

Fluorescenční sondy v charakterizaci termoplastů

Jiří Bartoš

Bakalářská práce
2011



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

Fakulta technologická

Ústav inženýrství polymerů

akademický rok: 2010/2011

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: Jiří BARTOŠ
Osobní číslo: T08683
Studijní program: B 2808 Chemie a technologie materiálů
Studijní obor: Chemie a technologie materiálů

Téma práce: Fluorescenční sondy v charakterizaci termoplastů

Zásady pro vypracování:

1. Popis principu fluorimetrie (fyzikální podstata jevu, instrumentace, typický výstup – spektrum, interpretace, příklady), intrinzická fluorescence polymerů – úvod.
2. Efekty ovlivňující fluorescenci molekul (látek) a látky, využívané jako fluorescenční sondy, jejich vlastnosti a aplikace zejména ve vztahu ke studiu polymerů.
3. Přehled současného stavu použití fluorescenčních sondových technik ve studiu termoplastů – těžiště práce.
4. Shrnutí poznatků a formulace perspektivy daných metod ve vztahu k instrumentáriu a studované problematice na FT UTB.



Rozsah bakalářské práce:

Rozsah příloh:

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná/elektronická**

Seznam odborné literatury:

1. LAKOWICZ, J.R. Principles of fluorescence spectroscopy. 2nd ed. New York ; London: Kluwer Academic/Plenum, 1999. xxiii,698p. ISBN 0306460939
2. LUPTON, J.M. Single-Molecule Spectroscopy for Plastic Electronics: Materials Analysis from the Bottom-Up. Advanced Materials. Sv. 22, č. 15, s. 1689-1721. ISSN 0935-9648.
3. VIJ, D.R. Handbook of applied solid state spectroscopy. New York: Springer, 2006. xix, 741 p. ISBN 0387324976

Vedoucí bakalářské práce: **doc. Ing. Ivo Kuřitka, Ph.D.**
Centrum polymerních materiálů

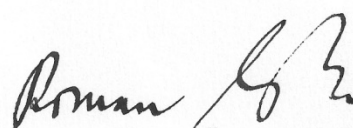
Datum zadání bakalářské práce: **11. února 2011**

Termín odevzdání bakalářské práce: **30. května 2011**

Ve Zlíně dne 11. února 2011



doc. Ing. Petr Hlaváček, CSc.
děkan



doc. Ing. Roman Čermák, Ph.D.
ředitel ústavu

Příjmení a jméno: Jiří Bartoš

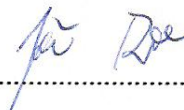
Obor: Chemie a technologie materiálu

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že

- beru na vědomí, že odevzdáním bakalářské práce souhlasím se zveřejněním své práce podle zákona č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, bez ohledu na výsledek obhajoby ¹⁾;
- beru na vědomí, že bakalářská práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému dostupná k nahlédnutí, že jeden výtisk bakalářské práce bude uložen na příslušném ústavu Fakulty technologické UTB ve Zlíně a jeden výtisk bude uložen u vedoucího práce;
- byl jsem seznámen s tím, že na moji bakalářskou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, zejm. § 35 odst. 3 ²⁾;
- beru na vědomí, že podle § 60 ³⁾ odst. 1 autorského zákona má UTB ve Zlíně právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona;
- beru na vědomí, že podle § 60 ³⁾ odst. 2 a 3 mohu užít své dílo –bakalářskou práci, nebo poskytnout licenci k jejímu využití jen s předchozím písemným souhlasem Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně, která je oprávněna v takovém případě ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které byly Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně na vytvoření díla vynaloženy (až do jejich skutečné výše);
- beru na vědomí, že pokud bylo k vypracování bakalářské práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tedy pouze k nekomerčnímu využití), nelze výsledky bakalářské práce využít ke komerčním účelům;
- beru na vědomí, že pokud je výstupem bakalářské práce jakýkoliv softwarový produkt, považují se za součást práce rovněž i zdrojové kódy, popř. soubory, ze kterých se projekt skládá. Neodevzdání této součásti může být důvodem k neobhájení práce.

Ve Zlíně 25.5.2011



.....

¹⁾ zákon č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, § 47 Zveřejňování závěrečných prací:

(1) Vysoká škola nevydělečně zveřejňuje disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce, u kterých proběhla obhajoba, včetně posudků oponentů a výsledku obhajoby prostřednictvím databáze kvalifikačních prací, kterou spravuje. Způsob zveřejnění stanoví vnitřní předpis vysoké školy.

(2) Disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce odevzdané uchazečem k obhajobě musí být též nejméně pět pracovních dnů před konáním obhajoby zveřejněny k nahlížení veřejnosti v místě určeném vnitřním předpisem vysoké školy nebo není-li tak určeno, v místě pracoviště vysoké školy, kde se má konat obhajoba práce. Každý si může ze zveřejněné práce pořizovat na své náklady výpisy, opisy nebo rozmnoženiny.

(3) Platí, že odevzdáním práce autor souhlasí se zveřejněním své práce podle tohoto zákona, bez ohledu na výsledek obhajoby.

²⁾ zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 35 odst. 3:

(3) Do práva autorského také nezasahuje škola nebo školské či vzdělávací zařízení, užije-li nikoli za účelem přímého nebo nepřímého hospodářského nebo obchodního prospěchu k výuce nebo k vlastní potřebě dílo vytvořené žákem nebo studentem ke splnění školních nebo studijních povinností vyplývajících z jeho právního vztahu ke škole nebo školskému či vzdělávacímu zařízení (školní dílo).

³⁾ zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 60 Školní dílo:

(1) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení mají za obvyklých podmínek právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla (§ 35 odst. 3). Odpírá-li autor takového díla udělit svolení bez vážného důvodu, mohou se tyto osoby domáhat nahrazení chybějícího projevu jeho vůle u soudu. Ustanovení § 35 odst. 3 zůstává nedotčeno.

(2) Není-li sjednáno jinak, může autor školního díla své dílo užít či poskytnout jinému licenci, není-li to v rozporu s oprávněnými zájmy školy nebo školského či vzdělávacího zařízení.

(3) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení jsou oprávněny požadovat, aby jim autor školního díla z výdělku jím dosaženého v souvislosti s užitím díla či poskytnutím licence podle odstavce 2 přiměřeně přispěl na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložily, a to podle okolností až do jejich skutečné výše; přitom se přihlédne k výši výdělku dosaženého školou nebo školským či vzdělávacím zařízením z užití školního díla podle odstavce 1.

ABSTRAKT

Tato rešeršní práce popisuje možnosti využití fluorescenčních sond v charakterizaci termoplastů. Práce je rozdělena na čtyři základní části, a to úvod do problematiky fotoluminiscenční spektroskopie, příklady nejznámějších sond a jejich využití, dále aplikaci fluorescenční sondy v charakterizaci termoplastů, jejichž popis je rozdělen podle chemického složení a podle účelu charakterizace. Poslední část obsahuje popis přístrojového vybavení UTB, potřebného pro charakterizaci polymerních matric pomocí fluorescenčních sond.

Klíčová slova:

Fluorescence, sonda, polymer

ABSTRACT

This thesis describes the possibility of fluorescent probes application in characterization of thermoplastic materials. The work is divided into four main parts, namely an introduction to the photoluminescence spectroscopy, the best known examples of probes and their use as fluorescent probes in the characterization of thermoplastics material. The topic is organised according to their chemical composition and by fiction of characterization. The last section contains a description of the instrumentation at UTB which is available for characterization of polymer matrices using fluorescent probes.

Keywords: Fluorescence, probe, polymer

Rád bych poděkoval vedoucímu mé bakalářské práce doc. Ing. et. Ing. Ivu Kuřitkovi Ph.D. et. Ph.D., za trpělivost, pomoc při řešení problémů a vstřícnost. Dále bych chtěl poděkovat své rodině za podporu při studiu.

Motto: „Teprve, když víme, že existuje slepota, činí nás to vidomými.“ Heinz von Foerster

Prohlašuji, že odevzdaná verze bakalářské práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou totožné.

OBSAH

1	ÚVOD	10
2	POPIS PRINCIPU FLOUROMETRIE	11
2.1	ABSORPČNÍ SPEKTROMETRIE V UV/VIS OBLASTI	11
2.1.1	Princip absorpční spektrofotometrie v UV/VIS oblasti.....	11
2.1.2	Základní veličiny	11
2.2	LUMINISCENČNÍ SPEKTROMETRIE.....	12
2.2.1	Fotoluminiscence.....	12
2.2.1.1	Fluorescence.....	13
2.2.1.2	Fosforescence	13
2.2.2	Trvání luminiscence	14
2.2.3	Jablonského diagram	14
2.2.4	Emisní a Excitační spektra.....	15
2.2.4.1	Emisní spektrum.....	15
2.2.4.2	Excitační spektrum	16
2.2.5	Zhášení fluorescence	16
2.3	NEVLASTNÍ FLUORESCENCE.....	18
2.3.1	Fluorescenční značky.....	18
2.3.2	Fluorescenční sondy	18
2.4	INSTRUMENTACE.....	19
2.5	CHARAKTERISTICKÝ VÝSTUP	20
2.5.1	Základní vztahy	20
2.5.2	Emisní a excitační spektra.....	21
3	FLUORESCENČNÍ SONDY	22
3.1	PŘÍKLADY NEJVÝZNAMNĚJŠÍCH FLUORESCENČNÍCH SOND	22
3.1.1	Akridinová oranž.....	22
3.1.2	MQAE.....	24
3.1.3	Krystalová violet'	24
4	FLUORESCENČNÍ SONDY PRO CHARAKTERIZACI TERMOPLASTŮ	26
4.1	FLUORESCENČNÍ SONDY PODLE CHEMICKÉHO SLOŽENÍ	26
4.1.1	Fluorescenční sondy založené na 1,8-naftalenimidu.....	26
4.1.2	Fluorescenční sondy založeny na p-(N,N-dialkylamino)benziliden malononitrilu	29
4.1.3	Fluorescenční sondy na bázi pyrenu a piperazinu.....	31
4.2	VYUŽITÍ FLUORESCENČNÍCH SOND PODLE ÚČELU CHARAKTERIZACE	33
4.2.1	Měření volného objemu v polymerní matrici.....	33
4.2.2	Měření Kritické micelární koncentrace	34
4.2.3	Měření polarity polymerní matrice.....	35
4.2.4	Měření dispergace plniva v polymerní matrici	36
5	PŘÍSTROJOVÉ VYBAVENÍ UNIVERZITY TOMÁŠE BATI	37
5.1	FS 920 EDINBURGH INSTRUMENTS	37
5.2	SHIMADZU RF-1501	38
	ZÁVĚR	39

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	40
SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....	44
SEZNAM OBRÁZKŮ.....	45

1 ÚVOD

Polymerní materiály v dnešní době nalézají uplatnění v celé řadě lidských činností, a proto je také snaha ke zvýšení efektivity a zlevnění výroby polymeru. Velmi časté je úsilí o nahrazení klasických materiálů novými, levnějšími polymerními materiály se stejnými, nebo lepšími, vlastnostmi, což vyžaduje rozsáhlý výzkum a vývoj v oblasti polymerů. Mezi mnohými metodami studia polymerních materiálů pak vyniká fluorescenční spektroskopie, která umožňuje zkoumat vlastnosti polymerů nedestruktivně, efektivně a s možností sledovat změny chování v čase.

Roku 1852 položil základy fluorescenční spektrometrie sir George Gabriel Stokes. Název fluorescence byl odvozen od minerálu fluoritu (fluorid vápenatý). Jev fluorescence má mnoho praktických využití v mineralogii, fluorescenční spektroskopii, používá se fluorescenční značení, biologické detektory atd. V této práci je však hlavním předmětem zájmu fluorescenční spektroskopie, především pak fluorescenční sondy. V práci je popsáno, zda a jak lze s pomocí fluorescenčních sond charakterizovat, studovat a analyzovat termoplasty.

Text této rešeršní práce je rozvržen do čtyř bloků. Úkolem prvního bloku je popsat základních pojmů souvisejících s fluorescencí a fluorescenční spektroskopii, a dále ukázat nejen principy vzniku tohoto jevu, ale také principy zhasnutí fluorescence. Druhý blok je pak věnován samotné technice měření fluorescence a fluorescenčních sond v polymerních matricích. Na příkladech jsou ukázány klasický výstup z měření i některé zajímavé či velice rozšířené sondy, využívající se nejen v termoplastech. Fluorescenční sondy pro charakterizaci termoplastických materiálů jsou předmětem třetího bloku. Ten je rozdělen na dvě části, první se zabývá fluorescenčními sondami založenými na stejné bázi (s podobným chemickým složením) a ukazuje různé chování těchto sond za stejných podmínek. Druhá část je poté vyhrazena nejdůležitějším množstvím využití fluorescenčních sond pro charakterizaci termoplastů a je rozdělena podle typických vlastností, k jejichž charakterizaci se sondy používají. Poslední blok textu práce pak popisuje přístrojové vybavení Univerzity Tomáše Bati, které je použitelné k měření fluorescence.

