

VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ

ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE

FACULTY OF CHEMISTRY

INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

ČASOVĚ ROZLIŠENÁ FLUORESCENCE SYSTÉMŮ POLYMER-TENZID

TIME-RESOLVED FLUORESCENCE OF SYSTEM POLYMER-SURFACTANT

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. JAKUB MONDEK

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. FILIP MRAVEC, Ph.D.

BRNO 2012



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

Zadání diplomové práce

Číslo diplomové práce:	FCH-DIP0622/2011	Akademický rok: 2011/2012
Ústav:	Ústav fyzikální a spotřební chemie	
Student(ka):	Bc. Jakub Mondek	
Studijní program:	Spotřební chemie (N2806)	
Studijní obor:	Spotřební chemie (2806T002)	
Vedoucí práce	Ing. Filip Mravec, Ph.D.	
Konzultanti:	Ing. Tereza Halasová	

Název diplomové práce:

Časově rozlišená fluorescence systémů polymer-tenzid

Zadání diplomové práce:

- 1) Literární rešerše na téma časově rozlišená fluorescence ve studiu biokoloidů.
- 2) Návrh experimentů zaměřených na studium interakcí v roztocích polymer-tenzid.
- 3) Provedení experimentů.
- 4) Zhodnocení využitelnosti časově rozlišené fluorescence ve studiu interakcí polymer-tenzid.

Termín odevzdání diplomové práce: 11.5.2012

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

Bc. Jakub Mondek
Student(ka)

Ing. Filip Mravec, Ph.D.
Vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
Ředitel ústavu

V Brně, dne 16.1.2012

prof. Ing. Jaromír Havlica, DrSc.
Děkan fakulty

ABSTRAKT

V diplomové práci byla studována časově-rozlišená fluorescence v systému polymer-tenzid. Nejdříve byla studována agregační čísla vybraného kationtového (cetyltrimethylamonium bromid), aniontového (dodecylsírán sodný) a neionogenního (Triton X-100) tenzidu pomocí steady-state a časově rozlišené fluorescence a tyto dvě metody byly srovnány. Bylo zjištěno, že steady-state metoda dává vždy nižší hodnoty agregačních čísel než časově-rozlišená metoda a že steady-state metoda není použitelná pro přesné stanovení agregačních čísel o vysokých hodnotách a ve vzorcích obsahujících rozpuštěný kyslík. Dále byl studován vliv přídatku nativního hyaluronanu k těmto tenzidům. Byla sledována změna agregačního čísla tenzidů a vliv hyaluronanu na procentuální zastoupení dynamického a statického zhášení. Hyaluronan ovlivňoval agregační číslo tenzidů cetyltrimethylamonium bromidu a Tritonu X-100. Dále bylo zjištěno, že hyaluronan zvýšil procentuální zastoupení dynamického zhášení u cetyltrimethylamonium bromidu a u Tritonu X-100. V případě dodecylsírán sodného byl pyren zhášen efektivní sférou a zastoupení dynamického zhášení bylo v tomto systému zanedbatelné.

Dále byla studována relativní pozice pyrenu v micelách cetyltrimethylamonium bromidu, dodecylsírán sodného a Tritonu X-100. Bylo zjištěno, že se pozice pyrenu mění s nábojem a strukturou micely. Také bylo zkoumáno, jak se mění procentuální zastoupení dynamického zhášení v micelách s různým nábojem při zhášení jodovými deriváty. Ve všech případech bylo vypočteno většinové zastoupení dynamického zhášení v systému. Hyaluronan neměl žádný vliv na zhášení v dodecylsírán sodném.

ABSTRACT

In this diploma thesis was studied time-resolved fluorescence in polymer-surfactant system. At first aggregation numbers of cationic (cetyltrimethylammonium bromide), anionic (sodium dodecylsulfate) and nonionic (Triton X-100) surfactants were studied by steady-state and time-resolved fluorescence spectroscopy. These two methods were compared. Aggregation numbers by steady-state method were always lower than aggregation numbers measured by time-resolved method. Steady-state method of determination aggregation numbers is useless for surfactants with high aggregation number and for aerated samples. Addition of hyaluronan to surfactant system was studied. There was observed change in aggregation number after addition of hyaluronan and change in percentage of dynamic quenching after addition of hyaluronan. Hyaluronan affected aggregation number of cetyltrimethylammonium bromide and Triton X-100. Hyaluronan increased percentage of dynamic quenching in cetyltrimethylammonium bromide and in Triton X-100. Pyren in sodium dodecylsulfate was quenched by sphere of action with negligible percentage of dynamic quenching and addition of hyaluronan had no effect on quenching.

As next goal of this thesis, the determination of the position of fluorescence probe pyrene in cetyltrimethylammonium bromide, sodium dodecylsulfate and Triton X-100 micelles was chosen. Position of pyrene changed with charge and structure of micelles. Next was studied how percentage of dynamic quenching by iodide compounds changes with different charge of micelle. In all cases majority of dynamic quenching was calculated.

KLÍČOVÁ SLOVA

Steady-state fluorescence, časově rozlišená fluorescence, cetyltrimethylamonium bromid, dodecylsírán sodný, Triton X-100, agregační číslo, dynamické zhášení, statické zhášení, hyaluronan, pyren

KEY WORDS

Steady-state fluorescence, time-resolved fluorescence, cetyltrimethylammonium bromide, sodium dodecylsulfate, Triton X-100, aggregation number, dynamic quenching, static quenching, hyaluronan, pyrene

MONDEK, J. *Časově rozlišená fluorescence systémů polymer-tenzid*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2012. 73 s. Vedoucí diplomové práce Ing. Filip Mravec, Ph.D.

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

Rád bych poděkoval vedoucímu mé diplomové práce Ing. Filipu Mravcovi, PhD, konzultantce Ing. Tereze Halasové za trpělivost, pomoc při řešení problémů a vstřícnost. Dále bych chtěl poděkovat svým nejbližším za podporu při studiu. Nakonec bych chtěl poděkovat Centru materiálového výzkumu, projektu OP VaVpI CZ.1.05/2.1.00/01.0012.

OBSAH

1	ÚVOD	8
2.	TEORETICKÁ ČÁST	9
2.1.	MOLEKULÁRNÍ ABSORPČNÍ SPEKTROFOTOMETRIE V UV/VIS OBLASTI.....	9
2.1.1.	<i>Princip molekulární absorpční spektrofotometrie v UV/VIS oblasti</i>	9
2.1.2.	<i>Základní veličiny</i>	9
2.1.2.1.	<i>Transmittance</i>	9
2.1.2.2.	<i>Absorbance</i>	9
2.1.2.3.	<i>Lambert – Beerův zákon</i>	10
2.1.3.	<i>Absorpční křivky v UV a VIS</i>	10
2.2.	LUMINISCENČNÍ SPEKTROMETRIE.....	11
2.2.1.	<i>Fotoluminiscence</i>	11
2.2.1.1.	<i>Fluorescence</i>	12
2.2.1.2.	<i>Fosforescence</i>	12
2.2.2.	<i>Emisní a excitační spektra molekul</i>	13
2.2.2.1.	<i>Emisní spektrum</i>	13
2.2.2.2.	<i>Excitační spektrum</i>	14
2.2.3.	<i>Doba života fluorescence a kvantový výtěžek</i>	14
2.2.4.	<i>Zhášení fluorescence</i>	16
2.2.4.1.	<i>Zhášedce fluorescence</i>	16
2.2.4.2.	<i>Dynamické zhášení</i>	18
2.2.4.3.	<i>Statické zhášení</i>	20
2.2.4.3.1.	<i>Sféra efektivního zhášení</i>	20
2.2.4.3.2.	<i>Tvorba nefluorescentního komplexu v základním stavu</i>	21
2.2.4.4.	<i>Kombinované statické a dynamické zhášení</i>	22
2.3.	NEVLASTNÍ FLUORESCENCE	23
2.3.1.	<i>Fluorescenční značky</i>	23
2.3.2.	<i>Fluorescenční sondy</i>	24
2.4.	ASOCIAČNÍ PROCESY	24
2.4.1.	<i>Asociativní (micelární) koloidy</i>	24
2.4.1.1.	<i>Molekulární struktura micelárních koloidů</i>	24
2.4.1.2.	<i>Vznik micel</i>	25
2.4.1.3.	<i>Struktura micel ve zředěném vodném roztoku</i>	25
2.4.1.4.	<i>Obrácené (reverzní) micely</i>	25
2.4.2.	<i>Solubilizace</i>	26
2.4.3.	<i>Koloidní roztoky vysokomolekulárních látek</i>	27
2.4.4.	<i>Roztoky vysokomolekulárních elektrolytů</i>	27
2.5.	KYSELINA HYALURONOVÁ	28
2.5.1.	<i>Chemická struktura</i>	28
2.5.2.	<i>Metabolismus kyseliny hyaluronové</i>	29
2.5.3.	<i>Výskyt a vlastnosti kyseliny hyaluronové</i>	29
3	SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	30
4	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	32

4.1.	POUŽITÉ CHEMIKÁLIE.....	32
4.2.	PŘÍSTROJE A ZAŘÍZENÍ.....	33
4.3.	PŘÍPRAVA ZÁSObNÍCH ROZTOKŮ.....	35
4.4.	PŘÍPRAVA VZORKŮ.....	35
4.4.1.	<i>Příprava vzorků pro měření kritické micelární koncentrace</i>	35
4.4.2.	<i>Příprava vzorků pro měření agregačního čísla</i>	35
4.4.3.	<i>Příprava vzorků pro měření agregačního čísla v přítomnosti nativního hyaluronanu</i>	36
4.4.4.	<i>Příprava vzorků pro měření účinnosti zhášení pyrenu jodovými deriváty</i>	36
4.5.	VLASTNÍ MĚŘENÍ.....	36
4.5.1.	<i>Měření emisních spekter a absorpčních spekter</i>	36
4.5.2.	<i>Měření vyhasínání fluorescence</i>	36
4.6.	VYHODNOCENÍ.....	37
4.6.1.	<i>Analýza dat metodou nelineárních nejmenších čtverců</i>	37
4.6.2.	<i>Analýza měření časově rozlišené fluorescence</i>	38
4.6.3.	<i>Korekce emisních spekter</i>	38
4.6.4.	<i>Stanovení kritické micelární koncentrace</i>	39
4.6.5.	<i>Stanovení agregačního čísla</i>	39
5	VÝSLEDKY A DISKUSE.....	41
5.1.	STANOVENÍ KRITICKÉ MICELÁRNÍ KONCENTRACE TENZIDŮ CTAB, SDS A TRITONU X-100.....	41
5.2.	STANOVENÍ AGREGAČNÍHO ČÍSLA TENZIDŮ CTAB, SDS A TRITONU X-100 POMOCÍ STEADY-STATE FLUORESCENCE A POMOCÍ ČASOVĚ ROZLIŠENÉ FLUORESCENCE.....	43
5.2.1.	<i>Stanovení agregačního čísla 20 mM CTAB a vliv přídavku nativního hyaluronanu na agregační číslo CTAB</i>	45
5.2.2.	<i>Stanovení agregačního čísla 70 mM SDS a vliv přídavku nativního hyaluronanu na agregační číslo SDS</i>	47
5.2.3.	<i>Stanovení agregačního čísla 10 mM Tritonu x-100 a vliv přídavku nativního hyaluronanu na agregační číslo Tritonu x-100</i>	49
5.3.	Vliv náboje micely na druh zhášení a vliv přídavku nativního hyaluronanu na druh zhášení.....	51
5.3.1.	<i>Vliv nativního hyaluronanu na zhášení v micelách 20 mM CTAB</i>	51
5.3.2.	<i>Vliv nativního hyaluronanu na zhášení v micelách 70 mM SDS</i>	53
5.3.3.	<i>Vliv nativního hyaluronanu na zhášení v micelách 10 mM Tritonu x-100</i>	54
5.4.	URČENÍ RELATIVNÍ POZICE PYRENU V MICELE CTAB, SDS A TRITONU X-100.....	56
5.4.1.	<i>Zhášení pyrenu jodovými deriváty v micelách 20 mM CTAB</i>	56
5.4.2.	<i>Zhášení pyrenu jodovými deriváty v micelách 70 mM SDS</i>	58
5.4.3.	<i>Zhášení pyrenu jodovými deriváty v micelách 10 mM Tritonu X-100</i>	60
6	ZÁVĚR.....	63
7	LITERATURA.....	65
8	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ.....	70
9	PŘÍLOHY.....	72

1 ÚVOD

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

Proč je určení doby života tak důležité? Doba života představuje průměrný čas, který fluorofor setrvává v excitovaném stavu. Po tuto dobu může v excitovaném stavu dojít k nějaké reakci nebo difúzi. Některé z těchto informací se mohou při měření klasické steady-state fluorescence ztrácet, protože intenzita steady-state fluorescence je v podstatě součinem intenzity budícího záření a průměrné doby života. Ve většině měření není naměřena jen jedna doba života, ale několik. V těchto případech se některé informace při steady-state měření ztrácí. Například makromolekuly mohou měnit konformaci během doby života fluoroforu. Fluorescenční sonda nebo značka vázána na protein může vykazovat při časově rozlišeném měření více dob života, tedy více konformací makromolekuly. Pokud by v tomto případě byla měřena pouze steady-state fluorescence, byla by obdržena pouze průměrná hodnota intenzity fluorescence více dob života.

Měřením steady-state fluorescence není možno odhalit, jestli jde o dynamické nebo statické zhášení. Opět je obdržena pouze průměrná hodnota intenzity fluorescence. Pokud je měřena steady-state i časově rozlišená fluorescence, je možno přesně určit, z jaké části se jedná o statické a z jaké části o dynamické zhášení. Z těchto informací lze dále například vypočítat množství fluorescenční sondy dostupné molekulám zhrášče.

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1. Molekulární absorpční spektrofotometrie v UV/VIS oblasti

Základy molekulární absorpční spektrofotometrie v ultrafialové a viditelné oblasti spektra byly položeny již okolo roku 1670 britským vědcem sirem Isaacem Newtonem. Newton objevil, že se světlo skládá ze spektra barev, a to od fialové barvy po červenou. UV/VIS spektrofotometrie umožňuje například identifikaci měřeného vzorku nebo také určení složení absorbujících komponent.

2.1.1. Princip molekulární absorpční spektrofotometrie v UV/VIS oblasti

Molekulární absorpční spektrofotometrie v UV/VIS měří absorpci záření v ultrafialové (UV) a viditelné (VIS) oblasti světelného spektra zředěnými roztoky molekul, což znamená, že se při měření využívá úbytku intenzity záření, který vznikne absorpcí záření měřeným vzorkem. Při interakci molekuly se zářením dochází k energetickým změnám v elektronových orbitalech a dochází k přechodu elektronu do excitovaného stavu. Oblast molekuly, ve které jsou lokalizovány elektronové přechody v průběhu absorpce záření, se nazývá chromofor. Chromoforem může být například hydratovaný kation, komplex nebo seskupení atomů v organické molekule.

2.1.2. Základní veličiny

Na kyvetu obsahující roztok vzorku dopadá zářivý tok I_0 . Prošlý zářivý tok I je zeslaben o odražené, rozptýlené a absorbované záření.

2.1.2.1. Transmittance

Transmittance, T , je relativní část prošlého záření. Často se uvádí v procentech:

$$T = \frac{I}{I_0} \text{ nebo } T = \frac{I}{I_0} \cdot 100(\%) \quad (1)$$

kde I_0 je dopadající zářivý tok a I je prošlý zářivý tok.

2.1.2.2. Absorbance

Absorbance, nebo také extinkce, je záporný dekadický logaritmus transmittance:

$$A = -\log T = -\log \frac{I}{I_0} \quad (2)$$

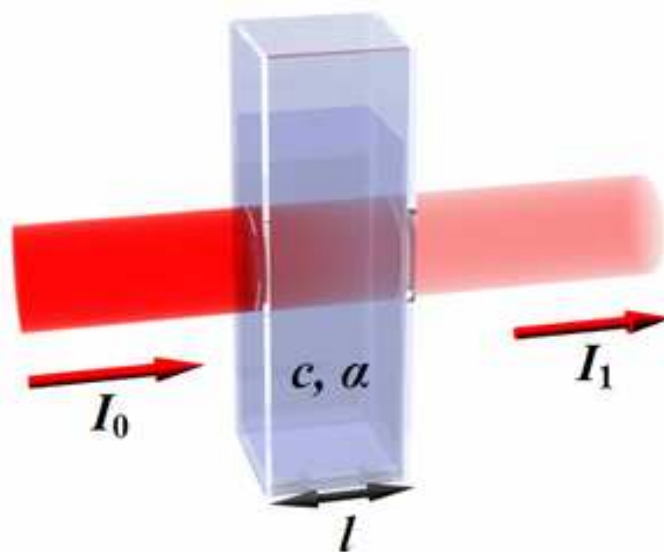
Pokud je absorpce záření nulová, transmittance je jednotková (100%).

2.1.2.3. Lambert – Beerův zákon

Lambert – Beerův zákon udává vztah mezi intenzitou dopadajícího a prošlého záření, délkou absorbující vrstvy a koncentrací měřeného vzorku (analytu). Absorbanci lze matematicky definovat jako (Obr. 1)[1]:

$$A = \varepsilon \cdot l \cdot c \quad (3)$$

kde ε je molární absorpční koeficient (konstanta je definovaná pro danou látku za daných podmínek při určité vlnové délce), l je tloušťka absorbující vrstvy (většinou tloušťka kyvety) a c je koncentrace měřeného vzorku. Absorbance je bezrozměrná veličina a je přímo úměrná koncentraci a tloušťce absorbující vrstvy.

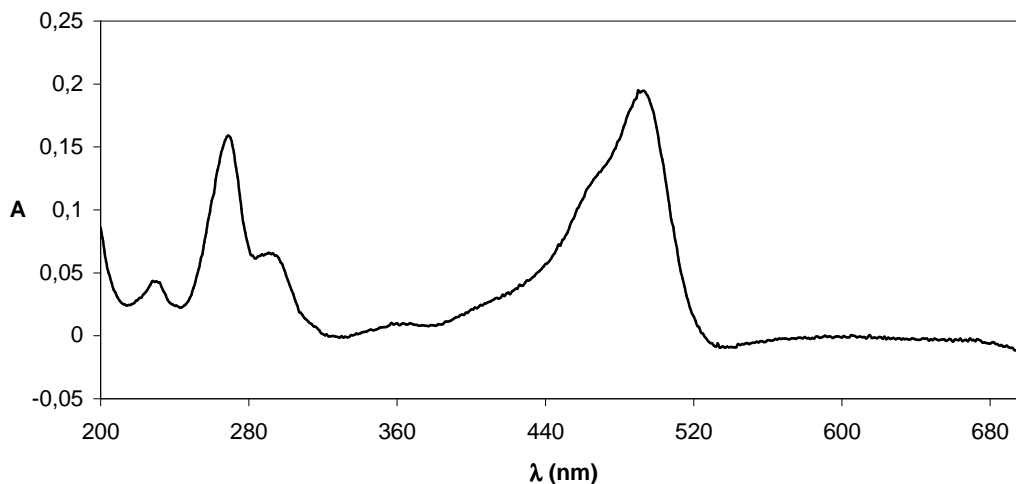


Obr. 1 Absorpce světelného paprsku procházejícího kyvetou, kde I_0 je dopadající zářivý tok, I_1 je prošlý zářivý tok, c je koncentrace měřeného vzorku, l je optická dráha (šířka kyvety) a α je absorpční koeficient (charakterizuje, jak lehce materiál nebo medium propustí světelný paprsek) [2]

Lambert - Beerův zákon platí pouze pro zředěné roztoky, pro monochromatické záření, a to v homogenních i heterogenních systémech. V homogenních i v některých heterogenních systémech je závislost absorbance na koncentraci vzorku lineární, ale v některých heterogenních systémech (například v koloidních roztocích) dochází k odchylkám od lineárního průběhu závislosti absorbance na koncentraci vzorku vlivem difúzního rozptylu záření. Absorbance roztoku je v podstatě úměrná počtu absorbujících částic a závisí na jejich povaze.

2.1.3. Absorpční křivky v UV a VIS

Absorpční křivky představují závislost absorbované nebo propuštěné zářivé energie na vlnové délce (λ), vlnočtu nebo kmitočtu. Obvyklým záznamem je ale křivka závislosti absorbované zářivé energie na vlnové délce (Obr. 2). Oblasti extrémních bodů na křivce mají obvykle Gaussovský (symetrický) průběh a odpovídají typickým elektronovým přechodům v molekule.



Obr. 2 Absorpční spektrum v UV a VIS

Větší počet extrémních bodů na absorpční křivce je důkazem většího počtu elektronových přechodů v absorbující molekule, existence většího počtu struktur téže látky nebo většího počtu různých absorbujících analytů v roztoku za daných podmínek.

Na absorpční křivky mají vliv různé faktory. Například zvýšení teploty posouvá λ_{\max} blíže k červené oblasti viditelného spektra. Vysoká koncentrace inertních solí mění tvar absorpčních spekter. Dalšími faktory, které mají vliv na absorpční spektra, jsou vliv tenzidů, vliv rozpouštědla a instrumentální vlivy.

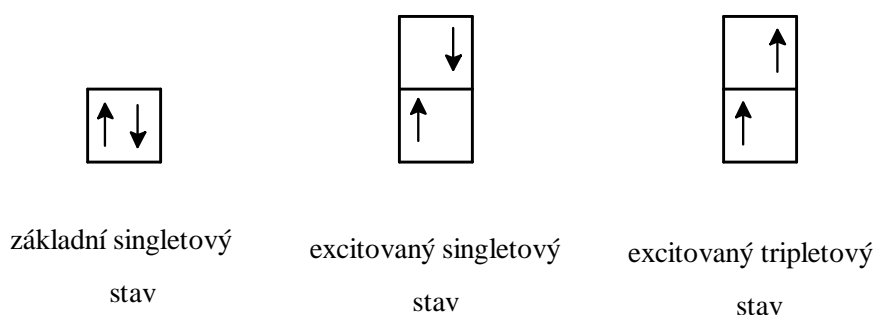
2.2. Luminiscenční spektrometrie

2.2.1. Fotoluminiscence

Po absorpci primárního záření molekulou může dojít k emisi sekundárního záření z excitovaných molekul. Tento jev se nazývá fotoluminiscence. Při absorpci záření přechází elektron ze základní singletové hladiny S_0 do excitovaného stavu (singlet S_1^* , případně triplet T_1^*). Obecně se elektronové stavy dělí na singletové a tripletové (Obr. 3):

- Singletový stav: Dvojice elektronů má opačný (antiparalelní) spin.
- Tripletový stav: Dvojice elektronů má stejný (paralelní) spin.

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



Obr. 3 Základní singletový, excitovaný singletový a excitovaný tripletový stav

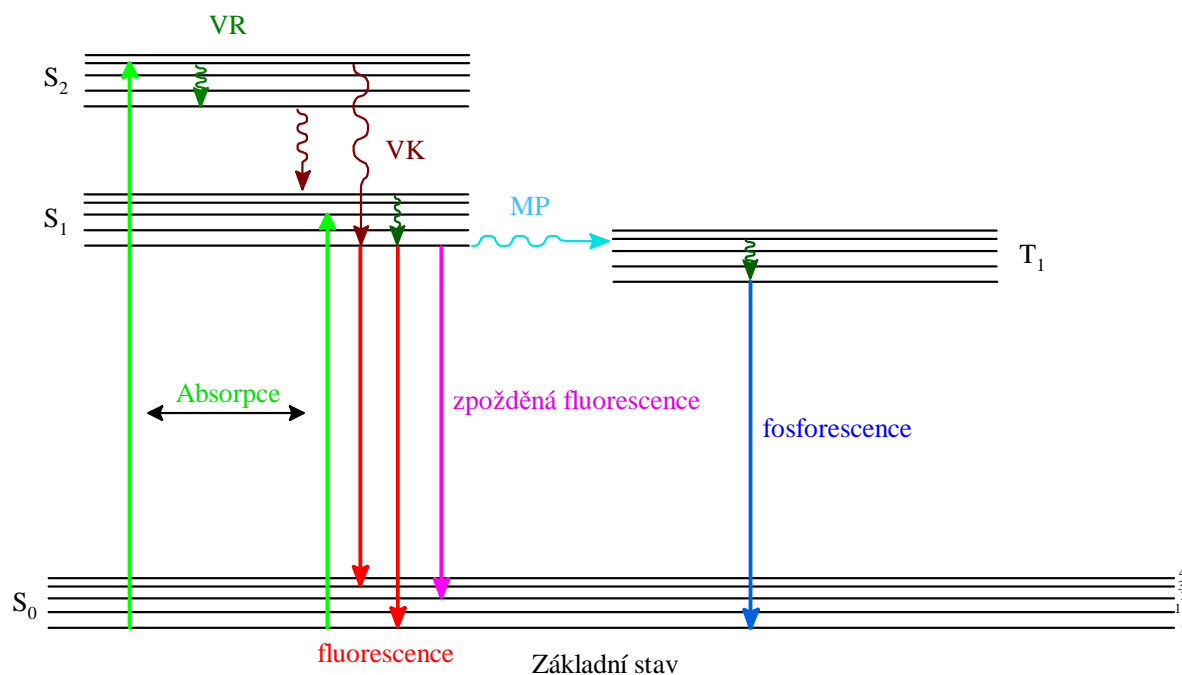
2.2.1.1. Fluorescence

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

Po absorpci záření se excitovaná molekula navrací do základního stavu za současného vyzáření fotonu. Tento přechod se nazývá *zářivý přechod*. Jedním z typů zářivého přechodu je přechod elektronu z excitovaného stavu S_1 do základního stavu S_0 . Tento jev se nazývá *fluorescence*. Elektron se může zářivě vrátit do základního stavu pouze z nejnižší vibrační hladiny. Pokud se excitovaný elektron nacházel v některé z vyšších vibračních hladin, přechází do nejnižší vibrační hladiny přechodem, který je nazýván *vnitřní konverze* nebo *vibrační relaxace*. Jedná se o nezářivé přechody. Excitovaný elektron, který přešel do tripletového stavu, se může dodáním energie znovu dostat do singletového stavu S_1 . Ze stavu S_1 se elektron vrací do základního stavu S_0 za současného vyzáření fotonu a je pozorována *zpožděná fluorescence* (Obr. 4). Z toho plyne, že proces zpožděné fluorescence je analogický k mezisystémovému přechodu z S_1 do T_1 , pouze probíhá opačně.

2.2.1.2. Fosforescence

Může nastat situace, kdy proběhne nezářivý přechod ze singletového stavu S_1 na hladinu T_1 , kdy je přechod spojen se změnou spinového stavu. Tento děj se nazývá *mezisystémový přechod* a většinou k němu dochází, pokud se překrývají nejnižší vibrační hladiny singletového stavu s vyššími hladinami tripletového stavu. Z tripletového stavu T_1 se excitovaný elektron navrací do základního stavu S_0 za současné ztráty energie ve formě fotonu. Tento děj se nazývá *fosforescence* (Obr. 4). Tripletový stav molekuly má nižší energii než příslušný singletový excitovaný stav, takže přechod do základního stavu je spojen s emisí záření o delší vlnové délce, než při fluorescenci. Protože molekula setrvává v tripletovém stavu poměrně dlouho, může ztratit svou energii snáze jinými pochody než fosforescencí, např. kolizí s molekulami rozpouštědla.



Obr. 4 Jablonskiho diagram – energetické přechody při vzniku fluorescence a fosforescence. Přechody: VR – vibrační relaxace, VK – vnitřní konverze, MP – mezisystémový přechod

Luminiscenční zářivý tok roste s množstvím absorbovaného záření, kvantovým výtěžkem luminiscence (tj. poměrem udávajícím počet emitovaných fotonů a absorbovaných fotonů). Luminiscenci nepříznivě ovlivňuje vyšší teplota, která zvyšuje pravděpodobnost nezářivých přechodů [4].

Fluorescence i fosforescence trvá i po přerušení budícího záření. Rozdíl je v tom, že fluorescence, která se vyskytuje hlavně v parách, kapalinách a roztocích, trvá 10^{-8} až 10^{-5} s po ukončení osvětlování, kdežto fosforescence trvá 10^{-2} až několik hodin, popřípadě i dní [6].

2.2.2. Emisní a excitační spektra molekul

Emisní a excitační spektra jsou zaznamenávána pomocí spektrofluorimetru. Je-li měřena závislost intenzity fluorescence (luminiscence) v určitém rozsahu vlnových délek při konstantní excitační vlnové délce, je tato závislost nazývána *emisním* spektrem. Je-li měřena závislost intenzity fluorescence pro různé excitační vlnové délky při konstantní emisní vlnové délce, je toto spektrum nazýváno *excitační*.

2.2.2.1. Emisní spektrum

Emisní spektrum je v různém výtěžku excitováno kteroukoliv vlnovou délkou v oblasti excitačního spektra a je ovlivněno různou citlivostí detektoru v závislosti na vlnové délce. Existují 3 druhy emisních spekter [4]:

1) Atomová neboli čárová spektra:

Jsou emitována volnými atomy v plynném stavu. Kovy emitují čáry ve viditelné spektrální oblasti (vlivem nízkého ionizačního potenciálu) a nekovy emitují čáry v ultrafialové oblasti pod 200 nm (vlivem vysokého ionizačního potenciálu).

2) Molekulová neboli pásová spektra:

Sestávají z mnoha blízko sebe umístěných čar, které splývají v pásy

3) Kontinuální spektra:

Vyzařují je pevné, kapalné i plynné látky. Vyzařování je rozděleno nepřetržitě na celý rozsah vlnových délek a toto rozdělení závisí na teplotě.

2.2.2.2. Excitační spektrum

Excitační spektrum je v podstatě zjednodušené absorpční spektrum analytu, protože jen některá absorpční maxima vyvolávají fluorescenci. Intenzita excitačního maxima je totožná s intenzitou absorpčního maxima při konstantní intenzitě emise zdroje v daném rozsahu vlnových délek [3].

