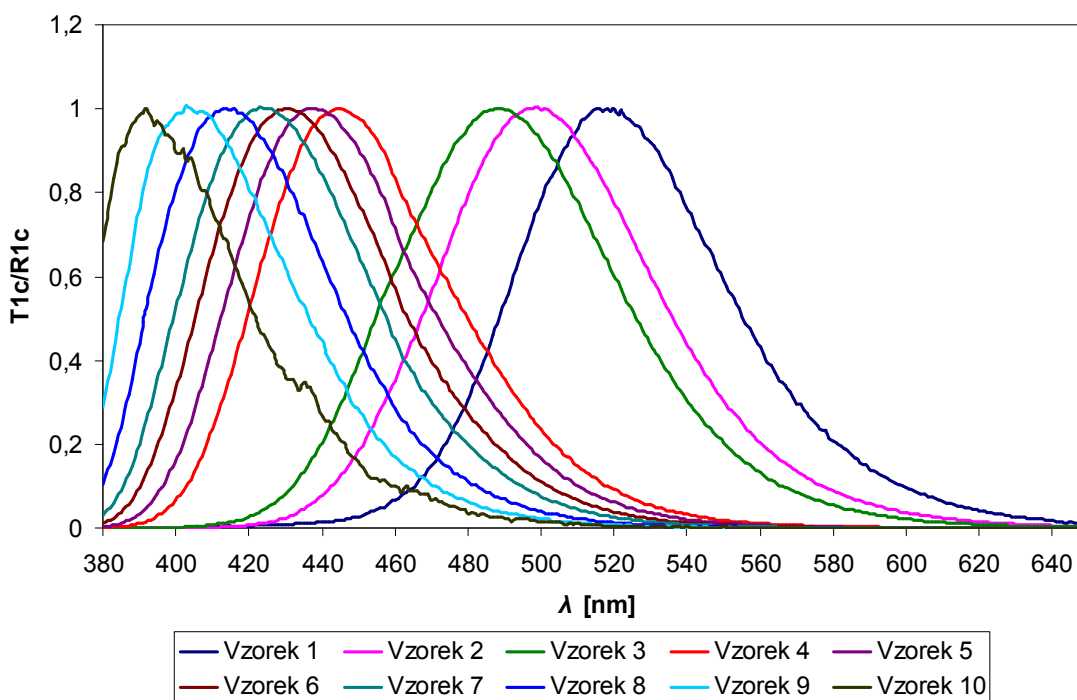
4.6 Výsledky a diskuze

4.6.1 Charakteristiky prodanu v polaritní škále rozpouštědel

Na přístroji Fluorolog byla zjištěna emisní spektra prodanu pro všech deset různě polárních prostředí, která jsou znázorněna na obrázku 12.



Obrázek 12: Emisní spektra prodanu v prostředích s různou polaritou



Obrázek 13: Normalizovaná emisní spektra prodanu v prostředích s různou polaritou

Po normalizování emisních spekter (Obrázek 13) je zřejmé, že se snižující se polaritou prostředí se maximum emise posunuje ke kratším vlnovým délkám. Nejvíce polárním prostředím byla čistá voda, nejméně polárním n-heptan. Maxima emise prodanu u těchto dvou prostředí byla 518 a 392 nm. Posun ke kratším vlnovým délkám se snižující se polaritou

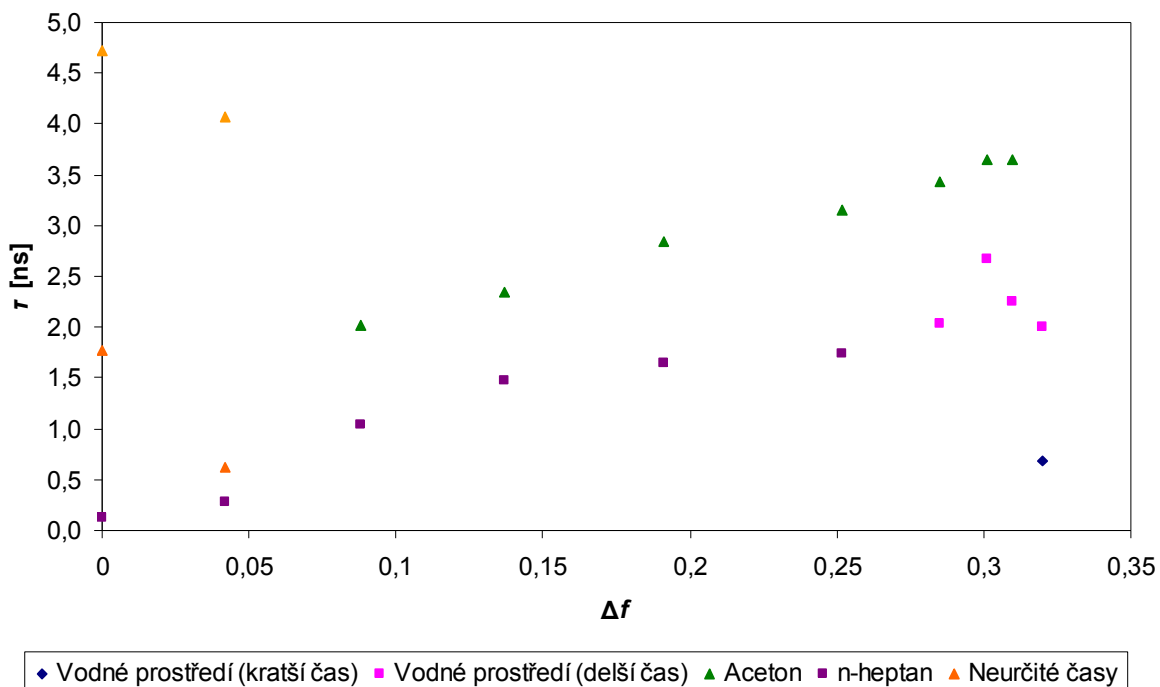
rozpouštědla je způsoben klesajícím dipólovým momentem molekul prostředí, které při své relaxaci (orientaci kvůli elektrostatickým interakcím) v okolí excitované molekuly odebírají excitované molekule méně energie.

Tabulka 4 znázorňuje doby života prodanu v jednotlivých prostředích. Plně jsou znázorněny doby života, které byly "přiřazeny" jednotlivým primárním rozpouštědlům, kurzívou jsou znázorněna relativní zastoupení příslušných dob života.

Tabulka 4: Doby života prodanu a jejich zastoupení pro jednotlivé vzorky

Δf	0,320	0,310	0,301	0,285	0,252	0,191	0,137	0,088	0,042	0,000
Vzorek	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
τ (voda - kratší čas) [%]	0,69 <i>51,06</i>									
τ (voda - delší čas) [%]	2,00 <i>48,94</i>	2,26 <i>61,16</i>	2,67 <i>38,33</i>	2,03 <i>7,18</i>						
τ (aceton) [%]		3,65 <i>38,84</i>	3,64 <i>61,67</i>	3,42 <i>92,82</i>	3,16 <i>92,41</i>	2,85 <i>87,38</i>	2,34 <i>74,85</i>	2,02 <i>15,70</i>		
τ (n-heptan) [%]					1,74 <i>7,59</i>	1,64 <i>12,62</i>	1,48 <i>25,15</i>	1,03 <i>84,30</i>	0,28 <i>31,54</i>	0,13 <i>80,40</i>
τ (neurčité) [%]									0,62 <i>63,35</i>	1,76 <i>7,66</i>
									4,07 <i>5,11</i>	4,71 <i>11,94</i>

Data z tabulky 4 jsou znázorněna na obrázku 14.



Obrázek 14: Závislost dob života prodanu na Lippert-Matagově polaritním parametru

Vzorek 1 s nejpolarnějšími prostředím - čistou vodou - vykázal dvě typické doby života, 2 a 0,69 ns. Tabelaované hodnoty jsou 2 a 0,7 ns [15].

Vzorky 2 - 3 byly směsmi vody a acetonu. Zde nebyla detekována doba života prodanu ve vodě, kdy dochází ke tvorbě komplexu prostřednictvím vodíkových můstků (0,7 ns). Objevily se zde vždy dvě doby života prodanu - pro vodné prostředí (2,26 a 2,67 ns) a pro lokalizaci v acetonu (3,65 a 3,64 ns). Z absence druhého času charakteristického pro vodu lze usuzovat, že se zde netvořily komplexy mezi excitovanou molekulou prodanu a molekulami vody prostřednictvím vodíkových můstků.

Vzorek 4 obsahoval pouze aceton, nicméně zde byla zjištěna druhá doba života, charakteristická pro vodu (2,03 ns). To může být vysvětleno přítomností nepatrného množství vody v použitém acetonu, odpovídá tomu i minoritní zastoupení tohoto času (7,18 %). Doba života prodanu v acetonu byla 3,42 ns. Tabelovaná hodnota je 3,35 ns [16]. Aceton je aprotické rozpouštědlo, komplexy excitovaného prodanu s molekulami vody prostřednictvím vodíkových můstků nebyly detekovány.

Vzorky 5 – 8 obsahovaly aceton a n-heptan. Vykazovaly dvě doby života, které byly přisouzeny interakcím s molekulami acetonu nebo n-heptanu. Obě doby života se zkracovaly s klesající polaritou prostředí, přičemž rostlo zastoupení doby života "přisouzené" n-heptanu.

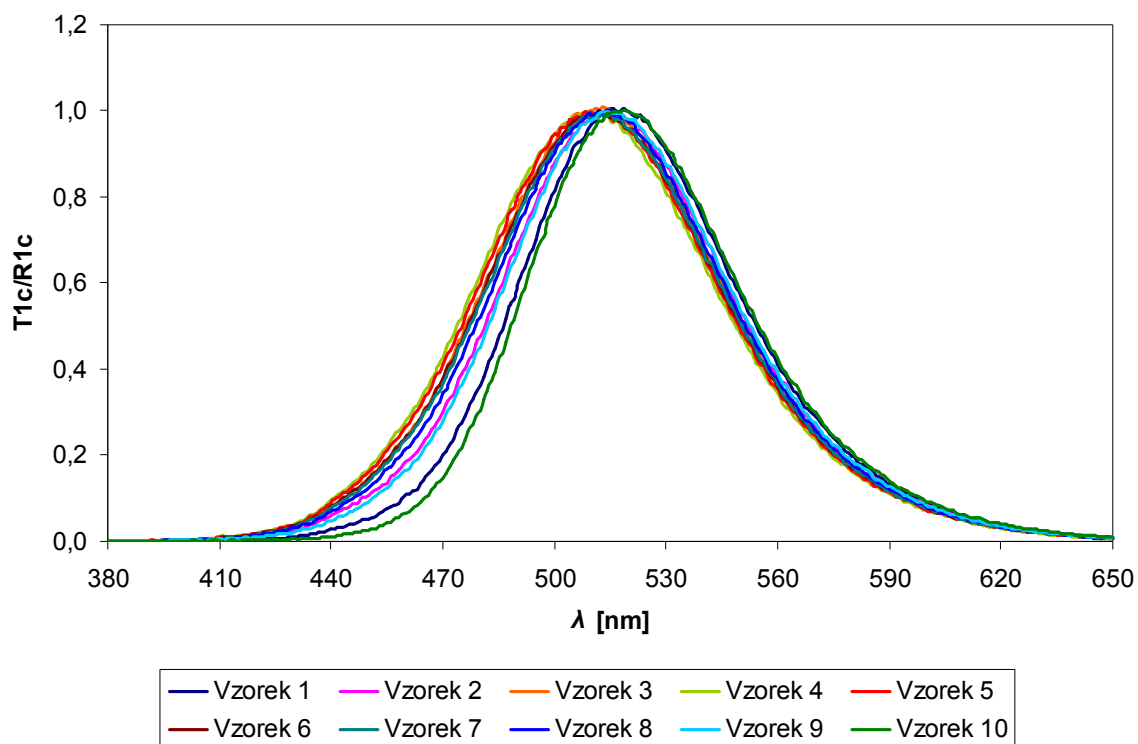
U vzorků 9 a 10 došlo k detekci tří dob života, z nichž nejkratší by mohla být přisouzena n-heptanu. Zbývající dvě doby života jsou neznámého původu, s největší pravděpodobností jde o nevýznamné doby života (nečistoty), jejichž detekce byla způsobena nízkou intenzitou fluorescence prodanu v n-heptanu, což je patrné z obrázku 1. U vzorku 9 byl době života prodanu v n-heptanu přisouzen čas 0,28 ns (31,54 %). U vzorku 10 patřil majoritní podíl detekovaných dob života n-heptanu s 0,13 ns (80,4 %). Tabelovaná hodnota doby života n-heptanu je 0,15 ns [15].

