



**MATEMATICKO-FYZIKÁLNÍ  
FAKULTA**  
Univerzita Karlova

## **DIPLOMOVÁ PRÁCE**

Bc. Jan Moučka

# **Fotofyzikální vlastnosti riboflavinu**

Katedra chemické fyziky a optiky

Vedoucí diplomové práce: doc. RNDr. Roman Dědic, Ph.D.

Studijní program: Biofyzika a chemická fyzika

Studijní obor: Experimentální biofyzika a chemická fyzika

Praha 2024

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracoval(a) samostatně a výhradně s použitím citovaných pramenů, literatury a dalších odborných zdrojů. Tato práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Beru na vědomí, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorského zákona v platném znění, zejména skutečnost, že Univerzita Karlova má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle §60 odst. 1 autorského zákona.

V ..... dne .....

Podpis autora

Chtěl bych poděkovat svému vedoucímu práce, RNDr. Romanu Dědicovi, Ph.D., za všechny rady, konzultace a pomoc, kterou mi s velkou ochotou poskytl. Dále bych chtěl poděkovat své rodině, která mě psychicky podržela a podporovala při tvorbě této diplomové práce. Moc si toho vážím. Díky také patří RNDr. Václavu Profantovi, Ph.D. za konzultace a seznámení se softwarem a Mgr. Janu Palackému, Ph.D. za poskytnutí softwaru pro faktorovou analýzu.

Název práce: Fotofyzikální vlastnosti riboflavinu

Autor: Bc. Jan Moučka

Katedra: Katedra chemické fyziky a optiky

Vedoucí diplomové práce: doc. RNDr. Roman Dědic, Ph.D., Katedra chemické fyziky a optiky

Abstrakt: Riboflavin, vitamin B<sub>2</sub>, je v těle nedílnou součástí. V našem těle funguje jako prekurzor pro výrobu flavin mononukleotidu a flavin adenin dinukleotidu, které tělo využívá například v mitochondriálním dýchacím řetězci nebo Krebsově cyklu. Porozuměním procesu zhášení singletního kyslíku a identifikaci efektivních zhášeců můžeme pozitivně ovlivnit naše zdraví. Díky absorpčním a fluorescenčním spektrům jsem byl schopený potvrdit vznik lumichromu a cyklodehydroriboflavinu. Pomocí časově rozlišené detekce luminiscence singletního kyslíku v roztocích riboflavinu a azidu sodného jsem zkoumal vliv těchto látek na dobu života singletního kyslíku a tripletních stavů riboflavinu. Bylo potvrzeno, že riboflavin fotosenzibilizuje singletní kyslík. Zhášení singletního kyslíku riboflavinem nebylo pozorováno. Ani v případě produkce singletního kyslíku ftalocyaninovým fotosenzibilizátorem k jeho zhášení riboflavinem nedocházelo.

Klíčová slova: Singletní kyslík, riboflavin, luminiscence, absorpce, doba života

Title: Photophysical properties of riboflavin

Author: Bc. Jan Moučka

Department: Department of chemical physics and optics

Supervisor: doc. RNDr. Roman Dědic, Ph.D., Department of chemical physics and optics

Abstract: Riboflavin, also known as B<sub>2</sub> vitamine, has an important role in our body metabolism. It is a precursor for flavin mononucleotide and flavin adenin dinucleotide synthesis. Our body uses these substances in mitochondrial respiration or Krebs cycle. We can improve our health if we understand better quenching of singlet oxygen and effective quenchers themselves. We have measured absorption spectra of riboflavin in detail and were able to identify lumichrome and cyclodehydroriboflavin in them. I have studied the influence of riboflavin and sodium azide on lifetime of singlet oxygen and triplet states of riboflavin via time-resolved luminescence of singlet oxygen in those solutions. It was confirmed that riboflavin is photosensitizer of singlet oxygen. Quenching of singlet oxygen by riboflavin was not observed. Same result was observed, when different photosensitizer, Al(III) phthalocyanine chloride tetrasulfonic acid in our case, was used to produce singlet oxygen.

Keywords: Singlet oxygen, riboflavin, luminescence, absorption, lifetime

# Obsah

<b>1</b>	<b>Úvod</b>	<b>3</b>
<b>2</b>	<b>Teorie</b>	<b>4</b>
2.1	Vlastnosti a struktura riboflavinu . . . . .	4
2.1.1	Využití při tvorbě FAD a FMN . . . . .	5
2.2	Reaktivní formy kyslíku . . . . .	6
2.3	Prooxidanty a antioxidanty . . . . .	7
2.4	Luminiscence . . . . .	8
2.5	Fotoluminiscence . . . . .	8
2.6	Fotosenzibilizace . . . . .	10
2.6.1	Srážkové zhášení . . . . .	11
2.7	Singletní kyslík . . . . .	12
2.7.1	Fosforescence singletního kyslíku . . . . .	12
2.8	Fotosenzibilizátory . . . . .	14
2.9	Fotodynamická terapie . . . . .	16
2.10	Role riboflavinu v potravinářství . . . . .	16
<b>3</b>	<b>Materiály</b>	<b>18</b>
3.1	Riboflavin . . . . .	18
3.2	AlPcS <sub>4</sub> . . . . .	18
3.3	Azid sodný . . . . .	20
<b>4</b>	<b>Experimentální uspořádání</b>	<b>21</b>
4.1	Kinetiky singletního kyslíku . . . . .	21
4.1.1	Laser . . . . .	22
4.1.2	Optický filtr Schott RG7 . . . . .	23
4.1.3	Monochromátor Jobin-YVON H20IR . . . . .	23
4.1.4	Fotonásobič Hamamatsu R9905 . . . . .	24
4.1.5	Předzesilovač Becker&Hickl HF AC-26 . . . . .	25
4.1.6	Časově rozlišený čítač Becker&Hickl MSA 300 . . . . .	25
4.2	Měření absorpčních a fluorescenčních spekter . . . . .	25
<b>5</b>	<b>Výsledky</b>	<b>27</b>
5.1	Absorpční spektra . . . . .	27
5.1.1	Absorpční spektrum riboflavinu v PBS . . . . .	27
5.1.2	Faktorová analýza absorpčních spekter v PBS . . . . .	31
5.1.3	Absorpční spektrum RF v H <sub>2</sub> O . . . . .	35
5.1.4	Absorpční spektrum RF + NaN <sub>3</sub> v PBS . . . . .	37
5.1.5	Absorpční spektrum RF + AlPcS <sub>4</sub> v PBS . . . . .	40
5.2	Fluorescenční spektra . . . . .	44
5.2.1	Fluorescenční spektra RF . . . . .	44
5.2.2	Fluorescenční spektra RF v H <sub>2</sub> O . . . . .	48
5.2.3	Fluorescenční spektra RF + NaN <sub>3</sub> . . . . .	49
5.3	Kinetiky singletního kyslíku . . . . .	50
5.3.1	Kinetiky <sup>1</sup> O <sub>2</sub> a <sup>3</sup> RF v roztoku RF v PBS . . . . .	50
5.3.2	Kinetiky <sup>1</sup> O <sub>2</sub> a <sup>3</sup> RF v roztoku RF v H <sub>2</sub> O . . . . .	53

5.3.3	Kinetiky $^1\text{O}_2$ a $^3\text{RF}$ v roztoku $50\ \mu\text{M}$ riboflavin (6,7-dimethyl-9-D-ribitylisoalloxazin) (RF) + $0,2\ \text{mM}$ $\text{NaN}_3$ v PBS . . . . .	54
5.3.4	Kinetiky $^1\text{O}_2$ a $^3\text{AlPcS}_4$ roztoku $50\ \mu\text{M}$ RF + $5\ \mu\text{M}$ $\text{AlPcS}_4$ . . . . .	56
<b>6</b>	<b>Diskuze</b>	<b>58</b>
6.1	Absorpční spektra a fotoprodukty . . . . .	58
6.2	Fluorescence . . . . .	62
6.3	Kinetiky $^1\text{O}_2$ , $^3\text{RF}$ a $^3\text{AlPcS}_4$ . . . . .	63
<b>7</b>	<b>Závěr</b>	<b>66</b>
<b>8</b>	<b>Seznam používaných zkratk</b>	<b>67</b>
<b>9</b>	<b>Příloha</b>	<b>68</b>
9.1	Příklady kinetik . . . . .	68
9.2	Kinetiky $^1\text{O}_2$ a $^3\text{RF}$ pro roztok RF v PBS s chybami . . . . .	68
9.3	Kinetiky $^1\text{O}_2$ a $^3\text{AlPcS}_4$ pro roztok $\text{AlPcS}_4$ + RF v PBS s chybami . . . . .	69
9.4	Naměřená data kinetik . . . . .	70
	<b>Literatura</b>	<b>81</b>
	<b>Seznam obrázků a grafů</b>	<b>82</b>
	<b>Seznam tabulek</b>	<b>85</b>

# 1 Úvod

Kyslík, jakožto molekula nezbytná k našemu životu, je velmi důležitou molekulou v lidském těle. Jeho reaktivní forma, singletní kyslík, nese dvě důležité role. První je role molekuly pomáhající s obranou proti virovým, bakteriálním a nádorovým onemocněním. Ve druhé roli funguje jako toxická molekula, která v určitém množství může naopak k nádorovým onemocněním dopomoci.

Singletní kyslík v těle přirozeně vzniká při mitochondriálním elektronovém přenosu a tělo jeho hladinu udržuje pomocí prooxidantů a antioxidantů.

Riboflavin, jinak známý jako vitamín B<sub>2</sub>, je přírodní žluté barvivo, které je slabě rozpustné ve vodě (8,47 mg na 100 ml). Je velmi odolný proti vysokým teplotám a jednoduše podléhá fotodegradaci. Účastní se procesů v těle, které regulují množství reaktivních forem kyslíku. Látky jako flavin adenin dinukleotid (FAD) a flavin mononukleotid (FMN), které v těle hrají důležitou roli v dýchacím řetězci, Krebsově cyklu a jiných metabolických drahách, si tělo vytváří právě z riboflavinu, který není schopno samo syntetizovat.

Moje bakalářská [1] práce ukázala, že interakce riboflavinu se singletním kyslíkem není jednoduchá, proto na ni magisterská práce navázala dalšími měřeními. Jejím cílem je prozkoumat produkci a případně zhášení singletního kyslíku riboflavinem a jeho fotoprodukty, které při ozáření vznikají. Zaměříme se proto na fotodegradaci riboflavinu a vznik fotoproduktů během jeho excitace světlem. Porovnáme a pokusíme se vysvětlit změny v tvorbě a zhášení singletního kyslíku během tvorby fotoproduktů, které srovnáme s jevy pozorovanými v absorpci a fluorescenci. Porovnáme tvorbu fotoproduktů při použití azidu sodného jako specifického zhášече singletního kyslíku. Ověříme, zda-li riboflavin zhasí singletní kyslík vytvořený jiným fotosenzibilizátorem, v našem případě chlorohlinitým tetrasulfoftalocyaninem (AlPcS<sub>4</sub>).

## 2 Teorie

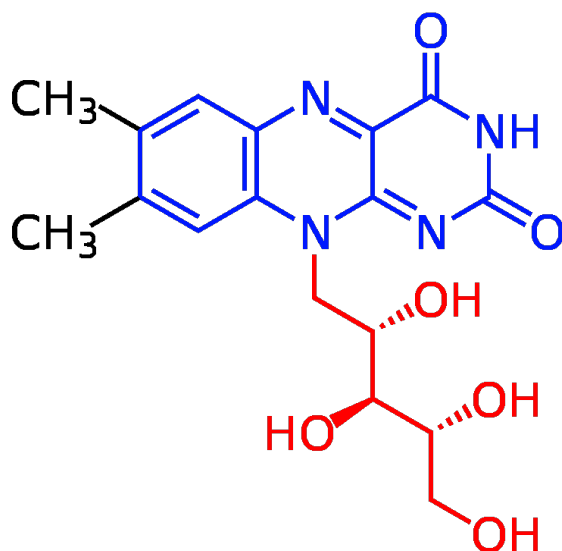
### 2.1 Vlastnosti a struktura riboflavinu

Molekula s triviálním názvem RF<sup>1</sup> je též známá jako vitamin B<sub>2</sub>. Její chemická struktura je znázorněna na obrázku č. 1 a skládá se ze dvou částí – flavin a ribitol.

**Flavinová** část, jinak též nazývána isoalloxazinové jádro, se skládá (zleva doprava) z benzenového, pyrazinového a pteridinového jádra a její oxidovaná forma je zodpovědná za žlutou barvu (z latinského *flavus*, „žlutý“). **Ribitolová** část, redukovaná forma cukru ribózy (C<sub>5</sub>H<sub>12</sub>O<sub>5</sub>), tvoří druhou část riboflavinu.

RF je ve vodě rozpustný vitamín, který naše tělo využívá pro syntézu důležitých molekul (FAD a FMN) pro různé metabolické cykly, jako je například dýchací řetězec a Krebsův cyklus. Je nezbytný pro správné fungování buněk, mozku, očí, trávicího traktu, kůže a metabolismu. Pomáhá vstřebávat tuky, proteiny a karbohydráty. Lidský metabolismus ztratil schopnost si ho syntetizovat [2]. Bakterie v tlustém střevě ho sice syntetizují, ale ne v dostatečném množství. Je proto nutné jej přijímat z potravy, nejčastějším zdrojem jsou vajíčka, játra, ovesná kaše, mléko, droždí a další. Jelikož je tento vitamín rozpustný ve vodě, předávkování jím většinou nehrozí. Doporučená denní dávka je 1,3 mg pro muže (19 -50 let) a 1,1 mg pro ženy (19 -50 let)[3], [4]. Výjimky nastávají pro děti, dospívající a těhotné ženy, kde se doporučené dávkování liší.

V případě deficitu riboflavinu se špatně vstřebávají makronutrienty (karbohydráty, tuky, proteiny), nastává únava, špatné vidění, oteklý krk, a dokonce i možné deprese. Dochází též k poškození kůže (kožní praskliny, svědění, vyrážka okolo úst), k degeneraci jater a může taktéž nastat ztráta vlasů a reprodukční problémy. Deficit je ale zvrátitelný při správné léčbě [5].



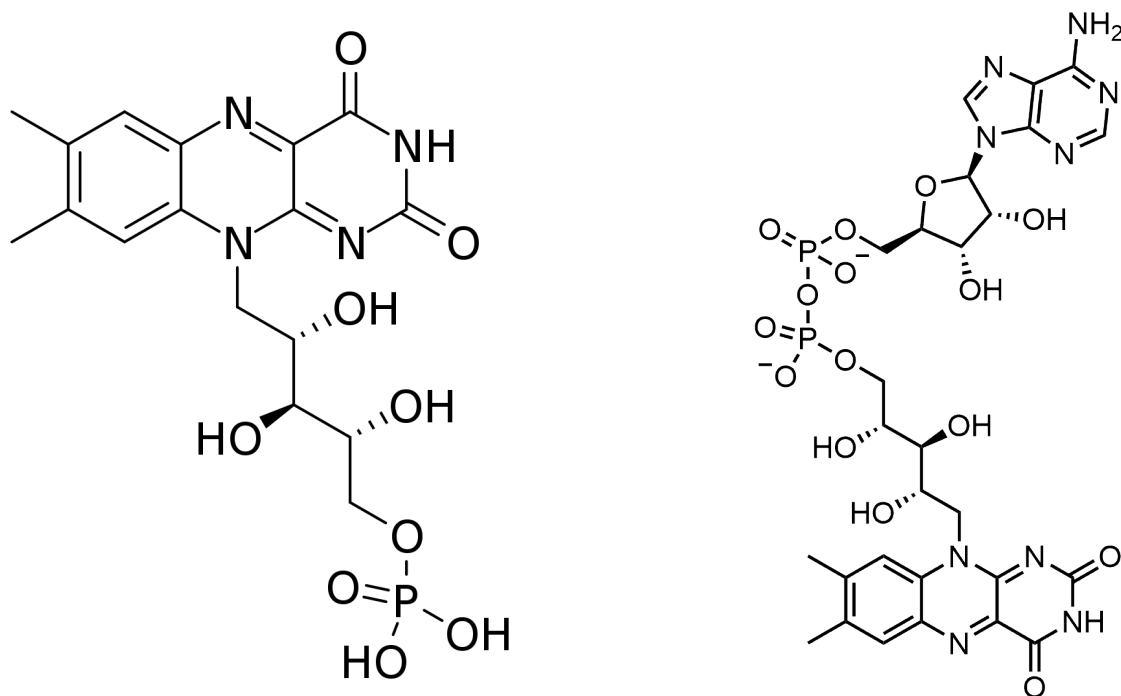
Obrázek 1: Chemická struktura Riboflavinu (RF). Modře je vyznačeno isoalloxazinové jádro, červeně je vyznačen ribitol.

<sup>1</sup>7,8-Dimethyl-10-[(2S,3S,4R)-2,3,4,5-tetrahydroxypentyl]benzo[g]pteridin-2,4-dion je její systematický název, 6,7-dimethyl-9-(1-D-ribityl)isoalloxazin je její triviální název



### 2.1.1 Využití při tvorbě FAD a FMN

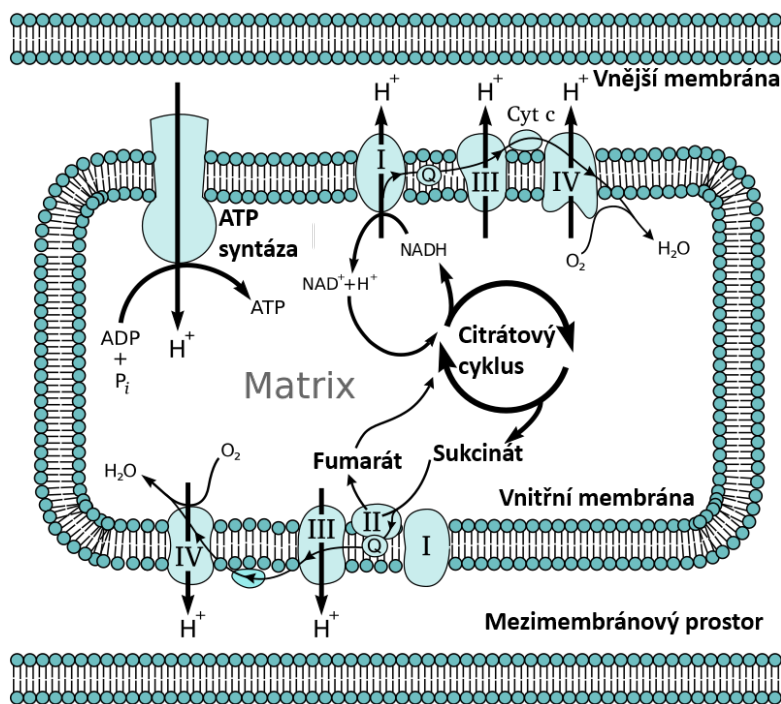
RF má v těle důležitou roli. Je to prekurzor pro tvorbu flavin mononukleotidu (FMN), ze kterého tělo vytváří flavin adenin dinukleotid (FAD).



Obrázek 2: Struktura molekul FMN (vlevo) a FAD (vpravo)

V těle je také velmi důležitá redukovaná forma nikotinamid adenin dinukleotidu (NADH) a oxidovaná forma nikotinamid adenin dinukleotidu ( $\text{NAD}^+$ ). Fungují jako přenašeče vodíkových atomů. Dokážou přijímat hydridový anion, který posléze předají dále s uvolněním energie. FMN v těle funguje mimo jiné jako kofaktor pro NADH dehydrogenázu v redoxních reakcích. Funguje též jako kofaktor v receptorech modrého světla. Fototropiny, světlem aktivované autofosforylující serin/threonin kinázy, navážou dva FMN a využívají je jako chromofory schopné absorpce modrého světla [6]. FMN můžeme najít především v membránových proteinech v buňce a zastává důležitou roli v elektronovém systému mitochondrií. V tomto systému pomáhá oxidovat NADH na  $\text{NAD}^+$ , které jsou pak využity v citrátovém cyklu.

FAD je podobně jako FMN využíván v aerobních procesech, fungují tam jako kofaktory pro oxidázy. FAD ale na rozdíl od FMN funguje i v anaerobních procesech, třeba jako kofaktor pro reakce dehydrogenáz [9]. FAD existuje ve 4 formách. Flavin-N(5)-oxid, chinonová forma FAD, semichinonová forma  $\text{FADH}$  a nakonec hydrochinonová forma  $\text{FADH}_2$ . Tělo využívá FAD ve složitých oxidačních reakcích, jako jsou například dehydrogenace C-C vazby na alken, oprava DNA, elektronový transport, biosyntéza nukleotidů a další. Nejvýznamnější výskyt je v Krebsově cyklu (citrátovém cyklu), kde se FAD využívá jako katalyzátor pro sukcinát dehydrogenázu, která mění sukcinát na fumarát. Vysokoenergetické elektrony z této oxidace jsou pak předány FAD, který se tím redukuje na  $\text{FADH}_2$ . Tyto elektrony jsou pak využity dále v elektronovém řetězci a  $\text{FADH}_2$  je zpátky přeměněno na FAD. Tato energie je ekvivalentní zhruba jeden a půl ATP. FAD má výhodu oproti  $\text{NAD}^+$  v tom, že dokáže přenášet jednotlivé elektrony.



Obrázek 3: Transport elektronů v mitochondriích. NADH a sukcinát vytvořený citrátovým cyklem slouží jako zdroj energie pro ATP syntázu a tedy tvorbu ATP v buňkách. NADH předává elektron FMN v **komplexu I** a sukcinát předává elektron FAD v **komplexu II**. Přenos elektronů přes membránu tvoří gradient koncentrace protonů a ten pohání syntézu ATP [7]. Tento obrázek je převzat a upraven z [8].

## 2.2 Reaktivní formy kyslíku

Molekuly či atomy mohou obsahovat ve svém elektronovém obalu nespárovaný elektron, díky kterému je daný atom či molekula vysoce reaktivní. Mezi reaktivní formy kyslíku (ROS) řadíme chemické formy vycházející z diatomové molekuly kyslíku, vody a peroxidu vodíku. Jedny z význačných molekul jsou například superoxydy ( $\cdot\text{O}_2^-$ ), hydroperoxydy ( $\text{HOO}\cdot$ ), hydroxylové radikály ( $\cdot\text{OH}$ , které nejsou tak reaktivní), **singletní kyslík** ( $^1\text{O}_2$ ) a vyexcitované karbonyly [10]. Singletní kyslík je ale oproti ostatním neradikální a excitovaný. Reaktivní formy kyslíku jsou pro tělo toxické a škodlivé, singletní kyslík je v malých množstvích mírně škodlivý. Problém nastává, pokud je ho hodně. O jeho správné množství se starají prooxidanty a antioxidanty.

ROS v těle vznikají během metabolismu molekulárního kyslíku. Je to především elektronový přenos v mitochondriích během aerobního dýchání.  $\cdot\text{O}_2$  je tvořen komplexy I a III v obrázku č. 3. Tvorba těchto ROS je ovlivněna potenciálem vnitřní membrány a hladinou vápníku v krvi [11].

Jak již bylo zmíněno, ROS mohou tělu prospívat, stejně tak jako mu škodit. Mají velký význam v buněčné signalizaci a vyskytují se v určitém množství ve většině buněk.  $^1\text{O}_2$  nám v těle pomáhá v boji proti bakteriím a virům, během procesu fotodynamické terapie s bojem proti rakovinným buňkám. Pomáhá taktéž v boji proti trombóze, pokud je v krvi v ideálním množství (do 0,5 mmol/l [10]).

Stejně tak, jako pomáhá tělu v imunitním systému, tak ve velkém množství může být pro tělo škodlivý. Vysoké koncentrace  $^1\text{O}_2$  jsou karcinogenní, protože jeho reaktivita může způsobit poškození DNA [12]. Ta potom vede k nekontrolovaným mutacím a může

vést k progresi karcinogeneze. Změn v DNA může být hodně, od modifikací bází, přes přeskupení DNA sekvence až po duplikace genových sekvencí. ROS kontrolují vnitřní procesy v buňkách, například apoptózu, buněčné stárnutí a proliferaci (hojné množení).

## 2.3 Prooxidanty a antioxidanty

**Antioxidanty** inhibují proces oxidace. V případě volných radikálů elektronová struktura antioxidantů umožňuje darovat elektron, aniž by se samy radikálem staly. Antioxidanty tak inhibují nebo prodlužují proces oxidace v buňkách, který by jinak pokračoval kaskádovitě za vytvoření mnoha radikálů. V případě  $^1\text{O}_2$  je to tak, že se na antioxidant přenese excitační energie z  $^1\text{O}_2$  a výměnným mechanismem se z  $^1\text{O}_2$  stane tripletní kyslík ( $^3\text{O}_2$ ), tedy kyslík v základním energetickém stavu.

Tělo tyto antioxidantující procesy provádí v několika vlnách [13]. **V první vlně** se za pomoci preventivních antioxidantů snaží zneutralizovat co nejvíce volných radikálů. Ačkoliv přesné procesy nejsou zatím dobře popsány, řadí se mezi zdroje radikálů kovem indukovaný rozpad hydroperoxidů a peroxidu vodíku. Aby se tělo vyhnulo těmto procesům, antioxidanty předběžně mění hydroperoxydy a peroxydy vodíku na vodu a alkohol bez vytváření volných radikálů. Dobrým příkladem je glutathion peroxidáza, která redukuje peroxid vodíku na vodu. **Ve druhé vlně** se antioxidanty snaží kaskádovou reakci zastavit tím, že potlačí začátek řetězové reakce nebo neutralizují radikály v průběhu této kaskády. **Třetí vlna** je obnovení antioxidantů a oprava poškozených buněk. Proteolytické enzymy a peptidázy přítomné v cytosolu a mitochondriích buněk potom rozpoznávají a opravují oxidativně poškozené proteiny. Pokud je poškozená i DNA, nukleázy a glykosylázy ji opraví.

**Adaptace** těla zde hraje taktéž roli. Tělo dostane signál o produkci a reakcích volných radikálů a v tomto místě se pak indukuje formování antioxidantů. Některé antioxidanty si tělo samo vytváří, mezi nejvýznamnější patří například kyselina močová, ubichinol či glutathion [13]. Velkou porci antioxidantů tělo přijímá z potravy. Hlavní složkou příjmu antioxidantů ze stravy je zelenina a ovoce. Vitamin C, E a  $\beta$ -karoten se mezi ně řadí na první místa. Další jsou například isoflavonoidy, indoly, luteiny, měď a spousta dalších.

**Prooxidanty** jsou naopak jakékoliv endobiotické či xenobiotické látky, které podporují oxidativní stres v buňkách<sup>2</sup>, a dělí se do mnoha skupin. Oxidativní stres může za určitých podmínek vytvářet mnoho zdrojů, od léků, pesticidů, fyzického cvičení až po atomy kovů v krevním řečišti, okolí a klima, mentální stres. Za určitých podmínek můžou i antioxidanty fungovat jako prooxidanty [14]. Do nejvýznamnějších prooxidantů můžeme zařadit například peroxid vodíku, ozon, hydroxylové skupiny, kyselinu chlornou. Tyto substance si fagocyty<sup>3</sup> vytvářejí samy jakožto obranný mechanismus proti patogenům. Je za to odpovědná nikotinamid adenin dinukleotid fosfát (NADPH) oxidáza, spolu se kterou se začnou tvořit za zvýšené koncentrace kyslíku právě zmíněné látky.

---

<sup>2</sup>ať už generací ROS nebo inhibicí antioxidantů

<sup>3</sup>buňky schopné fagocytózy, tedy pohlcování pevných částic přes jejich membránu

## 2.4 Luminiscence

Podle IUPAC<sup>4</sup> je luminiscence definovaná jako spontánní emise záření z elektronově a vibračně excitovaných stavů, které nejsou v termální rovnováze se svým okolím [15]. Nejdříve tedy dochází k excitaci elektronu z elektronového obalu molekuly dané látky. Během deexcitace tento elektron může vyzářit foton o delší vlnové délce než má excitační záření, tudíž i menší energii (Stokesův posun). Je to tedy přebytek záření látky nad jejím tepelným zářením po ukončení excitace. Tato spontánní emise musí po skončení budícího účinku trvat určitou dobu. Někdy se luminiscence nazývá studené záření. Látky vyzařující světlo tímto mechanismem se nazývají **luminofory**.

Luminiscence nastává, pokud látka absorbuje energii ať už z vysokoenergetického záření nebo z chemických reakcí, elektronových paprsků apod. Tato energie vyexcituje molekuly či atomy v látce a protože jsou tyto excitované energetické stavy atomů nestálé, tak se tato energie přemění na teplo, nebo se vyzáří. Efektivita luminiscence ale záleží na dané látce, protože ne každá látka luminiskuje tak, aby se dala využít v praxi.

Luminiscenci můžeme rozdělit podle způsobů excitace do několika podkategorií:

- Termoluminiscence – excitovaný stav elektronu je po určité období (v řádech i stovek let) uvězněn v krystalové struktuře. Po přijetí tepelné energie elektrony překonají energetickou bariéru pasti a mohou zářivě relaxovat. Termoluminiscence je často využívána u světélkujících barev (bezpečnostní tabule) a pro dozimetrii ionizujícího záření<sup>5</sup>. Tuto metodu lze použít i na datování předmětů.
- Mechanoluminiscence – nastává při mechanické námaze pevných látek, například triboluminiscence cukru. Lze jí dosáhnout i ultrazvukem.
- Chemiluminiscence – emise světla je vyvolána chemickou reakcí, například reakce luminolu s peroxidem vodíku. Řadí se sem i podskupina bioluminiscence, kam patří například záření světlušek pomocí luciferinu.
- Elektroluminiscence – při průchodu elektrického proudu danou látkou jsou elektrony excitovány z valenčního do vodivostního pásu, odkud mohou zářivě relaxovat zpět. Elektroluminiscence je využívána LED diodami.
- Fotoluminiscence.

## 2.5 Fotoluminiscence

Fotoluminiscence je v této práci zásadní. Excitace elektronů je vyvolána pouze předchozí absorpcí fotonu. Tyto excitované elektrony mají buď stejnou nebo opačnou spinovou multiplicitu jak před excitací. Fotoluminiscenci dělíme na:

- fluorescenci
- fosforescenci
- zpožděnou fluorescenci

---

<sup>4</sup>International Union of Pure and Applied Chemistry, tedy Mezinárodní svaz čisté a aplikované chemie

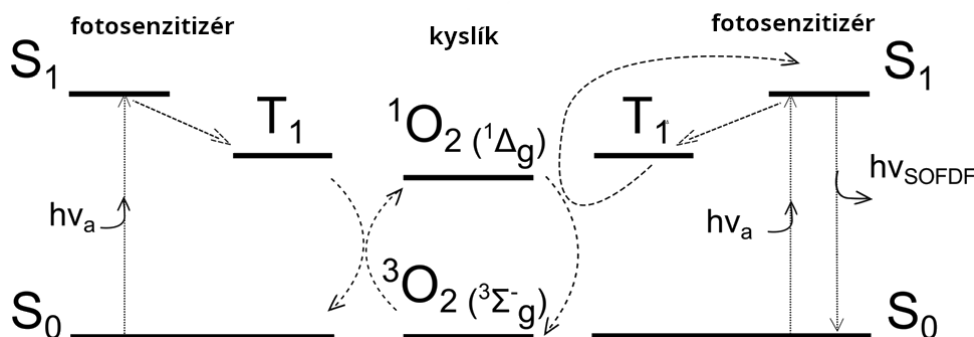
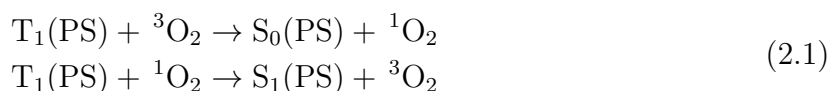
<sup>5</sup>kontrola množství radiace, které dostali pracovníci na odděleních ionizujícího záření, např. nukleární medicína nebo rentgenologie

Při **fluorescenci** jde o přechod mezi stavy se stejnou spinovou multiplicitou a luminescenční efekt tak trvá od **pikosekund** po **mikrosekundy** ([16], [17], [18]), protože jde o spinově povolený přechod.

**Fosforescence** je mechanismus trvající od mikrosekund po desítky minut. To je způsobeno tím, že excitovaný elektron změní překlopením spinu multiplicitu excitovaného stavu, a díky tomu nemůže zpátky deexcitovat do základního stavu. Tento proces je málo pravděpodobný, a proto fosforescence trvá mnohonásobně déle.

Během **zpožděné fluorescence** se excitovaný elektron dostává do tripletního stavu. V momentu, kdy se elektron dostane zpět do stavu singletního, deexcituje na základní energetickou úroveň a vyzáří foton. Zpožděná fluorescence je to proto, že přechod z tripletního do singletního stavu (zakázaný přechod) tuto deexcitaci výrazně zpomalí. Vlnová délka vyzářeného fotonu je stejná jak u přímé fluorescence.

Dva typy této zpožděné fluorescence se nazývají E-typ a P-typ. V **E-typu** se jedná o absorpci jednoho fotonu za lineární závislosti intenzity emise na intenzitě budícího záření. Je často vyvolávána zahříváním dané látky či systému, nebo taktéž statistickou fluktuací elektronů (v případě, že rozdíl mezi singletní a tripletní hladinou není příliš vysoký). V **P-typu** se jedná o kolize molekul, které jsou v tripletním stavu. Jedna z nich svoji energii nezářivě předá té druhé, která se vyexcituje do singletního stavu<sup>6</sup>. Tento efekt je dvoufotonový a tedy intenzita fluorescenční emise je úměrná čtverci intenzity budícího záření [19]. **Singletním kyslíkem zpožděná fluorescence**<sup>7</sup> (SOFDF) je třetí typ zpožděné fluorescence, kde kyslík funguje jako přenašeč energie mezi 2 tripletními stavy fotosenzibilizátoru (<sup>3</sup>PS) [20]. Přenosem energie z <sup>3</sup>PS na <sup>3</sup>O<sub>2</sub> se vytvoří <sup>1</sup>O<sub>2</sub>. Tato molekula nadále interaguje s jiným <sup>3</sup>PS, kterému předá energii za repopulace singletních stavů fotosenzibilizátorů (<sup>1</sup>PS). Intenzita SOFDF závisí na kvadrátu koncentrace <sup>3</sup>PS. Kinetiky SOFDF nejsou ale jednoduché díky přítomnosti <sup>1</sup>O<sub>2</sub>. Mechanismus je popsán rovnicemi (2.1).



Obrázek 4: Proces přenosu energie v mechanismu SOFDF. Převzato a upraveno z [21].

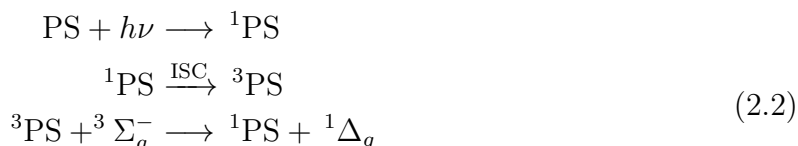
<sup>6</sup>triplet-tripletní anihilace

<sup>7</sup>z anglického – **S**inglet **o**xxygen **f**eedback-induced **d**elayed **f**luorescence

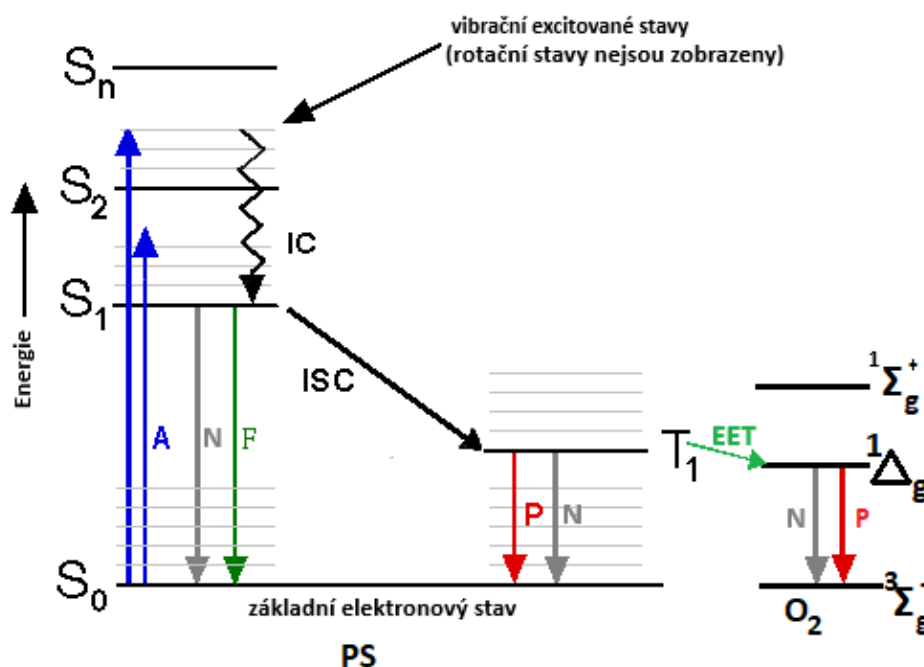
## 2.6 Fotosenzibilizace

Fotosenzibilizace je proces, při kterém dochází k přenosu energie z tzv. fotosenzibilizátoru (viz kap. 2.8) na jinou molekulu. Tento proces je hojně využíván ve fotodynamické terapii (viz kap. 2.9), v energetice (solární panely), při výrobě vodíku, k různým chemickým reakcím a dalším procesům.

Proces se dá vyjádřit jednoduše těmito rovnicemi:



Energii fotonu  $h\nu$  absorbuje fotosenzibilizátor (PS) a pokud je tato energie dostatečně velká, vyexcituje se do vyššího energetického stavu  ${}^1\text{PS}$ . Přes procesy vysvětlené v obrázku (5) se PS dostává do tripletního stavu  ${}^3\text{PS}$ , který svoji energii buď vyzáří, nebo předá jiné molekule. V našem případě kyslíku v tripletním stavu, ze kterého se stane kyslík singletní. Proces si detailněji popíšeme na následujícím Jablonského diagramu.



Obrázek 5: Proces přenosu energie z PS na kyslík. Převzato a upraveno z [22].

PS absorbuje energetické kvantum (A), kdy se dostává na vyšší excitované hladiny (S<sub>1</sub>, případně S<sub>n</sub>). Pokud je látka na vyšší elektronové hladině jak S<sub>1</sub> (může být i na nenulové vibrační hladině), dlouho tam nevydrží a pomocí **vnitřní konverze (IC)** se dostává do prvního excitovaného stavu S<sub>1</sub>. Z excitovaného singletního stavu přechází zpět do základního S<sub>0</sub> zářivě fluorescencí (F), nezářivě (N), nebo přejde **mezisystémovým přechodem (ISC)** do excitovaného tripletního stavu.

Pokud tento stav není T<sub>1</sub>, přes IC se do něj rychle dostává. Následně skrze vyzáření přebytečné energie **fosforescencí (P)** se PS dostane do základního singletního stavu.

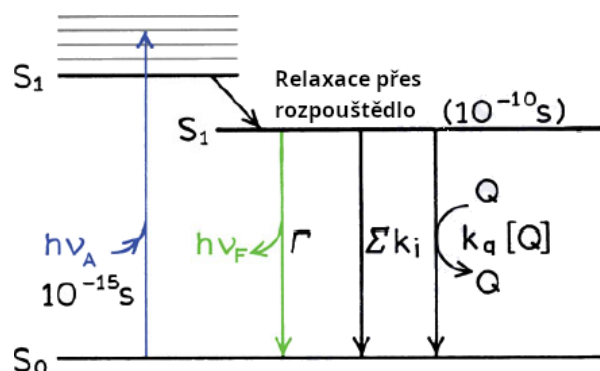
Svoji energii může taktéž předat (**EET**) jiné molekule (například  $^3\text{O}_2$ , ze kterého se při tom stane  $^1\text{O}_2$ ).  $^1\text{O}_2$  se přes fosforescenci dostává zpět do základního energetického stavu  $^3\text{O}_2$ .

### 2.6.1 Srážkové zhášení

Luminofory se během srážkového zhášení dostávají do kontaktu s okolními molekulami zhášečů  $Q$  a vrací se do svého základního energetického stavu, kde už vyzařovat fotony nemohou. Stern-Volmerova rovnice nám popisuje zánik excitovaných stavů molekuly a je vyjádřena jako:

$$\frac{\tau_0}{\tau} = 1 + k_q[Q], \quad (2.3)$$

kde  $\tau$  je doba života excitovaných stavů fluoroforů za přítomnosti zhášečů,  $\tau_0$  je doba života fluoroforů bez přítomnosti zhášečů a  $[Q]$  je koncentrace zhášeče [23].



Obrázek 6: Jablonského diagram, srážkové zhášení.  $h\nu_A$  je energie absorbovaného záření (**A**),  $h\nu_F$  je energie záření fluorescence (**F**) a  $\sum k_i$  jsou nezářivé přechody (**N**). Relaxace přes rozpouštědlo zajišťuje stabilizaci a snížení energetické hladiny excitovaných stavů pro luminofor. Zhášeč může odebrat energii (rychlostní konstanta  $k_q[Q]$ ) a luminofor se tak dostává do stavu  $S_0$ . Převzato a upraveno z [24].

