



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE

INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

CHARAKTERIZACE KOLOIDNÍCH ČÁSTIC POMOCÍ DEPROTONACE V EXCITOVANÉM STAVU ZA POUŽITÍ POKROČILÝCH FLUORESCENČNÍCH TECHNIK

CHARACTERIZATION OF COLOID PARTICLES BY EXCITED-STATE PROTON TRANSFER WITH
ADVANCED FLUORESCENCE TECHNIQUES

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Jan Kotouček

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.

BRNO 2016



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

Zadání diplomové práce

Číslo diplomové práce:	FCH-DIP1002/2015	Akademický rok: 2015/2016
Ústav:	Ústav fyzikální a spotřební chemie	
Student(ka):	Bc. Jan Kotouček	
Studijní program:	Chemie pro medicínské aplikace (N2846)	
Studijní obor:	Chemie pro medicínské aplikace (2808T031)	
Vedoucí práce	prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.	
Konzultanti:	Ing. Jakub Mondek	

Název diplomové práce:

Charakterizace koloidních částic pomocí deprotonace v excitovaném stavu za použití pokročilých fluorescenčních technik

Zadání diplomové práce:

Provést rešerši na téma fluorescenční sledování přenosu protonu se zvláštním zřetelem na jeho využití ve studiu vlastností koloidů. Navrhnout vhodný systém pro využití ke zkoumání vlastností a interakcí koloidů na bázi polyelektrolytů (zejména hyaluronanu) a tenzidů. Realizovat a vyhodnotit experimenty.

Termín odevzdání diplomové práce: 6.5.2016

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

Bc. Jan Kotouček
Student(ka)

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
Vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
Ředitel ústavu

V Brně, dne 31.1.2016

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
Děkan fakulty

ABSTRAKT

V této diplomové práci byly studovány deprotonační charakteristiky fluorescenčních sond α -naftolu a 8-hydroxypyren-1,3,6-trisulfonové kyseliny (HPTS), pomocí měření ustálené a časově rozlišené fluorescence. Byly měřeny dva kationtové tenzidy, Septonex a cetyltrimethylamonium bromid (CTAB) v komplexu s hyaluronanem o třech molekulových hmotnostech, 1,75 MDa, 1 MDa a 300 kDa. Měřením ustálené fluorescence byly stanoveny kritické agregační koncentrace pro jednotlivé tenzidy a také hodnoty pK_a^* . Dále byly měřením časově rozlišené fluorescence stanoveny deprotonační konstanty a průměrné doby života. Ze získaných dat a jejich porovnáním se systémem polystyrenulfonát (PSS) – tenzid byl posuzován vliv hydratačního obalu hyaluronanu na vznik komplexu hyaluronan – tenzid. Byly zjištěny velké rozdíly v deprotonačních charakteristikách mezi jednotlivými tenzidy a mezi jednotlivými molekulovými hmotnostmi hyaluronanu. Z měření plyne lokalizace hydratačního obalu v okolí disociované karboxylové skupiny, kde probíhá interakce s kladným nábojem tenzidu za vzniku komplexu.

Dále bylo pomocí zhášení pyrenu cetylpyridinium chloridem (CPC) stanoveno agregační číslo Septonexu pro koncentraci 20mM na hodnotu 104 molekul. Pomocí CPC byla také potvrzena lokalizace α -naftolu v micelách CTAB, respektive v komplexu polymer – CTAB.

ABSTRACT

The deprotonation characteristics of fluorescent probes α -naphthol and 8-hydroxypyrene-1,3,6-trisulphonic acid (HPTS) were studied in this diploma thesis, using steady-state and time-resolved fluorescence spectroscopy. Two cationic surfactants, Septonex and cetyltrimethylammonium bromide (CTAB), were studied. These surfactants were measured in the complex with hyaluronan (1.75 MDa, 1 MDa and 300 kDa). Steady-state fluorescence was used for determination of critical aggregation concentration of each surfactant and pK_a^* . Time-resolved fluorescence decays were used to calculate the average lifetimes and the deprotonation constants of naphthol and HPTS. The measurement with hyaluronan were compared with the polystyrenesulfonate (PSS) – surfactant system. The effect of hydration shell of hyaluronan on hyaluronan – surfactant complex formation results from the comparison of above mentioned systems. Large differences were found in the deprotonation characteristic between surfactants and even between individual molecular weights of hyaluronan. The measurement shows that the hydration shell is located near to the dissociated carboxyl groups of hyaluronan chain, where the interaction with the positively charged surfactants occurs.

Furthermore, the aggregation number of Septonex was determined by quenching of pyrene using cetylpyridinium chloride (CPC) as a quencher. The aggregation number for 20 mM Septonex solution was determined as a value of 104 molecules. CPC was used for confirmation of the localization of α -naphthol in the micelles of CTAB and polymer – CTAB, respectively.

KLÍČOVÁ SLOVA

Ustálená fluorescence, časově rozlišená fluorescence, ESIPT, ESPT, α -naftol, HPTS, cetyltrimethylamonium bromid, Septonex, hyaluronan, polystyrensulfonát, deprotonační konstanty, hydratační obal, agregační číslo.

KEY WORDS

Steady-state fluorescence, time-resolved fluorescence, ESIPT, ESPT, α -naphthol, HPTS, cetyltrimethylammonium bromide, Septonex, hyaluronan, polystyrene sulfonate, deprotonation rate constants, hydration shell, aggregation number.

Kotouček, J. *Charakterizace koloidních částic pomocí deprotonace v excitovaném stavu za použití pokročilých fluorescenčních technik*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2016. 96s. Vedoucí diplomové práce Prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.

PROHLÁŠENÍ

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

.....
podpis studenta

Na tomto místě bych rád poděkoval konzultantovi Ing. Jakubu Mondekovi a vedoucímu práce Prof. Ing. Miloslavu Pekařovi, CSc. za trpělivost, vstřícnost a pomoc při řešení problémů spojených s touto diplomovou prací.

OBSAH

1	Úvod.....	8
2	Teoretická část.....	9
2.1	Fotoluminiscence.....	9
2.2	Fluorescence	9
2.2.1	Kvantový výtěžek	9
2.2.2	Doba života.....	10
2.2.3	Stokesův posuv a zrcadlová symetrie	10
2.2.4	Jabloňského diagram	12
2.3	Zhášení fluorescence.....	12
2.3.1	Statické zhášení	14
2.3.2	Dynamické zhášení.....	15
2.4	Principy fluorescenční spektroskopie.....	16
2.4.1	Ustálená fluorescenční spektroskopie.....	16
2.4.2	Časově rozlišená fluorescenční spektroskopie	17
2.4.3	Časově rozlišená fluorescenční spektroskopie, TCSPC	18
2.5	Intramolekulární a intermolekulární reakce přenosu protonu v základním a excitovaném stavu molekuly	19
2.5.1	Försterův cyklus	20
2.6	Fluorescenční sondy podstupující přenos protonů v excitovaném stavu	22
2.6.1	α -naftol	22
2.6.2	HPTS	22
2.6.3	3HNA.....	23
2.7	Hyaluronan.....	23
2.8	Polystyren sulfonát.....	24
2.9	Asociativní micelární koloidy, tenzidy	25
2.9.1	Vznik a vlastnosti micel	27
2.9.2	CTAB.....	28
2.9.3	Septonex	29
3	Současný stav řešené problematiky	30
4	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	35
4.1	Vybavení a přístroje	35
4.1.1	Fluorolog	35
4.1.2	Fluorocube.....	35
4.1.3	Aminco Bowman Series 2	35
4.1.4	Použité chemikálie.....	35
4.1.5	Příprava zásobních roztoků.....	36
4.1.6	Příprava jednotlivých vzorků.....	37
4.2	Vlastní měření	38
4.2.1	Měření emisních spekter.....	38
4.2.2	Měření doby života	38

4.3	Vyhodnocení.....	39
4.3.1	Vyhodnocení měření časově rozlišené fluorescence	39
4.3.2	Stanovení agregačního čísla	39
4.3.3	Stanovení deprotonační konstanty	40
5	VÝSLEDKY A DISKUZE.....	42
5.1	Deprotonační charakteristiky fluorescenční sondy α-naftolu.....	42
5.1.1	Studium systému hyaluronan – CTAB	44
5.1.2	Studium systému hyaluronan – Septonex.....	50
5.1.3	Studium systému polystyrensulfonát – CTAB	56
5.1.4	Studium systému polystyrensulfonát – Septonex	60
5.2	Deprotonační charakteristiky fluorescenční sondy HPTS	63
5.2.1	Studium systému hyaluronan – CTAB	64
5.2.2	Studium systému hyaluronan – Septonex.....	67
5.3	Stanovení agregačního čísla Septonexu.....	71
5.4	Zhášení α-naftolu v micelách CTAB pomocí chlorových a jodových derivátů	72
6	Závěr.....	75
8	SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ	78
9	Seznam použitých zkratk.....	84
10	Přílohy	86

1 ÚVOD

Micelární komplex hyaluronanu a tenzidu poskytuje vhodný modelový systém pro cílenou distribuci léčiv. Díky hyaluronanu je zajištěna selektivita a cílení na nádorové tkáně a to především díky receptoru CD44, který je hojně přítomen právě v nádorových buňkách. Tento komplex hyaluronanu a příslušného tenzidu poskytuje vhodné prostředí pro solubilizaci potenciálního léčiva, zajišťuje jeho stabilitu a umožňuje jeho cílené uvolnění. Řetězec hyaluronanu je tvořen množstvím hydroxylových skupin. Díky těmto skupinám je hyaluronan schopen vázat velké množství vody a tvořit okolo řetězce hydratační obal. Hyaluronan obsahuje také množství karboxylových skupin, za běžných podmínek disociovaných. Disociované karboxylové skupiny o záporném náboji poskytují možnost elektrostatické interakce s kladným tenzidem za vzniku specifického komplexu. Pomocí měření časově ustálené a časově rozlišené fluorescence můžeme zkoumat dané změny a konkrétní podobu interakcí hydratačního obalu hyaluronanu a tenzidu při tvorbě komplexu. K tomu slouží fluorescenční sondy podstupující přenos protonů v excitovaném stavu. Reakce v excitovaném stavu, při kterých dochází k přenosu protonů, patří k základním fotochemickým reakcím. Poskytují odpovědi na změnu acidobazické rovnováhy, vypovídají o hydrofobní nebo hydrofilní povaze prostředí a mohou sloužit ke studiu například proteinů, micel, reverzních micel a biopolymerů.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Fotoluminiscence

Fotoluminiscence představuje záření pevných, častěji kapalných látek jako formu energetického navrácení molekuly na základní energetickou hladinu po excitaci. Fotoluminiscenci lze rozdělit do dvou kategorií, a to na fluorescenci a fosforescenci.

Pokud je elektron v excitační hladině spárován s elektronem v základní energetické hladině, díky opačnému spinu, je jeho následná deexcitace velmi rychlá, v řádu nanosekund. Hovoříme tak o spinově povoleném přechodu. Deexcitace je pak spojená s emisí charakteristického záření, které nazýváme fluorescence. Fosforescence je pak záření pocházející z tripletního excitovaného stavu. Excitovaný elektron má stejný spin jako elektron na základní energetické hladině. Přechod elektronu zpět na základní hladinu je tedy spinově zakázaný. Navrácení na základní hladinu je spojeno s reorientací spinu. Díky tomu je typická doba života, což je průměrný čas mezi excitací a navrácením se na základní energetickou hladinu, v řádu sekund. Fosforescence se obvykle nevyskytuje v roztocích při laboratorní teplotě díky velkému množství deaktivčních a zhášecích procesů [1].

2.2 Fluorescence

Jev nazvaný fluorescence poprvé pojmenoval v roce 1853 britský vědec George Gabriel Stokes u minerálu fluoritu (kazitce), který emitoval modré záření [2].

Molekuly vykazující fluorescenci se nazývají fluorofory. Fluorofory, které se ke vzorku naváží kovalentní vazbou, se nazývají fluorescenční značky. Při nekovalentní interakci hovoříme o fluorescenčních sondách [3].

Fluorofory jsou většinou molekuly obsahující aromatické konjugované systémy, jako jsou například polyaromatické uhlovodíky a heterocyklické molekuly [1]. Charakteristickou veličinou fluorescence je jednak doba života excitovaného stavu a také kvantový výtěžek spolu s intenzitou fluorescence. Intenzita fluorescence vyjadřuje počet fotonů procházející jednotkovou plochou v daném směru za definovaný čas. Vynesením intenzity fluorescence v závislosti na emisní vlnové délce (při konstantní vlnové délce excitačního záření) získáme fluorescenční emisní spektrum. Fluorofor je ovšem excitován jakoukoli vlnovou délkou z oblasti svého excitačního spektra, ale s různým kvantovým výtěžkem. Excitační spektrum poté představuje vykreslení závislosti intenzity fluorescence na různé excitační vlnové délce při konstantní emisní vlnové délce. Excitační spektrum je možno považovat za zjednodušené absorpční spektrum, protože ne všechna absorpční maxima vedou k fluorescenci [4].

2.2.1 Kvantový výtěžek

Kvantový výtěžek Q představuje poměr emitovaných fotonů k množství absorbovaných fotonů a je definován vztahem:

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

kde Γ je rychlostní konstanta zářivého přechodu, k_{nr} rychlostní konstanta nezářivého přechodu. Tyto rychlostní konstanty jsou určující pro dobu trvání tj., vyhasínání excitovaného stavu a plátí

že $\Gamma > k_{nr}$. Kvantový výtěžek nemůže být větší jak jedna, viz Stokesův posuv (kapitola 2.2.3), ale může se blížit k jedničce za předpokladu velkého rozdílu míry zářivého a nezářivého přechodu [1], [5].

2.2.2 Doba života

Doba života τ představuje čas, ve kterém molekula setrvává v excitovaném stavu před návratem na základní energetickou hladinu. Vzhledem k tomu, že ne všechny fluorofory emitují v době, která je rovna jejich době života, vyjadřuje se doba života jako průměrná hodnota. Obecně se doba života fluoroforu pohybuje v řádu nanosekund a je dána vztahem:

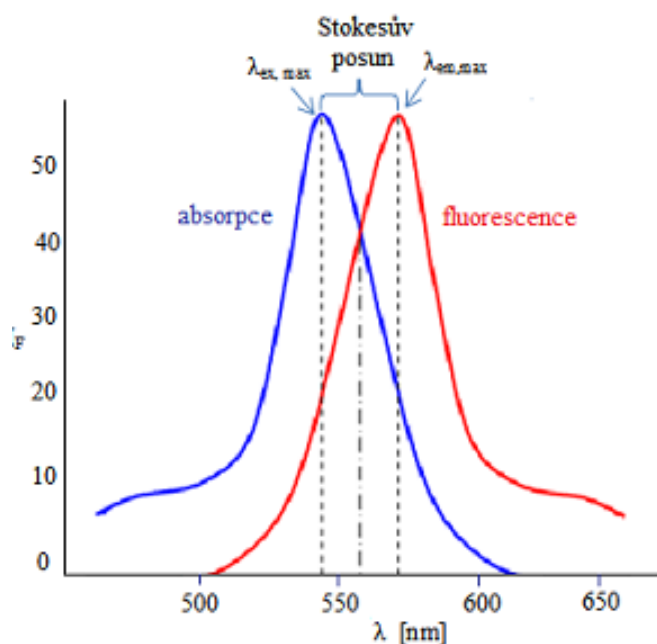
$$\tau = \frac{1}{\Gamma + k_{nr}}, \quad (2)$$

kde Γ je rychlostní konstanta zářivého přechodu, k_{nr} rychlostní konstanta nezářivého přechodu. V případě, že jedinou možností deexcitace je zářivý přechod, je doba života dána vztahem (3) a označuje se jako přirozená neboli vnitřní doba života τ_n [1].

$$\tau_n = \frac{1}{\Gamma} = \frac{\tau}{Q}. \quad (3)$$

2.2.3 Stokesův posuv a zrcadlová symetrie

Mezi absorpčním a emisním spektrem existuje jistá zrcadlová podobnost (viz **Obr. 1**). Tato symetrie je způsobena tím, že absorpce a emise z odpovídajících si vibračních hladin mají stejnou relativní pravděpodobnost. Vibrační hladiny základního stavu, hladiny S_0 , mají stejnou strukturu jako vibrační hladiny excitovaného stavu S_1 . Při excitaci přechází elektron vlivem absorpce energie excitačního zdroje z rovnovážné základní hladiny S_0 na některou z vibračních hladin vyšší energetické hladiny S_1 , popřípadě S_2 . Zde dochází k tzv. vnitřní konverzi. Jedná se o přechod mezi elektronovými stavy se stejnou multiplicitou spinu. K přechodu dochází z důvodu větší energetické blízkosti energetických hladin. Vibrační hladina excitovaného stavu S_1 se nachází ve stejné energetické úrovni jako rovnovážná hladina S_2 . Excitovaný elektron přechází v rámci excitační hladiny S_1 nebo S_2 z vibrační hladiny na rovnovážnou vibrační hladinu S_1 . Rychlost tohoto přechodu se pohybuje v řádu 10^{-12} až 10^{-13} s. Vzhledem k nanosekundové době života nezasahuje tento přechod do emisního spektra. Přechod je doprovázen tepelným zářením. Jedná se tedy o nezářivý přechod. Z rovnovážné hladiny S_1 přechází elektron, už zářivým přechodem, na některou z vyšších vibračních hladin S_0 . Přechod spojený s fluorescencí nastává obvykle z nejnižší vibrační hladiny prvního excitovaného stavu, tedy S_1 , tento jev se nazývá Kashovo pravidlo [1], [6].



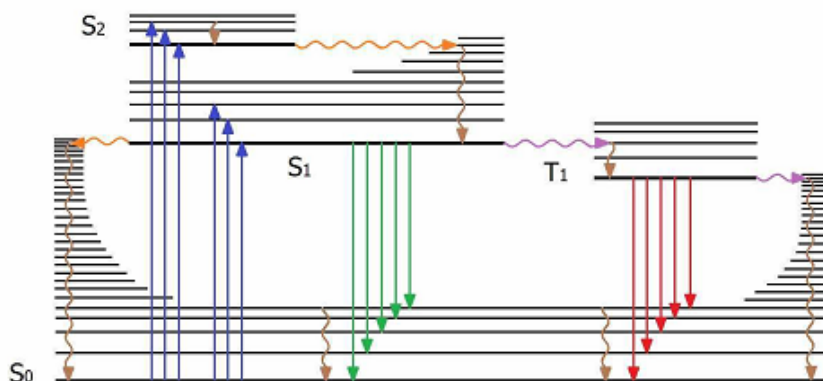
Obr. 1 Stokesův posuv [4].

Z obrázku (viz **Obr. 1**) také vyplývá energetický rozdíl mezi absorpčním a emisním spektrem, respektive posuv vlnové délky emisního maxima k vyšším vlnovým délkám. Tento rozdíl se nazývá Stokesův posuv a je způsoben energetickými ztrátami, které jsou dány vlivem událostí odehrávajících se před emisí. Hlavním důvodem je zejména rychlá vibrační relaxace a vnitřní konverze na rovnovážnou vibrační hladinu S_1 . Další energetické ztráty mohou být dány povahou roztoku, ve kterém se fluorofor nachází, reakcí v excitovaném stavu, tvorbou komplexů a vlivem jiných nežářivých energetických přechodů. Emisní spektrum má oproti absorpčnímu spektru nižší energie a je tedy posunuto k vyšším vlnovým délkám [4], [6].

Zrcadlovou symetrii absorpčního a emisního spektra nevykazují všechny fluorofory, některé se tomuto pravidlu vymykají. Příkladem takové výjimky je fluorescenční sonda 1-hydroxypyren-3,6,8-trisulfonát (dále HPTS). Rozdíly mezi absorpčním a emisním spektrem vznikají u této sondy ionizací hydroxylové skupin. Při nízkém pH kolem 1 se emisní spektrum podobá emisnímu spektru aromatických uhlovodíků (při nízkém pH je hydroxylová skupina protonována). Excitace při nízkém pH je doprovázena snížením disociační konstanty. Díky tomuto snížení dochází k ionizaci hydroxylové skupin. K emisi tedy dochází z aniontové formy molekuly. Vzhledem k tomu, že excitační záření absorbovala neutrální molekula, ale deexcitace a s tím spojená emise již probíhala z aniontové formy HPTS, je patrný rozdíl mezi absorpčním a emisním spektrem HPTS. Navíc je zde velký Stokesův posuv. Ten nastává kvůli energetickým ztrátám spojeným se změnou geometrie molekuly [24]. Abychom dosáhli zrcadlové symetrie absorpčních a emisních spekter u této sondy, musela by být sonda excitována v prostředí o vysokém pH, okolo 13, kde by již hydroxylová skupina byla deprotonována [1].

2.2.4 Jabloňského diagram

Jabloňského diagram (viz **Obr. 2**) znázorňuje jednotlivé vztahy mezi absorpcí a emisí, energetické stavy molekul a přechody mezi nimi. Základní energetická hladina je označena jako S_0 , vyšší excitační hladiny s postupně narůstající energií pak S_1 , S_2 atd. Každá energetická hladina obsahuje množství tzv. vibračních energetických hladin. Energetický rozdíl mezi základní hladinou S_0 a první excitační hladinou S_1 je relativně velký. Velký na to, aby nedocházelo k excitaci vlivem tepelného pohybu. K excitaci se tedy využívá světelného záření.



Obr. 2 Jabloňského diagram. Excitace, absorpce záření je v tomto diagramu reprezentována modrou barvou. Hnědou barvou je znázorněna vnitřní konverze a vibrační relaxace. Fluorescenci pak značí zelená barva. Spinovou konverzi značí fialová barva, červeně je označena fosforescence [4].

Vedle fluorescence může molekula v energetické hladině S_1 přejít spinovou konverzí do první tripletní hladiny T_1 . Tento přechod se nazývá mezi-systémový. Energie této hladiny je nižší v porovnání s první excitovanou singletní hladinou S_1 . A jak již bylo zmíněno výše, navrácení elektronu na základní energetickou hladinu S_0 je díky spinové konverzi spinově zakázáno. Pro návrat na základní energetickou hladinu musí dojít k reorientaci spinu. Doba života tohoto stavu se pohybuje v řádech sekund. Při navrácení z T_1 na S_0 je emitováno charakteristické záření - fosforescence, obecně posunuté k vyšším vlnovým délkám tj., nižší energii [4].

2.3 Zhášení fluorescence

Zhášení fluorescence představuje obecný proces snížení intenzity fluorescenčního záření. Proces zhášení můžeme rozdělit na statické zhášení a na zhášení dynamické. U statického zhášení se molekula zhášeče váže na fluorofor v základním stavu za vzniku nefluorescenčního komplexu. Pokud dochází k poklesu intenzity emisního záření vlivem kolizních střetů molekul zhášeče a fluoroforu, hovoříme o dynamickém zhášení. Ve velké většině případů dochází k tomu, že se u fluoroforu zhášeného jedním zhášečem projevuje jak dynamické, tak i statické zhášení. Ze zhášení fluorescence v biologických systémech je možno zjistit informace o molekulách, mezi kterými ke zhášení dochází, a také o prostředí ve kterém se nacházejí [4], [16], [59].

Jako zhášec může vystupovat celá řada molekul. Nejběžnějším zhášecem je molekulární kyslík, který zháší vesměs všechny známé fluorofory kolizním tj. dynamickým zhášením [7]. Díky kolizním srážkám se singletním kyslíkem v základním stavu přechází molekula fluoroforu mezi-systémovým přechodem do tripletního stavu. Tripletní stav s dlouhou dobou života je ovšem v roztocích rychle zhášen, takže nedochází k fosforescenčnímu záření, ke kterému by mohlo díky tripletu docházet. Aromatické a alifatické aminy jsou také efektivními zhášeci fluorescence většiny nesubstituovaných aromatických uhlovodíků. Příkladem může být antracen, který je efektivně zhášen dietylanilinem [8]. Antracen v excitovaném stavu přijme elektron z aminové skupiny dietylanilinu za vzniku excitovaného komplexu zvaného exciplex. Vznik exciplexu můžeme pozorovat zejména v nepolárních rozpouštědlech. V polárním rozpouštědle je ovšem fluorescence exciplexu zhášena, interakce mezi antracem a dietylanilinem vykazuje princip klasického zhášení. Dalším typem zhášení je zhášení pomocí molekul obsahujících atom těžkého prvku, jako je brom nebo jód. Halogenované sloučeniny jako jodbenzen, trichlorethanol nebo brombenzen zháší mechanismem dynamického zhášení. Zhášení většími halogeny jako bromidy a jodidy může vyústit k mezi-systémovému přechodu do tripletového stavu [9], [10]. Mechanismus zhášení je pravděpodobně odlišný pro sloučeniny obsahující chlor. Indoly, karbazoly a jejich deriváty jsou velice citlivé na zhášení chlorovanými uhlovodíky a tzv. elektronovými "scavengery" jako je, histidin, cystein, NO_3^- , fumarát, Cu^{2+} , Pb^{2+} , Cd^{2+} a Mn^{3+} [11]. Zhášení těmito látkami pravděpodobně zahrnuje přenos elektronu z fluoroforu ke zhášeci. Dalšími zhášeci fluorescence mohou být puriny, pyrimidiny, N-methylnikotinamidy nebo N-alkylpyridinium. Příkladem může být pyren, který je zhášen cetylpyridinium chloridem. Často je u těchto sloučenin pozorováno jak statické tak i dynamické zhášení, kde komplex v základním stavu, tvořený při statickém zhášení, může být velice stabilní [1].

Kromě rozdělení na statické a dynamické zhášení můžeme dle mechanismu zhášení a chemické povahy molekul určit dalších šest typů zhášení [12]:

- **Koncentrační samo-zhášení fluorescence:**

Od jisté mezní, prahové koncentrace vzorku dochází k poklesu kvantového výtěžku fluorescence vlivem neelastických srážek excitovaných molekul a molekul roztoku v základním stavu. Dochází k absorpci energie záření molekulami roztoku, ale nedochází k emisi a energie je disipována ve formě tepelné energie.

- **Vnitřní konverze molekul:**

Vnitřní konverze je typem nezářivého přechodu. V roztoku je způsobena srážkami excitovaných molekul s molekulami neexcitovanými. Pokles kvantového výtěžku se zvyšuje s rostoucí teplotou a s koncentrací roztoku.

- **Vnitřní filtrační efekt prvního druhu:**

Emisní záření je spektrofluorimetrem snímáno ze středu měrné květy. Pokles intenzity fluorescence je způsobem absorpcí excitačního záření okolním roztokem předtím, než se toto záření dostane do středu květy, ze které je poté snímána emise fluorescence.

- **Vnitřní filtrační efekt druhého druhu:**

Pokud se v roztoku nachází další fluorofor, jehož excitační vlnová délka se pohybuje v rozsahu emisní vlnové délky druhého fluoroforu, je část emitovaného záření druhého fluoroforu absorbována prvním fluoroforem.

- **Strukturní a konfigurační změny molekul:**

Tento typ zhášení se týká zejména organických molekul. Vlivem přechodu molekul do tripletního stavu, který je velmi reaktivní, dochází ke vzniku nefluoreskujících komplexů. Při strukturní a konfigurační změně může excitovaná molekula přejít do základního stavu bez emise záření. Což platí zejména pro molekuly s volnou strukturou.

- **Vliv cizích iontů:**

Pokles kvantového výtěžku fluorescence je způsoben pohlcením elektronu v excitační hladině, což vede k nemožnosti navrácení excitovaného elektronu na základní hladinu. Stupeň zhášení roste s polarizovatelností. Příklad zhášení anionty: $F^- < NO_3^- < (COO)^{2-} < Cl^- < Br^- < SCN^- < I^-$. Příklad zhášení kationty s neobsazenými *d*-orbitaly: $Mn^{2+}, Fe^{2+}, Hg^{2+} < UO_2^{2+} < Co, Ni < Fe^{3+} < Cu < Cr^{3+}$.

2.3.1 Statické zhášení

Principem statického zhášení je tvorba nefluorescenčního komplexu v základním stavu (viz **Obr. 3**). Statické zhášení tedy neovlivňuje dobu života fluoroforu. Ze závislosti intenzity fluorescence na koncentraci zhášeče může být odvozena konstanta stability vzniklého nefluorescentního komplexu. Konstanta je dána rovnicí:

$$K_s = \frac{[F-Q]}{[F] \cdot [Q]}, \quad (4)$$

kde $[F-Q]$ představuje koncentraci vzniklého komplexu, $[F]$ představuje koncentraci volného fluoroforu a $[Q]$ koncentraci zhášeče. Celková koncentrace fluoroforu je dána rovnicí:

$$[F_0] = [F] + [F-Q], \quad (5)$$

dosazením do rovnice (5) do rovnice (4):

$$K_s = \frac{[F_0] - [F]}{[F] \cdot [Q]} = \frac{[F_0]}{[F] \cdot [Q]} - \frac{1}{[Q]}. \quad (6)$$

Pro zředěné roztoky platí, že intenzita fluorescence je přímo úměrná koncentraci fluoroforu a rovnice (6) můžeme psát ve tvaru:

$$\frac{[F_0]}{[F]} = 1 + K_s \cdot [Q]. \quad (7)$$

Vynesená závislost F_0/F na koncentraci zhášeče $[Q]$ je lineární stejně jako v případě dynamického zhášení (viz **Obr. 3**). Oproti rovnici dynamického zhášení (viz kapitola 2.3.2 rovnice 8) je rychlostní konstanta statického zhášení zároveň konstantou stability vzniklého komplexu [1].

2.3.2 Dynamické zhášení

Dynamické zhášení popisuje Stern-Volmerova rovnice:

$$\frac{F_0}{F} = 1 + k_q \cdot \tau_0 \cdot [Q] = 1 + K_D \cdot [Q], \quad (8)$$

kde F_0 a F jsou intenzity fluorescence v nepřítomnosti a v přítomnosti zhášeče, k_q je bimolekulární rychlostní konstanta zhášení, τ_0 představuje dobu života fluoroforu bez přítomnosti zhášeče a Q je koncentrace zhášeče. Stern-Volmerova konstanta zhášení je pak dána rovnicí:

$$K_D = k_q \cdot \tau_0. \quad (9)$$

Pokud se jedná kompletně o dynamické zhášení, bude Stern-Volmerova konstanta označena jako K_D . V jiných případech bude tato konstanta označena K_{SV} [1].

Důležitou vlastností dynamického zhášení je jeho souvislost s dobou života fluorescence. K poklesu hodnoty doby života při dynamickém zhášení dochází proto, že dynamické zhášení je proces, který snižuje populaci excitovaného stavu bez emise fluorescence. Tím je snížena jak intenzita fluorescence, tak i daná doba života fluoroforu. Základní Stern-Volmerova rovnice (4) má pak tvar:

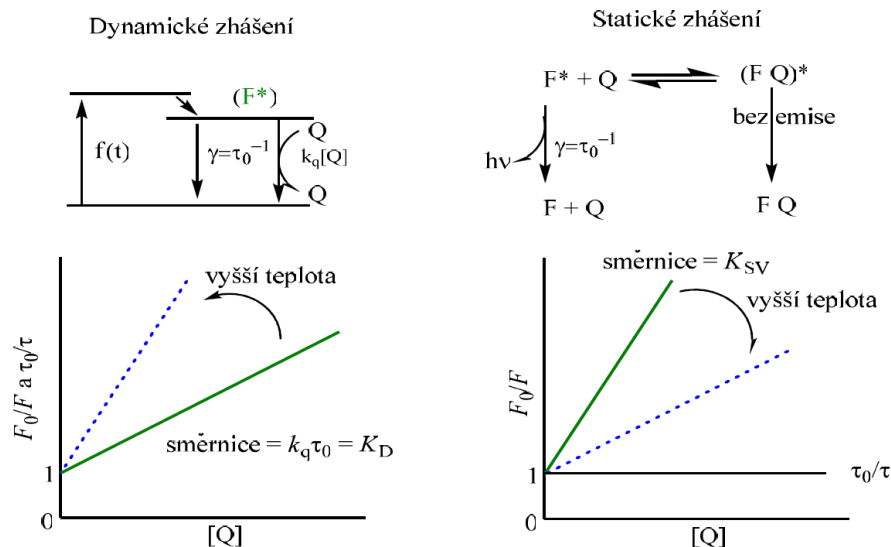
$$\frac{\tau_0}{\tau} = 1 + k_q \cdot \tau_0 \cdot [Q] = 1 + K_D \cdot [Q], \quad (10)$$

kde τ_0 představuje dobu života bez přítomnosti zhášeče a τ pak dobu života v přítomnosti zhášeče. Z rovnice (10) pak vyplývá, že snížení intenzity fluorescence je přímo úměrné snížení doby života fluorescence:

$$\frac{\tau_0}{\tau} = \frac{F_0}{F}. \quad (11)$$

Výstup zhášení fluorescence je většinou reprezentován jako graf závislosti F_0/F na koncentraci zhášeče $[Q]$, popřípadě jako závislost τ_0/τ na $[Q]$. Tato závislost by měla být lineární a z rovnice proložené přímkou by mělo být možné získat konstantu zhášení K_D (viz **Obr. 3**).

Pokud pozorujeme Stern-Volmerův lineární průběh závislosti, nemusí to znamenat, že se jedná o dynamické zhášení. Také statické zhášení dává lineární průběh. Statické a dynamické zhášení může být odlišeno závislostmi jednotlivých procesů na teplotě, viskozitě nebo na měření časově rozlišené fluorescence. Vyšší teplota ústí k rychlejší difúzi, takže dynamické zhášení bude efektivnější. Vyšší teplota také způsobí disociaci slabě vázaných komplexů, což vyústí k nižšímu podílu statického zhášení, protože principem statického zhášení je tvorba nefluorescentního komplexu v základním stavu (viz **Obr. 3**) [1].



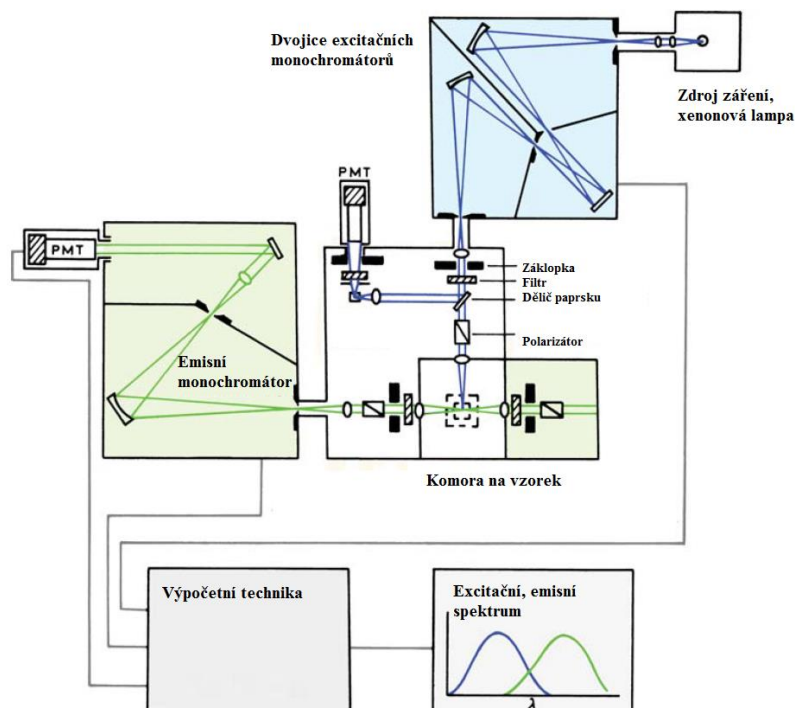
Obr. 3 Porovnání dynamického a statického zhášení [1].

2.4 Principy fluorescenční spektroskopie

Záznam fluorescenčního signálu poskytuje citlivou metodu pro sledování prostředí v okolí fluoroforu, jeho interakce a konformační změny. Pomocí dané instrumentace můžeme zaznamenávat především intenzitu fluorescence, dobu života a například polarizaci. Obecně můžeme fluorescenční měření rozdělit na dva typy. Na ustálenou fluorescenci (steady state) a časově rozlišenou fluorescenci (time resolved) [12].

2.4.1 Ustálená fluorescenční spektroskopie

Měření ustálené fluorescence se provádí při konstantní excitaci kontinuálním paprskem zdroje. Jako zdroj se většinou využívá xenonová lampa, která poskytuje relativně kontinuální zdroj záření s rozsahem vlnových délek od 250 do 700 nm [1]. Polychromatické bílé světlo dopadá na excitační monochromátor. Na monochromátoru dochází k difrakci mřížkou a výběru požadované excitační vlnové délky. Monochromatické záření je poté vedeno do cely se vzorkem, kde budí fluorescenci. Fluorescence se šíří všemi směry, emisní detektor je umístěn v pravém úhlu od směru dopadajícího excitačního záření, aby se zabránilo kontaminaci excitačním zdrojem. Před detektorem je umístěn druhý monochromátor, pomocí kterého je volena vhodná emisní vlnová délka. Souhra obou monochromátorů umožňuje skenování jednotlivých vlnových délek. Součástí detektoru je fotonásobič převádějící dopadající záření na elektrický proud v závislosti na intenzitě emisního záření. Obecné schéma fluorescenčního spektrofotometru je uvedeno níže (viz **Obr. 4**). Jako výstup měření ustálené fluorescence mohou sloužit například emisní, popřípadě excitační spektra. Zaznamenaná intenzita emisního záření je střední hodnotou emisí různých fluoroforů nebo jen různých forem téhož fluoroforu [4]. Možnost rozlišení jednotlivých emisních a excitačních spekter je díky spektrálnímu překryvu nemožná. Pro zjištění dílčích intenzit, dob života jednotlivých forem, popřípadě jednotlivých fluoroforů slouží časově rozlišená měření [4].

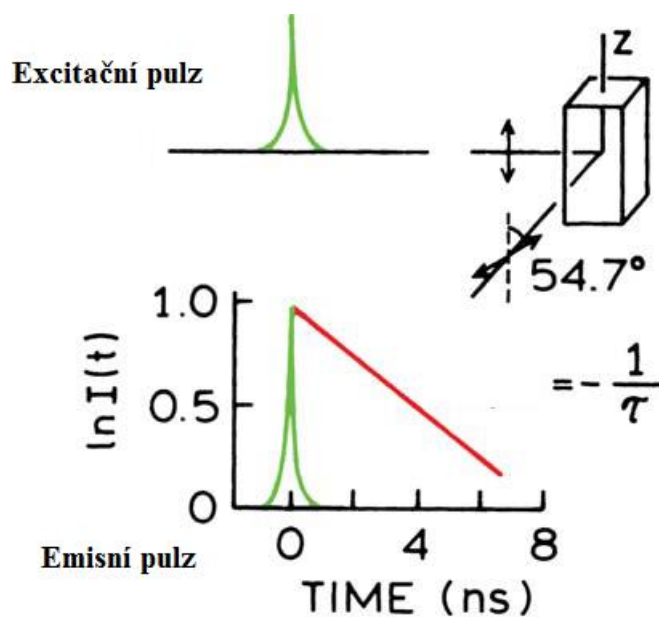


Obr. 4 Schématický diagram spektrofluorimetru [1].

2.4.2 Časově rozlišená fluorescenční spektroskopie

Časově rozlišená měření poskytují dodatečné informace, které ustálená fluorescence překrývá. Poskytují informace o dynamice excitovaného stavu a umožňují sledovat časové závislosti sledovaných parametrů. Existuje celá škála možných metod a variací, ale ve velké míře jsou používány dvě metody, a to pulzní metoda a metoda fázově modulovaného excitačního záření. Metoda fázově modulovaného excitačního záření používá záření o různé, ale vysoké frekvenci (frekvence blíží se 100 MHz), a vytváří harmonickou odezvu vzorku. Doba života fluoroforu, respektive emise tohoto fluoroforu, bude oproti excitačnímu pulzu opožděná. Výsledný posuv poté slouží k výpočtu požadované doby života τ [1].

Princip pulzní metody spočívá v ozařování vzorku velice krátkým excitačním pulzem. Pulz je mnohem kratší než je doba života sledovaného fluoroforu. Intenzita je poté zaznamenávána skrze polarizátor orientovaný v magickém uhlu $57,7^\circ$ vertikální osy-z, což zabraňuje zkreslení výsledné intenzity, ke které by mohlo dojít díky difuznímu rotačnímu pohybu molekul. Doba života τ je poté vypočítána ze směrnice závislosti $\log I(t)$ na čase t (viz **Obr. 5**). Kromě tohoto postupu se využívá proložení vyhasínající křivky předpokládaným modelem poklesu (viz **2.4.3**) [1], [14].

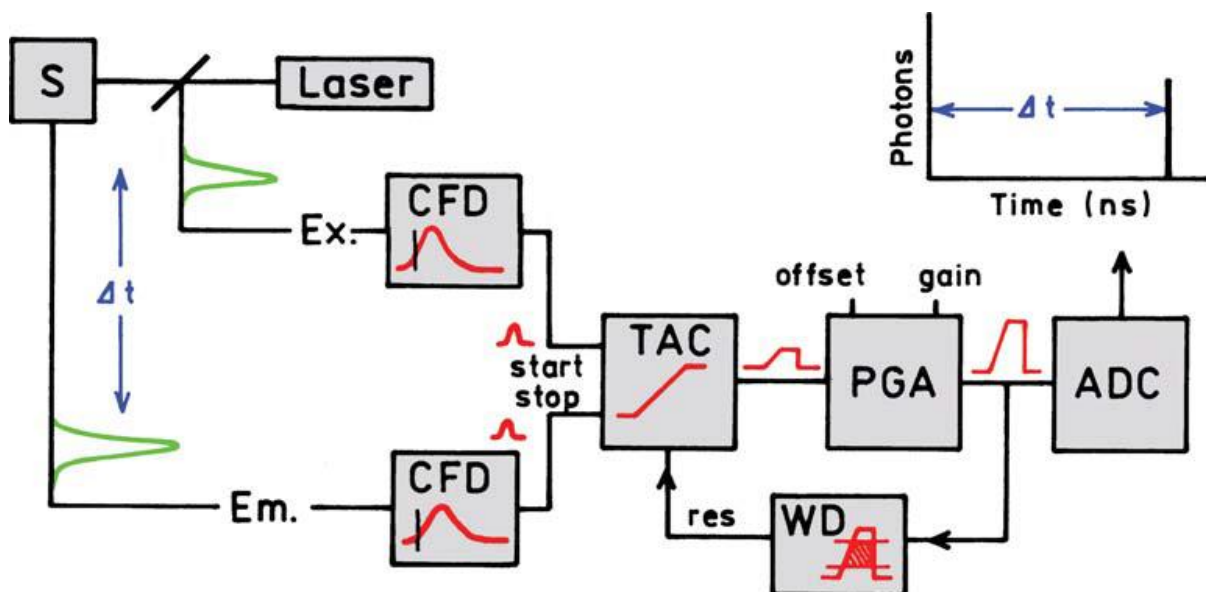


Obr. 5 Pulzní metoda měření časově rozlišené fluorescence [1].

