

Barevné principy absorpce a fluorescence

Pokročilé biofyzikální metody v experimentální biologii

Ctirad Hofr

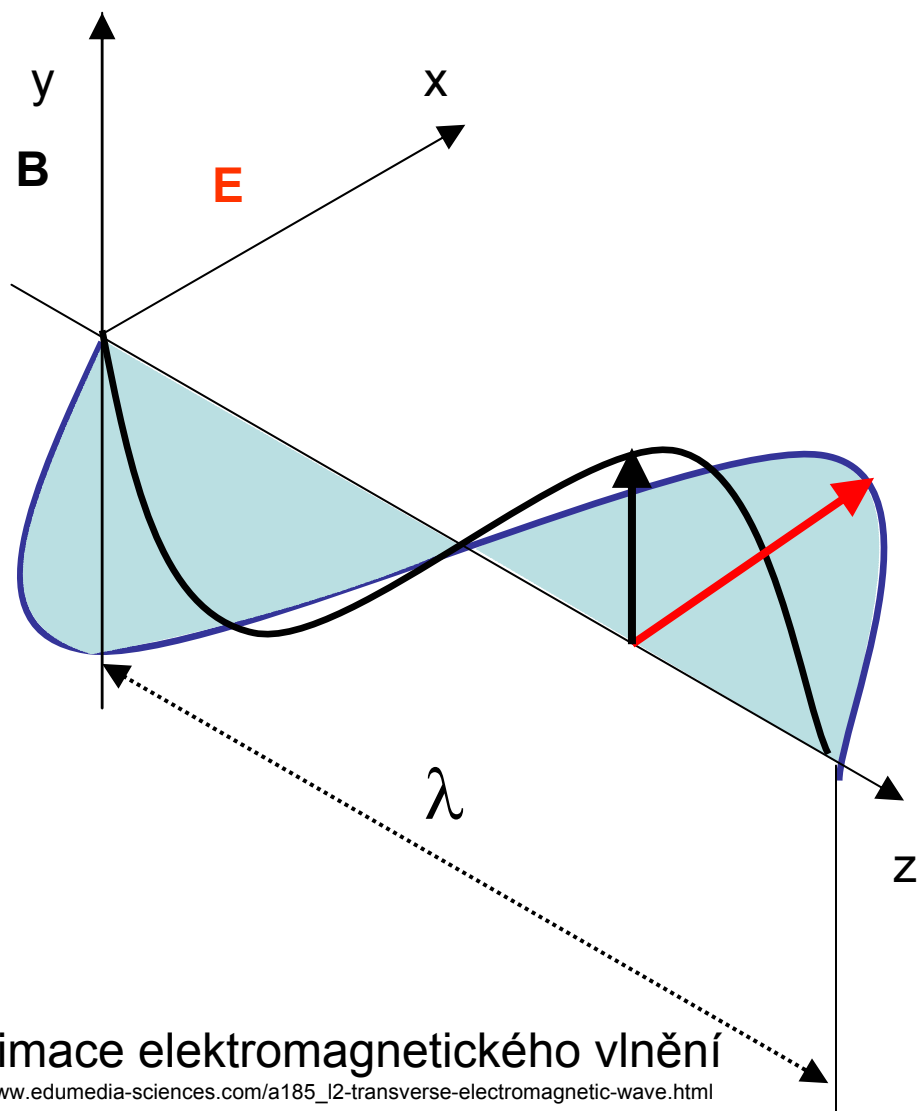


27.9.2007

Světlo je elektromagnetické vlnění

- Skládá se z elektrické složky a magnetické složky, které kmitají ve fázi v na sebe kolmých rovinách
- Světlo je charakterizováno frekvencí f a vlnovou délkou λ
- Frekvence f udává kolikrát za sekundu vlnění kmitne, udává se v $\text{Hz} = \text{s}^{-1}$
- Vlnová délka udává délku, kterou za jeden kmit světlo urazí, udává se v nanometrech $\text{nm} = 10^{-9} \text{ m}$
- Frekvence f a vlnová délka λ jsou spojeny vztahem
$$\mathbf{c = \lambda f}$$
kde c je rychlost světla -vlnění ($c=299\,792\,458 \text{ m s}^{-1}$ ve vakuu)
- Energie $E = h f$, kde h je Planckova konstanta ($6.626 \cdot 10^{-34} \text{ J s}$)

Elektromagnetická vlna



$$c = \lambda f$$

c je konstanta, pak
jestliže se zvýší vlnová délka,
musí se snížit frekvence, aby
byl součin konstantní.

