

**Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta**

**Fluorescenční vlastnosti bilinových barviv
a jejich komplexů s kovy**

Bakalářská práce

Vavřinec Konečný

Vedoucí práce: RNDr. Radek Litvín, Ph.D.

Konzultant: RNDr. David Bína, Ph.D.

České Budějovice 2024

Konečný, V., 2024: Fluorescenční vlastnosti bilinových barviv a jejich komplexů s kovy. [Fluorescence properties of bilins and their complexes with metals. Bc. Thesis, in Czech.] – 49 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.]

Anotace:

Tato práce se zabývá měřením a analýzou absorpčních, emisních a excitačních spekter čistého fykocyanobilinu a jeho komplexů s kovy. Dále se zabývá měřením kvantových výtěžků a dob života fluorescence fykocyanobilinu a jeho komplexů s kovy.

Annotation:

This thesis deals with measurement and analysis of absorption, emission, and excitation spectra of pure phycocyanobilin and its complexes with metals. It also deals with the measurement of quantum yield and fluorescence lifetime of phycocyanobilin and its complexes with metals.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem autorem této kvalifikační práce a že jsem ji vypracoval pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu použitých zdrojů.

České Budějovice, 12. 04. 2024

.....
Vavřinec Konečný

Klíčová slova

Absorbance, fluorescence, kvantový výtěžek fluorescence, doba života fluorescence, erythrosin B, chlorofyl *a*, biliverdin, fykocyanobilin, dohasínání fluorescence

Keywords

Absorption, fluorescence, quantum yield, fluorescence lifetime, erythrosin B, chlorophyll *a*, biliverdin, phycocyanobilin, fluorescence decay

Poděkování

Rád bych poděkoval vedoucímu své bakalářské práce RNDr. Radku Litvínovi, Ph.D., svému konzultantovi RNDr. Davidu Bínovi, Ph.D. za cenné rady, odborné vedení při práci v laboratoři a za několik konzultací během psaní práce. Dále bych rád poděkoval Bc. Hance Vomáčkové za přípravu fykocyanobilinů, s kterými jsem pracoval.

Obsah

1	ÚVOD.....	1
1.1	Absorpční spektroskopie	1
1.2	Fluorescence	2
1.2.1	Kvantový výtěžek fluorescence.....	3
1.2.2	Doba života fluorescence.....	4
1.3	Ramanův rozptyl	5
1.4	Tetrapyrolová barviva.....	5
1.4.1	Cyklické tetrapyroly	6
1.4.2	Lineární tetrapyroly	6
2	CÍLE PRÁCE	8
3	MATERIÁLY A METODY	9
3.1	Příprava fykocyanobilinu s kovy.....	9
3.2	Měření Ramanova rozptylu	9
3.3	Absorpční spektrometrie	10
3.4	Měření emisních a excitačních spekter	10
3.5	Měření kvantového výtěžku fluorescence pomocí koncentrační řady	10
3.6	Měření kvantového výtěžku fluorescence	10
3.7	Měření doby života fluorescence (TCSPC).....	11
4	VÝSLEDKY.....	12
4.1	Ramanův rozptyl použitých rozpouštědel	12
4.2	Erythrosin B	15
4.3	Chlorofyl <i>a</i>	17
4.4	Biliverdin.....	21
4.5	Fykocyanobilin.....	23
4.6	Fykocyanobilin s kovy	25
4.7	Souhrn výsledků pro fykocyanobilin s kovy.....	32
5	DISKUZE.....	35
6	ZÁVĚR.....	37
7	SEZNAM LITERATURY	38
8	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....	41
9	PŘÍLOHY.....	42

1 Úvod

1.1 Absorpční spektroskopie

Elektromagnetické záření procházející skrz absorbující látku ztrácí intenzitu. Úroveň útlumu elektromagnetického záření procházející absorbující látkou se nazývá absorbance a je definována jako (Prosser, 1989):

$$A = \log \left(\frac{I_0}{I} \right) \quad (1)$$

kde A je absorbance, I_0 je původní intenzita záření, I je intenzita záření po průchodu látkou.

Lambert-Beerův zákon vztahuje absorbanci ke koncentraci vzorku a dráze, kterou záření urazí dle vztahu:

$$A = \epsilon c l \quad (2)$$

kde A je absorbance, ϵ je absorpční koeficient, který je závislý na vlnové délce záření a charakterizuje látku, l je dráha, kterou záření urazí (Prosser, 1989). Ze vztahu (2) je zřejmé, že absorbance roste lineárně s koncentrací a dráhou. Měření absorbance se často používá pro stanovení koncentrace látek, ale zajímavé je i studium absorpčních spekter, tedy funkce $A(\lambda)$ nebo $\epsilon(\lambda)$. Energie absorpčních přechodů odpovídá energii přechodů mezi energetickými hladinami elektronů v absorbující látce. Při změně chemické struktury absorbující látky nebo při změně jejího prostředí dochází ke změně absorpčního spektra. Sledováním změn absorpčních spekter lze analyzovat průběh některých chemických reakcí. Protože měření absorbance využívá světlo, jedná se o metodu nedestruktivní a potenciálně s velkým časovým rozlišením (Atkins, a další, 2023).

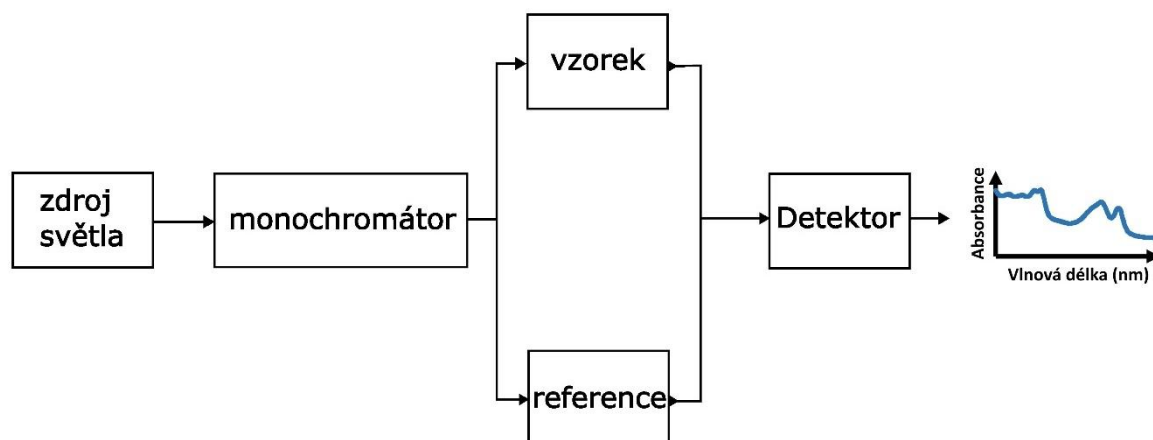
Absorbance tedy popisuje útlum světla. Na druhé straně lze měřit a kvantifikovat propustnost neboli kolik záření látkou projde, což popisuje transmitance, která je definována jako:

$$T = \left(\frac{I}{I_0} \right) = 10^{-A} \quad (3)$$

kde T je transmitance, A je absorbance, I_0 je původní intenzita záření, I je intenzita záření po průchodu látkou (Prosser, 1989). Transmitance je výhodnější než absorbance v situacích, kdy je žádoucí měřit množství záření, které prošlo vzorkem. Jde například o propustnost optických zařízení, jako jsou čočky a filtry (Ozdemir, a další, 2016).

Měření absorpčních spekter probíhá na přístroji zvaným absorpční spektrometr, který se skládá ze zdroje světla, monochromátoru, prostoru pro vzorek a detektoru a jeho zjednodušené schéma je na obrázku 1.1. Svazek světla ze zdroje je rozdělen a prochází referencí a vzorkem. Po průchodu světla skrz vzorek a referenci dopadá světlo na společný

detektor, pomocí elektroniky je určen poměr intenzity světla, které prošlo skrz referenci a skrz vzorek a vzniká spektrum propustnosti (Prosser, 1989).



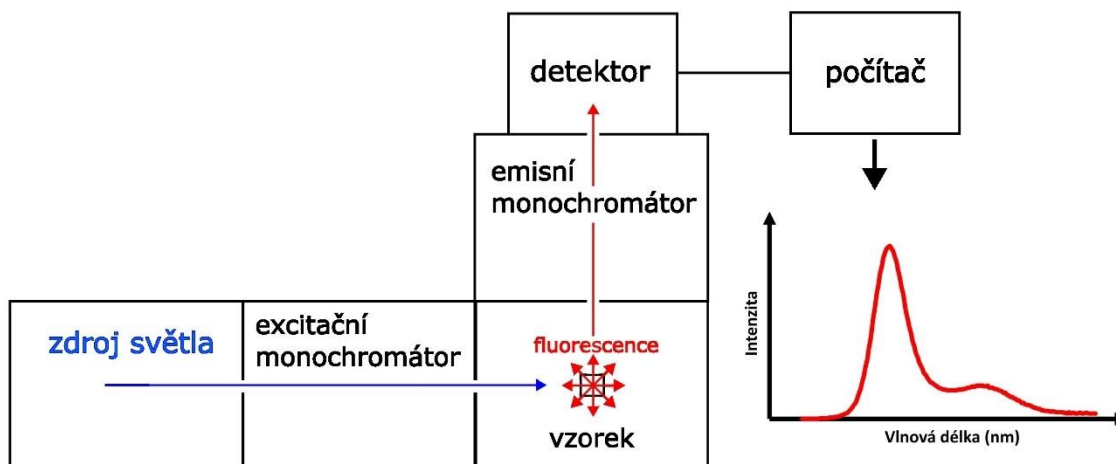
Obrázek 1.1: Zjednodušené schéma absorpčního spektrometru

1.2 Fluorescence

Fluorescence je typ luminiscence a jedná se o zářivý přechod z excitovaného stavu do stavu základního. Narozdíl od absorpce, kde může dojít k excitaci do vyšších stavů, jde u fluorescence téměř vždy o přechod z prvního excitovaného stavu S_1 do základního stavu S_0 , protože u vyšších excitovaných stavů dochází k vnitřní konverzi a relaxaci na nižší hladiny. Spektra fluorescence jsou tedy jednodušší než absorpční spektra. Fluorescence má také delší vlnovou délku než absorbované záření. To znamená, že se vyzáří pouze část pohlcené energie. Výhodou je také závislost intenzity fluorescence na intenzitě excitačního záření, což umožňuje detekovat velmi malé koncentrace, mnohem nižší než pomocí absorpce, která je omezena citlivostí detektoru. Citlivost fluorescence je totiž prakticky omezena jen intenzitou excitačního záření (Prosser, 1989). Fluorescenci lze využít k identifikaci různých složek vzorku, k určení umístění buněk, genetické analýze apod (Lakowicz, 2006). Různé látky mají totiž charakteristickou vlnovou délku jak absorpce, tak fluorescence (Lawson-Wood, a další, 2019).

Fluorescence se měří pomocí spektrofluorimetru, jehož zjednodušené schéma je na obrázku 1.2. Lze měřit emisní a excitační spektra. Emisní spektrum informuje o spektrálním složení fluorescence vzorku a excitační spektrum udává závislost intenzity fluorescence určité vlnové délky na vlnové délce excitačního záření (Pelant a Valenta, 2006). Měření emisního spektra spočívá v excitaci vzorku excitačním zářením o vybrané vlnové délce, kterou zajišťuje excitační monochromátor. Excitovaný vzorek fluoreskuje, což je detekováno detektorem umístěným zpravidla kolmo na směr excitačního záření. Pomocí emisního monochromátoru,

který je umístěn před detektorem, je proměřeno celé spektrum. Excitační spektrum se měří podobně, ale tentokrát je emisní monochromátor nastaven na konkrétní vlnovou délku a mění se vlnová délka excitačního záření pomocí excitačního monochromátoru (Prosser, 1989).



Obrázek 1.2: Zjednodušené schéma spektrofluorimetru pro steady-state fluorescence

1.2.1 Kvantový výtěžek fluorescence

Kvantový výtěžek je veličina popisující luminiscenci a je definován pro stacionární luminiscenci jako:

$$\phi = \frac{N_{abs}}{N_{em}} \quad (4)$$

kde N_{abs} je počet absorbovaných fotonů a N_{em} je počet vyzářených fotonů (Prosser, 1989)

Kvantový výtěžek popisuje pravděpodobnost deexcitace fluorescencí ku pravděpodobnosti celkové deexcitace, do které spadají vedle fluorescence i nezářivé přechody. U silně fluoreskujících látek platí, že přechod do základního stavu proběhne s mnohem větší pravděpodobností vyzářením fotonu než nějakým nezářivým procesem, protože doba zářivého přechodu je mnohem kratší než doba nezářivého přechodu (Pelant a Valenta, 2006).

Kvantový výtěžek má široké užití, určuje se ním například účinnost fotosyntézy, nebo třeba slouží ke stanovení účinnosti solárních panelů (Skillman, 2008, Gallagher a Gdula, 1965). V přírodě fluoreskuje spousta látek, jednou z nich je například chinin, který se používá jako antimalarikum nebo jako dochucovadlo v nápojích, kterým je například tonik. Při excitaci toniku UV zářením dochází k excitaci chininu a modré fluorescenci (Lawson-Wood, a další, 2019). Kvantový výtěžek chininu je $\Phi = 0,50-0,60$ a je jedním z častých standardů pro měření kvantového výtěžku. Dalším častým standardem je například fluorescein s kvantovým výtěžkem $\Phi = 0,95$, nebo rhodamin B s kvantovým výtěžkem $\Phi = 0,95$ (Brouwer, 2011).

Látky s velkým kvantovým výtěžkem, jako třeba chinin, jsou v přírodě spíše vzácné. Obvykle se jedná o silně fluorescenční látky už při kvantovém výtěžku $\Phi = 0,1$ (Pelant a Valenta, 2006).

Kvantový výtěžek fluorescence lze měřit absolutně nebo relativně. Absolutní měření kvantového výtěžku je poměrně složité, vzhledem k tomu, že je nutné změřit fluorescenci ve všech směrech, pro všechny vlnové délky a porovnat intenzitu absorpce excitačního světla s intenzitou naměřené fluorescence (Prosser, 1989). V této práci byl kvantový výtěžek měřen relativně. Měření spočívá v naměření absorpčních a emisních spekter několika koncentrací vzorku a standardu o známém kvantovém výtěžku. Důležité je, aby spektra byla měřena s identickým nastavením pro všechny koncentrace, jinak by změřený kvantový výtěžek nebyl správný. Dalším krokem je integrace spekter fluorescence vzorků jednotlivých koncentrací a vynesení závislosti integrované fluorescence na absorbanci v místě (vlnové délce) excitace. Poté je porovnána hodnota směrnice lineární regrese naměřených dat vzorku a standardu. Kvantový výtěžek je následně vypočten dle následujícího vztahu (Malina, 2020):

$$\phi_x = \phi_{ST} \left(\frac{\text{směrnice}_x}{\text{směrnice}_{ST}} \right) \left(\frac{\eta_x^2}{\eta_{ST}^2} \right) \quad (5)$$

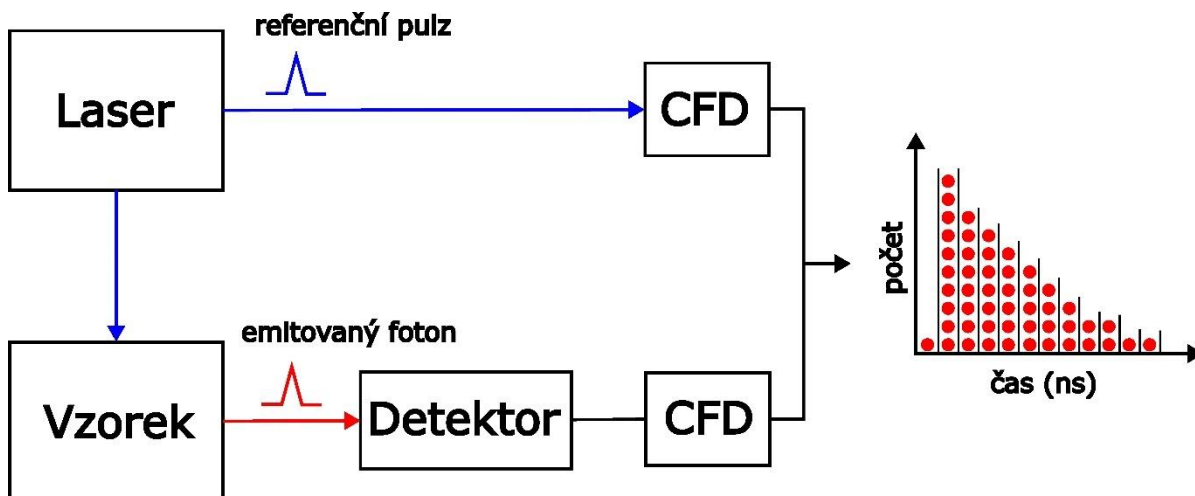
kde ϕ_x je kvantový výtěžek vzorku, ϕ_{ST} je známý kvantový výtěžek standardu, η_x je index lomu vzorku a η_{ST} je index lomu standardu.

1.2.2 Doba života fluorescence

Časově rozlišená fluorescenční spektroskopie je užitečná metoda využívaná nejčastěji pro výzkum biologických makromolekul. Oproti steady-state fluorescenční spektroskopii poskytuje více informací o vzorku. Pokud má vzorek několik fluoreskujících složek, emisní spektra se mohou překrývat a není poznat, že fluorescence pochází z různých zdrojů. Pomocí časově rozlišené fluorescenční spektroskopie lze, v případě různých dob života fluorescence, jednotlivé složky rozlišit. To dále poskytuje informaci o čistotě vzorku.

Doba života fluorescence udává průměrnou dobu, jakou vzorek setrvává v excitovaném stavu po excitaci (Lakowicz, 2006). Dobu života fluorescence lze změřit například pomocí metody TCSPC (Time-Correlated Single Photon Counting, česky: časově korelované čítání jednotlivých fotonů). Principem této metody je excitace vzorku pulzem laseru, vzorek poté při relaxaci s nějakou pravděpodobností danou kvantovým výtěžkem vyzáří foton, který je detekován detektorem. Pomocí časovací elektroniky CFD (Constant Fraction Discriminator, česky: diskriminátor konstantní frakce) je zjištěno zpoždění mezi referenčním pulzem laseru a pulzem z detektoru při detekci fotonu ze vzorku. Toto se opakuje, dokud se nenasbírá dostatek dat, z kterých je pak vytvořen histogram závislosti počtu fotonů na čase, který je křivkou dohasínání fluorescence. Křivku dohasínání fluorescence lze použít k výpočtu doby

života fluorescence (Wahl, 2009). Zjednodušené schéma přístroje pro časově rozlišenou fluorescenci je na obrázku 1.3.



