



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

LUMINISCENČNÍ NANOČÁSTICE PRO 3D ZOBRAZOVÁNÍ

LUMINESCENT NANOPARTICLES FOR 3D IMAGING

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Rastislav Smolka

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

doc. Mgr. Martin Vala, Ph.D.

BRNO 2021

Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP1520/2020 Akademický rok: 2020/21
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie
Student: **Bc. Rastislav Smolka**
Studijní program: Chemie pro medicínské aplikace
Studijní obor: Chemie pro medicínské aplikace
Vedoucí práce: **doc. Mgr. Martin Vala, Ph.D.**

Název diplomové práce:

Luminiscenční nanočástice pro 3D zobrazování

Zadání diplomové práce:

Práce je zaměřena na studium optických vlastností nových pi–konjugovaných molekul vhodných pro pokročilou zobrazovací techniku biologických preparátů, tzv. multifotonovou mikroskopii. Práce se bude soustředit na vypracování vhodné metodiky přípravy nanočástic z těchto molekul a na studium optických vlastností těchto částic včetně určení dvoufotonového absorpčního průřezu pomocí unikátní laserové aparatury. Práce přispěje k vytvoření znalostní základny pro návrh chemické struktury molekul s optimalizovanými vlastnostmi.

Termín odevzdání diplomové práce: 30.7.2021:

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

Bc. Rastislav Smolka
student(ka)

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

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 1.2.2021

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

ABSTRAKT

Cieľom tejto diplomovej práce je štúdium optických vlastností nových π -konjugovaných molekúl na báze látky 1,4-di(4'-N,N-difenylaminostyryl) benzénu a ich potencionálnej aplikácie ako prostriedkov pre pokročilé zobrazovacie techniky biologických preparátov, tzv. multifotónovou mikroskopiou. Práca sa zameriava predovšetkým na charakterizáciu ich optických vlastností a stanovenie ich dvojfotónového absorpčného prierezu pomocou unikátnej laserovej aparatury. Ďalej je tiež rozvinutá vhodná metodika prípravy nanočastíc z týchto molekúl, ich charakterizácia a stabilita. V práci je tiež skúmaný vplyv štruktúry na optické vlastnosti týchto derivátov. Bola preukázaná spojitosť medzi dĺžkou konjugovaného systému a prítomnosťou substituentov na hlavnom reťazci a optickými vlastnosťami molekúl v prostredí rozpúšťadla, polohu a tvar dvojfotónového absorpčného spektra a hodnotu dvojfotónového absorpčného prierezu. 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. Práca tak prispieva k vytvoreniu vedomostnej základne pre návrh chemickej štruktúry molekúl s optimalizovanými vlastnosťami.

ABSTRACT

The aim of this diploma thesis is to study the optical properties of new π -conjugated molecules based on 1,4-di(4'-N, N-diphenylaminostyryl)benzene and their potential application in advanced imaging techniques of biological specimens, the so-called multiphoton microscopy. The thesis focuses mainly on the characterization of their optical properties and the determination of their two-photon absorption cross-section using a unique laser equipment. Furthermore, a suitable methodology for the preparation of nanoparticles from these molecules, their characterization and stability are also developed. The thesis also investigates the influence of structure on the optical properties of these molecules. The relation between the length of the conjugated system and the presence of substituents on the backbone has been shown for the optical properties of the molecules in the solvent, the position and shape of the two-photon absorption spectrum and the value of two-photon absorption cross-section. It has been shown that this substance retains its unique fluorescent properties even in the form of nanoparticles and therefore appears to be a suitable candidate for the observation of biological specimens using multiphoton fluorescence microscopy. The work contributes to the knowledge base for the design of the chemical structure of molecules with desired properties.

KLÚČOVÉ SLOVÁ

Fluorescenčné organické nanočastice, fluorescencia, distyrylbenzén, nelineárne optické vlastnosti, dvojfotónová absorpcia, dvojfotónový absorpčný prierez

KEY WORDS

Fluorescent organic nanoparticles, fluorescence, distyrylbenzene, nonlinear optical properties, two-photon absorption, two-photon absorption cross-section

SMOLKA, Rastislav. *Luminiscenční nanočástice pro 3D zobrazování*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav fyzikální a spotřební chemie, 2021. 60s. Vedúci diplomovej práce doc. Mgr. Martin Vala, Ph.D.

ČESTNÉ PREHLÁSENIE

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

.....

podpis študenta

POĎAKOVANIE

V prvom rade by som chcel poďakovať svojmu vedúcemu diplomovej 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	7
2 Teoretická časť	9
2.1 Fluorescenčné organické nanočastice	9
2.1.1 Príprava organických nanočastíc	9
2.1.2 Biozobrazovanie	12
2.2 Luminiscencia	14
2.2.1 Kvantový výťažok fluorescencie	17
2.3 Nelineárne optické vlastnosti	17
2.3.1 Dvojfotónová absorpcia žiarenia	18
2.3.2 Dvojfotónový absorpčný prierez	19
2.3.3 Multifotónová mikroskopia	20
2.4 Súčasný stav riešenej problematiky	21
2.4.1 Fluorescencia u nanočastíc	22
2.4.2 Vplyv zhášania fluorescencie	23
2.4.3 Agregáciou indukovaná fluorescencia	24
3 Experimentálna časť	26
3.1 Zoznam použitých prístrojov	26
3.2 Skúmané materiály	26
3.2.1 Príprava roztokov skúmaných látok	28
3.2.2 Stanovenie optických vlastností	29
3.2.3 Stanovenie nelineárnych optických vlastností	30
3.3 Príprava a charakterizácia nanočastíc	31
4 Výsledky a diskusia	32
4.1 Charakterizácia skúmaných materiálov	32
4.1.1 Stanovenie absorpčných spektier a stability	32
4.1.2 Jednofotónová excitácia a fluorescencia	34
4.1.3 Dvojfotónová excitácia a emisia	37
4.1.4 Intenzitné merania a stanovenie dvojfotónového absorpčného prierezu	40
4.2 Charakterizácia nanočastíc	44
4.2.1 Normalizácia prípravy nanočastíc	45
5 Záver	49

6	Zoznam použitej literatúry.....	51
7	Zoznam použitých skratiek.....	59

1 ÚVOD

Zameraním tejto diplomovej práce je predovšetkým téma fluorescenčných organických nanočastíc a ich využitie v oblasti multifotónovej mikroskopie. Fluorescenčné nanočastice pripravené z rôznych organických molekúl a ich potencionálne využitie ako zobrazovacie prostriedky v biozobrazovaní v poslednej dobe vzbudili nemalú pozornosť. Vyznačujú sa svojou jednoduchosťou, dostupnosťou a rôznymi optickými vlastnosťami porovnateľnými s vlastnosťami konjugovaných polymérnych bodiek [1], ktoré umožňujú ich využitie v rôznych oblastiach biomedicíny a mikroskopii živých systémov. Medzi takéto mikroskopické techniky patrí aj multifotónová fluorescenčná mikroskopia [2]. Vo vývoji fluorescenčných nanočastíc sa neustále uskutočňujú rôzne pokroky, ale aj napriek tomu je táto téma stále pomerne málo preskúmaná [3, 4].

Je známych mnoho rôznych druhov organických a anorganických látok, ktoré môžu byť využité ako fluorescenčné sondy pri multifotónovom snímaní a zobrazovaní živých systémov *in vitro* a *in vivo*. Pre aplikáciu v tejto oblasti sú najvhodnejšie predovšetkým organické molekuly so systémom konjugovaných dvojitých väzieb. Takéto systémy sú charakteristické svojou schopnosťou emitovať žiarenie ako následok multifotónovej excitácie. Efektivita tohto procesu je úmerná veľkosti ich dvojfotónového absorpčného prierezu. Stratégia návrhu molekúl s veľkými dvojfotónovými absorpčnými prierezmi (δ_{TPA}) bola navrhnutá na základe modelu charakterizujúceho symetrický prenos náboja po excitácii z koncov konjugovaného systému tvoreného donornými alebo akceptornými skupinami do stredu molekuly alebo naopak prostredníctvom π mostíku. Dipolárne, kvadrupolárne a oktupolárne molekuly so štruktúrou odpovedajúcou motívu donor- π -donor, donor-akceptor-donor alebo akceptor-donor-akceptor vykazujú výnimočne vysoké hodnoty δ_{TPA} . Kombinácia veľkého δ_{TPA} a taktiež vysokého kvantového výťažku fluorescencie zabezpečuje intenzívny jas pri dvojfotónovej fluorescenčnej mikroskopii [2].

Nevýhodou väčšiny takýchto molekúl je ich nízka rozpustnosť vo vodnom prostredí, čo značne komplikuje ich využitie v zobrazovaní živých systémov. Z tohto hľadiska je dôležitý výskum fluorescenčných sond rozpustných vo vodnom prostredí, ktoré je pre pozorované živé organizmy tolerovateľné. To môže byť umožnené ich využitím vo forme vodnej suspenzie nanočastíc. Využitie organických molekúl ako stavebných jednotiek nanočastíc so sebou nesie množstvo výhod. Vyznačujú sa predovšetkým svojou biokompatibilitou a možnosťou modifikácie [2, 5]. Rôznymi syntetickými cestami je možné z jedinej východiskovej látky pripraviť široké spektrum derivátov s rozličnými vlastnosťami. Okrem toho, pri ich príprave nie sú potrebné žiadne stabilizujúce povrchovo aktívne látky, čo zamedzuje nežiaducim kontaktom neaktívnej zložky nanočastíc so živými organizmami.

Mnohé fluorescenčné sondy však vykazujú v agregovanom stave vo forme nanočastíc nízku intenzitu fluorescencie. To je zapríčinené najmä tzv. agregáciou indukovaným zhasaním fluorescencie, ktoré je spôsobené vzájomnými π - π interakciami medzi molekulami. Preto je dôležité skúmať spôsoby ako fluorescenciu v agregovanom stave podporiť. Jednou z mnohých možností je využitie tzv. agregáciou indukovanej fluorescencie, kedy sú medzimolekulárne interakcie využité na zintenzívnenie fluorescencie. Ďalšou možnosťou je modifikácia ich

štruktúry prídavkom rôznych substituentov, ktoré sféricky bránia π - π interakciami medzi susednými fluoroformi a tak zvyšujú intenzitu fluorescence [6].

Táto práca bude preto zameraná na skúmanie nových derivátov látky 1,4-di(4'-N,N-difenylnostyryl) benzénu, o ktorej je známe, že má pomerne vysokú hodnotu δ_{TPA} . Dôraz bude kladený predovšetkým na ich charakterizáciu vo forme roztokov, na ich fluorescenčné vlastnosti a najmä nelineárne optické vlastnosti. Bude pozorovaný vplyv modifikácie ich štruktúry predĺžovaním π mostíku a substitúciou hlavného reťazca na ich emisné, excitačné a absorpčné spektrá a kvantový výťažok fluorescence. Pre študované deriváty bude následne stanovená hodnota dvojfotónového absorpčného prierezu pomocou špecializovanej laserovej aparatúry. Ďalej budú skúmané roztoky nanočastíc pripravené z týchto derivátov. Experimenty budú zamerané predovšetkým na ich stabilitu a fluorescenčné vlastnosti vo forme vodnej suspenzie. Kombinácia týchto vlastností by mala poukázať na ich potencionálne využitie v oblasti biozobrazovania a multifotónovej mikroskopie.

2 TEORETICKÁ ČASŤ

2.1 Fluorescenčné organické nanočastice

Nanočastice sú pevné koloidné častice v rozmedzí veľkostí od 10 do 1000 nm. Fluorescenčné organické nanočastice pozostávajú z organických molekúl, ktoré sú charakteristické prítomnosťou systému konjugovaných dvojitých väzieb. Prítomnosť tohto systému má za následok pomerne jednoduchú možnosť modifikácie ich optických a elektrických vlastností. Organické nanočastice majú v porovnaní s anorganickými nanočasticami navrch práve preto, že sú pripravené z organických molekúl, čo umožňuje ich oveľa väčšiu variabilitu a flexibilitu pri syntéze materiálov a pri príprave nanočastíc [2–5].

V porovnaní s anorganickými fluorescenčnými nanočasticami, najmä kvantovými bodkami, sa znižuje riziko spojené s uvoľňovaním ťažkých kovov [7], čo umožňuje vnímanie takýchto nanočastíc ako alternatívy kvantových bodiek. Vo vnútri organických nanočastíc je možné zapuzdriť veľké množstvo fluorescenčných molekúl, a aj napriek tomu vykazujú preto v tejto podobe zvýšenú fotostabilitu. To platí či už sa jedná o organické nanočastice s molekulami fluorescenčného farbiva enkapsulovaného vo vnútri [8] alebo o častice už pozostávajúce z fluorescenčných molekúl [9].

Dôležitým krokom, vrátane samotnej prípravy organických nanočastíc, je ich charakterizácia a pozorovanie ich vlastností. To je možné najmä vďaka technikám zaoberajúcich sa lineárnymi a nelineárnymi optickými vlastnosťami, ako napríklad fluorescenčná spektroskopia, časovo rozlíšená spektroskopia a multifotónová mikroskopia [2, 3]. Keďže sa jedná o nanočastice, dôležitou technikou zameranou primárne na charakterizáciu suspenzií nanočastíc je metóda dynamického rozptylu svetla. Táto metóda nám okrem iného poskytuje informácie o veľkosti častíc nachádzajúcich sa v systéme [10]. Mnoho vlastností nanočastíc má priamy súvis s ich veľkosťou. Veľkosť pomeru povrchu nanočastice k jej objemu zohráva kľúčovú rolu najmä v oblasti ich využitia ako nanosenzorov založených na povrchových reakciách. Preto je veľmi dôležité vedieť presne charakterizovať veľkostnú distribúciu častíc v suspenzii [11].

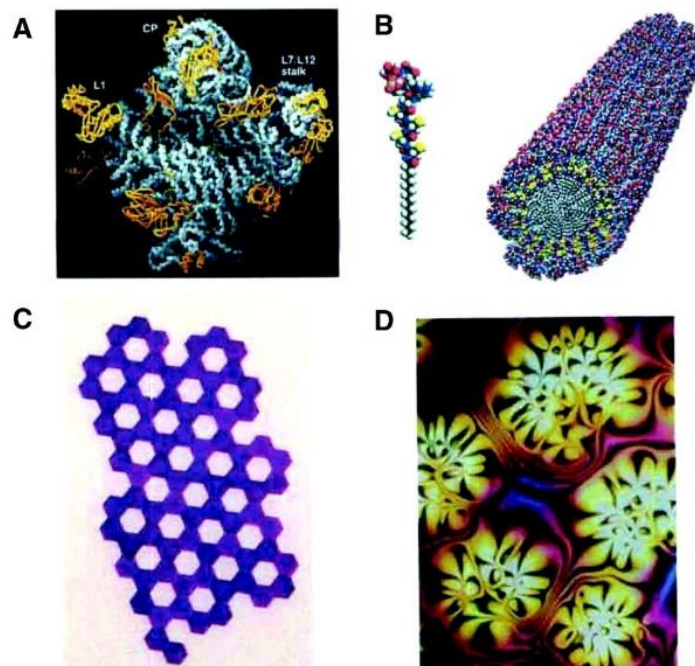
Fluorescenčné organické molekuly majú potencionálne využitie najmä v oblasti elektroniky, fotoniky a polovodičových súčiastok. Vo forme nanočastíc by častice mohli nájsť uplatnenie ako fotokatalyzátory a fluorescenčné senzory pre analýzu biologických vzoriek molekúl a znečisťujúcich látok. V oblasti farmaceutických vied a biológie zase ako nosičové systémy pre prenos a ciele distribúciu farbív na značenie buniek [3, 6, 12]. Z hľadiska zamerania tejto práce je však najdôležitejšie práve ich potencionálne využitie v multifotónovej mikroskopii a biozobrazovaní.

2.1.1 Príprava organických nanočastíc

Jedným z možných prístupov k syntéze takýchto nanočastíc, je metóda samousporiadavania, ktorá je zároveň najpopulárnejšou a pomerne jednoduchou metódou. Jedná sa o priamy proces, ktorý môže byť aplikovaný na široké spektrum rôznych materiálov, ako aj napríklad kovových nanočastíc [13].

Samousporiadavanie označuje proces, pri ktorom sa nanočastice alebo iné oddelené častice začnú spontánne organizovať a vytvárať väčší systém. K organizácii dochádza v dôsledku prítomnosti rôznych špecifických interakcií a to priamo alebo nepriamo, prejav interakcií je sprostredkovaný okolitým prostredím. Základné stavebné jednotky sa organizujú do usporiadaných, makroskopických štruktúr. Samousporiadavanie je zvyčajne spájané s termodynamickou rovnováhou systému, pričom vzniknuté organizované štruktúry sú charakteristické minimálnou hodnotou voľnej energie [15].

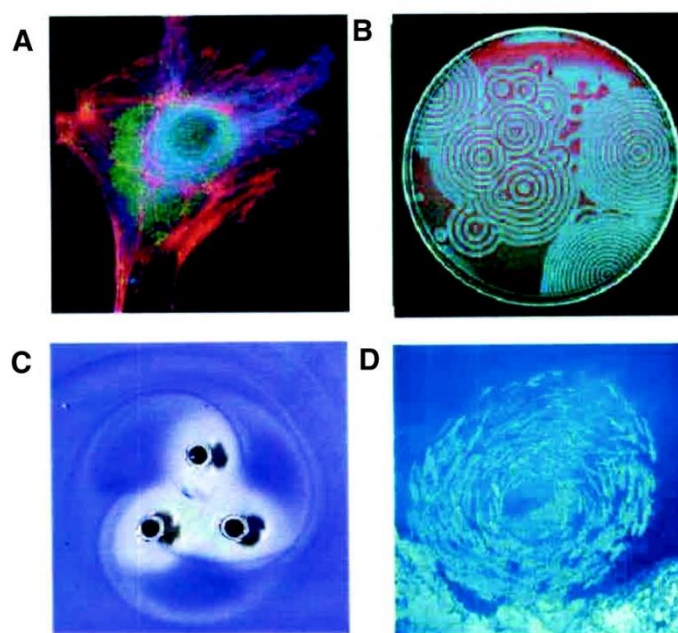
Samousporiadavanie preto môžeme rozdeliť do dvoch skupín a to na statické a dynamické. Statické samousporiadavanie zvyčajne označuje systém, pre ktorý platí, že sa nachádza v rovnováhe a ďalej nepredáva energiu svojmu okoliu. Medzi takéto systémy patria napríklad molekulárne kryštály, ktoré sú vytvorené procesom statického samousporiadavania, alebo proteíny, ktoré tvoria v roztoku stabilné štruktúry. Pri tomto procese môže vytvorenie usporiadanej štruktúry vyžadovať dodanie energie z vonkajšieho prostredia. Táto energia je dodávaná najčastejšie vo forme miešania. Vytvorená usporiadaná štruktúra je stabilná [14]. Príklady statického samousporiadavania pozorované v prírode sa nachádzajú na obrázku 1.



Obrázok 1: Príklad statického samousporiadavania systémov. Na obrázku A je príklad kryštalickej štruktúry ribozómu, obrázok B znázorňuje samousporiadane nanovlákiek amfifilného peptidu, na obrázku C sa nachádza systém polymérnej vrstvy vo veľkosti niekoľkých milimetrov vzniknutý vplyvom kapilárnych interakcií na rozhraní vody a perfluordekalínu a na obrázku D tenký film nematického tekutého kryštálu na izotropnom substráte [15].

Dynamické samousporiadavanie je charakteristické tým, že na vytvorenie stabilnej štruktúry je potrebné aby sa energia mohla šíriť systémom. Pri tomto procese sa štruktúra už existujúcich zložiek organizuje pod vplyvom špecifických lokálnych interakcií. Typickým príkladom takéhoto systému sú takzvané oscilačné reakcie. Pri týchto reakciách dochádza v systéme k priamym aj spätným reakciám sprostredkovaných vzájomnou difúziou zložiek systému [15].

V technologických aplikáciách je potrebné aby takýto proces bol dobre kontrolovateľný. Vysoká úroveň kontroly nad takýmto procesom je nevyhnutná pre účinný scale-up. Termodynamické sily, ktoré ovládajú takýto proces musia byť preto ovplyvniteľné využitím jednoduchých princípov chémie, nejakej formy šablóny alebo vplyvu externej sily vo forme poľa [16]. Z chemického hľadiska to znamená využitie faktorov riadiacich interakcie medzi molekulami nachádzajúcimi sa na koloidných rozhraniach. Medzi takéto faktory patrí teplota, pH [17], elektromagnetické žiarenie, polarita rozpúšťadla alebo redoxná aktivita [18]. Takéto samousporiadavanie sa tak označuje ako riadené samousporiadavanie za pomoci molekulárnych interakcií. Základom procesu však stále ostáva výber a tvorba vhodných stavebných jednotiek za účelom samousporiadania, uľahčený ovplyvňovaním vhodných termodynamických síl bez použitia pokročilých a zložitých techník [15]. Príklady dynamického samousporiadavania pozorované v prírode sa nachádzajú na obrázku 2.



Obrázok 2: Príklad dynamického samousporiadavania. Na obrázku A je príklad mikrofotografie bunky s fluorescenčne značeným cytoskeletonom a jadrom, mikrotubuly s priemerom asi 24 nm sú sfarbené do červena, obrázok B znázorňuje oscilačnú chemickú reakciu Belousov–Zhabotinského v Petriho miske, na obrázku C sa nachádza agregát troch milimetrových rotujúcich magnetických diskov, ktoré navzájom interagujú prostredníctvom vírových interakcií a na obrázku D húf rýb v mori [15].

Na prípravu organických nanočastíc sa v širokej miere využíva práve metóda samousporiadavania označovaná v tomto prípade ako nanoprecipitačná metóda alebo tiež metóda vytesňovania rozpúšťadla [19], ktorá bola po prvýkrát vyvinutá a patentovaná v roku 1989 [20]. Táto metóda predstavuje množstvo výhod v tom, že sa jedná o techniku priamu, rýchlu a ľahko vykonateľnú. Tvorba nanočastíc je okamžitá a celý postup sa uskutočňuje iba v jednom kroku. Na prípravu sú potrebné dve rozpúšťadlá, ktoré sú vzájomne miešateľné. Najčastejšie je východiskovým roztokom roztok hydrofóbnej zlúčeniny rozpustenej v málo polárnom rozpúšťadle. Zároveň táto látka nie je rozpustná v druhom rozpúšťadle. Nanoprecipitácia nastáva rýchlou desolvatáciou molekúl zlúčeniny, v momente keď sa východiskový roztok pridá k rozpúšťadlu, v ktorom nie je zlúčenina rozpustná. Akonáhle východiskové rozpúšťadlo obsahujúce zlúčeninu difunduje do nadbytku druhého rozpúšťadla,

zlúčenina sa vyzráža. Rýchla tvorba nanočastíc je riadená takzvaným Marangoniho efektom, ktorý je spôsobený medzifázovými javmi, ktoré prebiehajú na rozhraní dvoch rozpúšťadiel. Tie sú výsledkom rôznych procesov, ako sú zmeny prietoku, difúzie a povrchového napätia. Nanoprecipitácia často umožňuje produkciu malých nanočastíc v rozmedzí 100–300 nm s úzkou distribúciou [21] a s rôznymi optickými vlastnosťami [3, 6, 16]. Pri tvorbe nanočastíc nie sú povrchovo aktívne látky vždy potrebné a neprijateľné toxické organické rozpúšťadlá sú z tohto postupu všeobecne vylúčené. Pôvodná metóda nanoprecipitácie však má určité nevýhody. Táto technika nie je väčšinou vhodná pre zlúčeniny, ktoré majú hydrofilnú povahu [20]. Avšak práve vodné prostredie, v ktorom nedochádza k rozpúšťaniu východiskovej zlúčeniny, zohráva dôležitú úlohu z hľadiska aplikácie nanočastíc v biozobrazovaní [22].

2.1.2 Biozobrazovanie

Zobrazovanie biologických systémov *in vivo* a *in vitro* je už po značnú dobu uskutočňované pomocou mikroskopických techník založených na interakcii žiarenia a hmoty. V týchto technikách je ako žiarenie využívané práve svetlo [23]. Svetelné žiarenie sa vyznačuje tým, že je neinvazívne, schopné vytvoriť kontrast zmenou intenzity, vlnovej dĺžky, polarizácie [24], interferencie [25] alebo využiť nelineárne optické vlastnosti materiálov [26].

Vysoký rozptyl svetla, autofluorescencia a absorpcia určitých bielkovín prítomných v biologických systémoch je niekoľko problémov, ktoré komplikujú zobrazovanie vo viditeľnom spektre. Preto sa pre dosiahnutie rôznych výsledkov využívajú zdroje žiarenia s rôznou vlnovou dĺžkou v závislosti na požadovanej hĺbke prieniku žiarenia cez biologický materiál. Žiarenie s nízkou vlnovou dĺžkou, ako je UV žiarenie, je silno pohlcované už vo vrchných tkanivových vrstvách preparátu. Hĺbka prieniku tkanivom v takomto prípade sa pohybuje niekde v rozmedzí pár mikrometrov až jedného milimetra. Látka, ktorá je typická tým, že absorbuje značné množstvo žiarenia vo viditeľnej časti spektra je hemoglobín. Voda a lipidy sú naopak charakteristické vysokou absorpciou v infračervenej oblasti [27]. Tieto látky však vykazujú pomerne nízku absorpciu žiarenia v oblasti blízkeho infračerveného žiarenia. Preto žiarenie s vyššou vlnovou dĺžkou, akým je blízke infračervené žiarenie, vyniká vyššou hĺbkou prieniku v dôsledku minimálnej absorpcie vrchných tkanivových vrstiev preparátu [2].

