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

MIKROVISKOZITNÍ SONDY VE STUDIU AGREGACÍ SYSTÉMU BIOPOLYMER-TENZID

MICROVISCOSITY PROBES IN STUDY OF AGGREGATION
IN A BIOPOLYMER-SURFACTANT SYSTEM.

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE
BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE — KAMILA VAŠÍČKOVÁ
AUTHOR

VEDOUCÍ PRÁCE — Ing. FILIP MRAVEC, Ph.D.
SUPERVISOR

BRNO 2010

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

Zadání bakalářské práce

Číslo bakalářské práce:	**FCH-BAK0493/2009**	Akademický rok:	**2009/2010**
Ústav:	Ústav fyzikální a spotřební chemie		
Student(ka):	**Kamila Vašíčková**		
Studijní program:	Chemie a chemické technologie (B2801)		
Studijní obor:	Spotřební chemie (2806R002)		
Vedoucí práce	**Ing. Filip Mravec, Ph.D.**		
Konzultanti:			

Název bakalářské práce:

Mikroviskozitní sondy ve studiu agregací systému biopolymer-tenzid

Zadání bakalářské práce:

1. Shromáždit literární poznatky o využití fluorescenčních mikroviskozitních sond v systému biopolymer-tenzid, zvláště se zaměřením na hyaluronan jako modelový biopolymer.
2. Seznámit se s měřením pomocí mikroviskozitních sond.
3. Navrhnout a provést základní experimenty k ověření využití uvedené metody ve studiu interakcí hyaluronanu s tenzidy.
4. Zhodnotit výsledky ve vztahu k formulaci nosičových systémů biologicky aktivních látek na bázi hyaluronanu.

Termín odevzdání bakalářské práce: 28.5.2010

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

- -	- -	- -
Kamila Vašíčková Student(ka)	Ing. Filip Mravec, Ph.D. Vedoucí práce	prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc. Ředitel ústavu

- -

V Brně, dne 1.12.2009

prof. Ing. Jaromír Havlica, DrSc.
Děkan fakulty

ABSTRAKT
Byl zkoumán vliv koncentrace kationaktivního tenzidu a vliv iontové síly na anizotropii fluorescence sond difenylhexatrienu a fluoresceinu v systému s kationaktivním tenzidem a v systému kationaktivního tenzidu s hyaluronanem. Měření bylo provedeno metodou fluorescenční spektroskopie. Zjištěná anizotropie poskytuje informace o mikroviskozitě zkoumaných systémů. Dále byl zkoumán systém kationaktivního tenzidu s hyaluronanem při použití sond 9-(2-karboxy-2-kyanovinyl)julolidin, 4-(dikyanovinyl)julolidin a 1,3-bispyrenylpropan. Informace o mikroviskozitě mikroprostředí udává integrál pod emisní křivkou u 9-(2-karboxy-2-kyanovinyl)julolidinu a 4-(dikyanovinyl)julolidinu a poměr excimer/monomer u 1,3-bispyrenylpropanu. Bylo zjištěno, že vliv iontové síly na anizotropii difenylhexatrienu a fluoresceinu se projevil pouze při prvním přídavku soli, tj. při iontové síle 0,025 mol dm^{-3} a že přídavek hyaluronanu má vliv na anizotropii difenylhexatrienu a fluoresceinu pouze ve vzorcích bez přidané soli. Výsledky měření s 9-(2-karboxy-2-kyanovinyl)julolidinem a 4-(dikyanovinyl)julolidinem popisují vznik agregátů kationaktivního tenzidu s hyaluronanem a charakterizují tyto agregáty s hyaluronanem z hlediska mikroviskozity.

ABSTRACT
The effect of cationic surfactant concentration and ionic strength on anisotropy of fluorescence of probes diphenylhexatrien and fluorescein has been investigated in the system of cationic surfactant and in the system of cationic surfactant and hyaluronan. The investigation has been done by fluorescence emission spectroscopy. Obtained anisotropy gives information about microviscosity of investigated systems. Subsequently the system of cationic surfactant and hyaluronan has been investigated by 9-(2-carboxy 2-cyanovinyl)julolidine, 4-(dicyanovinyl)julolidine and 1,3-bispyrenylpropane probes. The information about the microviscosity of the system gives the integral under the emission curve of 9-(2-carboxy-2-cyanovinyl)julolidine and 4-(dicyanovinyl)julolidine and the ratio between excimer and monomer of 1,3-bispyrenylpropane. It has been discovered that the ionic strength influences the anisotropy of diphenylhexatrien and fluorescein only in the fist addition of salt (concentration 0,025 mol dm^{-3}) and that addition of hyaluronan influences the anisotropy of diphenylhexatrien and fluorescein only in samples without addition od salt. Results of measurment with 9-(2-carboxy-2-cyanovinyl)julolidine and 4-(dicyanovinyl)julolidine describe the formation of aggregates of catinoc surfactant with hyaluronan and characterize these aggregates from the point of microviscosity.

KLÍČOVÁ SLOVA
hyaluronan, 9-(2-karboxy-2-kyanovinyl)julolidin, 4-(dikyanovinyl)julolidin 1,3-bispyrenylpropan, difenylhexatrien, CCVJ, DCVJ, DPH, P3P, fluorescein, mikroviskozita, CTAB, iontová síla, fluorescenční spektroskopie, anizotropie

KEYWORDS
hyaluronan, 9-(2-carboxy-2-cyanovinyl)julolidine, 4-(dicyanovinyl)julolidine, 1,3-bispyrenylpropane, diphenylhexatrien, CCVJ, DCVJ, DPH, P3P, fluorescein, microviscosity, ionic strength, fluorescence spectroscopy, anisotropy

VAŠÍČKOVÁ, K. *Mikroviskozitní sondy ve studiu agregací systému biopolymer-tenzid.* Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2010. 42 s. Vedoucí bakalářské práce Ing. Filip Mravec, Ph.D.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracoval samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citoval. 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

Poděkování:
Ráda bych poděkovala Ing. Filipovi Mravcovi, Ph.D. a Ing. Tereze Halasové za odborný dohled a zaštítění mojí práce, za trpělivost, obětavou spolupráci a kreativní rady v průběhu celé práce.

OBSAH

1. ÚVOD ... 7
2. TEORETICKÁ ČÁST ... 9
2. 1. Kyselina hyaluronová, hyaluronan ... 9
2. 1. 1. Historie ... 9
2. 1. 2. Chemická struktura ... 9
2. 1. 3. Výskyt ... 10
2. 2. Tenzidy ... 10
2. 2. 1. Amfifilní struktura tenzidů ... 10
2. 2. 2. Micely ... 11
2. 2. 3. Klasifikace tenzidů ... 11
2. 3. Fluorescence ... 13
2. 3. 1. Vnitřní konverze ... 14
2. 3. 2. Mezisystémový přechod ... 14
2. 3. 3. Doba trvání excitovaného stavu ... 15
2. 3. 4. Kvantový výtěžek ... 16
2. 3. 5. Fluorescenční sondy ... 16
2. 3. 6. Viskozita ... 16
2. 3. 7. Mikroviskozita ... 17
2. 3. 8. Mikroviskozitní sondy ... 18
2. 3. 9. Anizotropie fluorescence ... 20
3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST ... 22
3. 1. Použité chemikálie ... 22
3. 2. Postup přípravy vzorků a jejich měření ... 22
3. 2. 1. Kalibrační řady ... 22
3. 2. 2. Vliv vzrůstající koncentrace CTAB v roztoku, vliv iontové síly na anizotropii DPH a fluoresceinu ... 22
3. 2. 3. Vliv vzrůstající koncentrace CTAB a iontové síly v roztoku s konstantní koncentrací hyaluronanu na anizotropii DPH a fluoresceinu ... 23
3. 2. 4. Vliv vzrůstající koncentrace CTAB v roztoku s konstantní koncentrací hyaluronanu na intenzitu fluorescence CCVJ a DCVJ a poměr excimer/monomer P3P. 23
3. 3. Metoda ... 23
3. 3. 1. Kalibrační řady ... 23
3. 3. 2. Vliv vzrůstající koncentrace CTAB v roztoku, vliv iontové síly na anizotropii DPH a fluoresceinu ... 24
3. 2. 3. Vliv vzrůstající koncentrace CTAB a iontové síly v roztoku s konstantní koncentrací hyaluronanu na anizotropii DPH a fluoresceinu ... 24
3. 2. 4. Vliv vzrůstající koncentrace CTAB v roztoku s konstantní koncentrací hyaluronanu na intenzitu fluorescence CCVJ a DCVJ a poměr excimer/monomer P3P. 24
3. 4. Výsledky a diskuze ... 25
3. 4. 1. Kalibrační řady ... 25
3. 4. 2. Vliv vzrůstající koncentrace CTAB v roztoku, vliv iontové síly na anizotropii DPH a fluoresceinu ... 28
3. 4. 3. Vliv vzrůstající koncentrace CTAB a iontové síly v roztoku s konstantní koncentrací hyaluronanu na anizotropii DPH a fluoresceinu ... 30
3. 4. 4. Vliv vzrůstající koncentrace CTAB v roztoku s konstantní koncentrací hyaluronanu na intenzitu fluorescence CCVJ a DCVJ a poměr excimer/monomer P3P. 32
3. 4. 5. Porovnání výsledků ... 34

5. ZÁVĚR 37
6. SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ 39
7. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ 41
Seznam zkratek 41
Seznam symbolů 41

1. ÚVOD

Biopolymery jsou přírodní látky polymerního charakteru neboli biomakromolekuly, které tvoří základ živých soustav. Patří mezi ně proteiny, polysacharidy, nukleové kyseliny a kaučuk. Následující práce se zabývá jednou výjimečnou makromolekulou, kyselinou hyaluronovou a studiem jejích interakcí s kationaktivním tenzidem CTAB za použití mikroviskozitních fluorescenčních sond.

Kyselina hyaluronová je bílá práškovitá látka bez zápachu, silně hydrofilní. Její struktura a chování v roztoku jsou soustavně zkoumány už od roku 1934, kdy ji Karl Meyer objevil [1]. Je to tělu vlastní látka, tzn., že není cytotoxická, imunogenní ani teratogenní, a proto je její průmyslové využití široké. Používá se např. v potravinářství, farmacii a medicíně (prostředky na hojení ran) a v neposlední řadě také v kosmetickém průmyslu.

Interakcí sodné soli kys. hyaluronové (NaHya) a alkyltrimethylammonium bromidů o různých délkách řetězce se zabývali **Kyrre Thalberg a Bjorn Lindman** [2]. Ke studiu těchto interakcí použili měření fázové separace, konduktivity, NMR vlastní difuze a solubilizaci barviv.

Měřením fázové separace bylo zjištěno, že interakce NaHya a alkyltrimethylbromidů s větším počtem uhlíků než deset často vede k fázové separaci. Pro tenzidy s nižším počtem uhlíků je energeticky výhodnější tvořit v roztoku volné micely a s hyaluronanem nereagovat. Nejnižší hodnota koncentrace tenzidu, při níž vzniká sraženina, koreluje s CMC. Vzhled vzniklé sraženiny je závislý na koncentraci tenzidu-od lehké opalescence až do mléčné sraženiny. Sraženina je vysoce viskózní, přechází na gel.

Výsledky měření konduktivity mapují počátek interakcí mezi tenzidy a hyaluronanem, navázání tenzidu na NaHya a konec vazného regionu. Křivka závislosti vodivosti na koncentraci tenzidu je v případě, že tenzid s NaHya nereaguje, lineární. Pokud reaguje, objevují se v této křivce dva zlomy-dvě další lineární oblasti. První zlom při koncentraci c_1 znamená počátek vázání, druhý zlom při koncentraci c_2 znamená konec vazného regionu. Při tomto měření bylo také zjištěno, že směrnice křivky závislosti vodivosti na koncentraci tenzidu v roztoku s NaHya je nižší než v roztoku samotného tenzidu z důvodu elektrostatických interakcí. Dále bylo zjištěno, že část bromidů (25%) následuje tenzid (TTA^+) ve vázání se na NaHya.

Měřením NMR difuse bylo zjištěno, že při nízkých koncentracích tenzidů je difusní koeficient téměř konstantní, asi o 16% menší než v čisté vodě. Od koncentrací tenzidu 60 mM se difusní koeficienty snižují-tenzid se začíná vázat na NaHya.

Solubilizačními experimenty s Oranží OT, která není rozpustná v kys. hyaluronové byly získány solubilizační zóny. První zóna je od koncentrace tenzidu 0,3 mM do 1,4 mM (TTAB), což znamená, že se tenzid navázal na hyaluronan a vytvořil se komplex, který je toto barvivo schopný rozpustit. Od koncentrace 0,7 mM CTAB dochází k fázové separaci, výsledky solubilizace po této hodnotě odpovídají kapalině nad sraženinou. Při vytváření sraženiny přidávaný TTAB částečně interaguje a částečně je v roztoku přítomen jako volný monomer, nedochází tedy k rozpuštění barviva. Po překročení CMC v supernatantu dochází k vytvoření micel a solubilizace barviva prudce vzroste.

Provedenými experimenty bylo zjištěno, že interakce tenzidů a hyaluronanu vede k vytvoření agregátů podobných micelám, které jsou navázány na řetězci polyelektrolytu, avšak jsou menší než odpovídající volné micely.

Kyrre Thalberg, Bjorn Lindman a Gunnar Karlstörm dále zkoumali fázové chování systému kationaktivního tenzidu a anionaktivního polyelektrolytu z hlediska vlivu přidané soli [3]. Zkoumaným systémem byl hyaluronan sodný o různé molekulové váze, CTAB a

NaBr. Bylo zjištěno, že při koncentraci soli větší než 250 mM nedochází k fázové separaci, ale při koncentraci NaBr větší než 500 mM se fázová separace může znovu objevit-je ovšem zcela odlišného charakteru než fázová separace dosažená při nízkých koncentracích soli.

Prezentované fázové diagramy ukazují, že přídavek soli vede ke zmenšení dvoufázové oblasti oproti roztoku bez soli, především z důvodu elektrostatických interakcí. Z výsledků je také patrné, že NaHya může vázat více tenzidu v přítomnosti soli, ovšem elektrostatické interakce v roztoku jsou přídavkem soli sníženy a zvyšující se koncentrace soli dokonce způsobuje zvýšení poměru náboje CTAB a NaHya v koncentrovanější fázi a snížení koncentrace NaHya, což znamená, že většina interakcí mezi NaHya a tenzidem je elektrostatické povahy.

Dále bylo zjištěno, že rozdílná molekulová hmotnost NaHya nemá na fázovou separaci téměř žádný vliv. Tenzid CTAB, použitý v tomto experimentu, je používán při zkoumání agregací systému biopolymer-tenzid v následující práci.

Kyrre Thalberg a spol také studovali systém kationaktivního tenzidu a anionaktivního polyelektrolytu pomocí časově rozlišené fluorescence [4]. Spektra pyrenu byla v tomto případě stejná v roztoku samotného tenzidu i v roztoku po přidání NaHya, což znamená, že přídavek NaHya nijak neovlivní tvorbu micel. Doba života fluorescence pyrenu byla naměřena vyšší se zvyšující se koncentrací NaHya, což se dá vysvětlit dvojím způsobem. Buď tak, že polyelektrolyt nahradí bromidové ionty, které fungují v roztoku jako zhášeč, a proto se doba života fluorescence prodlouží, nebo tak, že prostředí uzavřené micely chrání pyren před kyslíkem v roztoku, který také působí jako zhášeč.

Metodu fluorescence používal také **Evertsson a spol** ve svém výzkumu mikrostruktur formovaných v roztoku hydrofobní modifikované neionické celulózy a tenzidu SDS [5]. Při tomto měření byla použita technika tzv. steady-state fluorescence, neboli fluorescence za ustáleného stavu, k dosažení informací o mikroprostředí roztoku hydrofobní modifikované neionické celulózy a tenzidu SDS. Při měření byly použity tyto sondy: pyren pro informace o mikropolaritě, a 1,3-bispyrenylpropan (P3P) pro informace o mikroviskozitě. Bylo zjištěno, že poměr intenzit pásu monomeru ku pásu excimeru je v polymerních micelách mnohem větší než v micelách samotného SDS (12-13), jejich vnitřní prostředí je tedy viskóznější, téměř rigidní. S přídavky SDS mikroviskozita roste. S rostoucí mikroviskozitou mírně klesá mikropolarita micel (I_1/I_3 poměr u pyrenu klesá).

Mikroprostředím micel se zabýval také **Osman a spol.** [6]. Ve svém experimentu zkoumal micely biosurfaktantu (biologická povrchově aktivní látka) surfaktinu pomocí fluorescenční spektroskopie za použití sondy P3P. Mikroviskozita micel surfaktinu roste při pH 6 a také se zvyšující se teplotou.

Donner a spol. [7] se zabývali obecně spektrofluorimetrickými metodami měření mikroviskozity v potravinových systémech. Zaměřili se na tři metody: anizotropie, zhášení fluorescence a tvoření intramolekulárních komplexů. Jako fluorescenční sondy pro tyto metody byly použity difenylhexatrien (DPH), pyren a P3P.

Metodou anizotropie se podrobně zabýval **Marangoni** [8], sloužila mu jako nástroj k určení mikroviskozity v potravinových systémech. Používal sondu DPH.

Thorsteinsson a spol. [9] použil k výzkumu CMC detergentů také metodu fluorescenční anizotropie. Samotný fluorescein má nízkou hodnotu anizotropie, zatímco fluorescein navázaný na molekulu tenzidu má hodnotu anizotropie vyšší, tato metoda je tedy vhodná pro určení CMC různých tenzidů.

2. TEORETICKÁ ČÁST

2. 1. Kyselina hyaluronová, hyaluronan

2. 1. 1. Historie

Kyselina hyaluronová byla poprvé popsána Karlem Meyerem, který ji izoloval z očního sklivce hovězího oka [10]. Její název pochází z řečtiny, kde hyalos znamená sklovitý. Meyer a Palmer v roce 1934 zkoumali strukturu této nové látky a zjistili, že obsahuje kyselinu uronovou a glukosamin a neobsahuje sulfoestery [11]. Také zjistili, že při fyziologickém pH jsou všechny karboxylové skupiny disociovány. Proto byl tento polysacharid nazván kyselinou. Soli jsou označovány jako hyaluronany.

