



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE

INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

ORGANICKÉ LUMINOFORY S DLOUHOVLNNOU EMISÍ

ORGANIC LUMINOPHORES WITH LONG WAVELENGTH EMISSION

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Adéla Kolaříková

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

prof. Mgr. Martin Vala, Ph.D.

BRNO 2023

Zadání bakalářské práce

Číslo práce: FCH-BAK1761/2022 Akademický rok: 2022/23
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie
Studentka: **Adéla Kolaříková**
Studijní program: Chemie pro medicínské aplikace
Studijní obor: bez specializace
Vedoucí práce: **prof. Mgr. Martin Vala, Ph.D.**

Název bakalářské práce:

Organické luminofory s dlouhovlnnou emisí

Zadání bakalářské práce:

Práce je zaměřena na studium vztahu mezi molekulární strukturou a optickými vlastnostmi. Pozornost bude věnována zejména schopnosti emise v blízké infračervené oblasti. Takovéto látky pak najdou potenciální využití jako sondy či značky ve fluorescenční mikroskopii. Vlastnosti molekul budou studovány pomocí charakterizace absorpce, kvantového výtěžku a doby života fluorescence a vyhasínacích křivek časově rozlišené fluorescence. Bude tak využito jak ustálené optické spektroskopie, tak časově rozlišených optických metod.

Termín odevzdání bakalářské práce: 22.5.2023:

Bakalářská práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí bakalářské práce.

Adéla Kolaříková
studentka

prof. Mgr. Martin Vala, Ph.D.
vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 1.2.2023

prof. Ing. Michal Veselý, CSc.
děkan

ABSTRAKT

Tato bakalářská práce se zabývá studiem možnosti dosáhnout intenzivní fluorescence v červené oblasti spektra pomocí Försterova rezonančního přenosu energie (FRET) v nanočásticích. Nejprve byly studovány optické vlastnosti organických molekul, které by mohly být vhodné pro vytvoření tzv. *host-guest (HG) systému* tvořeného párem akceptor-donor. Studované molekuly byly založeny na derivátech difenylstilbenu obsahujícího elektron-donorovou skupinu difenylamin (DPA-DPS), která je pomocí π konjugovaného systému dvojných vazeb spojena s lišící se elektron-akceptorovou skupinou. Použité akceptorové skupiny, tj. indandion (-IOO), vinyl (-V) a di(methoxykarbonyl)vinyl (-V(COOMe)₂) se vzájemně liší strukturou a polaritou, která se projevila změnou polohy fluorescenčního spektra.

Ve studovaných *HG systémech* látka DPA-DPS-IOO sloužila vždy jako host (G1) a látky DPA-DPS-V a DPA-DPS-V(COOMe)₂ jako hostitel (H1 nebo H2). Nanočástice z těchto látek (G1H1 a G1H2) byly připraveny metodou nanoprecipitace. U obou těchto systému byl pozorován FRET. Při excitaci matrice byla energie přenesena na hosta G1, který následně fluoreskoval v dlouhovlnné oblasti. U nanočástic vytvořených ze systému G1H2 bylo dále pozorováno i zvýšení kvantového výtěžku fluorescence hosta a to jak v porovnání s práškovou formou, tak nanočásticemi vytvořených pouze ze samotného hosta, ze 7 % (prášek) a 3,1 % (nanočástice) na 14 %. U nanočástic systému G1H1 nebyl nárůst kvantového výtěžku fluorescence hosta pozorován. Z výsledků vyplynulo, že FRET může být účinný nástroj při vývoji nanočástic vykazující intenzivní dlouhovlnnou fluorescenci pro zobrazovací metody.

KLÍČOVÁ SLOVA

Fluorescence, daleké červené záření, blízké infračervené záření, FRET, systém hostitel-host, nanočástice, organické fluorofory, fluorescenční spektroskopie, přenos energie

ABSTRACT

This bachelor thesis studies the possibility of achieving intense fluorescence in the red region of the spectrum using Förster resonance energy transfer (FRET) in nanoparticles. First, the optical properties of organic molecules that could be suitable for the creation of a so-called host-guest (HG) system consisting of an acceptor-donor pair were studied. The molecules studied were based on derivatives of diphenylstilbene containing the electron-donor group diphenylamine (DPA-DPS), which is linked to a differing electron-acceptor group via a π -conjugated double bond system. The acceptor groups used, i.e., indandione (-IOO), vinyl (-V) and di(methoxycarbonyl)vinyl (-V(COOMe)₂), differ from each other in structure and polarity, which was reflected by a change in the position of the fluorescence spectrum.

In the HG systems studied, DPA-DPS-IOO always served as the guest (G1) and DPA-DPS-V and DPA-DPS-V(COOMe)₂ always served as the host (H1 or H2). Nanoparticles from these substances (G1H1 and G1H2) were prepared by the nanoprecipitation method. FRET was observed for both of these systems. Upon excitation of the matrix, the energy was transferred to the guest G1, which subsequently fluoresced in the long-wavelength region. Furthermore, an increase in the quantum yield of the guest fluorescence was also observed for the nanoparticles formed from the G1H2 system, from 7% (powder) and 3.1% (nanoparticles) to 14% compared to both the powder form and nanoparticles formed from the guest alone. No increase in the quantum yield of guest fluorescence was observed for the nanoparticles of the G1H1 system. The results indicated that FRET can be an effective tool in developing nanoparticles exhibiting intense long-wavelength fluorescence for imaging.

KEY WORDS

Fluorescence, far red emission, near infrared emission, FRET, host-guest system, nanoparticles, organic fluorophores, fluorescent spectroscopy, energy transfer

KOLAŘÍKOVÁ, Adéla. *Organické luminofory s dlouhovlnnou emisí* [online]. Brno, 2023 [cit. 2023-05-18]. Dostupné z: <https://www.vut.cz/studenti/zav-prace/detail/149029>. Bakalářská práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav fyzikální a spotřební chemie. Vedoucí práce Martin Vala.

ČESTNÉ PROHLÁŠENÍ

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

.....
podpis studenta

PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych poděkovala svému vedoucímu, panu prof. Mgr. Martinu Valovi, Ph.D., za sdílení jeho znalostí, odborný přístup a pomoc. Dále bych chtěla poděkovat mému konzultantovi, doktorandovi Ing. Rastislavu Smolkovi, za jeho přátelský přístup, ochotu, pomoc a obětovaný čas.

Obsah

ÚVOD	8
1 TEORETICKÁ ČÁST.....	10
1.1 Fluorescence	10
1.2 Stokesův posun	11
1.3 Přechody elektronů a přenos energie	11
1.4 Jablonského diagram	11
1.5 Försterův rezonanční energetický přenos	12
1.6 Fluorescenční spektroskopie.....	14
1.6.1 Definice a metody stanovení kvantového výtěžku fluorescence.....	15
1.6.2 Doba života fluorescence	16
1.7 Charakteristika studovaných molekul	16
1.7.1 Nanočástice	18
1.7.2 Příprava nanočástic	18
1.7.3 Metoda určování velikosti částic	20
1.7.4 Určování stability nanočástic	21
1.8 Současný stav řešené problematiky	21
2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	24
2.1 Studované organické molekuly	24
2.2 Použité přístroje a pomůcky	25
2.3 Příprava roztoků	25
2.4 Příprava host-guest systémů	26
2.5 Příprava nanočástic	27
2.6 Měření absorbance.....	27
2.7 Měření fluorescenčních spekter	27
2.8 Měření kvantového výtěžku fluorescence	28
2.9 Měření doby života fluorescence.....	28
2.10 Měření velikosti a zeta potenciálu nanočástic	29
3 VÝSLEDKY A DISKUZE	30
3.1 Výsledky měření na UV spektrofotometru.....	30
3.1.1 Absorbance samotných látek.....	30
3.1.2 Absorbance nanočástic vytvořených ze samotných látek	33
3.1.3 Absorbance HG systémů	34

3.1.4	Absorbance nanočástic vytvořených z HG systémů	36
3.2	Výsledky měření fluorescenčních spekter a kvantových výtěžků	38
3.2.1	Fluorescenční spektra samostatných látek	38
3.2.2	Fluorescenční spektra nanočástic vytvořených z jednotlivých látek.....	40
3.2.3	Fluorescenční spektra jednotlivých fluoroforů v pevné fázi (prášek).....	43
3.2.4	Fluorescenční spektra HG systémů v roztoku	44
3.2.5	Fluorescenční spektra nanočástic vytvořených z HG systémů	48
3.3	Výsledky měření doby života fluorescence	54
3.3.1	Doba života fluorescence HG systémů v roztoku THF.....	54
3.3.2	Doba života fluorescence nanočástic	55
3.3.3	Doba života fluorescence studovaných látek v pevné fázi	57
4	Závěr.....	58
5	Citovaná literatura	60
6	Seznam zkratk	65

ÚVOD

Tato bakalářská práce se zaměřuje na organické luminofory s dlouhovlnnou emisí. Luminiscenční jevy fascinují lidstvo již od pradávna. Světelná polární záře, světélkující hmyz a dřevo a další přírodní úkazy jsou příklady luminiscenčních jevů vyskytujících se přirozeně na planetě Zemi. Samotný pojem fluorescence byl poprvé použit v 19. století Sirem Goerge Gabriel Stokesem při popisu emise viditelného světla minerálu fluoritu po ozáření „neviditelným“ UV světlem. Fluorescence v dnešní době našla uplatnění jako dominantní metodika v biotechnologiích, průtokové cytometrii, sekvenování DNA, forenzní a genetické analýze, lékařské diagnostice, biozobrazovacích metodách, atd., díky své citlivosti a nízkým pořizovacím nákladům [1].

V posledních desetiletích došlo k vývoji a rozšíření fluorescenční spektroskopie, která byla dříve využívána jako výzkumný nástroj v biofyzice a biochemii. Fluorescenční zobrazovací techniky se staly mocnými nástroji. Zejména blízká infračervená fluorescence (NIR), nacházející se na rozpětí vlnových délek 700–1000 nm, výrazně usnadňuje sledování molekulárních procesů *in vivo*. Barviva aktivní v blízké infračervené oblasti přitahují neustálou pozornost díky svým rozmanitým aplikacím v biomedicině, materiálové vědě a souvisejících oborech. Mezi jejich výhody patří levná excitace laserovou diodou, snížený rozptyl a zvýšená schopnost průniku mnohem hlouběji do měkkých tkání a kostí, díky relativně nízké absorpci složek tkáně (voda a hemoglobin) v NIR spektrálním rozsahu. Proto se NIR fluorescenční sondy staly slibnými prostředky vedoucí k lepšímu pochopení biologických procesů na molekulární úrovni. Existuje však jen relativně málo dostupných druhů NIR barviv, patří mezi ně např. ftalokyany, kyaninová a skvarainová barviva. Fluorescenční barviva jsou obecně rozsáhlé π -konjugované aromatické systémy, často obsahující více spojených benzenových jader. Ačkoli modifikace stávajících skeletů barviv vhodnými funkčními skupinami výrazně zlepšila jejich fyzikálně-chemické vlastnosti, zvýšená molekulová hmotnost vedla k narušení fungování biomolekul, nízké rozpustnosti ve vodném prostředí nebo ke srážení. Proto je vývoj nových a nízkomolekulárních NIR platform v zájmu komunity biomedicínského zobrazování [2] [3] [4].

Pro tvorbu fluorescenčních sond se používají zejména fluorescenční nanočástice. Avšak tyto nanočástice musí splňovat určitá kritéria, který mi jsou např. vysoká fotostabilita, nízká toxicita, biodegradabilita a vysoká intenzita fluorescence. Jednou z nejzajímavějších a nejrychleji postupujících oblastí nanotechnologií v biomedicínském výzkumu je vývoj sond na bázi nanočástic pro molekulární zobrazování rakoviny *in vivo* [5]. Většina fluorescenčních nanočástic (kvantové tečky, modifikovaný oxid křemičitý, nanočástice s agregací indukovanou emisí), které byly úspěšně použity v praxi pro značení nádorových buněk, tkání atd., má obvykle strukturu jádra s obalem, kde fluorescenci zajišťuje jádro a obal chrání jádro nanočástice před fotovyblednutím a zlepšuje dispergovatelnost nanočástic ve vodném prostředí [6].

Tato práce bude proto zaměřená na zkoumání nových fluorescenčních organických molekul, které jsou deriváty látky difenylstilbenu s elektron-donorovou skupinou difenylaminem a rozdílnými elektron-akceptorovými skupinami. Důraz bude kladen na charakterizaci těchto látek ve formě roztoku, studování optických a fluorescenčních vlastností

za použití fluorescenční spektroskopie, metody TCSPC. Dále bude následovat tvorba *host-guest* systémů vždy ze dvou studovaných molekul, z kterých budou následně vytvořené nanočástice. Pro studované nanočástice ve formě vodné suspenze budou opět stanovené optické vlastnosti, velikost a stabilita metodou DLS a ζ potenciálem. Tyto organické luminofory se vzájemným překryvem fluorescenčních spekter, byly zvoleny z důvodu splňující podmínky pro Försterův rezonanční přenos energie (FRET), který bude pozorován změnou fluorescenčních vlastností u nanočástic.

1 TEORETICKÁ ČÁST

1.1 Fluorescence

Fluorescence spolu s fosforescencí je druh luminiscence, konkrétně fotoluminiscence. Luminiscence obecně značí spontánní emisi záření jakékoliv látky, z elektronového excitovaného stavu dané molekuly nenacházející se v tepelné rovnováze se svým prostředím. Látka, která je charakteristická fotoluminiscencí, absorbuje světlo neboli fotony jakožto elektromagnetické záření, čímž se dostane do excitovaného stavu. Při následné deexcitaci dochází k vyzařování světla, které je po časové prodlevě v řádech několika nanosekund vyzařené ve formě fotonů o větší vlnové délce a nižší energii. Zpožděné vyzařování fotonů v případě fosforescence je způsobeno zakázaným mezi-systémovým přechodem elektronů z hladiny singletové do hladiny tripletové a trvá i několik minut, jelikož pravděpodobnost vyzařování těchto fotonů roste s časem [7].

První zmínky o fenoménu, který byl později pojmenován jako fluorescence, sahají až do roku 1565 a to konkrétně do Španělska. Zde tehdejší lékař a botanik Nicolás Monardes léčil ledvinová onemocnění svítícím namodralým výtažkem z mexického dřeva zvaným *Lignum nephriticum*, který po vystavení slunečnímu záření jemně fluoreskoval. Sloučenina způsobující modré zbarvení – matlalin, která vzniká oxidací flavonoidu obsaženého ve dřevě, byla známá již starověkým Aztékům (*Matlali* – Aztécky modrá) [7]. Později v první polovině 19. století se Sir John Herschel zabýval studiem fluorescence organické molekuly – chininu. Jednalo se o nejnámější fluorofor obsažený v toniku, jenž se v dnešní době uplatňuje jako základní antimalarikum. Vystavení sklenice s tonikem slunečnímu záření pod správným úhlem umožnilo pozorovat slabou modrou záři na hladině tekutiny. UV záření ze Slunce excitovalo chinin na vyšší energetickou hladinu a při návratu do základního stavu došlo k emisi právě onoho modrého záření o vlnové délce 450 nm [8].

Pod pojmem fluorofor si lze představit molekulu, která je schopna absorbovat energii záření o určité vlnové délce a následně tuto energii ztratit emisí o delší vlnové délce. Fluorescence je tedy vlastnost, kterou vykazují některé molekuly označované jako fluorofory. Tyto fluorofory se mezi sebou liší vlnovými délkami, při kterých dochází k absorpci energie v podobě světla a k emisi energie ve formě fluorescence. Tedy lze říci, že každá molekula fluoroforu je charakteristická svým absorpčním a emisním spektrem [9].

Unikátní vlastnosti fluorescence z ní činí velmi užitečnou techniku pro zkoumání procesů na molekulární úrovni. Zejména užitečnou vlastností je doba, kterou stráví fluorofor v excitovaném stavu. Proto lze fluorofor označit jako „molekulární stopky“ začínající absorpcí světla a končící emisí světla. Fluorescenční molekuly tak mohou podávat informace odehrávající se na časové škále v rozmezí nanosekund. V posledních několika desítkách let je však popularita fluorescence do značné míry způsobena vývojem chemických látek pro fluorescenční sondy. Popularitě přidává také snadná dostupnost těchto sond a vývoj nových přístupů v oblasti mikroskopie. Rozvoj molekulární biologie (např. vznik rekombinantních proteinů a řízené mutagenese) spolu s těmito úvahami zapříčinila nespočet nových aplikací fluorescence v chemických, fyzikálních a přírodních vědách, v kterých se bez ohledu na aplikaci využívají základní principy fluorescence [10].

1.2 Stokesův posun

Každá fluorescenční molekula je charakteristická svými fluorescenčními spektry. Emisní a excitační spektrum daného fluoroforu jsou obvykle navzájem svými zrcadlovými obrazy. Excitační spektrum se nachází na kratších vlnových délkách a je charakteristické větší energií. Protože vlnová délka je nepřímo úměrná energii záření, ztráta energie posouvá emisní spektrum k delším vlnovým délkám. Tento jev je známý jako Stokesův posun, který je primárně způsoben vibrační relaxací; energetickým přechodem elektronů z vyšší vibrační hladiny excitovaného stavu do základní (nejnižší) vibrační hladiny S_1 daného excitovaného stavu. Fluorescenční molekuly mohou vykazovat Stokesův posun také v důsledku reakcí s rozpouštědlem, reakcí v excitovaném stavu, tvorby komplexů a přenosu energie. V praxi se Stokesův posun měří jako rozdíl mezi hodnotami vlnových délek excitačních a emisních maxim daného fluoroforu [8].

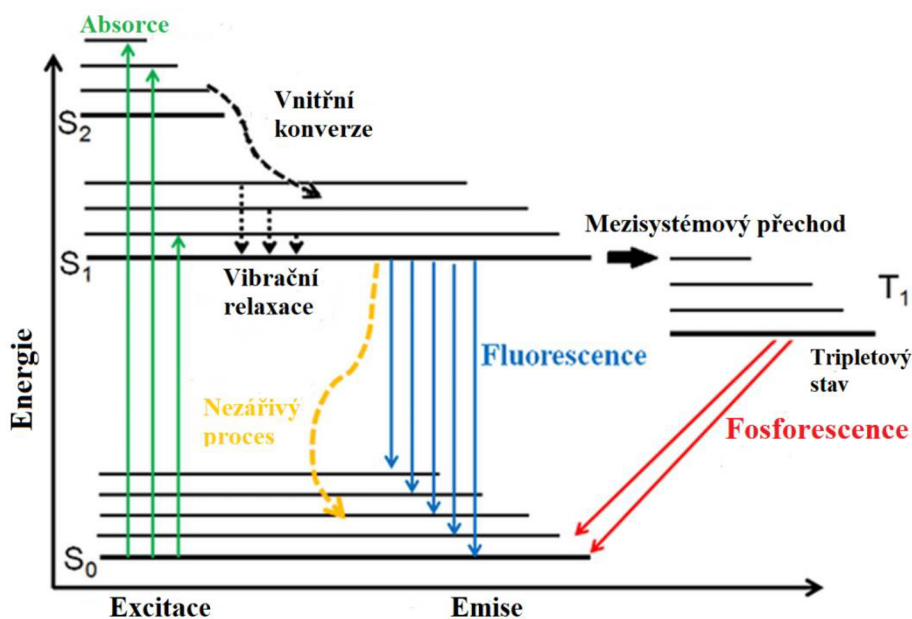
1.3 Přechody elektronů a přenos energie

V rámci elektronového spektra dochází získáním nebo vyzářením energie k přechodu elektronů do různých stavů – singletových S_0 , S_1 a tripletových T_1 , T_n , které jsou znázorněny v Jablonského diagramu (viz obrázek 1). Pomocí těchto přechodů vyobrazených v elektronovém absorpčním a emisním spektru molekuly lze získat informace o struktuře, energii a dynamice elektronově excitovaných stavů. Přechody spojené s absorpčními procesy $S_0 + hv \rightarrow S_1$ a $S_0 + hv \rightarrow T_1$ a emisními procesy $S_1 \rightarrow S_0 + hv$ a $T_1 \rightarrow S_0 + hv$ se využívají k odvození energetického diagramu elektronových stavů. Dynamiku fotochemických i fotofyzikálních vlastností lze zjistit z informací o době života excitovaných stavů T_1 a S_1 a kvantových výtěžků emisních dějů [11].

1.4 Jablonského diagram

Jablonského diagram (obrázek 1) se využívá k znázornění excitačních stavů molekul a možných zářivých a nezářivých přechodů, které probíhají při navrácení molekuly z excitovaného do základního stavu. Elektrony se excitují po absorpci energie z fotonu, která se přemění na vnitřní energii molekuly, ze základní vibrační singletové hladiny S_0 do vyšších vibračních hladin singletových stavů S_1 , S_2 , S_n . Přímá excitace ze singletových do tripletových stavů není kvůli zachování spinu možná. V rámci téhož elektronického stavu dochází k nezářivým přechodům – vibrační relaxaci na nižší energetickou hladinu, kdy se ztrácí část energie. Dalším neradiačním přechodem je tzv. vnitřní přeměna nastávající mezi dvěma elektronickými stavy se stejnou spinovou multiplicitou. Zářivý neboli radiační přechod $S_1 \rightarrow S_0$ provázený emisí fotonů je znám pod pojmem fluorescence, která je podle Kashova pravidla¹ nejintenzivnější probíhá-li z nejnižšího excitovaného stavu dané násobnosti. Alternativním a konkurujícím přechodem k vnitřní konverzi a fluorescenci je mezisystémový přechod ze stavu S_1 do stavu T_1 ; neradiační přechod probíhající mezi dvěma izoenergetickými hladinami s různou multiplicitou náležejících elektronických stavů. Jakmile náhle dojde k mezisystémovému přechodu molekula se navrátí na základní vibrační hladinu T_1 . Fosforescence je zakázaný radiační přechod $T_1 \rightarrow S_0$, který trvá mnohem déle než fluorescence díky nízké rychlostní konstantě [11] [8].

¹ Kashovo pravidlo – před emisí fluorescenčního kvanta dochází obvykle k relaxaci vibrační energie a vnitřní konverzi, takže fluorescenční přechod nastává z nejnižší vibrační hladiny prvního excitovaného stavu S_1 .



Obrázek 1 Jablonského diagram znázorňující možné energetické přechody elektronů [12]

1.5 Försterův rezonanční energetický přenos

Försterův rezonanční přenos energie je významný fyzikální fenomén vyskytující se mezi dvěma molekulami chromoforů. Tento proces způsobí přenos excitační energie z jednoho fluoroforu na druhý fluorofor nezářivou cestou, nedochází k emisi žádného fotonu. Přesná teorie FRET byla objasněna až německým vědcem Theodorem Försterem v polovině dvacátého století, předtím se tímto tématem zabývali Jean-Baptista a Francis Perrinovi [13].

Jak bylo výše zmíněno, teoretickou analýzu FRET provedl Theodor Förster. Mechanismus tohoto nezářivého procesu je schematicky znázorněn na obrázku 2. Donorová skupina/molekula (D) je excitována fotonem a poté se relaxací navrátí do nejnižšího excitovaného singletového stavu S_1 (podle Kashova pravidla). Pokud se akceptorová skupina/molekula (A) nevyskytuje velmi daleko, energie uvolněná při návratu donoru do základního stavu S_0 může způsobit současnou excitaci akceptoru. Přenos této energie je zprostředkován dipól-dipólovými interakcemi bez emise fotonů, jedná se o nezářivý proces, jenž je označován jako rezonance. Po excitaci a následné relaxaci akceptoru do nejnižšího singletového stavu S_1 , excitovaný akceptor emituje záření a vrací se zpátky do základního stavu S_0 , pokud neexistují jiné formy zhášení [8] [14].

Rezonanční energetický přenos je možné nejlépe pochopit na základě jednoho donoru a akceptoru, kteří jsou od sebe odděleni vzdáleností r . Rychlost přenosu pro donor a akceptor oddělených vzdáleností r je dána vztahem

$$k_T(r) = \frac{Q_D k^2}{\tau_D r^6} \left(\frac{9000(\ln 10)}{128\pi^5 N n^4} \right) \int_0^\infty F_D(\lambda) \varepsilon_A(\lambda) \lambda^4 d\lambda \quad (1)$$

kde Q_D je kvantový výtěžek donoru v nepřítomnosti akceptoru, n je index lomu média, N je Avogadrova konstanta, r vzdálenost mezi donorem a akceptorem, a τ_D je doba života samotného donoru. $F_D(\lambda)$ je korigovaná intenzita fluorescence donoru v rozmezí vlnových délek λ až $\lambda + \Delta\lambda$ s celkovou intenzitou normalizovanou na jednotku. $\varepsilon_A(\lambda)$ je extinkční koeficient

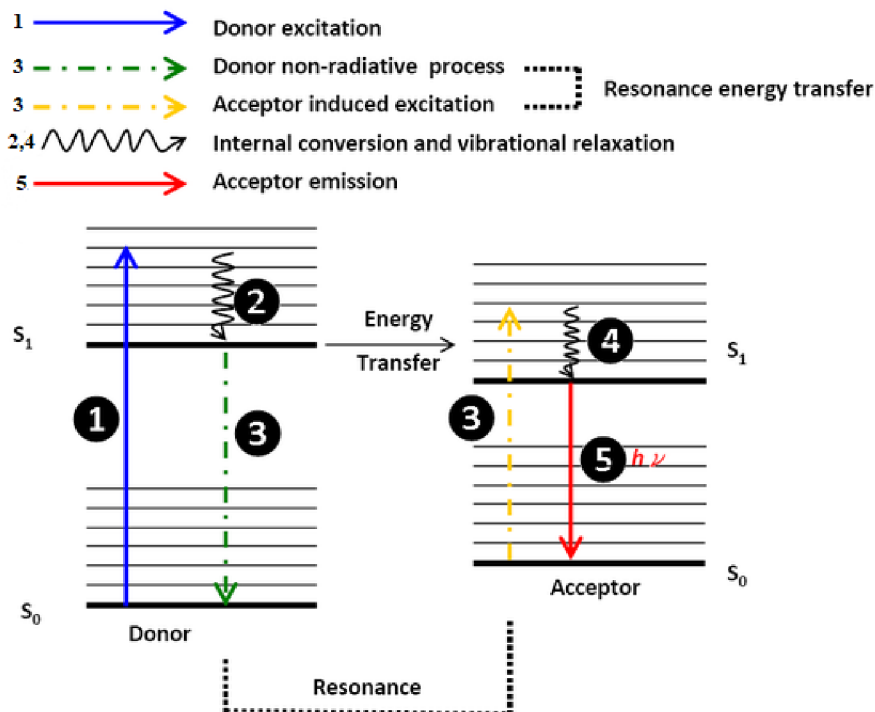
akceptoru a člen κ^2 je faktor popisující relativní orientaci přechodových dipólů donoru a akceptoru v prostoru. Rychlost přenosu je zapsána jako funkce r , $k_T(r)$, aby se zdůraznila její závislost na vzdálenosti [8].