**Vlnová délka λ je nepřímo
úměrná frekvenci f**

$$E = h f$$

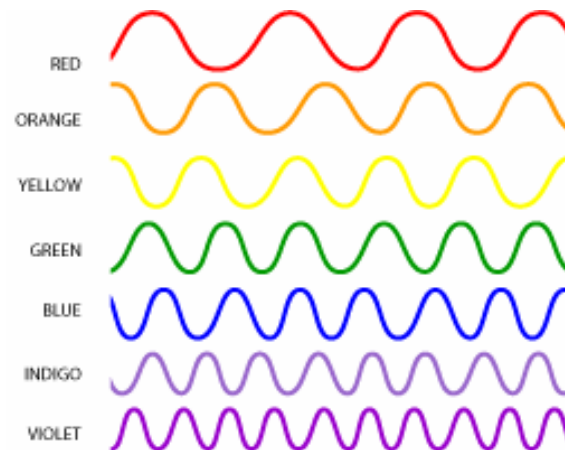
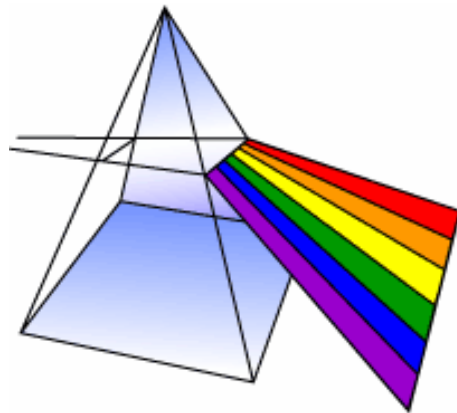
Čím je větší frekvence, tím je
větší energie záření.

**Čím je větší vlnová délka λ ,
tím je menší energie záření.**

Viditelné spektrum

Z celého spektra záření je pouze malá část viditelná.

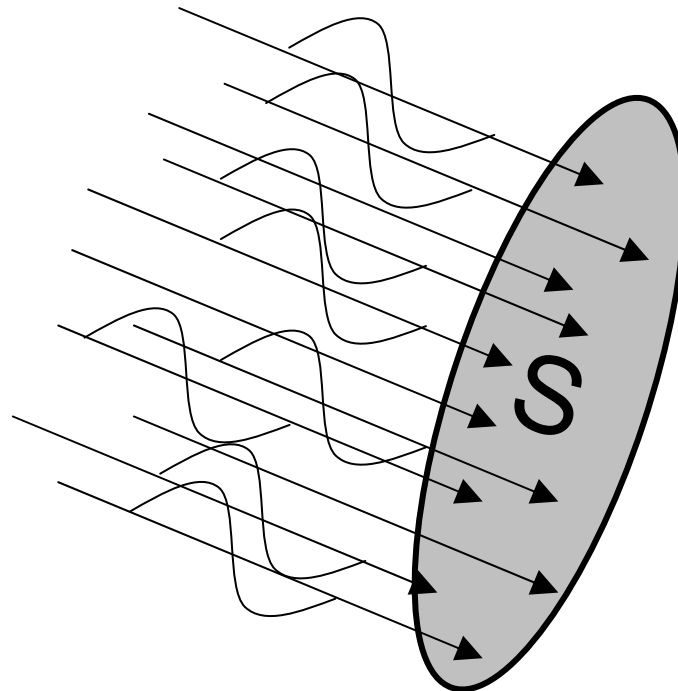
Viditelné spektrum je ohraničeno vlnovými délkami 400 nm a 700 nm.



<http://science.hq.nasa.gov/kids/imagers/ems/visible.html>

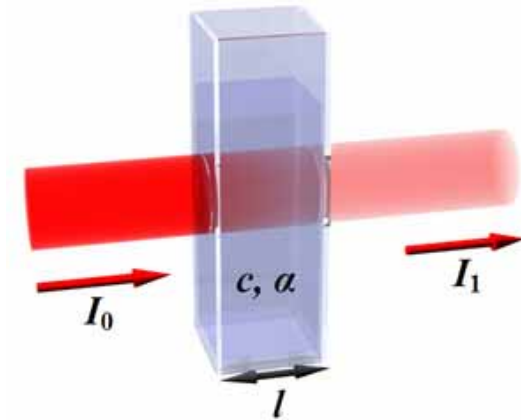
Intenzita

Intenzita – počet fotonů procházejících v daném směru jednotkovou plochou za jednotku času



Absorpce

- Látka pohlcuje světlo
- Pro absorpci monochromatického světla



- **Lambert-Beerův zákon:**

Absorbance je přímo úměrná koncentraci a tloušťce vrstvy roztoku

$$I = I_0 \cdot 10^{-\varepsilon \cdot c \cdot l} \quad A = \varepsilon \cdot c \cdot l = \log_{10} \frac{I_0}{I}$$

ε =molární extinční koeficient látky, c -koncentrace, l -délka optické dráhy

Luminiscence

- Emise světla z nějaké látky; nastává z elektronových excitovaných stavů

Podle původu dělíme luminiscenci na

1. fotoluminiscenci 2. chemiluminiscenci

Luminiscence se dělí na:

1. fluorescenci

2. fosforescenci

Fluorescence

- Emise z excitovaných singletových stavů
- Prakticky: fluorescenci pozorujeme během buzení a po jeho vypnutí rychle mizí
- Doba dohasínání τ (Lifetime) je průměrný čas, který uplyne od excitace po emisi – je řádově **1 – 10 nanosekund**
- pozn. : světlo urazí za 1 ns 30 cm

Fosforescence

- Emise z excitovaných (zakázaných) tripletových stavů
- Prakticky: **fosforescence** má mnohem delší dobu dohasínání než **fluorescence**

Doba dohasínání řádově

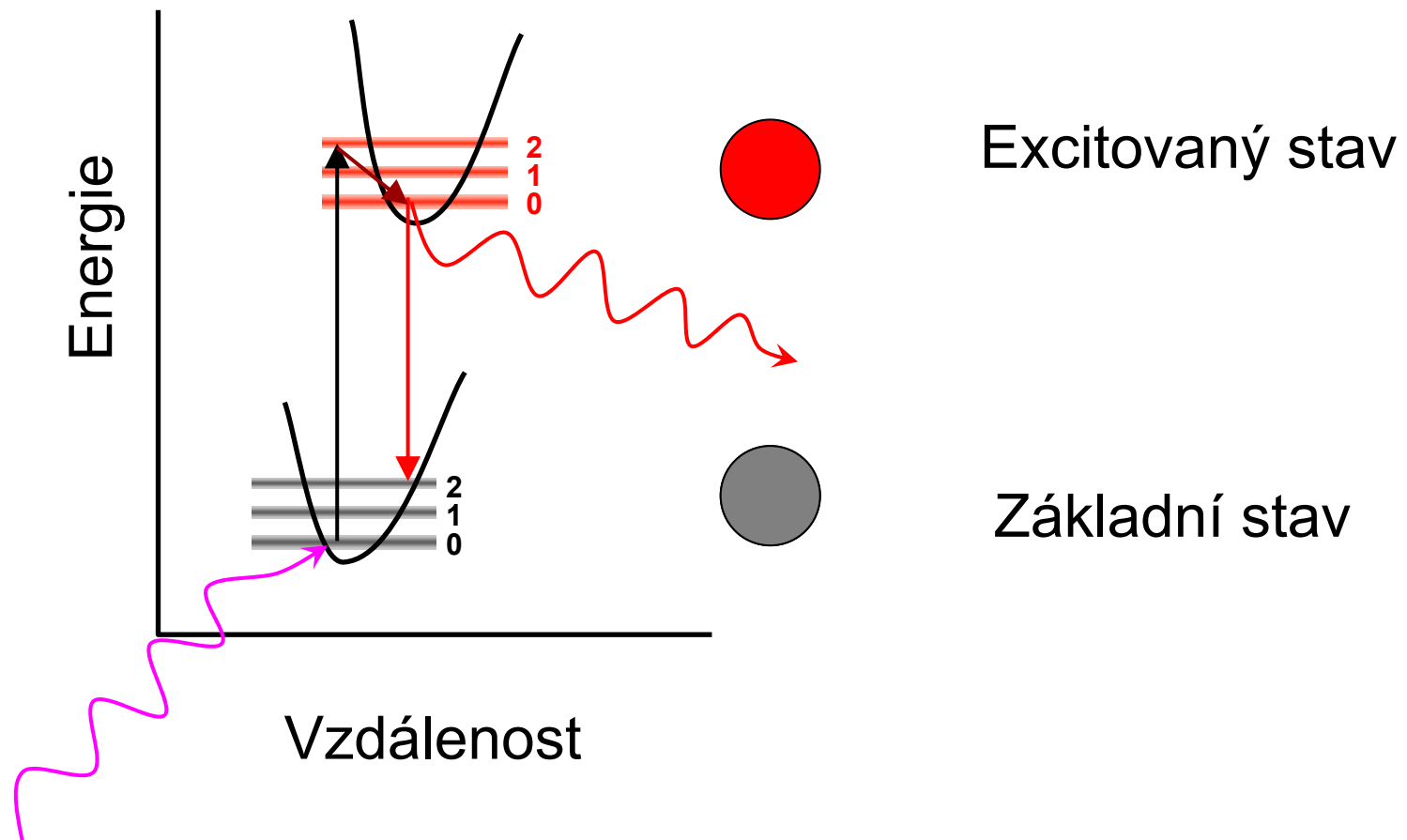