V průběhu 40. let byl hyaluronan izolován z mnoha zdrojů jako jsou oční sklivec, kloubní tekutina, pupeční šňůra, kůže, kohoutí hřebínky a také ze streptokoků. Fyzikálně-chemická charakterizace hyaluronanu probíhala v 60. letech. Bylo zjištěno, že molekulová hmotnost hyaluronanu je v řádech několika milionů a v roztoku se řetězec chová jako náhodně svinutá stuha s průměrem ~ 500 nm [12][13]. Tvar molekuly hyaluronanu v roztoku je ovlivněn působením kombinace chemické struktury disacharidu, vnitřních vodíkových můstků, a interakcemi s rozpouštědlem [14]. Axiální vodíkové atomy tvoří nepolární, relativně hydrofobní část, zatímco ekvatoriální řetězec tvoří polárnější, hydrofilní část. Molekula pak vypadá jako stočená stuha. To má za následek, že i v nízkých koncentracích pod 0,1 %hm. má roztok vysokou viskozitu. Tyto vlastnosti umožňují hyaluronanu regulovat rovnováhu vody a osmotický tlak, interagovat s proteiny, zachycovat makromolekuly, působit i jako lubrikant a stabilizovat molekuly navázané v síti hyaluronanu elektrostatickými interakcemi.

V roce 1972 bylo objeveno, že hyaluronan interaguje s chrupavkovými proteoglykany a slouží jako hlavní strukturní „páteř" chrupavky. Toto byl první příklad specifické interakce hyaluronanu s proteinem. Od té doby jich bylo objeveno ještě mnoho [15][16][17][18]. Po roce 1980 se výzkum rozdělil na více částí, hlavně proto, že se předpokládalo, že hyaluronan patří k proteoglykanům a jeho biosyntéza tudíž probíhá podobně. Dalším mylným předpokladem bylo, že tato biosyntéza probíhá v Golgiho aparátu. Později bylo dokázáno, že hyaluronan je syntetizován v plazmatických membránách a řetězec je pak přímo vytlačován do extracelulární matrix.

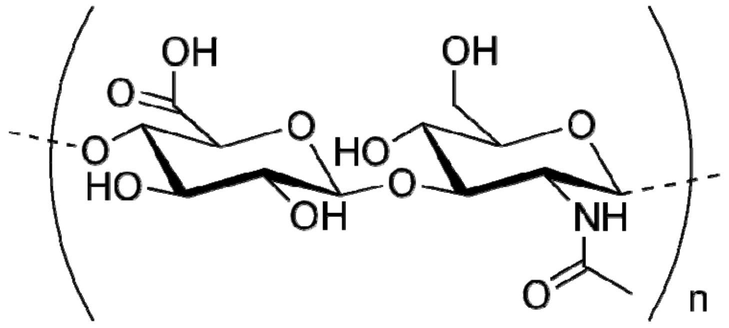
Balazs v roce 1982 vyvinul první průmyslově používanou metodu separace hyaluronanu a podařilo se mu vyprodukovat hyaluronan pro komerční použití jak v oční chirurgii, tak jako preparát na doplnění kloubních tekutin. V průběhu 80. let byly objeveny na buněčném povrchu proteiny vázající hyaluronan a v průběhu 90. let byly intenzivně studovány zejména z důvodu předpokladu, že jsou i na povrchu rakovinných buněk. Funkce některých bílkovin vázajících hyaluronan je dodnes neobjasněná. V 90. letech byly také z různých zdrojů získávány hyaluronansyntázy, každá schopná vyprodukovat hyaluronan různé molekulové hmotnosti a vlastností.

2. 1. 2. Chemická struktura

Hyaluronan se skládá ze základních disacharidových jednotek tvořených D-glukuronovou kyselinou a D-*N*-acetylglukosaminem, které jsou spojeny dohromady střídavě přes β-1,4 a β-1,3 glykosidickou vazbu (Obr. 1). Počet opakujících se disacharidových jednotek v molekule hyaluronanu dosahuje 10^4 nebo i více.

Ve fyziologickém roztoku je kostra hyaluronanu vyztužena kombinací chemické struktury disacharidu, vnitřními vodíkovými vazbami a interakcemi s rozpouštědlem. Hyaluronan ve vodě má stužce podobnou sekundární strukturu. Opačné strany stužky jsou identické, a to hyaluronanu umožňuje agregovat ve vodě pomocí specifických interakcí a vytvářet síťované

struktury dokonce i při nízkých koncentracích. Ve fyziologických roztocích tvoří hyaluronan náhodné, neuspořádané „klubko“, které v roztoku zabírá velkou doménu:1 mg hyaluronanu na 1 cm^3 roztoku. Toto uspořádání hyaluronanu v roztoku má za následek, že malé molekuly, jako je voda nebo elektrolyty mohou volně difundovat přes doménu, zatímco velké molekuly jako proteiny nemohou projít - kvůli svým rozměrům. To vede jak k pomalejší difusi makromolekul, tak k jejich menší koncentraci v síti hyaluronanu.



Obr. 1: Strukrura opakující se jednotky v hyaluronanu

2. 1. 3. Výskyt

Hyaluronan se vyskytuje ve všech obratlovcích a je také přítomný v pouzdrech některých patogenních bakterií jako jsou *Streptococcus* a *Pasteurella*. Je součástí extracelulární matrix v mnoha tkáních a v některých je přítomen dokonce jako hlavní stavební látka. Koncentrace hyaluronanu je nejvyšší v kohoutím hřebínku, v kloubní tekutině, v pupeční šňůře, ve sklivci oka a v kůži [22].

2. 2. Tenzidy

Tenzidy jsou povrchově aktivní látky, což znamená, že jsou schopny adsorbovat se na mezifázová rozhraní. Fázové rozhraní znamená hranici mezi dvěma různými nemísitelnými fázemi, přičemž u systému kapalina/vzduch je to povrch kapaliny.

Důvodem, proč se tenzidy adsorbují na mezifázová rozhraní, je snížení volné energie tohoto rozhraní. Volná energie rozhraní na jednotku povrchu představuje práci potřebnou k expanzi povrchu. Obvykle se pro tuto volnou energii používá termín *povrchové napětí*. Jestliže se povrch pokryje molekulami tenzidu, povrchové napětí, a tím tedy i volná energie rozhraní, se sníží. Existuje pět různých druhů mezifázových rozhraní. Jsou uvedeny v tabulce (Tabulka 1). Jestliže se tenzidy absorbují na povrchu, orientují se jejich polární části do roztoku a nepolární části na mezifázovém rozhraní. Povrch se tak stává hydrofilní a výsledkem je snížení povrchového napětí mezi povrchem a vodou.

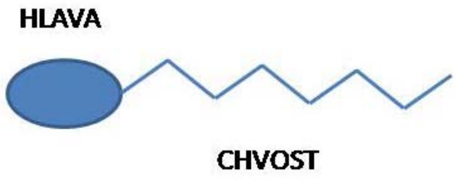
Tabulka 1: Druhy mezifázových rozhraní

Mezifázová rozhraní
Pevná látka – plyn
Pevná látka – kapalina
Pevná látka – pevná látka
Kapalina – plyn
Kapalina – kapalina

2. 2. 1. Amfifilní struktura tenzidů

Tenzidy jsou amfifilní látky. Toto slovo má původ v řečtině, kde amfi znamená „obojí“ a poukazuje na fakt, že molekuly tenzidů jsou složeny ze dvou částí, z nichž jedna je rozpustná v rozpouštědle a druhá nerozpustná. Část rozpustná se nazývá lyofilní, části

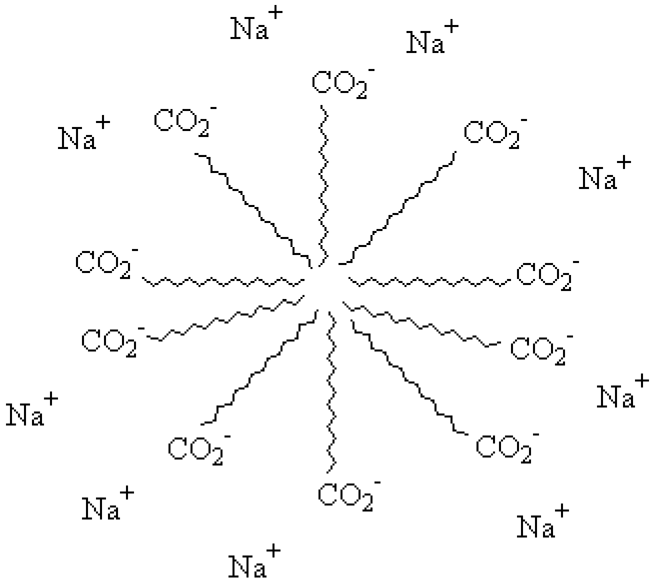
nerozpustné se říká lyofobní. Pokud je touto kapalinou voda, mluvíme o hydrofilní, resp, hydrofobní části. Hydrofilní část se dále označuje jako „hlava“ a hydrofobní jako „chvost“. Schématickou strukturu molekuly tenzidu popisuje Obr. 2.



Obr. 2: Schématická struktura tenzidu, hydrofilní „hlava“ a hydrofobní „chvost“.

2. 2. 2. Micely

Mezi další významné vlastnosti tenzidů patří schopnost agregovat ve vodných roztocích, agregáty se nazývají *micely*. Formování micel, neboli micelizace je alternativní mechanismus adsorpce na mezifázovém rozhraní. Při micelizaci dochází k uspořádání molekul tenzidu tak, aby jejich hydrofobní části nebyly v kontaktu s vodou, tím se opět snižuje volná energie systému. V micelách jsou molekuly tenzidů organizovány tak, že hydrofilní polární hlava je na povrchu agregátu a hydrofobní nepolární chvost je uvnitř agregátu. Celá micela je tak ve vodě rozpustná a v jejím hydrofobním jádře se mohou rozpustit sloučeniny ve vodě nerozpustné. Schematická struktura micely je znázorněna na Obr. 3. Micely se tvoří již při velmi nízkých koncentracích tenzidu, např. u tenzidu CTAB ve vodě je tato koncentrace přibližně 1 mM. Koncentrace, při které je povrch nasycen molekulami tenzidu a v roztoku dochází k tvorbě micel, se nazývá kritická micelární koncentrace, neboli CMC a je to důležitá charakteristika tenzidu.

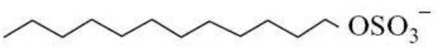


Obr. 3: Struktura micely

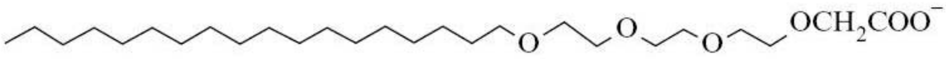
2. 2. 3. Klasifikace tenzidů

Tenzidy se primárně dělí podle náboje polární skupiny na anionaktivní, kationaktivní, neionogenní a amfiprotické. Amfiprotické tenzidy nesou za normálních podmínek kladný i záporný náboj.

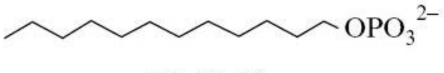
Anionaktivní tenzidy mají obvykle jako polární část karboxyskupiny, sulfáty, sírany a fosfáty. Vzhledem k jejich poměrně nízkým nákladům na výrobu tvoří až 60% celosvětové produkce tenzidů [19]. Párovým iontem těchto tenzidů bývá nejčastěji Na^{+},K^{+}, NH_4^{+}, Ca^{2+}. Sodík a draslík zabezpečuje rozpustnost ve vodě, zatímco vápník a hořčík rozpustnost v olejích. Některé anionaktivní tenzidy jsou vyobrazeny na Obr. 4.



Alkylsulfát



Alkyl éter karboxylát

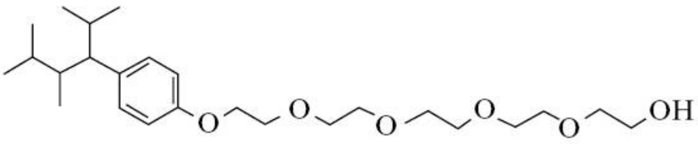


Alkylfosfát

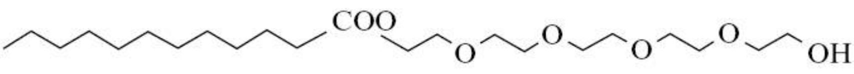
Obr. 4: Příklady anionaktivních tenzidů

Neionogenní tenzidy mají jako polární část buď polyetherovou nebo polyesterovou jednotku. Ve většině neionogenních tenzidů je tato jednotka polyether sestávající z oxyethylenových jednotek, obvykle je jich pět až deset. Příklady neionických tenzidů jsou na Obr. 5.

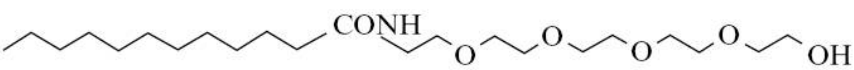
Ethoxylát vyššího alkoholu



Alkyfenol ethoxylát



Ethoxylát vyšší mastné kyseliny

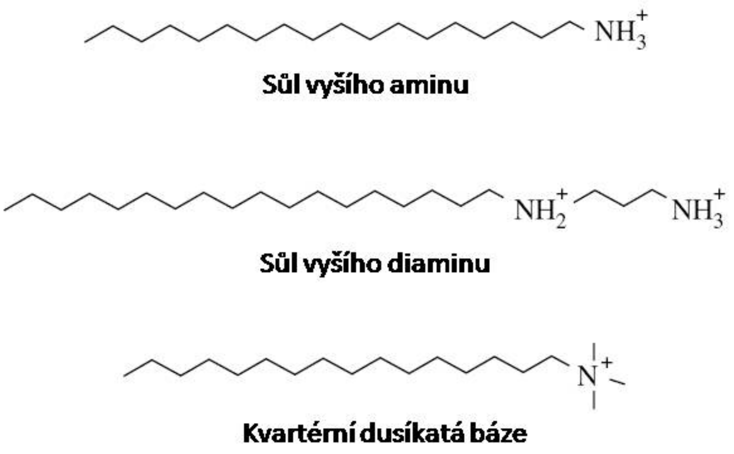


Ethoxylát vyššího amidu

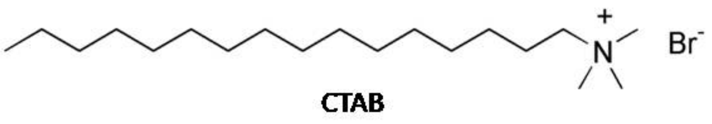
Obr. 5: Schématické znázornění struktury některých neionických surfaktantů

Kationaktivní tenzidy obsahují ve většině případů dusíkový atom nesoucí kladný náboj. Používají se jak aminy, tak kvartérní dusíkaté báze. Aminy fungují jako surfaktanty pouze

v protonovaném stavu a nelze je použít při vysokém pH, oproti tomu kvartérní dusíkaté báze nejsou citlivé na pH. Aminy jsou také mnohem citlivější na polyvalentní anionty. Příklady kationaktivních tenzidů jsou uvedeny na Obr. 6. Mezi kationaktivní tenzidy patří také cetyltrimethylamonium bromid, neboli CTAB. Jeho struktura je znázorněna na Obr. 7.



Obr. 6: Schématické znázornění struktury některých kationaktivních surfaktantů



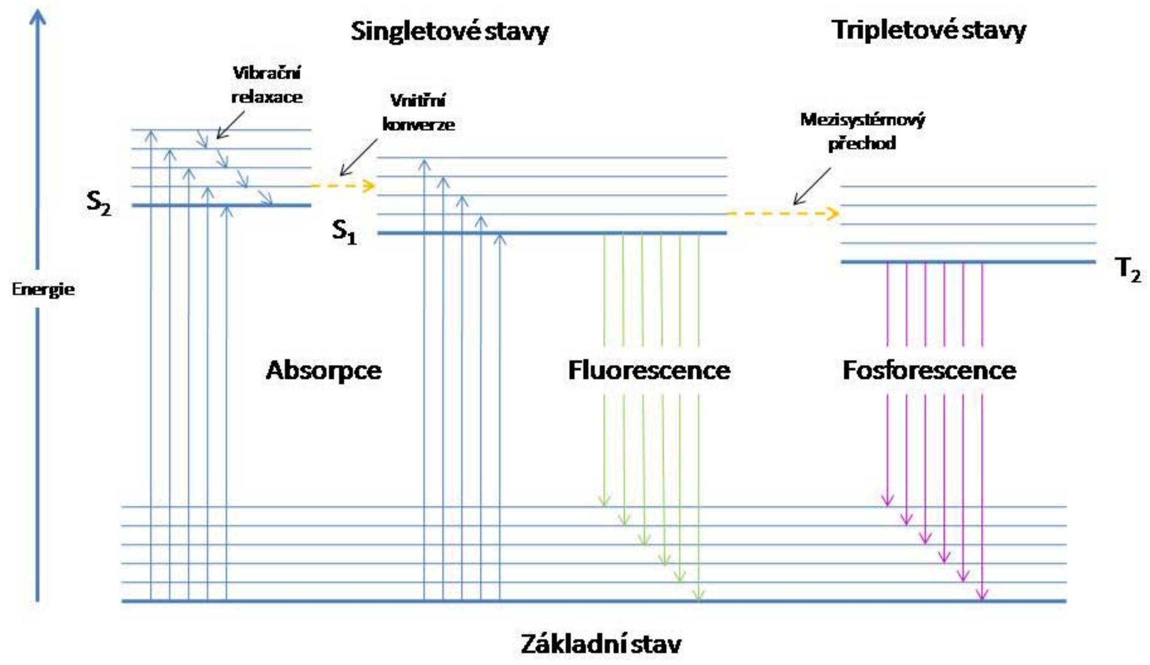
Obr. 7: Kationaktivní cetyltrimethylamonium bromid

2. 3. Fluorescence

Jestliže organická molekula absorbuje určité kvantum energie, dostane se ze základního energetického stavu do stavu excitovaného. Ze základního singletového stavu S_0 může molekula přejít do vyšších energetických singletových stavů S_1, S_2 nebo do takzvaných tripletových stavů T_1, T_2 s odlišnou multiplicitou. Při pokojové teplotě je rozdíl energetických hladin příliš vysoký na to, aby se dal překonat zvýšením teploty nebo zahříváním, používá se tedy excitace světelným zářením.