Toto měření potvrzuje, že prodan je fluorescenční sonda citlivá na polaritu okolního prostředí a na schopnost prostředí vytvářet vodíkové můstky. Protože u méně polárních prostředí nedochází k tak markantní relaxaci molekul rozpouštědla, dochází k menším ztrátám energie excitované molekuly prodanu do okolí. Molekuly prodanu pak mají tendenci emitovat v kratších časech a v kratších vlnových délkách. Při snížení polarity prostředí došlo vždy k hypsochromnímu posunu. Z trendu závislosti dob života prodanu na polaritě vybočoval pouze vzorek 1, který obsahoval nejpolárnější prostředí – čistou vodu. Zde byly doby života relativně krátké, což bylo způsobeno schopností vody vytvářet vodíkové můstky. Dalším důvodem mohl být fakt, že voda obsahuje jisté množství rozpuštěného kyslíku, který má schopnost zhaset excitované molekuly a zkracovat tak jejich dobu života.

4.6.2 Měření kritické agregační koncentrace CTAB pomocí prodanu

Emisní spektra prodanu obsahovala peak Ramanova rozptylu s maximem o vlnové délce asi 411 nm. Tento peak byl odstraněn odečtením intenzity emise blanku.

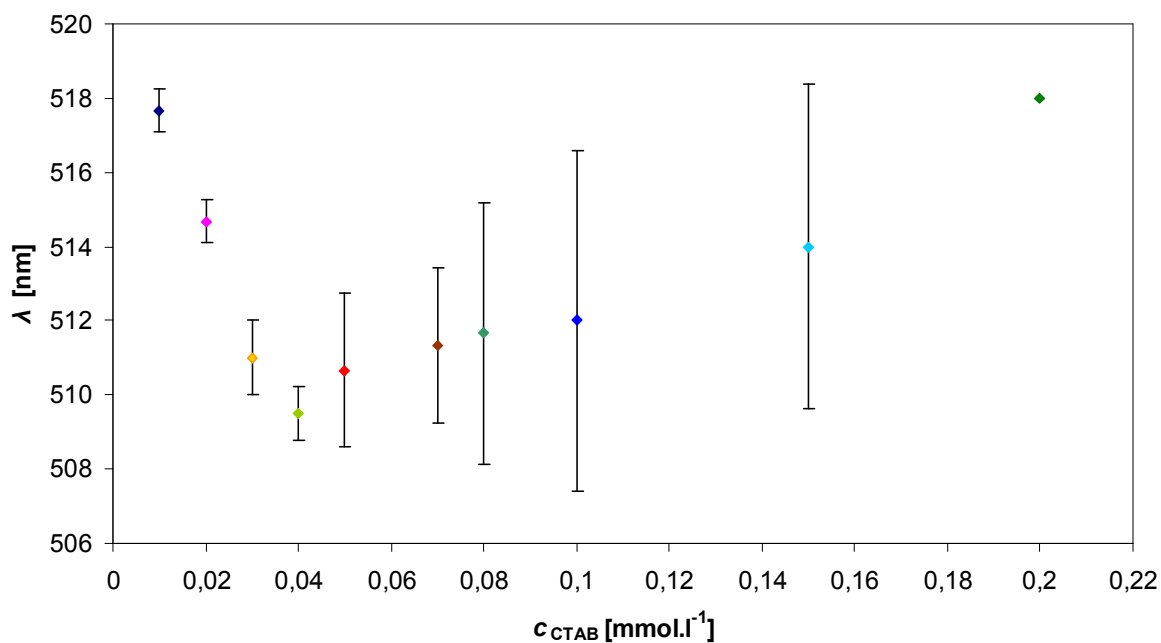
Hodnoty intenzity emise prodanu ze tří měření (bez přídavku NaCl) byly zprůměrovány (celkové měření bylo provedeno třikrát) a normalizovány. Výsledná spektra jsou znázorněna na následujícím obrázku:



Obrázek 15: Normalizovaná emisní spektra prodanu v systému HA – CTAB ve vodném prostředí

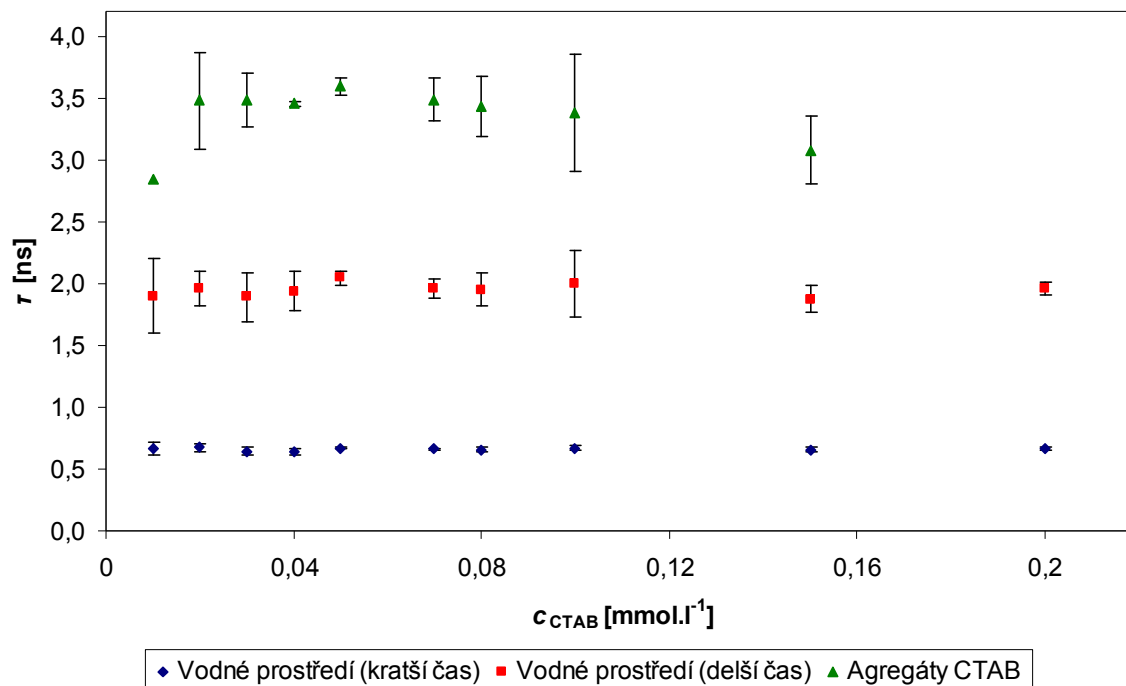
Z obrázku 15 je vidět, že dochází k posuvu maxim emise ke kratším vlnovým délkám u vzorků, které jsou situovány uvnitř koncentračního rozsahu CTAB.

Maxima emise prodanu ze tří měření byla zprůměrována pro každou z koncentrací CTAB a byla zjištěna jejich výběrová směrodatná odchylka.



Obrázek 16: Vlnové délky maxim emise prodanu v závislosti na koncentraci CTAB v systému HA – CTAB ve vodném prostředí

Obrázek 16 ukazuje, že ve zvoleném koncentračním rozsahu CTAB dochází ke snížení vlnové délky maxima emise, tedy že vzorky obsahovaly nepolární domény CTAB.



Obrázek 17: Doby života prodanu v závislosti na koncentraci CTAB v systému HA – CTAB ve vodném prostředí

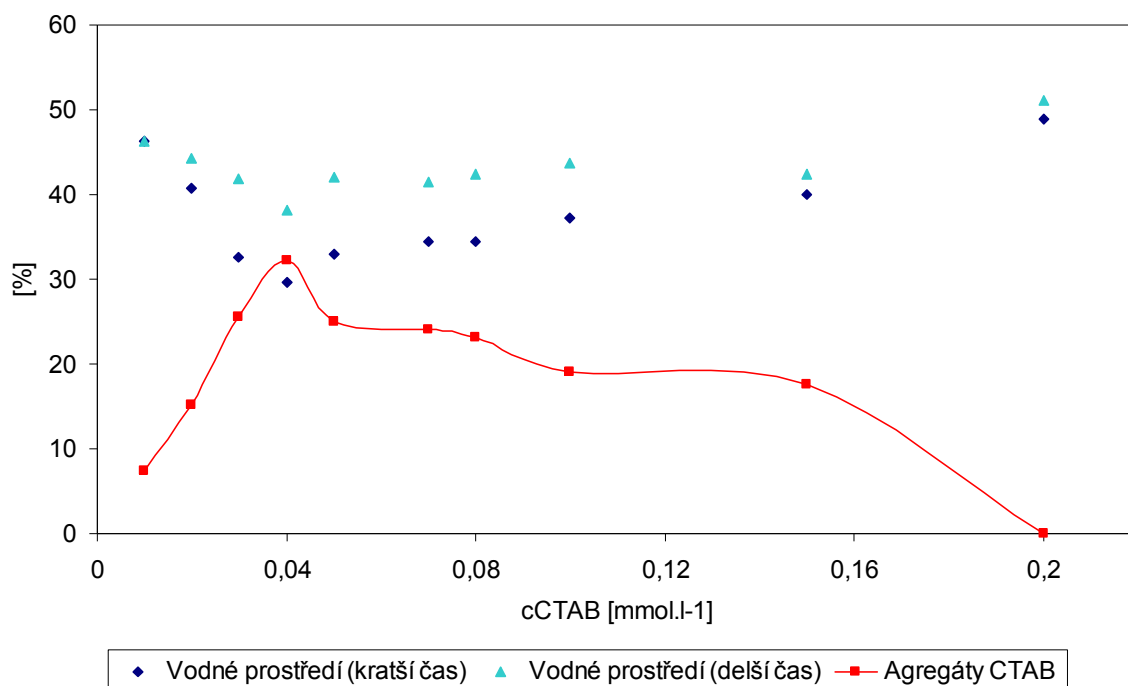
Průměrné hodnoty dob života prodanu v systému HA s CTAB bez přítomnosti soli:

