

**Univerzita Karlova v Praze**  
**Farmaceutická fakulta v Hradci Králové**  
**katedra biofyziky a fyzikální chemie**

**Studium fluorescenčních spekter léčiv**  
(bakalářská práce)

Vedoucí práce: Ing. Vladimír Kubíček, CSc.

## **Zadání**

Úkolem této práce bylo proměřit fluorescenční spektra dvou látek, PMEa a PMPA, které jsou používány jako antivirotika, v závislosti na pH prostředí a v závislosti na použitých rozpouštědlech. Výsledky práce mají napomoci při volbě podmínek fluorescenční detekce těchto látek.

## **Prohlášení**

„Prohlašuji, že tato bakalářská práce je mým původním autorským dílem a veškeré myšlenky, data a jejich zdroje, z nichž jsem pro zpracování čerpala, řádně cituji. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.“

# 1 Obsah

1	Obsah .....	4
2	Úvod.....	5
3	Teoretická část .....	6
3.1	Historie .....	6
3.2	Luminiscence .....	8
3.3	Fluorescence .....	11
3.4	Fluorescenční spektra .....	12
3.5	Vliv prostředí na fluorescenční spektra .....	14
3.6	Struktura a fluorescence .....	17
3.6.1	Alifatické sloučeniny .....	17
3.6.2	Aromatické uhlovodíky.....	17
3.6.3	Substituované aromatické uhlovodíky .....	18
3.6.4	Heterocyklické sloučeniny .....	19
3.7	Charakteristiky fluorescence.....	21
3.8	Využití fluorescenčních metod.....	24
4	Praktická část.....	25
4.1	Studované sloučeniny .....	25
4.1.1	PMEA.....	25
4.1.2	PMPA .....	26
4.2	Přístrojové vybavení.....	27
4.3	Použité chemikálie .....	28
4.4	Příprava roztoků studovaných sloučenin .....	28
4.5	Výsledky .....	29
4.5.1	Fluorescence PMEAs .....	29
4.5.1.1	Fluorescence PMEAs při různém pH .....	29
4.5.1.2	Fluorescence PMEAs při pH = 1 v methanolu a acetonitrilu .....	31
4.5.1.3	Fluorescence PMEAs při pH = 2 v methanolu a acetonitrilu .....	33
4.5.2	Fluorescence PMPA.....	36
4.5.2.1	Fluorescence PMPA při různém pH.....	36
4.5.2.2	Fluorescence PMPA při pH = 1 v methanolu a acetonitrilu .....	38
4.5.2.3	Fluorescence PMPA při pH = 2 v methanolu a acetonitrilu .....	41
4.6	Diskuse .....	43
5	Závěr .....	45
6	Seznam použité literatury.....	46

## 2 Úvod

Téma týkající se fluorescence jsem si zvolila z důvodu širokého využití této metody v laboratorních analytických metodách. Myslím, že metody založené na fluorescenci látek jsou v dnešní době stále aktuálním tématem.

Na fluorescenci jsou založeny metody zjišťující kvalitu i kvantitu neznámých látek, je využívána ve spektrofluorimetrii, fluorescenční mikroskopii, průtokové cytometrii nebo například u identifikace pomocí elektroforetických gelů, blotů nebo chromatografie.

Moje práce je zaměřena na ovlivnění fluorescence a fluorescenčních spekter strukturou molekul a prostředím, ve kterém se nachází. Stručným výčtem seznamuje s historií fluorescence, obecnými mechanismy luminiscence a fluorescence a s jejich charakteristikami. Dále pojednává o samotném ovlivnění fluorescence. Praktická část poskytuje ukázkou fluorescence dvou léčiv, antivirotik PMEa a PMPA, v různých prostředích.

## 3 Teoretická část

### 3.1 Historie

Z dnešního pohledu lze říci, že se historie spektroskopie datuje až k objevení viditelného spektra Newtonem. Od této doby se spektroskopie zaměřovala na dvě oblasti: analytickou chemii nebo interpretaci fyzikálních a atomových vlastností. V počátcích se zájem koncentroval na emisi, později byla objevena absorpce, pomocí výskytu tmavých pásů ve slunečním emisním spektru. Tento poznatek dovedl Kirchoffa k objevení vztahu mezi emisí a absorpcí: každá látka, která je při určité vlnové délce schopna emise musí v této vlnové délce i absorbovat. Mitchell a Zemansky shrnuli poznatky Kirchoffa a Bunsena a zabývali se interpretací atomových spekter a struktur (6).

Do roku 1930 byla pro kvalitativní účely používána pouze emise, výhody absorpce pro tyto účely nebyly známy. Ty byly zjištěny až po roce 1930. V roce 1953 byla atomová absorpční spektroskopie uvedena Walschem jako analytická metoda. Walsch byl schopen demonstrovat výhody absorpce vedle emise a plamenové fotometrie pro mnoho prvků. Nakonec byla atomová absorpční spektrometrie uznána jako výhodnější metoda oproti obloukové, výbojové a jednoduché plamenové fotometrii i oproti emisním metodám. Ve 20. letech 20. století Alexander Jablonski popsal diagram ilustrující procesy, které probíhají v molekule mezi absorpcí a emisí světla. Tento diagram je nazýván Jablonskiho diagramem. (6, 9).

Fluorescence atomových par prvků byla studována mnoha fyziky od konce 19. století. Poprvé pozoroval emisi par sodíku v zatavené skleněné trubici v plameni fyzik Robert W. Wood. Tento jev původně nazval rezonanční záření. Atomová fluorescence par byla dále zkoumána. L. Dunoyer ukázal, že časový interval mezi absorpcí a následnou emisí fluorescenčního záření je velmi krátký, a že pouze určitá část je efektivní pro výrobu fluorescence (7).

Fluorescence atomů lithia pomocí plamene byla popsána A. Borgosem. V roce 1912, Wood osvětloval rtuťové páry radiací pomocí křemeno rtuťové obloukové lampy a poté pozoroval intenzivní fluorescenční emisi při  $2537\text{\AA} = 253,7\text{ nm}$ . Další vědec zabývající se fluorescence atomů byl A. Terenin, ten ji objevil u kadmia, thalia, olova, bismutu, arsenu a antimonu. Studium fluorescence se věnovali také R. J. Strutt, C. J. Christensen, G. K. Rollefson, C. Boeckner, C. Fuchtbauer a P. Bender. Dále byla objevena fluorescence vápníku, stroncia, barya, lithia a sodíku v plameni pány E. L. Nicholsnem a H. L. Howesem. R. M. Badger později prokázal fluorescenci v Bunsenově plameni u thalia, rtuti, hořčíku, mědi, stříbra, kadmia a sodíku (7).

Zásadní krok znamenalo v roce 1956 použití atomové fluorescence ke studiu fyzikálních a chemických procesů v plameni. O 6 let později C. T. J. Alkemade navrhl možné využití atomové fluorescence v analytické chemii. Největší rozmach využití v chemické analýze začal v roce 1964 díky J. D. Winefordnerovi a T. J. Vickersovi (7).

## 3.2 Luminiscence

Stavba částic některých látek umožňuje těmto látkám nepřeměnit velkou část energie jimi pohlcené v energii tepelnou, ale vyzářit ji ve formě světla. Luminiscence je tedy nazývána „studeným“ světlem (1, 2, 3).

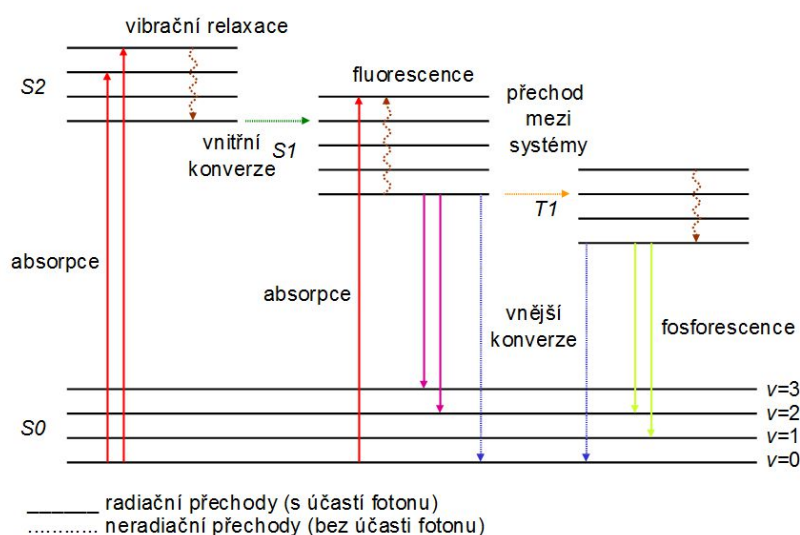
Luminiscence je světelné vyzařování atomů, molekul, iontů nebo složitějších soustav nacházejících se v nerovnovážném excitovaném stavu. Probíhá v několika stádiích. Po absorpci fotonu ultrafialového nebo viditelného záření dochází k excitaci některých elektronů látky. Podle druhu přijaté energie rozlišujeme více typů luminiscence, v tomto případě se jedná o fotoluminiscenci. Excitace je převedení elektronů ze základní singletové energetické hladiny  $S_0$  do vyšších energetických stavů  $S_1$ ,  $S_2$ . V každé z těchto energetických hladin se může látka nacházet v různých vibračních energetických hladinách (1, 2, 3, 4).

Části struktur, ve kterých probíhá absorpce, nazýváme absorpční centra. Po absorpci může docházet k procesům spojeným s přenosem energie mezi absorpčními a luminiscenčními centry, tyto procesy řadíme do stádia přenosu energie. Luminiscenční centrum tedy nemusí být totožné s absorpčním centrem. Posledním stádiem luminiscence je vyzáření energie ve formě světelného kvanta, tzv. zářivý přechod (1, 2, 3, 4).



Nejprve nastane nezářivý přechod na nejnižší vibrační hladinu prvního excitovaného stavu a to díky relaxaci vibračních stavů a vnitřní konverzi. Tento jev popisuje Kashovo pravidlo a dochází k němu během  $10^{-12}$  s nebo méně. Z tohoto singletu se elektron vrací do některé z vibračních subhladin základního stavu, tato hladina bývá zpravidla vyšší než hladina, ze které byl excitován. Dochází přitom k vyzáření fotonu a tento způsob vyzáření je velmi krátký, obvykle  $10^{-8}$  s. V tomto případě hovoříme o fluorescenci. V jiném případě může dojít k dalšímu nezářivému přechodu elektronu do tripletové hladiny  $T_1$ , tento přechod je spojen se změnou spinu. Přechod z tripletového stavu na základní subhladinu je tedy spinově „zakázán“, proto probíhá pomaleji, od  $10^{-8}$  s až stovky sekund. Dochází k fosforescenci. Přechod na excitovanou hladinu a následující zářivé přechody ukazuje *Obr. 1* (1, 2, 3, 9, 10).

## Jablonského diagram



*Obrázek 1: Možné přechody elektronů pro jednofotonovou excitaci*

Budící, excitační, záření je označováno jako primární záření, emisní záření jako sekundární. Stokesův zákon nám říká, že vlnová délka sekundárního záření je větší než vlnová délka absorbovaného záření, to znamená, že energie kvanta sekundárního záření je nižší (1, 2, 3).

Luminiscence roste s množstvím absorbované energie. Dále roste s koncentrací příslušné látky lineárně. Směrem k nižším hodnotám koncentrací ovlivňuje luminiscenci vyšší teplota, při které se zvyšuje šance na nezářivé přechody. Čím vyšší jsou hodnoty luminiscence, tím vyšší je její kvantový výtěžek (viz dále). (1, 2, 3).

### 3.3 Fluorescence

Fluorescence je typ emise světla látkou, kterou můžeme pozorovat pouze během buzení látky a velmi krátkou chvíli po jeho skončení. Návrat na základní hladinu probíhá jedním či více spontánními přechody bez přechodu na metastabilní hladinu, jako je tomu u fosforescence (4, 5).

Experimentální časové okno pro pozorování dynamických procesů je doba, po kterou jsou molekuly přítomny v excitovaném stavu, to může trvat několik desítek pikosekund až několik stovek nanosekund, tento čas je závislý na typu molekuly a média. Životnost je průměrná doba od excitace po návrat na základní úroveň (5).

Charakteristiky fluorescence (spektrum, kvantový výtěžek, životnost), které nejsou ovlivněny žádnými interakcemi molekuly s jejím blízkým prostředím, mohou poskytovat informace o tomto prostředí. Některé procesy probíhající v excitované molekule (konformační změna, elektronový, protonový nebo energetický přenos, excimerní nebo exciplexní formace) mohou vést k fluorescenci, která nevyplývá z excitace primárním zářením a toto záření je třeba odlišovat (5,8).