Po absorpci fotonu se elektrony excitují a nějakou dobu zůstanou excitovány. Excitace elektronů na hladině S_1 trvá přibližně 10^{-10}-10^{-7} s, na hladině T_1 10^{-6}-1 s [20]. Poté následuje deexcitace elektronů, které z vyšších energetických hladin přechází do nižších a přitom vyzáří energii určité vlnové délky. Tato vyzářená energie má vyšší vlnovou délku než je excitační vlnová délka a spadá buď do oblasti viditelného světla (zářivé přechody), nebo neviditelného vlnění (nezářivé přechody). Přechody jsou většinou nezářivé, pouze při přechodu z hladiny S_1 do hladiny S_0 nastává přechod zářivý. Zářivé přechody se obecně nazývají luminiscence a jsou rozděleny na fluorescenci a fosforescenci. Fluorescence je přechod z hladiny S_1 do základního stavu a fosforescence je přechod z hladiny T_1 do základního stavu. Stejně jako je rozdílná doba trvání excitovaného stavu na hladině S_1 a T_1, je rozdílná i doba trvání fosforescence a fluorescence. Zatímco doba života fluorescence je 10^{-10}-10^{-7} s, doba života fosforescence je 10^{-6}-1 s. Při nezářivých přechodech typu ISC (mezisystémový přechod) dochází k přechodu elektronu ze základní hladiny singletového stavu do podhladiny tripletového stavu se stejnou energií a následné vibrační relaxaci, což znamená, že elektron se z vyšší vibrační hladiny tripletového stavu dostane na hladinu základní a přitom ztratí energii. U přechodů typu IC (vnitřní konverze) se děje to samé, ale v rámci buď singletového, nebo

tripletového stavu.Všechny tyto procesy jsou graficky znázorněny v Perrin – Jabloňskiho diagramu. (Obr. 8)



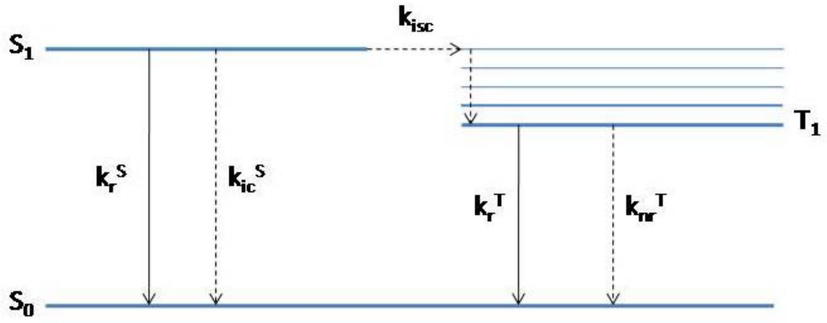
Obr. 8: Perrin – Jabloński diagram

2. 3. 1. Vnitřní konverze

Vnitřní přeměna je nezářivý přenos mezi dvěma energetickými stavy se stejnou spinovou multiplicitou. Excitovaná částice směřuje k nejnižší vibrační hladině nižšího energetického stavu a přebytek vibrační energie může být přenesen do okolního prostředí v průběhu srážek excitovaných částic s tímto okolím. K těmto přechodům dochází nejčastěji při přechodu mezi vyššími hladinami, protože energetický rozdíl mezi základním singletovým stavem S_0 a prvním excitovaným stavem S_1 je větší než např. mezi stavy S_2 a S_1.

2. 3. 2. Mezisystémový přechod

Mezisystémový přechod je nezářivý přenos mezi dvěma isoenergetickými hladinami, které patří energetickým stavům s rozdílnou multiplicitou. Například excitovaná molekula ve vibračním stavu 0 hladiny S_1 může přeskočit do vibračního stavu T_n se stejnou energií a poté se vibrační relaxací dostane na nejnižší vibrační stav T_1.



Obr. 9: Rychlostní konstanty zářivých a nezářivých přenosů z hladiny S_1 , resp. T_1 na hladinu S_0.

2. 3. 3. Doba trvání excitovaného stavu

Všechny procesy deexcitace elektronů z energetických hladin, jak zářivé tak nezářivé, probíhají určitou rychlosti, mají svoje rychlostní konstanty. Konstanty probíhajících deexcitačních procesů jsou znázorněny na Obr. 9.

Značení konstant je následující: k_r^S pro zářivý přenos z hladiny S_1 (fluorescenci), k_{ic}^S pro vnitřní konverzi, k_{isc} pro mezisystémový přechod k_r^T pro zářivý přenos z hladiny T_1 (fosforescenci), k_{nr}^T pro nezářivý přenos z hladiny T_1. Číselné hodnoty těchto konstant jsou uvedeny v tabulce 2.

Tabulka 2: Hodnoty rychlostních konstant zářivých a nezářivých přenosů

Konstanta	Číselná hodnota
k_r^S	10^7-10^{10}
k_{ic}^S	10^9-10^{11}
k_{isc}	10^8-10^{10}
k_r^T	1-10^6
k_{nr}^T	10^{10}-10^{12}

Máme-li fluoreskující látku A o koncentraci [mol dm^{-3}], pak krátký impuls světla dostane určité množství molekul látky A ze stavu S_0 do stavu S_1. Stejný počet molekul se pak vrací do stavu S_0 buď zářivě, nebo nezářivě. Rychlostní rovnice úbytku excitovaných molekul je pak vyjádřena takto:

$$-\frac{\mathrm{d}[^1\mathrm{A}^*]}{\mathrm{d}t} = \left(k_r^S + k_{nr}^S\right)[^1\mathrm{A}^*] \qquad (1)$$

Integrací této rovnice dostaneme časový vývoj koncentrace excitovaných částic, kde $[^1\mathrm{A}^*]_0$ je koncentrace excitovaných částic v čase 0.

$$[^1\mathrm{A}^*] = [^1\mathrm{A}^*]_0 \exp\left(-\frac{t}{\tau_S}\right), \qquad (2)$$

kde τ_S je doba trvání excitovaného stavu S_1

$$\tau_S = \frac{1}{\left(k_r^S + k_{nr}^S\right)} \qquad (3)$$

Intenzita fluorescence i_F v čase t je přímo úměrná okamžité koncentraci excitovaných molekul $[^1\mathrm{A}^*]$, směrnice této přímky je rychlostní konstanta zářivých přenosů k_r^S:

$$i_F(t) = k_r^S[^1\mathrm{A}^*] = k_r^S[^1\mathrm{A}^*]_0 \exp\left(-\frac{t}{\tau_S}\right) \qquad (4)$$

Tato intenzita je *skutečná* intenzita fluorescence. Naměřená intenzita závisí na nastavení přístroje.

Pokud by fluorescence byla jediná cesta ze stavu S_1 do stavu S_0, pak by doba trvání excitovaného stavu byla $1/k_r^S$. Této době se říká zářivá doba života a značí se τ_R. Významnou charakteristikou fluorescenčních molekul je takzvaná doba dohasínání τ_S.

2. 3. 4. Kvantový výtěžek

Kvantový výtěžek je poměr počtu světelných kvant emitovaných a absorbovaných fluoroforem za časovou jednotku.

$$\Phi_F = \frac{k_r^S}{k_r^S + k_{nr}^S} = k_r^S \tau_S \tag{5}$$

Jinými slovy lze kvantový výtěžek fluorescence vyjádřit jako poměr emitovaných a absorbovaných fotonů:

$$\frac{i_F(t)}{[^1A^*]_0} = k_r^S \exp\left(-\frac{t}{\tau_S}\right) \tag{6}$$

Integrací této rovnice přes celý průběh dohasínání dostáváme vztah pro kvantový výtěžek fluorescence:

$$\frac{1}{[^1A^*]_0} \int_0^\infty i_F(t)\mathrm{d}t = k_r^S \tau_S = \Phi_F \tag{7}$$

Pokud použijeme zářivé doby života fluorescence, lze kvantový výtěžek vyjádřit i takto:

$$\Phi = \frac{\tau_S}{\tau_R} \tag{8}$$

2. 3. 5. Fluorescenční sondy

Emise fluorescenčních molekul je silně ovlivňována tím, v jakém prostředí se tyto molekuly nachází. Charakteristiky fluorescence, jako např. doba života, poloha maxima nebo intenzita, jsou v závislosti na okolním prostředí odlišné. V důsledku této vlastnosti jsou fluorescenční molekuly využívány jako sondy mapující prostředí ve výzkumu fyzikálně-chemických, biologických a biochemických systémů. Výhodou použití fluorescenčních sond oproti jiným používaným sondám (např. EPR sondám či radioaktivnímu značení) je především možnost charakterizovat různé systémy: polymery, pevné povrchy, biologické membrány, bílkoviny aj.

Fluorescenční sondy se dělí do tří skupin: vnitřní sondy, vnější kovalentně vázané sondy a vnější asociující sondy. Vnitřní sondy jsou pro fluorescenční měření nejvhodnější, ale existuje jich pouze málo (např. tryptofan v bílkovinách). Kovalentně vázané sondy mají tu výhodu oproti asociativním sondám, že je ve výsledném systému lze přesně lokalizovat. Nejvíce používané jsou vnější asociující sondy, které se dále mohou dělit na tři typy: hydrofilní, hydrofobní a amfifilní sondy. Výběr správné fluorescenční sondy probíhá podle toho, jaké informace chceme o charakteru okolního prostředí sondy získat a podle toho se dále rozdělují i fluorescenční sondy např. na polaritní nebo mikroviskozitní sondy.

2. 3. 6. Viskozita

Viskozita byla poprvé popsána Newtonem v 17. století. V roce 1851 popsal Stokes sílu kapaliny F působící na kouli o viskozitě η:

$$F = 6\pi\eta v r, \tag{9}$$

kde r je poloměr koule a v je konstantní rychlost kapaliny. Součin $6\pi\eta r$ byl v tomto případě nazván tzv. *třecím koeficientem*, což je poměr viskozitních a rychlostních sil.

Stokes-Einsteinova rovnice definuje difusní koeficient koule:

$$D = \frac{kT}{\xi}, \tag{10}$$

kde k je Boltzmannova konstanta, T je termodynamická teplota a ξ je třecí koeficient. Pak vztahy pro translační a rotační difusní koeficient jsou následující:

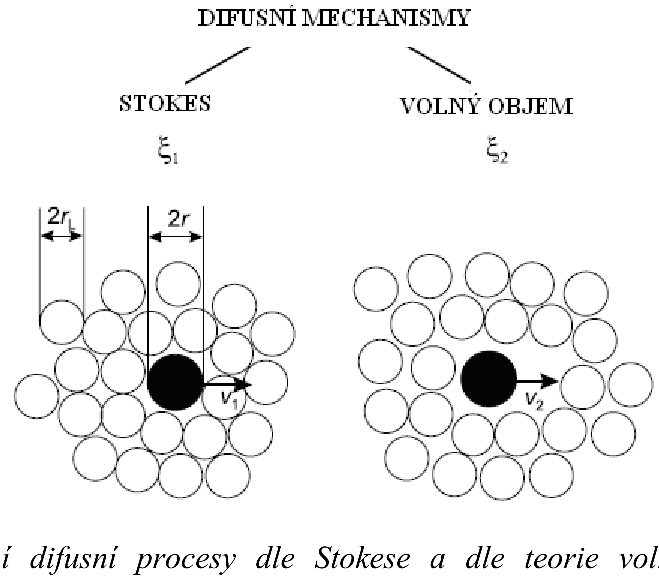
$$D_t = \frac{kT}{6\pi\eta r}, \tag{11}$$

$$D_r = \frac{kT}{8\pi\eta r^3} = \frac{kT}{6\eta V}, \tag{12}$$

kde r je hydrodynamický poloměr vrstvy a V je hydrodynamický objem.

V každé fluorescenční technice, která hodnotí fluiditu mikroprostředí pomocí fluorescenčních sond je třeba brát v úvahu také difusní koeficient, buď translační, nebo rotační, který vyjadřuje brzdění rychlosti okolních molekul v důsledku viskozity. Hlavní otázkou tedy je, jak přiblížit difusní konstantu D viskozitě η.

Rovnice (3),(4) platí pouze pro pevnou vrstvu, za kterou se dají pokládat molekulární dimenze pohybující se v homogenních newtonovských kapalinách a řídící se Stokesovým hydrodynamickým pravidlem. Je třeba zdůraznit, že pro sondy neexistuje žádný vztah mezi difusí a viskozitou roztoku. Je to dáno především jejich velikostí, jejich molekuly jsou stejně velké, nebo menší, než molekuly prostředí, které mají charakterizovat. Jinými slovy, viskozita je makroskopický parametr a její absolutní hodnotu pro zkoumané médium nikdy nemůžeme získat měřením pomocí fluorescenčních sond. Byl tedy zaveden termín *mikroviskozita*.



Obr. 10: Translační difusní procesy dle Stokese a dle teorie volného objemu. Černě znázorněna je rozpuštěná molekula, okolo jsou molekuly rozpouštědla.

2. 3. 7. Mikroviskozita

Tento termín je často používán, ovšem fluorescenčními sondami nemůžeme změřit absolutní hodnoty mikroviskozity, stejně jako jimi nemůžeme změřit ani absolutní hodnoty viskozity Proto nejlepším vyjádřením pro získané výsledky je tzv. *ekvivalentní viskozita*. Ekvivalentní viskozita je viskozita v homogenním médiu, ve kterém je odpověď sondy při měření stejná. Problém nastává při výběru referenčního rozpouštědla, protože rotační

relaxační rychlost sondy v různých rozpouštědlech o stejné makroskopické viskozitě závisí na struktuře rozpouštědla.

Rovnice (4) v případě mikroprostředí může být napsána jako:

$$D_r = \frac{kT}{6\eta Vsg}, \tag{13}$$

kde *s* charakterizuje vazné podmínky a *g* je faktor tvaru.

Další pohled na viskozitu v mikro měřítku byl představen v roce 1953 dvojicí Gierer a Wirtz. V této teorii se klade důraz zejména na konečnou tloušťku vrstev rozpouštědla a existenci tzv. *volného objemu*, tedy prázdných „děr“ v rozpouštědle. Rozpuštěné molekuly podstupují dva difusní procesy: viskózní, kde nahrazují molekuly rozpouštědla (Stokesova difuse) a proces migrace do „děr“ v rozpouštědle (difuse do volného objemu) (Obr. 10).

Kombinací obou těchto teorií byl zjištěn translační difusní koeficient na molekulární úrovni:

$$D_t = \frac{kT}{6\pi\eta r f_t}, \tag{14}$$

kde f_t je třecí faktor pro translaci. Empirický vztah mezi viskozitou a volným objemem byl navrhnut Doolitlem:

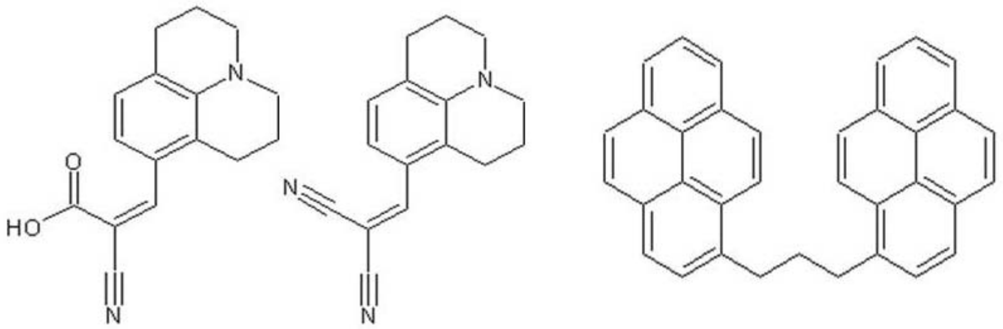
$$\eta = \eta_0 \exp\left(\frac{V_O}{V_f}\right), \tag{15}$$

kde η_0 je konstanta V_0 je van der Waalsův objem a V_f je volný objem.

2. 3. 8. Mikroviskozitní sondy

Fluorescenční sondy, které při měření poskytují údaje o mikroviskozitě jejich okolního prostředí nazýváme *mikroviskozitní sondy*. Měření mikroviskozity pomocí těchto sond je založeno na různých principech.

Metoda používající molekulární rotory: molekulární rotory jsou molekuly s vnitřní rotací, a proto se s měnící viskozitou prostředí mění jejich emisní vlastnosti. Je to např. 9-(2-karboxy-2-kyanovinyl)julolidin, dále CCVJ, 4-(dikyanovinyl)julolidin, dále DCVJ. Struktury těchto molekul jsou znázorněny na Obr. 11.



a) b) c)

Obr. 11: a) CCVJ, b) DCVJ a c) P3P

Vztah mezi kvantovým výtěžkem fluorescence a viskozitou mikroprostředí:

$$\frac{\Phi_F}{1-\Phi_F} = a\eta^x . \tag{16}$$

Pro malé kvantové výtěžky lze tento vztah aproximovat na:

$$\Phi_F \cong a\eta^x \tag{17}$$

Viskozita je funkcí teploty, proto:

$$\Phi_F = b(n/T)^x, \tag{18}$$

kde exponent x je charakteristický pro dané rozpouštědlo a je menší než 1, což znamená, že efektivní viskozita zkoumaná pomocí molekulárních rotorů je menší než celková viskozita roztoku v důsledku působení volných objemů.

