

# VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ  
CENTRUM MATERIÁLOVÉHO VÝZKUMU

FACULTY OF CHEMISTRY  
MATERIALS RESEARCH CENTRE

FLUORESCENCE VE VÝZKUMU HYDROFILNÍCH POLYMERŮ

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE  
BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE  
AUTHOR

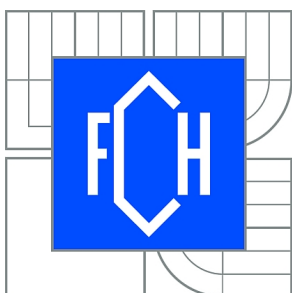
JAN KOTOUČEK

BRNO 2014



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ

CENTRUM MATERIÁLOVÉHO VÝZKUMU

FACULTY OF CHEMISTRY

MATERIALS RESEARCH CENTRE

# FLUORESCENCE VE VÝZKUMU HYDROFILNÍCH POLYMERŮ

FLUORESCENCE IN HYDROPHILIC POLYMERS RESEARCH

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

JAN KOTOUČEK

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. TEREZA HALASOVÁ, Ph.D.

BRNO 2014



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

## Zadání bakalářské práce

Číslo bakalářské práce:	<b>FCH-BAK0796/2013</b>	Akademický rok: <b>2013/2014</b>
Ústav:	Centrum materiálového výzkumu	
Student(ka):	<b>Jan Kotouček</b>	
Studijní program:	Chemie a chemické technologie (B2801)	
Studijní obor:	Chemie pro medicínské aplikace (2808R031)	
Vedoucí práce	<b>Ing. Tereza Halasová, Ph.D.</b>	
Konzultanti:	Ing. Jakub Mondek Ing. Filip Mravec, Ph.D.	

### Název bakalářské práce:

Fluorescence ve výzkumu hydrofilních polymerů

### Zadání bakalářské práce:

1. Shromáždit literární poznatky o využití přenosu protonu v excitovaném stavu v polymerních systémech.
2. Seznámit se s měřením fluorescence sond podstupujících přenos protonu v excitovaném stavu.
3. Navrhnout a provést experimenty pro charakterizaci roztoků hyaluronanu pomocí přenosu protonu v excitovaném stavu.
4. Zhodnotit výsledky ve vztahu k hydratačnímu obalu hyaluronanu.

### Termín odevzdání bakalářské práce: **23.5.2014**

Bakalářská práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu a v elektronické formě vedoucímu bakalářské práce. Toto zadání je přílohou bakalářské práce.

-----  
Jan Kotouček  
Student(ka)

-----  
Ing. Tereza Halasová, Ph.D.  
Vedoucí práce

-----  
prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.  
Ředitel ústavu

V Brně, dne 31.1.2014

-----  
prof. Ing. Jaromír Havlica, DrSc.  
Děkan fakulty

## **ABSTRAKT**

Tato bakalářská práce se zabývá využitím fluorescence ve studiu hydrofilních polymerů, konkrétně pak studiem polymeru polyvinylpyrrolidonu, karboxymethylcelulózy, hovězího sérového albuminu a hyaluronanu. Nejprve byla měřena intenzita fluorescence aniontové formy 3-hydroxynaftolové kyseliny, která podstupuje intramolekulární přenos protonu v excitovaném stavu, dále pak byla měřena anisotropie steady-state fluorescence 3-hydroxy naftolové kyseliny a také doba života této fluorescenční sondy. Z naměřených dat byla posuzována interakce sondy s hydratačním obalem polymeru ve vodném prostředí stanovením vazebné konstanty systému polymer – fluorescenční sonda. Byla zjištěna interakce aniontové formy sondy s hydratačním obalem polymeru hovězího albuminu (BSA), polyvinylpyrrolidonu (PVP) a karboxymethylcelulózy (CMC). U hyaluronanu nebyla prokázána interakce aniontu fluorescenční sondy s hydratačním obalem z důvodu repulze mezi nábojem sondy a hyaluronanem.

## **ABSTRACT**

This bachelor thesis deals with the use of fluorescence in the study of hydrophilic polymers such as polyvinylpyrrolidone, carboxymethylcellulose, bovine serum albumin, and hyaluronan. The first measurement was a fluorescence intensity of the anionic form of 3-hydroxy naphtholic acid which undergoes an intramolecular proton transfer in the excited state then the steady-state fluorescence anisotropy of 3-hydroxy naphtholic acid and also the lifetime of the fluorescent probe. The measured data were evaluated in terms of interaction of the fluorescence probe with hydration shell of polymer in an aqueous environment by determination of a binding constant of the system, polymer - fluorescent probe. The interaction between anionic form of the probe with polymer was found in BSA, PVP and CMC systems. There was no interaction of fluorescent probe with hydration shell of hyaluronan due to charge repulsion between the probe and hyaluronan.

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

Steady-state fluorescence, časově rozlišená fluorescence, anisotropie fluorescence, ESIPT, hyaluronan, vazebná konstanta.

## **KEY WORDS**

Steady-state fluorescence, time-resolved fluorescence, fluorescence anisotropy, ESIPT, hyaluronan, binding constant

Kotouček, J. *Fluorescence ve výzkumu hydrofilních polymerů*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2014. 40 s. Vedoucí bakalářské práce Ing. Tereza Halasová, Ph.D.

## **PROHLÁŠENÍ**

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

.....  
Podpis studenta

Rád bych poděkoval vedoucímu mé bakalářské práce Ing. Tereze Halasové, Ph.D., konzultantovi Ing. Jakubu Mondkovi a také Ing. Filipu Mravcovi, PhD. za trpělivost, vstřícnost a pomoc při řešení problémů.

# OBSAH

1	ÚVOD.....	7
2	TEORETICKÁ ČÁST .....	8
2.1	Luminiscence .....	8
2.2	Fluorescence.....	8
2.3	Fosforescence.....	8
2.4	Jablonského diagram.....	9
2.5	Stokesův posun .....	10
2.6	Vavilovovy postuláty .....	10
2.7	Kvantový výtěžek .....	10
2.8	Franck-Condonův princip .....	11
2.9	Zhášená fluorescence .....	11
2.10	Zpožděná fluorescence.....	11
2.11	Stacionární a časově rozlišená fluorescence .....	12
2.11.1	Metoda TCSPC .....	13
2.12	Anisotropie fluorescence.....	13
2.13	Fluorescenční sondy.....	13
2.14	Hyaluronan.....	14
2.15	Karboxymethylcelulóza (CMC).....	15
2.16	Polyvinylpyrrolidon (PVP) .....	15
2.17	Hovězí sérový albumin (BSA).....	15
3	REŠERŠE .....	16
4	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....	19
4.1	Vybavení a přístroje .....	19
4.1.1	Fluorolog .....	19
4.1.2	Fluorocube.....	19
4.1.3	Použité chemikálie .....	19
4.1.4	Příprava zásobního roztoku hyaluronanu.....	19
4.1.5	Příprava zásobního roztoku karboxymethylcelulózy .....	20
4.1.6	Příprava zásobního roztoku polyvinylpyrrolidonu.....	20
4.1.7	Příprava zásobního roztoku hovězího albuminu .....	20
4.1.8	Příprava zásobního roztoku fluorescenční sondy.....	20
4.1.9	Příprava vzorků .....	20
4.2	Měření doby života, anisotropie a emisních spekter.....	21

4.2.1	Fluorolog.....	21
4.2.2	Fluorocube.....	21
5	VÝSLEDKY A DISKUZE.....	22
5.1	Steady-state fluorescence.....	22
5.2	Časově rozlišená fluorescence.....	27
5.3	Anisotropie.....	30
6	ZÁVĚR.....	33
7	SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ.....	35
8	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ.....	37
9	PŘÍLOHY.....	38

# 1 ÚVOD

Vývoj syntetických polymerních léčiv nachází v dnešní době všestranné uplatnění při léčbě protinádorových onemocnění. Základním předpokladem je studium vztahu mezi chemickými, fyzikálními a biologickými vlastnostmi těchto látek, od kterého se pak odvíjí výběr a konkrétní aplikace polymeru. Požadavky na tyto látky jsou vysoké. Biologicky aktivní látka by měla být v průběhu transportu neaktivní, neměla by se ukládat v těle a ani by neměla být vylučována z těla ven. V takové formě by měla být schopna dopravit se do daného místa a zde se aktivovat. Dále by léčivo mělo být biodegradabilní, a to včetně metabolitů.

Jednou z látek, která odpovídá těmto přísným požadavkům na biodegradabilitu a biokompatibilitu, je hyaluronan. Hyaluronan se dnes získává mikrobiální fermentací z bakteriálních kultur *Bacillus subtilis* a *Streptococcus equi*. Oproti dřívějšímu zdroji, kterým byly oční sklivce a kohoutí hřebínky, je tento mikrobiální zdroj komerčně dostupnější, a tak i díky tomu dochází k vzrůstajícímu uplatnění této látky v biomedicíně, farmacii a v tkáňovém inženýrství.

Proto se ve své bakalářské práci zabývám studiem této látky a také dalších slibných polymerů, které by mohly v budoucnu najít uplatnění jako transportní média pro cílenou léčbu. Intramolekulární přenos protonu v excitovaném stavu slouží k pochopení mnoha chemických a biologických reakcí, v mém případě pak ke studiu hydrofilního obalu polymerů.



## 2 TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1 Luminiscence

Luminiscence je samovolné záření, vznikající jako přebytek záření nad tepelným zářením, pevných nebo kapalných látek, při kterém dochází u citlivých molekul k emisi záření z elektronicky excitovaných stavů, zapříčiněné fyzikální, mechanickou nebo chemickou cestou. Látky schopné luminiscence se nazývají luminofory. Generování luminiscence prostřednictvím excitace molekul ultrafialovým nebo viditelným světlem se nazývá fotoluminiscence. Fotoluminiscence se rozděluje v závislosti na elektronové konfiguraci excitovaného stavu a charakteru emise na dvě kategorie - fluorescenci a fosfoescenci [1].

### 2.2 Fluorescence

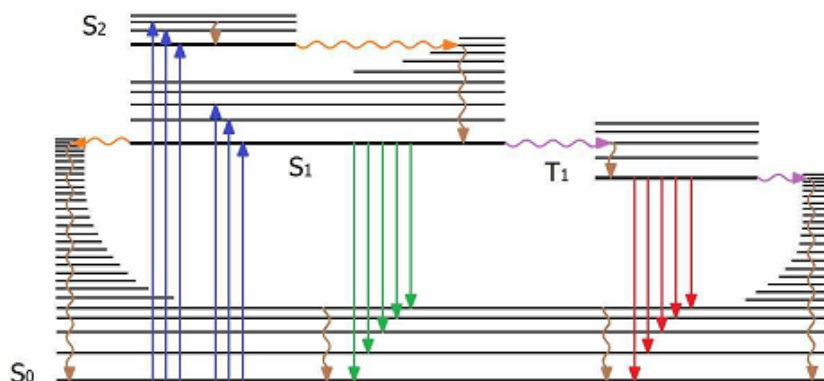
Jev nazvaný fluorescence poprvé popsal v roce 1892 britský vědec George Gabriel Stokes u minerálu fluoritu (kazivce), který emitoval modré záření.

Jde o vlastnost některých konjugovaných polycyklických aromatických molekul absorbovat záření o dané vlnové délce a vyzařovat záření o delší vlnové délce a menší energii po krátký časový interval, pohybující se v řádu  $10^{-8}$  sekund. Při absorpci záření dochází k excitaci molekuly a přechodu elektronu ze základního singletového stavu, do stavu excitovaného. Po excitaci dochází k jevu zvanému vibrační relaxace, neboli nezářivému přechodu, při kterém excitovaný elektron, nacházející se v dané vibrační vyšší energetické hladině, přechází do nejnižší možné vibrační hladiny v rámci dané energetické hladiny. Konečný přechod na původní energetickou hladinu  $S_0$  z nejnižší vibrační energetické hladiny  $S_1$  se nazývá zářivý přechod a tento přechod je spinově povolen. Pokud dojde k dodání energie elektronu v tripletovém stavu, může se tento elektron dostat do singletového stavu, ze kterého sestupuje do základního stavu. Tento přechod je označen za zpožděnou fluorescenci a je doprovázen emisí záření [1].

### 2.3 Fosforescence

Fosforescence trvá podstatně déle než fluorescence, a to v řádu milisekund až sekund. Delší životnost je způsobena spinově zakázaným přechodem, kdy excitovaný elektron má stejný spin jako párový elektron v základním stavu. Hladina  $T_1$  má nižší energii než  $S_1$  a zářivý přechod z nejnižší hladiny tripletového stavu  $T_1$  na základní hladinu má vyšší vlnovou délku než fluorescence [1].

## 2.4 Jablonského diagram



**Obr. 1** – *Jablonského diagram*

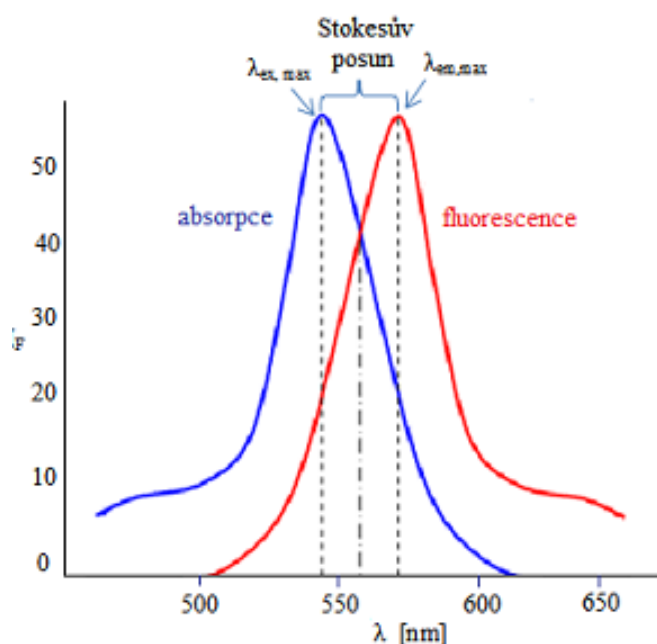
Jablonského diagram (viz **Obr. 1**) vyznačuje jednotlivé pochody excitace a deexcitace, energetické stavy molekul a přechody mezi nimi.

Základní energeticky nejnižší položená elektronová hladina je označena jako S<sub>0</sub>, energeticky bohatší elektronové hladiny s postupně narůstající energií, obsahující excitované elektrony, jsou značeny jako S<sub>1</sub> a S<sub>2</sub>. Jednotlivé čáry zobrazují přechody v Jablonského diagramu. Modře je označena absorpce, zeleně fluorescence, červeně fosforescence; hnědá barva značí vibrační relaxace, oranžová vnitřní konverze a fialová pak mezi systémové přechody [1].

