UNIVERZITA KARLOVA

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biofyziky a fyzikální chemie

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

FLUORESCENČNÍ SPEKTRA LÉČIV III

Vedoucí bakalářské práce: Ing. Vladimír Kubíček, CSc.

Hradec Králové 2021 **Nikola Přívratská**

Ráda bych poděkovala panu Ing. Vladimíru Kubíčkovi CSc. za odborné vedení a podporu během vypracování mé bakalářské práce. Také za rady a ochotu pomoci při experimentální části a jejího vyhodnocení.

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorských dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci jsou řádně citovány. Práce nebyla použita k získání jiného nebo stejného titulu.“

V Hradci Králové 2021 Nikola Přívratská

Obsah

Seznam použitých zkratek 7

Seznam obrázků 8

Seznam grafů 8

Seznam tabulek 8

1 Úvod a cíl práce 10

2 Teoretická část 11

2.1 Luminiscence 11

2.1.1 Fotoluminiscence 11

2.2 Absorpce světla molekulami 13

2.2.1 Franck–Condonův princip 14

2.3 Základní rysy fluorescence 14

2.3.1 Kashovo–Vavilovo pravidlo 14

2.3.2 Stokesův posun 14

2.3.3 Pravidlo zrcadlové symetrie spekter 15

2.4 Veličiny charakterizující fluorescenci 15

2.4.1 Životnost excitovaného stavu 15

2.4.2 Kvantový výtěžek 16

2.5 Zhášení fluorescence 16

2.5.1 Dynamické zhášení 17

2.5.2 Statické zhášení 17

2.5.3 Koncentrační zhášení a vnitřně filtrační efekt 17

2.6 Fluorofory 18

2.6.1 Vliv struktury molekuly na fluorescenci 18

2.6.2 Fluorofory a komplexy s kovy 20

2.7 Vliv prostředí na fluorescenci 20

2.7.1 Polarita rozpouštědla 21

2.7.2 Ostatní vlivy prostředí 22

2.8 Spektrofluorimetrie 23
2.8.1 Excitační a emisní spektra 23
2.8.2 Instrumentace 23
2.9 Flavonoidy 25
2.9.1 Luteolin a apigenin 25
3 Experimentální část 26
3.1 Přístrojové vybavení a pomůcky 26
3.2 Použité chemikálie 26
3.3 Příprava roztoků 26
3.3.1 Základní roztoky apigeninu a luteolinu 26
3.3.2 Roztok HCOOH 26
3.3.3 Roztok chloridu hořečnatého 27
3.3.4 Směsi HCOOH/MeOH a HCOOH/ACN 27
3.4 Měření spekter 28
3.4.1 Měření absorpčních spekter 28
3.4.2 Měření fluorescenčních spekter 28
3.4.3 Nastavení spektrofluorimetru 28
4 Výsledková část a diskuse 29
4.1 Výsledky měření absorpčních spekter 29
4.2 Výsledky měření fluorescenčních spekter apigeninu 29
4.2.1 Apigenin ve směsích HCOOH a MeOH 29
4.2.2 Apigenin ve směsích HCOOH a ACN 32
4.3 Výsledky měření fluorescenčních spekter luteolinu 35
4.3.1 Luteolin ve směsích HCOOH a MeOH 35
4.3.2 Luteolin ve směsích HCOOH a ACN 38
4.4 Porovnání vlivu hořečnatých a hlinitých kationtů na fluorescenci 42
4.4.1 Vliv kationtů na intenzitu fluorescence luteolinu 42
4.4.2 Vliv kationtů na intenzitu fluorescence apigeninu 43
5 Závěr 44

6 Seznam použité literatury 45

Seznam použitých zkratek

FAD	Flavinadenindinukleotid
NADH	Nikotinamidadenindinukleotid, redukovaná forma
μ_Z	Dipólový moment fluoroforu v základním stavu
μ_E	Dipólový moment fluoroforu v excitovaném stavu
UV záření	Ultrafialové záření
VIS	Viditelná oblast světla
ACN	Acetonitril
HCOOH	Kyselina mravenčí
MeOH	Methanol
Mg^{2+}	Hořečnaté kationty
Al^{3+}	Hlinité kationty
HPLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie
FS	Fluorescenční spektrum

Seznam obrázků

Obrázek 1: Diagram interakcí světla a hmoty 11

Obrázek 2: Jablonského diagram 13

Obrázek 3: Stokesův posun 15

Obrázek 4: Relaxace rozpouštědla 22

Obrázek 5: Schématický diagram spektrofluorimetru 24

Obrázek 6: Molekuly apigeninu a luteolinu 25

Obrázky 1–5 předloha**:** LAKOWICZ, Joseph R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. Third Edition. Baltimore, Maryland, USA: Springer, 2016. ISBN 978-0-387-31278-1

Seznam grafů

Graf 1: FS apigeninu bez Mg^{2+} kationtů a s nimi, směs číslo 9, λ_{exc} = 267 nm 30

Graf 2: FS apigeninu bez Mg^{2+} kationtů a s nimi, směs číslo 2, λ_{exc} = 339 nm 31

Graf 3: FS apigeninu bez Mg^{2+} kationtů a s nimi, směs číslo 18, λ_{exc} = 267 nm 33

Graf 4: FS apigeninu bez Mg^{2+} kationtů a s nimi, směs číslo 12, λ_{exc} = 335 nm 34

Graf 5: FS luteolinu bez Mg^{2+} kationtů a s nimi, směs číslo 9, λ_{exc} = 266 nm 36

Graf 6: FS luteolinu bez Mg^{2+} kationtů a s nimi, směs číslo 8, λ_{exc} = 350 nm 37

Graf 7: FS luteolinu bez Mg^{2+} kationtů a s nimi, směs číslo 13, λ_{exc} = 267 nm 39

Graf 8: FS luteolinu bez Mg^{2+} kationtů a s nimi, směs číslo 17, λ_{exc} = 348 nm 40

Seznam tabulek

Tabulka 1: Poměry HCOOH/MeOH a HCOOH/ACN ……27

Tabulka 2: Absorpční maxima apigeninu ve směsích ……29

Tabulka 3: Absorpční maxima luteolinu ve směsích ……29

Tabulka 4: Maximální intenzity fluorescence apigeninu ve směsích č. 1–9, λ_{exc}= 267 nm ……30

Tabulka 5: Maximální intenzity fluorescence apigeninu ve směsích č. 1–9, λ_{exc} = 339 nm ……31

Tabulka 6: Vliv časového intervalu od přidání Mg^{2+} na intenzitu fluorescence apigeninu ve směsi č. 9 ……32

Tabulka 7: Vliv časového intervalu od přidání Mg^{2+} na intenzitu fluorescence apigeninu ve směsi č. 2 ……32

Tabulka 8: Maximální intenzity fluorescence apigeninu ve směsích č. 10–18, λ_{exc} = 267 nm ……33

Tabulka 9: Maximální intenzity fluorescence apigeninu ve směsích č. 10–18, λ_{exc} = 335 nm ……34

Tabulka 10: Vliv časového intervalu od přidání Mg^{2+} na intenzitu fluorescence apigeninu ve směsi č. 18 ……35

Tabulka 11: Vliv časového intervalu od přidání Mg^{2+} na intenzitu fluorescence apigeninu ve směsi č. 12 ……35

Tabulka 12: Maximální intenzity fluorescence luteolinu ve směsích č. 1–9, λ_{exc} = 266 nm ……36

Tabulka 13: Maximální intenzity fluorescence luteolinu ve směsích č. 1–9, λ_{exc} = 350 nm ……37

Tabulka 14: Vliv časového intervalu od přidání Mg^{2+} na intenzitu fluorescence luteolinu ve směsi č. 9 ……38

Tabulka 15: Vliv časového intervalu od přidání Mg^{2+} na intenzitu fluorescence luteolinu ve směsi č. 8 ……38

Tabulka 16: Maximální intenzity fluorescence luteolinu ve směsích č. 10-18, λ_{exc} = 267 nm ……39

Tabulka 17: Maximální intenzity fluorescence luteolinu ve směsích č. 10-18, λ_{exc} = 348 nm ……40

Tabulka 18: Vliv časového intervalu od přidání Mg^{2+} na intenzitu fluorescence luteolinu ve směsi č. 13 ……41

Tabulka 19: Vliv časového intervalu od přidání Mg^{2+} na intenzitu fluorescence luteolinu ve směsi č. 17 ……41

1 Úvod a cíl práce

Fluorescence je jedním z druhů fotoluminiscence a nastává, pokud látka přijme budící energii ve formě světla a ocitne se v excitovaném stavu, z kterého se zpět do základního vrací pomocí vyzáření fotonu. Sloučenin, které přirozeně vykazují schopnost fluorescence, není mnoho, ale díky tomu, že se metody fluorescenční analýzy vyznačují svou vysokou citlivostí a selektivitou, jsou přínosem v řadě oborů.

Tématem této bakalářské práce je Studium fluorescenčních spekter léčiv. Některé kovové kationty mohou tvořit s molekulami schopnými fluorescence fluoreskující komplexy a ovlivnit tak její intenzitu. Hlavním cílem práce byla snaha otestovat možnost zvýšení intenzity fluorescence pomocí fluoreskujících komplexů mezi kationty kovu a fluorofory. Konkrétně byl testován vliv přidaných Mg^{2+} kationtů k roztokům apigeninu a luteolinu. Součástí práce bylo proměření fluorescenčních spekter apigeninu a luteolinu při vhodných excitačních vlnových délkách bez přidaných iontů a s nimi a pozorování vlivu přidaných Mg^{2+} kationtů na tato spektra a intenzitu fluorescence. Měření byla prováděna v roztocích, kde se jako rozpouštědla používaly binární směsi HCOOH s MeOH nebo s ACN v různých poměrech. Tyto látky byly vybrány tak, aby následně mohly sloužit jako mobilní fáze při gradientové eluci v systému HPLC, ale zároveň svými vlastnosti neovlivnily negativně intenzitu fluorescence a fluoreskující komplexy vedly naopak ke zlepšení fluorescenční detekce.

2 Teoretická část

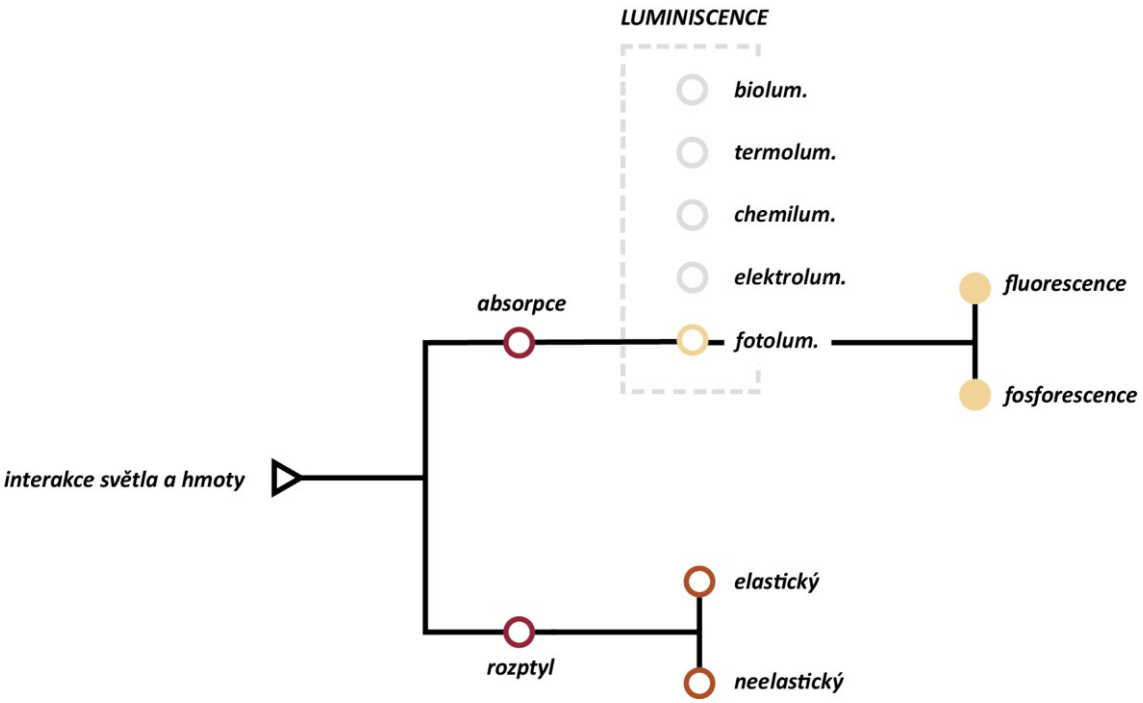
2.1 Luminiscence

Luminiscenci lze charakterizovat jako sekundární emitující záření, které nastane po dodání budící neboli excitační energie látce. K luminiscenci dochází, pokud se excitované molekuly vrací do stabilnějšího, základního energetického stavu pomocí emise elektromagnetického záření.

Podle původu budící energie dělíme luminiscenční záření *(obr. č. 1)* na fotoluminiscenci (buzenou světelným zářením), elektroluminiscenci (energie dodávána pomocí elektrického pole), chemiluminiscenci (doprovázející chemickou exotermní reakci), termoluminiscenci (ovlivňovanou teplotou), bioluminiscenci (vznikající v důsledku biochemické reakce) atd. [1] [2] [3].