Vzdálenost, při které je RET účinný z 50 % se nazývá Försterová vzdálenost, která se obvykle pohybuje v rozmezí 20–60 Å. Pro tento energetický přenos byl odvozen Försterův vztah, kdy rychlost přenosu energie $k_T(r)$ z donoru na akceptor je definována jako

$$k_T(r) = \left(\frac{1}{\tau_D}\right) \cdot \left(\frac{R_0}{r}\right)^6 \quad (2)$$

kde τ_D je doba života fluorescence donoru bez přítomnosti akceptoru, R_0 je Försterova vzdálenost, ve které je pravděpodobnost vnitřní deaktivace excitované molekuly rovna pravděpodobnosti přenosu energie, r je vzdálenost mezi donorem a akceptorem. Pokud je vzdálenost D-A (r) rovna Försterově vzdálenosti R_0 a účinnost přenosu je 50 %, rychlost přenosu energie se rovná rychlosti rozpadu donoru ($1/\tau_D$). Tedy při této vzdálenosti ($r = R_0$) by se v případě nepřítomnosti akceptoru snížila emise donoru na polovinu své intenzity. Rychlost RET je silně závislá na vzdálenosti a úměrná r^{-6} [8] [15].

Försterovy vzdálenosti v rozmezí 20–90 Å jsou vhodné pro studium biologické struktury makromolekul. Tyto vzdálenosti jsou srovnatelné s velikostí biomolekul, nebo se vzdáleností mezi dvěma zájmovými pozicemi na velké molekule s připojenými donor-akceptorovými skupinami. Jakýkoliv faktor, který ovlivní vzdálenost mezi D a A, ovlivní rychlost přenosu energie, což umožňuje kvantifikovat změnu vzdálenosti [16].



Obrázek 2 Schematický diagram Försterova rezonančního přenosu energie [17]

Pro uskutečnění FRET musí být splněno několik podmínek. Především, emisní spektrum donoru se musí překrývat s excitačním spektrem akceptoru (viz obrázek 3). Jelikož se energie přenáší prostřednictvím dipól-dipólových interakcí, musí být donor a akceptor

správně orientovány. Protože účinnost FRET (E), která je definována jako podíl energie přenesené na akceptor, je nepřímo úměrná šesté mocnině vzdálenosti mezi fluorofory, FRET funguje pouze na krátké vzdálenosti. V průměru musí být donor a akceptor od sebe vzdáleni méně než 10 nm, a závislost energie na vzdálenosti mezi fluorofory popisuje vztah

$$E = \frac{R_0^6}{R_0^6 + r_{DA}^6} \quad (3)$$

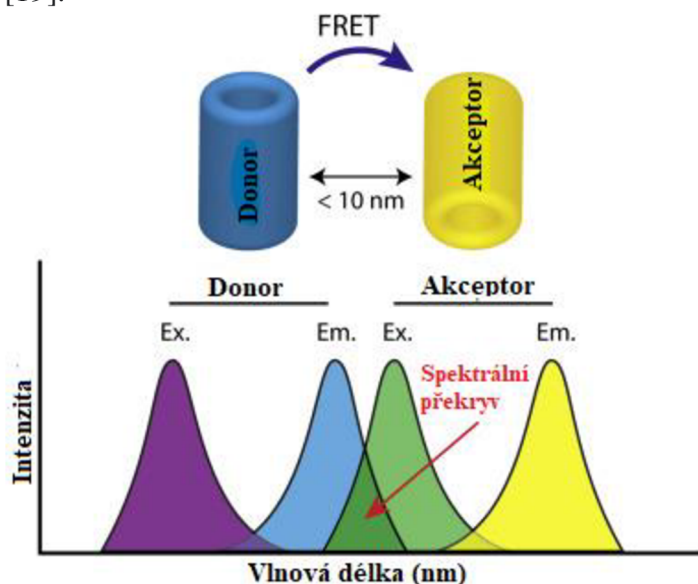
Lze spolehlivě předpokládat, že k přenosu energie dochází vždy, když jsou spektrální vlastnosti vhodné a vzdálenost D-A je srovnatelná s Försterovou vzdáleností R_0 [16] [18].

Čím více se emisní spektrum donoru a excitační spektrum akceptoru překrývají, tím lépe může donor přenést energii na akceptor. Překryvový integrál $J(\lambda)$ vyjadřuje stupeň spektrálního překryvu mezi emisí donoru a absorpcí akceptoru:

$$J = \int_0^\infty F_D(\lambda) \epsilon_A(\lambda) \lambda^4 d\lambda = \frac{\int_0^\infty F_D(\lambda) \epsilon_A(\lambda) \lambda^4 d\lambda}{\int_0^\infty F_D(\lambda) d\lambda} \quad (4)$$

kde $F_D(\lambda)$ je emisní spektrum donoru s celkovou intenzitou (plocha pod křivkou) normalizovanou na hodnotu 1. $\epsilon_A(\lambda)$ je molární extinkční koeficient ($M^{-1}cm^{-1}$) při vlnové délce λ (nm) [8].

Nejpřímějším postupem měření FRET je stanovení emise akceptoru po excitaci donoru, čehož lze dosáhnout použitím tří sad filtrů s excitačními/emisními vlnovými délkami donor/donor, akceptor/akceptor a donor/akceptor. Zmíněná emise akceptoru je tedy přímým důkazem energetického přenosu a způsobem, jak detekovat Försterův rezonanční energetický přenos [19].



Obrázek 3 Znáornění spektrálního překryvu donoru a akceptoru při FRET [20]

1.6 Fluorescenční spektroskopie

Znalost přístrojového vybavení a pozornost věnovaná experimentálním detailům je základním požadavkem pro správné použití fluorescenčních metod. Jelikož je fluorescence velice citlivá metoda, existuje velké množství potencionálních artefaktů, které mohou vést k chybným výsledným informacím. Kvůli vzorkům s velmi nízkou fluorescencí nebo vzorkům bez

fluorescence je možné nastavit a zesílit přístroj tak, aby byly získány pozorovatelné signály. Tyto výsledné signály nemusí vždy pocházet ze studovaného fluoroforu, ale místo toho lze pozorovat interferenci s fluorescencí v pozadí, jenž pochází z rozpouštědla. Dalším zdrojem interference může být průnik světla v důsledku špatné instrumentace přístroje, rozptyl světelného paprsku procházejícího optikou, zakalený vzorek způsobující rozptyl dopadajícího záření, Rayleigha nebo Ramanův rozptyl, atd. Spektrofluorometry používající se pro výzkum a analýzu fluoroforů poskytují nepravá emisní a excitační spektra v důsledku neuniformního spektrálního výstupu světelných zdrojů a účinnosti monochromátorů, detektorů v závislosti na vlnové délce. Lze tedy říci, že neexistuje ideální spektrofotometr poskytující ideální výsledky. Pro získání spolehlivých spektrálních dat je důležité mít na paměti výše zmíněné faktory [21].

Emisní spektrum měřené při konstantní excitační vlnové délce, a excitační spektrum, neboli závislost intenzity emise měření při jedné emisní vlnové délce, lze prezentovat na stupnici vlnových čísel nebo stupnici vlnových délek. Vlnové délky a vlnová čísla lze vzájemně přepočítat pomocí reciproké hodnoty vzaté z každé hodnoty. Veškeré dostupné přístroje produkují spektra na stupnici vlnových délek, i když je stupnice s vlnovými čísly energeticky lineární, jelikož jsou jednoduše interpretovatelná. V ideálním případě instrumentace spektrofluorometru by přímo detekovaná emise představovala rychlost emise fotonů nebo energii emitovanou při každé vlnové délce v intervalu vlnových délek. Obdobně excitační spektrum by představovalo relativní emisi fluoroforu na každé vlnové délce. Kvantové výtěžky, stejně tak emisní spektra, jsou pro většinu fluoroforů nezávislé na excitační vlnové délce [22].

1.6.1 Definice a metody stanovení kvantového výtěžku fluorescence

Kvantový výtěžek je jedním z nejdůležitějších parametrů při charakterizaci luminiscenčních molekul a vysoké hodnoty kvantových výtěžků jsou klíčové pro širokou škálu aplikací. Kvantový výtěžek fluorescence lze obecně popsat jako poměr mezi množstvím absorbované energie a množstvím energie, kterou daná reakce vyzářila. Jedná-li se o fluorescenci, tento poměr lze zkonkretizovat na poměr fotonových kvant nazpět vyzářených n_F k fotonům absorbovaným n_A daným fluoroforem:

$$\Phi = \frac{n_F}{n_A}, \quad (5)$$

Jinými slovy kvantový výtěžek udává pravděpodobnost, kdy je excitovaný stav deaktivovaný fluorescencí než jinými nezářivými procesy. Kvantový výtěžek lze také definovat jako podíl rychlosti vlastního fluorescenčního přechodu a celkové rychlosti všech dějů pocházejících ze stavu S_1 . Přítomnost dalších komponent v roztoku může způsobit deaktivaci stavu S_1 , a tak zhaset fluorescenci. Tyto látky jsou známé jako zhasěče, do kterých se řadí např. kyslík [23].

Pro stanovení kvantového výtěžku fluoreskující látky se využívá spektrofluorometrů a různých metod měření. Vhodná metoda se zvolí dle fáze (skupenství), v jakém se vzorek nachází. Způsobem stanovení kvantového výtěžku je využití relativní nebo absolutní metody. Relativní metodou se hodnota vypočítá porovnáním fotoluminiscenční emise sledovaného vzorku s emisí referenčního standardu se známým kvantovým výtěžkem. Z důvodu detekce pouze části emitovaného světla v běžných spektrometrech nelze přímo změřit kvantový výtěžek, a tak se problém překoná použitím referenčního standardu se známým kvantovým

výtěžkem a podobnými optickými vlastnostmi, jaké má vzorek. Za stejných podmínek se změří emisní spektra standardu a vzorku a poměr integrované emise se použije k výpočtu výtěžku [23].

Metoda absolutního kvantového výtěžku se obejde bez použití standardu, jelikož se k zachycení veškerého vzorkem emitovaného světla použije integrační sféra. Kvantový výtěžek se stanoví porovnáním počtu emitovaných fotonů s absorbovanými fotony. Mezi výhody absolutní metody patří širší rozsah emisních vlnových délek a možnost měření většího rozsahu typů vzorků [23].

1.6.2 Doba života fluorescence

Doba života fluorescence τ jsou spolu s kvantovým výtěžkem a fluorescenčním spektrem parametry charakteristické pro návrat excitovaného fluoroforu ze singletové hladiny S_1 do základního stavu S_0 . Jedná se o kinetický parametr, který je nepřímo úměrný součtu rychlostních konstant zářivých procesů k_f a nezářivých procesů k_{nr} označovaných jako zhášení

$$\tau = \frac{1}{(k_f + k_{nr})} \quad (6)$$

Doba života fluorescence je doba, kterou fluorofor stráví v excitovaném stavu, než vyžáří foton a vrátí se do základního stavu. Jedná se o přímý ukazatel rychlosti přenosu energie z excitovaných molekul do místního prostředí nebo do jiných fluoroforů. Obvykle trvá v řádech nanosekund pro fluorescenci a mikrosekund nebo sekund pro fosforescenci. Doba života fluorescence je parametr do značné míry nezávislý na koncentraci fluoroforu a intenzitě fluorescence. Tento proces je spojen s energeticky nestabilním stavem, čímž ho činí citlivým k vnitřním faktorům daných strukturou fluoroforu a vnějším faktorům zahrnující teplotu, polaritu, přítomnost zhášečů fluorescence. Měření doby života se považuje za absolutní měření, zatímco intenzita, která se obvykle bere z emisního spektra, je pouze relativním měřením [24].

Metoda TCSPC (time-correlated single-photon counting, v překladu časově korelované jednofotonové počítání) je hojně využívaným způsobem stanovení pikosekundových až mikrosekundových dob života fluorescence. Metoda je založena na pravděpodobnosti detekce jediného fotonu v určitém čase po excitačním impulzu, která je úměrná intenzitě fluorescence v daném čase. Konkrétně se jedná o pulzní techniku, která vytváří histogram z časů příchodů fluorescenčních fotonů z po sobě jdoucích cyklů excitace a sběru. Histogramy okamžitě podávají kvalitativní informace o době života a mohou informovat o přítomnosti více než jednoho rozpadu. Doba života se vypočítá ze sklonu rozpadové křivky podle rovnice

$$F(t) = F_0 e^{-t/\tau} \quad (7)$$

kde F_0 je intenzita v čase $t = 0$, t je čas po absorpci a τ je doba života fluorescence [25] [26].

1.7 Charakteristika studovaných molekul

Molekulami, kterými se zabývá tato bakalářská práce, jsou komplexní organické fluorofory. Tyto fluorofory jsou deriváty uhlovodíků a ve své struktuře obsahují převážně aromatické uhlovodíky, tedy šest řetězených atomů uhlíku se střídavě jednoduchými a dvojnými vazbami, které jsou mezi sebou vázány dalšími dvojnými vazbami. Z toho vyplývá, že molekula obsahuje

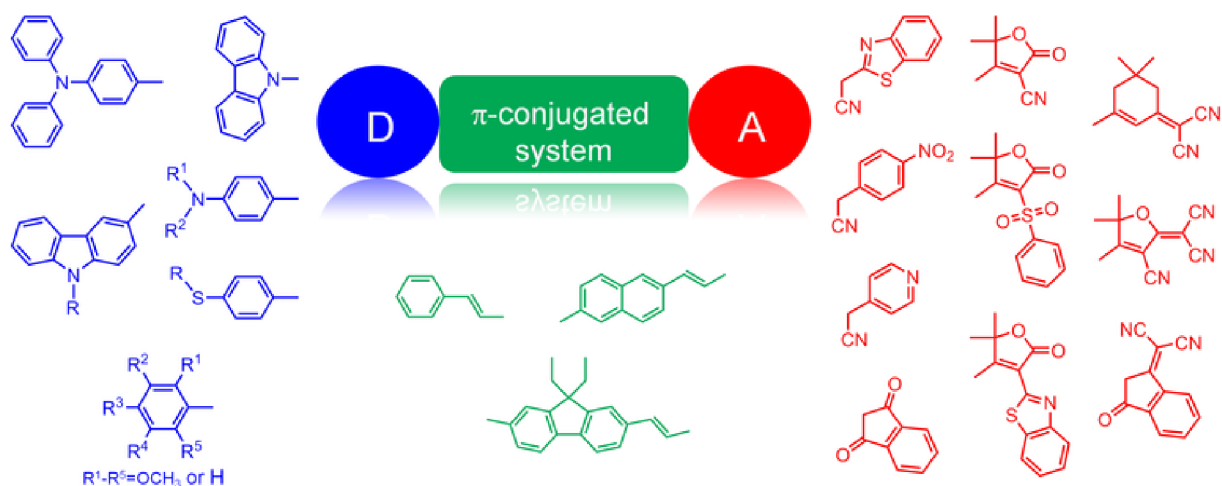
system konjugovaných dvojných vazeb s delokalizovanými π elektrony. Tento system umožňuje elektronům se pohybovat po struktuře fluoroforu. Elektrony vytváří hustý elektronový oblak vyskytující se jak nad molekulou, tak pod molekulou. Studovaná fluorescence vzniká excitací na vyšší energetickou hladinu a následným navracením do základní hladiny právě těchto delokalizovaných π elektronů.

Studovaný organický fluorofor ve své struktuře zahrnuje vždy akceptorovou skupinu, donorovou skupinu a mezi nimi uhlovodíkový řetězec s dvojnými vazbami sloužící jako most spojující tyto dvě skupiny. Dohromady tak tvoří tzv. donor-akceptorový system (DA) s π -konjugovanými vazbami (D- π -A). Donor, poskytující volné elektronové páry, a akceptor, poskytující volné orbitály k zaplnění elektrony, způsobí posun elektronové hustoty směrem k té části molekuly, která má lepší schopnost přitahovat volné elektrony. Ve většině případů se jedná o akceptorovou skupinu, ale vše záleží na konkrétním DA páru v dané molekule. Obrázek 4 představuje různé akceptorové, donorové skupiny a uhlíkaté řetězce, které mezi sebou mohou tvořit D- π -A system. Existují i složitější systemy obsahující více donorů nebo akceptorů znázorněnými např. jako D- π -A- π -D nebo A- π -D- π -A. Těmito složitějšími systemy se však v práci zabývat nebudeme.

Ke studiu byly vybrány tři organické fluorofory, kdy jeden z nich emituje velmi slabou fluorescenci v blízké infračervené oblasti (host) a další dva (hostitelé) jsou charakteristické silnou fluorescencí ve viditelné části spektra v oblasti 400 – 500 nm. Host s hostitelem je držen pospolu dipól-dipólovými interakcemi, π - π interakcemi, Van der Walsovými silami, atd., a tvoří tzv. *host-guest* system (HG system).

Host-guest system, v překladu system hostitel-host, je složen ze dvou a více molekul nebo iontů, které vytváří pro ně charakteristické a jedinečné strukturní uspořádání držené pohromadě elektrostatickými silami. Spojení dvou molekul v HG system může způsobit zlepšení vlastností fluorescence v podobě kvantového výtěžku, posunutí emise fluoroforu do dlouhovlnné oblasti (NIR), vytvořit stabilní system. apod. Obecně interakce mezi hostem a hostitelem umožní reakci systemu na různé vnější podněty, který mi jsou např. elektromagnetické záření, teplota, ionty, pH, atd [27].

Fluorescenční barviva emitující záření v červené až blízké infračervené oblasti (NIR) s vysokou stabilitou jsou velmi žádanými a intenzivně zkoumány. Molekuly emitující v NIR oblasti mohou být excitovány zdrojem záření v oblasti viditelného světla, což má za následek nižší škodlivé účinky na biologické vzorky, jako jsou buňky a tkáň, v porovnání s ultrafialovým zářením. Také delší excitace a emise záření umožňuje penetrovat tkáň mnohem hlouběji, aniž by došlo k autofluorescenci biologické tkáň [28]. Fluorescenčních molekuly a sondy s NIR emisí nachází využití zejména v biomedicíně zobrazování. Vizualizace nádorů, plaků, mapování cév v srdci a mozku jsou aspekty základního biomedicínského výzkumu a diagnostiky nemocí, které neustále těží z nových a vylepšených NIR barviv [29].



Obrázek 4 Příklady donorových, akceptorových skupin a uhlovodíkových mostů vyskytující se v organických molekulách [30]

1.7.1 Nanočástice

Věda zabývající se studiem problematiky na úrovni nano rozměrů, se stala v posledním desetiletí velmi slibným oborem a stále přitahuje větší pozornost. Nanočástice se obvykle charakterizují jako částice s velikostí definovanou na 1 až 1000 nm. Šířeji nanočástice lze definovat jako částice vykazující odlišné fyzikální a chemické vlastnosti než mají jejich základní materiály, z kterých byly vytvořeny. Důležitým znakem nanočástic je vysoký poměr povrchu k objemu, umožňující rozmanité povrchové úpravy a funkcionalizace. Částice v nano-rozměrech se podobají velikostí biologickým molekulám a jejich strukturám. Tyto hlavní přednosti přispívají k rozsáhlému studiu a aplikacím nanočástic v biomedicinském výzkumu zahrnující senzory, nanomedicínu, molekulární zobrazování [31].

Díky výborné biokompatibilitě a rychlému metabolismu mají právě malé organické fluorescenční molekuly (kyaninové barviva, porfyriny, barviva donor-akceptor-donor (D-A-D), nebo donor-akceptor (DA) atd.) velký potenciál v klinické terapii rakoviny řízené zobrazováním. Avšak fluorescenční molekuly jsou limitovány svou rozpustností ve vodě, slabou fotostabilitou. Efektivním řešením je vytvoření nanosond a nanočástic z organických fluoroforů, kterými se dosáhne zlepšení biologických a optických vlastností (větší Stokesův posun, posun spektra do červené oblasti, rozšířená absorpance) [32].

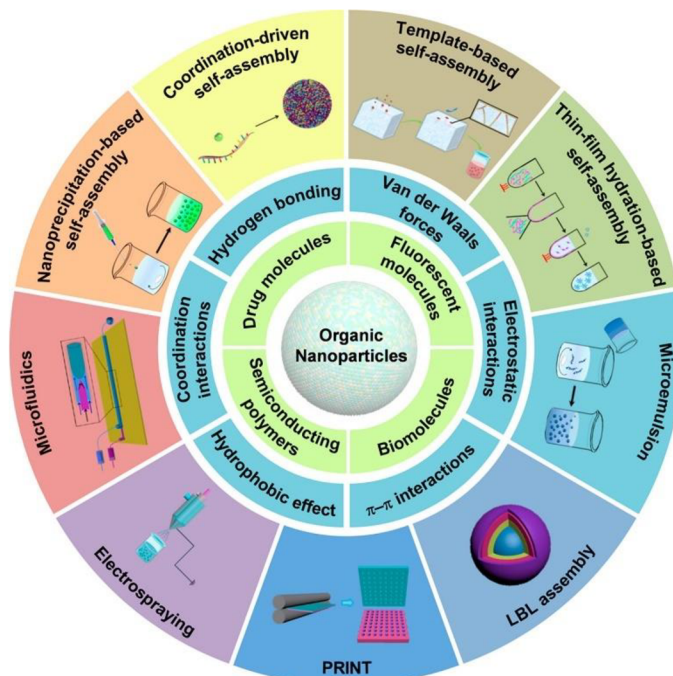
Dominantním faktorem při použití nanočástic a jejich aplikací je jejich syntéza a mechanismus růstu těchto nanostruktur. Existují různé druhy přípravy nanočástic např. *top down* a *bottom up* přístup.

1.7.2 Příprava nanočástic

Top down a *bottom up* jsou dvě různé, navzájem opačné techniky přípravy nanočástic. Přístup shora dolů je charakteristický zmenšením počáteční struktury až na velikost nanočástic, kdežto přístup zdola nahoru je tvorba „velkých“ nanočástic z jednotlivých atomů a molekul. *Top down* přístup zahrnuje mechanicko-fyzikální procesy tvorby částic, a obsahuje velké množství různých technik, kterými lze dosáhnout rozměru nanočástic (1–100 nm), a těmi jsou mechanické mletí neboli, tepelné odpařování, laserová ablace a rozprašování. Tyto zmíněné metody se spíše využívají pro tvorbu anorganických nanočástic [33].

Bottom up přístup tvorby nanočástic se zaměřuje zejména na organické materiály a zahrnuje několik technik, např. chemické nanášení par, hydrotermální techniku, srážecí

reakce, sol-gel techniku, atd. (viz obrázek 5). Metody jsou založené na fyzikálně-chemických principech organizace molekul a atomů. Pro tvorbu organických nanočástic se nejvíce hodí metoda samouspořádání (angl. *self-assembling*), která je hojnou a reprezentativní metodou právě *bottom up* přístupu [34].



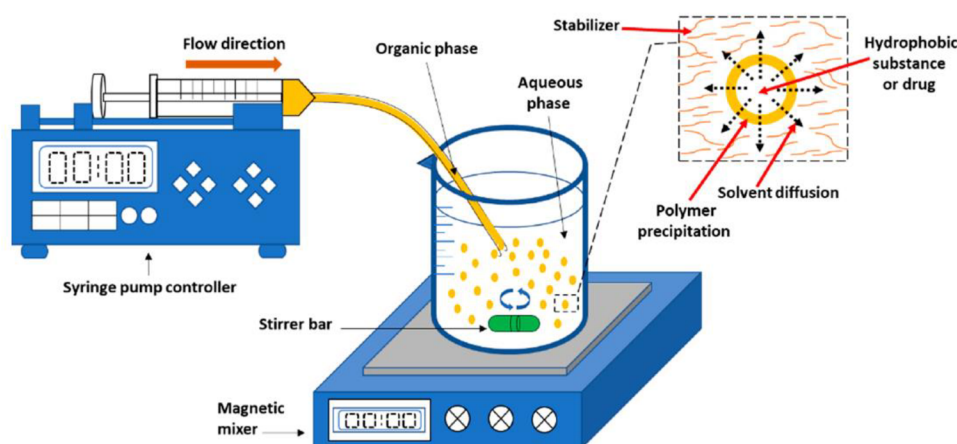
Obrázek 5 Souhrn metod sloužící pro přípravu organických nanočástic [34]

1.7.2.1 Samouspořádání

Samouspořádání je nejrozšířenějším a spontánním *bottom up* přístupem pro přípravu organických nanočástic, včetně amfifilních kopolymerů, *host-guest* komplexů, malých organických molekul. Při této metodě jsou jednotlivé atomy nanočástic drženy pospolu nekovalentními interakcemi, který mi jsou vodíkové interakce, hydrofobní efekt, van der Walsovy síly, elektrostatické interakce a π - π interakce. Při metodách vytváření organických nanočástic jsou π - π interakce velmi důležité hnací síly, které mohou vést ke směrovému růstu organických složek obsahující π konjugované skupiny. Právě organické nanočástice vytvořené z π konjugovaných fluorescenčních struktur jsou typickými zástupci v biomedicínských aplikacích. Existují různé typy samouspořádání, např. samouspořádání na bázi nanoprecipitace, koordinačně řízené samouspořádání používané zejména pro tvorbu nanomateriálů na bázi DNA, templátové samouspořádání produkující nanočástice menších než 50 nm vhodné pro nano-léčiva a nosiče léčiv, samouspořádání na bázi tenkých filmů [34] [35].

Samouspořádání na bázi nanoprecipitace je přístupná strategie, známá také jako metoda výměny rozpouštědel. Základním principem je mezifázové nanášení organických molekul po vytěsnění (viz obrázek 6). Hydrofobní prekurzory (např. organická barviva a polymery) jsou nejprve rozpuštěny v rozpouštědle mísitelné s vodou jako je tetrahydrofuran (THF), methanol nebo dimethyl sulfoxid. Dalším krokem je vstříknutí vzniklého roztoku pomocí pipety nebo stříkačky do vodné fáze (deionizované vody) za použití ultrazvuku nebo intenzivního míchání.

Dochází tedy k smísení hydrofobní a hydrofilní fáze a k jejich vzájemné interakci, které zapříčiní vysrážení nanočástic [36].



Obrázek 6 Příprava nanočástic pomocí principu samouspořádání na bázi nanoprecipitace [36]

1.7.3 Metoda určování velikosti částic

Metoda dynamického rozptylu světla (anglicky *dynamic light scattering (DLS)*), známá také jako fotonová korelační spektroskopie a zeta potenciál (ZP) jsou praktické stolní techniky vhodné pro použití v běžných laboratorních podmínkách pro zkoumání velikosti částic a jejich náboje. Jedná se o neinvazivní přístup vyžadující malé množství vzorku a žádnou kalibraci před experimentem.

Velikost je důležitým faktorem, který definuje nanočástice. Avšak i směs různě velkých částic může být považována za nanomateriál, pokud se více než 50 % částic nachází v rozmezí 1–100 nm. Proto je důležité vědět rozdělení velikosti částic ve směsi a početní rozložení nanočástic ve vzorku [37].