My můžeme rychlostní konstantu  $k_q$  odhadnout. Uvažujme difúzí omezený odhad této konstanty, kdy molekuly ve vzdálenosti  $r = r_1 + r_2$ , tedy ve vzdálenosti rovné součtu vzdáleností poloměrů obou molekul, budou se sebou **vždy** reagovat. Potom se tato konstanta bude rovnat:

$$k_q = \frac{2RT}{3\eta} \left( \frac{r_a + r_b}{r_a r_b} \right) d_c, \quad (2.4)$$

kde  $r_a + r_b$  je součet poloměrů částic **a** a **b**. Konstanta  $d_c$  značí vzdálenost částic **a** a **b** takovou, kde je 100% šance na jejich srážku. Tato hodnota se ale musí určit experimentálně. Tuto rovnici ale můžeme napsat trochu jednodušeji.

$$k_q = \frac{8RT}{3\eta}. \quad (2.5)$$

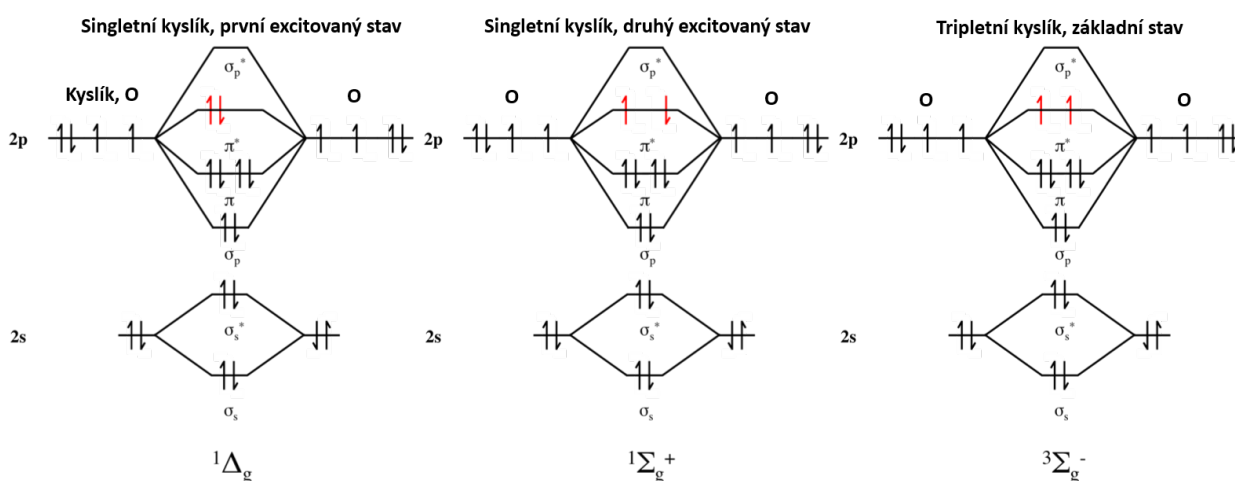
$R$  v této rovnici vystupuje jako konstanta ideálního plynu ( $R = kN_A \approx 8,3145 \text{ J} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$ , kde  $k$  je Boltzmannova konstanta,  $N_A$  je Avogadrova konstanta),  $T$  je teplota,  $\eta$  je viskozita roztoku. Samozřejmě tento výsledek nebude tak přesný a uspokojivý.

## 2.7 Singletní kyslík

Většina molekul v přírodě se vyskytuje ve svém základním energetickém stavu v *singletní formě* – všechny jejich elektrony jsou spinově spárované a jejich celkový spin je nulový ( $S=0$ ). Pokud je ale celkový spin  $S=1$ , potom se molekula bude vyskytovat v *tripletní formě*.

Vzácně se vyskytují ale i takové molekuly, které ve svém základním energetickém stavu jsou v tripletní formě. Jediný kyslík jako diatomická molekula je ve svém základním stavu ve stavu tripletním. Tato forma kyslíku má díky spinové konfiguraci elektronů nenulový magnetický moment, což znamená, že je molekula  $O_2$  ve svém základním stavu paramagnetická.

Když se tato molekula vyexcituje, vzniká singletní stav (na obrázku č. 7 vlevo). Ten je už ale hodně reaktivní, a to i s organickými molekulami. V těle se uplatňuje v řadě pozitivních i negativních rolí (viz kap. 2.2).



Obrázek 7: Elektronová struktura molekulových orbitalů molekuly kyslíku. Zleva doprava singletní kyslík v prvním excitovaném stavu  ${}^1\Delta_g$ , ve druhém singletním excitovaném stavu  ${}^1\Sigma_g^+$ , v tripletním základním stavu  ${}^3\Sigma_g^-$  s nejnižší energií. Převzato a upraveno z [25].

### 2.7.1 Fosforescence singletního kyslíku

Excitovaný stav singletního kyslíku, který je nestabilní, může do nižších energetických hladin relaxovat přes různé mechanismy. Přes rovnici (2.6) určíme změnu počtu molekul v excitovaném stavu v daném časovém úseku. V této rovnici vystupuje  $N$  jako počet excitovaných stavů a  $k_i$  jakožto **rychlostní konstanty** pro dané relaxační procesy, které vyjadřují poměry relaxací přes dané mechanismy k počtu molekul v excitovaném stavu za dobu  $t$ .

$$\frac{dN}{dt} = -N \sum_i k_i \quad (2.6)$$

$$N(t) = \exp(-tk) = \exp\left(-t \sum_i k_i\right)$$



Důležitá hodnota je doba života excitovaného stavu  $\tau$ , která se obecně definuje jako čas, za který původní počet excitovaných stavů poklesne na  $\frac{1}{e}$ . Můžeme tedy psát, že:

$$\tau = \frac{1}{\sum_i k_i}. \quad (2.7)$$

Rychlostní konstanty obecně závisí na koncentraci zhášečů nebo reaktantů. V případě velkého množství molekul, kdy jsou významné i srážkové mechanismy nebo fotochemické procesy, je potřeba tuto závislost brát v potaz. Budeme tedy pracovat s  $k_{Q_i}[Q_i]$ .

V našem případě budeme věnovat pozornost kinetikám PS a  $^1O_2$ . Uvažujme excitaci látky, kdy PS končí v tripletních stavech<sup>8</sup>. Tyto stavy mají dlouhou dobu života a relaxují přes neradiační přenosy (jako například IC, rychlostní konstanta bude  $k_N$ ), nebo přes fosforescenci ( $k_P$ ). Molekuly PS mohou být též zhášeny přes kolize s ostatními molekulami. Mezi významnými molekulami v tomto srážkovém zhášení je i zmiňovaný kyslík a přiřadíme mu rychlostní konstantu  $k_\Delta$ . Kinetika tripletních stavů PS je tedy popsána jako:

$$\frac{d[{}^3\text{PS}]}{dt} = - \left( k_P + k_N + k_\Delta[O_2] + \sum_i k_{Q_i}[Q_i] \right) \cdot [{}^3\text{PS}]. \quad (2.8)$$

Tato rovnice má jedno-exponenciální řešení a závorku si zjednodušíme většinou na

$$k = k_P + k_N + k_\Delta[O_2] + \sum_i k_{Q_i}[Q_i] = k_0 + k_Q[Q]. \quad (2.9)$$

Rychlostní konstanta je tedy lineární v koncentraci zhášečů. Měřením  $k$  za různých koncentrací zhášečů lze pak určit rychlostní konstantu daného zhášeče, která slouží pro určení účinnosti zhášení excitovaných stavů zhášeče.

Může ale nastat i **triplet-tripletní zhášení**, kde  ${}^3\text{PS}$  hraje roli zhášeče. V tomto případě se z rovnice (2.8) stává nelineární diferenciální rovnice. Řešení si napíšeme ve tvaru kinetiky luminiscence [26].

$$\begin{aligned} \frac{d[{}^3\text{PS}]}{dt} &= - \left( k_P + k_N + k_\Delta[O_2] + \sum_i k_{Q_i}[Q_i] + k_{TT}[{}^3\text{PS}] \right) [{}^3\text{PS}] \\ I(t) &= \frac{I_0}{c_0 t_1 \left\{ (k_{TT} + \frac{1}{c_0 t_1}) \exp(\frac{t}{t_1}) - k_{TT} \right\}} \end{aligned} \quad (2.10)$$

V rovnici vystupuje  $t_1 = (k_P + k_N + k_\Delta[O_2] + \sum_i k_{Q_i}[Q_i])^{-1}$  jako doba života  ${}^3\text{PS}$  (v našich měřeních to jsou tripletní stavy riboflavinu ( ${}^3\text{RF}$ )) bez uvažování triplet-tripletní anihilace,  $c_0$  jakožto počáteční koncentrace PS v čase  $t = 0$  a  $t_1 = k^{-1}$  (pro  $k$  z rovnice 2.9)

Singletní stav kyslíku může relaxovat stejně jako  ${}^3\text{PS}$  s tím rozdílem, že jeho generace nemůže být považována za okamžitou.  ${}^1O_2$  se generuje skrze  ${}^3\text{PS}$  s dlouhou dobou života. Musíme proto popsat kinetiku  ${}^1O_2$  jako konvoluci zániků  ${}^3\text{PS}$  dohromady se zánikem  ${}^1O_2$ . Pokud jsou oba tyto zániky popsány jedno-exponenciální závislostí, potom dostáváme dvou-exponenciální řešení ve tvaru

$$I(t) = \frac{I_0}{k_2 - k_1} (e^{-k_1 t} - e^{-k_2 t}). \quad (2.11)$$

<sup>8</sup>Do tripletního stavu se molekula dostane ze singletního stavu přes ISC. Singletní stavy v tomto případě ale neuvažujeme, protože jejich doby života jsou obecně mnohonásobně kratší a tedy zanedbatelné.

Člen  $k_2$  zde vystupuje jako nižší rychlostní konstanta buď pro PS nebo  $^1\text{O}_2$ , kdežto člen  $k_1$  popisuje tu druhou rychlostní konstantu. Pokud musíme uvažovat nelineární procesy (jako **triplet-tripletní** zhášení PS nebo vzájemné zhášení  $^1\text{O}_2$ ), potom nenajdeme žádnou jednoduchou analytickou formu konvoluce těchto zániků.

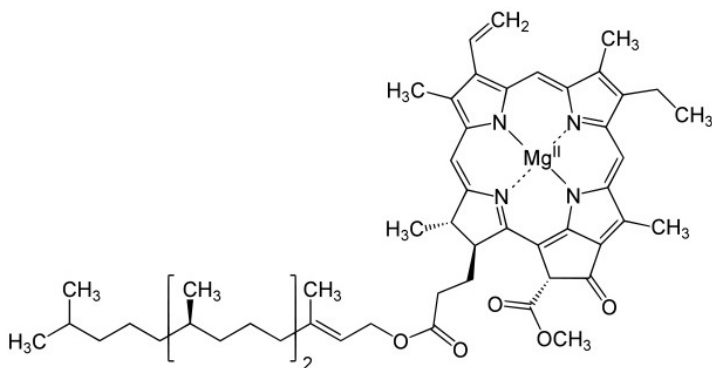
## 2.8 Fotosenzibilizátory

Látka, která absorbuje záření a excitační energii předá jiné molekule, například kyslíku za vytvoření jeho reaktivní singletní formy, se nazývá fotosenzibilizátor (PS).

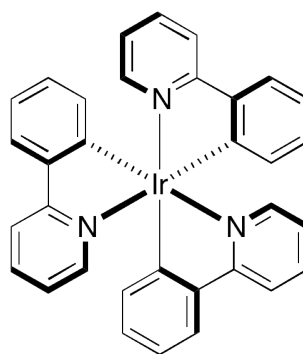
Fotosenzibilizátory rozdělujeme do 3 základních skupin:

- Metalo-organické
- Organické
- Nanomateriály

**Metaloorganické** se vyznačují přítomností atomů kovu v jejich struktuře, které mají zaplněné elektronové d-orbitaly. Tyto PS jsou vždy vázány aspoň k jednomu organickému ligandu a vazba na atom s velkým počtem elektronů umožňuje elektronům změnit multiplicitu při ISC.



Obrázek 8: Chlorofyl a



Obrázek 9: Tris(2-fenylpyridin)iridium

**Organické** PS využívají aromatických a konjugovaných systémů, díky kterým je energetický rozdíl mezi HOMO<sup>9</sup> a LUMO<sup>10</sup> malý. Můžeme sem zařadit spoustu barviv, které fungují jako PS, například bengálskou červeň nebo methylenovou modř. RF, stejně jako bengálská červeň nebo methylenová modř, obsahuje taktéž isoalloxazinové jádro, díky kterému může tvořit  $^1\text{O}_2$ . Další organické PS jsou dle FDA<sup>11</sup> směsí porfyrinů (protoporfyrin, hematoporfyrin) a deriváty benzooporfyrinů [27].

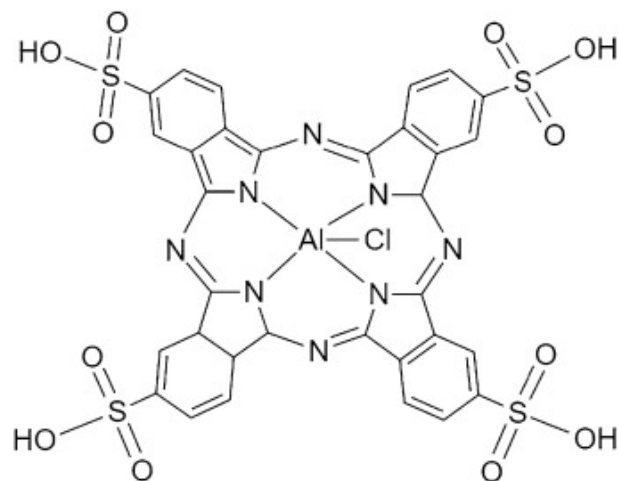
**Al(III) ftalocyanin tetrasulfonát**<sup>12</sup> je hojně používaný ve fotodynamické terapii díky jeho schopnosti hluboké penetrace do tkání, vysokých kvantových výtěžků a dobré fotostabilitě. Díky albuminu má však nižší penetraci do rakovinných buněk a slabou účinnost při rakovině zažívacího traktu. Proto se zkoumá to, s čím se musí ftalocyanin aplikovat, aby byla účinnost ve fotodynamické terapii vyšší [28].

<sup>9</sup>nejvyšší okupovaný molekulární orbital (highest occupied molecular orbital) (HOMO)

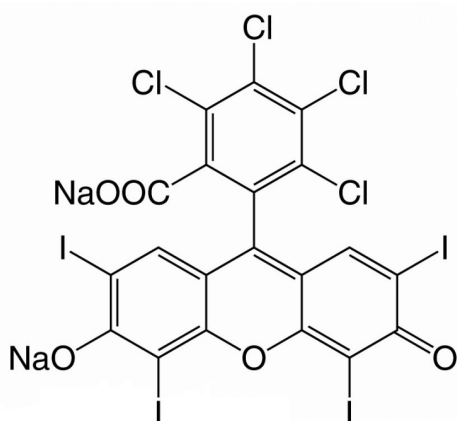
<sup>10</sup>nejnižší neokupovaný molekulární orbital (lowest unoccupied molecular orbital) (LUMO)

<sup>11</sup>Food and Drug Administration - Úřad pro kontrolu potravin a léků

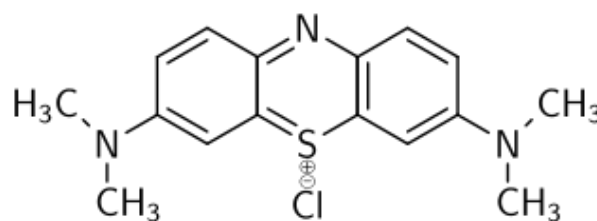
<sup>12</sup>AlPcS<sub>4</sub>, též hlinitý ftalocyanin tetrasulfonát



Obrázek 10: Strukturní vzorec sloučeniny AlPcS<sub>4</sub>



Obrázek 11: Bengálská červeň



Obrázek 12: Methylenová modř

Nanomateriály můžeme rozdělit do **kvantových teček** a **nanotyčičí**. Uměle vyrobené anorganické polovodičové nanokrystaly v koloidních roztocích nazýváme **kvantové tečky**. Mají různé optické a elektrické vlastnosti, které se mění i v závislosti na velikosti. Ta se pohybuje mezi 1 nm -10 nm. Fungují stejně jak již dvě výše zmíněné skupiny PS, jejich výhoda ale spočívá ve výběru vlastností. Kvantové tečky se vyznačují hlavně malou rozpustností a opět nízkým energetickým rozdílem mezi HOMO a LUMO. Oproti obyčejným PS je lze vyrobit tak, aby jejich emisní vlastnosti byly v infračerveném spektru. Používanými materiály jsou sulfid zinečnatý a olovnatý, oxid titaničitý nebo například čistý křemík. Používají se taktéž kvantové tečky založené na uhlíkové (uhlíková, grafenová) či kovové (kadmiové) struktuře [29]. Díky možnosti výroby **nanotyčičí** podle daných podmínek si můžeme vybrat absorpční a jiné vlastnosti, které v experimentu potřebujeme. Výběrem délky nanotyčičí lze ovlivňovat jejich absorpční pásy. Například zlaté nanotyčiče lze vytvořit tak, aby po ozáření ( $\lambda = 915 \text{ nm}$ ,  $130 \text{ mW cm}^{-2}$ ) mohly generovat singletní kyslík a zničit blízký B16F0<sup>13</sup> myší melanom. Nebylo zapotřebí používat dodatečné organické PS [31].

<sup>13</sup>Myší buňky obsahující melanom [30]

Dalším příkladem jsou zlaté **nanotyče**, které se syntetizují z kyseliny chlorozlatité ( $\text{HAuCl}_4$ ) a různých stabilizátorů<sup>14</sup>. Tyto zlaté tyče mají absorpční pásy závislé na orientaci dopadajícího světla a velikosti, která bývá okolo 45 nm. Ze zlata se vyrábí i zlaté nanočástice, nanoslupky a další [33], [34]. Zlaté nanočástice jsou slibné a jejich využití stále roste, například při dodávání léků na specifická místa v těle, ve fototerminální terapii a dalších.

## 2.9 Fotodynamická terapie

Fotodynamická terapie (PDT) je proces, který využívá **fotosenzibilizátorů**, **kyslíku** v buňkách a **fotonů** k ničení karcinogenních a pre-karcinogenních buněk. Využívá se ale také k léčení akné, sluncem popálené kůže ([35], [36]) a jiných druhů poškození. Základní principy a mechanismy PDT byly objeveny už na začátku 20. století [37] a jako léčba se začala využívat až v druhé polovině tohoto století.

Fotodynamická terapie začíná tím, že se aplikuje fotosenzibilizátor, který se selektivně akumuluje v cílové tkáni. Následně se excituje zářením. Vlnová délka použitého záření se odlišuje podle použitého PS. PS není pro tělo nijak toxický do té doby, než se aktivuje tímto specifickým zářením. V tomto momentu začne vytvářet reaktivní stavy, které ničí okolní buňky, tedy buňky nádoru.

Tvorba reaktivních stavů probíhá v buňkách přes dva mechanismy. **Fotoefekt I. typu**, kdy PS předává energii a vyměňuje  $e^-$  okolním molekulám, ze kterých se stávají volné radikály. Elektrony těchto radikálů potom reagují s kyslíkem a vytvářejí ROS, převážně tedy anionty superoxidu  $O_2^-$ . Tyto anionty vytvářejí další ROS, až díky oxidativnímu stresu dojde k destrukci buňky.

Při **fotoefektu II. typu** PS předává energii přímo tripletnímu kyslíku a stává se z něj singletní kyslík, který poškozuje buňky a jejich DNA. Nastává buněčná smrt. Jelikož se PS zachytává převážně v karcinogenní oblasti (díky rychlému metabolismu nádoru a zvýšené koncentraci LDL<sup>15</sup> lipoproteinů), je poškození omezeno na nemocnou tkáň.

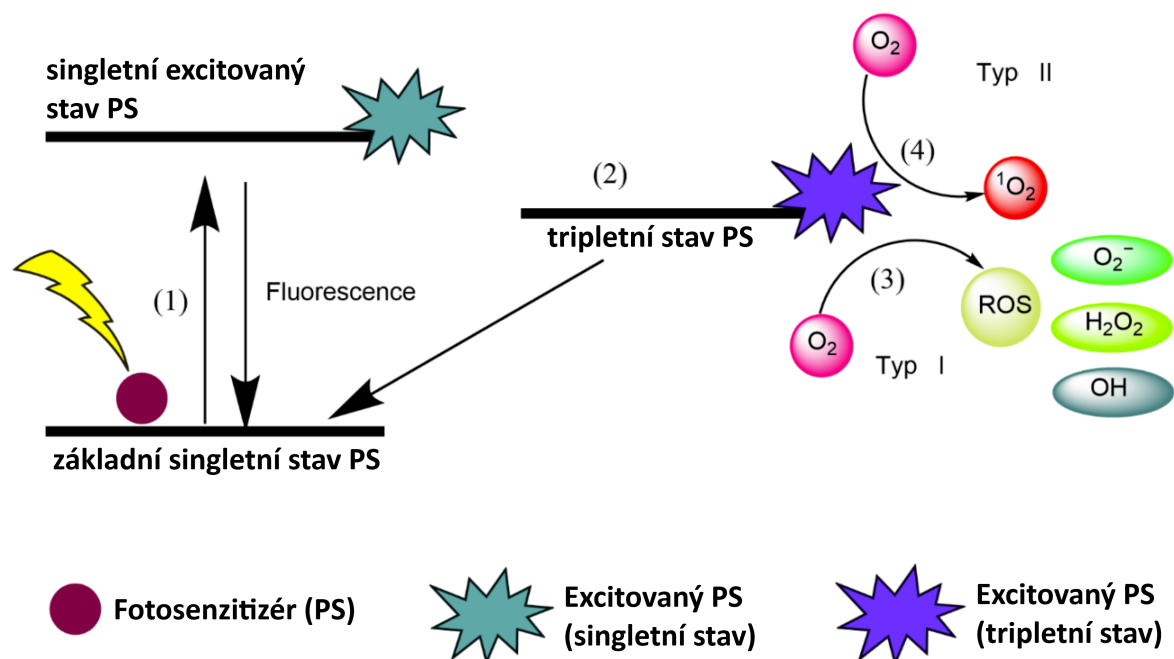
## 2.10 Role riboflavinu v potravinářství

Riboflavin je důležitý vitamín, který potřebujeme pro správné fungování buněk v těle. Je obsažen ve vajíčkách, ledvinách, v cereáliích, těstovinách, pivu a mléce. V potravinářství nese označení **E101** a **E101a** zastupuje riboflavin fosfát. Riboflavin fosfát se využívá pro jeho lepší rozpustnost ve vodě. Podle článku [39] má riboflavin fosfát rozpustnost až 39 mg/ml, což je skoro 400x větší rozpustnost, než RF (0,1 mg/ml -0,13 mg/ml [40]).

Jelikož je syntéza RF v lidském těle nemožná, je potřeba jej přijímat z potravy nebo syntetizovat uměle. Momentální produkce RF silně závisí na mikrobiální syntéze pomocí speciálních bakterií (*Bacillus subtilis*), hub (*Ashbya gossypii*) nebo kvasinek (*Candida famata*) [41]. Tyto mikroorganismy se upraví přes genetické inženýrství, kdy se za pomoci plasmidů a znalosti genetických kódů pro proteiny tvořící RF vpraví do DNA těchto mikroorganismů upravený DNA řetězec. Tato informace o vyšší produkci proteinů se zabuduje do vlastní DNA. Syntéza RF je touto cestou levná, kontrolovatelná a nejvíce používaná.

<sup>14</sup>například cetyltrimethylamoniumbromid [32]

<sup>15</sup>Lipoproteiny nízké hustoty (Low Density Lipoproteins) jsou struktury přenášející molekuly tuku (typicky 3000 -6000) po celém těle. Využívají se k zásobování tkáně cholesterolem a k vytváření membrán během dělení buněk. Karcinogenní buňky toto dělení mají velmi zrychlené a mají větší množství receptorů pro tyto přenašeče.



Obrázek 13: Vyobrazení prvního a druhého typu fotoefektu. Převzato a upraveno z [38].

Riboflavin se dříve vyráběl z ribózy, tento proces byl však náročný na CO<sub>2</sub> emise a neobnovitelné zdroje. Využitím mikroorganismů se tyto problémy skoro eliminovaly, stejně tak, jako se snížila výrobní cena nejenom riboflavinu.

Riboflavin hraje velkou roli v pivním průmyslu. Zdroj s největším obsahem RF při vaření piva je mladina. Kvasinky a chmel přispívají jen opravdu málo [42]. **Riboflavin** dodává pivu správnou chuť. RF je ale látka citlivá na světlo. Podobně je na tom i samotný chmel, a proto je nutné, aby se pivo uchovávalo mimo sluneční záření a v tmavých lahvích a minimalizovala se tak fotodegradace těchto látek. Mléko je na tom obdobně. V kravském mléku je obsaženo až 3,42 mg RF na litr [43]. Fotodegradaci podléhá i vitamin A a D, které jsou v mléce taktéž obsaženy [44].

## 3 Materiály

### 3.1 Riboflavin

Příprava roztoku riboflavinu probíhala následovně. V místnosti, kde jsme roztok připravovali, bylo nutno eliminovat jakékoliv sluneční světlo nebo světlo v absorpčních páslech riboflavinu. Pro viditelnost na přípravu vzorku jsme tedy využili červené světlo.

Z tmavé nádoby **riboflavinu** (SIGMA-ALDRICH, (-)-Riboflavin, R9504-25G) jsme odvážili množství riboflavinu (všechny kombinace jsou zapsány v tabulce č. 1), jehož molekulární hmotnost je  $M = 376,36 \text{ g mol}^{-1}$ , a nechali jej rozpustit buď v **PBS** (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline  $1 \times$  - PAA Laboratories GmbH; katalogové číslo: H15-002, 8 mM roztok) nebo **deionizované vodě**. Rozpustnost riboflavinu činí zhruba 0,1 mg/ml - 0,13 mg/ml [40] a maximální koncentrace je 225  $\mu\text{M}$ . Koncentrovanější riboflavin začne krystalizovat. Dostali jsme vždy zásobní roztok o maximální koncentraci 200  $\mu\text{M}$ , který jsme dále zpracovávali.

Tabulka 1: Tabulka s naváženým množstvím RF do objemu PBS, deionizované vody ( $\text{diH}_2\text{O}$ ) pro jednotlivé sady měření

navážené množství RF $m_{\text{RF}}$ [mg]	množství rozpouštědla $V$ [ml]	Typ rozpouštědla
1,6	21,238	PBS
2,7	35,869	PBS
2,2	29,225	PBS
2,5	33,210	PBS
2,4	31,884	PBS
3,1	41,183	PBS
1,7	22,585	$\text{diH}_2\text{O}$
2,4	31,880	$\text{diH}_2\text{O}$
2,5	33,212	$\text{diH}_2\text{O}$

Tento 200  $\mu\text{M}$  roztok jsme potom dali do ultrazvukové lázně zahřáté na 30 °C na minimálně 20 minut. Tento krok urychluje rozpuštění riboflavinu. Poté jsme odebrali 0,75 ml ze zásobního roztoku RF do křemenné kyvety a naředili jej s 2,25 ml rozpouštědla. Tak vznikly 3 ml 50  $\mu\text{M}$  roztoku RF pro spektrální charakterizaci.

### 3.2 $\text{AlPcS}_4$

Sloučenina s různými názvy, mezi které patří například Al(III) ftalocyanin chlorotetrasulfonát ( $\text{AlPcS}_4$ ) nebo *chlorohlinitý tetrasulfoftalocyanin* [45] (dále označováno jako *ftalocyanin*, chemická struktura na obrázku č. 10). Tento **ftalocyanin** (Frontier Specialty Chemicals, Al(III) Phtalocyanine Chloride Tetrasulfonic, číslo produktu: AlPcS-834) jsme si vybrali kvůli vlastnostem fotosenzitizéru (kapitola 2.8). Ftalocyanin byl použit kvůli tomu, že absorbuje na jiných vlnových délkách než riboflavin. Tím umožňuje sledovat, zda neexcitovaný riboflavin zhasí ftalocyaninem generovaný singletní kyslík.

Byl opět namíchan<sup>16</sup> zásobní roztok ftalocyaninu ( $M_W = 895,21 \text{ g mol}^{-1}$ ), kdy jsme navázili 0,4 mg do 45,68 ml PBS. Tímto jsme získali zásobní roztok o 10  $\mu\text{M}$  koncentraci.

<sup>16</sup>Na první dvě sady experimentů jsme využívali taktéž několik let starý 1 mM zásobní roztok ftalocyaninu, který připravoval ale jiný student a tudíž nevíme, jakou firmou byl použitý ftalocyanin vyroben.

Pro dlouhodobé uchování je potřeba mít vzorky ve tmě v teplotě  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Namíchali jsme si v každém měření s tímto ftalocyaninem roztoky o různých koncentracích riboflavinu, ale stejných koncentracích ftalocyaninu. Nastavení laseru v tomto případě muselo být změněno podle kapitoly 4.1.1.

Tabulka 2: V levých dvou sloupečcích je cílová koncentrace RF (z  $200\ \mu\text{M}$  zásobního roztoku) a ftalocyaninu (z  $1\ \text{mM}$  zásobního roztoku) pro výsledný vzorek, v pravých sloupečcích je použité množství zásobních roztoků. Tato tabulka je pro 1. a 2. měření roztoku  $50\ \mu\text{M}$  RF +  $5\ \mu\text{M}$  ftalocyaninu

c [ $\mu\text{M}$ ]		Poměry objemů [ $\mu\text{l}$ ]			Celkový objem $V_{\text{celk}}$ [ $\mu\text{l}$ ]
AlPcS <sub>4</sub>	RF	AlPcS <sub>4</sub>	RF	pufr	
5	0	10	0	1990	2000
5	0,5	10	5	1985	2000
5	1	10	10	1980	2000
5	2	10	20	1970	2000
5	3	10	30	1960	2000
5	5	10	50	1940	2000
5	7	10	70	1920	2000
5	10	10	100	1890	2000
5	20	10	200	1790	2000
5	50	10	500	1490	2000
5	100	10	1000	990	2000

Tabulka 3: V levých dvou sloupečcích je cílová koncentrace RF (z  $200\ \mu\text{M}$  zásobního roztoku) a ftalocyaninu (z  $10\ \mu\text{M}$  zásobního roztoku) pro výsledný vzorek, v pravých sloupečcích je použité množství zásobních roztoků. Tato tabulka je pro 3. měření roztoku  $50\ \mu\text{M}$  RF +  $5\ \mu\text{M}$  ftalocyaninu

c [ $\mu\text{M}$ ]		Poměry objemů [ $\mu\text{l}$ ]			Celkový objem $V_{\text{celk}}$ [ $\mu\text{l}$ ]
AlPcS <sub>4</sub>	RF	AlPcS <sub>4</sub>	RF	pufr	
5	0	1000	0	1000	2000
5	0,5	1000	5	995	2000
5	1	1000	10	990	2000
5	2	1000	20	980	2000
5	3	1000	30	970	2000
5	5	1000	50	950	2000
5	7	1000	70	930	2000
5	10	1000	100	900	2000
5	20	1000	200	800	2000
5	50	1000	500	500	2000
5	100	1000	1000	0	2000

### 3.3 Azid sodný

Bezzápachový bílý prášek s chemickým názvem azid sodný ( $\text{NaN}_3$ ) je jedovatá látka dobře rozpustná ve vodě (40,8 g na 100 ml) a její molekulární hmotnost je  $M_W = 65,01 \text{ g mol}^{-1}$ . Jeho využití najdeme v automobilovém průmyslu, kde se využívá prudkého rozkladu



Elektrická součástka při srážce vznítí směs oxidů a azidu sodného a vytvoří se velké množství dusíku, které naplní airbag. Protože je ve větších množstvích náchylný na výbuch, novější auta využívají jiných směsí. Využili jsme **o!** (**o!**)d firmy SIGMA-ALDRICH, Sodium azide S8032-100G.

$\text{NaN}_3$  byl v této práci využit pro bližší prozkoumání vlastností riboflavinu a jeho vlivu na singletní kyslík.  $\text{NaN}_3$  je známý tím, že je dobrý zhasič singletního kyslíku [46], [47]. Zatímco například askorbová kyselina zhasí singletní kyslík i riboflavin,  $\text{NaN}_3$  zhasí pouze singletní kyslík a pomáhá riboflavinu nedegradovat na světlo [48].

Během 3 měření jsme si navázali takové množství (vypsáno v tabulce č. 4), abychom dostali vždy 100 mM roztok. Z tohoto zásobního roztoku jsme odebrali 6  $\mu\text{l}$  a přidali do 750  $\mu\text{l}$  200  $\mu\text{M}$  roztoku RF a 2244  $\mu\text{l}$  PBS. Takto nám vznikly 3 ml roztoku 50  $\mu\text{M}$  RF + 0,2 mM  $\text{NaN}_3$  v PBS. Změnu koncentrace RF vzniklou tímto naředěním jsme zanedbali.

Tabulka 4: Tabulka s naváženým množstvím  $\text{NaN}_3$   $m_{\text{NaN}_3}$  do objemu  $V$  rozpouštědla PBS

navážené množství $\text{NaN}_3$ $m_{\text{NaN}_3}$ [mg]	množství rozpouštědla $V$ [ml]
11.8	1.815
10.9	1.677
5.8	0.877



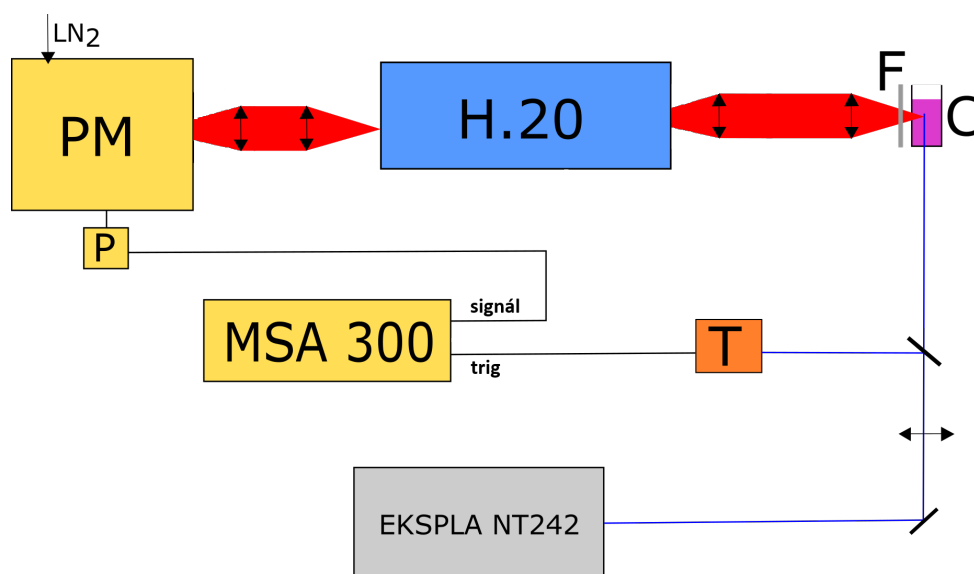
## 4 Experimentální uspořádání

### 4.1 Kinetiky singletního kyslíku

Kinetiky singletního kyslíku jsme měřili na aparatuře, která se skládá z následujících částí.

- Laser EKSPLA NT242
- 2x Optický filtr Schott RG7
- Monochromátor Jobin-YVON H20IR
- Infračervený fotonásobič Hamamatsu R9905
- Předzesilovač
- Časově rozlišený čítač Becker&Hickl MSA 300

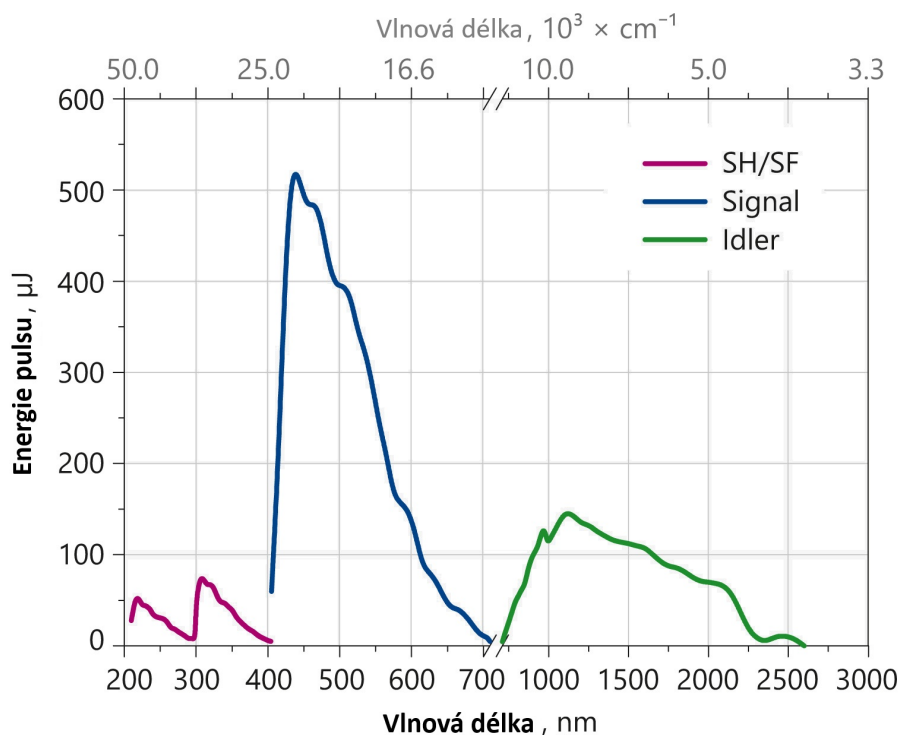
Jak lze vidět na schématu aparatury (obr. 14), laserem EKSPLA NT242 vysíláme excitační laserové pulsy, které dělíme na dva svazky. Jeden míří přímo do vzorku. Emisi singletního kyslíku sbíráme přes optické filtry RG7, ty nepropouštějí záření vlnových délek kratších než 750 nm, čímž se zbavíme rozptýleného světla excitačního laseru a přímé fluorescence PS. Záření dále prochází monochromátorem, který je nastavený na 1274 nm, což je maximum fotoemise singletního kyslíku [49]. Záření je dále detekováno infračerveným fotonásobičem. Tento znásobený signál vede do počítače, kde se zpracovává pomocí časově rozlišeného čítače s rozlišením 5 ns. Druhý svazek laserových pulsů vede na PIN fotodiodu a slouží k synchronizaci měření s excitací.



Obrázek 14: Zjednodušené experimentální uspořádání použité aparatury k měření kinetik singletního kyslíku. **EKSPLA NT242** - laser o nastavitelné vlnové délce excitačního záření a energie laserových pulsů, **C** - kvyeta se vzorkem, **F** - dlouhovlnný filtr, **H.20** - monochromátor Jobin YVON H20IR, **PM** - infračervený fotonásobič Hamamatsu R9905, **LN<sub>2</sub>** - chlazení tekutým dusíkem, **P** - předzesilovač, **MSA 300** - časově rozlišený čítač Becker and Hickl MSA 300, **T** - trigerovací PIN fotodioda

### 4.1.1 Laser

Laser EKSPLA NT242 je Nd:YAG pulsní laser fungující na bázi Q-switch s měnitelnou vlnovou délkou mezi 210 až 2600 nm díky optickému parametrickému oscilátoru. Jeho opakovací frekvence dosahuje až 1000 Hz [50]. Energie laserových pulsů se liší v závislosti na excitační vlnové délce dle obr. 16. Jeho ovládání přes počítač s LabVIEW™ softwarem umožňuje jednoduchý přístup k nastavení všech vlastností.



Obrázek 15: Závislost energie laserových pulsů na jejich vlnové délce v laseru EKSPLA NT242, převzato a upraveno z [50]

**Vlnová délka excitačního záření** byla nastavena dle absorpčních pásů měřených vzorků a dostupného výkonu laseru. Pro měření roztoku čistého riboflavinu a roztoku riboflavinu s azidem sodným bylo excitační záření nastaveno na 446 nm. Protože sledujeme přenos energie mezi riboflavinem a singletním kyslíkem, vybrali jsme vlnovou délku takovou, aby měl riboflavin co největší absorpci. **Energie laserových pulsů** se pohybovala okolo  $(10,2 \pm 0,3) \mu\text{J}$  při měření roztoku riboflavinu nebo roztoku riboflavinu a azidu sodného.

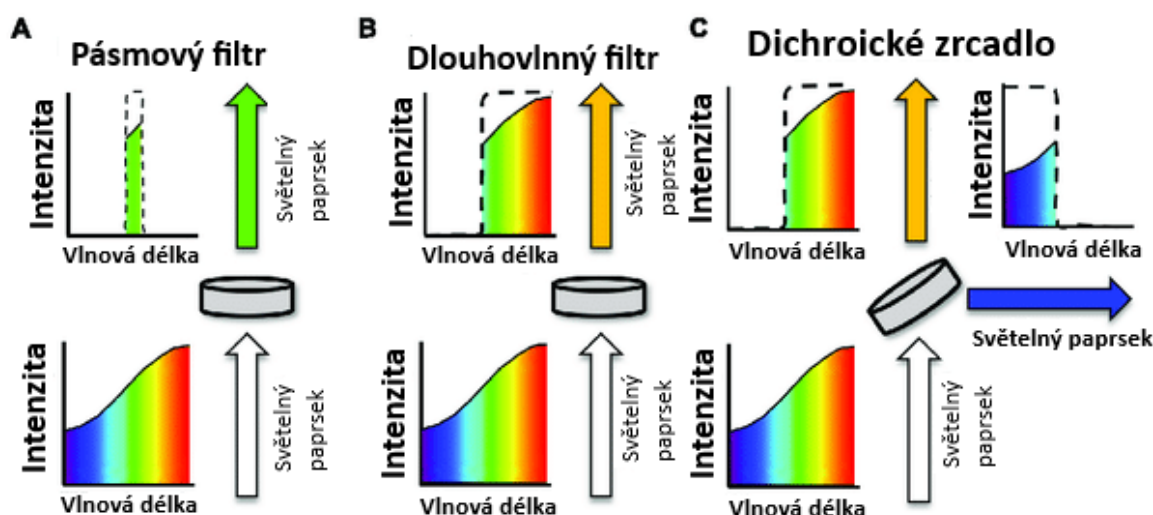
To samé jsme museli udělat pro ftalocyanin, ale zároveň tak, aby riboflavin neabsorboval. Pro excitaci ftalocyaninu jsme i přes nízkou energii pulsů laseru byli nuceni vybrat **vlnovou délku** 665 nm. Na této vlnové délce sice nejsme na maximu absorpce ftalocyaninu, ale dovoluje nám navýšit energii laserových pulsů na relativně přijatelné hodnoty. **Energie laserových pulsů** byla v tomto případě  $(1,0 \pm 0,1) \mu\text{J}$  během prvních měření v roce 2022. Během posledních měření tohoto a minulého roku byla energie laserových pulsů už velmi slabá a pohybovali jsme se okolo  $(0,2 \pm 0,1) \mu\text{J}$ . Museli jsme udělat kompromis mezi výkonem laseru na dané vlnové délce a absorpčním spektrem ftalocyaninu a tak maximalizovat absorbovanou energii.