Elektron se v excitovaném stavu nachází ve vyšší energetické hladině, kde může zaujmout některou z jejích vibračních hladin. Po excitaci, dříve než dojde k emisi, dochází ke ztrátě energie molekuly ve formě tepla a elektron přechází na nejnižší vibrační energetickou hladinu - dochází k takzvané vibrační relaxaci. Při následné deexcitaci dochází k zářivým a nezářivým přechodům. K zářivým přechodům patří luminiscence, k nezářivým pak vibrační relaxace, vnitřní konverze, konformační změny a fotochemické pochody [1].

Vnitřní konverze je přechod mezi elektronovými stavy se stejnou multiplicitou spinu. K přechodu dochází z důvodu větší energetické blízkosti energetických hladin. Vibrační hladina excitovaného stavu se nachází ve stejné energetické úrovni jako daná vibrační hladina nižšího elektronového stavu [1].

## 2.5 Stokesův posun



**Obr. 2** – Stokesův posun

Stokesův posun (viz **Obr. 2**) je rozdíl mezi maximy emisního a absorpčního spektra. Energie emise je menší než energie absorpce, což je způsobeno vlivem nežádoucích deexcitačních pochodů, vedoucích ke ztrátě energie excitované molekuly. Ztráty jsou způsobeny skrze vibrační relaxace a vlivem rozpouštědla. To má za následek posun emisního záření k větším vlnovým délkám [1].

U velkého množství molekul se uplatňuje zrcadlová symetrie absorpčního a emisního spektra, a to proto, že absorpce i emise z odpovídajících si vibračních hladin má stejnou relativní pravděpodobnost [1].

## 2.6 Vavilovovy postuláty

1. Při stokesovském buzení fotoluminiscence, kdy frekvence excitačního záření je větší nebo rovna frekvenci průsečíku emisního a excitačního spektra, nemůže být energetický výtěžek luminiscence větší než 1.

2. Při antistokesovském buzení, kdy je frekvence excitačního záření menší než frekvence průsečíku emisního a excitačního pásu, klesá energetický výtěžek luminiscence s růstem tohoto rozdílu, a to tím rychleji, čím je nižší teplota.

Z Vavilovových postulátů vyplývá, že kvantový výtěžek fluorescence je nezávislý na excitační vlnové délce, je tedy možno excitovat jakoukoliv vlnovou délkou z excitačního spektra s ohledem na nejvyšší odpovídající absorpci [7].

## 2.7 Kvantový výtěžek

Je poměr emitovaných fotonů k množství absorbovaných fotonů, definovaný vztahem:

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

kde  $Q$  je kvantový výtěžek,  $\Gamma$  je rychlostní konstanta zářivého přechodu,  $k_{nr}$  je rychlostní konstanta nezářivého přechodu. Tyto rychlostní konstanty určují rychlost vyhasínání excitovaného stavu. Tento vztah platí pouze v ustáleném stavu. Kvantový výtěžek se blíží k jedničce za předpokladu velkého rozdílu míry zářivého a nezářivého přechodu [1], [7].

## 2.8 Franck-Condonův princip

Elektrostatickými interakcemi dipól-dipól nebo dipól-indukovaný dipól mezi molekulami fluoroforu a rozpouštědla dochází v roztocích k solvataci molekul fluoroforu. Při měření fluorescence dochází vlivem rozdílných dipólových momentů a polarizovatelnosti molekul ke změnám ve spektrech. Doba potřebná pro molekulovou relaxaci je delší než doba elektronového přechodu a zároveň kratší než je životnost excitovaného stavu molekuly. Emise tedy probíhá ze stavu rovnovážné konfigurace. Energie emitovaného fluorescenčního záření je menší než energie čistě elektronového přechodu, protože se část absorbované energie spotřebuje na relaxaci molekul rozpouštědla v přítomnosti fluoroforu.

## 2.9 Zhášená fluorescence

Zhášení je proces snížení kvantového výtěžku fluorescence bez změny fluorescenčního spektra. Rozlišujeme dynamické a statické zhášení. Jako zhášeče mohou působit molekuly halogenů, amidů a také molekulární kyslík.

Při dynamickém, neboli srážkovém zhášení dochází k jeho deaktivaci, tedy k nezářivému navrácení fluoroforu na základní hladinu, a to srážkou s molekulou zhášeče. Pravděpodobnost srážky je přímo úměrná koncentraci zhášeče. Pokles intenzity fluorescence dynamickým zhášením je popsán Sternovou-Volmerovou rovnicí:

$$\frac{\Phi_0}{\Phi} = 1 + k_q \cdot \tau_0 \cdot C_q, \quad (2)$$

kde  $\Phi_0$  je kvantový výtěžek fluorescence bez zhášeče,  $\Phi$  je kvantový výtěžek v přítomnosti zhášeče,  $C_q$  je koncentrace zhášeče,  $\tau_0$  je zde doba dohasínání fluorescence bez přítomnosti zhášeče,  $t$  je doba dohasínání v přítomnosti zhášeče,  $k_q$  je zhášecí konstanta, vyjádřená vztahem:

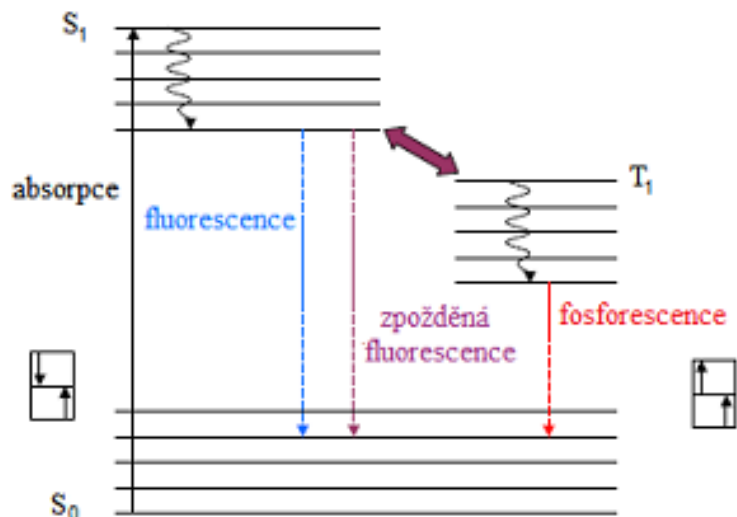
$$k_q = f_0 \cdot k_0, \quad (3)$$

kde  $f_0$  je účinnost zhášení, která se pro standardní zhášeče blíží k jedničce,  $k_0$  je difuzní biomolekulární rychlostní konstanta.

Oproti dynamickému zhášení dochází u statického zhášení ke změně struktury molekul, kdy po kontaktu fluoroforu a zhášeče vzniká nefluorescenční komplex.

## 2.10 Zpožděná fluorescence

Jedná se o termální excitaci molekuly nacházející se v nejnižší hladině tripletového stavu na nejnižší energetickou hladinu singletového excitovaného stavu. Protože dochází k návratu



**Obr. 3** – vratný přechod mezi  $T_1$  a  $S_1$  hladinou

na hladinu  $S_1$ , je vlnová délka emitovaného záření stejná jako u fluorescence. Rozlišujeme E a P typ zpožděné fluorescence. Pokud k excitaci dochází po srážce dvou molekul v tripletovém stavu, dojde k odevzdání energie neexcitované molekule, a ta přejde do excitovaného singletového stavu. Zpožděná fluorescence (typ P) byla prvně pozorována u pyrenu. Typ E, který byl poprvé pozorován u eosinu, probíhá u pevných látek za doprovodu zahřívání systému, což je způsobeno statickou fluktuací elektronů. Jedná se o jedno fotonovou absorpci s lineární závislostí intenzity emise a intenzity excitačního záření [7].

## 2.11 Stacionární a časově rozlišená fluorescence

Při stacionární fluorescenci je fluorescence měřena při konstantním osvětlení v ustáleném stavu. Ozařování vzorku probíhá kontinuálním světelným paprskem a je zaznamenávána intenzita emitovaného záření. Výstupem jsou pak emisní a excitační spektra. Emisní spektrum vyjadřuje závislost intenzity fluorescence na vlnové délce emitovaného záření, a to při konstantní vlnové délce excitačního záření. Excitační spektrum zobrazuje závislost intenzity fluorescence na vlnové délce budícího záření. Při absorpci dochází ke ztrátám vnitřní energie díky vnitřní konverzi a vibrační relaxaci, a emisní spektra jsou posunuta směrem k vyšší vlnové délce oproti absorpčním spektrům, viz Stokesův posun (Obr. 2) [1].

Časově rozlišená fluorescence zkoumá změnu intenzity emitovaného záření fluoroforu v závislosti na čase. Fluorofor v roztoku je vystaven impulzu světla, jehož vlnová délka je kratší než doba excitovaného stavu. Deexcitaci molekul lze vyjádřit základní kinetickou rovnicí:

$$[A^*] = [A^*]_0 \cdot \exp\left(-\frac{t}{T}\right), \quad (4)$$

kde  $[A^*]$  je koncentrace excitovaného fluoroforu v čase  $t$ ,  $[A^*]_0$  představuje koncentraci excitovaného fluoroforu v čase, kdy se  $t=0$  a  $T$  zde představuje dobu života excitovaného stavu [1].

Jednou ze základních charakteristik fluoroforu je doba života excitovaného stavu. Tato doba nezávisí na excitační vlnové délce a lze ji vyjádřit přes intenzitu fluorescence, která je úměrná koncentraci excitovaných molekul:

$$I = I_0 \cdot \exp\left(-\frac{t}{\tau}\right), \quad (5)$$

kde  $I$  je intenzita fluorescence excitovaného fluoroforu v čase  $t$ ,  $I_0$  představuje intenzitu fluorescence v čase  $t=0$  a  $\tau$  představuje dobu života [1].

### 2.11.1 Metoda TCSPC

Jednou z technik měření doby života excitovaného stavu fluoroforu je metoda časově korelovaného sčítání fotonů TCSPC (time-correlated single photon counting). Tato pulzní metoda využívá faktu, že pravděpodobnost detekce jednoho fotonu v daném čase po vyzáření excitačního pulzu je přímo úměrná intenzitě fluorescence. Přesnost korelační křivky poklesu závisí na počtu detekovaných signálů. Čím je počet detekovaných fotonů větší, tím přesnější je poklesová křivka.

Při samotném měření na jeden detekovaný foton připadá několik desítek excitačních pulzů a je zaznamenáván čas mezi excitačním pulzem a detekcí fotonu. Výstupem je histogram, kde osa  $x$  je rozdělena na časové kanály a osa  $y$  představuje počty detekovaných fotonů v odpovídajícím kanálu. Histogram nabývá tvaru postupně se snižující vlny, což je způsobeno jednak pulzní excitací, ale také podmínkou detekce jednoho fotonu na několik desítek excitačních pulzů.

## 2.12 Anisotropie fluorescence

Při excitaci fluoroforu polarizovaným světlem se excitují ty molekuly fluoroforu, které mají vektor absorpčního tranzitního momentu ve stejné rovině, jako je rovina polarizace. Dochází tedy k fotoselektivní excitaci fluoroforu. Tranzitní moment závisí na osách molekuly a má definovanou orientaci. V roztoku jsou molekuly fluoroforu uspořádány náhodně. Excitují se jen ty molekuly, které mají tranzitní dipól ve stejném směru jako je elektrický vektor polarizovaného světla [1].

Nepolarizované světlo ze zdroje prochází přes polarizátor. Vzniká tak polarizovaný paprsek, který kmitá v jedné rovině a následně dopadá na kyvetu obsahující fluorofor. Interakcí paprsku vzniká depolarizované světlo. Míra depolarizace je určena měřením intenzity fluorescence, která je měřena před detektorem kolmo na příchozí rovinu světla polarizovaného polarizátorem [1].

Stupeň polarizace  $p$  a anisotropie fluorescence  $r$  je vyjádřen vztahy:

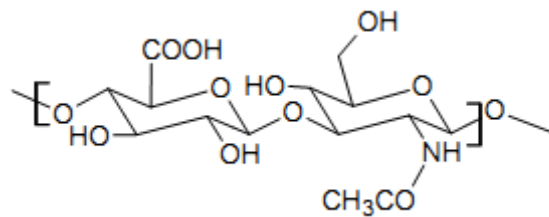
$$p = \left( \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + I_{\perp}} \right), \quad r = \left( \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + 2 \cdot I_{\perp}} \right), \quad (6),(7)$$

kde  $I_{\parallel}$  je intenzita rovnoběžného a  $I_{\perp}$  intenzita světla kolmého na směr polarizace budícího záření.

## 2.13 Fluorescenční sondy

Fluorescenční sondy neboli fluorofory jsou látky schopné fluorescence, které se na rozdíl od fluorescenčních značek vážou ke sledované struktuře nekovalentně. Dnes je známo několik tisíc fluorescenčních sond, například pyren, prodan, 1-anilio-8-naftalensulfonová kyselina (ANS), p-toulidinyl-6-naftalen sulfonová kyselina (TNS),  $\alpha$ -naftol a 3-hydroxynaftolová kyselina (3HNA).

## 2.14 Hyaluronan

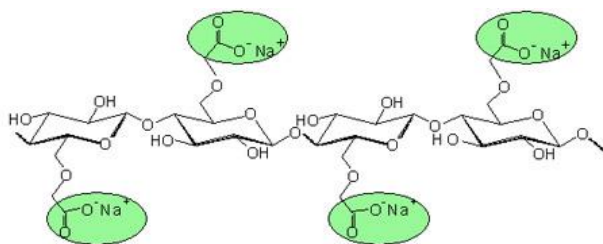


**Obr. 4** – *Hyaluronan*

Hyaluronan (viz **Obr. 4**) je polysacharid ze skupiny glykosaminoglykanů, sestávající z disacharidických jednotek monosacharidů kyseliny glukuronové a N-acetyl-D-glukosaminu. Tyto jednotky jsou spojené  $\beta$  1-3 disacharidickou vazbou, disacharidické jednotky jsou spojovány  $\beta$  1-4 glykosidickými vazbami v polymer dosahující až 10 000 disacharidových jednotek. Hyaluronan je organismu vlastní látka, vyskytující se u všech obratlovců, nacházející se v extracelulárním prostoru, kde je jeho hlavní funkcí vázání vody, interakce s dalšími částmi extracelulárního matrixu za tvorby vnitřní struktury a kotvení buněk interakcí s buněčnými receptory. Polymer obsahuje velké množství hydroxylových skupin, tvořících hydrofilní část, které jsou schopny vázat velké množství vody. Hyaluronan je dobře rozpustný ve vodě díky nábojové repulsi karboxylových skupin. V roztoku tvoří otáčející se šroubovici. Hyaluronan s vysokou molekulovou hmotností není biologicky aktivní, avšak se snižujícím se stupněm polymerace se jeho biologická aktivita zvyšuje. Kromě polymerů se tvoří také biologicky aktivní hyaluronové fragmenty [6].

