



**MATEMATICKO-FYZIKÁLNÍ
FAKULTA**
Univerzita Karlova

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Jan Moučka

**Vliv riboflavinu na zhášení a produkci
singletního kyslíku**

Katedra chemické fyziky a optiky

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

Studijní program: Fyzika

Studijní obor: Obecná Fyzika

Praha 2021

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracoval 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

Tato práce by nemohla vzniknout, kdyby nebylo obětavosti vedoucího mé práce, RNDr. Romana Dědice, Ph.D., jeho hodnotných rad a vedení na cestě bakalářských útrap. Tímto bych mu chtěl za tuto pomoc velmi poděkovat.

Poděkování rozhodně patří i celé mé rodině za jejich schopnost mě podržet a povzbuzovat v nejhroších chvílích. Vážím si všeho, co jsem díky vám získal, co mám a čeho jednou určitě dosáhnu.

V neposlední řadě bych chtěl poděkovat i kamarádům a známým za jejich cenné rady a pomoc, kterou mi poskytli. Děkuji vám všem.

Název práce: Vliv riboflavinu na zhášení a produkci singletního kyslíku

Autor: Jan Moučka

Katedra: Katedra chemické fyziky a optiky

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

Abstrakt: Riboflavin je vitamin B2 a působí jako antioxidant. Pomáhá našemu tělu zvládat oxidativní stres sám o sobě nebo také v mnoha buněčných metabolismech. Zkoumáním této problematiky si můžeme vylepšit pohled na antioxidantní procesy v těle a s tím spojené celkové zdraví. Riboflavin je možným fotosenzibilizátorem singletního kyslíku. Pomocí časově rozlišené detekce luminiscence singletního kyslíku v roztocích riboflavinu, azidu sodného a roztoků s vyšší koncentrací kyslíku jsem zkoumal vliv těchto látek na dobu života singletního kyslíku a tripletních stavů riboflavinu. Bylo zjištěno, že riboflavin fotosenzibilizuje singletní kyslík a jeho zhášení nebylo pozorováno. Ze závislosti dob života na koncentraci azidu sodného a rozpuštěného kyslíku jsem určil příslušné zhášecí konstanty. Částečná záměna normální vody za těžkou vedla k prodloužení doby života singletního kyslíku, což umožnilo identifikovat, která z dob života přísluší kyslíku a která riboflavinu.

Klíčová slova: Singletní kyslík, riboflavin, luminiscence, doba života, excitační energie

Title: Influence of riboflavin on generation and quenching of singlet oxygen

Author: Jan Moučka

Department: Department of chemical physics and optics

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

Abstract: Riboflavin is B2 vitamin and antioxidant for our body. It helps our body to manage oxidative stress by itself or in many cellular metabolism. We can improve our insight on antioxidative stress in our body and health generally by exploring the issues. Riboflavin is a potential photosensitizer of singlet oxygen. I have studied the influence of riboflavin, sodium azide and higher concentration of molecular oxygen on lifetime of singlet oxygen and triplet states of riboflavin via time-resolved luminescence of singlet oxygen in those solutions. I found out that riboflavin works as photosensitizer of singlet oxygen and its quenching was not observed. I have obtained rate constants of quenching by sodium azide and by dissolved oxygen. Partial exchange of normal water by heavy water led to longer lifetimes of singlet oxygen. It allowed to identify which lifetime corresponds to singlet oxygen and which to riboflavin.

Keywords: Singlet oxygen, riboflavin, luminescence, lifetime, excitation energy

1 Seznam používaných zkratek

RF riboflavin (6,7-dimethyl-9-D-ribitylisoalloxazin)	4
PS fotosenzitizér	9
³PS tripletní stav fotosenzitizéru	9
PS* první excitovaný singletní stav fotosenzitizéru	9
ROS reaktivní formy kyslíku	6
¹O₂ singletní kyslík	3
ISC mezisystémový přechod - přechod mezi 2 elektronovými stavy s různým spinovým číslem	7
IC vnitřní konverze - přechod mezi 2 elektronovými stavy se stejným spinovým číslem	10
NaN₃ azid sodný	17
D₂O těžká voda	18
PDT fotodynamická terapie	14

Obsah

1 Seznam používaných zkratk	1
2 Úvod	3
3 Teorie	4
3.1 Struktura riboflavinu a jeho vlastnosti	4
3.2 Riboflavin a jeho účinky na lidské tělo	5
3.3 Antioxidanty	6
3.4 Reaktivní formy kyslíku	6
3.4.1 Singletní a tripletní stav molekuly kyslíku	7
3.5 Luminiscence	8
3.5.1 Fotoluminiscence	9
3.6 Fotosenzibilizace	9
3.6.1 Srážkové zhašení	10
3.7 Fosforescence singletního kyslíku	11
3.8 Vznik singletního kyslíku procesem fotosenzibilizace	13
3.9 Fotodynamická terapie	14
3.9.1 Fotosenzitizéry	14
4 Materiály	17
4.1 Koncentrace riboflavinu	17
4.2 Azid sodný v roztoku RF	17
4.3 Riboflavin rozpuštěný v těžké vodě	18
5 Experimentální uspořádání	19
5.1 Aparatura	19
5.1.1 Laser EKSPLA NT242	19
5.1.2 Optický filtr RG7	19
5.1.3 Monochromátor Jobin YVON H20IR	20
5.1.4 Infráčervený fotonásobič Hamamatsu R9905	20
5.1.5 Předzesilovač Becker and Hickl HFAC-26	21
5.1.6 Časově rozlišený čítač Becker and Hickl MSA 300	21
5.2 Nastavení aparatury	21
5.3 Měření absorpčního spektra	22
6 Výsledky měření	23
6.1 Měření absorpce riboflavinu	23
6.2 Závislost kinetik luminiscence singletního kyslíku na koncentraci RF	24
6.3 Vliv částečné izotopické záměny vody na kinetiku emise singletního kyslíku	27
6.4 Vliv vyšší koncentrace rozpuštěného kyslíku v roztoku	28
6.5 Vliv azidu sodného na doby života kinetiky emise singletního kyslíku	29
7 Diskuze výsledků	31
8 Závěr	32
Literatura	37

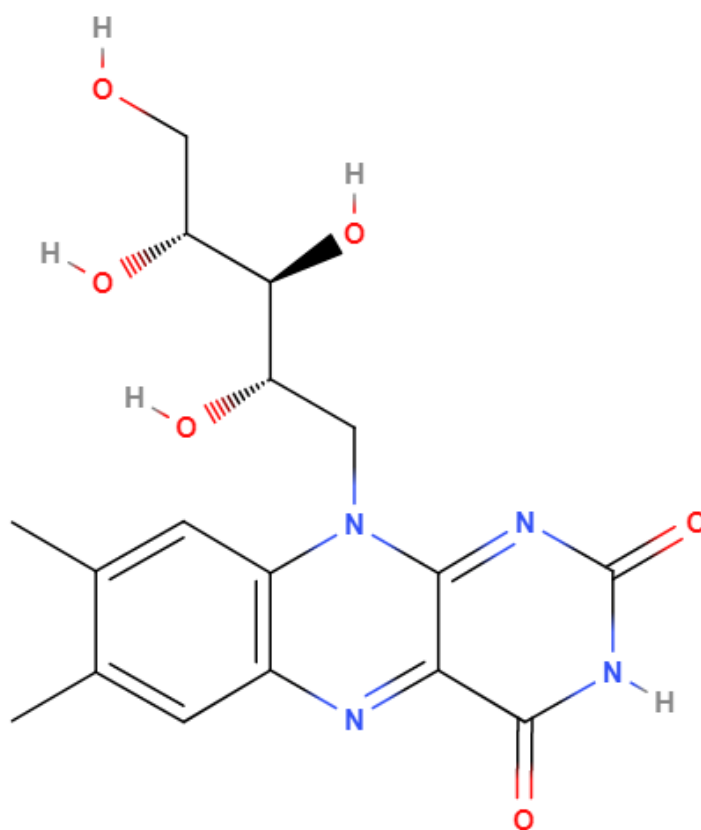
2 Úvod

V životě člověka hraje důležitou roli singletní kyslík ($^1\text{O}_2$). Chrání nás před různými patogeny, můžeme jej dokonce využít k léčbě nádorových onemocnění ve fotodynamické terapii. Na druhou stranu díky své vysoké reaktivitě může v těle poškozovat DNA, proteiny a má schopnost cytotoxicity (tedy schopnost ničit buňky - tuto schopnost mají buňky imunitního systému nebo některé jedy, jako jsou například jedy hadů či žahavců [1], [2]). Tělo reguluje hladinu singletního kyslíku pomocí antioxidantů, jako jsou například karotenoidy, flavonoidy, vitamíny A, E, C, B2, B3, některé sloučeniny kovů či různé kyseliny (kys. lipoová, askorbová či močová) [3, chapter 3.2.2], [4]. Úkolem práce je zkoumat vliv riboflavinu na dobu života singletního kyslíku a tripletních stavů riboflavinu, stejně tak jako vliv různých koncentrací azidu sodného a kyslíku. Výsledky měření nám dají informaci o tom, jak moc je riboflavin schopný $^1\text{O}_2$ zhaset, tedy jak moc je kvalitní antioxidant, nebo jak je naopak schopný $^1\text{O}_2$ produkovat.

3 Teorie

3.1 Struktura riboflavinu a jeho vlastnosti

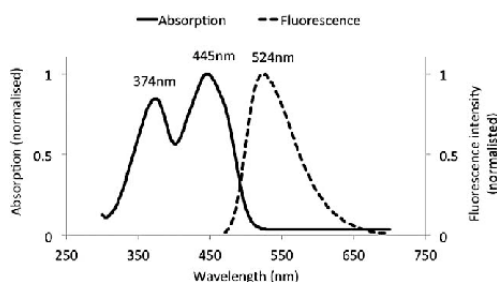
Sloučenina riboflavin (6,7-dimethyl-9-D-ribitylisoalloxazin) (**RF**) se skládá ze dvou částí. První část je flavin (z latinského flavus, tedy žlutý), nebo-li isoalloxazinové jádro, které je složeno ze tří šestiuhlíkatých jader¹ – benzoové, pyrazinové a pyrimidinové [5]. Tato dvě poslední jádra tvoří pteridinové jádro [6]. Flavín se může vyskytovat v redukované nebo oxidované formě [7] a právě tato oxidovaná forma je zodpovědná za nažloutlou barvu riboflavinu [8; chapter History]. Na pyrazinové jádro se váže tzv. ribitol ($C_5H_{12}O_5$ - jiný název také adonitol), což je forma redukované ribózy.



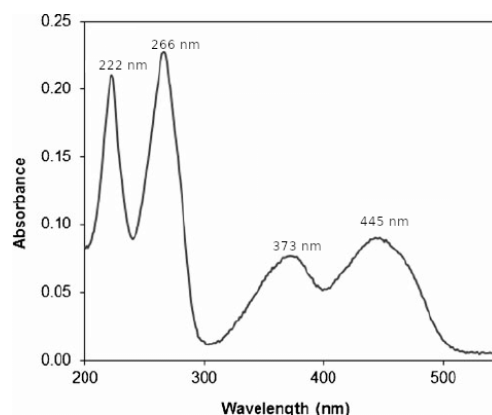
Obrázek 1: Strukturní vzorec riboflavinu

RF je biologickou látkou vysoce odolnou proti teplotě. Při teplotě 240 °C zčerná a začíná se pomalu tavit. Bod tání není přesně určený [5], ale pohybuje se někde okolo 278 °C. Rozkládá se na světle, proto je nutné jej uchovávat v tmavém prostředí. To ovšem rozkladu nezabrání, v článku [9] naměřili pokles **RF** o skoro 4% po necelých 100 hodinách ve tmavém prostředí. **RF** má absorpční pásy při vlnových délkách $\lambda_1 = 222$ nm, $\lambda_2 = 266$ nm, $\lambda_3 = 373$ nm a $\lambda_4 = 445$ nm (viz. obr. [2] a [3]). Při vlnové délce $\lambda_5 = 524$ nm fluoreskuje (viz. obr. [2] a článek [10]).

¹Na obrázku [1] popisováno zleva doprava



Obrázek 2: Absorbance a fluorescence **RF** v závislosti na vlnové délce; plnou čarou absorbance, přerušovanou fluorescence; levá y-osa určuje absorbanci, pravá y-osa určuje intenzitu fluorescence; Převzato z **[11]**



Obrázek 3: Absorbance **RF** o koncentraci $\rho_A = 0,08 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ v závislosti na vlnové délce, absorbční maxima zleva na $\lambda_1 = 222 \text{ nm}$, $\lambda_2 = 266 \text{ nm}$, $\lambda_3 = 373 \text{ nm}$ a $\lambda_4 = 445 \text{ nm}$; upraveno z **[10]**

3.2 Riboflavin a jeho účinky na lidské tělo

Riboflavin je jeden z vitamínů řady B. Označuje se jako vitamin B2, mnohdy také jako vitamin G. Jeho aktivní formy FAD^2 a FMN^3 jsou důležitou součástí různých enzymů, které jsou důležité například k rozkladu aldehydů, k β -oxidaci mastných kyselin a dalších **[8]**. Riboflavin je velmi významný pro správný růst kůže, ke správnému fungování srdce, očí a jiných orgánů **[12]**, **[13]**.

Jeho nedostatek v lidském těle pochází z neschopnosti ho syntetizovat, je tedy nutné jej přijímat v potravě. Vyšší obsah **RF** obsahují například hovězí játra, cereálie, ovesné vločky, droždí nebo listová zelenina. Dospělý muž by měl pro svoje mentální zdraví zkonsumovat denně okolo 1,3 mg **RF**, u netěhotných žen stačí 1,1 mg **RF** **[14]** a těhotné ženy by měly mít 1,4 mg **RF** denně. Příjem doporučeného množství zajistí i správné fungování dalších biologických procesů v těle, správný růst kostí, vlasů či kůže, správné fungování nervového systému apod. Protože je **RF** rozpustný ve vodě, předávkování jím většinou nenastává. Není proto takovou hrozbou, jako vitamíny A, D, E nebo K, které se rozpouštějí v tucích. Jeho deficit můžeme poznat například podle zánětů v okolí ústní dutiny, kožních vyrážek, ztráty vlasů, bolení v krku a dalších. Tyto symptomy se přesto mohou vztahovat i na jiná různá onemocnění. Nedostatek riboflavinu může vést až k zánětu spojivek, světloplachosti, normocytární anémii a dalším **[14]**.

RF je žlutý až oranžový prášek slabě rozpustný ve vodě. Jeho molární hmotnost je $376,36 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$. Umělá syntéza riboflavinu se uskutečňuje za pomoci nejrůznějších mikroorganismů **[1]** (jako například za pomoci bakterie *Corynebacterium diphtheriae* **[15]**, či kvasinky *Candidosis* **[16]**), které jsou geneticky upraveny k jeho vyšší produkci. Tato umělá syntéza nám právě dovoluje zkoumat jeho vlastnosti, které lze využít v lékařství a farmacii.

²flavinadeninnukleotid

³flavinmononukleotid

3.3 Antioxidanty

Řada chemických reakcí, zvláště oxidačních, vede ke vzniku radikálních částic (atomy, molekuly, ionty). Tyto částice mají ve svém elektronovém obalu nespárovaný valenční elektron, který je zodpovědný za vysokou chemickou reaktivitu. Tyto radikály zaplňují své orbitály odtržením elektronů z obalů blízkých molekul, čímž vznikají řetězové procesy radikálových reakcí vedoucí k poškození biologických struktur. Lidské tělo je toho schopno využít ve své imunitní odpovědi při ničení bakterií, nebo při buněčné signalizaci [17]. Radikály mohou ale také poničit i zdravé a prospěšné buňky, DNA, proteiny či lipidy v těle [18].

Antioxidanty jsou molekuly, které regulují již zmíněné oxidativní poškození biologických struktur zachytáváním uvedených radikálů. Hlavními antioxidanty jsou především vitamíny A, C, E, některé z řady B, karotenoidy, flavonoidy, sloučeniny zinku, manganu či selenu, nebo dokonce čisté uhlovodíky (bez dusíku, síry, apd.). Cílem antioxidantů není radikální částice v těle úplně potlačit, ale kontrolovat jejich množství situaci.

Díky svým vlastnostem by se mohlo zdát, že mají antioxidanty pozitivní vliv na naše zdraví, konkrétně díky jejich funkcím vůči nemocím a rakovině. Některé články hovoří o významné roli antioxidantů v prevenci proti nemocím, jako třeba proti kardiovaskulárním onemocněním, zákalům nebo rakovinám [19]. Různé antioxidanty mohou ale za určitých podmínek tělu škodit. Jiné studie hovoří totiž o neovlivnění rizika nemocí antioxidanty, či zvyšování rizika například rakoviny způsobené kouřením za užívání beta-karotenu [20, Chapter Conclusion]. Není stále jasné, jestli v určitých situacích působí antioxidanty samotné nebo za přítomnosti a pomoci ostatních látek, nebo jestli naopak antioxidanty nepůsobí ve prospěch těla a určitých nemocí vůbec.

3.4 Reaktivní formy kyslíku

Jak už bylo řečeno, každý atom, molekula či iont může mít ve svém elektronovém obalu nespárovaný elektron, díky kterému má částice vysokou reaktivitu. Částice vzniká buď v obyčejných metabolických procesech v těle, nebo z vnějších vlivů, jako je například vliv ozonu, kouření cigaret, znečištěného ovzduší nebo rentgenových paprsků [21]. Tyto vysoce reaktivní částice, nebo-li radikální částice, reagují s dalšími látkami v těle (například aminokyselinami, lipidy, proteiny, polynukleotidy atd.), kterým narušují integritu a způsobují následnou destrukci (ať už to jsou velké struktury jako např. buňky, nebo menší jako jsou již zmiňované biologické látky).

Radikální atomy mají tendenci zaplnit svoji valenční vrstvu tak velkou, že jsou schopny si vzít elektron od jiných atomů nebo molekul, tím je destabilizovat a vytvořit z nich taktéž radikál. Tento proces se opakuje do doby, než vytvoří stabilní vazbu s jiným radikálem. Tím pak oba dva radikály zanikají. V těle tento proces může poškodit i samotné buňky nebo biologické struktury, což má někdy za následek vznik nemocí, jako je například rakovina, Alzheimerova nemoc [22], Parkinsonova nemoc atd.. V lidském těle vznikají reaktivní formy kyslíku (ROS) díky samotnému dýchání.

ROS jsou částice chemicky reaktivní a obsahující kyslík, proto se dají rozdělit do dvou skupin:

- volné kyslíkové radikály
- látky, které nejsou volnými kyslíkovými radikály, tedy neradikálové molekuly

Do první skupiny můžeme zařadit například superoxydy $\cdot\text{O}_2^-$, hydroxylové radikály $\text{HO}\cdot$, peroxyly $\text{ROO}\cdot$ či hydroperoxyly $\cdot\text{HO}_2$.

Do druhé skupiny lze zařadit ozon O_3 , peroxidy (např. H_2O_2), některé kyslíkaté kyseliny (např. HClO) a hlavně singletní kyslík **$^1\text{O}_2$** .