milisekundy až sekundy

pozn. : světlo urazí za tu dobu 300 až 300 000 km

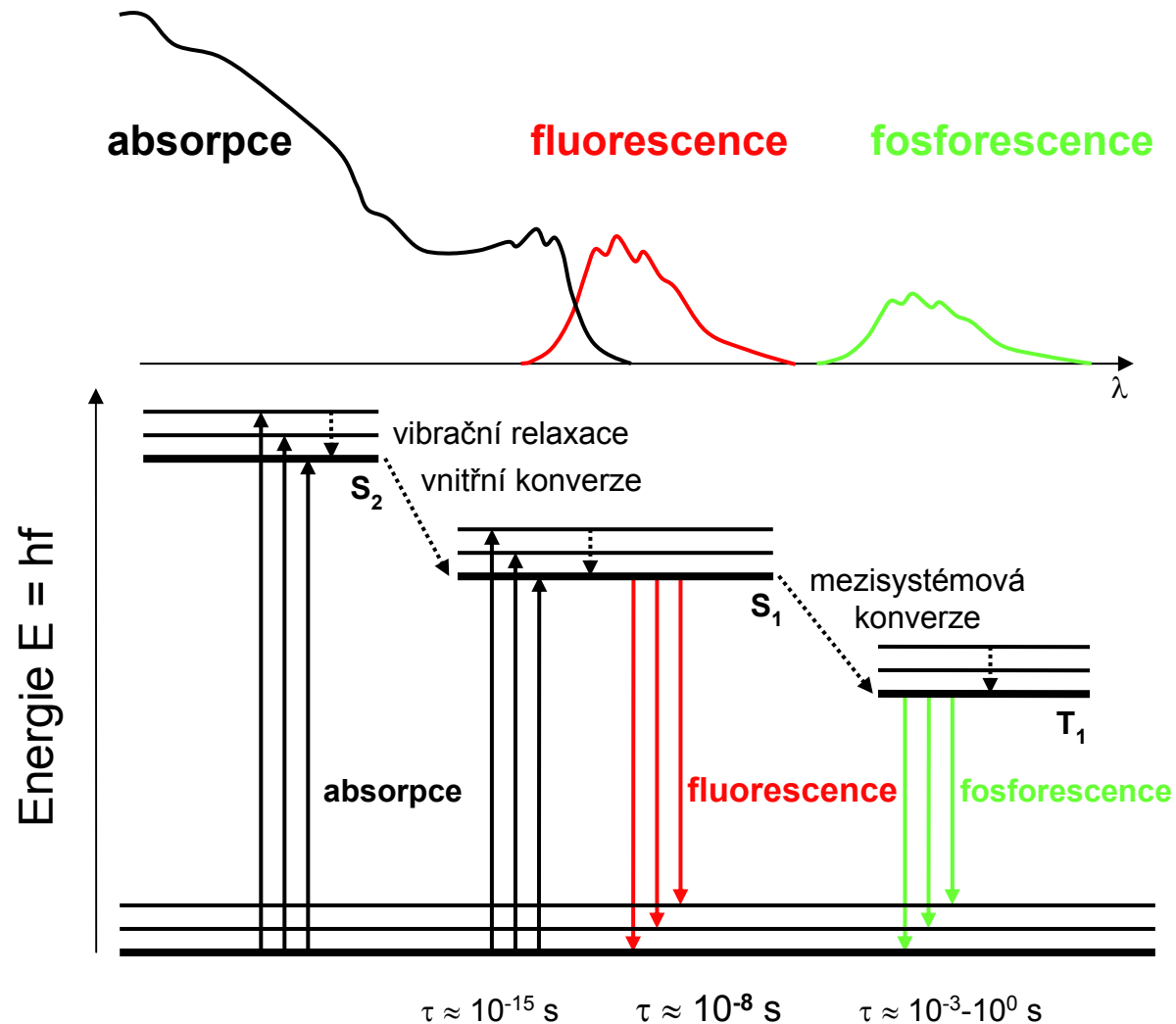
Frank-Condonův princip o „lenosti jader“ při absorpci

Absorpce fotonu elektronem (excitace molekuly) je velmi rychlý proces v řádu femtosekund (10^{-15} s). Protože atomové jádro je mnohem těžší než elektron, během absorpce fotonu se nepohybuje. Po absorpci fotonu - excitaci se celá molekula nachází v nestabilním stavu („je horká“) a vibruje, aby se zbavila energie (a „ochladila se“).