Metoda využívající intermolekulární zhášení: Intermolekulární zhášení je translační difusní proces závislý na viskozitě, proto poskytuje informace o fluiditě mikroprostředí, ovšem musí probíhat ve stejném časovém rozsahu jako doba života excitovaného stavu fluoroforu. Rychlostní konstanta zhášení k_q může být zjištěna měřením doby života nebo intenzity fluorescence jako funkce koncentrace zhášeče:

$$\frac{\Phi_0}{\Phi} = \frac{I_0}{I} = 1 + k_q \tau_0[\mathrm{Q}] = 1 + \mathrm{K_{SV}}[\mathrm{Q}], \tag{19}$$

kde Φ_0 resp. Φ je kvantový výtěžek fluorescence bez zhášeče, resp. se zhášečem. Jestliže je tento bimolekulární proces kontrolován difusí, pak rychlostní konstanta zhášení k_q může být nahrazena rychlostní konstantou difuse k_1. Pokud je k_1 nezávislá na čase, pak:

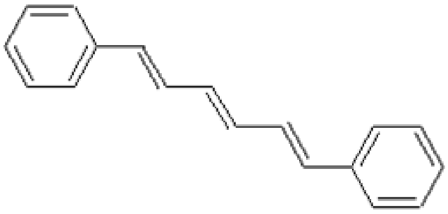
$$k_1 = 4\pi N R_C D, \tag{20}$$

kde R_C je nebližší vzájemná vzdálenost, N je $N_A/1000$, N_A je Avogadrova konstanta, D je vzájemný difusní koeficient

Metoda využívající intermolekulární formace excimeru: Tato metoda je založena na podobném principu jako metoda zhášení, protože se také jedná o proces kontrolovaný difusí. Excimer, neboli excitovaný dimer je tvořený ze dvou molekul, z nichž alespoň jedna je v excitovaném stavu. Excimery se formují v průběhu doby života excitovaného stavu monomeru. Za předpokladu vynechání přechodných vlivů je poměr intenzity excimeru k intenzitě monomeru přímo úměrný k_1. Sondou používanou při této metodě je např. 1,3-bispyrenylpropan, dále P3P. (Obr. 11)

Metoda využívající intramolekulární formace excimeru: Bifluoforické molekuly sestávající ze dvou identických fluoroforů spojených krátkým pružným řetězcem mohou tvořit intramolekulární excimery. V důsledku vnitřní rotace dochází v roztoku k těsnému přiblížení obou fluoroforů v průběhu excitovaného stavu a vzniká excimer. Informace o fluiditě mikroprostředí je následně získávána stejně jako u metod využívající intermolekulární formace excimeru.

Metoda polarizace fluorescence: Budeme uvažovat izotropní rotaci v izotropním médiu. Rotace jsou izotropní, pokud má sonda sférický tvar. Takových sond je málo, nicméně experimenty ukázaly, že v některých případech, pokud sonda interaguje vodíkovými můstky s rozpouštědlem, jsou rotace téměř izotropní. Takto reagují sondy, u nichž směr absorpce a emise souhlasí s podélnou osou molekuly, např. difenylhexatrien (DPH) (Obr. 12). Informace o rotačních pohybech fluoroforů mohou být získány měřením tzv. *emisní anizotropie*.



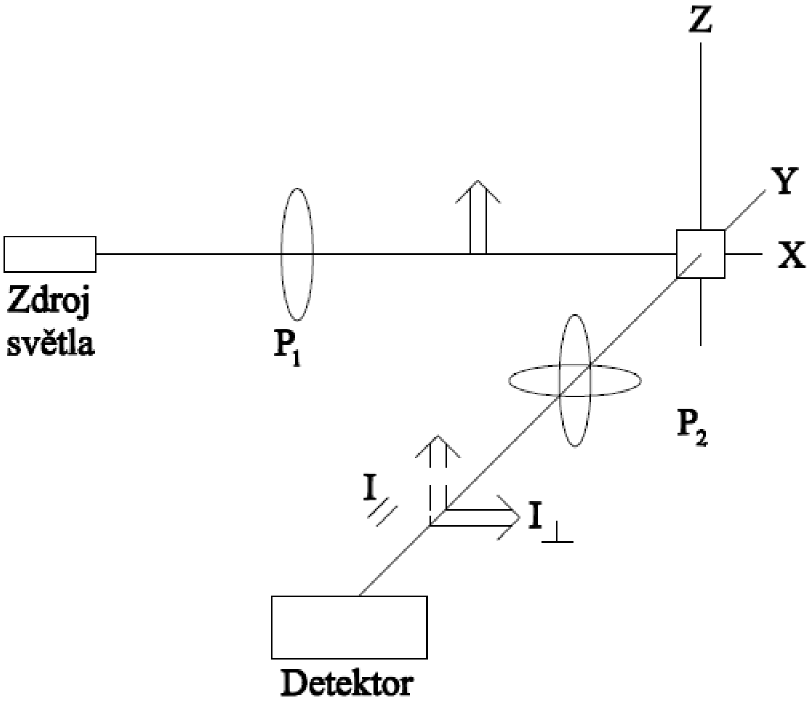
Obr. 12: Difenylhexatrien

2. 3. 9. Anizotropie fluorescence

Měření anizotropie jsou založena na principu fotoselektivní excitace fluoroforů polarizovaným světlem. Molekuly fluoroforů při absorpci upřednostňují fotony, jejichž elektrický vektor je orientován ve stejném směru jako transitní moment molekuly. [21]

Transitní moment má definovanou orientaci – závisí na osách molekuly. V izotropním roztoku jsou molekuly fluoroforů uspořádány náhodně. Po excitaci polarizovaným světlem se excituje pouze ta část molekul, které mají absorpční tranzitní dipól ve stejném směru jako elektrický vektor polarizovaného světla. V roztoku je pak část molekul orientovaná a její emise je polarizovaná.

Typické rozvržení fluorescenčního měření je znázorněno na Obr. 13. Monochromatické světlo je polarizováno polarizátorem P_1 podél osy Z a interaguje se vzorkem v kyvetě. Tato interakce může způsobit depolarizaci roviny příchozího světla. Míra depolarizace je určena měřením intenzit fluorescence rovnoběžně a kolmo na příchozí rovinu světla polarizovaného polarizátorem P_2. [7]



Obr. 13: Rozvržení měření fluorescenční anizotropie

Za maximální měrnou anizotropii r_0 je považován úhel mezi excitačním a emisním zářením u molekuly, která je excitována zářením polarizovaným ve směru její pevné osy. Fundamentální anizotropie r_0 je nejvyšší měřitelná hodnota anizotropie dané molekuly. Např. u molekuly DPH je fundamentální anizotropie, neboli r_0 = 0,36. Fluorescenční anizotropie r je definována vztahem:

$$r = \frac{I_{II} - I_{\perp}}{I_{II} - 2I_{\perp}}, \tag{21}$$

kde I_{II} a $I_{\perp}$ jsou intenzity fluorescence vertikálně (II) a horizontálně ($\perp$) polarizovaného světla, pokud je vzorek excitován vertikálně polarizovaným světlem. Pokud známe hodnotu fundamentální anizotropie, lze anizotropii vypočítat i s pomocí Perrinovy rovnice:

$$\frac{r_0}{r_S} = 1 + \frac{\tau}{\Phi}, \tag{22}$$

kde r_0 je hodnota fundamentální anizotropie, r_S je steady-state anizotropie, Φ je rotační korelační čas

3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3. 1. Použité chemikálie

Pro přípravu měřených vzorků a zásobních roztoků byly použity tyto chemikálie: aceton (Penta, čistota 99,5 %, č. šarže 1212021209), fluorescein (Sigma Aldrich, č. šarže 1407491), DPH (Sigma Aldrich, čistota 98 %, č. šarže 1054132), CCVJ (Sigma Aldrich, čistota 97%, č. šarže 405730/1), DCVJ (Fluka, čistota pro fluorescenci, č. šarže 405729/1), P3P (Molecular probes, č. šarže 4531-2), glycerol (Chemie GmbH, čistota 99 %), methanol (Chemie GmbH, čistota 99,9 %, č. šarže 4271B), CTAB (Sigma Aldrich, čistota 99 %, č. šarže 1406508), Hy active 106 kDa (CPN spol. s.r.o., č. šarže 190707-E1) a chlorid sodný (Lach-Ner s.r.o., čistota 99,5 %, šarže 30453), HySilk 650 kDa (CPN spol. s.r.o., č. šarže 280407-D1)

3. 2. Postup přípravy vzorků a jejich měření

3. 2. 1. Kalibrační řady

Nejprve byly připraveny zásobní roztoky sond v těkavém rozpouštědle. Fluorescein byl rozpuštěn v methanolu, DPH, CCVJ, DCVJ a P3P v acetonu. Konečná koncentrace fluoresceinu v methanolu byla přibližně 10^{-3} mol dm^{-3}, DPH, DCVJ i P3P v acetonu 10^{-4} mol dm^{-3} a CCVJ 10^{-5} mol dm^{-3}. Z těchto roztoků bylo pipetováno do vialek takové množství, aby po odpaření těkavého rozpouštědla byla výsledná koncentrace ve zkoumaném vzorku o hmotnosti 4 g řádově 10^{-5} mol dm^{-3} u fluoresceinu a řádově10^{-6} mol dm^{-3} u DPH, CCVJ, DCVJ a P3P. Těkavá látka byla odpařena.

Po odpaření rozpouštědla byl do vialek se sondou DPH, CCVJ, DCVJ a P3P navážen methanol dle stanovené koncentrační řady, zatímco do vialek obsahujících fluorescein byla navážena voda dle stanovené koncentrační řady. Poté byl methanol, resp. voda doplněn glycerolem na hmotnost 4 g. Namíchané vzorky byly ponechány přes noc na třepačce a následující den byly změřeny.

3. 2. 2. Vliv vzrůstající koncentrace CTAB v roztoku, vliv iontové síly na anizotropii DPH a fluoresceinu

Nejprve byly namíchány zásobní roztoky 0,02 mol dm^{-3} a 0,1 mol dm^{-3} CTAB ve vodě. Dále byly použity namíchané zásobní roztoky 10^{-3} mol dm^{-3} fluoresceinu v methanolu a 10^{-4} mol dm^{-3} DPH v acetonu. Z těchto roztoků bylo pipetováno do vialek takové množství, aby po odpaření těkavého rozpouštědla byla výsledná koncentrace ve zkoumaném vzorku o objemu 3 cm^3 řádově 10^{-5} mol dm^{-3} u fluoresceinu a řádově 10^{-6} mol dm^{-3} u DPH. Těkavá látka byla odpařena.

Po odpaření rozpouštědla byly do vialek pipetovány roztoky CTAB tak, aby výsledná koncentrace CTAB v roztoku o objemu 3 cm^3 byla v souladu s předem navrženou koncentrační řadou. Rozsah koncentrace CTAB byl od 0 mol dm^{-3} do 0,1 mol dm^{-3}. Namíchané vzorky byly doplněny vodou na výsledný objem, ponechány přes noc na třepačce a následující den byly změřeny. Po změření anizotropie koncentrační řady bez iontové síly bylo do vzorků přidáno předem vypočítané množství zásobního roztoku NaCl, vzorky byly ponechány 5 min v ultrazvukové lázni a poté byla opět změřena jejich anizotropie. Tento postup byl opakován, dokud u každého vzorku nebyla změřena anizotropie při navržené iontové síle. Iontová síla byla v rozmezí od 0 do 0,15 mol dm^{-3} NaCl.

3. 2. 3. Vliv vzrůstající koncentrace CTAB a iontové síly v roztoku s konstantní koncentrací hyaluronanu na anizotropii DPH a fluoresceinu

Byl namíchán zásobní roztok Hy active 106 kDa o koncentraci 1 g dm^{-3}. K míchání vzorků byly dále použity zásobní roztoky 0,02 mol dm^{-3} CTAB ve vodě, 0,1 mol dm^{-3} CTAB ve vodě, 10^{-3} mol dm^{-3} fluoresceinu v methanolu a 10^{-4} mol dm^{-3} DPH v acetonu. Z roztoků fluoresceinu a DPH bylo pipetováno do vialek takové množství, aby po odpaření těkavého rozpouštědla byla výsledná koncentrace ve zkoumaném vzorku o objemu 3 cm^3 řádově 10^{-5} mol dm^{-3} u fluoresceinu a řádově 10^{-6} mol dm^{-3} u DPH. Těkavá látka byla odpařena.

Po odpaření rozpouštědla byla do vialek přidán hyaluronan tak, aby jeho koncentrace ve vzorku o objemu 3 cm^3 byla 0,015 g dm^{-3}. Poté byly přidány roztoky CTAB v množství dle navržené koncentrační řady a vzorky byly doplněny vodou na výsledný objem. Rozsah koncentrace CTAB byl od 0 mol dm^{-3} do 0,04 mol dm^{-3}. Namíchané vzorky byly ponechány přes noc na třepačce a následující den byly změřeny stejným způsobem, jako v části 3. 2. 2.

3. 2. 4. Vliv vzrůstající koncentrace CTAB v roztoku s konstantní koncentrací hyaluronanu na intenzitu fluorescence CCVJ a DCVJ a poměr excimer/monomer P3P

Byl namíchán zásobní roztok Hya Silk 650 kDa o koncentraci 1 g dm^{-3}. Pro přípravu vzorků byly použity zásobní roztoky 20 mmol dm^{-3} a 0,2 mmol dm^{-3} CTAB a zásobní roztoky sond CCVJ, DCVJ a P3P. Z roztoků sond bylo do vialek pipetováno takové množství, aby výsledná koncentrace ve vzorcích o objemu 3 cm^3 byla řádově 10^{-6} mol l dm^{-3}. Těkavá látka byla odpařena. Poté bylo přidáno potřebné množství vody na doplnění objemu, zásobní roztok HySilk tak, aby konečná koncentrace ve vzorku byla 0,015 g dm^{-3} a předem vypočítané množství CTAB dle navržené koncentrační řady. Koncentrace CTAB v připravených vzorcích byla 0-3 mmol l^{-1}. Vzorky byly přes noc ponechány na třepačce. Následující den byly proměřeny emisní skeny těchto vzorků.

3. 3. Metoda

3. 3. 1. Kalibrační řady

Měření bylo provedeno na luminiscenčním spektrofotometru AMINCO–Bowman Series 2. Nejprve byl u nejviskóznějšího vzorku proměřen excitační a emisní sken pro fluorescein a DPH z důvodu nastavení citlivosti přístroje a určení detekčních vlnových délek

Poté bylo provedeno měření anizotropie u navržených viskozitních řad od 0 do 100 %hm glycerolu s konstantní koncentrací fluoresceinu a DPH. U fluoresceinu byla anizotropie měřena při excitační vlnové délce 484 nm a emisní vlnové délce 520 nm, zatímco u DPH probíhalo měření při excitační vlnové délce 385 nm a emisní 430 nm. Anizotropie jednoho vzorku byla vypočítána jako průměr 10 měření anizotropie s integračním časem 8 s.

Z naměřených hodnot anizotropií byla vyhodnocena závislost $r = f(\%hm)$ a $r = f(\eta)$, přičemž hodnoty viskozity byly získány přepočtem relativní viskozity glycerolu na skutečnou viskozitu v roztoku s methanolem, resp. vodou, vynesením těchto hodnot do grafu a interpolací v programu Origin8.

Excitační a emisní sken byl změřen také pro sondy CCVJ, DCVJ a P3P a na základě polohy maxima v těchto skenech byla nastavena excitační a emisní vlnová délka měření. Sonda CCVJ byla měřena při excitační vlnové délce 447 nm a emisní vlnové délce 498 nm, sonda DCVJ byla měřena při excitační vlnové délce 448 nm a emisní vlnové délce 497 nm a sonda P3P byla měřena při excitační vlnové délce 370 nm a emisní vlnové délce 437 nm.

Z naměřených hodnot byly vyhodnoceny následující závislosti: $i_{CCVJ} = f(\eta)$, $i_{DCVJ} = f(\eta)$; i je intenzita fluorescence reprezentována integrálem pod emisní křivkou. U sondy P3P pak byla vyhodnocena závislost excimer/monomer = $f(\eta)$. Měření bylo prováděno v cele

temperované připojeným termostatem při 20 °C. Vzorky byly měřeny v křemenných kyvetách o optické délce 1 cm.

3. 3. 2. Vliv vzrůstající koncentrace CTAB v roztoku, vliv iontové síly na anizotropii DPH a fluoresceinu

Měření bylo provedeno na luminiscenčním spektrofotometru AMINCO–Bowman Series 2. Nejprve byl u nejviskóznějšího vzorku proměřen excitační a emisní sken pro fluorescein a DPH z důvodu nastavení citlivosti přístroje a určení detekčních vlnových délek

Na základě těchto skenů byla anizotropie fluoresceinu ve vzorcích měřena při excitační vlnové délce 505 nm a emisní vlnové délce 526 nm, zatímco u DPH probíhalo měření při excitační vlnové délce 358 nm a emisní 430 nm.Anizotropie jednoho vzorku byla vypočítána jako průměr 10 měření anizotropie v integračním čase 8 s.

Z naměřených hodnot anizotropií byla vyhodnocena závislost r = f (c_{CTAB}) a r = f (I). Měření bylo prováděno v cele temperované připojeným termostatem při 20 °C. Vzorky byly měřeny v křemenných kyvetách o optické délce 1 cm.

3. 2. 3. Vliv vzrůstající koncentrace CTAB a iontové síly v roztoku s konstantní koncentrací hyaluronanu na anizotropii DPH a fluoresceinu

Měření bylo provedeno na luminiscenčním spektrofotometru AMINCO–Bowman Series 2. Nejprve byl u nejviskóznějšího vzorku proměřen excitační a emisní sken pro fluorescein a DPH z důvodu nastavení citlivosti přístroje a určení detekčních vlnových délek

Na základě těchto skenů byla anizotropie fluoresceinu ve vzorcích měřena při excitační vlnové délce 484 nm a emisní vlnové délce 520 nm, zatímco u DPH probíhalo měření při excitační vlnové délce 385 nm a emisní 426 nm. Anizotropie jednoho vzorku byla vypočítána jako průměr 10 měření anizotropie v integračním čase 8 s.

Z naměřených hodnot anizotropií byla vyhodnocena závislost r = f (c_{CTAB}) a r = f (I). Měření bylo prováděno v cele temperované připojeným termostatem při 20 °C. Vzorky byly měřeny v křemenných kyvetách o optické délce 1 cm.