2.1.1 Fotoluminiscence

Způsobem excitace u fotoluminiscence je absorpce viditelného, nebo ultrafialového světla. Na rozdíl od jiných druhů sekundárního záření vznikajících po



Obrázek 1: *Diagram interakcí světla a hmoty*

interakci světla a hmoty, jako je rozptyl (Rayleighův elastický a Ramanův neelastický) nebo odraz světla, dochází u fotoluminiscence k absorpci excitační energie a její následné transformaci. Dle doby dosvitu (časový úsek mezi koncem excitačního procesu a luminiscencí) dále rozlišujeme luminiscenci na fluorescenci a fosforescenci *(obr. č. 1)* [1].

Elektronové stavy organických molekul jsou zpravidla rozdělitelné na stavy singletové a tripletové. V případě singletového stavu tvoří páry v molekule elektrony s opačným spinem. Pokud mají elektrony spin shodný, jedná se o stav tripletový.

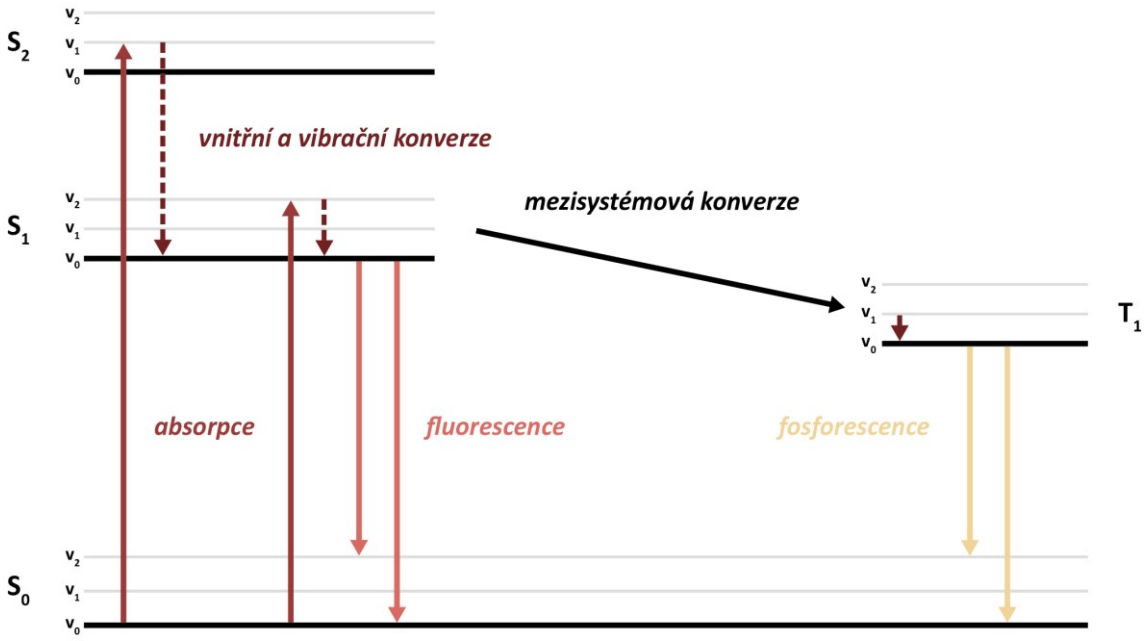
Základní energetickou hladinou molekuly je singlet S_0. Elektron musí být nejdříve excitován do vyšších energetických hladin. Absorpcí záření může elektron přejít do vzbuzeného singletového stavu S_1, případně S_2, S_3… Ovšem z těchto vyšších excitovaných stavů, jako je stav S_2 a S_3, se pomocí nezářivých procesů rychle relaxuje na singlet S_1. Tento jev nazývaný vnitřní konverze se obvykle objeví do 10^{-12} sekund. V rámci jednotlivých energetických hladin dochází také k vibrační relaxaci, kdy excitovaný elektron nezářivým přechodem přestoupí na nejnižší vibrační úroveň v_0. Jestliže se molekula vrací z excitovaného singletu na základní energetickou hladinu S_0 vyzářením nadbytečné energie kvantem fotonů, tak se jedná o **fluorescenci**. Tento zářivý přechod mezi hladinami se stejnou multiplicitou spinů je velmi rychlý, protože je spinově dovolený, a proto i pravděpodobnější. Charakteristická doba dosvitu fluorescence je v řádu 10^{-8}–10^{-5} sekund.

Méně pravděpodobný je přechod molekuly ze základního singletového do tripletového excitovaného stavu T_1, kdy dochází k obrácení spinu jednoho z elektronů. Molekula při návratu do S_0 opět ztrácí energii emisí fotonu, doba dosvitu je ale v důsledku zakázaného přechodu z T_1 na S_0 hladinu delší a trvá od 10^{-3} sekund až po několik sekund. V tomto případě se jedná o **fosforescenci**, která může pokračovat určitou dobu i po odstranění zdroje excitace. Vůči fluorescenci je také posunuta k vyšším vlnovým délkám, má tedy nižší energii [1] [4] [5] [6] [7].

Kromě již zmíněné vnitřní konverze mezi dvěma elektronovými stavy shodné multiplicity, kdy excitované molekuly předávají neradiačním způsobem (například srážkami) část své energie molekulám neaktivním (molekuly rozpouštědla), může dojít i ke konverzi mezisystémové. Při mezisystémové konverzi přechází elektrony mezi dvěma elektronovými stavy různé multiplicity. Z minimální vibrační hladiny v_0 vzbuzeného

singletu S_1 přejdou na vyšší vibrační hladinu (v_1, v_2) vzbuzeného tripletu T_1. Následuje vibrační relaxace na nejnižší vibrační stav a poté za vhodných experimentálních podmínek fosforescence. Energetické přechody při absorpci záření, fluorescenci a fosforescenci názorně zobrazuje Jablonského diagram *(obr. č. 2)* [1] [3] [8].

Vedle těchto základních luminiscenčních procesů se může objevit i **zpožděná fluorescence**. U tohoto typu fluorescence setrvává elektron delší dobu v excitovaném tripletu T_1, životnost v této hladině musí být dostatečně dlouhá. Molekula se přísunem energie ve formě tepla znovu vrátí do vzbuzeného singletu S_1 a odtud dojde ke fluorescenčnímu vyzáření. Emisní spektrum zpožděné fluorescence daného fluoroforu (kapitola 3.6) je shodné se spektrem normální fluorescence, ale doba dosvitu je prodloužena. Pravděpodobnost teplotně aktivované fluorescence je vyšší, pokud relativní energetický rozdíl mezi hladinami S_1 a T_1 je malý [1] [4].



Obrázek 2: *Jablonského diagram*

2.2 Absorpce světla molekulami

Absorpcí fotonu molekulou dochází k přechodu elektronu do neobsazeného orbitalu a molekula se ocitne v excitovaném stavu. Mezi molekulové orbitaly se řadí orbitaly σ a π. Přechod elektronu ze σ orbitalu do antivazebného σ^* orbitalu vyžaduje velké množství energie, a proto je přechod $\sigma \rightarrow \sigma^*$ pomocí absorpce světla

nepravděpodobný. U molekul obsahujících π vazby (dvojné a trojné vazby) může absorpce fotonu vhodné energie častěji vést k přechodu z vazebného do antivazebného orbitalu $\pi \rightarrow \pi^*$. Pokud molekula obsahuje heteroatom s nevazebnými elektrony, tak může dojít k přechodu z nevazebného orbitalu n do antivazebného π^* orbitalu. Tento přechod, značený jako $n \rightarrow \pi^*$, vyžaduje dodání menšího množství energie, než výše zmíněný $\pi \rightarrow \pi^*$ přechod [1] [9].

2.2.1 Franck–Condonův princip

Franck–Condonův princip říká, že během absorpce fotonů nedochází ke změnám polohy jader v dané molekule. Elektronové přechody do antivazebného orbitalu jsou mnohem rychlejší (10^{-15} s) v porovnání se změnami délek a úhlů vazeb mezi jádry atomů (10^{-12} s). Excitovaná molekula se nachází v tzv. Franck–Condonově stavu a jádra atomů reagují na nové rozložení elektronů se zpožděním.

2.3 Základní rysy fluorescence

2.3.1 Kashovo–Vavilovo pravidlo

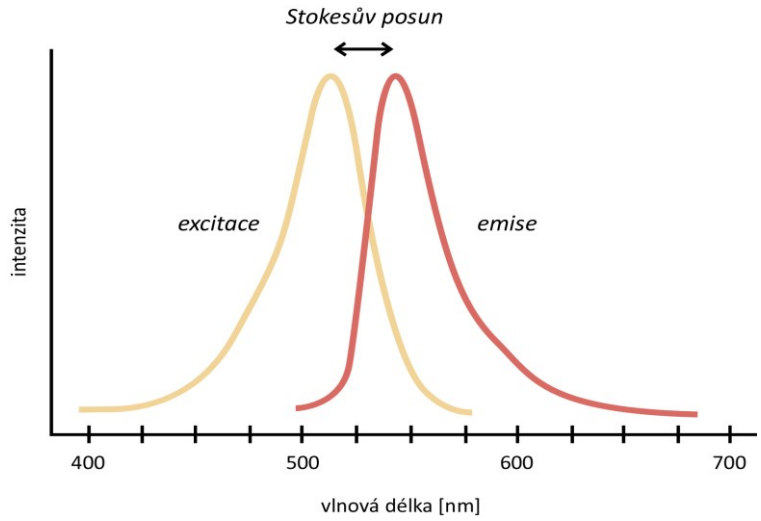
Při excitaci do vyšších elektronových a vibračních hladin se fluorofory zbavují přebytečné energie vnitřní a vibrační konverzí. V důsledku této rychlé relaxace na nejnižší vibrační hladinu v_0 prvního excitovaného singletu S_1 nejsou zpravidla emisní spektra závislá na excitační vlnové délce. Tuto typickou nezávislost popisuje Vavilovo pravidlo vyvozené z pravidla Kashova [8].

2.3.2 Stokesův posun

Stokesův posun *(obr. č. 3)* je rozdíl mezi maximem excitačního a emisního spektra ($\lambda_{exc} > \lambda_{emit}$). Matematicky se vyjadřuje pomocí vlnočtu $\tilde{\nu}$, jenž je dán počtem vlnových délek přináležejících na jednotku délky ($\tilde{\nu} = \frac{1}{\lambda}$) a vyjádřen bývá nejčastěji v cm^{-1}:

$$\Delta\tilde{\nu} = \tilde{\nu}_{exc} - \tilde{\nu}_{emit}$$

V důsledku nezářivých procesů při deexcitaci je energie emitovaného záření menší než energie absorbovaná. Nižší energie emitovaného záření znamená posun emisního spektra k vyšším vlnovým délkám vůči spektru excitačnímu. Tato skutečnost je také znázorněna na Jablonského diagramu *(obr. č. 2)* [1] [4] [8].



Obrázek 3: *Stokesův posun*

2.3.3 Pravidlo zrcadlové symetrie spekter

Pokud je relativní pravděpodobnost přechodu ze základního singletového stavu S_0 na první vzbuzený stav S_1 stejná, jako u přechodu opačného ($S_0 \rightarrow S_1$), je emisní spektrum zrcadlovým obrazem spektra absorpčního. Vzájemný překryv spekter platí pro spoustu organických molekul. Pokud ovšem v základním stavu existuje více forem daného fluoroforu jako v případě agregátů, komplexů nebo tautomerie, spektra nejsou vzájemnými obrazy [1] [10].

2.4 Veličiny charakterizující fluorescenci

2.4.1 Životnost excitovaného stavu

Životnost τ_S (v případě fosforescence τ_T) je průměrná doba, po kterou se systém nachází v excitovaném singletovém stavu před návratem do stavu základního. Závisí na rychlosti zářivých a nezářivých procesů. Vyjádřit ji můžeme tímto vztahem:

$$\tau_S = \frac{1}{k_r^S + k_{nr}^S}$$

kde k_r^S představuje časovou konstantu zářivého (r = radiative) přechodu $S_1 \rightarrow S_0$, k_{nr}^S časovou konstantu nezářivých přechodů (nr = non-radiative) danou vnitřní a mezisystémovou konverzí. U organických molekul se životnost systému v excitovaném stavu S_1 pohybuje od pikosekund až po nanosekundy [1][8].

2.4.2 Kvantový výtěžek

Kvantový výtěžek ϕ_F je ta část vzbuzených molekul, která se z celkového počtu excitovaných molekul vrací do základního stavu fluorescenčním vyzářením. Využívá se k hodnocení intenzity fluorescence. Vyjadřován je poměrem počtu kvant vyzářených N_F a celkového počtu kvant absorbovaných N daným systémem:

$$\phi_F = \frac{N_F}{N}$$

Častěji se ale vyjadřuje pomocí výše zmíněným časových konstant:

$$\phi_F = \frac{k_r^S}{k_r^S + k_{nr}^S}$$

Kvantové výtěžky se uvádí jako absolutní nebo relativní hodnoty. Převažuje využití relativních metod, kdy se srovnávají kvantové výtěžky vzorku a vhodně zvoleného standardu. V teoretickém případě, kdy by fluorofor absorboval i emitoval stejný počet fotonů, bude výsledný kvantový výtěžek roven jedné (100 %). Ovšem v důsledku nezářivých přechodů takového kvantového výtěžku nedosahujeme [9].

Výtěžek závisí nepřímo úměrně na teplotě. Účinnost nezářivých procesů je vyšší při vyšších teplotách, a proto je kvantový výtěžek snížen. Toto snížení je velmi nežádoucí u metod založených na fluorescenční detekci. Výsledný kvantový výtěžek je také velmi ovlivněn zhášením fluorescence. Oba tyto jevy lze potlačit nebo alespoň snížit uchováváním fluoroforu při nízkých teplotách. Dle Kashova pravidla není ovlivněn excitační vlnovou délkou [1] [8].