Obrázek 1.3: Schéma fluorescenčního spektrometru pro časově rozlišenou fluorescenci

1.3 Ramanův rozptyl

Při ozáření vzorku dochází k elastickému Rayleighově rozptylu světla z excitačního svazku. Vedle Rayleighova rozptylu, který má stejnou frekvenci jako excitační svazek a poměrně velkou intenzitu, lze na spektrech vidět i píky mnohem menší intenzity, řádově 10^{-5} intenzity excitačního svazku, které se nazývají Ramanův rozptyl (Ferraro, 2003). Světlo Ramanova rozptylu má obecně energii blízkou excitačnímu svazku a liší se od něj o energii přechodů mezi vibračními stavy molekul vzorku.

Píky Ramanova rozptylu jsou symetricky rozloženy kolem píky Rayleighova rozptylu (Prosser, 1989). Pokud tedy Rayleighův rozptyl má frekvenci ν_0 , píky Ramanova rozptylu odpovídají frekvencím $\nu_0 \pm \nu_R$, kde ν_R je vibrační frekvence molekuly (Ferraro, 2003). Posun $\nu_0 - \nu_R$ se nazývá Stokesův a posun $\nu_0 + \nu_R$ anti-Stokesův. V případě, že je spektrum v jednotkách vlnočtu (cm^{-1}), rozdíl $\nu_0 - \nu_R$ nezávisí na frekvenci excitačního svazku a je charakteristický pro danou látku (Prosser, 1989).

1.4 Tetrapyrolová barviva

Tetrapyrolová barviva jsou organické aromatické molekuly, dělí se na lineární tetrapyroly a cyklické tetrapyroly. Cyklické tetrapyroly jsou složeny ze čtyř pyrolových jader spojených do uzavřeného řetězce. Lineární tetrapyroly jsou bilinová barviva, která se stejně jako cyklické tetrapyroly skládají ze čtyř pyrolových jader, ale tvoří otevřený řetězec. (Malina, 2020).

1.4.1 Cyklické tetrapyroly

Mezi nejznámější a nejvýznamnější cyklické tetrapyroly patří chlorofyly a hem. Chlorofyly obsahují centrální kovový ligand – hořčík, a jsou to hlavní fotosyntetická barviva. Ve fotosyntetických procesech mají světlosběrnou funkci – zachytávají energii fotonů a přenášejí ji mezi sebou. Mají také redoxní funkci – účastní se prvních kroků separace náboje v reakčních centrech fotosystémů (Grimm, a další, 2006; Blankenship, 2008). Chlorofyly mají dva výrazné absorpční pásy pokrývající vlnové délky 330-480 nm a 630-1050 nm, naopak téměř neabsorbují v zelené oblasti. Chlorofyl *a* má Soretův pás v modré oblasti u 430 nm, Q_x pás u 580 nm a Q_y pás u 660 nm (Scheer, a další, 2003). Q_x pás odpovídá přechodu S_0-S_2 , Q_y pás přechodu S_0-S_1 , Soretův pás zastupuje více energetické přechody S_0-S_3 a S_0-S_4 (Malina, 2020). Chlorofyly mají dlouhou dobu života excitovaného stavu díky centrálnímu hořčíku (Grimm, a další, 2006). Při vazbě na proteinové komplexy se vlastnosti cyklických tetrapyrolů výrazně mění. Absorpce je pak posunuta do větších vlnových délek. Poloha absorpčních pásů také záleží na chemickém složení samotných pigmentů. Chlorofyl *a* a chlorofyl *b* jsou téměř identické molekuly až na jednu funkční skupinu. U chlorofylu *b* je methylová funkční skupina, kterou lze najít u chlorofylu *a*, nahrazena formylovou funkční skupinou. To způsobí posun absorpčních pásů směrem do modra (Blankenship, 2008).

1.4.2 Lineární tetrapyroly

Bilinová barviva se hojně vyskytují v přírodě v živých organismech, například v řasách, rostlinách, bakteriích, živočiších a účastní se mnoha biologických procesů, například fotosyntézy. Patří mezi ně bilirubin, biliverdin, fykocyanobilin a fykoerythrobilin a vznikají rozkladem cyklických tetrapyrolů. U živočichů dochází k degradaci hemu na biliverdin, který je dále redukován na bilirubin. U sinic je bilirubin dále redukován a vzniká fykoerythrobilin, ze kterého následně vzniká fykocyanobilin. Další lineární tetrapyroly, luciferiny, které vznikají rozkladem chlorofylu *a*, lze najít u mořských organismů, které emitují světlo v procesu bioluminiscence (Taniguchi a Lindsey, 2023). Bilinová barviva narozdíl od většiny cyklických tetrapyrolů neobsahují centrální kovový ligand (Scheer, a další, 2003). Jsou ale také k nalezení ve světlosběrných systémech a absorbují v oblasti, kde chlorofyly neabsorbují. (Blankenship, 2008). Volné biliny mají narozdíl od chlorofylů velmi krátkou dobu života excitovaného stavu, nejsou tedy moc vhodné jako světlosběrné pigmenty, protože absorbované světlo se rychle přemění na teplo. Pokud jsou ale navázané na proteinové komplexy, doba života excitovaného stavu se zvýší o čtyři řády a absorpce vzroste až 10krát. To je způsobeno tvorbou velmi rigidních molekul bilinů s proteiny. Proteiny také modifikují biliny do různých konformací, které tak mají různé vlastnosti, i když jejich chemická struktura je stejná. Toho

využívají některé mořské fotosyntetické organismy, které měnící se světelné podmínky nutí k adaptaci. Může být například fykocyanobilin, absorbující kolem 620 nm, nahrazen fykoerythrobilinem absorbujícím kolem 540 nm, a tak je pokryto větší spektrum vlnových délek (Zhao, a další, 2012).

2 Cíle práce

- Zvládnout metody steady-state a časově rozlišené fluorescenční spektroskopie
- Analyzovat spektra absorpce a fluorescence vybraných bilinových barviv
- Změřit jejich kvantové výtěžky fluorescence
- Změřit jejich doby života fluorescence
- Posoudit jejich vhodnost pro případné použití v systémech umělé fotosyntézy

3 Materiály a metody

3.1 Příprava fykocyanobilinu s kovy

Fykocyanobilin byl připraven Hanou Vomáčkovou v rámci její magisterské práce (Vomáčková, 2024). Z tablet potravinového doplňku spirulina byla izolována ve vodě rozpustná frakce, proteiny byly sraženy acetonem a po vysušení hydrolyzovány koncentrovanou kyselinou chlorovodíkovou. Z hydrolyzátu byla extrahována frakce rozpustná v chloroformu a z ní byl po neutralizaci a vysušení izolován fykocyanobilin s pomocí tenkovrstvé chromatografie.

Při přípravě komplexů fykocyanobilinu s kovy byl k zásobnímu roztoku fykocyanobilinu v methanolu o koncentraci 22 μM a objemu 250 μl přidán roztok soli kovu v methanolu o koncentraci 6,2 mM a objemu 10 μl , následně bylo přidáno ještě 740 μl methanolu. Zinek byl použit ve formě acetylacetonátu zinečnatého, měď ve formě acetylacetonátu měďnatého, nikl ve formě acetylacetonátu nikelnatého a kobalt ve formě acetylacetonátu kobaltnatého. Podle návodu od H. Vomáčkové (Vomáčková, 2024) byla směs ponechána týden potmě za pokojové teploty a poté byly provedeny spektroskopické experimenty.

Biliverdin (Sigma-Aldrich, 30891) byl použit bez dalšího přečištění a rozpuštěn v potřebném množství methanolu.

Chlorofyl *a* (Sigma-Aldrich, 96145) byl použit bez dalšího přečištění a rozpuštěn v potřebném množství methanolu. Před jeho použitím bylo kontrolováno absorpční spektrum na přítomnost demetalované formy (feofytin *a*), která se projevuje snížením Q pásu a dvojicí malých absorpčních pásů v oblasti 500–535 nm (Jeffrey, a další, 2005).

Pro přípravu vzorků byla použita deionizovaná voda a methanol v HPLC kvalitě (gradient grade, VWR, Česká republika).

3.2 Měření Ramanova rozptylu

Ramanův rozptyl byl měřen na spektrofluorimetru Horiba FluoroLog-3¹. Pro měření byly použity fluorescenční křemenné kyvety (QS) s optickou drahou 10 mm. Spektra byla měřena v rozmezí 350–750 nm při excitačních vlnových délkách 350 nm, 400 nm, 450 nm, 500 nm, 550 nm a 600 nm. Měření bylo provedeno pro deionizovanou vodu a methanol v HPLC kvalitě, protože tato rozpouštědla byla v práci používána a bylo nutné zjistit, kde by se mohly píky Ramanova rozptylu nacházet a kazit spektra měřených látek.

¹ Specifikace přístroje dostupné na:

https://static.horiba.com/fileadmin/Horiba/Company/About_HORIBA/Readout/R07E/RE07-14-066.pdf

3.3 Absorpční spektrometrie

Absorpční spektra byla měřena na spektrofotometru Shimadzu UV-1800 (Shimadzu, Japonsko)². Spektrofotometr je dvoupraprskový a používá dva světelné zdroje, wolfram-halogenovou lampu pro viditelnou oblast a deuteriovou lampu pro UV oblast. Měří v rozmezí vlnových délek 190-1100 nm s přesností 0,3 nm. Rozsah měřitelné absorbance je od -4 do 4. Spektrální šířka štěrbin byla 1 nm. Pro měření byly použity křemenné kyvety (QS) s optickou drahou 10 mm. Spektra byla měřena v rozmezí 300-800 nm s integrační dobou 0,1 s.

3.4 Měření emisních a excitačních spekter

Emisní a excitační spektra byla měřena na spektrofluorimetru Horiba FluoroLog-3(Horiba, Francie)¹. Spektrofluorimetr používá 450 W xenonovou výbojku jako zdroj světla a obsahuje dvojité monochromátory typu Czerny-Turner s mřížkami 1200vr/mm, rozlišením 0,2 nm a rozsahem 0-1300 nm. Detekce je zajištěna nechlazeným fotonásobičem v rozsahu 240-850 nm, umístěným kolmo na směr excitačního záření. K měření byly použity křemenné kyvety (QS) s optickou drahou 10 mm. Absorbance vzorků v maximu přechodu S_1-S_0 byla vždy nižší než 0,1. Detaily nastavení měření jsou uvedeny u výsledků (kapitola 4).

3.5 Měření kvantového výtěžku fluorescence pomocí koncentrační řady

Pro výpočet kvantového výtěžku fluorescence pomocí koncentrační řady byla změřena absorpční a emisní spektra několika koncentrací vzorku, kde vzorek s největší koncentrací měl absorbanci v maximu přechodu S_1-S_0 nižší než 0,1, další vzorky byly získány postupným ředěním. Stejným způsobem byla změřena absorpční a emisní spektra pro standard neboli vzorek o známém kvantovém výtěžku. Emisní spektra byla pro vzorek i standard měřena s identickým nastavením přístroje. Emisní spektra byla integrována a byla vynesena závislost integrované fluorescence na absorbanci v místě excitace. Data byla proložena přímkou. Poměr směrníc přímek vzorku a standardu odpovídá poměru jejich kvantových výtěžků. Pro získání kvantového výtěžku vzorku byl tímto poměrem vynásoben dle vztahu (5) známý kvantový výtěžek standardu.

3.6 Měření kvantového výtěžku fluorescence

Z důvodu malého množství některých vzorků byl pro ně použit zjednodušený výpočet kvantového výtěžku, kdy byla změřena absorpční a emisní spektra pouze pro jednu koncentraci vzorku a standardu neboli vzorku o známém kvantovém výtěžku, kde absorbance

² Specifikace přístroje dostupné na: <https://pim-resources.coleparmer.com/catalog-page/t-1920.pdf>

vzorku i standardu byla nižší než 0,1. Emisní spektra byla integrována a vydělena absorbcí v místě excitace, tímto byla získána hodnota pro vzorek i pro standard. Poměr těchto hodnot odpovídá poměru kvantových výtěžků vzorku a standardu a nahrazuje poměr směrnic. Kvantový výtěžek vzorku byl dle upraveného vztahu (5) získán vynásobením známého kvantového výtěžku standardu tímto poměrem místo poměru směrnic přímek.

3.7 Měření doby života fluorescence (TCSPC)

Měření probíhalo na spektrofluorimetru pro časově rozlišenou fluorescenci FluoTime 300 (PicoQuant, Německo)³ za stálé teploty 20°C. K excitaci byl použit modrý laser o vlnové délce 482 nm, výkonu 0,4-2 mW, FWHM⁴ menší než 110 ps a maximální frekvenci 40 MHz nebo červený laser o vlnové délce 638 nm, výkonu 0,6-4 mW, FWHM menší než 90 ps a maximální frekvenci 80 MHz. Při každém experimentu byla změřena také IRF⁵, která má u tohoto přístroje FWHM přibližně 250 ps. Fluorescence je detekována fotonásobičem přes monochromátor typu Czerny-Turner s ohniskovou vzdáleností 150 mm, difrakční mřížkou 1200 vř/mm a přesností vlnových délek 0,25 nm. TCSPC karta TimeHarp260 s rozhraním PCI, rozlišením 25 ps, dead-time pod 25 ps a počtem kanálů až 32768. K měření byly použity křemenné kyvety (QS) s optickou drahou 10 mm. Absorbance vzorků v maximu přechodu S₁-S₀ byla vždy nižší než 0,1. Změřené křivky dohasínání fluorescence byly analyzovány pomocí softwaru PicoQuant EasyTau 2 metodou iterativní rekonvoluce, kde data byla modelována konvolucí IRF a modelu dohasínání fluorescence ve formě sumy exponenciál. Výsledkem měření byly dílčí a průměrné doby života měřených vzorků. Průměrná doba života fluorescence byla vypočtena dle následujícího vztahu:

$$\tau_A = \frac{\sum_i A_i \tau_i}{\sum_i A_i} \quad (6)$$

kde A_i je amplituda i -té složky a τ_i je doba života fluorescence i -té složky (Fišerová a Kubala, 2012).

³ Specifikace přístroje dostupné na:

https://www.picoquant.com/images/uploads/downloads/fluotime300_brochure.pdf

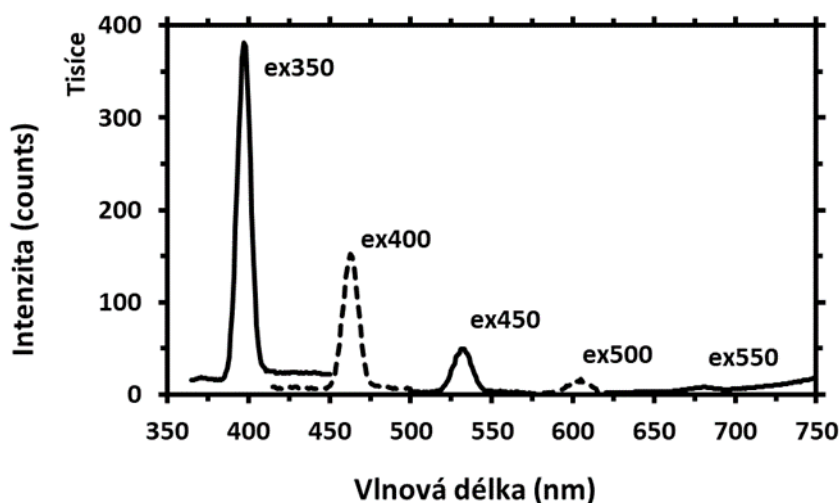
⁴ FWHM (Full Width at Half Maximum, česky: pološířka) je plná šířka v polovině maxima. V tomto případě jde o pološířku pulzu laseru v ps.

⁵ IRF (Instrument Response Function, česky: funkce odezvy přístroje).

4 Výsledky

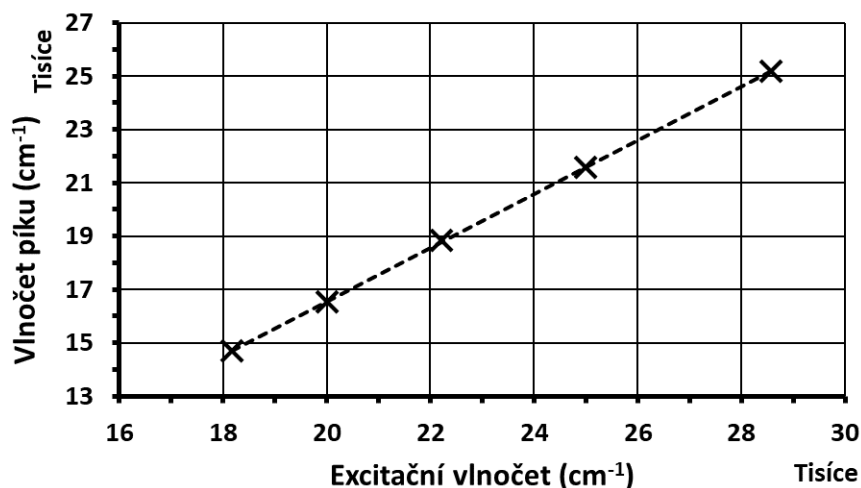
4.1 Ramanův rozptyl použitých rozpouštědel

Kvůli možnosti záměny slabé fluorescence bilinů a Ramanova rozptylu rozpouštědla byla změřena spektra Ramanova rozptylu pro vodu a methanol v rozmezí 350–750 nm při excitačních vlnových délkách 350 nm, 400 nm, 450 nm, 500 nm, 550 nm a 600 nm.



Obrázek 4.1: Ramanův rozptyl při různých excitačních vlnových délkách pro vodu. Popisky v grafu (ex350 apod.) značí excitační vlnovou délku v nm pro daný pik.

Jednotlivé píky Ramanova rozptylu pro vodu při různých excitačních vlnových délkách jsou na obrázku 4.1. Je zřejmé, že se zvyšující se excitační vlnovou délkou klesá intenzita Ramanova rozptylu. Největší intenzita byla zaznamenána při excitaci 350 nm. Při excitaci 600 nm už nebyl signál rozeznatelný od šumu. Hodnoty vodorovné osy byly z vlnových délek převedeny na vlnčet (cm^{-1}) a rozdíly pozic excitačního svazku a pozic maxim Ramanova rozptylu vyneseny do grafu na obrázku 4.2.

