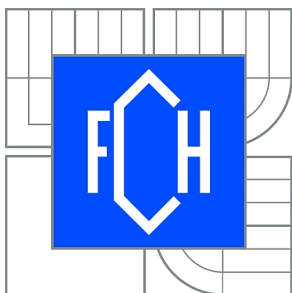


VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ

CENTRUM MATERIÁLOVÉHO VÝZKUMU

FACULTY OF CHEMISTRY

MATERIALS RESEARCH CENTRE

STUDIUM KINETIKY PŘENOSU PROTONU V EXCITOVANÉM STAVU V SYSTÉMU POLYMER-TENZID

KINETIC STUDY OF EXCITED STATE PROTON TRANSFER IN POLYMER-SURFACTANT
SYSTEM

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

JANA BAČOVÁ

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. FILIP MRAVEC, Ph.D.

BRNO 2014



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

Zadání bakalářské práce

Číslo bakalářské práce:	FCH-BAK0784/2013	Akademický rok: 2013/2014
Ústav:	Centrum materiálového výzkumu	
Student(ka):	Jana Bačová	
Studijní program:	Chemie a chemické technologie (B2801)	
Studijní obor:	Chemie pro medicínské aplikace (2808R031)	
Vedoucí práce	Ing. Filip Mravec, Ph.D.	
Konzultanti:	Ing. Jakub Mondek Ing. Tereza Halasová, Ph.D.	

Název bakalářské práce:

Studium kinetiky přenosu protonu v excitovaném stavu v systému polymer-tenzid

Zadání bakalářské práce:

- 1) Shromáždit literární poznatky o využití přenosu protonu v excitovaném stavu v koloidních systémech.
- 2) Seznámit se s měřením stacionární a časově rozlišené fluorescence sond podstupujících přenos protonu v excitovaném stavu.
- 3) Navrhnout a provést experimenty pro charakterizaci chování hyaluronanu při interakci s amfifilními látkami pomocí přenosu protonu v excitovaném stavu.
- 4) Zhodnotit výsledky ve vztahu k ovlivnění vnitřního prostředí koloidu hyaluronanem.

Termín odevzdání bakalářské práce: 23.5.2014

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

Jana Bačová
Student(ka)

Ing. Filip Mravec, Ph.D.
Vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
Ředitel ústavu

V Brně, dne 31.1.2014

prof. Ing. Jaromír Havlica, DrSc.
Děkan fakulty

ABSTRAKT

V této bakalářské práci byly studovány interakce mezi hyaluronanem a kationtovým septonexem pomocí stacionární a časově rozlišené fluorescence využitím fluorescenční sondy pyrenu a 1-naftolu. Nejprve byla zjištěna kritická micelární koncentrace septonexu. V případě obou fluorescenčních sond byla studována oblast pod a nad kritickou micelární koncentrací. Bylo zjištěno, že 1-naftol podléhá velmi rychlé deprotonaci ve vodném roztoku, zatímco v přítomnosti micel je rychlost deprotonace významně snížena. V systému hyaluronan – septonex se ukázalo, že tvorba agregátů nastává při nižších koncentracích, než je tomu u systému bez hyaluronanu. Molekuly sondy jsou nad kritickou micelární koncentrací pravděpodobně rozděleny mezi hyaluronan – septonex agregáty a volné micely.

ABSTRACT

In this bachelor thesis were studied interactions between hyaluronic acid and cationic septonex by steady-state and time-resolved fluorescence with fluorescence probes pyrene and 1-naphthol. At first was determined critical micelle concentration of septonex. In the case of both fluorescence probes was studied area below and above critical micelle concentration. It was found, that 1-naphthol undergo very fast deprotonation in aqueous solution, while in the present of micelles the rate of deprotonation is significantly retarded. In the system of hyaluronic acid – septonex it was observed, that formation of aggregates occurs at lower concentrations than in the system without hyaluronic acid. Molecules of probe are probably distributed between hyaluronic acid – septonex aggregates and free micelles above critical micelle concentration.

KLÍČOVÁ SLOVA

Kyselina hyaluronová, tenzid, pyren, 1-naftol, přenos protonu v excitovaném stavu, stacionární a časově rozlišená fluorescence

KEY WORDS

Hyaluronic acid, surfactant, pyrene, 1-naphthol, excited state proton transfer, steady-state and time-resolved fluorescence

BAČOVÁ, J. *Studium kinetiky přenosu protonu v excitovaném stavu v systému polymer-tenzid*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2014. 39 s. Vedoucí bakalářské práce Ing. Filip Mravec, Ph.D.

PROHLÁŠENÍ

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

.....
podpis studenta

Na tomto místě bych velmi ráda poděkovala vedoucímu mé bakalářské práce Ing. Filipu Mravcovi, Ph.D., konzultantce Ing. Tereze Halasové, Ph.D. a hlavně také konzultantovi Ing. Jakubu Mondekovi za jeho čas, odborný dohled a cenné připomínky, díky nimž mohla tato práce vzniknout. Poděkování patří i mým nejbližším za obrovskou podporu během studia.

OBSAH

1 ÚVOD	7
2 TEORETICKÁ ČÁST.....	8
2.1 Luminiscence.....	8
2.1.1 Fosforescence	8
2.1.2 Fluorescence.....	8
2.1.3 Fluorescenční sondy	8
2.1.3.1 Pyren.....	8
2.1.3.2 1-Naftol	9
2.1.4 Jablůnskiho diagram.....	10
2.1.5 Stacionární a časově rozlišená fluorescence.....	10
2.1.5.1 Metoda time – correlated single – photon counting	11
2.2 Přenos protonu v excitovaném stavu	13
2.2.1 Intramolekulární přenos protonu v excitovaném stavu	14
2.3 Asociativní (micelární) koloidy.....	14
2.3.1 Dělení povrchově aktivních látek.....	15
2.3.2 Vznik micel	15
2.3.3 Obrácené micely.....	16
2.4 Hyaluronan	16
2.4.1 Chemická struktura hyaluronanu.....	17
2.4.2 Výskyt, vlastnosti a použití hyaluronanu	17
2.4.3 Syntéza a odbourávání hyaluronanu.....	18
3 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY.....	19
4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	22
4.1 Použité chemikálie	22
4.2 Přístroje a zařízení	22
4.2.1 Přístroj Fluorolog	22
4.2.2 Přístroj Fluorocube	22
4.3 Příprava zásobních roztoků fluorescenční sondy	23
4.4 Příprava zásobních roztoků hyaluronanu	23
4.5 Příprava zásobního roztoku tenzidu	23
4.6 Příprava vzorků	23
4.6.1 Příprava vzorků pro měření kritické micelární koncentrace	23
4.6.2 Interakce tenzidu se systémem polyelektrolyt – fluorescenční sonda	23
4.7 Vlastní měření	24
4.7.1 Měření emisních spekter.....	24

4.7.2	Měření dob života 1-naftolu	24
4.8	Vyhodnocení	24
4.8.1	Stanovení kritické micelární koncentrace.....	24
4.8.2	Studium kinetiky 1-naftolu.....	25
5	VÝSLEDKY A DISKUZE	26
5.1	Měření kritické micelární koncentrace septonexu s pyrenem	26
5.2	Měření kritické micelární koncentrace septonexu s 1-naftolem.....	26
5.3	Interakce septonexu s hyaluronanem o koncentraci 7 mg/L	29
5.3.1	Interakce septonexu a hyaluronanu pomocí fluorescenční sondy pyrenu	29
5.3.2	Interakce septonexu a hyaluronanu pomocí fluorescenční sondy 1-naftolu.....	30
6	ZÁVĚR.....	33
7	LITERATURA.....	35
	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ	37
8	PŘÍLOHY	38

1 ÚVOD

Na světě existuje látka, kterou se vědci zabývají již osm desetiletí a tvrdí, že s jejím využitím jsou stále ještě na začátku. Je řeč o kyselině hyaluronové. V dnešní době je tato látka známá i široké veřejnosti jako přísada v nosních sprejích či v kosmetických přípravcích proti vráskám. Její potenciál ale sahá mnohem výše. Výzkum kyseliny hyaluronové je soustředěn na vývoj nosičů pro cílenou distribuci léčiv a to z důvodu, že s rakovinou je spojená stále vysoká úmrtnost. Bylo prokázáno, že na povrchu rakovinných buněk se hojně vyskytují receptory CD44 a RHAMM, které na sebe váží hyaluronan. V těchto místech se hyaluronan nachází ve vysoké koncentraci, což vede k urychlení růstu nádoru a jeho metastázám. Imunitní systém se díky hyaluronanu proti rakovinným buňkám nebrání. Jedna z možností léčby rakovinného bujení je podávání cytostatik. Jejich působením je zastaven růst nádorových buněk. Problémem však je, že je tento efekt nespecifický a zasahuje i zdravou tkáň, což způsobuje silně nežádoucí účinky jako je nevolnost, ztráta vlasů, zvracení atp.

Cílená distribuce léčiv by však mohla tyto potíže vyřešit. Do organismu by se vpravilo polymerní micelární léčivo tvořené hyaluronanem s navázaným kationtovým tenzidem. Léčivá látka zakomponovaná v jádře micely by se tak dostala ve vysoké koncentraci přímo k rakovinným buňkám a to právě díky interakci hyaluronanu s receptory CD44 a RHAMM. Byla by tak zajištěna dostatečně selektivní a efektivní léčba bez všech nežádoucích účinků.

V této bakalářské práci je studován systém hyaluronan s kationtovým tenzidem pomocí stacionární a časově rozlišené fluorescence. Stacionární a časově rozlišená fluorescence patří mezi nejrozšířenější metody, které popisují fyzikální, chemické a biologické systémy. Jsou ale využívány i v klinické chemii, při monitorování prostředí, buněčném zobrazování či genetických analýzách. Pomocí těchto metod můžeme odhalit mnoho informací o daném systému, např. k jakým interakcím v systému dochází a jak se bude daný systém chovat.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Luminiscence

Luminiscence je emise světla jakékoliv látky, která nastává excitací elektronu působením jiného záření, například tepelného záření atp. Existuje více druhů luminiscence, např. chemiluminiscence (patří sem i bioluminiscence), fotoluminiscence atd. Fotoluminiscence se dělí v závislosti na povaze excitovaného stavu. Jedná se o fosforescenci a fluorescenci.

2.1.1 Fosforescence

Fosforescence je emise světla vycházející z tripletového excitovaného stavu, ve kterém má elektron v excitovaném orbitalu stejně orientovaný spin jako elektron v základním stavu. Přechod do základního stavu je zakázaný. Fosforeskující látky září po několik minut, zatímco se excitovaný elektron pomalu vrací do základního stavu [1].

2.1.2 Fluorescence

Sir John Frederick William Herschel v roce 1845 poprvé pozoroval fluorescenci chininu, který je přítomný například v toniku. Je možné vidět slabý modrý odlesk na povrchu toniku, který je vystaven ultrafialovému záření. V excitovaném singletovém stavu má elektron opačný (antiparalelní) spin s elektronem v základním stavu. Při návratu elektronu ze singletového stavu S_1 do základního stavu S_0 dochází velmi rychle k emisi fotonu. Doba života fluorescence je v řádu nanosekund. Fluorescence se vyskytuje nejčastěji u aromatických molekul, zřídka pozorujeme fluorescenci i u anorganických molekul [2]. Takové látky, které mohou po absorpci záření část přijaté energie vyzářit ve formě světla, se nazývají fluorofory. Jedná se o vyzáření ze singletového stavu, nikoliv z tripletového.

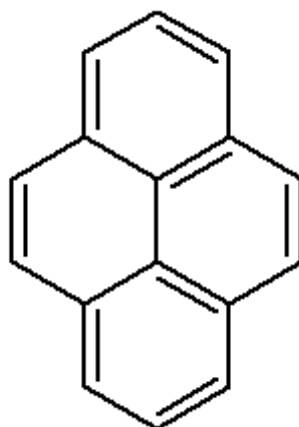
2.1.3 Fluorescenční sondy

Fluorescenční sondy se využívají pro cílené značení molekul. Jedná se o nevlastní fluorofory, které se ke zkoumané molekule vážou nekovalentně a mění přitom své fluorescenční vlastnosti. Důležitým faktorem k poskytnutí potřebných informací je volba fluorescenční sondy. Například při použití akridinové oranže jako fluorescenční sondy můžeme vizualizovat a identifikovat chromozomy nukleových kyselin, naopak použitím 2-*p*-toluidinonaftalen-6-sulfonátu lze zkoumat polaritu prostředí [3].

2.1.3.1 Pyren

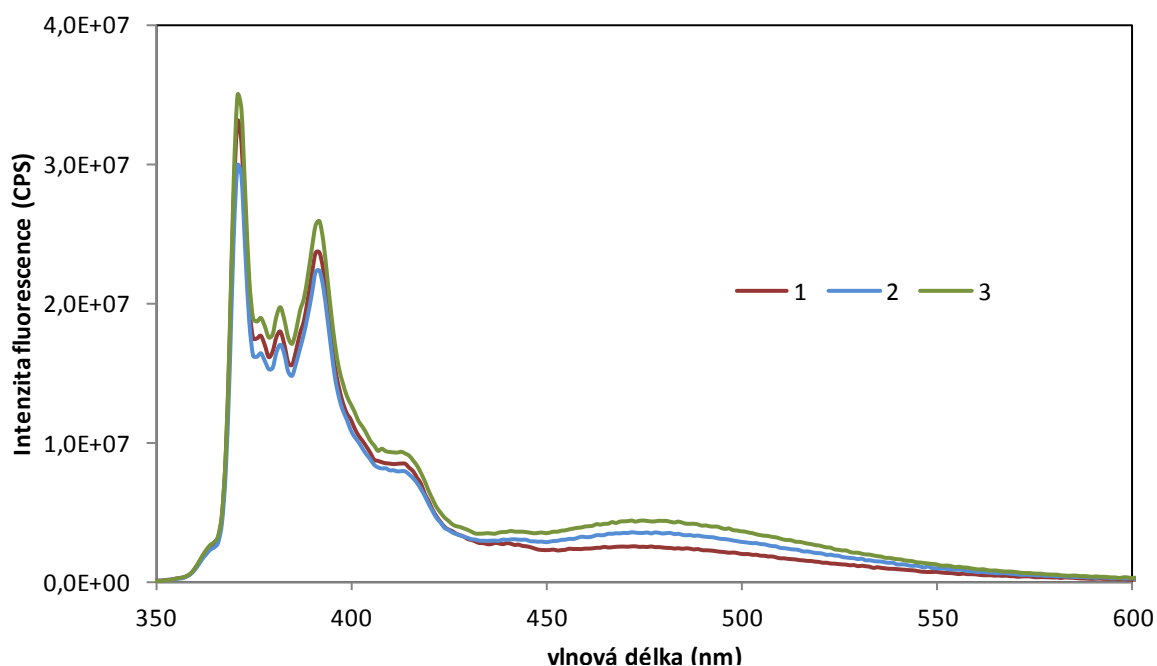
Jedná se o polycyklický aromatický uhlovodík, který sestává ze čtyř spojených benzenových kruhů a který se vyznačuje vysokou symetrií.

