

Metody chemického výzkumu

Jan Preisler

Fluorescenční spektroskopie
Fluorescence a další luminiscenční spektroskopie
Doba života, kvantový výtěžek
Intenzita fluorescence, zhášení a samozhášení
Spektra excitační a emisní
Spektrometr a postup měření
Kvazičarová fluorescence a fluorescence v pevné fázi
Applikace
Spojení se separačními technikami

1

Luminiscence

Pro zájemce podrobněji:

Petr Táborský, Jan Preisler
Molekulová luminiscence

2

Molekulová luminiscenční spektroskopie

- Luminiscence je jev, při kterém molekula absorbuje energii (např. ve formě fotonu) a následně ji vyzáří ve formě světla
- Molekulová luminiscenční spektroskopie je významná analytická metoda (nízké detekční meze, selektivita)
- Fluorofor ... skupina v molekule zodpovědná za luminiscenci se nazývá luminofor (fluorescence - fluorofor)

3

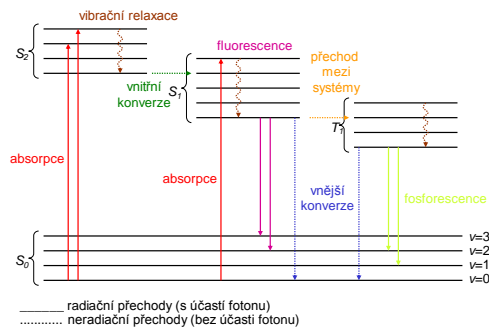
Klasifikace luminiscence

... podle zdroje excitační energie:

- fotoluminiscence
- chemiluminiscence
- bioluminiscence
- elektroluminiscence

4

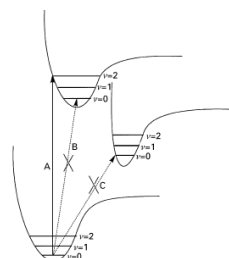
Jablonského diagram



5

Franck-Condonův princip

- Zářivé přechody: přechod elektronu je podstatně rychlejší než pohyb jader
- V okamžiku vybuzení má molekula v excitovaném stavu stejnou pozici a moment atomových jader jako ve stavu základním
- Excitovaná molekula má vyšší energii, než základní uspořádání, do kterého molekula přechází dodatečně
- K luminiscenci dochází ze základního uspořádání



6

Radiační (zářivá) deexcitace

Fluorescence

- Po absorpci záření přechází elektron na jednu z vibračních hladin stavu excitovaného stavu ($S_0 \rightarrow S_n$)
- Vibrační relaxace a vnitřní konverze (přechody v rámci hladin S až na S_1)
- Zářivý přechod na jednu z vibračních hladin základního stavu ($S_1 \rightarrow S_0$)

Fosforescence

- Elektron přechází z nejnižší vibrační hladiny excitovaného stavu na tripletovou hladinu ($S_1 \rightarrow T_1$)
- Vibračními relaxacemi přechází na nejnižší hladinu T_1
- Zářivý přechod na jednu z vibračních hladin základního stavu (S_0).

Zakázaný přechod ... musí dojít ke změně spinu, aby byl dodržen Pauliho princip \Rightarrow nízká pravděpodobnost přechodu a delší čas vyhasínání.

7

Neradiační (nezářivá) deexcitace

Vibrační relaxace

Po excitaci na jednu z vibračních hladin (v_n) excitovaného stavu (S_n) dochází postupně k přechodu na nižší vibrační hladiny téhož excitovaného stavu. Energie se rozptýlí v okolí (solvent).

Vnitřní konverze

Nezářivý přechod mezi stavy o stejné multiplicitě; typicky $S_n \rightarrow S_{n-1}$; pravděpodobnost vzrůstá při překryvu daných vibračních hladin obou stavů.

Mezisystémový přechod

Elektron může přejít do jedné z vibračních hladin tripletového stavu o podobné energii ($S \rightarrow T_1$). Přímý přechod ($S_0 \rightarrow T_1$) absorpcí fotonu je nepravděpodobný (nutná změna spinu).

8

Neradiační (nezářivá) deexcitace

Vnější konverze

Přenos energie do okolní – solvent, rozpuštěné látky, krystalová mřížka. Souvisí se zhasínáním fluorescence.

