

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

Aplikace
Spojení se separačními technikami

1

Klasifikace luminiscence

... podle zdroje excitační energie:

- fotoluminiscence
- chemiluminiscence
- bioluminiscence
- elektroluminiscence

4

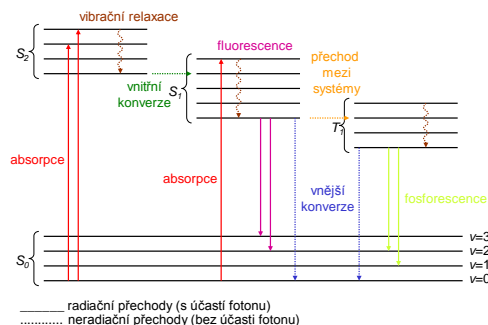
Luminiscence

Pro zájemce podrobněji:

Petr Táborský, Jan Preisler
Molekulová luminiscence
St v 17:00 v učebně AK1

2

Jablonského diagram



5

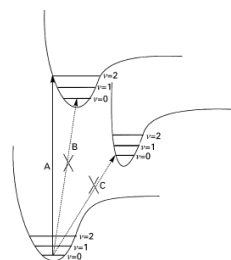
Molekulová luminiscenční spektroskopie

- 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

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

Časové relace

Absorpce $\sim 10^{-15}$ s (\sim perioda fononu)

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

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.

Mezysystémový 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 fononu je nepravděpodobný (nutná změna spinu).

8

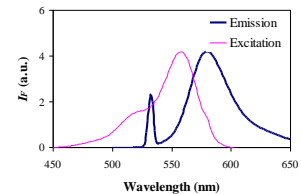
Emisní a excitační spektra

• Emisní spektrum

závislost intenzity luminescence na vlnové délce; $\lambda_{em} = \text{konst.}$

• Excitační spektrum (aktivační, absorpční)

závislost absorpce luminoforu (fluoroforu) na vlnové délce, $\lambda_{ex} = \text{konst.}$



(rhodamin B)
11

Neradiační (nezářivá) deexcitace

Vnější konverze

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

9

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 konverzemí

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

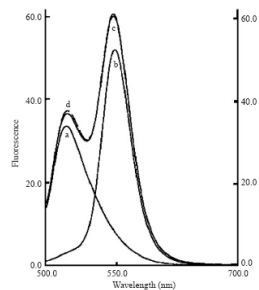
Vavilovův postulát

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

Aditivita spekter

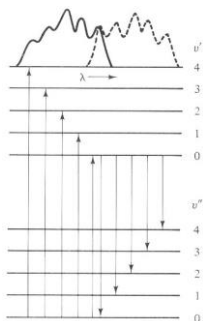
13

Aditivita spekter



16

Zrcadlové pravidlo



14

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

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

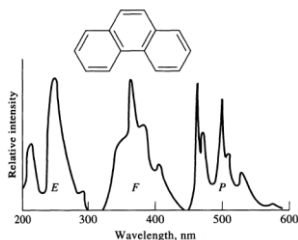
I_F – fluorescence (fotony/s), k – podíl emitovaných fotonů, které dorazí na detektor, ϕ – výtěžek fluorescence

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

zjednodušený vztah pro nízké koncentrace

17

Fluorescence a fosforecence



15

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

$$\phi_0 = E_{em}/E_{abs} = h\nu_{em}/h\nu_{ex} \quad \phi_0 < \phi_k \quad (\text{Stokesův posun})$$

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 blízke látky, 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

Struktura látek a luminiscence: typy luminiscenčních přechodů

organické luminofory – typické luminiscenční přechody jsou hlavně:

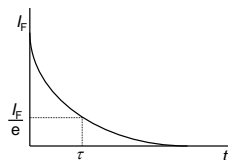


anorganické luminofory

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

22

Vyhasínání luminiscence



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

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

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

Luminiscence organických molekul – obecná pravidla

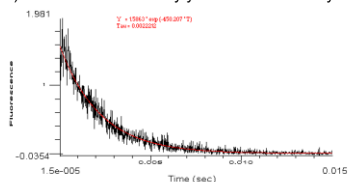
- podmínkou fotoluminiscence je absorpce
- intenzita luminiscence a posun emise k vyšším vlnovým délkám roste s počtem konjugovaných aromatických kruhů (hyperchromní a bathochromní posun)
- heteroatomy v aromatickém kruhu - vyšší intenzita luminiscence a posun emise k vyšším vlnovým délkám
- heteroatomy 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

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

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 dramaticky zvýšit kvantové výtěžky a emisní vlnové délky (červený, bathochromní posun). Donory e', např. -OH, zvyšují fluo. výtěžek, akceptory jej snižují.