Pyren je často využívaná fluorescenční sonda, která reaguje na polaritu prostředí. Při zkoumání polarity prostředí se využívá intenzita fluorescence při vlnové délce $\lambda = 373$ a 383 nm, což odpovídá prvnímu a třetímu vibračnímu pásu. Poměr intenzit těchto dvou pásů - I_1/I_3 se označuje jako emisní polaritní index (EmPI), který poskytuje informaci o polaritě v okolí pyrenu, čehož se využívá při stanovení kritické micelární koncentrace (CMC) [4], [5].



Obr. 1: *Struktura pyrenu*

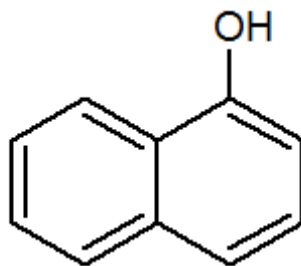
Kolem kritické micelární koncentrace vzniká excimer (Ex), jehož maximum intenzity fluorescence se nachází při vlnové délce $\lambda = 470$ nm. Při stanovení CMC se využívá také poměr excimer ku monomeru (Ex:Mo). Maximum intenzity fluorescence monomeru se nachází při vlnové délce $\lambda = 373$ nm, která odpovídá prvnímu emisnímu píku pyrenu.



Obr. 2: *Emisní spektrum pyrenu, kde se koncentrace tenzidu zvyšuje od 1 po 3 kolem kritické micelární koncentrace*

2.1.3.2 1-Naftol

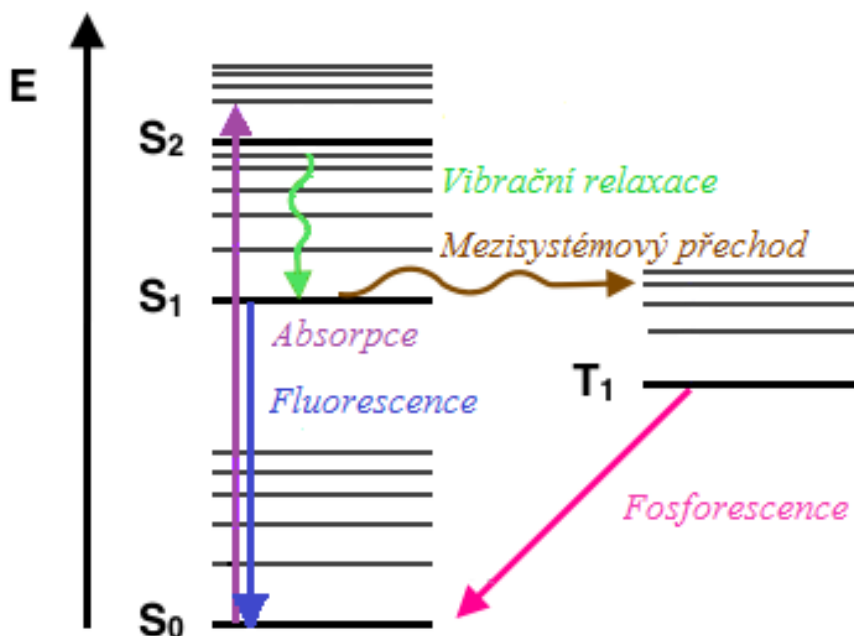
1-Naftol je aromatická uhlovodíková sloučenina s chemickým vzorcem $C_{10}H_7OH$. Za normálních podmínek je to bezbarvá krystalická látka. Hydroxylová skupina naftolu je mnohem reaktivnější než u fenolů. Jedná se tedy o fluorescenční sondu, která díky reaktivnosti hydroxylové skupiny podstupuje přenos protonu v excitovaném stavu [14], [15].



Obr. 3: Struktura 1-naftolu

2.1.4 Jabloňského diagram

Procesy, ke kterým dochází mezi absorpcí a emisí světla, jsou obvykle ilustrovány pomocí Jabloňského diagramu. Diagram znázorňuje základní a dvě excitované singletové hladiny S_0 , S_1 a S_2 . V každé z těchto elektronových energetických hladin může fluorofor existovat v celé řadě vibračních energetických hladin 0, 1, 2 atp. Přechody mezi stavy jsou ilustrovány svislými čarami. Po absorpci světla je fluorofor excitován do vyšší vibrační hladiny buď S_1 , S_2 nebo i výše. Absorpce a emise se vyskytují převážně u molekul s nejnižší vibrační energií. Molekuly v kapalných roztocích se rychle uvolňují do nižší vibrační hladiny S_1 . Jedná se o tzv. vibrační relaxaci. Nezářivý přechod elektronu z vyššího excitovaného stavu na nižší excitovaný stav je označován jako vnitřní konverze. Molekuly, jejichž dvojice elektronů v excitovaném tripletovém stavu mají stejný (paralelní) spin, v S_1 podléhají konverzi spinu do prvního tripletového stavu T_1 . Emise z T_1 se nazývá fosforescence. Přechod elektronu z S_1 na T_1 se nazývá mezisystémový přechod. Přechod elektronu z T_1 na základní singletový stav je zakázaný. Přechod z S_1 na S_0 se nazývá fluorescence.



Obr. 4: Jabloňského diagram

2.1.5 Stacionární a časově rozlišená fluorescence

Měření fluorescence může být klasifikováno do dvou typů měření: stacionární a časově rozlišená fluorescence. Stacionární fluorescence je běžnějším typem měření. Vzorek je

osvětlen kontinuálním paprskem světla a je měřena intenzita fluorescence. Dostáváme střední hodnotu intenzity fluorescence. Intenzita stacionární fluorescence je dána rovnicí [1]:

$$I_{ss} = \int_0^{\infty} I_0 \cdot e^{-t/\tau} dt = I_0 \tau ,$$

kde τ je doba života a I_0 je intenzita fluorescence v čase $t = 0$. Hodnota I_0 závisí na koncentraci fluoroforu. Intenzita stacionární fluorescence je tedy přímo úměrná době života.

Časově rozlišená fluorescence se využívá při měření poklesu anizotropie fluorescence a poklesu intenzity v čase, díky kterým dostáváme informaci o době života fluoroforu. Anizotropie fluorescence poskytuje informace o rotačních pohybech fluoroforu. Vzorek je vystaven pulzu budícího záření. Délka pulzu je obvykle kratší než doba života vzorku. Časově rozlišená fluorescence je široce využívána díky informacím, které jsou dostupné z údajů ve srovnání se stacionárním měřením. Stacionární měření poskytne pouze průměrnou hodnotu intenzity fluorescence. Mnoho informací o molekule je tak ztraceno. Časově rozlišené měření fluorescence poskytuje informace o době setrvání fluoroforu v excitovaném stavu a počtu dob života. Například makromolekuly mohou existovat ve více než jedné konformaci a doba života vázané sondy může na konformaci záviset. Vyhasínání fluorescence může ukázat dvě doby života a tedy přítomnost více než jednoho konformačního stavu. Při přenosu energie vyhasínání fluorescence ukazuje, jak jsou akceptory distribuovány v prostoru kolem donorů. Časově rozlišená fluorescence ukazuje, zda je zhášení v důsledku dynamického zhášení nebo vzniku komplexu s fluoroforem v základním stavu. Intenzita a anizotropie časově rozlišené fluorescence je dána exponenciální závislostí [1]:

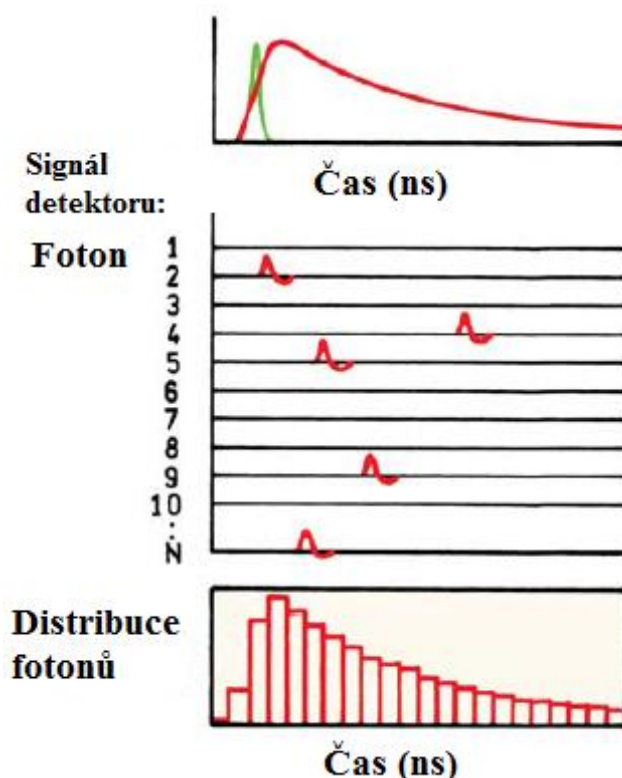
$$I = I_0 \cdot e^{-t/\tau}$$

$$r = r_0 \cdot e^{-t/\theta} ,$$

kde θ je rotační korelační čas, za který se molekula otočí o jeden radián a r_0 je anizotropie v čase $t = 0$. Rotační korelační čas závisí na velikosti molekuly a její molekulové hmotnosti.

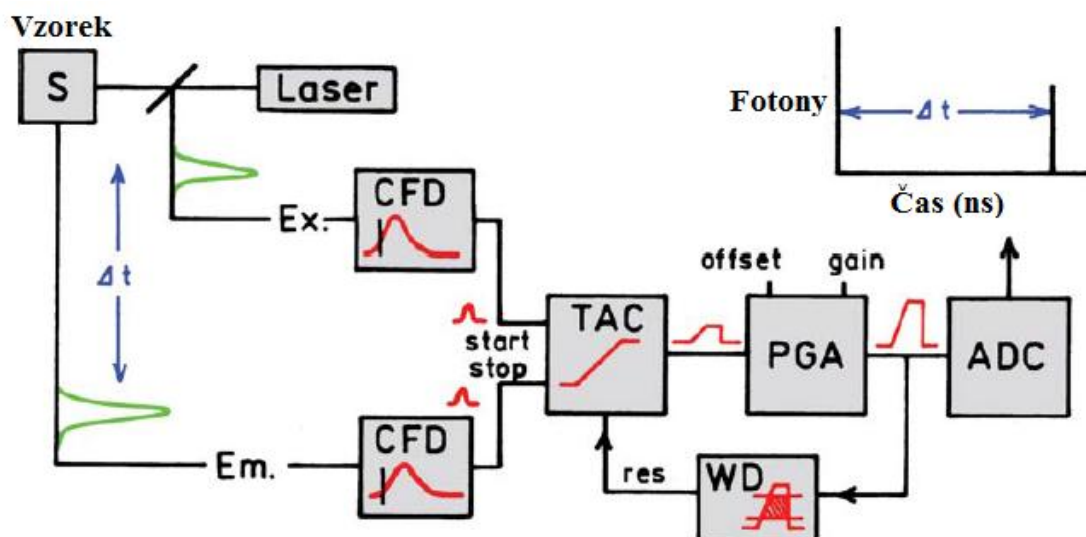
2.1.5.1 Metoda time – correlated single – photon counting

Při metodě time – correlated single – photon counting (TCSPC) je vzorek excitován pulsem světla. Podmínky TCSPC jsou takové, aby byl detekován méně než jeden foton na excitační puls. Rychlost detekce je zpravidla jeden foton na sto excitačních pulsů. Je měřen čas mezi excitačním pulsem a pozorovaným fotonem, který je uložen v histogramu. Osa x histogramu udává časové úseky, tzv. kanály a osa y počet detekovaných fotonů pro daný časový úsek. Pokud je detekován méně než jeden foton na excitační puls, histogram má klesající průběh podobající se vlně.



Obr. 5: Princip TCSPC [1]

Pro měření časového zpoždění mezi excitací a emisí se používá specializovaná elektronika. Experiment začíná excitačním pulzem, který vybudí fluorofor ve vzorku a posílá signál do elektroniky. Tento signál prochází „constant fraction discriminator“ (CFD), který přesně změří čas příchodu pulsu. Tento signál pak prochází „time-to-amplitude converter“ (TAC), který generuje schodek napětí lineárně se zvyšující s časem na nanosekundovém časovém úseku. Druhý kanál detekuje signál z jediného fotonu. Čas příchodu signálu detekovaného fotonu je přesně určen pomocí CFD, který posílá signál k zastavení růstu napětí. TAC nyní obsahuje napětí úměrné časovému zpoždění Δt mezi excitačním a emisním signálem. V případě potřeby je napětí zesíleno pomocí „programmable gain amplifier“ (PGA) a převedeno na číselnou hodnotu pomocí „analog-to-digital converter“ (ADC). Aby se minimalizovaly chybné hodnoty, je signál omezen na daný rozsah napětí. V případě, že signál není v tomto rozsahu, je tato událost potlačena pomocí „window discriminator“ (WD). Napětí je převedeno na digitální hodnotu, která je uložena jako jedna událost s měřeným časovým zpožděním. Histogram je měřen opakováním tohoto procesu několikrát za sebou. V současné době se téměř všechna měření provádí v reverzním módu, který šetří elektroniku. Proces je stejný jako v předchozím případě s výjimkou, že emisní puls spouští TAC a excitační puls zastavuje TAC. Tento postup je užíván díky vysoké rychlosti opakujících se pulsů moderních zdrojů pulsního záření. TAC musí být resetován a vynulován před každým spuštěním pulsu, který trvá jen omezenou dobu. Jestliže startovací signál dorazí příliš brzy, TAC může být stále vyresetován. Pulsy emise spouští TAC a excitační puls zastavuje TAC.