S nastavenou **opakovací frekvencí** 1000 Hz jsme pro každou jednu kinetiku luminiscence  $^1\text{O}_2$  měřili  **$10^5$  opakování**. Každé měření tedy trvalo 100 s. Jelikož jsme většinou měřili 10 setů (1000 s doby trvání) dat a až potom jsme manipulovali se vzorkem (měření absorpce, fluorescence), byl vzorek vystaven celkové dávce 10 J energie záření v případě měření roztoků **bez**  $\text{AlPcS}_4$ , 1 J energie záření v případě měření roztoků **s**  $\text{AlPcS}_4$  v roce 2022 a 0,2 J energie záření v případě měření roztoků **s**  $\text{AlPcS}_4$  v roce 2023 a 2024.

#### 4.1.2 Optický filtr Schott RG7

Mezi filtry řadíme **pásmové filtry** (tzv. band-pass filtry), notch filtry a dlouhovlnné a krátkovlnné filtry.

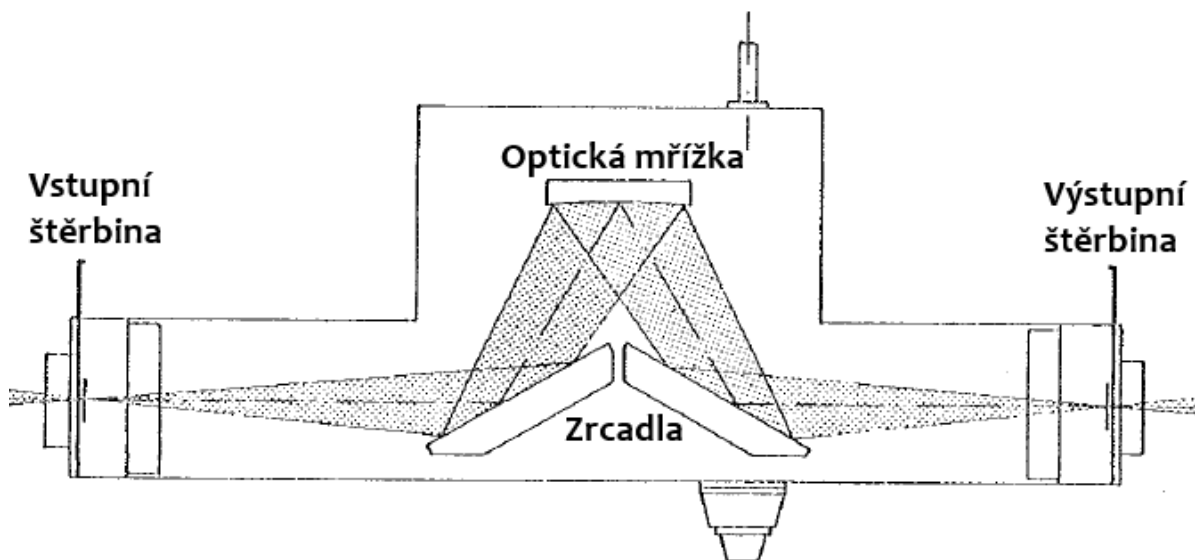
My jsme použili **dlouhovlnné optické filtry Schott RG7**, které propouští vlnové délky větší jak 750 nm a se kterými zeslabujeme rozptýlené excitační záření a fluorescenci samotného vzorku, protože signál luminiscence singletního kyslíku je řádově slabší. Filtry zastupují i funkci ochrany následujících součástí, protože kratší vlnové délky by je mohly poškodit.



Obrázek 16: Zleva doprava pásmový filtr, dlouhovlnný filtr a dichroické zrcadlo, které rozděljuje světelný svazek do dvou částí. Jednu propouští a druhou odráží na vlnové délce, která je pro filtr nastavena. Převzato a upraveno z [51].

#### 4.1.3 Monochromátor Jobin-YVON H20IR

Monochromátor využívá své optické soustavy k rozkladu světla podle vlnových délek. Světlo vstupuje do monochromátoru přes úzkou šterbinu a dále pokračuje na první ze dvou rovinných zrcadel, které jej odráží na konkávní optickou (též difrakční) mřížku. Světlo zde difraktuje díky periodické struktuře mřížky, kde se jednotlivé vlnové délky odrážejí méně nebo více. Natáčením mřížky můžeme tento posun zachytit a přes zrcadlo a druhý výstup z monochromátoru vybrat specifické pásy vlnových délek (viz obr. 17). Pomocí monochromátoru **Jobin-Yvon H20IR** si vybereme vlnovou délku 1274 nm, jakožto maximum emisního spektra singletního kyslíku ve vodě.



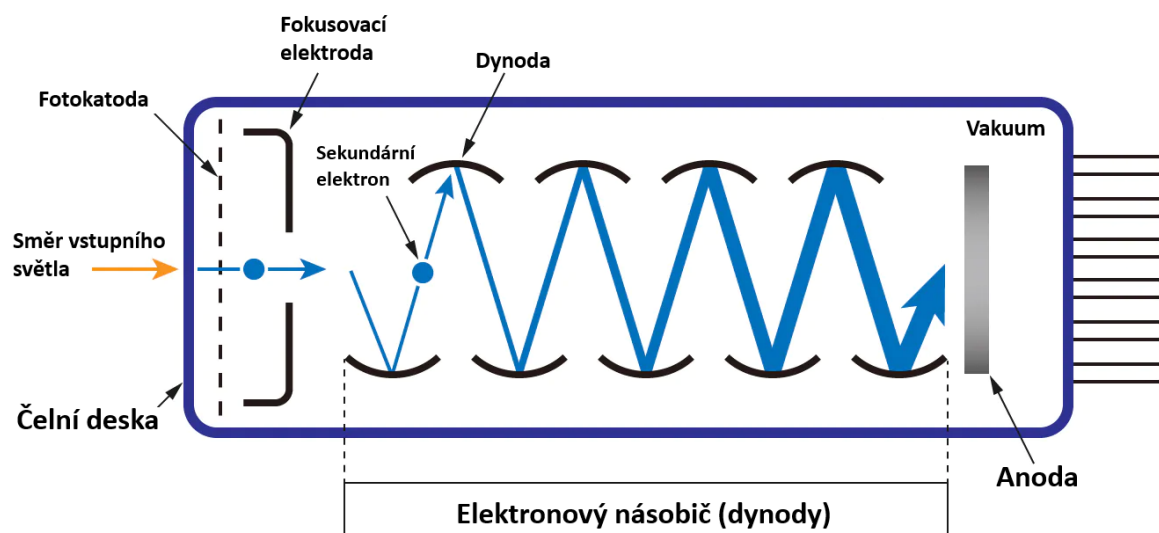
Obrázek 17: Světlo o různém profilu vlnových délek vstupuje do monochromátoru přes vstupní štěrbinu. Odráží se přes zrcadlo na optickou mřížku, kde se difraktuje. Difraktované světlo postupuje dále přes druhé zrcadlo do výstupní štěrbinu a tam světlo zachytáváme. **Nutno podotknout, že v našem monochromátoru máme konkávní difrakční mřížku a rovná zrcadla.** Převzato a upraveno z manuálu pro monochromátor H20.

#### 4.1.4 Fotonásobič Hamamatsu R9905

Fotonásobič nám zajišťuje zesílení slabého signálu z našeho vzorku, který prošel přes filtry a monochromátor. Fotonásobič využívá jevu, kdy za pomoci speciální polovodičové fotokatody (InP/InGaAsP) a elektrického pole ohneme valenční a vodivostní pásy katody tak, aby výstupní práce byla dostatečně nízká. To nám dovolí zaznamenat i fotony nižších frekvencí (tedy delší vlnové délky). Vzhledem k nízké výstupní práci se ale za pokojové teploty budou elektrony vyrážet z materiálu pouze tepelným pohybem (temný proud). Ty ale nebudou rozlišitelné od elektronů vyrážených fotoefektem. Velké množství termálních elektronů by mohlo fotonásobič poškodit a je proto důležité jej chladit. Náš fotonásobič byl před každým měřením pomalu ochlazován na  $-80^{\circ}\text{C}$  (ochlazování trvalo přibližně 3 hodiny).

Bylo taktéž potřeba dávat pozor na světlo ze zářivek a měřit výhradně za tmy v místnosti. Pokud bychom neměli chráněný vstup fotonásobiče závěrkou, fotonásobič by se dozajista nenávratně poškodil.

Vyražené elektrony putují postupně na každou z dynod uvnitř fotonásobiče, které zajišťují, že se signál mnohonásobně zesílí. V naší soustavě na měření těchto kinetik využíváme fotonásobič Hamamatsu R9905.



Obrázek 18: Světlo dopadá na katodu a vyráží elektron (fotoefekt). Takto vygenerovaný elektron je urychlován rozdílem napětí. Na každé dynodě vyrazí několik elektronů, které samostatně dál pokračují a každý z nich vyrazí další elektrony na následující dynodě. Anoda tento signál zachytí a posílá dál. Obrázek převzat a upraven z [52].

#### 4.1.5 Předzesilovač Becker&Hickl HF AC-26

Signál, který vychází z fotonásobiče, je ale pro čítač pořád slabý. Je potřeba ho zesílit přes předzesilovač, ze kterého signál vedeme dále do čítače.

#### 4.1.6 Časově rozlišený čítač Becker&Hickl MSA 300

Tento čítač umožňuje čítat signály s rozlišením až 5 ns na kanál, který nemá žádný mrtvý čas mezi sběrem signálu na kanálech [53]. Má rychlý sběr dat a počet čítaných signálů v jednom měření.

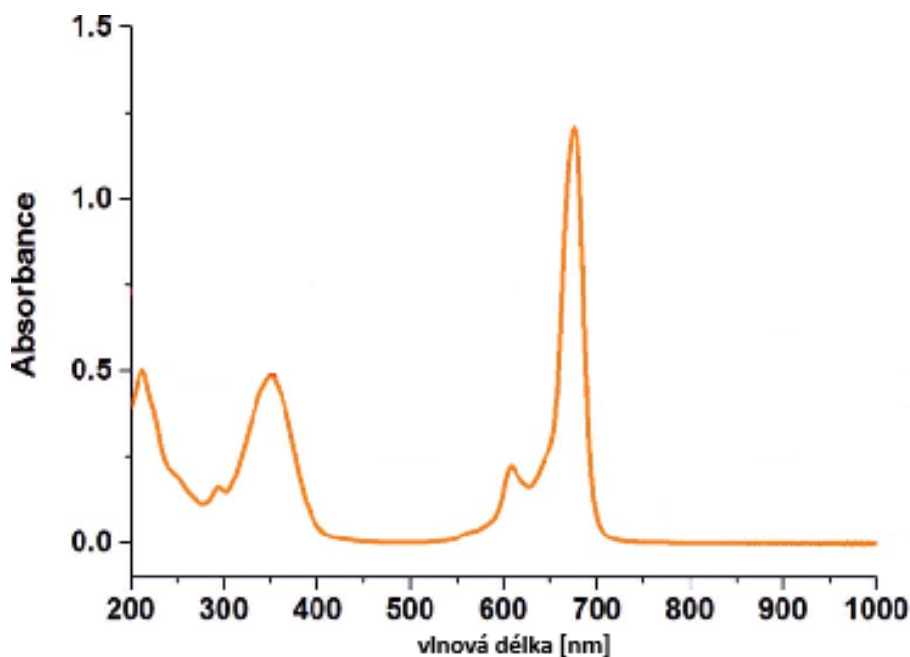
Triggerovací PIN dioda v této soustavě vystupuje jako synchronizační prvek pro signály z čítače a monochromátoru.

## 4.2 Měření absorpčních a fluorescenčních spekter

**Absorpční spektra** byla změřena na absorpčním spektrometru **Specord 250, Analytik Jena**. Spektrometr musí měnit zdroje světla pro měření absorpce v rozsahu od 200 nm do 800 nm, ve kterém jsme měřili. Tyto změny se pak projevují nespojitým průběhem absorpce na určitých vlnových délkách a ztěžují tak analýzu absorpčních spekter.

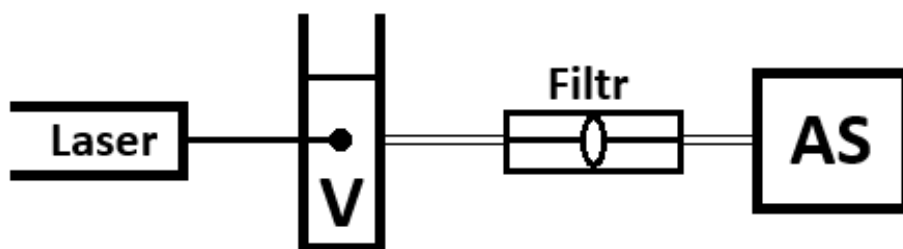
Co se týče riboflavinových vzorků, nebylo třeba měřit dál, riboflavin v infračerveném spektru neabsorbuje [54]. V našich měřeních se zaměříme převážně na absorpční pásy okolo 374 nm a 446 nm. Zbylé dva pásy 224 nm a 267 nm v UV oblasti taktéž budou oblastí zájmu.

Ftalocyanin také na delších vlnových délkách než 750 nm ve vodném roztoku neabsorbuje [55]. V tomto případě budeme pouze kontrolovat, aby se absorbance na daných vlnových délkách nijak neměnila, protože koncentrace ftalocyaninu ve vzorcích bude vždy stejná.



Obrázek 19: Absorpční spektrum AlPcS<sub>4</sub> ve vodném roztoku, převzato a upraveno z [55].

**Fluorescenční spektra** byla měřena na vláknovém spektrometru **Avantes Avaspec 2048** s počítačovým softwarem Avasoft verze 7 a 8. Každé z vytvořených spekter se měřilo od 300 nm do 800 nm. Na většinu měření jsme používali filtr o hraně 465 nm, k detailnějšímu prozkoumání efektů na kratších vlnových délkách jsme ale pro poslední měření použili filtr o hraně 425 nm. Před vlnovou délkou filtrů vidíme signál laseru, proto jsou všechna data uříznuta dle používaného filtru. Data byla nutno opravit o spektrální citlivost a kalibraci jednotlivých filtrů. V tomto měření jsme excitovali vzorek na vlnové délce 405 nm výkonem 15 mW pomocí diodového laseru Roithner.



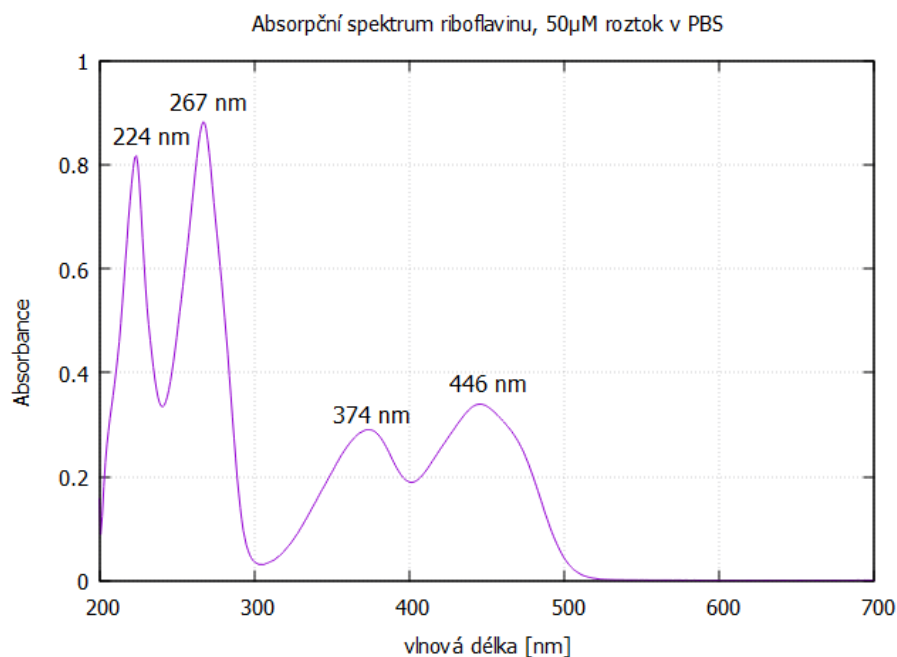
Obrázek 20: Zjednodušená struktura aparatury pro měření fluorescenčních spekter; Laserovým svazkem excitujeme vzorek (**V**). Signál fluorescence vedeme světlovody přes filtr (**F**) (> 425 nm nebo > 465 nm). Tento odfiltrovaný signál putuje do spektrometru (**AS**).

## 5 Výsledky

Kvůli množství naměřených dat bude používána následná nomenklatura pro lepší přehlednost, kde **experimentem** budeme označovat všechna měření absorpcí, fluorescencí nebo kinetik  $^1\text{O}_2$  provedených v daný den, **sadou měření** budeme označovat měření 10 kinetik  $^1\text{O}_2$ , **měřením / kinetikou** se budou myslet jednotlivá data (data pro jedno spektrum absorpce, fluorescence nebo jednu kinetiku) během daného experimentu.

### 5.1 Absorpční spektra

#### 5.1.1 Absorpční spektrum riboflavinu v PBS

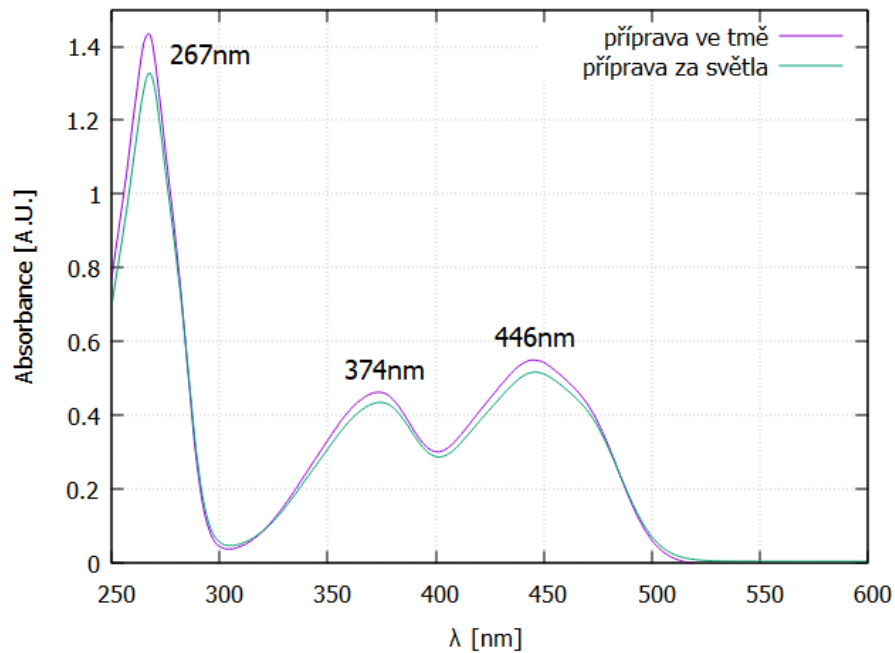


Obrázek 21: Absorpční spektrum riboflavinu, 50 μM roztok RF v PBS.

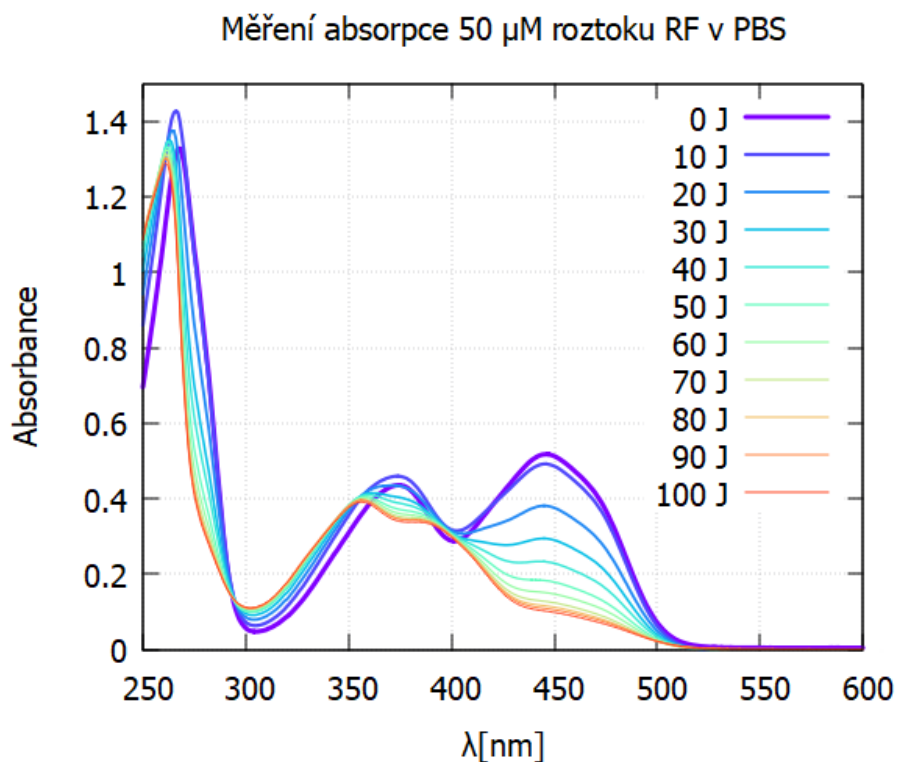
Jakožto jednu z fotofyzikálních vlastností riboflavinu jsme určovali jeho absorpční spektrum. Roztok RF má žluto oranžovou barvu, a proto budeme očekávat jeho absorpční vlastnosti především v modrých vlnových délkách. Riboflavin a jeho absorpční pásy (viz. obrázek č. 21) jsou především v modrých vlnových délkách s maximy dvou hlavních pásů na  $\lambda_1 = 446 \text{ nm}$  a  $\lambda_2 = 374 \text{ nm}$ . Jeho absorpční spektrum zasahuje i do UV oblasti, zde opět vidíme dva pásy na vlnových délkách  $\lambda_3 = 267 \text{ nm}$  a  $\lambda_4 = 224 \text{ nm}$ .

Během dvou let se naměřilo velké množství dat pro absorpci RF stejně tak jako pro další zkoumané vlastnosti (fluorescence a kinetiky). Všechna naměřená data absorpce RF se shodovala s naměřeným absorpčním spektrem na obrázku č. 21, které odpovídá riboflavinu v PBS roztoku připraveném v temném prostředí. Příprava bez světla je zde důležitým krokem, protože riboflavin prochází na světle fotochemickou změnou. I když příprava na světle netrvala nikdy déle než 30 min (navážení vzorku, rozpuštění v ultrazvukové lázni), je tento rozdíl přípravy ve tmě a na světle znatelný (viz obr. 22). I za těchto 30 min na denním světle lze vidět, že absorpce riboflavinu v hlavních absorpčních pásech poklesla. Porovnání přípravy za tmy a na světle můžeme vidět i na obrázcích č. 23 a č. 24, kde vidíme i vliv dodání energie z laserových pulsů. První absorpční spektrum (0 J dodané

energie) na obrázku č. 23 je v jednom z hlavních absorpčních pásů (373 nm) slabší než následující (10 J dodané energie) měření absorpce.

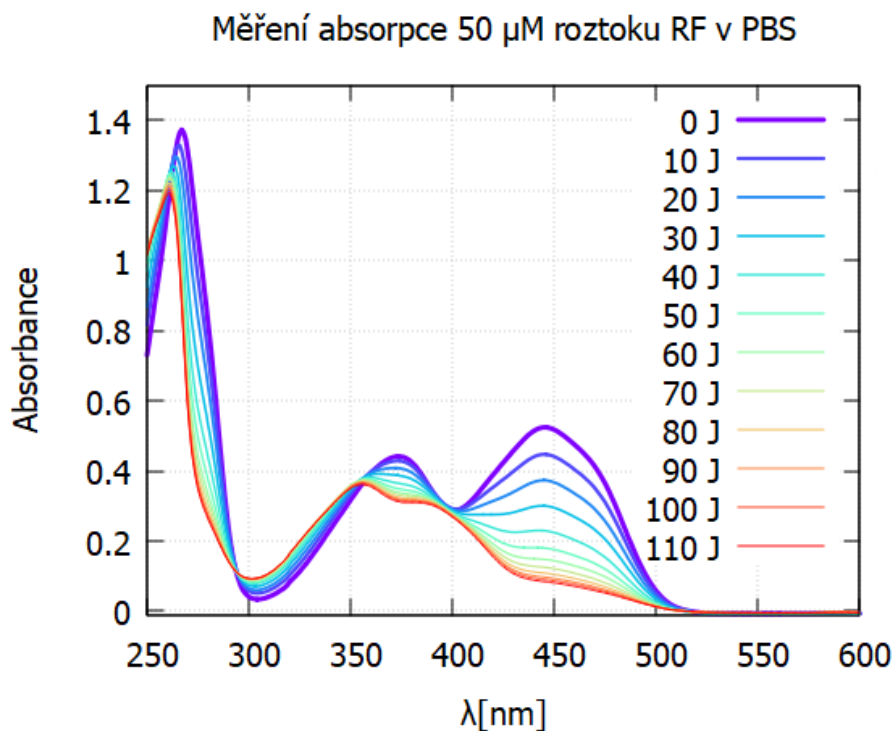


Obrázek 22: Rozdíly v absorbanci, pokud se 50 μM roztok RF připravuje ve tmě a na světle.



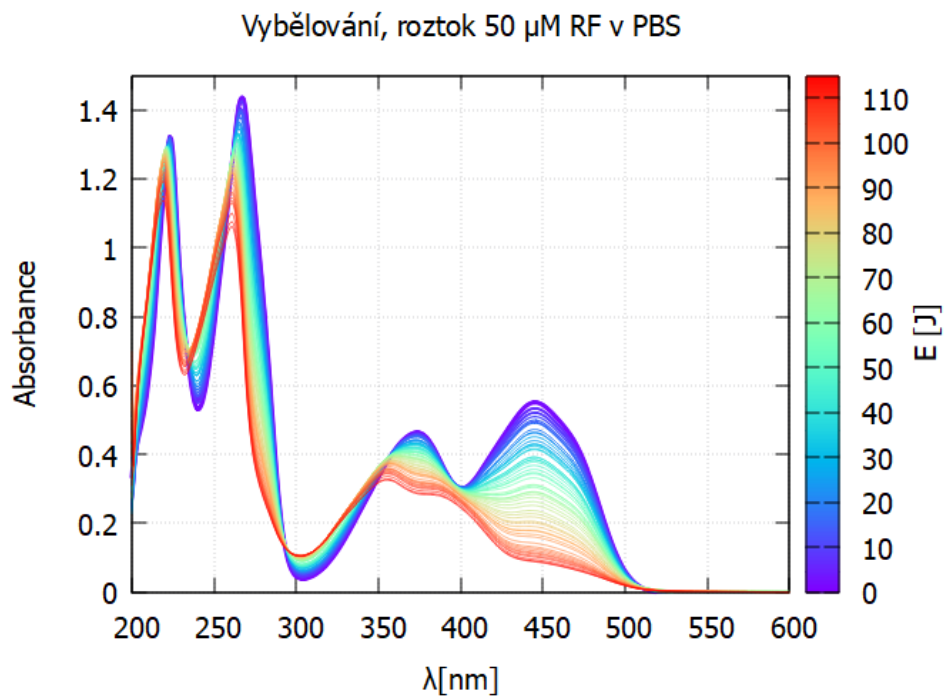
Obrázek 23: Absorpční spektrum 50 μM roztoku RF v PBS, vzorek byl připravován a přenášen za **světla**.



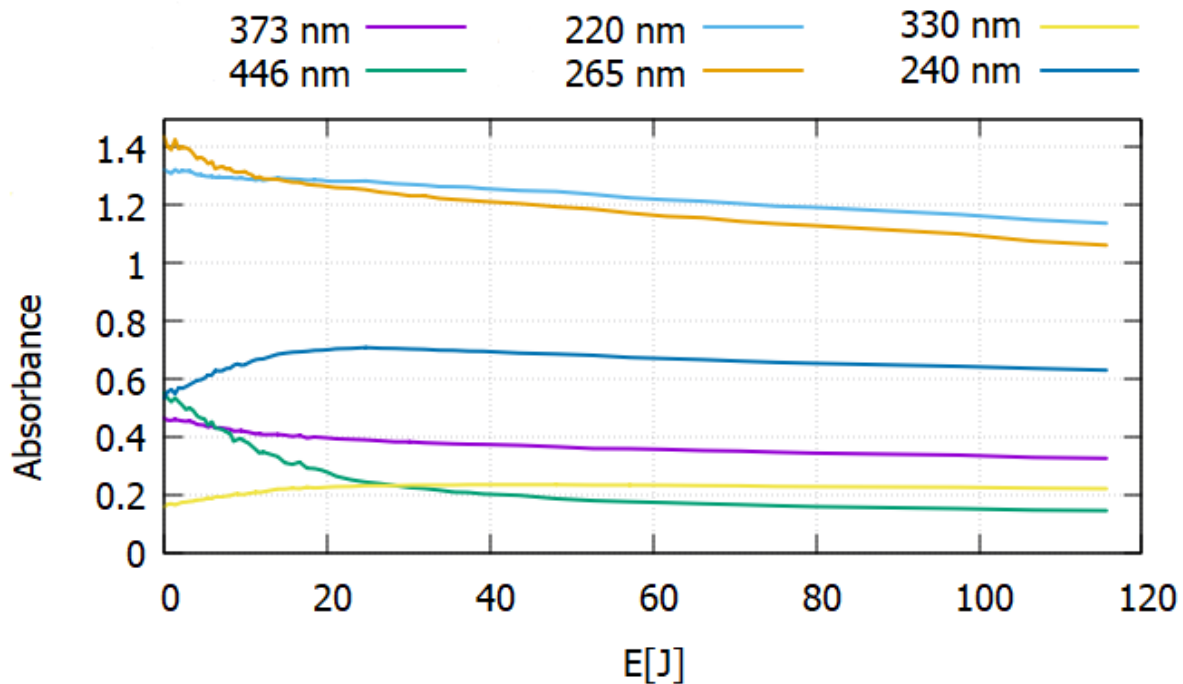


Obrázek 24: Absorpční spektrum 50  $\mu\text{M}$  roztoku RF v PBS, vzorek byl připravován a přenášen za **tmy**.

Měřili jsme i změnu absorpčních pásů RF v závislosti na době ozáření laserovými pulsy a kontinuálním laserem. Po změření počátečního absorpčního spektra jsme 50  $\mu\text{M}$  roztok RF umístili do držáku, kde jsme do něj svítili 15 mW laserem o excitační vlnové délce 405 nm. Po 30 s dlouhé expozici jsme vzorku změřili absorpční spektrum znovu. Toto měření jsme opakovali 30x, potom jsme prodloužili délku expozice na 60 s, protože absorpční spektrum se začalo měnit pomaleji. Bylo tedy potřeba zvýšit dodanou energii do vzorku a lépe tak pozorovat změnu absorpčních pásů. Po dalších 10 měření jsme zvýšili expozici na 2 min, od 51. měření jsme prodloužili expozici na 5 min. Poslední 3 měření měla expozici 10 min, přestali jsme ale pozorovat zásadní změny v absorpčních pásech a další spektra jsme už neměřili. Vývoj spekter v závislosti na dodané energii vidíme na obrázku č. 25. Kvůli přehlednosti na obrázku je vyobrazeno pouze každé třetí měření. I tak vidíme pár zajímavých skutečností. Absorpční pásy na vlnové délce okolo 221 nm a 265 nm vlivem fotodegradace ztrácí na své absorbanci a posunují se do kratších vlnových délek. Maximum prvního absorpčního pásu se posunulo z 223 nm na 219 nm, u druhého absorpčního pásu to bylo z 267 nm na 261 nm. Zajímavější část spektra byla okolo 240 nm, kde toto lokální absorpční minimum se taktéž posunovalo do kratších vlnových délek přes sedlový bod. Jak lze vidět na obrázku č. 26, absorpce na tomto minimum byla maximální na vlnové délce 236 nm při dodání 24,75 J.



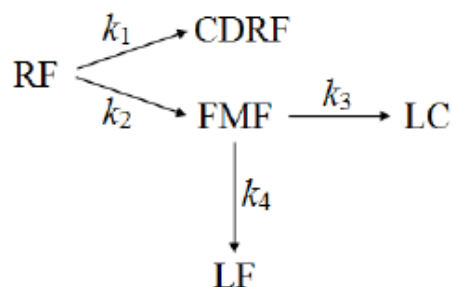
Obrázek 25: Změna absorpčního spektra RF v závislosti na dodané energii, vybělování (bleaching).



Obrázek 26: Změna absorpce na jednotlivých vlnových délkách pro vybělování roztoku RF.

### 5.1.2 Faktorová analýza absorpčních spekter v PBS

Některé sady absorpčních spekter během vybělování jsme analyzovali faktorovou analýzou (FA)<sup>17</sup>. Existují až 3 hlavní, 1 vedlejší a 4 minoritní fotoproducty. Formylmethylflavin (FMF), lumiflavin (LF, vznikající při neutrálních a alkalických podmínkách) a lumichrom (LC, vznikající při kyselých, neutrálních a alkalických podmínkách) jsou tři hlavní fotoproducty [58], [56]. Následuje cyklodehydridoriboflavin (CDRF) (viz obr. 27), který se ale tvoří pouze za přítomnosti divalentních aniontů (například  $\text{HPO}_4^{2-}$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ ). Absorpční spektrum těchto fotoproductů lze vidět na obrázcích č. 67 a č. 68. Další minoritní produkty jsou například karboxymethylflavin (CMF), 2,3-butandion, quinoxalinová karboxylová kyselina<sup>18</sup> a dioxoquinoxalin<sup>19</sup>. Identifikace těchto fotoproductů ale musí proběhnout přes analytické metody (jako je třeba chromatografie, multikomponentní spektrometrické metody), na které jsme neměli dostatek času.



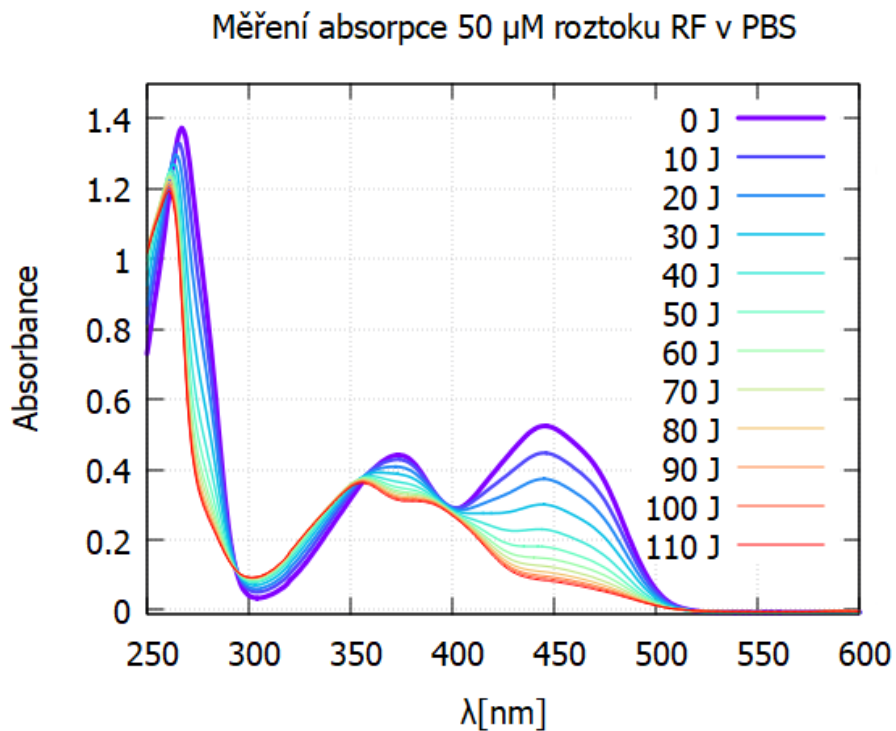
Obrázek 27: Fotodegradace RF v neutrálním roztoku za přítomnosti divalentních aniontů (například  $\text{HPO}_4^{2-}$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ ) za tvorby fotoproductů. Převzato z [56].

Nejprve byla provedena FA na sadě 11 absorpčních spekter 50  $\mu\text{M}$  roztoku RF v PBS vždy po 10 J expozice (viz graf č. 28). Výsledkem FA byla dvě spektra, které jsme přiřadili čistému RF a fotoproductu (viz obr. č. 29). Vývoj podílu těchto dvou složek potom vidíme na obrázku 30.

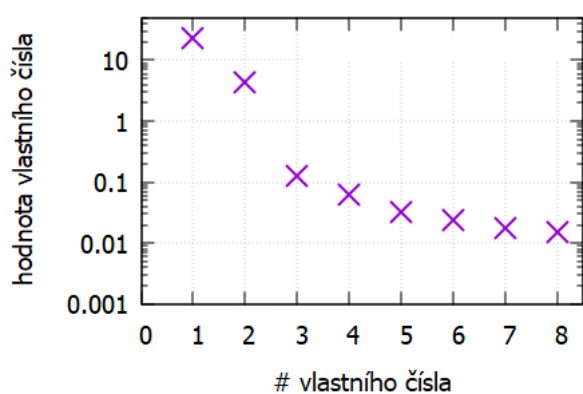
<sup>17</sup>Děkuji RNDr. Václavu Profantovi, Ph.D. za zprostředkování a konzultace a Mgr. Janu Palackému, Ph.D za poskytnutí softwaru k faktorové analýze [57].

<sup>18</sup>Zkratka KA, chemický název - 1,2-dihydro-1-methyl-2-keto-3-quinoxalinová karboxylová kyselina. Tvoří se hydrolytickým štěpením isoaloxazinového jádra v alkalickém prostředí [59].

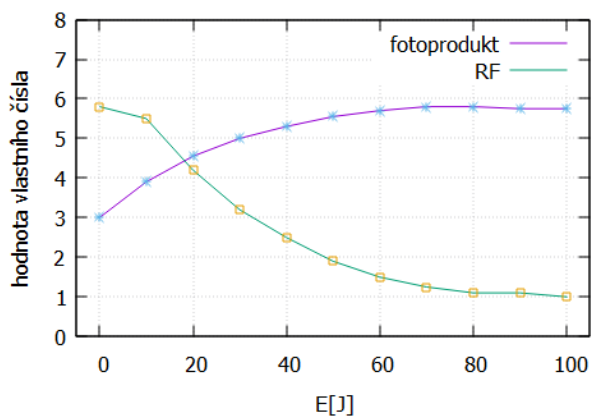
<sup>19</sup>Zkratka DQA, chemický název 1,2,3,4-tetrahydro-1-methyl-2,3-dioxo-quinoxalin. Podmínky vytvoření stejné jak pro KA



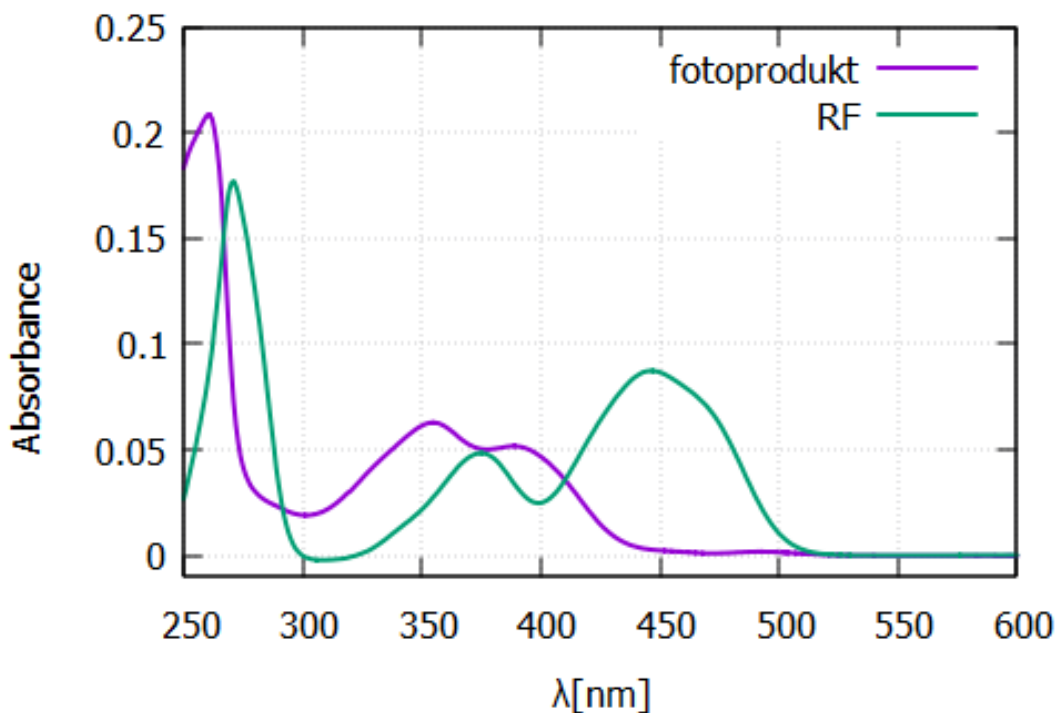
Obrázek 28: Absorpční spektra roztoku 50  $\mu\text{M}$  RF v PBS, mícháno ve tmě.