DLS je spektroskopická měřicí technika založená na numerické transformaci spektrálních měřicích signálů vzorku do rozdělení (distribuce) velikosti. Princip metody DLS je založen na rozptylu dopadajícího světla nanočásticemi, který je úměrný 6. mocnině jejich poloměru. Pokud jsou nanočástice velikostně menší než $1/10$ vlnové délky dopadajícího světla (tj. $\lambda/10$), jedná se o pružný rozptyl a rozptýlené světlo nese stejnou energii jako dopadající světlo nezávisle na úhlu (Rayleighův rozptyl). Překročí-li částice hranici $\lambda/10$ dojde ke změně rozptylu světla na nepružný a Rayleighův rozptyl se změní na anizotropní, úhlově závislý Mieho rozptyl [38].

Nejčastějším využitím DLS je analýza velikosti částic v submikrometrovém rozsahu. Při této analýze se využívá Brownův pohyb částic, který způsobuje prostorové přeskupení a tím ovlivňuje interferenci jednotlivých signálů rozptylů, jenž se projeví kolísáním signálu na detektoru. Dynamika přeskupování je definována koeficientem difúzní částice D_p , jenž je nepřímo úměrný velikosti částic:

$$D_p = \frac{k_b T}{3\pi\eta x_{H,t}} \quad (8)$$

Tento vztah se nazývá Stokes-Einsteinova rovnice, v které k_b představuje Boltzmannovu konstantu ($1,38064852 \cdot 10^{-23}$ J/K), T termodynamickou teplotu, η dynamickou viskozitu kapaliny a $x_{H,t}$ označuje hydrodynamický průměr translačního pohybu [39].

1.7.4 Určování stability nanočástic

Pro malé částice v kapalině neexistuje dostačující technika pro stanovení povrchového náboje částic. Běžnou metodou je měření ζ potenciálu, které se zabývá měřením elektrostatického potenciálu na elektrické dvojvrstvě obklopující nanočástice v roztoku. V iontovém roztoku nanočástice s nábojem mají silně vázanou vrstvu iontů s opačným nábojem na jejich povrchu. Tato vrstva je známá jako Sternova vrstva. Druhá vnější difúzní vrstva je tvořena volně vázanými ionty. Souhrnně se obě vrstvy značí jako elektrická dvojvrstva. V důsledku pohybu částice zapříčiněným Brownovým pohybem nebo působením síly se tvoří rozdíl mezi ionty v difúzní vrstvě pohybující se s nanočásticí a ionty disperzního prostředí. Na této hranici „kluzné roviny“ se nachází elektrostatický potenciál známý jako ζ potenciál.

Pomocí laserové dopplerovské velocimetrie je měřen pohyb nanočástic v elektrickém poli – elektroforetická pohyblivost. ζ potenciál je získán výpočtem z Henryho vztahu:

$$U_e = \frac{2\varepsilon z f(\kappa a)}{3\eta}, \quad (9)$$

kde U_e značí elektroforetickou pohyblivost, ε je dielektrická konstanta, η je absolutní viskozita a $f(\kappa a)$ je Henryho funkce, κa je míra poměru poloměru částice k Debyeově délce. Elektroforetická mobilita je měřena tzv. elektroforetickým rozptylem světla. Pohybující částice v průběhu elektroforézy rozptýlí dopadající laser, který má poté jinou frekvenci než originální laser a posun frekvence je proporcionalní rychlosti částic (Dopplerův posun). Laserový paprsek je rozdělen, jeden míří do vzorku a druhý slouží jako reference. Rozptýlené světlo částicemi je poté spojeno s referencí, z čehož lze zjistit Dopplerův posun. Hodnota zeta potenciálu nanočástice značí, zdali se jedná o částici stabilní nebo nestabilní. Tato hodnota také úzce souvisí s morfologií nanočástice. Dle hodnot ζ -potenciálu ± 0 –10 mV jsou částice vysoce nestabilní, ± 10 –20 mV relativně stabilní, ± 20 –30 mV středně stabilní a $> \pm 30$ mV vysoce stabilní. ζ potenciál poskytuje pouze informace o elektrostatických odpudivých silách, avšak neposkytuje informace o přitažlivých van der Waalových silách uvnitř nanočástice. Je důležité brát v potaz různé vlastnosti materiálu, které mohou zapříčinit stabilitu nanočástic při jiných hodnotách ζ potenciálu než jsou výše uvedené hodnoty [40] [41].

1.8 Současný stav řešené problematiky

Forsterův rezonanční energetický přenos je v posledních několika letech velmi studovaným jevem, jenž je používán jako mocný nástroj pro poskytování informací na úrovni nano-rozměrů v mnoha aplikacích. Tento jev úzce souvisí na složení a konstrukci páru donor a akceptor. Rychlé tempo vývoje v oblasti nanočástic vytváří čím dál více příležitostí k zlepšování technologie FRET. Kromě tradičních nanočástic z organických fluoroforů jsou používány pro energetický přenos FRET i jiné nanočástice, jako např. polovodičové a grafenové kvantové tečky, upkonverzní nanočástice, zlaté nebo grafenové nanočástice [42].

Systém host-hostitel v kombinaci s FRET v podobě fluorescenčních nanočástic jsou v dnešní době používány pro transport léčiv a jejich sledování, kdy přesná kontrola procesů podávání léčiv vede ke zlepšení terapeutických výtěžků. Obecně se v nano-medicíně FRET využívá ke sledování strukturálních změn nanočástic, včetně jejich rozměrů, asociace a integrity částic, uvolňování účinných látek do svého okolí, interakce nanočástic s buňkami.

Molekula hostitele může sloužit jako nosič pro zapouzdření a uchycení molekul hostů, včetně léčiv nebo jiných terapeutických látek. V souvislosti s farmakokinetikou je FRET používán ke sledování organických nanočástic *in vivo*, jelikož tato technika určuje jejich integritu. Integrita nanočástic má ve farmakokinetice zásadní význam, protože definuje jejich klinické přínosy, jako je např. ochranný účinek na zapouzdřená léčiva, orgánový cílený účinek, účinek membránového transportu, atd. Fluorescenční nanočástice lze pak dále použít k monitorování uvolňování navázaných molekul hostů v reálném čase pomocí FRET. V tomto případě jsou karbocyaninová barviva (nesulfonované kyaniny, indocyaninová zeleň, dialkylkarbocyaniny) hojně používanými fluorofory s emisním spektrem v blízké infračervené oblasti (650-900 nm), které zajišťuje pronikavost do tkáně a zabraňuje autofluorescenci buněk a tkání [43] [44].

Zobrazování pomocí NIR fluorescence je velmi atraktivní způsob pro časnou detekci rakoviny. Problémem fluoroforů s NIR emisí je však slabá fluorescence z důvodu samo-zhášení, nedostatečná foto-stabilita a malý Stokesův posun. Proto se vyvíjejí strategie vytvoření nanočástic z malých organických fluoroforů a jednotlivé NIR-fluorescenční molekuly již několik let, aby bylo možné dosáhnout účinného fluorescenčního rezonančního přenosu energie k získání NIR sond se zvýšenou účinností pro zobrazování *in vivo* i *in vitro* [45].

Úspěšnými se např. stali vědci z univerzity v Hong Kongu, kteří úspěšně představili nanočástice se silnou NIR-fluorescencí. Z derivátu ftalocyaninu (NIR712) a NPAFN (difenylamino-bifenyl-fumaronitril) byly vytvořené organické nanočástice metodou výměny rozpouštědla (výměna THF s vodným roztokem), kdy látka NIR712 sloužila jako host emitující fluorescenci v NIR oblasti a látka NPAFN jako hostitel s vlastností agregací indukované emise sloužící jako zapouzdřující červeně emitující nanočástice. Důvodem volby těchto dvou fluoroforů bylo vhodné překrytí fluorescenčního spektra NPAFN organických nanočástic s absorpčním spektrem fluoroforu NIR712, které zajišťuje účinný FRET v host-guest systému. Výsledné nanočástice o průměru zhruba 118 nm měly téměř zanedbatelnou buněčnou toxicitu, výrazně vyšší foto-stabilitu, kdy FRET v dopovaných NP nebyl rušen komplexním biologickým prostředím, a velký Stokesův posun (~250 nm). Z Stern – Volmerovy rovnice bylo zjištěno, že více než 1000 molekul NPAFN může být zhášeno pouze jednou molekulou NIR712, což dokazuje zesílený přenos energie z NIR712 na NPAFN. Tyto vynikající vlastnosti zařídily NIR – ONP využití v podobě fluorescenčních sond pro zobrazování *in vitro* a *in vivo* [46].

Využitím *host-guest* strategie byly v roce 2022 pod vedením Fuming Xiao byly poprvé získány organické materiály charakteristické fosforescencí v dlouhovlnné oblasti (600/657–681/732 nm) a dlouhou dobou života (102–324 ms). Pyrenové jednotky s navázanými skupinami anisolem nebo N,N-dimethylanilinem byly zvoleny za hosty kvůli své vysoké konjugaci, která zajistila, že výsledný materiál bude podléhat dlouhovlnné fosforescenci. Jako hostitelská matrice byla zvolena sloučenina benzofenonu (BPO), která je spojena s napomáháním přenosů hostujících excitonů a zamezením jejich neradiačních přechodů. Ukázalo se, že přenosy energie mezi molekulami hosta a hostitele, hraje zásadní roli během fosforescenční aktivitě. Mezi ně patří FRET, který je považován za reálné vysvětlení, proč některé *host-guest* materiály jsou charakteristické fosforescencí při pokojové teplotě (RTP). Výsledky ukazují, že navržené *host-guest* materiály jsou charakteristické silným

červeným dosvitem, který je viditelný pouhým okem. Tyto materiály vykazují dobrou tkáňovou penetraci při biovizualizaci, které byly prozatím úspěšně použity pro sledování nádorů u živých myši [47].

Opět v roce 2022 se povedlo Čínským vědcům zkonstruovat dvoustupňový systém sekvenčního získávání fosforescence s ultra velkým Stokesovým posunem (≈ 525 nm) a emisí v blízké infračervené oblasti (NIR) při 825 nm z racemického bromoizochinolinu (BQ) obsahující derivát 1,2-diaminocyklohexan, kurkubiturilu (CB) a látky SC4AD pomocí kaskádového samouspořádání ve vodném roztoku. Původní host BQ generoval slabou fosforescenci při vlnové délce 555 nm, která se dále spojila s látkou SC4AD za vzniku homogenně sférických nanočástic s velkým zvýšením doby života fosforescence na 0,364 ms. Tyto sférické těsně zabalené agregáty způsobily zvýšení intenzity fosforescence zhruba 30krát. Hydrofobní vnitřek kompaktní sestavy BC,CB,SC4AD do jisté míry chránil fosforofor před vlivem zhašečů, a také poskytoval mikroprostředí pro uložení dalších fluorescenčních barviv (Cy5, NiB), aby se mohl uskutečnit účinný přenos energie (FRET). Tento systém byl dále úspěšně aplikován jako NIR značení buněk [48].

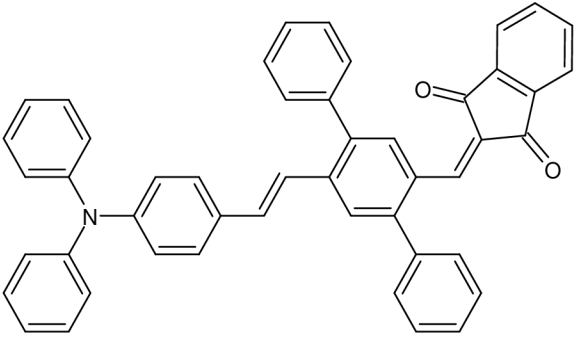
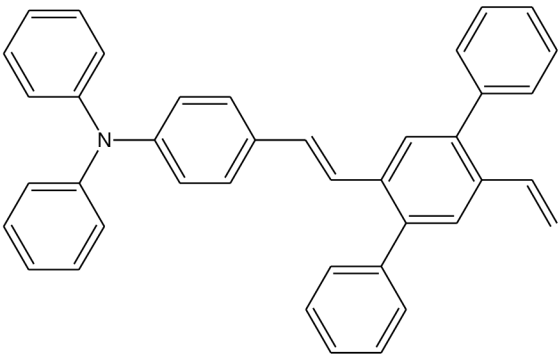
2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

Experimentální část bakalářské práce se bude zabývat optickými vlastnostmi a charakterizací studovaných fluoroforů. Budou zde definované metody, které sloužili pro získání absorpčních, excitačních a emisních spekter samotných látek, HG systémů a nanočástic z nich připravených. Kvantový výtěžek bude jeden z parametrů, podle kterého se bude určovat zdali dochází k FRET a jestli se podílí na zvýšení fluorescence a jak intenzivně k danému zvýšení přispívá. Dále zde bude popsán postup přípravy nanočástic a jejich charakterizace z hlediska jejich velikosti a stability pomocí ζ potenciálu. Poslední studovanou vlastností byla doba života fluorescence jednotlivých systémů.

2.1 Studované organické molekuly

Organické molekuly studované v této práci pocházejí z Fakulty chemickotechnologické - Univerzita Pardubice a byly syntetizovány a charakterizovány skupinou prof. Ing. Aleše Imravského, Ph.D. Molekulární struktura těchto látek je znázorněna v tabulce 1. Design těchto látek je založený na předchozích zkušenost a získaných poznatcích, které jsou popsány v samotném článku [49].

Tabulka 1 Akronymy, zkrácené názvy a strukturální vzorce studovaných organických molekul

Akronym	Zkrácený název	Strukturální vzorec
DPA-DPS-IOO	Difenylamin- difenylstilben- indandion	
DPA-DPS-V	Difenylamin- deifenylnilben-vinyl	

DPA-DPS-V(COOMe) ₂	Difenylamin-difenylstilben-di(methoxykarbonyl) vinyl	
-------------------------------	--	--

Tabulka 2 Číselné označení a molekulová hmotnost studovaných organických molekul

Akronym	Číselná zkratka	Molekulová hmotnost (g·mol ⁻¹)
DPA-DPS-IOO	G1	656
DPA-DPS-V	H1	526
DPA-DPS-V(COOMe) ₂	H2	642

Zkratky G1, H1, H2 byly zvoleny podle HG systémů, kdy zkratka H1, H2 značí hostitele a zkratka G1 značí hosta (guest).

2.2 Použité přístroje a pomůcky

- Běžné laboratorní sklo a vybavení
- Analytické váhy ew 620-3NM (KERN)
- Magnetická míchačka IKA C-MAG HS7 (BioTech a.s.)
- Spektrofotometr UV HITACHI U3900H
- Fluorescenční spektrometr HORIBA FluoroCube PRO-850
- FS5 spektrofluorometr (Edinburgh Instruments)
- Koloidní DLS analyzátor ZetaSizer Nano ZS (Malvern Panalytical)

2.3 Příprava roztoků

Experimentální část se začínala přípravou zásobních roztoků všech organických fluoroforů. Bylo nutné zvolit takové rozpouštědlo, ve kterém se daná molekula nejlépe rozpustila. Další podmínkou výběru rozpouštědla byla vzájemná mísitelnost rozpouštědel při nanoprecipitační metodě přípravy nanočástic. Z těchto důvodů byl zvolen bezvodý tetrahydrofuran (THF) jako rozpouštědlo. Pouze pro přípravu zásobních roztoků byl zvolen aceton z důvodu jeho těkavosti a rychlého vypařování. Nejdříve bylo naváženo malé množství látky na analytických vahách v řádu několika desítek miligramů. Konkrétně navážka látky DPA-DPS-IOO byla o hmotnosti 3,1 mg, navážka látky DPA-DPS-V o hmotnosti 2,6 mg, a navážka látky DPA-DPS-V(COOMe)₂ o hmotnosti 2,6 mg. Následně byly látky zality 20 ml acetonu a byly vloženy do ultrazvukové čističky Kraintek K-2LM naplněné vodou, aby došlo k jejich úplnému rozpuštění. Takto byly připravené zásobní roztoky podle tabulky 3 s koncentrací v rozmezí 0,20 do 0,25 mmol·dm⁻³. Jelikož studované organické fluorofory při delšímu vystavení slunečního záření degradují, musely být uchovány v zásobních lahvičkách z tmavého skla a uloženy na místě bez přístupu slunečního světla.

Při tvorbě vzorků byl odpipetován určitý objem ze zásobního roztoku, který se nechal odpařit. Na spodu vialky daná látka vykristalizovala a následně byla zalita rozpouštědlem THF. Pro veškerá měření byly použity roztoky látek v rozpouštědle THF. Po odpaření a zalití látky THF byl zásobní roztok vždy několikrát zředěn dle potřeby. Tabulka 1 zobrazuje molekuly, z kterých byly připraveny zásobní roztoky. Akronymy molekul byly vhodně barevně rozlišeny a stejné barevné označení koreluje s označením látek v grafech.

Tabulka 3 Výsledné koncentrace zásobních roztoků jednotlivých látek

Akronym	Koncentrace zásobního roztoku (mmol·dm ⁻³)
DPA-DPS-IOO	0,2364
DPA-DPS-V	0,2473
DPA-DPS-V(COOMe) ₂	0,2026

2.4 Příprava host-guest systémů

K přípravě jednoho *host-guest* systému (HG) byly použity dvě látky, neboli host a hostitel. Hostitele bylo vždy objemově více. Byly zvoleny objemové poměry 1:10, 1:25, 1:50, 1:75, kde vždy jeden objemový díl tvořil host. V našem případě byl pouze jeden host, kterou byla látka DPA-DPS-IOO, a dva hostitelé DPA-DPS-V, DPA-DPS-V(COOMe)₂. První systém hostitel-host byl složen z látek DPA-DPS-IOO, DPA-DPS-V a druhý z látek DPA-DPS-IOO, DPA-DPS-V(COOMe)₂. Ze zásobních roztoků obou látek byla dle poměrů z tabulky 4 napipetována do stejných vialek určitá objemová množství, která se nechala odpařit a následně byla zalita 1 ml bezvodým THF.

Tabulka 4 Pipetovaná objemová množství organických fluoroforů pro tvorbu HG-systémů s výslednými molárními poměry

Objemový poměr	Molární poměr G1H1	Molární poměr G1H2	Množství G1 (ml)	Množství H1/ H2 (ml)
1:10	1:10,5	1:9	0,100	1
1:25	1:26	1:21	0,040	1
1:50	1:52	1:43	0,020	1
1:75	1:79	1:64	0,013	1

Příklad výpočtu molárního poměru systému G1H1 při objemovém poměru 1:10:

$$n = c \cdot V$$

$$n_1 = 0,2364 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3} \cdot 0,0001 \text{ dm}^3 = 0,2364 \cdot 10^{-4} \text{ mmol}$$

$$n_2 = 0,2473 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3} \cdot 0,001 \text{ dm}^3 = 0,2473 \cdot 10^{-3} \text{ mmol}$$

$$0,2473 \cdot 10^{-3} \text{ mmol} \div 0,2364 \cdot 10^{-4} \text{ mmol} = 10,46 \doteq 10,5$$

Výsledný molární poměr je 1 : 10,5.

2.5 Příprava nanočástic

Nanočástice byly připraveny ze samostatných fluoroforů i z obou HG-systémů metodou samouspořádání na bázi nanoprecipitace. Nejdříve byly hydrofobní organické molekuly a HG systémy rozpuštěné v THF, které je s vodou mísitelné, a následně bylo malé množství vzniklého roztoku přikapáváno pomocí pipety do vodné fáze (deionizované vody) za intenzivního míchání míchačky IKA-C-MAG. Různými objemovými množstvími (viz tabulka 5) přikapávanými do vodné fáze vznikly nanočástic o různých koncentracích. Před měření fluorescence byly nanočástice přefiltrovány přes filtr RC (reduková celulóza) o velikosti pórů 0,45 μm , aby se omezil výskyt balastního materiálu nebo agregátů částic ve vzorku.

Tabulka 5 Konkrétní objemová množství HG systému a vodné fáze pro přípravu NP

Objemové množství HG systému (ml)	Množství vodné fáze (ml)
0,1	5
0,2	5
0,4	5

2.6 Měření absorbance

Po přípravě roztoků, nanočástic a HG-systémů následovalo měření absorbance a absorpčních spekter na UV spektrometru Hitachi U-3900H. Na měření byly použity křemenné kyvety s optickou dráhou 1 cm. Absorbance se měřila na rozpětí vlnových délek 200 – 800 nm. Cílem bylo dosáhnout hodnoty absorbance 0,1, což je hodnota vhodná pro další měření fluorescenčních spekter a doby života fluorescence. Pokud měřené roztoky látek dosahovaly vyšší absorbance, byly následně zředěny a znova změřeny. Ve velmi koncentrovaných roztocích může docházet ke snížení fluorescence, kdy ne všechny molekuly v roztoku jsou schopny přímo absorbovat záření ze zdroje přístroje, protože jsou zastíněny molekulami nacházejícími se před nimi.

Výsledkem byla absorpční spektra, z kterých byly odečteny absorpční maxima jednotlivých studovaných roztoků potřebných pro nastavení excitačního záření při měření fluorescenčních spekter. Absorpční a excitační spektrum bylo v případě kapalného roztoku shodné.

2.7 Měření fluorescenčních spekter

Měření fluorescence probíhalo na spektrofluorometru FS5 firmy Edinburgh Instruments. Tento spektrofluorometr obsahuje xenonovou obloukovou výbojku jako zdroj záření. Intenzitu záření je možno korigovat nastavitelnou šířkou štěrbin, kterými paprsek prochází. Fluorescenční spektra a kvantové výtěžky jsou měřena pomocí vyměnitelného modulu s klasickým držákem na kyvety nebo modulu s integrační sférou, které je možné měřit jak pevnou tak kapalnou fází studovaných látek.

Emisní a excitační spektra studovaných látek byla měřena pomocí modul SC-25 s klasickým držákem na kyvety. Měření spekter probíhalo v rozmezí vlnových délek 250–850 nm. Konkrétně byly použity kyvety vyrobené z křemenného skla s optickou délkou

1 cm. Do kyvety byly pomocí pipety dávkované roztoky s přibližnou hodnotou absorpce 0,1. Pokud byl vzorek charakteristický nízkou intenzitou fluorescence, do kyvet se dávkovaly i více koncentrované roztoky s hodnotou absorpce vyšší než 0,1. V přístroji byla nastavena vlnová délka excitačního maxima na hodnotu absorpčního maxima a emisní maximum. Výsledkem byla prvotní spektra, která sloužila jako předloha pro následující přesné měření spekter a také pro zjištění přesného emisního maxima. V dalších měřeních byla emisní a excitační spektra změřena vždy několikrát při více vlnových délkách a s větší intenzitou záření. Důvodem těchto opakovaných měření je případně zjistit změnu spektra, jelikož předpokládáme, že tvar emisního spektra nezáleží na vlnové délce excitačního záření. Změna spektra by znamenala, že se systém nechová podle Kashova pravidla a je ovlivněný nějakým dalším jevem, např. přítomností nečistoty. Pomocí šířky štěrbin se intenzita záření nastavila na hodnotu přibližnou $1 \cdot 10^6$ CPS (counts per second), což znamená počet zachycených fotonů za jednu sekundu. Takovým nastavením přístroje se dosáhne nejpresnějších výsledných hodnot.

2.8 Měření kvantového výtěžku fluorescence

Měření kvantových výtěžků opět probíhalo na spektrofluorometru FS5, ale pomocí jiného přístupu za použití modulu SC-30 s integrační sférou. Integrační sféra je kulovitá plocha, která je vyrobena z bílého materiálu spectralonu, který je schopen odrazit až 99,9 % dopadajícího záření. Dle skupenství vzorku je důležité zvolit správný držák pro kyvety nebo pevnou fázi.

Postup měření kvantového výtěžku vzorků v roztoku byl prováděn následujícím způsobem. Nejdříve bylo změřeno pozadí dané přítomností rozpouštědla, v tomto případě tetrahydrofuranu nebo deionizované vody při měření NP, a také vlastnosti excitační sféry. Celkově se tímto měřicím krokem získalo spektrum, které vyjadřovalo jak září zdroj záření (xenonová výbojka) včetně vlivu kvantové sféry obsahující kyvetu s rozpouštědlem. Excitační štěrbinu byla záměrně nastavena na hodnotu několikrát větší (např. 4 nm) než emisní štěrbinu (např. 0,4 nm). Hodnoty excitační a emisní vlnové délky byly nastavené na stejnou hodnotu absorpčního maxima zkoumaného vzorku. Intenzita záření opět dosahovala hodnoty $1 \cdot 10^6$ CPS. Dále byl změřen excitační pulz zdroje záření. Měření emise fluorescence čistého rozpouštědla proběhla na rozmezí vlnových délek od hodnoty excitačního maxima až po 850 nm, což byl konec spektrálního rozsahu přístroje. Po výměně kyvety s rozpouštědlem a za kyvetu se vzorkem bylo pomocí stejného postupu změřeno další emisní spektrum a excitační pulz zdroje přes kyvetu se vzorkem. Výsledná čtyři spektra byla poté analyzována softwarem Fluoracle. Ten automaticky vypočítal hodnotu podílu absorbovaných k vyzařeným fotonům, neboli hodnotu kvantového výtěžku.

2.9 Měření doby života fluorescence

Doba života fluorescence vyjadřuje střední dobu, za kterou daná molekula fluoroforu v excitovaném stavu navrátí zpátky do základní energetické hladiny prostřednictvím fluorescence. Tato doba byla měřena na přístroji HORIBA FluoroCube PRO-850 pomocí metody TCSPC.

Vlnové délky náležící excitačním maximům získané z předchozího měření fluorescenčních spekter byly použity pro výběr laserových diod, jakožto zdroje excitačního záření. Křemenná kyveta obsahující vzorek byla vložena do držáku na kyvety spolu s kyvetou

obsahující roztok Ludox – koloidní roztok oxidu křemičitého. Pomocí monochromátoru a šířky štěrbin se nastavilo množství dopadajících částic, který nesměl přesáhnout 2 %, aby nedošlo k přesycení detektoru. Nejdříve byla změřena funkce odezvy přístroje (prompt) odrážející rozložení fotonů z excitačního impulzu v nefluorescenčním rozptylovém prostředí, které bylo zajištěno výše zmíněným roztokem Ludoxu. Poté následovalo měření rozpadu emise fluorescence (decay). Přístroj měřil čas, za který dopadne na detektor první foton prostřednictvím fluorescence od excitace zářením. Doba života fluorescence byla vypočítána ze sklonu rozpadové křivky podle vztahu (7).

Výsledná fluorescenční rozpadová křivka se prokládá exponenciální křivkou, přičemž nejčastěji se používá metoda nejmenších čtverců ((chi-kvadrátový test χ^2). Ten vyjadřuje jak přesně jsou proložena experimentální data. Pokud bylo proloženo monoexponenciální, výstup poskytoval jednu dobu života fluorescence s hodnotou χ^2 blízké 1. Velká hodnota χ^2 obvykle naznačovala multiexponenciální rozpad způsobený dalšími fluorescenčními složkami.

2.10 Měření velikosti a zeta potenciálu nanočástic

Posledním krokem byla samostatná charakterizace nanočástic. Měření velikosti i zeta potenciálu nanočástic probíhalo na přístroji zvaném Zetasizer Nano ZS firmy Malvern Panalytical. Jednotlivé roztoky s nanočásticemi byly přeneseny do skleněných kyvet v množství 0,5 ml a po jedné vloženy do přístroje. Pro získání správných dat byl počet měření v jedné sérii zvolen 12 a počet opakování sérií 3. Výsledkem měření byla velikost nanočástic a korelační křivky, graficky znázorněná distribuce velikosti nanočástic. Kvalita získaných výsledků byla zhodnocena na základě tvaru získané korelační křivky. V případě, že korelační křivka nesplňovala všechny kritéria správného měření, experiment byl zopakovaný. Z grafu distribuce velikosti částic bylo možné vyčíst převážnou velikost nanočástic a odchylky velikosti způsobené agregací nanočástic nebo jejich rozpadem.

