

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

INTERAKCE HYALURONANU S HYDROFOBními SOLUTY

DIPLOMOVÁ PRÁCE
DIPLOMA THESIS

AUTOR PRÁCE
AUTHOR

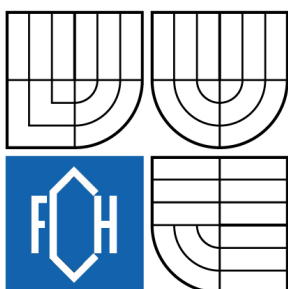
DAGMAR SLEZÁKOVÁ

BRNO 2008



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ

ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE

FACULTY OF CHEMISTRY

INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

INTERAKCE HYALURONANU S HYDROFOBními SOLUTY

HYALURONANE INTERACTIONS WITH HYDROPHOBIC SOLUTES

DIPLOMOVÁ PRÁCE

DIPLOMA THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

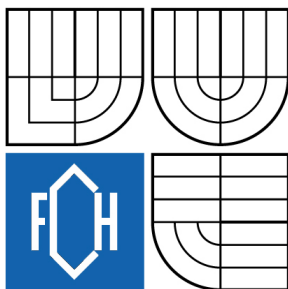
DAGMAR SLEZÁKOVÁ

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

doc. Ing. MILOSLAV PEKAŘ, CSc.

BRNO 2008



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

Zadání diplomové práce

Číslo diplomové práce	FCH-DIP0144/2007	Akademický rok: 2007/2008
Ústav	Ústav fyzikální a spotřební chemie	
Student(ka)	Slezáková Dagmar	
Studijní program	Spotřební chemie (M2806)	
Studijní obor	Spotřební chemie (2806T002)	
Vedoucí diplomové práce	doc. Ing. Miloslav Pekař, CSc.	
Konzultanti diplomové práce	Ing. Filip Mravec	

Název diplomové práce:

Interakce hyaluronanu s hydrofobními soluty

Zadání diplomové práce:

1. Literární rešerše na téma využití spektroskopických metod ve studiu interakcí koloidních roztoků a hydrofobních solutů.
2. Návrh experimentů pro koloidy na bázi hyaluronanu, zejména alkylovaného, zahrnujících i studium vlivu způsobu substituce.
3. Provedení experimentů.
4. Vyhodnocení experimentů především z hlediska potenciální použití hyaluronanu jako nosiče aktivních substancí v medicíně či kosmetice.

Termín odevzdání diplomové práce: 16.5.2008

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

Dagmar Slezáková
student(ka)

doc. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
Vedoucí práce

Ředitel ústavu

V Brně, dne 1.9.2007

doc. Ing. Jaromír Havlica, CSc.
Děkan fakulty

ABSTRAKT

Diplomová práce se zabývá hydrofobními interakcemi nativního hyaluronanu s vybranými soluty. Na základě literárních rešerší byly vybrány fluorescenční sondy a fluoreskující biologicky aktivní látky, které se využívají právě ke studiu koloidních roztoků biopolymerů, a to 6-(*p*-toluidino)-2-naftalensulfonová kyselina (polaritní sonda), lipofilní vitamín (\pm)- α -tokoferol, pyren (polaritní sonda) a hydrofilní vitamín riboflavin.

V experimentální části byl studován vliv rozpouštědel s různou polaritou, respektive relativní permitivitou, na emisní spektra. Byly studovány interakce nativního hyaluronanu s TNS, dále interakce s vlivem iontové síly, které však nebyly prokázány, což bylo pravděpodobně způsobeno dostatečně silným solvatačním obalem hyaluronanu. Prokázání interakce se podařilo až po procesu lyofilizace a následné rehydratace vzorků. Další studium interakcí bylo prováděno s biologicky aktivní látkou riboflavinem, a to pomocí měření REES efektu v nativním hyaluronanu o různých koncentracích a různých molekulových hmotnostech. Nedošlo však k posunům emise, a tak se nepodařilo prokázat interakce riboflavinu s HA v rámci zvolených koncentrací. Použitím další biologicky aktivní látky – α -tokoferolu bylo zkoumáno asociativní chování hyaluronanu a také byla sledována anizotropie fluorescence α -tokoferolu v různých koncentracích a molekulových hmotnostech nativního hyaluronanu. Anizotropie fluorescence dosahovala vysokých hodnot v porovnání s referenčním roztokem směsi glycerol-ethanol, které však závisely více na molekulové hmotnosti než na koncentraci hyaluronanu. Prokázání interakcí hyaluronanu bylo studováno také pomocí polaritní sondy pyren v různých koncentracích a molekulových hmotnostech hyaluronanu. Poměr 1:3 nevykazoval koncentrační závislost v rámci vybraných koncentrací až na molekulovou hmotnost $253,9 \text{ kg mol}^{-1}$. Jak α -tokoferol, tak i pyren byly podrobeny lyofilizaci a následné rehydrataci, což vedlo ke zlepšení interakcí těchto sond s hyaluronanem.

ABSTRACT

The diploma thesis is based on the study of hydrophobic interactions of the native hyaluronan with selected solutes. On the basis of a literature search were chosen fluorescent probes and fluorescing biologically active substances, which are useful for investigation of colloids as 6-(*p*-toluidino)-2-naphthalenesulfonic acid (polarity probe), lipophilic vitamin α -tocopherol, pyrene (polarity probe) and finally hydrophilic vitamin riboflavin.

In the experimental part of this thesis was studied the influence of solvents with different polarities, or more precisely dielectric constant, on the emission spectra, as well. There were investigated interactions of native hyaluronan with TNS and then interactions, which were influenced by ionic strength. Such influenced interactions were not observed, that was probably due to the strong solvation's wrapping of the hyaluronan. Interactions were observed after the process of lyophilisation followed-up by the rehydration of the samples. For the next study of interactions the riboflavin was chosen and was investigated the REES effect in the native hyaluronan in different concentrations of its different molecular weights. In this case were not observed any shifts in the emission maximum with the excitation wavelength shift and that is why the interactions of hyaluronan with riboflavin were not demonstrated in the field of chosen concentrations. By using another biologically active substance – α -tocopherol was investigated the associative behaviour of hyaluronan and moreover was observed anisotropy of α -tocopherol in different concentrations of different molecular weights of native hyaluronan. The anisotropy reached high values in contrast to the reference solute that was the mixture of glycerol and ethanol. The anisotropy depended more on the molecular weight than on the concentration of hyaluronan. Interactions of hyaluronan were also studied by using the polarity probe pyrene in different concentrations of different molecular weights of the hyaluronan. The pyrene 1:3 ratio did not show the concentration dependence within the chosen concentrations except for the molecular weight $253.9 \text{ kg mol}^{-1}$. Both probes

α -tocopherol and pyrene were performed by the process of lyophilisation followed-up by the rehydratation, which improved interactions of these probes with hyaluronan.

KLÍČOVÁ SLOVA

Fluorescence, fluorescenční sondy, 6-(*p*-toluinido)-2-naftalensulfonová kyselina, (\pm)- α -tokoferol, pyren, riboflavin, relaxace rozpouštědla, REES efekt, emisní anizotropie.

KEYWORDS

Fluorescence, fluorescent probes, 6-(*p*-toluidino)-2-naphthalenesulfonic acid, (\pm)- α -tocopherol, pyrene, riboflavin, solvent relaxation, REES effect, emission anisotropy.

SLEZÁKOVÁ, D. *Interakce hyaluronanu s hydrofobními soluty*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2008. 59 s. Vedoucí diplomové práce doc. Ing. Miloslav Pekař, CSc.

PROHLÁŠENÍ

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

.....
podpis diplomanta

Poděkování

Velmi bych chtěla poděkovat vedoucímu mé diplomové práce Doc. Ing. Miloslavu Pekařovi CSc. za jeho cenné rady a konzultantovi mé diplomové práce Ing. Filipu Mravcovi za velkou podporu, vedení při vypracování této diplomové práce, za drahocenné rady, trpělivost a vstřícnost. A v neposlední radě celé své rodině za velkou podporu při studiu.

OBSAH

1	ÚVOD	8
2	TEORETICKÁ ČÁST	9
2.1	Kyselina hyaluronová.....	9
2.1.1	Struktura v roztocích	9
2.1.2	Výskyt	10
2.1.3	Funkce	10
2.1.4	Syntéza	10
2.2	Micelární (asociativní) koloidy	11
2.2.1	Struktura molekul asociujících povrchově aktivních látek	11
2.2.1.1	Tvorba micel	12
2.2.2	Kritická micelární koncentrace	12
2.2.3	Solubilizace	13
2.3	Fluorescenční spektroskopie	14
2.3.1	Luminiscence	14
2.3.1.1	Fluorescence	15
2.3.1.2	Fosforescence	15
2.3.1.3	Zpožděná fluorescence	16
2.3.2	Spektra molekul.....	16
2.3.3	Zákony a postuláty	16
2.3.3.1	Stokesův zákon.....	16
2.3.3.2	Stokesův posuv.....	17
2.3.3.3	Kashovo pravidlo	17
2.3.3.4	Vavilovy postuláty	17
2.3.3.5	Vavilovo pravidlo.....	17
2.3.3.6	Jermolajevovo pravidlo	17
2.3.3.7	Zákon zrcadlové symetrie	18
2.3.3.8	Franck – Condonův princip.....	18
2.3.4	Jabloňského diagram.....	18
2.3.5	Fluorescenční sondy.....	19
2.3.5.1	TNS	20
2.3.5.2	Pyren.....	20
2.3.6	Fluoreskující biologicky aktivní látky.....	21
2.3.6.1	Riboflavin.....	21
2.3.6.2	α -tokoferol.....	21
2.3.7	Vliv rozpouštědla na emisi fluorescence.....	22
2.3.8	REES efekt	23
2.3.8.1	Význam	23
2.3.8.2	Vznik	23
2.3.8.3	Podmínky vzniku.....	24
2.3.8.4	Aplikace	24
2.3.9	Emisní anizotropie.....	24
2.3.9.1	Excitace polarizovaným světlem.....	25
2.3.9.2	Průběh měření	25
2.3.9.3	Charakteristické vztahy	26
2.3.9.4	Aplikace	26
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	27

3.1	Použité chemikálie	27
3.2	Použité přístroje.....	27
3.3	Zásobní roztoky fluorescenčních sond a fluoreskujících biologicky aktivních látek	28
3.4	Standardní postup přípravy vzorků pro všechny vybrané sondy	29
4	VÝSLEDKY A VYHODNOCENÍ.....	30
4.1	Experimenty s polaritní sondou TNS	30
4.1.1	Vliv polaritní prostředí na intenzitu emisního záření TNS	30
4.1.1.1	Polaritní řada rozpouštědel.....	30
4.1.1.2	Směsi rozpouštědel s vodou	31
4.1.2	Studium interakce nativního hyaluronanu s TNS	32
4.1.3	Vliv iontové síly na interakce nativního hyaluronanu se sondou TNS	33
4.1.4	Vliv teploty na studium vlivu iontové síly na interakce nativního hyaluronanu se sondou TNS	35
4.1.5	Další postup pro interakci HA s TNS – proces „oil-in-water emulsion“	37
4.2	Experimenty s riboflavinem	38
4.2.1	Vliv polaritní prostředí na intenzitu emisního záření riboflavinu	38
4.2.1.1	Polaritní řada rozpouštědel.....	38
4.2.1.2	Směsi rozpouštědel s vodou	40
4.2.2	Studium hydrofobních interakcí riboflavinu s nativním hyaluronanem pomocí měření REES efektu.....	41
4.3	Experimenty s α -tokoferolem.....	42
4.3.1	Vliv polaritní prostředí na intenzitu emisního záření α -tokoferolu.....	42
4.3.2	Asociace nativního hyaluronanu s α -tokoferolem.....	44
4.3.3	Studium hydrofobních interakcí α -tokoferolu s nativním hyaluronanem pomocí měření REES efektu.....	45
4.3.4	Měření anizotropie α -tokoferolu	45
4.3.4.1	α -tokoferol ve směsi glycerol/ethanol.....	45
4.3.4.2	α -tokoferol v nativním hyaluronanu.....	47
4.4	Experimenty s polaritní sondou pyrenem.....	49
4.4.1	Vliv polaritní prostředí na intenzitu emisního záření pyrenu.....	49
4.4.2	Studium interakcí pyrenu s hyaluronanem.....	50
4.4.3	Studium asociace hyaluronanu s pyrenem	51
4.4.4	Další postup pro interakci HA s pyrenem – proces „oil-in-water emulsion“	52
4.5	Proces lyofilizace u TNS, α -tokoferolu a pyrenu.....	53
5	ZÁVĚR	55
6	SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ	57
7	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ	59

1 ÚVOD

Vzhledem k již dlouhodobé spolupráci Fakulty chemické v Brně s českou biotechnologickou firmou Contipro Group s.r.o, která se zabývá výrobou hyaluronanu a jeho modifikované formy, byla diplomová práce založena na studiu interakcí právě tohoto polysacharidu, který by se díky své sekundární struktuře mohl stát dobrým nosičem hydrofobních látek.

Kyselina hyaluronová, která je přirozenou součástí lidského těla, zajišťuje dokonalou hydrataci pokožky. Zvýšené množství kyseliny hyaluronové obsahuje i lidské embryo, jemuž narůstá ocásek, který dalším vývojem opět zmizí a nenechává za sebou jedinou jizvu. A tento poznatek je důležitým předpokladem k tomu, že právě kyselina hyaluronová zajišťuje optimální organizaci pojivové tkáně v místě srůstu – hojení. Po narození má člověk $4 \cdot 10^6 \text{ kg mol}^{-1}$ dlouhý řetězec kyseliny hyaluronové, který se s věkem zkracuje. A proto dochází k poklesu obsahu vody ve vazivu, snižuje se imunitní schopnost a s tím související zhoršování vlastností pokožky. Vznikají vrásky, klesá pružnost a objevují se poruchy tvorby vlasu. Tento pokles molekulové délky řetězce způsobují volné radikály a během života prodělané infekce, které jsou vždy doprovázeny účinky hyaluronidáz – enzymů štěpících kyselinu hyaluronovou. Pokud se aplikuje vysokomolekulární komplex, může aktivovat tvorbu vlastního hyaluronového komplexu o větší délce. Výsledkem je pak mladiství vzhled pokožky (regenerace i po opalování), pozitivní vliv na kvalitu vlasů a v neposlední řadě zlepšení pohyblivosti pohybového aparátu.

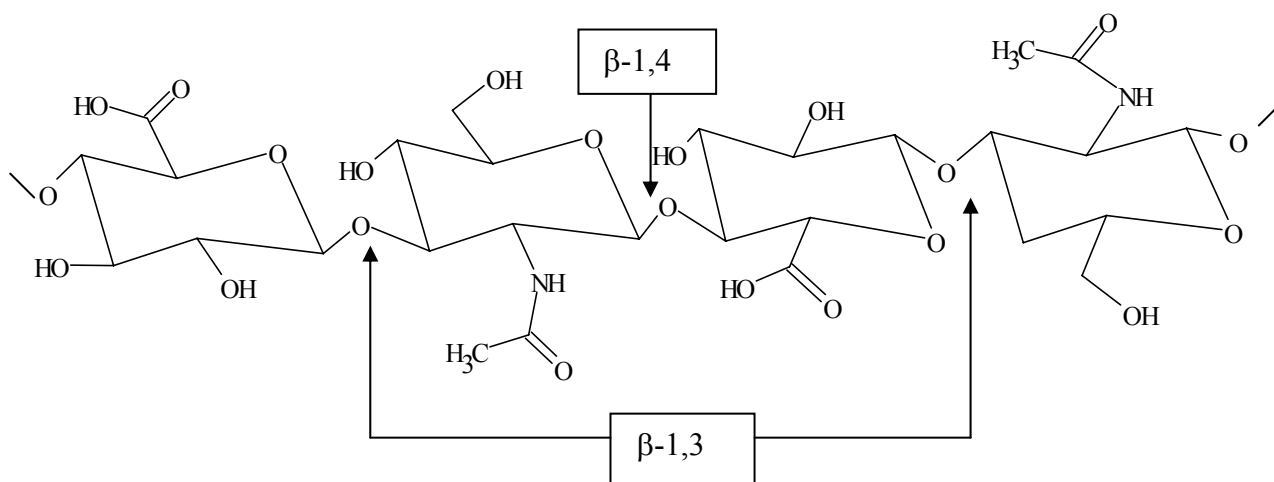
Díky svým jedinečným hydratačním a elastickým vlastnostem nachází kyselina hyaluronová uplatnění i v oční chirurgii. Uvažuje se také o využití modifikovaného hyaluronanu jako nosičového systému při léčbě nádorových onemocněních.

Všechny experimenty byly prováděny v nativním hyaluronanu o různých molekulových hmotnostech. Následně měly být studovány i nové modifikované hyaluronany, ale kvůli jejich nedeřešené syntéze nebyly k dispozici. A tak se hlavním studovaným systémem tedy stal především nativní hyaluronan. Studovanými hydrofobními látkami byly fluorescenční sondy – TNS a pyren a biologicky aktivní látky – lipofilní vitamín α -tokoferol a ve vodě velmi slabě rozpustný vitamín riboflavin, které byly zvoleny na základě literárních rešerší. Interakce nativního hyaluronanu s vybranými sondami a látkami byly zkoumány pomocí fluorescenčních technik, které poskytují široké spektrum informací o vlastnostech zkoumaných látek. Mezi hlavní sledované veličiny patřila emisní spektra a jejich maxima, intenzity fluorescence, popřípadě hodnoty anizotropie.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Kyselina hyaluronová

V roce 1934 Karl Meyer a jeho asistent John Palmer popsali proces izolace nového glukosaminu ze sklivce hovězího oka. Prokázali, že tato látka obsahuje „uronic acid“ a aminocukr. Z toho vznikl samotný název kyseliny, a to složený ze dvou slov. Prvním z nich je hyaloid, což je sklivec, a druhým uronová kyselina. Jde tedy o polysacharid, který je tvořen neustále se opakujícím řetězcem disacharidových jednotek, D-glukuronové kyseliny a *N*-acetyl-D-glukosaminu. Tyto disacharidové jednotky jsou mezi sebou vázány glykosidickou vazbou β -1,4 a β -1,3 (Obr. 1). [1], [2]



Obr. 1 Struktura kyseliny

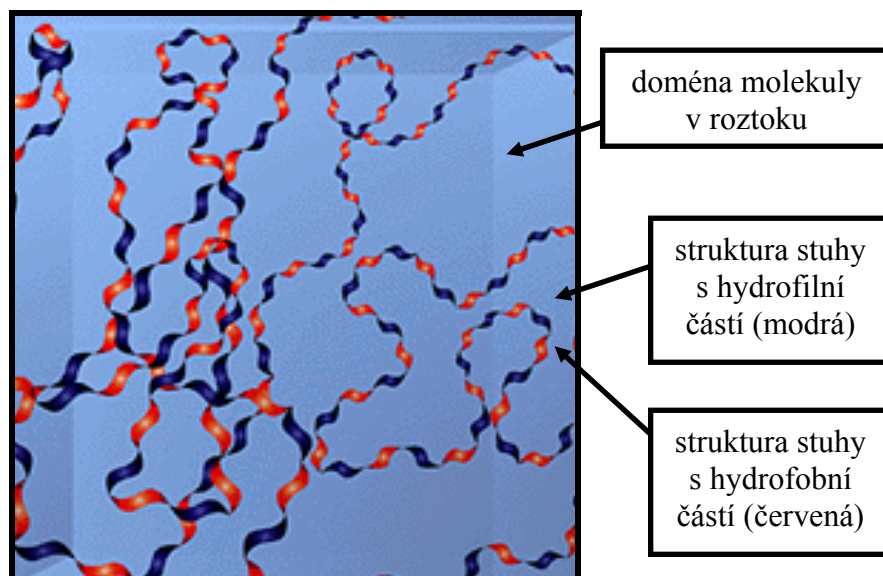
2.1.1 Struktura v roztocích

Ve fyziologických roztocích je hlavní řetězec molekuly kyseliny vyztužen vodíkovými vazbami, které vznikají mezi disacharidovými jednotkami kyseliny a molekulami vody. Dochází tedy k vzájemnému ovlivňování s rozpouštědlem. Axiální uhlíky vytvářejí nepolární tedy hydrofobní část, zatímco ekvatoriální části řetězce vytvářejí více polární, respektive hydrofilní část. Takto vzniká struktura ve tvaru zkroucené stuhy. Z toho vyplývá, že molekula hyaluronanu ve fyziologických roztocích nabude roztaženou spirálovitou strukturu, která zaujímá velikou doménu (Obr. 2).

Doménová struktura hyaluronanu má velmi zajímavé a důležité důsledky. Malé molekuly jako je voda, elektrolyt a živiny mohou volně difundovat rozpouštědlem uvnitř domény. Zatímco velké molekuly jako jsou proteiny, které budou z domény částečně vyjmuty kvůli své hydrodynamické velikosti v roztoku.

Všechny molekuly projdou sítí hyaluronanu, ale budou zpomaleny v závislosti na jejich hydrodynamickém objemu.

Hodnota pK karboxylových skupin na zbytcích glukuronové kyseliny je 3-4 v závislosti na iontových podmínkách. Při pH 7 jsou tyto skupiny převážně ionizovány a molekula hyaluronanu se stává polyaniontem, který se stává výměnným kationem párového iontu sloužící k udržení neutrálního náboje. Řídící tok elektrolytu přes polyaniontovou doménu může vést k vhodné separaci náboje a k vytvoření potenciálního proudění.



Obr. 2 Model hyaluronové stuhu v trojrozměrné doméně

2.1.2 Výskyt

Kyselinu hyaluronovou najdeme u všech obratlovců a u některých živočichů s hřbetní strunou. Můžeme ji nalézt i u některých druhů Streptokoků, kteří parazitují na enzymatickém mechanismu kvůli své syntéze na obratlovcích jako hostitelích.

Kyselina hyaluronová je součástí extracelulární hmoty. Nachází se v synoviální tekutině, kde má za úkol zvyšovat viskozitu tekutiny. Společně s lubricinem patří mezi důležité lubrikační komponenty.

V neposlední řadě je kyselina hyaluronová nepostradatelnou součástí kloubní chrupavky. Vznikají zde proteoglykanové agregáty, které se napojují pomocí spojovacích proteinů na vlákno kyseliny hyaluronové a vzniká velká makromolekula. Tyto agregáty absorbují vodu, což má pozitivní vliv na pružnost chrupavky a její odolnost vůči tlaku. Splňuje tedy funkci mazadla. Molekulová váha kyseliny hyaluronové v chrupavce s věkem klesá, přestože se její množství zvyšuje.

Svou významnou roli hraje kyselina hyaluronová i v kůži, kde je její funkce spojená s posílením tkáně. Pokud je kůže vystavena přílišnému UVB záření, dochází k úžehu a buňky škály přestanou kyselinu produkovat. To má za příčinu zvýšení stupně degradace. [1]

2.1.3 Funkce

Kyselina hyaluronová vyskytující se v extracelulárním prostoru interaguje s buňkami pomocí specifických receptorů. Jedním z hlavních je receptor CD44. Patří mezi adhezivní receptory transmembránových glykoproteinů a je významnou proteoglykanovou složkou mezibuněčné hmoty. Proteoglykanová forma receptoru CD44 má vysokou afinitu i k dalším tkáňovým složkám jako je kolagen a osteopontin, stejně tak i růstové faktory a cytokiny. Interakce kyseliny hyaluronové a receptoru CD44 musí být regulovaná. Cytokiny tedy aktivují buňky, které mají na povrchu kyseliny hyaluronové, a tak dochází ke zvýšení vazby mezi receptorem CD44 a kyselinou hyaluronovou. Celý proces probíhá na molekulární úrovni. [1], [3]

2.1.4 Syntéza

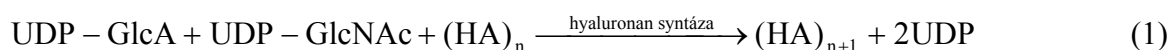
Kyselina hyaluronová je syntetizována skupinou integrálních membránových proteinů, nazývaných hyaluronan syntetázy. Obratlovcí mají tři typy těchto membránových proteinů –

HAS1, HAS2 a HAS3. Tyto tři enzymy prodlužují řetězec kyseliny hyaluronové opakovaným připojováním kyseliny glukuronové a *N*-acetylglukosaminu na vznikající polysacharid dokud nedojde k jeho vytlačení přes buněčnou membránu do extracelulárního prostoru.

Syntéza kyseliny hyaluronové probíhá fermentačním procesem za účelem získat funkčně schopné polymery.

Samotný výzkum je zaměřen na produkci kyseliny hyaluronové v *Streptococcus Zooepidemicus*. Studie je zaměřena zejména na vliv procesních parametrů na vlastnosti spojené s molekulovou hmotností, která hraje velmi významnou roli. Nízká teplota růstu (28 °C), vysoká počáteční koncentrace glukosy (40 g L⁻¹) a provzdušňování kultury patří mezi fermentační parametry, které způsobují již zmiňovanou vyšší molekulovou hmotnost. Proces míchání a pH molekulovou váhu kyseliny hyaluronové neovlivňují.

Enzymy hyaluronan syntázy patří mezi membránové enzymy a řídí dvě různé enzymatické aktivity, tzv. soutěžící procesy. Patří sem biosyntéza kyseliny hyaluronové a růst samotné buňky bakterií. Tyto dva procesy soutěží o omezené zdroje uhlíku, dusíku a energie. Pokud je rychlost růstu buňky nízká, dochází k syntéze kyseliny hyaluronové glukosou aktivovanými prekurzory (UDP-GlcA a UDP-GlcNAc).