Vodné prostředí (kratší čas): $\tau = (0,66 \pm 0,01) \text{ ns}$

Vodné prostředí (delší čas): $\tau = (1,95 \pm 0,05) \text{ ns}$

Agregáty CTAB: $\tau = (3,36 \pm 0,24) \text{ ns}$

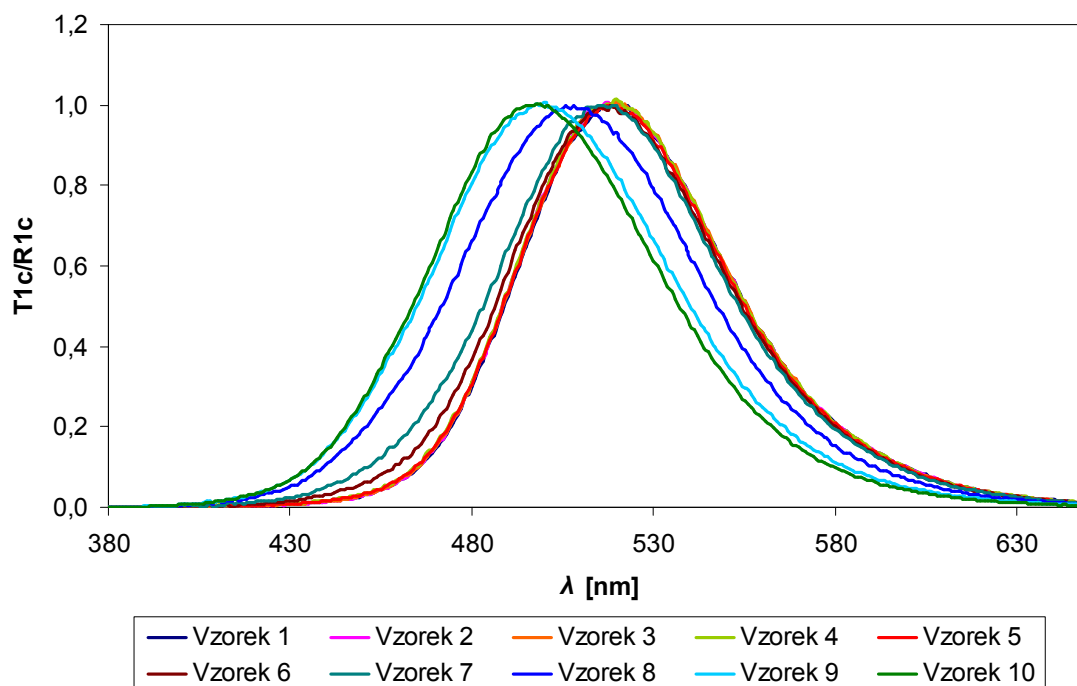
Z obrázku 17 lze vidět, že všechny vzorky kromě vzorku 10 vykazovaly tři doby života prodanu, neboli je potvrzeno, že ve zvoleném koncentračním rozsahu CTAB docházelo k agregaci CTAB.



Obrázek 18: Průměrné relativní zastoupení dob života prodanu v závislosti na koncentraci CTAB v systému HA – CTAB ve vodném prostředí

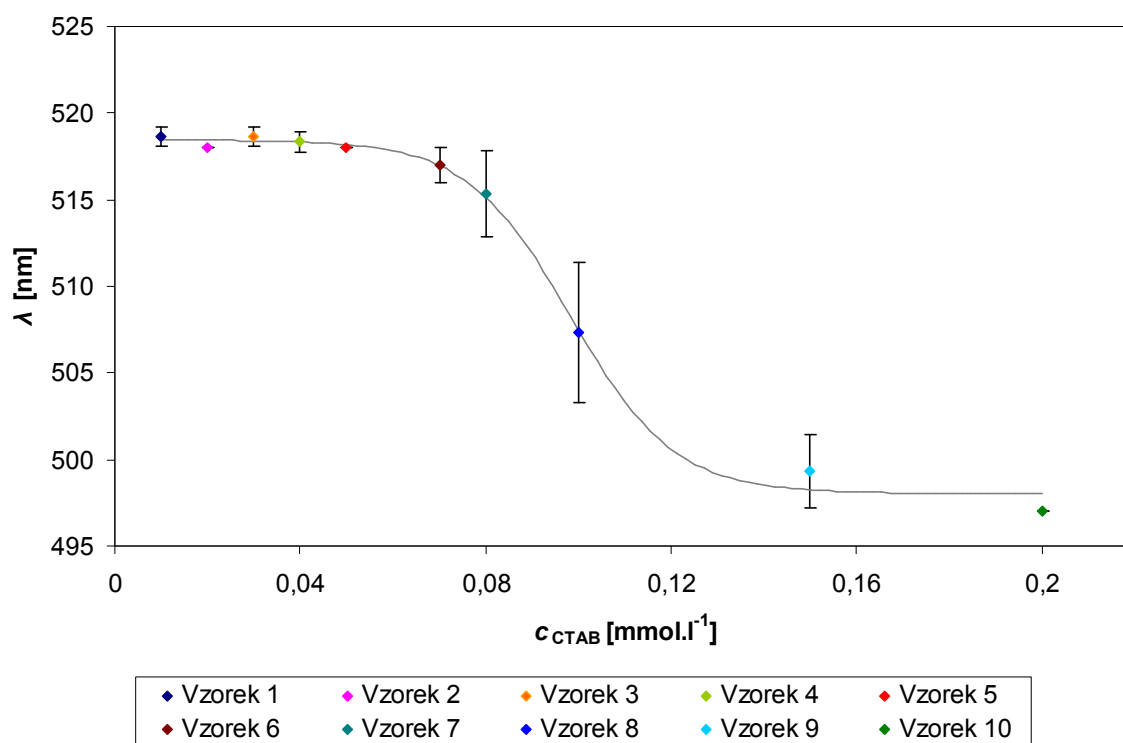
Obrázek 18 ukazuje, že zastoupení doby života prodanu emitujícího z nepolárních domén roste se zvyšující se koncentrací CTAB až ke vzorku 4, poté pozvolna klesá až je nakonec nulové u vzorku 10. CTAB tedy agregovalo nejvíce při koncentraci $0,04 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$.

Do proměřených vzorků bylo přidáno příslušné množství NaCl a vzorky byly analogicky proměřeny znovu. Získaná data byla zpracována stejným způsobem, jak je popsáno výše.



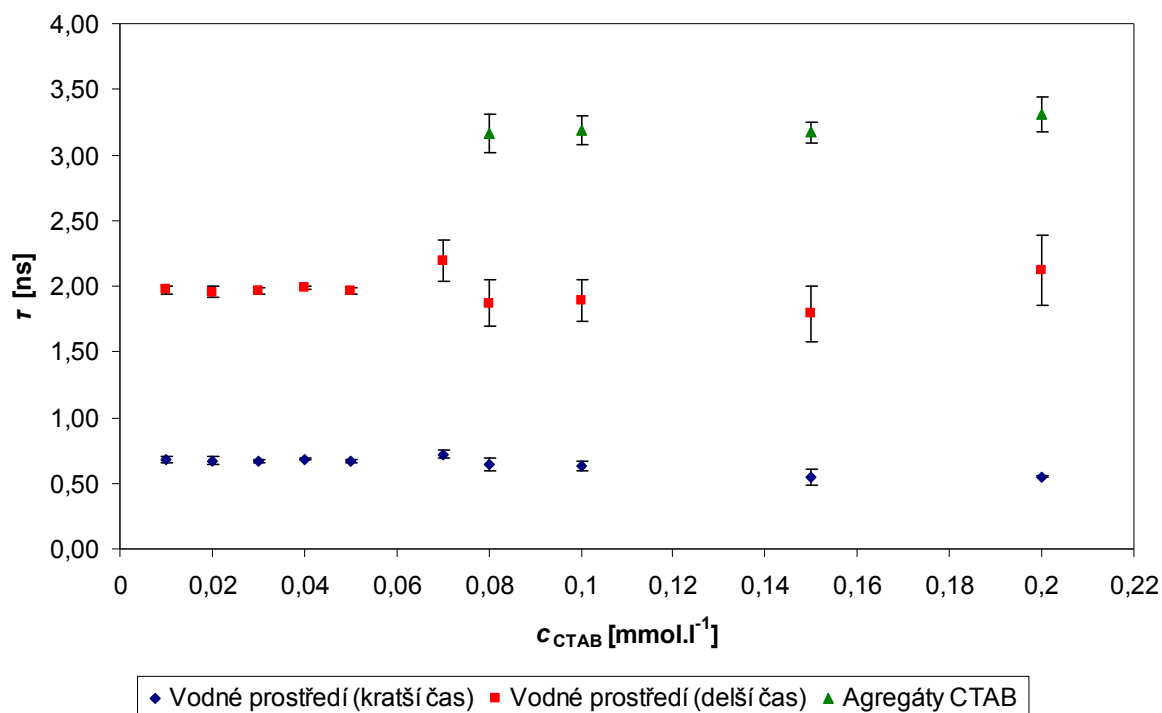
Obrázek 19: Normalizovaná emisní spektra prodanu v systému HA – CTAB za přítomnosti soli

Obrázek 19 ukazuje, že dochází k výraznějšímu posunu vlnové délky maxim emise prodanu a to u vzorků na koncovém okraji koncentračního rozsahu CTAB. Zvláště u vzorků 8, 9 a 10.



Obrázek 20: *Vlnová délka maxima emise prodanu v závislosti na koncentraci CTAB v systému HA – CTAB za přítomnosti soli*

Z obrázku 20 lze vidět, že vlnová délka maxima emise s rostoucí koncentrací nejdříve stagnuje, a poté klesá. Posun ke kratším vlnovým délkám je markantnější než posun v nepřítomnosti soli a pravděpodobně tedy vznikají větší micelární agregáty.