2.2.3. Doba života fluorescence a kvantový výtěžek

Doba života fluorescence a jeho kvantový výtěžek patří mezi nejdůležitější vlastnosti fluoroforu. Kvantový výtěžek je poměr počtu emitovaných fotonů a počtu fotonů absorbovaných. Doba života fluoroforu určuje dobu, po kterou je fluorofor schopný interagovat nebo difundovat v jeho prostředí. Všechny interakce v excitovaném stavu se následně projeví na emisi tohoto fluoroforu. Především je soustředěna pozornost na to, jakým způsobem se fluorofor dostane zpět do základního stavu, konkrétně jestli se fluorofor vrátí do základního stavu zářivým nebo nezářivým přechodem nebo kombinací obou přechodů. Takže se jedná o kombinaci rychlosti zářivého přechodu (k_r) a rychlosti přechodu nezářivého (k_{nr}).

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

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

Z rovnice 4 plyne, že kvantový výtěžek se bude blížit jedné, pouze pokud rychlostní konstanta zářivého přechodu bude mnohem větší než rychlostní konstanta nezářivého přechodu. Jedna z molekul, která má kvantový výtěžek blízky jedné je fluorescenční sonda známá jako perylen.

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

$$-\frac{d[A^*]}{dt} = (k_r + k_{nr})[A^*] \quad (5)$$

Řešením rovnice 5 je:

$$[A^*] = [A^*]_0 \exp\left(-\frac{t}{\tau_S}\right) \quad (6)$$

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

$$\tau_S = \frac{1}{k_r + k_{nr}} \quad (7)$$

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



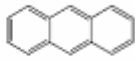
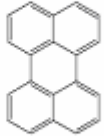
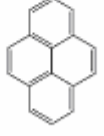
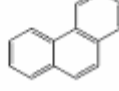
$$\tau_r = \frac{1}{k_r} \quad (8)$$

Doba života, která je určena pouze reciprokou hodnotou rychlostní konstanty zářivého přechodu, se nazývá přirozená doba života (natural nebo intrinsic lifetime). Tato doba života může být teoreticky spočítána z absorpčního spektra, extinkčního koeficientu a emisního spektra fluoroforu pomocí Strickler-Bergova vztahu [7], [25],

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

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

$$\int_{\infty}^0 F_{\bar{\nu}}(\bar{\nu}_F) d\bar{\nu}_F = \Phi_F \quad (10)$$

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

Obr. 5 Příklady fluoroforů, jejich kvantové výtěžky fluorescence (Φ_F) a doby života (τ_S) [4]

2.2.4. Zhášení fluorescence

Zhášení fluorescence představuje jakýkoli proces snížení intenzity fluorescence vzorku. Zhášení vycházející z kolizních střetů mezi molekulami fluoroforu (látka schopná fluorescence) a zhášeče se nazývá *dynamické* zhášení. Jestliže se molekuly fluoroforu váží na molekuly zhášeče, nazývá se toto zhášení *statické*. Zhášení všeobecně bylo a je intenzivně studováno v souvislosti s biochemickými systémy. Ze zhášení fluorescence v biologických systémech je možno zjistit některé informace o molekulách, mezi kterými ke zhášení dochází nebo o prostředí, ve kterém ke zhášení dochází. V podstatě dostáváme informace o příslušném donor-akceptorovém páru, což představuje molekuly nebo charakteristické skupiny molekul, které jsou schopny darovat nebo přijmout například energii nebo elektron, z čehož donorem je molekula poskytující energii a akceptorem je molekula tuto energii přijímající. Pokud se vybere správný donor-akceptorový pár je možno odhalit umístění látky v membráně buňky [41] nebo lze například určit vzdálenost mezi dvěma místy molekuly proteinu, čímž lze charakterizovat skládání proteinů, tzv. protein folding [48], [49].

2.2.4.1. Zhášeče fluorescence

Široká řada látek se chová jako zhášeč fluorescence. Jedním z nejznámějších zhášečů fluorescence je molekulární kyslík, který zháší téměř všechny známé fluorofory. Nejpravděpodobnějším mechanismem zhášení fluorescence kyslíkem je nezářivý přechod fluoroforu do tripletového stavu, tedy mezisystémový přechod fluoroforu. V roztocích je tripletový stav zhášen s maximální efektivitou, takže fosforescence není pozorována. Aromatické a alifatické aminy jsou také efektivními zhášeči fluorescence většiny nesubstituovaných aromatických uhlovodíků. Příkladem může být antracen, který je efektivně zhášen dietylanilinem [17]. V případě antracenu a dietylanilinu se formuje excitovaný komplex zvaný exciplex. K formování exciplexu dochází proto, že fluorofor v excitovaném stavu přijme elektron z aminu. V nepolárních rozpouštědlech můžeme tento proces klasifikovat jako reakci v excitovaném stavu, protože samotná fluorescence exciplexu bývá pozorována, kdežto v polárních rozpouštědlech je fluorescence tohoto exciplexu zhášena, takže se interakce mezi antracem a diethylanilinem jeví jako klasické zhášení.

Dalším typickým procesem, při kterém dochází ke zhášení, je efekt těžkého atomu. Patří sem například jód nebo brom. Halogenované sloučeniny jako jodbenzen, trichlorethanol nebo brombenzen zháší mechanismem dynamického zhášení (viz kapitola 2.2.4.2.). Zhášení většími halogeny jako bromidy a jodidy může vyústit k mezisystémovému přechodu do tripletového stavu, který je způsoben "spin-orbit couplingem" (vzájemná interakce magnetických momentů spinového pohybu elektronů a orbitálního pohybu elektronů) excitovaného fluoroforu a halogenu [18], [26]. Mechanismus zhášení je pravděpodobně odlišný pro sloučeniny obsahující chlor. Indoly, karbazoly a jejich deriváty jsou velice citlivé na zhášení chlorovanými uhlovodíky a tzv. elektronovými "scavengery" jako protony, histidin, cystein, fumarát, NO_3^- , Cu^{2+} , Pb^{2+} , Cd^{2+} a Mn^{2+} [19]. Zhášení těmito látkami pravděpodobně zahrnuje přenos elektronu z fluoroforu ke zhášeči.

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

Protože spousta molekul se chová jako zhášeč, může být lehce vybrán vhodný pár fluoroforu a zhášeče. Některé zhášeče mohou být vysoce selektivní pro určitý fluorofor.

Selektivita často záleží na mechanismu zhášení, který zase bude záviset na chemických vlastnostech jednotlivých molekul.

Dále je možno rozdělit zhášení fluorescence do šesti typů [3]:

1) **Koncentrační (samo)zhášení fluorescence (Vavilov):**

Od určité mezní koncentrace c_0 (prahová koncentrace analytu) dochází k poklesu kvantového výtěžku fluorescence. Důsledkem jsou neelastické srážky excitovaných molekul s molekulami analytu v základním stavu (možná také asociace molekul). Molekuly analytu absorbují záření, ale neemitují. Energie je disipována formou tepelné energie.

2) **Vnitřní konverze molekul:**

V důsledku kolizí excitovaných molekul s neexcitovanými dochází ke ztrátě energie excitované molekuly na nezářivé formy energie. Ztráty se zvyšují s rostoucí teplotou, dále ztráty závisí na koncentraci molekul, na viskozitě roztoku apod.

3) **Vnitřní filtrační efekt prvního druhu:**

Detektor spektrofluorimetru detekuje emisi záření pouze z centrální části kyvety (z jejího středu). Než dopadající záření dosáhne středu kyvety, značná část dopadajícího záření je absorbována před dosažením centrální části kyvety. Tento efekt má za následek snížení intenzity fluorescence.

4) **Vnitřní filtrační efekt druhého druhu:**

Obsahuje-li roztok další chromofor, který absorbuje světlo při blízké vlnové délce jako fluoreskující produkt analytu, tak se chromofor chová jako filtr, který k produktu analytu propustí jen část dopadajícího záření.

5) **Strukturní a konfigurační změny molekul (organických):**

Převod molekuly do tripletového stavu (tvorba volného biradikálu s nepárovými elektrony, který je velmi reaktivní). Přejít na složitější sloučeniny (dimery). Vzniklé sloučeniny nemusí fluoreskovat. Při strukturní a konfigurační změně může excitovaná molekula přejít do základního stavu bez emise nového záření. K tomu jsou náchylné látky s volnější strukturou, volně otáčivé části molekul. Dochází k degradaci elektronové energie na vibrační energii.

6) **Vliv cizích iontů:**

Pokles kvantového výtěžku fluorescence v přítomnosti cizích iontů a látek. Stupeň zhášení roste s polarizovatelností respektive s deformabilitou, s rostoucí kovalentní charakteristikou.

Zhášení anionty: $F^- < NO_3^- < SO_4^{2-} < ac < (COO)^{2-} < Cl^- < Br^- < SCN^- < I^-$

Zhášení kationty: $Cu^{2+}, Ni^{2+}, Fe^{2+}, Fe^{3+}, Mn^{2+}$ (kationty s neobsazenými d-orbitaly; $Mn^{2+}, Fe^{2+}, Hg^{2+} < UO_2^{2+} < Co, Ni < Fe^{3+} < Cu < Cr^{3+}$)

Důsledkem je pohlcení elektronu ze vzbuzené hladiny fluoreskujícího chelátu analytu v neobsazeném d-orbitalu, což má za následek znemožnění návratu excitovaného elektronu do základní hladiny.

Pro účely této práce bylo k podrobnějšímu vysvětlení vybráno zhášení dynamické a zhášení statické.

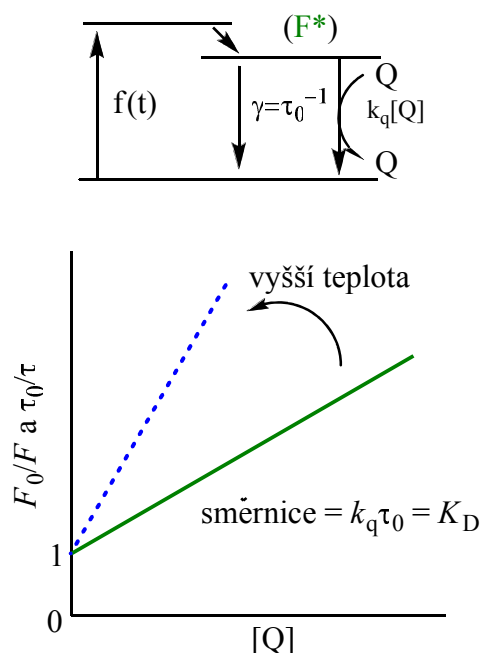
2.2.4.2. Dynamické zhášení

Dynamické zhášení může být popsáno Stern-Volmerovou rovnicí:

$$\frac{F_0}{F} = 1 + k_q \tau_0 [Q] = 1 + K_D [Q] \quad (11)$$

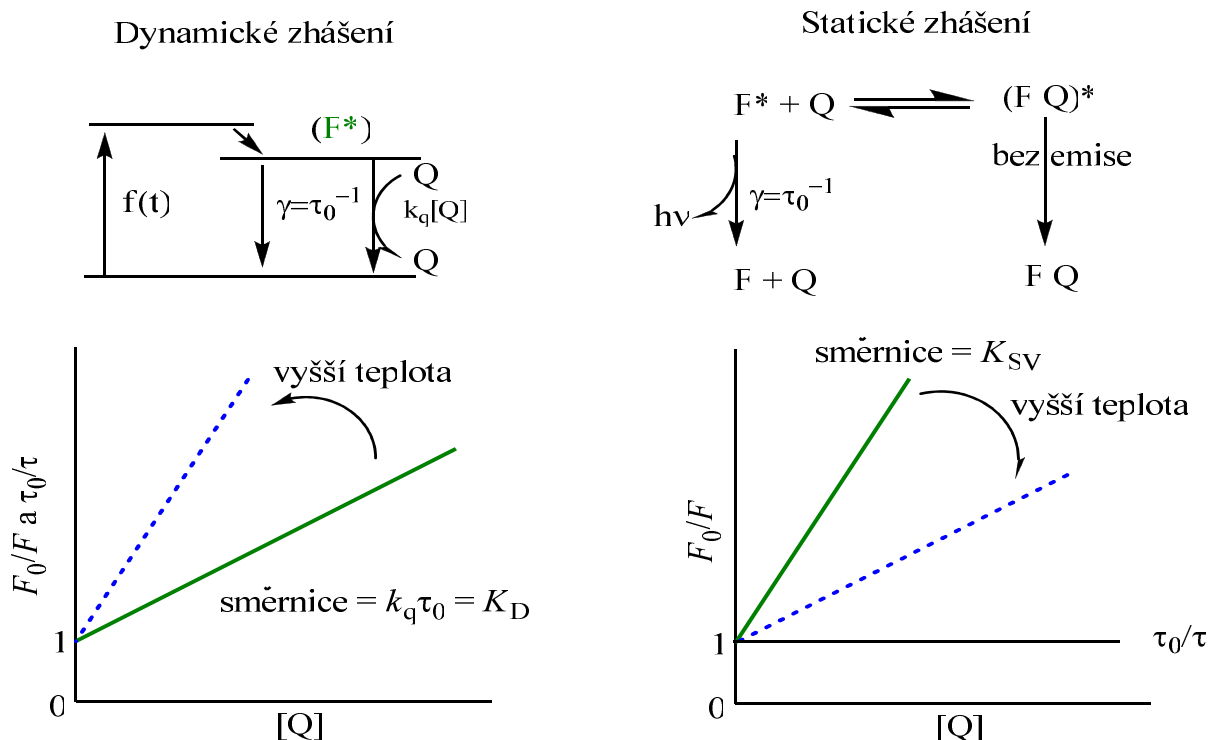
kde F_0 a F jsou intenzity fluorescence v nepřítomnosti zhášeče a v přítomnosti zhášeče, k_q je bimolekulární rychlostní konstanta zhášení, τ_0 představuje dobu života fluoroforu bez přítomnosti zhášeče a Q je koncentrace zhášeče. Stern-Volmerova konstanta zhášení pak je dána rovnicí $K_D = k_q \tau_0$.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

Data jsou většinou prezentována jako graf závislosti poměru intenzit fluorescence bez přítomnosti zhášeče a v přítomnosti zhášeče na koncentraci zhášeče. Protože tato závislost by měla být lineární, mělo by být možno ze směrnice přímky této závislosti získat konstantu K_D (Obr. 6).



Obr. 6 Stern-Volmerův graf pro dynamické zhášení a schéma mechanismu dynamického zhášení

Pokud pozorujeme Stern-Volmerův lineární průběh závislosti, nemusí to ještě znamenat, že se jedná o dynamické zhášení. Také statické zhášení dává lineární průběh závislosti (viz kapitola 2.2.4.3.). Statické a dynamické zhášení může být odlišeno závislostmi jednotlivých procesů na teplotě nebo viskozitě nebo například měřeními časově rozlišené fluorescence. Vyšší teplota ústí k rychlejší difúzi, takže dynamické zhášení bude efektivnější. Vyšší teplota také způsobí disociaci slabě vázaných komplexů, což vyústí k nižšímu podílu statického zhášení, protože principem statického zhášení je tvorba nefluorescentního komplexu (Obr. 7).



Obř. 7 Porovnání dynamického a statického zhášení

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

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

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

$$\tau_0 = \frac{1}{\gamma} \quad (13)$$

$$\tau = \frac{1}{\gamma + k_q[Q]} \quad (14)$$

a tedy Stern-Volmerova rovnice má tvar:

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

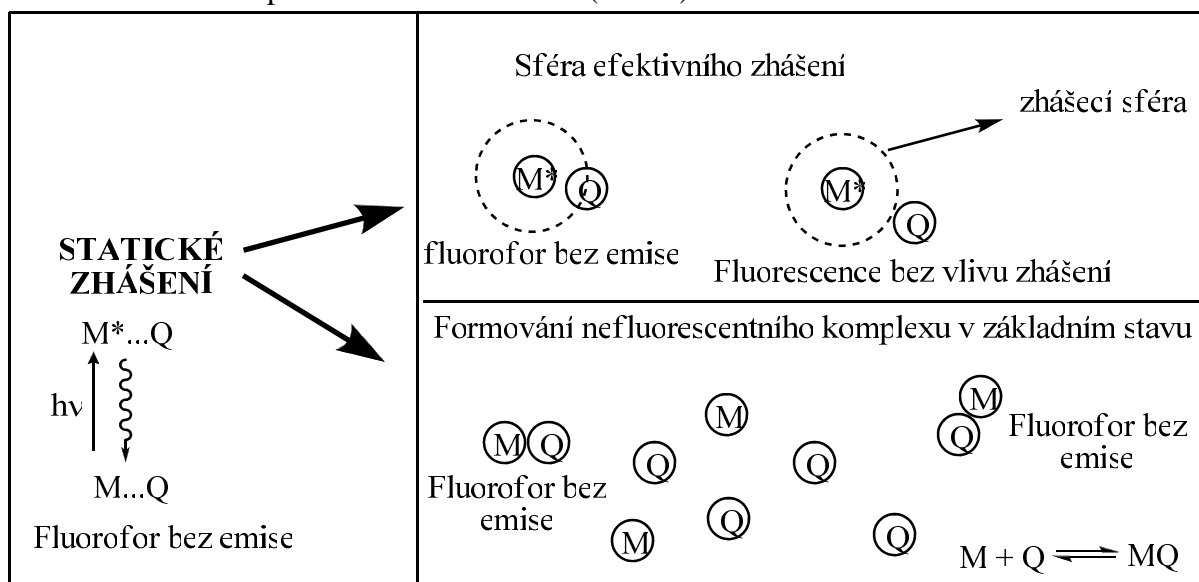
Z rovnice plyne důležitá charakteristická vlastnost dynamického zhášení. Platí zde, že snížení intenzity fluorescence je přímo úměrné snížení doby života fluorescence:

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

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

2.2.4.3. Statické zhášení

Principem statického zhášení je formace nefluorescentního komplexu. K tvorbě tohoto komplexu může dojít buď díky tzv. sféře efektivního zhášení, anebo přímou tvorbou nefluorescentního komplexu v základním stavu (Obr. 8).



Obr. 8 Schéma statického zhášení

2.2.4.3.1. Sféra efektivního zhášení

Může nastat situace, kdy fluorofor v excitovaném stavu a zhášedce nemohou měnit svou vzájemnou pozici v prostoru během doby života excitovaného stavu (například v prostředí s vysokou viskozitou nebo v rigidní matici). Pro tuto situaci navrhl Perrin model zhášení, ve kterém se molekula zhášedce nachází uvnitř sféry o objemu V_q , která obklopuje fluorofor (tento objem je nazýván sféra efektivního zhášení, aktivní sféra nebo jen sféra zhášení). Pokud se zhášedce nachází mimo aktivní sféru, nemá zhášedce žádný vliv na fluorofor. Pokud se ale dostane zhášedce do oblasti aktivní sféry, intenzita fluorescence je snížena, avšak na dobu života fluorescence nemá zhášení žádný vliv (Obr. 8).

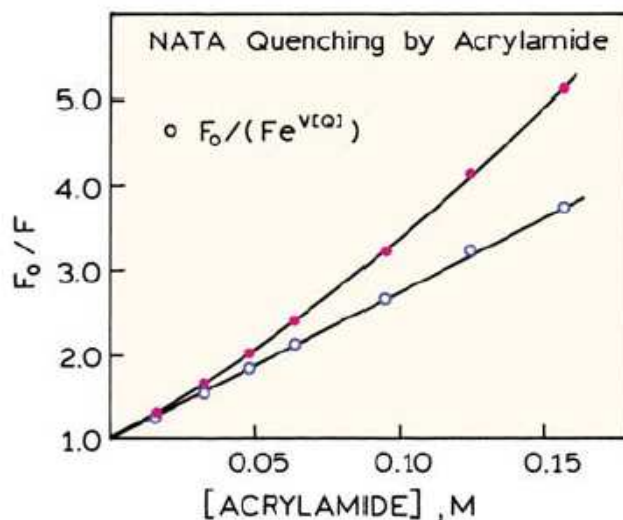
Protože intenzita emise fluorescence je přímo úměrná pravděpodobnosti, že se zhášedce nachází v objemu V_q , může být tato pravděpodobnost vyjádřena rovnicí:

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

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

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

V porovnání se Stern-Volmerovou rovnicí není závislost $\frac{F_0}{F}$ na koncentraci zhášeče lineární, ale vykazuje odchylku od linearitu ve vysokých koncentracích zhášeče (Obr. 9). Ze směrnice této závislosti je možno vypočítat objem V_q .



Obr. 9 Příklad zhášení v aktivní sféře. Zhášení NATA (*N*-acetyl-*L*-tryptophanamide) pomocí akrylamidu [53]

2.2.4.3.2. Tvorba nefluorescentního komplexu v základním stavu

Předpokladem této teorie je tvorba nefluorescentního komplexu v základním stavu (Obr. 8) v poměru 1:1 podle rovnováhy:



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

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

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

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

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

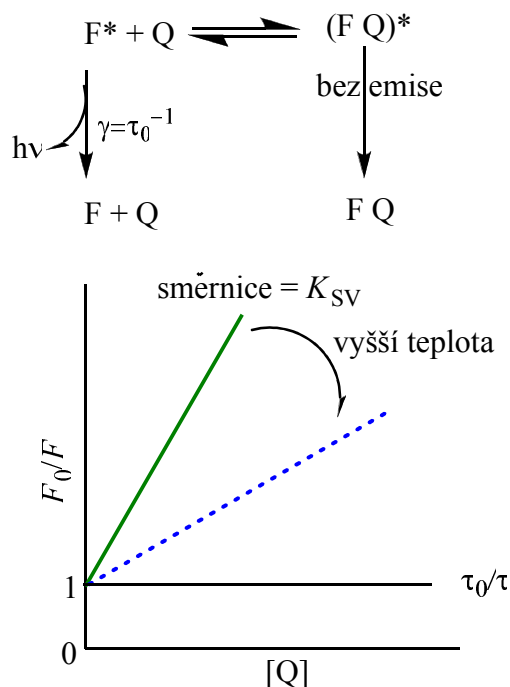
což vede k rovnici pro frakci nekomplexovaného fluoroforu:

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

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

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

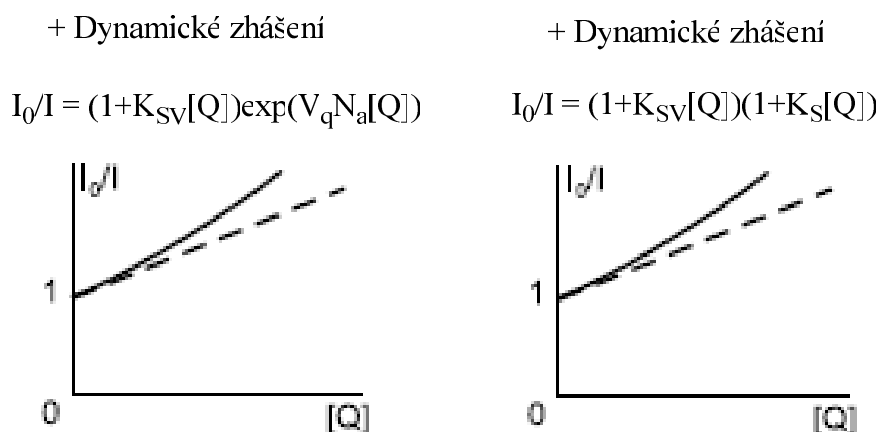
Výsledná závislost $\frac{F_0}{F}$ na koncentraci zhášedce je opět lineární stejně jako tomu bylo v případě dynamického zhášení (Obr. 10). Změnou oproti rovnici dynamického zhášení je to, že rychlostní konstanta zhášení je v případě statického zhášení konstanta stability komplexu.



Obr. 10 Schéma statického zhášení tvorbou nefluorescentního komplexu v základním stavu a schéma závislosti poměru intenzity fluorescence v nepřítomnosti a v přítomnosti zhášedce na koncentraci zhášedce

2.2.4.4. Kombinované statické a dynamické zhášení

Ve spoustě případů dochází k tomu, že dynamické a statické zhášení jednoho fluoroforu stejným zhášedcem probíhá zároveň. V těchto případech dochází k odchýlení Stern-Volmerovy závislosti od linearit, přesněji závislost intenzit fluorescence před přidáním a po přidání zhášedce na koncentraci zhášedce směřuje ve vyšších koncentracích zhášedce k vyšším poměrům $\frac{F_0}{F}$, než by se očekávalo od klasické Stern-Volmerovy závislosti pro samostatné dynamické nebo statické zhášení tvorbou nefluorescentního komplexu (Obr. 11).



Obr. 11 Kombinované statické a dynamické zhášení. Vlevo statické zhášení sféry efektivního zhášení kombinované s dynamickým zhášením. Vpravo statické zhášení nefluorescentního komplexu v základním stavu v kombinaci s dynamickým zhášením [7]

U případů zhášení efektivní sférou nebo tvorbou nefluorescentního komplexu v kombinaci s dynamickým zhášením je potřeba vynásobit poměr $\frac{I}{I_0}$ pro dynamické zhášení frakcí nekomplexovaných molekul fluoroforu:

$$\frac{F_0}{F} = \left[\frac{F_0}{F} \right]_{\text{dyn}} \times \frac{[M]_0}{[M]} \quad (24)$$

Dosazením za výraz pro dynamické zhášení, a pokud se vezme v úvahu, že intenzita fluorescence je přímo úměrná koncentraci fluoroforu, tak i dosazením rovnice pro statické zhášení jsou získány rovnice pro kombinované dynamické a statické zhášení. Pro statické zhášení tvorbou nefluorescentního komplexu v základním stavu bude rovnice:

$$\frac{I_0}{I} = (1+K_D[Q])(1+K_S[Q]) = 1 + (K_D + K_S)[Q] + K_D K_S [Q]^2 \quad (25)$$

V případě zhášení sférou efektivního zhášení má rovnice tvar:

$$\frac{I_0}{I} = (1+K_D[Q])\exp(V_q N_a [Q]) \quad (26)$$

V obou případech je pozorován nelineární průběh těchto závislostí ve vyšších koncentracích zhášeče (Obr. 11).

2.3. Nevlastní fluorescence

K látkám, které sami nemají schopnost fluoreskovat, se přidávají nevlastní fluorofory. Díky nevlastním fluoroforům vzniká nevlastní fluorescence. Pokud se na studovaný vzorek váží kovalentně, nazývají se *fluorescenční značky*. Pokud se váží nekovalentně, jedná se o *fluorescenční sondy* [9].

2.3.1. Fluorescenční značky

Fluorescenční značky jsou nevlastní fluorofory, které se ke sledovaným biomolekulám (proteinům, peptidům a jiným) váží kovalentní vazbou. Nejčastěji se používají k fluorescenčnímu značení proteinů, kdy se kovalentně váží na jejich aminové nebo histidinové boční řetězce, thiolové skupiny, atd. Mají různé využití například v imunologii nebo v histochemii [9].

2.3.2. Fluorescenční sondy

Fluorescenční sondy jsou nevlastní fluorofory, které se ke sledované struktuře váží nekovalentně a často přitom mění své fotofyzikální vlastnosti. Volba fluorescenční sondy je nejdůležitější součástí ve fluorescenční spektroskopii, protože právě její vlastností umožňují získat potřebné informace. V současné době existuje nepřehledné množství fluorescenčních sond [9].

2.4. Asociační procesy

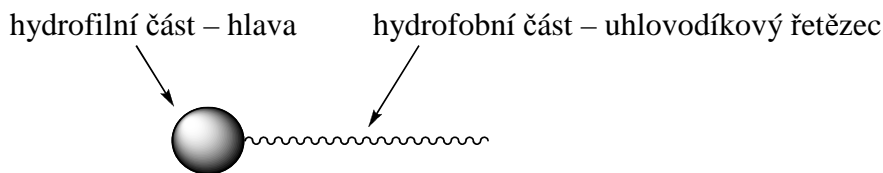
2.4.1. Asociativní (micelární) koloidy

Existuje skupina látek, která jen za nízkých koncentrací tvoří pravé roztoky, ale po překročení určité koncentrace jejich molekuly asociují a vytvářejí koloidní částice. Tyto polymolekulární útvary se nazývají micely a látky, které se chovají tímto způsobem, jsou označovány jako micelární neboli asociativní koloidy [10].

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

2.4.1.1. Molekulární struktura micelárních koloidů

Schopnost vytvářet micely je podmíněna zvláštní strukturou molekul, tzv. tenzidů. Molekula tenzidu je amfipatická neboli amfifilní, tj. musí se skládat z lyofilní části, která má tendenci se v daném prostředí rozpouštět, a z lyofobní části, která je naopak v témže prostředí nerozpustná (Obr. 12). Neochota lyofobní části ke kontaktu s molekulami rozpouštědla je pak příčinou asociace. Ve většině případů se jedná o povrchově aktivní látky (PAL) rozpustné ve vodě, jejichž molekuly obsahují silně hydrofilní polární skupinu, která je schopna zajistit rozpustnost ve vodě, a silně hydrofobní nepolární část, tedy jeden nebo více uhlovodíkových řetězců. Aby docházelo k asociaci těchto látek, musí mít povrchově aktivní látky dostatečně dlouhý uhlovodíkový řetězec. Podle toho, zda a jak podléhá hydrofilní skupina elektrolytické disociaci, se dělí micelární koloidy na ionogenní a na neionogenní neboli neutrální. Ionogenní se ještě dále dělí na kationaktivní, anionaktivní a amfoterní.



Obr. 12 Amfifilní molekula (tenzid)

2.4.1.2. Vznik micel

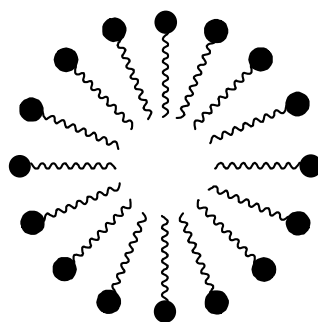
Zředěné roztoky micelárních koloidů se vyznačují charakteristickým průběhem závislosti různých fyzikálních vlastností na koncentraci. Ve velkých zředěních tvoří micelární koloidy pravé roztoky. Při určité koncentraci nastávají na křivkách koncentračních závislostí různých fyzikálně-chemických vlastností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

Při vyšších koncentracích se na křivkách koncentračních závislostí různých fyzikálně-chemických vlastností objevuje další zlom. Předpokládá se, že příčina tohoto jevu, který nastává při tzv. druhé CMC [11], jsou změny v typu agregace.