Obrázek 29: Vlastní čísla získaná z faktorové analýzy absorpčního spektra 28 v 2. experimentu (obrázek č. 28)

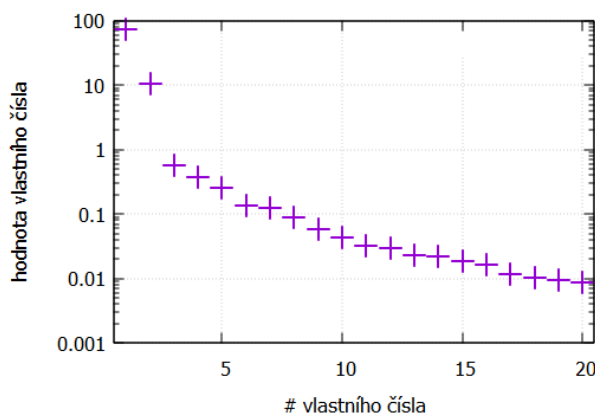


Obrázek 30: Průběh podílů složek směsi z 2. experimentu během vybělování RF (obrázek č. 28)

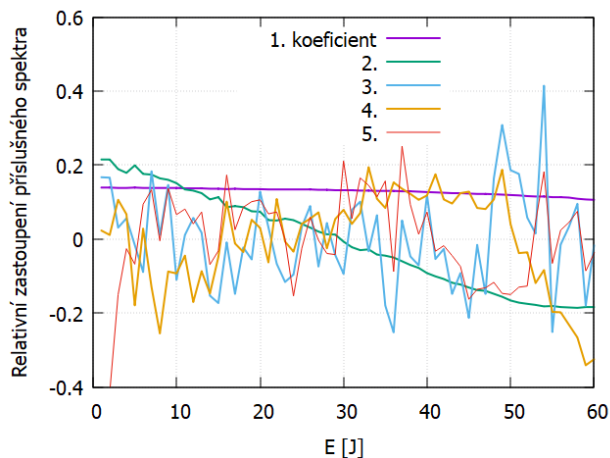


Obrázek 31: Spektra RF a fotoproduktu získaná z FA 2. experimentu (obrázek č. 28)

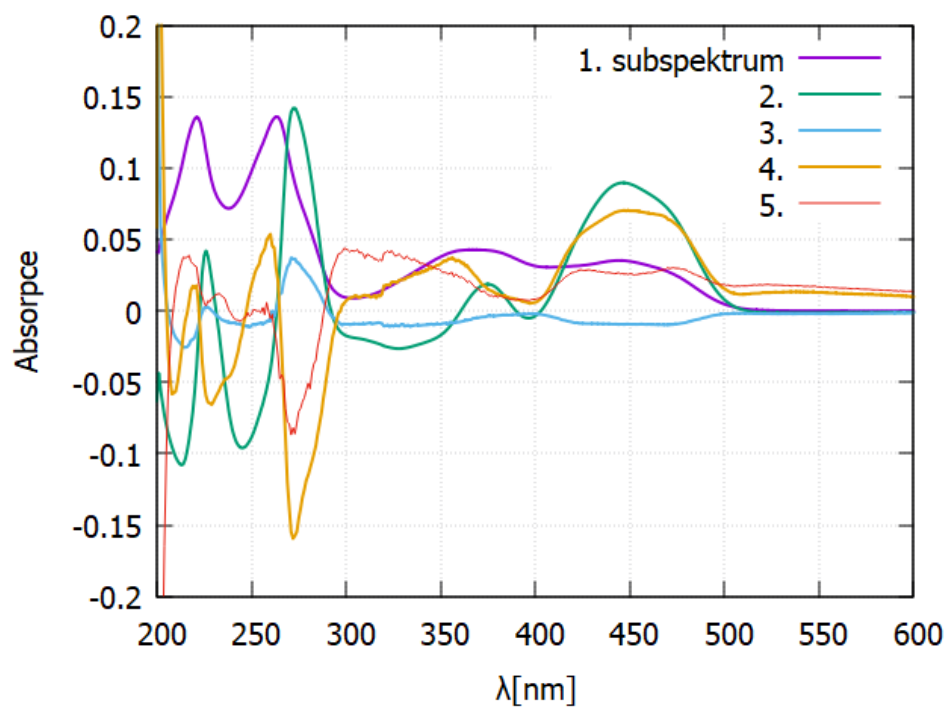
Další faktorová analýza, provedena ve 4. experimentu a z 60 spekter, nám ukázala několik zásadních věcí. Počet produktů z fotodegradace RF vzrostl až na 4. Hodnoty vlastních čísel vidíme na obrázku č. 32. Šesté vlastní číslo, stejně tak jako další vyšší vlastní čísla, mají hodnotu velmi malou a nebudeme je proto uvádět. To stejné lze vidět na grafu č. 32. Prvních 5 subspekter vidíme na obrázku č. 34. Už 3. průběh koeficientu je velmi zašuměný (viz. graf č. 33) a od 6. průběhu koeficientu je chování téměř náhodné (data nejsou ukázána).



Obrázek 32: Vlastní čísla získaná z faktorové analýzy 4. experimentu absorpčního spektra z obrázku č. 25



Obrázek 33: Průběh podílů složek směsi v 4. experimentu vybělování roztoku RF

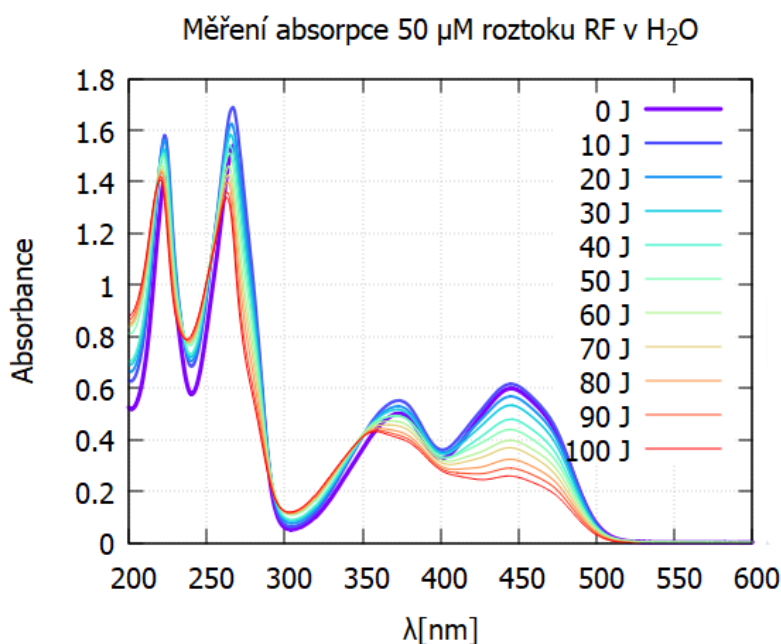


Obrázek 34: Subspektra získaná z FA spekter z 4. experimentu (viz obrázek č. 25)

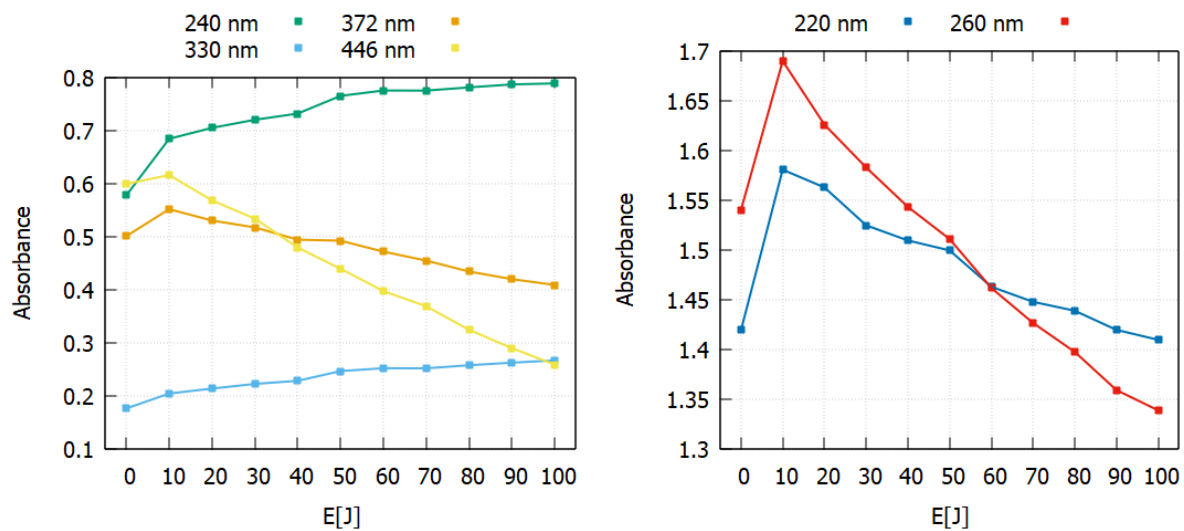
### 5.1.3 Absorpční spektrum RF v H<sub>2</sub>O

V dalším měření jsme zkoumali fotodegradaci riboflavinu v čisté vodě, tedy bez přítomnosti fosfátových iontů. Jak lze vidět na grafu č. 35 vybělování RF ve vodě v porovnání s grafem č. 25, vidíme velký rozdíl na absorpčním pásu 446 nm. Ve vodě se tento pás vyběluje podstatně pomaleji než v PBS.

Vidíme taktéž, že se měření absorpčního spektra před dodáním energie do vzorku vymyká předpokládanému chování na všech 4 absorpčních pásích. Očekávali bychom, že absorpční spektrum bude s dodanou energií klesat, tedy vzorek se bude vybělovat. V tomto případě ale po dodání 10 J energie do vzorku absorpční spektrum vzrostlo skoro v celém pásu vlnových délek. Jediná dvě místa, kde se absorpční spektrum chová podle předpokladů, je část mezi 300 nm a 330 nm a samotné pozadí (od ~520 nm). Všude jinde bychom čekali, že bude absorpce zhruba o 10 -15% větší. Vzorek jsme nijak během měření neupravovali a byl připravený za tmy. Pozadí absorpčního spektrometru je díky nulovosti absorpčního spektra nad 520 nm správně naměřeno. Opět můžeme pozorovat neočekávané chování v absorpčních hodnotách okolo dodané energie 50 J na vlnových délkách 220 nm, 240 nm, 260 nm, 330 nm a 372 nm (grafy č. 36).



Obrázek 35: Změna absorpčního spektra 50  $\mu$ M roztoku RF v H<sub>2</sub>O v závislosti na dodané energii na daných vlnových délkách. Vzorek je připravený za světla.



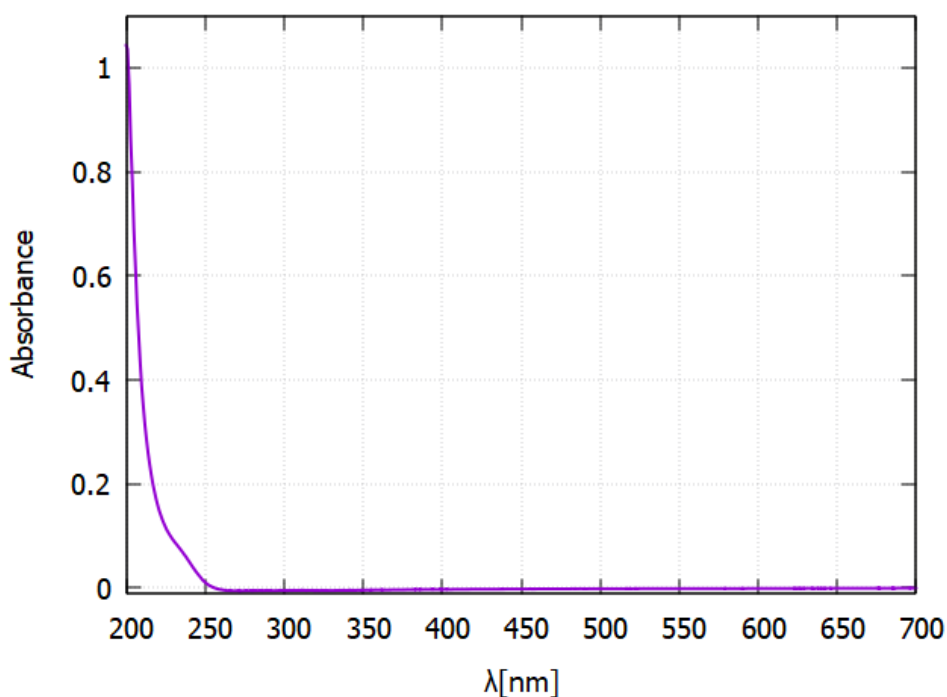
Obrázek 36: Postup změn absorpce během vybělování 50  $\mu\text{M}$  roztoku RF v  $\text{H}_2\text{O}$  na daných vlnových délkách. Pro pásy 220 nm, 240 nm a 260 nm je vlnová délka jen přibližná, vynášely se hodnoty absorpance pro maxima a minima v těchto oblastech. Jak lze vidět v obrázku č. 35, maxima a minima okolo daných vlnových délkách se posouvají.



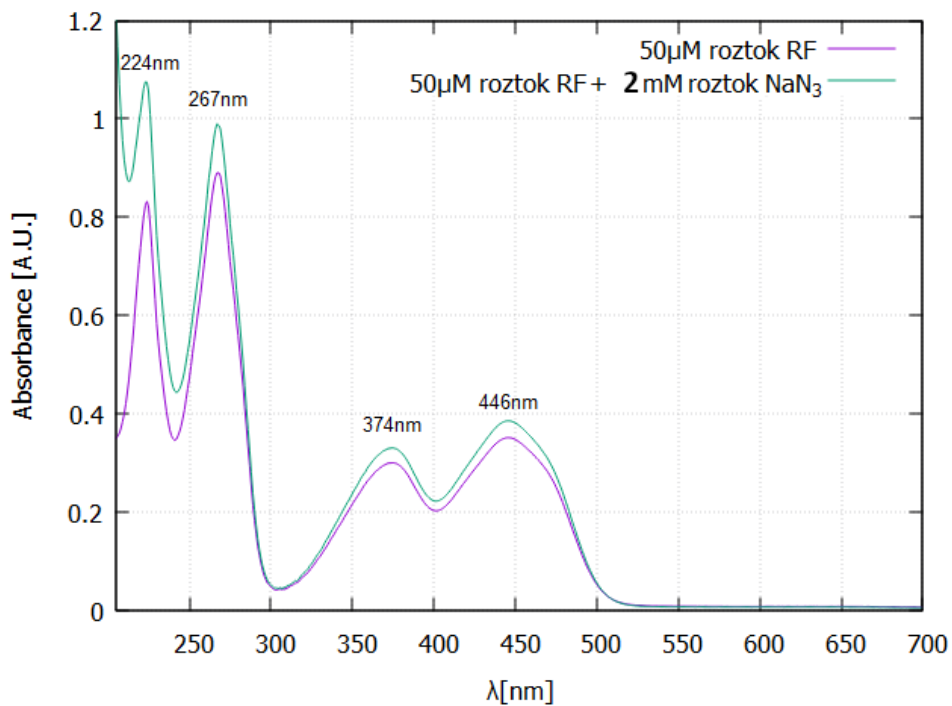
#### 5.1.4 Absorpční spektrum RF + NaN<sub>3</sub> v PBS

V diplomové práci zkoumáme vliv azidu sodného (NaN<sub>3</sub>) na fotodegradaci RF. Azid sodný díky svému vlastnímu absorpčnímu spektru zvyšuje absorpci v UV části spektra, kde je absorpce roztoku RF + NaN<sub>3</sub> oproti RF až dvojnásobná [60, Strana 24] (viz obr. 37). NaN<sub>3</sub> však už od 270 nm neabsorbuje, a proto zvýšení hodnot absorpce ve viditelných pásech (i maximum na hodnotě 267 nm) není způsobeno jeho absorpcí.

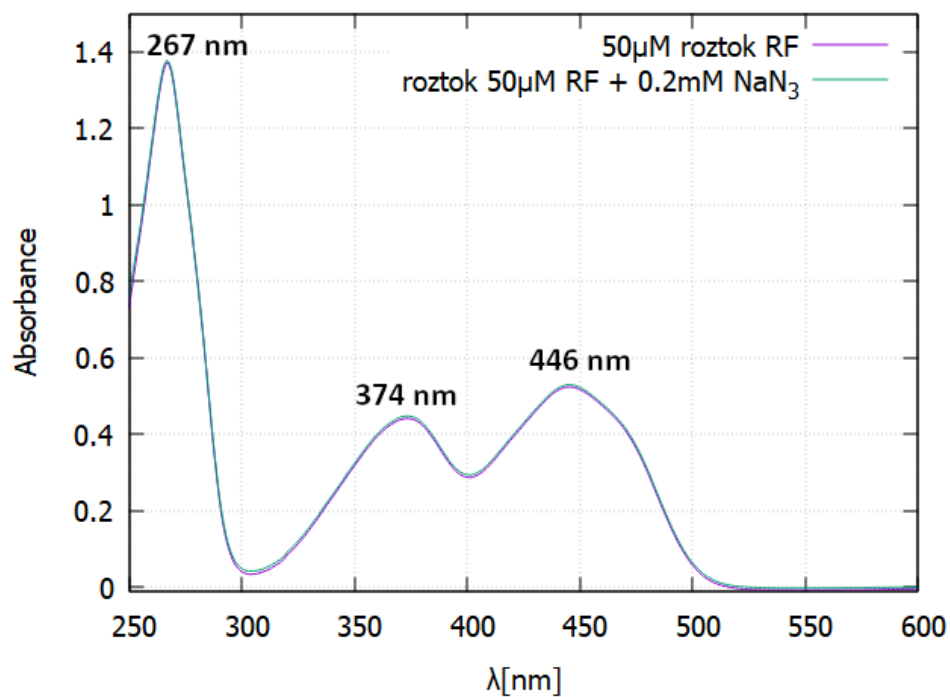
Byla také měřena změna absorpčního spektra v závislosti na energii dodané do vzorku. Absorpční spektrum jednotlivých měření na vlnové délce 446 nm se chová zprvu lineárně, ke konci absorpce klesá pomaleji (obr. 41). Na všech vlnových délkách vidíme změnu v absorpci pro 50 J dodané energie, kdy se objevuje inflexní bod pro absorpční křivky.



Obrázek 37: Absorpční spektrum roztoku 0,2 mM NaN<sub>3</sub> v PBS.

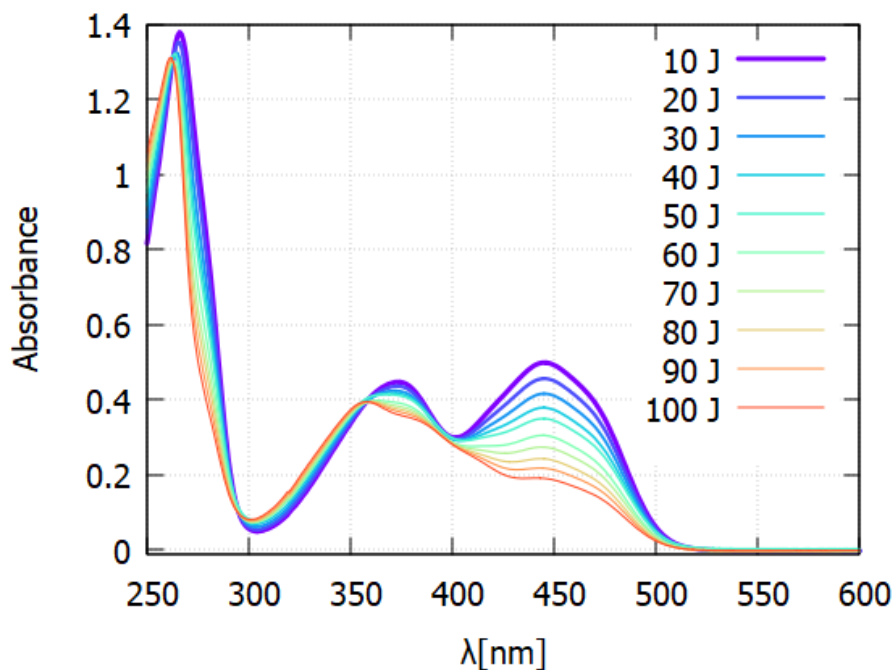


Obrázek 38: Porovnání 50  $\mu$ M roztoku RF v PBS a roztoku 50  $\mu$ M RF + 2 mM NaN<sub>3</sub> v PBS, příprava obou vzorků probíhala za světla.

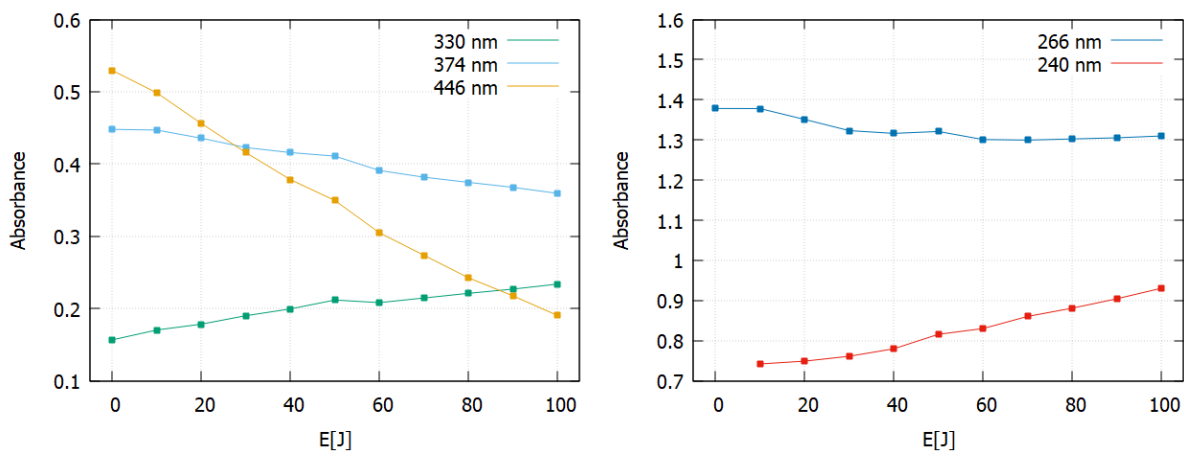


Obrázek 39: Porovnání 50  $\mu$ M roztoku RF v PBS a roztoku 50  $\mu$ M RF + 0,2 mM NaN<sub>3</sub> v PBS, příprava obou vzorků probíhala za tmy.

Měření absorpce roztoku  $50 \mu\text{M}$  RF +  $0,2 \text{ mM}$   $\text{NaN}_3$  v PBS



Obrázek 40: Absorpční spektrum  $50 \mu\text{M}$  roztoku RF +  $0,2 \text{ mM}$   $\text{NaN}_3$  v PBS v závislosti na dodané energii do vzorku.



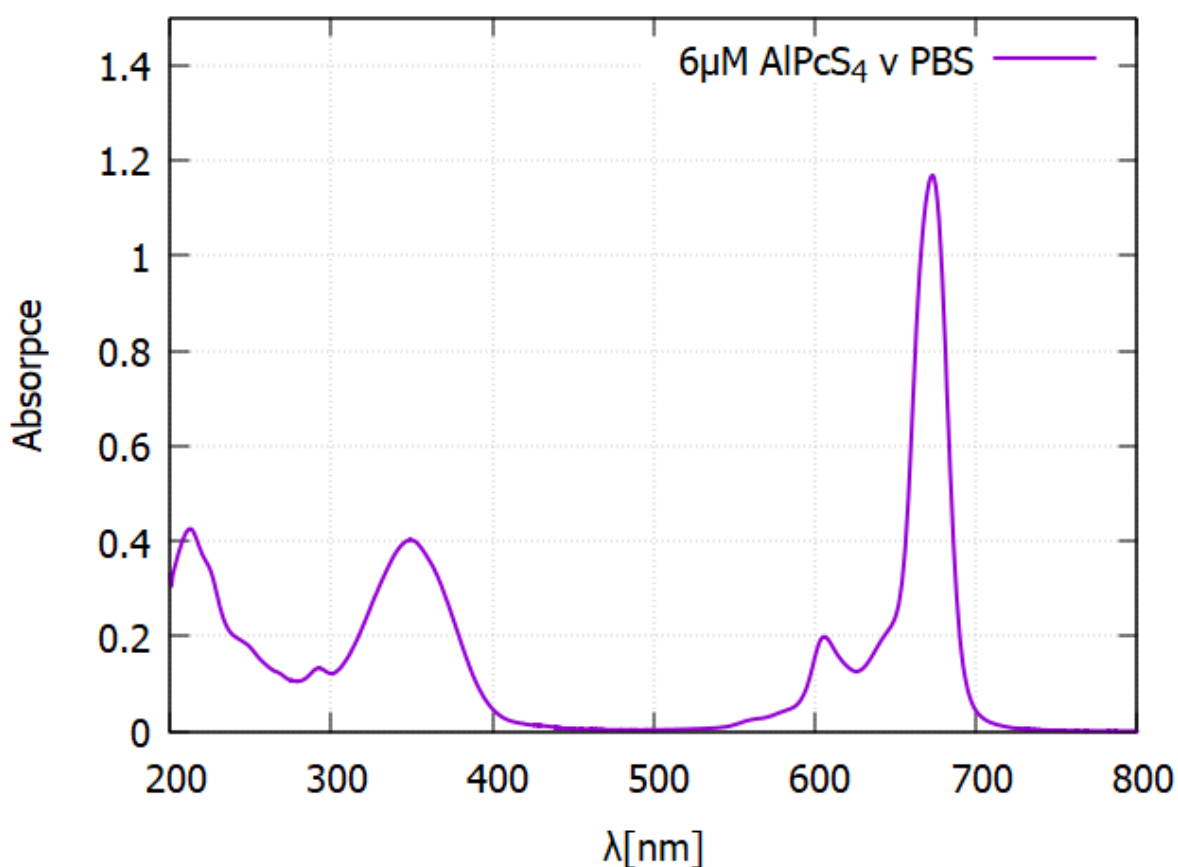
Obrázek 41: Postup změn absorpce během vybělování roztoku  $50 \mu\text{M}$  RF +  $0,2 \text{ mM}$   $\text{NaN}_3$  na daných vlnových délkách. Pro vlnovou délku 266 nm je hodnota přibližná, vynášely se totiž hodnoty absorpce pro maxima v této oblasti. Jak lze vidět v obrázku 40, maxima a minima okolo daných vlnových délek se posouvají. Data pro 0 J na vlnové délce 240 nm nebyla změřená.

### 5.1.5 Absorpční spektrum RF + AlPcS<sub>4</sub> v PBS

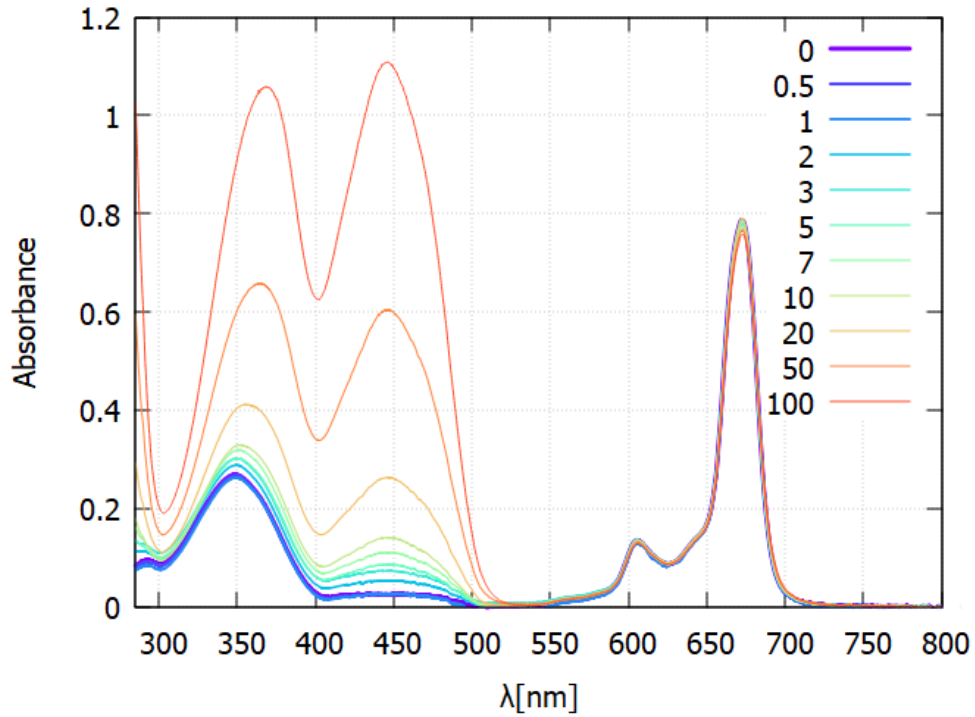
Pro ověření kvality materiálu bylo nejdříve změřeno absorpční spektrum 5  $\mu\text{M}$  roztoku AlPcS<sub>4</sub> v PBS (obrázek č. 42).

Přesnost míchání vzorků RF a AlPcS<sub>4</sub> jsme ověřovali měřením všech absorpčních spekter. Tato spektra poukazují na případnou možnost interakce RF a AlPcS<sub>4</sub>. Při prvních dvou experimentech jsme míchali vzorek podle tabulky č. 2, na posledním, 3. experimentu, jsme vzorky míchali dle tabulky č. 3. Bylo to kvůli nízké reprodukovatelnosti pipetace malých objemů vzorku. Koncentrace AlPcS<sub>4</sub> byla tak každé měření s velkou chybou jiná (obrázek č. 43 vs. obrázek č. 47)

Zatímco absorbance RF rostla lineárně s jeho koncentrací, rozdíly v absorpci AlPcS<sub>4</sub> pozorovat lze. Objevuje se pokles a narůst absorpce AlPcS<sub>4</sub> na vlnových délkách 670 nm a 690 nm s rostoucí koncentrací RF.

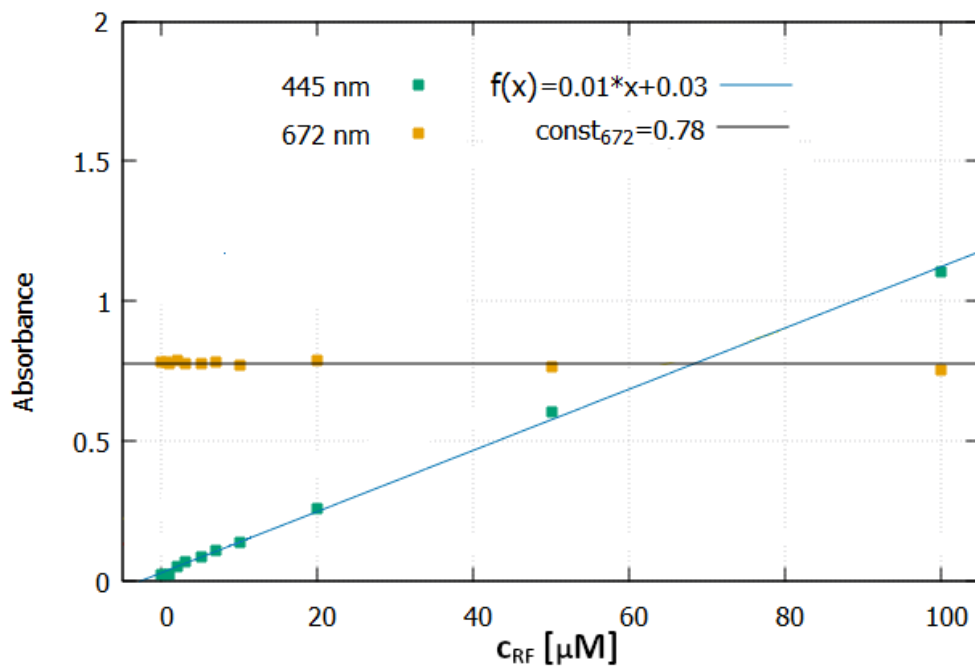


Obrázek 42: Absorpční spektrum 6  $\mu\text{M}$  roztoku AlPcS<sub>4</sub>.

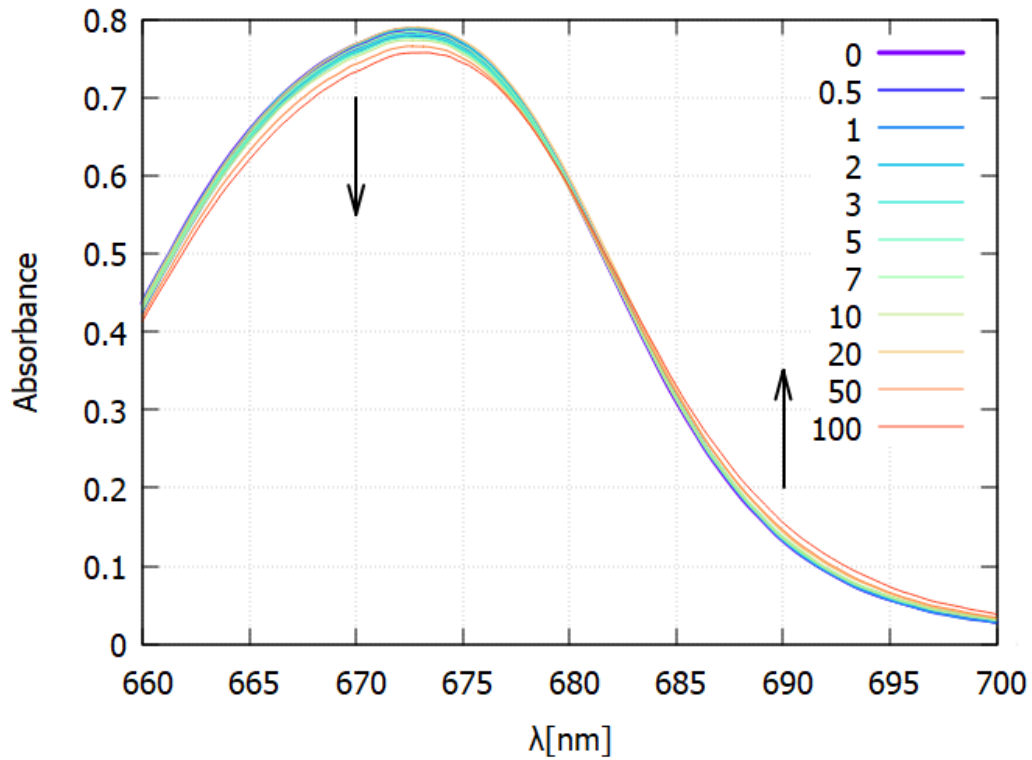


Obrázek 43: Absorpční spektrum roztoku 5  $\mu\text{M}$  AlPcS<sub>4</sub> a RF s různými koncentracemi, 3. experiment.

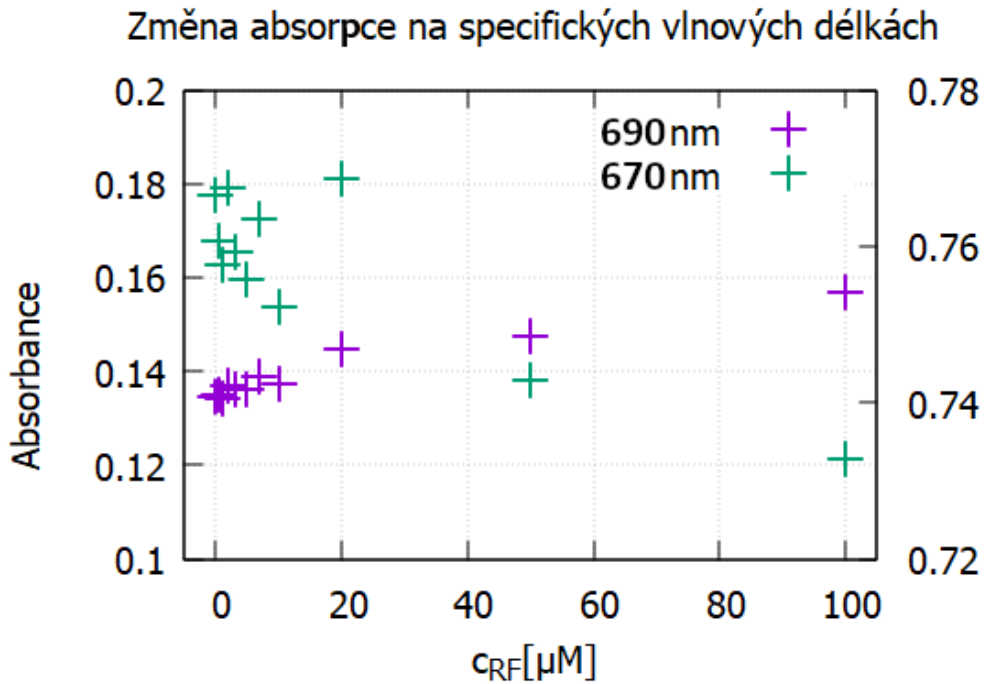
**Změna absorpce na jednotlivých vlnových délkách, 4. experiment**



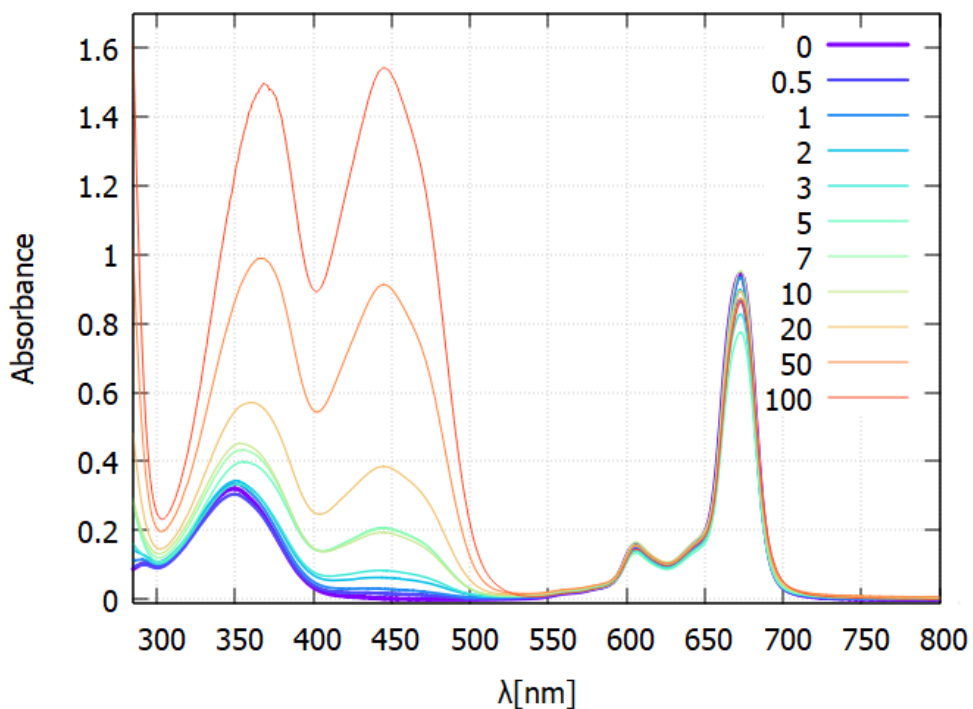
Obrázek 44: Změna absorpce roztoku 50  $\mu\text{M}$  RF + 5  $\mu\text{M}$  AlPcS<sub>4</sub> na vlnových délkách 445 nm a 672 nm, 3. experiment.



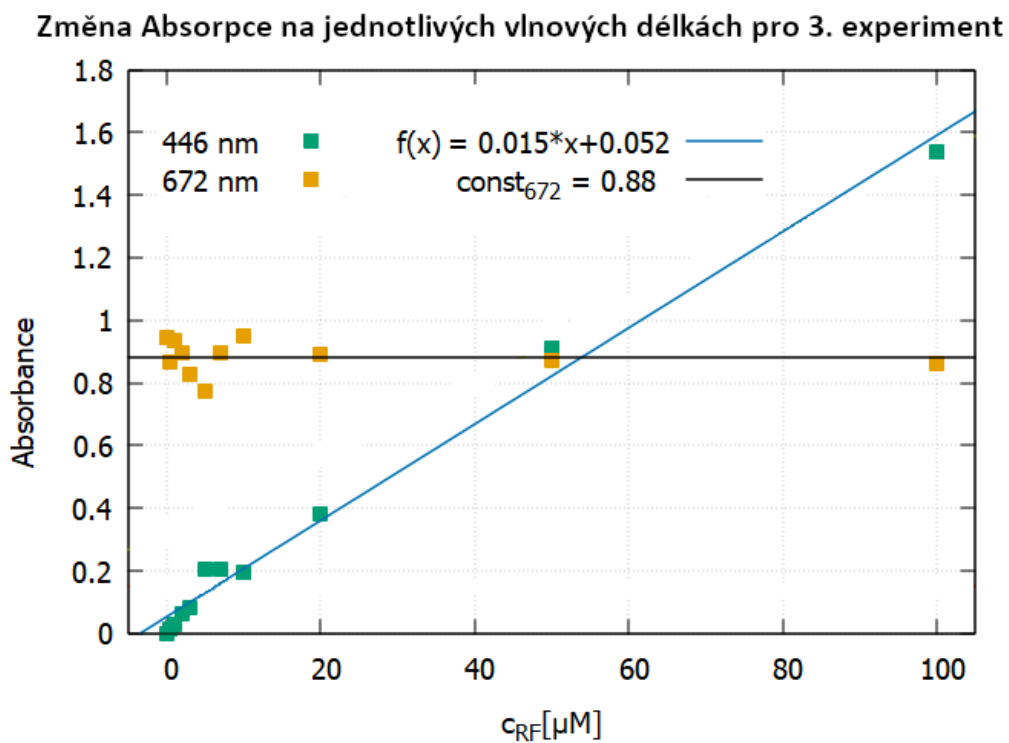
Obrázek 45: Detail absorpčního pásu na vlnové délce 673 nm pro 3. experiment (graf č. 44). Ukázka nárůstu a poklesu absorpce na 670 nm a 690 nm v hlavním absorpčním pásu AIPcS<sub>4</sub>.



Obrázek 46: Změna absorpce pro 3. experiment (graf č. 44) na vlnových délkách 670 nm a 690 nm.



Obrázek 47: Absorpční spektrum roztoku 5  $\mu\text{M}$  ftalocyaninu s různými koncentracemi RF, 2. experiment.



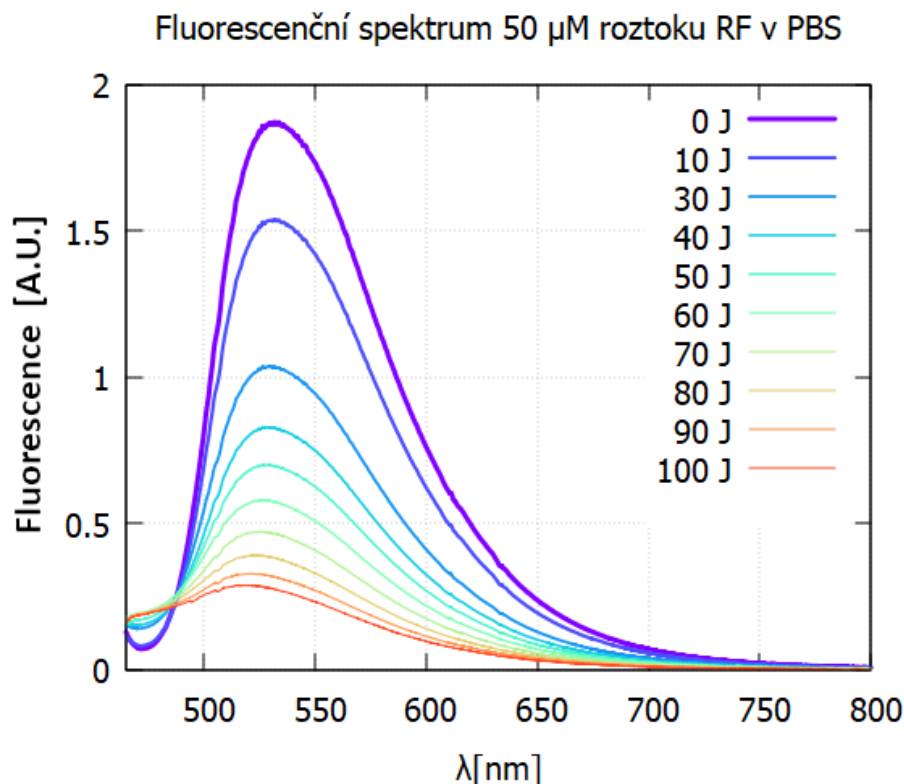
Obrázek 48: Změna absorpce absorpčního spektra roztoku 50  $\mu\text{M}$  RF + 5  $\mu\text{M}$  ftalocyaninu, 2. experiment, na vlnových délkách 445 nm a 672 nm.