Obrázek 21: Doby života prodanu v závislosti na koncentraci CTAB v systému HA – CTAB za přítomnosti soli

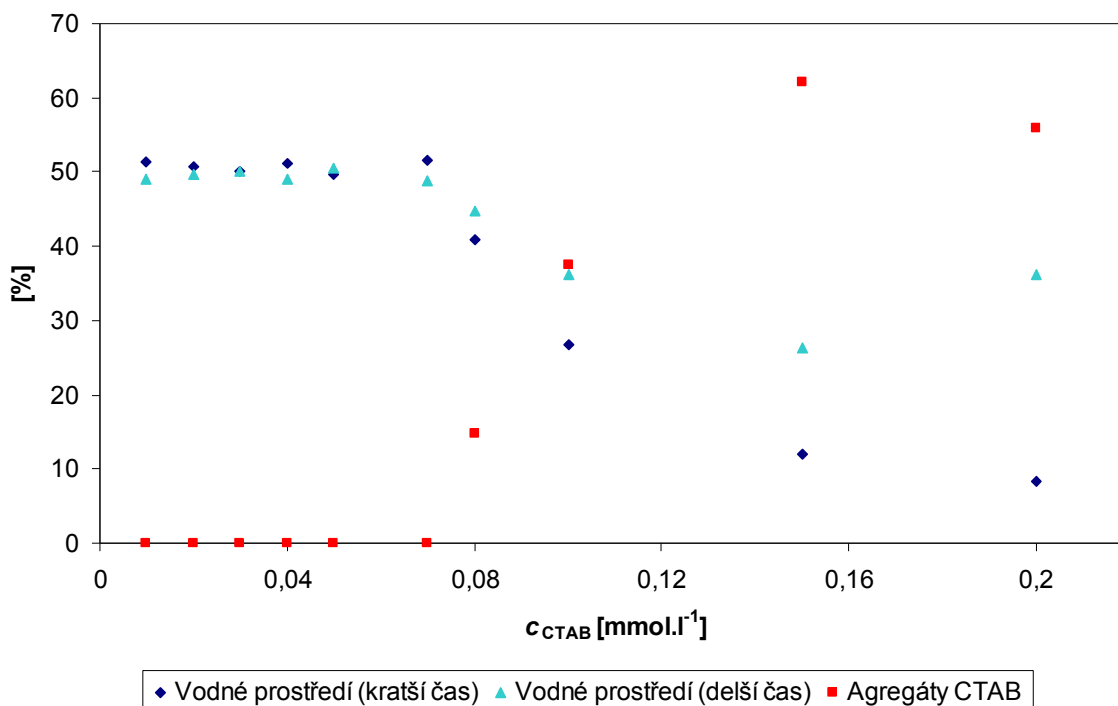
Průměrné hodnoty dob života prodanu v systému HA s CTAB v přítomnosti soli:

Vodné prostředí (kratší čas): $\tau = (0,65 \pm 0,06) \text{ ns}$

Vodné prostředí (delší čas): $\tau = (1,97 \pm 0,12) \text{ ns}$

Agregáty CTAB: $\tau = (3,21 \pm 0,07) \text{ ns}$

Na obrázku 21 je vidět, že po přidání soli se v systému objevily doby života charakterizující agregáty CTAB až u vzorku 7, 8, 9 a 10.



Obrázek 22: Průměrné relativní zastoupení dob života prodanu v závislosti na koncentraci CTAB v systému HA – CTAB za přítomnosti soli

Obrázek 22 ukazuje, zvyšující se zastoupení dob života prodanu charakteristických pro agregáty CTAB.

Výsledky měření kritické agregační koncentrace potvrdily vznik agregátů v koncentračním rozsahu CTAB 0,01 – 0,2 mmol.l⁻¹. U vzorků 1 – 9, tj. v koncentracích CTAB 0,01 – 0,15 mmol.l⁻¹, byla zjištěna třetí doba života prodanu, který byl přiřazen nepolárním agregátům CTAB. U vorku 10 docházelo ke vzniku gelu, ve kterém byly agregáty CTAB zachyceny. V měřeném objemu vzorku tedy žádné agregáty detekovány nebyly.

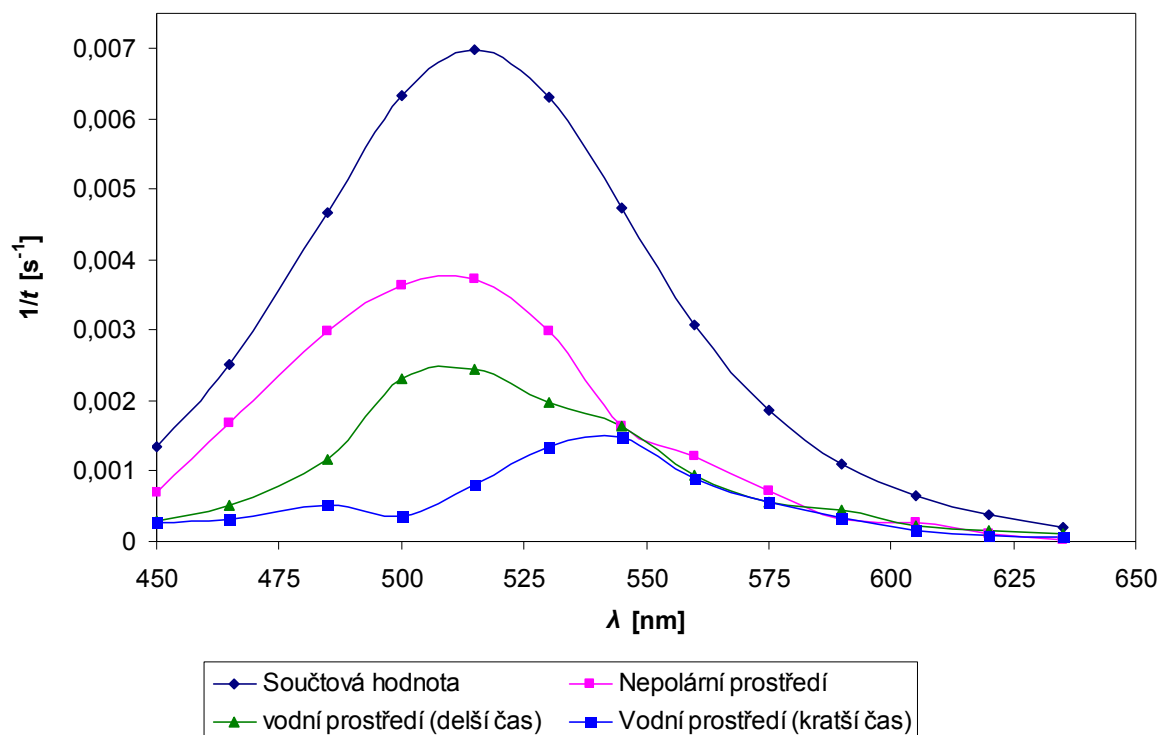
Po přidání soli došlo v systému k výrazné změně. K agregaci docházelo až ve větších koncentracích CTAB (0,08 – 0,2 mmol.l⁻¹) a s větší intenzitou než v případě nepřítomnosti soli. V systému tedy nedocházelo ke vniku CAC, vzniklé domény CTAB by mohly být vysvětleny sníženou hodnotou CMC, ke které se systém blížil.

4.6.3 Měření časově rozlišených emisních spekter prodanu

Pro zjištění časově rozlišených emisních spekter prodanu byly použity dva vzorky se systémem HA – CTAB se stejnou koncentrací CTAB (0,05 mmol.l⁻¹ - přibližně střed rozsahu koncentrací CTAB, kde vznikaly agregáty) a s koncentrací HA stejnou jako v předešlých případech. Jeden ze vzorků obsahoval NaCl o koncentraci 0,15 mol.l⁻¹. Podle předchozích měření by v nepřítomnosti soli měly být detekovány tři doby života a v přítomnosti soli dvě doby života prodanu.

Celkem bylo pro každý vzorek individuálně změřeno 16 poklesů intenzity při vlnových délkách od 410 do 635 nm s krokem 15 nm. Poklesy byly naměřeny se stabilním počtem detekovaných fotonů ve svém maximu. Pro získání TRES bylo tedy potřeba vycházet z času, za který došlo k dosažení zvoleného množství fotonů v maximu poklesu. K získání TRES byla použita reciproká hodnota doby trvání měření poklesů. Získaná hodnota potom byla

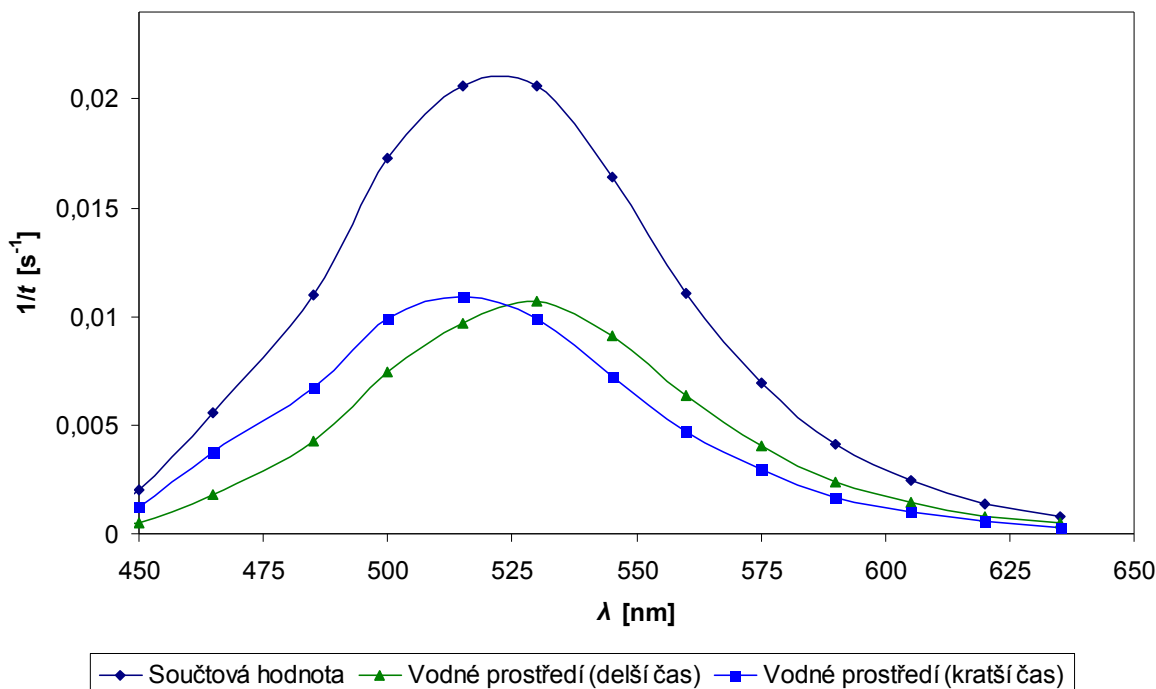
u každé měřené vlnové délky rozdělena v poměru získaných relativních amplitud příslušejících jednotlivým časům.



Obrázek 23: Časově rozlišené emisní spektrum prodanu v systému HA – CTAB, při koncentraci CTAB 0,05 mmol·l⁻¹ ve vodném prostředí

Na obrázku 23 je vidět, že výsledná intenzita je součtem tří dílčích emisí náležících třem dobám života prodanu. Dílčí emise pro dobu života prodanu z hydrofóbních domén je v rámci celkového spektra posunuta ke kratším vlnovým délkám oproti dílčím emisím prodanu z vody, protože dochází k menším ztrátám energie excitované molekuly prodanu relaxací prostředí.

V případě časově rozlišeného emisního spektra prodanu ze vzorku se solí (Obrázek 24) byly detekovány dvě doby života, které jsou charakteristické pro prodan ve vodě. Kratší doba života je více zastoupena v kratších vlnových délkách, protože zde dochází dříve k emisi a tedy menší ztrátě energie.