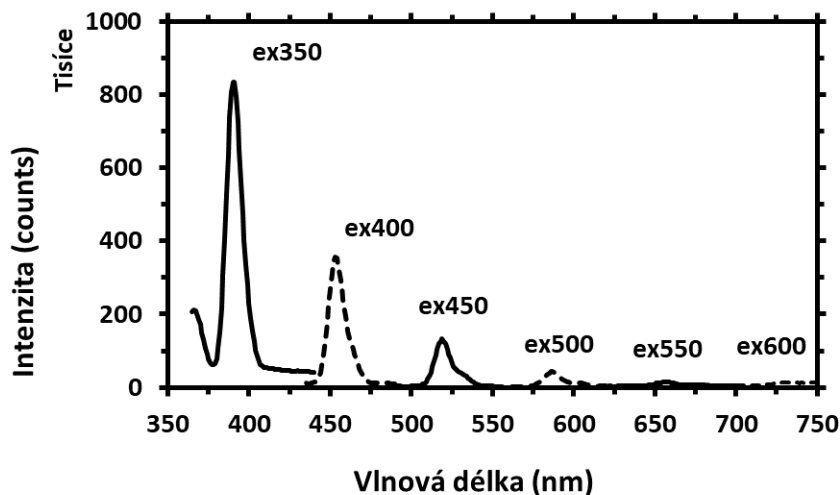


Obrázek 4.2: Hodnoty Stokesova posuvu Ramanova rozptylu pro vodu.

Data jsou proložena přímkou s rovnicí $y = 1.0095x - 3640$. Všechny body leží na jedné přímce, což potvrzuje nezávislost velikosti posuvu na excitační vlnové délce. Konstanta rovnice přímky 3640 cm^{-1} odpovídá Stokesově posuvu. V literatuře je uvedeno, že se spektrum Ramanova rozptylu vody skládá z několika pásů, jejichž hodnoty jsou napsány v tabulce 4.1. Experimentálně zjištěná hodnota odpovídá hodnotám pásu 5 v tabulce 4.1.

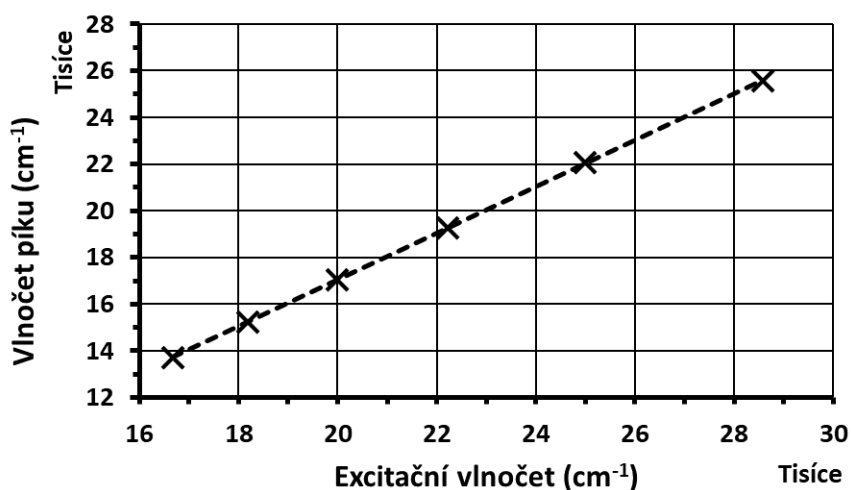
Tabulka 4.1: Hodnoty Stokesova posuvu Ramanova rozptylu pro vodu v literatuře

Pás 1 (cm^{-1})	Pás 2 (cm^{-1})	Pás 3 (cm^{-1})	Pás 4 (cm^{-1})	Pás 5 (cm^{-1})	Reference
-	3240	3435	3540	3620	(Walrafen, 1967)
3014	3226	3432	3572	3636	(Sun, 2009)



Obrázek 4.3: Ramanův rozptyl při různých excitačních vlnových délkách pro methanol.

Jednotlivé píky Ramanova rozptylu pro methanol při různých excitačních vlnových délkách jsou na obrázku 4.3. Stejně jako v případě vody (obrázek 4.1) klesá intenzita Ramanova rozptylu se zvyšující se excitační vlnovou délkou a největší intenzita byla zaznamenána při excitaci 350 nm. Na rozdíl od vody (obrázek 4.1) byl Ramanův rozptyl methanolu detekován i při excitaci 600 nm. Data byla z vlnových délek převedena na vlnočety (cm^{-1}) a rozdíly pozic excitačního svazku a pozic Ramanova rozptylu vyneseny do grafu na obrázku 4.4.



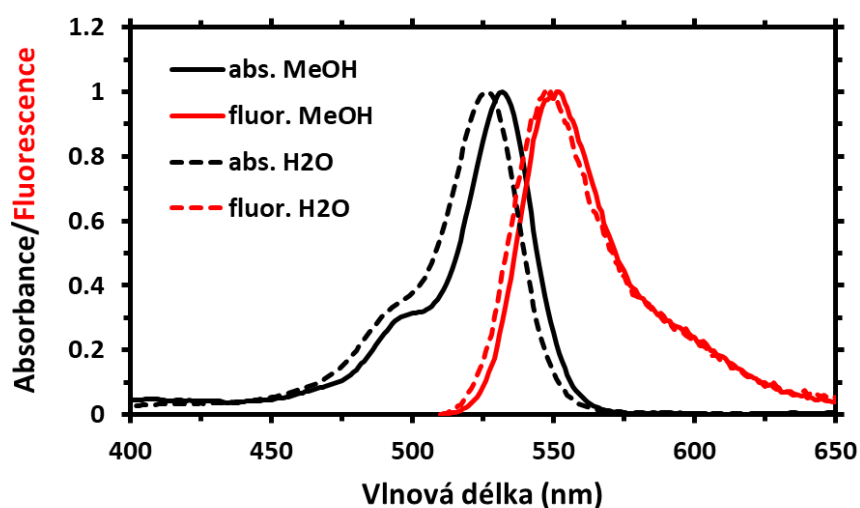
Obrázek 4.4: Stokesův posuv Ramanova rozptylu pro methanol.

Data jsou proložena přímkou s rovnicí $y = 0.9992x - 2945$. Všechny body leží na jedné přímce, což potvrzuje nezávislost velikosti Stokesova posuvu na excitační vlnové délce.

Konstanta rovnice přímky 2945 cm^{-1} odpovídá Stokesově posuvu. Literatura uvádí dvě pro methanol charakteristické hodnoty a to 2840.2 cm^{-1} a 2949.7 cm^{-1} (Emin, a další, 2020) nebo 2834 cm^{-1} a 2993 cm^{-1} (Hickstein, a další, 2018). Experimentálně zjištěná hodnota je opět poměrně blízko k vyššímu z publikovaných údajů.

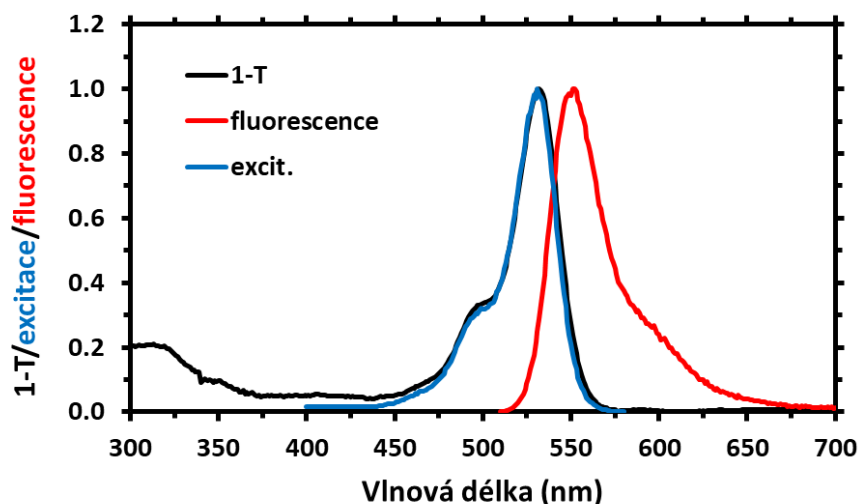
4.2 Erythrosin B

Jako první referenční vzorek v této práci sloužil erythrosin B, pro který bylo změřeno spektrum absorpční, emisní a excitační. Emisní spektrum bylo měřeno s excitační štěrbínou 3 nm, emisní štěrbínou 1 nm a integračním časem 0,1 s. Excitační spektrum bylo měřeno s excitační štěrbínou 2 nm a emisní štěrbínou 2 nm s integračním časem 0,1 s. Dále byl změřen kvantový výtěžek fluorescence a doba života fluorescence.



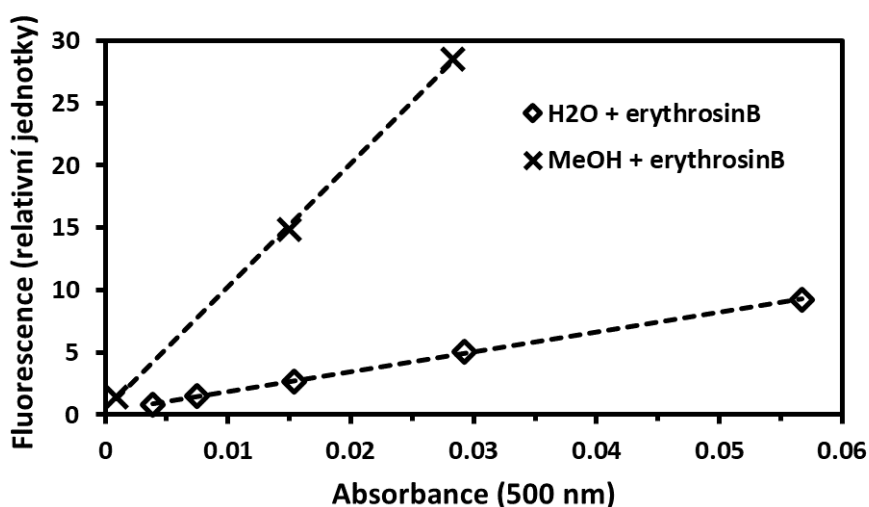
Obrázek 4.5: Absorpční spektra (černě) a emisní spektra (červeně) erythrosinu B (excitace 500 nm). Spektra jsou normalizována na maximum signálu. Ramanův rozptyl methanolu by mohl být detekován při této excitaci u 590 nm, Ramanův rozptyl vody u 606 nm.

Na obrázku 4.5 je černě vykresleno absorpční spektrum erythrosinu B rozpuštěném ve vodě a v druhém případě v methanolu. V obou rozpouštědlech má erythrosin B jeden výrazný pík s vibračním ramenem. Ve vodě má absorpční maximum u 526 nm, v methanolu se absorpční maximum nachází v 532 nm. Červeně jsou pak vykreslena emisní spektra erythrosinu B v obou rozpouštědlech. V obou rozpouštědlech má erythrosin B výraznou fluorescenci, ale v methanolu je intenzita fluorescence přibližně třikrát větší než ve vodě. Ve vodě je maximum fluorescence u 548 nm a v methanolu 552 nm. Absorpční i fluorescenční maxima odpovídají hodnotám v literatuře (Boens, a další, 2007).



Obrázek 4.6: Emisní spektrum (červeně, excitace 500 nm), excitační spektrum (modře, detekce 590 nm) a 1-T (černě) pro erythrosin B v methanolu. Spektra jsou normalizována na maximum signálu Ramanův rozptyl methanolu by mohl být detekován u 590 nm.

Na obrázku 4.6 je červeně vykresleno emisní spektrum erythrosinu B v methanolu, modře excitační spektrum a černě 1-T, kde T je transmitance. Spektra 1-T a excitační jsou tvarově téměř stejná. Maximum 1-T spektra je u 532 nm a maximum excitačního spektra u 531 nm. Pološířka píku excitačního i 1-T spektra je 29 nm. Maximum fluorescence je u 549 nm s pološířkou 35 nm.



Obrázek 4.7: Graf závislosti integrované fluorescence na absorbanci koncentrační řady erythrosinu B ve vodě a v methanolu k výpočtu kvantového výtěžku fluorescence erythrosinu B v methanolu.

Pro zjištění kvantového výtěžku erythrosinu B byla použita metoda měření kvantového výtěžku pomocí koncentrační řady. Rovnice přímky pro erythrosin B ve vodě na obrázku 4.7 je $y = 158,888x + 0,259$ a $R^2 = 0,9995$. Rovnice přímky pro erythrosin B v methanolu je $y = 987,664x + 0,395$ a $R^2 = 0,9996$. Poměr směrnic těchto přímek je 6,22. Pro výpočet kvantového výtěžku erythrosinu B v methanolu byl jako standard použit erythrosin B ve vodě o známém kvantovém výtěžku $0,012 \pm 0,002$ (Boens, a další, 2007). Kvantový výtěžek byl vypočten dle vztahu (5), kde index lomu vody je 1,3350 (Hale a Querry, 1973) a index lomu methanolu je 1,3302 (Moutzouris, a další, 2014) Naměřený kvantový výtěžek Φ je zapsán v tabulce 4.2.

Tabulka 4.2: Kvantový výtěžek erythrosinu B ve dvou rozpouštědlech.

Látka	Rozpouštědlo	Kvantový výtěžek Φ	Φ v literatuře (Boens, a další, 2007)
erythrosin B	voda	-	$0,012 \pm 0,002$
erythrosin B	methanol	0,074	$0,09 \pm 0,01$

Doba života fluorescence byla měřena pouze pro erythrosin B v methanolu a je uvedena v následující tabulce 4.3. Excitováno bylo modrým laserem o vlnové délce 482 nm a detekováno bylo u 550 nm. V literatuře bylo excitováno 543 nm a detekováno u 555 nm (Boens, a další, 2007). Změřená hodnota dobře odpovídá publikovanému údaji. Křivka dohasínání fluorescence erythrosinu B v methanolu je v příloze (kapitola 9) na obrázku 9.1.

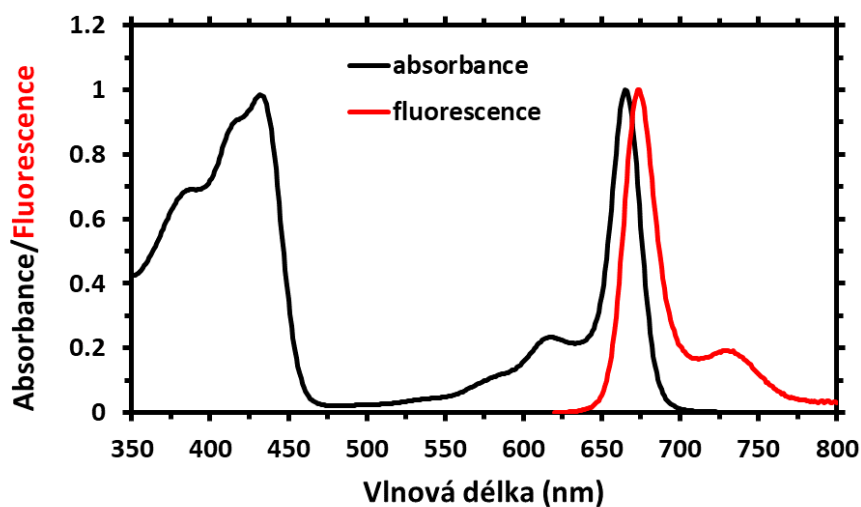
Tabulka 4.3: Doba života fluorescence erythrosinu B v methanolu (excitace 482 nm, detekce 550 nm), τ_1 , τ_2 jsou dílčí komponenty doby života fluorescence a τ_{avg} je průměrná doba života fluorescence.

erythrosin B (MeOH)	τ_1 (ns)	τ_2 (ns)	τ_{avg} (ns)
Naměřené	2,05	0,52	0,52
V literatuře (Boens, a další, 2007)	-	-	0,48

4.3 Chlorofyl *a*

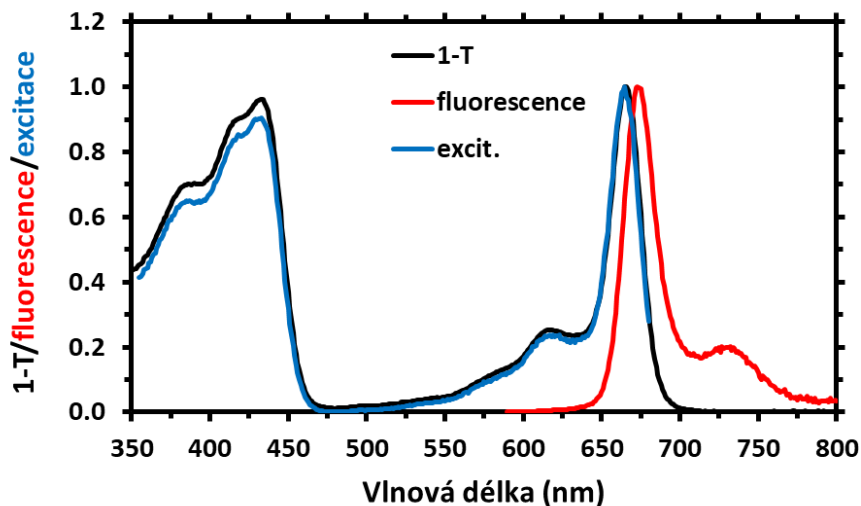
Chlorofyl *a* byl dalším referenčním vzorkem a standardem pro výpočet kvantového výtěžku fluorescence bilinů. Pro chlorofyl *a* bylo změřeno spektrum absorpční, emisní a excitační. Emisní spektrum bylo měřeno s excitační šěrbinou 4 nm, emisní šěrbinou 4 nm a integračním časem 0,5 s. Excitační spektrum bylo měřeno s excitační šěrbinou 2 nm a emisní

štěrbínou 2 nm s integračním časem 0,1 s. Dále byl změřen kvantový výtěžek fluorescence a doba života fluorescence. Absorpční a emisní spektrum je na obrázku 4.8.



Obrázek 4.8: Absorpční spektrum (černě) a emisní spektrum (červeně) chlorofylu *a* v methanolu (excitace 610 nm). Spektra jsou normalizována na maximum signálu *Q* pásu absorpčního spektra. Ramanův rozptyl methanolu by mohl kazit spektrum kolem 739 nm.