## 5.2 Fluorescenční spektra

### 5.2.1 Fluorescenční spektra RF

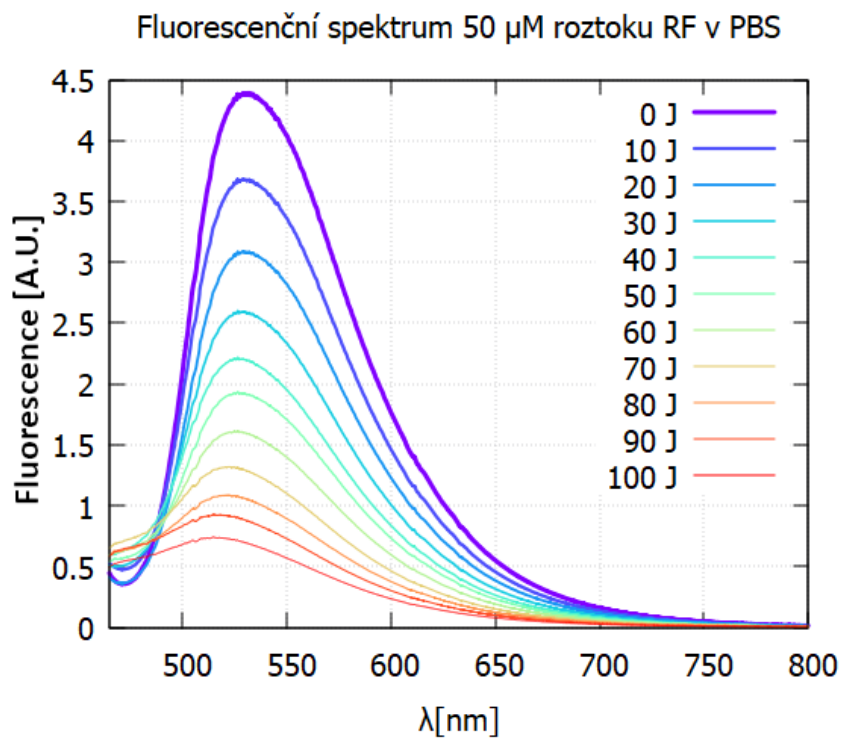
Fluorescenční spektra 50  $\mu\text{M}$  roztoku RF v PBS jsme po změření museli upravit na spektrální citlivost přístroje.

V experimentu měření fluorescence RF v PBS můžeme pozorovat jistý efekt. Vidíme, že jak se maximum na 530 nm postupně vyběluje, fluorescenční spektrum roste na vlnové délce okolo 472 nm. Jelikož přístroj ale neměřil přesně a fluorescenční spektra měnily své amplitudy, nemůžeme říct, zda-li je tato změna lineární, jestli je vůbec lineární, nebo se změna spektra při určité energii změní a bude naopak klesat. V důsledku technických problémů počítače během měření fluorescence v tomto experimentu docházelo ke změnám integrační doby detektoru, proto hodnoty fluorescence nepředvídatelně kolísaly (viz obrázek č. 51). Chyby způsobené tímto efektem jsme se pokusili opravit (obrázek č. 49 a č. 50)

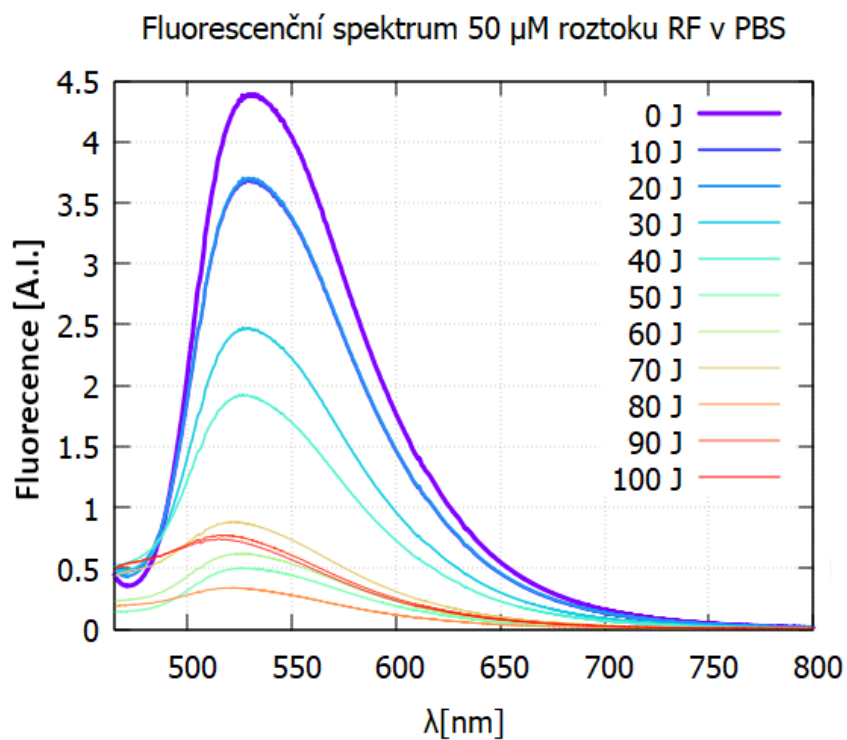


Obrázek 49: Fluorescenční spektrum 50  $\mu\text{M}$  roztoku RF v PBS, 3. experiment, 23. 11. 2022.

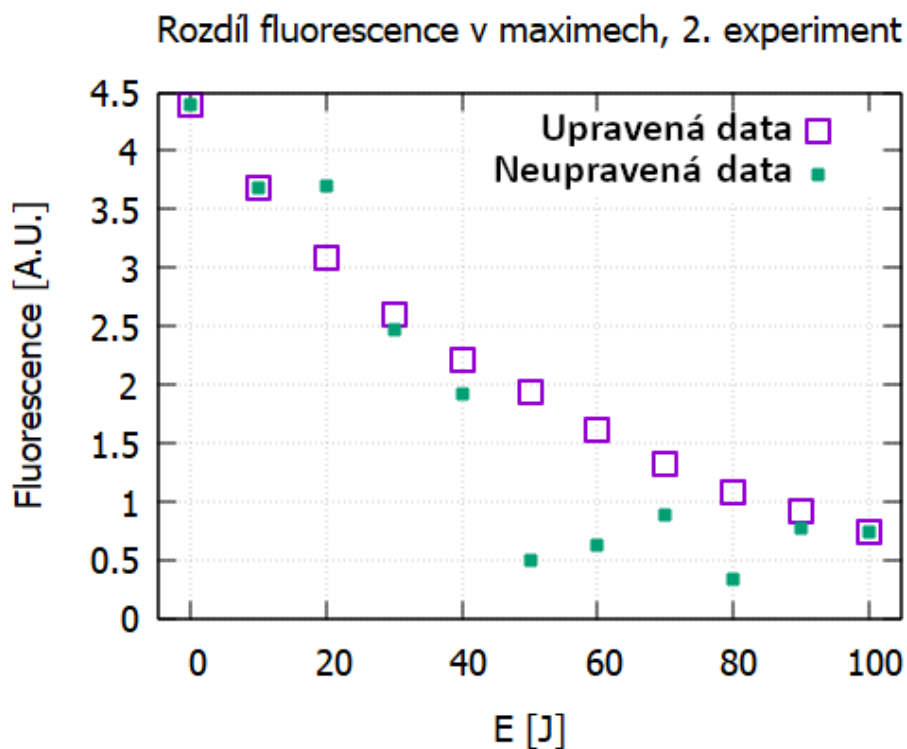




Obrázek 50: Fluorescenční spektrum 50  $\mu\text{M}$  roztoku RF v PBS, 2. experiment, 23. 11. 2022. Spektra byla naškálována kvůli problémům s počítačem.



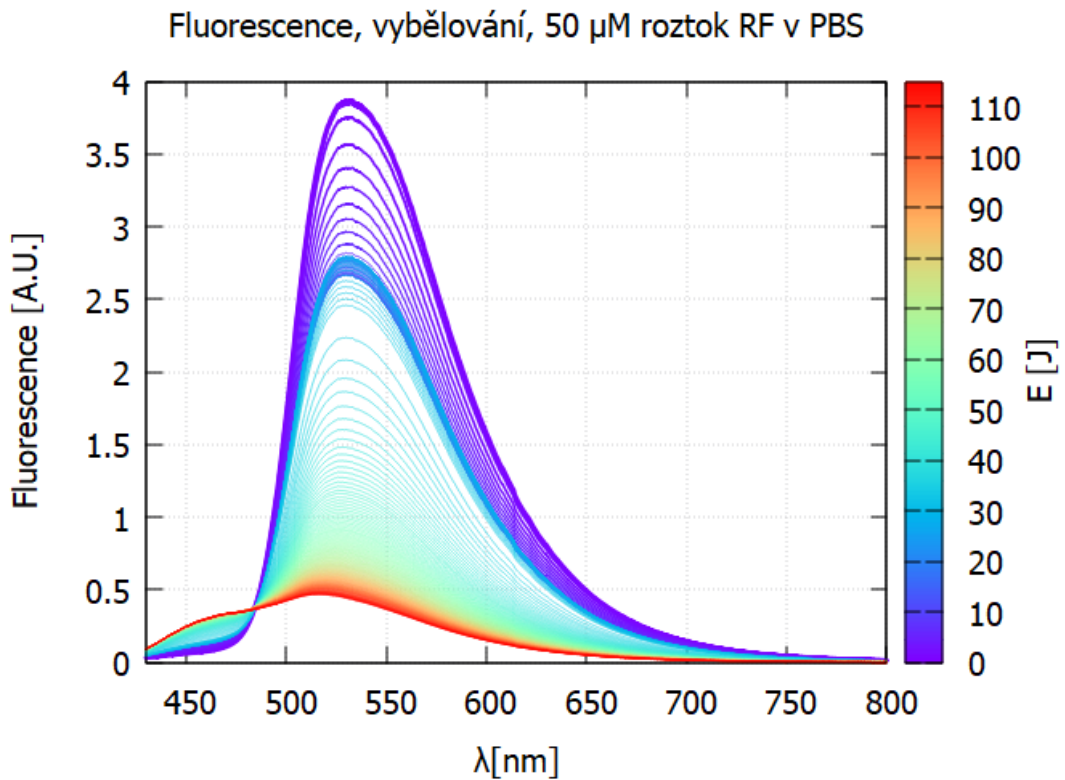
Obrázek 51: Fluorescenční spektrum 50  $\mu\text{M}$  roztoku RF v PBS, 2. experiment, 23. 11. 2022. Tato spektra nejsou upravena.



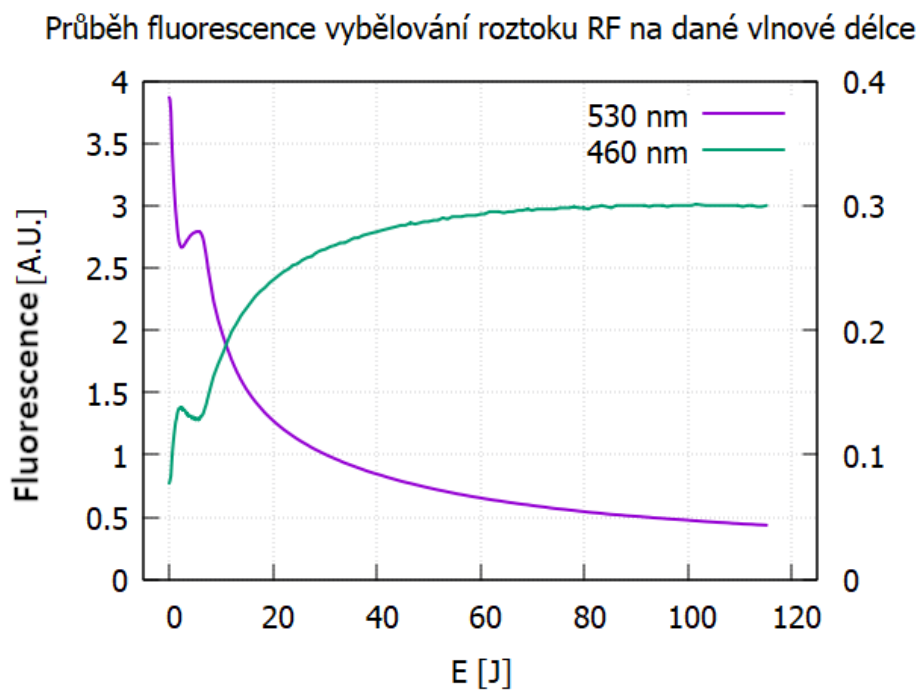
Obrázek 52: Rozdíly maxim fluorescence (grafy č. 50 a č. 51) při 2. experimentu.

V prvních měřeních byl použit dlouhovlnný filtr 460 nm. Měření ale naznačovala růst signálu na kratších vlnových délkách, proto jsme provedli nové měření s nově zakoupeným dlouhovlnným filtrem 425 nm. 50  $\mu$ M roztok RF v PBS jsme kontinuálně ozařovali 15 mW laserem na 405 nm a měřili fluorescenční spektra v pravidelných intervalech po 10 s. Později, když se spektrum měnilo pomaleji, jsme měřili v delších časových úsecích, 30 s, 60 s, 300 s a nakonec 600 s. Celkově jsme do vzorku dodali až 110 J (viz obrázek č. 53).

Díky novému filtru vidíme, že fluorescenční pás okolo vlnové délky 470 nm průběžně roste a že to není artefakt měření. Jak vidíme na obrázcích č. 53 a č. 54, fluorescenční signál se na vlnové délce 530 nm při energii 2,3 J zastaví a začne na chvíli stoupat při dodávání další energie. Na 5,5 J se stoupání zastaví a fluorescence zase začne klesat (obrázek č. 54). Tento efekt pozorujeme komplementárně na stejných hodnotách dodané energie i na vlnové délce 470 nm. Nový emisní pás se zde teprve tvoří, efekt je tedy kvalitativně podobný, ale zrcadlově převrácený.



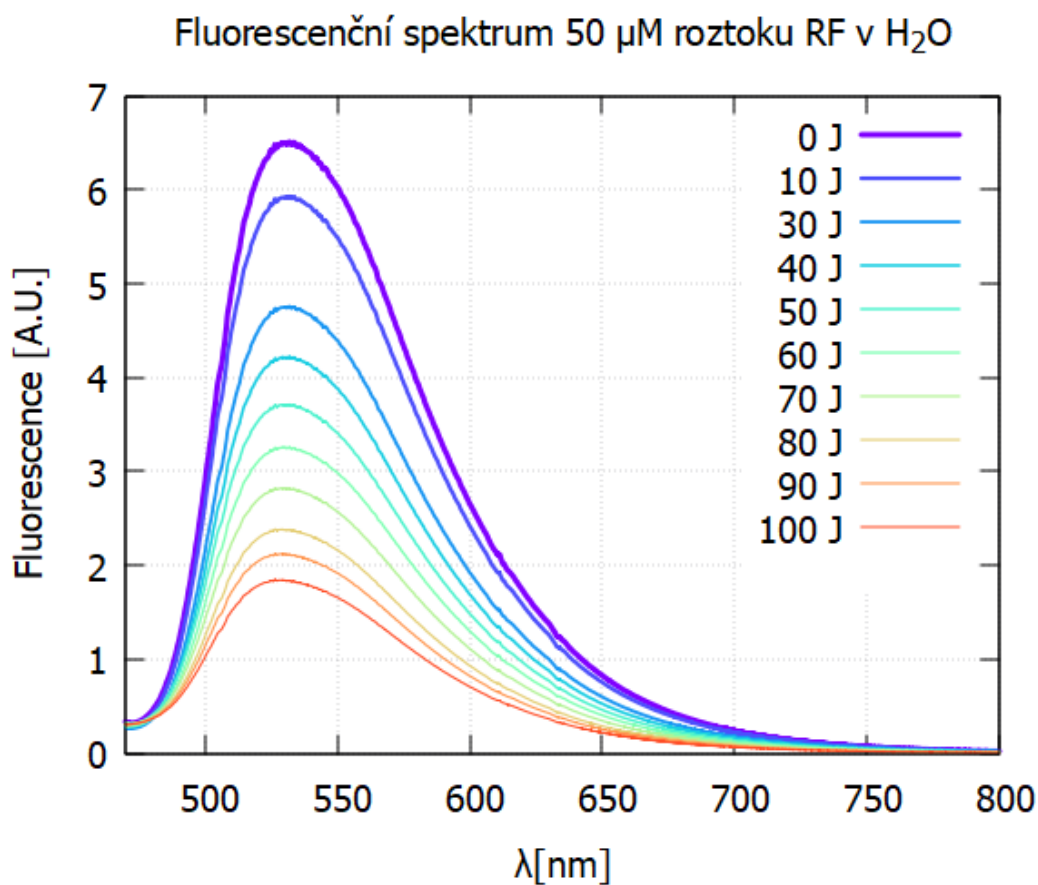
Obrázek 53: Fluorescenční spektrum při vybělování 50  $\mu\text{M}$  roztoku RF v PBS, 4. experiment. Legenda je uvedena v energii dodané do vzorku během vybělování.



Obrázek 54: Změna fluorescence během vybělování na specifických vlnových délkách.

### 5.2.2 Fluorescenční spektra RF v H<sub>2</sub>O

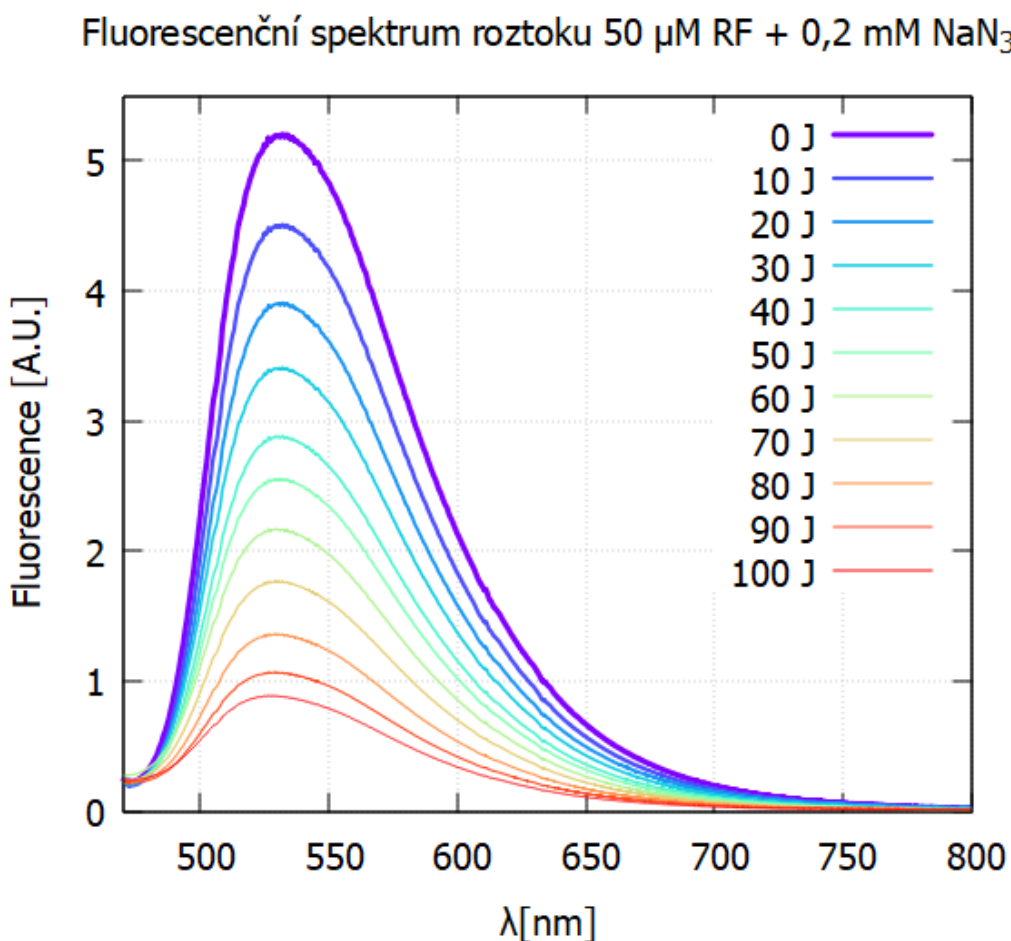
Tato spektra jsme taktéž upravili jak o spektrální závislosti, tak i o velikosti hodnot. Fluorescence byly měřeny po změření kinetik (viz výsledky v kapitole 5.3.2). V tomto případě bylo do vzorku vždy dodáno 10 J energie během měření kinetik <sup>1</sup>O<sub>2</sub> a s 15 mW kontinuálním laserem změřeno fluorescenční spektrum během 2 s. Tuto energii 30 mJ tedy budeme zanedbávat oproti energii z kinetik. U fluorescenčních spekter 50 μM roztoku RF v H<sub>2</sub>O se ale ukázalo, že tento efekt nárůstu dodatečného fluorescenčního pásu okolo 470 nm nenastává vůbec. Lze taktéž pozorovat, že tvar spekter při dodané energii 100 J neodpovídá tvaru spektra pro roztok RF v PBS. V PBS je spektrum pro tuto energii mnohem plošší. Roztok RF v H<sub>2</sub>O se tedy vyběluje pomaleji než roztok RF v PBS.



Obrázek 55: Fluorescenční spektrum 50 μM roztoku RF ve vodě, 3. experiment

### 5.2.3 Fluorescenční spektra RF + NaN<sub>3</sub>

Toto měření probíhalo stejně, jak měření fluorescenčních spekter RF v H<sub>2</sub>O. Po změření kinetik <sup>1</sup>O<sub>2</sub> a dodání 10 J do vzorku jsme změřili fluorescenční spektra opět během 2 s a do vzorku dodali dalších zanedbatelných 30 mJ. Efekt nového fluorescenčního pásu okolo vlnové délky 470 nm v tomto měření taktéž nepozorujeme. Vidíme však ale, že se fluorescenční spektra vybělují podobně rychle, jak v případě roztoku RF v PBS.



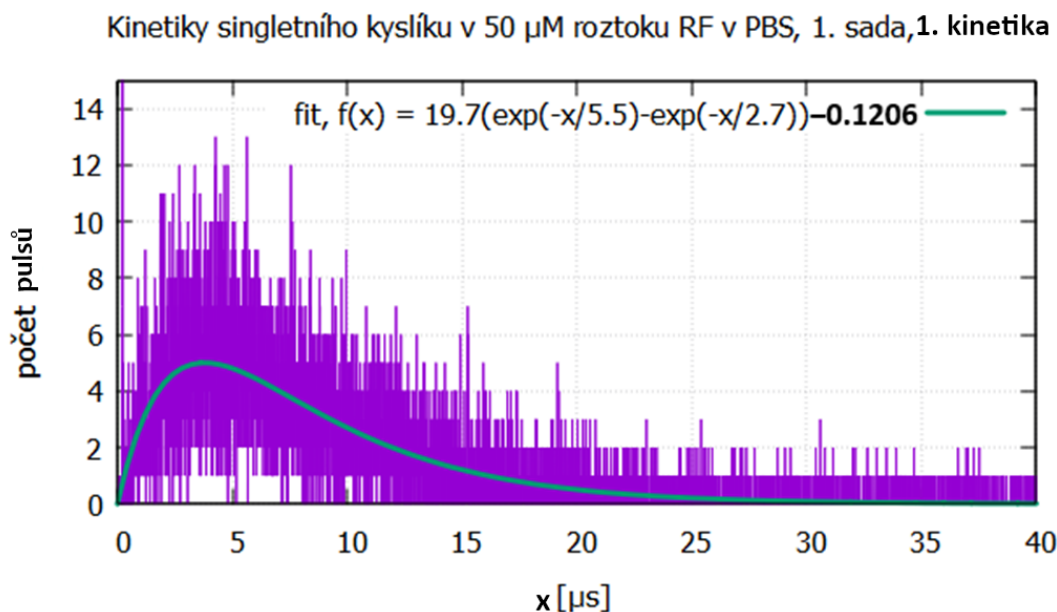
Obrázek 56: Fluorescenční spektrum 50 μM roztoku RF + 0,2 mM v PBS, 3. experiment

## 5.3 Kinetiky singletního kyslíku

### 5.3.1 Kinetiky $^1\text{O}_2$ a $^3\text{RF}$ v roztoku RF v PBS

Měření kinetik probíhalo na měřicí aparatuře (obr. 14), do které jsme umístili měřený vzorek  $50\ \mu\text{M}$  roztoku RF v PBS v křemenné kyvetě. Vždy jsme používali 1 cm křemenné kyvety o tloušťce stěny 1 mm. Díky tomu, že kyvety mají leštěné dno, jsme mohli svítit excitačními pulsy zesponu vzorku a signál odebírat boční stěnou. Je to proto, že tento signál bude rovnoběžný se štěrbinou monochromátoru.

Jako experimenty budeme označovat celé měření kinetik  $^1\text{O}_2$  pro daný roztok. Experimenty většinou obsahovaly 9 -10 sad kinetik, v některých případech až 14 sad. Sady měření jsou skupiny 10 kinetik, každá o  $10^5$  opakování laserových pulsů o energii  $\sim 10\ \mu\text{J}$  pro měření roztoků RF, kdy jsme excitovali na 446 nm. Jednotlivé sady tedy dodaly do vzorku přibližně 10 J energie. Pro měření roztoků ftalocyaninu, kdy jsme excitovali na 665 nm, jsme měřili s energií  $(1,0 \pm 0,1)\ \mu\text{J}$  a  $(0,2 \pm 0,1)\ \mu\text{J}$  laserových pulsů. Slabší energie laserových pulsů byla během 3. experimentu měření roztoků  $\text{AlPcS}_4$  díky opotřebení nelineárního krystalu v laseru. Nastavení laseru bylo totožné jak u jiných měření  $\text{AlPcS}_4$ .



Obrázek 57: Příklad zobrazení kinetik singletního kyslíku pro  $50\ \mu\text{M}$  roztok RF, 1. experiment, 1. sada, 1. kinetika.

Data z kinetik nám daly počet zaznamenaných signálů v daném čase, tedy určitý histogram. Tyto hodnoty jsme poté fitovali funkcí<sup>20</sup>

$$f(x) = A \cdot (\exp(-x/t) - \exp(-x/T)) + c \quad (5.1)$$

za použití *gnuplot* kódu (viz přílohu, kapitola 9.1). Využíváme rovnice č. 2.11, kde pokládáme prefaktor  $\frac{I}{k_2 - k_1}$  za konstantu  $A$ ,  $k_2$  za  $\frac{1}{T}$ ,  $k_1$  za  $\frac{1}{t}$  a samotný čas  $t$  v rovnici za  $x$ . Když zjistíme hodnotu pozadí (konstanty  $c$ , fitujeme od 75 po 100  $\mu\text{s}$ , kde je signál luminiscence  $^1\text{O}_2$  už nulový), rovnicí  $f(x)$  fitujeme získaná data od 0,3 po 100  $\mu\text{s}$ . Na

<sup>20</sup>V obrázcích se může vyskytnout  $f(x) = A \cdot (\exp(-x/t) - \exp(-x/T)) - c$ , kde je sice pozadí nařítováno, ale odečteno z nařítované funkce

Tabulka 5: Hodnoty konstant  $A, t, T$  a  $c$  ( $A$  a  $c$  vyjádřeny v počtu pulsů  $U$ ) pro měření 50  $\mu\text{M}$  roztoku RF v PBS - 1. sada měření z 19. 04. 2023.

E [J]	A [U]	$\sigma_A$ [U]	t [ $\mu\text{s}$ ]	$\sigma_t$ [ $\mu\text{s}$ ]	T [ $\mu\text{s}$ ]	$\sigma_T$ [ $\mu\text{s}$ ]	$c$ [U] $\cdot 10^{-2}$	$\sigma_c \cdot 10^{-2}$ [U]
10	42,96	18,72	4,45	0,29	3,24	0,24	14,60	0,38
20	37,46	14,78	4,61	0,29	3,30	0,23	14,11	0,37
30	58,65	58,91	4,32	0,44	3,50	0,39	14,22	0,37
40	22,54	3,42	5,06	0,20	2,91	0,14	14,37	0,38
50	51,89	40,86	4,42	0,40	3,48	0,34	14,16	0,37
60	39,46	17,73	4,53	0,31	3,30	0,25	14,27	0,38
70	37,56	15,79	4,56	0,30	3,28	0,24	14,22	0,38
80	19,98	2,52	5,27	0,19	2,86	0,13	14,18	0,38
90	18,88	2,19	5,34	0,18	2,83	0,12	14,26	0,38
100	44,75	28,72	4,41	0,36	3,38	0,31	14,11	0,37

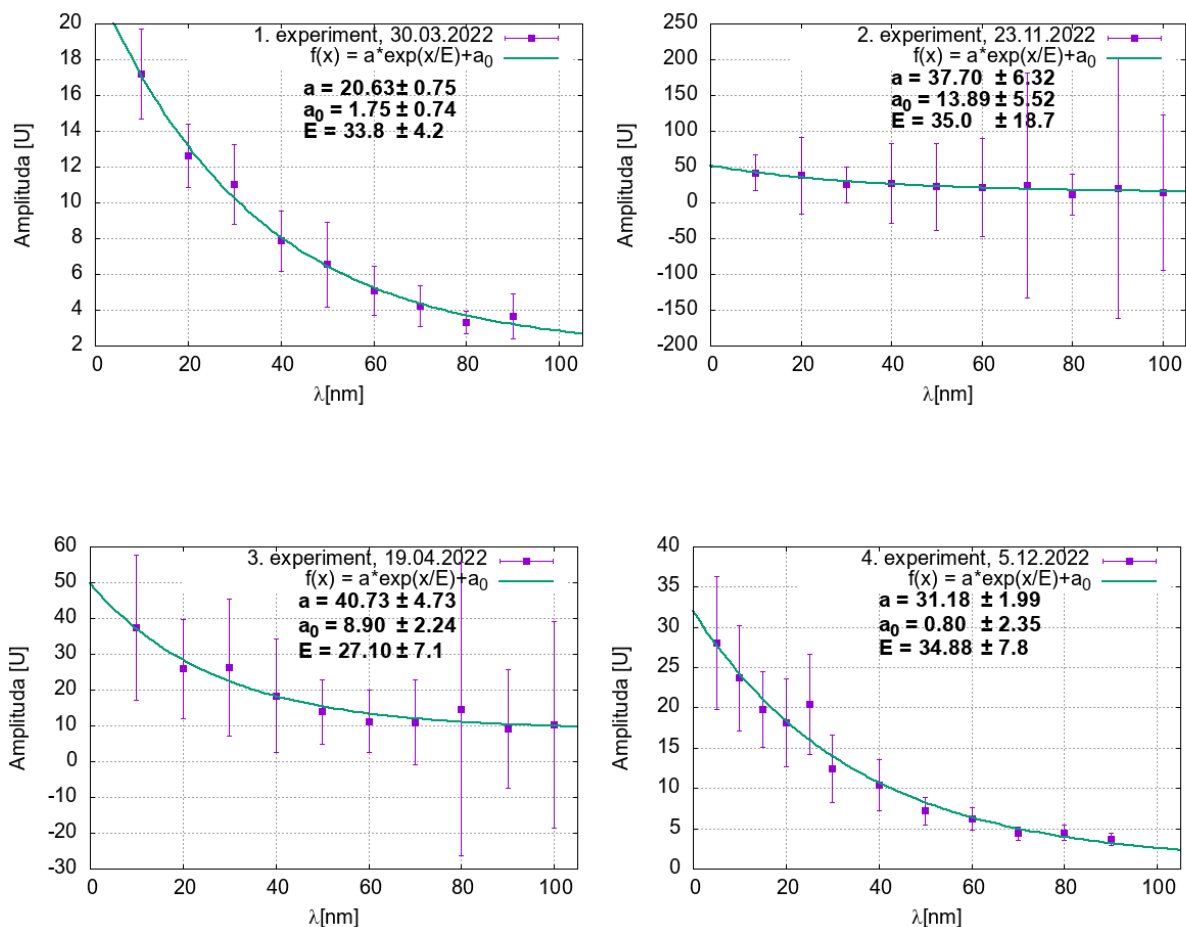
Tabulka 6: Průměrné hodnoty konstant  $A, t, T$  a  $c$  ( $A$  a  $c$  vyjádřeny v počtu pulsů  $U$ ) pro jednotlivé sady měření 50  $\mu\text{M}$  roztoku RF v  $\text{H}_2\text{O}$  - všechny sady měření z 6. 12. 2023.

E [J]	A [U]	$\sigma_A$ [U]	t [ $\mu\text{s}$ ]	$\sigma_t$ [ $\mu\text{s}$ ]	T [ $\mu\text{s}$ ]	$\sigma_T$ [ $\mu\text{s}$ ]	$c$ [U] $\cdot 10^{-2}$	$\sigma_c \cdot 10^{-2}$ [U]
10	19,90	1,67	5,07	0,13	2,23	0,08	12,37	0,50
20	15,87	1,25	5,14	0,14	2,30	0,08	12,60	0,50
30	13,62	1,08	5,28	0,14	2,20	0,08	12,81	0,51
40	13,18	1,31	5,14	0,16	2,32	0,10	13,14	0,51
50	10,65	0,91	5,28	0,16	2,20	0,09	13,20	0,51
60	9,78	0,94	5,22	0,18	2,25	0,11	13,17	0,51
70	8,46	0,81	5,25	0,19	2,16	0,11	13,46	0,52
80	7,19	0,76	5,44	0,20	2,07	0,11	13,40	0,52
90	6,95	0,93	5,26	0,22	2,16	0,13	13,62	0,52
100	6,51	0,91	5,16	0,24	2,23	0,14	13,78	0,52
110	6,37	1,18	5,00	0,27	2,24	0,16	13,85	0,52
120	6,76	2,18	4,81	0,34	2,45	0,23	13,73	0,52
130	4,54	0,78	5,24	0,29	2,07	0,16	13,92	0,53
140	3,82	0,45	5,51	0,28	1,96	0,14	14,06	0,53

začátku kinetik totiž dostáváme signály z rozptýleného excitačního záření a fluorescence vzorku a je potřeba tyto signály z fitu odstranit. Pro každou kinetiku z dané sady byly použity stejné počáteční parametry, které byly získány z testovacího fitu prvního měření. To je důležité zejména pro sady, kdy už byl vzorek skoro vybělený. V těchto kinetikách *gnuplot* špatně počítá hledané konstanty, pokud mu nedáme počáteční podmínky. Získané výsledky potom aritmeticky průměrujeme.

V tabulce č. 5 je příklad získaných výsledků z jednoho z měření 50  $\mu\text{M}$  roztoku RF. Je nutno poznamenat, že se hodnoty fitovaných parametrů liší až o 10%, pokud nepoužijeme stejné počáteční podmínky. Po zpracování všech sad kinetik pro jednotlivé experimenty dostáváme konečnou tabulku (tab. č. 7-11 v příloze). Provedli jsme celkově **4 experimenty** pro měření kinetik singletního kyslíku v 50  $\mu\text{M}$  roztoku **RF v PBS**, **2 experimenty** pro 50  $\mu\text{M}$  roztok **RF v H<sub>2</sub>O**, **3 experimenty** pro roztok 50  $\mu\text{M}$  **RF + 0,2 mM NaN<sub>3</sub> v PBS** a **3 experimenty** pro roztok **RF** o různých koncentracích + 5  $\mu\text{M}$  **ftalocyaninu v PBS**.

Na grafech (obrázek č. 58) můžeme vidět změnu amplitudy fitu pro 4 experimenty měření 50  $\mu\text{M}$  roztoku RF v PBS. Pozorujeme velké chyby v 2. a 3. experimentu, zatímco v 1. a 4. experimentu jsou chyby přijatelné.



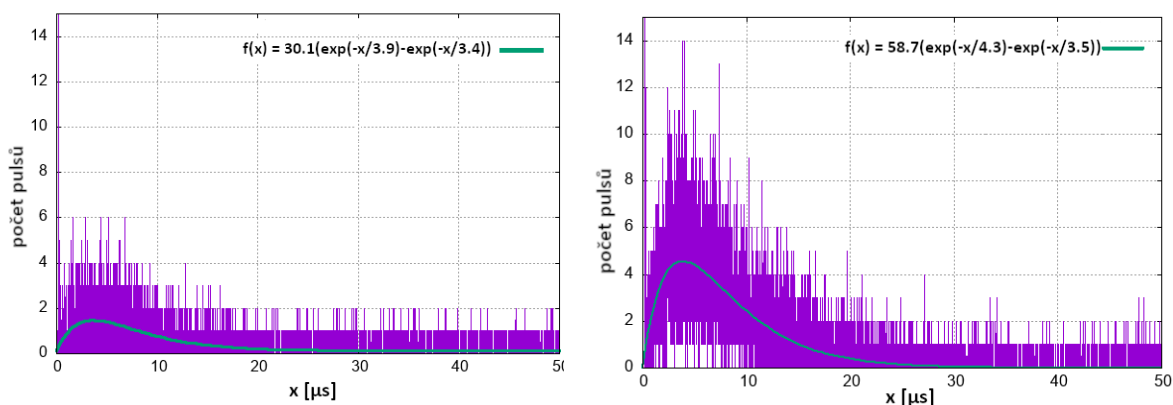
Obrázek 58: Změna amplitudy fitu pro 4 experimenty 50  $\mu\text{M}$  roztoku RF v PBS. Vlevo nahoře 1. experiment měřený 30. 3. 2022, vpravo nahoře 2. experiment měřený 23. 11. 2022, vlevo dole 3. experiment měřený 19. 4. 2023 a vpravo dole 4. experiment měřený 5. 12. 2023.

V každém experimentu jsme měřili doby života  $t$  a  $T$ , tedy doby života  $^1\text{O}_2$  a doby života  $^3\text{RF}$ . Z mé bakalářské práce [1, kapitola 6.3] víme, že doba  $t$ , tedy člen  $\exp(-\frac{x}{t})$  v rovnici č. 5.1, přísluší právě  $^1\text{O}_2$ . Doba  $T$ , tedy člen  $\exp(-\frac{x}{T})$  v rovnici 5.1, bude potom náležet  $^3\text{RF}$ .

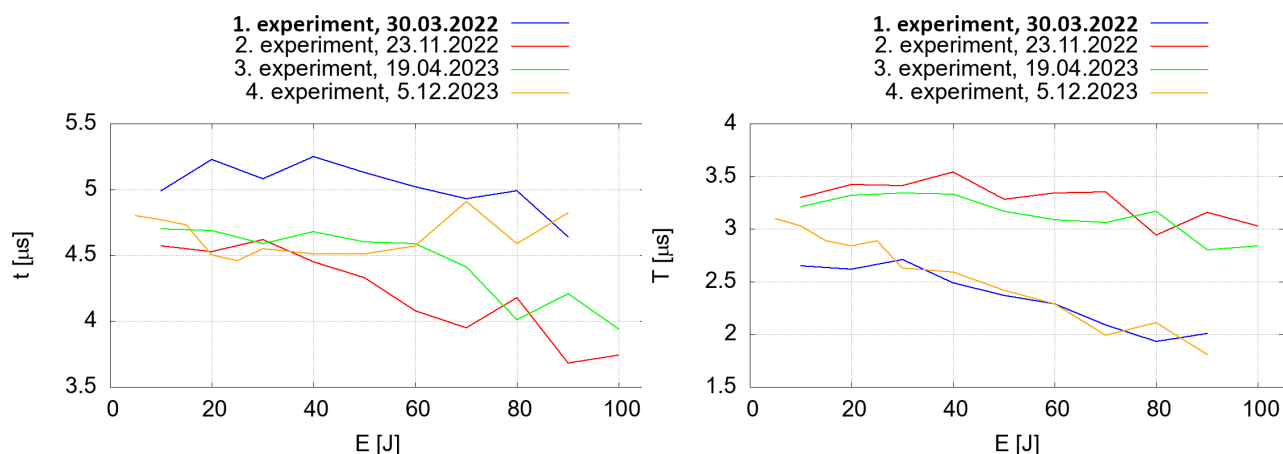
Lze vidět, že jsou hodnoty doby života  $^1\text{O}_2$  kvantitativně odlišné, kvalitativně jsou podobné jen 2. a 3. experiment. U všech experimentů začíná tato doba zhruba na  $(4,7 \pm 0,3) \mu\text{s}$ , tedy kromě prvního, kde to je  $(5,0 \pm 0,2) \mu\text{s}$ . Pro 2. a 3. experiment byl jak průběh, tak hodnoty velmi podobné, končí na zhruba  $(3,8 \pm 1,2) \mu\text{s}$ . Pro 1. a 4. experiment je konečná hodnota zhruba  $(4,7 \pm 0,4) \mu\text{s}$ , avšak průběh je zde odlišný. Zatímco v případě experimentu 1 hodnota klesala, hodnota ke konci 4. experimentu byla v rámci chyby konstantní  $(4,7 \pm 0,3) \mu\text{s}$ .

Pro dobu života tripletních stavů je chování o něco jednodušší. Kvalitativně se doba  $T$  v každém experimentu zmenšuje, v 1. a 4. experimentu se zmenšuje rychleji. Doba života  $T$  začínala pro všechny experimenty okolo hodnoty  $(3,3 \pm 0,2) \mu\text{s}$  pro 0 dodané energie.