Fluorescenčné sondy pozostávajúce z organických molekúl sú pomerne bežne využívané pre potreby zobrazovania. Mnohé z takýchto bežne využívaných sond majú svoje nevýhody:

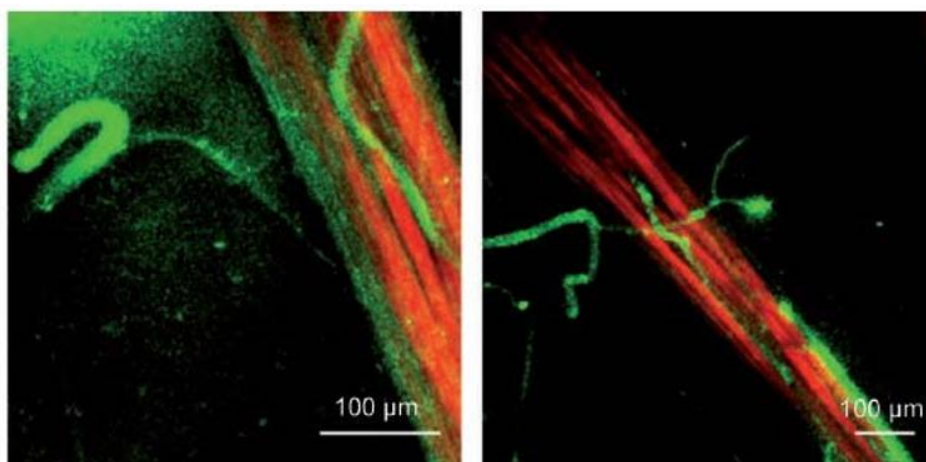
1. Častokrát sú náchylné na rýchly fotobleaching (vybielovanie), takže nie sú schopné udržať si svoje fluorescenčné vlastnosti po dlhšiu dobu ožarovania.
2. Organické fluorofory majú typicky široké emisné spektrá siahajúce cez niekoľko stoviek nanometrov. Preto nie sú ideálne pre zobrazovanie za použitia viacerých rozdielnych fluoroforov súbežne. Emisné spektrá sa navzájom prekrývajú, čo znemožňuje od seba spoľahlivo rozlíšiť jednotlivé fluorofory. Mnohé môžu byť efektívne excitované iba žiarením s určitou vlnovou dĺžkou, čo znemožňuje využitie jedného excitačného žiarenia pre viac rozdielnych fluoroforov.

3. Emisné a excitačné spektrá môžu byť ovplyvnené prostredím, v ktorom sa fluorofor nachádza. Na tvar a povahu spektra má vplyv najmä pH, polarita a rôzne medzimolekulárne interakcie.
4. Žiarenie získané z fluorescenčnej sondy sa môže prekryvať s autofluorescenciou z okolitého tkaniva. Autofluorescencia je často spôsobená prítomnosťou malého množstva prirodzene sa vyskytujúcich fluoroforov v živých organizmoch. Medzi takéto fluorofory patrí napríklad nikotínamidadenín-dinukleotid (NAD(H)), flavíny, kolagén a elastín [28].

Zobrazovanie biologických systémov je možné aj za použitia nanočastíc ako fluorescenčných sond. Nanočastice sa vyznačujú jednoduchosťou svojej prípravy, rôznou veľkosťou a možnosťou byť zostavené s inkorporovanými biologickými ligandami slúžiacimi na rozpoznávanie. Dôležitými vlastnosťami, ktoré by mali spĺňať fluorescenčné sondy na báze nanočastíc, sú najmä:

1. Stabilita *in vivo* a *in vitro*
2. Odolnosť voči fotobleachingu [29]
3. Vysoký kvantový výťažok fluorescencie
4. Odolnosť voči odbúraniu vo vnútri živých systémov
5. Netoxickosť
6. Charakteristické emisné spektrum s maximom s vhodnou vlnovou dĺžkou
7. Schopnosť tvoriť stabilnú suspenziu vo fyziologickom prostredí [30]

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 boli zhotovené dvojfotónovým fluorescenčným mikroskopom (viď obrázok 3). Týmto experimentom bolo potvrdené, že luminiscenčné nanočastice pripravené z vhodných molekúl sa naozaj dajú použiť ako prostriedky na 3D zobrazovanie biologických preparátov [3].



Obrázok 3: Snímky tkaniva žubrienky zosťovené dvojfotónovou fluorescenčnou mikroskopiou po vstriednutí 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 [3].

2.2 Luminiscencia

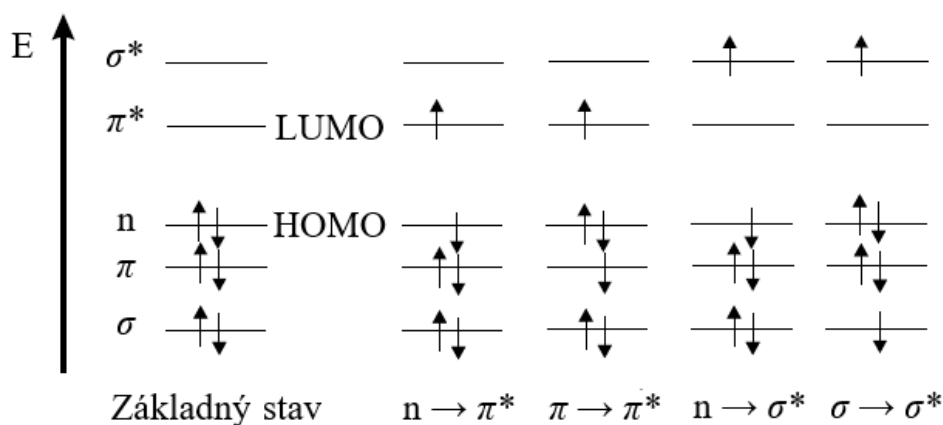
Luminiscencia je proces pri ktorom dochádza k uvoľňovaniu fotónov ultrafialového, viditeľného a infračerveného spektra z molekúl v excitovanom stave. Slovo luminiscencia pochádza z latinčiny (*lumen* = svetlo) a po prvýkrát bol tento termín použitý fyzikom a vedcom Eilhardtom Wiedemannom v roku 1888, v snahe opísať všetky svetelné fenomény, ktoré nie sú priamo spojené so zvyšovaním teploty [31]. Fotoluminiscencia je teda proces, pri ktorom dochádza k emitovaniu žiarenia hmotou. V tomto prípade predchádza procesu fotoluminiscencie excitácia molekúl prostredníctvom absorpcie elektromagnetického žiarenia o vhodnej vlnovej dĺžke. Časti molekuly zodpovedné za luminiscenciu sa nazývajú fluorofory. Tieto časti molekúl sú najmä charakteristické svojim systémom konjugovaných dvojitých väzieb, môžu to byť aromatické zlúčeniny, heterocyklické zlúčeniny alebo organkovové zlúčeniny [22, 33].

Molekuly sa zvyčajne nachádzajú v základnom stave, čiže v energeticky najnižšom stave, s elektrónom lokalizovaným na základnej singletovej hladine. Prechod elektrónov v polyatómových molekulách spočíva v prestupe elektrónu z orbitálu molekuly v základnom stave na voľný neobsadený orbitál pomocou absorpcie fotónu. Molekulový orbitál σ môže byť tvorený buď z dvoch s orbitálov dvoch atómov, z jedného s orbitálu a jedného p orbitálu alebo tiež z dvoch p orbitálov, ktorých osa väzby je kolmá na spojnicu stredov jadier. V prípade dvoch s orbitálov sa takto vzniknutá väzba nazýva σ väzba. π molekulový orbitál teda tvoria dva p orbitály molekúl, ktoré sa navzájom prekrývajú. Vzniknutá väzba sa nazýva π väzba [32]. Napríklad v molekule etylénu sú atómy uhlíka navzájom spojené jednou σ väzbou a jednou π väzbou. Absorpcia vhodného množstva energie vo forme fotónu môže viesť k tomu, že jeden z elektrónov π väzby prejde na protiväzbový orbitál označený π^* . Takýto prechod sa potom označuje ako prechod $\pi \rightarrow \pi^*$. Prechod elektrónu z σ väzby si vyžaduje absorpciu oveľa väčšej energie z oblasti UV žiarenia [34].

Molekuly môžu tiež obsahovať nespárované voľné elektróny. V prípade molekuly formaldehydu je zdrojom takýchto elektrónov heteroatóm kyslík. Takéto molekulové orbitály sú označované ako n orbitály. Prechod neväzbového elektrónu do protiväzbového orbitálu je možný a tento jav je označovaný ako prechod $n \rightarrow \pi^*$. Energia potrebná na uskutočnenie týchto elektrónových prechodov v molekule zvyčajne rastie v tomto poradí [32, 34]:

$$n \rightarrow \pi^* < \pi \rightarrow \pi^* < n \rightarrow \sigma^* < \sigma \rightarrow \pi^* < \sigma \rightarrow \sigma^*$$

Obrázok 4 znázorňuje energetické hladiny a možnosti prechodu elektrónov medzi týmito hladinami na príklade formaldehydu [34]. Zaujímavým prechodom je prechod $n \rightarrow \pi^*$, kedy po excitácii sa presunie elektrón z oblasti v okolí atómu kyslíku do priestoru medzi kyslíkom a uhlíkom. Preto je tento prechod spojený s prenosom náboja v rámci molekuly. To sa prejaví na zvýšení dipólového momentu molekuly v porovnaní s molekulou v základnom stave [35]. U spektroskopických metód hrajú dôležitú úlohu dva typy orbitálov. Najvyšší obsadený molekulový orbitál (HOMO) a najnižší neobsadený molekulový orbitál (LUMO) charakterizujú energetický stav molekuly v základnom stave. V prípade formaldehydu je HOMO n orbitál a LUMO π^* orbitál [36].



Obrázok 4: Molekulárne orbitály prítomné v molekule formaldehydu a možné prechody elektrónov [34]

Po absorpcii žiarenia dochádza k presunu elektrónu zo základného stavu (S_0) 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. Druhým typom je tripletový stav (T_1). V tomto prípade sú spiny oboch elektrónov paralelné [9, 10]. Keď jeden z elektrónov zo základného stavu prejde do orbitálu s vyššou energiou jeho spin ostáva nezmenený a tiež preto nedochádza k zmene celkového kvantového čísla spinu S , ktorý je rovný nule. Multiplicita, ktorá charakterizuje zmenu kvantového stavu molekuly spôsobenou nenulovou hodnotou celkového spinu elektrónov, je v prípade základného a excitovaného stavu rovnaká a podľa rovnice (1) rovná jednej. Preto obidva tieto stavy sa označujú pojmom singletový stav. Základný stav je označovaný ako S_0 a excitované stavy ako S_1 , S_2 atd [34].

$$M = 2S + 1 \tag{1}$$

Takýto prechod elektrónu je označovaný ako singlet-singlet prechod. Môže dôjsť k prechodu molekuly zo singletového stavu do stavu, v ktorom dôjde k zmene spinu elektrónu. V takomto stave dôjde k tomu, že celkové kvantové číslo nadobudne hodnoty 1 a multiplicita bude tak rovná 3. Takýto stav sa preto označuje ako tripletový stav a podľa Hundovho pravidla má takýto stav nižšiu energiu ako singletový excitovaný stav. V molekule akou je formaldehyd sa väzbové a protiväzbové orbitály nachádzajú medzi dvoma atómami zapojených vo väzbe. V prípade molekúl s konjugovaným systémom dvojitéch väzieb sa π orbitál nachádza pozdĺž celého reťazca a tvorí tak delokalizovaný systém elektrónov, ktorý je zároveň nezávislý od σ orbitálov a elektrónov zapojených v σ väzbe. Čím je tento systém delokalizovaných elektrónov rozsiahlejší, tým nižšiu energiu vyžaduje prechod $\pi \rightarrow \pi^*$. To sa prejaví na prítomnosti absorpčného pásu vo väčších vlnových dĺžkach [34, 36].

Pri prechode systému z excitovaného stavu do stavu s nižšou energiou dochádza k emisii 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). Najčastejšie je možné pozorovať fluorescenciu u organických látok, z ktorých sú najčastejšie používané zlúčeniny obsahujúce aromatické cykly [33, 37].

Fluorescenčné spektrá majú niekoľko zaujímavých vlastností. Emisné spektrum je nezávislé od energie excitačného žiarenia, teda jeho vlnovej dĺžky, za predpokladu, že má excitačné žiarenie dostatočnú energiu aby vôbec došlo k excitácii. To, že emisné spektrum je nezávislé od excitačnej energie je výsledkom rýchlej vnútornej konverzie excitovaného stavu z vyšších energetických a vibračných hladín do základnej vibračnej hladiny prvého excitovaného stavu S_1 a následnej žiarivej deexcitácie. Pre mnohé bežné fluorofory platí, že energetický rozdiel medzi jednotlivými vibračnými hladinami je podobný pre stavy S_0 a S_1 , čo vedie k zrkadlovej podobnosti fluorescenčného a excitačného spektra [38]. Rovnaké elektrónové prechody sú teda výhodné pre obidva javy. Fluorofory sa najbežnejšie študujú v roztoku. Podrobná vibračná štruktúra sa však vplyvom prostredia spravidla vytratí a emisné spektrum sa javí ako široké pásmo.

Energia spojená s emisnými prechodmi je väčšinou nižšia ako s tými absorpčnými. Emitované fotóny majú menej energie a sú posunuté k vyšším vlnovým dĺžkam. Tento jav je všeobecne známy ako Stokesov posun a vyskytuje sa pri prakticky všetkých fluoroforoch [39]. Primárny dôvod Stokesovho posunu je rýchly prechod excitovaných elektrónov na najnižšiu hladinu vibračnej energie stavu S_1 . Okrem toho je emisia žiarenia obvykle sprevádzaná prechodmi do vyšších vibračných hladín stavu S_0 , čo má za následok ďalšiu stratu energie. Ďalšie procesy, ako napríklad zmena orientácie okolitých molekúl rozpúšťadla, reakcie excitovaného stavu, tvorba komplexov a prenos rezonančnej energie môžu tiež prispieť k emisii odohrávajúcej sa vo väčších vlnových dĺžkach [40].

2.2.1 Kvantový výťažok fluorescencie

Kvantový výťažok fluorescencie je jedným z najdôležitejších parametrov charakterizujúcich fluorescenčné vlastnosti fluoroforu v danom prostredí. Je definovaný ako pomer medzi množstvom fotónov látkou vyžiarených a celkovým počtom fotónov látkou absorbovaných [41]. Kvantový výťažok fluorescencie môže byť charakterizovaný rovnicou:

$$Q = \frac{\Gamma}{\Gamma + k_{nr}} \quad (2)$$

Rýchlostné konštanty Γ a k_{nr} charakterizujú rýchlosť zániku excitovaného stavu. Konštanta Γ zahŕňa všetky žiarivé procesy deexcitácie a konštanta k_{nr} zase zahŕňa všetky nežiarivé procesy. Rovnica charakterizuje zlomok fluoroforov, ktorých deexcitácia je sprevádzaná emisiou žiarenia. Hodnota kvantového výťažku sa môže blížiť jednej, ak miera deexcitácie nežiarivými prechodmi je oveľa nižšia ako miera deexcitácie žiarivými prechodmi, takže platí, že $\Gamma > k_{nr}$. Je dôležité poznamenať, že hodnota kvantového výťažku fluorescencie bude vždy menšia ako jeden, kvôli stratám energie, ktoré charakterizuje Stokesov posun [42]. Inak povedané kvantový výťažok určuje pravdepodobnosť toho, či bude excitovaný stav deaktivovaný fluorescenciou alebo iným mechanizmom, u ktorého nedochádza k emitovaniu žiarenia.

Absorpcia fotónov molekulou zapríčiní, že dôjde k vzniku excitovaného stavu s vyššou energiou. To čo nastane potom je do značnej miery ovplyvnené fyzikálnymi vlastnosťami prostredia, ktoré tvorí rozpúšťadlo, ďalej štruktúrou a povahou samotného fluoroforu. Zakaždým ale dôjde k návratu molekuly z excitovaného stavu do základného stavu, ktorý je spojený so stratou energie [42]. Táto deexcitácia môže prebiehať buď nežiarivými alebo žiarivými procesmi. Medzi nežiarivé procesy patrí vibračná relaxácia, vnútorná konverzia a medzysystémový prechod. Žiarivé prechody zahŕňajú fluorescenciu a fosforescenciu. Intenzita fluorescencie rastie lineárne len v prípade veľmi zriedených roztokov. U koncentrovanejších roztokov začína mať pozorovateľný vplyv na intenzitu fluorescencie reabsorpcia emitovaného žiarenia [43, 44].

2.3 Nelineárne optické vlastnosti

Pojem nelineárne optické vlastnosti látok zahŕňa nelineárne javy, ktoré sa objavujú pri interakcii hmoty so zdrojom žiarenia s vysokou intenzitou akým je napríklad laser. Práve laser poskytuje dostatočné množstvo energie na to, aby došlo k vyvolaniu nelineárneho optického fenoménu [45]. Preto bolo možné začať tieto javy aktívne skúmať pomerne nedávno a to vďaka zostrojeniu prvého lasera v roku 1960 [46]. Ako prvý nelineárny optický efekt bol popísaný jav dvojfotónovej absorpcie fyzičkou Mariou Goepfertovou Mayerovou už v roku 1931 [47]. Na to aby bolo možné pozorovať nelineárne optické vlastnosti systémov nie je vždy potrebný len laser. O niektorých fenoménoch sa už vedelo dávno pred jeho vynájdením. Teória popisujúca tieto javy je založená na pomerne preskúmanej teórii lineárnych optických vlastností látok.

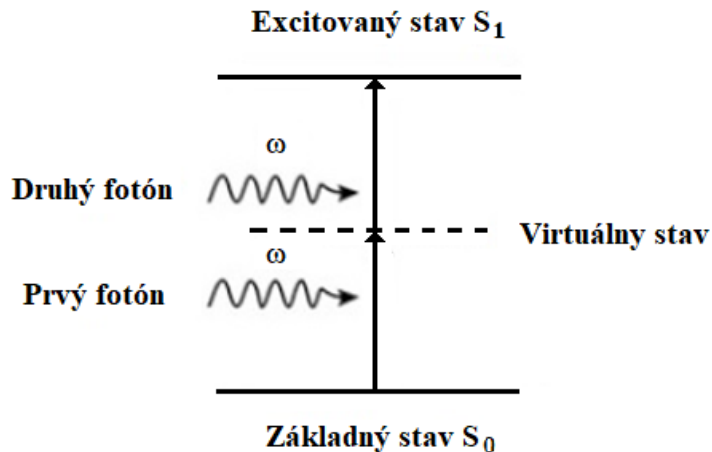
S rýchlym pokrokom v oblasti nanotechnológií vzrástlo aj množstvo potenciálnych aplikácií nelineárnych optických vlastností materiálov. Tieto vlastnosti sa môžu uplatniť napríklad v technológií laserov [47], biosenzorov, v spracovaní a ukladaní informácií [48],

komunikácii [49], zobrazovaní [2] a optických výpočtových technikách. Nelineárne optické vlastnosti materiálov sa neprejavujú len v makroskopickej mierke ale práve aj na nano úrovni [50].

2.3.1 Dvojfotónová absorpcia žiarenia

Dvojfotónová absorpcia je fyzikálny jav, pri ktorom dochádza k absorpcii energie dvoch fotónov o rovnakej alebo rôznej frekvencii a teda energie chromoforom. To zapríčiní 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 [2]. Tento proces sa zaradzuje do skupiny nelineárnych optických procesov [45]. 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 mnohonásobne slabšia ako lineárna absorpcia jedného fotónu. Závislosť absorpcie teda rastie exponenciálne. Nad lineárnou absorpciou dominuje hlavne pri vysokých intenzitách budiaceho žiarenia. Miera dvojfotónovej absorpcie sa vyjadruje prostredníctvom parametru tzv. dvojfotónového absorpčného prierezu (σ_{TPA}). Hodnoty σ_{TPA} (v jednotkách GM, kedy $1 \text{ GM} = 10^{-50} \text{ cm}^4 \cdot \text{s} \cdot \text{fotón}^{-1}$) odlišných materiálov sú stanovované pomocou rôznych techník buď priamo alebo nepriamo. Medzi takéto techniky patria napríklad dvoma fotónmi excitovaná fluorescencia, ktorá sa používa najmä u fluoreskujúcich látok, a Z-scan, ktorý sa používa v prípade látok nedisponujúcich fluorescenčnými vlastnosťami [2, 4, 51, 52].

Priebeh dvojfotónovej excitácie znázorňuje obrázok 5. Aby vôbec došlo k excitácii, je potrebné aby dva fotóny z excitačného lúču zasiahli molekulu vo veľmi krátkom okamihu a to v priebehu jednej femtosekundy (10^{-15} s). Keď s molekulou interaguje prvý dopadajúci fotón, dodá jej energiu, ktorá zapríčiní energetický prechod molekuly zo základného energetického stavu do stavu s vyššou energiou tzv. virtuálneho stavu. 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 molekuly aj s druhým fotónom. Molekula sa tak dostane do excitovaného stavu. Na vytvorenie takýchto podmienok je preto potrebný výkonný zdroj žiarenia, a to laser. Laser dokáže produkovať veľmi krátke impulzy svetla a s vysokou intenzitou. Dvojfotónová absorpcia môže ďalej viesť k dvojfotónovo 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. Zobrazovacia technológia, ktorá pracuje na princípe tohto javu, sa nazýva dvojfotónová mikroskopia [4, 51, 52].



Obrázok 5: Schéma energetických hladín spojených s absorpciou dvoch fotónov s rovnakou energiou

Popularite sa tešia najmä látky schopné fluorescencie vo forme nanočastíc slúžiace ako fluorescenčné sondy. Takéto nanočastice sa vyznačujú silnejším fluorescenčným signálom a zvýšenou fotostabilitou oproti fluorescenčným sondám vo forme roztoku. Nevýhodou ale je, že so zväčšujúcim sa množstvom molekúl vo vnútri nanočastice sa znižuje ich fluorescencia v dôsledku agregáciou indukovaného zhášania [53]. V záujmu zachovania výhodných vlastností je preto dôležité nájsť spôsob akým ich uchovať aj vo forme nanočastíc. Jednou z možností je modifikáciou štruktúry fluorescenčných molekúl znížiť vplyv zhášania fluorescencie [54–56] alebo využiť fluorescenčné molekuly s agregáciou indukovanou fluorescenciou [57–59].

2.3.2 Dvojfotónový absorpčný prierez

Molekuly s vysokou hodnotou dvojfotónového absorpčného prierezu majú hneď niekoľko potenciálnych využití. Už pomerne dlhú dobu sa javia ako možní kandidáti v aplikáciách zameraných na trojrozmerné optické ukladanie dát [60] a v multifotónovej fluorescenčnej mikroskopii [4]. Už po desaťročia sa na stanovenie dvojfotónového absorpčného prierezu využívalo mnoho rozličných techník. Medzi takéto techniky patria napríklad transmisné metódy ako nelineárna transmisia [61], metóda Z-scan [62] a metódy založené na využití javu excitácie akým je napríklad metóda dvojfotónovo indukovanej fluorescencie [63].

Experimentálne metódy na stanovenie dvojfotónového absorpčného prierezu môžu byť rozdelené na priame a nepriame. Priame metódy sú založené na sledovaní miery úbytku intenzity lúča prechádzajúceho vzorkou. V nepriamych metódach sa sledujú javy vyvolané interakciou žiarenia s hmotou, ktoré sa objavia po absorpcii dvoch fotónov. Medzi takéto javy patrí práve fluorescencia [4].

Nepriame stanovenie dvojfotónového absorpčného prierezu zvyčajne prebieha za využitia zdroja žiarenia s vysokou energiou ako je napríklad laser. Pri takýchto vysokých intenzitách zákonite dochádza v skúmanom systéme k vzniku iných procesov akými sú napríklad indukovaná emisia žiarenia, absorpcia v excitovanom stave, Ramanov rozptyl, modulácia vlastnej fázy, vznik plazmy alebo generovaním superkontinua. Takéto procesy môžu do istej

miery ovplyvňovať a konkurovať javu dvojfotónovej absorpcie. Často je preto náročné interpretovať namerané údaje pri využití vysokej intenzity budiaceho žiarenia, keď v systéme dominujú procesy nesúvisiace s dvojfotónovou absorpciou [64].

V metódach založených na využití excitovaného stavu sa výpočet dvojfotónového absorpčného prierezu prevádza pomocou dvojfotónovej absorpcie. Príkladom je práve metóda dvojfotónovo indukovanej fluorescencie, kedy sa meria fluorescencia prvého excitovaného singletového stavu molekuly zapríčinená práve dvojfotónovou absorpciou. Pretože integrál intenzity fluorescencie je úmerný počtu excitovaných molekúl, je možné z takéhoto merania pomerne presne stanoviť dvojfotónový absorpčný prierez. Iné nelineárne procesy môžu ovplyvniť intenzitu fluorescencie, avšak tomu sa dá jednoducho vyhnúť. Merania fluorescencie zvyčajne vyžadujú o niekoľko rádov nižšie hodnoty koncentrácie vzorky a niekoľkonásobne nižšie intenzity excitačného žiarenia ako tomu je u transmisných metód. Vplyv nelineárnych optických procesov je preto v takomto prípade do značnej miery znížený [4].