Absorpce a emise energie molekulou



Zářivé a nezářivé přechody mezi elektronově vibračními stavy molekuly



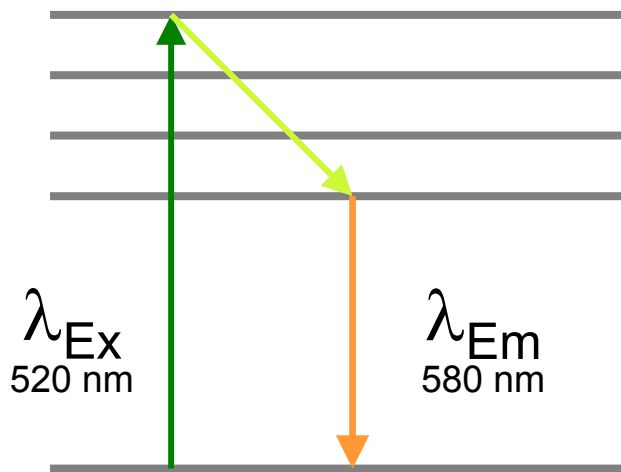
Barevný animovaný úvod do principu fluorescence

<http://probes.invitrogen.com/resources/education/tutorials/1Introduction/player.html>

Stokesův zákon

Vlnová délka emitovaného světla je větší nebo rovna vlnové délce excitačního světla

$$\lambda_{em} \geq \lambda_{ex}$$



To je dáno tím, že po absorpci záření často dochází k částečné ztrátě energie (tepla) při přechodu z vyšších excitovaných elektronových stavů do metastabilního nejnižšího excitovaného stavu.

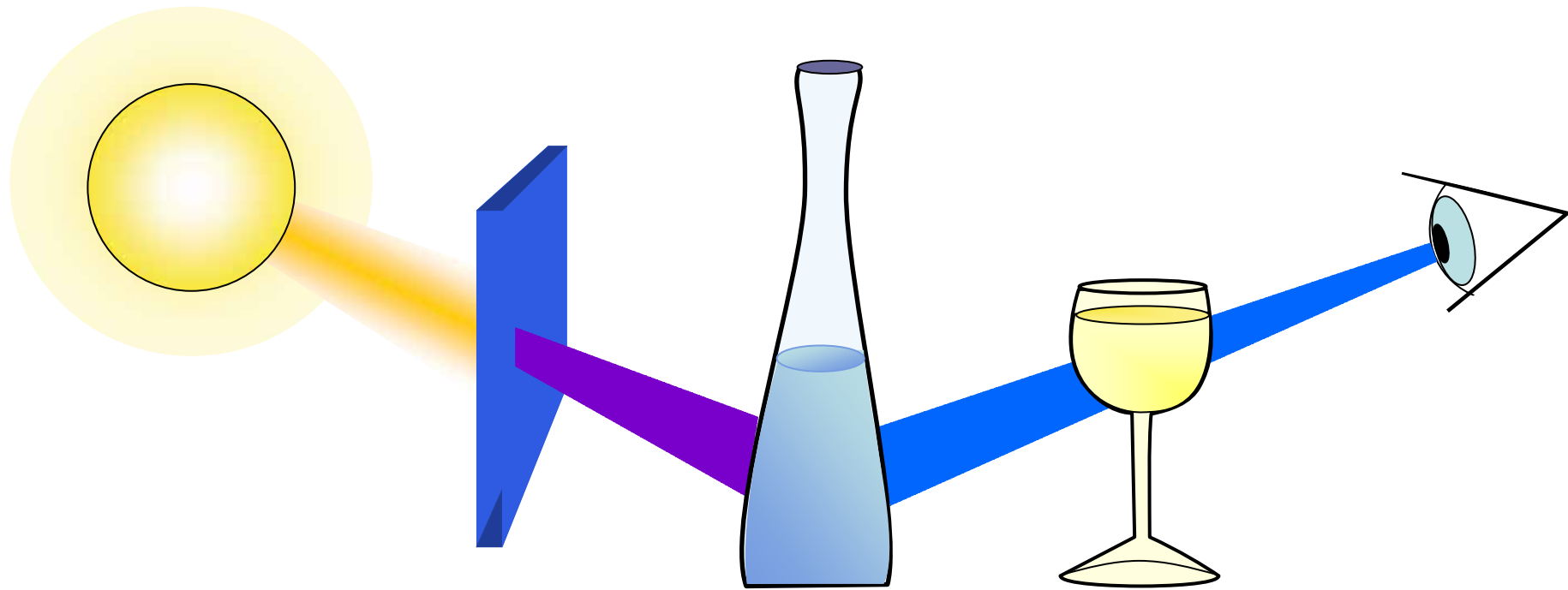
Stokesův posun

Emise má vždy menší energii (větší vlnovou délku) než je energie absorbovaná (menší λ).

Rozdíl mezi maximem absorpčního a maximem fluorescenčního emisního spektra je specifická charakteristika daného fluoroforu.

