



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

**FLUORESCENČNÍ SPEKTROSKOPIE VE VÝZKUMU
AMINOJÍLŮ**

FLUORESCENCE SPECTROSCOPY IN THE RESEARCH OF AMINOCLAYS

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Anna Procházková

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Filip Mravec, Ph.D.

BRNO 2017

Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP1105/2016
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie
Studentka: **Bc. Anna Procházková**
Studijní program: Spotřební chemie
Studijní obor: Spotřební chemie
Vedoucí práce: **Ing. Filip Mravec, Ph.D.**
Akademický rok: 2016/17

Název diplomové práce:

Fluorescenční spektroskopie ve výzkumu aminojílů

Zadání diplomové práce:

1. Rešerše na tvorbu fluorescentních komplexů aminojílů.
2. Na základě znalosti struktury aminojílu a rešerše navrhnout vhodné látky a způsob přípravy fluorescentního aminojílu.
3. Z výše uvedeného připravit a spektrálně charakterizovat fluorescentní komplexy, vhodné pro pozorování na současném vybavení Laboratoře fluorescenční spektroskopie.
4. Z experimentů vybrat vhodné komplexy pro další studium interakce aminojílů pomocí fluorescenční spektroskopie.

Termín odevzdání diplomové práce: 5.5.2017

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

Bc. Anna Procházková
student(ka)

Ing. Filip Mravec, Ph.D.
vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2017

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

ABSTRAKT

Aminojíl spadá do velké skupiny organicky modifikovaných jílových materiálů, které mohou v praxi najít řadu uplatnění, zejm. v podobě matrice, která má schopnost organizace a stabilizace inkorporovaných látek. Velmi nadějně je využití aminojílu v medicínských aplikacích, kde je však zapotřebí mít možnost vizualizace daného systému a dějů. Předložená práce se zabývá problematikou vizualizace aminojílu využitím technik fluorescenční spektroskopie. Bylo zjištěno, že aminojíl vykazuje autofluorescenci, která je charakterizována pomocí fluorescenční spektroskopie. Autofluorescence aminojílu však v praxi není využitelná kvůli její slabé intenzitě. Z tohoto důvodu byly zkoumány možnosti modifikace vnitřní struktury implementací europitých iontů, které jsou ve vhodně chelátované podobě schopny fluorescence. A modifikace vnější struktury pomocí elektrostatických interakcí s fluorescenčními sondami. Připravené komplexy byly spektrálně charakterizovány pomocí spektrofluorimetrie a fluorescenční mikroskopie za účelem zhodnocení využitelnosti v praxi.

ABSTRACT

Aminoclay belongs to a large group of organic modified materials based on clays. These materials could find many potential practical applications and, in particular, may be used as a matrix with the ability of the organisation and stabilisation of incorporated substances. The utilisation of aminoclay in the field of medical applications seems highly prospective, but there is the need to visualise the clay system and the processes within it. This essay deals with the issue of aminoclay visualisation by means of fluorescent spectroscopy. Through fluorescent spectroscopy, aminoclay was discovered to be autofluorescent. The autofluorescence of aminoclay is not usable in practical applications because of the low fluorescence intensity. This is the reason for the research into other possibilities for modifications of the internal structure of aminoclay by europium ions. These ions in chelated form are able to be fluorescent and modifications of the external structure are possible by electrostatic implementation of fluorescent dyes. Characterisation of the prepared complexes was provided by spectrofluorimetry and fluorescent microscopy for the purpose of evaluation of the practical application of aminoclay.

KLÍČOVÁ SLOVA

Aminojíl, aminojíl s inkorporovanými ionty europia, organicky modifikované jíly, fluorescenční spektroskopie, fluorescenční sondy, pyrendodekanová kyselina

KEY WORDS

Aminoclay, aminoclay with incorporated europium ions, organoclay, fluorescent spectroscopy, fluorescent probes, pyrenedodecanoic acid

PROCHÁZKOVÁ, A. Fluorescenční spektroskopie ve výzkumu aminojílů. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2017. 53 s. Vedoucí diplomové práce Ing. Filip Mravec, Ph.D.

PROHLÁŠENÍ

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

.....

podpis studenta

Obsah

1 Úvod.....	7
2 Teoretická část.....	8
2.1 Aminojíl.....	8
2.1.1 Obecné vlastnosti aminojílu	8
2.1.2 Vliv aminojílu na živé organismy	9
2.1.3 Aplikační možnosti aminojílu	10
2.2 Luminiscence	11
2.2.1 Fotoluminiscence	12
2.2.2 Fluorescenční spektroskopie	15
2.2.3 Fluorescenční sondy	17
3 Současný stav řešené problematiky	19
3.1 Interakce aminojílu s organickými látkami přirozeně vykazujícími fluorescenci... 20	
3.2 Hybridní materiály obsahující aminojíl se včleněnými lanthanoidy	22
3.3 Aminojíl se zabudovanými uhlíkovými nanotečkami ve své struktuře.....	23
4 Experimentální část.....	25
4.1 Použité chemikálie.....	25
4.2 Použité přístroje	26
4.3 Příprava aminojílu	27
4.3.1 Modifikace aminojílu včleněním lanthanoidu.....	27
4.3.2 Modifikace aminojílu včleněním lanthanoidu vedle hořčnatých iontů	27
4.3.3 Analýza aminojílů	27
4.4 Interakce aminojílu s fluorescenčními sondami	29
4.4.1 Navázání fluorescenční sondy pomocí elektrostatických interakcí	29
5 Výsledky a diskuze	31
5.1 Charakterizace aminojílu a vnitřně modifikovaných aminojílů	31
5.1.1 Rentgenová prášková difrakce	31
5.1.2 FTIR spektroskopie	33
5.1.3 Fluorescenční spektroskopie	34
5.2 Charakterizace komplexů aminojílu značených fluorescenčními sondami.....	40
5.2.1 Fluorescenční spektroskopie	40

6	Závěr	45
7	Literatura.....	47
8	Seznam použitých zkratek a symbolů.....	52
8.1	Použité zkratky	52
8.2	Použité symboly.....	53

1 Úvod

Aminojíl se řadí do skupiny organicky modifikovaných jíílů, které jsou hybridními materiály kombinujícími vlastnosti anorganických jíílových materiálů a organických zbytků navázaných na anorganické matrici. Právě volba organických zbytků a skupin na nich umístěných uděluje jíílům unikátní vlastnosti laděné přímo na míru pro danou aplikaci. V případě krystalického aminojílu je anorganická kostra modifikována 3-aminopropylovými zbytky, které umožňují tvorbu disperzních soustav ve vodném prostředí a vznik kladného náboje na povrchu, díky navázání protonu na bazickou aminoskupinu.

Aminojíl má ve vodních disperzních soustavách podobu malých destiček s kladným nábojem na povrchu, což hraje důležitou roli při síťování organických polymerů za vzniku hydrogelů a filmů s nanostrukturou, které potom mají lepší zejm. mechanické vlastnosti. Dále je možné využití vodného roztoku aminojílu k cílené distribuci léčiv a k obalování biomolekul, např. DNA či různých enzymů [1]. V rámci bakalářské práce [2] bylo zjištěno, že je aminojíl schopen interakce s hyaluronanem sodným za vzniku gelovité sraženiny. Aminojíl má navíc netoxický charakter a vykazuje mírnou antimikrobiální aktivitu – potlačuje růst mikroorganismů ve svém prostředí (např. *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* či *Candida albicans*) [3]–[6].

Všechna popsaná zjištění otevírají možnost využití aminojílu v celé řadě medicínských aplikací, kde je aminojíl schopen vystupovat jako podpůrná látka napomáhající organizaci bioaktivních molekul a zlepšující např. mechanické vlastnosti, rozpustnost, stabilitu aj.

K pochopení mechanismu popsaných jevů je žádoucí vizualizace aminojílu. Velmi jednoduchou a elegantní metodou vizualizace je využití fluorescenční spektroskopie. Aminojíl sám o sobě vykazuje fluorescenci, jejíž intenzita je však pro praktické využití velmi nízká, proto je nezbytné zkoumat další metody.

Vizualizací se již zabývají různé výzkumné týmy, které využívají obecně tří přístupy. První a nejjednodušší možností je navázání fluorescenční sondy nebo jiné látky přirozeně vykazující fluorescenci [7]. Další možností vizualizace je interakce aminojílu s lanthanoidy, těžkými kovy (např. Eu^{3+} , La^{3+}), které vykazují luminiscenci, jsou-li v přítomnosti vhodného chelatačního činidla. Výhodou tohoto přístupu je možnost ladění vlnové délky emitovaného záření, tj. barvy připraveného komplexu, na základě kombinace a poměrů použitých kovů [8] a [9]. Nejnovějším přístupem je interakce aminojílu s uhlíkovými nanotečkami [10], takové komplexy napomáhají studiu nádorových buněk a přípravě systémů, umožňujících cílenou distribuci léčiv právě díky vizualizaci probíhajících dějů.

2 Teoretická část

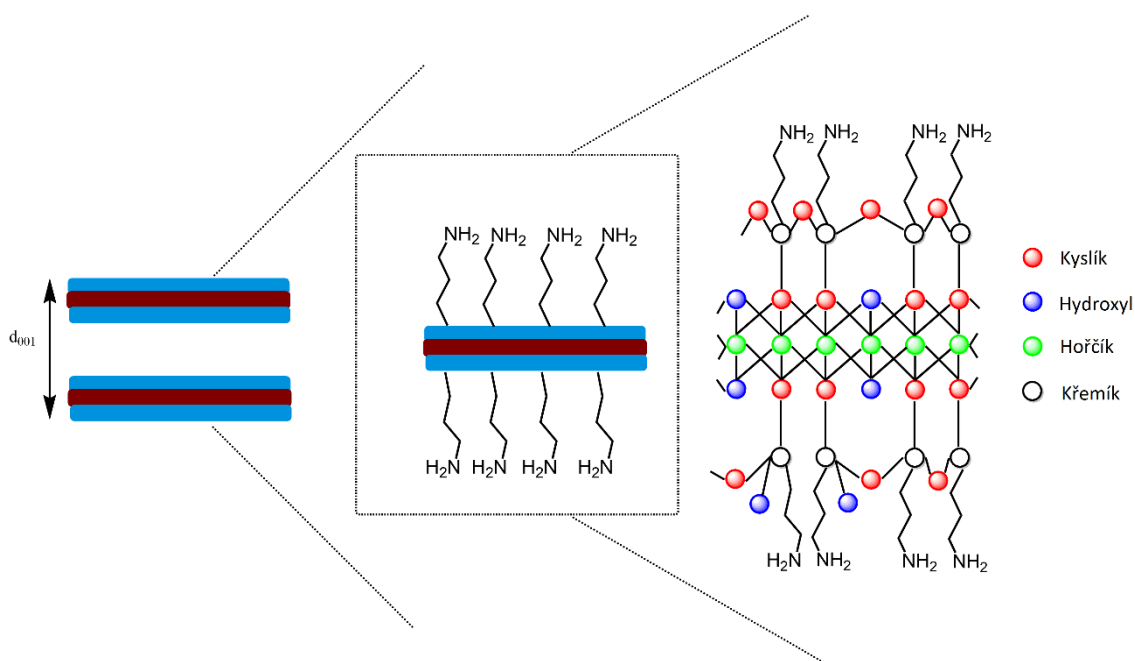
2.1 Aminojíl

Možnost syntézy organicky modifikovaných jílových materiálů pomocí jednoduché sol-gel reakce je předmětem studií již od 90. let minulého století. Tyto hybridní materiály mohou kombinovat vlastnosti hojně využívaných anorganických jíků, např. smektitu, kaolinitu či bentonitu, které jsou velmi omezeně rozpustné ve vodě, a organických skupin, jež mohou být voleny dle konkrétních požadavků pro zvolenou aplikaci (mohou např. zvyšovat rozpustnost, umožňovat vysoký stupeň samovolné strukturní organizovanosti systému či podporovat interakci s požadovanými strukturami) [1] a [11].

Obecná podoba struktury organicky modifikovaných jílových materiálů pozůstává z křemíku vázaného v anorganické kostře obsahující kovové kationty (např. Mg^{2+} , Ca^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} , Ce^{3+} , Fe^{3+} a Al^{3+}) v oktahedrálním uspořádání. Křemík a charakteristické organické skupiny vystupující ze základní anorganické struktury jsou do hybridních materiálů vneseny pomocí organokřemičitanů, ty jsou kovalentně spojeny s kovovými kationty v průběhu autokatalyzované sol-gel reakce. Často využívány jsou uhlovodíkové zbytky s aminovými, hydroxylovými, thiolovými či fenylovými skupinami [3].

2.1.1 Obecné vlastnosti aminojílů

Je-li při přípravě organicky modifikovaných jílových materiálů použit jako organokřemičitan 3-aminopropyltriethoxysilan (APTES), můžeme hovořit o tzv. aminojílech (AC). Ve struktuře aminojílu mohou být inkorporovány všechny již uvedené kovové kationty, nejčastěji se však používají hořečnaté, vápenaté a popř. železité. Nebude-li zmíněno jinak, bude aminojílem myšlen aminojíl s inkorporovanými hořečnatými ionty (Mg-AC) o funkčním vzorci $[H_2N(CH_2)_3]_8Si_8Mg_6O_{16}(OH)_4$, jehož struktura je patrná na obr. 1 [1].

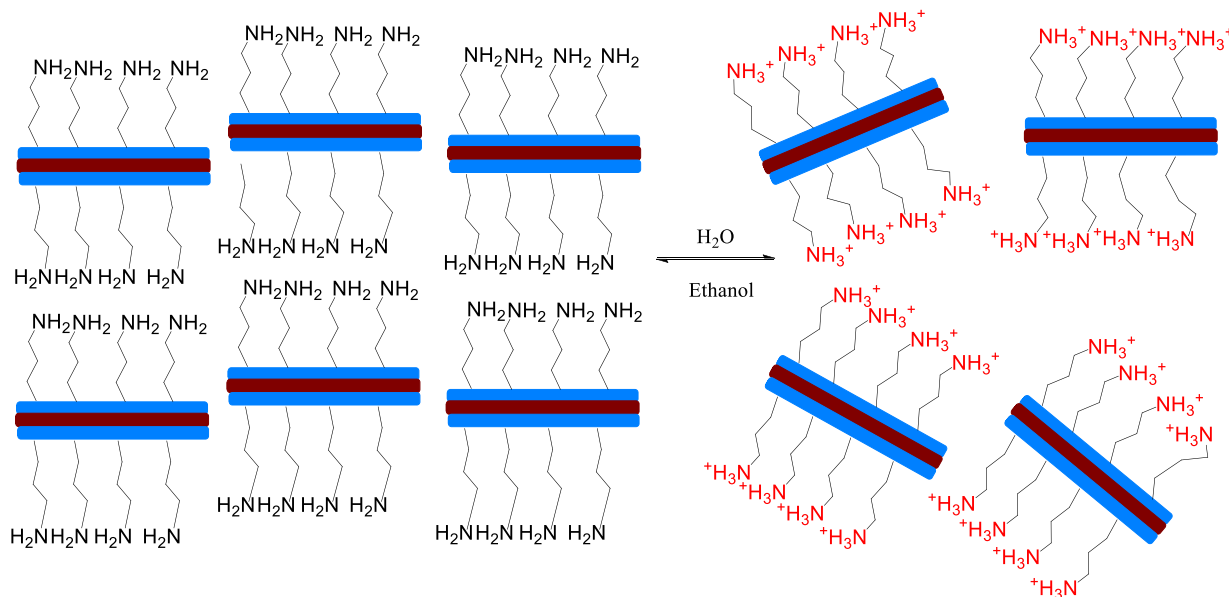


obr. 1: Schematické znázornění struktury aminojílu [1]

Příprava aminojílu probíhá jednoduchým sol-gel procesem, kdy je do ethanolového roztoku hexahydrátu chloridu hořečnatého po kapkách přidáván APTES. APTES nejen, že umožňuje zesíťování anorganické matrice, ale vnáší do ní i organické 3-aminopropylové skupiny modifikující povrch jílového materiálu, viz obr. 1. Navíc APTES díky své zásadité povaze (hodnota pH je cca 10,5) pomáhá autokatalyzovat reakci vzniku aminojílu [1], [3] a [12]. Byly provedeny i experimenty zkoumající, zda je možné pomocí zásadité katalýzy hydroxidem sodným urychlit dosažení rovnovážného stavu reakce. Bylo zjištěno, že bazická katalýza sice urychlí dobu potřebnou k dosažení rovnovážného stavu, která bez katalýzy trvala 12 hodin a s katalýzou 6 hodin, avšak sníží výtěžek reakce o necelých 40 % [3].

Do struktury vnesené 3-aminopropylové skupiny udělují aminojílu unikátní vlastnosti týkající se organizovanosti v různých polárních prostředích. Ve vodě jako v polárním rozpouštědle dochází k protonaci koncových aminoskupin a vytváří se čirá disperzní soustava, její vznik lze podpořit působením ultrazvuku. Tento vratný proces se nazývá exfoliace. Přídavek méně polárního rozpouštědla (obvykle se používá ethanol) způsobí deprotonaci a tvorbu vrstevnaté struktury, tzn. dojde k vysrážení aminojílu, který je poté možné izolovat odstředěním. Schematicky je popsán jev znázorněn na obr. 2.

Podle stupně exfoliace, která může být ovlivněna působením ultrazvuku nebo hodnotou pH prostředí, dochází k narušení vrstevnaté struktury aminojílu. Vzniklé destičky tvořící ve vodném prostředí již zmíněnou disperzní soustavu jsou dlouhé 30–150 nm a tlusté přibližně 2–4 nm. Vodná disperze má díky bazickým aminoskupinám hodnotu pH kolem 9,6. Při této hodnotě pH dosahuje zeta potenciál až +25 mV [1].



obr. 2: Schematické znázornění vratné exfoliace aminojílu [1]

2.1.2 Vliv aminojílu na živé organismy

Pro posouzení využitelnosti aminojílu v řadě aplikačních možností (viz dále v kapitole 2.1.3) je nezbytné zabývat se také vlivem aminojílu na živé organismy. Byl prokázán antibakteriální účinek proti gramnegativním i grampozitivním bakteriím, rovněž proti některým houbám a re-

zistentním kmenům jako jsou *Escherichia coli* či *Staphylococcus aureus*. Mechanismus antibakteriálního účinku spočívá v navázání aminojílu pomocí kladně nabitých 3-aminopropylových skupin na buněčnou stěnu mikroorganismů, která za normálních podmínek nese záporný náboj. Aminojíl adsorbovaný na povrchu buňky je schopen penetrovat membránou a způsobit tak její rozrušení, což nevyhnutelně vede ke smrti mikroorganismu. Je tedy zřejmé, že antibakteriální účinek aminojílu se bude lišit podle struktury a rozmístění záporného náboje na buněčné membráně mikroorganismů [3]–[5].

Oproti tomu vykazuje aminojíl vůči buňkám lidského organismu jen nízkou toxicitu. K projevu cytotoxicity aminojílu na zkoumané buňky docházelo až od koncentrace aminojílu nad $1\ 000\ \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, výjimkou byly kožní fibroblasty, takže toxický účinek aminojílu je specifický podle typu studovaných buněk [6].

2.1.3 Aplikační možnosti aminojílu

Aminojíl je díky všem výše zmíněným vlastnostem přímo předurčen pro celou řadu aplikací. Jednou z nich je možnost stabilizace nanočástic kovů (např. zlata, stříbra, platiny a železa), které je dále možné využít jako katalyzátory. Inkorporace nanočástic stříbra do komplexů aminojílu i s jinými látkami polymerního charakteru navíc zvyšuje jeho antibakteriální účinek [13]–[15]. Možnost poutat těžké kovy vedla i ke studiím, zda je aminojíl schopen na sebe vázat tyto polutanty z půdy [16].

Aminojíl dále může interagovat se záporným nábojem biomolekul, může tak obklopit např. deoxyribonukleovou kyselinu (DNA), hemoglobin, glukózu oxidázu a oxidovaný myoglobin za vzniku komplexů s vyšší tepelnou stabilitou a lepší odolností vůči prostředí [12], [17]–[19]. Aminojíl může s huminovými kyselinami ve vodném prostředí tvořit agregáty, které jsou schopny flokulace, což bylo studováno z hlediska těžby řas [20]. Interakce samozřejmě není omezena na biomolekuly – aminojíl může se syntetickými polymery tvořit komplexy ve formě hydrogelů, do těchto systémů mohou být implementovány i jiné biologicky aktivní látky (např. léky) [21].

Tvorba systémů s obsahem léčiv vedle aminojílu může být považována za samostatnou aplikační možnost. Aminojíl může zvýšit již diskutovanou rozpustnost použitých léčiv a v závislosti na změně pH prostředí může tento systém cíleně distribuovat inkorporované biologicky aktivní látky [22] a [23].

V neposlední řadě může aminojíl interagovat i s molekulami, které vykazují fluorescenci, což je náplní této práce. Aminojíl v těchto případech slouží jako matrice poutající fluorofory a zabraňující jejich interakci, která by mohla vést ke zhášení. Připravené komplexy primárně neslouží k vizualizaci aminojílu, ale byly vyvinuty pro potřeby elektronického průmyslu na výrobu např. světlo emitujících diod (LED) [24]. Více je tato problematika rozvinuta v kapitole 3.

Jak je patrné ze stručného výčtu aplikačních možností aminojílu, používá se tato látka jako součást různých komplexů, kde však nevystupuje jako účinná část, ale jako podpůrná matrice vylepšující některé vlastnosti právě aktivních složek. Aminojíl je např. schopen zabránit agregaci navázaných látek, popř. tuto agregaci podpořit a zesíťovat polymerní struktury do formy hydrogelů, aminojíl dále může zvýšit rozpustnost nerozpustných sloučenin poutaných ve vodě, může rovněž zvýšit stabilitu a odolnost biomolekul a bioaktivních látek [1] a [12].