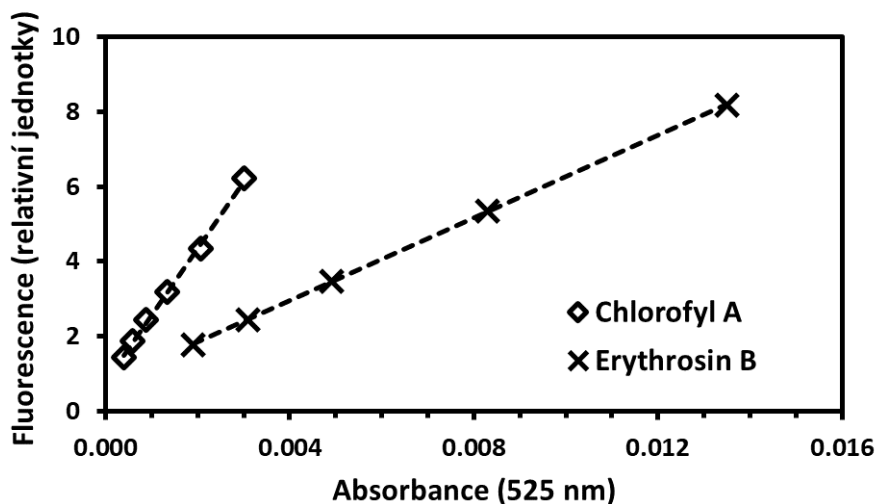
Chlorofyl *a* má dva výrazné absorpční pásy. Soretův pás v oblasti modré a téměř stejně vysoký *Q* pás v oblasti červené. Velmi málo absorbuje v zelené oblasti 500-550 nm. Absorpční maxima mají vlnové délky 432 nm a 665 nm, což odpovídá údajům v literatuře (Jeffrey, a další, 2005). Intenzita maxima *Q* pásu je o asi 4 % vyšší než intenzita maxima Soretova pásu. Fluorescence chlorofylu *a* je v červené oblasti s maximem u 674 nm a s výrazným vibračním ramenem u 728 nm.



Obrázek 4.9: Emisní spektrum (červeně, excitace 580 nm), excitační spektrum (modře, detekce 690 nm) a 1-T (černě) pro chlorofyl *a* v methanolu. Spektra jsou normalizována na maximum signálu v oblasti Q pásu absorpčního spektra. Ramanův rozptyl methanolu by mohl být detekován u 698 nm.

Na obrázku 4.9 je červeně vykresleno emisní spektrum chlorofylu *a* v methanolu, modře excitační spektrum a černě 1-T, kde T je transmitance. Spektra 1-T a excitační jsou tvarově téměř stejná, ale v UV oblasti má excitační spektrum menší intenzitu až o asi 6 %. Maximum 1-T spektra i excitačního spektra je u 665 nm. Pološířka píku excitačního i 1-T spektra v červené oblasti je 23 nm. Maximum fluorescence je u 674 nm s pološířkou 24 nm.

Jako standard kvantového výtěžku pro měření výtěžku chlorofylu *a* byl použit erythrosin B v methanolu. Excitováno bylo u 525 nm. Závislost integrované fluorescence na absorbanci v místě excitace je na obrázku 4.10.



Obrázek 4.10: Graf závislosti integrované fluorescence na absorbanci koncentrační řady erythrosinu B a chlorofylu a k výpočtu kvantového výtěžku fluorescence chlorofylu a.

Pro zjištění kvantového výtěžku chlorofylu *a* byla použita metoda měření kvantového výtěžku pomocí koncentrační řady. Rovnice přímky pro erythrosin B v methanolu na obrázku 4.10 je $y = 551,837x + 0,742$ a $R^2 = 0,9999$. Rovnice přímky pro chlorofyl *a* je $y = 1789,987x + 0,786$ a $R^2 = 0,9979$. Poměr směrnic těchto přímek je 3,24. Naměřený kvantový výtěžek chlorofylu *a* v methanolu je dle vztahu (5) $\Phi = 0,29$. Literatura pro chlorofyl *a* v etheru uvádí $\Phi = 0,32$ (Bowers, a další, 1967).

Změřená doba života fluorescence pro chlorofyl *a* v methanolu v porovnání s publikovanými údaji jsou uvedeny v následující tabulce 4.4. Experimentálně zjištěná doba života je asi o 7 % delší než publikované údaje. Křivka dohasínání fluorescence chlorofylu *a* v methanolu je v příloze (kapitola 9) na obrázku 9.2.

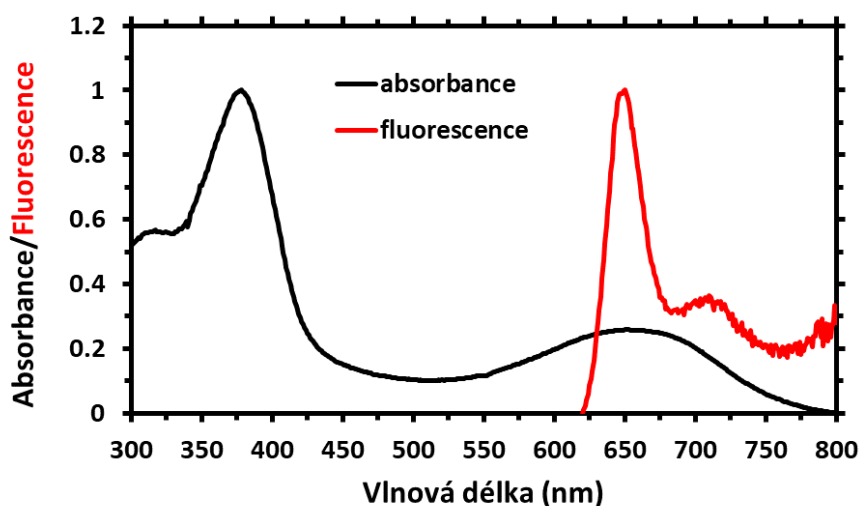
Tabulka 4.4: Doba života fluorescence chlorofylu *a* v methanolu (excitace 482 nm, detekce 672 nm), τ_1 je dílčí komponenta doby života fluorescence a τ_{avg} je průměrná doba života fluorescence.

chlorofyl <i>a</i> (MeOH)	τ_1 (ns)	τ_{avg} (ns)
Naměřené	5,79	5,79
V literatuře (Connolly, a další, 1982)	-	5,44

V literatuře (Bourne-Worster, a další, 2023)	-	5,1
V literatuře (Singhal, a další, 1969)	-	4,9

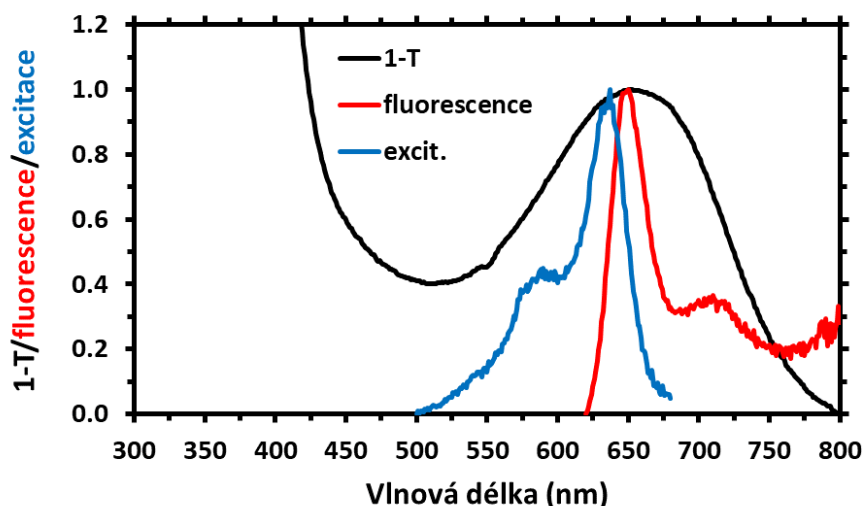
4.4 Biliverdin

Poslední referenční vzorek před měřením bilinů byl biliverdin. U biliverdinu bylo změřeno spektrum absorpční, emisní a excitační. Emisní i excitační spektrum bylo měřeno s excitační šterbinou 4 nm, emisní šterbinou 4 nm a integračním časem 0,5 s. Dále byl změřen kvantový výtěžek fluorescence a doba života fluorescence. Absorpční a emisní spektrum biliverdinu v methanolu je na obrázku 4.11.



Obrázek 4.11: Absorpční spektrum (černě) a emisní spektrum (červeně) čistého biliverdinu v methanolu (excitace 610 nm). Spektra jsou normalizována na maximum signálu. Ramanův rozptyl methanolu by mohl kazit spektrum okolo 739 nm.

Biliverdin má dva výrazné absorpční pásy. Soretův pás je v UV oblasti a částečně zasahuje do fialové, maximum má u 378 nm. Široký Q pás je v oblasti žluté až červené s maximem u 653 nm. Biliverdin výrazněji neabsorbuje v modré až zelené oblasti. Literatura udává podobné hodnoty absorpčních maxim (Petrier, a další, 1979). Q pás má přibližně třetinovou intenzitu Soretova pásu. Fluorescence biliverdinu je v červené oblasti s maximem u 650 nm, což souhlasí s emisním spektrem v literatuře (Holzwarth, a další, 1983). Pík fluorescence je výrazně užší než Q pás absorpčního spektra a neleží blízko červené hrany absorpčního Q pásu.



Obrázek 4.12: Emisní spektrum (červeně, excitace 610 nm), excitační spektrum (modře, detekce 690 nm) a 1-T (černě) pro čistý biliverdin v methanolu. Spektra jsou normalizována na maximum signálu v oblasti Q pásu absorpčního spektra. Ramanův rozptyl methanolu by mohl být detekován u 698 nm.

Na obrázku 4.12 je červeně vykresleno emisní spektrum biliverdinu v methanolu, modře excitační spektrum a černě 1-T, kde T je transmitance. Maximum 1-T spektra je u 653 nm s pološířkou 170 nm. Maximum excitačního spektra je u 639 nm s pološířkou 39 nm. Maximum fluorescence je u 650 nm s pološířkou 34 nm. Výrazná odlišnost spektra 1-T a excitačního spektra byla již dříve popsána v literatuře a interpretována jako důsledek přítomnosti několika konformačních forem biliverdinu v roztoku, z nichž některé mají výrazně vyšší výtěžek fluorescence než jiné (Braslavsky, a další, 1983). Absorpční spektrum je tedy souhrnem spekter různých konformací biliverdinu přítomných v roztoku.

Pro výpočet kvantového výtěžku biliverdinu byla použita metoda měření kvantového výtěžku pomocí koncentrační řady. Jako standard byl kvůli vhodnosti polohy fluorescenčního pásu použit chlorofyl *a* o známém kvantovém výtěžku $\Phi = 0,32$ (Bowers, a další, 1967). Změřený kvantový výtěžek biliverdinu v methanolu je $\Phi = 0,0011$, což je přibližně dvojnásobek hodnoty $\Phi = 0,00057$, uvedené v literatuře (Braslavsky, a další, 1983).

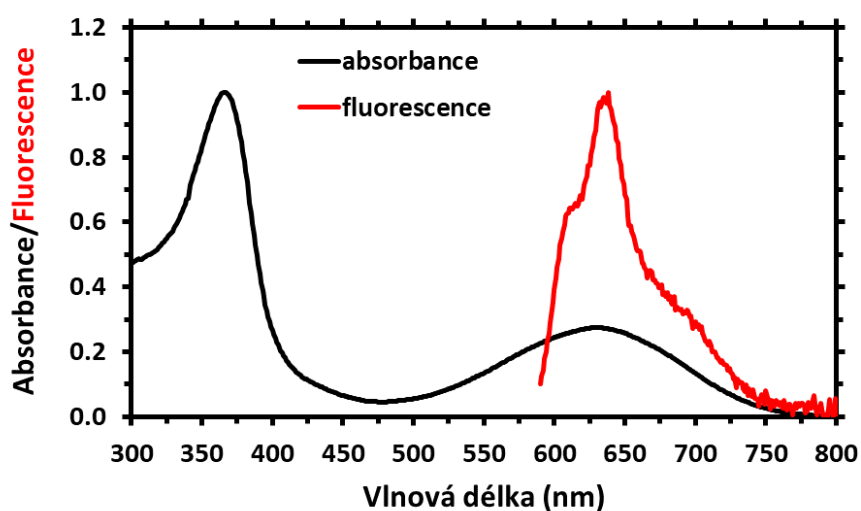
Doba života fluorescence pro biliverdin v methanolu je uvedena v následující tabulce 4.5. Excitováno bylo červeným laserem o vlnové délce 638 nm a detekce byla u 720 nm. V literatuře bylo excitováno 640 nm a detekováno u 710 nm (Holzwarth, a další, 1983). Hodnoty změřené v této práci velmi dobře odpovídají publikovaným údajům. Křivka dohasínání fluorescence biliverdinu v methanolu je v příloze (kapitola 9) na obrázku 9.3.

Tabulka 4.5: Doba života fluorescence biliverdinu v methanolu (excitace 638 nm, detekce 720 nm), τ_1 , τ_2 , τ_3 jsou dílčí komponenty doby života fluorescence a τ_{avg} je průměrná doba života fluorescence.

biliverdin (MeOH)	τ_1 (ns)	τ_2 (ns)	τ_3 (ns)	τ_{avg} (ns)
Naměřené	4,67	0,69	0,09	0,30
V literatuře (Holzwarth, a další, 1983)	4,59	0,63	0,04	-

4.5 Fykocyanobilin

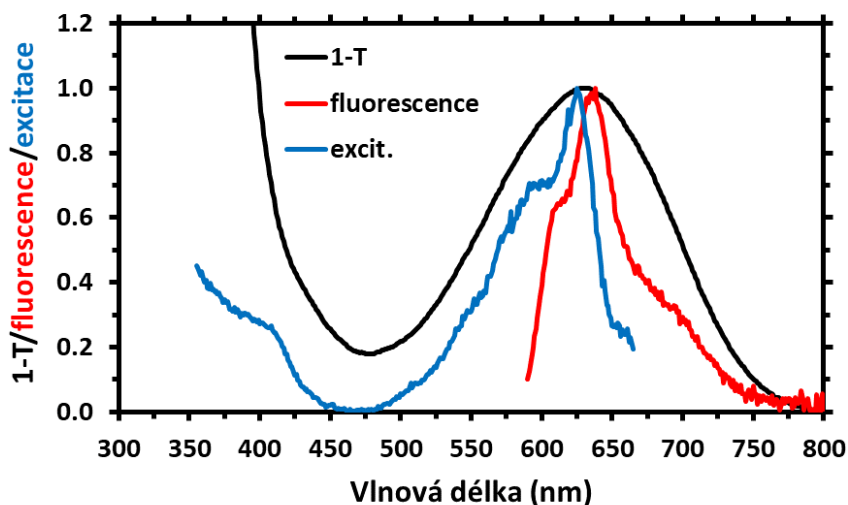
U čistého fykocyanobilinu v methanolu bylo změřeno spektrum absorpční, emisní a excitační. Emisní i excitační spektrum bylo měřeno s excitační štěrbinou 4 nm, emisní štěrbinou 4 nm a integračním časem 0,1 s. Dále byl změřen kvantový výtěžek fluorescence a doba života fluorescence. Absorpční a emisní spektrum čistého fykocyanobilinu je na obrázku 4.13.



Obrázek 4.13: Absorpční spektrum (černě) a emisní spektrum (červeně) čistého fykocyanobilinu v methanolu (excitace 580 nm). Spektra jsou normalizována na maximum signálu. Ramanův rozptyl methanolu by mohl kazit spektrum okolo 698 nm.

Čistý fykocyanobilin má dva výrazné absorpční pásy. Soretův pás je v UV oblasti a částečně zasahuje do fialové, maximum má u 366 nm. Široký Q pás je v oblasti zelené až červené s maximem u 630 nm. Čistý fykocyanobilin výrazněji neabsorbuje v modré oblasti. Q pás má přibližně třetinovou intenzitu Soretova pásu. Fluorescence fykocyanobilinu je

v červené oblasti s maximem u 635 nm. Pík fluorescence je výrazně užší než Q pás absorpčního spektra.



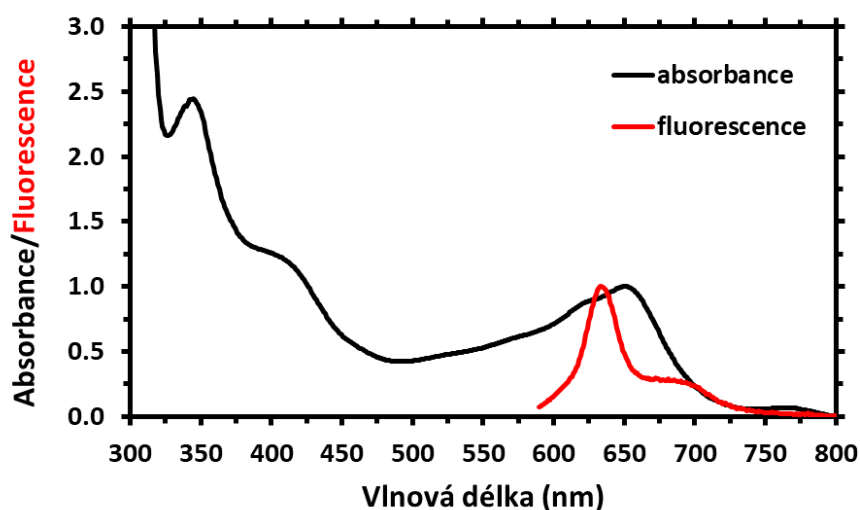
Obrázek 4.14: Emisní spektrum (červeně, excitace 580 nm), excitační spektrum (modře, detekce 680 nm) a 1-T (černě) pro čistý fykocyanobilin v methanolu. Spektra jsou normalizována na maximum signálu v oblasti Q pásu absorpčního spektra. Ramanův rozptyl methanolu by mohl být detekován u 698 nm.

Na obrázku 4.14 je červeně vykresleno emisní spektrum čistého fykocyanobilinu v methanolu, modře excitační spektrum a černě 1-T, kde T je transmittance. Maximum 1-T spektra je u 630 nm s pološířkou 152 nm. Maximum excitačního spektra je u 625 nm s pološířkou 69 nm. Maximum fluorescence je u 635 nm s pološířkou 56 nm. Spektra fykocyanobilinu mají obdobný charakter jako referenční spektra biliverdinu. Opět se zjevně jedná o vzorek s mnoha konformačními formami fykocyanobilinu, z nichž jen některé mají silnější fluorescenci.