Obrázek 59: Vlevo příklad kinetiky pro 2. experiment pro RF v PBS, sada kinetik pro  $E = 70$  J, 5. kinetika; vpravo 3. experiment pro RF v PBS, sada kinetik pro  $E = 30$  J, 3. kinetika.



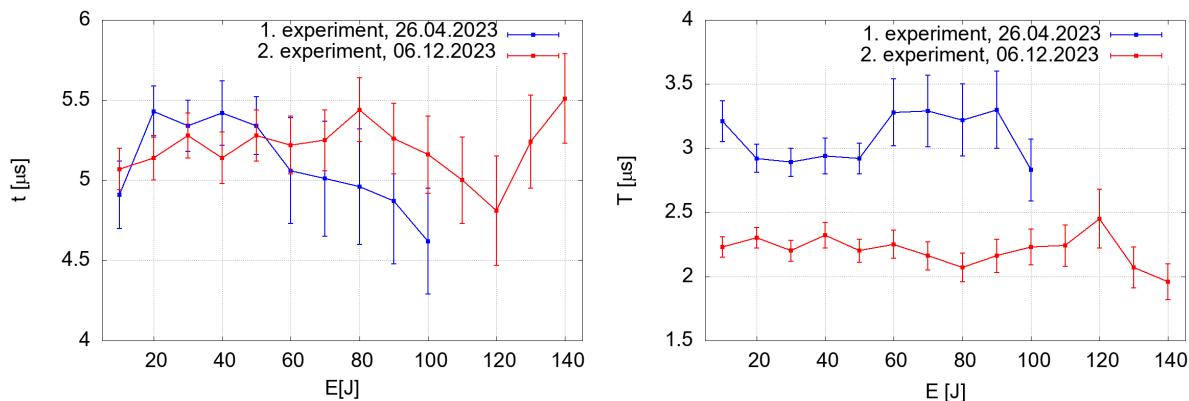
Obrázek 60: Vlevo doba života  $^1\text{O}_2$   $t$ , vpravo doba života  $^3\text{RF}$   $T$  pro souhrn experimentů 50  $\mu\text{M}$  roztoku RF v PBS. 4. měření obsahuje kinetiky i po 5 J dodané energie.

Pro 2. a 3. experiment máme konstantní doby života ( $3,4 \pm 0,4$ )  $\mu\text{s}$  do 40 J dodané energie, potom se tato doba snižuje k hodnotě ( $2,9 \pm 1,0$ )  $\mu\text{s}$ . Pro 1. a 4. experiment je chování odlišné, protože už od začátku tato doba klesá k hodnotě ( $1,9 \pm 0,2$ )  $\mu\text{s}$ .

Rozdíl v těchto experimentech je pro 3. a 4. experiment, kdy jsme vzorek připravovali ve tmě. Tato skutečnost se ale statisticky neodráží na naměřených datech. Chyba fitu je ovšem tím větší, čím je dodaná energie vyšší, pro 2. a 3. experiment jsou dokonce chyby pro doby života až 45%, ale pro 1. a 4. experiment tyto chyby nepřesáhly 10% ani pro vyšší dodané energie.

### 5.3.2 Kinetiky $^1\text{O}_2$ a $^3\text{RF}$ v roztoku RF v $\text{H}_2\text{O}$

V dalších experimentech jsme zkoumali vliv záměny PBS za deionizovanou vodu. U 1. experimentu došlo u doby života  $^1\text{O}_2$  ke zvýšení hodnoty z ( $4,9 \pm 0,2$ )  $\mu\text{s}$  na ( $5,4 \pm 0,2$ )  $\mu\text{s}$  v prvních 20 J dodané energie. Tato doba života se držela zhruba konstantně a na 50 J začala klesat. Klesla až na hodnotu ( $4,6 \pm 0,3$ )  $\mu\text{s}$ . U 2. experimentu, ve kterém jsme roztok RF ve



Obrázek 61: Vlevo doba života  $^1\text{O}_2$ , vpravo doba života  $^3\text{RF}$  pro roztok  $50 \mu\text{M}$  RF v  $\text{H}_2\text{O}$ .

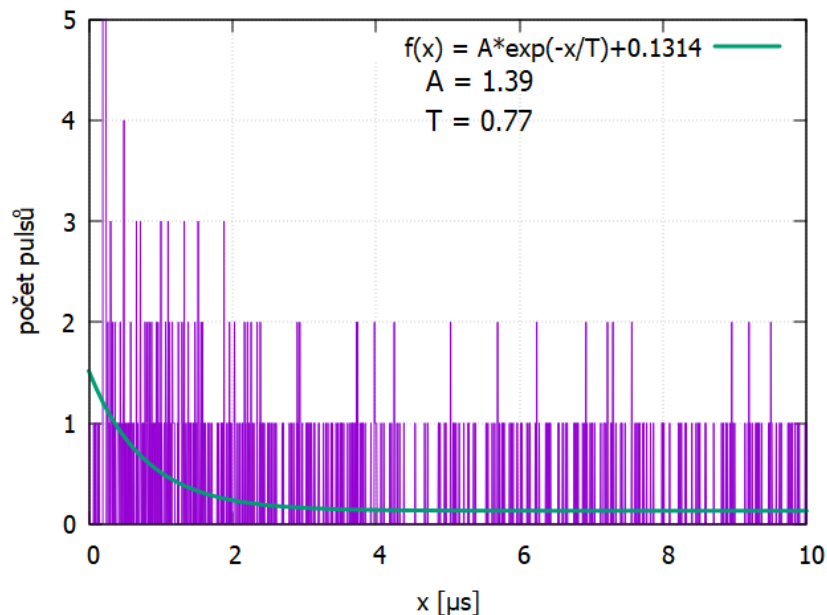
vodě vybělovali mnohem déle (se stejnými energetickými kroky), však k tomuto chování nedochází. Doba života  $^1\text{O}_2$  v tomto případě roste od  $(5,1 \pm 0,1) \mu\text{s}$  až po  $(5,4 \pm 0,2) \mu\text{s}$  na 80 J dodané energie. V tomto momentu začne výrazně klesat až na  $(4,8 \pm 0,3) \mu\text{s}$  při 120 J a následně hned stoupat zpět na  $(5,5 \pm 0,3) \mu\text{s}$ .

Co se týká doby života  $^3\text{RF}$ , ta je při vybělování konstantní v rámci chyb do energie 110 J, tedy  $(2,2 \pm 0,1) \mu\text{s}$ . Na energii 120 J vzroste a klesá na hodnotu  $(2,0 \pm 0,1) \mu\text{s}$ . Z hlediska chyb je tato doba života  $^3\text{RF}$  konstantní i u 1. experimentu, tentokrát ale s hodnotou až  $(3,1 \pm 0,2) \mu\text{s}$ . Tato doba života začne zdánlivě klesat vždy až ke konci experimentů. To se v experimentech RF v PBS v žádném z experimentů nevyskytlo, doba života  $^3\text{RF}$  tam v každém případě klesá.

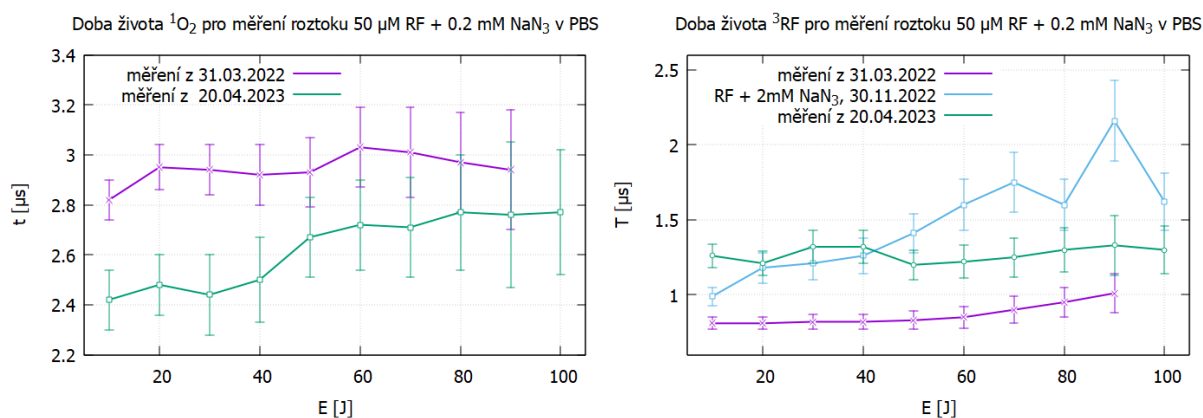
### 5.3.3 Kinetiky $^1\text{O}_2$ a $^3\text{RF}$ v roztoku $50 \mu\text{M}$ RF + $0,2 \text{ mM}$ $\text{NaN}_3$ v PBS

V dalším experimentu jsme zkoumali vliv přidání  $0,2 \text{ mM}$   $\text{NaN}_3$ .  $\text{NaN}_3$  je specifický zhášec  $^1\text{O}_2$  [61] a očekáváme tedy eliminaci fotoefektu II. typu (viz kapitolu 2.9). Doba života singletního kyslíku  $^1\text{O}_2$  by se tak měla výrazně snížit a  $^3\text{RF}$  by měl mít svoji dobu života stejnou jak bez  $\text{NaN}_3$ . Už v mé bakalářské práci [1, kapitola 6.5] se ale ukázalo, že  $\text{NaN}_3$  výrazně snižuje i dobu života  $^3\text{RF}$ . Byl proveden experiment (2. experiment měřený 30. 11. 2022), kde byla chybně namíchána koncentrace  $\text{NaN}_3$  10x vyšší. V tomto měření  $2 \text{ mM}$   $\text{NaN}_3$  zcela zmizel signál  $^1\text{O}_2$  a zbyla pouze emise  $^3\text{RF}$ , která byla fitována jednoexponenciálním poklesem s dobou života  $T$  (viz kinetika č. 62).

Měření probíhalo stejně jak v předchozím případě. I tyto experimenty probíhaly s nastavením aparatury stejně jak měření RF v PBS. Pro 1. experiment jsme zkoušeli fitovat i funkcí, která je blíž rovnici č. 2.11, tedy  $f(x) = \frac{A}{1/T - 1/t} \cdot (\exp(-x/t) - \exp(-x/T))$ . Výsledky byly téměř totožné pro rovnici č. 5.1, rozdílly se vyskytovaly až na tisícinách  $\mu\text{s}$ , tedy výrazně pod chybou určení.



Obrázek 62: Kinetiky  $^3\text{RF}$  při měření roztoku  $50\ \mu\text{M}$  RF +  $2\ \text{mM}$   $\text{NaN}_3$ , 2. experiment, 4. sada, 3. kinetika.



Obrázek 63: Vlevo doba života  $^1\text{O}_2$ , vpravo doba života  $^3\text{RF}$  pro roztok  $50\ \mu\text{M}$  RF +  $0,2\ \text{mM}$   $\text{NaN}_3$ . Experiment z 30. 11. 2022 proběhl za špatně namíchané koncentrace  $\text{NaN}_3$ , která byla  $2\ \text{mM}$ . Nevidíme proto žádnou dobu života  $^1\text{O}_2$  pro 2. experiment, protože množství  $\text{NaN}_3$  efektivně zhasí  $^1\text{O}_2$ .

Doba života  $^1\text{O}_2$  je v rámci chyb v 1. experimentu stejná, a to  $(2,9 \pm 0,2)\ \mu\text{s}$ . V druhém experimentu rostla od  $(2,4 \pm 0,1)\ \mu\text{s}$  po  $(2,8 \pm 0,3)\ \mu\text{s}$ . Chyby pro tyto časy nebyly větší než 5 -10% hodnoty doby života pro každé sady kinetik.

Co se týče doby života  $^3\text{RF}$  je tato situace trochu odlišná. Chyby jsou zde opět maximálně 5 -10% a v každém experimentu jsou doby života  $^3\text{RF}$  odlišné. Rozdíl v těchto experimentech je opět pouze ten, že v 3. experimentu jsme připravovali vzorek za tmy, v 1. experimentu jsme jej připravovali za světla a ve 2. experimentu byla koncentrace  $\text{NaN}_3$   $2\ \text{mM}$ . V 1. experimentu doba života  $^3\text{RF}$  začíná na  $(0,81 \pm 0,04)\ \mu\text{s}$  a zdánlivě od  $50\ \text{J}$  roste až k  $(1,0 \pm 0,2)\ \mu\text{s}$ . Chyby časů jsou bohužel v rámci porovnání s ostatními hodnotami velké, a tedy nelze přesně určit, jestli hodnota roste nebo je v rámci chyb konstantní. Ve

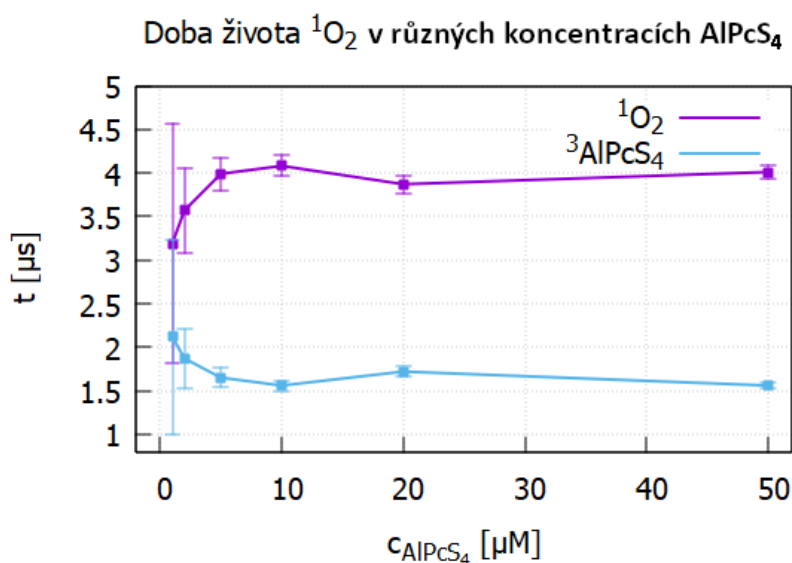
3. experimentu je situace obdobná, doba života je zdánlivě konstantní, tedy  $(1,3 \pm 0,1) \mu\text{s}$ . V případě 2 mM koncentrace  $\text{NaN}_3$  doba života roste od  $(1,0 \pm 0,1) \mu\text{s}$  po  $(2,2 \pm 0,3) \mu\text{s}$ . Na 100 J dodané energie doba života  $^3\text{RF}$  klesla až na  $(1,6 \pm 0,2) \mu\text{s}$ .

#### 5.3.4 Kinetiky $^1\text{O}_2$ a $^3\text{AlPcS}_4$ roztoku $50 \mu\text{M RF} + 5 \mu\text{M AlPcS}_4$

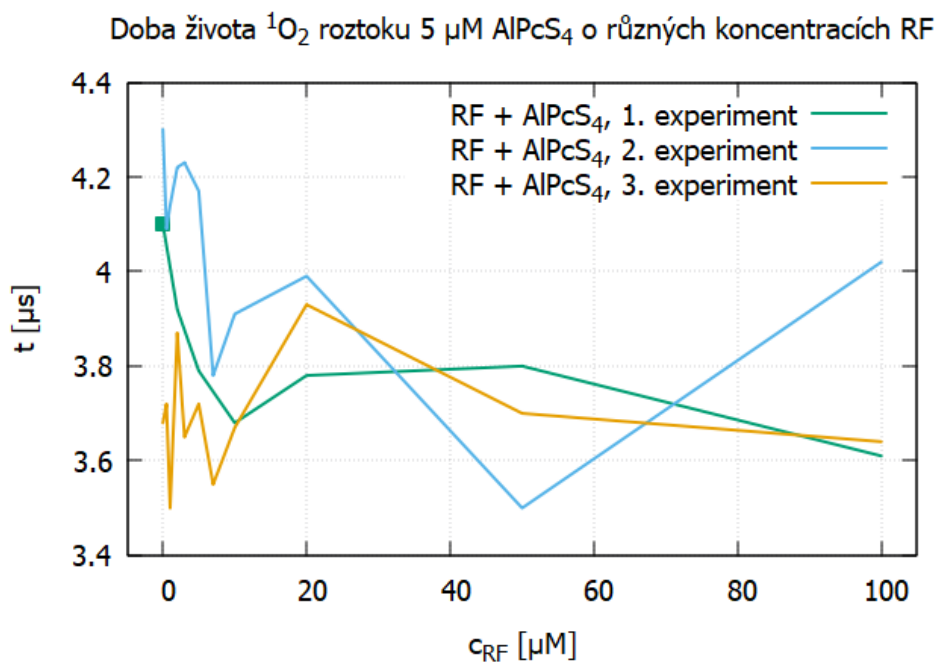
V těchto 3 experimentech jsme zkoumali, jak bude RF zhášet  $^1\text{O}_2$  vytvořený  $^3\text{AlPcS}_4$ . Vzorek jsme excitovali na vlnové délce 665 nm a míchali dle tabulky č. 2 a č. 3. Měřili jsme 1 experiment čistého  $5 \mu\text{M}$  roztoku  $\text{AlPcS}_4$  na porovnání výsledků s roztokem  $\text{RF} + \text{AlPcS}_4$ .

Doby života  $^1\text{O}_2$  i  $^3\text{AlPcS}_4$  mají v experimentu s čistým  $\text{AlPcS}_4$  přesně opačný vývoj. Doba života  $^1\text{O}_2$  se zdánlivě při malých koncentracích zvyšuje. Z hlediska chyb se později ustálí okolo hodnoty  $(4,0 \pm 0,1) \mu\text{s}$ . Doba života  $^3\text{AlPcS}_4$  se naopak zmenšuje až ke konečné hodnotě  $(1,6 \pm 0,1) \mu\text{s}$ . Nutno podotknout, že hodnota pro  $1 \mu\text{M}$  koncentraci má díky slabým kinetikám vysokou hodnotu chyby fitu. Pro  $20 \mu\text{M}$  koncentraci ftalocyaninu vidíme lokální pokles a nárůst v dobách života pro  $^1\text{O}_2$ ,  $^3\text{AlPcS}_4$  respektive. Tento pokles i nárůst je ale v rámci chyby zanedbatelný a proto tyto doby života bereme od  $5 \mu\text{M}$  za konstantní. Tyto výsledky vidíme na obrázku č. 64.

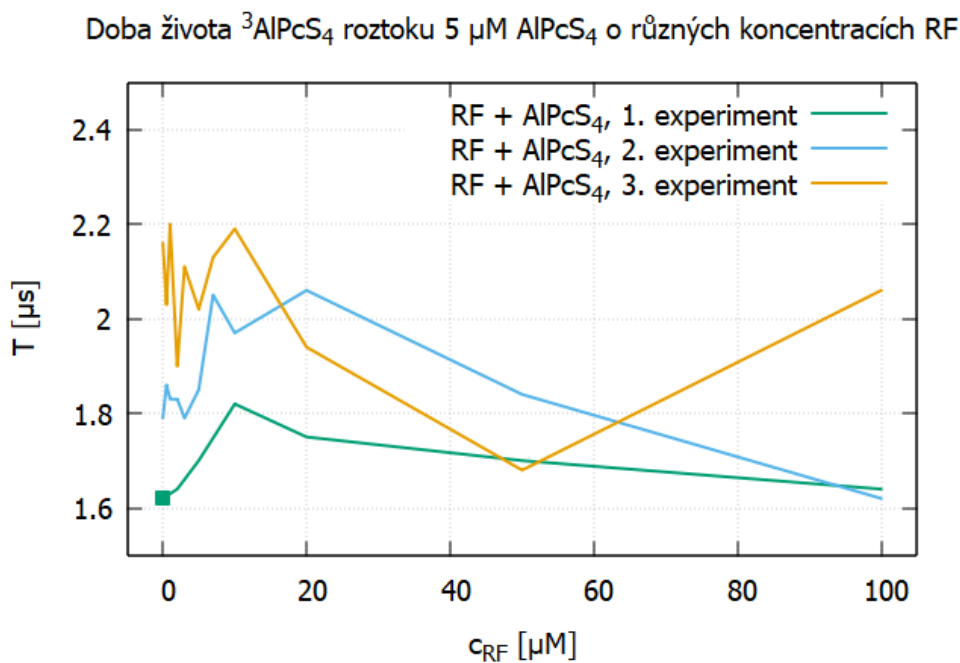
Pro roztok  $\text{RF} + \text{AlPcS}_4$  jsme měřili koncentrace  $\text{RF}$  od  $0 \mu\text{M}$  po  $100 \mu\text{M}$  se zaměřením na menší koncentrace, dle tabulky č. 3. V těchto roztocích jsme vždy používali  $5 \mu\text{M}$  roztok  $\text{AlPcS}_4$ . Ve všech 3 experimentech výsledky vyšly podobně v rámci chyb, které byly pro 1. experiment a 3. experiment maximálně 15%. Pro 2. experiment byla tato chyba v mnohých případech až 30%. Experimenty s malými koncentracemi  $\text{RF}$  mají pak doby života, které se chovají nepředvídatelně. K maximálním měřeným koncentracím se doba života  $^1\text{O}_2$  ustálí na hodnotě  $(3,6 \pm 0,3) \mu\text{s}$  pro  $^1\text{O}_2$  s výjimkou 2. experimentu, kdy vzrostla na  $(4,0 \pm 0,7) \mu\text{s}$ . Doba života  $^3\text{AlPcS}_4$  se ustálila na  $(1,6 \pm 0,3) \mu\text{s}$  s výjimkou 4. experimentu, kdy tato hodnota opět narostla až na  $(2,0 \pm 0,3) \mu\text{s}$ . Výsledky pro čistý roztok ftalocyaninu a pro roztok  $\text{RF} + \text{ftalocyaninu}$  vidíme na grafech č.64, č. 65 a č. 66.



Obrázek 64: Závislost doby života  $^1\text{O}_2$  a  $^3\text{AlPcS}_4$  na koncentraci  $\text{AlPcS}_4$ .



Obrázek 65: Doba života  $^1\text{O}_2$  pro roztoky čistého  $5\ \mu\text{M}$  AlPcS<sub>4</sub> a pro  $x\ \mu\text{M}$  RF +  $5\ \mu\text{M}$  AlPcS<sub>4</sub>, kde chyby neuvádíme kvůli přehlednosti. Tyto chyby jsou zobrazeny v příloze, obrázek č. 9.3.



Obrázek 66: Doba života  $^3\text{AlPcS}_4$  pro roztoky čistého  $5\ \mu\text{M}$  AlPcS<sub>4</sub> a pro  $x\ \mu\text{M}$  RF +  $5\ \mu\text{M}$  AlPcS<sub>4</sub>, kde chyby neuvádíme kvůli přehlednosti. Tyto chyby jsou zobrazeny v příloze, obrázek č. 9.3.

## 6 Diskuze

### 6.1 Absorpční spektra a fotoprodukty

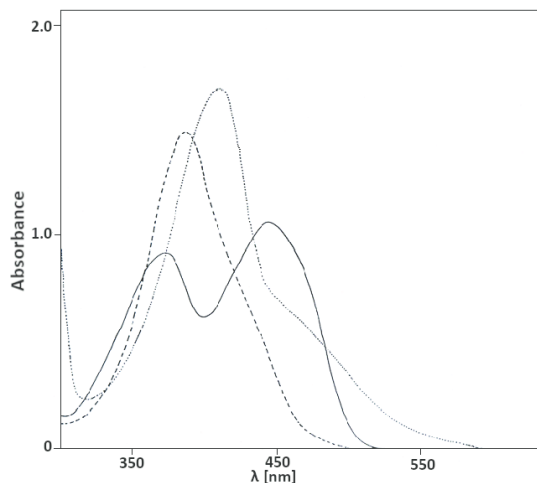
Riboflavin, jak bylo již několikrát zmíněno, je velmi fotocitlivý. Jeho absorpční pásy se vyskytují jak v UV oblasti, tak ve viditelné části, takže vliv slunečního či umělého světla je výrazný. V diplomové práci jsme zjišťovali, jak dobře se riboflavin na světle rozpadá a jaký vliv mají nově vzniklé fotoprodukty na tvorbu a zhášení singletního kyslíku.

Během experimentu bylo zjištěno, že vzorky s riboflavinem je nutno připravovat za červeného světla nebo ve tmě. Červené záření RF absorbovat nemůže, a tak jsme eliminovali jakékoliv fotorozpady. Přesun RF mezi měřicími aparaturami probíhal v držáku, kde se kyveta s roztokem ukrývala pod světlotěsným krytem. Jak lze vidět na obrázku č. 22, rozdíl v absorpci vzorku při přípravě na světle a ve tmě je zásadní. Jsou to dva vzorky připravené každý zvlášť, takže minimální rozdíl v koncentraci vlivem chyb vážení a míchaní se může objevit. Pokud se ale podíváme na vlnovou délku 300 nm, tak můžeme pozorovat, že je zde absorpční spektrum pro přípravu na světle silnější. To je v souladu s dalšími experimenty, kde bylo zjištěno, že absorpční spektrum na této vlnové délce roste tím více, čím déle je vzorek vystaven světlu (viz obrázek č. 25). Podobné efekty lze vidět například u náběhu absorpce na vlnovou délku 446 nm. Absorpce zde roste pomaleji, protože je RF už z malé části vybělený.

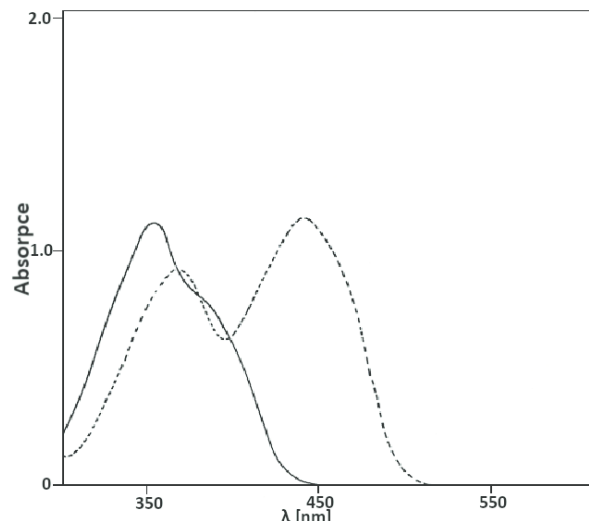
Na dalších absorpčních spektrech (obrázek č. 23 a č. 24) vidíme vliv přípravy ve tmě. Pokud vzorek připravujeme na světle, můžeme pozorovat nárůst absorpce na absorpčním pásu 373 nm a 260 nm při dodané energii 10 J, který ale v druhém případě absorpce vzorku připravovaného za tmy nenalzáme. Nastává zde tedy rozdíl, pokud roztok RF absorbuje na vlnové délce 446 nm nebo v celém jeho absorpčním spektru. V roztoku tedy nejspíš vznikají jiné stavy RF, které absorbují v tomto pásu méně. Během dodávání 10 J energie se vrátí zpět do základního stavu a začnou se vybělovat za vzniku jiných fotoproduktů. Nárůst tohoto pásu může být způsoben taktéž přítomností nějakého fotoproduktu (LC nebo FMF), který se později opět přetvoří na RF. Tento efekt v experimentu č. 24 nevidíme a vidíme zde tedy, že se RF opravdu velmi jednoduše na světle rozpadá. Tento rozdíl by teoreticky mohl nastat, pokud by bylo jiné nastavení mezi energií 0 J a 10 J. K tomu však nedošlo, pozadí v celém experimentu bylo v rámci chyb pro všechna měření stejné. Rozdíly, které v pásu 373 nm nastávají, jsou na to příliš velké.

Na obrázku č. 25 vidíme, že absorpční spektrum se mění na několika zajímavých vlnových délkách. Na vlnové délce 446 nm se vyběluje RF složka (dle experimentu [62], obrázek č. 69). Na vlnové délce 373 nm absorpční spektrum taktéž klesá a lze zde vidět náznak vytváření nového absorpčního pásu na vlnové délce 373 nm. Nárůst takového pásu značící tvorbu fotoproduktu CDRF vidíme na obrázku č. 69, který byl měřený pro 1 M fosfátové roztoky. Díky použitému rozpouštědлу **PBS** byla fosfátová koncentrace v našich roztocích pouze 8 mM, přesto je změna absorpčního pásu viditelná. Na vlnových délkách od 300 nm po 335 nm vidíme, že zde absorpční spektrum s vyšší dodanou energií do vzorku narůstá. To značí fotoprodukt LC, který má svůj absorpční pás posunutý blíže kratším vlnovým délkám (viz. obrázek č. 67 a č. 68), kde taky absorbuje více jak RF. Absorpční spektrum LF je skoro totožné s absorpčním spektrem RF, stejně tak má FMF podobné spektrum jako CDRF. Není proto pouze s porovnáváním absorpčních spekter možné určit, zda-li se v našem vzorku LF a FMF vyskytuje.

Proto jsme využili možnost faktorové analýzy a aplikovali ji na soubor 11 absorpčních spekter z grafu č. 28. Z této analýzy jsme zjistili, že se ve vzorku vyskytují 2 hlavní složky, samotný RF a jeden další fotoprodukt. To ovšem neodpovídá skutečnosti, a nejenom proto



Obrázek 67: Absorpční spektra RF (—), CDRF (····) a FMF (----) v pH 2 a KCl-HCl bufferu. Převzato a upraveno z [56].

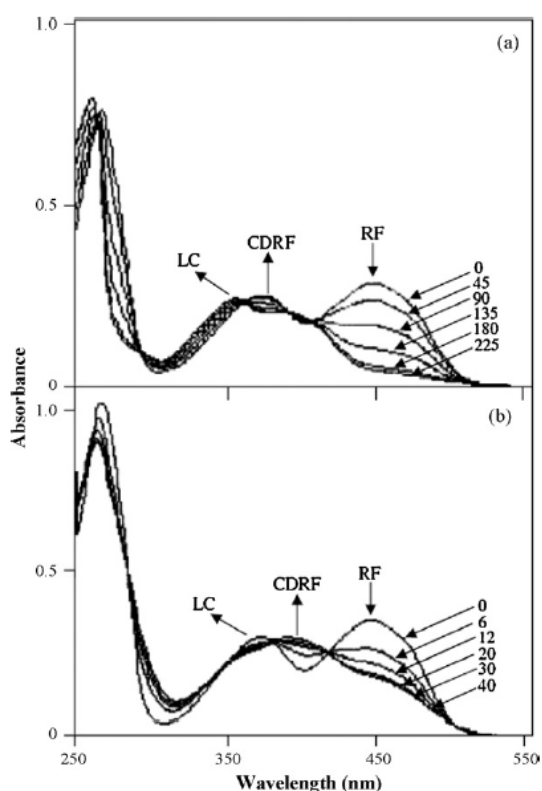


Obrázek 68: Absorpční spektra LC (—), LF (----) v pH 4.5 a acetátovém bufferu. Převzato a upraveno z [56].

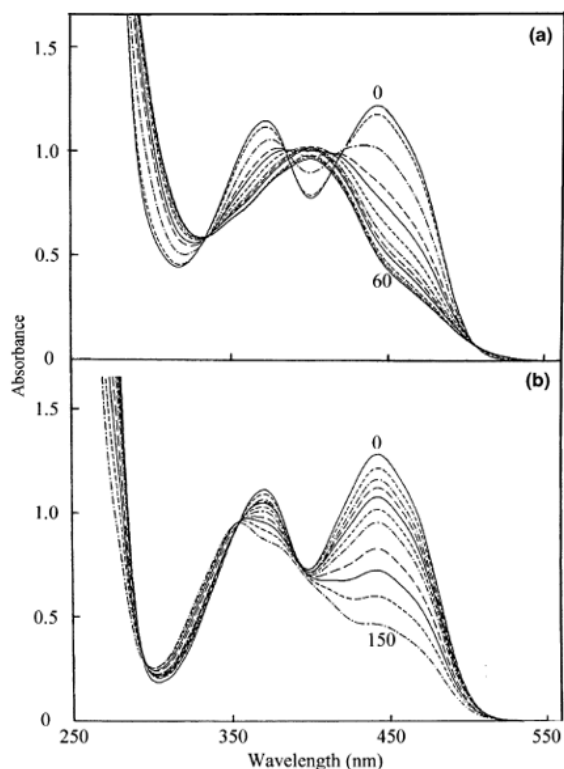
jsme byli nuceni provést detailnější měření roztoku RF, měření na obrázku č. 25. Faktorová analýza na těchto 60 spektrech odhalila až 5 složek. To odpovídá neutrálním roztokům s přítomností divalentních aniontů, kdy se tvoří CDRF, FMF, LC a LF [56]. V roztoku však záleží i na pH a za předpokladu jeho neměnnosti, které se pro námi používaný PBS pohybuje mezi 7 -7.4, můžeme vyloučit jiné možnosti fotorozpadu RF, které jsou zmíněny v [56]. V tomto roztoku pH měřeno nebylo, ostatní fotorozpady (za kyselých a bazických podmínek) ale mají fotoproductů méně. Pro potvrzení přítomnosti jak CDRF a LC, tak FMF a LF bychom museli provést další spektrometrické nebo chromatografické metody, na které bohužel nebyl čas. Možné metody jsou popsány v [64], [65] a [66]. Jedná se hlavně o vodné chromatografie a speciální softwary pro analýzu absorpčních spekter.

Absorpční spektrum roztoku RF ve vodě bylo měřeno pouze za přítomnosti světla. Vidíme zde stejný efekt, který jsme viděli při přípravě roztoku RF v PBS za světla a ve tmě (viz obrázky č. 23 a č. 24). První měření absorpčního spektra vzorku připravovaného za světla, kdy jsme do vzorku nedodali žádnou energii, je v hlavních absorpčních pásech slabší než druhé měření, kdy jsme do vzorku dodali energii 10 J. Tento efekt opět nepřikládáme špatnému pozadí, protože na vlnových délkách, kde RF neabsorbuje (550 nm a dále) je absorpce podobná pro všechna měření. Můžeme si taktéž všimnout, že se vzorek vyběluje pomaleji. Pás na vlnové délce 446 nm se zmenšil po dodání 100 J energie asi o 57%. Pro experiment RF v PBS to ale bylo až o 84%. Podobný efekt pozorujeme na vlnové délce 240 nm. V případě vybělování docházelo k nárůstu absorpce na této vlnové délce po 24,75 J dodané energie, pak se absorpce začala opět snižovat. V případě experimentu pro RF ve vodě však pozorujeme, že absorpce stále roste i na 100 J dodané energie. Odlišnosti najdeme i na vlnové délce 200 nm v porovnání s obrázkem č. 25. V experimentu pro RF ve vodě toto spektrum narůstá rychleji, než narůstá v experimentu pro vybělování RF v PBS. Rychlost vybělování pásů od 10 J<sup>21</sup> dodané energie je v UV oblasti (220 nm a 260 nm) pro oba případy stejná. Experiment pro absorpci roztoku RF v H<sub>2</sub>O tedy poukazuje

<sup>21</sup>Nemůžeme díky prvnímu měření, které je vlivem světla v absorpčním spektru při 0 J dodané energie nízkou, porovnávat hned od prvního naměřeného spektra.



Obrázek 69: Absorpční spektrum v UV a viditelné části spektra fotodegradovaných roztoků RF (50  $\mu\text{M}$ , pH 7) a) za přítomnosti 1 M roztoku fosfátů a b) za přítomnosti 1 M roztoku sulfátů. Čas je vyobrazen v minutách, byla použita rtuťová lampa s výkonem 125 W. Převzato z [62].



Obrázek 70: Absorpční spektrum v UV a viditelné části spektra fotodegradovaných roztoků RF (100  $\mu\text{M}$ , pH 7) a) s 2 M koncentrací fosfátů na 0, 2.5, 5, 7.5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50 a 60 minutách b) 50 mM na 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 80, 100, 120 a 150 minutách. Experimenty proběhly za použití rtuťové lampy s výkonem 125 W. Převzato z [63].

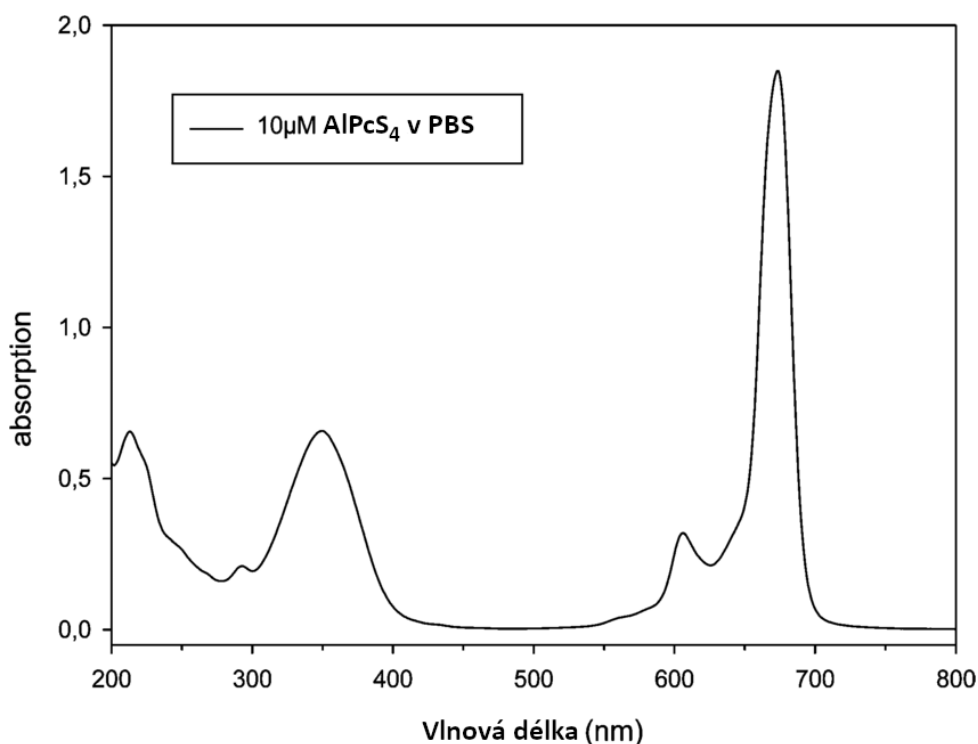
na pomalejší vybělování RF díky nepřítomnosti fosfátových složek, které fungují jako katalyzátor pro fotodegradaci [63]. Porovnání pro absorpční spektra roztoku RF v  $\text{H}_2\text{O}$  připravovaného ve tmě bohužel není.

Absorpce  $\text{NaN}_3$  se vyskytuje pouze v UV části zhruba do 250 nm. Na obrázku č. 39 vidíme, že 0,2 mM koncentrace  $\text{NaN}_3$  nijak nemění absorpční spektrum, pokud je vzorek připravovaný za tmy. Výsledek se ale změní, pokud bude koncentrace vyšší (2 mM) a vzorek bude připravovaný za světla (viz obrázek č. 38). Změna absorpce na pásu 224 nm je způsobena jak koncentrací  $\text{NaN}_3$ , tak částečným vybělením vzorku, kdežto zbylé pásy jsou způsobeny pouze částečným vybělením RF. Agregace či jiné ovlivňování absorpčního spektra není pozorované ani v jiných člancích. Na dalším obrázku č. 40 v porovnání s obrázkem č. 28 ale vidíme, že  $\text{NaN}_3$  má velký vliv (podobně jak rozpouštění RF ve vodě) na rychlost jeho fotodegradace. Pás na vlnové délce 446 nm se v tomto případě zmenšil o 64% (porovnejme s vodou - 57%). V naší měřené koncentraci  $\text{NaN}_3$  a používaných koncentracích fosfátových složek v PBS (8 mM) vidíme, že záměna PBS rozpouštědla za vodu a přidání 0,2 mM roztoku  $\text{NaN}_3$  má podobný vliv na zpomalení fotodegradace RF.



Absorpční spektrum ftalocyaninu bylo změřeno s velmi dobrou shodou s [67] (viz obrázky č. 71 a č. 42), co se jeho maxim absorpce na 606 nm a 673 nm týče. I když jsme všude míchali stejnou koncentraci ftalocyaninu, jeho absorpční pásy na 606 nm a 673 nm nebyly ve všech experimentech a měřeních stejné (viz obrázek č. ??). Bylo to způsobeno nízkou reprodukovatelností pipetace malého množství roztoku ftalocyaninu. Na třetí pokus jsme pipetovali větší objem roztoku ftalocyaninu o menší koncentraci a výsledek byl znatelně lepší (viz obrázek č. 43). AlPcS<sub>4</sub> nám v tomto experimentu absorboval i na vlnové délce 446 nm. Tam určitě absorbovat nemá, jak vidíme na obrázku č. 42. Proto je uveden absolutní člen ve fitovací rovnici na obrázku č. 44. To může znamenat buď znečištěnou kyvetu, chybně nastavený přístroj nebo kontaminaci zásobního roztoku AlPcS<sub>4</sub>. V případě kontaminace takové, že pozorujeme nárůst na 446 nm, bychom měli pozorovat větší nárůst na vlnové délce 290 nm, kde se vyskytuje hlavní UV pás RF.

Pro experiment na obrázku č. 43 jsme zaznamenali změnu absorpčního spektra ftalocyaninu v závislosti na přidaném množství RF (viz obrázek č. 44). V tomto nacházíme dobrou shodu s článkem [68], kde RF a AlPcS<sub>4</sub> rozpouštěli ale v D<sub>2</sub>O. Těžká voda by neměla mít vliv na absorpční spektrum RF, má však vliv na prodloužení dob života <sup>1</sup>O<sub>2</sub>. Mezi RF a AlPcS<sub>4</sub> dochází k tvorbě agregátů, které ovlivňují absorpční spektrum AlPcS<sub>4</sub>. Pro ověření změny absorpčního spektra RF v závislosti na koncentraci AlPcS<sub>4</sub> by bylo potřeba změřit několik absorpčních spekter pro roztoky o stejné koncentraci RF a o různých koncentracích AlPcS<sub>4</sub>, na tento experiment však nebyl čas.



Obrázek 71: Absorpční spektrum 10  $\mu$ M roztoku AlPcS<sub>4</sub>. Převzato a upraveno z [67].