2.2 Luminiscence

Pojmem luminiscence je myšlena emise fotonů ve formě ultrafialového (UV), viditelného (VIS) nebo infračerveného (IR) záření, které je schopna vysílat látka, jež se nachází v nestabilním elektronově excitovaném stavu. Podle způsobu dodání energie potřebné k excitaci elektronu rozlišujeme několik luminiscenčních dějů vyčtených v tab. 1. V následujícím textu bude věnována pozornost pouze fotoluminiscenci, tj. luminiscenci vyvolané absorpcí elektromagnetického záření hmotou [25] a [26].

tab. 1: Přehled luminiscenčních dějů klasifikovaných dle způsobu excitace látky [25] a [26]

Luminiscenční jev	Způsob vzniku excitovaného stavu
Fotoluminiscence	absorpcí záření o kratší vlnové délce, než má emitované záření
Radioluminiscence	ionizačním zářením (rentgenové záření)
Katodoluminiscence	vysokoenergetickým (10^2 – 10^3 eV) svazkem elektronů
Elektroluminiscence	působením elektrického pole a průchodem elektrického proudu látkou
Termoluminiscence	zahřátím krátkovlnného elektromagnetického záření látky po výrazném ochlazení
Chemiluminiscence	exotermním chemickým procesem
Bioluminiscence	jistý typ chemiluminiscence, který doprovází některé biochemické reakce
Triboluminiscence	působením třecích a elektrostatických sil
Sonoluminiscence	působením ultrazvuku

Luminiscenci mohou vykazovat jak organické sloučeniny (aromatické uhlovodíky a molekuly obsahující konjugovaný systém dvojných vazeb), tak i anorganické sloučeniny (např. ionty lanthanoidů, dopovaná skla a krystaly sulfidů nebo selenidů), popř. i organokovové sloučeniny (př. komplexy ruthenia nebo lanthanoidů). Původ luminiscence organických a anorganických látek však se liší. Nositelem luminiscence organických látek jsou individuální molekuly, které mají definovanou energetickou strukturu velmi často prezentovanou ve formě Jablůnského diagramu (viz dále v podkapitole 2.2.1). Avšak anorganické látky v pevném stavu, zabýváme-li se především polovodiči, mají tendenci tvořit klastry a pravidelné struktury krystalů čítajících řádově 10^{10} atomů. Takže v případě polovodičů nemá smysl hovořit o individuálních molekulách a definovaných elektronových stavech, a to z toho důvodu, že dochází k tvorbě zakázaného pásu energií [25] a [26].

Luminiscence krystalických polovodičů může být buď intrinsická (vlastní), která vzniká v ideální krystalové mřížce, anebo extrinsická (nevlastní či příměsová), jejíž existenci umožňují defekty či příměsi v mřížce. Za předpokladu, že luminiscenci zapříčiňují příměsi, je pro ně nezbytná přítomnost mřížky, která vystupuje jako nosná matrice a jako médium zachycující a předávající excitační energii. Navíc může mřížka svým charakterem a modifikacemi ladit podobu optických spekter [26].

2.2.1 Fotoluminiscence

Při interakci elektromagnetického záření s látkou nemusí nutně dojít k jeho absorpci. Záření může být i rozptýleno; můžeme pozorovat buď elastický (Rayleighův rozptyl) anebo neelastický (Ramanův rozptyl). Při rozptylu nedochází k výměně energie, a proto je rozptyl záření podstatně rychlejším jevem než absorpce [25]–[27].

Při absorpci elektromagnetického záření látkou dochází k excitaci, tedy k přechodu elektronu z molekulového orbitalu v základním stavu do orbitalu neobsazeného. Dle Bohrovy rezonanční podmínky může molekulu excitovat pouze takový foton, který má dostatečnou energii k přenesení elektronu do neobsazeného orbitalu. V této souvislosti se velmi často uvažují dva typy molekulových orbitalů: nejvyšší obsazený (HOMO) a nejnižší neobsazený molekulový orbital (LUMO), oba se vztahují k základnímu stavu dané molekuly. Právě energetický rozdíl mezi HOMO a LUMO je nejnižší možné kvantum energie, které musí být při excitaci dodáno.

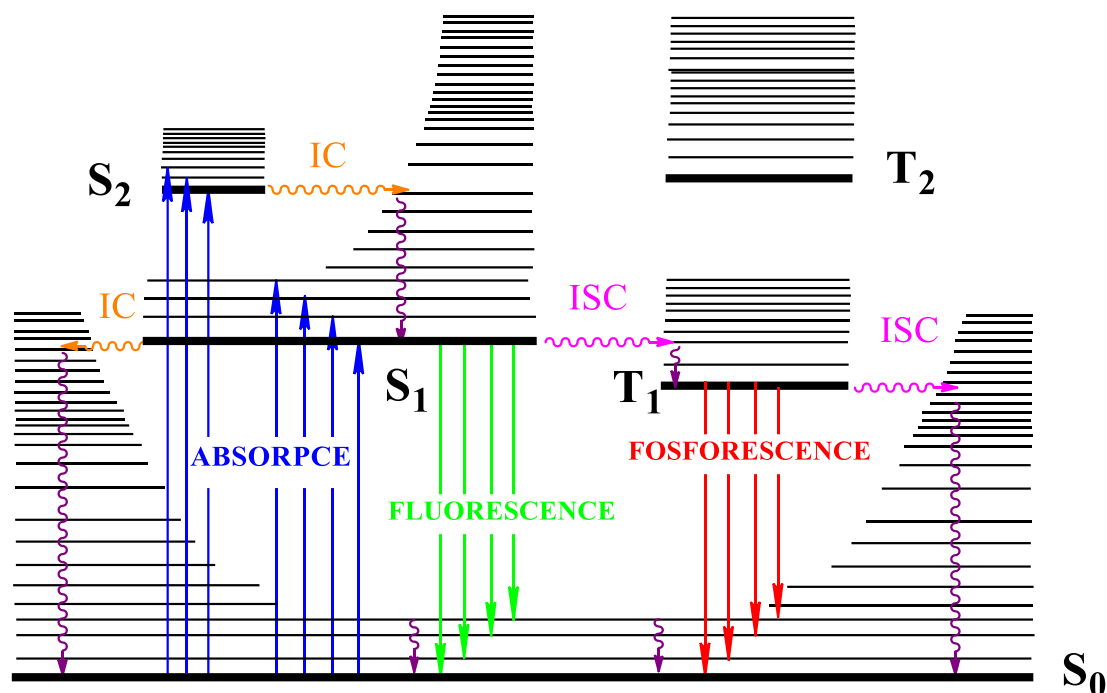
Je-li molekule dodáno potřebné kvantum energie, nemusí ještě pořád nutně dojít k absorpci záření, musí být totiž dále ještě splněna dvě základní výběrová pravidla.

- Dle pravidla o spinově zakázaných přechodech jsou možné jen ty, které probíhají mezi stavy se stejnou multiplicitou. To znamená, že při excitaci elektronu ze základního stavu nesmí dojít ke změně jeho spinu, aby bylo zachováno nulové spinové kvantové číslo S a multiplicita M ($M = 2S + 1$) byla rovna jedné, takový stav se nazývá jako singletový, obvykle značený jako S_0 , S_1 či S_2 pro základní singletový stav, první excitovaný stav, resp. druhý excitovaný stav. V praxi bývá pozorováno (avšak v omezené míře) porušení definovaného pravidla; při excitaci tedy dojde ke změně spinu a výsledná multiplicita je poté rovna třem, takový stav se nazývá jako tripletový a je zvykem označovat jej písmenem T. Tripletového stavu je možné dosáhnout mezisystémovým přechodem z S_1 na T_1 , viz dále.
- Přechod může být rovněž zakázaným z hlediska symetrie systému.

Absorpce fotonu se řídí vedle již zmíněných pravidel i principem nazývaným jako Franck–Condonův, jenž je postavený na skutečnosti, že přechod elektronu do protivazebného molekulového orbitalu trvá řádově 10^{-15} s, což je mnohem rychlejším dějem než vibrace celé molekuly (řádově 10^{-10} – 10^{-12} s). Proto přechod elektronu proběhne s největší pravděpodobností bez změn pozic jader v molekulách, což se projeví tzv. svislým přechodem, ten bude tím intenzivnější, čím více se budou vlnové funkce vibračních stavů překrývat.

Vzhledem k nestabilní povaze excitovaného stavu bude tendence systému navrátit se do stavu základního. Deexcitačních procesů je celá řada: emise přebytečné energie ve formě fluorescence anebo ve formě fosforescence či zpožděné fluorescence. Fosforescenci a zpožděnou fluorescenci umožňuje mezisystémový přechod (ISC, z angl. *intersystem crossing*) spočívající v přechodu do tripletového stavu. Fluorescence, fosforescence a zpožděná fluorescence jsou tzv. zářivé přechody. Naopak při nezářivých přechodech dochází např. k vnitřní konverzi (IC, z angl. *internal conversion*), intramolekulárnímu přenosu náboje, ke změně konformace, přenosu elektronu či protonu anebo k přenosu energie, dále může dojít k tvorbě excimeru (neboli excitovaného dimeru) nebo exciplexu (neboli excitovaného komplexu) anebo k fotochemické transformaci.

Přehledné grafické zpracování nejvýznamnějších zejm. zářivých relaxačních procesů bývá uváděno v podobě Jablůnskiho diagramu, viz obr. 3 [25], [27] a [28].



obr. 3: Jablůnskiho diagram, vlnitými šipkami jsou znázorněny nezářivé přechody, přímými zářivé přechody [25]

Při absorpci je fluorofor obvykle excitován do vyšší vibrační hladiny singletového stavu S₁ nebo i S₂, obvykle nastává rychlá vibrační relaxace na nejnižší vibrační hladinu prvního excitovaného singletového stavu S₁. Pokud se překrývají vibrační podhladiny prvního a excitovaného a základního stavu, může vnitřní konverze proběhnout až do základního elektronového stavu S₀ anebo může dojít k vyzáření fotonu ve formě fluorescence. Emitované záření má vyšší vlnovou délku (tj. má nižší energii) než záření absorbované, ztráta energie nastává vlivem vibračních relaxací. Obecně jsou si excitační a emisní spektra výrazně zrcadlově podobná, což je dáno stejným charakterem vibračních hladin základního a excitovaného stavu. Posun mezi vlnovou délkou maxima absorpčního a emisního pásu je známý jako Stokesův posun.

V předchozím odstavci jsme uvažovali pouze spinově dovolené přechody, avšak může nastat i situace, kdy se změní spin v rámci mezisystémového přechodu a vznikne tripletový stav T₁. Tripletový stav může relaxovat buď zářivým přechodem, tj. vyzářením fotonu procesem zvaným fosforescence, který je spinově zakázaný, anebo může dojít v rámci mezisystémového přechodu k opakované změně spinu, a systém může relaxovat nezářivě (formou vnitřní konverze) nebo zářivě (formou tzv. zpožděné fluorescence).

Aby mohla být pozorována zpožděná fluorescence, je třeba přechod z tripletového stavu T₁ do singletového S₁ podpořit buď dodáním energie ve formě tepla anebo triplet-triplet anihilací, kdy dojde zejm. v koncentrovaných roztocích ke srážce dvou molekul v tripletovém stavu, což umožní vznik singletového stavu. Další možností je triplet-triplet přechodem, který spočívá

v další absorpci fotonu o jiné vlnové délce (tento přechod je spinově dovolený). Velmi zajímavé je porovnání charakteristických časů jednotlivých diskutovaných dějů v tab. 2 [25], [27] a [28].

tab. 2: Doby trvání jednotlivých dějů diskutovaných v Jablůňského diagramu [25]

Děj	Charakteristický čas (s)
Absorpce	10^{-15}
Vibrační relaxace	10^{-12} – 10^{-18}
Doba života excitovaného stavu S_1 = fluorescence	10^{-10} – 10^{-7}
Mezisystémový přechod	10^{-10} – 10^{-8}
Vnitřní konverze	10^{-11} – 10^{-9}
Doba života excitovaného stavu T_1 = fosforescence	10^{-6} –1

Kinetické aspekty jednotlivých dějů nesou důležité informace týkající se zejm. fluoroforu a jeho okolí a jejich vzájemného vlivu. Mezi často diskutované vlastnosti fluoroforů patří doba života excitovaného stavu a kvantový výtěžek fluorescence. Kvantovým výtěžkem je myšlen počet emitovaných fotonů ku počtu fotonů absorbovaných; hodnota kvantového výtěžku leží v rozmezí hodnot 0–1.

Zavedení pojmu doba života fluorescence je možné za předpokladu, že je deexcitační proces látky A považován za monomolekulární reakci, tzn. reakci prvního řádu dle rovnice:



Reakční rychlost nebo lépe řečeno rychlost deexcitace můžeme definovat jako úbytek koncentrace excitované látky $[A^*]$ s časem pomocí následující rovnice:

$$-\frac{d[A^*]}{dt} = (k_r + k_{nr}) \cdot [A^*], \quad (2)$$

kde t značí čas, k_r a k_{nr} je rychlostní konstanta zářivého, resp. nezářivého přechodu ze singletového stavu S_1 do základního S_0 . Integrací uvedené rovnice (2) se získá vztah:

$$[A^*] = [A^*]_0 \cdot \exp\left(-\frac{t}{\tau}\right), \quad (3)$$

kde $[A^*]_0$ je koncentrace excitované molekuly v čase $t = 0$ s a τ značí dobu života excitovaného stavu. Platí

$$\tau = \frac{1}{k_r + k_{nr}} \quad (4)$$

Za přijetí zjednodušujícího předpokladu dle rovnice (1), že při deexcitaci látky A^* nedochází k nezářivým přechodům a přebytečná energie je emitována ve formě záření, je možné definovat tzv. přirozenou dobu života excitovaného stavu τ_n , kde platí:

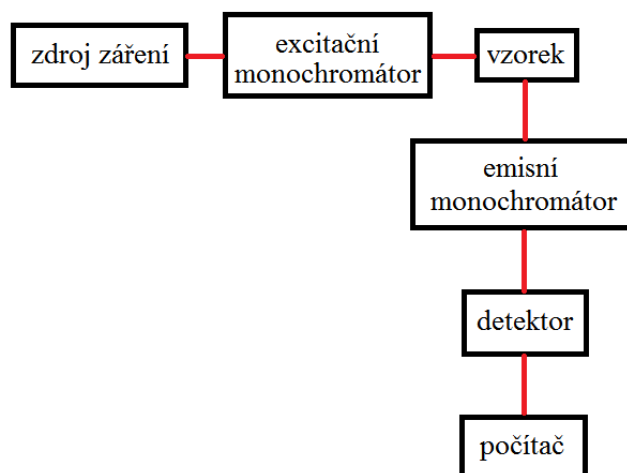
$$\tau_n = \frac{1}{k_r} \quad (5)$$

Důležité je však mít na vědomí, že doba života excitovaného stavu je pouze statistickým údajem, fluorofory emitují elektromagnetické záření náhodně a diskutovaná doba života je průměrnou hodnotou jednotlivých časových údajů popsanych distribuční křivkou [25] a [29].

2.2.2 Fluorescenční spektroskopie

Úlohou fluorescenční spektroskopie je rozložení fluoroforem emitovaného záření v emisní spektrum anebo rozložení záření vedoucího k excitaci fluoroforu v excitační spektrum. Tato metoda neklade vysoké nároky na instrumentaci s výjimkou detektoru. Vzhledem ke slabé intenzitě fluorescence je nutné použít extrémně citlivé detektory, např. fotonásobič či mnohokanálové detektory, kterým je např. detektor s nábojově vázanými obvody (CCD, z angl. *charge coupled device*).

Blokové schéma spektrofluorimetru je schematicky znázorněno na obr. 4. Nezbytné součásti přístroje tvoří zdroj záření, excitační a emisní monochromátor, detektor a samozřejmě prostor pro vložení vzorku, celý systém je kontrolovatelný a říditelný počítačem, který je schopen sbírat data a vyhodnocovat je [26] a [29].



obr. 4: Blokové schéma spektrofluorimetru [29]

Zdroj záření

Jako zdroj záření se ve většině spektrofluorimetrů často používá kontinuální vysokotlaká xenonová výbojka, která má vysokou a relativně konstantní intenzitu záření při všech vlnových délkách už od cca 250 nm až do 700 nm. Je důležité mít na paměti, že v oblasti kolem 450 nm a nad 800 nm není intenzita záření konstantní, projevuje se zde emise excitovaného xenonu.

Z toho důvodu je vhodné provádět korekci naměřených spekter pro odstranění nežádoucích signálů.

Není-li třeba zdroj, který emituje záření v širokém rozmezí vlnových délek, bývají přístroje vybaveny laserovými diodami, které emitují monochromatické a snadno fokusovatelné záření. K dispozici jsou laserové diody o různých vlnových délkách. Obvykle se tento zdroj záření využívá pro časově rozlišenou spektroskopii [26] a [29].

Monochromátory

Spektrofluorimetr musí obsahovat excitační a emisní monochromátor, což je disperzní prvek, který má za úkol rozložit záření ve spektrum. Štěrbínou zařazenou za monochromátorem se poté propouští požadovaná vlnová délka nebo spíše úzké spektrální pásmo. Jako samotný disperzní prvek může sloužit např. hranol, mnohem častěji se však využívají konkávní optické mřížky vyrobené holografickými metodami. Mřížky mohou být kombinovány v monochromátoru více způsoby, obvykle se používá uspořádání Czerny-Turner.

Pro alespoň částečnou kompenzaci neideálního chování monochromátorů bývají zařazeny do spektrofluorimetrů i barevné filtry. Barevné filtry se dále využívají namísto monochromátorů ve fluorescenčních mikroskopech. Specifitou fluorescenční mikroskopie je uspořádání, kdy excitační a emisní záření prochází stejnou optickou soustavou, pro jejich oddělení se využívá dichroických zrcadel a barevných filtrů. Excitační filtry slouží k výběru požadované vlnové délky ze zdroje záření. Emisní filtry poté propouštějí vzorkem emitované záření a odfiltrovávají excitační záření anebo nežádoucí fyzikální jevy, jako je např. rozptyl [26] a [29].

Detektory

Záření emitované ve formě fluorescence je charakteristické svou slabou intenzitou, z toho důvodu jsou kladeny vysoké nároky na detekční systémy spektrofluorimetrů. Používané detektory mohou být buď jednobarevné anebo vícebarevné. Mezi typické, ve fluorescenční spektroskopii využívané jednobarevné detektory, patří fotonásobič, který měří intenzitu dopadajícího záření pomocí vygenerovaného elektrického proudu v jednom prostorovém bodě.

Fotonásobič je vakuovaná trubice obsahující fotokatodu a několik dynod. Dopadem fotonu na fotokatodu dojde k vyrazení elektronu, který postupným dopadem na jednotlivé dynody generuje více elektronů, jež poté dopadají na anodu a vzniká signál. Intenzita signálu tedy závisí na počtu dopadených fotonů emitovaných vzorkem a na velikosti na detektor přiváděného napětí. Zvýšením napětí přiváděného na detektor dochází ke zvýšení počtu elektronů vyražených z dynod.

Vícebarevné detektory typu CCD hojně zařazované do fluorescenčních mikroskopů a tzv. spektrografů jsou schopné snímat i celé spektrum současně, čímž se zřetelně zkrátí doba záznamu spekter oproti použití fotonásobiče. CCD obsahují až 10^6 pixelů, každý jeden pixel je schopen akumulovat vygenerovaný náboj, který je úměrný intenzitě dopadajícího záření. V libovolném čase je možné získat údaje z každého pixelu a získat tak dvourozměrný výstup z měření [26] a [29].

2.2.3 Fluorescenční sondy

Fluorescenční spektroskopie je jako analytická technika velmi populární, její obrovské přednosti jsou vysoká citlivost a selektivita. Ne všechny látky však disponují schopností vykazovat fluorescenci, a proto je nezbytné pro jejich studium pomocí fluorescenční spektroskopie zvolit vhodný způsob vizualizace. Tři obecné v praxi využívané přístupy jsou následující:

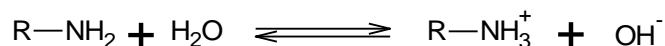
- pomocí reakce analytu s vhodnou látkou připravit fluorescenci vykazující derivát,
- vytvoření fluorescentního komplexu,
- najít takovou látku vykazující fluorescenci, kterou je studovaný analyt schopen zhaset.

Látky používané k vizualizaci studovaných analytů se nazývají fluorescenční sondy a mohou se na analyt vázat kovalentně i nekovalentně. Některé fluorescenční sondy bývají citlivé na vlastnosti prostředí (např. polarita či hodnota pH, rozpouštědlo, ...), což je důležité mít na paměti při jejich výběru [25].

Vhodnou fluorescenční sondu je možné najít podle jejího charakteru a charakteru značené látky (polarita, funkční skupiny, objem molekuly aj.). Podle možnosti vizualizace existuje několik druhů fluorescenčních sond, mezi nejznámější patří amino-reaktivní fluorofory, fluorofory schopné modifikovat látky obsahující thiolové skupiny, fluorescenční sondy specificky interagující s proteiny, nukleovými kyselinami, enzymy aj. biologicky aktivními látkami. Neméně zajímavé jsou nepolární či amfifilní sondy interagující s buněčnými membránami, dále také markery značící biochemické pochody (funkčnost iontových kanálků, endocytózu či exocytózu) nebo indikátory vápenatých, hořečnatých či zinečnatých iontů anebo indikátory pH [30].

Vzhledem k charakteru této práce jsou diskutovány fluorescenční sondy vhodné pro modifikaci primárních aminů.

Volný elektronový pár na dusíku uděluje primárním aminům bazický charakter a možnost tvořit amonné ionty. Způsob tvorby amonných iontů ve vodném prostředí je popsán rovnovážnou reakcí uvedenou na obr. 5. Bazické vlastnosti aminoskupiny umožňují reakce s kyselinami za vzniku solí, což je jednou z možností interakce s fluorescenčními sondami obsahujícími kyselé skupiny (tj. karboxylové anebo sulfonové) – povaha této interakce je čistě elektrostatické povahy [31].



obr. 5: Schéma znázorňující bazické vlastnosti primárního aminu [31]

Pro kovalentní modifikaci primárních aminů se běžně používají fluorofory obsahující funkční skupiny isothiokyanát, sukcinimidyl ester, chlorid sulfonové kyseliny anebo aldehyd, při modifikaci aminu bývá obvykle nezbytné pracovat v pufrch, a to z toho důvodu, že uvedené reagenty mají své chování výrazně závislé na hodnotě pH. Schematicky jsou uvedené modifikace naznačeny na obr. 6.