2.4.3 Časově rozlišená fluorescenční spektroskopie, TCSPC

Jedná se o metodu „časově korelovaného sčítání fotonů“, zkráceně TCSPC (time correlated single photon counting). Její princip spočívá v detekci jednoho fotonu na cca 100 excitačních pulzů. Měří se čas, který uplyne mezi excitačním pulzem a detekcí prvního fotonu. K excitaci je ve velké míře používané záření emitující diody (LED). Opakovací frekvence těchto diod může dosahovat až 40 MHz s velkou škálou různých vlnových délek. Schématické zobrazení instrumentace pro měření TCSPC je uvedeno na obrázku níže (viz **Obr. 6**). Měření začíná excitačním pulzem. Tento pulz dopadá jednak na vzorek, kde dochází k excitaci vzorku a následné emisi fluorescence, a zároveň je veden přes CFD diskriminátor (constant function discriminator). Signál prochází CFD, kde je přesně zaznamenán čas příchodu, a je dále veden na konvertor TAC (time to amplitude converter). Příchodem signálu je lineárně generováno napětí na kondenzátoru v nanosekundových časech. Druhý kanál zaznamenává pulz vzniklý detekcí prvního fotonu z emitujícího vzorku. Tento pulz je veden přes diskriminátor CFD, který vyšle signál do TAC, a tím dochází k zastavení růstu napětí na kondenzátoru. Vzniklé napětí na TAC koresponduje s časovým rozdílem příchodu signálu o excitaci a detekci prvního fotonu emisního záření. Dle potřeby je toto napětí zesíleno zesilovačem PGA (programmable gain amplifier) a převedeno na numerickou hodnotu skrze převodník ADC (analog to digital converter). K minimalizování chybových detekcí je signál omezen daným rozsahem napětí. Jestliže není signál v daném rozmezí, detekce je potlačena pomocí diskriminátoru WD (window discriminator). V okamžiku, kdy signál prochází přes ADC, dojde k záznamu události, a o daný foton se zvýší množství fotonů v jemu vlastním časovém kanálu. Je třeba říci, že měření ve velké míře probíhá v tzv. reverzním módu. Celý proces se ve své podstatě neliší od procesu popsaného výše, pouze k započítání růstu napětí na TAC je místo excitačního pulzu použit emisní pulz a k zastavení nárůstu napětí je použit excitační pulz. Reverzního módu se užívá z důvodu nutnosti a časové náročnosti resetování

TAC. Po každé události musí dojít k poklesu napětí na TAC na nulovou hodnotu. Jak již bylo řečeno výše, na jeden detekovaný foton připadá přibližně 100 excitačních pulzů. V reverzním módu pak nedochází k tak častému resetování TAC [1].



Obr. 6 Schéma pro měření časově rozlišené fluorescence metodou TCSPS [1].

Výsledkem měření je pak histogram. Na ose- x se nachází časový rozdíl v rámci jednotlivých kanálů a na ose- y počet fotonů, které byly po daný časový úsek detekovány. Po zaznamenání daného množství jednotlivých fotonů v jejich specifických časech a při podmínce jednoho fotonu na cca 100 excitačních pulzů dostáváme vyhasínací křivku.

Výslednou vyhasínací křivku je nutné tzv. dekonvoluovat. K tomu je nutné naměřit profil excitačního pulzu neboli odezvu přístroje. K tomuto účelu slouží koloidní médium oxidu křemičitého tzv. Ludox [15]. Výsledná vyhasínací křivka měření Ludoxu představuje nejkratší možný časový profil naměřený přístrojem [1].

2.5 Intramolekulární a intermolekulární reakce přenosu protonu v základním a excitovaném stavu molekuly

Reakce v excitovaném stavu, při kterých dochází k přenosu protonů, patří k základním fotochemickým reakcím. Tyto reakce mohou sloužit ke studiu hydratační dynamiky [16], ke sledování změn acidobazické rovnováhy (pH, pOH jump studies) [17] a v neposlední řadě jako sondy pro studium prostředí proteinů, micel, reverzních micel a biopolymerů [18], [19].

V roce 1931 popsal Weber změnu acidobazické rovnováhy u excitovaných organických molekul [20]. Dále v roce 1949 Förster popsal celý reakční proces přenosu protonů v excitovaném stavu a změnu acidobazické rovnováhy. Tento proces je vyjádřen schématem nazvaným Försterův cyklus (viz 2.5.1), ze kterého je mimo jiné možno stanovit pK_a molekuly na základě jejího pK_a^* v excitovaném stavu a emisního/absorpčního spektra [21].

Fyzikální vlastnosti, jako je acidobazická rovnováha nebo dipólový moment, se excitováním molekul mění. Změna těchto vlastností je dána změnou rozložení náboje na molekule,

ke kterému dochází právě při excitaci molekuly. Reakce v excitovaném stavu jsou vlastně isomerizační reakce, kdy jednotlivé izomery mezi sebou udržují rovnováhu a skrze tautomerizační reakce mohou přecházet z jednoho izomeru na druhý [22].

Hnací silou pro fotoindukovaný přenos protonů je změna acidity a bazicity daných funkčních skupin. V molekulách, které jsou tvořeny naftolovým nebo fenolovým jádrem, dochází vlivem excitace k přesunu elektronové hustoty z kyslíkového atomu na aromatické jádro. Výsledkem tohoto přesunu je skokový nárůst acidity excitované molekuly oproti molekule v základním stavu [23]. Dochází k deprotonaci hydroxylové skupiny vlivem rozpouštědla nebo jiné molekuly v základním stavu, která se chová jako akceptor. Tento proces deprotonace se nazývá intermolekulární přenos protonů v excitovaném stavu, ESPT (excited state proton transfer). Odštěpením vodíkového protonu vzniká aniontová forma fluoroforu, která může buďto reagovat s jinou molekulou, nebo relaxovat na základní energetickou hladinu, kde dochází k reprotonaci [24]. Při relaxaci na základní hladinu dochází k uvolnění přebytečné energie ve formě emisního záření aniontové formy s charakteristickým bathochromním posuvem oproti záření neutrální formy.

Kromě změny acidity může u molekul obsahujících například pyrazinové jádro docházet po excitaci ke skokové změně bazicity a vzniku protonované, kationtové formy fluoroforu [25]. Obecně se dá říct, že aromatické molekuly s donorním substituentem budou po excitaci silnějším donorem elektronů, a elektron akceptorní skupiny si budou elektrony více přitahovat [24].

Další možností reakce v excitovaném stavu je přenos protonů v rámci jedné molekuly tzv. ESIPT (excited state intramolecular proton transfer). Na molekule fluoroforu, který obsahuje na stejném chromoforu jak akceptorní, tak i donorní skupinu v dané vzdálenosti a správné orientaci, dochází ke vzniku intramolekulární vodíkové vazby [24].

Mimo výše uvedené možnosti přenosu protonů, intramolekulárního (ESIPT) a intermolekulárního (ESPT), může u specifických molekul nastat tzv. ESDPT (excited state intermolecular double proton transfer). V takovém případě dochází ke vzniku cyklické vodíkové vazby s protickým rozpouštědlem nebo ke vzniku dimeru [24].

2.5.1 Försterův cyklus

Försterův cyklus (viz **Obr. 7**) představuje schéma kombinující termodynamická a spektroskopická data ke stanovení hodnoty pK_a^* v excitovaném stavu. Volná Gibbsova energie může být vyjádřena z hlediska entalpie a entropie deprotonace. Pro základní energetickou hladinu (12) a pro excitovaný stav (13) platí rovnice:

$$\Delta G^\circ = \Delta H^\circ - T \cdot \Delta S = -R \cdot T \cdot \ln(K_a), \quad (12)$$

$$\Delta G^\circ = \Delta H^\circ - T \cdot \Delta S^* = -R \cdot T \cdot \ln(K_a^*), \quad (13)$$

za předpokladu rovnosti disociační entropie ArOH a ArOH^* dostáváme vztah:

$$\Delta G^\circ - \Delta G^{*\circ} \approx \Delta H^\circ - \Delta H^{*\circ} = -R \cdot T \cdot \ln\left(\frac{K_a}{K_a^*}\right). \quad (14)$$

kde ΔH a ΔH^* představují standardní molární entalpie (viz **Obr. 7**), K_a a K_a^* jsou rovnovážné konstanty základního a excitovaného stavu. Jelikož se jedná o uzavřený okruh absorpce,

deprotonace v excitovaném stavu, emise, a reprotonace v základním stavu, z Försterova cyklu vyplývá:

$$\begin{aligned} N_A \cdot h \cdot \nu_{\text{ArOH}} + \Delta H^{*\circ} - N_A \cdot h \cdot \nu_{\text{ArO}^-} - \Delta H^\circ &= 0 \\ \Rightarrow \Delta H^\circ - \Delta H^{*\circ} &= N_A \cdot (h \cdot \nu_{\text{ArOH}} - h \cdot \nu_{\text{ArO}^-}), \end{aligned} \quad (15)$$

kde $h\nu_{\text{ArOH}}$ a $h\nu_{\text{ArO}^-}$ představují energetické rozdíly mezi jednotlivými hladinami. Z kombinace rovnic (14) a (15) plyne:

$$\ln\left(\frac{K_a}{K_a^*}\right) = \frac{h \cdot N_A \cdot (\nu_{\text{ArOH}} - \nu_{\text{ArO}^-})}{R \cdot T}. \quad (16)$$

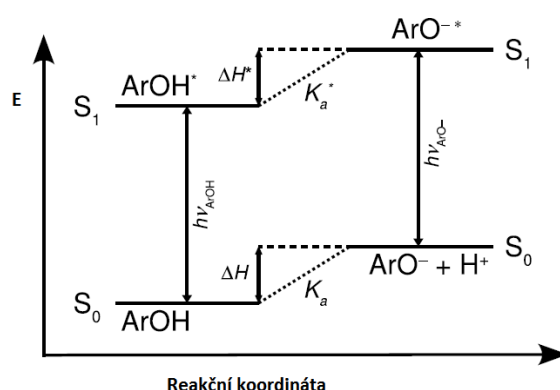
Platí že:

$$\begin{aligned} \ln\left(\frac{K_a}{K_a^*}\right) &= 2,303 \cdot (\log(K_a) - \log(K_a^*)), \\ pK_a &= -\log(K_a), \\ pK_a^* &= -\log(K_a^*), \\ \Rightarrow \ln\left(\frac{K_a}{K_a^*}\right) &= 2,303 \cdot (pK_a^* - pK_a), \end{aligned} \quad (17)$$

další úpravou a převedením transiční frekvence ν ArOH a ArO⁻ na vlnovou délku (vyjádřenou v m⁻¹) dostáváme rovnici pro disociační konstantu excitovaného stavu pK_a^* :

$$\begin{aligned} pK_a^* &= pK_a - \frac{N_A \cdot h \cdot (\nu_{\text{ArOH}} - \nu_{\text{ArO}^-})}{2,303 \cdot R \cdot T} \\ pK_a^* &= pK_a - \frac{N_A \cdot h \cdot c \cdot (\tilde{\nu}_{\text{ArOH}} - \tilde{\nu}_{\text{ArO}^-})}{2,303 \cdot R \cdot T} = pK_a - \frac{N_A \cdot h \cdot c \cdot \Delta\tilde{\nu}}{2,303 \cdot R \cdot T}, \end{aligned} \quad (18)$$

kde h představuje Planckovu konstantu ($6,622076 \cdot 10^{-34}$ J·s), N_A Avogadrovu konstantu ($6,022137 \cdot 10^{23}$ mol⁻¹), R ideální plynovou konstantu ($8,31451$ J·mol⁻¹·K⁻¹), c je rychlost světla ($2,9979 \cdot 10^8$ m·s⁻¹) a T je termodynamická teplota (K) [26].



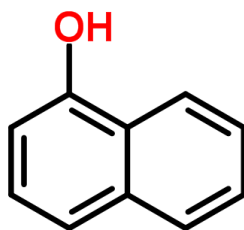
Obr. 7 Försterův cyklus [26].

2.6 Fluorescenční sondy podstupující přenos protonů v excitovaném stavu

Přenos protonů v excitovaném stavu může v mnoha případech vyústit v duální emisní spektrum. Jednak v emisní spektrum neutrální molekuly a jednak v emisní spektrum aniontové, popřípadě kationtové formy molekuly. Emisní maximum aniontové, popřípadě kationtové molekuly vykazuje relativně velký Stokesův posuv směrem k vyšším vlnovým délkám oproti emisnímu maximu neutrální molekuly. Tento posuv je způsoben velkými energetickými ztrátami. Energetické ztráty jsou dány geometrickými změnami probíhajícími na molekule při transferu protonů. Při absenci akceptoru protonu může být potlačena tautomerizační reakce a vznik aniontové nebo kationtové formy molekuly. Celý proces přenosu protonů silně závisí na povaze prostředí, jeho schopnosti tvořit vodíkovou vazbu, dále na konformaci molekuly a také na teplotě [24], [27].

2.6.1 α -naftol

Tato fluorescenční sonda (viz **Obr. 8**) obsahuje hydroxylovou skupinu na pozici C₁ (též 1-naftol). Molekulová hmotnost této organické sloučeniny činí 144,17 g·mol⁻¹. Je rozpustná v ethanolu, etherech, acetonu a vodě, a snadno rozpustná v benzenu, chloroformu a v roztoku alkalických hydroxidů [28].

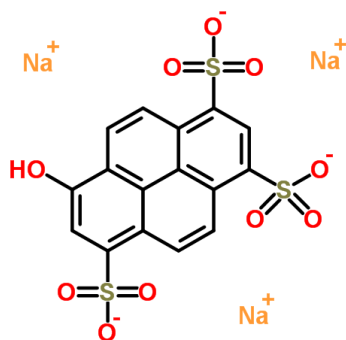


Obr. 8 *Strukturní vzorec α -naftolu [30].*

Excitační vlnová délka α -naftolu činí 300 nm [29]. Molekula podstupuje intermolekulární přenos protonů (ESPT) s charakteristickým emisním spektrem obsahujícím dvě emisní maxima (viz kapitola 5.1). Disociační konstanta v základním stavu pK_a činí 9,2 [1].

2.6.2 HPTS

Fluorescenční sonda HPTS (sodná sůl 8-hydroxypyren-1,3,6-trisulfonové kyseliny), také pyranin (viz **Obr. 9**). Molekulová hmotnost HPTS činí 524,39 g·mol⁻¹, je rozpustná ve vodě, DMSO a v nízkomolekulárních alkoholech [31].

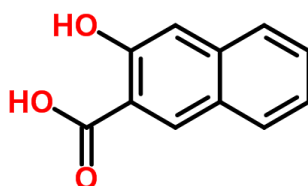


Obr. 9 *Strukturní vzorec HPTS [32].*

Excitační vlnová délka HPTS činí 454 nm [33]. Molekula podstupuje intermolekulární přenos protonů (ESIPT) a emise probíhá převážně z ionizované formy fluoroforu. Emise neutrální formy se vyskytuje převážně v silně kyselém prostředí [1]. Emisní spektra HPTS v různých rozpouštědlech jsou uvedena v kapitole 5.2.

2.6.3 3HNA

Fluorescenční sonda 3HNA (3-hydroxy-2-naftolová kyselina) (viz **Obr. 10**). Molekulová hmotnost činí 188,18 g·mol⁻¹, je rozpustná v benzenu, chloroformu, alkoholech a etherech [49].



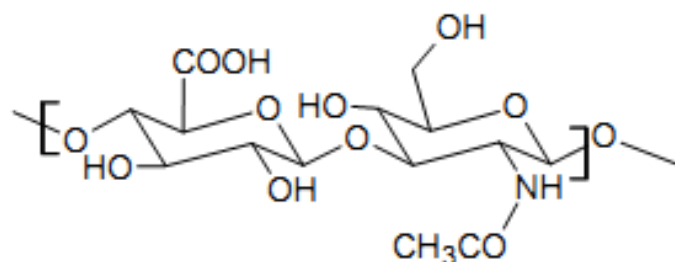
Obr. 10 *Strukturní vzorec 3HNA [47].*

Excitační vlnová délka 3HNA činí 360 nm. Emisní charakteristiky 3HNA v jednotlivých rozpouštědlech jsou uvedeny v kapitole 3.

2.7 Hyaluronan

Hyaluronan je polysacharid skládající se z opakujících se disacharidických jednotek. Polysacharid patří do skupiny glykosaminoglykanů. Opakující se disacharidická jednotka se skládá z monosacharidu kyseliny glukuronové a N-acetylglukosaminu, spojených β (1-3) glykosidickou vazbou. Vysoký stupeň polymerace je tvořen díky spojování jednotlivých disacharidických jednotek β (1-4) glykosidickou vazbou. Jak je vidět na obrázku (viz **Obr. 11**), struktura hyaluronanu je tvořena velkým množstvím hydroxylových skupin. Díky těmto skupinám je hyaluronan schopen vázat velké množství vody a tvořit okolo řetězce hydratační obal. Disociací těchto karboxylových skupin vzniká záporný náboj,

který díky nábojové repulzi umožňuje relativně dobrou rozpustnost ve fyziologických podmínkách [34].



Obr. 11 Strukturální vzorec hyaluronanu [34].

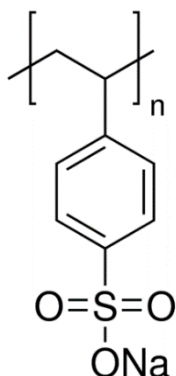
V živých systémech se hyaluronan vyskytuje buďto jako vázaný na extracelulární matrix nebo volný v tkáních, sloužící jako lubrikant, například v kloubech. Dále je zastoupen jako složka udržující objem, například v oční bulvě. Jeho biologická aktivita se odvozuje od molekulové hmotnosti. Obecně se dá říct že hyaluronan o vysoké molekulové hmotnosti nevykazuje žádnou biologickou aktivitu a slouží tedy jako strukturální, výplňová jednotka. Zde se uplatňuje jeho vlastnost zadržování velkého množství vody. Udržení vody v extracelulárním matrixu je klíčové pro přežití a správnou funkci buněk. Interakce dalších složek extracelulárního matrixu s proteoglykanovými jednotkami formuje vnitřní strukturu a definuje dané fyzikální a mechanické vlastnosti tkáně. Hyaluronan se například podílí na formování kolagenních vláken. Rovněž interaguje s buňkami a to hlavně pomocí receptoru CD 44, který se nachází na povrchu velké většiny buněk. Díky tomu se buňky mohou vázat na extracelulární matrix. Hyaluronan o nízké molekulové hmotnosti (pod 500 Da) již biologickou aktivitu vykazuje a platí, že se snižující se molekulovou hmotností tato aktivita roste [34]. Nízká molekulová hmotnost je u hyaluronanu spojena s protizánětlivými účinky. Dále se podílí se na buněčné diferenciaci, migraci a celkové obnovy tkáně [37]. Řetězce o nízké molekulové hmotnosti se v tkáních prakticky nevyskytují. Nízkomolekulární fragmenty hyaluronanu mohou v tkáni vznikat například při zánětlivé infekci, nebo při napadení organismu.

Velký potenciál hyaluronanu spočívá v jeho chemických modifikacích. Nativní hyaluronan je ve tkáňovém inženýrství prakticky nepoužitelný a to hlavně kvůli velice snadné a rychlé biodegradabilitě ve tkáních. Vhodným navázáním ligandů a jejich následným zasíťováním můžeme připravit trojrozměrnou strukturu, hydrogel, jakožto univerzální jednotku pro tkáňové inženýrství. Ligandy se mohou vázat na značné množství primárních nebo sekundárních hydroxylových skupin za tvorby esterové vazby. Rozpustnost modifikovaného hyaluronanu závisí na stupni substituce a na délce ligandového řetězce [34].

2.8 Polystyren sulfonát

Polystyrensulfonát (PSS) je syntetickým polymerem, jehož struktura vychází z polymeru polystyrénu. Jednotlivé monomerní jednotky jsou sulfonovány funkčními skupinami SO_2^- . Jedná se tedy o sodnou sůl polykyseliny. Tento polymer je dobře rozpustný ve vodě. V nižších alkoholech je téměř nerozpustný. Celková struktura je velmi jednoduchá (viz **Obr. 12**), centrální skupina je vázána pouze jedním uhlíkovým atomem, z čehož plyne velké množství stupňů volnosti. Polystyrensulfonát tak samovolně nezaujímá strukturálně organizovanější formy

a ve vodném roztoku tvoří náhodně organizované shluky. To se projevuje i na relativně vysoké viskozitě a tvorbě viskoelastických roztoků [36].



Obr. 12 *Strukturální vzorec polystyrensulfoánu [35].*

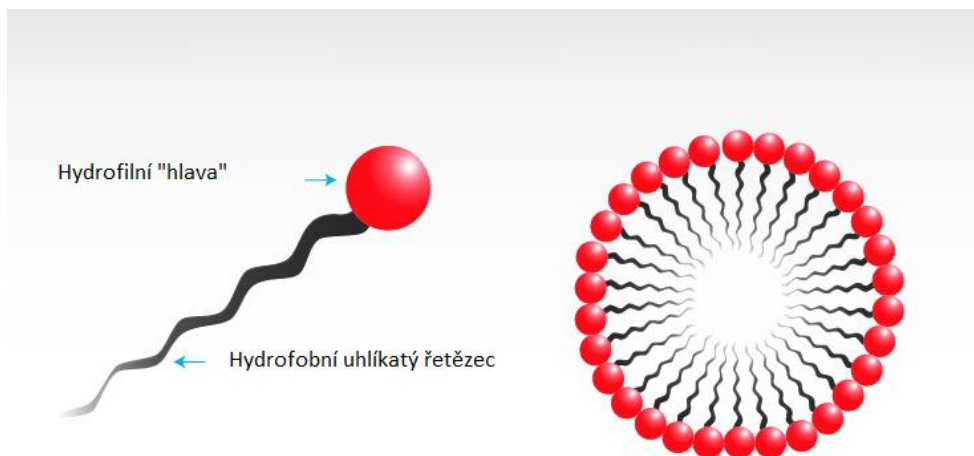
Polystyrensulfoát je biologicky stabilní a díky své dobře definované jednoduché struktuře slouží jako modelový polymer. Řetězec obsahuje po celé délce záporně nabitě funkční skupiny, které jsou schopny reagovat s kladně nabitými funkčními skupinami jiných látek, jako jsou například amfifilní tenzidy [36].

2.9 Asociativní micelární koloidy, tenzidy

Jedná se o nízkomolekulární povrchově aktivní látky (PAL). Tyto látky tvoří za nízkých koncentrací pravé roztoky. Při dosažení dané koncentrace (kritické agregační, kritické micelární koncentrace) dochází k asociaci molekul těchto látek a vzniku koloidních částic, micel. Vlastnosti takto vzniklých micel jsou dány stavovými veličinami jako je teplota, tlak a koncentrace (jak vlastní koncentrace, tak i koncentrace přidaných látek). Tento proces je reverzibilní [38].

Vznik micel je dán amfifilní povahou povrchově aktivních látek. Jednotlivá molekula se skládá z části lyofilní, tedy rozpustné v daném prostředí, a z části lyofobní, která je v daném prostředí nerozpustná. Lyofobní část se snaží minimalizovat svůj kontakt s rozpouštědlem, což má za následek shlukování molekul na povrchu mezifázového rozhraní a platí pro nízké koncentrace. Tím je sníženo povrchové napětí rozpouštědla a z toho důvodu jsou tyto látky označovány jako povrchově aktivní. Při zvyšování koncentrace tenzidu dochází ke vzniku agregátů, micel [38], [39].

Většinou se jedná o povrchově aktivní látky rozpustné ve vodě. Molekuly těchto látek obsahují tedy hydrofilní část (hlava) a hydrofobní část, tvořenou nejčastěji jedním nebo více uhlovodíkovými řetězci (viz **Obr. 13**). Aby docházelo ke vzniku micel, musí být uhlovodíkový řetězec dostatečně dlouhý.



Obr. 13 Schématické znázornění molekuly tenzidu a asociací vzniklé micely [39].

Povrchově aktivní látky jsou dle možnosti disociace hydrofilní skupiny ve vodném prostředí rozděleny na neiontové a na iontové tenzidy. Iontové se dále dělí na kationtové, aniontové, případně amfoterní (viz **Obr. 14**):

- **Aniontové PAL**

Záporný náboj je u těchto látek tvořen disociací karboxylové, sulfátové nebo fosforečnanové skupiny. Jako proti-ionty vystupují většinou atomy draslíku, sodíku, vápníku a amoniové ionty. Příkladem aniontového tenzidu může být dodecylsulfát sodný (SDS) nebo stearan sodný [40].

- **Kationtové PAL**

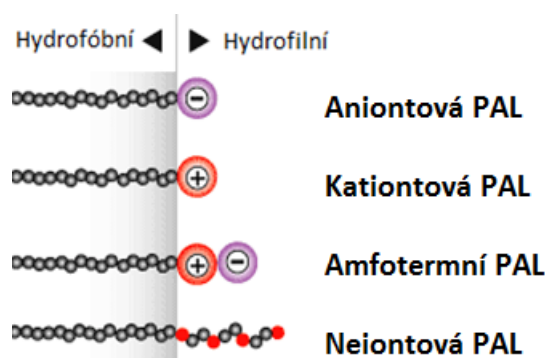
U většiny kationtových povrchových látek je hydrofilní část molekuly tvořena dusíkatým atomem. Využívají se jak aminy, tak i kvarterní dusíkaté báze, které na rozdíl od aminů nejsou závislé na pH. Kladný náboj u aminoskupin se vyskytuje jen v protonovaném stavu. Zástupcem kationtového tenzidu je například cetyltrimethylamoniumbromid (CTAB), nebo karbethodeciniumbromid (Septonex) [40]. Tito dva zástupci povrchově aktivních látek jsou dále rozpracováni v kapitole **2.9.2** a **2.9.3**.

- **Amfoterní PAL**

V molekule amfoterního tenzidu jsou přítomny dvě hydrofilní skupiny, které disociují v závislosti na pH okolního prostředí. V prostředí s pH blízcím se jejich izoelektrickému bodu vykazují tyto látky jak záporný, tak i kladný náboj. Jejich volný náboj je tedy plně vykompenzován. Příkladem přírodních amfoterních látek jsou fosfolipidy, příkladem syntetických amfoterních látek betainy [40].

- **Neiontové PAL**

Tyto tenzidy elektrolyticky nedisociují. Jejich molekuly se obvykle skládají z dlouhého uhlovodíkového řetězce, zakončeného polární nebo neiontovou skupinou na konci. Nejčastěji se jedná o polyetherové nebo polyhydroxylové skupiny. Díky polárním hydrofilním skupinám jsou tyto tenzidy dobře rozpustné ve vodě a vykazují silné hydratační vlastnosti. Příkladem zástupce této skupiny povrchově aktivních látek může být alkohol ethoxylát [40].

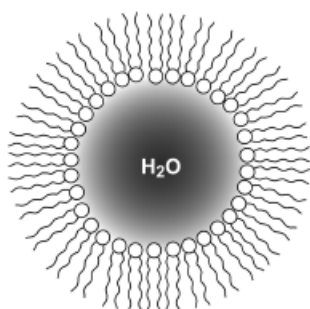


Obr. 14 Přehled jednotlivých tenzidů dle disociace hydrofilní skupiny [41].

2.9.1 Vznik a vlastnosti micel

Roztoky micelárních koloidů o nízké koncentraci vykazují charakteristický průběh závislosti daných fyzikálních vlastností na koncentraci. Při dosažení určité koncentrace dochází ke skokovým změnám na těchto křivkách. Micelární koloidy tvoří při nízkých koncentracích pravé roztoky. Při vyšších charakteristických hodnotách koncentrace se hydrofobní části molekul snaží minimalizovat kontakt s rozpouštědlem a tvoří agregáty. Tato koncentrace je označována jako kritická agregační koncentrace (CAC). Při dalším zvyšování koncentrace nastává na křivkách závislosti fyzikálních a chemických vlastností na koncentraci další skok. Tato koncentrace je označována jako kritická micelární koncentrace (CMC) a jak již bylo uvedeno výše, dochází ke vzniku micel [38].

Velikost a tvar micel závisí na mnoha aspektech, jako je například koncentrace, teplota, velikost a struktura molekul povrchově aktivní látky atd. Ve vodném roztoku je hydrofilní „hlava“ molekuly tenzidu v kontaktu s rozpouštědlem, zatímco hydrofobní uhlíkatý řetězec se snaží kontakt s rozpouštědlem minimalizovat (viz **Obr. 13**). V nepolárních rozpouštědlech je situace opačná. Zde některé amfifilní povrchově aktivní látky tvoří tzv. reverzní neboli obrácené micely. U reverzních micel je hydrofilní „hlava“ obrácena do středu vzniklé micely a hydrofobní uhlíkaté řetězce jsou směřovány do rozpouštědla (viz **Obr. 15**) [38], [42].



Obr. 15 Schématické znázornění reverzní micely [38].

Jednou z vlastností micel je možnost včleňování dalších molekul do jejich struktur, tzv. solubilizace. Solubilizaci rozdělujeme na přímou a reverzní. Schématické znázornění jednotlivých procesů solubilizace je uvedeno níže na obrázku (viz **Obr. 16**). Při solubilizaci

roste hmotnost micel tenzidu nejen v důsledku zabudování molekul solubilizátu do micely, ale také proto, že začleňováním se zvětší objem hydrofobního jádra a musí se tedy zvětšit i počet molekul tenzidu, které tvoří micelu [43].

- **Přímá solubilizace**

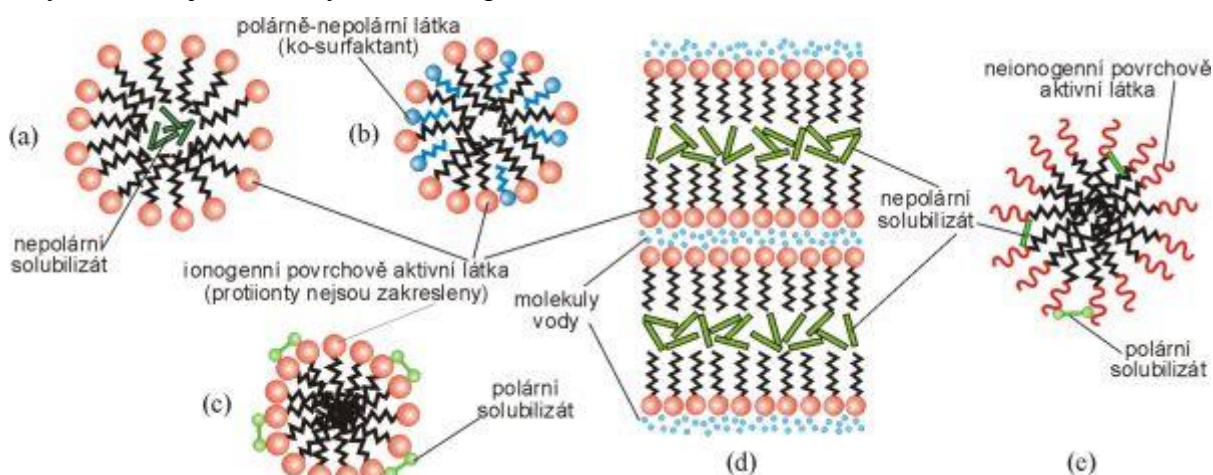
U nepolárních látek, které jsou ve vodném prostředí nerozpustné nebo slabě rozpustné, dochází k začleňování do jádra micel. V případě polárně-nepolárních organických látek, jako jsou například alkoholy nebo aminy, dochází k začlenění molekul do struktury micel tak, že kopírují charakteristické uspořádání micel. Uhlovodíkové řetězce těchto látek směřují do středu micely a jejich polární skupiny do prostředí rozpouštědla. Polární látky se pak solubilizují na povrchu micely.

U laminárních micel vstupují molekuly nepolární látky mezi uhlovodíkové řetězce tenzidu a tím dochází k oddálení jednotlivých vrstev.

Micely neionogenních povrchových látek si molekuly solubilizátu rozmisťují ve strukturních útvarech zohýbaných molekul tenzidu, na úrovni hydrofilních řetězců. Nepolární látky se pak začleňují blíže k jádru micely [43].

- **Obrácená solubilizace**

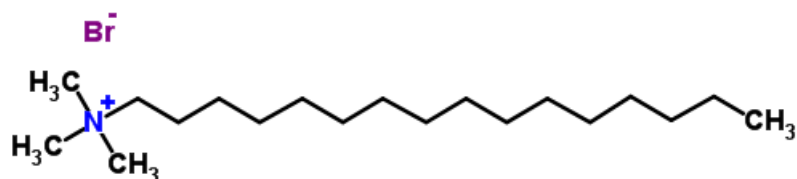
Tento typ solubilizace nastává s prostředí reverzních micel, tedy v nepolárním prostředí s hydrofilním jádrem a hydrofobním povrchem [43].



Obr. 16 Přímá solubilizace (a) nepolárních látek, (b) polárně-nepolárních látek, (c) polárních látek v micelách, (d) nepolárních látek v laminárních micelách, (e) nepolárních a polárních látek v neionogenních micelách [43].

2.9.2 CTAB

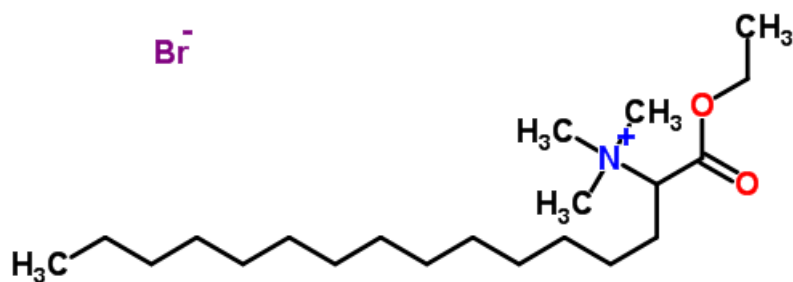
Cetyltrimethylamoniumbromid (viz **Obr. 17**) je kationický tenzid, jehož kladný náboj je tvořený kvarterní amoniovou solí s bromem jako proti-iontem o funkčním vzorci $(C_{16}H_{33})N(CH_3)_3Br$ a systematickém názvu hexadecyltrimethylamoniumbromid [44]. Molekulová hmotnost tohoto tenzidu činí $364.5 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$. Ve vodě dochází ke vzniku micel při dosažení kritické micelární koncentrace pohybující se v rozmezí $(0,92 - 1,0) \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Agregační číslo vzniklých micel se pohybuje v závislosti na metodě stanovení v rozmezí 75 – 120 (25 °C) [45].



Obr. 17 *Strukturální vzorec CTAB [44].*

2.9.3 Septonex

Septonex neboli karbethopendeciniumbromid (viz **Obr. 18**) o funkčním vzorci $C_{21}H_{44}BrNO_2$ je stejně jako CTAB kationický tensid tvořený kvarterní amoniovou solí a bromovým proti-iontem. Molekulová hmotnost tohoto tensidu činí $422,48 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ [46]. Ve vodě dochází ke vzniku micel při dosažení kritické micelární koncentrace pohybující se v rozmezí $(0,79 - 0,81) \cdot 10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ [48].



Obr. 18 *Strukturální vzorec Septonexu [46].*

3 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

Fluorescenční sondy podstupující přenos protonů v excitovaném stavu nacházejí využití v studiu dynamiky a struktury vysoce organizovaných komplexů jako jsou polymerní gely [55], micely [56], [18], [19] a lipidové membrány [59]. Dále pak ke stanovení hydratační dynamiky polymerů [16] a v neposlední řadě mohou tyto sondy reagovat na změnu pH, čímž se stávají hojně využívanými jako senzory změny acidobazické rovnováhy [17], [58].

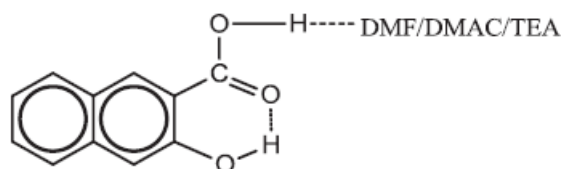
Anita C. Kumar a A.K. Mishra studovali proces bobtnání polyvinylalkoholové (PVA) gelové vrstvy ve vodě za pomoci inkorporací α -naftolu do prostorové matrice gelu. PVA je netoxický, biokompatibilní polymer, který ochotně bobtná ve vodě. V závislosti na stupni asociace mezi vodou a polymerem se mění struktura vody uvnitř gelu. Emisní spektrum α -naftolu v suchém gelu obsahovalo ve velké míře pouze zastoupení neutrální formy molekuly. Po započítání bobtnání, tj. pronikání vody do gelu, se snižovalo zastoupení neutrální formy sondy a zároveň docházelo ke zvyšování disociované, aniontové formy fluoroforu. Díky hydrofobním interakcím zůstával α -naftol v matrici polymeru PVA. Monitorováním emisního spektra spolu se stanovením hmotnosti celého gelu bylo možné stanovit čas maximálního nasycení polymerního gelu vodou a také rozlišit vodu vázanou přímo na polymer oproti vodě uchycené v zesíťované struktuře [55].

Mandal D., Kumar S. a kolektiv posuzovali deprotonační charakteristiky α -naftolu v micelách neutrálních (X-100, TX-100R), kationtových (CTAB) a aniontových (docecylsulfát sodný (SDS)) tenzidů. Ve vodě podstupuje α -naftol rychlou deprotonaci okolo 35 ps [57], [58]. Velký rozdíl emisních charakteristik aniontové a neutrální formy vykazuje tento fluorofor v organizovaném prostředí micel. Změna poměru intenzit neutrální a aniontové formy nastává okolo kritické micelární koncentrace jednotlivých tenzidů. Dochází ke zvýšení intenzity aniontové formy v prostředí micel nad kritickou micelární koncentrací u tenzidů CTAB a TX-100R, oproti tomu u micel SDS dochází k poklesu v porovnání s vodou. Tento pokles značí odlišnou pozici fluoroforu v micelách SDS, kde α -naftol emituje převážně jako nevázaná sonda ve vodě. V micelách CTAB docházelo ke zpomalení přenosu protonů a doba života fluoroforu pro 460 nm byla zpomalená na 600 ps, stejně jako v případě doby života neutrální formy, při 360 nm. Pro TX-100R a SDS je doba života aniontové formy při 460 nm vyšší, než je tomu v případě neutrální formy (360 nm). Doba života v micelách TX-100R byla stanovena na 2,5 ns pro 460 nm a 2,5 ns pro 360 nm. U SDS byla doba života pro 460 nm stanovena na 600 ps a 1,8 ns pro 360 nm [56].

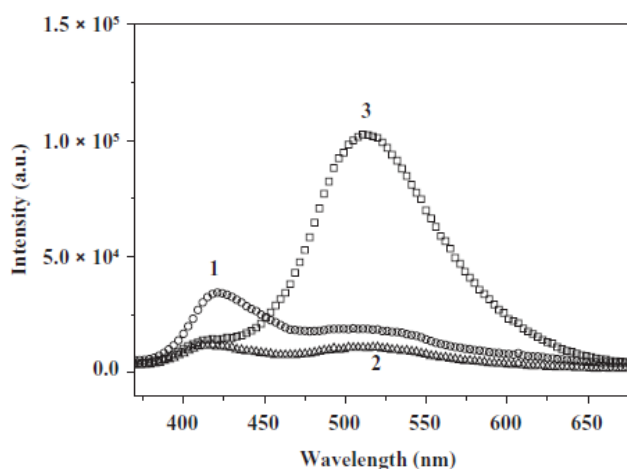
N. Pappaye a A.K. Mishra studovali chování různě substituovaného naftolu, konkrétně 4-chlor-1-naftol, 5-amino-1-naftol, 4-methoxy-1-naftol, 7-methoxy-2-naftol, 3-amino-2-naftol, 6-brom-2-naftol a 1-brom-2-naftol v prostředí lipozomů užitím ustálené a časově rozlišené fluorescence. Z jejich měření vyplývají jako vhodné sondy především 4-chlor-1-naftol, popřípadě i 4-methoxy-1-naftol, podstupující intermolekulární přenos protonů (ESPT). Hlavním důvodem uvádí rozdíl v disociačních konstantách základního (pK_a) a excitovaného (pK_a^*) stavu. U naftolů se zavedenou aminoskupinou se projevuje snížení kvantového výtěžku v nepolárních médiích. U substituování naftolu bromem docházelo u výsledného derivátu k značným mezi-systémovým přechodům. Docházelo k emitaci fosforescence, což nebylo žádoucí. Jak již bylo řečeno výše, nejlepší vlastnosti vykazovala sonda 4-chlor-1-naftol,

konkrétně její neutrální forma, která dobře korelovala s umístěním v liposomové membráně. Pozice fluoroforu byla zjištěna pomocí zhášení fluorescence jodovými ionty. Za předpokladu jódu jako hydrofilního zhášeče bude zhášena pouze neutrální frakce fluoroforu zabudovaného v membráně, která je v kontaktu s vodou. Tento fluorofor také reagoval změnou emisního spektra na přítomnost cholesterolu v lipidové dvojvrstvě. Cholesterol snižuje stlačitelnost membrány a navyšuje její kohezní vlastnosti. V lipidové dvojvrstvě je vlivem přítomnosti cholesterolu větší organizovanost acylových řetězců mastných kyselin. Při změně teploty vykazovala neutrální forma naftolu nižší intenzitu s rostoucím zastoupením cholesterolu v lipidové dvojvrstvě [59].

L. Meijuan, T. Qiang a kolektiv se zabývali charakterizací polymeru poly(metylmetakrylát) (PMMA). Z tohoto polymeru byl připraven kompozitní materiál spolu s 3-hydroxy-2-naftolovou kyselinou (3HNA) *in situ*. V této studii byl posuzován vliv různých rozpouštědel na fluorescenční vlastnosti kompozitu 3HNA. Jejich výsledky indikují duální emisní spektrum kompozitu 3HNA [50]. 3HNA vykazuje emisi neutrální formy v nepolárních rozpouštědlech jako je například toluen. V polárních rozpouštědlech jako je například acetonitril a pyridin vykazuje emise velký Stokesův posuv. Tento posuv byl pozorován také v přítomnosti akceptoru protonu jako je triethylamin (TEA), který byl přidáván do nepolárního roztoku [62]. V polárních rozpouštědlech dochází pravděpodobně k interakci s 3HNA za vzniku intermolekulární vodíkové vazby (viz **Obr. 19**). Jako tomu bylo v případě studie interakce 3HNA s polymethylmethakrylátem (PMMA), kdy po přidavku polárního aprotického rozpouštědla dimethylformamidu (DMF) docházelo ke zvyšování intenzity emisního záření při vlnové délce okolo 500 nm (viz **Obr. 20**). Ke stejné interakci by mělo docházet i v případě DMAC (dimethylacetamid) a TEA (triethylamin) [50].