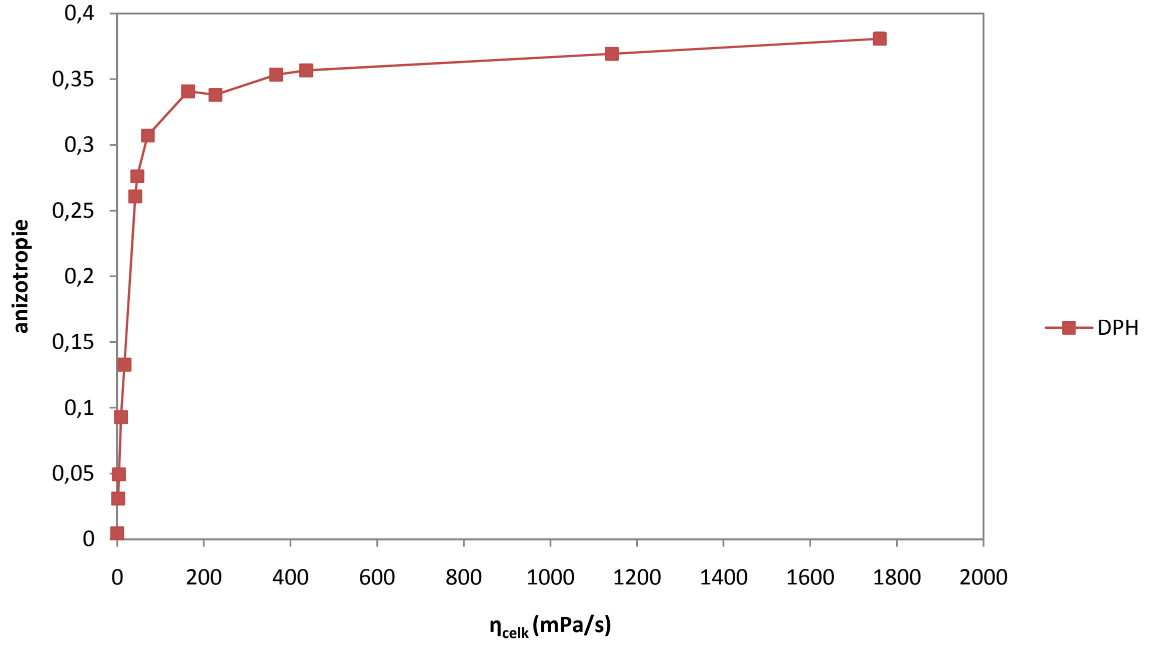
3. 2. 4. Vliv vzrůstající koncentrace CTAB v roztoku s konstantní koncentrací hyaluronanu na intenzitu fluorescence CCVJ a DCVJ a poměr excimer/monomer P3P

Měření bylo provedeno na luminiscenčním spektrofotometru AMINCO–Bowman Series 2. Nastavení přístroje bylo následovné: pro vzorky obsahující sondu CCVJ a DCVJ byl emisní sken měřen v rozsahu od 400 do 600 nm a excitační monochromátor byl nastaven na vlnovou délku 430 nm, zatímco emisní byl nastaven na 500 nm. U sondy P3P byl změřen emisní sken v rozsahu od 200 do 600 nm, excitační monochromátor byl nastaven na vlnovou délku 345 nm, emisní byl nastaven na 417 nm.

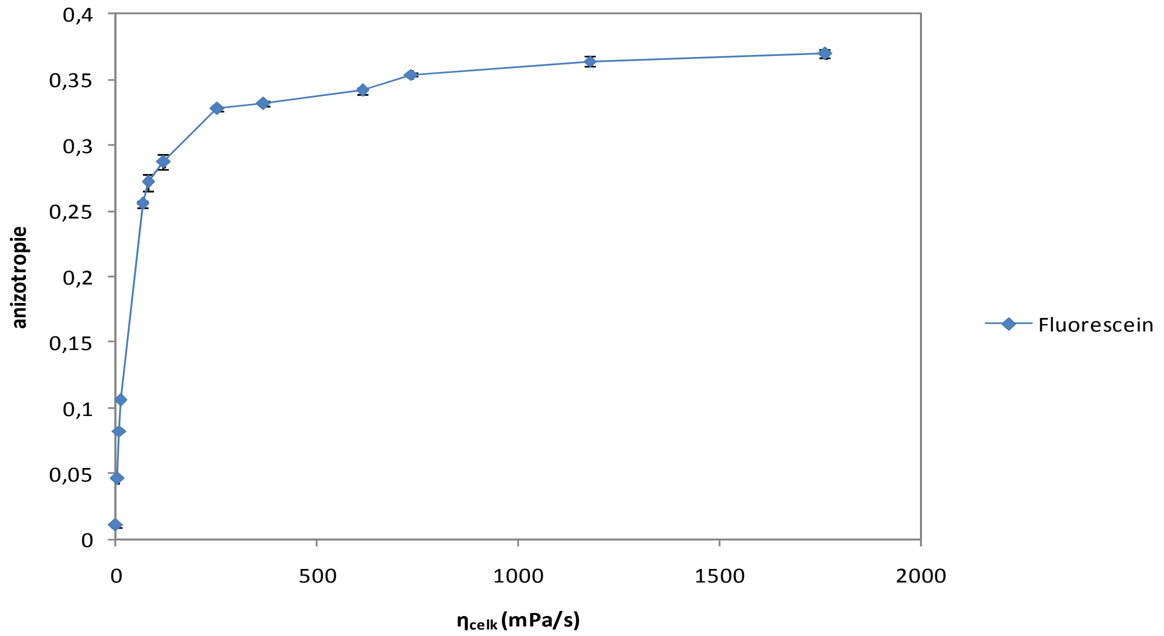
Z naměřených emisních spekter CCVJ a DCVJ byly zaznamenány hodnoty integrálu pod emisní křivkou, ze spektra P3P byly zaznamenány hodnoty intenzity fluorescence monomeru a excimeru. Poté byla u CCVJ a DCVJ vyhodnocena závislost i = f (c_{CTAB}), kde i znamená integrál pod emisní křivkou, a závislost excimer/monomer = f (c_{CTAB}). Měření bylo prováděno v cele temperované připojeným termostatem při 20 °C. Vzorky byly měřeny v křemenných kyvetách o optické délce 1 cm.

3. 4. Výsledky a diskuze

3. 4. 1. Kalibrační řady



Obr. 14: Závislost anizotropie DPH na celkové viskozitě v roztoku glycerolu a methanolu.

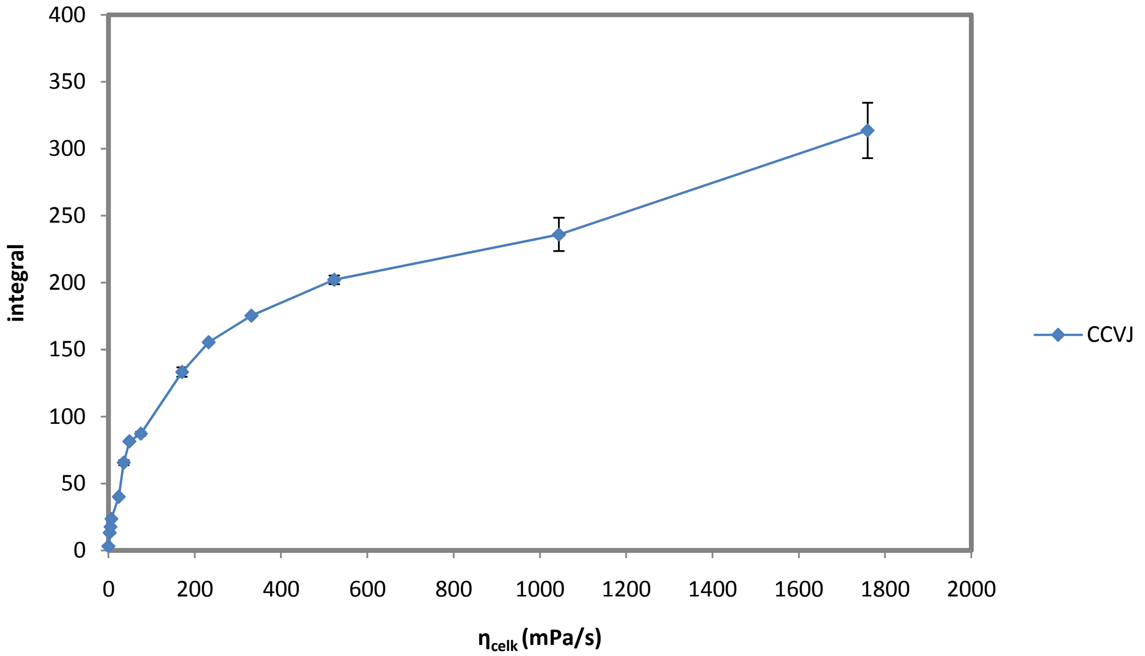


Obr. 15: Závislost anizotropie fluoresceinu na celkové viskozitě v roztoku glycerolu a methanolu.

Závislost anizotropie na viskozitě (Obr. 14)vykazuje prudký nárůst až do hodnoty 163 mPa s^{-1}, kterou reprezentuje vzorek s 90 % hm. glycerolu. Poté následuje pozvolný vzestup až do hodnoty 1760 mPa s^{-1}, což je vzorek se 100 %hm glycerolu.

Hodnoty viskozit roztoků do 86%hm glycerolu se mění v řádu desítek, do 96%hm v řádu stovek a poté v řádu tisíců, proto je počáteční vzestup hodnot anizotropie tak prudký. Graf charakterizuje změny anizotropie DPH v roztoku se zvyšující se viskozitou. Lze konstatovat, že anizotropie se zvyšující se viskozitou roste, což je očekávané chování. Chybové úsečky nepřesahují velikost bodu.

Průběh závislosti anizotropie fluoresceinu na viskozitě roztoku glycerolu a methanolu na obrázku (Obr. 15) je podobný jako průběh závislosti anizotropie DPH v tomto roztoku – prudký narůst anizotropie Do 90%hm glycerolu, poté nárůst pozvolný. Fluorescein není typická anizotropní sonda, nemá dlouhou podélnou osu molekuly jako DPH (obr. 12), proto část energie polarizovaného záření je u fluoresceinu spotřebována na změnu polohy, otočení se – v rigidním prostředí jsou změny polohy menší a je tak naměřena vyšší anizotropie.



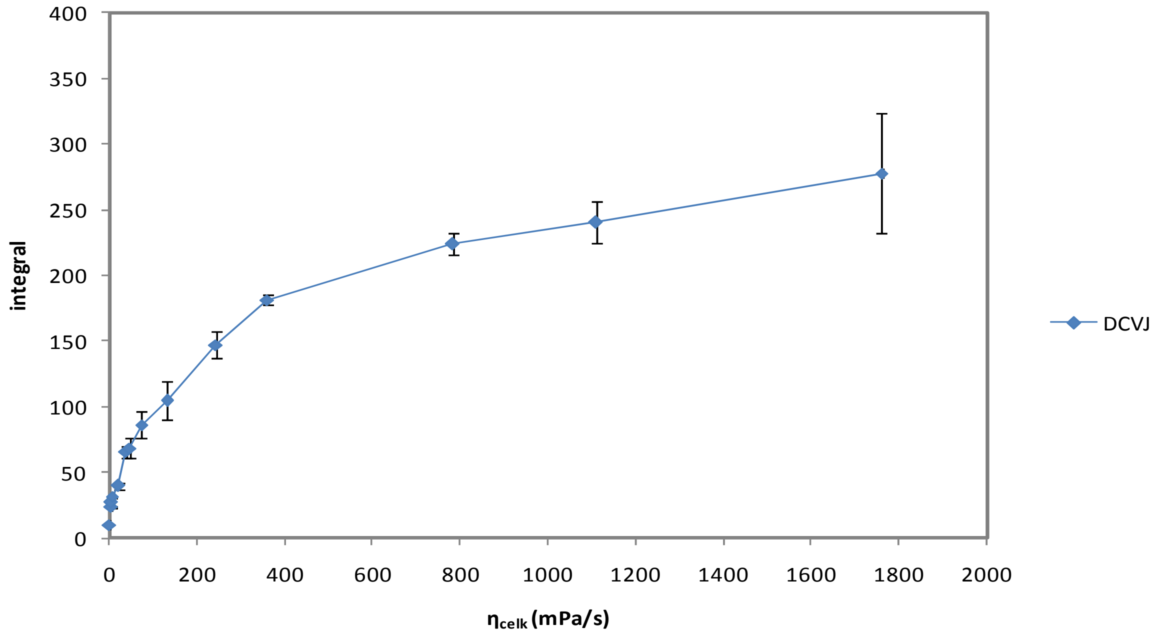
Obr. 16: Závislost integrálu pod emisní křivkou CCVJ na celkové viskozitě roztoku glycerolu a methanolu

Obr. 16 ukazuje, že integrál pod emisní křivkou CCVJ se zvyšující se viskozitou roste. Největší nárůst integrálu pod emisní křivkou lze pozorovat do 92%hm glycerolu, poté je pozvolnější. Chování CCVJ je očekávané – CCVJ je tzv. molekulární rotor, molekula složená ze dvou částí spojených σ-vazbou, podél které se obě její části mohou po absorpci otáčet. Intenzita fluorescence volně se otáčejících molekul ve fluidním prostředí je malá, zatímco intenzita fluorescence v prostředí se vzrůstající viskozitou roste z důvodu pomalého otáčení podél σ-vazby.

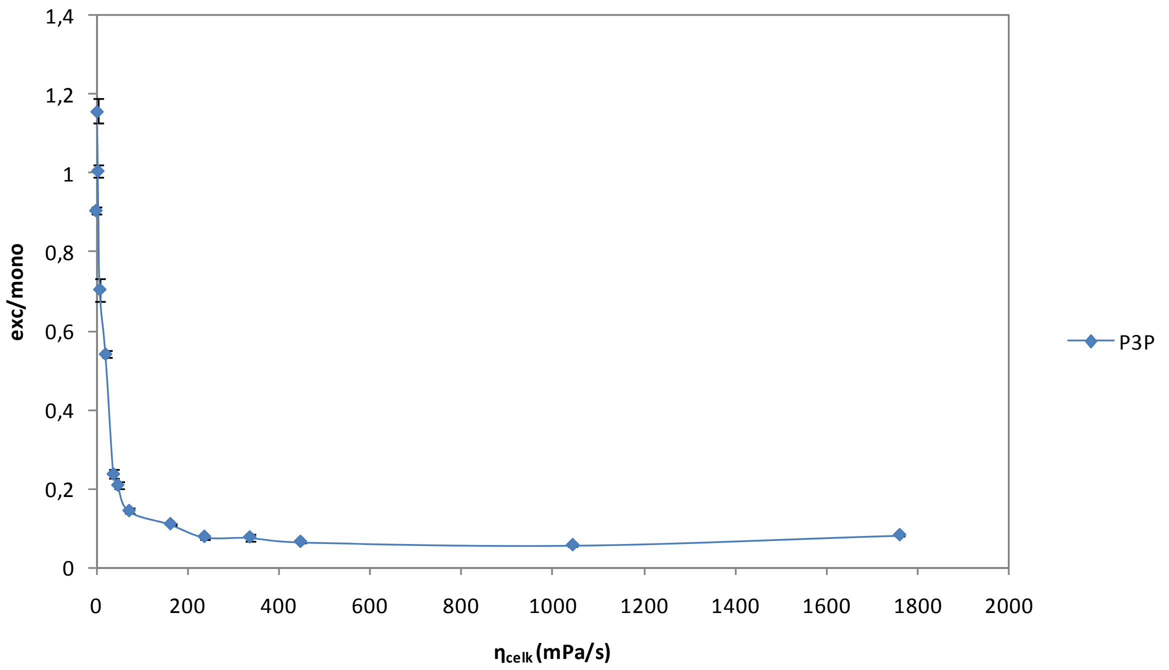
Obr. 17 ukazuje podobný, téměř stejný průběh závislosti jako Obr. 16, protože CCVJ i DCVJ jsou molekulární rotory. Liší se pouze velikostí integrálu pod emisní křivkou, protože sonda DCVJ má nižší intenzitu fluorescence než CCVJ. Se vzrůstající viskozitou prostředí integrál pod emisní křivkou roste.

V grafu na obrázku (Obr. 18) je patrný prudký pokles poměru excimer/monomer u P3P až do 86%hm. glycerolu, poté je tento poměr téměř konstantní. Struktura sondy P3P (obr. 11) umožňuje tvorbu excimeru. Obě pyrenová jádra se k sobě přiblíží a jestliže jedno z nich je excitováno, pak je schopno interagovat s druhým pyrenovým jádrem molekuly a vzniká excitovaný dimer (excimer), který emituje při jiné vlnové délce než monomer. Pokud je

molekula P3P ve fluidním prostředí, excimer se tvoří snadněji než v prostředí s vysokou viskozitou a poměr excimer/monomer ve fluidním prostředí je vyšší.