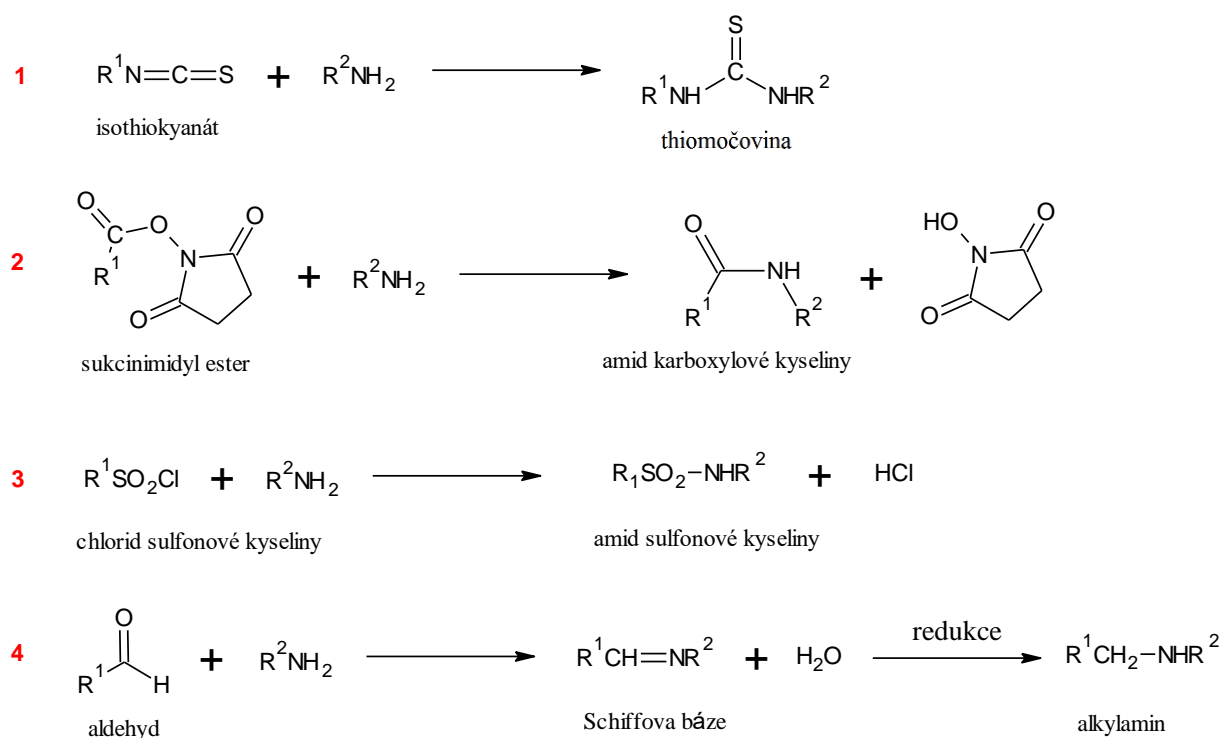
Reakcí primárního aminu s isothiokyanáty, které jsou mírně reaktivní a stabilní ve vodě a většinou rozpouštědel, vzniká derivát thiomocoviny. Mezi nejznámější a nejhojněji používané

fluorescenční sondy s isothiokyanoskupinou patří isothiokyanát fluoresceinu (FITC) a isothiokyanát tetramethylrhodaminu (TRITC).

Pro modifikaci primární aminoskupiny jsou vhodné sukcinimidyl estery, které umožňují vznik stabilní amidové vazby. Některé sukcinimidyl estery nejsou rozpustné ve vodě a mají tendenci podléhat hydrolyze nad hodnotou pH cca 9. Pro tvorbu amidové vazby je možné použít i karboxylové kyseliny, které však musí být aktivovány, a to buď tvorbou sukcinimidyl esteru anebo halogenidu.

Halogenidy sulfonových kyselin mohou rovněž reagovat s primárními aminy, dochází ke vzniku sulfonamidů. Chloridy sulfonových kyselin jsou vysoce reaktivní, avšak jsou nestabilní ve vodním prostředí zejm. při vyšších hodnotách pH.

Mezi další amino-reaktivní fluorofory patří ty, které obsahují karbonylovou skupinu. Reakcí aldehydu nebo ketonu s aminoskupinou dochází ke vzniku Schiffovy báze, která redukcí může přecházet na alkylaminy [30].



obr. 6: Reakce primárního aminu s 1) isothiokyanátem, 2) sukcinimidyl esterem, 3) chloridem sulfonové kyseliny a 4) s aldehydem [30]

3 Současný stav řešené problematiky

Aminojíl a komplexy z něj připravované mají velmi pestré možnosti využití. Jak již bylo naznačeno v úvodní části, dvě dominantní aplikační oblasti jsou medicínské aplikace a organická elektronika, v obou případech slouží aminojíl jako podpurná matrice. Obecně tvorby funkčních systémů z aminojílu využívají jednoduchost protonace jeho aminoskupin ve vodném prostředí a následné tvorby disperzní soustavy. Možnost tvorby homogenní disperze hraje důležitou roli při síťování organických polymerů za vzniku hydrogelů a filmů s definovanou nanostrukturou anebo při obklopování biologicky aktivních látek, které mohou být ve spojení s aminojílem buď cíleně distribuovány anebo chráněny před nežádoucími ataky jiných molekul [1].

Jak již bylo zmíněno, aminojíl byl použit k enkapsulaci hemoglobinu, oxidázy glukózy nebo oxidovaného myoglobinu. Vznikaly tak systémy nanočástic s chráněnou strukturou a se zlepšenou tepelnou stabilitou. Dále může aminojíl díky svému kladnému náboji interagovat i s molekulami DNA. Může tedy enkapsulovat plazmidy DNA a díky snadné permeaci buněčnou stěnou je vpravit do prostoru buňky, kde je bude chránit před ataky endonukleáz. Popsané systémy se nabízí pro využití při transformaci DNA, které se jinak provádí drastickými způsoby poškozujícími buňky [5], [12], [17]–[19].

V rámci bakalářské práce [2] byl popsán vznik gelovité sraženiny interakcí aminojílu s hyaluronanem sodným. Sodná sůl kyseliny hyaluronové se díky svým unikátním vlastnostem hojně využívá v medicínských aplikacích [32] a komplex, který vzniká v přítomnosti aminojílu, by mohl díky svému gelovitému charakteru najít uplatnění např. jako povrchové krytí ran.

Díky protonaci aminoskupin ve vodném prostředí může aminojíl zvýšit rozpustnost špatně rozpustných látek, např. léčiv. Byla studována interakce aminojílu s telmisartanem (lékem, který se využívá při léčbě arteriální hypertenze) [23]. Vzniklý komplex získal lepší rozpustnost v závislosti na pH prostředí, což umožnilo efektivní uvolňování účinné látky z léku při průchodu gastrointestinálním traktem.

K bližšímu pochopení principů popsaných interakcí je žádoucí vizualizace aminojílu. Možnostmi vnesení fluoroforů do struktury aminojílu se již zabývají různé výzkumné týmy, které obecně využívají tři přístupy:

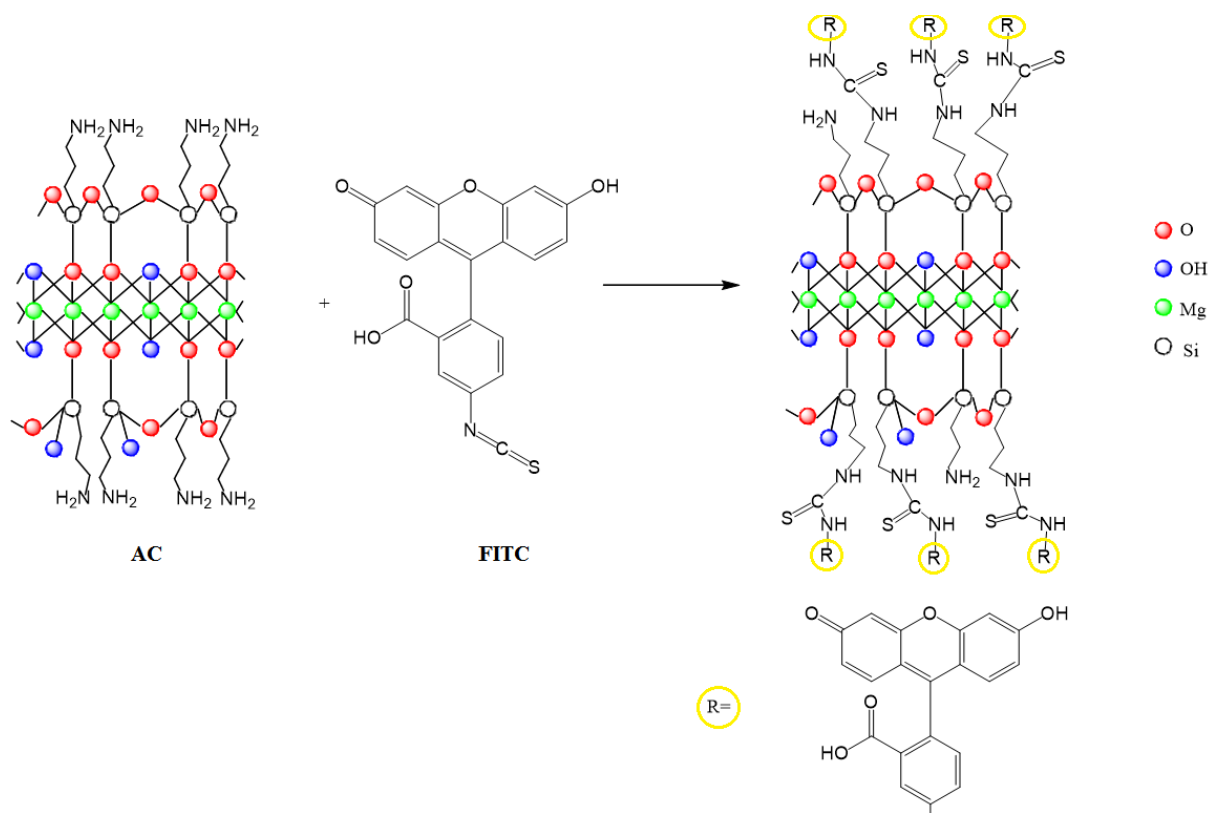
- a) zavedení látky přirozeně vykazující fluorescenci, ať už fluorescenční sondu či jinou organickou molekulu do struktury aminojílu,
- b) interakce aminojílu s molekulami obsahujícími chelatovaný těžký kov,
- c) interakce aminojílu s uhlíkovými nanotečkami.

Každý přístup je specifický pro danou aplikaci a nese s sebou vedle výhod a předností i nevýhody; ve všech případech je umožněna příprava různorodých materiálů a systémů přímo na míru pro daný požadavek, protože připravené komplexy nemusí výhradně sloužit k pouhé vizualizaci [1], [8]–[10] a [24].

3.1 Interakce aminojílu s organickými látkami přirozeně vykazujícími fluorescencí

Young-Chul Lee a kol. [7] se zabývali značením aminojílu pomocí fluorescein-5-isothiocyanátu (FITC), strukturní vzorec viz obr. 7. Navázání FITC, populární fluorescenční sondy používané ke značení aminokyselin a peptidů či bílkovin [30], probíhalo dvěma přístupy:

- FITC byl použit k modifikaci APTES a aminojíl byl syntetizován ze značeného prekursoru přidávkem chloridu hořečnatého,
- FITC byl navázán na strukturu aminojílu tak, že byl přidán roztok sondy v ethanolu do vodné disperze aminojílu.



obr. 7: Schematické znázornění tvorby komplexu FITC-AC [7]

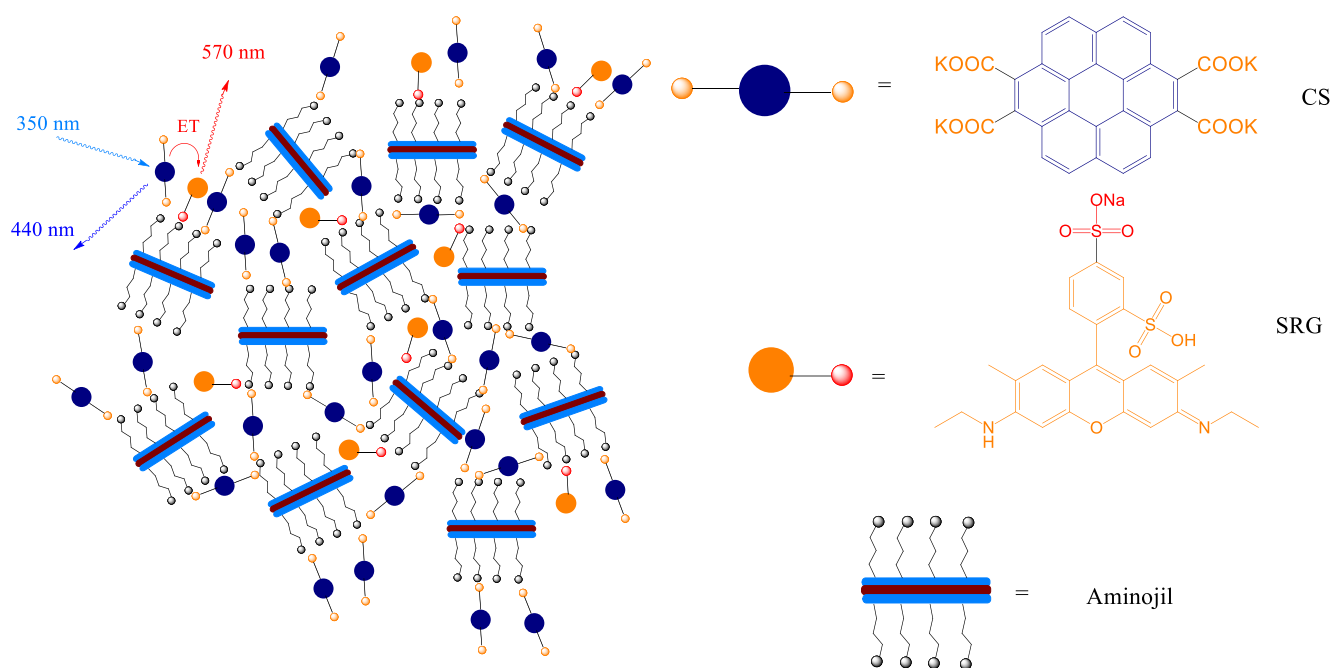
Na základě výsledků z provedených analýz, zejm. z transmisní elektronové mikroskopie (TEM), byl jako vhodnější přístup vyhodnocený ten, kdy byl FITC navázán na aminojíl. Byl-li FITC navázán na APTES a až následně se syntetizoval aminojíl, došlo ke tvorbě nepravidelné nekystalické struktury. Samozřejmě i při druhém způsobu tvorby komplexu FITC-AC (aminojíl s kovalentně navázaným FITC) došlo ke tvorbě méně pravidelné struktury, než jakou má samotný aminojíl. Přítomnost vzniklé thioamočovinové skupiny prokazovali autoři pomocí infračervené spektroskopie.

Navázáním FITC na strukturu aminojílu došlo ke změně doby života fluorescence. Zatímco FITC v prostředí ethanolu měl jednu dobu života, a to 4,58 ns, komplex FITC-AC už měl doby života dvě: 0,72 ns a 2,68 ns. Dalším zajímavým pozorovaným jevem bylo, že při dlouhé době ozáření docházelo k oslabování intenzity fluorescence, ta se však zregenerovala byl-li vzorek

ponechán v tmavém prostředí. Autoři předpokládají, že při ozáření komplexu FITC-AC dochází k vratné fotoizomeraci.

Fluorescenci vykazující organické látky vázal na aminojíl i **K. V. Rao a kol.** [24], zde se však autoři primárně nesnažili o vizualizaci aminojílu. Aminojíl v předložené studii sloužil jako matrice poutající iontové chromofory, mezi kterými může docházet k přenosu energie. Chromofory zde byly koronentetrakarboxylát (CS) s fluorescencí v modré oblasti spektra a sulforhodamin G (SRG) s fluorescencí ve žluté oblasti spektra, maxima excitačních vlnových délek uvedených sloučenin jsou 314 nm, respektive 534 nm, maxima emisních vlnových délek jsou poté 435 nm, respektive 560 nm. Interakce mezi aminojílem a organickými sloučeninami byla dle autorů čistě elektrostatické povahy a docházelo k ní při smísení roztoků účastněných látek.

Spektrální překryv emise CS a absorpce SRG umožňuje tuto dvojici využít jako donor-akceptorní pár pro přenos energie a vícefunkční povaha CS dává možnost propojit jednotlivé destičky aminojílu a podpořit tvorbu kompaktní struktury ve formě hydrogelu schematicky znázorněno na obr. 8. Díky přenosu energie je možné různými poměry chromoforů ve struktuře ladit vlnovou délku emitovaného záření.



obr. 8: Strukturní vzorec koronentetrakarboxylátu (CS) a sulforhodaminu G (SRG) a předpokládané schéma systému CS-SRG-AC, ve kterém je naznačen přenos energie (ET) [24]

Z již popsaného systému byly připravovány transparentní tenké filmy, které rovněž vykazovaly fluorescenci. Film, který obsahoval pouze CS, vykazoval stejně jako gel emisi v modré oblasti spektra. Tím se potvrdila hypotéza, že aminojíl zabráňuje interakci chromoforů a zvyšuje kvantový výtěžek fluorescence. Přidáním 1,0 mol.% SRG (vztaženo k obsahu CS) docházelo k výraznému zhášení emise v modré oblasti spektra.

Systemy popsané K. V. Raoem a jeho týmem mohou najít uplatnění v mnoha odvětvích. S gely emitujícími bílé světlo je možné psát na sklo či jiné flexibilní substráty a k zobrazení textu poslouží komerčně dostupné UV lampy emitující záření o vlnové délce 365 nm. Díky transparentnímu charakteru může být komplex aplikován i na lampy a poskytnout tak zářivé bílé světlo.

3.2 Hybridní materiály obsahující aminojíl se včleněnými lanthanoidy

V současné době jsou v organické elektronice velmi často využívány lanthanoidy, které mají úzké emisní pásy, dlouhou dobu života a výrazný Stokesův posun závislý na povaze ligandu. Takové předpoklady jsou nezbytné pro výrobu světlo emitujících diod (LED), luminiscenčních solárních koncentrátorů, aktivních prostředí laserů či senzorů pro biologické aplikace [8].

Skupina T. Wanga [9] začlenila do struktury aminojílu lanthanoidy (Tb^{3+} a Eu^{3+}) pomocí senzibilizátoru benzen-1,2,4,5-tetrakarboxylátu sodného (BTC), který slouží jako chelatační činidlo. Příprava byla velmi jednoduchá, smísily se roztoky aminojílu a benzen-1,2,4,5-tetrakarboxylátu sodného s obsahem lanthanoidů, které se navázaly elektrostaticky. Vznikl hydrogel, který byl po několik hodin sušen při teplotě 80 °C a došlo k vytvoření komplexu AC-BTC, ten pod UV zářením vykazoval fluorescenci. Podle výchozího poměru Tb^{3+} a Eu^{3+} se vzorky lišily zbarvením.

Vlnová délka emitovaného záření dále závisela na vlnové délce, kterou byl vzorek excitován. Zvýšením excitační vlnové délky až na 325 nm se posunulo emisní spektrum hybridních materiálů k modré oblasti, což je způsobeno neefektivním přenosem energie z ligandu na lanthanité ionty. Pokud je molární poměr $Eu^{3+} : Tb^{3+} = 1 : 7$, blíží se emise vzorku ideálnímu bílému světlu.

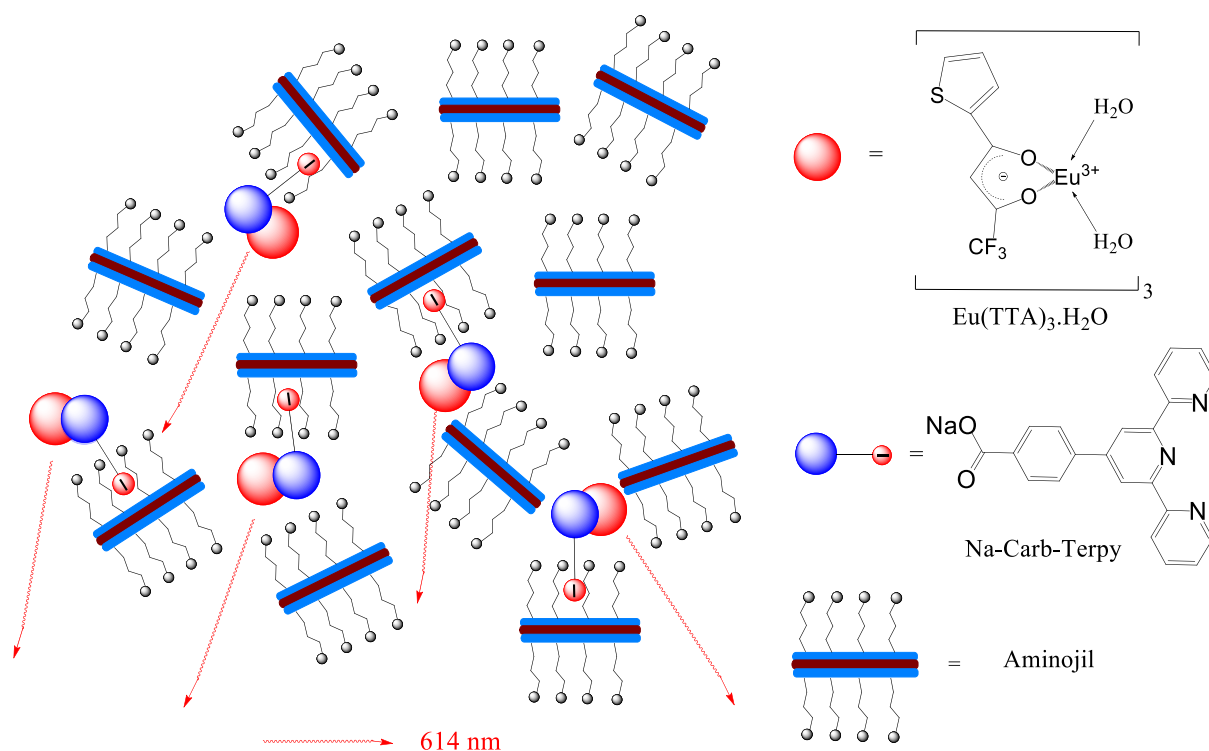
Luminiscence vzorků se měnila i v závislosti na teplotě. Zde vykazoval zajímavé chování vzorek s molárním poměrem opět $Eu^{3+} : Tb^{3+} = 1 : 7$, který vykazoval vynikající luminiscenci lineárně závislou na teplotě v rozmezí 78–288 K, takový komplex by mohl být využit při výrobě samosrovnávacího luminiscenčního teploměru. Velmi zajímavou vlastností je rovněž možnost připravit transparentní filmy, které by mohly být využity k potíštění zaoblených objektivů jako UV-LED cela.