2 POPIS PRINCIPU FLOUROMETRIE

2.1 Absorpční spektrometrie v UV/VIS oblasti

Základní kámen molekulární absorpční spektrofotometrie v ultrafialové a viditelné oblasti spektra položil již okolo roku 1670 britský vědec sir Isaac Newton. Isaac Newton objevil, že světlo, takové jak ho vidíme, se skládá ze spektra barev. Od fialové barvy po červenou. UV/VIS spektrofotometrie umožňuje na základě průchodu světla látkou například identifikaci měřeného vzorku, nebo také určení složení absorbujících komponentů.

Analytické metody založené na absorpční spektroskopii patří svou historií mezi nejmladší fyzikálně-chemické metody. *I když absorpční čáry ve slunečním spektru pozoroval již Wolaston v r. 1802 (volné atomy v chladnějším plynném obalu absorbují některé vlnové délky spojitého záření, které slunce vysílá), první analytický atomový absorpční spektrometr sestrojil až v roce 1953 Walsh.*[1]

2.1.1 Princip absorpční spektrofotometrie v UV/VIS oblasti

Absorpční spektrofotometrie v UV/VIS měří absorpci záření v ultrafialové (UV) a viditelné (VIS) oblasti světelného spektra při průchodu vzorkem. Při interakci molekuly se zářením dochází k energetickým změnám v elektronových orbitalech. Elektrony jsou excitovány ze základních do vyšších energetických hladin energií fotonu daného záření. Oblast molekuly, ve které jsou lokalizovány elektronové přechody v průběhu absorpce záření, označujeme jako chromofor. Chromoforem může být například hydratovaný kation, komplex nebo seskupení atomů v organické molekule.

2.1.2 Základní veličiny

Pro hodnocení velikosti absorpce se využívá měření propustnosti a odvozených veličin, nejčastěji absorpance.[2] Je však nutno brát v úvahu, že záření vstupující do hmotného prostředí může být tímto prostředím nejen absorbována a část záření je propuštěna, ale část může být také rozptýlena nebo odražena.[3]

Při měření absorpce záření je propustnost T (transmittance) definována poměrem toku monochromatického záření propuštěného látkou po absorpci Φ k toku vstupujícího záření Φ_0 [2]:

$$T = \frac{\Phi}{\Phi_0} \quad (1)$$

Absorptance α je vyjádřením podílu toku absorbovaného monochromatického záření k toku záření vystupujícího[2]:

$$\alpha = \frac{\Phi_0 - \Phi}{\Phi_0} = 1 - T \quad (2)$$

Hodnoty propustnosti i absorptance se často uvádějí v %.

Absorbance A je definována pro uvedené toky monochromatického záření jako[2]:

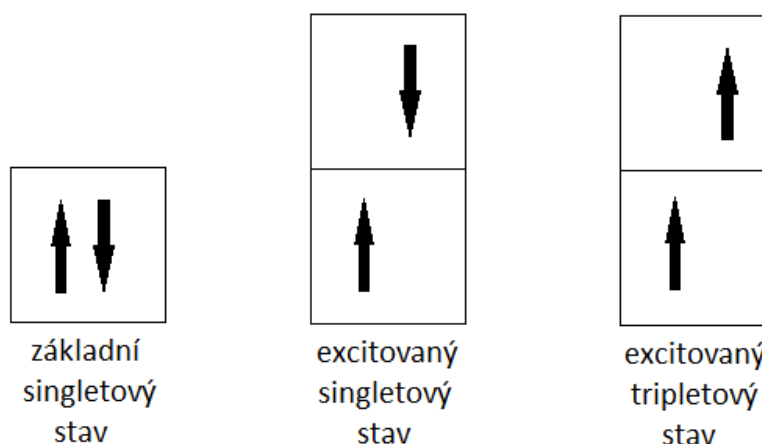
$$A = \log \frac{\Phi}{\Phi_0} = -\log T \quad (3)$$

Pro vyhodnocení se používá některá z výše uvedených veličin (nejčastěji absorptance, případně transmitance) v závislosti na vlnové délce záření, nebo na její reciproké hodnotě, označované jako vlnočet. Takováto závislost je poté označována jako absorpční spektrum. Oblasti extrémních bodů na křivce mají obvykle Gaussovský průběh, který odpovídá typickým elektronovým přechodům v molekule. Větší počet extrémních bodů na absorpční křivce je důkazem většího počtu elektronových přechodů v absorbující molekule, pokud jsou dostatečně rozlišeny. To značí existenci většího počtu struktur téže látky, případně izotopů jednoho prvku, nebo většího počtu různých absorbujících analytů v roztoku za daných podmínek. Na absorpční křivky mají vliv různé faktory. Například zvýšení teploty posouvá λ_{\max} k delším vlnovým délkám. Vysoká koncentrace inertních solí mění tvar absorpčních spekter. Dalšími faktory, které mají vliv na absorpční spektra, jsou: vliv tenzidů, rozpouštědla a instrumentální vlivy.[4, 5, 6]

2.2 Luminiscenční spektrometrie

2.2.1 Fotoluminiscence

Fotoluminiscence je děj, při kterém dochází k emisi sekundárního záření z excitovaných elektronů v molekule. Při absorpci záření přechází elektron ze singletové hladiny S_0 do excitovaného stavu (singlet S_1). Obecně se elektronové stavy dělí na singletové a tripletové. Singletový stav je charakteristický opačným (antiparalelním) spinem dvojce excitovaných elektronů, zatím co tripletový stav se vyznačuje stejným (paralelním) spinem, potom podle způsobu, z jakého stavu se excitované elektrony vrací do původního, dělíme fotoluminiscenci na fluorescenci, ta probíhá přes singletový stav, a fosforescenci, při které se elektrony navrací přes triplet. Viz obr. 1.[7]



Obrázek 1 znázornění spinů u základního singletového stavu a u excitovaného singletového a tripletového stavu [8]

2.2.1.1 Fluorescence

Termín fluorescence poprvé publikoval v článku *The phenomenon fluorescence* v roce 1852 George Gabriel Stokesem.[9] Název fluorescence byl odvozen z názvu minerálu fluoritu (fluorid vápenatý), který emitoval modrou fluorescenci.

Po absorpci záření se excitovaná molekula navrácí do základního stavu za současného vyzáření fotonu. Tento přechod se nazývá zářivý přechod. Jedním z typů zářivého přechodu je přechod elektronu z excitovaného stavu S_1 do základního stavu S_0 a tento jev se nazývá fluorescence. Elektron se může zářivě vrátit do základního stavu zpravidla z nejnižší vibrační hladiny. Pokud se excitovaný elektron nacházel v některé z vyšších vibračních hladin, přechází do nejnižší vibrační hladiny přechodem, který je označován jako vnitřní konverze, nebo vibrační relaxace, což je nezářivý přechod. Excitovaný elektron, který přešel do tripletového stavu, se může přísunem energie znovu dostat do singletového stavu S_1 . Ze stavu S_1 se elektron vrací do základního stavu S_0 za současného vyzáření fotonu, poté je možné pozorovat takzvanou zpožděnou fluorescenci (Obr. 2). [7]

2.2.1.2 Fosforescence

Je možné, že proběhne nezářivý přechod ze singletového stavu S_1 na hladinu T_1 , kdy je přechod spojen se změnou spinu excitovaného elektronu. Tento děj se nazývá mezisystémový přechod a většinou k němu dochází, pokud se překrývají nejnižší vibrační hladiny singletového stavu s vyššími hladinami tripletového stavu. Z tripletového stavu T_1 se excitovaný elektron navrácí do základního stavu S_0 za současné ztráty energie ve formě fotonu

a změny spinu elektronu. Tento děj se nazývá fosforescence. Tripletový stav molekuly má nižší energii než příslušný singletový excitovaný stav, takže přechod do základního stavu je spojen s emisí záření o delší vlnové délce než při fluorescenci. Protože molekula setrvává v tripletovém stavu poměrně dlouho (10^{-3} až 10^2 s), může ztratit svou energii snáze jinými pochody než fosforescencí, např. kolizí s molekulami rozpouštědla.[7]

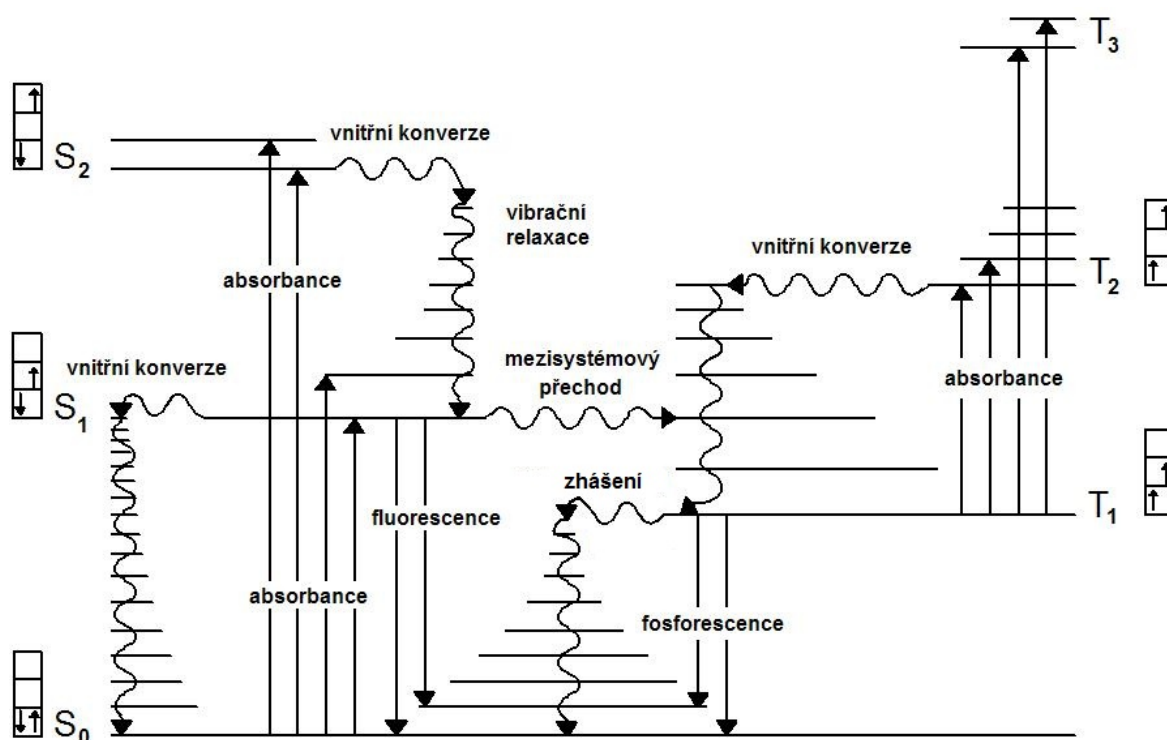
2.2.2 Trvání luminiscence

Luminiscenční zářivý tok roste s množstvím absorbovaného záření, kvantovým výtěžkem luminiscence (tj. poměrem udávajícím počet emitovaných fotonů a absorbovaných fotonů). Luminiscenci nepříznivě ovlivňuje vyšší teplota, která zvyšuje pravděpodobnost nezářivých přechodů.[10]

I po přerušení budícího záření lze měřit fluorescenci i fosforescenci. Tato doba je pro oba jevy odlišná fluorescence, která se vyskytuje hlavně v parách, kapalinách a roztocích. Trvá 10^{-9} až 10^{-7} s po ukončení osvětlování, kdežto fosforescence trvá 10^{-3} až 10^2 s. Některá literatura však uvádí pro fosforescenci dobu několika hodin, popřípadě i dní od ukončení osvětlování.[7, 11]

2.2.3 Jablonskiho diagram

Tento diagram zobrazuje jakými přechody, zářivými i nezářivými, se může fotonem excitovaný elektron vrátit na původní energetickou hladinu. V tomto diagramu jsou uvedeny následující symboly: S_0 – označuje základní singletový stav; S_1 a S_2 – označují první a druhý excitovaný singletový stav; T_1 , T_2 a T_3 – jsou symboly označující první, druhý a třetí excitovaný tripletový stav. Vodorovné čáry znázorňují jednotlivé energie vibrační hladiny. Rovnými šipkami jsou poté znázorněny zářivé přechody, při nichž se buď absorbuje, nebo naopak vyzařuje foton a zvlněné šipky pak znázorňují nezářivé přechody elektronu.[8]



Obrázek 2 Jablonskiho diagram, základní pojmy jsou uvedeny výše v textu, podle [7]

2.2.4 Emisní a Excitační spektra

Emisní a excitační spektra jsou zaznamenávána pomocí spektrofluorimetru. Emisní spektrum je závislost intenzity fluorescence na vlnové délce (nebo energii, vlnočtu či frekvenci) při konstantní vlnové délce budícího záření. Zatím co excitační spektrum je závislost intenzity fluorescence na vlnové délce (nebo energii, vlnočtu či frekvenci) při konstantní vlnové délce emitovaného záření.[4]

2.2.4.1 Emisní spektrum

Emisní spektrum je v různém výtěžku excitováno kteroukoliv vlnovou délkou v oblasti excitačního spektra a je ovlivněno různou citlivostí detektoru v závislosti na vlnové délce. Existují 3 druhy emisních spekter[10]:

A) Atomová (čárová) spektra:

Jsou emitována volnými atomy v plynném stavu. Kovy emitují čáry ve viditelné spektrální oblasti (vlivem nízkého ionizačního potenciálu). Charakteristickým příkladem jsou zářící páry sodíku, kde je možno pozorovat dvojici (tzv. dublet) spektrálních čar žluté barvy o vlnových délkách 589 nm a 589,6 nm.

