



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

**PŘÍPRAVA LUMINISCENČNÍCH NANOČÁSTIC PRO 3D
ZOBRAZOVÁNÍ**

PREPARATION OF LUMINESCENT NANOPARTICLES FOR 3D IMAGING

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Rastislav Smolka

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

doc. Mgr. Martin Vala, Ph.D.

BRNO 2019

Zadání bakalářské práce

Číslo práce: FCH-BAK1407/2018 Akademický rok: 2018/19
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie
Student: **Rastislav Smolka**
Studijní program: Chemie a chemické technologie
Studijní obor: Chemie pro medicínské aplikace
Vedoucí práce: **doc. Mgr. Martin Vala, Ph.D.**

Název bakalářské práce:

Příprava luminiscenčních nanočástic pro 3D zobrazování

Zadání bakalářské práce:

Práce bude zaměřena na studium vhodné metodiky přípravy nanočástic vykazujících luminiscenci. Cílem bude nalézt vhodné kandidáty pro 3D mikroskopii biologických preparátů pomocí multifotonové absorpce. V práci bude zkoumán vliv modifikace přípravy nanočástic na fotofyzikální vlastnosti a absorpční a fluorescenční spektra v závislosti na vlastnostech prostředí. V práci je možné následně pokračovat stanovováním multifotonového absorpčního průřezu připravených nanočástic pomocí unikátní laserové aparatury.

Termín odevzdání bakalářské práce: 24.5.2019:

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

Rastislav Smolka
student(ka)

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

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2019

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

ABSTRAKT

Cieľom tejto bakalárskej práce je štúdium vhodnej metodiky prípravy luminiscenčných nanočastíc a charakterizácia ich optických vlastností spojených s rôznymi fyzikálnymi vlastnosťami prostredia. Tak isto aj ich prípadným využitím ako prostriedkov na sledovanie biologických preparátov v 3D mikroskopii pomocou multifotónovej absorpcie. Práca sa zaoberá najmä nanočasticami pripravenými z *N,N*-difenylamino-2,5-difenyl-1,4-distyrylbenzen kyanidu a štúdiom ich fluorescenčných a absorpčných spektier. Pomocou metódy dynamického rozptylu svetla a pomocou fluorescenčnej spektroskopie je pozorovaná závislosť veľkosti pripravených nanočastíc, zmena ich fluorescenčných vlastností a zmena kvantového výťažku v závislosti na meniacich sa vlastnostiach prostredia. Dáta z multifotónových absorpčných meraní preukazujú, že táto látka vykazuje odozvu na multifotónovú excitáciu. V práci bolo preukázané, že táto látka si zachováva svoje unikátne fluorescenčné vlastnosti aj vo forme nanočastíc a javí sa teda ako vhodný kandidát pre pozorovanie biologických preparátov pomocou multifotónovej fluorescenčnej mikroskopie. Ďalším pokračovaním tejto práce by preto mohlo byť samotné stanovenie celkového multifotónového absorpčného prierezu týchto pripravených nanočastíc.

ABSTRACT

The aim of this bachelor thesis was to study a suitable methodology for the preparation of fluminiscent nanoparticles and to characterize their optical properties associated with various physical properties of environment. Also, their potential use as a means of monitoring biological preparations in 3D microscopy using multiphoton absorption. In particular, we deal with nanoparticles prepared from *N,N*-diphenylamino-2,5-diphenyl-1,4-distyrylbenzene cyanide and their fluorescence and absorption spectra. Using the dynamic light scattering method and fluorescence spectroscopy, the dependence of the size of the prepared nanoparticles, the change in their fluorescence properties and the change in the quantum yield is observed, depending on the changing environmental properties. Data from multifoton absorption measurements demonstrate that this substance responds to multifoton excitation. It has been shown that this substance retains its unique fluorescence properties also in the form of nanoparticles and thus appears to be a suitable candidate for the observation of biological preparations using multifoton fluorescence microscopy. Therefore, the continuation of this work could be the mere determination of the total multifoton absorption cross section of these prepared nanoparticles.

KLÚČOVÉ SLOVÁ

Fluorescenčné organické nanočastice, fluorescencia, časovo rozlíšená fluorescencia, dynamický rozptyl svetla, dvojfotónová absorpcia

KEY WORDS

Fluorescent organic nanoparticles, fluorescence, time-resolved fluorescence, dynamic light scattering, two-photon absorption

SMOLKA, Rastislav. *Příprava luminiscenčních nanočástic pro 3D zobrazování*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav fyzikální a spotřební chemie, 2019. 37s. Vedúci bakalárskej práce doc. Mgr. Martin Vala, Ph.D.

ČESTNÉ PREHLÁSENIE

Prehlasujem, že som bakalársku prácu vypracoval samostatne a že všetky použité literárne zdroje som správne a úplne citoval. Bakalárska práca je z hľadiska obsahu majetkom Fakulty chemickej VUT v Brne a môže byť využitá ku komerčným účelom len zo súhlasom vedúceho bakalárskej práce a dekana FCH VUT

.....

podpis študenta

POĎAKOVANIE

V prvom rade by som chcel poďakovať svojmu vedúcemu bakalárskej práce, pánovi doc. Mgr. Martinovi Valovi, Ph.D za jeho odborný dohľad, pomoc a prístup. Ďalej by som chcel taktiež poďakovať aj môjmu konzultantovi, doktorandovi Ing. Matoušovi Kratochvílovi za jeho neoceniteľnú pomoc pri práci v laboratóriu, za jeho čas a zhovievavosť.

OBSAH

1 Úvod	6
2 Teoretická časť	7
2.1 Fluorescenčné organické nanočastice.....	7
2.1.1 Využitie organických nanočastíc	7
2.1.2 Metódy prípravy nanočastíc	7
2.2 Fotoluminiscencia.....	8
2.2.1 Jablónského diagram	9
2.2.2 Franck-Condonov princíp a Stokesov posun	10
2.2.3 Limitácie fluorescenčných meraní	10
2.2.4 Kvantový výťažok fluorescencie.....	11
2.2.5 Doba života fluorescencie	12
2.3 Dynamický rozptyl svetla.....	12
2.4 Dvojfotónová absorpcia žiarenia.....	13
2.5 Súčasný stav riešenej problematiky.....	15
3 Experimentálna časť	17
3.1 Použité prístroje a pomôcky	17
3.2 Použité chemikálie.....	17
3.3 Príprava zásobného roztoku a roztokov nanočastíc.....	17
4 Výsledky a diskusia	19
4.1 Charakterizácia nanočastíc	19
4.1.1 UV-VIS spektroskopia	19
4.1.2 Veľkosť častíc	21
4.1.3 Fluorescenčná spektroskopia.....	23
4.1.4 Kvantový výťažok fluorescencie.....	25
4.1.5 Doba života fluorescencie	26
4.1.6 Stabilita pripravených nanočastíc.....	28
4.1.7 Dvojfotónovo excitovaná fluorescencia.....	30
5 Záver	33
6 Zdroje.....	34
7 Zoznam použitých skratiek.....	37

1 ÚVOD

Organické nanočastice, najmä tie vykazujúce fluorescenčné vlastnosti, pripravené z malých organických molekúl v poslednej dobe prilákali zvýšenú pozornosť práve kvôli svojej jednoduchosti, dostupnosti a jedinečným optoelektronickým vlastnostiam. Pre aplikáciu v oblasti zobrazovacích techník sú najvhodnejšie predovšetkým organické molekuly a π -konjugované polyméry charakteristické svojou multifotónovou aktivitou, čiže emisiou žiarenia indukovanou súčasnou absorpciou viacerých fotónov. Vo vývoji takýchto nanočastíc a najmä v ich príprave boli zaznamenané určité pokroky, ale aj napriek tomu, na rozdiel od anorganických nanočastíc, téma organických nanočastíc ja stále málo preskúmaná [1, 2, 3].

Využitie organických molekúl na stavbu nanočastíc so sebou prináša veľké množstvo výhod. Organické molekuly sa vyznačujú predovšetkým svojou modifikovateľnosťou a potencionálnou biokompatibilitou. Pomerne jednoduchými chemickými reakciami a postupmi je možné z jedinej východiskovej látky pripraviť široké spektrum derivátov s rôznymi vlastnosťami. Vlastnosti môžu byť cielene podporené alebo potlačené. Nevýhodou takýchto molekúl je však ich obmedzená rozpustnosť v biologicky prijateľnom prostredí, čo značne komplikuje ich využiteľnosť v biomedicíne. To je dôvod, prečo je dôležité sa zaoberať práve prípravou organických nanočastíc tvoriacich stabilnú suspenziu vo vodnom roztoku [4, 5, 6].

Dôležitým krokom, okrem samotnej prípravy organických nanočastíc, je pozorovanie ich vlastností a ich charakterizácia. Na tento účel slúžia najmä techniky zaoberajúce sa lineárnymi a nelineárnymi optickými vlastnosťami, ako napríklad fluorescenčná spektroskopia, časovo rozlíšená spektroskopia a multifotónová mikroskopia. V neposlednom rade, dôležitým nástrojom pre charakterizáciu suspenzií nanočastíc je metóda dynamického rozptylu svetla, ktorá nám poskytuje informácie o veľkosti častíc vyskytujúcich sa v systéme [1, 2].

Z hľadiska zamerania tejto práce má najväčší význam práve jav multifotónovej absorpcie, fluorescencie a najmä jeho využitie pri pozorovaní a analýze biologických systémov. Technika multifotónovej mikroskopie sa vyznačuje mnohými výhodami. Ako jedna z mála techník poskytuje možnosť sledovanie živých systémov v reálnom čase, *in vivo*, *in vitro* aj *in situ*. Je to nedeštruktívna metóda umožňujúca zobrazovanie živého tkaniva do hĺbky, ktorú nie je možné dosiahnuť bežnou fluorescenčnou alebo konfokálnou mikroskopiou. Excitačné lasery pracujú výhradne v blízkej infračervenej oblasti spektra a to znamená, že použité infračervené žiarenie veľmi dobre preniká okolitým tkanivom. Tým sa zvyšuje penetračná hĺbka, ktorá dosahuje až hodnoty jedného milimetru, a taktiež potláča rušivý vplyv pozadia. Použitím tejto techniky sa minimalizuje poškodenie biologických systémov mnohonásobným použitím excitačného žiarenia. Preto je vhodná v kombinácii s laserovou skenovacou technológiou, čo umožňuje vizualizáciu fluorescencie vo forme 3D mapy. V dôsledku toho, že fotovybieľovanie a fototoxicita obmedzujú použitie klasickej fluorescenčnej mikroskopie, sa vlastnosti tejto metódy ukázali byť kľúčovými v mnohých oblastiach pozorovania biologických systémov [1, 3, 7].

2 TEORETICKÁ ČASŤ

2.1 Fluorescenčné organické nanočastice

Fluorescenčné organické nanočastice (FON) sú organické molekuly s prítomným systémom konjugovaných dvojitých väzieb. Prítomnosť tohto π -konjugovaného systému má za následok pomerne jednoduchú možnosť modifikácie ich optických a elektrických vlastností. Jednou z potencionálne najužitočnejších optických vlastností takýchto nanočastíc je práve dvojfotónová absorpcia. V porovnaní s konvenčnými nanočasticami pozostávajúcimi z rôznych anorganických molekúl a kovov majú tieto organické nanočastice niekoľko výhod. Ich vlastnosti sa dajú pomerne ľahko ovplyvniť a to modifikáciou ich štruktúry, prípadne prídavkom rôznych funkčných skupín v procese syntézy. Syntéza vhodných molekúl na tvorbu takýchto nanočastíc je však o niečo náročnejšia. Často sa pozostáva z mnohých krokov a vyžaduje prítomnosť špecifických katalyzátorov. Pri syntéze ale môžu byť taktiež použité rôzne fluorescenčné materiály, ako napríklad malé fluorescenčné molekuly, oligoméry alebo fluorescenčné polyméry [1, 2, 3, 4].

2.1.1 Využitie organických nanočastíc

Fluorescenčné organické nanočastice majú potencionálne využitie najmä v oblasti elektroniky, fotoniky a polovodičových súčiastok na úrovni nanočastíc. Taktiež by takéto častice mohli nájsť uplatnenie vo forme fotokatalyzátorov a fluorescenčných senzorov pre analýzu biologických vzoriek molekúl a taktiež znečisťujúcich látok. V oblasti farmaceutických vied a biológie by mohli nájsť využitie ako nosičové systémy pre prenos a cieleňú distribúciu farbív na značenie buniek [2, 5, 6].

2.1.2 Metódy prípravy nanočastíc

Medzi obvykle používané metódy prípravy nanočastíc patria metódy ako bottom-up a top-down. Cieľom týchto metód je kontrolovane vytvárať nanočastice s rovnakým tvarom a rovnakou veľkosťou. Prístup prípravy bottom-up, označovaný ako prístup zdola nahor, začína usporiadaním samotných atómov látky do vyšších funkčných nanoštruktúr. Tie potom ďalej tvoria hlavné súčasti komplikovanejších systémov. Táto metóda sa prirodzene uplatňuje najmä v prírode okolo nás, kde na podobnom princípe funguje vytváranie biologických štruktúr. Metóda je založená na využívaní kontrolovateľných chemických reakcií, ktorými je možné pripraviť častice o veľkosti asi 2–10 nm. Príprava takýchto častíc môže prebiehať v roztokoch, ale aj v plynnej fáze, napríklad za využitia chemickej depozície v plynnej fáze (CVD), plazmová alebo plameňová syntéza a pod. Postup top-down, označovaný ako postup zhora dolu, je charakteristický tým, že do nanosveta sa dostávame z makrosveta. Jedná sa o fyzikálny postup pri ktorom využívame objekty z makrosveta, s ktorými sa jednoducho manipuluje. Metóda ďalej pozostáva zo súboru krokov, ktorých cieľom je vstupné objekty znižovať a postupne dostať ich veľkosť na požadovanú hodnotu nanosveta, čo je približne 10–100 nm. Metóda zahrňuje rôzne postupy ako napríklad pôsobenie ultrazvuku, drtenie, mletie atď. Tieto metódy prípravy nanočastíc sú však vhodnejšie pri príprave častíc z anorganických látok [7, 8, 9].

Pri príprave organických fluorescenčných nanočastíc sa využíva princípu samousporiadavania. Tento proces je relatívne jednoduchý a je ho možné aplikovať na široké spektrum materiálov. Jednou z možností je napríklad zmiešanie opačne nabitých fluorescenčných molekúl spolu s vhodným spojovacím činidlom v správnom pomere. Nanočastice sa vytvoria samé vplyvom rôznych medzimolekulových interakcií a to prostredníctvom elektrostatických interakcií, vodíkových mostíkov, hydrofóbných interakcií, ale taktiež prostredníctvom kovalentnej väzby. Takýto spôsob prípravy nanočastíc však má často za následok zníženie ich fluorescencie alebo ovplyvnenie ich fotochemickej stability. Na prípravu organických fluorescenčných nanočastíc sa v širokej miere využíva aj zrážacia metóda. Táto metóda spočíva vo vyzrážaní nanočastíc prídavkom rozpúšťadla, v ktorom nanočastice už naďalej nie sú rozpustné. Najčastejšie je východným roztokom roztok hydrofóbnej zlúčeniny rozpustenej v nepolárnom rozpúšťadle. Do takto pripraveného roztoku sa za stáleho miešania vpraví, veľké množstvo polárneho rozpúšťadla, najčastejšie vody. Miešanie zmesi urýchli proces zrážania častíc zlúčeniny vo forme nanoagregátov prípadne nanokryštálov. Takýmto spôsobom dokážu byť získané nanočastice s rôznymi optickými vlastnosťami [2, 5, 10].

2.2 Fotoluminiscencia

Fotoluminiscencii predchádza proces excitácie molekúl prostredníctvom absorpcie elektromagnetického žiarenia o vhodnej vlnovej dĺžke. Tieto molekuly sú najmä molekuly látok so systémom konjugovaných dvojitych väzieb, aromatické zlúčeniny, heterocyklické zlúčeniny alebo organkovové zlúčeniny. Molekuly sa zvyčajne nachádzajú v základnom stave, čiže v energeticky najnižšom stave, s elektrónom lokalizovaným na základnej singletovej hladine S_0 . Po absorpcii žiarenia o vhodnej vlnovej dĺžke dochádza k presunu elektrónu zo základného stavu do energeticky vyššieho stavu, pričom absorbovaná energia musí byť rovná rozdielu základného a nového excitovaného stavu. Prvým z nich je singletový stav (S_1), v ktorom sú spiny oboch elektrónov antiparalelné. Z kvantovo-mechanického hľadiska je vytvorenie singletového excitovaného stavu najpravdepodobnejšie. Druhým typom je tripletový stav (T_1). V tomto prípade sú spiny oboch elektrónov paralelné [10, 11, 12, 13].