9

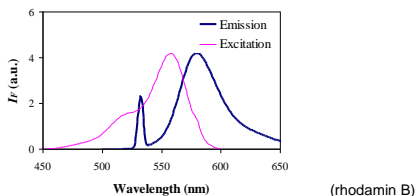
Časové relace

Absorpce	$\sim 10^{-15}$ s	(–perioda fotonu)
Vibrační relaxace	$10^{-11} - 10^{-10}$ s	postupný přechod ($\Delta v = 1$), perioda vibračního pohybu $\sim 10^{-13}$ s
Vnitřní konverze	$\sim 10^{-12}$ s	pravděpodobnost vzrůstá při překryvu vibračních hladin singletů
Fluorescence	$10^{-10} - 10^{-6}$ s	obvykle z nulového vibračního pásu excitovaného singletu
Vnější konverze		energie předána okolí (solvent aj.)
Fosforescence	$10^{-4} - 10^4$ s	zakázaný přechod (změna stavu spinu)

10

Emisní a excitační spektra

- Emisní spektrum**
závislost intenzity luminiscence na vlnové délce; $\lambda_{em} = \text{konst.}$
- Excitační spektrum** (aktivační, absorpční)
závislost absorpce luminoforu (fluoroforu) na vlnové délce, $\lambda_{ex} = \text{konst.}$



11

Emisní a excitační spektra

Stokesův posun

Rozdíl mezi vlnovými délkami emisního a excitačního maxima (nm).

Antistokesův posun

Ve **vzácných** případech může být emisní maximum při kratší vlnové délce než excitační maximum

Nejvyšší výtěžek fluorescence: excitace při $\lambda_{ex, \max}$

Fluorescenční záření bývá posunuto k delším vlnovým délkám v důsledku ztráty části energie konverzemi

U fosforescenčních spekter je posun k delším vlnovým délkám ještě výraznější; přechod $T_1 \rightarrow S_0$ je spojen s menším rozdílem energie než přechod z $S_1 \rightarrow S_0$

12

Emisní a excitační spektra

Zrcadlové pravidlo

emisní a excitační spektra organických látek mají podobný tvar, ale jsou zpravidla zrcadlově obrácené

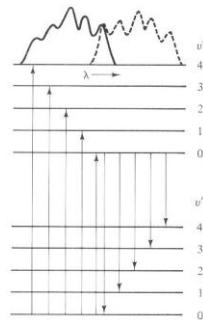
Vavilův postulát

Tvar emisního spektra není ovlivněn vlnovou délkou excitace a lze excitovat zářením s kteroukoli vlnovou délkou z excitačního spektra.

Aditivita spekter

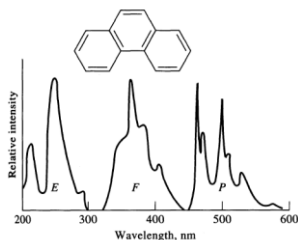
13

Zrcadlové pravidlo



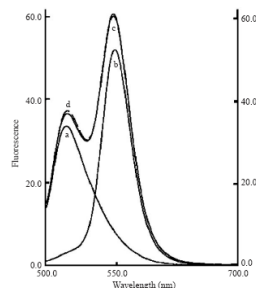
14

Fluorescence a fosforescence



15

Aditivita spekter



16

Základní vztahy

$$A = c x \varepsilon = \log(I_0/I) \quad (\text{Lambert-Beerův zákon})$$

A – absorbance, c – koncentrace, ε – absorpční koeficient, x – tloušťka květy, I_0 – světelný tok dopadající na vzorek, I – světelný tok prošlý vzorkem

$$I_f = k \phi I_0 (1 - 10^{-c x \varepsilon})$$

I_f – fluorescence (fotony/s), k – podíl emitovaných fotonů, které dorazí na detektor, ϕ – výtěžek fluorescence

$$I_f \sim k \phi I_0 2.3 c x \varepsilon$$

zjednodušený vztah pro nízké koncentrace

17

Výtěžek luminiscence

$$\text{Kvantový výtěžek} \quad \Phi = \frac{\sum k_{rad}}{\sum k_{rad} + \sum k_{nrad}}$$

$$\phi_k = N_{em}/N_{abs} = I_{em}/I_{abs} = I_{em}/(I_0 - I) \quad \phi_k \leq 1$$

Energetický výtěžek

$$\phi_o = E_{em}/E_{abs} = h\nu_{em}/h\nu_{ex} \quad \phi_o < \phi_k \quad (\text{Stokesův posun})$$

N počet fotonů za sekundu

I světelný tok (emitovaný, absorbovaný)

E energie

ν frekvence fotonu

k rychlostní konstanty

18

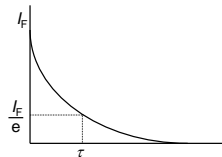
Stanovení kvantového výtěžku

- fluorescenční standard musí mít absorpční a fluorescenční maximum blízké látce, jejíž kvantový výtěžek stanovujeme
- fluorescenční standardy:
 - roztoky
 - chinin bisulfát (250nm/450nm)
 - naftalén (290nm/330nm)
 - ovalén (342nm/482nm)
 - fluorescein (488nm/503nm)
 - rhodamin B (562nm/573nm)
 - hranoly

$$\Phi_x = \Phi_{st} \frac{I_x A_{st}}{I_{st} A_x}$$

19

Vyhasínání luminiscence



Úbytek fluorescence: $-dI_F/dt = k_F I_F$

Exponenciální průběh vyhasínání fluorescence: $I_F = I_{F0} e^{-k_F t}$

Doba života (luminescence lifetime): $\tau = 1/k_F$
 ... doba potřebná k poklesu fluorescence na hodnotu $I_{F(t=0)}/e$