Zatím co nekovy emitují čáry v ultrafialové oblasti pod 200 nm (vlivem vysokého ionizačního potenciálu).

B) Molekulová (pásová) spektra:

Skládají se z mnoha blízko sebe umístěných čar, které splývají v pásy. Tento typ spekter se využívá právě pro měření využívající fluorescenčních sond.

C) Kontinuální spektra:

Vyzařují je pevné, kapalné i plynné látky. Vyzařování je rozděleno nepřetržitě na celý rozsah vlnových délek. Toto rozdělení je závislé na teplotě.

2.2.4.2 Excitační spektrum

Excitační spektrum je v podstatě zjednodušené absorpční spektrum analytu, protože jen některá absorpční maxima vyvolávají fluorescenci. Intenzita excitačního maxima je totožná s intenzitou absorpčního maxima, při konstantní intenzitě emise zdroje v daném rozsahu vlnových délek.[5]

2.2.5 Zhášení fluorescence

Zhášení fluorescence představuje jakýkoli proces, který snižuje kvantový výtěžek fluorescence bez změny fluorescenčního emisního spektra. Zhášení, které vychází z kolizních střetů mezi molekulami fluoroforu (látka schopná fluorescence) a zhášeče (jakákoli látka schopná snížit intenzitu fluorescence), se nazývá dynamické zhášení. Jestliže se molekuly fluoroforu váží na molekuly zhášeče, je toto zhášení nazýváno jako *statické*. Zhášení všeobecně bylo a je intenzivně studováno v souvislosti s biochemickými systémy (především kvůli molekulárním interakcím v biologickém systému), které mají za následek zhášení, což vede například ke zjištění vaznosti mezi molekulami.

V případě dynamického zhášení musí zhášeč difundovat ke fluoroforu během doby, ve které se molekula fluoroforu vyskytuje v excitovaném stavu. Při kontaktu se fluorofor vrací do základního stavu, ale bez emise fotonu. Při statickém zhášení se vytvoří komplex mezi fluoroforem a zhášečem, který nefluoreskuje. U statického i dynamického zhášení musí být fluorofor a zhášeč v kontaktu. Samozhášení je zhášení fluoroforu jím samotným. Nastává při jeho vysokých koncentracích. [4, 6]

Byly pozorovány tyto typy zhášení fluorescence[4, 5]:

a) Koncentrační zhášení (samozhášení) fluorescence (Vavilov):

Od určité mezní koncentrace c_0 (prahová koncentrace analytu) dochází k poklesu kvantového výtěžku fluorescence (podíl počtu emitovaných fotonů a absorbovaných fotonů). Důsledkem jsou neelastické srážky excitovaných molekul s molekulami analytu v základním stavu (možná také asociace molekul). Molekuly analytu absorbují záření, ale neemitují. Energie je vyzářena formou tepelné energie.

b) Vnitřní konverze molekul:

V důsledku kolizí excitovaných molekul s neexcitovanými dochází ke ztrátě energie excitované molekuly na nezářivé přechody. Ztráty se zvyšují s rostoucí teplotou. Dále ztráty závisí na koncentraci molekul, na viskozitě roztoku apod.

c) Vnitřní filtrační efekt prvního druhu:

Detektor spektrofluorimetru detekuje emisi záření pouze z centrální části kyvety (z jejího středu). Než dopadající záření dosáhne středu kyvety, značná část dopadajícího záření je absorbována před dosažením centrální části kyvety. Tento efekt má za následek snížení intenzity fluorescence.

d) Vnitřní filtrační efekt druhého druhu:

Obsahuje-li roztok další chromofor, který absorbuje světlo při blízké vlnové délce jako fluoreskující produkt analytu, tak se chromofor chová jako filtr, který k produktu analytu propustí jen část dopadajícího emitujícího záření.

e) Strukturální a konfigurační změny molekul:

Převod molekuly do tripletového stavu (tvorba volného biradikálu s nepárovými elektrony, který je velmi reaktivní). Přechod na složitější sloučeniny (dimery). Vzniklé sloučeniny nemusí fluoreskovat. Při strukturální a konfigurační změně může excitovaná molekula přejít do základního stavu bez vyzáření nového záření. K tomu jsou náchylné látky s volnější strukturou, volně otáčivé části molekul. Dochází k degradaci elektronové energie na vibrační energie.

f) Vliv cizích iontů:

Pokles kvantového výtěžku fluorescence v přítomnosti cizích iontů a látek. Stupeň zhášení roste s polarizovatelností respektive s deformabilitou, s rostoucí kovalentní charakteristikou. Nejčastější představitelé ze skupiny aniontů jsou například halogenidy (F^- , Cl^- , Br^-), případně organické skupiny $((COO)^{2-}$, NO_3^- ,

SCN⁻). Mezi kationty poté můžeme zařadit kovy (Cu²⁺, Ni²⁺, Fe²⁺, Fe³⁺, Mn²⁺), a kationty s neobsazenými d-orbitaly (Hg²⁺, UO²⁺, Cr³⁺). Důsledkem je pohlcení elektronu ze vzbuzené hladiny fluoreskujícího chelátu analytu v neobsazeném d-orbitalu, což má za následek znemožnění návratu excitovaného elektronu do základní hladiny.

Tyto jevy je však nutno rozdělit na instrumentální efekty (vady), respektive nedokonalosti měření a na zhášení ve fyzikálním smyslu slova, tj. jako procesu, který způsobí, že po excitaci dojde k nežádivému přechodu místo zářivého. [6]

Mezi vady pak můžeme zařadit vnitřní filtrační efekt prvního a druhého druhu. Zbylé výše jmenované způsoby, pak řadíme do skupiny fyzikálního zhášení.

2.3 Nevlastní fluorescence

K látkám, které samy nemají schopnost fluoreskovat, se přidávají dodatečné fluorofory. Díky nevlastním fluoroforům vzniká nevlastní fluorescence. Pokud se fluorofor na studovaný vzorek váže kovalentně, nazýváme jej pak *fluorescenční značkou*. Pokud se váže nekovalentně, jedná se o *fluorescenční sondu*. [12]

2.3.1 Fluorescenční značky

Fluorescenční značky jsou nevlastní fluorofory, které se ke sledovaným biomolekulám (proteinům, peptidům a jiným) váží kovalentní vazbou. Nejčastěji se používají k fluorescenčnímu značení proteinů, kdy se kovalentně váží na jejich aminové, histidinové boční řetězce, thiolové skupiny, atd. Mají různé využití například v imunologii nebo v histochemii. [12]

2.3.2 Fluorescenční sondy

Fluorescenční sondy jsou nevlastní fluorofory, které se ke sledované struktuře váží nekovalentně a často přitom mění své fotofyzikální vlastnosti. V závislosti na studovaném jevu (viskozita, polarita atd.) je pak nutné vybrat vhodnou fluorescenční sondu, která umožní získat potřebné informace. Volba fluorescenční sondy je nejdůležitější součástí ve fluorescenční spektroskopii. V současné době existuje velké množství fluorescenčních sond. [12]

2.4 Instrumentace

Existují dva obecné typy přístrojů[3]:

a) Flourimetry

Tyto přístroje se používají pro pozorování či měření fotoluminiscence při dané vlnové délce. Vlnová délka emitujícího záření je nastavitelná pomocí speciálních filtrů.

b) Spektroflourimetry

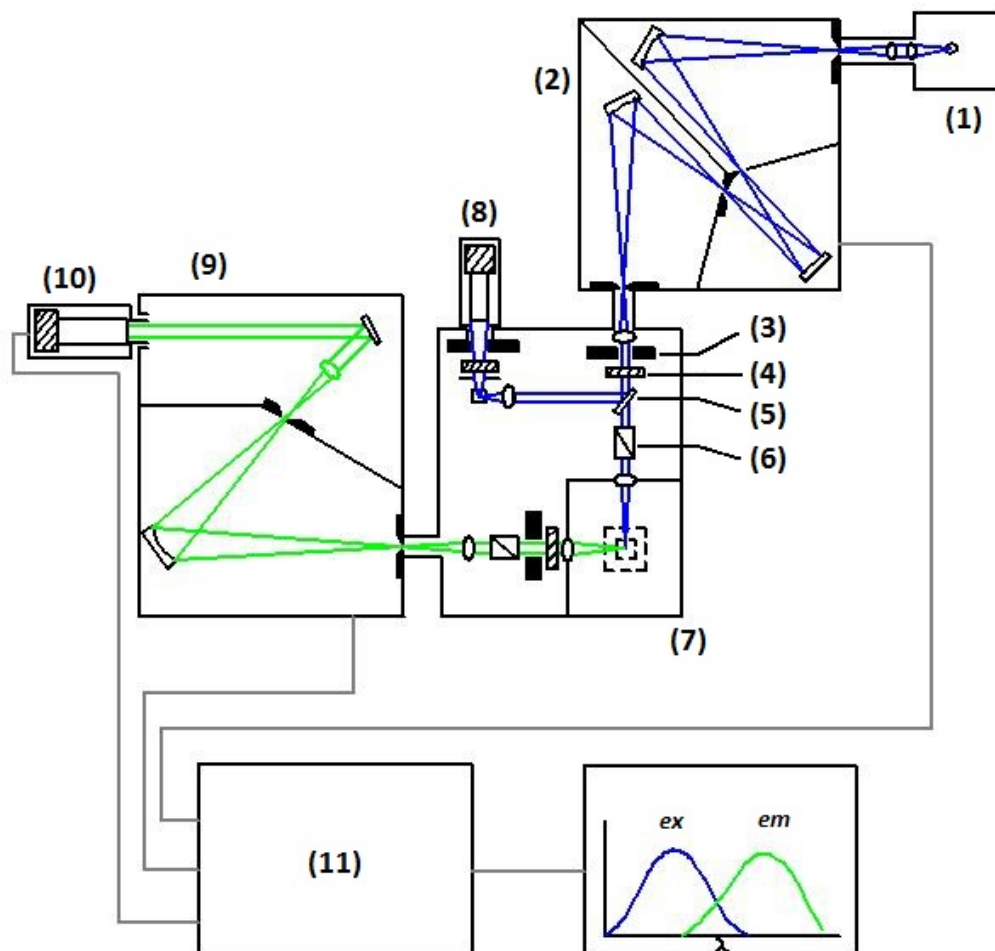
Jsou to přístroje s monochromátory (mřížkou, či hranolem jako disperzním prvkem). Pomocí těchto přístrojů můžeme zaznamenávat celá luminiscenční spektra.