Protože je surový hyaluronan charakteristický velkou rozpustností a špatnou mechanickou odolností, tvoří se navázáním vhodného ligandu a následným spojováním jednotlivých řetězců trojrozměrná struktura, hydrogel. Takto připravené hydrogely jsou poté používány ve tkáňovém inženýrství a k tvorbě nosičů léčivých látek [6].

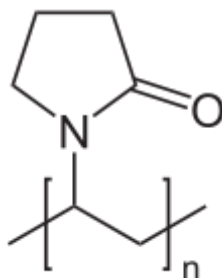
## 2.15 Karboxymethylcelulóza (CMC)



**Obr. 5** – Karboxymethylcelulóza

Karboxymethylcelulóza (viz **Obr. 5**) je derivát přírodně získané celulózy. Karboxymethylová skupina je vázána na hydroxylovou skupinu monomeru celulózy. Získává se reakcí alkalické celulózy s její sodnou solí v organickém médiu. Díky polaritě karboxymethylové skupiny je CMC dobře rozpustná ve vodě. Nevýhodou je její nízká odolnost vůči hnilobě a světlu. Využívá se především v potravinářském průmyslu jako zahušťovadlo. Karboxymethylcelulóza má lepší absorpční vlastnosti než 100% celulóza, ale s rostoucí iontovou silou roztoku klesá schopnost absorpce.

## 2.16 Polyvinylpyrrolidon (PVP)



**Obr. 6** - Polyvinylpyrrolidon

Poly (N-vinyl-2-pyrrolidon) (viz **Obr. 6**) je flexibilní, náhodně stočený polymer, který je vysoce rozpustný ve vodě a v organických rozpouštědlech. Vyznačuje se vysokou chemickou stabilitou a vysokou schopností tvorby komplexů.

## 2.17 Hovězí sérový albumin (BSA)

Hovězí sérový albumin je tvořen jedním polypeptidovým řetězcem obsahujícím 583 aminokyselin, které jsou stabilizované intramolekulárními disulfidickými můstky. Izoluje se ze séra skotu Cohnovým procesem na základě rozdílné rozpustnosti sérových proteinů při různém pH. Se svými vlastnostmi se podobá lidskému albuminu a v laboratořích se užívá jako nosný protein, který je odolný vůči změnám pH [12].



### 3 REŠERŠE

**Debabrata Mandal a spol.** zkoumali v roce 1998 intramolekulární přenos protonu v excitovaném stavu sondy  $\alpha$ -naftol v micelách. Deprotonace byla sledována ve třech typech micel, a to v neiontové (Triton X-100), aniontové (CTAB - cetyltrimethylamonium bromid) a kationtové (SDS - dodecylsírán sodný). Právě v organizovaných soustavách, jako jsou micely, dochází k výraznému snížení rychlosti přenosu protonu. V základním stavu molekula zůstává v neiontové formě, v excitovaném stavu se snadno deprotonuje za vzniku aniontu, ze kterého dochází k emisi. Ve vodném prostředí se při měření časově proměnné fluorescence neiontové formy zobrazuje pokles intenzity a aniontová forma vykazuje počáteční růst intenzity následovaný poklesem. Ve vodných roztocích dochází k deprotonaci  $\alpha$ -naftolu za 35 pikosekund. V důsledku rychlé deprotonace ve vodném roztoku je intenzita emise neutrálního  $\alpha$ -naftolu extrémně nízká, a objevuje se pouze emise aniontové formy. V alkoholech je však deprotonace výrazně potlačena a díky tomu je pozorována emise neutrální formy.

Aromatické aminy a fenoly se stávají více kyselými v excitovaném stavu a jejich konstanta acidity (pKa) klesá o několik jednotek v porovnání se základním, neexcitovaným stavem [8].

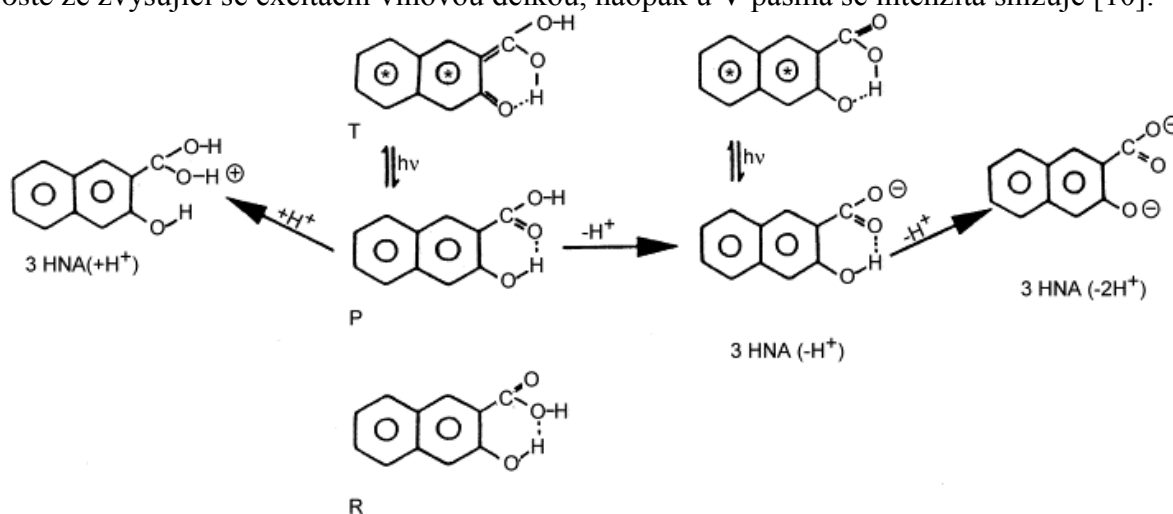
**Anitha C. Kumar a spol.** ve své práci sledovali použitelnost fluorescenční sondy  $\alpha$ -naftolu jako fluorescenční sondy pro zkoumání hydratace polymerů, konkrétně pak polyvinylalkoholu (PVA). Tento polymer má vysoké využití v biomedicínských aplikacích díky své variabilitě, malé toxicitě, vysoké biologické kompatibilitě a stupni bobtnání. Polymerní hydrogely jsou zasíťovány v trojrozměrnou strukturu obsahující vodu. Chování vody je ovlivněno stupněm spojení polymeru s vodou. Byly zjištěny tři složky vody v hydrogelech – voda vázaná v polymeru, dělicí se na nemrznoucí a mrznoucí složku, a voda volná. Celkovou hmotnost vody přítomné v hydrogelu tvoří součet jejích dvou částí, nemrznoucí a mrznoucí složky. Nemrznoucí část obsahuje molekuly vody, které jsou přímo spojeny s řetězcem polymeru dvěma vodíkovými vazbami. Pokud je do gelu přidávána další voda, tyto dvě vodíkové vazby jsou přerušeny. Jedna zůstává pevně vázaná na polymer a další tvoří vazbu s nevázanou vodou. Toto spojení mění chování vody při procesu ochlazování [9].

Fluorescenční sondy založené na přenosu protonu v excitovaném stavu umožňují zjistit strukturní a dynamické informace o organizovaných systémech jako jsou micely, lipidové membrány, polymerní gely a dutiny cyklodextrinu.  $\alpha$ -naftol emituje z excitované neutrální formy (350 nm), pokud je přítomen v hydrofobním prostředí organizovaného média.

Je-li sonda začleněna do struktury PVA, dochází ke snížení intenzity neiontové formy  $\alpha$ -naftolu a nárůstu intenzity aniontové formy, která je velmi citlivá na stupeň hydratace polymeru. Tato sonda je tedy schopna reagovat na množství vázané vody v polymeru a jeho celkovou hydrataci [9].

**Hirdyesh Mishra a spol.** studovali chování 3HNA v různých rozpouštědlech a za různých podmínek. Experimenty ukazují, že 3HNA při fotoexcitaci vykazuje dvě emisní spektra. Absorpce a emise je ovlivněna koncentrací sondy, zvoleným rozpouštědlem, pH, teplotou a excitační vlnovou délkou. V polárním rozpouštědle, etanolu, se s rostoucí koncentrací 3HNA (od  $10^{-5}$  do  $10^{-2}$  M) pohybovalo absorpční maximum od 355-361 nm. V etanolu, okyseleném přídatkem 0,1 M  $H_2SO_4$ , bylo absorpční spektrum lehce posunuto, absorpční maximum dosahovalo hodnoty 366 nm. Emisní spektrum se skládá ze dvou částí. První část dosahuje maxima při vlnové délce 421,5 nm (V pásmo), druhá část při 581 nm

(R pásma). Emisní spektrum se mění se změnou excitační vlnové délky. Intenzita R pásma roste ze zvyšující se excitační vlnovou délkou, naopak u V pásma se intenzita snižuje [10].



**Obr. 7** – 3HNA existuje ve dvou základních formách, P a R. První forma, oproti druhé, podstupuje ESIPT za vzniku tautomeru.

**Anirban Pal, a spol.** studovali strukturu vody v blízkosti řetězce polymeru N-vinyl-2-pyrrolidynu (PVP). PVP je flexibilní a náhodně stočený polymer, který je dobře rozpustný ve vodě a také v jiných organických rozpouštědlech. Pro svou chemickou stabilitu a velkou komplexotvornost je jedním z nejpoužívanějších polymerů.

Koncentrace polymeru v roztoku byla zvolena nízká ( $M_r = 40\,000$ ), stejně tak koncentrace sondy 3HNA ( $20\,\mu\text{M}$ ), aby nedocházelo k polymerizaci. Ke studii byl užit intramolekulární přenos protonu v excitovaném stavu (ESIPT). 3HNA vykazuje dvě maxima. Pro normální emisi při 418 nm a pro ESIPT emisi v rozmezí 495-515 nm. Míra interakce mezi sondou a polymerem byla určena výpočtem vazebné konstanty dle vztahu Benesi-Hilderbrand měření intenzity fluorescence:

$$\frac{[F_\infty - F_0]}{[F_x - F_0]} = 1 + \frac{1}{K \cdot [L]}, \quad (8)$$

kde  $F_\infty$  je intenzita fluorescence pro maximální koncentraci polymeru,  $F_0$  je intenzita fluorescence bez polymeru a  $F_x$  je intenzita pro každou danou koncentraci mezi  $F_\infty$  a  $F_0$ .  $L$  je hodnota koncentrace a  $K$  je vazebná konstanta.

Se zvyšující se koncentrací polymeru docházelo ke zvyšování intenzity emise 3HNA, vlnová délka se pohybovala od 514 nm pro roztok bez polymeru až po 507 nm v roztoku s nejvyšší koncentrací polymeru. Kvantový výtěžek vzrostl čtyřnásobně v přítomnosti polymeru oproti nulové koncentraci polymeru a hodnota vazebné konstanty se pohybovala v řádu  $10^4$ .

Dielektrickým měřením byla zjištěna existence tří typů vody. První typ je čistá voda, druhý typ je zkreslený shluk, sestávající z pěti molekul vody na jednotku PVP, třetí typ je neuspořádaná struktura mezi řetězci polymeru [11].

Pro určení vazebné konstanty z anisotropie steady-state fluorescence je nutné zavést předpoklad tvorby komplexu v poměru 1:1. Vazebnou konstantu systému polymer-sonda vyjadřuje vztah:

$$K = \frac{[FP]}{[F] \cdot [P]} = \frac{F_b \cdot C_0}{(1 - F_b) \cdot C_0 \cdot [P]}, \quad (9)$$

kde  $F_b$  je část sondy 3HNA vázané na polymer,  $(1 - F_b)$  představuje koncentraci 3HNA, která na polymer není vázána, a  $C_0$  představuje celkovou koncentraci fluorescenční sondy.

Pozorovaná anisotropie ESIPT emise 3HNA v rostoucí koncentraci polymeru je vyjádřena vztahem:

$$r = \frac{F_f \cdot Q_f \cdot r_f + F_b \cdot Q_b \cdot r_b}{F_f \cdot Q_f + F_b \cdot Q_b}, \quad (10)$$

kde  $F_f$  představuje část sondy nevázané na polymer a  $F_b$  část sondy vázané na polymer,  $Q_f$  a  $Q_b$  představují kvantový výtěžek volné a vázané sondy a  $r_f$  a  $r_b$  jsou anisotropie měřené pro volnou sondu a sondu vázanou na polymer. Z toho vyplývá, že část sondy, která je zakomponovaná do polymeru vyjadřuje vztah:

$$F_b = \frac{(r - r_f)}{\left[ (r - r_f) + \left( \frac{Q_b}{Q_f} \right) \cdot (r_b - r) \right]}. \quad (11)$$

## 4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 4.1 Vybavení a přístroje

#### 4.1.1 Fluorolog

K měření fluorescenčních spekter fluoroforu a anisotropie byl použit přístroj od firmy Horiba Scientific, umožňující fluorescenční analýzu měřením emisních a excitačních spekter. Fluorescence byla detekována v pravouhlém uspořádání. Pro excitaci byla použita Xe výbojka (450 W). Vodní lázni byla udržována teplota pro měření 22 °C. Ke zpracování dat steady-state fluorescence a anisotropie byl použit software FluorEssence, HORIBA Jobin Yvon Inc.

#### 4.1.2 Fluorocube

Přístroj vyrábí již zmíněná firma Horiba Scientific, k dispozici je sada NanoLED (260 nm- 740 nm) o pracovní frekvenci 1 MHz. Díky TBX pikosekundovému detektoru měří přístroj v rozlišení 20 ps/kanál. Rozsah měřených dob života fluoroforu se pohybuje od  $10^{-10}$  do  $10^{-6}$  s. Měření je možno provádět za konstantní teploty 22 °C díky připojené vodní lázni. Na zpracování dat byl použit software DataStation, HORIBA Jobin Yvon Inc.