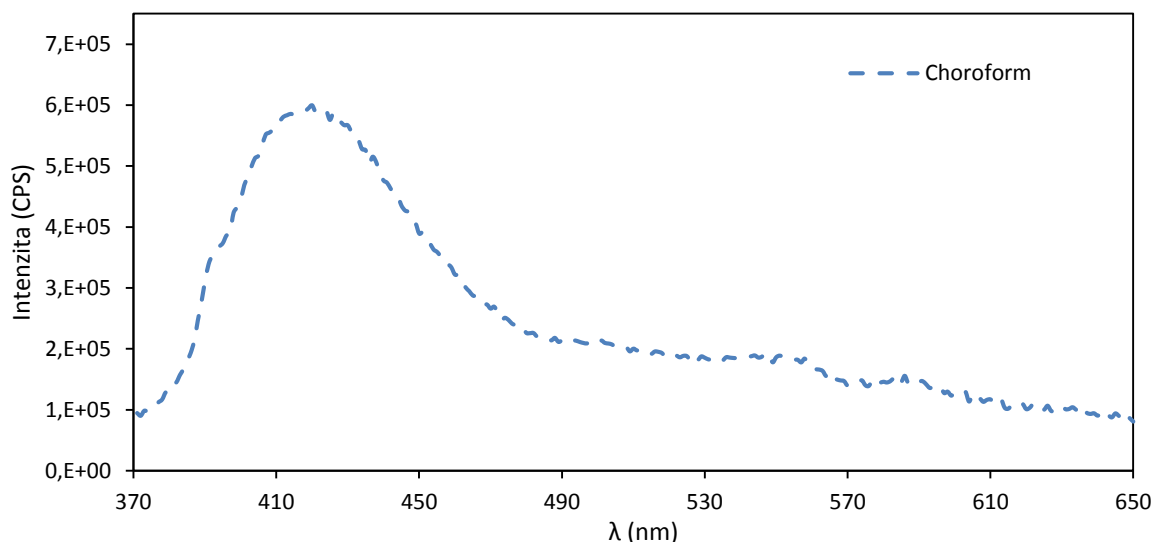


Obr. 19 Vzniklý komplex vodíkové vazby s3HNA s DMF,DMAC a TEA [50].



Obr. 20 Emisní spektra 3HNA kompozitu s PMMA s přidavkem DMF, (1) 0 wt%, (2) 0,5 wt%, (3) 3,0 wt% [50].

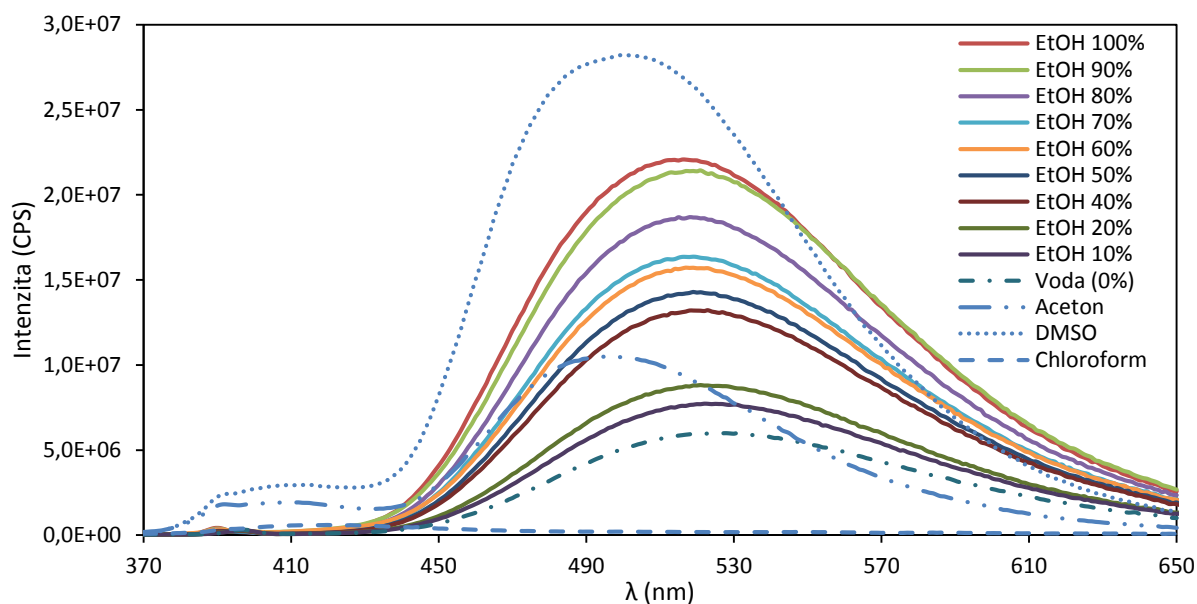
Pro kompletní výčet fluorescenčních sond podstupujících přenos protonů v excitovaném stavu, se kterými bylo pracováno v bakalářské i v diplomové práci, jsou níže uvedeny emisní charakteristiky 3HNA v různých rozpouštědlech (viz **Obr. 22**). Dále je na grafu níže (viz **Obr. 21**) uvedeno emisní spektrum 3HNA v chloroformu. Fluorofor v chloroformu vykazuje velice nízkou intenzitu v porovnání s ostatními rozpouštědly a proto je zde uveden samostatně. V tomto nepolárním rozpouštědle dochází k emisi neutrální formy 3HNA s maximem okolo 420 nm. Nedochozí k deprotonaci a vzniku aniontové formy s maximem okolo 510 nm.



Obr. 21 Samostatné emisní spektrum 3HNA v chloroformu.

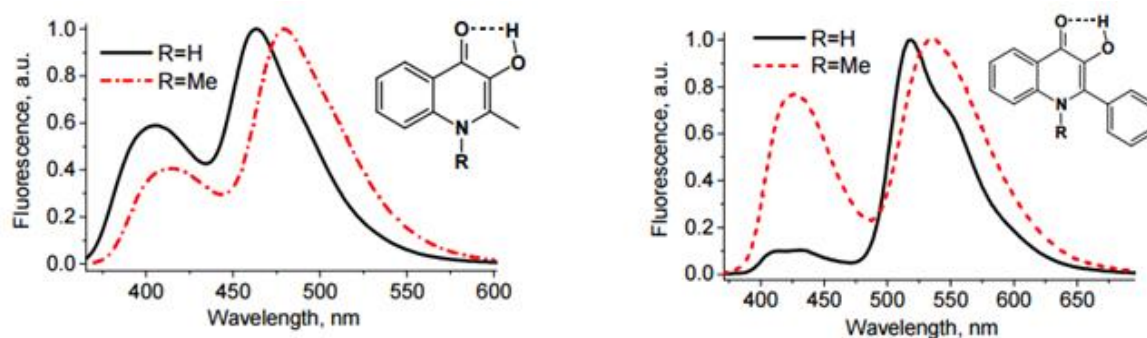
V polárních aprotických rozpouštědlech, jako je aceton a DMSO, je emisní maximum posunuto k vlnové délce okolo 500 nm (viz **Obr. 20**). V těchto rozpouštědlech dochází pravděpodobně k interakci s 3HNA za vzniku intermolekulární vodíkové vazby [50].

V polárních protických rozpouštědlech dochází se zvyšující se polaritou roztoku ke snižování intenzity aniontové formy molekuly s emisním maximem okolo 510 nm. Maximální intenzitu aniontové formy vykazuje roztok 100% ethanolu, zatímco nejmenší intenzitu můžeme pozorovat pro čistou vodu.



Obr. 22 Emisní spektra 3HNA v různých rozpouštědlech.

Přenos protonů vykazují i sondy na bázi chinolinonu. **Dmytro A. Yuschenko a kolektiv** studovali fluorescenční vlastnosti 2-aryl-3-hydroxychinolinů (3HQ) s různými substituenty pomocí ustálené a časově rozlišené fluorescence. Substituce tohoto fluoroforu probíhala na pozici 2-arylového kruhu a na atomu dusíky heterocyklu (viz **Obr. 23**). Byl zaznamenán velký rozdíl mezi emisními spektry u jednotlivých substituentů. Zatímco absorpční spektra byla u všech substituovaných fluoroforů prakticky stejná a nevykazovala velké odchylky pro jednotlivé substituenty, emisní charakteristiky, respektive poměr intenzit mezi jednotlivými maximy duálního spektra, se pro jednotlivé substituenty výrazně lišily. Omezenou reakci na změnu polaritu vykazovaly chinolinové sondy obsahující N-H substituent. Oproti tomu N-Me substituovaný chinolinon (N-Me 3HQ) poskytuje dostatečnou odpověď na změnu polaritu prostředí a to díky symetrickým změnám poměru jednotlivých intenzit v závislosti na změně polaritu [51].



Obr. 23 Normalizovaná emisní spektra 2-metyl-3HQ (černá) a 1,2-dimethyl-3HQ (červená) vlevo. Vpravo pak normalizovaná emisní spektra 2-fenyl-3HQ (červená) a 1-methyl-2-fenyl-3HQ (červená) v DMF při excitační vlnové délce 360 nm pro všechny sloučeniny [51].

S. Kalyanasis a kolektiv posuzovali emisní charakteristiky pyraninu (HPTS) v systému lysozymu a CTAB pomocí ustálené a časově rozlišené fluorescence. Ve vodě vykazoval

pyranin dvě absorpční maxima, pro neutrální formu ROH u 405 nm, která byla signifikantně menší než druhé absorpční maximum pro aniontovou formu RO⁻ u 450 nm. Pyranin vykazoval změnu emisních charakteristik po přidavku lysozymu. Pro 0,09 % koncentraci činil poměr ROH:RO⁻ hodnou 1:8, pro 0,5% koncentraci lysozymu byl poměr 1:7. Intenzita RO⁻ pyraninu byla v lysozymu výrazně potlačena oproti pyraninu ve vodě, kde poměr ROH:RO⁻ dosahoval hodnoty 1:20. Po přidavku $0,6 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ CTAB do obou koncentrací lysozymu docházelo ke snížení RO⁻ vlivem zhášecí interakce pyraninu a CTAB. Zvyšování koncentrace CTAB nad $0,6 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ mělo za následek prudký růst intenzity RO⁻ u 0,09% lysozymu. Rovněž intenzita RO⁻ pod touto koncentrací CTAB vykazovala mírný nárůst. Z tohoto trendu byla odečtena kritická agregační koncentrace mezi CTAB a lysozymem, tedy $0,6 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ CTAB při 0,09% lysozymu. Tomuto odpovídaly i hodnoty deprotonačních konstant, kdy vlivem vzniklých agregátů CTAB a lysozymu docházelo ke snížení rychlostní konstanty deprotonace [52].

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Vybavení a přístroje

4.1.1 Fluorolog

K měření fluorescenčních spekter fluoroforu 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 ustálené fluorescence 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 až 20 ps/kanál. Rozsah měřených dob života fluoroforu se pohybuje od 10^{-10} do 10^{-6} s. Měření je možno provádět za konstantní teploty díky připojené vodní lázni. Pro měření byla udržována teplota 22 °C. Na zpracování dat byl použit software DataStation, HORIBA Jobin Yvon Inc.

4.1.3 Aminco Bowman Series 2

K měření fluorescenčních spekter fluoroforu byl použit přístroj Aminco Bowman Series 2 (AB2) umožňující fluorescenční analýzu měřením emisních a excitačních spekter. Jako světelný zdroj slouží Xe výbojka. Budící paprsek prochází prvním excitačním monochromátorem pro výběr dané excitační vlnové délky. Kolmo na excitační paprsek je detekováno fluorescenční záření, které prochází emisním monochromátorem. Měření bylo prováděno při nastavení citlivosti přístroje 60% pro daný rozsah budícího napětí, pohybující se v rozmezí 250 až 1025 V. Pro vyhodnocení měření byl použit dodaný software AB2.

4.1.4 Použité chemikálie

Hyaluronan (130 – 300 kDa)	Contipro Biotech s.r.o	šarže: 213-6213
Hyaluronan (750 – 1000 kDa)	Contipro Biotech s.r.o	šarže: 214-7794
Hyaluronan (1500 – 1750 kDa)	Contipro Biotech s.r.o	šarže: 214-9062
PSS (1 MDa)	Sigma-Aldrich Chemistry	šarže: MKAA1218V CAS: 25704-18-1
PSS (70 kDa)	Sigma-Aldrich Chemistry	šarže: BCBF6120V CAS: 25704-18-1
α -naftol	Sigma-Aldrich Chemistry	šarže: BVBJ8068V CAS: 90-15-3
HPTS	Sigma-Aldrich Chemistry	šarže: BFD37575V CAS: 6358-69-6

Pyren	Fluka Analytical	šarže: 4301661 CAS: 57-09-0
3HNA	Sigma-Aldrich Chemistry	šarže: BCBK3459V CAS: 92-70-6
CTAB	Sigma-Aldrich Chemistry	šarže: 059K0041 CAS: 57-09-0
Septonex	GNB Chemistry	šarže: 910SEP002 CAS: 10567-02-9
Ethanol pro UV-VIS	Penta Ing. Petr Švec	šarže: 220313 CAS: 64-17-5
DMSO	Fluka Analytical	šarže: 1468197V CAS: 67-68-5
Chloroform	Penta Ing. Petr Švec	šarže: 2097200715 CAS: 602-006-00-4
Aceton	Penta Ing. Petr Švec	šarže: 1308200810 CAS: 67-64-1
Deionizovaná voda	Milipore academic	
LUDOX	Sigma-Aldrich Chemistry	šarže: MKBJ4732V CAS: 7631-86-9
CPC	Sigma-Aldrich Chemistry	šarže: 075K0200 CAS: 6004-24-6
Jodid draselný	Fluka Analytical	šarže: 4571101 CAS: 7681-11-0
3-Jodpropanová kyselina	Sigma-Aldrich Chemistry	šarže: S10757-184 CAS: 141-76-4

4.1.5 Příprava zásobních roztoků

Dle následujícího seznamu byly připraveny zásobní roztoky:

- **Hyaluronan**

Na analytických vahách bylo naváženo dané množství hyaluronanu o molekulové hmotnosti 130 – 300 kDa, 750 – 1000 kDa nebo 1500 – 1740 kDa. Navážené množství bylo kvantitativně převedeno do odměrné baňky o objemu 100 cm³. Úplným rozpuštěním a následným doplněním roztoku po rysku deionizovanou vodou byly připraveny zásobní roztoky hyaluronanu o koncentraci 0,015 g·dm⁻³.

- **Tenzidy**

Na analytických vahách bylo naváženo dané množství CTAB nebo Septonexu. Navážené množství bylo kvantitativně převedeno do odměrné baňky o objemu 100 cm³. Úplným rozpuštěním a následným doplněním roztoku po rysku deionizovanou vodou byly připraveny zásobní roztoky tenzidu o koncentraci 5·10⁻² mol·dm⁻³ a 5·10⁻⁴ mol·dm⁻³.

- **Zhášeče**

Na analytických vahách bylo naváženo dané množství zhášeče. Pro jodbenzen činilo navážené množství 0,2083 g, toto množství bylo převedeno do odměrné baňky o objemu 50 cm³

a doplněno po rysku DMSO. Pro CPC bylo naváženo 0,0488 g a tato navážka byla převedena do odměrné baňky o objemu 100 cm³ a doplněna vodou po rysku. Takto vznikly zásobní roztoky o koncentraci 0,0204 mol·dm⁻³ pro jodbenzen a 5,75·10⁻³ mol·dm⁻³ pro CPC.

- **α-naftol**

Na analytických vahách bylo naváženo 0,0079 g α-naftolu o relativní molekulové hmotnosti 144,17 g·mol⁻¹. Navážené množství bylo kvantitativně převedeno do odměrné baňky o objemu 50 cm³. Rozpuštěním a následným doplněním roztoku po rysku ethanolem (ethanol na UV-VIS) byl připraven zásobní roztok fluoroforu α-naftolu o koncentraci 1,10·10⁻³ mol·dm⁻³.

- **HPTS**

Na analytických vahách bylo naváženo 0,0514 g HPTS o relativní molekulové hmotnosti 524,39 g·mol⁻¹. Navážené množství bylo kvantitativně převedeno do odměrné baňky o objemu 50 cm³. Úplným rozpuštěním a následným doplněním roztoku po rysku ethanolem (ethanol na UV-VIS) byl připraven zásobní roztok HPTS o koncentraci 1,96·10⁻³ mol·dm⁻³.

4.1.6 Příprava jednotlivých vzorků

Dle následujícího seznamu byly připraveny vzorky:

- **Vzorky pro stanovení vlivu tenzidu na hydrataci sondy**

Do vialek bylo napipetováno 13 μl popřípadě 46 μl roztoku fluorescenční sondy α-naftolu nebo HPTS v ethanolu. Rozpouštědlo bylo následně odpařeno za laboratorní teploty a do vialek byl napipetován konstantní objem hyaluronanu o molekulové hmotnosti 1500 – 1740 kDa, tenzidu a deionizované vody tak, aby celkový objem vzorku činil 5 cm³. Koncentrace sondy ve vzorku byla pro α-naftol 1·10⁻⁵ mol·dm⁻³ a pro HPTS 5·10⁻⁶ mol·dm⁻³. Konstantní koncentrace hyaluronanu ve vzorku činila 7 mg·dm⁻³. Koncentrace tenzidu se pohybovala v rozsahu 0 až 2·10⁻² mol·dm⁻³.

Takto byly od každého tenzidu a v kombinaci s každou sondou vytvořeny tři řady roztoků, které byly ponechány na třepačce do druhého dne.

- **Vzorky pro stanovení vlivu hyaluronanu na hydrataci sondy**

Do vialek bylo napipetováno 13 μl popřípadě 46 μl roztoku fluorescenční sondy α-naftolu nebo HPTS v ethanolu. Rozpouštědlo bylo následně odpařeno za laboratorní teploty a do vialek byl napipetován daný objem hyaluronanu o molekulové hmotnosti 130 – 300 kDa, 750 – 1000 kDa nebo 1500 – 1740 kDa, konstantní objem tenzidu a deionizované vody tak, aby celkový objem vzorku činil 5 cm³. Koncentrace sondy ve vzorku byla pro α-naftol 1·10⁻⁵ mol·dm⁻³ a pro HPTS 5·10⁻⁶ mol·dm⁻³. Koncentrace tenzidu byla konstantní pro každou řadu, a to 3 mM, 5 mM, 7 mM, 10 mM a 20 mM. Koncentrace hyaluronanu se ve vzorcích pohybovala v rozmezí 0 až 15 mg·dm⁻³.

Takto byly od každého tenzidu a hyaluronanu v kombinaci s každou sondou vytvořeny tři řady roztoků, které byly ponechány na třepačce do druhého dne.

- **Vzorky pro stanovení emisních charakteristik fluorescenčních sond v různých rozpouštědlech**

Do vialek bylo napipetováno 13 μl popřípadě 46 μl roztoku fluorescenční sondy α -naftolu nebo HPTS v ethanolu. Rozpouštědlo bylo následně odpařeno za laboratorní teploty a do vialek bylo napipetováno 5 cm^3 vody, DMSO, popřípadě chloroformu. Pro koncentrační řadu ethanolu ve vodě byly pipetovány dané objemy tak, aby se koncentrace ethanolu pohybovala v rozmezí 0 až 100%. Koncentrace sondy ve vzorku byla pro α -naftol $1 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ a pro HPTS $5 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$.

Takto byly pro každou sondu v kombinaci s každým rozpouštědlem vytvořeny vzorky o konečném objemu 5 cm^3 .

- **Vzorky pro stanovení agregačního čísla Septonexu**

Do vialek bylo napipetováno 48 μl zásobního roztoku pyrenu, rozpouštědlo bylo následně odpařeno za laboratorní teploty. Koncentrace zlášeče CPC se pohybovala v rozmezí 0 až $7 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Koncentrace Septonexu byla konstantní, a to $6 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Výsledné vzorky byly doplněny na objem 5 cm^3 deionizovanou vodou. Takto byly vytvořeny tři stejné řady vzorků.

- **Vzorky pro zhášení α -naftolu pomocí jodbenzenu a CPC**

Do vialek bylo napipetováno 91 μl fluorescenční sondy α -naftolu, rozpouštědlo bylo následně odpařeno za laboratorní teploty. Koncentrace zlášeče byla zvolena tak, aby se poměr s koncentrací micel pohyboval v rozmezí 0,5 až 1,5. Koncentrace CTAB byla konstantní, a to $2 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Výsledné vzorky byly doplněny na objem 5 cm^3 deionizovanou vodou. Takto byly vytvořeny tři stejné řady vzorků jednak pro CPC, tak i pro jodbenzen.

4.2 Vlastní měření

4.2.1 Měření emisních spekter

Pro měření emisních charakteristik jednotlivých sond byl excitační monochromátor nastaven na vlnovou délku 300 nm pro α -naftol a 454 nm pro HPTS. Emisní monochromátor byl pak nastaven pro α -naftol v rozsahu 320 až 560 nm a pro HPTS 460 až 620 nm. Štěrbiny jak excitačního tak emisního monochromátoru byly nastaveny na 4 nm.

4.2.2 Měření doby života

Odezva lampy byla zjištěna měřením rozptylujícího záření koloidního roztoku oxidu křemičitého pro nastavení monochromátoru NanoLED lampy na vlnovou délku 301 nm pro α -naftol a 455 nm pro HPTS. Emisní monochromátor byl nastaven na vlnovou délku 350 nm pro neutrální formu α -naftol a 450 nm pro aniontovou formu, pro HPTS byl monochromátor nastaven na 510 nm. Další 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 štěrbin byla nastavena v rozsahu 16 až 32 dle zahlcení detektoru. Měření byla prováděna v reverzním uspořádání.

4.3 Vyhodnocení

4.3.1 Vyhodnocení měření časově rozlišené fluorescence

Výsledná měření časově rozlišené fluorescence byla vyhodnocena pomocí programu DataStation, HORIBA Jobin Yvon Inc. Naměřená data mohou být proložena až pěti-exponenciální funkcí s obecnou rovnicí [53]:

$$F(t) = A + B_i \exp\left(-\frac{t}{\tau_i}\right), \quad (19)$$

kde A je parametr proložení, B_i představuje předexponenciální funkci, která koresponduje s procentuálním zastoupením emitujícího fluoroforu, t představuje čas a τ_i příslušnou dobu života.

Dále je možné vypočítat průměrnou dobu života při více exponenciálním proložení dat, získaných měřeními doby života dle rovnice [54]:

$$\tau_a = \sum_{i=1}^n (B_i \cdot 0,01) \cdot \tau_i. \quad (20)$$

4.3.2 Stanovení agregačního čísla

Agregační číslo daného tenzidu může být stanoveno jednak pomocí dynamického, tak i pomocí statického zhášení fluorescence. Ovšem pro přesnější stanovení hodnoty agregačního čísla se časově rozlišená fluorescence jeví jako vhodným nástroj. U statického zhášení ustálené fluorescence roste odchylka s rostoucí viskozitou prostředí a také s rostoucí hodnotou samotného agregačního čísla [60].

Při měření časově rozlišené fluorescence metodou TCSPC bez přítomnosti zhášeče je rychlostní konstanta vyhasínání dána rovnicí:

$$k = \frac{1}{\tau_0}, \quad (21)$$

kde τ_0 představuje dobu života fluoroforu solubilizovaného v micelárním prostředí při monoexponenciálním proložení vyhasínací křivky. Pro dobu života v přítomnosti zhášeče platí rovnice [61]:

$$F(t) = F(0) \exp\left(-\frac{t}{\tau_0} - C \cdot [1 - \exp(-k_Q \cdot t)]\right), \quad (22)$$

kde $F(t)$ a $F(0)$ představují intenzity fluorescence v čase t a v čase 0, C představuje poměr koncentrace zhášeče ke koncentraci micel. Vynesením závislosti C na koncentraci zhášeče $[Q]$ dostáváme ze směrnice závislosti hodnotu agregačního čísla N_D dle rovnice:

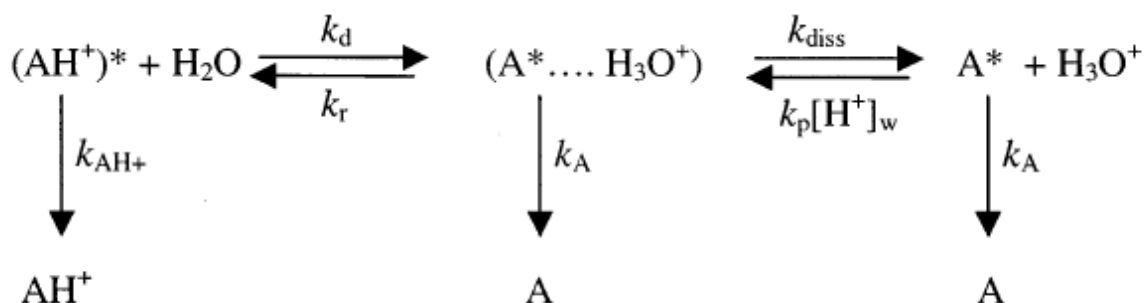
$$C = \frac{N_D}{[S] - [\text{CMC}]} \cdot [Q], \quad (23)$$

Kde $[S]$ představuje koncentraci tenzidu a $[\text{CMC}]$ jeho kritickou micelární koncentraci.

Poměr C musí být volen tak, aby koncentrace zhášeče neovlivňovala strukturu vznikajících micel. Pro rostoucí koncentraci zhášeče by se tento poměr měl pohybovat v rozmezí 0 pro nulovou koncentraci zhášeče až po 1,5 [60].

4.3.3 Stanovení deprotonační konstanty

Přenos protonů v excitovaném stavu probíhá dle schématu níže (viz **Obr. 24**). Excitovaný fluorofor $(AH^+)^*$ může, kromě emise z neutrální formy, podstupovat rychlý přenos protonů za vzniku iontového páru $(A^* \dots H_3O^+)$ s konstantou deprotonace k_d . Disociací tohoto iontového páru s konstantou disociace k_{diss} získáváme individuální ionty A^* a H_3O^+ . Může docházet k rekombinaci rychlostní konstanty k_r za vzniku neutrální formy (AH^+) . Stejně tak mohou být jednotlivé ionty transferovány zpět za vzniku iontového páru $(A^* \dots H_3O^+)$ s rychlostní konstantou $k_p[H^+]_w$. Z komplexu iontového páru a z disociovaných iontů dochází k emisi aniontové formy fluoroforu. Díky relativně vysoké hodnotě pH, kdy vzorky byly připravovány v neutrálním pH, je zpětný transfer jednotlivých iontů do iontového komplexu zanedbatelný, respektive je vznik samostatných iontů ireverzibilní. Konstanta $k_p[H^+]_w$ je vůči konstantě k_A zanedbatelná [58].



Obr. 24 Schéma kinetiky přenosu protonů v excitovaném stavu [58].

$$\frac{d}{dt} \begin{bmatrix} AH^+ \\ A \dots H^+ \\ A \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} -X & k_r & 0 \\ k_d & -Y & k_p[H^+]_w \\ 0 & k_{diss} & -Z \end{bmatrix} \cdot \begin{bmatrix} AH^+ \\ A \dots H^+ \\ A \end{bmatrix}, \quad (21)$$

kde X , Y a Z jsou dány rovnicemi:

$$X = k_d + k_{AH^+}, \quad (22)$$

$$Y = k_r + k_{diss} + k_A, \quad (23)$$

$$Z = k_{diss} + k_A, \quad (24)$$

Rovnice (21) vychází z předpokladu proložení vyhasínací křivky fluoroforu tři-exponenciální funkcí, z čehož plyne, že tři reciproké doby života (pro AH^+ ($A \dots H^+$) a A) budou kořeny rovnice:

$$\begin{bmatrix} \lambda - X & k_r & 0 \\ k_d & \lambda - Y & k_p[H^+]_w \\ 0 & k_{diss} & \lambda - Z \end{bmatrix} = 0, \quad (25)$$

Vyhasínací křivka neutrální formy vykazuje kratší vyhasínací časy τ_3 a τ_2 (s nejdelším časem τ_1). Poměr předexponenciálních faktorů těchto časů dává vzniku předexponenciálnímu koeficientu R dle rovnice:

$$R = \frac{B_3}{B_2}, \quad (26)$$

Řešení rovnice (25) za předpokladu $k_p[\text{H}^+]_w = 0$:

$$\lambda_{3,2} = \frac{(X + Y) \pm \sqrt{(X - Z)^2 + 4 \cdot k_r \cdot k_d}}{2}, \quad (27)$$

$$\lambda_1 = k_A. \quad (28)$$

Odvozením vztahů mezi rychlostní konstantou, parametry poklesu a předexponenciálním koeficientem dostáváme vztahy pro jednotlivé konstanty [58]:

$$X = \frac{R \cdot \lambda_3 + \lambda_2}{R + 1}, \quad (29)$$

$$Y = \lambda_3 + \lambda_2 - X, \quad (30)$$

$$k_d = X - k_{\text{AH}^+} \approx X, \quad (31)$$

$$k_r = \frac{X \cdot Y - \lambda_3 \cdot \lambda_2}{k_d}, \quad (32)$$

$$k_{\text{diss}} = Y - k_A - k_r. \quad (33)$$

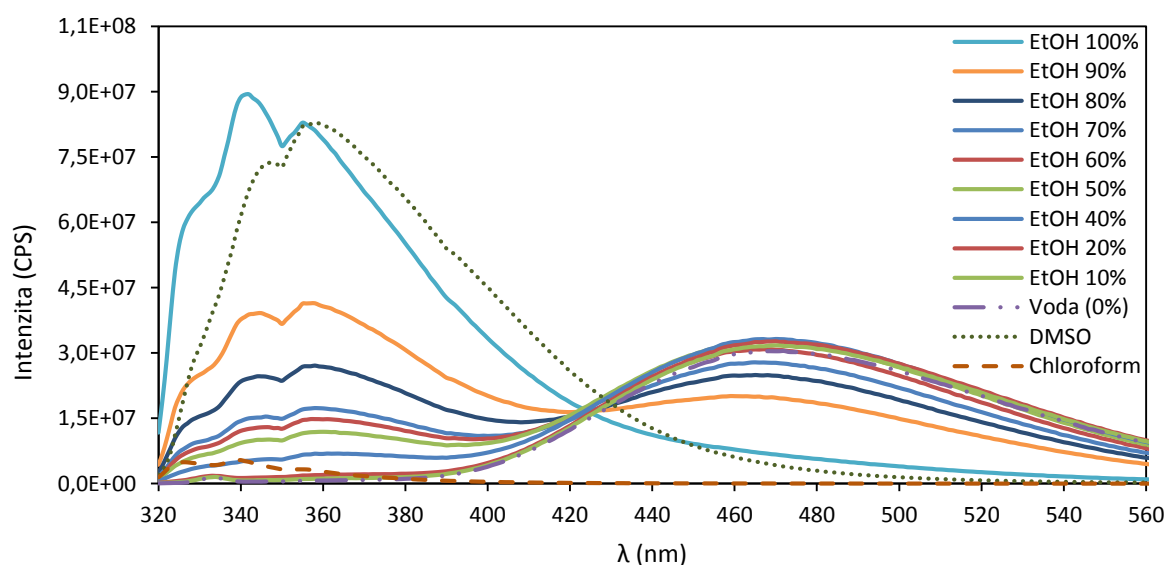
Pro účely této práce byla vzata v potaz deprotonační konstanta k_d , jako charakterizující konstanta pro přenos protonů v excitovaném stavu:

$$k_d \approx \frac{R \cdot \lambda_3 + \lambda_2}{R + 1}. \quad (34)$$

5 VÝSLEDKY A DISKUZE

5.1 Deprotonační charakteristiky fluorescenční sondy α -naftolu

Fluorescenční sonda α -naftol podstupuje intermolekulární přenos protonů v excitovaném stavu (ESPT) s charakteristickým duálním emisním spektrem s prvním emisním maximem neutrální molekuly NpOH při vlnové délce cca 350 nm a druhým maximem aniontové molekuly NpO⁻ okolo vlnové délky 450 nm, v závislosti na rozpouštědle (viz **Obr. 25**). V roztoku ethanol/voda se vlivem snižující se koncentrace ethanolu zvyšuje polarita roztoku. Se zvyšující se polaritou dochází ke snižování zastoupení emisního záření neutrální formy molekuly a k růstu emisního záření aniontové formy molekuly. V polárním aprotickém rozpouštědle DMSO dominuje emise neutrální formy molekuly s malým posuvem emisního maxima. V nepolárním rozpouštědle chloroformu je intenzita emisního záření neutrální molekuly velice nízká a emise aniontové molekuly je zcela potlačena. Je třeba říci, že intenzita fluorescence aniontové molekuly již neroste a to ani v případě čisté vody.



Obr. 25 Emisní spektra α -naftolu v různých rozpouštědlech.

Fluorofor α -naftol se řadí mezi fotokyseliny. Míru kyselosti α -naftolu v excitovaném stavu vyjadřuje hodnota disociační konstanty pK_a^* . V základním stavu činí hodnoty pK_a 9,2 [1], po excitaci dochází vlivem strukturálních změn na molekule ke skokovému růstu kyselosti. V tabulce níže (viz **Tab. 1**) jsou uvedeny hodnoty pK_a^* pro různá rozpouštědla, odvozené z Försterova cyklu (viz kapitola 2.5.1). U čistého ethanolu, DMSO a chloroformu nedocházelo k deprotonaci a vzniku aniontové formy fluoroforu, tudíž hodnota pK_a^* nemohla být určena. Pro roztoky obsahující ethanol v koncentraci 90 až 20% nedocházelo k výrazným změnám pK_a^* . Můžeme ovšem pozorovat jistý trend poklesu pK_a^* , tedy nárůstu míry kyselosti fluoroforu, se snižující se koncentrací ethanolu. U 10% ethanolu dochází k výrazné změně kyselosti a poklesu pK_a^* na hodnotu 0,32. V čisté vodě má pK_a^* hodnotu 0,41. Tyto nízké hodnoty disociačních konstant řadí α -naftol v excitovaném stavu k silným kyselinám. V méně polárním prostředí ethanolu dochází ke snížení míry kyselosti α -naftolu, hodnota pK_a^* je oproti čisté vodě zvýšena téměř sedmkrát.

Tab. 1 Disociační konstanty v excitovaném stavu α -naftolu, pK_a^* a jednotlivé hodnoty emisního maxima pro $NpOH$ a NpO^- .

EtOH (%)	λ_{em} (nm) $NpOH$	λ_{em} (nm) NpO^-	pK_a^*
100	342	-	-
90	358	459	2,96
80	358	465	2,66
70	358	465	2,66
60	357	467	2,48
50	360	469	2,63
40	358	470	2,42
20	360	470	2,58
10	334	470	0,32
Voda	334	468	0,41
DMSO	358	-	-
Chloroform	340	-	-

Dále byla měřena časově rozlišená fluorescence neutrální a aniontové formy molekuly α -naftolu v různých rozpouštědlech (viz **Tab. 2**). Výsledné vyhasínací křivky byly vyhodnoceny proložením dvou nebo tři-exponenciální funkcí (viz kapitola **4.3.1**). Od 40% koncentrace ethanolu byly vzorky prokládány tři-exponenciální funkcí, kdy docházelo k postupnému nárůstu relativního zastoupení A_1 nejkratší doby života t_1 , která je spojena s rychlou deprotonací. Se snižujícím se zastoupením ethanolu klesá i průměrná doba života $NpOH$.

Tab. 2 Doba života t_i a relativní procentuální zastoupení A_i , $NpOH$ a NpO^- α -naftolu v různých rozpouštědlech.

EtOH (%)	$NpOH$							NpO^-						
	t_1 (ns)	t_2 (ns)	t_3 (ns)	A_1	A_2	A_3	t průměr (ns)	t_1 (ns)	t_2 (ns)	t_3 (ns)	A_1	A_2	A_3	t průměr (ns)
100	-	1,69	3,22	-	1,39	98,61	3,20	-	3,72	8,74	-	59,70	40,30	5,74
90	-	1,13	1,93	-	91,48	18,52	1,39	-	2,12	9,70	-	20,85	79,15	8,12
80	-	0,84	2,39	-	94,39	5,61	0,93	-	2,04	10,36	-	13,38	86,62	9,25
70	-	0,64	3,16	-	96,71	3,29	0,72	-	1,76	10,59	-	8,32	91,68	9,86
60	-	0,55	4,02	-	97,47	2,53	0,64	-	1,83	10,69	-	7,22	92,78	10,05
50	-	0,47	3,73	-	97,29	2,71	0,56	-	1,60	10,54	-	5,57	94,43	10,04
40	0,28	0,7	7,59	78,39	10,51	2,1	0,45	0,09	2,99	10,12	2,40	3,07	94,53	9,66
20	0,13	0,66	7,3	92,78	3,95	3,27	0,39	0,06	3,24	8,97	1,96	1,10	96,95	8,73
10	0,06	0,64	7,19	95,02	2,44	2,54	0,26	0,08	4,16	8,55	1,68	0,76	97,56	8,37
0	0,05	0,83	8,09	98,42	2,48	1,10	0,16	0,08	6,77	-	5,25	94,75	-	6,41
DMSO	-	1,87	3,71	-	0,30	99,7	3,70	0,23	3,69	11,08	1,38	94,15	4,48	3,97
Chloroform	0,20	1,04	4,38	90,39	5,9	3,70	0,40	-	-	-	-	-	-	-

5.1.1 Studium systému hyaluronan – CTAB

Byla zaznamenávána emisní spektra a doba života fluorescenční sondy α -naftolu v systému hyaluronan – CTAB. Koncentrace hyaluronanu byla konstantní $7 \text{ mg}\cdot\text{dm}^{-3}$ ve třech molekulových hmotnostech, a to 300 kDa, 1 MDa a 1,75 MDa. Koncentrace CTAB se postupně zvyšovala, a to od $1\cdot 10^{-6}$ až po $2\cdot 10^{-2} \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$. Kritická micelární koncentrace CTAB se pohybuje v rozmezí od $0,92\cdot 10^{-3}$ do $1,0\cdot 10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ [45].

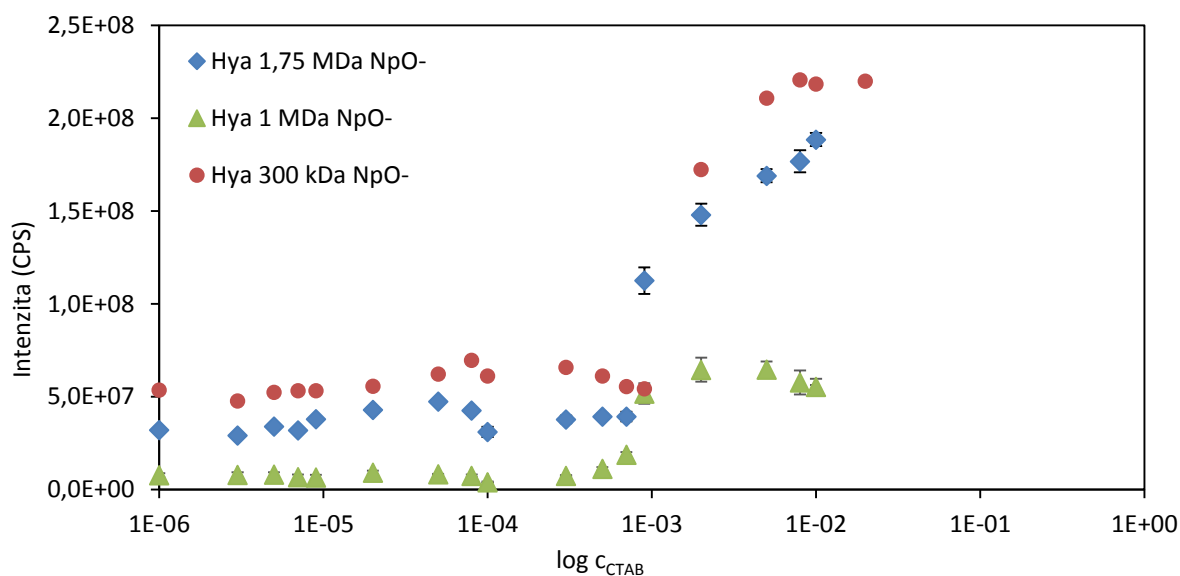
Dále byl studován vliv změny koncentrace 1,75 MDa hyaluronanu na deprotonační charakteristiky α -naftolu v roztocích micelárního koloidu o koncentraci CTAB $3\cdot 10^{-3}$, $5\cdot 10^{-3}$, $7\cdot 10^{-3}$, $1\cdot 10^{-2}$ a $2\cdot 10^{-2} \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$. Koncentrace hyaluronanu se pro každou sadu CTAB pohybovala od 0 do $15 \text{ mg}\cdot\text{dm}^{-3}$.

5.1.1.1 Ustálená fluorescence

Graf níže (viz **Obr. 26**) zobrazuje závislost intenzity fluorescence (NpO^-) α -naftolu na rostoucí koncentraci tenzidu v systému hyaluronan – CTAB. Intenzita deprotonované aniontové formy molekuly α -naftolu se až do koncentrace $1\cdot 10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ tenzidu neměnila. Jak bylo uvedeno výše, tato hodnota koncentrace je i kritickou micelární koncentrací CTAB. Fluorescenční sonda se solubilizuje do Sternovy vrstvy vznikajícího komplexu hyaluronan – CTAB. V tomto komplexu je fluorofor ovlivněn vyšší hydratací micelárního komplexu, což se projevuje velkým nárůstem aniontové formy molekuly pro všechny tři molekulové hmotnosti hyaluronanu. Solubilizaci sondy do komplexu indikuje i posuv pozice emisního maxima (viz **Tab. 3**), kdy oproti měření α -naftolu v čisté vodě vykazují roztoky po dosažení kritické micelární koncentrace hypsochromní posuv o 12 nm v průměru pro všechny tři molekulové hmotnosti hyaluronanu.

U vzorků obsahujících hyaluronan o molekulové hmotnosti 1 MDa docházelo jak k menšímu nárůstu intenzity NpO^- (viz **Obr. 26**), tak i k menšímu posuvu pozice emisního maxima pro největší koncentraci CTAB (viz **Tab. 3**) oproti 1,75MDa a 300kDa hyaluronanu. U této molekulové hmotnosti hyaluronanu je fluorofor pravděpodobně hydratován v menší míře a nedochází k tak výraznému začleňování do komplexu hyaluronan – CTAB jak je tomu v případě ostatních dvou molekulových hmotností.

V tabulce (viz **Tab. 3**) jsou také uvedeny disociační konstanty pK_a^* . V roztoku neobsahující přidaný tenzid vykazuje α -naftol výrazně kyselé vlastnosti, a to i proti prostředí čisté vody, kdy je hodnota pK_a^* téměř dvojnásobná. S rostoucí koncentrací CTAB pak dochází ke snižování kyselosti fluoroforu, kdy hodnota pK_a^* je oproti pK_a^* v čisté vodě až čtyřnásobná, nezávisle na molekulové hmotnosti hyaluronanu. V porovnání se systémem PSS – CTAB (viz kapitola **5.1.3.1 Tab. 9**) dosahovaly pK_a^* celkově vyšších hodnot. Pro nejvyšší koncentraci CTAB činila hodnota pK_a^* 2,09. Podobných hodnot pK_a^* , jako v případě PSS, dosahovaly vzorky ethanolu (viz kapitola **5.1 Tab. 1**). Pro 80% ethanol činila hodnota pK_a^* 2,66. Dá se tedy přepokládat, že vlivem hydratačního obalu hyaluronanu dochází k mírnému nárůstu pK_a^* fluoroforu uvnitř Sternovy vrstvy komplexu hyaluronan – CTAB.