3.4.1 Singletní a tripletní stav molekuly kyslíku

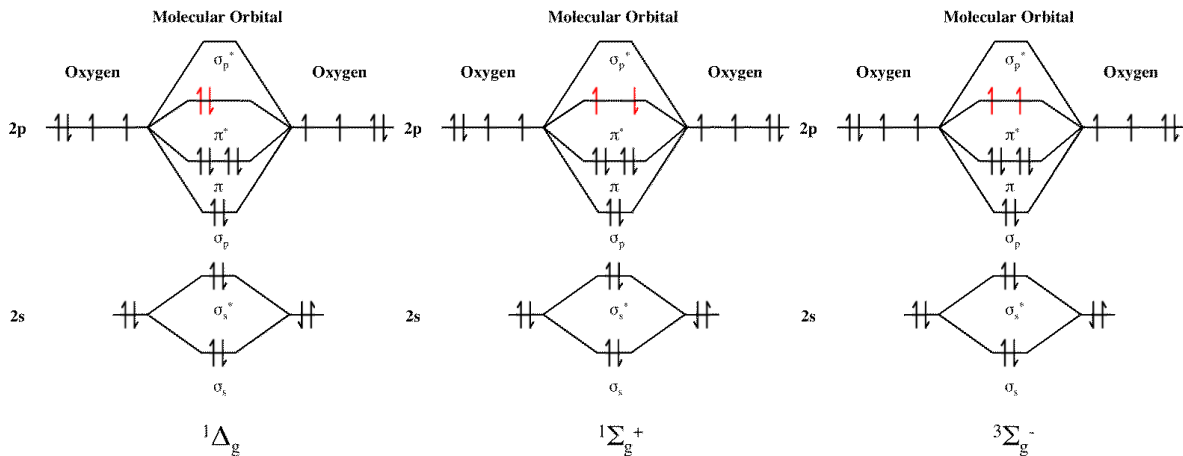
K pochopení excitovaných stavů je třeba si uvědomit, jak se elektrony v obalu atomu nebo molekuly chovají. Pauliho vylučovací princip nám říká, že nemůžeme nalézt v jednom systému dva elektrony, které by měly všechna kvantová čísla stejná (tedy hlavní kvantové číslo n , vedlejší kvantové číslo l , magnetické kvantové číslo m_l a spinové číslo s). To znamená, že se nemohou vyskytnout dva elektrony, které (například) budou na první elektronové vrstvě atomu se stejným spinem (oba by měly stejné $n = 1, l = 0, m_l = 0$ a $s = \frac{1}{2}$). Jeden z nich musí mít $s = -\frac{1}{2}$.

Obecně singletní stav (základní stav) jakékoliv molekuly se vyznačuje tím, že v elektronovém obalu dané látky se vyskytují pouze elektrony, které jsou spinově spárované (všechna kvantová čísla mají stejná, až na spin, který je opačný). Elektron může přijmout kvantum energie a být excitován. Pokud se nějaký elektron excituje na vyšší hladinu, může dojít ke dvěma věcem.

Zprvce může mít excitovaný elektron stejný spin jako měl před excitací v daném elektronovém páru, a vzniká excitovaný singletní stav. Jinak řečeno, v tomto stavu se vyskytují dva elektrony s různými spiny na jiných energetických hladinách, které byly původně spárované.

Zadruhé se může během excitace elektronu změnit i jeho spin a vzniká tak tripletní stav. V tomto stavu se budou vyskytovat dva elektrony původně spárované, které jsou na jiných hladinách a mají stejný spin. Skutečnost stejných spinů tomuto elektronu zakazuje deexcitovat na původní hladinu do té doby, než dojde ke změně jednoho ze spinů, tzv. mezisystémový přechod - přechod mezi 2 elektronovými stavy s různým spinovým číslem (**ISC**). Excitace do tripletních stavů není tak častá, protože musí dojít právě ke zmiňované změně spinu elektronu.

Molekula kyslíku je významná tím, že se v základním stavu vyskytuje právě v tripletním stavu **[23]**. Pokud je excitována do vyššího singletního energetického stavu $^1\Sigma_g^+$, velice rychle zrelaxuje do energeticky nižšího singletního stavu $^1\Delta_g$. Tento stav kyslíku je v dané formě vysoce reaktivní. Relaxace do základního tripletního stavu je zdlouhavý proces, neboť tento přechod je spinově zakázaný.



Obrázek 4: Zleva doprava molekulární orbitály singletního kyslíku v excitovaném stavu ${}^1\Delta_g$, excitovaného stavu ${}^1\Sigma_g^+$ s vyšší energií a nakonec jeho formy v tripletním základním stavu ${}^3\Sigma_g^-$ s nejnižší energií; převzato z [24]

3.5 Luminiscence

Luminiscencí můžeme označit proces spontánního vyzařování světla z jakékoliv látky, který je přebytkem záření nad jejím tepelným vyzařováním a trvá určitou dobu i po skončení excitace. Nejprve musí dojít k excitaci elektronu z elektronového obalu molekuly dané látky. Excitovaný elektron po určité relaxační době bude chtít deexcitovat a během tohoto procesu vyzaří foton. Tento foton má delší vlnovou délku λ (vlnová délka je blíž infra-červené oblasti) a tudíž menší energii než foton excitační (Stokesův posun).

Nezaměňujme luminiscenci s odrazem světla, jenž se stává například na Měsíci. Pokud se foton ihned odrazí od povrchu látky, o luminiscenci jako takovou nejde.

Luminiscence se dále dělí na mnoho podskupin, mezi které patří hlavně:

- Chemiluminiscence – emise světla je vyvolána chemickou reakcí, například reakce luminolu s peroxidem vodíku, řadí se sem i podskupina bioluminiscence, ve které si můžeme představit záření světlušek pomocí luciferinu.
- Elektroluminiscence – při průchodu elektrického proudu danou látkou jsou elektrony excitovány z valenčního do vodivostního pásu, odkud mohou zářivě relaxovat zpět.
- Mechanoluminiscence – při mechanické námaze pevných látek, lze jí dosáhnout i ultrazvukem, například triboluminiscence cukru.
- Termoluminiscence – Vnější záření může předat svou energii elektronům v atomech pevných látek Tento stav elektronu je po určité období (v řádech i stovek let) uvězněn v krystalové struktuře. Po přijetí energie ze zahřátí se elektrony uvolní a mohou reagovat s fotony zevnějšku, či vibracemi mřížky. Tato metoda lze použít i na datování předmětů.
- Fotoluminiscence.

A další skupiny a podskupiny.

Právě fotoluminiscence souvisí s tématem této bakalářské práce. Excitace elektronů je ve fotoluminiscenci jako jediná vyvolána samotnými fotony.

Právě ona se může dělit na **fluorescenci**, kde doba trvání absorpce energie fotonu, která vede na excitaci elektronu, a následná deexcitace je v řádech femtosekund až mikrosekund. Způsob, kterým se elektron deexcituje, právě určuje tuto relaxační dobu.

Pokud tento proces trvá déle, jedná se o **fosforescenci**. Excitace elektronu v případě fosforescence je taková, že elektron přejde do spinově zakázaného stavu (tripletního stavu) odkud nemůže deexcitovat kvůli spinovému zákazu. Fosforescence je o několik řádů delší než fluorescence, protože změna spinu elektronu při deexcitačním přechodu je málo pravděpodobný proces.

3.5.1 Fotoluminiscence

Fotoluminiscence je druh luminiscence, která je vyvolána dopadajícími fotony. Tento dopadající foton předá energii elektronu v obalu atomu dané látky a elektron se tím excituje. Zapsáno rovnicí jako:

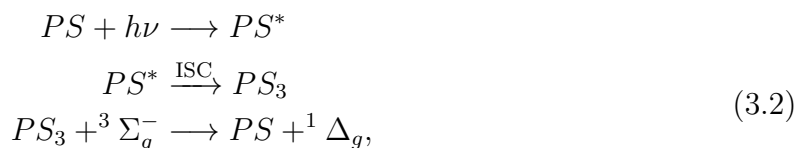


Protože excitované stavy relaxují do základního stavu s nejnižší možnou energií zářivě (dochází k emisi fotonu) či nezářivě, za krátkou dobu se tak elektron zpátky deexcituje. Při nezářivé relaxaci se nadbytečná energie přemění na teplo, nebo je předána jiné molekule při procesu nazývaném zhášení (angl. quenching) luminiscence. Molekula zhášče (angl. quencher) může a nemusí při zhášení přejít do excitovaného stavu.

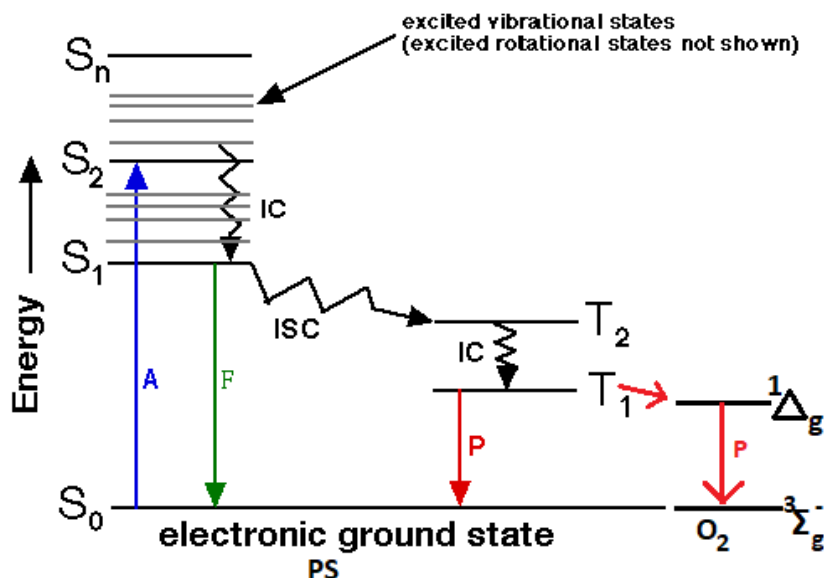
V rovnici (3.1) vystupuje energie fotonu jako $E_{ph} = h\nu$, tedy součin Planckovy konstanty $h = 6,626\,070\,15 \cdot 10^{-34}$ Js a frekvence fotonu ν v hertzech pro excitační foton. S_0 zde vystupuje jako singletní základní stav (singlet) luminoforu a S_1 jako první excitovaný singletní stav. Proces fluorescence se děje v průběhu řádů femtosekund až mikrosekund.

3.6 Fotosenzibilizace

Za proces fotosenzibilizace je zodpovědný fotosenzitizér (PS), což pro případ vzniku singletního kyslíku jsou většinou organické molekuly, které absorbují energii z elektromagnetického záření a excitují se v první excitovaný singletní stav fotosenzitizéru (PS^{*}). Pomocí ISC se změní v tripletní stav fotosenzitizéru (³PS) s nižší energií. ³PS může deexcitovat zářivě – fosforescencí, nezářivě, nebo může předat energii jiné molekule, např. O₂ (vyjádřeno pro singletní kyslík systémem rovnic 3.2 [25]). V případě kyslíku ¹O₂ v základním tripletním stavu, který převezme energii od ³PS výměnným mechanismem, se excituje do ¹Δ_g - tj. první excitovaný singletní stav molekuly kyslíku ¹O₂. Pomocí různých mechanismů (ISC nebo také přes reakci s PS v rovnicích 3.2) pak může zpětně přejít zářivě (kdy vyzáří foton) nebo nezářivě do ³Σ_g⁻ - tj. základní tripletní stav molekuly kyslíku ¹O₂.



Co se přesně děje v procesu rovnic 3.2? Popišme si to na upraveném Jablonského diagramu.



Obrázek 5: Obrázek upravený z [26]; A - absorpce energetického kvanta, F - fluorescence, P - fosforescence, S_n - n-tý excitovaný singletní stav, S_0 - základní stav, T_1 a T_2 - tripletní stavy, IC - vnitřní konverze, ISC - mezisystémový přechod

Základní stav [PS] se po absorpci energetického kvanta dostává do prvního či vyššího excitovaného stavu S_n . V tomto stavu sám o sobě dlouho nevydrží a pomocí **fluorescence** nebo vnitřní konverze - přechod mezi 2 elektronovými stavy se stejným spinovým číslem (IC) - se dostává zpět do základního stavu. Do tripletního stavu, odkud může fosforescencí přejít taktéž do základního stavu, se dostává pomocí [ISC]

Fluorescence znamená, že se excitovaný stav S_n pomocí IC změnil na první excitovaný stav S_1 (pokud už v tomto stavu daná látka není) a zbytek své přebytečné energie vyzáří pomocí fluorescence. Tato skutečnost má za podmínku to, že excitovaný elektron musí být ve stejném spinovém stavu, jako byl před excitací.

Pokud se spin elektronu liší od původního neexcitovaného, potom probíhá [ISC], který látku dostane do tripletního stavu s vyšší energií, než má stav základní a elektronu změnil spin. V případě, že toto není první excitovaný tripletní stav, tak stejně jak výše probíhá IC, aby se látka dostala do prvního excitovaného tripletního stavu. Z toho místa se přes již zmíněnou **fosforescenci** dostává do základního stavu dané látky S_0 a zbytek absorbované energie se vyzáří elektromagnetickým zářením.

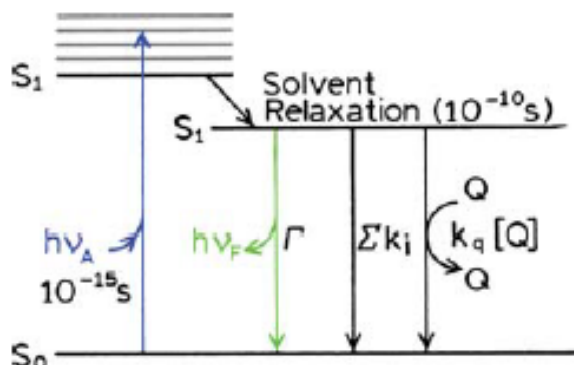
V přírodě se vyskytuje převážně fluorescence pro většinu molekul s tím, že doba života fluorescenčních stavů se pohybuje okolo 10^{-8} s. Fosforescence na druhou stranu může trvat od 10^{-3} s až po minuty nebo hodiny. Další možnost, jak předat energii, je přes nezářivé konverze jako jsou již zmiňované [ISC] nebo IC, ale také i srážkové kolize.

3.6.1 Srážkové zhášení

Srážkové zhášení je proces, který redukuje intenzitu záření luminiscence [27]. Během srážkového zhášení se luminofor díky velmi rychlé kolizi s molekulou zhášeče Q vrací do svého základního stavu. To je v plynech nebo v roztocích velmi rychlé, molekula nemusí stihnout podstoupit proces fosforescence nebo fluorescence. Proces srážkového zhášení popíšeme obrázkem modifikovaným na kolizní srážení a velmi známou Stern-Volmerovou

rovnici [28, Chapter 8]:

$$\frac{1}{t} = \frac{1}{t_0} + k_q[Q], \quad (3.3)$$



Obrázek 6: Obrázek převzat z [28]; Jablonského diagram ke srážkovému zhášení, Σk_i vyjadřuje nezářivé přechody do základního stavu S_0

kde k_q je zhášecí konstanta pro bimolekulární systém, τ_0 je doba života bez zhášeče a $[Q]$ je koncentrace zhášeče.

Pro difusí omezený odhad konstanty k_q se za daných podmínek (pokud jsou srážející se částice sférické a ve vzdálenosti r , kde r se rovná součtu poloměrů obou částic, se sebou reagují **vždy**) používá vyjádření:

$$k_q = \frac{8RT}{3\eta}, \quad (3.4)$$

kde R je konstanta ideálního plynu ($R = kN_A \approx 8,3145 \text{ Jmol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$; kde k je Boltzmannova konstanta, N_A je Avogadrova konstanta), T je teplota v kelvinech, η je viskozita roztoku. Pro obecnější popis se používá

$$k_q = \frac{2RT}{3\eta} \left(\frac{r_a + r_b}{r_a r_b} \right) d_c, \quad (3.5)$$

kde r_a a r_b jsou poloměry částic A a B a d_c je přibližná hodnota vzdálenosti, kde se očekává reakce se 100% pravděpodobností. Reálně se tato konstanta musí určit experimentálně, protože ne všechny kolize jsou ve zhášení efektivní.

3.7 Fosforescence singletního kyslíku

Meta-stabilní stav má tendenci relaxovat zpět do základního stavu mnohými procesy. Rychlostní konstanta k_i je obecně definována jako pravděpodobnost relaxace excitovaného stavu daným mechanismem za jednotku času. Časový vývoj počtu excitovaných molekul můžeme pak zapsat jednoduchou rovnicí:

$$\frac{dN}{dt} = -N \sum_i k_i \quad (3.6)$$

Tato rovnice má exponenciální řešení:

$$N(t) = \exp(-t \sum_i k_i), \quad (3.7)$$

kde $\sum_i k_i$ můžeme také napsat jako $\frac{1}{\tau}$, tedy dobu života excitovaných stavů, kdy jejich počet klesne na $\frac{1}{e}$.

Doba života ale také závisí na koncentracích molekul, které se podílejí na relaxacích (například zhášení skrz kolize molekul, nebo přes různé fotochemické procesy a jiné). Konstanta k_i tedy závisí na koncentracích těchto molekul (zhášečů), tedy v rovnici (3.6) se objeví nejenom konstanty závislé na koncentraci zhášečů $k_{Q_i}[Q_i]$, ale i konstanty, které na koncentracích nezávisí.

Zajímáme se o kinetiku ^3PS a samotný $^1\text{O}_2$. Tripletní stavy izolovaného ^3PS relaxují přes nezářivý nebo zářivý přechod, tedy fosforescenci. K těmto mechanismům určíme rychlostní konstanty jako k_N a k_P . Tripletní stavy, jak už bylo zmíněno, se mohou zhášet přes kolizi s jinými molekulami, například v biologickém prostředí. Tomuto procesu přiřadíme konstantu Q_i . Zhášení přes molekulu kyslíku má speciální konstantu k_Δ . Kinetika tripletních stavů ^3PS je potom dána jako

$$\frac{d[{}^3\text{PS}]}{dt} = -(k_P + k_N + k_\Delta[\text{O}_2] + \sum_i k_{Q_i}[Q_i])[{}^3\text{PS}], \quad (3.8)$$

kde závorku můžeme přepsat na

$$k = k_P + k_N + k_\Delta[\text{O}_2] + \sum_i k_{Q_i}[Q_i]. \quad (3.9)$$

Vystupují zde lineární závislosti na koncentracích, což je často přepsáno do zjednodušené formy Stern-Volmerovy rovnice

$$k = k_0 + k_Q[Q] \quad (3.10)$$

Může se uplatnit mechanismus triplet-triplet anihilace, kdy se navzájem zhášejí dva tripletní stavy. Diferenciální rovnice pak nabude tvaru nelineárního (29)

$$\frac{d[{}^3\text{PS}]}{dt} = -(k_P + k_N + k_\Delta[\text{O}_2] + \sum_i k_{Q_i}[Q_i] + k_{TT}[{}^3\text{PS}])[{}^3\text{PS}] \quad (3.11)$$

a lze ji řešit přes Bernoulliho řešení diferenciálních nelineárních rovnic

$$y' + f(x)y = g(x)y^n. \quad (3.12)$$

To nám dá řešení ve tvaru

$$I(t) = \frac{I_0}{c_0 A \left\{ (k_{TT} + \frac{1}{c_0 A}) \exp(\frac{t}{A}) - k_{TT} \right\}}, \quad (3.13)$$

kde c_0 je koncentrace ^3PS tripletů v čase $t = 0$ a $A = k^{-1}$ a k je z rovnice (3.9), která zde zastupuje dobu života ^3PS bez ovlivňování se tripletních stavů navzájem.