Obrázek 24: Časově rozlišené emisní spektrum prodanu v systému HA – CTAB, při koncentraci CTAB 0,05 mmol·l⁻¹ za přítomnosti soli

Průměrné hodnoty dob života prodanu v systému HA – CTAB bez přítomnosti soli:

Vodné prostředí (kratší čas): $\tau = (0,51 \pm 0,12) \text{ ns}$

Vodné prostředí (delší čas): $\tau = (1,37 \pm 0,32) \text{ ns}$

Agregáty CTAB: $\tau = (3,02 \pm 0,28) \text{ ns}$

Průměrné hodnoty dob života prodanu v systému HA – CTAB v přítomnosti soli:

Vodné prostředí (kratší čas): $\tau = (0,70 \pm 0,29) \text{ ns}$

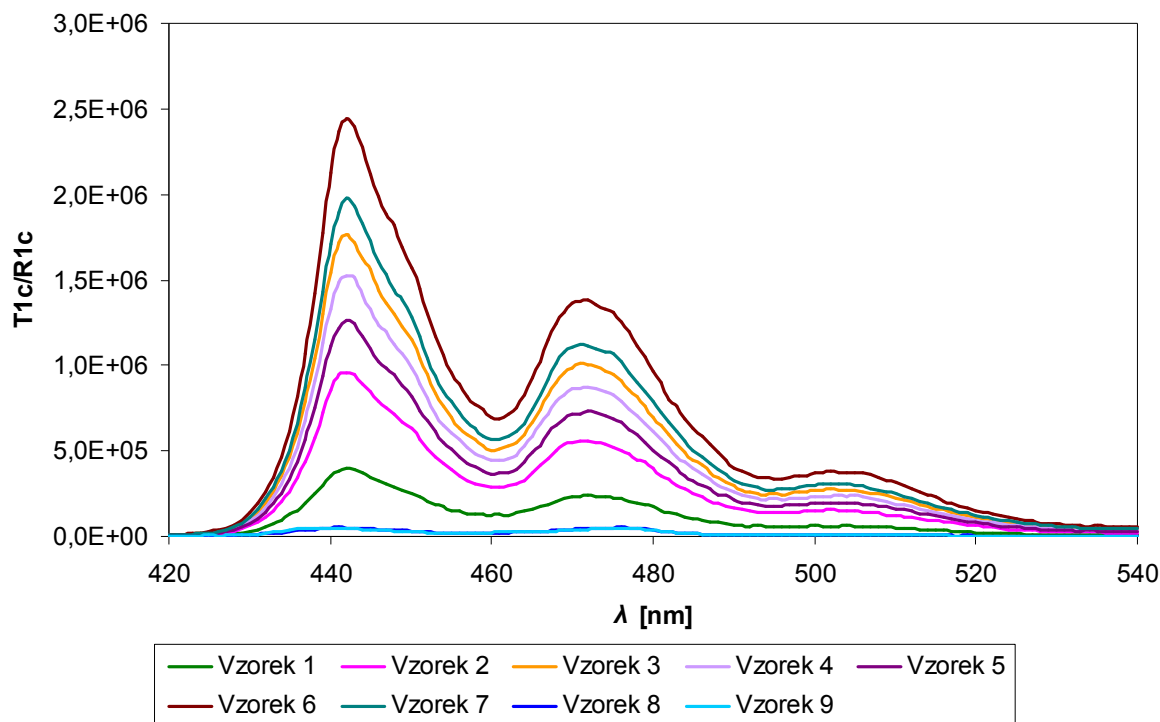
Vodné prostředí (delší čas): $\tau = (2,08 \pm 0,55) \text{ ns}$

Tato měření se obvykle provádí automatizovaně a nepoužívá se měření individuálních poklesů při jednotlivých vlnových délkách. Při automatizovaném měření totiž dochází ke korelování parametrů poklesů a získané výsledky jsou přesnější. Časově rozlišená měření byla u zmíněných vzorků provedena také automatizovaně, nicméně takto získaná data se zatím nepodařilo pomocí dostupných programů vyhodnotit a získat tak potřebné parametry poklesů.

U poklesů měřených při nižších vlnových délkách než 450 nm docházelo k rušení požadovaných dat přítomností Ramanova rozptylu. Tento jev by bylo možno eliminovat použitím zkřížených polarizátorů, které by ale výrazně prodloužily dobu získávání dat, nebo použitím excitace o kratší vlnové délce, díky které by se Ramanův rozptyl projevil u kratších vlnových délek, než tomu bylo při použité excitaci (361 nm).

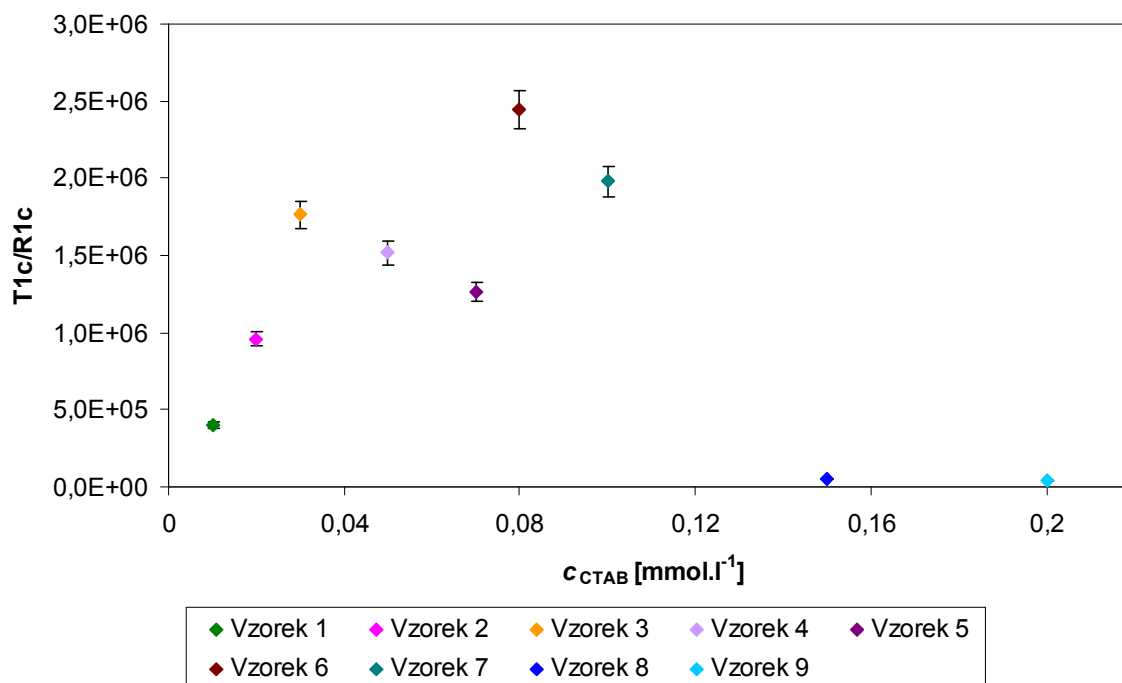
4.6.4 Měření kritické agregační koncentrace CTAB pomocí perylenu

Ve stejném koncentračním rozsahu CTAB jako v případě měření kritické agregační koncentrace CTAB pomocí prodanu bylo provedeno měření pomocí perylenu.



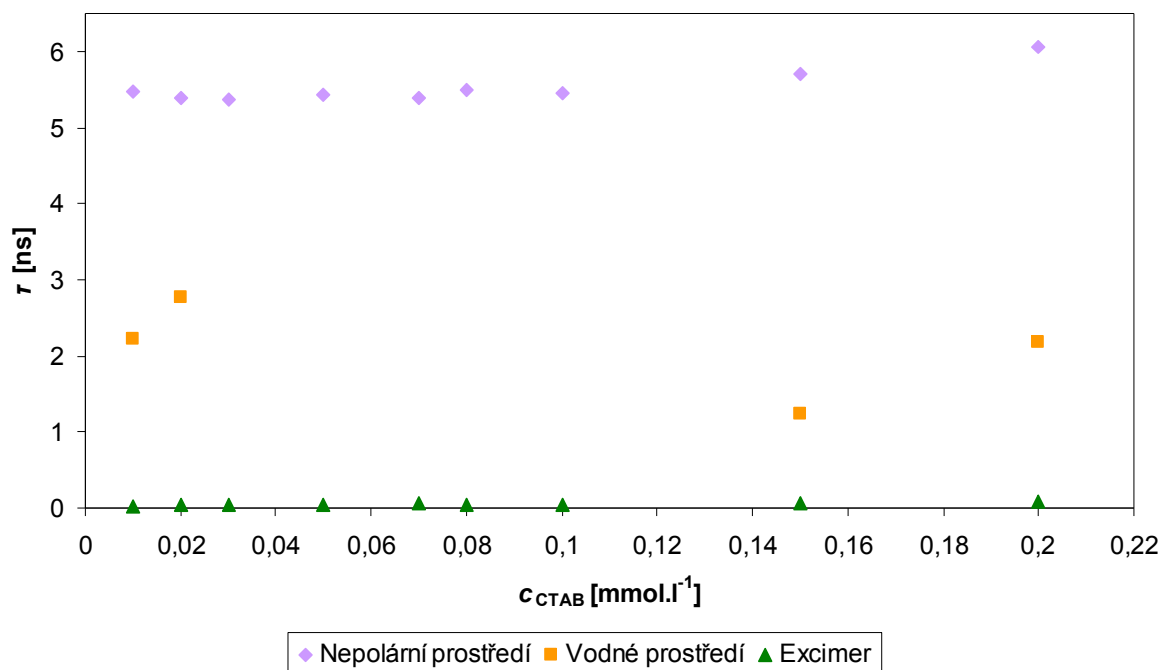
Obrázek 25: Emisní spektra perylenu v systému HA – CTAB ve vodném prostředí

Na obrázku 25 je vidět, že nejvyšší intenzitu fluorescence vykazují vzorky ze středu koncentračního rozsahu. To je vysvětleno tím, že zde vznikají hydrofobní domény, ve kterých je perylen na rozdíl od vody dobře rozpustný.



Obrázek 26: Intenzita fluorescence perylenu v maximu emise při 442 nm na koncentraci CTAB v systému HA – CTAB ve vodném prostředí

Obrázek 26 potvrzuje vznik hydrofóbních domén ve středu koncentračního rozsahu CTAB zvýšením intenzity emise.