Hodnota zeta potenciálu se měří nepřímo prostřednictvím elektroforetické pohyblivosti studovaných částic. Jeho měření přináší podrobný pohled na příčiny dispergace, agregace nebo flokulace a lze jej použít ke zlepšení složení disperzí, emulzí a suspenzí. Před měřením zeta potenciálu bylo nutné do skleněné kyvety vložit tzv. ponornou celu obsahující katodu a anodu, sloužící pro měření zeta potenciálu nanočástic ve vodných i nevodných rozpouštědlech, a až poté byla kyveta vložena do přístroje. Dále se opět zvolil správný typ měření s názvem zeta, počet měření v jednom opakování a počet opakování, typ kyvety a ponorné cely, teplota měření. Počet měření byl nastaven na 30 v jedné sérii a počet opakování sérií byl opět 3. Během měření byly kladné částice přitahovány k anodě a záporné částice přitahovány ke katodě, čímž se určila pohyblivost nabitých částic ve střídavém elektrickém poli. Zeta potenciál se poté získal přepočtem, jelikož rychlost částice je úměrná elektrickému potenciálu částice ve smykovém poli. Výsledkem byla přehledná tabulka s jednotlivými hodnotami zeta potenciálů.

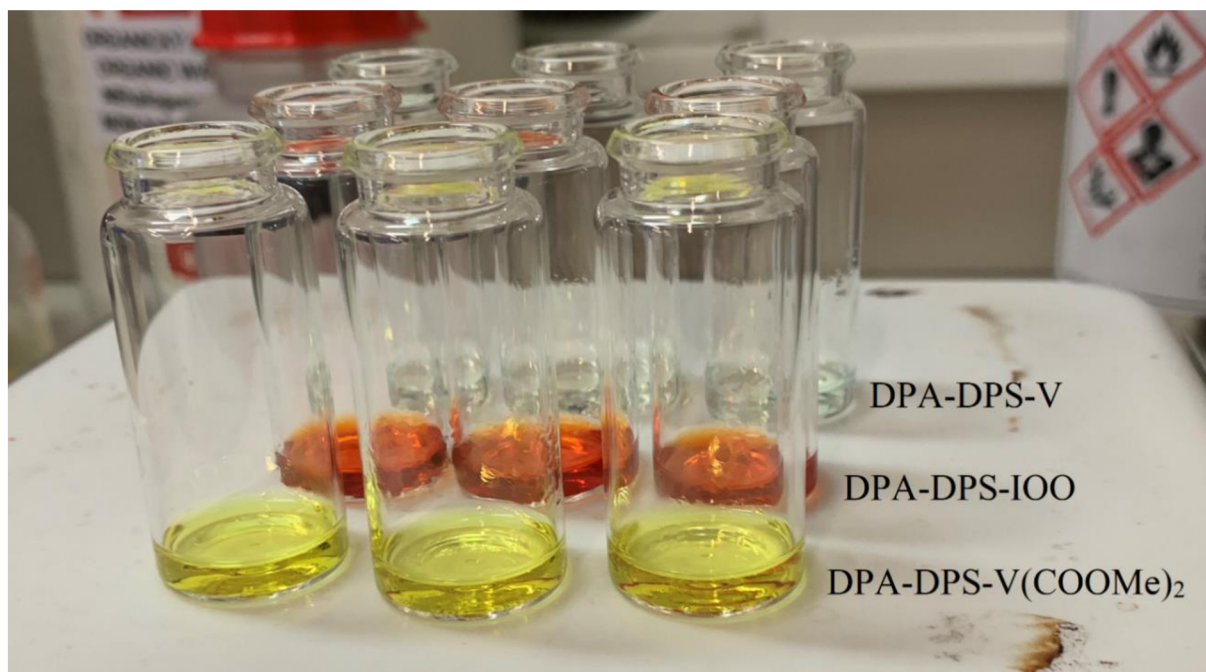
3 VÝSLEDKY A DISKUZE

Tabulka 6 shrnuje výsledné optické vlastnosti studovaných organických molekul, z nich vytvořených *host-guest* systémů a nanočástic, které jsou podrobněji diskutovány v následujících kapitolách.

3.1 Výsledky měření na UV spektrofotometru

3.1.1 Absorbance samotných látek

Po provedení UV spektroskopie byla získána absorpční spektra jednotlivých látek, která se nacházejí na obrázku 8. Jedná se o spektra zásobních roztoků, přičemž hodnoty absorpce jsou normalizované, tak aby maximum bylo rovno 1. Zbarvení těchto roztoků odpovídá poloze absorpčních spekter, kdy koncentrovaný roztok s látkou DPA-DPS-IOO má červenou barvu, další roztok s látkou DPA-DPS-V má opalescentní světle modrou barvu a poslední roztok s látkou DPA-DPS-V(COOMe)₂ má žlutou barvu. Charakteristické zbarvení jednotlivých látek lze vidět na obrázku 7.



Obrázek 7 Charakteristické zbarvení zásobních roztoků samotných látek

První absorpční pás látky DPA-DPS-IOO se rozkládá na rozmezí vlnových délek 410–590 nm s absorpčním maximem λ_{\max} při vlnové délce 480 nm. Tento pás nejspíše odpovídá elektronovému přechodu ze základní hladiny S_0 do vyšší energetické hladiny S_1 , tedy k přechodu elektronů mezi nejvyšším obsazeným molekulovým orbitalem (HOMO) a nejnižším obsazeným molekulovým orbitalem (LUMO). Tato látka má ještě dva další absorpční píky při vlnové délce 348 nm a 309 nm.

Po absorpci energie fotonu dochází u chromoforů tohoto typu (donor-akceptor) k tzv. intramolekulárnímu CT (charge transfer) přechodu (ICT), kdy při excitaci molekuly přechází elektrony z elektronově bohaté části molekuly (donor) do elektronově deficientní části (akceptor). K tomu dochází pouze v prvním absorpčním pásu, v dalších absorpčních pásech se uplatňují jiné orbitalové přechody.

Tabulka 6 Shrnující tabulka získaných parametrů z experimentální části

Látka	Forma (poměr)	λ_{\max} (nm)	λ_{Ex} (nm)	λ_{Em} (nm)	PLQY (%)	τ_1 (ns)	d (nm)	PDI	ζ (mV)
-IOO (G1)	Roztok	480	480	750	34,4	-	-	-	-
	NP	500	498	750	3,1	-	-	-	-
	Pevná fáze	-	622	686	7,0	0,06	-	-	-
-V (H1)	Roztok	383	379	475	69,2	-	-	-	-
	NP	389	386	491	14,7	-	-	-	-
	Pevná fáze	-	449	476	12,6	2,93	-	-	-
-V(COOMe) ₂ (H2)	Roztok	407	406	607	41,6	-	-	-	-
	NP	414	408	591	15,6	-	-	-	-
	Pevná fáze	-	528	574	20,0	2,25	-	-	-
Směs -IOO, -V (G1H1)	Roztok	383	383	472	61,1	1,74	-	-	-
	NP (1:10)	387	387	666	5,35	1,38	97	0,18	-23
Směs -IOO, -V(COOMe) ₂ (G1H2)	Roztok	406	405	605	56,6	0,10	-	-	-
	NP (1:10)	412	410	693	14,1	0,62	113	0,32	-17

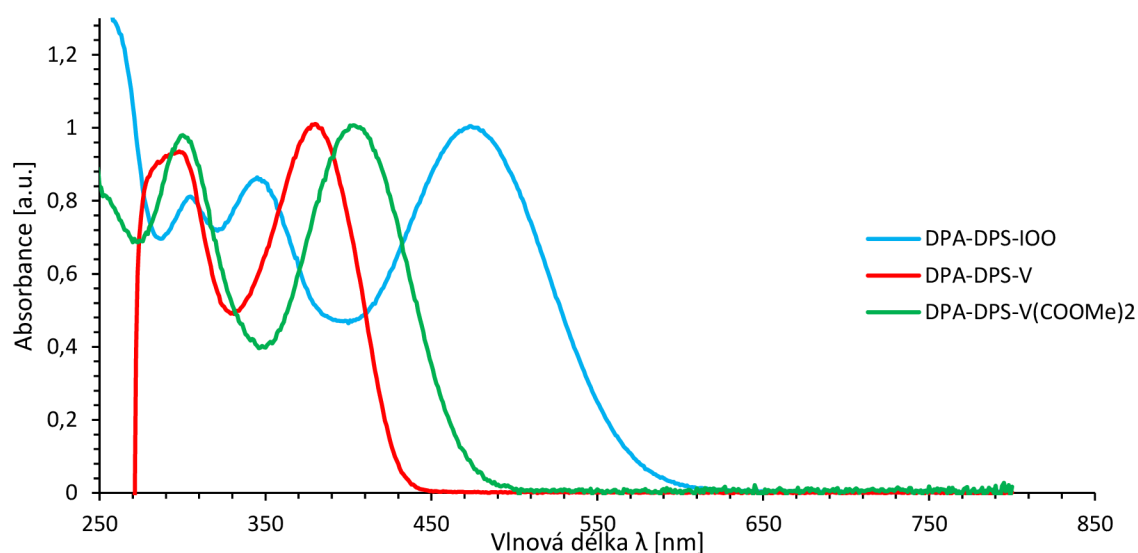
Poloha a energie všech přechodů je ovlivněna charakterem prostředí, v kterém se fluorofor nachází. V našem případě je prostředí tvořeno rozpouštědlem THF, které je mírně polární.

Na obrázku 8 si lze všimnout posunu absorpčního spektra látky DPA-DPS-IOO k delším vlnovým délkám vůči absorpčním spektrům látek DPA-DPS-V a DPA-DPS V(COOMe)₂, který je charakteristický pro ICT přechody. Tento bathochromní posun je způsoben silnou elektronově-akceptorní skupinou, indandionem. Po absorpci záření dochází k změně elektronické struktury molekuly v excitovaném stavu. Každá ze zkoumaných látek má rozdílně silné elektron-akceptorové skupiny, což způsobuje rozdílný vliv na rozložení elektronů v molekule jak ve stavu S₀ tak ve vyšším stavu S₁. Tímto dochází ke změně dipólového momentu molekuly, který způsobí rozdílné interakce mezi molekulami látky a rozpouštědla. Molekuly rozpouštědla THF mají také určitý dipólový moment, který způsobí natočení molekul rozpouštědla k molekule fluoroforu. Tento efekt je znám pod názvem solvatochromismus. Solvatochromismus je způsoben interakcí mezi molekulami rozpuštěné

látky a molekulami rozpouštědla, které stabilizovaly jeden nebo oba orbitály zapojené do elektronového přechodu, čímž ovlivnily absorpční maximum λ_{\max} . Podle Franck-Condonova principu je pohyb jader pomalejší než pohyb elektronů, což znamená, že molekuly rozpouštědla neměly čas na změnu orientace a došlo k excitaci rozpouštědla. Z toho vyplývá, že molekula fluoroforu se silným dipólem ztratila elektrickými interakcemi část energie, která byla využita k otočení molekul THF správným dipólem. Důsledkem je snížení energetické mezery mezi vyšší energetickou hladinou a základním stavem, které způsobilo posun absorpčního maxima λ_{\max} k větším vlnovým délkám.

Látka DPA-DPS-(COOMe)₂ je charakteristická prvním absorpčním pásem v rozmezí vlnových délek 350–490 nm a absorpčním maximem λ_{\max} při vlnové délce 407 nm. Energie potřebná k přechodu elektronů mezi orbitály HOMO a LUMO je větší než v případě látky DPA-DPS-IOO a v porovnání s ní se jedná o hypsochromní posun maxima o 73 nm. Akceptorová skupina V(COOMe)₂ je polární a silná, ale v porovnání s akceptorovou skupinou -IOO je slabší, a proto dochází k menšímu posunu k větším vlnovým délkám. Stejně jako v případě látky DPA-DPS-IOO je ve spektru viditelné druhé lokální maximum při vlnové délce 303 nm.

První absorpční pás látky DPA-DPS-V se nachází na rozmezí vlnových délek 330–440 nm s absorpčním maximem λ_{\max} při vlnové délce 383 nm. Tato látka s elektron-akceptorovou skupinou vinylenem je ze všech tří skupin nejméně polární. Změna této skupiny má za následek změnu energie potřebné k přechodu elektronů mezi orbitály HOMO a LUMO. Z toho vyplývá, že energie potřebná pro tento přechod je větší než v případě předchozích látek. Důsledkem nízké polarizability molekuly je slabý dipólový moment molekuly, což způsobuje také slabé intermolekulové interakce. V porovnání s absorpčním spektrem látky DPA-DPS-IOO se jedná o hypsochromní posun maxima o 97 nm.



Obrázek 8 Absorpční spektra jednotlivých organických fluoroforů DPA-DPS-V(COOMe)₂, DPA-DPS-IOO, DPA-DPS-V v THF

Tabulka 7 obsahuje všechny naměřené vlnové délky pro maximální absorptivitu v roztoku THF.

Tabulka 7 Naměřené vlnové délky absorpčních maxim jednotlivých látek

Akronym	Elektron-akceptorová skupina	λ_{\max} (nm)
DPA-DPS-IOO	Indandion	480 ; 348; 309
DPA-DPS-V	Vinyl	383 ; 308
DPA-DPS-V(COOMe) ₂	Di(methoxykarbonyl)vinyl	407 ; 303

3.1.2 Absorbance nanočástic vytvořených ze samotných látek

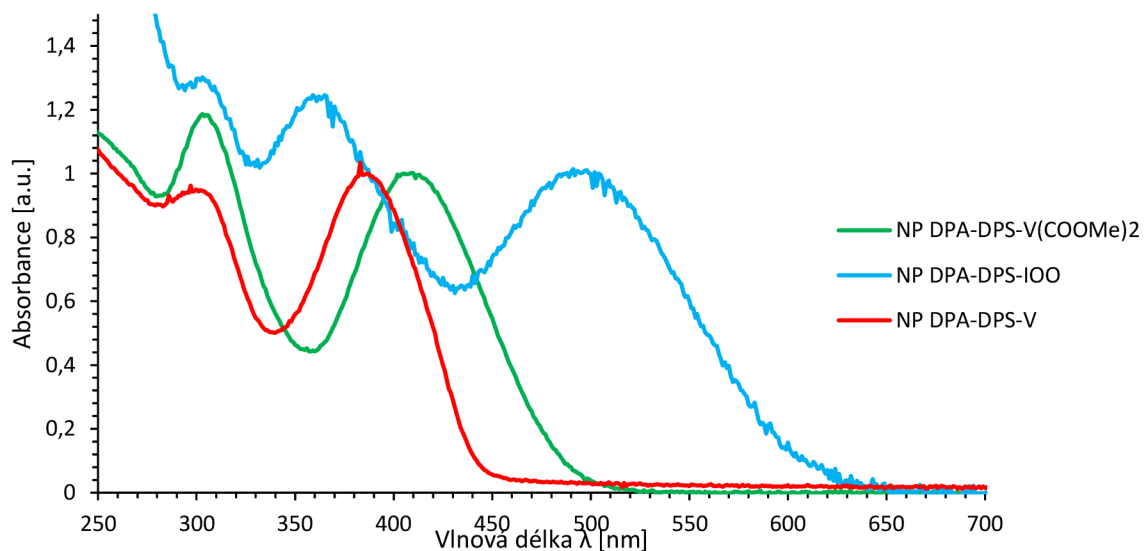
Výsledná absorpční spektra nanočástic vytvořených ze samotných látek ve vodném prostředí je možné vidět na obrázku 9. Absorpční pás nanočástic látky DPA-DPS-IOO se nachází na rozmezí vlnových délek 436–640 nm s absorpčním maximem λ_{\max} při vlnové délce 500 nm. Tento absorpční pás odpovídá přechodům elektronů mezi orbitály HOMO a LUMO. Poloha a energie všech elektronových přechodů je ovlivněna prostředím, v kterém se dané nanočástice nachází. V tomto případě je prostředí tvořeno destilovanou vodou. Voda jakožto rozpouštědlo je velmi polární, v porovnání s THF je voda dle indexu polarity dvakrát tak polární než THF. Takto polární rozpouštědlo ovlivnilo rozložení elektronů v orbitalech HOMO a LUMO. Indandion, jenž je strukturně velká elektron-akceptorová skupina, způsobí přesun elektronů a vytvoření hustého elektronového mraku ve svém okolí. Tato akceptorová skupina díky rozměrné struktuře přispívá k mraku dalšími elektrony, což způsobí silnější mezimolekulární interakce. Tímto rozložení elektronů dochází ke změně dipólového momentu na povrchu molekuly a rozložení elektronů ve stavu S_0 i ve vyšším energetickém stavu S_1 . V tomto případě reagují s molekulou rozpouštědla pouze molekuly na povrchu nanočástice. Zbytek molekul uvnitř nanočástice se chová jako pevná látka. Každá nanočástice je agregátem molekul, které se na sebe skládají určitým způsobem. Vzdálenost molekul a způsob skládání značně ovlivňuje jejich vzájemné interakce. Čím blíže jsou molekuly u sebe tím jsou silnější intramolekulární interakce.

Bylo by možné předpokládat, že absorpční maxima nanočástic budou shodná s absorpčními maximy jednotlivých látek, avšak v porovnání s absorpčním spektrem samotné látky DPA-DPS-IOO je první absorpční maximum nanočástic bathochromně posunutě o 21 nm.

Absorpční pás nanočástic vytvořených z látky DPA-DPS-V(COOMe)₂ se nachází v rozmezí vlnových délek 360–510 nm s absorpčním maximem λ_{\max} při vlnové délce 414 nm. Opět v prvním absorpčním pásu dochází k ICT, další pás je charakteristický jinými orbitalovými přechody. Uvnitř nanočástice jsou vlivem elektron-akceptorové skupiny -V(COOMe)₂ jednotlivé molekuly uspořádány jiným způsobem, než v případě nanočástic látky DPA-DPS-IOO, což se projeví slabšími π - π interakcemi a menším orbitalovým překryvem. Důsledkem je hypsochromní posun maxima o 86 nm vzhledem k absorpčnímu spektru nanočástic látky DPA-DPS-IOO.

Absorpční spektrum nanočástic látky DPA-DPS-V je tvořeno výrazným prvním absorpčním pásem v rozmezí vlnových délek 340–450 nm s maximem λ_{\max} při vlnové délce 389 nm. Tato látka s elektron-akceptorovou skupinou vinylenem je ze všech tří skupin nejméně polární. Změna této skupiny má za následek změnu energie potřebné k přechodu elektronů mezi orbitály HOMO a LUMO. Z toho vyplývá, že energie potřebná pro tento přechod je větší než

v případě předchozích látek. Uvnitř nanočástice jsou pravděpodobně molekuly uspořádané jiným způsobem než v předchozích dvou případech a vlivem slabé akceptorové skupiny jsou intermolekulární interakce slabší. Vzhledem k absorpčnímu spektru nanočástic látky DPA-DPS-IOO došlo k hypochromnímu posunu absorpčního maxima prvního absorpčního pásu o 111 nm.



Obrázek 9 Absorpční spektra nanočástic vyrobených z jednotlivých fluoroforů ve vodném roztoku

Tabulka 8 obsahuje všechny naměřené vlnové délky pro maximální absorbanci nanočástic ve vodném roztoku.

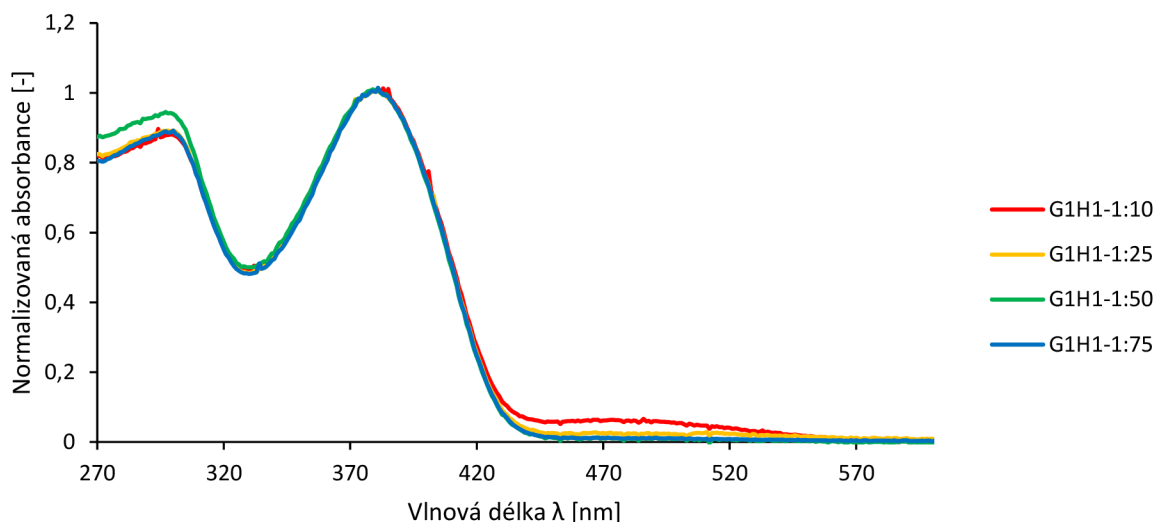
Tabulka 8 Naměřené vlnové délky absorpčních maxim pro nanočástice vytvořené ze samostatných látek

Nanočástice	Elektron-akceptorová skupina	λ_{\max} (nm)
DPA-DPS-IOO	Indandion	500 ; 367; 307
DPA-DPS-V	Vinyl	389 ; 305
DPA-DPS-V(COOMe) ₂	Di(karboxymethyl)-vinyl	414 ; 303

3.1.3 Absorbance HG systémů

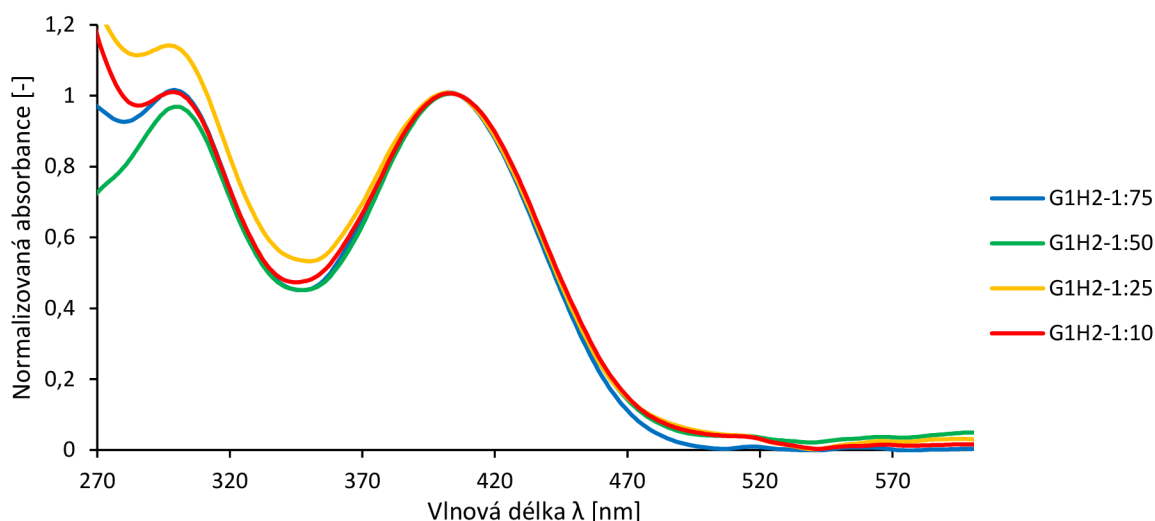
Po vytvoření HG systémů G1H1 a G1H2 byly změřeny jejich absorpční spektra. Na obrázku 10 jsou vyobrazená absorpční spektra systému H1G1 ve čtyřech různých molárních poměrech 1:10,5, 1:26, 1:52, 1:79 připravených v rozpouštědle THF. Tato absorpční spektra se shodují v prvním absorpčním pásu, který se nachází v rozmezí vlnových délek 330–430 nm s absorpčním maximem λ_{\max} při vlnové délce 383 nm. První absorpční maximum se shoduje s prvním absorpčním maximem samotné látky DPA-DPS-V (H1), jak můžete vidět na obrázku 8. Tato látka je hostitelem tohoto systému G1H1, což znamená, že je zastoupena ve větším objemovém i molárním množství než samotný host (viz tabulka 4). Dá se tedy předpokládat výrazná absorpce hostitele H1 a nepatrná absorpce hosta G1, což vede ke shodě absorpčních maxim se samotnou látkou H1. Jelikož je systém G1H1 směsí ze dvou látek, absorpce hosta G1 se nejvíce projevila v objemovém poměru 1:10,5, který obsahuje méně

molekul H1 než ostatní objemové poměry. Při poměru 1:10,5 roste absorpční pás hosta G1 v oblasti přibližně 450–530 nm s absorpčním maximem při vlnové délce 480 nm. Toto absorpční maximum se shoduje s absorpčním maximem samotné látky DPA-DPS-IOO (G1), tudíž se opravdu jedná o absorpci látky G1. Na absorpčním spektru je viditelné druhé lokální maximum při vlnové délce 301 nm, které je shodné ve všech objemových poměrech systému G1H1.