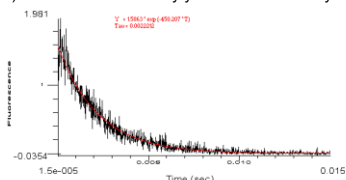
Časově rozlišená (time-resolved) luminiscence

20

Časově rozlišená luminiscence

Vyhodnocení

- poločas vyhasínání luminiscence (luminescence life-time), $\tau_{1/2}$ nebo τ - pokles na $1/2$ nebo $1/e$ počáteční intenzity, nejlépe z log závislosti
- time-gated fluorescence (integrace signálu v definovaném iontervalu) – rozlišení mezi analyty s různou dobou vyhasínání



21

Struktura látek a luminiscence: typy luminiscenčních přechodů

organické luminofoxy – typické luminiscenční přechody jsou hlavně:



anorganické luminofoxy

- přechody mezi energetickými hladinami ligandu
- přechody mezi energetickými hladinami kovu (d-d, f-f)
- kov i ligand („charge transfer“ přechody)

22

Luminiscence organických molekul – obecná pravidla

- podmínkou fotoluminiscence je absorpce
- intenzita luminiscence a posun emise k vyšším vlnovým délkám roste s počtem konjugovaných aromatických kruhů (hyperchromní a bathochromní posun)
- heteroatomy v aromatickém kruhu - vyšší intenzita luminiscence a posun emise k vyšším vlnovým délkám
- heteroatomy mimo aromatický kruhu - vyšší intenzita luminiscence a posun emise k vyšším vlnovým délkám (ale méně, než u heteroatomů v arom. kruhu)
- stabilizace molekuly do planární konfigurace přispívá k zvýšení intenzity luminiscence

23

Luminiscence organických molekul – obecná pravidla

- Nasyčené uhlovodíky (bez π či n e) obvykle nefluoreskují
- Nearomatické uhlovodíky s několika dvojnými vazbami fluoreskují zřídka. Sloučeniny s vysoce konjugovanými dvojnými vazbami, např. karoteny, vykazují fluorescenci
- Aromatické uhlovodíky fluoreskují ($\pi-\pi^*$). Pravděpodobnost fosforescence vzrůstá s výskytem n e' příp. substituentů.
- Fosforescence podpořena v aromatických molekulách přítomností karbonylové skupiny nebo heteroatomů ($n-\pi^*$). Výsledná zvýšená pravděpodobnost přechodu mezi systémy obvykle snižuje intenzitu fluorescence.
- Substituenty na aromatickém kruhu ovlivňují hladinu nejnižšího excitovaného stavu a mohou dramatičticky zvýšit kvantový výtěžek a emisní vlnové délky (červený, bathochromní posun). Donory e', např. -OH, zvyšují fluo. výtěžek, akceptory jej snižují.

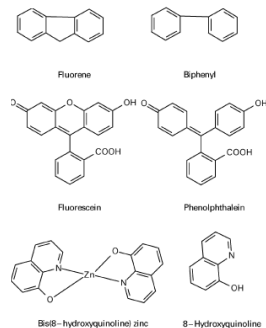
24

Luminiscence organických molekul – obecná pravidla

- Vliv vnitřního těžkého atomu – vliv halidových substituentů: podpora přechodů mezi systémy, $S \leftrightarrow T$.
- S rostoucí velikostí a konjugovaností aromatického systému roste kvantový výtěžek fluorescence, klesá výtěžek fosforescence.
- Luminiscence je typická pro molekuly s planární strukturou, které jsou charakteristické vysokou konjugací e^- a slabými interakcemi s rozpouštědly.
- Fluorescence z atomů kovů se obvykle vyskytuje v rigidních organometalických komplexech, samotný ligand nemusí fluoreskovat. Kromě přechodů v ligandech se na vzniku fluorescence mohou podílet $d \rightarrow e^-$ a $f \rightarrow e^-$ (prvky vzácných zemin).

25

Struktura a luminiscence



26

Fotoluminiscence aromatických látek

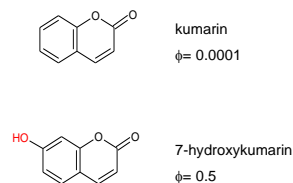
Fluorescence of linear aromatics in EPA at 77K*

Compound	Φ_f	λ_{ex} (nm)	λ_{em} (nm)	ϕ_f	τ_f (s)
Benzene	0.11	205	278	0.26	7
Naphthalene	0.29	286	321	0.1	2.6
Anthracene	0.46	365	400	<0.01	0.04
Naphthalene	0.60	390	480	—	—

*EPA is a mixture of ethanol, isopropanol, and ether.