#### 4.1.3 Použité chemikálie

Hyaluronan	CPN spol s.r.o	Šarže:071207-P1
CMC	Sigma-Aldrich Chemistry	CAS: 9004 32 4
(karboxymethylcelulóza)	M=90 kDa	Šarže: 1001112535
PVP	Sigma-Aldrich	CAS: 9003 39 8
(polyvinylpyrrolidone)	M=40 kDa	Šarže: 101362498
BSA	Sigma-Aldrich Life Science	CAS: 9048 46 8
(hovězí sérový albumin)	M= 66 430	Šarže: 1000599797
$\alpha$ -naftol	Sigma-Aldrich, ReagentPlus®	CAS: 90 15 3
		Šarže: 101256259
3HNA		CAS: 92 70 6
		Šarže: 101291110
Voda Mili-Q	Milipore academic	
Ethanol	Ing. Petr Švec - PENTA	Šarže: 220313

#### 4.1.4 Příprava zásobního roztoku hyaluronanu

Na analytických vahách bylo naváženo 1,5019 g hyaluronanu. Navážené množství bylo kvantitativně převedeno do odměrné baňky o objemu 100 cm<sup>3</sup>. Úplným rozpuštěním a následným doplněním roztoku po rysku vodou Mili-Q byl připraven zásobní roztok hyaluronanu o koncentraci 15,019 g · dm<sup>-3</sup>.

#### 4.1.5 Příprava zásobního roztoku karboxymethylcelulózy

Na analytických vahách bylo naváženo 3,6488 g karboxymethylcelulózy o relativní molekulové hmotnosti 90 kDa. Navážené množství bylo kvantitativně převedeno do odměrné baňky o objemu 100 cm<sup>3</sup>. Úplným rozpuštěním a následným doplněním roztoku po rysku vodou Mili-Q byl připraven zásobní roztok karboxymethylcelulózy o koncentraci 402,975 μmol · dm<sup>-3</sup>.

#### 4.1.6 Příprava zásobního roztoku polyvinylpyrrolidonu

Na analytických vahách bylo naváženo 1,6049 g polyvinylpyrrolidonu o relativní molekulové hmotnosti 40 kDa. Navážené množství bylo kvantitativně převedeno do odměrné baňky o objemu 100 cm<sup>3</sup>. Úplným rozpuštěním a následným doplněním roztoku po rysku vodou Mili-Q byl připraven zásobní roztok polyvinylpyrrolidonu o koncentraci 401,225 μmol · dm<sup>-3</sup>.

#### 4.1.7 Příprava zásobního roztoku hovězího albuminu

Na analytických vahách bylo naváženo 0,0635 g hovězího albuminu o relativní molekulové hmotnosti 66430 g · mol<sup>-1</sup>. Navážené množství bylo kvantitativně převedeno do odměrné baňky o objemu 100 cm<sup>3</sup>. Úplným rozpuštěním a následným doplněním roztoku po rysku vodou Mili-Q byl připraven zásobní roztok hovězího albuminu o koncentraci 9,5589 μmol · dm<sup>-3</sup>.

#### 4.1.8 Příprava zásobního roztoku fluorescenční sondy

Na analytických vahách bylo naváženo 0,0193 g 3HNA o relativní molekulové hmotnosti 188,18 g · mol<sup>-1</sup>. Navážené množství bylo kvantitativně převedeno do odměrné baňky o objemu 50 cm<sup>3</sup>. Úplným rozpuštěním a následným doplněním roztoku po rysku ethanolem (ethanol na UV-VIS) byl připraven zásobní roztok 3HNA o koncentraci 0,002051 mol · dm<sup>-3</sup>.

#### 4.1.9 Příprava vzorků

Do vialek bylo napipetováno 73 μdm<sup>3</sup> roztoku fluorescenční sondy v ethanolu, rozpouštědlo bylo následně odpařeno za laboratorní teploty a do vialek byl napipetován daný objem polymeru a vody Mili-Q (viz **Tab. 1**), aby celkový objem vzorku činil 5 cm<sup>3</sup>, a aby koncentrace sondy ve vzorku byla 30 μmol · dm<sup>-3</sup>. Vzorky byly ponechány na třepače do druhého dne.

Takto byly od každého polymeru vytvořeny tři řady obsahující fluorescenční sondu 3HNA a jedna řada bez fluorescenční sondy.

**Tab. 1** – Koncentrační řada hyaluronanu, karboxymethylcelulózy, polyvinylpyrrolidonu a albuminu. Objem každého vzorku byl doplněn na  $5 \text{ cm}^{-3}$ .

Vzorek	$C_{\text{Hya}}$ [g · dm <sup>-3</sup> ]	$V_{\text{Hya}}$ [μdm <sup>3</sup> ]	$C_{\text{CMC}}$ [μmol · dm <sup>-3</sup> ]	$V_{\text{CMC}}$ [μdm <sup>3</sup> ]	$C_{\text{PVP}}$ [μmol · dm <sup>-3</sup> ]	$V_{\text{PVP}}$ [μdm <sup>3</sup> ]	$C_{\text{BSA}}$ [μmol · dm <sup>-3</sup> ]	$V_{\text{BSA}}$ [μdm <sup>3</sup> ]
a	0,0	0	0	0	0	0	0,0	0
b	0,5	166	20	247	20	249	1,0	523
c	1,0	333	50	617	50	623	2,0	1046
d	3,0	999	100	1233	100	1246	3,0	1569
e	5,0	1665	200	2467	200	2492	4,0	2092
f	7,0	2330	300	3700	300	3739	5,0	2615
g	9,0	2996	400	4933	400	4985	6,0	3138
h	12,0	3995					9,6	5000
i	13,0	4328						
j	15,0	5000						

## 4.2 Měření doby života, anisotropie a emisních spekter

### 4.2.1 Fluorolog

Měření fluorescenčních spekter a anisotropie 3HNA v různých koncentracích polymeru bylo prováděno za konstantní teploty 22 °C pro excitační vlnovou délku 350 nm, emisní vlnovou délku 360-610 nm a pro excitační a emisní šterbinu o velikosti 3 nm.

### 4.2.2 Fluorocube

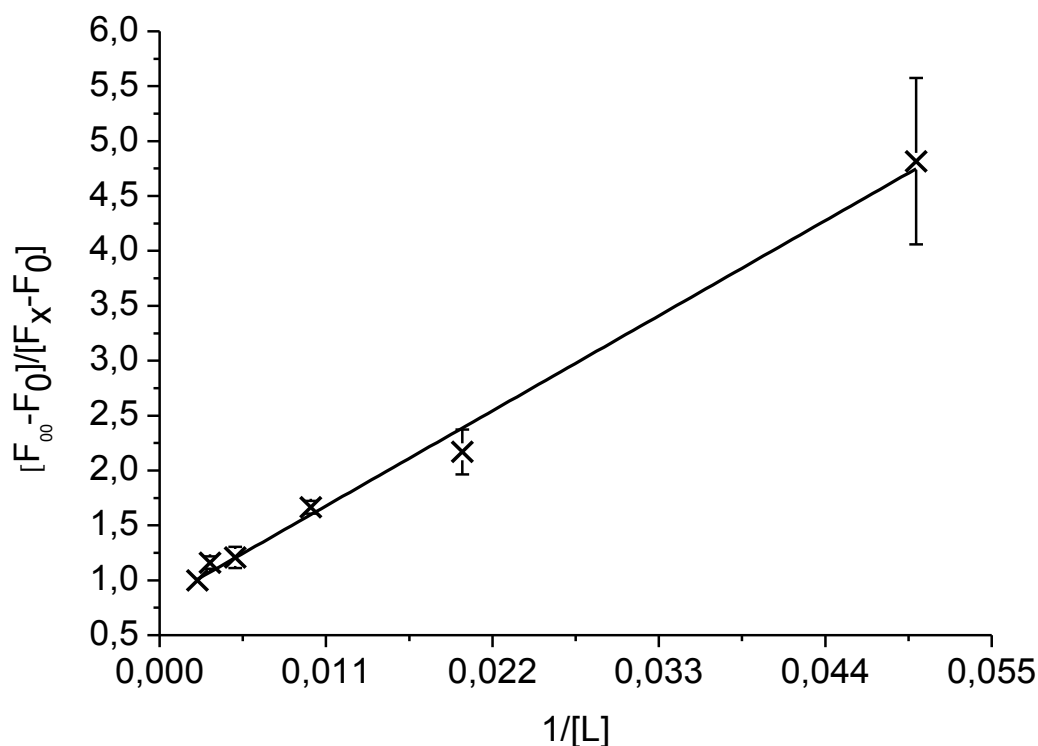
Odezva lampy byla zjištěna měřením rozptylujícího záření koloidního roztoku oxidu křemičitého pro nastavení monochromátoru NanoLED lampy na vlnovou délku 361 nm a za použití filtrů pro snížení intenzity lampy při nadměrném zahlcení detektoru. Měření vzorků bylo prováděno za konstantní teploty 22 °C a za použití monochromátoru nastaveného pro vlnovou délku 510 nm. Nastavení přístroje: coaxial delay 65 ns, TAC range 50-100 ns, počet fotonů v maximu 10000, repetition rate 1MHz, sync delay 0-50 s, velikost šterbin byla nastavena na 32 nm. Měření byla prováděna v reverzním uspořádání.

## 5 VÝSLEDKY A DISKUZE

### 5.1 Steady-state fluorescence

Interakce mezi polymerem a fluorescenční sondou 3HNA byla zkoumána určením vazebné konstanty. Vazebná konstanta byla získána vyhodnocením intenzity ESIPT emise 3HNA pomocí metody Benesi-Hilderbrand [11]. Vykreslením závislosti  $[F_{\infty} - F_0]/[F_x - F_0]$  na převrácené hodnotě koncentrace přidaného polymeru a následným proložení získaných bodů přímkou byla posuzována jak linearita přímky, tak i vazebná konstanta získaná ze směrnice rovnice.

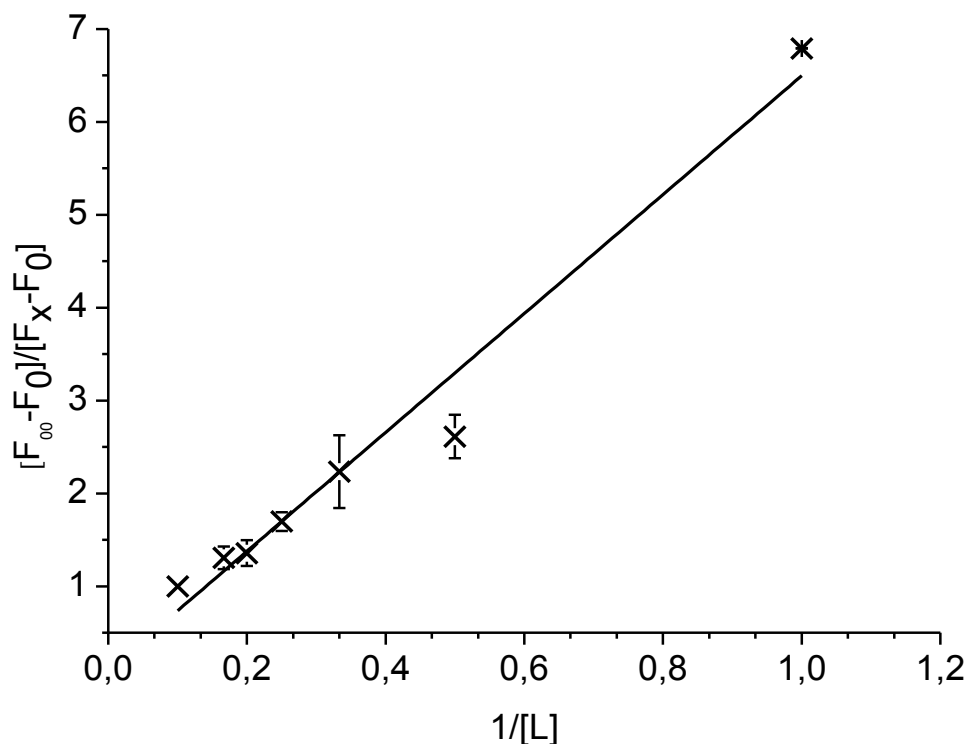
Výsledná spektra byla získána zprůměrováním hodnot intenzit tří řad vzorků po odečtu rozptylu prostředí měřením vzorku bez fluorescenční sondy.



**Obr. 8** - Závislost  $[F_{\infty} - F_0]/[F_x - F_0]$  na převrácené hodnotě koncentrace polymeru PVP při konstantní koncentraci sondy 3HNA 20  $\mu\text{M}$ .

Polyvinylpyrrolidon sloužil jako kontrolní měření, byl vybrán na základě literární rešerše, k posouzení správnosti použitých metod a výpočtů. Je zde viditelný nárůst intenzity ESIPT emise fluorescenční sondy 3HNA se vzrůstající koncentrací polymeru polyvinylpyrrolidonu (viz **Obr. 12**). Příložený graf (viz **Obr. 8**) zobrazuje body získané metodou Benesi-Hilderbrand, z lineárního průběhu se vzestupnou tendencí byla proložení křivkou stanovena vazebná konstanta pro systém 3HNA – PVP na  $1,27 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$ . Vazebná konstanta tohoto systému získaná z literární rešerše, byla stanovena na hodnotu  $0,9 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$  užitím metody Benesi-Hilderbrand. Hodnoty vazebných konstant se liší jen nepatrně.

Zde je zvýšení intenzity ESIPT emise fluoroforu způsobeno interakcí aniontové formy fluoroforu s hydrofilní částí řetězce PVP.

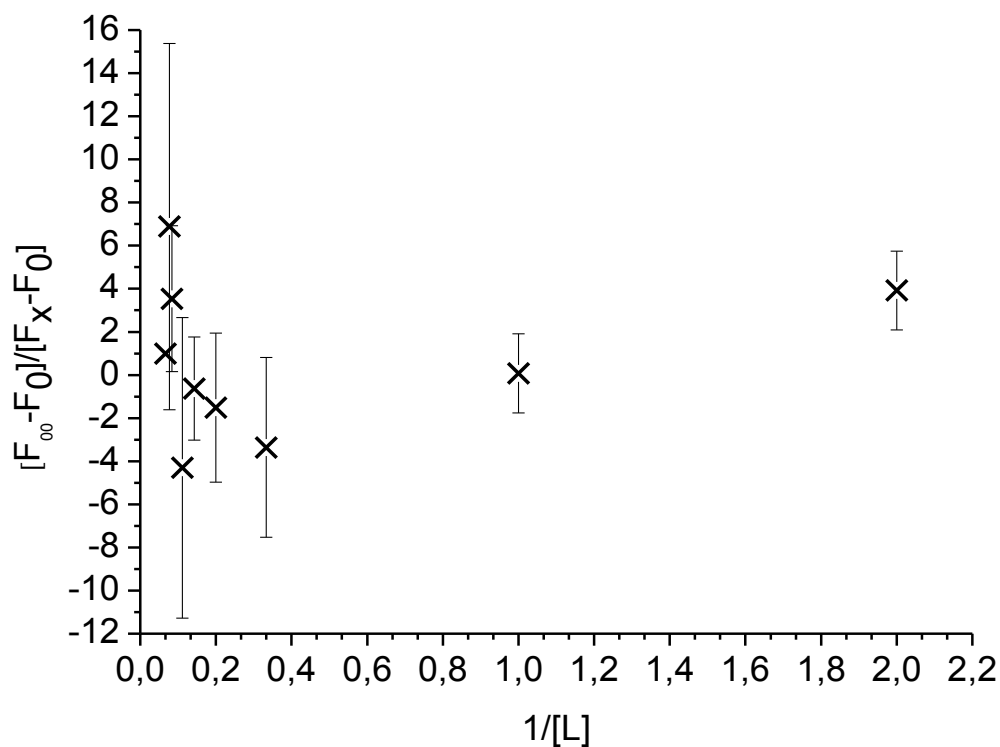


**Obr. 9** – Závislost  $[F_{\infty}-F_0]/[F_x-F_0]$  na převrácené hodnotě koncentrace polymeru BSA při konstantní koncentraci sondy 3HNA 30  $\mu\text{M}$ .