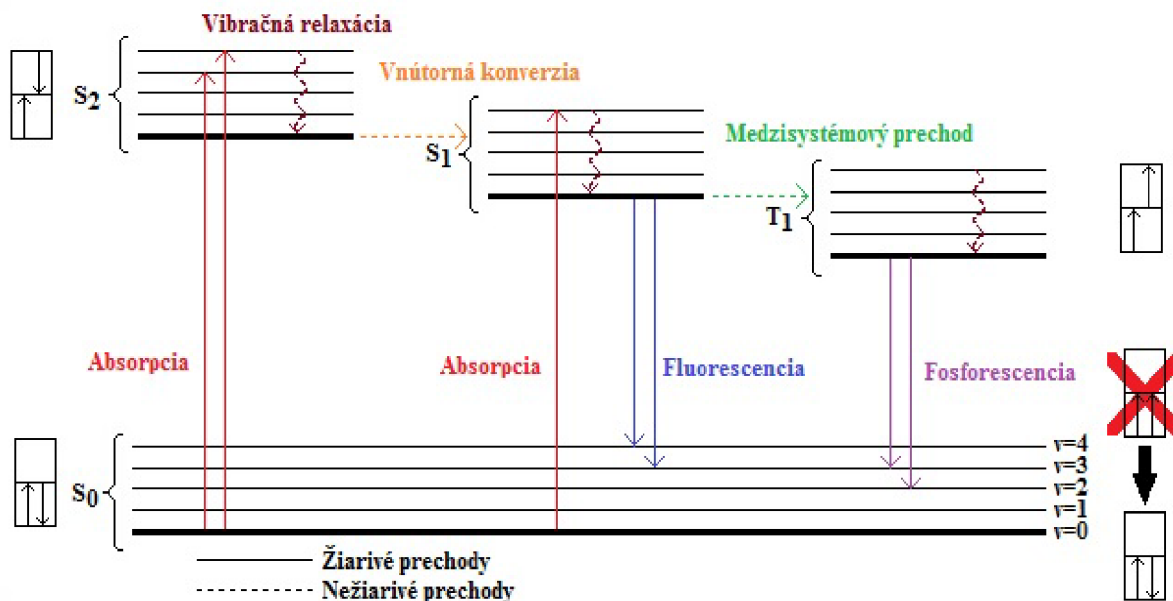
Pri prechode systému z excitovaného stavu do stavu s nižšou energiou dochádza k emisi žiarenia. Tento jav sa nazýva fluorescencia. Objavuje sa v jednoduchých, aj v komplexnejších systémoch, či už vo fáze plynnej, kvapalnej alebo pevnej. Fluorescencia je sekundárne žiarenie, ktoré je charakteristické tým, že dochádza k vyžiareniu energie vo veľmi krátkej dobe, rádovo 10^{-9} s až 10^{-6} s. Emitované žiarenie je vyžiarené molekulou, ktorá energiu pohltila. Jedná sa o prechod z prvého singletového stavu (S_1) do základnej hladiny (S_0). Fluorescencia bola pomenovaná podľa minerálu fluoritu čiže kazivca, u ktorého bol tento jav prvýkrát pozorovaný. U anorganických zlúčenín je fluorescencia pozorovaná len veľmi zriedkavo. Častejšie je teda možné pozorovať fluorescenciu u organických látok, z ktorých sú najčastejšie používané zlúčeniny obsahujúce aromatické cykly. Základné charakteristiky fluorescencie sú najmä intenzita, spektrálne zloženie, polarizácia, doba dohasínania a rôzne koherenčné vlastnosti. Najvýraznejší príklad fluorescencie nastáva, keď je absorpčné žiarenie v ultrafialovej oblasti spektra a teda neviditeľné pre ľudské oko, zatiaľ čo emitované svetlo je vo viditeľnej oblasti,

čo dáva fluorescenčnej látke zreteľnú farbu, ktorú možno vidieť len pri vystavení UV žiareniu [11, 12].

Dôležitým parametrom fluorescencie je jej intenzita. Intenzita fluorescencie je úmerná intenzite násobenej kvantovým výťažkom fluorescencie. Fluorescencia sa musí merať pod presným uhlom, aby sa zamedzilo ovplyvneniu výsledkov prípadnou nesúmernosťou systému. Vďaka použitiu citlivých fotonásobičov na detekciu fluorescenčného žiarenia a pri intenzívnom osvetlení vzorky môže byť detekovaná aj veľmi nízka koncentrácia fluoreskujúcich látok. Kvôli citlivosti, ktorú metóda poskytuje, je možné merať koncentrácie až 10^{-12} mol/l čo je prinajmenšom o 4 rády vyššia citlivosť, než pri absorpčnom meraní. V dôsledku toho, že kvantový výťažok fluorescencie roztokov zložitejších molekúl je zvyčajne nezávislý na vlnovej dĺžke excitačného žiarenia, je excitačné spektrum fluorescencie zriedených roztokov presnou kópiou ich absorpčného spektra a tak je možné spektrofluorimetricky získať absorpčné spektrum látky pri oveľa nižšej koncentrácii ako v prípade merania absorpcie na spektrofotometri [11, 13].

2.2.1 Jablónského diagram

Fotofyziku organických molekúl prehľadne ilustruje Jablónskiho diagram (*Obrázok 1*). Jeho základné schéma tvorí zobrazenie relatívnych energií molekúl v základnej a excitovanej forme. Procesy, pri ktorých nedochádza k emisii viditeľného žiarenia sa uskutočňujú medzi vibračne-rotačnými hladinami rôznych elektrónových stavov. Pri týchto procesoch sa nemení celková energia systému. Tieto nežiarivé procesy sú v diagrame rôzne označené, podľa toho, akým mechanizmom sa uskutočňujú. Relaxácia excitovaného stavu do jeho najnižšieho vibračného stavu je nazývaná vibračná relaxácia. Tento proces zahŕňa rozptýlenie energie z molekuly do jej okolia a preto sa nemôže vyskytovať u osamostatnených molekúl. Ďalším typom nežiarivého prechodu je tzv. vnútorná konverzia, kedy dochádza k tomu, že vibračný stav elektricky vyššieho stavu sa môže spájať s vibračným stavom nižšieho elektrónického stavu. Tretím typom je prechod medzi systémový, medzi-systémový prechod. Je to prechod na stav s inou multiplicitou spinu. Tento prechod môže byť nasledovaný fosforescenciou. Procesy, pri ktorých sa mení celková energia systému, sú označené priamymi šípkami. Tieto procesy sú žiarivé procesy, zahŕňajúce absorpciu, ktorá sa uskutočňuje pri prechode do vyššieho energetického stavu alebo emisiu, pri ktorej dochádza k uvoľneniu žiarenia vo forme fotónu. Diagram je pomenovaný po poľskom fyzikovi Aleksanderovi Jablónskim [11].



Obrázok 1: Jablonskiho diagram popisujúci jednotlivé žiarivé a nežiarivé prechody medzi rôznymi energetickými hladinami

2.2.2 Franck-Condonov princíp a Stokesov posun

Franck-Condonov princíp charakterizuje intenzitu vibračných prechodov vo vnútri molekuly. Pri prechode elektrónov medzi jednotlivými energetickými hladinami spôsobeného napríklad ionizáciou, jadrová konfigurácia ostáva nezmenená. Toto je spôsobené tým, že hmotnosti elektrónov v obale a jadier atómov sú výrazne odlišné. Prechod elektrónov je preto omnoho rýchlejší ako odozva jadier. V excitovanom stave tak dochádza k zmene hustoty elektrónov na rôznych miestach v molekule. Na pôvodne stacionárne jadrá tak začne pôsobiť nová sila, ktorá zapríčini vibráciu jadier. K relaxačnej vibrácii preto dochádza až po tom, čo na novú elektrónovú konfiguráciu zareaguje aj jadro atómu. V prípade, že okolie chromoforu tvorí polárne prostredie a ak excitovaný stav je charakteristický väčším dipólom než základný stav, tak energia tohto excitovaného stavu je v dôsledku relaxácie rozpúšťadla znížená. Pretože hustota elektrónov a ich distribúcia v molekule je v excitovanom stave iná ako v základnom stave, tak aj orientácia molekúl rozpúšťadla v tesnej blízkosti chromoforu je rozdielna. Zníženie energie excitovaného stavu má potom za následok to, že energia emitovaného fotónu je nižšia, ako by sme predpokladali [13].

Počas vibračnej relaxácie, ktorá sa uskutočňuje v excitovanom stave, excitovaný elektrón prichádza o časť svojej energie. Pri deexcitácii tak dochádza k emitovaniu fotónu o nižšej energii, čiže o vyššej vlnovej dĺžke akú malo pôvodné absorbované žiarenie. Tým dochádza k charakteristickému posunu maxima žiarenia emitovaného voči maximu excitačného žiarenia. Tento posun sa nazýva Stokesov posun [13, 14, 15].

2.2.3 Limitácie fluorescenčných meraní

Pri meraní fluorescencie je dôležité brať do úvahy aj niektoré limitácie tohto merania. Medzi najvýraznejšie javy ovplyvňujúce kvalitu výsledkov patrí rozptyl excitačného žiarenia. Tento rozptyl je zapríčinený buď prítomnosťou molekúl samotného rozpúšťadla, tzv. Rayleighov rozptyl, alebo prítomnosťou malých častíc, tzv. Tyndallov rozptyl. Určitá časť excitačného

žiarenia môže byť taktiež absorbovaná molekulami rozpúšťadla. Výsledkom je prítomnosť nezanedbateľného rozptylu najmä pri väčších vlnových dĺžkach, vtedy sa jedná o tzv. Ramanov rozptyl. Ďalšou limitáciou je zhášanie fluorescence. Molekuly absorbujúce svetlo môžu absorbovať excitačné, ale aj emitované žiarenie, čo sa prejaví zhášaním fluorescence. Toto môže byť spôsobené príliš vysokou koncentráciou absorbujúcich molekúl v roztoku. Tento efekt sa tiež nazýva aj vnútorný filtračný efekt. Pri ďalšom zvyšovaní koncentrácie fluoroforu v roztoku dochádza k postupnému znižovaniu kvantového výťažku fluorescence. Medzi limitácie taktiež patrí charakteristická fotostabilita fluoroforu. Pri opakovanom a vysoko intenzívnom excitovaní dochádza, v prípade niektorých fluoroforov, k sérii fotochemických reakcií, ktoré postupne zapríčinia úpadok intenzity fluorescence [15, 16].

2.2.4 Kvantový výťažok fluorescence

Pri absorpcii fotónu fluoroforom dochádza k vytvoreniu excitovaného stavu s vyššou energiou. To, čo sa stane potom, má priamy súvis s povahou a štruktúrou fluoroforu, tak isto ako s fyzikálnymi vlastnosťami prostredia tvoreného rozpúšťadlom. Výsledkom je však zakaždým strata energie a návrat do pôvodného stavu s nižšou energiou. Deaktivácia excitovaného fluoroforu môže byť sprostredkovaná buď žiarivými, alebo nežiarivými prechodmi. Kvantový výťažok fluorescence (ϕ) je pomer medzi množstvom fotónov látkou vyžiarených a množstvom fotónov látkou pohltých – absorbovaných. Inak povedané, kvantový výťažok určuje pravdepodobnosť, s ktorou je excitovaný stav deaktivovaný skôr fluorescenciou, než iným nežiarivým mechanizmom. Intenzita fluorescence F je preto priamo úmerná množstvu absorbovaného žiarenia,

$$F = \phi(I_0 - I), \quad (1)$$

kde I_0 je intenzita svetla dopadajúceho a I je intenzita svetla prechádzajúceho látkou. Pretože $I/I_0 = 10^{-\epsilon lc}$ (Beer-Lambertov zákon), množstvo absorbovaného svetla môžeme vyjadriť ako

$$I_0 - I = I_0(1 - 10^{-\epsilon lc}). \quad (2)$$

Spojením rovníc (1) a (2) získame vzťah

$$F = \phi I_0(1 - 10^{-\epsilon lc}), \quad (3)$$

kde ϵ je molárny absorpčný koeficient, l je dĺžka optickej dráhy a c je koncentrácia fluoreskujúcej látky. Pri nízkej koncentrácii fluoreskujúcej látky však platí pre intenzitu fluorescence vzťah

$$F = 2,3\phi I_0 \epsilon lc. \quad (4)$$

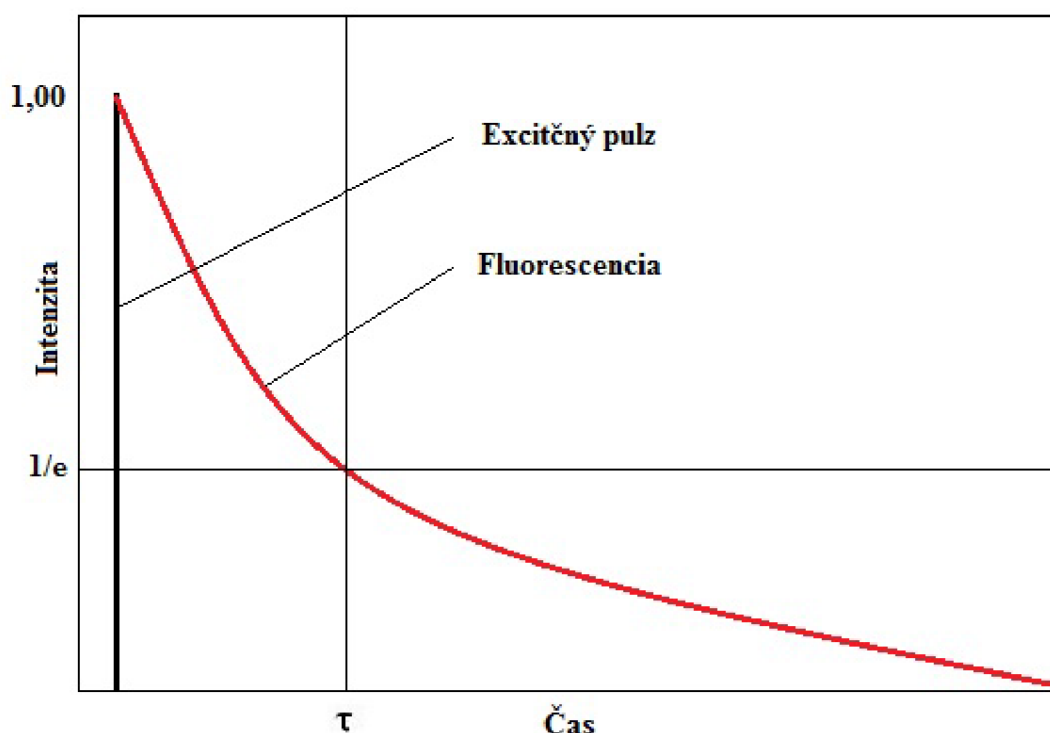
Z toho vyplýva, že závislosť intenzity fluorescence na koncentrácii má lineárny charakter len pri veľmi zriedených roztokoch, a to s hodnotou absorpcie nižšou ako 0,02. Z rovnice (4) je zjavné, že intenzita fluorescence je priamo úmerná intenzite zdroja žiarenia. Preto, pre výšenie citlivosti tohto merania, je výhodnejšie použiť zdroj žiarenia vo forme laseru [15, 17].

2.2.5 Doba života fluorescence

Doba života fluorescence vyjadruje čas, ktorý fluorofor strávi v energeticky vyššom excitovanom stave predtým, než sa dôjde k návratu do základného stavu s nižšou energiou. Aby bolo tento prechod možné zaznamenať, musí byť sprevádzaný emitovaním fotónu. Doba života fluorescence sa môže pohybovať v rozsahu niekoľkých pikosekúnd až stoviek nanosekúnd. Pri excitácii fluoroforu, doba života fluorescence je čas, ktorý je potrebný na deexcitáciu určitého množstva excitovaných molekúl na hodnotu $1/e$ alebo 36,8% pôvodného množstva molekúl, čo znázorňuje *Obrázok 2*. Pokles intenzity je funkciou času podľa rovnice:

$$I_t = \alpha e^{-t/\tau}, \quad (5)$$

kde I_t je intezita v čase t , α je predexponenciálny faktor a τ je doba života fluorescence. Ak deaktiváciu fluoroforu je možné popísať len za použitia jedného predexponenciálneho faktoru a doba života je v porovnaní s dĺžkou excitačného pulzu vysoká, potom je možné dobu života fluorescence stanoviť priamo pomocou sklonu krivky [13, 14, 15].