Jednou ze slibných struktur vhodných především díky kvantovým výtěžkům až 36,5 % nejen pro výše popsaná uplatnění jsou komplexy β -diketonátu lanthanitého ($LnDC$), konkrétně $[Eu(TTA)_3(phen)]$, kde TTA je zkratka pro 2-theonyltrifluoroacetonát. Bohužel však takové sloučeniny nevykazují fotostabilitu ani termostabilitu.

Velmi často je možné problém nestability komplexů řešit použitím organicko-anorganické matrice, např. polymery, iontové kapaliny či zeolity, nicméně zakomponování takových materiálů jen navýší cenu finálních zařízení. Elegantní řešení našla opět **skupina T. Wanga** [8], která použila aminojíl jako skafold pro komplexy β -diketonátů. Použitým lanthanoidem bylo tentokrát europium ve formě komplexní sloučeniny $Eu(TTA)_3 \cdot 3H_2O$, která byla s aminojílem nekovalentně spojena (pomocí karboxylátových skupin) přes sodnou sůl 4'-*para*-fenylkarboxyl-2,2':6',2''-terpyridinu (dále značeno jako Na-Carb-Terpy). Schémata znázorňující předpokládanou strukturu a výsledné komplexy jsou uvedena na obr. 9.

Popsaný hybridní materiál vykazuje dobrou rozpustnost ve vodě, právě díky protonaci aminokupin aminojílu. Komplex je schopen luminiscence jak ve vodném prostředí, tak i v pevné fázi ve formě prášku, dochází k emisi zářivě červeného světla po excitaci UV zářením o vlnové délce 365 nm (viz obr. 9). Dále došlo ke značnému vylepšení fotostability a termostability transparentních a flexibilních tenkých filmů přidávkem malého množství organického ve vodě rozpustného polymeru polyvinylalkoholu (PVA) do výchozí vodné suspenze.

Na základě experimentů byl vhodným molárním poměrem aminojíl : Terpy shledán poměr 4 : 1. Doba života luminiscence takového komplexu byla stanovena na 0,45 ms a kvantový výtěžek 39,2 %. Flexibilní transparentní filmy s obsahem PVA měly vyšší dobu života luminiscence 0,55 ms a vyšší kvantový výtěžek 42,5 %. Takové charakteristiky umožňují použití komplexů AC-Terpy-Eu(TTA)₃ na výrobu optoelektronických zařízení



obr. 9: Předpokládaná struktura komplexu AC-Terpy-Eu(TTA)₃, včetně struktur Eu(TTA)₃ a Na-Carb-Terpy [8]

3.3 Aminojíl se zabudovanými uhlíkovými nanotečkami ve své struktuře

Uhlíkové nanotečky (CD) s rozměrem menším než 10 nm jsou jednou z nejmladších modifikací uhlíku. Poprvé byly pozorovány při čištění jednotěných uhlíkových nanotrubeček při jejich přípravě pomocí elektroforézy. Svými výjimečnými vlastnostmi si CD velmi rychle získaly pozornost. Jsou rozpustné ve vodě, chemicky inertní, velmi málo toxické a jednoduše se připravují jejich deriváty. CD jsou fotostabilní a vykazují výraznou fluorescenci, proto bývají označovány za fluorescenční uhlík. Právě pro zmíněné vlastnosti (rozpustnost ve vodě, inertní vlastnosti, možnost zavedení různých funkčních skupin, fotostabilita, nízká toxicita a biokompatibilita) získávají CD stále větší zájem na úkor klasických polovodičových kvantových teček a organických fluorescenčních sond a barviv [33].

Jak již bylo vícekrát zmíněno, aminojíl může najít uplatnění nejen jako matrice při výrobě organické elektroniky, ale také v oblasti medicíny, především díky tomu, že nejeví žádné známky toxicity. Pro možnost využití v medicínských aplikacích se však studuje nejen aminojíl s obsahem hořčíku ve své struktuře, ale i aminojíl s inkorporovanými železitými ionty (Fe-AC), který už ale slabou toxicitu vykazuje. Možnost pro využití železitého aminojílu v kombinaci s uhlíkovými nanotečkami popsala **skupina K. S. Kanga** [10].

Cytotoxicita Fe-AC je zapříčiněna oxidací peroxidu vodíku v nádorových buňkách železitými ionty za vzniku volných hydroxylových radikálů, které způsobují zánik buněk poškozením DNA a buněčné membrány. Pokud je Fe-AC v konjugaci s uhlíkovými nanotečkami, dochází ke snížení toxicity, pravděpodobně vlivem sterické zábrany při interakci železitých iontů s reaktivními kyslíkatými molekulami. Díky včlenění fluorescenci vykazujících uhlíkových nanoteček do struktury aminojílu, je možné sledovat vstup CD-Fe-AC dovnitř buněk, konkrétně do cytosolu nebo přímo do jádra.

Uhlíkové nanotečky modifikované karboxylovými skupinami byly na strukturu aminojílu navázány kovalentně. Pro tvorbu amidové skupiny byla karboxylová skupina na CD aktivována 1-ethyl-3-[3-dimethylaminopropyl]karbodiimidem a N-hydroxysulfosukcinimidem. Samotná reakce probíhala ve fosfátovém pufru při pokojové teplotě.

Mimo jiné byl in vitro zkoumán vliv CD-Fe-AC na nádorové buňky adenokarcinomu děložního čípku. Při koncentraci CD-Fe-AC 1 000 $\mu\text{g/ml}$ docházelo k zániku pouze nádorových buněk, zdravé buňky zůstaly při této koncentraci ještě nepoškozené. Vhodnou kombinací Fe-AC a Fe-AC ve spojení s CD, případně ještě s navázanými jinými biologicky aktivními látkami, je tak možné získat systém k cílené distribuci léčiv selektivně do nádorových buněk, který je zároveň možné pozorovat vhodnými zobrazovacími metodami.

4 Experimentální část

V průběhu studia aminojílu bylo zjištěno, že vykazuje slabou autofluorescenci, která je pravděpodobně způsobena defekty v krystalické struktuře. Proto je součástí experimentální části i charakterizace autofluorescence aminojílu.

Na základě poznatků získaných z literatury bylo potom vyhodnoceno, že k samotné vizualizaci je možné přistupovat třemi různými způsoby:

- modifikace vnitřní struktury aminojílu vnesením těžkých kovů (zejm. europia) dovnitř anorganické matrice,
- navázání fluorescenční sondy na strukturu aminojílu pomocí elektrostatických interakcí,
- tvorba kovalentní vazby mezi aminoskupinou aminojílu a jinou funkční skupinou fluorescenční sondy.

V rámci diplomové práce byly studovány první dvě možnosti tvorby fluorescenčních komplexů aminojílu, tj. vnitřní struktura aminojílu byla modifikována europitými ionty, které jsou schopny fluorescence, jsou-li implementovány ve vhodné struktuře, obvykle se používají chelatační činidla, a byla studována interakce aminojílu s fluorescenčními sondami dostupnými v laboratoři Fluorescenční spektroskopie nesoucími záporný náboj.

4.1 Použité chemikálie

Hexahydrát chloridu
hořečnatého

(MgCl₂·6H₂O)

výrobce: Lachner

č. šarže: PP/2012/11656

Hexahydrát chloridu
europitého

(EuCl₃·6H₂O)

výrobce: Sigma Aldrich

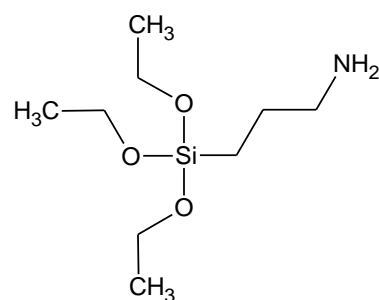
LOT: MKBQ2481V

3-aminopropyltriethoxysilan

(APTES)

výrobce: Sigma Aldrich

č. šarže: 612-108-00-0

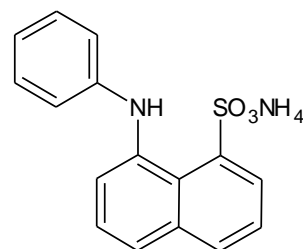


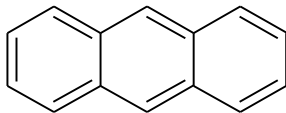
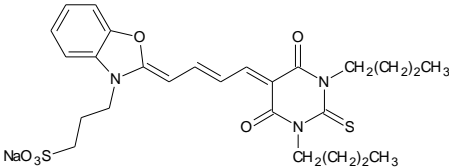
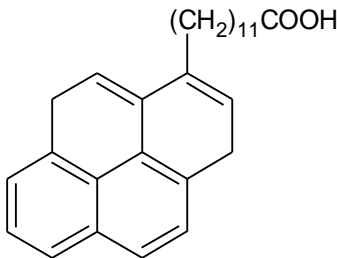
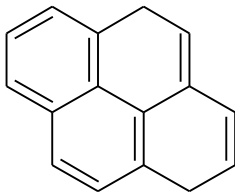
Amonná sůl 8-anilinaftalen-
1-sulfonové kyseliny

(ANS)

výrobce: Fluka Biochemika

č. šarže: 396575/1



Antracen	výrobce: neuveden č. šarže: neuvedeno	
Merocyanin	výrobce: Sigma Aldrich č. šarže: 03301EH	
1-pyrendodekanová kyselina (PDA)	výrobce: Fluka Biochemika LOT 448948/1 č. šarže: 32704125	
Pyren	výrobce: Fluka Biochemika LOT 430166/1 č. šarže: 42304287	
Ethanol, p. a. C ₂ H ₅ OH	výrobce: Penta č. šarže: 1910031016	
Methanol, p. a. CH ₃ OH	výrobce: Lachner č. šarže: PP/2008/00031/0	
Aceton, p. a. CH ₃ COCH ₃	výrobce: Penta č. šarže: 13082008/0	

4.2 Použité přístroje

- Fluorimetr Aminco Bowman Series 2, Thermo Electron Corporation
- Fluorescenční mikroskop Microtime 200, PicoQuant, doplněný spektrografem Andor
- FTIR spektrometr Nicolet iS50, Thermo Scientific
- RTG difraktometr Empyrean, Panalytical
- Odstředivka Rotofix 32, Hettich Zentrifugen

- Sušárna Venticell, BMT Medical Technology
- Přístroj Pure lab pro přípravu demineralizované vody
- UV lampa Krüss, Merci

4.3 Příprava aminojílu

Aminojíl byl připravován podle doporučeného postupu uvedeného v závěrečné práci [34], která se zabývala optimalizací přípravy aminojílu.

Bylo naváženo 0,84 g hexahydrátu chloridu hořečnatého, který byl rozpuštěn v 25 ml laboratorního ethanolu. Do čirého roztoku byl po kapkách přidáván 1,3 ml APTES, vznikla bílá disperzní soustava, která byla ponechána na magnetické míchačce, dokud nedošlo k odpaření rozpouštědla.

Hrubý produkt byl rozdispergován v 10 ml deionizované vody a následně bylo přidáno 50 ml ethanolu, čímž došlo k vysrážení aminojílu z vodného prostředí. Tento krok se nazývá exfoliace a vede k reorganizaci vrstevnaté struktury aminojílu. Produkt byl izolován odstředěním (při otáčkách $4\ 000\ \text{min}^{-1}$ po dobu 8 min), následovalo promytí laboratorním (za účelem odstranění nezreagovaných výchozích látek) a poté absolutním ethanolem. Připravený aminojíl byl vysušen v sušárně při $50\ ^\circ\text{C}$. Popsaným postupem je možné získat cca 0,4 g aminojílu.

4.3.1 Modifikace aminojílu včleněním lanthanoidu

Vzhledem k možnosti inkorporace řady kovových iontů do matrice aminojílu, byl aminojíl modifikován europitými ionty (Eu^{3+}). Postup přípravy Eu-AC byl analogický přípravě samotného aminojílu. Byla pouze pozměněna navážka hexahydrátu chloridu europitého a to tak, že bylo zachováno látkové množství vneseného kovového iontu (4,13 mmol).

V 25 ml laboratorního ethanolu bylo rozpuštěno 1,51 g hexahydrátu chloridu europitého a poté bylo přidáno 1,3 ml APTES, vzniklá zakalená soustava byla ponechána na magnetické míchačce, dokud nedošlo k odpaření přebytečného rozpouštědla. Následovala exfoliace, dvě promytí laboratorním ethanolem a jedno promytí absolutním ethanolem. Produkt byl vysušen v sušárně při $50\ ^\circ\text{C}$.

4.3.2 Modifikace aminojílu včleněním lanthanoidu vedle hořečnatých iontů

Byl učiněn pokus o včlenění do struktury aminojílu europité ionty vedle hořečnatých. Molární poměr hořečnatých iontů ku europitým byl 19 : 1. Postup přípravy takto modifikovaného aminojílu (Mg-Eu-AC) byl opět analogický přípravě běžného aminojílu.

Bylo naváženo 3,19 g hexahydrátu chloridu hořečnatého a 0,30 g hexahydrátu chloridu europitého, oba chloridy byly rozpuštěny ve 100 ml laboratorního ethanolu a bylo přikapáno 5,2 ml APTES, byl pozorován vznik zákalu. Reakční soustava byla ponechána na magnetické míchačce do odpaření ethanolu, poté byl hrubý produkt exfoliován a promyt. Sušení probíhalo opět při $50\ ^\circ\text{C}$.

4.3.3 Analýza aminojílů

Připravené aminojíly byly studovány pomocí rentgenové difrakční analýzy (XRD), která podávala informace o krystalickém charakteru vzorků, a pomocí FTIR spektroskopie, což jsou

dvě časté analýzy prováděné v dostupných publikacích o aminojílu. Spektrální vlastnosti byly zjišťovány pomocí spektrofotometru.

Aminojíl a jeho modifikované analogy byly studovány pomocí rentgenové difrakční analýzy (XRD) přístrojem Empyrean (výrobce Panalytica). Parametry měření jsou uvedeny v tab. 3.

tab. 3: Nastavení přístroje při XRD analýze

Parametr	Nastavení
Materiál anody	Cu
Vlnová délka K- α_1 a K- α_2	$1,541 \cdot 10^{-10}$ a $1,544 \cdot 10^{-10}$ m
Napětí	40 kV
Rozsah snímání 2θ	$3,800-65,000^\circ$
Velikost jednoho kroku	$0,013^\circ$
Doba snímání jednoho bodu	95,88 s

Změny vazebných poměrů byly detekovány pomocí FTIR spektroskopie. FTIR spektra byla měřena přístrojem Nicolet iS50. Nejdříve bylo změřeno pozadí – vzduch. Pevné vzorky byly měřeny na ATR krystalu. V rozsahu měření $400-4\,000\text{ cm}^{-1}$ bylo provedeno 128 skenů s rozlišením 4 cm^{-1} .

Spektrální vlastnosti aminojílu a jeho modifikací byly charakterizovány v roztocích pomocí spektrofotometru. Excitační a emisní spektra byla měřena pomocí fluorimetru Aminco Bowman Series 2. Rozsah vlnových délek byl přizpůsoben danému měření, rychlost skenu byla nastavena na $1\text{ nm}\cdot\text{s}^{-1}$, citlivost detektoru byla 970 V. Šířka štěrbin byla rovněž přizpůsobena měření. Měření probíhalo v křemenné kyvetě. Koncentrace Eu-AC pro měření emisních spekter pomocí spektrografu Andor byla přibližně $1\text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$.

Pro doplnění spektrálních vlastností byly aminojíly (AC, Mg-Eu-AC a Eu-AC) ve vodném prostředí zkoumány pomocí fluorescenčního mikroskopu Microtime 200 doplněného o spektrograf Andor. Byly měřeny doby života fluorescence. Pro excitaci byl použit laser o vlnové délce 375 nm, intenzita laseru byla řádově $1 \cdot 10^3$ a. u., a byl použit emisní filtr 460 LP (LP je z angl. *long pass* a značí, že byly propouštěny vlnové délky nad 460 nm). Koncentrace aminojílů byla přibližně $0,05\text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$.

Pevný aminojíl a jeho deriváty Mg-Eu-AC a EuAC byly analyzovány pomocí techniky FLIM (zkratka z angl. *fluorescence-lifetime imaging microscopy*). Měření probíhalo opět pomocí fluorescenčního mikroskopu Microtime 200. Vzorek byl připraven přesrážením z roztoku pomocí ethanolu, vzniklá suspenze byla nanášena na krycí sklíčko a vzorek byl vysušen při $50\text{ }^\circ\text{C}$. Excitace probíhala pomocí laseru o vlnové délce 375 nm, byl použit emisní filtr 460 LP, intenzita laseru byla při studiu aminojílu řádově 10 a. u., a při studiu modifikovaných aminojílů, tzn. Eu-AC a Mg-Eu-AC byla intenzita řádově 100 a. u.

4.4 Interakce aminojílu s fluorescenčními sondami

Při hodnocení použitelnosti konkrétní fluorescenční sondy modifikující aminojíl je nutné brát v úvahu jednoduchost přípravy komplexu, který bude vykazovat silnou fluorescenci a nebude mít tendenci k rychlé degradaci.

4.4.1 Navázání fluorescenční sondy pomocí elektrostatických interakcí

Ve vodném prostředí dochází k naprotonování aminoskupin, aminojíl tedy disponuje kladným nábojem. Proto volené fluorescenční sondy musí nést záporný náboj; v literatuře se podařilo elektrostaticky navázat fluorofory na bázi sulfonových nebo karboxylových kyselin. Interakce probíhala ve vodném roztoku aminojílu [24].

V rámci práce byly zvoleny fluorescenční sondy obsahující sulfonovou skupinu: amonná sůl anilinaftalensulfonové kyseliny (ANS) a merocyanin. ANS se obvykle využívá při studiu povrchu membrán a bílkovin. ANS nevykazuje fluorescenci ve vodě, fluorescence nastává až po navázání na membrány či příslušné bílkoviny v membráně. Merocyanin je fluorescenční sonda využívaná při potenciometrii, je schopen navázat se kolmo na polarizovanou membránu, při depolarizaci vzniká nefluorescentní dimer, který pozměňuje absorpční spektra. Vedle potenciometrie je možné využít merocyanin při studiu lipidů, zejm. transmembránových lipidů [30].

Karboxylovou skupinu obsahovala 1-pyrendodekanová kyselina (PDA). PDA patří do skupiny fluoroforů modifikujících mastné kyseliny a fosfolipidy, což napomáhá studiu membránových struktur a metabolismu či transportu jednotlivých lipidů [30]. PDA je fluorescenční sonda, která je schopna tvořit excimery ve vhodném prostředí (např. v cyklohexanu), a to díky tvorbě vodíkové vazby mezi karboxylovými skupinami [35].

Schopnost aminojílu interagovat se sondami s aromatickým charakterem byla zjišťována použitím antracenu a pyrenu jako fluorescenčních sond. Antracen a pyren se ve formě derivátů využívají při studiu celé řady systémů, např. již zmíněných membránových struktur [30]. Maximální excitační a emisní vlnové délky vyčtených a použitých fluorescenčních sond jsou uvedeny v tab. 4.

tab. 4: Tabelované spektrální charakteristiky použitých fluorescenčních sond [30], [36] a [37]

Fluorescenční sonda	Rozpouštědlo	λ_{ex} [nm]	λ_{em} [nm]
ANS	methanol	372	480
Merocyanin	methanol	555	578
PDA	methanol	339	377*
Antracen	cyklohexan	350	395**
Pyren	dimethylsulfoxid	338	375

*PDA má vedle maximální emisní vlnové délky 377 nm při excitaci zářením o vlnové délce 339 nm i další méně intenzivní lokální maxima v oblastech 397, 418 a 440 nm [36].

**Antracen má vedle maximální emisní vlnové délky 395 nm při excitaci zářením o vlnové délce 350 nm i další méně intenzivní lokální maxima v oblastech 375, 420 a 445 nm [37].

Vzorky byly připraveny následujícím způsobem: do vialek vymytých chromsírovou směsí bylo napipetováno 0,100 ml dané fluorescenční sondy a bylo odpařeno rozpouštědlo, poté bylo přidáno 5 ml roztoku aminojílu o koncentraci $3,5 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$. Koncentrace použitých fluorescenčních sond v zásobním roztoku a ve vzorku aminojílu jsou uvedeny v tab. 5.