$^1\text{O}_2$ je generován fotosenzibilizací – přenosem energie z ^3PS (člen $k_\Delta[\text{O}_2][{}^3\text{PS}]$ v rovnici (3.11)). Sám také deexcituje do základního stavu fosforescencí, nezářivě nebo při zhášení zhášeči s příslušnými rychlostními konstantami. V případě zanedbatelné triplet-tripletní anihilace je kinetika luminiscence singletního kyslíku popsána jako konvoluce zániků ^3PS a samotného $^1\text{O}_2$ jednou rovnicí (29)

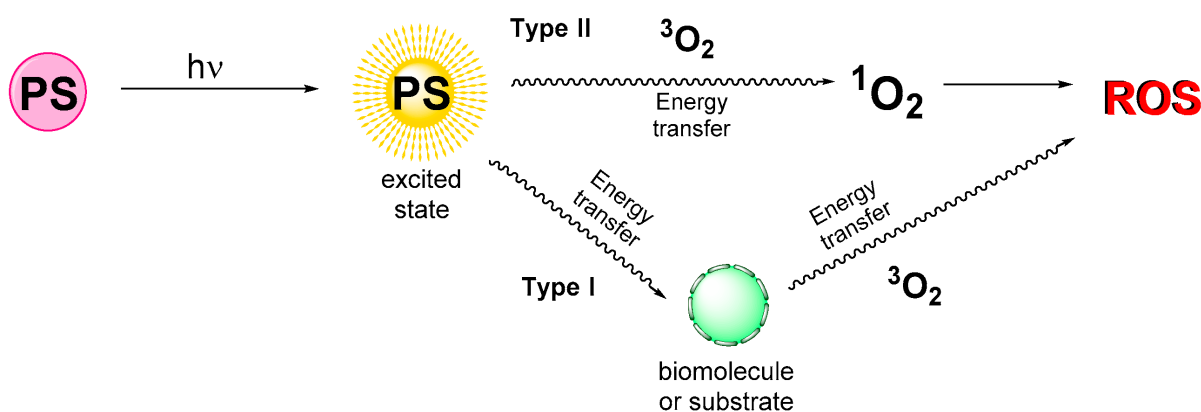
$$I(t) = \frac{I_0}{k_2 - k_1} (e^{-k_1 t} - e^{-k_2 t}), \quad (3.14)$$

kde k_2 popisuje nižší hodnotu rychlostní konstanty deexcitace buď ^3PS nebo $^1\text{O}_2$ a k_1 popisuje tu vyšší.

3.8 Vznik singletního kyslíku procesem fotosenzibilizace

PS , jakožto nedílná součást procesu fotosenzibilizace, je schopen předat dané kvantum energie kyslíku, což vede ke vzniku jeho singletní formy. Toto kvantum většinou získá od elektromagnetického záření většinou ve viditelné části nebo v infra-červené části spektra.

Základní singletní stav PS , ve kterém je většina molekul, přijímá kvantum energie $h\nu$ a přechází do víceenergetické formy, tzv. PS^* . Pokud je kvantum energie dostatečně velké, může PS přejít do vyššího excitovaného stavu, odkud se ale velmi rychle nezářivým přechodem vrátí do prvního excitovaného stavu. Z PS^* , který má velmi krátkou dobu života, má několik možností přechodu. První možnost je ta, že se vrátí do svého základního stavu pomocí fluorescence nebo IC . Další možnost je přechod do 3PS pomocí ISC , který má naopak delší dobu života (10^{-3} s až minuty nebo hodiny) a tedy má delší čas na reakci s okolními molekulami. 3PS je potom schopný reagovat s molekulou kyslíku, předat energii a uvést ji do reaktivní singletní formy 1O_2 . V ten samý moment se 3PS vrátí do základního singletního stavu PS .



Obrázek 7: Proces fotosenzibilizace je zde vyznačený plnou čarou. PS přijme kvantum energie $h\nu$ a přes 3PS se vybudí 1O_2 na ROS . Vlnovkami jsou vyznačeny fotoefekty typu I a II, těmito cestami se ničí molekuly ve fotodynamické terapii; obrázek převzatý z [30]

Tyto procesy mohou být oboustranné, a aby tomu tak nebylo, musí kvantum energie splňovat energetická kritéria. Energetický rozdíl mezi stavem 3PS a PS musí být o něco větší, než mezi 3O_2 a 1O_2 . Pokud tomu tak je, proces bude probíhat dostatečně rychle a k reakci opačným směrem nebude docházet.

3.9 Fotodynamická terapie

Široké využití pro fotosenzitizéry nabízí fotodynamická terapie (PDT), která se využívá nejen k léčení nádorových onemocnění, ale i onemocnění kůže nebo očí [31]. Tato metoda využívá tři základních složek pro správné fungování, tedy:

- Fotosenzitizér
- Singletní kyslík
- Světlo

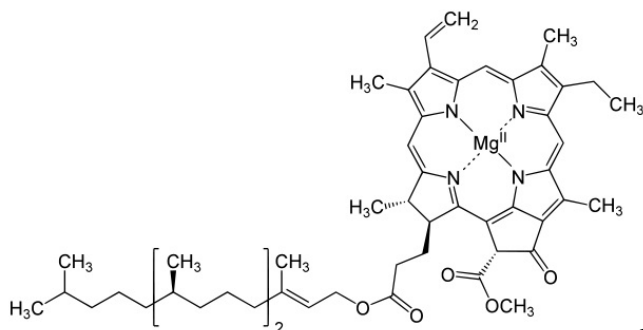
V případě nádorových onemocnění se fotosenzitizér zavede do těla, kde se vstřebá do všech buněk. Jelikož v normálních buňkách nesetrvává tak dlouho jako v rakovinných, čeká se přibližně 24 - 72 hodin, než se PS ze zdravých buněk vyloučí, aby mohla léčba začít. Tumor je poté ozářen specifickým světlem, které dodá energii PS a jeho tripletní stavy vytváří singletní kyslík nebo volné radikály, které ničí buňky v okolí. Nejenže PS a $^1\text{O}_2$ ničí krevní cévy v okolí nádoru, díky čemuž nádor nemůže získávat živiny na své šíření, ale také mohou aktivovat imunitní systém, který v léčbě s rakovinou pomáhá [32].

3.9.1 Fotosenzitizéry

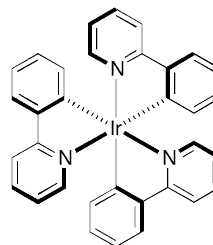
Fotosenzitizéry můžeme rozdělit do tří základních skupin podle jejich molekulární struktury:

- Metaloorganické
- Organické
- Nanomateriály

Metaloorganické se vyznačují přítomností atomu kovu, který je chelatovaný k minimálně jednomu organickému ligandu. Tyto PS mívají většinou v centru atomy, které mají zaplněné hlavně d-orbitaly. Interakce s ligandy spolu s množstvím elektronů z d-orbitalů zajišťuje excitovaným elektronům změnu multiplicity při ISC. Lze nalézt i dělení podle přírodních nebo syntetických PS. Příkladem této metaloorganické skupiny je například chlorofyl a nebo Tris(2-fenylpyridin)iridium.



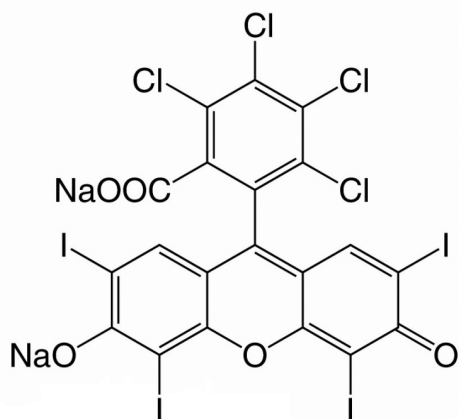
Obrázek 8: chlorofyl a



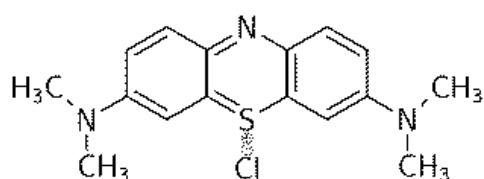
Obrázek 9: Tris(2-fenylpyridin)iridium

Organické PS se skládají z organických konjugovaných systémů uhlovodíků, které mají delokalizované elektrony. Díky jejich konjugaci a delokalizovaným elektronům mají

tyto systémy menší energetický rozdíl mezi nejvyšším obsazeným molekulárním orbitalem (HOMO) a nejnižším neobsazeným molekulárním orbitalem (LUMO), a tak je mnohem jednodušší excitace elektronů. Jejich excitování do tripletních stavů je tak mnohem efektivnější a díky tomu jsou skvělé [PS]. Do této skupiny můžeme zařadit například bengálskou červeně nebo methylenovou modř. Velmi účinné [PS] schválené FDA⁴, které se používají ve fotodynamické terapii, jsou také směsi porfyrinů (hematoporfyrin, protoporfyrin, hydroxyethyldeuteroporfyrin), verteporfin a deriváty benzoporfyrinů [33]



Obrázek 10: Bengálská červeně



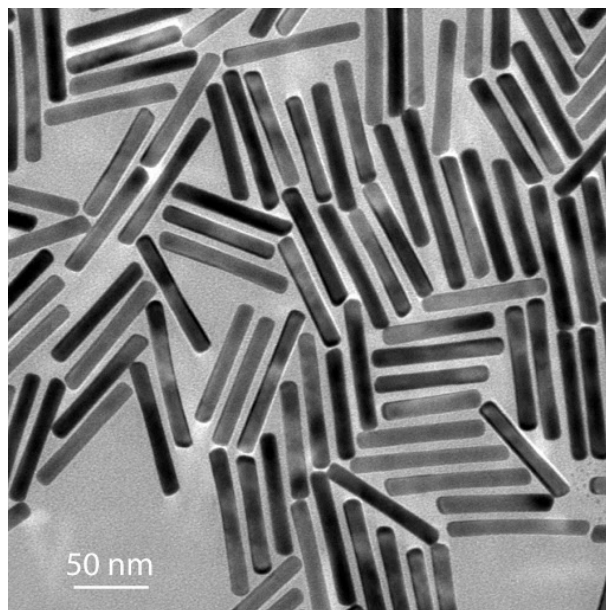
Obrázek 11: Methylenová modř

Nanomateriály obsahují dvě podskupiny:

- Kvantové tečky
- Nanotyče

Materiály s názvem **kvantové tečky**, což jsou nanočásticové anorganické polovodičové krystaly s dobrou kontrolou nad jejich optickými a polovodičovými vlastnostmi. Jejich velikost se pohybuje v rozmezí od 10 do 50 atomů na jednu hranu krystalu, což je přibližně 1-10 nm. Jako [PS] fungují stejně, jako výše zmíněné 2 skupiny, ale díky jejich vlastnostem máme větší kontrolu nad různými aspekty. Jejich význačnými vlastnostmi jsou například malý energetický rozdíl mezi HOMO a LUMO či nerozpustitelnost v mnoha rozpouštědlech. Nejpoužívanější materiály pro výrobu kvantových teček jsou například sulfid zinečnatý, sulfid olovnatý, oxid titaničitý, křemík a další.

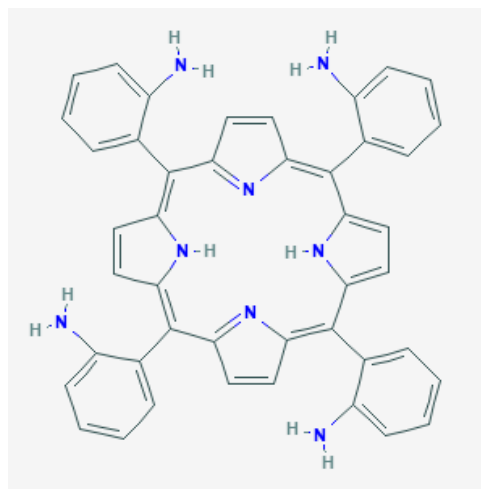
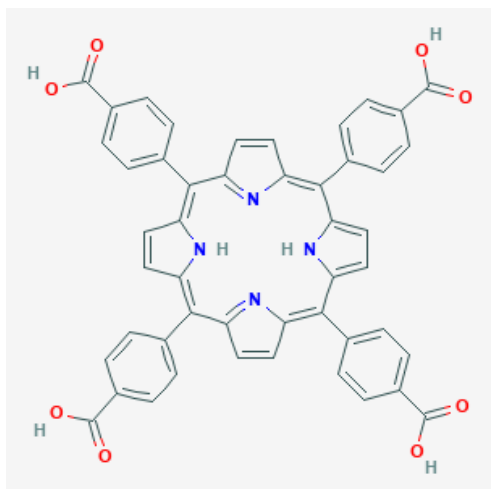
⁴Food and Drug Administration



Obrázek 12: Stejně jak u kvantových teček velikost určuje jejich vlastnosti, stejně tak tyto vlastnosti určuje i tvar a délka u zlatých nanotyčů. Využívají se zejména v lékařství, jako třeba snímkování, fototerální terapie, dodávání léků v těle [34].

Dále existují tzv. **nanotyče**, které jsou kvantovým tečkám ve svých vlastnostech velmi podobné. Dokážeme díky jejich materiálu a velikosti správně nastavit absorpční maximum během jejich procesu syntézy.

Ke generaci singletního kyslíku lze využít i tyto zmíněné nanomateriály. Mezi známé oxidy a generátory singletního kyslíku patří například TiO_2 nebo také ZnO . Jako speciální materiály se také používají fullereny, což je strukturální forma čistého uhlíku, která v sobě může obsahovat i jiný atom, a jejich deriváty. Ke generaci singletního kyslíku za použití rentgenových paprsků se také používají například nanočástice $\text{LaF}_3:\text{Tb}^{3+}$ konjugované na [PS] tetrakis(4-karboxyfenyl)porfyrin, nebo ZnO nanočástice konjugované na tetrakis(o-aminofenyl)porfyrin [35].



Obrázek 13: Tetrakis(4-karboxyfenyl)porfyrin **Obrázek 14:** Tetrakis(o-aminofenyl)porfyrin

4 Materiály

4.1 Koncentrace riboflavinu

Na mikrováze jsme si odměřili 1,46 mg **RF** a rozpustili jsme jej v 19,39 ml pufru. Rozpuštění riboflavinu bylo rychlé. Na promíchání jsme použili přístroj VERTEX, který vzorek promíchal vibracemi a rotací nádoby za nás. Z vytvořeného vzorku roztoku **RF** jsme si oddměřili 2 ml 200 μM roztoku, nalili do kyvety a dali před detektor aparatury. V tomto okamžiku bylo potřeba dodržovat bezpečnostní opatření jak pro nás, tak pro přístroj. Ochranné brýle a vyvarování se odrazu laseru bylo velmi důležité. Laser má velký výkon, pokud by zasáhl sítnici v oku, mohlo by to mít trvalé následky. Stejně tak jsme si museli dát pozor na přesný postup spouštění měření. Bylo nutné, aby detektor přístroje byl vždy zavřený, pokud v místnosti svítí denní světlo nebo světlo z žárovky. Jelikož je detektor přístroje velmi citlivý, mohlo by dojít k jeho spálení.

Po ochranných krocích jsme mohli spustit první měření s 2 ml 200 μM roztoku **RF** s nastavením laseru o excitační vlnové délce $\lambda = 420 \text{ nm}$. Tuto excitační délku jsme použili pro všechna další měření. Měření trvalo přibližně 10 – 15 min, kdy jsme během této doby naměřili 10 sad dat. Po dokončení měření bylo nutné zavřít clonu u detektoru, aby opět nedošlo k poničení. Museli jsme naměřit další vzorky o slabších koncentracích, které byly postupně 100 μM , 50 μM , 20 μM , 10 μM , 5 μM , 2 μM , 1 μM . Vytvořit 100 μM roztok nebylo těžké. Jediné, co stačilo udělat, bylo zředit náš původní 200 μM roztok pufrům v poměru 1:1. Tedy z 2 ml 200 μM jsme vypipetovali 1 ml roztoku a přidali 1 ml pufru. Tak jsme získali 100 μM roztok a mohli pokračovat dále v míchání 50 μM roztoku, které probíhalo stejně. Roztok 20 μM z roztoku 50 μM jsme získali tak, že jsme z 2 ml 50 μM roztoku odebrali $\frac{3}{5}$ objemové části a poté doplnili pufrům.

Při míchání roztoků se dopouštíme malé chyby díky nepřesnosti přístroje na odměřování – pipety. Jakmile nebudeme vycházet z původního roztoku, chyba z hlediska pipetování a odměřování se bude stupňovat. Je tedy lepší dané roztoky odměřovat z původního 200 μM roztoku. Tato chyba ovšem není tak podstatná, pokud si dáme záležet na přesném nastavení množství a počtu odpipetování.

Měřili jsme i čistý pufr. U tohoto měření je zřejmé, že na případné zhášení nebude mít vliv **RF**, ale jiné mechanismy, například srážkové zhášení rozpouštědlem (viz kapitola 3.6.1). Tyto mechanismy nás z hlediska zkoumání vlivu **RF** zajímají z toho důvodu, abychom oddělili vlivy okolí a vliv samotné zkoumané látky. Protože singletní kyslík v nepřítomnosti **RF** nevzniká, můžeme měření sady I prohlásit za pozadí. Toto pozadí poté budeme odečítat z naměřených dat.

4.2 Azid sodný v roztoku RF

Kvůli schopnosti zhášet $^1\text{O}_2$ [36] byl použit azid sodný (**NaN₃**). Této vlastnosti využijeme v přiřazení konstant t, T v rovnici 6.2. **NaN₃** se vyskytuje v podobě bílého prášku bez zápachu, který je, jak je zmíněno v tabulce 1 níže, rozpustný ve vodě a vysoce toxický [37]. Je potřeba s ním zacházet velmi opatrně.

Tabulka 1: Fyzikální vlastnosti **NaN₃**

Molární hmotnost	65,010 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$
Hustota	1,846 $\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$
Rozpustnost ve vodě (při 20 °C)	40,8 g/100 ml

Rozpuštěním 28,47 mg v 4,38 ml pufru jsme si připravili zásobu 100 mM roztoku azidu sodného. Do 2 ml 50 μ M roztoku **RF** jsme přidávali postupně po 2 μ l 100 mM roztoku azidu sodného a každou sadu změřili. Vytvořili jsme si 3 sady vzorků o koncentracích 0,1 mM, 0,2 mM a 0,3 mM NaN_3 .

4.3 Riboflavin rozpuštěný v těžké vodě

Molekula vody, kde místo vodíku je deuterium D, se nazývá těžká voda (**D_2O**). Deuterium je vodík s jedním neutronem navíc, tedy ${}^2_1\text{H} = \text{D}$. D_2O má jiné fyzikální vlastnosti než voda normální **[38]**, což nám později pomůže rozhodnout a rozlišit konstanty v rovnici **[6.2]**.

Tabulka 2: Fyzikální vlastnosti těžké vody

Vlastnost	D_2O	H_2O
Molární hmotnost	20,028 g/mol	18,015 g/mol
Teplota tuhnutí	3,82 °C	0,0 °C
Teplota tání	101,4 °C	100,0 °C
Maximální hustota	1,106 g/ml	0,998 g/ml
pH (při 25 °C)	7.44	7.0
Index lomu	1.328	1.333

Vzorek jsme připravili pomocí základního 200 μ M vzorku **RF**, který jsme v poměru 3:1 naředili D_2O . Tím jsme získali 50 μ M vzorek **RF** rozpuštěný v směsi těžké vody a lehké vody. Hlavní důvod výběru D_2O je ten, že v její přítomnosti nedochází ke zhášení singletního kyslíku tak účinně a jeho doba života se prodlužuje **[39]**, Chapter IV] z 3,1 μ s ve vodném roztoku až na 68 μ s v roztoku těžké vody.

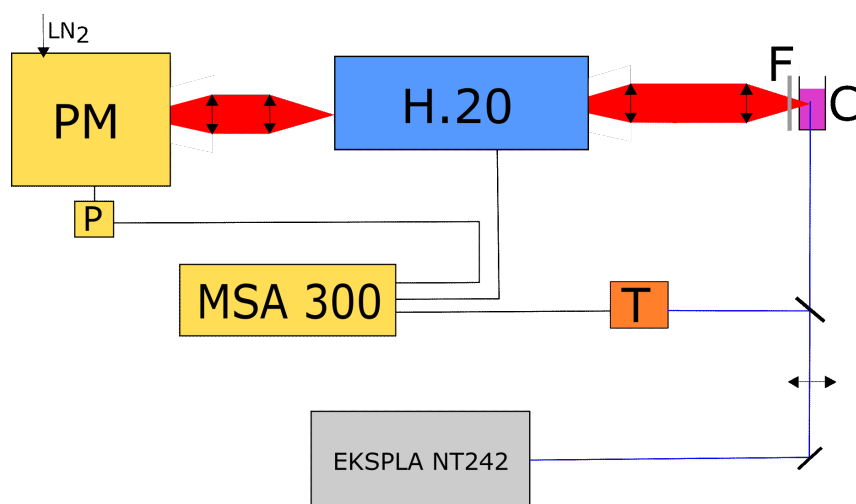
V článku **[39]**, Chapter III] se píše o tom, že kromě oxidovatelnosti, energii tripletního stavu, teploty a tlaku má na generaci singletního kyslíku také vliv struktura, prostorový tvar, elektrická konfigurace a dokonce také polarita rozpouštědla. Z důvodu větší hmotnosti deuteria se mění celá řada vlastností těžké vody. Mění se ale také i vzdálenosti intramolekulárních vazeb, stejně tak jako intermolekulárních vazeb vodíkových můstků **[40]**, které jsou o pár % v D_2O delší. Mění se také vodivost **[41]**, která je pro těžkou vodu menší, a polarita je pro D_2O taktéž menší. Ten hlavní důvod je nejspíše násobek energie vibračních přechodů, který je v rezonanci s ${}^1\text{O}_2$ pro H_2O . Tuto vlastnost ale D_2O nemá, a tedy **${}^1\text{O}_2$** bude zhášet hůře. Tyto skutečnosti nám dovolí s jistotou říci, zda-li t nebo T v rovnici **[6.2]** je doba života singletního kyslíku, proto využijeme jako rozpouštědlo i D_2O .