Pro měření fluorescenčních sond budeme upřednostňovat tzv. dvoupraskové spektrometry, které lze korigovat na nestabilitu zdroje záření (nestejná intenzita budícího záření při různých vlnových délkách) a na nestejnou spektrální citlivost detektoru. Uspořádání přístroje je následující: světlo z budícího zdroje je přivedeno na monochromátor a odtud dopadá na vzorek. Mezi monochromátorem a vzorkem je poté vložen rozdělovač paprsku a pásový filtr, který přivádí v čase paprsek přes referenční vzorek (roztok referenčního fluoroforu s vysokým kvantovým výtěžkem) na detektor, kde se simultánně s měřením snímá i excitační spektrum reference a jeho intenzita. Po dopadu paprsku na vzorek se některé molekuly excitují a následně emitují fluorescenční záření. Toto fluorescenční záření je vyzařováno do všech směrů. Část jej prochází druhým emisním monochromátorem a dopadá na detektor. Emisní spektrum je měřeno pod úhlem 90° k paprskům dopadajícího světla, aby se minimalizoval vliv prošlého, nebo odraženého světla k detektoru. Často jsou tyto přístroje, kromě těchto základních prvků, vybaveny také pomocnou optikou pro vedení zářivého toku a dalšími specifickými součástmi.[3, 6, 13]

Jako zdroj záření je možno použít vodíkovou výbojku pro oblast blízkého UV. Pro vyšší intenzitu se však používá výbojka rtuťová. Xenonová výbojka pak poskytuje spojitě záření v UV i viditelné oblasti spektra.[3, 6]

Samotné měření se poté provádí nejčastěji v kyvetách s předem známou tloušťkou vzorku. Základní podmínkou pak je, aby daný materiál, ze kterého je kyveta vyrobena, neabsorboval záření ve sledovaném vlnovém rozsahu.[3]

Pro neprůhledné či vysoce zakalené vzorky existuje možnost měřit fluorescenci z přední strany.[14]



Obrázek 3 Schéma dvoupraskového spektrometru. (1) zdroj světla, xenonová ob-
louková lampa; (2) excitační monochromátor; (3) uzávěrka; (4) držák filtru; (5)
rozdělovač paprsku; (6) polarizátor; (7) komora se vzorkem; (8) korekční detek-
tor; (9) emisní monochromátor; (10) emisní detektor; (11) kontrola monochromá-
toru a počítač s následnou ukázkou výstupu [6].

2.5 Charakteristický výstup

2.5.1 Základní vztahy

Energetický výtěžek fluorescence χ , což je poměr mezi energií emitovanou (E_{em}) a energií absorbovanou (E_{abs}), slouží k hodnocení intenzity fluorescence [3].

$$\chi = \frac{E_{em}}{E_{abs}} \quad (4)$$

Jako odvozená veličina se poté uvádí kvantový výtěžek fluorescence φ_F , který je definován poměrem počtu vyzářených kvant (N_{em}), ku počtu kvant absorbovaných soustavou (N_{abs}) [3].

$$\varphi_F = \frac{N_{em}}{N_{abs}} \quad (5)$$

Vztah mezi těmito veličinami je pak následovný [3]:

$$\chi = \frac{\lambda_{em}}{\lambda_{abs}} \varphi_F \quad (6)$$

2.5.2 Emisní a excitační spektra

Jak bylo uvedeno výše, pro měření pomocí fluorescenčních sond využíváme molekulová spektra. Fluorescenční emisní spektrum je vyjádřeno jako závislost intenzity zářivého toku fluorescenčního záření φ_F na vlnové délce λ případně na její reciproké hodnotě zvané vlnčet ν , při konstantní vlnové délce excitace. Zpravidla jde o téměř zrcadlový obraz absorpčního spektra, ale je posunuto k delším vlnovým délkám. Nejčastěji se jedná o jednoduchou křivku s maximem při vyšších vlnových délkách, než je vlnová délka excitace. Pro měření excitačního spektra postupujeme tak, že měníme vlnovou délku excitace při konstantní vlnové délce emise [3, 13].

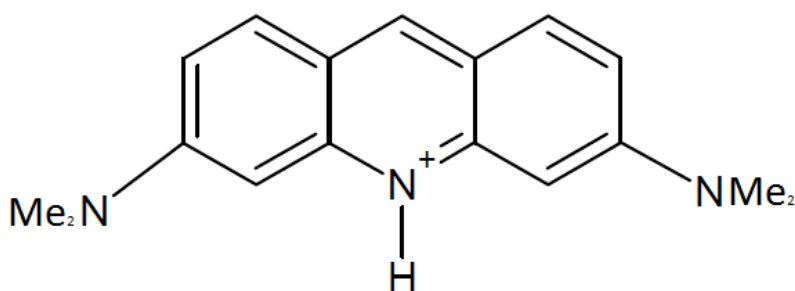
3 FLUORESCENČNÍ SONDY

Fluorescenční sondy jsou látky vážící se v materiálu nekovalentními vazbami. Používají se na výzkum látek neschopných vlastní (intrinsické) fluorescence. Existuje nepřehledné množství specifických fluorescenčních sond, např. viskozitní sondy, pH sondy, chemicky průzkumné sondy pro stanovení iontu, oxygen sondy pro stanovení kyslíku uvnitř látek a mnohé další aplikace. Z tohoto důvodu je velmi důležité zvolit správnou fluorescenční sondu pro daný systém polymer - sonda. [6, 15]

3.1 Příklady nejvýznamnějších fluorescenčních sond

3.1.1 Akridinová oranž

Akridinová oranž, nebo také 3,6-bis(dimethylamino)akridin (Obr. 4) je kationaktivní fluorescenční sonda vyznačující se snadnou rozpustností ve vodě. Je schopná reagovat s přírodními polymery jako například DNA a RNA. Převážně schopnost reagovat s DNA a RNA je důvodem zájmu o tuto sondu [16]. Samotná DNA ani RNA nefluoreskují. Pokud se ke šroubovicím přimísí akridinová oranž, pak se tato sonda na šroubovice naváže nekovalentní vazbou a dochází u této sondy ke změnám v absorpční a fluorescenční části spektra. Pokud se akridinová oranž naváže na DNA, emituje zelenou fluorescenci při 530 nm. Pokud se však naváže na RNA, emituje červenou fluorescenci při 640 nm [17].

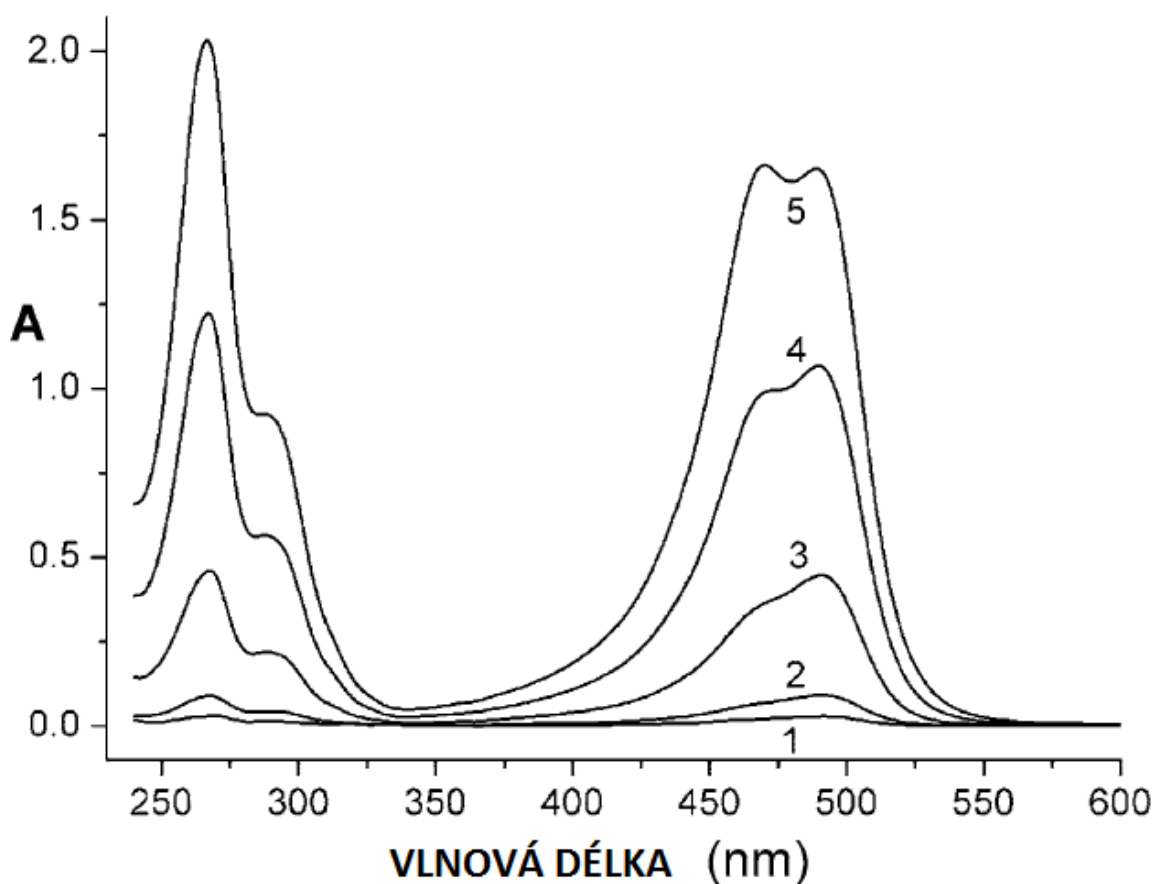


Obrázek 4 3,6-bis(dimethylamino)akridin [10]

Ve zředěných roztocích existuje akridinová oranž pouze jako monomer. Pokud je ale koncentrace této sondy vyšší než $2 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, dochází k agregaci monomeru na dimer [18]. Tvorba dimeru způsobuje zhasnutí fluorescence monomeru, ale i dimer je schopný fluorescence, avšak jeho intenzita bude o mnoho nižší než intenzita monomeru

samotného. Důkazem tvorby dimeru jsou absorpční spektra akridinové oranže (obrázek 5). Monomer má absorpční maximum při 490 nm a dimer má absorpční maximum při 465 nm. S rostoucí koncentrací dimeru, klesá absorpční maximum monomeru a absorpční maximum dimeru se naopak zvyšuje. Dalším důkazem agregace monomeru na dimer jsou její fluorescenční spektra. S rostoucí koncentrací sondy roste intenzita fluorescence až do chvíle agregace monomeru. Jakmile se začne tvořit dimer, intenzita fluorescence prudce klesá.

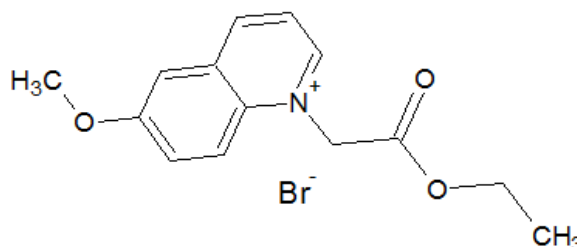
Akridinová oranž se používá pro výzkum interakcí polymer – sonda a sonda – sonda v biopolymerech a v syntetických polyelektrolytech. Vazba sondy na polyelektrolyt může poskytnout mnoho informací o chemické a fyzikální podstatě vazných míst polymeru a o uspořádání řetězce polymeru [19].



Obrázek 5 závislost absorpance na vlnové délce pro roztoky akridinové oranže v 1 % roztoku hexamethylentetraminu, při koncentracích: 1) $1,2 \cdot 10^{-6}$ mol/l 2) $4,0 \cdot 10^{-6}$ mol/l 3) $2,0 \cdot 10^{-5}$ mol/l 4) $5,0 \cdot 10^{-5}$ mol/l 5) $8,0 \cdot 10^{-5}$ mol/l [18]

3.1.2 MQAE

Velmi často se objevuje potřeba spektroskopicky zjistit přítomnost substituentů, jako jsou ionty Cl^- , Ca^{2+} , nebo Na^+ . Pro tento účel existují tzv. chemicky senzitivní sondy. Pro stanovení Cl^- lze použít sondu MQAE, N - (Etoxykarbonylmethyl) - 6 - metoxyquino-
linium bromid. Pokud zkoumaný roztok, případně polymerní matrice, obsahuje chloridové ionty, pak je tato sonda kolizně zhasena. Tato sonda je vhodná pro sledování transportu, nebo průběhu substituce chloridových iontů. Koncentrace chloridových iontů je poté možno určit pomocí Stern-Volmerovy rovnice, která je založena na snížení intenzity fluorescence právě kolizním zhasením.[6]

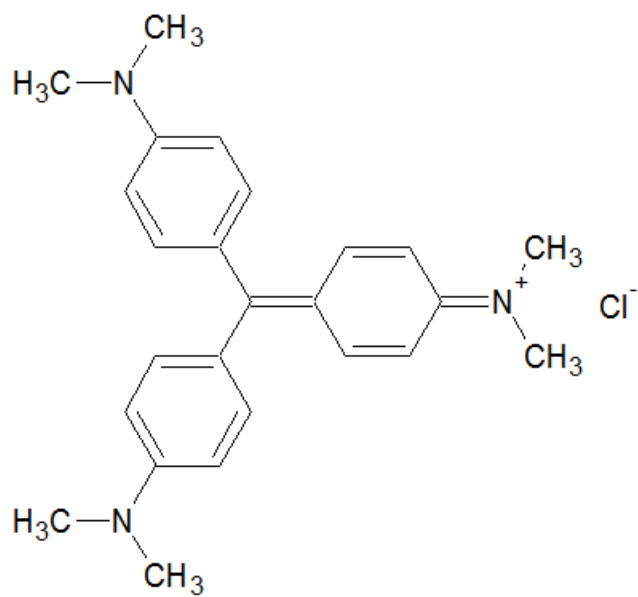


Obrázek 6 sonda MQAE, N - (Ethoxycarbonylmethyl) - 6 - methoxyquino-
linium bromid [6]

3.1.3 Krystalová violet'

Tato chemická sloučenina, sloužící jako viskozitní sonda, patří do skupiny trifenyl metylenových barviv. Nejčastěji se tato látka vyskytuje v chromatickém stavu, přesto může být snadno převedena na tzv. leuco (bezbarvou) formu. V současnosti jsou někteří členové této skupiny spojováni se zvýšeným rizikem vzniku rakoviny. [20]

Látky, používající se jako viskozitní sondy, musí splňovat dva základní předpoklady. Prvním předpokladem je, že látka je schopná emitovat fluorescenci, a druhým předpokladem je existence viskozitně citlivé části, která je schopná rotace. Zvýšení viskozity poté brání rotaci částí molekuly a tím i nezářivým de-excitačním přechodům, ve prospěch zvýšení intenzity fluorescence. [21]



Obrázek 7 krystalová violet', 4-[(4-dimethylaminophenyl)-phenyl-methyl]-N,N-dimethyl-aniline [20]

4 FLUORESCENČNÍ SONDY PRO CHARAKTERIZACI TERMOPLASTŮ

Použití fluorescenčních sond poskytuje široký potenciál pro studium a charakterizaci termoplastů. Využití naleznou především při sledování průběhu polymerace, kdy se pomocí viskozitních fluorescenčních sond dá sledovat stupeň konverze daného polymeru. Pomocí chemicky specifických sond je poté možné sledovat substituční reakce. Sledovaným parametrem je poté především zhášení fluorescence.