Experiment G. G. Stokes

1852, Cambridge



Slunce

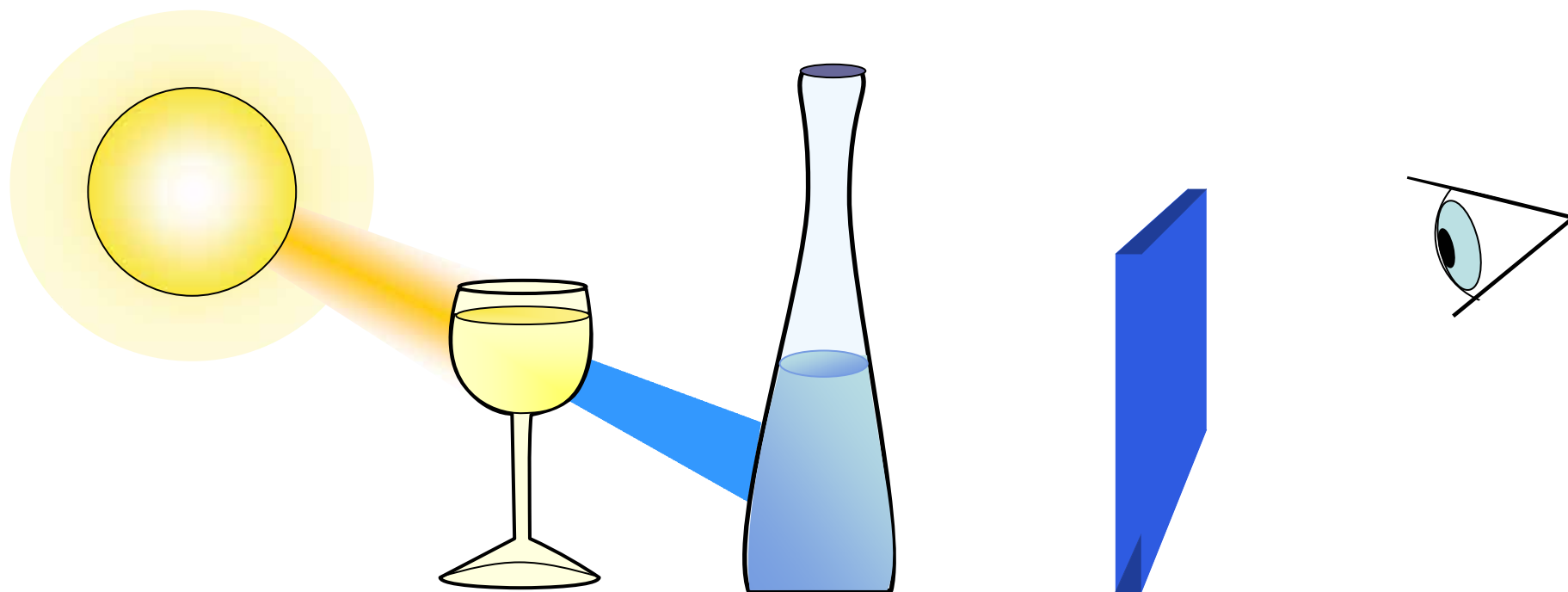
Modré sklo
okna v kostele
Propouští světlo s
 $\lambda < 400 \text{ nm}$
Excitační filtr

Roztok
chininu

Sklenice vína
Propouští světlo s
 $\lambda > 400 \text{ nm}$
Emisní filtr

G.G.
Stokes

Po záměně filtrů – fluorescence mizí



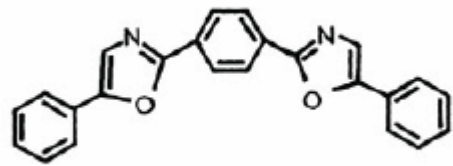
Při záměně filtrů , tj. jestliže dáme sklenici vína do dráhy slunečních paprsků, procházející světlo již nemůže roztok chininu excitovat.

Typické fluorofory

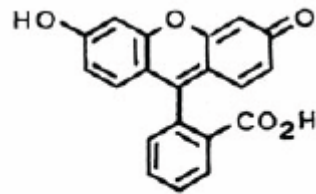
Fluorofory nebo **fluorescenční barviva** jsou molekuly, které fluoreskují. Fluorescenci vykazují zejména aromatické sloučeniny (polyaromatické uhlovodíky nebo heterocykly).

Typickými fluorofory jsou například:

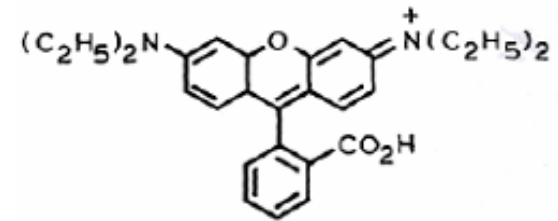
- chinin (tonik)
- fluorescein, rhodamin B (nemrznoucí směsi, fluorescenční značení)
- POPOP (scintilátory)
- akridinová oranž (DNA)
- umbeliferon (ELISA)
- antracén, perylén (znečištění životního prostředí oleji)