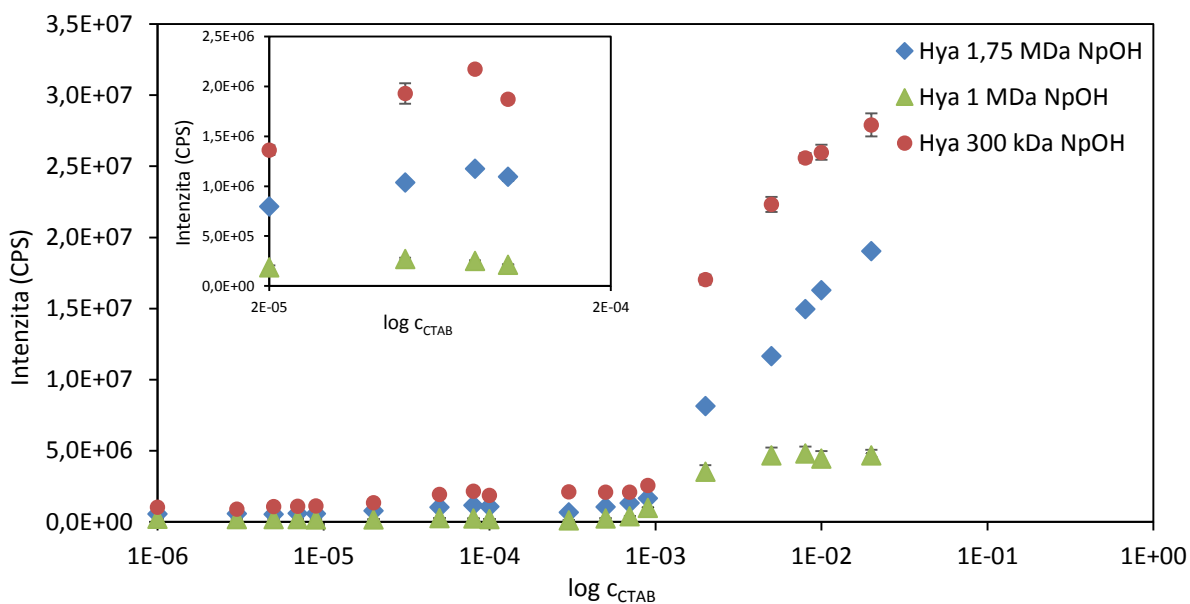


Obr. 26 Závislost intenzity NpO^- α -naftolu v komplexu hyaluronan – CTAB na logaritmu koncentrace CTAB. Intenzita aniontové formy pro 1,75MDa hyaluronan (\blacklozenge), pro 1MDa hyaluronan (\blacktriangle) a pro hyaluronan o molekulové hmotnosti 300 kDa (\bullet).

Tab. 3 Pozice emisních maxim aniontové formy α -naftolu v systému hyaluronan – CTAB a disociační konstanty v excitovaném stavu, pK_a^* .

c_{CTAB} ($\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$)	Hya 1,75MDa	pK_a^*	Hya 1 MDa	pK_a^*	Hya 300 kDa	pK_a^*	
	λ_{em} (nm)		λ_{em} (nm)		λ_{em} (nm)		
0	471	0,18	472	0,13	470	0,22	
$1\cdot 10^{-6}$	471	0,27	471	0,27	470	0,22	
$9\cdot 10^{-4}$	465	0,56	459	0,85	460	0,71	
$2\cdot 10^{-3}$	453	1,15	457	0,95	458	0,90	
$2\cdot 10^{-2}$	457	1,78	447	1,46	459	1,59	
Voda						468	0,41

Výrazná změna intenzity NpOH probíhala až po dosažení kritické micelární koncentrace CTAB (viz **Obr. 27**). Od této hodnoty koncentrace můžeme pozorovat výrazný narůstající trend intenzity NpOH . Největší nárůst můžeme pozorovat pro hyaluronan o molekulové hmotnosti 300 kDa. Dále pak menší, i když znatelný nárůst pro 1,75MDa hyaluronan a nejmenší nárůst intenzity NpOH vykazoval hyaluronan o molekulové hmotnosti 1 MDa. Tento trend koresponduje se začleňováním α -naftolu do Sternovy vrstvy. Pokud by docházelo pouze k začlenění fluoroforu do hydrofilních domén vznikajícího komplexu hyaluronanu a CTAB, fluorofor by byl ve velké míře deprotonován. Nedošlo by tedy k emisi neutrální formy nebo by byla její intenzita velmi nízká. Dá se předpokládat solubilizace fluoroforu do mezifázového rozhraní polymer/tenzid, kde vlivem hydratačního obalu hyaluronanu dochází k větší míře deprotonace fluoroforu, což se projevuje růstem intenzity NpO^- . Intenzita NpO^- je v takovém komplexu větší, než v čisté vodě. Dochází také k zatlačování části fluoroforu do hydrofobní části micel CTAB, z čehož plyne i nárůst intenzity NpOH .

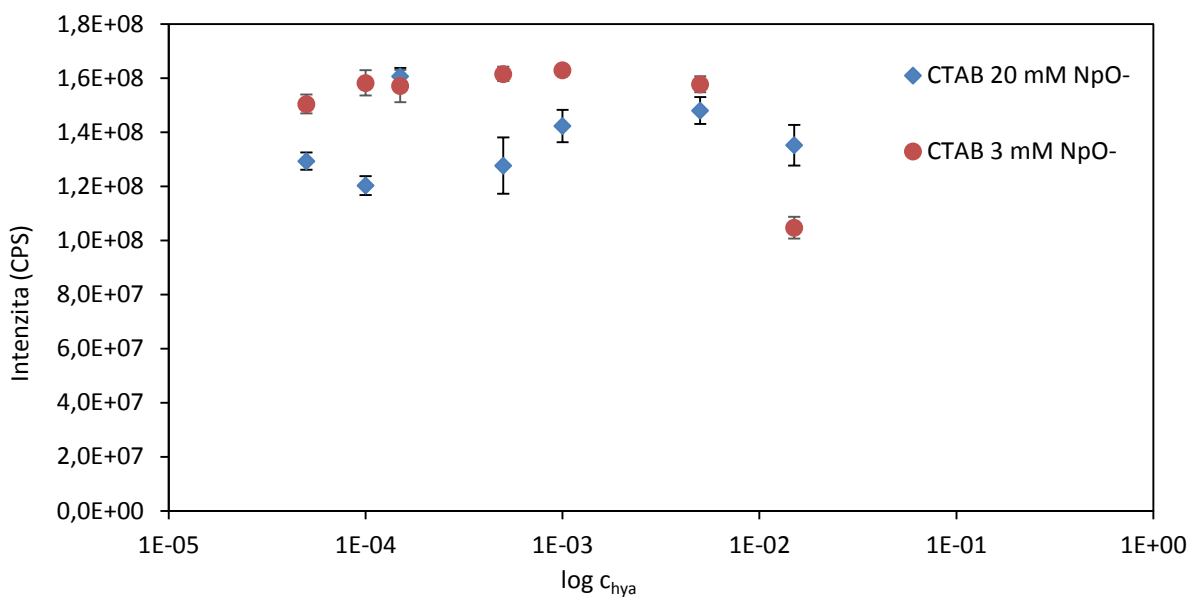


Obr. 27 Závislost intenzity NpOH α -naftolu v komplexu hyaluronan – CTAB na logaritmu koncentrace CTAB. Intenzita neutrální formy pro 1,75MDa hyaluronan (\blacklozenge), pro 1MDa hyaluronan (\blacktriangle) a pro hyaluronan o molekulové hmotnosti 300 kDa (\bullet). Vložený graf zobrazuje výše koncentrací od $3 \cdot 10^{-5}$ do $1 \cdot 10^{-4}$ mol·dm $^{-3}$.

Vložený graf (viz **Obr. 27**) zobrazuje malý nárůst intenzity NpOH ještě před dosažením kritické micelární koncentrace, s maximem u koncentrace $8 \cdot 10^{-5}$ mol·dm $^{-3}$ CTAB. Poté dochází s rostoucí koncentrací k mírnému poklesu k hodnotě $1 \cdot 10^{-4}$ mol·dm $^{-3}$. Pro koncentraci CTAB menší a větší než $1 \cdot 10^{-4}$ mol·dm $^{-3}$ dochází k růstu intenzity NpOH, můžeme tedy tuto koncentraci CTAB považovat za kritickou agregační koncentraci ve vztahu s hyaluronanem o koncentraci 7 mg·dm $^{-3}$.

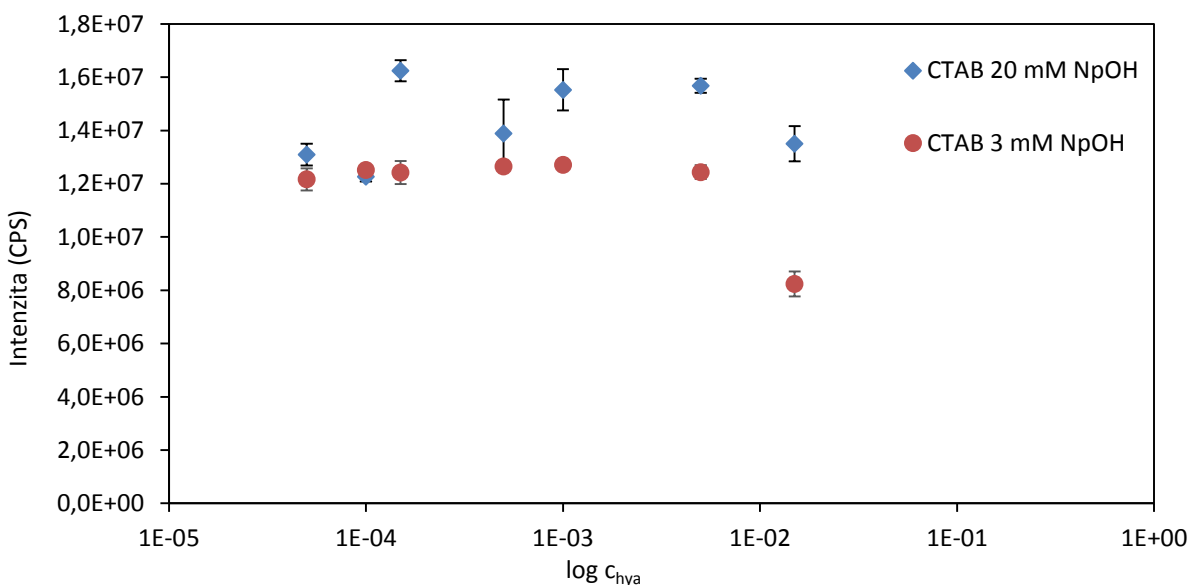
Emisní spektra jednotlivých molekulových hmotností hyaluronanu jsou pro přehlednost uvedena v příloze: 1,75MDa hyaluronan viz příloha **Obr. 48**, 1MDa hyaluronan viz příloha **Obr. 49** a 300kDa hyaluronan viz příloha **Obr. 50**.

Změna koncentrace 1,75 MDa hyaluronanu v micelárním systému CTAB neměla velký vliv na změnu emisních charakteristik α -naftolu. Pro přehlednost zobrazují grafy pouze minimální a maximální použitou koncentraci CTAB a to $3 \cdot 10^{-3}$ a $2 \cdot 10^{-2}$ mol·dm $^{-3}$ (viz **Obr. 28**). Z grafu vyplývá pouze malý pokles intenzity NpO $^{-}$, a to až v případě dosažení maximální koncentrace hyaluronanu 15 mg·dm $^{-3}$ jak pro CTAB o koncentraci $3 \cdot 10^{-3}$ mol·dm $^{-3}$, tak i pro $2 \cdot 10^{-2}$ mol·dm $^{-3}$. Tento pokles může být způsoben rostoucí viskozitou roztoku. Celkově se intenzita NpO $^{-}$ neměnila ani pro ostatní koncentrace CTAB, jejíž grafy jsou uvedeny v příloze (viz příloha **Obr. 51**).



Obr. 28 Závislost intenzity NpO^- na koncentraci hyaluronanu (1,75 MDa) pro CTAB o koncentraci $3 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ (3 mM) a $2 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ (20 mM).

Výrazně se neměnila ani intenzita $NpOH$. V závislosti na rostoucí koncentraci hyaluronanu se neměnila lokalizace fluoroforu ani nedocházelo k jeho větší solubilizaci do hydrofobních domén komplexu hyaluronan – CTAB. Stejně jako v případě intenzit aniontové formy, i pro neutrální formu jsou v grafu uvedeny pouze koncentrace $3 \cdot 10^{-3}$ a $2 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ CTAB (viz **Obr. 29**). Pro ostatní koncentrace CTAB, které vykazují stejný trend, jsou grafy uvedeny v příloze (viz příloha **Obr. 52**).



Obr. 29 Závislost intenzity $NpOH$ na koncentraci hyaluronanu (1,75 MDa) pro CTAB o koncentraci $3 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ (3 mM) a $2 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ (20 mM).

5.1.1.2 Časově rozlišená fluorescence

Byla měřena časově rozlišená fluorescence neutrální a aniontové formy molekuly α -naftolu v systému hyaluronan – CTAB. Výsledné vyhasínací křivky byly vyhodnoceny proložením tři-exponenciální funkcí (viz kapitola 4.3.1). Z takto získaných dob života jednotlivých forem neutrální formy fluoroforu byla vypočtena deprotonační konstanta k_{pt} (viz kapitola 4.3.3). Jak můžeme vidět z tabulky (viz Tab. 4), s rostoucí koncentrací tenzidu CTAB dochází k mírnému nárůstu průměrné doby života aniontové formy NpO^- , a to ještě před dosažením kritické micelární koncentrace. Průměrná doba života NpO^- při dosažení kritické micelární koncentrace je dvojnásobná oproti vzorkům s nízkou koncentrací CTAB, tj. $1,9 \cdot 10^{-8}$ s. S dalším nárůstem koncentrace CTAB stoupá hodnota průměrné doby života NpO^- k hodnotě okolo $2 \cdot 10^{-8}$ s. K nárůstu průměrné doby života NpO^- ovšem dochází i v samotných micelách CTAB, aniontová forma fluoroforu NpO^- není hyaluronanem příliš ovlivněna [63].

U neutrální formy fluoroforu $NpOH$, respektive u deprotonační konstanty k_{pt} , je již patrný vliv hyaluronanu. Deprotonační konstanta vykazuje výraznou změnu až při dosažení kritické micelární koncentrace. Je třeba říci, že tento skokový pokles deprotonační konstanty k_{pt} , a s tím spojené zpomalení přenosu protonu, se u jednotlivých molekulových hmotností hyaluronanu liší. Pro hyaluronan o molekulové hmotnosti 1,75 MDa dochází k výrazné změně k_{pt} při dosažení koncentrace $2,0 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Při této koncentraci činí hodnota k_{pt} $4,19 \cdot 10^{-9} \text{ s}^{-1}$ oproti hodnotě $16,61 \cdot 10^{-9} \text{ s}^{-1}$ pro počáteční koncentraci CTAB. Pro koncentraci CTAB $2,0 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ činí hodnota deprotonační konstanty $3,98 \cdot 10^{-9} \text{ s}^{-1}$. U hyaluronanu o molekulové hmotnosti 1 MDa je výrazný pokles k_{pt} posunut ke koncentraci $7,0 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Pro tuto koncentraci dosahuje k_{pt} hodnoty $9,77 \cdot 10^{-9} \text{ s}^{-1}$ a po dosažení kritické micelární koncentrace dochází k dalšímu poklesu, a to na hodnotu $2,04 \cdot 10^{-9} \text{ s}^{-1}$. S rostoucí koncentrací CTAB se deprotonační konstanta v systému 1 MDa hyaluronanu a CTAB výrazně nemění. Pro 300kDa hyaluronan je poklesu k_{pt} docíleno již při koncentraci $8,0 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, kdy hodnota této deprotonační konstanty činí $7,90 \cdot 10^{-9} \text{ s}^{-1}$ a po dosažení kritické micelární koncentrace klesá na hodnotu $5,25 \cdot 10^{-9} \text{ s}^{-1}$.

U vzorků s nejvyšší koncentrací CTAB, tedy $2,0 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, je patrný výrazný vliv hydratačního obalu hyaluronanu. Zatímco pro hyaluronan o molekulové hmotnosti 1,75 MDa a 300 kDa dosahuje hodnota k_{pt} $3,98 \cdot 10^{-9} \text{ s}^{-1}$ a $4,16 \cdot 10^{-9} \text{ s}^{-1}$, u systému s hyaluronanem 1MDa činí k_{pt} pouze $1,82 \cdot 10^{-9} \text{ s}^{-1}$. V porovnání se systémem PSS – CTAB, kde hodnoty k_{pt} činí $2,20 \cdot 10^{-9} \text{ s}^{-1}$ pro 70kDa PSS a $1,70 \cdot 10^{-9} \text{ s}^{-1}$ pro 1MDa PSS (viz kapitola 5.1.3), jsou hodnoty k_{pt} u hyaluronanu téměř dvakrát vyšší. Stejně hodnoty k_{pt} jako v systému PSS – CTAB se vyskytují i v případě roztoku 80% methanolu, kde hydratace fluoroforu není předpokládána [63]. Dá se tedy předpokládat vliv hyaluronanu na hydrataci fluoroforu ve Sternově vrstvě komplexu hyaluronan – CTAB. Je třeba říci, že u hyaluronanu o molekulové hmotnosti 1 MDa se hodnoty k_{pt} příliš neliší od k_{pt} v systému PSS – CTAB. Nízká míra hydratačních vlastností této molekulové hmotnosti se projevila i v měření ustálené fluorescence (viz kapitola 5.1.1.1), kde se intenzita NpO^- výrazně lišila oproti ostatním molekulovým hmotnostem hyaluronanu, tedy 1,75 MDa a 300 kDa.

Tab. 4 Průměrné doby života α -naftolu a deprotonační konstanty k_{pt} v systému hyaluronanu o molekulové hmotnosti 1,75 MDa, 1 MDa a 300 kDa v CTAB.

CCTAB (M)	Hya 1,75 MDa			Hya 1 MDa			Hya 300 kDa		
	NpOH		NpO ⁻	NpOH		NpO ⁻	NpOH		NpO ⁻
	t průměr	$k_{pt} \cdot 10^{-9}$	t průměr	t průměr	$k_{pt} \cdot 10^{-9}$	t průměr	t průměr	$k_{pt} \cdot 10^{-9}$	t průměr
	(ns)	(s ⁻¹)	(ns)	(ns)	(s ⁻¹)	(ns)	(ns)	(s ⁻¹)	(ns)
0	0,71	16,54	7,99	0,55	15,10	7,97	0,07	32,99	9,96
1·10 ⁻⁶	0,55	16,61	7,99	0,34	17,31	7,95	0,38	16,28	8,02
3·10 ⁻⁶	0,04	52,57	7,99	1,04	23,92	7,95	0,56	8,83	8,02
5·10 ⁻⁶	0,04	52,58	8,00	1,45	17,47	7,94	0,33	19,45	8,02
7·10 ⁻⁶	0,05	27,00	7,98	0,98	30,65	7,97	0,22	24,48	8,12
9·10 ⁻⁶	0,06	27,00	8,39	0,35	24,44	7,99	0,41	16,07	8,12
2·10 ⁻⁵	0,06	26,96	8,68	0,87	15,78	8,17	0,36	13,78	8,54
5·10 ⁻⁵	0,58	7,24	9,77	0,71	11,56	9,33	0,34	11,85	9,14
8·10 ⁻⁵	0,03	39,99	9,42	0,44	18,64	9,45	0,29	7,90	9,07
1·10 ⁻⁴	0,02	41,66	9,61	0,45	19,35	9,55	0,29	8,58	9,32
3·10 ⁻⁴	0,02	41,66	8,35	0,44	25,24	8,47	0,46	6,69	8,32
5·10 ⁻⁴	0,02	41,66	10,04	0,19	25,26	9,32	0,26	8,64	9,81
7·10 ⁻⁴	0,03	39,98	10,09	0,59	9,77	9,73	0,20	9,54	10,48
9·10 ⁻⁴	0,03	39,96	10,10	0,59	6,67	12,48	0,21	4,98	10,72
2·10 ⁻³	0,59	4,19	19,19	0,85	2,04	19,19	0,48	5,25	18,95
5·10 ⁻³	0,76	2,28	20,22	0,89	2,06	20,25	0,44	7,32	19,51
8·10 ⁻³	0,28	3,67	20,31	0,87	1,90	20,32	0,25	5,28	20,12
1·10 ⁻²	0,65	4,44	20,36	0,88	2,10	20,36	0,57	4,54	20,25
2·10 ⁻²	0,25	3,98	20,48	0,89	1,82	20,47	0,58	4,16	20,75

Sledování vlivu hyaluronanu na deprotonační charakteristiky α -naftolu v micelárním systému $3 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ a $2 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ CTAB nevykazovaly velké změny pro jednotlivé koncentrace hyaluronanu o molekulové hmotnosti 1,75 MDa. Jak můžeme vidět v tabulce (viz **Tab. 5**) průměrná doba života neutrální formy NpOH zůstává neměnná pro jednotlivé koncentrace hyaluronanu. Pro systém $3 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ CTAB činí průměrná doba života NpOH 0,8 ns, ovšem pro systém $2 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ CTAB se tato hodnota pohybuje okolo 1,4 ns. Tento rozdíl pro jednotlivé koncentrace CTAB koresponduje i s rozdílem deprotonačních konstant k_{pt} , kdy vlivem velké koncentrace tenzidu dochází ke zpomalení přenosu protonů, a tím i nárůstu průměrné doby života NpOH. Dále je u $3 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ CTAB relativně menší doba života NpO⁻ oproti koncentraci $2 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. S tím, jak se fluorofor solubilizuje do Sternovy vrstvy komplexu hyaluronan – CTAB, dochází při vysoké koncentraci CTAB k větší míře solubilizace fluoroforu, což se projevuje i na mírném snižování deprotonační konstanty k_{pt} .

Tab. 5 Průměrné doby života α -naftolu a deprotonační konstanty k_{pt} v systému hyaluronanu o molekulové hmotnosti 1,75 MDa s CTAB o koncentraci $3 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ (3 mM) a $2 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ (20 mM).

$C_{\text{Hyaluronan}}$ ($\text{g} \cdot \text{dm}^{-3}$)	3 mM CTAB			20 mM CTAB		
	NpOH		NpO ⁻	NpOH		NpO ⁻
	t průměr	$k_{pt} \cdot 10^{-9}$	t průměr	t průměr	$k_{pt} \cdot 10^{-9}$	t průměr
	(ns)	(s ⁻¹)	(ns)	(ns)	(s ⁻¹)	(ns)
0	0,84	2,08	19,23	1,42	1,67	19,24
$5,0 \cdot 10^{-5}$	0,88	2,04	19,05	1,43	1,67	19,32
$1,0 \cdot 10^{-4}$	0,82	2,08	18,96	1,34	1,72	26,76
$1,5 \cdot 10^{-4}$	0,79	2,27	18,77	1,25	1,76	28,36
$5,0 \cdot 10^{-4}$	0,84	2,04	18,94	1,37	1,73	21,02
$1,0 \cdot 10^{-3}$	0,81	2,12	18,88	1,37	1,63	25,45
$5,0 \cdot 10^{-3}$	0,83	2,08	18,92	1,30	1,78	24,32
$1,5 \cdot 10^{-2}$	0,86	2,04	19,18	1,29	1,96	20,84

5.1.2 Studium systému hyaluronan – Septonex

Dále byla měřena emisní spektra a doba života fluorescenční sondy α -naftolu v systému hyaluronan – Septonex. Koncentrace hyaluronanu byla konstantní, a to $7 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ ve třech molekulových hmotnostech 300 kDa, 1 MDa a 1,75 MDa. Koncentrace Septonexu se postupně zvyšovala, a to od $1 \cdot 10^{-6}$ až do $2 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Kritická micelární koncentrace Septonexu činí až $3,6 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ [45].

Dále byl studován vliv změny koncentrace 1,75MDa hyaluronanu na deprotonační charakteristiky α -naftolu v roztocích micelárního koloidu Septonexu o koncentraci $3 \cdot 10^{-3}$, $5 \cdot 10^{-3}$, $7 \cdot 10^{-3}$, $1 \cdot 10^{-2}$ a $2 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Koncentrace hyaluronanu se pro každou sadu Septonexu pohybovala od 0 do $15 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$.

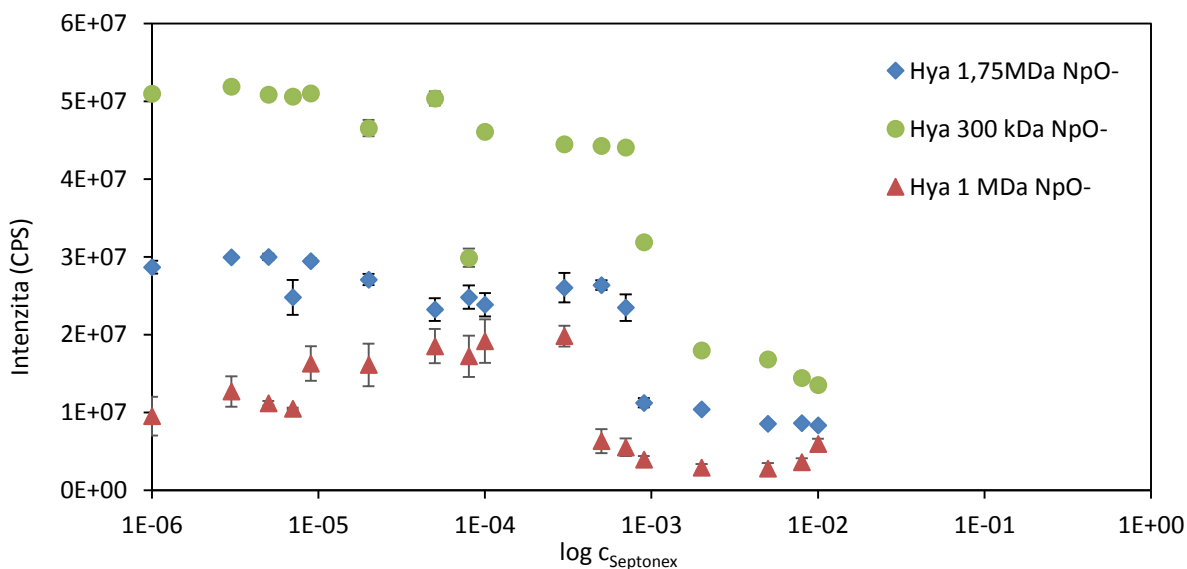
5.1.2.1 Ustálená fluorescence

Graf uvedený níže (viz **Obr. 30**) zobrazuje závislost intenzity fluorescence α -naftolu na rostoucí koncentraci tenzidu v systému hyaluronan – Septonex. Intenzita NpO⁻ zůstává před dosažením kritické micelární koncentrace v podstatě neměnná. Jak již bylo uvedeno výše, kritická micelární koncentrace Septonexu činí $3,6 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, od této koncentrace můžeme pozorovat pokles intenzity NpO⁻. Tento pokles je pozorován u všech třech molekulových hmotností hyaluronanu. Fluorofor se v tomto případě solubilizuje do hydrofobních struktur vznikajících micel Septonexu, kde dochází ke zpomalení a zastavení přenosu protonů, protože zde chybí vhodný protonový akceptor. Tím pádem nedochází ke vzniku deprotonované aniontové formy molekuly α -naftolu. Solubilizaci do hydrofobních domén indikuje i změna pozice emisního maxima (NpO⁻), kdy dochází k hypsochromnímu posuvu vlnové délky maxima průměrně o 22 nm oproti čisté vodě (viz **Tab. 6**).

V tabulce (viz **Tab. 6**) jsou také uvedeny disociační konstanty pK_a^* . Až do dosažení kritické micelární koncentrace nevykazují disociační konstanty přílišnou změnu. Při koncentraci Septonexu $2 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ dochází zhruba k dvojnásobnému nárůstu hodnoty pK_a^* oproti vzorkům bez přidaného tenzidu. Pro maximální koncentraci Septonexu docházelo k výraznému

snížení kyselosti fluoroforu. Hodnota pK_a^* při koncentraci $2 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ Septonexu je až šestinásobná oproti vzorkům bez přidaného tenzidu. Ve srovnávacím systému PSS – Septonex (viz kapitola **5.1.4 Tab. 11**) dosahovaly pK_a^* podobných hodnot jako v systému hyaluronan – Septonex. Pro nejvyšší koncentraci Septonexu činila hodnota pK_a^* v systému PSS – Septonex průměrně 2,35. Ovšem před dosažením kritické micelární koncentrace byly hodnoty pK_a^* téměř dvakrát větší v porovnání s hodnotami pK_a^* u systému hyaluronan – Septonex. Tento rozdíl může značit vliv hydratačních vlastností hyaluronanu na fluorofor. Ovšem s rostoucí koncentrací Septonexu docházelo k solubilizaci fluoroforu do hydrofobních částí micel, kde již nebyly hydratační vlastnosti hyaluronanu příliš patrné.

Z Grafu (viz **Obr. 30**) je také patrný rozdíl emisních charakteristik pro jednotlivé molekulové hmotnosti hyaluronanu. Největší intenzitu NpO^- vykazoval hyaluronan o molekulové hmotnosti 300 kDa. Pro nízké koncentrace Septonexu byl i velký rozdíl mezi intenzitou NpO^- u 1MDa a 1,75MDa hyaluronanu. Ovšem s rostoucí koncentrací Septonexu docházelo k mírnému nárůstu intenzity NpO^- u 1MDa hyaluronanu. Těsně před dosažením kritické micelární koncentrace byla intenzita NpO^- 1MDa hyaluronanu srovnatelná s intenzitou vzorků o molekulové hmotnosti 1,75 MDa. Rozdílné chování sondy vlivem změny molekulové hmotnosti hyaluronanu značí možnou odlišnost vznikajícího komplexu hyaluronan – Septonex pro jednotlivé molekulové hmotnosti.

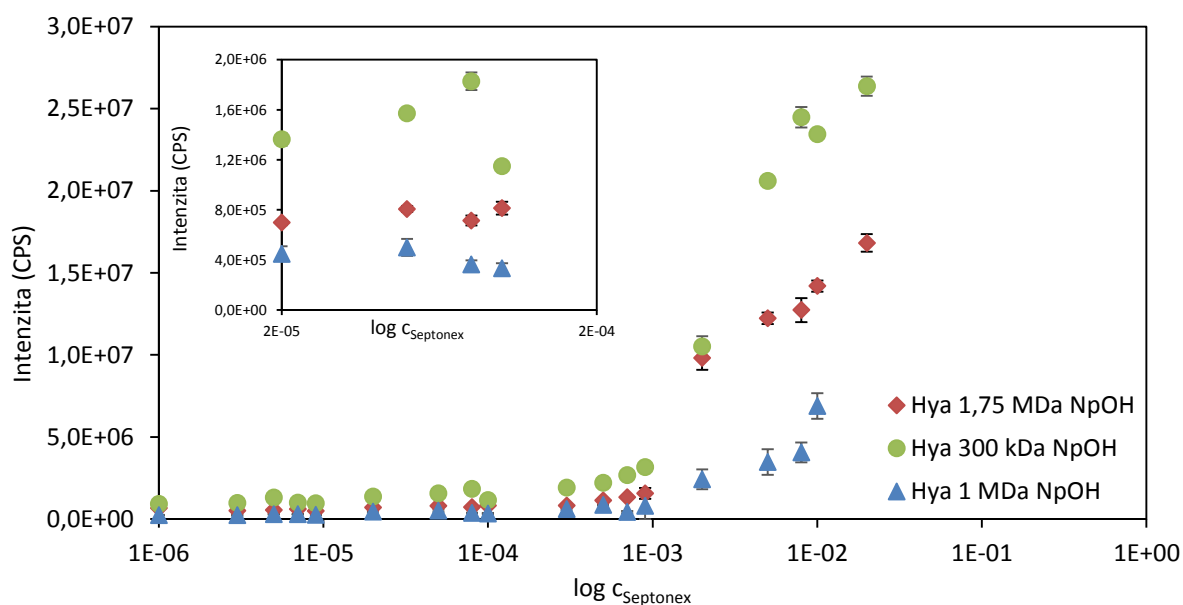


Obr. 30 Závislost intenzity NpO^- α -naftolu v komplexu hyaluronan – Septonex na logaritmu koncentrace Septonexu. Intenzita neutrální formy pro 1,75MDa hyaluronan (\blacklozenge), pro 1MDa hyaluronan (\blacktriangle) a pro hyaluronan o molekulové hmotnosti 300 kDa (\bullet).

Tab. 6 Pozice emisních maxim aniontové formy α -naftolu v systému hyaluronan – Septonex a disociační konstanty v excitovaném stavu, pK_a^* .

C_{Septonex} ($\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$)	Hya 1,75MDa	pK_a^*	Hya 1 MDa	pK_a^*	Hya 300 kDa	pK_a^*
	λ_{em} (nm)		λ_{em} (nm)		λ_{em} (nm)	
0	470	0,32	469	0,36	470	0,32
$1\cdot 10^{-6}$	470	0,32	466	0,51	470	0,32
$9\cdot 10^{-4}$	470	0,32	468	0,41	471	0,27
$2\cdot 10^{-3}$	458	1,00	462	0,80	466	0,60
$2\cdot 10^{-2}$	451	1,99	442	2,46	445	2,30
Voda	468					0,41

Stejně jako v případě změny intenzity NpO^- i změna intenzity NpOH α -naftolu probíhala až po dosažení kritické micelární koncentrace Septonexu (viz **Obr. 31**). Solubilizaci α -naftolu do hydrofobních částí micel Septonexu naznačuje i trend nárůstu intenzity NpOH . V hydrofobním prostředí nedochází k již zmíněné deprotonaci a sonda emituje pouze jako neutrální molekula. I zde je patrný vliv molekulové hmotnosti na výslednou intenzitu emisního záření. Největší intenzitu vykazoval fluorofor v případě hyaluronanu o molekulové hmotnosti 300 kDa. Nejmenší intenzitu a i malý trend růstu intenzity NpOH vykazovaly vzorky obsahující 1MDa hyaluronan.



Obr. 31 Závislost intenzity NpOH α -naftolu v komplexu hyaluronan – Septonex na logaritmu koncentrace Septonexu. Intenzita neutrální formy pro 1,75MDa hyaluronan (\blacklozenge), pro 1MDa hyaluronan (\blacktriangle) a pro hyaluronan o molekulové hmotnosti 300 kDa (\bullet). Vložený graf zobrazuje výšeč koncentrací od $2\cdot 10^{-5}$ až $2\cdot 10^{-4}$ $\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$.

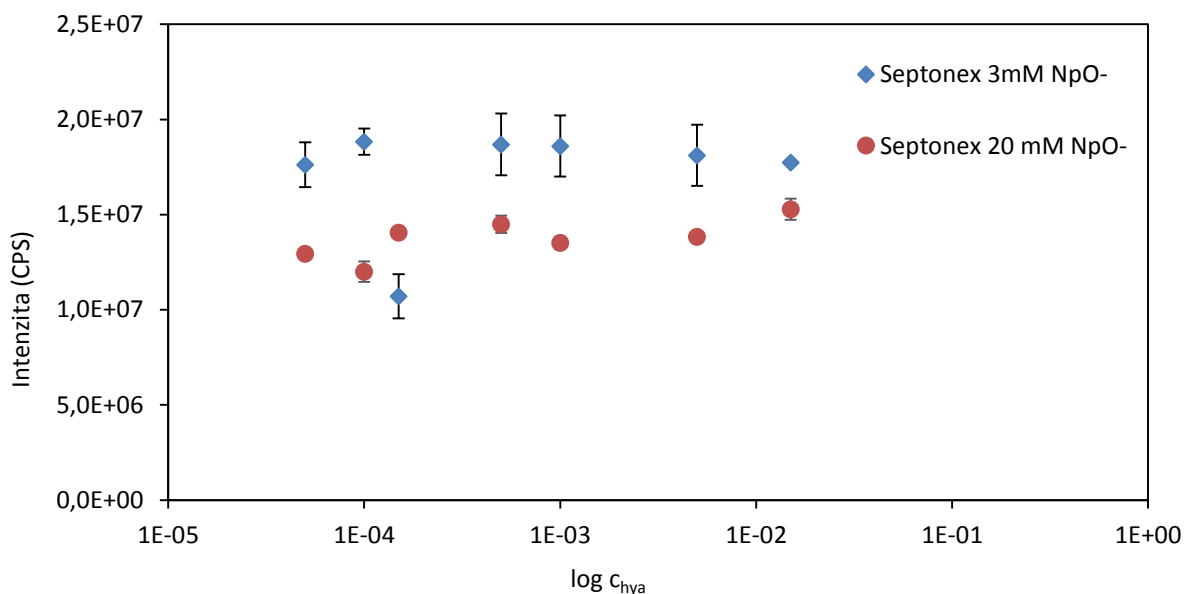
Ve vloženém grafu (viz **Obr. 31**) je uvedena výšeč koncentrací Septonexu v rozmezí $2\cdot 10^{-5}$ až $2\cdot 10^{-4}$ $\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$, kde je patrný mírný nárůst intenzity NpOH ještě před dosažením kritické micelární koncentrace. Pro koncentrace Septonexu menší a větší, než je koncentrace $1\cdot 10^{-4}$ $\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ pro hyaluronan o molekulové hmotnosti 300 kDa a 1 MDa a $8\cdot 10^{-5}$ $\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$

pro 1,75MDa hyaluronan, roste intenzita NpOH. Tyto koncentrace Septonexu můžeme tedy považovat za kritické agregační koncentrace ve vztahu s hyaluronanem o koncentraci $7 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$.

Emisní spektra jednotlivých molekulových hmotností hyaluronanu jsou pro přehlednost uvedena v příloze: 1,75MDa hyaluronan viz příloha **Obr. 53**, 1MDa hyaluronan viz příloha **Obr. 54** a 300kDa hyaluronan viz příloha **Obr. 55**.

Přídavek 1,75MDa hyaluronanu do micelárního systému Septonexu neměl velký vliv na změnu emisních charakteristik α -naftolu. Pro přehlednost zobrazují grafy pouze minimální a maximální použitou koncentraci Septonexu, a to $3 \cdot 10^{-3}$ a $2 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ (viz **Obr. 32**). Je zde ovšem velký vliv celkové koncentrace tenzidu. Jak můžeme pozorovat z grafu níže, celková intenzita NpO^- se pro vzorky koncentrace Septonexu $3 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ výrazně liší od koncentrace $2 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Vzhledem k tomu, že se fluorofor solubilizuje do hydrofobního středu vzniklých micel, vyšší koncentrace tenzidu představuje vyšší pravděpodobnost, že fluorofor nebude mít ve své blízkosti vhodný akceptor protonu. S rostoucí koncentrací pak klesá intenzita deprotonovaného fluoroforu.

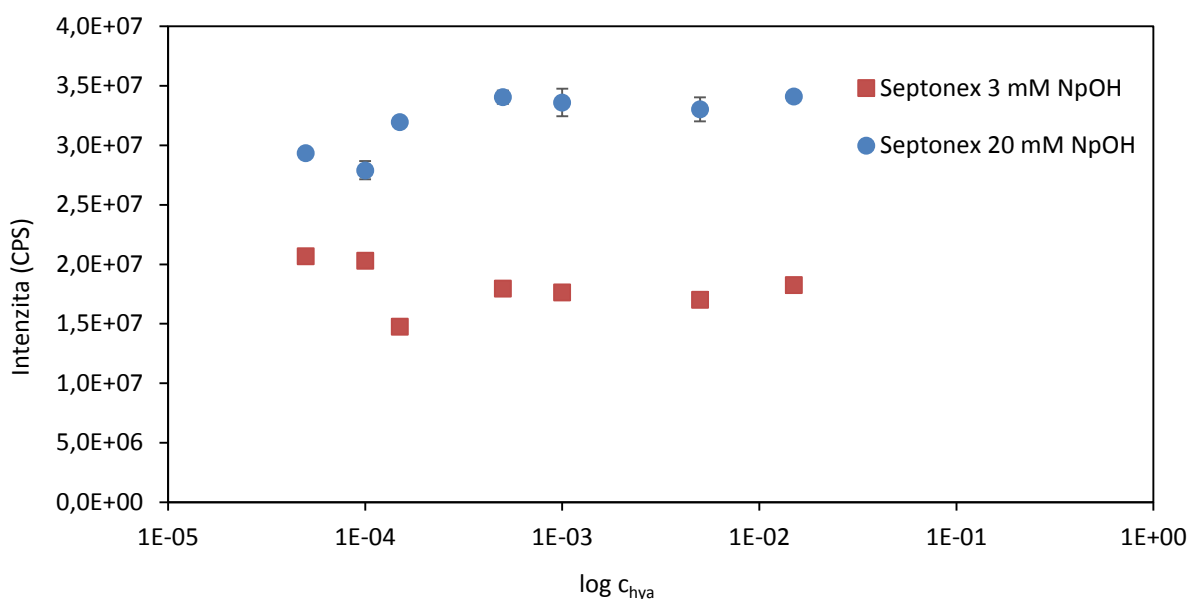
Pro přehlednost jsou grafy zbývajících koncentrací uvedeny v příloze (viz příloha **Obr. 56**).



Obr. 32 Závislost intenzity NpO^- na koncentraci hyaluronanu (1,75 MDa) pro Septonex o koncentraci $3 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ (3 mM) a $2 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ (20 mM).

Intenzita NpOH se s rostoucí koncentrací hyaluronanu o molekulové hmotnosti 1,75 MDa neměnila (viz **Obr. 33**). I zde můžeme pozorovat znatelný rozdíl mezi vzorky o celkové koncentraci Septonexu, kdy s rostoucí koncentrací tenzidu se zvyšuje i množství sondy solublizující se do hydrofobní části vzniklých micel. Tím nedochází k emitaci aniontové formy NpO^- , ale zvyšuje se intenzita neutrální formy fluoroforu NpOH.

Stejně jako v případě intenzit aniontové formy i pro neutrální formu jsou v grafu uvedeny pouze koncentrace $3 \cdot 10^{-3}$ a $2 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ Septonexu. Pro ostatní koncentrace Septonexu, které vykazují stejný trend, jsou grafy uvedeny v příloze (viz příloha **Obr. 57**).



Obr. 33 Závislost intenzity NpOH na koncentraci hyaluronanu (1,75 MDa) pro Septonex o koncentraci $3 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ (3 mM) a $2 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ (20 mM).