2.5 Zhášení fluorescence

Řada fyzikálních nebo chemických procesů vede k poklesu intenzity fluorescenční emise neboli ke zhášení fluorescence. Zhášení fluorescence je nejčastěji způsobeno molekulární interakcí mezi molekulou fluoroforu a další molekulou, tzv. zhášečem. Zhášení v důsledku bimolekulární interakce je reverzibilní proces. To znamená, že po skončení deexcitačních dějů se nachází fluorofor v základním stavu beze změny své molekuly. Dva hlavní typy zhášení jsou zhášení dynamické a statické. U obou těchto typů musí být molekula fluoroforu v kontaktu s molekulou zhášeče [1] [8] [9].

2.5.1 Dynamické zhášení

K dynamickému neboli koliznímu zhášení dochází, pokud se excitovaná molekula fluoroforu střetne s atomem nebo molekulou zhášeče. Kontakt musí tedy proběhnout během doby charakterizující životnost excitovaného stavu fluoroforu. Kolize se zhášečem rostou úměrně s jeho koncentrací a délkou životnosti. Zjednodušují návrat do základního stavu pomocí nezářivých procesů, a tím dochází ke snížení kvantového výtěžku fluorescence. Vztah, kterým je kolizní zhášení popisováno, se nazývá Stern–Volmerova rovnice:

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_{SV}[Q]$$

kde F_0 a F jsou intenzity fluorescenčního záření v nepřítomnosti a přítomnosti zhášeče, $[Q]$ vyjadřuje koncentraci zhášeče ve vzorku a K_{SV} značí Stern–Volmerovu zhášecí konstantu. Ta je dána součinem životnosti excitovaného stavu τ_S a zhášecí konstantou k_q. Mezi běžné zhášeče řadíme kyslík, akrylamid nebo jodidové a bromidové ionty [1] [8] [9].

2.5.2 Statické zhášení

Některé fluorofory dokážou vytvořit s další molekulou stabilní komplex, který není schopen fluorescenčního vyzáření. Pokud tento komplex absorbuje světlo, vrací se do základního stavu bez vyzáření. Na rozdíl od dynamického zhášení se molekula fluoroforu při kontaktu může nacházet jak v základním, tak excitovaném stavu. Mezi molekuly, které se podílejí na statickém zhášení, patří chinony, purin nebo pyrimidin [1] [9].

2.5.3 Koncentrační zhášení a vnitřně filtrační efekt

Ke koncentračnímu zhášení dochází, pokud koncentrace fluoroforu překročí určitou prahovou hodnotu. Koncentrační zhášení neboli samozhášení je pak důsledkem neelastických srážek molekul excitovaných a těch v základním stavu. Případně může dojít k asociaci molekul podobně jako u statického zhášení, kdy molekuly záření sice absorbují, ale následně neemitují.

Spektrometrické stanovení může být v důsledku vysoce koncentrovaného roztoku také ovlivněno tzv. vnitřně filtračním efektem. V případě primárního filtračního efektu je excitační paprsek oslaben koncentrovaným vzorkem, a proto je celková

fluorescenční emise snížena. Při významném překryvu excitačního a emisního spektra může docházek k sekundárnímu vnitřně filtračnímu efektu. V takovém případě je snížení kvantového výtěžku fluorescence způsobeno absorpcí již emitovaného sekundárního záření roztokem analytu [4].

2.6 Fluorofory

Molekula, která je schopna po ozáření absorbovat energii a následně ji fluorescenčně vyzářit, se nazývá fluorofor. S rostoucí schopností absorpce ultrafialového nebo viditelného záření molekulou roste i pravděpodobnost intenzivnější fotoluminiscence. Dle původu dělíme fluorofory na vnitřní a vnější.

Vnitřní fluorofory se přirozeně vyskytují v přírodě. Využíváme je, pokud studujeme systém, ve kterém se takový fluorofor přirozeně nachází. Mezi biologické molekuly schopné fluorescence řadíme například pyridinové koenzymy (NADH), flavinové koenzymy (FAD), chlorofyl, proteiny a aromatické aminokyseliny jako fenylalanin, tryptofan nebo tyrozin.

V přírodě se nevyskytující, uměle vytvořené, fluorofory jsou nazývané **vnější**. Přidávají se ke vzorkům, které nemají požadované fluorescenční vlastnosti, jež hodnotíme pomocí kvantového výtěžku. Těchto fluoroforů bylo vytvořeno velké množství. Jsou tou příkladu sondy pro kovalentní a nekovalentní značení proteinů, pro značení lipofilních membrán, nukleotidů nukleových kyselin atd. I když těchto skupin je mnoho, tak většina sond je založena na tom, že jejich struktura obsahuje jádro jako naftalen, heterocyklický biman a oxazin, xanten, nebo kyanin. Vnější fluorofory se velmi často využívají při fluorescenční mikroskopii. Při velké intenzitě světla může docházet k rozpadu fluoroforů, tzv. photobleachingu, a snížení schopnosti emitovat fluorescenční záření. Proto jednou z vlastností požadovaných u fluoroforu je jeho fotostabilita [3] [8] [9].

2.6.1 Vliv struktury molekuly na fluorescenci

Jak již bylo nastíněno, většina fluoroforů jsou **aromatické sloučeniny**. Fluoreskují především multicyklické sloučeniny s aromatickou planární strukturou. Alifatických sloučenin schopných dostatečné fluorescence je velmi málo a jedná se o vysoce nenasycené molekuly.

S vyšší mírou konjugace π-elektronového systému, tedy s vyšším počtem překrytých p orbitalů v molekule, obecně roste kvantový výtěžek. Také platí, že čím je konjugovaný systém větší, tím je delší vlnová délka, kterou absorbuje. Dojde tedy k posunu absorpčního i fluorescenčního emisního spektra k vyšším vlnovým délkám.

Nejčastější a nejníže položený elektronový přechod aromatických uhlovodíků je přechod z vazebného do antivazebného orbitalu $\pi \rightarrow \pi^*$. Tento přechod je typický vysokým kvantovým výtěžkem fluorescence a vysokým absorpčním koeficientem [1] [3].

Obě tyto charakteristiky jsou obvykle sníženy, pokud je v konjugovaném systému zahrnut heteroatom. Nejnižším přechodem u těchto molekul může být přechod $n \rightarrow \pi^*$. Zářivý přechod je příliš pomalý, aby konkuroval procesům nezářivým, a proto je kvantový výtěžek snížen. Typ přechodu je ale u heterocyklických sloučenin silně závislý na prostředí a je těžší u nich předvídat fluorescenční vlastnosti. Například pokud je prostředí pro heterocyklickou sloučeninu obsahující dusík vyhovující, mohou vznikat vodíkové vazby mezi atomem dusíku a molekulami rozpouštědla. V tomto případě se stává nejnižším přechodem $\pi \rightarrow \pi^*$ přechod a kvantový výtěžek je naopak zvýšen [1] [4].

Aromatické uhlovodíky mohou mít řadu substituentů, které svým typem i polohou ovlivňují charakter molekuly jako fluoroforu. Mezi základní typy substituentů řadíme těžké atomy, substituenty elektrondonorní a elektronakceptorní. Přestože existuje předpoklad, jak daný typ substituentu ovlivní fluorescenci, není vhodné zevšeobecnění. Například u kombinace různých typů substituentů je odhad fluorescenčních charakteristik velmi komplexní a složitý [1].

- Přítomností **těžkého atomu**, jako je atom bromu nebo jodu, dochází v důsledku větší pravděpodobnosti mezisystémové konverze, jakožto nezářivého přechodu, ke zhášení fluorescence. Míra, kterou ovlivní vnitřní těžký atom v aromatickém uhlovodíku výsledný výtěžek fluorescence, závisí také na převaze zářivých přechodů nad nezářivými v původním systému bez substituentů [1].
- **Elektrondonorní substituenty** jako jsou hydroxylové a aminové skupiny (–OH, $–NH_2$, –NHR, $–NR_2$) způsobují vůči aromatické molekule bez substituentů zvýšení molárního absorpčního koeficientu a také posun excitačního a emisního spektra. Kromě posunu spekter jsou spektra fenolů a aromatických aminů velmi závislá na pH prostředí a v porovnání se spektrem nesubstituované molekuly

široká. Substituce elektrondonorní skupiny nemění nejnižší elektronový přechod $\pi \rightarrow \pi^*$ aromatických sloučenin [1] [4].

- K **elektronakcepotorním substituentům** patří karbonylové a nitro skupiny. Aromatické aldehydy a ketony upřednostňují nezářivé přechody před těmi zářivými. Nejčastěji probíhá mezisystémová konverze a kvantový výtěžek je nízký. Přestože častější elektronový přechod u karbonylových aromatických sloučenin je přechod $n \rightarrow \pi^*$, tak $\pi \rightarrow \pi^*$je u některých sloučenin také možný. Pravděpodobnější je s rostoucí polaritou rozpouštědla, s kterou roste i intenzita fluorescence. V případě aromatických sloučenin obsahujících nitroskupiny je fluorescence téměř nulová. Velmi efektivní je mezisystémová konverze a sloučeniny spíše fosforeskují. Další nevýhodou ohledně fluorescence je, že nitroaromatické sloučeniny velmi často podléhají fotodegradaci, tedy nevratnému poškození molekuly fluoroforu [1] [4].

2.6.2 Fluorofory a komplexy s kovy

Při analytickém využití fluorescence je významná také stabilizace molekuly. Pomocí chelátového komplexu vytvořeného reakcí organické molekuly s kovovým iontem můžeme zbavit molekulu její pohyblivosti [3].

Jak již bylo zmíněno, některé cizí ionty mohou být zhášeči fluorescence. Mezi zhášecí anionty patří například halogenidy, thiokyanáty nebo sírany. Mezi kationty způsobující pokles intenzity fluorescence patří především kationty s vakantními d–orbitaly jako jsou kationty měďnaté, nikelnaté, železité a železnaté.

Naopak některé ionty prvků, bez d–vakantních orbitalů, tvoří s organickými činidly, jako jsou polyhydroxyflavony nebo rhodamin B, fluoreskující komplexy. Vhodnými kationy jsou kationty hlinité, hořečnaté, zinečnaté a lanthanité [4].

2.7 Vliv prostředí na fluorescenci

Vliv struktury fluoroforu je často spojován s konkrétním prostředím, ve kterém se molekula nachází. Přestože fluorescenci vykazují některé organické i anorganické látky v pevném stavu, při fluorescenčním měření se využívají hlavně látky v roztocích. Z tohoto důvodu se tato kapitola bude věnovat vlivu vlastností rozpouštědla.

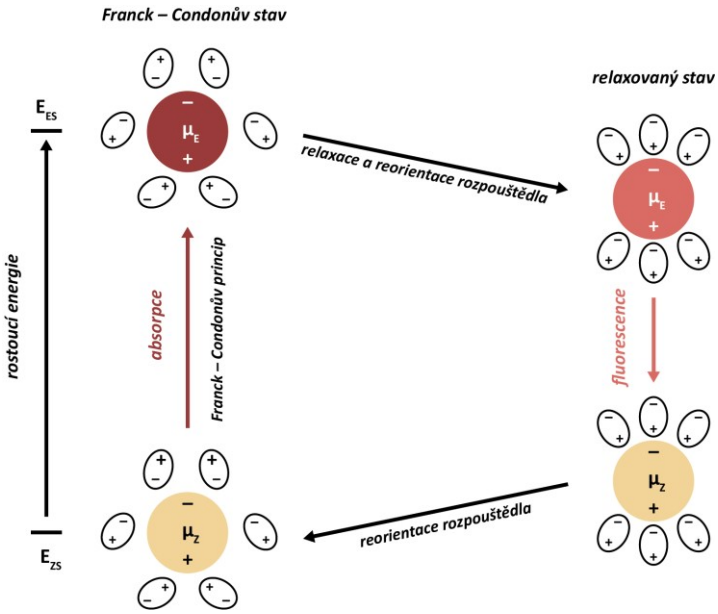
Prostředí je definováno fyzikálními a chemickými charakteristikami, mezi které patří polarita, viskozita, pH, teplota atd. Právě souvislost mezi polaritou, viskozitou a kyselostí prostředí a fluorescencí udává vysokou citlivost a selektivitu technik založených na fluorescenční emisi. Účinky jednotlivých charakteristik na fluorescenční emisi se liší u jednotlivých fluoroforů, obecně ale ovlivňují absorpční a emisní spektra (spektrální posuny) a také kvantové výtěžky. Přestože se nejčastěji diskutuje vliv polarity rozpouštědla, bývá fluorofor často ovlivněn více vlivy, a proto je těžké určit, který z nich je v daném systému ten dominantní [1] [3] [8] [9].

2.7.1 Polarita rozpouštědla

Již bylo popsáno snížení energie emitovaného záření vůči energii záření absorbovaného v důsledku nezářivých přechodů. Tyto nezářivé přechody jsou velmi ovlivněny právě polaritou prostředí. Po excitaci přechází přebytečná vibrační energie v rámci elektronové hladiny na molekuly rozpouštědla obklopující excitovaný fluorofor.