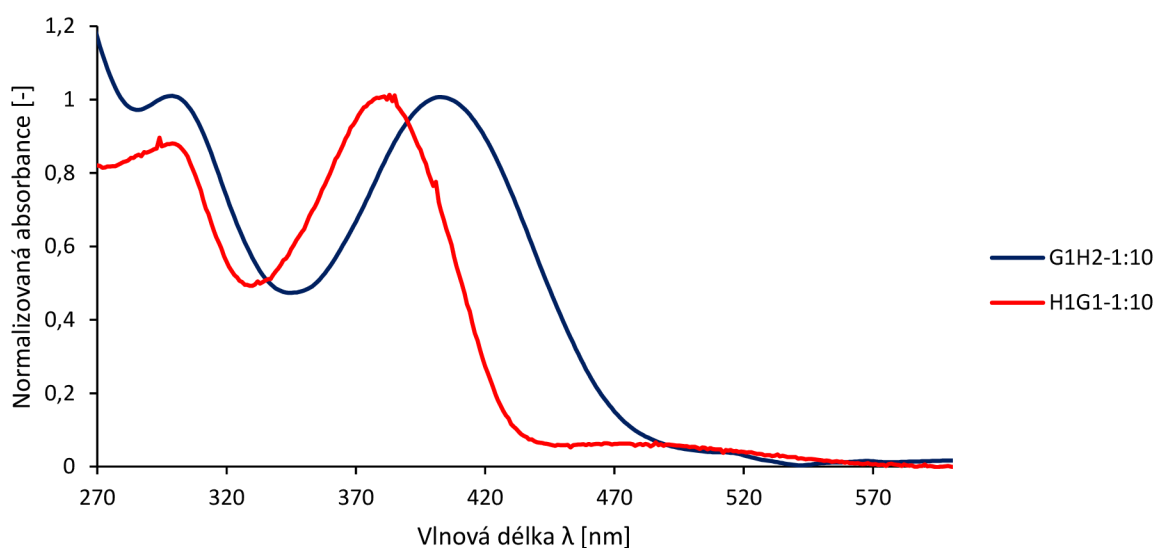
Obrázek 10 Absorpční spektrum HG systému G1H1 v různých objemových poměrech v rozpouštědle THF

Absorbance druhého HG systému látek G1H2 v molárních poměrech 1:9, 1:21, 1:43 a 1:64 je zobrazena na obrázku 11. Tato absorpční spektra se shodují v prvním absorpčním pásu, který se nachází v rozmezí vlnových délek 350–480 nm s absorpčním maximem λ_{\max} při vlnové délce 406 nm. Systém G1H2 je směsí ze dvou látek, kdy látka H2 je větším objemovým a molárním množstvím než látka G1. Z toho vyplývá, že první absorpční maximum bude patřit látce H2, což můžeme potvrdit shodou s absorpčním maximem samotné látky H2 (DPA-DPS-V(COOMe)₂) z obrázku 8. Absorpce hosta G1 se projevila pouze v molárním poměru 1:9 při větších vlnových délkách v oblasti okolo 470–530 nm, kde se nacházelo maximum při vlnové délce 480 nm. Tento pík je nepatrný v porovnání s prvním systémem H1G1 (viz obrázek 10), protože látka H2 absorbuje až do vlnové délky 480 nm.



Obrázek 11 Absorpce HG systému látek G1H2 v různých objemových poměrech v rozpouštědle THF

Při pohledu na obrázek 12 můžeme pozorovat bathochromní posun absorpčního spektra systému G1H2 oproti absorpčnímu spektru systému G1H1. Tento posun je způsoben silnější akceptorovou skupinou $V(\text{COOMe})_2$ ve struktuře molekul H2. V obou případech dochází po absorpci energie ve stavu S_1 k posunu elektronů k akceptorové skupině, což způsobí změnu dipólového momentu molekuly. Obě látky v systémech G1H1 a G1H2 absorbovaly samostatně (avšak G1 málo intenzivně) a tedy poloha spekter je shodná s polohou spekter samostatných látek (viz obrázek 8).

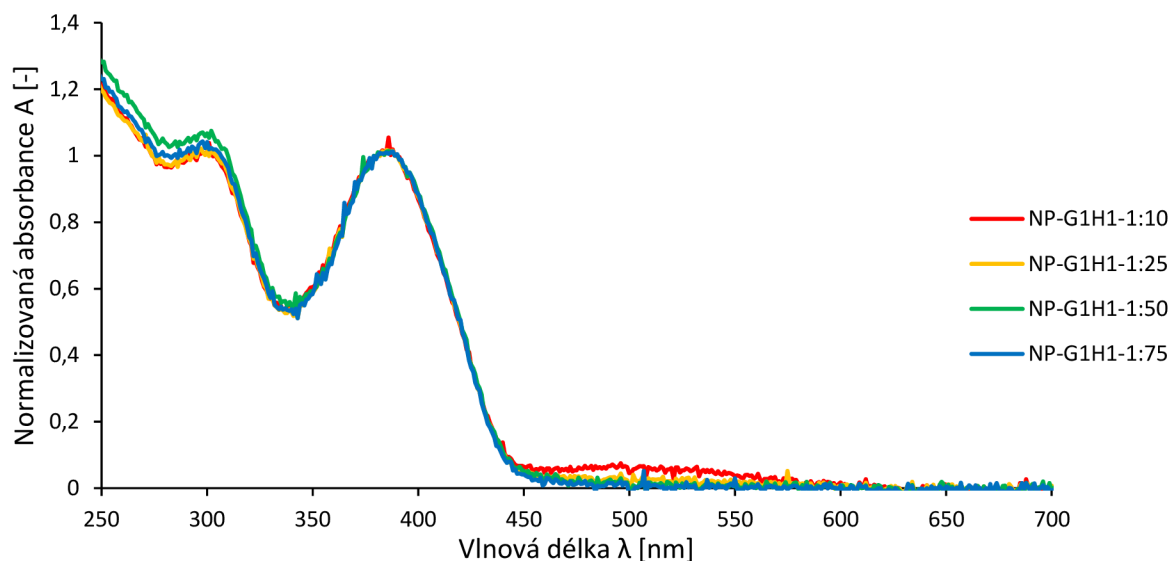


Obrázek 12 Absorpční spektrum systémů G1H1 a G1H2 v objemovém poměru 1:10 v rozpouštědle THF

3.1.4 Absorbance nanočástic vytvořených z HG systémů

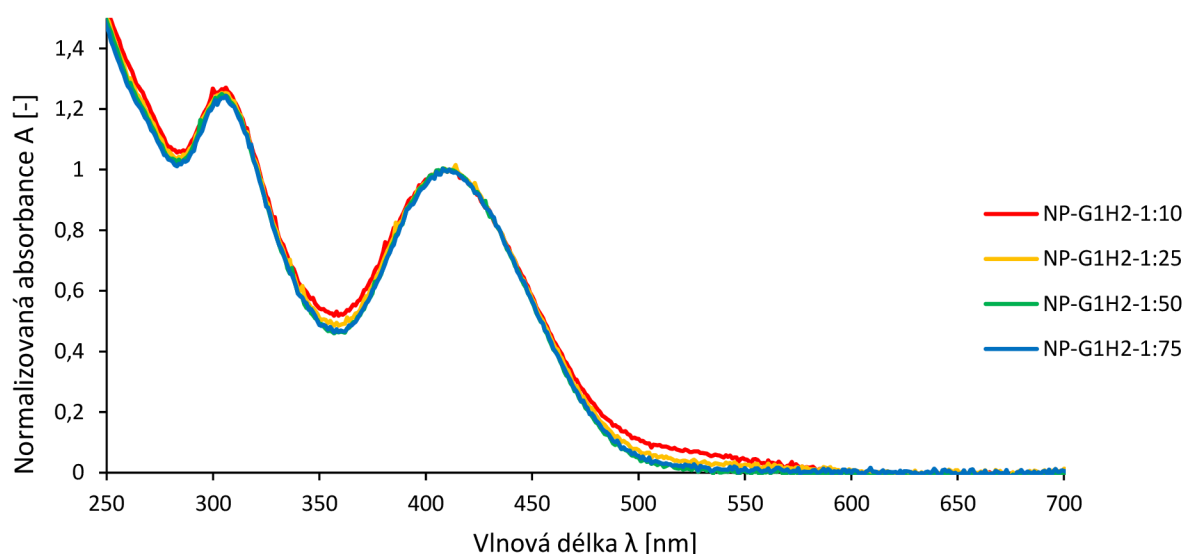
Na obrázku 13 je vyobrazeno absorpční spektrum nanočástic vytvořených z HG systému látek G1H1 v molárních poměrech 1:10,5, 1:26, 1:52, 1:79. Absorpční spektra jednotlivých objemových poměrů se shodují v prvním absorpčním pásu, který se rozkládá v rozmezí vlnových délek 340–450 nm s absorpčním maximem λ_{max} při vlnové délce 387 nm. Dále je na absorpčním spektru viditelný vliv molekul látky G1 v dlouhovlnné oblasti v rozmezí vlnových

dělek 450–600 nm s absorpčním maximem při vlnové délce 496 nm. Absorpce látky G1 se projevuje pouze u nanočástic v objemovém poměru 1:10.



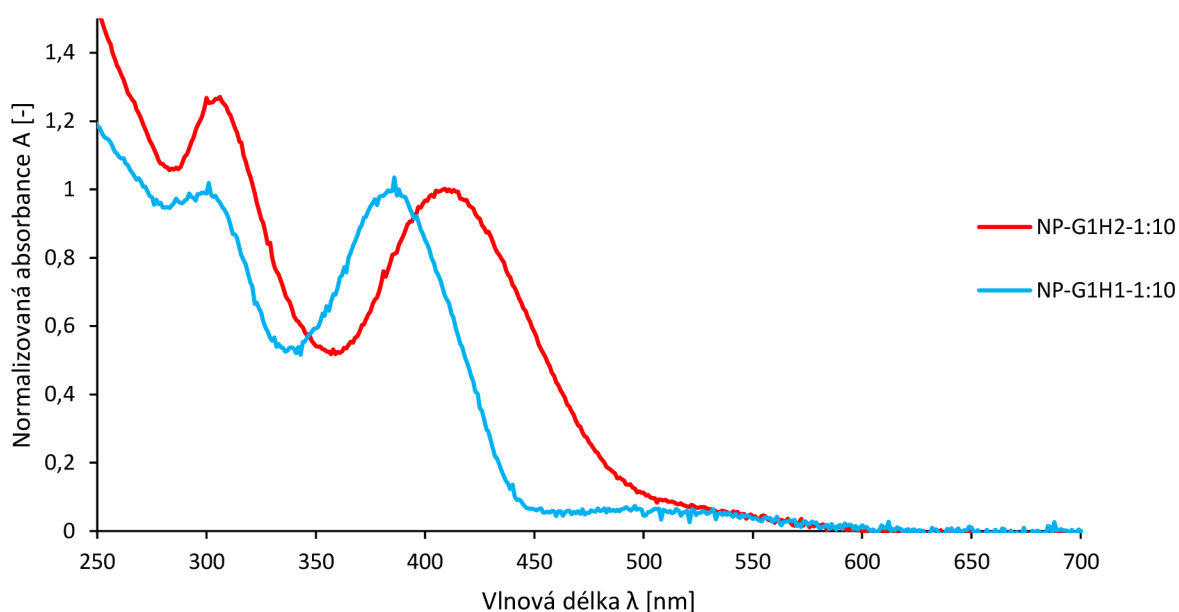
Obrázek 13 Absorpční spektrum nanočástic vytvořených ze systému látek G1H1 v různých objemových poměrech ve vodném rozpouštědle

Absorpční spektrum nanočástic vytvořených z HG systému G1H2 v molárních poměrech 1:9, 1:21, 1:43 a 1:64 můžeme vidět na obrázku 14. Absorpční spektra jednotlivých objemových poměrů se shodují v prvním absorpčním pásu, který se rozkládá v rozmezí vlnových délek 360–520 nm s absorpčním maximem λ_{\max} při vlnové délce 412 nm. Poloha a energie veškerých elektronových přechodů je ovlivněna polaritou vodného rozpouštědla, ve kterém se dané nanočástice nacházejí. Dále je na absorpčním spektru v dlouhovlnné oblasti viditelný vliv molekul látky G1. Absorpční maximum látky G1 se nejspíše nachází v okolí vlnové délky 500 nm. Absorpce samotné látky G1 se projevuje pouze u nanočástic v molárním poměru 1:9. Na absorpčním spektru je vidět druhý absorpční pás v rozmezí vlnových délek 280–360 nm s absorpčním maximem při vlnové délce 306 nm.



Obrázek 14 Absorpční spektrum nanočástic vytvořených ze systému látek G1H2 v různých objemových poměrech ve vodném prostředí

Na obrázku 15 lze vidět posun absorpčního spektra nanočástic vytvořených ze systému G1H2 směrem k delším vlnovým délkám v porovnání s absorpčním spektrem nanočástic vytvořených ze systému G1H1 v objemových poměrech 1:10. Tento posun je způsoben elektron-akceptorovou skupinou V(COOMe)₂ látky H2 (DPA-DPS-V(COOMe)₂), která je silnější než elektron-akceptorová skupina vinyl látky H1 (DPA-DPS-V).



Obrázek 15 Absorpční spektra nanočástic vytvořených z HG systému G1H1 a G1H2 v objemovém poměru 1:10 ve vodném prostředí

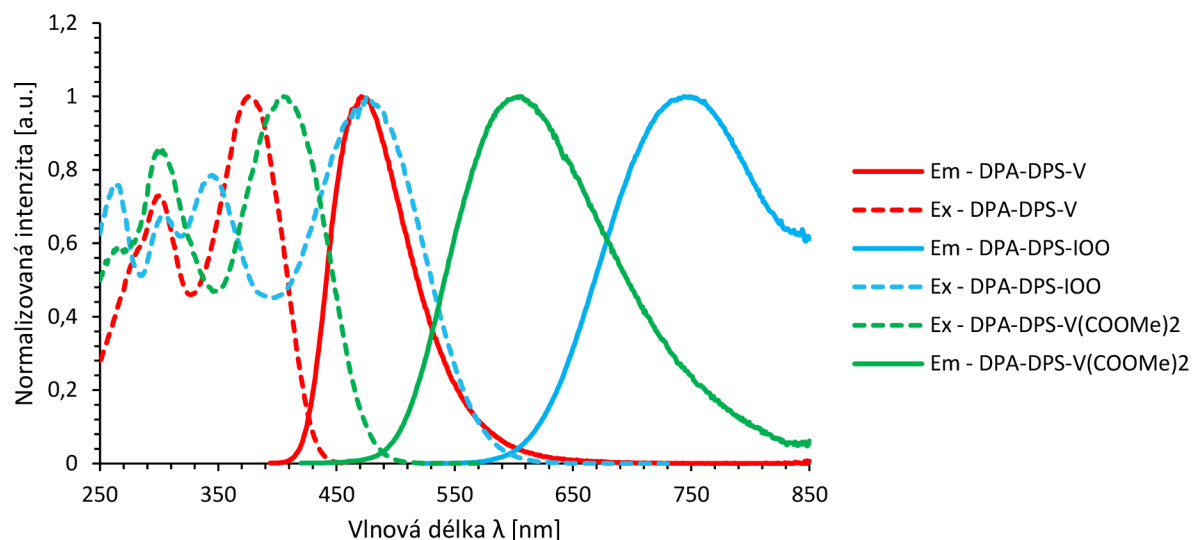
3.2 Výsledky měření fluorescenčních spekter a kvantových výtěžků

3.2.1 Fluorescenční spektra samostatných látek

Po získání absorpčních spekter přišla na řadu fluorescenční spektroskopie. Výsledný graf, který obsahuje emisní a excitační spektra samostatných zkoumaných látek, zobrazuje obrázek 16. První, čeho si můžeme všimnout, je rozdílně velký Stokesův posun zkoumaných látek. V případě látky DPA-DPS-IOO (G1) se první excitační maximum nachází při vlnové délce 480 nm a emisní maximum při vlnové délce 750 nm. Vzdálenost těchto maxim způsobuje nejdelší kladný Stokesův posun, který má hodnotu 270 nm. Tento jev může nastat při stabilizaci jednotlivých základních nebo excitovaných stavů molekul rozpouštědlem. Excitační maximum této látky je shodné s jejím absorpčním maximem 480 nm (viz obrázek 8). Emisní spektrum zasahuje až do oblasti vlnových délek nacházejících se mimo měřitelný rozsah detektoru (oblast NIR).

Při pohledu na fluorescenční spektrum látky DPA-DPS-V(COOMe)₂ (H2) můžeme vidět první excitační maximum při vlnové délce 406 nm a emisní maximum při vlnové délce 607 nm s kladným Stokesovým posunem 198 nm. Excitační spektrum můžeme považovat za shodné s absorpčním spektrem látky DPA-DPS-(COOMe)₂ (H2), jelikož se vlnová délka absorpčního (viz tabulka 7) a excitačního maxima liší pouze o 1 nm. Emisní spektrum se rozkládá na rozmezí vlnových délek 470–850 nm, opět však není úplné.

Fluorescenční spektrum látky DPA-DPS-V je charakteristické nejmenším Stokesovým posunem. Tento posun je kladný a má hodnotu 96 nm. První excitační maximum excitačního spektra se nachází při vlnové délce 379 nm, a je shodné s absorpčním spektrem této látky. Emisní spektrum se rozkládá v rozmezí vlnových délek 410–650 nm s emisním maximem při vlnové délce 475 nm.



Obrázek 16 Fluorescenční spektra látek DPA-DPS-V, DPA-DPS-IOO, DPA-DPS-V(COOMe)₂ v THF

Kvantový výtěžek je jedním z hlavních posuzujících faktorů fluorescence (ϕ), který udává schopnost fluoroforu přeměnit absorbované záření na vlastní záření v podobě fluorescence. Výsledné hodnoty kvantových výtěžků jednotlivých látek jsou zapsány v tabulce 9. Hodnoty kvantových výtěžků se pohybují pro látku DPA-DPS-IOO (G1) v rozmezí 30–40 %, pro látku DPA-DPS-V(COOMe)₂ (H2) v rozmezí 40–43 %, a pro látku DPA-DPS-V (H1) okolo 69 %. Hodnota kvantového výtěžku látky DPA-DPS-IOO je zkrácená a nejspíše nižší než bychom předpokládali, protože nebylo možné změřit celé emisní spektrum. Kvantový výtěžek byl vypočítáván pouze z části emisního spektra, tudíž je výsledná hodnota ponížena.

Tabulka 9 Kvantové výtěžky samotných látek DPA-DPS-V, DPA-DPS-IOO, DPA-DPS-V(COOMe)₂

	DPA-DPS-IOO	DPA-DPS-V(COOMe) ₂	DPA-DPS-V
Φ (%)	34 ± 5	41,6 ± 1,3	69,2 ± 0,3

Na obrázku 17 můžeme pozorovat charakteristické zbarvení fluorescence jednotlivých nanočástic. Postupně zleva pozorujeme fluorescenci látky DPA-DPS-V (H1), DPA-DPS-V(COOMe)₂ (H2) a DPA-DPS-IOO (G1).



Obrázek 17 Charakteristické zbarvení fluorescence nanočástic vytvořených ze samotných látek, vlevo látka DPA-DPS-V, uprostřed DPA-DPS-V(COOMe)₂, vpravo DPA-DPS-IOO

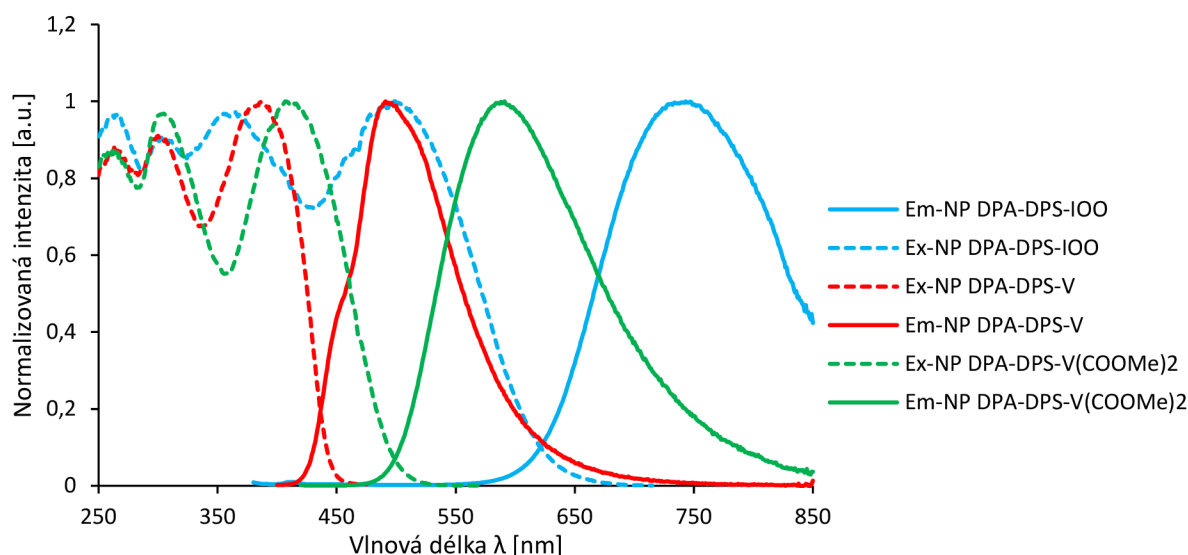
3.2.2 Fluorescenční spektra nanočástic vytvořených z jednotlivých látek

Excitační a emisní spektra nanočástic vytvořených ze samotných fluoroforů jsou vyobrazena na obrázku 18. Uvnitř nanočástice se nachází pevná fáze složená z molekul G1/H1/H2. Otázkou je, jak moc záření ze zdroje při měření fluorescence penetrovalo danou nanočástici, pokud by záření proniklo do určité hloubky, kde se nachází pevná fáze, předpokládali bychom, že kvantový výtěžek i tvar fluorescenčních spekter bude odpovídat kvantovému výtěžku a fluorescenčním spektrům molekul G1, H1, H2 v pevné fázi (prášku).

Excitační spektrum nanočástic látky DPA-DPS-IOO (G1) má první excitační maximum při vlnové délce 498 nm, a je shodné s absorpčním spektrem nanočástic DPA-DPS-IOO (G1), maxima se liší o 2 nm. Emisní spektrum je posunuté do červené oblasti, zasahuje do NIR. Emisní maximum se nachází při vlnové délce 750 nm. Toto maximum je shodné s emisním maximum samotné látky DPA-DPS-IOO (G1). Fluorescenční spektrum nanočástic látky DPA-DPS-IOO (G1) vykazují největší Stokesův posun, který je dlouhý 250 nm. V porovnání s Stokesovým posunem samotné látky DPA-DPS-IOO (G1) je Stokesův posun nanočástic menší o 20 nm.

Při pohledu na fluorescenční spektrum nanočástic vytvořených z látky DPA-DPS-V(COOMe)₂ (H2) lze pozorovat excitační maximum při vlnové délce 408 nm a emisní maximum při vlnové délce 591 nm s kladným Stokesovým posunem 183 nm. Tento posun je menší o 15 nm v porovnání se Stokesovým posunem látky DPA-DPS-V(COOMe)₂.

Fluorescenční spektrum nanočástic vytvořených z látky DPA-DPS-V je charakteristické nejmenším Stokesovým posunem, který má hodnotu 105 nm. První excitační maximum excitačního spektra se nachází při vlnové délce 386 nm. Absorpční spektrum nanočástic se shoduje s excitačním spektrem. Emisní spektrum se rozkládá v rozmezí vlnových délek 420–750 nm, s maximem při vlnové délce 491 nm.



Obrázek 18 Fluorescenční spektra nanočástic jednotlivých látek DPA-DPS-V, DPA-DPS-IOO, DPA-DPS-V(COOMe)₂ ve vodném prostředí

Hlavním posuzujícím faktorem fluorescence je kvantový výtěžek. Výsledné hodnoty kvantových výtěžků jednotlivých látek jsou zapsány v tabulce 10. Výsledná hodnota kvantového výtěžku nanočástic látky DPA-DPS-IOO (G1) se pohybuje okolo hodnoty 3,1 %, výsledná hodnota kvantového výtěžku nanočástic látky DPA-DPS-V(COOMe)₂ (H2) se pohybuje v rozmezí 12–18 %, a výsledná hodnota kvantového výtěžku nanočástic látky DPA-DPS-V (H1) se pohybuje okolo hodnoty 14,7 %. Při pohledu na obrázek 18 můžeme vidět neúplné emisní spektrum nanočástic vyrobených z látek DPA-DPS-IOO a chybějící část emisního spektra nanočástic z látky DPA-DPS-V(COOMe)₂. Kvantové výtěžky těchto nanočástic nebyly vypočítány z celého emisního spektra a tudíž výsledné hodnoty kvantových výtěžků jsou nejspíše nižší než by měly být. Výsledné kvantové výtěžky nanočástic jsou v porovnání s kvantovými výtěžky samotných látek v THF menší o několik desítek procent.

Tabulka 10 Kvantové výtěžky nanočástic vytvořených ze samostatných látek

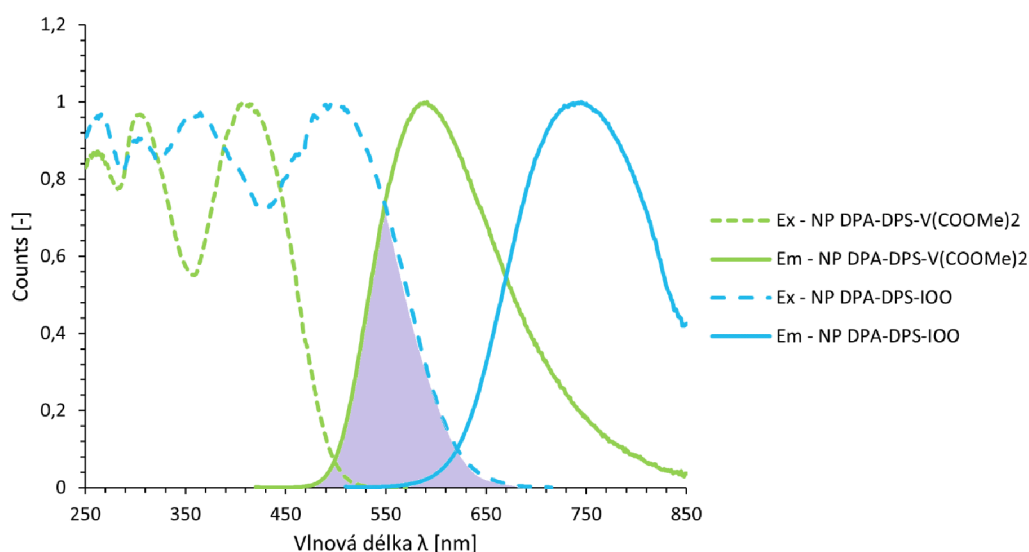
NP	DPA-DPS-IOO	DPA-DPS-V(COOMe) ₂	DPA-DPS-V
Φ (%)	3,1 ± 1,7	15,6 ± 2,5	14,7 ± 0,4

Zde v tabulce 10 vidíme velmi nízký kvantový výtěžek fluorescence nanočástic samotné látky DPA-DPS-IOO (G1), avšak jako jediná ze studovaných látek je charakteristická žádanou fluorescencí v FR/NIR oblasti. Cílem tedy je zvýšit kvantový výtěžek nanočástic G1 tak, že molekuly G1 vložíme do matrice (H1/H2) s intenzivní fluorescencí a vznikne tak *host-guest* systém, v kterém předpokládáme, že dojde k přenosu energie mezi molekulami G1 (akceptor) a H1/H2 (donor), a tím pádem k zvýšení intenzity fluorescence v FR/NIR oblasti.