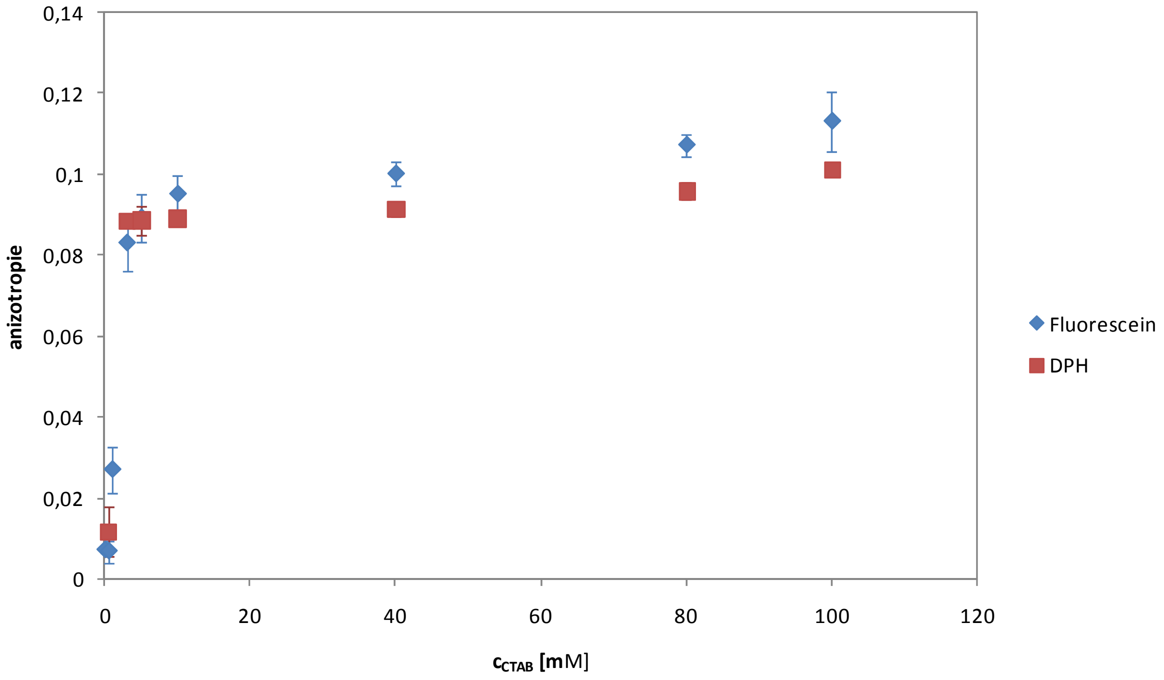


Obr. 17: Závislost integrálu pod emisní křivkou DCVJ na celkové viskozitě roztoku glycerolu a methanolu



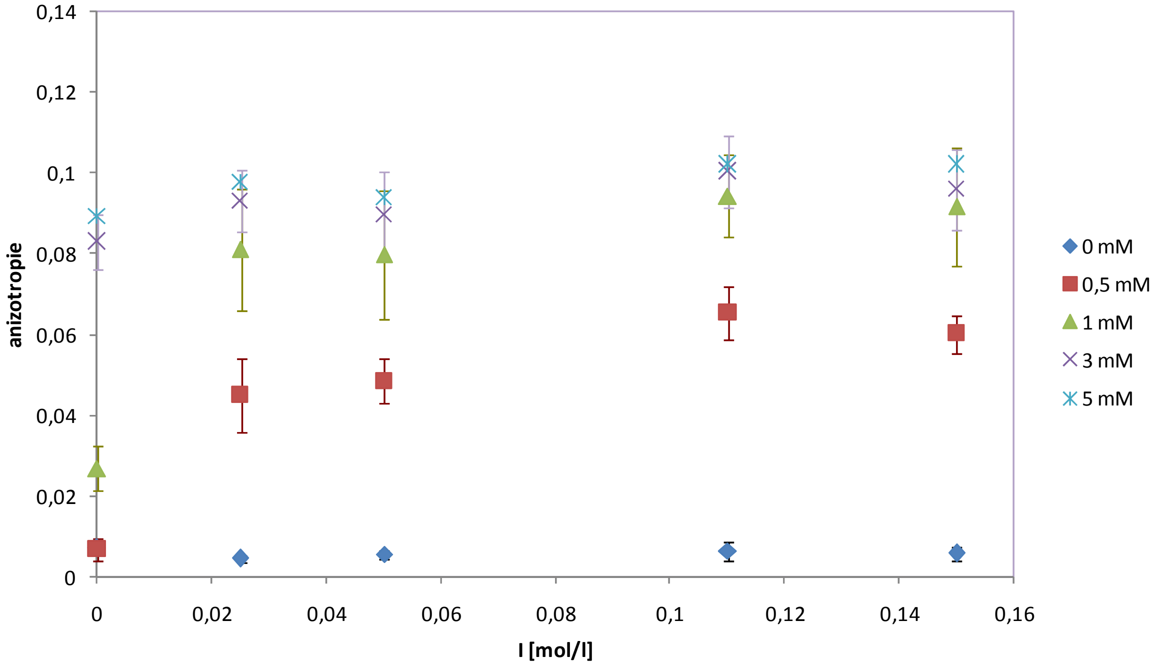
Obr. 18: Závislost poměru excimer/monomer sondy P3P na celkové viskozitě roztoku glycerolu a methanolu

3. 4. 2. Vliv vzrůstající koncentrace CTAB v roztoku, vliv iontové síly na anizotropii DPH a fluoresceinu

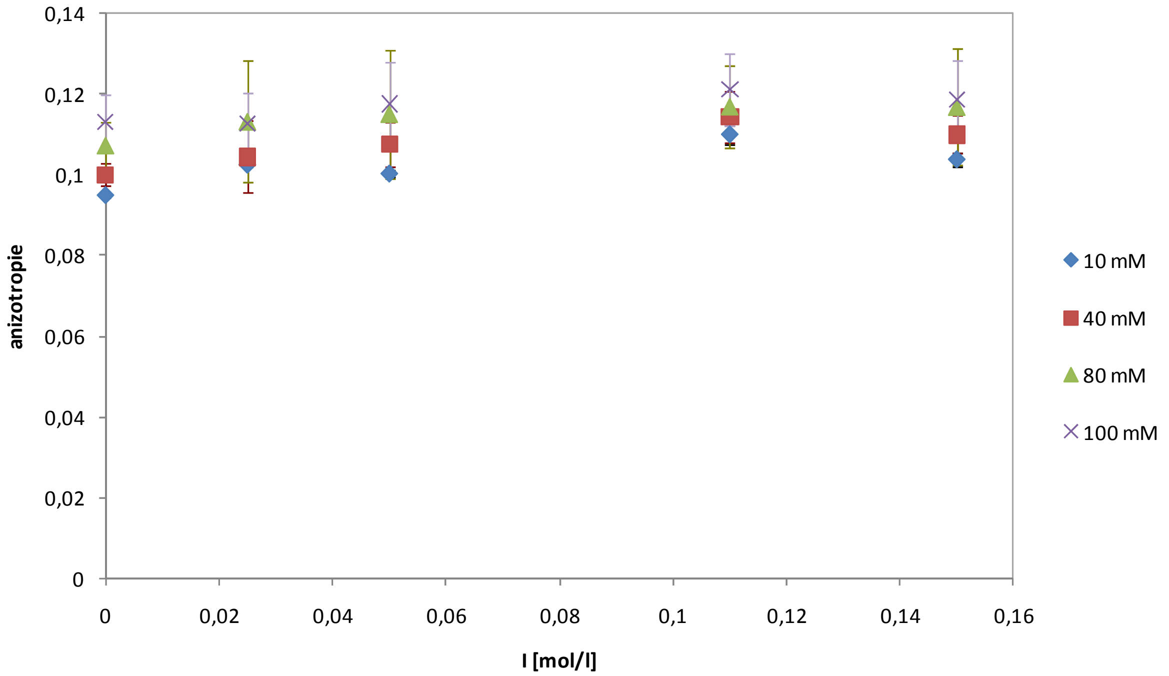


Obr. 19: Závislost anizotropie DPH a fluoresceinu na vzrůstající koncentraci CTAB

Anizotropie obou sond v grafu na obrázku (Obr. 19) se zvyšující se koncentrací roste až do koncentrace CTAB 3 mM, poté je nárůst pozvolný. Je to dáno překročením CMC CTAB v roztoku, vytvořením micel a následným vzrůstem viskozityv mikroprostředí micel, která se dále téměř nemění jak v micelách, což ukazuje sonda DPH, tak ani na fázovém rozhranní, což ukazuje fluorescein.

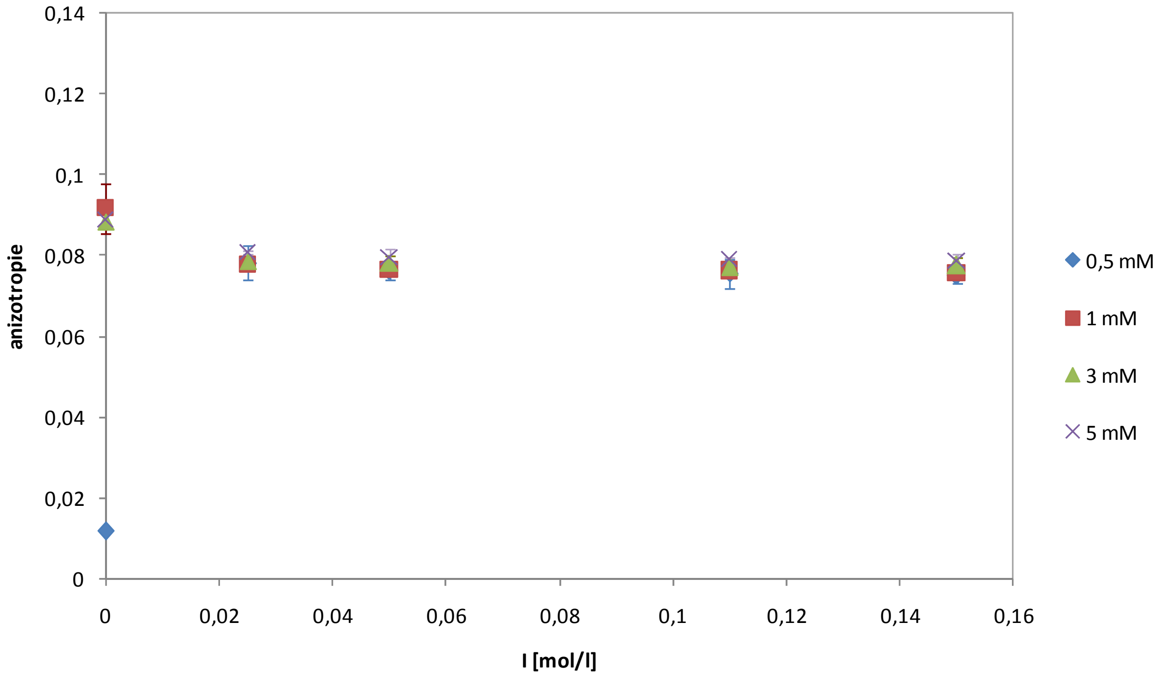


Obr. 20: Závislost anizotropie fluoresceinu na vzrůstající iontové síle roztoků CTAB o různých koncentracích

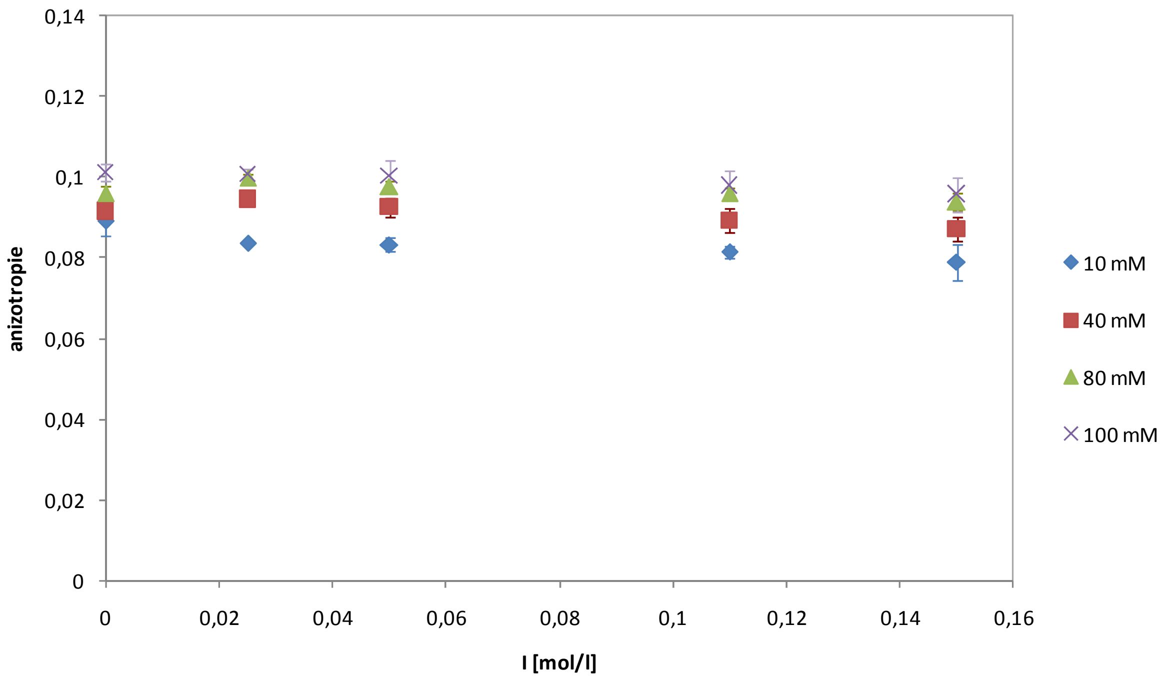


Obr. 21: Závislost anizotropie fluoresceinu na vzrůstající iontové síle roztoků CTAB o různých koncentracích

Grafy na obrázcích výše (Obr. 20) a (Obr. 21) ukazují nárůst anizotropie fluoresceinu ve všech koncentracích CTAB (kromě nulové) při prvním přídavku soli, tj. při iontové síle 0,025 mol dm^{-3}. Tento nárůst je nejvíce patrný zejména při koncentracích 0,5 mM a 1 mM CTAB. Je to dáno tím, že tyto koncentrace se pohybují okolo CMC a zvýšení iontové síly napomáhá agregaci micel. Záporně nabitý fluorescein (Obr. 11) reaguje s kladně nabitým CTAB a zvýší se tak anizotropie. S dalšími přídavky soli se anizotropie s ohledem na chybové úsečky nemění, znamená to tedy, že vzrůstající iontová síla nemá na systém CTAB + fluorescein žádný vliv.



Obr. 22: Závislost anizotropie DPH na vzrůstající iontové síle roztoků CTAB o různých koncentracích



Obr. 23: Závislost anizotropie DPH na vzrůstající iontové síle roztoků CTAB o různých koncentracích

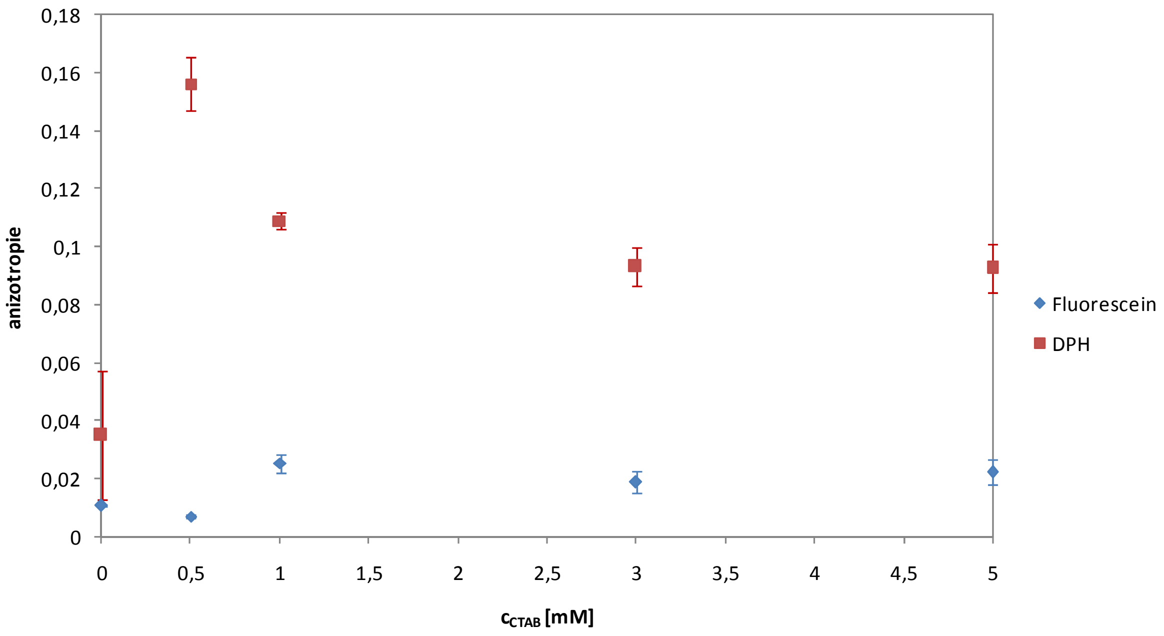
Chování DPH v roztocích o různé koncentraci CTAB při vzrůstající iontové síle popisují grafy na obrázcích. (Obr. 22)(Obr. 23) Nejvyšší změna je patrná při koncentraci 0,5 mM CTAB, což je koncentrace blízká CMC, při prvním přídavku soli-iontová síla 0,025 mol dm^{-3}. Nárůst anizotropie je způsoben nárůstem mikroviskozity v důsledku vytvoření micel. Sůl vznik micel urychlila.

Koncentrace CTAB 1 mM, 3 mM, 5 mM a 10 mM CTAB vykazují při prvním přídavku soli dokonce pokles anizotropie, což může být způsobeno tím, že zvýšením iontové síly se velikost už vzniklých micel zvětší a mikroviskozita v micele klesne. Při vyšší iontové síle než 0,025 mol dm^{-3} pak zůstává anizotropie u těchto vzorků konstantní, což znamená, že uvnitř micely nedochází k žádným změnám, které by byly zaznamenány anizotropií. Anizotropie koncentrací CTAB vyšších než10 mM při různých iontových silách zůstává také konstantní.