Stupeň produkce kyseliny hyaluronové roste, když klesá rychlost růstu buňky. Hustotu enzymů, které syntetizují kyselinu hyaluronovou nejde měnit, proto se vyšší rychlost produkce dá přisoudit vyšší rychlosti polymerizace v syntézách. Zvýšená aktivita syntéz může vycházet z vyšší koncentrace mezibuněčného substrátu, který je výsledkem nízké rychlosti růstu. [1]

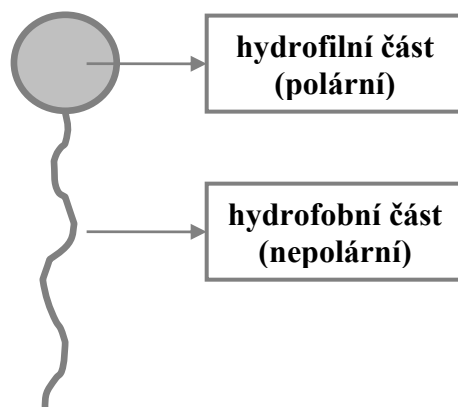
2.2 Micelární (asociativní) koloidy

Zvolí-li se vhodné rozpouštědlo, poskytují některé nízkomolekulární látky ve velkých zředěních pravé roztoky, ale při dosažení určité koncentrace asociují jejich molekuly tak, že vznikají částice koloidních rozměrů s relativně nízkou molekulovou hmotností. Takto vzniklé polymolekulární útvary se nazývají *micely* a látky s tímto chováním se označují jako micelární, resp. asociativní koloidy.

Micelární koloidy vznikají samovolným rozpouštěním a jejich vylučování z roztoku se řídí termodynamickými zákony fázových rovnováh. Jejich vlastnosti závisí na okamžitých fyzikálních podmínkách – teplotě, tlaku, koncentraci vlastních i přidaných látek. Micelární koloidy jsou termodynamicky stabilní (do jisté míry lze použít termodynamiku pravých roztoků) a reverzibilní systémy. K nejznámějším micelárním koloidům rozpustným ve vodě patří mýdla, detergenty a tenzidy. [4], [5]

2.2.1 Struktura molekul asociujících povrchově aktivních látek

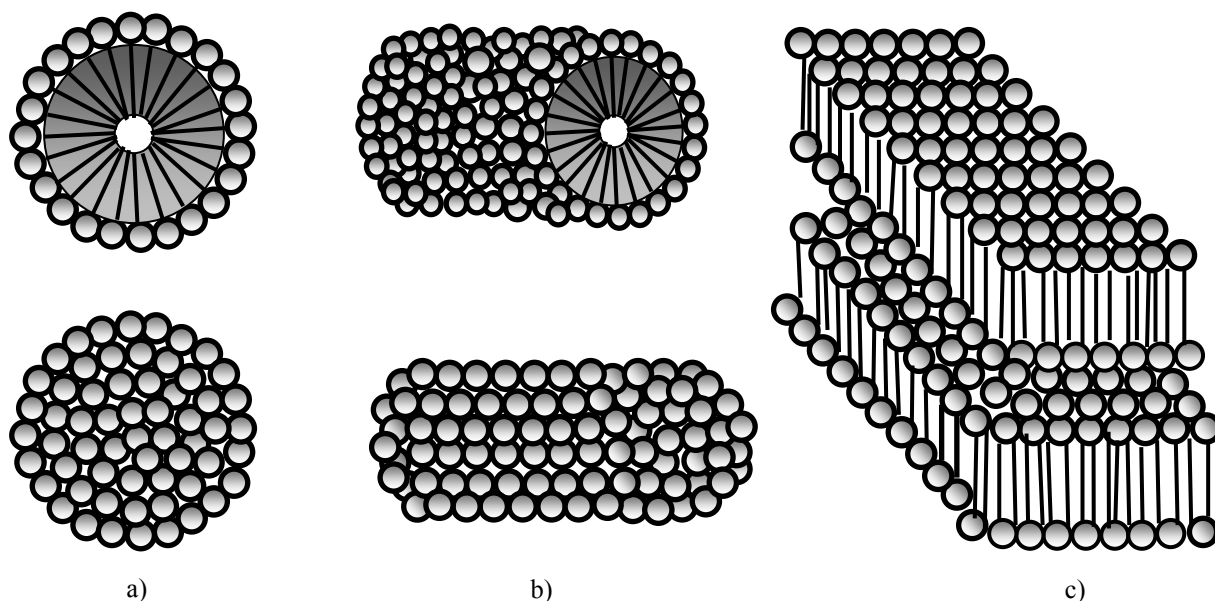
Schopnost vytvářet micely je podmíněna zvláštní strukturou molekul. Vyžaduje, aby molekula obsahovala skupiny, které svou velkou afinitou k rozpouštědлу zaručují značnou rozpustnost (lyofilní), a aby současně druhá část molekuly byla sama o sobě v daném prostředí nerozpustná (lyofobní). Takovéto molekuly se označují jako *amfipatické*, respektive *amfifilní* (Obr. 3). Většinou jsou to povrchově aktivní látky (PAL) rozpustné ve vodě. Lyofilní část (hlava) je tvořena solemi nebo polárně nabitými částicemi, zatímco lyofilní část (ocas) tvoří uhlovodíkový řetězec.



Obr. 3 *Amfipatická molekula*

2.2.1.1 *Tvorba micel*

Při vzniku micely jsou molekuly PAL orientovány hydrofilními částmi molekuly k molekulám vody, zatímco hydrofobní části se uzavírají uvnitř micely. Primární tvar micel při jejich vzniku je kulovitý. Pokud je ovšem koncentrace molekul PAL v roztoku dostatečná, dochází k dalšímu spojování molekul. Původně tedy kulovitá micela se tvarově mění v micely cylindrické nebo lamelární (Obr. 4).



Obr. 4 *Schématické znázornění micel: a) kulovitého tvaru, b) vláknitého tvaru, c) lamelárního tvaru.*

2.2.2 **Kritická micelární koncentrace**

Je to koncentrace, při které se v pravém roztoku micelárního koloidu začínají tvořit micely. Ke vzniku micely je třeba, aby rozpustnost PAL byla vyšší než CMC (některé PAL jsou při laboratorní teplotě málo rozpustné a kvůli zvýšení rozpustnosti se zvyšuje teplota). Teplota, při které PAL dosáhne CMC, je Krafftův bod T_K , jehož hodnota závisí na délce hydrofobní části molekuly. Pro různé látky kolísá CMC v rozmezí od 10^{-5} do 10^{-3} mol L^{-1} . Pod touto koncentrací je micelární koloid v systému pouze ve formě unimerních molekul, zatímco nad touto koncentrací dochází k asociaci molekul do větších celků. [5], [6]

Faktory ovlivňující CMC

- **Vliv chemické struktury**

Především závisí hodnota CMC na struktuře uhlovodíkového řetězce PAL, potom na vlastnostech hydrofobní a hydrofilní skupiny i opačně nabitých iontů.

- **Struktura uhlovodíkového řetězce**

Hodnota CMC s rostoucí délkou uhlovodíkového řetězce klesá. V homologické řadě lze závislost CMC na počtu uhlíků n_C vyjádřit vztahem

$$\ln \text{CMC} = A - B \cdot n_C, \quad (2)$$

kde A je konstanta závislá na teplotě pro danou homologickou řadu, povaze a množství hydrofilních skupin a na substituentech v uhlovodíkovém řetězci. Konstanta B se mění s počtem iontových skupin.

Rozvětvení uhlovodíkového řetězce a přítomnost dvojných vazeb vede ke zvýšení CMC (jedna dvojná vazba zvyšuje CMC 3 - 4krát).

- **Vliv hydrofilní skupiny**

Je dán povahou a zejména nábojem. Při stejné délce uhlovodíkového řetězce je CMC neionogenních PAL nižší než u ionogenních.

- **Vliv protiiontů vzniklých disociací PAL**

CMC klesá se zvyšujícím se nábojem protiiontů.

- **Vliv teploty a tlaku**

Hodnota CMC se s rostoucí teplotou může zvyšovat (u ionogenních PAL) nebo snižovat (u neionogenních PAL).

Změna CMC s rostoucím tlakem je malá i v oblastech velmi vysokých tlaků.

- **Vliv příměsí**

Jednoduché anorganické elektrolyty snižují hodnotu CMC.

Neelektrolyty se projevují různě:

a) *polární látky*: mají komplexní účinky – zvyšují CMC

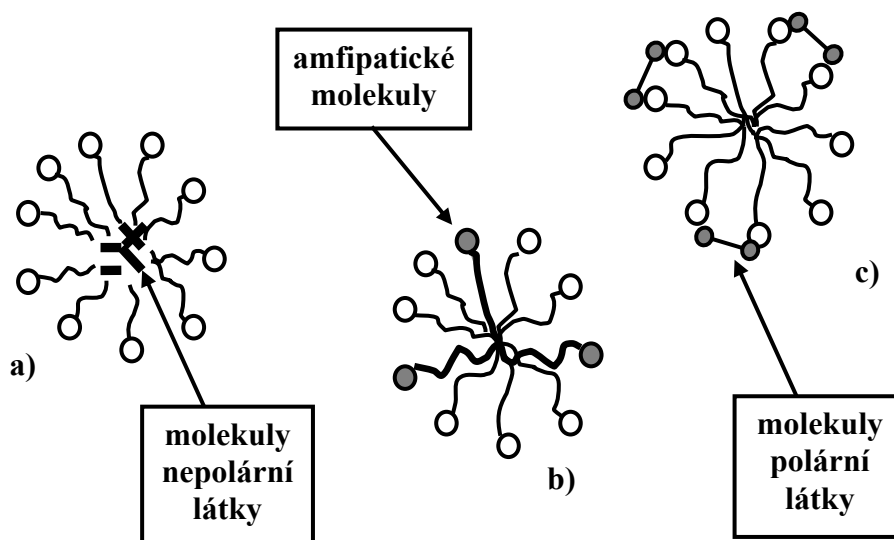
b) *nepolární látky*: snižují CMC (solubilizace do micely a zvětšování objemu) [4]

2.2.3 Solubilizace

Patří mezi významnou vlastnost micelárních koloidů. Je to tedy schopnost rozpouštět i látky v čistém disperzním prostředí nerozpustné. Mechanismus solubilizace je různý. Nepochopitelné látky se rozpouštějí v jádře micely (Obr. 5a), zatímco polární organické látky se rozmísťují v micelách tak, že jejich uhlovodíkové řetězce směřují dovnitř micel a polární části do vodné fáze (Obr. 5b). Polární látky s kratšími řetězci jsou adsorbovány na povrchu micely nebo v těsné blízkosti povrchu (Obr. 5c). Při solubilizaci roste hmotnost micel PAL nejen v důsledku molekul solubilizátů zabudovaných do micely, ale také proto, že se solubilizací zvětší objem hydrofobního jádra a musí se zvětšit i počet molekul PAL tvořících micelu.

Solubilizace má velký praktický význam při detergentu (praní znečištěných povrchů působením PAL), micelární katalýze (orientování a koncentrace molekul solubilizovaných v micelách vede ke změnám kinetiky chemické interakce), emulzní polymeraci nenasycených uhlovodíků (při syntéze latexů). Nachází uplatnění ve farmaceutickém a kosmetickém průmyslu nebo při výrobě herbicidů, insekticidů či fungicidů.

V systémech s nepolárním rozpouštědlem, kde vznikají micely s hydrofilním jádrem a hydrofobním povrchem, dochází k tzv. *obrácené solubilizaci*, které se nejčastěji využívá v potravinářském průmyslu. [5]



Obr. 5 a) Solubilizace nepolárních látek malými micelami aniontové PAL b) solubilizace polárně-nepolárních látek malými micelami aniontové PAL c) solubilizace polárních látek s kratším řetězcem

2.3 Fluorescenční spektroskopie

Za zakladatele a jednoho z prvních průkopníků fluorescenční spektroskopie lze považovat irského matematika a fyzika George Gabriela Stokesa. Narodil se 13. srpna 1819 ve městě Sligo v Irsku. Během studií odešel do Anglie, kde se na univerzitě v Cambridge později stal profesorem matematiky a založil první fyzikální laboratoř. Zabýval se studiem matematiky, mechaniky, matematické a experimentální fyziky, teorie vyšších řad, hydrodynamiky, rovnováhy pružných těles, teorie mořských vln a hlavně studiem spektra absorpce, interference a polarizace světla a difrakce. Stokes dokázal, že fluoreskující látky se stávají světelnými, absorbují-li světlo na ně dopadající tak, že světlem jsou molekuly hmoty uváděny do vibračního pohybu. Stokes se dále zabýval absorpcí světla (zkoumal ultrafialové paprsky) a doplnil teorii duhy.

S fluorescenčními metodami se můžeme setkat nejen v biochemickém a biofyzikálním výzkumu, ale i v klinické chemii, genetických analýzách a při monitorování prostředí.

Fluorescenční spektroskopie je jednou z hlavních metod, která slouží ke studiu uspořádání a dynamiky biologických i modelových membrán díky své rozsáhlé časové škále a vysoké citlivosti. [7], [8]

2.3.1 Luminiscence

Luminiscence je spontánní záření pevných těles nebo kapalných látek, které vzniká jako přebytek záření tělesa nad úroveň jeho tepelného záření v určité spektrální oblasti při dané teplotě. Toto záření má ještě určitou dobu doznívání, tedy trvá i po dobu budícího účinku.

Lze říci, že luminiscence je děj, při kterém záření o kratší vlnové délce vyvolá v látce určitého složení záření o delší vlnové délce.

Vzniká excitací atomů působením jiného záření a následným návratem atomu do základního stavu. Tímto dojde k vyzáření fotonu. Luminiscenci lze tedy pozorovat po jejím ozáření jiným zdrojem záření.

Můžeme ji rozdělit na fluorescenci, fosforescenci a zpožděnou fluorescenci. [8], [9]

2.3.1.1 Fluorescence

Fluorescence je luminiscenční jev, kdy emise záření z excitovaného elektronového stavu nastane jedním či více energetickými přechody. Tento jev končí ihned s osvitěním, je tedy pozorovatelný pouze během buzení a po jeho vypnutí mizí. Doba dohasínání se obvykle pohybuje okolo 10^{-8} s. Fluorescence je tedy spinově dovolený zářivý přechod většinou z rovnovážné vibrační hladiny stavu S_1 do některé z vibračních hladin základního stavu S_0 (Obr. 8). Výjimkou je fluorescence azulenu, kdy energetický rozdíl mezi S_2 a S_1 je srovnatelný s energií deaktivace do základního stavu. (tímto je porušeno Kashovo pravidlo viz. 2.3.3.3). Emise světla je v tomto případě spontánní (excitované částice ztrácí energii vyzářením za absence vnějšího zdroje záření). Rychlostní konstanta takového emise je známá jako Einsteinův faktor A , který poskytuje informaci o jeho době života. Vyjadřuje se pomocí vztahu

$$I = A [X], \quad (3)$$

kde I je intenzita emitovaného světla (energie vyzářená na 1 m^2 plochy za $1 \text{ s} \Rightarrow \tau = 1/A$) a $[X]$ je koncentrace excitované molekuly.

Doba života τ charakterizuje čas, po který bude elektron v excitovaném stavu. Je definována jako čas potřebný k poklesu na $1/e$ hodnotu počáteční intenzity

$$\tau = \frac{1}{k_e}, \quad (4)$$

kde k_e je rychlostní konstanta poklesu emise. Doba života fluorescence je oproti fosforescenci kratší, ale proces fluorescence je velmi rychlý a spinově „dovolený“ díky zachování multiplicity. Rychlostní konstanta fluorescence se pohybuje od $10^6 - 10^9 \text{ s}^{-1}$.

Intenzita fluorescence je charakterizována vztahem

$$I_f = I_{\text{abs}} \Phi_f = I_0 \Phi_f (1 - e^{-\varepsilon_0 d c}), \quad (5)$$

kde I_f je intenzita fluorescence, I_{abs} je intenzita absorbovaného světla a Φ_f je kvantový výtěžek fluorescence.

Fluorescence je nejpravděpodobnější deaktivální proces u atomů za nízkých tlaků. Naproti tomu některé molekuly nefluoreskují vůbec nebo pouze velmi slabě.

Existují jednoduché obecné principy, podle kterých lze odhadnout, zda bude molekula fluoreskovat:

- Absorpce musí nastat zářením o vlnové délce, která nezpůsobí chemickou disociaci.
- Mezisystémový přechod $S_1 \rightarrow T_1$ musí být dostatečně pomalý, aby fluorescenci nekonkuroval.
- Bimolekulární procesy (intramolekulární přenos energie nebo elektronu, fotochemická reakce, atd.) nesmí konkurovat.
- Geometrická uspořádání molekuly (rigidita nebo planarita konjugovaného systému) pozitivně ovlivňují účinnost fluorescence.

Nejjednodušším typem fluorescence je **rezonanční fluorescence**, při které se emituje záření o jedné vlnové délce jako záření absorbované. Lze ji pozorovat pouze v plynné fázi za nízkých tlaků.

2.3.1.2 Fosforescence

Fosforescence je kvantově-mechanicky „zakázaná“ luminiscence, což má za následek delší dobu života ve srovnání s fluorescencí. Fosforescence je emise záření z déle trávajícího metastabilního elektronového stavu (tripletový), který je energeticky níže než stav vzniklý absorpcí světla (singletový) (Obr. 8). Delší doba života má za následek kvantově-mechanicky „zakázaný“ zářivý přechod $T_1 \rightarrow S_0$, neboť dochází ke změně multiplicity. Rychlostní konstanta fosforescence se pohybuje od 10^{-2} do 10^4 s^{-1} . Díky dlouhým dobám života fosforeskujících stavů je srážka s jinou molekulou nejčastější příčinou jejich deaktivace,

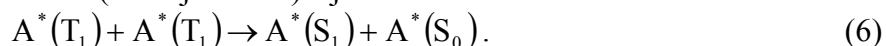
a proto je fosforescence viditelná pouhým okem je málo častá. Ovšem výjimkou je případ, kdy tento tip deaktivace není potlačen. Tohoto lze dosáhnout v tuhých (rigidních) médiích, kde molekuly nejsou schopny difúze a bimolekulární deaktivace je příliš pomalá.

Stejně jako u fluorescence i u fosforescence dochází k porušení Kashova pravidla (2.3.3.3) v případě fosforescence anthracenu. A to tak, že energetický rozdíl mezi T_2 a T_1 je srovnatelný s energií deaktivace do základního stavu.

2.3.1.3 Zpožděná fluorescence

Zpožděná fluorescence je zářivý přechod ze stejného singletového stavu (S_1) jako u fluorescence, ovšem s delší dobou dohasínání danou časem, během kterého je molekula v metastabilním tripletovém stavu. Mezi mechanismy zpožděné fluorescence patří triplet-tripletová anihilace (fluorescence typu P) a termicky aktivovaná zpožděná fluorescence (fluorescence typu E).

Fluorescence typu P je emise záření v souvislosti s přechodem $S_1 \rightarrow S_0$ s dobou života emitujícího stavu, která je srovnatelná s dobou života tripletového stavu. Souvisí s bimolekulární interakcí mezi dvěma tripletovými stavy, která umožní vznik jednoho excitovaného singletového stavu (emituje záření) a jednoho stavu základního dle rovnice



Název této fluorescence je odvozen od molekuly pyrenu, u kterého byla pozorována.

Fluorescence typu E se projevuje při tepelné aktivaci, která způsobí zpětný přechod z T_1 do S_1 . Jeho název je odvozen od názvu molekuly barviva eosin, u kterého byl tento typ fluorescence pozorován. [9]

2.3.2 Spektra molekul

Absorpci kvanta záření se molekuly dostávají do excitovaného stavu, přičemž se mění i vibrační energie molekul. Každá fluoreskující molekula má dvě charakteristická spektra – excitační a emisní.

▪ Excitační spektrum

Je to zjednodušené absorpční spektrum analytu, které je ovlivněno rozložením křivky emise zdroje v předem daném oboru vlnových délek. Excitační spektrum vystihuje relativní účinnost různých vlnových délek excitujícího záření při vyvolání fluorescence. Je to tedy závislost intenzity fluorescence (měří se při konstantní vlnové délce) na vlnové délce excitujícího záření. Pásky excitačního spektra by měly být totožné s pásky spektra absorpčního. Ve skutečnosti se však částečně liší, protože excitační spektrum obsahuje jen ty pásky absorpčního spektra, kde dochází k zářivé deexcitaci – fluorescenci.

▪ Emisní spektrum

Je v různém výtěžku excitováno kteroukoliv vlnovou délkou v oblasti excitačního spektra a je ovlivněno různou citlivostí detektoru v závislosti na vlnové délce. Emisní spektrum je tedy závislostí intenzity fluorescence na vlnové délce excitujícího záření. Toto spektrum bývá většinou obrazem spektra absorpčního a je možné jej excitovat zářením kterékoliv vlnové délky nacházející se uvnitř absorpčního pásu. [11], [12]

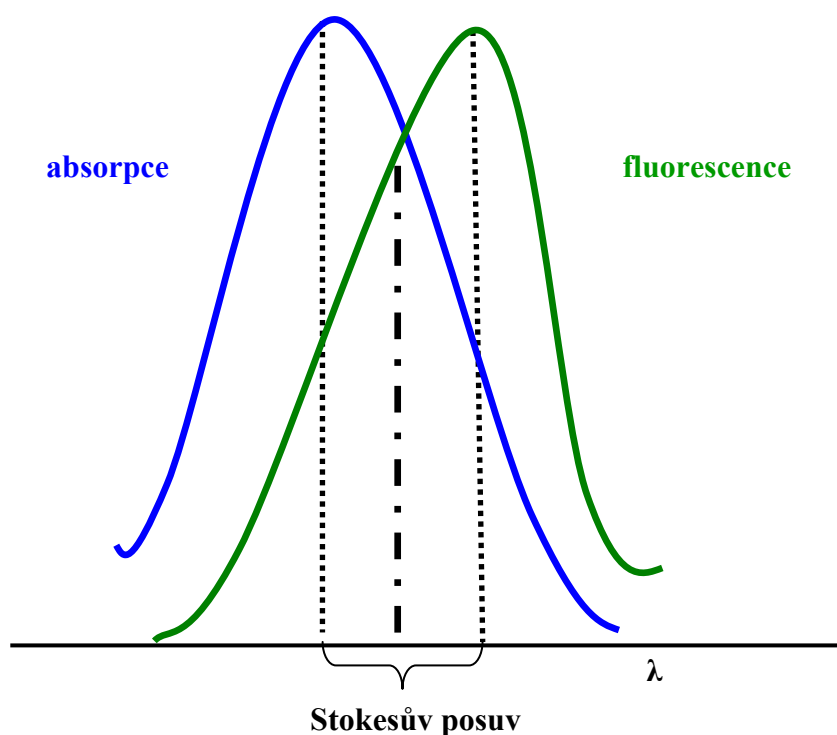
2.3.3 Zákony a postuláty

2.3.3.1 Stokesův zákon

Vlnová délka luminiscenční emise při fotoluminiscenci je větší nebo rovna vlnové ploše excitačního světla ($\lambda_{em} \geq \lambda_{ex}$). [8]

2.3.3.2 Stokesův posuv

Je to rozdíl vlnových délek absorpčního a emisního maxima. Emitované záření má větší vlnovou délku a proto nižší energii (Obr. 6). [12]



Obr. 6 Schéma Stokesova posuvu a zrcadlové symetrie

2.3.3.3 Kashovo pravidlo

Říká, že před emisí fluorescenčního kvanta obvykle dochází k relaxaci vibrační energie a vnitřní konverzi, z čehož plyne, že fluorescenční přechod nastává z nejnižší vibrační hladiny excitovaného stavu S_1 .

2.3.3.4 Vavilovy postuláty

- Při stokesovském buzení fotoluminiscence, kdy frekvence excitačního záření (ν_{ex}) je větší nebo rovna frekvenci průsečíku emisního a excitačního pásu, nemůže být energetický výtěžek luminiscence větší než jedna.
- Při antistokesovském buzení, kdy je frekvence excitačního záření (ν_{ex}) menší než frekvence průsečíku emisního a excitačního pásu, energetický výtěžek luminiscence klesá s růstem tohoto rozdílu, a to tím rychleji, čím je nižší teplota. [8]

2.3.3.5 Vavilovo pravidlo

Je důsledkem Kashova pravidla a říká, že kvantové výtěžky fluorescence a fosforescence nezávisí na energii excitujícího záření.

2.3.3.6 Jermolajevovo pravidlo

Také je důsledkem Kashova pravidla a říká, že součet kvantového výtěžku fluorescence a fosforescence se blíží jedné. [9]

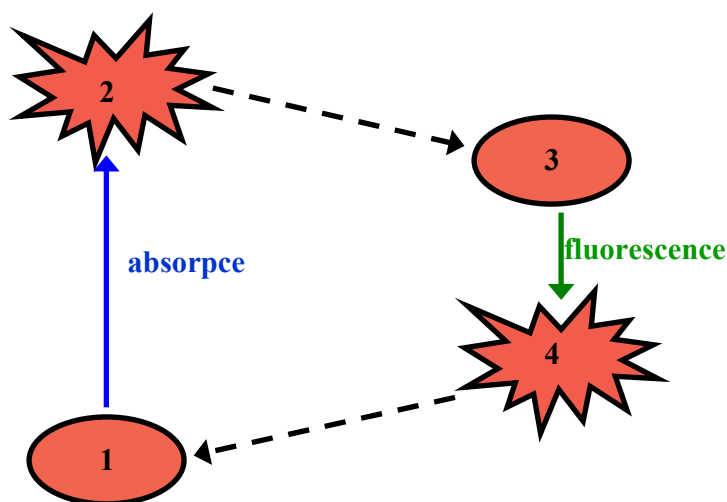
2.3.3.7 Zákon zrcadlové symetrie

Zrcadlová symetrie mezi absorpčním a fluorescenčním pásem (Obr. 6) platí pro mnoho organických molekul. Je způsobena tím, že absorpce i emise z odpovídajících si vibračních hladin mají stejnou relativní pravděpodobnost. Většina absorbujících i emitujících molekul se nachází v rovnovážném vibračním stavu, kdy vibrační struktura základního i excitovaného stavu mají stejnou strukturu. Po absorpci přechází elektron z rovnovážné vibrační hladiny stavu S_0 na vyšší vibrační hladinu stavu S_1 . Teprve potom nastává zářivý přechod na vyšší vibrační hladinu stavu S_0 a další vibrační relaxace. Výjimky tohoto zákona jsou důsledkem rozdílného geometrického uspořádání atomových jader v excitovaném stavu vůči stavu základnímu. [8]

2.3.3.8 Franck – Condonův princip

Okamžitě po absorpci není excitovaná molekula v rovnovážném stavu, ale do rovnováhy se dostane až po vyrovnání sil, které na ni působí.