Obrázok 2: Obrázok znázorňujúci grafické určenie doby života fluorescence

2.3 Dynamický rozptyl svetla

Dynamický rozptyl svetla je fyzikálna technika ktorá sa používa najmä na určenie distribúcie veľkosti častíc v roztoku alebo suspenzii. Táto technika patrí medzi neinvazívne techniky merania veľkosti častíc a molekúl. Vzorka je vložená do kyvety a ožiarená zdrojom žiarenia. Toto žiarenie nedosahuje vysokých intenzít, preto počas experimentu nedochádza ku žiadnym zmenám vo vzorke. Veľkosť častíc sa určuje na základe sledovania Brownovho pohybu v suspenzii. Jedná sa o pohyb náhodný, zapríčinený vzájomnými interakciami a zrážkami molekúl a častíc vo vnútri systému. Dynamický rozptyl svetla teda sleduje najmä rýchlosť častíc podliehajúcich Brownovmu pohybu. Z pravidla platí, že menšie častice sa pohybujú

rýchlejšie a častice väčšie pomalšie. Rýchlosť Brownovho pohybu je definovaná translačným difúznym koeficientom označovaným písmenom D . Tento koeficient je prevedený na veľkosť častíc pomocou Stokes-Einsteinovej rovnice, ktorá má tvar:

$$d_H = \frac{kT}{3\pi\eta D}, \quad (6)$$

kde d_H je hydrodynamický priemer, k je Boltzmannova konštanta, T je termodynamická teplota a η je viskozita. Hodnota viskozity prostredia je závislá na termodynamickej teplote, čo je teplota, pri ktorej bolo prevedené meranie. Výsledkom tejto rovnice je teda hodnota hydrodynamického priemeru. Hydrodynamický priemer určuje priemer pevnej častice guľovitého tvaru, ktorá difunduje suspenziou častíc rovnakou rýchlosťou ako častica alebo molekula, ktorá je práve meraná.

Hodnota hydrodynamického priemeru je závislá na iónovej sile roztoku, povrchovej štruktúre a celkovom tvare častice. Iónová sila roztoku ovplyvňuje predovšetkým hrúbku vrstvy nabitých častíc obklopujúcej časticu. S rastúcou iónovou silou klesá hrúbka tejto vrstvy. Z toho vyplýva, že pre rovnakú suspenziu častíc by sa získaný hydrodynamický priemer líšil v roztoku s vyššou iónovou silou od toho v roztoku s nižšou iónovou silou. Vplyv povrchovej štruktúry je najvýraznejší najmä vtedy, keď povrch častice je tvorený molekulami alebo ich časťami vyčnievajúcimi do okolitého priestoru. To zvyšuje odpor prostredia a znižuje difúziu rýchlosť častice suspenziou. Keď sa častica vyznačuje nepravidelným tvarom, hodnota difúzneho koeficientu sa môže pri viacnásobných meraniach líšiť. Závisí to na tom, v akej polohe sa častica nachádzala v dobe daného merania a s akým odporom tak difundovala systémom [18, 19].

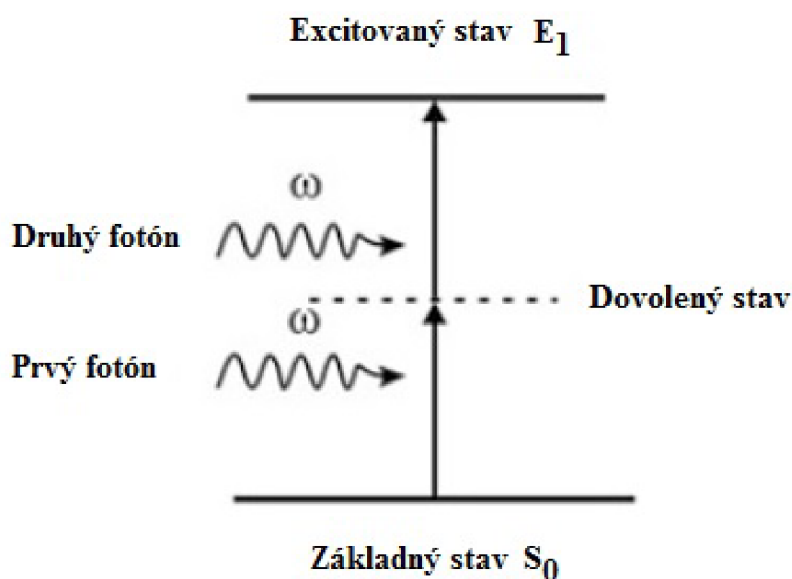
2.4 Dvojfotónová absorpcia žiarenia

Jednofotónová absorpcia je fyzikálny proces, pri ktorom dochádza k pohlteniu energie jedného fotónu látkou, ktorej valenčné elektróny následne prechádzajú medzi dvoma úrovňami energie. Na princípe absorpcie žiarenia pracuje množstvo rôznych analytických prístrojov a zariadení. V praxi sa najčastejšie môžeme stretnúť práve s UV-VIS spektrofotometrami, ktoré pracujú na princípe tohto javu.

Dvojfotónová absorpcia je fyzikálny jav, pri ktorom dochádza, narozdiel od jednofotónovej absorpcie, k absorpcii energie nie jedného, ale hneď dvoch fotónov o rovnakej alebo rôznej frekvencii a teda i energie chromoforu. Takto pohltená energia sa následne využije na excitáciu chromoforu z jeho základného stavu do stavu s vyššou energiou, tzv. excitovaného stavu. Energetický rozdiel medzi týmito dvoma stavmi je rovný súčtu energii absorbovaných fotónov potrebných na takýto prechod. Tento proces patrí do skupiny nelineárnych optických procesov. Tento jav bol pôvodne predpovedaný v roku 1931 teoretickou fyzičkou Mariou Göppert Mayerovou, kedy sa jej vo svojej práci podarilo dokázať pravdepodobnosť tohto javu matematicky. Až o celých tridsať rokov neskôr bol tento jav po prvýkrát testovaný a overený experimentom. To bolo možné vďaka vynálezu vysoko výkonného zdroju žiarenia, laseru.

Hlavný rozdiel, medzi absorpciou jedného a dvoch fotónov je v tom, že miera prechodu molekúl medzi dvoma energetickými stavmi v dôsledku dvojfotónovej absorpcie závisí na druhej mocnine intenzity dopadajúceho svetla. To znamená, že pri nízkych intenzitách excitačného svetla je absorpcia o mnohonásobne slabšia ako lineárna absorpcia jedného fotónu. Závislosť absorpcie teda rastie exponenciálne a nad lineárnou absorpciou môže dominovať hlavne pri vysokých intenzitách dopadajúceho svetla. Miera dvojfotónovej absorpcie môže byť vyjadrená vďaka zavedenému parametru dvojfotónového absorpčného prierezu (σ_{TPA}). Hodnoty σ_{TPA} odlišných materiálov sú stanovované pomocou rôznych techník, medzi ktoré patria najmä dvoma fotónmi excitovaná fluorescencia, ktorá sa používa najmä u fluoreskujúcich látok, a Z-scan, ktorý sa používa v prípade látok nedisponujúcich fluorescenčnými vlastnosťami [1, 3, 13, 20].

Priebeh excitácie znázorňuje *Obrázok 3*. Aby k tomuto javu vôbec došlo, je potrebné aby dva fotóny zasiahli molekulu vo veľmi krátkom momente a to v priebehu jednej femtosekund (10^{-15} s). Najskôr s molekulou interaguje prvý dopadajúci fotón, ktorý jej dodá energiu a sprostredkuje prechod zo základného energetického stavu do tzv. virtuálneho (dovoleného) stavu s vyššou energiou. Tento stav nie je skutočným energetickým stavom molekuly a existuje len na veľmi krátku dobu. Na to aby bol dosiahnutý excitovaný stav je potrebné, aby počas tohto veľmi krátkeho okamihu došlo k interakcii aj druhého fotónu s molekulou. To zaisť nadobudnutie excitovaného stavu molekulou. Na vytvorenie takýchto podmienok je preto samozrejme potrebný výkonný zdroj žiarenia, sústredený laser, ktorý dokáže produkovať veľmi krátke impulzy svetla a s veľkým výkonom. Dvojfotónová absorpcia môže ďalej viesť k dvojfotónovej excitovanej fluorescencii, kedy excitovaný stav vytvorený v dôsledku absorpcie dvoch fotónov spontánne prejde do nižšieho energetického stavu. Tento prechod je zároveň sprevádzaný emisiou žiarenia. Takto získané fluorescenčné spektrum by malo byť zhodné s tým, ktoré sa dá získať pri absorpcii jedného fotónu. Technológia, ktorá pracuje na princípe tohto javu, sa nazýva dvojfotónová mikroskopia [3, 13, 20].



Obrázok 3: Schéma energetických hladín spojených s absorpciou dvoch fotónov s rovnakou energiou

2.5 Súčasný stav riešenej problematiky

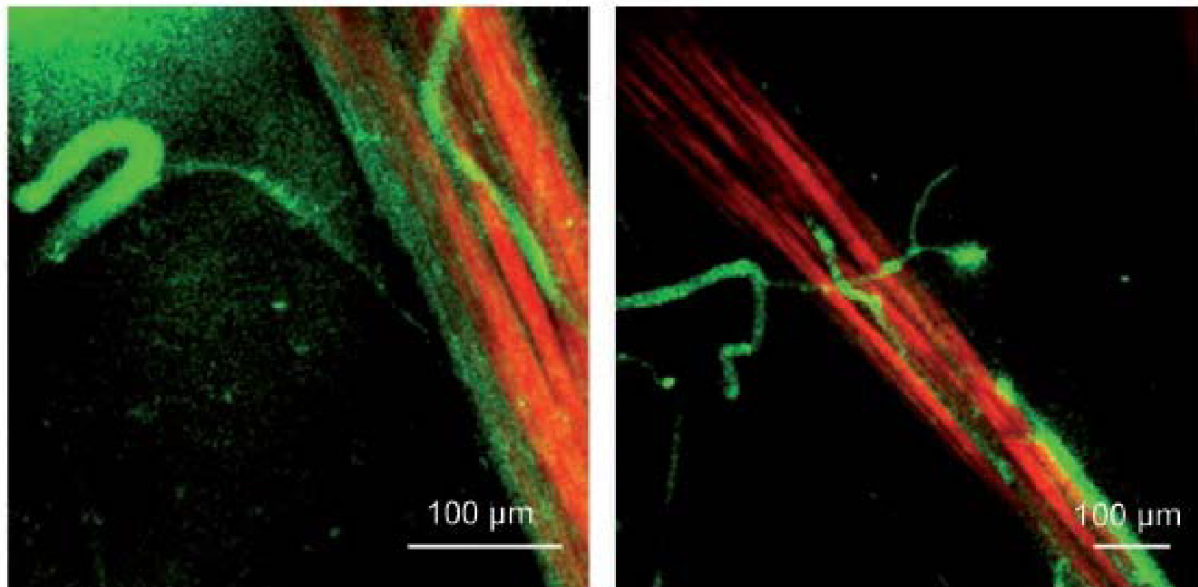
Organické nanočastice vykazujúce fluorescenciu indukovanú absorpciou dvoch fotónov v súčasnosti podliehajú intenzívnemu výskumu. Ako látky s najväčším potenciálom pre prípravu týchto nanočastíc sa javia byť predovšetkým molekuly na báze tetrafenyletenu a trifenylamínu. Tieto látky vykazujú značnú citlivosť na excitáciu dvomi fotónmi a hlavne poskytujú možnosť pomerne jednoduchej úpravy. Na zlepšenie ich dvojfotónovej absorpcie boli preto, navrhnuté a syntetizované rôzne deriváty tvoriace predovšetkým dipolárne, kvadrupolárne a oktopolárne systémy. Takto pripravené systémy sa vyznačujú prítomnosťou funkčných skupín s elektrón donorným a akceptorným charakterom. Systémy s týmito vlastnosťami sú charakteristické pomerne vysokým dvojfotónovým absorpčným prierezom [1, 2].

Vlastnosti pripravených látok sú skúmané v rôznych rozpúšťadlách líšiacimi sa najmä svojou polaritou. Sleduje sa vplyv ich prípravy a prostredia na ich fluorescenčné vlastnosti. V dôsledku zjednodušenia ich aplikácie ako prostriedkov pozorovania biologických systémov sú zrážacími procesmi pripravované nanočastice, ktoré sa vyznačujú svojou rozpustnosťou a stabilitou vo vodnom prostredí. Ich rozpustnosť vo vode je pre ich aplikáciu v biomedicíne kritická. Skúmaný je taktiež aj vplyv rôznych povrchovo aktívnych látok na tvorbu a vlastnosti nanočastíc. Taktiež bola modifikovaná ich samotná príprava, kedy bolo cieľom pripraviť častice so zložitejšou štruktúrou pozostávajúcou z viacerých povrchových vrstiev. Takto pripravené nanočastice sú zložené z dvoch rôznych chromovorov vybraných za účelom zlepšenia efektivity prenosu excitačnej energie medzi jednotlivými komponentmi nanočastíc. Príprava jadra nanočastíc prebieha ako prvá len z jedného druhu chromofor. Rovnakým procesom zrážania je následne jadro obalené vrstvou molekúl rozdielneho chromoforu. Vytvorí sa plášť nanočastice. Proces prenosu excitačnej energie prebieha najmä na rozhraní plášťa a jadra. Výsledkom je, že fluorescencia je lokalizovaná práve na tomto rozhraní a je pozorovateľne intenzívnejšia ako u nanočastíc pozostávajúcich len z jedného typu chromofór [1, 2, 5, 10].

Metóda dvojfotónovej fluorescenčnej mikroskopie sa v poslednej dobe teší veľkej obľube. Látky používané ako fluorescenčné sondy, u ktorých je pozorovaná dvojfotónová absorpcia, sú pomerne dobre dostupné. Taktiež sú známe aj látky s rovnakými vlastnosťami prirodzene sa vyskytujúce v biologických preparátoch, ako sú napríklad kofaktory FAD a NAD(P)H. Ich prítomnosť a distribúciu v bunke je možné sledovať dvojfotónovou fluorescenčnou mikroskopiou. Problémom komerčne dostupných sond je však ich obmedzená fotostabilita a prípadná rozpustnosť len v organických rozpúšťadlách. Spoločným cieľom je preto prostredníctvom syntézy z rôznych prekursorov, čo najviac zdokonaľiť dvojfotónové vlastnosti takýchto látok a hlavne dokázať ich optické vlastnosti v pevnej fáze preniesť aj do vodného prostredia [3, 5, 21].

Nanočastice vo vodnej suspenzii už boli testované ako kontrastné látky *in vivo* 3D dvojfotónového fluorescenčného zobrazovania biologického preparátu. Sledovaným objektom bola *Xenopus laevis* v štádiu žubrienky. Suspenzia bola do krvného obehu vpravená injekčne. Tento experiment mal predovšetkým za úlohu zistiť ako sa pripravená suspenzia správa v krvnom obehu živého organizmu. Snímky zhotovené dvojfotónovým fluorescenčným

mikroskopom sa nachádzajú na *Obrázku 4*. Týmto experimentom bolo potvrdené, že nanočastice pripravené z vhodných molekúl sa naozaj dajú použiť ako prostriedky na 3D zobrazovanie biologických preparátov [2].



Obrázok 4: Snímky tkaniva žubrienky zostrojené dvojfotónovou fluorescenčnou mikroskopiou po vstreknutí suspenzie fluorescenčných nanočastíc do krvného obehu. Snímky boli zhotovené po 20 a 90 minútach od vstreknutia. Červená farba patrí svalovému tkanivu, zatiaľ čo zelená farba signalizuje prítomnosť fluorescenčnej sondy v podobe vstreknutej suspenzie nanočastíc [2].