Jedným z bežne používaných prístupov k určeniu dvojfotónového absorpčného prierezu skúmanej látky je to, že sa táto hodnota vypočíta relatívne vzhľadom k látke, ktorej dvojfotónový absorpčný prierez je dobre známy [65]. Dvojfotónový absorpčný prierez je možné určiť pomocou merania fluorescenčného signálu generovaného po dvojfotónovej absorpcii. Takéto merania poskytujú hodnotu dvojfotónového fluorescenčného prierezu (δ_{TPE}), ktorý je priamoúmerný dvojfotónovému absorpčnému prierezu (δ_{TPA}) na základe rovnice:

$$\delta_{TPE} = \delta_{TPA} \Phi_{TPE}, \quad (3)$$

kde Φ_{TPE} reprezentuje kvantový výťažok fluorescencii po dvojfotónovej absorpcii. Stanovenie δ_{TPE} pre rozličné molekuly je pomerne náročné a preto je najjednoduchšie ho stanoviť v porovnaní s molekulou, ktorej δ_{TPE} je dobre známy. Vzťah δ_{TPE} k experimentálnym dátam za predpokladu, že parametre merania pre všetky experimenty boli zhodné, vyjadruje rovnica:

$$\delta_{TPE(N)} = \delta_{TPE(S)} \frac{F_{(N)} P_{(S)}^2 c_{(S)}}{F_{(S)} P_{(N)}^2 c_{(N)}}, \quad (4)$$

kde $\delta_{TPE(N)}$ a $\delta_{TPE(S)}$ sú hodnoty dvojfotónového fluorescenčného prierezu, $F_{(N)}$ a $F_{(S)}$ sú hodnoty získané integráciou intenzity fluorescencie za rovnakých podmienok, $P_{(N)}$ a $P_{(S)}$ sú hodnoty intenzity excitačného žiarenia generovaného laserom a $c_{(N)}$ a $c_{(S)}$ sú koncentrácie skúmaných roztokov. Index (N) charakterizuje skúmanú látku a index (S) je štandard, prípadne referenčná zlúčenina [66].

2.3.3 Multifotónová mikroskopia

Biologické vzorky sú väčšinou charakteristické vysokou mierou rozptylu žiarenia, preto je vytváranie snímok s vysokým rozlíšením z hlbších vrstiev bežnou fluorescenčnou mikroskopiou takmer neuskutočiteľné. Multifotónová mikroskopia, konkrétne dvojfotónovo excitovaná fluorescenčná mikroskopia, umožňuje vytváranie takýchto snímok vďaka využitiu nelineárnych optických vlastností skúmaného materiálu [4]. Žiarenie zachytené zo vzorky je presne priradené na miesto, v ktorom došlo k vytvoreniu nelineárnej optickej odozvy. 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* [5]. 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 fluorescence vo forme 3D mapy.

V dôsledku toho, že fotovybielovanie a fototoxická obmedzujú použitie klasickej fluorescenčnej mikroskopie, sa vlastnosti tejto metódy ukázali byť kľúčovými v mnohých oblastiach pozorovania biologických systémov [2, 22]. Za využitia multifotónovej mikroskopie boli skúmané rôzne druhy organizmov a ich častí, ako napríklad orgány lymfatického systému [67], obličky [68], srdce [69] a pokožka [70] a to do rôznej hĺbky. Táto technika môže byť tiež využitá na pozorovanie vývoja a postupu rôznych nádorových ochorení a tak určenia potencionalnej liečby [71].

V multifotónovej mikroskopii majú excitačné fotóny nižšiu energiu ako fotóny emitované zo vzorky. Emisné spektrum je tak posunuté bližšie smerom k UV oblasti, čo je opakom tradičnej fluorescenčnej mikroskopie. Bežné fluorescenčné sondy využívané v multifotónovej mikroskopii sú charakteristické emisným žiarením vo viditeľnej časti svetelného spektra, zatiaľ čo excitácia dvojfotónovou absorpciou prebieha v blízkej infračervenej oblasti (700 až 1000 nm) [72]. Excitačné žiarenie nie len že sa vyznačuje hlbším prienikom, ale zároveň aj nižšou fototoxicitou.

K multifotónovej absorpcii dochádza v perifokálnej oblasti, kde je excitačné žiarenie sústredené objektívom mikroskopu. Preto, v oblasti mimo ohniska objektívu nedochádza k absorpcii, čo je jedným z významných rozdielov v porovnaní s konfokálnou mikroskopiou, kde k jednofotónovej excitácii dochádza pozdĺž celého excitačného lúču fotónov. To má za následok zníženie fotopoškodenia a opotrebenia tkaniva, čo je dôležité pre dlhodobé pozorovanie preparátov [73].

Konštrukcia dvojfotónového mikroskopu je do značnej miery podobná s konštrukciou konfokálneho mikroskopu. Rozdielom je najmä zdroj excitačného žiarenia a spôsob detekcie emisného žiarenia. Zdrojom je laser, najčastejšie sa jedná o femtosekundové lasery s titánovými zafirovými kryštálmi. Výstupná vlnová dĺžka z takéhoto laseru sa pohybuje v rozmedzí 670 až 1070 nm. Excitačné žiarenie putuje zo zdroja žiarenia cez sústavu šošoviek a zakrivených zrkadiel do modulátoru intenzity laseru. Lúč laseru je polarizovaný, prechádza cez objektív, ktorý ho zaostruje na vzorku. Vzniknuté fluorescenčné žiarenie prechádza naspäť cez objektív mikroskopu, kde dopadá na detektor. Typickým detektorom využívaným v dvojfotónovej fluorescenčnej mikroskopii je fotonásobič [72].

2.4 Súčasný stav riešenej problematiky

Organické nanočastice vykazujúce fluorescenciu indukovanú absorpciou dvoch fotónov v súčasnosti podliehajú intenzívnemu výskumu. Látky používané ako fluorescenčné sondy, u ktorých je pozorovaná dvojfotónová absorpcia, sú pomerne dobre dostupné. 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 [4, 6, 74].

Ako látky s potenciálom pre prípravu takýchto nanočastíc sa javia byť aj molekuly na báze tetrafenyletenu a trifenylamínu. Tieto látky vykazujú značnú citlivosť na excitáciu dvomi fotónmi a hlavne poskytujú možnosť pomerne jednoduchšej úpravy. Na zlepšenie ich dvojfotónovej absorpcie boli preto, navrhnuté a syntetizované rôzne deriváty tvoriace predovšetkým dipolárne, kvadropolárne a oktupolárne 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 [2, 3].

Oblasť využitia fluorescenčných organických nanočastíc je široká. Fluorescenčné sondy na báze 7-nitro-1,2,3-benzoxadiazol amínu boli úspešne využité ako molekuly špecificky rozpoznávajúca prítomnosť sulfánu pomocou thiolýzy v živých systémoch. Boli pripravené fluorescenčné nanočastice vyznačujúce sa vysokou citlivosťou a rýchlou odozvou. Fluorescenčná sonda bola úspešne využitá na detekciu H₂S pomocou multifotónovej mikroskopie v živých bunkách. Nadmerná prítomnosť sulfánu v živých bunkách bola pozorovaná pri mnohých ochoreniach, ako napríklad Alzheimerovej choroby, Downovho syndrómu, cirhózy pečene a cukrovky. Preto je detekcia H₂S v biologických systémoch užitočná aj pri klinickej diagnostike [75].

2.4.1 Fluorescencia u nanočastíc

Ideálne častice pre praktické aplikácie v oblasti biozobrazovania sú častice s dostatočnou intenzitou fluorescencie, tak aby sa výsledný obraz vyznačoval vysokým kontrastom. To je možné dosiahnuť práve tým, že sa do ich vnútra zapuzdrí čo najviac molekúl organického farbiva. Avšak, keď sa v malom objem vo vnútri častice nachádza naraz veľké množstvo molekúl farbiva, je možné pozorovať oslabenie až zhášanie fluorescencie. Zhášanie je primárne spôsobené π - π interakciami medzi molekulami a prítomnosťou iných nežiarivých prechodov v systéme. Tento fotofyzikálny jav je pomerne bežný pre tradičné organické farbivá a jedná sa o zhášanie spôsobené agregáciou molekúl farbiva [76]. Taktiež je možné sledovať opačný prípad, kedy z dôvodu agregácie molekúl farbiva v malom objeme dochádza k tzv. agregáciou indukovanej emisii [9]. Takéto fluorofory však väčšinou nie sú schopné emitovať žiarenie vo forme molekulárneho roztoku. Častice, ktorých fungovanie je založené na takomto jave boli úspešne využité v oblasti bunkového zobrazovania [77], detekcie tumorov *in vivo* [78] a dvojfotónového zobrazovania [79].

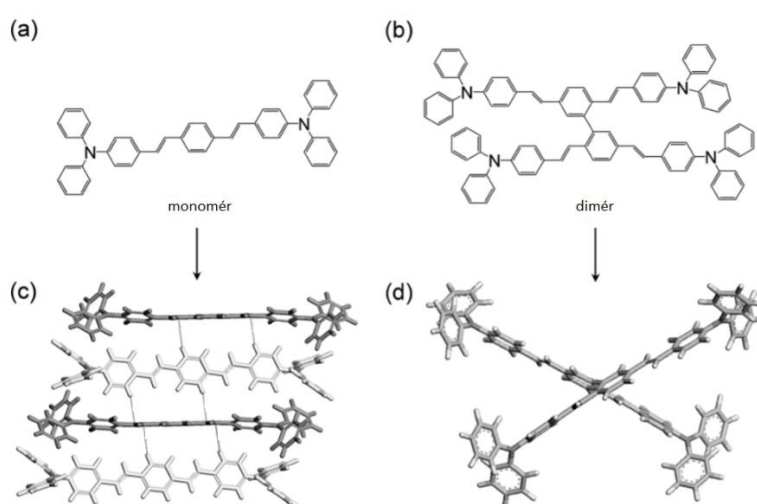
Jednou z možností ako zvýšiť intenzitu fluorescencie u nanočastíc je modifikácia ich prípravy, kedy je cieľom pripraviť častice so zložitejšou štruktúrou pozostávajúcou z viacerých povrchových vrstiev. Takto pripravené nanočastice sú zložené z dvoch rôznych chromoforov vybraných za účelom zlepšenia efektivity prenosu excitačnej energie medzi jednotlivými komponentmi nanočastíc. Príprava jadra nanočastíc prebieha ako prvá len z jedného druhu chromoforov. 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 chromoforov [22].

2.4.2 Vplyv zhášania fluorescencie

Dôležitým faktorom pri príprave fluorescenčných organických nanočastíc je dosiahnuť to, aby látka, ktorá sa vyznačuje svojimi fluorescenčnými vlastnosťami a charakteristický výrazným dvojfotónovým prierezom v roztoku, si zachovala tieto vlastnosti aj vo fáze pevnej. To sa rovnako týka aj nanočastíc pripravených z takýchto látok, keďže ich vnútorná štruktúra a usporiadanie molekúl je zhodné s tým v pevnej fáze. Medzi takéto látky patria aj látky na báze 1,4-di(4'-N,N-difenyylaminostyryl) benzénu, ktorý je známy svojou výraznou dvojfotónovou absorpciou a silnou fluorescenciou vo forme roztoku. Avšak v pevnej fáze látka vykazuje nižšie hodnoty kvantového výťažku fluorescencie ako v roztoku. To je dôsledkom silného javu samozhášania zapríčineného medzimolekulárnymi interakciami v kondenzovaných fázach. Jedná sa o tzv. agregáciu indukované zhášanie fluorescencie. Najväčší vplyv má na to prítomnosť π - π interakcií, čo je typické pre molekuly so systémom konjugovaných dvojitých väzieb. Difenyylaminostyryl benzén má pevnú, planárnu štruktúru a silnú tendenciu tvoriť kryštály.

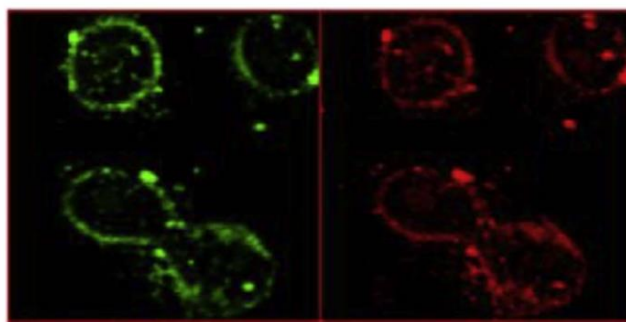
Za účelom zvýšenia kvantového výťažku fluorescencie v pevnej fáze bola syntetizovaná molekula, ktorá vznikla z dvoch molekúl difenyylaminostyryl benzénu navzájom prepojených cez bifenylovú skupinu. Takto pripravená molekula nadobúda krížovú formu a nemá naďalej už planárny charakter. Štruktúra molekuly je znázornená na obrázku 6. Neplanárny charakter má za následok zníženie vplyvu koncentračného zhášania, čo je spôsobené sférickým efektom, kedy dochádza k obmedzeniu medzimolekulárných interakcií. Takto pripravený dimér vykazuje značne vyšší dvojfotónový prierez a kvantový výťažok fluorescencie než pôvodný monomér, čo zvyšuje možnosť aplikácie takto upravenej molekuly v pozorovaní biologických systémov pomocou dvojfotónovej mikroskopie [54].



Obrázok 6: Planárna štruktúra monoméru 1,4-di(4'-N,N-difenyylaminostyryl) benzénu (a) a krížová forma odpovedajúceho diméru (b) [54]

Ďalším príkladom látky ktorá vykazuje výborný kvantový výťažok fluorescence v kvapalnom roztoku sú látky založené na báze benzothiazolu [55]. V roku 2010 boli publikované výsledky dvojfotónových fluorescenčných molekúl na báze tejto látky, ktoré vykazovali vysokú hodnotu dvojfotónového absorpčného prierezu s pomerne veľkým kvantovým výťažkom. Zároveň jednoduchou modifikáciou jeho štruktúry bol pripravený derivát benzothiazol dimetyl anilín, u ktorého sa preukázal kvantový výťažok až o hodnote 0,9. Zo získaných dát vyplýva, že benzothiazol je excelentný fluorofor, avšak silnú fluorescenciu má len v roztoku organického rozpúšťadla, nie vo vode.

Na základe tohto bol následne benzothiazol využitý ako elektornakceptorná skupina a fluorofor na trifenylamínovom jadre a z neho boli následne pripravené rôzne trifenylamín benzothiazolové deriváty. Opäť cieľom, prípravy takýchto derivátov bolo dosiahnuť to, aby látka, ktorá disponuje veľkým dvojfotónovým prierezom v kvapalnom roztoku mala tieto vlastnosti aj v pevnej fáze, a to v podobe nanočastíc vo vodnom prostredí. V pevnej fáze sa u jednoduchého benzothiazolu vyskytovali π - π interakcie, čo malo za následok zhášanie fluorescence. Pripravením derivátov z trifenylamín benzothiazolu sa tak prejavil sférický efekt a obmedzili sa medzimolekulárne interakcie. Následne boli pripravené nanočastice vo vodnom prostredí za prítomnosti povrchovo aktívnej látky Pluronic F127 ako stabilizátoru. Kvôli lepšej aplikácii v oblasti biologických systémov bol ako rozpúšťadlo použitý fosfátový tlmivý roztok s hodnotou pH 7,4 ako rozpúšťadlo disperzie nanočastíc. Pripravené nanočastice mali veľkosť od 100 nm, čo je pre ich prípadnú aplikáciu v 3D zobrazovaní živých systémov nevyhnutné. Taktiež vykazovali silnú jedno a dvojfotónovú fluorescenciu s kvantovým výťažkom dosahujúcich hodnoty od 0,63 do 0,81. Následne boli nanočastice priamo využité na zobrazovanie v živých HeLa bunkách pomocou jedno a dvojfotónovej mikroskopie a bolo preukázané že je možné tieto častice stabilizovať na vonkajšej strane membrán vo vnútri živých buniek (viď obrázok 7) [56].



Obrázok 7: Snímky buniek zaobstaraných pomocou jednofotónovej (vľavo) a dvojfotónovej (vpravo) mikroskopie [56]

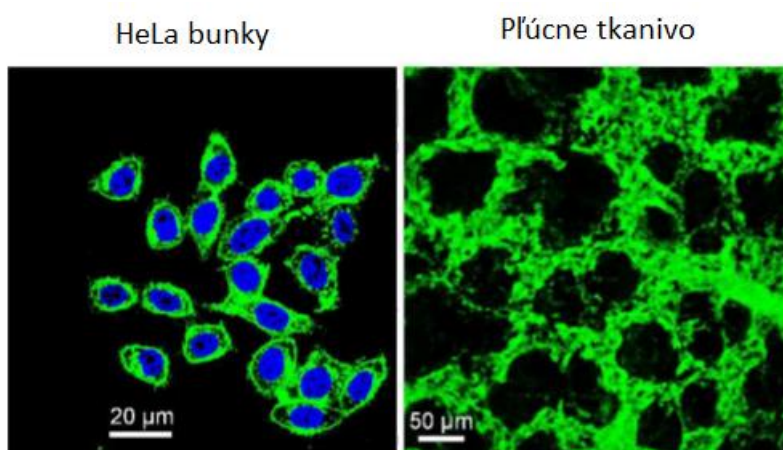
2.4.3 Agregáciou indukovaná fluorescencia

Jedným zo spôsobov ako dosiahnuť čo najvyššiu intenzitu fluorescence je dostať čo najväčšie množstvo fluoroforov do vnútra nanočastice. Avšak ak je v malom priestore zároveň prítomných veľa organických molekúl s konjugovaným systémom dvojitých väzieb, tak dochádza práve naopak k oslabeniu fluorescence a v niektorých prípadoch zhasínaniu. To je dôsledok π - π interakcií alebo iných nežiarivých prechodov [80]. Štúdie prevedené pomocou

Z-skenu preukázali, že medzimolekulárne interakcie môžu byť spoločne využité na zlepšenie TPA efektivity v kondenzovanom stave [56]. Jedná sa o takzvanú agregáciou indukovanú emisiú. Typické fluorofory, pri ktorých je takáto indukovaná emisia pozorovaná, takmer úplne nefluoreskujú vo forme molekulového roztoku, ale naopak vykazujú silnú fluorescenciu v kondenzovanom stave vo forme organických nanočastíc [80] alebo vo forme organických bodiek [81].

Táto jedinečná vlastnosť preto dovoľuje vytvoriť organické nanočastice s vysokým obsahom jednoduchých fluoroforov vo svojom vnútri. Ako výsledok boli pripravené nanočastice s vysokou žiarivosťou, veľkým Stokesovým posuvom a dobrou biokompatibilitou, ktoré boli následne využité na zobrazovanie v biologických systémoch [82]. Pre aplikácie *in vivo* a *in vitro*, sú nanočastice s emisiou vo vyšších vlnových dĺžkach pomerne žiadané. Fluorescenčné organické nanočastice s agregáciou indukovanou fluorescenciou boli prezentované aj ako prostriedky na monitorovanie nádorových ochorení a zároveň ako prostriedky ich liečby [83].

Jedným zo spôsobov ako pripraviť takéto častice je syntetizovať molekuly s donorno-akceptorovou štruktúrou. Veľa komerčne dostupných derivátov benzoxadiazolu, ako napríklad 4-chloro-7-nitrobenzo-2,1,3-oxadiazol alebo 9,10-bis[4'-(4''-aminostyryl)styryl]antracén [56], sú považované za kvalitné fluorescenčné sondy. Bolo preukázané, že práve molekuly pozostávajúce z derivátu benzoxadiazolu a tetrafenyletén (BTPEBD) disponujú efektom indukovanej emisie v kondenzovanom stave, kde benzoxadiazol zastáva funkciu elektronakceptornej skupiny a tetrafenyletén elektrondonornej skupiny. Takto pripravené molekuly boli použité na tvorbu nanočastíc využiteľných pre dvojfotónové zobrazovanie živých systémov. Vyznačujú sa značne vysokým kvantovým výťažkom presahujúcim 90% vo forme nanočastíc vo vodnom roztoku, dobrou fotostabilitou a nízkou cytotoxicitou. Nanočastice boli využité na zobrazenie najskôr HeLa buniek a napokon aj na vzorkách pľúcneho tkaniva z myši za použitia dvojfotónovej mikroskopie (viď obrázok 8). Tento experiment preukázal, že látky na báze indukovanej emisie v kondenzovanom stave sú využiteľné pre metódy zobrazovania živých systémov [59].



Obrázok 8: Snímka HeLa buniek inkubovaných fluorescenčnou sondou BTPEBD (vľavo) a snímka buniek pľúcneho tkaniva myši taktiež s prítomným BTPEBD (vpravo) [59]

3 EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

3.1 Zoznam použitých prístrojov

- Magnetická miešačka Big Squid IKAMAG – IKA, (BioTech a.s.)
- Analytické váhy ew 620-3NM, (KERN)
- UV-VIS spektrofotometer Cary 50 Probe (Varian)
- Koloidný DLS analyzátor ZetaSizer Nano ZS, (Malvern Panalytical)
- Luminiscenčný spektrometer Fluorolog (HORIBA Scientific)
- Spektrograf Andor Shamrock SR-303i s laserom Nd:YAG (EKSPLA PG400), OPG modulom a s kamerovým detektorom Andor iStar ICCD

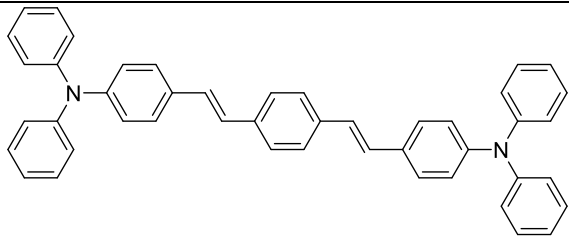
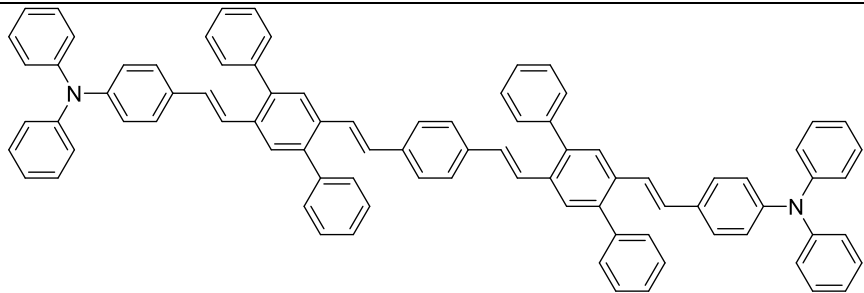
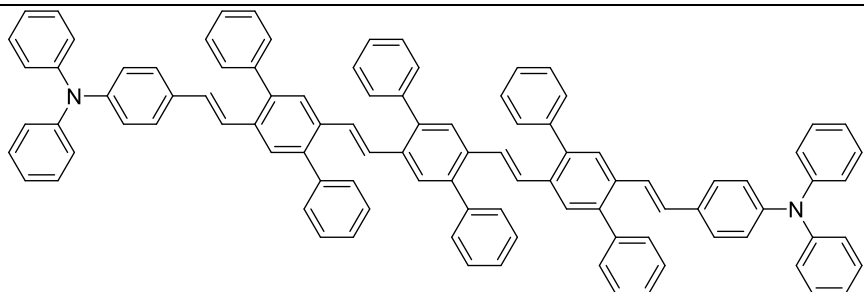
3.2 Skúmané materiály

Skúmanými materiálmi boli látky založené na distyrylbenzéne, ktorých molekulárna štruktúra je znázornená v tabuľke 1. Skúmané materiály pochádzajú z Fakulty chemicko-technologickej - Univerzita Pardubice a boli syntetizované a charakterizované skupinou doc. Ing. Aleša Imramovského, Ph.D. Syntéza týchto látok bude popísaná v samostatnom článku, ktorý v dobe vypracovania tejto práce ešte nebol publikovaný. Bolo preukázané, že veľkosť dvojfotónového absorpčného prierezu molekúl s donornými a akceptornými skupinami má spojitosť s mierou prenosu intramolekulárneho náboja po excitácii [84]. Konjugované molekuly substituované s donornými (D) alebo akceptronými (A) skupinami preukazujú vyššiu hodnotu dvojfotónového absorpčného prierezu ako im zodpovedajúce nesubstituované molekuly. Pre molekuly s všeobecnou štruktúrou charakterizovanou ako $D - \pi - D$ (kde π predstavuje systém konjugovaných dvojitých väzieb) sa s rastúcou dĺžkou reťazca zvyšuje hodnota dvojfotónového absorpčného prierezu a poloha dvojfotónového pásu sa posúva smerom k vyšším vlnovým dĺžkam [85]. Ďalej bolo preukázané, že prítomnosť akceptorných skupín na π mostíku zapríčiňuje, že molekuly charakterizované ako $D - A - D$ majú vyšší dvojfotónový absorpčný prierez ako $D - \pi - D$ chromofory. Prenos náboja medzi donornými skupinami na koncoch molekuly je uľahčený práve prítomnosťou akceptroných skupín. To do určitej miery platí aj pre molekuly so štruktúrou $A - D - A$.