5 Experimentální uspořádání

5.1 Aparatura

Celá aparatura je vyobrazena na obrázku 15 a skládá se z těchto částí:

- laser EKSPLA NT242
- 2x optický filtr RG7
- monochromátor Jobin YVON H20IR
- infračervený fotonásobič Hamamatsu R9905
- předzesilovač
- časově rozlišený čítač Becker&Hickl MSA 300



Obrázek 15: Experimentální uspořádání pro měření zhášení singletního kyslíku v roztoku RF. Soustava se skládá z EKSPLA NT242 laseru, T: Trigerovací PIN fotodioda MSA 300: časově rozlišený čítač, P: předzesilovač, PM: fotonásobič Hamamatsu R9905, H.20: monochromátor Jobin YVON H20IR, F: dlouhovlnné filtry, C: kyveta se vzorkem RF, LN₂: Chlazení tekutým dusíkem

5.1.1 Laser EKSPLA NT242

Laser série NT242 se používá k vytváření krátkých pulsů na široké bázi vlnových délek s frekvencí opakování 1 kHz [42]. To nám dovolí změřit mnoho signálů za krátký čas. Dá se jednoduše ovládat přes počítač, pokud je vybavený specifickými ovladači LabVIEW™. Díky svým vlastnostem je to výborný nástroj pro laboratorní aplikace, jako je třeba fotobiologie, nebo fluorescence látek.

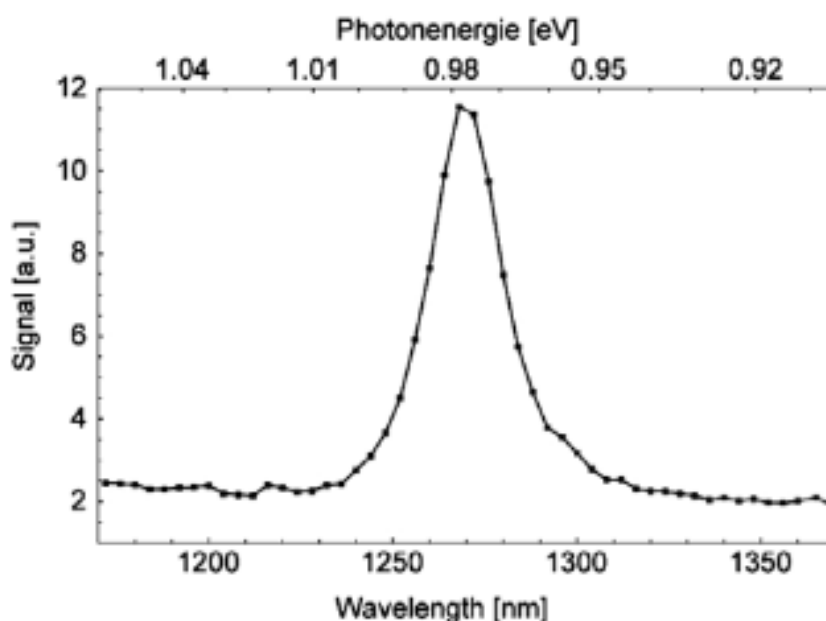
5.1.2 Optický filtr RG7

Optické filtry se řadí do dvou skupin. Do první skupiny patří filtry, které absorbují určitý rozsah vlnových délek, do druhé patří ty, které se zakládají na dichroických nebo interferenčních filtrech (zesilování či zeslabování určitých vlnových délek).

Naše filtry SCHOTT RG7 se nacházejí za luminiskujícím vzorkem a jejich umístění je z důvodu, aby zeslabovaly rozptýlené excitační záření a fluorescenci samotného [RF]. Tyto signály jsou silnější (o několik řádů), než luminiscence singletního kyslíku, kterou chceme měřit, tedy je potřeba se toho zbavit pomocí filtrů. Kromě překrytí dat by tyto signály mohly poškodit i detektor.

5.1.3 Monochromátor Jobin YVON H20IR

Monochromátory jsou přístroje, které propouštějí zvolenou úzkou část spektra. V tomto experimentu jsme měřili spektrum na vlnové délce 1274 nm, kde leží maximum emise singletního kyslíku ve vodě [43].

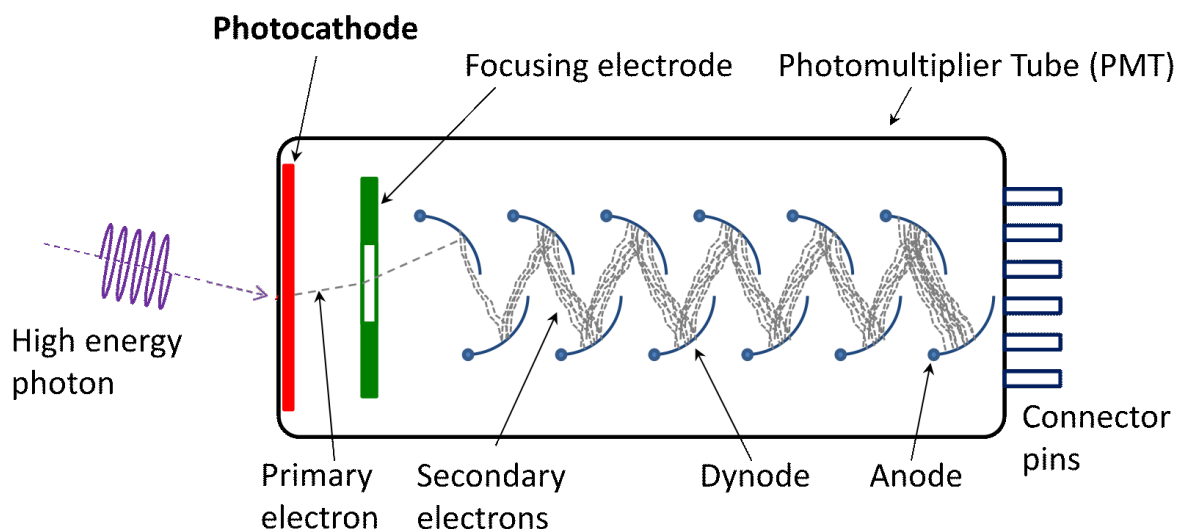


Obrázek 16: Luminiscenční signál singletního kyslíku generovaného 50 μM roztokem [RF] v závislosti na vlnové délce; převzato z [43]

5.1.4 Infračervený fotonásobič Hamamatsu R9905

Tato část aparatury je schopna detekovat i velmi slabé elektromagnetické signály. Fungování fotonásobiče je založeno na vnějším fotoelektrickém efektu a multiplikaci náboje přes sekundární emise elektronů [44]. Energie dopadajících fotonů je rozdělena mezi kinetickou energii vyraženého fotonu a energii, která je potřebná k vyražení elektronu z materiálu. Z této skutečnosti vyplývá, že dopadající foton musí mít určitou energii, aby fotoelektrický jev vůbec nastal.

Přicházející fotony interagují s materiálem fotokatody. Nastává fotoelektrický efekt, který vyrazí elektrony. Ty jsou urychleny napětím z další elektrody, tzv. dynody, na kterou dopadnou. Tam se díky sekundární emisi vyrazí mnohem více elektronů, které pokračují k další dynodě. Po několikanásobném zesílení elektrony dopadají na anodu a dochází k zesílení prvotního signálu.



Obrázek 17: Schéma obecného fungování fotonásobiče, převzato a upraveno z [45]

Náš fotonásobič využívá jevu, kdy jsou pomocí elektrického pole a speciální polovodičové katody (InP/InGaAsP) hladiny valečnického a vodivostního pásu ohnuty tak, aby výstupní práce byla dostatečně nízká, a my proto mohli detekovat fotony delších vlnových délek. Zde se vyskytuje problém, že těmito vlnovým délkám odpovídají tak malé výstupní práce, že za běžné pokojové teploty se budou vyražet tepelným pohybem elektrony z materiálu, které navíc nebudou rozlišitelné od těch vyražených fotoefektem. Tak obrovské množství vyražených elektronů by způsobilo vysoký temný proud, který by přehříval a poškodil fotonásobič. Je nutné proto tento fotonásobič chladit na přijatelnou teplotní úroveň (v našem případě -80°C). Zchlazení fotonásobiče tekutým dusíkem trvalo zhruba 3 hodiny.

5.1.5 Předzesilovač Becker and Hickl HFAC–26

Signál z fotonásobiče je ale pořád velmi slabý, proto je nutné ho před zpracováním čítačem zesílit.

5.1.6 Časově rozlišený čítač Becker and Hickl MSA 300

Čítač slouží k čítání jednotlivých fotonů, nebo jiných rychlých jevů. Díky jeho velké opakovací frekvenci je tento přístroj užitečný v mnoha odvětvích. Má časové rozlišení 5 ns na jeden kanál [46].

5.2 Nastavení aparatury

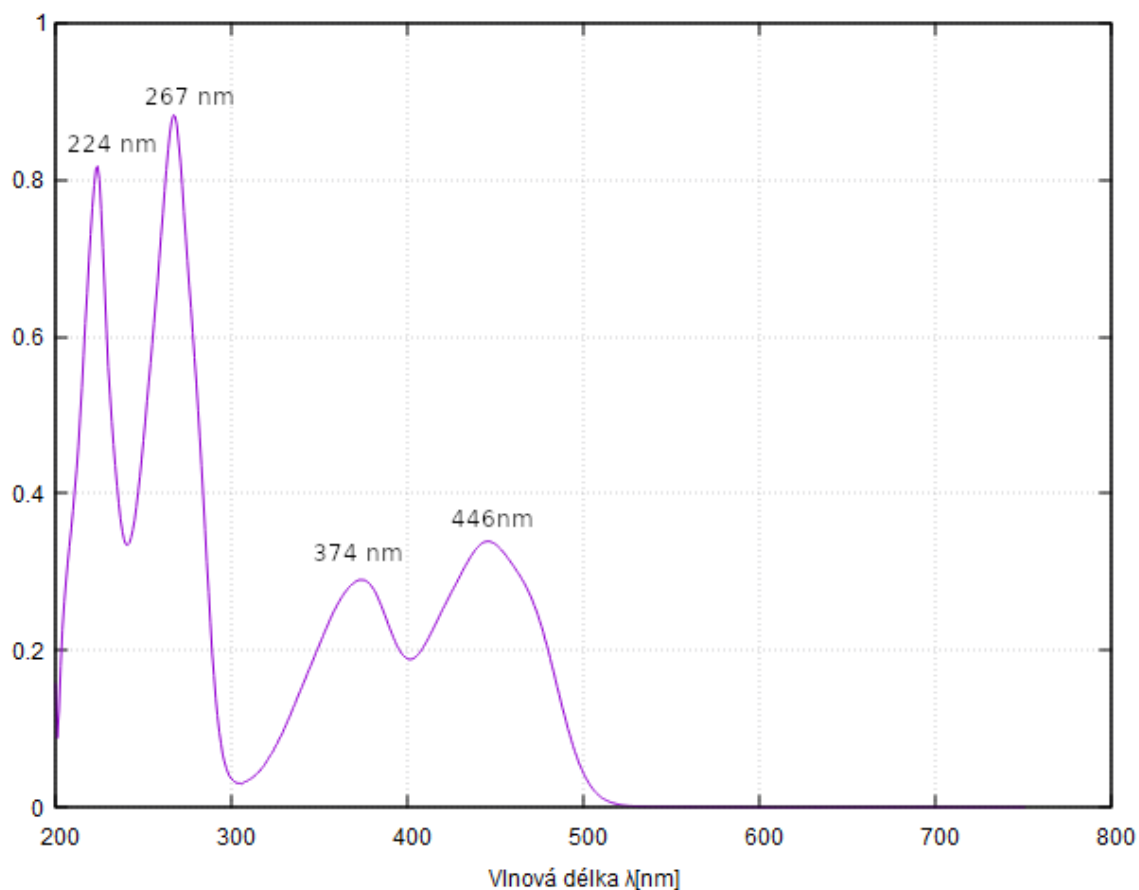
K měření jsme potřebovali správně nastavit laser, který díky energii vysílaných fotonů excitoval naše částice ve vzorku. energii laserových pulsů jsme nastavili na $10\ \mu\text{J}$ a excitační vlnovou délku jsme nastavili na 420 nm.

Po nastavení experimentálního uspořádání bylo nutné nastavit počet měření. Pokaždé jsme měřili 100 000 opakování na jednu sadu dat a celkově jsme naměřili 10 sad měření pro každou koncentraci [RF]. Z tohoto datového vzorku můžeme usoudit, jak se riboflavin chová, či jaký má vliv na zhášení singletního kyslíku. Ovšem pro bližší specifikaci času t

a T z rovnice 6.2 je potřeba proměřit i jiné sady, které zahrnují NaN_3 , D_2O nebo změnu koncentrace rozpuštěného kyslíku.

5.3 Měření absorpčního spektra

V této práci bylo změřeno absorpční spektrum riboflavinu. To bylo provedeno na dvoupaprskovém absorpčním spektrometru SPECORD 250 od firmy Analytik Jena.

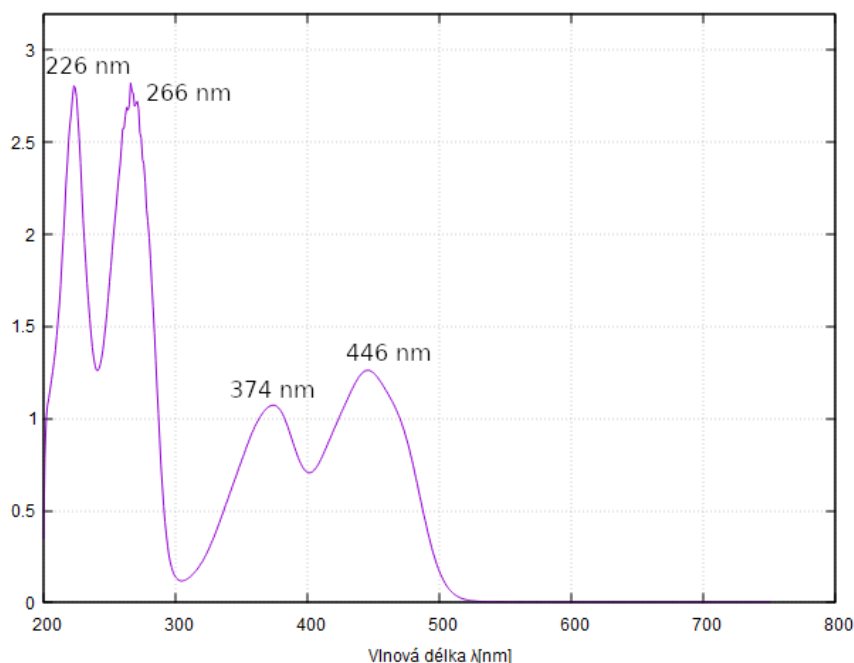


Obrázek 18: Absorpční spektrum 50 μM roztoku [RF](#)

6 Výsledky měření

6.1 Měření absorpce riboflavinu

V první části jsme měřili závislost absorpce na každé z použitých koncentrací RF. Tímto měřením zjistíme, zda riboflavin neagreguje při daných koncentracích a neovlivňuje se tím zhášením $^1\text{O}_2$. Typické absorpční spektrum lze vidět na obrázku č. 19.



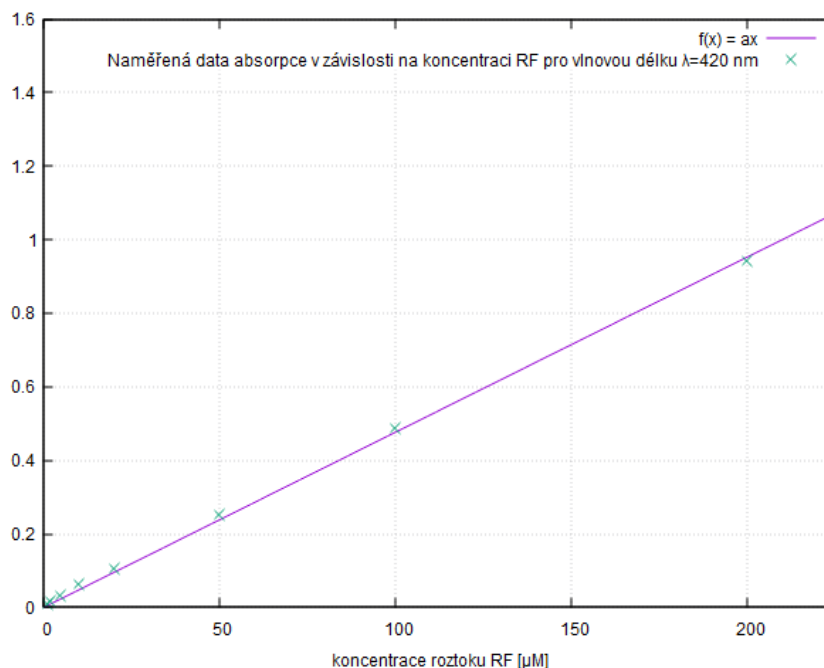
Obrázek 19: Absorpční spektrum 200 μM roztoku RF

Toto absorpční spektrum se skládá ze 4 pásů s maximy na vlnových délkách $\lambda_1=223$ nm, $\lambda_2=266$ nm, $\lambda_3=374$ nm a $\lambda_4=446$ nm a velmi dobře se shoduje s absorpčním spektrem, které naměřili v článku 11 (obrázek č. 3).

Tato naměřená spektra jsme dále zpracovávali. V závislosti na koncentraci RF v roztocích jsme vynesli hodnoty jejich absorpce pro jednu vlnovou délku $\lambda = 420$ nm do grafu a fitovali rovnici 6.1. Pro toto λ a rovnici:

$$f(x) = ax \tag{6.1}$$

máme fit funkce 6.1 (graf č. 20) s členem rovným $a = (4,77 \pm 0,05) \cdot 10^{-3} \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1}$. Pro vlnovou délku $\lambda = 450$ nm jsme získali parametr $a = (6,32 \pm 0,07) \cdot 10^{-3} \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1}$ (graf č. 45 k tomuto fitu v příloze). Lze vidět, že absorpce na koncentraci závisí lineárně s malou chybou. To znamená, že RF neagreguje v proměřeném intervalu koncentrací.