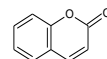
24

Luminiscence organických molekul – obecná pravidla

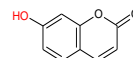
- Vliv vnitřního těžkého atomu – vliv halidových substituentů: podpora přechodů mezi systémy, $S \leftrightarrow T$.
- S rostoucí velikostí a konjugovaností aromatického systému roste kvantový výtěžek fluorescence, klesá výtěžek fosforescence.
- Luminiscence je typická pro molekuly s planární strukturou, 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 a f e^- (prvky vzácných zemin).

25

Substituce aromátů skupinami zvyšujícími konjugaci



kumarin
 $\phi = 0.0001$

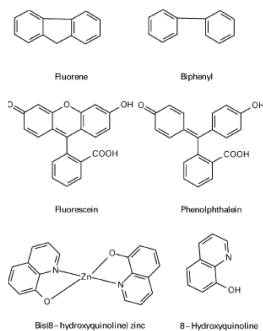


7-hydroxykumarin
 $\phi = 0.5$

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

28

Struktura a luminiscence



26

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

Fotoluminiscence aromatických látek

Fluorescence of linear aromatics in EPA at 77K*

Compound	ϕ_f	λ_{ex} (nm)	λ_{em} (nm)	ϕ_p	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
Naphthacene	0.60	390	480	—	—

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

27

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_f (s)	k_{int} (s ⁻¹)
Naphthalene	0.55	325	0.051	469.5	2.6	1×10^7
1-Fluoronaphthalene	0.84	316	0.056	475	1.5	2×10^7
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 polarity solventu snižuje energii exc. stavu více než energii stavu základního, což vede k červenému posunu fluorescence. U přechodu $n-\pi^*$ je tomu naopak.

pH

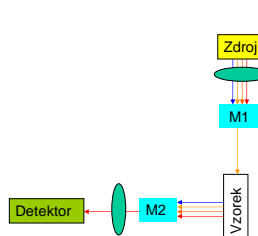
fluorescence protonované a neprotonované formy se mohou výrazně lišit mezi pK_a excitovaném a základním stavu může být řádový rozdíl

Vliv externího těžkého atomu

zvýšení fosforescence podpořením přechodů mezi systémy

31

Měření fotoluminiscence



Zdroj

lampa (Xe, deuteriová, atd.), laser (různé typy), LED

Excitační monochromátor (M1)

výběr excitační vlnové délky, není nutný u laserového excitačního zdroje

Emisní monochromátor (M2):

výběr emisní vlnové délky

Detektor:

úhel nastavení detektoru je zpravidla 90°.

34

Zhášení luminiscence

Jevy vedoucí k redukci intenzity luminiscence

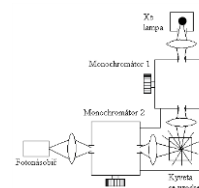
1. **statické zhášení** - např. nefluorescenční komplex, energii absorbuje jiná část molekuly atd.
2. **dynamické (kolizní) zhášení** – srážka s molekulou zhášedla (např. solventu)
3. **vnitřně-filtrační efekt** (reabsorpce u molekul s malým Stokesovým posunem)
4. **fotovybělování** – degradace luminoforu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

32

Instrumentace



AMINCO- Bowman, Series 2 (AB-2)



35

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

Zdroje excitačního záření

- Lampa
- Laser
- LED

36

Lampa

Typ

xenonová (200-1500nm, UV-Vis)

deuteriová (185-370 nm, hlavně UV oblast)

rtuťová 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)

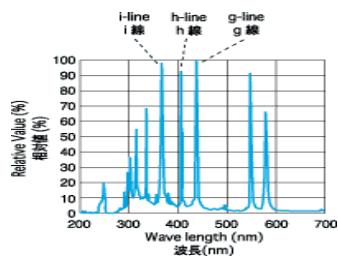
37

Běžné lasery

Laser Source	Wavelength (nm)
Ar-ion (air cooled)	457, 472, 476, 488, 496, 501, 514
Ar-ion (oil frame)	275, 300, 305, 333, 351, 364, 385, 437, 472, 476, 488, 496, 501, 514
Ar-ion (oil frame, frequency doubled)	229, 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)	360-850
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