Díky vysoké citlivosti fluorescenční spektroskopie je možno stanovit i velmi nízké koncentrace doplňkových látek (stabilizátory, změkčovadla atd.) a to jak kvantitativně tak i kvalitativně.[22]

4.1 Fluorescenční sondy podle chemického složení

Existuje předpoklad, že pokud je látka schopná vlastní fluorescence a je použitelná jako fluorescenční sonda, poté i některé její deriváty mohou vykazovat podobné vlastnosti. Řada výzkumů se proto provádí vyšetřováním dané fluorescenční sondy a jejich derivátu, a hledá se nejsilnější závislosti dané sondy (intenzita, zhášení, posun fluorescenčního emisního maxima atd.) na studovaném jevu.[23, 24, 25]

4.1.1 Fluorescenční sondy založené na 1,8-naftalenimidu

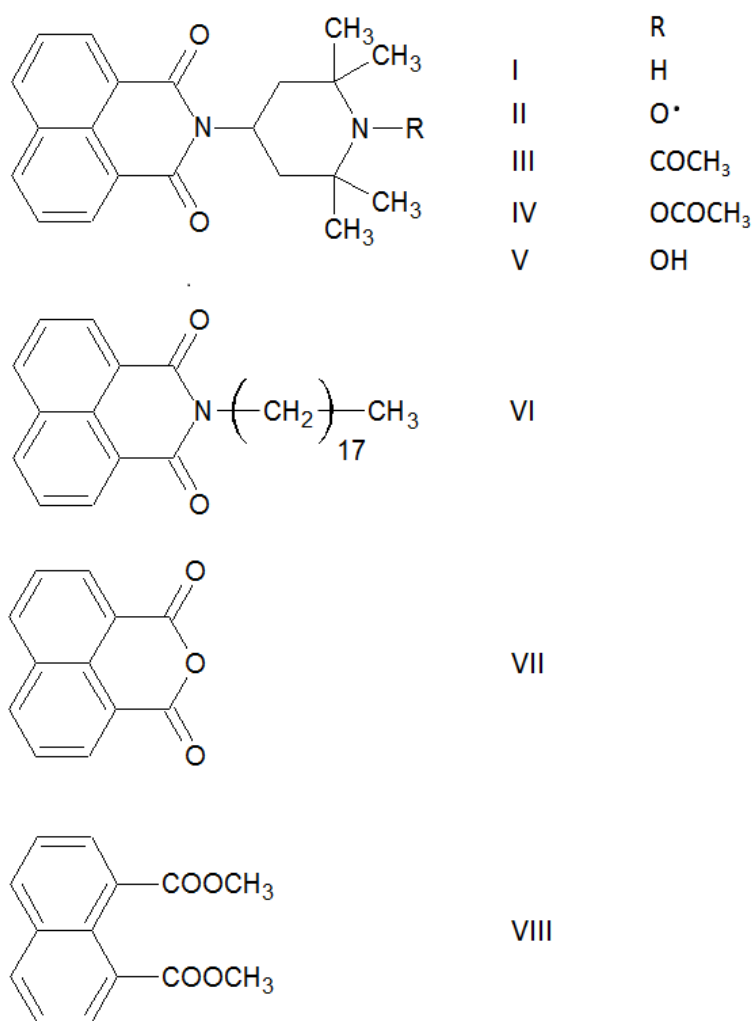
V roce 1997 provedl výzkum těchto fluorescenčních sond profesor Pavol Hrdlovič ze Slovenské Akademie věd. Multifunkční fluorescenční sondy s rozdílnou strukturou jsou používány pro monitorování fotofyzikálních a fotochemických procesů v různorodých prostředích. Konečným cílem tohoto výzkumu bylo zjistit chování jednotlivých sond v polymerních maticích, a parametry, které vykazují silné závislosti na mediu využít jako senzory. Výhody, které fluorescenční techniky přináší, jsou především vysoká citlivost, jednoduchá detekce a snadné kvantitativní vyhodnocení.[23]

Chování sond založených na 1,8-naftalenimidu, bylo referenčně zkoumáno proti standardu, antracénu. Dobrá rozpustnost v rozpouštědlech různé polarity, dobrá kompatibilita s polymerní maticí, absorpce a emise ve stejné oblasti jako studované sondy, dostupnost ve vysoké čistotě, a malý nebo žádný vliv na spektrální vlastnosti média, byly hlavní důvody, proč byl antracén jako reference zvolen. Na obrázku 8 je poté vyobrazeno všech osm zkoumaných sond. Dané sondy byly zkoumány v polymerních maticích polystyrenu

(PS), Polymethylmethakrylát (PMMA), polyvinylchloridu (PVC) a izotaktického polypropylénu (iPP). [23]

Pro měření vlivu media na spektrální analýzu molekul plniva se obecně zavádí předpoklad, že solvatace látky v polymerní matrici je podobná jako u nízkomolekulárních rozpouštědel, za předpokladu, že jsou do ní zapojeny stejné jednotky. Tento předpoklad však byl dosud prokázán pouze v několika případech. Drobná odchylka je způsobena především různou mobilitou nízkomolekulárního rozpouštědla, kde je mobilita vysoká, a proto je solvatace v podstatě neomezená. A polymerní matrice, kde je solvatace omezena z důvodu nižší pohyblivosti řetězců. Dá se očekávat, že tento účinek nemá žádný vliv na absorpční spektra dané látky. Díky tomuto předpokladu mohlo měření absorbance daných sond probíhat v roztoku nepolárního rozpouštědla cyklohexanonu a polárního rozpouštědla metanolu. [23]

Měřením fluorescenční sondy I a porovnáním absorpčních a emisních spekter s antracénem, bylo zjištěno, že relativní kvantový výtěžek v porovnání s antracénem je podstatně vyšší v polystyrenu než v cyklohexanu. V matrici izotaktického polypropylénu vykazuje sonda I emisní červený posun na 445 nm oproti 362 nm v cyklohexanu, tento posun vykazují také sondy III, IV, VI a VIII. Tento posun je způsoben interakcí nepolární matrice a polární sondy kdy při zkoumané koncentraci $5 \cdot 10^{-3}$ mol/kg docházelo k agregaci (tvorba dimerů) dané sondy. Přesto však tato sonda měla v iPP nejširší spektrum fluorescence.[23]



Obrázek 8 zkoumané fluorescenční sondy (I) N-(2',2',6',6'-tetramethyl-4'-piperidinyl)-1,8-naftalenimid; (II) N-(1'-oxo-2',2',6',6'-tetramethyl-4'-piperidinyl)-1,8-naftalenimid; (III) N-(1'-acetyl-2',2',6',6'-tetramethyl-4'-piperidinyl)-1,8-naftalenimid; (IV) N-(1'-acetyloxy-2',2',6',6'-tetramethyl-4'-piperidinyl)-1,8-naftalenimid; (V) N-(1'-hydroxy-2',2',6',6'-tetramethyl-4'-piperidinyl)-1,8-naftalenimid; (VI) N-oktadekyl-1,8-naftalenimid; (VII) Anhydrid 1,8-naftalendikarboxylové kyseliny; (VIII) dimetyléster 1,8-naftalendikarboxylové kyseliny [23]

Pro matrici PS vykazovala nejvyšší intenzitu fluorescence sonda VII. Pro sondy I-VI byly měřeny poločasy fluorescence. V nízkomolekulárních látkách se tato doba pohybovala v rozmezí okolo 1 ns, zatím co v polymerní matrici byla tato doba změřena na 3-8 ns. Tyto sondy vykazují dvě funkční centra, a sice chromofor 1,8-naftalenimid a stericky bráněný amin, který může být oxidován, nebo substituován. Přítomnost reakčního centra způsobuje zhášení fluorescence v závislosti na prostředí. Tato závislost se dá vyjádřit jako

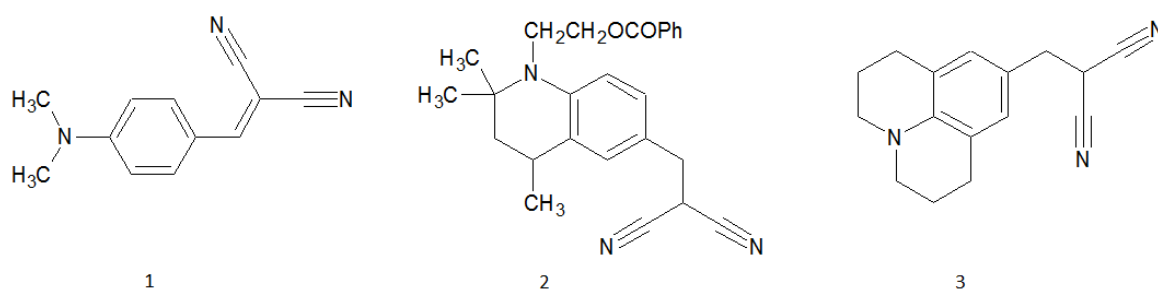
poměr intenzity fluorescence sondy I a intenzity fluorescence zkoumané sondy. Tato závislost je u nepolárních polymerů, jako je iPP, PS rovna hodnotě 1, která ukazuje skutečnost, že v těchto matricích ke zhášení nedochází. U matric PMMA a PVC je tato hodnota blízká 3. Sondy I-VII, které jsou od sondy I odvozeny vykazují fotochemickou nestálost. Nejstabilnější je v tomto ohledu sonda IV, a jako nejméně stabilní se jevila sonda III. [23]

Sondy založené na 1,8-naftalenimidu vykazují poměrně složité spektrální chování. Byl prokázán silný vliv media na emisní spektra i na zhášení fluorescence těchto sond. Pro každé použití těchto sond však musí být brána v úvahu jejich fotochemická nestálost. [23]

4.1.2 Fluorescenční sondy založené na p-(N,N-dialkylamino)benziliden malononitrilu

Tyto fluorescenční sondy patří do skupiny organických molekul známých jako „molekulární rotory“. Vnitřní molekulární rotace těchto sloučenin může být zpomalena zvýšením tuhosti okolního media, nárůstem viskozity, nebo snížením tzv. volného objemu, který umožňuje molekulární relaxace. Inhibice molekulární rotace vede k útlumu nezářivých přechodů a tím i k nárůstu fluorescenčního záření. Fluorescenční emise této třídy sloučenin nám umožňuje studovat statické i dynamické změny ve volném objemu polymerů v závislosti na parametrech polymerace, molekulové hmotnosti, stereoregularitě, síťování a na relaxaci a flexibilitě polymerního řetězce.[24]