Obr. 6: Schéma TCSPC [1]

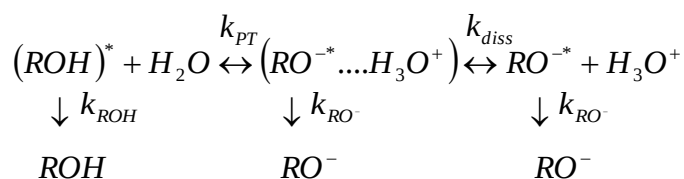
2.2 Přenos protonu v excitovaném stavu

V úvodu lze poznamenat, že dynamika reakcí v polárním rozpouštědle je řízena solvatací. Nejjednodušší příklad takové reakce je disociace kyseliny: $HA \rightarrow H^+ + A^-$. V nepolárním prostředí je tento proces endotermický a nevýhodný díky vysoké energetické bariéře. Disociace kyseliny v polárním rozpouštědle se stává výhodnou díky solvataci produktů (proton a anion) a přechodnému stavu. Bylo prokázáno, že dynamika solvatace molekulami vody je výrazně pomalejší v organizovaných útvarech [15].

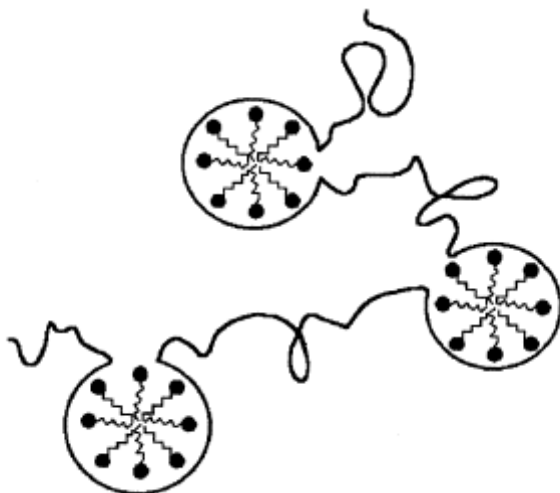
Acidita a bazicita mnoha molekul se mění v excitovaném stavu. 1-naftol je v základním stavu slabá báze, ale ve vodném roztoku v excitovaném stavu je silnou kyselinou. Takové molekuly, které se stávají kyselinou při excitaci fotonu, se nazývají fotokyseliny. Přenos protonu v excitovaném stavu (ESPT) 1-naftolu je velmi rychlý ve vodném prostředí. ESPT by měl být snadnější v prostředí methanolu díky tomu, že methanol je lepší akceptor protonu než voda. Nicméně k ESPT 1-naftolu v prostředí methanolu nedochází. V organizovaných útvarech např. cyklodextrinu či micelách a lipidech je sterická překážka pro molekuly vody k solvataci neutrální molekuly nebo iontu mnohem větší než ve vodě. V důsledku sterické překážky a dalších lokálních interakcí je pohyb molekul vody v těchto organizovaných útvarech vysoce omezený. Nedostatečná solvatace molekul a iontů (H^+ a A^-) 1-naftolu výrazně zpomaluje ESPT v cyklodextrinu [21], micelách [22] a lipidech [23] v rozsahu o 1-2 řády ve srovnání s vodou. Rozpouštědla působí na ESPT 1-naftolu (R^*OH) v mnoha ohledech. Rozpouštědlo ovlivňuje difúzní separaci a rekombinaci zdvojeného aniontu (R^*O^-) a protonu. Přenosem protonu v excitovaném stavu lze zjistit, jak se chová systém polymer-tenzid a jak spolu interagují ve vodných roztocích [6], [9], [10].

Ve vodných roztocích polymery snadno tvoří agregáty s tenzidy nad hodnotu konkrétní koncentrace známé jako kritická asociační koncentrace (CAC) [9], [10] díky hydrofobnímu efektu. To se stává u stejně nabitého tenzidu a polymeru a u opačně nabitých převládá elektrostatická interakce. CAC pro systém polymer – tenzid je často mnohem nižší než kritická micelární koncentrace (CMC). V přítomnosti polymeru v tenzidu nad CMC, systém obsahuje polymer-tenzid agregáty a nevázané micely.

Schéma 1: Kinetické schéma popisující přenos protonu v excitovaném stavu:



Přenos protonu v excitovaném stavu sestává z několika kroků: ultra rychlá deprotonace tvoří zdvojený iontový pár $(RO^{-*} \cdots H_3O^+)$, který je následován rekombinací a také jeho disociací. ESPT v komplexu polymer – tenzid je v souladu s modelem perlového náhrdelníku [11], [12]. Dle modelu perlového náhrdelníku si můžeme představit uspořádání micel v řetězci polymeru. Agregáty systému polymer – tenzid tvoří řadu sférických micel, které jsou obklopené částmi řetězce polymeru. Sférické micely představují korále a makromolekulární řetízky představují vlákno. Toto uspořádání připomíná perlový náhrdelník, podle kterého je tento model pojmenován.



Obr. 7: Uspořádání micel v řetězci polymeru dle modelu perlového náhrdelníku [14]

2.2.1 Intramolekulární přenos protonu v excitovaném stavu

Vznik ICT (vnitřní přenos náboje) ukazuje, že distribuce elektronu může být různá pro fluorofor v základním nebo excitovaném stavu. To může vést ke změnám ionizace v excitovaném stavu. Jeden z příkladů je intramolekulární přenos protonu v excitovaném stavu (ESIPT). Nejprve dojde k excitaci molekuly a poté k uvolnění části přebytečné energie ve formě záření. Zároveň ale může dojít k přenosu protonu přes vznikající intramolekulární vodíkovou vazbu nebo vazbu mezi molekulou rozpouštědla, přičemž vzniká tautomer, který uvolní část energie ve formě záření o jiné vlnové délce. Proces ESIPT může probíhat velmi rychle, protože je přenesený proton již u akceptoru protonu v okamžiku buzení.

2.3 Asociativní (micelární) koloidy

Jedná se o nízkomolekulární látky, které tvoří pravé roztoky. Avšak po překročení určité koncentrace molekuly začínají asociovat a vytváří částice koloidních rozměrů, tzv. micely. Vlastnosti těchto roztoků závisí na okamžitých fyzikálních podmínkách, např. na teplotě, tlaku a koncentraci. Micelární koloidy jsou tedy reverzibilní systémy [17].

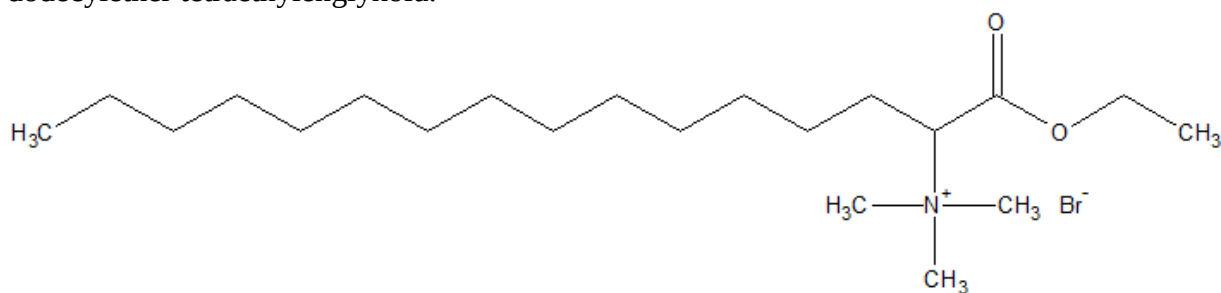
Molekula těchto roztoků musí být amfifilní neboli amfipatická a skládá se z lyofilní a lyofobní části. Lyofilní část má velkou afinitu k rozpouštědлу a je tedy v daném prostředí rozpustná, zatímco lyofobní část má malou afinitu k rozpouštědлу a je v daném prostředí nerozpustná. Díky kontaktu s rozpouštědlem je lyofobní část micelárního koloidu příčinou asociace. Molekula musí obsahovat silně polární skupinu a dostatečně dlouhý uhlovodíkový řetězec. Tyto látky nazýváme také jako povrchově aktivní látky (PAL), protože snižují povrchové napětí, nebo také tenzidy či detergenty.



Obr. 8: Struktura povrchově aktivní látky, kde lyofilní část – hlava představuje silně polární skupinu a lyofobní část dlouhý uhlovodíkový řetězec

2.3.1 Dělení povrchově aktivních látek

Povrchově aktivní látky dělíme na iontové (kationtové, aniontové nebo amfoterní) a na neiontové neboli neutrální podle toho, jak jsou ve vodném prostředí schopné disociovat. Mezi aniontové PAL patří alkalické soli vyšších mastných kyselin (přirozená mýdla). Skupina COO^- je ve vodě rozpustná, zatímco uhlovodíkový řetězec představuje část nerozpustnou. Dalším příkladem je silně kyselá skupina $-\text{SO}_3\text{H}$. Soly alkylsulfonových kyselin tvoří také micely, např. dodecylsulfát sodný $\text{C}_{12}\text{H}_{25}\text{OSO}_3\text{Na}$. Mezi kationtové PAL patří pyridinové sloučeniny, které jsou substituované na atomech dusíku a soli čtyřsytných amonných bází, např. cetyltrimethylamonium bromid $\text{C}_{19}\text{H}_{42}\text{BrN}$ nebo septonex $\text{C}_{21}\text{H}_{44}\text{BrNO}_2$. Neiontové PAL nejsou schopné disociace a nemají tedy náboj. Obsahují většinou aminové, hydroxylové nebo esterové skupiny a dlouhý uhlovodíkový řetězec. Mezi neiontové PAL patří např. dodecylether tetraethylenglykolu.



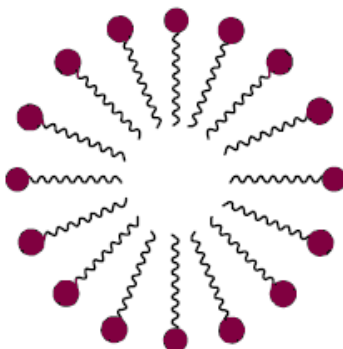
Obr. 9: Kationtový tenzid septonex

2.3.2 Vznik micel

Ve velkých zředěních tvoří micelární koloidy pravé roztoky. Závislosti různých fyzikálních vlastností na koncentraci vykazují zlom při určité koncentraci, který pozorujeme jen u těchto roztoků. Tato koncentrace je označována jako kritická micelární koncentrace. Kritická micelární koncentrace je nejvyšší koncentrace, při které se PAL vyskytuje v molekulové (iontové) formě. Tato koncentrace je specifická pro každý tenzid. Ve vodném prostředí je dosaženo minimálního styku mezi molekulami rozpouštědla a lyofobní částí molekuly. PAL

se orientují nepolárním řetězcem dovnitř micely a polární skupinou ven. Uvnitř micely tak vzniká nepolární prostředí, kde mohou být rozpuštěny látky hydrofobního charakteru.

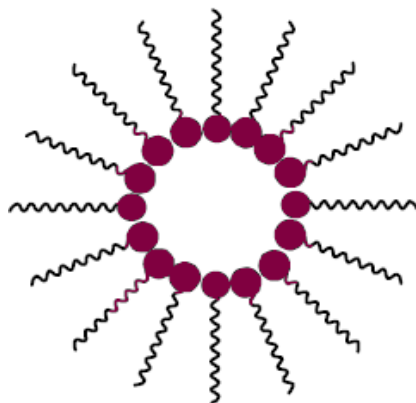
Nad hodnotu CMC asociují molekuly rozpuštěné látky ve větší celky – micely. Na křivce závislosti fyzikálních vlastností na koncentraci PAL nastává další zlom, který je připisován tzv. druhé CMC [18], při které nastává změna v typu agregace, či změna interakce micela – micela, monomer – micela atp. Micely mají ve zředěných roztocích kulový tvar, mluvíme proto o sférických micelách [17]. V koncentrovaných roztocích vznikají lamelární micely složené ze dvou vrstev PAL.



Obr. 10: *Struktura micely*

2.3.3 Obrácené micely

V některých případech v nevodném prostředí vznikají tzv. obrácené micely. Uhlovodíkové řetězce směřují ven do nepolárního prostředí, zatímco jádro tvoří polární skupiny. Kritická micelární koncentrace však bývá obtížně definována. Přechod z pravého roztoku na koloidní nastává v širokém intervalu koncentrací. Silně polární jádro micely snadno solubilizuje vodu, takže je velmi obtížné připravit bezvodý roztok. Jádro obrácené micely je díky své polaritě vhodným prostředím pro katalýzu některých chemických reakcí.



Obr. 11: *Struktura obrácené micely*

2.4 Hyaluronan

Kyselina hyaluronová byla poprvé izolována v roce 1934 z hovězího sklivce Karlem Meyerem a jeho asistentem Johnem Palmerem. Jedná se o přirozeně se vyskytující lineární biopolysacharid, který se skládá ze dvou opakujících se disacharidových jednotek.

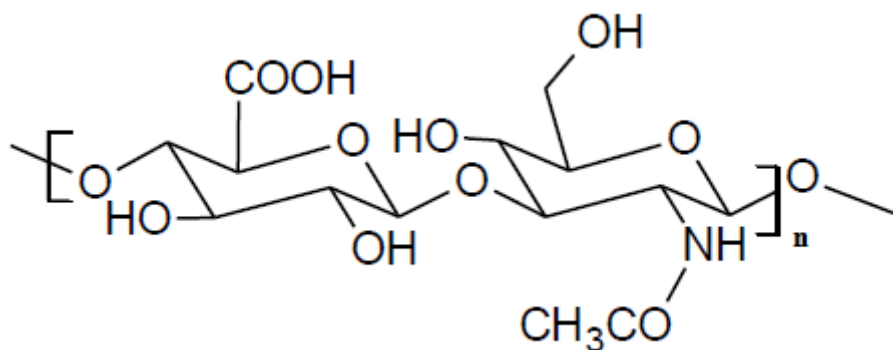
Disacharidová jednotka se skládá z monomeru D-glukuronové kyseliny a monomeru N-acetylglukosaminu.