Vysoká úspěšnost fluorescenčních vyšetřovacích metod při studiu struktury a dynamiky hmoty nebo biologického systému vyplývá z jejich vysoké citlivosti, specifčnosti fluorescenčních vlastností vzhledem k prostředí a schopnosti časové a prostorové informace. Fyzikální a chemické parametry charakterizující prostředí – polarita, vodíkové můstky, ionty, elektrický potenciál, zhášeče, teplota, viskozita a pH, mohou ovlivňovat charakteristiku fluorescence molekuly (5).

K fluorescenci dochází nejčastěji u aromatických molekul. Zástupcem typicky fluoreskujících látek je chinin (8).

Vzhledem k velmi krátké době fluorescence tato technika analýzy vyžaduje citlivou přístrojovou techniku. Navzdory těmto složitostem je fluorescence pro analýzu velmi rozšířená, a to díky velkému množství informací získaných touto metodou (8).

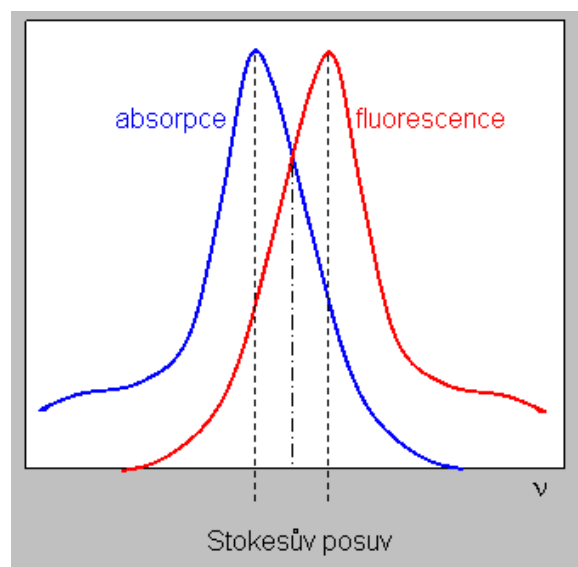
### 3.4 Fluorescenční spektra

Údaje z fluorescenčních analýz jsou prezentovány jako fluorescenční spektra. Spektra jsou závislosti intenzity fluorescence na vlnové délce (nm), vlnočtu ( $\text{cm}^{-1}$ ), energii (eV) nebo frekvenci ( $\text{s}^{-1}$ ). Spektra různých látek se značně liší a jsou závislá na chemické struktuře fluoreskující látky a prostředí, ve kterém se tato látka nachází. Podle způsobu měření je rozdělujeme na emisní a excitační (8, 10).

Emisní spektrum je charakterizováno závislostí intenzity fluorescence na vlnové délce emise, pokud je konstantní vlnová délka budícího záření. Kvantový výtěžek a doba trvání excitovaného stavu složitých molekul nezávisí na vlnové délce excitujícího záření, která je, jak již bylo zmíněno, při měření emisních spekter konstantní. Nezávislost emisních spekter na vlnové délce excitace je obecná vlastnost fluorescence. Excitační spektrum je podobně závislost intenzity fluorescence na vlnové délce excitace při konstantní vlnové délce emitovaného záření (10).

Emisní spektrum leží při vyšších vlnových délkách než excitační spektrum. Tento posun je způsoben ztrátou energie kvůli vibračním přechodům molekuly v excitovaném stavu. Podle Stokesova pravidla by tento posun měl platit vždy. Tímto posunem rozumíme rozdíl vlnových délek maxima absorpčního pásu a maxima fluorescence a nazýváme ho Stokesovým posunem. Stokesův posun je ukázán na *Obr. 2.* (5, 10)

Obecně platí, že pravděpodobnost vibračních hladin je pro většinu organických látek stejná ve stavu základním i excitovaném, proto se fluorescenční spektrum podobá spektru absorpčnímu, což je tzv. pravidlo „zrcadlové symetrie“. Absorbující i emitující molekuly látky se nachází v rovnovážném vibračním stavu, kdy platí, že vibrační struktura základního i excitujícího stavu je stejná. Pravidlu zrcadlové symetrie se vymykají látky s rozdílným geometrickým uspořádáním jader v excitovaném a základním stavu. Ukázka zrcadlové symetrie je na *Obr. 2.* (5, 10).



*Obrázek 1: Zrcadlová symetrie*

Různé vibrační energetické hladiny jsou ve spektru charakterizovány individuálními emisními maximy. Tato emisní maxima jsou od sebe vzdálena několik nm, tato vzdálenost je charakteristická pro každou látku (5).

### 3.5 Vliv prostředí na fluorescenční spektra

Fluorescence molekul je velmi citlivá na prostředí, ve kterém se molekuly nachází. Většina analytických fluorescenčních měření se provádí v kapalném roztoku. Nejdůležitější vlastnosti rozpouštědla, které mají vliv na fluorescenci v něm rozpuštěné látky, jsou polarita, viskozita a kyselost. Dále vlivem rozpouštědla dochází k solvataci molekul fluoreskující látky. K solvataci dochází především díky elektrostatickým interakcím dipól – dipól nebo dipól-indukovaný dipól. Obecně platí to, že dipólové momenty a polarizovatelnost molekul se v základním a excitovaném stavu liší. Interakce rozpuštěné látky a rozpouštědla mohou měnit energii a intenzitu fluorescence a účinky rozpouštědla na fluorescenční spektra se mohou v průběhu buzení a vyzařování měnit. Solvatační účinky při absorpci jsou jiné než účinky při fluorescenci (5, 10, 18).

K molekulárním elektronickým přechodům může dojít v časovém intervalu přibližně  $10^{-15}$  s, v tomto čase nemůže dojít ke změnám v souřadnicích jádra. Proto mají molekuly v přechodném stavu změněné distribuce elektronů, ale geometrie molekuly zůstává stejná jako v základním stavu. Přesto se molekula po emisi nachází v přechodném základním stavu a následně prochází strukturálním a solventním přeorientováním na původní základní stav (18).

Absorpční a fluorescenční spektra jsou závislá na **pH** v důsledku rozdílných acidobazických vlastností v základním a excitovaném stavu. U většiny organických molekul jsou změny kyselosti molekuly v základním a excitovaném stavu v rozmezí od 4 do 9 pK. Některé sloučeniny se po excitaci stávají silnějšími kyselinami, jiné slabšími (5, 18).

Přechod elektronu z excitovaného stavu na základní hladinu může nebo nemusí nastat v závislosti na pH. Fluorescence je pozorovatelná pokud je  $\text{pH} < \text{pK}$ . Této závislosti fluorescence na pH se využívá u fluorescenčních indikátorů pH, jsou mnohem citlivější než klasická barviva, jako jsou fenolftalein nebo thymolová modř a jsou široce používány v analytické chemii, bioanalytické chemii, buněčné biologii a medicíně. Hodnoty  $\text{pK}_a$  excitovaného stavu jsou citlivé na změny v molekulární struktuře, toho se využívá ke zvýšení selektivity analytických postupů. Fluorescenční mikroskopie poskytuje prostorové informace o hodnotě pH (5, 18).

Vliv pH na fluorescenci molekuly, která obsahuje kyselé nebo zásadité funkční skupiny, se často velmi zásadně liší od vlivu na její absorbanci. Aby byl účinek acidobazických reakcí na fluorescenci viditelný, musí být čas, kdy probíhá protolytická disociační reakce v excitovaném stavu molekuly, mnohem nižší než čas mezi absorbancí a fluorescencí. U některých sloučenin je

disociační reakce velmi rychlá a proběhne přímo v intervalu mezi absorpcí a fluorescencí, v těchto případech bude změna fluorescenčního spektra oproti absorpčnímu velmi razantní. Častějším případem je stav, kdy je rychlost disociační reakce srovnatelná s rychlostí fluorescence, v takovém případě se velká změna projeví až po velké změně pH. To může způsobit až existenci dvou fluorescenčních maxim, pokud se fluorescence měří v širokém rozmezí pH (18).

Intenzita fluorescence kyseliny může být velmi odlišná od intenzity fluorescence její konjugované báze (18).

Posuny absorpčních a emisních pásů mohou být způsobeny změnami **solvatační energie**. Pokud je látka obklopena rozpouštědlem, je její základní i excitovaný stav více či méně stabilizován interakcemi mezi rozpouštěnou látkou a rozpouštědlem. Tyto interakce nejsou dány pouze dipóly molekul ale i jejich polarizovatelností. Čtyři hlavní dielektrické interakce jsou interakce dipól – dipól mezi rozpouštědlem a rozpouštěnou látkou, dipól rozpouštěné látky – polarita rozpouštědla, polarita rozpouštěné látky – dipól rozpouštědla a polarizovatelnost – polarizovatelnost. Tyto čtyři interakce jsou nespecifické, specifickou interakcí jsou vodíkové můstky. Solvatační energie  $E_{\text{solv}}$  je dána dvěma faktory vyjadřujícími samostatně polární charakteristiku  $P$  rozpouštěné látky a polární charakteristiku  $\Pi$  rozpouštědla (5, 18).

$$E_{\text{solv}} = P \Pi$$

$P$  zastupuje celkový stav molekul rozpouštědla daný dielektrickou konstantou, indexem lomu a schopností vytvářet vodíkové můstky.  $\Pi$  oproti tomu zastupuje stav molekul rozpouštěné látky charakterizovaný dipólovým momentem, polarizovatelností, dipólovým momentem přechodu a schopností vytvářet vodíkové můstky (5).

V případě, že rozpouštědlo i rozpouštěná látka obsahují trvalé dipóly, bude interakce dipól – dipól převládající faktor působící na fluorescenci látky. Na základě různých polarit rozpouštědla může dojít k solvatochromním posunům, z důvodu ovlivnění velikosti energie potřebné k excitaci molekuly. Pokud jsou obě látky vysoce polární, jsou působky elektrostatických interakcí malé ve srovnání s působením lokálních změn, jako jsou například vodíkové můstky. U většiny aromatických polárních molekul je excitovaný stav více polární než základní, proto zvýšení polarit rozpouštědla vede ke zvýšení stabilizace molekuly v excitovaném stavu. Se zvyšující polaritou se absorpční i fluorescenční spektra posouvají k nižším energiím. I v případě, že jsou obě látky nepolární v obou stavech, vede výskyt elektronických přechodů ke vzniku přechodného dipólového momentu, který polarizuje okolí. Zejména u uhlovodíků jako rozpouštěných látek je polarizační posun hlavním solventním účinkem na energii fluorescence. (18, 5, 17).

Rozpouštění nepolárních molekul, které se nachází v základním stavu, v polárním rozpouštědle zvyšuje vzdálenost mezi energetickými hladinami a dochází k hypsochromnímu neboli modrému posunu  $\lambda_{\max}$  ke kratším vlnovým délkám, v důsledku toho dochází ke zvýšení energie potřebné k excitaci molekul. Opakem tomuto posunu je bathochromní neboli červený posun, který naopak snižuje energii potřebnou k excitaci molekul fluoreskující látky tím, že snižuje rozdíl mezi energetickými hladinami a dochází k posunu  $\lambda_{\max}$  k vyšším vlnovým délkám (5, 17).

Přítomnost **těžkých atomů** v roztoku zvyšuje poměr intenzity fosforescence k intenzitě fluorescence. Účinky těžkých atomů, přítomných ve struktuře molekuly nebo jako součástí roztoku, jsou srovnatelné. Pokud je atom přítomen i intramolekulárně, zvyšuje se účinek atomu přítomného v roztoku. Efekt vnějšího těžkého atomu vzniká díky tvorbě slabých donor – akceptorových vazeb, kde příslušné rozpouštědlo je donor a látka obsahující těžký atom je akceptor. Těžké atomy mohou způsobovat poměrně významné spektrální posuny a v některých případech změny intenzity. Pokud je použito rozpouštědlo obsahující těžké atomy, dochází ke zhášení fluorescence (viz dále) (18).

Přítomnost **molekulárního kyslíku** v roztoku má schopnost zhášet excitovaný singletový i tripletový stav. V některých případech je zhášení vyvoláno oxidací molekul. Většinou ale bývá reverzibilní a po odstranění kyslíku z roztoku zhášení mizí. Rychlost zhášení je závislá na rychlosti difuze kyslíku v roztoku. Účinnost kyslíku jako zhášedla fluorescence je závislá na typu látky, proto je velmi rozmanitá. V minulosti bylo kyslíkové zhášení zdrojem mnoha chyb v měřeních luminiscence látek (18).

Jako další zhášeče fluorescence fungují **kovové ionty** obsažené v roztoku. Zhášení je způsobeno jejich paramagnetickými vlastnostmi a probíhá prostřednictvím přenosu náboje mezi fluoreskující molekulou a kovovým iontem v excitovaném stavu (18).