Při mnohem nižších koncentracích než je kritická micelární koncentrace, dochází k tvorbě tenzidu v agregované formě, nikoliv však k tvorbě micel. Koncentrace, při které se tvoří takovéto typy agregátů, je nazývána kritická agregační koncentrace (CAC) [15].

2.4.1.3. Struktura micel ve zředěném vodném roztoku

Existence micel byla potvrzena mnoha experimentálními metodami, ale o jejich velikosti a tvaru, zvláště v koncentrovanějších roztocích, existuje mnoho různých představ. Velikost a tvar micel závisí na koncentraci, teplotě, struktuře PAL, charakteru mezimolekulárních sil, atd. Měřením rozptylu světla byla potvrzena domněnka, že micely ve zředěných roztocích mají kulový tvar, proto se mluví o sférických micelách (Obr. 13). Na povrchu jsou molekulám vody vystaveny hydrofilní skupiny, zatímco hydrofobní uhlovodíkové řetězce jsou sdruženy v jádru micely tak, aby jejich kontakt s vodou byl co nejmenší [11].

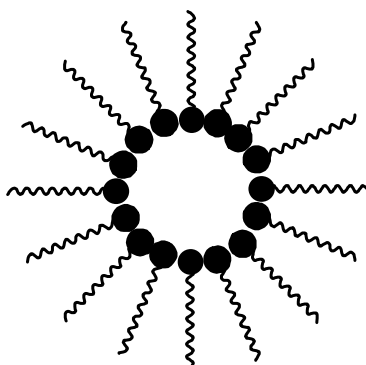


Obr. 13 Struktura micely

2.4.1.4. Obrácené (reverzní) micely

Některé amfifilní molekuly vytvářejí v nepolárních rozpouštědlech micely, jejichž jádro tvoří polární skupiny, zatímco uhlovodíkové řetězce směřují ven do nepolárního prostředí (Obr. 14). Kritická micelární koncentrace u obrácených micel je těžko definovatelná, protože oblast přechodu z pravého roztoku na koloidní roztok pokrývá širší interval koncentrací. Silně polární jádro micely velmi ochotně rozpouští vodu, což má za následek zvýšení hodnoty asociačního čísla (ale i přes zvýšení asociačního čísla reverzních micel bude toto číslo stále

menší, než asociační číslo micel vytvořených v polárním rozpouštědle). Kvůli polárnímu jádru bývá velmi obtížné připravit dokonale bezvodé roztoky. Jádro reverzní micely je vhodným prostředím pro katalýzu některých chemických reakcí.

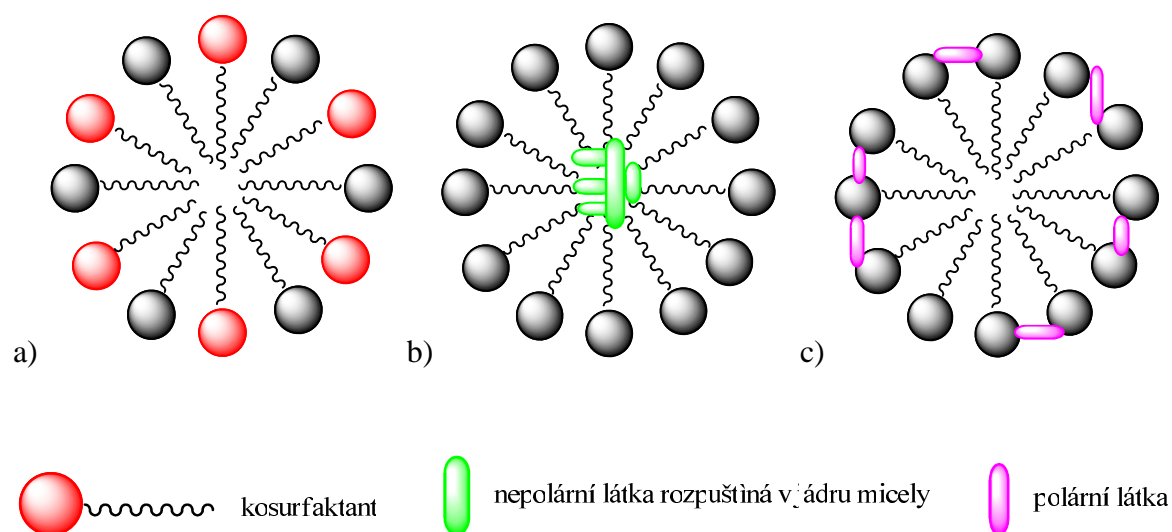


Obr. 14 *Struktura obrácené (reverzní) micely*

2.4.2. Solubilizace

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

Nepolární látky se rozpouštějí v jádru micely, amfifilní molekuly (tzv. kosurfaktanty) se rozmísťují v micelách tak, že jejich uhlovodíkové řetězce směřují dovnitř micel a polární skupiny do vodné fáze. Polární látky jsou solubilizovány na povrchu micely nebo v těsné blízkosti jejího povrchu (Obr. 15).



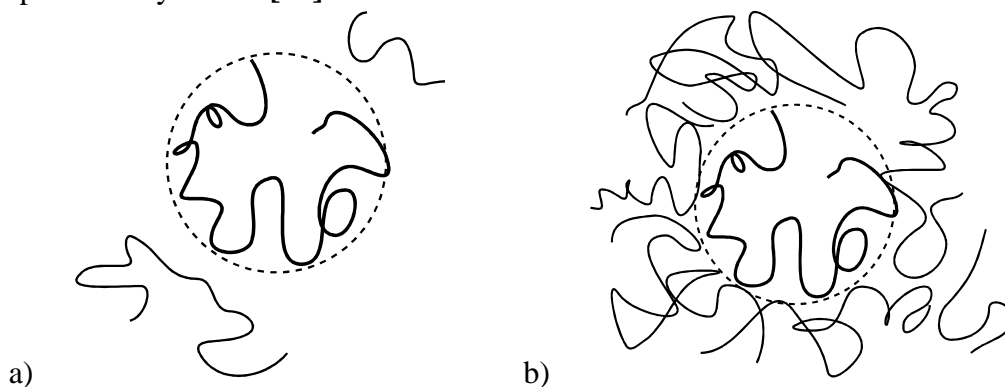
Obr. 15 *Solubilizace a) kosurfaktantů, b) nepolárních látek, c) polárních látek solubilizovaných na povrchu micely*

2.4.3. Koloidní roztoky vysokomolekulárních látek

Roztoky vysokomolekulárních látek jsou pravé roztoky. Jejich částice se neskládají jako micely z množství malých molekul, ale jsou to jednotlivé molekuly velkých rozměrů, tedy útvary vázané chemickými valenčními silami.

Zředěný roztok vysokomolekulární látky je takový roztok, v němž jsou jednotlivá makromolekulární klubka od sebe oddělena spojitou fází rozpouštědla (Obr. 16a). Klubka se střídají s oblastmi nulové koncentrace polymeru, což znamená, že zředěný roztok je koncentračně nestejnorodý.

Je-li koncentrace vysokomolekulární látky zvyšována do té míry, kdy domény klubek vyplní celý prostor roztoku a začínají se navzájem překrývat (Obr. 16b), přestává platit definice pro zředěný roztok [10].



Obr. 16 Roztoky vysokomolekulárních látek a) zředěný roztok, b) koncentrovaný roztok [10]

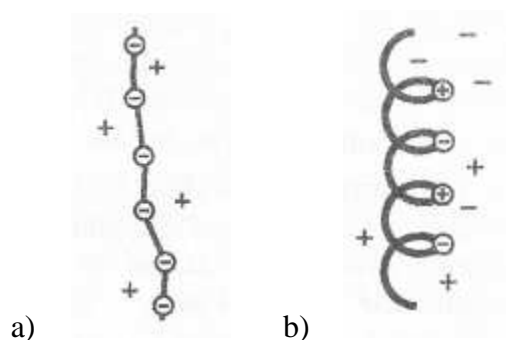
2.4.4. Roztoky vysokomolekulárních elektrolytů

Molekuly řady vysokomolekulárních látek obsahují ionogenní skupiny a jsou schopné v roztoku vytvářet ionty, tedy disociovat. Tyto vysokomolekulární elektrolyty jsou nazývány polyelektrolyty. Právě takovým příkladem polyelektrolytu, patřícího do skupiny polyelektrolytů obsahujících kyselou skupinu, je kyselina hyaluronová, která obsahuje karboxylové skupiny.

Chování makromolekul, které v roztoku elektrolyticky disociují, je ovlivněno kromě mezimolekulárních disperzních sil i silami elektrostatickými. Pokud neobsahuje roztok žádný jiný elektrolyt kromě vysokomolekulárního, vliv elektrostatických sil je velký, ale podstatně se zeslabuje přidáním i malého množství nízkomolekulárního elektrolytu.

Lineární makromolekula obsahující pouze náboje stejného znaménka se jen málo svinuje v klubko a ve zředěných roztocích existuje spíše ve formě nataženého řetězce (Obr. 17a). To je způsobeno velkými odpuzivými silami mezi souhlasně nabitými skupinami. Tvar makromolekuly je ale ovlivněn i malými opačně nabitými ionty přítomnými v roztoku. Tyto ionty vytvářejí kolem makromolekuly iontovou atmosféru opačného náboje, která zeslabuje odpuzivé účinky elektrostatických sil. Iontovou atmosférou je myšleno takové rozložení iontů, kdy v blízkém okolí centrálního iontu převládá četnost iontů s opačným znaménkem (protiiontů) nad četností iontů souhlasně nabitých (koiontů). Přídávkem nízkomolekulárního elektrolytu stoupá iontová síla roztoku, iontová atmosféra se kolem nabitých skupin stlačuje a makromolekula se svíjí v klubko. Ke svinutí původně nataženého řetězce stačí již malé přídávky elektrolytu. Podobný vliv jako malý přídavek nízkomolekulárního elektrolytu má i

zvýšení koncentrace polyelektrolytu. U amfoterních makromolekul, u kterých se pravidelně střídají kladné a záporné náboje, se řetězec svinuje do cívkovitého nebo spirálovitého tvaru (Obr. 17b) [11].



Obr. 17 Struktura vysokomolekulárních elektrolytů a) makromolekula se souhlasnými náboji ve zředěném roztoku bez nízkomolekulárního elektrolytu, b) amfoterní makromolekula s pravidelně se střídajícími kladnými a zápornými náboji [11]

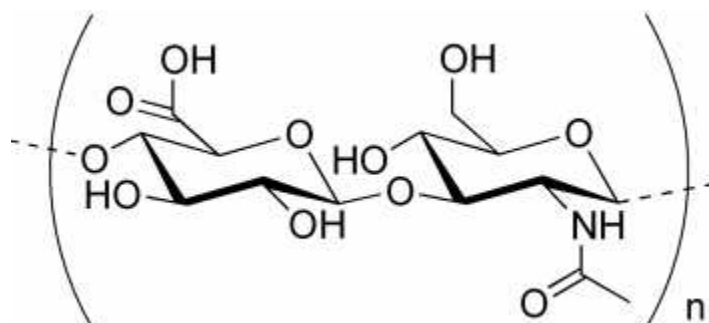
2.5. Kyselina hyaluronová

Kyselina hyaluronová je vysokomolekulární, biologicky odbouratelný, netoxický a nehořlavý lineární polysacharid, který objevili v roce 1934 Karl Meyer a jeho asistent John Palmer. Izolovali ji ze sklivce hovězích očí. Název kyselina hyaluronová vznikl ze slov hyaloid (sklivec) a uronová kyselina. Nejčastěji je tato látka označována jako *hyaluronan* [14].

Kyselina hyaluronová nabízí mnoho klinických uplatnění. První klinické použití kyseliny hyaluronové se datuje do roku 1968, kdy byly popáleniny léčeny čištěnou kyselinou hyaluronovou. Od té doby si kyselina hyaluronová našla cestu do téměř všech oblastí medicíny [12].

2.5.1. Chemická struktura

Z hlediska chemické struktury se hyaluronan skládá ze stále se opakujících sacharidových jednotek, a to z kyseliny D-glukoronové a z D-N-acetylglukosaminu. Jednotlivé sacharidové jednotky se k sobě váží beta-1,4 a beta-1,3 glykosidickými vazbami (Obr. 18).



Obr. 18 Chemická struktura kyseliny hyaluronové

2.5.2. Metabolismus kyseliny hyaluronové

Metabolismus hyaluronanu je velmi dynamický. Některé buňky, jako například chondrocyty v chrupavkách, aktivně syntetizují a katabolizují hyaluronan po celý jejich život. Studie těchto metabolismů ukázaly, že poločas rozpadu hyaluronanu v chrupavkách se pohybuje okolo dvou až tří týdnů. Dalším příkladem buněk, které aktivně syntetizují a rozkládají hyaluronan, patří keratinocyty v pokožce. V tomto případě je poločas rozpadu hyaluronanu podstatně nižší. Je menší než den [14].

2.5.3. Výskyt a vlastnosti kyseliny hyaluronové

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

3 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

Měření časově rozlišené fluorescence se stalo nedílnou součástí experimentů zahrnujících fluorescenční měření. Časově-rozlišená fluorescence se stále více používá pro určování agregačních čísel [30], [31], [35], pro studium přenosu energie [37], [38], [39], [40], nebo pro zkoumání dynamického zhášení [41], [42], [43].

Pro určení agregačních čísel se časově rozlišená metoda používá, protože je možno mnohem přesněji určit hodnoty agregačních čísel, než tomu je v případě steady-state metody. Odchylka steady-state metody roste s rostoucí viskozitou prostředí, s rostoucí hodnotou agregačního čísla a s klesajícím kinetickým poměrem k_q/k . Alargova a spol. zkoumali agregační čísla některých kationtových, aniontových a neionogenních tenzidů. Také zkoumali vliv přídavku polyetylenoxidu k SDS a jeho vliv na změnu agregačního čísla. Bylo vyzorováno, že dobrá shoda mezi oběma metodami nastává, pokud je rychlostní konstanta zhášení alespoň pětkrát větší než rychlostní konstanta vyhasínání fluoroforu v přítomnosti kyslíku. Dále polyetylenoxid snižoval agregační číslo SDS a zvyšoval rozdíl mezi steady-state a časově-rozlišenou metodou [30].

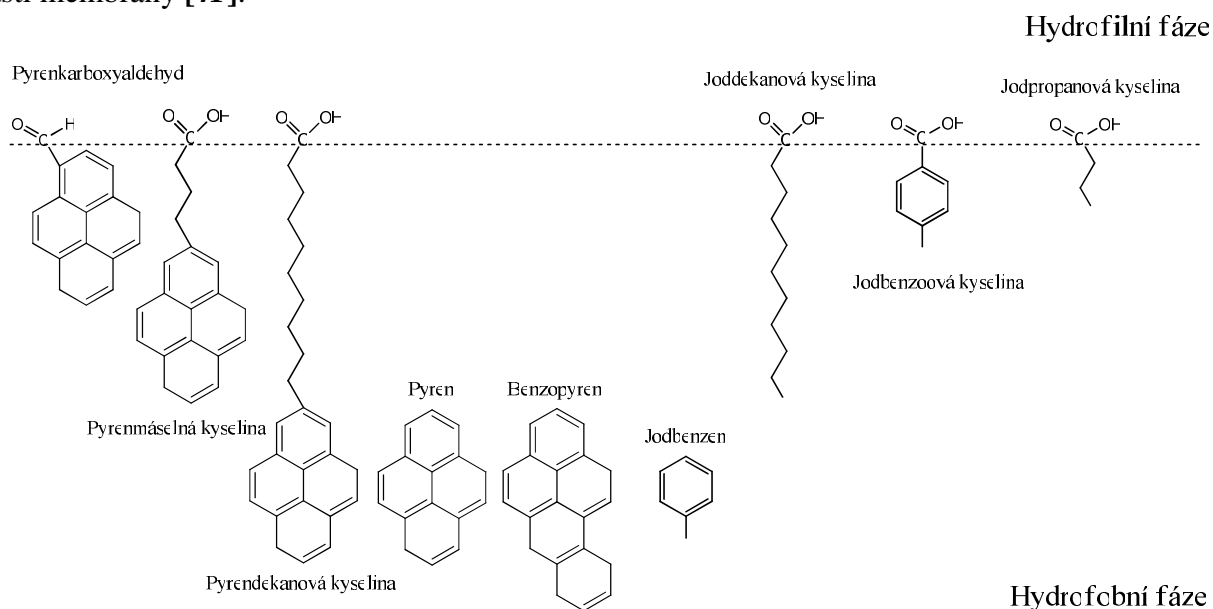
Jedním z případů studia steady-state a časově rozlišené fluorescence v systému polymer-tenzid je práce Yana a spol., kteří zkoumali interakci mezi polyakrylátem sodným a tenzidy s různými velikostmi hydrofilních skupin. Určovali kritickou micelární koncentraci, agregační číslo, mikropolaritu micel a dobu života pyrenu. Jejich výsledky naznačují, že velikost hydrofilní skupiny má výrazný efekt na interakci mezi tenzidem a polyelektrolytem. Interakce je oslabena, když se zvýší velikost hydrofilní skupiny z dodecyltrimetylu na dodecyltripropylammonium bromid. Pravděpodobně to má za následek sterická nekompatibilita mezi řetězcem polyelektrolytu a povrchem micely. Když se ale následně zvětší hydrofilní část na tributyl ($C_{12}NB$), interakce prudce vzroste. Pravděpodobně je to způsobeno asociací hydrofilních skupin $C_{12}NB$ [44].

Dále Sen a spol. zkoumali dynamiku solvatace TNS (2,6-p-toluidinonaphthalene sulfonate) ve vodném roztoku polymeru poly(vinylpyrrolidonu) (PVP) a v agregátech PVP s tenzidem SDS pomocí časově rozlišené fluorescence. Sen a spol. zjistili, že se kvantový výtěžek TNS zvýší asi 210krát, pokud se k vodnému roztoku TNS přidá poly(vinylpyrrolidon). Vyhasínání fluorescence ukázalo, že se jedná o biexponenciální vyhasínací křivku s majoritním zastoupením času 60 ps a minoritním zastoupením času 800 ps. Biexponenciální křivka charakterizovala i TNS v agregátech PVP-SDS. Většinové zastoupení měl delší čas 300 ps, kdežto minoritní podíl měl čas 100 ps. Pomalejší dynamika solvatace TNS v agregátech PVP-SDS značí silné omezení mobility molekul vody mezi řetězcem polymeru a povrchem micely [45].

Zhášení může být také použito pro určení polohy hostující molekuly v agregátech například micel [46] nebo ve fosfolipidové vrstvě membrány [41].

Deumié a spol. použili pro zjištění polohy různých derivátů pyrenu ve fosfolipidové membráně zhášeče na bázi jodu. Použili zhášeče o různé polaritě pro zkoumání hydrofilního povrchu i hydrofobní části fosfolipidové membrány. Použili jodid draselný pro zkoumání vodné fáze, jodpropanovou kyselinu a jodbenzoovou kyselinu pro zkoumání membránového rozhraní a jodbenzen a joddekanovou kyselinu pro zkoumání hydrofobní oblasti membrány (Obr. 19). Předpokladem bylo, že se pyrenmásečná kyselina bude rozkládat částečně ve vodné fázi, částečně ve fázi hydrofobní, pyrenkarboxyaldehyd se bude vázat na povrch membrány. Pyren, benzopyren a pyrendekanová kyselina se budou rozprostírat v různých místech

uhlovodíkového jádra membrány. Pro určení polohy použili jak steady-state, tak i časově rozlišenou fluorescenci. Porovnáním statického a dynamického zhášení zjistili, že dynamické zhášení bylo v těchto systémech zastoupeno 75 % až 100 %. Jejich měření ukázala, že se pyren, benzopyren a pyrendekanová kyselina nacházejí v odlišných částech lipidové dvojvrstvy. Pyren se pravděpodobně rozprostírá přes oblast lipidové matrice mezi oběma lipidovými vrstvami. Benzopyren a pyrendekanová kyselina se nacházejí hlavně v centrální části membrány [41].



Obr. 19 Schématické zobrazení pyrenových derivátů, zhášeců a jejich předpokládanou pozici ve fosfolipidové dvojvrstvě.

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1. Použité chemikálie

<i>Kyselina hyaluronová</i>	CPN spol. s. r. o., HYActive 106 kDa Číslo šarže: 190707-E1
<i>Fluorescenční barviva</i>	Pyren, Fluka, pro fluorescenci, CAS: 129-00-0 Číslo šarže: 430166/1
<i>Povrchově aktivní látky</i>	Cetyltrimethyl amonium bromid: Sigma-Aldrich Chemie, pro molekulární biologii, CAS: 57-09-0 Číslo šarže: 059K0041
	Dodecylsíran sodný: Fluka, pouze použití pro R&D, CAS: 151-21-3 Číslo šarže: 1353471
	Triton X-100: Sigma-Aldrich Chemie, pouze použití pro R&D, CAS: 9002-93-1 Číslo šarže: 1249005
	Hexadecyl piridinium chlorid: Sigma-Aldrich Chemie, pouze použití pro R&D, CAS: 123-03-5 Číslo šarže: 115K0073
<i>Zhášedče</i>	Jodid draselný: Fluka, pouze použití pro R&D, CAS: 7681-11-0 Číslo šarže: 457110/1
	3-jodpropanová kyselina: Sigma-Aldrich Chemie, čistota větší jak 95 %, CAS: 141-76-4 Číslo šarže: S10757-184
<i>Rozpouštědla</i>	Jodbenzen: Fluka, čistota větší jak 99 %, CAS: 591-50-4 Číslo šarže: 1087534
	Dimethylsulfoxid, Fluka, použití pouze pro R&D, CAS: 67-68-5 Číslo šarže: 1468197V
<i>LUDOX</i>	Koloidní křemík, Sigma-Aldrich Chemie, použití pouze pro R&D Číslo šarže: MKBJ4732V

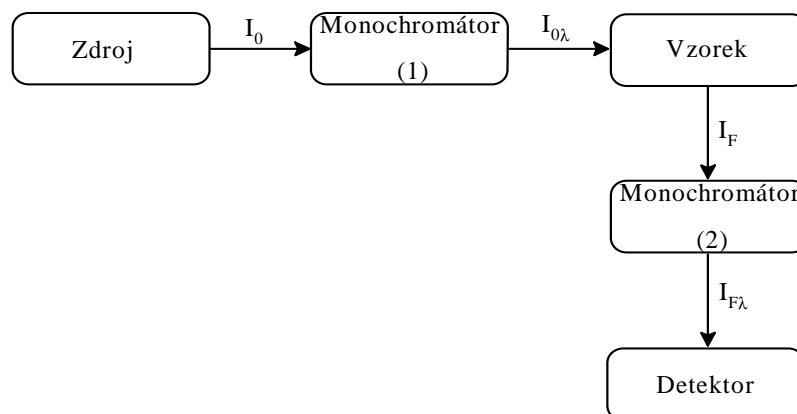
4.2. Přístroje a zařízení

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

Luminiscenční spektrometr, Fluorolog HORIBA Jobin Yvon

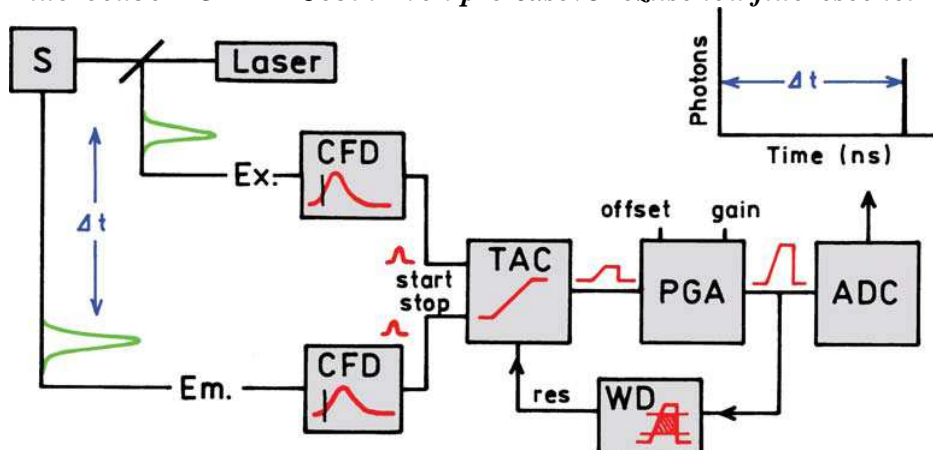
Zdroj záření	Xenonová lampa – 450 W
Monochromátor	Czerny-Turner
Detektor	S1-PMT (R928), PbS, InGaAs
Rozmezí detektoru PMT λ	185 – 900 nm
Rychlost skenu	150 nm/s

Z primárního zdroje polychromatického záření vstupuje záření do mřížkového monochromátoru 1 (excitační), kde se vybere záření o vhodné vlnové délce excitace. Selektivní paprsek o přesně definované vlnové délce prochází křemennou kyvetou se vzorkem, která je umístěna v jeho optické dráze. Dochází k excitaci elektronů zkoumaného vzorku. Fluorescence je pozorována v kolmém směru ke směru paprsku primárního záření, aby primární záření procházející kyvetou nerušilo měření fluorescence. Proto jsou druhý monochromátor (emisní) i detektor umístěny v kolmém směru ke kyvetě. Emisní záření prochází monochromátorem 2, kde je stanovena jeho vlnová délka a pomocí detektoru je zjištěna intenzita fluorescence (Obr. 20) [4].



Obr. 20 Schéma jednopaprskového spektrofluorimetru HORIBA Jobin Yvon

Fluorocube HORIBA Jobin Yvon pro časově rozlišenou fluorescenci



Obr. 21 Schéma instrumentace pro časově rozlišenou fluorescenci [8]

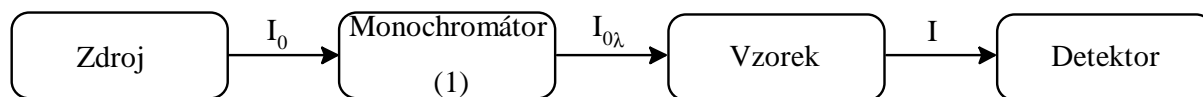
Z laseru je vyslán excitační puls, který excituje vzorek a zároveň je vyslán signál do excitačního constant function discriminátoru (CFD), který zároveň zaznamená čas příchodu excitačního pulzu. Následně je signál předán time-to-amplitude convertoru (TAC), který generuje určité napětí, které se lineárně zvyšuje s časem. V druhém emisním kanálu je pozorován emitovaný foton, který přijde do emisního CFD, který zaznamená příchod fotonu a pošle signál do TAC, kde je zastaveno zvyšování napětí. TAC nyní obsahuje napětí úměrné časovému rozdílu mezi excitačním pulzem a příchodem emitovaného fotonu. Tento proces je opakován stále dokola a jednotlivé naměřené časy jsou zaznamenávány do histogramu, dokud není měření ukončeno. Pokud je potřeba, může být příslušné napětí zesíleno pomocí programmable gain amplifieru (PGA), který informace předá analog-to-digital converteru (ADC), ve kterém je příslušné napětí převedeno na numerickou hodnotu (Obr. 21).

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

UV-VIS Spektrofotometr, Cary 50 Probe

Zdroj záření	Xenonová pulzní lampa
Monochromátor	Czerny-Turner 0,25 m
Rozmezí λ	190 – 1100 nm
Opakovatelnost λ	$\pm 0,1$ nm
Max rychlost skenu	24 000 nm/min
Detektor	2 křemíkové diody

UV-VIS spektrofotometr je zařízení, které měří absorpci záření v UV a VIS oblasti světelného spektra. Záznamem těchto měření jsou absorpční spektra měřeného vzorku. Zařízení se skládá ze zdroje záření, monochromátoru (zde se získá monochromatické záření, tedy záření o určité vlnové délce), kyvety se vzorkem a detektoru. V detektoru je zaznamenán úbytek intenzity monochromatického záření procházejícího vzorkem (Obr. 22).



Obr. 22 Schéma UV-VIS spektrofotometru

4.3. Příprava zásobních roztoků

Na analytických vahách bylo naváženo vypočtené množství tenzidu, které bylo analyticky převedeno do odměrné baňky o objemu 100 ml a roztok byl doplněn po rysku Milli-Q vodou. Zásobní roztoky pro měření CMC měly následné koncentrace: CTAB – 40 m mol/dm³, SDS - 40 m mol/dm³ a Triton X-100 – 13,9 m mol/dm³. Zásobní roztoky pro měření agregačního čísla měly tyto koncentrace: CTAB – 28,6 m mol/dm³, SDS – 121 m mol/dm³ a Triton X-100 40 m mol/dm³.

Na analytických vahách bylo naváženo vypočtené množství pyrenu, které bylo analyticky převedeno do odměrné baňky o objemu 50 ml. Roztok byl následně doplněn po rysku acetonem. Takto vzniklý zásobní roztok měl koncentraci $2 \cdot 10^{-4}$ mol/dm³.

Na analytických vahách bylo naváženo vypočtené množství cetylpyridinium chloridu, které bylo analyticky převedeno do odměrné baňky o objemu 100 ml. Roztok byl následně doplněn po rysku Milli-Q vodou. Takto vzniklý zásobní roztok měl koncentraci $5 \cdot 10^{-3}$ mol/dm³.

Na analytických vahách bylo naváženo vypočtené množství hyaluronanu, které bylo analyticky převedeno do odměrné baňky o objemu 50 ml. Roztok byl následně doplněn po rysku Milli-Q vodou. Takto vzniklý zásobní roztok měl koncentraci 0,5 hm%.

Na analytických vahách bylo naváženo vypočtené množství zhášeče, které bylo analyticky převedeno do odměrné baňky o objemu 25 ml. Roztok byl následně doplněn po rysku Milli-Q vodou. Takto vzniklý zásobní roztok měl koncentraci 0,2 mol/dm³. V případě jodbenzenu byl jako rozpouštědlo použit dimetylsulfoxid.