27

Substituce aromátů skupinami zvyšujícími konjugaci



vliv substituentů: $CR_3 < CH_3 < SR < SH < NH_2 < OR < OH$

28

Vliv některých substituentů

Effect of substituents on luminescence of aromatic compounds*

Substituent	ϕ_f	ϕ_p
Alkyl	Slight	Increase
Hydroxyl, methoxyl	Increase	Increase
Carboxyl, keto	Large decrease	Large increase
Nitro, nitroso	Decrease	Increase
Primary, secondary, or tertiary amine	Increase	Increase
Sulphydryl	Decrease	—
Sulfonic acid	Slight	—
Halogen	Decrease	Increase
Cyanide	Increase	—

*Effect on ϕ_f and ϕ_p relative to the parent compound.

29

Vliv vnitřního těžkého atomu

Internal heavy-atom effect illustrated for 1-substituted naphthalenes*

Compound	ϕ_f	λ_f (nm)	ϕ_p	λ_p (nm)	τ_p (s)	k_{isc} (s ⁻¹)
Naphthalene	0.55	325	0.051	469.5	2.6	1×10^8
1-Fluoronaphthalene	0.84	316	0.056	475	1.5	2×10^8
1-Chloronaphthalene	0.058	319	0.30	483	0.29	1.5×10^8
1-Bromonaphthalene	0.0016	320	0.27	483	0.018	5×10^8
1-Iodonaphthalene	<0.0005	—	0.38	480	0.002	< 3×10^8

*Measurements in ethanol-ether at 77 K.

30

Luminiscence – vliv prostředí

Teplota

obvykle snižuje luminiscenci v důsledku vyššího dynamického zhášení

Solvent

viskozita – vyšší viskozita = méně kolizí, zvýšení fluorescence

polarita a schopnost tvorby H můstků ovlivňují povahu exc. stavu např. pro $\pi-\pi^*$ je excitovaný stav obvykle polárnější a zvýšení polarit solventu snižuje energii exc. stavu více než energii stavu základního, což vede k červenému posunu fluorescence. U přechodu $n-\pi^*$ je tomu naopak.

pH

fluorescence protonované a neprotonované formy se mohou výrazně lišit mezi pK_a excitovaném a základním stavu může být řádový rozdíl

Vliv externího těžkého atomu

zvýšení fosforescence podpořením přechodů mezi systémy

31

Zhášení luminiscence

Jevy vedoucí k redukci intenzity luminiscence

1. **statické zhášení** - např. nefluorescenční komplex, energii absorbuje jiná část molekuly atd.
2. **dynamické (kolizní) zhášení** – srážka s molekulou zhášedla (např. solventu)
3. **vnitřně-filtrační efekt** (reabsorpce u molekul s malým Stokesovým posunem)
4. **fotovybělování** – degradace luminoforu vlivem světla, kterým excitujeme
5. **koncentrační zhášení** (nelinearita při vyšších koncentracích)

32

Instrumentace - fluorimetr

Fluorimetr

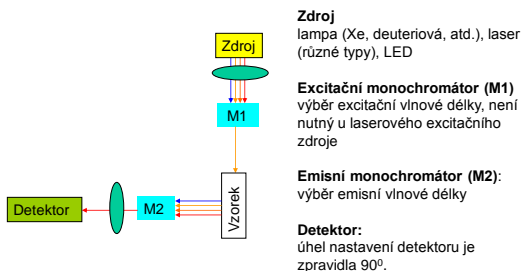
- měření celkové fluorescence
- kvantitativní analýza
- zdroj záření: lampa nebo laser (větší citlivost stanovení)
- místo monochromátoru(ů) může být filtr

Spektrofluorimetr

- měření fluorescenčních (emisních a excitačních) spekter
- zdroj záření: zpravidla lampa (možnost volby vlnové délky exc. záření)
- možné další režimy (synchronní sken, časově závislá fluo aj.)

33

Měření fotoluminiscence

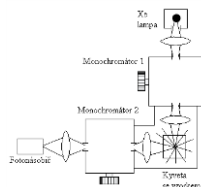


34

Instrumentace



AMINCO- Bowman, Series 2 (AB-2)



35

Zdroje excitačního záření

- Lampa
- Laser
- LED

36

Lampa

Typ

xenonová (200-1500nm, UV-Vis)
deuteriová (185-370 nm, hlavně UV oblast)
rutovná výbojka (253.4 nm a 302.6 nm)

Výhody

zpravidla možnost výběru z velkého rozmezí vlnových délek a nízká cena

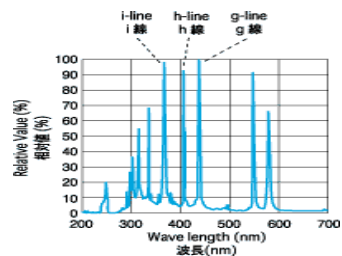
Nevýhody

slabý výkon (při vybrané vlnové délce)