Existence **vodíkových můstků** také významně ovlivňuje excitaci molekuly. Vznik vodíkových můstků se může lišit u molekul v základním a v excitovaném stavu, proto se fluorescenční a absorpční spektra mohou lišit. Vodíkové můstky hrají klíčovou roli v účincích rozpouštědla na změny spekter, hlavně u heterocyklů obsahujících atom dusíku. S rostoucí schopností rozpouštědla tvořit vodíkové můstky, roste i absorbovaná energie, potřebná k excitaci molekuly (18).

Bylo často pozorováno, že aromatické karbonylové sloučeniny a dusíkaté heterocykly fluoreskují v nepolárních, aprotických rozpouštědlech velmi slabě a jejich fluorescence roste se schopností rozpouštědla tvořit vodíkové můstky. Pokud dojde ke vzniku vodíkového můstku mezi dvěma aromatickými molekulami, může dojít i ke zhášení fluorescence. Vliv vodíkových vazeb na fluorescenci je obvykle nepředvídatelný (18).



## 3.6 Struktura a fluorescence

Fluorescence je závislá nejen na prostředí, ve kterém se látka nachází, ale samozřejmě i na molekulové struktuře látky samotné. V některých případech se i nefluoreskující látka dá vhodnými reakcemi převést na látku fluoreskující. Environmentální a strukturální vlivy spolu úzce souvisí a nelze je oddělit jako dva úplně samostatné pohledy (18).

Pouhá schopnost molekuly fluoreskovat neposkytuje důležité informace o jejím strukturálním složení, ale některé strukturální faktory mají tendenci fluorescenci posilovat nebo naopak zeslabovat (18).

### 3.6.1 Alifatické sloučeniny

Jen velmi malé množství alifatických a nasycených cyklických organických sloučenin poskytuje fluorescenci. Všechny elektrony v alifatických sloučeninách jsou velmi pevně vázány nebo se podílejí na vzniku  $\sigma$  vazeb, proto se v nasycených vazbách vyskytují jen  $\sigma \rightarrow \sigma^*$  přechody, které mají značnou energetickou náročnost a absorbují záření s kratšími vlnovými délkami než 200nm. (18, 20).

Absorpce energie nasycenou molekulou má obvykle přímo nebo nepřímo za následek disociaci vazby, protože energie potřebná k excitaci elektronu je vysoká a excitovaný elektron se obvykle podílí na vazbě molekuly. Z toho vyplývá, že excitační energie, pomocí které dojde k rozštěpení vazeb, nemůže vést k fluorescenci, to má za následek, že kvantové výtěžky nasycených organických molekul se obvykle rovnají nule (18).

Důležitou výjimkou jsou alifatické aldehydy a ketony, ve kterých může být excitován nevázebný elektron na karbonylovém kyslíku na antivázebný C=O  $\pi$  orbital bez narušení molekulární vazby (18).

### 3.6.2 Aromatické uhlovodíky

Ve sloučeninách s velkými konjugovanými systémy, ve kterých jsou  $\pi$  elektrony vázány méně pevně než  $\sigma$  elektrony, mohou být tyto elektrony excitovány do  $\pi^*$  orbitalů absorpcí elektromagnetického záření o nízké energii bez porušení vazeb (18).

Nesubstituované aromatické uhlovodíky vykazují většinou v kapalném roztoku intenzivní fluorescenci v ultrafialovém i viditelném záření. Kvantový výtěžek se zvyšuje s velikostí konjugovaného systému. Nejintenzivnější fluorescenci vykazují rigidní, planární sloučeniny. Rigidita molekuly snižuje možnost vzniku vibračních amplitud, což snižuje možnost vzniku přechodů, které mohou soutěžit s fluorescencí. Také citlivost rigidních molekul na změny prostředí, zejména teploty, je menší než u molekul nerigidních, u kterých může být jejich molekulární konformace velice teplotně závislá. Aromatické molekuly, jejichž struktury jsou rigidní, ale ne planární obvykle vykazují neobvyklé emise (18).

### 3.6.3 Substituované aromatické uhlovodíky

Substituce na kruhu mění energii a výtěžek fluorescence. Účinky substituentů na chemické a fyzikální vlastnosti molekul v základním stavu a vlivy substituentů na chování molekuly v excitovaném stavu jsou stále předmětem zkoumání. Vliv substituce na fluorescenci aromatické molekuly je závislý na poloze, typu i počtu substituentů. Pokud je na molekule navázáno více substituentů, musí se jejich vliv posuzovat komplexně (18, 5).

#### Substituce těžkými atomy

Přítomnost těžkých atomů, například F, Cl, Br, I, jako substituentů na aromatickém jádře, fluorescenci obecně zhasí. Jejich přítomnost zvyšuje pravděpodobnost mezisystémových přechodů. Čím větší je protonové číslo atomu, tím větší je tento efekt (5).

Pokud je kvantový výtěžek fluorescence tak velký, že fluorescence převládá nad ostatními deexcitačními procesy, může být efekt těžkého atomu velmi malý. K malému ovlivnění dochází také v opačném případě, kdy je kvantový výtěžek tak malý, že je možnost mezisystémového přechodů velmi nízká nebo pokud je tripletový stav energeticky vzdálený od stavu singletového (5).

#### Elektrondonorové substituenty

Mezi elektrondonorové substituenty patří -OH, -OR, -NH<sub>2</sub>, -NHR, -NR<sub>2</sub>. Obecně platí, že tato skupina substituentů zvyšuje molární absorpční koeficient i kvantový výtěžek fluorescence a způsobuje posun excitačních i emisních spekter k vyšším vlnovým délkám. Ve srovnání se spektry mateřských uhlovodíků jsou tato spektra široká a beztvářá (5).

Konjugace volných elektronových párů zvyšující fluorescenci je možná pouze u planárních molekul. Pokud je substituent natočen z roviny aromatického kruhu snižuje se stupeň konjugace (5).

Absorpční a emisní charakteristiky molekul s těmito substituenty jsou závislé na pH (5).

### **Elektronakceptorové substituenty**

Do této skupiny se řadí karbonylové a nitrosloučeniny (5).

Fluorescenční vlastnosti karbonylových sloučenin jsou složité a těžko předvídatelné. Nejčastějším deexcitačním procesem u aromatických aldehydů a ketonů je mezisystémový přechod, proto fluoreskují s nízkými kvantovými výtěžky. Kvantový výtěžek je závislý na polaritě rozpouštědla. S vyšší polaritou výtěžek roste. U aromatických molekul, které jsou substituované karbonylovou skupinou, pozorujeme změny fluorescenčních vlastností v závislosti na změnách pH (5).

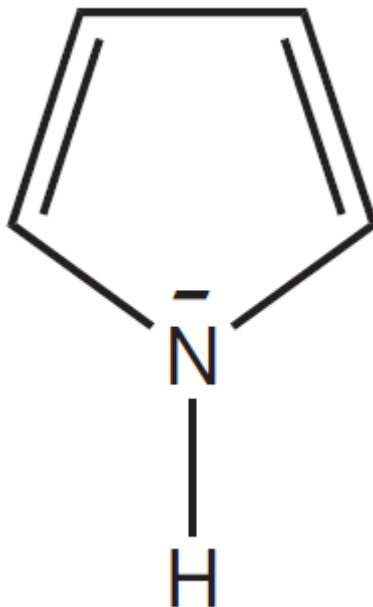
Obecně platí, že aromatické uhlovodíky s nitroskupinou jako substituentem fluorescenci nevykazují. V těchto molekulách dochází převážně k mezisystémovým přechodům, což vede spíše k fosforescenci (5).

## **3.6.4 Heterocyklické sloučeniny**

Zavedení heteroatomu do struktury uhlovodíku zásadním způsobem mění fluorescenci dané látky. Nejběžnější heteroatomy mají alespoň jeden volný elektronový pár. (18).

Sloučeninám obsahujícím heterocyklické atomy dusíku, síry nebo kyslíku je umožněn nízkoenergetický přechod  $n - \pi^*$ . Tento přechod způsobuje malé kvantové výtěžky fluorescence. Fluorescenční charakteristiky těchto sloučenin jsou silně závislé na rozpouštědle. V protických rozpouštědlech, jako jsou například alkoholy, se mohou mezi molekulami rozpouštědla a heteroatomem tvořit vodíkové můstky. Tyto interakce mají za následek mnohem větší kvantový výtěžek fluorescence než výtěžek, kterého je dosaženo při rozpouštění v uhlovodíkových rozpouštědlech. Elektronová hustota na heteroatomu se při excitaci snižuje, s klesající elektronovou hustotou klesá i schopnost tvořit vodíkové vazby. Základní stav molekuly je tedy mnohem více stabilizován než stav excitovaný. Proto má přechod z nepolárního do polárního prostředí za následek posun excitačních i fluorescenčních spekter k vyšším vlnovým délkám (5).

Je-li heteroatom dusíku vázán ve sloučenině jako pyrrolový kruh, nachází se nevazebný orbital dusíku kolmo k rovině kruhu a dochází k překrytí  $\pi$  orbitalů sousedních atomů uhlíku. Tyto sloučeniny mají velký výtěžek fluorescence. *Obr. 3* ukazuje strukturu pyrrolu (18).



*Obrázek 2: Pyrrol*

Některé fluorofory jsou ve vodě špatně rozpustné. Jejich rozpustnost se zvyšuje substitucí sulfonátem. Tento substituent jen mírně ovlivňuje fluorescenční charakteristiky původní molekuly. Dochází jen k malému červenému posunu a mírnému snížení kvantového výtěžku (18).

### 3.7 Charakteristiky fluorescence

Nejdůležitějšími charakteristikami fluoroforu jsou životnost a kvantový výtěžek (8).

**Kvantový výtěžek** je poměr počtu fotonů emitovaných k počtu fotonů absorbovaných. Látky s nejvyššími výtěžky poskytují nejjasnější emise. Energetický výnos bude vždy menší než jedna díky Stokesově posunu (8).

$$\Phi_k = N_{em} / N_{abs}$$

*Rovnice 1: Kvantový výtěžek*

**Životnost** je průměrná doba, po kterou molekula existuje v excitovaném stavu, před tím než se vrátí do základního stavu. Obecně platí, že životnost fluorescence je okolo 10 ns. Životnost také určuje **dobu dohasínání**. Je to doba trvání fluorescence od ukončení excitace molekuly (8, 5).

$$\Phi_t = \Phi_0 \times 10^{t/\tau}$$

$\Phi_t$  – zářivý tok v čase t

$\Phi_0$  – zářivý tok v čase t = 0

$\tau$  – doba dohasínání

*Rovnice 2: Doba dohasínání*

**Intenzita** fluorescence ( $\Phi_F$ ) je udávána počtem fotonů, který projde v určitém směru jednotkovou plochou za jednotku času (10).

$$\Phi_F = k' \times \Phi_A = k' \times (\Phi_0 - \Phi) = k' \times \Phi_0 \times (1 - 10^{-\varepsilon c l})$$

$k'$  – konstanta obsahující fluorescenční výtěžek a fotony dopadlé na detektor

$\Phi_F$  – fluorescenční zářivý tok

$\Phi_A$  – absorbovaný zářivý tok

$\Phi_0$  – vstupní zářivý tok

$\Phi$  – výstupní zářivý tok

$\varepsilon$  - molární absorpční koeficient

$c$  – molární koncentrace dané látky

$l$  – tloušťka absorbující vrstvy

### *Rovnice 3: Intenzita*

Pomocí fluorescence lze detekovat koncentrace až v řádu  $10^{-12}$  mol/l. Tého citlivosti dosáhneme při použití intenzivního záření pro buzení fluorescence a citlivých fotonásobičů (10).

Intenzita fluorescence klesá samovolně s časem, ale také může být snížena různými procesy. Toto snižování intenzity se nazývá **zhášení**. Dochází při ní ke snižování kvantového výtěžku beze změny fluorescenčního emisního spektra. K tomuto snižování dochází různými mechanismy. Jedním z mechanismů je srážkové zhášení, k tomu dochází, pokud je excitovaný stav deaktivován při styku s jinou molekulou v roztoku, která se nazývá zhášeč. Kromě srážkového zhášení může dojít ke zhášení i jinými procesy. Fluorofory mohou například tvořit komplexy s nefluoreskujícími přísadami. Tento způsob zhášení se označuje jako statické zhášení, protože se vyskytuje v základním stavu a molekuly jsou při něm chemicky měněny. Ke zhášení může dojít i nemolekulárními mechanismy, například útlumem záření fluoroforem samotným nebo jinými absorpčními mechanismy (8, 5, 10).

**Spektrální složení** je charakterizováno různou spektrální hustotou fotonů při určitých intervalech vlnových délek nebo frekvencí (10).