Obrázek 27: Doby života perylenu v závislosti na koncentraci CTAB v systému HA – CTAB ve vodném prostředí

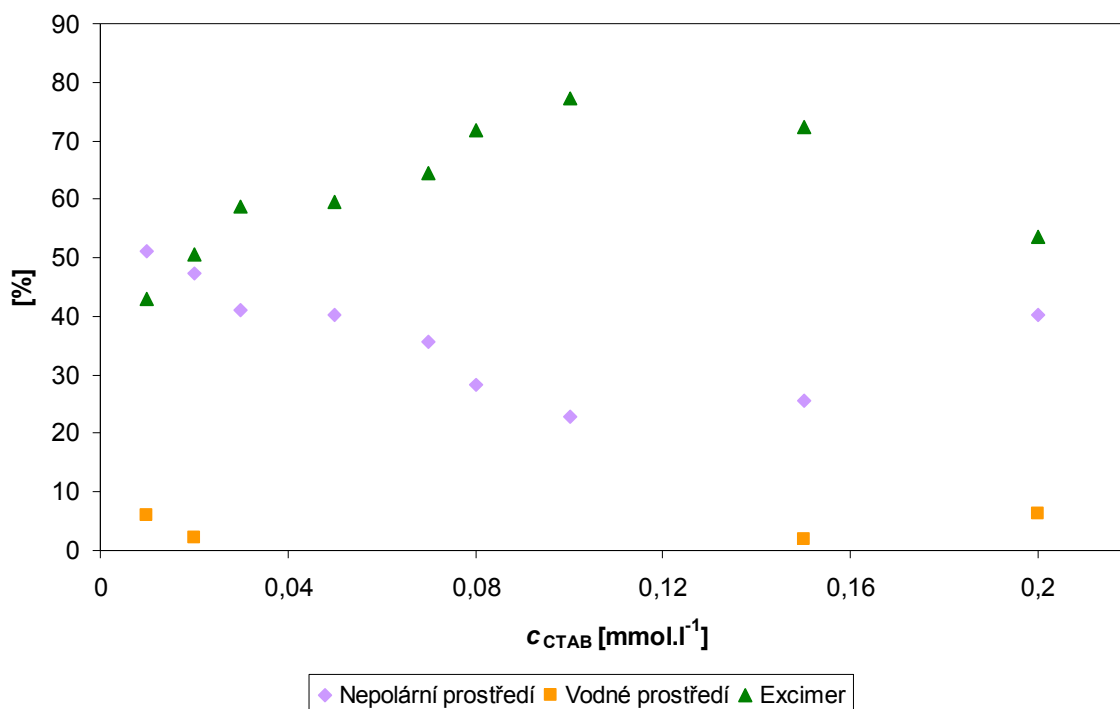
Průměrné hodnoty dob života perylenu v systému HA – CTAB:

Agregáty CTAB: $\tau = (5,53 \pm 0,23) \text{ ns}$

Vodné prostředí: $\tau = (2,10 \pm 0,63) \text{ ns}$

Excimer: $\tau = (0,05 \pm 0,02) \text{ ns}$

Na obrázku 27 jsou znázorněny doby života perylenu v systému HA – CTAB. Dochází zde stabilně k detekci dvou dob života perylenu, které mohou být přiřazeny perylenu v nepolární doméně (5,53 ns) a excimeru perylenu (0,05 ns). Třetí doba života může být přiřazena perylenu situovanému ve vodném prostředí. Tato doba života byla zjištěna pouze u krajních hodnot koncentračního rozsahu CTAB.



Obrázek 28: *Relativní zastoupení dob života perylenu v závislosti na koncentraci CTAB v systému HA – CTAB ve vodném prostředí*

Z obrázku 28 je vidět, že ve středu koncentračního rozpětí CTAB nese zvýšený podíl emise pocházející z excimeru perylenu. Docházelo zde pravděpodobně k vytvoření větších agregátů CTAB, ve kterých vzrostla pravděpodobnost vytvoření excimeru (perylene jako lipofilní molekula má tendenci dostat se do hydrofóbních domén). Lze odtud také vyvodit, že doba života perylenu příslušející vodě je pravděpodobně přítomná stále, jen u vzorků ve středu koncentračního rozsahu je emise z vody tak slabá v porovnání s emisí z hydrofóbních domén, že nebyla detekována.

Výsledky měření systému HA – CTAB pomocí perylenu potvrzují výsledky měření pomocí prodanu. Ve zvoleném koncentračním rozsahu CTAB vznikají agregáty CTAB, které se ve vyšších koncentracích CTAB (0,2 mmol.l⁻¹) shlukují s HA do formy gelu a vytrácí se z volného roztoku. Tato sonda byla označena jako méně vhodná pro studium systému CAC ve srovnání s prodanem z důvodu složitější analýzy dob života.

5 ZÁVĚR

Tato práce studovala agregaci kationaktivního tenzidu CTAB na záporně nabitým řetězci hyaluronové kyseliny, kdy tenzid vytvářel minimicely, útvary menší než klasické volné micely vyskytující se v roztoku po dosažení CMC. Systém obsahující minimicely by mohl najít využití v oblasti cílení léčiv, proto byl tento systém aplikován i do prostředí fyziologického roztoku (prostředí s NaCl o koncentraci $0,15 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$), kde bylo zjišťováno, zda je systém přítomností soli nezměněn. Systém HA – CTAB byl studován při jedné koncentraci kyseliny hyaluronové a proměnné koncentraci tenzidu, kde koncentrační rozsah nedosahoval CMC tenzidu, jen se k ní blížil. Ke studiu těchto systémů byly použity dvě fluorescenční sondy – prodan a perylen. U prodanu byly dále na základě jeho nespecifické rozpustnosti zjištěny jeho fluorescenční charakteristiky (maxima emise a doby života) v polaritní škále rozpouštědel. Analýza systémů probíhala prostřednictvím ustálené a časově rozlišené fluorescenční spektroskopie.

První část práce se zabývá studiem charakteristik prodanu v polaritní škále rozpouštědel. Tato škála byla vytvořena ze tří primárních rozpouštědel o různé polaritě (voda, aceton, n-heptan) a z jejich binárních směsí. Kromě citlivosti na polaritu prokázal prodan citlivost i na schopnost prostředí tvořit vodíkové můstky, eventuálně na přítomnost rozpuštěného kyslíku a to konkrétně u vzorku obsahujícího pouze vodu. Zde vykázal prodan dvě relativně krátké doby života (kratší doba života je přisouzena interakci s vodíkovými můstky [15]). U dalších vzorků se postupně snižovala polarita, se kterou se postupně zkracovaly jak zjištěné doby života, tak vlnové délky maxima emise prodanu. Každá doba života prodanu byla přisouzena interakci vždy s jedním z primárních rozpouštědel. Nevhodným prostředím pro použití prodanu jako fluorescenční sondy by mohl být označen čistě nepolární n-heptan, z něhož prodan emituje ve vlnových délkách na modrém konci svého emisního spektra. Intenzita fluorescence je pak velmi slabá a je rušena nevýznamnými jevy (projevení nečistot). Zjištěné doby života prodanu v primárních rozpouštědlech odpovídaly tabelovaným hodnotám [15, 16].

Druhá část práce studovala systém HA – CTAB ve vodném prostředí a ve fyziologickém roztoku. V případě vodného prostředí byl ve zvoleném koncentračním rozsahu CTAB splněn předpoklad vzniku agregátů CTAB. Se zvyšující se koncentrací se množství agregátů nejdříve zvyšovalo, poté klesalo, až vymizelo, kvůli uzavření do gelové fáze. V případě použití sondy prodanu byla přítomnost agregátů potvrzena získáním třetí doby života. U perylenu docházelo ke zvýšené emisi pocházející z excimeru perylenu.

Po přidání soli došlo ke kolapsu systému. Agregáty CTAB vznikaly až na konci zvoleného koncentračního rozsahu CTAB a byly výraznější, než v případě vodného prostředí. Nejspíše docházelo ke vzniku volných micel, systém tedy dosáhl kritické micelární koncentrace.

Dále byla získána časově rozlišená emisní spektra prodanu v systému HA – CTAB při jedné koncentraci CTAB jak ve vodném prostředí, tak v prostředí fyziologického roztoku. Tato spektra prokázala přítomnost agregátů ve vodném prostředí a nepřítomnost agregátů ve fyziologickém roztoku. Bylo předpokládáno, že při snímání poklesů intenzity fluorescence při jednotlivých vlnových délkách by v přítomnosti agregátů CTAB mohlo dojít k detekci čtyř dob života prodanu. Čtvrtá doba života by pocházela od prodanu situovaného v palisádové vrstvě agregátů CTAB, kde by byl prodan držen díky interakci svých π -elektronových oblaků s kladně nabitými skupinami tenzidu. Tato doba života prodanu však nebyla zjištěna.

Cílem další práce je získat časově rozlišená emisní spektra s korelovanými parametry a hledat další systémy HA – CTAB, které by se mohly uplatnit jako nosiče léčiv i ve fyziologickém roztoku.

6 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

[1]

MANNA, Uttam, Sri BHARANI a Satish PATIL. Layer-by-Layer Self-Assembly of Modified Hyaluronic Acid/Chitosan Based on Hydrogen Bonding. *Biomacromolecules*. 2009-09-14, roč. 10, č. 9, s. 2632-2639. ISSN 1525-7797. DOI: 10.1021/bm9005535. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/bm9005535>

[2]

CHOI, Ki Young, Hong Yeol YOON, Jong-Ho KIM, Sang Mun BAE, Rang-Woon PARK, Young Mo KANG, In-San KIM, Ick Chan KWON, Kuiwon CHOI, Seo Young JEONG, Kwangmeyung KIM a Jae Hyung PARK. Smart Nanocarrier Based on PEGylated Hyaluronic Acid for Cancer Therapy. *ACS Nano*. 2011-11-22, roč. 5, č. 11, s. 8591-8599. ISSN 1936-0851. DOI: 10.1021/nn202070n. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/nn202070n>

[3]

OH, Eun Ju, Jung-Wook KIM, Ji-Hyun KONG, Sung Ho RYU a Sei Kwang HAHN. Signal Transduction of Hyaluronic Acid?Peptide Conjugate for Formyl Peptide Receptor Like 1 Receptor. DOI: 10.1021/bc800255y. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/bc800255y>

[4]

SZARPAK, Anna, Isabelle PIGNOT-PAINTRAND, Claire NICOLAS, Catherine PICART a Rachel AUZÉLY-VELTY. Multilayer Assembly of Hyaluronic Acid/Poly(allylamine): Control of the Buildup for the Production of Hollow Capsules. *Langmuir*. 2008-09-02, roč. 24, č. 17, s. 9767-9774. ISSN 0743-7463. DOI: 10.1021/la801274z. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/la801274z>

[5]

EL-DAKDOUKI, Mohammad a Xuefei HUANG. Biological Applications of Hyaluronic Acid Functionalized Nanomaterials. 2011, s. -. DOI: 10.1021/bk-2011-1091.ch011.

[6]

FÍŠAR, Zdeněk. Fluorescenční spektroskopie v neurovědách. In: [online]. 2003 [cit. 2012-04-16]. Dostupné z: <http://psych.lf1.cuni.cz/fluorescence/Default.htm>

[7]

LAKOWICZ, Joseph R. *Principles of fluorescence spectroscopy*. 3rd ed. New York: Springer, c2006, 954 s. ISBN 03-873-1278-1.

[8]

VALEUR, Bernard. *Molecular Fluorescence*. 1st ed. Weinheim: Wiley-VCH, 2002. ISBN 35-276-0024-8.