Přechod elektronů je rychlejší než pohyb jader. Když dochází k absorpci, má molekula v excitovaném stavu stejnou pozici a moment atomových jader jako ve stavu základním. Excitovaná molekula má tedy vyšší energii než v základním stavu, do kterého molekula přechází dodatečně (Obr. 7). [10]



Obr. 7 Schématické zobrazení Franck – Condonova principu (1 – rovnovážná konfigurace v základním stavu, 2 – nerovnovážná konfigurace v excitovaném stavu = Franck – Condonův stav, 3 – rovnovážná konfigurace v excitovaném stavu, 4 – nerovnovážná konfigurace v základním stavu = Franck – Condonův stav)

2.3.4 Jabloňského diagram

Jabloňského diagram (Obr. 8) slouží k ilustraci fotochemie organických molekul. Zobrazuje jednotlivé elektronové a vibronové (vibračně-elektronové) stavy a zároveň nejdůležitější aktivační a deaktivační procesy. Aktivační procesy jsou doprovázeny absorpcí záření, zatímco deaktivační jsou doprovázeny buď emisí záření – zářivé procesy nebo zvýšením tepelné energie systému – nezářivé procesy. Každý z procesů je charakterizován rychlostní konstantou.

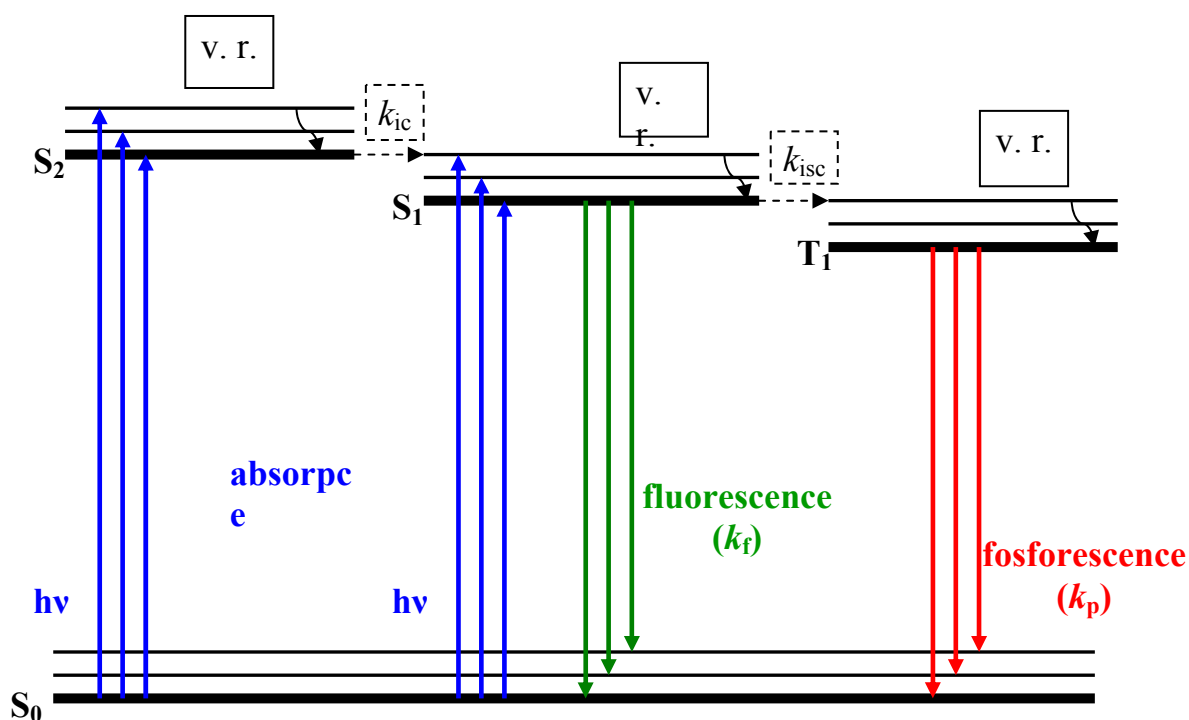
V diagramu jsou zakresleny různé energetické hladiny, kde tučné linky představují elektronové energetické hladiny a tenké linky označují vibrační energetické stavy. Zářivé procesy reprezentují rovné přímé šipky, zatímco nezářivé procesy jsou označeny šikmými a zahnutými šipkami.

Zářivé procesy jsou charakterizovány přechodem molekul z vyššího do nižšího energetického stavu nebo naopak, tedy vyzářením světelného kvanta ($h\nu$). Patří sem:

- „Dovolená“ singlet – singletová absorpce ($S_0 + h\nu \rightarrow S_1$ nebo $S_0 + h\nu \rightarrow S_2$).
- „Zakázaná“ singlet – tripletová absorpce ($S_0 + h\nu \rightarrow T_1$).
- „Dovolená“ triplet – tripletová absorpce.
- „Dovolená“ singlet – singletová emise ($S_1 \rightarrow h\nu + S_0$), tzv. *fluorescence*, charakterizovaná rychlostní konstantou k_f .
- „Zakázaná“ triplet - singletová emise ($T_1 \rightarrow h\nu + S_0$), tzv. *fosforescence*, charakterizovaná rychlostní konstantou k_p .

Nezářivé procesy se uskutečňují mezi vibračně-rotacími hladinami různých elektronových stavů, a to buď mezi isoenergetickými stavy nebo s různou energií. Při těchto procesech se nemění celková energie systému, a tak nedochází k emisi záření. Patří sem:

- „Dovolený“ přechod mezi stavy se stejnou spinovou multiplicitou ($S_2 \rightarrow S_1$), tzv. *vnitřní konverze*, charakterizovaná rychlostní konstantou k_{ic} . (ic = internal conversion)
- „Zakázaný“ přechod mezi excitovanými stavy s rozdílnou spinovou multiplicitou ($S_1 \rightarrow T_1$), tzv. *mezisystémový přechod*, charakterizovaný rychlostní konstantou k_{isc} . (isc = intersystem crossing)
- Přechod z vyšších vibračních stavů do stavu základního za uvolnění tepla je tzv. *vibrační relaxace* (v.r.). [8], [9]



Obr. 8 Schéma Jablonskiho diagramu

2.3.5 Fluorescenční sondy

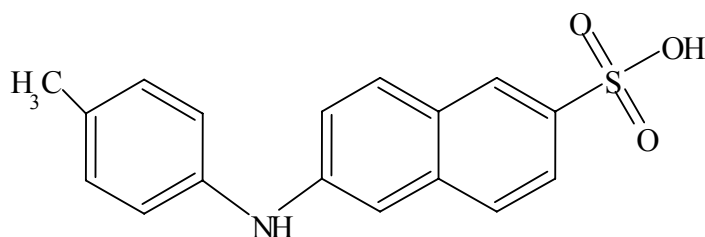
Fluorescenční sondy jsou vnější, resp. nevlastní fluorofory, přidávající se ke vzorkům, které nemají vhodné fluorescenční vlastnosti a vážou se na ně nekovalentní vazbou. Jejich funkcí je měnit fluorescenční vlastnosti – zvyšovat, resp. snižovat intenzitu emise, posouvat emisní maxima, měnit čas vyhasínání. Volba vhodné fluorescenční sondy se pro experimenty stává klíčovým bodem, neboť právě její vlastnosti umožňují získat potřebné informace.

2.3.5.1 TNS

Sonda 6-(*p*-toluinido)-2-naftalensulfonová kyselina (Obr. 9) patří mezi aromatické sulfonové kyseliny, které slouží ke studiu dynamické polarity. S rostoucí polaritou prostředí se její emisní spektrum posouvá k vyšším vlnovým délkám. Kvantový výtěžek fluorescence TNS se silně mění při vazbě na buněčné struktury a závisí na bezprostředním mikrookolí fluoroforu. [14]

Patří mezi nepoužívanější sondy, které slouží k určení hydrofobicity vazebných míst a ke studiu změn v konformaci u některých proteinů, ke studiu biologických membrán a micelárních systémů. Důvodem závislosti této sondy na polaritě zvoleného prostředí je intermolekulární přenos náboje, specifické interakce rozpouštědla a sondy, mezisystémový přechod do tripletového stavu a monofotonická fotoionizace. Všechny tyto procesy si navzájem konkurují, a tak lze jen těžko stanovit, který z nich převládá.

Po přidávku TNS do zkoumaného roztoku se zvyšuje intenzita fluorescence, protože dochází k jeho navázání se na hydrofobní místa. TNS nefluoreskuje ve vodě (polární prostředí), ale v organických rozpouštědlech nebo v hydrofobním prostředí (prostředí o nízké polaritě). [15], [16], [17]

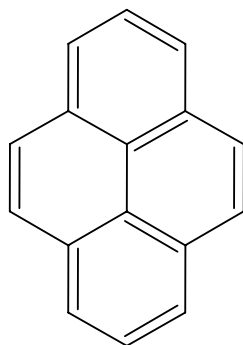


Obr. 9 TNS

2.3.5.2 Pyren

Pyren (Obr. 10) patří mezi polycyklické aromatické uhlovodíky. Má vysokou symetrii, s kterou je spojován první singletový absorpční přechod ($S_0 \rightarrow S_1$) a který je z hlediska symetrie zakázaný. Jednotlivé zakázané vibrační přechody silně závisí na polaritě rozpouštědla a tedy i fluorescenční spektra pyrenu jsou velmi citlivá na polaritu mikrookolí, což znamená, že slouží jako vhodná sonda k jeho charakterizaci. Některé emisní pásy jsou nezměněny, zatímco ostatní se odlišují v intenzitě na základě síly interakce s rozpouštědlem (přechod 0-0).

Je to sonda vhodná pro fluorescenční spektroskopii kvůli svému vysokému kvantovému výtěžku a době života fluorescence. Pyren zaujímá dimerovou strukturu, která stejně jako excimer vykazuje vysokou fluorescenci. Excimer je dimer v excitovaném stavu, jehož doba života je velmi krátká, a pohybuje se řádově v ns. Vzniká spojením excitované molekuly s nexcitovanou. Fluorescenční pás, který odpovídá excimeru se zpravidla vyskytuje u vyšších vlnových délek než monomer a nevykazuje vibrační pásy. Pyrenu se využívá při zkoumání míry propustnosti vody do micel koloidních systémů a také ke stanovení kritické micelární koncentrace. [17]



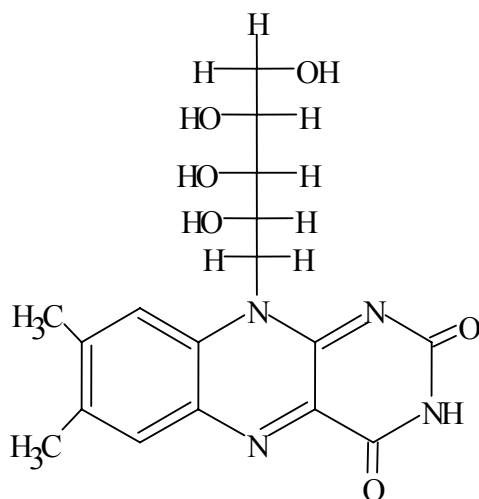
Obr. 10 Pyren

2.3.6 Fluoreskující biologicky aktivní látky

2.3.6.1 Riboflavin

Tento vitamín (Obr. 11) je známý pod dalšími názvy jako vitamín B₂ nebo vitamín G. Riboflavin je žluté až oranžově žluté přírodní barvivo, které se velmi slabě rozpouští ve vodě. Riboflavin fluoreskuje, je odolný vůči vysokým teplotám a rozkládá se na světle. Rostliny a mikroorganismy jej dokáží syntetizovat, ale živočichové a tedy i člověk ho musí přijímat v potravě. Zdrojem riboflavinu jsou kvasnice, vejce, ryby, hovězí a vepřové maso a vyskytuje se i v tvarohu a kakau. [18]

Riboflavin je pro živé organismy nepostradatelný, protože hraje důležitou roli při metabolismu, zejména při přeměně karbohydrátů na cukr. Podílí se dále na enzymatické činnosti zasahující do redukčně – oxidačních procesů buněk. Riboflavin je především zdrojem vodíku při látkové výměně proteinů a tuků. Vodíkové vazby riboflavinu jsou velmi podobné vazbám thyminové báze, a proto se váží na aktivní centrum. Riboflavin fungující jako fluorescenční sonda může tedy sloužit k selektivní detekci pyrimidinové nukleové báze – thyminu. Zároveň i struktura riboflavinu (Obr. 11), zejména jeho tricyklický systém, umožňuje maximální hydrofobní shlukování s thyminem právě v aktivním centru enzymu. [19]



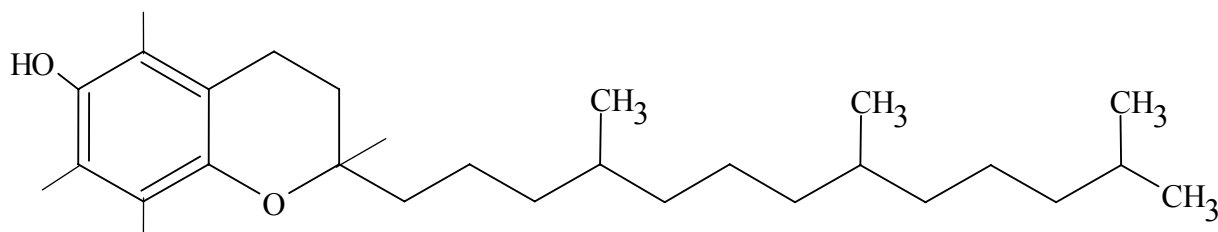
Obr. 11 Riboflavin

2.3.6.2 α -tokoferol

α -tokoferol, neboli vitamín E (Obr. 12) se řadí do skupiny látek isoprenoidní povahy, které jsou rozpustné v tucích. Snadno se oxiduje, a to i v případě jednoelektronového přenosu. α -tokoferol je velice důležitým antioxidantem v těle a působí jako ochrana lipidových struktur, protože zabraňuje oxidaci vysoce nenasycených vyšších mastných kyselin.

Antioxidační účinky znamenají také to, že se α -tokoferol účastní destrukce nebo neutralizace volných radikálů, které poškozují buněčné membrány. Kromě antioxidačního působení stabilizuje α -tokoferol membránové struktury a ovlivňuje propustnost membrány pro malé molekuly.

Tento vitamín se v těle uchovává jen po velmi krátkou dobu. Najdeme ho v másle a v mnoha rostlinných materiálech jako jsou pšeničné klíčky, sója, burské oříšky, ale také v masu savců. Nedostatek α -tokoferolu vede především ke ztrátě reprodukční schopnosti a svalové dystrofii. [20], [21]



Obr. 12 α -tokoferol

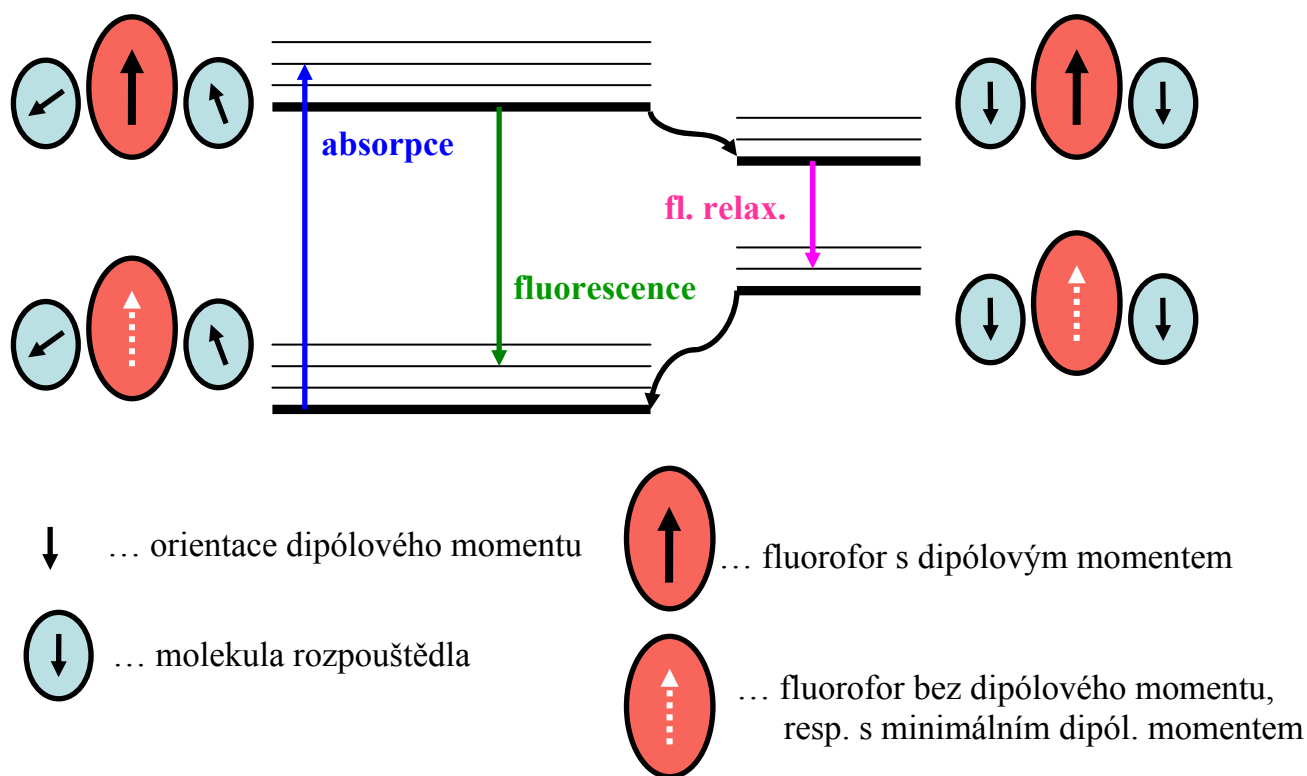
2.3.7 Vliv rozpouštědla na emisi fluorescence

Emise fluorescence je ovlivňována celou škálou nejrůznějších faktorů jako je interakce mezi fluoroforem a kolem něj se shlukujícími se molekulami rozpouštědla (závisí na polaritě rozpouštědla), organické a anorganické sloučeniny, teplota, pH a lokalizovaná koncentrace daného fluoroforu. Vliv těchto parametrů je různý v závislosti na použitém fluoroforu, zatímco absorpční a emisní spektra stejně jako kvantový výtěžek jsou mnohem více ovlivněna zvoleným prostředím. Ve skutečnosti je vysoká citlivost fluorescence spojena s interakcemi, které se objevují v prostředí během doby života excitovaného stavu. Fluorofor může být považován za zcela odlišnou molekulu v excitovaném než základním stavu, a to zapříčiňuje různé vlastnosti pokud jde o interakce s prostředím v excitovaném stavu vzhledem ke stavu základnímu.

Energetické rozdíly základního a excitovaného stavu fluoroforu přispívají změně dipólového momentu, který skutečně způsobuje přeskupení molekul rozpouštědla okolo fluoroforu. Avšak **Franck - Condonův princip** (2.3.3.8) říká, že při excitaci fluoroforu je jeho molekula excitována do vyšší energetické hladiny v mnohem kratším čase než je doba reorientace molekul rozpouštědla okolo fluoroforu. Výsledkem je tedy časová prodleva mezi samotnou excitací a reorientací molekul rozpouštědla okolo solvatovaného fluoroforu, která má zpravidla větší dipólový moment v excitovaném stavu než v základním.

Fluorofor je excitován do vyšších vibračních hladin prvního excitovaného stavu S_1 , kdy dochází ke ztrátě přebytečné energie do molekuly rozpouštědla podle toho, jak rychlá, resp. pomalá je relaxace fluoroforu do energeticky nejnižšího vibračního stavu. Molekuly rozpouštědla přispívají ke stabilizaci a snižování energie excitovaného stavu svou reorientací – **relaxace rozpouštědla** (Obr. 13). To má vliv na snižování energie mezi základním a excitovaným stavem, který vyústí v červený posun (k vyšším vlnovým délkám) emise fluorescence.

Dále platí, že čím vyšší je polarita rozpouštědla, tím nižší je energie relaxace a tím větší je červený posun emisního spektra fluorescence. Na relaxaci má také vliv viskozita prostředí. Pokud je prostředí dostatečně viskózní, aby umožnilo reorientaci molekul rozpouštědla, nastává emise ze stavu, který je blízký stavu Franck – Condonovu (2.3.3.8), a nedochází tak k žádnému posunu fluorescenčního spektra. Polarita fluoroforu určuje přesně citlivost excitovaného stavu k relaxaci rozpouštědla. Z čehož vyplývá, že nabitě fluorofory mají mnohem větší vliv než fluorofory nepolární. [17], [22]



Obr. 13 Relaxace rozpouštědla

2.3.8 REES efekt

2.3.8.1 Význam

REES (Red Edge Excitation Shift) efekt je definován jako posun vlnové délky emisního maxima fluorescence směrem k vyšším vlnovým délkám, který je způsoben posunem excitační vlnové délky směrem do červené oblasti absorpčního pásu. Vzniká pomalou relaxací (reorientací) rozpouštědla okolo excitovaného fluoroforu, který má pohybově omezenou funkci v molekule rozpouštědla v bezprostřední blízkosti fluoroforu. A právě díky této blízkosti je možné zkoumat parametry samotného prostředí (reprezentované relaxací molekul rozpouštědla) za použití fluoroforu jako referenční skupiny.

2.3.8.2 Vznik

REES efekt vznikl na základě změny interakce fluorofor – rozpouštědlo v základním a excitovaném stavu. Tato změna je doprovázena změnou dipólového momentu fluoroforu při excitaci a změnou rychlosti, jakou jsou molekuly rozpouštědla schopny se reorientovat okolo excitovaného fluoroforu. U polárního fluoroforu nastane dipolární interakce s rozpouštědlem v základním stavu kvůli minimalizaci energie tohoto stavu. Dále se dipólový moment změní při excitaci, kdy se molekuly rozpouštědla musí reorientovat okolo nového excitovaného stavu, aby zaujaly nejvýhodnější uspořádání. Toto přizpůsobení se dipolární interakce molekul rozpouštědla k fluoroforu se skládá ze dvou kroků. Prvním z nich je přerozdělení elektronů v okolí molekul rozpouštědla kvůli změněnému dipólovému momentu excitovaného stavu fluoroforu a druhým z nich je fyzikální reorientace molekul rozpouštědla okolo excitovaného stavu fluoroforu. [23]

2.3.8.3 Podmínky vzniku

Hlavním kritériem vzniku REES efektu je polární a pohybově omezené prostředí stejně jako polární fluorofor, který je schopen se v základním stavu vhodně orientovat okolo molekul rozpouštědla. Dále by mělo docházet ke změně dipólového momentu fluoroforu při excitaci. Pokud je polární fluorofor ve viskózním prostředí, kde je jeho pohyblivost omezená, je možné zaznamenat závislost emisního maxima fluorescence na excitační vlnové délce. Zatímco když se polární fluorofor nachází v málo viskózním prostředí k podobné závislosti nedochází. V neposlední řadě je podmínkou, aby doba reorientace rozpouštědla okolo fluoroforu v excitovaném stavu byla delší nebo srovnatelná s dobou života fluorescence.

Je možné tento efekt ovlivnit i teplotou. Pokud se teplota zvýší, zvýší se také stupeň reorientace rozpouštědla a emise bude dominovat od relaxačních stavů rozpouštědla. S vyšší teplotou se tedy očekává i pokles REES efektu.

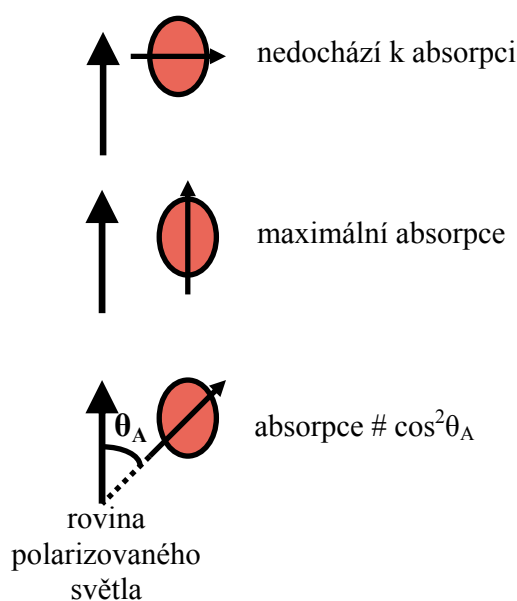
REES efekt tedy závisí jak na vlastnostech fluoroforu samotného, tak na prostředí, s kterým interaguje.