#### **Základní spektrální charakteristiky (10) :**

energie (eV) –  $E = h \cdot \nu$

frekvence ( $s^{-1}$ ) –  $\nu = c / \lambda$

vlnčet ( $cm^{-1}$ ) –  $\nu = 1 / \lambda$

vlnová délka (nm) –  $\lambda = c / \nu$

E – energie, kterou vyzařuje zdroj záření

$\nu$  – frekvence vlny – počet kmitů za sekundu

$\nu$  – vlnčet vlny – počet vlnových délek za jednotku délky

$\lambda$  – vlnová délka vlny – vzdálenost, kterou urazí vlna po dobu jednoho kmitu

c – rychlost světla (ve vakuu  $2,998 \cdot 10^8 \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$ )

h – Planckova konstanta ( $6,626176 \cdot 10^{-34} \text{ J}\cdot\text{s}$ )

### 3.8 Využití fluorescenčních metod

Analytické metody založené na fluorescenci jsou velmi populární díky vysoké citlivosti a selektivitě. Fluorescenční metody se používají v oblasti potravinářství, ochrany životního prostředí, průmyslu, farmacie, zdravotnictví a kriminologie (5).

Z hlediska potravinářství je fluorescence využívána například pro analýzu bílkovin v kravském mléce nebo průkaz léků. V průmyslu pro detekci aromatických uhlovodíků v surových olejích nebo monitorování průmyslových procesů. V rámci životního prostředí je využívána pro zjišťování znečišťujících látek ve vzduchu a vodě. Dále se fluorescence využívá k detekci plynů, například kyslíku, SO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>S, amoniaku, HCl, Cl<sub>2</sub> nebo chlorovaných uhlovodíků (5).

Ve zdravotnictví se využití týká biochemického a biofyzikálního výzkumu, ale i klinické praxe, jako jsou genetické analýzy, klinická biochemie a biomedicína. Fluorescenční detekce se zavádí pro sekvenování DNA, analýzu DNA fragmentů, fluorescenční barvení gelů pro elektroforetické separace, imunologické testy jako je například test ELISA, pro identifikaci buněk dělených průtokovou cytometrií, zobrazování ve fluorescenční mikroskopii a studiu změn konformací a dynamiky buněčných systémů (5, 8, 10).

Dalším z cílů fluorescenčního snímání je neinvazivní monitorování klinicky významných fyziologických parametrů. Zařízení podobné mobilnímu telefonu by mělo i přes kůži změřit hodnoty zadaných parametrů, uložit je do paměti nebo odeslat lékaři. Těmito zařízeními je již možné přes kůži měřit pH a hodnoty iontů v krvi (8).

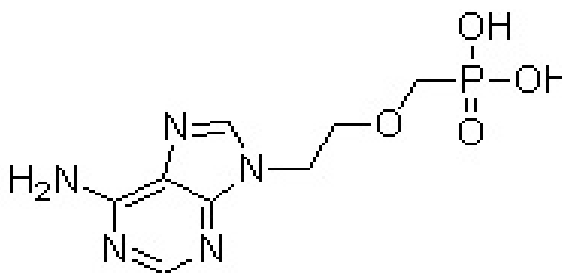


## 4 Praktická část

### 4.1 Studované sloučeniny

#### 4.1.1 PME A

PMEA je zkratka pro phosphonyl – methoxyethyl – adenine. Tato sloučenina patří mezi antivirotika, její triviální název je adefovir a systematický název podle současných pravidel je {[2-(6-amino-9H-purin-9-yl)ethoxy]methyl}phosphonic acid. Strukturální vzorec adefoviru je ukázán na *Obr. 4*.



*Obrázek 3: Strukturální vzorec PME A*

Adefovir se používá k léčbě chronické infekce způsobené virem hepatitidy B. Způsobuje zpomalení růstu viru a tím snižuje jeho množství v těle. Tento lék ale nezabraňuje komplikacím chronické hepatitidy B, jako jsou cirhóza nebo rakovina jater. Také nezabraňuje přenosu na jiné osoby (13).

Patří do skupiny léků nazývaných nukleosidová analoga. Tato analoga připomínají přirozeně se vyskytující nukleosidy a způsobují zánik vznikajícího řetězce DNA. Obecně jsou tato léčiva bezpečná a dobře tolerovaná (13, 14).

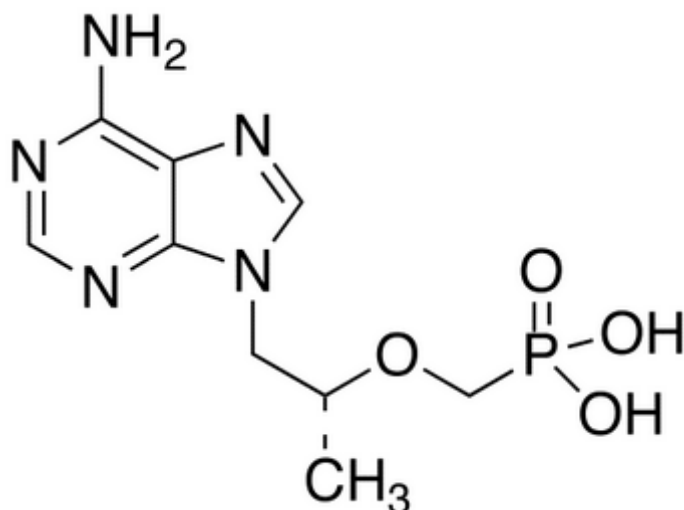
Molekulový vzorec:  $C_8H_{12}N_5O_4P$

Molekulová hmotnost PME A: 273,19

Teplota tání:  $>260\text{ }^{\circ}\text{C}$

### 4.1.2 PMPA

Zkratka PMPA znamená phosphonyl – methoxypropyl – adenine. Stejně jako PMEPA patří mezi antivirotika, její triviální název je tenofovir a systematický ( $\{[(2R)\text{-}1\text{-}(6\text{-amino}\text{-}9H\text{-purin}\text{-}9\text{-yl})\text{propan}\text{-}2\text{-yl}]\text{oxy}\}$ methyl)phosphonic acid. Strukturní vzorec tenofoviru je ukázán na Obr. 5.



Obrázek 5: Strukturní vzorek PMPA

Tenofovir je používán k léčbě lidské imunodeficiency způsobené virem HIV u dospělých a dětí od 2 let věku a k léčbě chronické hepatitidy typu B u dospělých a dětí od 12 let. Patří do skupiny nukleosidových inhibitorů reverzní transkriptázy (NRTI). Funguje tak, že snižuje množství HBV a HIV v krvi. Ačkoli tenofovir nevyčistí HIV, snižuje pravděpodobnost vzniku syndromu získaného selhání imunity a onemocnění souvisejících s HIV, jako jsou těžké infekce a rakovina. Při užívání u hepatitidy typu B nezabrání komplikacím, jako jsou cirhóza jater, rakovina jater a také nemusí zabránit přenosu na jiné hepatitidy na jiné osoby (15).

Molekulový vzorec: C<sub>9</sub>H<sub>14</sub>N<sub>5</sub>O<sub>4</sub>P

Molekulová hmotnost: 287,21

Teplota tání: 271 – 282 °C

## 4.2 Přístrojové vybavení

### UV – VIS spektrofotometr (21)

Absorpční spektra byla měřena pomocí spektrofotometru s diodovým polem HP 8453 (Agilent Technologies).

Technické specifikace přístroje:

- lampy
  - deuteriová
  - wolframová
- rozsah vlnových délek 190 – 1100 nm
- rychlost snímání – plný rozsah vlnových délek 1,5 s
- přesnost vlnových délek  $< \pm 0,5$  nm
- fotometrická přesnost  $< \pm 0,005$  A při 1 A
- šířka štěrbin 1 nm.

### Luminiscenční spektrometr (19)

Fluorescenční spektra byla měřena na spektrofluorimetru AMINCO – Bowman Series 2 (Thermo Spectronic).

Technické specifikace přístroje:

- lampy zdroj
  - 150 W xenonová výbojka
  - 7 W pulzní xenonová výbojka
- rychlost snímání 3 – 6 000 nm/min
- rozsah vlnových délek 220 – 850 nm
- přesnost vlnové délky  $\pm 0,5$  nm
- opakovatelnost vlnové délky  $\pm 0,25$  nm.

Měření absorpčních i fluorescenčních spekter byla prováděna v křemenných kyvetách.

**Analytické váhy** (Sartorius)

**Magnetické míchadlo** (Laboratorní přístroje Praha)

### 4.3 Použité chemikálie

#### **Pufry**

Univerzální pufir podle H. T. S. Brittona a R. A. Robinsona. Na přípravu tohoto pufiru jsem použila základní roztok, složení  $0,04 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1} \text{ H}_3\text{PO}_4$ ,  $0,04 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1} \text{ CH}_3\text{COOH}$ ,  $0,04 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1} \text{ H}_3\text{BO}_4$ , a  $0,2 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$  hydroxid sodný – NaOH.

**Acetonitril** – ACTN,  $\text{CH}_3\text{CN}$  (Aldrich)

**Methanol** – MetOH,  $\text{CH}_3\text{OH}$  (Aldrich)

**Kyselina chlorovodíková** – HCl,  $c = 1 \text{ mol/l}$ , roztok připravený na KBFCH, FaF

**PMPA, PME A** v pevné formě, dar doc Trejtnara (KFTOX, FaF)

### 4.4 Příprava roztoků studovaných sloučenin

Do kádinky bylo na analytických vahách naváženo přibližně přesně 0,8 mg sloučeniny (PMEA nebo PMPA) a rozpuštěno v 10 ml methanolu za mírného zahřívání a stálého míchání na magnetickém míchadle. Tento základní roztok byl dále ředěn podle potřeby.

## 4.5 Výsledky

### 4.5.1 Fluorescence PME A

#### 4.5.1.1 Fluorescence PME A při různém pH

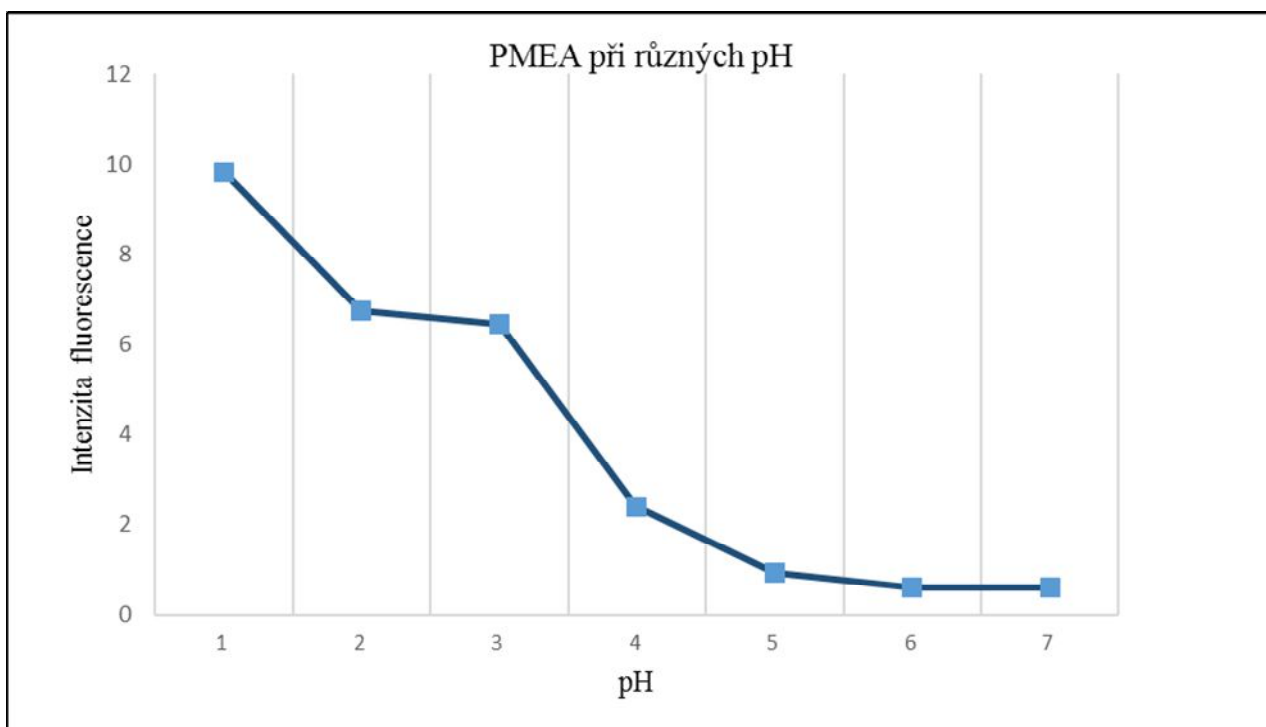
Připravila jsem roztoky PME A s různými hodnotami pH. Do kádinek jsem připravila sedm roztoků Brittonova – Robinsonova pufru s hodnotami pH od 2 do 7. Do kyvet jsem automatickou pipetou napipetovala základní roztok PME A v methanolu a roztoky pufrů v poměru 1:9. Roztok o pH = 1 jsem připravila zředěním HCl ( $c = 1 \text{ mol/l}$ ) ve stejném poměru. Roztoky byly v kyvetách promíchány třepáním.