U hovězího albuminu byl zaznamenán nárůst intenzity ESIPT emise fluorescenční sondy 3HNA se vzrůstající koncentrací albuminu. Emisní spektrum 3HNA v přítomnosti BSA je uvedeno v seznamu příloh (viz **Obr. 20**). Body získané metodou Benesi-Hilderbrand mají lineární charakter. Je tedy možné je proložit přímkou (viz **Obr. 9**). Z postupného zvyšování intenzity ESIPT emise 3HNA a z lineárního průběhu přímky byla stanovena vazebná konstanta systému 3HNA – BSA, a to  $1,56 \cdot 10^5 \text{ [M}^{-1}\text{]}$ .

Dá se tedy usoudit interakce fluoroforu s řetězcem polymeru. Aniontová forma sondy se zde váže na hydratační obal řetězce, což způsobuje nárůst ESIPT emise fluoroforu v emisním spektru. Vazebná konstanta je u tohoto systému vyšší než u systému kontrolního měření 3HNA – PVP, kde hodnota vazebné konstanty dosahovala řádů  $10^4$ . Lze usoudit větší míru interakce sondy s polymerem BSA.

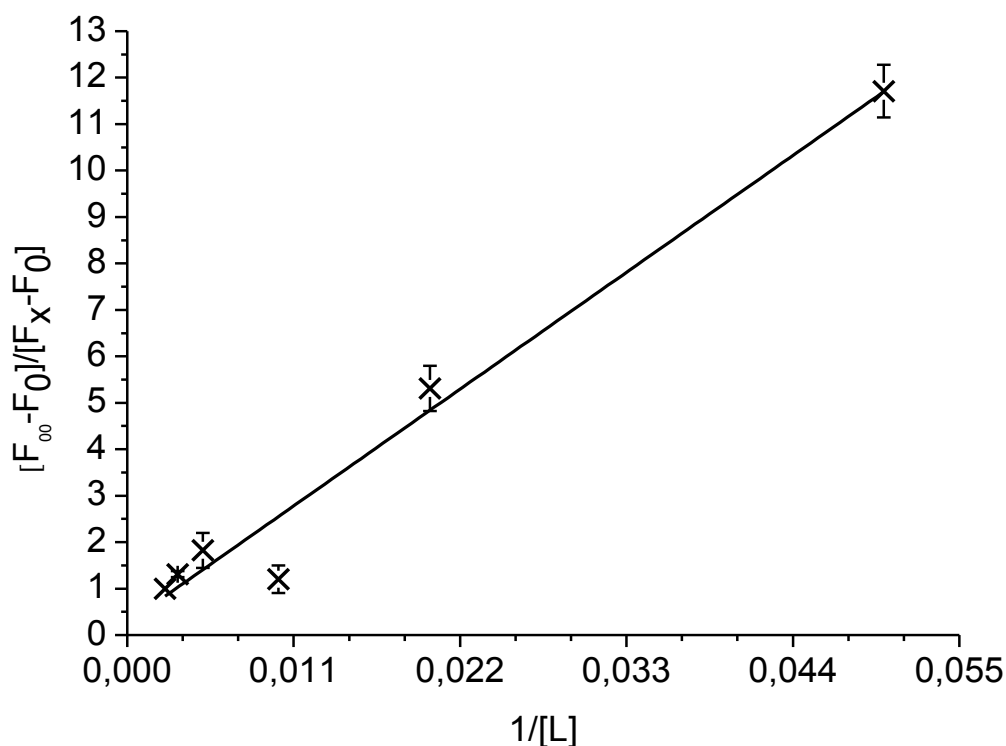




**Obr. 10** – Závislost  $[F_{\infty}-F_0]/[F_x-F_0]$  na převrácené hodnotě koncentrace polymeru Hya při konstantní koncentraci sondy 3HNA 30  $\mu$ M.

U hyaluronanu není viditelný nárůst intenzity ESIPT emise 3HNA s koncentrací polymeru (viz **Obr. 13**). Body získané metodou Benesi-Hilderbrand nevykazují lineární průběh, nedala se tedy stanovit vazebná konstanta proložením bodů přímkou (viz **Obr. 10**).

Fluorescenční sonda v tomto případě neinteraguje s hydrofilní částí řetězce polymeru. Aniontová forma sondy je odpuzována záporným nábojem na řetězci hyaluronanu, který vzniká disociací karboxylové skupiny, jež dává hyaluronanu záporný náboj.



**Obr. 11** – Závislost  $[F_{\infty}-F_0]/[F_x-F_0]$  na převrácené hodnotě koncentrace polymeru CMC při konstantní koncentraci sondy 3HNA 30  $\mu\text{M}$ .

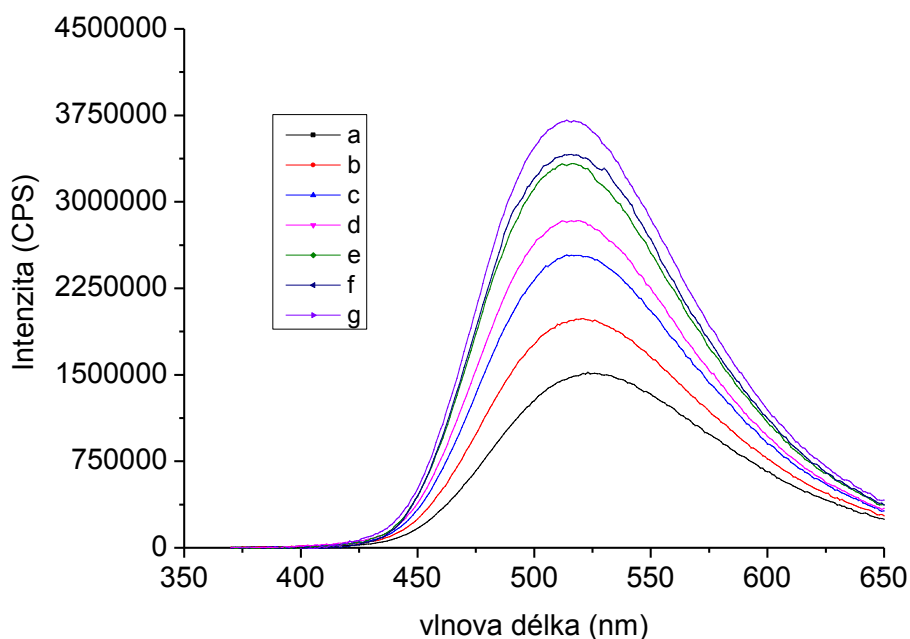
Dalším zkoumaným polymerem je CMC. Tento polymer obsahuje, stejně jako hyaluronan množství karboxylových skupin, ale je také velmi hydrofilní. Dá se tedy předpokládat, že interakce polymer – sonda bude ovlivněna přítomností těchto skupin.

Emisní spektra karboxymethylcelulózy (viz **Obr. 21**) vykazovala nerovnoměrný nárůst intenzity ESIPT emise 3HNA. Body získané metodou Benesi-Hilderbrand mají lineární charakter se vzrůstající tendencí (viz **Obr. 11**), bylo je tedy možno proložit přímkou. Ze vzestupného trendu přímky bylo možno stanovit vazebnou konstantu systému CMC – 3HNA na  $4,37 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}$ .

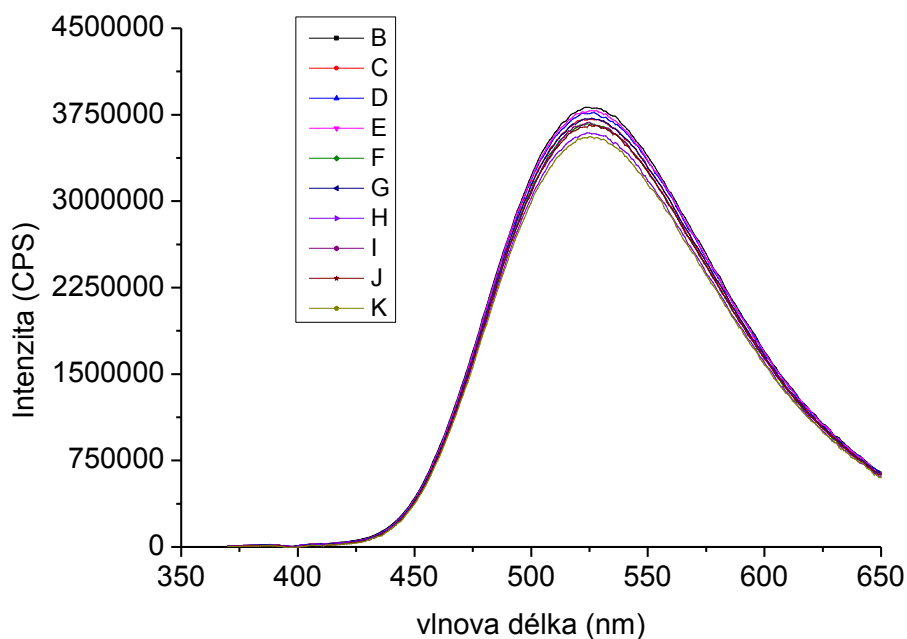
Nerovnoměrný nárůst intenzity může být způsoben vysokou viskozitou roztoku polymeru a možným částečným zesíťováním polymeru, nicméně lineární průběh zvyšování intenzity s koncentrací je zde patrný. Dá se tedy říct, že se aniontová forma fluoroforu 3HNA vázala na hydratační obal řetězce karboxymethylcelulózy. Hodnota vazebné konstanty je pro tento systém nižší než pro kontrolní systém 3HNA – PVP kde se hodnota vazebné konstanty pohybovala v řádu  $10^4$ . Důvodem může být odpuzování sondy záporným nábojem na řetězci karboxymethylcelulózy, který zde ovšem není tak silný jako v případě hyaluronanu. Proto se na hydrofilní část váže poměrně menší frakce aniontové formy sondy než v případě měření systému PVP, nebo BSA.

Níže jsou uvedeny emisní spektra polymeru polyvinylpyrrolidonu a hyaluronanu. Jak bylo řečeno, polyvinylpyrrolidon zde slouží jako kontrolní měření, emisní spektra vykazují postupný nárůst intenzity ESIPT emise 3HNA (viz **Obr. 12**). Intenzita fluorescence 3HNA se v přítomnosti hyaluronanu nemění rovnoměrně (viz **Obr. 13**), ale kolísá okolo jedné

hodnoty, tak nebylo možné stanovit vazebnou konstantu, z toho plyne, že se sonda neadsorbovala na vodu vázanou k polymeru.



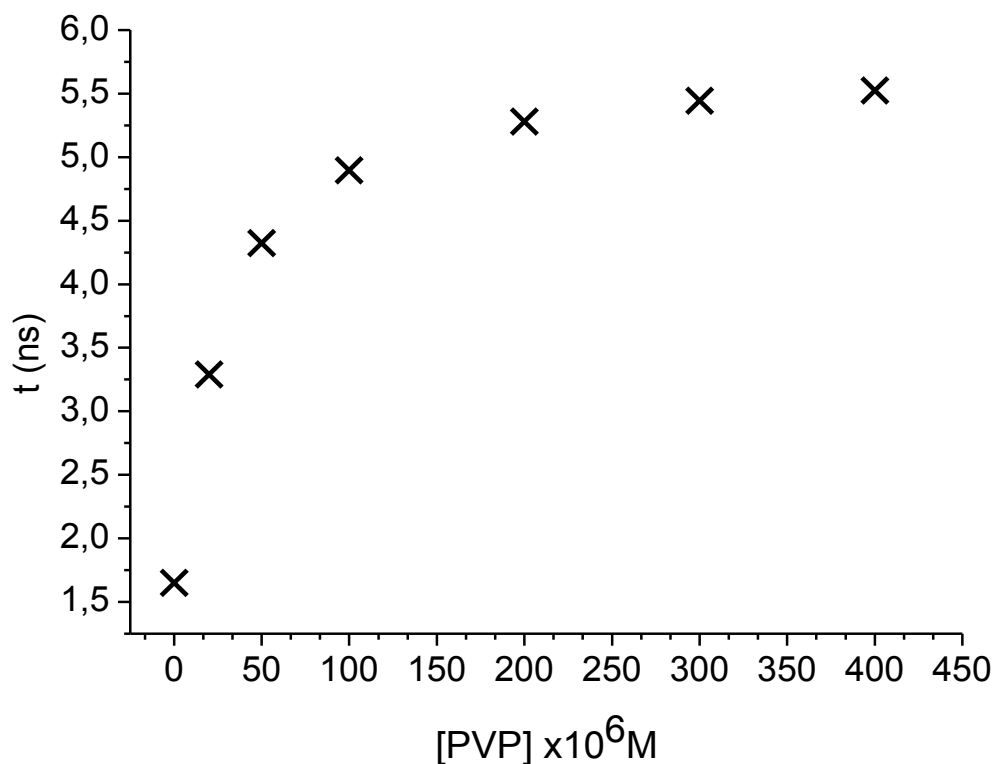
**Obr. 12** – Fluorescenční spektra 3HNA s rostoucí koncentrací PVP, (a) 400  $\mu\text{M}$ , (b) 300  $\mu\text{M}$ , (c) 200  $\mu\text{M}$ , (d) 100  $\mu\text{M}$ , (e) 50  $\mu\text{M}$ , (f) 20  $\mu\text{M}$  a (g) 0  $\mu\text{M}$  při konstantní koncentraci 3HNA 20  $\mu\text{M}$ .