Kvantový výtěžek a doba života fluorescence čistého fykocyanobilinu je uvedena v souhrnu výsledků v tabulce 4.7 v kapitole 4.7. Křivka dohasínání fluorescence čistého fykocyanobilinu v methanolu je v příloze (kapitola 9) na obrázku 9.4.

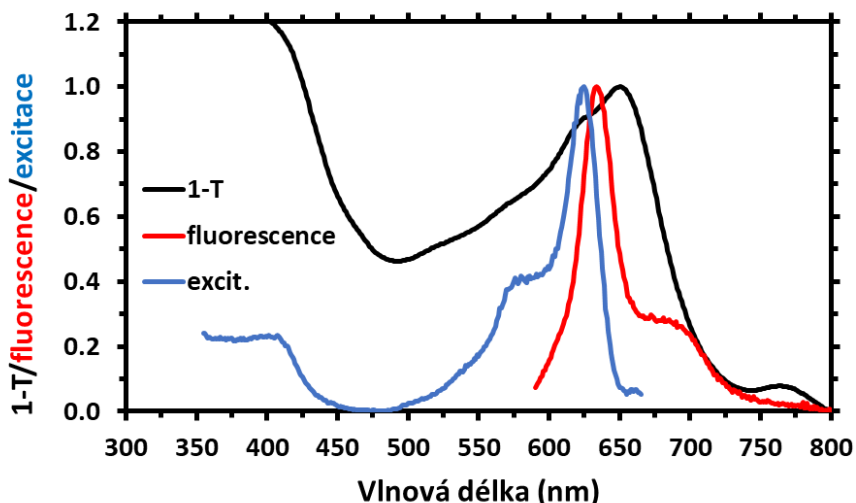
4.6 Fykocyanobilin s kovy

U komplexů fykocyanobilinu s kovy bylo týden po přípravě vzorků změřeno spektrum absorpční, emisní a excitační. Emisní i excitační spektrum bylo měřeno s excitační štěrbinou 4 nm a emisní štěrbinou 4 nm s integračním časem 0,1 s. Výjimkou byl fykocyanobilin se zinkem, kde emisní i excitační spektrum bylo měřeno s excitační štěrbinou 2 nm, emisní štěrbinou 2 nm a integračním časem 0,1 s. Dále byl změřen kvantový výtěžek fluorescence a doba života fluorescence. Přidanými kovy byly zinek, měď, nikl a kobalt. Všechny vzorky byly rozpuštěny v methanolu.



Obrázek 4.15: Absorpční spektrum (černě) a emisní spektrum (červeně) fykocyanobilinu s niklem v methanolu, jeden týden po přípravě vzorku (excitace 580 nm). Spektra jsou normalizována na maximum signálu v oblasti Q pásu absorpčního spektra. Ramanův rozptyl methanolu by mohl být detekován u 698 nm.

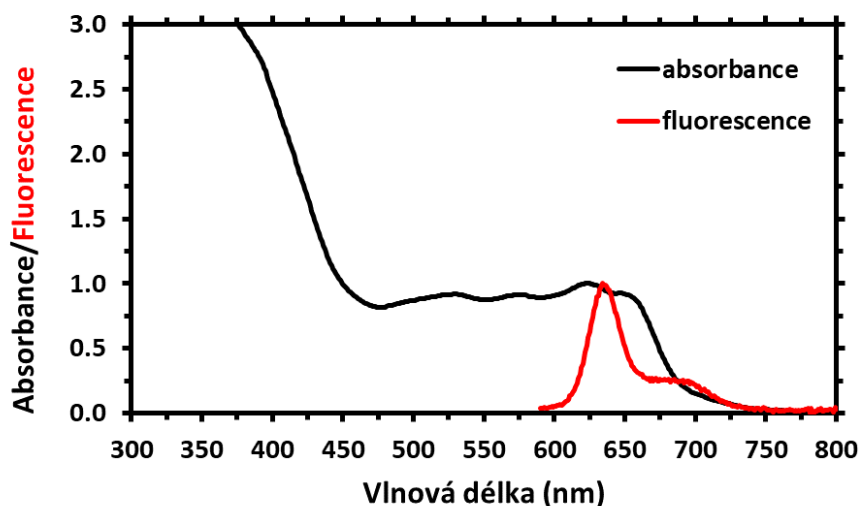
Absorpční spektrum fykocyanobilinu se po přidání niklu výrazně mění (obrázek 4.15). Soretův pás se rozdělil na více menších píků s maximy u 345 nm a kolem 410 nm oproti 366 nm u fykocyanobilinu (obrázek 4.13). Maximum Q pásu se nachází oproti čistému fykocyanobilinu dále v červené oblasti a to u 650 nm. V modré oblasti, kde čistý fykocyanobilin téměř neabsorboval, se zvýšila absorbance. Fluorescence fykocyanobilinu s niklem je stejně jako u čistého fykocyanobilinu v červené oblasti s maximem u 634 nm. Pík fluorescence je výrazně užší než Q pás absorpčního spektra a leží na jeho modré hraně, tedy ve vyšších energiích.



Obrázek 4.16: Emisní spektrum (červeně, excitace 580 nm), excitační spektrum (modře, detekce 680 nm) a 1-T (černě) pro fykocyanobilin s niklem v methanolu, jeden týden po přípravě roztoku. Spektra jsou normalizována na maximum signálu v oblasti Q pásu absorpčního spektra. Ramanův rozptyl methanolu by mohl být detekován u 698 nm.

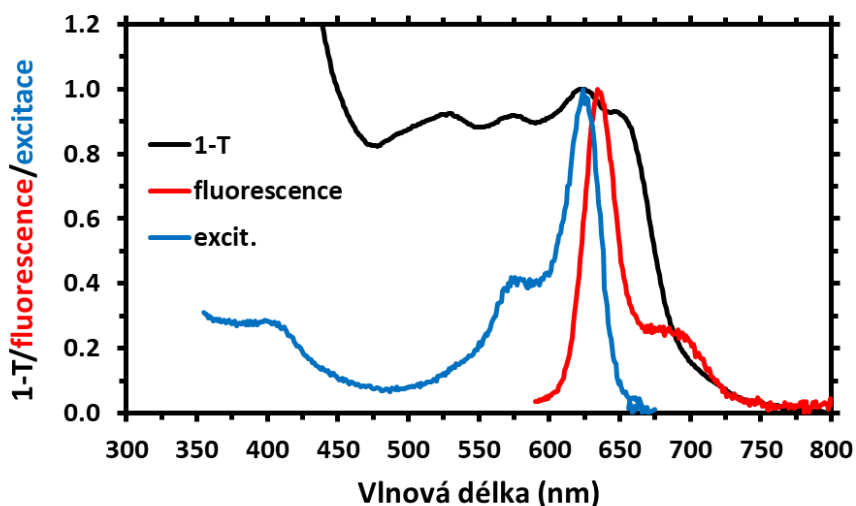
Na obrázku 4.16 je červeně vykresleno emisní spektrum fykocyanobilinu s niklem v methanolu, modře excitační spektrum a černě 1-T, kde T je transmittance. Maximum 1-T spektra je u 651 nm s pološířkou 168 nm. Maximum excitačního spektra je u 625 nm s pološířkou 31 nm. Maximum fluorescence je u 634 nm s pološířkou 30 nm. Ačkoli došlo v absorpčním spektru fykocyanobilinu s niklem k vytvoření zřetelných absorpčních pásů oproti čistému fykocyanobilinu, excitační spektrum neodpovídá tvarově spektru 1-T a nepochází z energeticky nejvyššího přechodu u 651 nm.

Kvantový výtěžek a doba života fluorescence fykocyanobilinu s niklem je uvedena v souhrnu výsledků v tabulce 4.7 v kapitole 4.7. Křivka dohasínání fluorescence fykocyanobilinu s niklem v methanolu je v příloze (kapitola 9) na obrázku 9.5.



Obrázek 4.17: Absorpční spektrum (černě) a emisní spektrum (červeně) fykocyanobilinu s kobaltem v methanolu, jeden týden po přípravě roztoku (excitace 580 nm). Spektra jsou normalizována na maximum signálu v oblasti Q pásu absorpčního spektra. Ramanův rozptyl methanolu by mohl být detekován u 698 nm.

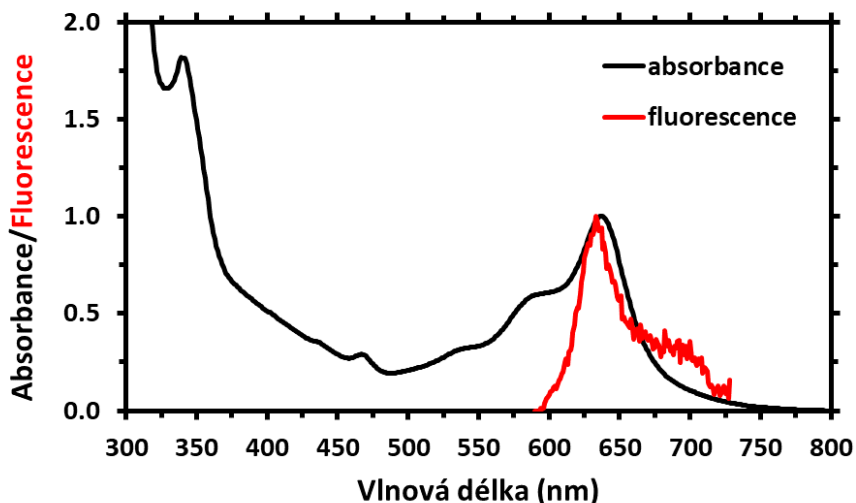
Absorpční spektrum fykocyanobilinu se po přidání kobaltu (obrázek 4.17) mění podobně jako po přidání niklu (obrázek 4.15). Polohu Soretova pásu nelze určit, protože absorbance od Q pásu kontinuálně stoupá se snižující se vlnovou délkou. Q pás se nachází v rozmezí vlnových délek 475 nm až 675 nm a skládá se z několika překrývajících se píků. Vlnová délka maxima největšího píku z této oblasti je u 623 nm, další píky jsou u 529 nm, 575 nm a 647 nm. V modré oblasti fykocyanobilin s kobaltem absorbuje ještě více než fykocyanobilin s niklem. Fluorescence fykocyanobilinu s kobaltem je opět v červené oblasti s maximem u 634 nm. Pík fluorescence je výrazně užší než Q pás absorpčního spektra.



Obrázek 4.18: Emisní spektrum (červeně, excitace 580 nm), excitační spektrum (modře, detekce 680 nm) a 1-T (černě) pro fykocyanobilin s kobaltem v methanolu, jeden týden po přípravě vzorku. Spektra jsou normalizována na maximum signálu v oblasti Q pásu absorpčního spektra. Ramanův rozptyl methanolu by mohl být detekován u 698 nm.

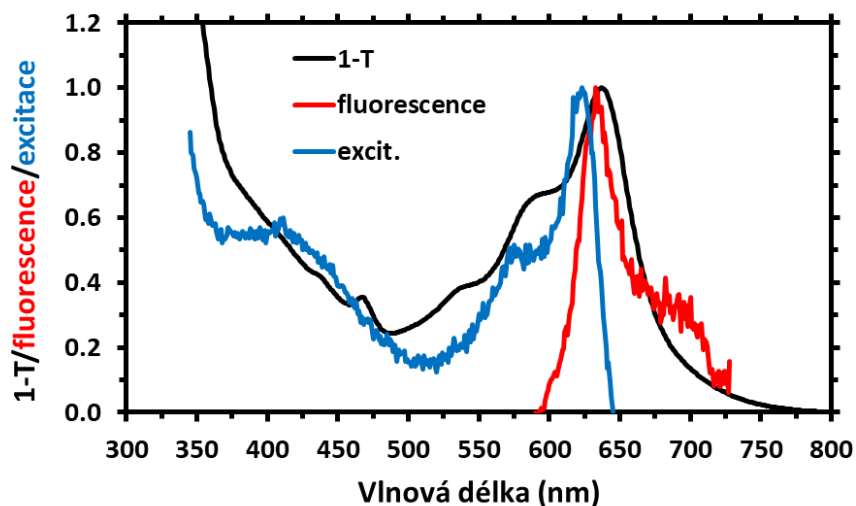
Na obrázku 4.18 je červeně vykresleno emisní spektrum fykocyanobilinu s kobaltem v methanolu, modře excitační spektrum a černě 1-T, kde T je transmitance. Maximum 1-T spektra je nejspíše u 623 nm, pološířku nelze snadno určit, protože spektrum se skládá s několika překrývajícími se píky a nelze řádně rozlišit jednotlivé píky. Maximum excitačního spektra je u 625 nm s pološířkou 33 nm. Maximum fluorescence je u 634 nm s pološířkou 27 nm. Excitační spektrum zřetelně pochází z nejvyššího píku absorpčního spektra a nikoli z píku s nejnižší energií.

Kvantový výtěžek a doba života fluorescence fykocyanobilinu s kobaltem je uvedena v souhrnu výsledků v tabulce 4.7 v kapitole 4.7. Křivka dohasínání fluorescence fykocyanobilinu s kobaltem v methanolu je v příloze (kapitola 9) na obrázku 9.6.



Obrázek 4.19: Absorpční spektrum (černě) a emisní spektrum (červeně) fykocyanobilinu s mědí v methanolu, jeden týden po přípravě vzorku (excitace 580 nm). Spektra jsou normalizována na maximum signálu v oblasti Q pásu absorpčního spektra. Ramanův rozptyl methanolu by mohl být detekován u 698 nm.

Absorpční spektrum fykocyanobilinu s mědí je na obrázku 4.19. V UV oblasti se nachází pík s maximem u 339 nm, dále do UV oblasti absorbance prudce stoupá. Q pás je užší než u čistého fykocyanobilinu a nachází se v červené oblasti s maximem u 637 nm. V modré oblasti téměř neabsorbuje. Fluorescence fykocyanobilinu s mědí je v červené oblasti s maximem u 633 nm a je velmi slabá.

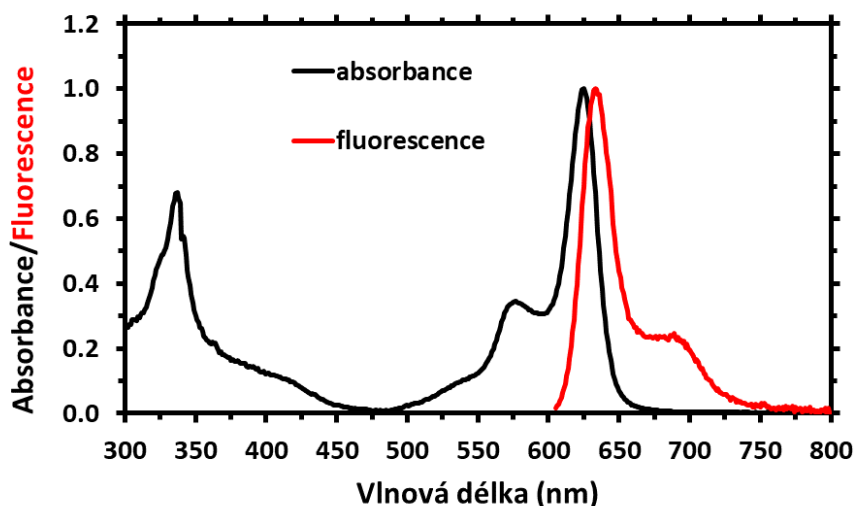


Obrázek 4.20: Emisní spektrum (červeně, excitace 580 nm), excitační spektrum (modře, detekce 680 nm) a 1-T (černě) pro fykocyanobilin s mědí v methanolu, jeden týden po přípravě vzorku. Spektra jsou normalizována na maximum signálu v oblasti

Q pásu absorpčního spektra. Ramanův rozptyl methanolu by mohl být detekován u 698 nm.

Na obrázku 4.20 je červeně vykresleno emisní spektrum fykocyanobilinu s mědí v methanolu, modře excitační spektrum a černě 1-T, kde T je transmittance. Maximum 1-T spektra je u 637 nm s pološířkou 96 nm. Maximum excitačního spektra je u 623 nm s pološířkou 43 nm a je významně odlišné od maxima absorbance, směrem do modré části spektra. Maximum fluorescence je u 633 nm s pološířkou 33 nm, leží tedy na kratší vlnové délce než maximum absorpce. V tomto případě jsou si absorpční a excitační spektra poměrně podobná, ale je zřejmé, že i zde fluorescence detekuje jen malou část molekul ve vzorku.

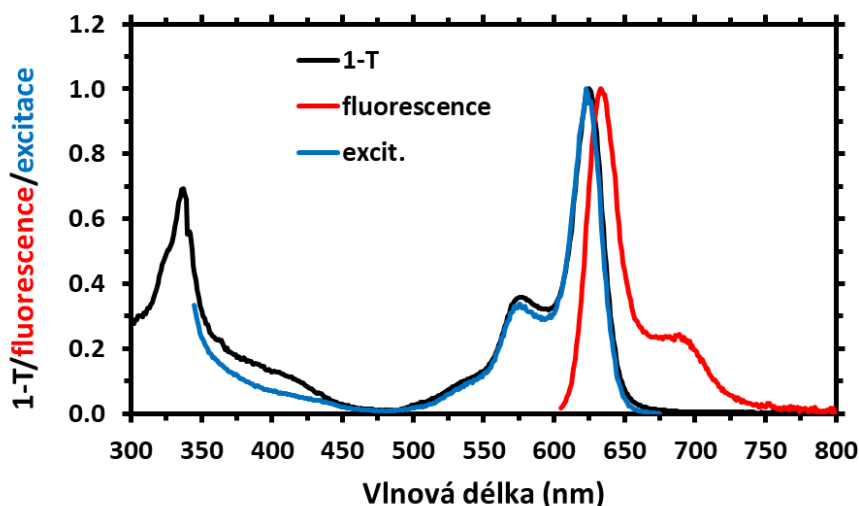
Kvantový výtěžek a doba života fluorescence fykocyanobilinu s mědí je uvedena v souhrnu výsledků v tabulce 4.7 v kapitole 4.7. Křivka dohasínání fluorescence fykocyanobilinu s mědí v methanolu je v příloze (kapitola 9) na obrázku 9.7.



Obrázek 4.21: Absorpční spektrum (černě) a emisní spektrum (červeně) fykocyanobilinu se zinkem v methanolu, jeden týden po přípravě vzorku (excitace 600 nm). Spektra jsou normalizována na maximum signálu v oblasti Q pásu absorpčního spektra. Ramanův rozptyl methanolu by mohl být detekován u 725 nm.