Vzorky byly ponechány na třepače přes noc. Následující den byla zkoumána intenzita fluorescence pomocí spektrofluorimetru Aminco Bowman Series 2.

tab. 5: Roztoky fluorescenčních sond použitých pro studium interakce s aminojílem, přepočet koncentrace sond ve vzorku aminojílu

Fluorescenční sonda	Koncentrace zásobního roztoku ($\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$), rozpuštědlo	Koncentrace sondy v 5 ml vzorku aminojílu ($\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$)
ANS	$7\cdot 10^{-5}$, methanol	$1\cdot 10^{-6}$
Merocyanin	$1\cdot 10^{-4}$, aceton	$2\cdot 10^{-6}$
PDA	$7\cdot 10^{-5}$, methanol	$1\cdot 10^{-6}$
Antracen	$2\cdot 10^{-4}$, aceton	$4\cdot 10^{-6}$
Pyren	$1\cdot 10^{-4}$, ethanol	$2\cdot 10^{-6}$

Aby se usnadnila interakce aminojílu s fluorescenční sondou, byly připraveny vzorky znovu, avšak byly ponechány na vyhřívané magnetické míchače (cca $75 \text{ }^\circ\text{C}$). Bylo zjištěno, že PDA za uvedených podmínek je schopná interakce s aminojílem (komplex AC-PDA). Spektrální vlastnosti byly zkoumány pomocí fluorimetru Aminco Bowman Series 2. Schopnost tvořit komplex AC-PDA byla zkoumána i z hlediska koncentrace fluorescenční sondy ve vzorku.

Pro posouzení charakteru interakce aminojílu s PDA byly vzorky studovány i s časovým odstupem (jeden den a dva dny starý vzorek uchovávaný v lednici) a byla studována i možnost vysrážet značený aminojíl ethanolem a získat tak pevný značený aminojíl. Zůstala-li fluorescenční sonda navázána na strukturu aminojílu, bylo posuzováno na základě naměřených spekter pomocí fluorimetru.

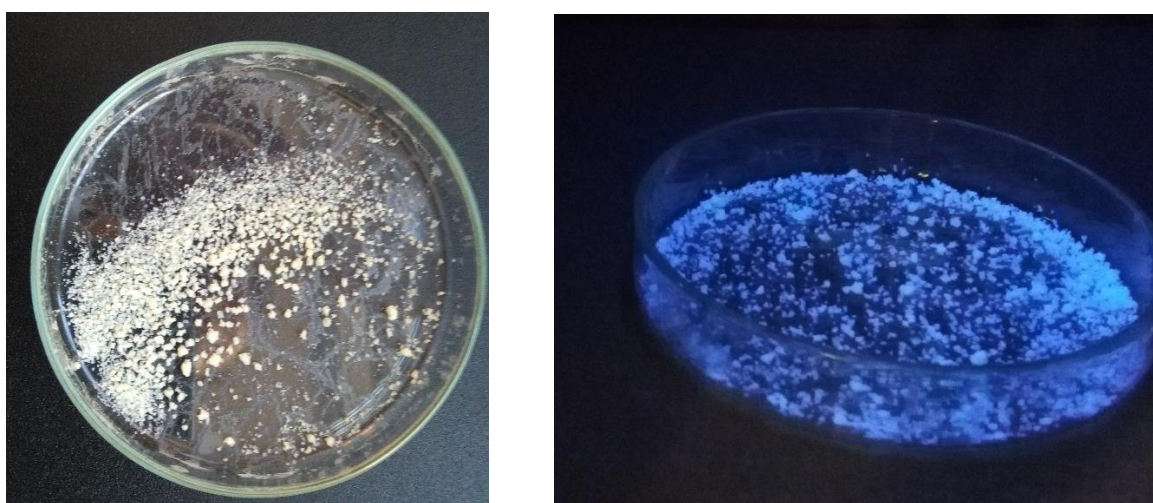
Dále byla změřena doba života komplexu AC-PDA ve vodném roztoku pomocí fluorescenčního mikroskopu Microtime 200. Pro excitaci byl použit laser o vlnové délce 375 nm, intenzita laseru byla řádově $1\cdot 10^2$ a. u., a byl použit emisní filtr 460 LP.

5 Výsledky a diskuze

5.1 Charakterizace aminojílu a vnitřně modifikovaných aminojílů

Aminojíl připravený již diskutovaným způsobem měl krystalickou strukturu a byl jemně nažloutlé barvy, po ozáření UV lampou o vlnové délce 365 nm vykazoval fluorescenci v modré oblasti spektra. Snímky aminojílu a aminojílu ozářeného UV zářením jsou pro ilustraci uvedeny na obr. 10. Modifikované aminojíly, do jejichž struktury byly inkorporovány lanthanoidy, se po vizuální stránce od běžného aminojílu nijak nelišily.

Bylo však pozorováno odlišné chování aminojílů ve vodném prostředí. Zatímco aminojíl je možné rozdispergovat působením ultrazvuku a vytvořit tak čirý roztok, struktury Eu-AC a Mg-Eu-AC se nepodařilo tak dokonale rozdispergovat – v koloidních roztocích byl vždy patrný zákal, který znesnadňoval studium spektrálních vlastností v roztocích.



obr. 10: Fotografie aminojílu, vlevo snímek na denním světle, vpravo po ozáření UV lampou o vlnové délce 366 nm.

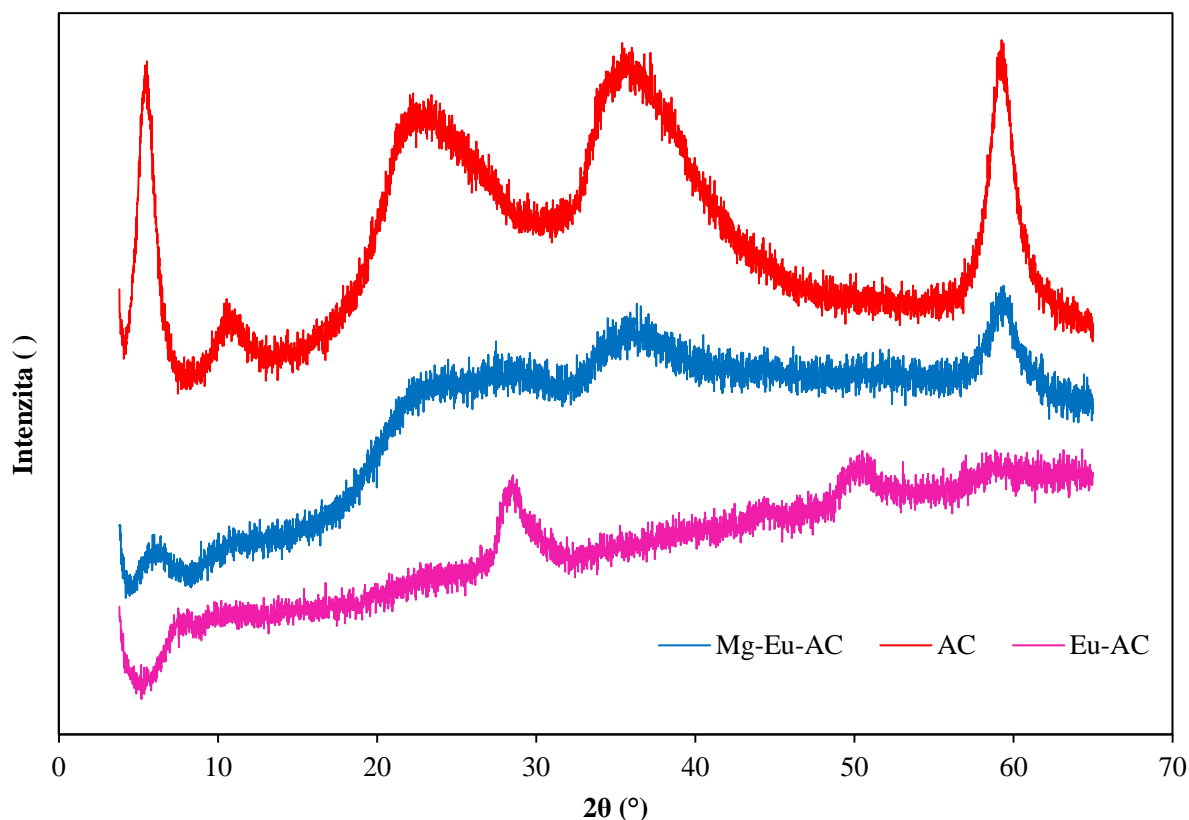
5.1.1 Rentgenová prášková difrakce

Charakter struktury aminojílu a jeho modifikovaných derivátů Eu-AC a Mg-Eu-AC byl studován pomocí rentgenové práškové difrakce. Získaná spektra jsou v grafické podobě uvedena na obr. 11. Na základě tvaru a polohy píků jednotlivých spekter lze porovnat krystalický charakter vzorků a určit mezirovinnou vzdálenost mezi jednotlivými destičkami struktury aminojílu d_{001} naznačenou na obr. 1.

Struktura aminojílu samotného má krystalický charakter, avšak ve srovnání s anorganickými krystalickými materiály by bylo vhodnější použít termín semikrystalický, protože jednotlivé píky jsou široké a nikoli úzké. První difrakce aminojílu byla pozorována při úhlu $2\theta = 5,6^\circ$ a je způsobena mezirovinnou vzdáleností $d_{001} = 1,62$ nm. Tato relativně velká vzdálenost netypická pro jílové materiály je způsobena přítomností 3-aminopropylových skupin v mezirovinném prostoru.

Aminojíl s inkorporovanými europitými ionty místo hořečnatých (vzorek Eu-AC) měl oproti aminojílu výrazně jiný charakter spektra. Pozorované píky jsou málo intenzivní a značně široké, což poukazuje na spíše amorfni charakter materiálu.

Byl proveden experiment, kdy do struktury aminojílu vedle hořčíku bylo včleněno europium, molární poměr atomů Mg : Eu byl 19 : 1 (vzorek Mg-Eu-AC). Při bližším zkoumání tvaru ilustrovaných spekter je možné pozorovat kombinaci spekter aminojílu komplexu Eu-AC. Oproti čistému aminojílu došlo však ke zřetelnému posunu píku k větší hodnotě úhlu 2θ první difrakce, tato skutečnost poukazuje na zmenšení mezirovinné vzdálenosti, která byla výpočtem stanovena na 1,49 nm. Pík první difrakce struktury ve spektru Mg-Eu-AC je zdatelně méně intenzivní než ve spektru aminojílu, což poukazuje na méně pravidelnou krystalickou strukturu. Další polohy píků ve spektru Mg-Eu-AC se poměrně shodují s polohami píků ve spektru aminojílu (viz maxima v okolí úhlů 23° , 36° a 59°). Navíc v hybridním aminojílu Mg-Eu-AC přibýly náznaky píku v oblasti kolem 28° , který je pozorován ve spektru Eu-AC.



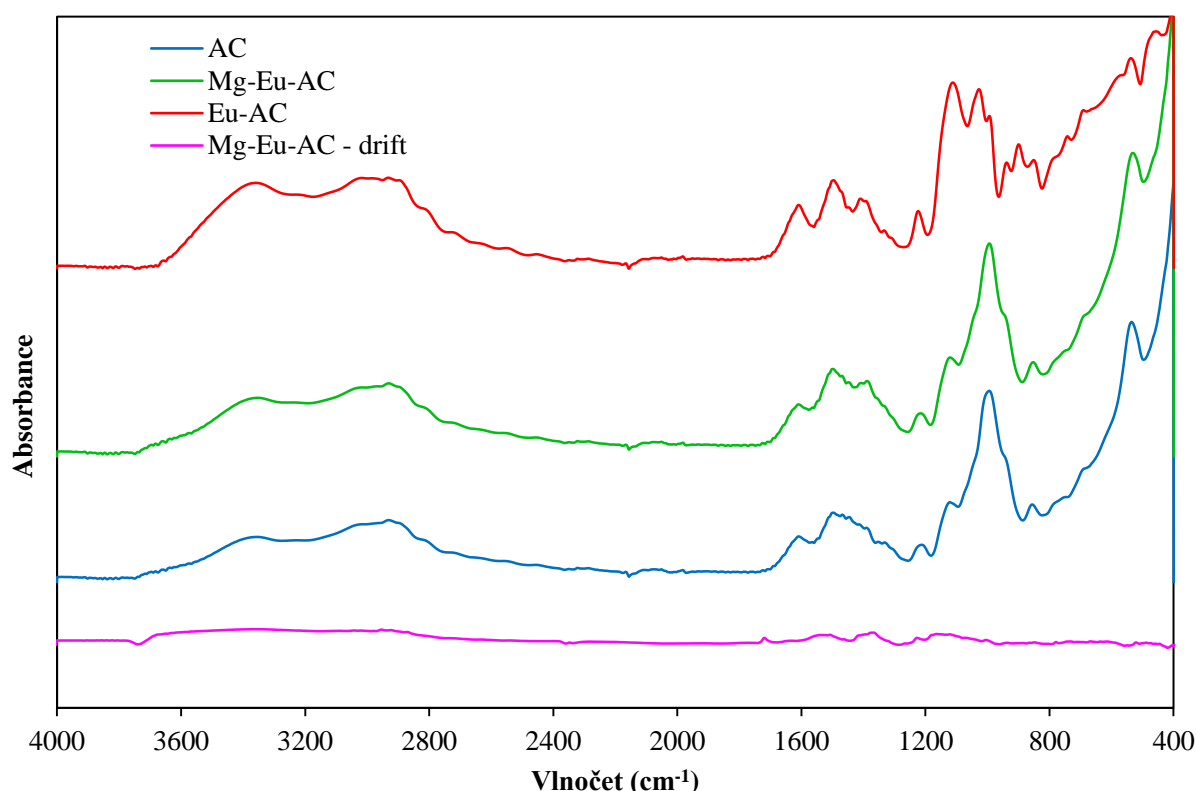
obr. 11: XRD spektra aminojílu (AC), aminojílu s inkorporovaným europiem (Eu-AC) a s inkorporovaným europiem vedle hořčíku (Mg-Eu-AC)

Závěrem lze tedy konstatovat, že inkorporaci pouze europitých iontů do struktury aminojílu došlo ke ztrátě krystalické struktury. Narušení pravidelnosti vrstevnaté struktury bylo pravděpodobně způsobeno vnesením atomu europia o větším atomovém poloměru, než má atom hořčíku. Atomový poloměr hořčíku je 145 pm a europia je 231 pm [38]. Modelováním v programu Wolfram Alpha bylo určeno, že hořečnatý kation v oktahedrálním uspořádání má poloměr 89 pm a europitý kation opět v oktahedrálním uspořádání má poloměr 107 pm.

Studiem aminojílů s obsahem europitých iontů vedle hořečnatých bylo zjištěno, že tento materiál kombinuje spektrální vlastnosti obou látek. Struktura měla opět spíše amorfni charakter, což opět může být vysvětleno vnořením europitých iontů o větším atomovém poloměru; došlo-li skutečně k inkorporaci europa vedle hořčíku, ztratily pravděpodobně jednotlivé destičky pravidelnost a došlo k jejich zvrásnění.

5.1.2 FTIR spektroskopie

Struktura aminojílů a aminojílů modifikovaných inkorporací europitých iontů byla pro doplnění XRD spekter charakterizována i pomocí FTIR spektroskopie, grafické zpracování výsledků viz obr. 12.



obr. 12: Naměřená FTIR spektra pro aminojíl (AC), aminojíl s obsahem europitých iontů vedle hořečnatých (Mg-Eu-AC), pro srovnání s aminojílem bylo naměřeno i diferenční spektrum, a aminojíl s obsahem europitých iontů (Eu-AC)

V naměřeném FTIR spektru aminojílu (obr. 12) jsou patrné charakteristické vibrace: pro vazbu Mg–O, (Mg–O–Si) je charakteristický pás v oblasti $520\text{--}550\text{ cm}^{-1}$ a pro vazbu Si–O–Si potom v oblasti $990\text{--}1\,020\text{ cm}^{-1}$. Pásky v oblasti $1\,120$ a $1\,210\text{ cm}^{-1}$ jsou charakteristické pro vazbu Si–C. Píky o vlnočtech $1\,610$ a $1\,500\text{ cm}^{-1}$ poukazují na přítomnost vazby N–H. Vazby C–H jsou zřejmé v pásech odpovídajících vlnočtům $2\,930\text{ cm}^{-1}$ (asymetrická vibrace) a $1\,470\text{ cm}^{-1}$ (charakteristická vibrace pro methylenovou skupinu) [7], [16] a [39].

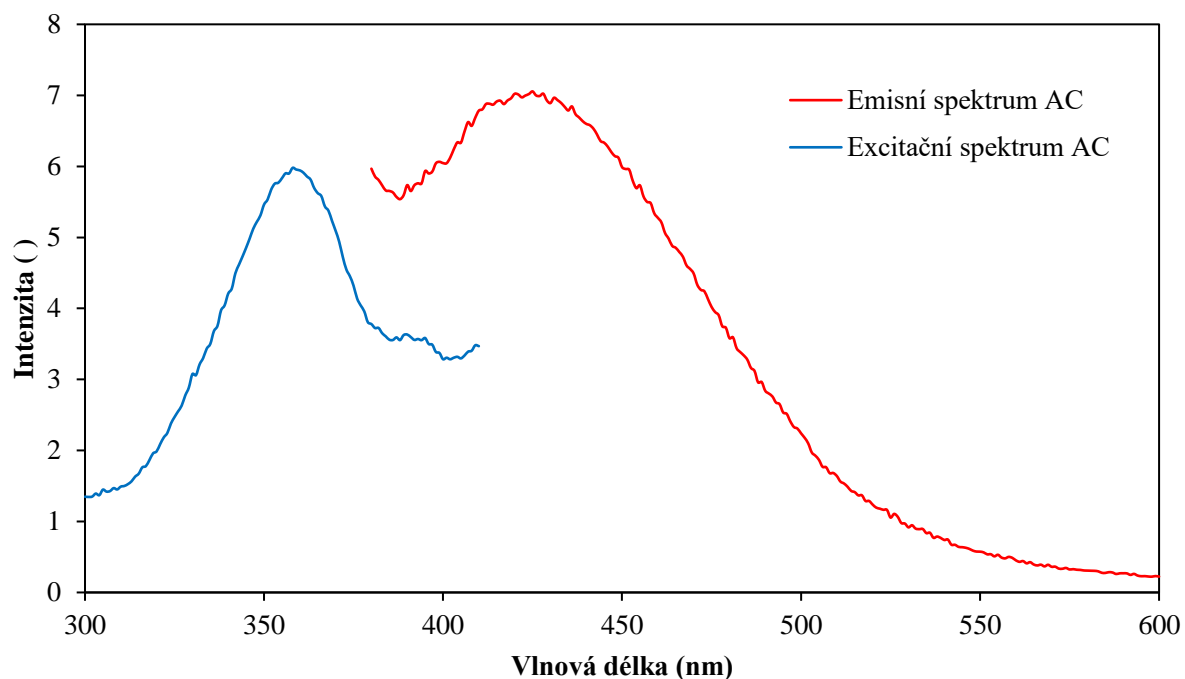
Bylo změřeno FTIR spektrum aminojílu s obsahem atomů europa místo hořčíku (Eu-AC). Polohy píků jsou shodné v porovnání spektra běžně připravovaného aminojílu, až na nepatrná posunutí, v oblasti $410\text{--}480\text{ cm}^{-1}$ se projevují vibrace vazby lanthanoid–kyslík, čili v našem případě vazby Eu–O [39] a [40].

Při porovnávání FTIR spekter aminojílu a aminojílu s inkorporovanými atomy europia vedle hořčíku (Mg-Eu-AC) nebyly pozorovány žádné výrazné rozdíly. Bylo proto naměřeno i diferenční spektrum pro tuto dvojici komplexů, kde však nejsou pozorovány žádné výrazné rozdíly. Bylo očekáváno, že v diferenčním spektru vynikne vazba Eu–O v již zmíněné oblasti 410–480 cm^{-1} .

FTIR spektroskopie tedy nepotvrdila přítomnost vazby Eu–O ve vzorku Mg-Eu-AC. Vezmeme-li v úvahu i výsledky z XRD, které na základě diskuze spekter z obr. 11 dávají možnost tušit kombinaci europitých iontů vedle hořečnatých, je možné, že se komplex Mg-Eu-AC podařilo připravit, avšak koncentrace vnesených europitých iontů je tak nízká, že vibrace vazby Eu–O ani v diferenčním spektru nevynikla. (Vibrace vazby Eu–O ve vzorku Eu-AC je také málo intenzivní.)