**Obr. 13** – Fluorescenční spektra 3HNA s rostoucí koncentrací Hya, (a) 15 g/l, (b) 13 g/l, (c) 12 g/l, (d) 9 g/l, (e) 7 g/l, (f) 5 g/l, (g) 3 g/l, (h) 1 g/l, (i) 0,5 g/l a (j) 0 g/l při konstantní koncentraci 3HNA 30  $\mu\text{M}$ .

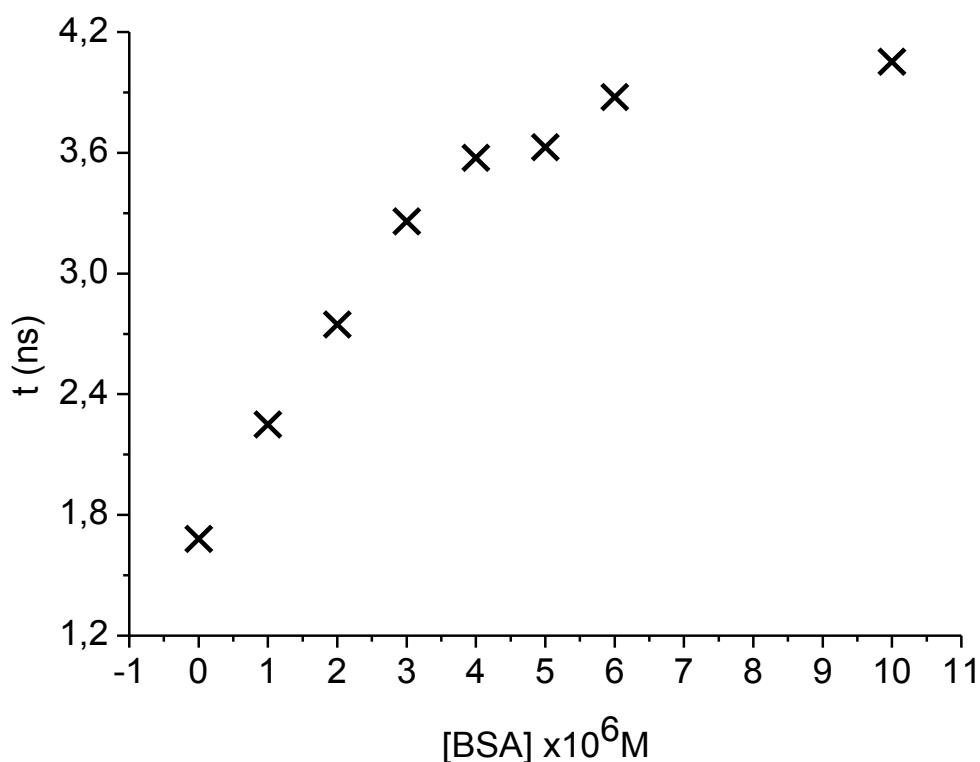
## 5.2 Časově rozlišená fluorescence

Měřením časově rozlišené fluorescence byla zjištěna doba života fluoroforu.



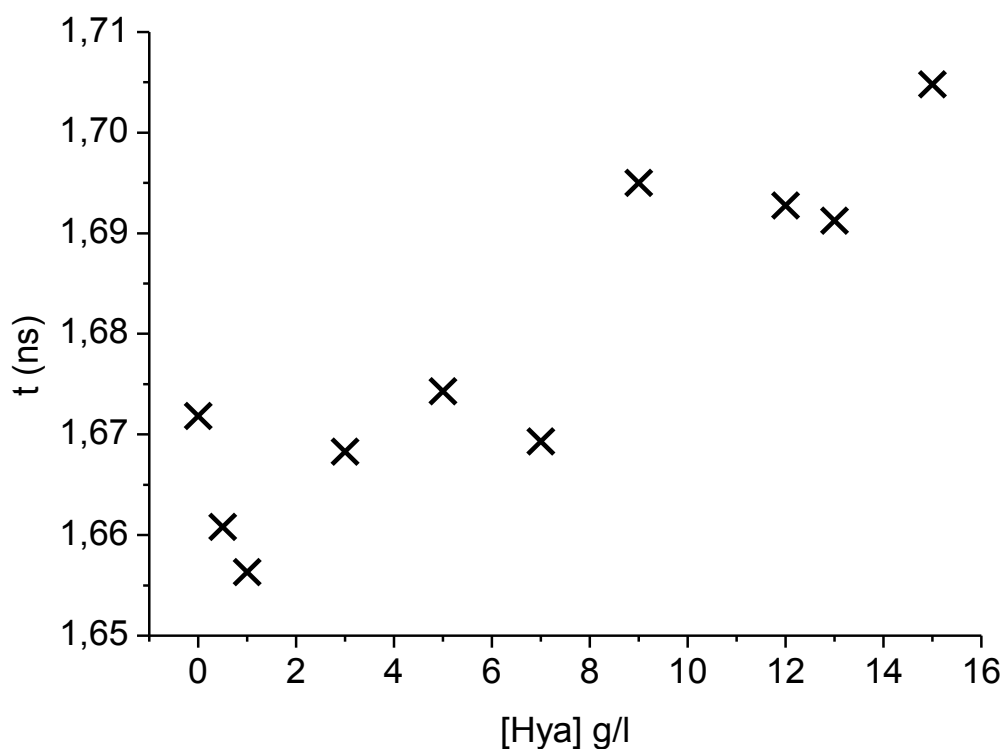
**Obr. 14** – Doba života fluoroforu systému PVP – 3HNA v závislosti na koncentraci polymeru při konstantní koncentraci 3HNA 20  $\mu$ M.

U kontrolního měření polymeru polyvinylpyrrolidonu byla proložením vyhasínání intenzity ESIPT emise fluoroforu 3HNA ve vodném roztoku, neobsahující přidání polymeru PVP, jedno-exponenciální funkcí zjištěna doba života volného fluoroforu 1,65 ns. S rostoucí koncentrací polymeru byl pokles prokládán dvou-exponenciální funkcí a průměrná doba života fluoroforu vzrostla na hodnotu 5,52 ns s postupným procentuálním nárůstem podílu doby života fluoroforu vázaného na řetězec polymeru (viz **Obr. 14**). V systému PVP – 3HNA bylo dosaženo limitní hodnoty doby života fluoroforu. Pro koncentrace PVP 300 a 400  $\mu$ M se doba života ustálila na hodnotě 5,52 ns. Hodnoty dob života fluoroforu a jejich relativní amplitudy jsou uvedeny v seznamu příloh (viz **Tab. 2**).



**Obr. 15** – Doba života fluoroforu systému BSA – 3HNA v závislosti na koncentraci polymeru při konstantní koncentraci 3HNA 30  $\mu$ M.

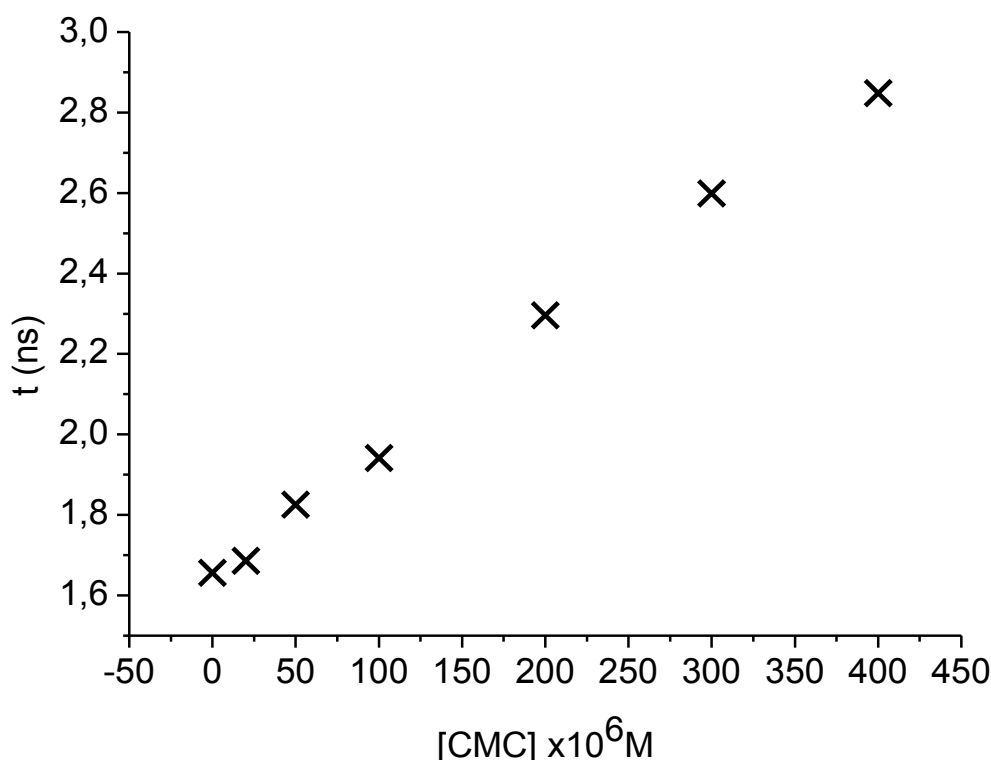
Proložení poklesu intenzity ESIPT emise fluoroforu 3HNA ve vodném roztoku, neobsahující přidaný polymer BSA, jedno-exponenciální funkcí byla zjištěna doba života volného fluoroforu 1,68 ns. Následným přidáním polymeru BSA byl pokles intenzity prokládán dvou-exponenciální funkcí. S rostoucí koncentrací polymeru se prodlužovala i průměrná hodnota doby života fluoroforu až na 4,05 ns. Se zvyšující se dobou života rostla i relativní amplituda doby života fluoroforu vázaného v polymeru BSA (viz **Obr. 15**). Dále je možné z grafu pozorovat dosažení limitní hodnoty. Pro koncentrace větší jak 6  $\mu$ M dosahovala hodnota doby života fluoroforu 4,05 ns a s rostoucí koncentrací na 10  $\mu$ M se již doba života výrazně neprodužovala. Hodnoty dob života fluoroforu a jejich relativní amplitudy jsou uvedeny v seznamu příloh (viz **Tab. 3**).



**Obr. 16** – Doba života fluoroforu systému Hya – 3HNA v závislosti na koncentraci polymeru při konstantní koncentraci 3HNA 30  $\mu$ M.

Měřením poklesu intenzity a následným proložením jedno-exponenciální funkcí u roztoku neobsahující přidaný hyaluronan byla stanovena doba života volného fluoroforu na 1,67 ns (viz **Obr. 16**). Pokles intenzity u roztoků obsahující postupně se zvyšující koncentraci polymeru nevykazoval interakci sondy s řetězcem. Pokles byl pro celou koncentrační řadu prokládán pouze jedno-exponenciální funkcí a stanovená doba života fluoroforu se pohybovala mezi hodnotou 1,67-1,70 ns. Tato hodnota odpovídá době života volného fluoroforu ve vodném prostředí.

Aniontová forma fluoroforu 3HNA se tedy neváže na hydratační obal hyaluronanu, což je způsobeno silnou repulzí mezi nábojem 3HNA a hyaluronanu, který má především díky disociovaným karboxylovým skupinám záporný náboj. Hodnoty dob života fluoroforu a jejich relativní amplitudy jsou uvedeny v seznamu příloh (viz **Tab. 4**).



**Obr. 17** – Doba života fluoroforu systému CMC – 3HNA v závislosti na koncentraci polymeru při konstantní koncentraci 3HNA 30  $\mu$ M.

U polymeru karboxymethylcelulózy byly první dva poklesy proloženy jedno-exponenciální funkcí, doba života fluoroforu se pohybovala od 1,66-1,70 ns. Pro koncentraci polymeru vyšší jak 50  $\mu$ M byl pokles intenzity prokládán dvou-exponenciální funkcí. Doba života fluoroforu se zvyšovala až k hodnotě 2,85 ns s postupným procentuálním zvyšováním doby života vázaného fluoroforu (viz **Obr. 17**). Z lineárního průběhu grafu je patrné, že doba života ještě nedosáhla limitní hodnoty a má tendence se s nárůstem koncentrace dále prodlužovat. Aniontová forma fluoroforu se tedy váže na polymerní řetězec CMC, ale již při koncentraci 400  $\mu$ M byl roztok vysoce viskózní a dalším zvyšováním koncentrace by se zkomplikovala příprava vzorků. Hodnoty dob života fluoroforu a jejich relativní amplitudy jsou uvedeny v seznamu příloh (viz **Tab. 5**).

### 5.3 Anisotropie

Hodnoty steady-state anisotropie mohou být použity na určení vazebné konstanty systému polymer – 3HNA. Vazebná konstanta je určena zlomkem  $K \cdot [P] = F_b / (1 - F_b)$ , kde data získaná měřením steady-state anisotropie byla použita k určení frakce molekul fluoroforu vázaného na polymerní řetězec, tzv.  $F_b$ . Vynesením závislosti  $F_b / (1 - F_b)$  na koncentraci polymeru  $[P]$  a proložení získaných bodů přímkou lineární regrese vycházející z počátku souřadnicového systému byla určena vazebná konstanta daného systému  $K$  [11].

Výsledné hodnoty anisotropie systému byly zjištěny zprůměrováním měřených hodnot. Pro každý systém byla měřena anisotropie pětkrát.

Měřením anisotropie systému PVP – 3HNA, bylo dosaženo limitní hodnoty, kdy anisotropie s rostoucí koncentrací polymeru stoupala, ale pro koncentraci vyšší jak 300  $\mu\text{M}$  se anisotropie výrazně neměnila. Naměřené hodnoty anisotropie se pohybují od 0,0129 do 0,0415 (viz **Obr. 18**). Body získané z grafu závislosti  $F_b/(1-F_b)$  na koncentraci polymeru byly proloženy přímkou lineární regrese. Takto byla stanovena hodnota vazebné konstanty pro systém PVP – 3HNA na  $1,63 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$ . Vazebná konstanta, pro stejný systém, stanovená metodou Benesi-Hilderbrand dosahovala nižší hodnoty a to  $1,27 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$ . Tento nepatrný rozdíl je pravděpodobně způsoben viskozitou, která roste s rostoucí koncentrací polymeru.

Anisotropie systému BSA – 3HNA vykazovala rostoucí tendenci (viz **Obr. 22**) s rostoucí koncentrací přidaného polymeru, a to od 0,0121 pro vzorek bez přidaného polymeru, až po 0,196 pro fluorofor vázaný na řetězec. Z grafu je patrné dosažení limitní hodnoty anisotropie, kdy od koncentrace polymeru větší jak 6  $\mu\text{M}$  se již anisotropie systému výrazně nemění, nestoupá. Proložení závislosti  $F_b/(1-F_b)$  na koncentraci polymeru a následným proložení těchto bodů byla stanovena vazebná konstanta systému BSA – 3HNA na  $6,99 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$ . Vazebná konstanta, pro stejný systém, stanovená metodou Benesi-Hilderbrand dosahovala nižší hodnoty a to  $1,56 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$ . Ovšem obě konstanty se pohybují ve stejném řádu, tedy  $10^5$  což značí vyšší podíl sondy interagující s řetězcem než u kontrolního měření systému PVP. Zvýšení hodnoty konstanty získané z anisotropie je pravděpodobně způsobeno viskozitou, která se s rostoucí koncentrací zvyšuje a ovlivňuje hodnotu anisotropie.