4.4. Příprava vzorků

4.4.1. Příprava vzorků pro měření kritické micelární koncentrace

Do skleněných vialek bylo napipetováno 25 μ l pyrenu a rozpouštědlo bylo odpařeno. Následně bylo do vialek pipetováno takové množství tenzidu, aby po doplnění vzorků na 5 ml byla vytvořena koncentrační řada tenzidu v rozsahu 0 až $6 \cdot 10^{-3}$ mol/dm³ v případě CTAB. U SDS byla vytvořena koncentrační řada o 15 vzorcích v rozsahu 0 až $4 \cdot 10^{-2}$ mol/dm³. V případě Tritonu X-100 byla koncentrační řada v rozsahu 0 až $9 \cdot 10^{-4}$ mol/dm³.

4.4.2. Příprava vzorků pro měření agregačního čísla

Do skleněných vialek bylo napipetováno 25 μ l pyrenu a rozpouštědlo bylo odpařeno. Následně bylo do vialek pipetováno 3500 μ l tenzidu v případě CTAB, 2900 μ l v případě SDS a 1270 μ l v případě Tritonu X-100. Poté byla do vialek pipetována Milli-Q voda tak, aby po pipetování zhášeče byl objem každého vzorku 5 ml. Nakonec byl do vialek pipetován zhášeč tak, aby vznikla koncentrační řada o 16 vzorcích od 0 po $2,51 \cdot 10^{-4}$ mol/dm³ v případě CTAB. V případě SDS vznikla koncentrační řada 0 až $1,32 \cdot 10^{-3}$ mol/dm³. Koncentrační řada v případě Tritonu X-100 byla vytvořena v rozsahu 0 až $1,41 \cdot 10^{-4}$ mol/dm³. Koncentrace

zhášeče v jednotlivých tenzidech se liší, protože rozsah poměru koncentrace zhášeče a koncentrace micel byl přizpůsoben od 0,5 do 1,5.

4.4.3. Příprava vzorků pro měření agregačního čísla v přítomnosti nativního hyaluronanu

Do skleněných vialek bylo napipetováno 25 μl pyrenu a rozpouštědlo bylo odpařeno. Následně bylo do vialek pipetováno 3500 μl tenzidu v případě CTAB, 2900 μl v případě SDS a 1270 μl v případě Tritonu X-100. Následně bylo do vialek pipetováno 982 μl hyaluronanu, takže v každém vzorku byla koncentrace hyaluronanu 0,1 hm%. Poté byla do vialek pipetována Milli-Q voda tak, aby po pipetování zhášeče byl objem každého vzorku 5 ml. Nakonec byl do vialek pipetován zhášeč tak, aby vznikla koncentrační řada o 16 vzorcích od 0 po $2,51 \cdot 10^{-4}$ mol/dm³ v případě CTAB. V případě SDS vznikla koncentrační řada 0 až $1,32 \cdot 10^{-3}$ mol/dm³. Koncentrační řada v případě Tritonu X-100 byla vytvořena v rozsahu 0 až $1,41 \cdot 10^{-4}$ mol/dm³. Rozsah poměru koncentrace zhášeče a koncentrace micel byl 0,5 až 1,5.

4.4.4. Příprava vzorků pro měření účinnosti zhášení pyrenu jodovými deriváty

Do skleněných vialek bylo napipetováno 25 μl pyrenu a rozpouštědlo bylo odpařeno. Následně bylo do vialek pipetováno 3500 μl tenzidu v případě CTAB, 2900 μl v případě SDS a 1270 μl v případě Tritonu X-100. Poté byla do vialek pipetována Milli-Q voda tak, aby po pipetování zhášeče byl objem každého vzorku 5 ml. Nakonec byl do vialek pipetován zhášeč tak, aby vznikla řada 16 vzorků s rozsahem poměru koncentrace zhášeče a koncentrace micel 0,5 až 1,5.

4.5. Vlastní měření

4.5.1. Měření emisních spekter a absorpčních spekter

Excitační monochromátor byl nastavený na 335 nm. Emisní spektra byla měřena v rozsahu vlnových délek 360 až 550 nm. Štěrbiny u excitačního i emisního monochromátoru byly nastaveny na 2 nm.

Absorpční spektra byla měřena v rozsahu 200 až 800 nm s krokem 1 nm rychlostí 600 nm/min.

4.5.2. Měření vyhasínání fluorescence

Nastavení přístroje pro vyhasínání fluorescence se lišilo pro každý tenzid, protože pyren v CTAB emituje s odlišnou dobou života než v SDS nebo Tritonu X-100.

Pro CTAB: Excitace – 329 nm, emisní monochromátor byl nastaven na 381 nm. Peak preset byl nastaven na 10 000 counts, TAC range 2 μs , Repetition rate na 1 MHz, štěrbiny nastaveny na 6 nm.

Pro SDS: Excitace – 329 nm, emisní monochromátor byl nastaven na 381 nm. Peak preset byl nastaven na 10 000 counts, TAC range 5 μs , Repetition rate na 250 kHz, štěrbiny nastaveny na 8 nm.

Pro Triton X-100: Excitace – 329 nm, emisní monochromátor byl nastaven na 381 nm. Peak preset byl nastaven na 10 000 counts, TAC range 5 μs , Repetition rate na 250 kHz, štěrbiny nastaveny na 6 nm.

K rozptylu světla pro stanovení signálu lampy (tzv. prompt) byl použit kolidní křemík a emisní monochromátor byl nastaven na vlnovou délku lampy, tedy na 329 nm.

4.6. Vyhodnocení

4.6.1. Analýza dat metodou nelineárních nejmenších čtverců

Data pro časově rozlišenou fluorescenci jsou ve většině případů složitá do té míry, že nemohou být analyzována pomocí grafických metod. Od vzniku TCSPC (time-correlated single photon counting) bylo vyvinuto několik metod pro vyhodnocení TCSPC dat, z nichž v současné době je nejpoužívanější metoda nelineárních nejmenších čtverců [20], [22].

Pokud v souboru dat existuje dostatečný počet parametrů, každý tento soubor dat může být proložen jistým matematickým modelem. Cílem metody nelineárních nejmenších čtverců je zjistit, jestli se soubor dat shoduje s matematickým modelem, kterým byla tato data proložena. Dále tato metoda určí hodnotu pravděpodobnosti správnosti použitého modelu. Neboli je poskytnut parametr, který porovná naměřená data $N(t_k)$ a příslušný matematický model $N_c(t_k)$. Toho je dosaženo pomocí minimalizace správnosti proložení, která je dána rovnicí:

$$\chi^2 = \sum_{k=1}^n \frac{1}{\sigma_k^2} [N(t_k) - N_c(t_k)]^2 = \sum_{k=1}^n \frac{[N(t_k) - N_c(t_k)]^2}{N(t_k)}, \quad (27)$$

kde proměnná n představuje počet dat (počet kanálů) použitých pro analýzu a σ_k je standardní odchylka každého datového bodu.

Nicméně ve výsledku není vhodné interpretovat přímo hodnotu χ^2 , protože závisí na množství dat. Hodnota χ^2 se bude zvyšovat se zvyšujícím se množstvím dat. Vzhledem k této skutečnosti je zaváděna hodnota, která je od množství dat nezávislá. Tato hodnota se nazývá redukovaná správnost proložení:

$$\chi_R^2 = \frac{\chi^2}{n-p} = \frac{\chi^2}{v}, \quad (28)$$

kde n je množství dat, p představuje počet parametrů volnosti a v je počet stupňů volnosti. Pro TCSPC je množství dat většinou mnohem větší, než počet parametrů volnosti, takže se většinou $n-p$ rovná přibližně n . Pokud se projevují pouze náhodné chyby, měla by hodnota χ_R^2 být okolo jedné. Jestli se příslušný matematický model nebude shodovat s naměřenými daty, bude hodnota χ_R^2 mnohem větší než 1.

K posouzení, do jaké hodnoty χ_R^2 je správné zachovávat matematický model, se podle Lakowicze [8] nabízejí dvě metody. První z nich je matematická a druhá založená na pozorování. Podle matematické metody by každé proložení s $\chi_R^2 \geq 1,2$ mělo být zamítnuto a měl by být použit jiný matematický model. Příkladem může být systém obsahující jednu dobu života, kde se objevují systematické chyby a monoexponenciální proložení vrátí hodnotu $\chi_R^2 = 1,2$. Následně je použit biexponenciální model. Proložení souboru dat biexponenciálním modelem způsobí snížení hodnoty χ_R^2 , ale tento závěr povede k chybné interpretaci dat. Proto úplné spolehnutí se na matematické tabulky může vést k chybnému vyhodnocení měření. Hodnota χ_R^2 je jeden z nejdůležitějších parametrů, které posuzují správnost proložení, ale nelze se na ni spoléhat úplně. Pokud χ_R^2 výrazně neklesne při použití složitějšího modelu,

tak pravděpodobně hodnota χ_R^2 odráží špatnou kvalitu dat. Většinou se považuje za správný pokles hodnoty χ_R^2 , pokud klesne dvakrát nebo vícekrát. Menší změny v χ_R^2 jsou interpretovány opatrně, většinou jsou založeny na předchozí znalosti analyzovaného systému [8].

4.6.2. Analýza měření časově rozlišené fluorescence

K provádění proložení měření časově rozlišené fluorescence byl poskytnut program DAS6 Fluorescence Decay Analysis Software od společnosti HORIBA Scientific. Pro analýzu dob života mohou být měření prokládána 1 až 5 exponenciálními funkcemi. Obecnou matematickou funkcí, kterou jsou měření prokládána je:

$$F(t) = A + B_i \exp\left(-\frac{t}{T_i}\right), \quad (29)$$

kde t představuje čas, A je fitovací parametr, B představuje předexponenciální funkci, která dává souvislost s množstvím emitující látky v analyzovaném vzorku a T je příslušná doba života [24].

V případech víceexponenciálních poklesů, kdy je potřeba porovnat výsledky s rovnovážnou fluorescencí, se zavádí průměrná doba života. Ta může být spočítána pomocí dvou metod, které závisí na aplikaci výsledků [23]. Většina aplikací si vystačí s vypočtenou průměrnou dobou života podle rovnice:

$$\tau_a = \sum_{i=1}^n \alpha_i \tau_i, \quad (30)$$

kde $\alpha_i = B_i \cdot 0,01$. Druhým způsobem výpočtu, který se používá například pro užití ve Stern-Volmerově grafu je:

$$\tau_a = \frac{\sum_{i=1}^n \alpha_i \tau_i^2}{\sum_{i=1}^n \alpha_i \tau_i}. \quad (31)$$

4.6.3. Korekce emisních spekter

Vlivem vnitřního filtračního efektu prvního druhu je pozorovaná intenzita fluorescence menší než skutečná intenzita fluorescence. Protože vnitřní filtrační efekt může zkreslit měřené závislosti, je potřeba odstranit vnitřní filtrační efekt pomocí následujícího výpočtu:

$$F_{\text{corr}} = F_{\text{obs}} \cdot 10^{\frac{1}{2}(OD_{\text{ex}} + OD_{\text{em}})}, \quad (32)$$

kde F_{corr} je korigovaná intenzita fluorescence, F_{obs} pozorovaná intenzita fluorescence, OD_{ex} je optická hustota při excitační vlnové délce a OD_{em} je optická hustota při emisní vlnové délce.

Protože mezi optickou hustotou a absorbcí platí vztah

$$OD = \frac{A_\lambda}{l}, \quad (33)$$

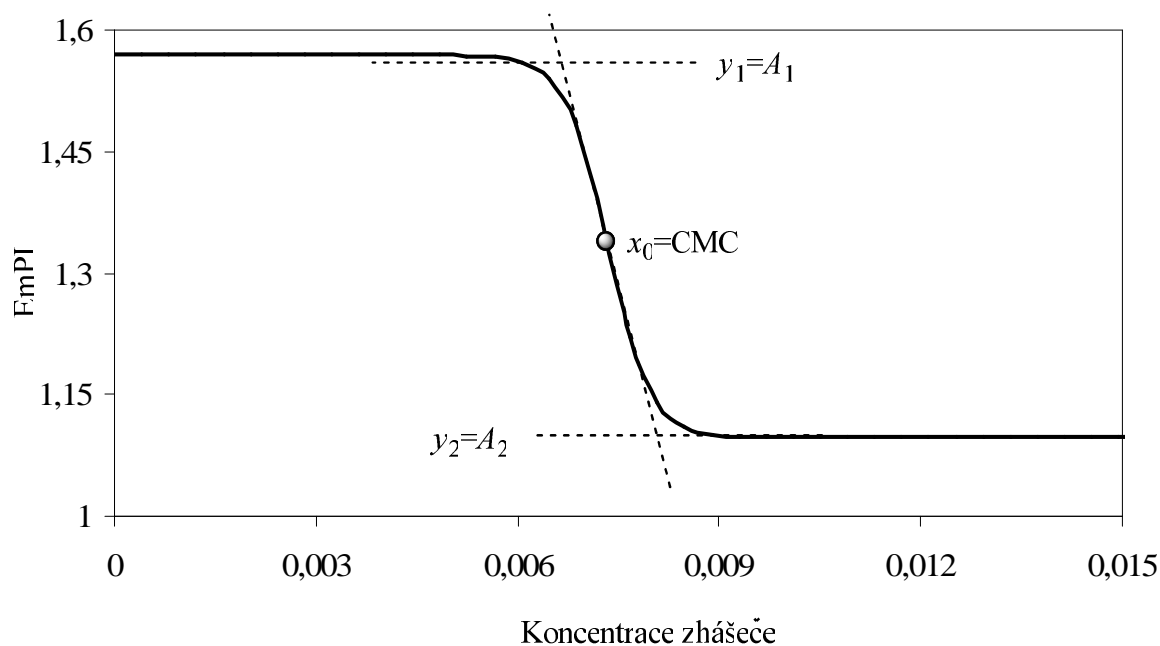
může být optická hustota nahrazena absorbcí v případě, že je k měření používána kyveta o tloušťce 1 cm.

4.6.4. Stanovení kritické micelární koncentrace

Kritická micelární koncentrace byla určena pomocí fluorescenční sondy pyrenu. Tato metoda je založená na polaritní závislosti intenzity fluorescence vibračních pásů monomeru pyrenu. Poměr intenzit fluorescence prvního a třetího vibračního pásu je v polárním prostředí vyšší než v prostředí nepolárním. Pokud začne tenzid agregovat, prudce se sníží poměr intenzit fluorescence prvního (373 nm) a třetího (383 nm) vibračního pásu (dále jen emisní polaritní index nebo EmPI). Ze závislosti emisního polaritního indexu (EmPI) na logaritmu koncentrace tenzidu se spočítá kritická micelární koncentrace. Tento postup je založen na předpokladu, že závislost EmPI na logaritmu koncentrace může být popsána sigmoidní křivkou Boltzmanova typu. Rovnice takové závislosti je vyjádřena jako [28]:

$$y = \frac{A_1 - A_2}{1 + e^{\frac{x-x_0}{\Delta x}}} + A_2 \quad (34)$$

kde y odpovídá poměru intenzit fluorescence prvního a třetího píku pyrenu, nezávislá proměnná x představuje celkovou koncentraci tenzidu, A_1 a A_2 jsou horní a dolní limity sigmoidní křivky, x_0 představuje inflexní bod sigmoidní křivky a Δx je gradient. Proložení závislosti EmPI na logaritmu koncentrace sigmoidní křivkou Boltzmanova typu v programu Origin lze získat inflexní bod této závislosti, tedy výslednou kritickou micelární koncentraci (Obr. 23).



Obr. 23 Sigmoidní křivka Boltzmanova typu s parametry pro určení CMC

4.6.5. Stanovení agregačního čísla

Agregační čísla byla určena pomocí zhašení fluorescence. Zhašení může být zkoumáno jak pomocí steady-state fluorescence, tak i časově rozlišené fluorescence. Obě metody používají stejný pár fluorescenční sondy a zhašeče. Steady-state metoda zahrnuje měření emise intenzity fluorescence s rostoucí koncentrací zhašeče. Časově rozlišená metoda zahrnuje měření vyhasínacích křivek fluoroforu za použití TCSPC. Vyhasínací křivky jsou

zaznamenávány v přítomnosti solubilizované sondy v micelách a v přítomnosti sondy a zhášedce. Křivky jsou následně analyzovány pomocí metody nelineárních nejmenších čtverců. Stanovení agregačního čísla pomocí časově rozlišené metody je z hlediska provedení a analyzování měření složitější než rovnovážná metoda, ale neplatí pro ni omezení, jako tomu je v případě steady-state metody [30], [47].

Při použití steady-state metody se musí předpokládat, že se v systému nachází imobilní sonda i zhášedce, tedy že nedochází k žádné intermicelární migraci sondy a zhášedce po dobu života fluorescenční sondy. Při použití koncentrace fluorescenční sondy mnohem nižší než je koncentrace micel a pokud se koncentrace zhášedce mění tak, že podíl koncentrace zhášedce a micel se bude měnit v rozmezí 0 až 2, tak změna intenzity emise fluorescence je dána rovnicí:

$$\frac{F_0}{F} = \exp\left(\frac{[Q]}{[M]}\right) \quad (35)$$

kde $[M]$ je koncentrace micel a $[Q]$ je koncentrace zhášedce. Dalším předpokladem je, že kinetický poměr $\frac{k_Q}{k}$ (k_Q představuje rychlostní konstantu intramicelárního zhášení a k je rychlostní konstanta intramicelárního vyhasínání fluorescence) je mnohem větší jak 1 a distribuce sondy a zhášedce podléhá Poissonově statistice. Následně se po vynesení závislosti $\ln \frac{F_0}{F}$ na koncentraci zhášedce může ze směrnice této závislosti určit agregační číslo:

$$\ln \frac{F_0}{F} = \frac{N_{ss}}{[S] - [CMC]} [Q] \quad (36)$$

kde $[S]$ představuje celkovou koncentraci tenzidu a $[CMC]$ je kritická micelární koncentrace.

Při časově rozlišených měřeních je sonda excitovaná krátkým světelným pulzem a vyhasínání fluorescence je monitorováno pomocí TCSPC zařízení. Při absenci zhášedce je rychlostní konstanta vyhasínání $k = 1/\tau_0$ (τ_0 představuje dobu života fluoroforu v micelárním prostředí) a křivka vyhasínání je monoexponenciální. Přítomnost zhášedce ovlivní vyhasínání tak, že se křivka stává biexponenciální a může být proložena rovnicí, kterou navrhli Infelta a Tachiya [50], [51]:

$$F(t) = F(0) \exp\left\{-\frac{t}{\tau_0} - C[1 - \exp(-k_Q t)]\right\} \quad (37)$$

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

$$C = \frac{N_D}{[S] - [CMC]} [Q] \quad (38)$$

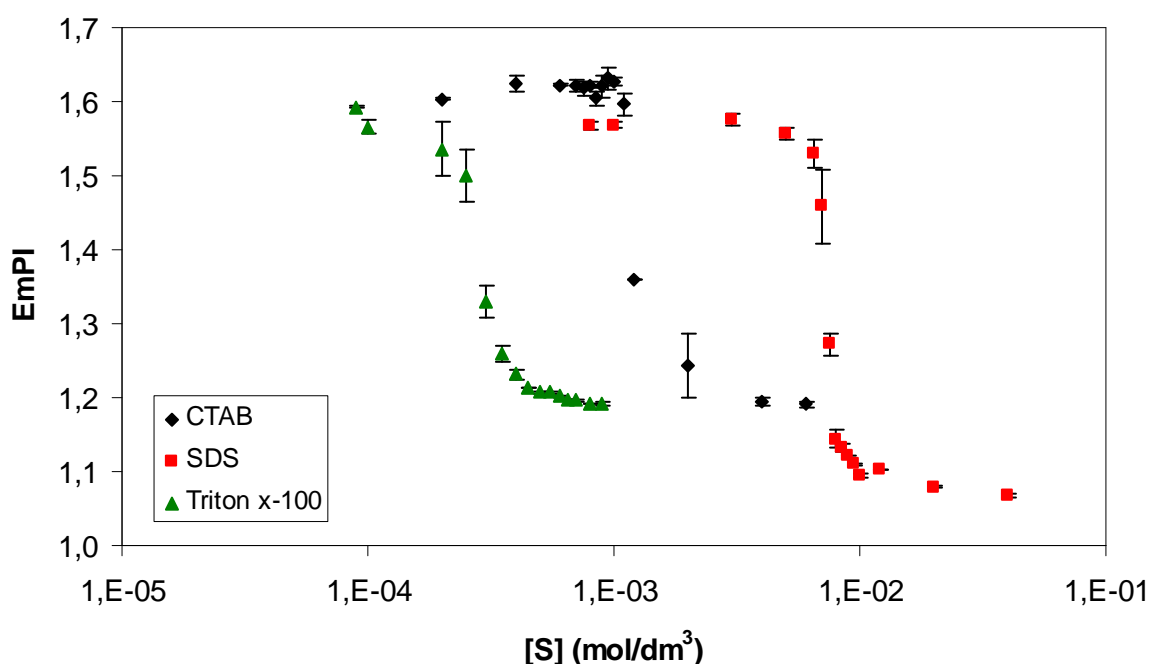
Jedinou podmínkou u časově rozlišené metody je, že hodnoty C musí být přizpůsobeny, aby byly okolo 1. Z teoretických důvodů nesmí být hodnoty C vyšší jak 2 [52]. Taková koncentrace zhášedce by mohla ovlivnit strukturu micel. Pokud se v systému nachází statické zhášení, ovlivňuje to pouze hodnotu $F(0)$ a ne N_D nebo k_Q . Absorbance všech vzorků musela být držena pod hodnotu 0,1, aby bylo zamezeno vnitřnímu filtračnímu efektu.

5 VÝSLEDKY A DISKUSE

5.1. Stanovení kritické micelární koncentrace tensidů CTAB, SDS a Tritonu x-100

Kritická micelární koncentrace tensidů CTAB, SDS a Tritonu x-100 byla stanovena pomocí steady-state fluorescence. Postup a teorie stanovení CMC je popsána v kapitole 4.6.4. Hodnoty CMC jsou nezbytné pro přípravu vzorků pro stanovení agregačního čísla těchto tensidů.

Hodnoty kritické micelární koncentrace byly zjištěny proložení závislosti emisního polaritního indexu na logaritmu koncentrace (Obr. 24) sigmoidní křivkou v programu Origin.



Obr. 24 Závislosti emisního polaritního indexu na koncentraci příslušného tensidu. Osa x je v logaritmickém měřítku

Hodnota kritické micelární koncentrace uváděna Sigmou-Aldrich by měla být okolo 1 mM [27]. Podobnou hodnotu uváděli ve své práci Aguiara a spol., kteří publikovali hodnotu kritické micelární koncentrace CTAB v rozmezí 0,92 – 1,00 mM [28]. Mnou stanovená hodnota kritické micelární koncentrace byla 1,18 mM.

Pro tensid SDS uvádí Sigma-Aldrich hodnotu kritické micelární koncentrace v rozmezí 7 - 10 mM [27]. Domínguez a spol. zjišťovali CMC SDS pomocí UV-VIS metody, fluorescenční metody a pomocí elektrické vodivosti a publikují rozmezí kritické micelární koncentrace SDS od 7,4 mM do 8 mM [29]. Mnou naměřená hodnota CMC byla 7,3 mM.

Sigma-Aldrich udává hodnotu kritické micelární koncentrace pro tensid Triton x-100 v rozmezí 0,2 – 0,9 mM [27]. Dále Aguiar a spol. udává hodnotu CMC Tritonu x-100 v rozmezí 0,24 – 0,27 mM [28]. Mnou stanovená hodnota kritické micelární koncentrace Tritonu x-100 byla 0,28 mM.

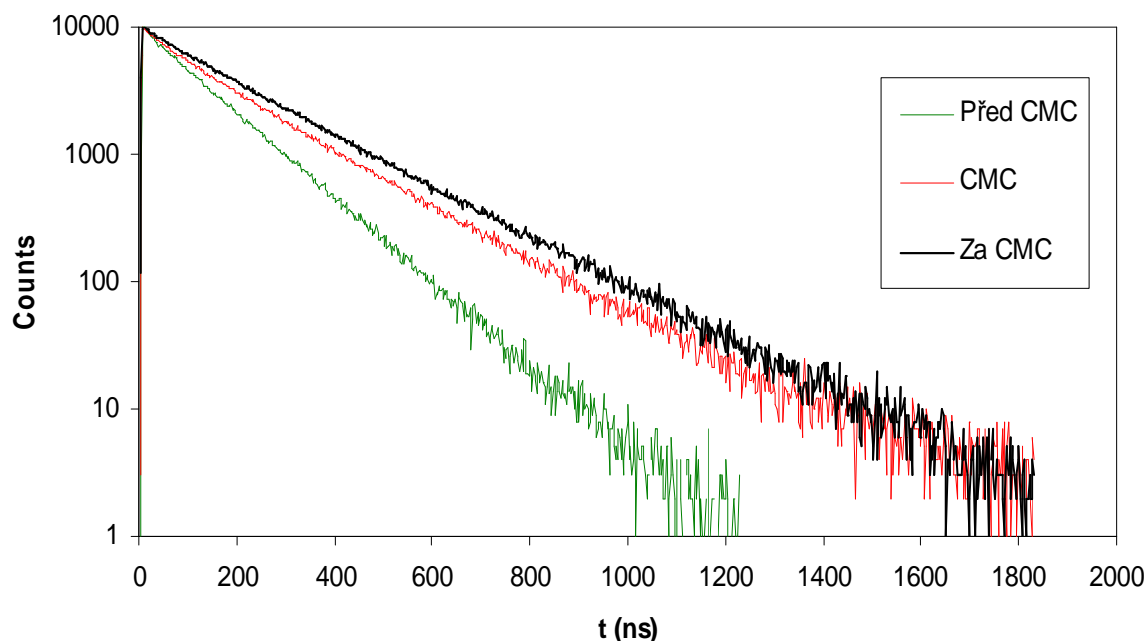
Vzorky pro stanovení kritické micelární koncentrace steady-state metodou byly také podrobeny časově-rozlišeným měřením. Příslušné doby života viz Tabulka 1. Z výsledků

plyne, že v koncentracích před kritickou micelární koncentrací je pokles monoexponenciální, ale jakmile se začínají tvořit agregáty tenzidu, vyhasínací křivka se stává biexponenciální. Druhý čas patří excimeru pyrenu, což bylo potvrzeno proložením vyhasínací křivky matematickým modelem pro excimer. Z tabulky je možno pomocí relativních amplitud, tedy relativního zastoupení příslušné doby života, pozorovat přítomnost excimeru i v koncentracích za CMC. Excimer pyrenu se přestává tvořit, až když poměr koncentrace pyrenu a koncentrace micel klesne pod 0,5.

Tabulka 1 Příklad hodnot dob života fluoroforu (τ_1 a τ_2) a jejich příslušné relativní amplitudy (B_1 , B_2)

číslo vzorku	$C_{\text{Triton}} \times 100$ (mol/dm ³)	CMC			
		τ_1	τ_2	B_1	B_2
0	0	125,29	-	100	-
1	9,0E-05	127,29	-	100	-
2	1,0E-04	129,73	-	100	-
3	2,0E-04	127,16	-	100	-
4	2,5E-04	129,38	18,44	96,90	3,10
5	3,0E-04	172,30	87,93	61,27	38,73
6	3,5E-04	197,73	92,53	60,89	30,11
7	4,0E-04	212,23	94,89	79,22	20,78
8	4,5E-04	210,05	94,32	18,90	81,10
9	5,0E-04	207,99	95,23	18,00	82,00
10	5,5E-04	206,36	69,16	92,60	7,40
11	6,0E-04	215,42	77,98	92,68	7,32
12	6,5E-04	212,41	73,81	93,81	6,19
13	7,0E-04	214,20	76,22	93,48	6,52
14	8,0E-04	212,84	50,55	96,85	3,15
15	9,0E-04	212,94	58,07	96,59	3,41
16	1,0E-02	225,47	5,51	96,63	3,37

V případě CTAB a SDS byl hluboko za kritickou micelární koncentrací vždy pozorován monoexponenciální pokles, takže veškeré množství sondy bylo solubilizováno v micelách. V případě Tritonu x-100 se za kritickou micelární koncentrací objevovaly dva časy. Bylo usouzeno, že první čas okolo 225 ns patří pyrenu emitujícímu z micel a druhý čas okolo 5,5 ns patří, vzhledem ke struktuře tohoto tenzidu, samotnému Tritonu x-100. Tato domněnka byla potvrzena měřeními časově rozlišené fluorescence roztoku Tritonu x-100 bez přítomnosti fluorescenční sondy, kdy byl naměřen čas 5,1 ns. K tomuto fenoménu nedochází ihned po agregaci tenzidu, ale až hluboko za kritickou micelární koncentrací. Pravděpodobně dochází ke změně organizace micely, respektive benzenových jader tenzidů tak, že je možno pozorovat emisi fluorescence.