K dalšímu snížení energie excitovaného stavu dochází pomocí relaxace rozpouštědla *(obr. č. 4)*. Při excitaci dle Franck–Condonova principu nastane změna polohy elektronů bez změny polohy atomových jader. Redistribuce elektronů je spojená se změnou dipólového momentu fluoroforu. Fluorofor v excitovaném stavu má zpravidla větší dipólový moment než tentýž fluorofor ve stavu základním ($\mu_E > \mu_Z$). Molekuly rozpouštědla obklopující excitovaný fluorofor podléhají po změně jeho dipólového momentu reorientaci v důsledku dipólového momentu vlastního. Stav, ve kterém se excitovaná molekula nachází po relaxaci, je jiný, energeticky chudší, než stav Franck–Condonův. Tato relaxace rozpouštědla vede ke snížení energie emitovaného záření a posunu k vyšším vlnovým délkám. S rostoucí polaritou rozpouštědla roste snížení energie excitovaného stavu a tím i velikost Stokesova posunu. Naopak změnou prostředí za prostředí méně polární se sníží vliv rozpouštědla na energetickou hladinu excitovaného stavu [1] [8] [9].

Citlivost excitovaného stavu na rozpouštědlo je dána také polaritou samotného fluoroforu. Polární rozpouštědla ovlivňují hlavně polární fluorofory. Nepolární fluorofory vykazují vůči polaritě mnohem menší citlivost [1] [8].



Obrázek 4: *Relaxace rozpouštědla*

2.7.2 Ostatní vlivy prostředí

Spektrální posuny rozdělujeme na bathochromní (červené), kdy jsou spektra posunuta k vyšším vlnovým délkám a hypsochromní (modré), kdy jsou naopak spektra posunuta ke kratším vlnovým délkám [1].

Mezi příčiny posunů patří také viskozita. Výše zmíněná relaxace rozpouštědla vyžaduje určitý čas na reorganizaci molekul rozpouštědla kolem excitovaného fluoroforu. Spektrální posun v důsledku relaxace rozpouštědla se projeví, pokud je vyžadovaný čas kratší než doba životnosti excitovaného stavu. Pokud je prostředí, ve kterém se fluorofor nachází, příliš viskózní a nedovolí rychlou reorganizaci molekul rozpouštědla, dojde k emisi fluorescenčního záření ze stavu blízkého Franck–Condonovu a k posunu emisního spektra nedojde [8] [9].

Viskozita daného prostředí je také ovlivňována teplotou. Vystavení rozpouštědla nižším teplotám může zapříčinit jeho vyšší viskozitu, a tedy pomalejší relaxaci. Naopak zvýšení teploty vede ke snížení jak kvantového výtěžku, tak doby životnosti excitovaného stavu. Při vyšších teplotách jsou účinnější nezářivé procesy vedoucí k poklesu fluorescenčního vyzáření [1] [8].

Stejně jako u vlivu struktury samotného fluoroforu jsou efekty vnějšího prostředí velmi složité a komplexní. Kromě popsaných základních vlivů může docházet ke specifickým interakcím mezi fluoroforem a prostředím, které komplikují předpověď fluorescenčního chování [1] [8] [9].

2.8 Spektrofluorimetrie

Spektrofluorimetrie se zabývá měřením velikosti fluorescence. Pomocí většiny spektrofluorimetrů můžeme získat excitační i emisní spektra látky schopné fluorescenčního vyzáření. Fotoluminiscenční spektra jsou záznamem naměřené intenzity emitovaného záření jako funkce excitační či emisní vlnové délky. Při analytické aplikaci porovnáním intenzity spekter různých vzorků získáme představu o jejich fluorescenčních vlastnostech [8] [9].

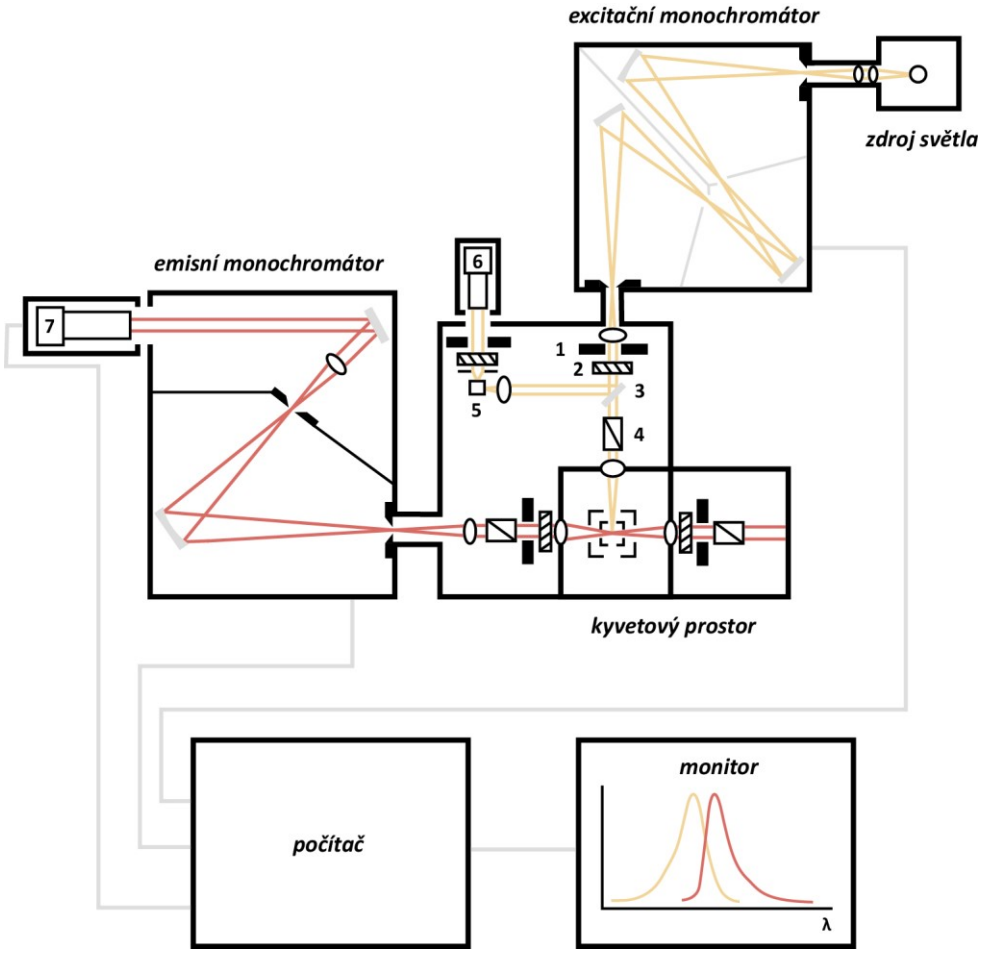
2.8.1 Excitační a emisní spektra

Emisní spektrum představuje závislost intenzity fluorescence na vlnové délce emisního, sekundárního, záření při konstantní vlnové délce excitace. Jak již bylo zmíněno, toto spektrum bývá zpravidla zrcadlovým obrazem ke spektru absorpčnímu posunuté k delším vlnovým délkám. **Excitační spektrum** je závislostí intenzity fluorescence na vlnové délce excitačního záření měřené při konstantních podmínkách emise. Bývá často shodné se spektrem absorpčním a umožňuje nám výběr vhodné excitační vlnové délky. K excitaci můžeme většinou využít jakoukoli vlnovou délku, která odpovídá rozsahu vlnových délek změřeného absorpčního pásu [3] [5].

2.8.2 Instrumentace

Spektrofluorimetry *(obr. č. 5)* jsou konstruovány ze zdroje excitačního záření, excitačního a emisního monochromátoru, kyvetového prostoru pro kyvetu s měrným vzorkem a detektoru. Jako zdroj světla pro excitaci se využívají xenonové výbojky, lasery nebo světlo emitující diody (LEDs = light-emitting diodes).

Monochromátory slouží k výběru excitační a emisní vlnové délky. Pokud spektrofluorimetr zaznamenává spektrum excitační, vychází z excitačního monochromátoru plynule se měnící excitační vlnová délka, zatímco emisní monochromátor je nastaven na neměnnou vlnovou délku, která obvykle odpovídá maximu fluorescenční emise. Při měření spektra emisního je nastavení opačné, vlnové délky vycházející z emisního monochromátoru se mění a excitační monochromátor je nastaven konstantně.



1 – štěrbina, 2 – držák pro filtry, 3 – rozdělovač paprsku, 5 – referenční buňka,
6 – referenční fotonásobič, 7 – fotonásobič

Obrázek 5: *Schématický diagram spektrofluorimetru*

Fluorescenční záření vzorku je měřeno pod úhlem 90° vzhledem ke směru primárního záření. Detekci fluorescence zajišťuje fotonásobič. Spojení s elektronickým zařízením vede ke kvantifikaci a grafickému znázornění.

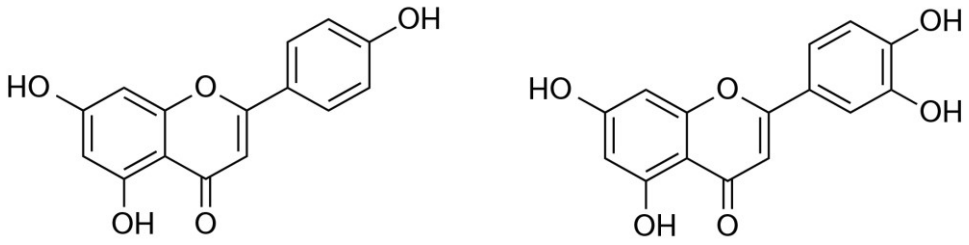
Okolí kyvetového prostoru tvoří optická soustava. Její součástí je štěrbina, která umožňuje regulaci průchodu světla, jejíž nastavená šířka odpovídá spektrální šířce procházejícího záření. Následuje rozdělovač paprsku, který rozdělí paprsek světla na dvě části. Jedna část excitačního záření je odražena na referenční fotonásobič. Optické filtry mohou být využity k omezení rušivého rozptýleného záření. Poslední součástí optické soustavy jsou polarizátory. Ty jsou často odnímatelné a jsou využívány, pokud při měření vyžadujeme určitou polarizaci některého záření [3] [8] [9].

2.9 Flavonoidy

Flavonoidy patří mezi běžné sekundární metabolity vyšších rostlin. Po chemické stránce to jsou deriváty 2-fenylchromanu a dle oxidace pyranového kruhu je dělíme do několika skupin. Jednou ze skupin jsou flavony, mezi které patří i apigenin s luteolinem. U rostlin jsou flavonoidy příčinou jejich zbarvení, ovlivňují jejich strukturu, ale také chrání před patogeny nebo UV zářením. Pro člověka jsou příznivé především antioxidační účinky. Vedle nich mohou mít také efekt protizánětlivý, protikarcinogenní, schopnost rozšiřovat cévy a snižovat krevní tlak. Zvýšený příjem flavonoidů chrání před vznikem aterosklerózy a snižuje riziko srdečních onemocněních. Bohatými zdroji flavonoidů jsou citrusy, borůvky, červené víno, celer, zelí [11] [12] [13].

2.9.1 Luteolin a apigenin

Luteolin a apigenin jsou žluté krystalické látky. Řadí se mezi přirozeně se vyskytující flavony, které jsou obsaženy jak v zelenině, ovoci, tak také v řadě rostlin. Mezi jejich farmakologické účinky se řadí zejména účinek protizánětlivý, antioxidační a zejména u luteolinu schopnost indukce apoptózy nádorových buněk. Jako u dalších flavonoidů (myricetin, kvercetin) jsou i u apigeninu s luteolinem pozorovány fluorescenční vlastnosti.



apigenin luteolin

Obrázek 6: *Molekuly apigeninu* – 5,7-dihydroxy-2-(4-hydroxyfenyl)chromen-4-on *a luteolinu* – 2-(3,4-dihydroxyfenyl)-5,7-dihydroxychromen-4-on

3 Experimentální část

3.1 Přístrojové vybavení a pomůcky

- UV – VIS Spektrofotometr HP 8453 (Agilent Technologies)
- Spektrofluorimetr AMINCO-Bowman series 2 (Thermo Spectronic)
- Analytické váhy (Sartorius)
- Magnetická míchačka MM4 (LAVAT)
- Poloautomatické pipety Finnpipette (ThermoLab Systems)
- Kyvety (Chromspec, Hewlett packard)

3.2 Použité chemikálie

- Apigenin (Toronto Research Chemicals Inc.)
- Luteolin (Toronto Research Chemicals Inc.)
- Methanol MeOH Chromasolv®for HPLC (Aldrich)
- Acetonitril ACN for HPLC LC-MS grade (VWR BDH Chemicals)
- Kyselina mravenčí HCOOH p. a. (Penta)
- Chlorid hořečnatý p. a. (Lachema Brno)
- Ultračistá voda (Farmaceutická fakulta)

3.3 Příprava roztoků

3.3.1 Základní roztoky apigeninu a luteolinu

Základní roztok luteolinu o koncentraci $0{,}3494.10^{-3}$ mol/l byl připraven rozpuštěním navážky 1,0 mg v MeOH v 10 ml odměrné baňce. Stejným způsobem bylo připraveno 10 ml základního roztoku apigeninu v MeOH. Připravený základní roztok apigeninu měl koncentraci $0{,}370.10^{-3}$ mol/l. Tyto základní roztoky flavonů byly uchovávány v lednici.

3.3.2 Roztok HCOOH

Roztok HCOOH o koncentraci 0,03 mol/l byl připraven napipetováním 565 µl 99 % HCOOH a doplněním 500 ml odměrné baňky ultračistou vodou.

3.3.3 Roztok chloridu hořečnatého

V experimentální části byl použit jako zdroj Mg^{2+} kationtů roztok chloridu hořečnatého v ultračisté vodě. Tento roztok o koncentraci 5.10^{-3} mol/l byl připraven rozpuštěním navážky 0,0475 g v 100 ml odměrné baňce.