2.3.8.4 Aplikace

Tento efekt se používá ke zkoumání dynamických vlastností rozpouštědel, modelových membrán a bílkovin. Aplikace REES na biologické systémy byla omezena hlavně na indol, tryptofan a další fluorescenční sondy ve viskózních rozpouštědlech a při vázání bílkovin. [24]

2.3.9 Emisní anizotropie

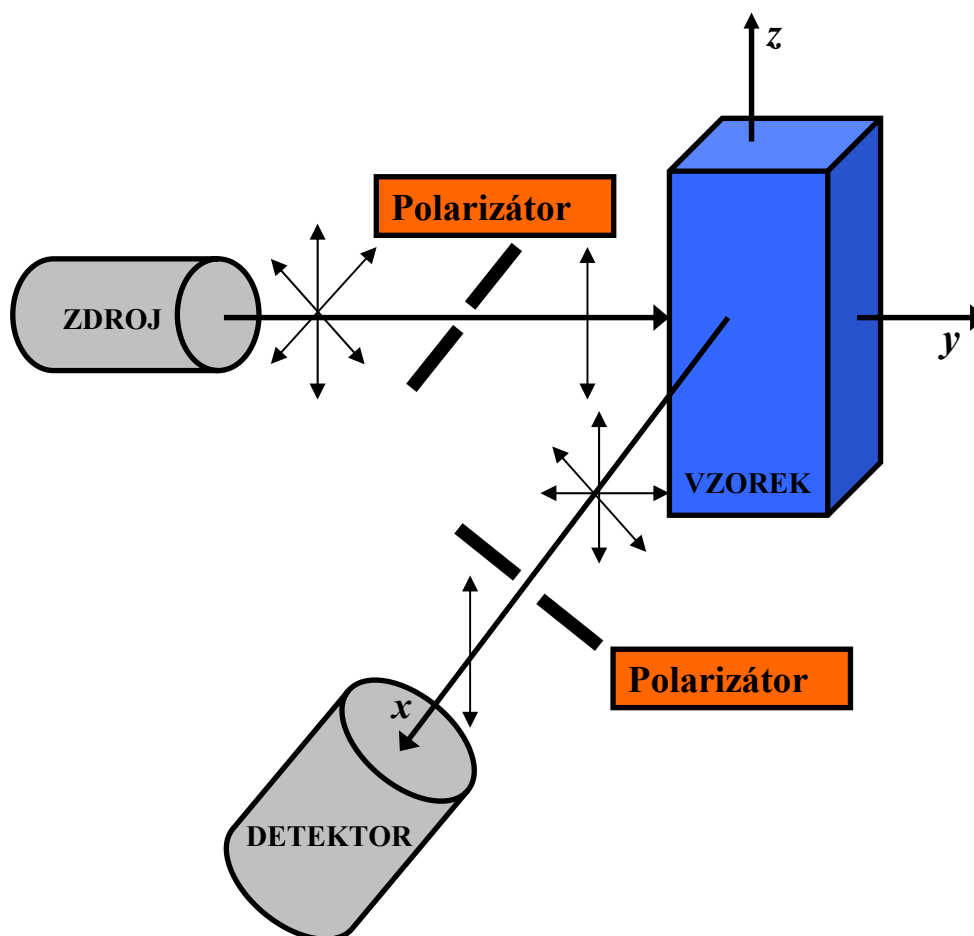
Světlo je elektromagnetická vlna a tedy tvořeno elektrickou a magnetickou složkou, které jsou na sebe kolmé. Při přirozeném světle nemají tyto složky výhodnou orientaci, ale při lineárně polarizovaném světle kmitá elektrická složka v jednom směru, resp. rovině. Když jsou fluorofory, jejichž přechodový moment je orientován ve směru elektrického vektoru, ozářeny lineárně polarizovaným světlem, dochází k jejich přednostní excitaci. Tento jev je nazýván **fotoselekce** (Obr. 14). Neboť rozdělení excitovaných fluorofor je anizotropní, je i emise fluorescence považována za anizotropní. Stupeň polarizované emise je popisován pomocí anizotropie. [17]



Obr. 14 Fotoselekce

2.3.9.1 Excitace polarizovaným světlem

Základem měření anizotropie je měření excitace fluoroforu polarizovaným světlem. Většinou se měří horizontálně polarizovaná excitace s orientací v rovině zy (Obr. 15). Detekce probíhá jak ve směru kolmém, tak ve směru shodném se směrem excitační polarizace.



Obr. 15 Schématické uspořádání pro měření anizotropie

2.3.9.2 Průběh měření

Nejprve dojde k absorpci fotonu fluoroforem a díky interakci kmitavé elektrické složky vstupujícího záření a přechodovým dipólovým momentem, který vznikl elektronovým stavem molekul fluoroforu, dochází k excitaci. Přednostně se excitují ty fluorofory, které mají vektor absorpčního přechodového momentu shodný s rovinou polarizace. Během doby života fluorescence vykoná molekula jako celek převážně rotační pohyb i za předpokladu, že absorpční a emisní přechodové momenty jsou orientovány souhlasně. Při emisi je tedy molekula již otočená o určitý úhel a polarizace emitovaného záření se neshoduje se zářením absorbovaným. Nastává **depolarizace**. [25] Příčinami depolarizace jsou odlišné absorpční a emisní přechodové momenty, torzní vibrace, Brownův pohyb a přenos excitační energie na jinou molekulu s rozdílnou orientací. [17] Depolarizaci lze eliminovat použitím prostředí o vysoké viskozitě, které brzdí rotaci molekuly. Zatímco při použití fluidního prostředí by byla emise zcela depolarizována. [25]

2.3.9.3 Charakteristické vztahy

Měřením úhlu mezi přechodovými dipólovými momenty excitace a emise se určuje stupeň polarizace

$$p = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + I_{\perp}}, \quad (7)$$

a nebo anizotropie

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

kde I_{\parallel} je intenzita pro nastavení emisního a excitačního polarizátoru vertikálně a I_{\perp} je intenzita pro nastavení emisního polarizátoru horizontálně a excitačního polarizátoru vertikálně.

Již zmiňovaný vztah mezi anizotropií a viskozitou popisuje Perrinova rovnice

$$\frac{r_0}{\langle r \rangle} = 1 + \frac{RT\tau}{V\eta}, \quad (9)$$

kde r_0 je fundamentální anizotropie v čase 0 s (nedochází k žádnému pohybu fluoroforu), $\langle r \rangle$ je limitní anizotropie (experimentálně zjištěná hodnota), R je molární plynová konstanta, T je teplota zkoumaného roztoku v K, τ je doba života fluoroforu v excitovaném stavu, V je objem molekuly a η je dynamická viskozita prostředí. [26]

2.3.9.4 Aplikace

Anizotropního měření se využívá ke stanovení viskozitních poměrů v okolí sondy, rigidity membrán i geometrie excitovaných stavů. [26] Z fluorescenční anizotropie lze získat informace o molekulové váze, tvaru, velikosti a pohyblivosti molekul, o fyzikálních vlastnostech biologických membrán fázových přechodů nebo tekutosti, resp. viskozitě prostředí. [17]

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Použité chemikálie

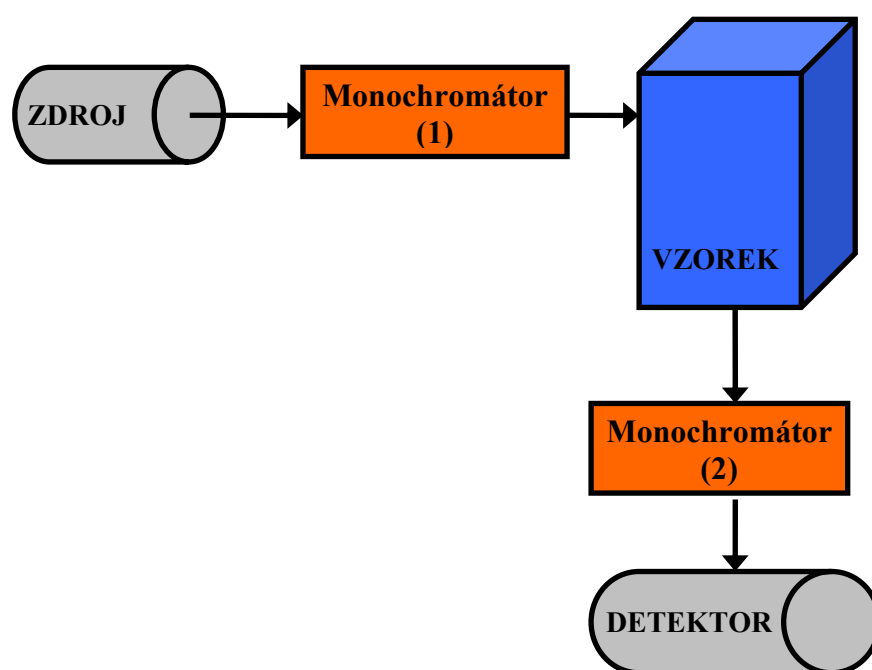
- **Fluorescenční sondy:**
 - TNS:** (6-(*p*-toluinido)-2-naftalensulfonová kyselina): Fluka GmbH, pro fluorescenci se stupněm čistoty $\geq 97\%$, $M_r = 313,88$, CAS [7724-15-4], viz. (2.3.5.1)
 - Pyren:** Fluka GmbH, pro fluorescenci se stupněm čistoty $\geq 99\%$, $M_r = 202,26$, CAS [129-00-0], viz. (2.3.5.2)
- **Fluoreskující biologicky aktivní látky:**
 - Riboflavin:** Fluka GmbH, pro HPLC se stupněm čistoty $\geq 98\%$, $M_r = 376,38$, CAS [83-88-5], viz. (2.3.6.1)
 - (±)- α -tokoferol:** Fluka GmbH, pro HPLC se stupněm čistoty $\geq 97\%$, $M_r = 430,72$, CAS [1019-41-0], viz. (2.3.6.2)
- **Kyselina hyaluronová:** CPN spol. s.r.o.
 - HA – $M_w = 740 \text{ kg mol}^{-1}$
 - HA – Nr. 030206 ($M_w = 100,5 \text{ kg mol}^{-1}$)
 - HA – Nr. 060306/180705/24 ($M_w = 253,9 \text{ kg mol}^{-1}$)
 - HA – Nr. 050206-D1 ($M_w = 1390 \text{ kg mol}^{-1}$)
 - Hy Silk – Nr. 280407-D1 ($M_w = 650 \text{ kg mol}^{-1}$)
- **Rozpouštědla:**
 - Methanol:** Fluka GmbH; pro UV-spektroskopii; $M_r = 32,04$; CAS [67-56-1]
 - Ethanol:** Lach-Ner, s.r.o.; pro UV-spektroskopii; $M_r = 46,07$; CAS [200-578-6]
 - Propan-1-ol:** Fluka GmbH; pro UV-spektroskopii; $M_r = 60,10$; CAS [71-23-8]
 - Oktan-1-ol:** Sigma Aldrich, s.r.o.; $M_r = 130,23$; CAS [11,261-5]
 - Aceton:** Fluka GmbH; pro UV-spektroskopii; $M_r = 58,08$; CAS [11,261-5]
 - Dimethylsulfoxid:** Fluka GmbH; pro UV-spektroskopii; $M_r = 78,13$; CAS [67-68-5]
 - Acetonitril:** Fluka GmbH; pro UV-spektroskopii; $M_r = 41,05$; CAS [75-05-8]
 - Cyklohexan:** Riedel-de Haën ®; $M_r = 84,16$; CAS [110-82-7]
 - Terc-butylalkohol:** Reanal Budapešť; $M_r = 74,12$
- **Ostatní:**
 - NaCl:** Lach-Ner, s.r.o.; $M_r = 58,44$; CAS [7647-14-5]
 - KCl:** Lach-Ner, s.r.o.; $M_r = 74,56$; CAS [7447-40-7]
 - CaCl₂:** Lach-Ner, s.r.o.; $M_r = 147,02$; EINECS [233-140-8]

3.2 Použité přístroje

- **Analytické váhy** Denver Instrument (min. 0,001 g, max. 220 g)
- **Automatické pipety:** Biohit, Vitrum, Finnpiquette
- **Magnetické míchadlo** Heidolph Mr 3002 S
- **Rotační míchadlo** Heidolph Reax 2
- **Zahřívání** Heidolph EKT 3001
- **Vortex** IKA ® MS2 Minishaker MS2

- **Ultrazvuk** Bandelin Sonorex Digitech
- **Elektrický teploměr** Gryf 310 (−50 °C – 200 °C), senzor Ni
- **Lyofilizátor** Labconco Freeze Dry Systém/Freezone ® 4,5
- **Luminiscenční spektrometr** Fluo-AMINCO-Bowman ® Series 2

Zdrojem polychromatického záření je xenonová lampa (150 W), jejíž paprsky vstupují do mřížkového excitačního monochromátoru, kde dochází k selekci záření vhodné excitační vlnové délky. Paprsek o definované vlnové délce dále prochází křemennou kyvetou se vzorkem, kde dochází k vybuzení elektronů zkoumaného vzorku. Fluorescence je pozorována ve směru kolmém ke směru zdroje polychromatického záření, aby nedocházelo k rušení měření. Z tohoto důvodu je také emisní monochromátor a detektor umístěn v kolmém směru ke kyvetě se zkoumaným vzorkem. Po průchodu emisního záření emisním monochromátorem je stanovena jeho vlnová délka a detektorem následně zjištěna intenzita fluorescence (Obr. 16). [28]



Obr. 16 Schématické uspořádání měření pomocí jednopaprskového luminiscenčního spektrometru AMINCO-Bowman ® Series 2 (Monochromátor (1) – excitační, Monochromátor (2) – emisní)

3.3 Zásobní roztoky fluorescenčních sond a fluoreskujících biologicky aktivních látek

- **TNS, riboflavin, pyren, α -tokoferol**

Na analytických vahách bylo naváženo 5,8; 1,8; 50 mg a 1,08 g fluorescenční sondy, které bylo kvantitativně převedeno do odměrné baňky o objemu 500; 10; 50; 100 mL a doplněno po rysku acetonem. Připravený roztok fluorescenční sondy měl molární koncentraci $3,70 \cdot 10^{-5}$; $4,78 \cdot 10^{-5}$; 0,05; $2,47 \cdot 10^{-3}$ mol L⁻¹.

3.4 Standardní postup přípravy vzorků pro všechny vybrané sondy

Ze zásobního roztoku fluorescenční sondy bylo do vialek (objem vialky je cca 10 mL) odpipetováno určité množství sondy, řádově v μL . Následně bylo za atmosférického tlaku odpařeno rozpouštědlo, ve kterém byla daná sonda rozpuštěna. Ve všech případech to byl aceton. Poté byly do vialek pipetovány roztoky podle zkoumaných vlivů a interakcí vždy v celkovém objemu 5 mL. Vzorky, vyjímaje čistá rozpouštědla, byly cca 12 hod promíchávány na rotačním míchadle a nakonec byla proměřena intenzita fluorescence emisního a v některých případech i excitačního záření a také emisní anizotropie.

4 VÝSLEDKY A VYHODNOCENÍ

4.1 Experimenty s polaritní sondou TNS

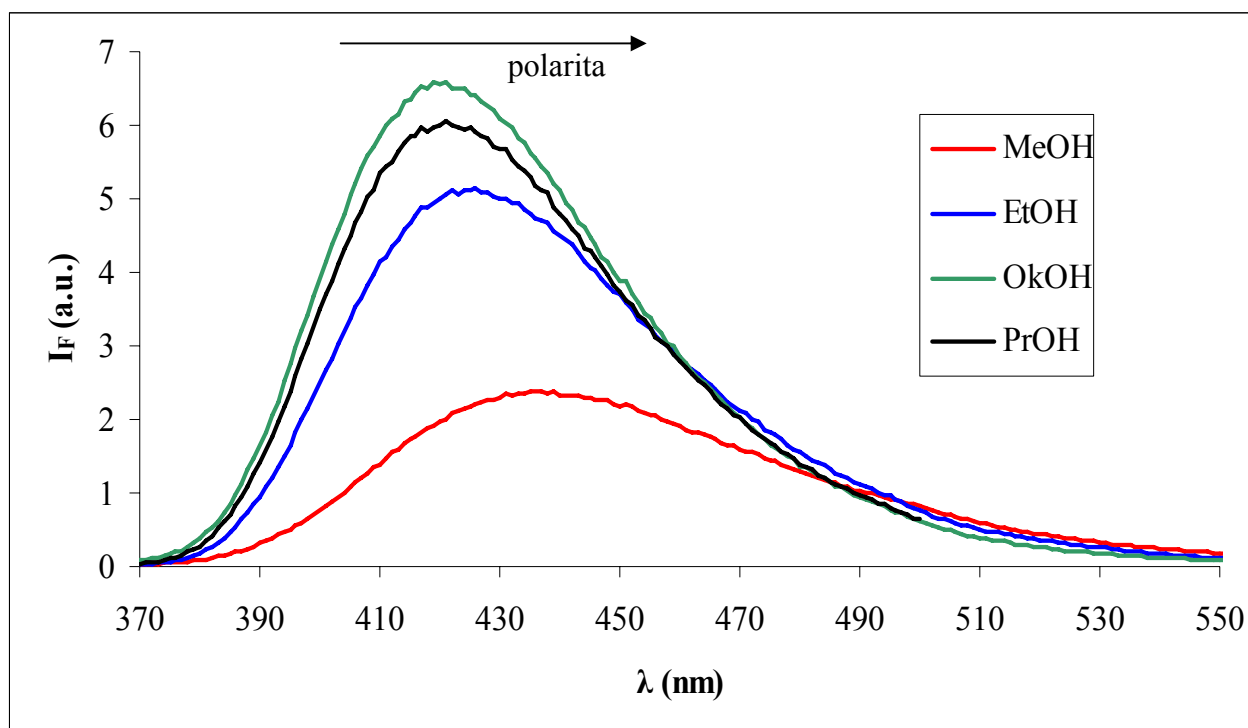
Výsledná koncentrace sondy ve vzorku byla vždy $3,7 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$.

4.1.1 Vliv polarity prostředí na intenzitu emisního záření TNS

4.1.1.1 Polaritní řada rozpouštědel

Do vialek se sondou bylo odpipetováno 5 mL vybraných rozpouštědel - methanol, ethanol, propanol a oktanol, tak aby tvořila polaritní řadu.

Polarita roztoku je charakterizována fyzikální veličinou nazývanou relativní permitivita ϵ_r a existují její tabelované hodnoty pro různá rozpouštědla.



Obr. 17 Závislost velikosti intenzity fluorescence a posunu vlnové délky emise TNS v methanolu, ethanolu, propanolu a oktanolu ($c_{TNS} = 3,7 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, $\lambda_{ex} = 300 \text{ nm}$)

Tab. I Relativní permitivity použitých rozpouštědel, naměřené intenzity fluorescence a emisní maxima fluorescence

rozpouštědlo	ϵ_r	I_F (a.u.)	λ_{em} (nm)
MeOH	33,62	3,2	438
EtOH	25,07	5,1	426
PrOH	20,30	6,0	421
OkOH	10,34	6,6	419

Z grafu (Obr. 17) je zřejmé, že s rostoucí polaritou prostředí, a tedy i s rostoucí relativní permitivitou prostředí dochází k bathochromnímu posunu emise TNS. Tento posun činí od nejméně polárního oktanolu k nejvíce polárnímu methanolu 19 nm (Tab. I).

Nejvyšších hodnot intenzity fluorescence (Tab. I) dosahovala sonda TNS v nejméně polárním oktanolu a nejnižší hodnota intenzity fluorescence byla v methanolu. Polaritní řada organických rozpouštědel respektuje pokles intenzity fluorescence se vzrůstající permitivitou.

4.1.1.2 Směsi rozpouštědel s vodou

Byla připravena řada pěti různých objemových poměrů methanolu ve směsi s injekční vodou a pro porovnání ve stejných koncentracích i směs propanolu s injekční vodou.

Pro relativní permitivitu směsi platí vztah

$$\varepsilon_{r,AB} = \varepsilon_{r,A} \cdot \mu_A + \varepsilon_{r,B} \cdot \mu_B, \quad (10)$$

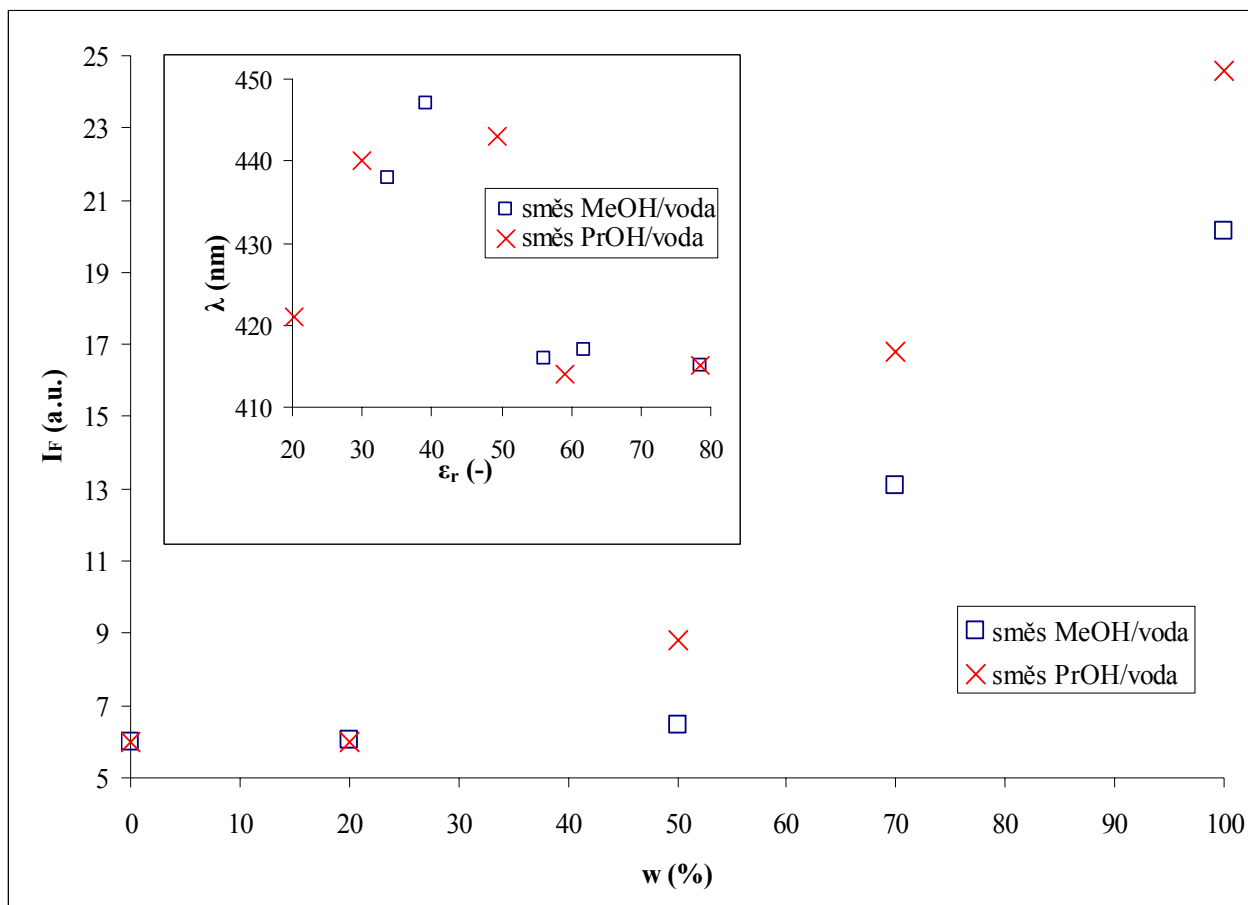
kde $\varepsilon_{r,A}$, $\varepsilon_{r,B}$ je relativní permitivita rozpouštědla A, respektive rozpouštědla B a μ_A , μ_B je molární zlomek rozpouštědla A, respektive rozpouštědla B ve směsi.

Tab. II Vypočtené hodnoty relativních permitivit směsí methanol/voda propanol/voda použitých rozpouštědel, naměřené intenzity fluorescence a maxima emise fluorescence

w (%)	směs MeOH/voda			směs PrOH/voda		
	ε_r	I_F (a.u.)	λ_{em} (nm)	ε_r	I_F (a.u.)	λ_{em} (nm)
0	78,59	6,0	415	78,59	6,0	415
20	61,74	6,0	417	59,07	6,0	414
50	56,11	6,4	416	49,45	8,8	443
70	39,25	13,1	447	29,93	16,8	440
100	33,62	20,1	438	20,30	24,6	421

Bylo zjištěno, že s rostoucí relativní permitivitou směsi rozpouštědlo/voda dochází ke snižování intenzity emitovaného záření. Dle tabulky (Tab. II) má směs methanol/voda vyšší relativní permitivitu než směs propan/voda a tedy lze říci, že organické rozpouštědlo methanol je více polární než propanol. Důvodem je větší zhášení intenzity fluorescence ve směsi methanol/voda než je tomu tak u směsi propanol/voda. V grafu (Obr. 18) je ze závislosti intenzity fluorescence na objemovém zlomku rozpouštědlo/voda vidět její exponenciální nárůst se zvyšujícím se objemovým zlomkem směsi. Přídavkem většího množství vody do směsi rozpouštědlo/voda docházelo ke zvyšování polarity prostředí okolo sondy TNS, a tak bylo podporováno zhášení emitovaného záření.

Z grafu (Obr. 18) je zřejmé, že maxima emise a jejich posuny nevykazují žádný trend. Navíc dochází k nepředpokládaným interakcím TNS ve vodě. Maximum emise se od nejméně polárního vzorku posunuje hypsochromně, což neodpovídá charakterizaci provedené v předešlém experimentu (4.1.1). Z toho lze usuzovat, že dochází k jiným interakcím TNS ve vodě než v organických rozpouštědlech. Předpokladem závislosti emisních maxim byl lineární, případně exponenciální průběh.



Obr. 18 Závislost intenzity fluorescence TNS na objemovém zlomku směsi rozpouštědlo/voda a závislost emisního maxima na relativní permitivitě směsi rozpouštědlo/voda ($\lambda_{ex} = 300 \text{ nm}$)

4.1.2 Studium interakce nativního hyaluronanu s TNS

Do vialek se sondou bylo přidáváno určité množství hyaluronanu doplněné injekční vodou, tak aby vznikla koncentrační řada HA.

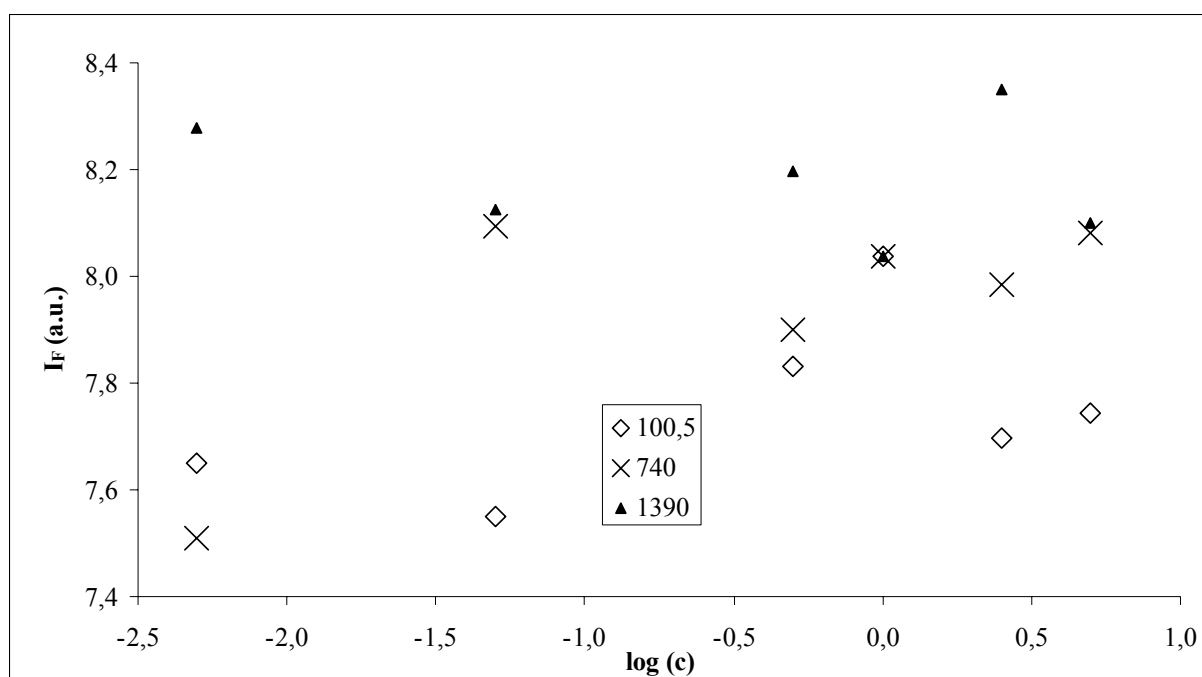
Ke studiu interakcí byly vybrány hyaluronany o různých molekulových hmotnostech – 100,5; 740; 1390 kg mol^{-1} .