Typické spektrum lampy



38

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

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

Monochromátory

- Filtr
- Hranol
- Mřížka

42

Detektory

Požadavky

- vysoká citlivost
- široký dynamický rozsah

Fotonásobič (PMT)

Charge-Coupled Device (CCD)

Diode array (DA)

43

Další režimy spektrofleurimetru

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

Instrumentace pro časově rozlišenou luminescenci

excitace zábleskovou lampou

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

excitace pulsním laserem

velmi krátké trvání pulsu

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

44

Příklad: synchronní sken

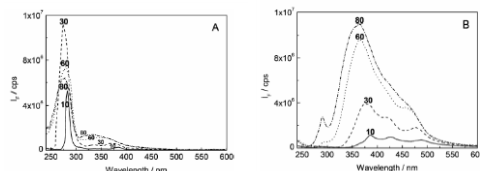


Fig. 4. Synchronous fluorescence spectra of a lager beer (Beer G) recorded at $\Delta\lambda = 10$ nm, 30 nm, 50 nm, and 80 nm: (A) 10 nm, 30 nm, 50 nm; (B) 30 nm, 50 nm, 80 nm.

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

47

Srovnání absorpční a luminescenční 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)

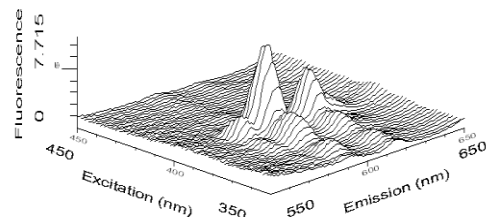
Luminescenční spektroskopie

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

Luminescenční 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 kolidující excitační zdroj)

45

Příklad 3D spektra: Luminescence 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

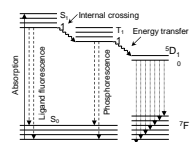
49

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

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

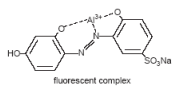
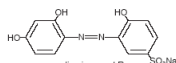
Příklady luminiscenčních stanovení – organické látky a biomolekuly s vlastní fluorescencí

Class	Compounds ^a
aromatic amino acids	phenylalanine (F) tyrosine (F)
vitamins	tryptophan (F, P) 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) organothiophosphorous pesticides (F) carbamate insecticides (F) DDT (P)

53

Příklady stanovení anorganických iontů

Chelating Agent	Metal Ions
8-hydroxyquinoline	Al^{3+} , Be^{2+} , Zn^{2+} , Li^+ , Mg^{2+} (and others)
flavonol	Zr^{4+} , Sr^{2+}
benzoin	$\text{Ba}_2\text{O}_7^{2-}$, Zn^{2+}
2',3,4',5,7-pentahydroxyflavone	Ba^{2+}
2-(o-hydroxyphenyl) benzoxazole	Cd^{2+}



Stanovení Al^{3+} fluorimetricky s alizarinem

51

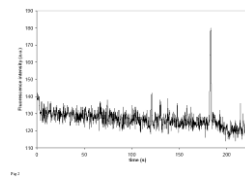
Derivatizace

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

54

Výběr fluorescenčních značek

Kritéria:

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

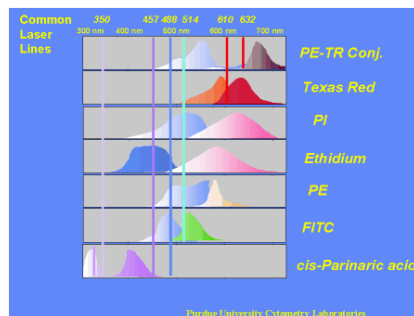
vazebné místo (-NH₂, -SH skupina a další)

podmínky reakce (pH, koncentrace...)

další vlastnosti (acidobazicitá, hydrofobicitá ...)

55

Výběr fluorescenční značky – spektrální vlastnosti



58

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

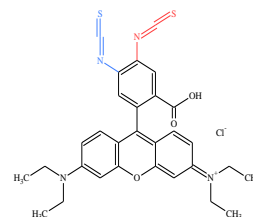
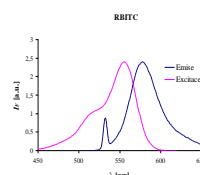
fluorescenční sondy (fluorescent probes)

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

56

Výběr fluorescenční značky – spektrální vlastnosti



Analyt: **peptidy, aminokyseliny, aminosloučeniny**
 Nd:YAG (x2): **532 nm** **rhodaminB isothiokeyanát**
 Ar⁺: **488 nm** **fluorescein isothiokeyanát**