37

Typické spektrum lampy



38

Laser

Jako zdroje excitačního záření lze použít pulsní i kontinuální lasery

Výhody

vysoký výkon při dané vlnové délce
koherence
prostorové vlastnosti paprsku (zaostření, kompatibilita s mikrometodami)
pulsní lasery pro studium časově závislé fluorescence

Nevýhody

rel. vysoká cena
fixní excitační vlnová délka

Laditelné lasery

diskrétně a kontinuálně laditelné lasery

39

Běžné lasery

Laser Source	Wavelength (nm)
Ar-ion (air cooled)	473, 472, 476, 488, 496, 501, 514
Ar-ion (full frame)	275, 300, 305, 333, 351, 364, 385, 457, 472, 476, 488, 496, 501, 514
Ar-ion (full frame, frequency doubled)	239, 238, 244, 248, 257
Ar-Kr	350, 360, 457, 472, 476, 488, 496, 501, 514, 521, 531, 568, 647, 752
He-Cd	325, 354, 442
He-Ne	543, 594, 604, 612, 633
Excimer	
XeCl (pulsed)	308
KrF (pulsed)	248
Nitrogen (pulsed)	337
Nitrogen pumped dye (tunable)	360-950
Solid state	
YAG (frequency doubled)	532
YAG (frequency quadrupled)	266
Diode lasers	
frequency doubled (LiNbO ₃)	415
frequency doubled (KTP)	424
frequency tripled (Nd-doped YLF)	349

40

LED

- light-emitting diodes
- rozvoj CD, DVD, blue ray
- běžné v IR a Vis, nyní i v UV
- pro fluorimetrii vhodné UV a Vis LED



- Vis: 450 - 800
- UV: 285 - 400

41

Monochromátory

- Filtr
- Hranol
- Mřížka

42

Detektory

Požadavky

- vysoká citlivost
- široký dynamický rozsah

Fotonásobič (PMT)

Charge-Coupled Device (CCD)

Diode array (DA)

43

Instrumentace pro časově rozlišenou luminiscenci

excitace zábleskovou lampou

obvykle pro časy delší než desítky mikrosekund (nejčastěji Xe lampa)

excitace pulsním laserem

velmi krátké trvání pulsu

femtosekundové lasery (Heisenbergův princip: $\Delta\tau$ vs. $\Delta\nu$)

44

Srovnání absorpční a luminiscenční spektroskopie v oblasti UV-Vis

Spektroskopie v oblasti UV-Vis

$$A = c \times \epsilon \times l = \log(I_0/I)$$

Absorpční spektroskopie: měření poměru dvou světelných toků + přesnost (odolnost vůči změnám abs. hodnoty světelného toku Φ_0) - citlivost při (nepatrný rozdíl mezi I_0/I při nízké koncentraci analytu)

Luminiscenční spektroskopie

$$F \sim k \phi I_0 \cdot 2.3 c \times \epsilon$$

Luminiscenční spektroskopie: měření vyzářené energie + vysoká citlivost při použití citlivého detektoru (i jednotlivé fotony) - přesnost (fluorescence je přímo úměrná excitačnímu světelnému toku (I_0); projevuje se u ní negativně kolísání excitačního zdroje)

45

Další režimy spektrofluorimetru

3D spektra

- emisní spektrum vs. excitační
- emisní (resp. excitační spektrum) vs. čas
- vyhasínání luminescence vs. emisní spektrum

Synchronní sken

- Současný sken obou monochromátorů
- Stokesův posun je konstantní
- Stokesův posun není konstantní (jen speciální případy)

46

Příklad: synchronní sken

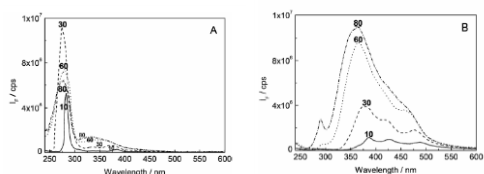
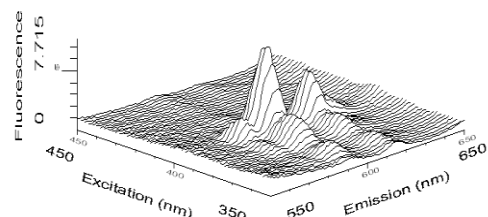


Fig. 4. Synchronous fluorescence spectra of a Lager beer (Beer G) recorded at $\Delta\lambda = 10$ nm, 30 nm, 60 nm, and 80 nm: (A) Diluted beer, 3.2% in water (v/v); (B) Bulk beer.