5.1.2.2 Časově rozlišená fluorescence

Byla měřena časově rozlišená fluorescence neutrální a aniontové formy molekuly α -naftolu v systému hyaluronan – Septonex. Výsledné vyhasínací křivky byly vyhodnoceny proložením tři-exponenciální funkcí (viz kapitola 4.3.1). Z takto získaných dob života jednotlivých forem neutrální formy fluoroforu byla vypočtena deprotonační konstanta k_{pt} (viz kapitola 4.3.3). Z tabulky uvedené níže (viz Tab. 7) plyne mírný nárůst průměrné doby života neutrální formy NpOH až do maximální koncentrace Septonexu ($2 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$), se skokovým nárůstem při koncentracích okolo kritické micelární koncentrace. Pro nejvyšší koncentraci Septonexu je průměrná doba života NpOH téměř dvojnásobná oproti vzorkům o koncentraci před CAC, a to u všech tří molekulových hmotností hyaluronanu. Dá se ovšem přepokládat, že vlivem solubilizace fluoroforu do hydrofobních částí micel nemá hyaluronan, respektive jeho hydratační obal, velký vliv na hydrataci fluoroforu po dosažení kritické micelární koncentrace. Můžeme tak usuzovat i z hodnot deprotonačních konstant k_{pt} , které dosahovaly před dosažením kritické micelární koncentrace relativně vysokých hodnot. Při vyšší koncentraci, než je micelární, docházelo ke zpomalení přenosu protonů vlivem vznikajících struktur tenzidu, což se projevilo i snížením deprotonační konstanty. Pro nejvyšší koncentraci Septonexu činí hodnota k_{pt} $1,54 \cdot 10^{-9}$, $1,73 \cdot 10^{-9}$ a $3,58 \cdot 10^{-9} \text{ s}^{-1}$ pro hyaluronan o molekulové hmotnosti 1,75MDa, 1 MDa a 300 kDa. V porovnání se systémem PSS – Septonex, kde hodnoty k_{pt} činí $1,34 \cdot 10^{-9} \text{ s}^{-1}$ pro 70kDa PSS a $1,67 \cdot 10^{-9} \text{ s}^{-1}$ pro 1MDa PSS (viz kapitola 5.1.4), jsou hodnoty k_{pt} u hyaluronanu téměř totožné. Stejně hodnoty k_{pt} jako v systému PSS – Septonex se vyskytují i v případě roztoku 80% methanolu, kde není hydratace přepokládána [63]. Je třeba říci, že u hyaluronanu o molekulové hmotnosti 300 kDa jsou hodnoty k_{pt} pro nízké koncentrace Septonexu několikrát menší vůči ostatním dvěma molekulovým hmotnostem. Poklesu k_{pt} na hodnoty odpovídající micelárnímu komplexu je dosaženo až při koncentracích Septonexu za kritickou micelární koncentrací, s mírným poklesem při kritické agregační koncentraci. Pro nejvyšší koncentraci Septonexu je hodnota k_{pt} asi dvakrát větší v porovnání s ostatními

molekulovými hmotnostmi. Vliv rozdílné molekulové hmotnosti je patrný i v emisních spektrech, kde jak neutrální, tak aniontová forma fluoroforu ve vzorcích hyaluronanu o molekulové hmotnosti 300 kDa vykazovala vyšší intenzity emisního záření.

Průměrná doba života NpO^- po dosažení kritické micelární koncentrace klesá až čtyřikrát oproti koncentraci před kritickou micelární. Tento pokles je přisuzován solubilizaci do hydrofobních částí micel Septonexu a s tím spojené menší míry deprotonace fluoroforu.

Tab. 7 Průměrné doby života α -naftolu a deprotonační konstanty k_{pt} v systému hyaluronanu o molekulové hmotnosti 1,75 MDa, 1 MDa a 300 kDa v Septonexu.

C_{Septonex} ($\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$)	Hya 1,75 MDa			Hya 1 MDa			Hya 300 kDa		
	NpOH		NpO ⁻	NpOH		NpO ⁻	NpOH		NpO ⁻
	t průměr	$k_{\text{pt}}\cdot 10^{-9}$	t průměr	t průměr	$k_{\text{pt}}\cdot 10^{-9}$	t průměr	t průměr	$k_{\text{pt}}\cdot 10^{-9}$	t průměr
	(ns)	(s^{-1})	(ns)	(ns)	(s^{-1})	(ns)	(ns)	(s^{-1})	(ns)
0	1,04	22,77	7,96	0,52	28,62	8,01	0,36	8,72	7,77
$1\cdot 10^{-6}$	0,82	8,27	0,54	0,59	22,12	8,06	0,63	4,70	7,98
$3\cdot 10^{-6}$	0,80	26,86	7,96	1,07	14,35	7,92	0,40	8,63	7,96
$5\cdot 10^{-6}$	0,91	21,33	7,91	0,51	21,21	7,98	0,41	9,83	7,94
$7\cdot 10^{-6}$	0,45	14,63	8,02	0,46	23,72	7,94	0,28	12,34	7,93
$9\cdot 10^{-6}$	0,94	22,64	7,96	0,65	17,88	7,95	0,22	14,03	7,99
$2\cdot 10^{-5}$	1,21	13,92	7,91	1,06	10,95	7,88	0,21	16,40	7,91
$5\cdot 10^{-5}$	1,13	13,35	7,85	0,64	11,50	7,90	0,27	12,03	7,84
$8\cdot 10^{-5}$	0,67	20,28	7,79	0,47	21,32	0,49	0,09	48,38	7,83
$1\cdot 10^{-4}$	0,98	13,76	7,86	0,30	13,93	9,72	0,19	12,27	7,95
$3\cdot 10^{-4}$	0,61	18,04	7,83	0,37	13,86	9,95	0,12	11,01	7,8
$5\cdot 10^{-4}$	1,04	11,91	8,26	1,17	6,96	7,90	0,32	6,28	7,71
$7\cdot 10^{-4}$	2,29	5,51	7,74	2,36	9,17	7,70	0,05	24,86	7,71
$9\cdot 10^{-4}$	1,08	7,65	7,62	1,64	2,75	7,40	0,19	13,55	7,64
$2\cdot 10^{-3}$	2,97	1,23	5,06	1,49	1,79	5,38	0,39	10,28	6,52
$5\cdot 10^{-3}$	1,18	2,23	3,82	0,99	1,95	2,72	1,05	2,86	3,23
$8\cdot 10^{-3}$	1,25	1,80	3,00	1,03	1,93	2,22	1,07	2,01	2,52
$1\cdot 10^{-2}$	1,37	1,79	2,60	1,01	1,98	1,98	1,08	2,20	2,28
$2\cdot 10^{-2}$	2,01	1,54	2,14	1,20	1,73	1,34	1,08	3,58	1,85

Sledování vlivu hyaluronanu na deprotonační charakteristiky α -naftolu v micelárním systému $3\cdot 10^{-3}$ $\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ a $2\cdot 10^{-2}$ $\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ Septonexu nevykazovaly velké změny pro jednotlivé koncentrace hyaluronanu o molekulové hmotnosti 1,75 MDa (viz **Tab. 8**). U koncentrace Septonexu $3\cdot 10^{-3}$ $\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ můžeme ovšem pozorovat mírný pokles průměrné doby života NpOH z počátečních 3,70 ns na hodnotu 2,14 ns a s tím spojený mírný nárůst hodnoty deprotonační konstanty k_{pt} s rostoucí koncentrací hyaluronanu. U Septonexu o koncentraci $2\cdot 10^{-2}$ $\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ nepozorujeme žádný vliv rostoucí koncentrace hyaluronanu. Je třeba uvést, že je zde patrný výrazný rozdíl v deprotonačních charakteristikách fluoroforu pro jednotlivé koncentrace Septonexu. U $3\cdot 10^{-3}$ $\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ Septonexu je hodnota deprotonačních konstant k_{pt} téměř pětikrát menší než v případě koncentrace Septonexu

$2 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Taktéž průměrná doba aniontové formy NpO^- je v případě $3 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ koncentrace Septonexu dvojnásobná oproti vzorkům obsahujícím $2 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ Septonex.

Tab. 8 Průměrné doby života α -naftolu a deprotonační konstanty k_{pt} v systému hyaluronanu o molekulové hmotnosti 1,75 MDa a Septonexu o koncentraci $3 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ (3 mM) a $2 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ (20 mM).

$C_{\text{Hyaluronan}}$ ($\text{g} \cdot \text{dm}^{-3}$)	3 mM Septonex			20 mM Septonex		
	NpOH		NpO ⁻	NpOH		NpO ⁻
	$t_{\text{průměr}}$	$k_{\text{pt}} \cdot 10^{-9}$	$t_{\text{průměr}}$	$t_{\text{průměr}}$	$k_{\text{pt}} \cdot 10^{-9}$	$t_{\text{průměr}}$
	(ns)	(s ⁻¹)	(ns)	(ns)	(s ⁻¹)	(ns)
0	3,70	0,25	4,56	2,67	1,34	2,07
$5,0 \cdot 10^{-5}$	3,11	0,26	4,26	1,65	1,01	1,99
$1,0 \cdot 10^{-4}$	2,76	0,28	4,15	2,12	1,54	1,91
$1,5 \cdot 10^{-4}$	2,65	0,32	4,12	2,35	1,57	1,97
$5,0 \cdot 10^{-4}$	2,30	0,31	3,87	2,73	1,49	2,07
$1,0 \cdot 10^{-3}$	2,11	0,31	4,16	2,86	1,49	2,11
$5,0 \cdot 10^{-3}$	2,18	0,28	4,19	2,76	1,30	2,03
$1,5 \cdot 10^{-2}$	2,14	0,44	4,07	2,60	1,34	2,00

5.1.3 Studium systému polystyrenulfonát – CTAB

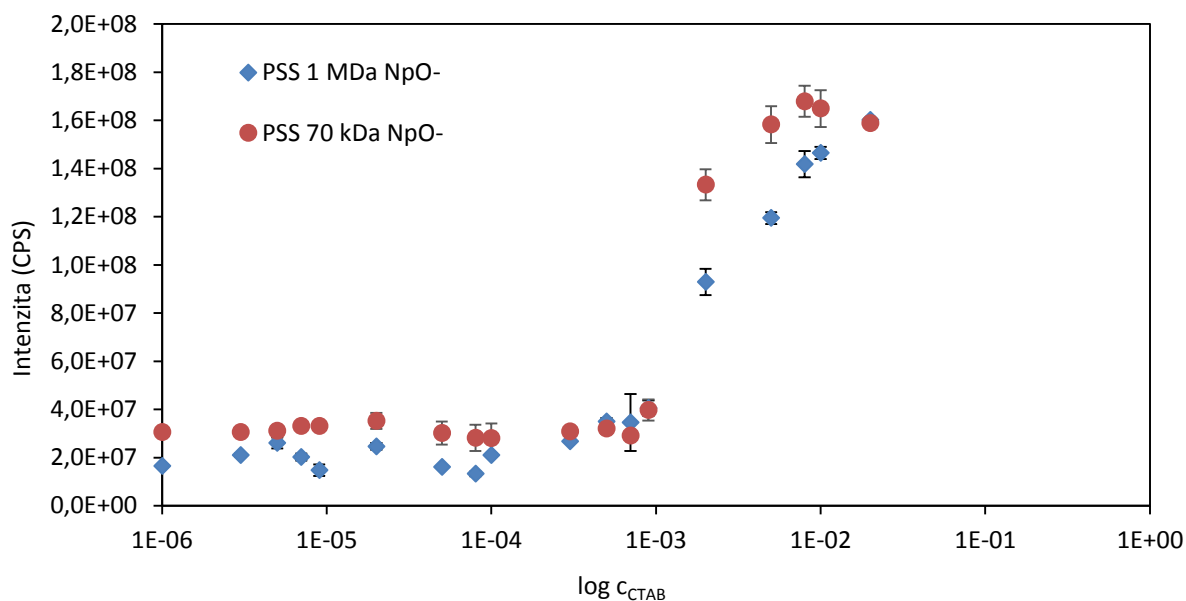
Byla zaznamenávána emisní spektra a doba života fluorescenční sondy α -naftolu v systému polystyrenulfonát (PSS) – CTAB. Koncentrace PSS byla konstantní, a to $7 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ ve dvou molekulových hmotnostech 1 MDa a 70 kDa. Koncentrace CTAB se postupně zvyšovala, a to od $1 \cdot 10^{-6}$ až po $2 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Studium syntetického polystyrenulfonátu bez přítomnosti významné hydratační vrstvy [63] slouží k porovnání s hyaluronanem, který je znám právě pro své hydratační vlastnosti [34]. Polystyrenulfonát je již dobře definovaným polymerem [63], s dobrou rozpustností ve vodě a definovanou hustotou záporného náboje, schopného interagovat s kladným nábojem tenzidu.

5.1.3.1 Ustálená fluorescence

Graf níže (viz **Obr. 34**) zobrazuje závislost intenzity NpO^- na rostoucí koncentraci CTAB. Před dosažením kritické micelární koncentrace nedocházelo ke změně intenzity NpO^- , poté je možno v grafu pozorovat narůstající trend intenzity u obou molekulových hmotností PSS. Fluorofor se i zde solubilizuje do Sternovy vrstvy vznikajícího komplexu PSS – CTAB, kde dochází k jeho deprotonaci vlivem zvýšení hydratace. Zabudování fluoroforu do komplexu ukazuje i změna pozice emisního maxima NpO^- zachycená v tabulce (viz **Tab. 9**), kdy dochází k posuvu v průměru o 19 nm směrem k nižší vlnové délce proti čisté vodě při maximální koncentraci tenzidu.

V tabulce níže (viz **Tab. 9**) jsou také uvedeny disociační konstanty pK_a^* . S rostoucí koncentrací tenzidu dochází ke zvyšování hodnoty pK_a^* . Pro koncentrace CTAB okolo kritické micelární dochází ke skokovému růstu až na čtyřnásobnou hodnotu pK_a^* oproti čisté vodě. Pro nejvyšší koncentraci CTAB je pK_a^* šestkrát vyšší, než v čisté vodě.

Z grafu je patrný i vliv molekulové hmotnosti PSS na výsledná emisní spektra, kdy pro PSS o molekulové hmotnosti 70 kDa lze pozorovat celkově větší intenzitu NpO^- , než je tomu v případě PSS o molekulové hmotnosti 1 MDa. Pouze v místě s koncentrací CTAB těsně před dosažením CMC je intenzita NpO^- vzorů obou molekulových hmotností stejná.



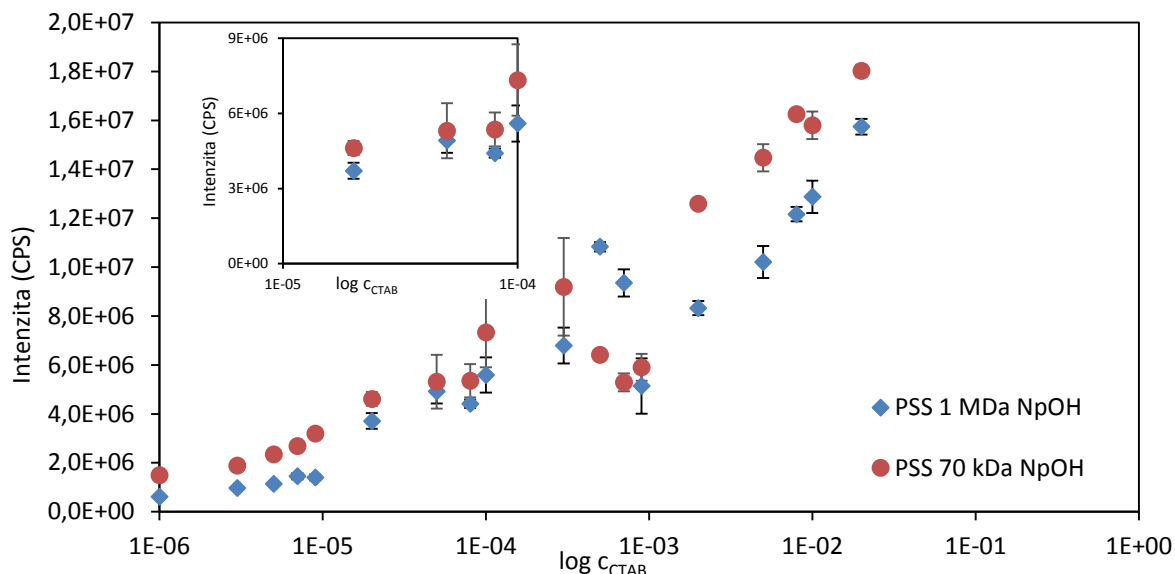
Obr. 34 Závislost intenzity NpO^- α -naftolu v komplexu PSS – CTAB na logaritmu koncentrace CTAB. Intenzita neutrální formy pro 1 MDa PSS a pro 70 kDa PSS.

Tab. 9 Pozice emisních maxim aniontové formy α -naftolu v systému PSS – CTAB a disociační konstanty v excitovaném stavu, pK_a^* .

c_{CTAB} ($\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$)	PSS 1 MDa	pK_a^*	PSS 70 kDa	pK_a^*
	λ_{em} (nm)		λ_{em} (nm)	
0	470	0,32	469	0,36
$1\cdot 10^{-6}$	470	0,32	470	0,32
$9\cdot 10^{-4}$	451	1,26	458	0,90
$2\cdot 10^{-3}$	450	1,31	457	0,95
$2\cdot 10^{-2}$	449	2,09	449	2,09
Voda	468		0,41	

Změna intenzity neutrální formy NpOH je z grafu níže (viz **Obr. 35**) patrná již od narůstající koncentrace CTAB. S rostoucí koncentrací CTAB rovnoměrně narůstá intenzita NpOH . Při dosažení kritické micelární koncentrace dochází ke skokovému poklesu intenzity NpOH , s následným rovnoměrným nárůstem. Tento trend je patrný u obou molekulových hmotností PSS, tedy 1 MDa a 70 kDa. Stejně jako v případě intenzity NpO^- i zde je patrný rozdíl mezi jednotlivými molekulovými hmotnostmi PSS. Pro 70kDa PSS je intenzita NpOH celkově vyšší a po dosažení kritické micelární koncentrace se rozdíl oproti intenzitě NpOH 1MDa PSS zvyšuje. Pozvolný nárůst intenzity NpOH již od koncentrace $9\cdot 10^{-6}$ $\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ může značit interakci tenzidu a PSS ještě před dosažením kritické agregační koncentrace. Popřípadě může značit solubilizaci α -naftolu do hydrofobních struktur řetězce PSS, kde by byl přenos protonů

z fluoroforu na akceptor zpomalen. Skokový pokles intenzity NpOH při dosažení kritické micelární koncentrace koresponduje se vznikem komplexu PSS – CTAB, kdy zabudování fluoroforu do Sternovy vrstvy potlačuje deprotonace a vznik aniontové formy.



Obr. 35 Závislost intenzity NpOH α -naftolu v komplexu PSS – CTAB na logaritmu koncentrace CTAB. Intenzita neutrální formy pro 1 MDa PSS (♦) a pro 70 kDa PSS (●). Vložený graf zobrazuje výšeč v rozmezí koncentrací CTAB $9 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ až $9 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$.

Vložený graf (viz **Obr. 35**) zobrazuje pokles intenzity NpOH pro koncentraci CTAB $8 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Pro koncentrace vyšší a nižší, než je výše uvedená koncentrace, intenzita NpOH stoupá. Tuto koncentraci můžeme považovat za kritickou agregační koncentraci CTAB ve vztahu s PSS o koncentraci $7 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$. Při měření časově rozlišené fluorescence byl pokles deprotonační konstanty k_{pt} , značící vznik organizovaných struktur, pozorován již při koncentraci $2 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Tento rozdíl může být dán charakterem měření, kdy u časově rozlišené fluorescence dostáváme informace o jednotlivých formách fluoroforu. Oproti tomu u ustálené fluorescence je výstupem střední hodnota emisí různých forem fluoroforů. Dá se tedy přepokládat vznik agregátů v rozsahu koncentrací od $2 \cdot 10^{-5}$ až do $8 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ CTAB.

Emisní spektra jednotlivých molekulových hmotností PSS jsou pro přehlednost uvedena v příloze: 1 MDa viz příloha **Obr. 58** a 70 kDa viz příloha **Obr. 59**.

5.1.3.2 Časově rozlišená fluorescence

Byla měřena časově rozlišená fluorescence α -naftolu v systému polystyrensulfonátu (PSS) – CTAB. V tabulce uvedené níže (viz **Tab. 10**) můžeme vidět jednotlivé průměrné doby života NpOH a NpO⁻ spolu s deprotonačními konstantami k_{pt} . Pro PSS o molekulové hmotnosti 1 MDa můžeme pozorovat výrazný pokles deprotonační konstanty již okolo koncentrace $9 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ a $5 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, kdy dochází ke změně z $17,03 \cdot 10^{-9} \text{ s}^{-1}$ na $9,39 \text{ s}^{-1}$, popřípadě $3,58 \cdot 10^{-9} \text{ s}^{-1}$. Tento pokles značí kritickou agregační koncentraci při dosažení koncentrace $2 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ CTAB. Vlivem vzniklých agregátů tenzidu a polymeru dochází ke zpomalení přenosu protonů. K další změně k_{pt} dochází při blízkosti se kritické micelární koncentraci, a to na $3,93 \cdot 10^{-9} \text{ s}^{-1}$. Pro PSS o molekulové hmotnosti 70 kDa nastává první pokles

k_{pt} při koncentraci CTAB $2 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, a to z $5,51 \cdot 10^{-9} \text{ s}^{-1}$ na $1,86 \cdot 10^{-9} \text{ s}^{-1}$. K další změně k_{pt} dochází až při koncentracích okolo kritické micelární koncentrace CTAB. S dalším růstem koncentrace CTAB klesá hodnota k_{pt} až na hodnotu $1,70 \cdot 10^{-9} \text{ s}^{-1}$ pro 1MDa PSS a $2,22 \cdot 10^{-9} \text{ s}^{-1}$ pro 70kDa PSS. Před dosažením kritické micelární koncentrace můžeme pozorovat nepravidelný nárůst průměrné doby života NpO^- . Výrazné změny dosahuje průměrná doba života NpO^- až při koncentraci blíží se kritické micelární, kdy dochází k nárůstu na hodnotu 12,83 ns a posléze na 19,18 ns. S rostoucí koncentrací CTAB stoupá průměrná doba života až na hodnotu 20,55 ns pro 1MDa PSS. U PSS o molekulové hmotnosti 70 kDa můžeme pozorovat pozvolný nárůst průměrné doby života NpO^- po celém rozsahu koncentrace z počátečních 7,98 ns, přes kritickou micelární koncentraci, kdy průměrná doba života NpO^- činila 17,73 ns, až po maximální koncentraci CTAB, kdy dosahovala průměrná doba života hodnoty 20,54 ns. Průměrná doba života NpOH u 70kDa PSS dosahovala celkově vyšších hodnot, než v případě PSS o molekulové hmotnosti 1 MDa. Tento trend koresponduje i s hodnotou deprotonační konstanty k_{pt} , která byla u PSS o molekulové hmotnosti 70 kDa výrazně nižší v celém rozsahu koncentrace CTAB, než je tomu u PSS 1MDa. Nižší molekulová hmotnost zde přispívá ke vzniku kompaktnějších agregátů PSS – CTAB před dosažením kritické micelární koncentrace. Přenos protonů je v takovém komplexu značně zpomalen, což se projevuje nižší deprotonační konstantou a vyšší průměrnou dobou života NpOH .

Tab. 10 Průměrné doby života α -naftolu a deprotonační konstanty k_{pt} v systému PSS o molekulové hmotnosti 1 MDa a 300 kDa v CTAB.

C_{CTAB} ($\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$)	PSS 1 MDa			PSS 70 kDa		
	NpOH		NpO ⁻	NpOH		NpO ⁻
	t průměr	$k_{pt} \cdot 10^{-9}$	t průměr	t průměr	$k_{pt} \cdot 10^{-9}$	t průměr
	(ns)	(s^{-1})	(ns)	(ns)	(s^{-1})	(ns)
0	0,98	17,03	8,08	2,88	5,51	7,98
$1 \cdot 10^{-6}$	1,07	16,62	7,97	2,59	5,76	7,80
$3 \cdot 10^{-6}$	1,23	15,92	7,92	2,58	5,16	7,95
$5 \cdot 10^{-6}$	1,35	11,88	7,91	3,00	4,80	7,96
$7 \cdot 10^{-6}$	1,75	13,24	7,95	3,26	3,77	7,98
$9 \cdot 10^{-6}$	2,21	9,39	7,92	3,01	3,59	7,95
$2 \cdot 10^{-5}$	3,56	3,58	10,23	3,26	1,86	8,83
$5 \cdot 10^{-5}$	2,82	9,52	9,39	1,77	7,20	8,54
$8 \cdot 10^{-5}$	1,63	13,63	0,02	1,63	9,11	8,45
$1 \cdot 10^{-4}$	0,79	15,41	6,60	1,66	7,69	8,50
$3 \cdot 10^{-4}$	0,54	29,38	10,79	1,27	11,35	9,21
$5 \cdot 10^{-4}$	2,70	3,93	0,03	2,70	3,93	9,09
$7 \cdot 10^{-4}$	0,87	1,15	0,04	2,55	1,88	9,48
$9 \cdot 10^{-4}$	2,55	1,06	12,83	2,40	1,59	10,76
$2 \cdot 10^{-3}$	1,55	1,57	19,18	1,13	2,13	17,73
$5 \cdot 10^{-3}$	1,10	1,77	20,36	1,04	2,19	20,35
$8 \cdot 10^{-3}$	1,01	1,71	20,44	0,97	2,13	20,43
$1 \cdot 10^{-2}$	0,97	1,76	20,47	0,78	4,26	20,47
$2 \cdot 10^{-2}$	0,97	1,70	20,55	0,92	2,22	20,54

5.1.4 Studium systému polystyrensulfonát – Septonex

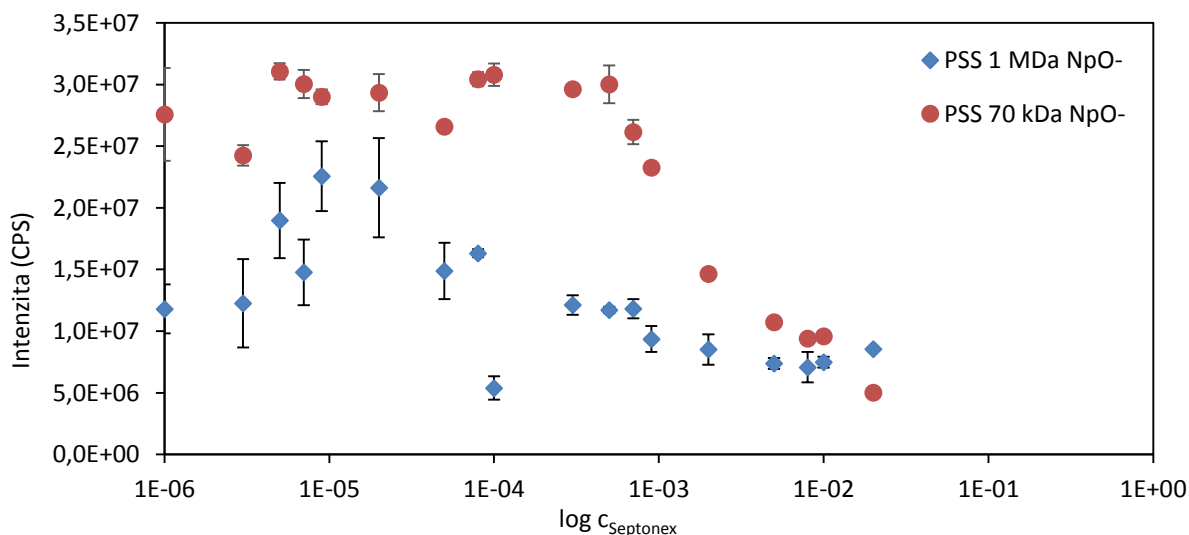
Byla zaznamenávána emisní spektra a doba života fluorescenční sondy α -naftolu v systému polystyrensulfonát (PSS) – Septonex. Koncentrace PSS byla konstantní, a to $7 \text{ mg}\cdot\text{dm}^{-3}$ ve dvou molekulových hmotnostech 1 MDa a 70 kDa. Koncentrace Septonexu se postupně zvyšovala od $1\cdot 10^{-6}$ až po $2\cdot 10^{-2} \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$. Studium syntetického polystyrensulfonátu, bez přítomnosti významné hydratační vrstvy [63] slouží k porovnání s hyaluronanem, který je znám pro své hydratační vlastnosti [34].

5.1.4.1 Ustálená fluorescence

Graf níže (viz **Obr. 36**) zobrazuje závislost intenzity NpO^- na postupně narůstající koncentraci Septonexu. Jak můžeme pozorovat z grafu, intenzita NpO^- zůstává v podstatě neměnná až do dosažení kritické micelární koncentrace. Poté dochází k postupnému snižování intenzity NpO^- s tím, jak se fluorofor zabudovává do hydrofobního prostředí vznikajících micel Septonexu.

Z grafu je také patrný rozdílný vliv molekulových hmotností na výslednou podobu emisního spektra NpO^- . Největší intenzitu NpO^- vykazovaly vzorky obsahující 70kDa PSS, proti tomu výrazně nižší intenzitou NpO^- disponovaly vzorky 1 MDa PSS. U těchto vzorků je také patrná relativně velká chybová úsečka spolu s nepravidelným trendem poklesu intenzity NpO^- . Dochází také k posuvu pozice emisního maxima NpO^- , a to o 23 nm pro obě dvě molekulové hmotnosti (viz **Tab. 11**). Rozdílná podoba emisního spektra pro jednotlivé molekulové hmotnosti souvisí s rozdílnou hydratací vzniklého komplexu PSS – Septonex.

Dále jsou v tabulce (viz **Tab. 11**) uvedeny disociační konstant pK_a^* . Pro nízké koncentrace Septonexu nevykazují hodnoty pK_a^* výraznou změnu. Po dosažení kritické micelární koncentrace je hodnota pK_a^* dvojnásobná oproti pK_a^* v čisté vodě. Pro nejvyšší koncentraci CTAB dosahují hodnoty pK_a^* téměř šestnásobku oproti čisté vodě.



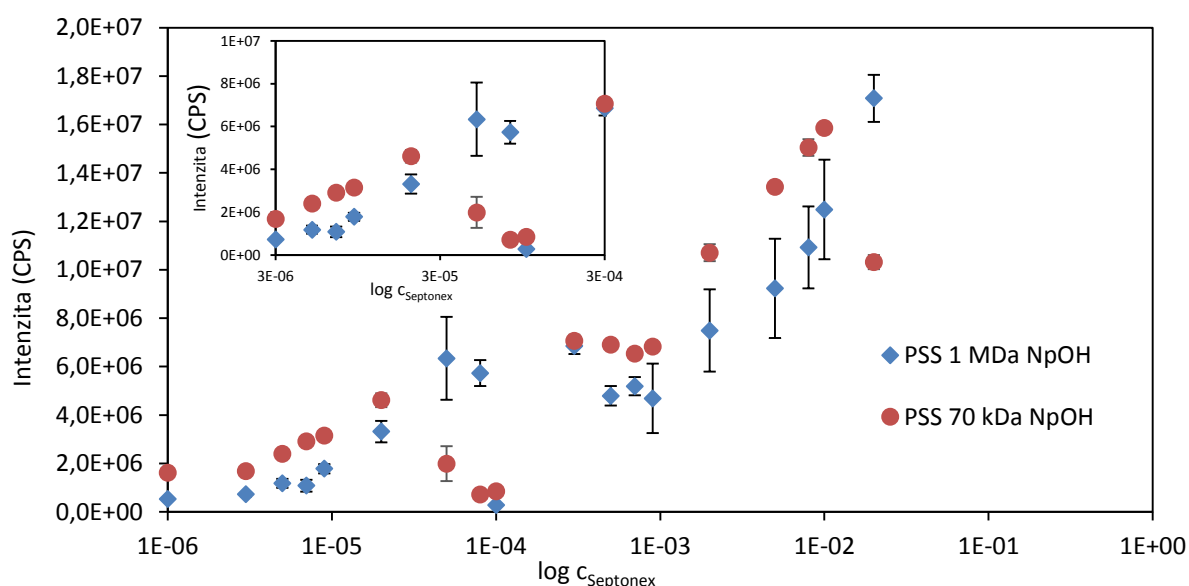
Obr. 36 Závislost intenzity NpO^- α -naftolu v komplexu PSS – Septonex na logaritmu koncentrace Septonexu. Intenzita neutrální formy pro 1 MDa PSS a pro 70 kDa PSS.

Tab. 11 Pozice emisních maxim aniontové formy α -naftolu v systému PSS – Septonex a disociační konstanty v excitovaném stavu, pK_a^* .

C_{Septonex} ($\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$)	PSS 1 MDa	pK_a^*	PSS 70 kDa	pK_a^*
	λ_{em} (nm)		λ_{em} (nm)	
0	468	0,41	470	0,32
$1\cdot 10^{-6}$	468	0,41	469	0,36
$9\cdot 10^{-4}$	465	0,56	468	0,41
$2\cdot 10^{-3}$	459	0,85	461	0,75
$2\cdot 10^{-2}$	445	2,30	445	2,39
Voda	468		0,41	

Nárůst intenzity neutrální formy NpOH je znatelný již pro nízké koncentrace Septonexu, a to jak pro molekulovou hmotnost 70 kDa, tak i pro 1MDa PSS (viz **Obr. 37**). I zde dochází k menšímu poklesu intenzity NpOH v okolí kritické micelární koncentrace, ale poté s rostoucí koncentrací Septonexu narůstá intenzita NpOH rovnoměrně s tím, jak se fluorofor solubilizuje do hydrofobních micel tenzidu. Počáteční nárůst intenzity NpOH značí vznik agregátů před dosažením kritické micelární koncentrace.

Z grafu je patrný také vliv molekulových hmotností na celkovou intenzitu. I v tomto případě je intenzita celkově vyšší v případě 70 kDa PSS. U molekulové hmotnosti 1 MDa se projevuje nepravidelný nárůst s relativně velkou odchylkou.



Obr. 37 Závislost intenzity NpOH α -naftolu v komplexu PSS – Septonex na logaritmu koncentrace Septonex. Intenzita neutrální formy pro 1 MDa PSS (♦) a pro 70 kDa PSS (●). Vložený graf zobrazuje výše koncentrací Septonexu $3\cdot 10^{-6}$ $\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ až $3\cdot 10^{-4}$ $\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$.

Ve vloženém grafu (viz **Obr. 37**) můžeme pozorovat pokles intenzity NpOH až na koncentraci $1\cdot 10^{-4}$ $\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$. Pro koncentraci Septonexu vyšší a nižší, než je výše uvedená koncentrace, dochází k růstu intenzity NpOH. Tuto koncentraci tedy můžeme brát za kritickou agregační, a to ve vztahu s PSS o koncentraci $7\text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$.

Emisní spektra jednotlivých molekulových hmotností PSS jsou pro přehlednost uvedena v příloze: 1 MDa viz příloha **Obr. 60** a 70 kDa viz příloha **Obr. 61**.

5.1.4.2 Časově rozlišená fluorescence

Byla měřena časově rozlišená fluorescence α -naftolu v systému polystyrensulfonátu (PSS) – Septonex. V tabulce uvedené níže (viz **Tab. 12**) můžeme vidět jednotlivé průměrné doby života NpOH a NpO^- spolu s deprotonačními konstantami k_{pt} . Pro PSS o molekulové hmotnosti 1 MDa můžeme pozorovat pozvolný pokles deprotonační konstanty až ke koncentraci $2 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Další pokles deprotonační konstanty je patrný až při koncentracích blízkých se kritické micelární koncentraci, kde hodnota k_{pt} činí $2,76 \cdot 10^{-9} \text{ s}^{-1}$. S rostoucí koncentrací Septonexu klesá k_{pt} až na $1,34 \cdot 10^{-9} \text{ s}^{-1}$. Pro 70kDa PSS dochází k pravidelnému poklesu k_{pt} ke koncentraci $2 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Při koncentraci blízké se kritické agregační dochází k dalšímu poklesu a hodnota k_{pt} se dále se zvyšující koncentrací Septonexu nemění. Průměrná doba života NpOH vykazuje u 1MDa PSS klesající trend od $7 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ Septonexu z 2,85 ns až na hodnotu 1,04 ns. U 70kDa PSS dochází k růstu průměrné doby života NpOH až do koncentrace Septonexu $2 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Hodnoty k_{pt} jsou pro Septonex o koncentraci $2 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ nejnižší. Můžeme tedy tuto hodnotu koncentrace považovat za kritickou agregační. Mezi kritickou agregační a kritickou micelární koncentrací můžeme pozorovat snižující se průměrnou dobu života NpOH a vysoké hodnoty k_{pt} . V tomto rozmezí koncentrací nedochází ke zpomalení přenosu protonů, fluorofor zde není solubilizován do agregátů. Pravděpodobně dochází k jejich reorganizaci. Snižování k_{pt} nastává až při koncentracích okolo kritické micelární koncentrace. Při kritické micelární koncentraci dochází k výraznému zpomalení přenosu proton, k_{pt} je cca dvakrát menší než při kritické agregační koncentraci. Průměrná doba aniontové formy NpO^- zůstává stejná až do kritické micelární koncentrace, kde dochází k jejímu skokovému poklesu nejprve na 5,04 ns pro 1MDa PSS a 5,55ns pro 70kDa PSS. Dále klesá na 2,17 ns a 2,08 u 1MDa PSS, respektive 70kDa PSS, a to pro nejvyšší koncentraci Septonexu. Pokles průměrné doby života deprotonované formy značí solubilizaci do hydrofobního středu micel.

Vzhledem k vysokým průměrným dobám života NpO^- při kritické agregační koncentraci se dá předpokládat lokalizace fluoroforu do mezifázového rozhraní agregátů tenzidu a polymeru. Tomu odpovídá i počáteční narůstající trend intenzit NpO^- (viz **Obr. 36**). Po kritické micelární koncentraci se mění lokalizace fluoroforu do hydrofobního středu micel. Dochází k již zmiňovanému poklesu průměrné doby života NpO^- a intenzity emise NpO^- .

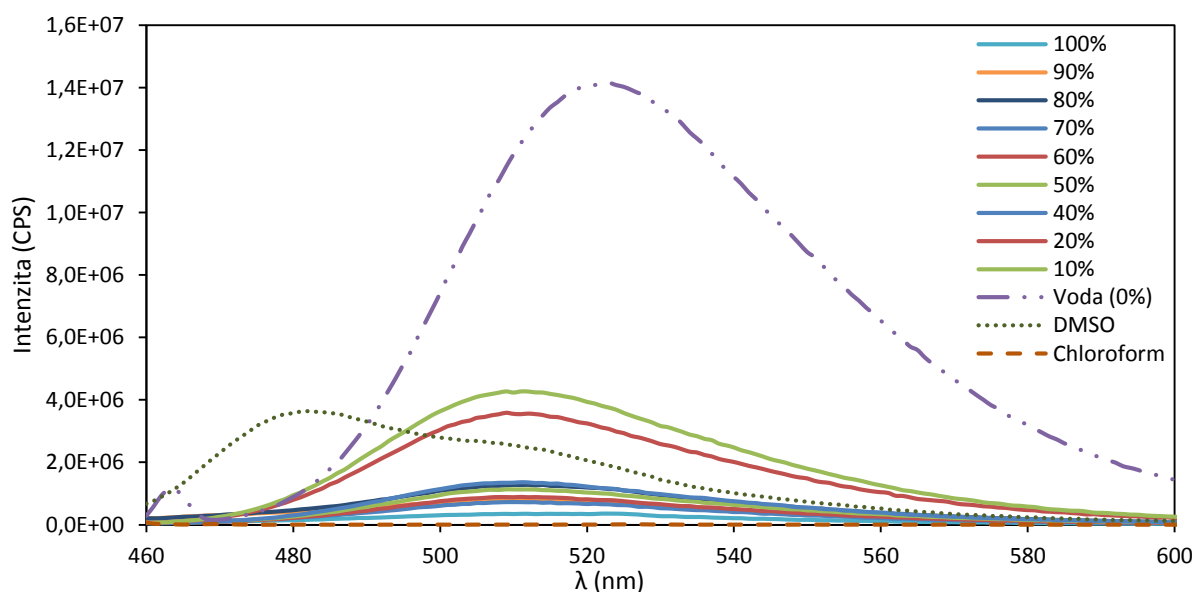
Tab. 12 Průměrné doby života α -naftolu a deprotonační konstanty k_{pt} v systému PSS o molekulové hmotnosti 1 MDa a 70 kDa v Septonexu

C_{Septonex} ($\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$)	PSS 1 MDa			PSS 70 kDa		
	NpOH		NpO ⁻	NpOH		NpO ⁻
	t průměr (ns)	$k_{\text{pt}} \cdot 10^{-9}$ (s^{-1})	t průměr (ns)	t průměr (ns)	$k_{\text{pt}} \cdot 10^{-9}$ (s^{-1})	t průměr (ns)
0	0,76	21,15	7,91	2,30	8,82	7,99
$1 \cdot 10^{-6}$	1,69	11,22	7,98	2,32	8,41	7,96
$3 \cdot 10^{-6}$	1,82	10,17	7,95	2,53	7,70	8,02
$5 \cdot 10^{-6}$	2,01	8,21	0,14	3,27	3,38	7,97

$7 \cdot 10^{-6}$	2,25	7,83	7,97	3,46	2,43	7,96
$9 \cdot 10^{-6}$	2,37	6,98	7,98	3,63	2,13	7,98
$2 \cdot 10^{-5}$	3,09	4,52	7,94	3,25	1,66	7,91
$5 \cdot 10^{-5}$	1,20	19,16	7,72	1,03	4,68	8,01
$8 \cdot 10^{-5}$	0,89	20,19	7,85	0,68	12,75	8,01
$1 \cdot 10^{-4}$	0,10	41,34	7,98	0,50	15,77	5,92
$3 \cdot 10^{-4}$	0,16	40,99	7,00	2,89	1,94	7,84
$5 \cdot 10^{-4}$	0,47	39,35	7,69	3,00	1,37	7,81
$7 \cdot 10^{-4}$	2,85	2,76	7,61	3,02	1,21	7,75
$9 \cdot 10^{-4}$	2,63	3,93	7,36	3,13	1,62	7,54
$2 \cdot 10^{-3}$	1,83	2,01	5,04	2,21	1,71	5,55
$5 \cdot 10^{-3}$	1,39	2,11	2,16	1,62	1,85	3,87
$8 \cdot 10^{-3}$	1,34	1,87	2,91	1,59	1,90	3,04
$1 \cdot 10^{-2}$	1,18	1,96	2,71	1,65	1,65	2,71
$2 \cdot 10^{-2}$	1,04	1,34	2,17	1,78	1,64	2,08

5.2 Deprotonační charakteristiky fluorescenční sondy HPTS

Fluorescenční sonda HPTS vykazuje intramolekulární přenos protonů v excitovaném stavu s charakteristickým duálním spektrem. Pro účely této diplomové práce byla excitační vlnová délka volena tak, aby emisní spektrum vykazovalo pouze aniontovou formu molekuly HPTS, a to kolem 520 nm. Neutrální forma HPTS se vyskytuje zejména pro vysoce kyselé prostředí s pH kolem jedné. V neutrálním pH je intenzita ArOH nízká v porovnání s ArO⁻ (viz kapitola 3). Aniontová forma (ArO⁻) je vysoce citlivá na změny pH a svého maxima dosahuje při pH 13 [1]. Jak můžeme vidět v grafu uvedeném níže (viz **Obr. 38**), v čistě vodném prostředí vykazuje HPTS o řád vyšší intenzitu než pro ostatní rozpouštědla. Pro roztoky ethanol/voda se již při 10% obsahu ethanolu intenzita velmi snižuje a dochází k posuvu emisního maxima k vlnové délce 510 nm. V polárním aprotickém rozpouštědle DMSO vykazuje HPTS posuv emisního maxima k 483 nm.



Obr. 38 Emisní spektra HPTS v různých rozpouštědlech

5.2.1 Studium systému hyaluronan – CTAB

Byla zaznamenávána emisní spektra a doba života aniontové formy (ArO^-) fluorescenční sondy HPTS v systému hyaluronan – CTAB. Koncentrace hyaluronanu byla konstantní, a to $7 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ ve třech molekulových hmotnostech 300 kDa, 1 MDa a 1,75 MDa. Koncentrace CTAB se postupně zvyšovala od $1 \cdot 10^{-6}$ až po $2 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$.

Dále byl studován vliv změny koncentrace 1,75 MDa hyaluronanu na charakteristiky HPTS v roztocích micelárního koloidu o koncentraci CTAB $3 \cdot 10^{-3}$, $5 \cdot 10^{-3}$, $7 \cdot 10^{-3}$, $1 \cdot 10^{-2}$ a $2 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Koncentrace hyaluronanu se pro každou sadu vzorků CTAB pohybovala od 0 do $15 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$.