Skúmané látky sa na základe ich štruktúry môžu charakterizovať ako látky $D - \pi - D$. V prípade skúmaných derivátov, je π mostík tvorený distyrylbenzénom, resp. reťazcom pozostávajúcim z jednotiek polyfenylén vinylénu. Bolo preukázané, že oligoméry polyfenylén vinylénu, ktoré majú päť aromatických kruhov v jednom reťazci vykazujú planárnu konformáciu. Prítomnosťou rôznych substituentov na reťazci je možné konformáciu zmeniť. Poloha substituentov, ich vzdialenosť od ostatných substituentov a schopnosť podieľať sa na interakciách s inými atómami alebo skupinami prítomnými na reťazci alebo v okolitom prostredí má priamy súvis so zmenou konformácie. Miera presunu elektrónov medzi donornými a akceptornými substituentami v molekule s neplanárnym charakterom je znížená v dôsledku menšieho prekryvania medzi jednotlivými π orbitálmi konjugovaného mostíku. To sa môže prejavovať na zmene veľkosti dvojfotónového absorpčného prierezu molekuly so substituovaným konjugovaným mostíkom v porovnaní s molekulou s nesubstituovaným mostíkom, a to na základe rozdielnej distribúcie náboja v základnom a dvojfotónovo excitovanom stave [86]. Na druhej strane bolo tiež preukázané, že zmena planarity môže mať aj pozitívny vplyv na zmenu

dvojfotónového absorpčného prierezu jednoduchých alkylmi substituovaných molekúl 4-quinopyranu [87].

Tabuľka 1: Molekulárna štruktúra derivátov skúmaných v tejto práci

Látka	Molekulárna štruktúra
KT 1-11-1 (1)	
KT-1-24-1 (2)	
KT-1-28-1 (3)	

Štúdie derivátov distyrylbenzénu preukázali, že dochádza medzi jednotlivými molekulami k π - π interakciám. Predpokladá sa preto, že tieto interakcie majú za následok zníženú fluorescenciu týchto molekúl v pevnej fáze [88]. Tento jav sa nazýva agregáciou vyvolané zhášanie fluorescencie, ktoré je bližšie vysvetlené v kapitole 2.4.2. Modifikáciou štruktúry distyrylbenzénu, tak že dôjde k zmene planarity molekuly, môže viesť k zvýšeniu fluorescencie v pevnej fáze. Neplanárna konfigurácia takejto molekuly má za následok potlačenie zhášania fluorescencie vyvolaného sférickým efektom, ktorý obmedzuje vplyv π - π interakcií [54].

V tejto práci budú preto skúmané molekuly, ktorých štruktúra je založená a inšpirovaná 1,4-di(4'-N,N-difenylaminostyryl) benzénom (DPA-DSB). DPA-DSB bude skúmaný ako referenčná molekula (1), s ktorou budú ostatné deriváty porovnávané. Charakteristickým znakom pre látku (1) je π mostík pozostávajúci z troch aromatických jadier navzájom prepojených vinylénom, ktoré spolu tvoria konjugovaný systém dvojitéch väzieb. Na koncoch reťazca sa nachádzajú elektrón-donorné difenylaminové skupiny. Látka (2) sa líši dĺžkou π mostíku, ktorý v tomto prípade tvorí päť aromatických jadier. Na rozdiel od látky (1) sú na π mostíku prítomné postranné reťazce, konkrétne fenylové skupiny. Tie majú za úlohu pozmeniť planárnu konformáciu molekuly a svojou prítomnosťou teda znížiť vplyv π - π interakcií v pevnej fáze. Pevná fáza má formu nanočastíc, ktoré sú tvorené zhluknutými molekulami

v tesnej blízkosti. Predpokladá sa, že postranné reťazce zapríčinia to, že medzi molekulami bude väčšia vzdialenosť a tak sa do určitej miery zabráni zhášaniu fluorescencie vplyvom agregácie. Narastajúca dĺžka reťazca by mala mať taktiež vplyv na hodnotu dvojfotónového absorpčného prierezu molekuly. Táto hodnota by mala byť vyššia ako tomu je v prípade referenčnej molekuly (1). Látka (3) sa líši od látky (2) len prítomnosťou ďalších fenylových substituentov na centrálnom aromatickom jadre. Vplyv prítomnosti ďalších substituentov bude preto pozorovaný a porovnaný s ostatnými skúmanými látkami. Množstvo a poloha substituentov by sa aj v tomto prípade mala prejaviť na nelineárnych optických vlastnostiach látky.

3.2.1 Príprava roztokov skúmaných látok

Zásobné roztoky boli pripravené zo skúmaných látok (1) až (3) podľa tabuľky 2. Ako rozpúšťadlo bol zvolený tetrahydrofurán (THF) s čistotou p. a. zakúpený od spoločnosti Sigma-Aldrich. Navážky pre jednotlivé látky boli odvážené na analytickej váhe *ew 620-3NM (KERN)*. Zásobné roztoky boli pripravené do tmavých sklenených vialiek o objeme 10 ml. Navážka bola presypaná do vialky, do ktorej bolo následne pridané rozpúšťadlo. Z dôvodu urýchlenia rozpúšťania látky (3) boli vialky umiestnené do sonifikátoru po dobu 5 minút. Takto pripravené roztoky boli za účelom zvýšenia ich trvanlivosti umiestnené a skladované na mieste s minimálnym prístupom svetla.

Tabuľka 2: Zásobné roztoky skúmaných látok, kde M je molárna hmotnosť, m je hmotnosť navážky, V_r je objem pridaného rozpúšťadla, c je koncentrácia zásobného roztoku a λ_{max} je vlnová dĺžka v maxime absorpcie

Látka	M [g·mol ⁻¹]	m [mg]	V_r [ml]	c [mol·dm ⁻³]	λ_{max} [nm]
(1)	616,79	2,5	5	$8,1 \cdot 10^{-4}$	410
(2)	1125,44	5,4	5	$9,6 \cdot 10^{-4}$	425
(3)	1277,63	5,2	5	$8,9 \cdot 10^{-4}$	398

Z takto pripravených zásobných roztokov boli ďalej pripravené roztoky podľa tabuľky 3. Pre každú látku boli pripravené tri roztoky s rôznou koncentráciou, s ktorými sa ďalej pracovalo v experimentoch. Ako rozpúšťadlo bol využitý tetrahydrofurán (THF) s čistotou p. a. Roztoky boli skladované opäť na mieste s minimálnym prístupom svetla a v tmavých vialkách, aby sa zabránilo ich znehodnoteniu svetlom. Pre potreby experimentov boli roztoky pripravené tak, aby sa ich výsledná koncentrácia pohybovala približne v rozmedzí 10^{-5} až 10^{-7} a zároveň aby ich absorbcia bola v rozmedzí 0,1 až 1. Meranie absorpcie prebiehalo paralelne s ich prípravou. Absorbancia bola stanovená na UV-Vis spektrofotometri *Cary 50 Probe (Varian)* s xenonovou pulznou lampou ako zdrojom žiarenia a monochromátorom Czerny-Turner s rozsahom 190–1100 nm. Meranie prebiehalo v kremenných kyvetách a ako blank bolo použité rozpúšťadlo THF. U každého roztoku bola zaznamenaná hodnota vlnovej dĺžky λ_{max} , v ktorej roztok vykazoval maximum absorpcie.

Tabuľka 3: Skúmané roztoky látok (1) až (3), kde V_z označuje množstvo zásobného roztoku danej látky, V_r je množstvo pridaného rozpúšťadla, c je koncentrácia výsledného roztoku a A je absorbančia

Látka	Označenie	V_z [μ l]	V_r [ml]	c [$\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$]	A [-]
(1)	1a	100	10	$8,1\cdot 10^{-6}$	1,060
	1b	25	5	$4,1\cdot 10^{-6}$	0,489
	1c	10	10	$8,1\cdot 10^{-7}$	0,108
(2)	2a	130	5	$2,5\cdot 10^{-5}$	1,022
	2b	60	5	$1,2\cdot 10^{-5}$	0,491
	2c	13	5	$2,5\cdot 10^{-6}$	0,108
(3)	3a	250	5	$4,5\cdot 10^{-5}$	1,057
	3b	120	5	$2,1\cdot 10^{-5}$	0,523
	3c	25	5	$4,5\cdot 10^{-6}$	0,121

3.2.2 Stanovenie optických vlastností

Emisné a excitačné spektrá skúmaných derivátov boli stanovené na luminiscenčnom spektrometri *Fluorolog* (*HORIBA Scientific*). V použítom prevedení spektrometer umožňuje meranie fluorescence v tzv. ustálenom stave (steady-state). Ako zdroj excitačného žiarenia je využívaná xenonová lampa s výkonom 450 W a excitačným rozsahom 200–850 nm. Zariadenie disponuje monochromátorom Czerny-Turner. Zaznamenávanie emisných a excitačných spektier bolo prevádzané za pomoci PMT detektoru (fotonásobič). Na meranie kvantových výťažkov bola využitá integračná sféra Quanta- ϕ určená na meranie absolútnych kvantových výťažkov.

Pre každý roztok bolo prevedených 5 samostatných meraní kvantového výťažku, líšiacich sa použitou hodnotou vlnovej dĺžky excitačného pulzu. Vlnové dĺžky excitačného pulzu boli určené na základe tvaru a charakteru spektra pre danú látku. Dĺžka excitačného pulzu bola nastavená na 0,1 s s integračnou dĺžkou času zberu signálu tiež 0,1 s. Výsledný signál bol porovnaný s referenčným signálom charakterizujúcim možné kolísanie intenzity excitačného žiarenia a následne podľa získaných dát korigovaný.

Ako prvé bolo vždy zmerané emisné spektrum skúmaného roztoku. Šírka štrbín na zdroji žiarenia a monochromátore pred detektorom bola zvolaná tak, aby signál na detektore generovaný dopadajúcim žiarením emitovaným skúmanou látkou z kyvety nepresahoval intenzitu $1\cdot 10^{-6}$ CPS (counts per second). Keby bol signál vyšší, je možné, že dôjde k poškodeniu detektoru. Takéto nastavenie systému bolo zachované počas celej doby merania. Následne bolo stanovené emisné spektrum blanku, v tomto prípade THF. V ďalšom kroku bola zaznamenaná intenzita excitačného pulzu a jeho zoslabenie spôsobené prechodom cez kyvetu s blankom. Pretože intenzita excitačného pulzu je vysoká a veľmi malé množstvo žiarenia je pohlcované rozpúšťadlom, je opäť nutné zariadiť, aby intenzita signálu na detektore nepresahovala $1\cdot 10^{-6}$ CPS. To bolo dosiahnuté za použitia absorpčných optických filtrov *Thorlabs* s optickou hustotou v rozmedzí 0,1–2. Filtre boli postupne zvolené tak, aby intenzita

dopadajúceho žiarenia neprekračovala maximálnu odporúčanú hodnotu. Ako posledné boli stanovené emisné spektrá jednotlivých roztokov za využitia rovnakých optických filtrov a za rovnakých podmienok merania. Zo získaných dát bol pomocou programu *OriginLab* stanovená hodnota kvantového výťažku fluorescencie v THF pre jednotlivé látky. Experimenty prebiehali výlučne za použitia kremenných kyviet. Jednotlivé roztoky boli vždy pred meraním premiešané.

3.2.3 Stanovenie nelineárnych optických vlastností

Stanovenie spektra dvojfotónovo excitovanej fluorescencie pre skúmané látky prebiehala za využitia unikátnej laserovej aparatúry. Zdrojom žiarenia je pikosekundový Nd:YAG laser (*KSPLA PG400*). Generovaný laserový pulz je prostredníctvom OPG modulu transformovaný na laserový pulz o požadovanej vlnovej dĺžke. V prípade použitej aparatúry sa jedná o vlnovú dĺžku v rozsahu 740–1050 nm. Excitačné žiarenie je zaoštrované pomocou série šošoviek na polarizátor, ktorého úlohou je úprava intenzity žiarenia v rozsahu 0–100 %. Sústava šošoviek za polarizátorom zabezpečuje zaoštrovanie excitačného lúču na miesto vo vnútri kyvety. Kremenná kyveta so skúmanou látkou je upevnená v pohyblivom module, ktorý umožňuje meniť polohu ohniska, v ktorom dochádza k dvojfotónovej absorpcii a excitácii. Emitované žiarenie je zachytávané pod uhlom 90° pomocou kamerového detektoru *Andor iStar ICCD*.

Parametre merania ako šírka vstupných a výstupných štrbín, nastavenie laseru, OPG modulu a zvýšenie napäťového zisku na detektore boli stanovené na základe predošlých skúseností s meraním dvojfotónovo excitovaných fluorescenčných spektier v rámci bakalárskej práce [92]. Excitačná vlnová dĺžka bola pre fluorescenčné merania látok (1) až (3) rovnaká a to 740 nm. Emisné žiarenie bolo zaznamenávané len v rozsahu 500 nm a to z dôvodu limitu detektora. Dvojfotónové excitačné spektrá boli stanovené v rozsahu 740–1050 nm.

Pri intenzitných meraniach boli fluorescenčné spektrá pre všetky koncentrácie skúmaných látok (1) až (3) postupne stanovené pre rôzne intenzity excitačného žiarenia. Zo získaných dát boli pomocou programu *OriginLab* vytvorené grafy závislosti intenzity fluorescencie na intenzite excitačného žiarenia, za účelom pozorovania nelineárnych optických procesov a nakoniec aj stanovenia dvojfotónového absorpčného prierezu.

Výpočet dvojfotónového absorpčného prierezu skúmaných látok bol prevedený na základe rovníc v kapitole 2.3.2. Na získanie spoľahlivejších výsledkov je možné experimentálne stanoviť δ_{TPA} zmeraním viacerých roztokov s rôznou koncentráciou a nahradiť tak pomer F/c smernicou závislosti $F = f(c)$. Experimentálne je však oveľa jednoduchšie meniť výkon lasera. Preto boli zostrojené závislosti integrovanej intenzity fluorescencie F na druhej mocnine výkonu lasera P a v rovnici (4) bol nahradený pomer F/P^2 smernicou s rovnice závislosti $F = f(P^2)$. Spojeným takto upravenej rovnice (4) a rovnice (3) získame výraz:

$$\delta_{\text{TPA(N)}} = \delta_{\text{TPA(S)}} \frac{s_{\text{(N)}}c_{\text{(S)}}\Phi_{\text{TPE(S)}}}{s_{\text{(S)}}c_{\text{(N)}}\Phi_{\text{TPE(N)}}}. \quad (5)$$

Za predpokladu, že jedno a dvojfotónové fluorescenčné spektrá sú si podobné, tak môžeme predpokladať, že jednofotónové (Φ_{OPE}) a dvojfotónové (Φ_{TPE}) výťažky fluorescencie sú rovnaké. V takom prípade dostaneme konečný výraz:

$$\delta_{\text{TPA(N)}} = \delta_{\text{TPA(S)}} \frac{s_{\text{(N)}}c_{\text{(S)}}\Phi_{\text{OPE(S)}}}{s_{\text{(S)}}c_{\text{(N)}}\Phi_{\text{OPE(N)}}}, \quad (6)$$

kde $\delta_{\text{TPA(N)}}$ a $\delta_{\text{TPA(S)}}$ sú hodnoty dvojfotónového absorpčného prierezu, $s_{\text{(N)}}$ a $s_{\text{(S)}}$ sú hodnoty smernice závislosti $F = f(P^2)$, $\Phi_{\text{OPE(N)}}$ a $\Phi_{\text{OPE(S)}}$ sú hodnoty jednofotónového kvantového výťažku fluorescencie a c_1 a c_2 sú koncentrácie skúmaných roztokov. Index (N) charakterizuje skúmanú látku a index (S) je štandard.

3.3 Príprava a charakterizácia nanočastíc

Roztok nanočastíc bol pripravený za využitia zásobného roztoku látky (2). Tento experiment mal za úlohu zistiť a preukázať, či je možné zo skúmaných látok pripraviť stabilnú suspenziu nanočastíc bez využitia povrchovo aktívnych látok. Súčasťou experimentov bolo tiež stanovenie optických vlastností pripravených nanočastíc a sledovanie vplyvu spôsobu ich prípravy na zmenu týchto vlastností.

Roztoky nanočastíc boli pripravené pri teplote 25°C zo zásobného roztoku látky (2). Tvorba nanočastíc prebieha procesom samousporiadavania. Táto metóda spočíva v tom, že nanočastice vzniknú vyzrážaním zapríčineným náhlym nárastom množstva rozpúšťadla, v ktorom látka už naďalej nie je rozpustná. Zásobným roztokom je v tomto prípade skúmaná látka v THF, čiže hydrofóbná zlúčenina v nepolárnom rozpúšťadle. Polárnym rozpúšťadlom je voda. Roztok sa tak za stáleho miešania vpravil do veľkého množstva vody a tým došlo k tvorbe nanočastíc. Miešanie roztokov prebiehalo na magnetickej miešače *Big Squid IKAMAG – IKA (BioTech a.s.)* po dobu 5 minút. Každý roztok následne podliehal sonifikácii po dobu 5 min. Ďalej boli roztoky 1 až 3 prefiltrované cez striekačkový filter s priemerom pórov 0,45 μm z redukovanej celulózy, aby sa zamedzilo prípadnej prítomnosti agregátov s väčšími rozmermi.

Pre takto pripravené roztoky nanočastíc boli stanovené priemerné hodnoty veľkosti nanočastíc a hodnoty polydisperzného indexu pomocou koloidného DLS analyzátoru *ZetaSizer Nano ZS, (Malvern Panalytical)*. Absorpčné spektrá boli zhotovené na UV-Vis spektrofotometri *Cary 50 Probe (Varian)*. A fluorescenčné spektrá spolu s kvantovými výťažkami namerané na luminiscenčnom spektrometri *Fluorolog (HORIBA Scientific)* a vypočítané v programe *OriginLab*. Parametre merania boli stanovené na základe predošlých skúseností s meraním fluorescenčných spektier nanočastíc v rámci bakalárskej práce [92]. Postup stanovenia kvantového výťažku je rovnaký ako v prípade zásobných roztokov a je popísaný v kapitole 3.2.2.

4 VÝSLEDKY A DISKUSIA

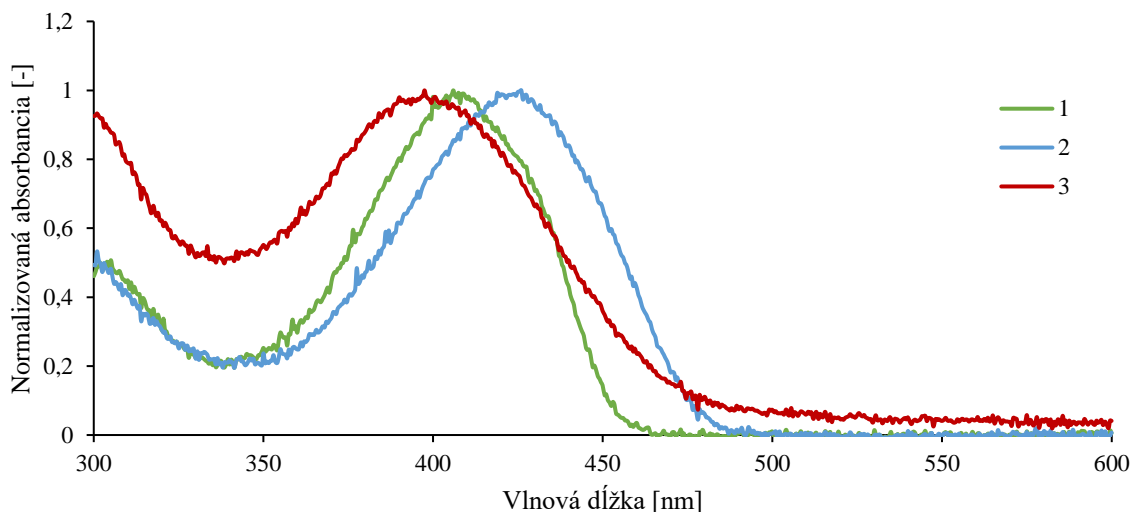
4.1 Charakterizácia skúmaných materiálov

4.1.1 Stanovenie absorpčných spektier a stability

Absorpčné spektrá skúmaných látok (1) až (3) sa nachádzajú na obrázku 9. Jedná sa o spektrá zásobných roztokov s ktorými sa v práci ďalej pracovalo. Hodnoty absorbancie sú normalizované, tak aby maximum bolo rovné hodnote 1. Skúmané roztoky mali žltozelené sfarbenie, čomu odpovedá aj poloha absorpčných spektier. Látka (1) je charakteristická výrazným absorpčným píkcom s absorpčným maximom λ_{\max} pri vlnovej dĺžke 410 nm. To odpovedá pozícii prechodu elektrónu medzi najvyšším obsadeným molekulovým orbitálom (HOMO) a najnižším neobsadeným molekulovým orbitálom (LUMO). Poloha a energia všetkých prechodov je ovplyvnená charakterom prostredia, v ktorom sa chromofor nachádza. V tomto prípade je prostredie tvorené rozpúšťadlom THF. Preto za použitia iného rozpúšťadla môžeme očakávať buď bathochrómny (červený) alebo hypsochrómny (modrý) posun maxima. Z grafu je zrejmé, že spektrum má ďalšie absorpčné maximum, ktoré sa nachádza niekde okolo hodnoty 300 nm. Tento absorpčný pás, je typický pre všetky molekuly, ktoré majú podobnú štruktúru ako skúmané látky. Jedná sa o elektrónový prechod $\pi-\pi^*$. V rámci prevedených experimentov, nie je tento elektrónový prechod nijako zaujímavý. Spektrum v oblasti vlnových dĺžok 250–300 nm je zaťažené vysokým šumom, ktorý je do spektra vnesený korekciou signálu na blank.

Látka (2) sa od látky (1) líši svojou štruktúrou. Zmena štruktúry má za následok zmenu energie potrebnej k prechodu elektrónov medzi HOMO a LUMO, čo sa prejavuje bathochrómny posunom maxima o približne 15 nm. Z toho vyplýva, že energia potrebná na tento prechod je nižšia ako tomu je v prípade látky (1). Absorpčné maximum sa nachádza pri vlnovej dĺžke 425 nm. Tento absorpčný pík je širší než v prípade látky (1), čomu odpovedá zložitejšia štruktúra látky (2). Tak isto ako v prípade spektra látky (1), aj tu je viditeľný náznak toho, že spektrum má druhé lokálne maximum niekde do 300 nm. Toto maximum však nebolo možné spoľahlivo určiť z dôvodu vysokého šumu pozadia.

S prihliadnutím na podobnosť štruktúry látky (3) a látky (2) by bolo možné predpokladať, že absorpčné maximá budú veľmi podobné. Meranie absorbancie však preukázalo, že poloha absorpčného maxima látky (3) sa nachádza na hodnote 398 nm. Čo odpovedá hypsochrómnemu posuvu vzhľadom k látke (2) o takmer 27 nm. Avšak pri príprave zásobného roztoku látky (3) bolo zrejmé, že látka má veľmi zlú rozpustnosť v THF. Aj po niekoľkonásobnom zriedení roztok stále vykazoval mierny zákal po ožiarení svetlom, čo znamená, že sa nejednalo o pravý roztok ale o koloidný roztok. Z toho dôvodu je možné predpokladať, že pri meraní absorbancie bude dochádzať k rozptylu žiarenia na časticách prítomných v roztoku. To sa aj prejavilo na absorpčnom spektre. Je viditeľné, že absorbanca nadobúda nenulové hodnoty na v priebehu celého spektra. Aj napriek tomuto sa s látkou (3) pokračovalo v experimentoch ďalej.

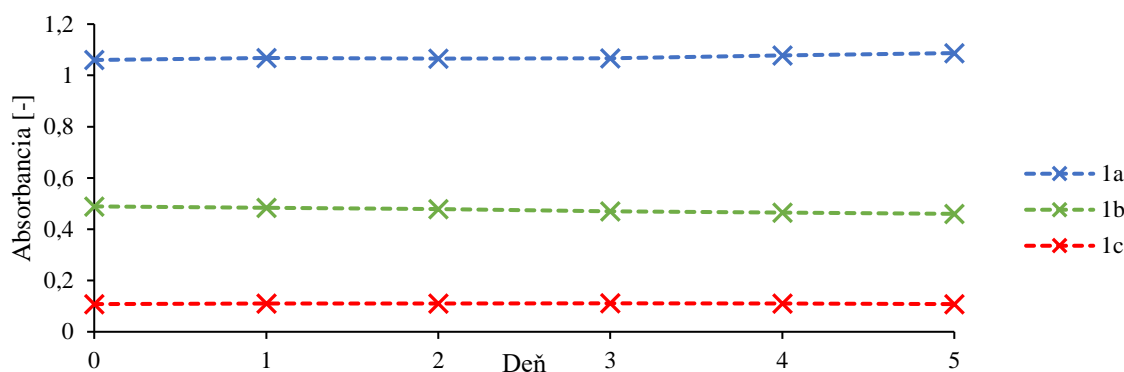


Obrázok 9: Absorpčné spektrá látky 1 až 3 v THF

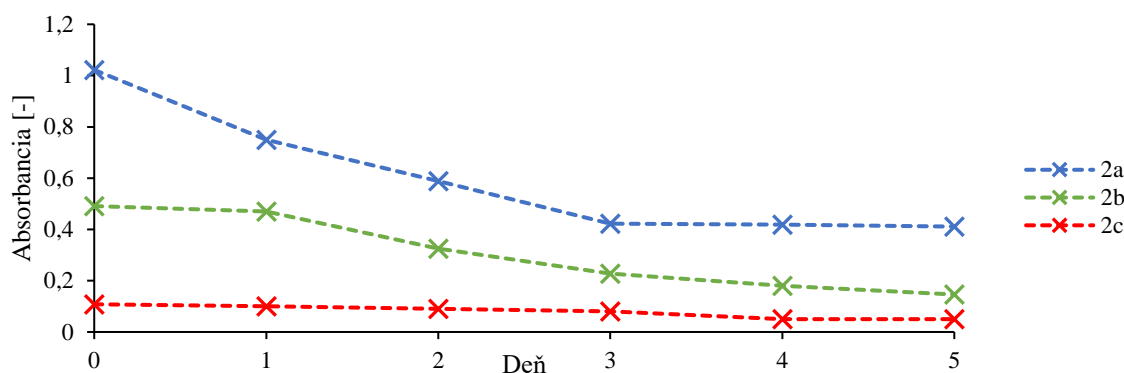
Dôležitou vlastnosťou pripravených roztokov je ich stabilita. Ako parameter charakterizujúci stabilitu bola v tomto prípade určená zmena absorbancie. Zmena absorbancie roztokov 1a až 3c bola sledovaná po dobu 5 dní. Zo získaných dát viditeľných na obrázku 10 je zrejmé, že roztoky látky (1) sa vyznačujú výbornou stabilitou po celú dobu experimentu. Tvar spektier a poloha maxima absorbancie na konci bola rovnaká ako na začiatku. Prípadné odchýlky mohli byť spôsobené každodennou manipuláciou s roztokmi. U najkoncentrovanejšieho roztoku je možné sledovať mierny nárast absorbancie. To môže byť spôsobené tým, že počas celého priebehu experimentu mohlo dôjsť k odpareniu časti rozpúšťadla THF, čo malo za následok zakonzentrovanie roztoku a tak postupné zvýšenie jeho absorbancie.