Absorpční spektrum fykocyanobilinu se zinkem je na obrázku 4.21. Soretův pás je v UV oblasti s maximem u 337 nm a je výrazně užší než u čistého fykocyanobilinu. Soretův pás fykocyanobilinu se zinkem má v porovnání s čistým fykocyanobilinem přibližně o 25 % nižší intenzitu. Q pás je výrazně užší než u čistého fykocyanobilinu a je i užší než u fykocyanobilinu s mědí, kobaltem, nebo niklem. U fykocyanobilinu se zinkem má Q pás větší intenzitu než pás Soretův, což je naopak než u čistého fykocyanobilinu i ostatních

komplexů s kovy. Q pás se nachází v oranžové až červené oblasti a tvoří ho dva výrazné píky. Hlavní pík má maximum u 624 nm, vibronický pík má maximum u 577 nm. V modré oblasti tento vzorek neabsorbuje. Fluorescence fykocyanobilinu se zinkem je v červené oblasti s maximum u 633 nm. Pík fluorescence je stejně široký jako Q pás absorpčního spektra a to 25 nm. V porovnání s ostatními vzorky s kovy a s čistým fykocyanobilinem je fluorescence fykocyanobilinu se zinkem výrazně silnější.



Obrázek 4.22: Emisní spektrum (červeně, excitace 600 nm), excitační spektrum (modře, detekce 680 nm) a 1-T (černě) pro fykocyanobilin se zinkem v methanolu, jeden týden po přípravě vzorku. Spektra jsou normalizována na maximum signálu v oblasti Q pásu absorpčního spektra. Ramanův rozptyl methanolu by mohl být detekován u 725 nm.

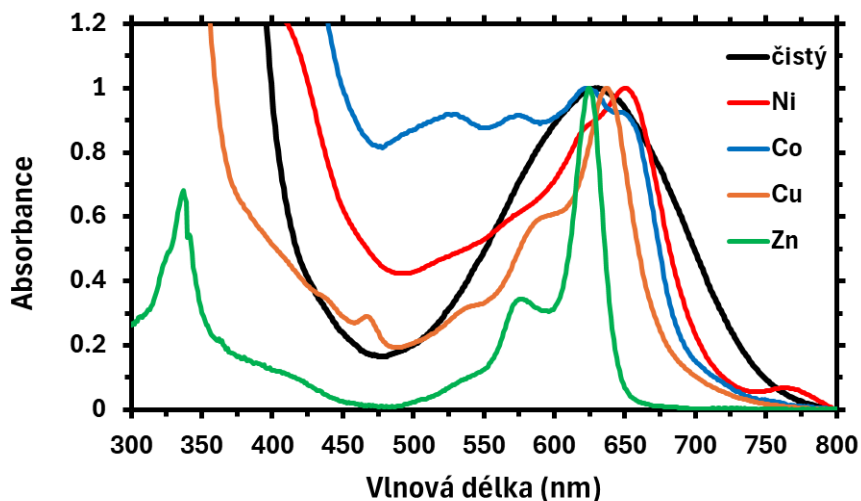
Na obrázku 4.22 je červeně vykresleno emisní spektrum fykocyanobilinu se zinkem v methanolu, modře excitační spektrum a černě 1-T, kde T je transmitance. Spektra 1-T a excitační jsou tvarově stejné, ale ve fialové oblasti má excitační spektrum asi o 5 % menší intenzitu než spektrum 1-T. Maximum 1-T spektra i excitačního spektra je u 624 nm. Pološířka píku excitačního i 1-T spektra v oranžové oblasti je 25 nm. Maximum fluorescence je u 633 nm s pološířkou 26 nm. Tento vzorek je tedy v kontrastu s ostatními spektroskopicky poměrně homogenní a spektra v obrázku 4.22 charakterem silně připomínají např. spektra chlorofylu *a* (obrázek 4.9).

Kvantový výtěžek a doba života fluorescence fykocyanobilinu se zinkem je uvedena v souhrnu výsledků v tabulce 4.7 v kapitole 4.7. Křivka dohasínání fluorescence fykocyanobilinu se zinkem v methanolu je v příloze (kapitola 9) na obrázku 9.8.

4.7 Souhrn výsledků pro fykocyanobilin s kovy

V této kapitole jsou shrnuté výsledky referenčních vzorků, erythrosinu B, chlorofylu *a*, biliverdinu, a fykocyanobilinu s kovy.

Absorpční spektra fykocyanobilinu s kovy byla pro souhrnný pohled vykreslena do jednoho grafu na následujícím obrázku 4.23.



Obrázek 4.23: Absorpční spektra fykocyanobilinu s kovy v methanolu týden po přípravě vzorků. Vzorky jsou identifikovány v legendě grafu, černě je čistý fykocyanobilin, červeně fykocyanobilin s niklem, modře s kobaltem, oranžově s mědí a zeleně se zinkem. Spektra jsou normalizována na maximum signálu v oblasti Q pásu absorpčního spektra.

Po přidání kovu se výrazně mění tvar absorpčního spektra a pološířka Q pásu. Nejmenší pološířku lze pozorovat u fykocyanobilinu se zinkem a to 25 nm. Největší pološířku vykazuje vzorek s kobaltem, protože jeho absorpční spektrum se skládá s několika překrývajícími se píky, které od sebe nelze jednoznačně odlišit. Mimo kobalt by největší pološířku měl fykocyanobilin s niklem a to 168 nm, další je čistý fykocyanobilin s pološířkou 152 nm a fykocyanobilin s mědí s pološířkou 96 nm.

Polohy a pološířky Q pásů referenčních vzorků a fykocyanobilinu s kovy jsou souhrnně zapsány v tabulce 4.6.

Tabulka 4.6: Souhrnný přehled polohy maxima a pološířky Q pásu, fluorescence a excitace pro referenční vzorky, biliverdin, erythrosinu B a chlorofylu a vše v methanolu, a pro fykocyanobilin s různými kovy v methanolu týden po přípravě vzorků.

	Q pás		Excitace		Fluorescence	
	Poloha (nm)	Pološířka (nm)	Poloha (nm)	Pološířka (nm)	Poloha (nm)	Pološířka (nm)
biliverdin	653	170	639	39	650	34
chlorofyl a	665	23	665	23	674	24
erythrosin B	532	29	531	29	549	35
čistý fcb	630	152	625	69	635	56
fcb + Ni	650	168	625	31	634	30
fcb + Co	623 ⁶	- ⁷	625	33	634	27
fcb + Cu	637	96	623	43	633	33
fcb + Zn	624	25	624	25	633	26

Pro výpočet kvantového výtěžku fluorescence vzorků fykocyanobilinu byl jako standard použit chlorofyl *a* o známém kvantovém výtěžku $\Phi = 0,32$ (Bowers, a další, 1967). Doby života a kvantové výtěžky fluorescence referenčních vzorků a fykocyanobilinu s kovy jsou souhrnně zapsány v tabulce 4.7. Polohy excitace a detekce při měření doby života jednotlivých vzorků jsou uvedeny v tabulce 4.8.

⁶ Jedná se pouze o odhad nejpravděpodobnější polohy maxima, neboť nelze snadno určit, kde se maximum nachází z důvodu několika překrývajících se píků.

⁷ Nelze určit pološířku z důvodu několika překrývajících se píků tvořících roztáhlé spektrum.

Tabulka 4.7: Souhrnný přehled naměřených kvantových výtěžků Φ a dob života fluorescence pro referenční vzorky biliverdin, erythrosinu B, chlorofylu a vše v methanolu, a pro fykocyanobilin s různými kovy v methanolu týden po přípravě vzorků. τ_1 , τ_2 , τ_3 jsou dílčí komponenty doby života fluorescence a τ_{avg} je průměrná doba života fluorescence.

	τ_1 (ns)	τ_2 (ns)	τ_3 (ns)	τ_{avg} (ns)	Φ
biliverdin	4,67	0,69	0,09	0,30	0,0011
chlorofyl a	5,79	-	-	5,79	0,29
erythrosin B	2,05	0,52	-	0,52	0,075
čistý fcb	6,36	3,37	0,93	2,72	0,0042
fcb + Ni	7,06	5,71	4,05	5,46	0,0058
fcb + Co	8,27	5,06	0,22	4,17	0,0042
fcb + Cu	6,59	3,45	0,34	3,37	0,0003
fcb + Zn	7,35	4,89	-	5,74	0,5360

Tabulka 4.8: Souhrnný přehled polohy excitace a detekce při měření dob života fluorescence referenčních vzorků, erythrosinu B, chlorofylu a, biliverdinu, a fykocyanobilinu s kovy, vše v methanolu.

	Excitace (nm)	Detekce (nm)
biliverdin	638	720
chlorofyl a	482	672
erythrosin B	482	550
čistý fcb	638	700
fcb + Ni	638	700
fcb + Co	638	700
fcb + Cu	638	700
fcb + Zn	482	690

5 Diskuze

Před měřením na necharakterizovaných fykobilinech byly metody otestovány na referenčních vzorcích erythrosinu B a chlorofylu *a*. Experimentální data kvantových výtěžků erythrosinu B a chlorofylu *a* vykazovala odchylku od publikovaných údajů přibližně 10-20 %. Doby života fluorescence byly změřeny s odchylkou pod 10 %. Změřené polohy absorpčních a fluorescenčních pásů obou barviv odpovídaly literatuře s odchylkou menší než 1 nm. Menší přesnost měření kvantových výtěžků fluorescence byla nejspíše způsobena nepřesností při měření absorbancí velmi zředěných vzorků, které jsou nezbytné pro přesné stanovení intenzity fluorescence. Další vliv mohlo mít odpařování rozpouštědla (methanolu) a s tím související změna koncentrace v průběhu přípravy vzorku a experimentu (Seely a Connolly, 1986).

Excitační spektrum biliverdinu se významně liší od absorpčního spektra a jeho křivka dohasínání obsahuje tři komponenty. To již bylo dříve vysvětleno přítomností různých molekulárních forem v základním stavu (Holzwarth, a další, 1983). Nízký kvantový výtěžek fluorescence biliverdinu, pod 0,1 %, byl vysvětlen nezářivou relaxací excitovaných stavů umožněnou konformačními změnami molekuly a procesy přenosu protonů. Komponenta s přes 4 ns dlouhou dobou života je důkazem přítomnosti relativně rigidní konformace biliverdinu (Holzwarth, a další, 1983).

Stejným způsobem lze vysvětlit fluorescenční vlastnosti fykocyanobilinu, protože se jedná o chemicky obdobné látky. Doba života fluorescence fykocyanobilinu změřená v této práci byla výrazně delší než doba života biliverdinu, čemuž odpovídá i kvantový výtěžek. Je možné, že roztok fykocyanobilinu obsahuje větší množství stabilních konformací. Vzhledem k velmi nízkému kvantovému výtěžku fluorescence fykocyanobilinu oproti chlorofylu *a* není fykocyanobilin vhodný k přímému využití pro sběr energie světla ve fotosyntéze. V přírodních systémech jsou fykobiliny vázány na proteinové komplexy, které významně mění jejich vlastnosti. Tyto změny způsobí prodloužení doby života a tím zvýší účinnost přenosu energie (Scheer, a další, 2003).

Na základě naměřených fluorescenčních vlastností fykocyanobilinu s navázanými atomy kovů je možné vzorky rozdělit na dvě skupiny. První skupina s obdobnými vlastnostmi jako volný fykocyanobilin, do které patří komplexy s mědí, kobaltem a niklem. A druhá skupina s vlastnostmi podobným chlorofylu *a*, které splňuje komplex fykocyanobilinu se zinkem. Ačkoliv došlo ve všech případech k zúžení Q pásu absorpčních spekter, vzorky první skupiny měly pouze malou podobnost absorpčních a excitačních spekter. Vzorky tedy obsahovaly více spektrálních forem, z nichž některé měly silnější měřitelnou fluorescenci. Všechny vzorky z první skupiny měly také nízký kvantový výtěžek fluorescence a to pod 1 %.

Všechny vzorky ale měly relativně úzký fluorescenční pás s pološírkami podobnými erythrosinu B a chlorofylu *a*. Změřené doby života fluorescence byly relativně dlouhé, mezi 2,7 a 5,5 ns, v porovnání s krátkou dobou života fluorescence biliverdinu 0,3 ns. U chlorofylů je známé, že komplexy s kovy, jako je nikl, kobalt a měď, mají vysokou pravděpodobnost vnitřní konverze (nezářivé relaxace), což vede k výraznému zkrácení doby života excitovaného stavu, a i ke snížení kvantového výtěžku fluorescence (Scheer, a další, 2003). V této práci tedy existuje určitý konflikt mezi naměřenými kvantovými výtěžky a dobou života fluorescence. Nelze vyloučit, vzhledem k velmi nízkým intenzitám fluorescence analyzovaných vzorků, že nedošlo k nějaké kontaminaci malým množstvím příměsí s vyšší intenzitou fluorescence, delší dobou života a vyšším kvantovým výtěžkem fluorescence. Týden trvající příprava vzorků mohla také ovlivnit výsledky měření, protože mohlo dojít k znečištění nebo rozpadu vzorků. Zmínky o nestabilitě izolovaných bilinů jsou k nalezení v literatuře (Scheer, a další, 2003). Dalším faktorem ovlivňující přesnost měření mohla být volba standardu – chlorofylu *a*, kde byl velký rozdíl mezi kvantovými výtěžky fluorescence standardu a vzorků. Přesnější výsledky měření by mohla přinést volba lepšího, vzorkům podobnějšího standardu, kterým by mohl být biliverdin, minimálně pro komplexy fykocyanobilinu s kovy z první skupiny s vlastnostmi podobnými volnému fykocyanobilinu. Bylo by tedy vhodné provést experimenty vícekrát a vzorky lépe charakterizovat. (Vomáčková, 2024)

Absorpční a excitační spektrum komplexu fykocyanobilinu se zinkem se tvarem dobře shodovalo. Vyznačoval se také úzkým emisním pásem, dlouhou dobou života a velkým kvantovým výtěžkem přes 50 %, dokonce větším než chlorofyl *a* s výtěžkem 32 % (Bowers, a další, 1967). Kvantový výtěžek fykocyanobilinu se zinkem byl o dva řády vyšší než kvantový výtěžek komplexů fykocyanobilinu s jinými kovy. Jedná se zřejmě o molekulu s rigidní strukturou, která by mohla mít podobnou konfiguraci jako komplex lineárního fylobilinu se zinkem, který má silnou fluorescenci (Li, a další, 2014). U chlorofylů je známo, že silnou fluorescenci mají jen komplexy s hořčíkem a zinkem (Grimm, a další, 2006).

Pro dobrou účinnost přenosu energie v přírodních i umělých světlosběrných systémech jsou nutné vhodné molekuly a to takové, které mají dlouhou dobu života a vysoký kvantový výtěžek fluorescence (Ruban, a další, 2011). Komplex fykocyanobilinu se zinkem tyto vlastnosti splňuje a mohl by tak být dobrým kandidátem pro budoucí experimenty.

6 Závěr

V první části práce byla změřena absorpční, emisní a excitační spektra referenčních vzorků a to biliverdinu, erythrosinu B a chlorofylu *a*. Dále byl u referenčních vzorků změřen kvantový výtěžek fluorescence a doba života fluorescence. Výsledky těchto měření byly srovnány s literaturou. Absorpční a emisní spektra a jejich maxima odpovídala publikacím s odchylkou menší než 2 nm. U erythrosinu B a chlorofylu *a* byla odchylka naměřených kvantových výtěžků od publikovaných hodnot 10-20 %. Doby života erythrosinu B a biliverdinu velmi dobře odpovídaly publikacím. Doba života chlorofylu *a* byla změřena s chybou necelých 7 %.

V další části byla změřena a popsána absorpční, emisní a excitační spektra fykocyanobilinu a jeho komplexů s kovy. Bylo zjištěno, že přidáním kovu se mění absorpční i fluorescenční vlastnosti a tím i spektra fykocyanobilinu. Největší změna fluorescenčních vlastností byla zaznamenána u fykocyanobilinu se zinkem, kde přidáním zinku vzrostl kvantový výtěžek fluorescence oproti čistému fykocyanobilinu více než 100krát a měl tak dokonce vyšší kvantový výtěžek než chlorofyl *a*. Došlo také ke změně pološířky Q pásu absorpčního spektra. Největší změna nastala opět u fykocyanobilinu se zinkem, jehož pološířka Q pásu absorpčního spektra je 25 nm oproti 152 nm u čistého fykocyanobilinu. Přidáním kovu se také prodloužila doba života fluorescence.

Fykocyanobilin se zinkem by mohl být vhodný k další podrobné analýze vzhledem k jeho vysokému kvantovému výtěžku a dlouhé době života fluorescence, což by mohlo znamenat i dobrou účinnost v systémech umělé fotosyntézy. Případně by bylo možné vyzkoušet, jestli by s jinými kovy vznikly komplexy vykazující podobné vlastnosti jako fykocyanobilin se zinkem.

7 Seznam literatury

1. ATKINS, Peter William; DE PAULA, Julio; KEELER, James. *Atkins' physical chemistry*. Oxford University Press, 2023.
2. BLANKENSHIP, Robert E. *Molecular mechanisms of photosynthesis*. John Wiley & Sons, 2021, ISBN: 978-1-119-80001-9.
3. BOENS, Noël, et al. Fluorescence lifetime standards for time and frequency domain fluorescence spectroscopy. *Analytical chemistry*, 2007, 79.5: 2137-2149.
4. BOURNE-WORSTER, Susannah; FEIGHAN, Oliver; MANBY, Frederick R. Charge transfer as a mechanism for chlorophyll fluorescence concentration quenching. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2023, 120.5: e2210811120.
5. BOWERS, P. G.; PORTER, George. Quantum yields of triplet formation in solutions of chlorophyll. *Proceedings of the Royal Society of London. Series A. Mathematical and Physical Sciences*, 1967, 296.1447: 435-441.
6. BRASLAVSKY, Silvia E.; HOLZWARTH, Alfred R.; SCHAFFNER, Kurt. Solution conformations, photophysics, and photochemistry of bile pigments; bilirubin and biliverdin, dimethyl esters and related linear tetrapyrroles. *Angewandte Chemie International Edition in English*, 1983, 22.9: 656-674.
7. BROUWER, Albert M. Standards for photoluminescence quantum yield measurements in solution (IUPAC Technical Report). *Pure and Applied Chemistry*, 2011, 83.12: 2213-2228.
8. CONNOLLY, John S.; JANZEN, A. Frederick; SAMUEL, Edward B. Fluorescence lifetimes of chlorophyll a: solvent, concentration and oxygen dependence. *Photochemistry and photobiology*, 1982, 36.5: 559-563.
9. EMIN, Adil; HUSHUR, Anwar; MAMTIMIN, Tursunay. Raman study of mixed solutions of methanol and ethanol. *AIP Advances*, 2020, 10.6.
10. FERRARO, John R. *Introductory raman spectroscopy*. Elsevier, 2003. ISBN 978-0-12-254105-6
11. FIŠEROVÁ, Eva; KUBALA, Martin. Mean fluorescence lifetime and its error. *Journal of Luminescence*, 2012, 132.8: 2059-2064.
12. GALLAGHER, D. J.; GDULA, W. G. *The measurement and application of the quantum yield of solar cells using a filter technique*, Goddard Space Flight Center
13. Greenbelt, Maryland, 1965.
14. HALE, George M.; QUERRY, Marvin R. Optical constants of water in the 200-nm to 200- μm wavelength region. *Applied Optics*, 1973, 12.3: 555-563.