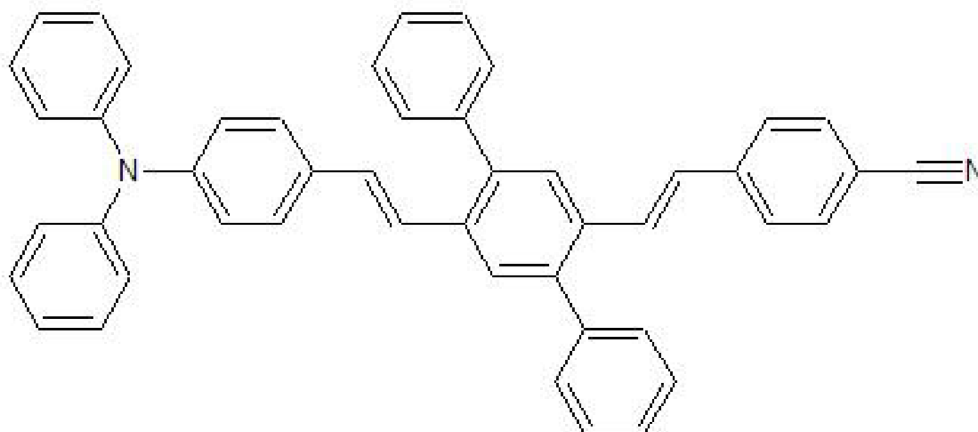
3 EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

3.1 Použité prístroje a pomôcky

- Magnetická miešačka Big Squid IKAMAG – IKA, (BioTech a.s.)
- Analytické váhy ew 620-3NM, (KERN)
- Spektrofotometer UV-VIS HITACHI U-3900H
- Koloidný DLS analyzátor ZetaSizer Nano ZS, (Malvern Panalytical)
- Fluorescenčný spektrometer Horiba FluoroLog®
- Spektrofluorometer Fluorocube, (Horiba Jobin Yvon Scientific, Inc.)
- Spektrograf Shamrock sr-303i s kamerovým detektorom Andor iStar
- Striekačkový filter ProFill RC/0,45 μm , (Fisher Scientific, spol. s r.o.)
- Bežné laboratórne sklo a vybavenie

3.2 Použité chemikálie

Na prípravu nanočastíc bola použitá látka *N,N*-difenylamino-2,5-difenyl-1,4-distyrylbenzen kyanid (ďalej už len DPA-DP-DSB-CN). Táto látka pochádza zo série látok syntetizovaných Ing. Karelom Paukom, Ph.D. na Univerzite Pardubice, odkiaľ bola látka aj prevzatá [22]. Molekulárna štruktúra látky je zobrazená v *Obrázku 5*. Na prípravu zásobného roztoku DPA-DP-DSB-CN bol použitý tetrahydrofurán (THF) s čistotou p. a. zakúpený od spoločnosti Sigma-Aldrich. Na prípravu roztokov nanočastíc bola použitá destilovaná voda.



Obrázok 5: Molekulárna štruktúra DPA-DP-DSB-CN [22]

3.3 Príprava zásobného roztoku a roztokov nanočastíc

Najskôr bol pripravený zásobný roztok látky DPA-DP-DSB-CN, ktorý sa ďalej používal na prípravu roztokov nanočastíc o rôznej koncentrácii. Na analytickej váhe bola odvážená navážka látky o hmotnosti 2,6 mg. Roztok bol následne pripravený rozpustením navážky v 2,5 ml rozpúšťadla THF. Takýmto spôsobom bol pripravený roztok o finálnej koncentrácii $1,66 \text{ mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$. Ten bol kvôli trvanlivosti uschovaný v tmavej vialke na mieste s minimálnym prístupom svetla.

Zásobný roztok DPA-DP-DSB-CN bol použitý na prípravu roztokov nanočastíc. Jednotlivé roztoky boli pripravené s rôznym pomerom vody a zásobného roztoku, tak aby ich finálny objem bol vždy 5 ml. Prípravu roztokov a jednotlivé objemy vody a zásobného roztoku

znázorňuje *Tabuľka 1*. Hodnoty objemu neboli vybrané náhodne. Roztok č. 1 predstavuje roztok, s najnižšou koncentráciou ktorú bolo možné pripraviť kvôli rozsahu použitej pipety. Roztok č. 6 je roztok, ktorý sa vyznačuje pomerom vody a zásobného roztoku približne 1:50. Tento pomer sa pri koncentrácii zásobného roztoku $1,66 \text{ mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$ preukázal ako minimálny pomer zásobného roztoku a destilovanej vody, kedy ešte nedochádza k vytvoreniu zakaleného roztoku. Roztoky o nižšom zmiešavacom pomere ako 1:50 boli charakteristické jemným zákalom, čo s najväčšou pravdepodobnosťou dokazuje prítomnosť častíc väčších ako $1 \mu\text{m}$. Nanočastice boli pripravené prídavkom určitého objemu rozpustenej látky v THF do malej vialky s vodou, za stáleho miešania. Miešanie každého roztoku prebiehalo na magnetickej miešače po dobu 5 minút pri 1000 RPM. Roztoky nanočastíc mali na pohľad rovnaké žlté sfarbenie ako pôvodná látka v roztoku THF, z ktorej boli pripravené.

Tabuľka 1: Koncentračná rada pripravených roztokov nanočastíc, kde V_i je objem zásobného roztoku DPA-DP-DSB-CN, V_v je objem vody a c je koncentrácia charakterizujúca množstvo látky v podobe nanočastíc vzhľadom na objem

Číslo roztoku	V_i [ml]	V_v [ml]	c [$\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$]
1	0,02	4,98	$6,64\cdot 10^{-5}$
2	0,04	4,96	$1,33\cdot 10^{-4}$
3	0,06	4,94	$1,99\cdot 10^{-4}$
4	0,08	4,92	$2,66\cdot 10^{-4}$
5	0,10	4,90	$3,32\cdot 10^{-4}$
6	0,12	4,88	$3,98\cdot 10^{-4}$
7	0,15	4,85	$4,98\cdot 10^{-4}$
8	0,20	4,80	$6,64\cdot 10^{-4}$

4 VÝSLEDKY A DISKUSIA

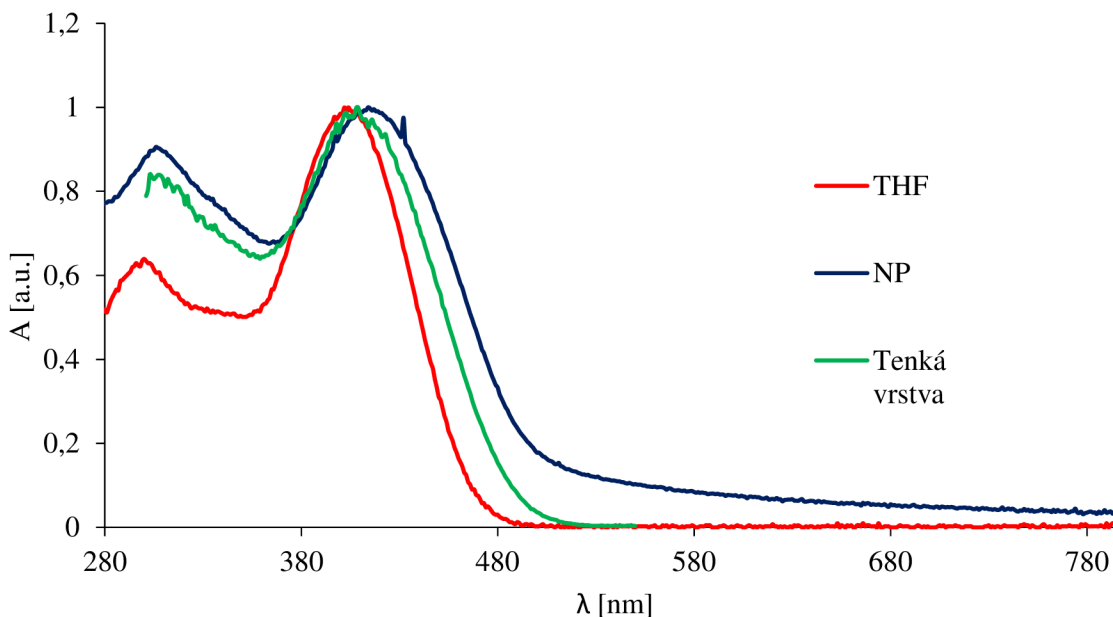
4.1 Charakterizácia nanočastíc

4.1.1 UV-VIS spektroskopia

Meranie roztokov prebiehalo hneď po príprave na UV-Vis spektrometri *HITACHI* v kremenných kyvetách. Kremenné kyvety boli zvolené z dôvodu merania absorpcie aj v UV oblasti svetelného spektra. Kremenné sklo, z ktorého sú kyvety vyrobené, neabsorbuje žiarenie v tejto oblasti vlnových dĺžok, preto je na meranie ideálne. Rozsah vlnových dĺžok bol nastavený od 200 nm po 800 nm s krokom 1 nm.

Ako prvý bol premeraný zásobný roztok rozpustenej látky DPA-DP-DSB-CN v THF. Následne bol pre porovnanie premeraný roztok č. 4 obsahujúci pripravené nanočastice. Tento roztok bol zvolený kvôli tomu, že hodnota absorpcie v maxime sa nachádzala v intervale medzi 0,8 až 1. Dáta pre absorpciu látky v pevnom skupenstve v tenkej vrstve boli k dispozícii už pred začiatkom experimentu. Namerané spektrá sú znázornené v jednom spoločnom grafe kvôli posúdeniu zmeny polohy absorpčného maxima jednotlivých vzoriek. Absorpcia bola pre toto porovnanie normalizovaná na hodnotu 1 v maximách absorpcií.

Absorpčné spektrá zásobného roztoku DPA-DP-DSB-CN, pripraveného roztoku č. 4 obsahujúceho nanočastice a látky DPA-DP-DSB-CN v pevnom skupenstve vo forme tenkej vrstvy znázorňuje *Obrázok 6*. Hodnoty absorpcií boli normalizované pre účely grafu. Meranie absorpcie zásobného roztoku DPA-DP-DSB-CN a roztoku nanočastíc prebiehalo v kremenných kyvetách v rozsahu vlnových dĺžok 200–800 nm. Graf avšak obsahuje spektrá zobrazené len od 280 nm. Je tomu tak kvôli tomu, že pri vlnovej dĺžke 200 až 280 nm sa vyskytovalo zreteľné rušenie a šum signálu. Toto rušenie mohlo byť pravdepodobne spôsobené prítomnosťou samotných nanočastíc, taktiež ako absorpciou rozpúšťadla THF a vody prítomných v každom roztoku. Na oboch spektrách sú jasne viditeľné a rozoznateľné práve dve lokálne maximá absorpcie. Pre absorpciu zásobného roztoku sa absorpčné maximum nachádza pri vlnovej dĺžke 403 nm. Pre absorpciu roztoku nanočastíc sa hodnota maxima nachádza pri 419 nm. Absorpcia bola zakaždým meraná proti slepej vzorke, ktorá bolo v prvom prípade rozpúšťadlo tetrahydrofurán a v druhom prípade destilovaná voda, rovnaká aká bola použitá pri príprave roztoku nanočastíc. Maximálna hodnota absorpcie látky DPA-DP-DSB-CN v tenkej vrstve sa nachádza pri vlnovej dĺžke 410 nm.

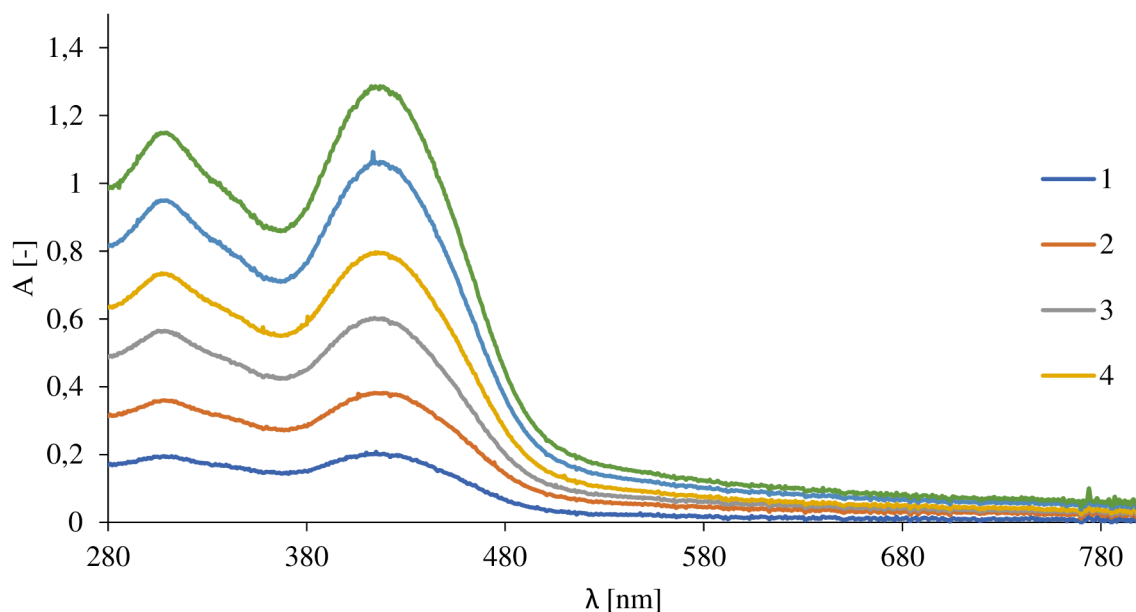


Obrázok 6: Absorpčné spektrum zásobného roztoku DPA-DP-DSB-CN, vodného roztoku nanočastíc a látky DPA-DP-DSB-CN v tenkej vrstve

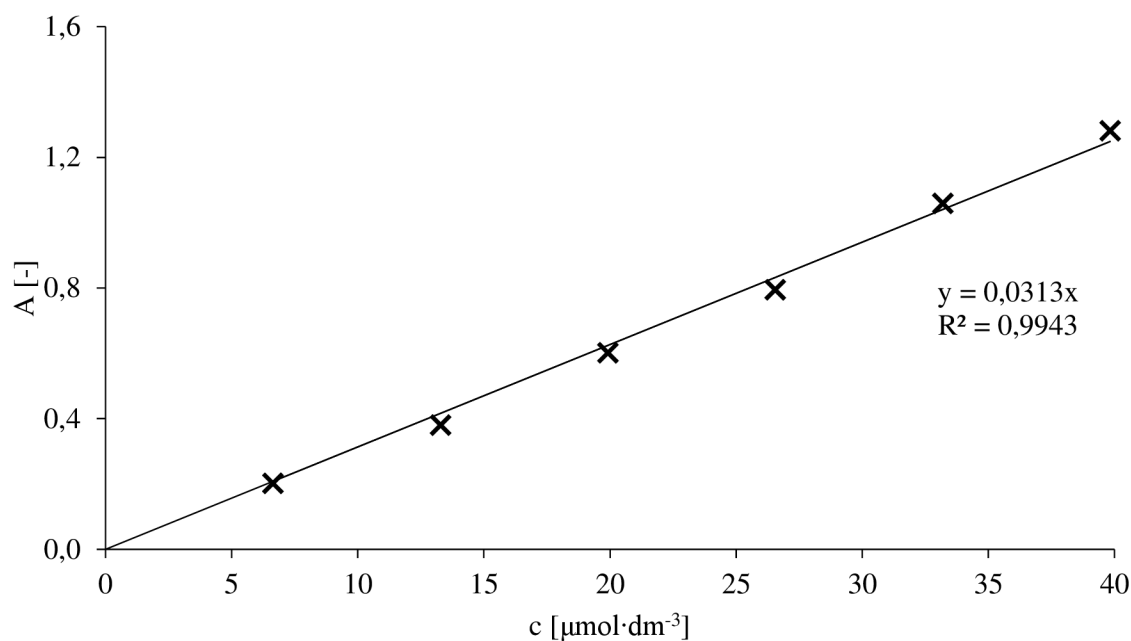
Ďalej boli premerané absorpčné spektrá jednotlivých roztokov nanočastíc pripravených podľa *Tabuľky 1* vo forme koncentračnej rady. Najskôr bola opäť premeraná vzorka vody, ktorá bola použitá ako rozpúšťadlo, a tak má funkciu slepej vzorky. Meranie absorpcie následne ďalej prebiehalo od najmenej koncentrovaného roztoku (roztok č. 1) po roztok najkoncentrovanejší (roztok č. 8). Takýto postup bol zvolený z dôvodu toho, že meranie absorpcie všetkých vzoriek prebiehalo v rovnakej kyvete. Medzi jednotlivými meraniami bola kyveta prepláchnutá malým množstvom destilovanej vody, ale aj napriek tomu mohla časť roztoku ostať prichytená na vnútornej strane kyvety. Táto časť sa potom pri ďalšom použití premieša s ďalším roztokom a tak môže dôjsť k skresleniu výsledku, kvôli nepatrnej zmene koncentrácie. Takúto chybu je možné minimalizovať práve správnym poradím merania roztokov za sebou. Meranie každého roztoku prebiehalo trikrát.