Nejprve jsem na UV - VIS spektrofotometru změřila absorpční spektra připravených roztoků, z nich odečetla vlnové délky maxima absorpce, které byly následně použity jako excitační vlnové délky, a poté jsem na spektrofluorimetru snímala fluorescenční spektra pro každé pH.

V *Tabulce 1* jsou zapsány zaznamenané intenzity fluorescence  $\Phi_F$  pro každou hodnotu pH, použité excitační vlnové délky  $\lambda_{ex}$  a zjištěná fluorescenční maxima  $\lambda_{fl}$ . *Graf 1* ukazuje závislost fluorescence PME A na hodnotách pH.

pH	$\lambda_{fl}$ (nm)	$\Phi_F$	$\lambda_{ex}$ (nm)
1	361	9,83	259
2	361	6,75	259
3	361	6,45	260
4	358	2,38	261
5	348	0,94	261
6	348	0,59	261
7	348	0,61	261

*Tabulka 1: Fluorescence PME A při různých hodnotách pH*



*Graf 1: Závislost fluorescence PME na pH*

#### 4.5.1.2 Fluorescence PME A při pH = 1 v methanolu a acetonitrilu

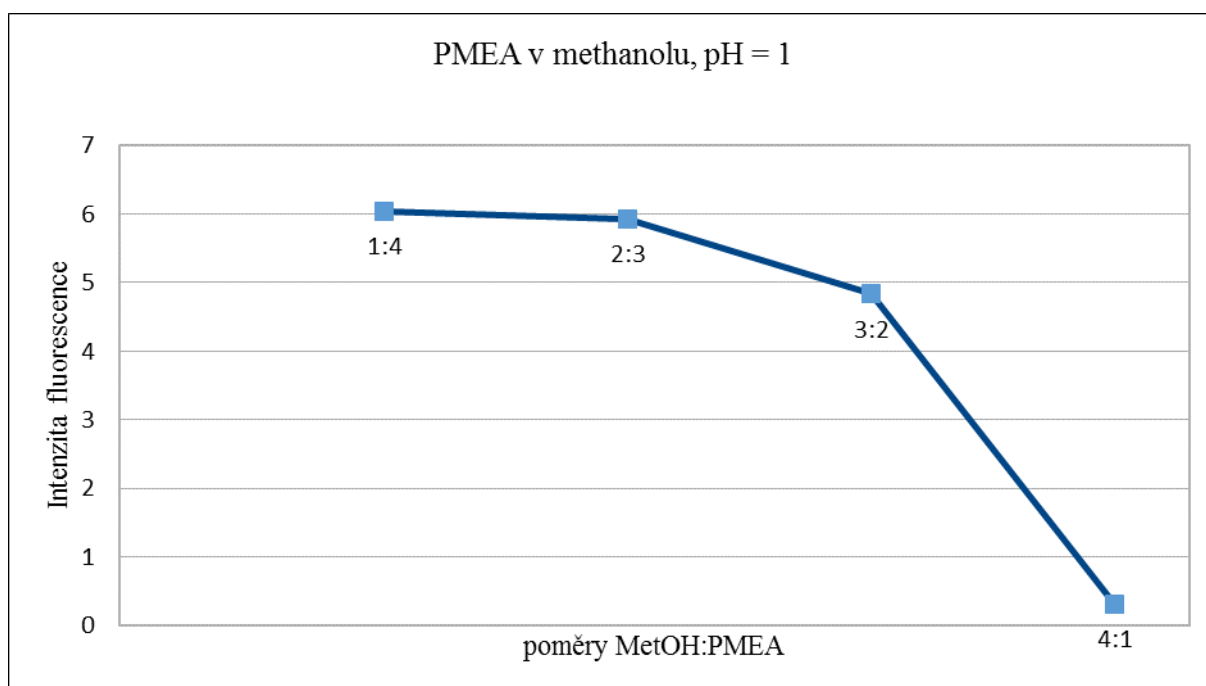
Nejprve jsem připravila roztok PME A s hodnotou pH = 1, tak že jsem do kádinky napipetovala HCl (c = 1 mol/l) a roztok PME A v poměru 1:9.

Roztok PME A s pH = 1 jsem v různých poměrech (1:4, 2:3, 3:2, 4:1) smíchala s methanolem. To samé jsem udělala s roztokem PME A, pH = 1 a acetonitrilem. U těchto osmi různých roztoků jsem na spektrofotometru měřila absorpční spektra a z nich odečetla vlnové délky maxim absorpce, které jsem použila jako excitační vlnové délky, a dále jsem měřila fluorescenční spektra na spektrofluorimetru.

V *Tabulce 2* jsou zapsány naměřené intenzity fluorescence  $\Phi_F$ , použité excitační vlnové délky  $\lambda_{ex}$  a zjištěná fluorescenční maxima  $\lambda_{fl}$  u PME A při pH = 1 v různých poměrech methanol a PME A. *Graf 2* ukazuje závislost fluorescence PME A na obsahu methanolu při pH = 1.

MetOH:PME A	$\lambda_{fl}$ (nm)	$\Phi_F$	$\lambda_{ex}$ (nm)
1:4	361	6,04	259
2:3	359	5,93	259
3:2	356	4,83	256
4:1	338	0,31	206

*Tabulka 2: Fluorescence PME A v methanolu při pH = 1*

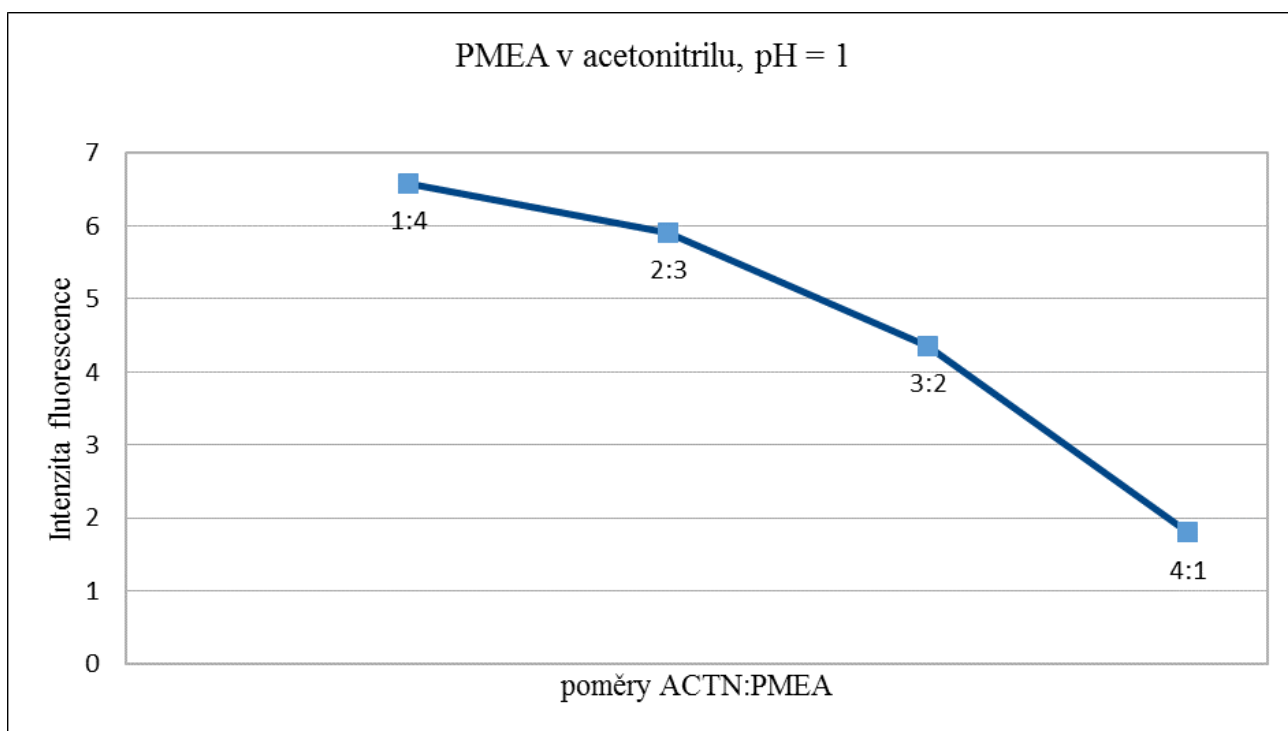


*Graf 1: Závislost fluorescence PME A na obsahu methanolu při pH = 1*

V *Tabulce 3* jsou zapsány naměřené intenzity fluorescence  $\Phi_F$ , použité excitační vlnové délky  $\lambda_{ex}$  a zjištěná fluorescenční maxima  $\lambda_{fl}$  při hodnotě  $pH = 1$  a v různém obsahu acetonitrilu. *Graf 3* ukazuje závislost fluorescence PMEa na obsahu acetonitrilu při  $pH = 1$ .

ACTN:PMEa	$\lambda_{fl}$ (nm)	$\Phi_F$	$\lambda_{ex}$ (nm)
1:4	362	6,57	259
2:3	361	5,9	259
3:2	361	4,36	260
4:1	362	1,8	257

*Tabulka 3: Fluorescence PMEa v acetonitrilu při  $pH = 1$*



*Graf 2: Závislost fluorescence PMEa na obsahu acetonitrilu při  $pH = 1$*



### 4.5.1.3 Fluorescence PMEÁ při pH = 2 v methanolu a acetonitrilu

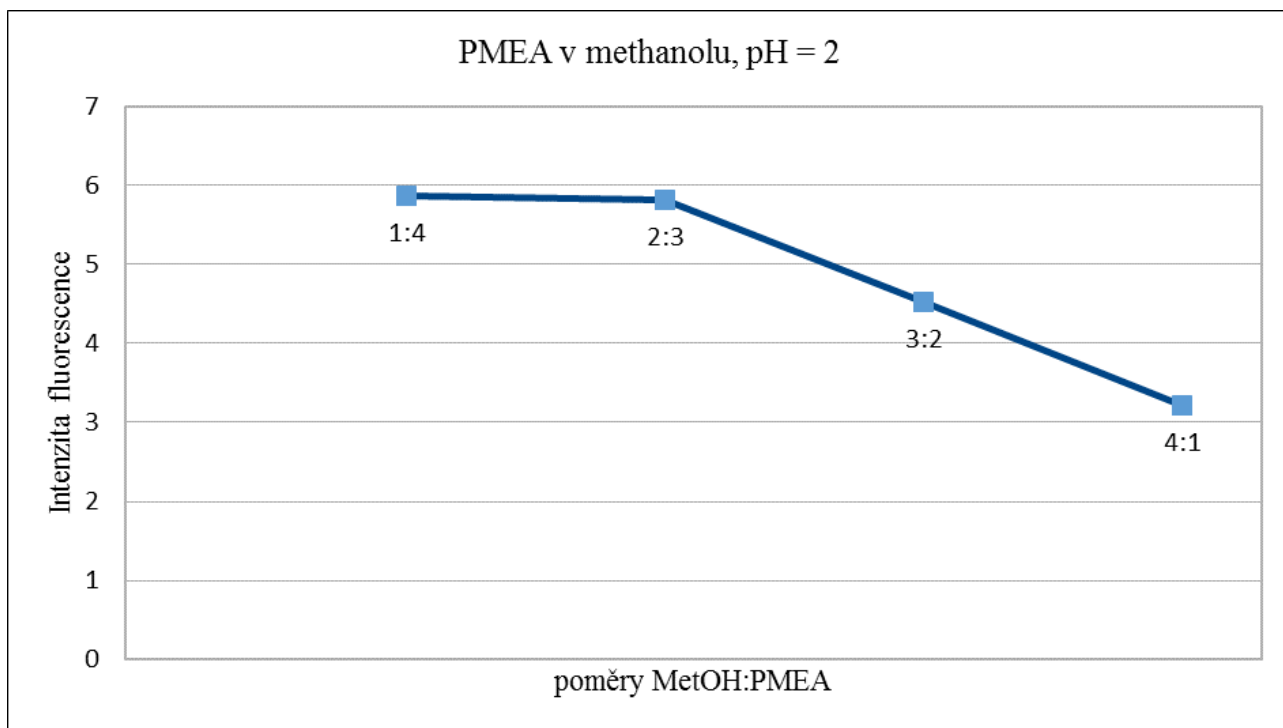
Připravila jsem roztok PMEÁ s hodnotou pH = 2. Nejprve jsem si připravila Brittonův – Robinsonův pufr o hodnotě pH = 2. Poté jsem do kádinky napipetovala pufr a roztok PMEÁ v poměru 1:9.

Roztok PMEÁ s hodnotou pH = 2 jsem v různých poměrech (1:4, 2:3, 3:2, 4:1) míchala s methanolem. To samé jsem udělala s roztokem PMEÁ s hodnotou pH = 2 a acetonitrilem. Dále jsem měřila na spektrofotometru absorpční spektra a z nich odečetla vlnové délky maxima absorpce, které jsem použila jako excitační vlnové délky, a na spektrofluorimetru fluorescenční spektra u všech osmi roztoků.