3.3.4 Směsi HCOOH/MeOH a HCOOH/ACN

Obě směsi byly připraveny v devíti různých procentuálních zastoupeních jednotlivých složek. Poměry HCOOH : MeOH/ACN byly od 90 : 10 až po 10 : 90. Názorně je příprava směsí HCOOH/MeOH a HCOOH/ACN zobrazena v *tabulce č. 1*.

Číslo směsi	**Roztok HCOOH [%]**	**MeOH [%]**
1	10	90
2	20	80
3	30	70
4	40	60
5	50	50
6	60	40
7	70	30
8	80	20
9	90	10
Číslo směsi	**Roztok HCOOH [%]**	**ACN [%]**
10	10	90
11	20	80
12	30	70
13	40	60
14	50	50
15	60	40
16	70	30
17	80	20
18	90	10

Tabulka 1: Poměry HCOOH/MeOH a HCOOH/ACN

3.4 Měření spekter

3.4.1 Měření absorpčních spekter

Pomocí spektrofotometru byla proměřena absorpční spektra roztoků tvořených 100 µl základního roztoku apigeninu/luteolinu a 1900 µl směsi HCOOH s MeOH/ACN. Absorpční spektra sloužila k výběru vhodné excitační vlnové délky u fluorescenčního měření. Jako slepé vzorky byly využity samotné směsi HCOOH s MeOH/ACN *(tabulka č. 1)* bez přídavku základních roztoků flavonů.

3.4.2 Měření fluorescenčních spekter

FS apigeninu byla proměřena při vybraných excitačních vlnových délkách. První měřené vzorky byly tvořeny 100 µl základního roztoku apigeninu a 1900 µl směsi HCOOH s MeOH/ACN. Ke každému z celkových 18 vzorků základního roztoku apigeninu ve směsi bylo po změření přidáno 10 µl roztoku chloridu hořečnatého a zopakováno proměření fluorescenčních spekter. Následně byla porovnána FS vzorků bez Mg^{2+} kationtů s fluorescenčními spektry vzorků s Mg^{2+} kationty a zhodnocen případný růst či pokles intenzity fluorescence. U vzorků apigeninu, u kterých byl naměřen nejvyšší nárůst maximální intenzity fluorescence při dané excitační vlnové délce, byl sledován vliv časového intervalu od přidání Mg^{2+} kationtů na další případné zvýšení intenzity fluorescence. FS apigeninu byla proměřena ihned po přidání Mg^{2+} kationtů ke vzorku, poté po 5, 10 a 15 minutách.

Měření fluorescenčních spekter luteolinu proběhlo ve stejném pořadí jako u spekter apigeninu. Všechny vzorky byly před vlastním měřením řádně promíchány.

Jednotlivé směsi, ke kterým byly přidávány základní roztoky flavonů, byly zvoleny tak, aby mohly být využitelné pro gradientovou eluci v systému HPLC.

3.4.3 Nastavení spektrofluorimetru

- Šířka štěrbin: při excitaci 1 nm, při emisi 8 nm
- Rychlost snímání fluorescenčního spektra: 3 nm/s
- Automatická citlivost fotonásobiče pro dané měření

4 Výsledková část a diskuse

4.1 Výsledky měření absorpčních spekter

Spektrofotometricky změřené vlnové délky absorpčních maxim roztoku apigeninu ve směsích č. 1–18 jsou zahrnuty v *tabulce č. 2*. Pro roztoky luteolinu jsou hodnoty vlnových délek zahrnuty v *tabulce č. 3*.

Apigenin	
Složení směsi	**Vlnové délky maxim [nm]**
HCOOH + MeOH	267, 339
HCOOH + ACN	267, 335

Tabulka 2: Absorpční maxima apigeninu ve směsích

Luteolin	
Složení směsi	**Vlnové délky maxim [nm]**
HCOOH + MeOH	206, 254, 266, 350
HCOOH + ACN	207, 252, 267, 348

Tabulka 3: Absorpční maxima luteolinu ve směsích

4.2 Výsledky měření fluorescenčních spekter apigeninu

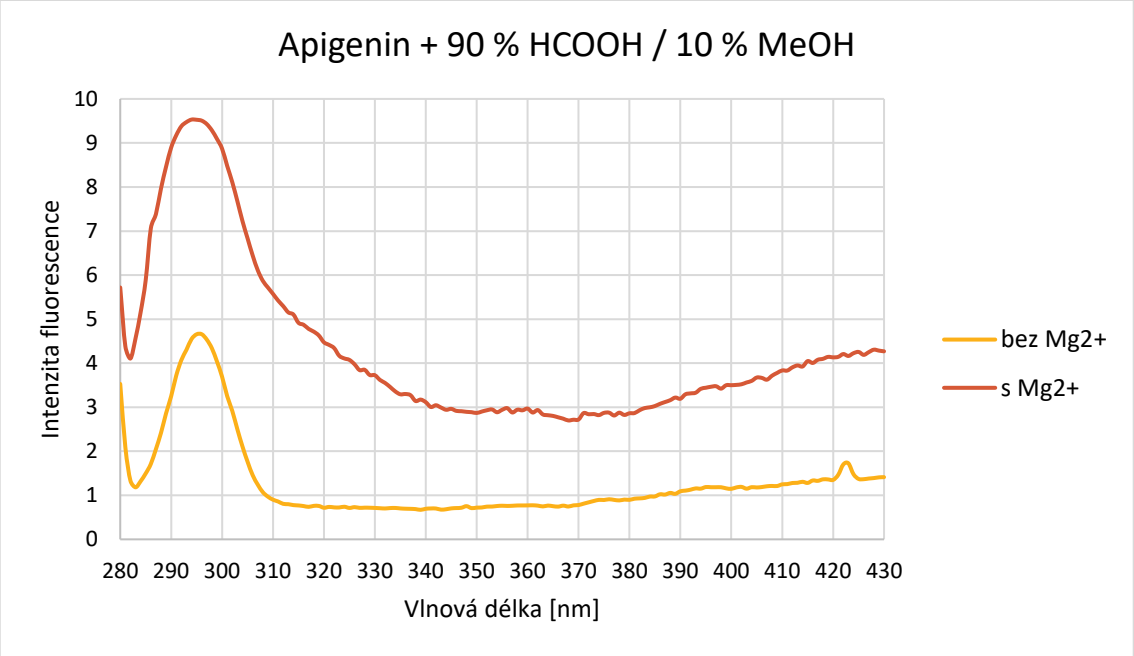
4.2.1 Apigenin ve směsích HCOOH a MeOH

FS apigeninu ve směsích HCOOH/MeOH *(tabulka č. 1)* byla měřena při excitačních vlnových délkách 267 nm a 339 nm. Výsledky měření při excitační vlnové délce λ_{exc}= 267 nm jsou zaznamenány v *tabulce č. 4* . Pro excitační vlnovou délku λ_{exc}= 339 nm zobrazuje výsledky měření *tabulka č. 5*. Vliv časového intervalu od přidání Mg^{2+} kationtů na tvorbu komplexů, a tím na případné zvýšení intenzity fluorescence, je zaznamenán v *tabulce č. 6* (λ_{exc}= 267 nm) a v *tabulce č. 7* (λ_{exc}= 339 nm).

Apigenin + HCOOH/MeOH, excitační vlnová délka λ_{exc} = 267 nm, emisní vlnová délka λ_{emit} = 296 nm		
Číslo směsi HCOOH/MeOH	Maximální intenzita bez Mg^{2+}	Maximální intenzita s Mg^{2+}
1	7,76	9,98
2	5,29	9,88
3	7,56	9,32
4	7,78	9,72
5	6,47	9,62
6	6,52	8,25
7	5,74	9,33
8	5,38	8,86
9	4,66	9,51

Tabulka 4: Maximální intenzity fluorescence apigeninu ve směsích č. 1–9, λ_{exc}= 267 nm

Zvýšení intenzity fluorescence apigeninu ve směsích č. 1–9 při excitační vlnové délce λ_{exc} = 267 nm zaznamenává *tabulka č. 4*. U všech devíti vzorků bylo pozorováno zvýšení intenzity fluorescence. Nejvyšší, přibližně dvojnásobný, nárůst intenzity fluorescence apigeninu nastal ve směsi č. 9, u které byl poměr HCOOH a MeOH 9 : 1. Spektra pro tento vzorek bez Mg^{2+} kationtů a s nimi je znázorněn pomocí *grafu č. 1*.

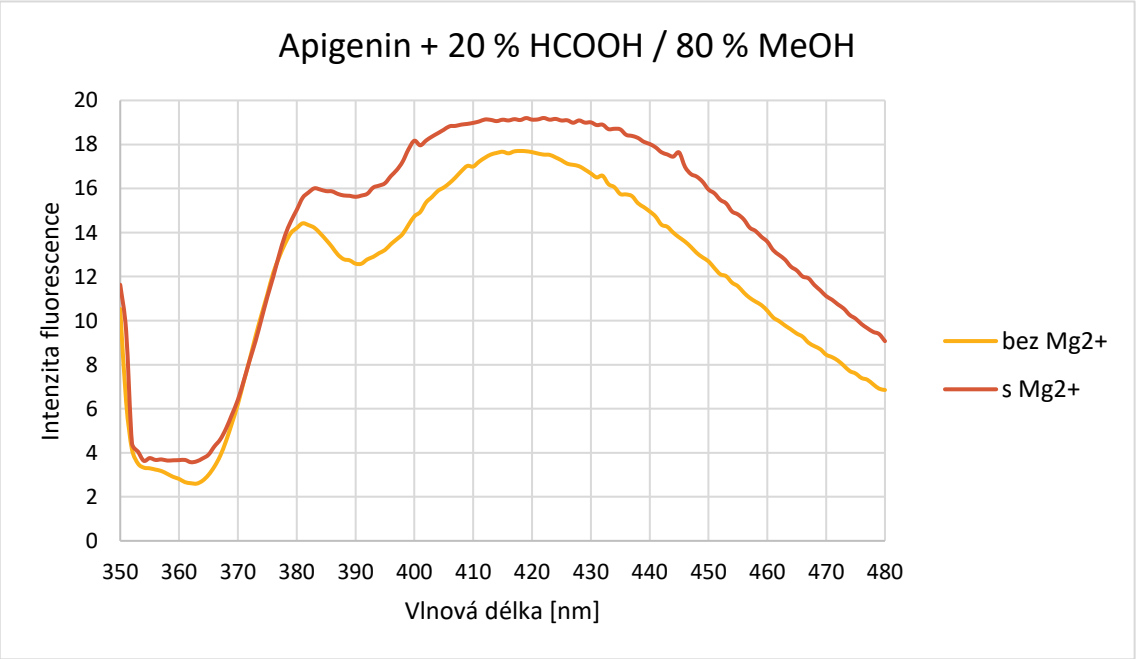


Graf 1: FS apigeninu bez Mg^{2+} kationtů a s nimi, směs číslo 9, λ_{exc} = 267 nm

Apigenin + HCOOH/MeOH, excitační vlnová délka λ_{exc} = 339 nm, emisní vlnová délka λ_{emit} = 422 nm		
Číslo směsi HCOOH/MeOH	Maximální intenzita bez Mg^{2+}	Maximální intenzita s Mg^{2+}
1	17,70	18,73
2	17,59	19,20
3	17,67	17,39
4	16,41	14,55
5	16,76	16,78
6	15,85	14,04
7	15,27	13,93
8	13,37	12,07
9	10,27	10,81

Tabulka 5: Maximální intenzity fluorescence apigeninu ve směsích č. 1–9, λ_{exc} = 339 nm

Tabulka č. 5 zaznamenává výsledky měření intenzity fluorescence apigeninu ve směsích číslo 1–9 při excitační vlnové délce λ_{exc} = 339 nm. U vzorků ve směsích číslo 1 a 2 došlo k nárůstu intenzity fluorescence. Naopak zhášení se projevilo u vzorků číslo 4, 6, 7 a 8. Velmi malé změny v intenzitě fluorescence byly změřeny u apigeninu ve směsích číslo 3, 5 a 9. Nejvyšší nárůst intenzity fluorescence nastal u apigeninu ve směsi č. 2 tvořené HCOOH a MeOH v poměru 2 : 8. FS tohoto vzorku zobrazuje následující *graf č. 2.*



Graf 2: FS apigeninu bez Mg^{2+} kationtů a s nimi, směs číslo 2, λ_{exc} = 339 nm

Následující *tabulka č. 6* pro měření při excitační vlnové délce λ_{exc} = 267 nm a *tabulka č. 7* pro měření při excitační vlnové délce λ_{exc} = 339 nm zobrazují výsledky měření. Žádné z těchto měření neprokázalo vliv času na vznik komplexů mezi fluoroforem a kationty a na další nárůst intenzity fluorescence.