5.1.3 Fluorescenční spektroskopie

Bylo zjištěno, že aminojíl vykazuje autofluorescenci, proto byl zkoumán ve vodném roztoku pomocí fluorimetru Aminco Bowman Series 2. Intenzita fluorescence v roztoku o koncentraci $3 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$ byla velmi nízká. Pro její detekci bylo nutné měřit při nastavení vysokého napětí na detektoru a při šířce štěrbin 4 nm. Získaná spektra jsou uvedena na obr. 13 a je z nich patrné, že maximální absorpce záření je při vlnové délce 359 nm a maximální emise nastává při vlnové délce 425 nm. Důležité je ještě poznamenat, že emisní spektra jsou deformována Ramanovým rozptylem v oblasti kolem 410 nm.



obr. 13: Spektrální vlastnosti vodného roztoku aminojílu o koncentraci $3 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$, excitace byla při vlnové délce 360 nm a emise 420 nm, šířka štěrbin byla 4 nm

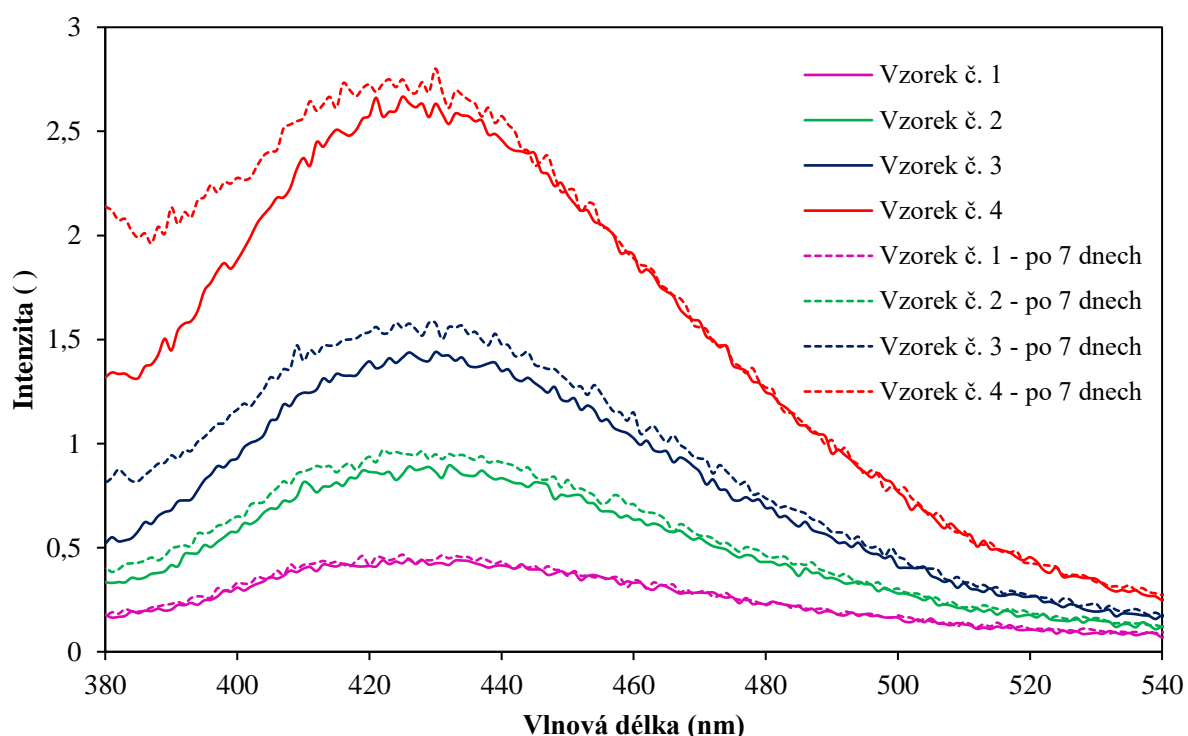
Na obr. 14 dále jsou uvedena emisní spektra vodných roztoků aminojílu o různých koncentracích, hmotnostní koncentrace jednotlivých vzorků jsou uvedeny v tab. 6. Z grafu je patrné,

že s rostoucí koncentrací aminojílu dochází k nárůstu intenzity fluorescence. Poloha maximální emisní vlnové délky se nemění.

Popsané vodné roztoky aminojílu byly ponechány v lednici po dobu 7 dnů a poté byla opět změřena emisní spektra, která jsou uvedena rovněž na obr. 14. Je patrné, že fluorescence aminojílu nemá tendenci s časem degradovat ani posouvat emisní maxima ať už ke kratším či delším vlnovým délkám. Nepatrná změna intenzity fluorescence bude pravděpodobně způsobena měřením, byť byla všechna nastavení přístroje zachována.

tab. 6: Koncentrace vzorků aminojílu ve vodném prostředí studovaných pro závislost intenzity fluorescence aminojílu na jeho koncentraci

Č. vzorku	Koncentrace aminojílu ($\text{g}\cdot\text{dm}^{-3}$)
1	1,3
2	2,9
3	4,9
4	9,7

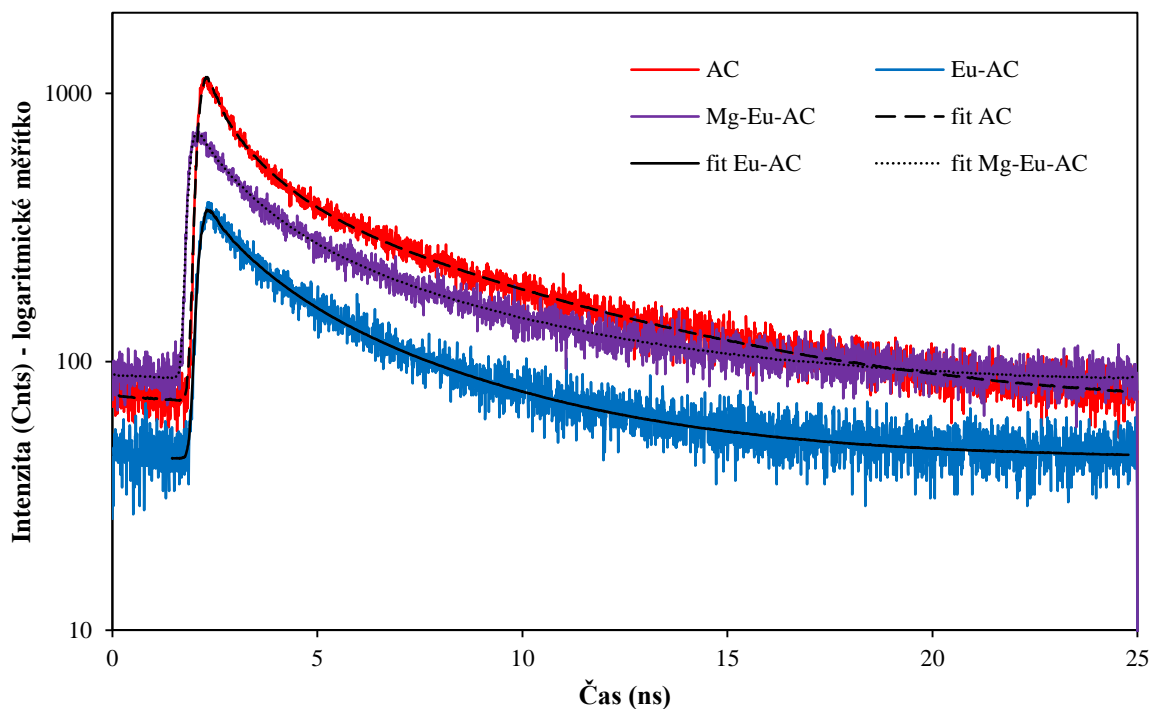


obr. 14: Studium emisních spekter aminojílu ve vodném prostředí s různou koncentrací, studium vlivu stáří vzorku, excitační vlnová délka byla 360 nm a šířka štěrbin byla 2 nm. Koncentrace jednotlivých vzorků jsou uvedeny v tab. 6

Vzorky Eu-AC a Mg-Eu-AC se ve vodném prostředí rozpouštěly neochotně. Vzniklé disperzní soustavy byly výrazně zakalené. Rozptyl excitačního záření znemožňoval detekci emisních spekter. Proto bylo emisní spektrum vzorku Eu-AC detekováno pomocí spektrografu Andor. Při excitační vlnové délce 375 nm bylo emisní maximum pozorováno při vlnové délce

490 nm. Inkorporací europitých iontů došlo k posunu emisního maxima k vyšším hodnotám vlnových délek.

Pro roztoky aminojílu, Eu-AC a Mg-Eu-AC byly měřeny doby života fluorescence. Křivky dohasínání fluorescence jsou uvedeny na obr. 15 a konkrétní doby života jsou poté vyčteny v tab. 7.



obr. 15: Křivky dohasínání fluorescence aminojílu (AC), aminojílu s inkorporovanými europitými ionty ve struktuře (Eu-AC) a aminojílu s inkorporovanými europitými ionty vedle hořečnatých (Mg-Eu-AC)

Vyhasinací křivky látek, které byly měřeny za stejných podmínek a po stejnou dobu, se liší intenzitou, což však není vypovídající, protože koncentrace obou vzorků nebyly shodné. Byť je znám molekulový vzorec aminojílu, nemusí odpovídat skutečnosti, velikosti jednotlivých celků se mohou lišit. Molekulové vzorce systémů Eu-AC ani Mg-Eu-AC nejsou známy, stejně tak jako nejsou určena konkrétního luminiscenční centra. Z diskutovaných důvodů není možné připravit systémy o stejné molární koncentraci anebo o stejné koncentraci luminiscenčně aktivních center.

Vzhledem k nízké intenzitě fluorescence probíhala měření doby života relativně dlouhou dobu, i tak byl počet detekovaných fotonů nižší, než bývá pro tyto analýzy požadován (cca 10^4). Z toho důvodů nemusí jednotlivé doby života získané dekonvolucí plně odpovídat reálnému stavu. Dalším nepříjemným jevem byl Ramanský rozptyl projevující se při vlnové délce cca 435 nm, kvůli tomu musela být snímána emise záření vyšší než 460 nm (filtr 460 LP), kde však je už intenzita fluorescence aminojílu i jeho derivátů nízká.

Křivky dohasínání fluorescence byly vyhodnoceny pomocí dekonvoluce a byly získány tři doby života aminojílu, Eu-AC i Mg-Eu-AC, které nejsou totožné, viz tab. 7. Uvedené nejkratší

doby života aminojílu, Eu-AC a Mg-Eu-AC ($0,014 \pm 0,001$) ns, ($0,023 \pm 0,002$) ns, resp. ($0,020 \pm 0,009$) ns bude pravděpodobně příslušet nějakému fyzikálnímu jevu, pro dobu života excitovaného stavu se jedná o velmi krátkou dobu. Teoreticky by se mohlo jednat o tzv. dorotaci, která by však byla charakteristickým jevem spíš pro malé organické molekuly, destičky aminojílu jsou poměrně velké systémy a jejich rotace by neměla být výrazným jevem.

Budeme-li brát v úvahu průměrnou dobu života váženou na základě intenzity fluorescence všech tří diskutovaných aminojílů, je možné tvrdit, že se jednotlivé modifikace aminojílu podepsaly i na době života fluorescence. Nejdelší dobu života má aminojíl s nepozměněnou vnitřní strukturou (tj. obsahuje pouze hořčnaté ionty), konkrétně ($4,70 \pm 0,05$) ns, inkorporací europia namísto hořčíku došlo ke vzniku systému Eu-AC, který má dobu života kratší o přibližně 22 %, tj. ($3,65 \pm 0,05$) ns, hodnota doby života Mg-Eu-AC leží poté mezi zmíněnými, byla oproti aminojílu kratší ($3,9 \pm 0,1$) ns, tj. přibližně o 17 %. Diskutované časové údaje jsou uvedeny v tab. 7.

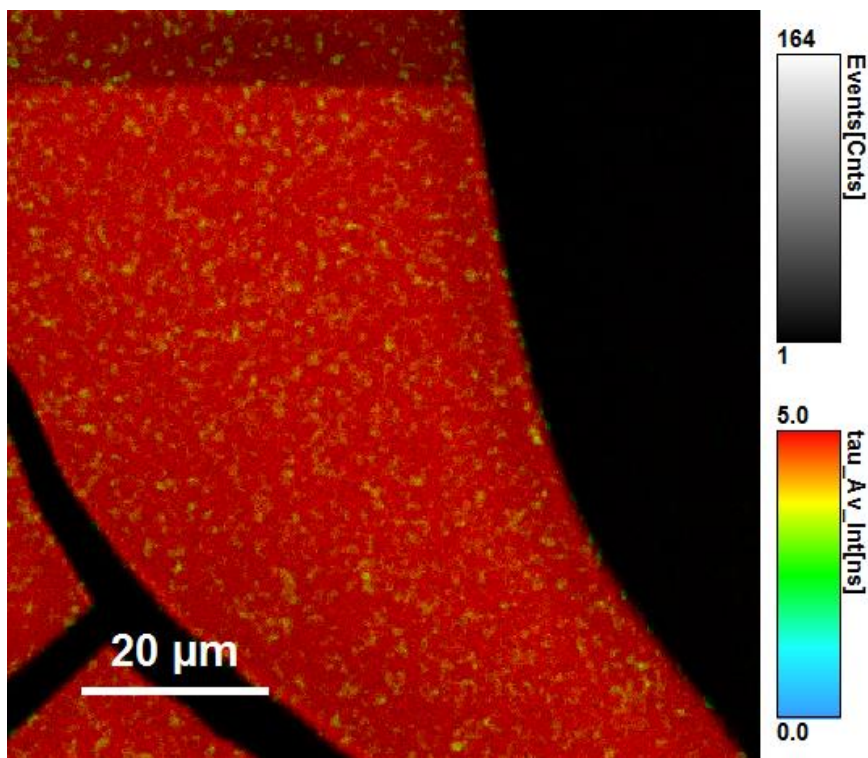
Na základě získaných výsledků je patrné, že vnesení europitých iontů do struktury aminojílu má za následek snížení doby života fluorescence. Je možné předpokládat, že změnou poměrů mezi europitými a hořčnatými ionty by bylo možné dosáhnout požadované doby života ležící v intervalu 3,9–4,7 ns.

tab. 7: Doby života vodných roztoků aminojílu (AC), aminojílu s inkorporovanými europitými ionty ve struktuře (Eu-AC) a aminojílu s inkorporovanými europitými ionty vedle hořčnatých (Mg-Eu-AC)

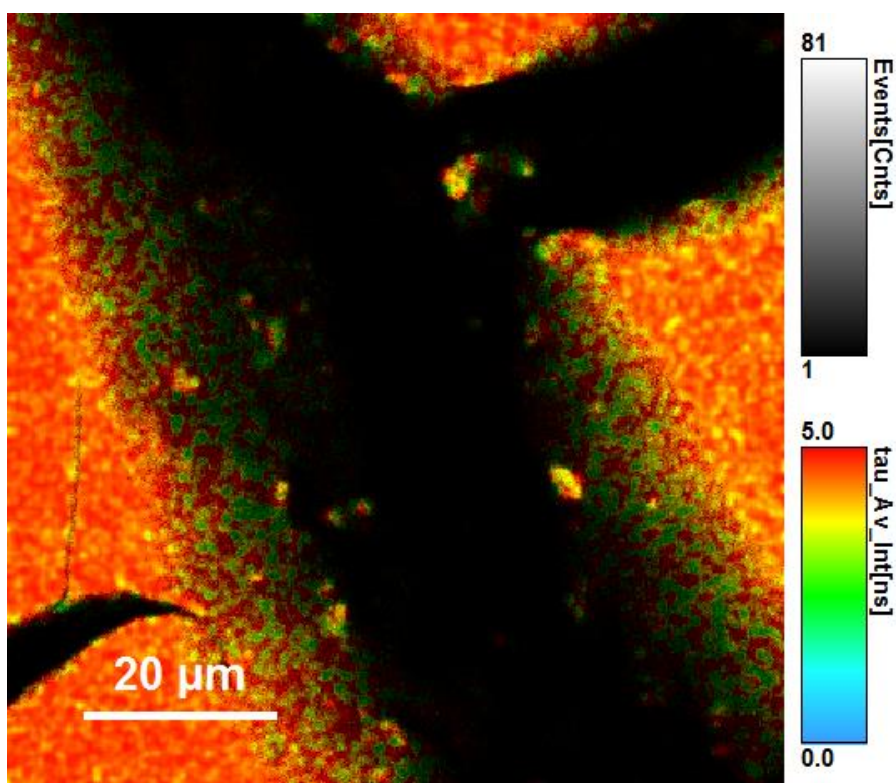
Vzorek	AC	Eu-AC	Mg-Eu-AC
Doba života fluorescence τ_1 (ns)	$6,3 \pm 0,1$	$4,7 \pm 0,1$	$5,2 \pm 0,2$
Amplituda A_1 (kCnts)	$0,37 \pm 0,01$	$0,17 \pm 0,01$	$0,26 \pm 0,02$
Doba života fluorescence τ_2 (ns)	$1,12 \pm 0,04$	$1,29 \pm 0,06$	$1,24 \pm 0,07$
Amplituda A_2 (kCnts)	$0,45 \pm 0,01$	$0,13 \pm 0,01$	$0,28 \pm 0,01$
Doba života fluorescence τ_3 (ns)	$0,014 \pm 0,001$	$0,023 \pm 0,002$	$0,020 \pm 0,009$
Amplituda A_3 (kCnts)	32 ± 3	5 ± 1	11 ± 10
Průměrná doba života vážená podle intenzity fluorescence τ (ns)	$4,70 \pm 0,05$	$3,65 \pm 0,05$	$3,90 \pm 0,10$

Pevné vzorky aminojílu, Mg-Eu-AC a Eu-AC byly podrobeny analýze FLIM, a to za účelem detekce případných luminiscenčních center, zjištění homogenity těchto center a dále za účelem získání dob života aminojílu a jeho modifikovaných analogů. Výstupy z měření jsou v grafické podobě prezentovány na obr. 16, obr. 17 a na obr. 18.

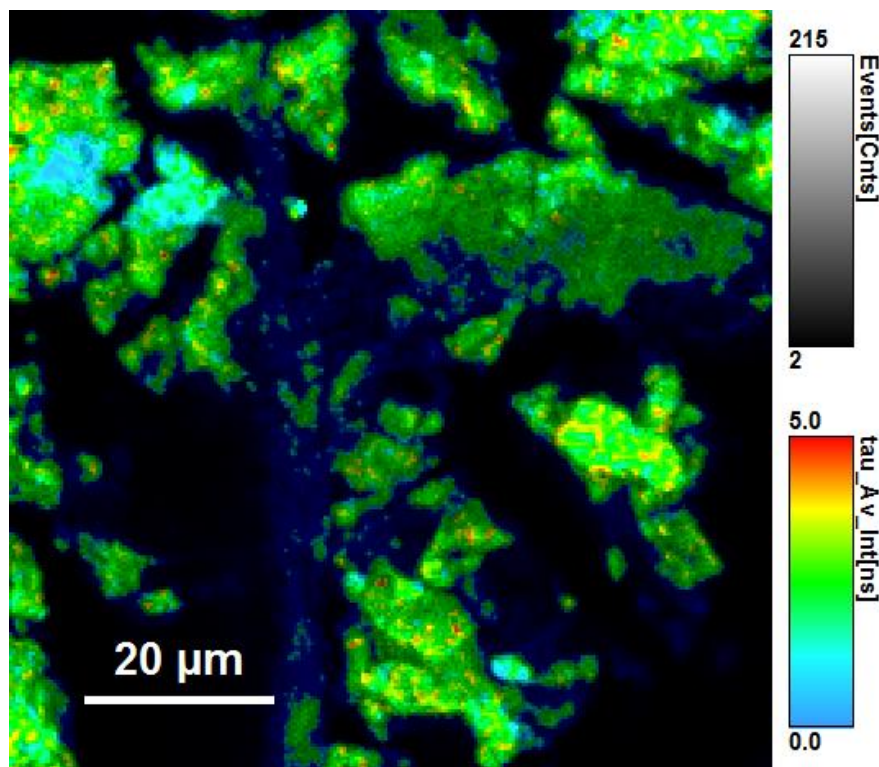
Vyhodnocením pomocí dekonvoluční analýzy byly získány doby života jednotlivých vzorků. Doby života jsou uvedeny v tab. 8 a z údajů je patrné, že doba života studovaných vzorků závisí na tom, zda jsou v pevném stavu anebo ve formě roztoku.



obr. 16: FLIM pevného aminojílu, černobilou škálou vyjadřující jas je znázorněn počet událostí (popisek events) a v barevné škále je znázorněna střední hodnota doby života průměrovaná přes intenzity fluorescence (popisek tau)



obr. 17: FLIM pevného vzorku Mg-Eu-AC, černobilou škálou vyjadřující jas je znázorněn počet událostí (popisek events) a v barevné škále je znázorněna střední hodnota doby života průměrovaná přes intenzity fluorescence (popisek tau)



obr. 18: FLIM pevného vzorku Eu-AC, černobílou škálou vyjadřující jas je znázorněn počet událostí (popisek events) a v barevné škále je znázorněna střední hodnota doby života průměrovaná přes intenzity fluorescence (popisek tau)

tab. 8: Doby života pevných vzorků aminojílu (AC), aminojílu s inkorporovanými europitými ionty ve struktuře (Eu-AC) a aminojílu s inkorporovanými europitými ionty vedle hořčnatých (Mg-Eu-AC)

Vzorek	AC	Eu-AC	Mg-Eu-AC
Doba života fluorescence τ_1 (ns)	$7,9 \pm 0,1$	$0,8 \pm 0,1$	$6,9 \pm 0,3$
Amplituda A_1 (kCnts)	$7,02 \pm 0,07$	$7,56 \pm 0,03$	$3,50 \pm 0,09$
Doba života fluorescence τ_2 (ns)	$2,59 \pm 0,03$	$3,63 \pm 0,03$	$2,22 \pm 0,09$
Amplituda A_2 (kCnts)	$7,5 \pm 0,1$	$1,6 \pm 0,1$	$3,1 \pm 0,2$
Doba života fluorescence τ_3 (ns)	$0,95 \pm 0,01$		$0,97 \pm 0,04$
Amplituda A_3 (kCnts)	$6,5 \pm 0,1$		$2,1 \pm 0,3$
Průměrná doba života vážená podle intenzity fluorescence τ (ns)	$6,09 \pm 0,04$	$2,15 \pm 0,01$	$5,61 \pm 0,09$

Dle podmínek měření bylo zjištěno, že aminojíl má ze všech tří modifikovaných struktur nejintenzivnější fluorescenci, na snímku na obr. 16 je patrná homogenní struktura vzorku, není možné určit luminiscenčně aktivní centrum. Zajímavým pozorovaným jevem bylo, že všechny tři doby života diskutované v tab. 8 mají obdobné zastoupení, což může být dáno strukturou aminojílu. Aminojíl má sám o sobě objemnou strukturu a luminiscenční centra, která jsou pravděpodobně způsobena defekty, jsou v různé hloubce této objemné struktury, což může mít vliv na dobu života fluorescence.

Vnesením europitých iontů do struktury aminojílu a tvorbou vzorku Eu-AC došlo ke značnému snížení doby života fluorescence oproti aminojílu – doba života se snížila z hodnoty $(6,09 \pm 0,04)$ ns o více než polovinu na $(2,150 \pm 0,009)$ ns. Pravděpodobně atomy europia rozrušily strukturu aminojílu (což bylo potvrzeno i pomocí XRD) a mohly pozměnit defekty způsobující luminiscenci.