Merania stability látky (2) sú zobrazené na obrázku 11. Zo získaných dát je zrejmé, že látka (2) nevykazuje vysokú stabilitu vo forme roztoku. Na absorpčných spektrách z jednotlivých dní bolo možné sledovať úbytok chromoforu zodpovedného za absorpciu pri 425 nm. Spoločným znakom pre roztoky 2a až 2c na konci experimentu bol výrazný hypsochrómny posun maxima absorbancie o takmer 35 nm a to na hodnotu λ_{\max} 390 nm. To môže byť spôsobené tým, že látka v roztoku podliehala degradácii. Za zmenu absorpčného spektra tak môžu byť zodpovedné produkty tejto degradácie. Z tohto dôvodu, bol pred každým nasledujúcim experimentom pripravený nový zásobný roztok látky (2) a aj séria roztokov 2a až 2c.

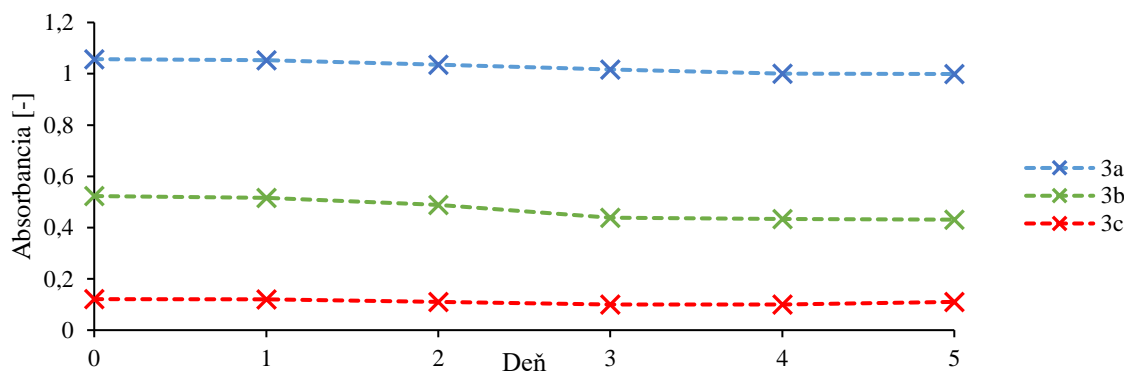
V prípade látky (3) bola opäť sledovaná stabilita počas celého experimentu. Namerané dáta sú zobrazené na obrázku 12. Rovnako ako v prípade látky (2) bol pozorovaný úbytok absorbancie. V tomto prípade bol úbytok miernejší a absorpčné maximum ostalo nezmenené. Hodnoty absorbancie môžu byť ale skreslené z dôvodu pretrvávajúceho zakalenia skúmaných roztokov.



Obrázok 10: Meranie stability roztokov 1a až 1c látky (1). Hodnoty absorbancie pri vlnovej dĺžke 410 nm



Obrázok 11: Meranie stability roztokov 2a až 2c látky (2). Hodnoty absorbancie pri vlnovej dĺžke 425 nm



Obrázok 12: Meranie stability roztokov 3a až 3c látky (3). Hodnoty absorbancie pri vlnovej dĺžke 398 nm

4.1.2 Jednofotónová excitácia a fluorescencia

Excitačné, emisné a absorpčné spektrum pre látku (1) sa nachádza na obrázku 13. Zobrazené dáta sú normalizované. Emisné spektrum sa v tomto prípade vyznačuje prítomnosťou maxima pri vlnovej dĺžke 490 nm a 470 nm. Jedná sa o elektrónové prechody zo základnej hladiny prvého excitovaného stavu do rôznych vibračných hladín základného stavu pri fluorescencii. Po absorpcii fotónov excitovaný fluorofor rýchlo podstupuje relaxáciu (tzv. vibračná relaxácia) na najnižšiu hladinu vibračnej energie excitovaného stavu. Všetky nasledujúce relaxačné dráhy, v tomto prípade fluorescencia, teda postupujú od najnižšej vibračnej hladiny excitovaného stavu. Pravdepodobnosť návratu elektrónu z excitovaného stavu do konkrétnej vibračnej

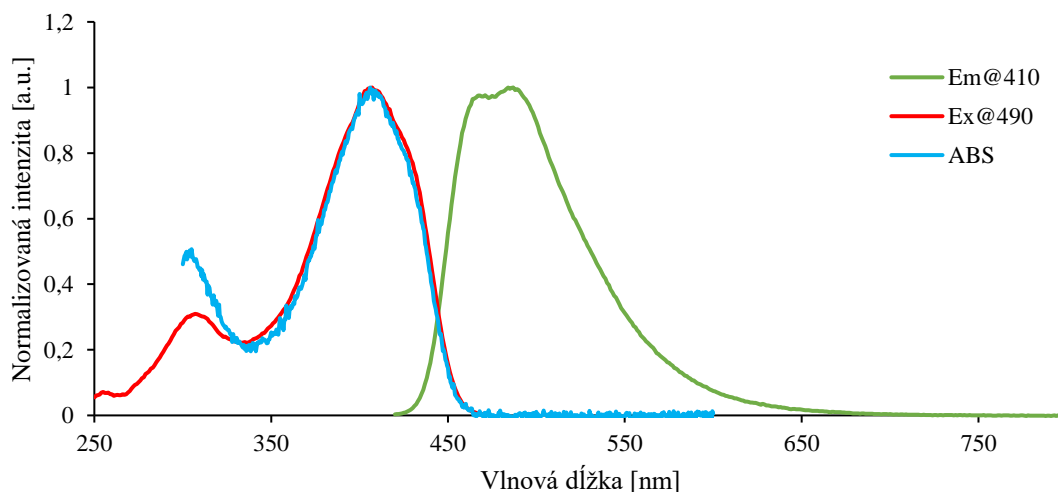
hladiny základného stavu závisí od miery prekrytia vlnových funkcií medzi jednotlivými energetickými stavmi. To že sú v prípade látky (1) tieto prechody do malej miery rozlíšené, má pravdepodobne za následok interakcia excitovaného stavu molekuly s okolitým prostredím a samotná štruktúra molekuly. Jedná sa o rigidnú molekulu s planárnou štruktúrou. Emisné spektrum bolo stanovené v rozmedzí vlnových dĺžok 420–800 nm pri excitačnej vlnovej dĺžke 410 nm. Maximum excitačného spektra sa nachádza tiež pri 410 nm, čo odpovedá maximu absorpcie. Táto hodnota zodpovedá hodnote jednofotónovej absorpcie stanovenej M. Drobizhevom a spol. pre túto látku [89]. Stokesov posun má hodnotu 80 nm. Absorpčné a excitačné spektrum sú si veľmi podobné. Na excitačnom spektre je už jasne rozoznateľný druhý pík pri 300 nm. Tento pík je rovnako ako v prípade absorpčného spektra typický pre molekuly s konjugovaným systémom dvojitých väzieb a prechodom $\pi-\pi^*$. Tento prechod vyžaduje vysokú energiu a je pomerne málo intenzívny. To, že tento pík nie je prítomný v emisnom spektre znamená, že nedochádza k emisii žiarenia excitovaného stavu z energetickej hladiny odpovedajúcej tomuto prechodu. Pravdepodobne sa jedná o prechod z hladiny S_0 do hladiny S_2 . V excitovanom stave dochádza k vnútornej konverzii zo stavu S_2 do stavu S_1 , z ktorého následná deexcitácia je sprevádzaná emisiou žiarenia. Prítomnosťou fluoroforu v roztoku rozpúšťadla sa podrobná vibračná štruktúra spravidla stratí a spektrá sa javia ako široké pásma. Z tohto dôvodu spektrá nie sú svojim zrkadlovým odrazom ako tomu môže byť u jednoduchších fluorofor. U látky (1) bol experimentálne stanovený kvantový výťažok fluorescence v THF a to $84 \pm 2 \%$.

Normalizované excitačné, emisné a absorpčné spektrum pre látku (2) sa nachádza na obrázku 14. Maximum emisného spektra sa nachádza približne pri 525 nm. Látka (2) má v porovnaní s látkou (1) zložitejšiu štruktúru, čomu odpovedá aj tvar emisného spektra. Emisné spektrum je tvorené jedným širokým píkom, presne tak ako by mohlo byť očakávané. Emisné spektrum bolo stanovené v rozmedzí 450–800 nm pri excitačnej vlnovej dĺžke 425 nm. Maximum excitačného spektra sa nachádza pri rovnakej vlnovej dĺžke ako maximum absorpcie. Látka je charakteristická pomerne výrazným Stokesovým posunom a to 100 nm. Rovnako ako v prípade látky (1), je aj v excitačnom spektre látky (2) prítomné druhé excitačné maximum pri 295 nm. Prítomnosť tohto maxima opäť odpovedá prítomnosti konjugovaného systému dvojitých väzieb a jedná sa preto pravdepodobne o prechod S_0 do S_2 . Kvantový výťažok látky v THF bol stanovený na hodnotu $98 \pm 5 \%$, čo je takmer o 14 % viac ako tomu je v prípade látky (1). Látka (2) rovnako ako látka (1) sa vyznačuje vysokou hodnotou kvantového výťažku fluorescence. Vyššia hodnota kvantového výťažku látky (2) je pravdepodobne zapríčinená rozdielnou štruktúrou. Látka (2) sa vyznačuje dlhším systémom konjugovaných dvojitých väzieb a relatívnou planaritou. V rámci molekuly nedochádza k stratám energie excitovaného stavu a tak je kvantový výťažok vyšší.

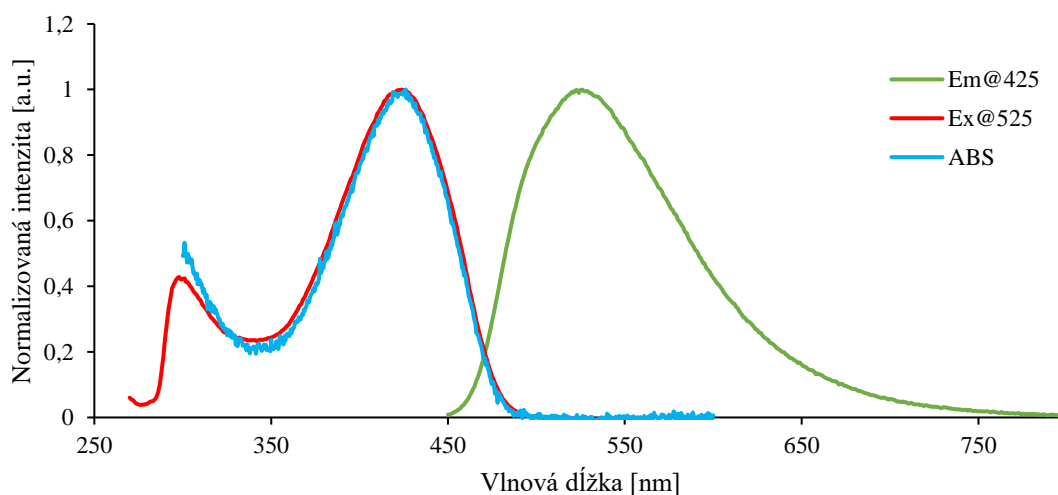
Jednotlivé spektrá pre látku (3) sú znázornené na obrázku 15. Maximum emisného spektra sa nachádza pri 535 nm, čo je veľmi podobné látke (2). To je pravdepodobne spôsobené veľkou podobnosťou ich molekulárnej štruktúry. Emisné spektrum je rovnako aj v tomto prípade tvorené jedným širokým píkom a bolo stanovené v rozmedzí 420–800 nm, pri excitačnej vlnovej dĺžke 398 nm. Maximum excitačného spektra pri 403 nm v tomto prípade nie je zhodné s maximom absorpčného spektra. To môže byť spôsobené rozdielnym spôsobom stanovenia týchto spektier a rozdielnym vplyvom zakalenia roztoku pozorovaného už od jeho prípravy.

Na skreslení tvaru absorpčného spektra sa prejavil rozptyl svetla na časticiach zodpovedných za zakalenie roztoku. Rovnako ako v prípade látky (1) a (2) aj látka (3) má relatívne intenzívny pík pri vlnovej dĺžke 288 nm, ktorý je charakteristický len pre energetický prechod zo základného stavu do stavu excitovaného. Z dôvodu zlej rozpustnosti nebolo možné spoľahlivo určiť hodnotu kvantového výťažku fluorescence látky (3).

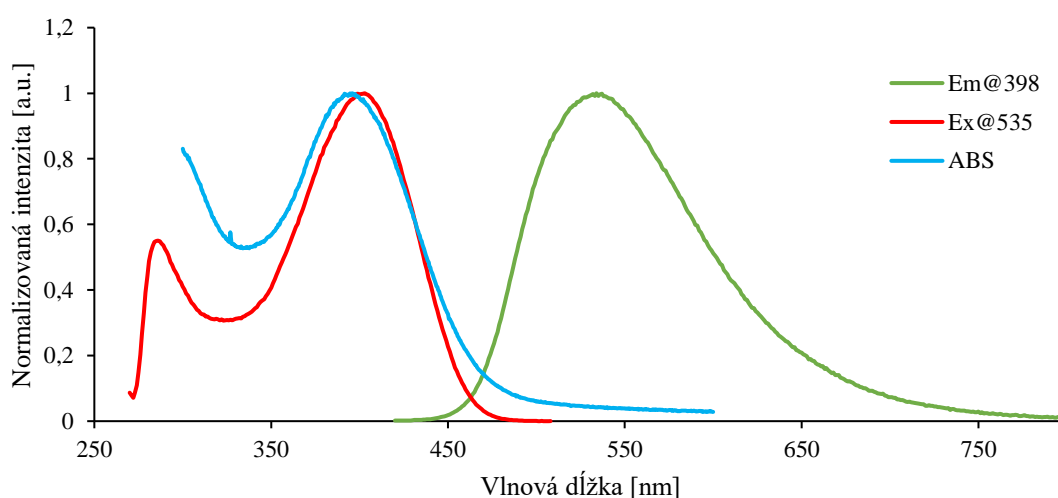
V tomto experimente bol pozorovaný vplyv rozdielnej štruktúry skúmaných derivátov na ich optické vlastnosti. Bolo preukázané, že predĺžený π konjugovaný mostík látky (2) oproti látke (1) má vplyv na energiu HOMO a LUMO. Došlo zrejme k zníženiu energetického rozdielu medzi týmito dvomi orbitálmi. Excitačné maximum látky (2) sa posunulo smerom k vyššej vlnovej dĺžke, čo má za následok intenzívnejšiu excitáciu pri nižšej energii excitačného žiarenia. Naopak u látky (3) bol pozorovaný posun absorpčného pásu smerom k nižším vlnovým dĺžkam. To je zapríčinené väčšou odchýlkou od planarity molekuly spôsobenej prítomnosťou väčšieho množstva fenylových substituentov na π mostíku. Zmena planarity môže mať za následok zmenu elektrónovej štruktúry v excitovanom stave a zhoršenie presunu elektrónov pozdĺž π mostíku. To sa prejaví zvýšením energetického rozdielu medzi HOMO a LUMO a tak k zvýšeniu potrebnej energie k excitácii.



Obrázok 13: Emisné, excitačné a absorpčné spektrum látky (1)



Obrázok 14: Emisné, excitačné a absorpčné spektrum látky (2)



Obrázok 15: Emisné, excitačné a absorpčné spektrum látky (3)

4.1.3 Dvojfotónová excitácia a emisia

Dvojfotónové excitačné a emisné spektrum látky (1) sa nachádza na obrázku 16. Dvojfotónové excitačné spektrá sú kvôli prehľadnosti umiestnené na vedľajšiu os. V prípade skúmaných derivátov sa predpokladá, že dvojfotónové excitačné spektrum (TPE_x) by malo mať podobný tvar ako jednofotónové excitačné spektrum (OPE_x), pričom maximum by sa malo nachádzať u vyššej vlnovej dĺžky, pretože energia fotónov potrebných na dvojfotónovú absorpciu je polovičná. Fluorescenčné spektrum zapríčinené dvojfotónovou absorpciou (TPE_m) by malo byť zhodné s jednofotónovo excitovaným fluorescenčným spektrom (OPE_m). Je tomu tak preto, že nezáleží na spôsobe excitácie, pri deexcitácii fluoroforu dochádza k prechodu elektrónov z excitovaného stavu do základného stavu rovnakým spôsobom. Ako je možné na nameraných dátach vidieť, spektrá sú si veľmi podobné. Maximum jednofotónovej fluorescence pre látku (1) je pri 490 nm. Maximum dvojfotónovej fluorescence je pri vlnovej dĺžke 497 nm. Rozdiel je spôsobený reabsorpciou emitovaného žiarenia v prípade TPE_m. Na nameraných dátach pre OPE_m v kapitole 4.1.2 je možné vidieť, že excitačné a emisné spektrum

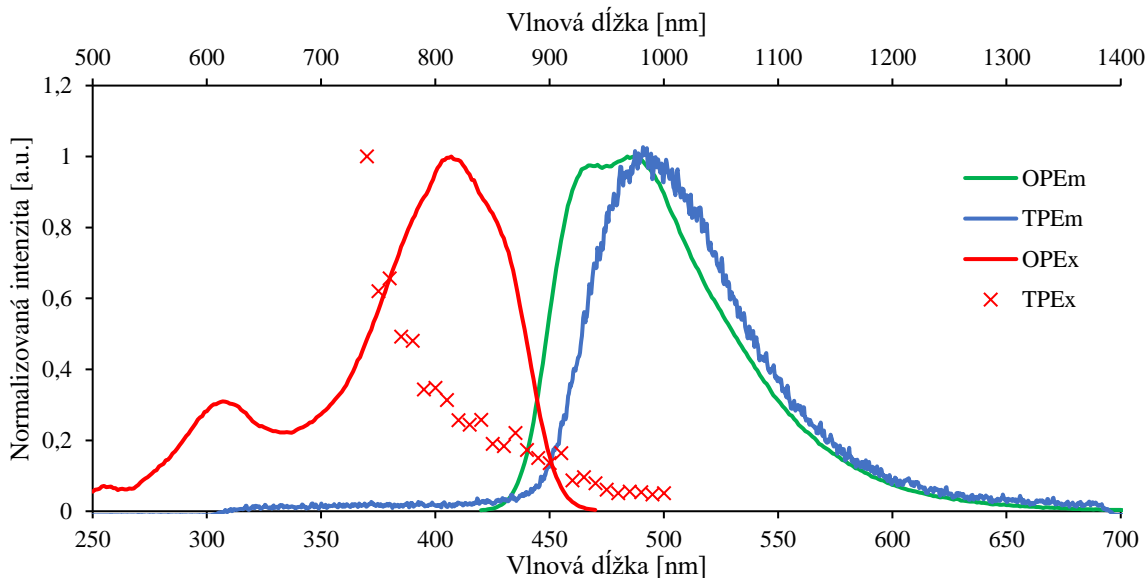
látky (1) sa navzájom prekrýva. Preto časť emitovaného žiarenia pri nižšej vlnovej dĺžke je absorbovaná okolitými fluoroformi ešte predtým ako vôbec dorazí k detektoru a tak má spektrum odlišný tvar. To do akej miery sa reabsorpcia prejaví na výslednom emisnom spektre závisí na technickom prevedení experimentu, napríklad od polohy miesta excitácie od steny kyvety a od koncentrácie fluoroforov. TPEx spektrum bolo stanovené v rozmedzí 740–1000 nm. Z nameraných dát vyplýva, že maximum dvojfotónového excitačného spektra sa nachádza mimo rozsahu detekcie. Na základe údajov získaných Feng He a spol. sa dvojfotónové excitačné maximum látky (1) v roztoku toluénu nachádza pri hodnote 490 nm [54]. Na základe toho je možné predpokladať, že maximum TPEx spektra v THF sa bude tiež nachádzať niekde pod 740 nm. Z dôvodu limitácie laserovej aparatury, nie je možné zaznamenať spektrum o nižšej vlnovej dĺžke ako 740 nm. Je preukázané, že poloha dvojfotónového excitačného spektra závisí na vlastnostiach prostredia, tvoreného najmä molekulami rozpúšťadla [90]. Môžeme ale predpokladať, že tvar dvojfotónového excitačného spektra bude s veľkou pravdepodobnosťou odlišný od toho jednofotónového. Je tomu tak preto, že pri absorpcii dvoch fotónov môže dôjsť k elektorónovému prechodu, ktorý je dovolený len pre dvojfotónovú absorpciu. Tento prechod je tak zastúpený píkom prítomným len v dvojfotónovom excitačnom spektre.

Dvojfotónové excitačné a emisné spektrum látky (2) je znázornené na obrázku 17. Jednofotónové a dvojfotónové fluorescenčné spektrá sú si opäť veľmi podobné. Maximum jednofotónovej fluorescencie pre látku (2) sa nachádza pri 525 nm. Maximum dvojfotónovej fluorescencie je pri 544 nm. Je možné sledovať rovnaký trend ako v prípade látky (1), kedy je časť fluorescenčného spektra reabsorbovaná a maximum je tak posunuté k väčším vlnovým dĺžkam. Excitačné spektrum bolo aj v tomto prípade stanovené v rozmedzí 740–1000 nm. Z dát vyplýva, že maximum excitačného spektra sa nachádza mimo rozsahu merania. Zo získaných dát je ale náročné určiť, či sa väčšina excitačného spektra nachádza v rozsahu merania, alebo sa jedná len o šum na okraji excitačného spektra. Pretože maximum jednofotónového excitačného spektra sa nachádza pri 425 nm (oproti 410 nm pre látku (1)), môžeme tak predpokladať, že dvojfotónové excitačné spektrum by malo byť posunuté práve k vyšším vlnovým dĺžkam v porovnaní s excitačným spektrom látky (1).

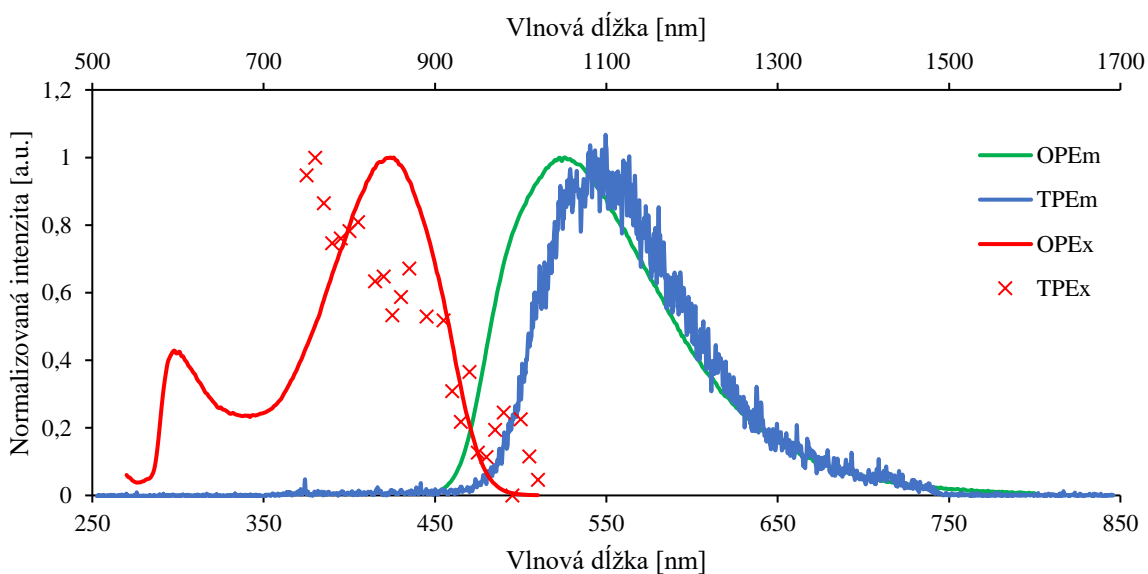
Namerané spektrá pre látku (3) sú na obrázku 18. Emisné spektrum je do značnej miery zaťažené šumom pozadia. Maximum emisie je v tomto prípade zhodné tak ako pre jednofotónovú, tak ja dvojfotónovú fluorescenciu a to pri 535 nm. Emisné spektrum má prítomný aj druhý pík približne pri vlnovej dĺžke 700 nm. Z dát vyplýva, že v prípade látky (3) dochádza k minimálnej odozve na dvojfotónovú excitáciu. Jedným z dôvodov môže byť aj nízka rozpustnosť látky (3) v THF a tým spôsobený zákal roztoku.