Apigenin + 90 % HCOOH / 10 % MeOH, excitační vlnová délka λ_{exc} = 267 nm, emisní vlnová délka λ_{emit} = 296 nm	
	Maximální intenzita fluorescence
Bez Mg^{2+} kationtů	4,60
Ihned po přidání Mg^{2+} kationtů	9,45
5 minut po přidání Mg^{2+} kationtů	9,62
10 minut po přidání Mg^{2+} kationtů	9,55
15 minut po přidání Mg^{2+} kationtů	9,51

Tabulka 6: Vliv časového intervalu od přidání Mg^{2+} na intenzitu fluorescence apigeninu ve směsi č. 9

Apigenin + 20 % HCOOH / 80 % MeOH, excitační vlnová délka λ_{exc} = 339 nm, emisní vlnová délka λ_{emit} = 422 nm	
	Maximální intenzita fluorescence
Bez Mg^{2+} kationtů	17,60
Ihned po přidání Mg^{2+} kationtů	19,21
5 minut po přidání Mg^{2+} kationtů	19,31
10 minut po přidání Mg^{2+} kationtů	19,23
15 minut po přidání Mg^{2+} kationtů	19,31

Tabulka 7: Vliv časového intervalu od přidání Mg^{2+} na intenzitu fluorescence apigeninu ve směsi č. 2

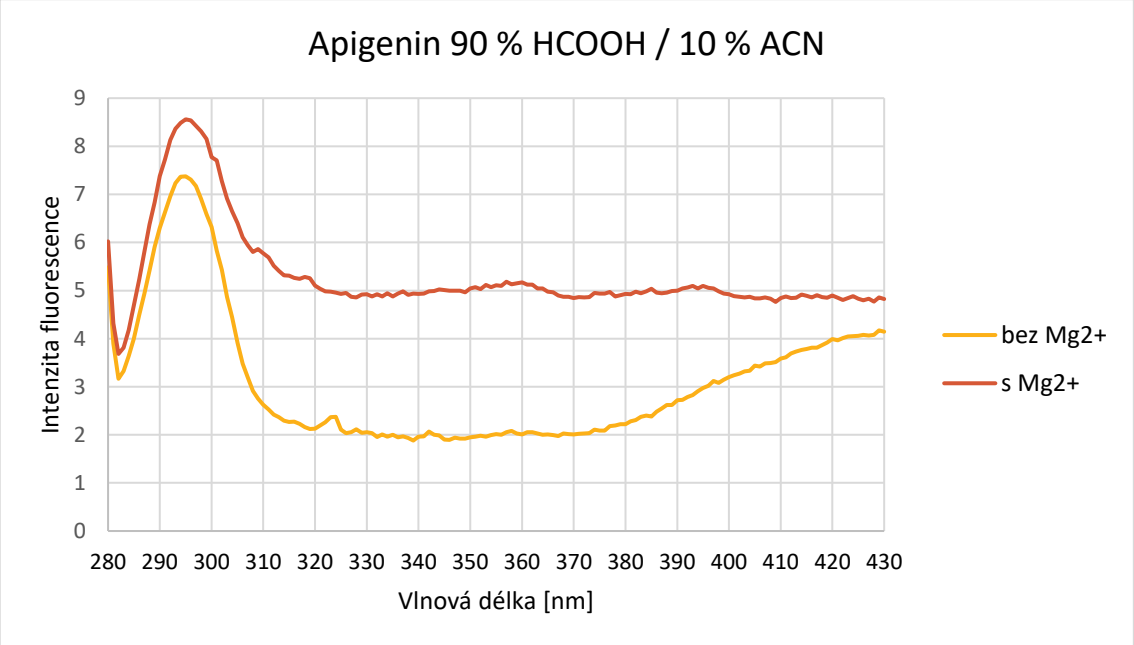
4.2.2 Apigenin ve směsích HCOOH a ACN

Při měření FS apigeninu ve směsích HCOOH/ACN č. 10–18 *(tabulka č. 1)* byly využity excitační vlnové délky 267 nm a 335 nm. *Tabulka č. 8* obsahuje výsledky měření při excitační vlnové délce λ_{exc} = 267 nm a *tabulka č. 9* při excitační vlnové délce λ_{exc} = 335 nm. *Tabulka č. 10* a *tabulka č. 11* zobrazují výsledky měření ověřující vliv časového intervalu od přidání Mg^{2+} kationtů pro obě excitační vlnové délky.

Apigenin + HCOOH/ACN, excitační vlnová délka λ_{exc} = 267 nm, emisní vlnová délka λ_{emit} = 296 nm		
Číslo směsi HCOOH/ACN	Maximální intenzita bez Mg^{2+}	Maximální intenzita s Mg^{2+}
10	8,90	7,63
11	8,04	7,36
12	7,97	7,52
13	8,51	7,67
14	8,78	7,76
15	7,78	7,38
16	8,18	7,17
17	7,55	7,25
18	7,36	8,56

Tabulka 8: Maximální intenzity fluorescence apigeninu ve směsích č. 10–18, λ_{exc} = 267 nm

Maximální naměřené intenzity fluorescence apigeninu ve směsích HCOOH/ACN číslo 10–18 při excitační vlnové délce λ_{exc} = 267 nm zobrazuje *tabulka č. 8*. U většiny vzorků došlo po přidání Mg^{2+} kationtů k poklesu intenzity fluorescence. Pouze u vzorku apigeninu ve směsi č. 18 tvořené HCOOH a ACN v poměru 9 : 1 došlo k mírnému, přibližně šestinovému, zvýšení intenzity fluorescence vůči původnímu vzorku. FS apigeninu, která dokumentují nárůst intenzity fluorescence po přidání Mg^{2+} kationtů ve směsi č. 18, zobrazuje *graf č. 3*.

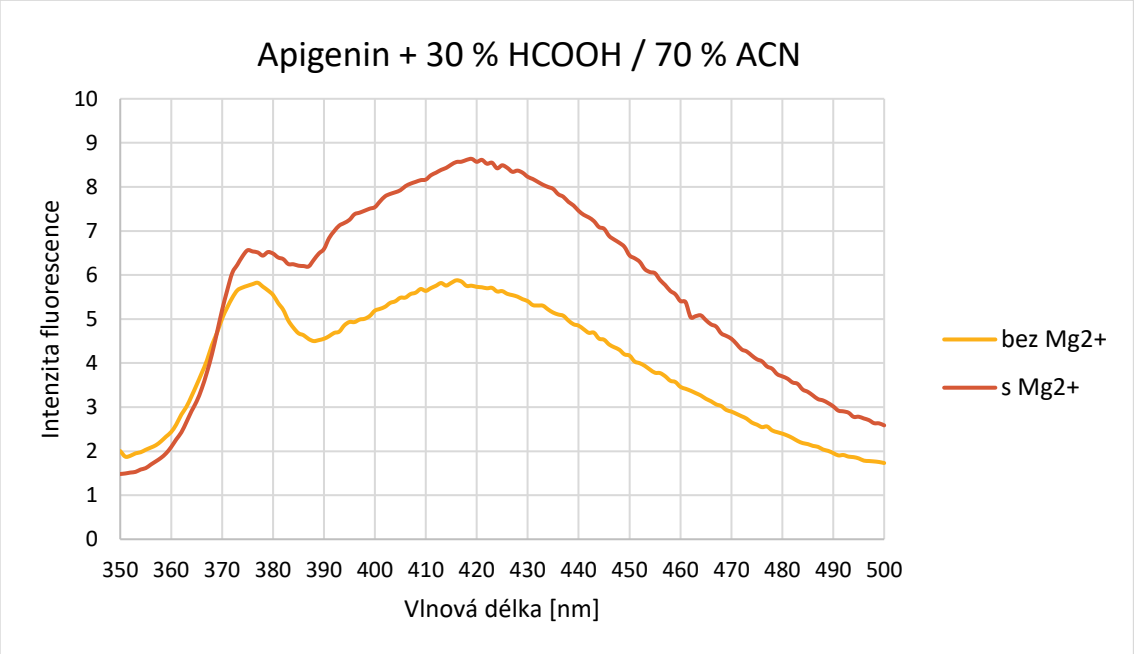


***Graf 3**:* FS apigeninu bez Mg^{2+} kationtů a s nimi, směs číslo 18, λ_{exc} = 267 nm

Apigenin + HCOOH/ACN, excitační vlnová délka λ_{exc} = 335 nm, emisní vlnová délka λ_{emit} = 419 nm		
Číslo směsi HCOOH/ACN	Maximální intenzita bez Mg^{2+}	Maximální intenzita s Mg^{2+}
10	4,29	4,29
11	4,93	6,83
12	5,76	8,63
13	6,98	9,41
14	7,74	9,12
15	8,60	9,05
16	8,19	9,20
17	8,12	8,36
18	7,82	7,61

Tabulka 9: Maximální intenzity fluorescence apigeninu ve směsích č. 10–18, λ_{exc} = 335 nm

Výsledky měření FS apigeninu ve směsích č. 10–18 *(tabulka č. 1)* při excitační vlnové délce λ_{exc} = 335 nm zaznamenává *tabulka č. 9*. Minimální změna intenzity fluorescence nastala u apigeninu ve směsích č. 10, 17 a 18. V ostatních vzorcích apigeninu ve směsích HCOOH a ACN byl zaznamenán nárůst intenzity fluorescence. Nejvýrazněji se zvýšení projevilo u apigeninu ve směsi č. 12, která byla tvořena HCOOH a ACN v poměru 3 : 7. *Graf č. 4* zobrazuje FS tohoto vzorku.



Graf 4: FS apigeninu bez Mg^{2+} kationtů a s nimi, směs číslo 12, λ_{exc} = 335 nm

Tabulka č. 10 a *tabulka č. 11* obsahují výsledky měření, které ověřovalo vliv časového intervalu od přidání Mg^{2+} kationtů ke vzorku apigeninu na růst maximální intenzity fluorescence. Měření bylo prováděno u vzorků apigeninu ve směsích č. 18 *(tabulka č. 10)* a č. 12 *(tabulka č. 11),* u kterých nastal při předchozích měření největší nárůst intenzity. U apigeninu ve směsích tvořených HCOOH a ACN se časová závislost intenzity fluorescence také neprojevila.

Apigenin + 90 % HCOOH / 10 % ACN,
excitační vlnová délka λ_{exc} = 267 nm, emisní vlnová délka λ_{emit} = 296 nm

	Maximální intenzita fluorescence
Bez Mg^{2+} kationtů	7,43
Ihned po přidání Mg^{2+} kationtů	8,48
5 minut po přidání Mg^{2+} kationtů	8,53
10 minut po přidání Mg^{2+} kationtů	8,66
15 minut po přidání Mg^{2+} kationtů	8,54

Tabulka 10: Vliv časového intervalu od přidání Mg^{2+} na intenzitu fluorescence apigeninu ve směsi č. 18

Apigenin + 30 % HCOOH / 70 % ACN,
excitační vlnová délka λ_{exc} = 335 nm, emisní vlnová délka λ_{emit} = 419 nm

	Maximální intenzita fluorescence
Bez Mg^{2+} kationtů	5,88
Ihned po přidání Mg^{2+} kationtů	8,73
5 minut po přidání Mg^{2+} kationtů	8,62
10 minut po přidání Mg^{2+} kationtů	8,65
15 minut po přidání Mg^{2+} kationtů	8,74

Tabulka 11: Vliv časového intervalu od přidání Mg^{2+} na intenzitu fluorescence apigeninu ve směsi č. 12

4.3 Výsledky měření fluorescenčních spekter luteolinu

4.3.1 Luteolin ve směsích HCOOH a MeOH

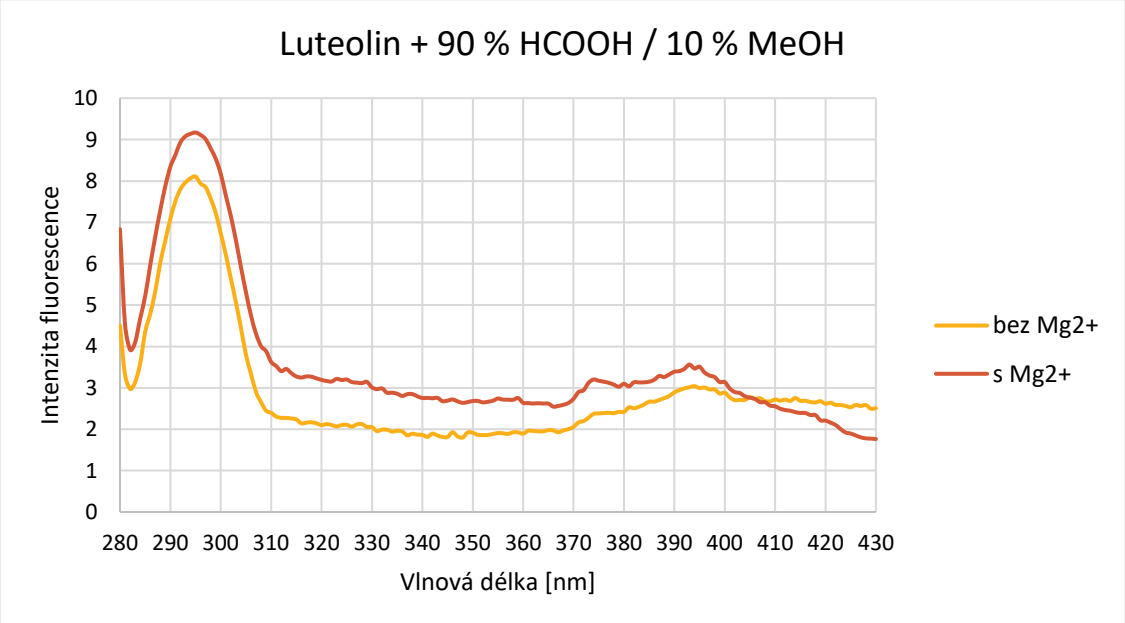
FS luteolinu byla měřena při excitačních vlnových délkách 266 nm a 350 nm ve směsích HCOOH/MeOH *(tabulka č. 1)*. Výsledky měření při excitační vlnové délce λ_{exc}= 266 nm jsou zaznamenány v *tabulce č. 12* . Pro excitační vlnovou délku λ_{exc}= 350 nm zahrnuje výsledky měření *tabulka č. 13.* Výsledky měření, které ověřovalo vliv časového intervalu od přidání Mg^{2+} kationtů na tvorbu komplexů mezi kationty a

luteolinem, a tím na případné další zvýšení intenzity fluorescence, je zaznamenán v *tabulce č. 14* (λ_{exc}= 266 nm) a v t*abulce č. 15* (λ_{exc}= 350 nm).