Na obrázku 19 a obrázku 20 jsou vyobrazena fluorescenční spektra nanočástic s barevně zvýrazněným překryvem emisního spektra donoru s absorpčním spektrem akceptoru. Försterův rezonanční přenos energie je jev, který závisí na tomto spektrálním překryvu. V našem případě se absorpční spektrum nanočástic látky DPA-DPS-IOO shoduje s excitačním spektrem těchto

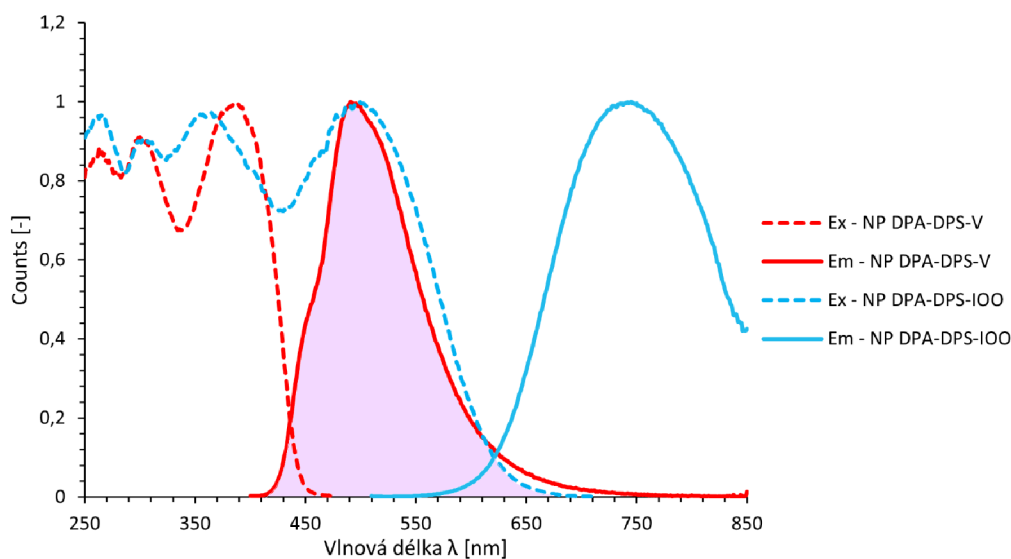
nanočástic. Molekuly uvnitř nanočástice se chovají jako molekuly v pevné fázi, předpokládáme tedy, že i spektra těchto nanočástic odpovídají spektrům molekul v pevné fázi (prášku). V dalších experimentech, kde tyto látky budou tvořit jednu nanočástici chceme docílit situace, kdy jako akceptor energie budou vystupovat molekuly látky DPA-DPS-IOO (G1) a donorem budou látky DPA-DPS-V(COOMe)₂ (H2) a DPA-DPS-V (H1). Spektra čistých látek ve formě nanočástic se překrývají, můžeme tedy předpokládat, že k FRET bude docházet.

Na obrázku 19 je vidět překryv mezi excitačním spektrem nanočástic látky DPS-DPS-IOO (akceptor) a emisním spektrem nanočástic DPA-DPS-V(COOMe)₂ (donor) vyznačen fialovou barvou. Tento částečný překryv splňuje jednu z podmínek FRET. Překryv se nachází v rozmezí vlnových délek 470–670 nm.



Obrázek 19 Překryv excitačního a emisního spektra nanočástic vytvořených z látek DPA-DPS-IOO a DPA-DPS-V(COOMe)₂

Na obrázku 20 je zachycen překryv mezi excitačním spektrem nanočástic DPA-DPS-IOO (akceptor) a emisním spektrem nanočástic DPA-DPS-V (donor) vyznačen růžovou barvou. Tímto překryvem je splněna jedna z podmínek pro FRET. Překryv se nachází v rozmezí vlnových délek 410–750 nm. Plocha překryvu je podstatně větší než v případě překryvu mezi molekulou DPA-DPS-IOO a DPA-DPS-V(COOMe)₂ na obrázku 19. Na základě těchto pozorování je tedy možné předpokládat, že i přenos energie mezi donorem a akceptorem bude v případě DPA-DPS-V větší, jelikož emisní spektrum akceptoru se téměř celé překrývá s excitačním spektrem donoru. Je zde ovšem potřeba také vzít v úvahu vliv rozpouštědla na vlastnosti nanočástic. Proto jsou v další kapitole studovány vlastnosti látek v práškové, mikrokryalické formě.



Obrázek 20 Překryv emisního a excitačního spektra nanočástic vytvořených z látek DPA-DPS-IOO a DPA-DPS-V

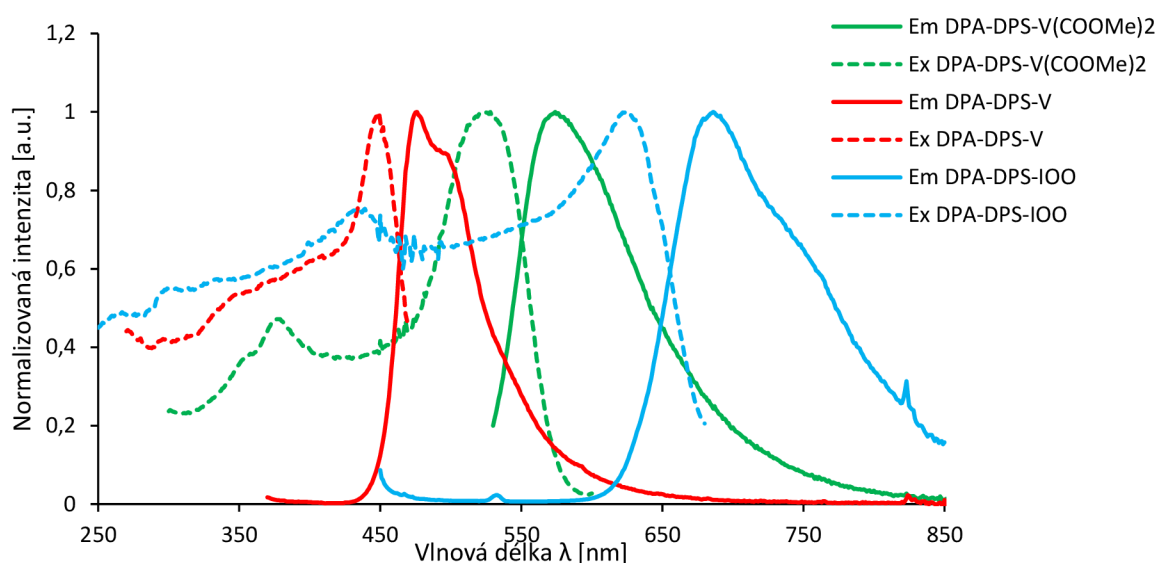
3.2.3 Fluorescenční spektra jednotlivých fluoroforů v pevné fázi (prášek)

Fluorescenční spektra látek DPA-DPS-V, DPA-DPS-V(COOMe)₂, DPA-DPS-IOO v pevné fázi jsou vyobrazena na obrázku 21. Excitační spektrum látky DPA-DPS-IOO (G1) se rozkládá na rozmezí vlnových délek 500–680 nm s excitačním maximem při vlnové délce 622 nm. Zrcadlově obrácené emisní spektrum je posunuté k vyšším vlnovým délkám, zasahuje do oblasti NIR a je charakteristické emisním maximem při vlnové délce 686 nm. Excitační a emisní spektrum látky DPA-DPS-IOO v pevné fázi je mezi sebou vzdálené kladným Stokesovým posunem 64 nm.

Předpokládáme, že excitační a emisní maxima pevné látky (prášku) DPA-DPS-IOO se budou shodovat s maximy nanočástic vytvořených z té samé látky, protože uvnitř nanočástic se nachází právě pevná fáze tvořená molekulami DPA-DPS-IOO. Při porovnání však zjistíme, že se vlnové délky příslušících maxim neshodují. Excitační maximum nanočástic se nachází při vlnové délce 498 nm, což je 124 nm rozdíl. Emisní maximum nanočástic nacházející se při vlnové délce 750 nm je posunuté do červené oblasti o 64 nm více než emisní maximum v pevné fázi (prášku). Důvodem posunu fluorescenčního spektra nanočástic k větším vlnovým délkám jsou interakce mezi molekulami na povrchu nanočástice a molekulami vodného rozpouštědla. Protože nanočástice mají velký povrch oproti vnitřnímu objemu, jsou interakce s okolním prostředím určující pro výsledné optické vlastnosti.

Při pohledu na fluorescenční spektrum látky DPA-DPS-V(COOMe)₂ (H2) v prášku si můžeme všimnout excitačního maxima při vlnové délce 528 nm a emisního maxima při vlnové délce 574 nm s kladným Stokesovým posunem 46 nm. Opět předpokládáme na základě pevné fáze uvnitř nanočástic, že se fluorescenční spektra látky DPA-DPS-V(COOMe)₂ v prášku a nanočástic z ní vytvořených budou shodovat. Po porovnání jsme zjistili, že nanočástice disponují větším Stokesovým posunem 183 nm, což znamená, že excitační a emisní maximum se nachází při rozdílných vlnových délkách, konkrétně při 408 nm a 591 nm. Domníváme se, že interakce mezi molekulami na povrchu nanočástice a molekulami vodného rozpouštědla jsou důvodem tohoto posunu.

Fluorescenční spektrum látky DPA-DPS-V (H1) v prášku je charakteristické nejmenším Stokesovým posunem 27 nm. Excitační pás se rozkládá zhruba na rozmezí vlnových délek 420–470 nm s maximem vlnové délce 449 nm. Zrcadlově obrácené emisní spektrum se nachází na rozmezí vlnových délek 440–650 nm s maximem při vlnové délce 476 nm. Na základě faktu, že uvnitř nanočástice se nachází pevná fáze tvořená molekulami látky H1, předpokládáme shodu v emisním a excitačním maximu látky v pevné fázi a z ní vytvořených nanočástic. Avšak tato maxima se opět neshodují. Excitační maximum nanočástic se nachází při vlnové délce 386 nm, což je rozdíl 63 nm, a emisní maximum nacházející se při vlnové délce 491 nm je posunuté k větším vlnovým délkám, konkrétně o 15 nm. Důvodem rozdílných fluorescenčních spekter jsou interakce molekul na povrchu nanočástic s molekulami rozpouštědla, protože interakce s okolním prostředím určují výsledné optické vlastnosti, jelikož nanočástice disponují velkým povrchem oproti vnitřnímu objemu.



Obrázek 21 Fluorescenční spektrum samostatných fluoroforů v pevné fázi

Výsledné hodnoty kvantových výtěžků fluoroforů v pevné fázi jsou vypsány v tabulce 11. Největšího kvantový výtěžek se pohybuje v rozmezí 17–23 % a patřil látce DPA-DPS-V(COOMe)₂, kvantový výtěžek látky DPA-DPS-V se pohybuje kolem hodnoty 12 %, a kvantový výtěžek látky DPA-DPS-IOO se pohybuje v rozmezí 6–8 %.

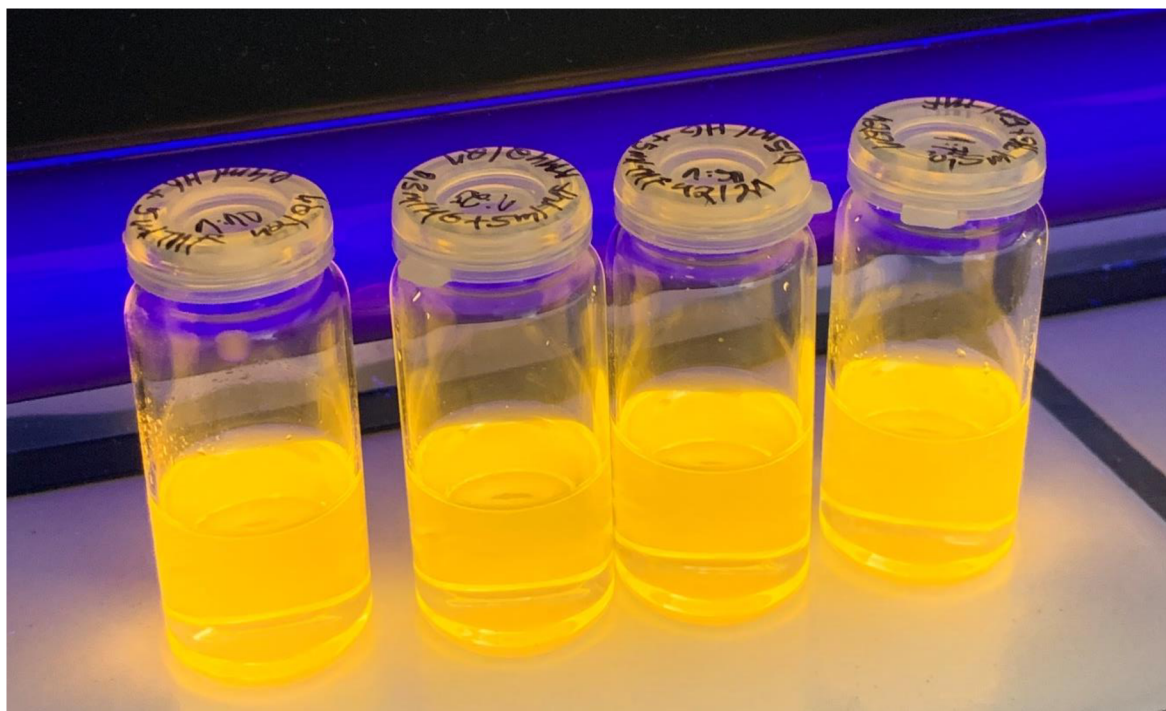
Ze zjištěných poloh spekter a kvantových výtěžků lze usuzovat, že v *host-guest* systémech bude FRET účinnější v případě páru G1H2 než G1H1. Spektrální překryvy jsou podobné, ale kvantový výtěžek látky H2 je téměř dvakrát tak velký.

Tabulka 11 Kvantové výtěžky samostatných látek v pevné fázi

Pevná fáze	DPA-DPS-IOO	DPA-DPS-V(COOMe) ₂	DPA-DPS-V
Φ (%)	7,0 ± 1,0	20,0 ± 3,0	12,6 ± 0,1

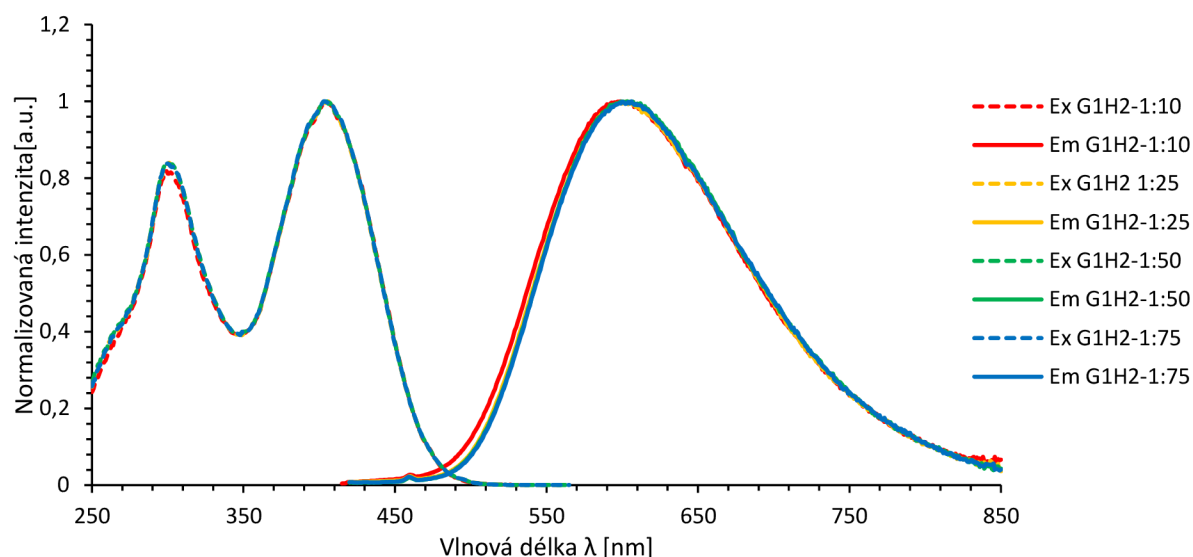
3.2.4 Fluorescenční spektra HG systémů v roztoku

Fluorescenční spektra HG systémů látek G1H2 v molárních poměrech 1:9, 1:21, 1:43, 1:64 jsou vyobrazena na obrázku 23. Systém G1H2 je složen z látek DPA-DPS-IOO (G1) a DPA-DPS-V(COOMe)₂ (H2). Charakteristické sytě žluté zbarvení fluorescence systému G1H2 po ozáření UV-lampou je zachyceno na obrázku 22.



Obrázek 22 Charakteristické zbarvení fluorescence systému G1H2 v rozpouštědle THF, zleva vidíme G1H2 v objemovém poměru 1:10, dále 1:25, 1:50 a 1:75

Normalizovaná emisní a excitační spektra jednotlivých molárních poměrů (obrázek 23) jsou shodná, to znamená, že nedochází ke změně fluorescenčního spektra. Excitační spektra mají dvě maxima, kdy první excitační maxima se nachází při vlnové délce 405 nm a druhá excitační maxima při vlnové délce 303 nm. Emisní spektra mají pouze jedno maximum při vlnové délce 605 nm. Fluorescenční spektra jsou charakteristická kladným Stokesovým posunem 200 nm. Fluorescence samotné látky G1 se pouze nepatrně projevuje při objemovém poměru 1:10, v ostatních případech se fluorescence hosta G1 neprojevuje. Excitační a emisní spektra systému G1H2 nejsou tvarově totožná s excitačním a emisním spektrem samotné látky H2 (DPA-DPS-V(COOMe)₂) (viz obrázek 16), tudíž nelze tvrdit, že se projevila pouze fluorescence látky H2. Avšak kvůli molární převaze látky H2 v systému G1H2 je excitační maximum téměř shodné s excitačním maximumem látky H2. Emisní maximum se neshoduje s maximumem samotné látky H2, je posunuté o 14 nm. Lze tedy předpokládat, že se na emisním spektru podílí i fluorescence látky G1. Dalším důvodem, proč je fluorescence látky G1 tak nízká, bylo měření emisního spektra v absorpčním maximumu látky H2 mimo maximum absorpce látky G1. Látka G1 v této oblasti absorbovala méně intenzivně, proto je intenzita fluorescence také velmi nízká.



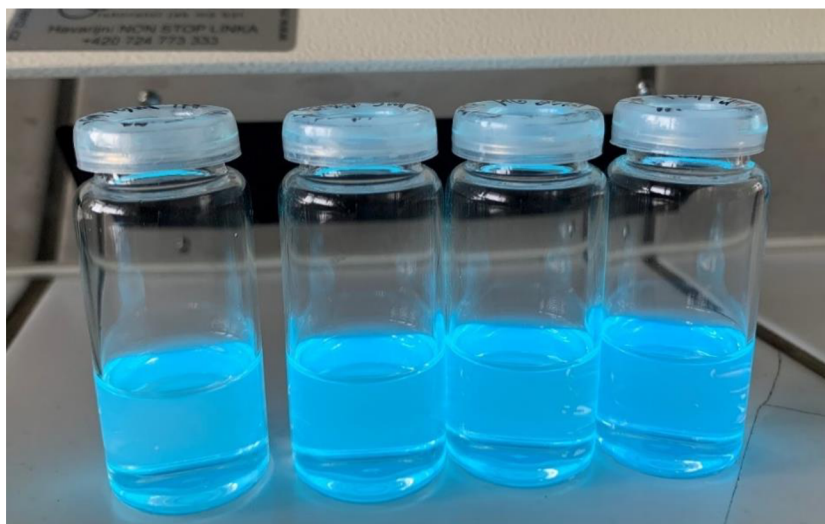
Obrázek 23 Fluorescenční spektra z HG systému látek G1H2 v různých objemových poměrech v rozpouštědle THF

Výsledné hodnoty kvantových výtěžků jednotlivých objemových poměrů systému G1H2 jsou vypsány v tabulce 12. Největší hodnoty kvantového výtěžku v rozmezí 53,9–59,3 % dosáhl systém G1H2 v molárním poměru 1:9. Vysoká hodnota kvantového výtěžku je způsobena fluorescenčním projevem látky G1, který je v ostatních objemových poměrech téměř nulový. Výsledná hodnota kvantového výtěžku systému G1H2 o molárním poměru 1:21 se pohybuje v rozmezí 23,5–30,3 %, výsledná hodnota kvantového výtěžku molárního poměru 1:43 se pohybuje v rozmezí 31,3–40,7 %, a výsledná hodnota molárního poměru 1:64 se pohybuje v rozmezí 38,4–48,8 %. Předpokládáme, že výsledné hodnoty kvantových výtěžků systému G1H2 v molárních poměrech 1:43, 1:64 přísluší pouze látce H2, v porovnání s hodnotou kvantového výtěžku $41,6 \pm 1,3 \%$ samotné látky H2 (DPA-DPS-V(COOMe)₂) z tabulky 9 jsou hodnoty velmi podobné.

Tabulka 12 Kvantové výtěžky systému G1H2 v různých objemových poměrech

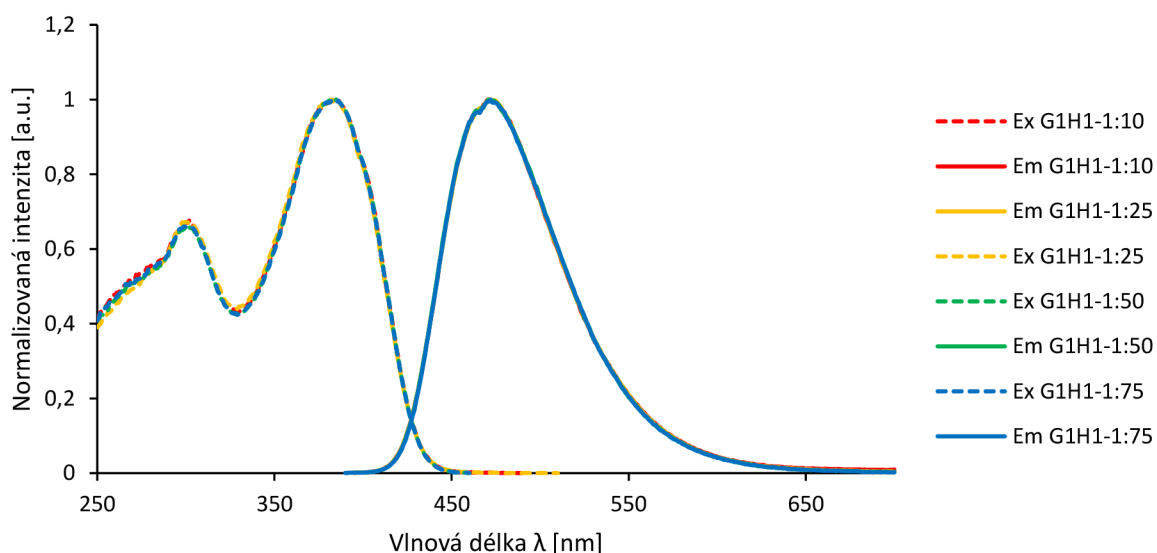
G1H2				
Objemový poměr	1:10	1:25	1:50	1:75
Molární poměr	1:9	1:21	1:43	1:64
Φ (%)	$56,6 \pm 2,7$	$26,9 \pm 3,4$	$36,0 \pm 4,7$	$43,6 \pm 5,2$

Na obrázku 25 jsou vyobrazena fluorescenční spektra HG systému látek G1H1 v molárních poměrech 1:10,5, 1:26, 1:52, 1:79 v rozpouštědle THF. Systém G1H1 je složený z látek DPA-DPS-IOO (G1) a DPA-DPS-V (H1). Charakteristické modré zbarvení fluorescence systému G1H1 lze pozorovat na obrázku 24.



Obrázek 24 Charakteristické zbarvení fluorescence systému G1H1 v rozpouštědle THF

Excitační a emisní spektra systému G1H1 v jednotlivých molárních poměrech jsou naprosto totožná. Excitační spektrum má dvě maxima, první excitační maximum se nachází při vlnové délce 383 nm a je shodné s absorpčním maximem samotné látky H1. Druhé excitační maximum se nachází při vlnové délce 303 nm. Emisní spektrum má pouze jediné maximum při vlnové délce 472 nm. Poloha emisního maxima samotné látky H1 se nachází při vlnové délce 475 nm, polohy maxim jsou téměř shodné. První excitační a emisní maxima jsou mezi sebou vzdálená 89 nm, jedná se o výrazně kratší Stokesův posun než v případě systému G1H2. Z polohy emisních a excitační maxim lze usoudit, že látka G1 v systému G1H1 se svou fluorescencí neprojevila. Emisní spektra byla měřena v absorpčním maximu látky H2, a z obrázku 8 víme, že látka G1 v této oblasti absorbuje záření méně intenzivně. Spektra byla tedy měřena mimo absorpční maximum látky G1, což je důvodem neprojevení její fluorescence.



Obrázek 25 Fluorescenční spektra HG systému látek G1H1 v různých objemových poměrech v rozpouštědle THF

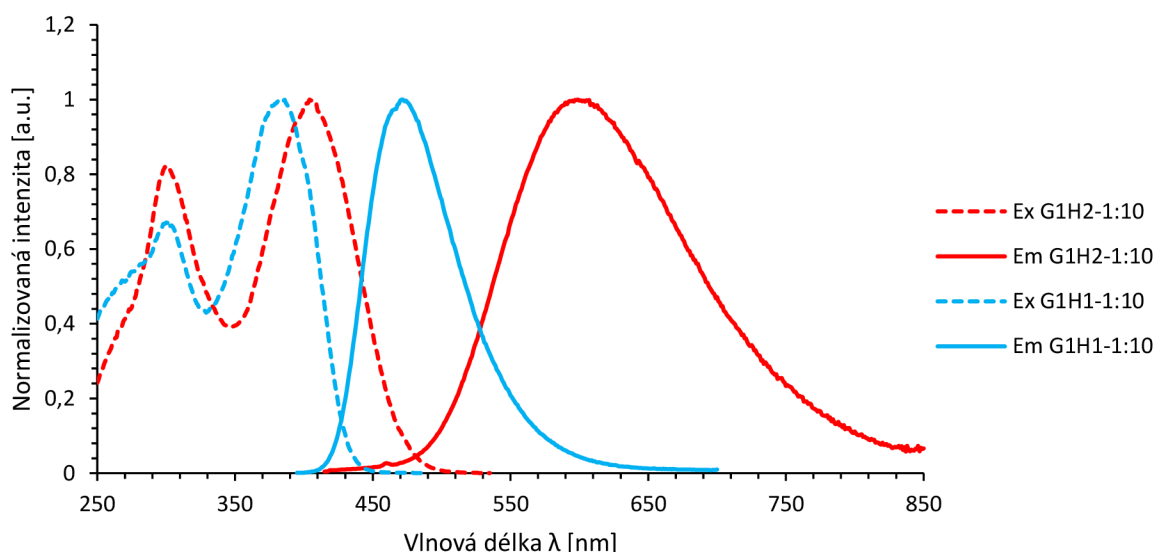
V tabulce 13 jsou vypsány výsledné hodnoty kvantových výtěžků systému G1H1 v různých molárních poměrech. Největší hodnota kvantového výtěžky byla zaznamenána u molárního poměru systému G1H1 1:79. V molárním poměru 1:79 je látky H1 největší

množství, z toho vyplývá, že fluorescence bude nejvíce intenzivní. Porovnáním s hodnotou kvantového výtěžku 69,2 % samotné látky H1 (DPA-DPS-V) je patrné, že se opravdu jedná pouze o fluorescenci látky H1.