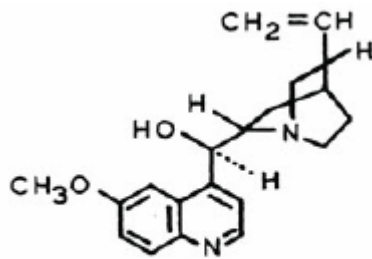
POPOP



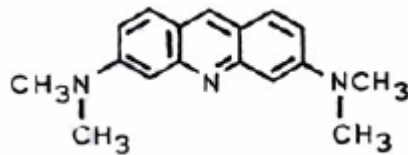
Fluorescein



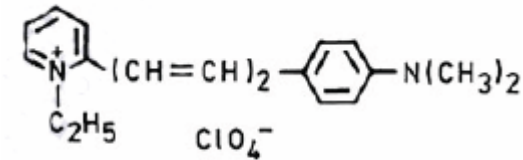
Rhodamine B



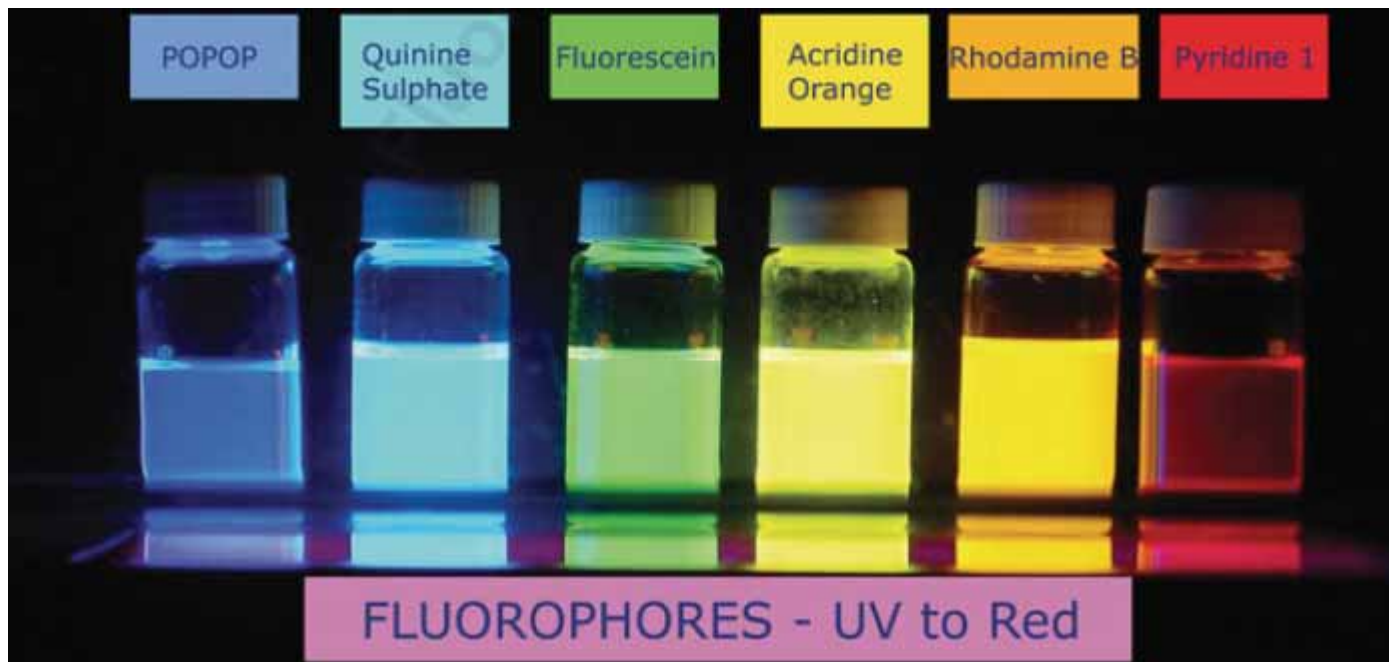
Quinine



Acridine Orange



Pyridine 1



Kvantový výtěžek

Kvantový výtěžek Q je poměr počtu emitovaných a absorbovaných fotonů.

Udává účinnost s jakou budící fotony vyvolávají fluorescenci.

Kvantový výtěžek může být maximálně 1.

Ve skutečnosti je nižší díky nezářivým přechodům molekul z excitovaného stavu.

Největší kvantové výtěžky mají rodaminové flourofory (~ 1) a fluorescein (0.95) <http://www.iss.com/resources/yield.html>

Charakteristické je snižování kvantového výtěžku s teplotou-
teplotní zhášení luminiscence

Excitační spektrum

Závislost intenzity fluorescence na
excitační vlnové délce při konstantní
vlnové délce emitovaného záření

$$\lambda_{\text{Ex}} \text{ scan} \quad \lambda_{\text{Em}} = \text{konst.}$$

Emisní spektrum

Závislost intenzity fluorescence na vlnové délce při konstantní excitační vlnové délce

λ_{Em} scan $\lambda_{\text{Ex}} = \text{konst.}$

Neměnnost emisního spektra

Emisní spektra jsou nezávislá na vlnové délce excitace.