Zo získaných nameraných dát bolo zostrojené absorpčné spektrum z priemerných hodnôt absorpcií pre každý roztok. Namerané spektrá sú zobrazené v *Obrázku 7*. Následne bola určená hodnota vlnovej dĺžky λ_{\max} pri ktorom pripravené roztoky absorbovali najvýraznejšie. Absorpčné maximum roztokov sa nachádza pri 419 nm. Z nameraných hodnôt absorpcií bol zostrojený graf kalibračnej závislosti absorpcie na koncentrácii. Kalibračnú závislosť absorpcie na koncentrácii pripravených roztokov nanočastíc znázorňuje *Obrázok 7*. Kalibračná závislosť obsahuje len výsledky z merania roztokov č. 1 až 6. Dáta z merania absorpcie pre roztoky č. 7 a 8 boli do značnej miery odlišné od nameraných hodnôt ostatných roztokov nanočastíc. Táto odchýlka mohla byť spôsobená tým, že tieto dva roztoky boli značne zakalené. Zákal sa prejavoval na absorpčnom spektre ako výrazný šum prítomný v celom rozmedzí vlnových dĺžok. Taktiež u roztokov č. 7 a 8 bola pozorovaná sedimentácia častíc, kedy roztoky stáli dlhšiu dobu v kyvete bez premiešania. Kvôli tomu neboli hodnoty absorpcie pri λ_{\max} týchto roztokov brané v úvahu a boli tak z kalibračnej závislosti vynechané. Rovnica lineárnej regresie získaná v programe *EXCEL* má tvar $y = (3,13 \pm 0,05) \cdot 10^{-2} \text{ dm}^3 \cdot \mu\text{mol}^{-1} \cdot x$. Zostrojená

závislosť bola preložená priamkou lineárnej regresie pomocou programu *EXCEL*. Výsledná rovnica priamky, s absolútnym členom rovným nule, je zobrazená spolu s kalibračnou závislosťou na *Obrázku 8*.



Obrázok 7: Absorpčné spektrá pripravených roztokov nanočastíc číslo 1 až 6

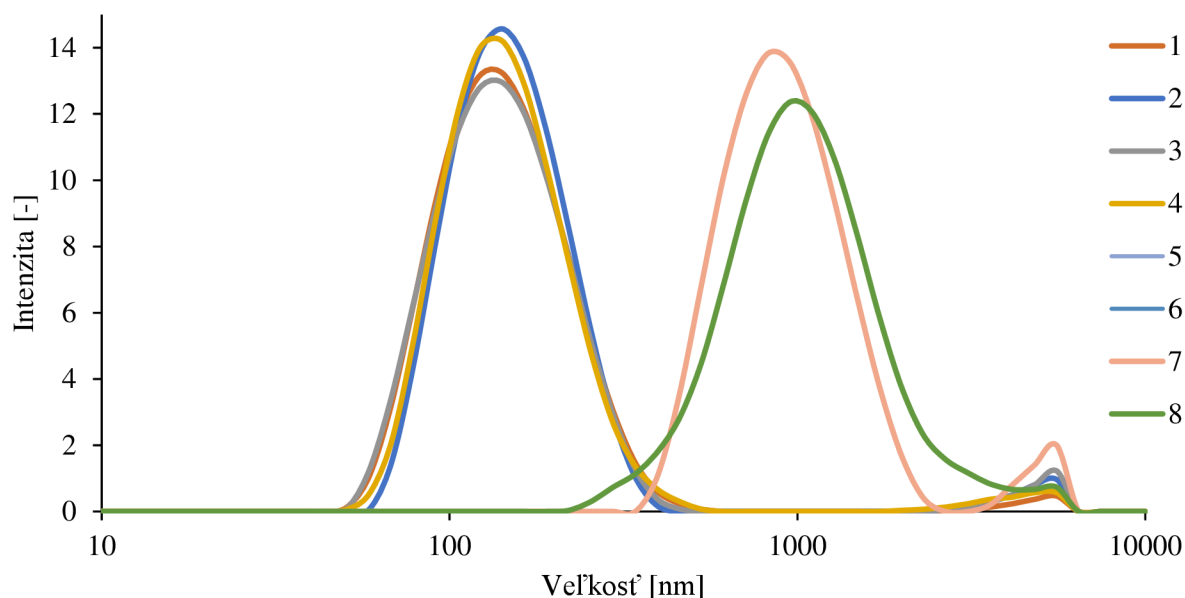


Obrázok 8: Kalibračná závislosť absorpcie na množstve a koncentrácii látky DPA-DP-DSB-CN v roztokoch pripravených nanočastíc

4.1.2 Veľkosť častíc

Veľkosť pripravených nanočastíc bola určená metódou dynamického rozptylu svetla. Meranie prebiehalo v jednorazových plastových kyvetách na prístroji *Zeta-Sizer*. Každý roztok bol pred meraním temperovaný na teplotu 21,5°C v meracej komore prístroja. Táto teplota približne

zodpovedala teplote v laboratóriu. Každý roztok bol premeraný trikrát, z čoho každé meranie pozostávalo z 10 opakovaných meraní, každé s dĺžkou 10 sekúnd. Dáta boli postupne získavané na základe sledovania Brownovho pohybu častíc vo vzdialenosti presne 1 mm od steny kyvety. Toto nastavenie by malo zabezpečiť to, že v prípade výskytu zrazeniny alebo nečistoty v roztoku ich prítomnosť minimálne ovplyvňuje presnosť merania. Postupne bola premeraná veľkosť a distribúcia nanočastíc v každom roztoku. Namerané hodnoty reprezentuje *Obrázok 9* a *Tabuľka 2*.



Obrázok 9: Distribúcia častíc pre roztoky nanočastíc číslo 1 až 8

Tabuľka 2: Nemerné hodnoty strednej veľkosti častíc prítomných v roztokoch 1 až 8 s odpovedajúcimi indexmi polydisperzity

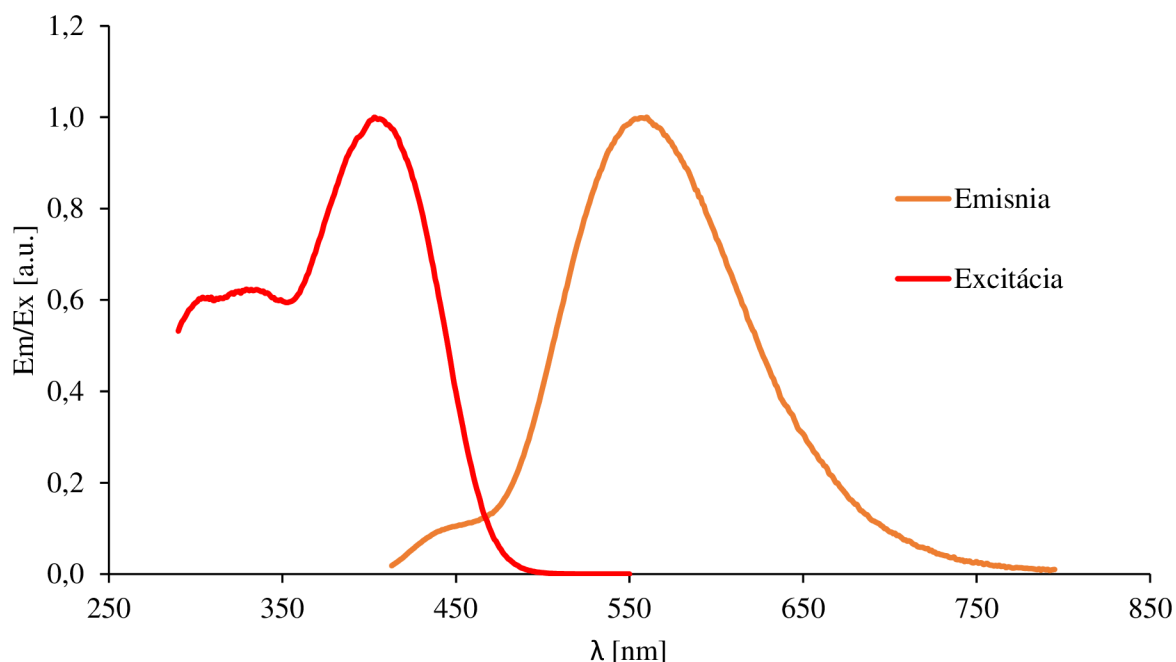
Číslo roztoku	Veľkosť [nm]	IPD
1	133 ± 1	0,17 ± 0,01
2	145 ± 6	0,19 ± 0,03
3	140 ± 6	0,24 ± 0,07
4	140 ± 7	0,19 ± 0,05
5	147 ± 1	0,18 ± 0,03
6	140 ± 1	0,19 ± 0,06
7	900 ± 90	0,24 ± 0,03
8	920 ± 80	0,27 ± 0,04

Z nameraných dát je zjavné, že veľkosť vzniknutých nanočastíc a ich distribúcia nezávisí na zmiešavacom pomere zásobného roztoku a vody, len v obmedzenom rozsahu. Veľkosť nanočastíc v roztokoch číslo 1 až 6 sa pohybuje v intervale 133–147 nm s hodnotou indexu polydisperzity 0,17–0,19. Výnimkou je roztok č. 3, kde index polydisperzity dosahuje hodnotu 0,24. Toto môže byť spôsobené prítomnosťou častíc s väčším priemerom a to najmä nečistôt, ktoré sa mohli do roztoku dostať pri jeho príprave. Prítomnosť týchto nečistôt je pozorovateľná

aj z grafu v *Obrázku 9*. Nečistoty sú reprezentované druhým píkom pri hodnote približne 5500 nm. Roztoky č. 7 a 8 sú od ostatných výrazne odlišné. Priemerná veľkosť častíc v týchto roztokoch sa pohybuje medzi hodnotami 898–925 nm. Priemerne vyšší index polydisperzity týchto roztokov signalizuje, že pozostávajú z väčšieho množstva rôzne veľkých častíc. Toto meranie potvrdzuje predpoklad v kapitole 4.1.1, že tieto roztoky obsahujú častice o veľkosti približne 1 μm prejavujúce sa zákalom a postupnou sedimentáciou.

4.1.3 Fluorescenčná spektroskopia

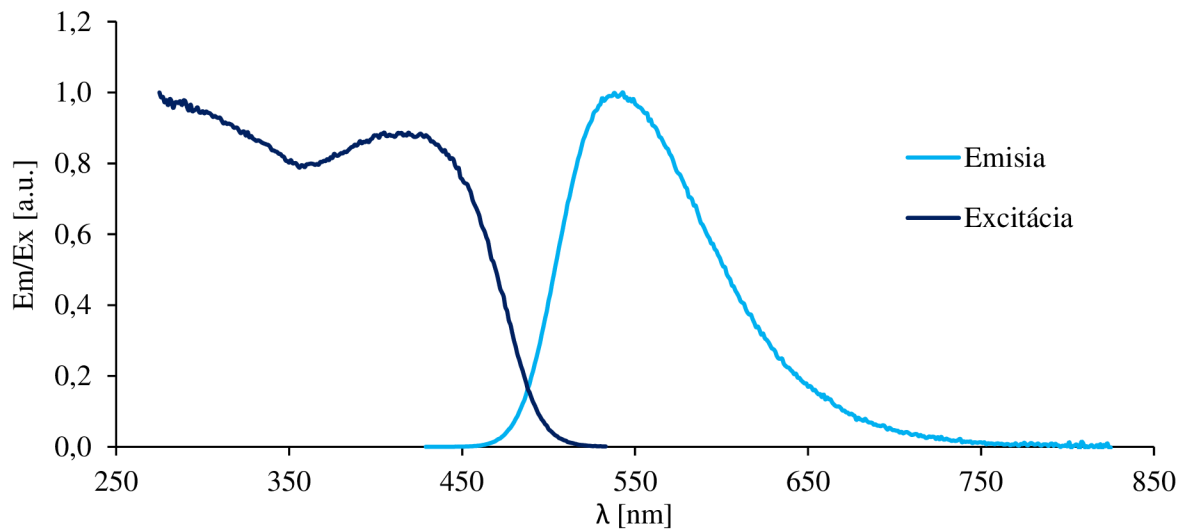
Fluorescenčné merania zásobného roztoku DPA-DP-DSB-CN a roztokov nanočastíc prebiehali na prístroji *Fluorolog* za použitia integračnej sféry. Excitačné a emisné spektrum zásobného roztoku znázorňuje *Obrázok 10*. Zobrazené dáta boli normalizované. Tvar emisného spektra má formu jedného píku. To odpovedá očakávaniu, keďže sa jedná o zložitú molekulu so systémom konjugovaných dvojitých väzieb. Spektrum je preto spojité s jasne rozoznateľným len jedným maximom. Taktiež sa spektrá vyznačujú výrazným Stokesovým posunom, ktorý je najvýraznejší práve pri látke rozpustenej v rozpúšťadle tertahydrofurán. Emisné spektrum bolo spracované pri excitačnom žiarení o vlnovej dĺžke 403 nm. Tato vlnová dĺžka bola vybraná preto, lebo pri nej dochádza k najvyššej absorpcii žiarenia roztokom. Toto vyplýva z výsledkov merania v kapitole 4.1.1. Emitované žiarenie bolo následne zaznamenávané v intervale 413–795 nm. Intenzita fluorescencie bola najvyššia pri 561 nm. Následne bolo premerané excitačné spektrum v intervale 293–551 nm. Emisné spektrum sa vyznačuje prítomnosťou ďalšieho píku pri vlnovej dĺžke približne 444 nm, čo môže značiť prítomnosť kontaminujúcej látky v roztoku.



Obrázok 10: Normalizované excitačné a emisné spektrum zásobného roztoku látky DPA-DP-DSB-CN

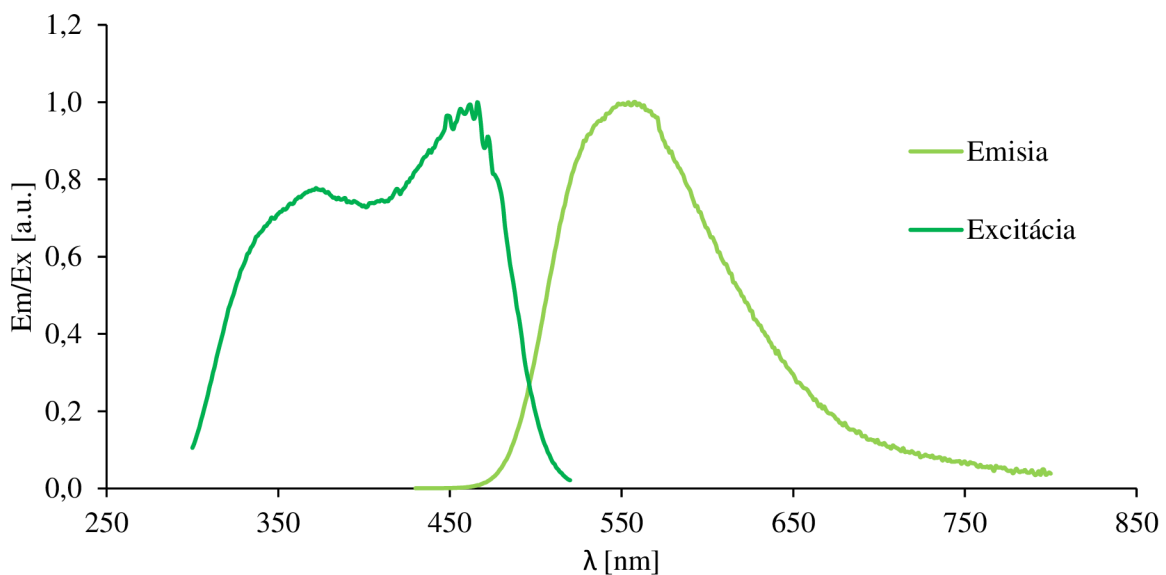
Excitačné a emisné spektrum pre roztok nanočastíc znázorňuje *Obrázok 11*. Tieto dáta boli normalizované a porovnané v jednom grafe. Emisia žiarenia bola zaznamenávaná v rozsahu vlnových dĺžok 429–825 nm. Vlnová dĺžka excitačného žiarenia bola 419 nm, čo približne

zodpovedá absorpčnému maximu zistenému v predchádzajúcom meraní v kapitole 4.1.1. Emisné spektrum má jedno maximum pri 543 nm, v ktorom bola intenzita fluorescence maximálna. Následne bolo premerané excitačné spektrum. Roztok bol excitovaný žiarením postupne v intervale 275–533 nm. Detektor snímala meniacu sa intenzitu fluorescence pri 543 nm a na základe vzniknutej závislosti bolo určené excitačné spektrum.



Obrázok 11: Normalizované excitačné a emisné spektrum roztoku nanočastíc

Pre látku DPA-DP-DSB-CN v tenkej vrstve je excitačné a emisné spektrum znázornené na Obrázku 12. Dáta sú opäť normalizované. Emisné spektrum bolo zaznamenávané v rozsahu vlnových dĺžok od 430 nm do 800 nm, pri vlnovej dĺžke excitačného žiarenia 410 nm, čo približne zodpovedá bodu maximálnej absorpcie látky v pevnom skupenstve. Pri meraní excitačného spektra bola však spozorovaná výrazná odchýlka maxim excitačného a absorpčného spektra. Maximá sú od seba vzdialené približne 60 nm.