Hodnoty intenzity fluorescence (Obr. 19) nevykazují žádný trend v závislosti na obsahu HA v roztoku. Nejvyšší hodnoty intenzit fluorescence (Tab. III) jsou u nejvyšší použité molekulové hmotnosti HA. Podle intenzity fluorescence nedochází k rozdílům mezi vodou a HA. Nedochází ani k posunům emisních maxim, pouze u koncentrace 0,05 g L^{-1} v 740 a 1390 kg mol^{-1} HA dochází k posunu maxima o 4 nm vůči jinak konstantním hodnotám emisních maxim.

Pomocí směrodatných odchylek bylo zjištěno, že k „největším“ posunům emisního maxima docházelo u nejvyšší molekulové hmotnosti. Z toho lze usoudit, že posun emisního maxima závisí více na molekulové hmotnosti HA než na její koncentraci. A stejně tak je tomu u zjištěných průměrných hodnot intenzit fluorescence. Dochází ke zvýšení intenzity fluorescence s rostoucí molekulovou hmotností HA. Ale spíše je to velká fluktuace než trend.

Tab. III Naměřené hodnoty intenzity fluorescence TNS, emisní maxima, jejich průměrné hodnoty a směrodatné odchylky

100,5 kg mol ⁻¹			740 kg mol ⁻¹		1390 kg mol ⁻¹	
c (g L ⁻¹)	λ _{em. max} (nm)	I _F (a.u.)	λ _{em. max} (nm)	I _F (a.u.)	λ _{em. max} (nm)	I _F (a.u.)
0,000	414	8,0	414	8,0	414	8,0
0,005	414	7,7	414	7,5	416	8,3
0,050	414	7,6	418	8,1	418	8,1
0,500	416	7,8	414	7,9	414	8,2
2,500	415	7,7	416	8,0	415	8,3
5,000	415	7,7	414	8,1	411	8,1
průměr	414,67	7,75	415,00	7,93	414,67	8,18
sm.odch.	0,75	0,15	1,53	0,20	2,13	0,11



Obr. 19 Závislost intenzity fluorescence TNS na logaritmu koncentrace hyaluronanu pro různé molekulové hmotnosti ($c_{TNS} = 3,7 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, $\lambda_{ex} = 300 \text{ nm}$)

4.1.3 Vliv iontové síly na interakce nativního hyaluronanu se sondou TNS

Bylo přidáváno konstantní množství HA ($c_{HA} = 2,5 \text{ g L}^{-1}$ v celkovém objemu) a různá množství solí k vytvoření koncentrační řady. Vzhledem k tomu, že sonda TNS je záporně nabitá stejně jako HA, jsou voleny právě roztoky solí, aby odstínily nábojovou repulzi. Cílem experimentu bylo zvýšit interakci TNS s HA.

Ke studiu interakcí byly vybrány tři nativní hyaluronany o různé molekulové hmotnosti - 100,5; 253,9; 740 kg mol⁻¹. Vodné roztoky solí byly NaCl, KCl a CaCl₂. Intenzita fluorescence emisního záření byla proměřena při vysoké citlivosti a při nastavení šířky štěrbin na 8 nm.

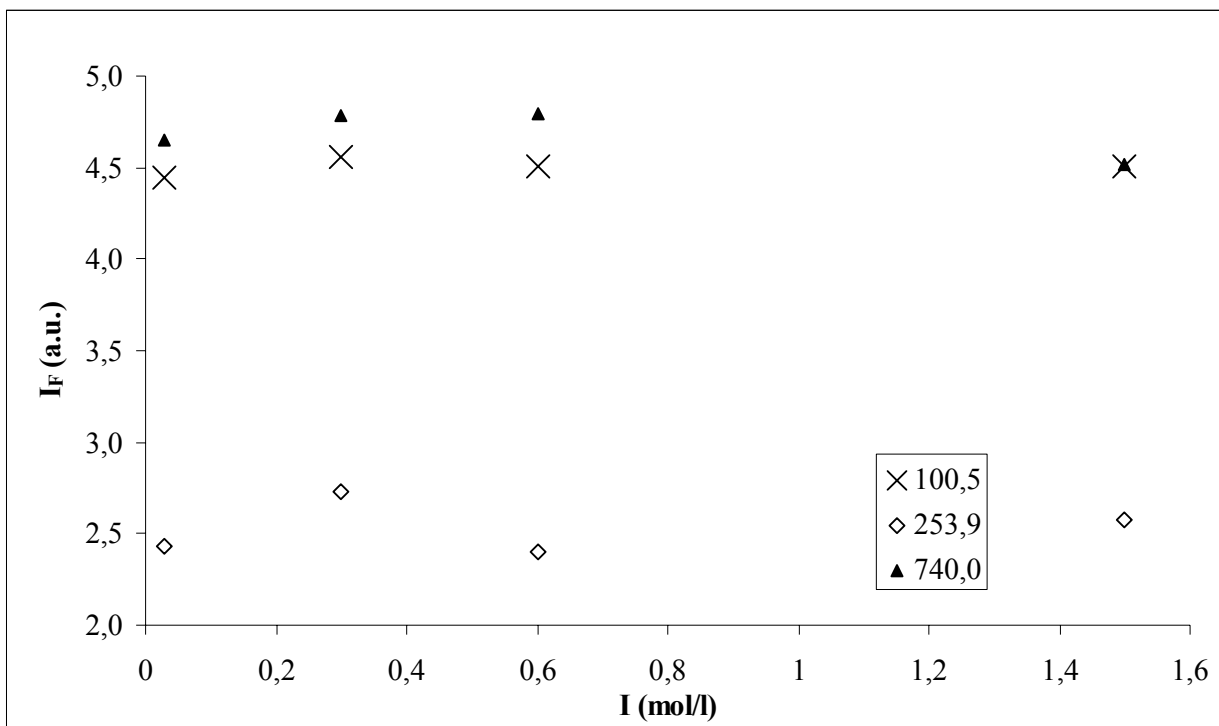
Tab. IV Posuny emisních maxim ($\Delta\lambda$) vztažené k vodě, intenzity fluorescence TNS a vypočtené iontové síly přidávaných solí k HA o různých molekulových hmotnostech

	100,5 kg mol ⁻¹			253,9 kg mol ⁻¹		740 kg mol ⁻¹	
	I (mol L ⁻¹)	I _F (a.u.)	$\Delta\lambda$ (nm)	I _F (a.u.)	$\Delta\lambda$ (nm)	I _F (a.u.)	$\Delta\lambda$ (nm)
NaCl	0,01	4,6	1	2,2	3	4,7	2
	0,10	4,5	0	2,3	4	4,7	4
	0,20	4,5	2	2,4	-1	4,7	2
	0,50	4,6	0	2,5	5	4,5	6
KCl	0,01	4,5	2	2,2	2	4,7	0
	0,10	4,5	2	2,1	-1	4,8	5
	0,20	4,5	2	2,4	0	4,8	3
	0,50	4,7	5	2,3	2	4,5	1
CaCl₂	0,03	4,4	2	2,4	0	4,7	7
	0,30	4,6	2	2,7	2	4,8	6
	0,60	4,5	1	2,4	3	4,8	5
	1,50	4,5	2	2,6	1	4,5	6

V tabulce (Tab. IV) jsou uvedeny odchylky maxima emisního záření vztažená k maximu emise vody. V rámci jedné molekulové váhy HA a po přidavku jednotlivých solí docházelo k minimálním bathochromním posunům vlnových délek emisních maxim u molekulové hmotnosti 100,5 kg mol⁻¹. Naopak u nejvýše zvolené molekulové hmotnosti HA (740 kg mol⁻¹) v rámci experimentu docházelo k největším bathochromním posunům emisních maxim. A to především po přidavku vodného roztoku soli CaCl₂ tento posun činil 5 – 7 nm. Tento posun znamená posun do hydrofobnější oblasti. Dochází tak pravděpodobně k interakci TNS s HA. Opět posun emisního maxima závisí především na molekulové hmotnosti.

Intenzita fluorescence emisního záření TNS fluktovala u jednotlivých molekulových hmotností v rámci jedné hodnoty intenzity, jak je vidět u grafu (Obr. 20), který je uveden pro iontovou sílu vodného roztoku CaCl₂. Nejnižší hodnoty intenzit fluorescence byly u molekulové hmotnosti 253,9 kg mol⁻¹ a nejvyšší pak u 740 kg mol⁻¹. Z toho vyplývá, že intenzita fluorescence spíše závisela na molekulové hmotnosti než na typu nebo přidavku soli. Po přidání solí v porovnání s předchozím experimentem (4.1.2) docházelo i při jejich nízkém přidavku ke zhášení fluorescence až o 50 %.

V konečném výsledku lze říci, že se nepodařilo snížit repulze mezi TNS a HA, ale vlivem iontových sil docházelo ke zhášení intenzity fluorescence.



Obr. 20 Příklad účinku iontové síly roztoku CaCl_2 na intenzitu fluorescence TNS v HA o různých molekulových hmotnostech ($\lambda_{\text{ex}} = 300 \text{ nm}$)

4.1.4 Vliv teploty na studium vlivu iontové síly na interakce nativního hyaluronanu se sondou TNS

Ke studiu interakcí byly vybrány tři nativní hyaluronany o různé molekulové hmotnosti stejně jako v předešlém experimentu (4.1.3) a stejně tak byly zvoleny i vodné roztoky solí. U každé soli byla navíc přidána nejvíce koncentrovaná sůl, a to v koncentraci 1 mol L^{-1} . Intenzita fluorescence emisního záření byla měřena při dvou různých teplotách, a to při $30 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ a $50 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ po dobu 1 hod. Cílem bylo snížení repulzí mezi TNS a HA a také podpoření účinku nízkomolekulárního elektrolytu, a tak posílit interakci mezi TNS a HA. Oproti předchozímu experimentu (4.1.3) došlo ke snížení citlivosti měření na 770 V, což je cca o 23 % nižší vůči původní hodnotě, i když nastavení šířky štěrbin bylo opět na 8 nm.

Cílem tohoto experimentu bylo zvyšováním teploty měřených vzorků ovlivnit interakci HA s TNS a podpořit vliv soli, respektive očekávaným jevem bylo posílení interakce a navázání sondy TNS na hydrofobní místa HA.

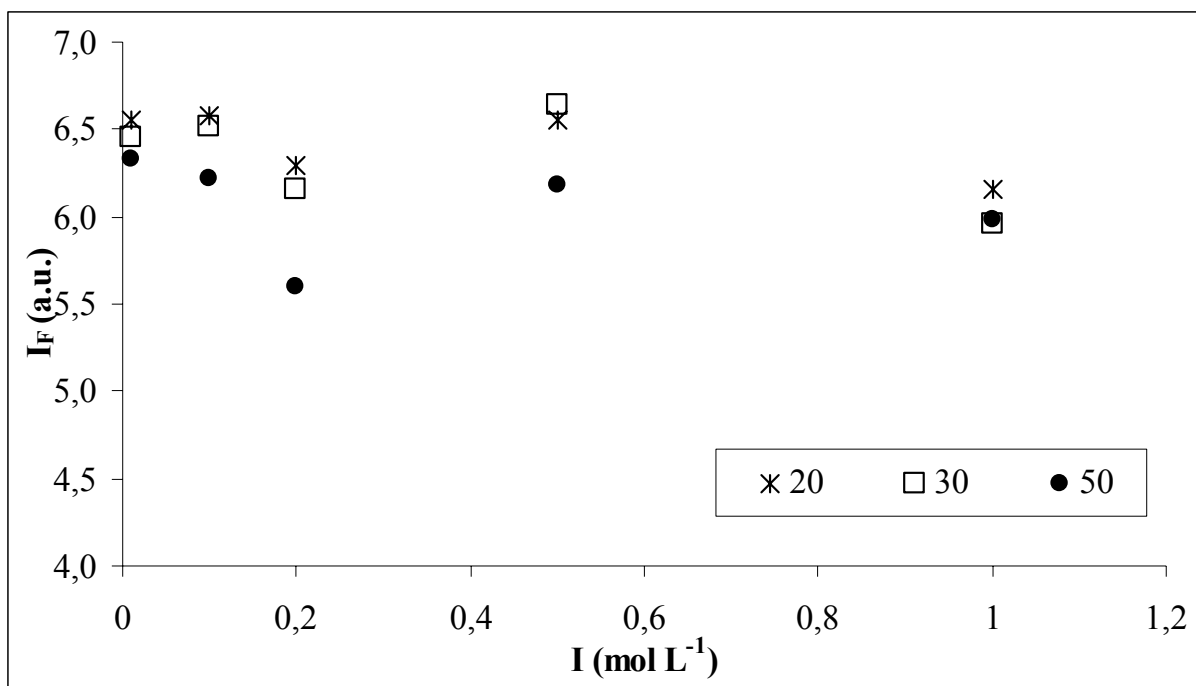
Dle tabulky (Tab. V) nedochází ani k žádné závislosti emisních maxim vzhledem ke zvyšující se teplotě. V porovnání s předešlým experimentem (4.1.3) lze konstatovat, že vlivem zvyšování teploty dochází k mírnému bathochromnímu posunu maxima emise. Je zřejmé, že repulze mezi TNS a HA jsou stále dosti silné. S časových důvodů však nebyla sledována závislost na čase.

Tab. V Posuny emisního maxima v závislosti na teplotě a vlivu iontové síly přidávaných solí k HA o různých molekulových hmotnostech (kg mol^{-1})

	30 °C			50 °C			
	I (mol L^{-1})	$\lambda_{\text{em}30}$ (nm)	$\lambda_{\text{em}30}$ (nm)	$\lambda_{\text{em}30}$ (nm)	$\lambda_{\text{em}50}$ (nm)	$\lambda_{\text{em}50}$ (nm)	$\lambda_{\text{em}50}$ (nm)
NaCl	1,00	418	419	421	418	421	418
	0,50	417	420	419	421	418	419
	0,20	417	418	418	418	416	416
	0,10	416	419	419	421	418	415
	0,01	418	416	415	418	417	414
KCl	1,00	418	417	418	418	418	418
	0,50	414	416	416	415	420	418
	0,20	417	416	415	417	417	415
	0,10	420	417	419	414	416	415
	0,01	416	416	419	418	416	413
CaCl₂	3,00	419	417	418	418	418	416
	1,50	420	420	417	418	418	418
	0,60	419	419	421	418	417	420
	0,30	419	417	421	417	417	416
	0,03	419	417	414	417	414	417

Jak je vidět z grafu (Obr. 21), nedocházelo u zkoumaných vzorků ke zvýšení intenzity fluorescence se zvyšující se teplotou, ale právě naopak. Z grafu je také vidět, že u koncentrace soli 1 mol L^{-1} dochází k unifikaci závislosti. Obdobný trend byl pozorován i u ostatních solí CaCl_2 a KCl . Důsledkem unifikace 1 mol L^{-1} solí je pravděpodobně vznikající přesycení iontů, ke kterému u ostatních nižších koncentracích solí nedochází. Graf je vynesena záměrně v širším rozmezí intenzit fluorescence, aby nedocházelo ke zkreslení, že jsou změny v intenzitách razantní, zatímco dochází jen k jejich fluktuaci řádově okolo jedné intenzity. Nelze také ve vysokých koncentracích vyloučit zhášení fluorescence volného TNS chloridovými aniony.

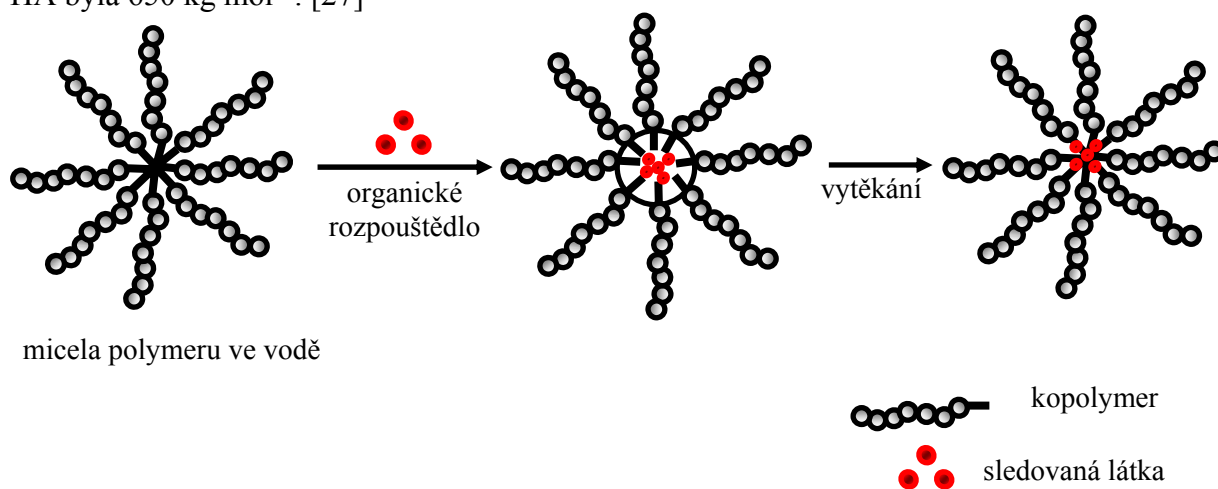
Se zvyšující se teplotou u vyšší molekulové hmotnosti dochází k degradaci řetězce HA. Závěrem lze říci, že ani změnou teploty nedocházelo k interakcím HA s TNS, což je pravděpodobně způsobeno silným hydratačním obalem HA, který je třeba narušit.



Obr. 21 Příklad závislost intenzity fluorescence na iontové síle vodného roztoku NaCl ($HA = 100,5 \text{ kg mol}^{-1}$, $c_{HA} = 2,48 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, $\lambda_{ex} = 300 \text{ nm}$), legenda je uvedena ve $^{\circ}\text{C}$

4.1.5 Další postup pro interakci HA s TNS – proces „oil-in-water emulsion“

Na základě literární rešerše bylo použito procesu „oil-in-water emulsion“ (Obr. 22). Tato metoda je obecně založena na přípravě vodného roztoku kopolymeru (resp. polymeru obsahujícímu hydrofilní a hydrofobní segmenty), ke kterému je přidáván roztok sledované látky (léčivo, sonda) rozpuštěný ve vodě nerozpustném těkavém rozpouštědle, který chceme na daný kopolymer navázat, v tomto případě je to TNS. Účelem je tedy vytvořit emulzi olej/voda, kdy skrze interakci rozpouštědla s hydrofobními segmenty řetězce (předpokládá se preferování interakce HF-segment-olej) dojde i ke zprostředkování interakce mezi aktivní látkou a daným hydrofobním segmentem. Vznikne tak agregát polymer-olej-látka, který je orientovaný hydrofobními segmenty směrem k částicím rozptýleného rozpouštědla. K agregaci micely se sledovanou látkou začne docházet při vytěkání rozpouštědla. Jako těkavé ve vodě nerozpustné rozpouštědlo byl použit oktanol a zvolená molekulová hmotnost HA byla 650 kg mol^{-1} . [27]



Obr. 22 Schématické znázornění procesu „oil-in-water emulsion“

Byl připraven roztok hyaluronanu o koncentraci 5 g L^{-1} , do kterého byla přidána sonda TNS rozpuštěná v oktanolu. Oktanol se s vodou nemísí a jak ukázaly polaritní experimenty, v daných koncentracích je TNS v oktanolu dobře rozpustné. Celkem byly připraveny dva vzorky TNS v oktanolu s hyaluronanem, které se nechaly cca 24 hod stát, aby mohlo rozpouštědlo vytékat. K úplnému vytěkání oktanolu ale nedošlo, protože malá část oktanolu zůstala plavat na hladině roztoku. Jeden ze vzorků byl následně 30 minut sonifikován na ultrazvuku a druhý ponechán stát.

Tab. VI Naměřené hodnoty intenzity fluorescence a posunu maxima emise záření TNS

vzorky	λ_{em} (nm)	I_F (a. u.)
referenční	413	7,9
nesonifikovaný	412	4,3
sonifikovaný	409	3,0

Do kyvety byl odebírán pomocí pipety vzorek tak, aby se tam nedostal nevytěkaný oktanol. V tabulce (Tab. VI) je vidět hypsochromní posun maxima emise o 4 nm do hydrofilní oblasti u vzorku, který byl sonifikován. Naopak u nesonifikovaného vzorku nedocházelo k žádnému výraznému posunu, pouze k 50 % snížení intenzity fluorescence vůči referenčnímu vzorku, což byl hyaluronan s TNS. Intenzita fluorescence nevykazuje možné interakce TNS s HA, ale vzhledem k posunu maxima emise pravděpodobně k navázání určitého množství TNS na sekundární strukturu HA došlo. Neúspěchem je pravděpodobně nevytěkaný oktanol, ve kterém mohla zůstat poměrná část TNS, která se nedostala do vodného roztoku hyaluronanu.

4.2 Experimenty s riboflavinem

Výsledná koncentrace sondy ve vzorku byla vždy $4,8 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$.

4.2.1 Vliv polaritního prostředí na intenzitu emisního záření riboflavinu

4.2.1.1 Polaritní řada rozpouštědel

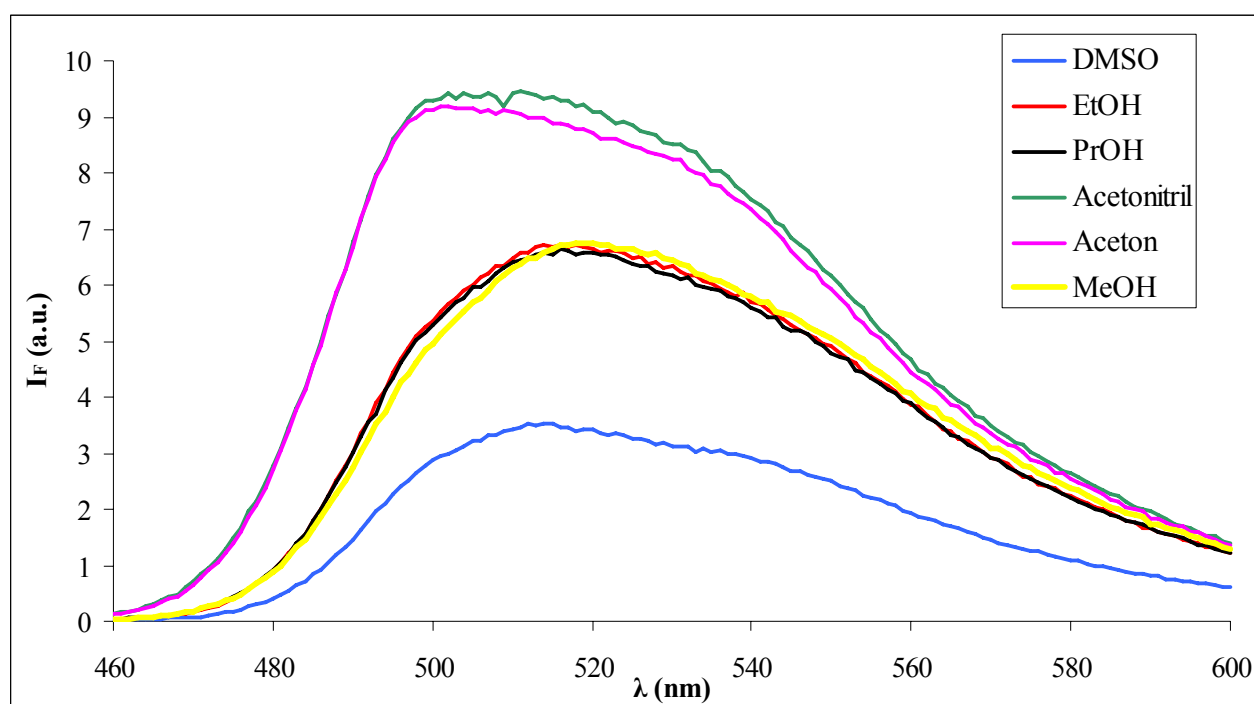
Do vialek bylo přidáváno 5 mL organického rozpouštědla ($w = 100 \%$) a 2,5 mL organického rozpouštědla s 2,5 mL injekční vody ($w = 50 \%$). Zvolená rozpouštědla jsou uvedena v tabulce (Tab. VII) i s uvedenými hodnotami relativních permitivit. Záměrně byla vybrána rozpouštědla zastupující téměř celou elotropní řadu.

V tabulce (Tab. VII) jsou uvedena rozpouštědla s klesající relativní permitivitou, respektive s klesající polaritou. Při porovnání intenzit fluorescence v rozpouštědlech má nejvyšší intenzitu riboflavin v čistém acetonitrilu a oproti tomu nejnižší hodnota je v DMSO, což je ze zvolených rozpouštědel to s nejvyšší relativní permitivitou, kde je intenzita naprosto identická v obou koncentracích rozpouštědla. V polovičním objemovém hmotnostním zlomku rozpouštědel docházelo ke snižování intenzity fluorescence a k bathochromnímu posunu emisních maxim vůči čistému rozpouštědлу (Obr. 23). Tento posun činí v průměru cca 9 nm v závislosti na použitém rozpouštědle. Maximum emise se ve všech rozpouštědlech s $w = 100 \%$ pohybuje od 520 do 523 nm.