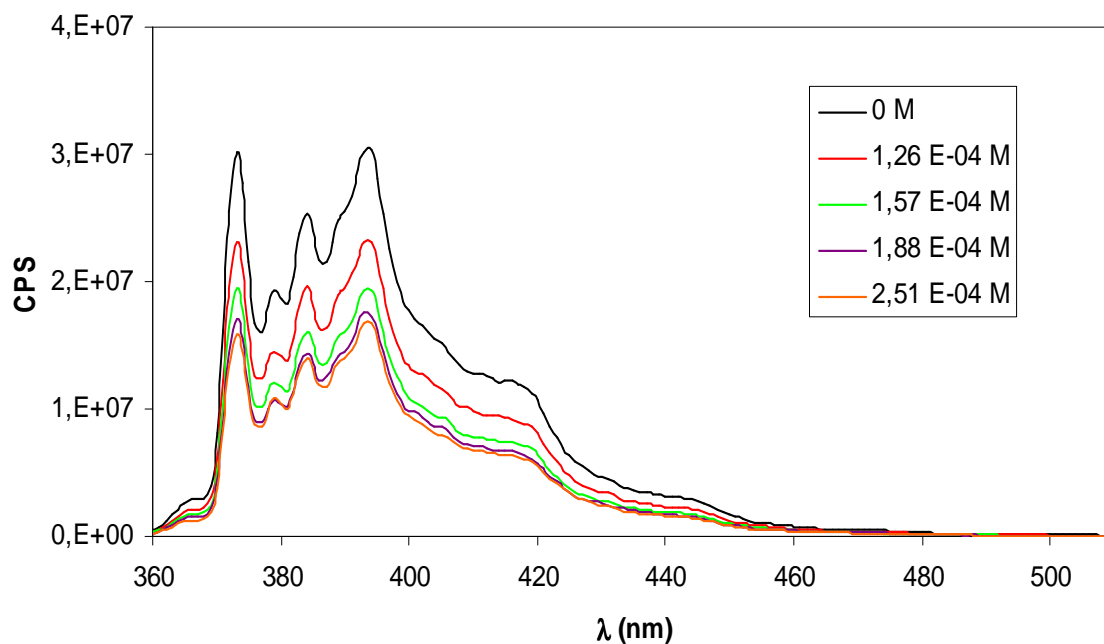


Obr. 25 Vyhasínací křivky pyrenu v Tritonu x-100 o různých koncentracích

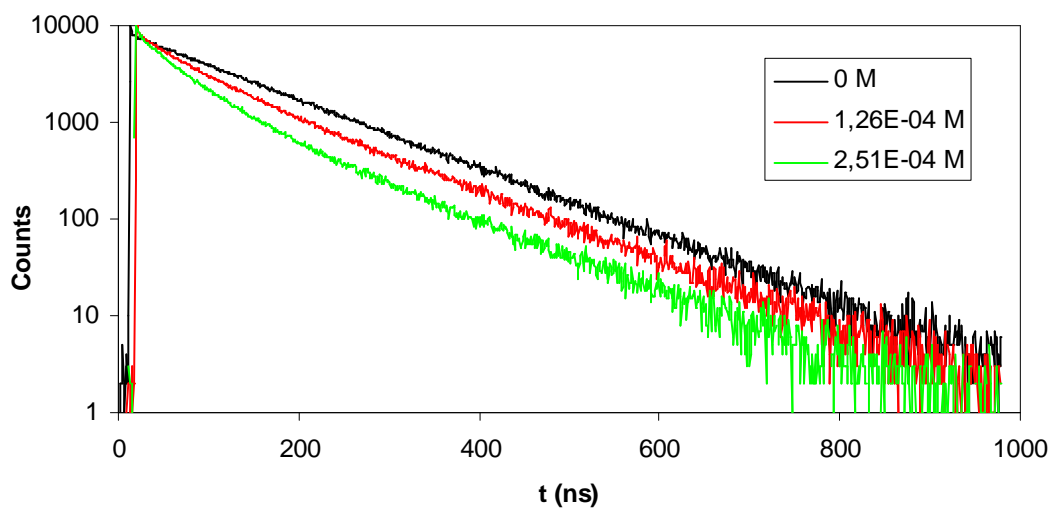
5.2. Stanovení agregačního čísla tenzidů CTAB, SDS a Tritonu x-100 pomocí steady-state fluorescence a pomocí časově rozlišené fluorescence

Postup pro výpočet agregačního čísla je popsán v kapitole 4.6.5.. Agregační číslo bylo určeno pomocí zhášení fluorescence, které je popsáno v kapitole 2.2.4. a bylo určeno pomocí steady-state a časově-rozlišené metody. Při zhášení dochází k poklesu intenzity fluorescence, což se projevuje jak na emisních spektrech (Obr. 26), tak i na velikosti a tvaru vyhasínacích křivek (Obr. 27). V případě časově rozlišených experimentů je možno pozorovat změnu doby života fluorescence se zvyšující se koncentrací zhášeče. Doba života se bude měnit pouze, pokud v systému probíhá dynamické zhášení.

Podle Alargovy a spol. může výpočet agregačního čísla pomocí steady-state fluorescence vyústit ve značné chyby v agregačních číslech. Množství tenzidů, pro které je možno s dostatečnou přesností určit agregační čísla steady-state metodou, je mnohem více omezen než množství tenzidů, u nichž je možno dostatečně přesně agregační číslo stanovit pomocí časově rozlišené metody. Proto je důležité kontrolovat steady-state data ještě časově rozlišenými měřeními. Aby se steady-state a časově rozlišená metoda shodovaly, musí být kinetický poměr $\frac{k_q}{k}$ alespoň větší jak 10. Dále s rostoucí velikostí agregačního čísla také roste chyba při jeho stanovení steady-state metodou. Další odchylka steady-state metody oproti časově rozlišené fluorescenci spočívá ve zvýšení viskozity prostředí, například přidávkem polymeru. Opět čím vyšší je viskozita prostředí, tím větší by měla být odchylka steady-state metody od metody časově-rozlišené [30].



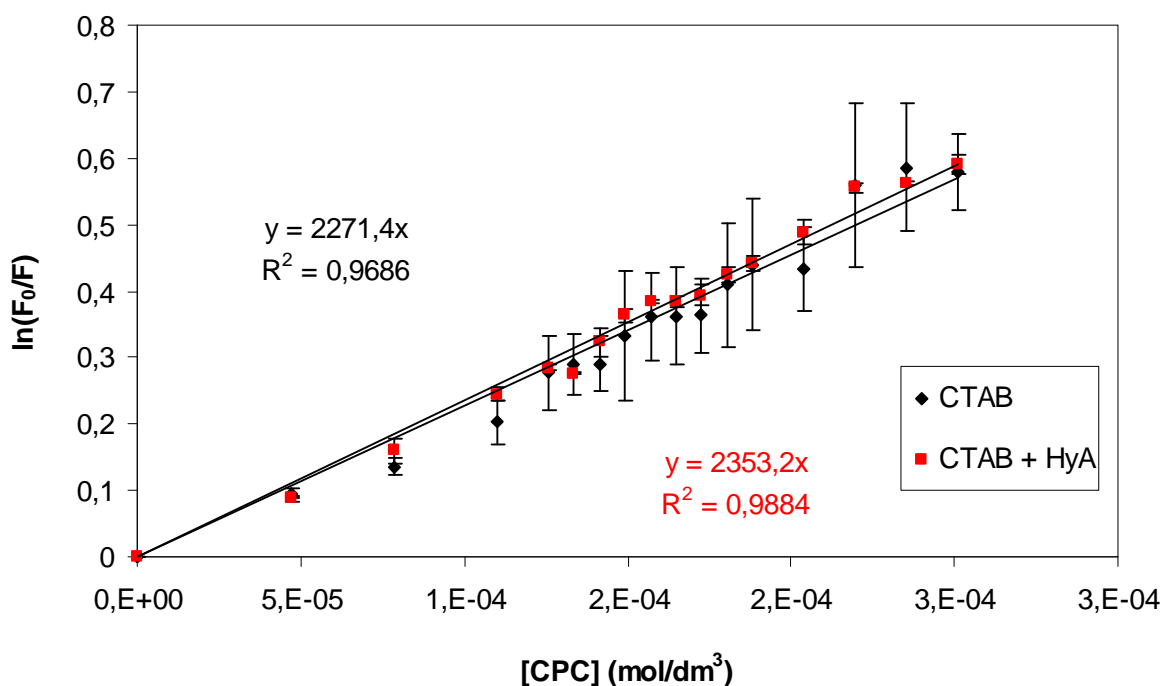
Obr. 26 Emisní spektra pyrenu solubilizovaného v micelách. Pokles intenzity fluorescence byl způsoben zvyšující se koncentrací zhasěče



Obr. 27 Křivky vyhasínání pyrenu solubilizovaného v micelách. Pokles intenzity fluorescence i změna tvaru vyhasínací křivky byla způsobena zvyšující se koncentrací zhasěče

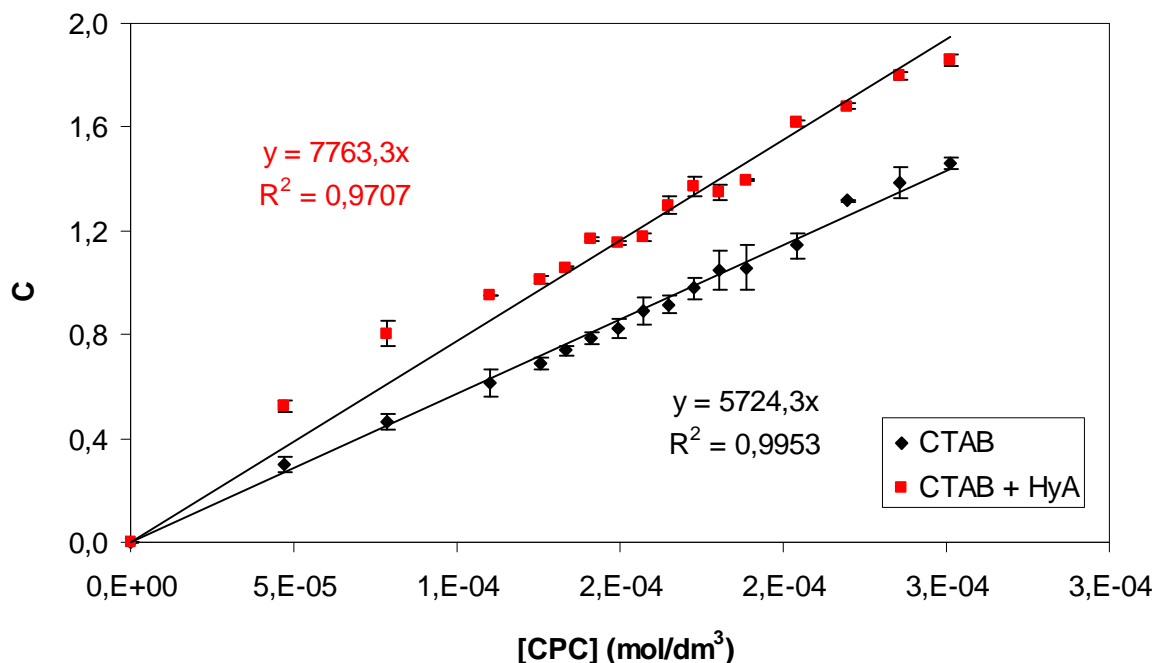
5.2.1. Stanovení agregačního čísla 20 mM CTAB a vliv přidavku nativního hyaluronanu na agregační číslo CTAB

V případě čistého CTAB bylo agregační číslo pomocí steady-state fluorescence stanoveno na 43 molekul tenzidu na micelu (Obr. 28). Časově-rozlišenými experimenty bylo agregační číslo CTAB vypočteno na 108 molekul tenzidu na micelu (Obr. 29). Obě závislosti byly podle předpokladu lineární.



Obr. 28 Závislost přirozeného logaritmu podílu intenzit fluorescence v absenci a v přítomnosti zhášeče na koncentraci zhášeče, koncentrace CTAB a hyaluronanu byla konstantní

Rozdíl mezi agregačními čísly zjištěnými pomocí obou metod je více než dvojnásobný. Je to způsobeno nízkou hodnotou kinetického poměru, který má hodnotu 1,1, a také tím, že micely CTAB v této koncentraci mají vysokou hodnotu agregačního čísla, které není možno steady-state metodou dostatečně přesně stanovit. Při zkoumání agregačního čísla pomocí steady-state metody se také značně liší hodnoty z odborných publikací. Například Moulik a spol. zjistili pomocí steady-state metody agregační číslo o hodnotě 62 [32], kdežto Sánchez a Ruiz zjistili agregační číslo 20 mM CTAB o hodnotě 81 [34]. Agregační číslo CTAB bylo také zkoumáno v předchozích pracích pomocí časově rozlišené metody. Například Roelants a Schryver zjistili touto metodou agregační číslo 31 mM CTAB o hodnotě 104 molekul tenzidu na micelu [31]. Pravděpodobně největší roli v rozdílu mezi agregačními čísly CTAB stanovenými pomocí obou metod hraje roli kinetický poměr, jehož hodnota je 1,1. Dále se pravděpodobně bude rapidně měnit struktura micel s koncentrací tenzidu a tedy i počet molekul tenzidu na micelu, čímž poroste chyba mezi oběma příslušnými metodami určení agregačního čísla s koncentrací tenzidu. Dalším faktorem ovlivňujícím rozdíl mezi steady-state a časově-rozlišenou metodou je přítomnost rozpuštěného kyslíku ve vzorku [30].



Obr. 29 Závislost poměru koncentrace zhlášeče a micel na koncentraci zhlášeče, koncentrace CTAB a hyaluronanu byla konstantní

Po přidání hyaluronanu došlo ke změně agregačního čísla pouze u časově-rozlišené metody. Podle předpokladu se agregační číslo CTAB mělo po přidání hyaluronanu změnit. Vzhledem k tomu, že hyaluronan obsahuje disociované karboxylové skupiny a molekuly CTAB mají kladný náboj, předpokládala se elektrostatická interakce mezi molekulami CTAB a hyaluronanem, takže i změna agregačního čísla. Pravděpodobně se tvořily agregáty CTAB vázané na hyaluronan a pravděpodobně hyaluronan umožnil stabilizaci micel CTAB přes elektrostatické interakce tak, že to způsobilo agregaci tenzidu o větším agregačním čísle. Pomocí steady-state metody bylo v obou případech stanoveno téměř shodné agregační číslo. Agregační číslo vzrostlo ze 43 na 44 molekul tenzidu na micelu (Obr. 28). Pomocí časově-rozlišené metody agregační číslo vzrostlo ze 108 na 146 molekul tenzidu na micelu (Obr. 29). Rozdíl mezi oběma metodami se zvýšil pravděpodobně kvůli změně ve viskozitě prostředí a zvětšení agregačního čísla micely CTAB. Jelikož byl do systému přidán hyaluronan, došlo ke zvýšení viskozity prostředí a tedy i zvýšení difúzního koeficientu, což mělo vliv na rozdíl agregačních čísel stanovených pomocí obou metod. Zvýšení kinetického poměru na hodnotu 1,2 by nemělo mít žádný vliv na změnu rozdílu agregačních čísel získaných pomocí obou metod. Na steady-state metodu má značný vliv přítomnost rozpuštěného kyslíku ve vzorku. Na časově-rozlišenou metodu by přítomnost kyslíku ve vzorku mít vliv neměla [30]. Hodnoty agregačních čísel a kinetických poměrů viz Tabulka 2.

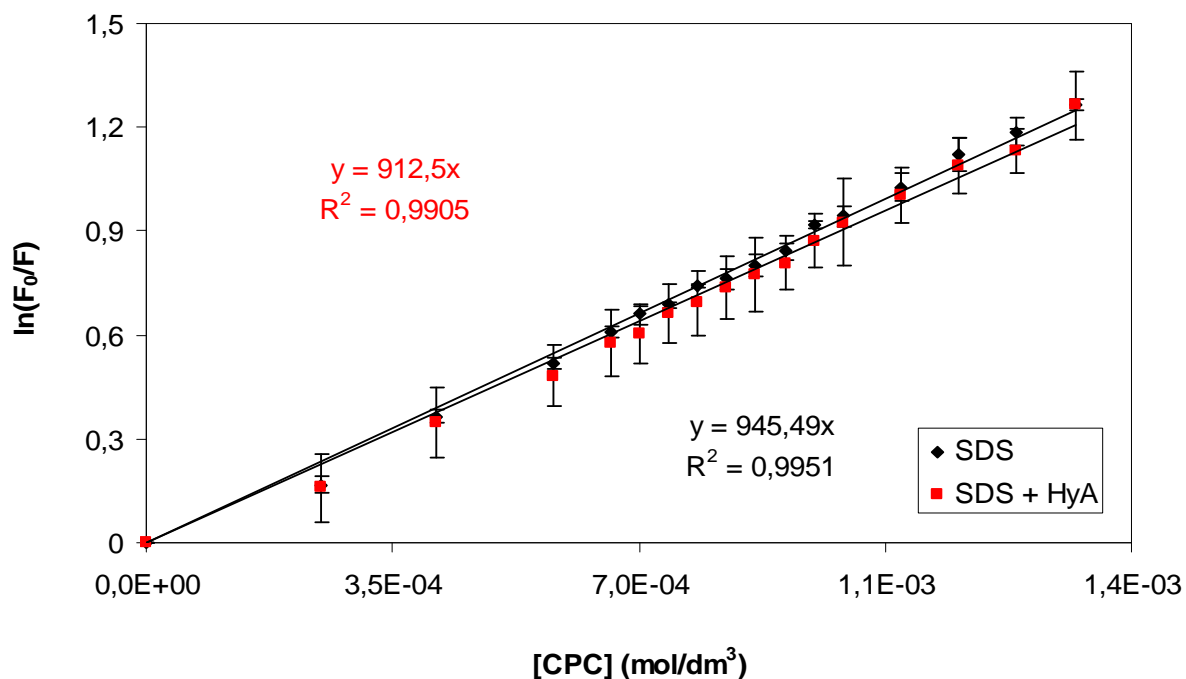
Tabulka 2 Vypočtené hodnoty agregačních čísel 20 mM CTAB v absenci a v přítomnosti 0,1 % hyaluronanu a příslušné kinetické poměry

	N_{SS}	N_D	$10^{-7} k_q (s^{-1})$	$10^{-7} k (s^{-1})$	k_q/k
CTAB	43	108	0,887	0,813	1,092
CTAB + HyA	44	146	0,988	0,829	1,191

5.2.2. Stanovení agregačního čísla 70 mM SDS a vliv přídavku nativního hyaluronanu na agregační číslo SDS

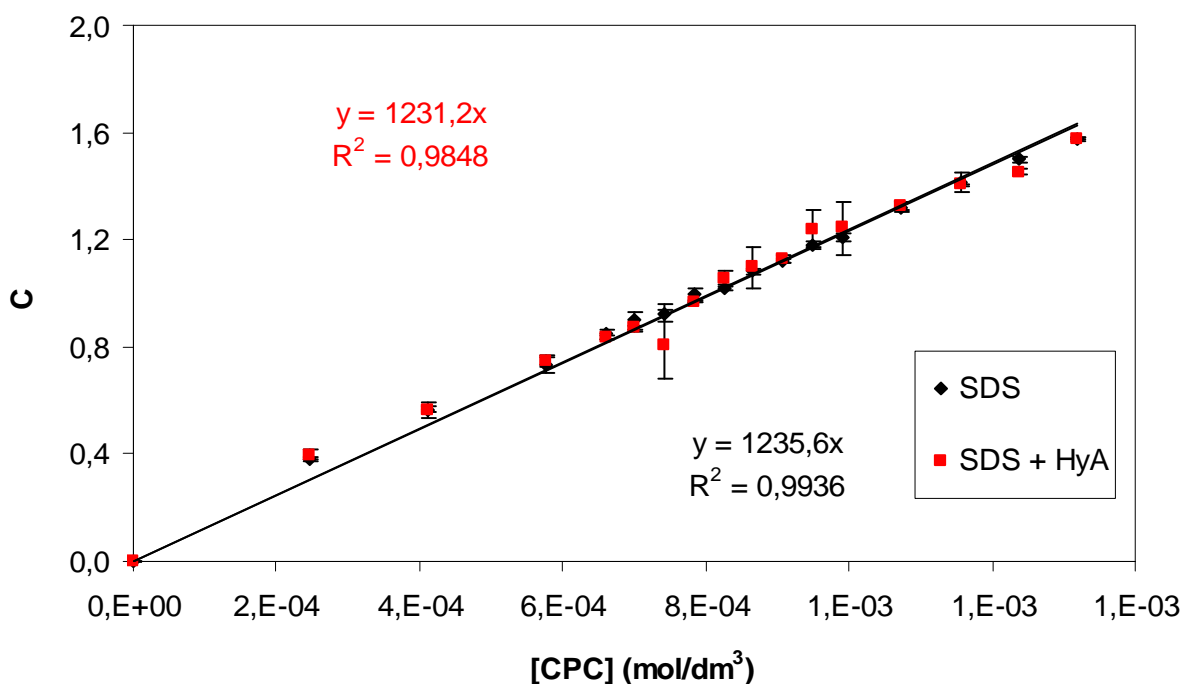
Dodecylsírán sodný je již dobře definovaný tenzid, který bývá používán jako modelová látka pro nové páry zhášedce a fluorescenční sondy [30]. I v tomto případě byl použit jako modelová látka pro určení rozdílu mezi steady-state metodou a časově rozlišenou metodou. Rozdíl mezi oběma metodami by měl být minimální. Následně bylo zkoumáno, jak ovlivňuje hyaluronan agregační číslo tohoto tenzidu.

Pomocí steady-state metody bylo agregační číslo SDS stanoveno na 59 molekul tenzidu na micelu (Obr. 30). Časově-rozlišenou metodou bylo agregační číslo SDS stanoveno na 77 molekul tenzidu na micelu (Obr. 31).



Obr. 30 Závislost logaritmu podílu intenzit fluorescence v absenci a v přítomnosti zhášedce na koncentraci zhášedce, koncentrace SDS a hyaluronanu byla konstantní

Rozdíl mezi oběma metodami je v tomto případě velice malý. Je to především způsobeno vysokým kinetickým poměrem, který má hodnotu 5,8. Dalším důvodem malého rozdílu mezi oběma metodami je velikost agregačního čísla. Při srovnání s micelami CTAB je počet molekul tvořících micelu téměř dvakrát menší. Z toho plyne, že bude možno pomocí steady-state fluorescence stanovit agregační číslo SDS s větší přesností, než tomu bylo u CTAB. Alargova a spol. stanovovali agregační číslo SDS o koncentraci 97 mM také pomocí steady-state i časově-rozlišené metody a dostaly hodnoty 75,2 a 76,1 molekul tenzidu na micelu [30]. Rozdíl 18 molekul tenzidu na micelu v mém měření byl způsoben tím, že vzorky nebyly zbaveny rozpuštěného kyslíku. Jak je již zmíněno výše, časově rozlišená metoda není závislá na rozpuštěném kyslíku ve vzorcích, kdežto steady-state metodu to značnou měrou ovlivňuje. Dále Gehlen a Schryver stanovovali agregační čísla SDS pomocí časově rozlišené metody v rozmezí koncentrací 50 mM až 200 mM a získali hodnoty agregačních čísel v rozmezí 63 až 68 [35].



Obr. 31 Závislost poměru koncentrace zrhášeče a micel na koncentraci zrhášeče, koncentrace SDS a hyaluronanu byla konstantní

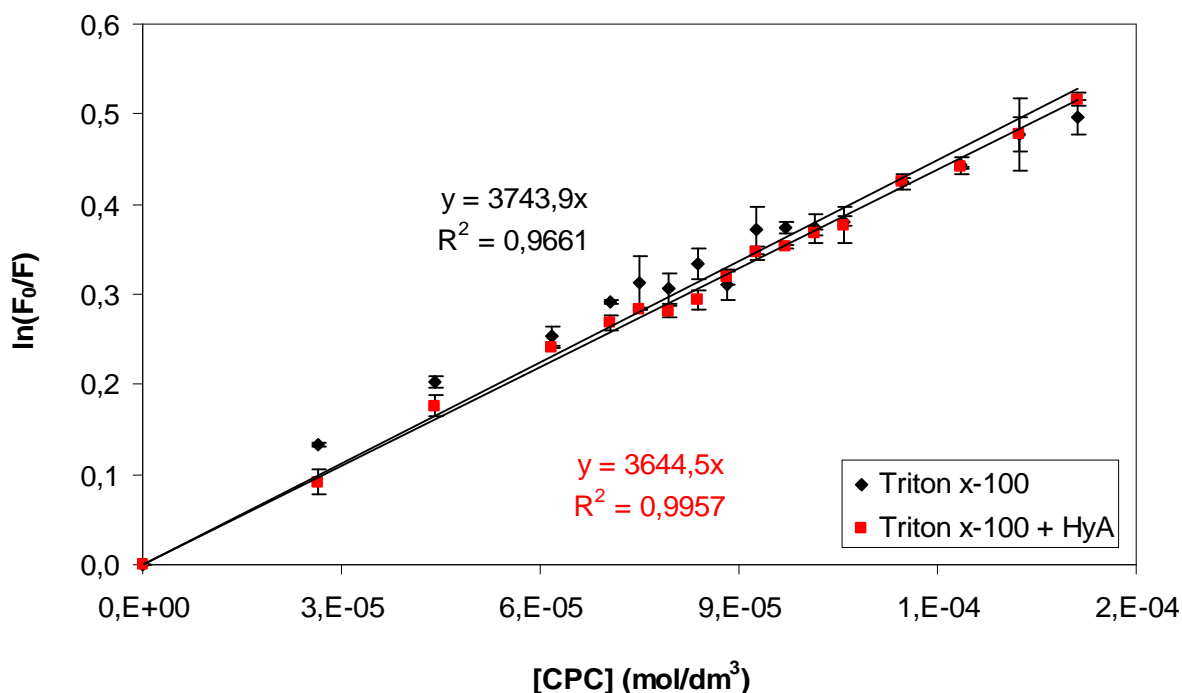
Přidání hyaluronanu k SDS podle předpokladu lehce změnilo pouze agregační číslo stanovované steady-state metodou z 59 molekul tenzidu na micelu na 57 pravděpodobně kvůli zvýšení viskozity prostředí po přidání hyaluronanu. Rozdíl mezi agregačními čísly stanovovanými steady-state a časově-rozlišenou metodou je způsoben opět přítomností rozpuštěného kyslíku ve vzorcích, který ovlivňuje steady-state data. Pokud by byl rozpuštěný kyslík ze vzorků odstraněn, pravděpodobně by kinetické poměry přesáhly hodnotu 10 a agregační čísla stanovená pomocí obou metod by byla identická. Hyaluronan neovlivňuje agregační čísla micel dodecylsírnanu sodného, protože hyaluronan i molekuly SDS nesou záporný náboj, takže se v roztoku budou odpuzovat a jednotlivé micely SDS budou od molekul hyaluronanu odděleny spojitou vrstvou rozpouštědla. Hodnoty agregačních čísel SDS a příslušných kinetických poměrů viz Tabulka 3

Tabulka 3 Vypočtené hodnoty agregačních čísel 70 mM SDS v absenci a v přítomnosti 0,1 % hyaluronanu a příslušné kinetické poměry

	N_{SS}	N_D	$10^{-7} k_q \text{ (s}^{-1}\text{)}$	$10^{-7} k \text{ (s}^{-1}\text{)}$	k_q/k
SDS	59	77	3,417	0,585	5,841
SDS + HyA	57	77	4,336	0,615	7,050

5.2.3. Stanovení agregačního čísla 10 mM Tritonu x-100 a vliv přidavku nativního hyaluronanu na agregační číslo Tritonu x-100

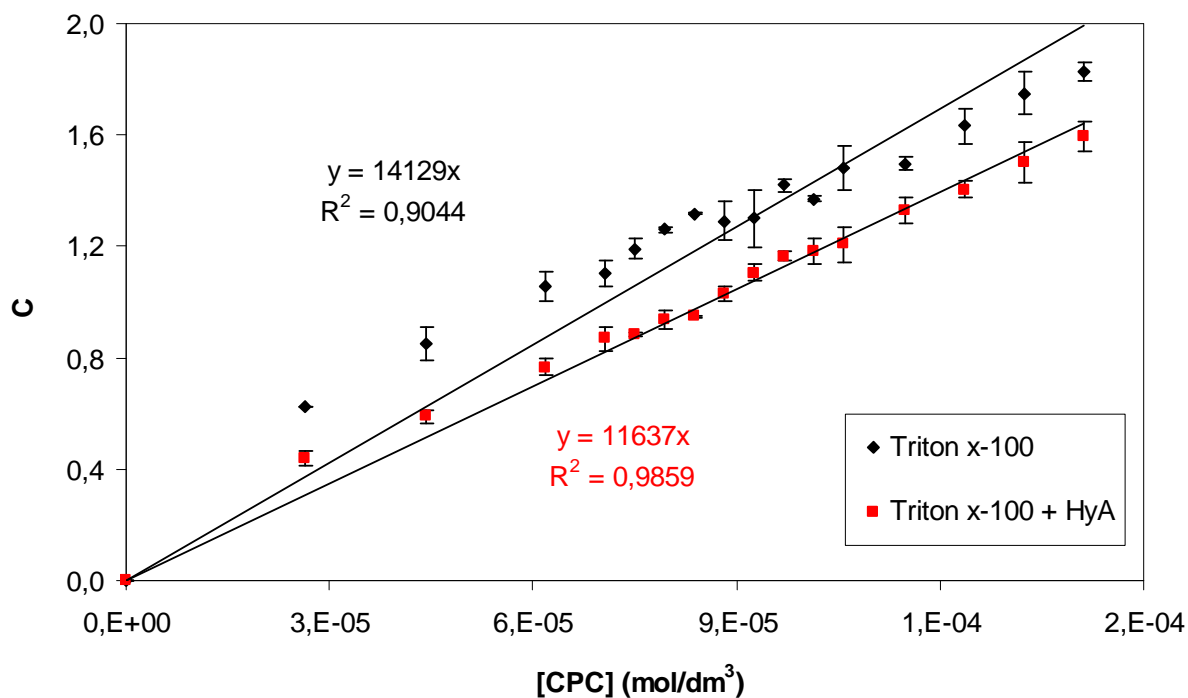
Pomocí steady-state metody bylo stanoveno agregační číslo Tritonu x-100 na 36 molekul tenzidu na micelu (Obr. 32). Časově rozlišenou metodou bylo jeho agregační číslo určeno na 137 molekul tenzidu na micelu (Obr. 33).