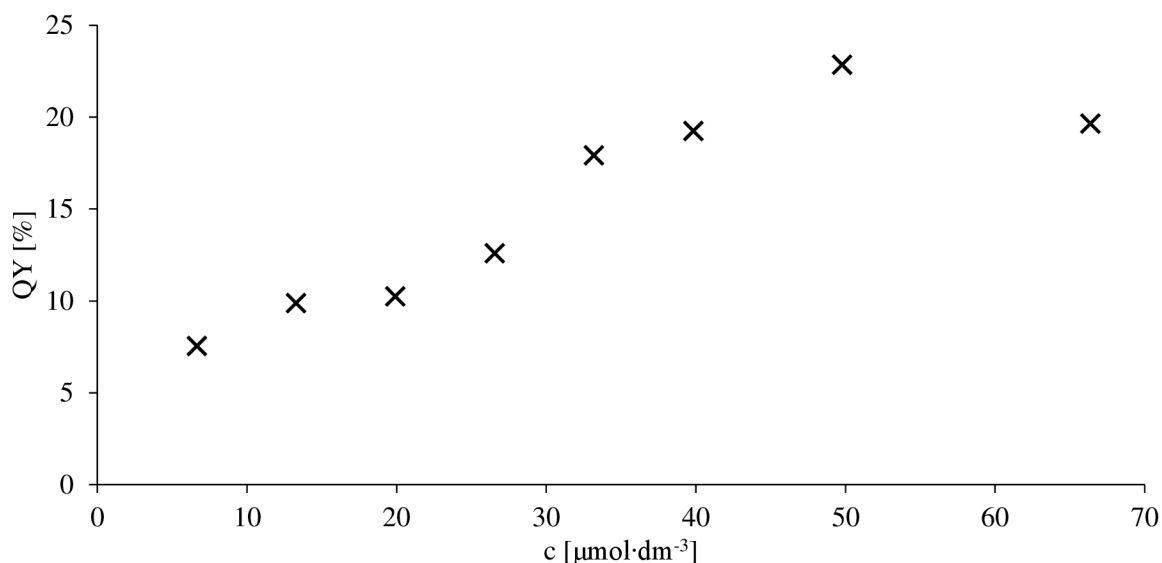
Obrázok 12: Excitačné a emisné spektrum látky DPA-DP-DSB-CN v tenkej vrstve

4.1.4 Kvantový výťažok fluorescence

Na meranie kvantového výťažku fluorescence bol použitý prístroj *Fluorolog* za použitia integračnej sféry. Týmto experimentom bol zistený a stanovený kvantový výťažok fluorescence pre roztoky pripravených nanočastíc č. 1–8. Boli prevedené 2 merania pre každý roztok. Každé prebiehalo pri šírke pásu excitačného žiarenia 30 nm v okolí hodnoty maximálnej absorpcie roztoku nanočastíc. Vlnová dĺžka excitačného žiarenia bola opäť zvolená na základe výsledkov z absorpčného merania v kapitole 4.1.1 a to na hodnotu 419 nm. Dĺžka excitačného pulzu bola 0,1 s. Integračná dĺžka času zberu signálu bola nastavená na hodnotu 0,1 s. Šírka štrbín na zdroji excitačného žiarenia, tak isto ako na vstupe do monochromátoru pred detektorom, boli nastavené tak, aby množstvo signálu zachytené detektorom, bolo približne $1 \cdot 10^6$ fotónov. Výsledný signál z detektora bol korigovaný referenčným signálom zo zdroja žiarenia. Intenzita emitovaného žiarenia bola zaznamenávaná v rozsahu od 435 do 800 nm. Každé meranie pozostávalo z 4 krokov. V prvom kroku sa premerala fluorescencia roztoku nanočastíc, podľa intenzity signálu boli nastavené šírky štrbín. Toto nastavenie systému sa zachovalo po dobu celého merania. V druhom kroku bolo zostrojené emisné spektrum slepej vzorky, v tomto prípade sa jednalo o vzorku destilovanej vody použitej na prípravu roztoku nanočastíc. Tretí krok pozostával z merania excitačného pulzu a jeho zoslabenia priechodom cez kyvetu s destilovanou vodou. V tomto prípade bol detektor nastavený tak aby snímal intenzitu excitačného pulzu v rozsah vlnových dĺžok od 405–435 nm. Intenzita excitačného pulzu je však veľmi vysoká, preto boli na jeho zoslabenie použité absorpčné filtre. Tieto filtre boli zvolené tak, aby intenzita signálu na detektore dosahovala opäť hodnotu $1 \cdot 10^6$ fotónov za 0,1 s. Posledným krokom bolo premeranie intenzity excitačného pulzu cez vzorku roztoku nanočastíc pri rovnakom nastavení a s použitím rovnakých filtrov. Zo získaných dát z týchto 4 meraní bol pomocou softvéru prístroja vypočítaný kvantový výťažok fluorescence. Vypočítané hodnoty sa nachádzajú v *Tabuľke 3* a v *Obrázku 13*.

Tabuľka 3: Kvantový výťažok fluorescence pre roztoky nanočastíc číslo 1 až 8

Roztok	c [mol·dm⁻³]	QY [%]
1	$6,64 \cdot 10^{-5}$	$7,6 \pm 1,2$
2	$1,33 \cdot 10^{-4}$	$9,9 \pm 0,6$
3	$1,99 \cdot 10^{-4}$	$10,3 \pm 0,4$
4	$2,66 \cdot 10^{-4}$	$12,6 \pm 1,2$
5	$3,32 \cdot 10^{-4}$	18 ± 4
6	$3,98 \cdot 10^{-4}$	$19,3 \pm 2,3$
7	$4,98 \cdot 10^{-4}$	$22,9 \pm 0,5$
8	$6,64 \cdot 10^{-4}$	$19,6 \pm 0,7$



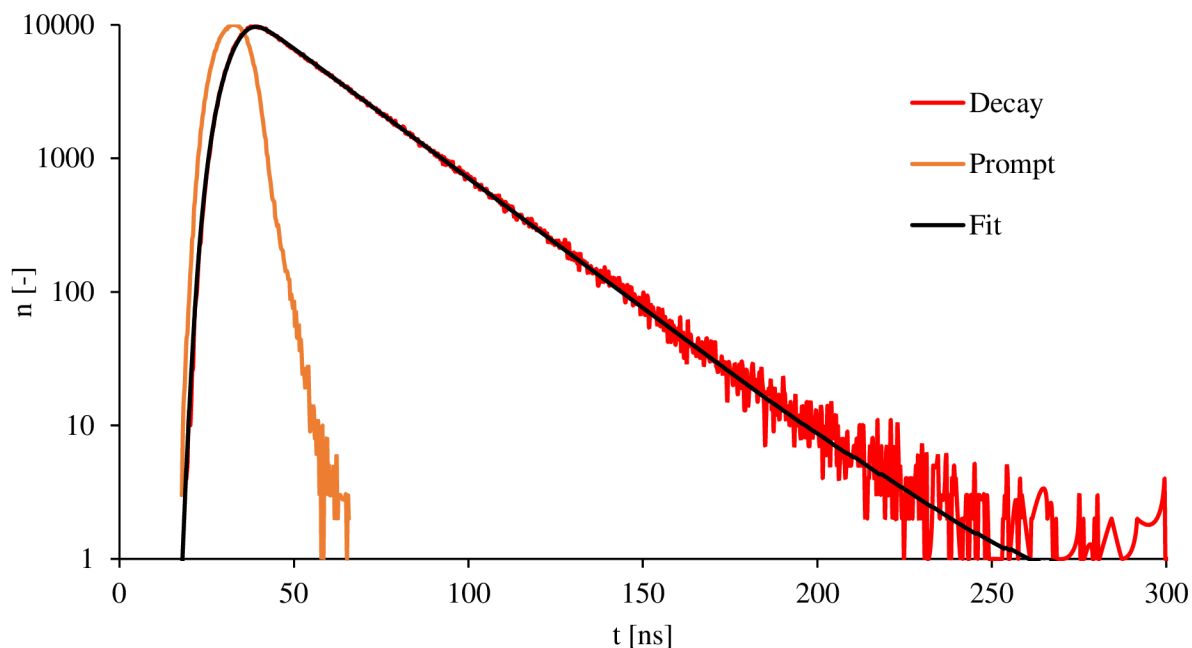
Obrázok 13: Grafické znázornenie kvantového výťažku fluorescence pre roztoky nanočastíc č. 1 až 8 s rôznou koncentráciou

Cieľom tohto merania bolo zistiť, ako vplýva miera polarít prostredia nanočastíc na kvantový výťažok fluorescence. Z nameraných dát je zrejmé, že kvantový výťažok rastie so znižujúcou sa polaritou rozpúšťadla. Pre roztoky č. 1 až 7 je charakteristická lineárna závislosť. S ďalej klesajúcou polaritou rozpúšťadla sa však kvantový výťažok už nezväčšuje, ale ustáli sa približne na hodnote 20%. Tento jav môže mať úzky súvis s tým, že tieto roztoky už obsahujú prevažne častice nad 500 nm. Častice sú niekoľkonásobne väčšie a preto styčná plocha medzi časticami a prostredím je nižšia. Z toho vyplýva, že polarita prostredia už nemá rovnaký vplyv na kvantový výťažok ako tomu bolo u roztokov s menšími časticami.

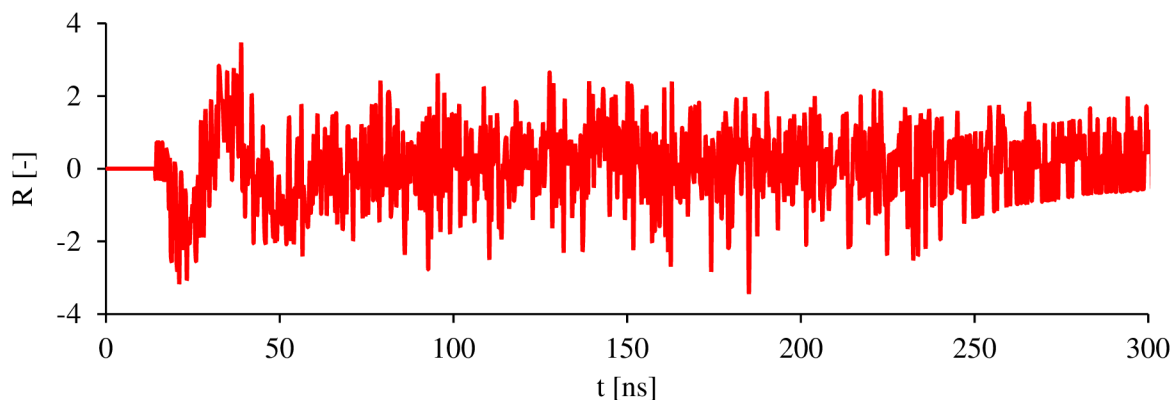
4.1.5 Doba života fluorescence

Doba fluorescence bola určená pre zásobný roztok aj pre roztok č. 1 pripravených nanočastíc. Meranie prebiehalo na prístroji *Fluorocube*. Vzorky boli excitované monochromatickým zdrojom žiarenia o vlnovej dĺžke 389 nm. Doba života fluorescence bola meraná po excitácii pulzom žiarenia zo zdroja pomocou metódy TCSPC. Fluorescencia vzoriek bola zakaždým sledovaná pri vlnovej dĺžke maxima emisie, ktoré bolo zistené v kapitole 4.1.3. Pre zásobný roztok bola emisná vlnová dĺžka 561 nm a pre roztok nanočastíc 543 nm.

Namerané dáta boli spracované priamo v meracom programe zariadenia. Výsledky merania pre zásobný roztok reprezentuje *Obrázok 14*. Distribúciu resídií charakterizuje *Obrázok 15*. Vypočítané hodnoty doby života fluorescence pre sa nachádzajú v *Tabuľke 4*. Pre zásobný roztok bola určená doba fluorescence na hodnotu 2,23 ns.

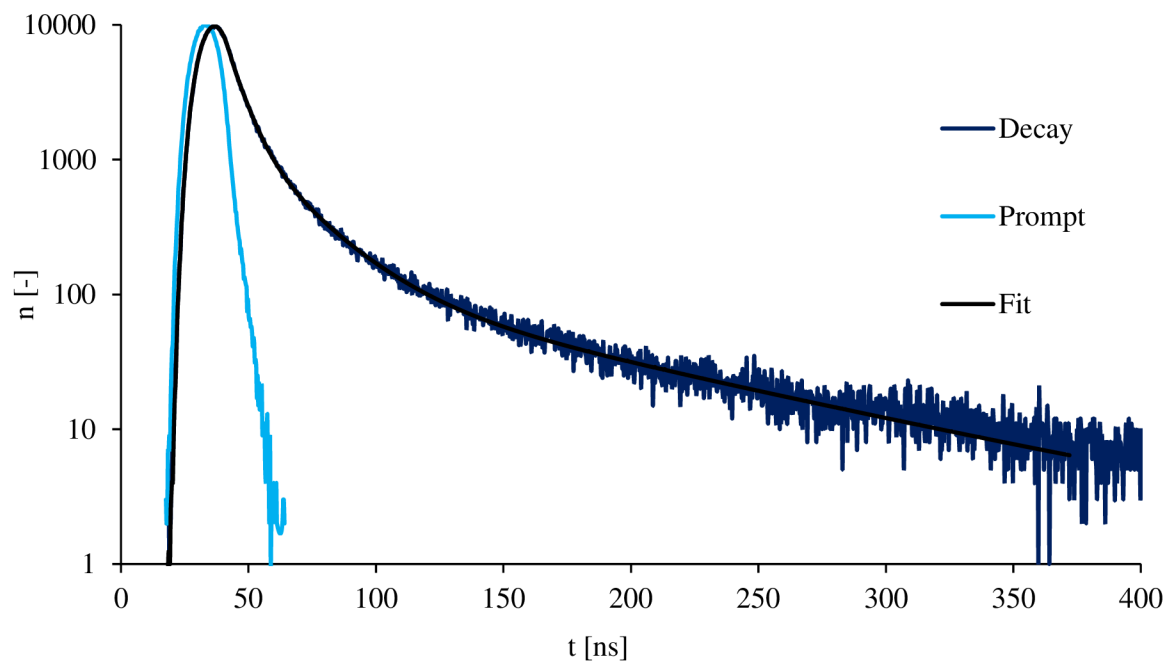


Obrázok 14: Doba života fluorescence pre zásobný roztok DPA-DP-DSB-CN, kde n je počet fotónov zaznamenaných detektorom

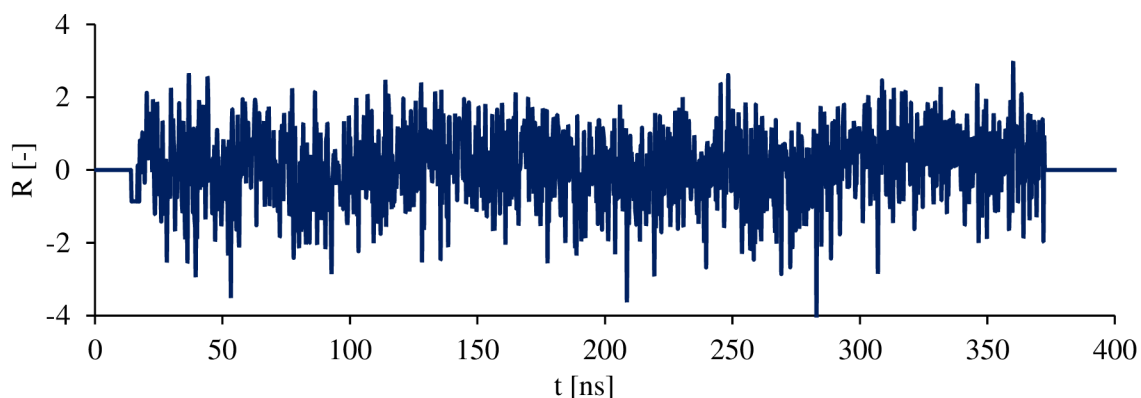


Obrázok 15: Hodnoty residuí merania doby života fluorescence pre zásobný roztok DPA-DP-DSB-CN, kde R charakterizuje hodnotu odchýlky fitovanej závislosti od skutočných dát

Namerané hodnoty doby fluorescence pre roztok nanočastíc popisuje *Obrázok 16*. Distribúcia residuí sa nachádza v *Obrázok 17*. Pri spracovaní nameraných dát bolo určené, že systém obsahuje fluorofory s štyrmi rôznymi dobami života fluorescence. To je pravdepodobne výsledok toho, že v fluorofory sa nachádzajú vo forme nanočastíc. Fluorofory nachádzajúce sa na povrchu sú, na rozdiel od tých vo vnútri, ovplyvňované vonkajším prostredím. Výsledné hodnoty sa nachádzajú v *Tabuľke 4*. Prvá hodnota doby života fluorescence je 0,014 ns s relatívnym zastúpením 53,84%, druhá hodnota je 0,60 ns s relatívnym zastúpením 26,84%, tretia 2,07 ns s 14,25% zastúpením a posledná hodnota je 10,21 ns so zastúpením 5,06%.