15. HICKSTEIN, Daniel D., et al. Rapid, accurate, and precise concentration measurements of a methanol–water mixture using Raman spectroscopy. *OSA Continuum*, 2018, 1.3: 1097-1110.
16. HOLZWARTH, Alfre D., et al. Picosecond kinetics of excited state relaxation in biliverdin dimethyl ester. *Israel Journal of Chemistry*, 1983, 23.2: 223-231.
17. JEFFREY SW, MANTOURA RFC, WRIGHT SW Phytoplankton pigments in oceanography: guidelines to modern methods. Monographs on oceanographic methodology, vol 10, 2nd edn. UNESCO Publishing, Paris
18. LAKOWICZ, Joseph R. (ed.). *Principles of fluorescence spectroscopy*. Boston, MA: springer US, 2006.
19. LAWSON-WOOD, Kathryn; EVANS, Kieran; SEER GREEN, U. K. Determination of Quinine in Tonic Water Using Fluorescence Spectroscopy. *Application Note: Fluorescence Spectroscopy*, 2019
20. LI, Chengjie, et al. Blue transition metal complexes of a natural bilin-type chlorophyll catabolite. *Chemical Science*, 2014, 5.9: 3388-3395.
21. MALINA, Tomáš. Artificial light-harvesting antenna based on an aggregation of bacteriochlorophyll c with selected pigments. 2020.
22. MOUTZOURIS, Konstantinos, et al. Refractive, dispersive and thermo-optic properties of twelve organic solvents in the visible and near-infrared. *Applied Physics B*, 2014, 116: 617-622.
23. OZDEMIR, Tuba, et al. The evaluation of spectral transmittance of optical eye-lenses. *Optik*, 2016, 127.4: 2062-2068.
24. PELANT, Ivan a VALENTA, Jan. *Luminiscenční spektroskopie*. Praha: Academia, 2006. ISBN 80-200-1447-0.
25. PETRIER, C., et al. Studies on tetrapyrrols pigments—I. Absorption and fluorescence of biliverdin dimethyl esters of the IX series. *Photochemistry and Photobiology*, 1979, 29.2: 389-392.
26. PROSSER, Václav. *Experimentální metody biofyziky*. Praha: Academia, 1989. ISBN 80-200-0059-3.
27. RUBAN, Alexander V.; JOHNSON, Matthew P.; DUFFY, Christopher DP. Natural light harvesting: principles and environmental trends. *Energy & Environmental Science*, 2011, 4.5: 1643-1650.
28. SEELY, G. R.; CONNOLLY, J. S. *Light Emission by Plants and Bacteria*, Academic Press, 1986.

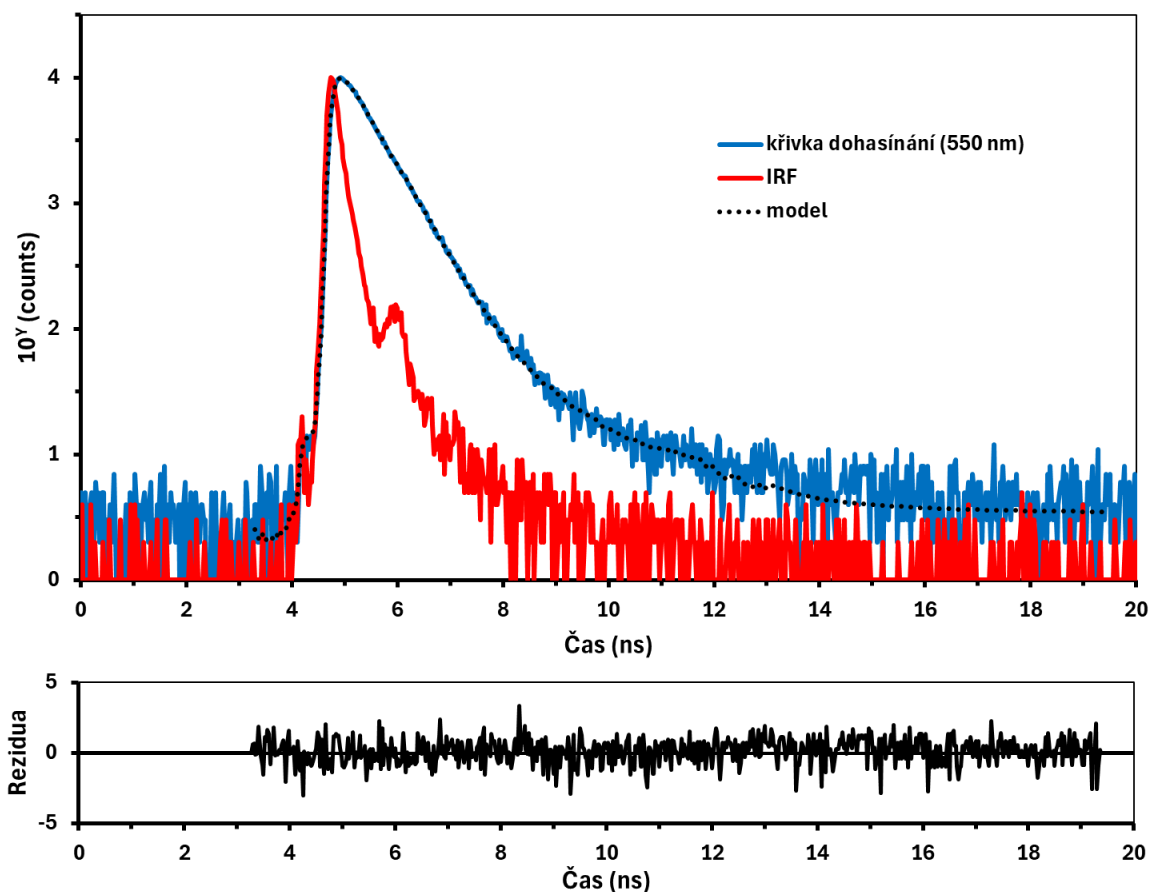
29. GRIMM, Bernhard, PORRA, Robert J., RÜDIGER, Wolfhart, SCHEER, Hugo. An overview of chlorophylls and bacteriochlorophylls: biochemistry, biophysics, functions and applications In *Chlorophylls and bacteriochlorophylls: biochemistry, biophysics, functions and applications*, Springer, 2006.
30. SCHEER, Hugo, GREEN, Beverley, PARSON, William W. The pigments. In: *Light-harvesting antennas in photosynthesis*, Springer, Dordrecht, Netherlands, 2003.
31. SINGHAL, G. S.; RABINOWITCH, E. Measurement of the fluorescence lifetime of chlorophyll a in vivo. *Biophysical Journal*, 1969, 9.4: 586-591.
32. SKILLMAN, John B. Quantum yield variation across the three pathways of photosynthesis: not yet out of the dark. *Journal of experimental botany*, 2008, 59.7: 1647-1661.
33. SUN, Qiang. The Raman OH stretching bands of liquid water. *Vibrational Spectroscopy*, 2009, 51.2: 213-217.
34. TANIGUCHI, Masahiko; LINDSEY, Jonathan S. Absorption and fluorescence spectra of open-chain tetrapyrrole pigments–bilirubins, biliverdins, phycobilins, and synthetic analogues. *Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews*, 2023, 100585.
35. VOMÁČKOVÁ, H., 2024: Vazba iontů kovů na fykocyanobilin a jeho estery. [Binding of metal ions to phycocyanobilin and its esters. Mgr. Thesis, in Czech.], Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.
36. WAHL, Michael. Time-correlated photon counting instrumentation for time-resolved photoluminescence measurement on semiconductor surfaces. In: *Ultrafast Phenomena in Semiconductors V*. SPIE, 2001. p. 166-173.
37. WALRAFEN, G. E. Raman spectral studies of the effects of temperature on water structure. *The Journal of Chemical Physics*, 1967, 47.1: 114-126.
38. ZHAO, Kai-Hong, PORRA Robert J., SCHEER Hugo: Phycobiliproteins, In *Handbook of Porphyrin Science*, World Scientific Publishing Company, 2012, Volume 22: 1-66.

8 Seznam použitých symbolů a zkratek

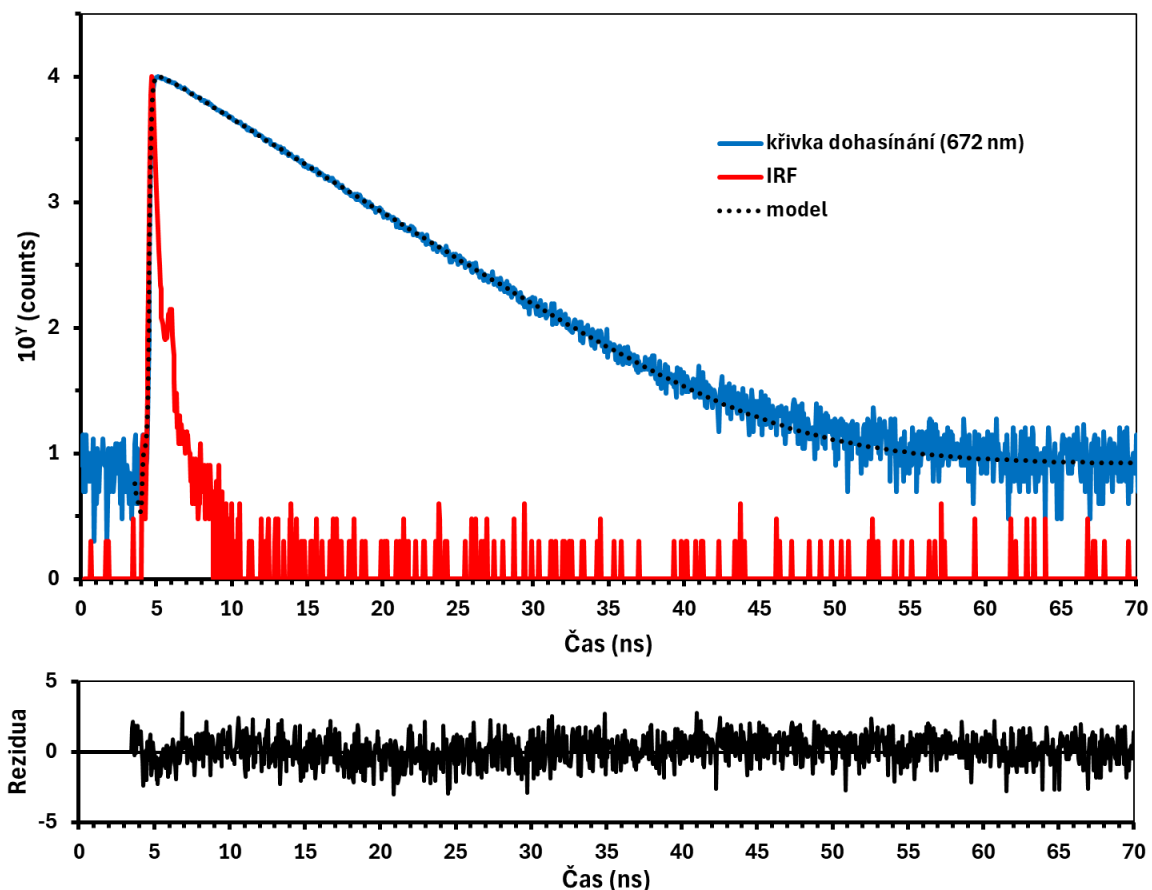
H ₂ O	voda
MeOH	methanol
Ni	nikl
Co	kobalt
Cu	měď
Zn	zinek
fc _b	fykocyanobilin
τ	doba života fluorescence
Φ	kvantový výtěžek fluorescence
IRF	Instrument Response Function, česky: funkce odezvy přístroje
FWHM	Full Width at Half Maximum, česky: pološířka

9 Přílohy

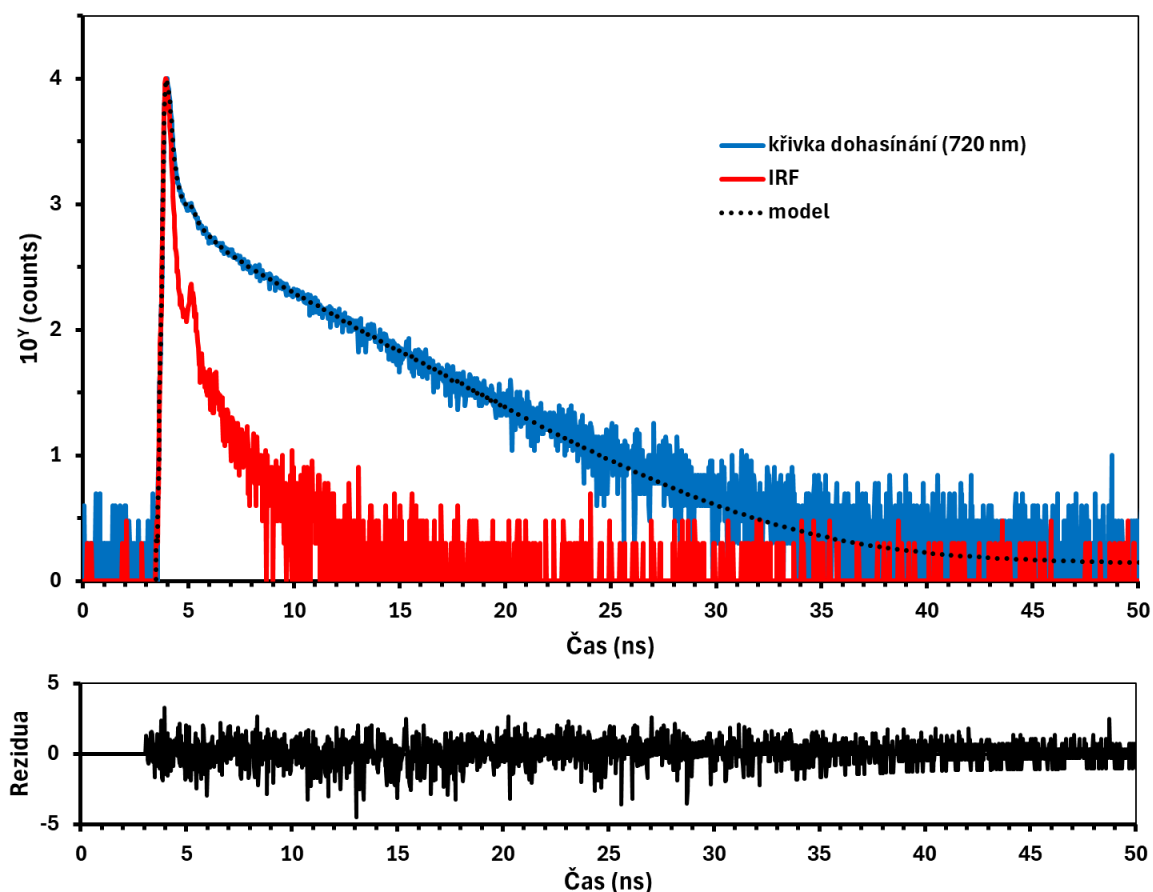
V následujících obrázcích jsou křivky dohasínání fluorescence referenčních vzorků, chlorofylu *a*, erythrosinu B, biliverdinu, a dále fykocyanobilinu a jeho komplexů s kovy, které jsou popsány ve výsledcích v kapitole 4.



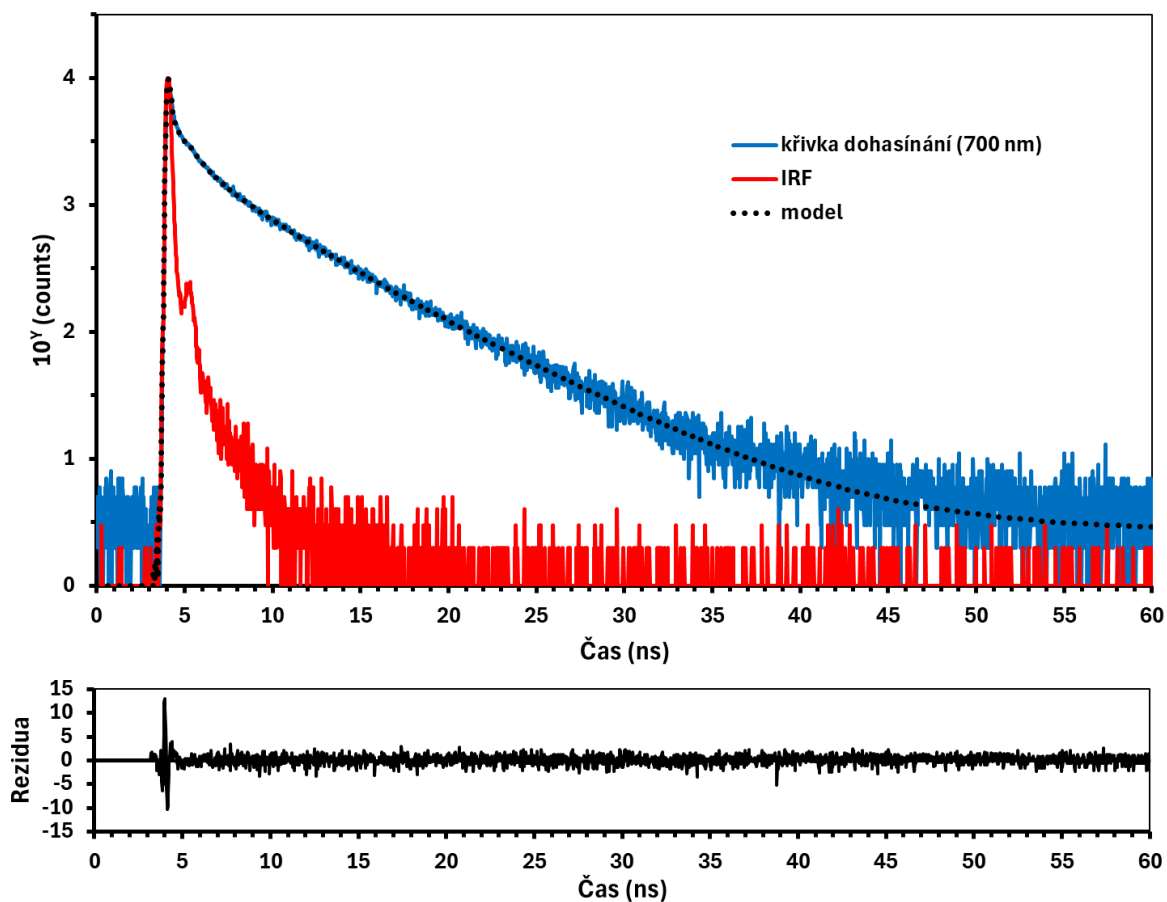
Obrázek 9.1: Křivka dohasínání fluorescence (modře), IRF-funkce odezvy přístroje (červeně), křivka modelu (černě tečkovaně) a rezidua (černě, dole) erythrosinu **B** v methanolu. Excitováno modrým laserem o vlnové délce 482 nm, detekce u 550 nm. Model se skládá ze dvou komponent, vzhledem k rovnoměrné distribuci reziduí kolem nuly, lze usoudit, že model je dobrou reprezentací naměřených dat.