Obr. 32 Závislost logaritmu podílu intenzit fluorescence v absenci a v přítomnosti zrhášeče na koncentraci zrhášeče, koncentrace Tritonu X-100 a hyaluronanu byla konstantní

Rozdíl mezi oběma metodami je v tomto případě téměř čtyřnásobný. Je to způsobeno velmi nízkou hodnotou kinetického poměru, která je 0,64. Dalšími důvody jsou přítomnost rozpuštěného kyslíku ve vzorcích a velikost agregačního čísla Tritonu X-100. Časově-rozlišená fluorescence stanovila agregační číslo o relativně vysoké hodnotě, které není schopna steady-state metoda dostatečně přesně stanovit. Každé měření agregačního čísla Tritonu x-100 bude také záviset na způsobu přípravy vzorků, která bude ovlivňovat výslednou hodnotu agregačního čísla. Triton x-100 je totiž látka hygroskopická a fotosenzitivní, takže způsob přípravy bude hrát roli v získané hodnotě agregačního čísla. Samotná literatura se, stejně jako u kationtového CTAB, velice liší v naměřených hodnotách agregačního čísla Tritonu x-100. Sigma-Aldrich referuje hodnotu agregačního čísla Tritonu x-100 mezi 100 až 155 molekulami tenzidu na micelu [27]. Dále Bhattacharya a spol určily agregační číslo Tritonu x-100 o koncentraci 10 mM na 138 molekul tenzidu na micelu [36]. Následně Alargova a spol určily hodnotu agregačního čísla Tritonu x-100 o hmotnostní koncentraci 3,44 hm% pomocí steady-state i časově rozlišené metody na 69,5 a 106 molekul tenzidu na micelu [30]. Důvodem odchylky od publikovaných hodnot může být způsob přípravy vzorků, podmínky měření a také, u steady-state metody, přítomnost kyslíku ve vzorcích. Dalším důvodem odchylky od publikovaných hodnot agregačních čísel může být fakt, že samotné micely Tritonu x-100 v koncentraci daleko za kritickou micelární koncentrací emitují fluorescenci s dobou života 5,1 ns. Po přidání fluorescenční sondy

se v roztoku micel a sondy objevují dvě doby života namísto jedné. To přináší problémy pro určení agregačního čísla pomocí časově-rozlišeného modelu pro micelární zhášení, protože tento model je uzpůsoben jako biexponenciální. Jelikož po přidání zhášeče do systému pyrenu s Tritonem x-100 lze vyhasínací křivku vyhodnotit triexponenciálním modelem, dochází při proložení modelem pro micelární zhášení k získání vysokých hodnot χ_R^2 a tedy i k pravděpodobně odlišným hodnotám poměru koncentrace zhášeče a micel. Pravděpodobně vysoké hodnoty χ_R^2 jednotlivých vyhasínacích křivek jsou důvodem nízké hodnoty spolehlivosti proložení naměřených dat regresní křivkou.



Obr. 33 Závislost poměru koncentrace zhášeče a micel na koncentraci zhášeče, koncentrace Tritonu X-100 a hyaluronanu byla konstantní

Přídavek hyaluronanu snížil hodnoty agregačního čísla určovaného pomocí obou metod. Pomocí steady-state metody byla stanovena hodnota agregačního čísla Tritonu x-100 na 35 molekul tenzidu na micelu (Obr. 32). Pomocí časově-rozlišené metody bylo určeno agregační číslo Tritonu x-100 v přítomnosti hyaluronanu na 113 molekul tenzidu na micelu (Obr. 33). Protože nebyla snížena hodnota agregačního čísla určovaného pouze pomocí steady-state metody, nehrála v tomto případě výraznou roli zvýšená viskozita prostředí, ale spíše interakce mezi hyaluronanem a Tritonem x-100. Mohlo dojít k vytvoření vodíkové vazby mezi hyaluronanem a hydrofilními polyetylenoxidovými skupinami tenzidu, čímž by mohly být některé molekuly tenzidu nedostupné k agregaci nebo se díky těmto vazbám začínají agregáty Tritonu x-100 tvořit v blízkosti řetězce hyaluronanu, kde pravděpodobně nebude možno vytvořit agregát o stejné velikosti, jako tomu bylo ve vodném roztoku. Hodnoty agregačních čísel a příslušných kinetických poměrů viz Tabulka 4.

Tabulka 4 Vypočtené hodnoty agregačních čísel 10 mM Tritonu X-100 v absenci a v přítomnosti 0,1 % hyaluronanu a příslušné kinetické poměry

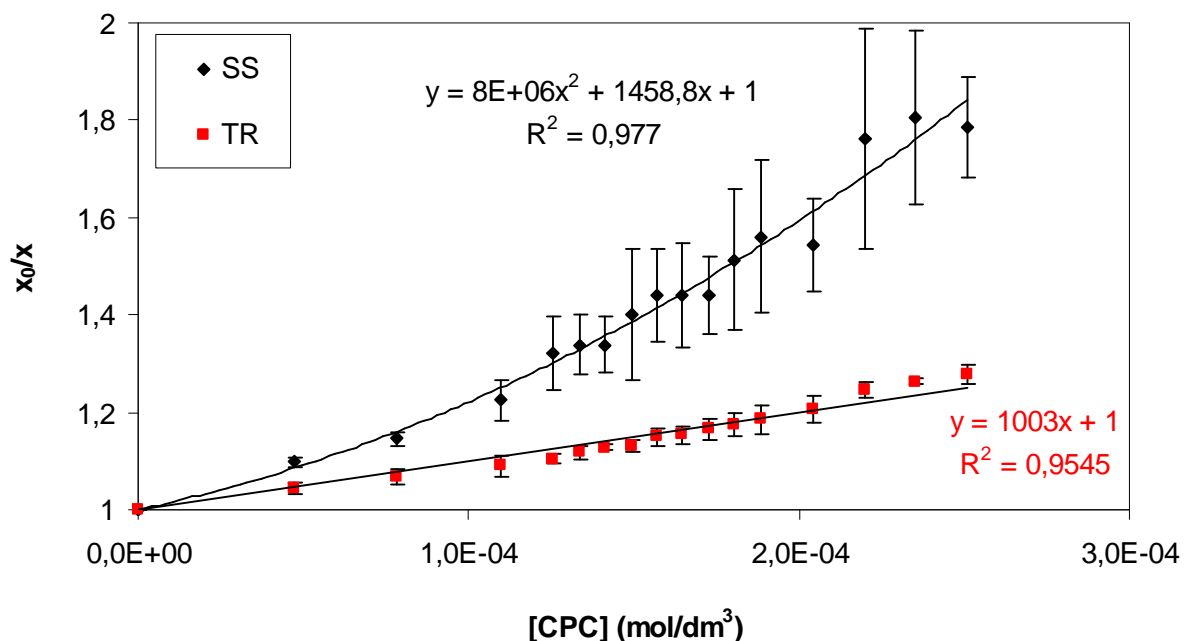
	N_{SS}	N_D	$10^{-7} k_q$ (s ⁻¹)	$10^{-7} k$ (s ⁻¹)	k_q/k
Triton x-100	36	137	0,289	0,449	0,642
Triton x-100 +HyA	35	113	0,381	0,410	0,929

5.3. Vliv náboje micely na druh zhášení a vliv přídavku nativního hyaluronanu na druh zhášení

Dále bylo zkoumáno, jak ovlivňuje náboj micely druh zhášení. Byl vybrán kationtový, aniontový a neiontový tenzid a pro všechny tyto tenzidy byl vybrán stejný pár sondy a zhášeče. Následně byl zkoumán vliv přídavku nativního hyaluronanu na druh a procentuální zastoupení zhášení.

5.3.1. Vliv nativního hyaluronanu na zhášení v micelách 20 mM CTAB

Jak již napovídá Stern-Volmerův graf pro zhášení pyrenu ve vodném roztoku CTAB, probíhá zde kombinovaně statické i dynamické zhášení (Obr. 34). Bylo vypočteno, že z 35 % se jedná o dynamické zhášení a z 65 % se jedná o statické zhášení.

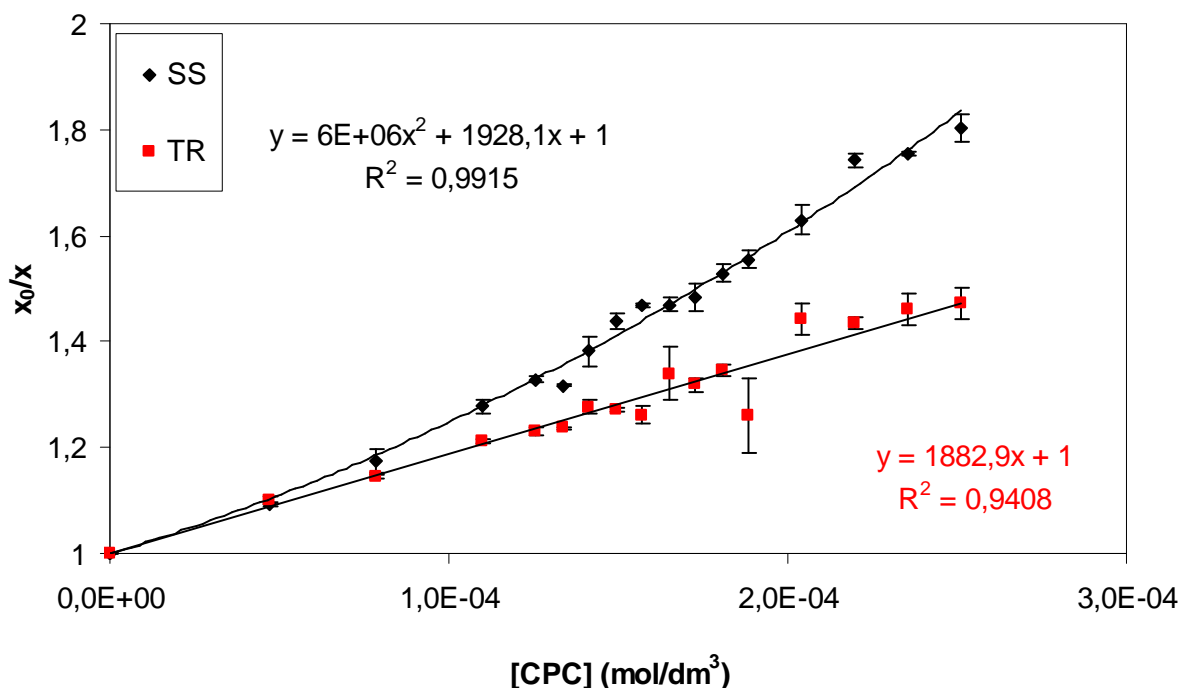


Obr. 34 Stern-Volmerův graf pro zhášení pyrenu v 20 mM CTAB pomocí CPC. Poměr x_0/x značí v případě steady-state dat poměr F_0/F a v případě časově-rozlišených dat τ_0/τ , koncentrace CTAB byla konstantní

Dynamické zhášení je ovlivněno tím, jak rychle dokáže zhášeč difundovat k fluoroforu, ale u statického zhášení dochází k vytvoření nefluorescentního komplexu v základním stavu, pokud je nějakým způsobem fluorofor v blízkosti zhášeče před absorpcí světla. Z toho plyne, že v blízkosti 65 % zhášených fluoroforů se ještě před absorpcí světla nacházela molekula zhášeče v blízkosti fluoroforu. Ke zbytku zhášených fluoroforů se zhášeč dostal až po

absorpci světla, tedy když se fluorofor nacházel v excitovaném stavu, čímž byla snížena doba života fluoroforu. Ze Stern-Volmerova grafu plyne, že v nízkých koncentracích zhášedce je preferováno dynamické zhášení. Nejspíše v nízkých koncentracích budou převládat odpuzivé síly mezi micelami a molekulami zhášedce, protože sdílí stejný náboj. Se zvýšením koncentrace zhášedce bude pravděpodobně energeticky výhodnější začlenit molekuly zhášedce do micely CTAB, čímž by mohl být vytvořen nefluorescentní komplex v základním stavu.

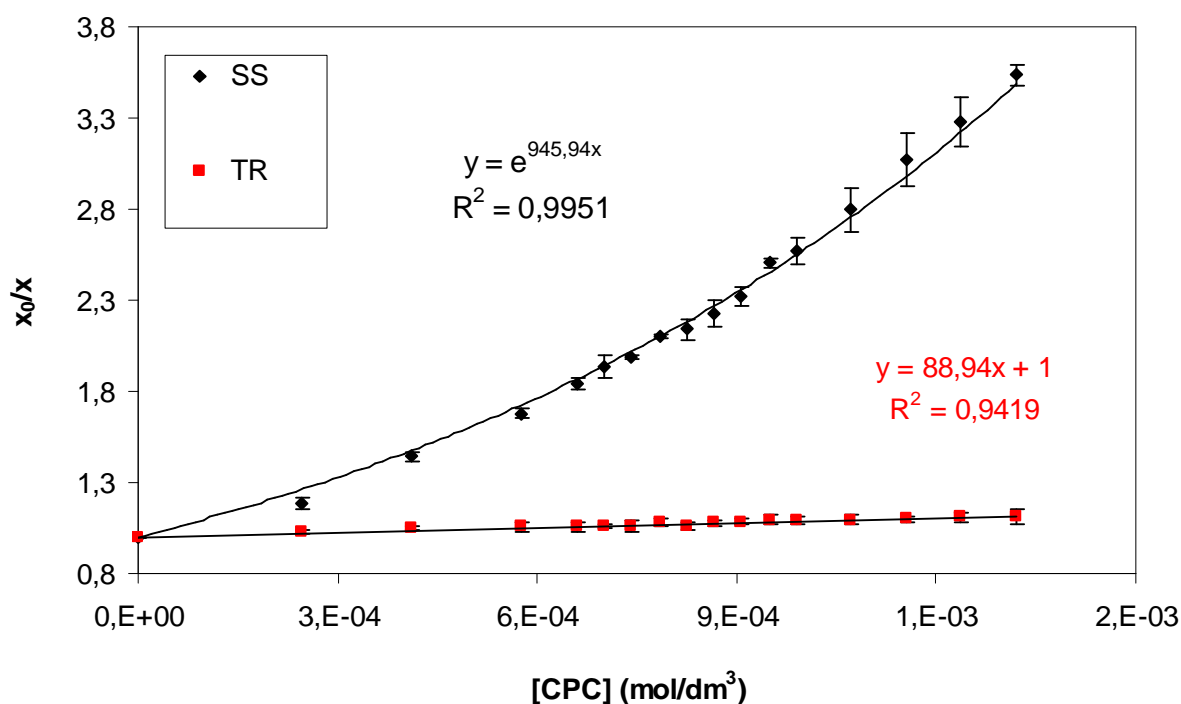
V případě přidavku nativního hyaluronanu k vodnému roztoku CTAB se očekávala, stejně jako v případě určení agregačního čísla, interakce mezi karboxylovými skupinami hyaluronanu a kladně nabytými tenzidy CTAB, popřípadě i interakce hyaluronanu s molekulami CPC. Vzhledem ke zvýšení viskozity prostředí díky přidavku hyaluronanu se očekávalo snížení efektivity dynamického zhášení. Jelikož se jedná o proces kontrolovaný difúzí, zvýšení viskozity sníží difúzní koeficient, tedy by mělo dojít k omezení efektivity dynamického zhášení. Po přidání hyaluronanu došlo oproti předpokladům ke zvýšení efektivity dynamického zhášení na 63 % a efektivita statického zhášení klesla na 37 % (Obr. 35). Jelikož kvůli zvýšení viskozity neklesla efektivita dynamického zhášení, musí mít interakce hyaluronanu s CTAB za následek změnu v organizaci micely CTAB nebo pozice sondy v micelle tak, že nemohl být vytvořen komplex fluoroforu a zhášedce. Popřípadě díky vytvoření agregátů CTAB-hyaluronan neměl zhášedce možnost proniknout do struktury micely, aby mohl vytvořit komplex fluorofor-zhášedce. Molekuly zhášedce byly následně schopny ve větším množství difundovat k molekulám fluorescenční sondy, ale nebyly schopny se do jejich blízkosti dostat ještě před absorpcí světla.



Obr. 35 Stern-Volmerův graf pro zhášení pyrenu v CTAB a HyA pomocí CPC. Poměr x_0/x značí v případě steady-state dat poměr F_0/F a v případě časově-rozlišených dat τ_0/τ , koncentrace CTAB a hyaluronanu byla konstantní

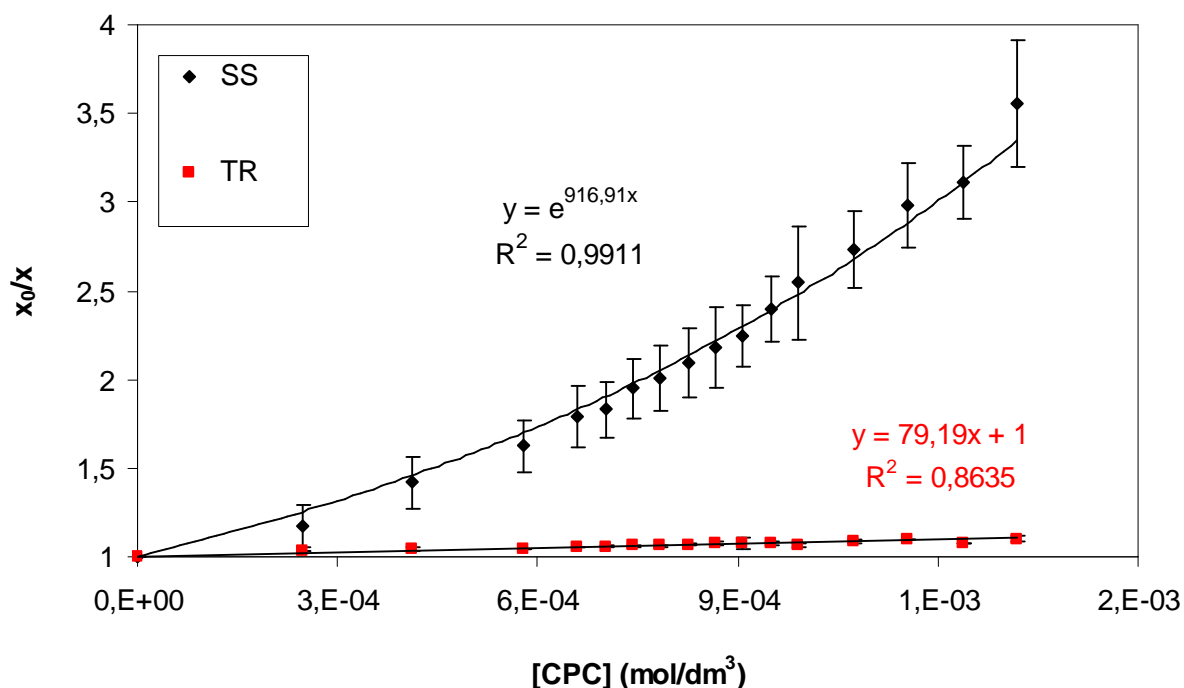
5.3.2. Vliv nativního hyaluronanu na zhášení v micelách 70 mM SDS

V 70 mM vodném roztoku SDS jde, vzhledem k téměř nulovému zastoupení dynamického zhášení a vzhledem k zakřivení Stern-Volmerova grafu pro steady-state měření, o zhášení efektivní sférou (Obr. 36). Důvodem je struktura micely SDS. Uhlovodíkový řetězec SDS je kratší než řetězec CPC, takže s předpokladem, že se pyren nachází v hydrofobní části micely nebo i v palisádové vrstvě micely, nebude fluorofor v bezprostřední blízkosti zhášedce, čímž nebude moct dojít k vytvoření nefluorescentního komplexu v základním stavu. Vzhledem k účinnosti statického zhášení bude fluorofor v dosahu zhášecí sféry CPC. Tento systém může být také stabilizován opačnými náboji micely a zhášedce. Takto zanedbatelný podíl dynamického zhášení bude pravděpodobně způsobem tím, že vzniklý systém SDS s molekulami CPC zakomponovanými v micelle a stabilizovanými opačným nábojem bude více energeticky výhodný, než molekuly CPC difundující roztokem.



Obr. 36 Stern-Volmerův graf pro zhášení pyrenu v SDS pomocí CPC. Poměr x_0/x značí v případě steady-state dat poměr F_0/F a v případě časově-rozlišených dat τ_0/τ , koncentrace SDS byla konstantní

Po přidání hyaluronanu k SDS nedošlo téměř k žádným změnám rychlostních konstant zhášení. Opět se jedná pouze o zhášení efektivní sférou a příspěvek dynamického zhášení lze zanedbat. Došlo k malému zmenšení sféry efektivního zhášení z $V_q N_a = 945,94 \text{ dm}^3/\text{mol}$ na $V_q N_a = 916,91 \text{ dm}^3/\text{mol}$ v systému tenzidu s hyaluronanem (Obr. 37). Může to být způsobeno zvýšením viskozity prostředí, kde zhášecí sféra pravděpodobně nemá takový účinek jako v roztoku s menší viskozitou.

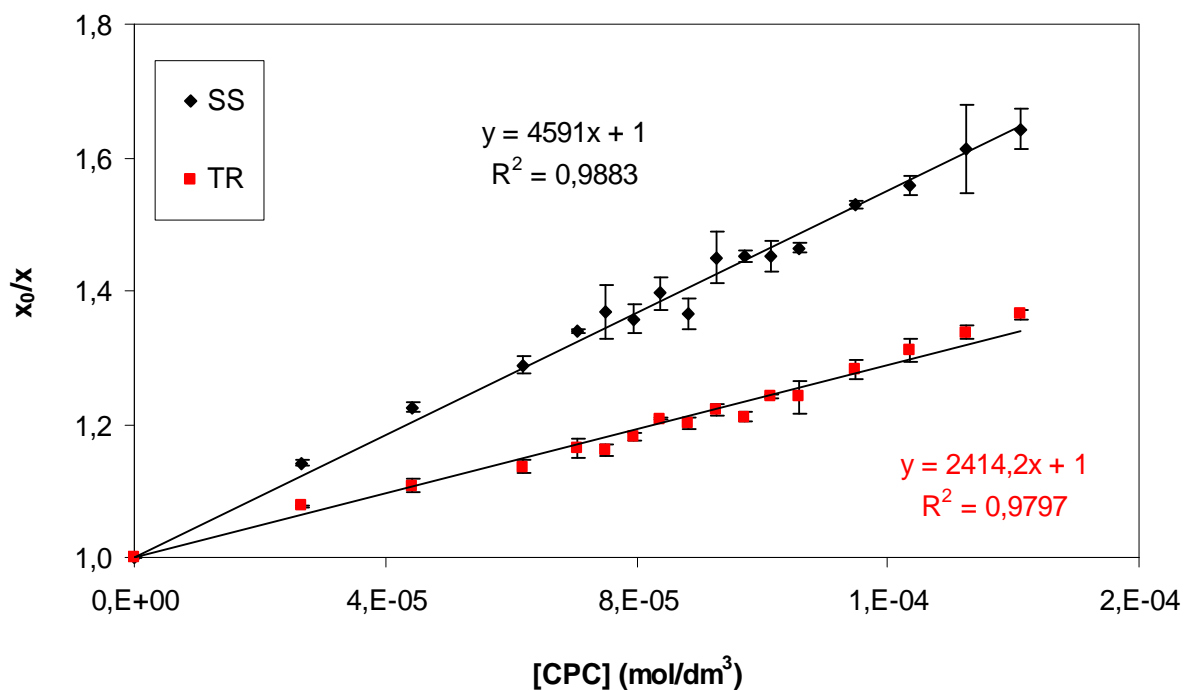


Obr. 37 Stern-Volmerův graf pro zhášení pyrenu v SDS a HyA pomocí CPC. Poměr x_0/x značí v případě steady-state dat poměr F_0/F a v případě časově-rozlišených dat τ_0/τ , koncentrace SDS a hyaluronanu byla konstantní

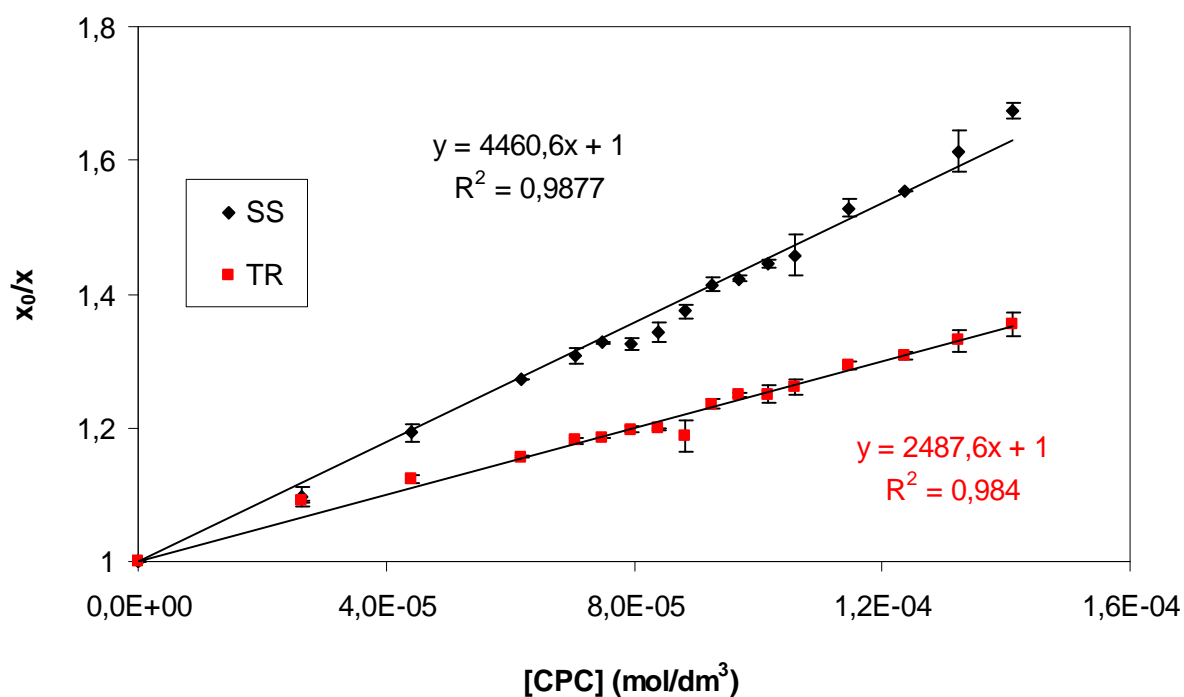
5.3.3. Vliv nativního hyaluronanu na zhášení v micelách 10 mM Tritonu x-100

U zhášení v Tritonu x-100 se projevilo kombinované statické i dynamické zhášení, stejně jako u CTAB. Ale proložení steady-state dat lineární křivkou dalo stejnou hodnotu spolehlivosti jako při proložení polynomickou funkcí, proto byl ponechán lineární model (Obr. 38). Pravděpodobně to plyne z toho, že v systému je většinový podíl dynamického zhášení, který bude mít větší vliv na zakřivení závislosti kombinovaného zhášení. Z výpočtu podílu dynamického a statického zhášení byly získány hodnoty 53 % pro dynamické zhášení a 47 % pro statické zhášení. Pravděpodobně více jak polovina molekul zhášeče podílejících se na zhášení není v micelle Tritonu x-100 dostatečně stabilizována, aby vytvořila nefluorescentní komplex v základním stavu.

Po přidání hyaluronanu byl zvýšen podíl dynamického zhášení na 56 % a podíl statického zhášení se snížil na 44 % (Obr. 39). Opět byla steady-state data proložena lineární funkcí oproti polynomické, protože hodnota spolehlivosti byla pro oba případy stejná. Protože nedošlo k poklesu podílu dynamického zhášení, ale k jeho nárůstu, hráli větší roli, než vzrůst viskozity prostředí díky hyaluronanu, interakce mezi Tritonem X-100 a hyaluronanem. Vzhledem ke změně agregačního čísla Tritonu x-100 bez hyaluronanu a v přítomnosti hyaluronanu je pravděpodobné, že se na zvýšení podílu dynamického zhášení podílela i strukturní změna micel Tritonu x-100 díky interakci tohoto tenzidu s hyaluronanem. Jak již bylo zmíněno výše, hyaluronan by mohl interagovat přes vodíkové můstky s Tritonem x-100 a tato interakce by mohla ovlivňovat strukturu jeho micel. Tím by mohlo dojít i k lepší stabilizaci micel Tritonu x-100, čímž by více molekul zhášeče nebylo schopno vytvořit nefluorescentní komplex v základním stavu a tím zvýšit podíl statického zhášení v systému.