2.4.1 Chemická struktura hyaluronanu

Kyselina D-glukuronová je spojená s N-acetylglukosaminem glykosidickou vazbou β -1,3. Jednotlivé disacharidové jednotky se spojují v polymer glykosidickou vazbou β -1,4. Všechny objemné skupiny disacharidu (hydroxylové, karboxylové) jsou ve stericky výhodné ekvatoriální pozici, zatímco všechny malé vodíkové atomy zaujímají méně výhodnou axiální pozici. To znamená, že struktura disacharidu je energeticky velmi stabilní. Axiální vodíkové atomy představují hydrofobní část, zatímco ekvatoriální boční řetězce představují hydrofilní část [19].

Počet opakujících se disacharidových jednotek může přesahovat 10 000 a molekulová hmotnost se tak může pohybovat kolem 4 MDa, což je 400 daltonů na každý disacharid. Délka řetězce pak může dosahovat 10 μ m, což je délka průměrného erytrocytu (červené krvinky).

Ve vodném prostředí podléhá karboxylová skupina disociaci. Na záporně nabitou karboxylovou skupinu se pak iontovou silou mohou navázat kationty. Hyaluronan je schopen pojmout vodu (až tisícinásobek vlastní hmotnosti). Je to umožněno díky jeho struktuře, která nese velké množství hydroxylových skupin.



Obr. 12: Struktura kyseliny hyaluronové

2.4.2 Výskyt, vlastnosti a použití hyaluronanu

Hyaluronan se vyskytuje prakticky ve všech tkáních obratlovců. Nachází se ve většině pojivových tkáních (v synoviální tekutině, očním sklivci, pupeční šňůře), v kůži, ledvinách, plicích, mozku, svalové tkáni a v kohoutích hřebíncích. Je také vázaný v mezibuněčném prostoru (matrix). Vyskytuje se v organismu spíše jako sodná či draselná sůl.

Hyaluronan vykazuje různé biologické účinky v závislosti na molekulové hmotnosti. Čím nižší je molekulová hmotnost, tím vyšší je biologická aktivita. Je viskoelastický, čímž napomáhá dobré pohyblivosti kloubů jako lubrikant, v kůži zajišťuje správnou hydrataci a udržuje tvar (oční bulva). Je také biokompatibilní, biodegradabilní a imunogenní. Hyaluronan je díky svým unikátním vlastnostem hojně využíván v mnoha odvětvích klinické medicíny, např. při doplnění kloubní tekutiny, v oční chirurgii, usnadňuje hojení a regeneraci ran a také

nacházíme jeho využití v cílené distribuci léčiv nebo v kosmetickém průmyslu jako přípravek proti vráskám.

2.4.3 Syntéza a odbourávání hyaluronanu

Buněčná syntéza hyaluronanu je unikátní a velmi řízený proces. Hyaluronan je přirozeně syntetizován enzymem hyaluronan syntázou (HAS). Jedná se o integrální membránové proteiny, které jsou pevně vázané k membráně. HAS spojuje aktivovanou glukuronovou kyselinu (UDP-glukuronovou kyselinu) s aktivovaným N-acetylglukosaminem (UDP-N-acetylglukosaminem). Hyaluronan je syntetizován na vnitřním povrchu plazmatické membrány a poté je vysouván z buňky do extracelulárního prostoru.

Odbourávání hyaluronanu je způsobeno enzymem hyaluronidázou, který štěpí vysokomolekulární hyaluronan na oligosacharidy [19].

3 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

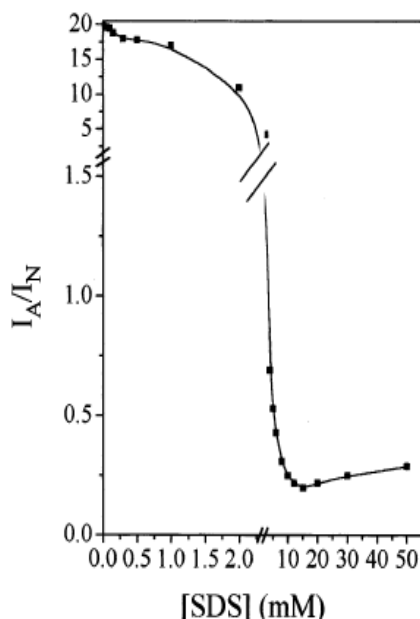
Kalyanasis Sahu et al. se věnovali problematice studia přenosu protonu v excitovaném stavu v systému protein – tenzid. Přenos protonu v excitovaném stavu pyraninu (8-hydroxypyren-1,3,6-trisulfonát) byl studován v komplexu lysozym – CTAB pomocí fluorescenční spektroskopie. Aniontová sonda pyranin velmi silně váže kationtový tenzid CTAB. Pyranin ve vodném roztoku vykazuje dva hlavní píky v absorpčním spektru, které jsou připisovány protonované formě (ROH) a deprotonované formě (RO⁻) [8]. Pomocí stacionární fluorescence bylo zjištěno, že po přidání lysozymu do vodného roztoku pyraninu došlo ke zvýšení intenzity fluorescence ROH a současně ke snížení intenzity fluorescence RO⁻. Poměr intenzit fluorescence ROH a RO⁻ forem naznačuje potlačení přenosu protonu v excitovaném stavu pyraninu v přítomnosti lysozymu. Lysozym a CTAB tvoří supra-molekulární útvary díky hydrofobní interakci, ve které je rychlostní konstanta přenosu protonu výrazně zmenšená. Rychlostní konstanta deprotonace neutrální formy a rekombinace a disociace zdvojeného iontového páru uvnitř agregátů lysozym – CTAB je vyšší než v micelách CTAB. To poukazuje na rozdílnost prostředí pyraninu v agregátech lysozym – CTAB oproti prostředí v micelách CTAB [13].

Sukul et al. se zabývali studií interakce mezi polymerem polyvinylpyrrolidonem (PVP) s aniontovým tenzidem dodecylsulfátem sodným (SDS) využitím přenosu protonu v excitovaném stavu pomocí 1-naftolu. Bylo prokázáno, že 1-naftol podléhá velmi rychlé deprotonaci ve vodném roztoku. Pokud v bezprostředním okolí molekul 1-naftolu nebude dostupný adekvátní počet molekul vody, bude přenos protonu v excitovaném stavu do značné míry potlačen. Pokud se 1-naftol váže ve vodném roztoku v agregátech organizovaných do útvarů např. micel a cyklodextrinu, počet molekul vody kolem 1-naftolu klesá a dochází tak k výraznému potlačení přenosu protonu v excitovaném stavu (ESPT). Stanovení rychlosti ESPT 1-naftolu vázaného do PVP – SDS agregátů bylo studováno pomocí časově rozlišené fluorescence neutrální a aniontové formy. Bylo prokázáno, že v nepřítomnosti SDS se 1-naftol neváže na polymer PVP.

Autoři dospěli k závěru, že 1-naftol se snadno váže do PVP – SDS agregátů. Přerušení intenzity neutrální formy je připisováno CAC pro daný systém a je 10 krát nižší než CMC SDS. V komplexu PVP – SDS drtivá většina molekul vůbec nepodléhá deprotonaci. Na rozdíl od SDS micel zůstává anion 1-naftolu vázán v PVP – SDS komplexu. Souhrnem lze říci, že mikroprostředí sondy v PVP – SDS komplexu je velmi odlišné od prostředí SDS micel. V PVP – SDS komplexu jsou v podstatě dvě různá prostředí. V jednom z nich polymerní řetězec chrání molekuly 1-naftolu před molekulami vody, což má za následek téměř úplné potlačení deprotonace. Ve druhém prostředí zůstává sonda částečně vystavena molekulám vody. Ale přenos protonu v excitovaném stavu je mnohem pomalejší, než když je sonda ve vodném roztoku zcela vystavená molekulám vody [14].

P. Dutta et al. studovali přenos protonu v excitovaném stavu pomocí 1-naftolu v systému polymer hydroxypropylcelulóza (HPC) – tenzid SDS. ESPT 1-naftolu je výrazně zpomalen v HPC – SDS agregátech nad CAC. Nad CMC SDS jsou molekuly 1-naftolu rozloženy mezi HPC – SDS agregáty a mezi volné micely SDS. Interakce mezi polymerem a tenzidem vede k formaci perlového náhrdelníku. Souhrnem lze říci, že se 1-naftol snadno váže do HPC – SDS agregátů a ESPT 1-naftolu je výrazně zpomalen v agregátech, které obsahují

HPC a tenzid SDS. Vykreslení podílu intenzit fluorescence aniontové a neutrální formy ukazuje přerušení, které odpovídá CAC SDS pro HPC.



Obr. 13: Závislost poměru intenzit fluorescence aniontové a neutrální formy 1-naftolu na koncentraci SDS [15]

Emisní spektra ukazují, že drtivá většina molekul 1-naftolu v agregátech HPC – SDS vůbec nepodléhá deprotonaci. Intenzita fluorescence neutrální formy je snížena. HPC – SDS agregáty způsobují mnohem větší zvýšení intenzity fluorescence neutrální formy, než které jsou způsobeny micelami SDS. Změna intenzity fluorescence neutrální formy 1-naftolu (R^*OH) s HPC a SDS naznačuje, že mikroprostředí 1-naftolu v HPC – SDS se mění s koncentrací SDS. Anion 1-naftolu vázaného v HPC – SDS vykazuje jinou dobu života než v prostředí vody. Nad CMC, kdy jsou tvořeny volnými molekulami tenzidu SDS micely, jsou molekuly 1-naftolu rozděleny mezi HPC – SDS agregáty a micely. Se zvyšováním koncentrace SDS se příspěvek 1-naftolu v SDS micelách zvyšuje [15].

Kombarova a Il'ichev se věnovali studiu přenosu protonu ve vodných roztocích poly(methakrylové kyseliny) (PMA) využitím fluorescenční sondy 1-hydroxypyrenu (HP). Využitím FTIR bylo zjištěno, že protolytická fotodisociace 1-hydroxypyrenu ve vodě je velmi pomalá. Malá rychlostní konstanta přenosu protonu v excitovaném stavu je neměnná s energetickým stavem reakce a povahou nejnižšího singletového excitovaného stavu HP. HP se díky velmi pomalé reakci s vodou využívá jako ideální fluorescenční sonda při studiu bimolekulární reakce přenosu protonu. Bylo zjištěno, že polyanion PMA je neefektivní jako akceptor protonu pro excitovaný HP. ESPT mezi HP a PMA byl významně urychlen v přítomnosti kationtového tenzidu, ale jen v případě, že byly vytvořeny agregáty polymer – tenzid (kde $[DTAC] > CAC$) a HP byl solubilizován v těchto agregátech. Data časově rozlišené fluorescence ukazují, že kinetika přenosu protonu reakce v kationtových tenzidových útvech stabilizovaných reaktivním polyaniontem se výrazně liší od získaných výsledků v přítomnosti malého protionu. Fluorescenční data dokázala kooperativní protonizaci PMA v HP lokalizovaném v komplexu PMA – DTA. To je přisuzováno selektivní

protonaci COO^- skupin, které intereagují s fotokyselinami. Závislost pH přechodu může být spojena s konformačními změnami v komplexu polymer – tenzid [16].

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Použité chemikálie

Kyselina hyaluronová

Contipro Biotech s.r.o. ($M_w = 936$ kDa)

Číslo šarže: 213-4160

Fluorescenční sondy

1-Naftol: Sigma-Aldrich Chemie

CAS: 90-15-3

Číslo šarže: BCBJ8068V

Pyren: Fluka

CAS: 129-00-0

Číslo šarže: 430166/1

Povrchově aktivní látka

Septonex: GNB chem, a.s.

CAS: 10567-02-9

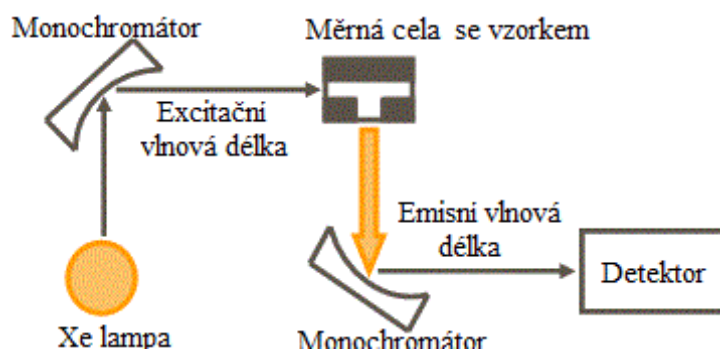
Číslo šarže: 910SEP002

4.2 Přístroje a zařízení

4.2.1 Přístroj Fluorolog

Na přístroji Fluorolog HORIBA Jobin Yvon byla měřena stacionární fluorescence. Jako excitační zdroj byla použita xenonová výbojka (450 W) a byla snímána intenzita fluorescence v kolmém směru na excitační paprsek.

Polychromatické záření prochází excitačním monochromátorem, kde je vybrána určitá vlnová délka. Toto záření prochází kyvetou se vzorkem s optickou dráhou 1 cm. Dochází k vybuzení fluoroforu a po průchodu emisním monochromátorem se snímá emitované světlo pomocí fotonásobiče.



Obr. 14: Schéma měření stacionární fluorescence

4.2.2 Přístroj Fluorocube

Na přístroji Fluorocube HORIBA Jobin Yvon byla měřena časově rozlišená fluorescence. Tento přístroj využívá metodu TCSPC (viz kapitola 2.1.5.1). Je používána sada excitačních

NanoLED diod s pracovní frekvencí 1 MHz. Přístroj díky TBX pikosekundovému detektoru měří s rozlišením až 20 pikosekund/kanál.

4.3 Příprava zásobních roztoků fluorescenční sondy

Na analytických vahách bylo naváženo 0,0144 g 1-naftolu. Toto množství bylo kvantitativně převedeno do 100 ml odměrné baňky. Po rozpuštění navážky byl roztok doplněn methanolem po rysku. Byl tak připraven odměrný roztok 1-naftolu o koncentraci $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$.

Na analytických vahách bylo naváženo 0,0040 g pyrenu. Toto množství bylo kvantitativně převedeno do 100 ml odměrné baňky. Po rozpuštění navážky byl roztok doplněn acetonem po rysku. Byl tak připraven odměrný roztok pyrenu o koncentraci $2 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$.