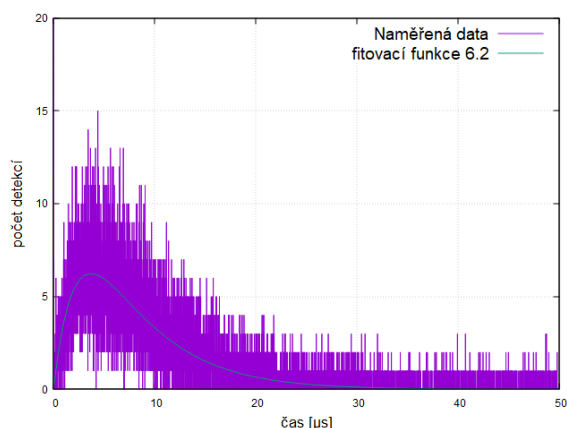
Obrázek 20: Lineární závislost absorpce na koncentraci RF v roztoku na excitační vlnové délce $\lambda = 420$ nm

6.2 Závislost kinetik luminiscence singletního kyslíku na koncentraci RF

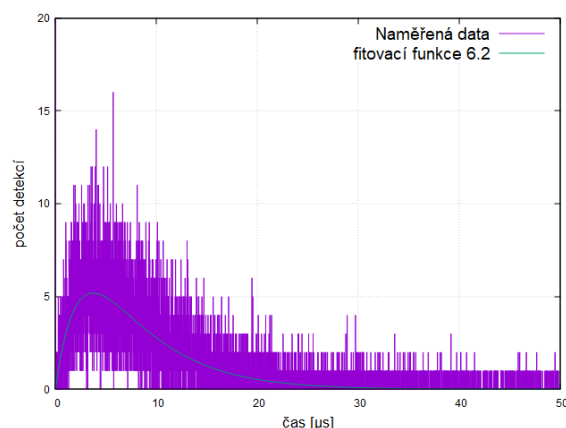
V druhé části musíme změřit závislost doby životů tripletních stavů RF a $^1\text{O}_2$ na koncentracích RF. Všechna naměřená data budeme fitovat funkcí 6.2, která zastupuje rovnici 3.14,

$$F(x) = A \cdot (e^{-\frac{x}{t}} - e^{-\frac{x}{T}}) + c, \quad (6.2)$$

kde t a T zastupují doby života $^1\text{O}_2$ a tripletů RF a c zde zastupuje roli pozadí. V tento moment nelze říct, která z dob života přísluší kterému excitovanému stavu. Lze jen říci, že konstanta T by měla být menší, než konstanta t . Dvě exponenciály v rovnici 6.2 budou dávat výsledek, který nám řekne, kolik bylo detekcí luminiscence $^1\text{O}_2$ v daném čase. Vystupují v ní dvě části. Jedna je zodpovědná za zhášení $^1\text{O}_2$ a druhá za zhášení samotného tripletního stavu RF. Konstanta c zde hraje roli opravnou. Přístroj totiž nezaznamenává jenom fotonové signály z našeho vzorku, objevuje se i signál pozadí. Je to náhodný šum, který se v detektoru objevuje a který v našem měření nechceme. Potřebujeme pouze čistý signál z našeho vzorku. Úroveň pozadí lze určit buď z části kinetiky, kde již signál $^1\text{O}_2$ klesl k nule, nebo z měření čistého pufu.



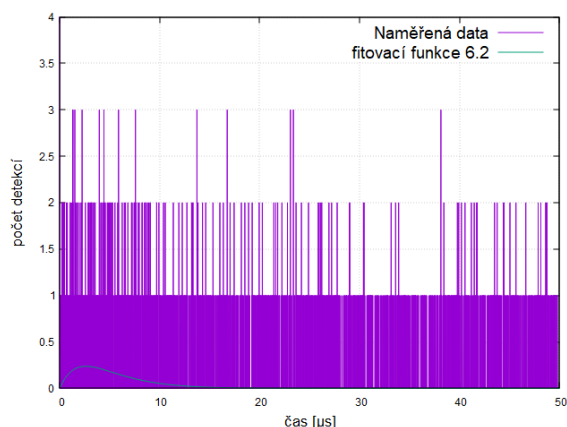
Obrázek 21: Sada A, měření 7; 200 μM roztok RF



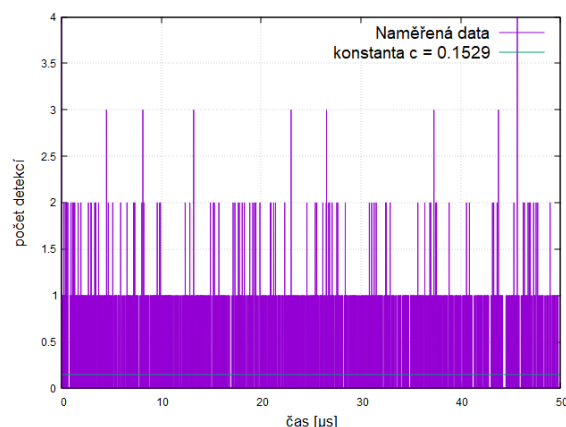
Obrázek 22: Sada B, měření 3; 100 μM roztok RF

Fitování probíhalo pomocí programu GNUPLOT, ve kterém byl využit kód, který je sepsán v příloze i s popisky. Díky tomuto kódu jsme byli schopni během relativně krátké doby najít pro všechna měření u všech sad přibližné hodnoty hledaných koeficientů A , t , T .

Nejdříve jsme si změřili závislost doby života kinetiky $^1\text{O}_2$ na koncentraci RF . Měli jsme celkem 9 sad (A-I) po deseti měřeních (viz tab. 3). V prvním kroku bylo potřeba si nafitovat pozadí, které jsme mohli jednoduše získat ze sady I, kde je nulová koncentrace RF , a z fitování této sady konstantní hodnotou. Konstanta tohoto pozadí je rovna $c = (15,29 \pm 0,90) \cdot 10^{-2}$ a využijeme ji k fitování ostatních sad, kam už zadáme fixní hodnotu c v rovnici 6.2. Lze opravdu vidět, že vliv přítomnosti RF v předposlední sadě (graf č. 23) už skoro vymizel a v sadě I (graf č. 24) lze pozorovat jen signály z pozadí, kterým se v měření chceme vyhnout.



Obrázek 23: Sada H, měření 5; 1 μM roztok RF



Obrázek 24: Sada I, měření 4; 0 μM roztok RF

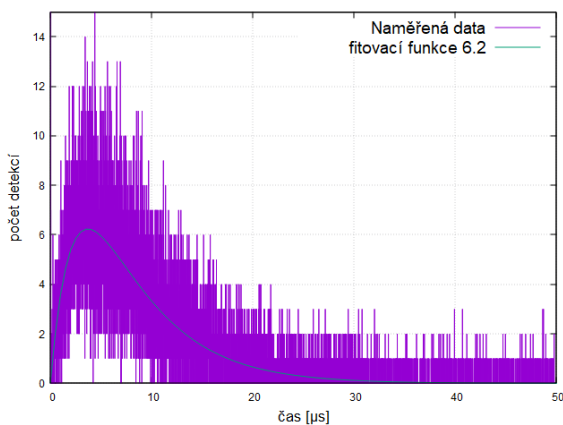
Fitování všech sad probíhalo až od 0,04 μs , protože do té doby jsme zachytávali pouze nechtěné signály z rozptýleného laseru. Nafitované konstanty A , t , T z každého měření jednotlivých sad jsme zprůměrovali a vytvořili tabulku 3. Z té lze snadno vyčíst, že zatímco doba T se se vzrůstající koncentrací RF nemění, doba t roste (viz. obrázek č. 27). Bylo důležité správně odhadnout počáteční hodnoty konstant A , t a T pro nižší koncentrace RF , fitování funkce by bez toho nemuselo zkonvergovat ke správným hodnotám. Proto

bylo dobré průběžně sledovat hodnoty konstant A , t a T u měření s vyšší koncentrací **RF**, sledovat jejich změnu a tuto změnu aplikovat na fit v další sadě.

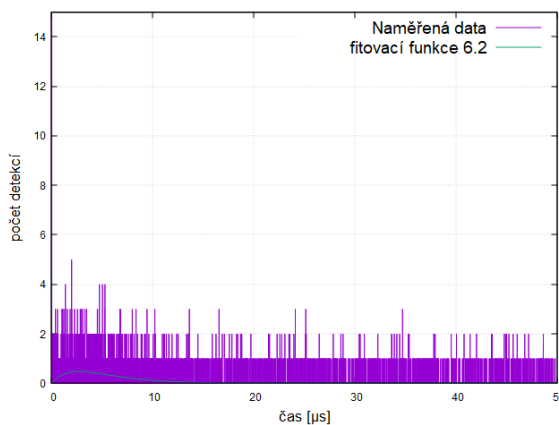
Tabulka 3: Nafitované hodnoty parametrů rovnice **6.2** pro všechny sady měření s **RF** rozpuštěným v pufru

Sada	Koncentrace RF	A	σ_A	t [μs]	σ_t [μs]	T [μs]	σ_T [μs]
A	200 μM	21,71	2,27	5,78	0,23	2,53	0,12
B	100 μM	20,22	3,06	5,62	0,28	2,75	0,26
C	50 μM	27,10	9,77	4,75	0,35	2,86	0,24
D	20 μM	18,35	8,58	4,29	0,38	2,57	0,26
E	10 μM	14,27	16,57	3,86	0,55	2,45	0,41
F	5 μM	10,49	28,98	3,57	0,98	2,47	0,79
G	2 μM	6,36	43,48	3,09	2,15	2,46	1,84
H	1 μM	5,79	178,62	2,77	5,43	2,44	5,00
I ⁵	0 μM	-	-	-	-	-	-

Obrázek č. **25** ukazuje naměřenou kinetiku luminiscence $^1\text{O}_2$ roztoku **RF** o koncentraci 200 μM spolu s fitovací funkcí **6.2**. Při nižších koncentracích byl signál luminiscence $^1\text{O}_2$ oproti pozadí výrazně slabší, a proto bylo fitování méně spolehlivé. To je znázorněno na obrázku č. **26**, kde je signál luminiscence $^1\text{O}_2$ s příslušnou nafitovanou funkcí pro roztok **RF** o koncentraci 2 μM.



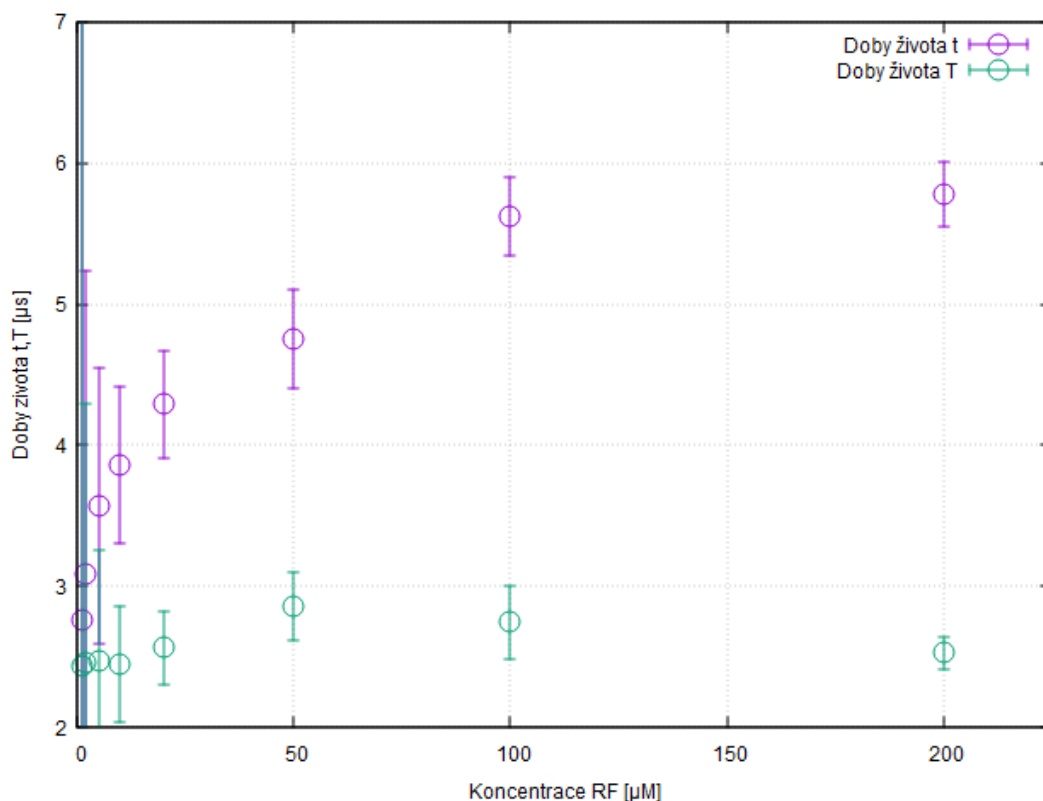
Obrázek 25: Sada A, měření 7; 200 μM roztok **RF**



Obrázek 26: Sada G, měření 6; 2 μM roztok **RF**

Pokud si vyneseme jednotlivé doby života pro $^1\text{O}_2$ a tripletní stavy **RF** do grafu, lze vidět, že se zvyšující se koncentrací se doba T v rámci chyby nemění, ale doba t se zvyšuje. Ze závislosti samotné nelze určit, která doba patřila době života $^1\text{O}_2$ a která naopak době života tripletních stavů **RF**, proto bylo nutné provést další měření.

⁵Sadu I jsme fitovali konstantní hodnotou, nafitovat jí rovnicí **6.2** nebylo možné



Obrázek 27: Srovnání dob života t , T v závislosti na molaritě roztoku RF [3]

6.3 Vliv částečné izotopické záměny vody na kinetiku emise singletního kyslíku

Dle informací v podkapitole [4.3] víme, že D_2O nemá takovou schopnost 1O_2 zhášet. To už nám napovídá, jestli t nebo T je právě ona doba života 1O_2 .

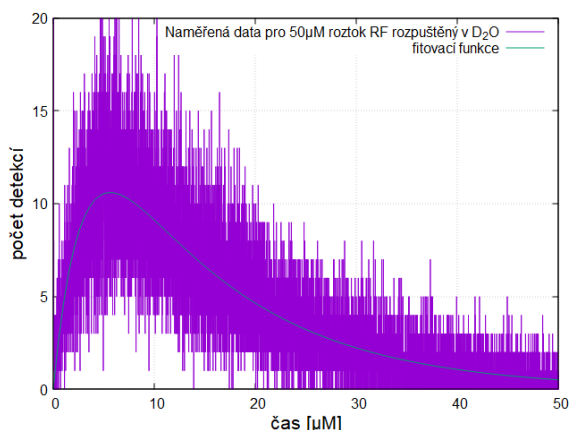
V následující tabulce jsou uvedeny hodnoty rychlostních konstant luminiscence 1O_2 , které jsme měřili pro riboflavin rozpuštěný ve vodě a v D_2O . Zkoumáme zde vliv izotopické záměny lehké vody za těžkou.

Tabulka 4: Srovnání nařizovaných parametrů pro tři sady C, J, a N pro RF rozpuštěný ve vodě a sadu P, kde je vzorek RF rozpuštěný v D_2O

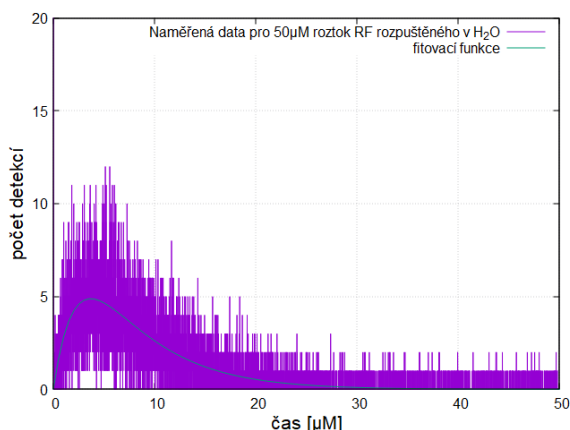
Sada	Koncentrace RF	A	σ_A	$t[\mu s]$	$\sigma_t[\mu s]$	$T[\mu s]$	$\sigma_T[\mu s]$
C	$50 \mu M$ ⁶⁾	27,10	9,77	4,75	0,35	2,86	0,24
J	$50 \mu M$)	24,48	7,23	4,95	0,32	2,82	0,21
N	$50 \mu M$)	17,43	7,65	4,59	0,37	2,63	0,25
P	$50 \mu M$ v D_2O	13,73	0,19	12,84	0,13	2,95	0,05

Obrázky [28] a [29], že RF rozpuštěný v D_2O má až několikrát delší dobu t oproti RF rozpuštěného ve vodě. Doba T se oproti tomu v rámci chyby nezměnila. To je důležitá informace, protože teď můžeme s jistotou říct, že doba t je doba života 1O_2 a doba T je tedy doba života tripletního stavu RF.

⁶⁾ = rozpuštěno v pufru



Obrázek 28: Sada P, měření 1; RF rozpuštěný v těžké vodě - 50 μM roztok



Obrázek 29: Sada C, měření 6; 50 μM roztok RF v pufru (lehká voda)

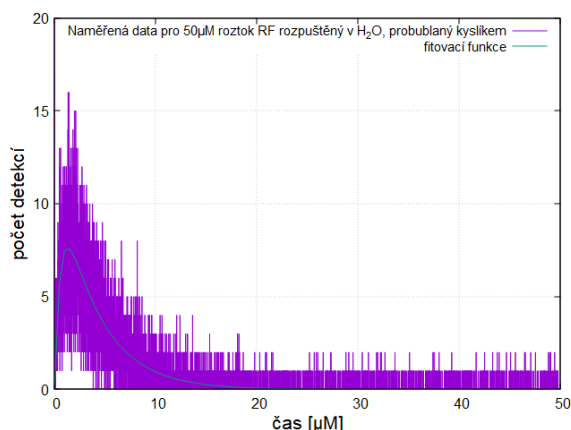
6.4 Vliv vyšší koncentrace rozpuštěného kyslíku v roztoku

Vyšší koncentrace O_2 v roztoku RF způsobila, že doba T se výrazně zkrátila (viz článek 47) a doba t se zkrátila přibližně o 30 % oproti průměru doby t v sadách C, J a N (viz tab. 5). Můžeme to pozorovat na mnohem vyšším a užším peaku v grafu č. 30 oproti grafu č. 31.

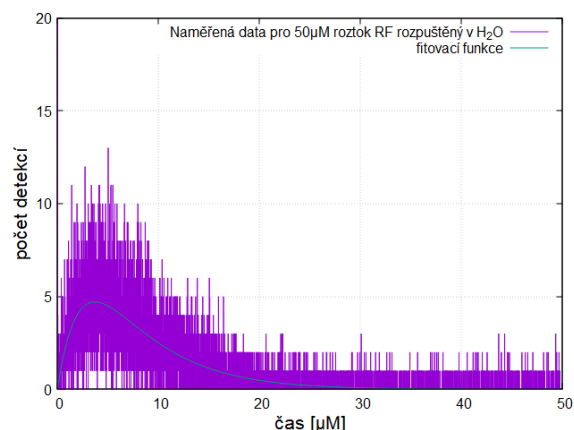
Tabulka 5: Srovnání nafitovaných parametrů pro tři sady měření C, J, a N pro 50 μM roztok RF rozpuštěný v pufru a sadu O, kde je vzorek v pufru navíc probubláný kyslíkem O_2

Sada	Koncentrace O_2	A	σ_A	t[μs]	σ_t [μs]	T[μs]	σ_T [μs]
C	0,28 mM	27,10	9,77	4,75	0,35	2,86	0,24
J	0,28 mM	24,48	7,23	4,95	0,32	2,82	0,21
N	0,28 mM	17,43	7,65	4,59	0,37	2,63	0,25
O	1,4 mM	13,13	0,24	3,64	0,06	0,61	0,02

Díky těmto hodnotám budeme navíc schopni určit zhášecí konstantu podle Stern-Volmerovy rovnice. Podle knihy 48 je koncentrace kyslíku ve vzorku saturovaného vzduchem 0,28 mmol·l⁻¹ a 1,4 mmol·l⁻¹ ve vzorku, který je saturovaný čistým kyslíkem O_2 . My jsme roztok RF probublávali kyslíkem zhruba 20 minut. Z těchto dat lze určit zhášecí konstantu pomocí užití rovnice 3.3 na získaná data. Získané body pro koncentraci kyslíku v roztoku saturovaném vzduchem zprůměrované ze sad C, J a N a kyslíkem byly použity pro získání koeficientů rovnice 3.3. Zhášecí konstanta se zde rovná $k_{O_2-T} = (1,14 \pm 0,23) \cdot 10^9 \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ a přirozená doba života tripletů při nulové koncentraci volných molekul O_2 vyšla $t_0 = (24,14 \pm 0,01) \mu\text{s}$.