Tab. VII Zjištěné hodnoty intenzity a posun vlnových délek emise fluorescence riboflavinu

rozpuštědlo	ϵ_r	w (%)	$\lambda_{em,max}$ (nm)	I_F (a.u.)
DMSO	(47,0)	50	446	3,5
		100	511	3,5
ACETONITRIL	(37,5)	50	446	9,5
		100	511	9,8
MeOH	(32,6)	50	522	5,4
		100	519	6,7
EtOH	(24,3)	50	523	6,1
		100	514	6,7
ACETON	(20,7)	50	522	5,9
		100	502	9,2
PrOH	(4,8)	50	520	5,3
		100	516	6,6

Z grafu (Obr. 23) je také zřejmé, že absorpční pás riboflavinu je dosti široký, jakoby docházelo k rozdělení maximálního píku na dva menší, což by mohlo příslušet dalšímu vibračnímu pásu riboflavinu. Toto rozdělení píku se projevilo především v čistých rozpouštědlech a nejvíce pak v DMSO, acetonitrilu a acetonu.



Obr. 23 Fluorescenční spektra riboflavinu v čistých rozpouštědlech - DMSO, acetonitril, methanol, ethanol, aceton a propanol ukazující vliv polarity zvoleného prostředí ($\lambda_{ex} = 445$ nm)

4.2.1.2 Směsi rozpouštědel s vodou

Do vialek byla přidávána organická rozpouštědla (methanol, ethanol a propanol) smíchána v různých objemových poměrech s injekční vodou, aby celkový objem směsi ve vialce byl 5 mL.

K charakterizaci prostředí kromě relativní permitivity slouží také polaritní parametr, což je fyzikální veličina, která zohledňuje dielektrickou konstantu (při 20 °C) a index lomu (při 20 °C) zvoleného rozpouštědla a slouží k charakterizaci zvoleného prostředí. Jeho hodnoty se pohybují od 0,001 v cyklohexanu po 0,3201 ve vodě. Vztah pro jeho výpočet je

$$\Delta f = f(\varepsilon) - f(n^2) = \frac{\varepsilon - 1}{2\varepsilon + 1} - \frac{n^2 - 1}{2n^2 + 1}, \quad (11)$$

kde ε je relativní permitivita a n je index lomu daného rozpouštědla.

Tab. VIII Polaritní parametry zvolených čistých rozpouštědel [17]

rozpouštědlo	Δf
voda	0,3201
MeOH	0,3090
EtOH	0,2900
Pr-1-OH	0,2739

Polaritní parametr směsi byl vypočítán ze vztahu

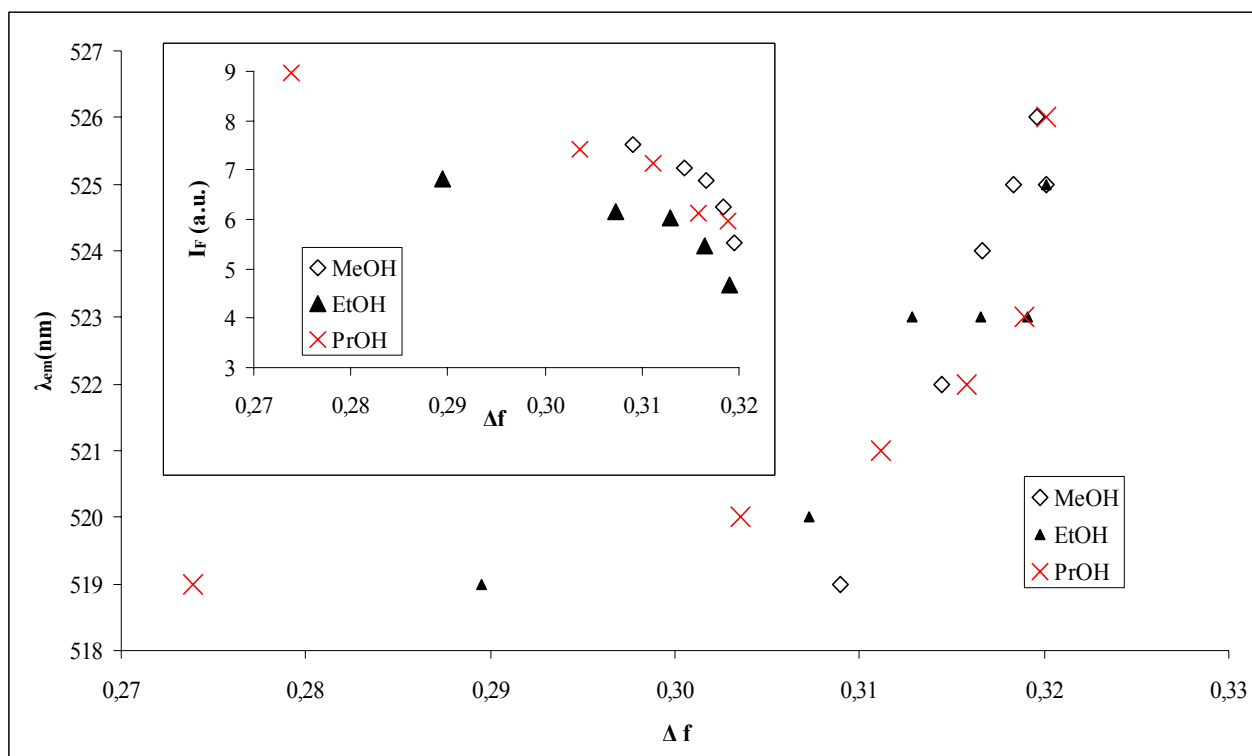
$$\Delta f_{\text{mix}} = (\mu_{\text{rozpouštědlo/voda}} \cdot f_{\text{rozpouštědlo}}) + (\mu_{\text{voda/rozpouštědlo}} \cdot f_{\text{voda}}), \quad (12)$$

kde $\mu_{\text{rozpouštědlo/voda}}$ je molární zlomek rozpouštědla ve směsi, $\mu_{\text{voda/rozpouštědlo}}$ je molární zlomek vody ve směsi a f je polaritní faktor rozpouštědla, resp. vody.

Tab. IX Vypočítané hodnoty polaritních parametrů směsi rozpouštědlo/voda, naměřené intenzity a posun vlnových délek emise fluorescence riboflavinu

w (%)	MeOH/voda			EtOH/voda			PrOH/voda		
	Δf_{mix}	I_{F} (a.u.)	λ_{em} (nm)	Δf_{mix}	I_{F} (a.u.)	λ_{em} (nm)	Δf_{mix}	I_{F} (a.u.)	λ_{em} (nm)
0	0,32	5,5	525	0,32	3,9	525	0,32	5,8	526
10	0,32	5,5	526	0,32	4,7	523	0,32	6,0	523
30	0,32	6,3	525	0,32	5,5	523	0,32	6,1	522
50	0,32	6,8	524	0,31	6,0	523	0,31	7,1	521
70	0,31	7,0	522	0,31	6,1	520	0,30	7,4	520
100	0,31	7,5	519	0,29	6,8	519	0,27	9,0	519

V grafu (Obr. 24) je exponenciální pokles intenzity fluorescence se zvyšujícím se polaritním faktorem ve všech měřených směsích. Ve směsi methanol/voda docházelo k nejmenším rozdílům intenzit fluorescence (Tab. IX), zatímco k pozvolnému poklesu intenzity docházelo u nejméně polární směsi propanol/voda. Po přidavku vody k rozpouštědlům byl roztok více polární a docházelo tak k významné podpoře zhášení emitovaného záření riboflavinu, což může být způsobeno snížením doby života excitovaného stavu.



Obr. 24 Závislost intenzity fluorescence riboflavinu na polaritním faktoru směsi rozpouštědlo/voda a závislost emisního maxima vlnové délky fluorescence riboflavinu na polaritním faktoru směsi rozpouštědlo/voda ($\lambda_{ex} = 445 \text{ nm}$)

V grafu (Obr. 24) je pozorován bathochromní posun maxima emise se zvyšujícím se polaritním faktorem. U směsi ethanol/voda dochází u 90 % až 50 % obsahu vody (Tab. IX) ke stagnaci, tedy setrvání maxima emise na 523 nm. Posun maxim emise činil u směsi methanol/voda a ethanol/voda od nejméně polární k nejvíce polární směsi 6 nm a u směsi propanol/voda byl zaznamenán tento posun 7 nm. Přídavek vody k rozpouštědлу má pozitivní vliv na interakci prostředí s riboflavinem. Dochází k posunu emisního maxima do hydrofobní oblasti.

4.2.2 Studium hydrofobních interakcí riboflavinu s nativním hyaluronanem pomocí měření REES efektu

Do vialek bylo přidáváno určité množství hyaluronanu, aby jeho koncentrace byla 0; 0,05; 0,5 a 5 g L⁻¹ a doplněno injekční vodou na celkový objem 5 mL.

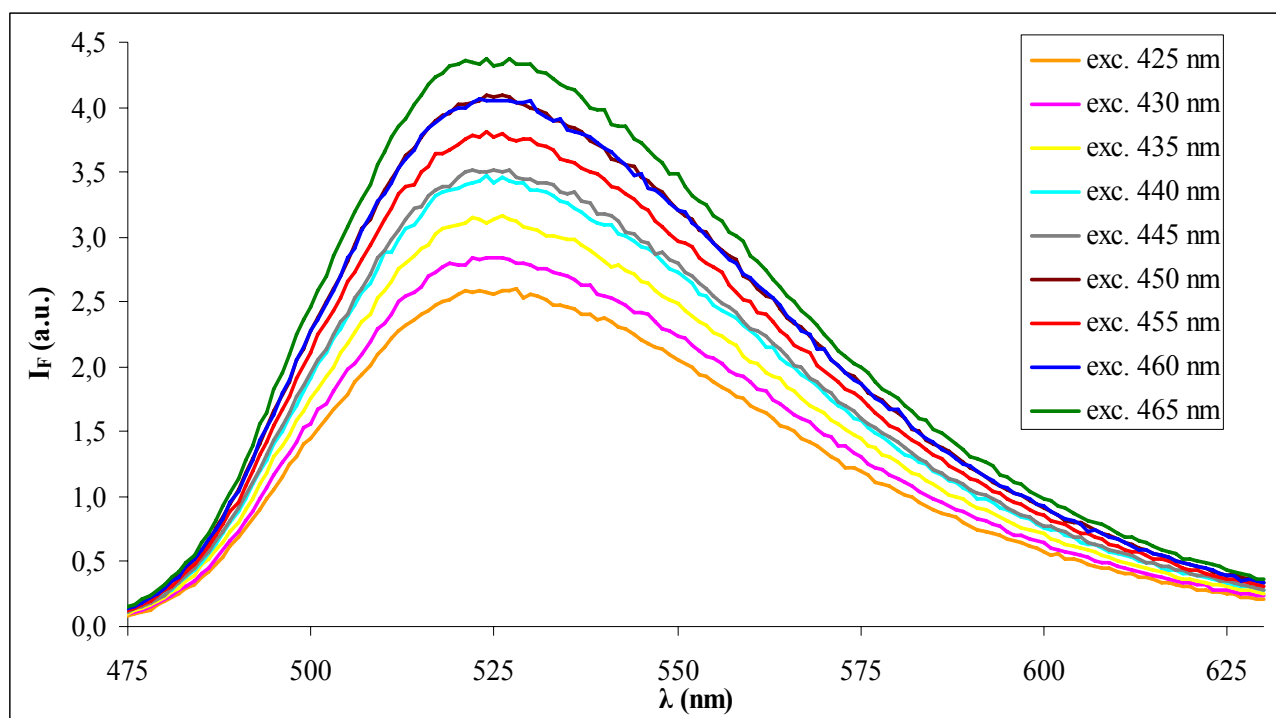
Pro experiment byly zvoleny čtyři molekulové hmotnosti nativního hyaluronanu, a to 100,5; 253,9; 740; 1390 kg mol⁻¹.

Během experimentu byla měněna excitační vlnová délka, avšak k posunu maxima emisního píku riboflavinu v různých koncentracích hyaluronanu (ani v různě volených molekulových hmotnostech – jsou uvedeny pouze zjištěné hodnoty HA o $M_w = 740 \text{ kg mol}^{-1}$) nedocházelo. Měnila se pouze intenzita fluorescence, která svých maxim dosahovala při excitaci 465 nm (Obr. 25). Nejvyšší hodnota intenzity fluorescence byla zaznamenána ve vodě při excitaci 465 nm (Tab. X). Naopak nejnižší intenzita fluorescence byla naměřena v nejvíce koncentrovaném hyaluronanu – 5 g L⁻¹ při excitaci 425 nm.

Výsledkem experimentu je neprokázání REES efektu, respektive hydrofobních interakcí HA s riboflavinem, v rámci zvolených oblastí koncentrací i v rámci vybraných molekulových hmotností HA.

Tab. X Změny emisních maxim v závislosti na měněné excitační vlnové délce riboflavinu v různých koncentracích nativního hyaluronanu o $M_w = 740 \text{ kg mol}^{-1}$

λ_{ex} (nm)	0 g L^{-1}		$0,05 \text{ g L}^{-1}$		$0,5 \text{ g L}^{-1}$		5 g L^{-1}	
	λ_{em} (nm)	I_{Fem} (a.u.)	λ_{em} (nm)	I_{Fem} (a.u.)	λ_{em} (nm)	I_{Fem} (a.u.)	λ_{em} (nm)	I_{Fem} (a.u.)
425	524	6,0	528	2,6	521	2,7	525	2,0
430	523	6,6	526	2,8	527	2,9	524	2,3
435	526	7,3	526	3,2	524	3,2	523	2,5
440	525	7,9	524	4,5	526	3,5	524	2,7
445	525	7,9	527	3,5	524	3,6	524	2,8
450	524	9,3	526	4,1	528	4,2	526	3,2
455	527	8,7	524	3,8	525	3,9	525	3,0
460	525	9,3	523	4,1	523	4,2	527	3,0
465	525	9,9	524	4,4	523	4,6	525	3,5



Obr. 25 Příklad vývoje emisních spekter riboflavinu v závislosti na posunu vlnové délky emise ($c_{\text{HA}} = 0,05 \text{ g L}^{-1}$ a $M_w = 740 \text{ kg mol}^{-1}$, $\lambda_{\text{ex}} = 445 \text{ nm}$)

4.3 Experimenty s α -tokoferolem

Výsledná koncentrace sondy ve vzorku byla vždy $1,97 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$.

4.3.1 Vliv polaritě prostředí na intenzitu emisního záření α -tokoferolu

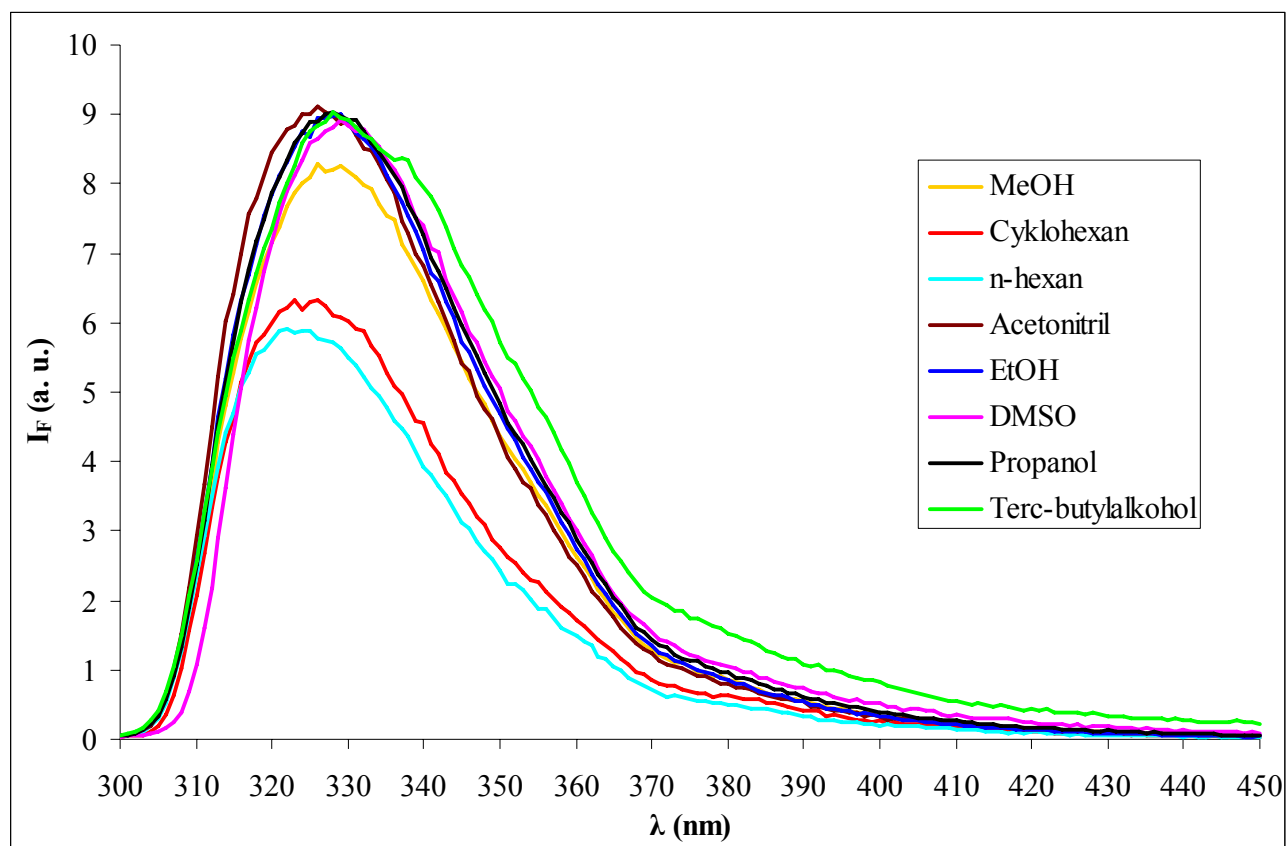
Do vialek bylo pipetováno 5 mL vybraných organických rozpouštědel – DMSO, acetonitril, methanol, ethanol, *terc*-butanol, propanol, cyklohexan a n-hexan. Cílem experimentu bylo sledovat vliv posunu maxima emise v závislosti na relativní permitivitě rozpouštědla.

Tab. XI Naměřené hodnoty intenzit fluorescence a posuny emisního maxima α -tokoferolu

rozpouštědlo	ϵ_r (-)	$\lambda_{em,max}$ (nm)	I_F (a.u.)
DMSO	48,90	329	8,9
Acetonitril	38,80	326	9,1
MeOH	33,62	326	8,3
EtOH	25,07	329	9,0
PrOH	20,30	328	9,0
<i>terc</i> -butylalkohol	12,47	328	9,0
cyklohexan	2,02	326	6,3
n-hexan	1,89	322	5,9

V tabulce (Tab. XI) jsou uvedeny intenzity fluorescence emisního záření α -tokoferolu, kdy nejvyšší hodnoty dosahovala v acetonitrilu (Obr. 26) a nejnižší v nejméně polárním organickém rozpouštědle n-hexanu. Intenzita fluorescence měla stoupající trend do relativní permitivity ethanolu, pak docházelo u methanolu k poklesu a následoval opět pozvolný nárůst. Nejlépe α -tokoferol svítil v organických rozpouštědlech s vysokou relativní permitivitou, tedy ve více polárním prostředí.

Posuny emisního maxima závisely na polaritě rozpouštědla. Pohybovaly se v rozmezí od 322 do 329 nm. Posuny emisních maxima byly bathochromní do hydrofobní oblasti.



Obr. 26 Fluorescenční emisní spektra α -tokoferolu v organických rozpouštědlech s různou relativní permitivitou ($\lambda_{ex} = 295$ nm)

4.3.2 Asociace nativního hyaluronanu s α -tokoferolem

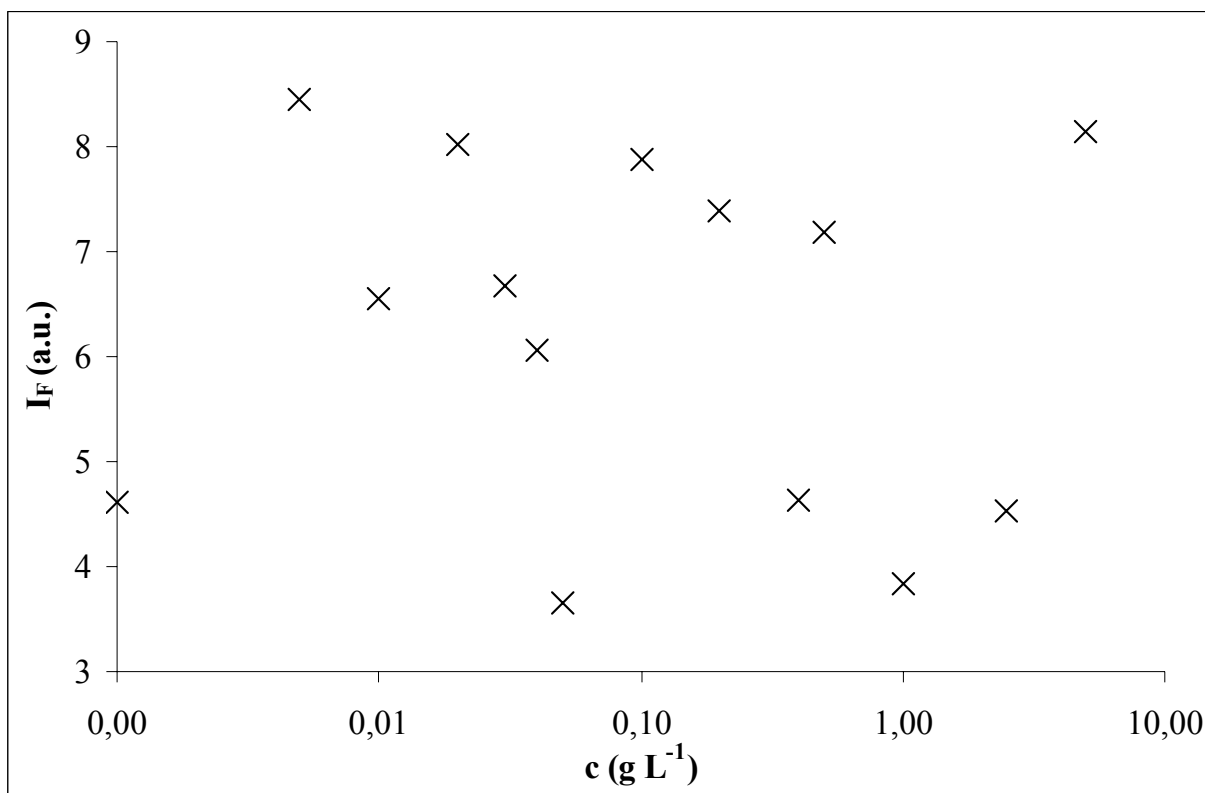
Do vialek bylo přidáváno určité množství HA ($M_w = 100,5 \text{ kg mol}^{-1}$) a doplněno injekční vodou tak, aby byla vytvořena koncentrační řada.

Tab. XII *Intenzity fluorescence, posun emisního maxima a pouhým okem pozorovatelná, resp. nepozorovatelná fázová separace α -tokoferolu*

c (g L⁻¹)	λ_{em} (nm)	I_F (a.u.)	Fázová separace α-tokoferolu
0,000	328	5,2	ano
0,001	328	4,6	ano
0,005	327	8,5	ano
0,010	328	6,6	ano
0,020	327	8,0	ano
0,030	328	6,7	ano
0,040	327	6,1	ano
0,050	328	3,7	ano
0,100	327	7,9	ne
0,200	327	7,4	ano
0,400	328	4,6	ne
0,500	327	7,2	ne
1,000	328	3,8	ne
2,500	328	4,5	ne
5,000	328	8,1	ne

Hodnoty intenzit fluorescence nevykazují žádnou závislost (Obr. 27), jsou velmi proměnlivé. V nízkých koncentracích HA až do koncentrace $0,5 \text{ g L}^{-1}$ navíc bylo pouhým okem patrné, že se α -tokoferol zcela nerozpustil i přes dlouhodobé (12 h) míchání a v roztoku zůstával fázově separovaný. Navíc jak je vidět z tabulky (Tab. XII), nedocházelo ani k posunu maxima, které bylo neměnné takže α -tokoferol se zkoumaným roztokem HA neinteragoval. Část ho ulpěla i na stěnách vialek, takže ve zkoumaném roztoku zůstávala pravděpodobně jen malá část původně nadávkované koncentrace. V tabulce jsou uvedeny koncentrace HA, u kterých byl α -tokoferol fázově separovaný.

Vše tedy nasvědčuje tomu, že α -tokoferol s HA o molekulové hmotnosti $100,5 \text{ kg mol}^{-1}$ ve zvolených koncentracích neinteraguje.



Obr. 27 Závislost intenzity fluorescence α -tokoferolu na koncentraci hyaluronanu o molekulové hmotnosti $100,5 \text{ kg mol}^{-1}$, která je v logaritmickém měřítku. ($\lambda_{ex} = 295 \text{ nm}$)

4.3.3 Studium hydrofobních interakcí α -tokoferolu s nativním hyaluronanem pomocí měření REES efektu

Do vialek bylo přidáváno určité množství hyaluronanu, aby jeho koncentrace byla 1 g L^{-1} a doplněno injekční vodou na celkový objem 5 mL . Další použitou metodou zkoumání hydrofobních interakcí α -tokoferolu s HA je měření REES efektu.

Pro experiment byla zvolena molekulová hmotnost nativního hyaluronanu $100,5 \text{ kg mol}^{-1}$.

Během experimentu byla měněna excitační vlnová délka a nedocházelo k posunu maxima emisního píku α -tokoferolu. Předpokladem úspěšné interakce HA s α -tokoferolem byl bathochromní posun emisních maxim do hydrofobní oblasti.

Měnila se pouze intenzita fluorescence, která svého maxima dosahovala při excitaci 295 nm a po dosažení tohoto maxima nastal klesající trend intenzity fluorescence.

Výsledkem experimentu je neprokázání REES efektu, resp. hydrofobních interakcí HA s α -tokoferolem v rámci zvolené koncentrace a molekulové hmotnosti HA.

4.3.4 Měření anizotropie α -tokoferolu

4.3.4.1 α -tokoferol ve směsi glycerol/ethanol

Na základě literární rešerše byl proveden experiment s měřením anizotropie α -tokoferolu, kdy tato metoda slouží ke zjištění vlastností biopolymerů. Jako referenční prostředí byl vybrán glycerol, který je díky přítomnosti hydroxylových skupin polární molekulou a neomezitelně se mísí s vodou a jednoduchými alkoholy, jako je ethanol nebo methanol. Dalším důvodem proč byl zvolen právě glycerol je kvůli jeho viskozitě, díky které dochází ke zpomalení rotace molekuly.