Inkorporací europitých iontů vedle hořečnatých do vzorku Mg-Eu-AC došlo oproti Eu-AC ke zvýšení doby života na více než dvojnásobek, na $(5,6 \pm 0,1)$ ns. Doba života Mg-Eu-AC se blíží době života vzorku aminojílu. Jak již bylo poznamenáno při studiu roztoků těchto vzorků, je možné předpokládat, že obměňováním poměrů atomů hořčíku a europia by bylo možné ladit i dobu života luminiscence.

Skutečné doby života aminojílu a jeho analogů se mohou od experimentálně stanovených mírně lišit. Je totiž možné, že dekonvoluční analýza získaných dat za účelem získání jednotlivých dob života, která se běžně používá při vyhodnocování kinetických informací organických fluoroforů, není pro aminojíl vhodnou metodou. Vhodnější metodou by mohlo být proložení získaných dat tzv. protaženými („stretched“) exponenciálními funkcemi, touto možností však program SymPhoTime 64 využívaný k vyhodnocení naměřených údajů nedisponuje.

5.2 Charakterizace komplexů aminojílu značených fluorescenčními sondami

Komplexy aminojílu s fluorescenčními sondami ANS, merocyaninem, antracem, pyrenem a PDA se pouhým smísením roztoků nepodařilo připravit. Vizuelním porovnáním (změna tvorby zákalu, změna zabarvení vzorku, fluorescence pozorovatelná pod UV lampou) vodných roztoků komplexů s roztokem aminojílu nedošlo k žádné změně. Naměřená emisní spektra těchto komplexů tvarem a intenzitou kopírovala emisní spektra naměřená pro samotný aminojíl.

Bylo však zjištěno, že při zahřívání vodného roztoku aminojílu v přítomnosti PDA dochází k interakci aminojílu s touto fluorescenční sondou. Pakliže byly zahřívány vzorky s obsahem ANS, merocyaninu, antracenu nebo pyrenu v přítomnosti aminojílu, nebyly pozorovány rozdíly v emisních spektrech ani v intenzitách fluorescence v porovnání s vodným roztokem aminojílu.

Z roztoku se nepodařilo izolovat aminojíl značený fluorescenční sondou PDA. Izolace probíhala přesrážením vodného roztoku připraveného komplexu ethanolem a následným promytím. Po vysušení byla získána jemně nažloutlá krystalická látka (vizuelně stejná jako aminojíl), jejíž spektrální vlastnosti byly stejné jako spektrální vlastnosti aminojílu. Na základě tohoto experimentu je usuzováno, že interakce aminojílu s PDA je nestabilní a je čistě elektrostatické povahy; z toho důvodu byly zkoumány spektrální vlastnosti komplexů AC-PDA pouze ve formě roztoku.

5.2.1 Fluorescenční spektroskopie

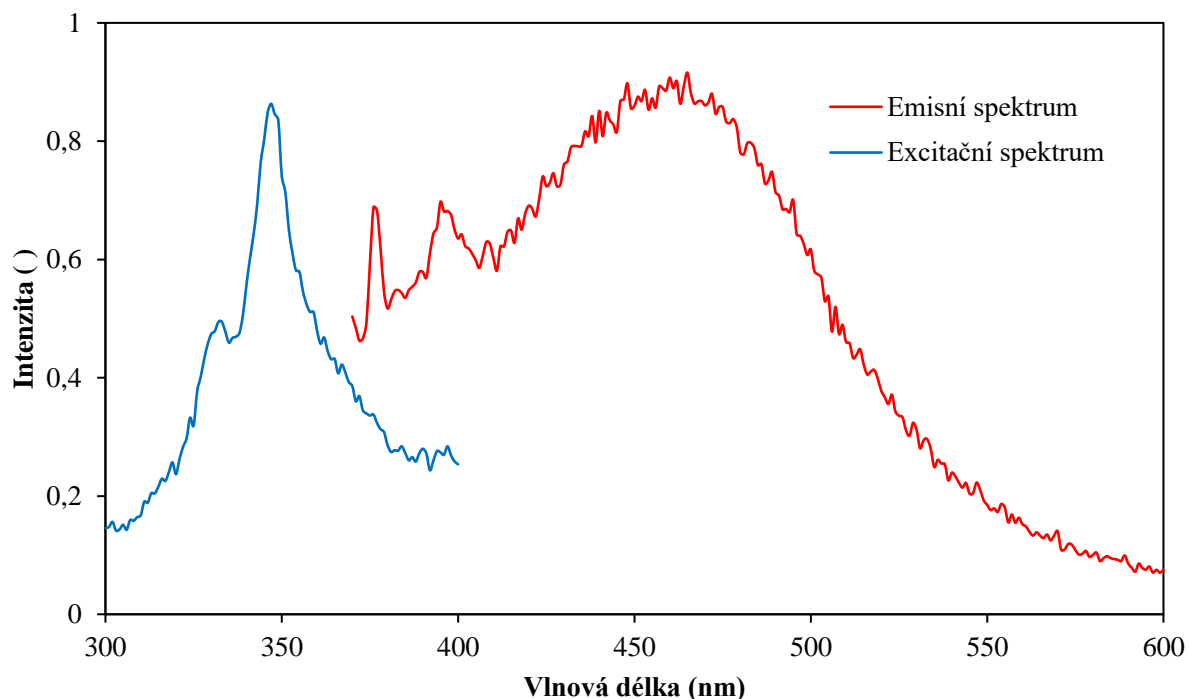
Komplex AC-PDA byl spektrálně charakterizován. FTIR spektroskopie neměla dostatečně vypovídající hodnotu, protože koncentrace PDA byla ve vzorcích příliš nízká a vibrace hledaných vazeb byly na úrovni šumu, navíc měření značně komplikovala přítomnost vody. Z toho

důvodu byla provedena pouze charakterizace vzorku AC-PDA ve vodném prostředí pomocí fluorescenční spektroskopie.

Na obr. 19. jsou uvedena excitační a emisní spektra komplexu AC-PDA, který oproti aminojílu nemá výrazně intenzivnější fluorescenci (porovnání emisních spekter aminojílu a AC-PDA je dále až na obr. 20). Nicméně u vzorku AC-PDA došlo k posunu emisního maxima na hodnotu 465 nm a při kratších vlnových délkách jsou dále pozorovatelná lokální maxima v oblastech 377 a 397 nm – polohy maxim poukazují na přítomnost PDA v systému (viz tab. 4).

Maximum emise při vlnové délce 465 nm poukazuje na tvorbu excimeru PDA. V již diskutované literatuře [35] je popsána tvorba excimerů v nepolárních rozpouštědlech typu cyklohexanu, přidavkem polárních rozpouštědel je narušena tvorba vodíkových můstků mezi karboxylovými skupinami PDA. Pro srovnání byla zjišťována i spektrální charakteristika samotné PDA ve vodě (vzorek byl připraven za stejných podmínek jako vzorky AC-PDA, tj. i působením zvýšené teploty), avšak nebyla pozorována žádná fluorescence; PDA je ve vodě nerozpustná. Na základě tohoto experimentu je možné předpokládat, že přítomnost aminojílu zvyšuje rozpustnost PDA a podporuje tvorbu struktur podobných excimerům vykazujících fluorescenci o odpovídající vlnové délce.

Další změnou oproti spektrálním charakteristikám roztoku aminojílu je tvar excitačního spektra, kde přibylo lokální excitační maximum v oblasti kolem 330 nm, k nejintenzivnější excitaci dochází při dopadu záření o vlnové délce 350 nm.



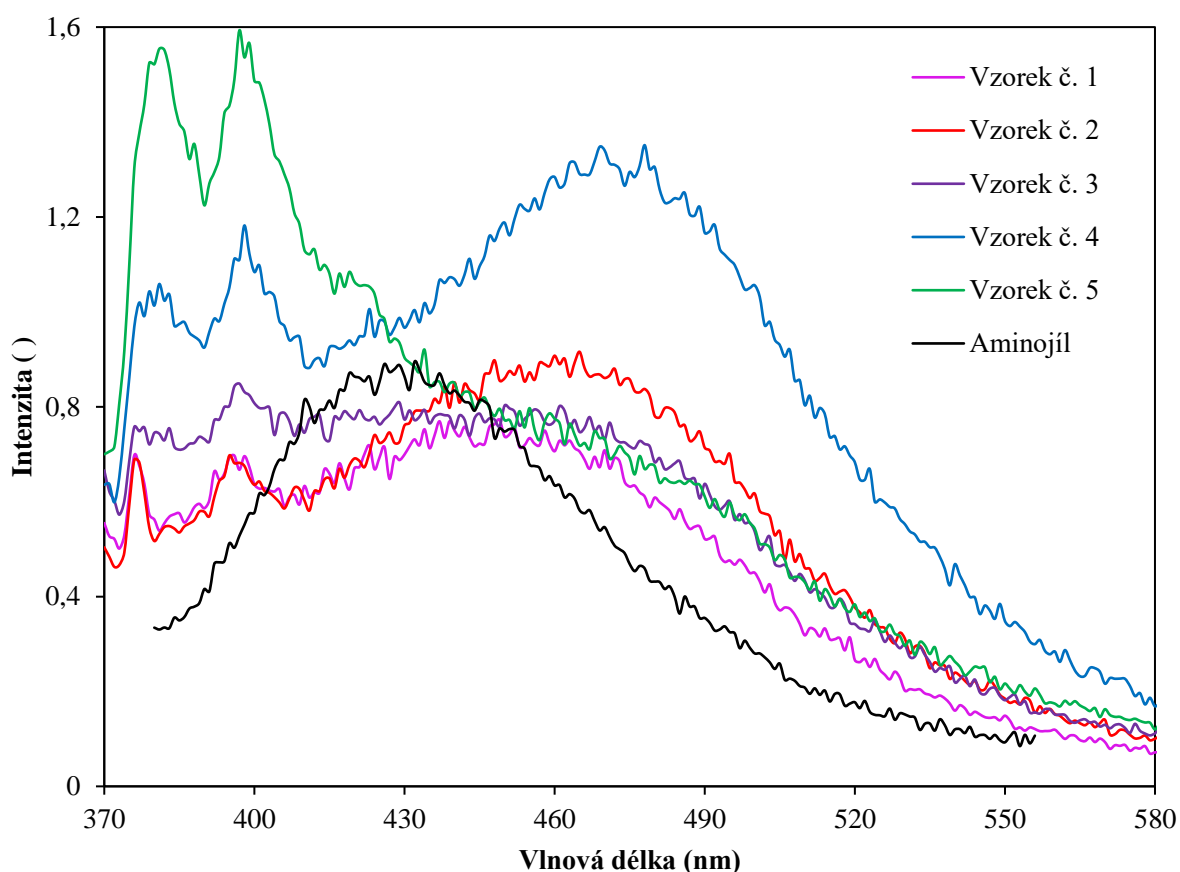
obr. 19: Spektrální charakteristika komplexu AC-PDA, excitační vlnová délka byla 350 nm a emisní vlnová délka byla 460 nm, šířka štěrbin byla nastavena na 2 nm

Dále byl studován vliv změny koncentrace fluorescenční sondy ve vzorku. Koncentrace PDA v daných vzorcích jsou uvedeny v tab. 9. Naměřená emisní spektra jsou poté uvedena

na obr. 20, pro porovnání je v grafu uvedeno i emisní spektrum samotného aminojílu o odpovídající koncentraci, které bylo změřeno za stejných podmínek jako vzorky AC-PDA.

tab. 9: Koncentrace PDA ve studovaných vzorcích komplexu AC-PDA, koncentrace aminojílu byla $3 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$.

Č. vzorku	Koncentrace PDA ($\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$)
1	$1,5\cdot 10^{-6}$
2	$3,0\cdot 10^{-6}$
3	$6,0\cdot 10^{-6}$
4	$1,2\cdot 10^{-5}$
5	$1,5\cdot 10^{-5}$



obr. 20: Spekrální charakteristiky komplexů AC-PDA se vzrůstajícím obsahem fluorescenční sondy (konkrétní hodnoty koncentrací fluorescenční sondy ve vzorcích jsou uvedeny v tab. 9). Excitační vlnová délka byla 375 nm, šířka štěrbin byla nastavena na 2 nm. Pro porovnání bylo přidáno i emisní spektrum aminojílu měřeno za stejných podmínek jako komplexy AC-PDA

Výsledky dosažené obměňováním koncentrace fluorescenční sondy jsou prezentovány v grafické podobě na obr. 20. Elektrostatickým navázáním PDA na strukturu aminojílu byly získány komplexy vykazující luminiscenci s maximální emisní vlnovou délkou ležící v rozmezí 465–475 nm.

Při realizaci popsaného experimentu bylo předpokládáno, že s rostoucí koncentrací fluorescenční sondy bude vzrůstat i intenzita fluorescence vzorků. Tento trend je skutečně pozorován na emisních maximech v oblastech okolo 380 a 400 nm. U maxim při delších vlnových délkách nelze intenzitu emise popsat jednoduchým trendem.

V oblasti kolem 475 nm fluoreskoval nejintenzivněji vzorek o koncentraci $1,20 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ PDA, naopak nejmenší intenzitu vykazoval vzorek o koncentraci $1,5 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ PDA. Lze předpokládat, že při vyšší koncentraci PDA (viz průběh emisního spektra vzorku č. 5) dochází k omezení tvorby excimerů. Což bylo již popsáno v literatuře [35].

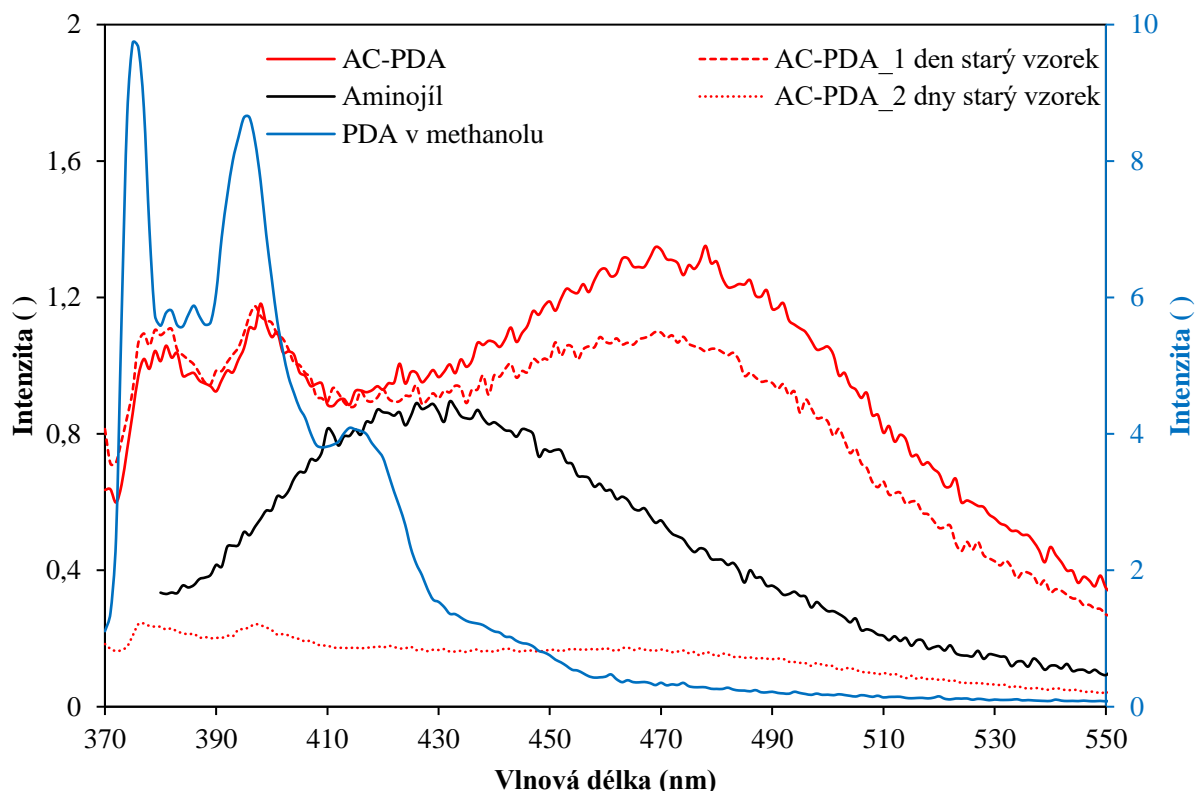
Dále je důležité vzít v potaz, že se PDA k aminojílu pravděpodobně nevázala rovnoměrně, ale čistě nahodile. Studované vzorky nebyly dostatečně homogenní, byl v nich totiž pozorován vznik zákalu a výjimečně malých agregátů (vysvětlení kolísání intenzity fluorescence mezi vzorky č. 2 a 3). Vzhledem k nepolárnímu charakteru fluorescenční sondy mohlo „obalením“ aminojílu dojít k omezení jeho rozpustnosti, což mohlo vést ke tvorbě agregátů a způsobovat nehomogenitu vzorků a zhaset fluorescenci při větších vlnových délkách. Nicméně k sedimentaci při měření dle vizuálního hodnocení vzorků v kyvetě nedocházelo.

Neméně zajímavým pozorovaným jevem bylo, že se s rostoucí koncentrací posouvala vlnová délka emisního maxima k vyšším hodnotám. Vzorek č. 1 o koncentraci $1,5 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ PDA měl emisní maximum při vlnové délce 465 nm a vzorek č. 4 o koncentraci $1,20 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ PDA měl emisní maximum při vlnové délce 475 nm. U koncentrovanějšího vzorku, jak již bylo popsáno, je fluorescence zhasena.

Byla dále studována případná degradace komplexu AC-PDA ve vzorku č. 4, viz obr. 21, kde je pro porovnání vloženo i emisní spektrum aminojílu a PDA v roztoku methanolu. PDA vykazovala velmi intenzivní fluorescenci, proto byly hodnoty intenzity vyneseny na vedlejší osu.

Ze spektrálních charakteristik je patrné, že při skladování elektrostaticky značeného aminojílu pomocí PDA dochází k degradaci. Maximální emisní vlnová délka se po jednom dni snížila z hodnoty 470 nm na 450 nm, což je hypsochromní posun o 20 nm. Zároveň došlo i ke snížení intenzity fluorescence. Píky v oblastech kratších vlnových délek, tj. kolem 380 a 400 nm se po jednom dni nijak výrazně nezměnily. Vzorek byl skladován v lednici, čili v temném chladném místě.

Vzhledem k nepolárnímu charakteru PDA a ke skutečnosti, že je tato fluorescenční sonda nerozpustná ve vodě, je možné předpokládat, že dochází k oslabení elektrostatické interakce s aminojílem. Fluorescenční sonda však může rovněž oslabovat rozpustnost aminojílu jeho obalením a způsobovat tak vysrážení komplexu AC-PDA; opět byly v připravených vzorcích pozorovány drobné agregáty, které měly tendenci s časem ulpívat na stěnách. Poslední zmíněná teorie by podporovala skutečnost pozorovaného poklesu intenzity fluorescence, kde není patrný náznak tvaru emisního spektra aminojílu.



obr. 21: Spektrální charakteristika komplexu AC-PDA a studium jeho degradace. Pro srovnání jsou v grafu uvedena emisní spektra aminojílů a PDA v methanolu měřená za stejných podmínek. Excitační vlnová délka byla 350 nm, šířka excitační štěrbin byla nastavena na 2 nm

Pro doplnění studia spektrálních vlastností byla měřena i časově rozlišená spektroskopie. Dekonvolucí vyhasínací křivky byly získány doby života excitovaného stavu, které jsou vyčteny v tab. 10. Byly zjištěny tři doby života, z nichž ta nejkratší 0,022 ns bude pravděpodobně příslušet nějakému fyzikálnímu jevu probíhajícímu v systému. Oproti samotnému aminojílů došlo ke zvýšení průměrné doby života vážené podle intenzity fluorescence, a to z hodnoty $(4,70 \pm 0,05)$ ns na $(6,3 \pm 0,1)$ ns.

tab. 10: Doby života komplexu AC-PDA

Vzorek	AC-PDA
Doba života fluorescence τ_1 (ns)	$7,49 \pm 0,09$
Amplituda A_1 (kCnts)	$0,30 \pm 0,01$
Doba života fluorescence τ_2 (ns)	$1,24 \pm 0,05$
Amplituda A_2 (kCnts)	$0,26 \pm 0,01$
Doba života fluorescence τ_3 (ns)	$0,022 \pm 0,002$
Amplituda A_3 (kCnts)	8 ± 1
Průměrná doba života vážená podle intenzity fluorescence τ (ns)	$6,29 \pm 0,09$

6 Závěr

V rámci diplomové práce byla studována možnost vizualizace aminojílu pomocí metod fluorescenční spektroskopie. Jak bylo diskutováno v teoretické části, aminojíl může být díky svým vlastnostem využit zejm. v oblasti medicínských aplikací. Aminojíl především vykazuje antibakteriální vlastnosti, je schopen interakce s celou řadou biomolekul a také zlepšuje rozpustnost málo rozpustných látek a zvyšuje jejich organizovanost. Pro posouzení využitelnosti aminojílu v medicínských aplikacích je důležité mít možnost jeho vizualizace v živých soustavách.

K vizualizaci aminojílu je na základě studia literatury diskutované v kapitole zabývající se současným stavem řešené problematiky možné přistupovat třemi různými způsoby. Prvním způsobem je možnost využití autofluorescence aminojílu, kterou je teoreticky možné podpořit implementací vhodných atomů do anorganické matrice. Druhou možností je interakce aminojílu s fluorescenčními sondami obsahujícími kyselou funkční skupinu. A posledním možným přístupem je kovalentní modifikace primárních aminoskupin vystupujících z povrchu aminojílu.

Předložená diplomová práce se zabývala charakterizací autofluorescence aminojílu a vlivem inkorporovaných atomů europia na jeho vlastnosti a dále byla zkoumána možnost značení aminojílu pomocí elektrostatických interakcí s organickými fluorescenčními sondami.