Tabulka 13 Kvantové výtěžky systému G1H1 v různých objemových poměrech

G1H1				
Objemový poměr	1:10	1:25	1:50	1:75
Molární poměr	1:10,5	1:26	1:52	1:79
Φ (%)	61,1 ± 1,2	65,2 ± 1,7	68,4 ± 1,4	71,5 ± 1,2

Excitační a emisní spektra systému G1H1 a G1H2 v objemovém poměru 1:10 jsou porovnána na obrázku 26. Na první pohled můžeme vidět posun fluorescenčních spekter systému G1H2 k větším vlnovým délkám. Tento posun je způsoben silnější elektron-akceptorovou skupinou $-V(\text{COOMe})_2$ ve struktuře molekul H2 než je elektron-akceptorová skupina vinyl ve struktuře molekul H1. Se silnou elektron-akceptorovou skupinou souvisí polarita molekul, tudíž je molekula H2 více polárnější. Čím větší je polarita, tím větší jsou interakce mezi molekulami H2 a molekulami THF, které způsobí silnější efekt solvatochromismu. Se silnějším efektem solvatochromismu dochází k posunu emise do blízké infračervené oblasti. Tento posun je znám jako bathochromní.



Obrázek 26 Fluorescenční spektra systému G1H1 a G1H2 v objemovém poměru 1:10 v rozpouštědle THF

3.2.5 Fluorescenční spektra nanočástic vytvořených z HG systémů

Byly připravené nanočástice ze systému G1H2 v různých molárních poměrech, které měly rozdílnou velikost a ζ -potenciál. Nanočástice připravené z molárního poměru 1:9 systému G1H2 měly velikost 113 nm s polydisperzní index 0,32 a ζ potenciál -17 mV. Další nanočástice připravené z molárního poměru 1:21 systému G1H2 měly velikost 120 nm s polydisperzním indexem 0,36 a ζ potenciál -11 mV. Nanočástice systému G1H2 o molárním poměru 1:43 byly připravené o velikosti 137 nm s polydisperzním indexem 0,39 a ζ potenciálem -13 mV,

a nanočástice systému G1H2 o molárním poměru 1:64 byly připravené o velikosti 141 nm s polydisperzním indexem 0,34 a ζ potenciálem -13 mV. Na základě údajů získaných z DLS usuzujeme, že se jedná ve všech případech o relativně monodisperzní systém (splňující naše požadavky), který se však vyznačuje značnou nestabilitou. Systémy jsou však dostatečně stabilní na to, abychom byli schopni provést všechny potřebné měření v dostatečné kvalitě ihned po přípravě nanočástic.

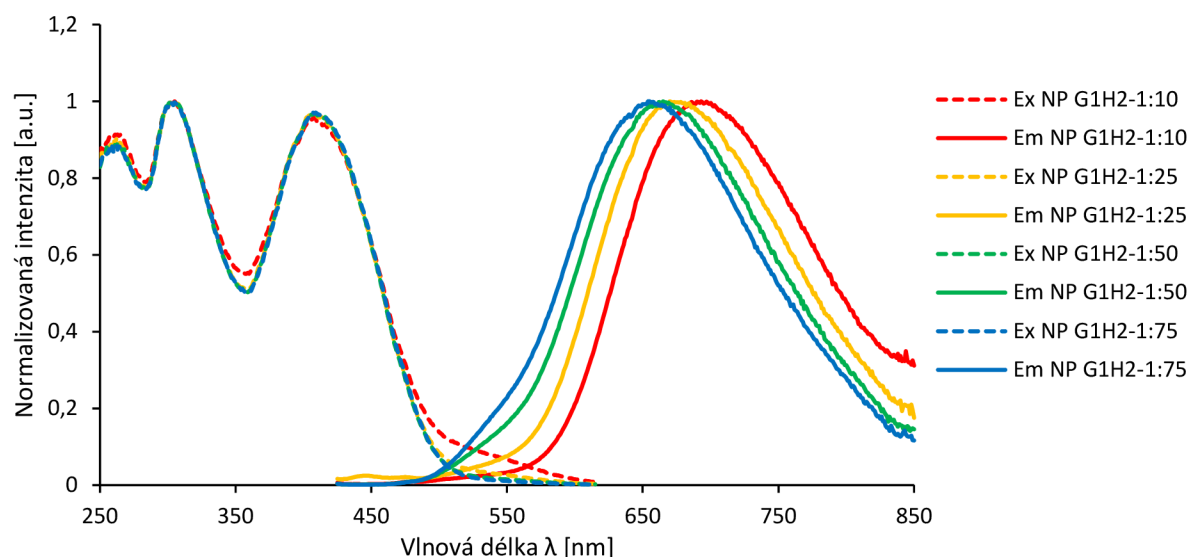
Na obrázku 27 můžeme pozorovat charakteristickou fluorescenci nanočástic systému G1H2 v červené oblasti.



Obrázek 27 Charakteristické zbarvení fluorescence nanočástic systému G1H2

Před měřením těchto spekter byly nanočástice přefiltrovány přes filtr z redukované celulózy s póry o velikosti $0,45 \mu\text{m}$. Tím se měl vzorek zbavit balastních látek nebo agregovaných částic, který by poté svou fluorescencí ovlivnil fluorescenční spektra i kvantový výtěžek nanočástic.

Fluorescenční spektra nanočástic vytvořených ze systému G1H2 v molárních poměrech 1:9, 1:21, 1:43, 1:64 lze vidět na obrázku 28. Emisní spektrum je složené z jednoho výrazného emisního pásu, který se při větším poměru 1:75 podobá emisnímu spektru samotné látky H2 a při nejmenším poměru 1:9 se podobá emisnímu spektru samotné látky G1. Emisní maxima se nachází při vlnových délkách 658 nm, 667 nm, 677 nm, 693 nm. Jednotlivé vlnové délky emisních maxim se zvyšují s klesajícím objemovým poměrem látky H2 v HG systému G1H2. Excitační spektrum nanočástic je shodné ve všech případech objemových poměrů. První excitační maximum se nachází při vlnové délce 410 nm a druhé excitační maximum se nachází při vlnové délce 307 nm. Největší Stokesův posun 283 nm je možné vidět mezi excitačním a emisním spektrem nanočástic v objemovém poměru 1:10. Naopak nejmenší Stokesův posun 248 nm se nachází mezi excitačním a emisním spektrem nanočástic systému G1H2 v objemovém poměru 1:75.



Obrázek 28 Fluorescenční spektra nanočástic vytvořených ze systému G1H2 v různých objemových poměrech ve vodném prostředí, filtrované

Z naměřených dat lze pozorovat trend posunu spektra do červené oblasti se zvyšujícím se množstvím látky G1 uvnitř nanočástic. Tento posun začíná u emisního maxima při vlnové délce 658 nm emisního spektra nanočástic G1H2 objemového poměru 1:75 a pokračuje až do emisního maxima při vlnové délce 693 nm emisního spektra nanočástic objemového poměru 1:10. Maximum emise molekul akceptoru H2 se nachází při vlnové délce 406 nm a maximum emise donoru G1 se nachází při vlnové délce 750 nm, a v grafu vidíme, že fluorescence nanočástic se přibližuje k tomuto emisnímu maximu. Z toho vyplývá, že došlo k FRET mezi molekulami G1 a H2 uvnitř nanočástice. Navzdory tomu, že látka H2 (hostitel) má o hodně vyšší kvantový výtěžek než látka G1 (host) a je jí mnohonásobně více (10x až 75x), tak bychom předpokládali, že by se na fluorescenčním spektru měla přítomnost látky H2 projevat nejintenzivněji. Avšak jsme dokázali, že i s relativně malým přidavkem látky G1 (v objemovém poměru 1:10/molárním poměru 1:9) jsme dosáhli posunu spektra do vyšších vlnových délek mimo maximum látky H2. Proto předpokládáme, že k tomuto posunu došlo proto, že fluorescence tohoto systému pochází z velké míry právě z fluorescence molekul G1. Tento jev je tedy způsoben nějakou mezi-molekulární interakcí, s největší pravděpodobností právě FRET. Tuto hypotézu podporuje i fakt, že navzdory posunu fluorescence o více než 35 nm jsme nezaznamenali výrazný pokles kvantového výtěžku a podařilo se nám připravit systém, který je charakteristický emisí záření při vyšší vlnové délce než samotná látka H2 a zároveň si udržuje zvýšený kvantový výtěžek na rozdíl od čisté látky G1. Z obrázku 19 víme, že částečný překryv excitačního pásu akceptoru a emisního pásu donoru splňoval podmínku pro umožnění FRET.

Výsledné hodnoty kvantových výtěžků jsou důležitým faktorem v určení, zdali opravdu došlo k FRET. V tabulce 14 jsou vypsány kvantové výtěžky nanočástic systému G1H2 v různých molárních poměrech. Předpokládáme, že důsledkem FRET dojde ke zvýšení kvantového výtěžku nanočástic systému G1H2 oproti kvantovému výtěžku samotných nanočástic látky G1. Výsledná hodnota nanočástic systému G1H2 molárního poměru 1:9 se nachází v rozmezí 12,4–15,8 %, systému G1H2 molárního poměru 1:21 se nachází v rozmezí 15,4–20,4 %, systému G1H2 molárního poměru 1:43 se nachází v rozmezí 16,5–17,9 % a systému G1H2 o molárním poměru 1:64 se nachází v rozmezí 12,8–18,8 %. Z tabulky 10

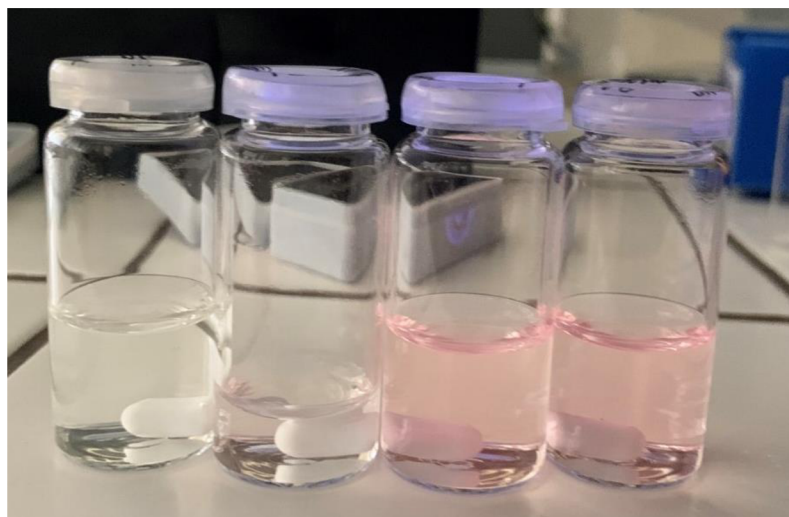
víme, že kvantový výtěžek nanočástic vytvořených ze samotné látky G1 se pohybuje okolo hodnoty 3,1 % a kvantový výtěžek nanočástic vytvořených pouze ze samotné látky H2 se pohybuje okolo hodnoty 15,6 %.

Tabulka 14 Kvantové výtěžky nanočástic vytvořených z HG systému látek G1 a H2 v různých objemových poměrech

NP G1H2				
Objemový poměr	1:10	1:25	1:50	1:75
Molární poměr	1:9	1:21	1:43	1:64
Φ (%)	14,1 ± 1,7	17,9 ± 2,5	17,2 ± 0,7	15,8 ± 3,6

Nanočástice připravené ze systému G1H1 o různých molárních poměrech byly charakteristické odlišnými vlastnostmi. Nanočástice připravené ze systému G1H1 o molárním poměru 1:10,5 byly průměrně velké 97 nm s polydisperzním indexem 0,18 a ζ potenciálem -23 mV. Dále byly připravené nanočástice systému G1H1 molárního poměru 1:26 o velikosti 98 nm s polydisperzním indexem 0,20 a ζ potenciálem -22 mV, a nanočástice systému G1H1 molárního poměru 1:52 byly připravené o velikosti 97 nm s polydisperzním indexem 0,22 a ζ potenciálem -21 mV. Poslední nanočástice systému G1H1 molárního poměru 1:79 byly připravené o velikosti 95 nm s polydisperzním indexem 0,24 a ζ potenciálem -22 mV. Ze získaných údajů z DLS usuzujeme, že se jedná ve všech případech o relativně monodisperzní systém, který se vyznačuje nízkou stabilitou. Potřebné měření byly provedeny v dostatečné kvalitě hned po přípravě nanočástic.

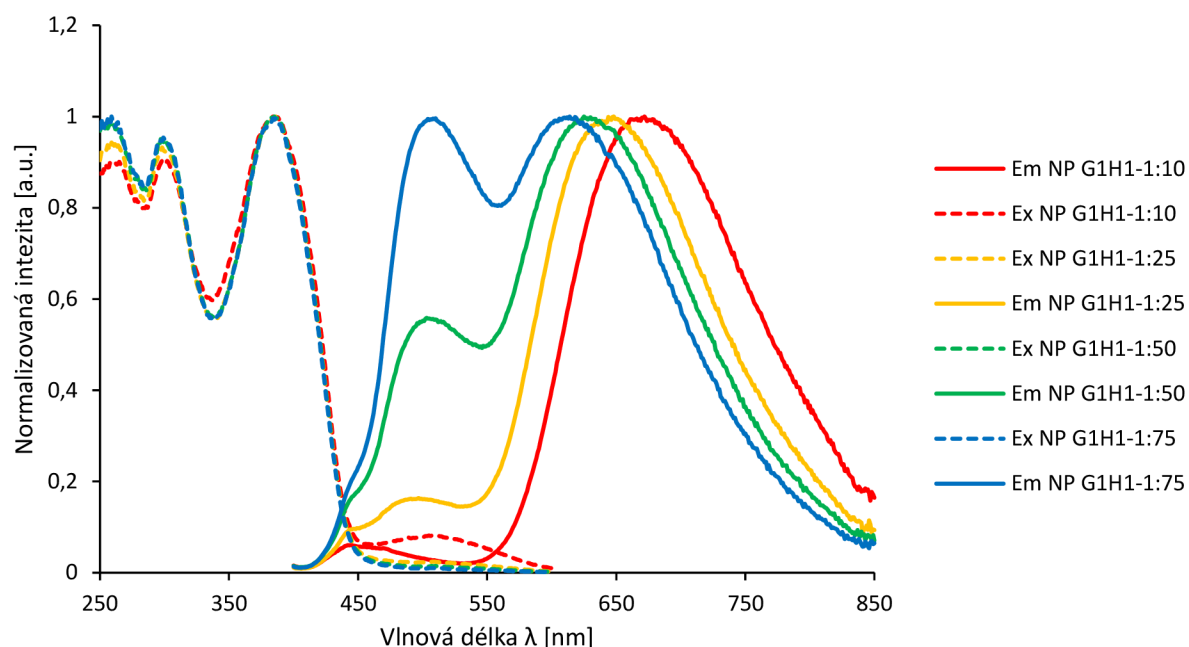
Na obrázku 29 můžeme pozorovat charakteristické zbarvení fluorescence nanočástic systému G1H1 v červené oblasti, postupně zprava od molárního poměru 1:10,5 až po molární poměr 1:79.



Obrázek 29 Charakteristická fluorescence nanočástic vytvořených ze systému G1H1, zprava molární poměr 1:10,5, dále 1:26, 1:52 a 1:79

Fluorescenční spektra nanočástic vytvořených ze systému G1H1 v molárních poměrech 1:10,5, 1:26, 1:52, 1:79 jsou vyobrazena na obrázku 30. Excitační spektrum nanočástic je totožné ve všech případech objemových poměrů. První excitační maximum se nachází při vlnové délce 387 nm a druhé excitační maximum se nachází při vlnové délce 305 nm. V oblasti

550 nm excitačního spektra nanočástic G1H1 v molárním poměru 1:10,5 se projevuje excitace samotné látky G1. Emisní maxima se nachází při vlnových délkách 615 nm, 630 nm, 650 nm, 666 nm. Jednotlivé vlnové délky emisních maxim se zvyšují s klesajícím objemovým poměrem látky H1 v HG systému G1H1. Každé emisní spektrum má ještě druhé maximum při vlnové délce 503 nm. Intenzita těchto emisních píků se mění spolu s rostoucím molárním poměrem, kdy při molárním poměru 1:79 je tento pík nejintenzivnější. Emisní maximum nanočástic látky H1 se nachází při vlnové délce 491 nm. Z toho vyplývá, že se nejspíše jedná o samotnou fluorescenci nanočástic H1. Intenzivní projev látky H1 byl předpokládán, jelikož má kvantový výtěžek o hodně větší než látka G1 a je jí mnohonásobně více (10x až 75x). Malý posun k vyšším vlnovým délkám mohl být způsoben mezi-molekulovými interakcemi uvnitř nanočástic. Největší Stokesův posun 279 nm je možné vidět mezi excitačním a emisním spektrem nanočástic v molárním poměru 1:10,5. Naopak nejmenší Stokesův posun 228 nm se nachází mezi excitačním a emisním spektrem nanočástic systému G1H1 v molárním poměru 1:79.



Obrázek 30 Fluorescenční spektra nanočástic vytvořených ze systému G1H1 v různých objemových poměrech ve vodném prostředí, filtrované

Z naměřených dat lze pozorovat trend posunu spektra do červené oblasti se zvyšujícím se množstvím látky G1 uvnitř nanočástic. Tento posun začíná u emisního maxima při vlnové délce 615 nm emisního spektra nanočástic G1H1 molárním poměru 1:79 a pokračuje až do emisního maxima při vlnové délce 666 nm emisního spektra nanočástic molárního poměru 1:10,5. Molekuly donoru G1 samy o sobě svítí při vlnové délce 750 nm, a v grafu vidíme, že fluorescence nanočástic se přibližuje k tomuto emisnímu maximumu. Předpokládáme že tento posun je opět způsoben fluorescencí, která pochází z velké míry z fluorescence molekul G1. Pouze malým přídavkem látky G1 se dosáhl posun spektra do vyšších vlnových délek mimo maximum H2. Tento jev je způsobený určitou mezi-molekulární interakcí, s velkou pravděpodobností právě FRET. Na obrázku 20 můžeme vidět úplný překryv absorpčního

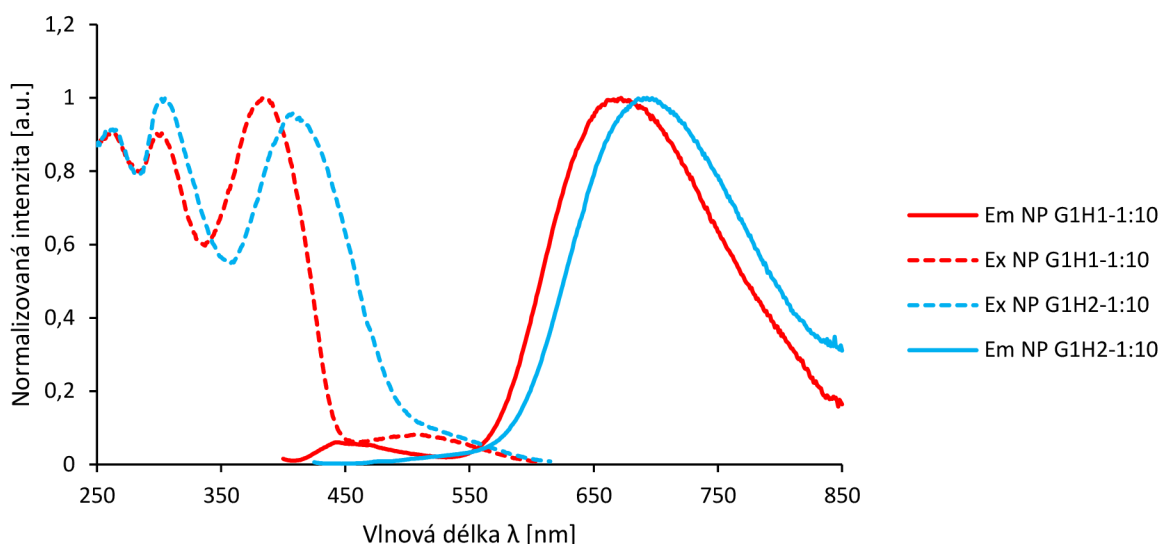
spektra donoru a emisního spektra akceptoru, můžeme se tedy domnívat, že FRET bude účinnější než v případě G1H2. Překryv spekter ovšem není jediný faktor, který ovlivňuje FRET a v tomto případě hraje důležitou úlohu i kvantový výtěžek donoru, který je v případě H1 téměř dvakrát menší než v případě H2. Výsledná účinnost FRET tak bude v případě systému G1H1 zřejmě menší.

Výsledné hodnoty kvantových výtěžků jsou důležitým faktorem v určení, o jak účinný FRET se jedná. V tabulce 15 jsou vypsány kvantové výtěžky nanočástic v různých molárních poměrech. Předpokládáme, že důsledkem FRET dojde ke zvýšení kvantového výtěžku nanočástic systému G1H1 oproti kvantovému výtěžku samotných nanočástic látky G1. Z tabulky 10 víme, že kvantový výtěžek nanočástic vytvořených ze samotné látky G1 se pohybuje okolo hodnoty 3,1 % a kvantový výtěžek nanočástic vytvořených pouze ze samotné látky H1 se pohybuje okolo hodnoty 14,7 %. Po porovnání výsledných hodnot kvantových výtěžků zjistíme, že kvantový výtěžek nanočástic G1H1 v molárním poměru 1:10,5 narostl pouze o 2,25 %. K FRET tedy dochází ale jeho účinnost není velká. Hodnotu kvantového výtěžku nanočástic v molárním poměru 1:79 nejvíce ovlivňuje fluorescence samotné látky H1. Navzdory tomu, že dochází k velkému překryvu absorpčního a emisního spektra (viz obrázek 20), kvantový výtěžek není výrazně zvýšen jako tomu bylo v případě nanočástic vytvořených ze systému G1H2.

Tabulka 15 Kvantové výtěžky nanočástic vytvořených z HG systému látek G1 a H1 v různých objemových poměrech

NP G1H1				
Objemový poměr	1:10	1:25	1:50	1:75
Molární poměr	1:10,5	1:26	1:52	1:79
Φ (%)	5,35 ± 1,2	9,3 ± 1,4	7 ± 1	10,5 ± 1,9

Na obrázku 31 lze vidět fluorescenční spektra nanočástic systému G1H1 i G1H2 v objemovém poměru 1:10. Na první pohled můžeme vidět posun fluorescenčních spekter nanočástic G1H2 k větším vlnovým délkám. Tento posun je způsoben silnější elektron-akceptorovou skupinou $-V(\text{COOMe})_2$ ve struktuře molekul H2 než je elektron-akceptorová skupina vinyl ve struktuře molekul H1. Se silnou elektron-akceptorovou skupinou souvisí polarita molekul, tudíž je molekula H2 více polárnější. Čím větší je polarita, tím větší jsou π - π interakce v pevné fázi, což se projeví větším posunem fluorescenčního spektra do červené oblasti (v porovnání s H1). V polárnějším prostředí H2 oproti H1 je tedy pravděpodobně vlivem solvatochromie emise akceptoru (G1) bathochromně posunuta.



Obrázek 31 Porovnání fluorescenčních spekter nanočástic vytvořených z G1H1 a G1H2 v objemových poměrech 1:10 ve vodném prostředí

3.3 Výsledky měření doby života fluorescence

3.3.1 Doba života fluorescence HG systémů v roztoku THF

Doba života fluorescence systému G1H2 byla změřena pro objemové poměry 1:10 až 1:75. Z naměřených dat v tabulce 16 můžeme usuzovat, že pro tento systém je charakteristická multiexponenciální fluorescence, která pravděpodobně svědčí o přítomnosti různých excitovaných stavů. Tyto stavy mohou pocházet ze vzájemných interakcí jednotlivých komponentů systému v základním a excitovaném stavu. Také to má souvislost se strukturou molekul G1 a H2, na které závisí jejich vzájemné uspořádání v agregovaném stavu. Molekuly tvořící v roztoku molekulové agregáty (elektronicky vázané dimery) mohou být charakterizované právě přítomností více než jednoho poločasu rozpadu excitovaného stavu. To může být zapříčiněné nižší rozpustností látky H2 v THF. Takový systém má proto tendenci se shlukovat již ve formě pravého roztoku.

Při měření doby života fluorescence systémů G1H2 ve všech objemových poměrech byla pro excitaci použita vlnová délka 389 nm a emise vzorků byla měřena při vlnové délce 603 nm. Každý systém je charakteristický dvěma časy τ , které se pohybují v rozmezí 0,4–1 ns pro nejkratší čas a 1,3–1,6 ns pro nejdelší čas. U časových konstant τ_2 , τ_1 vidíme, že se jejich vzájemný poměr zastoupení liší v závislosti na poměru G1:H2. S větším množstvím látky G1 je také větší zastoupení času τ_1 a s rostoucím množstvím látky H2 roste zastoupení času τ_2 . Můžeme proto předpokládat, že čas τ_1 má souvislost právě s fluorescencí dopantu G1 a čas τ_2 s fluorescencí matrice H2. Může se proto jednat zvláště o poločasy rozpadu čistého fluoroforu G1 a H2, které by měly být totožné s hodnotou τ pro nanočástice vytvořené jen z látky G1 a pro nanočástice vytvořené z látky H2.

Tabulka 16 Doba života fluorescence systému G1H2 v různých objemových poměrech

Systém G1H2	Obj. poměr	τ_1 (ns)	B_1 (%)	τ_2 (ns)	B_2 (%)	χ^2 (-)
	1:10	1,04	46,29	1,64	53,71	1,02
	1:25	0,91	24,76	1,47	75,24	0,89
	1:50	0,59	9,17	1,35	90,83	0,95
	1:75	0,395	7,38	1,32	92,62	1,02

Doba života fluorescence byla změřena pro všechny objemové poměry systému G1H1 při excitační vlnové délce 389 nm a emise byla měřena při vlnové délce 472 nm. Z naměřených dat v tabulce 17 můžeme usuzovat, že systém G1H1 je charakteristický monoexponenciální fluorescencí, konkrétně časem τ_1 1,74–1,75 ns. Také můžeme předpokládat, že nedochází ke vzniku molekulových agregátů. V případě, že ke vzniku agregátů dochází, neprojevují se žádným způsobem na průběhu fluorescence. Se zvyšujícím se množstvím G1 v systému nedochází k pozorovatelnému vlivu na časový průběh fluorescence, tak jako tomu bylo v případě systému G1H2.

Tabulka 17 Doba života fluorescence HG-systému G1H1 v různých objemových poměrech

Systém G1H1	Obj. poměr	τ_1 (ns)	B_1 (%)	χ^2 (-)
	1:10	1,74	100	1,13
	1:25	1,74	100	1,04
	1:50	1,74	100	1,00
	1:75	1,75	100	1,05

3.3.2 Doba života fluorescence nanočástic

Doba života fluorescence nanočástic vytvořených ze systému G1H1 byla změřena při excitační vlnové délce 389 nm a emisní vlnové délce 660 nm pro objemový poměr 1:10 a 613 nm pro objemový poměr 1:75. Tyto objemové poměry byly vybrány jako extrémní zástupci na obou stranách na základě trendu. Na základě dat v tabulce 18 lze usuzovat, že pro tyto nanočástice je charakteristická multiexponenciální fluorescence, která pravděpodobně svědčí o přítomnosti většího počtu excitovaných stavů. Tyto stavy nejspíše pochází ze vzájemných interakcí komponentů tvořící nanočástice v základním a excitovaném stavu. Také to má souvislost se strukturou molekul G1 a H1, která způsobí vzájemné uspořádání v agregovaném stavu. V tomto případě nepochybujeme o přítomnosti molekulárních agregátů, jelikož se jedná o systém nanočástic, což jsou vlastně velké agregáty molekul G1 a H1. Přítomnost agregátů (nanočástic) potvrzují tři časy fluorescence.