59

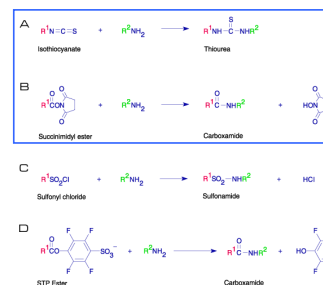
Použití luminiscenčních značek

- 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“

57

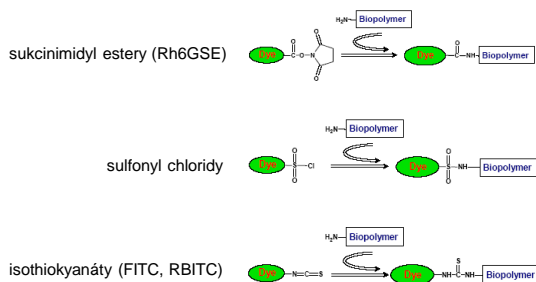
Fluorescenční značky

- Klasifikace fluorescenčních značek podle vazebného místa biomolekuly:
 aminová skupina
 thiolová skupina
 další



60

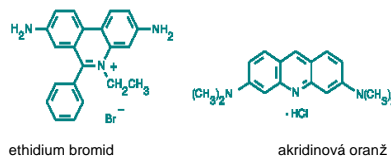
Výběr fluorescenční značky – vazebná místa: amino-reaktivní značky



61

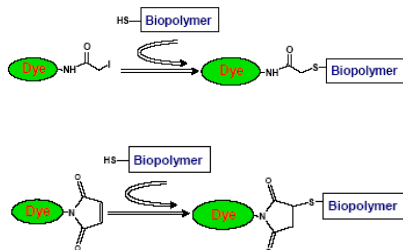
Fluorescenční sondy pro NK

- Vizualizace a identifikace RNA a DNA
- Různé principy interakce, např. „vmezení“ barviva do šroubovice DNA (ethidium bromid)



64

Výběr fluorescenční značky dle vazebného místa: thiol-reaktivní značky



62

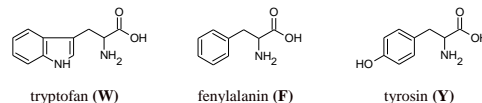
Nativní fluorescence peptidů a proteinů

V peptidech a proteinech fluoreskují zejména: W, Y a F.

W fluoreskuje nejvíce, Y je nejpočetnější, W může zhasět Y.

Excitace v oblasti UV, emise od 280 nm po 400 nm.

Dále mohou fluoreskovat různé prostetické části proteinů (např. kofaktory), ale mohou také zhaset...



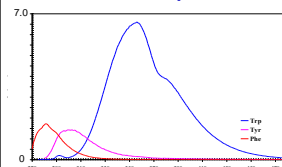
65

Fluorescenční imun analytické metody

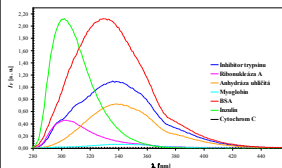
- Fluorescence Immuno Assay (FIA)
- Fluorescence Polarization Immuno Assay (FPIA)
- Time Resolved Fluorescence Immuno Assay (TR-FIA)
- Elektroluminiscenční, chemiluminiscence a další
- Enzymatické metody s luminiscenční detekcí
- náhrada radioimuno technik s příchodem levných laserů a kvůli vyšší bezpečnosti
- detekční limity obou metod jsou srovnatelné (až 10^{-12} g.l⁻¹)

63

Nativní fluorescence aminokyselin, proteinů a peptidů



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



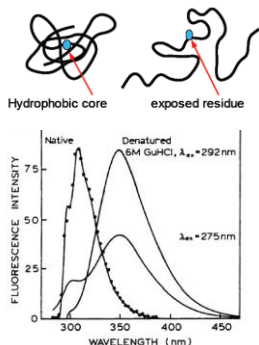
66

Nativní fluorescence peptidů a proteinů

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

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

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



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 bělení
- pro danou třídu analytů, resp. derivátů zvolen vhodný laser podle vlnové délky
- jednoduchá sestava

70

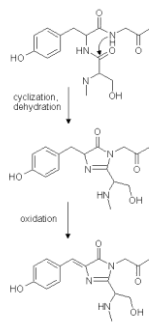
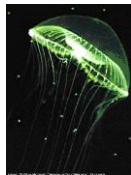
Green Fluorescent Protein (GFP)

Zeleně fluoreskující protein (GFP)- izolován z
medúzy.