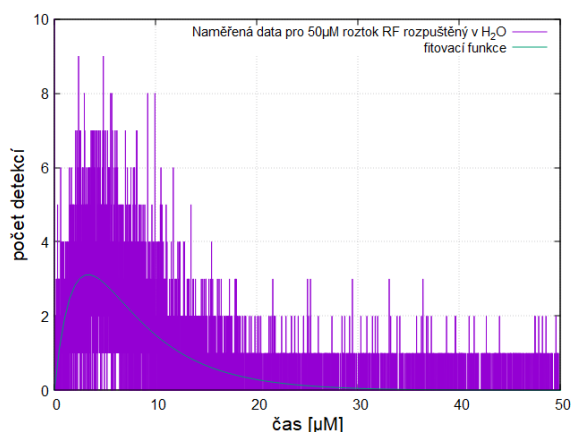


Obrázek 30: Sada O, měření 4; 50 μM roztok **RF** probublávaný kyslíkem

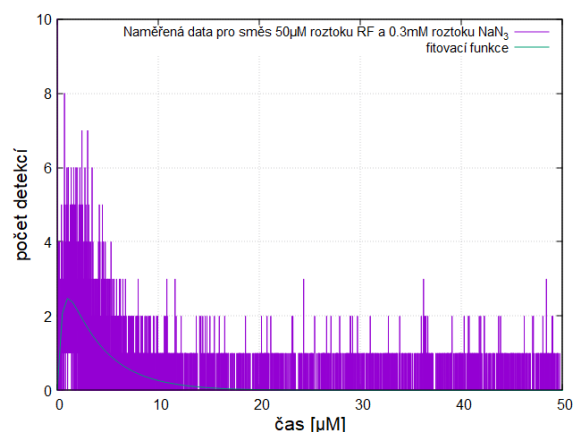


Obrázek 31: Sada J, měření 8; 50 μM roztok **RF** v rovnováze se vzduchem

6.5 Vliv azidu sodného na doby života kinetiky emise singletního kyslíku



Obrázek 32: Sada N, měření 10; 50 μM roztok **RF** bez NaN_3

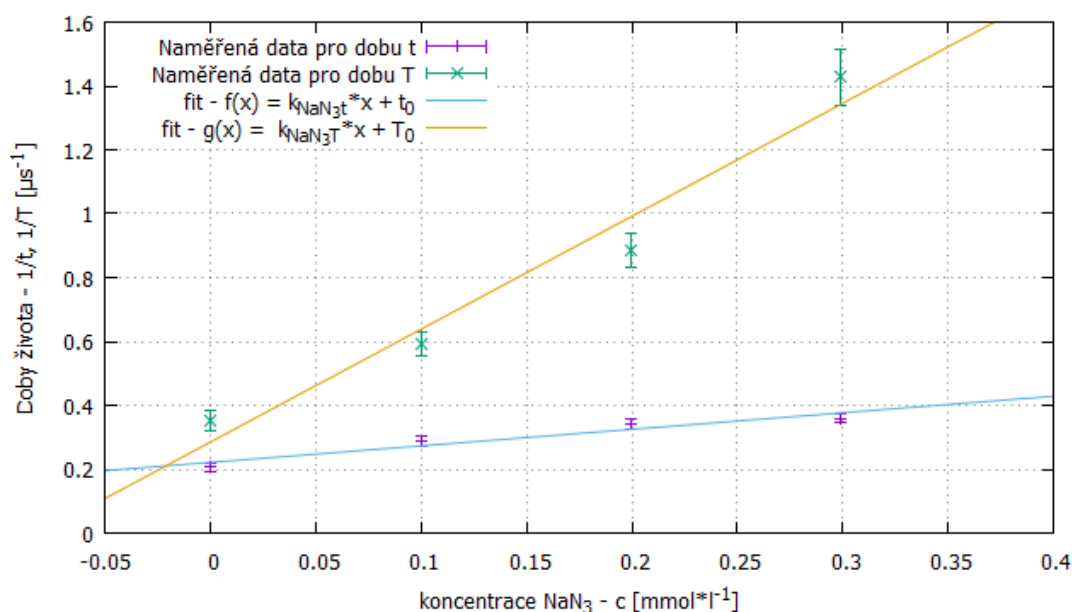


Obrázek 33: Sada M, měření 3; směs 50 μM roztoku **RF** a 0,3 mM roztoku NaN_3

Tabulka č. 6 ukazuje doby života $^1\text{O}_2$ a tripletních stavů **RF** pro vzorky, kam jsme přidávali zhašeč NaN_3 . Ten by měl podle článku [36] zhašet $^1\text{O}_2$ a zkracovat tak jeho dobu života, tedy dobu života t . V tabulce lze toto pozorovat. Skutečně se vzrůstající koncentrací NaN_3 se zkracuje doba t . Navíc se zkracuje i doba T . Lze vidět na grafech [33] a [42], že pro vyšší koncentraci NaN_3 je peak v datech užší a trochu menší.

Tabulka 6: Srovnání nařizovaných parametrů pro 50 μM roztok **RF** rozpuštěný ve vodě H_2O s přidaným NaN_3

Sada	Koncentrace NaN_3	A	σ_A	$t[\mu\text{s}]$	$\sigma_t[\mu\text{s}]$	$T[\mu\text{s}]$	$\sigma_T[\mu\text{s}]$
C	0 mM	27,10	9,77	4,75	0,35	2,86	0,24
J	0 mM	24,48	7,23	4,95	0,32	2,82	0,21
N	0 mM	17,43	7,65	4,59	0,37	2,63	0,25
K	0,1 mM	15,48	2,91	3,48	0,19	1,69	0,11
L	0,2 mM	9,95	1,13	2,92	0,14	1,13	0,07
M	0,3 mM	5,87	0,44	2,59	0,11	0,75	0,05



Obrázek 34: Fitování naměřených dat pro kinetiku funkcí $f(x) = k_{\text{NaN}_3} \cdot c + t_0$, kde k_{NaN_3} zastupuje zhášecí konstantu excitovaných stavů **RF** a $^1\text{O}_2$ kyslíkem, c zastupuje koncentraci NaN_3 v roztoku a t_0 zastupuje převrácenou přirozenou dobu života excitovaných stavů **RF**

Určili jsme zhášecí konstantu $^1\text{O}_2$ a tripletních stavů **RF** azidem sodným. Po nařizování dat funkcí [3.3] bylo zjištěno, že azid sodný skutečně velice dobře zháší $^1\text{O}_2$ podle konstanty $k_{\text{NaN}_3t} = (5,83 \pm 0,57) \cdot 10^8 \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$. Zháší ale také i tripletní stavy **RF**, čemuž byla určena konstanta $k_{\text{NaN}_3T} = (3,25 \pm 0,27) \cdot 10^9 \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$.

Ze všech nyní dostupných informací můžeme říct, že doba t patří době života $^1\text{O}_2$ a doba T patří době života tripletních stavů **RF**.

7 Diskuze výsledků

Experiment měl za úkol určit, jaký vliv má riboflavin na produkci a zhášení $^1\text{O}_2$. Tato problematika se vyskytuje v buněčných metabolismech a má vliv na celý lidský organismus. Vliv vitamínu B2 ovlivňuje naše zdraví a je důležité o něm vědět co nejvíce. Proto je tato práce zaměřená na pochopení celého procesu produkce a zhášení reaktivní formy kyslíku.

V první části jsme měřili absorpční spektrum pro 1 μM až 200 μM roztoky RF v pufru. Tvar spektra a polohy absorpčních pásů odpovídají datům z článků [11] nebo [49]. Graf ukazuje, že RF dobře absorbuje záření ve vlnových délkách od 210 nm do 280 nm, kde se objevují 2 absorpční pásma. S menší absorpcí se vyskytují další 2 absorpční pásma mezi 350 nm až 460 nm. Vynesená lineární závislost absorbance RF na vlnových délkách 420 nm a 450 nm závisí na jeho koncentraci lineárně. To znamená, že riboflavin v roztoku neagreguje, a neovlivňuje se tím proces produkce a zhášení $^1\text{O}_2$.

RF je v těle využíván pro mnoho procesů a funkcí. V práci [50] se pojednává o jeho antioxidantních účincích nebo napomáhání antioxidantů přes glutathionový redoxní cyklus. To znamená, že RF by mohl i účinně snižovat dobu t v našich měřeních, ale není tomu tak. Z hodnot v tabulce [3] je jasné, že se zvyšující se koncentrací RF tato doba stoupá a zdá se, že v roztoku tohoto vitamínu B2 rozpuštěného v pufru se koncentrace $^1\text{O}_2$ naopak zvyšuje. RF napomáhá $^1\text{O}_2$ v jeho delším trvání života. V článku [51] se píše, že jeho vlastnosti mohou záviset i na okolních biologických sloučeninách. My zkoumáme čistě jen roztok RF a nezdá se, že by vzhledem ke zhášení $^1\text{O}_2$ nějaké antioxidantní účinky měl. Spíše naopak. Riboflavin $^1\text{O}_2$ se napomáhá udržet v excitovaném stavu a nevrátit se do $^3\Sigma_g^-$. Ovšem doba života jeho tripletních stavů zůstává poměrně neměnná. Zjistil jsem také (graf č. [20]), že při měřených koncentracích RF neagreguje a po celou dobu je rovnoměrně rozšířený v celém objemu roztoku. Pro 50 μM roztok RF a výsledkem doby života $^1\text{O}_2$ $t = (3,86 \pm 0,55) \mu\text{s}$ se dobře shodujeme s prací [52, chapter 3.1], kde naměřili $t = (3,86 \pm 0,04) \mu\text{s}$ pro stejnou koncentraci RF.

Riboflavin jsme částečně rozpouštěli i v D_2O , čímž by mělo nastat prodloužení doby života $^1\text{O}_2$, protože D_2O nezháší $^1\text{O}_2$ tak dobře jako obyčejná voda, a zároveň nenastává ovlivnění doby života tripletu riboflavinu. Na sadě P (srov. obrázek č. [28] a obr. č. [29]) lze vidět, že D_2O výrazně prodlužuje dobu života t a zároveň nemění dobu T (v rámci chyby - tabulka č. [5]). To je způsobeno rozdílnými vlastnostmi D_2O a H_2O , jak bylo zmíněno v podkapitole [4.3]. V práci [53] se zaměřují na měření doby života $^1\text{O}_2$ v 100 μM roztoku RF. Naměřili dobu života $^1\text{O}_2$ $t = (3,56 \pm 0,09) \mu\text{s}$ pro RF rozpuštěný ve vodě a $t = (12,90 \pm 0,06) \mu\text{s}$ pro RF rozpuštěný ve směsi D_2O a H_2O v poměru 3:1 s excitační vlnovou délkou 370 nm. My jsme měřili roztok 50 μM RF rozpuštěný v D_2O a H_2O v poměru 3:1 s excitační vlnovou délkou laserových pulsů 420 nm, kde nám doba $^1\text{O}_2$ vyšla na $t = (12,84 \pm 0,13) \mu\text{s}$. Rozdíl pro dobu kyslíku v jejich 100 μM vzorku a v našem 100 μM vzorku je nejspíše způsoben menší excitační vlnovou délkou laserových pulsů, kde má RF nižší absorpci (viz. graf č. [18]). Napomůže tomu i jejich probublání vzorku kyslíkem po dobu 4 minut, což zkrátí dobu života $^1\text{O}_2$ (tab. [5]). Délka života $^1\text{O}_2$ v částečně zaměněném rozpouštědle za D_2O se nám shoduje v rámci chyby, pokud zvažíme probublání kyslíkem a větší koncentraci RF. Tyto efekty by se mohly ve změnách doby života $^1\text{O}_2$ vyrovnat.

Provedli jsme další měření, kdy jsme vzorek 50 μM roztoku RF probublávali kyslíkem a porovnávali se vzorkem saturovaným vzduchem. Jak již bylo zmíněno v podkapitole [6.3], vyšší koncentrace kyslíku má za následek rychlejší zhášení tripletních stavů RF. Prováděli jsme měření s roztokem saturovaným ze vzduchu, kdy koncentrace kyslíku v něm

je podle knihy [48] $0,28 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$, a s roztokem, který jsme probublávali čistým kyslíkem po dobu 20 minut, kdy je koncentrace $1,4 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$. Dostali jsme průměrnou hodnotu $t=(4,76 \pm 0,35) \mu\text{s}$ pro vzorky saturované vzduchem, zatímco v článku [54] naměřili, že doba života $^1\text{O}_2$ je na koncentraci O_2 v $50 \mu\text{M}$ roztoku [RF] nezávislá (v rozsahu koncentrací $10 \mu\text{M} - 280 \mu\text{M}$ rozpuštěného kyslíku) a má hodnotu $t=(3,2 \pm 6,2) \mu\text{s}$. Zde ale nebyl nalezený článek s experimentální hodnotou t , který by měl stejné podmínky měření a stejný měřený vzorek. Rozdíl může být způsobený opět odlišnou excitační vlnovou délkou, která v případě práce [54] byla 355 nm . V kyslíkem saturovaném $50 \mu\text{M}$ roztoku [RF] jsme naměřili dobu $^1\text{O}_2$ $t=(3,64 \pm 0,06) \mu\text{s}$. Zkracování doby $^1\text{O}_2$ není zcela jasné. Může se uplatňovat emise dimolu, kdy 2 $^1\text{O}_2$ vytvoří jeden kyslík v základním stavu $^3\Sigma_g^-$ a jeden excitovaný v tripletním stavu $^1\Sigma_g^+$. Může se taky uplatnit kyslíkem senzitivovaná zpožděná fluorescence, kdy $^1\text{O}_2$ s molekulou ^3PS vytvoří kyslík v základním stavu $^3\Sigma_g^-$ a singletní excitovaný stav [RF] [55, chapter 28].

Nakonec jsme přidávali malé množství NaN_3 do $50 \mu\text{M}$ roztoku [RF], kdy by mělo nastávat zhášení $^1\text{O}_2$ a zároveň nenastávat zhášení tripletního stavu riboflavinu. Na nafitovaných datech ze sady M (srov. obr. č. [33] a obr. č. [42]) lze ale vidět, že NaN_3 zkracuje nejenom dobu života $^1\text{O}_2$, ale také zkracuje dobu života tripletních stavů RF (viz. tabulka č. [6]). Mechanismy, které jsou za to odpovědné, nejsou přesně známy. Možnost zhášení tripletů [RF] azidem sodným byla publikována v článcích [56] a [57], ale bez bližšího vysvětlení. Co se týče doby $^1\text{O}_2$, tak se relativně dobře shodujeme s prací [58], kde přidávali $500 \mu\text{M}$ azidu sodného do $50 \mu\text{M}$ roztoku [RF]. Při excitační vlnové délce laseru 355 nm naměřili hodnotu $t=(1,8 \pm 0,5) \mu\text{s}$, zatímco my jsme v $300 \mu\text{M}$ roztoku azidu sodného naměřili čas $t=(2,59 \pm 0,11) \mu\text{s}$. Pokud bychom s koncentrací pokračovali až do $500 \mu\text{M}$, můžeme extrapolací zjistit, že bychom dosáhli hodnoty $(1,99 \pm 0,14) \mu\text{s}$, což se v rámci chyby zhoduje.

8 Závěr

Změřili jsme závislost kinetiky luminescence $^1\text{O}_2$ v roztocích riboflavinu o koncentracích $1 \mu\text{M}$ až $200 \mu\text{M}$. Bylo zjištěno, že se [RF] chová jako fotosenzibilizátor $^1\text{O}_2$. Doby života tripletních stavů [RF] se pohybovaly okolo $(2,65 \pm 0,21) \mu\text{s}$ a byly na koncentraci [RF] v rámci chyby nezávislé. Konkrétně pro všechna měření $50 \mu\text{M}$ koncentrací roztoku [RF] vyšly doby života tripletních stavů [RF] průměrně na $(2,77 \pm 0,23) \mu\text{s}$. Doby života $^1\text{O}_2$ se zvyšovaly s rostoucí koncentrací od $(2,77 \pm 5,43) \mu\text{s}$ po $(5,78 \pm 0,23) \mu\text{s}$. To ukazuje, že [RF] $^1\text{O}_2$ nezhasí, naopak jeho zhášení brání.

Při záměně H_2O za D_2O došlo k prodloužení života $^1\text{O}_2$, zatímco doba života tripletních stavů [RF] se v rámci chyby nezměnila. Dále bylo zjištěno, že NaN_3 zhasí nejen singletní kyslík se zhášecí konstantou $(5,83 \pm 0,57) \cdot 10^8 \text{ l}\cdot\text{mol}^{-1}\text{s}^{-1}$, ale i tripletní stavy [RF] se zhášecí konstantou $(3,25 \pm 0,27) \cdot 10^9 \text{ l}\cdot\text{mol}^{-1}\text{s}^{-1}$. Byla určena zhášecí konstanta tripletních stavů [RF] vyšší koncentrací kyslíku v roztoku jako $(1,14 \pm 0,23) \cdot 10^9 \text{ l}\cdot\text{mol}^{-1}\text{s}^{-1}$.

Literatura

1. JAMUNAA, A; VEJAYAN, J; HALIJAH, I; SHARIFAH, SH; AMBU, S. Cytotoxicity of Southeast Asian snake venoms. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*. 2012, roč. 18, s. 150–156. ISSN 1678-9199. Dostupné také z: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1678-91992012000200004&nrm=iso>.
2. MARIOTTINI, Gian Luigi; PANE, Luigi. Cytotoxic and Cytolytic Cnidarian Venoms. A Review on Health Implications and Possible Therapeutic Applications. *Toxins*. 2014, roč. 6, č. 1, s. 108–151. ISSN 2072-6651. Dostupné z DOI: [10.3390/toxins6010108](https://doi.org/10.3390/toxins6010108).
3. LÍZALOVÁ, Ing. Martina. *Aplikace vybraných metod k analýze oxidačního stresu*. 2010, 24–25. Dostupné také z: <https://theses.cz/id/5jclhi/zaverecna_prace.pdf>.
4. *Antioxidační ochrana organismu*. [N.d.]. Dostupné také z: <<http://www.edukafarm.cz/c160-antioxidacni-ochrana-organismu>>.
5. SZCZUKO, Małgorzata; ZIĘTEK, Maciej; KULPA, Danuta; SEIDLER, Teresa. Riboflavin - properties, occurrence and its use in medicine. *Pteridines*. 2019, roč. 30, č. 1, 33–47. Dostupné z DOI: [10.1515/pteridines-2019-0004](https://doi.org/10.1515/pteridines-2019-0004).
6. *Pteridine*. Wikimedia Foundation, 2019. Dostupné také z: <<https://en.wikipedia.org/wiki/Pteridine>>.
7. BACK, E.; BIESALSKI, H. K. Vitamin B2. In: *Encyclopedia of Molecular Pharmacology*. Ed. OFFERMANN, Stefan; ROSENTHAL, Walter. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2008, s. 1289–1290. ISBN 978-3-540-38918-7. Dostupné z DOI: [10.1007/978-3-540-38918-7_278](https://doi.org/10.1007/978-3-540-38918-7_278).
8. *Riboflavin*. Wikimedia Foundation, 2021. Dostupné také z: <<https://en.wikipedia.org/wiki/Riboflavin#Function>>.
9. *mechanism of riboflavin destruction under light*. [N.d.]. Dostupné také z: <https://kb.osu.edu/bitstream/handle/1811/24702/OARDC%20Poster_RF.pdf;sequence=1>.
10. GORE, Daniel; MARGINEANU, Anca; FRENCH, Paul; O'BRART, David; DUNSBY, Chris; ALLAN, Bruce. Two-Photon Fluorescence Microscopy of Corneal Riboflavin Absorption. *Investigative ophthalmology visual science*. 2014, roč. 55, s. 7. Dostupné z DOI: [10.1167/iovs.14-13975](https://doi.org/10.1167/iovs.14-13975).
11. ORLOWSKA, Marta; KOUTCHMA, Tatiana; GRAPPERHAUS, Michael; GALLAGHER, John; SCHAEFER, Raymond; DEFELICE, Cheryl. Continuous and Pulsed Ultraviolet Light for Nonthermal Treatment of Liquid Foods. Part 1: Effects on Quality of Fructose Solution, Apple Juice, and Milk. *Food and Bioprocess Technology*. 2012, roč. 6, s. 14. Dostupné z DOI: [10.1007/s11947-012-0779-8](https://doi.org/10.1007/s11947-012-0779-8).
12. *Riboflavin: Health Benefits, Uses, Side Effects, Dosage Interactions*. RxList, 2019. Dostupné také z: <<https://www.rxlist.com/riboflavin/supplements.htm>>.
13. SYNETIX, s. r. o.; SYNETIX S.R.O., www.synetix.cz. *Vitamin B2 – riboflavin*. [N.d.]. Dostupné také z: <<https://www.vitaminybezczury.cz/vitamin-b2>>.