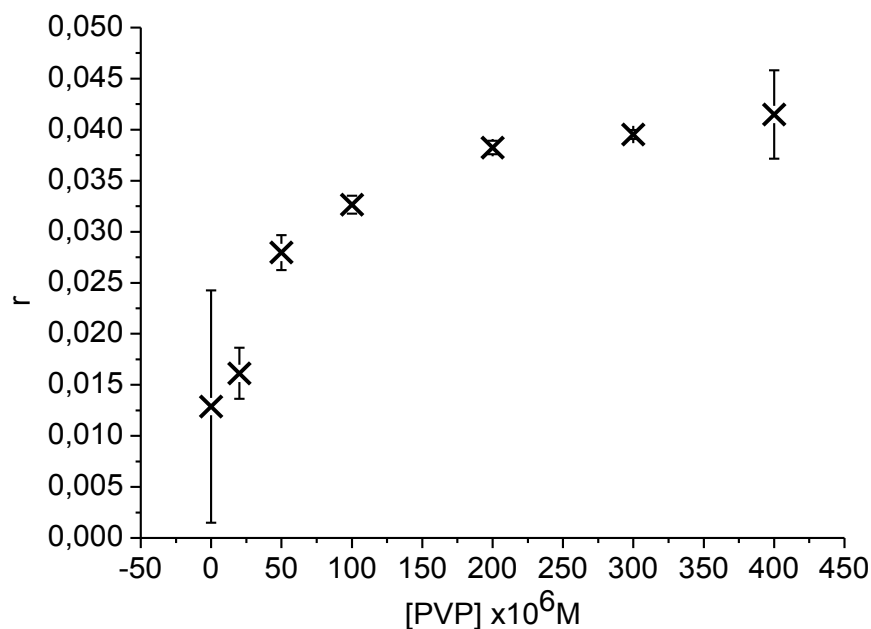
U systému Hya – 3HNA se měřená anisotropie pohybovala od 0,00342 do 0,00482, což odpovídá hodnotě anisotropie fluoroforu nevázaného na polymer. Nebyla zaznamenána žádná tendence růstu anisotropie a nemohla být stanovena hodnota vazebné konstanty tohoto systému (viz **Obr. 19**). Protože se anisotropie téměř neměnila, respektive se pohybovala v řádu  $10^{-3}$ , lze usoudit, že nedocházelo k interakci sondy a hydratačního obalu hyaluronanu.

Systém CMC – 3HNA vykazoval růst anisotropie s koncentrací polymeru, avšak nebylo dosaženo limitní hodnoty anisotropie pro tento systém. Z vynesené závislosti anisotropie na koncentraci přidaného polymeru (viz **Obr. 23**) je patrné, že anisotropie systému by nadále rostla při zvyšování koncentrace, nebylo tedy dosaženo nasycení. Byla zjištěna vazebná konstanta systému proložení bodů získaných výpočtem frakce vázaného polymeru na koncentraci. Vazebná konstanta systému CMC – 3HNA byla stanovena na  $1,16 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$ . Vazebná konstanta, pro stejný systém, stanovená metodou Benesi-Hilderbrand dosahovala hodnoty  $4,37 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}$ . Jako u předešlých měření hodnota vazebné konstanty určená měřením anisotropie je větší než vazebná konstanta určená měřením intenzity ESIPT emise. Rozdíl v hodnotě vazebných konstant je dán vysokou citlivostí anisotropie na viskozitu roztoku. Tento rozdíl je nejvíce patrný právě u karboxymethylcelulózy, kdy byl roztok na pohled vysoce viskózní a i hodnoty vazebných konstant se liší více než u předchozích systémů. Proto nemůžeme vazebnou konstantu systému CMC – 3HNA porovnávat s ostatními systémy, neboť je zatížena velkým zkreslením.

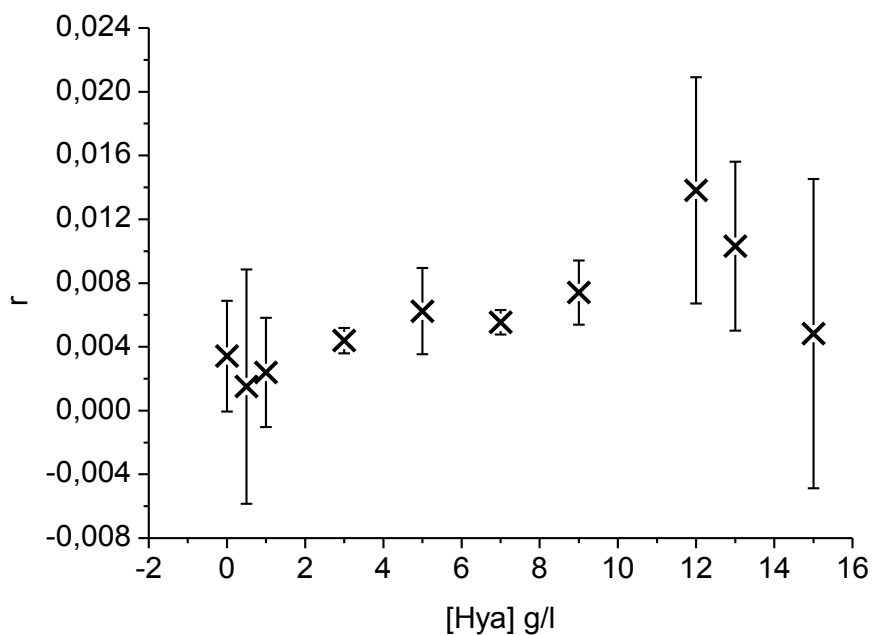
Níže uvedené grafy zobrazují závislost anisotropie systému PVP – 3HNA a Hya – 3HNA na koncentraci polymeru. Měření anisotropie polymeru polyvinylpyrrolidonu sloužilo jako kontrolní měření, z grafu je patrný nárůst anisotropie i dosažené limitní hodnoty



(viz **Obr. 18**). Pro systém Hya – 3HNA nevykazovala měření anisotropie výrazné změny ani rostoucí tendenci (viz **Obr. 19**). Graf zachycuje nepatrnou změnu anisotropie, která může být způsobena rostoucí viskozitou systému.



**Obr. 18** – Anisotropie steady-state fluorescence systému PVP – 3HNA v závislosti na koncentraci polymeru při konstantní koncentraci 3HNA 20  $\mu$ M



**Obr. 19** – Anisotropie steady-state fluorescence systému Hya – 3HNA v závislosti na koncentraci polymeru při konstantní koncentraci 3HNA 30  $\mu$ M

## 6 ZÁVĚR

Cílem bakalářské práce bylo zkoumání hydrofilního obalu hyaluronanu, karboxymethylcelulózy a hovězího albuminu měřením steady-state fluorescence, steady-state anisotropie fluorescence a časově rozlišené fluorescence při teplotě 22 °C. Měření interakce polymeru polyvinylpyrrolidonu a fluorescenční sondy 3HNA bylo na základě literární rešerše zvoleno jako kontrolní, k potvrzení správnosti měření a výpočtů.

Nejprve byla měřena intenzita ESIPT emise fluorescenční sondy 3HNA v systému PVP – 3HNA. Měřením ESIPT emise byla stanovena vazebná konstanta na  $1,27 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$ . Byla určena vazebná konstanta z anisotropie fluorescence pro stejný systém na  $1,63 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$ . Tyto hodnoty vazebných konstant odpovídají konstantám zjištěným z literární rešerše, kde je pro metodu Benesi-Hilderbrand stanovena vazebná konstanta na  $0,9 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$  a z dat steady-state anisotropie na  $1,4 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$ . Tímto měřením byla ověřena správnost postupu i použitých výpočtů. Doba života fluoroforu pro tento systém byla v bakalářské práci určena na 1,65 ns pro systém bez polymeru a 5,52 ns pro systém vázaného fluoroforu. Doba života fluoroforu z literární rešerše se pohybovala od 1,5 do 5,5 ns, což odpovídá i měření v bakalářské práci.

Dále byla měřena intenzita ESIPT emise fluorescenční sondy 3HNA v přítomnosti hovězího albuminu. Měřením byla stanovena vazebná konstanta metodou Benesi-Hilderbrand na  $1,56 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$ . Dále byla stanovena vazebná konstanta z anisotropie fluorescence a to na  $6,99 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$ . Obě vypočtené vazebné konstanty odpovídají interakci ve stejném systému, tedy BSA – 3HNA, s konstantní koncentrací sondy 3HNA 30  $\mu\text{M}$ . Pozorovaný rozdíl mezi vypočtenými konstantami je způsoben viskozitou, která s rostoucí koncentrací stoupá a ovlivňuje anisotropii. U toho systému dochází k vázání aniontové formy fluoroforu na hydratační obal polymeru. Tento předpoklad byl potvrzen měřením doby života fluoroforu časově rozlišenou fluorescencí. Metodou TCSPC byla také stanovena prodlužující se doba života fluoroforu a to z 1,68-4,05 ns s postupným nárůstem doby života fluoroforu vázaného na řetězec.

Měřená intenzita ESIPT emise systému Hya – 3HNA se s rostoucí koncentrací neměnila ani za použití vysoce koncentrovaného roztoku hyaluronanu (15 g/l). Aniontová forma se na řetězec nevázala z důvodu záporného náboje na řetězci hyaluronanu způsobeného především disociací karboxylové skupiny. Tento předpoklad byl potvrzen měřením anisotropie fluorescence, kdy se hodnota anisotropie pohybovala v rozmezí  $3,42 \cdot 10^{-3}$  –  $4,82 \cdot 10^{-3}$ , a rovněž měřením doby života fluoroforu, kdy naměřená doba života na základě literární rešerše odpovídá době života volného fluoroforu, tedy 1,67 – 1,70 ns.

Jako poslední byl měřen systém karboxymethylcelulózy, ke zjištění vlivu přítomnosti karboxylových skupin na interakci sondy s polymerem. V systému karboxymethylcelulózy docházelo k interakci aniontové formy 3HNA s hydrofilním řetězcem, ovšem vazebná konstanta byla nižší než u předchozích měření systémů PVP a BSA. Snížení frakce sondy vázané na hydratační obal CMC mohlo být způsobeno právě přítomností karboxylových skupin a jejich disociací. Metodou Benesi-Hilderbrand byla stanovena vazebná konstanta na  $4,37 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}$  a pro anisotropii na  $1,63 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$ . Z rostoucího trendu doby života fluorescence, kdy nebylo dosaženo limitní hodnoty pro interakci CMC – 3HNA, se dá říci, že při zvyšující se koncentraci polymeru ve vzorku by se mohla vázat s řetězcem ještě větší část fluoroforu, ovšem další zvyšování nemohlo být pro vysokou viskozitu provedeno, nebylo tedy dosaženo nasycení. Ovšem hodnota vazebné konstanty získaná z anisotropie

fluorescence je relativně vysoká oproti metodě Benesi-Hilderbrand a to z důvodu vysoké viskozity měřených roztoků.

## 7 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

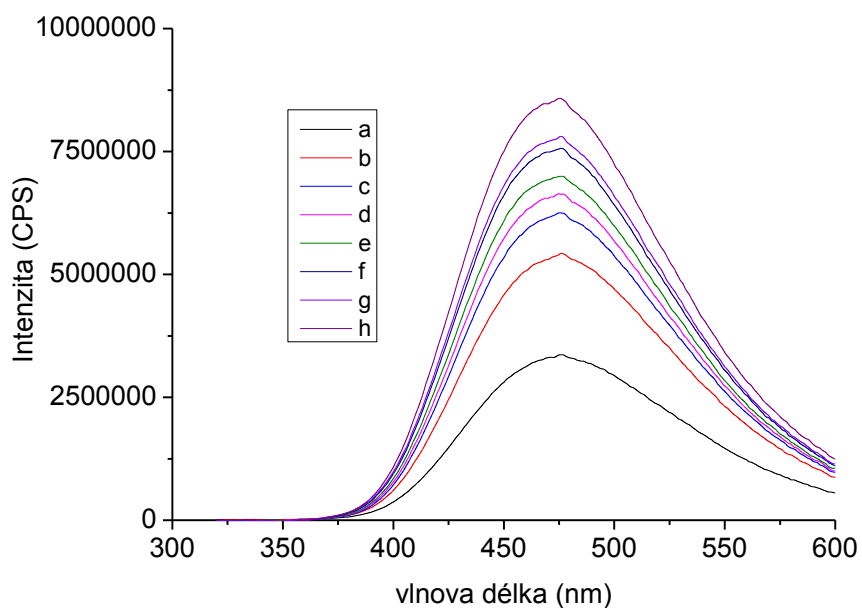
- [1] LAKOWICZ, Joseph R. Principles of fluorescence spectroscopy. 3rd ed. New York: Springer, c2006, xxvi, 954 p. ISBN 03-873-1278-1.
- [2] HERNÁNDEZ LÓPEZ, M. Synchronous-derivative phosphorimetric determination of 1- and 2-naphthol in irrigation water by employing  $\beta$ -cyclodextrin. *Talanta* [online]. vol. 49, issue 3, s. 679-689 [cit. 2013-06-14]. DOI: 10.1016/S0039-9140(99)00067-3. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0039914099000673>
- [3] KUMAR, Challa S.S.R. a Faruq MOHAMMAD. Magnetic nanomaterials for hyperthermia-based therapy and controlled drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews* [online]. 2011, roč. 63, č. 9, s. 789-808 [cit. 2012-12-27]. ISSN 0169409x. DOI: 10.1016/j.addr.2011.03.008. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0169409X11000597>
- [4] KUMAR, A a A MISHRA. 1-Naphthol as an excited state proton transfer fluorescent probe for sensing bound-water hydration of polyvinyl alcohol. *Talanta* [online]. 2007-03-30, vol. 71, issue 5, s. 2003-2006 [cit. 2013-06-14]. DOI: 10.1016/j.talanta.2006.09.010. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0039914006006266>
- [5] Life Technologies: Lipid-Mixing Assays of Membrane Fusion. LIFE TECHNOLOGIES CORPORATION. [online]. 2013. vyd. [cit. 2013-06-14]. Dostupné z: <http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/References/Molecular-Probes-The-Handbook/Technical-Notes-and-Product-Highlights/Lipid-Mixing-Assays-of-Membrane-Fusion.htm>
- [6] VELEBNÝ, RNDr. Vladimír Velebný, CSc. CONTIPRO. Hyaluronan: Polymer pro tkáňové inženýrství. Brno, 2012.
- [7] Univerzita Karlova: Principi fluorescence. [online]. [cit. 2013-06-14]. Dostupné z: <http://psych.lf1.cuni.cz/fluorescence/soubory/principy.htm>
- [8] MANDAL, Debabrata, Samir Kumar PAL a Kankan BHATTACHARYYA. Excited-State Proton Transfer of 1-Naphthol in Micelles. *The Journal of Physical Chemistry A* [online]. 1998, vol. 102, issue 48, s. 9710-9714 [cit. 2013-06-21]. DOI: 10.1021/jp982483n. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jp982483n>
- [9] KUMAR, A a A MISHRA. 1-Naphthol as an excited state proton transfer fluorescent probe for sensing bound-water hydration of polyvinyl alcohol. *Talanta* [online]. 2007-03-30, vol. 71, issue 5, s. 2003-2006 [cit. 2013-06-24]. DOI: 10.1016/j.talanta.2006.09.010. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0039914006006266>
- [10] Hirdyesh Mishra, Hem Chandra Joshi, Hira Ballabh Tripathi, Shruti Maheshwary, Narayanasami Sathyamurthy, Manoranjan Panda, Jayaraman Chandrasekhar, Photoinduced proton transfer in 3-hydroxy-2-naphthoic acid, *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, Volume 139, Issue 1, 16 February 2001, Pages 23-36, ISSN 1010-6030. Dostupné z <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1010603000004159>
- [11] PAL, Anirban, Shyam SUNDAR MAITY, Subhodip SAMANTA, Pinki SAHA SARDAR a Sanjib GHOSH. Interaction of the excited state intramolecular proton transfer probe 3-hydroxy-2-naphthoic acid with poly N-vinyl-2-pyrrolidone polymer in water: An insight into the water structure in the binding region. *Journal of*