4.4 Příprava zásobních roztoků hyaluronanu

Na analytických vahách bylo naváženo 0,0072 g hyaluronanu o molární hmotnosti 936 kDa. Toto množství bylo kvantitativně převedeno do 100 ml odměrné baňky. Po rozpuštění navážky byl roztok doplněn mili-Q vodou po rysku. Byl tak připraven zásobní roztok hyaluronanu o koncentraci $70 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$.

4.5 Příprava zásobního roztoku tenzidu

Na analytických vahách bylo naváženo 0,2538 g tenzidu septonexu. Toto množství bylo kvantitativně převedeno do 100 ml odměrné baňky. Po rozpuštění navážky byl roztok doplněn mili-Q vodou po rysku. Byl tak připraven zásobní roztok septonexu o koncentraci $6 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$.

4.6 Příprava vzorků

4.6.1 Příprava vzorků pro měření kritické micelární koncentrace

Do skleněných vialek bylo napipetováno 25 μl zásobního roztoku fluorescenční sondy pyrenu a rozpouštědlo bylo odpařeno v digestoři. Výsledná koncentrace pyrenu ve vialkách byla $10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$. Do každé vialky bylo k fluorescenční sondě přidáváno ze zásobního roztoku různé množství septonexu tak, aby po následném doplnění mili-Q vodou na výsledný objem 5 ml byla vytvořena koncentrační řada o 14 vzorcích v koncentračním rozsahu septonexu $2 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ až $6 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$.

Do skleněných vialek bylo napipetováno 50 μl zásobního roztoku fluorescenční sondy 1-naftolu a rozpouštědlo bylo odpařeno v digestoři. Výsledná koncentrace 1-naftolu ve vialkách byla $10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$. Vzorky byly připraveny stejným způsobem jako v předchozím případě. U septonexu byla připravena koncentrační řada také o 14 vzorcích v rozsahu $2 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ až $6 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ bez fluorescenční sondy 1-naftolu.

4.6.2 Interakce tenzidu se systémem polyelektrolyt – fluorescenční sonda

Do skleněných vialek bylo napipetováno 50 μl zásobního roztoku fluorescenční sondy 1-naftolu a rozpouštědlo bylo odpařeno v digestoři. Výsledná koncentrace 1-naftolu ve

vialkách byla $10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Do každé vialky bylo ze zásobního roztoku napipetováno 500 μl kyseliny hyaluronové. Výsledná koncentrace kyseliny hyaluronové ve vialkách byla $7 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$. Následně bylo do každé vialky přidáváno ze zásobního roztoku různé množství septonexu tak, aby po následném doplnění mili-Q vodou na výsledný objem 5 ml byla vytvořena koncentrační řada o 20 vzorcích v koncentračním rozsahu septonexu $1\cdot 10^{-6} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ až $1,5\cdot 10^{-2} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$.

Vzorky pro další měření s tenzidem byly připraveny stejně jako v předchozím případě. Jako fluorescenční sonda byl použit pyren ve výsledné koncentraci $1\cdot 10^{-6} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$.

4.7 Vlastní měření

4.7.1 Měření emisních spekter

Na Fluorologu HORIBA Jobin Yvon bylo měřeno emisní spektrum pyrenu při excitační vlnové délce 335 nm a emisní sken byl měřen v rozsahu vlnových délek 350 – 550 nm s krokem 1 nm. Štěrbina u excitačního monochromátoru byla nastavena na 1,5 nm a u emisního monochromátoru na 2 nm. Bylo také proměřeno emisní spektrum 1-naftolu při excitační vlnové délce 300 nm a emisní sken byl měřen v rozsahu vlnových délek 310 – 580 nm s krokem 1 nm. Štěrbiny u excitačního i emisního monochromátoru byly nastaveny na 2 nm.

4.7.2 Měření dob života 1-naftolu

Byla studována neutrální forma (ROH) 1-naftolu při vlnové délce 350 nm a aniontová forma (RO^-) 1-naftolu při vlnové délce 450 nm. Pro měření neutrální formy byl nastaven emisní monochromátor na 350 nm, celkové zpoždění bylo nastaveno na 65 ns, rozsah TAC byl nastaven na 50 ns a cyklus vyhasínání byl zopakován 10 000krát. Pro měření aniontové formy byl emisní monochromátor přenastaven na 450 nm, rozsah TAC byl přenastaven na 100 ns a celkové zpoždění bylo nastaveno na 115 ns. Všechna měření byla provedena v reverzním módu (viz kapitola 2.1.5.1).

Pro měření dob života 1-naftolu byla použita NanoLED dioda o vlnové délce 301 nm. Po proměření prvního vzorku byla zjištěna odezva diody, tzv. prompt pomocí roztoku oxidu křemičitého. Nastavení promptu bylo totožné jako u prvního proměřeného vzorku s výjimkou emisního monochromátoru, který byl nastaven na excitační vlnovou délku použité NanoLED diody. Byly použity neutrální filtry, které zeslabují intenzitu excitačního záření.

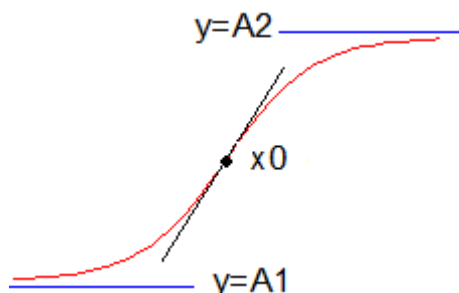
4.8 Vyhodnocení

4.8.1 Stanovení kritické micelární koncentrace

Kritická micelární koncentrace byla stanovena pomocí fluorescenční sondy pyrenu. Byl studován pokles poměru intenzity fluorescence prvního a třetího emisního píku pyrenu (EmPI). Emisní polaritní index v závislosti na logaritmu koncentrace tenzidu vykazuje sigmoidní průběh, který lze popsat Boltzmannovou sigmoidní křivkou. Rovnice Boltzmannovy sigmoidní křivky je popsána následujícími čtyřmi parametry:

$$y = \frac{A_1 - A_2}{1 + e^{\frac{x - x_0}{\Delta x}}} + A_2, \quad 24$$

kde y odpovídá poměru I_1/I_3 , A_1 je maximum a A_2 je minimum na ose y , x je celková koncentrace tenzidu, x_0 představuje inflexní bod a Δx je gradient. Hodnota kritické micelární koncentrace vychází z inflexního bodu x_0 .



Obr. 15: Boltzmannova sigmoidní křivka

Kritická micelární koncentrace byla stanovena také pomocí fluorescenční sondy 1-naftolu. Byl studován růst intenzity fluorescence při vlnové délce 350 nm. Byl pozorován rozptyl při vlnové délce 320 nm, takže byly nejdříve od sebe odečteny intenzity fluorescence naměřené s fluorescenční sondou od intenzit naměřených bez fluorescenční sondy. Kritická micelární koncentrace 1-naftolu byla určena pomocí průsečíku dvou přímek. První lineární závislost odpovídá intenzitám fluorescence neutrální formy 1-naftolu před vzrůstem a druhá lineární závislost odpovídá vzrůstu intenzitám fluorescence neutrální formy 1-naftolu.

4.8.2 Studium kinetiky 1-naftolu

V programu DAS6 byla vyhodnocena data fluorescenčních poklesů. Pomocí vhodné exponenciální funkce byly stanoveny doby života a jejich procentuální zastoupení. Z těchto údajů byla vypočítána rychlostní konstanta přenosu protonu neutrální formy 1-naftolu podle následujících vztahů [20]:

$$R = \frac{A_2}{A_1},$$

$$\lambda_i = \frac{1}{\tau_i},$$

$$k_{PT} = \frac{R \cdot \lambda_2 + \lambda_1}{R + 1},$$

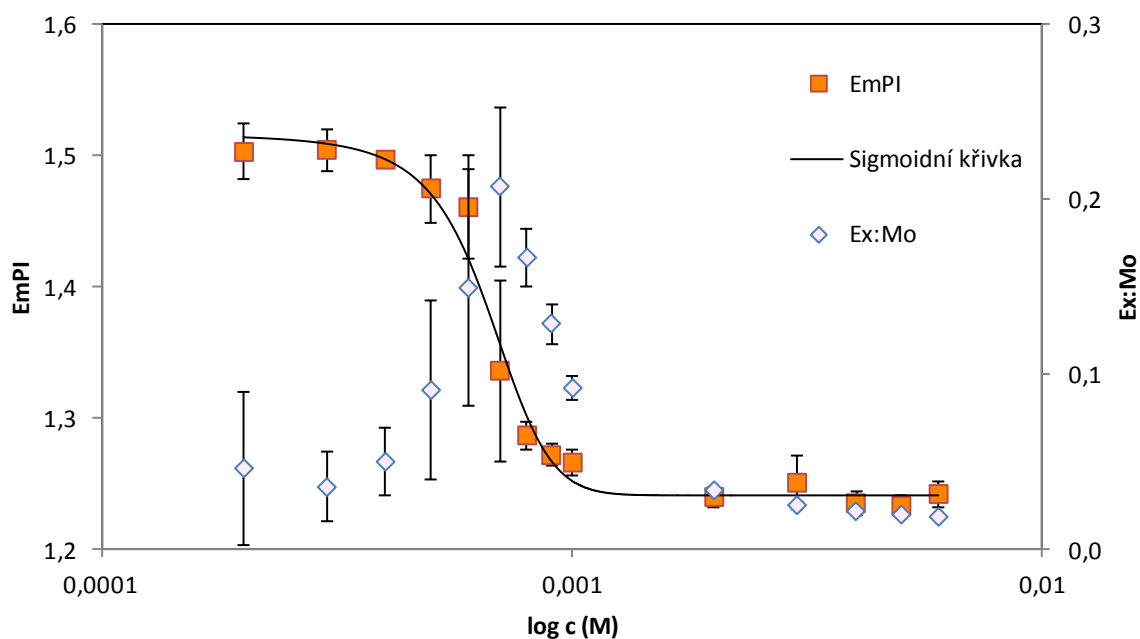
kde τ_i je doba života a A_i je relativní zastoupení dané doby života.

Rychlostní konstanty fluorescence neutrální a aniontové formy byly vypočítány jako převrácená hodnota nejdelší doby života, avšak pro tuto práci nejsou důležité.

5 VÝSLEDKY A DISKUZE

5.1 Měření kritické micelární koncentrace septonexu s pyrenem

Parametr x_0 byl odečten ze sigmoidní Boltzmannovy křivky v programu Origin a hodnota kritické micelární koncentrace byla stanovena na $0,67 \pm 0,04$ mM. Podobná hodnota byla uvedena v práci Čermákové a kolektivu, kteří publikovali hodnotu kritické micelární koncentrace septonexu 0,77 mM [24].



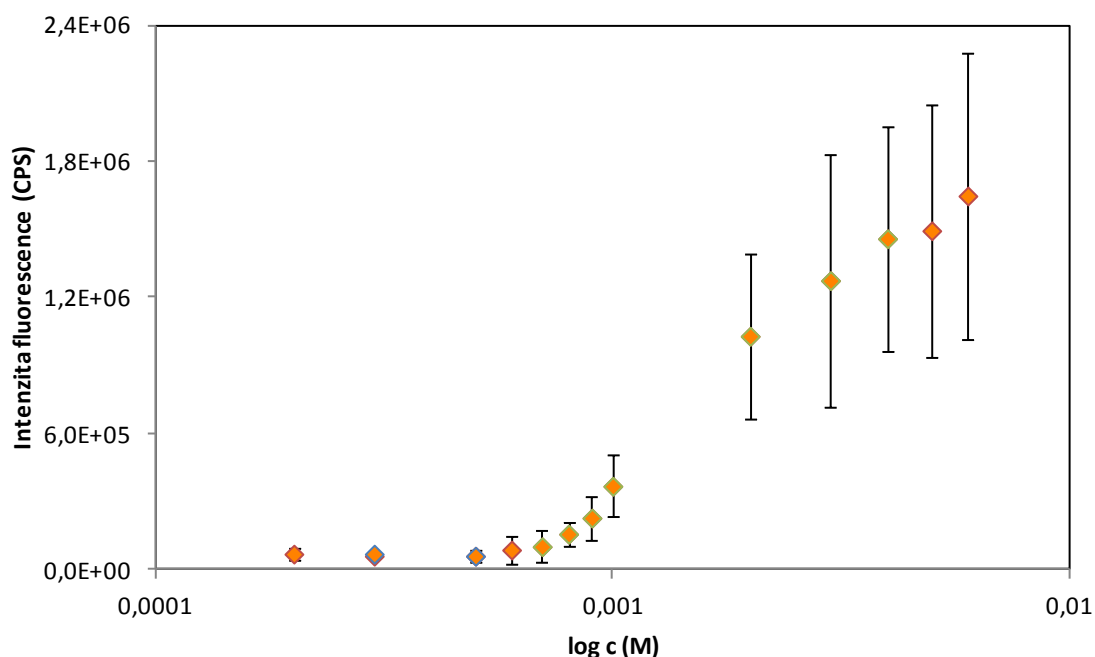
Obr. 16: Závislost emisního polaritního indexu a poměru excimer ku monomeru pyrenu na logaritmu koncentrace septonexu

Intenzity některých vibračních pásů pyrenu ukazují, že je velmi citlivý na prostředí, zejména na polaritu. Jedná se o poměr prvního a třetího emisního píku známý jako emisní polaritní index. Pod kritickou micelární koncentrací (v nepřítomnosti micel) je hodnota emisního polaritního indexu vysoká a pohybuje se kolem 1,5 (viz Obr. 16). Nad kritickou micelární koncentrací (v přítomnosti micel) emisní polaritní index klesá, jelikož se snížila polarita v okolí pyrenu, což znamená, že se pyren solubilizoval do micel. U septonexu můžeme pozorovat prudký pokles křivky ve chvíli, kdy se začaly v roztoku tvořit micely.

Po koncentraci 0,5 mM dochází k růstu poměru Ex:Mo. V roztoku se začínají tvořit agregáty. Nejvyšší bod tohoto poměru o koncentraci 0,7 mM odpovídá kritické micelární koncentraci stanovené pomocí Boltzmannovy sigmoidní křivky. Po této koncentraci se snižuje intenzita fluorescence excimeru při vlnové délce 470 nm a tak klesá i poměr Ex:Mo.