Ref: E. Sikorska, T. Górecki, I. V. Khmeinskii, M. Sikorski and D. De Keukeleire, J. Inst. Brew. 110(4), 267-275, 2004

47

Příklad 3D spektra: Luminiscence lanthanoidů Tb^{3+} , Eu^{3+} , Dy^{3+} , Sm^{3+} a Gd^{3+}



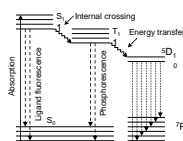
48

Využití luminiscence v chemickém výzkumu

- **stanovení** anorganických a organických sloučenin a biosloučenin
- stanovení sloučenin s vlastní fluorescencí
- stanovení anorganických iontů a prvků (tvorba chelátů s organickými činidly)
- fluorimetrická **indikace ekvivalenčního bodu** (stanovení Ca^{2+} , Ba^{2+} , Sr^{2+} chelatometricky za přítomnosti fluorexonu)
- fluorescenční **acidobazické indikátory**: naftylamin (pH 3.4 – 4.8), chininbissulfát (pH 3.0 – 5.0), akridin (pH 4.8 – 6.6)
- **oxidačně redukční fluorescence**: Hg^{2+} oxiduje thiamin na thiochrom (fluoreskuje)
- široká škála biologických aplikací: **informace o kvantitě, struktuře, vzájemných interakcích a lokalizaci**

49

Luminiscence lanthanoidů - příklad anorganické luminiscence



„Anténový efekt“ – ligand absorbuje energii, která je převedena na centrální iont, který vyzáří kvantum energie

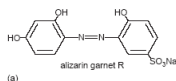
Charakteristické rysy luminiscence lanthanoidů:

- dlouhé časy vyhasínání
- dlouhý Stokesův posun
- ostré píky náležící energetickým přechodům mezi hladinami

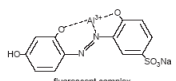
50

Příklady stanovení anorganických iontů

Chelating Agent	Metal Ions
8-hydroxyquinoline	Al^{3+} , Be^{2+} , Zn^{2+} , Li^+ , Mg^{2+} (and others)
flavonal	Zr^{4+} , Sr^{4+}
benzoin	$\text{B}_4\text{O}_7^{2-}$, Zn^{2+}
2,3,4,5,7-pentahydroxyflavone	Be^{2+}
2-(o-hydroxyphenyl) benzoxazole	Cd^{2+}



(a)



(b)

Stanovení Al^{3+} fluorimetricky s alizarinem

51

Příklady stanovení anorganických iontů – fluorescence v pevné fázi

- fluorescence UO_2^{2+} v taveninách (NaF, KF, LiF aj.)
- luminiscence nosičů polovodičového typu v přítomnosti aktivátorů
nosič: CaO , CaSO_4 , NaF, CaCO_3
aktivátor: Sb, Bi, Tl, Sn, lanthanoidy

52

Příklady luminiscenčních stanovení – organické látky a biomolekuly s vlastní fluorescencí

Class	Compounds*
aromatic amino acids	phenylalanine (F) tyrosine (F) tryptophan (F, P)
vitamins	vitamin A (F) vitamin B ₂ (F) vitamin B ₆ (F) vitamin B ₁₂ (F) vitamin E (F) folic acid (F)
catecholamines	dopamine (F) norepinephrine (F)
pharmaceuticals and drugs	quinine (F) salicylic acid (F, P) morphine (F) barbiturates (F) LSD (F) codeine (P) caffeine (P) sulfanilamide (P)
environmental pollutants	polycyclic aromatic hydrocarbons: pyrene (F) benzo[a]pyrene (F) organothiophosphorus pesticides (F) carbamate insecticides (F) DDT (P)

53

Příklad organické luminiscence kvazičárová molekulová fluorescence

Efekt Špolského

Jemná „kvazičárová“ struktura fluorescenčních pásů při teplotách < 77 K

Charakteristické pro aromatické uhlovodíky rozpuštěné např. v alkanech

Struktura čar odráží prostorové uspořádání analytu v krystalové mřížce rozpouštědla

Význam pro stanovení směsí (často karcinogenních) polyaromatických uhlovodíků, LOD ~ 10^{-11} g

54

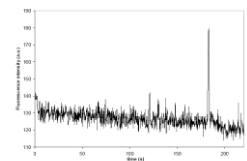
Derivatizace

Vnitřní (nativní) x vnější luminiscence - značky a sondy

Molekuly bez vlastní (vnitřní, nativní, přirozené) luminiscence lze derivatizovat luminiscenčními značkami/sondami

Detekce jednotlivých molekul a obsahu jednotlivých buněk

„single molecule/cell detection“



Rhodamin B ($c = 1 \times 10^{-12} \text{ mol.l}^{-1}$)

55

Výběr fluorescenčních značek

Kritéria:

spektrální vlastnosti (excitace, emise, kvantový výtěžek atd.)

vazebné místo (-NH₂, -SH skupina a další)

podmínky reakce (pH, koncentrace...)

další vlastnosti (acidobazicitá, hydrofobicitá ...)