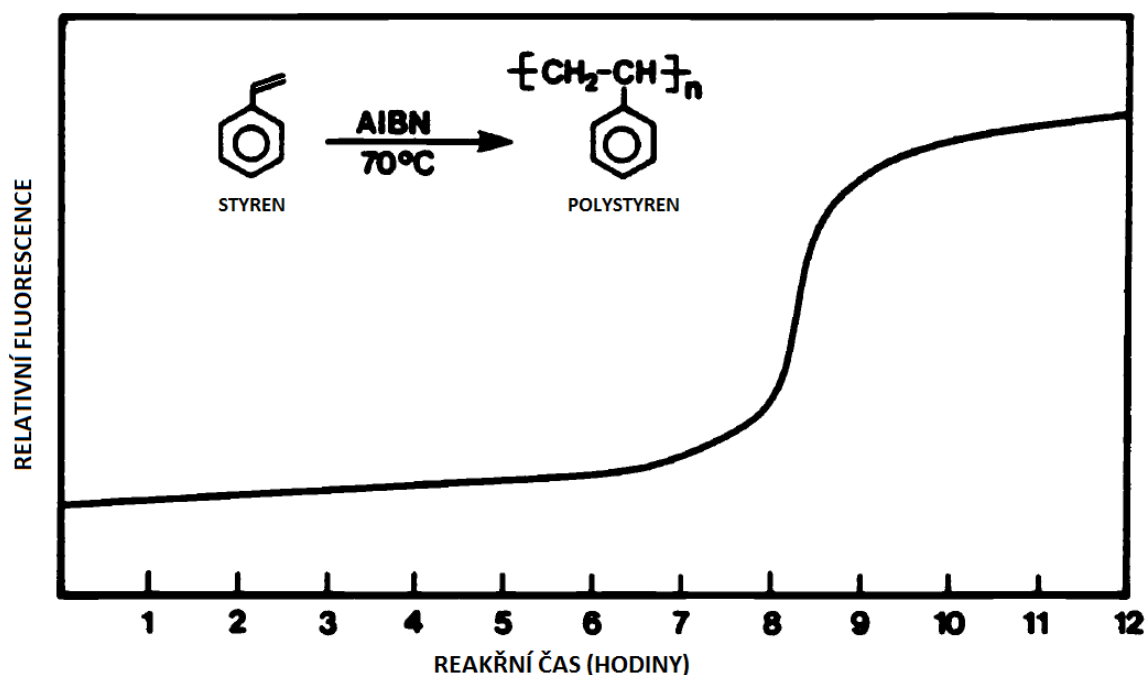
Životnost excitovaného stavu u sond typu [p-(N,N-dialkylamino)benzylidenkafr] malononitril, na (obrázku 9 pod čísly 1-3), v roztoku je odhadována na 3-10 ps což odpovídá nezářivým přechodům. Tento velice rychlý přechod zpět do základního stavu je způsoben torzní relaxací. Faktory prostředí, které omezují vnitřní molekulární rotace těchto sond vedou ke zvýšení doby přechodu z excitovaného stavu na základní a následně i k nárůstu intenzity fluorescence. Tyto látky jsou vynikající mikrofyzikální sondy pro měření torzní tuhosti okolního media a jejich fluorescence je velmi citlivá na dynamické procesy a strukturální změny v okolním mediu při širokém teplotním rozmezí. To umožňuje sledovat změny viskozity i při polymerních reakcích.[24]



Obrázek 9 fluorescenční sondy typu [p-(N,N-dialkylamino)benzylidenkafr] malononitril [24]

Fluorescenční sondy typu [p-(N,N-dialkylamino)benzylidenkafr] malononitril vykazují nejintenzivnější absorpci v modré části spektra a slabou emisi fluorescenčního záření v zelené části. Absorpční maximum a fluorescenční emisní maximum se posouvá k vyšším vlnovým délkám v závislosti na vzrůstající dielektrické konstantě daného média. Tato lineární závislost je velice důležitý parametr, který může sloužit k určení polaridy okolního média. [24]

Pomocí intenzity fluorescence sondy 3, byla sledována polymerační reakce PS a PMMA. V monomeru byla jednoduše tato sonda rozpuštěna při koncentraci 10^{-5} mol/l a přidáno 0,5 hm.% iniciátoru azodiisobutyrodinitrilu (AIBN), polymerace poté probíhala při 70 °C. Sledovala se intenzita fluorescence v závislosti na čase při excitaci o vlnové délce 430 nm. Jak je vidět na obrázku 10 intenzita fluorescence zůstává v čase téměř konstantní až do kritického momentu, kdy dochází k prudkému nárůstu a následnému ustálení, kdy se polymer dostane k limitní konverzi. Takový esovitý charakter průběhu je totožný pro všechny zkoumané polymerní matrice. Nicméně doba, kdy tento nárůst nastane, sklon tohoto nárůstu a zvýšení intenzity fluorescence je pro každý polymer (či kopolymer) různá. Oblast ve které se intenzita fluorescence zvyšuje, odpovídá přechodu ze středně viskózní kapaliny na tuhé sklo. [24]

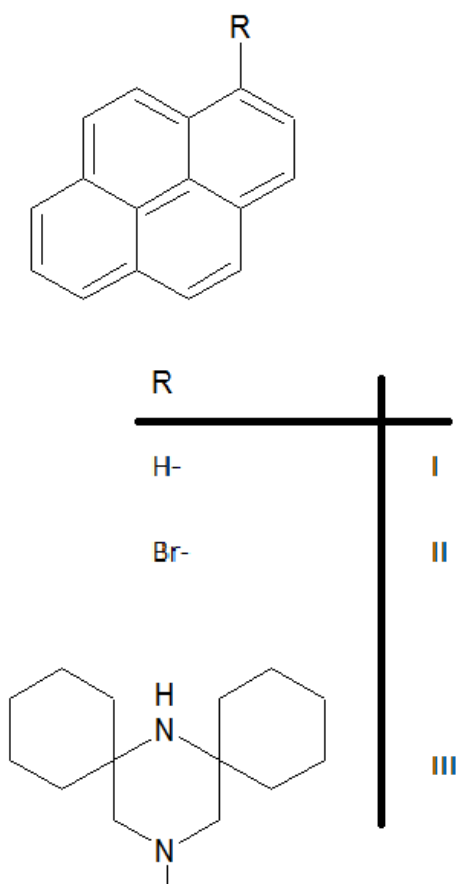


Obrázek 10 závislost intenzity fluorescence fluorescenční sondy 3, na čase polymerace polystyrenu [24]

Polymerní matrice stericky ovlivňuje plnivo (fluorescenční sondu). Závislost intenzity na volném objemu uvnitř polymerní matrice je matematicky odvozena a s dostačující přesností ověřena sondou 2. Této skutečnosti lze využít pro sledování průběhu polymerace, aby se zabránilo polymeracím do vyššího než požadovaného stupně. Tato možnost může mít i průmyslový význam. Důležitým sledovaným parametrem je také vlnová délka maxima fluorescenční emise. Tento parametr ukazuje na polaritu media. [24]

4.1.3 Fluorescenční sondy na bázi pyrenu a piperazinu

Jedná se relativně nový typ fluorescenčních sond. Kvantový výtěžek těchto sond v polymerní matrici je až devětkrát vyšší v porovnání s antracénem. Životnost těchto sond se pohybuje kolem 5 ns. Pyren, nebo jeho deriváty, nacházejí univerzální uplatnění pro sledování fotochemických a fotofyzikálních jevů v komplexních systémech, jako jsou micely, polymerní materiály, nebo biologické strukturální jednotky. [25]



Obrázek 11 fluorescenční sondy (I) pyren (II) 1-bromopyren
(III) 15-(1-pyren)-7,15-diazadispiro [5,1,5,3] hexadekan (PY-PA) [25]

Fluorescenční sondy na bázi pyrenu vykazují v polymerních matricích (PS, PMMA, PVC) silné absorpční maximum při $25\,500\text{ cm}^{-1}$. V této oblasti nastává buzení fluorescence. Fluorescenční sondy vykazují několik skupin s maximem na $25\,500\text{ cm}^{-1}$ pro pyren, dvě skupiny $25\,800\text{ cm}^{-1}$ a $24\,800\text{ cm}^{-1}$ pro 1-bromopyren a $24\,000\text{ cm}^{-1}$ pro sondu PY-PA. Tyto hodnoty byly naměřeny v polymerní matrici PMMA při koncentraci sondy $0,002\text{ mol/kg}$. [25]

Vliv kyslíku je pro každou z těchto sond různý. Pyrenová sonda je velmi citlivá na přítomnost kyslíku. Životnost této sondy byla zkoumána v prostředí metanolu. Pokud tento roztok obsahoval kyslík, poločas luminiscence této sondy byl 18 ns , pokud neobsahoval, poločas luminiscence této sondy se zvýšil na 390 ns (měřeno při koncentraci $2,12 \cdot 10^{-3}\text{ mol/dm}^3$). Pro sondu PY-PA se vlastnosti, v závislosti na přítomnosti kyslíku, neměnily. Podobné vlastnosti byly objeveny také v polymerní matrici. Pro PMMA byla u pyrenové

sondy zjištěn poločas luminiscence 226 ns, v porovnání s 1-brompyrenovou sondou (4,4 ns) a PY-PA sondou (11 ns), při koncentracích sond 0,002 mol/kg.[25]

Dalším důležitým aspektem je kvantový výnos fluorescence, měřený v porovnání s antracénem z výše zmíněných důvodů. Měření tohoto aspektu byla podrobena sonda PY-PA. Nejvyšší hodnoty, tedy 9,3x většího kvantového výtěžku fluorescence se dosáhlo v polymerní matrici PS, nejnižší hodnota byla v PMMA (1,2x) a v matrici PVC byla tato hodnota 4,9x, při koncentracích sond 0,002 mol/kg. Zajímavým prvkem sondy PY-PA je koncentrační zvilost na pozici fluorescenčního maxima. Pro polymerní matrice PMMA a PVC, a pro koncentrace 0,002 až 0,04 mol/kg, byl rozdíl v posunu o 1000 cm^{-1} . A pro polymerní matrici PS 500 cm^{-1} . U sond pyren a 1-brompyren tento posun nebyl pozorován. Nejjednodušší vysvětlení spočívá v agregaci molekul dané sondy v tuhé polymerní matrici. Toto tvrzení je však těžké dokázat, v submikroskopickém měřítku jsou totiž tyto plněné filmy opticky transparentní. Předpokladem však zůstává, že sonda PY-PA je poměrně citlivým type pro tuto agregaci. K prokázání je však třeba dalšího výzkumu. [25]

4.2 Využití fluorescenčních sond podle účelu charakterizace

Fluorescenční techniky obecně nachází široké uplatnění pro výzkum a charakterizaci polymerních materiálů. Fluorescenční sondy mnohdy nahrazují komplikované a nepřesné metody. Díky známým závislostem lze použít tyto sondy například pro sledování průběhu polymerace v čase, vyšetřování komatibilizace polymerních směsí, dispergaci barviv či jiných plniv, degradaci polymerních materiálů atd. [24, 26, 27]

4.2.1 Měření volného objemu v polymerní matrici

Při chlazení amorfního polymeru, přes teplotu skelného přechodu, nastane v tomto okamžiku vysoký nárůst viskozity a mechanických vlastností. Právě při tomto ději jsou molekuly „uvězněny“ v nerovnovázném stavu, charakterizovaném termodynamicky vyšším stavem než by odpovídalo rovnovážnému stavu (energii i objemem) pro ___?___ k rovnovážnému objemu po danou teplotu. Rozdíl objemů mezi skelným stavem a mezi stavem rovnovážným je poté tzv. volný objem. [28]

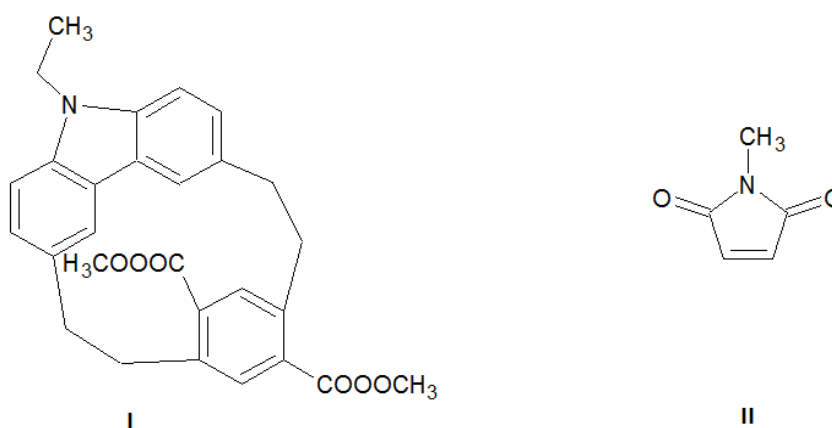
Pro měření volného objemu lze využít fluorescenční sondy schopné tento jev indikovat. Tyto sondy, označované též jako molekulární rotory, jsou v závislosti na okolním volném objemu schopné fluorescence. Na obrázku 12 je poté uvedeno několik takových v praxi využívaných sond. [24, 28]