Cieľom experimentu bolo pozorovať dvojfotónové excitačné spektrá látok (1) ž (3) a vplyv ich štruktúry na intenzitu fluorescencie a ich polohy v porovnaní s jednofotónovými spektrami daných látok. Z nameraných dát vyplýva, že látky (1) a (2) vykazujú fluorescenciu po dvojfotónovej absorpcii. U látky (3) sa to nepodarilo preukázať, pretože získané dáta sú nedostatočným dôkazom. Pozorovanie emisných spektier poukázalo na vplyv reabsorpcie pri zaznamenávaní fluorescencie. To je zrejme zapríčinené relatívne vysokou koncentráciou meraných roztokov. Avšak v dôsledku nízkej intenzity fluorescencie by nemalo zmysel ďalej

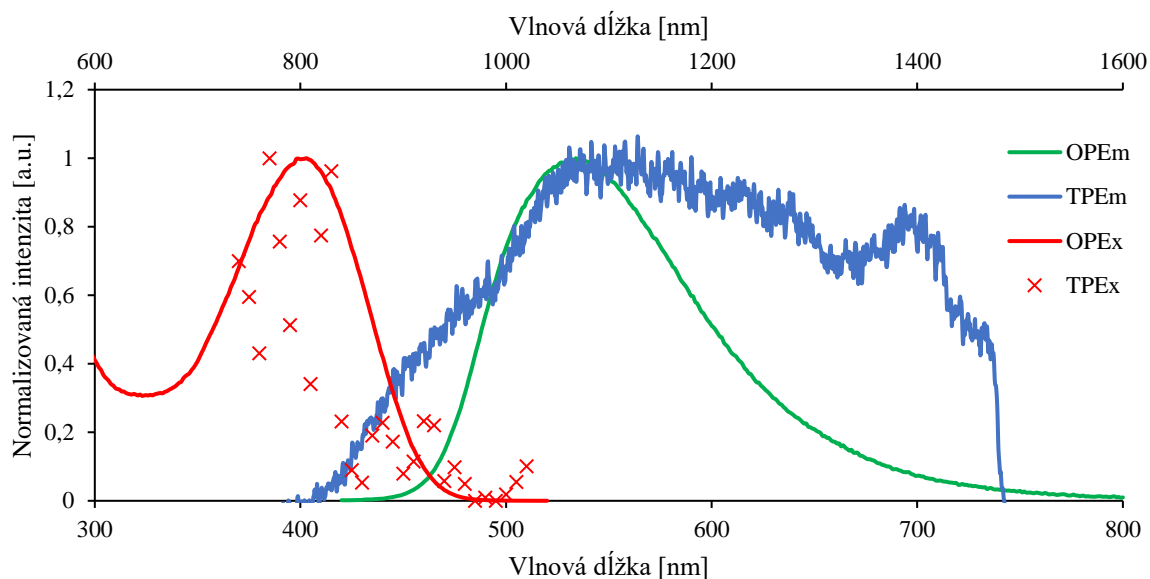
roztoky riediť a znižovať tak koncentráciu. Ďalej bol tiež pozorovaný posun TPEx spektra látky (2) k vyšším vlnovým dĺžkam oproti látke (1). Predpokladalo sa, že maximum bude posunuté k takej vlnovej dĺžke, že ho bude možné zaznamenať za použitia dostupnej laserovej aparatúry. Z nameraných dát však nie je možné s určitosťou tvrdiť, či sa to podarilo alebo nie.



Obrázok 16: Dvojfotónové excitačné (TPEx) a emisné (TPEm) spektrum látky (1) v porovnaní s jednofotónovým emisným spektrom (OPEm) a excitačným (OPEx) spektrom



Obrázok 17: Dvojfotónové excitačné (TPEx) a emisné (TPEm) spektrum látky (2) v porovnaní s jednofotónovým emisným spektrom (OPEm) a excitačným (OPEx) spektrom



Obrázok 18: Dvojfotónové excitačné (TPE_x) a emisné (TPE_m) spektrum látky (3) v porovnaní s jednofotónovým emisným spektrom (OPE_m) a excitačným (OPE_x) spektrom

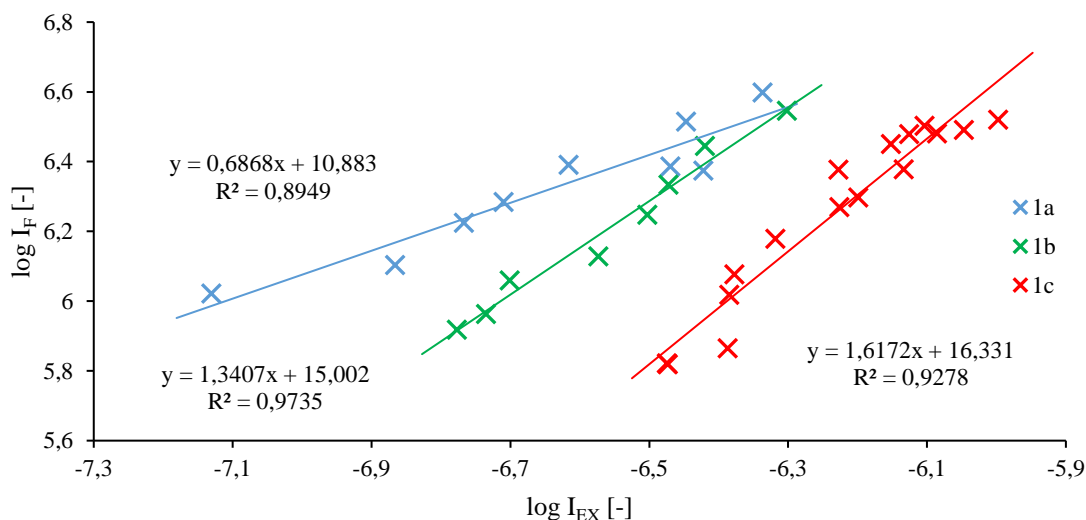
4.1.4 Intenzitné merania a stanovenie dvojfotónového absorpčného prierezu

Priebeh TPE_m má kvadratický charakter, to znamená že intenzita fluorescence rastie s druhou mocninou intenzity dopadajúceho žiarenia. Ak po logaritmovaní nameraných dát a ich vynesení do grafu pozorujeme lineárnu závislosť so smernicou vzniknutej priamky rovnou hodnote 2, tak sa jedná o dvojfotónovo excitovanú fluorescenciu. Skúmanými látkami boli roztoky 1a až 3c. Parametre merania rovnako ako informácie o laserovej aparatúre sú uvedené v kapitole 3.2.3. Každé meranie pozostávalo z 500 opakovaní a to za účelom zvýšenia pomeru signál-šum. TPE_m spektrá boli zaznamenávané po dobu 100 ns. Každý dátový bod predstavuje emisné spektrum excitované pri určitej intenzite excitačného žiarenia. Takto získané dáta boli spracované prostredníctvom program *OriginLab*.

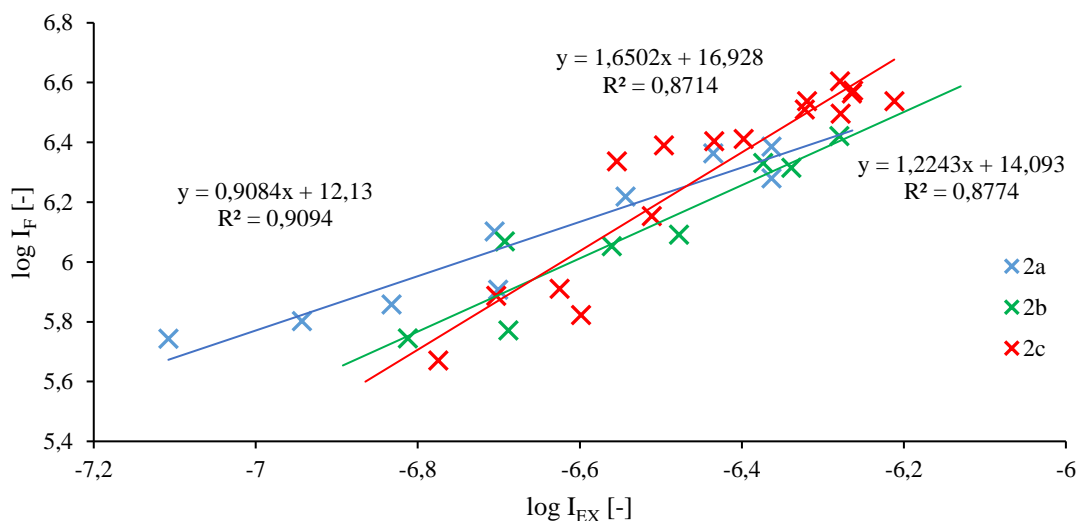
Intenzitné merania dvojfotónovej fluorescence pre látku (1) sa nachádzajú na obrázku 19. Pre skúmané roztoky 1a až 1c bola zostrojená závislosť logaritmu intenzity fluorescence na logaritme intenzity excitačného žiarenia. Zo získaných dát vyplýva, že pre roztoky 1a a 1b nameraná závislosť nevykazuje závislosť charakteristickú pre dvojfotónovú fluorescenciu. To je spôsobené ich vysokou koncentráciou a teda vysokým vplyvom reabsorpcie. So znižujúcou sa koncentráciou môžeme sledovať zmenu hodnoty smernice závislosti a približujúcej sa k hodnote 2. U najmenej koncentrovaného roztoku 1c je rovnica lineárnej regresie získaná z programu *EXCEL* $y = 1,62x + 16,33$, čo sa najbližšie približuje očakávanej hodnote smernice závislosti.

Intenzitné merania pre roztoky 2a až 2c látky (2) reprezentuje obrázok 20. Opäť je možné sledovať podobný trend ako v prípade látky (1). Lineárna závislosť pre roztok 3c je $y = 1,65x + 16,93$. Z doposiaľ spracovaných dát, je zrejmé, že nižšia koncentrácia je vhodnejšia pre určenie dvojfotónovej fluorescence.

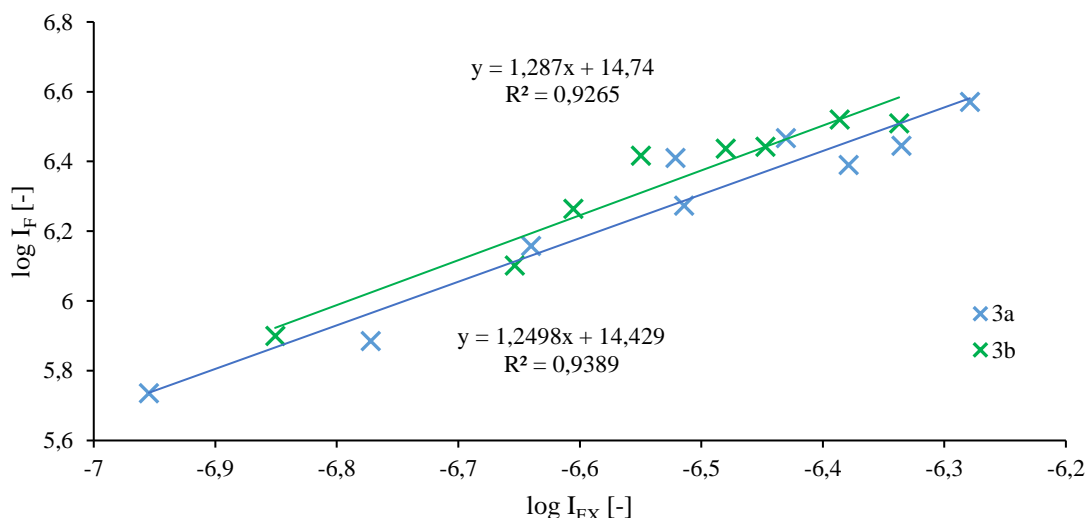
Dáta pre skúmané roztoky látky (3) sa nachádzajú v obrázku 21. V tomto prípade sa pre najmenej koncentrovaný roztok nepodarilo zaznamenať žiadne údaje o fluorescencii. Intenzita fluorescenčného signálu bola príliš nízka. Je zrejmé, že v prípade roztokov 3a a 3b dochádza v určitej miere k zaznamenaniu nelineárneho optického procesu. Intenzita fluorescenčného signálu rastie nepriamoúmerne intenzite excitačného žiarenia. To, že nepozorujeme v tomto prípade jednoznačnú kvadratickú závislosť má zrejme na svedomí rozptyl svetla prítomný v roztokoch látky (3) od začiatku experimentov a tiež opäť jav reabsorpcie. Excitačný a aj fluorescenčný signál je do určitej miery rozptýlený na koloidných časticiach prítomných v roztoku.



Obrázok 19: Intenzitné merania pre roztoky 1a až 1c látky (1)

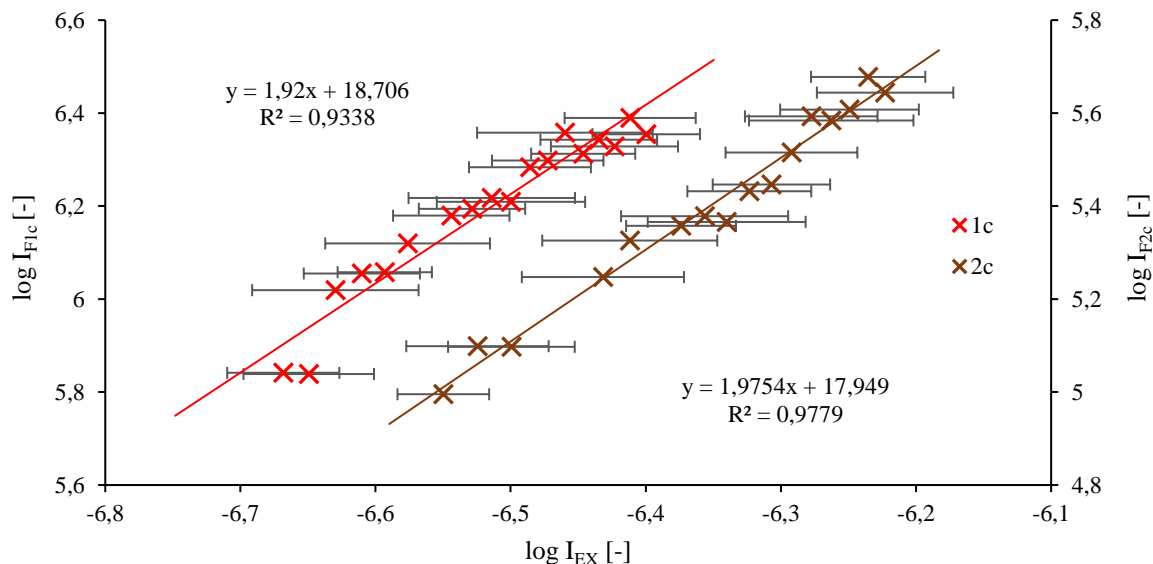


Obrázok 20: Intenzitné merania pre roztoky 2a až 2c látky (2)



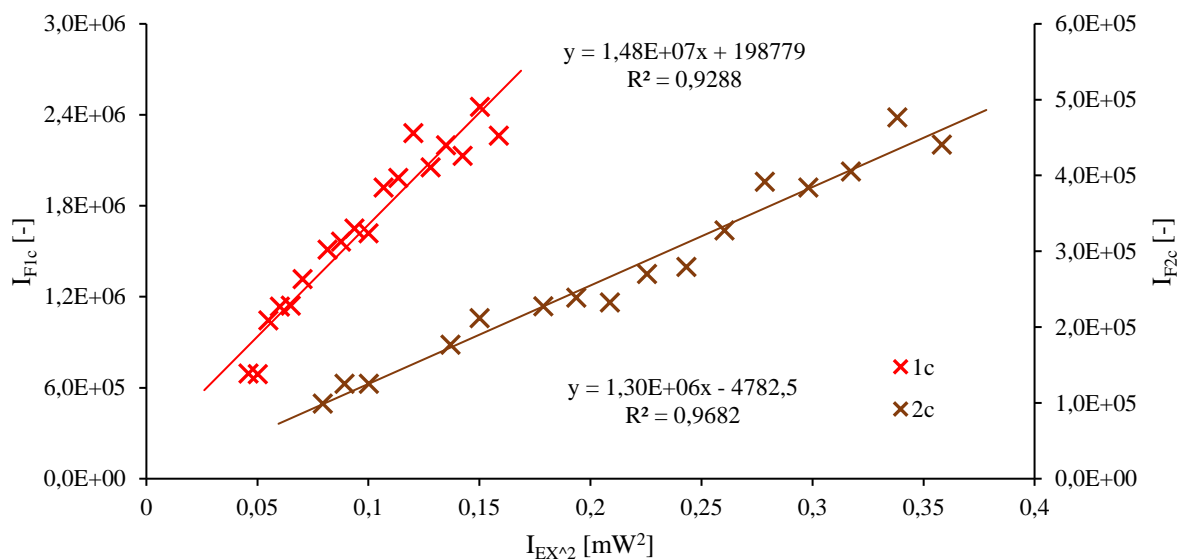
Obrázok 21: Intenzitné merania pre roztoky 3a a 3b látky (3)

Na základe získaných dát z predchádzajúcich experimentov bolo zistené, že najvhodnejšie roztoky na stanovenie dvojfotónového absorpčného prierezu sú roztoky 1c a 2c. Jedná sa o najmenej koncentrované roztoky. Za účelom potlačenia reabsorpcie boli upravené podmienky experimentu. V tomto prípade bolo ohnisko, v ktorom dochádza k dvojfotónovej absorpcii posunuté bližšie k stene kyvety. Vzdialenosť od steny kyvety bola v tomto prípade okolo 1 mm. Výsledky tohto experimentu je možné vidieť na obrázku 22. V prípade roztoku 1c látky (1) bola takto získaná závislosť $y = 1,92x + 18,71$. V prípade roztoku 2c látky (2) to bolo $y = 1,98x + 17,95$. Takto získané údaje jednoznačne potvrdzujú dvojfotónovú absorpciu látky (1) aj (2). Chybové úsečky v nameraných dátach značia vysoký rozptyl intenzity excitačného žiarenia, aj napriek tomu, že každé meranie pozostávalo z 500 opakovaní.



Obrázok 22: Graf závislosti fluorescencie indukovanej dvoma fotónmi na intenzite excitačných impulzov pre roztok 1c a 2c po úprave parametrov merania

Na základe rovnice (6) v kapitole 3.2.3 bol vypočítaný dvojfotónový absorpčný prierez pre látky (1) a (2). Pre tento výpočet boli zostrojené závislosti intenzity fluorescence I_F na druhej mocniny výkonu lasera P^2 pre roztoky 1c a 2c, ktoré sa nachádzajú na obrázku 23. Rovnice lineárnej regresie boli vypočítané pomocou programu EXCEL. Rovnica priamky pre roztok 1c má tvar $y = 1,48 \cdot 10^7 \cdot \text{mW}^{-2}x + 198779$ a pre roztok 2c $y = 1,30 \cdot 10^6 \cdot \text{mW}^{-2}x - 4782,5$. Hodnota dvojfotónového absorpčného prierezu (δ_{TPA}) látky (1) bola zistená z literatúry a bola použitá ako referencia [89] pre výpočet δ_{TPA} látky (2). Vypočítané hodnoty δ_{TPA} sa nachádzajú v tabuľke 4.



Obrázok 23: Závislosť intenzity fluorescence I_F na druhej mocniny výkonu lasera P^2 pre roztoky 1c a 2c

Tabuľka 4: Hodnoty dvojfotónového absorpčného prierezu (δ_{TPA}), dvojfotónového emisného prierezu (δ_{TPE}) a vlnovej dĺžky maxima TPEm spektra (λ_{max})

Látka	λ_{max} [nm]	δ_{TPA} [GM]	δ_{TPE} [GM]
(1)	497	1900	1596
(2)	544	46	45

Cieľom tohto experimentu bolo stanovenie dvojfotónového absorpčného prierezu pre látky (1) až (3). Podarilo sa však stanoviť δ_{TPA} len pre látky (1) a (2). Na stanovenie δ_{TPA} látky (3) nebolo možné experimentálne získať vhodné dáta. Experimentálne určená veľkosť δ_{TPA} pre látku (1) má hodnotu 1900 GM a pre látku (2) 46 GM. Na základe teoretických znalostí a štruktúry látky (2) bola predpokladaná vyššia hodnota δ_{TPA} ako v prípade látky (1). To sa žiaľ prostredníctvom prevedených experimentov nepodarilo dokázať. Nízka hodnota δ_{TPA} látky (2) má pravdepodobne súvis s nižšou intenzitou dvojfotónovej fluorescence ako v prípade látky (1). Možným dôvodom takéhoto výsledku je výber nevhodnej metódy stanovenia δ_{TPA} prípadne nevhodným nastavením laserovej aparatúry a jednotlivých parametrov merania. Taktiež je možné, že pri manipulácii s vzorkami došlo k zavedeniu chyby do experimentu. Ďalším možným dôvodom je to, že meranie intenzitných spektier, z ktorých bol určený δ_{TPA} , neprebiehala v jeden deň, ale s odstupom niekoľkých dní. Látka (2) sa už od počiatku

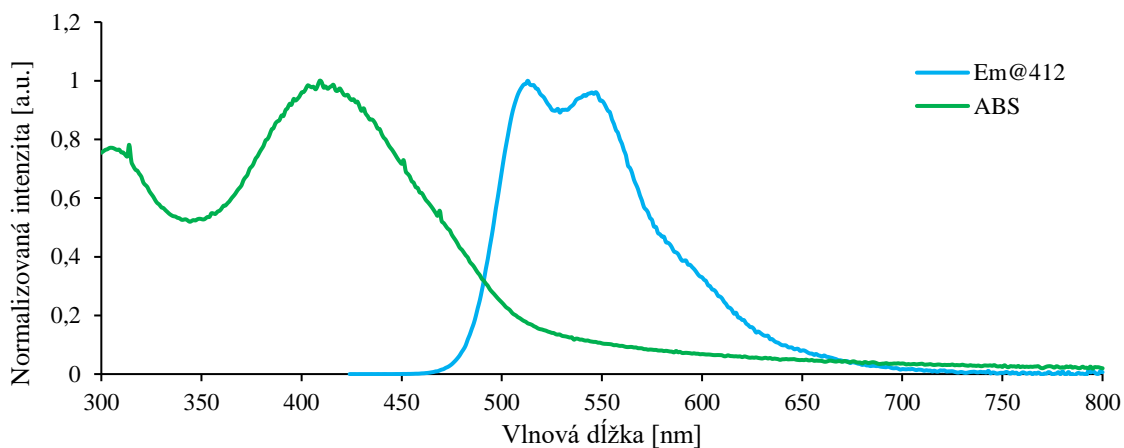
vyznačovala nízkou stabilitou v roztoku THF. Je preto možné, že aj napriek príprave čerstvých roztokov pred každým meraním, získané dáta neodpovedajú pôvodnej látke (2), ale naopak nejakému jej degradačnému produktu. To či sa jedná o chemickú alebo inú degradáciu nie je možné zo získaných dát spoľahlivo určiť.

4.2 Charakterizácia nanočastíc

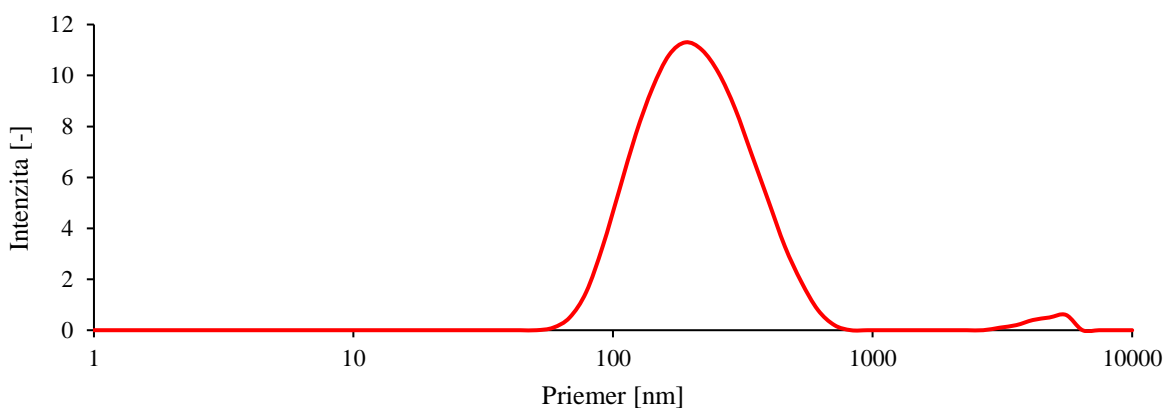
Na základe predošlých výsledkov (najmä vyššieho kvantového výťažku fluorescence) bol na prípravu nanočastíc zvolený roztok látky (2). Excitačné a fluorescenčné spektrá roztoku nanočastíc sú zobrazené na obrázku 24. Fluorescenčné spektrum bolo zaznamenané v rozsahu 425–800 nm pri excitačnej vlnovej dĺžke 412 nm. Fluorescenčné spektrum je charakteristické rozoznateľnou vibračnou štruktúrou s maximami pri 514 a 548 nm. Tieto píky odpovedajú energetickým prechodom zo základnej hladiny excitovaného stavu do rozličných vibračných hladín základného stavu. Takéto rozlíšenie vibračnej štruktúry je pozorovateľné pre látku (2) aj vo forme roztoku v THF. V tom prípade vibračný prechod pri nižšej vlnovej dĺžke tvorí len rameno na okraji spektra. Z toho vyplýva, že poloha a vzájomná intenzita týchto píkov má súvis s tvorbou nanočastíc vo vodnom prostredí. Pri vzniku nanočastíc dochádza k tomu, že sa zmení charakter prostredia, ktoré obklopuje jednotlivé fluorofory. Zmena vlastností okolitého prostredia, najmä jeho polarita, má vplyv na tvar a polohu emisného spektra..