Obrázok 16: Doba života fluorescencie pre roztok nanočastíc, kde n je počet fotónov zaznamenaných detektorom



Obrázok 17: Hodnoty residuí merania doby života fluorescencie pre zásobný roztok DPA-DP-DSB-CN, kde R charakterizuje hodnotu odchýlky fitovanej závislosti od skutočných dát

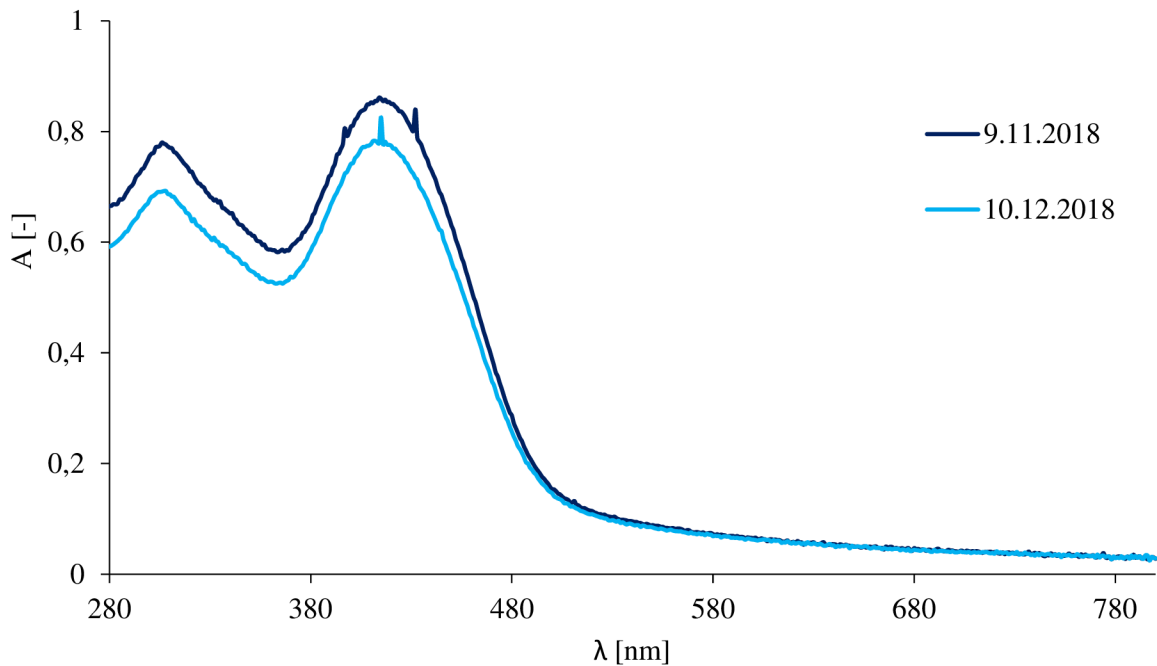
Tabuľka 4: Doba života fluorescencie zásobného roztoku DPA-DP-DSB-CN (označený ako THF) a roztoku nanočastíc (označený ako NP)

vzorka	τ [ns]	zastúpenie [%]
THF	2,23	100
NP	0,014	53,84
	0,60	26,84
	2,07	14,25
	10,21	5,06

4.1.6 Stabilita pripravených nanočastíc

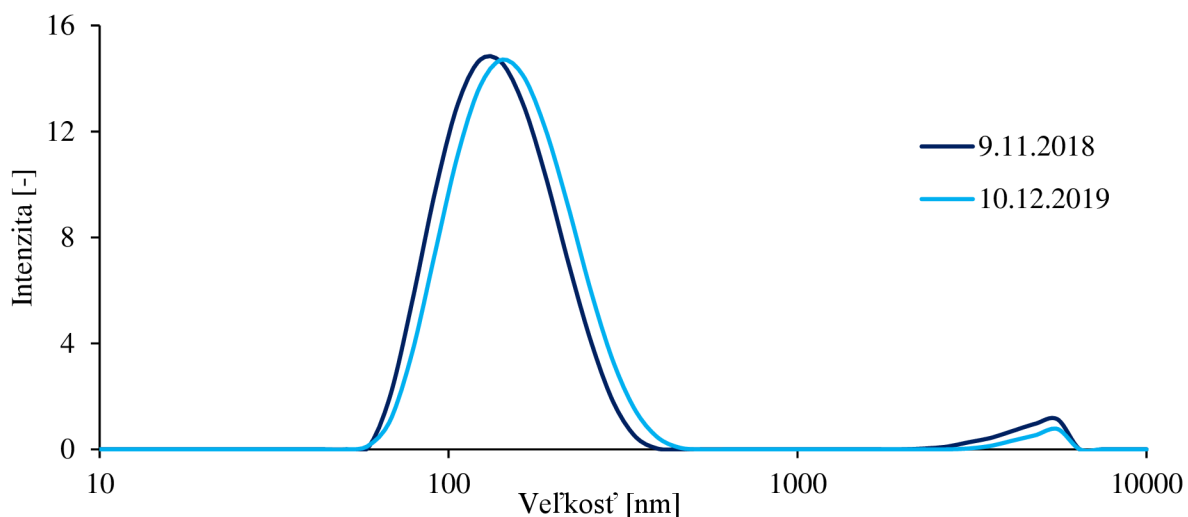
Stabilita pripravených nanočastíc bola určená absorpčným meraním a meraním veľkosti častíc metódou dynamického rozptylu svetla. Namerané spektrá z absorpčného merania sa nachádzajú na Obrázku 18. Na meranie bola použitá kremenná kyveta. Roztok nanočastíc použitý

na meranie bol pripravený 9.11.2018 z rovnakého zásobného roztoku z akého bola pripravená neskôr koncentračná rada. Približný zmiešavací pomer pri príprave roztoku bol 1 diel zásobného roztoku k 50 dielom vody. Takto pripravený roztok bol premeraný ihneď po príprave. Ďalšie meranie prebehlo približne po uplynutí jedného mesiaca. Roztok bol medzičasom uchovaný na tmavom mieste s minimálnym prístupom svetla, aby sa zamedzilo akémukoľvek ovplyvneniu vlastností roztoku žiarením. Z nameraných dát je viditeľné, že intenzita absorpcie po jednom mesiaci nepatrne klesla, a to z hodnoty 0,855 na hodnotu 0,779. Tento pokles je spôsobený úbytkom častíc – chromofor absorbujúcich svetlo v roztoku.



Obrázok 18: Absorpčné spektrá roztoku nanočastíc získané s časovým odstupom približne 1 mesiac

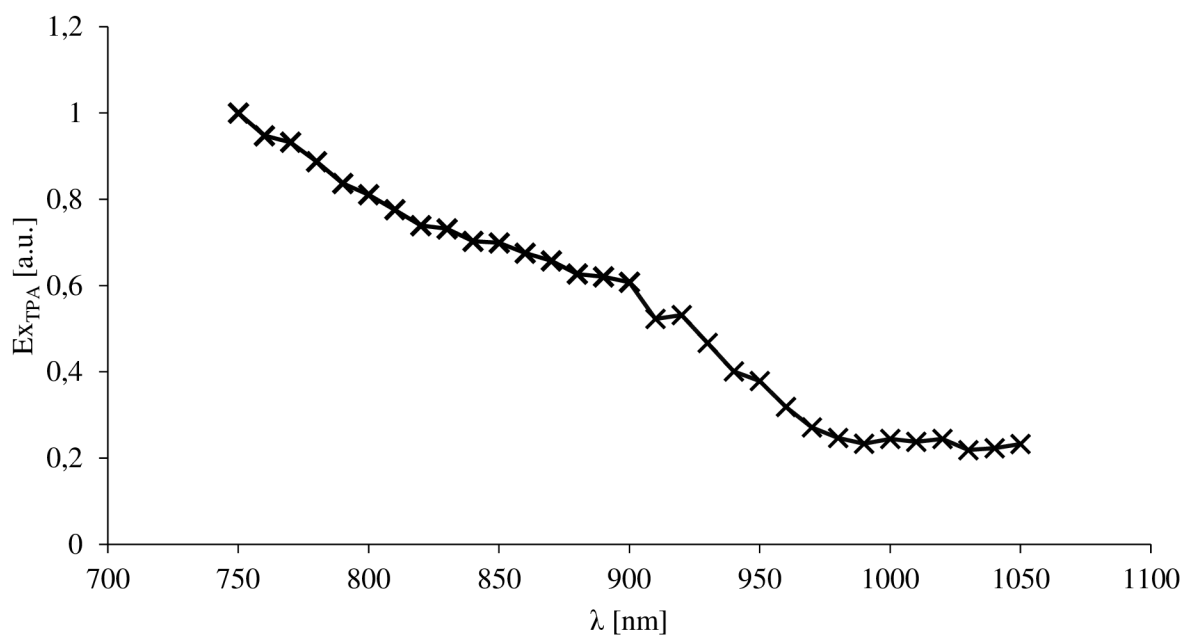
Distribúcia častíc v roztoku je charakterizovaná na *Obrázku 19*. Dáta pre distribúciu boli získané v rovnaké dni, v akých prebehlo meranie absorpcie. Merania prebiehali v jednorazovej plastovej kyvete. Podmienky experimentu boli zhodné s podmienkami merania distribúcie častíc v kapitole 4.1.2. Priemerná veľkosť častíc v roztoku ihneď po príprave bola (138 ± 3) nm s indexom polydisperzity $0,20 \pm 0,05$. S časovým odstupom jeden mesiac sa priemerná veľkosť častíc podľa nameraných dát zmenila na (147 ± 4) nm a index polydisperzity klesol na hodnotu $0,18 \pm 0,05$. Mierny nárast priemernej veľkosti je zrejme spôsobený agregáciou častíc vo vodnom prostredí. Hodnota indexu polydisperzity odráža mieru prítomnosti častíc reprezentovaných druhým píkom v intenzitnom spektre. Jedná sa o častice s veľkosťou približne 5 μ m. Prítomnosť týchto častíc bola pozorovaná u všetkých roztokov aj v kapitole 4.1.2. Jedná sa pravdepodobne o vznášajúce sa nečistoty, ktoré sa do roztokov dostali pri ich príprave.



Obrázok 19: Distribúcia veľkosti častíc toho istého roztoku nanočastíc s časovým odstupom približne 1 mesiac

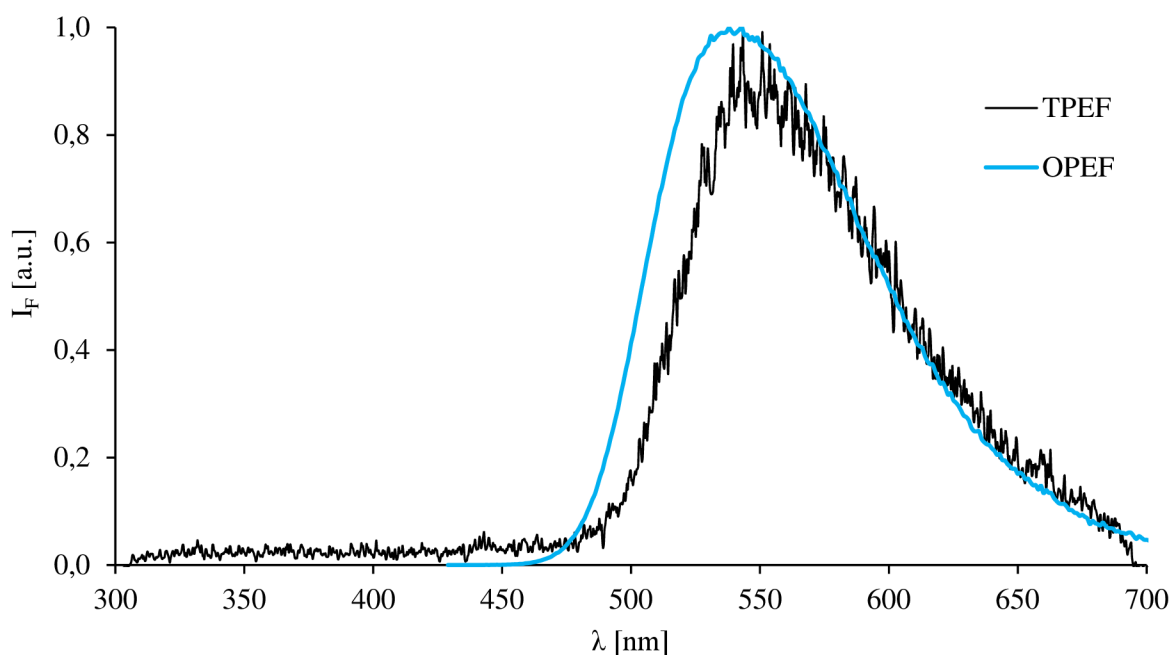
4.1.7 Dvojfotónovo excitovaná fluorescencia

Dvojfotónové excitačné spektrum roztoku nanočastíc č. 1. bolo zostrojené na prístroji *Shamrock*. Spektrum sa nachádza na *Obrázku 20*. Jednalo sa o roztok s najnižšou pripravenou koncentráciou. Roztok bol excitovaný pulzom z pikosekundového laseru. Pretože spektrálna šírka 30-ps pulzu laseru v blízkom okolí IR je približne 5–10 nm spektrum je namerané s krokmi 10 nm. Meranie spektra prebiehalo v dvoch fázach. V prvej fáze bola zaznamenávaná intenzita excitácie v rozmedzí excitačných vlnových dĺžok 750–900 nm a v druhej fáze od 900–1050 nm. Zo získaného excitačného spektra nie je možné určiť maximum dvojfotónovej excitácie. Z tvaru spektra sa dá ale predpokladať, že toto maximum sa nachádza pri vlnovej dĺžke menšej ako 750 nm. Z technických dôvodov však nie je možné previesť meranie pri vlnovej dĺžke nižšej ako 750 nm.



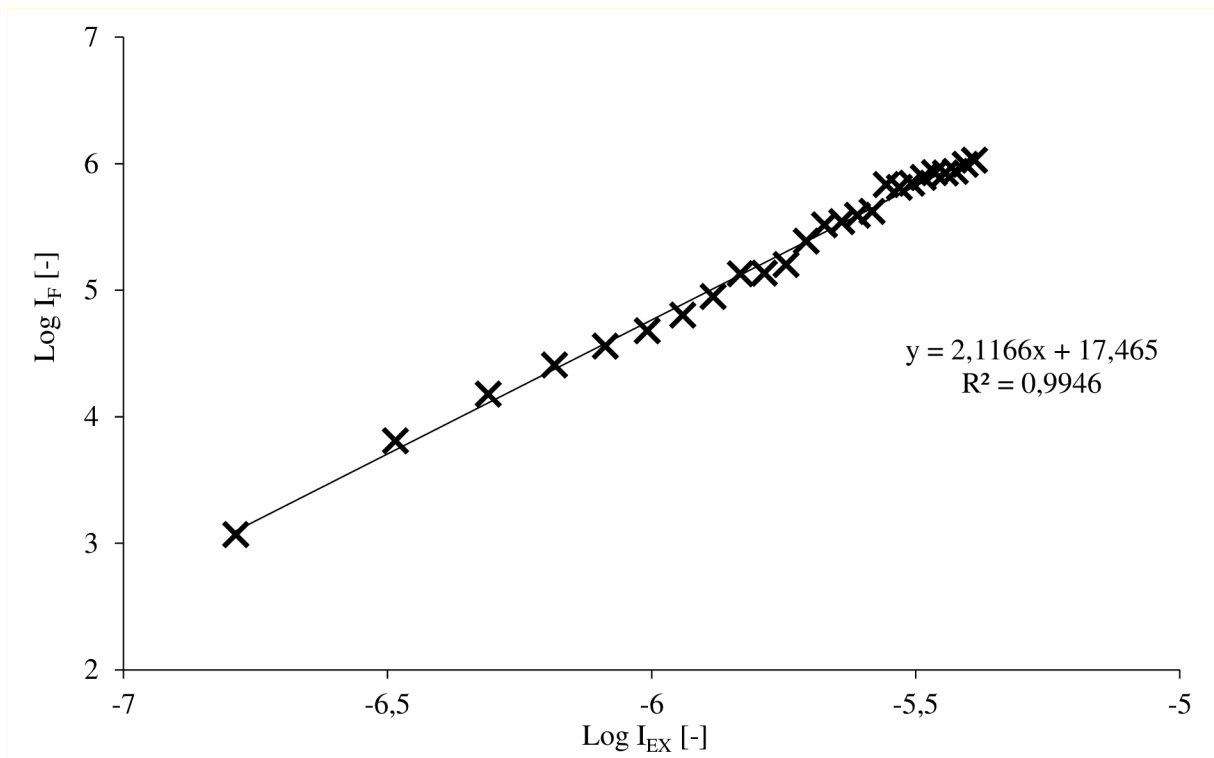
Obrázok 20: Dvojfotónové excitačné spektrum roztoku nanočastíc

Intenzita fluorescence bola premeraná pri vlnovej dĺžke excitačného pulzu 750 nm. Dvojfotónové fluorescenčné spektrum spolu s jednofotónovým sa nachádzajú na *Obrázku 21*. Maximum fluorescence sa nachádza približne pri hodnote 550 nm. Získaná hodnota približne zodpovedá maximu fluorescence excitovanej absorpciou jedného fotónu zistenej pri meraní v kapitole 4.1.3. Z toho vyplýva, že pri meraní dochádzalo k excitácii fluoroforu absorpciou práve dvoch fotónov a získané fluorescenčné spektrum sa od toho získaného jednofotónovou absorpciou takmer vôbec nelíši.