14. *Office of Dietary Supplements - Riboflavin*. U.S. Department of Health a Human Services, [n.d.]. Dostupné také z: <<https://ods.od.nih.gov/factsheets/Riboflavin-HealthProfessional/>>.
15. MEFANET, síť lékařských fakult ČR a SR. *Corynebacterium diphtheriae*. [N.d.]. Dostupné také z: <https://www.wikiskripta.eu/w/Corynebacterium_diphtheriae>.
16. MEFANET, síť lékařských fakult ČR a SR. *Candidosis*. [N.d.]. Dostupné také z: <<https://www.wikiskripta.eu/w/Candidosis>>.
17. MEFANET, síť lékařských fakult ČR a SR. *Fyziologická úloha reaktivních foriem kyslíka v metabolizme*. [N.d.]. Dostupné z: www.wikiskripta.eu/w/Fyziologická_úloha_reaktivních_foriem_kyslíka_v_metabolizme.
18. MEFANET, síť lékařských fakult ČR a SR. *Základní reaktivní formy kyslíku a dusíku*. [N.d.]. Dostupné z: www.wikiskripta.eu/w/Základní_reaktivní_formy_kyslíku_a_dusíku.
19. DIPLOCK, Anthony T. Antioxidants and disease prevention. *Molecular Aspects of Medicine*. 1994, roč. 15, č. 4, s. 293–376. ISSN 0098-2997. Dostupné z DOI: [https://doi.org/10.1016/0098-2997\(94\)90005-1](https://doi.org/10.1016/0098-2997(94)90005-1).
20. HAJHASHEMI, V.; VASEGHI, G.; POURFARZAM, M.; ABDOLLAHI, A. Are antioxidants helpful for disease prevention? 2010. Dostupné také z: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3093095/>>. PMID: PMC3093095; PMID: 21589762.
21. 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](https://doi.org/10.4103/0973-7847.70902).
22. TUPPO, EE; FORMAN, LJ. Free radical oxidative damage and Alzheimer's disease. *The Journal of the American Osteopathic Association*. 2001, roč. 101, č. 12 Suppl Pt 1, S11—5. ISSN 0098-6151. PMID:11794746.
23. *Triplet oxygen*. Wikimedia Foundation, 2019. Dostupné také z: <https://en.wikipedia.org/wiki/Triplet_oxygen>.
24. *Singlet oxygen*. 2020. Dostupné také z: <https://en.wikipedia.org/wiki/Singlet_oxygen>.
25. GILBERT, Daniel L.; COLTON, Carol A. Singlet oxygen. In: *Reactive oxygen species in biological systems: an interdisciplinary approach*. Kluwer academic/Plenum publ., 1999, 40–43.
26. TEXAS, Sam Houston State University. [N.d.]. Dostupné také z: <https://www.shsu.edu/~chm_tgc/chemilumdir/JABLONSKI.html>.
27. LAKOWICZ, Joseph R. (ed.). Quenching of Fluorescence. In: *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. Boston, MA: Springer US, 2006, s. 277–330. ISBN 978-0-387-46312-4. Dostupné z DOI: [10.1007/978-0-387-46312-4_8](https://doi.org/10.1007/978-0-387-46312-4_8).
28. LAKOWICZ, Joseph R. Principles of fluorescence spectroscopy. In: Springer, 2010.
29. DĚDIC, Roman. Luminescence Detection of Singlet Oxygen in Photosynthesis and Photodynamic Therapy. *Habilitační práce*. 2011.
30. WANG, Pingping; LI, Ao; YU, Luodan; CHEN, Yu; XU, Di. Energy Conversion-Based Nanotherapy for Rheumatoid Arthritis Treatment. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. 2020, roč. 8. Dostupné z DOI: [10.3389/fbioe.2020.00652](https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00652).

31. NHS, [n.d.]. Dostupné také z: <<https://www.nhs.uk/conditions/photodynamic-therapy/>>.
32. *Photodynamic Therapy for Cancer*. [N.d.]. Dostupné také z: <<https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/types/surgery/photodynamic-fact-sheet#what-is-photodynamic-therapy>>.
33. 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](https://doi.org/10.1039/b311429e).
34. MOON. *GOLD NANOMATERIALS APPLICATIONS: THE ROLE OF THE SHAPE (NANORODS AND NANOSTARS)*. moon <https://www.nanovexbiotech.com/wp-content/uploads/2020/04/Nanovex1.png>, 2019. Dostupné také z: <<https://www.nanovexbiotech.com/gold-nanomaterials-applications-role-shape-nanorods-nanostars/>>.
35. CLEMENT, Sandhya; DENG, Wei; CAMILLERI, Elizabeth; WILSON, Brian C.; GOLDYS, Ewa M. X-ray induced singlet oxygen generation by nanoparticle - photosensitizer conjugates for photodynamic therapy: determination of singlet oxygen quantum yield. *Scientific Reports*. 2016, roč. 6, č. 1. Dostupné z DOI: [10.1038/srep19954](https://doi.org/10.1038/srep19954).
36. LI, M. Y.; CLINE, C. S.; KOKER, E. B.; CARMICHAEL, H. H.; CHIGNELL, C. F.; BILSKI, P. Quenching of Singlet Molecular Oxygen (1O_2) by Azide Anion in Solvent Mixtures. *Photochemistry and Photobiology*. 2007, roč. 74, č. 6, 760–764. Dostupné z DOI: [10.1562/0031-8655\(2001\)0740760qosmoo2.0.co2](https://doi.org/10.1562/0031-8655(2001)0740760qosmoo2.0.co2).
37. *Sodium azide*. Wikimedia Foundation, 2020. Dostupné také z: <https://en.wikipedia.org/wiki/Sodium_azide>.
38. *Heavy water*. Wikimedia Foundation, 2020. Dostupné také z: <https://en.wikipedia.org/wiki/Heavy_water>.
39. SCHWEITZER, Claude; SCHMIDT, Reinhard. Physical Mechanisms of Generation and Deactivation of Singlet Oxygen. *Chemical Reviews*. 2003, roč. 103, č. 5, 1685–1758. Dostupné z DOI: [10.1021/cr010371d](https://doi.org/10.1021/cr010371d).
40. ZYGA, Lisa. *Scientists identify quantum differences between light and heavy water*. Phys.org, 2008. Dostupné také z: <<https://phys.org/news/2008-08-scientists-quantum-differences-heavy.html>>.
41. PRAKASH, G. Veda; KUMAR, R.; SAURABH, K.; NASIR; ANITHA, V. P.; CHOWDHURI, M. B.; SHYAM, A. Comparative study of electrical breakdown properties of deionized water and heavy water under pulsed power conditions. *Review of Scientific Instruments*. 2016, roč. 87, č. 1, s. 015115. Dostupné z DOI: [10.1063/1.4940420](https://doi.org/10.1063/1.4940420).
42. *Tunable Wavelength*. [N.d.]. Dostupné také z: <<https://ekspla.com/product/nt242-series-tunable-wavelength-nanosecond-lasers/#description>>.
43. BAIER, Jürgen; FUSS, Thomas; PÖLLMANN, Claudia; WIESMANN, Christopher; PINDL, Katrin; ENGL, Roland; BAUMER, Daniela; MAIER, Max; LANDTHALER, Michael; BÄUMLER, Wolfgang. Theoretical and experimental analysis of the luminescence signal of singlet oxygen for different photosensitizers. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 2007, roč. 87, č. 3, s. 163–173. ISSN 1011-1344. Dostupné z DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2007.02.006>.

44. *Photomultiplier tube*. Wikimedia Foundation, 2019. Dostupné také z: <https://en.wikipedia.org/wiki/Photomultiplier_tube>.
45. *Photomultiplier tube - Wikipedia*. [N.d.]. Dostupné také z: <https://cs.xcv.wiki/wiki/Photomultiplier_tube>.
46. *Photon Counter / Multiscaler*. [N.d.]. Dostupné také z: <<https://www.becker-hickl.com/products/photon-counter-multiscaler/#product-overview>>.
47. MAISCH, T.; BAIER, J.; FRANZ, B.; MAIER, M.; LANDTHALER, M.; SZEIMIES, R.-M.; BAUMLER, W. The role of singlet oxygen and oxygen concentration in photodynamic inactivation of bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2007, roč. 104, č. 17, 7223–7228. Dostupné z DOI: [10.1073/pnas.0611328104](https://doi.org/10.1073/pnas.0611328104).
48. LINKE, William F. *Solubilities of Inorganic and Metal Organic Compounds*. American Chemical Society. 1965.
49. SHAHI THAKURI, Pradip; RAMILA, Joshi; BASNYAT, Subas; PANDEY, Sunita; TAUJALE, Shree; MISHRA, Niju. Antibacterial photodynamic therapy on *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* in-vitro. *Nepal Medical College journal : NMCI*. 2011, roč. 13, s. 281–4.
50. ASHOORI, Marziyeh; SAEDISOMEOLIA, Ahmad. Riboflavin (vitamin B2) and oxidative stress: a review. *British Journal of Nutrition*. 2014, roč. 111, č. 11, 1985–1991. Dostupné z DOI: [10.1017/s0007114514000178](https://doi.org/10.1017/s0007114514000178).
51. SUWANNASOM, Nittiya; KAO, Ijad; PRUSS, Axel; GEORGIEVA, Radostina; BÄUMLER, Hans. Riboflavin: The Health Benefits of a Forgotten Natural Vitamin. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020, roč. 21, č. 3, s. 950. Dostupné z DOI: [10.3390/ijms21030950](https://doi.org/10.3390/ijms21030950).
52. WOLNICKA-GLUBISZ, Agnieszka; PAWLAK, Anna; INSINSKA-RAK, Malgorzata; ZADLO, Andrzej. Analysis of photoreactivity and phototoxicity of riboflavin's analogue 3MeTARF. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 2020, roč. 205, s. 111820. ISSN 1011-1344. Dostupné z DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2020.111820>.
53. DAVIS, Caroline A.; MCNEILL, Kristopher; JANSSEN, Elisabeth M.-L. Non-Singlet Oxygen Kinetic Solvent Isotope Effects in Aquatic Photochemistry. *Environmental Science Technology*. 2018, roč. 52, č. 17, 9911–9911. Dostupné z DOI: [10.1021/acs.est.8b01512](https://doi.org/10.1021/acs.est.8b01512).
54. BAIER, Jürgen; MAISCH, Tim; MAIER, Max; ENGEL, Eva; LANDTHALER, Michael; BÄUMLER, Wolfgang. Singlet Oxygen Generation by UVA Light Exposure of Endogenous Photosensitizers. *Biophysical Journal*. 2006, roč. 91, č. 4, 1452–1459. Dostupné z DOI: [10.1529/biophysj.106.082388](https://doi.org/10.1529/biophysj.106.082388).
55. SCHOLZ, Marek; DĚDIC, Roman. Singlet oxygen sensitized delayed fluorescence. In: 2016, volume 2, 63–81. ISBN ISBN 978-1-78262-697-8. Dostupné z DOI: [10.1039/9781782626992](https://doi.org/10.1039/9781782626992).

56. NAVARATNAM, S.; HAMBLETT, I.; TONNESEN, H.Hjorth. Photoreactivity of biologically active compounds.: XVI. Formation and reactivity of free radicals in mefloquine11Paper presented at the 2nd Online Conference for Photochemistry and Photobiology, <http://www.photobiology.com/photobiology99/index.htm>. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 2000, roč. 56, č. 1, s. 25–38. ISSN 1011-1344. Dostupné z DOI: [https://doi.org/10.1016/S1011-1344\(00\)00056-7](https://doi.org/10.1016/S1011-1344(00)00056-7).
57. BOSCA, Francisco; MIRANDA, Miguel A; MORERA, Isabel M; SAMADI, Abdelouahid. Involvement of type I and type II mechanisms in the linoleic acid peroxidation photosensitized by tiaprofenic acid. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 2000, roč. 58, č. 1, s. 1–5. ISSN 1011-1344. Dostupné z DOI: [https://doi.org/10.1016/S1011-1344\(00\)00102-0](https://doi.org/10.1016/S1011-1344(00)00102-0). The Molecular and Cellular Mechanisms of Drug Phototoxicity.
58. LINDIG, Barbara A.; RODGERS, Michael A. J.; SCHAAP, A. Paul. Determination of the lifetime of singlet oxygen in water-d2 using 9,10-anthracenedipropionic acid, a water-soluble probe. *Journal of the American Chemical Society*. 1980, roč. 102, č. 17, 5590–5593. Dostupné z DOI: [10.1021/ja00537a030](https://doi.org/10.1021/ja00537a030).
59. MOUČKA, Jan. *Data - Google Drive*. 2020. Dostupné také z: https://drive.google.com/drive/folders/10x0Lc6Eki0vCwsYgZ2XYfFb_Yd65-mhM.

Seznam obrázků a grafů

1	Strukturní vzorec riboflavinu	4
2	Absorbance a fluorescence RF v závislosti na vlnové délce; plnou čarou absorbance, přerušovanou fluorescence; levá y-osa určuje absorbanci, pravá y-osa určuje intenzitu fluorescence; Převzato z [11]	5
3	Absorbance RF o koncentraci $\rho_A = 0,08 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ v závislosti na vlnové délce, absorpční maxima zleva na $\lambda_1 = 222 \text{ nm}$, $\lambda_2 = 266 \text{ nm}$, $\lambda_3 = 373 \text{ nm}$ a $\lambda_4 = 445 \text{ nm}$; upraveno z [10]	5
4	Zleva doprava molekulární orbitaly singletního kyslíku v excitovaném stavu $^1\Delta_g$, excitovaného stavu $^1\Sigma_g^+$ s vyšší energií a nakonec jeho formy v tripletním základním stavu $^3\Sigma_g^-$ s nejnižší energií; převzato z [24]	8
5	Obrázek upravený z [26]; A - absorpce energetického kvanta, F - fluorescence, P - fosforescence, S_n - n-tý excitovaný singletní stav, S_0 - základní stav, T_1 a T_2 - tripletní stavy, IC - vnitřní konverze, ISC - mezisystémový přechod	10
6	Obrázek převzat z [28]; Jablonského diagram ke srážkovému zhašení, Σk_i vyjadřuje nezářivé přechody do základního stavu S_0	11
7	Proces fotosenzibilizace je zde vyznačený plnou čarou. PS přijme kvantum energie $h\nu$ a přes ^3PS se vybudí $^1\text{O}_2$ na ROS. Vlnovkami jsou vyznačeny fotoefekty typu I a II, těmito cestami se ničí molekuly ve fotodynamické terapii; obrázek převzat z [30]	13
8	chlorofyl a	14
9	Tris(2-fenylpyridin)iridium	14
10	Bengálská červen	15
11	Methylenová modř	15
12	Stejně jak u kvantových teček velikost určuje jejich vlastnosti, stejně tak tyto vlastnosti určuje i tvar a délka u zlatých nanotyčí. Využívají se zejména v lékařství, jako třeba snímkování, fototermaální terapie, dodávání léků v těle [34]	16
13	Tetrakis(4-karboxyfenyl)porfyrin	16
14	Tetrakis(o-aminofenyl)porfyrin	16
15	Experimentální uspořádání pro měření zhašení singletního kyslíku v roztoku RF. Soustava se skládá z EKSPLA NT242 laseru, T: Trigerovací PIN fotodiody MSA 300: časově rozlišený čítač, P: předzesilovač, PM: fotonásobič Hamamatsu R9905, H.20: monochromátor Jobin YVON H20IR, F: dlouhovlnné filtry, C: kyveta se vzorkem RF, LN ₂ : Chlazení tekutým dusíkem	19
16	Luminiscenční signál singletního kyslíku generovaného 50 μM roztokem RF v závislosti na vlnové délce; převzato z [43]	20
17	Schéma obecného fungování fotonásobiče, převzato a upraveno z [45]	21
18	Absorpční spektrum 50 μM roztoku RF	22
19	Absorpční spektrum 200 μM roztoku RF	23
20	Lineární závislost absorpce na koncentraci RF v roztoku na excitační vlnové délce $\lambda = 420 \text{ nm}$	24
21	Sada A, měření 7; 200 μM roztok RF	25
22	Sada B, měření 3; 100 μM roztok RF	25
23	Sada H, měření 5; 1 μM roztok RF	25
24	Sada I, měření 4; 0 μM roztok RF	25

25	Sada A, měření 7; 200 μM roztok RF	26
26	Sada G, měření 6; 2 μM roztok RF	26
27	Srovnání dob života t , T v závislosti na molaritě roztoku RF 3	27
28	Sada P, měření 1; RF rozpuštěný v těžké vodě - 50 μM roztok	28
29	Sada C, měření 6; 50 μM roztok RF v pufru (lehká voda)	28
30	Sada O, měření 4; 50 μM roztok RF probublávaný kyslíkem	29
31	Sada J, měření 8; 50 μM roztok RF v rovnováze se vzduchem	29
32	Sada N, měření 10; 50 μM roztok RF bez NaN_3	29
33	Sada M, měření 3; směs 50 μM roztoku RF a 0,3 mM roztoku NaN_3	29
34	Fitování naměřených dat pro kinetiku funkcí $f(x) = k_{\text{NaN}_3} \cdot c + t_0$, kde k_{NaN_3} zastupuje zhášecí konstantu excitovaných stavů RF a $^1\text{O}_2$ kyslíkem, c zastupuje koncentraci NaN_3 v roztoku a t_0 zastupuje převrácenou přirozenou dobu života excitovaných stavů RF	30
35	Sada A, měření 7; 200 μM roztok RF	42
36	Sada C, měření 9; 50 μM roztok RF	42
37	Sada M, měření 8; směs 50 μM roztoku RF a 0,3 mM roztoku NaN_3	42
38	Sada J, měření 7; 50 μM roztok RF	42
39	Sada P, měření 8; RF rozpuštěný v těžké vodě - 50 μM roztok	43
40	Sada N, měření 7; 50 μM roztok RF	43
41	Sada O, měření 1; 50 μM roztok RF probublávaný kyslíkem	43
42	Sada N, měření 10; 50 μM roztok RF při normální koncentraci kyslíku	43
43	Sada H, měření 4; 1 μM roztok RF	43
44	Sada I, měření 2; čistý pufr	43
45	Lineární závislost absorpce na koncentraci RF v roztoku na vlnové délce $\lambda = 450 \text{ nm}$; hodnoty parametrů v části 6	44
46	Absorpční spektrum 2 μM roztoku RF	44
47	Absorpční spektrum 200 μM roztoku RF	45