5.2 Měření kritické micelární koncentrace septonexu s 1-naftolem

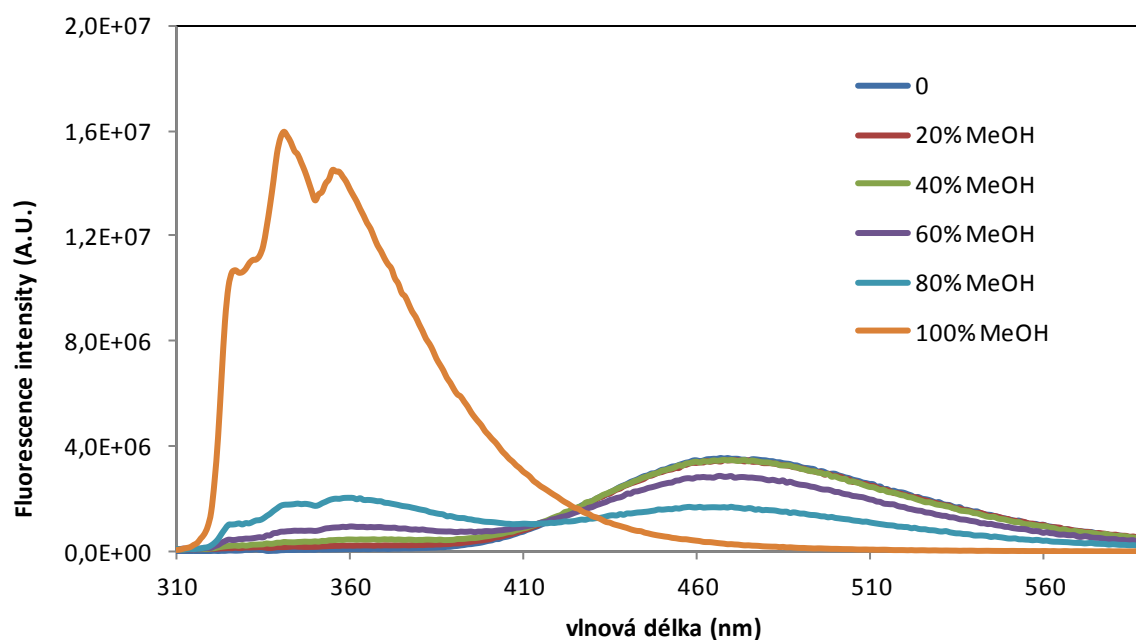
Hodnota kritické micelární koncentrace byla stanovena na $0,60 \pm 0,05$ mM pomocí metody průsečíku dvou přímek.



Obr. 17: *Závislost intenzity fluorescence 1-naftolu při 350 nm na logaritmu koncentrace septonexu*

Ve vodném prostředí je intenzita fluorescence neutrální formy 1-naftolu při 350 nm velmi nízká, zatímco intenzita fluorescence aniontové formy při 450 nm je o dost vyšší. Se zvyšující se koncentrací tenzidu zůstávají intenzity fluorescence neutrální i aniontové formy nezměněny až do koncentrace, která se blíží kritické micelární koncentraci. U 1-naftolu začala růst intenzita fluorescence okolo CMC, což je u septonexu 0,67 mM (viz Obr. 17). Nad kritickou micelární koncentrací se intenzita fluorescence neutrální formy zvyšuje. V roztoku se začínají tvořit micely. Intenzita fluorescence neutrální formy mírně převyšuje aniontovou formu. V systému se ale pořád aniontová forma 1-naftolu vyskytuje, takže je několik možností, kde se v micely 1-naftol nachází. To může znamenat, že molekuly 1-naftolu se nachází buď na rozmezí Sternova vrstva – hydrofobní jádro micely nebo je část molekul 1-naftolu ve Sternově vrstvě poutána elektrostaticky (jedná se o aniontovou formu) a druhá část molekul 1-naftolu (jedná se o neutrální formu) se může nacházet v jádře micely.

Pokud by byly všechny molekuly 1-naftolu rozpuštěny v jádru micely, nacházel by se vlastně v tekutých uhlovodících a intenzita neutrální formy 1-naftolu by převyšovala aniontovou formu. Respektive přenos protonu v excitovaném stavu by víceméně neprobíhal, asi jako v případě methanolu (viz Obr. 18).



Obr. 18: Vliv přidavku methanolu na přenos protonu 1-naftolu ve vodném roztoku

Z emisních spekter 1-naftolu můžeme vypořizovat, že ve vodném roztoku je intenzita neutrální formy 1-naftolu velmi malá oproti aniontové formě. S rostoucím podílem methanolu ve vodném roztoku se intenzita aniontové formy 1-naftolu snižuje a zároveň se zvyšuje intenzita neutrální formy. V případě bezvodého roztoku tvořeného pouze methanolem se intenzita neutrální formy 1-naftolu rapidně zvýšila a aniontová forma vymizela, což poukazuje na to, že přenos protonu v excitovaném stavu v methanolu neprobíhá.

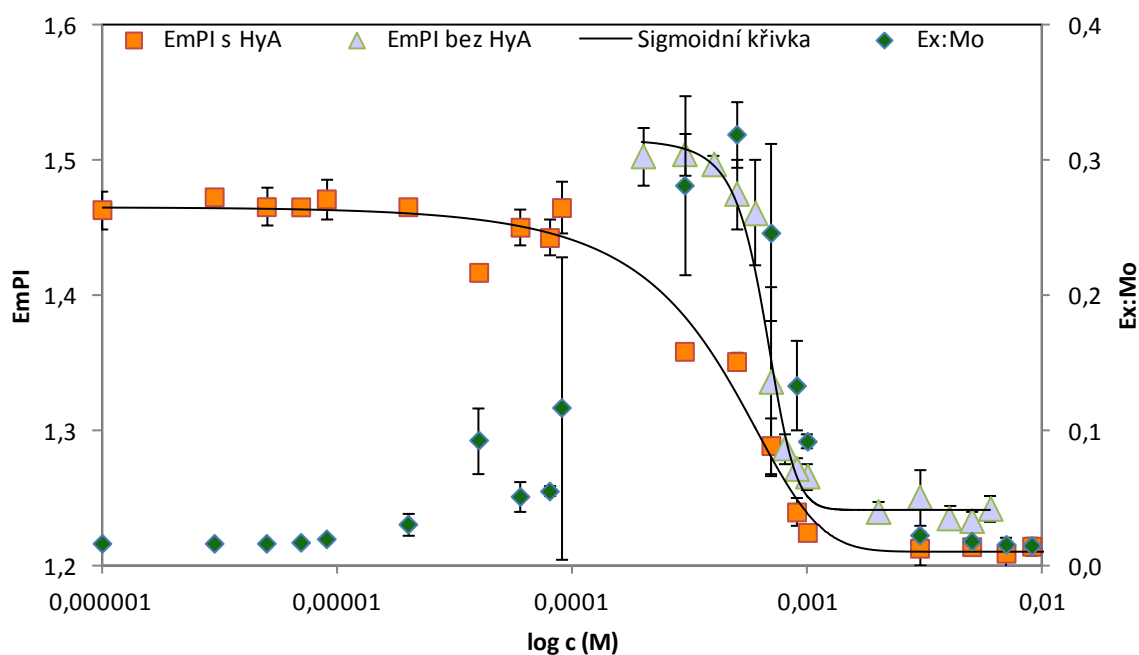
Tabulka 1: Jednotlivé doby života, jejich relativní zastoupení a rychlostní konstanta přenosu protonu neutrální formy 1-naftolu

	$c [M]$	$\tau_1 [ns]$	$\tau_2 [ns]$	$\tau_3 [ns]$	$A_1 [\%]$	$A_2 [\%]$	$A_3 [\%]$	$k_{PT} [ns^{-1}]$
1	2,E-04	0,03	2,45	9,65	92,18	2,66	5,16	31,05
2	3,E-04	0,03	1,44	8,15	91,96	2,23	5,81	31,08
3	4,E-04	0,03	1,67	8,06	91,14	2,43	6,44	28,02
4	5,E-04	0,02	1,73	8,35	93,33	2,1	4,58	40,78
5	6,E-04	0,03	1,62	8,31	92,26	2,75	4,99	35,77
6	7,E-04	0,03	1,23	8,18	89,21	3,66	7,12	30,69
7	8,E-04	0,12	0,92	6,85	70,87	16,19	12,94	7,23
8	9,E-04	0,08	0,91	7,41	75,45	14,25	10,3	10,11
9	1,E-03	0,09	1,39	8,88	66,79	15,29	17,92	9,15
10	2,E-03	0,07	0,86	7,58	69,05	19,39	11,56	11,17
11	3,E-03	0,18	0,82	6,15	49,93	36,12	13,95	3,71
12	4,E-03	0,30	0,96	6,88	52,85	33,72	13,43	2,42
13	5,E-03	0,23	0,87	6,77	49,93	37,32	12,74	2,98
14	6,E-03	0,19	0,95	7,89	49,69	38,29	12,02	3,45

Sonda může být lokalizována v micelárním systému na různých místech (ve vodě, uvnitř micel či na rozhraní micela – voda). Metodou časově rozlišené fluorescence byly vypočítány rychlostní konstanty přenosu protonu neutrální formy 1-naftolu (viz Tabulka 1). Z tabulky lze vypočítat, že jednotlivé doby života se víceméně nemění kromě nejkratší doby života, tzv. rise time [22]. Procentuální zastoupení této doby života se s rostoucí koncentrací tenzidu snižuje. Přenos protonu v excitovaném stavu 1-naftolu je do koncentrace 0,7 mM velmi rychlý. Znamená to tedy, že molekuly 1-naftolu jsou dostatečně obklopeny molekulami vody. Do této koncentrace se molekuly tenzidu koncentrují na fázovém rozhraní voda – vzduch. Avšak po překročení této koncentrace se rychlostní konstanta deprotonace snižuje. Souvisí to s tím, že v roztoku se začínají tvořit agregáty. Další změna nastává po překročení koncentrace 3 mM, kdy se rychlostní konstanta deprotonace výrazně snižuje. V roztoku se zvyšuje počet micel či jejich velikost s rostoucí koncentrací tenzidu. Nad CMC se minimalizuje příspěvek volného 1-naftolu ve vodném prostředí, protože téměř všechny molekuly sondy jsou vázány do micel, což plyne z nízké rychlostní konstanty deprotonace.

5.3 Interakce septonexu s hyaluronanem o koncentraci 7 mg/L

5.3.1 Interakce septonexu a hyaluronanu pomocí fluorescenční sondy pyrenu

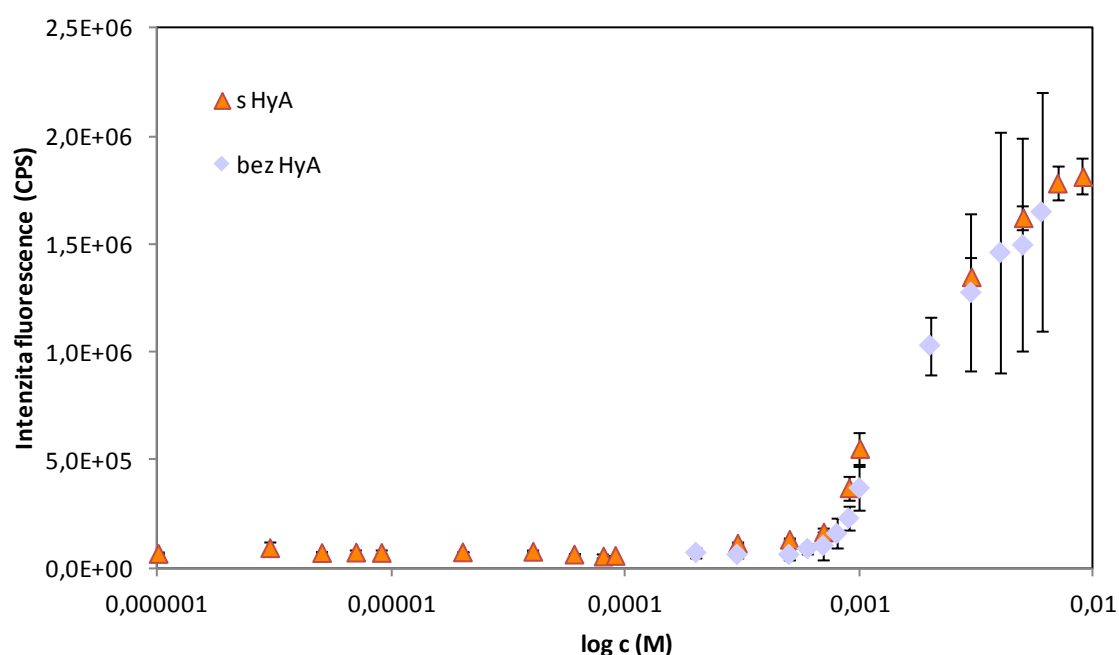


Obr. 19: Závislost emisního polaritního indexu a poměru excimer ku monomeru pyrenu na logaritmu koncentrace septonexu v přítomnosti hyaluronanu a bez hyaluronanu

Koncentrace hyaluronanu 7 mg/L byla takto zvolena proto, že se v této nízké koncentraci neobjevuje zákal. Emisní polaritní index byl nepatrně snížen na hodnotu 1,46 (viz Obr. 19). To může být způsobeno přidáním hyaluronanu, jehož axiální vodíkové atomy jsou hydrofobního charakteru. Z grafu lze vypočítat, že došlo k posunu CMC. To je pravděpodobně způsobeno tím, že záporně nabitý hyaluronan je elektrostatickými silami poután ke kationtovému tenzidu. Nějakou roli by však mohly hrát i hydrofobní interakce hyaluronanu a uhlovodíkového řetězce tenzidu. V programu Origin byla stanovena kritická micelární