Intenzity fluorescence  $\Phi_F$ , použité excitační vlnové délky  $\lambda_{ex}$  a zjištěná fluorescenční maxima  $\lambda_{fl}$  u PMEÁ v roztoku o pH = 2 jsou zapsány v *Tabulce 4*. Závislost fluorescence PMEÁ na obsahu methanolu při pH = 2 ukazuje *Graf 4*.

MetOH:PMEÁ	$\lambda_{fl}$ (nm)	$\Phi_F$	$\lambda_{ex}$ (nm)
1:4	361	5,86	259
2:3	359	5,82	260
3:2	358	4,53	260
4:1	352	3,21	260

*Tabulka 4: Fluorescence PMEÁ v methanolu při pH = 2*

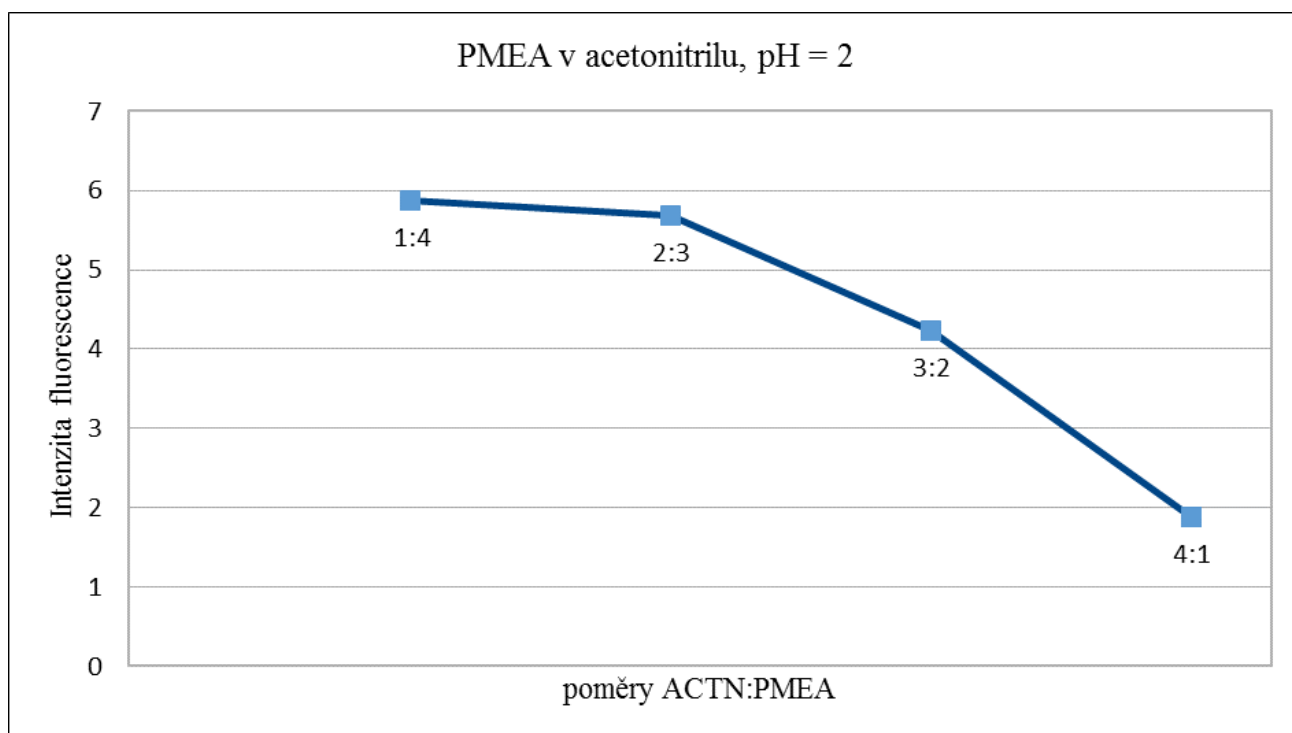


*Graf 3: Závislost fluorescence PME na obsahu methanolu při pH = 2*

Tabulka 5 ukazuje naměřené intenzity fluorescence  $\Phi_F$ , a použité excitační vlnové délky  $\lambda_{ex}$  pro každý poměr acetonitrilu a PMEa při  $pH = 2$  a fluorescenční maxima  $\lambda_f$  při kterých byla tato fluorescence naměřena. Graf 5 zobrazuje závislost fluorescence PMEa na obsahu acetonitrilu při  $pH = 2$ .

ACTN:PMEa	$\lambda_f$ (nm)	$\Phi_F$	$\lambda_{ex}$ (nm)
1:4	361	5,87	259
2:3	361	5,68	260
3:2	360	4,23	260
4:1	360	1,89	260

Tabulka 5: Fluorescence PMEa v acetonitrilu při  $pH = 2$



Graf 4: Závislost fluorescence PMEa na obsahu acetonitrilu při  $pH = 2$

## 4.5.2 Fluorescence PMPA

### 4.5.2.1 Fluorescence PMPA při různém pH

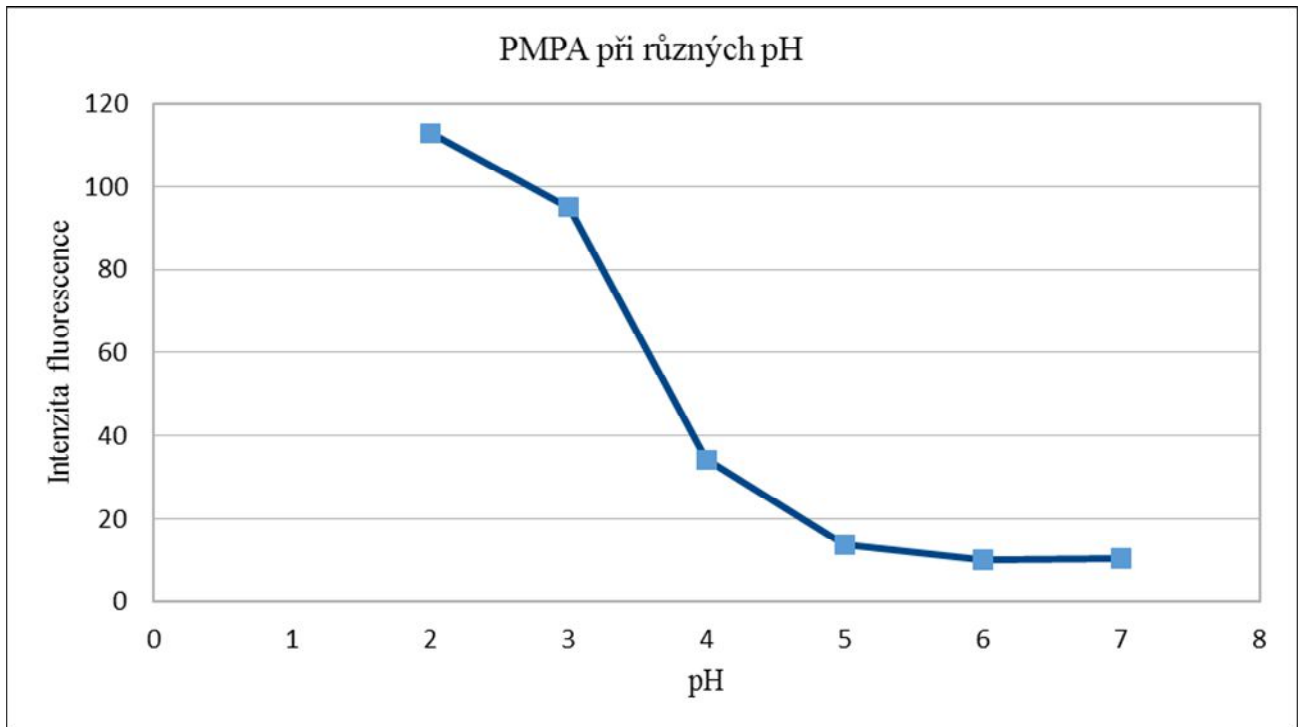
Roztoky PMPA s různými hodnotami pH jsem připravila smícháním roztoků pufrů a roztoku PMPA nebo smícháním HCl ( $c = 1 \text{ mol/l}$ ) a roztoku PMPA v poměru 9:1. Pufry byly připraveny pomocí základního roztoku pro Brittonův – Robinsonův pufr a NaOH v hodnotách pH od 2 do 7. Roztok o  $\text{pH} = 1$  byl připraven pomocí HCl ( $c = 1 \text{ mol/l}$ ).

Poté jsem na spektrofotometru změřila absorpční spektra a z nich odečetla vlnové délky maxima absorbance, které byly následně použity jako excitační vlnové délky, a na spektrofluorimetru fluorescenční spektra pro každé pH.

V *Tabulce 6* jsou zapsány zaznamenané intenzity fluorescence  $\Phi_F$  pro každou hodnotu pH, použité excitační vlnové délky  $\lambda_{\text{ex}}$  a zjištěná fluorescenční maxima  $\lambda_{\text{fl}}$  a *graf 6* ukazuje závislost fluorescence PMPA na hodnotách pH.

pH	$\lambda_{\text{fl}}$ (nm)	$\Phi_F$	$\lambda_{\text{ex}}$ (nm)
1	361	128,97	259
2	361	112,81	260
3	360	95,19	260
4	359	34,27	260
5	346	13,74	260
6	342	10,24	260
7	340	10,52	260

*Tabulka 6: Fluorescence PMPA při různých hodnotách pH*



*Graf 5: Závislost fluorescence PMPA na pH*

#### 4.5.2.2 Fluorescence PMPA při pH = 1 v methanolu a acetonitrilu

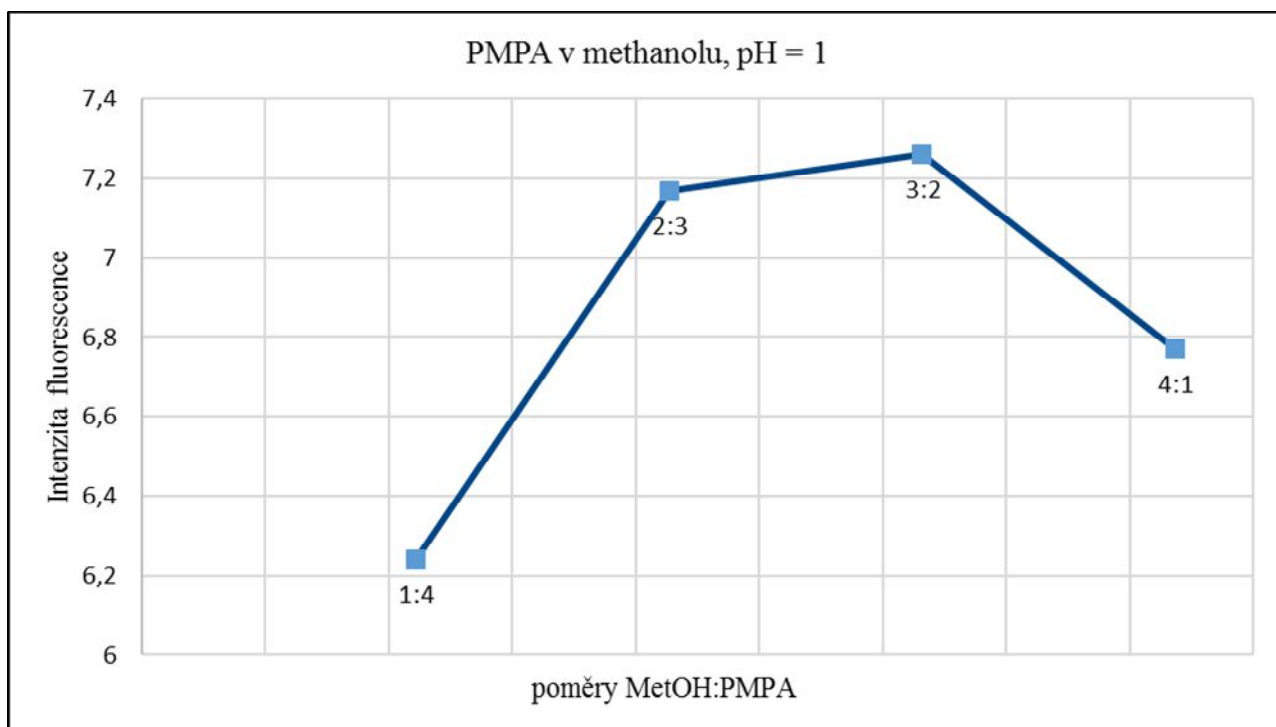
Roztok PMPA s hodnotou pH = 1 jsem připravila smícháním HCl ( $c = 1\text{ mol/l}$ ) a roztoku PME A v poměru 1:9.