Ustálená fluorescence vzorků obsahujících hyaluronan o molekulové hmotnosti 300 kDa již byla měřena na přístroji Aminco Bowman Series 2.

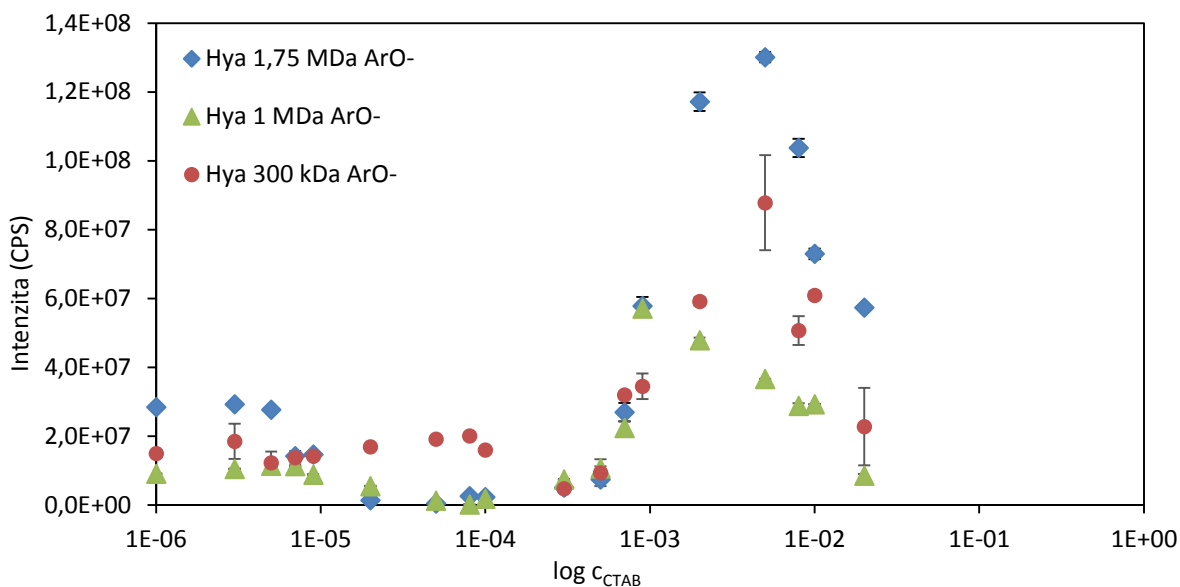
5.2.1.1 Ustálená fluorescence

Z grafu níže (viz **Obr. 39**) vidíme, že před dosažením kritické micelární koncentrace CTAB nastává pokles intenzity ArO^- . Pro hyaluronan o molekulové hmotnosti 1,75 MDa a 1 MDa dochází k poklesu již při koncentraci CTAB $2 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Pro hyaluronan o molekulové hmotnosti 300 kDa dochází k poklesu při koncentraci $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Tento pokles intenzity ArO^- je pravděpodobně způsoben interakcí HPTS a CTAB za vzniku nefluorescenčního komplexu, což se projevilo i zbarvením roztoku do světle zelené.

Pro koncentraci CTAB vyšší a nižší, než $3 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ dochází k nárůstu intenzity ArO^- . Můžeme tedy tuto koncentraci považovat za kritickou agregační koncentraci (CAC) CTAB pro hyaluronan o koncentraci $7 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$, a to pro všechny molekulové hmotnosti hyaluronanu. Dále s rostoucí koncentrací CTAB dochází i k růstu intenzity ArO^- . Ovšem při dosažení kritické micelární koncentrace dochází u hyaluronanu o molekulové hmotnosti 1 MDa k prudkému poklesu intenzity. U molekulové hmotnosti 1,75 MDa a 300 kDa dochází k poklesu lehce za kritickou micelární koncentrací při $5 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ CTAB.

Emisní spektrum HPTS vykazuje v porovnání s emisním spektrem α -naftolu ve stejném systému výrazné změny. Emisní spektrum NpO^- α -naftolu vykazuje jen malý, neznatelný pokles v intenzitě emise při dosažení CAC, oproti tomu při dosažení CMC intenzita NpO^- prudce roste. V případě HPTS je výrazný pokles intenzity ArO^- při dosažení CAC. Po dosažení CMC dochází k prudkému poklesu intenzity ArO^- . Pokles může být způsoben změnou acidobazické rovnováhy uvnitř micel. Ta se projevila i v případě α -naftolu, kdy s rostoucí koncentrací docházelo ke zvyšování hodnoty pK_a^* (viz kapitola **5.1.3.1 Tab. 3**). Vzhledem k tomu, že pokles intenzit ArO^- u HPTS nekoreloval se změnou průměrné doby života při měření časově rozlišené fluorescence (viz kapitola **5.2.1.2**), je možné, že pokles intenzity je projevem statického zhášení, tj. vznikem nefluorescenčního komplexu v základním stavu. Statické zhášení by nemělo mít vliv na dobu života fluoroforu.

V tabulce níže (viz **Tab. 13**) můžeme pozorovat posuv pozice emisního maxima ArO^- , kdy vlivem vzniku komplexu HPTS – CTAB dochází ke změně v průměru o 13 nm při počáteční koncentraci CTAB oproti emisnímu spektru HPTS ve vodě pro všechny molekulové hmotnosti. Z grafu (viz **Obr. 38**) také plyne vliv molekulových hmotností hyaluronanu na emisní charakteristiky. Nejnižší intenzity dosahuje HPTS v prostředí hyaluronanu o molekulové hmotnosti 1 MDa, nejvyšší pak pro 1,75MDa hyaluronan.



Obr. 39 Závislost intenzity ArO^- HPTS v komplexu hyaluronan – CTAB na logaritmu koncentrace CTAB. Intenzita neutrální formy pro 1,75MDa hyaluronan (\blacklozenge), pro 1MDa hyaluronan (\blacktriangle) a pro hyaluronan o molekulové hmotnosti 300 kDa (\bullet).

Emisní spektra jednotlivých molekulových hmotností hyaluronanu jsou pro přehlednost uvedena v příloze: 1,75 MDa viz příloha **Obr. 62**, 1 MDa viz příloha **Obr. 63** a 300 kDa viz příloha **Obr. 64**.

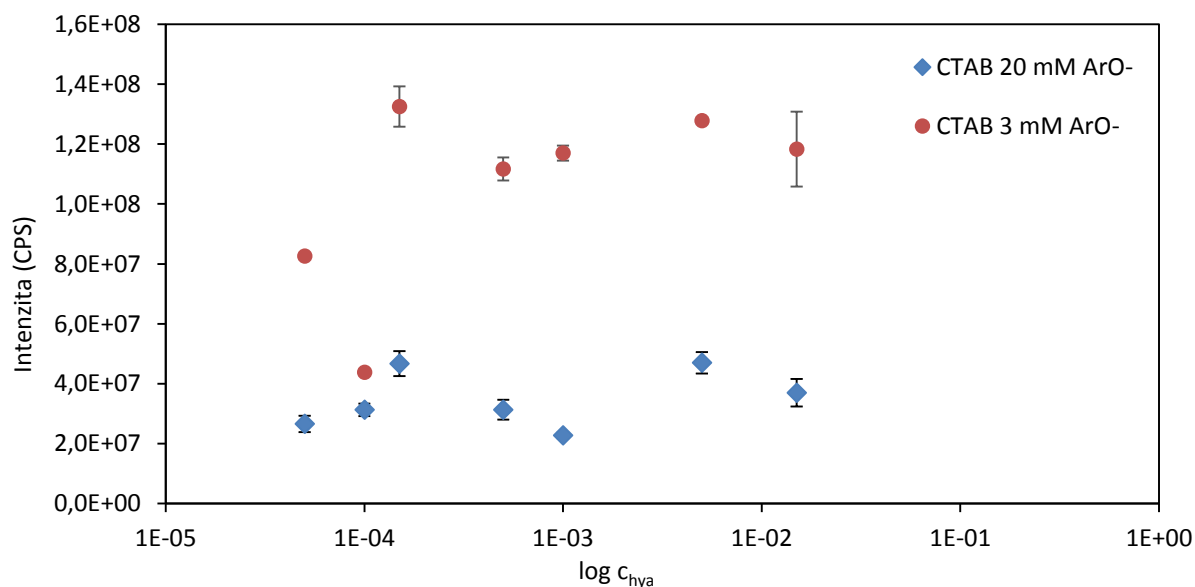
Tab. 13 Pozice emisních maxim aniontové formy HPTS v systému hyaluronan – CTAB.

C_{CTAB} (mol·dm ⁻³)	Hya 1,75MDa	Hya 1 MDa	Hya 300 kDa
	λ_{em} (nm)		
0	512	513	506
$1 \cdot 10^{-6}$	512	512	506
$9 \cdot 10^{-4}$	527	528	517
$2 \cdot 10^{-3}$	528	527	519
$2 \cdot 10^{-2}$	528	526	523
Voda	523		

Dále byl sledován vliv přidavku hyaluronanu o molekulové hmotnosti 1,75 MDa k micelárnímu roztoku CTAB o koncentraci $3 \cdot 10^{-3}$, $5 \cdot 10^{-3}$, $7 \cdot 10^{-3}$, $1 \cdot 10^{-2}$ a $2 \cdot 10^{-2}$ mol·dm⁻³ na emisní charakteristiky aniontové formy HPTS (viz **Obr. 40**). Pro názornost jsou zde uvedeny pouze hraniční koncentrace CTAB, a to $3 \cdot 10^{-3}$ mol·dm⁻³ a $2 \cdot 10^{-2}$ mol·dm⁻³. Grafy pro ostatní koncentrace CTAB jsou uvedeny v příloze (viz příloha **Obr. 68**).

Změna koncentrace hyaluronanu neměla, až na malé lokální výkyvy, velký vliv na intenzitu ArO^- . Je zde ovšem patrný výrazný rozdíl v intenzitě ArO^- u jednotlivých koncentrací CTAB. Pro nejnižší koncentraci vykazují vzorky vysokou intenzitu ArO^- , která poté pro jednotlivé koncentrace CTAB klesá. Nejnižší intenzitu vykazují vzorky o nejvyšší koncentraci CTAB. Při vysoké koncentraci CTAB je fluorofor solubilizován do většího počtu micel. Jak již bylo

uvedeno výše, v micelách dochází ke snižování intenzity ArO^- . Při studiu stejného systému pomocí α -naftolu byla intenzita NpO^- pro všechny koncentrace CTAB prakticky totožná. S rostoucí koncentrací CTAB nevznikala další mezifázová rozhraní, kde by docházelo k solubilizaci α -naftolu. Pokud by s rostoucí koncentrací CTAB docházelo ke zvětšování micel, měla by růst i plocha mezifázového rozhraní. Dá se tedy usuzovat, že pro $2 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ Septonex již systém obsahuje volné, na hyaluronan nevázané, micely.



Obr. 40 Závislost intenzity ArO^- na koncentraci hyaluronanu (1,75 MDa) pro CTAB o koncentraci $3 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ (3 mM) a $2 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ (20 mM).

5.2.1.2 Časově rozlišená fluorescence

Tabulka uvedená níže (viz **Tab. 14**) vyobrazuje průměrné doby života aniontové formy HPTS. Jak můžeme vidět, pro nulové koncentrace CTAB vykazuje průměrná doba života HPTS hodnotu okolo 5 ns. S rostoucí koncentrací CTAB dochází při dosažení koncentrace $5 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ k poklesu průměrné doby života ArO^- vlivem již zmíněného vzniku komplexu HPTS a CTAB. U hyaluronanu 300kDa je průměrná doba života ArO^- vyšší než u zbylých dvou molekulových hmotností. Tyto relativně vysoké průměrné doby života ArO^- mohou značit větší míru hydratace fluoroforu. Také k nárůstu průměrné doby života, který je spojený s kritickou agregační koncentrací, dochází až při koncentraci $7 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. S postupnou rostoucí koncentrací CTAB dochází ke zvyšování průměrné doby života až na hodnotu okolo 6 ns pro kritickou micelární koncentraci. Dále se pak průměrná doba ArO^- výrazně nemění. Z těchto dat je patrný vliv hyaluronanu na hydrataci micel CTAB, kdy průměrná doba života vzrostla z hodnoty okolo 5 ns pro nízké koncentrace CTAB až na hodnotu okolo 6 ns pro maximální koncentraci CTAB, a to pro všechny molekulové hmotnosti.

Vzhledem k relativně nízkým hodnotám průměrné doby života ArO^- v koncentračním rozsahu $5 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ až $5 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ CTAB dochází k solubilizaci HPTS do hydrofobních částí vzniklého komplexu hyaluronan – CTAB pro molekulové hmotnosti 1,75 a 1 MDa. Jak bylo uvedeno výše, u 300kDa hyaluronanu je větší míra hydratace HPTS a může docházet i k rozdílné lokalizaci HPTS v komplexu.

Experimenty stanovující vliv zvyšující se koncentrace hyaluronanu o molekulové hmotnosti 1,75 MDa na deprotonační charakteristiky HPTS v prostředí CTAB vykazovaly relativně stejnou hodnotu průměrné doby života ArO^- , a to 6 ns. Při měření časově rozlišené fluorescence nedocházelo ke změnám průměrné doby života s rostoucí koncentrací CTAB. Nedocházelo tedy ke změnám jako v případě měření ustálené fluorescence (viz **Obr. 40**). Z toho se dá usuzovat, že dochází ke statickému samozhášení molekul HPTS v micelárním roztoku CTAB. Jak bylo uvedeno výše, tento typ zhášení se projevuje změnou intenzity fluorescence, nikoli změnou doby života fluoroforu.

Tab. 14 Průměrné doby života aniontové formy HPTS v systému hyaluronanu o molekulové hmotnosti 1,75 MDa, 1 MDa a 300 kDa v CTAB.

c_{CTAB} ($\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$)	Hya 1,75 MDa	Hya 1 MDa	Hya 300 kDa
	ArO^-	ArO^-	ArO^-
	t průměr	t průměr	t průměr
	(ns)	(ns)	(ns)
0	5,41	5,85	5,25
$1\cdot 10^{-6}$	5,37	5,83	5,68
$3\cdot 10^{-6}$	5,39	5,38	5,39
$5\cdot 10^{-6}$	5,33	5,40	5,39
$7\cdot 10^{-6}$	5,39	5,36	5,38
$9\cdot 10^{-6}$	5,37	5,42	5,39
$2\cdot 10^{-5}$	5,00	3,69	5,40
$5\cdot 10^{-5}$	1,36	1,51	3,86
$8\cdot 10^{-5}$	1,02	1,59	3,66
$1\cdot 10^{-4}$	3,89	2,66	2,39
$3\cdot 10^{-4}$	3,93	4,34	2,84
$5\cdot 10^{-4}$	4,39	4,38	2,20
$7\cdot 10^{-4}$	5,11	5,18	4,14
$9\cdot 10^{-4}$	5,97	6,10	5,23
$2\cdot 10^{-3}$	6,02	6,31	5,37
$5\cdot 10^{-3}$	6,01	6,13	6,17
$8\cdot 10^{-3}$	6,02	6,11	6,22
$1\cdot 10^{-2}$	6,03	6,16	6,21
$2\cdot 10^{-2}$	6,01	6,22	6,40

5.2.2 Studium systému hyaluronan – Septonex

Byla zaznamenávána emisní spektra a doba života aniontové formy ArO^- fluorescenční sondy HPTS v systému hyaluronan – Septonex. Koncentrace hyaluronanu byla konstantní, a to $7\text{ mg}\cdot\text{dm}^{-3}$ ve třech molekulových hmotnostech 300 kDa, 1 MDa a 1,75 MDa. Koncentrace Septonexu se postupně zvyšovala od $1\cdot 10^{-6}$ až po $2\cdot 10^{-2}\text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$.

Dále byl studován vliv změny koncentrace 1,75 MDa hyaluronanu na charakteristiky HPTS v roztocích micelárního koloidu o koncentraci Septonexu $3\cdot 10^{-3}$, $5\cdot 10^{-3}$, $7\cdot 10^{-3}$, $1\cdot 10^{-2}$

a $2 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Koncentrace hyaluronanu se pro každou sadu vzorků Septonexu pohybovala od 0 do $15 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$.

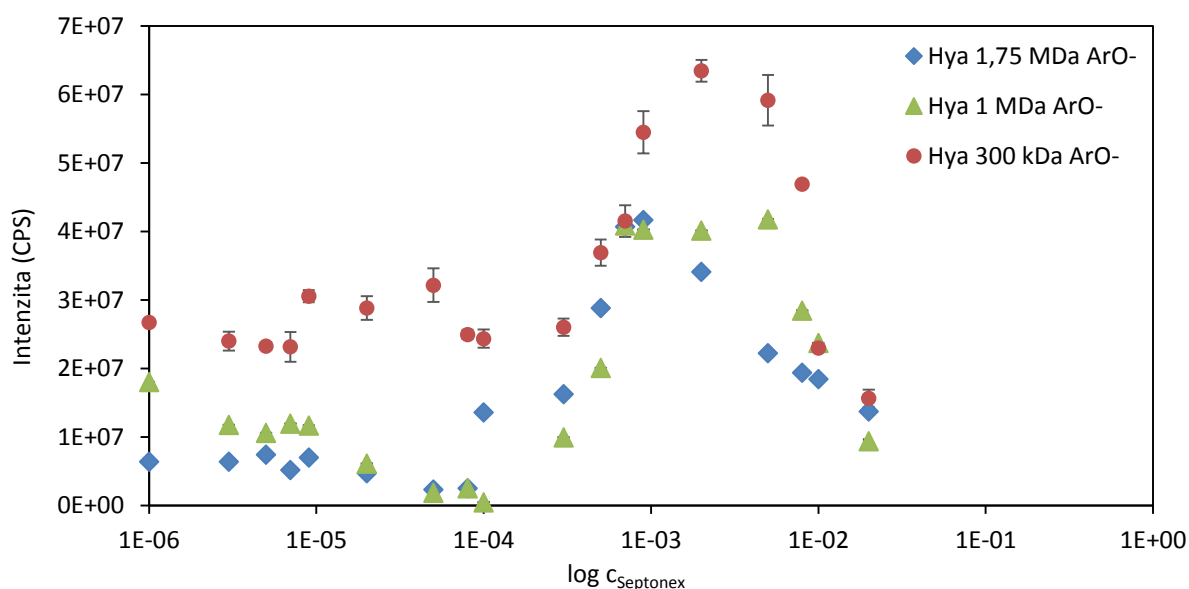
Ustálená fluorescence vzorků obsahujících hyaluronan o molekulové hmotnosti 300 kDa již byly měřeny na přístroji Aminco Bowman Series 2.

5.2.2.1 Ustálená fluorescence

Z grafu uvedeného níže (viz **Obr. 41**) můžeme pozorovat pokles intenzity ArO^- při dosažení koncentrace Septonexu $2 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ pro hyaluronan o molekulové hmotnosti 1,75 a 1 MDa. Pro 300kDa hyaluronan nastává mírný pokles až při koncentraci $5 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Stejně jako v případě měření CTAB, i zde bylo pozorováno zabarvení roztoku vlivem vznikajícího komplexu HPTS – Septonex.

S rostoucí koncentrací Septonexu pak od hodnoty $3 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ pro 300kDa hyaluronan, $8 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ pro 1,75MDa hyaluronan a $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ pro 1MDa hyaluronan dochází k nárůstu intenzity ArO^- . Pro koncentrace Septonexu nižší, než jsou uvedeny výše a pro koncentrace Septonexu vyšší, než výše uvedené, roste intenzita ArO^- . Můžeme tyto koncentrace Septonexu považovat za kritické agregační koncentrace vůči hyaluronanu s koncentrací $7 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$. Při dosažení kritické micelární koncentrace dochází u hyaluronanu o molekulové hmotnosti 1,75 MDa a 1 MDa k výraznému poklesu. Pro hyaluronan o molekulové hmotnosti 300 kDa nastává tento pokles až při koncentraci $2 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$.

V tabulce níže (viz **Tab. 15**) můžeme pozorovat posuv pozice emisního maxima ArO^- . Oproti vlnové délce maxima při nízkých koncentracích Septonexu, dochází k posuvu o cca 18 nm pro maximální koncentraci vlivem vznikajících agregátů. U hyaluronanu s molekulovou hmotností 300 kDa dochází k posuvu z 506 nm na 524 nm. Trend je u této molekulové hmotnosti hyaluronanu je sice jako v případě molekulové hmotnosti 1,75 a 1 MDa.



Obr. 41 Závislost intenzity ArO^- HPTS v komplexu hyaluronan – Septonex na logaritmu koncentrace Septonexu. Intenzita neutrální formy pro 1,75MDa hyaluronan (\blacklozenge), pro 1MDa hyaluronan (\blacktriangle) a pro hyaluronan o molekulové hmotnosti 300 kDa (\bullet).

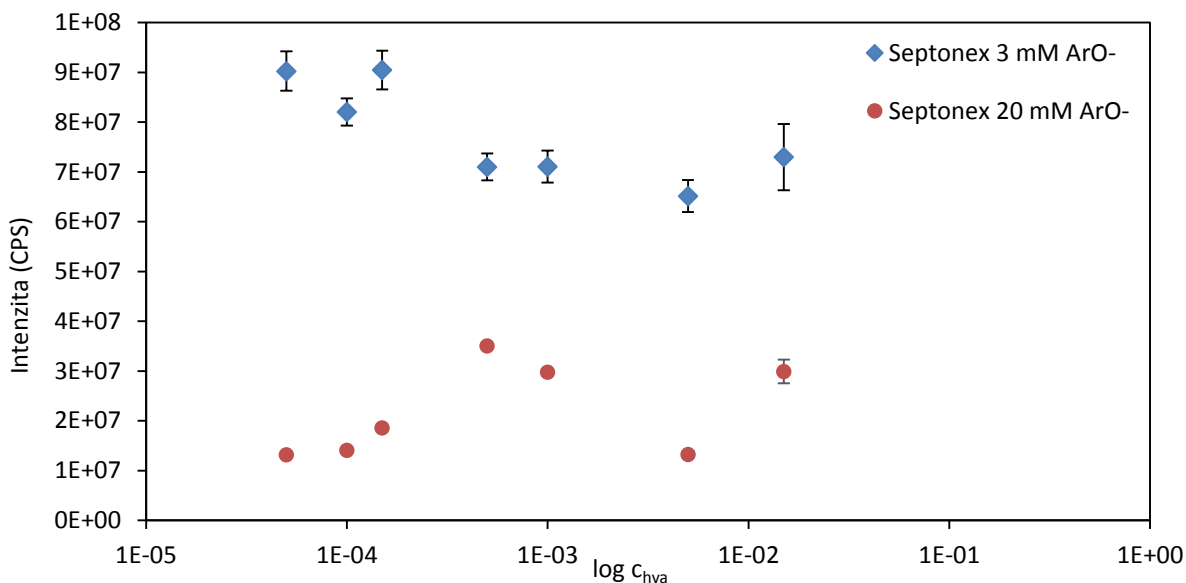
Emisní spektra jednotlivých molekulových hmotností hyaluronanu jsou pro přehlednost uvedena v příloze: 1,75 MDa viz příloha **Obr. 65**, 1 MDa viz příloha **Obr. 66** a 300 kDa viz příloha **Obr. 67**.

Tab. 15 Pozice emisních maxim aniontové formy HPTS v systému hyaluronan – Septonex.

C_{Septonex} ($\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$)	Hya 1,75MDa	Hya 1 MDa	Hya 300 kDa
	λ_{em} (nm)		
0	511	511	506
$1\cdot 10^{-6}$	511	511	504
$9\cdot 10^{-4}$	532	531	524
$2\cdot 10^{-3}$	528	531	521
$2\cdot 10^{-2}$	529	527	524
Voda	523		

Dále byl sledován vliv přídavku hyaluronanu o molekulové hmotnosti 1,75 MDa k micelárnímu roztoku Septonexu o koncentraci $3\cdot 10^{-3}$, $5\cdot 10^{-3}$, $7\cdot 10^{-3}$, $1\cdot 10^{-2}$ a $2\cdot 10^{-2}$ $\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ na emisní charakteristiky aniontové formy HPTS (viz **Obr. 42**). Pro názornost jsou zde uvedeny pouze hraniční koncentrace Septonexu, a to $3\cdot 10^{-3}$ $\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ a $2\cdot 10^{-2}$ $\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$. Z grafu je patrný velký rozdíl intenzit ArO^- . Grafy pro ostatní koncentrace CTAB jsou uvedeny v příloze (viz příloha **Obr. 69**).

Změna koncentrace hyaluronanu neměla, až na malé výkyvy, velký vliv na intenzitu ArO^- . Je zde ovšem patrný výrazný rozdíl v intenzitě ArO^- pro jednotlivé koncentrace Septonexu. Pro nejnižší koncentraci Septonexu vykazují vzorky vysokou intenzitu ArO^- . Se zvyšující se koncentrací Septonexu u jednotlivých vzorků intenzita ArO^- klesá. Pokles může být způsoben rozdílnou lokalizací HPTS v Septonexu oproti CTAB, podobně jako je tomu v případě měření systému hyaluronan – Septonex pomocí α -naftolu, kdy vlivem lokalizace fluoroforu v hydrofobních částech micel docházelo ke snižování intenzity NpO^- pro jednotlivé rostoucí koncentrace Septonexu. Může se zde ovšem projevit i vznik nefluoreskujícího komplexu HPTS v micelách Septonexu, stejně jako v případě micel CTAB. Ani v případě Septonexu nedochází k ovlivnění doby života HPTS.



Obr. 42 Závislost intenzity ArO^- na koncentraci hyaluronanu (1,75 MDa) pro Septonex o koncentraci $3 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ (3 mM) a $2 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ (20 mM).

5.2.2.2 Časově rozlišená fluorescence

Z tabulky uvedené níže (viz **Tab. 16**) můžeme pozorovat pokles průměrné doby života HPTS v systému hyaluronan – Septonex. Při dosažení koncentrace $5 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ pro 1,75MDa hyaluronan a $8 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ pro 1MDa hyaluronan dochází k poklesu průměrné doby života ArO^- vlivem vznikajícího komplexu HPTS – Septonex. Po dosažení kritické micelární koncentrace dochází u 1,75 a 1 MDa hyaluronanu k pozvolnému nárůstu průměrné doby života ArO^- až k hodnotě okolo 6 ns. Malý rozdíl průměrné doby života při nízkých koncentracích k maximální koncentraci Septonexu značí menší míru hydratace hyaluronanu u komplexu hyaluronan – Septonex. Vzhledem k relativně vysokým hodnotám průměrné doby života ArO^- v koncentračním rozsahu $5 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ až $7 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ Septonexu můžeme předpokládat solubilizaci HPTS do Sternovy vrstvy mezi řetězce hyaluronanu a Septonex.

U hyaluronanu o molekulové hmotnosti 300 kDa je situace rozdílná. Při dosažení koncentrace Septonexu $5 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ dochází ke skokovému poklesu doby života na hodnotu 0,01 ns. Takto nízké hodnoty jsou přítomny až do koncentrace $2 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, kdy dochází k mírnému růstu na hodnotu 0,97 ns. Tento pokles může značit velkou míru reprotonace HPTS. Je možné, že u hyaluronanu o molekulové hmotnosti 300 kDa dochází k silné repulzi HPTS vlivem záporných nábojů, a tím je fluorofor tlačěn do hydrofobního středu micel. S rostoucí koncentrací Septonexu stoupá průměrná doba života ArO^- k hodnotě 4,88 ns.

Experimenty stanovující vliv zvyšující se koncentrace hyaluronanu o molekulové hmotnosti 1,75 MDa na deprotonační charakteristiky HPTS v prostředí Septonexu vykazovaly relativně stejnou hodnotu průměrné doby života ArO^- , a to 5,6 ns. Při měření časově rozlišené fluorescence nedocházelo ke změnám průměrné doby života s rostoucí koncentrací Septonexu. Nedocházelo tedy ke změnám jako v případě měření ustálené fluorescence (viz **Obr. 42**). Z toho se dá usuzovat, že dochází ke statickému samozhášení molekul HPTS v micelárním roztoku Septonexu. Jak bylo řečeno výše, tento typ zhášení se projevuje změnou intenzity fluorescence, nikoli změnou doby života fluoroforu.

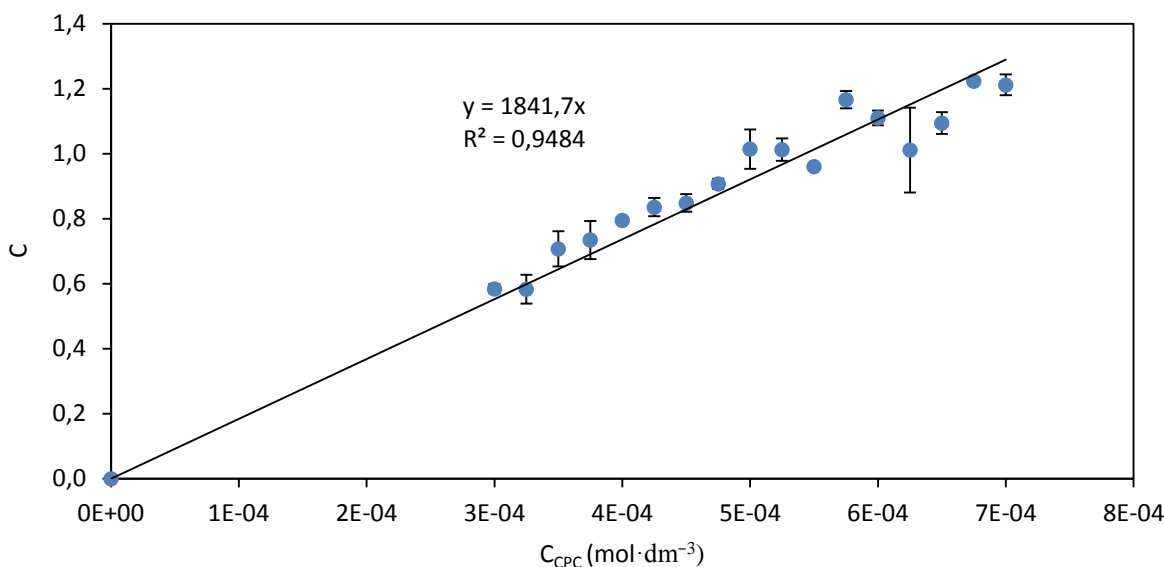
Tab. 16 Průměrné doby života aniontové formy HPTS v systému hyaluronanu o molekulové hmotnosti 1,75 MDa, 1 MDa a 300 kDa v Septonexu.

C_{Septonex} (M)	Hya 1,75 MDa	Hya 1 MDa	Hya 300 kDa
	ArO ⁻	ArO ⁻	ArO ⁻
	$t_{\text{průměr}}$	$t_{\text{průměr}}$	$t_{\text{průměr}}$
	(ns)	(ns)	(ns)
0	5,46	5,37	3,49
$1 \cdot 10^{-6}$	5,40	5,40	5,42
$3 \cdot 10^{-6}$	5,42	5,37	5,34
$5 \cdot 10^{-6}$	5,37	5,40	5,45
$7 \cdot 10^{-6}$	5,41	5,38	5,44
$9 \cdot 10^{-6}$	5,38	5,38	5,25
$2 \cdot 10^{-5}$	4,50	5,39	0,01
$5 \cdot 10^{-5}$	3,52	5,03	0,01
$8 \cdot 10^{-5}$	3,95	3,57	0,01
$1 \cdot 10^{-4}$	3,51	3,98	0,02
$3 \cdot 10^{-4}$	3,96	4,59	0,04
$5 \cdot 10^{-4}$	4,22	4,22	0,24
$7 \cdot 10^{-4}$	5,24	5,02	0,02
$9 \cdot 10^{-4}$	5,70	5,76	0,13
$2 \cdot 10^{-3}$	5,86	5,89	0,97
$5 \cdot 10^{-3}$	5,86	5,88	3,75
$8 \cdot 10^{-3}$	6,00	5,85	4,29
$1 \cdot 10^{-2}$	6,03	5,90	4,64
$2 \cdot 10^{-2}$	6,02	5,91	4,88

5.3 Stanovení agregačního čísla Septonexu

Agregační číslo Septonexu bylo zjišťováno měřením časově rozlišené fluorescence pyrenu v přítomnosti zhášedce cetylpyridinium chloridu (CPC) v micelách Septonexu. Koncentrace tenzidu byla konstantní a byla volena tak, aby vysoce převyšovala hodnotu kritické micelární koncentrace Septonexu.

Z naměřených dob života byl dle rovnic popsanych v kapitole 4.3.2 sestaven graf závislosti poměru τ_0/τ , kde τ_0 představuje dobu života pyrenu bez zhášedce a τ dobu života v přítomnosti zhášedce na koncentraci zhášedce CPC (viz Obr. 43). Porovnáním rovnice (22) (viz kapitola 4.3.2) a rovnice lineární regrese z grafu uvedeného níže (viz Obr. 43) bylo stanoveno agregační číslo Septonexu na hodnotu 104 molekul pro koncentraci tenzidu $6 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$.



Obr. 43 Graf závislosti poměru τ_0/τ na koncentraci zhášedce CPC proložené lineární regresí.

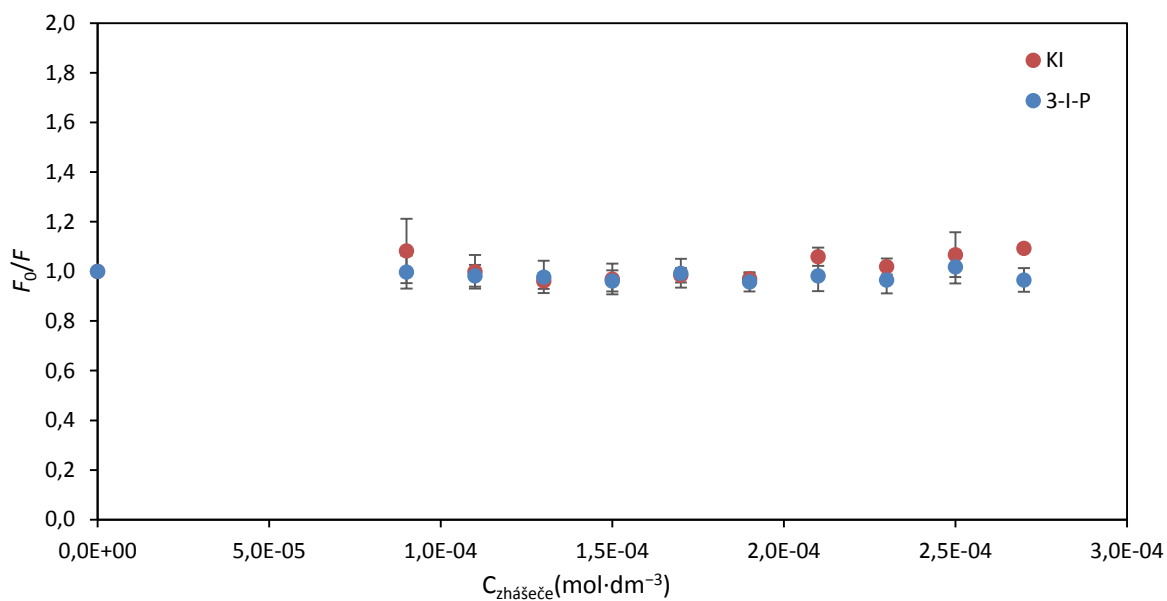
5.4 Zhášení α -naftolu v micelách CTAB pomocí chlorových a jodových derivátů

Byla měřena emisní spektra fluorescenční sondy α -naftolu tenzidu CTAB o koncentraci $2 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ v přítomnosti zhášedce cetylpyridiniumchloridu (CPC), 3-jodpropanové kyseliny a jodidu draselného. Koncentrace zhášedce byla volena tak, aby v poměru s koncentrací micel CTAB byl rozsah od 0,5 do 1,5.

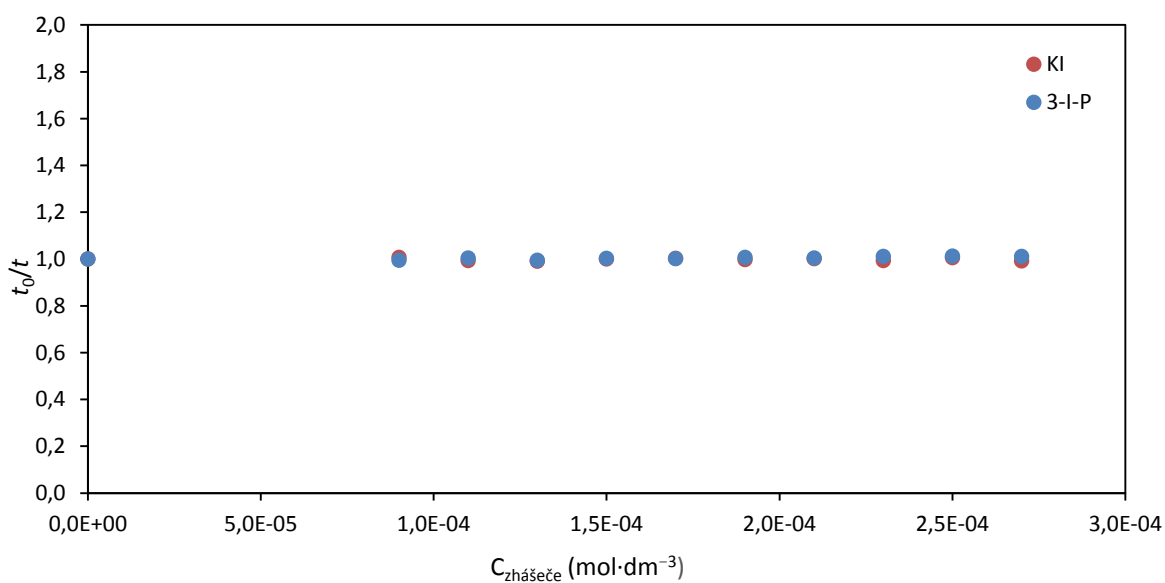
S rostoucí koncentrací zhášedce na bázi jodového derivátu nedocházelo k poklesu intenzity ustálené fluorescence (viz **Obr. 44**). Výsledný poměr intenzity emise bez zhášedce F_0 k intenzitě emise v přítomnosti zhášedce F vykazoval relativně stabilní hodnoty pohybující se kolem jedné. Nedocházelo ani ke změně při měření časově rozlišené fluorescence (viz **Obr. 45**), kdy poměr doby života bez přítomnosti zhášedce t_0 k době života v přítomnosti zhášedce t nevykazoval změnu s rostoucí koncentrací jodového zhášedce. Dalo by se tedy předpokládat, že nedochází ke zhášení α -naftolu jodovými deriváty.

U chlorového derivátu cetylpyridiniumchloridu (viz **Obr. 46**) docházelo s rostoucí koncentrací zhášedce k poklesu intenzity ustálené fluorescence. Výsledný poměr F_0 k intenzitě emise v přítomnosti zhášedce F vykazuje rostoucí trend. Nedocházelo ovšem k výrazné změně v době života fluoroforu (viz **Obr. 47**). Dá se tedy předpokládat, že se jedná o statické zhášení s lineárním charakterem růstu poměru F_0/F .

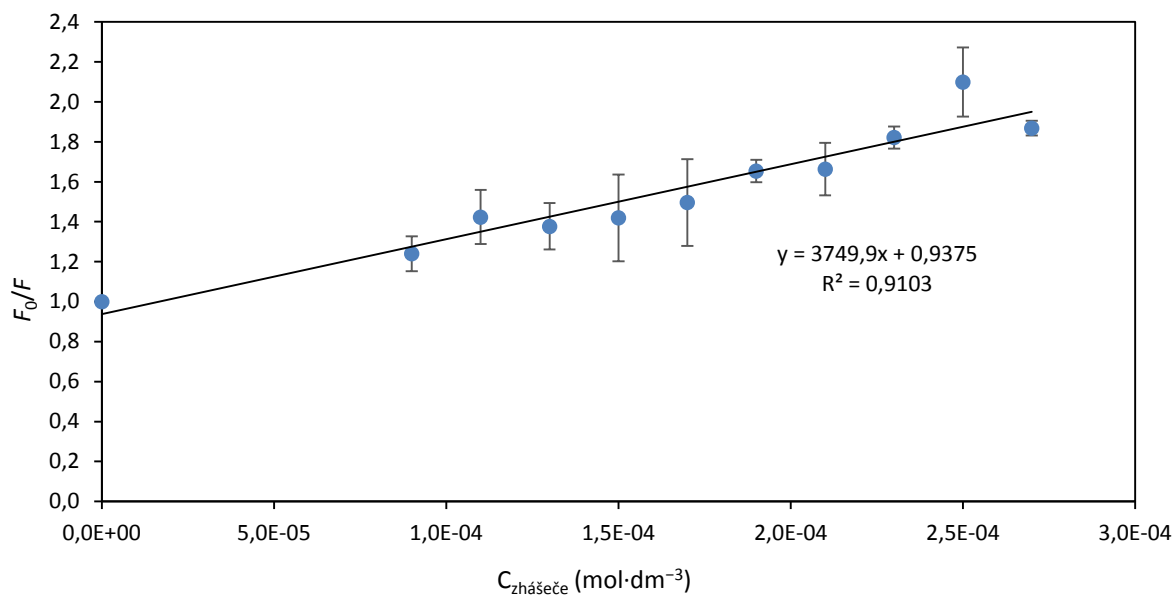
Měření zhášení pomocí jodových derivátů mělo za cíl potvrzení lokalizace α -naftolu v micelách a agregátech. Jodové deriváty nevykazovaly dynamické ani statické zhášení fluoroforu, a to ani v čisté vodě. Z toho důvodu byl pro potvrzení lokalizace fluoroforu vyzkoušen derivát chlóru. Konkrétně cetylpyridinium chlorid, se kterým byly prováděny experimenty na stanovení agregačního čísla. Tento zhášedce již vykazoval hledané vlastnosti a byla potvrzena lokalizace α -naftolu na povrchu micel CTAB.



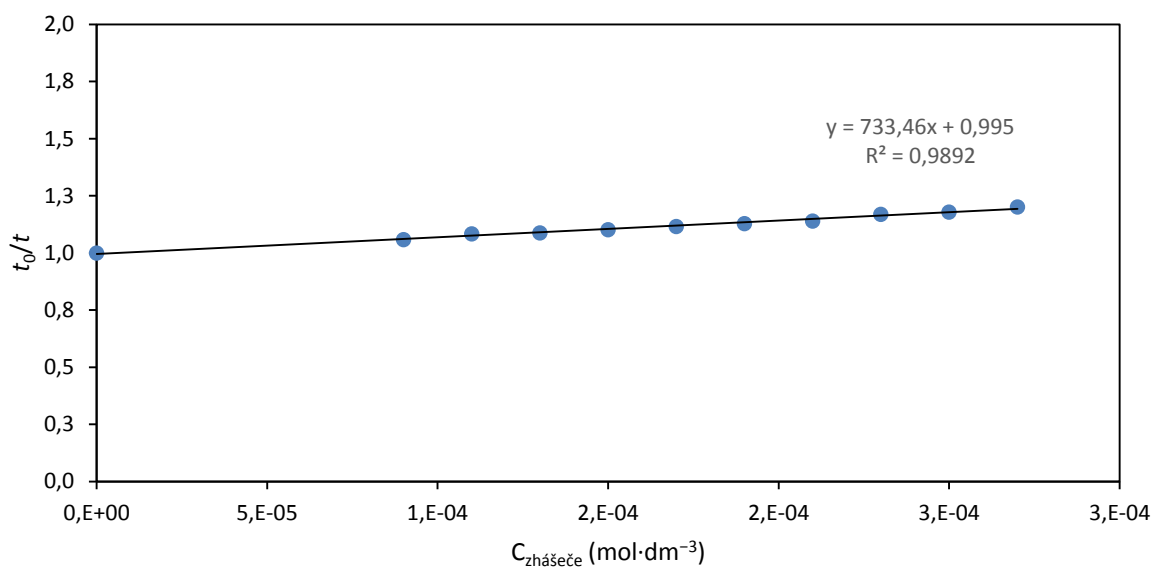
Obr. 44. Grafy závislosti poměru intenzity emise bez zhášedce F_0 k intenzitě emise v přítomnosti zhášedce F na koncentraci zhášedce 3-jodpropanové kyseliny (3-I-P) a jodidu draselného (KI).