56

Fluorescenční značky a sondy

fluorescenční značky (fluorescent labels)

nevlastní (extrinsic fluorescence) fluorofory, které se ke sledovaným biomolekulám (proteinům, peptidům, ligandům, oligonukleotidům a jiným) vážou kovalentní vazbou

fluorescenční sondy (fluorescent probes)

nevlastní fluorofory, které se ke sledované struktuře vážou nekovalentně a často přitom mění své fluorescenční vlastnosti

Značky a sondy jsou velmi důležitými nástroji především v bioanalytice

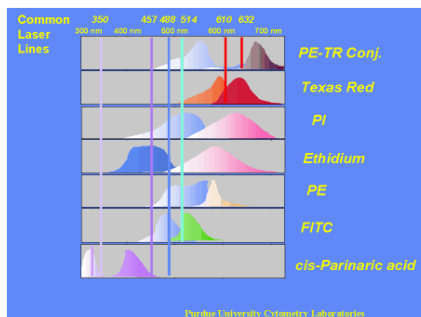
57

Použití luminiscenčních značek

- analytické stanovení (příp. v kombinaci se sep. metodou)
- fluorescenční mikroskopie, značení buněk a tkání
- fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH)
- měření vzdálenosti funkčních skupin (FRET)
- průtoková cytometrie
- fluorescenční „immunoassays“

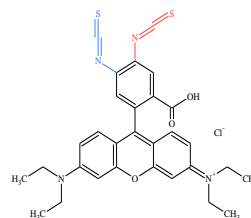
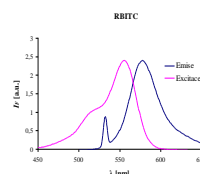
58

Výběr fluorescenční značky – spektrální vlastnosti



59

Výběr fluorescenční značky – spektrální vlastnosti



Analyt: peptidy, aminokyseliny, aminosloučeniny

Nd:YAG (x2): 532 nm

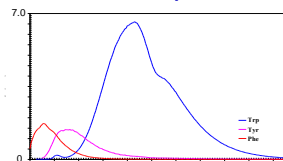
Ar⁺: 488 nm

rhodaminB isothiokyanát

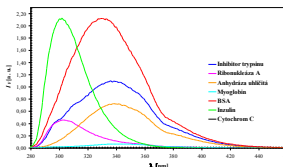
fluorescein isothiokyanát

60

Nativní fluorescence aminokyselin, proteinů a peptidů



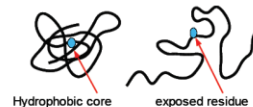
	Tyr	Trp	Phe
λ_{max} (nm)	348	303	282
ϕ	0.20	0.14	0.04
τ (ns)	2.6	3.6	6.4
Abs λ_{max} (nm)	280	274	257
Abs ϵ_{max}	5600	1400	200
$\epsilon_{max} \cdot \tau$	11	2	0.008



67

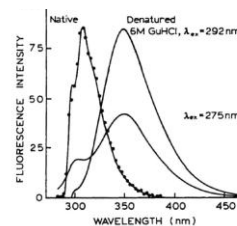
Nativní fluorescence peptidů a proteinů

Unfolded (nesbalené):
volná rotace, více kolíží,
větší vliv polárnějšího
solventu



Folded (fixní konformace):
méně kolíží, fluorescence je
ovlivněna nepolárním
jádem proteinu

Se zvyšující se polaritou
prostředí (konformace, solvent)
roste emisní maximum



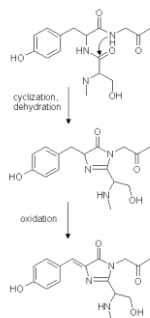
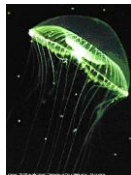
Green Fluorescent Protein (GFP)

Zeleně fluoreskující protein (GFP) - izolován z medúzy.

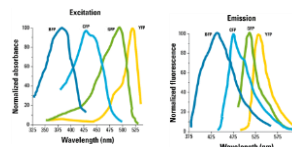
Fluorescence pochází z konjugovaného systému vzniklého cyklizací vedlejšího řetězce proteinu a následnou oxidací sekvence Ser-Tyr-Gly.

GFP má dva výrazné excitační pásy (kolem 395 a 475 nm) a maximum emise je 508 nm. V živém organismu je energie získána chemickou reakcí (chemiluminiscence).

Po modifikaci DNA mohou produkovat GFP také jiné organismy (bakterie, mušky, savčí buňky...)



GFP, YFP a další...