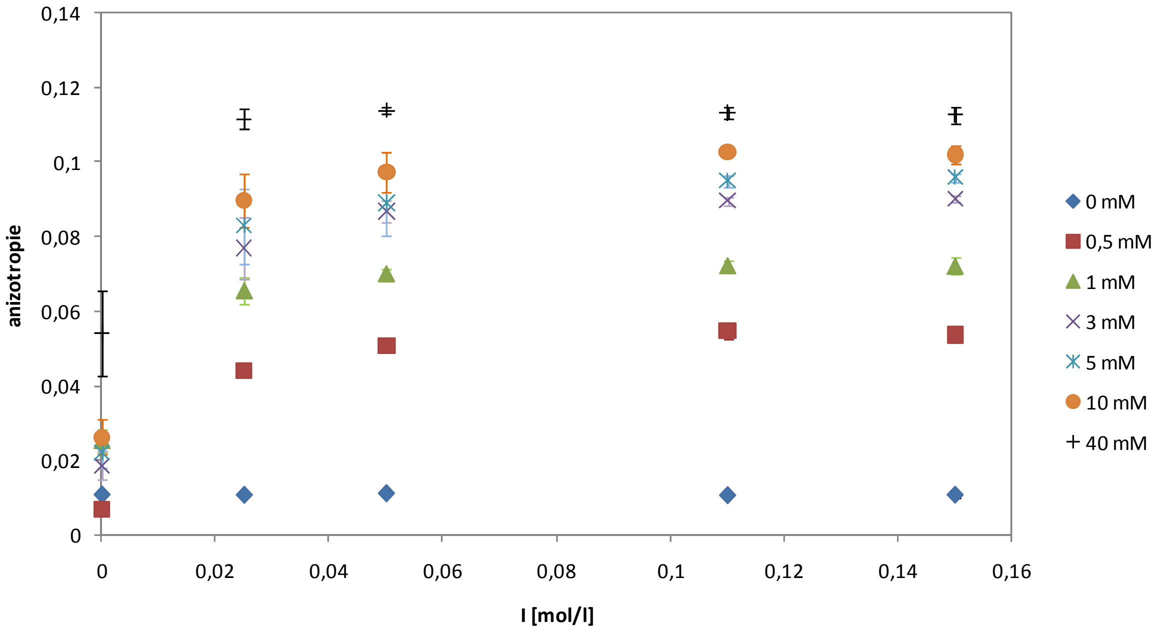
3. 4. 3. Vliv vzrůstající koncentrace CTAB a iontové síly v roztoku s konstantní koncentrací hyaluronanu na anizotropii DPH a fluoresceinu

Závislost anizotropie fluoresceinu a DPH na koncentraci CTAB v přítomnosti konstantní koncentrace hyaluronanu je znázorněna na obrázku (Obr. 24) a vykazuje výrazné změny anizotropie jak fluoresceinu, tak DPH do koncentrace 1 mM. To je důsledek vzniku agregátů CTAB s hyaluronanem, při koncentraci 1 mM. Jsou větší, než volné micely, takže viskozita uvnitř agregátů, kterou mapuje sonda DPH, klesá, zatímco anizotropie fluoresceinu mírně roste poté, co dojde k jeho navázání na tyto agregáty. S dalším zvyšováním koncentrace CTAB se anizotropie nemění, v roztoku se objevují volné micely, takže další přídavky tenzidu nemají na anizotropii žádný vliv.

Závislost na obrázku (Obr. 25) ukazuje, že po prvním přídavku soli a vzrůstu iontové síly na 0,025 mol dm^{-3} dochází ve všech koncentracích CTAB kromě nulové k vzrůstu anizotropie fluoresceinu, která se dále téměř nemění. Nárůst anizotropie po prvním přídavku soli je způsoben repulzí nábojů v hlavě micely, která má za následek zmenšení (kontrakci) micely a pevnější navázání fluoresceinu na povrch micely. Použitím sondy DPH pro toto měření nebyla získána žádná prokazatelná závislost.

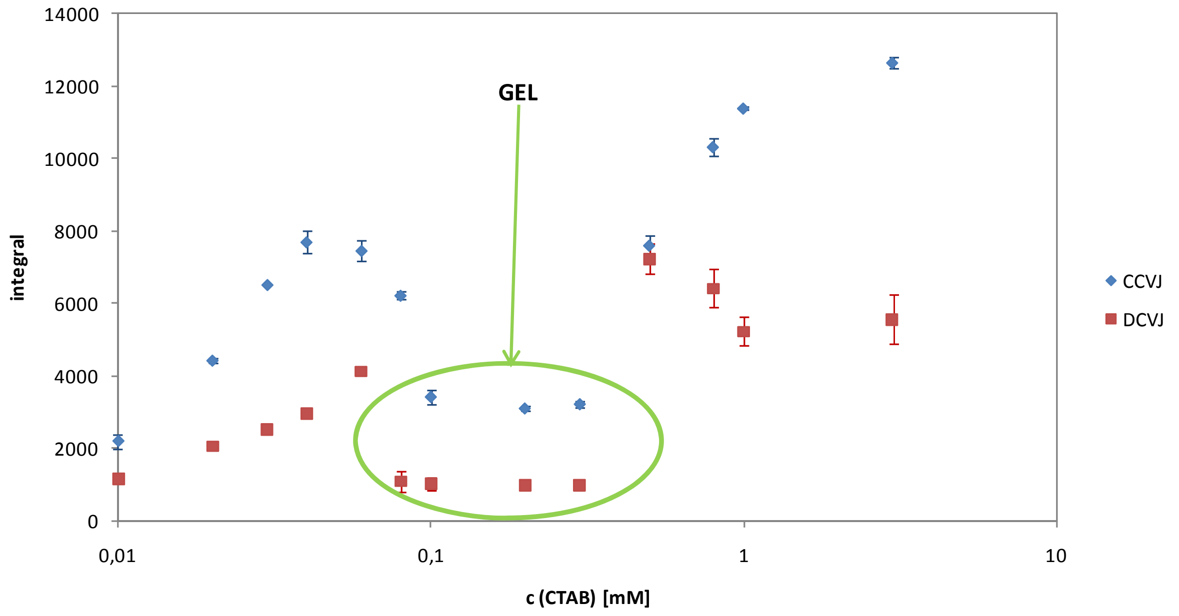


Obr. 24: Závislost anizotropie fluoresceinu a DPH v roztoku s konstantní koncentrací hyaluronanu na koncentraci CTAB při nulové iontové síle

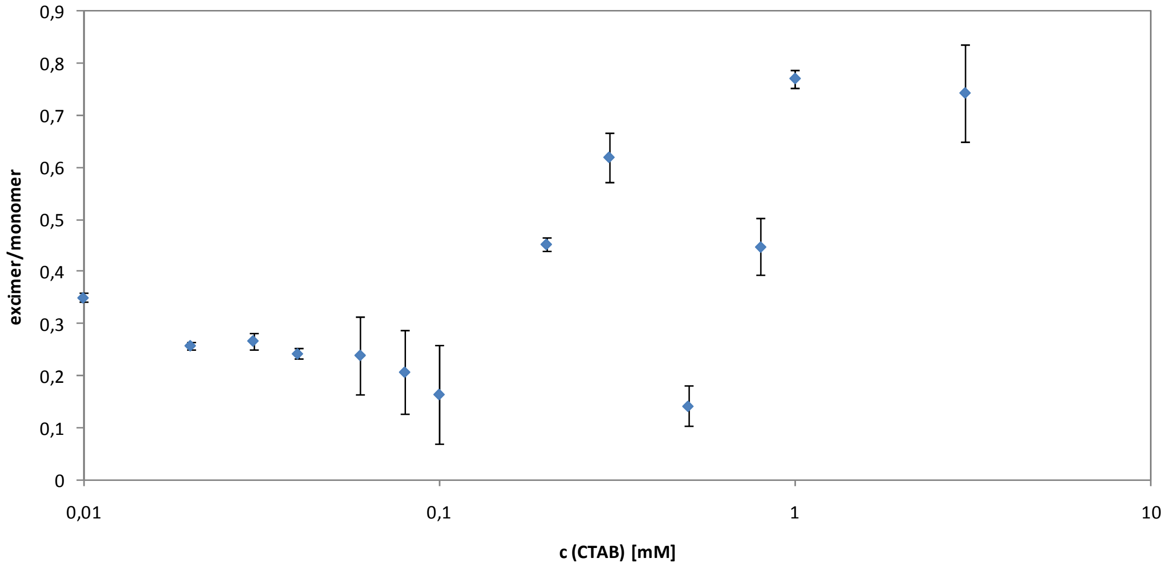


Obr. 25: Závislost anizotropie fluoresceinu na iontové síle roztoků s konstantní koncentrací hyaluronanu na měnící se koncentrací CTAB.

3. 4. 4. Vliv vzrůstající koncentrace CTAB v roztoku s konstantní koncentrací hyaluronanu na intenzitu fluorescence CCVJ a DCVJ a poměr excimer/monomer P3P



Obr. 26: Závislost integrálu pod emisní křivkou CCVJ, resp.DCVJ na vzrůstající koncentraci CTAB v přítomnosti hyaluronanu o koncentraci 15 mg dm^{-3}



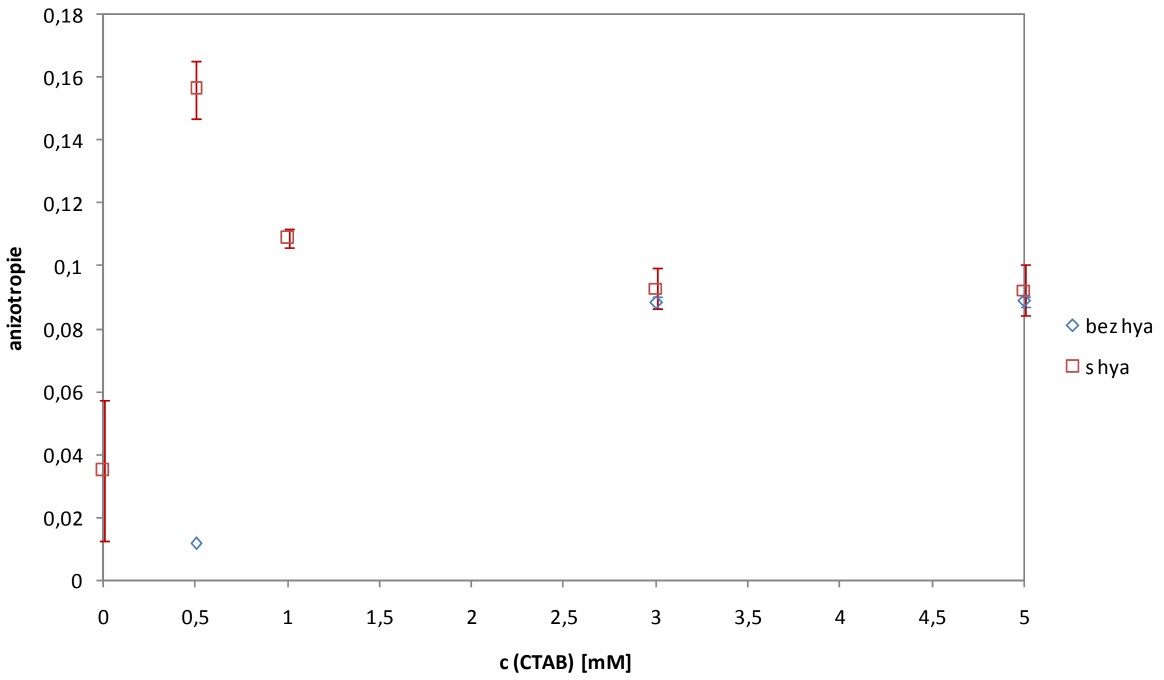
Obr. 27: Závislost poměru excimer/monomer u P3P na vzrůstající koncentraci CTAB v přítomnosti hyaluronanu o koncentraci 15 mg dm^{-3}

Na obrázku (Obr. 26) jsou porovnány dvě závislosti. Závislost integrálu pod emisní křivkou u CCVJ, resp. DCVJ na koncentraci CTAB. CCVJ se díky své struktuře (Obr. 11) váže na rozhraní micel a roztoku, zatímco DCVJ se díky své struktuře (Obr. 11) váže do micely. Prvotní nárůst integrálu pod emisní křivkou, tedy intenzity fluorescence u CCVJ může tedy znamenat jak nárůst viskozity, tak nárůst počtu rozpuštěných částic a tedy intenzity fluorescence. Prvotní nárůst u DCVJ ovšem znamená nárůst viskozity. To znamená, že v roztoku došlo k vytvoření micel ještě před bodem CMC a tyto micely jsou menší než micely vytvořené po CMC. U obou sond poté následuje oblast, kde došlo ke zhroucení stability

systému a vytvoření gelu. Při dalších přídavcích CTAB pak intenzita fluorescence CCVJ narůstá, což může být dáno dalším rozpouštěním částic okolo bodu CMC (1 mM ve vodě), nebo dalším vzrůstem viskozity, nebo kombinací obou těchto vlivů. Výsledky měření se sondou DCVJ po vytvoření gelu ukazují nárůst viskozity poté, co dojde k opětovnému vytvoření micel, při dalším přídavku pokles viskozity a poté jsou hodnoty intenzit konstantní.

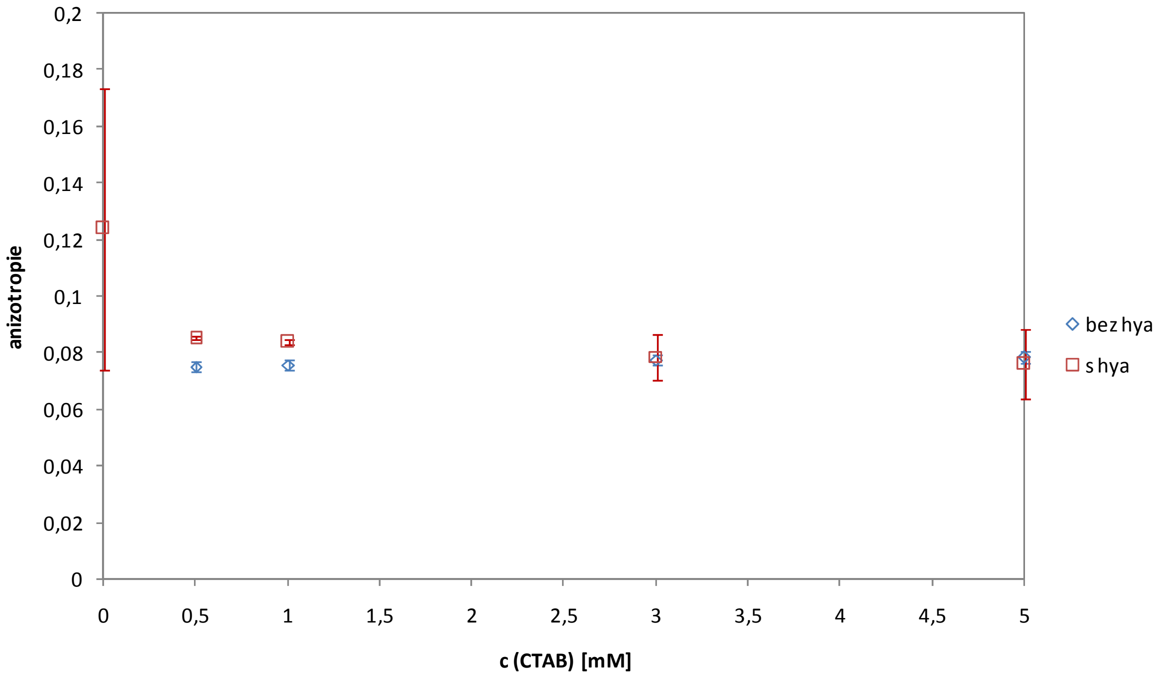
Výsledky v grafu na obrázku (Obr. 27) nevykazují žádný jednotný trend. Je to způsobeno zřejmě tím, že molekula P3P (Obr. 11) je příliš velká a v malých micelách pod CMC se nerozpouští.

3. 4. 5. Porovnání výsledků



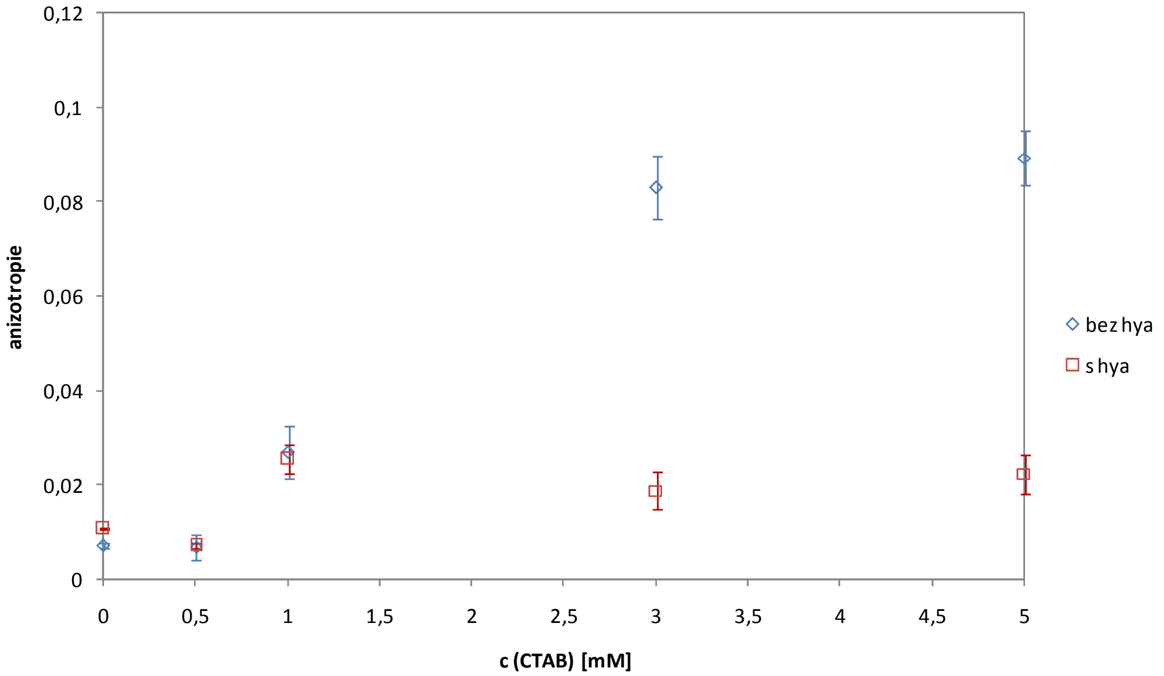
Obr. 28: Závislost anizotropie DPH na vzrůstající koncentraci CTAB při nulové iontové síle bez hyaluronanu a s 0,015 g dm^{-3} hyaluronanem

Obrázek (Obr. 28) ukazuje rozdíly závislosti anizotropie DPH na koncentraci CTAB při iontové síle 0 mol l^{-1} bez hyaluronanu a v přítomnosti hyaluronanu o konstantní koncentraci. Největší rozdíl je v koncentraci 0,5 mM, kde je anizotropie v přítomnosti hya o řád vyšší než bez hya. Je to způsobeno vznikem agregátů hya a tenzidu.