## 6.2 Fluorescence

Na příkladu na obrázku č. 51 vidíme, že během všech 2. experimentů (roztok RF + roztok RF s  $\text{NaN}_3$ ) a během 3. experimentů (roztoku RF + roztok RF v  $\text{H}_2\text{O}$ ) se spektrometr sám od sebe odpojoval a připojoval k počítači. To vedlo k problémům měřicího softwaru a možným změnám integrační doby detektoru. Fluorescenční měření tedy nebyla všechna stejná. Nastavení experimentu je ovšem ve všech měřeních totožné. Výsledky těchto fluorescenčních měření jsme proto byli nuceni ručně upravit tak, aby bylo vidět vybělování vzorku. Nikdy jsme však neupravovali první a poslední měření daného experimentu. Jelikož jsme do dat takto zasáhli, můžeme tyto výsledky brát pouze jako důkaz vybělování RF (bohužel zde nebude zaznamenána žádná úměra) a vzniku nového fluorescenčního pásu na vlnové délce 470 nm. Tato chyba v softwaru byla eliminována změnou počítače pro 3. experiment, kde už k podobným chybám nedocházelo a fluorescenční spektra mají očekávané chování.

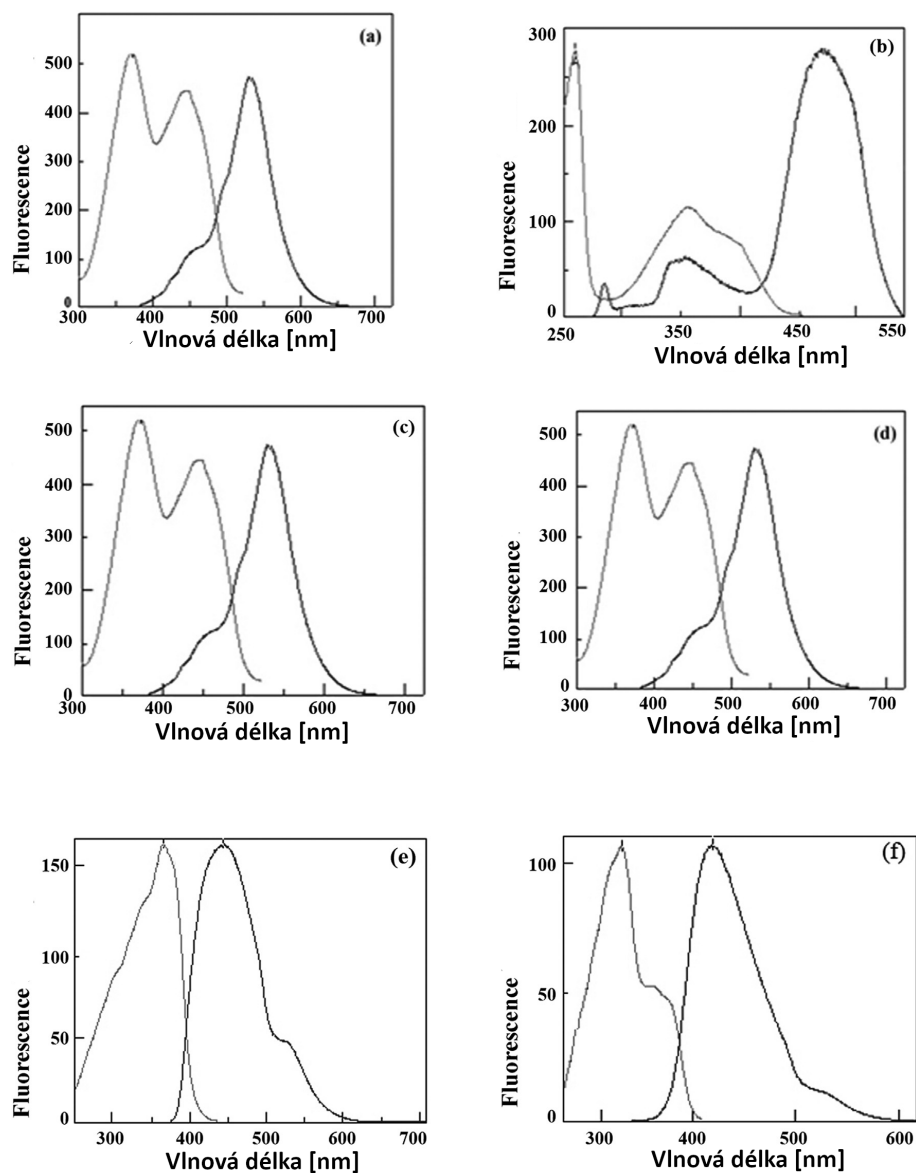
Nový fluorescenční pás na vlnové délce 470 nm vznikal pouze v případě, pokud jsme měřili RF v PBS. V těchto měřeních vidíme, že postupně s dodávanou energií se v této oblasti fluorescenční spektrum zesiluje, i když nepravidelně (díky již zmíněné softwarové chybě). Pro detailnější popis tohoto efektu jsme zakoupili filtr o hraně 425 nm, aby tento pás bylo vidět lépe. Na vybělování RF (obrázek č. 53) vidíme, že s dodávanou energií tento pás postupně roste a od 80 J zůstává na konstantní hodnotě (viz obrázek č. 54, kdy jsme vynášeli hodnotu na vlnové délce 460 nm). Pro zjištění, čemu tento nový fluorescenční pás náleží, by bylo zapotřebí změřit fluorescenční spektra jednotlivých fotoproduktů a porovnat. Pokud by to porovnat nebylo možné, bylo by potřeba provést jiné analytické metody na konečný vybělený vzorek a zjistit tak jeho složení. Například LC má maximum fluorescenčního pásu okolo 475 nm a LF má maximum okolo 530 nm (viz obrázek č. 72). Nově vzniklý pás bude tvořený více pásy fotoproduktů, jeden z příspěvků může být od LC. Hlavní fluorescenční pás se posunul z maxima 533 nm prvního měření na maximum 515 nm posledního měření (viz obrázek č. 53). To je díky vybělování složky RF a nárůst jiných fotoproduktů, které mají fluorescenční maximum blíže kratším vlnovým délkám.

Nárůst nového fluorescenčního pásu však nenastával při experimentu pro RF s  $\text{NaN}_3$  a ani při experimentu pro RF rozpuštěný v  $\text{H}_2\text{O}$ . Ani po dodání 100 J energie nevidíme žádnou známku fotoproduktů, které by přispívaly k nárůstu nového fluorescenčního pásu. Maximum fluorescence se v tomto případě nemění, z prvního měření na 0 J dodané energie s maximem na 531 nm se maximum posunulo při 90 J na 530 nm. Roztok se nevyběloval ani tak rychle jako v případě roztoků RF v PBS<sup>22</sup>. Zatímco v případě detailnějšího spektra (obr. 53) nám poklesla intenzita fluorescence o 86%, v případě experimentu pro RF v  $\text{H}_2\text{O}$  to bylo pouze 66%. Tuto skutečnost přikládáme opět nepřítomnosti fosfátových složek v roztoku.

V případě měření RF s  $\text{NaN}_3$  v PBS máme výsledek podobný. K vytvoření nového fluorescenčního pásu na 470 nm nedochází. Spektrum se ovšem vyběluje podobně rychle, jak v případě RF v PBS. V porovnání pro 86% v případě experimentu pro čistý roztok RF je to v případě RF s  $\text{NaN}_3$  v PBS zhruba 83%. Srovnatelnou rychlost vybělování opět přikládáme tomu, že se v tomto měření v roztoku nacházely fosfátové ionty. Nevytvoření nového fluorescenčního pásu je důsledkem toho, že vzhledem ke krátké době života  $^1\text{O}_2$  nemůže dojít k jeho účinné reakci s RF vedoucí k tvorbě toho z fotoproduktů, kterému tento pás náleží.

---

<sup>22</sup>porovnáváme vždy první a poslední hodnoty měření, které jsme nikdy nijak neupravovali



Obrázek 72: Absorpční a fluorescenční spektra: a) FMF ( $\lambda_{ex}=444$  nm,  $\lambda_{em}=530$  nm), b) LC ( $\lambda_{ex}=356$  nm,  $\lambda_{em}=478$  nm), c) LF ( $\lambda_{ex}=444$  nm,  $\lambda_{em}=530$  nm), d) CMF ( $\lambda_{ex}=444$  nm,  $\lambda_{em}=530$  nm), e) KA ( $\lambda_{ex}=364$  nm,  $\lambda_{em}=443$  nm) a f) DQA ( $\lambda_{ex}=332$  nm,  $\lambda_{em}=420$  nm) ve vodném roztoku při pH=6.5 v 5 mM citro-fosfátovém bufferu. Převzato a upraveno z [59].

### 6.3 Kinetiky $^1\text{O}_2$ , $^3\text{RF}$ a $^3\text{AlPcS}_4$

Kinetiky singletního kyslíku byly vždy měřeny o těchto energiích laserových pulsů. Pro měření roztoků RF v PBS, RF a  $\text{NaN}_3$  v PBS a roztok RF v  $\text{H}_2\text{O}$  byla energie vždy  $(10,2 \pm 0,3)$   $\mu\text{J}$ . Laser na excitační vlnové délce 446 nm byl stabilní a energie se v rámci uvedené chyby neměnila. Pro měření RF s  $\text{AlPcS}_4$  byla tato energie však zřetelně menší. Jelikož laser v oblasti 600 nm až 700 nm má velmi slabý signál, byla energie laserových pulsů na 1. experimentu pro roztoky RF s  $\text{AlPcS}_4$  pouze  $(1,0 \pm 0,2)$   $\mu\text{J}$ . Při druhém experimentu stejného roztoku byla tato energie dokonce 5x menší, tedy  $(0,2 \pm 0,1)$   $\mu\text{J}$ . To bylo způsobeno nejspíše díky opotřebenému krystalu v laseru. Díky slabé síle laserových pulsů u experimentů pro RF a  $\text{AlPcS}_4$  jsme měli taktéž slabé kinetiky a jejich fity byly občas s

velkou chybou, převážně v hodnotě amplitud. Chyby dob života nikdy nepřesáhly více jak 40%. Jak ale vidíme na obrázku č. 59, velká chyba může nastat i v případě, kdy je signál dostatečně silný na to, aby používaný software nafitoval doby života i amplitudy relativně přesně (jak se v mnoha případech stalo). K tomu dochází v důsledku tvaru fitované funkce tehdy, když jsou doby života  $^1\text{O}_2$  blízké dobám života tripletů fotosensibilizátoru ( $^3\text{RF}/^3\text{AlPcS}_4$ ). Fitovací algoritmus potom vede k velkým chybám fitovaných parametrů. Další důvod může být silná závislost na volbě počátečních hodnot parametrů pro fitování.

Doby života  $^1\text{O}_2$  pro RF v PBS nejsou pro všechny experimenty stejné. Roztoky RF byly připravovány ve tmě až od 3. experimentu a na grafech č. 60 nevidíme žádnou spojitost. Kvalitativně i kvantitativně spolu souhlasí 2. a 3. experiment, ale 4. experiment se kvalitativně (a při vyšších dodaných energiích i kvantitativně až o 15%) vymyká ostatním měřením. 1. experiment se naopak kvalitativně shoduje s 2. a 3. experimentem ve všech měřených energiích, ale kvantitativně je doba života v tomto případě vyšší až o 20%. Pro 1. a 4. experiment dob života  $^3\text{RF}$  vidíme stejný kvalitativní průběh. 4. experiment začíná na hodnotě  $(3,1 \pm 0,2) \mu\text{s}$  a 1. experiment na hodnotě  $(2,7 \pm 0,1) \mu\text{s}$ . Během obou dvou experimentů se v rámci chyby stejně rychle doba života  $^3\text{RF}$  zmenšuje na hodnotu  $(1,9 \pm 0,2) \mu\text{s}$ . Obdoba tohoto chování se odehrává ve 2. a 3. experimentu, kde máme jiné počáteční  $((3,3 \pm 0,3) \mu\text{s})$  a koncové  $((2,9 \pm 1,2) \mu\text{s})$  doby života. U druhého měření konečných kinetik bylo obtížné najít správné počáteční podmínky a chyby fitů jsou tedy vysoké (viz obrázek č. 75 a č. 76). Pokud bychom uvažili i maxima a minima chyb, měření se stávají kvalitativně a částečně i kvantitativně stejnými.

Ve dvou experimentech pro RF v  $\text{H}_2\text{O}$  vidíme podobné výsledky. Pro doby života  $^1\text{O}_2$  vidíme, že zhruba po 50 -60 J dodané energie se doby života chovají stejně v rámci chyb fitů. Od této energie doba života  $^1\text{O}_2$  z prvního experimentu začne klesat, zatímco doba života ve druhém experimentu stále roste až po 80 J dodané energie a klesat začne až v tomto momentu. Na konci experimentu opět začne růst od 120 po 140 J dodané energie. Doba života  $^3\text{RF}$  je v obou případech převážně konstantní v rámci chyb s tím numerickým rozdílem, že 1. experiment se pohybuje s dobami okolo  $(3,1 \pm 0,2) \mu\text{s}$  a 2. experiment s dobami okolo  $(2,2 \pm 0,1) \mu\text{s}$ . Ve druhém experimentu vidíme náznak zrcadlového chování oproti dobám života  $^1\text{O}_2$ , kdy se od 80 J dodané energie doba života  $^3\text{RF}$  začíná trochu zvyšovat a od 120 J dodané energie se zase snižuje. Jediný rozdíl v těchto dvou experimentech byl ten, že během 1. experimentu jsme měřili po každých 10 J dodané energie absorpční a fluorescenční spektra, kdežto 2. experiment byl měřený nepřetržitě.

Dohromady ve 2 experimentech pro roztok  $50 \mu\text{M RF} + 0,2 \text{ mM NaN}_3$  a 1 experiment pro roztok  $50 \mu\text{M RF} + 2 \text{ mM NaN}_3$  můžeme pozorovat následující. V dobách života  $^1\text{O}_2$  vidíme 2 experimenty, jeden provedený se vzorkem připravovaným na světle, druhý experiment se vzorkem připravovaným za tmy. Opět zde máme doby života, které se kvalitativně neliší, ale zásadně se liší v hodnotě. Se vzorkem připravovaným na světle zde máme dobu života  $^1\text{O}_2$  neměnicí hodnotu  $(3,0 \pm 0,2) \mu\text{s}$  po celou dobu měření vzhledem k chybám. Pokud přihlídneme k chybám, i ve druhém experimentu pro vzorek připravovaný ve tmě se doba života  $^1\text{O}_2$  nemění. V tomto případě se ale doba života pohybuje okolo  $(2,6 \pm 0,2) \mu\text{s}$ . Doba života  $^1\text{O}_2$  je na koncentraci velmi závislá, a proto tento rozdíl hodnot může být způsobený i rozdílnou koncentrací. V obou experimentech jsme míchali koncentraci 0,2 mM, ale prostor pro chyby určitě je. Pro doby života  $^3\text{RF}$  zde máme navíc jeden experiment pro roztok  $50 \mu\text{M RF} + 2 \text{ mM NaN}_3$ . V těchto kinetikách jsme dostávali velmi slabý signál emise  $^1\text{O}_2$ , který nebylo možné nafitovat. Kinetiky jsme tedy fitovali jenom jednou exponenciálou vyjadřující signál od  $^3\text{RF}$  (viz obrázek č. 62). Na grafu č. 63 vidíme, že doba života  $^3\text{RF}$  v každém z experimentů roste zhruba od 50 J. V experimentu

pro vyšší koncentraci  $\text{NaN}_3$  vidíme tento nárůst nejvyšší. K tomu možná dochází kvůli tomu, že odstraněním  $^1\text{O}_2$  nevznikají některé fotoprodukty, které by měli za následek snižování doby života  $^3\text{RF}$ . Může naopak vznikat více toho produktu, který je odpovědný za prodloužení doby života.

Pro měření efektivitu RF jako zhášče  $^1\text{O}_2$  vytvořeného  $\text{AlPcS}_4$  jsme nejdřív zkoumali dobu života  $^1\text{O}_2$  a  $^3\text{AlPcS}_4$ . Toto měření, které lze vidět na grafu č. 64, zkoumá několik vzorků o různých koncentracích  $\text{AlPcS}_4$  a jejich vliv na doby života. V rámci chyb byla doba života  $^1\text{O}_2$  i  $^3\text{RF}$  konstantní a to na hodnotách  $(4,1 \pm 0,3) \mu\text{s}$  pro doby života  $^1\text{O}_2$  a  $(1,6 \pm 0,4) \mu\text{s}$  pro doby života  $^3\text{AlPcS}_4$ . Tímto měřením jsme našli koncentraci  $5 \mu\text{M}$   $\text{AlPcS}_4$ , kterou budeme používat v následujících měřeních. Malé koncentrace jsou výhodné pro případné interakce s RF. Je to kompromis mezi absorpčními vlastnostmi roztoku a dobou života  $^3\text{AlPcS}_4$ , která se od  $5 \mu\text{M}$  už nemění a chyby určení dob života jsou malé.

V dalších experimentech měříme doby života  $^1\text{O}_2$  a  $^3\text{AlPcS}_4$  pro roztoky  $5 \mu\text{M}$   $\text{AlPcS}_4$  s různou koncentrací RF. Vidíme, že všechny 3 experimenty se kvalitativně v rámci chyb shodují v tvaru křivek pro doby života  $^1\text{O}_2$  i pro doby života  $^3\text{AlPcS}_4$ . Vyšší koncentrace RF nemají viditelný vliv na dobu života  $^1\text{O}_2$  generovaného  $\text{AlPcS}_4$ . Doba života  $^1\text{O}_2$  je zde však podstatně menší oproti experimentu pro RF v PBS. Odpovídá to dobám života naměřených v [69], [70].

Tyto výsledky ukazují, že se RF chová jako účinný fotosensibilizátor singletního kyslíku a naopak nefunguje jako jeho zhášče. To souhlasí s výsledkem z článku [71], kde bylo vyvráceno mnoho jiných výsledků z cizích experimentů o schopnosti RF zhášet  $^1\text{O}_2$ . Tento článek vyšel v době měření této diplomové práce a data byla naměřena nezávisle na článku. Pro více fotorozpadů, tedy větší dodanou energii do vzorku, se doba života  $^1\text{O}_2$  zkracuje v experimentech pro RF v PBS. To je tím, že se ve vzorku nevyskytuje už mnoho molekul čistého RF, nýbrž spíše molekuly jeho fotoproduktů, a singletní kyslík má tedy málo zdrojů pro jeho tvorbu.

Měření RF v  $\text{H}_2\text{O}$  nám ukázalo, že přítomnost fosfátových složek v rozpouštědle je velice zásadní. Měření s  $\text{NaN}_3$  ukázalo, že jeho přítomnost zásadně ovlivňuje dobu života  $^1\text{O}_2$ , která je na koncentraci  $\text{NaN}_3$  velmi závislá. S dostatečnou koncentrací dokonce eliminuje  $^1\text{O}_2$  z velké části, kdy už nejsme schopni dostat informaci o jeho době života z kinetik pomocí námi používaných softwarů, protože kinetiky jsou potom velmi slabé.

## 7 Závěr

Ze změřených **absorpčních spekter** 50  $\mu\text{M}$  roztoku RF jsme byli schopni potvrdit fotodegradaci riboflavinu a tvorbu několika fotoproduktů, jedním z nich je lumichrom. Pro potvrzení ostatních fotoproduktů (tedy lumiflain, formylmethylflavin, případně karboxymethylflavin) byla provedena i **faktorová analýza**, která potvrdila, že se v roztoku po vybělování objevují až 4 fotoprodukty. Pro detailnější určení množství ostatních složek by bylo zapotřebí použít speciální analytické metody, absorpční pásy se v mnohých případech překrývají. Bylo zjištěno, že riboflavin snadno fotodegraduje, a je proto potřeba jej uchovávat za tmy a připravovat jeho roztoky za světla, které neabsorbuje, tedy červené vlnové délky.

Bylo taktéž zjištěno, že **rozpouštědlo** má velký vliv na průběh rozpadu RF. Fosfátové složky přítomné v používaném rozpouštědle PBS urychlovaly průběh fotodegradace a vznik fotoproduktů. Výměnou PBS za deionizovanou vodu jsme vybělování RF výrazně zpomalili.

Přidáním **azidu sodného** (0,2 mM koncentrace) jsme docílili efektivního zhašení singletního kyslíku. Probíhal fotoefekt I. typu, fotoefekt II. typu byl částečně eliminován. To mělo efekt pomalejšího vybělování, stejně jako při záměně rozpouštědla.

Absorpční spektra roztoků 5  $\mu\text{M}$  **ftalocyaninu** a různých koncentrací RF je v části RF stejné. Prokazatelnou změnu jsme zachytili v absorpčním pásu na vlnové délce 673 nm, kde vznikají agregáty RF a ftalocyaninu. Absorpční hodnoty s přidáváním RF se postupně zvyšují na vlnové délce 690 nm a zmenšují na vlnové délce 670 nm, i když na těchto vlnových délkách RF neabsorbuje.

**Fluorescenční spektra** roztoku RF se vybělují různě rychle v závislosti na použitém rozpouštědle. Při čistém roztoku 50  $\mu\text{M}$  RF v PBS a roztoku 50  $\mu\text{M}$  RF + 0,2 mM  $\text{NaN}_3$  v PBS se fluorescenční spektra vybělují podobně rychle. Při rozpuštění v **deionizované vodě** ale vidíme, že fluorescenční spektrum klesá pomaleji.

V průběhu měření se objevuje další fluorescenční pás na vlnové délce 470 nm. Ten vzniká pouze v případech roztoku 50  $\mu\text{M}$  RF rozpuštěného v PBS a nevzniká za použití deionizované vody ani v případě přidání azidu sodného v námi měřených vlnových délkách.

Průběh vybělování fluorescenčního spektra není monotónní a má při dodané energii 2 -5 J lokální maximum. Identifikace tohoto fotoproduktu musí být vyšetřena pomocí specifitějších analytických technik.

Potvrdili jsme, že specifický zhášeč singletního kyslíku  $\text{NaN}_3$  zkracuje dobu života  $^1\text{O}_2$ . Doby života  $^3\text{RF}$  jsou díky tomu stabilní, ale jsou opět menší. Za použití vyšší koncentrace  $\text{NaN}_3$  se neobjevuje žádná doba života  $^1\text{O}_2$  a doba života  $^3\text{RF}$  postupem dodávání energie začíná růst.

Experimenty s  $\text{AlPcS}_4$  potvrdily, že je RF dobrým fotosenzibilizátorem  $^1\text{O}_2$ , ale nijak ho nezháší. Tvorba fotoproduktů je složitá, záleží na přítomnosti fosfátových iontů. Fotodegradace je nejspíše závislá jak na  $^1\text{O}_2$ , tak na excitovaných stavech RF.

## 8 Seznam používaných zkratek

**AlPcS<sub>4</sub>** Al(III) ftalocyanin chlorotetrasulfonát

**<sup>3</sup>AlPcS<sub>4</sub>** tripletní stav AlPcS<sub>4</sub>

**FAD** flavin adenin dinukleotid

**FMN** flavin mononukleotid

**HOMO** nejvyšší okupovaný molekulární orbital (highest occupied molecular orbital)

**IC** vnitřní konverze

**ISC** mezisystémový přechod

**LUMO** nejnižší neokupovaný molekulární orbital (lowest unoccupied molecular orbital)

**NADH** redukovaná forma nikotinamid adenin dinukleotidu

**NAD<sup>+</sup>** oxidovaná forma nikotinamid adenin dinukleotidu

**NADPH** nikotinamid adenin dinukleotid fosfát

**NaN<sub>3</sub>** azid sodný

**<sup>1</sup>O<sub>2</sub>** singletní kyslík

**<sup>3</sup>O<sub>2</sub>** tripletní kyslík

**PS** fotosenzibilizátor

**<sup>3</sup>PS** tripletní stav fotosenzitizéru

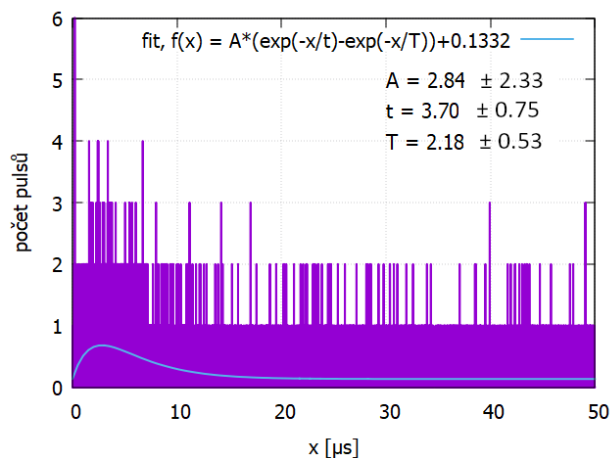
**RF** riboflavin (6,7-dimethyl-9-D-ribitylisoalloxazin)

**<sup>3</sup>RF** tripletní stavy riboflavinu

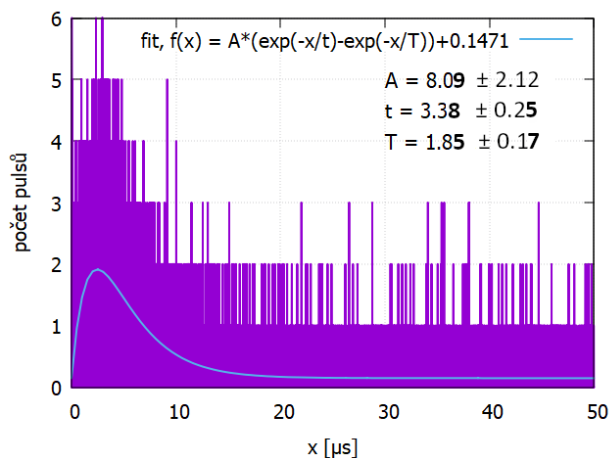
**ROS** reaktivní formy kyslíku

## 9 Příloha

### 9.1 Příklady kinetik

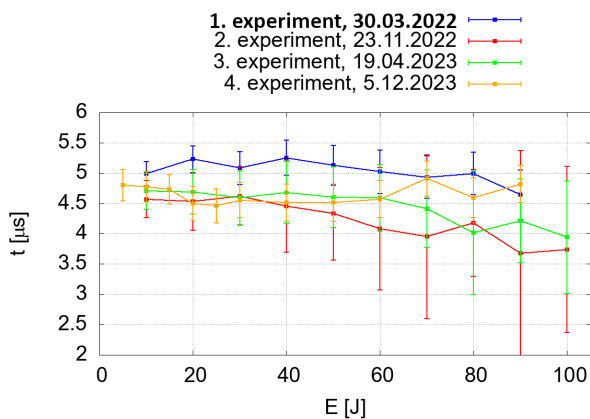


Obrázek 73: 2. experiment pro měření 50 μM RF s 5 μM AlPcS<sub>4</sub>, 2. kinetika.

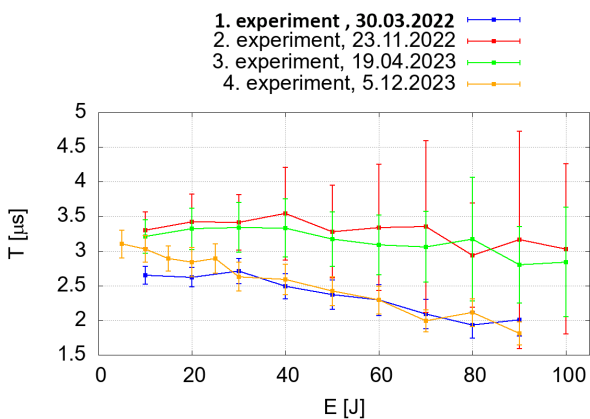


Obrázek 74: 1. experiment pro měření 50 μM RF s 5 μM AlPcS<sub>4</sub>, 2. kinetika.

### 9.2 Kinetiky <sup>1</sup>O<sub>2</sub> a <sup>3</sup>RF pro roztok RF v PBS s chybami



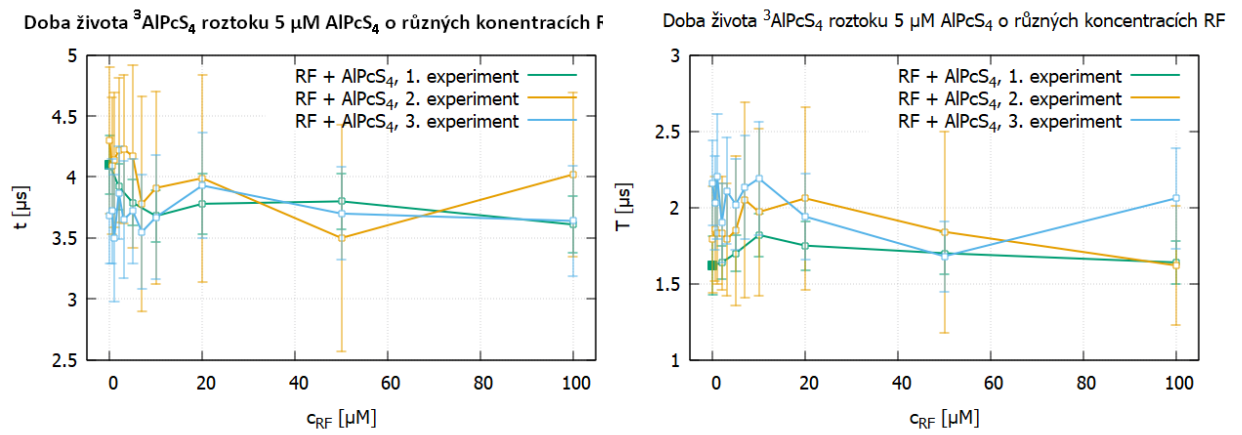
Obrázek 75: Doby života <sup>1</sup>O<sub>2</sub> pro měření RF v PBS, všechny 4 experimenty i s chybami fitů.



Obrázek 76: Doby života <sup>3</sup>RF pro měření RF v PBS, všechny 4 experimenty i s chybami fitů.



### 9.3 Kinetiky $^1\text{O}_2$ a $^3\text{AlPcS}_4$ pro roztok $\text{AlPcS}_4 + \text{RF}$ v PBS s chybami



Obrázek 77: Vlevo doba života  $^1\text{O}_2$ , vpravo doba života  $^3\text{AlPcS}_4$  pro roztoky čistého  $5\ \mu\text{M}$   $\text{AlPcS}_4$  s chybami fitů.

## 9.4 Naměřená data kinetik

Kromě použitých kódů v *GNU PLOTU* zobrazují i tabulky všech měření, co jsme zpracovali. V každé tabulce je sepsáno datum (pokud je o něm záznam), popis měření. Zobrazují se tam i funkce  $f(x)$  a  $g(x)$ . Normálně fitujeme rovnicí (5.1), tedy  $f(x)$ , ale zkoušeli jsme i rovnici (2.11), tedy  $g(x)$ , zda-li bude výsledek odlišný. Měření některých experimentů jsme prováděli vícekrát. Tato měření jsou popsána jako **1. měření**, **2. měření**, **3. měření**, případně **4. měření**.

V tabulce vystupuje konstanta  $A$ , která popisuje amplitudu fitované funkce, doba života  $t$ , která popisuje dobu života  $^1\text{O}_2$ , doba života  $T$ , která popisuje dobu života  $^3\text{RF} / ^3\text{AlPcS}_4$ , a konstanta  $c$ , která popisuje velikost pozadí.  $T$  a  $t$  jsou vyjádřeny v  $\mu$ -sekundách,  $A$  a  $c$  mají význam hodnoty v počtu zaznamenaných fotonů.

```
1 f(x) = f(x) = A*(exp(-x/t)-exp(-x/T)) ;
2
3 set print 'data_fit.txt' ;
4 do for[i=1:10]{;
5 A = 15 ;
6 t = 5 ;
7 T = 2 ;
8 num = i+1 ;
9 fit[75:100] c 'data.dat' u 1:num via c ;\clearpage
10 fit[0.3:100] f(x)+c 'data.dat' u 1:num via A,t,T ;
11 print A, A_err, t, t_err, T, T_err, c, c_err} ;
```

Kód 1: Kód pro určení parametrů fitů jedné sady kinetik.

```
1 set grid; set encoding utf8; set terminal png size 600,400; f(x) = A*(
  exp(-x/t)-exp(-x/T)); set xrange [0:50]; set yrange [0:15] ;
2 seznam = 'ABCDEFGHJIJ' ;
3 do for[i=1:10]{;
4 letter = substr(seznam, i, i) ;
5 set print 'fit_data_' .letter. '.txt' ;
6 do for[j=1:10]{;
7 A = 25 ;
8 t = 4 ;
9 T = 2.8 ;
10 num = j+1 ;
11 fit[75:100] c 'data_' .letter. '.txt' u 1:num via c ;
12 fit[0.3:100] f(x)+c 'data_' .letter. '.txt' u 1:num via A,t,T ;
13 set label 1 sprintf("A = %3.4f",A) at 35,12 font "arialbd,16" ;
14 set label 2 sprintf("t = %3.4f",t) at 35,11 font "arialbd,16" ;
15 set label 3 sprintf("T = %3.4f",T) at 35,10 font "arialbd,16" ;
16 set output 'graf_data_' .letter. '_' .j. '.png' ;
17 print A, A_err, t, t_err, T, T_err, c, c_err ;
18 plot 'data_' .letter. '.txt' u 1:num w l t '', f(x)+c lw 3 t 'fit, f(x) =
  A*(exp(-x/t)-exp(-x/T))' ;
```

Kód 2: Kód pro fitaci kinetik singletního kyslíku jednotlivých sad a zanesení do grafu.

Tabulka 7: Tabulka pro nařitované hodnoty pro měření roztoku 50  $\mu\text{M}$  RF v PBS.

E [J]	A [U]	$\sigma_A$ [U]	t [ $\mu\text{s}$ ]	$\sigma_t$ [ $\mu\text{s}$ ]	T [ $\mu\text{s}$ ]	$\sigma_T$ [ $\mu\text{s}$ ]	c [U] $\cdot 10^{-2}$	$\sigma_c \cdot 10^{-2}$ [U]
RF v PBS - 1. měření, 30. 03. 2022								
10	17,20	2,52	4,99	0,20	2,65	0,13	16,08	0,57
20	12,63	1,77	5,23	0,22	2,62	0,14	16,00	0,57
30	11,02	2,24	5,08	0,27	2,71	0,18	16,34	0,57
40	7,86	1,71	5,25	0,29	2,49	0,18	16,50	0,58
50	6,55	2,38	5,13	0,33	2,37	0,21	16,34	0,58
60	5,09	1,36	5,02	0,36	2,29	0,22	16,83	0,58
70	4,25	1,14	4,93	0,35	2,09	0,21	16,57	0,58
80	3,30	0,64	4,99	0,35	1,93	0,19	16,67	0,58
90	3,65	1,25	4,64	0,41	2,01	0,24	16,46	0,57
RF v PBS - 2. měření, 23. 11. 2022								
10	41,87	24,97	4,57	0,31	3,30	0,26	11,80	0,49
20	38,21	53,60	4,53	0,47	3,42	0,40	11,87	0,49
30	25,03	25,08	4,62	0,48	3,41	0,40	12,04	0,49
40	26,95	55,78	4,45	0,76	3,54	0,67	11,95	0,49
50	22,62	60,68	4,33	0,77	3,28	0,67	12,51	0,50
60	21,22	68,46	4,08	1,01	3,34	0,91	12,46	0,50
70	24,71	156,96	3,95	1,35	3,35	1,24	12,56	0,50
80	11,37	28,35	4,18	0,88	2,94	0,75	12,59	0,50
90	20,28	181,40	3,68	1,69	3,16	1,57	12,88	0,51
100	14,19	109,11	3,74	1,37	3,03	1,23	13,17	0,51
RF v PBS - 3. měření, 19. 04. 2023								
10	37,41	20,36	4,70	0,30	3,21	0,24	14,25	0,38
20	25,95	13,84	4,69	0,37	3,32	0,30	13,99	0,37
30	26,19	19,17	4,59	0,44	3,34	0,36	14,38	0,38
40	18,41	15,87	4,68	0,51	3,33	0,42	14,52	0,38
50	13,90	8,98	4,60	0,50	3,17	0,39	14,65	0,38
60	11,26	8,67	4,59	0,55	3,09	0,43	14,67	0,38
70	10,98	11,82	4,41	0,64	3,06	0,51	13,28	0,38
80	14,63	41,02	4,01	1,02	3,17	0,89	15,06	0,39
90	9,07	16,61	4,21	0,69	2,80	0,55	15,18	0,39
100	10,23	28,80	3,94	0,93	2,84	0,79	15,36	0,39
RF v PBS - 4. měření, 5. 12. 2023								
5	28,08	8,28	4,80	0,26	3,10	0,20	12,78	0,50
10	23,69	6,54	4,77	0,25	3,03	0,19	13,00	0,51
15	19,81	4,72	4,73	0,24	2,89	0,18	12,61	0,50
20	18,15	5,51	4,50	0,28	2,84	0,21	13,09	0,51
25	20,44	6,28	4,46	0,28	2,89	0,21	12,68	0,50
30	12,46	4,17	4,55	0,29	2,63	0,21	13,27	0,52
40	10,36	3,18	4,51	0,31	2,59	0,22	13,44	0,52
50	7,19	1,73	4,51	0,31	2,42	0,21	13,90	0,52
60	6,20	1,43	4,57	0,31	2,29	0,20	13,96	0,53
70	4,41	0,80	4,91	0,29	1,99	0,16	13,54	0,52
80	4,47	0,95	4,59	0,33	2,11	0,20	14,63	0,54
90	3,70	0,77	4,82	0,31	1,81	0,17	14,53	0,54

Tabulka 8: Tabulka pro nafitované hodnoty pro měření roztoku 50  $\mu\text{M}$  RF v  $\text{H}_2\text{O}$ .

E [J]	A [U]	$\sigma_A$ [U]	t [ $\mu\text{s}$ ]	$\sigma_t$ [ $\mu\text{s}$ ]	T [ $\mu\text{s}$ ]	$\sigma_T$ [ $\mu\text{s}$ ]	c [U] $\cdot 10^{-2}$	$\sigma_c \cdot 10^{-2}$ [U]
RF v $\text{H}_2\text{O}$ - 1. měření, 26. 04. 2023								
10	45,46	11,70	4,91	0,21	3,21	0,16	14,53	0,38
20	25,78	2,69	5,43	0,16	2,92	0,11	14,48	0,38
30	26,51	2,87	5,34	0,16	2,89	0,11	14,79	0,39
40	21,04	3,61	5,42	0,20	2,94	0,14	15,18	0,39
50	22,69	2,76	5,34	0,18	2,92	0,12	15,23	0,39
60	20,77	8,03	5,06	0,33	3,28	0,26	15,29	0,39
70	20,01	8,49	5,01	0,36	3,29	0,28	15,53	0,39
80	17,81	7,22	4,96	0,36	3,22	0,28	16,07	0,40
90	19,27	8,24	4,87	0,39	3,30	0,30	15,96	0,40
100	11,41	4,18	4,62	0,33	2,83	0,24	14,62	0,36
RF v $\text{H}_2\text{O}$ - 2. měření, 6. 12. 2023								
10	19,90	1,67	5,07	0,13	2,23	0,08	12,37	0,50
20	15,87	1,25	5,14	0,14	2,30	0,08	12,60	0,50
30	13,62	1,08	5,28	0,14	2,20	0,08	12,81	0,51
40	13,18	1,31	5,14	0,16	2,32	0,10	13,14	0,51
50	10,65	0,91	5,28	0,16	2,20	0,09	13,20	0,51
60	9,78	0,94	5,22	0,18	2,25	0,11	13,17	0,51
70	8,46	0,81	5,25	0,19	2,16	0,11	13,46	0,52
80	7,19	0,76	5,44	0,20	2,07	0,11	13,40	0,52
90	6,95	0,93	5,26	0,22	2,16	0,13	13,62	0,52
100	6,51	0,91	5,16	0,24	2,23	0,14	13,78	0,52
110	6,37	1,18	5,00	0,27	2,24	0,16	13,85	0,52
120	6,76	2,18	4,81	0,34	2,45	0,23	13,73	0,52
130	4,54	0,78	5,24	0,29	2,07	0,16	13,92	0,53
140	3,82	0,45	5,51	0,28	1,96	0,14	14,06	0,53

Tabulka 9: Tabulka pro naitované hodnoty pro měření roztoku 50  $\mu\text{M}$  RF + 0,2 mM  $\text{NaN}_3$  v PBS;  $f(x) = A \cdot (\exp(\frac{-x}{t}) - \exp(\frac{-x}{T}))$ ,  $g(x) = \frac{A^*}{1/T-1/t} \cdot (\exp(\frac{-x}{t}) - \exp(\frac{-x}{T}))$ .