4.2.3 Měření polarity polymerní matrice

Měření polarity uvnitř polymerní matrice se provádí přes měření permeability prostředí (dříve dielektrická konstanta). Nejčastěji používanou sondou pro tento účel je pyren. Tato fluorescenční sonda má vysokou závislost právě na polaritě okolního média. Nicméně tato sonda je použitelná jen v omezeném rozsahu teplot. Pro větší teplotní rozsah byly vyvinuty nové fluorescenční sondy. [30]

Fluorescenční sonda karbazol-tereftalát cyklopentan, který je vyobrazen na obrázku třináct, je vhodnou sondou pro měření polarity daných materiálu v širokém pásmu teplot, a to především díky unikátní konstrukci, která si zachovává svou konformaci i v prostředí tuhého polymeru.[30]

Další zajímavou sondou pro měření polarity v polymerní matrici je látka odvozená od fluorescenční sondy v anglické literatuře uváděné jako „fluoroprobe“ (FP), v doslovném překladu fluorosonda, a od ní odvozená sonda maleimido fluoroprobe (MFP). Tato fluorescenční sonda je označována za nejcitlivější sondu pro měření polaritě media. Její chemická struktura je uvedena na obrázku 13. Studium této sondy ukázalo, že se v průběhu polymerace současně zabudovává do řetězce, což způsobuje zvýšení intenzity fluorescence už v počáteční, nízko viskózní části polymerace. Díky této vlastnosti je tak možno pozorovat i stupeň polymerizace. Polarita média je poté pozorovatelná díky tzv. modrému posunu maxima fluorescence.[30]

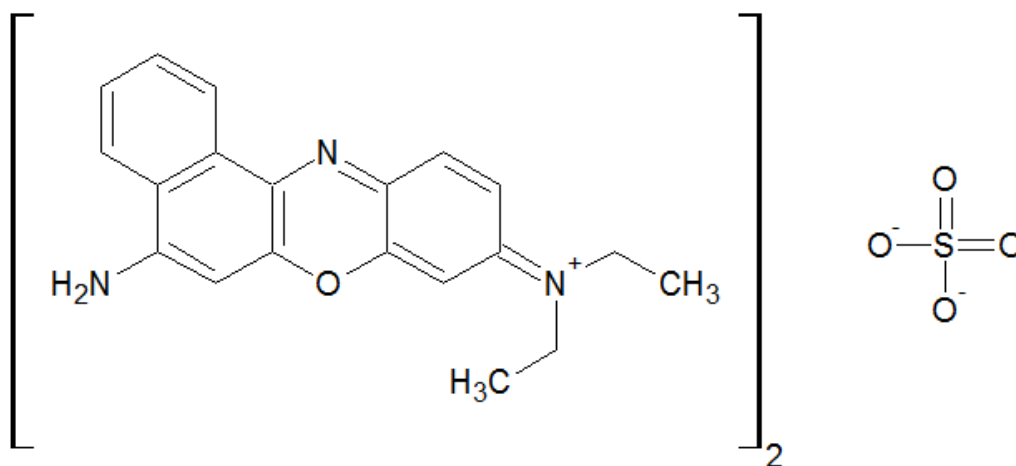


Obrázek 13 fluorescenční sondy pro měření polaritě (I) karbazol-tereftalát cyklopentan (2) MFP [30, 31]

4.2.4 Měření dispergace plniva v polymerní matrici

Další velice zajímavou aplikací fluorescenčních sond je měření stupně dispergace plniva v polymerní matrici. Pro tento účel posloužila fluorescenční sonda Nilská modř (NB). Tato sonda byla začleněna do plniva pomocí iontově výměnných procesů. Takto označené plnivo bylo pak mícháno s polymerní matricí. V systému sonda-plnivo nebyla zaznamenána žádná fluorescence z důvodu koncentračního zhášení. Při dispergaci plniva poté nastalo uvolnění sondy do polymerní matrice, kde již byla naměřena fluorescence.[32]

Použití této fluorescenční sondy je dvojí. První možnost je měření stupně dispergace plniva v čase hned za vytlačovací hlavou, bez nutnosti pravidelného odběru vzorků a destruktivních metod určování. Druhou možností je pak možnost vyladit veškeré parametry míchání v čase podle naměřených dat. V praxi byl prováděn výzkum, kdy v polyamidu 11 byly dispergovány silikátové nanočástice označeny sondou NB. Výsledky ukázaly, že při špatné dispergaci bylo maximum fluorescence na 500 nm (excitace byla prováděna vlnovou délkou 407 nm). Zatím co při dobré dispergaci bylo toto maximum posunuto na 610 nm. [32]



Obrázek 14 Fluorescenční sonda Nilská modř. [33]

5 PŘÍSTROJOVÉ VYBAVENÍ UNIVERZITY TOMÁŠE BATI

Možnost provádět měření a výzkum polymerních materiálů pomocí fluorescenčních sond, je posledním aspektem této práce. Univerzita Tomáše Bati disponuje dvěma přístroji schopnými měřit fluorescenci. Přístroj FS 920 Edinburgh Instruments umístěný na Fakultě technologické, budova U1 a přístroj Shimadzu RF-1501 umístěný v budově U5.

5.1 FS 920 Edinburgh Instruments

FS 920 je modulární, počítačem řízený spektrofluorimetr, pro měření luminiscence v ustáleném stavu spektra, v rozsahu od ultrafialové oblasti, až do blízké infračervené oblasti, s citlivostí jednoho fotonu. Tento přístroj v sobě kombinuje maximální citlivost a vysoké spektrální rozlišení. Tento spektrofluorimetr je ideální pro náročné aplikace v široké oblasti výzkumu.[34]

Spektrofluorimetry řady FS920, používají monochromátory značky Czerny-Turner, s vysokou kvalitou difrakčních mřížek. Vlnová délka je nastavitelná, díky mikro-krokovým motorům s velikostí kroku 0,5 nm. Rovněž tato řada vykazuje výborné vlastnosti, co se týče potlačení rozptylu světla. To je zásadní pro vzorky, které vykazují nízký kvantový výtěžek fluorescence, nebo vysokou úroveň rozptylu. Co do spektrálního rozsahu, lze provádět luminiscenční měření o vlnových délkách od 185 nm až do 1700 nm, při použití fotonásobičů pro jednofotonovou detekci. Při použití analogové detekce lze dosáhnout měření až do 5000 nm.[34]

Pro potlačení možných instrumentálních chyb při měření emisních a excitačních spekter vzorku, je možné použít spektrální korekci. Ta se provádí pomocí dříve naměřených korekčních souborů. Nekorigované excitační spektra jsou ovlivněny spektrálním výkonem světelného zdroje (v tomto případě je světelným zdrojem xenonová oblouková lampa typu CW 450 W), případně chybou monochromátoru. Tyto spektra jsou korigována pomocí vestavěného referenčního detektoru. Podobně nekorigovaná emisní spektra mohou být ovlivněna účinností monochromátoru a spektrální odezvou detektoru. Pro korekci se používá unikátní korekční soubor, který se pro každý spektrometr získává kalibrací pomocí kalibrovaného zdroje světla.[34]

Díky tomuto přístroji je možné měřit anizotropii fluorescence za ustáleného stavu, kterou získáme z polarizovaného excitačního a emisního spektra. Tato spektra jsou poté důležitě kvůli přímému vztahu anizotropie excitace k orientaci mezi excitací a emisí dipó-

lů. Teplotní a rozpouštěcí analýza závislá na takovéto anizotropii, je výkonný nástroj pro studium rotace fluoroforů, nebo rotace molekul těmito fluorofory označených. Další možnost měření na tomto přístroji je měření kinetiky např. chemické reakce, nebo průběhu polymerace. Kdy tento přístroj měří za konstantní emisní a excitační vlnové délky změnu intenzity fluorescence v předem zadaných časových usecích. [34]



Obrázek 15 spektrofluorimetr FS 920 Edinburgh Instruments

5.2 Shimadzu RF-1501

Tento fluorescenční spektrofotometr Japonské firmy Shimadzu disponuje optikou, díky níž dosahuje tento přístroj vysoké citlivosti za velmi kompaktních rozměrů. V přístroji je umístěna xenonová lampa o výkonu 150 W, umožňující měření od 220 nm až do 900 nm s přesností nastavení vlnové délky ± 5 nm. Systém umožňuje automatické vyhledání optimální vlnové délky pro excitaci a emisi záření. Umožňuje vysokorychlostní skenování (3700 nm/min) s možností kvantitativních měření. [35]

ZÁVĚR

Fluorescenční spektroskopie je dnes v mnoha ohledech nenahraditelnou možností výzkumu polymerních materiálů. Výzkum nových technik a nových látek, používaných jako fluorescenční sondy, napomáhá k získání levnějšího, rychlejšího a přesnějšího výzkumu polymerů. Již dnes jsou techniky fluorescenční spektroskopie nenahraditelné například pro stanovování kritické micelární koncentrace, nebo zjištění dispergace plniv nedestruktivními metodami. Fluorescenční spektroskopie dnes disponuje nepřehledným množstvím fluorescenčních sond s vysokým potenciálem využití nejen v makromolekulární chemii.

Jako velká výhoda se v mnoha aplikacích jeví možnost sledování daného jevu v čase, kdy můžeme v krátkých časových intervalech pozorovat změnu vlastností a podle ní taky okamžitě na tuto změnu reagovat, a to vše bez nutnosti odebrání vzorků z vyšetřovaného systému sonda-polymer a bez nutnosti využití destruktivních metod, jako je například transmisní elektronová mikroskopie.

I přes mnoho výhod této techniky existuje i mnoho problémů. Jsou to například chyby v měření způsobované vnitřním filtračním efektem prvního a druhého druhu. Dalším problémem, který je často zmiňován v literatuře, je problém tvorby dimeru, nebo agregace sondy v polymerní matici. Často se používá pro porovnání vlastností sondy umístěné v polymerní matici sonda umístěná do nízkomolekulární látky, u které se předpokládá podobná polarita. Polymerní řetězce jsou však více omezeny v pohybu, tudíž ani při nízkých koncentracích sondy nejsou schopny tuto molekulu solvatovat tak, jako molekuly nízkomolekulárního rozpouštědla. Podobných problémů, více či méně řešitelných, existuje celá řada. Výhody této metody charakterizace ale převládají nad nevýhodami.

Fluorescenční sondy nacházejí uplatnění v charakterizaci termoplastů v několika případech. Asi nejdůležitější je možnost velmi přesného stanovení micelární koncentrace pro směsi polymerů, zjištění polarit uvnitř tuhé matrice polymeru. Díky chemicky specifickým sondám je možné analytické zjišťování iontů v termoplastickém materiálu, významná je možnost sledování průběhu polymerace, případně degradace materiálu. Dalším využitím je sledování dispergace plniva v polymerní matici. Další možnost uplatnění je měření volného objemu a teploty skelného přechodu polymeru. Měření vlastností polymerů s využitím fluorescenčních sond ve Zlíně nebylo dosud uskutečněno, avšak potřebné zařízení zde je.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] NĚMCOVÁ, I.; ČERMÁKOVÁ, L.; RYCHLOVSKÝ, P. *Spektrometrické analytické metody I*. Praha : Karolinum, 1970. Atomová absorpční a fluorescenční spektroskopie, s. 67. ISBN 80-246-0776-X.
- [2] NĚMCOVÁ, I.; ČERMÁKOVÁ, L.; RYCHLOVSKÝ, P. *Spektrometrické analytické metody I*. Praha : Karolinum, 1970. Atomová absorpční a fluorescenční spektroskopie, s. 10. ISBN 80-246-0776-X.
- [3] NĚMCOVÁ, I.; ČERMÁKOVÁ, L.; RYCHLOVSKÝ, P. *Spektrometrické analytické metody I*. Praha : Karolinum, 1970. Atomová absorpční a fluorescenční spektroskopie, ISBN 80-246-0776-X.
- [4] *Univerzita Karlova v Praze : I. lékařská univerzita* [online]. 2006 [cit. 2011-05-25]. Principy fluorescenční spektroskopie. Dostupné z WWW: <<http://www1.lfl.cuni.cz/~zfsar/fluorescence/soubory/principy.htm>>.
- [5] SOMMER, Lumír. *Analytická spektrometrie I*. Praha : Státní pedagogické nakladatelství, 1986. 173 s
- [6] LAKOWICZ, Joseph R. *Principles of fluorescence spectroscopy* [online]. Baltimore : School of medicine (University of Maryland), 2006 [cit. 2010-03-08]. ISBN 0-387-31278-1. Dostupné z WWW: <http://books.google.cz/books?id=-PSybuLNxcAC&pg=PA277&dq=fluorescence+quenching&cd=1#v=onepage&q=fluorescence%20quenching&f=false>
- [7] www.olympusmicro.com [online]. c2000-2009 [cit. 2010-03-01]. *Fluorescence microscopy: Basic concepts in fluorescence*. Dostupné z WWW: <http://www.olympusmicro.com/primer/techniques/fluorescence/fluorescenceintro.html>
- [8] Smith K. C. Basic photochemistry. Stanford University School of Medicine. Dostupné z www: <http://www.photobiology.info/Photochem.html>
- [9] Stokes, G. G. On the Change of Refrangibility of Light. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London* **142**: 463–562. Dostupné z www: doi:10.1098/rstl.1852.0022
- [10] KLOUDA, Pavel. *Moderní analytické metody*. Ostrava : Pavel Klouda, 1996. 203 s. ISBN 80-902155-0-5