Obr. 45 Grafy závislosti doby života bez zhášedce t_0 k době života v přítomnosti zhášedce t na koncentraci zhášedce 3-jodpropanové kyseliny (3-I-P) a jodidu draselného (KI).



Obr. 46 Grafy závislosti poměru intenzity emise bez zhášeeče F_0 k intenzitě emise v přítomnosti zhášeeče F na koncentraci zhášeeče cetylpyridiniumchloridu (CPC).



Obr. 47 Grafy závislosti doby života bez zhášeeče t_0 k době života v přítomnosti zhášeeče t na koncentraci zhášeeče cetylpyridiniumchloridu (CPC).

6 ZÁVĚR

Cílem této diplomové práce byla charakterizace hydratačního obalu hyaluronanu a jeho vlivu na micelární komplex hyaluronanu a tenzidu. Studie probíhala za použití dvou tenzidů, CTAB a Septonexu. Hyaluronan byl zvolen ve třech molekulových hmotnostech, a to 1,75 MDa, 1 MDa a 300 kDa. K charakterizaci vzniklých komplexů byly použity dvě fluorescenční sondy podstupující přenos protonů v excitovaném stavu, konkrétně α -naftol a HPTS. Jako modelový systém k posouzení hydratačních vlastností sloužil systém polystyrensulfonyl (PSS) – CTAB popřípadě Septonex. PSS byl zvolen ve dvou molekulových hmotnostech 1 MDa a 70 kDa.

Pro posouzení deprotonačních charakteristik jednotlivých fluoroforů byla měřena ustálená a časově rozlišená fluorescence α -naftolu a HPTS v nepolárním rozpouštědle chloroformu, v polárním aprotickém DMSO a v polárním protickém, ve vodě a ethanolu.

Emisní charakteristiky α -naftolu se pro jednotlivé tenzidy lišily. Zatímco v systému hyaluronan – CTAB docházelo k solubilizaci fluoroforu do mezifázového rozhraní Sternovy vrstvy, což se projevovalo nárůstem intenzity fluorescence aniontové i neutrální formy fluoroforu, u systému hyaluronan – Septonex se α -naftol, vzhledem k poklesu intenzity fluorescence aniontové formy a nárůstu intenzity fluorescence neutrální formy fluoroforu, solubilizoval do hydrofobních částí micel. Vlivem solubilizace α -naftolu do komplexu hyaluronan – tenzid docházelo i ke změně disociační konstanty pK_a^* . V komplexu hyaluronan – Septonex, dosahovaly hodnoty pK_a^* 1,99 pro 1,75 MDa hyaluronan, 2,46 pro 1 MDa hyaluronan a 2,30 pro 300kDa hyaluronan. Tyto relativně vysoké hodnoty pK_a^* byly přítomny také u systému PSS – Septonex a taktéž u systému PSS – CTAB. U polymeru PSS jsou tyto hodnoty pK_a^* způsobeny absencí hydratační vrstvy. U systému hyaluronan – Septonex jsou tyto hodnoty pK_a^* způsobeny lokalizací α -naftolu, který se, dle emisního spektra, nachází v hydrofobní části micel, kde již není patrný vliv hydratačního obalu hyaluronanu. Situace je ovšem odlišná u systému hyaluronan – CTAB, kde již systém vykazuje relativně nízké hodnoty pK_a^* oproti výše zmíněným systémům, tedy 1,78 pro 1,75MDa hyaluronan, 1,46 pro 1MDa hyaluronan a 1,59 pro 300kDa hyaluronan. Vzhledem k lokalizaci fluoroforu se dá předpokládat, že hydratační obal hyaluronanu zde přispívá k vyšší míře disociace fluoroforu.

Zvyšování koncentrace hyaluronanu v micelárním roztoku tenzidu nevykazovalo velký vliv na emisní charakteristiky fluoroforu. Je zde ovšem patrný vliv celkové koncentrace tenzidu. V systému hyaluronan – Septonex se intenzita fluorescence aniontové formy pro jednotlivé koncentrace Septonexu snižovala. Jak již bylo uvedeno výše, fluorofor je v tomto systému solubilizován do hydrofobního středu micel, a tím pádem nedochází k jeho deprotonaci. S rostoucí koncentrací Septonexu se snižuje intenzita fluorescence deprotonované formy a roste intenzita fluorescence neutrální formy sondy. Fluorofor při koncentraci $3 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ Septonexu vykazoval velmi nízké deprotonační konstanty k_{pt} , které se pohybovaly v rozmezí od $2,5 \cdot 10^{-9} \text{ s}^{-1}$ pro nulovou koncentraci hyaluronanu až do $4,4 \cdot 10^{-9} \text{ s}^{-1}$ pro koncentraci $15 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$. Dá se tedy předpokládat tvorba kompaktnějších agregátů než v případě Septonexu $2 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, kde byly hodnoty k_{pt} až pětkrát vyšší. U systému hyaluronan – CTAB nedochází ani k růstu intenzity fluorescence neutrální a aniontové formy sondy pro jednotlivé koncentrace CTAB. Vzhledem k solubilizaci fluoroforu do Sternovy vrstvy mezifázového rozhraní by se dalo očekávat, že vzhledem k rostoucí koncentraci CTAB a hyaluronanu bude

docházet ke zvětšování plochy mezifázového rozhraní a tím poroste intenzita fluorescence jak aniontové, tak neutrální formy sondy. Ovšem i když je změna intenzity fluorescence neutrální a aniontové formy sondy s rostoucí koncentrací hyaluronanu malá, vykazuje spíše klesající trend. Deprotonační konstanty k_{pt} se pro $2 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ CTAB pohybují v rozmezí od $1,67 \cdot 10^{-9} \text{ s}^{-1}$ pro nulovou koncentraci hyaluronanu až po $1,96 \cdot 10^{-9} \text{ s}^{-1}$ pro koncentraci $15 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$. Pro $3 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ CTAB jsou deprotonační konstanty o něco vyšší, pohybují se v rozmezí 2,08 až $2,04 \cdot 10^{-9} \text{ s}^{-1}$. Rovněž průměrná doba života neutrální a aniontové formy fluoroforu je pro $2 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ CTAB vyšší. Z měření časově rozlišené fluorescence se tedy dá přepokládat větší míra tvorby komplexů hyaluronanu a CTAB s rostoucí koncentrací jak hyaluronanu, tak tenzidu. Dá se tedy přepokládat, že pokud by se hydratační obal hyaluronanu vyskytoval po celé délce jeho řetězce, docházelo by k výraznějším změnám na deprotonačních charakteristikách neutrální formy fluoroforu. Zde se jeví, že je hydratační obal soustředěn do míst v okolí záporného náboje disociované karboxylové skupiny, kde probíhá i interakce s kladným nábojem tenzidu, a α -naftol je solubilizován ve vzniklém mezifázovém rozhraní.

Měřením ustálené fluorescence α -naftolu a HPTS byla stanovena kritická agregační koncentrace (CAC) jednotlivých tenzidů ve vztahu k hyaluronanu o koncentraci $7 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$. Pro CTAB byla z poklesu intenzity fluorescence neutrální formy α -naftolu stanovena CAC na $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. U intenzity fluorescence aniontové formy fluoroforu nebyl pokles tak patrný. Z poklesu intenzity fluorescence HPTS byla stanovena CAC na hodnotu $3 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Hodnoty CAC byly stejné pro všechny molekulové hmotnosti hyaluronanu. U Septonexu byl již patrný malý vliv jednotlivých molekulových hmotností hyaluronanu na hodnotu kritické agregační koncentrace. Z poklesu neutrální formy α -naftolu byla stanovena CAC na $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ pro 1MDa a 300kDa hyaluronan. U 1,75 MDa byla CAC posunuta na koncentraci $8 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Z poklesu HPTS byla stanovena hodnota CAC $8 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ pro 1,75 MDa hyaluronan, stejně jako v případě α -naftolu. Pro 1 MDa hyaluronan činila CAC $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ a pro hyaluronan o molekulové hmotnosti 300 kDa činila hodnota CAC $3 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$.

Celkově docházelo při měření ustálené fluorescence HPTS k prudkému poklesu intenzity fluorescence, patrně vlivem statického samo-zhášení, hned po dosažení kritické micelární koncentrace. V měření časově rozlišené fluorescence je patrný malý rozdíl mezi jednotlivými tenzidy. Průměrná doba života aniontové formy HPTS pro největší koncentraci CTAB činila 6,01, 6,22 a 6,40 ns pro hyaluronan o molekulové hmotnosti 1,75 MDa, 1 MDa a 300 kDa. U Septonexu s nejvyšší koncentrací činila průměrná doba života podobně jako u CTAB 6,02 ns pro 1,75MDa a 5,91 ns pro 1MDa hyaluronan. U molekulové hmotnosti 300 kDa docházelo u Septonexu k výrazně nižší průměrné době života ArO^- (4,88 ns). Dá se tedy přepokládat snížený vliv hydratace hyaluronanu na fluorofor HPTS buď vlivem odlišné lokalizace fluoroforu nebo vlivem odlišné struktury celého komplexu hyaluronan – Septonex.

Dále bylo stanoveno agregační číslo Septonexu. Zhášením pyrenu pomocí zhášeče cetylpyridinium chloridu (CPC) bylo určeno agregační číslo $6 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ Septonexu na 104. Agregační číslo mělo být použito v dalších experimentech na stanovení pozice α -naftolu v micelách Septonexu pomocí jodových derivátů. Pro CTAB je již agregační číslo známo. Ovšem při měření zhášení fluorescence jodovými deriváty v micelách CTAB nedocházelo k poklesu intenzity fluorescence emisního záření ani ke změnám v době života

fluoroforu. Jodové deriváty nevykazovaly požadované vlastnosti ani v micelách Septonexu. Pro potvrzení lokalizace α -naftolu byl zvolen zhášec obsahující chlor, tedy již výše zmíněný cetylpyridinium chlorid. Tento zhášec by se měl svojí strukturou začleňovat do struktury micel tak, že hydrofobní řetězec bude kopírovat pozici hydrofobního řetězce tenzidu a část obsahující chlor bude na povrchu micely. Při měření docházelo ke statickému zhášení α -naftolu, čímž byla potvrzena jeho lokalizace v CTAB.

Z měření plyne vliv hydratačního obalu na látky solubilizovány v mezifázovém rozhraní Sternovy vrstvy komplexu hyaluronan – tenzid. Hydratační vrstva má také vliv na formování komplexu, před dosažením kritické micelární koncentrace. U řetězce hyaluronanu je tato hydratační vrstva pravděpodobně fokusována do okolí disociovaných karboxylových skupin a není tedy rovnoměrně rozprostřena po celé jeho struktuře.

8 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] VALEUR, Bernard. Molecular Fluorescence. 1st ed. Weinheim: Wiley-VCH, 2002. ISBN 3527600248.
- [3] Fluorofory v biomedicině [online]. [cit. 2016-02-04]. Dostupné z WWW: <http://www1.lf1.cuni.cz/~zfishar/fluorescence/soubory/fluorofory.htm>
- [4] Univerzita Karlova: Principi fluorescence. [online]. [cit. 2016-02-07]. Dostupné z: <http://psych.lf1.cuni.cz/fluorescence/soubory/principy.htm>
- [5] W. ALLEN, Michael. Measurement of Fluorescence Quantum Yields: Technical Note: 52019. In: Thermo Fisher Scientific [online]. Madison WI, USA: Thermo Fisher Scientific, 2015 [cit. 2016-02-07]. Dostupné z: <https://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:qMjPDE5oXcsJ:https://www.researchgate.net/file.PostFileLoader.html%3Fid%3D55e65d055f7f715f718b460f%26assetKey%3DAS%253A273843782914049%25401442300853562+&cd=3&hl=cs&ct=clnk&gl=cz>
- [6] A Guide to Recording Fluorescence Quantum Yields. In: HORIBA: Jobin Yvon [online]. Dalston Gardens, Stanmore, Middlesex HA7 1BQ UK: HORIBA Jobin Yvon, 2016 [cit. 2016-02-07]. Dostupné z: <http://www.horiba.com/fileadmin/uploads/Scientific/Documents/Fluorescence/quantumyieldstrad.pdf>
- [7] KAUTSKY, Hans. Quenching of luminescence by oxygen. Transactions of the Faraday Society [online]. 1939, 35, 216- [cit. 2016-02-15]. DOI: 10.1039/tf9393500216. ISSN 0014-7672. Dostupné z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=tf9393500216>
- [8] KNIBE, Henk, Dieter REHM a Albert WELLER. Intermediates and Kinetics of Fluorescence Quenching by Electron Transfer. Berichte der Bunsengesellschaft für physikalische Chemie. 1968, roč. 72, č. 2, s. 257-263. DOI: 10.1002/bbpc.19680720237
- [9] Fluorescence Quenching and External Spin-Orbit Coupling Effects. KEARVELL, A. a F. WILKINSON. Molecular Crystals: University of East Anglia, Norwich, England [online]. Vol. 4. Germany: Gordon and Breach Science Publishers, 1968, s. 69-81 [cit. 2016-02-15]. Dostupné z: http://www.lsc-international.org/conf/pfiles/lsc1966_069.pdf
- [10] Kasha, M. (1952) Collisional perturbation of spin-orbit coupling and the mechanism of fluorescence quenching - a visual demonstration of the perturbation, Journal of Chemical Physics 20, 71-74
- [11] STEINER, Robert F. a Edward P. KIRBY. Interaction of the ground and excited states of indole derivatives with electron scavengers. The Journal of Physical Chemistry [online]. 1969, 73(12), 4130-4135 [cit. 2016-02-16]. DOI: 10.1021/j100846a015. ISSN 0022-3654. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/j100846a015>
- [12] SOMMER, Lumír. Analytická spektrometrie I. Praha: Státní pedagogické nakladatelství, 1986. 173 s
- [13] PETER, TC So a Y Dong CHEN. *ENCYCLOPEDIA OF LIFE SCIENCES: Fluorescence Spectrophotometry* [online]. In: . Massachusetts Institute of Technology,

- Cambridge, Massachusetts, USA: Macmillan Publishers Ltd, Nature Publishing Group, 2002, s. 1-4 [cit. 2016-02-26]. Dostupné z: <http://web.mit.edu/solab/Documents/Assets/So-Fluorescence%20spectrophotometry.pdf>
- [14] Horiba: Scientific Instruments & Systems [online]. HORIBA Scientific, 2016 [cit. 2016-02-27]. Dostupné z: <http://www.horiba.com/uk/scientific/products/fluorescence-spectroscopy/lifetime/fluorocube/fluorocube-our-compact-benchttop-spectrofluorometer-825/>
- [15] LUCHOWSKI, Rafal, Mariusz SZABELSKI, Pabak SARKAR, et al. Fluorescence Instrument Response Standards in Two-Photon Time-Resolved Spectroscopy. *Applied Spectroscopy* [online]. 2010, 64(8), 918-922 [cit. 2016-02-27]. DOI: 10.1366/000370210792081000. ISSN 00037028. Dostupné z: <http://asp.sagepub.com/lookup/doi/10.1366/000370210792081000>
- [16] ROBINSON, G. W., P. J. THISTLETHWAITE a J. LEE. Molecular aspects of ionic hydration reactions. *The Journal of Physical Chemistry* [online]. 1986, 90(18), 4224-4233 [cit. 2016-03-09]. DOI: 10.1021/j100409a003. ISSN 0022-3654. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/j100409a003>
- [17] BECKER., Carol A. a Solana , Calif. BEACH. VISIBLE LIGHT PH CHANGE FOR ACTIVATING POLYMERS AND OTHER PH DEPENDENT REACTANTS. USA. 6,143,138. Přihlášeno Aug. 20, 1998. Uděleno Nov. 7, 2000.
- [18] NAG, Ashis a Kankan BHATTACHARYYA. Fluorescence enhancement of p-toluidino naphthalenesulphonate in a micellar environment. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* [online]. 1989, 47(1), 97-102 [cit. 2016-03-09]. DOI: 10.1016/1010-6030(89)85009-9. ISSN 10106030. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/1010603089850099>
- [19] ARNAUT, Luís G. a Sebastião J. FORMOSINHO. Excited-state proton transfer reactions I. Fundamentals and intermolecular reactions. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* [online]. 1993, 75(1), 1-20 [cit. 2016-03-09]. DOI: 10.1016/1010-6030(93)80157-5. ISSN 10106030. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/1010603093801575>
- [20] K. Weber, *Z. Phys. Chem.*, B15 (1931) 18
- [21] Forster. T. *Naturwissenschaften*. 1949, 36, 186.
- [22] CHOWDHURY, Papia, Rakesh KUMAR, Prakash CHANDRA SATI a Anirban PATHAK. Study of Proton Transfer Reaction Dynamics in Pyrrole 2-Carboxyldehyde: Department of Physics and Material Science & Engineering [online]. Jaypee Institute of Information Technology University, Noida, 2013 [cit. 2016-03-09]. Dostupné z: <http://arxiv.org/pdf/0901.3830.pdf>
- [23] WAN, Peter. a Deepak. SHUKLA. Utility of acid-base behavior of excited states of organic molecules. *Chemical Reviews* [online]. 1993,93(1), 571-584 [cit. 2016-03-09]. DOI: 10.1021/cr00017a024. ISSN 0009-2665. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/cr00017a024>
- [24] VETOKHINA, Volha. *Spectroscopy, photophysics, conformational equilibria, and photoinduced tautomerization in selected bifunctional proton donor-acceptor azaaromatic molecules: Institute of Physical Chemistr* [online]. Polish Academy of Sciences ul. Kasprzaka 44/52, O 1-224 Warsaw, 2012 [cit. 2016-03-09]. Dostupné z: http://rcin.org.pl/ichf/Content/26026/WA333_44315_F-B444-13_Vetokhina.pdf. Vedoucí práce Prof. dr hab. Jerzy Herbich.

- [25] Grabowski Z. R., Grabowska A., *Z. Phys. Chem. N.F.*, 1976, 101, 197.
- [26] Excited-state properties of 2-naphthol (the acidity constants): INTRODUCTION. In: California State University, Northridge [online]. Northridge, 2009 [cit. 2016-03-11]. Dostupné z: <https://www.csun.edu/~jeloranta/CHEM355L/experiment6a.pdf>
- [27] PINAKINBHAI JANI, KRUPA. THE PHOTOLENSITIZED REACTION AND MECHANISM OF 8-HYDROXY QUINOLINE-5-SULPHONIC ACID USING METHYLENE BLUE (MB) AS PHOTOLENSITIZER. *Sci. Revs. Chem. Commun* [online]. Government Science Collage, GANDHINAGAR (Guj.) INDIA, 2014, , 69-79 [cit. 2016-03-11]. ISSN 2277-2669. Dostupné z: [http://www.sadgurupublications.com/ContentPaper/2014/4_182_4\(2\)2014_SRCC.pdf](http://www.sadgurupublications.com/ContentPaper/2014/4_182_4(2)2014_SRCC.pdf)
- [28] PubChem: OPEN CHEMISTRY DATABASE [online]. USA: National Center for Biotechnology Information, U.S, 2016 [cit. 2016-02-27]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/1-naphthol#section=Top>
- [29] Sigma Aldrich: Inc. FLUKA. Sigma Aldrich Inc [online]. Honeywell Specialty Chemicals Seelze GmbH, 2016 [cit. 2016-02-27]. Dostupné z: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sial/n1000?lang=en&ion=CZ>
- [30] PubChem: OPEN CHEMISTRY DATABASE. ChemSpider: Search and share chemistry [online]. Royal Society of Chemistry, 2015 [cit. 2016-02-27]. Dostupné z: <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.6739.html?rid=8dc995ed-c411-4d70-9b60-3d885c6ffc4b>
- [31] PubChem: OPEN CHEMISTRY DATABASE. ChemSpider: Search and share chemistry [online]. Royal Society of Chemistry, 2015 [cit. 2016-03-12]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/61388#section=Parent-Compound>
- [32] PubChem: OPEN CHEMISTRY DATABASE. ChemSpider: Search and share chemistry [online]. Royal Society of Chemistry, 2015 [cit. 2016-03-02]. Dostupné z: <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.55317.html?rid=429523e4-7b3d-4bea-b01c-8b49c550a312>
- [33] Sigma Aldrich: Inc. FLUKA. Sigma Aldrich Inc [online]. Honeywell Specialty Chemicals Seelze GmbH, 2016 [cit. 2016-03-12]. Dostupné z: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/h1529?lang=en®ion=CZ>
- [34] VELEBNÝ, Vladimír. Hyaluronan: biopolymer pro tkáňové inženýrství [online]. Brno, 2012 [cit. 2016-02-25]. Dostupné z: http://www.fch.vutbr.cz/media/docs/vr/Velebny_teze.pdf. Teze habilitační práce. VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ, Fakulta chemická, Ústav fyzikální a spotřební chemie.
- [35] Sigma Aldrich: Inc. FLUKA. Sigma Aldrich Inc [online]. Honeywell Specialty Chemicals Seelze GmbH, 2016 [cit. 2016-03-25]. Dostupné z: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/substance/polysodium4styrenesulfonate123452570418111?lang=en®ion=CZ>
- [36] MAUCK, Christine K, Debra H WEINER, Susan A BALLAGH, et al. Single and multiple exposure tolerance study of polystyrene sulfonate gel: a phase I safety and colposcopy study. *Contraception* [online]. 2004,70(1), 77-83 [cit. 2016-03-25]. DOI: 10.1016/j.contraception.2004.02.016. ISSN 00107824. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0010782404000812>
- [37] Kobayashi H., Suzuki M., Kanayama N., Nishida T., Takigawa M., Terao T., CD44 stimulation by fragmented hyaluronic acid induces upregulation of urokinase-type

- plasminogen activator and its receptor and subsequently facilitates invasion of human chondrosarcoma cells. *Int. J. Cancer* 2002, 102:379-38
- [38] BARTOVSKÁ, Lidmila a Marie ŠIŠKOVÁ. Fyzikální chemie povrchů a koloidních soustav [online]. Vyd. 6., přeprac. Praha: Vydavatelství VŠCHT, 2010 [cit. 2016-02-24]. ISBN 978-80-7080-745-3. Dostupné z: http://147.33.74.135/knihy/uid_isbn-80-7080-579-X/pages-img/obalka-1.html
- [39] Science Learning Hub: Surfactants [online]. New Zealand: University of Waikato. [cit. 2016-02-23]. Dostupné z: <http://sciencelearn.org.nz/Science-Stories/Where-Land-Meets-Sea/Sci-Media/Images/Surfactants>
- [40] HOLMBERG, Krister. Surfactants and polymers in aqueous solution. 2nd ed. / . Hoboken, NJ: John Wiley & Sons, c2003. ISBN 0471498831.
- [41] InkJet site: Dispersing process. [online]. [cit. 2016-02-23]. Dostupné z: <http://www.inkline.gr/inkjet/newtech/tech/dispersion/>
- [42] VAN HORN, Wade D., Mark E. OGILVIE a Peter F. FLYNN. Reverse Micelle Encapsulation as a Model for Intracellular Crowding. *Journal of the American Chemical Society* [online]. 2009, 131(23), 8030-8039 [cit. 2016-02-25]. DOI: 10.1021/ja901871n. ISSN 0002-7863. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ja901871n>
- [43] Co je co v povrchové a koloidní chemii, výkladový slovník [online]. BARTOVSKÁ, Lidmila a Marie ŠIŠKOVÁ. 1.0. Vysoká škola chemicko-technologická v Praze: Vydavatelství VŠCHT Praha, 2005 [cit. 2016-02-25]. Dostupné z: http://147.33.74.135/knihy/uid_es-001/hesla/solubilizace.html
- [44] ChemSpider: Search and share chemistry [online]. Royal Society of Chemistry, 2015 [cit. 2016-02-25]. Dostupné z: <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.5754.html>
- [45] Sigma Aldrich Inc.: Hexadecyltrimethylammonium bromide (H6269) - Product Information Sheet [online]. Saint Louis Missouri [cit. 2016-02-25]. Dostupné z: https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma/Product_Information_Sheet/2/h6269pis.pdf
- [46] ChemSpider: Search and share chemistry [online]. Royal Society of Chemistry, 2015 [cit. 2016-02-25]. Dostupné z: <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.141396.html?rid=108dba47-60b3-454c-96df-7713166a82cc>
- [47] ChemSpider: Search and share chemistry [online]. Royal Society of Chemistry, 2015 [cit. 2016-03-12]. Dostupné z: <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.6837.html?rid=1fa400c0-1201-4901-8e1f-884b20a32edd>
- [48] Micellization of [1-(Ethoxycarbonyl)pentadecyl]trimethylammonium Bromide Studied by Conductometry and Potentiometry F. KOPECKÝ, M. VOJTEKOVÁ, J. OREMUSOVÁ, and O. GREKSÁKOVÁ *Chem. Papers* 47 (1) 55-59 (1993)
- [49] PubChem: OPEN CHEMISTRY DATABASE. ChemSpider: Search and share chemistry [online]. Royal Society of Chemistry, 2015 [cit. 2016-03-12]. Dostupné z: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/3-Hydroxy-2-naphthoic_acid#section=Hazards-Identification
- [50] LIN, M., Q. TANG, Q. AN, H. ZENG a Q. LING. Fluorescence properties of 3-hydroxy-2-naphthoic acid-doped poly(methyl methacrylate) composites. *Journal of Thermoplastic Composite Materials* [online]. , - [cit. 2016-03-15]. DOI: 10.1177/0892705714533564. ISSN 0892-7057. Dostupné z: <http://jtc.sagepub.com/cgi/doi/10.1177/0892705714533564>

- [51] YUSHCHENKO, Dmytro A., Volodymyr V. SHVADCHAK, Andrey S. KLYMCHENKO, Guy DUPORTAIL, Yves MÉLY, Vasyl G. PIVOVARENKO a Frank H. QUINA. 2-Aryl-3-hydroxyquinolones, a new class of dyes with solvent dependent dual emission due to excited state intramolecular proton transfer [online]. [cit. 2016-03-26]. DOI: 10.1039/b601400c. ISBN 10.1039/B601400C. Dostupné z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=B601400C>
- [52] SAHU, Kalyanasis, Durba ROY, Sudip Kumar MONDAL, Rana KARMAKAR a Kankan BHATTACHARYYA. Study of protein–surfactant interaction using excited state proton transfer. *Chemical Physics Letters* [online]. 2005, 404(4-6), 341-345 [cit. 2016-04-07]. DOI: 10.1016/j.cplett.2005.01.113. ISSN 00092614. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0009261405001582>
- [53] DAS6 Fluorescence decay analysis software: User guide. HORIBA JOBIN YVON.
- [54] SILLEN, Alain a Yves ENGELBORGHES. The Correct Use of "Average" Fluorescence Parameters [online]. [cit. 2016-03-21]. DOI: 10.1111/j.1751-1097.1998.tb09082.x. ISBN 10.1111/j.1751-1097.1998.tb09082.x. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1751-1097.1998.tb09082.x>
- [55] 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, 71(5), 2003-2006 [cit. 2016-03-21]. DOI: 10.1016/j.talanta.2006.09.010. ISSN 00399140. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0039914006006266>
- [56] 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, 102(48), 9710-9714 [cit. 2016-03-26]. DOI: 10.1021/jp982483n. ISSN 1089-5639. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jp982483n>
- [57] Webb, S. P.; Yeh, S. W.; Philips, L. A.; Tolbert, M. A.; Clark J. H. J. *Am. Chem. Soc.* 1984, 106, 7286.
- [58] GIESTAS, Letícia, Chang YIHWANG, João C. LIMA, Carolina VAUTIER-GIONGO, António LOPES, Antonio L. MAÇANITA a Frank H. QUINA. The Dynamics of Ultrafast Excited State Proton Transfer in Anionic Micelles † [online]. [cit. 2016-03-26]. DOI: 10.1021/jp0265900. ISBN 10.1021/jp0265900. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jp0265900>
- [59] PAPPAYEE, N a A.K. MISHRA. Excited state proton transfer of some substituted naphthols in liposomes. In: *Indian Journal of Chemistry* [online]. September. Madras: India Institute of Technology, 2000, s. 964-973 [cit. 2016-03-26]. Dostupné z: [https://www.google.cz/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&cad=rja&uact=8&ved=0ahUKEwj9rGLsd7LahVHRhQKHdmPAEoQFggkMAA&url=http%3A%2F%2Fnopr.niscair.res.in%2Fbitstream%2F123456789%2F26087%2F1%2FIJC-A%252039A\(9\)%2520964-973.pdf&usq=AFQjCNF8EesdpR-0GW_y2NwI9cP49ZB1XQ&sig2=Tf75W1gNjHd82pAko7R1eg](https://www.google.cz/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&cad=rja&uact=8&ved=0ahUKEwj9rGLsd7LahVHRhQKHdmPAEoQFggkMAA&url=http%3A%2F%2Fnopr.niscair.res.in%2Fbitstream%2F123456789%2F26087%2F1%2FIJC-A%252039A(9)%2520964-973.pdf&usq=AFQjCNF8EesdpR-0GW_y2NwI9cP49ZB1XQ&sig2=Tf75W1gNjHd82pAko7R1eg)
- [60] ALARGOVA, R. G., I. I. KOCHIASHKY, M. L. SIERRA a R. ZANA. Micelle Aggregation Numbers of Surfactants in Aqueous Solutions: A Comparison between the Results from Steady-State and Time-Resolved Fluorescence Quenching [online]. [cit. 2016-03-24]. DOI: 10.1021/la980565x. ISBN 10.1021/la980565x. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/la980565x>
- [61] INFELTA, P. P., M. GRATZEL, J. K. THOMAS a R. ZANA. Luminescence decay of hydrophobic molecules solubilized in aqueous micellar systems. Kinetic model: A Comparison between the Results from Steady-State and Time-Resolved Fluorescence

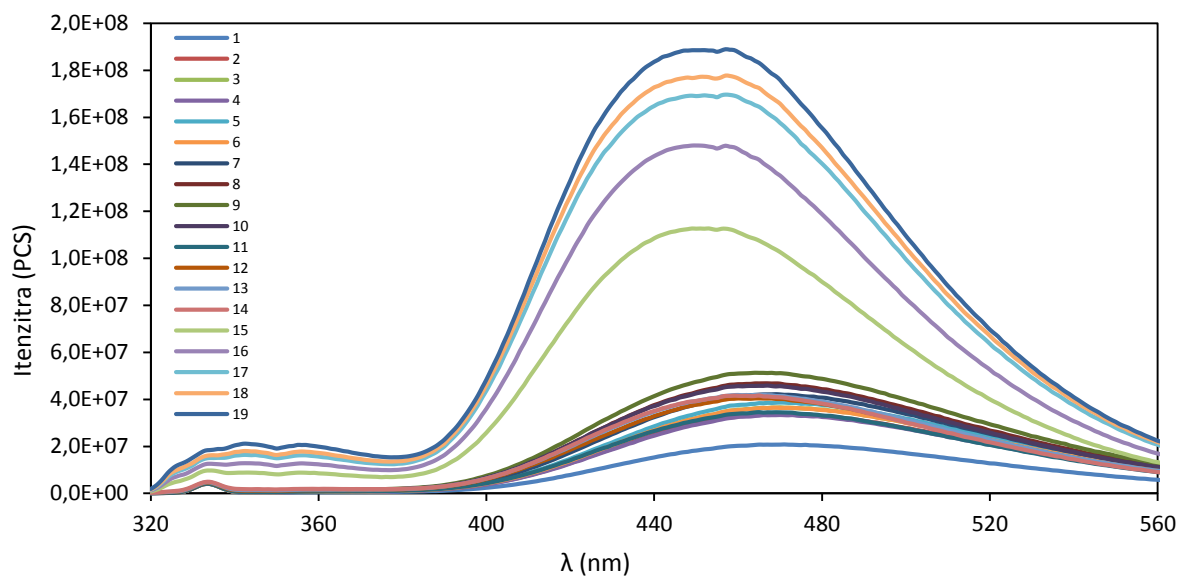
- Quenching [online]. [cit. 2016-03-24]. DOI: 10.1021/j100595a021. ISBN 10.1021/j100595a021. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/j100595a021>
- [62] Ware WR, Shukla PR, Sullivan PJ, et al. Intramolecular proton transfer in the excited singlet state of 3-hydroxy-2-naphthoic acid. *J Chem Phys* 1971; 55: 4048–4052.
- [63] MONDEK, Jakub a Miloslav PEKAŘ. The change in excited-state proton transfer kinetics of 1-naphthol in micelles upon the binding of polymers: The influence of hyaluronan hydration. *Carbohydrate Polymers* [online]. 2015, 129, 168-174 [cit. 2016-04-15]. DOI: 10.1016/j.carbpol.2015.04.060. ISSN 01448617. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0144861715003768>

9 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

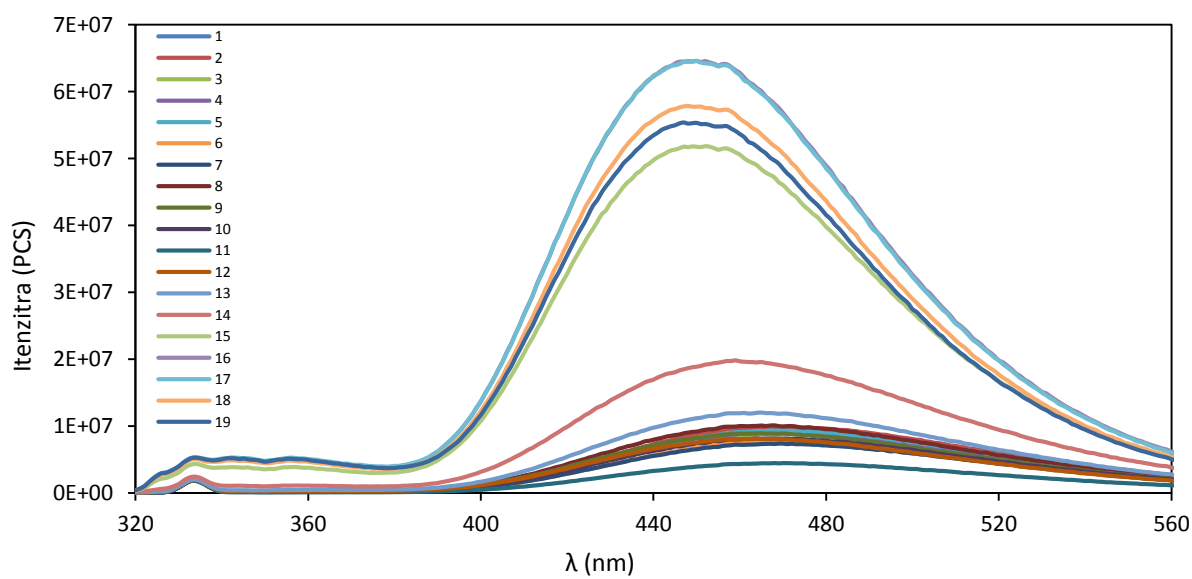
ESIPT	excited state intramolecular proton transfer
ESPT	excited state proton transfer (intermolecular)
ESDPT	excited state double proton transfer
Hya	hyaluronan
PSS	polystyrensulfonát
CMC	kritická micelární koncentrace
CAC	kritická agregační koncentrace
PAL	povrchově aktivní látky
CTAB	cetyltrimethylammonium bromid
HPTS	1-hydroxypyren-3,6,8-trisulfonát
3HNA	3-hydroxynafotlová kyselina
3HQ	2-aryl-3-hydroxychiolinon
TCSPC	time correlated single photon counting
CFD	constant function discriminator
TAC	time to amplitude convertor
PGA	programmable gain amplifier
PVA	polyvinylalkohol
SDS	dodecylsulfát sodný
Triton X-100	polyoxyethylen(9,5)oktylfenol
DMAC	dimethylacetamid
DMF	dimethylformamid
PMMA	polymethylmethakrylát
TEA	triethylamin
EtOH	ethanol
DMSO	dimethylsulfoxid
CPC	cetylpyridiniumchlorid
KI	jodid draselný
3-I-P	3-jodpropanová kyselina
NpOH	neutrální forma naftolu
NpO ⁻	aniontová forma naftolu
ArOH	neutrální forma fluoroforu
ArO ⁻	aniontová forma fluoroforu
<i>Q</i>	kvantový výtěžek
<i>Γ</i>	rychlostní konstanta zářivého přechodu
<i>k_{nr}</i>	rychlostní konstanta nezářivého přechodu
<i>K_s</i>	konstanta stability komplexu
<i>F</i>	intenzita fluorescence v přítomnosti zhašeče

F_0	intenzita fluorescence bez zhášedce
k_{pt}	deprotonační konstanta
τ_0	doba života bez zhášedce
τ	doba života v přítomnosti zhášedce
C	poměr koncentrace zhášedce a micel
N_D	agregační číslo
[S]	koncentrace tenzidu
[Q]	koncentrace zhášedce
[CMC]	kritická micelární koncentrace
λ	vlnová délka
t	doba života fluoroforu
A	parametr fitován (časově rozlišená fluorescence)
B	předexponenciální faktor
S_i	singlet
T_i	triplet
CPS	counts per second
k_d, k_{pt}	deprotonační rychlostní konstanta
k_{diss}	disociační rychlostní konstanta
k_r	rychlostní konstanta rekombinace
pK_a	disociační konstanta v základním stavu
pK_a^*	disociační konstanta v excitovaném stavu
ΔG^0	standardní Gibbsova energie v základním stavu
ΔG^{*0}	standardní Gibbsova energie v excitovaném stavu
ΔH	standardní molární entropie v základním stavu
ΔH^*	standardní molární entropie v excitovaném stavu
K_a	rovnovážná konstanta základního stavu
K_a^*	rovnovážná konstanta excitovaného stavu
h	Planckova konstanta
N_a	Avogadrova konstanta
R	univerzální plynová konstanta
T	termodynamická teplota
c	rychlost světla

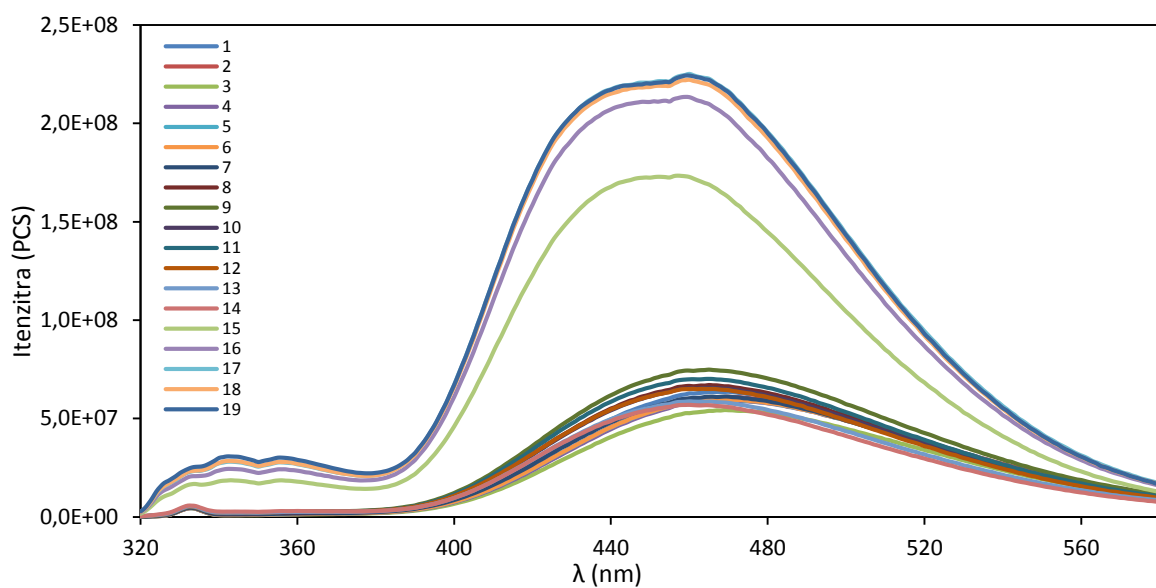
10 PŘÍLOHY



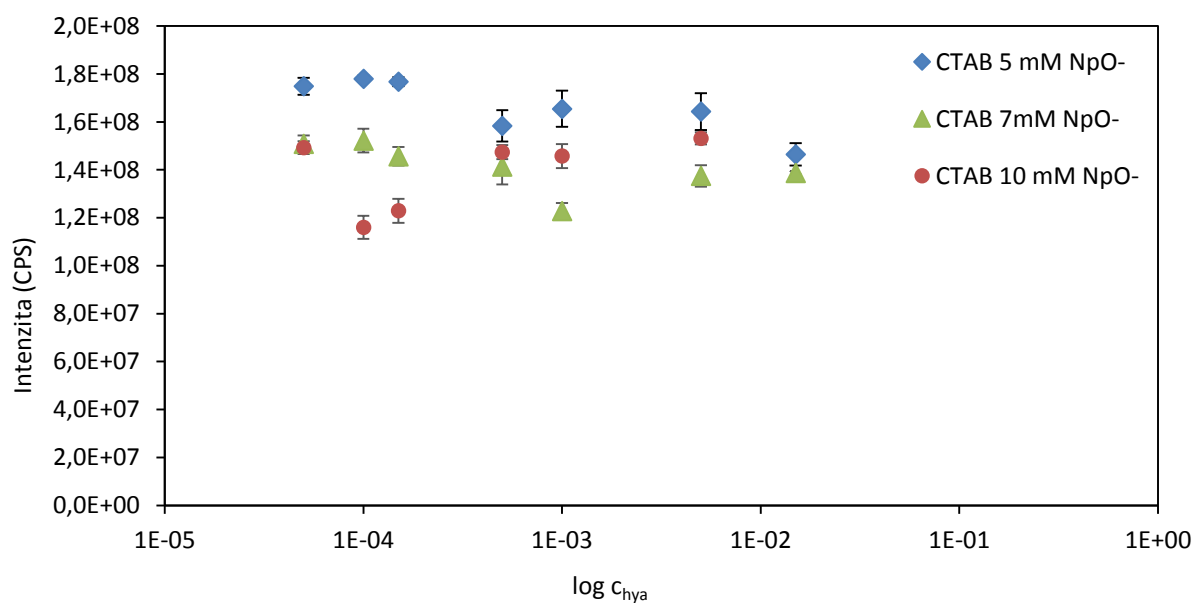
Obr. 48 Emisní spektra α -naftolu v systému hyaluronan (1,75 MDa) – CTAB s rostoucí koncentrací CTAB (1 – 19).