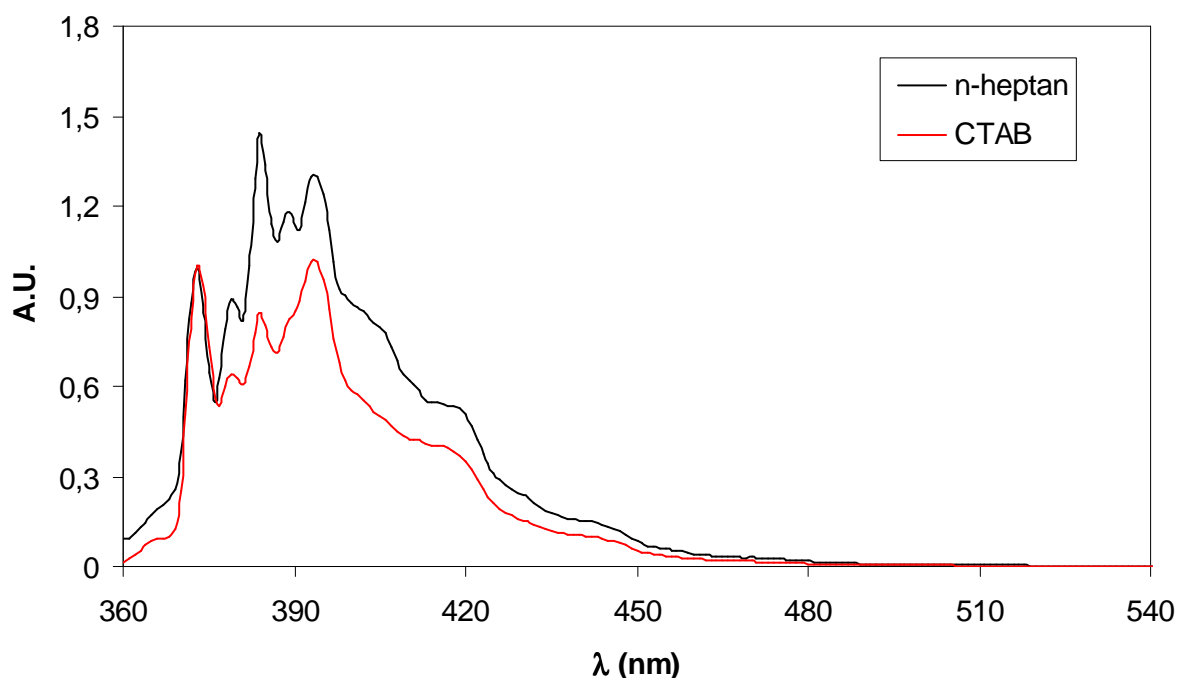
Obr. 38 Stern-Volmerův graf pro zhášení pyrenu v Tritonu x-100 pomocí CPC. Poměr x_0/x značí v případě steady-state dat poměr F_0/F a v případě časově-rozlišených dat τ_0/τ , koncentrace Tritonu X-100 byla konstantní



Obr. 39 Stern-Volmerův graf pro zhášení pyrenu v Tritonu x-100 a HyA pomocí CPC. Poměr x_0/x značí v případě steady-state dat poměr F_0/F a v případě časově-rozlišených dat τ_0/τ , koncentrace Tritonu X-100 a hyaluronanu byla konstantní

5.4. Určení relativní pozice pyrenu v micelle CTAB, SDS a Tritonu X-100

Podle struktury pyrenu by se dalo předpokládat, že se ve vodném roztoku micel bude nacházet v centrální, tedy hydrofobní části micely. Dále by se mohlo předpokládat, že pyren nebude emitovat fluorescenci (popřípadě s velice slabou intenzitou), pokud bude ve vodném roztoku. Ve vodě ale pyren intenzivně fluorescenci emituje. Dále z hodnoty emisního polaritního indexu naměřeného v hydrofobním prostředí *n*-heptanu a z porovnání emisního polaritního indexu naměřeného v micelách bylo usouzeno, že se pyren nebude nacházet v hydrofobní části micely, ale spíše na rozhraní hydrofobní a hydrofilní části nebo blízko rozhraní hydrofilní část micely-voda (Obr. 40). Ke zkoumání pozice fluoroforu v micelle bylo vybráno zhášení jodidem draselným, který byl určen ke zkoumání vodného prostředí a fázového rozhraní voda-hydrofilní část micely, 3-jodpropanovou kyselinou, která byla určena ke zkoumání hydrofilní části micely a rozhraní mezi hydrofilní a hydrofobní částí micely a fenyljodidem, který byl vybrán pro zkoumání hydrofobní oblasti micely.

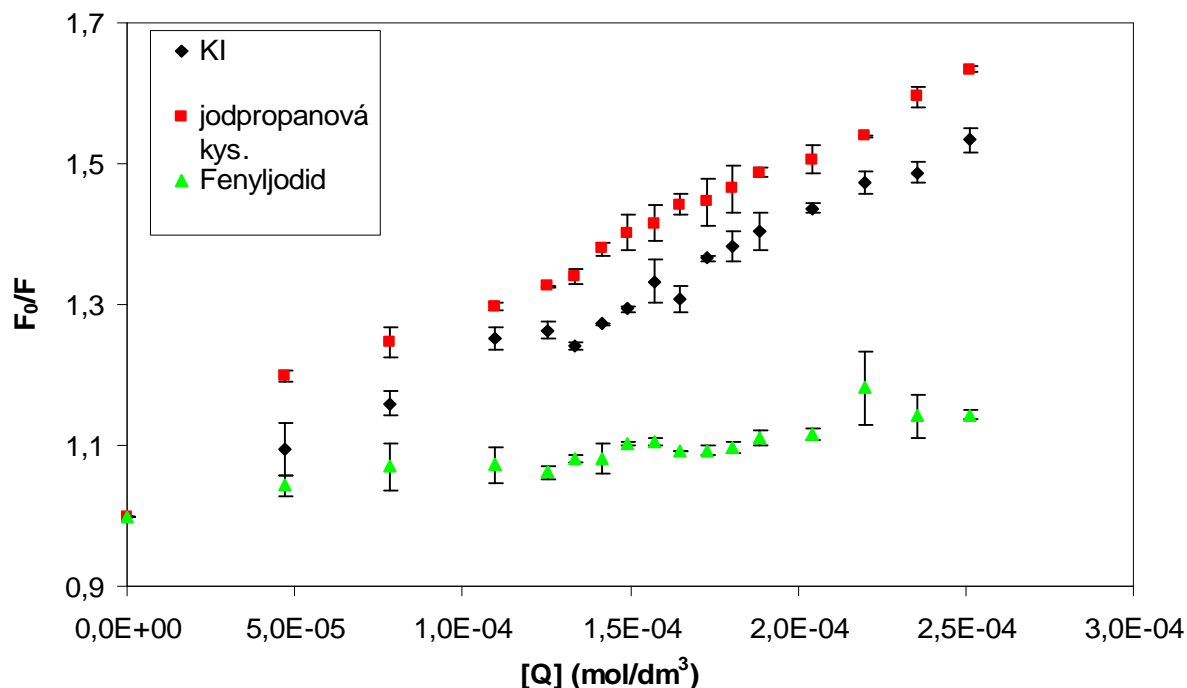


Obr. 40 Emisní spektra pyrenu v *n*-heptanu a v CTAB

5.4.1. Zhášení pyrenu jodovými deriváty v micelle 20 mM CTAB

Pyren v CTAB byl nejúčinněji zhášen za pomoci 3-jodpropanové kyseliny a jodidu draselného. Naopak jodbenzen pyren nezchášel téměř vůbec (Obr. 41). Vzhledem k tomu, že účinnost zhášení mezi 3-jodpropanovou kyselinou a jodidem draselným byla velice podobná, nachází se většina pyrenu na rozhraní hydrofobní a hydrofilní části. I když jodid draselný zhášel s podobnou účinností jako 3-jodpropanová kyselina, nebude to znamenat, že se část molekul pyrenu nachází na hydrofilní části micely nebo ve vodné fázi a část v palisádové vrstvě micely. Časově rozlišené měření pyrenu solubilizovaného v micelách dalo monoexponenciální pokles a doba života byla odlišná od doby života pyrenu ve vodě. Také steady-state data ukázala, že je pyren v prostředí s rozdílným EmPI, než jakým má voda. Z toho bylo usouzeno, že se pyren nachází v palisádové vrstvě micely. Vysoká účinnost zhášení jodidem draselným značí, že se tento zhášeč nenachází pouze ve vodném prostředí,

ale je i solubilizován na hydrofilním rozhraní micely, kde stále má velký vliv ve zhášení pyrenu. Vzhledem k účinnosti zhášení jodbenzenem to vypadá, že se molekuly pyrenu téměř vůbec nenachází v centrální části micely.

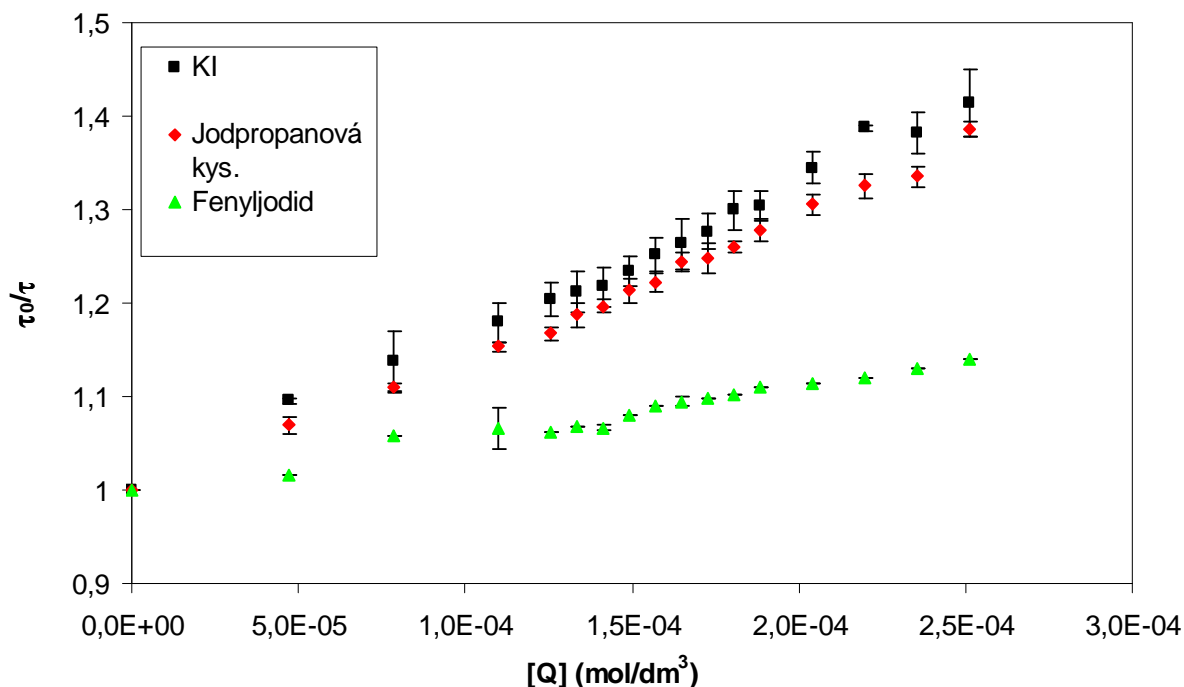


Obr. 41 Steady-state data pro zhášení pyrenu v CTAB pomocí jodidu draselného, 3-jodpropanové kyseliny a fenyljodidu, koncentrace CTAB byla konstantní

Pomocí časově rozlišených měření byl určen poměr mezi dynamickým a statickým zhášením pro jednotlivé zhášeče. Již ze Stern-Volmerových závislostí je vidět, že největší účinnost dynamického zhášení měl jodid draselný (Obr. 42). Neměl však největší procentuální zastoupení dynamického zhášení ze všech tří jodových derivátů. Nejvíce, tedy 99 % dynamického zhášení, měl jodbenzen, což bylo dáno celkovou účinností zhášení, která dosahovala u poměru F_0/F pouze k hodnotě 1,14. I u ostatních zhášečů se dosahovalo vysokého podílu dynamického zhášení. Konkrétně 3-jodpropanová kyselina zhášela z 64,3 % dynamickým zhášením a jodid draselný ze 77 %. Tyto vysoké podíly dynamického zhášení jsou způsobeny vlivem těžkého atomu, tedy jodu. Molekuly obsahující těžký atom ve většině případů zháší převážně pomocí kolizního zhášení. Zhášení halogenovými molekulami, jako je jod, může způsobit mezisystémový přechod do excitovaného tripletového stavu, kde je emise z tripletového stavu zhášena dalšími deaktivacími procesy, protože emise z tripletového stavu je velmi pomalá (viz kapitola 2.2.4.1.). Směrnice Stern-Volmerových závislostí, příslušné rychlostní konstanty a hodnoty podílu dynamického a statického zhášení viz Tabulka 5.

Tabulka 5 Porovnání Stern-Volmerových a rychlostních konstant obdržných pomocí steady-state a časově rozlišené metody a výpočty procentuálního zastoupení dynamického zhášení

	$K_{\text{obs}} (M^{-1})$	$k_{q(\text{obs})} (10^9 M^{-1}s^{-1})$	$K_{\text{sv}} (M^{-1})$	$k_{q(\text{sv})} (10^9 M^{-1}s^{-1})$	Dynamické zhášení (%)
KI	2121	17,88	1635	13,78	77,07
IP	2338	19,71	1504	12,68	64,33
IB	579	4,88	564	4,83	98,98



Obr. 42 Časově rozlišená data pro zhášení pyrenu v CTAB pomocí jodidu draselného, 3-jodpropanové kyseliny a fenyljodidu, koncentrace CTAB byla konstantní

5.4.2. Zhášení pyrenu jodovými deriváty v micelle 70 mM SDS

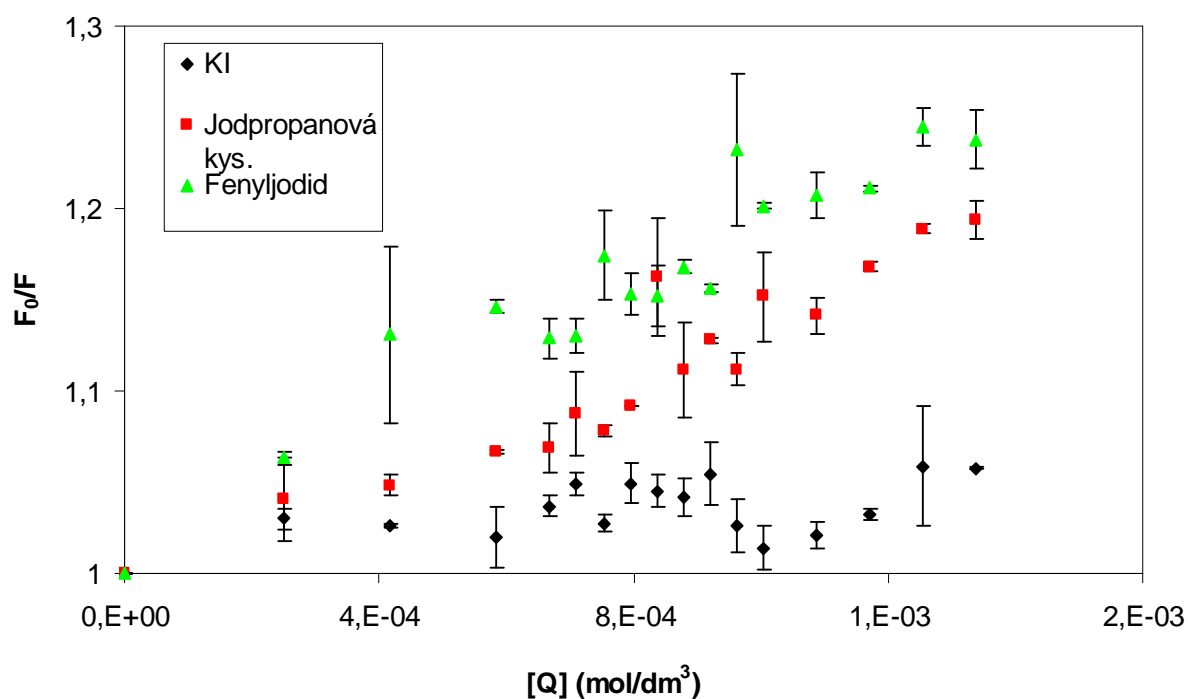
V micelách SDS byl pyren nejučinněji zhášen fenyljodidem a 3-jodpropanovou kyselinou. Jodid draselný nezahášel vůbec. Oproti micelám CTAB bylo nejučinnější zhášení v SDS více jak poloviční, což značí, že mnohem méně molekul zhášeče se dostane do kontaktu s fluoroforem. Pravděpodobně došlo ke změně pozice pyrenu oproti CTAB. Protože jodid draselný nezahášel pyren vůbec, bude to znamenat, že se pyren nenachází v bezprostřední blízkosti hydrofilní skupiny tenzidu nebo je jodid draselný solubilizován pouze ve vodné fázi. Vzhledem k tomu, že pyren byl zhášen téměř stejnou měrou fenyljodidem a 3-jodpropanovou kyselinou, bude se pyren v micelách SDS nacházet někde mezi polem působnosti 3-jodpropanové kyseliny a fenyljodidu, tedy v blízkosti hydrofobního řetězce, ale ne v centrální části micel.

Porovnáním časově-rozlišených dat se steady-state daty byly získány hodnoty podílu dynamického zhášení pro jednotlivé zhášeče. V případě jodidu draselného byl vypočten podíl dynamického zhášení o hodnotě 181 %, u 3-jodpropanové kyseliny 116 % a u fenyljodidu 65 %. Hodnoty podílu dynamického zhášení přesahující 100 % byly způsobeny nižší

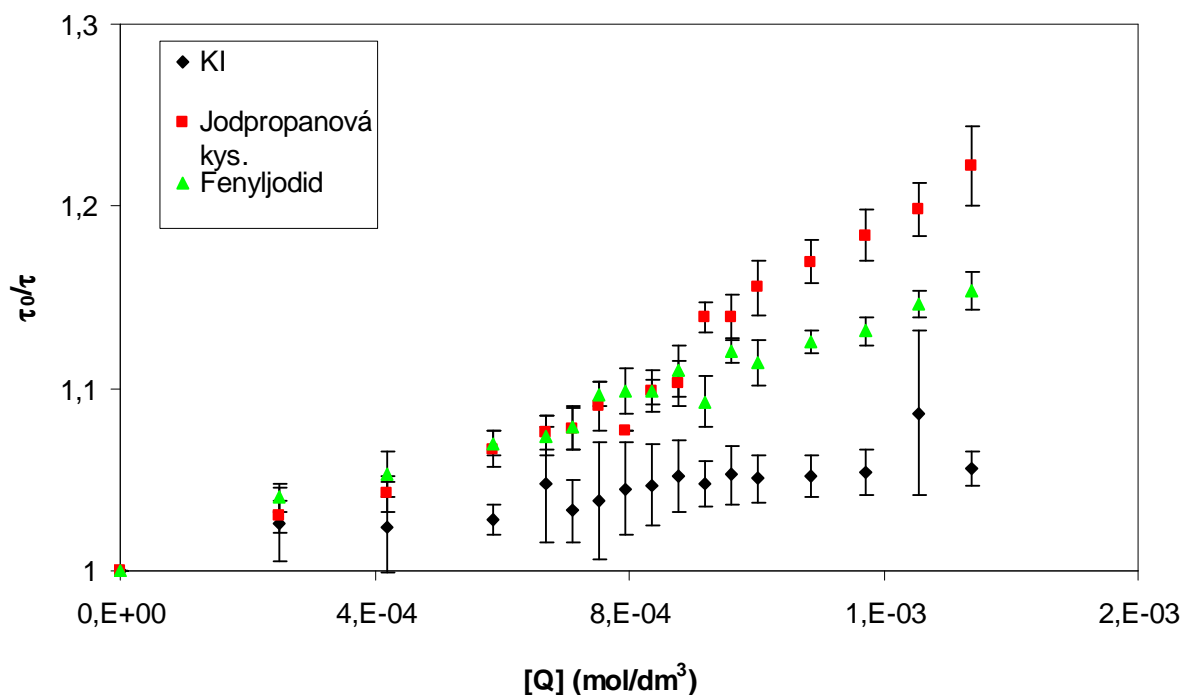
hodnotou spolehlivosti lineárního proložení závislostí získaných pomocí obou metod a nízkou hodnotou účinnosti zhášení (Obr. 44). U těchto vzorků se zhášení může považovat za čistě dynamické. Opět většinový podíl dynamického zhášení byl způsoben zhášením vlivem těžkého atomu, jako tomu bylo u experimentů s CTAB. Směrnice Stern-Volmerových závislostí, příslušné rychlostní konstanty a hodnoty podílu dynamického a statického zhášení viz Tabulka 6.

Tabulka 6 Porovnání Stern-Volmerových a rychlostních konstant obdržných pomocí steady-state a časově rozlišené metody a výpočty procentuálního zastoupení dynamického zhášení

	$K_{\text{obs}} (\text{M}^{-1})$	$K_{\text{q(obs)}} (10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1})$	$K_{\text{sv}} (\text{M}^{-1})$	$K_{\text{q(sv)}} (10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1})$	Dynamické zhášení (%)
KI	26	1,64	47	2,96	180,49
IP	149	9,38	172	10,83	115,46
IB	170	10,7	111	6,99	65,33



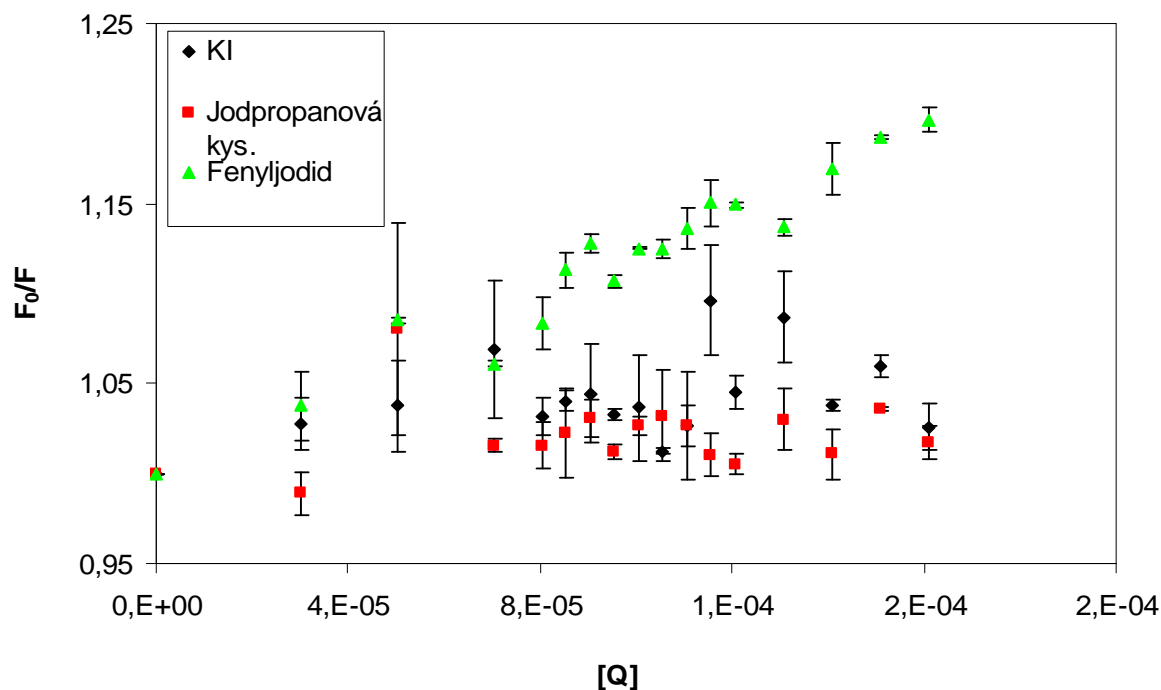
Obr. 43 Steady-state data pro zhášení pyrenu v SDS pomocí jodidu draselného, 3-jodpropanové kyseliny a fenyljodidu, koncentrace SDS byla konstantní



Obr. 44 Časově rozlišená data pro zhášení pyrenu v SDS pomocí jodidu draselného, 3-jodpropanové kyseliny a fenyljodidu, koncentrace SDS byla konstantní

5.4.3. Zhášení pyrenu jodovými deriváty v micelle 10 mM Tritonu X-100

V micelách Tritonu X-100 byl pyren nejlépe zhášen fenyljodidem. Jodid draselný a jodpropanová kyselina zhášeli téměř s nulovou účinností. Když se vezme v úvahu účinnost zhášení fenyljodidem v Tritonu x-100 oproti účinnosti zhášení jodpropanovou kyselinou v micelách CTAB, je účinnost zhášení fenyljodidem v Tritonu X-100 třikrát nižší než jodpropanovou kyselinou v micelle CTAB. Podle účinnosti zhášení všech tří jodových derivátů v micelle Tritonu X-100 se dá předpovědět pozice pyrenu v micelle Tritonu X-100 (Obr. 45). Pravděpodobně se bude pyren nacházet na rozhraní polyetylglykolového řetězce a hydrofobní části molekuly Tritonu X-100, tedy benzenovým jádrem. Popřípadě, kvůli malé účinnosti zhášení fenyljodidem, se může pyren rozprostírat po polyetylglykolovém řetězci. Pyren by mohl být na hydrofobně-hydrofilním rozhraní stabilizován π - π stackingem, ale pravděpodobně v této pozici bude solubilizován i fenyljodid, takže by byla účinnost zhášení vyšší. Pokud by se pyren nacházel na polyetylglykolovém řetězci, pravděpodobně by se k němu ani 3-jodpropanová kyselina a jodid draselný nedostaly. Díky tomu, že je polyetylglykolový řetězec dlouhý přibližně 9 jednotek, nedostane se pyren k fázovému rozhraní, jako tomu bylo v případě CTAB, což vyústilo téměř v nulovou účinnost zhášení jodpropanovou kyselinou i jodidem draselným.

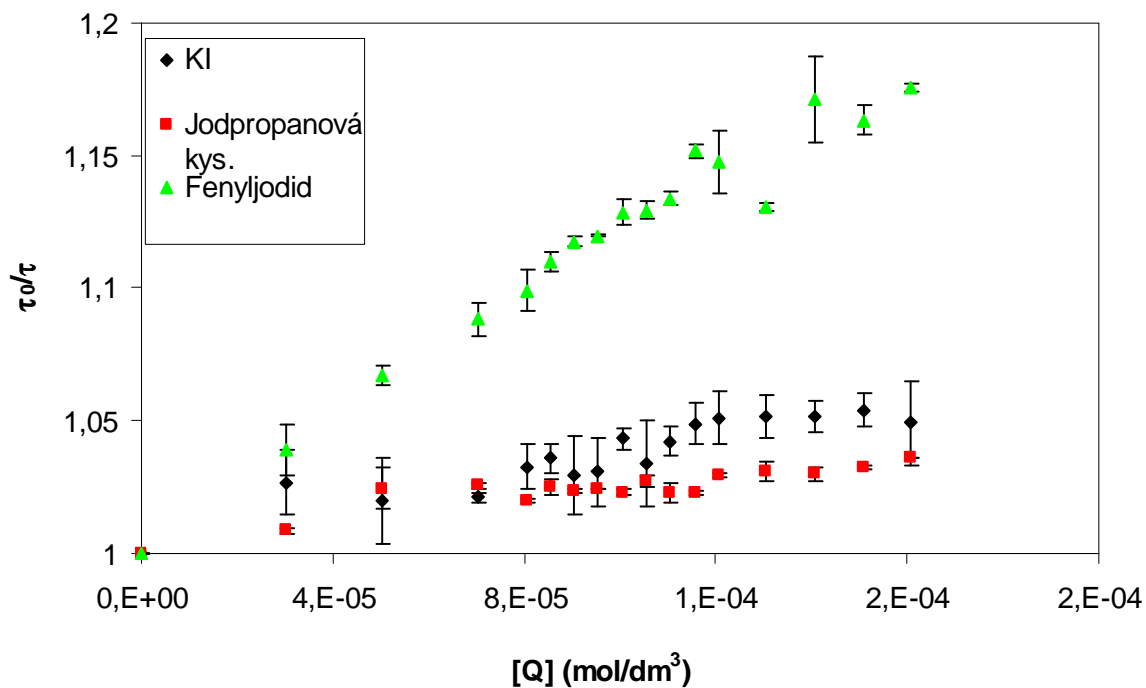


Obr. 45 Steady-state data pro zhášení pyrenu v Tritonu X-100 pomocí jodidu draselného, jodpropanové kyseliny a fenyljodidu, koncentrace Tritonu X-100 byla konstantní

Srovnáním měření pomocí časově rozlišené a steady-state metody byly získány hodnoty podílu dynamického zhášení. Opět u jodidu draselného a 3-jodpropanové kyseliny byly obdrženy hodnoty podílu dynamického zhášení větší než 100 %. Konkrétně u jodidu draselného 139 % a u 3-jodpropanové kyseliny 314 %. Bylo to způsobeno nízkou hodnotou účinnosti zhášení u obou zhášečů a také větší nepřesností steady-state metody. Pokud jsou srovnány chybové úsečky obou metod, je možno vyzorovat, že u steady-state metody jsou chybové úsečky větší než u časově-rozlišené metody. U těchto zhášečů se může zhášení považovat za čistě dynamické. Při zhášení fenyljodidem bylo dosaženo podílu dynamického zhášení o hodnotě 91 %. Většinový podíl dynamického zhášení v systému byl způsoben efektem vlivu těžkého atomu, stejně jako tomu bylo v předešlých případech. Směrnice Stern-Volmerových závislostí, příslušné rychlostní konstanty a hodnoty podílu dynamického a statického zhášení viz Tabulka 7.

Tabulka 7 Porovnání Stern-Volmerových a rychlostních konstant obdržných pomocí steady-state a časově rozlišené metody a výpočty procentuálního zastoupení dynamického zhášení

	$K_{\text{obs}} (\text{M}^{-1})$	$K_{\text{q(obs)}} (10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1})$	$K_{\text{sv}} (\text{M}^{-1})$	$K_{\text{q(sv)}} (10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1})$	Dynamické zhášení (%)
KI	230	9,48	319	13,15	138,71
IP	58	2,39	182	7,50	313,81
IB	1188	48,98	1085	44,73	91,32



Obr. 46 Časově rozlišená data pro zhášení pyrenu v Tritonu X-100 pomocí jodidu draselného, jodpropanové kyseliny a fenylijodidu, koncentrace Tritonu X-100 byla konstantní

6 ZÁVĚR

Cílem práce byla rešerše, návržení a vyhodnocení experimentů v systému polymer-tenzid, který měl být zkoumán pomocí časově-rozlišené fluorescence. Jako hlavní téma práce bylo vybráno zhášení pyrenu v micelárním prostředí. Byly vybrány 3 tenzidy. Kationtový CTAB, aniontový SDS a neionogenní Triton X-100. Jako zhášec pro určení agregačního čísla byl vybrán cetylpyridinium chlorid. Pro určení relativní pozice pyrenu v micelách byly vybrány zhášec na bázi jodu. Jodid draselný zkoumající vodné prostředí a fázového rozhraní voda-hydrofilní část micely, 3-jodpropanová kyselina, která zkoumá palisádovou vrstvu a hydrofilně-hydrofobní rozhraní a fenyljodid, který zkoumá hydrofobní centrální část micely.