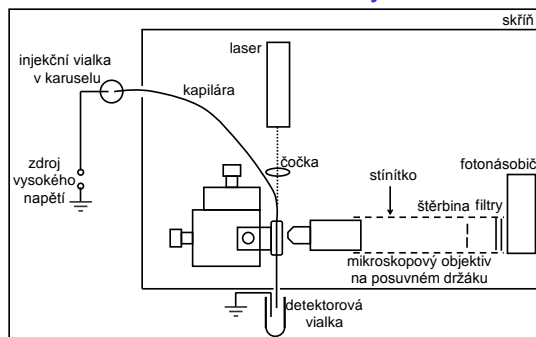
Fluorescence pochází z konjugovaného systému
vzniklého cyklizací vedlejšího řetězce proteinu a
následnou oxidací sekvence Ser-Tyr-Gly.

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...)

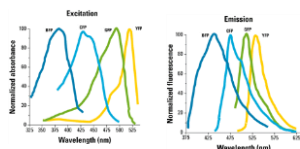


Příklad: schema sestavy CE LIF



71

GFP, YFP a další...

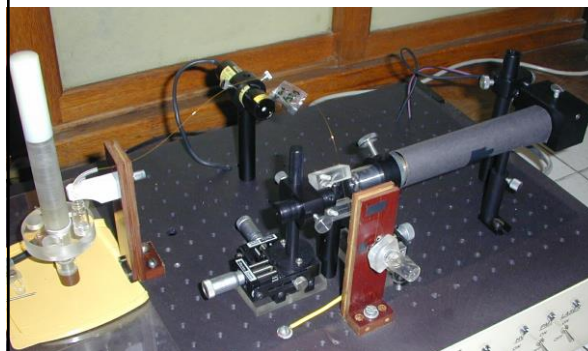


Proteiny s výraznou vlastní (vnitřní) fluorescencí jsou využívány:

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

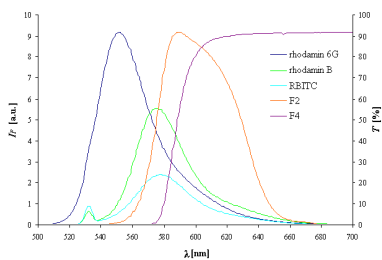
69

Konstrukce CE LIF



72

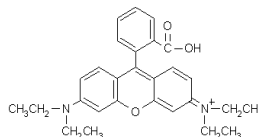
Výběr luminiscenčního barviva – spektrální vlastnosti



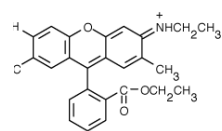
73

Separace rhodaminových barviv

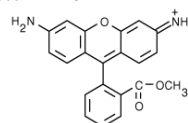
Rhodamin B



Rhodamin 6G

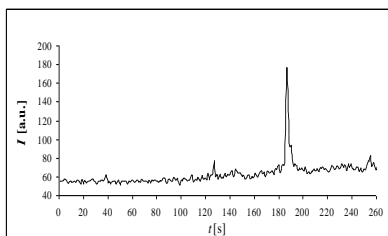


Rhodamin 123



76

CE LIF: velmi nízké detekční limity

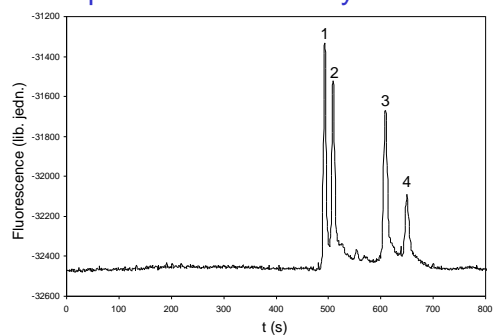


Analyt: Rhodamin B, $c = 1 \times 10^{-12}$ mol/l, excitace: 532 nm, 5 mW; emise: > 560 nm, kapilára: 50 mm *i.d.*, 375 mm *o.d.*, $l = 30/37$ cm, dávkování: $U = 5$ kV, $t_e = 10$ s nebo $\Delta h = 2$ cm, $t_s = 30$ s, separace: 0,02 mol/l fosfát v 10% MeOH, pH 10; $U = 10$ kV