Luteolin + HCOOH/MeOH, excitační vlnová délka λ_{exc} = 266 nm, emisní vlnová délka λ_{emit} = 295 nm		
Číslo směsi HCOOH/MeOH	Maximální intenzita bez Mg^{2+}	Maximální intenzita s Mg^{2+}
1	9,95	9,99
2	9,89	9,91
3	9,86	9,85
4	9,20	9,64
5	9,75	9,68
6	9,33	9,92
7	9,41	9,80
8	8,75	9,14
9	8,11	9,17

Tabulka 12: Maximální intenzity fluorescence luteolinu ve směsích č. 1–9, λ_{exc} = 266 nm

Měření vzorků luteolinu ve směsích tvořených HCOOH a MeOH ukázalo, že se u většiny vzorků neprojevil vliv přidaných Mg^{2+} kationtů na maximální intenzitu fluorescence (vzorek luteolinu ve směsích č. 1, 2, 3 a 5) nebo byl vzrůst intenzity velmi malý (vzorek luteolinu ve směsích č. 4, 6, 7 a 8). Pouze u vzorku luteolinu ve směsi č. 9, která byla tvořena HCOOH a MeOH v poměru 9 : 1 nastal výraznější nárůst intenzity fluorescence v emisním maximu. Naměřená FS tohoto vzorku zobrazuje *graf č. 5*.

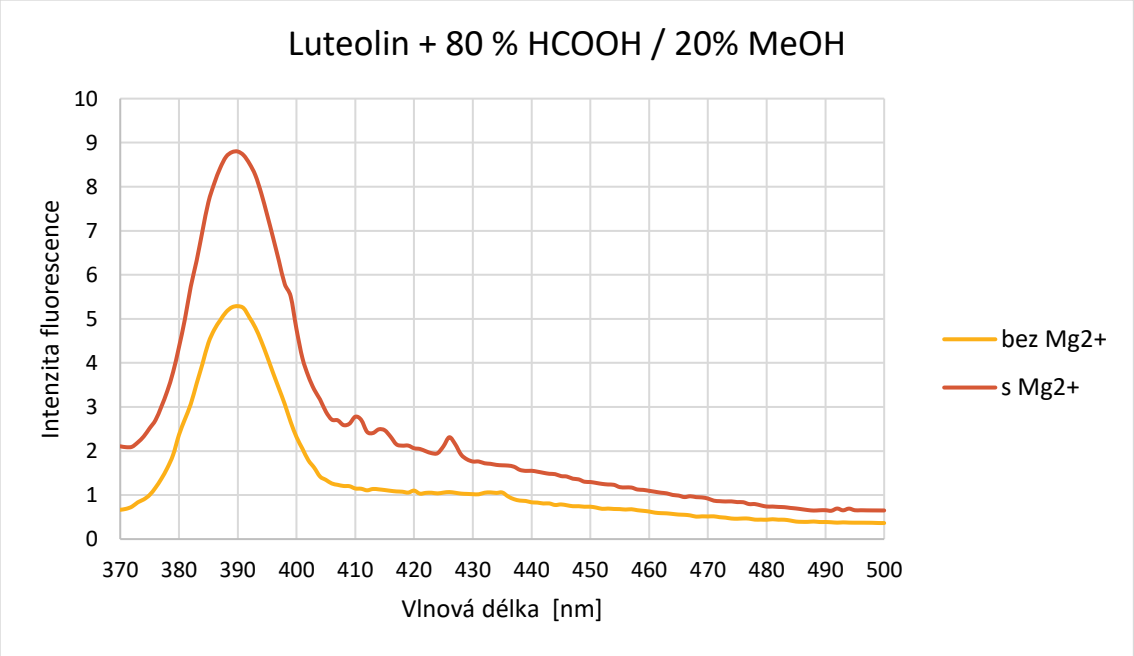


Graf 5: FS luteolinu bez Mg^{2+} kationtů a s nimi, směs číslo 9, λ_{exc} = 266 nm

Luteolin + HCOOH/MeOH, excitační vlnová délka λ_{exc} = 350 nm, emisní vlnová délka λ_{emit} = 390 nm		
Číslo směsi HCOOH/MeOH	Maximální intenzita bez Mg^{2+}	Maximální intenzita s Mg^{2+}
1	7,15	8,60
2	5,62	8,58
3	5,24	7,40
4	5,28	6,87
5	4,96	6,62
6	5,76	7,47
7	5,46	8,07
8	5,29	8,80
9	5,11	8,32

Tabulka 13: Maximální intenzity fluorescence luteolinu ve směsích č. 1–9, λ_{exc} = 350 nm

Na rozdíl od vzorků luteolinu měřených při excitační vlnové délce λ_{exc} = 266 nm (tabulka č. 12) došlo u všech vzorků měřených při excitační vlnové délce λ_{exc} = 350 nm k výraznému zvýšení intenzity fluorescence v emisním maximu. *Graf č. 6* zobrazuje FS luteolinu ve směsi č. 8, u kterého došlo k nejvyššímu nárůstu intenzity fluorescence.



Graf 6: FS luteolinu bez Mg^{2+} kationtů a s nimi, směs číslo 8, λ_{exc} = 350 nm

Pomocí následujících dvou měření zaznamenaných v *tabulce č. 14* a *tabulce č. 15* byl hodnocen vliv časového intervalu od přidání Mg^{2+} kationtů na zvýšení intenzity fluorescence. Ve směsích č. 9 a č. 8, u kterých se projevil největší nárůst intenzity fluorescence po přidání Mg^{2+} kationtů, neprokázalo vliv času na rostoucí intenzitu.

Luteolin + 90 % HCOOH / 10 % MeOH,
excitační vlnová délka λ_{exc} = 266 nm, emisní vlnová délka λ_{emit} = 295 nm

	Maximální intenzita fluorescence
Bez Mg^{2+} kationtů	8,16
Ihned po přidání Mg^{2+} kationtů	9,14
5 minut po přidání Mg^{2+} kationtů	9,14
10 minut po přidání Mg^{2+} kationtů	9,14
15 minut po přidání Mg^{2+} kationtů	9,15

Tabulka 14: Vliv časového intervalu od přidání Mg^{2+} na intenzitu fluorescence luteolinu ve směsi č. 9

Luteolin+ 80 % HCOOH / 20 % MeOH,
excitační vlnová délka λ_{exc} = 350 nm, emisní vlnová délka λ_{emit} = 390 nm

	Maximální intenzita fluorescence
Bez Mg^{2+} kationtů	5,30
Ihned po přidání Mg^{2+} kationtů	8,81
5 minut po přidání Mg^{2+} kationtů	8,80
10 minut po přidání Mg^{2+} kationtů	8,78
15 minut po přidání Mg^{2+} kationtů	8,79

Tabulka 15: Vliv časového intervalu od přidání Mg^{2+} na intenzitu fluorescence luteolinu ve směsi č. 8

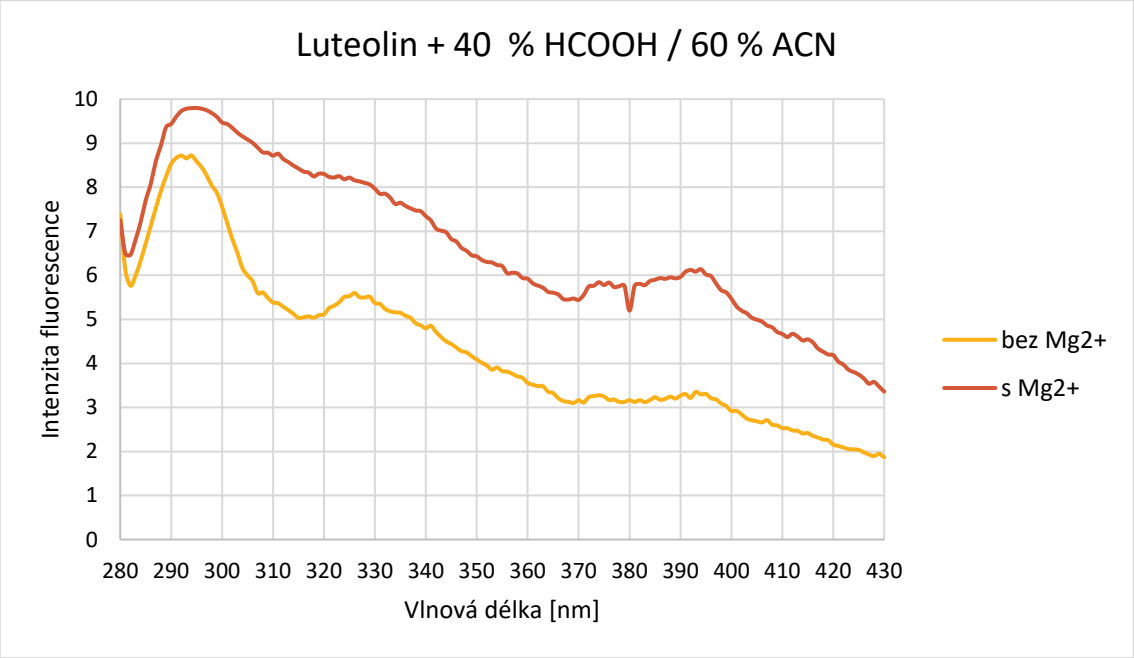
4.3.2 Luteolin ve směsích HCOOH a ACN

Excitační vlnové délky, které byly využity při měření FS luteolinu ve směsích HCOOH a ACN byly λ_{exc} = 267 nm a λ_{exc} = 348 nm. *Tabulka č. 16* znázorňuje výsledky měření při excitační vlnové délce λ_{exc} = 267 nm a *tabulka č. 17* při excitační vlnové délce λ_{exc} = 348 nm. Opět byl ověřen vliv časového intervalu od přidání Mg^{2+} kationtů na růst intenzity fluorescence, výsledky těchto měření obsahují *tabulka č. 18* (λ_{exc} = 267 nm) a *tabulka č. 19* (λ_{exc} = 348 nm).

Luteolin + HCOOH/ACN, excitační vlnová délka λ_{exc} = 267 nm, emisní vlnová délka λ_{emit} = 295 nm		
Číslo směsi HCOOH/ACN	Maximální intenzita bez Mg^{2+}	Maximální intenzita s Mg^{2+}
10	9,23	9,31
11	7,87	8,45
12	8,04	8,99
13	8,58	9,80
14	7,91	8,91
15	8,22	8,45
16	8,90	9,11
17	7,82	8,23
18	8,41	8,80

Tabulka 16: Maximální intenzity fluorescence luteolinu ve směsích č. 10-18, λ_{exc} = 267 nm

U všech vzorků luteolinu ve směsích č. 10–18 nastalo zvýšení intenzity fluorescence. U vzorků luteolinu ve směsích č. 10, 15 a 11 byl nárůst velmi malý. Nejvyšší nárůst intenzity fluorescence byl změřen u vzorku luteolinu ve směsi č. 13 tvořené HCOOH a ACN v poměru 4 : 6. *Graf č. 7* zobrazuje FS tohoto vzorku bez Mg^{2+} kationtů a s nimi.

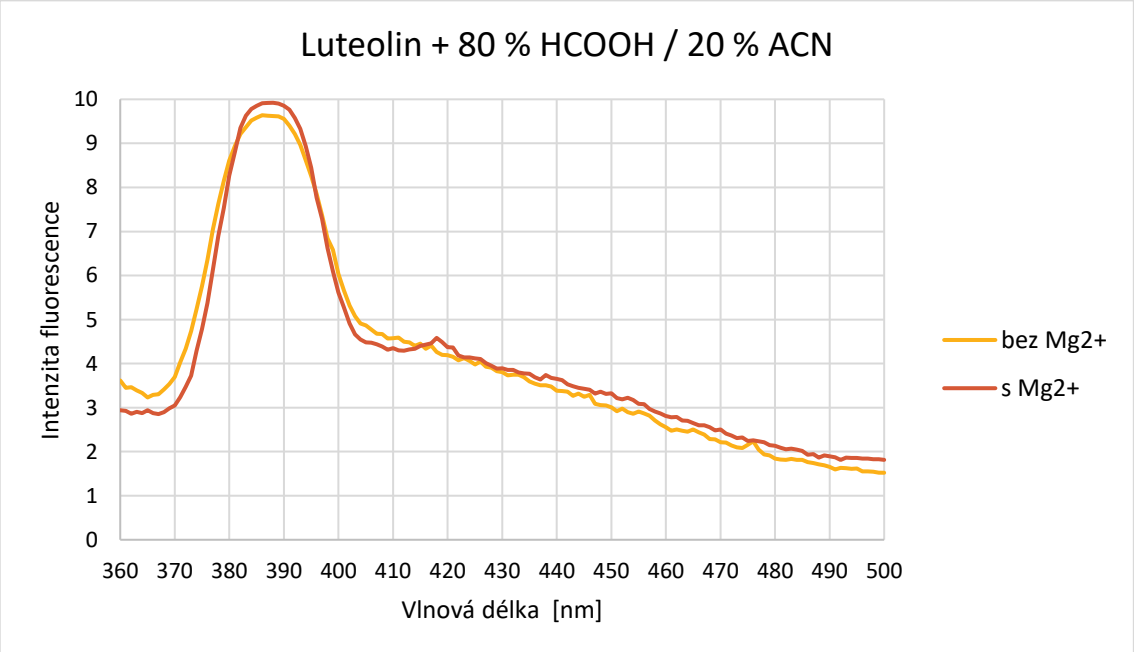


Graf 7: FS luteolinu bez Mg^{2+} kationtů a s nimi, směs číslo 13, λ_{exc} = 267 nm

Luteolin + HCOOH/ACN, excitační vlnová délka λ_{exc} = 348 nm, emisní vlnová délka λ_{emit} = 388 nm		
Číslo směsi HCOOH/ACN	Maximální intenzita bez Mg^{2+}	Maximální intenzita s Mg^{2+}
10	9,58	9,35
11	9,40	9,35
12	9,47	9,58
13	9,73	9,25
14	9,48	9,64
15	9,62	9,93
16	9,81	9,94
17	9,62	9,92
18	9,82	9,92

Tabulka 17: Maximální intenzity fluorescence luteolinu ve směsích č. 10-18, λ_{exc} = 348 nm

U žádného ze vzorků luteolinu ve směsích HCOOH a ACN při excitační vlnové délce λ_{exc} = 348 nm nenastala výrazná změna v intenzitě fluorescence po přidání Mg^{2+} kationtů. Ve směsích č. 10, 11 a 13 došlo k mírnému snížení, u ostatních vzorků k velmi malému zvýšení intenzity. *Graf č. 8* zobrazuje FS luteolinu ve směsi č. 17. *Graf č. 8* byl vybrán jako ukázka z tohoto měření, přestože u vzorku také nebyl pozorován výrazný vliv Mg^{2+} kationtů na zvýšení intenzity fluorescence.