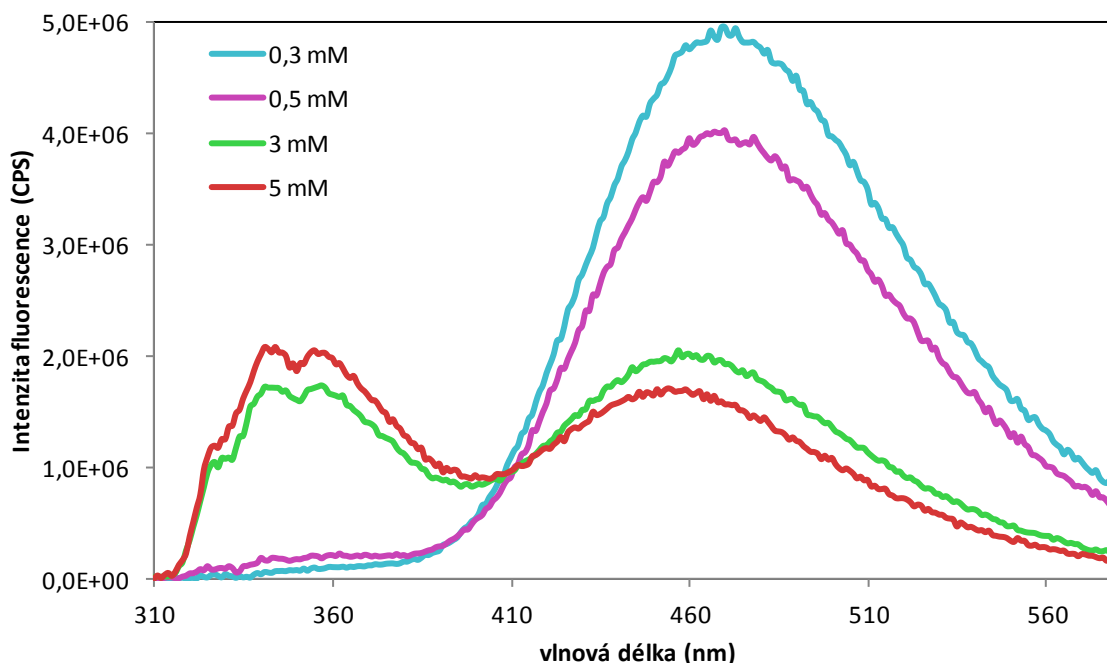
koncentrace septonexu na $0,31 \pm 0,02$ mM, což je asi dvakrát menší hodnota než pro systém bez přídavku hyaluronanu. To znamená, že micely se tvoří v roztoku již při nižší koncentraci po přidání hyaluronanu. U koncentrace 0,04 mM dochází k poklesu emisního polaritního indexu. Chybová úsečka je zde zanedbatelná, takže pokles EmPI je způsoben změnou prostředí, ne odchylkou. Jedná se tedy o kritickou asociační koncentraci, při níž se začínají tvořit v roztoku hyaluronan – septonex agregáty. Pokles EmPI může být v porovnání se snížením emisního polaritního indexu při tvorbě micel okolo CMC způsoben i zásahem hydratačního obalu hyaluronanu do struktury micely, takže pyren by byl více odhalen molekulám vody než v případě pravých micel. Nad kritickou micelární koncentrací je pyren pravděpodobně rozdělen mezi hyaluronan – septonex agregáty a mezi volné micely septonexu. Vytvoření agregátů při koncentraci 0,04 mM potvrzuje i poměr Ex:Mo, který se zvýšil. Pokud vezmeme v úvahu chybovou úsečku u bodu při koncentraci 0,3 mM, poměr Ex:Mo by byl zde nejvyšší a zároveň odpovídá i stanovené kritické micelární koncentraci pomocí Boltzmannovy sigmoidní křivky.

5.3.2 Interakce septonexu a hyaluronanu pomocí fluorescenční sondy 1-naftolu



Obr. 20: Závislost intenzity fluorescence 1-naftolu při 350 nm na logaritmu koncentrace septonexu v přítomnosti hyaluronanu a bez hyaluronanu

Z grafu lze vypočítat (viz Obr. 20), že došlo k nepatrnému posunu kritické micelární koncentrace po přidání hyaluronanu. Micely se začaly tvořit v roztoku při nepatrně nižší koncentraci tenzidu než je tomu u systému bez hyaluronanu. Dochází totiž k navázání záporně nabitého hyaluronanu ke kationtovému tenzidu. Předpokládalo se zvýšení intenzity fluorescence neutrální formy 1-naftolu při koncentraci 0,04 mM, protože v případě pyrenu došlo k poklesu EmPI. Žádné zvýšení však nenastalo.



Obr. 21: Emisní spektrum 1-naftolu

V emisním spektru je patrné (viz Obr. 21), že neutrální forma 1-naftolu je velmi malá oproti aniontové formě před kritickou micelární koncentrací. Při koncentraci 0,3 mM až 0,5 mM můžeme vidět první nárůst intenzity neutrální formy 1-naftolu. Při koncentraci 3 mM neutrální forma 1-naftolu roste a blíží se aniontové formě 1-naftolu a již při koncentraci 5 mM neutrální forma mírně převyšuje aniontovou formu 1-naftolu. Tedy i po přidání hyaluronanu se molekuly 1-naftolu nad kritickou micelární koncentrací mohou nacházet buď na rozmezí Sternova vrstva – hydrofobní jádro micely nebo je část molekul 1-naftolu ve Sternově vrstvě poutána elektrostaticky (jedná se o aniontovou formu) a druhá část molekul 1-naftolu (jedná se o neutrální formu) se může nacházet v jádře micely.

Metodou časově rozlišené fluorescence byly vypočítány rychlostní konstanty přenosu protonu neutrální formy 1-naftolu (viz Tabulka 2). Při nízkých koncentracích tenzidu jsou rychlostní konstanty přenosu protonu velmi vysoké až do koncentrace 0,007 mM. Poté dochází ke snížení rychlostní konstanty přenosu protonu mezi koncentrací 0,3 mM až 0,5 mM, což poukazuje na vznik agregátů. Pravděpodobně v roztoku vznikají micely nebo se v roztoku nachází větší množství agregátů. Kolem koncentrace 6 mM je rychlostní konstanta přenosu protonu asi 2krát menší v prostředí hyaluronanu než v nepřítomnosti hyaluronanu, takže v přítomnosti hyaluronanu je přenos protonu více potlačený.

Při koncentraci 0,3 mM septonexu byla rychlostní konstanta deprotonace po přidání hyaluronanu snížena ve srovnání s čistým septonexem, což může být způsobeno tím, že se k sobě hyaluronan s tenzidem elektrostaticky poutají, čili v roztoku dochází ke vzniku hyaluronan – septonex agregátů. Po přidání hyaluronanu do roztoku se tedy začínají tvořit agregáty mnohem dříve, než je tomu v případě systému bez hyaluronanu. Poblíž koncentrace 0,5 mM dochází k významnému snížení rychlostní konstanty přenosu protonu. Kritická micelární koncentrace tedy nastává kolem této koncentrace, což se shoduje s výpočtem CMC septonexu pomocí průsečíku dvou přímk, která byla stanovena na 0,41 mM. Kolem koncentrace 1 mM nastává další zlom. To může být připisováno malé přístupnosti molekul

1-naftolu, který se nachází v micelle, vůči molekulám vody. Molekuly 1-naftolu jsou pravděpodobně rozděleny mezi hyaluronan – septonex agregáty a micely nad kritickou micelární koncentrací.

Tabulka 2: Jednotlivé doby života, jejich relativní zastoupení a rychlostní konstanta přenosu protonu neutrální formy 1-naftolu

	$c [M]$	$\tau_1 [ns]$	$\tau_2 [ns]$	$\tau_3 [ns]$	$A_1 [\%]$	$A_2 [\%]$	$A_3 [\%]$	$k_{PT} [ns^{-1}]$
1	1,E-06	0,02	1,41	7,75	92,68	2,02	5,30	41,02
2	3,E-06	0,01	1,57	7,86	98,26	0,56	1,17	81,96
3	5,E-06	0,02	1,68	8,01	91,73	2,87	5,40	38,92
4	7,E-06	0,02	1,39	7,55	94,57	1,58	3,85	50,51
5	9,E-06	0,04	1,50	7,57	86,09	4,45	9,47	22,29
6	2,E-05	0,04	1,13	7,18	88,34	3,66	8,00	22,40
7	4,E-05	0,03	1,22	7,75	89,86	3,85	6,29	28,99
8	6,E-05	0,04	1,47	7,58	87,73	4,79	7,48	21,47
9	8,E-05	0,03	1,42	7,65	91,76	2,98	5,28	28,74
10	9,E-05	0,04	1,53	7,67	89,57	4,43	6,01	21,73
11	3,E-04	0,04	1,12	6,19	88,14	6,01	5,85	24,11
12	5,E-04	0,07	1,14	6,30	76,78	13,18	10,05	11,97
13	7,E-04	0,06	1,01	5,59	74,34	16,91	8,75	14,59
14	9,E-04	0,09	0,76	4,79	50,96	34,40	14,65	6,92
15	1,E-03	0,25	0,88	4,83	43,12	37,15	19,73	2,65
16	3,E-03	0,33	0,87	4,59	40,52	38,45	21,03	2,13
17	5,E-03	0,33	0,86	4,50	34,03	42,96	23,02	2,00
18	7,E-03	0,34	0,89	4,85	35,93	41,26	22,81	1,98
19	9,E-03	0,57	3,06	10,78	67,48	22,71	9,82	1,40
20	2,E-02	0,42	1,16	6,02	48,08	32,75	19,17	1,76

6 ZÁVĚR

Bakalářská práce byla věnována studiu interakcí v systému hyaluronan – septonex pomocí stacionární a časově rozlišené fluorescence. Jako fluorescenční sonda byl použit pyren a 1-naftol. Pyren byl vybrán pro svou citlivost na polaritu v jeho okolí a 1-naftol byl vybrán z toho důvodu, že v excitovaném stavu podstupuje přenos protonu, který je citlivý na přítomnost vody. Ve všech vzorcích mají obě sondy i hyaluronan konstantní koncentraci.

Nejdříve byla stanovena kritická micelární koncentrace septonexu s pyrenem o koncentraci $10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ na hodnotu $0,67 \pm 0,04 \text{ mM}$ pomocí Boltzmannovy sigmoidní křivky. Měření bylo také provedeno s 1-naftolem. Kritická micelární koncentrace septonexu byla stanovena na hodnotu $0,60 \pm 0,05 \text{ mM}$ pomocí průsečíku dvou přímek. Výsledky se nepatrně liší, avšak CMC stanovená pomocí obou metod je zatížena určitou chybou. Byl studován pokles EmPI pyrenu a kolem koncentrace $0,5 \text{ mM}$ se již v roztoku začaly tvořit agregáty.

U 1-naftolu o koncentraci $10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ byla pozorována neutrální forma (350 nm) a aniontová forma (450 nm). Nad kritickou micelární koncentrací se intenzita fluorescence neutrální formy zvýšila. Jelikož intenzita neutrální formy 1-naftolu byla nepatrně vyšší než aniontová forma, molekuly 1-naftolu se mohly nacházet buď na rozmezí Sternova vrstvy – hydrofobní jádro micely nebo část molekul 1-naftolu byla ve Sternově vrstvě poutána elektrostaticky (jedná se o aniontovou formu) a druhá část molekul 1-naftolu (jedná se o neutrální formu) se mohla nacházet v jádře micely. Byly spočítány rychlostní konstanty přenosu protonu v excitovaném stavu 1-naftolu pomocí dob života a jejich relativní zastoupení. Bylo zjištěno, že do koncentrace tenzidu $0,7 \text{ mM}$ je rychlostní konstanta deprotonace velmi rychlá. Avšak po vzniku agregátů byla tato konstanta snížena. Po překročení koncentrace tenzidu 3 mM byla rychlostní konstanta deprotonace výrazně snížena, což naznačuje, že nad CMC jsou všechny molekuly 1-naftolu vázány do micel.

Dále byly studovány interakce hyaluronanu o koncentraci $7 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ a septonexu pomocí pyrenu. Po přidání hyaluronanu došlo k posunu CMC, tedy micely se začaly tvořit v roztoku při nižších koncentracích než je tomu u systému bez hyaluronanu. Záporně nabitý hyaluronan je elektrostaticky poután ke kationtovému septonexu. U koncentrace $0,04 \text{ mM}$ došlo k poklesu emisního polaritního indexu. Jedná se o CAC, při níž se začaly tvořit v roztoku hyaluronan – septonex agregáty nebo může být pokles EmPI v porovnání se snížením emisního polaritního indexu při tvorbě micel okolo CMC způsoben i zásahem hydratačního obalu hyaluronanu do struktury micely, takže pyren by byl více odhalen molekulám vody než v případě pravých micel.

Interakce hyaluronanu a septonexu byly studovány také pomocí 1-naftolu. Po přidání hyaluronanu se CMC septonexu snížila. Kolem koncentrace tenzidu $0,5 \text{ mM}$ se začaly v roztoku tvořit agregáty, došlo ke zvýšení neutrální formy 1-naftolu. Nad kritickou micelární koncentrací neutrální forma 1-naftolu mírně převyšuje aniontovou formu. Metodou časově rozlišené fluorescence byly vypočítány rychlostní konstanty přenosu protonu neutrální formy 1-naftolu. Při nízkých koncentracích septonexu jsou rychlostní konstanty přenosu protonu velmi vysoké až do koncentrace $0,007 \text{ mM}$. Poté došlo ke snížení rychlostní konstanty přenosu protonu, což poukazuje na vznik agregátů. Při koncentraci $0,5 \text{ mM}$ došlo k dalšímu snížení rychlostní konstanty přenosu protonu. Pravděpodobně v roztoku vznikaly micely nebo

se v roztoku nacházelo větší množství agregátů. Kolem koncentrace 6 mM byla rychlostní konstanta přenosu protonu asi 2krát menší v prostředí hyaluronanu, takže v přítomnosti hyaluronanu je přenos protonu více potlačený. Tím, že se hyaluronan elektrostaticky připoutá na septonex, vzniká menší prostor pro navázání molekul 1-naftolu. 1-Naftol se tedy váže do jádra micely, což vyplývá z porovnání rychlostních konstant přenosu protonu bez hyaluronanu a v přítomnosti hyaluronanu, kdy je ESPT 2krát více potlačen v přítomnosti hyaluronanu, takže je větší množství molekul sondy rozpuštěno v jádře micely.

1-Naftol, který podstupuje přenos protonu v excitovaném stavu, se ukázal jako vhodná fluorescenční sonda pro výzkum interakcí hyaluronanu a septonexu díky extrémní citlivosti přenosu protonu v excitovaném stavu na přítomnost vody. Tyto systémy budou ještě dále zkoumány.