E [J]	A / A* [U]	$\sigma_A$ [U]	t [ $\mu\text{s}$ ]	$\sigma_t$ [ $\mu\text{s}$ ]	T [ $\mu\text{s}$ ]	$\sigma_T$ [ $\mu\text{s}$ ]	c [U] $\cdot 10^{-2}$	$\sigma_c \cdot 10^{-2}$ [U]
RF + $\text{NaN}_3$ v PBS, $\mathbf{f}(\mathbf{x})$ - 1. měření, 31. 03. 2022								
10	6,49	0,36	2,82	0,08	0,81	0,04	14,15	0,53
20	5,69	0,31	2,95	0,09	0,81	0,04	14,41	0,54
30	5,06	0,34	2,94	0,10	0,82	0,05	14,77	0,54
40	4,39	0,35	2,92	0,12	0,82	0,05	14,56	0,54
50	3,88	0,36	2,93	0,14	0,83	0,06	14,95	0,55
60	3,36	0,38	3,03	0,16	0,85	0,07	15,05	0,55
70	3,18	0,45	3,01	0,18	0,90	0,09	15,12	0,55
80	2,98	0,49	2,97	0,20	0,95	0,10	15,51	0,56
90	3,06	0,81	2,94	0,24	1,01	0,13	15,46	0,56
RF + $\text{NaN}_3$ v PBS, $\mathbf{g}(\mathbf{x})$ - 1. měření, 31. 03. 2022								
10	5,74	0,17	2,82	0,08	0,81	0,04	14,15	0,53
20	5,09	0,16	2,95	0,09	0,81	0,04	14,41	0,54
30	4,46	0,16	2,94	0,10	0,82	0,05	14,77	0,54
40	3,82	0,15	2,92	0,12	0,82	0,05	14,56	0,54
50	3,34	0,16	2,94	0,14	0,83	0,06	14,95	0,55
60	2,82	0,15	3,02	0,16	0,86	0,07	15,05	0,55
70	2,38	0,13	3,01	0,18	0,90	0,09	15,12	0,55
80	2,08	0,12	2,97	0,20	0,95	0,10	15,51	0,56
90	1,89	0,12	2,91	0,31	1,04	0,20	15,46	0,56
RF + $\text{NaN}_3$ v PBS - 2. měření, 30. 11. 2022 <sup>23</sup>								
10	1,34	0,07	0,99	0,06	-	-	12,87	0,36
20	0,99	0,06	1,18	0,10	-	-	12,89	0,36
30	0,84	0,06	1,21	0,11	-	-	13,15	0,36
40	0,79	0,06	1,26	0,12	-	-	13,05	0,36
50	0,77	0,05	1,41	0,13	-	-	13,54	0,37
60	0,64	0,05	1,60	0,17	-	-	13,75	0,37
70	0,57	0,05	1,75	0,20	-	-	13,67	0,37
80	0,62	0,05	1,60	0,17	-	-	13,85	0,37
90	0,49	0,04	2,16	0,27	-	-	14,09	0,37
100	0,49	0,04	1,62	0,19	-	-	12,87	0,34
RF + $\text{NaN}_3$ v PBS - 3. měření, 20. 04. 2023								
10	14,12	2,46	2,42	0,12	1,26	0,08	13,85	0,52
20	11,85	1,84	2,48	0,12	1,21	0,08	14,13	0,53
30	13,32	4,26	2,44	0,16	1,32	0,11	14,37	0,54
40	9,72	2,74	2,50	0,17	1,32	0,11	14,73	0,54
50	6,99	1,44	2,67	0,16	1,20	0,10	14,71	0,54
60	6,54	1,66	2,72	0,18	1,22	0,11	14,95	0,55
70	5,96	1,71	2,71	0,20	1,25	0,13	14,67	0,54
80	5,44	1,75	2,77	0,23	1,30	0,15	14,68	0,54
90	5,24	2,75	2,76	0,29	1,33	0,20	14,60	0,54
100	5,36	2,03	2,77	0,25	1,30	0,16	14,74	0,54

Tabulka 10: Tabulka pro naitované hodnoty pro měření x  $\mu\text{M}$  roztoku AlPcS<sub>4</sub> v PBS;  $f(x) = A \cdot (\exp(\frac{-x}{t}) - \exp(\frac{-x}{T}))$ ,  $g(x) = \frac{A^*}{1/T-1/t} \cdot (\exp(\frac{-x}{t}) - \exp(\frac{-x}{T}))$ .

c [ $\mu\text{M}$ ]	A / A* [U]	$\sigma_A$ [U]	t [ $\mu\text{s}$ ]	$\sigma_t$ [ $\mu\text{s}$ ]	T [ $\mu\text{s}$ ]	$\sigma_T$ [ $\mu\text{s}$ ]	c [U] $\cdot 10^{-2}$	$\sigma_c \cdot 10^{-2}$ [U]
AlPcS <sub>4</sub> v PBS, <b>f(x)</b> - 1. měření, 06. 04. 2022								
1	3,84	16,92	3,19	1,38	2,12	1,12	15,85	0,56
2	4,61	4,26	3,57	0,49	1,87	0,34	15,49	0,56
5	6,77	0,89	3,99	0,19	1,65	0,11	16,00	0,56
10	10,70	0,71	4,08	0,12	1,56	0,06	15,78	0,57
20	20,02	1,45	3,87	0,10	1,72	0,06	15,08	0,55
50	18,91	0,91	4,01	0,08	1,56	0,04	14,94	0,55
AlPcS <sub>4</sub> v PBS, <b>g(x)</b> - 1. měření, 06. 04. 2022								
1	0,59	0,07	1,64	1,08	3,98	1,37	15,85	0,56
2	1,05	0,06	1,79	6,90	3,77	6,99	15,49	0,56
5	2,37	0,07	1,65	0,11	3,98	0,19	16,00	0,56
10	4,20	0,08	2,23	0,08	3,38	0,10	15,78	0,57
20	6,36	0,09	3,09	0,08	2,50	0,07	15,08	0,55
50	7,33	0,10	2,21	0,05	3,36	0,07	14,94	0,55

<sup>23</sup>Pro tabulku č. 9 - Namíchání roztoku bylo špatně provedeno, konečný roztok měl koncentraci 10x větší, takže naměřené kinetiky nebyly fitovatelné funkcí (5.1) ani (2.11), fitovali jsme tedy pouze jednoexponenciální funkcí.

Tabulka 11: Tabulka pro nabitované hodnoty pro měření roztoku  $x \mu\text{M} + 5 \mu\text{M AlPcS}_4$  v PBS;  $f(x) = A \cdot (\exp(\frac{-x}{t}) - \exp(\frac{-x}{T}))$ ,  $g(x) = \frac{A^*}{1/T-1/t} \cdot (\exp(\frac{-x}{t}) - \exp(\frac{-x}{T}))$ .

$c[\mu\text{M}]$	$A / A^* [\text{U}]$	$\sigma_A [\text{U}]$	$t [\mu\text{s}]$	$\sigma_t [\mu\text{s}]$	$T [\mu\text{s}]$	$\sigma_T [\mu\text{s}]$	$c [\text{U}] \cdot 10^{-2}$	$\sigma_c \cdot 10^{-2} [\text{U}]$
RF + AlPcS <sub>4</sub> v PBS, <b>f(x)</b> - 1. měření, 13. 04. 2022								
2	6,80	0,99	3,92	0,19	1,64	0,11	15,37	0,56
5	8,42	1,62	3,79	0,19	1,70	0,12	15,42	0,56
10	8,21	1,58	3,68	0,21	1,82	0,14	15,41	0,55
20	6,73	2,28	3,78	0,25	1,75	0,16	14,99	0,55
50	6,35	1,50	3,80	0,23	1,70	0,14	14,84	0,55
100	6,38	1,54	3,61	0,23	1,64	0,14	14,68	0,54
RF + AlPcS <sub>4</sub> v PBS, <b>g(x)</b> - 1. měření, 13. 04. 2022								
2	2,34	0,07	3,92	0,19	1,64	0,11	15,37	0,56
5	2,52	0,07	3,69	0,30	1,79	0,24	15,42	0,56
10	2,23	0,06	3,62	0,23	1,87	0,16	15,41	0,55
20	1,89	0,06	3,78	0,25	1,75	0,16	14,99	0,55
50	1,92	0,07	3,80	0,23	1,70	0,14	14,84	0,55
100	1,99	0,07	3,56	0,32	1,68	0,23	14,68	0,54
RF + AlPcS <sub>4</sub> v PBS - 2. měření, 07. 12. 2022								
0	2,06	1,07	4,30	0,60	1,79	0,35	12,61	0,35
0,5	2,14	0,96	4,09	0,56	1,86	0,34	12,94	0,36
1	2,08	0,86	4,14	0,55	1,83	0,33	12,90	0,36
2	2,12	1,27	4,22	0,59	1,83	0,37	13,32	0,36
3	1,93	1,25	4,23	0,61	1,79	0,37	13,48	0,37
5	2,05	3,39	4,17	0,75	1,85	0,49	13,38	0,37
7	2,77	5,16	3,78	0,88	2,05	0,64	13,49	0,37
10	2,51	3,74	3,91	0,79	1,97	0,55	13,65	0,37
20	2,71	4,50	3,99	0,85	2,06	0,60	14,07	0,37
50	1,95	3,21	3,50	0,93	1,84	0,66	11,28	0,32
100	1,26	0,86	4,02	0,67	1,62	0,39	11,41	0,32
RF + AlPcS <sub>4</sub> v PBS - 3. měření, 03. 05. 2023								
0	7,44	4,51	3,68	0,39	2,16	0,28	13,09	0,36
0,5	6,56	9,42	3,72	0,43	2,03	0,31	12,99	0,36
1	8,78	14,11	3,50	0,52	2,20	0,41	12,81	0,36
2	5,12	3,92	3,87	0,38	1,90	0,26	13,19	0,36
3	5,82	4,44	3,65	0,48	2,11	0,35	13,31	0,36
5	4,59	2,42	3,72	0,43	2,02	0,30	11,60	0,34
7	6,11	4,58	3,55	0,47	2,13	0,34	12,18	0,35
10	5,20	3,49	3,67	0,51	2,19	0,37	13,24	0,36
20	3,72	1,67	3,93	0,43	1,94	0,28	13,02	0,36
50	2,72	0,96	3,70	0,38	1,68	0,23	11,99	0,33
100	5,90	5,51	3,64	0,45	2,06	0,33	13,18	0,70

## Literatura

1. MOUČKA, Jan. *Vliv riboflavinu na zhášení singletního kyslíku*. 2021.
2. SAID, Hamid M. Water-soluble vitamins: Absorption, metabolism, and deficiency. *Encyclopedia of Gastroenterology*. 2004, 631–637. Dostupné z DOI: 10.1016/b0-12-386860-2/00096-4.
3. WebMD, [b.r.]. Dostupné také z: <https://www.webmd.com/vitamins/ai/ingredientmono-957/riboflavin>.
4. U.S. Department of Health a Human Services, [b.r.]. Dostupné také z: <https://ods.od.nih.gov/factsheets/Riboflavin-HealthProfessional/>.
5. MAHABADI, N; BHUSAL, A; BANKS, S W. Riboflavin Deficiency. In: *StatPearls*. StatPearls Publishing, 2023.
6. BRIGGS, Winslow R.; CHRISTIE, John M.; SALOMON, Michael. Phototropins: A new family of flavin-binding blue light receptors in plants. *Antioxidants amp; Redox Signaling*. 2001, roč. 3, č. 5, 775–788. Dostupné z DOI: 10.1089/15230860152664975.
7. SHARMA, Lokendra; LU, Jianxin; BAI, Yidong. Mitochondrial respiratory complex I: Structure, function and implication in human diseases. *Current Medicinal Chemistry*. 2009, roč. 16, č. 10, 1266–1277. Dostupné z DOI: 10.2174/092986709787846578.
8. Wikimedia Foundation, 2022. Dostupné také z: [https://simple.wikipedia.org/wiki/Electron\\_transport\\_chain](https://simple.wikipedia.org/wiki/Electron_transport_chain).
9. RUCKER, Robert B.; STEINBERG, Francene M.; CHOWANADISAI, Winyoo. Organic: Biochemical mechanisms and regulation of vitamins and vitamin-like cofactors. *Encyclopedia of Human Nutrition*. 2023, 215–249. Dostupné z DOI: 10.1016/b978-0-12-821848-8.00156-6.
10. STIEF, Thomas W. The physiology and pharmacology of singlet oxygen. *Medical Hypotheses*. 2003, roč. 60, č. 4, 567–572. Dostupné z DOI: 10.1016/s0306-9877(03)00026-4.
11. RUCKER, Robert B.; STEINBERG, Francene M.; CHOWANADISAI, Winyoo. Organic: Biochemical mechanisms and regulation of vitamins and vitamin-like cofactors. *Encyclopedia of Human Nutrition*. 2023, 215–249. Dostupné z DOI: 10.1016/b978-0-12-821848-8.00156-6.
12. WARIS, Gulam; AHSAN, Haseeb. *Journal of Carcinogenesis*. 2006, roč. 5, č. 1, s. 14. Dostupné z DOI: 10.1186/1477-3163-5-14.
13. LOBO, V; PATIL, A; PHATAK, A; CHANDRA, N. Free radicals, antioxidants and Functional Foods: Impact on human health. *Pharmacognosy Reviews*. 2010, roč. 4, č. 8, s. 118. Dostupné z DOI: 10.4103/0973-7847.70902.
14. RAHAL, Anu; KUMAR, Amit; SINGH, Vivek; YADAV, Brijesh; TIWARI, Ruchi; CHAKRABORTY, Sandip; DHAMA, Kuldeep. Oxidative stress, prooxidants, and antioxidants: The interplay. *BioMed Research International*. 2014, roč. 2014, 1–19. Dostupné z DOI: 10.1155/2014/761264.
15. PURE, The International Union of; (IUPAC), Applied Chemistry. *Luminescence (L03641)*. [B.r.]. Dostupné také z: <https://goldbook.iupac.org/terms/view/L03641>.



16. KAROLCZAK, J; KOMAR, D; KUBICKI, J; WRÓŻOWA, T; DOBEK, K; CIE-SIELSKA, B; MACIEJEWSKI, A. The measurements of picosecond fluorescence lifetimes with high accuracy and subpicosecond precision. *Chemical Physics Letters*. 2001, roč. 344, č. 1–2, 154–164. Dostupné z DOI: 10.1016/s0009-2614(01)00689-3.
17. KAFLE, Bhim Prasad. Molecular luminescence spectroscopy. *Chemical Analysis and Material Characterization by Spectrophotometry*. 2020, 269–296. Dostupné z DOI: 10.1016/b978-0-12-814866-2.00009-9.
18. [B.r.]. Dostupné také z: <https://micro.magnet.fsu.edu/primer/techniques/fluorescence/fluorescenceintro.html>.
19. PREISLER, Jan; TÁBORSKÝ, Petr. *Molekulová luminescence*. Ústav chemie, PŘF MU, 2014.
20. SCHOLZ, Marek; DĚDIC, Roman; HÁLA, Jan. Microscopic time-resolved imaging of singlet oxygen by delayed fluorescence in living cells. *Photochemical amp; Photobiological Sciences*. 2017, roč. 16, č. 11, 1643–1653. Dostupné z DOI: 10.1039/c7pp00132k.
21. VINKLÁREK, Ivo S.; SCHOLZ, Marek; DĚDIC, Roman; HÁLA, Jan. Singlet oxygen feedback delayed fluorescence of protoporphyrin IX in Organic Solutions. *Photochemical amp; Photobiological Sciences*. 2017, roč. 16, č. 4, 507–518. Dostupné z DOI: 10.1039/c6pp00298f.
22. PEDIO, Maddalena; RESSEL, Barbara. Introduction to Electronic Properties and Dynamics of Organic Complexes as Self-Assembled Monolayers. In: 2017. ISBN 978-953-51-3157-1. Dostupné z DOI: 10.5772/68111.
23. LAKOWICZ, Joseph R.; WEBER, Gregorio. Quenching of fluorescence by oxygen. probe for structural fluctuations in macromolecules. *Biochemistry*. 1973, roč. 12, č. 21, 4161–4170. Dostupné z DOI: 10.1021/bi00745a020.
24. LAKOWICZ, Joseph R. Principles of fluorescence spectroscopy. In: Springer, 2010, kap. 8.
25. *Singlet oxygen*. 2020. Dostupné také z: [https://en.wikipedia.org/wiki/Singlet\\_oxygen](https://en.wikipedia.org/wiki/Singlet_oxygen).
26. DĚDIC, Roman. Luminescence Detection of Singlet Oxygen in Photosynthesis and Photodynamic Therapy. *Habilitační práce*. 2011.
27. WANG, Shizhong; GAO, Ruomei; ZHOU, Feimeng; SELKE, Matthias. Nanomaterials and singlet oxygen photosensitizers: potential applications in photodynamic therapy. *Journal of Materials Chemistry*. 2004, roč. 14, č. 4, s. 487. Dostupné z DOI: 10.1039/b311429e.
28. XIN, Jing; WANG, Sijia; WANG, Bing; WANG, Jiazhuang; WANG, Jing; ZHANG, Luwei; XIN, Bo; SHEN, Lijian; ZHANG, Zhenxi; YAO, Cuiping. AlPcS4-pdt for gastric cancer therapy using gold nanorod, cationic liposome, and pluronic® F127 nanomicellar drug carriers. *International Journal of Nanomedicine*. 2018, roč. Volume 13, 2017–2036. Dostupné z DOI: 10.2147/ijn.s154054.
29. UPRETY, Bhawna; ABRAHAMSE, Heidi. Semiconductor quantum dots for photodynamic therapy: Recent advances. *Frontiers in Chemistry*. 2022, roč. 10. Dostupné z DOI: 10.3389/fchem.2022.946574.
30. ATCC, [b.r.]. Dostupné také z: <https://www.atcc.org/products/crl-6322>.

31. KRAJCZEWSKI, Jan; RUCIŃSKA, Karolina; TOWNLEY, Helen E.; KUDELSKI, Andrzej. Role of various nanoparticles in photodynamic therapy and detection methods of singlet oxygen. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*. 2019, roč. 26, 162–178. Dostupné z DOI: 10.1016/j.pdpdt.2019.03.016.
32. SAU, Tapan K.; MURPHY, Catherine J. Seeded high yield synthesis of short au nanorods in aqueous solution. *Langmuir*. 2004, roč. 20, č. 15, 6414–6420. Dostupné z DOI: 10.1021/la049463z.
33. SHANG, Liang; ZHOU, Xinglu; ZHANG, Jiarui; SHI, Yujie; ZHONG, Lei. Metal nanoparticles for photodynamic therapy: A potential treatment for breast cancer. *Molecules*. 2021, roč. 26, č. 21, s. 6532. Dostupné z DOI: 10.3390/molecules26216532.
34. YANG, Zhijing; WANG, Dongxu; ZHANG, Chenyu; LIU, Huimin; HAO, Ming; KAN, Shaoning; LIU, Dianfeng; LIU, Weiwei. The applications of gold nanoparticles in the diagnosis and treatment of gastrointestinal cancer. *Frontiers in Oncology*. 2022, roč. 11. Dostupné z DOI: 10.3389/fonc.2021.819329.
35. ANDERSON, Reagan. *Light therapy | photodynamic (PDT) [dermatology]*. Doctorpedia, 2018. Dostupné také z: <https://www.youtube.com/watch?v=SFbnvYQ1hA>.
36. INSTITUTE, The Woodruff. *Photodynamic therapy (PDT) is a powerful tool to take care of sun-damaged skin!* 2017. Dostupné také z: <https://www.thewoodruffinstitute.com/photodynamic-therapy-pdt-powerful-tool-take-care-sun-damaged-skin/>.
37. HAMBLIN, Michael R. Photodynamic therapy for cancer: What's past is prologue. *Photochemistry and Photobiology*. 2020, roč. 96, č. 3, 506–516. Dostupné z DOI: 10.1111/php.13190.
38. POLAT, Ece; KANG, Kyungsu. Natural photosensitizers in antimicrobial photodynamic therapy. *Biomedicines*. 2021, roč. 9, č. 6, s. 584. Dostupné z DOI: 10.3390/biomedicines9060584.
39. [B.r.]. Dostupné také z: <https://www.selleckchem.com/datasheet/flavin-mononucleotide-S510700-DataSheet.html>.
40. U.S. National Library of Medicine, [b.r.]. Dostupné také z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Riboflavin#section=Solubility>.
41. ABBAS, Charles A.; SIBIRNY, Andriy A. Genetic control of biosynthesis and transport of riboflavin and flavin nucleotides and construction of robust biotechnological producers. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 2011, roč. 75, č. 2, 321–360. Dostupné z DOI: 10.1128/mmb.00030-10.
42. DUYVIS, Martina G.; HILHORST, Riet; LAANE, Colja; EVANS, David J.; SCHMEDDING, Diederik J. Role of riboflavin in beer flavor instability: determination of levels of riboflavin and its origin in beer by fluorometric apoprotein titration. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2002, roč. 50, č. 6, 1548–1552. Dostupné z DOI: 10.1021/jf010511k.
43. HAND, David B.; SHARP, Paul F. The riboflavin content of cow's milk. *Journal of Dairy Science*. 1939, roč. 22, č. 10, 779–783. Dostupné z DOI: 10.3168/jds.s0022-0302(39)92936-x.
44. WOŹNIAK, Dagmara; CICHY, Wojciech; DOBRZYŃSKA, Małgorzata; PRZYŚLAWSKI, Juliusz; DRZYMAŁA-CZYŻ, Sławomira. Reasonableness of enriching cow's milk with vitamins and minerals. *Foods*. 2022, roč. 11, č. 8, s. 1079. Dostupné z DOI: 10.3390/foods11081079.

45. [B.r.]. Dostupné také z: <https://www.medkoo.com/products/10466#:~:text=Description%3A%20AlPcS4%20%2C%20also%20known%20as,therapy%20and%20cancer%20photodynamic%20therapy..>
46. BANCIROVA, Martina. Sodium azide as a specific quencher of singlet oxygen during chemiluminescent detection by luminol and cypridina luciferin analogues. *Luminescence*. 2011, roč. 26, č. 6, 685–688. Dostupné z DOI: 10.1002/bio.1296.
47. MIYOSHI, Norio; TOMITA, Giiti. Quenching of singlet oxygen by sodium azide in reversed micellar systems. *Zeitschrift für Naturforschung B*. 1979, roč. 34, č. 2, 339–343. Dostupné z DOI: 10.1515/znb-1979-0239.
48. HUANG, R.; CHOE, E.; MIN, D.B. Kinetics for singlet oxygen formation by riboflavin photosensitization and the reaction between riboflavin and singlet oxygen. *Journal of Food Science*. 2004, roč. 69, č. 9. Dostupné z DOI: 10.1111/j.1365-2621.2004.tb09924.x.
49. BELTUKOVA, D. M.; BELIK, V. P.; VASYUTINSKII O. S., E-mail: osv@pms.ioffe.ru; GADZHIEV, I. M.; GONCHAROV, S. E.; SEMENOVA, I. V. Luminescence of Radachlorin Photosensitizer in Aqueous Solution under Excitation at 405 and 660 nm. *Optics and Spectroscopy*. 2018, roč. 124, č. 1. ISSN 0030-400X. Dostupné z DOI: 10.1134/S0030400X18010034.
50. 2024. Dostupné také z: <https://ekspla.com/product/nt242-series-tunable-wavelength-nanosecond-lasers/>.
51. O'SHEA, Christopher; HOLMES, Andrew P.; WINTER, James; CORREIA, Joao; OU, Xianhong; DONG, Ruirui; HE, Shicheng; KIRCHHOF, Paulus; FABRITZ, Larissa; RAJPOOT, Kashif; AL., et. Cardiac optogenetics and optical mapping – overcoming spectral congestion in all-optical cardiac electrophysiology. *Frontiers in Physiology*. 2019, roč. 10. Dostupné z DOI: 10.3389/fphys.2019.00182.
52. INC., Matsusada Precision. *Photomultiplier tubes: Application*. [B.r.]. Dostupné také z: [https://www.matsusada.com/application/ps/photomultiplier\\_tubes/](https://www.matsusada.com/application/ps/photomultiplier_tubes/).
53. 2022. Dostupné také z: <https://www.becker-hickl.com/products/photon-counter-multiscaler/>.
54. KARTHIKEYAN, Sivakumaran. Spectroscopic Study of Characterisation of Commercial Drug and its Mixture. In: 2012. Dostupné z DOI: 10.13140/2.1.1302.1127.
55. ABRAMCZYK, H.; BROZEK-PLUSKA, Beata; SURMACKI, Jakub; MUSIAL, Jacek; KORDEK, Radzislaw. Oncologic photodynamic diagnosis and therapy: Confocal Raman/fluorescence imaging of metal phthalocyanines in human breast cancer tissue in vitro. *Analyst*. 2014, roč. 139. Dostupné z DOI: 10.1039/C4AN00966E.
56. SHERAZ, Muhammad; KAZI, Sadia; AHMED, Sofia; QADEER, Kiran; KHAN, Marium; AHMAD, Iqbal. Multicomponent spectrometric analysis of riboflavin and photoproducts and their kinetic applications. *Open Chemistry*. 2014, roč. 12, č. 6, 635–642. Dostupné z DOI: 10.2478/s11532-014-0527-1.
57. PALACKÝ, Jan; MOJZEŠ, Peter; BOK, Jiří. SVD-based method for intensity normalization, background correction and solvent subtraction in Raman spectroscopy exploiting the properties of water stretching vibrations. *Journal of Raman Spectroscopy*. 2011, roč. 42, č. 7, 1528–1539. Dostupné z DOI: 10.1002/jrs.2896.

58. NOHR, D.; BIESALSKI, H.K. Vitamin B2. *Reference Module in Food Science*. 2016. Dostupné z DOI: 10.1016/b978-0-08-100596-5.01072-6.
59. AHMAD, Iqbal; MIRZA, Tania; ANWAR, Zubair; EJAZ, Muhammad Ahsan; SHERAZ, Muhammad Ali; AHMED, Sofia. Multicomponent spectrofluorimetric method for the assay of formylmethylflavin and its hydrolytic products: Kinetic Applications. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 2018, roč. 205, 540–550. Dostupné z DOI: 10.1016/j.saa.2018.07.066.
60. LAUBROVÁ, Veronika. Spektroskopické studium verteporfinu v liposomech. *Diplomová práce*. 2023.
61. MIYOSHI, Norio; TOMITA, Giiti. Production and reaction of singlet oxygen in aqueous micellar solutions using pyrene as Photosensitizer. *Zeitschrift für Naturforschung B*. 1978, roč. 33, č. 6, 622–627. Dostupné z DOI: 10.1515/znb-1978-0612.
62. AHMAD, Iqbal; AHMED, Sofia; SHERAZ, Muhammad Ali; VAID, Faiyaz H.M.; ANSARI, Izhar A. Effect of divalent anions on photodegradation kinetics and pathways of riboflavin in aqueous solution. *International Journal of Pharmaceutics*. 2010, roč. 390, č. 2, 174–182. Dostupné z DOI: 10.1016/j.ijpharm.2010.01.042.
63. AHMAD, Iqbal; FASIHULLAH, Q.; VAID, Faiyaz H.M. A study of simultaneous photolysis and photoaddition reactions of riboflavin in aqueous solution. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 2004, roč. 75, č. 1–2, 13–20. Dostupné z DOI: 10.1016/j.jphotobiol.2004.04.001.
64. AHMAD, Iqbal; RAPSON, H.David C. Multicomponent spectrophotometric assay of Riboflavine and photoproducts. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 1990, roč. 8, č. 3, 217–223. Dostupné z DOI: 10.1016/0731-7085(90)80029-o.
65. SHERAZ, Muhammad Ali; KAZI, Sadia Hafeez; AHMED, Sofia; ANWAR, Zubair; AHMAD, Iqbal. Photo, thermal and chemical degradation of riboflavin. *Beilstein Journal of Organic Chemistry*. 2014, roč. 10, 1999–2012. Dostupné z DOI: 10.3762/bjoc.10.208.
66. SKOOG, Douglas A.; WEST, Donald M.; HOLLER, F. James; CROUCH, Stanley R. *Fundamentals of Analytical Chemistry*. Brooks/Cole, Cengage learning, 2014.
67. AMIN, Rehab M.; HAUSER, Carmen; KINZLER, Ingrid; RUECK, Angelika; SCALFI-HAPP, Claudia. Evaluation of photodynamic treatment using aluminum phthalocyanine tetrasulfonate chloride as a photosensitizer: New approach. *Photochemical amp; Photobiological Sciences*. 2012, roč. 11, č. 7, 1156–1163. Dostupné z DOI: 10.1039/c2pp05411f.
68. INSIŃSKA-RAK, Małgorzata; HENKE, Petr; BREITENBACH, Thomas; OGILBY, Peter R. Singlet oxygen quenching by riboflavin. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*. 2024, roč. 446, s. 115108. Dostupné z DOI: 10.1016/j.jphotochem.2023.115108.
69. DĚDIC, Roman; VYKLICKÝ, Vojtěch; SVOBODA, Antonín; HÁLA, Jan. Phosphorescence of singlet oxygen and 5,10,15,20-tetrakis(1-methyl-4-pyridinio)porphine: Time and spectral-resolved study. *Journal of Molecular Structure*. 2009, roč. 924–926, 153–156. Dostupné z DOI: 10.1016/j.molstruc.2008.10.010.

70. DĚDIC, Roman; SVOBODA, Antonín; PŠENČÍK, Jakub; HÁLA, Jan. Phosphorescence of singlet oxygen and Meso-tetra(4-sulfonatophenyl)porphin: Time and spectral resolved study. *Journal of Molecular Structure*. 2003, roč. 651–653, 301–304. Dostupné z DOI: 10.1016/s0022-2860(02)00645-2.
71. INSIŇSKA-RAK, Małgorzata; HENKE, Petr; BREITENBACH, Thomas; OGILBY, Peter R. Singlet oxygen quenching by riboflavin. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*. 2024, roč. 446, s. 115108. Dostupné z DOI: 10.1016/j.jphotochem.2023.115108.

## Seznam obrázků a grafů

1	Chemická struktura Riboflavinu (RF). Modře je vyznačeno isoalloxazinové jádro, červeně je vyznačen ribitol. . . . .	4
2	Struktura molekul FMN a FAD . . . . .	5
3	Transport elektronů v mitochondriích . . . . .	6
4	Proces přenosu energie v mechanismu SOFDF . . . . .	9
5	Proces přenosu energie z PS na kyslík. Převzato a upraveno z [22]. . . . .	10
6	Jablonského diagram, srážkové zhášení . . . . .	11
7	Elektronová struktura molekulových orbitalů molekuly kyslíku . . . . .	12
8	Chlorofyl a . . . . .	14
9	Tris(2-fenylpyridin)iridium . . . . .	14
10	Strukturní vzorec sloučeniny AlPcS <sub>4</sub> . . . . .	15
11	Bengálská červeň . . . . .	15
12	Methylenová modř . . . . .	15
13	Vyobrazení prvního a druhého typu fotoefektu . . . . .	17
14	Zjednodušené experimentální uspořádání použité aparatury k měření kinetik singletního kyslíku . . . . .	21
15	Závislost energie laserových pulsů na jejich vlnové délce v laseru EKSPLA NT242 . . . . .	22
16	Druhy filtrů . . . . .	23
17	Schéma monochromátoru . . . . .	24
18	Schéma fotonásobiče . . . . .	25
19	Absorpční spektrum AlPcS <sub>4</sub> ve vodném roztoku . . . . .	26
20	Zjednodušená struktura aparatury pro měření fluorescenčních spekter . . . . .	26
21	Absorpční spektrum riboflavinu, 50 μM roztok RF v PBS. . . . .	27
22	Rozdíly v absorbanci, pokud se 50 μM roztok RF připravuje ve tmě a na světle. . . . .	28
23	Absorpční spektrum 50 μM roztoku RF v PBS, vzorek byl připravován a přenášán za <b>světla</b> . . . . .	28
24	Absorpční spektrum 50 μM roztoku RF v PBS, vzorek byl připravován a přenášán za <b>tmy</b> . . . . .	29
25	Změna absorpčního spektra RF v závislosti na dodané energii, vybělování (bleaching). . . . .	30
26	Změna absorbce na jednotlivých vlnových délkách pro vybělování roztoku RF. . . . .	30
27	Fotodegradace RF v neutrálním roztoku za přítomnosti divalentních aniontů (například HPO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> , SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> ) za tvorby fotoproduktů. Převzato z [56]. . . . .	31
28	Absorpční spektra roztoku 50 μM RF v PBS, mícháno ve tmě. . . . .	32
29	Vlastní čísla získaná z faktorové analýzy absorpčního spektra 28 v 2. experimentu (obrázek č. 28) . . . . .	32
30	Průběh podílů složek směsi z 2. experimentu během vybělování RF (obrázek č. 28) . . . . .	32
31	Spektra RF a fotoproduktu získaná z FA 2. experimentu (obrázek č. 28) . . . . .	33
32	Vlastní čísla získaná z faktorové analýzy 4. experimentu absorpčního spektra z obrázku č. 25 . . . . .	33
33	Průběh podílů složek směsi v 4. experimentu vybělování roztoku RF . . . . .	33
34	Subspektra získaná z FA spekter z 4. experimentu (viz obrázek č. 25) . . . . .	34

35	Změna absorpčního spektra 50 $\mu\text{M}$ roztoku RF v $\text{H}_2\text{O}$ v závislosti na dodané energii na daných vlnových délkách. Vzorek je připravený za světla. . . . .	35
36	Postup změn absorpce během vybělování 50 $\mu\text{M}$ roztoku RF v $\text{H}_2\text{O}$ na daných vlnových délkách . . . . .	36
37	Absorpční spektrum roztoku 0,2 mM $\text{NaN}_3$ v PBS. . . . .	37
38	Porovnání 50 $\mu\text{M}$ roztoku RF v PBS a roztoku 50 $\mu\text{M}$ RF + 2 mM $\text{NaN}_3$ v PBS, příprava obou vzorků probíhala za světla. . . . .	38
39	Porovnání 50 $\mu\text{M}$ roztoku RF v PBS a roztoku 50 $\mu\text{M}$ RF + 0,2 mM $\text{NaN}_3$ v PBS, příprava obou vzorků probíhala za tmy. . . . .	38
40	Absorpční spektrum 50 $\mu\text{M}$ roztoku RF + 0,2 mM $\text{NaN}_3$ v PBS v závislosti na dodané energii do vzorku. . . . .	39
41	Postup změn absorpce během vybělování roztoku 50 $\mu\text{M}$ RF + 0,2 mM $\text{NaN}_3$ na daných vlnových délkách . . . . .	39
42	Absorpční spektrum 6 $\mu\text{M}$ roztoku $\text{ALPcS}_4$ . . . . .	40
43	Absorpční spektrum roztoku 5 $\mu\text{M}$ $\text{ALPcS}_4$ a RF s různými koncentracemi, 3. experiment. . . . .	41
44	Změna absorpce roztoku 50 $\mu\text{M}$ RF + 5 $\mu\text{M}$ $\text{ALPcS}_4$ na vlnových délkách 445 nm a 672 nm, 3. experiment. . . . .	41
45	Detail absorpčního pásu na vlnové délce 673 nm pro 3. experiment (graf č. 44). Ukázka nárůstu a poklesu absorpce na 670 nm a 690 nm v hlavním absorpčním pásu $\text{ALPcS}_4$ . . . . .	42
46	Změna absorpce pro 3. experiment (graf č. 44) na vlnových délkách 670 nm a 690 nm. . . . .	42
47	Absorpční spektrum roztoku 5 $\mu\text{M}$ ftalocyaninu s různými koncentracemi RF, 2. experiment. . . . .	43
48	Změna absorpce absorpčního spektra roztoku 50 $\mu\text{M}$ RF + 5 $\mu\text{M}$ ftalocyaninu, 2. experiment, na vlnových délkách 445 nm a 672 nm. . . . .	43
49	Fluorescenční spektrum 50 $\mu\text{M}$ roztoku RF v PBS, 3. experiment, 23. 11. 2022. . . . .	44
50	Fluorescenční spektrum 50 $\mu\text{M}$ roztoku RF v PBS, 2. experiment, 23. 11. 2022. Spektra byla naškálována kvůli problémům s počítačem. . . . .	45
51	Fluorescenční spektrum 50 $\mu\text{M}$ roztoku RF v PBS, 2. experiment, 23. 11. 2022. Tato spektra nejsou upravena. . . . .	45
52	Rozdíly maxim fluorescence (grafy č. 50 a č. 51) při 2. experimentu. . . . .	46
53	Fluorescenční spektrum při vybělování 50 $\mu\text{M}$ roztoku RF v PBS, 4. experiment. Legenda je uvedena v energii dodané do vzorku během vybělování. . . . .	47
54	Změna fluorescence během vybělování na specifických vlnových délkách. . . . .	47
55	Fluorescenční spektrum 50 $\mu\text{M}$ roztoku RF ve vodě, 3. experiment . . . . .	48
56	Fluorescenční spektrum 50 $\mu\text{M}$ roztoku RF + 0,2 mM v PBS, 3. experiment . . . . .	49
57	Příklad zobrazení kinetik singletního kyslíku pro 50 $\mu\text{M}$ roztok RF, 1. experiment, 1. sada, 1. kinetika. . . . .	50
58	Změna amplitudy fitu pro 4 experimenty 50 $\mu\text{M}$ roztoku RF v PBS . . . . .	52
59	Příklad kinetik . . . . .	53
60	Doba života $^1\text{O}_2$ $t$ a $^3\text{RF}$ $T$ pro experimenty měření RF v PBS. . . . .	53
61	Vlevo doba života $^1\text{O}_2$ , vpravo doba života $^3\text{RF}$ pro roztok 50 $\mu\text{M}$ RF v $\text{H}_2\text{O}$ . . . . .	54
62	Kinetiky $^3\text{RF}$ při měření roztoku 50 $\mu\text{M}$ RF + 2 mM $\text{NaN}_3$ , 2. experiment, 4. sada, 3. kinetika. . . . .	55

63	Vlevo doba života $^1\text{O}_2$ , vpravo doba života $^3\text{RF}$ pro roztok $50\ \mu\text{M}$ RF + $0,2\ \text{mM}$ $\text{NaN}_3$ . . . . .	55
64	Závislost doby života $^1\text{O}_2$ a $^3\text{ALPcS}_4$ na koncentraci $\text{AlPcS}_4$ . . . . .	56
65	Doba života $^1\text{O}_2$ pro roztoky čistého $5\ \mu\text{M}$ $\text{AlPcS}_4$ a pro různé koncentrace RF + $5\ \mu\text{M}$ $\text{AlPcS}_4$ . . . . .	57
66	Doba života $^3\text{AlPcS}_4$ pro roztoky čistého $5\ \mu\text{M}$ $\text{AlPcS}_4$ a pro různé koncentrace RF + $5\ \mu\text{M}$ $\text{AlPcS}_4$ . . . . .	57
67	Absorpční spektra RF (-), CDRF (⋯⋯) a FMF (----) v pH 2 a KCl-HCl bufferu. Převzato a upraveno z [56]. . . . .	59
68	Absorpční spektra LC (-), LF (----) v pH 4.5 a acetátovém bufferu. Převzato a upraveno z [56]. . . . .	59
69	Absorpční spektrum v UV a viditelné části spektra fotodegradovaných roztoků RF za přítomnosti fosfátů a sulfátů . . . . .	60
70	Absorpční spektrum v UV a viditelné části spektra fotodegradovaných roztoků RF s rozdílnou koncentrací fosfátů a rozdílnou dobou ozáření . . . . .	60
71	Absorpční spektrum $10\ \mu\text{M}$ roztoku $\text{AlPcS}_4$ . Převzato a upraveno z [67]. . . . .	61
72	Absorpční a fluorescenční spektra: a) FMF ( $\lambda_{ex}=444\ \text{nm}$ , $\lambda_{em}=530\ \text{nm}$ ), b) LC ( $\lambda_{ex}=356\ \text{nm}$ , $\lambda_{em}=478\ \text{nm}$ ), c) LF ( $\lambda_{ex}=444\ \text{nm}$ , $\lambda_{em}=530\ \text{nm}$ ), d) CMF ( $\lambda_{ex}=444\ \text{nm}$ , $\lambda_{em}=530\ \text{nm}$ ), e) KA ( $\lambda_{ex}=364\ \text{nm}$ , $\lambda_{em}=443\ \text{nm}$ ) a f) DQA ( $\lambda_{ex}=332\ \text{nm}$ , $\lambda_{em}=420\ \text{nm}$ ) ve vodném roztoku při pH=6.5 v $5\ \text{mM}$ citro-fosfátovém bufferu. Převzato a upraveno z [59]. . . . .	63
73	2. experiment pro měření $50\ \mu\text{M}$ RF s $5\ \mu\text{M}$ $\text{AlPcS}_4$ , 2. kinetika. . . . .	68
74	1. experiment pro měření $50\ \mu\text{M}$ RF s $5\ \mu\text{M}$ $\text{AlPcS}_4$ , 2. kinetika. . . . .	68
75	Doby života $^1\text{O}_2$ pro měření RF v PBS, všechny 4 experimenty i s chybami fitů. . . . .	68
76	Doby života $^3\text{RF}$ pro měření RF v PBS, všechny 4 experimenty i s chybami fitů. . . . .	68
77	Vlevo doba života $^1\text{O}_2$ , vpravo doba života $^3\text{AlPcS}_4$ pro roztoky čistého $5\ \mu\text{M}$ $\text{AlPcS}_4$ s chybami fitů. . . . .	69



## Seznam tabulek

1	Tabulka s naváženým množstvím RF do objemu PBS, deionizované vody (diH <sub>2</sub> O) pro jednotlivé sady měření . . . . .	18
2	Tabulka pro namíchání zásobního roztoku AlPcS <sub>4</sub> , 1. a 2. experiment . . . . .	19
3	Tabulka pro namíchání zásobního roztoku AlPcS <sub>4</sub> , , 3 .experiment . . . . .	19
4	Tabulka s naváženým množstvím NaN <sub>3</sub> m <sub>NaN<sub>3</sub></sub> do objemu <b>V</b> rozpouštědla PBS . . . . .	20
5	Hodnoty konstant $A, t, T$ a $c$ ( $A$ a $c$ vyjádřeny v počtu pulsů $U$ ) pro měření 50 μM roztoku RF v PBS - 1. sada měření z 19. 04. 2023. . . . .	51
6	Průměrné hodnoty konstant $A, t, T$ a $c$ ( $A$ a $c$ vyjádřeny v počtu pulsů $U$ ) pro jednotlivé sady měření 50 μM roztoku RF v H <sub>2</sub> O - všechny sady měření z 6. 12. 2023. . . . .	51
7	Tabulka pro naitované hodnoty pro měření roztoku 50 μM RF v PBS. . . . .	71
8	Tabulka pro naitované hodnoty pro měření roztoku 50 μM RF v H <sub>2</sub> O. . . . .	72
9	Tabulka pro naitované hodnoty pro měření roztoku 50 μM RF + 0,2 mM NaN <sub>3</sub> v PBS; $f(x) = A \cdot (\exp(\frac{-x}{t}) - \exp(\frac{-x}{T}))$ , $g(x) = \frac{A^*}{1/T-1/t} \cdot (\exp(\frac{-x}{t}) - \exp(\frac{-x}{T}))$ . . . . .	73
10	Tabulka pro naitované hodnoty pro měření x μM roztoku AlPcS <sub>4</sub> v PBS; $f(x) = A \cdot (\exp(\frac{-x}{t}) - \exp(\frac{-x}{T}))$ , $g(x) = \frac{A^*}{1/T-1/t} \cdot (\exp(\frac{-x}{t}) - \exp(\frac{-x}{T}))$ . . . . .	74
11	Tabulka pro naitované hodnoty pro měření roztoku x μM + 5 μM AlPcS <sub>4</sub> v PBS; $f(x) = A \cdot (\exp(\frac{-x}{t}) - \exp(\frac{-x}{T}))$ , $g(x) = \frac{A^*}{1/T-1/t} \cdot (\exp(\frac{-x}{t}) - \exp(\frac{-x}{T}))$ . . . . .	75