[9]

LÁTAL, J., P. KOUDELKA, F. HANÁČEK a P. ŠIŠKA. Úvod do distribuovaných optovláknových systémů založených na Ramanově jevu pro měření teploty. [online]. 2010[cit. 2012-04-17]. Dostupné z: <http://access.feld.cvut.cz/view.php?cislocclanku=2010030001>

[10]

RAGUŽ, Marija a Jasminka BRNJAS-KRALJEVIĆ. Resolved Fluorescence Emission Spectra of PRODAN in Ethanol/Buffer Solvents. *Journal of Chemical Information and Modeling*. 2005, roč. 45, č. 6, s. 1636-1640. ISSN 1549-9596. DOI: 10.1021/ci050166p. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ci050166p>

[11]

MRAVEC, Filip. *Fluorescenční spektroskopie ve výzkumu koloidních a asociativních systémů*. ver. 3. Brno, 2006.

[12]

BAAROVÁ, R. *PRODAN a nilská červeň ve studiu chování vodných roztoků modifikovaného hyaluronanu*. Brno, 2006. 65 s. Diplomová práce na Fakultě chemické Vysokého učení technického v Brně. Vedoucí diplomové práce doc. Ing. Miloslav Pekař, CSc.

[13]

HARIANAWALA, Abizer I a Robin H BOGNER. Sensitivity and selectivity of p-(N-dimethylamino cinnamylidene) malononitrile, 6-propionyl-2-(dimethylamino) naphthalene (PRODAN) and fluorescein. *Journal of Luminescence*. 1998, roč. 79, č. 2, s. 97-105. ISSN 00222313. DOI: 10.1016/S0022-2313(98)00034-9. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022231398000349>

[14]

KARUKSTIS, Kerry K. a James R. MCDONOUGH. Characterization of the Aggregates of N -Alkyl- N -methylpyrrolidinium Bromide Surfactants in Aqueous Solution. DOI: 10.1021/la047015l. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/la047015l>

[15]

ADHIKARY, Ramkrishna, Charles A. BARNES a Jacob W. PETRICH. Solvation Dynamics of the Fluorescent Probe PRODAN in Heterogeneous Environments: Contributions from the Locally Excited and Charge-Transferred States. *The Journal of Physical Chemistry B*. 2009-09-03, roč. 113, č. 35, s. 11999-12004. ISSN 1520-6106. DOI: 10.1021/jp905139n. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jp905139n>

[16]

LASAGNA, Mauricio, Victor VARGAS, David M. JAMESON a Juan E. BRUNET. Spectral Properties of Environmentally Sensitive Probes Associated with Horseradish Peroxidase. *Biochemistry*. 1996, roč. 35, č. 3, s. 973-979. ISSN 0006-2960. DOI: 10.1021/bi951983t. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/bi951983t>

[17]

[online]. [cit. 2012-04-16]. Dostupné z: <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=9142>

[18]

VELARDEZ, Gustavo Fabián, Henrik T. LEMKE, Dag W. BREIBY, Martin M. NIELSEN, Klaus Braagaard MØLLER a Niels E. HENRIKSEN. Theoretical Investigation of Perylene Dimers and Excimers and Their Signatures in X-Ray Diffraction. *The Journal of*

Physical Chemistry A. 2008-09-04, roč. 112, č. 35, s. 8179-8187. ISSN 1089-5639. DOI: 10.1021/jp8016375. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jp8016375>

[19]

BARTOVSKÁ, Lidmila a Marie ŠIŠKOVÁ. *Fyzikální chemie povrchů a koloidních soustav*. Vyd. 6., přeprac. Praha: Vydavatelství VŠCHT, 2010, 262 s. ISBN 978-80-7080-745-3.

[20]

KUCEJOVÁ, J. *Interakce kolagenu I se směsí surfaktantů*. Zlín, 2010. Diplomová práce na Fakultě technologické Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně, Vedoucí diplomové práce Ing. Jiří Krejčí, CSc.

[21]

KOGAN, Grigorij, Ladislav ŠOLTÉS, Robert STERN a Peter GEMEINER. Hyaluronic acid: a natural biopolymer with a broad range of biomedical and industrial applications. *Biotechnology Letters*. 2006-12-8, roč. 29, č. 1, s. 17-25. ISSN 0141-5492. DOI: 10.1007/s10529-006-9219-z. Dostupné z: <http://www.springerlink.com/index/10.1007/s10529-006-9219-z>

[22]

SEEBECK, Petra. Hyaluronic acid (Hyaluronan). In: [online]. 2009 [cit. 2012-04-16]. Dostupné z: [http://www.tecomedical.com/downloads/pdf/Hyaluron%20\(e\)%20\(10\).pdf](http://www.tecomedical.com/downloads/pdf/Hyaluron%20(e)%20(10).pdf)

[23]

HASCALL, Vincent C. a Torvard C. LAURENT. Hyaluronan: structure and physical properties. In: [online]. 1997 [cit. 2012-04-16]. Dostupné z: <http://www.glycoforum.gr.jp/science/hyaluronan/HA01/HA01E.html>

[24]

SCOTT, John E. Secondary and tertiary structures of hyaluronan in aqueous solution. Some biological consequences. In: [online]. 1998 [cit. 2012-04-16]. Dostupné z: <http://www.glycoforum.gr.jp/science/hyaluronan/HA02/HA02E.html>

[25]

ALMOND, A. Hyaluronan. DOI: 10.1007/s00018-007-7032-z. Dostupné z: <http://www.springerlink.com/index/10.1007/s00018-007-7032-z>

[26]

KARUKSTIS, Kerry K., April A. FRAZIER, Christine T. LOFTUS a August S. TUAN. Fluorescence Investigation of Multiple Partitioning Sites in Aqueous and Reverse Micelles. *The Journal of Physical Chemistry B*. 1998, roč. 102, č. 42, s. 8163-8169. ISSN 1520-6106. DOI: 10.1021/jp980955s. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jp980955s>

[27]

KARUKSTIS, Kerry K., Shelley A. MCCORMACK, Tyrel M. MCQUEEN a Kimberly F. GOTO. Fluorescence Delineation of the Surfactant Microstructures in the CTAB-SOS-H₂O Catanionic System. *Langmuir*. 2004, roč. 20, č. 1, s. 64-72. ISSN 0743-7463. DOI: 10.1021/la0351764. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/la0351764>

[28]

MOYANO, Fernando, M. Alicia BIASUTTI, Juana J. SILBER a N. Mariano CORREA. New Insights on the Behavior of PRODAN in Homogeneous Media and in Large Unilamellar Vesicles. *The Journal of Physical Chemistry B*. 2006, roč. 110, č. 24, s. 11838-11846. ISSN 1520-6106. DOI: 10.1021/jp057208x. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jp057208x>

[29]

ŠACHL, Radek, Miroslav ŠTĚPÁNEK, Karel PROCHÁZKA, Jana HUMPOLÍČKOVÁ a Martin HOF. Fluorescence Study of the Solvation of Fluorescent Probes Prodan and Laurdan in Poly(ϵ -caprolactone)- block -poly(ethylene oxide) Vesicles in Aqueous Solutions with Tetrahydrofurane. *Langmuir*. 2008, roč. 24, č. 1, s. 288-295. ISSN 0743-7463. DOI: 10.1021/la702277t. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/la702277t>

[30]

KOZYRA, K.A., J.R. HELDT a J. HELDT. Influence of spectral heterogeneity of prodan and laurdan solutions on the transfer of electronic energy to octadecyl rhodamine B. *Biophysical Chemistry*. 2006, roč. 121, č. 1, s. 57-64. ISSN 03014622. DOI: 10.1016/j.bpc.2005.11.009. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0301462205003170>

[31]

CWIKLIK, Lukasz, Adelia J. A. AQUINO, Mario VAZDAR, Piotr JURKIEWICZ, Jiří PITTNER, Martin HOF a Hans LISCHKA. Absorption and Fluorescence of PRODAN in Phospholipid Bilayers: A Combined Quantum Mechanics and Classical Molecular Dynamics Study. *The Journal of Physical Chemistry A*. 2011-10-20, roč. 115, č. 41, s. 11428-11437. ISSN 1089-5639. DOI: 10.1021/jp205966b. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jp205966b>

[32]

KHAN, Tapan K. a Parkson Lee-Gau CHONG. Studies of Archaeobacterial Bipolar Tetraether Liposomes by Perylene Fluorescence. *Biophysical Journal*. 2000, roč. 78, č. 3, s. 1390-1399. ISSN 00063495. DOI: 10.1016/S0006-3495(00)76692-6. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006349500766926>

[33]

WALLIN, Torsten a Per LINSE. Monte Carlo Simulations of Polyelectrolytes at Charged Micelles. 3. Effects of Surfactant Tail Length. *The Journal of Physical Chemistry B*. 1997, roč. 101, č. 28, s. 5506-5513. ISSN 1520-6106. DOI: 10.1021/jp970224c. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jp970224c>

[34]

FUKADA, Kazuhiro, Emi SUZUKI a Tsutomu SEIMIYA. Rheological Properties of Sodium Hyaluronate in Decyltrimethylammonium Bromide Aqueous Solutions 1. *Langmuir*. 1999, roč. 15, č. 12, s. 4217-4221. ISSN 0743-7463. DOI: 10.1021/la9811822. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/la9811822>

[35]

LIN, Chi-Ching, Chien-Hsiang CHANG a Yu-Min YANG. Gelation of spontaneously formed catanionic vesicles by water soluble polymers. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 2009, roč. 346, 1-3, s. 66-74. ISSN 09277757. DOI: 10.1016/j.colsurfa.2009.05.027. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0927775709003483>

[36]

POJJÁK, Katalin, Edit BERTALANITS a Róbert MÉSZÁROS. Effect of Salt on the Equilibrium and Nonequilibrium Features of Polyelectrolyte/Surfactant Association. *Langmuir*. 2011-07-06, s. 110706132928079-. ISSN 0743-7463. DOI: 10.1021/la2021353. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/la2021353>

[37]

HALASOVÁ, T., J. KROUSKÁ, F. MRAVEC a M. PEKAŘ. Hyaluronan-surfactant interactions in physiological solution studied by tensiometry and fluorescence probe techniques. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 2011, roč. 391, 1-3, s. 25-31. ISSN 09277757. DOI: 10.1016/j.colsurfa.2011.05.035. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0927775711003621>

[38]

KUBICKI, Aleksander A. Time-resolved emission spectra of stilbene derivatives in various solvents. *Chemical Physics Letters*. 2009, roč. 483, 4-6, s. 268-272. ISSN 00092614. DOI: 10.1016/j.cplett.2009.10.090. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0009261409013852>

[39]

GUPTASARMA, P. Resolving multiple protein conformers in equilibrium unfolding reactions: A time-resolved emission spectroscopic (TRES) study of Azurin. *Biophysical Chemistry*. 1997, roč. 65, 2-3, s. 221-228. ISSN 03014622. DOI: 10.1016/S0301-4622(96)02244-2. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0301462296022442>

[40]

TOPTYGIN, Dmitri, Regina S. SAVTCHENKO, Norman D. MEADOW a Ludwig BRAND. Homogeneous Spectrally- and Time-Resolved Fluorescence Emission from Single-Tryptophan Mutants of IIA Glc Protein. *The Journal of Physical Chemistry B*. 2001, roč. 105, č. 10, s. 2043-2055. ISSN 1520-6106. DOI: 10.1021/jp003405e. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jp003405e>

[41]

KUMAR SATPATI, Ashis, Manoj KUMBHAKAR, Dilip KUMAR MAITY a Haridas PAL. Photophysical investigations of the solvent polarity effect on the properties of coumarin-6 dye. *Chemical Physics Letters*. 2005, roč. 407, 1-3, s. 114-118. ISSN 00092614. DOI: 10.1016/j.cplett.2005.03.070. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0009261405004008>

[42]

PARK, Jong-Ho Park et al. Dependence of Salt in Water-in-Crude Oil Emulsion System. *Journal of the Korean Physical Society*. 2005.