- [11] BRDIČKA, Rudolf; DVOŘÁK, Jiří. *Základy fyzikální chemie*. Praha : Nakladatelství Československé akademie věd, 1977. 852 s
- [12] *Fluorofory v biomedicině* [online]. [cit. 2010-03-08]. Dostupné z WWW:
<http://www1.lfl.cuni.cz/~zfsisar/fluorescence/soubory/fluorofory.htm>
- [13] RENDELL, D. *Fluorescence and Phosphorescence Spectroscopy : Analytical Chemistry by Open Learning*. London : John Wiley & Sons, 1987. 440 s. ISBN 978-0471913801.
- [14] EISINGER, Josef; FLORES, Jorge. Front-face fluorometry of liquid samples. *Analytical Biochemistry*. 1 April 1979, no. 94, Issue 1, s. 15-21. Dostupný také z WWW:
<http://www.sciencedirect.com/science?_ob=ArticleURL&_udi=B6W9V-4DYTNJ8-52&_user=10&_coverDate=04%2F01%2F1979&_rdoc=1&_fmt=high&_orig=gateway&_origin=gateway&_sort=d&_docanchor=&view=c&_acct=C000050221&_version=1&_urlVersion=0&_userid=10&md5=d76f8196eddc922e447c13d57e6ef72b&searchtype=a>. ISSN 0003-2697.
- [15] Database of Fluorescent Dyes; Properties and Applications dostupné z WWW:
<http://www.fluorophores.tugraz.at/>
- [16] COSTANTINO, Lucia; GUARINO, Gennaro; ORTONA, Ornella; VITAGLIANO, Vincenzo. Acridine Orange Association Equilibrium in Aqueous Solution. *Journal of Chemical and Engineering Data*. 1984, 29, s. 62
- [17] LAURETTI, Flávio, et al. Use of acridine orange staining for the detection of rotavirus RNA in polyacrylamide gels. *Journal of Virological Methods*. December 2003, 114, 1, s. 29-35
- [18] WANG, Fei, et all. Study on the formation and depolymerization of acridine orange dimer in acridine orange–sodium dodecyl benzene sulfonate–protein system. *Journal of Colloid and Interface Science*. 2006, 298, s. 757-764. Dostupný také z WWW: www.sciencedirect.com
- [19] TAN, J. S.; SCHNEIDER, R. L. Dye Binding and Its Relation to polyelectrolyte Conformation. *The Journal of Physical Chemistry*. 1975, Vol. 79, No. 14, s. 1380-1386

- [20] ŠAFAŘÍK, I.; ŠAFAŘÍKOVÁ, M. Detection of low concentrations of malachite green and crystal violet in water. *Water Research*. 2002, Volume 36, Issue 1, s. 196-200. Dostupný také z WWW: <www.sciencedirect.com>.
- [21] WANG, Ke, et al. Characterization of 2-phenylbenzo[g]quinoxaline derivatives as viscosity-sensitive fluorescent probes. *Talanta*. 2009, Volume 77, Issue 5, s. 1795-1799. Dostupný také z WWW: <www.sciencedirect.com>.
- [22] BRAUN, Dietrich, et al. *Polymer Synthesis: Theory and Practice*. 2005. Berlín : Springer, 2005. Methods and Techniques for Synthesis, Characterization, Processing, and Modification of Polymers, s. 39-156. Doi: 10.1007/3-540-26890-1_2.
- [23] HRDLOVIČ, Pavol; CHMELA, Štefan; DANKO, Martin. Spectral characteristics and photochemical stability of fluorescence probes based on 1,8-naphthaleneimide in solution and in polymer matrix. *Journal of Photochemistry and Photobiology*. 1998, 112, s. 197-203. Dostupný také z WWW: <www.sciencedirect.com>.
- [24] LOUTFY, R. O. Fluorescence probes for polymer free-volume. *Pure and Applied Chemistry*. 1986, vol.58, No. 9, s. 1239-1248. Dostupný také z WWW: <<http://www.iupac.org/publications/pac/pdf/1986/pdf/5809x1239.pdf>>.
- [25] HRDLOVIČ, Pavol; KOLLÁR, Jozef; CHMELA, Štefan. Novel fluorescence probe based on pyrene and piperazine : spectral properties in solution and in polymer matrices. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*. 2004, Volume 163, Issues 1-2, s. 289-296. Dostupný také z WWW: <www.sciencedirect.com>.
- [26] FORTELNÝ, Ivan; MICHÁLKOVÁ, Danuše; KRULIŠ, Zdeněk. An efficient method of material recycling of municipal plastic waste. *Polymer Degradation and Stability*. 2004, Volume 85, Issue 3, s. 975-979. Dostupný také z WWW: <www.sciencedirect.com>.
- [27] SANDOVAL, ROBERT, et al. Critical Micelle Concentrations of Block and Gradient Copolymers in Homopolymer : Effects of Sequence Distribution, Composition, and Molecular Weight. *Journal of Polymer Science : Polymer Physics*. 2008, Vol. 46, s. 2672–2682.

- [28] VICTOR, John; TORKELSON, John. On Measuring the Distribution of Local Free Volume in Glassy : Polymers by Photochromic and Fluorescence Techniques. *Macromolecules*. 1987, 20, s. 2241-2250.
- [29] SHANNIGRAHI, M; BAGCHI, S. Novel Fluorescent Probe as Aggregation Predictor and Micro-polarity Reporter for Micelles and Mixed Micelles. *SpectrochimicaActa Part A-molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2005 JUL, Vol.61(9), P.2131-2138. 2005, vol. 61, no. 9 s. 2131-molecular. ISSN:1386-1425.
- [30] WARMAN, JM; ABELLON, RD; VERHEY, HJ; VERBOEVEN, JW; HOFSTRAAT, JW. Maleimido-fluoroprobe: A Dual-purpose Fluorogenic Probe of Polymerization Dynamics. *Journal of Physical Chemistry B*, 1997 JUN 19, Vol.101(25), P.4913-4916. 1997, vol. 101, no. 25 s. 4913-4916. ISSN:1089-5647..
- [31] WARMAN, J.M; ABELLON, R.D; VERHEY, H.J; VERHOEVEN, J.W; HOFSTRAAT, J.W. Maleimido-fluoroprobe: A Dual-purpose Fluorogenic Probe of Polymerization Dynamics. *Journal of Physical Chemistry B*. 1997, vol. 101, no. 25 s. 4913-4916. ISSN:1089-5647.
- [32] BUR, A; ROTH, S; START, P; LEE, Y.-H; MAUPIN, P. Monitoring Clay Exfoliation During Polymer/clay Compounding Using Fluorescence Spectroscopy. *Transactionsofthe Institute ofMeasurement and Control*, 2007, Vol.29(5), P.403-416. 2007, vol. 29, no. 5 s. 403-416. ISSN:0142-3312.
- [33] Sigma-Aldrich Co. *Sigma-Aldrich Co.* [online]. 2011 [cit. 2011-05-21]. Nile Blue A. Dostupné z WWW: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/ProductDetail.do?lang=en&N4=N0766|SIGMA&N5=SEARCH_CONCAT_PNO|BRAND_KEY&F=SPEC>.
- [34] *Edinburgh Instruments Ltd* [online]. 2009 [cit. 2011-05-14]. FS920 Spectrometer. Dostupné z WWW: <<http://www.edinst.com>>.
- [35] *Shimadzu* [online]. 2010 [cit. 2011-05-16]. Spectroscopy. Dostupné z WWW: <<http://www.shimadzu.eu/products/spectro/rf/rf1500/spec.aspx>>.

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

A	Absorbance [-]
Atd.	A tak dále
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
E_{em}	Emitovaná energie [J]
E_{abs}	Energie absorbovaná [J]
FP	Fluoroprobe
MFP	Maleimido fluoreprobe
MQAE	N - (Etoxykarbonylmethyl) - 6 - metoxyquinolinium bromid
N_{em}	Počet emitovaných kvant [-]
N_{abs}	Počet absorbovaných kvant [-]
NB	Nilská modř
Obr.	Obrázek
PY-PA	15-(1-pyren)-7,15-diazadispiro [5,1,5,3] hexadekan
RNA	Ribonukleová kyselina
S_1	Excitovaný singletový stav
S_0	Základní stav singlem
T_1	Excitovaný tripletový stav
Tzv.	Tak zvaný
Tj.	To jest, nebo tak jest
T	Transmitance [-]
UV	Ultra fialové záření
VIS	Viditelné záření
α	Absorptance [-]
λ	Vlnová délka [m]
ϕ_F	Kvantový výtěžek fluorescence [-]
Φ	Zářivý tok po absorpci [lm]
Φ_0	Zářivý tok před absorpci [lm]
χ	Energetický výtěžek fluorescence [-]

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1 znázornění spinů u základního singletového stavu a u excitovaného	13
Obrázek 2 Jablonskiho diagram, základní pojmy jsou uvedeny výše v textu, podle [7]	15
Obrázek 3 Schéma dvoupraskového spektrometru. (1) zdroj světla, xenonová oblouková lampa; (2) excitační monochromátor; (3) uzávěrka; (4) držák filtru; (5) rozdělovač paprsku; (6) polarizátor; (7) komora se vzorkem; (8) korekční detektor; (9) emisní monochromátor; (10) emisní detektor; (11) kontrola monochromátoru a počítač s následnou ukázkou výstupu [6].....	20
Obrázek 4 3,6-bis(dimethylamino)akridin [10]	22
Obrázek 5 závislost absorbance na vlnové délce pro roztoky akridinové oranže v 1 % roztoku hexamethylentetraminu, při koncentracích: 1) $1,2 \cdot 10^{-6}$ mol/l 2) $4,0 \cdot 10^{-6}$ mol/l 3) $2,0 \cdot 10^{-5}$ mol/l 4) $5,0 \cdot 10^{-5}$ mol/l 5) $8,0 \cdot 10^{-5}$ mol/l [18]	23
Obrázek 6 sonda MQAE, N - (Ethoxycarbonylmethyl) - 6 - methoxyquinolinium bromid [6]	24
Obrázek 7 krystalová violet, 4-[(4-dimethylaminophenyl)-phenyl-methyl]-N,N-dimethyl-aniline [20]	25
Obrázek 8 zkoumané fluorescenční sondy (I) N-(2',2',6',6'-tetramethyl-4'-piperidinyl)-1,8-naftalenimid; (II) N-(1'-oxo-2',2',6',6'-tetramethyl-4'-piperidinyl)-1,8-naftalenimid; (III) N-(1'-acetyl-2',2',6',6'-tetramethyl-4'-piperidinyl)-1,8-naftalenimid; (IV) N-(1'-acetyloxy-2',2',6',6'-tetramethyl-4'-piperidinyl)-1,8-naftalenimid; (V) N-(1'-hydroxy-2',2',6',6'-tetramethyl-4'-piperidinyl)-1,8-naftalenimid; (VI) N-oktadekyl-1,8-naftalenimid; (VII) Anhydrid 1,8-naftalendikarboxylové kyseliny; (VIII) dimetyléster 1,8-naftalendikarboxylové kyseliny [23].....	28
Obrázek 9 fluorescenční sondy typu [p-(N,N-dialkylamino)benzylidenkafr] malononitril [24]	30
Obrázek 10 závislost intenzity fluorescence fluorescenční sondy 3, na čase polymerace polystyrenu [24]	31
Obrázek 11 fluorescenční sondy (I) pyren (II) 1-brompyren (III) 15-(1-pyren)-7,15-diazadispiro [5,1,5,3] hexadekan (PY-PA) [25]	32
Obrázek 12 fluorescenční sondy využívané pro měření volného objemu. Azobenzén, stilben, 1,1'-azonaftalén [28]	34

Obrázek 13 fluorescenční sondy pro měření polarity (I) karbazol-teraftalát cyklopentan (2) MFP [30, 31].....	35
Obrázek 14 Fluorescenční sonda Nilská modř. [33].....	36
Obrázek 15 spektrofluorimetr FS 920 Edinburgh Instruments.....	38