Nanočástice jsou charakteristické třemi časy τ , které se pohybují v rozmezí 1,1–1,4 ns pro nejkratší čas τ_1 a 3,6–4,0 ns pro čas τ_2 a 13,5–16 ns pro nejdelší čas τ_3 . Vzájemný poměr zastoupení těchto časových konstant se liší v závislosti o jaký objemový poměr látek G1:H1 se jedná. U objemového poměru 1:10 je čas τ_1 relativně zastoupen 50 %, τ_2 31 % a τ_3 19 %, kdežto u objemového poměru 1:75 je čas τ_1 relativně zastoupen 43 %, τ_2 43 % a τ_3 14 %. Avšak měnící se poměr látek G1 a H1 systému, z kterého jsou nanočástice vytvořené, nemá pozorovatelný vliv na změnu časových konstant a jejich vzájemné zastoupení.

Tabulka 18 Doba života fluorescence nanočástic látek DPA-DPS-V a DPA-DPS-IOO v různých objemových poměrech

NP systému G1H1	Obj. poměr	τ_1 (ns)	B_1 (%)	τ_2 (ns)	B_2 (%)	τ_3 (ns)	B_3 (%)	χ^2 (-)
	1:10	1,38	50,22	4,02	30,97	13,5	18,81	1,19
	1:75	1,06	42,76	3,59	43,00	15,83	14,25	1,28

Pro měření doby života fluorescence nanočástic vytvořených ze systému G1H2 byly vybrány dva objemové poměry 1:10, 1:75 jakožto dva extrémní zástupci na obou stranách. Při měření obou poměrů byla zvolena excitace při vlnové délce 389 nm, emise byla měřena při vlnové délce 695 nm. Dle tabulky 19 můžeme usuzovat, že nanočástice G1H2 jsou charakteristické multiexponenciální fluorescencí, která s největší pravděpodobností svědčí o přítomnosti různých excitovaných stavů. Tyto stavy pocházející zejména ze vzájemných interakcí molekul G1 a H2 v základním a excitovaném stavu jsou typické pro molekulární agregáty, kterými nanočástice jsou. Tři časy fluorescence tedy potvrzují přítomnost nanočástic (agregátů).

Oba systémy nanočástic G1H2 jsou charakterizovány třemi časy τ , které se pohybují v rozmezí 0,6–1,3 ns pro nejkratší čas, 2,5–3,7 ns pro druhý čas, a 7,6–12,6 ns pro nejdelší čas. Relativní zastoupení všech časů je v případě obou poměrů velmi podobné. Čas τ_1 je relativně zastoupen v rozmezí 16,8–24,9 %, čas τ_2 v rozmezí 61,6–66 % a čas τ_3 v rozmezí 17–13,5 %. Měnící se poměr látek G1 a H1 v systému nanočástic nemá pozorovatelný vliv na změnu časů τ_1 , τ_2 , τ_3 a jejich vzájemné zastoupení.

Tabulka 19 Doba života fluorescence nanočástic látek DPA-DPS-V(COOMe)₂ a DPA-DPS-IOO v různých objemových poměrech

NP systému G1H2	Obj. poměr	τ_1 (ns)	B_1 (%)	τ_2 (ns)	B_2 (%)	τ_3 (ns)	B_3 (%)	χ^2 (-)
	1:10	0,62	16,81	2,48	66,06	7,61	17,13	1,33
	1:75	1,28	24,86	3,74	61,57	12,62	13,57	1,29

3.3.3 Doba života fluorescence studovaných látek v pevné fázi

Výsledné hodnoty z měření doby života fluorescence samotných látek v pevné fázi můžeme vidět v tabulce 20. Doba života fluorescence byla měřená pro látku G1 při excitační vlnové délce 508 nm a emisní vlnové délce 685 nm, pro látku H1 při excitační vlnové délce 389 nm a emisní vlnové délce 475 nm, a pro látku H2 při excitační vlnové délce 452 nm a emisní vlnové délce 574 nm. Každá látka v pevné fázi je charakteristická multiexponenciální fluorescencí, která svědčí o přítomnosti různých exponenciálních stavů. Látka G1 společně s látkou H1 jsou charakteristické třemi časy τ , látka H2 pouze dvěma časy τ . Výsledné časy τ_1 , τ_2 , τ_3 látky G1 dosahují hodnoty 0,06 ns, 0,82 ns, 2,03 ns, látky H1 0,8 ns, 2,93 ns, 5,77 ns, a látky H2 2,25 ns, 14,73 ns. Relativní zastoupení těchto časů je u jednotlivých látek velmi odlišné.

Tabulka 20 Doba života fluorescence jednotlivých látek v pevné fázi

Akronym	τ_1 (ns)	B ₁ (%)	τ_2 (ns)	B ₂ (%)	τ_3 (ns)	B ₃ (%)	χ^2 (-)
DPA-DPS-IOO (G1)	0,06	29	0,82	61	2,03	10	1,03
DPA-DPS-V (H1)	0,80	61,351	2,93	18,81	5,77	19,84	1,07
DPA-DPS-V(COOMe) ₂ (H2)	2,25	93	14,73	7	-	-	0,99

4 Závěr

V bakalářské práci byla diskutována problematika závislosti získaných spektrálních vlastností na struktuře studovaných π konjugovaných organických molekul, derivátů difenylstilbenu s elektron-donorovou skupinou difenylaminem (DPA-DPS) a odlišnou elektron-akceptorovou skupinou (indandionem -IOO, vinylem -V, di(methoxykarbonyl)vinylem -V(COOMe)₂). Cílem bylo pozorovat, zdali v rámci nanočástic vytvořených z *host-guest* systémů studovaných fluoroforů dochází k FRET a zvýšení fluorescence dopantu v blízké infračervené oblasti, jež je hodně žádaná v biozobrazovacích metodách.

Získané absorpční spektra látek DPA-DPS-V, DPA-DPS-V(COOMe)₂, DPA-DPS-IOO vykazovaly posun k vyšším vlnovým délkám v důsledku přibývajících síly elektron-akceptorové skupiny. Na fluorescenčních spektrech těchto látek byl možný pozorovat stejný trend posunu emisních maxim k vyšším vlnovým délkám. Bylo zjištěno, že látka DPA-DPS-IOO (G1) je jako jediná charakteristická fluorescencí v NIR oblasti (emisní maximum při 750 nm), ale nízkým kvantovým výtěžkem v pevné, práškové podobě (7 %). Proto byla v rámci *host-guest* systémů zvolena jako dopant (host).

Vzájemné interakce molekul v *host-guest* systémech a z nich vytvořených nanočástic se projeví výrazným Stokesovým posunem a posunutím absorpčních i fluorescenčních spekter k větším vlnovým délkám. U systémů hostitel-host v rozpouštědle THF nebyl pozorován výrazný Stokesův posun, spektra měla stejný tvar i polohu jako spektra čisté látky H1/H2 v THF. V systému G1H1 se fluorescence molekul G1 neprojevila vůbec (emisní maximum se shoduje s emisním maximem samotné látky H1), v systému G1H2 pouze málo. Různé molární poměry, tzn. různá molární množství látek G1 a H1/H2 nezpůsobily posun emisních maxim v závislosti na poměru. V těchto roztocích tedy nedochází k zvýšení fluorescence dopantu (G1) prostřednictvím FRET. Stejně tak se neprojevila i fluorescence dopantu (G1) v systémech G1H1/H2 rozpuštěných v THF, neboť je málo intenzivní sama o sobě.

Nanočástice systému G1H1 i G1H2 absorbovaly při přibližně stejné vlnové délce jako samotné *host-guest* systémy, tedy v oblasti absorpce matrice (hostitel). Avšak byl pozorován daleko větší Stokesův posun, konkrétně 279 nm u nanočástic systému G1H1 a 283 nm nanočástic G1H2. Fluorescenční spektra *host-guest* systémů G1H1, G1H2 a z nich vytvořených nanočástic se lišily svou intenzitou a maximem v závislosti na molárním poměru dopantu (G1) a matrice (H1/H2). Čím větší molární množství látky G1 se v roztoku nacházelo, tím větší byla intenzita fluorescence způsobená projevem látky G1, a tím docházelo k největšímu posunu do dlouhovlnné oblasti. Opět se projevila silnější elektron-akceptorová skupina molekuly H2, která byla důvodem posunu fluorescenčních spekter příslušejícího systému a nanočástic k větším vlnovým délkám.

U nanočástic vytvořených z obou systémů G1H2 i G1H1 jsme pozorovali FRET, který způsobil posun emisního spektra do dlouhovlnné oblasti. FRET byl účinnější u dvojice G1H2, protože H2 má vyšší kvantový výtěžek fluorescence a kratší dobu života (v práškové formě). FRET byl i potvrzen zvýšeným kvantovým výtěžkem v porovnání s kvantovým výtěžkem nanočástic připravených ze samotné látky DPA-DPS-IOO ze 3 % na přibližně 14 %. Zvýšení kvantového výtěžku nanočástic systému G1H1 bylo zanedbatelné – pouze ze 3 % na 5,35 %. Přenos zde nebyl tak významný než v případě nanočástic systému G1H2.

Výsledkem této bakalářské práce je tedy poznatek, že studované organické luminofory v podobě nanočástic připravené z *host-guest* systému G1H2 mají potenciál pro další zkoumání a využití v oblasti zobrazovacích metod jako případné fluorescenční sondy s dlouhovlnnou emisí. Podařilo se dokázat, že FRET může být způsob jakým dokážeme zvýšit fluorescenci fluoroforu v FR/NIR oblasti nad jeho standartní úroveň zvolením vhodné molekuly zastávající úlohu donoru energie v systému host-hostitel.

5 Citovaná literatura

- [1] GOLDYS, Ewa M. *Fluorescence Applications in Biotechnology and Life Sciences*. 1st edition. Wiley-Blackwell, 2009. ISBN 978-0-470-08370-3.
- [2] UENO, Tasuku a Tetsuo NAGANO. Fluorescent probes for sensing and imaging. *Nature Methods* [online]. 2011, **8**(8), 642-645 [cit. 2023-05-15]. ISSN 1548-7091. Dostupné z: doi:10.1038/nmeth.1663
- [3] GUO, Zhiqian, Sookil PARK, Juyoung YOON a Injae SHIN. Recent progress in the development of near-infrared fluorescent probes for bioimaging applications. *Chem. Soc. Rev* [online]. 2014, **43**(1), 16-29 [cit. 2023-05-15]. ISSN 0306-0012. Dostupné z: doi:10.1039/C3CS60271K
- [4] ESCOBEDO, Jorge, Oleksandr RUSIN, Soojin LIM a Robert STRONGIN. NIR dyes for bioimaging applications. *Current Opinion in Chemical Biology* [online]. 2010, **14**(1), 64-70 [cit. 2023-05-15]. ISSN 13675931. Dostupné z: doi:10.1016/j.cbpa.2009.10.022
- [5] DANG, Huiping a Lifeng YAN. Organic fluorescent nanoparticles with NIR-II emission for bioimaging and therapy. *Biomedical Materials* [online]. 2021, **16**(2) [cit. 2023-05-16]. ISSN 1748-6041. Dostupné z: doi:10.1088/1748-605X/abca4a
- [6] SANTRA, Swadeshmukul, Debamitra DUTTA, Glenn WALTER a Brij MOUDGIL. *Fluorescent Nanoparticle Probes for Cancer Imaging* [online]. 2005, **4**(6), 593-602 [cit. 2023-05-15]. ISSN 1533-0346. Dostupné z: doi:10.1177/153303460500400603
- [7] VALEUR, Bernard a Mário BERBERAN-SANTOS. A Brief History of Fluorescence and Phosphorescence before the Emergence of Quantum Theory. *Journal of Chemical Education* [online]. 2011, **88**(6), 731-738 [cit. 2023-05-15]. ISSN 0021-9584. Dostupné z: doi:10.1021/ed100182h
- [8] LAKOWICZ, Joseph R. Introduction to Fluorescence. *Principles of Fluorescence Spectroscopy* [online]. Boston, MA: Springer US, 1999, 1-23 [cit. 2023-05-15]. ISBN 978-1-4757-3063-0. Dostupné z: doi:10.1007/978-1-4757-3061-6_1
- [9] HERMAN, Brian. Fluorescence Microscopy. *Current Protocols in Cell Biology* [online]. 1998, **00**(1) [cit. 2023-05-15]. ISSN 1934-2500. Dostupné z: doi:10.1002/0471143030.cb0402s13
- [10] JAMESON, David M. *Introduction to fluorescence*. 1st edition. Boca Raton, 2015. ISBN 1439806055.
- [11] NEPRAŠ, Miloš a Miloš TITZ. *Základy teorie elektronových spekter: absorpční a luminiscenční spektra organických sloučenin v ultrafialové a viditelné oblasti světla.: Teoretická knižnice inženýra*. Praha: Státní nakladatelství technické literatury, 1983.
- [12] SCHWEIZER, Thorsten, Heiko KUBACH a Thomas KOCH. Investigations to characterize the interactions of light radiation, engine operating media and fluorescence tracers for the use of qualitative light-induced fluorescence in engine systems.

- Automotive and Engine Technology* [online]. 2021, **6**(3-4), 275-287 [cit. 2023-05-15]. ISSN 2365-5127. Dostupné z: doi:10.1007/s41104-021-00092-3
- [13] CLEGG, Robert M. Chapter 1 Förster resonance energy transfer—FRET what is it, why do it, and how it's done. *Fret and Flim Techniques* [online]. Elsevier, 2009, 1-57 [cit. 2023-05-15]. Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology. ISBN 9780080549583. Dostupné z: doi:10.1016/S0075-7535(08)00001-6
- [14] GRYCZYNSKI, Zygmunt a Ignacy GRYCZYNSKI. *Practical Fluorescence Spectroscopy* [online]. [cit. 2023-05-15]. Dostupné z: doi:10.1201/9781315374758
- [15] KRAMER, Horst a Peter FISCHER. The Scientific Work of Theodor Förster: A Brief Sketch of his Life and Personality. *ChemPhysChem* [online]. 2011, **12**(3), 555-558 [cit. 2023-05-15]. ISSN 1439-4235. Dostupné z: doi:10.1002/cphc.201000733
- [16] ŠIMKOVÁ, Eva a David STANĚK. Probing Nucleic Acid Interactions and Pre-mRNA Splicing by Förster Resonance Energy Transfer (FRET) Microscopy. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2012, **13**(12), 14929-14945 [cit. 2023-05-15]. ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms131114929
- [17] Schematic Diagram of Förster Resonance Energy Transfer. In: *LibreTexts Chemistry* [online]. [cit. 2023-05-15]. Dostupné z: https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Physical_and_Theoretical_Chemistry_Textbook_Maps/Supplemental_Modules_%28Physical_and_Theoretical_Chemistry%29/Fundamentals/Fluorescence_Resonance_Energy_Transfer
- [18] LOU, Xin-Yue, Nan SONG a Ying-Wei YANG. Fluorescence Resonance Energy Transfer Systems in Supramolecular Macrocyclic Chemistry. *Molecules* [online]. 2017, **22**(10) [cit. 2023-05-15]. ISSN 1420-3049. Dostupné z: doi:10.3390/molecules22101640
- [19] PISTON, David a Gert-Jan KREMERS. Fluorescent protein FRET: the good, the bad and the ugly. *Trends in Biochemical Sciences* [online]. 2007, **32**(9), 407-414 [cit. 2023-05-15]. ISSN 09680004. Dostupné z: doi:10.1016/j.tibs.2007.08.003
- [20] BROUSSARD, Joshua a Kathleen GREEN. Research Techniques Made Simple: Methodology and Applications of Förster Resonance Energy Transfer (FRET) Microscopy. *Journal of Investigative Dermatology* [online]. 2017, **137**(11), 185-191 [cit. 2023-05-20]. ISSN 0022202X. Dostupné z: doi:10.1016/j.jid.2017.09.006
- [21] ALBANI, Jihad René. *Principles and Applications of Fluorescence Spectroscopy* [online]. [cit. 2023-05-15]. Dostupné z: doi:10.1002/9780470692059
- [22] TURNER, George K. An Absolute Spectrofluorometer. *Science* [online]. 1964, **146**(3641), 183-189 [cit. 2023-05-15]. ISSN 0036-8075. Dostupné z: doi:10.1126/science.146.3641.183

- [23] BIRKS, J.B. Fluorescence quantum yield measurements. *Journal of Research of the National Bureau of Standards Section A: Physics and Chemistry* [online]. 1976, **80**(3) [cit. 2023-05-15]. ISSN 0022-4332. Dostupné z: doi:10.6028/jres.080A.038
- [24] BEREZIN, Mikhail a Samuel ACHILEFU. Fluorescence Lifetime Measurements and Biological Imaging. *Chemical Reviews* [online]. 2010, **110**(5), 2641-2684 [cit. 2023-05-15]. ISSN 0009-2665. Dostupné z: doi:10.1021/cr900343z
- [25] BECKER, W. Fluorescence lifetime imaging - techniques and applications. *Journal of Microscopy* [online]. 2012, **247**(2), 119-136 [cit. 2023-05-15]. ISSN 00222720. Dostupné z: doi:10.1111/j.1365-2818.2012.03618.x
- [26] GHOSH, Arindam, Narain KAREDLA, Jan THIELE, Ingo GREGOR a Jörg ENDERLEIN. Fluorescence lifetime correlation spectroscopy: Basics and applications. *Methods* [online]. 2018, **140-141**, 32-39 [cit. 2023-05-15]. ISSN 10462023. Dostupné z: doi:10.1016/j.ymeth.2018.02.009
- [27] YANG, Xi, Di YUAN, Jinhong HOU, Adam SEDGWICK, Suying XU, Tony JAMES a Leyu WANG. Organic/inorganic supramolecular nano-systems based on host/guest interactions. *Coordination Chemistry Reviews* [online]. 2021, **428** [cit. 2023-05-15]. ISSN 00108545. Dostupné z: doi:10.1016/j.ccr.2020.213609
- [28] LIU, Lei-Jing, Wen LIU, Guang JI, Zhi-Yuan WU, Bin XU, Jun QIAN a Wen-Jing TIAN. NIR Emission Nanoparticles Based on FRET Composed of AIE Luminogens and NIR Dyes for Two-photon Fluorescence Imaging. *Chinese Journal of Polymer Science* [online]. 2019, **37**(4), 401-408 [cit. 2023-05-15]. ISSN 0256-7679. Dostupné z: doi:10.1007/s10118-019-2206-3
- [29] ESCOBEDO, Jorge, Oleksandr RUSIN, Soojin LIM a Robert STRONGIN. NIR dyes for bioimaging applications. *Current Opinion in Chemical Biology* [online]. 2010, **14**(1), 64-70 [cit. 2023-05-15]. ISSN 13675931. Dostupné z: doi:10.1016/j.cbpa.2009.10.022
- [30] ABID, Namra, Aqib KHAN, Sara SHUJAIT et al. Synthesis of nanomaterials using various top-down and bottom-up approaches, influencing factors, advantages, and disadvantages: A review. *Advances in Colloid and Interface Science* [online]. 2022, **300** [cit. 2023-05-15]. ISSN 00018686. Dostupné z: doi:10.1016/j.cis.2021.102597
- [31] KHAN, Ibrahim, Khalid SAEED a Idrees KHAN. Nanoparticles: Properties, applications and toxicities. *Arabian Journal of Chemistry* [online]. 2019, **12**(7), 908-931 [cit. 2023-05-15]. ISSN 18785352. Dostupné z: doi:10.1016/j.arabjc.2017.05.011
- [32] FERY-FORGUES, Suzanne. Fluorescent organic nanocrystals and non-doped nanoparticles for biological applications. *Nanoscale* [online]. 2013, **5**(18) [cit. 2023-05-15]. ISSN 2040-3364. Dostupné z: doi:10.1039/c3nr02657d
- [33] ABID, Namra, Aqib KHAN, Sara SHUJAIT et al. Synthesis of nanomaterials using various top-down and bottom-up approaches, influencing factors, advantages, and

- disadvantages: A review. *Advances in Colloid and Interface Science* [online]. 2022, **300** [cit. 2023-05-15]. ISSN 00018686. Dostupné z: doi:10.1016/j.cis.2021.102597
- [34] FANG, Fang, Min LI, Jinfeng ZHANG a Chun-Sing LEE. Different Strategies for Organic Nanoparticle Preparation in Biomedicine. *ACS Materials Letters* [online]. 2020, **2**(5), 531-549 [cit. 2023-05-15]. ISSN 2639-4979. Dostupné z: doi:10.1021/acsmaterialslett.0c00078
- [35] CHENG, Hong-Bo, Yuanyuan LI, Ben TANG a Juyoung YOON. Assembly strategies of organic-based imaging agents for fluorescence and photoacoustic bioimaging applications. *Chemical Society Reviews* [online]. 2020, **49**(1), 21-31 [cit. 2023-05-15]. ISSN 0306-0012. Dostupné z: doi:10.1039/C9CS00326F
- [36] PULINGAM, Thiruchelvi, Parisa FOROOZANDEH, Jo-Ann CHUAH a Kumar SUDESH. Exploring Various Techniques for the Chemical and Biological Synthesis of Polymeric Nanoparticles. *Nanomaterials* [online]. 2022, **12**(3) [cit. 2023-05-15]. ISSN 2079-4991. Dostupné z: doi:10.3390/nano12030576
- [37] BHATTACHARJEE, Sourav. DLS and zeta potential – What they are and what they are not?. *Journal of Controlled Release* [online]. 2016, **235**, 337-351 [cit. 2023-05-15]. ISSN 01683659. Dostupné z: doi:10.1016/j.jconrel.2016.06.017
- [38] STETEFELD, Jörg, Sean MCKENNA a Trushar PATEL. Dynamic light scattering: a practical guide and applications in biomedical sciences. *Biophysical Reviews* [online]. 2016, **8**(4), 409-427 [cit. 2023-05-15]. ISSN 1867-2450. Dostupné z: doi:10.1007/s12551-016-0218-6
- [39] BABICK, Frank. Dynamic light scattering (DLS). *Characterization of Nanoparticles* [online]. Elsevier, 2020, 137-172 [cit. 2023-05-15]. ISBN 9780128141823. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-814182-3.00010-9
- [40] CLOGSTON, Jeffrey a Anil PATRI. Zeta Potential Measurement. *Characterization of Nanoparticles Intended for Drug Delivery* [online]. Totowa, NJ: Humana Press, 2011, 63-70 [cit. 2023-05-15]. Methods in Molecular Biology. ISBN 978-1-60327-197-4. Dostupné z: doi:10.1007/978-1-60327-198-1_6
- [41] XU, Renliang. Progress in nanoparticles characterization: Sizing and zeta potential measurement. *Particuology* [online]. 2008, **6**(2), 112-115 [cit. 2023-05-15]. ISSN 16742001. Dostupné z: doi:10.1016/j.partic.2007.12.002
- [42] SHI, Jingyu, Feng TIAN, Jing LYU a Mo YANG. Nanoparticle based fluorescence resonance energy transfer (FRET) for biosensing applications. *Journal of Materials Chemistry B* [online]. 2015, **3**(35), 6989-7005 [cit. 2023-05-15]. ISSN 2050-750X. Dostupné z: doi:10.1039/C5TB00885A
- [43] KAEOKHAMLOED, Norraseth, Samuel LEGEAY a Emilie ROGER. FRET as the tool for in vivo nanomedicine tracking. *Journal of Controlled Release* [online]. 2022, **349**, 156-173 [cit. 2023-05-15]. ISSN 01683659. Dostupné z: doi:10.1016/j.jconrel.2022.06.048

- [44] PRIEM, Bram, Cheng TIAN, Jun TANG, Yiming ZHAO a Willem MULDER. Fluorescent nanoparticles for the accurate detection of drug delivery. *Expert Opinion on Drug Delivery* [online]. 2015, **12**(12), 1881-1894 [cit. 2023-05-15]. ISSN 1742-5247. Dostupné z: doi:10.1517/17425247.2015.1074567
- [45] HONG, Guosong, Alexander ANTARIS a Hongjie DAI. Near-infrared fluorophores for biomedical imaging. *Nature Biomedical Engineering* [online]. 2017, **1**(1) [cit. 2023-05-15]. ISSN 2157-846X. Dostupné z: doi:10.1038/s41551-016-0010
- [46] YU, Jia, Xiujuan ZHANG, Xiaojun HAO, Xiaohong ZHANG, Mengjiao ZHOU, Chun-Sing LEE a Xianfeng CHEN. Near-infrared fluorescence imaging using organic dye nanoparticles. *Biomaterials* [online]. 2014, **35**(10), 3356-3364 [cit. 2023-05-15]. ISSN 01429612. Dostupné z: doi:10.1016/j.biomaterials.2014.01.004
- [47] XIAO, Fuming, Heqi GAO, Yunxiang LEI et al. Guest-host doped strategy for constructing ultralong-lifetime near-infrared organic phosphorescence materials for bioimaging. *Nature Communications* [online]. 2022, **13**(1) [cit. 2023-05-15]. ISSN 2041-1723. Dostupné z: doi:10.1038/s41467-021-27914-0
- [48] HUO, Man, Xian-Yin DAI a Yu LIU. Ultralarge Stokes Shift Phosphorescence Artificial Harvesting Supramolecular System with Near-Infrared Emission. *Advanced Science* [online]. 2022, **9**(22) [cit. 2023-05-15]. ISSN 2198-3844. Dostupné z: doi:10.1002/advs.202201523
- [49] PAUK, Karel, Stanislav LUŇÁK, Aleš RŮŽIČKA et al. Colour-tuneable solid-state fluorescence of crystalline powders formed from push–pull substituted 2,5-diphenylstilbenes. *RSC Advances* [online]. 2022, **12**(54), 34797-34807 [cit. 2023-05-15]. ISSN 2046-2069. Dostupné z: doi:10.1039/D2RA05593G

6 Seznam zkratek

atd.	a tak dále
tzv.	tak zvaně
např.	například
tj.	to znamená
apod.	a podobně
HG	host-guest systém (systém hostitel-host)
NP	nanočástice
FRET	Försterův rezonanční přenos energie
RET	rezonanční přenos energie
D	donor
A	akceptor
DA	donor-akceptorový pár
NIR	blízká infračervená oblast
UV	ultrafialový
ζ	zeta potenciál
THF	tetrahydrofuran
FR	daleko červená oblast spektra
HOMO	nejvyšší obsazený molekulový orbital
LUMO	nejnižší obsazený molekulový orbital
S_0	základní singletový stav
S_1	první excitovaný singletový stav
S_2	druhý excitovaný singletový stav
T_1	excitovaný tripletový stav
λ_{\max}	hodnota vlnové délky v maximu absorbance
λ	vlnová délka
n	molární poměr
c	koncentrace
V	objem
Φ	kvantový výtěžek
DPA-DPS	difenylamin difenylstilben
H	hostitel
G	host
A	absorbance
DLS	dynamický rozptyl světla (dynamic light scattering)
ICT	intramolekulární přenos náboje (intramolecular charge transfer)
PDI	polydisperzní index