- Luminescence [online]. 2010, vol. 130, issue 11, s. 1975-1982 [cit. 2013-06-28]. DOI: 10.1016/j.jlumin.2010.05.001. Dostupné z:  
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022231310001870>
- [12] SIGMA-ALDRICH: Product information. Sigma-Aldrich chemical directory: [elektronický zdroj] [online]. Nottingham: Hampden Data, c1997 [cit. 2014-04-22]. Dostupné z:  
[http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma/Product\\_Information\\_Sheet/b4287pis.pdf](http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma/Product_Information_Sheet/b4287pis.pdf)

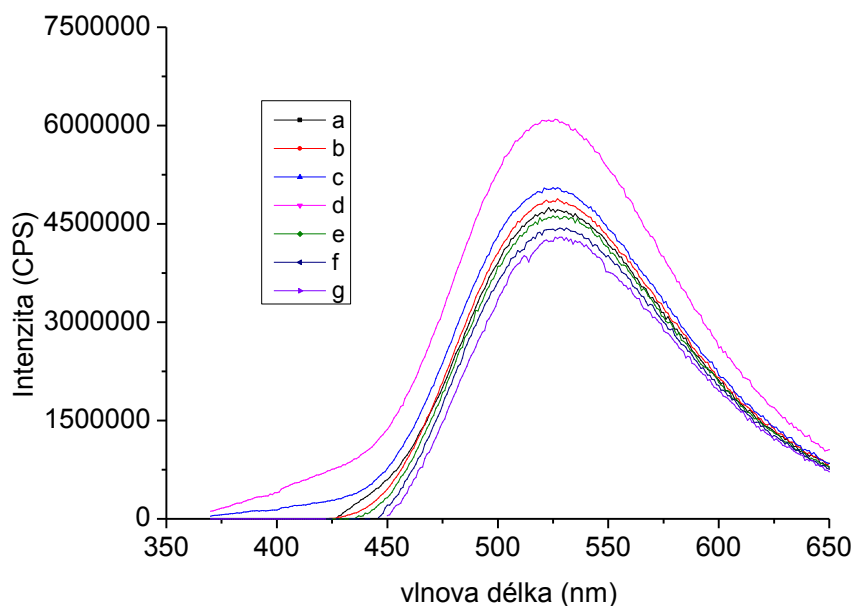
## 8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

ESIPT	excited state intramolecular proton transfer
Hya	hyaluronan
CMC	karboxymethylcelulóza
PVP	polyvinylpyrrolidon
BSA	hovězí sérový albumin
CTAB	cetyltrimethylammonium bromid
SDS	dodecylsírán sodný
PVA	polyvinylalkohol
3HNA	3-hydroxy naftolová kyselina
TNS	p-toulidinyl-6-naftalen sulfonová kyselina
ANS	1-anilio-8-naftalen sulfonová kyselina
TCSPC	time-correlated single photon counting
$F_{\infty}$	intenzita fluorescence pro maximální koncentraci polymeru
$F_0$	intenzita fluorescence bez polymeru
$F_x$	intenzita pro každou danou koncentraci
L	koncentrace polymeru
K	vazebná konstanta
r	anisotropie fluorescence
$I_T$	intenzita kolmého světla
$I_{II}$	intenzita rovnoběžného světla
p	stupeň polarizace
$[A^*]$	koncentrace excitovaného fluoroforu čase $t$
$[A^*]_0$	koncentraci excitovaného fluoroforu v čase, kdy se $t=0$
T	doba života excitovaného stavu
I	intenzita fluorescence v čase $t$
$I_0$	představuje intenzitu fluorescence v čase, kdy se $t=0$
$\Gamma$	rychlostní konstanta
$k_{nr}$	rychlostní konstanta nežádivého přechodu
$\Phi_0$	kvantový výtěžek fluorescence bez zhášedce
$\Phi$	kvantový výtěžek v přítomnosti zhášedce
$C_q$	koncentrace zhášedce
$t_0$	doba dohasínání fluorescence bez přítomnosti zhášedce
$t$	doba dohasínání v přítomnosti zhášedce
$k_q$	zhášecí konstanta
$f_0$	účinnost zhášení

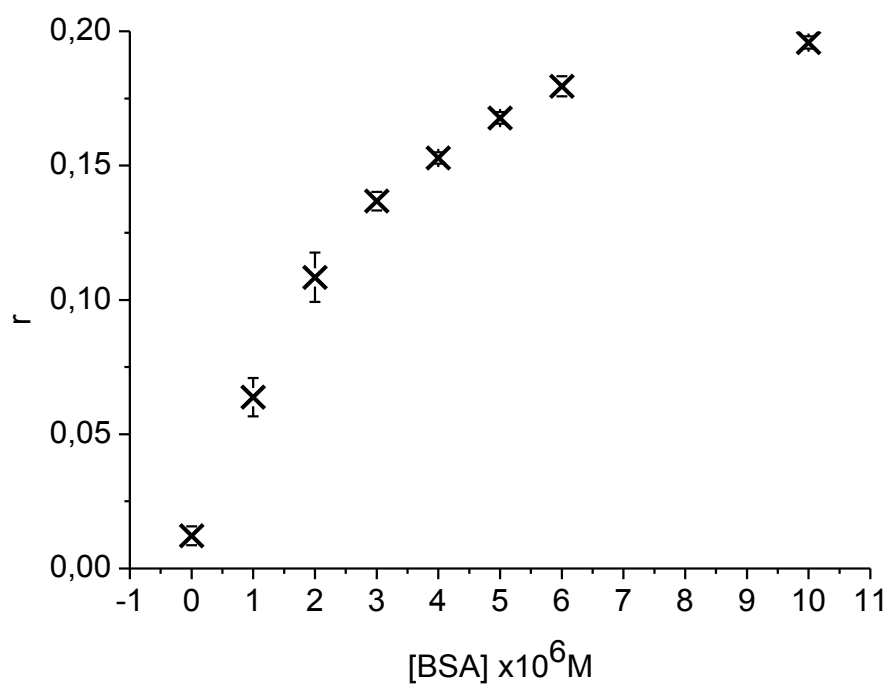
## 9 PŘÍLOHY



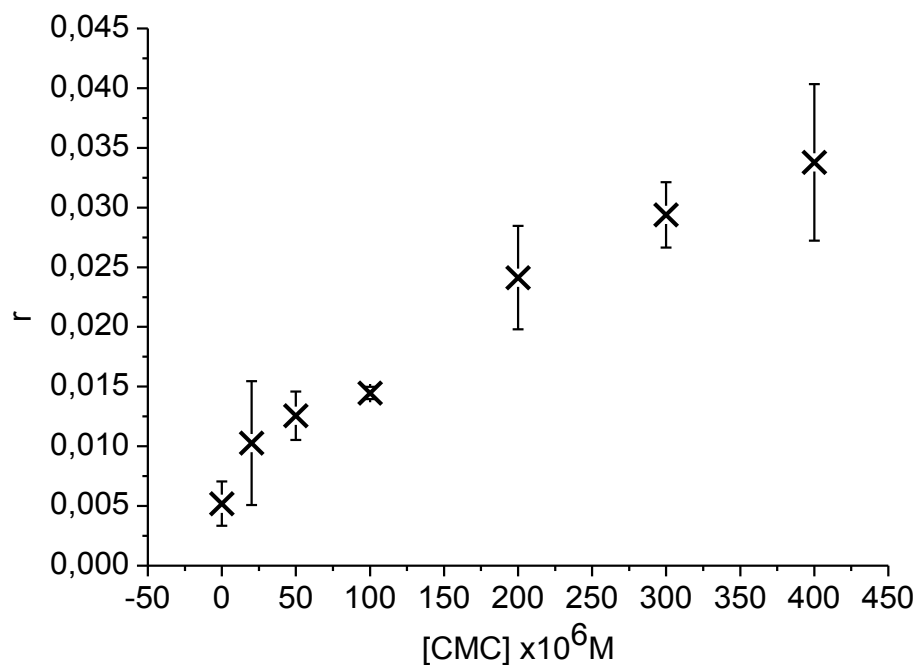
**Obr. 20** – Fluorescenční spektra 3HNA s rostoucí koncentrací BSA, (a)  $9,6 \mu\text{M}$ , (b)  $6 \mu\text{M}$ , (c)  $5 \mu\text{M}$ , (d)  $4 \mu\text{M}$ , (e)  $3 \mu\text{M}$ , (f)  $2 \mu\text{M}$ , (g)  $1 \mu\text{M}$  a (h)  $0 \mu\text{M}$  při konstantní koncentraci sondy 3HNA  $30 \mu\text{M}$ .



**Obr. 21** – Fluorescenční spektra 3HNA s rostoucí koncentrací CMC, (a)  $400 \mu\text{M}$ , (b)  $300 \mu\text{M}$ , (c)  $200 \mu\text{M}$ , (d)  $100 \mu\text{M}$ , (e)  $50 \mu\text{M}$ , (f)  $20 \mu\text{M}$  a (g)  $0 \mu\text{M}$  při konstantní koncentraci sondy 3HNA  $30 \mu\text{M}$ .



**Obr. 22** – Anisotropie steady-state fluorescence systému BSA – 3HNA v závislosti na koncentraci polymeru při konstantní koncentraci 3HNA 30  $\mu$ M



**Obr. 23** – Anisotropie steady-state fluorescence systému CMC – 3HNA v závislosti na koncentraci polymeru při konstantní koncentraci 3HNA 30  $\mu$ M



**Tab. 2** – Doby života fluoroforu ( $\tau_1$ ,  $\tau_2$ ) a jejich příslušné amplitudy ( $A_1$ ,  $A_2$ )

$C_{PVP}$ [ $\mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ ]	$\tau_1$ [ns]	$A_1$	$\tau_2$ [ns]	$A_2$	$\tau_{\text{průměr}}$ [ns]
0	1,65	100%	-	-	1,65
20	1,70	67,42%	6,57	32,58%	3,29
50	1,82	47,31%	6,58	52,69%	4,32
100	2,00	36,72%	6,58	63,28%	4,90
200	2,22	30,35%	6,61	69,65%	5,28
300	2,51	30,48%	6,73	69,52%	5,44
400	2,63	29,96%	6,76	70,04%	5,52

**Tab. 3** – Doby života fluoroforu ( $\tau_1$ ,  $\tau_2$ ) a jejich příslušné amplitudy ( $A_1$ ,  $A_2$ )

$C_{BSA}$ [ $\mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ ]	$\tau_1$ [ns]	$A_1$	$\tau_2$ [ns]	$A_2$	$\tau_{\text{průměr}}$ [ns]
0	1,68	100%	-	-	1,68
1	1,69	86,10%	5,69	13,90%	2,25
2	1,79	77,62%	6,08	22,38%	2,75
3	1,89	68,94%	6,30	31,06%	3,26
4	2,00	64,88%	6,49	35,12%	3,58
5	2,03	63,95%	6,46	36,05%	3,63
6	2,15	61,38%	6,61	38,62%	3,88
10	2,28	59,20%	6,63	40,80%	4,05

**Tab. 4** – Doby života fluoroforu ( $\tau_1$ ,  $\tau_2$ ) a jejich příslušné amplitudy ( $A_1$ ,  $A_2$ )

$C_{\text{Hya}}$ [ $\text{g} \cdot \text{dm}^{-3}$ ]	$\tau_1$ [ns]	$A_1$	$\tau_2$ [ns]	$A_2$	$\tau_{\text{průměr}}$ [ns]
0	1,67	100%	-	-	1,67
0,5	1,66	100%	-	-	1,66
1	1,65	100%	-	-	1,65
3	1,67	100%	-	-	1,67
5	1,67	100%	-	-	1,67
7	1,67	100%	-	-	1,67
9	1,70	100%	-	-	1,70
12	1,69	100%	-	-	1,69
13	1,69	100%	-	-	1,69
15	1,71	100%	-	-	1,71

**Tab. 5** – Doby života fluoroforu ( $\tau_1$ ,  $\tau_2$ ) a jejich příslušné amplitudy ( $A_1$ ,  $A_2$ )

$C_{\text{CMC}}$ [ $\mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ ]	$\tau_1$ [ns]	$A_1$	$\tau_2$ [ns]	$A_2$	$\tau_{\text{průměr}}$ [ns]
0	1,66	100%	-	-	1,66
20	1,69	100%	-	-	1,69
50	1,62	95,51%	6,30	4,49%	1,83
100	1,63	94,46%	7,18	5,54%	1,94
200	1,68	91,30%	8,74	8,70%	2,30
300	1,70	87,47%	8,89	12,53%	2,60
400	1,73	85,33%	9,35	14,67%	2,85