Obrázok 21: Dvojfotónové (TPEF) a jednofotónové (OPEF) fluorescenčné spektrum roztoku nanočastic

Následne bola zostrojená závislosť intenzity fluorescence na intenzite excitačného pulzu. Zostrojená závislosť sa nachádza na *Obrázku 22*. Vlnová dĺžka excitačného žiarenia bola 750 nm. Z nameraných dát je zrejmé, že s rastúcou intenzitou excitačného žiarenia rastie intenzita fluorescence. Pri dvojfotónovej fluorescencii platí, že jej intenzita rastie s druhou mocninou intenzity excitačného pulzu. Toto platí najmä pri vysokých intenzitách. Intenzita fluorescence aj excitácie boli v grafe na osi vynesené ako hodnoty logaritmu. Takto zobrazená závislosť má lineárny charakter. Smernica má hodnotu blízku dvom, čo dokazuje kvadratickú závislosť intenzity fluorescence na intenzite excitačného pulzu.



Obrázok 22: Logaritmický graf závislosti fluorescencie indukovanej dvoma fotónmi na intenzite excitačných impulzov

5 ZÁVER

V rámci bakalárskej práce bola spracovaná problematika prípravy a charakterizácie fluorescenčných organických nanočastíc. Ako vhodný kandidát na ich prípravu bol vybraný *N,N*-difenylamino-2,5-difenyl-1,4-distyrylbenzen kyanid. Táto látka je charakteristická prítomnosťou elektrón donorných a akceptorných funkčných skupín a taktiež systémom π -konjugovaných väzieb. To, spolu s objemnými substituentmi na okrajoch molekuly, sú predpoklady pre intenzívnu multifotónovú excitáciu a silnú fluorescenciu v pevnej fáze.

Zo zásobného roztoku zvolenej látky boli pripravené nanočastice zrážacou metódou založenou na zmene polarity rozpúšťadla, kedy nepolárny zásobný roztok bol za stáleho miešania pomaly pridávaný do destilovanej vody. Takýmto spôsobom bola postupne vytvorená rada roztokov, líšiacich sa zmiešavacím pomerom a teda aj polaritou prostredia v okolí vzniknutých nanočastíc.

Metódou dynamického rozptylu svetla bola určená disperzita systému jednotlivých roztokov nanočastíc. Z nameraných dát bolo zistené, že veľkosť pripravených nanočastíc do určitého bodu nezávisí na polarite prostredia. Pri koncentrácii zásobného roztoku $1,66 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ sa ako kritický ukázal byť pomer zásobného roztoku a vody 1:50. Pri nižšom zmiešavacom pomere už dochádza k samovoľnému zrážaniu nanočastíc sprevádzaného tvorbou zákalu a usadeniny.

Absorpčné spektrá pre pripravené roztoky nanočastíc boli stanovené pomocou UV-Vis spektroskopie. Získané spektrá boli porovnané so spektrami látky v pravom roztoku a v tenkej vrstve. Bola zistená minimálna odchýlka hodnoty vlnovej dĺžky, pri ktorej dochádza k maximálnej absorpcii. Pomocou fluorescenčnej spektroskopie boli zostrojené emisné a excitačné spektrá roztokov nanočastíc. Pri porovnaní fluorescenčných spektier bolo zistené, že spektrum pre pripravené nanočastice sa vyznačuje najnižšou hodnotou Stokesovho posunu. To je pravdepodobne zapríčinené špecifickým charakterom prostredia a tým, že fluorescenčné molekuly sa nepohybujú voľne roztokom, ale nachádzajú sa v svojej tesnej blízkosti v vnútri nanočastíc. Pri meraní kvantového výťažku fluorescencie bol pozorovaný predpokladaný pokles súvisiaci s rastúcou polaritou prostredia v okolí nanočastíc. Časovo rozlíšená fluorescencia poskytla údaje o dobe života fluorescencie pre roztok nanočastíc a aj pre zásobný roztok. Pre roztok nanočastíc je charakteristická prítomnosť väčšieho množstva rozličných časov života fluorescencie, čo odráža odlišnú polohu fluoroforov v štruktúre nanočastíc.

Pomocou špecializovanej laserovej aparatúry bolo zostrojené dvojfotónové excitačné spektrum, intenzitné spektrum, odrážajúce kvadratickú závislosť intenzity fluorescencie na intenzite excitačného žiarenia, a aj samotné dvojfotónovo excitované fluorescenčné spektrum. Z nameraných dát je zrejmé, že získané fluorescenčné spektrum sa od spektra získaného jednofotónovou excitáciou takmer vôbec nelíši. Intenzitné spektrum preukazuje kvadratickú závislosť intenzity fluorescencie na intenzite excitačného pulzu, čo je charakteristické pre dvojfotónovú absorpciu.

Výsledky prípravy a charakterizácie nanočastíc preukázali, že nami vybraná látka je vhodným kandidátom pre ďalšie štúdium nelineárnych optických vlastností a značia aj jej vysoký potenciál pre ďalšie využitie pre 3D zobrazovanie pomocou dvojfotónovej excitačnej mikroskopie. Látka je dobre excitovateľná a zachováva si svoju fluorescenciu aj v pevnej fáze.

6 ZDROJE

- [1] APARICIO-IXTA, Laura, Mario RODRIGUEZ, Gabriel RAMOS-ORTIZ, Gaëlle RECHER, Francesca TEREZIANI a Mireille BLANCHARD-DESCE. Organic Nanomaterials with Two-Photon Absorption Properties for Biomedical Applications. *Contemporary Optoelectronics*. Dordrecht: Springer Netherlands, 2016, 2016-9-12, 7(22), 25-50. Springer Series in Optical Sciences. DOI: 10.1007/978-94-017-7315-7_2. ISBN 978-94-017-7314-0. ISSN 16136810. Dostupné tiež z: http://link.springer.com/10.1007/978-94-017-7315-7_2
- [2] PARTHASARATHY Venkatakrishnan a spol., Suzanne FERY-FORGUES, Elisa CAMPIOLI, Gaëlle RECHER, Francesca TEREZIANI a Mireille BLANCHARD-DESCE. Dipolar versus Octupolar Triphenylamine-Based Fluorescent Organic Nanoparticles as Brilliant One- and Two-Photon Emitters for (Bio)imaging. *Small*. 2011, 7(22), 3219-3229. DOI: 10.1002/sml.201100726. ISSN 16136810. Dostupné tiež z: <http://doi.wiley.com/10.1002/sml.201100726>
- [3] DENK, W, J. STRICKLER, W. WEBB, Pi-Tai CHOU, Ching-Hsing SHEN, Chih-Wei HSU a Li-Chyong CHEN. Two-photon laser scanning fluorescence microscopy. *Science*. 1990, 1987, 248(4951), 73-76. DOI: 10.1126/science.2321027. ISSN 0036-8075. Dostupné tiež z: <http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.2321027>
- [4] FENG, Xuli, Yanli TANG, Xinrui DUAN, Libing LIU a Shu WANG. Lipid-modified conjugated polymernanoparticles for cell imaging and transfection. *J. Mater. Chem.* 2010, 20(7), 1312-1316. DOI: 10.1039/B915112E. ISSN 0959-9428. Dostupné tiež z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=B915112E>
- [5] TANG, Fu, Chun WANG, Jinshan WANG, Xiaoyu WANG, Lidong LI, Mireille BLANCHARD-DESCE a Francesca TEREZIANI. Fluorescent Organic Nanoparticles with Enhanced Fluorescence by Self-Aggregation and their Application to Cellular Imaging. *Journal of Materials Chemistry C*. Dordrecht: Springer Netherlands, 2014, 2016-9-12, 6(20), 18337-18343. Springer Series in Optical Sciences. DOI: 10.1021/am505776a. ISBN 978-94-017-7314-0. ISSN 1944-8244. Dostupné tiež z: <http://pubs.acs.org/doi/10.1021/am505776a>
- [6] SUN, Yeh-Yang, Jen-Hai LIAO, Jim-Min FANG, Pi-Tai CHOU, Ching-Hsing SHEN, Chih-Wei HSU a Li-Chyong CHEN. Fluorescent Organic Nanoparticles of Benzofuran–Naphthyridine Linked Molecules: Formation and Fluorescence Enhancement in Aqueous Media. *Organic Letters*. 2006, 8(17), 3713-3716. DOI: 10.1021/ol061293p. ISSN 1523-7060. Dostupné tiež z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ol061293p> 10.1016/j.neuron.2006.05.019
- [7] XU, Guo-Yuan, Chuan-Hui ZONG, Yi-Ang SUN, Xiao-Xi WANG, Na ZHANG, Fei WANG, Ai-Xiang LI a Qiu-Hong LI. Preparation of Core—Shell Silver Nanoparticles@Mesoporous Silica Nanospheres with Catalytic Activities. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*. 2019, 19(9), 5893-5899. DOI: 10.1166/jnn.2019.16553. ISSN 1533-4880. Dostupné tiež z: <http://www.ingentaconnect.com/content/10.1166/jnn.2019.16553>

- [8] HÁJKOVÁ, Zdeňka a Petr ŠMEJKAL. Nanovýroba v přírodovědném vzdělávání. *Chemické listy*. Praha: Česká společnost chemická, 2014, (108), 892-896. ISSN 0009-2770. Dostupné tiež z: http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2014_09_892-896.pdf
- [9] BELUSSO, Laísa C.S., Guilherme F. LENZ, Evandir E. FIORINI, Anderson J. PEREIRA, Rodrigo SEQUINEL, Rafael A. BINI, Jorlandio F. FELIX a Ricardo SCHNEIDER. Synthesis of silver nanoparticles from bottom up approach on borophosphate glass and their applications as SERS, antibacterial and glass-based catalyst. *Applied Surface Science*. 2019, 473, 303-312. DOI: 10.1016/j.apsusc.2018.12.155. ISSN 01694332. Dostupné tiež z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0169433218334937>
- [10] CAMPIOLI, Elisa, Domna Maria NIKOLAIDOU, Vincent HUGUES, Marco CAMPANINI, Lucia NASI, Mireille BLANCHARD-DESCE a Francesca TEREZIANI. Amplified two-photon brightness in organic multicomponent nanoparticles. *Journal of Materials Chemistry C*. Dordrecht: Springer Netherlands, 2015, 2016-9-12, 3(28), 7483-7491. Springer Series in Optical Sciences. DOI: 10.1039/C5TC01136A. ISBN 978-94-017-7314-0. ISSN 2050-7526. Dostupné tiež z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=C5TC01136A>
- [11] PERTILE, Eva a Peter SEGLA. *Instrumental methods of analysis*. Ostrava: VŠB - Technical University of Ostrava, 2017. ISBN 978-80-248-4124-3.
- [12] VALEUR, Bernard a Mário N. BERBERAN-SANTOS. A Brief History of Fluorescence and Phosphorescence before the Emergence of Quantum Theory. *Journal of Chemical Education*. 2011, 88(6), 731-738. DOI: 10.1021/ed100182h. ISSN 0021-9584. Dostupné tiež z: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/ed100182h>
- [13] SKOOG, Douglas A a James J LEARY. *Principles of instrumental analysis*. 4th ed. Fort Worth: Harcourt Brace College Publishers, 1992, 700 s. ISBN 0-03-075398-8.
- [14] NOOMNARM, Ulai, Robert M. CLEGG, N. R. PATIL, H. S. GEETHANJALI a R. A. KUSANUR. Fluorescence lifetimes: fundamentals and interpretations. *Photosynthesis Research*. 2009, 101(2-3), 181-194. DOI: 10.1007/s11120-009-9457-8. ISSN 0166-8595. Dostupné tiež z: <http://link.springer.com/10.1007/s11120-009-9457-8>
- [15] MCHALE, Jeanne L. *Molecular spectroscopy*. Second edition. Boca Raton, [2017]. ISBN 978-1-4665-8658-1.
- [16] CHRISTOPOULOS, THEODORE K. a ELEFTHERIOS P. DIAMANDIS. FLUORESCENCE IMMUNOASSAYS. *Immunoassay*. Elsevier, 1996, 1996, , 309-335. DOI: 10.1016/B978-012214730-2/50015-7. ISBN 9780122147302. Dostupné tiež z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780122147302500157>
- [17] NAGARAJA, D., R. M. MELAVANKI, N. R. PATIL, H. S. GEETHANJALI a R. A. KUSANUR. Solvent effect on the relative quantum yield and fluorescence quenching of a newly synthesized coumarin derivative. *Luminescence*. 2015, 30(5), 495-502. DOI: 10.1002/bio.2766. ISSN 15227235. Dostupné tiež z: <http://doi.wiley.com/10.1002/bio.2766>
- [18] ŠEVČÍKOVÁ, P., V. KAŠPÁRKOVÁ, J. KREJČÍ a P. VLTAVSKÁ. Dynamický rozptyl světla v analýze koloidních systémů. *Chemické Listy* [online]. Czech Society of Chemical Engineering, 2014, 108(5), 479-482 [cit. 2019-05-10]. ISSN 00092770.

- [19] Dynamic Light Scattering: Measuring the Particle Size Distribution. LS instruments [online]. 2014 [cit. 2019-05-10]. Dostupné tiež z: http://www.lsinstruments.ch/technology/dynamic_light_scattering_dls/
- [20] LIU, Lei-Jing, Wen LIU, Guang JI, Zhi-Yuan WU, Bin XU, Jun QIAN, Wen-Jing TIAN a Qiu-Hong LI. NIR Emission Nanoparticles Based on FRET Composed of AIE Luminogens and NIR Dyes for Two-photon Fluorescence Imaging. *Chinese Journal of Polymer Science*. 2019, **37**(4), 401-408. DOI: 10.1007/s10118-019-2206-3. ISSN 0256-7679. Dostupné tiež z: <http://link.springer.com/10.1007/s10118-019-2206-3>
- [21] ALONZO, Carlo Amadeo, Sevasti KARALIOTA, Dimitra POULI, Zhiyi LIU, Katia P. KARALIS, Irene GEORGAKOUDI a Li-Chyong CHEN. Two-photon excited fluorescence of intrinsic fluorophores enables label-free assessment of adipose tissue function. *Scientific Reports*. 2016, 1987, **6**(1), -. DOI: 10.1038/srep31012. ISSN 2045-2322. Dostupné tiež z: <http://www.nature.com/articles/srep31012>
- [22] PAUK, Karel, Stanislav LUŇÁK JR., Martin VALA, Michal HRABAL, Veronika SCHMIEDOVÁ, Martin WEITER a Aleš IMRAMOVSKÝ. Solid state fluorescence of push-pull end-capped sterically hindered distyrylbenzenes. Pardubice, Česká Republika, 2019, článok nebol v dobe prípravy tejto práce ešte publikovaný.

7 ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK

FON	fluorescenčné organické nanočastice
CVD	chemická depozícia v plynnej fáze
FAD	flavinadenindinukleotid
NAD(P)H	redukovaná forma nikotínamid adenin dinukleotid fosfátu
DPA-DP-DSB-CN	<i>N,N</i> -difenylamino-2,5-difenyl-1,4-distyrylbenzen kyanid
THF	tetrahydrofurán
RPM	otáčky za minútu
NP	nanočastice
UV	ultrafialový
Vis	viditeľný
IPD	index polydisperzity
Em	emisia
Ex	excitácia
F	fluorescencia
I	intenzita
TPA	dvojfotónová absorpcia
QY	kvantový výťažok fluorescence
TPEF	dvojfotónovo excitovaná fluorescencia
OPEF	jednofotónovo excitovaná fluorescencia