Graf 8: FS luteolinu bez Mg^{2+} kationtů a s nimi, směs číslo 17, λ_{exc} = 348 nm

U žádného vzorku luteolinu ve směsích HCOOH a ACN nebyl prokázán vliv časového intervalu od přidání Mg^{2+} kationtů na tvorbu komplexů mezi luteolinem a kationty, u kterého byl předpoklad zvýšení intenzity fluorescence. Výsledky měření luteolinu ve směsi č. 13 při excitační vlnové délce λ_{exc} = 267 nm zahrnuje *tabulka č. 18*. Výsledky měření spekter luteolinu ve směsi č. 17 při excitační vlnové délce λ_{exc} = 348 nm obsahuje *tabulka č. 19*.

Luteolin + 40 % HCOOH / 60 % ACN,
excitační vlnová délka λ_{exc} = 267 nm, emisní vlnová délka λ_{emit} = 295 nm

	Maximální intenzita fluorescence
Bez Mg^{2+} kationtů	8,62
Ihned po přidání Mg^{2+} kationtů	9,80
5 minut po přidání Mg^{2+} kationtů	9,79
10 minut po přidání Mg^{2+} kationtů	9,88
15 minut po přidání Mg^{2+} kationtů	9,90

Tabulka 18: Vliv časového intervalu od přidání Mg^{2+} na intenzitu fluorescence luteolinu ve směsi č. 13

Luteolin+ 80 % HCOOH / 20 % ACN,
excitační vlnová délka λ_{exc} = 348 nm, emisní vlnová délka λ_{emit} = 388 nm

	Maximální intenzita fluorescence
Bez Mg^{2+} kationtů	9,61
Ihned po přidání Mg^{2+} kationtů	9,91
5 minut po přidání Mg^{2+} kationtů	9,93
10 minut po přidání Mg^{2+} kationtů	9,91
15 minut po přidání Mg^{2+} kationtů	9,92

Tabulka 19: Vliv časového intervalu od přidání Mg^{2+} na intenzitu fluorescence luteolinu ve směsi č. 17

4.4 Porovnání vlivu hořečnatých a hlinitých kationtů na fluorescenci

Hlavním cílem této práce bylo otestovat případné zvýšení intenzity fluorescence apigeninu a luteolinu pomocí přidaných Mg^{2+} kationtů k jejich základním roztokům. Snahou o zvýšení intenzity fluorescence pomocí fluoreskujících komplexů mezi kationty kovu a těmito dvěma fluorofory se zabývala také práce Fluorescenční spektra léčiv II [16]. Konkrétně se jednalo o snahu zvýšit intenzitu fluorescence apigeninu a luteolinu pomocí Al^{3+} kationtů.

Základní roztoky apigeninu a luteolinu, přidávané roztoky kationtů i směsi se v obou pracích shodovaly ve své molární koncentraci, a proto může být posouzen vliv přidaných kationtů na růst intenzity fluorescence apigeninu a luteolinu. Byl porovnáván procentuální nárůst intenzity fluorescence roztoků po přidání kationtů (Mg^{2+}/Al^{3+}) vůči intenzitě původních roztoků bez kationtů. K porovnání byly použity intenzity fluorescence v emisním maximu FS. Na rozdíl od roztoků obsahujících Mg^{2+} kationty byl v roztocích s Al^{3+} kationty pozorován značný vliv času od přidání kationtů ke vzorku na intenzitu fluorescence, proto byly v případě roztoků s Al^{3+} kationty k porovnání využity hodnoty intenzity fluorescence naměřené po 15 minutách.

4.4.1 Vliv kationtů na intenzitu fluorescence luteolinu

K významnému nárůstu intenzity fluorescence luteolinu ve směsích tvořených HCOOH a MeOH došlo u obou experimentálních prací při měření FS luteolinu při excitační vlnové délce λ_{exc} = 350 nm. Po přidání **Mg^{2+} kationtů** došlo ve směsi tvořené HCOOH a MeOH v poměru 8 : 2 k **66%** nárůstu intenzity fluorescence v emisním maximu vůči vzorku původnímu. K nejvyššímu nárůstu intenzity fluorescence luteolinu po přidání **Al^{3+} kationtů** ke vzorku došlo ve směsi tvořené HCOOH a MeOH v poměru 3 : 7. V této směsi byl nárůst intenzity fluorescence **84%** vůči vzorku původnímu.

Vliv kationtů na intenzitu fluorescence luteolinu byl porovnán i ve směsích HCOOH a ACN. Po přidání **Mg^{2+} kationtů** došlo k nejvyššímu nárůstu intenzity fluorescence v emisním maximu luteolinu ve směsi tvořené HCOOH a ACN v poměru 4 : 6. V této směsi byl nárůst intenzity **14%** vůči vzorku bez kationtů, spektra byla měřena při excitační vlnové délce λ_{exc} = 267 nm. Nejvyšší nárůst intenzity fluorescence po přidání **Al^{3+} kationtů** byl změřen při excitační vlnové délce λ_{exc} = 350 nm ve směsi tvořené

HCOOH a ACN v poměru 1 : 9. V tomto vzorku byl nárůst **166%** vůči původnímu vzorku bez Al^{3+} kationtů.

Na procentuální nárůst intenzity fluorescence luteolinu po přidání kationtů měly **výraznější vliv Al^{3+} kationty** v obou směsích(HCOOH a MeOH/ACN).

4.4.2 Vliv kationtů na intenzitu fluorescence apigeninu

FS apigeninu byla opět u obou prací měřena ve směsích HCOOH a MeOH/ACN. Procentuálně nejvyšší nárůst intenzity fluorescence apigeninu ve směsi HCOOH a MeOH po přidání **Mg^{2+} kationtů** byl **104%** vůči vzorku bez kationtů. K tomuto nárůstu došlo při měření FS při excitační vlnové délce λ_{exc} = 267 nm ve směsi HCOOH a MeOH v poměru 9 : 1 . Při téměř stejné excitační vlnové délce (λ_{exc} = 268 nm) byla měřena spektra apigeninu, ke kterému byly přidány Al^{3+} kationty. Po přidání **Al^{3+} kationtů** se projevil **303%** nárůst intenzity vůči původním u vzorku bez kationtů ve směsi tvořené HCOOH a MeOH v poměru 4 : 6.

FS apigeninu ve směsích HCOOH a ACN byla měřena u obou prací opět při velmi podobných excitačních vlnových délkách (A. Ocelková: λ_{exc} = 268 nm a λ_{exc} = 337 nm, N. Přívratská: λ_{exc} = 267 nm a λ_{exc} = 335 nm). K nejvyššímu nárůstu intenzity fluorescence po přidání **Mg^{2+} kationtů** došlo ve směsi tvořené HCOOH a ACN v poměru 3 : 7. FS apigeninu v této směsi byla měřena při excitační vlnové délce λ_{exc} = 335 nm a v emisním maximu došlo k **50%** nárůstu intenzity vůči původnímu vzorku. U FS vzorků apigeninu ve směsích HCOOH a ACN, ke kterým byly přidány **Al^{3+} kationty**, byl pozorován až **265%** nárůst intenzity fluorescence v emisním maximu vůči původnímu vzorku bez kationtů. Tento nárůst byl zaznamenám u FS apigeninu ve směsi HCOOH a ACN v poměru 5 : 5 při excitační vlnové délce λ_{exc} = 268 nm.

Přestože se vliv Mg^{2+} kationtů na růst intenzity fluorescence apigeninu také projevil, opět měly **výraznější vliv Al^{3+} kationty**.

5 Závěr

V této práci byl testován vliv přídavku Mg^{2+} kationtů na intenzitu fluorescence vybraných roztoků apigeninu a luteolinu. Obecně lze na základě výsledků v práci dosažených konstatovat, že přídavek Mg^{2+} kationtů zvyšuje u roztoků apigeninu a luteolinu intenzitu fluorescence.

V případě **apigeninu** bylo dosaženo nejvyšší intenzity fluorescence v roztoku složeném z **HCOOH a MeOH v poměru 2 : 8** při excitační vlnové délce λ_{exc} = 339 nm. Po přidání Mg^{2+} kationtů došlo k největšímu nárůstu intenzity fluorescence v roztoku **HCOOH a MeOH** v poměru **9 : 1** při excitační vlnové délce λ_{exc} = 267 nm.

Pro detekci **luteolinu** tvoří optimální prostředí z hlediska fluorescenční intenzity směs **HCOOH a MeOH** v poměru **2 : 8** při excitační vlnové délce λ_{exc} = 266 nm. U tohoto vzorku nastal ale jen minimální nárůst intenzity po přidání Mg^{2+} kationtů. Nejvyšší nárůst intenzity fluorescence luteolinu nastal ve směsi **HCOOH a MeOH** v poměru **8 : 2** při excitační vlnové délce λ_{exc} = 350 nm.

Na základě dosažených výsledků nelze obecně říci, zda jsou pro detekci obou flavonoidů z pohledu intenzity fluorescence výhodnější roztoky obsahující MeOH nebo ACN.

Z porovnání vlivu Mg^{2+} a Al^{3+} kationtů je patrné, že **výraznější vliv na zvýšení intenzity fluorescence měly ve všech případech Al^{3+} kationty**. Navíc byla zjištěna emisní maxima u těch roztoků s Al^{3+} kationty, které obsahovaly vyšší podíly organického rozpouštědla (MeOH/ACN), což je pro případnou gradientovou eluci v systému HPLC výhodnější.

6 Seznam použité literatury

[1] VALEUR, Bernard. *Molecular Fluorescence: Principles and Applications*. Weinheim: Wiley-VCH, 2002. ISBN 3-527-29919-X.

[2] PELANT, Ivan a Jan VALENTA. *Luminiscenční spektroskopie: I. Objemové krystalické polovodiče*. 1. Praha: Academia, 2006. ISBN 80-200-1447-0.

[3] ČERMÁKOVÁ, Ludmila a Irena NĚMCOVÁ. *Spektrometrické metody v analytické chemii*. Praha: Státní pedagogické nakladatelství, 1987. ISBN 80-7184-365-2.

[4] SOMMER, Lumír. *Analytická spektrometrie I*. Praha: Státní pedagogické nakladatelství, 1986.

[5] HARVEY, David. *Modern Analytical Chemistry*. The United States of America: McGraw-Hill Higher Education, 2000. ISBN 0-07-237547-7.

[6] KLOUDA, Pavel. *Moderní analytické metody*. Třetí, upravené vydání. Ostrava: nakladatelství Pavko, 2016. ISBN 978-80-86369-22-8.

[7] GAFT, Michael, Renata REISFELD a Gerard PANCZER. *Modern Luminescence Spectroscopy of Minerals and Materials*. 2nd edition. Switzerland: Springer International Publishing, 2015. ISBN 978-3-319-24765-6.

[8] LAKOWICZ, Joseph R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. Third Edition. Baltimore, Maryland, USA: Springer, 2016. ISBN 978-0-387-31278-1.

[9] JAMESON, David. *Introduction to fluorescence*. Boca Raton: Taylor and Francis Group, 2014. ISBN 978-1-4398-0604-3.

[10] ALBANI, Jihad Rene. *Structure and Dynamics of Macromolecules: Absorption and Fluorescence Studies*. Elsevier Science, 2004. ISBN 978-0-444-51449-3.

[11] KIMÁKOVÁ, Tatiana a Ivana BARANOVIČOVÁ. *Léčivá síla antioxidantů.* Bratislava: Príroda, 2015. ISBN 978-80-07-02455-7.

[12] KLOUDA, Pavel. *Biochemie zblízka.* Druhé vydání. Ostrava: Pavko, 2016. ISBN 978-80-86369-20-4.

[13] SPILKOVÁ, Jiřina. *Farmakognozie*. Praha: Karolinum, 2016. ISBN 978-80-246-3264-3.

[14] PubChem [internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information; 2004-. PubChem Compound Summary for CID

5280443, Apigenin; [cit. 8. 5. 2021]. Dostupné z: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Apigenin

[15] PubChem [internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information; 2004-. PubChem Compound Summary for CID 5280445, Luteolin; [cit. 8. 5. 2021]. Dostupné z: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Luteolin

[16] OCELKOVÁ, Anna: *Bakalářská práce*, Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta, Katedra biofyziky a fyzikální chemie, 2020.