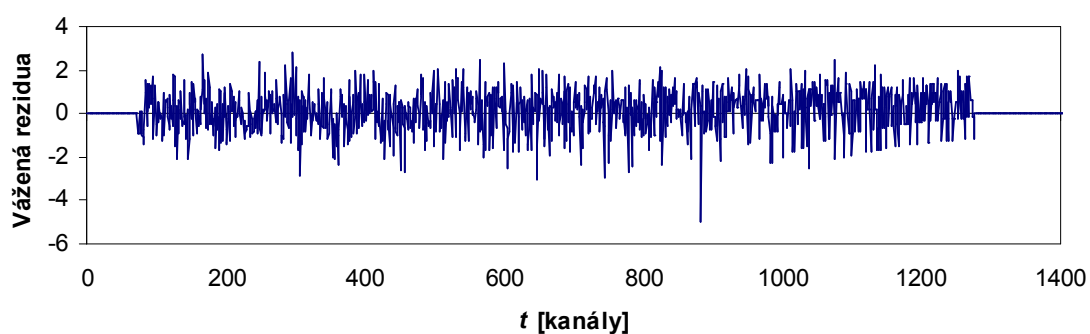
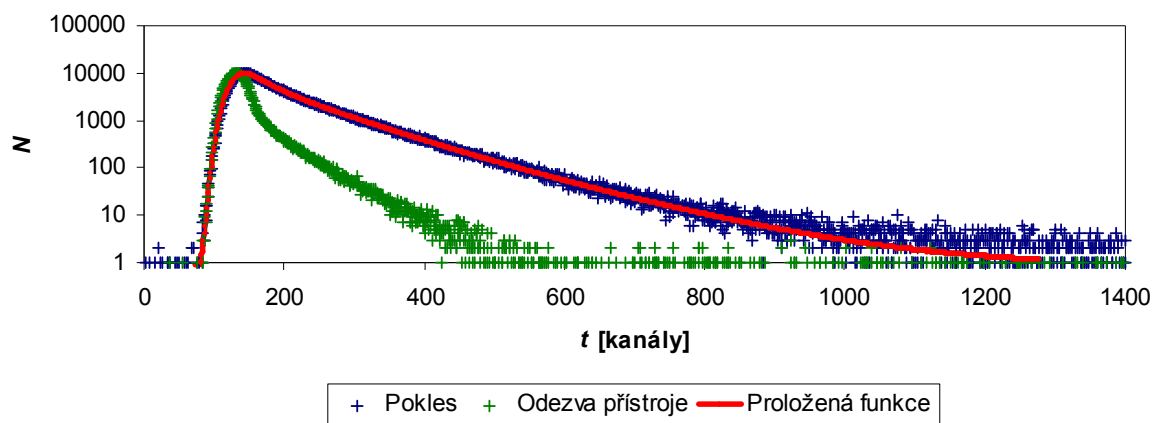
[43]
LOUISIANA STATE UNIVERSITY MACROMOLECULAR STUDIES GROUP
SERVER. [online]. [cit. 2012-04-25]. Dostupné z:
<http://macro.lsu.edu/HowTo/solvents/Dielectric%20Constant%20.htm>

[44]
LOUISIANA STATE UNIVERSITY MACROMOLECULAR STUDIES GROUP
SERVER. [online]. [cit. 2012-04-25]. Dostupné z:
<http://macro.lsu.edu/HowTo/solvents/Refractive%20Index.htm>

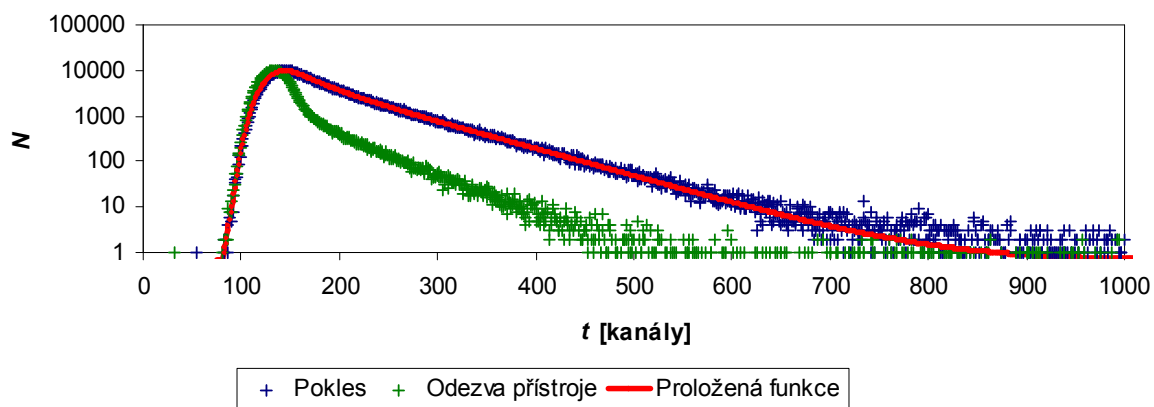
7 SEZNAM ZKRATEK

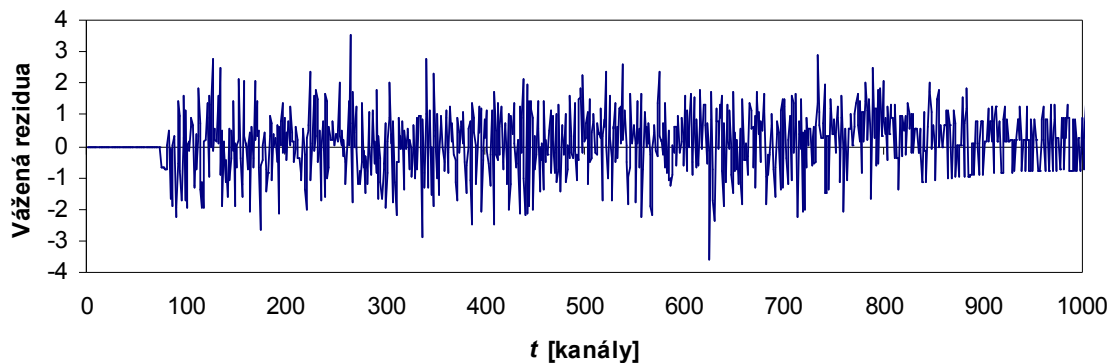
ADC	analog-to-digital converter (analogově digitální převodník)
CAC	kritická agregační koncentrace
CFD	constant function discriminator ("diskriminátor konstantní funkce")
CMC	kritická micelární koncentrace
CTAB	cetyltrimethylamonium bromid
FWHM	the full width of the half maximum intensity
HA	hyaluronová kyselina
IRF	instrument response function (funkce přístrojové odezvy)
NLLS	nonlinear least squares (metoda nejmenších čtverců)
PAL	povrchově aktivní látky
PGA	programmable gain amplifier ("programovatelný výsledný zesilovač")
TAC	time-to-amplitude convertor (převodník času na amplitudu)
TCSPC	time-correlated single photon counting (metoda časově korelovaného čítání fotonů)
TRES	time-resolved emission spectra (časově rozlišená emisní spektra)
WD	window discriminator

8 PŘÍLOHY

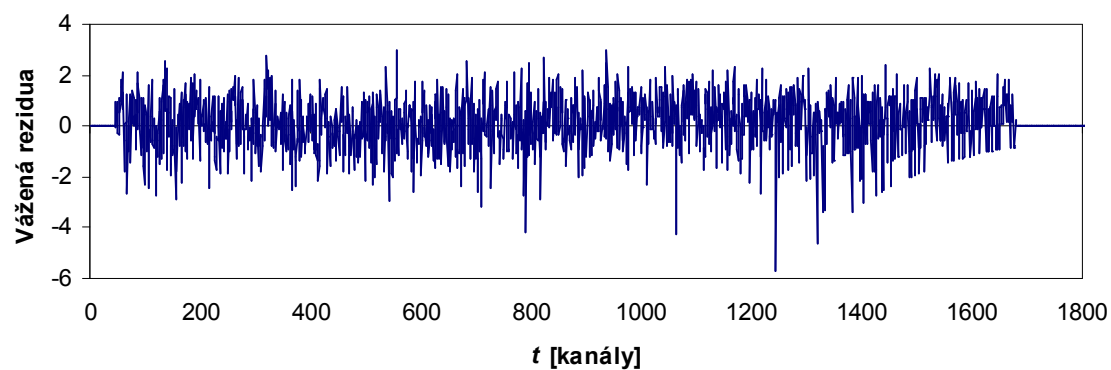
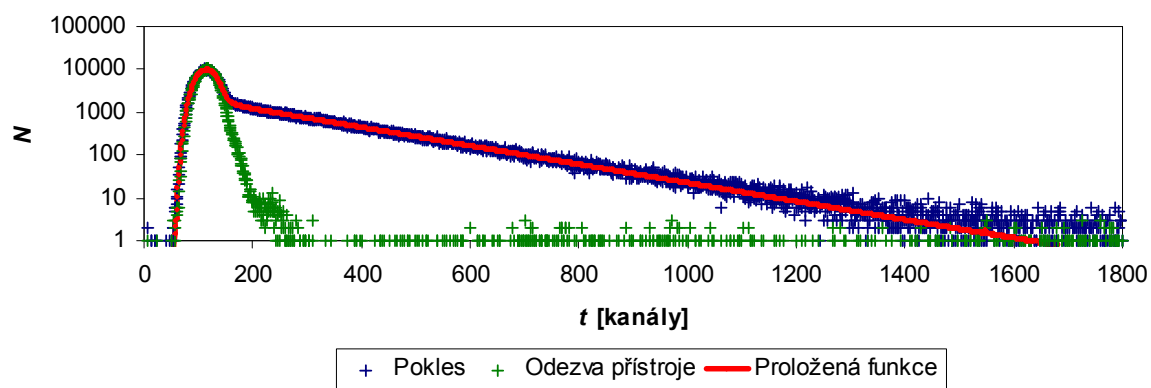


Příloha 1: TCSPC data prodanu u vzorku č. 5 v systému HA – CTAB ve vodném prostředí (měřeno při vyřazeném emisním monochromátoru)





Příloha 2: TCSPC data prodanu u vzorku č. 5 v systému HA – CTAB v přítomnosti soli (měřeno při vyřazeném emisním monochromátoru)



Příloha 3: TCSPC data perylenu u vzorku č. 4 v systému HA – CTAB ve vodném prostředí (měřeno při vyřazeném emisním monochromátoru)