Poté jsem roztok PMPA s pH = 1 v různých poměrech (1:4, 2:3, 3:2, 4:1) smíchala s methanolem. To samé jsem udělala s roztokem PME A, pH = 1 a acetonitrilem. U roztoků jsem měřila absorpční spektra na spektrofotometru a z nich odečetla vlnové délky maxima absorbance, které jsem použila jako excitační vlnové délky, a dále fluorescenční spektra na spektrofluorimetru.

V *Tabulce 7* jsou zapsány naměřené intenzity fluorescence  $\Phi_F$ , použité excitační vlnové délky  $\lambda_{ex}$  a zjištěná fluorescenční maxima  $\lambda_{fl}$  pro každý poměr metanolu a PMPA. *Graf 7* představuje závislost fluorescence PMPA na obsahu methanolu při pH = 1.

MetOH:PMPA	$\lambda_{fl}$ (nm)	$\Phi_F$	$\lambda_{ex}$ (nm)
1:4	361	6,24	259
2:3	359	7,17	260
3:2	358	7,26	259
4:1	357	6,77	259

*Tabulka 7: Fluorescence PMPA v methanolu při pH = 1*

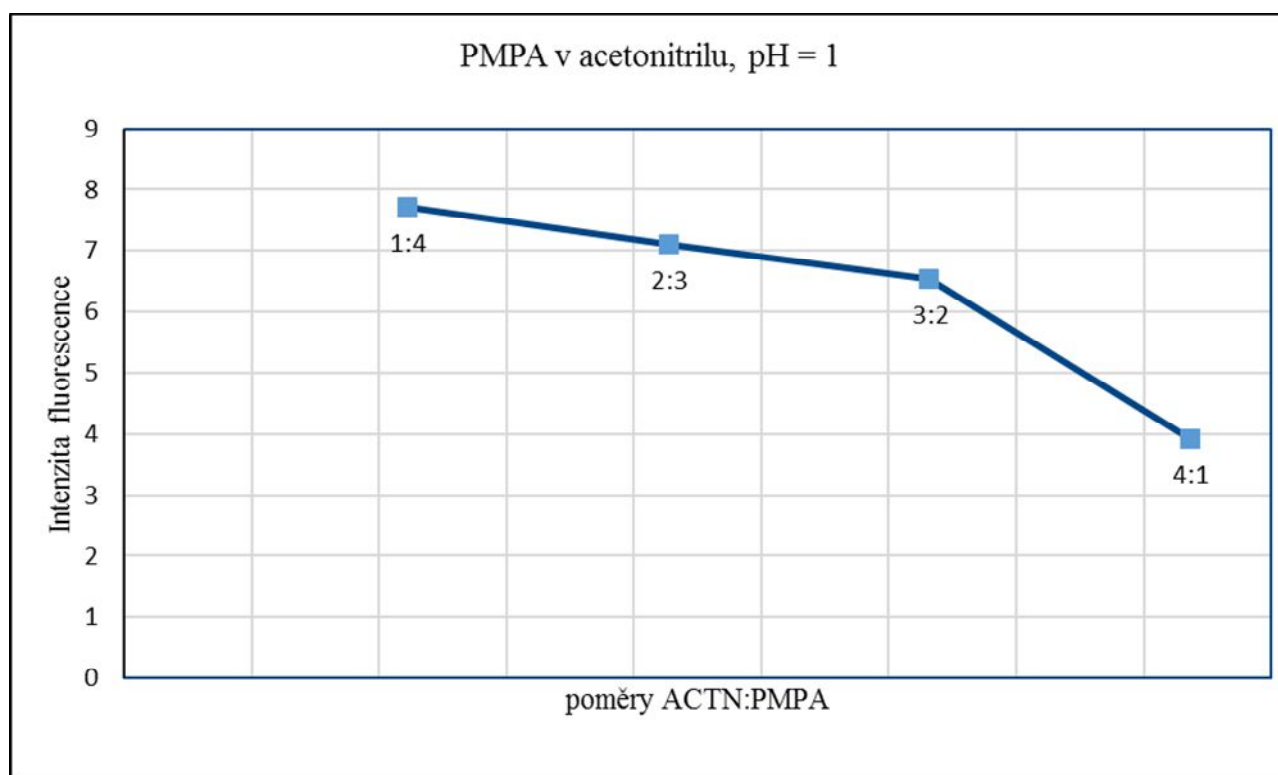


*Graf 6: Závislost fluorescence PMPA na obsahu methanolu při pH = 1*

Tabulka 8 ukazuje naměřené intenzity fluorescence  $\Phi_F$  a použité excitační vlnové délky  $\lambda_{ex}$  pro každý poměr acetonitrilu a PMPA a vlnové délky fluorescenčních maxim  $\lambda_{fl}$ . Graf 8 představuje závislost fluorescence PMPA na obsahu acetonitrilu při pH = 1.

ACTN:PMPA	$\lambda_{fl}$ (nm)	$\Phi_F$	$\lambda_{ex}$ (nm)
1:4	363	7,71	259
2:3	362	7,1	259
3:2	357	6,54	260
4:1	362	3,92	259

Tabulka 8: Fluorescence PMPA v acetonitrilu při pH = 1



Graf 7: Závislost fluorescence PMPA na obsahu acetonitrilu při pH = 1



### 4.5.2.3 Fluorescence PMPA při pH = 2 v methanolu a acetonitrilu

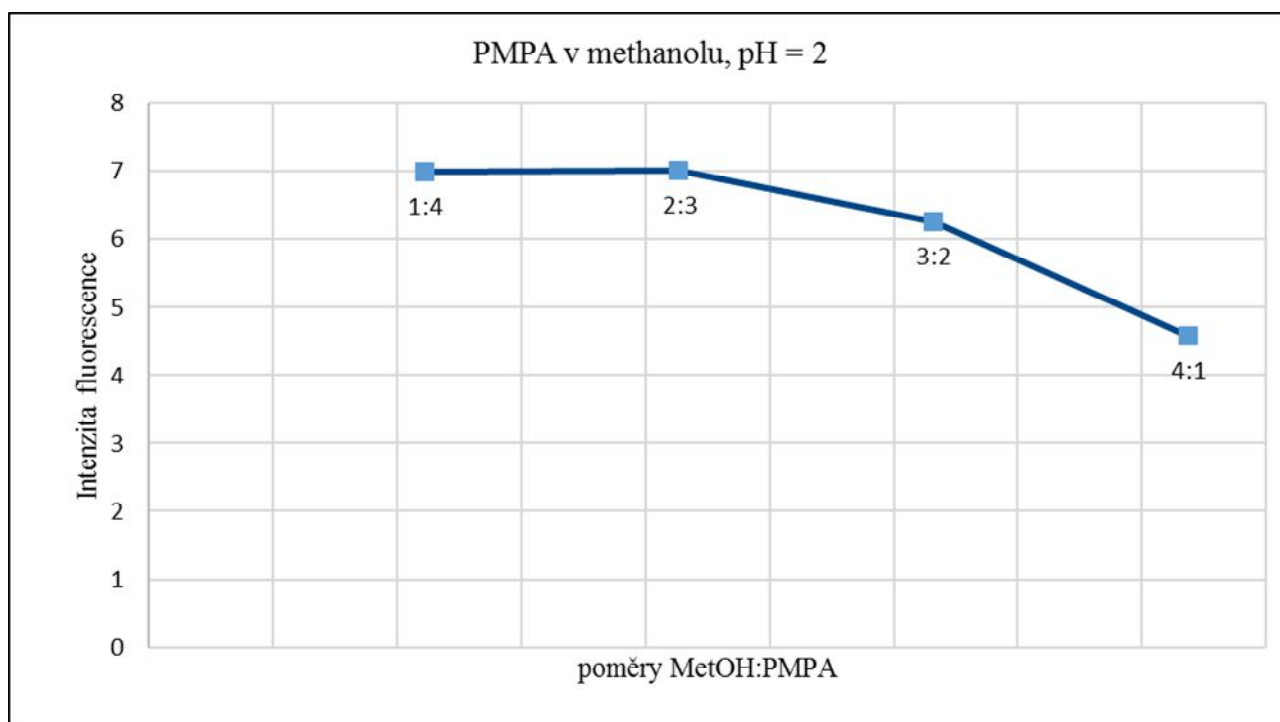
Smícháním Brittonova – Robinsonova pufru o pH = 2 a roztoku PMPA jsem připravila roztok, který byl dále používán.

Roztok PMPA s hodnotou pH = 2 jsem míchala nejprve s methanolem a poté s acetonitrilem v poměrech 1:4, 2:3, 3:2, 4:1. Dále jsem u těchto osmi roztoků měřila absorpční spektra na spektrofotometru a z nich odečetla vlnové délky maxim absorpance, které byly použity jako excitační vlnové délky, a fluorescenční spektra na spektrofluorimetru.

Intenzity fluorescence  $\Phi_F$ , použité excitační vlnové délky  $\lambda_{ex}$  pro poměry metanolu a PMPA v roztoku o pH = 2 a vlnové délky fluorescenčních maxim  $\lambda_{fl}$  jsou zapsány v *Tabulce 9*. Závislost fluorescence PMPA na obsahu methanolu při pH = 2 ukazuje *Graf 9*.

MetOH:PMPA	$\lambda_{fl}$ (nm)	$\Phi_F$	$\lambda_{ex}$ (nm)
1:4	359	6,99	260
2:3	359	7,02	260
3:2	360	6,26	260
4:1	357	4,58	260

Tabulka 9: Fluorescence PMPA v methanolu při pH = 2

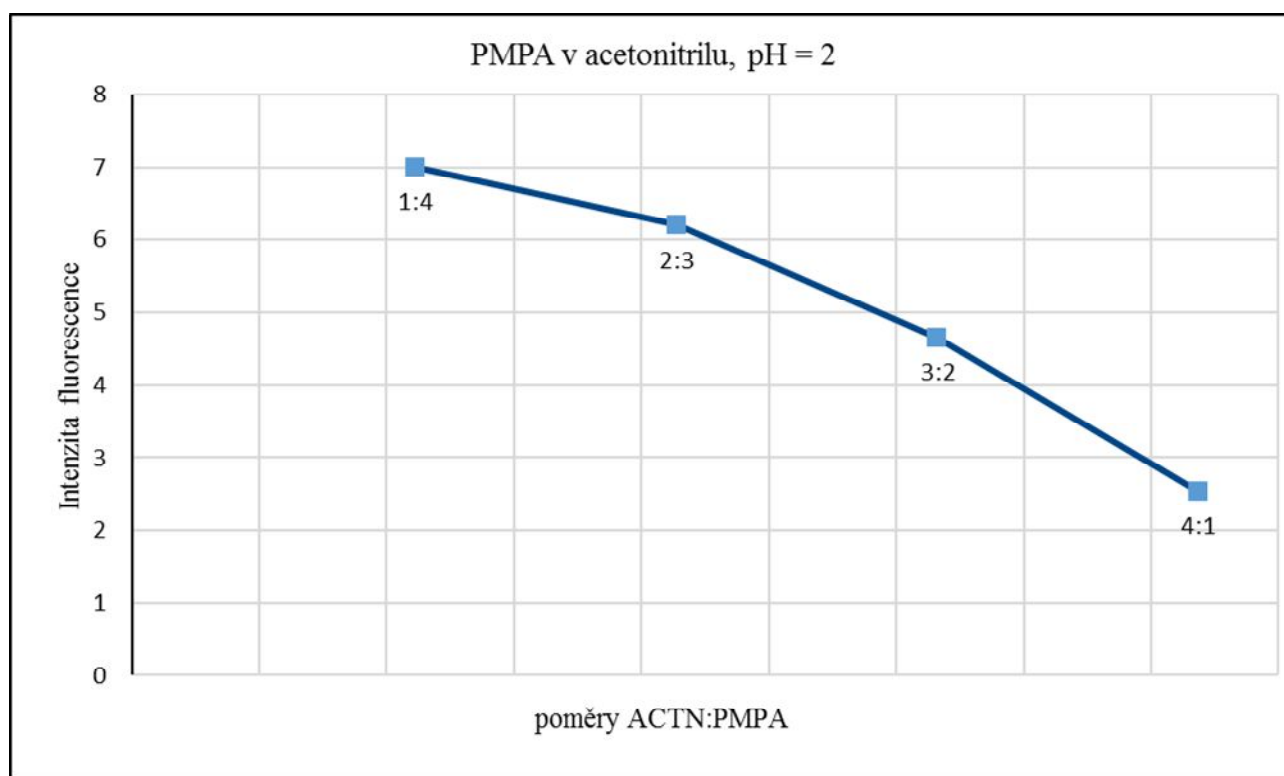


Graf 8: Závislost fluorescence PMPA na obsahu methanolu při pH = 2

V *Tabulce 10* jsou zapsány naměřené intenzity fluorescence  $\Phi_F$ , použité excitační vlnové délky  $\lambda_{ex}$  a zjištěná fluorescenční maxima  $\lambda_{fl}$  pro každý poměr acetonitrilu a PMPA při  $pH = 2$ . *Graf 10* ukazuje závislost fluorescence PMPA na obsahu acetonitrilu při  $pH = 2$ .