7 LITERATURA

- [1] LAKOWICZ, Joseph R. *Principles of fluorescence spectroscopy*. 3. vyd. New York: Springer, 2006. 954 s. ISBN 03-873-1278-1.
- [2] JUNHONG, G., et al. In situ probing of intracellular pH by fluorescence from inorganic nanoparticles. *Biomaterials*. 2013, Vol. 34, Issue 36, s. 9183-9189. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S014296121300971X>
- [3] FIŠAR, Zdeněk. FLUORESCENČNÍ SPEKTROSKOPIE V NEUROVĚDÁCH [online]. Praha, 2009. Dostupné z: <http://www1.lf1.cuni.cz/~zfishar/fluorescence/Default.htm>
- [4] MOHR, A., et al. A new pyrene-based fluorescent probe for the determination of critical micelle concentrations. *J. Phys. Chem. B*. 2007, vol. 111, issue 45, s. 12985-12992. DOI: 10.1021/jp0731497. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jp0731497>
- [5] AGUIAR, A., et al. On the determination of the critical micelle concentration by the pyrene 1:3 ratio method. *Journal of colloid and interface science*. 2003, vol. 258, issue 1, s. 116-122. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021979702000826>
- [6] GHOSH, Subhadip, et al. Ultrafast Proton Transfer of Pyranine in a Supramolecular Assembly: PEO-PPO-PEO Triblock Copolymer and CTAC. *J. Phys. Chem. B*. 2007, vol. 111, s. 13504-13510. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jp072919b>
- [7] SAHU, Kalyanasis, et al. Excited-state proton transfer from pyranine to acetate in methanol. *J. Chem. Sci.* 2007, vol. 119, issue 2, s. 71-76. Dostupné z: <http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs12039-007-0012-x>
- [8] ROY, D., KARMAKAR, R., MONDAL, S. K., SAHU, K., BHATTACHARYYA, K. Excited state proton transfer from pyranine to acetate in a CTAB micelle. *Chem. Phys. Lett.* 2004, vol. 399, issues 1-3, s. 147-151. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0009261404015325>
- [9] TAJIK, Behnoosh, et al. The study of polymer-surfactant interaction in catanionic surfactant mixtures. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 2013, vol. 436, 5, s. 890-897. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0927775713005827#>
- [10] NIZRI, Gilat, MAGDASSI, Shlomo. Solubilization of hydrophobic molecules in nanoparticles formed by polymer-surfactant interactions. *Journal of Colloid and Interface Science*. 2005, vol. 291, issue 1, s. 169-174. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021979705005035#>
- [11] KANTOR, Yacov, et al. Necklace model of randomly charged polymers. *Physica A: Statistical Mechanics and its Applications*. 1998, vol. 249, issues 1-4, s. 301-306. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378437197004780>
- [12] CALIRI, A. et al. Geometric constraints in polymer chains: analysis on the pearl-necklace model by Monte Carlo simulation. *Journal of Molecular Structure: THEOCHEM*. 1995, vol. 335, issues 1-3, s. 123-127. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/016612809403991S#>
- [13] SAHU, Kalyanasis, et al. Study of protein-surfactant interaction using excited state proton transfer. *Chemical Physics Letters*. 2005, vol. 404, issues 4-6, s. 341-345. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0009261405001582>
- [14] SUKUL, Dipankar, PAL, Samir Kumar, MANDAL, Debabrata, SEN, Sobhan, BHATTACHARYYA, Kankan. Excited State Proton Transfer as a Probe for

- Polymer–Surfactant Interaction. *The Journal of Physical Chemistry B*. 2000, vol. 104, issue 26, s. 6128-6132. DOI: 10.1021/jp993748g. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jp993748g>
- [15] DUTTA, Partha, et al. Excited State Proton Transfer of 1-Naphthol in a Hydroxypropylcellulose/Sodium Dodecyl Sulfate System. *Langmuir*. 2002, vol. 18, issue 21, s. 7867-7871. DOI: 10.1021/la020390y. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/la020390y>
- [16] KOMBAROVA, Svetlana, et al. Excited-State Proton Transfer in Complexes of Poly(methacrylic acid) with Dodecyltrimethylammonium Chloride. *Langmuir*. 2004, vol. 20, issue 15, s. 6158-6164. DOI: 10.1021/la049585r. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/la049585r>
- [17] POUCHLÝ, Julius. *Fyzikální chemie makromolekulárních a koloidních soustav*. 2. vyd. Praha: VŠCHT, 2001, 198 s. ISBN 80-708-0422-X.
- [18] BARTOVSKÁ, Lidmila. *Fyzikální chemie povrchů a koloidních soustav*. 3. přepr.vyd. Praha: VŠCHT, 1999, 204 s. ISBN 80-708-0337-1.
- [19] NECAS, J., BARTOSKOVA, L., BRAUNER, P., KOLAR, J.: Hyaluronic acid (hyaluronan): a review. *Veterinarni medicina*. 2008, vol. 53, issue 8, s. 397-411. Dostupné z: <http://www.agriculturejournals.cz/publicFiles/02029.pdf>
- [20] GIESTAS, L., YIHWANG, C., LIMA, J.C., LOPES, A. The dynamics of ultrafast excited state proton transfer in anionic micelles. *J. Phys. Chem. A*. 2003, vol. 107, issue 18, s. 3263–3269. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jp0265900>
- [21] PARK, Hyoung-Ryun, et al. Excited-State Proton Transfer of 2-Naphthol Inclusion Complexes with Cyclodextrins. *The Journal of Physical Chemistry*. 1994, vol. 98, issue 24, s. 6158-6166. DOI: 10.1021/j100075a019. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/j100075a019>
- [22] BHATTACHARYYA, Kankan, et al. Excited-state proton transfer of 1-naphthol in micelles. *J. Phys. Chem. A*. 1998, vol. 102, s. 9710-9714. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/jp982483n>
- [23] DAS, Ranjan, et al. Excited state proton transfer and solvent relaxation of a 3-hydroxyflavone probe in lipid bilayers. *J. Phys. Chem. B*. 2008, vol. 112, s. 11929-11935. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/jp804956u>
- [24] ČERMÁKOVÁ, Ludmila, Jitka ROSENDORFOVÁ a Miroslav MALÁT. Determination of critical micelle concentration of 1-carbethoxypentadecyltrimethylammonium bromide. *Collection of Czechoslovak Chemical Communications* [online]. 1980, vol. 45, issue 1, s. 210-213 [cit. 2014-05-12]. DOI: 10.1135/cccc19800210. Dostupné z: <http://cccc.uochb.cas.cz/45/1/0210/>

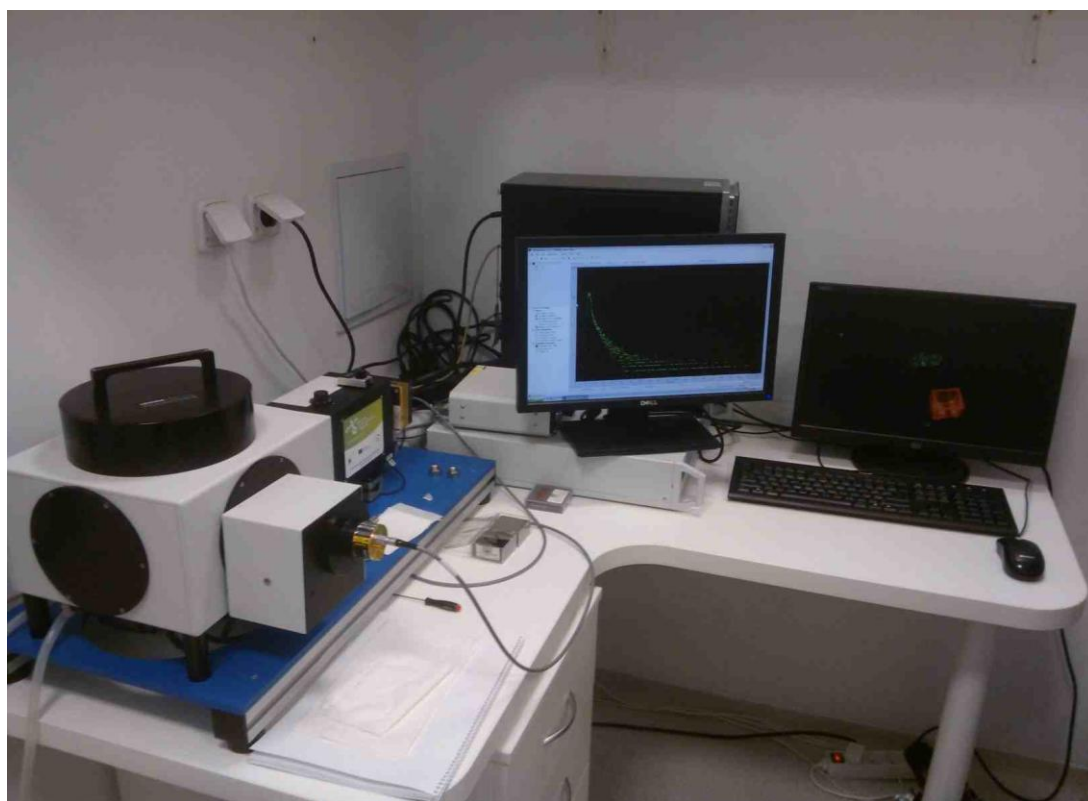
SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

CMC	kritická micelární koncentrace
CAC	kritická asociační koncentrace
CTAB	cetyltrimethylamonium bromid
PAL	povrchově aktivní látka
EmPI	emisní polaritní index
TCSPC	time – correlated single – photon counting
CDF	constant fraction discriminator
TAC	time-to-amplitude converter
PGA	programmable gain amplifier
ADC	analog-to-digital converter
WD	window discriminator
ESPT	přenos protonu v excitovaném stavu
ESIPT	intramolekulární přenos protonu v excitovaném stavu
HAS	hyaluronan syntáza
ROH	neutrální forma
RO ⁻	aniontová forma
PVP	polyvinylpyrrolidon
SDS	dodecylsulfát sodný
HPC	hydroxypropylcelulóza
PMA	poly(methakrylová kyselina)
HP	1-hydroxypyren
M	mol·dm ⁻³
Da	Dalton
HyA	hyaluronan, kyselina hyaluronová
k_{ROH}	rychlostní konstanta fluorescence neutrální formy
k_{RO^-}	rychlostní konstanta fluorescence aniontové formy
k_{PT}	rychlostní konstanta přenosu protonu
S ₀	základní singletová hladina
S ₁	první excitovaná singletová hladina
S ₂	druhá excitovaná singletová hladina
T ₁	první tripletový stav

8 PŘÍLOHY



Příloha 1: *Přístroj Fluorolog Jobin Yvon*



Příloha 2: *Přístroj Fluorocube Jobin Yvon*

Příloha 3: Jednotlivé doby života a jejich relativní zastoupení aniontové formy a rychlostní konstanta fluorescence aniontové formy a neutrální formy 1-naftolu

	$c [M]$	$\tau_1 [ns]$	$\tau_2 [ns]$	$\tau_3 [ns]$	$A_1 [\%]$	$A_2 [\%]$	$A_3 [\%]$	$k_{RO^-} [ns^{-1}]$	$k_{ROH} [ns^{-1}]$
1	2,E-04	-	0,94	8,09	-	1,72	98,28	0,12	0,10
2	3,E-04	-	0,75	8,08	-	1,6	98,4	0,12	0,12
3	4,E-04	-	1,12	8,11	-	1,77	98,23	0,12	0,12
4	5,E-04	-	1,06	8,07	-	2,67	97,33	0,12	0,12
5	6,E-04	-	1,04	8,06	-	2,7	97,3	0,12	0,12
6	7,E-04	-	1,04	8,03	-	2,83	97,17	0,12	0,12
7	8,E-04	-	1,12	8,06	-	3,93	96,07	0,12	0,15
8	9,E-04	-	1,15	8,04	-	8,53	91,47	0,12	0,13
9	1,E-03	-	1,19	8,04	-	15,24	84,76	0,12	0,11
10	3,E-03	-	1,22	7,95	-	50,68	49,32	0,13	0,16
11	4,E-03	-	1,17	7,81	-	57,45	42,55	0,13	0,15
12	5,E-03	-	1,22	7,82	-	64,74	35,26	0,13	0,15
13	6,E-03	-	1,19	7,72	-	69,18	30,82	0,13	0,13

Příloha 4: Jednotlivé doby života a jejich relativní zastoupení aniontové formy a rychlostní konstanta fluorescence aniontové a neutrální formy 1-naftolu v přítomnosti hyaluronanu

	$c [M]$	$\tau_1 [ns]$	$\tau_2 [ns]$	$\tau_3 [ns]$	$A_1 [\%]$	$A_2 [\%]$	$A_3 [\%]$	$k_{RO^-} [ns^{-1}]$	$k_{ROH} [ns^{-1}]$
1	1,E-06	-	1,49	8,23	-	2,31	97,69	0,12	0,13
2	3,E-06	-	1,35	8,19	-	1,88	98,12	0,12	0,13
3	5,E-06	-	0,70	8,16	-	1,41	98,59	0,12	0,12
4	7,E-06	-	1,31	8,16	-	1,87	98,13	0,12	0,13
5	9,E-06	-	1,23	8,17	-	1,88	98,12	0,12	0,13
6	2,E-05	-	3,84	8,34	-	6,12	93,88	0,12	0,14
7	4,E-05	-	3,73	8,41	-	7,57	92,43	0,12	0,13
8	6,E-05	-	4,05	8,35	-	6,16	93,84	0,12	0,13
9	8,E-05	-	0,87	8,19	-	1,86	98,14	0,12	0,13
10	9,E-05	-	1,09	8,20	-	1,93	98,07	0,12	0,13
11	3,E-04	-	1,00	8,13	-	3,01	96,99	0,12	0,16
12	5,E-04	-	1,02	8,08	-	3,22	96,78	0,12	0,16
13	7,E-04	-	1,22	8,08	-	3,72	96,28	0,12	0,18
14	9,E-04	-	1,25	8,06	-	7,39	92,61	0,12	0,21
15	1,E-03	-	1,27	8,04	-	13,23	86,77	0,12	0,21
16	3,E-03	-	1,31	7,92	-	51,72	48,28	0,13	0,22
17	5,E-03	-	1,31	7,55	-	67,7	32,3	0,13	0,22
18	7,E-03	0,24	1,25	7,36	-10,24	84,53	25,71	0,14	0,21
19	9,E-03	0,27	1,25	7,16	-11,74	89,9	21,84	0,14	0,09
20	2,E-02	0,25	1,27	6,75	-12,91	97,94	14,97	0,15	0,17