Do vialek bylo odváženo určité množství glycerolu a doplněno ethanolem. Vzorby byly míchány 8 hodin.

Tab. XIII Stanovené hodnoty maxim polarizované emise, intenzity fluorescence emisního záření směsi glycerol/ethanol při nastavení polarizátorů vertikálně-vertikálně a vertikálně-horizontálně

Polarizátory	hmotnostní procenta	λ_{em} (nm)	I_F (a.u.)
VV	80 % glyc. + 20 % EtOH	330	5,8
	85 % glyc. + 15 % EtOH	329	5,8
	90 % glyc. + 10 % EtOH	331	4,5
	95 % glyc. + 5 % EtOH	331	4,0
VH	80 % glyc. + 20 % EtOH	325	2,6
	85 % glyc. + 15 % EtOH	327	3,2
	90 % glyc. + 10 % EtOH	325	2,7
	95 % glyc. + 5 % EtOH	328	2,1

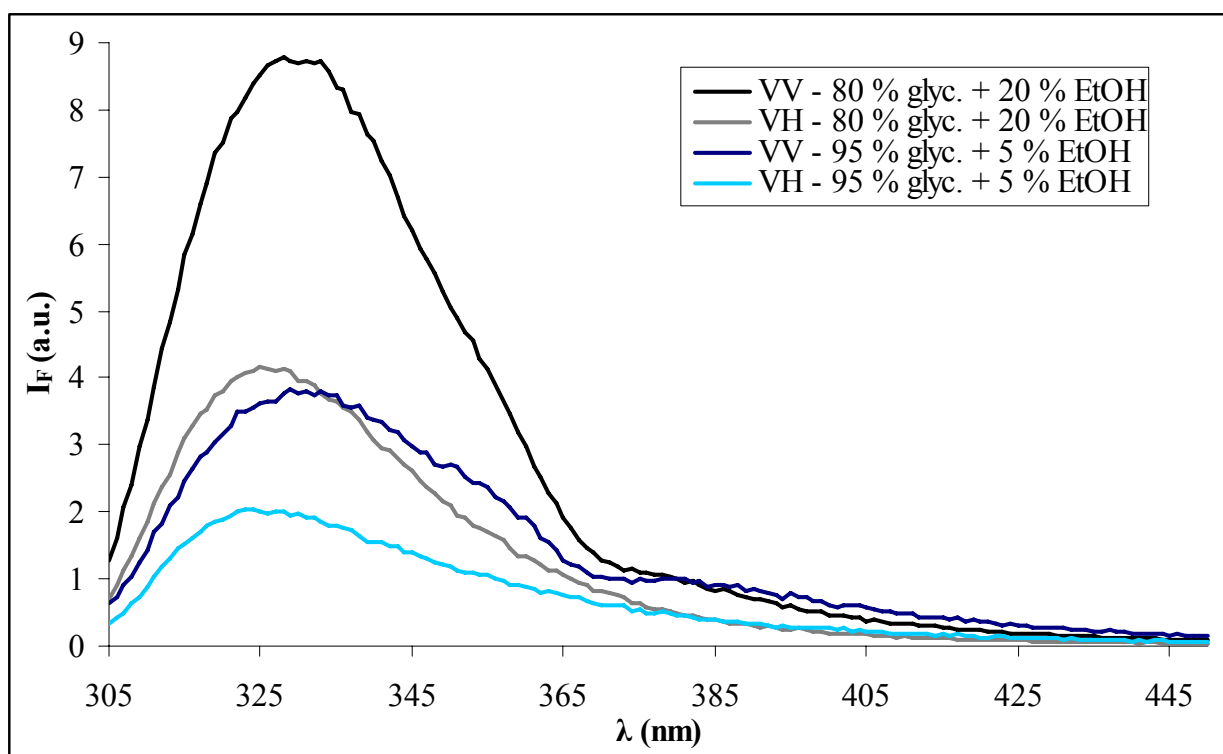
Tab. XIV Stanovené hodnoty anizotropie fluorescence a totální intenzity a jejich odchylky v závislosti na koncentraci směsi glycerol/ethanol při nastavení polarizátorů vertikálně-vertikálně a vertikálně-horizontálně

hmotnostní procenta	r	ΔE	$I_{tot.}$ (a.u.)	ΔE
80 % glyc. + 20 % EtOH	0,1037	0,0107	19,33	0,04
85 % glyc. + 15 % EtOH	0,1117	0,0149	14,33	0,09
90 % glyc. + 10 % EtOH	0,1454	0,0039	11,46	0,12
95 % glyc. + 5 % EtOH	0,1900	0,0051	8,55	4,94

α -tokoferol se ve směsi rozpustil, protože se v roztoku nevyskytoval fázově separovaný. Hodnoty anizotropie α -tokoferolu (Tab. XIV) rostou se zvyšujícím se obsahem glycerolu ve směsi. Nejvyšší hodnoty anizotropie bylo tedy dosaženo ve vzorku s nejvíce viskózním obsahem, tzn. u nejvyšších obj. % glycerolu. S klesajícím obsahem glycerolu ve směsi glycerol/ethanol docházelo ke zvýšení totální intenzity fluorescence. Z čehož vyplývá, že α -tokoferol má vyšší intenzitu fluorescence v méně viskózních roztocích, kde nedochází k tak velkému zpomalování rotace molekul jako je tomu ve viskóznějších roztocích.

Při rozlišném nastavení polarizátorů (Tab. XIII) dochází k posunu maxima emise, a to k posun bathochromnímu při nastavení polarizátorů vertikálně-vertikálně vůči nastavení polarizátorů vertikálně-horizontálně. Tento posun činí řádově 5 nm. Dochází také k poklesu intenzity fluorescence o 50 %. Tyto rozdíly jsou způsobeny tím, že při nastavení polarizátorů vertikálně-horizontálně se zaznamenává pouze depolarizovaná fluorescence, zatímco při nastavení vertikálně-vertikálně je zaznamenávána jak emise fluorescence, tak i rozptyl světla.

V grafu (Obr. 28) jsou pak pro srovnání vyneseny intenzity fluorescence směsi glycerol/voda při odlišném nastavení polarizátorů pro nejméně a nejvíce viskózní připravené vzorky.



Obr. 28 Závislost intenzity fluorescence směsi glycerol/ethanol na posunu emisního maxima α -tokoferolu při nastavení polarizátorů vertikálně – vertikálně a vertikálně horizontálně pro různě koncentrované vzorky ($\lambda_{ex} = 295 \text{ nm}$)

4.3.4.2 α -tokoferol v nativním hyaluronanu

Do vialek bylo přidáváno určité množství nativního hyaluronanu a doplněno injekční vodou s cílem získat koncentrační řadu. Pro experiment byly vybrány čtyři molekulové hmotnosti hyaluronanu – 100,5; 253,9; 740; 1390 kg mol^{-1} . Vzorky byly 24 hod míchány a poté 5 hod nechány stát.

Anizotropie α -tokoferolu byla měřena kvůli neprokazatelným hodnotám intenzity fluorescence. Dalším důvodem výběru bylo to, že anizotropie nezávisí na kvantovém výtěžku a v neposlední řadě je to kvůli jeho vysoké polaritě a také na základě literární rešerše, ve které byl pomocí měření anizotropie zkoumán vliv pohyblivosti α -tokoferolu v lipidové dvojvrstvě. [29]

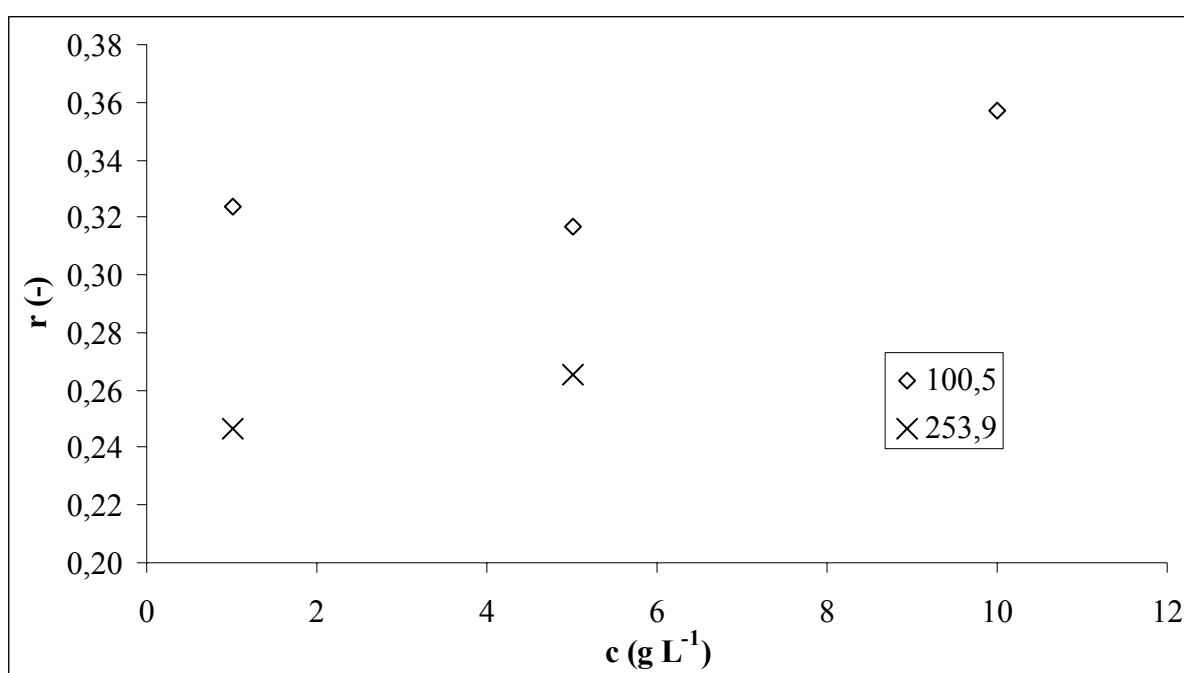
Tab. XV Stanovené hodnoty maxim polarizované emise, intenzity fluorescence emisního záření, anizotropie fluorescence a totální intenzity a jejich odchylky v závislosti na koncentraci HA ($M_w = 100,5 \text{ kg mol}^{-1}$) při nastavení polarizátorů vertikálně-vertikálně a vertikálně-horizontálně

c (g L^{-1})	VV	VV	VH	VH	r (-)	ΔE	$I_{tot}(\text{a.u.})$	ΔE
	$\lambda_{em}(\text{nm})$	$I_F(\text{a.u.})$	$\lambda_{em}(\text{nm})$	$I_F(\text{a.u.})$				
1	328	5,8	323	2,6	0,3236	0,0038	9,942	0,108
5	328	5,4	325	2,3	0,3167	0,0107	9,339	0,281
10	327	5,0	324	1,9	0,3572	0,0086	8,116	0,187

Tab. XVI Stanovené hodnoty maxim polarizované emise, intenzity fluorescence emisního záření, anizotropie fluorescence a totální intenzity a jejich odchylky v závislosti na koncentraci HA ($M_w = 253,9 \text{ kg mol}^{-1}$) při nastavení polarizátorů vertikálně-vertikálně a vertikálně-horizontálně – vzhledem k nedostupnosti vyšší koncentrace HA, nebylo možné proměřit i koncentraci 10 g L^{-1}

c (g L^{-1})	VV	VV	VH	VH	r (-)	ΔE	$I_{\text{tot.}}$ (a.u.)	ΔE
	λ_{em} (nm)	I_{F} (a.u.)	λ_{em} (nm)	I_{F} (a.u.)				
1	330	6,3	328	3,0	0,2469	0,0049	12,380	0,180
5	326	7,0	322	4,0	0,2655	0,0025	13,680	0,099

Anizotropie byla měřena i u vzorků s vyšší molekulovou hmotností, ale hodnoty kvůli zakalenosti vzorků dosahovali příliš vysokých hodnot, a tak nejsou ve vyhodnocení uvedeny.



Obr. 29 Závislost anizotropie fluorescence α -tokoferolu na koncentraci HA o různých molekulových hmotnostech ($\lambda_{\text{ex}} = 295 \text{ nm}$)

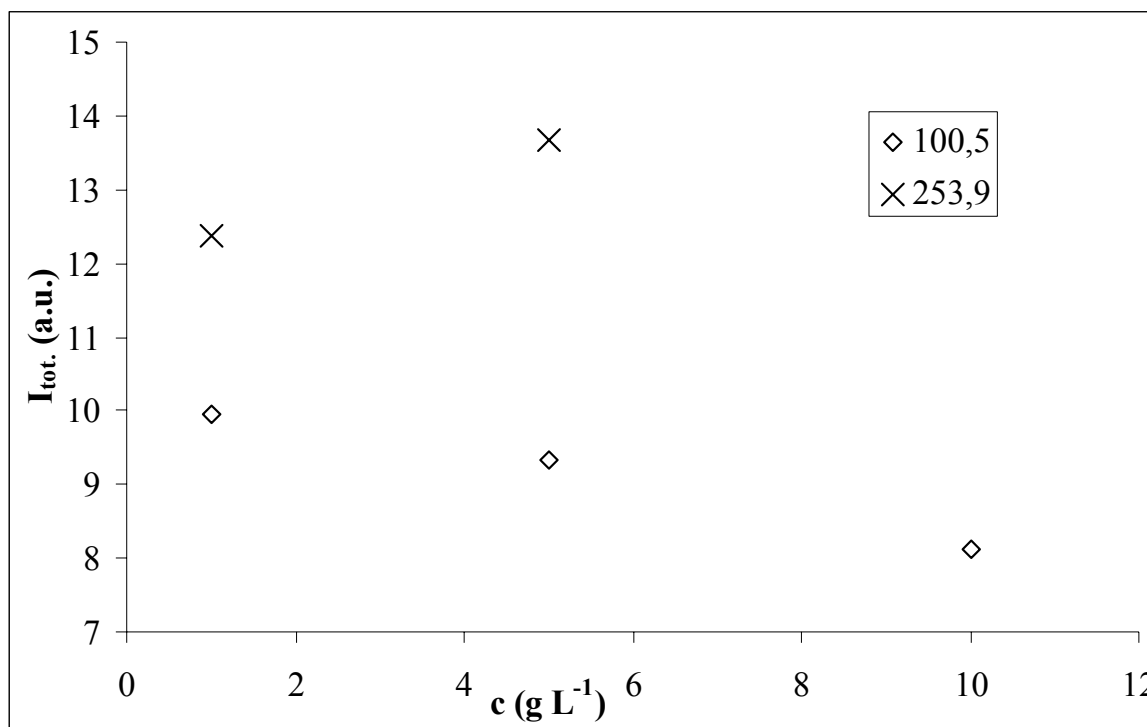
Z naměřených hodnot je vidět, že hodnota anizotropie je velmi vysoká, což bylo způsobeno již zmiňovaným vysokým zákalem vzorků. Ale došlo k rozpuštění α -tokoferolu, protože se již v roztoku fázově nesePARoval, což bylo pouhým okem patrné.

Při porovnání intenzit fluorescence při průchodu různě nastavených polarizátorů (Tab. XV) a (Tab. XVI) lze říci, že při nastavení polarizátorů vertikálně-horizontálně dochází k jejímu poklesu o 50 – 70 %, což je způsobeno převažující orientací molekul ve vertikálním směru. Stejně jako u referenčního vzorku směsi glycerol/voda dochází k bathochromnímu posunu maxima emise.

Při vynesení závislosti anizotropie fluorescence na koncentraci HA o různých molekulových hmotnostech (Obr. 29) není pozorovatelný žádný trend. Pouze lze říci, že hodnota anizotropie fluorescence záleží více na molekulové hmotnosti HA než na změně její koncentrace. U HA o vyšší molekulové hmotnosti byly hodnoty anizotropie vyšší. Stejně tak se neprojevil žádný trend v závislosti totální intenzity na koncentraci HA (Obr. 30). Ovšem na

rozdíl od anizotropie dosahovala totální intenzita vyšších hodnot u nižších molekulových hmotností HA.

V porovnání s předchozím experimentem (4.3.4.1) byly hodnoty anizotropie vyšší, což pravděpodobně nasvědčuje více polárnímu prostředí, které bylo vytvořeno u HA. Nejen vysoké hodnoty anizotropie nasvědčují probíhající interakci, ale i zákal měřených vzorků α -tokoferolu s HA.



Obr. 30 Závislost celkové intenzity fluorescence α -tokoferolu na koncentraci HA o různých molekulových hmotnostech ($\lambda_{ex} = 295$ nm)

4.4 Experimenty s polaritní sondou pyrenem

Výsledná koncentrace sondy ve vzorku byla vždy $2,5 \cdot 10^{-11}$ mol L⁻¹.

4.4.1 Vliv polaritního prostředí na intenzitu emisního záření pyrenu

Do vialek bylo pipetováno 5 mL vybraných organických rozpouštědel – voda, aceton, DMSO, acetonitril, methanol, ethanol, *tert*-butanol, propanol, chloroform, cyklohexan a n-hexan.

Tab. XVII *Vypočtené hodnoty poměru intenzit fluorescence I_I/I_{III} v závislosti na relativní permitivitě rozpouštědla*

rozpouštědlo	ϵ_r (-)	poměr I_I/I_{III}
voda	78,590	1,45
DMSO	46,700	1,70
acetonitril	37,500	1,71
methanol	33,620	1,36
ethanol	25,070	1,11
aceton	20,700	0,96
propan-1-ol	20,300	0,87
<i>terc</i> -butanol	12,470	1,13
chloroform	4,806	1,21
cyklohexan	2,023	0,53
n-hexan	1,890	0,51

V tabulce (Tab. XVII) jsou uvedeny intenzity ve vzájemném poměru, známém jako 1:3, který je obrazem polaritě mikrookolí pyrenu. Číslo 1 symbolizuje přechod 0-0, který závisí na polaritě prostředí a nachází se u vlnové délky 373 nm, zatímco číslo 3 představuje přechod 0-2, který je pásem referenčním u vlnové délky 383 nm. Jak je vidět, dosahuje tento poměr v polárním prostředí hodnot 1,11 až 1,45, zatímco v méně polárním je to okolo 0,51 až 0,96. Jakousi hranicí je hodnota poměru odpovídající jedné.

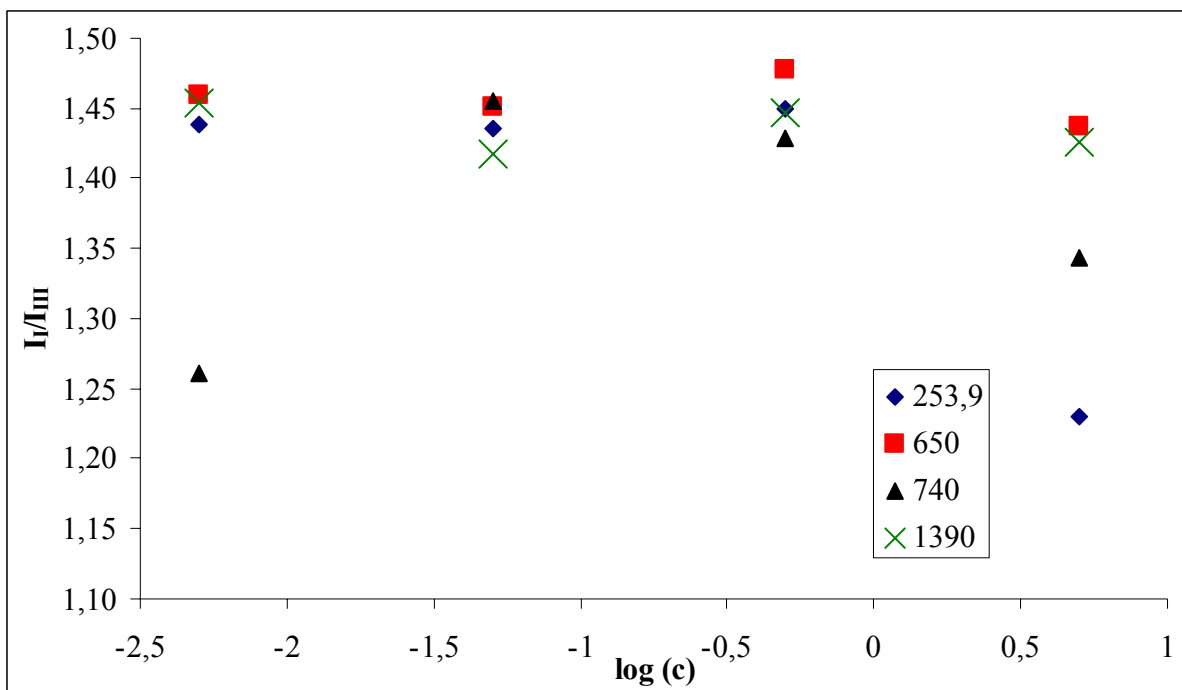
4.4.2 Studium interakcí pyrenu s hyaluronanem

Do vialek byla postupně pipetována různá množství nativního hyaluronanu a doplněna injekční vodou, aby vznikla koncentrační řada. Pro tento experiment byly vybrány čtyři molekulové hmotnosti hyaluronanu – 253,9; 650; 740; 1390 kg mol⁻¹.

Tab. XVIII *Poměry intenzit fluorescence pyrenu 1:3 v různých koncentracích hyalorunanů o různé molekulové hmotnosti*

c (g L⁻¹)	253,9 kg mol⁻¹	650 kg mol⁻¹	740 kg mol⁻¹	1390 kg mol⁻¹
	I_I/I_{III}	I_I/I_{III}	I_I/I_{III}	I_I/I_{III}
0,005	1,44	1,46	1,26	1,45
0,050	1,44	1,45	1,46	1,42
0,500	1,45	1,48	1,43	1,45
5,000	1,23	1,44	1,34	1,43

Jak je vidět na obrázku (Obr. 31) poměr 1:3 nevykazoval koncentrační závislost v rámci vybraných koncentrací až na molekulovou hmotnost 253,9 kg mol⁻¹ a 650 kg mol⁻¹, kdy dochází k poměru a náznaku S-křivky. Na základě nezávisle se měnících poměrů 1:3 lze říci, že interakce pyrenu s různě koncentrovanými roztoky HA jsou nahodilé a nevykazují žádný trend. Podle srovnání s předchozím experimentem (4.4.1), zejména porovnáním hodnot poměru 1:3 z tabulky (Tab. XVIII) lze říci, že hodnoty poměru dosahují vysokých hodnot jako v polárním prostředí vody.



Obr. 31 Závislost poměru 1:3 na logaritmu koncentrace pro různé molekulové hmotnosti HA ($\lambda_{ex} = 335 \text{ nm}$)

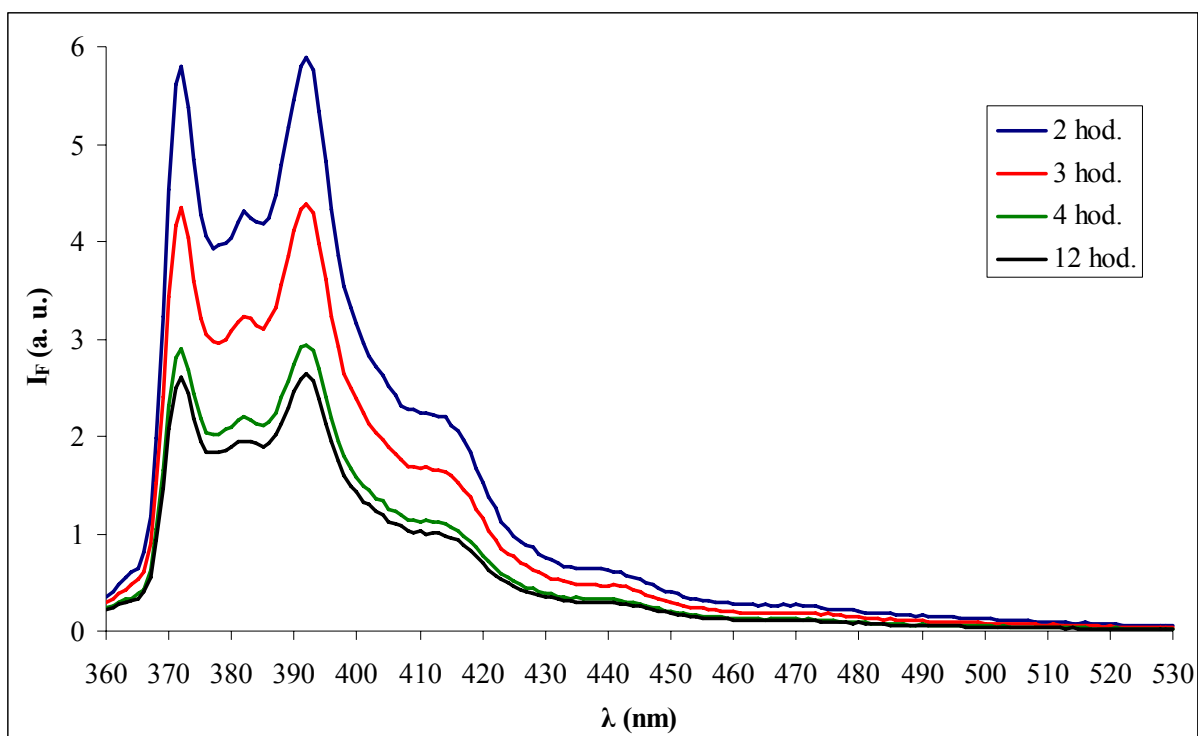
4.4.3 Studium asociace hyaluronanu s pyrenem

Do kádinky byl přidán hyaluronan o koncentraci 5 g L^{-1} o molekulové hmotnosti 650 kg mol^{-1} . Vzorek byl zahříván a míchán při teplotě $50 \text{ }^\circ\text{C} \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ a postupně po 2, 3, 4 a 12 hodinách bylo odebráno 5 mL vzorků, které se nechaly vychladnout a následně byly proměřeny.

Tab. XIX Poměr 1:3 ovlivněný konstantní teplotou a dobou odběru

t (hod)	I _I /I _{III}
2	1,35
3	1,35
4	1,34
12	1,32

Jak je vidět z tabulky (Tab. XIX), nedocházelo k radikálním změnám poměru 1:3 v závislosti na teplotě, a tedy ani zvýšením teploty nedošlo k podpoření hydrofobní interakce. Poměr 1:3 vykazoval pouze mírný pokles. Teplota tedy interakci neovlivňuje. Jediná závislost, která je viditelná z grafu (Obr. 32), je závislost intenzity fluorescence emisního záření pyrenu na době ohřevu. Docházelo tedy k poklesu intenzity fluorescence pyrenu s dobou ohřevu vzorku. Po 12 hod ohřevu intenzita poklesla cca o 60 %. Při delším sledování této závislosti by podle stávajících výsledků mohlo dojít ke snížení poměru 1:3 a tedy i k hydrofobním interakcím pyrenu s HA.