Absorpčné spektrum má výrazné maximum pri 415 nm a druhé menej výrazné pri hodnote vlnovej dĺžky 306 nm. Prítomnosť druhého píku pri nižšej vlnovej dĺžke len v absorpčnom spektre naznačuje, že sa opäť jedná o energetický prechod spojený s prítomnosťou aromatických jadier a konjugovaného systému dvojitých väzieb zo základného stavu na excitovaný stav. Jedná sa o prechod $\pi-\pi^*$. Na absorpčnom spektre je možné sledovať podobný trend ako tomu bolo v kapitole 4.1.1 u roztoku látky (3). Kedy je spektrum v celom svojom rozsahu povýšené a zaťažené šumom. V tomto prípade sa jedná tiež o rozptyl svetla na časticiach v roztoku, pretože sa jedná o koloidný roztok. To môže komplikovať stanovenie kvantového výťažku fluorescence.

Veľkosť pripravených nanočastíc bola určená metódou dynamického rozptylu svetla. Distribúcia veľkosti nanočastíc je zobrazená na obrázku 25. Meranie prebiehalo v jednorazových plastových kyvetách. Pred meraním bol roztok temperovaný na teplotu 21,5°C, čo približne odpovedalo teplote v laboratóriu. Meranie veľkosti nanočastíc pozostávalo z 10 opakovaných meraní s dĺžkou 5 minút. Získavanie dát prebieha na základe sledovania Brownovho pohybu častíc v roztoku. Tento typ pohybu častíc je ovplyvnený teplotou okolitého prostredia, preto je dôležité dbať pri takomto meraní na nastavenie správnej teploty merania. Z dôvodu minimalizácie vplyvu nečistôt na presnosť merania bolo meranie prevádzané vo vzdialenosti 1 mm od steny kyvety. Takýmto spôsobom bola stanovená priemerná veľkosť častíc a to 178,0 nm.



Obrázok 24: Absorpčné a emisné spektrum roztoku nanočastíc látky (2)



Obrázok 25: Distribúcia častíc pre roztok nanočastíc látky (2)

4.2.1 Normalizácia prípravy nanočastíc

Na vlastnosti pripravených nanočastíc má vplyv mnoho faktorov. V tomto experimente bol pozorovaný vplyv rýchlosti miešania suspenzie na veľkosť pripravených nanočastíc a či je možné sa u takéhoto roztoku zbaviť nadmerných agregátov jednoduchou filtráciou.. Preto boli pripravené 4 roztoky nanočastíc líšiace sa spôsobom prípravy. Príprava roztokov je popísaná tabuľke 5. Pri tomto experimente boli počas prípravy roztoky 1 a 2 miešané rýchlosťou 500 otáčok za minútu a roztoky 3 a 4 rýchlosťou 1300 otáčok za minútu. Z nameraných dát z predchádzajúceho experimentu je zrejmé, že pripravený roztok obsahuje mnoho rozličných veľkostí nanočastíc s priemerom od 100 do 500 nm. Zo snahy o zníženie polydisperzity systému, boli roztoky nanočastíc 1 až 3 boli prefiltrované cez striekačkový filter z redukovanej celulózy s veľkosťou pórov 0,45 μm . Roztok číslo 1 bol navyše ponechaný v digestore po dobu 24 hodín z dôvodu odparenia prebytočného THF prítomného v roztoku po príprave. Následne bol sledovaný vplyv odparenia tohto rozpúšťadla na vlastnosti roztoku.

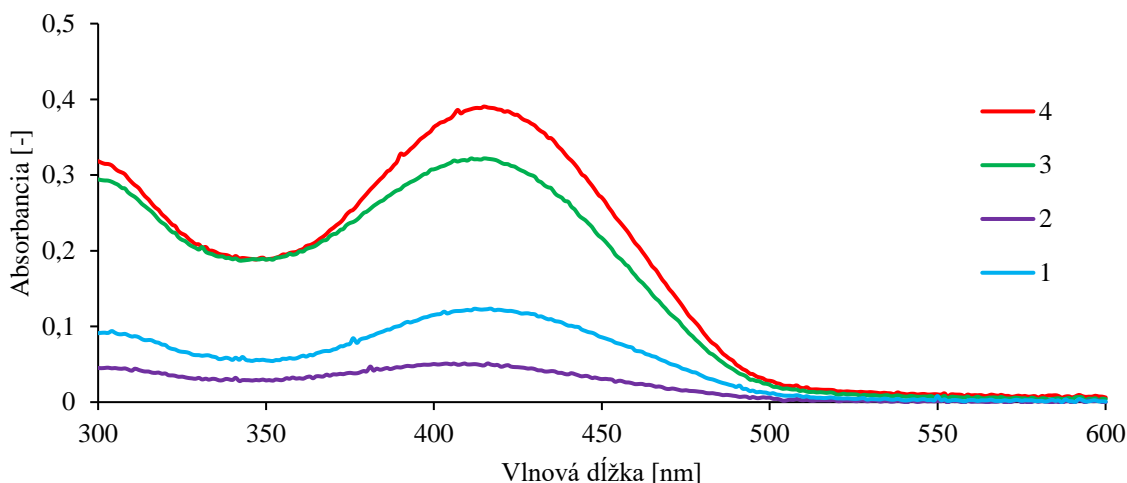
Tabuľka 5: Parametre prípravy jednotlivých roztokov nanočastíc z látky (2), kde V je celkový objem suspenzie, V_z je objem zásobného roztoku látky (2), V_v je objem rozpúšťadla (vody), f charakterizuje rýchlosť miešania na magnetickej miešačke pre jednotlivé roztoky.

Roztok	V [ml]	V_z	V_v	f [rpm]	Poznámka	Filtrácia
1	10	0,2	9,8	500	Odparenie THF v digestore (24h)	Áno
2	10	0,2	9,8	500	Meranie ihneď po príprave	Áno
3	5	0,1	4,9	1300	Meranie ihneď po príprave	Áno
4	5	0,1	4,9	1300	Meranie ihneď po príprave	Nie

Absorpčné spektrá pripravených roztokov sa nachádzajú na obrázku 26. V prípade všetkých roztokov sa maximum absorpcie pohybovalo okolo hodnoty 415 nm. Pre porovnanie absorpčné maximum látky (2) v podobe roztoku v THF sa nachádza pri hodnote 425 nm. Všetky roztoky boli pripravené z rovnakého pomeru vody a zásobného roztoku THF. Z nameraných dát je zrejmé, že absorpcia roztokov nanočastíc 1 a 2 je výrazne nižšia ako roztokov 3 a 4. Pri príprave týchto roztokov bola suspenzia nanočastíc miešaná pri nižšej rýchlosti. To pravdepodobne viedlo k vytvoreniu rozmernejších agregátov, ktoré boli pri následnej filtrácii z roztoku odstránené, čo sa prejavilo na výrazne nižšej absorpcii. V prípade roztoku 1 nemalo odparenie rozpúšťadla zásadný vplyv na veľkosť vzniknutých nanočastíc. Priemerná veľkosť nanočastíc v roztoku (1) bola po filtrácii určená na hodnotu 114,0 nm. Roztok 1 ani po 24 hodinách nevykazoval vyššiu mieru agregácie nanočastíc ako roztok 2. Roztok 2 bol po filtrácii na pohľad číry a bezfarebný s minimálnou hodnotou absorpcie. Priemerná veľkosť nanočastíc v roztoku bola určená na 129,3 nm.

Roztok 3 a 4 boli pripravené pri výraznom miešaní suspenzie. To sa prejavilo na veľkosti pripravených nanočastíc, kedy aj napriek tomu, že roztok 3 bol prefiltrovaný, jeho absorpcia klesla v porovnaní s roztokom 4 iba približne o 18 %. Z toho vyplýva, že množstvo odfiltrovaných častíc zodpovedných za absorpciu bolo minimálne. Priemerná veľkosť častíc pre roztok 3 bola stanovená na 106,7 nm a pre roztok 4 len 102,6 nm. Aj napriek tomu, že bol roztok 3 prefiltrovaný ihneď po príprave, filtrácia nemala žiadny vplyv na zníženie priemeru častíc v roztoku, v porovnaní s roztokom 4.

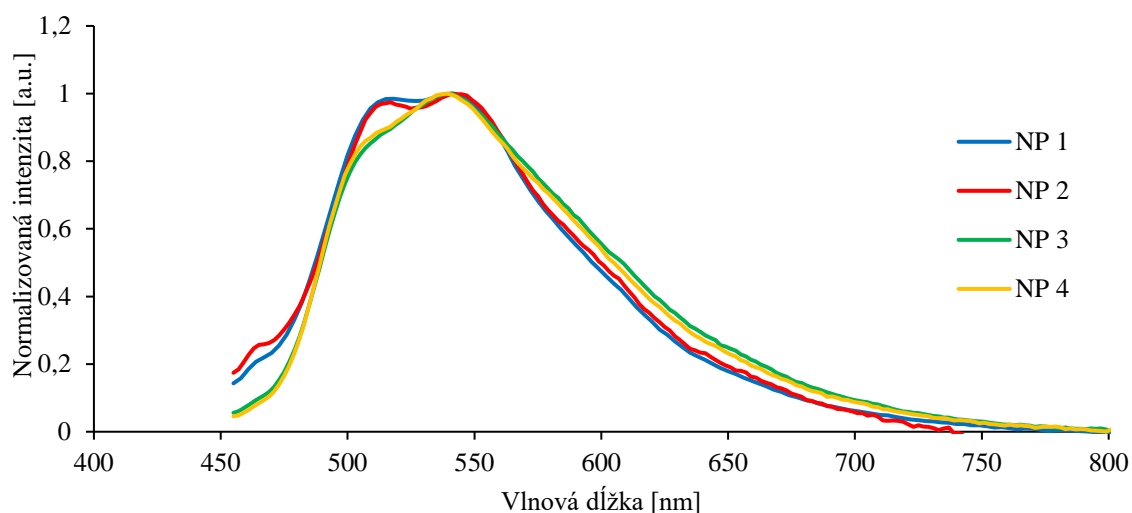
Z nameraných dát teda vyplýva, že je výhodné pripravovať suspenziu nanočastíc z látky (2) pri intenzívnom miešaní a následná filtrácia vôbec nie je potrebná. Veľkosť nanočastíc zohráva dôležitú roľu najmä pri ich využití v biomedicíne.



Obrázok 26: Absorpčné spektrá roztokov nanočastíc 1 až 4 látky (2) po príprave a filtrácii

Pre roztoky 1 až 4 bolo následne stanovené aj emisné spektrum ako súčasť stanovenia kvantových výťažkov fluorescencie. Emisné spektrá sa nachádzajú na obrázku 27. Spektrum odpovedajúce roztoku nanočastíc 1 a 2 má odlišný tvar ako spektrum pre 3 a 4. Spektrá so od seba navzájom líšia rôznou intenzitou vibračných prechodov. Bolo preukázané, že poloha a vzájomná intenzita takýchto prechodov v rámci nanočastíc je funkciou ich veľkosti [91]. V prípade skúmaných roztokov to znamená, že nanočastice s väčšou veľkosťou sa vyznačujú rozlíšenejším emisným spektrom ako menšie nanočastice. V rámci nanočastice dochádza vo vnútri, medzi jednotlivými molekulami, k medzimolekulovým interakciám, ktoré môžu tiež ovplyvniť intenzitu jednotlivých prechodov. Na rozlíšení vibračnej štruktúry emisného spektra sa podieľa okolité prostredie tvorené rozpúšťadlom. Na tvar spektra môže mať opäť vplyv aj reabsorpcia, ktorá je zapríčinená prienikom absorpčného a emisného spektra. Roztoky 1 a 2 sa vyznačujú nižšou absorbanciou a z toho vyplýva, že majú aj nižšiu koncentráciu. Preto vplyv reabsorpcie emitovaného žiarenia okolitými fluoroformi nebude tak znateľný ako v prípade roztokov 3 a 4, ktorých absorbancia a teda aj koncentrácia je vyššia. U roztokov 3 a 4 je časť emisného spektra u nižších vlnových dĺžkach ponížená o hodnotu absorbovanú prostredím ešte pred príchodom žiarenia na detektor.

Hodnoty jednotlivých emisných maxím spolu s nameranými hodnotami kvantových výťažkov sa nachádzajú v tabuľke 6. Kvantové výťažky fluorescencie roztokov nanočastíc boli stanovené rovnakým spôsobom ako v prípade zásobných roztokov v kapitole 3.2.2. V prípade všetkých roztokov sa kvantový výťažok pohybuje okolo hodnoty 1 až 4 %.



Obrázok 27: Emisné spektrá roztokov nanočastíc pri excitačnej vlnovej dĺžke 416 nm

Tabuľka 6: Maximá fluorescence pre roztoky nanočastíc 1 až 4 látky (2) pri excitačnej vlnovej dĺžke 416 nm, priemerné hodnoty veľkosti nanočastíc v roztokoch 1 až 4 a hodnoty kvantových výťažkov fluorescence pri excitačnej vlnovej dĺžke 414 a 416 nm.

Roztok	λ_{416} [nm]	QY ₄₁₄ [%]	QY ₄₁₆ [%]	d [nm]
1	518; 542	1,88 ± 0,01	2,02 ± 0,01	114,0
2	513; 540	1,44 ± 0,01	3,67 ± 0,02	129,3
3	513; 542	1,36 ± 0,01	2,00 ± 0,01	106,7
4	513; 537	1,97 ± 0,02	2,73 ± 0,02	102,6

Tento experiment mal za úlohu preukázať, že z látky (2) je možné pripraviť nanočastice. Tiež bol skúmaný vplyv jednoduchej modifikácie základného parametru prípravy na veľkosť a fluorescenčné vlastnosti suspenzie nanočastíc. Bolo preukázané, že látka (2) nedisponuje takým vysokým kvantovým výťažkom fluorescence vo forme nanočastíc ako vo forme roztoku v THF. Tieto výsledky by mali slúžiť ako úplný základ pri príprave nanočastíc zo skúmaných derivátov. Využitie látok (1) až (3) ako základných stavebných zložiek luminiscenčných nanočastíc je preto témou až pre ďalšiu prácu.

5 ZÁVER

Cieľom tejto diplomovej práce bolo štúdium optických vlastností nových π konjugovaných molekúl na báze látky 1,4-di(4'-N,N-difenylaminostyryl) benzénu a ich potencionálnej aplikácie ako prostriedkov pre pokročilé zobrazovacie techniky biologických preparátov. Ďalej tiež rozvinutie metodiky prípravy nanočastíc zo skúmaných látok a tiež ich samotná charakterizácia. Získané výsledky boli interpretované na základe vypracovanej teoretickej časti diplomovej práce.

Pripravené roztoky (1) až (3) boli podrobené jednoduchej skúške stability v priebehu jedného týždňa. Skúška preukázala, že roztok látky (2) nie je dlhodobu stabilný a znamenalo to, že pred každým ďalším experimentom bolo potrebné prípravu roztoku zopakovať, aby sa zamedzilo prípadnej chybe. Roztoky látky (1) a (3) vykazovali dobrú stabilitu po celú dobu experimentu. Roztok látky (3) sa už od počiatku vyznačoval nízkou rozpustnosťou a prítomným zákalom, čo komplikovalo ďalšie experimenty. Analýza absorpčných spektier preukázala prítomnosť absorpčného maxima okolo 300 nm pre všetky skúmané látky, čo potvrdzuje prítomnosť elektrónového prechodu π - π^* , typického pre zlúčeniny s aromatickým jadrom a konjugovaným systémom dvojitých väzieb.

Bolo preukázané, že predĺžený π konjugovaný mostík látky (2) v porovnaní s látkou (1) má vplyv na energiu HOMO a LUMO. V tomto prípade bol pozorovaný pokles energetického rozdielu medzi týmito dvomi orbitálmi pre látku (2), čo sa prejavilo posunutím excitačného spektra k vyšším vlnovým dĺžkam. Naopak u látky (3) bol pozorovaný nárast energie potrebnej na excitáciu. To je zapríčinené odchýlkou molekuly od planarity v dôsledku rozdielnej štruktúry oproti látke (1) a (2). Zmena planarity má za následok zmenu elektrónovej štruktúry v excitovanom stave a zhoršenie presunu elektrónov pozdĺž π mostíku. Všetky skúmané látky sú charakteristické výrazným Stokesovým posunom v rozmedzí 80–100 nm. V rámci tohto experimentu bol určený aj kvantový výťažok fluorescence, ktorý bol pre látku (1) $84 \pm 2 \%$ a pre látku (2) $98 \pm 5 \%$. Kvantový výťažok látky (3) nebolo možné stanoviť.

U látok (1) a (2) sa podarilo zaznamenať fluorescenciu indukovanú dvojfotónovou absorpciou. U látky (3) sa nepodarilo získať presvedčivé výsledky. Analýza emisných spektier poukázala na vplyv reabsorpcie okolitým roztokom. To bolo zrejme zapríčinené relatívne vysokou koncentráciou meraných roztokov. V dôsledku nízkej intenzity fluorescence roztoky ďalej neboli riedené. Bol pozorovaný posun dvojfotónového excitačného spektra látok (2) a (3) vplyvom rozdielnej štruktúry smerom k vyšším vlnovým dĺžkam. Píky TPEX spektier všetkých troch skúmaných molekúl sa aj napriek tomu nachádzajú mimo rozsahu laserovej aparatury, takže nebolo možné presne určiť maximum excitácie ani pre jednu látku.

Merania intenzity fluorescence v závislosti na intenzite excitačného žiarenia preukázali kvadratickú závislosť pre najzriedenejšie roztoky látky (1) a (2). Po úprave parametrov merania za účelom potlačenia reabsorpcie boli stanovené hodnoty dvojfotónového absorpčného prierezu. Kvôli výpočtu δ_{TPA} boli vytvorené závislosti intenzity fluorescence na druhej mocnine výkonu excitačného laseru. Smernica priamky takto získanej závislosti bola využitá pri výpočtoch. Hodnota δ_{TPA} látky (1) bola získaná z literatúry a bola použitá ako referencia pre výpočet δ_{TPA} látky (2). Výsledná hodnota δ_{TPA} látky (2) je 46 GM. Hodnota δ_{TPA} látky (1) je

1900 GM, čo je takmer 41krát viac ako látky (2). Nepodarilo sa potvrdiť predpoklad, že látka (2) by mala mať kvôli svojej rozdielnej štruktúre väčší δ_{TPA} . Látka (2) sa už od počiatku vyznačovala nízkou stabilitou v roztoku THF, čo mohlo mať priamy vplyv na stanovenie hodnoty δ_{TPA} . Stanovenie δ_{TPA} látky (3) neprebehlo z dôvodu toho, že nebolo možné experimentálne získať vhodné dáta.

Nanočastice boli pripravené z roztoku látky (2) najmä z dôvodu vyššieho kvantového výťažku fluorescence tohto fluoroforu. Experiment preukázal, že dochádza k pomerne silnej fluorescencii látky (2) aj vo forme nanočastíc. U roztoku nanočastíc bola stanovená priemerná veľkosť pripravených nanočastíc na hodnotu 178,0 nm. Aj v tomto prípade bola pozorovaná prítomnosť elektrónového prechodu $\pi-\pi^*$ pri vlnovej dĺžke 306 nm. V nasledujúcom experimente bol sledovaný vplyv zmeny parametrov prípravy nanočastíc na ich vlastnosti. Bolo zistené, že veľkosť nanočastíc závisí od rýchlosti miešania suspenzie pri príprave. Čím rýchlejšie je suspenzia miešaná, tým menšie častice vznikajú. Filtrácia suspenzie 0,45 μm striekačkovým filtrom v takom prípade nemá žiadny zmysel. V prípade všetkých roztokov sa kvantový výťažok fluorescence pohybuje okolo hodnoty 1 až 4 %. Veľkosť nanočastíc a hodnota ich kvantového výťažku fluorescence zohráva dôležitú rolu pri ich využití v biozobrazovaní.

Získané výsledky teda poukázali na to, že látky (1) a (2) sú vhodnými kandidátmi pre ďalšie štúdium nelineárnych optických vlastností a značia ich potenciál pre ďalšie využitie v oblasti 3D zobrazovania pomocou dvojfotónovej excitačnej mikroskopie. V prípade látky (2) sa podarilo pripraviť aj roztok nanočastíc. Preukázalo sa, že látka je dobre excitovateľná a zachováva si svoju fluorescenciu aj v pevnej fáze.

6 ZOZNAM POUŽITEJ LITERATÚRY

- [1] WU, Changfeng, Barbara BULL, Craig SZYMANSKI, Kenneth CHRISTENSEN a Jason MCNEILL. Multicolor Conjugated Polymer Dots for Biological Fluorescence Imaging. *ACS Nano*. 2008, **2**(11), 2415-2423. ISSN 1936-0851. Dostupné z: doi:10.1021/nn800590n
- [2] APARICIO-IXTA, Laura, Mario RODRIGUEZ a Gabriel RAMOS-ORTIZ. Organic Nanomaterials with Two-Photon Absorption Properties for Biomedical Applications. *Contemporary Optoelectronics*. Dordrecht: Springer Netherlands, 2016, 2016-9-12, , 25-50. Springer Series in Optical Sciences. ISBN 978-94-017-7314-0. Dostupné z: doi:10.1007/978-94-017-7315-7_2
- [3] PARTHASARATHY, Venkatakrishnan, 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. ISSN 16136810. Dostupné z: doi:10.1002/smll.201100726
- [4] DENK, W, J. STRICKLER a W. WEBB. Two-photon laser scanning fluorescence microscopy. *Science*. 1990, **248**(4951), 73-76. ISSN 0036-8075. Dostupné z: doi:10.1126/science.2321027
- [5] 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. ISSN 0959-9428. Dostupné z: doi:10.1039/B915112E
- [6] TANG, Fu, Chun WANG, Jinshan WANG, Xiaoyu WANG a Lidong LI. *Fluorescent Organic Nanoparticles with Enhanced Fluorescence by Self-Aggregation and their Application to Cellular Imaging*. 2014, **6**(20), 18337-18343. ISSN 1944-8244. Dostupné z: doi:10.1021/am505776a
- [7] YANG, Guangbao, Soo Zeng Fiona PHUA, Anivind Kaur BINDRA a Yanli ZHAO. Degradability and Clearance of Inorganic Nanoparticles for Biomedical Applications. *Advanced Materials*. 2019, **31**(10). ISSN 09359648. Dostupné z: doi:10.1002/adma.201805730
- [8] TROFYMCHUK, Kateryna, Andreas REISCH, Ievgen SHULOV, Yves MÉLY a Andrey S. KLYMCHENKO. Tuning the color and photostability of perylene diimides inside polymer nanoparticles: towards biodegradable substitutes of quantum dots. *Nanoscale*. 2014, **6**(21), 12934-12942. ISSN 2040-3364. Dostupné z: doi:10.1039/C4NR03718A
- [9] SHI, Xingrui, Zhenzhen XU, Qing LIAO, Yishi WU, Zhanjun GU, Renhui ZHENG a Hongbing FU. Aggregation enhanced two-photon fluorescence of organic nanoparticles. *Dyes and Pigments*. 2015, **115**, 211-217. ISSN 01437208. Dostupné z: doi:10.1016/j.dyepig.2014.12.023
- [10] HOO, Christopher M., Natasha STAROSTIN, Paul WEST a Martha L. MECARTNEY. A comparison of atomic force microscopy (AFM) and dynamic light scattering (DLS) methods to characterize nanoparticle size distributions. *Journal of Nanoparticle Research*. 2008, **10**(S1), 89-96. ISSN 1388-0764. Dostupné z: doi:10.1007/s11051-008-9435-7