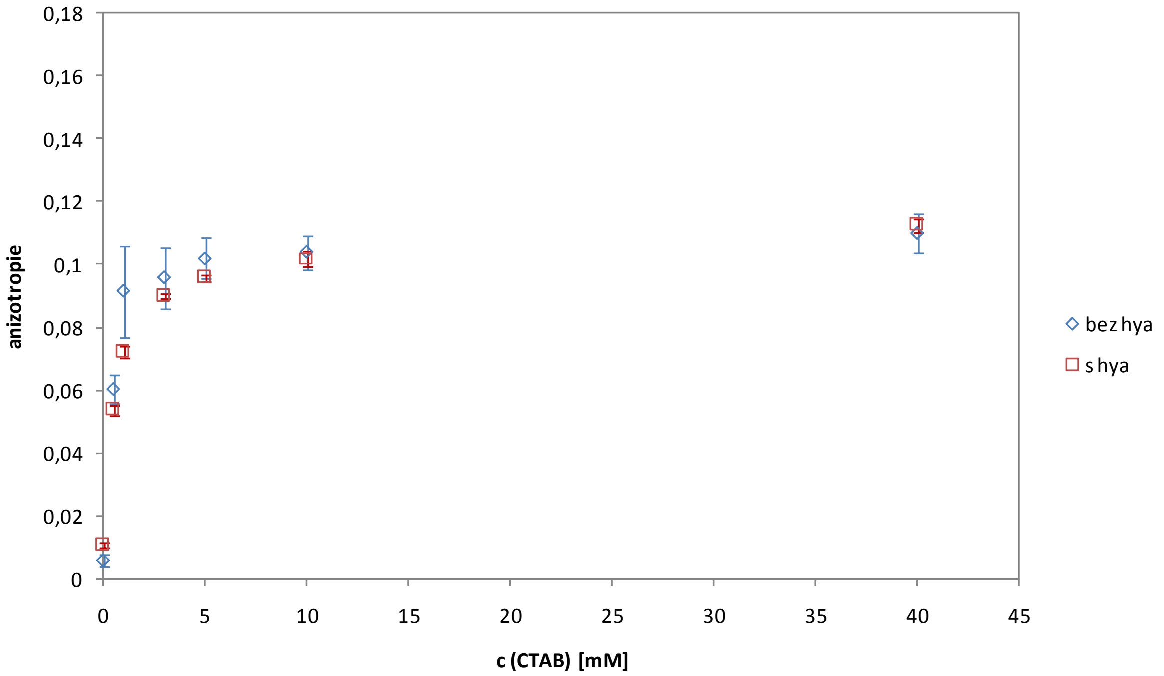


Obr. 29: Závislost anizotropie DPH na vzrůstající koncentraci CTAB při iontové síle 0,15 mol dm^{-3} bez hyaluronanu a s 0,015 g dm^{-3} hyaluronanem

Závislost anizotropie DPH na vzrůstající koncentraci CTAB na obrázku (Obr. 29) ukazuje, že anizotropie DPH při iontové síle 0,15 mol dm^{-3} je konstantní jak pro roztok s hyaluronanem, tak pro roztok bez hyaluronanu, navíc jsou si tyto hodnoty anizotropie velmi podobné.



Obr. 30: Závislost anizotropie fluoresceinu na vzrůstající koncentraci CTAB při nulové iontové síle bez hyaluronanu a s 0,015 g dm^{-3} hyaluronanem



Obr. 31: Závislost anizotropie fluoresceinu na vzrůstající koncentraci CTAB při iontové síle 0,15 mol dm^{-3} bez hyaluronanu a s 0,015 g dm^{-3} hyaluronanem

Graf na obrázku (Obr. 30) ukazuje, že přídavek hyaluronanu nemá na anizotropii fluoresceinu žádný vliv až do koncentrace 1 mM, poté anizotropie vzorků s hyaluronanem klesá oproti vzorkům, ve kterých hya přítomna není. Je to zřejmě způsobeno tím, že fluorescein se lépe váže na samotné micely CTAB než na agregáty CTAB s hyaluronanem. Při dalším zvyšování koncentrace tenzidu až do 40 mM zůstávají hodnoty anizotropie jak ve vzorcích s hyaluronanem, tak ve vzorcích bez hyaluronanu konstantní.

Rozdíly závislosti anizotropie fluoresceinu na koncentraci CTAB při iontové síle 0,15 mol dm^{-3} jsou prezentovány na obrázku.(Obr. 31) Průběh závislostí si odpovídá, pouze u koncentrace 1 mM CTAB je anizotropie fluoresceinu u vzorku s hyaluronanem menší, než u vzorku bez hyaluronanu. Je to způsobeno zřejmě volnějším navázáním fluoresceinu na agregáty tenzidu s hyaluronanem, než na micely samotného tenzidu.

5. ZÁVĚR

Byla provedena rešerše zkoumání interakcí hyaluronan a kationaktivní tenzid, používání metody fluorescenční spektroskopie pro zkoumání těchto interakcí, měření mikroviskozity systémů polymer a tenzid pomocí metody fluorescenční spektroskopie a používání různých mikroviskozitních sond při tomto měření. Na základě provedené rešerše bylo vybráno pět sond vhodných pro charakteristiku mikroviskozity mikroprostředí. Jsou to sondy CCVJ, DCVJ, P3P, fluorescein a DPH. Mikroprostředím se v tomto případě rozumí micely tenzidu CTAB a agregáty hyaluronanu s těmito micelami, jejichž viskozita se nedá srovnávat s viskozitou v celém roztoku, proto byl pro ni zaveden pojem mikroviskozita.

Nejprve byla provedena charakterizace vybraných sond pomocí roztoků glycerolu a methanolu s definovanou viskozitou. Výsledkem této charakterizace jsou grafy, které znázorňují chování měřených veličin, jako jsou intenzita fluorescence u CCVJ a DCVJ, poměr excimer/monomer u P3P a anizotropie fluorescence u fluoresceinu a DPH, v závislosti na viskozitě. Na základě těchto provedených měření pak bylo možno charakterizovat zkoumané systémy z hlediska mikroviskozity.

Zkoumaným systémem byl tenzid CTAB a tenzid CTAB v roztoku s kys. hyaluornovou. Jako první byla stanovena anizotropie sond DPH a fluoresceinu v závislosti na koncentraci čistého CTAB. Tyto dvě sondy byly zvoleny zejména proto, že z hlediska struktury DPH podává informace o mikroprostředí uvnitř micely, zatímco fluorescein se váže na její povrch a podává tak informace o prostředí na mezifázovém rozhraní. Výsledky měření se u obou sond téměř neliší, anizotropie DPH i fluoresceinu roste do koncentrace 3 mM CTAB, poté je nárůst jen mírný – znamená to, že anizotropie se zvedla v důsledku vytvoření micel a následného vzrůstu viskozity, která se dále nemění ani v micelách, ani na mezifázovém rozhraní.

Poté byla anizotropie sond DPH a fluoresceinu proměřena při jednotlivých koncentracích CTAB v závislosti na iontové síle, která byla upravována nasyceným roztokem NaCl. Z výsledků měření s fluoresceinem je patrný skokový nárůst anizotropie při prvním přídavku soli, zejména v koncentracích do 1 mM. Přídavek soli tedy urychluje vznik micel. Výsledky měření s DPH jsou do koncentrace 1 mM CTAB stejné jako u fluoresceinu, po překročení této koncentrace anizotropie při prvním přídavku soli (iontová síla 0,025 mol dm^{-3}) klesá, což může být způsobeno tím, že vzniklé micely se vysolením zvětší a jejich mikroviskozita klesne. Po překročení iontové síly 0,025 mol dm^{-3} se anizotropie ani fluoresceinu ani DPH nemění a zůstává konstantní. Znamená to, že rozhodující vliv na agregaci micel má pouze první přídavek soli, do iontové síly 0,025 mol dm^{-3}.

Stejná měření byla provedena i se systémem CTAB a hyaluronanem. Pro měření byla zvolena HyActive 106 kDa o koncentraci 15 mg dm^{-3}. Výsledky měření anizotropie DPH a fluoresceinu v závislosti na koncentraci CTAB s konstantní koncentrací hyaluronanu ukazují výrazné změny anizotropie jak fluoresceinu, tak DPH do koncentrace 1 mM. To je důsledek vzniku agregátů CTAB s hyaluronanem při koncentraci 1 mM. Jsou větší než volné micely, takže viskozita uvnitř agregátů, kterou mapuje sonda DPH, klesá, zatímco anizotropie fluoresceinu mírně roste poté, co dojde k jeho navázání na tyto agregáty. S dalším zvyšováním koncentrace CTAB se anizotropie nemění.

Druhé měření závislosti anizotropie fluoresceinu a DPH při jednotlivých koncentracích CTAB s konstantní koncentrací hya na iontové síle ukazuje zvýšení anizotropie po prvním přídavku soli (I = 0,025 mol dm^{-3}) u všech vzorků obsahujících fluorescein. Je to způsobeno repulzí nábojů v hlavě micely, která se zmenší a pevněji váže fluorescein. Výsledky měření s DPH nedávají žádnou zaznamenatelnou závislost.

Dále byl zkoumán systém CTAB s HyaSilk 650 kDa o konstantní koncentraci 15 mg dm^{-3} za použití sond CCVJ, DCVJ a P3P. Výsledky měření s CCVJ a DCVJ ukazují vznik agregátů menších než normální micely, ještě před CMC, poté dojde v systému k vytvoření gelu a po opětovném vytvoření micel se viskozita téměř nemění. Použití obou těchto sond umožňuje srovnat, nakolik výsledky ovlivňuje změna viskozity a na kolik pouze vliv rozpuštěných částic, neboť DCVJ se díky své struktuře nachází uvnitř micel, zatímco CCVJ na mezifázovém rozhraní. Na základě výsledků měření s P3P lze zkonstatovat, že tato sonda je příliš velká a v agregátech, vzniklých před CMC, se nerozpouští.

Nakonec byly porovnány vlivy koncentrace CTAB na anizotropii DPH a fluoresceinu v roztocích s hyaluronanem a v roztocích bez hyaluronanu při nulové iontové síle a při iontové síle 0,15 mol dm^{-3}. Výsledky měření s DPH ukazují, že anizotropie při iontové síle 0,15 mol dm^{-3} je konstantní a přídavek hyaluronanu na ni nemá téměř žádný vliv, zatímco na anizotropii DPH při nulové iontové síle při přídavku hyaluronanu vzroste u koncentrace 0,5 mM CTAB, což je způsobeno vznikem agregátů tenzidu s hyaluronanem.

Výsledky měření s fluoresceinem ukazují, že přídavek hyaluronan nemá na anizotropii fluoresceinu žádný vliv až do koncentrace 1 mM, poté anizotropie vzorků s hyaluronanem klesá oproti vzorkům, ve kterých hyaluronan přítomen není. Je to zřejmě způsobeno tím, že fluorescein se lépe váže na samotné micely CTAB než na agregáty CTAB s hyaluronanem.

Cílem této práce bylo seznámit se s měřením pomocí mikroviskozitních sond a využít toto měření při studiu interakcí hyaluronanu s tenzidy. Na provedená měření by měl navazovat další výzkum s cílem provedená měření prohloubit, potvrdit a upřesnit.

6. SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

[1] Meyer, K., Palmer, J., W.: The Polysaccharide of the Vitreous Humor. *Journal of Biologocal Chemistry*, 1934, vol. 107, pp. 629-634
[2] Thalberg, K., Lindman, B.: Interaction between hyaluronan and cationic surfactants. Journal of Physical Chemistry, 1989, vol. 93, pp. 1478-1483
[3] Thalberg, K., Lindman, B., Karlstroem, G.: Phase behavior of a system of cationic surfactant and anionic polyelectrolyte: the effect of salt. *Journal of Physical Chemistry*, 1991, vol. 95, pp. 6004-6011
[4] Thalberg, K., Stam, J. V., Lindblad, C., Almgren, M., Lindman, B.: Time-resolved fluorescence and self-diffusion studies in systems of a cationic surfactant and an anionic polyelectrolyte. *Journal of Physical Chemistry*, 1991, vol. 95, pp. 8975-8982
[5] Evertsson, H., Nilsson, S.: Microstructures formed in aqueous solutions of a hydrophobically modified nonionic cellulose derivative and sodium dodecyl sulfate: a fluorescence probe investigation. *Carbohydrate Polymers*, 1999, vol. 40, pp. 293-298
[6] Osman, M., Høiland, H., Holman, H.: Micropolarity and microviscosity in the micelles of the heptapeptide biosurfactant ‘‘surfactin’’. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*,1998, vol. 11, pp. 167-175
[7] Donner, M., Bouchy, M., Viriot, M., André, J.: Spectrofluorimetric methods for the measurement of the so called ”Microviscosity“ of lipidic structures. *Biochemie*, 1981, vol. 63, pp. 961-965
[8] Marangoni, A.: Steady-state fluorescence polarization as a tool to determine microviscosity and structural order in food systems. *Food Research International*, 1992, vol. 25, pp. 67-80
[9] Thorsteinssona, M., Richtera, J., Leeb, A., DePhillipsa, P.: 5-Dodecanoylaminofluorescein as a probe for the determinationof critical micelle concentration of detergents using fluorescence anisotropy. *Analytical Biochemistry*, 2005, vol. 340, pp. 220-225
[10] Necas, J., Bartosikova, L., Brauner, P., Kolar, J.: Hyaluronic acid (hyaluronan): a review. *Veterinarni medicina*, 2008, vol. 53, pp. 397-411
[11] Meyer, K., Palmer, J., W.: The Polysaccharide of the Vitreous Humor. *Journal of Biologocal Chemistry*, 1934, vol. 107, pp. 629-634
[12] Cowman, M., K., Matsuoka, S.: Experimental approaches to hyaluronan structure. *Carbohydrate Research*, 2005, vol. 340, pp. 791-809
[13] Furlan, S., La Penna, G., Perico, A., Cesto, A.: Hyaluronan chain conformation and dynamics. *Carbohydrate Research*, 2005, vol. 340, pp. 959-970
[14] Hascall, C. V., Laurent, C. T. Dr.: *Hyaluronan: Structure and Physical Properties.* [online], 1997, [cit. 5. 5.. 2010], dostupné z: <http://www.glycoforum.gr.jp/>.
[15] Day, A., J., Sheehan, J., K.: Hyaluronan: polysaccharide chaos to protein organisation. *Current Opinion in Structural Biology*, 2001, vol. 11, pp. 617-622
[16] Rinaudo, M.: Rheological investigation on hyaluronan–fibrinogen interaction. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2008, vol. 43, pp. 444-450
[17] Kappler, J., Hegener, O., Baader, S., L., Franken, S., Gieselmann, V., Häberlein, H., Rauch, U.: Transport of a hyaluronan-binding protein in brain tissue. *Matrix Biology*, 2009, vol. 28, pp. 396-405
[18] McDevitt, C., A., Marcelino, J., Tucker, L.: Febs Letters, 1991, vol. 294, pp. 167-170

[19] Holmberg, K., Jonsson, B., Kronberg, B., Lindman, B.: *Surfactants and polymers in aqueous solution.* 2nd ed. John Wiley & Sons, Ltd., 2002. 545 p. ISBN 0-471-49883-1
[20] Valeur, B.: *Molecular Fluorescence: Principles and Applications.* Wiley-VCH Verlag GmbH, 2001. 381 p. ISBN 3-527-29919-X
[21] Lakowicz J.R. *Principles of fluorescence spectroscopy.* 3rd ed. Springer, 2006. 954 p. ISBN 0-387-31278-1
[22] Elias, Hans-Georg: *Macromolecules.Volume 2: Industrial polymers and Syntheses*. WILEY-VCH, 2007. 635 p. ISBN 978-3-527-31173-6

7. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

Seznam zkratek

Zkratka	Význam
CTAB	cetyltrimethylammoniumbromid
NaHya	sodná sůl kyseliny hyaluronové
NMR	nukleární magnetická resonance
CMC	kritická micelární koncentrace
TTAB	tetradecyltrimethylammoniumbromid
SDS	sodium dodecyl sulfát
P3P	1,3-bispyrenylpropan
DPH	difenylhexatrien
CCVJ	9-(2-carboxy-2-kyanovinyl)julolidin
DCVJ	4-(dikyanovinyl)julolidin

Seznam symbolů

Symbol	Název veličiny
k_r^S	rychlostní konstanta pro zářivý přenos z hladiny S_1
k_{ic}^S	rychlostní konstanta pro vnitřní konverzi,
k_{isc}	rychlostní konstanta pro mezisystémový přechod
k_r^T	rychlostní konstanta pro zářivý přenos z hladiny T_1
k_{nr}^T	rychlostní konstanta pro nezářivý přenos z hladiny T_1.
τ_S	doba trvání excitovaného stavu
i_F	intenzita fluorescence
Φ_F	kvantový výtěžek fluorescence
η	viskozita
D	difusní koeficient
D_t	translační difusní koeficient
D_r	rotační difusní koeficient
F	síla
T	termodynamická teplota
$[^1A^*]$	okamžitá koncentrace excitovaných molekul
k	Boltzmannova konstanta
ξ	třeí koeficient
r	poloměr
v	rychlost
s	vazné podmínky
g	faktor tvaru
f	třecí faktor
V_0	van der Waalsův objem
V_f	volný objem
N_A	Avogadrova konstanta
I_0	intenzita fluorescence bez přítomnosti zhášeče
I	intenzita fluorescence se zhášečem
[Q]	koncentrace zhášeče

r_0 fundamentální anizotropie

I_{II} intenzita fluorescence vertikálně polarizovaného světla

$I_{\perp}$ intenzita fluorescence horizontálně polarizovaného světla

τ_r rotačně korelační čas

k_q rychlostní konstanta zhášení

k_1 rychlostní konstanta difuse