Obr. 32 Fluorescenční spektrum pyrenu v hyaluronanu ovlivněné dobou ohřevu ($\lambda_{ex} = 335 \text{ nm}$)

4.4.4 Další postup pro interakci HA s pyrenem – proces „oil-in-water emulsion“

Stejně jako u sondy TNS (4.1.5) byla na základě stejné literární rešerše provedena metoda „oil-in-water emulsion“ pro pyren. Jako těkavé ve vodě nerozpustné rozpouštědlo byl použit chloroform a zvolená molekulová hmotnost HA byla 650 kg mol^{-1} .

Tab. XX Vypočtené hodnoty poměru 1:3

vzorky	I_I/I_{III}
referenční	1,290
sonifikovaný	1,294
nesonifikovaný	1,437

Byl připraven roztok hyaluronanu o koncentraci 5 g L^{-1} , do kterého byl přidáván pyren v chloroformu. Stejně byly připraveny dva vzorky, které se nechaly cca 24 hod stát, aby došlo k vytěkání rozpouštědla. K úplnému vytěkání ovšem nedošlo, protože malá část chlorofomu zůstala na rozdíl od oktanolu ležet na dně kádinky, protože má větší hustotu než voda. Jeden ze vzorků byl následně 30 min sonifikován na ultrazvuku a druhý ponechán stát.

V tabulce (Tab. XX) je vidět, že v porovnání s referenčním vzorkem nedocházelo u sonifikovaného vzorku k žádné změně poměru 1:3. Zatímco u vzorku, který se ponechal stát je zřejmý nárůst poměru, a to směrem do hydrofilní oblasti. Nedocházelo ani ke změnám intenzity fluorescence, která zůstávala téměř neměnná. Nepodařilo se tedy dostatečně podpořit interakci pyrenu se zvoleným hyaluronanem.

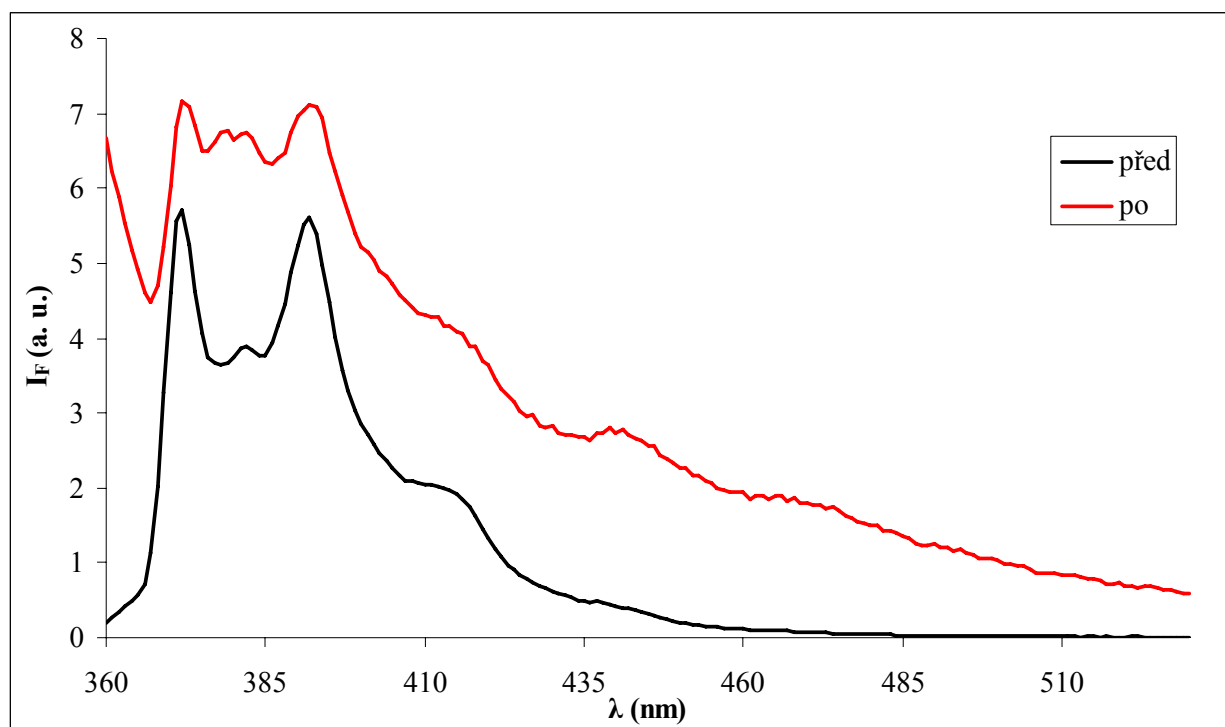
4.5 Proces lyofilizace u TNS, α -tokoferolu a pyrenu

Lyofilizace je sušení vymrazováním a řadí se mezi nejšetrnější metodu přípravy suchých látek. Při lyofilizaci se využívá fyzikálního jevu sublimace ledu, což je bezprostřední přímý přechod z pevné fáze do fáze plynné. Pro vysušování se vloží připravená látka ve zmrzlém stavu do vakuové komory. Za vakua sublimací ledu se uvolněná vodní pára zachytává namrznáním na kondenzátoru, který je vychlazen na velmi nízkou teplotu. Vakuové čerpadlo má za úkol odčerpávat vzduch z vakuové komory. Aby docházelo k sublimaci ledu, musí být mnohem vyšší teplota okolí (přímé kontaktní teplo), což je docíleno sušením v zábrusových baňkách vně vakuové komory. [30]

Byly připraveny tři vzorky o celkovém objemu 15 mL. Koncentrace jednotlivých sond byla dodržena jako u všech předešlých experimentů, 650 kg mol^{-1} hyaluronan měl koncentraci 5 g L^{-1} a dále byl přidán dvacetiprocentní *tert*-butanol. Vzorky byly promíchány a mraženy v lihové lázni 24 hod. Poté byly 12 hod uchovány v mrazícím boxu při teplotě $30 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$. Následovala fáze lyofilizace na lyofilizátoru (teplota $-50 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$, tlak $125 \cdot 10^{-3} \text{ mbar}$) po dobu 24 hod. Konečnou fází byla rehydratace vzorků.

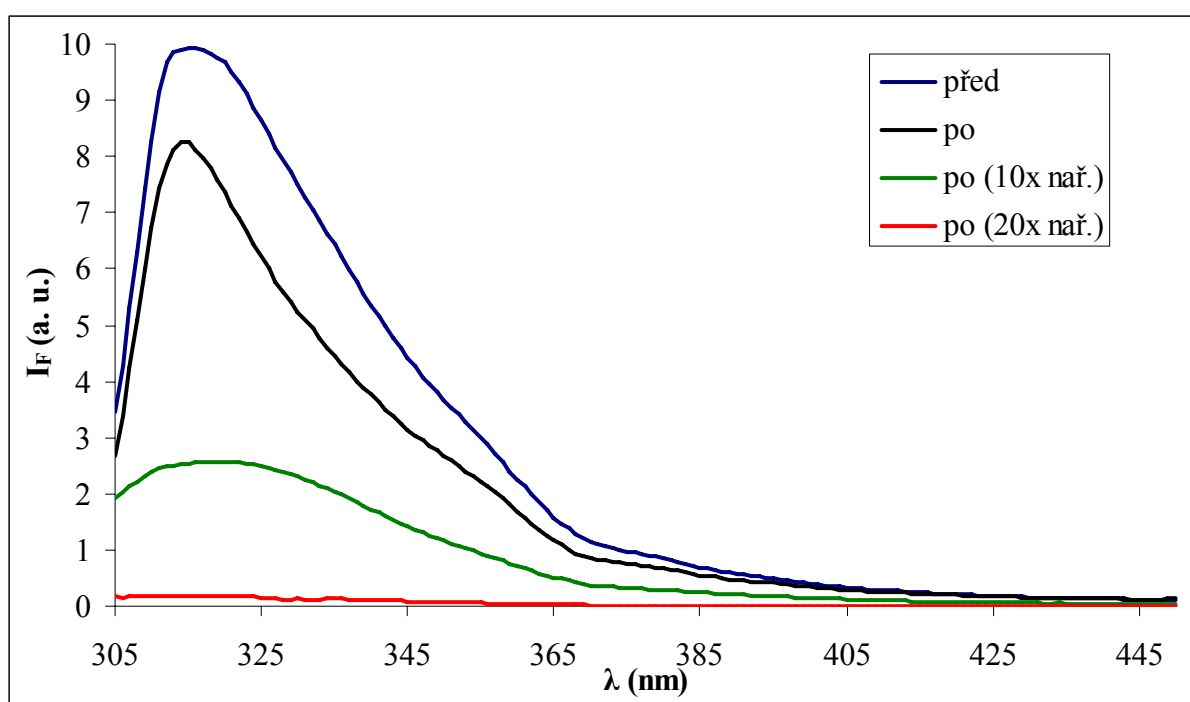
Tab. XXI Zjištěné hodnoty intenzit fluorescence a posunů maxima emise, respektive poměr 1:3 v závislosti na procesu lyofilizace

sonda	před lyofilizací		po lyofilizaci	
	λ_{em} (nm)	I_F (a.u.)	λ_{em} (nm)	I_F (a.u.)
TNS	417	3,5	427	6,3
α -tokoferol	315	9,9	315	8,3
pyren	I_I/I_{III}	1,5	I_I/I_{III}	1,1



Obr. 33 Fluorescenční spektrum pyrenu v závislosti na posunu vlnové délky emise (proces lyofilizace, $\lambda_{ex} = 335 \text{ nm}$)

V tabulce (Tab. XXI) je u sondy TNS zaznamenán posun emisního maxima do bathochromní oblasti o 10 nm, což nasvědčuje tomu, že proces lyofilizace a následné rehydratace vzorků přispěl k prokázání hydrofobní interakce hyaluronanu s polaritní sondou TNS a došlo tedy k jejímu navázání na sekundární strukturu HA. Nárůst intenzity fluorescence TNS byl padesátiprocentní vůči nelyofilizovanému vzorku. Další zkoumanou sondou byl α -tokoferol, u kterého metoda lyofilizace neměla na interakci vliv. Docházelo pouze k mírnému poklesu intenzity fluorescence. Vzhledem k tomu, že měřený vzorek α -tokoferolu byl po rehydrataci kalný, bylo provedeno jeho naředění (Obr. 34), kdy i po dosti velkém naředění vzorků byla intenzita fluorescence vysoká. Zakalení vzorku mohlo být způsobeno úplným rozpuštěním sondy. α -tokoferol nebyl totiž v roztoku fázově separovaný. A poslední měřenou sondou byl pyren. Jak je patrné již z grafu (Obr. 33), docházelo k nárůstu intenzity fluorescence a tedy i ke snížení poměru 1:3 (Tab. XXI), což znamená posun do hydrofobní oblasti a tedy prokázání hydrofobní interakce pyrenu s HA.



Obr. 34 Fluorescenční spektrum α -tokoferolu v závislosti na posunu vlnové délky emise (proces lyofilizace, $\lambda_{ex} = 295$ nm)

5 ZÁVĚR

Cílem práce bylo prozkoumat hydrofobní interakce kyseliny hyaluronové se zvolenými fluorescenčními sondami a fluoreskujícími biologicky aktivními látkami. Spektrální vlastnosti fluoroforů jsou ovlivňovány vlastnostmi jejich mikrookolí a při vhodné interakci fluoroforů s kyselinou hyaluronovou dochází ke změnám spektrálních vlastností. Těchto změn se využívá ke stanovení viskozitních poměrů v okolí sondy, geometrie excitovaných stavů, pohyblivosti, velikosti a tloušťky molekul a dalších. Zadané cíle diplomové práce byly splněny. Nedošlo pouze k prozkoumání modifikovaných hyaluronanů, které nebyly k dispozici vzhledem k jejich nedořešené syntéze, v porovnání s nativním hyaluronanem.

Jako první byl sledován vliv eluotropní řady organických rozpouštědel na emisi fluorescenčního záření polaritní sondy TNS. Prostředí byla zvolena podle rostoucí relativní permitivity methanol, ethanol, propanol a oktanol. S rostoucí relativní permitivitou prostředí docházelo k bathochromnímu posunu emise a také k poklesu intenzity fluorescence. Poté byly pro potvrzení závislosti připraveny polaritní řady methanolu a stejně tak i pro propanol pro srovnání. S rostoucí relativní permitivitou směsi rozpouštědlo/voda docházelo ke snižování intenzity emitovaného záření. Směs methanol/voda má vyšší relativní permitivitu než směs propanol/voda, a proto lze říci, že methanol je více polární než propanol. Přidáváním vody do směsi rozpouštědlo/voda docházelo ke zvyšování polaritě prostředí okolo sondy TNS. Další vybranou sondou byl pyren, jehož vliv polaritě byl studován pomocí poměru 1:3. Tento poměr v polárním prostředí dosahoval hodnot 1,11 až 1,70, zatímco v méně polárním je to okolo 0,51 až 0,96. Jakousi hranicí je hodnota poměru odpovídající jedné. U riboflavinu byla provedena charakterizace prostředí pomocí vybraných organických rozpouštědel a v jejich padesátiprocentních roztocích. Výsledkem byl exponenciální pokles intenzity fluorescence se zvyšujícím se polaritním faktorem. Ve směsi methanol/voda docházelo k nejmenším rozdílům intenzit fluorescence, zatímco k pozvolnému poklesu intenzity docházelo u nejméně polární směsi propanol/voda. Po přidavku vody byl roztok více polární a docházelo tak k významné podpoře zhášení emitovaného záření riboflavinu, což může být způsobeno snížením doby života excitovaného stavu. Stejná charakterizace byla provedena i pro α -tokoferol, ale v závislosti na relativních permitivitách rozpouštědel. Intenzita fluorescence měla stoupající trend do relativní permitivity ethanolu, pak docházelo u methanolu k poklesu a následoval opět pozvolný nárůst. Nejlépe α -tokoferol svítil v organických rozpouštědlech s vysokou relativní permitivitou, tedy ve více polárním prostředí. Posuny emisního maxima závisely na polaritě rozpouštědla. Pohybovaly se v rozmezí od 322 do 329 nm a byly bathochromní do hydrofobní oblasti.

Dále byly studovány interakce nativního hyaluronanu (100,5; 740; 1390 kg mol⁻¹) s TNS. Hodnoty intenzity fluorescence nevykazovaly žádný trend v závislosti na obsahu HA v roztoku. Vše nasvědčuje tomu, že TNS s HA hydrofobně neinteraguje. Nedochozí ani k bathochromnímu posunu emisních maxim, pouze u koncentrace 0,05 g L⁻¹ v 740 a 1390 kg mol⁻¹ HA dochází k posunu o 4 nm vůči jinak konstantním hodnotám. Podle polohy emisních maxim dochází k interakci TNS s HA v modré hypsochromní oblasti spektra. Pomocí směrodatných odchylek bylo zjištěno, že k „největším“ posunům emisního maxima docházelo u nejvyšší zvolené molekulové hmotnosti. U α -tokoferolu nevykazovaly hodnoty intenzit fluorescence žádnou závislost, byly velmi proměnlivé a nedocházelo ani k posunu maxima. Při nízkých koncentracích HA až do 0,5 g L⁻¹ navíc bylo pouhým okem pozorovatelné, že se α -tokoferol zcela nerozpustil i přes cca dvanáctihodinové míchání. Část ho ulpívala i na stěnách vialek. Sonda α -tokoferol s HA tedy také neinteraguje. A další zkoumanou sondou byl pyren, jehož poměr 1:3 nevykazoval koncentrační závislost v rámci

vybraných koncentrací až na molekulovou hmotnost $253,9 \text{ kg mol}^{-1}$ a 650 kg mol^{-1} , kde docházelo k poklesu poměru a náznaku S-křivky.

Hydrofobní interakce hyaluronanu s TNS byly dále podporovány iontovou silou – vodnými roztoky NaCl, KCl a CaCl_2 v různých koncentracích. U žádného hyaluronanu však nedocházelo k žádným změnám, pouze k fluktuaci intenzity fluorescence. Intenzita fluorescence spíše závisela na molekulové hmotnosti než na typu nebo přídatku soli. Po přidání solí docházelo i při jejich nízkém přídatku ke zhasení fluorescence až o 50 %. U nejdříve zvolené molekulové hmotnosti HA (740 kg mol^{-1}) docházelo oproti nejnižší molekulové hmotnosti ($100,5 \text{ kg mol}^{-1}$) k bathochromním posunům emisních maxim. A to především po přídatku vodného roztoku soli CaCl_2 tento posun činil 4 – 5 nm. Tento posun znamená posun do hydrofobní oblasti, kdy může docházet k interakci TNS s HA. Všechny vzorky byly proměřeny ještě při teplotě $30 \text{ }^\circ\text{C}$ a $50 \text{ }^\circ\text{C}$, která měla snížit repulzi mezi TNS a HA, ale ke snížení se změnou teploty nedocházelo, což je pravděpodobně způsobeno silným hydratačním obalem HA, který je třeba narušit.

Pomocí měření REES efektu byly studovány interakce riboflavinu s HA. Byla měněna excitační vlnová délka a sledován posun maxima emisního píku riboflavinu v různých koncentracích hyaluronanu. Posun nebyl zaznamenán, pouze docházelo ke změně intenzity fluorescence, která maxima dosahovala při excitaci 465 nm. Nepodařilo se prokázat REES efekt, respektive hydrofobní interakce HA s riboflavinem, v rámci zvolených oblastí koncentrací ani v rámci vybraných molekulových hmotností HA. REES efekt byl studován i u α -tokoferolu, kdy se měnila pouze intenzita fluorescence, která svého maxima dosahovala při excitaci 295 nm a po dosažení tohoto maxima nastal klesající trend intenzity fluorescence.

U α -tokoferolu byla z důvodu neprokazatelnosti intenzity fluorescence a na základě literární rešerše měřena anizotropie a jako referenční prostředí byla vybrána směs glycerol/ethanol. Hodnoty anizotropie nevykazovaly specifický trend. V HA byly naměřeny vysoké hodnoty anizotropie, což bylo pravděpodobně způsobeno zakalením vzorků a jejich viskozitou, protože velikost anizotropie souvisí s viskozitou prostředí a také s velikostí fluoroforu a makromolekuly. Výsledkem experimentu je, že hodnota anizotropie fluorescence záleží více na molekulové hmotnosti HA než na změně její koncentrace. U HA o vyšší molekulové hmotnosti byly hodnoty anizotropie mnohonásobně vyšší.

Pro usnadnění interakce HA s TNS a pyrenem byla dle literární rešerše použita metoda „oil-in-water emulsion“. Jeden z připravených vzorků s TNS byl ponechán v klidu a druhý byl sonifikován. Nastal hypsochromní posun maxima emise o 4 nm do hydrofilní oblasti u vzorku, který byl sonifikován. U nesonifikovaného vzorku nedocházelo k žádnému výraznému posunu, pouze k 50 % snížení intenzity fluorescence vůči vzorku referenčnímu. Nepodařilo se tedy prokázat interakci sondy TNS s HA. Stejný proces byl aplikován i pro pyren, ale poměr 1:3 zůstal nezměněn.

Za účelem narušení silného solvatačního obalu HA byla použita metoda lyofilizace pro TNS, α -tokoferol a pyren. U sondy TNS byl po lyofilizaci zaznamenán posun emisního maxima do bathochromní oblasti o 11 nm, což nasvědčuje tomu, že byly prokázány hydrofobní interakce hyaluronanu s polaritní sondou TNS a došlo tedy k jejímu navázání na sekundární strukturu HA. U α -tokoferolu nedocházelo k posunu emisního maxima, docházelo pouze k mírnému poklesu intenzity fluorescence. A poslední studovanou sondou byl pyren. Docházelo u něj k nárůstu intenzity fluorescence a i ke snížení poměru 1:3, což znamená posun do hydrofobní oblasti a tedy prokázání hydrofobní interakce pyrenu s HA.

6 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] <http://www.glycoforum.gr.jp/science/hyaluronan/HA01/HA01E.html#I>, GlycoForum/Science of Hyaluronan-1 [15. 1. 2008]
- [2] <http://en.wikipedia.org/wiki/Hyaluronan>, Hyaluronan – Wikipedia [17. 1. 2008]
- [3] <http://www.tigis.cz/alergie/aler103/09kopriiva.htm>, Cytokiny a onemocnění příštítných tělísek [17. 1. 2008]
- [4] POUCHLÝ, J.: *Fyzikální chemie makromolekulárních a koloidních soustav*, Vysoká škola chemicko – technologická v Praze roku 2001, ISBN 80-7080-331-2 (1.vyd.), ISBN 80-7080-422-X
- [5] BARTOVSKÁ, L., ŠIŠKOVÁ, M.: *Fyzikální chemie povrchů a koloidních soustav*, Vysoká škola chemicko – technologická v Praze roku 2002, ISBN 80-7080-475-0
- [6] http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_es_001/hesla/kriticka_micelarni_koncentrace.html, Kritická micelární koncentrace [13. 2. 2008]
- [7] <http://herodes.feld.cvut.cz/nonlin/slavni/stokes.htm>, Stokem [19. 12. 2007]
- [8] <http://psych.lf1.cuni.cz/fluorescence/soubory/principy.htm>, Principy fluorescenční spektroskopie [14. 1. 2008]
- [9] KLÁN, P.: *Organická fotochemie*, Masarykova univerzita v Brně roku 2001, ISBN 80-210-2526-3
- [10] <http://bart.chemi.muni.cz/courses/1a2.pdf>, Molekulová luminiscenční spektroskopie [20. 3. 2008]
- [11] SOMMER, L.: *Analytická spektrometrie – I*, Univerzita J. E. Purkyně v Brně roku 1986
- [12] <http://www.upce.cz/priloha/kalch-anal2lab-uloha4>, Molekulová fluorescenční analýza [20. 3. 2008]
- [13] http://www.lf2.cuni.cz/Ustavy/biochemie/vyuka/259.5.Stokesuv_posuv, Fluorescence a chemiluminiscence [14. 3. 2008]
- [14] <http://psych.lf1.cuni.cz/fluorescence/soubory/fluorofory.pdf>, Fluorofory v biomedicině [3. 4. 2008]
- [15] www.sciencedirect.com, Zhi-Jun Wang, Lie-Xiang Ren, Ya-Qin Zhao, Guo-Ting Li, Ai-Hua Liang, Bin-Sheng Yang, Metal ions-induced conformational change of P₂₃ by using TNS as fluorescence probe, *Spektrochimica Acta Part A* 66 (2007) 1323 – 1326
- [16] www.sciencedirect.com, Kelli Kachel, Emma Asunción-Punzalan, Erwin London, The location of fluorescence probes with charged groups in model membranes, *Biochimica et Biophysica Acta* (1998) 63 – 76
- [17] VALEUR, B.: *Molecular fluorescence*
- [18] <http://cs.wikipedia.org/wiki/Riboflavin>, Riboflavin [20. 3. 2008]
- [19] www.sciencedirect.com, Seiichi Nishizawa, N, B, Sankaran, Takehiro Seino, Ying-Yu Cui, Qing Dai, Chun-Yan Xu, Keitaro Yoshimoto, Norio Teramae, Use of vitamin B₂ for fluorescence detection of thymidine – related single – nucleotide polymorphisms, *Analytica Chimica Acta* 556 (2006) 133 – 139
- [20] <http://www.beltina.cz/vitamin/vitamin-e-tokoferol/>, Vitamin E [20. 3. 2008]
- [21] http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_es-002_v1/hesla/tokoferol.html, Tokoferol [21. 3. 2008]

- [22] <http://www.olympusmicro.com/primer/techniques/fluorescence/fluorescenceintro.html>, Olympus Microscopy resource Center: Specialized Microscopy Techniques – Fluorescence – Basic Co [12. 4. 2008]
- [23] www.sciencedirect.com, Amitabha Cahttopadhyay, Sushimita Mukherjee, Red Edge Excitation Shift of Deeply Embedded Membrane Probe: Implications in Water Penetration in the Bilayer, *J, Phys, Chem, B* (1999), 103, 8180 – 8185
- [24] www.sciencedirect.com, Suranja Guha, Satinder S, Rawat, Amitabha Cahttopadhyay, Bhabatarak Bhattacharyya, Tubulin Conformation and Dynamics: Red Edge Excitation Shift Study, *Biochemistry* (1996), 35, 13426 – 13433
- [25] MRAVEC, F.: *Fluorescenční spektroskopie ve výzkumu koloidních a asociativních systémů ver, 2*, Brno 2006
- [26] http://is.muni.cz/el/1431/podzim2007/Bi7230/um/3973768/06_Anizotropie.pdf, Anizotropie [17. 4. 2008]
- [27] www.sciencedirect.com, Marie-Christine Jones, Jean-Christophe Perouc, Polymeric micelles – a new generation of colloidal drug carriers, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* (1999), 101 – 111
- [28] KLOUDA, P.: *Moderní analytické metody*, 1, vydání, Ostrava 1996, ISBN 80-902155-0-5
- [29] www.sciencedirect.com, Małgorzata Jemiola-Rzemińska, Jerzy Kruk, Kazimierz Strzałka, Anisotropy measurements of intrinsic fluorescence of prenylipids reveal much higher mobility of plastoquinol than alpha-tocopherol in model membranes, *Chemistry and Physics of Lipids 123* (2003), 233 – 243
- [30] <http://www.pragolab.cz/kategorie/59/lyofilizace-a-zakoncentrovani-vzorku>, Pragolab [2. 5. 2008]

7 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

HA	kyselina hyaluronová
UDP-GlcA	uridindifosfát glukuronová kyseliny
UDP-GlcNAc	uridindifosfát <i>N</i> -acetyl-glukosamin
UDP	uridindifosfát
PAL	povrchově aktivní látka
CMC	kritická micelární koncentrace
TNS	6-(<i>p</i> -toluinido)-2-naftalensulfonová kyselina
REES	Red Edge Excitation Shift, posun vlnové délky emisního maxima fluorescence směrem k vyšším vlnovým délkám