- [11] AHMED, Mukhtiar, Muhammad FAISAL, Ayesha IHSAN a Muhammad Moazzam NASEER. Fluorescent organic nanoparticles (FONs) as convenient probes for metal ion detection in aqueous medium. *The Analyst*. 2019, **144**(8), 2480-2497. ISSN 0003-2654. Dostupné z: doi:10.1039/C8AN01801D
- [12] 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. ISSN 1523-7060. Dostupné z: doi:10.1021/ol061293p
- [13] SINGAMANENI, Srikanth, Valery N. BLIZNYUK, Christian BINEK a Evgeny Y. TSYMBAL. Magnetic nanoparticles: recent advances in synthesis, self-assembly and applications. *Journal of Materials Chemistry*. 2011, **21**(42). ISSN 0959-9428. Dostupné z: doi:10.1039/c1jm11845e
- [14] VOISE, Jonathan, Michael SCHINDLER, Jérôme CASAS a Elie RAPHAËL. Capillary-based static self-assembly in higher organisms. *Journal of The Royal Society Interface*. 2011, **8**(62), 1357-1366. ISSN 1742-5689. Dostupné z: doi:10.1098/rsif.2010.0681
- [15] WHITESIDES, G. M. Self-Assembly at All Scales. *Science*. **295**(5564), 2418-2421. ISSN 00368075. Dostupné z: doi:10.1126/science.1070821
- [16] KONONOVA, I. E., K. G. GAREEV, V. A. MOSHNIKOV, V. I. AL'MYASHEV a O. V. KUCHEROVA. Self-assembly of fractal magnetite-silica aggregates in a static magnetic field. *Inorganic Materials*. 2014, **50**(1), 68-74. ISSN 0020-1685. Dostupné z: doi:10.1134/S0020168514010117
- [17] NAIK, Sandeep S., Jacob G. RAY a Daniel A. SAVIN. Temperature- and pH-Responsive Self-assembly of Poly(propylene oxide)- b -Poly(lysine) Block Copolymers in Aqueous Solution. *Langmuir*. 2011, **27**(11), 7231-7240. ISSN 0743-7463. Dostupné z: doi:10.1021/la200882f
- [18] KIM, Hoon, Sang-Mi JEONG a Ji-Woong PARK. Electrical Switching between Vesicles and Micelles via Redox-Responsive Self-Assembly of Amphiphilic Rod–Coils. *Journal of the American Chemical Society*. 2011, **133**(14), 5206-5209. ISSN 0002-7863. Dostupné z: doi:10.1021/ja200297j
- [19] BILATI, Ugo, Eric ALLÉMANN a Eric DOELKER. Development of a nanoprecipitation method intended for the entrapment of hydrophilic drugs into nanoparticles. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2005, **24**(1), 67-75. ISSN 09280987. Dostupné z: doi:10.1016/j.ejps.2004.09.011
- [20] FESSI, H., F. PUISIEUX, J.Ph. DEVISSAGUET, N. AMMOURY a S. BENITA. Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. *International Journal of Pharmaceutics*. 1989, **55**(1), R1-R4. ISSN 03785173. Dostupné z: doi:10.1016/0378-5173(89)90281-0
- [21] HORNIG, Stephanie, Thomas HEINZE, C. Remzi BECER a Ulrich S. SCHUBERT. Synthetic polymeric nanoparticles by nanoprecipitation. *Journal of Materials Chemistry*. 2009, **19**(23). ISSN 0959-9428. Dostupné z: doi:10.1039/b906556n

- [22] CAMPIOLI, Elisa, Domna Maria NIKOLAIDOU, Vincent HUGUES, Marco CAMPANINI, Lucia NASI, Mireille BLANCHARD-DESCE a Francesca TERENZIANI. Amplified two-photon brightness in organic multicomponent nanoparticles. *Journal of Materials Chemistry C*. 2015, **3**(28), 7483-7491. ISSN 2050-7526. Dostupné z: doi:10.1039/C5TC01136A
- [23] KIM, Jong-Ho, Kyeongsoon PARK, Hae Yun NAM, Seulki LEE, Kwangmeyung KIM a Ick Chan KWON. Polymers for bioimaging. *Progress in Polymer Science*. 2007, **32**(8-9), 1031-1053. ISSN 00796700. Dostupné z: doi:10.1016/j.progpolymsci.2007.05.016
- [24] DEMOS, Stavros, Harry RADOUSKY a Robert ALFANO. Deep subsurface imaging in tissues using spectral and polarization filtering. *Optics Express*. 2000, **7**(1). ISSN 1094-4087. Dostupné z: doi:10.1364/OE.7.000023
- [25] DUNN, Andrew K., Hayrunnisa BOLAY, Michael A. MOSKOWITZ a David A. BOAS. *Dynamic Imaging of Cerebral Blood Flow Using Laser Speckle*. 2001, **21**(3), 195-201. ISSN 0271-678X. Dostupné z: doi:10.1097/00004647-200103000-00002
- [26] CHEN, Yu, Ruilin GUAN, Chen ZHANG, Juanjuan HUANG, Liangnian JI a Hui CHAO. Two-photon luminescent metal complexes for bioimaging and cancer phototherapy. *Coordination Chemistry Reviews*. 2016, **310**, 16-40. ISSN 00108545. Dostupné z: doi:10.1016/j.ccr.2015.09.010
- [27] WEISSLEDER, Ralph. A clearer vision for in vivo imaging. *Nature Biotechnology*. 2001, **19**(4), 316-317. ISSN 1087-0156. Dostupné z: doi:10.1038/86684
- [28] SHARMA, Parvesh, Scott BROWN, Glenn WALTER, Swadeshmukul SANTRA a Brij MOUDGIL. Nanoparticles for bioimaging. *Advances in Colloid and Interface Science*. 2006, **123-126**, 471-485. ISSN 00018686. Dostupné z: doi:10.1016/j.cis.2006.05.026
- [29] CHAN, Warren C.W, Dustin J MAXWELL, Xiaohu GAO, Robert E BAILEY, Mingyong HAN a Shuming NIE. Luminescent quantum dots for multiplexed biological detection and imaging. *Current Opinion in Biotechnology*. 2002, **13**(1), 40-46. ISSN 09581669. Dostupné z: doi:10.1016/S0958-1669(02)00282-3
- [30] GUAN, Yuyao, Tingting SUN, Jun DING a Zhigang XIE. Robust organic nanoparticles for noninvasive long-term fluorescence imaging. *Journal of Materials Chemistry B*. 2019, **7**(44), 6879-6889. ISSN 2050-750X. Dostupné z: doi:10.1039/C9TB01905G
- [31] NEWTON HARVEY, E. *A History of Luminescence: From the Earliest Times Until 1900*. 1st ed. Dover Publications, 2005. 768 s. ISBN 978-0486442587.
- [32] VALEUR, Bernard. Molecular Fluorescence. *Encyclopedia of Applied Physics*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co., 2003, s. 477-531. ISBN 9783527268412.
- [33] PERTILE, Eva. *Instrumental methods of analysis*. Ostrava: VŠB - Technical University of Ostrava, 2017. ISBN 978-80-248-4124-3.
- [34] VALEUR, Bernard. *Molecular Fluorescence: Principles and Applications*. Wiley-VCH, 2001. ISBN 978-3527299195.
- [35] LAKOWICZ, Joseph R. Introduction to Fluorescence. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. Boston, MA: Springer US, 1999, 1999, , 1-23. ISBN 978-1-4757-3063-0. Dostupné z: doi:10.1007/978-1-4757-3061-6_1

- [36] KAVARNOS, George J. Fundamental concepts of photoinduced electron transfer. *Photoinduced Electron Transfer I*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 1990, 1990-5-31, , 21-58. Topics in Current Chemistry. ISBN 978-3-540-52379-6. Dostupné z: doi:10.1007/3-540-52379-0_2
- [37] 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. ISSN 0021-9584. Dostupné z: doi:10.1021/ed100182h
- [38] BĄCZYŃSKI, Andrzej a Danuta RADOMSKA. Electronic spectra of dye solutions. I. The mirror image rule. *Journal of Fluorescence*. 1992, **2**(3), 175-180. ISSN 1053-0509. Dostupné z: doi:10.1007/BF00866932
- [39] BAGCHI, Biman, David W. OXTOBY a Graham R. FLEMING. Theory of the time development of the stokes shift in polar media. *Chemical Physics*. 1984, **86**(3), 257-267. ISSN 03010104. Dostupné z: doi:10.1016/0301-0104(84)80014-2
- [40] WOLF, David E. Fundamentals of Fluorescence and Fluorescence Microscopy. *Digital Microscopy, 3rd Edition*. Elsevier, 2007, 2007, , 63-91. Methods in Cell Biology. ISBN 9780123740250. Dostupné z: doi:10.1016/S0091-679X(06)81005-8
- [41] NAWARA, Krzysztof a Jacek WALUK. Improved Method of Fluorescence Quantum Yield Determination. *Analytical Chemistry*. 2017, **89**(17), 8650-8655. ISSN 0003-2700. Dostupné z: doi:10.1021/acs.analchem.7b02013
- [42] LAKOWICZ, Joseph R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. 3rd edition. Springer, Boston, MA, 2006. ISBN 978-0-387-46312-4.
- [43] CHAZE, William, Ophélie CABALLINA, Guillaume CASTANET a Fabrice LEMOINE. The saturation of the fluorescence and its consequences for laser-induced fluorescence thermometry in liquid flows. *Experiments in Fluids*. 2016, **57**(4). ISSN 0723-4864. Dostupné z: doi:10.1007/s00348-016-2142-8
- [44] MCHALE, Jeanne L. *Molecular spectroscopy*. Second edition. Boca Raton, [2017]. ISBN 978-1-4665-8658-1
- [45] BOYD, Robert. *Nonlinear Optics*. 3rd edition. Academic Press, 2008. ISBN 9780080485966.
- [46] MESCHÉDE, Dieter. *Optics, Light and Lasers*. Wiley, 2004. ISBN 9783527403646.
- [47] GRZYBOWSKI, Andrzej a Krzysztof PIETRZAK. Maria Goeppert-Mayer (1906–1972): Two-photon effect on dermatology. *Clinics in Dermatology*. 2013, **31**(2), 221-225. ISSN 0738081X. Dostupné z: doi:10.1016/j.clindermatol.2012.06.002
- [48] BAJPAI, Anil K. a Rajesh K. SAINI. *Advances in Polymeric Nanomaterials for Biomedical Applications*. Elsevier, 2021. ISBN 9780128146583.
- [49] JU, SEONGMIN, PRAMOD R. WATEKAR, SEONGMOOK JEONG, YOUNGWOONG KIM a WON-TAEK HAN. *NONLINEAR OPTICAL PROPERTIES OF ZINC DOPED GERMANO-SILICATE GLASS OPTICAL FIBER*. 2012, **19**(04), 791-799. ISSN 0218-8635. Dostupné z: doi:10.1142/S0218863510005728
- [50] ZHANG, Yu-xi a Yu-hua WANG. Nonlinear optical properties of metal nanoparticles: a review. *RSC Advances*. 2017, **7**(71), 45129-45144. ISSN 2046-2069. Dostupné z: doi:10.1039/C7RA07551K

- [51] SKOOG, Douglas A. a James J. LEARY. *Principles of instrumental analysis*. 4th ed. Fort Worth: Saunders College, 1992. ISBN 00-307-5398-8.
- [52] 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*. 2019, **37**(4), 401-408. ISSN 0256-7679. Dostupné z: doi:10.1007/s10118-019-2206-3
- [53] WANG, Hao, Ronghua YANG, Liu YANG a Weihong TAN. Nucleic Acid Conjugated Nanomaterials for Enhanced Molecular Recognition. *ACS Nano*. 2009, **3**(9), 2451-2460. ISSN 1936-0851. Dostupné z: doi:10.1021/nn9006303
- [54] HE, F., L. L. TIAN, X. Y. TIAN, et al. Diphenylamine-Substituted Cruciform Oligo(phenylene vinylene): Enhanced One- and Two-Photon Excited Fluorescence in the Solid State. *Advanced Functional Materials*. 2007, **17**(9), 1551-1557. ISSN 1616301X. Dostupné z: doi:10.1002/adfm.200600518
- [55] ECHEVARRIA, Lorenzo, Iván MORENO, José CAMACHO, Mary Carmen SALAZAR a Antonio HERNÁNDEZ. A fluorescent benzothiazole probe with efficient two-photon absorption. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 2012, **97**, 274-276. ISSN 13861425. Dostupné z: doi:10.1016/j.saa.2012.06.022
- [56] GAN, Xiaoping, Haiyan WANG, Lanmei LU, et al. Three new water-soluble fluorescent organic nanoparticles with embedded structure: Structure-activity relationship and two-photon bio-imaging application. *Dyes and Pigments*. 2018, **150**, 27-35. ISSN 01437208. Dostupné z: doi:10.1016/j.dyepig.2017.11.005
- [57] KIM, S., Q. ZHENG, G. S. HE, D. J. BHARALI, H. E. PUDAVAR, A. BAEV a P. N. PRASAD. Aggregation-Enhanced Fluorescence and Two-Photon Absorption in Nanoaggregates of a 9,10-Bis[4'-(4"-aminostyryl)styryl]anthracene Derivative. *Advanced Functional Materials*. 2006, **16**(18), 2317-2323. ISSN 1616301X. Dostupné z: doi:10.1002/adfm.200500928
- [58] KIM, S., H. E. PUDAVAR, A. BONOIU a P. N. PRASAD. Aggregation-Enhanced Fluorescence in Organically Modified Silica Nanoparticles: A Novel Approach toward High-Signal-Output Nanoprobes for Two-Photon Fluorescence Bioimaging. *Advanced Materials*. 2007, **19**(22), 3791-3795. ISSN 09359648. Dostupné z: doi:10.1002/adma.200700098
- [59] LIU, Jie, Maximilien EVRARD, Xiaolei CAI, Guangxue FENG, Nikodem TOMCZAK, Lai Guan NG a Bin LIU. Organic nanoparticles with ultrahigh quantum yield and aggregation-induced emission characteristics for cellular imaging and real-time two-photon lung vasculature imaging. *Journal of Materials Chemistry B*. 2018, **6**(17), 2630-2636. ISSN 2050-750X. Dostupné z: doi:10.1039/C8TB00386F
- [60] PARTHENOPOULOS, D. A. a P. M. RENTZEPIS. Three-Dimensional Optical Storage Memory. *Science*. 1989, **245**(4920), 843-845. ISSN 0036-8075. Dostupné z: doi:10.1126/science.245.4920.843
- [61] BOGGESESS, T., K. BOHNERT, K. MANSOUR, S. MOSS, I. BOYD a A. SMIRL. Simultaneous measurement of the two-photon coefficient and free-carrier cross section above the bandgap of crystalline silicon. *IEEE Journal of Quantum Electronics*. 1986, **22**(2), 360-368. ISSN 0018-9197. Dostupné z: doi:10.1109/JQE.1986.1072964

- [62] KUZYK, Mark G. *Characterization Techniques and Tabulations for Organic Nonlinear Optical Materials*. New York: Routledge, 1998. ISBN 9781315139036.
- [63] WU, Li-Zhu, Xin-Jing TANG, Min-Hua JIANG a Chen-Ho TUNG. Two-photon induced fluorescence of novel dyes. *Chemical Physics Letters*. 1999, **315**(5-6), 379-382. ISSN 00092614. Dostupné z: doi:10.1016/S0009-2614(99)01118-5
- [64] SUTHERLAND, Richard L. *Handbook of Nonlinear Optics (Optical Science and Engineering)*. 2nd edition. CRC Press, 2003. ISBN 978-0824742430.
- [65] OULIANOV, D.A, I.V TOMOV, A.S DVORNIKOV a P.M RENTZEPIS. Observations on the measurement of two-photon absorption cross-section. *Optics Communications*. 2001, **191**(3-6), 235-243. ISSN 00304018. Dostupné z: doi:10.1016/S0030-4018(01)01121-X
- [66] VALA, Martin, Matouš KRATOCHVÍL, Patricie HEINRICHOVA a Martin WEITER. Determination of Two-Photon Absorption Cross-Sections in Selected Diketo-Pyrrolo-Pyrroles. *Materials Science Forum*. 2019, **955**, 37-43. ISSN 1662-9752. Dostupné z: doi:10.4028/www.scientific.net/MSF.955.37
- [67] BOUSSO, Philippe a Ellen A. ROBEY. Dynamic Behavior of T Cells and Thymocytes in Lymphoid Organs as Revealed by Two-Photon Microscopy. *Immunity*. 2004, **21**(3), 349-355. ISSN 10747613. Dostupné z: doi:10.1016/j.immuni.2004.08.005
- [68] MOLITORIS, Bruce A. a Ruben M. SANDOVAL. Intravital multiphoton microscopy of dynamic renal processes. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*. 2005, **288**(6), F1084-F1089. ISSN 1931-857X. Dostupné z: doi:10.1152/ajprenal.00473.2004
- [69] RUBART, Michael. Two-Photon Microscopy of Cells and Tissue. *Circulation Research*. 2004, **95**(12), 1154-1166. ISSN 0009-7330. Dostupné z: doi:10.1161/01.RES.0000150593.30324.42
- [70] LAIHO, Lily H., Serge PELET, Thomas M. HANCEWICZ, Peter D. KAPLAN a Peter T. C. SO. Two-photon 3-D mapping of ex vivo human skin endogenous fluorescence species based on fluorescence emission spectra. *Journal of Biomedical Optics*. 2005, **10**(2). ISSN 10833668. Dostupné z: doi:10.1117/1.1891370
- [71] MADDEN, Kelley S., Martha L. ZETTEL, Ania K. MAJEWSKA a Edward B. BROWN. Brain Tumor Imaging: Live Imaging of Glioma by Two-Photon Microscopy. *Cold Spring Harbor Protocols*. 2013, **2013**(3). ISSN 1940-3402. Dostupné z: doi:10.1101/pdb.prot073668
- [72] HELMCHEN, Fritjof a Winfried DENK. Deep tissue two-photon microscopy. *Nature Methods*. 2005, **2**(12), 932-940. ISSN 1548-7091. Dostupné z: doi:10.1038/nmeth818
- [73] LI, Ming, Fang LIU, Hongfei JIANG, Tai Sing LEE a Shiming TANG. Long-Term Two-Photon Imaging in Awake Macaque Monkey. *Neuron*. 2017, **93**(5), 1049-1057.e3. ISSN 08966273. Dostupné z: doi:10.1016/j.neuron.2017.01.027
- [74] ALONZO, Carlo Amadeo, Sevasti KARALIOTA, Dimitra POULI, Zhiyi LIU, Katia P. KARALIS a Irene GEORGAKOUDI. Two-photon excited fluorescence of intrinsic fluorophores enables label-free assessment of adipose tissue function. *Scientific Reports*. 2016, **6**(1). ISSN 2045-2322. Dostupné z: doi:10.1038/srep31012

- [75] WANG, Dongmei, Jiajia HE a Junyong SUN. Two-photon ratiometric fluorescent probe based on NBD-amine functionalized semiconducting polymer nanoparticles for real-time imaging of hydrogen sulfide in living cells and zebrafish. *Talanta*. 2021, **228**. ISSN 00399140. Dostupné z: doi:10.1016/j.talanta.2021.122269
- [76] MA, Xiaofeng, Rui SUN, Jinghui CHENG, Jiaoyan LIU, Fei GOU, Haifeng XIANG a Xiangge ZHOU. Fluorescence Aggregation-Caused Quenching versus Aggregation-Induced Emission: A Visual Teaching Technology for Undergraduate Chemistry Students. *Journal of Chemical Education*. 2016, **93**(2), 345-350. ISSN 0021-9584. Dostupné z: doi:10.1021/acs.jchemed.5b00483
- [77] ZHANG, Xiaoyong, Xiqi ZHANG, Bin YANG, Meiyong LIU, Wanyun LIU, Yiwang CHEN a Yen WEI. Polymerizable aggregation-induced emission dye-based fluorescent nanoparticles for cell imaging applications. *Polym. Chem.* 2014, **5**(2), 356-360. ISSN 1759-9954. Dostupné z: doi:10.1039/C3PY01226C
- [78] YI, Xiaoyong, Jun LI, Zhipeng ZHU, Qian LIU, Qiang XUE a Dan DING. In vivo cancer research using aggregation-induced emission organic nanoparticles. *Drug Discovery Today*. 2017, **22**(9), 1412-1420. ISSN 13596446. Dostupné z: doi:10.1016/j.drudis.2017.04.004
- [79] LI, Ying, Rongbing TANG, Xiaoyan LIU, et al. Bright Aggregation-Induced Emission Nanoparticles for Two-Photon Imaging and Localized Compound Therapy of Cancers. *ACS Nano*. 2020, **14**(12), 16840-16853. ISSN 1936-0851. Dostupné z: doi:10.1021/acsnano.0c05610
- [80] MEI, Ju, Yuning HONG, Jacky W. Y. LAM, Anjun QIN, Youhong TANG a Ben Zhong TANG. Aggregation-Induced Emission: The Whole Is More Brilliant than the Parts. *Advanced Materials*. 2014, **26**(31), 5429-5479. ISSN 09359648. Dostupné z: doi:10.1002/adma.201401356
- [81] LOU, Xiaoding, Zujin ZHAO a Ben Zhong TANG. Organic Dots Based on AIEgens for Two-Photon Fluorescence Bioimaging. *Small*. 2016, **12**(47), 6430-6450. ISSN 16136810. Dostupné z: doi:10.1002/sml.201600872
- [82] ROUILLON, Jean, Jan BLAHUT, Marion JEAN, et al. *Two-Photon Absorbing AIEgens: Influence of Stereoconfiguration on Their Crystallinity and Spectroscopic Properties and Applications in Bioimaging*. 2020, **12**(49), 55157-55168. ISSN 1944-8244. Dostupné z: doi:10.1021/acscami.0c15810
- [83] MA, Haijun, Chong ZHAO, Haibing MENG, et al. *Multifunctional Organic Fluorescent Probe with Aggregation-Induced Emission Characteristics: Ultrafast Tumor Monitoring, Two-Photon Imaging, and Image-Guide Photodynamic Therapy*. 2021, **13**(7), 7987-7996. ISSN 1944-8244. Dostupné z: doi:10.1021/acscami.0c21309
- [84] ALBOTA, M. Design of Organic Molecules with Large Two-Photon Absorption Cross Sections. *Science*. **281**(5383), 1653-1656. Dostupné z: doi:10.1126/science.281.5383.1653

- [85] RUMI, Mariacristina, Jeffrey E. EHRLICH, Ahmed A. HEIKAL, et al. Structure–Property Relationships for Two-Photon Absorbing Chromophores: Bis-Donor Diphenylpolyene and Bis(styryl)benzene Derivatives. *Journal of the American Chemical Society*. 2000, **122**(39), 9500-9510. ISSN 0002-7863. Dostupné z: doi:10.1021/ja994497s
- [86] POND, Stephanie J. K., Mariacristina RUMI, Michael D. LEVIN, et al. One- and Two-Photon Spectroscopy of Donor–Acceptor–Donor Distyrylbenzene Derivatives: Effect of Cyano Substitution and Distortion from Planarity. *The Journal of Physical Chemistry A*. 2002, **106**(47), 11470-11480. ISSN 1089-5639. Dostupné z: doi:10.1021/jp0267104
- [87] PATI, Swapan K., Tobin J. MARKS a Mark A. RATNER. Conformationally Tuned Large Two-Photon Absorption Cross Sections in Simple Molecular Chromophores. *Journal of the American Chemical Society*. 2001, **123**(30), 7287-7291. ISSN 0002-7863. Dostupné z: doi:10.1021/ja0033281
- [88] VEENSTRA, S.C, P.F VAN HUTTEN, A POST, Y WANG, G HADZIIOANNOU a H.T JONKMAN. Structural studies on thin films of an unsubstituted oligo(paraphenylenevinylene). *Thin Solid Films*. 2002, **422**(1-2), 104-111. ISSN 00406090. Dostupné z: doi:10.1016/S0040-6090(02)00983-5
- [89] DROBIZHEV, M., A. REBANE, Z. SUO a C.W. SPANGLER. One-, two- and three-photon spectroscopy of π -conjugated dendrimers: cooperative enhancement and coherent domains. *Journal of Luminescence*. 2005, **111**(4), 291-305. ISSN 00222313. Dostupné z: doi:10.1016/j.jlumin.2004.10.009
- [90] WOO, Han Young, Bin LIU, Bernhard KOHLER, Dmitry KORYSTOV, Alexander MIKHAILOVSKY a Guillermo C. BAZAN. Solvent Effects on the Two-Photon Absorption of Distyrylbenzene Chromophores. *Journal of the American Chemical Society*. 2005, **127**(42), 14721-14729. ISSN 0002-7863. Dostupné z: doi:10.1021/ja052906g
- [91] FU, Hong-Bing a Jian-Nian YAO. Size Effects on the Optical Properties of Organic Nanoparticles. *Journal of the American Chemical Society*. 2001, **123**(7), 1434-1439. ISSN 0002-7863. Dostupné z: doi:10.1021/ja0026298
- [92] SMOLKA, Rastislav. *Příprava luminiscenčních nanočástic pro 3D zobrazování*. Vysoké učení technické v Brně. Fakulta chemická, 2019.

7 ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK

N	dusík
3D	trojrozmerný
δ_{TPA}	dvojfotónový absorpčný prierez
δ_{TPE}	dvojfotónový emisný prierez
UV	ultrafialový
NAD(P)H	redukovaná forma nikotínamid adenin dinukleotid fosfátu
HOMO	najvyšší obsadený molekulový orbitál
LUMO	najnižší neobsadený molekulový orbitál
S_0	základný singletový stav
S_1	prvý excitovaný singletový stav
S_2	druhý excitovaný singletový stav
T_1	excitovaný tripletový stav
Q/QY	kvantový výťažok fluorescence
Γ	konštanta charakterizujúca rýchlosť zániku excitovaného stavu
k_{nr}	konštanta charakterizujúca rýchlosť zániku excitovaného stavu
GM	jednotky Goeppert-Mayerovej
Φ_{TPE}	kvantový výťažok dvojfotónovej fluorescence
Φ_{OPE}	kvantový výťažok jednofotónovej fluorescence
F	hodnota integrovanej fluorescence
P	hodnota intenzity excitačného žiarenia
c	koncentrácia
H ₂ S	sulfán
HeLa	bunková línia ľudských epitelových buniek
TPA	dvojfotónová absorpcia
Vis	viditeľný
D	donor elektrónov
A	akceptor elektrónov
DPA-DSB	difenylamín distyrylbenzén
THF	tetrahydrofurán
M	molárna hmotnosť

m	hmotnosť
V	objem
λ_{\max}	hodnota vlnovej dĺžky v maxime absorbancie
λ	vlnová dĺžka
A	absorbancia
PMT	fotonásobič
CPS	počet za sekundu (counts per second)
OPG	optický parametrický generátor (optical parametric generator)
TPE _x	dvojfotónová excitácia
OPE _x	jednofotónová excitácia
TPE _m	dvojfotónová emisia
OPE _m	jednofotónová emisia