ACTN:PMPA	$\lambda_{fl}$ (nm)	$\Phi_F$	$\lambda_{ex}$ (nm)
1:4	361	7	260
2:3	359	6,2	260
3:2	361	4,66	260
4:1	358	2,54	261

*Tabulka 10: Fluorescence PMPA v acetonitrilu při  $pH = 2$*



*Graf 9: Závislost fluorescence PMPA na obsahu acetonitrilu při  $pH = 2$*

## 4.6 Diskuse

Z *Grafu 1* je viditelné, že fluorescence PMEAs klesá se vzrůstajícím pH okolí. Nejprudší klesání fluorescence je z  $\text{pH} = 1$  k  $\text{pH} = 2$  a z  $\text{pH} = 3$  k  $\text{pH} = 4$ . Ostatní změny pH způsobily pozvolnější klesání fluorescence. Nejnižší fluorescenci vykazuje látka okolo bodu její disociační konstanty, která má hodnotu 6,69. Také je z tohoto grafu vidět, že se stoupajícím pH dochází k hypsochromnímu posunu, což je ve shodě s literaturou (18).

Z *Grafu 6* můžeme vyčíst, že fluorescence PMPA klesá se vzrůstající hodnotou pH, stejně jako intenzita fluorescence PMEAs. K nejprudšímu snížení intenzity došlo z  $\text{pH} = 3$  k  $\text{pH} = 4$ . Intenzita fluorescence je nejnižší a téměř neměnná po snížení hodnoty pH pod hodnotu disociační konstanty. Hodnota disociační konstanty je 6,2. I zde je pozorován stejný hypsochromní posun jako u PMEAs.

*Graf 2* ukazuje, že fluorescence PMEAs klesá se zvyšujícím se obsahem methanolu v roztoku při  $\text{pH} = 1$ . Největší skok intenzity fluorescence je patrný mezi poměry 3:2 a 4:1. Methanol je poměrně polární látka schopná tvořit vodíkové můstky, proto může být toto klesání vysvětleno vznikem vodíkových můstků.

Intenzita fluorescence PMPA se se vzrůstajícím obsahem methanolu při  $\text{pH} = 1$  nepředvídatelně mění jak je patrné z *Grafu 7*. Při poměru 1:4 byla fluorescence nejnižší. Hodnoty fluorescence při poměrech 2:3 a 3:2 jsou téměř srovnatelné a dosahují nejvyšších hodnot. Hodnota při poměru 4:1 se nachází přibližně uprostřed mezi nejvyšší hodnotou, při poměru 3:2, a nejnižší hodnotou, poměr 1:4.

Při porovnávání intenzit fluorescencí PMEAs v acetonitrilu při  $\text{pH} = 1$  v *Grafu 3* je patrné, že fluorescence klesá se zvyšujícím se obsahem acetonitrilu a čím vyšší je jeho obsah, tím větší je i hodnota, o kterou se snižuje fluorescence. Acetonitril je stejně jako methanol polární látka a způsobuje klesání hodnot fluorescence, bez vzniku vodíkových můstků.

Pokles intenzity fluorescence v obou předchozích případech je patrně důsledkem snížení polaritě prostředí, které je zde zároveň provázáno i poklesem koncentrace protogenního rozpouštědla, což u dusíkatých heterocyklů může mít tento efekt (18).

V *Grafu 8* vidíme, že fluorescence PMPA se vzrůstajícím obsahem acetonitrilu při  $\text{pH} = 1$  kontinuálně klesá, narozdíl od intenzit fluorescencí PMPA v methanolu. K nejvíce patrnému snížení došlo mezi poměry 3:2 a 4:1. Průběh křivky grafu od poměru 1:4 do poměru 3:2 je lineární. Fluorescence klesá se zvyšujícím se obsahem polárního rozpouštědla.

Anomální průběh závislosti v *Grafu 7* se nám nepodařilo uspokojivě vysvětlit a tato závislost bude podrobena dalšímu zkoumání.

Z *Grafu 4*, který ukazuje fluorescenci PME A v methanolu při  $\text{pH} = 2$  je patrné, že intenzita fluorescence klesá se vzrůstajícím obsahem methanolu v roztoku, intenzity při poměrech 1:4 a 2:3 jsou srovnatelné. Další průběh křivky grafu je lineární.

Intenzita fluorescence PMPA se vzrůstajícím obsahem methanolu při  $\text{pH} = 2$  klesá, jak je patrné z *Grafu 9*. Při poměrech 1:4 a 2:3 je fluorescence téměř stejná a se zvyšujícím se poměrem metanolu ku PMPA kontinuálně klesá.

Při porovnávání intenzit fluorescencí PME A v acetonitrilu při  $\text{pH} = 2$  zakreslených v *Grafu 5* je viditelné, že fluorescence klesá se zvyšujícím se obsahem acetonitrilu. Průběh grafu je stejný jako při  $\text{pH} = 1$ .

Z *Grafu 10* můžeme vyčíst, že intenzity fluorescence PMPA při  $\text{pH} = 2$  klesají se vzrůstajícím obsahem acetonitrilu. Čím vyšší je obsah acetonitrilu, tím strměji klesá intenzita fluorescence.

Pokles intenzity fluorescence je i v těchto případech zřejmě důsledkem snížení polaritý prostředí, provázeným poklesem koncentrace protogenního rozpouštědla.

## 5 Závěr

Úkolem mé bakalářské práce bylo seznámit se s fluorescenčními spektry léčiv a s jejich ovlivněním strukturou molekuly a prostředím. Konkrétně byl studován vliv pH a různých rozpouštědel na fluorescenci antivirotik PMEa a PMPA.

U studovaných látek bylo zjištěno, že intenzita fluorescence klesá se stoupající bazicitou prostředí a zvyšujícím se obsahem polárního rozpouštědla. Z obecného pohledu tato skutečnost není obvyklý jev, zejména u aromatických sloučenin, jejichž základní skelet je tvořen pouze uhlíkovými atomy. Avšak v případě heterocyklů s vyšším podílem atomů dusíku, k nimž purinové struktury bezesporu patří, je podle literatury takové chování běžné.

Získaná data mají sloužit jako vodítko při vyhledávání vhodných detekčních podmínek při stanovení těchto látek, například metodou HPLC.

## 6 Seznam použité literatury

- [1] SOMMER L.: Analytická spektrometrie I. 1. vyd., Státní pedagogické nakladatelství, Praha 1986.
- [2] KLOUDA P.: Moderní analytické metody: učebnice základů instrumentálních analytických metod. 1. vyd., P. Klouda, Ostrava 1996.
- [3] DVOŘÁK L., KUPKA Z.: Fyzikální podstata a využití luminiscence. 1. vyd., SPN, Praha 1980.
- [4] VACEK K.: Luminiscence I, Státní pedagogické nakladatelství, Praha 1967.
- [5] VALEUR B.: Molecular fluorescence: principles and applications. 1st ed., Wiley-Vch, Weinheim 2002.
- [6] KIRKBRIGHT G., SARGENT M.: Atomic absorption and fluorescence spectroscopy, Academic Press, London 1974.
- [7] SYCHRA V., RUBEŠKA I., SVOBODA V.: Atomic fluorescence spectroscopy, Van Nostrand Reinhold, London 1975.
- [8] LAKOWICZ J. R.: Principles of fluorescence spectroscopy. 2nd ed., Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York 1999.
- [9] PERKAMPUS H.- H.: UV-VIS spectroscopy and its applications, Springer-Verlag, New York 1992.
- [10] FIŠAR Z.: Principy fluorescenční spektroskopie. *psych.lf1.cuni.cz*. [online]. [cit. 2016-03-17]. Dostupné z: <http://psych.lf1.cuni.cz/fluorescence/soubory/principy.htm>
- [11] AUTOR NEUVEDEN: Rayleigh scattering. Encyclopædia Britannica. [online]. 2016 [cit. 2016-03-19]. Dostupné z: <http://www.britannica.com/science/Rayleigh-scattering>
- [12] NAVE C.R.: Raman scattering. HyperPhysics. [online]. [2016] [cit. 2016-03-19]. Dostupné z: <http://hyperphysics.phy-astr.gsu.edu/hbase/atmos/raman.html#c1>
- [13] AUTOR NEUVEDEN: Adefovir. *MedlinePlus*. [online]. 3.1.2010 [cit. 2016-03-26]. Dostupné z: <https://www.nlm.nih.gov/medlineplus/druginfo/meds/a605024.html>
- [14] AUTOR NEUVEDEN: Antiretroviral agents: nucleoside analogues. *LiverTox*. [online]. [2013] [cit. 2016-03-26]. Dostupné z: <http://livertox.nih.gov/NucleosideAnalogues.htm>
- [15] AUTOR NEUVEDEN: Tenofovir. *MedlinePlus*. [online]. 15.1.2016 [cit. 2016-03-26]. Dostupné z: <https://www.nlm.nih.gov/medlineplus/druginfo/meds/a602018.html>
- [16] NĚMCOVÁ I., RYCHLOVSKÝ P., ČERMÁKOVÁ L.: Spektrometrické analytické metody I. 1. vyd., Karolinum, Praha 1997.

- [17] KLÁN P.: Organická fotochemie. 1. vyd., Masarykova univerzita, Brno 2001.
- [18] WEHRY E. L.: Effects of Molecular Structure on Fluorescence and Phosphorescence, Effects of Molecular Environment on Fluorescence and Phosphorescence, in GUILBAULT G. G. (ed.): Practical Fluorescence. Marcel Dekker, New York, Basel, Hong Kong 1990.
- [19] AUTOR NEUVEDEN: Thermo Spectronic AMINCO-Bowman Series 2 Luminescence Spectrometer. *ALT*. [online]. [2015] [cit. 2016-04-27]. Dostupné z: [http://usedlabequipment.com/lab\\_equipment/Thermo+Spectronic+AMINCO-Bowman+Series+2+Luminescence+Spectrometer\\_6047.php](http://usedlabequipment.com/lab_equipment/Thermo+Spectronic+AMINCO-Bowman+Series+2+Luminescence+Spectrometer_6047.php)
- [20] VACEK K.: Luminiscence II, Státní pedagogické nakladatelství, Praha 1972.
- [21] AUTOR NEUVEDEN: Agilent 8453 Diode Array Spectrophotometers. *GMI*. [online]. [2016] [cit. 2016-04-27]. Dostupné z: <http://www.gmi-inc.com/agilent-8453-diode-array-spectrophotometers.html>

#### Obrázek 1

PREISLER J.: [bart.chemi.muni.cz/index.php/en/](http://bart.chemi.muni.cz/index.php/en/) [online]. [cit. 10.3.2016]. Dostupný na WWW: [bart.chemi.muni.cz/content/04\\_teaching/methods/MChV%20Luminiscence.pdf](http://bart.chemi.muni.cz/content/04_teaching/methods/MChV%20Luminiscence.pdf) - přednáška „Molekulová luminiscence“ v rámci kurzu „Metody chemického výzkumu“, Masarykova univerzita, 2005.

#### Obrázek 2

FIŠAR Z.: <http://psych.lf1.cuni.cz> [online]. [cit. 19.3.2016]. Dostupný na WWW: <http://psych.lf1.cuni.cz/fluorescence/soubory/principy>.

#### Obrázek 3

AUTOR NEUVEDEN: [fblt.cz](http://fblt.cz) [online]. [cit. 27.4.2016]. Dostupný na WWW: <http://fblt.cz/en/skripta/vi-dychaci-soustava/4-metabolismus-hemoglobinu-a-transport-krevnich-plynu/>

#### Obrázek 4

AUTOR NEUVEDEN: [chemicalbook.com](http://www.chemicalbook.com) [online]. [cit. 25.3.2016]. Dostupný na WWW: [http://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty\\_EN\\_CB2698137.htm](http://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty_EN_CB2698137.htm)

*Obrázek 5*

AUTOR NEUVEDEN: *trc - canada.com* [online]. [cit. 26.3.2016]. Dostupný na WWW:  
<http://www.trc-canada.com/product-detail/?CatNum=>

*Rovnice 1*

Seznam použité literatury [6] KIRKBRIGHT G., SARGENT M.: Atomic absorption and fluorescence spectroscopy, Academic Press, London 1974.

*Rovnice 2*

Seznam použité literatury [6] KIRKBRIGHT G., SARGENT M.: Atomic absorption and fluorescence spectroscopy, Academic Press, London 1974.

*Rovnice 3*

Seznam použité literatury [16] NĚMCOVÁ I., RYCHLOVSKÝ P., ČERMÁKOVÁ L.: Spektrometrické analytické metody I. vyd., Karolinum, Praha 1997.