Nejprve musela být stanovena hodnota kritické micelární koncentrace pomocí steady-state fluorescence. Pomocí časově-rozlišené fluorescence nelze přesně stanovit hodnotu kritické micelární koncentrace. Hodnota kritické micelární koncentrace u CTAB byla stanovena na 1,18 mM, u SDS na 7,3 mM, u Tritonu X-100 na 0,28 mM. Vzorky pro stanovení CMC byly také podrobeny časově-rozlišeným měřením. Vzhledem k nastavení emisního monochromátoru na 381 nm by měla být sledována pouze změna doby života monomeru pyrenu. Z experimentů vyplynulo, že v koncentraci blízké CMC se objevila druhá, kratší doba života, která patřila excimeru pyrenu. Zároveň byla sledována změna doby života s polaritou prostředí, která ale neovlivnila matematický model exponenciálního proložení.

Dále bylo zkoumáno agregační číslo pomocí steady-state a časově-rozlišené fluorescence, tyto metody byly porovnány a následně byl zkoumán vliv přídatku hyaluronanu na agregační číslo. Byly zjištěny rapidní rozdíly mezi oběma metodami. V případě CTAB bylo určeno agregační číslo pomocí steady-state metody na 43 molekul tenzidu na micelu a pomocí časově-rozlišené metody na 108 molekul tenzidu na micelu. U SDS byla agregační čísla stanovena na 59 pomocí steady-state metody a 77 pomocí časově-rozlišené metody. U Tritonu X-100 byla agregační čísla stanovena na 36 pomocí steady-state metody a 137 pomocí časově-rozlišené metody. Agregační čísla stanovená pomocí časově-rozlišené fluorescence se shodovala s agregačními čísly vyhledanými v literatuře. Rapidní rozdíly mezi agregačními čísly stanovenými pomocí obou metod u CTAB a Tritonu X-100 byly způsobeny nízkým kinetickým poměrem (u obou tenzidů okolo hodnoty 1). U SDS nebyl rozdíl v agregačních číslech tak velký, protože kinetický poměr byl stanoven na 5,8. Ale i u SDS byl rozdíl 18 molekul tenzidu na micelu při porovnání obou metod, i když by obě hodnoty měly být shodné. Bylo to způsobeno přítomností rozpuštěného kyslíku ve vzorcích, který je účinným zhášecem fluorescence. Rozpuštěný kyslík má ale vliv pouze na steady-state fluorescenci. Po přidání hyaluronanu byly sledovány změny v agregačních číslech tenzidů CTAB a Tritonu X-100. Vzhledem k elektrostatické interakci mezi CTAB a hyaluronanem byla hodnota agregačního čísla CTAB stanoveného pomocí časově-rozlišené metody zvýšena na 146 molekul tenzidu na micelu. U steady-state metody nebyla zaznamenána žádná změna v hodnotě agregačního čísla. V případě Tritonu X-100 byla hodnota agregačního čísla s přídatkem hyaluronanu určeného pomocí obou metod snížena. Pomocí časově-rozlišené fluorescence bylo agregační číslo stanoveno na 113 molekul tenzidu na micelu. Pravděpodobně je to způsobeno interakcí hyaluronanu s molekulami Tritonu X-100 přes vodíkové vazby.

Pomocí zhášení fluorescence mohl být také sledován vliv náboje micely na podíl statického a dynamického zhášení a také vliv přídatku hyaluronanu na druh zhášení. U CTAB byl podíl dynamického zhášení vypočten na 35 % a podíl statického zhášení na 65 %. Po přídatku

hyaluronanu se podíl dynamického zhášení zvýšil na 63 % a podíl statického zhášení snížil na 37 %. Důvodem byla změna v organizaci micely CTAB vlivem elektrostatické interakce s hyaluronanem. U tenzidu SDS bylo zjištěno, že se dynamické zhášení na celkovém podílu v podstatě nepodílí, ale pyren je zhášen ve sféře efektivního zhášení. Důvodem je menší velikost micely, protože pyridiniový iont nebude v kontaktu s fluoroforem kvůli rozdílu velikostí hydrofobních řetězců SDS a CPC. V Tritonu X-100 bylo dominantní dynamické zhášení. Jeho podíl byl určen na 53 %. V micelách Tritonu X-100 mohou molekuly zhášeče volněji difundovat, protože molekuly CPC nejsou schopny tvořit takovou měrou jako v CTAB nefluorescentní komplex v základním stavu, což vyplývá ve vyšší podíl dynamického zhášení. Po přidání hyaluronanu byl zvýšen podíl dynamického zhášení na 56 %. Zvýšením viskozity by mělo dojít k poklesu podílu dynamického zhášení. Protože došlo ke zvýšení zastoupení dynamického zhášení, hráli větší roli interakce mezi Tritonem X-100 a hyaluronanem. U SDS byla závislost získaná rovnovážnou metodou proložena exponenciální regresní křivkou, protože se jednalo o zhášení efektivní sférou. V případě Tritonu X-100 nebyla závislost získaná rovnovážnou metodou proložena polynomickou regresní křivkou pro kombinované statické a dynamické zhášení jako tomu bylo v případě CTAB, ale byla proložena lineární regresní křivkou. Hodnoty spolehlivosti byly totožné pro lineární i polynomickou regresní křivku. Pravděpodobně pokud je v systému majoritní zastoupení dynamického zhášení, bude mít mnohem větší vliv na tvar závislosti, než zbytkový podíl statického zhášení. I u experimentů se zhášeči na bázi jodu byly všechny závislosti proloženy lineární funkcí a majoritním zhášením bylo zhášení dynamické.

Pomocí zhášení fluorescence molekulami na bázi jodu lze zkoumat pozici fluorescenční sondy v micelárním prostředí. Pyren se v micelách CTAB, vzhledem k účinnosti zhášení jodidu draselného a 3-jodpropanové kyseliny, nachází v palisádové vrstvě. Dále bylo zjištěno, že jodid draselný se v micelách CTAB bude solubilizovat v hydrofilní části micely a v palisádové vrstvě, ne jen ve vodném prostředí. V prostředí SDS se pyren pravděpodobně nachází v blízkosti hydrofobního řetězce tenzidu, tedy mezi polem působnosti 3-jodpropanové kyseliny a fenyljodidu. V Tritonu X-100 se bude pyren nacházet v blízkosti polyetylglykolového řetězce a zároveň v blízkosti benzenového jádra Tritonu X-100, protože účinnost zhášení jodbenzenem dosahuje malých hodnot a 3-jodpropanová kyselina a jodid draselný dosahují nulové účinnosti zhášení. Jodbenzen bude stabilizován v blízkosti benzenového jádra molekuly Tritonu X-100 a vzhledem k délce polyetylglykolového řetězce se k pyrenu nedostane 3-jodpropanová kyselina ani jodid draselný.

Určení relativní pozice pyrenu v micelách CTAB, SDS a Tritonu X-100 potvrzuje výsledky zhášení v těchto tenzidech pomocí CPC a také dává informaci, proč se tak výrazně změnila hodnota podílu dynamického zhášení po přidání hyaluronanu do roztoku CTAB. Protože se pyren v CTAB nachází v palisádové vrstvě, elektrostatická interakce CTAB s hyaluronanem způsobí, že se pyren může posunout do hydrofobnější oblasti micely. Protože na pyren bude působit částečně vliv záporného náboje hyaluronanu, jako tomu bylo u pyrenu v samotném SDS, může se pyren posunout do blízkosti hydrofobního řetězce tenzidu, což může značnou měrou ovlivnit podíl statického a dynamického zhášení. Pro SDS a Triton X-100 bude platit, že hyaluronan neovlivnil podíl statického a dynamického zhášení v případě Tritonu X-100, a velikost zhásecí sféry SDS takovou měrou, protože docházelo k menší nebo žádné interakci mezi Tritonem X-100 a hyaluronanem a SDS a hyaluronanem, než tomu bylo v případě CTAB. Protože se pyren v Tritonu X-100 a SDS nacházel v hydrofobnějších oblastech než v CTAB, tak hyaluronan neměl na pozici pyrenu téměř žádný vliv.

7 LITERATURA

- [1] *Uv-Visible Spectroscopy* [online]. c2005 - 2006 [cit. 2010-02-28]. Dostupné z WWW: <http://www.bookrags.com/research/uv-visible-spectroscopy-wop/>
- [2] *Beer-Lambert law* In *Wikipedia : the free encyclopedia* [online]. St. Petersburg (Florida) : Wikipedia Foundation, , 25.2.2010 [cit. 2010-03-06]. Dostupné z WWW: http://en.wikipedia.org/wiki/Beer-Lambert_law
- [3] SOMMER, Lumír. *Analytická spektrometrie I*. Praha : Státní pedagogické nakladatelství, 1986. 173 s
- [4] KLOUDA, Pavel. *Moderní analytické metody*. Ostrava : Pavel Klouda, 1996. 203 s. ISBN 80-902155-0-5
- [5] www.olympusmicro.com [online]. c2000-2009 [cit. 2010-03-01]. *Fluorescence microscopy: Basic concepts in fluorescence*. Dostupné z WWW: <http://www.olympusmicro.com/primer/techniques/fluorescence/fluorescenceintro.html>
- [6] BRDIČKA, Rudolf; DVOŘÁK, Jiří. *Základy fyzikální chemie*. Praha : Nakladatelství Československé akademie věd, 1977. 852 s
- [7] VALEUR, Bernard. *Molecular fluorescence : Principles and applications*. Wiley-VCH Verlag GmbH, 2001. 381 s. ISBN 3-527-29919-X
- [8] LAKOWICZ, Joseph R. *Principles of fluorescence spectroscopy* [online]. Baltimore : School of medicine (University of Maryland), 2006 [cit. 2010-03-08]. ISBN 0-387-31278-1. Dostupné z WWW: <http://books.google.cz/books?id=-PSybuLNxcAC&pg=PA277&dq=fluorescence+quenching&cd=1#v=onepage&q=fluorescence%20quenching&f=false>
- [9] *Fluorofory v biomedicíně* [online]. [cit. 2010-03-08]. Dostupné z WWW: <http://www1.lf1.cuni.cz/~zfishar/fluorescence/soubory/fluorofory.htm>
- [10] POUCHLÝ, Julius. *Fyzikální chemie makromolekulárních a koloidních soustav*. Praha : Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Fakulta chemicko-inženýrská, 2001. 198 s. ISBN 80-7080-422-X
- [11] BARTOVSKÁ, Lidmila; ŠIŠKOVÁ, Marie. *Fyzikální chemie povrchů a koloidních soustav*. Praha : Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Fakulta chemicko-inženýrská, 2002. 192 s. ISBN 80-7080-475-0
- [12] KAKEHI, Kazuaki, Mitsuhiro KINOSHITA a Shin-ichi YASUEDA. Hyaluronic acid: separation and biological implications. *Journal of Chromatography B*. 2003, roč. 797, 1-2, s. 347-355. ISSN 15700232. DOI: 10.1016/S1570-0232(03)00479-3. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1570023203004793>
- [13] PRICE, Richard D., M.G. BERRY a Harshad A. NAVSARIA. Hyaluronic acid: the scientific and clinical evidence. *Journal of Plastic, Reconstructive*. 2007, roč. 60, č. 10, s. 1110-1119. ISSN 17486815. DOI: 10.1016/j.bjps.2007.03.005. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1748681507001805>
- [14] HASCALL, Vincent C.; LAURENT, Torvard C. *Glycoforum.gr.jp* [online]. 15.12.2007 [cit. 2010-03-13]. *Hyaluronan: Structure and Physical Properties*. Dostupné z WWW: <http://www.glycoforum.gr.jp/science/hyaluronan/HA01/HA01E.html#VIII>

- [15] BORUAH, Bornali, Palash M. SAIKIA, Biren GOHAIN a Robin K. DUTTA. Partition equilibrium of phenol red in aqueous polymer-surfactant system: Determination of critical aggregation concentration. *Journal of Molecular Liquids*. 2010, roč. 151, č. 1, s. 81-85. ISSN 01677322. DOI: 10.1016/j.molliq.2009.11.007. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0167732209002463>
- [16] BAKSHI, Mandeep S.; KAUR, I. Surfactant-polymer aggregates of mixed cationic micelles and anionic polyelectrolytes: a surfactant head group contribution. *Progress in Colloid and Polymer Science*. 2003, 122, s. 37-46. Dostupný také z WWW: <http://www.springerlink.com/content/57ru46497635x007/>
- [17] 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
- [18] KASHA, Michael. Collisional Perturbation of Spin - Orbital Coupling and the Mechanism of Fluorescence Quenching: A Visual Demonstration of the Perturbation. *Journal of Chemical Physics*. 1952, roč. 20. DOI: 10.1063/1.1700199
- [19] 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*. 1969, roč. 73, č. 12, s. 4130-4135. ISSN 0022-3654. DOI: 10.1021/j100846a015. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/j100846a015>
- [20] GRINVALD, A a I STEINBERG. On the analysis of fluorescence decay kinetics by the method of least-squares. *Analytical Biochemistry*. 1974, roč. 59, č. 2, s. 583-598. ISSN 00032697. DOI: 10.1016/0003-2697(74)90312-1. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0003269774903121>
- [21] PERIASAMY, N. Analysis of Fluorescence Decay by the Nonlinear Least Squares Method. *Biophysical Journal*. 1988, roč. 54, č. 5, s. 961-967. ISSN 00063495. DOI: 10.1016/S0006-3495(88)83032-7. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006349588830327>
- [22] WARE, William R., Laurence J. DOEMENY a Thomas L. NEMZEK. Deconvolution of fluorescence and phosphorescence decay curves. Least-squares method. *The Journal of Physical Chemistry*. 1973, roč. 77, č. 17, s. 2038-2048. ISSN 0022-3654. DOI: 10.1021/j100636a003. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/j100636a003>
- [23] SILLEN, Alain a Yves ENGELBORGHES. The Correct Use of "Average" Fluorescence Parameters. *Photochemistry and Photobiology*. 1998, roč. 67, č. 5, s. 475-486. ISSN 0031-8655. DOI: 10.1111/j.1751-1097.1998.tb09082.x. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1751-1097.1998.tb09082.x>
- [24] HORIBA JOBIN YVON. DAS6 Fluorescence decay analysis software: User guide
- [25] STRICKLER, S. J. a Robert A. BERG. Relationship between Absorption Intensity and Fluorescence Lifetime of Molecules. *The Journal of Chemical Physics*. 1962, roč. 37, č. 4, s. 814-. ISSN 00219606. DOI: 10.1063/1.1733166. Dostupné z: <http://link.aip.org/link/JCPSA6/v37/i4/p814/s1>
- [26] SUPPAN, Paul. *Chemistry and Light*. Cambridge: The Royal Society of Chemistry, 1994. ISBN 0-85186-814-2

- [27] BioFiles for life science research: Detergents and Solubilization Reagents. SIGMA-ALDRICH. [online]. [cit. 2012-04-20]. Dostupné z: http://www.sigmaaldrich.com/etc/medialib/docs/Sigma/General_Information/2/biofiles_issue3_3.Par.0001.File.tmp/biofiles_issue3_3.pdf
- [28] AGUIAR, J., P. CARPENA, J.A. MOLINA-BOLÍVAR, C. CARNERO RUIZ. On the determination of the critical micelle concentration by the pyrene 1:3 ratio method: 3 ratio method. *Journal of Colloid and Interface Science*. 2003-02-01, roč. 258, č. 1, s. 116-122. ISSN 00219797. DOI: 10.1016/S0021-9797(02)00082-6. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021979702000826>
- [29] DOMÍNGUEZ, Ana, Aurora FERNÁNDEZ, Noemí GONZÁLEZ, Emilia IGLESIAS a Luis MONTENEGRO. Determination of Critical Micelle Concentration of Some Surfactants by Three Techniques. *Journal of Chemical Education*. 1997, roč. 74, č. 10, s. 1227-1231
- [30] 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. *Langmuir*. 1998, roč. 14, č. 19, s. 5412-5418. ISSN 0743-7463. DOI: 10.1021/la980565x. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/la980565>
- [31] ROELANTS, E. a F. C. DE SCHRYVER. Parameters affecting aqueous micelles of CTAC, TTAC, and DTAC probed by fluorescence quenching. *Langmuir*. 1987, roč. 3, č. 2, s. 209-214. ISSN 0743-7463. DOI: 10.1021/la00074a011. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/la00074a011>
- [32] MOULIK, Satya Priya, Md. Emdadul HAQUE, Pijush Kanti JANA a Akhil Ranjan DAS. Micellar Properties of Cationic Surfactants in Pure and Mixed States. *The Journal of Physical Chemistry*. 1996, roč. 100, č. 2, s. 701-708. ISSN 0022-3654. DOI: 10.1021/jp9506494. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jp9506494>
- [33] LOVE, L. J. Cline, Joseph G. HABARTA a John G. DORSEY. The micelle-analytical chemistry interface. *Analytical Chemistry*. 1984, roč. 56, č. 11, 1132A-1148A. ISSN 0003-2700. DOI: 10.1021/ac00275a001. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ac00275a001>
- [34] SÁNCHEZ, F.García a C.Carnero RUIZ. Intramolecular energy transfer in aqueous CTAB solutions. *Journal of Luminescence*. 1996, roč. 69, č. 4, s. 179-186. ISSN 00222313. DOI: 10.1016/S0022-2313(96)00116-0. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022231396001160>
- [35] GEHLEN, Marcelo H. a Frans C. DE SCHRYVER. Time-resolved fluorescence quenching in micellar assemblies. *Chemical Reviews*. 1993, roč. 93, č. 1, s. 199-221. ISSN 0009-2665. DOI: 10.1021/cr00017a010. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/cr00017a010>
- [36] BHATTACHARYA, Subhash C., Hari T. DAS a Satya P. MOULIK. Quenching of fluorescence of 2-anthracene sulphonate by cetylpyridinium chloride in micellar solutions of Tweens, Triton X-100, sodium dodecylsulphate (SDS) and cetyltrimethylammonium bromide (CTAB). *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*. 1993, roč. 71, č. 3, s. 257-262. ISSN 10106030. DOI: 10.1016/1010-6030(93)85007-U. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/101060309385007U>

- [37] DE, Swati, Agnishwar GIRIGOSWAMI a Anil Kumar MANDAL. Energy transfer - a tool for probing micellar media. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 2003, roč. 59, č. 11, s. 2487-2496. ISSN 13861425. DOI: 10.1016/S1386-1425(03)00043-X. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S138614250300043X>
- [38] WU, P. Resonance Energy Transfer: Methods and Applications. *Analytical Biochemistry*. roč. 218, č. 1, s. 1-13. ISSN 00032697. DOI: 10.1006/abio.1994.1134. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/doi/10.1006/abio.1994.1134>
- [39] ROLLER, Robert S. a Mitchell A. WINNIK. The Determination of the Förster Distance (R_0) for Phenanthrene and Anthracene Derivatives in Poly(methyl methacrylate) Films. *The Journal of Physical Chemistry B*. 2005, roč. 109, č. 25, s. 12261-12269. ISSN 1520-6106. DOI: 10.1021/jp0443355. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jp0443355>
- [40] STÖFERLE, Thilo, Ullrich SCHERF a Rainer F. MAHRT. Energy Transfer in Hybrid Organic/Inorganic Nanocomposites. *Nano Letters*. 2009-01-14, roč. 9, č. 1, s. 453-456. ISSN 1530-6984. DOI: 10.1021/nl8034465. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/nl8034465>
- [41] DEUMIÉ, Michel, Mohamed EL BARAKA a Edwin QUINONES. Fluorescence quenching of pyrene derivatives by iodide compounds in erythrocyte membranes: an approach of the probe location. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*. 1995, roč. 87, č. 2, s. 105-113. ISSN 10106030. DOI: 10.1016/1010-6030(94)03974-Y. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/101060309403974Y>
- [42] KATHIRAVAN, A., V. ANBAZHAGAN, M. ASHA JHONSI a R. RENGANATHAN. Interaction of meso-tetrakis (p-sulfonatophenyl) porphyrin (TSPP) with pyrimidines: A steady state and time-resolved fluorescence quenching study. *Journal of Molecular Structure*. 2009, roč. 919, 1-3, s. 79-82. ISSN 00222860. DOI: 10.1016/j.molstruc.2008.08.013. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022286008005541>
- [43] GUAN, J. Dynamics of Fluorescence Quenching of Pyrene in Novel Micelles of the Zwitterionic Betaine Surfactant N-(3-Dodecyloxy-2-hydroxypropyl)-N,N-dimethylglycine. *Journal of Colloid and Interface Science*. 1998-12-01, roč. 208, č. 1, s. 90-95. ISSN 00219797. DOI: 10.1006/jcis.1998.5754. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S002197979895754X>
- [44] YAN, P, C JIN, C WANG, J YE a J XIAO. Effect of surfactant head group size on polyelectrolyte?surfactant interactions: steady-state and time-resolved fluorescence study. *Journal of Colloid and Interface Science*. 2005-02-1, roč. 282, č. 1, s. 188-192. ISSN 00219797. DOI: 10.1016/j.jcis.2004.08.164. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021979704008677>
- [45] SEN, Sobhan, Dipankar SUKUL, Partha DUTTA a Kankan BHATTACHARYYA. Solvation Dynamics in Aqueous Polymer Solution and in Polymer-Surfactant Aggregate. *The Journal of Physical Chemistry B*. 2002, roč. 106, č. 15, s. 3763-3769. ISSN 1520-6106. DOI: 10.1021/jp0118672. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jp0118672>

- [46] SZAJDZINSKA-PIETEK, Ewa a Marian WOLSZCZAK. Quenching of pyrene fluorescence by amphiphilic nitroxide radicals embedded in cationic micelles. *Chemical Physics Letters*. 1997, roč. 270, 5-6, s. 527-532. ISSN 00092614. DOI: 10.1016/S0009-2614(97)00395-3. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0009261497003953>
- [47] WATTEBLED, Laurent, André LASCHEWSKY, Alain MOUSSA a Jean-Louis HABIB-JIWAN. Aggregation Numbers of Cationic Oligomeric Surfactants: A Time-Resolved Fluorescence Quenching Study. *Langmuir*. 2006, roč. 22, č. 6, s. 2551-2557. ISSN 0743-7463. DOI: 10.1021/la052414h. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/la052414h>
- [48] XIE, Yun, Tucker MAXSON a Yitzhak TOR. Fluorescent Ribonucleoside as a FRET Acceptor for Tryptophan in Native Proteins. *Journal of the American Chemical Society*. 2010, roč. 132, č. 34, s. 11896-11897. ISSN 0002-7863. DOI: 10.1021/ja105244t. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ja105244t>
- [49] LAKOWICZ, Joseph R., Ignacy GRYCZYNSKI, Wieslaw WICZK, Gabor LACZKO, Franklyn C. PRENDERGAST a Michael L. JOHNSON. Conformational distributions of mellitin in water/methanol mixtures from frequency-domain measurements of nonradiative energy transfer. *Biophysical Chemistry*. 1990, č. 36, s. 99-115
- [50] INFELTA, P. P., M. GRATZEL a J. K. THOMAS. Luminescence decay of hydrophobic molecules solubilized in aqueous micellar systems. Kinetic model. *The Journal of Physical Chemistry*. 1974, roč. 78, č. 2, s. 190-195. ISSN 0022-3654. DOI: 10.1021/j100595a021. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/j100595a021>
- [51] TACHIYA, Masanori. Application of a generating function to reaction kinetics in micelles. Kinetics of quenching of luminescent probes in micelles. *Chemical Physics Letters*. 1975, roč. 33, č. 2, s. 289-292. ISSN 00092614. DOI: 10.1016/0009-2614(75)80158-8. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0009261475801588>
- [52] ALMGREN, Mats, Jan Erik LEOFROTH a Jan VAN STAM. Fluorescence decay kinetics in monodisperse confinements with exchange of probes and quenchers. *The Journal of Physical Chemistry*. 1986, roč. 90, č. 18, s. 4431-4437. ISSN 0022-3654. DOI: 10.1021/j100409a043. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/j100409a043>
- [53] EFTINK, M. R. a C. A. GHIRON. Fluorescence quenching of indole and model micelle systems. *The Journal of Physical Chemistry*. 1976, roč. 80, č. 5, s. 486-493. ISSN 0022-3654. DOI: 10.1021/j100546a014. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/j100546a014>

8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

PAL	povrchově aktivní látky
CMC	kritická micelární koncentrace
CAC	kritická agregační koncentrace
CTAB	cetyltrimethylamonium bromid
SDS	dodecylsírán sodný
Triton X-100	polyoxyethylen(9,5)oktylfenol
CPC	cetylpyridinium chlorid
C ₁₂ NB	dodecyltributylammonium bromid
TNS	2,6-p-toluidinonaphthalen sulfonát
PVP	poly(vinylpyrrolidonu)
CFD	constant function discriminator
TAC	time-to-amplitude convertor
PGA	programmable gain amplifier
ADC	analog-to-digital converter
TCSPC	time-correlated single photon counting
EmPI	emisní polaritní index
UV-VIS	ultrafialová a viditelná oblast elektromagnetického spektra
NATA	<i>N</i> -acetyl- <i>L</i> -tryptophanamide
OD	optická hustota
SS	steady-state fluorescence
TR	časově-rozlišená fluorescence
k_r	rychlost zářivého přechodu
k_{nr}	rychlost nezářivého přechodu
Φ	kvantový výtěžek fluorescence
τ_s	doba života excitovaného stavu
τ_r	přírodní doba života
λ	vlnová délka
T	transmitance
I_0	dopadající zářivý tok
I	prošlý zářivý tok
A	absorbance
ε	molární absorpční koeficient
l	tloušťka absorbující vrstvy
c	koncentrace vzorku
S_0	základní singletová hladina
S^*	excitovaný singlet
T^*	excitovaný triplet
[A]	koncentrace látky A
[A*]	koncentrace látky A v excitovaném stavu
F	intezita fluorescence v přítomnosti zhášedce
F_0	intenzita fluorescence v nepřítomnosti zhášedce
k_q	rychlostní konstanta zhášení

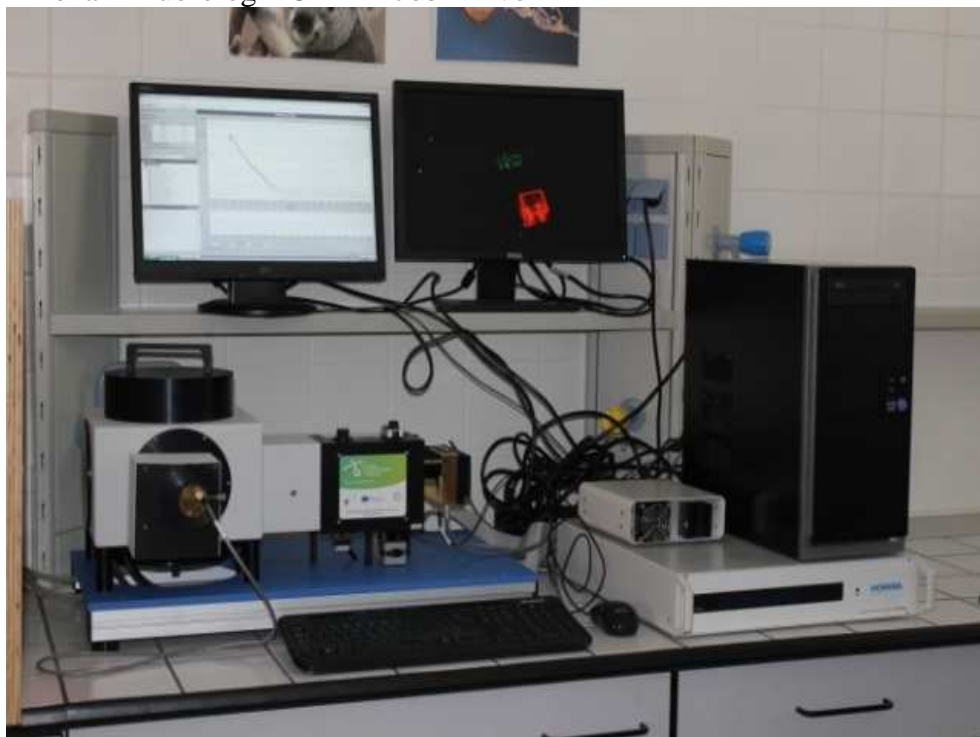
τ_0	doba života fluoroforu bez přítomnosti zhášedce
[Q]	koncentrace zhášedce
K_D	Stern-Volmerova konstanta zhášení
γ	poměr rychlosti vyhasínání fluorescence v nepřítomnosti zhášedce
V_q	objem zhášedcí sféry
N_a	Avogadrova konstanta
P_0	pravděpodobnost výskytu zhášedce uvnitř objemu zhášedcí sféry
K_S	konstanta stability nefluorescentního komplexu = Stern-Volmerova konstanta statického zhášení tvorbou nefluorescentního komplexu
$N(t_k)$	naměřená data
$N_c(t_k)$	použitý matematický model
χ^2	hodnota správnosti proložení
σ_k	standardní odchylka každého datového bodu
n	počet dat
χ_R^2	hodnota redukované správnosti proložení
p	počet parametrů volnosti
v	počet stupňů volnosti
A	fitovací parametr (při vyhodnocování doby života)
B	předexponenciální funkce
τ_a	průměrná doba života
F_{corr}	korigovaná intenzita fluorescence
F_{obs}	pozorovaná intenzita fluorescence
OD_{ex}	optická hustota při excitační vlnové délce
OD_{em}	optická hustota při emisní vlnové délce
y	poměr intenzit prvního a třetího píku pyrenu
x	celková koncentrace tenzidu
A_1	horní limita sigmoidní křivky
A_2	dolní limita sigmoidní křivky
x_0	inflexní bod sigmoidní křivky
Δx	gradient sigmoidní křivky
[S]	koncentrace tenzidu
N_{SS}	agregační číslo určené pomocí steady-state metody
C	poměr koncentrace zhášedce a micel
N_D	agregační číslo určené pomocí časově-rozlišené metody
$F(0)$	intenzita fluorescence v čase 0
$F(t)$	intenzita fluorescence v čase t

9 PŘÍLOHY

Příloha 1 *Luminiscenční spektrometr, Fluorolog HORIBA Jobin Yvon*



Příloha 2 Fluorolog HORIBA Jobin Yvon



Příloha 3 *UV-VISIBLE Spektrofotometr, Cary 50 Probe*