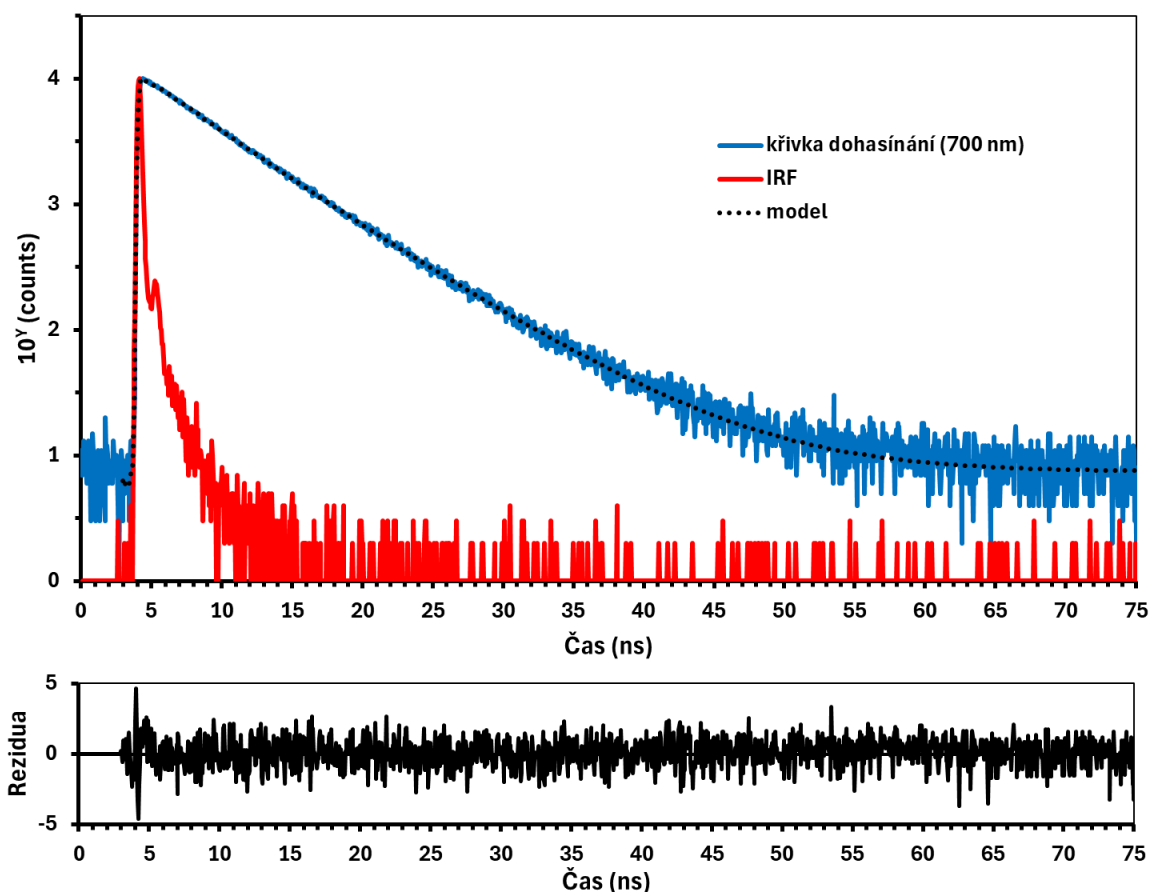
Obrázek 9.2: Křivka dohasínání fluorescence (modře), IRF-funkce odezvy přístroje (červeně), křivka modelu (černě tečkovaně) a rezidua (černě, dole) **chlorofylu a** v methanolu. Excitováno modrým laserem o vlnové délce 482 nm, detekce u 672 nm. Model se skládá pouze z jedné komponenty, symetrie reziduí se v čase 5-15 ns odchyluje od nuly, model tedy není úplně dobrým fitem naměřených dat. Více komponent ale fit nezlepšilo.



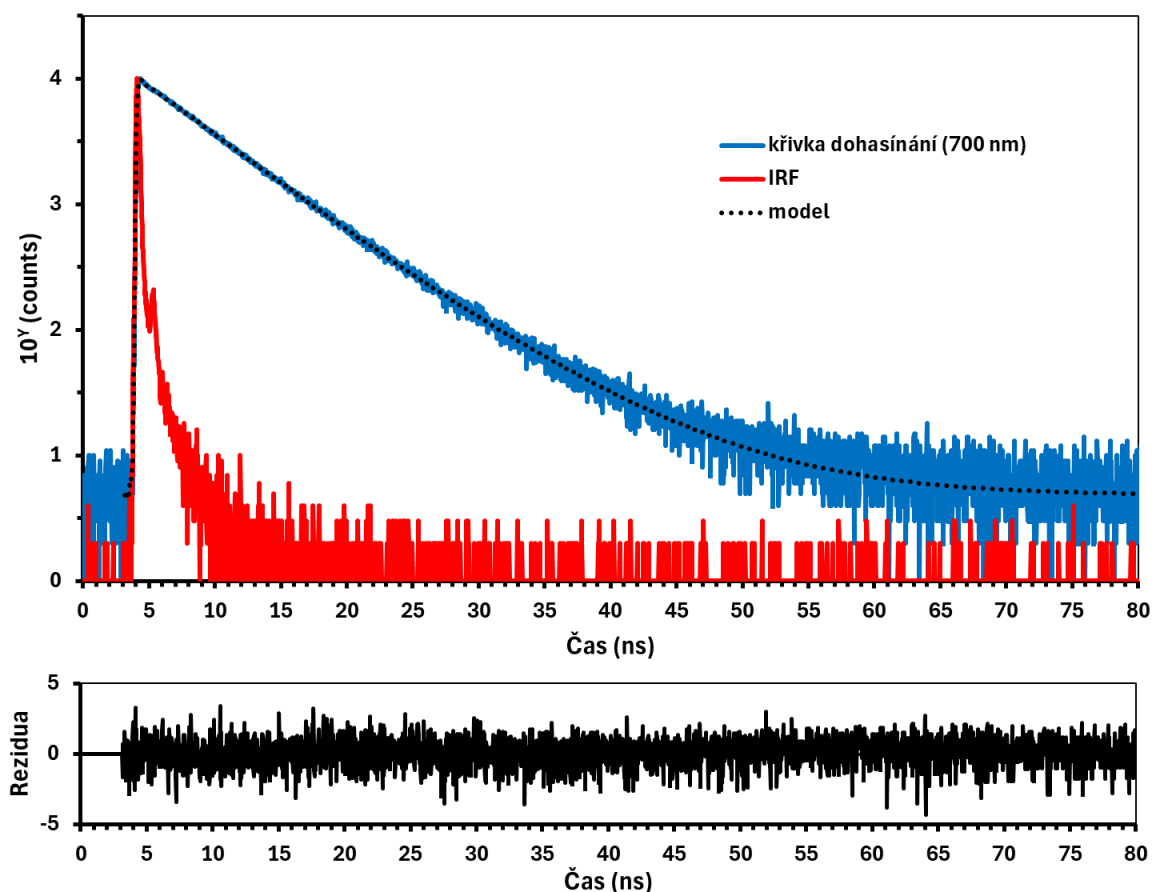
Obrázek 9.3: Křivka dohasínání fluorescence (modře), IRF-funkce odezvy přístroje (červeně), křivka modelu (černě tečkovaně) a rezidua (černě, dole) **biliverdinu** v methanolu. Excitováno červeným laserem o vlnové délce 638 nm, detekce u 720 nm. Model se skládá ze tří komponent, rezidua ukazují nějakou periodickou závislost, model tedy není úplně dobrou reprezentací naměřených dat. Jiný počet komponent model nezlepšilo.



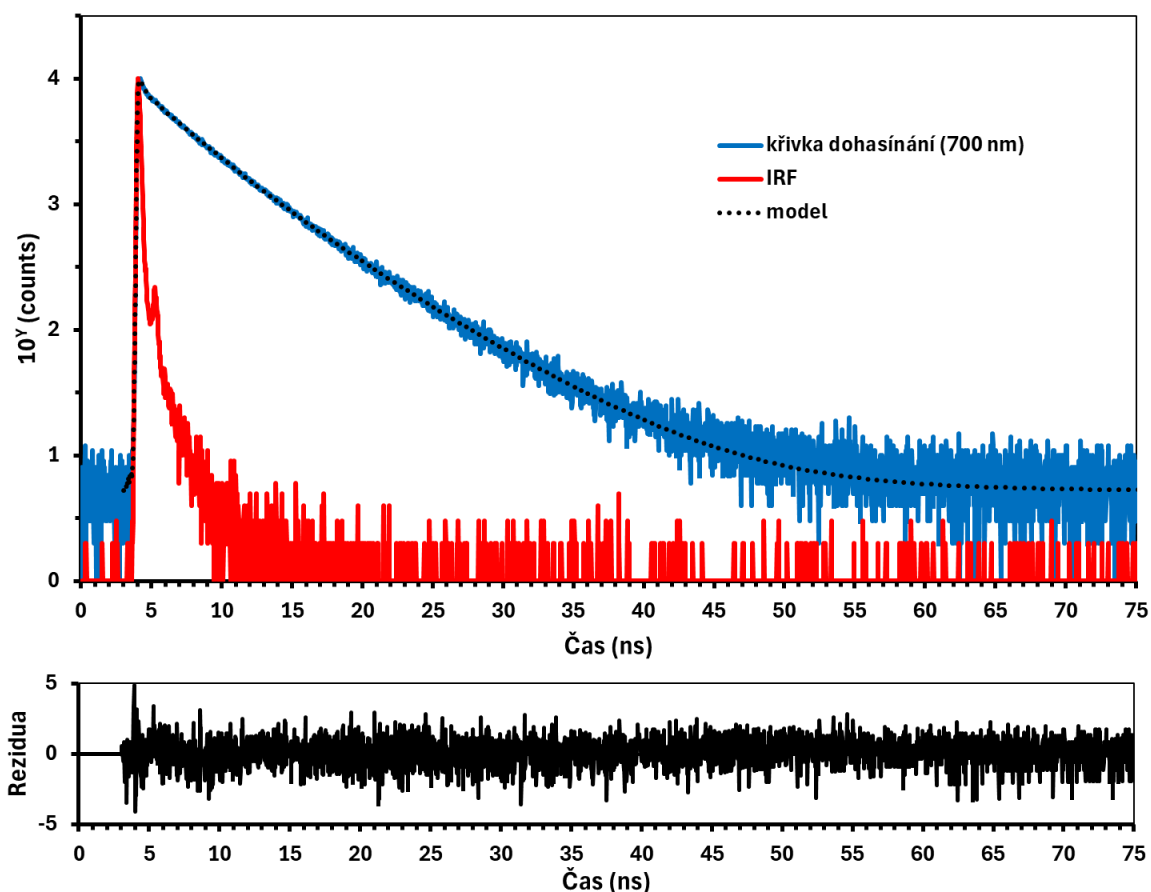
Obrázek 9.4: Křivka dohasínání fluorescence (modře), IRF-funkce odezvy přístroje (červeně), křivka modelu (černě tečkovaně) a rezidua (černě, dole) čistého *fykocyanobilinu* v methanolu. Excitováno červeným laserem o vlnové délce 638 nm, detekce u 700 nm. Model se skládá ze tří komponent. Velkou odchylku reziduí lze pozorovat na počátku dohasínání, dále je ale distribuce rovnoměrná, model je tedy dobrým fitem naměřených dat.



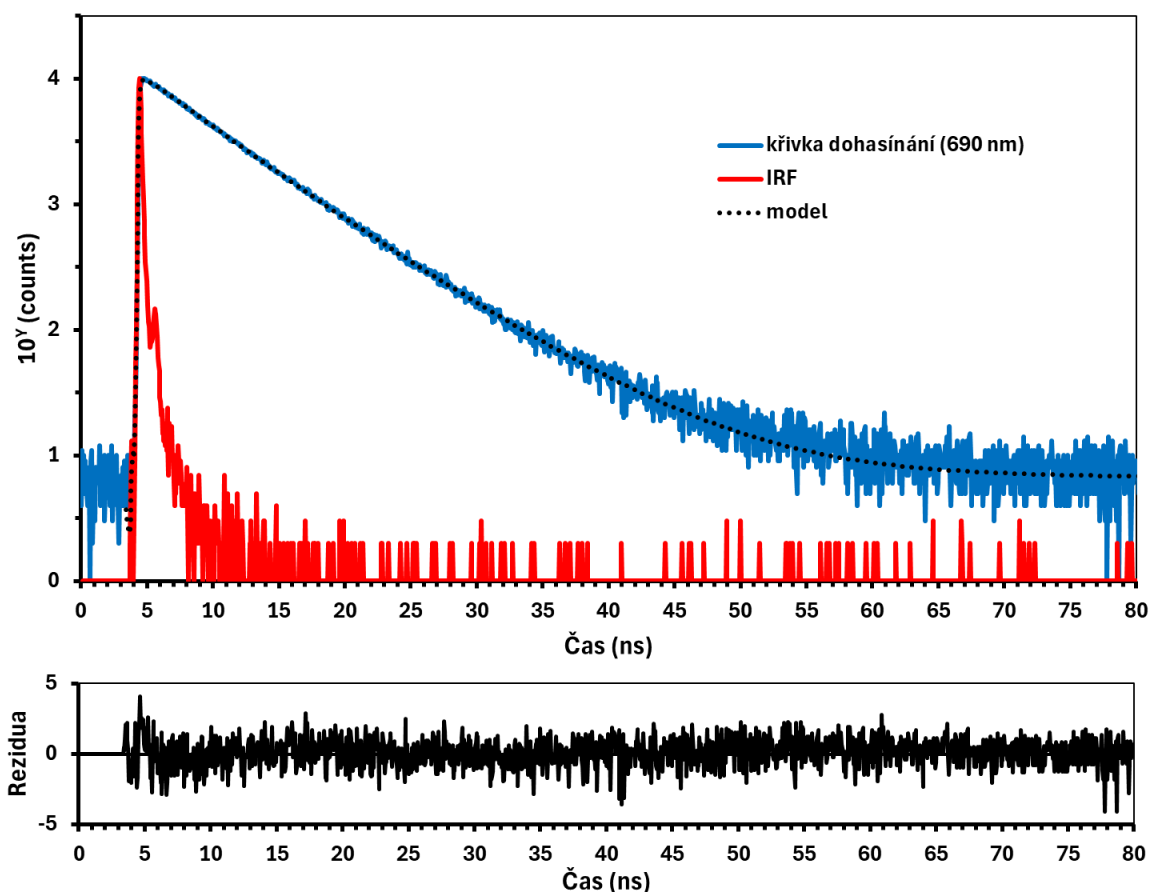
Obrázek 9.5: Křivka dohasínání fluorescence (modře), IRF-funkce odezvy přístroje (červeně), křivka modelu (černě tečkovaně) a rezidua (černě, dole) *fykocyanobilinu s niklem* v methanolu, týden po přípravě vzorku. Excitováno červeným laserem o vlnové délce 638 nm, detekce u 700 nm. Model se skládá ze tří komponent. Velkou odchylku reziduí lze pozorovat na počátku dohasínání, dále je ale distribuce rovnoměrná, model je tedy dobrým fitem naměřených dat.



Obrázek 9.6: Křivka dohasínání fluorescence (modře), IRF-funkce odezvy přístroje (červeně), křivka modelu (černě tečkovaně) a rezidua (černě, dole) *fykocyanobilinu s kobaltem* v methanolu, týden po přípravě vzorku. Excitováno červeným laserem o vlnové délce 638 nm, detekce u 700 nm. Model se skládá ze tří komponent. Distribuce reziduí je rovnoměrná, model tedy dobře reprezentuje naměřená data.



Obrázek 9.7: Křivka dohasínání fluorescence (modře), IRF-funkce odezvy přístroje (červeně), křivka modelu (černě tečkovaně) a rezidua (černě, dole) *fykocyanobilinu s mědí* v methanolu, týden po přípravě vzorku. Excitováno červeným laserem o vlnové délce 638 nm, detekce u 700 nm. Model se skládá ze tří komponent. V první části jsou na reziduích vidět větší odchylky, od asi 10 ns je už distribuce rovnoměrná, model tedy celkem odpovídá naměřeným datům. Jiný počet komponent fit nezlepšilo.



Obrázek 9.8: Křivka dohasínání fluorescence (modře), IRF-funkce odezvy přístroje (červeně), křivka modelu (černě tečkovaně) a rezidua (černě, dole) **fykocyanobilinu se zinkem** v methanolu, týden po přípravě vzorku. Excitováno modrým laserem o vlnové délce 482 nm, detekce u 690 nm. Model se skládá ze dvou komponent. Opět jsou odchylky v prvních 10 ns, poté je distribuce reziduí rovnoměrná. Model tedy celkem odpovídá naměřeným datům. Více komponent fit nezlepšilo.