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

74

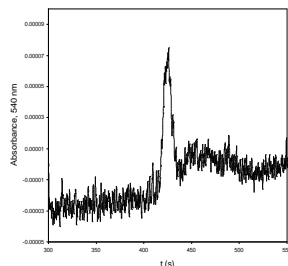
Separace rhodaminových barviv



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

77

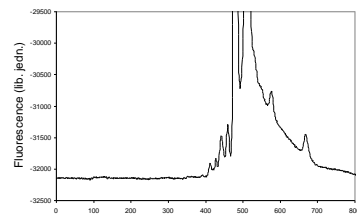
LOD: srovnání s absorbanční detekcí



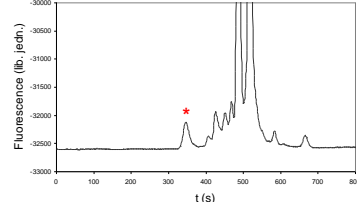
Analyt: Rhodamin B, $c = 1 \times 10^{-5}$ mol/l (při obdenném dávkování)

75

blank



peptid



78

Rodina proteinů AHP – rozsah fosforylace?

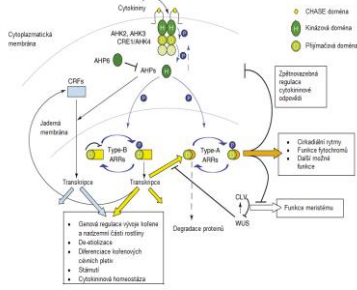
Cytokinová signální dráha rostlin

A. thaliana proteiny AHP (Arabidopsis Histidinephospho-transfer Proteins)

AHP1-5 fungují jako proteiny HPT

doména HPT s evolučně konzervovaným strukturním motivem **XHQXKGSSXS**

Role fosforylace na His?

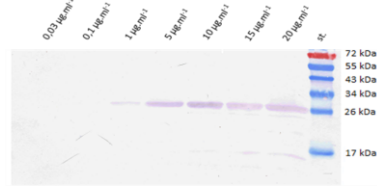


To, J.P. Kieber, J.J. Trends Plant Sci. 2008, 13, 85-92

79

WB standardu GFP

Western blot standardu GFP



0,03 - 20 µg.ml⁻¹ vždy v objemu 30 µl

LOD

Western blot ~1,0 µg.ml⁻¹

CE-LIF ~0,01 µg.ml⁻¹

82

Fosfohistidin (pHis)

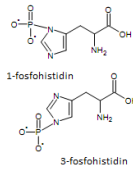
typ fosforylované aminokyseliny	prostředí		
	kyselé	stabilní	zásadité
O-fosfáty	fosfoserin	stabilní	nestabilní
	fosfotreonin	stabilní	nestabilní
N-fosfáty	fosfotyrosin	stabilní	stabilní
	fosfohistidin	nestabilní	stabilní
	fosfospartát	nestabilní	nestabilní
	fosfoglutamát	nestabilní	nestabilní
acyl-fosfáty	fosfoarginin	nestabilní	stabilní
	fosfolyzin	nestabilní	stabilní
S-fosfáty	fosfocystein	stabilní	stabilní

SICKMANN, A; MEYER, HE. *Analyst*. 2005, 130, 9, s. 1263-1270.

...nelze separovat 2D PAGE ⇒ CE-LIF

- separace v nativním prostředí
- specifická
- fúzní proteiny AHP-GFP

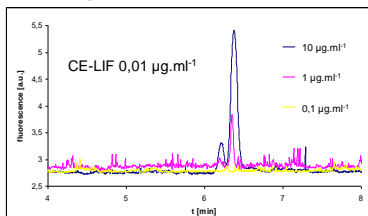
- 2 izomery pHis
- 6 % z celkového počtu fosfoproteinů



80

CE-LIF standardu GFP

Elektroforegram standardu GFP



$\Delta h = 3$ cm, $t_{inj} = 5$ s, $U = 8$ kV, 50 mM Tris se 50 mM NaCl, $pH = 9,0$

LOD [ng/ml]	LOD [M]	V [n]	Ref.
0,08	$3,0 \cdot 10^{-12}$	17	1
-	$1,3 \cdot 10^{-10}$	3	2
90	$3 \cdot 10^9$	1,9	3
10	$4 \cdot 10^{10}$	0,6	tato práce

1. Craig, D. B.; Wong, J. C. Y.; Dovichi, N. J., *Biomedical Chromatography* 1997, 11 (4), 205-206.
2. Zhang, H. F.; Ma, L.; Liu, X.; Lu, Y. T., *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* 2004, 804 (2), 413-420.
3. Kort, G. M.; Landers, J. P.; O'Shea, D. J., *Analytical Biochemistry* 1997, 251 (2), 210-218.

81