Aminojíl je sám o sobě schopen fluorescence, a to jak v pevné fázi, tak i v roztocích. Původ fluorescence je přisuzován defektům v anorganické matici. Maximální excitační vlnová délka aminojílu v roztoku je při 359 nm a maximální emisní vlnová délka poté činí 425 nm. Průměrná doba života fluorescence aminojílu v roztoku vážená na základě intenzity je $(4,70 \pm 0,05)$ ns a v pevné fázi $(6,09 \pm 0,04)$ ns. Vnesením atomů europia do struktury aminojílu místo hořčnatých iontů došlo ke vzniku Eu-AC, vznik byl potvrzen pomocí FTIR spektroskopie a XRD analýzou. Intenzita fluorescence Eu-AC byla nižší než samotného aminojílu, rovněž došlo ke snížení doby života. V roztoku byla doba života určena $(3,65 \pm 0,05)$ ns a v pevné fázi $(2,150 \pm 0,009)$ ns. Inkorporací europitých iontů vedle hořčnatých byl připraven Mg-Eu-AC, jehož doba života v roztoku byla stanovena $(3,9 \pm 0,1)$ ns a v pevné fázi $(5,6 \pm 0,1)$ ns.

Vnášením europitých iontů do struktury aminojílu dochází ke snížení intenzity fluorescence a ke zkrácení doby jejího života, dále nastává i ztráta krystalického charakteru. Vodné disperzní soustavy Eu-AC a Mg-Eu-AC nejsou čiré ve srovnání s aminojílem – rozpustnost aminojílu modifikovaného europiem je tedy omezenější.

Byť je intenzita fluorescence aminojílu ve vodném prostředí slabá, je dostatečná pro využití technik fluorescenční mikroskopie. Výhodou aminojílu je ve srovnání s ostatními organickými fluorofory relativně dlouhá doba života fluorescence, která může být navíc i laděna vnesením např. diskutovaných europitých iontů do anorganické matrice. Je tedy možné aminojíl ve studovaných systémech identifikovat a sledovat právě díky volitelné době života fluorescence.

Druhá polovina experimentální části byla zaměřena na studium schopnosti elektrostatické interakce aminojílu s fluorescenčními sondami. Aminojíl je schopen ve vodném prostředí interagovat s pyrendodekanovou kyselinou (PDA). Vzniklý komplex vykazoval vyšší intenzitu

fluorescence než samotný aminojíl a delší průměrnou dobu života, a to $(6,3 \pm 0,1)$ ns. Dále nastal posun emisního maxima k vyšším vlnovým délkám. Konkrétní maximální emisní vlnová délka závisela na koncentraci PDA, která v přítomnosti aminojílu vytvářela komplexy spektrálně podobné excimerům, jejichž vznik je pozorován v nepolárních rozpouštědlech. Maximální emisní vlnová délka se pohybovala v intervalu 456–475 nm; s rostoucí koncentrací PDA ve vzorku docházelo k posunu maxima k delším vlnovým délkám, až do koncentrace $1,20 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ PDA, koncentrace aminojílu ve studovaných vzorcích byla $3 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$. Maximální excitační vlnová délka byla pro všechny studované vzorky shodná, a to 375 nm.

Vodní disperze AC-PDA nebyla homogenního charakteru a měla s časem tendenci degradovat, z toho důvodu není tento komplex vhodný pro studium vlastností aminojílu v biologických soustavách pomocí technik fluorescenční spektroskopie.

Pro značení aminojílu pomocí organických molekul vykazujících fluorescenci je doporučeno využít tvorby kovalentní vazby mezi primární aminoskupinou aminojílu a funkční skupinou fluorescenční sondy typu isothiokyanátu, sukcinimidyl esteru, chloridu sulfonové kyseliny, popř. aldehydu. Další možností je využití tvorby aminojílu značeného fluorescein-5-isothiokyanátem (FITC), tento systém byl popsán skupinou Young-Chul Lee [7].

Potenciální nevýhodou kovalentního značení aminojílu je modifikace jeho povrchu, kdy stericou zábranou může dojít k zablokování kladného náboje na povrchu aminojílu a k omezení interakce s jinými látkami. Je tedy potřeba se této problematice dále věnovat, a v případě kovalentního značení aminojílu optimalizovat množství vneseného fluoroforu.

7 Literatura

- [1] DATTA, K. K. R., A. ACHARI a M. ESWARAMOORTHY. Aminoclay: a functional layered material with multifaceted applications. *Journal of Materials Chemistry A* [online]. 2013, **1**(23), 6707-6718 [cit. 2017-03-08]. DOI: 10.1039/c3ta00100h. ISSN 20507488. Dostupné z: <http://pubs.rsc.org/en/Content/ArticleLanding/2013/TA/c3ta00100h#!divAbstract>
- [2] PROCHÁZKOVÁ, A. *Interakce aminojílů s polyelektrolyty přírodního původu*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2015. 35 s. Vedoucí bakalářské práce prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
- [3] LEE, Young-Chul, Yoo-Sung CHOI, Minkee CHOI, Hetong YANG, Kechun LIU a Hyun-Jae SHIN. Dual-end functionalized magnesium organo-(phyllo)silicates via co-condensation and its antimicrobial activity. *Applied Clay Science* [online]. Elsevier B.V, 1310, **83-84**, 474-485 [cit. 2017-03-08]. DOI: 10.1016/j.clay.2012.10.007. ISSN 01691317. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com.ezproxy.lib.vutbr.cz/science/article/pii/S0169131712002657>
- [4] CHANDRASEKARAN, Gayathri, Hyo-Kyung HAN, Geun-Joong KIM a Hyun-Jae SHIN. Antimicrobial activity of delaminated aminopropyl functionalized magnesium phyllosilicates. *Applied Clay Science* [online]. Elsevier B.V, 2011, **53**(4), 729-736 [cit. 2017-03-09]. DOI: 10.1016/j.clay.2011.07.001. ISSN 01691317. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com.ezproxy.lib.vutbr.cz/science/article/pii/S0169131711002407>
- [5] CHOI, Hyoung-An, Young-Chul LEE, Jin-Young LEE, Hyun-Jae SHIN, Hyo-Kyung HAN a Geun-Joong KIM. A simple bacterial transformation method using magnesium- and calcium-aminoclays. *Journal of Microbiological Methods* [online]. Elsevier B.V, 1311, **95**(2), 97-101 [cit. 2017-03-09]. DOI: 10.1016/j.mimet.2013.07.018. ISSN 01677012. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com.ezproxy.lib.vutbr.cz/science/article/pii/S0167701213002352>
- [6] HAN, Hyo-Kyung, Young-Chul LEE, Moo-Yeol LEE, Avinash J. PATIL a Hyun-Jae SHIN. Magnesium and Calcium Organophyllosilicates: Synthesis and In vitro Cytotoxicity Study. *Acs Applied Materials & Interfaces* [online]. 2011, **3**(7), 2564-2572 [cit. 2017-03-10]. DOI: 10.1021/am200406k. ISSN 19448244. Dostupné z: <http://pubs.acs.org.ezproxy.lib.vutbr.cz/doi/abs/10.1021/am200406k>
- [7] LEE, Young-Chul, Tae-Ho LEE, Hyo-Kyung HAN, Woon Jung GO, Ji-Won YANG a Hyun-Jae SHIN. Optical Properties of Fluorescein-labeled Organoclay. *Photochemistry and Photobiology* [online]. Oxford, UK: Blackwell Publishing, 1005, **86**(3), 520-527 [cit. 2017-03-12]. DOI: 10.1111/j.1751-1097.2009.00701.x. ISSN 00318655. Dostupné z:

<http://onlinelibrary.wiley.com.ezproxy.lib.vutbr.cz/doi/10.1111/j.1751-1097.2009.00701.x/full>

- [8] WANG, Tianren, Meiqi LIU, Quan JI a Yige WANG. Aqueous synthesis of stable and luminescent flexible non-covalently assembled europium(iii) complexesorganoclay films. *RSC Advances* [online]. 2015, **5**(125), 103433-103438 [cit. 2016-12-26]. DOI: 10.1039/c5ra21828d. ISSN 20462069. Dostupné z: <http://pubs.rsc.org/en/Content/ArticleLanding/2015/RA/C5RA21828D#!divAbstract>
- [9] WANG, Tianren, Peng LI a Huanrong LI. Color-tunable luminescence of organoclay-based hybrid materials showing potential applications in white LED and thermosensors. *ACS applied materials & interfaces* [online]. 2014, **6**(15): 12915 [cit. 2016-12-26]. DOI: 10.1021/am5028555. Dostupné z: <http://pubs.acs.org.ezproxy.lib.vutbr.cz/doi/ipdf/10.1021/am5028555>
- [10] KANG, Kyoung Suk, Hyun Uk LEE, Moon Il KIM, et al. In-vitro cytotoxicity assessment of carbon-nanodot-conjugated Fe-aminoclay (CD-FeAC) and its bio-imaging applications. *Journal of nanobiotechnology* [online]. 2015, **13**(1), 88 [cit. 2016-12-26]. DOI: 10.1186/s12951-015-0151-z. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4662025/>
- [11] MANN, Stephen, Sandra L. BURKETT, Sean A. DAVIS, Christabel E. FOWLER, Neil H. MENDELSON, Stephen D. SIMS, Dominic WALSH a Nicola T. WHILTON. Sol-gel synthesis of organized matter. *Chemistry Of Materials* [online]. 1997, **9**(11), 2300-2310 [cit. 2017-03-08]. ISSN 08974756. Dostupné z: <http://pubs.acs.org.ezproxy.lib.vutbr.cz/doi/abs/10.1021/cm970274u>
- [12] PATIL, Avinash J. a Stephen MANN. Self-assembly of bio-inorganic nanohybrids using organoclay building blocks. *Journal of Materials Chemistry* [online]. 2008, **18**(39), 4605 [cit. 2017-04-03]. DOI: 10.1039/b805653f. ISSN 0959-9428. Dostupné z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=b805653f>
- [13] DATTA, K. K. R., M. ESWARAMOORTHY a C. N. R. RAO. Water-solubilized aminoclay metal nanoparticle composites and their novel properties. *Journal of Materials Chemistry*. 2007, **17**(7): 613-. DOI: 10.1039/b617198b. ISSN 0959-9428. Dostupné také z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=b617198b>
- [14] HWANG, Yuhoon, Young-Chul LEE, Paul D. MINES, You-Kwan OH, Jin SEOK CHOI a Henrik R. ANDERSEN. Investigation of washing and storage strategy on aging of Mg-aminoclay (MgAC) coated nanoscale zero-valent iron (nZVI) particles. *Chemical Engineering Science* [online]. 2014, **119**: 310-317 [cit. 2017-03-02]. DOI: 10.1016/j.ces.2014.08.002. ISSN 0009-2509. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com.ezproxy.lib.vutbr.cz/science/article/pii/S0009250914004102>
- [15] JOHNSY, G., K. K. R. DATTA, V. A. SAJEEVKUMAR, S. N. SABAPATHY, A. S. BAWA a M. ESWARAMOORTHY. Aminoclay: a designer filler for the synthesis of highly ductile polymer-nanocomposite film. *ACS applied materials & interfaces*

- [online]. 2009, **1**(12): 2796 [cit. 2017-03-02]. DOI: 10.1021/am9005226. ISSN 1944-8244. Dostupné z: <http://pubs.acs.org.ezproxy.lib.vutbr.cz/doi/abs/10.1021/am9005226>
- [16] LEE, Young-Chul, Eun Jung KIM, Dong Ah KO a Ji-Won YANG. Water-soluble organo-building blocks of aminoclay as a soil-flushing agent for heavy metal contaminated soil. *Journal of Hazardous Materials* [online]. 2011, **196**, 101-108 [cit. 2017-04-03]. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2011.08.077. ISSN 03043894. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304389411010958>
- [17] PATIL, Avinash J., Mei LI, Erik DUJARDIN a Stephen MANN. Novel Bioinorganic Nanostructures Based on Mesolamellar Intercalation or Single-Molecule Wrapping of DNA Using Organoclay Building Blocks. *Nano Letters* [online]. 2007, **7**(9), 2660-2665 [cit. 2017-04-07]. DOI: 10.1021/nl071052q. ISBN 10.1021/nl071052q. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/nl071052q>
- [18] PATIL, Avinash J., Eswaramoorthy MUTHUSAMY a Stephen MANN. Fabrication of functional protein–organoclay lamellar nanocomposites by biomolecule-induced assembly of exfoliated aminopropyl-functionalized magnesium phyllosilicates. *Journal of Materials Chemistry* [online]. 2005, **15**(35-36), 3838- [cit. 2017-04-07]. DOI: 10.1039/b504288g. ISSN 0959-9428. Dostupné z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=b504288g>
- [19] PATIL, Avinash J., Eswaramoorthy MUTHUSAMY a Stephen MANN. Synthesis and Self-Assembly of Organoclay-Wrapped Biomolecules. *Angewandte Chemie International Edition* [online]. Weinheim: WILEY-VCH Verlag, 2004, **43**(37), 4928-4933 [cit. 2017-03-10]. DOI: 10.1002/anie.200453868. ISSN 14337851. Dostupné z: <http://onlinelibrary.wiley.com.ezproxy.lib.vutbr.cz/doi/10.1002/anie.200453868/full>
- [20] LEE, Young-Chul, Seo Yeong OH, Yun Suk HUH, Hyun Uk LEE, Bohwa KIM, So Yeun LEE, Ji-Yeon PARK, You-Kwan OH, Moon-Hee CHOI, Go-Woon LEE, Taegong RYU, Kang-Sup CHUNG a Young-Kyu HAN. Aminoclay-induced humic acid flocculation for efficient harvesting of oleaginous *Chlorella* sp. *Bioresource Technology* [online]. 2013 [cit. 2017-03-10]. DOI: 10.1016/j.biortech.2013.11.103. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com.ezproxy.lib.vutbr.cz/science/article/pii/S0960852413018658>
- [21] MARTIN, Jessica E., Avinash J. PATIL, Michael F. BUTLER a Stephen MANN. Guest-Molecule-Directed Assembly of Mesostructured Nanocomposite Polymer/Organoclay Hydrogels. *Advanced Functional Materials* [online]. 2011, **21**(4): 674-681 [cit. 2017-03-10]. DOI: 10.1002/adfm.201002138. ISSN 1616301X. Dostupné z: <http://onlinelibrary.wiley.com.ezproxy.lib.vutbr.cz/doi/10.1002/adfm.201002138/abstract>
- [22] HOLMSTRÖM, Stewart C., Avinash J. PATIL, Michael BUTLER a Stephen MANN. Influence of polymer co-intercalation on guest release from aminopropyl-

- functionalized magnesium phyllosilicate mesolamellar nanocomposites. *Journal of Material Chemistry* [online]. 2007, **17**(37), 3894-3900 [cit. 2017-04-03]. DOI: 10.1039/b705158a. ISBN 10.1039/b705158a. Dostupné z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=b705158a>
- [23] YANG, Liang, Yating SHAO a Hyo-Kyung HAN. Improved pH-dependent drug release and oral exposure of telmisartan, a poorly soluble drug through the formation of drug-aminoclay complex. *International Journal of Pharmaceutics* [online]. Elsevier B.V., 2014, **471**(1-2), 258-263 [cit. 2017-03-10]. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2014.05.009. ISSN 03785173. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com.ezproxy.lib.vutbr.cz/science/article/pii/S0378517314003263>
- [24] RAO, K. Venkata, K. K. R. DATTA, Muthusamy ESWARAMOORTHY a Subi J. GEORGE. Highly Pure Solid-State White-Light Emission from Solution-Processable Soft-Hybrids. *Advanced Materials* [online]. Weinheim: WILEY-VCH Verlag, 2013, **25**(12): 1713-1718 [cit. 2016-12-26]. DOI: 10.1002/adma.201204407. ISSN 09359648. Dostupné z: <http://onlinelibrary.wiley.com.ezproxy.lib.vutbr.cz/doi/10.1002/adma.201204407/pdf>
- [25] VALEUR, Bernard. *Molecular fluorescence: principles and applications*. New York: Wiley-VCH, c2002. ISBN 35-272-9919-X.
- [26] PELANT, Ivan a Jan VALENTA. *Luminiscenční spektroskopie*. Praha: Academia, 2006. ISBN 80-200-1447-0.
- [27] ROUESSAC, Francis a Annick ROUESSAC. *Chemical analysis: modern instrumentation methods and techniques*. 2nd ed. Hoboken, NJ: John Wiley, c2007, s. 241-259. ISBN 978-0-470-85902-5.
- [28] ATKINS, Peter a Julio DE PAULA. *Fyzikální chemie*. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2013, s. 461-489. ISBN 978-80-7080-830-6.
- [29] LAKOWICZ, Joseph R. *Principles of fluorescence spectroscopy*. 3rd ed. New York: Springer, c2006. ISBN 03-873-1278-1.
- [30] HAUGLAND, Richard D., Michelle T.Z. Spence, editor MICHELLE T.Z. SPENCE, editor a Iain D. Johnson, technical information coordinator. IAIN D. JOHNSON, TECHNICAL INFORMATION COORDINATOR. *Handbook of fluorescent probes and research chemicals*. 6th ed. Eugene, OR: Molecular probes, 1996. ISBN 09-652-2401-5.
- [31] MCMURRY, John. *Organická chemie*. V Brně: VUTIUM, 2007, s. 892-931. Překlady vysokoškolských učebnic. ISBN 978-80-214-3291-8.
- [32] KOGAN, Grigorij, Ladislav ŠOLTÉS, Robert STERN a Peter GEMEINER. Hyaluronic acid: a natural biopolymer with a broad range of biomedical and industrial applications. *Biotechnology Letters* [online]. 2006-12-8, **29**(1), 17-25 [cit. 2017-04-

- 03]. DOI: 10.1007/s10529-006-9219-z. ISSN 0141-5492. Dostupné z:
<http://link.springer.com/10.1007/s10529-006-9219-z>
- [33] LI, Haitao, Zhenhui KANG, Yang LIU a Shuit-Tong LEE. Carbon nanodots: synthesis, properties and applications. *Journal of Materials Chemistry* [online]. 2012, **22**(46), 24230 [cit. 2017-03-12]. DOI: 10.1039/c2jm34690g. ISSN 09599428. Dostupné z:
<http://pubs.rsc.org/en/Content/ArticleLanding/2012/JM/c2jm34690g#!divAbstract>
- [34] PLOTĚNÁ, Michaela. *Optimalizace přípravy aminojilů a jejich charakterizace*. Brno: Vysoké učení technické v Brně. Fakulta chemická, 2015. 44 s. Vedoucí bakalářské práce prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
- [35] PISTOLIS, Angeles, Angeles PALEOS a Angeles MALLIARIS. Molecular recognition in organic solvents. The importance of excimer fluorescence spectroscopy. *Journal of Physical Chemistry* [online]. 1995, **99**(21), 8896-8902 [cit. 2017-04-05]. ISSN 00223654. Dostupné z:
<http://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/j100021a066?source=chemport>
- [36] SIGMA-ALDRICH [online]. 2017 [cit. 2017-04-03]. Dostupné z:
<http://www.sigmaaldrich.com/czech-republic.html>
- [37] Anthracene. *Oregon medical laser center* [online]. Portland: Oregon Health & Science University, 2012 [cit. 2017-04-05]. Dostupné z:
<http://omlc.org/spectra/PhotochemCAD/html/022.html>
- [38] Atomic Radius of the Elements. *Periodic Table* [online]. Champaign-Urbana, Illinois: Element Collection, 2013 [cit. 2017-04-06]. Dostupné z:
<http://periodictable.com/Properties/A/AtomicRadius.v.html>
- [39] MEYERS, Robert A. *Encyclopedia of analytical chemistry: applications, theory, and instrumentation*. New York: Wiley, c2000. ISBN 0-471-97670-9.
- [40] GAYE, M., F. B. TAMBOURA a A.S. SALL. Spectroscopic studies of some lanthanide(III) nitrate complexes synthesized from a new ligand 2,6-bis-(salicylaldehydhydrazone)-4-chlorophenol. *Chemical Society of Ethiopia* [online]. 2002, 27-34 [cit. 2017-04-05]. ISSN 1011-3924. Dostupné z:
<https://www.ajol.info/index.php/bcse/article/viewFile/61726/49822>

8 Seznam použitých zkratk a symbolů

8.1 Použité zkratky

AC	aminojíl
ANS	amonná sůl 8-anilinonaftalen-1-sulfonové kyseliny
APTES	3-aminopropyltriethoxysilan
BTC	benzen-1,2,4,5-tetrakarboxylát sodný
CD	uhlíkové nanotečky
CS	koronentetrakarboxylát
DNA	deoxyribonukleová kyselina
Eu-AC	aminojíl s inkorporovanými europitými ionty
ET	přenos energie
Fe-AC	aminojíl s inkorporovanými železitými ionty
FITC	fluorescein-5-isothiokyanát
FTIR spektroskopie	infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací
HOMO	nejvyšší obsazený molekulový orbital
IC	vnitřní konverze
IR záření	infračervené záření
ISC	mezisystémový přechod
LED	světlo emitující dioda
LnDC	β -diketonát lanthanitý
LUMO	nejnižší neobsazený molekulový orbital
Mg-AC	aminojíl s inkorporovanými hořečnatými ionty
Na-Carb-Terpy	sodná sůl 4'- <i>para</i> -fenyلكarboxyl-2,2':6',2''-terpyridinu
PDA	1-pyrendodekanová kyselina
PVA	polyvinylalkohol
SRG	sulforhodamin G
TEM	transmisní elektronová mikroskopie
TTA	2-theonyltrifluoroacetonát
UV záření	ultrafialové záření
VIS záření	viditelné záření
XRD	rentgenová difrakční analýza

8.2 Použité symboly

d_{001}	mezirovinná vzdálenost
k_r	rychlostní konstanta zářivého přechodu
k_{nr}	rychlostní konstanta nezářivého přechodu
λ	vlnová délka
M	multiplicita
S	spinové kvantové číslo
S_0, S_1, S_2	singletový stav základního stavu, prvního excitovaného, resp. druhého excitovaného stavu
t	čas
T_1, T_2	tripletový stav excitovaného, resp. druhého excitovaného stavu
τ	doba života excitovaného stavu