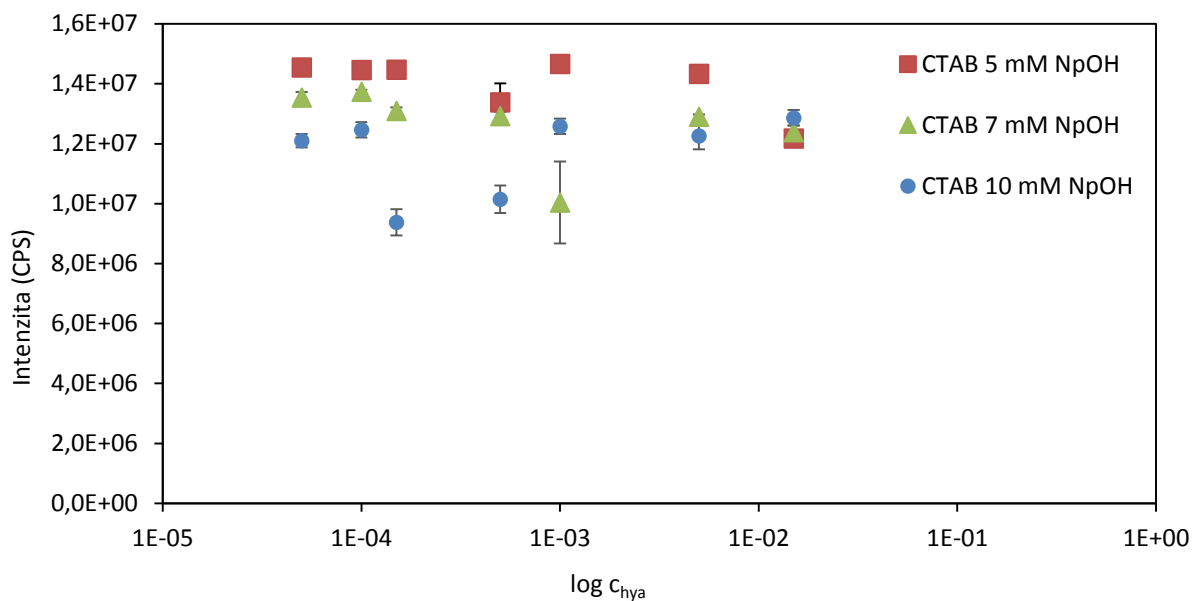
Obr. 49 Emisní spektra α -naftolu v systému hyaluronan (1 MDa) – CTAB s rostoucí koncentrací CTAB (1 – 19).



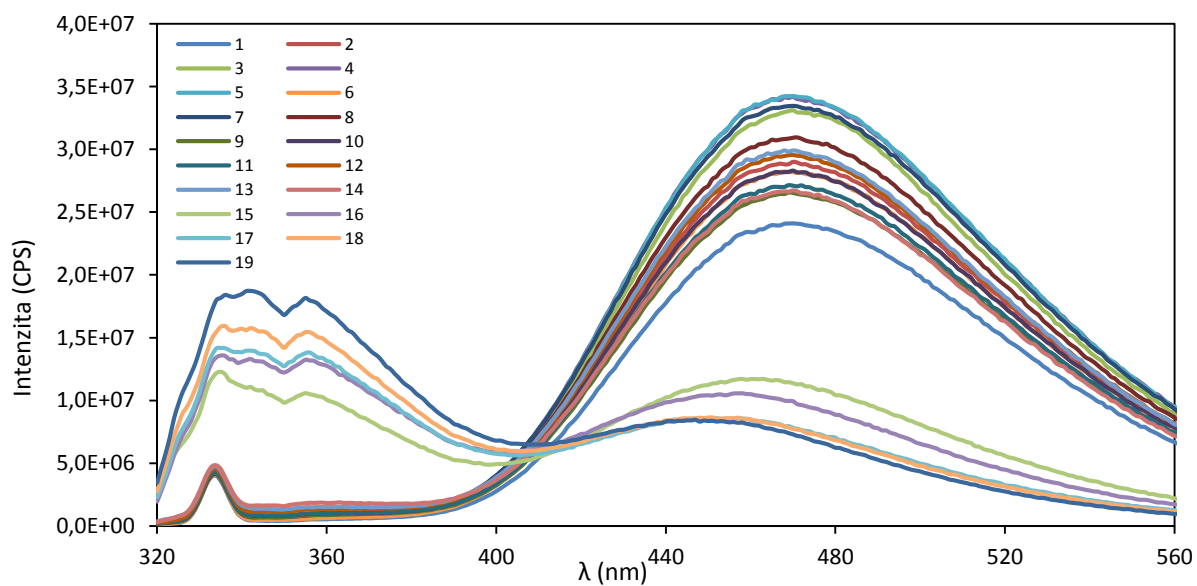
Obr. 50 Emisní spektra α -naftolu v systému hyaluronan (300 kDa) – CTAB s rostoucí koncentrací CTAB (1 – 19).



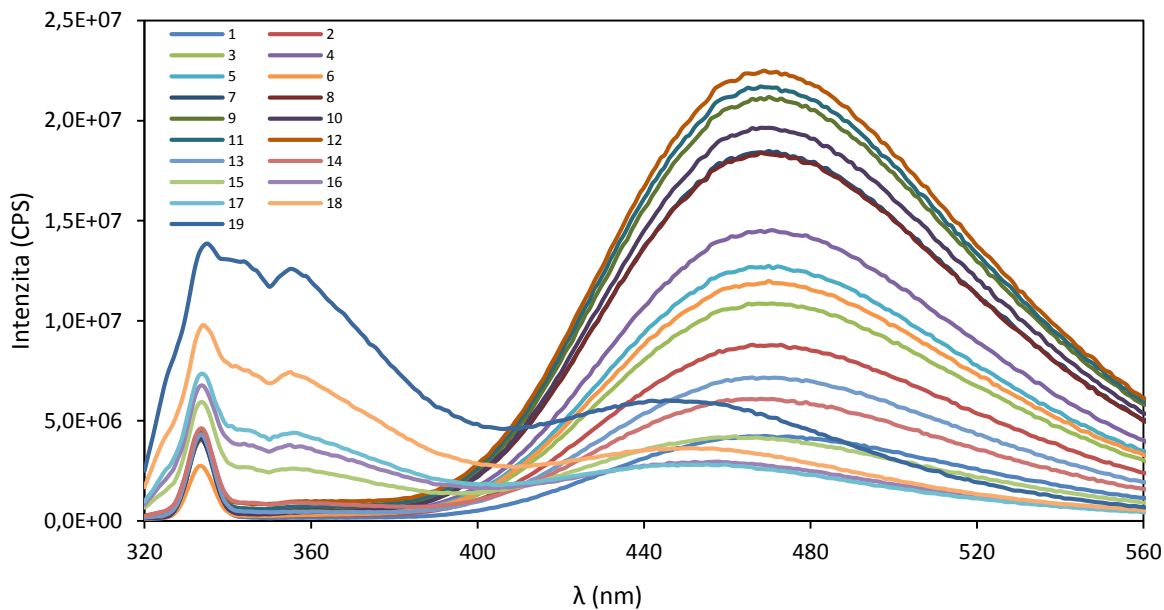
Obr. 51 Závislost intenzity NpO^- na koncentraci hyaluronanu (1,75 MDa) pro CTAB o koncentraci $5 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ (7 mM), $7 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ (5 mM) a $1 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ (10 mM).



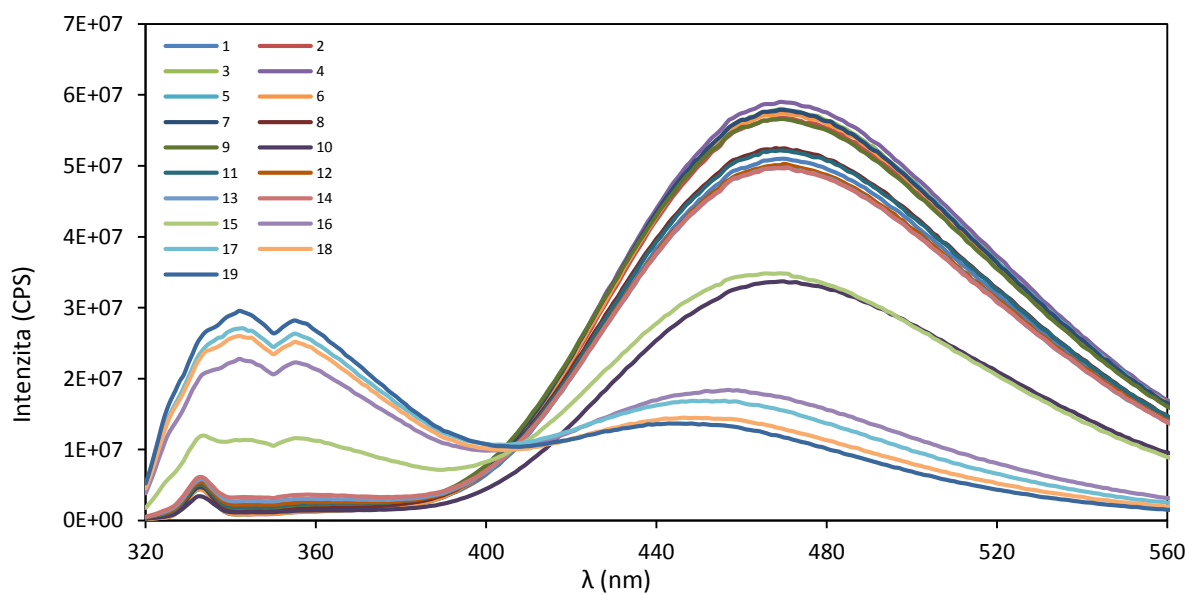
Obr. 52 Závislost intenzity NpOH na koncentraci hyaluronanu (1,75 MDa) pro CTAB o koncentraci $5 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ (7 mM), $7 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ (5 mM) a $1 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ (10 mM).



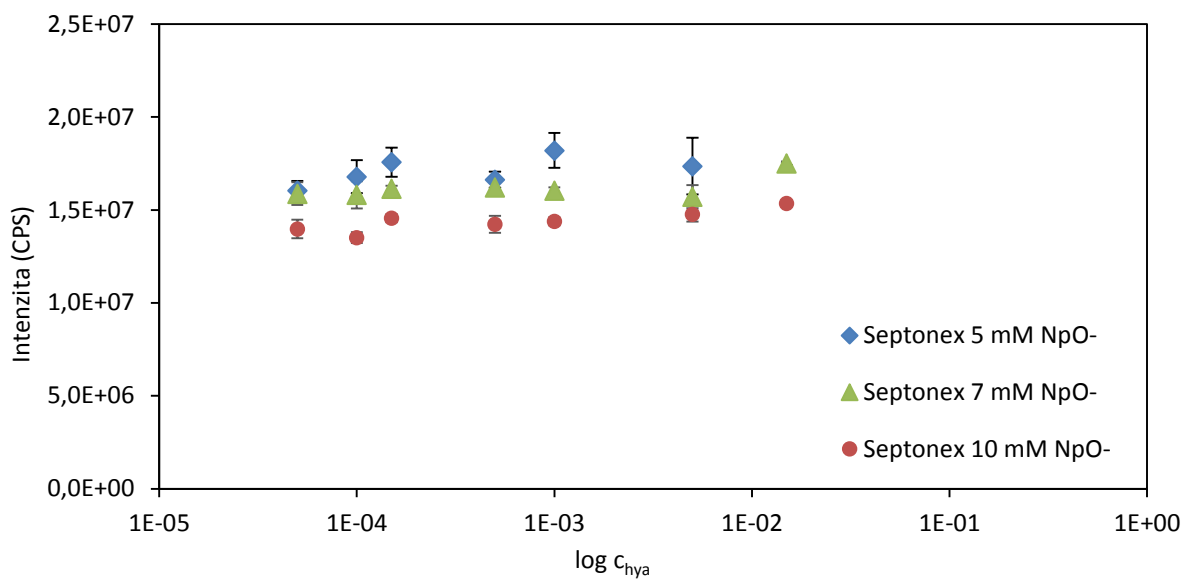
Obr. 53 Emisní spektra α -naftolu v systému hyaluronan (1,75 MDa) – Septonex s rostoucí koncentrací Septonexu (1 – 19).



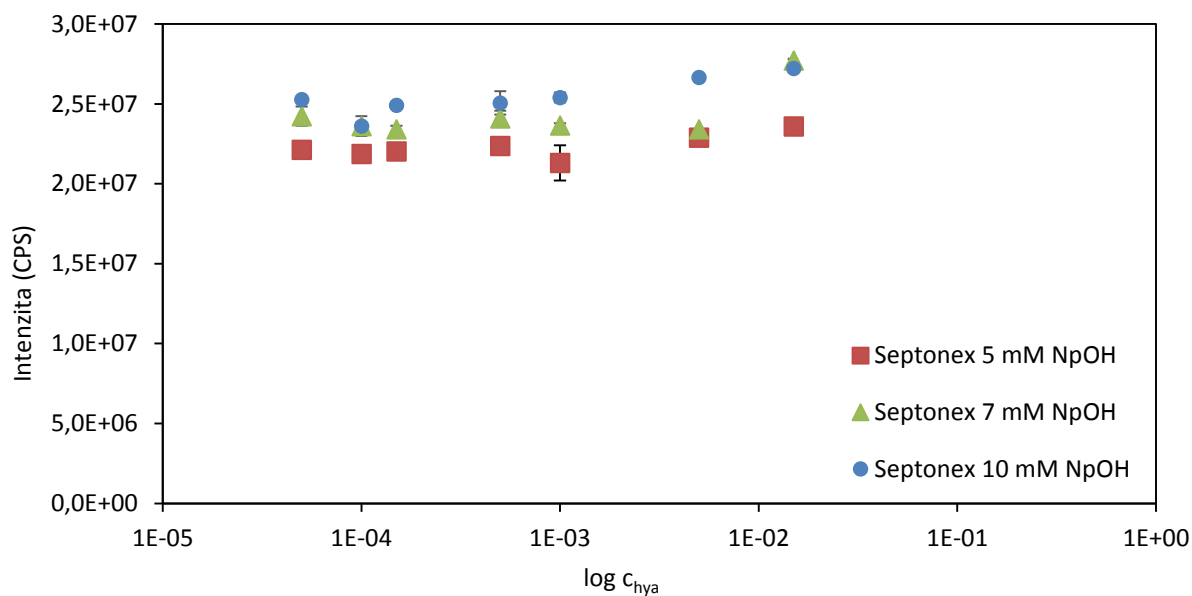
Obr. 54 Emisní spektra α -naftolu v systému hyaluronan (1 MDa) – Septonex s rostoucí koncentrací Septonexu (1 – 19).



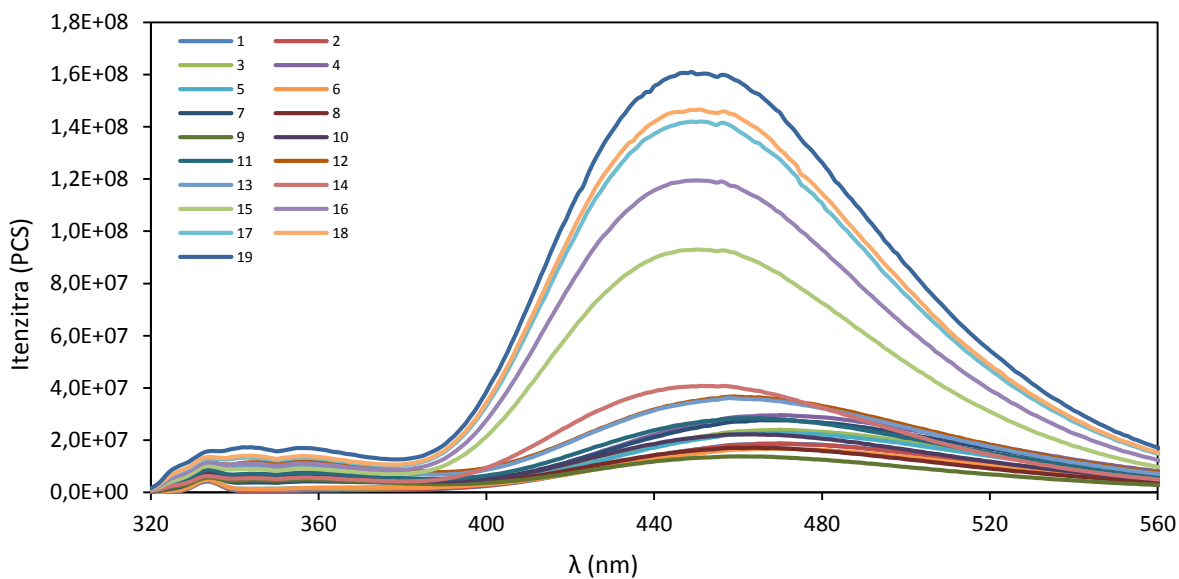
Obr. 55 Emisní spektra α -naftolu v systému hyaluronan (300 kDa) – Septonex s rostoucí koncentrací Septonexu (1 – 19).



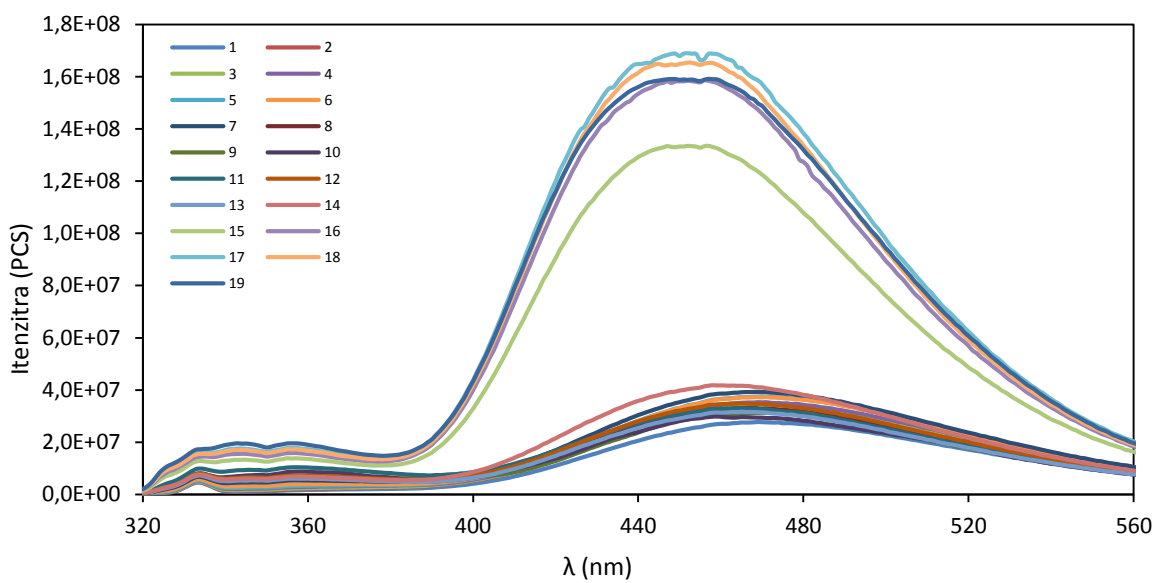
Obr. 56 Závislost intenzity NpO^- na koncentraci hyaluronanu (1,75 MDa) pro Septonex o koncentraci $5 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ (7 mM), $7 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ (5 mM) a $1 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ (10 mM).



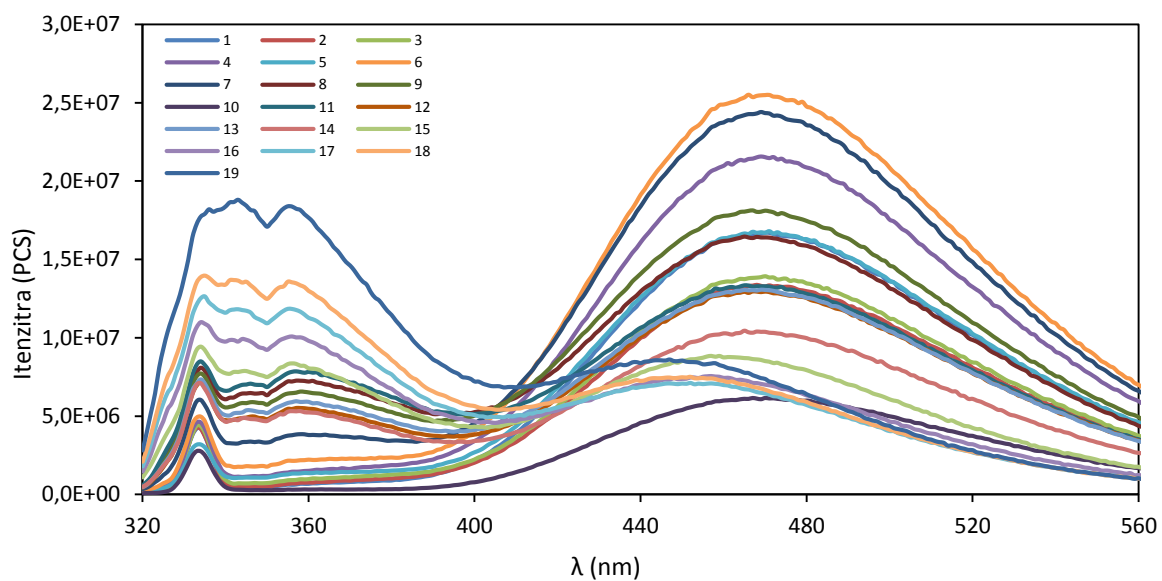
Obr. 57 Závislost intenzity $NpOH$ na koncentraci hyaluronanu (1,75 MDa) pro Septonex o koncentraci $5 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ (7 mM), $7 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ (5 mM) a $1 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ (10 mM).



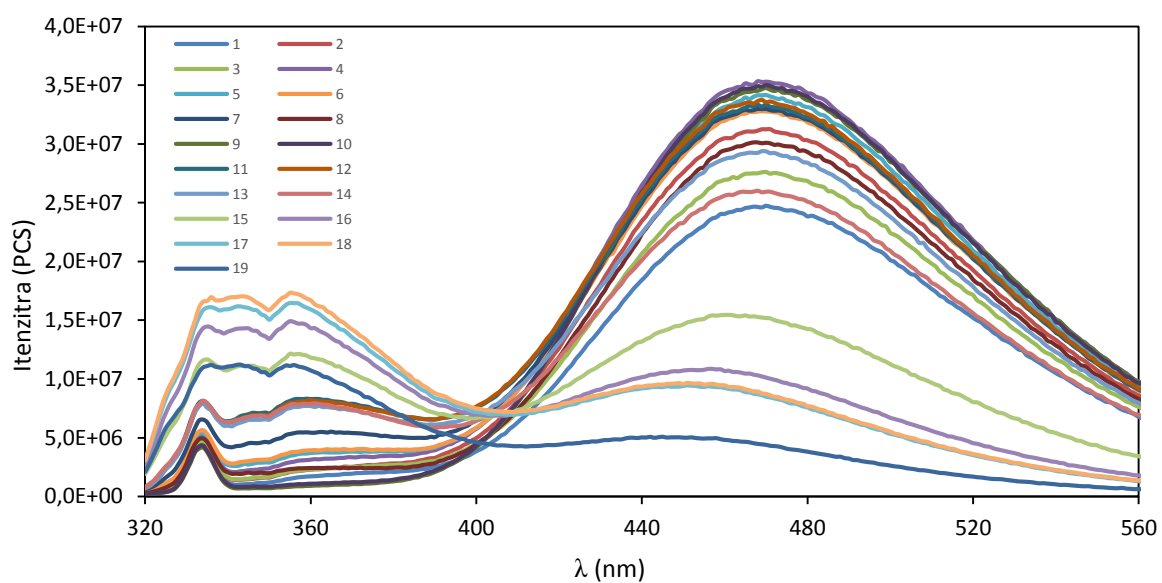
Obr. 58 Emisní spektra α -naftolu v systému PSS (1 MDa) – CTAB s rostoucí koncentrací CTAB (1 – 19).



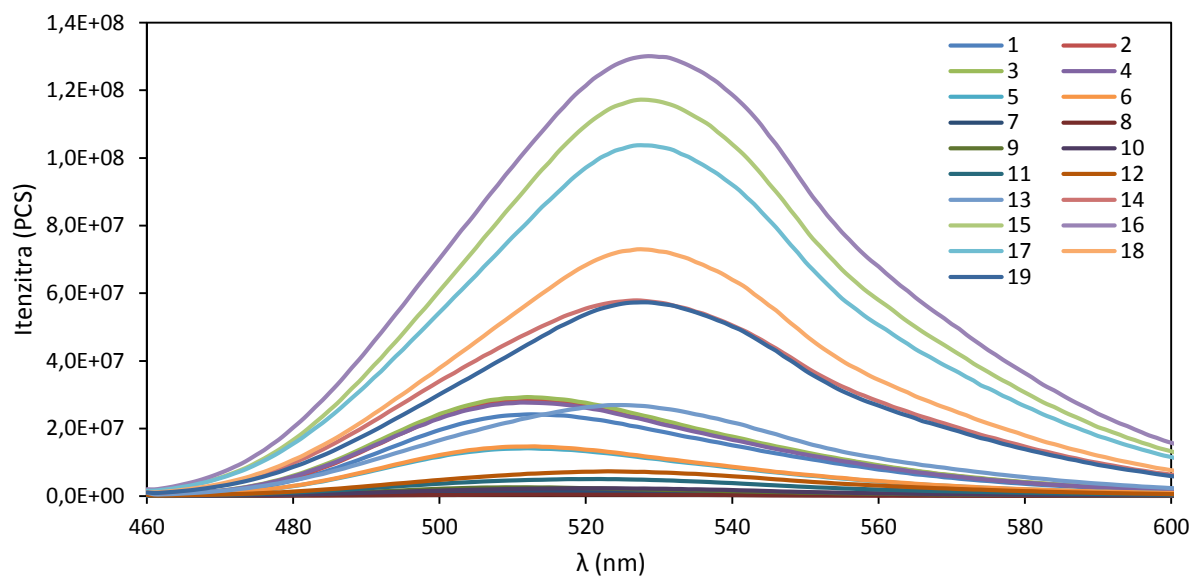
Obr. 59 Emisní spektra α -naftolu v systému PSS (70 kDa) – CTAB s rostoucí koncentrací CTAB (1 – 19).



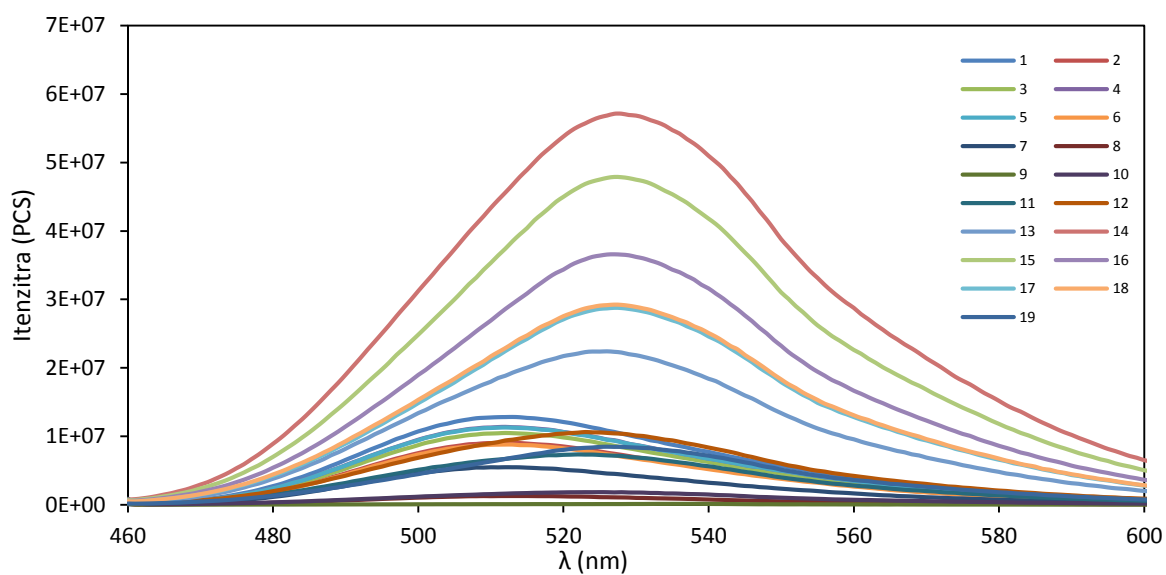
Obr. 60 Emisní spektra α -naftolu v systému PSS (1 MDa) – Septonex s rostoucí koncentrací Septonexu (1 – 19).



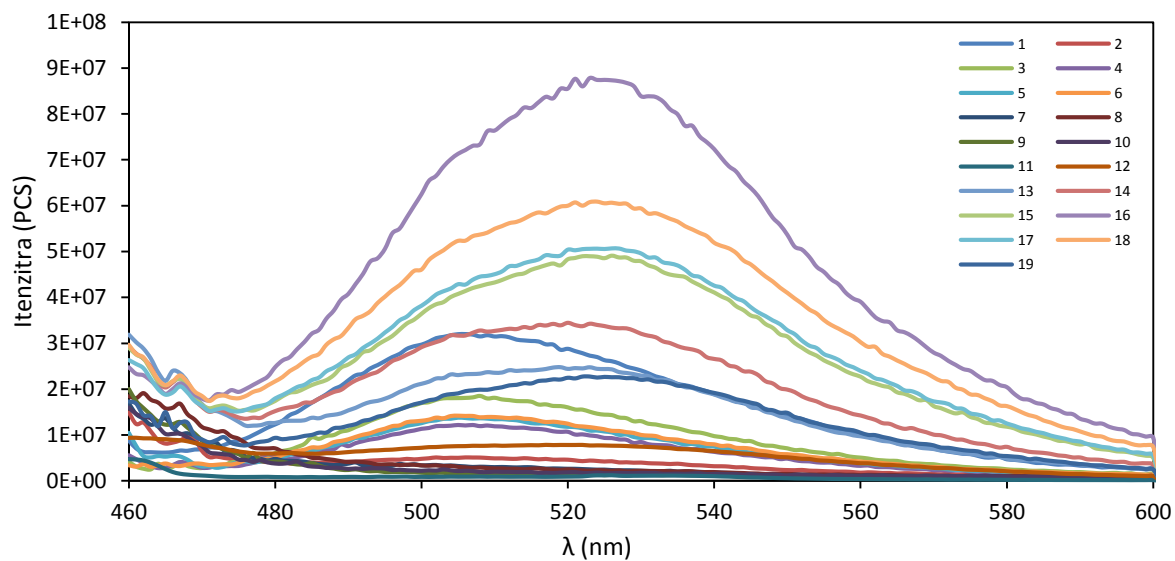
Obr. 61 Emisní spektra α -naftolu v systému PSS (70 kDa) – Septonex s rostoucí koncentrací Septonexu (1 – 19).



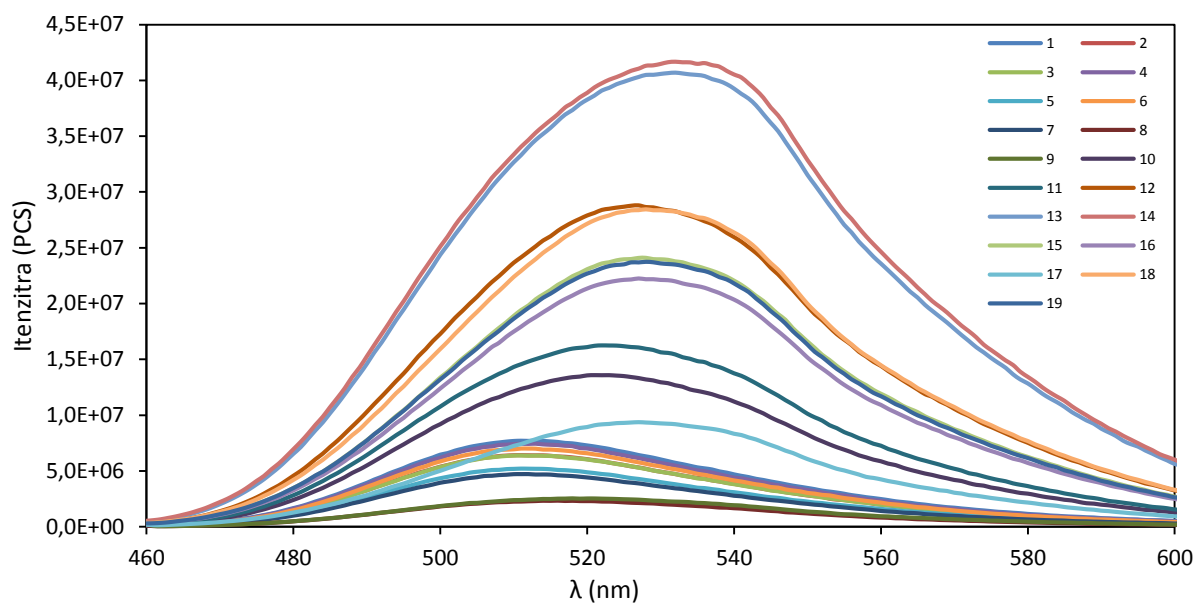
Obr. 62 Emisní spektra HPTS v systému hyaluronan (1,75 MDa) – CTAB s rostoucí koncentrací CTAB (1 – 19).



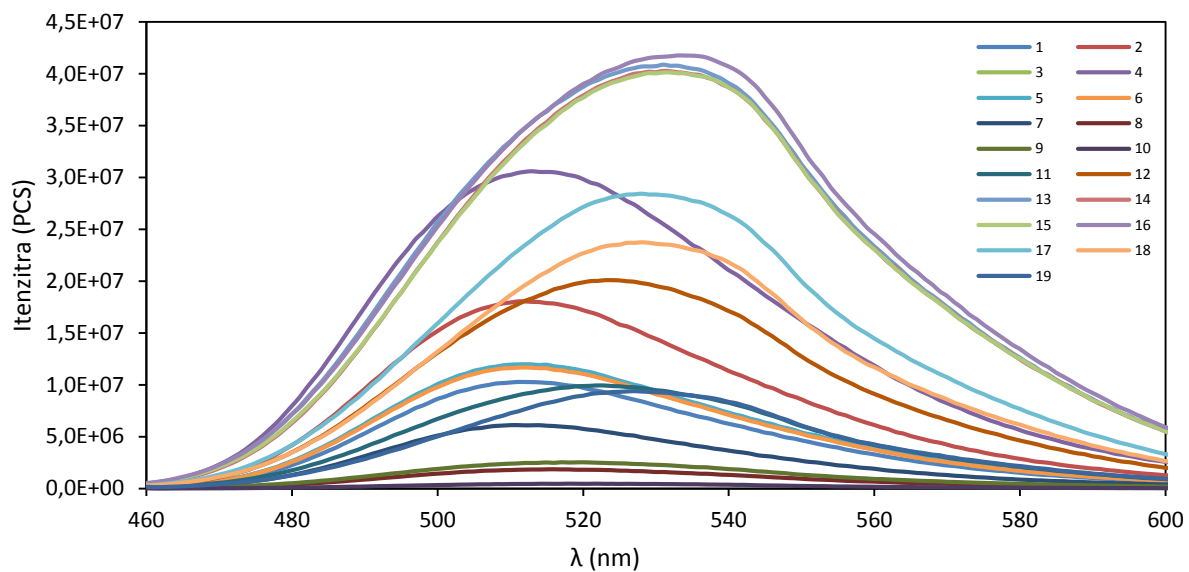
Obr. 63 Emisní spektra HPTS v systému hyaluronan (1 MDa) – CTAB s rostoucí koncentrací CTAB (1 – 19).



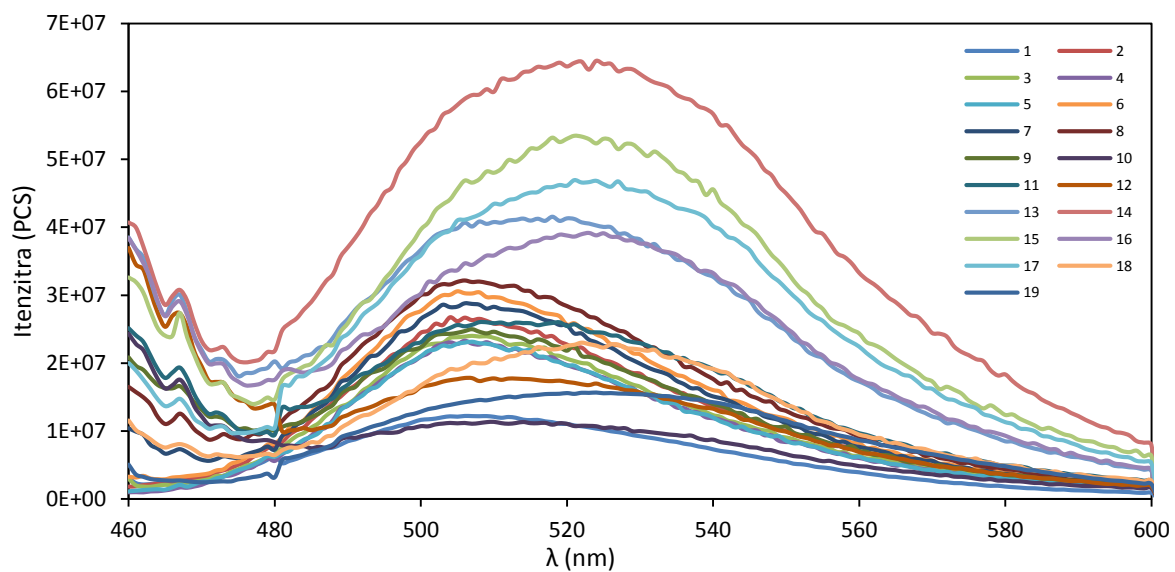
Obr. 64 Emisní spektra HPTS v systému hyaluronan (300 kDa) – CTAB s rostoucí koncentrací CTAB (1 – 19).



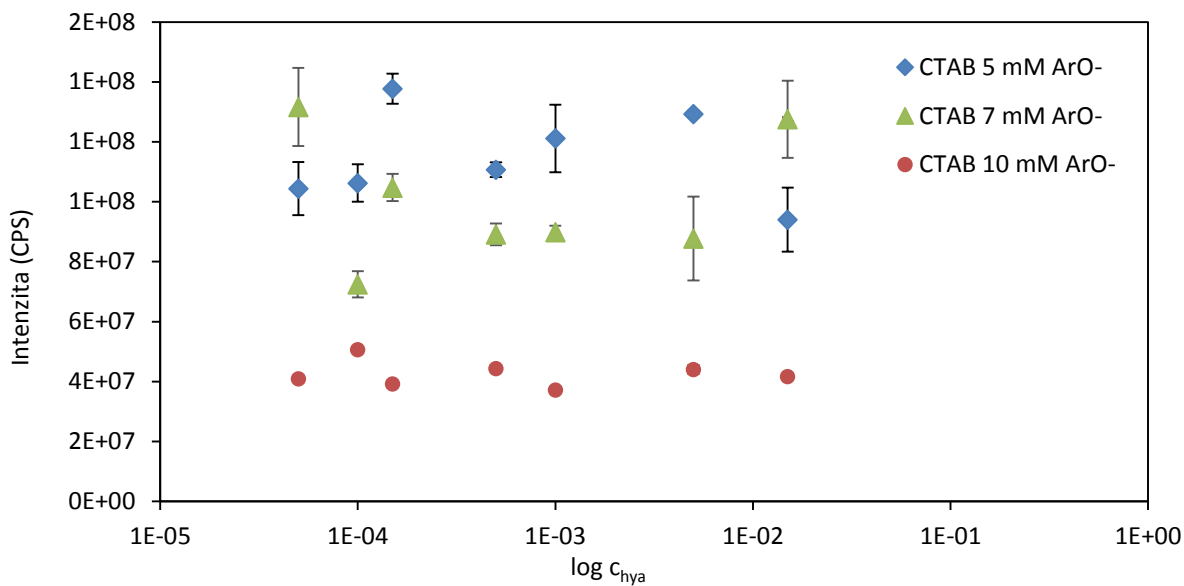
Obr. 65 Emisní spektra HPTS v systému hyaluronan (1,75 MDa) – Septonex s rostoucí koncentrací Septonexu (1 – 19).



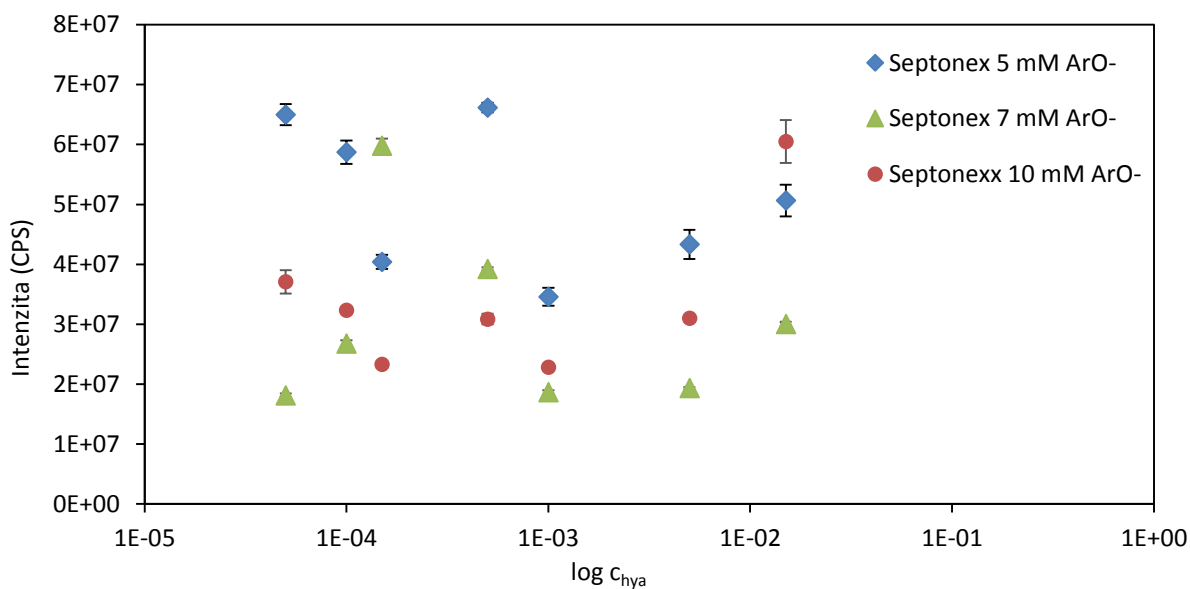
Obr. 66 Emisní spektra HPTS v systému hyaluronan (1 MDa) – Septonex s rostoucí koncentrací Septonexu (1 – 19).



Obr. 67 Emisní spektra HPTS v systému hyaluronan (300 kDa) – Septonex s rostoucí koncentrací Septonexu (1 – 19).



Obr. 68 Závislost intenzity ArO^- HPTS na koncentraci hyaluronanu (1,75 MDa) pro CTAB o koncentraci $5 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ (7 mM), $7 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ (5 mM) a $1 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ (10 mM).



Obr. 69 Závislost intenzity ArO^- HPTS na koncentraci hyaluronanu (1,75 MDa) pro Septonex o koncentraci $5 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ (7 mM), $7 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ (5 mM) a $1 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ (10 mM).