Seznam tabulek

1	Fyzikální vlastnosti NaN_3	17
2	Fyzikální vlastnosti těžké vody	18
3	Nafitované hodnoty parametrů rovnice 6.2 pro všechny sady měření s RF rozpuštěným v pufru	26
4	Srovnání nafitovaných parametrů pro tři sady C, J, a N pro RF rozpuštěný ve vodě a sadu P, kde je vzorek RF rozpuštěný v D_2O	27
5	Srovnání nafitovaných parametrů pro tři sady měření C, J, a N pro $50\ \mu\text{M}$ roztok RF rozpuštěný v pufru a sadu O, kde je vzorek v pufru navíc probubláný kyslíkem O_2	28
6	Srovnání nafitovaných parametrů pro $50\ \mu\text{M}$ roztok RF rozpuštěný ve vodě H_2O s přidaným NaN_3	30
7	Popisky k souborům na google disku [59]	46

Příloha

Fitování v gnuplotu - kód

Předpokládáme už předem nastavenou cestu ke složkám, kde máme uložená data z 59.

```
set terminal pngcairo size 350.262 enhanced font 'Verdana,10'
#nastaveni grafu jakozto vychoziho obrazku

abc = 'abcdefghijklmnop'
#vytvoreni listu, ze ktereho budeme vybirat pro fitování dané sady

f(x) = A * (exp(-x/t) - exp(-x/T))
#funkce, kterou fitujeme nase data

set xrange[0.04:50]
set yrange[0:25] #nastaveni rozsahu grafu
do for [i=1:1] {
  #zacatek for cyklu, cyklus pres ruzne koncentrace
  #a ruzne sady mereni
  letter = substr(abc, i, i)
  do for[j=1:10] {
    #for cyklus pres mereni 1 az 10
    num = sprintf("%02d", j)
    file = "rf_" . letter . "_" . num . ".dat"
    print file
    A = 20
    t = 5
    T = 3
    #pocatecni podminky, lisi se u kazde sady, nutno se nejdriv
    #podivat na graf a pak odhadnout podle primarni
    #a dobre nafitovane prvni sady

    fit[0.04:50] f(x) + 0.1529 file u 1:3 via A,t,T
    #fit začíná od 0.04 kvůli výskytu prvotním nesmyslným udajům;
    #lze fitovat místo nafitované konstanty 0,1529 použít konstantu c,
    #kterou budeme fitovat v průběhu

    set output " rf_ " . letter "_" . num . " . png "
    plot file u 1:3 with lines, f(x)
    #vykresleni grafu a fitu do jednoho obrazku s priponou png
  }
}
```

Data k měření

Data k našim měřením jsou velmi rozsáhlá, proto si je lze stáhnout z tohoto odkazu:
<https://drive.google.com/drive/folders/10x0Lc6Eki0vCwsYgZ2XYfFb_Yd65-mhM>

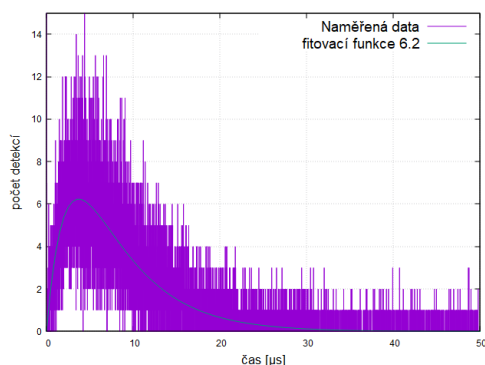
Popis jednotlivých dat

Na odkazu lze nalézt soubory rozdělené do tří složek, které jsou výsledky našich měření. Jejich formát ve složkách **riboflavin - voda** a **riboflavin - jine** je především Rf_X_Y.dat, kde X zastupuje písmenka od A po P a Y zastupuje čísla od 01 po 10. Každé písmenko zastupuje různou sadu měření, většinou jde o různou koncentraci **RF** rozpuštěného v pufru, někdy je do roztoku přidán NaN_3 , někdy je rozpuštěn v D_2O . Pro lepší orientaci ve významu označení sad měření přikládám tabulku **7** s vysvětlivkami.

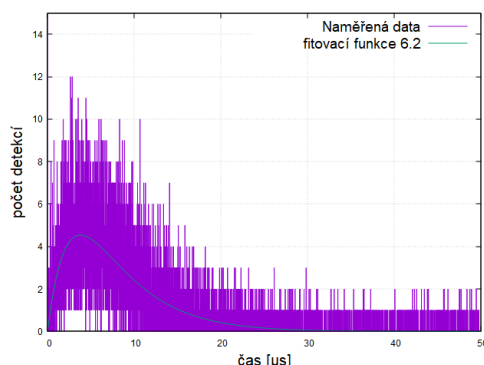
Dále se na odkazu vyskytuje složka *spektrumriboflavinu*, která pojednává o spektrometrii našich vzorků a vlnových délek, na kterých **RF** nejlépe absorbuje. Ve složce je i soubor Rf.par, ve kterém jsou zaznamenány informace o přístroji, kterým byl vzorek měřený, stejně tak jako informace o samotném měření.

Grafy

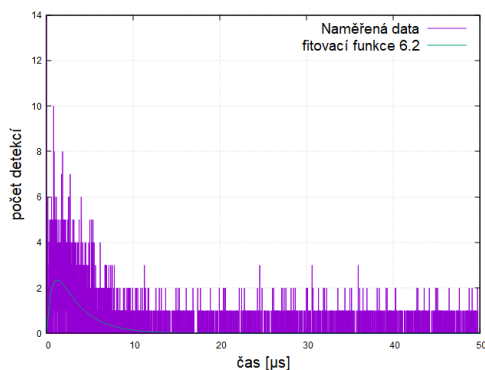
Vybrané grafy popisující některé sady měření. Jako fitovací funkce byla použita funkce **6.2**.



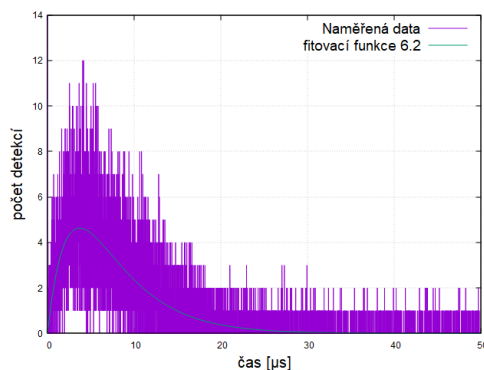
Obrázek 35: Sada A, měření 7; 200 μM roztok **RF**



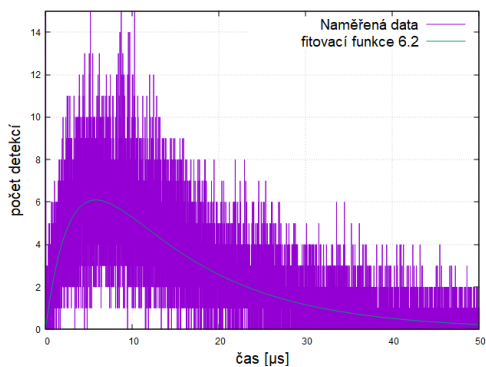
Obrázek 36: Sada C, měření 9; 50 μM roztok **RF**



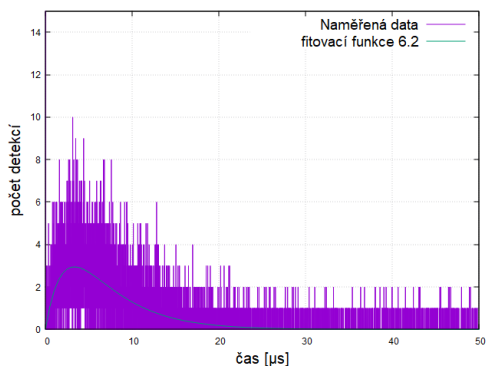
Obrázek 37: Sada M, měření 8; směs 50 μM roztoku **RF** a 0,3 mM roztoku NaN_3



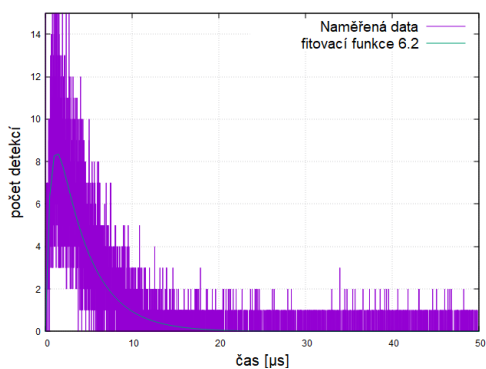
Obrázek 38: Sada J, měření 7; 50 μM roztok **RF**



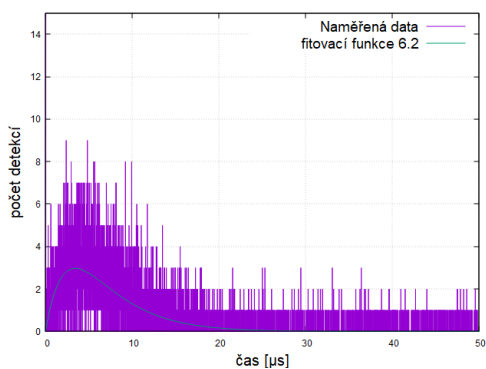
Obrázek 39: Sada P, měření 8; **RF** rozpuštěný v těžké vodě - 50 μM roztok



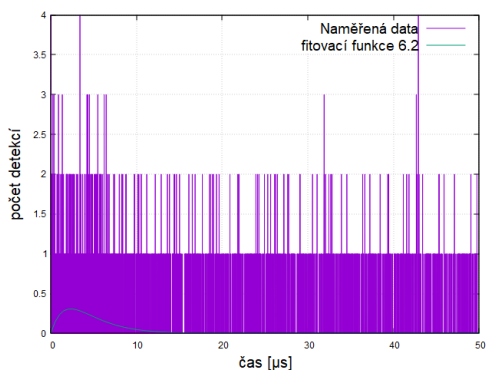
Obrázek 40: Sada N, měření 7; 50 μM roztok **RF**



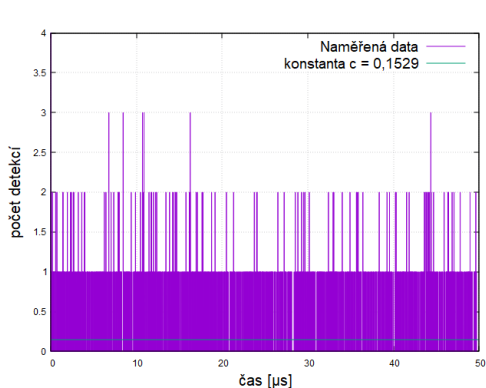
Obrázek 41: Sada O, měření 1; 50 μM roztok **RF** probublávaný kyslíkem



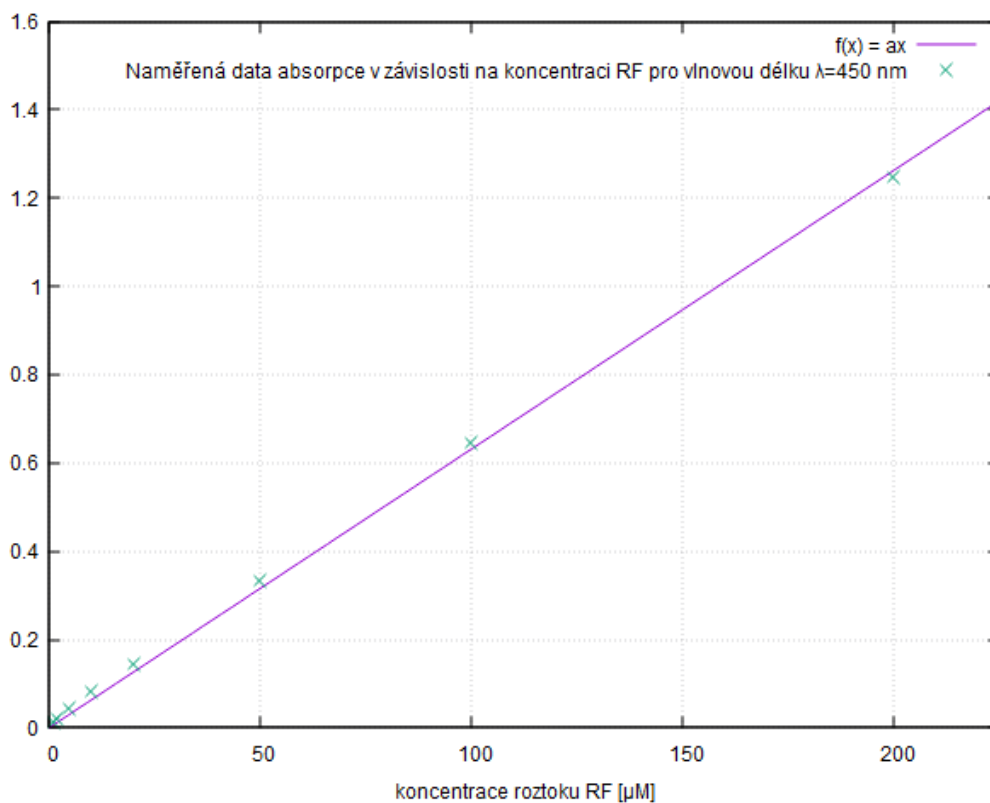
Obrázek 42: Sada N, měření 10; 50 μM roztok **RF** při normální koncentraci kyslíku



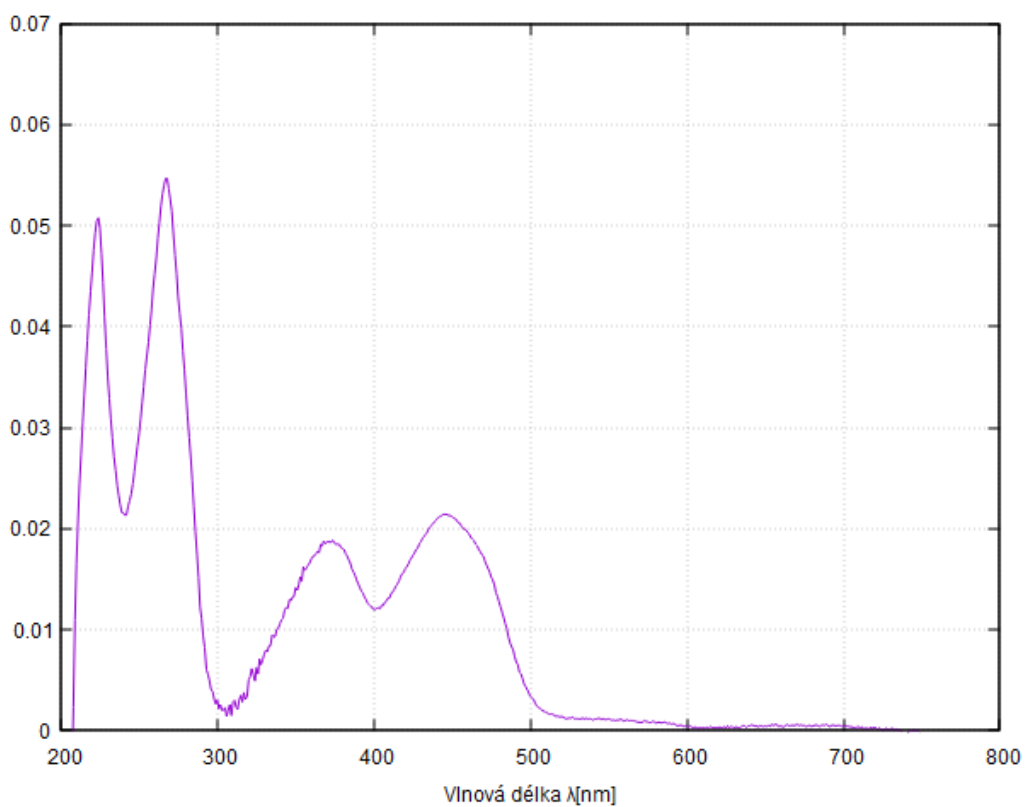
Obrázek 43: Sada H, měření 4; 1 μM roztok **RF**



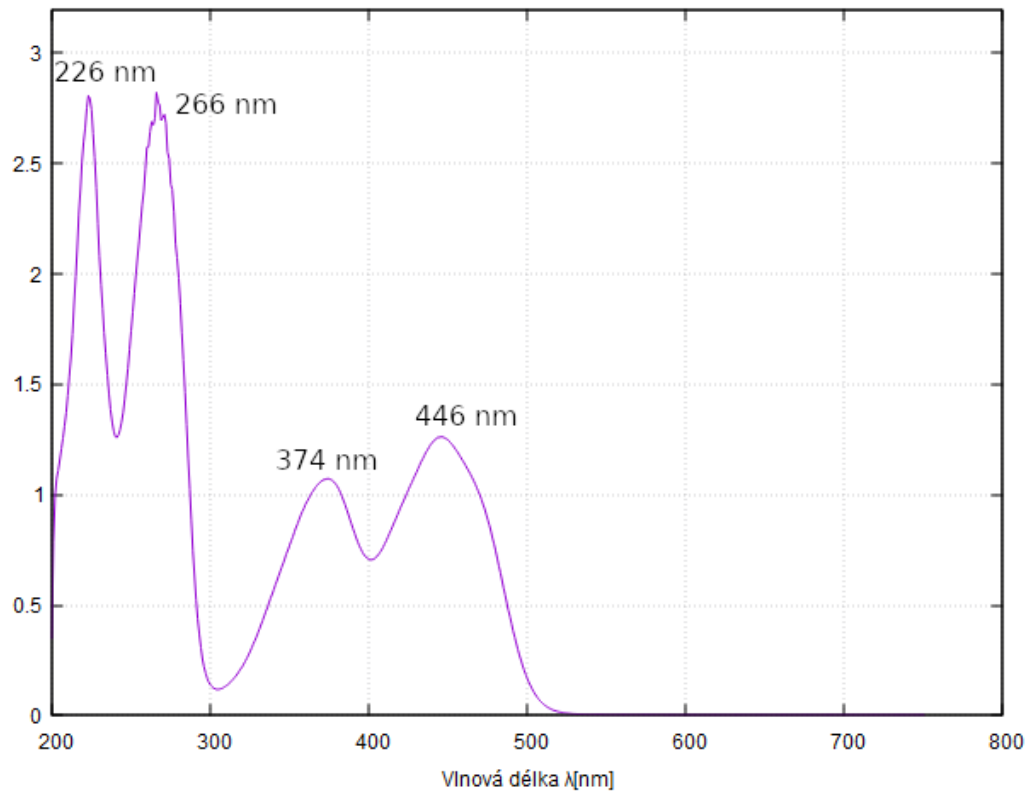
Obrázek 44: Sada I, měření 2; čistý pufr



Obrázek 45: Lineární závislost absorpce na koncentraci **RF** v roztoku na vlnové délce $\lambda = 450$ nm; hodnoty parametrů v části **6**



Obrázek 46: Absorpční spektrum $2 \mu\text{M}$ roztoku **RF**



Obrázek 47: Absorpční spektrum 200 μM roztoku **RF**

Tabulka 7: Popisky k souborům na google disku [59](#)

Sada	Koncentrace	Popis
A	200 μM RF	roztok RF v rozpuštěný pufru
B	100 μM RF	
C	50 μM RF	
D	20 μM RF	
E	10 μM RF	
F	5 μM RF	
G	2 μM RF	
H	1 μM RF	
I	0 μM RF	
J	50 μM RF	50 μM roztok RF rozpuštěný v pufru
K	50 μM RF + 0,1 mM $[\text{NaN}_3]$	Směs 0,1 mM roztoku NaN_3 a 50 μM roztoku RF rozpuštěných v pufru
L	50 μM RF + 0,2 mM $[\text{NaN}_3]$	Směs 0,2 mM roztoku NaN_3 a 50 μM roztoku RF rozpuštěných v pufru
M	50 μM RF + 0,3 mM $[\text{NaN}_3]$	Směs 0,3 mM roztoku NaN_3 a 50 μM roztoku RF rozpuštěných v pufru
N	50 μM RF	50 μM roztok RF rozpuštěný v pufru
O	50 μM RF + 1,4 mM $[\text{O}_2]$	50 μM roztok RF rozpuštěný v pufru, probubláný kyslíkem po dobu 20 minut
P	50 μM RF ; D_2O	50 μM roztok RF rozpuštěný v D_2O