Proteiny s výraznou vlastní (vnitřní) fluorescencí jsou využívány:

- neinvazivní fluorescenční „marker“ přímo v živých buňkách
- sledování exprese genu
- interakce protein-protein

70

Spojení separačních technik a fluorescence

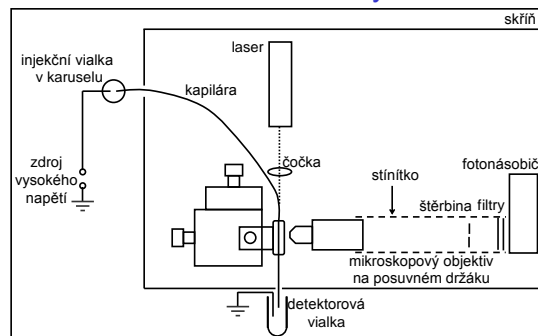
Kolonové i planární separační techniky - HPLC, CE, ITP, 2D GE aj.

Laser výhodný jako zdroj excitačního záření zvláště pro on-column detekci u mikrokolonových sep. technik

- LIF (laser induced fluorescence)
- kompatibilita laserového paprsku s mikrokolonovými technikami
 - dostatečný světelný tok i při rel. malém výkonu laseru (~mW)
 - vyšší toky způsobují běhnutí
- pro danou třídu analytů, resp. derivátů zvolen vhodný laser podle vlnové délky
- jednoduchá sestava

71

Příklad: schema sestavy CE LIF

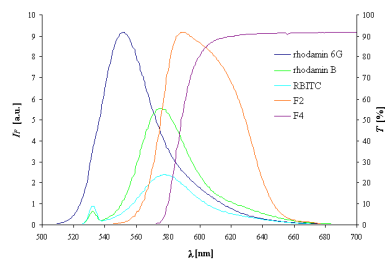


72

Konstrukce CE LIF

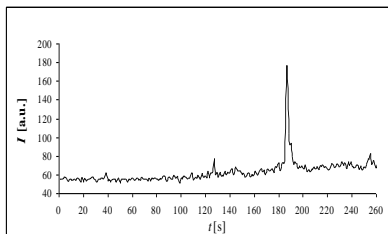


Výběr luminiscenčního barviva – spektrální vlastnosti



74

CE LIF: velmi nízké detekční limity

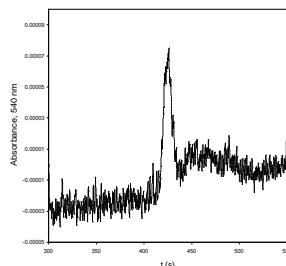


Analyt: Rhodamin B, $c = 1 \times 10^{-12}$ mol/l, excitace: 532 nm, 5 mW; emise: > 560 nm, kapilára: 50 mm *i.d.*, 375 mm *o.d.*, $l = 30/37$ cm, dávkování: $U = 5$ kV, $t_f = 10$ s nebo $\Delta h = 2$ cm, $t_f = 30$ s, separace: 0,02 mol/l fosfát v 10% MeOH, pH 10; $U = 10$ kV

LOD ~ 2×10^{-13} mol/l ... $\sim 10^2$ molekul

75

LOD: srovnání s absorbanční detekcí

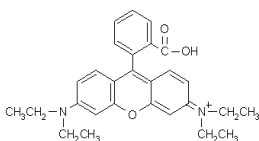


Analyt: Rhodamin B, $c = 1 \times 10^{-5}$ mol/l (při obdobném dávkování)

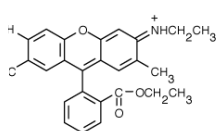
76

Separace rhodaminových barviv

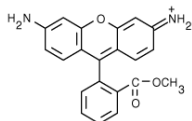
Rhodamin B



Rhodamin 6G

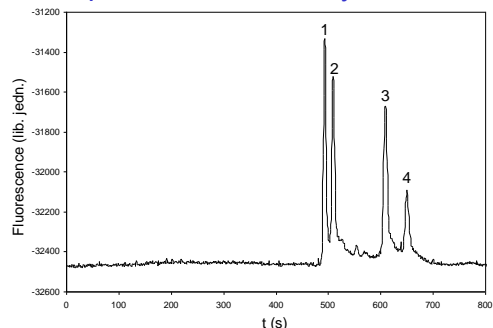


Rhodamin 123



77

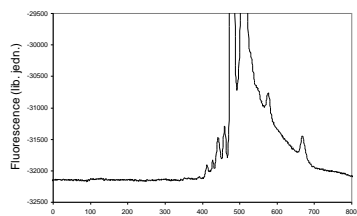
Separace rhodaminových barviv



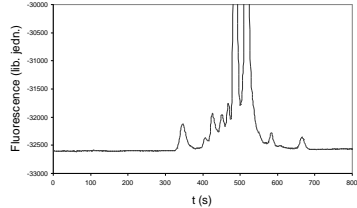
Píky: 1, 2 - Rh 123, 3 - Rh 6G, 4 - Rh B

78

blank



peptid
(derivatiz.
před
kolonou)



79