Tento jev je důsledkem toho, že doba trvání excitovaného stavu a kvantový výtěžek složitých molekul v roztoku nezávisí na vlnové délce budícího záření

Barevný animovaný úvod do fluorescenční spektroskopie

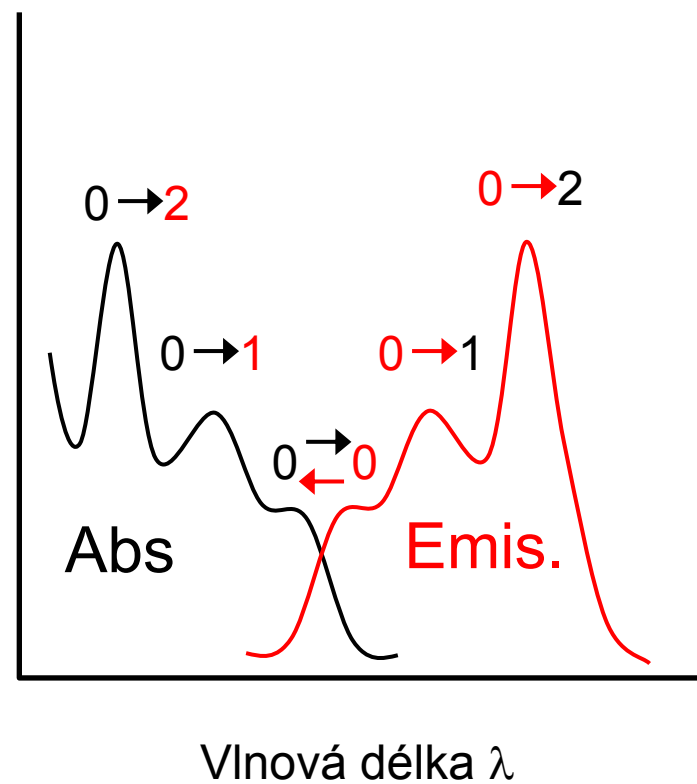
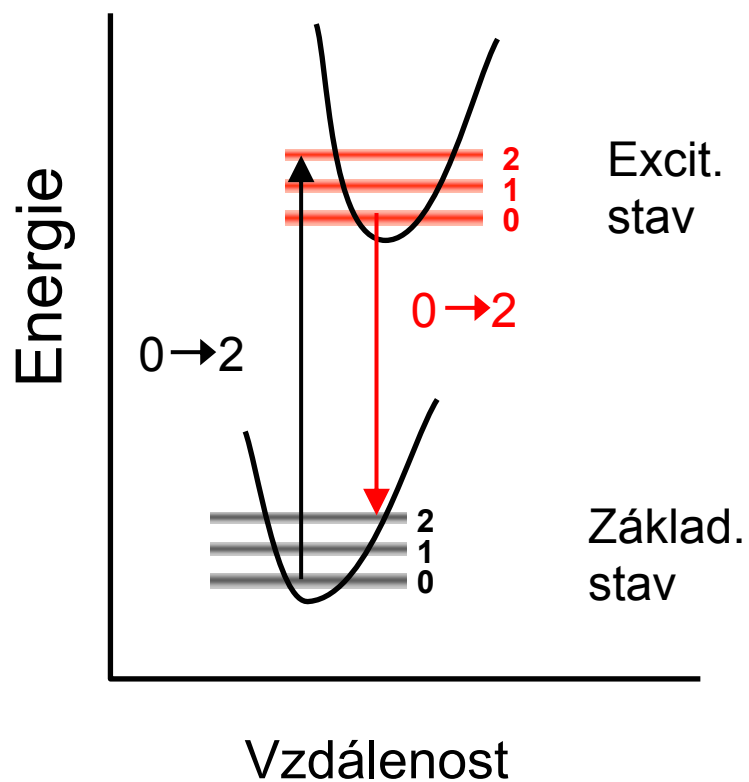
<http://probes.invitrogen.com/resources/education/tutorials/2Spectra/player.html>

Zákon zrcadlové symetrie mezi absorpčním a emisním spektrem

Struktura vibračních hladin u základního i excitovaného stavu je stejná, proto absorpce i emise z odpovídajících si vibračních hladin může nastat se stejnou pravděpodobností. To má za následek zrcadlovou symetrii absorpčního spektra a emisního fluorescenčního spektra.

Prakticky: při velmi malé koncentraci vzorku můžeme z fluorescenčního emisního spektra zjistit jak vypadá absorpční spektrum, aniž by se použilo o několik řádů větší množství vzorku

Zrcadlová symetrie absorpčního a excitačního spektra



Flourescenční excitační a emisní spektrum reálného roztoku

