

# Barevné principy absorpce a fluorescence

**Pokročilé biofyzikální metody v experimentální biologii**

**Ctirad Hofr**



Oddělení funkční genomiky a proteomiky

Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta  
Brno, Česká republika

FGP

# Světlo je elektromagnetické vlnění

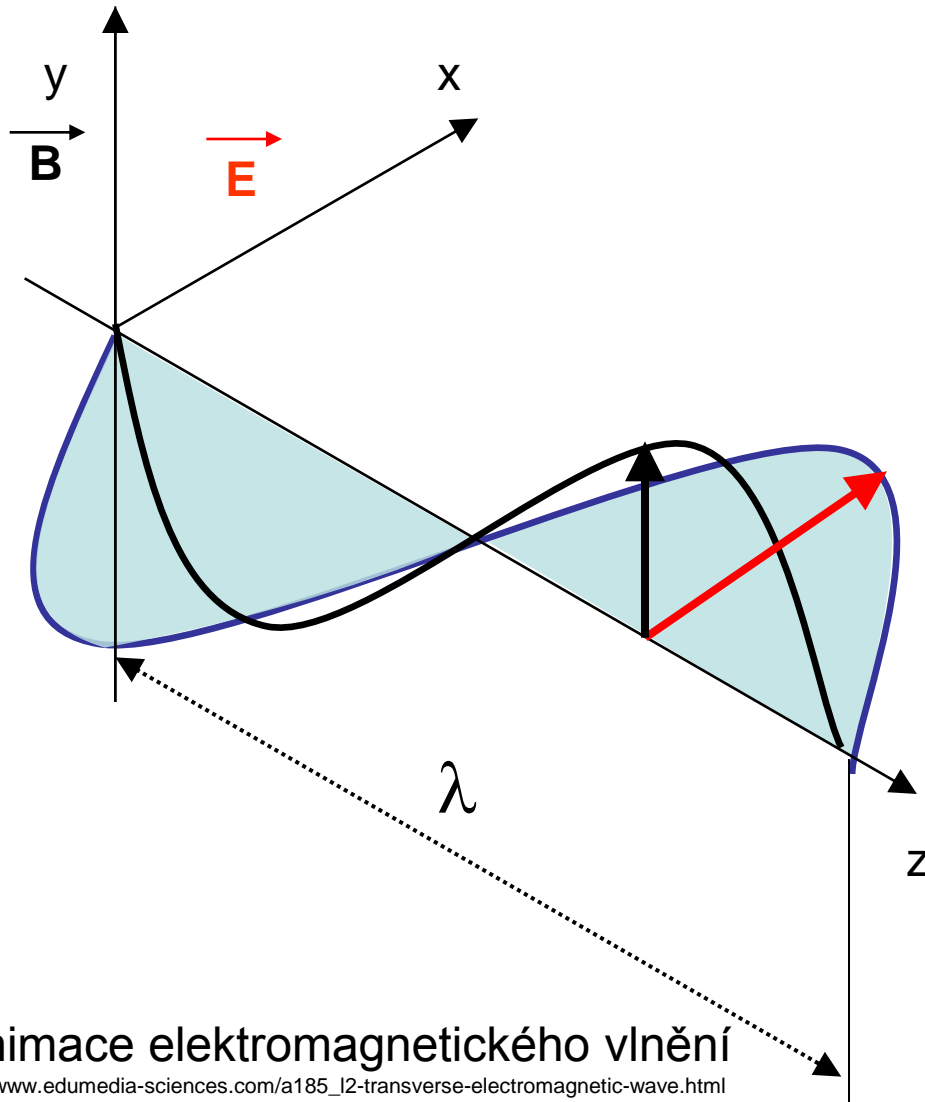
- Skládá se z elektrické složky a magnetické složky, které kmitají ve fázi v na sebe kolmých rovinách
- Světlo je charakterizováno frekvencí  $f$  a vlnovou délkou  $\lambda$
- Frekvence  $f$  udává kolikrát za sekundu vlnění kmitne, udává se v  $\text{Hz} = \text{s}^{-1}$
- Vlnová délka udává délku, kterou za jeden kmit světlo urazí, udává se v nanometrech  $\text{nm} = 10^{-9} \text{ m}$
- Frekvence  $f$  a vlnová délka  $\lambda$  jsou spojeny vztahem

$$c = \lambda f$$

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  $\lambda$  je nepřímo  
úměrná frekvenci  $f$**

$$E = h f$$

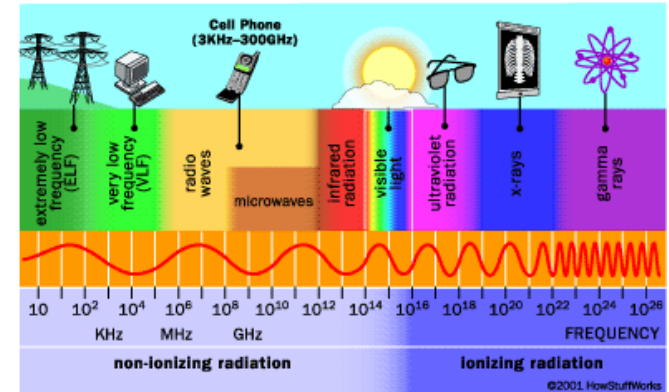
Čím je větší frekvence, tím je  
větší energie záření.

**Čím je větší vlnová délka  $\lambda$ ,  
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.



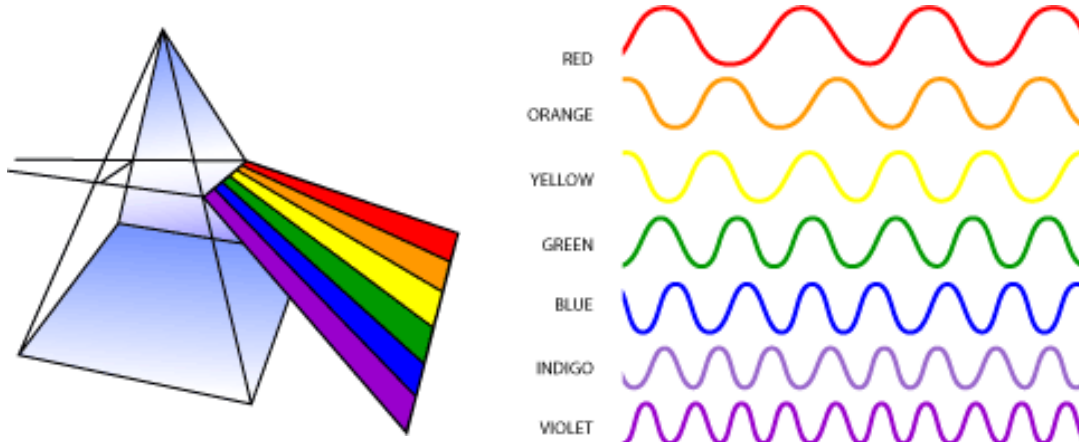
400 nm

$7.5 \cdot 10^{14}$  Hz



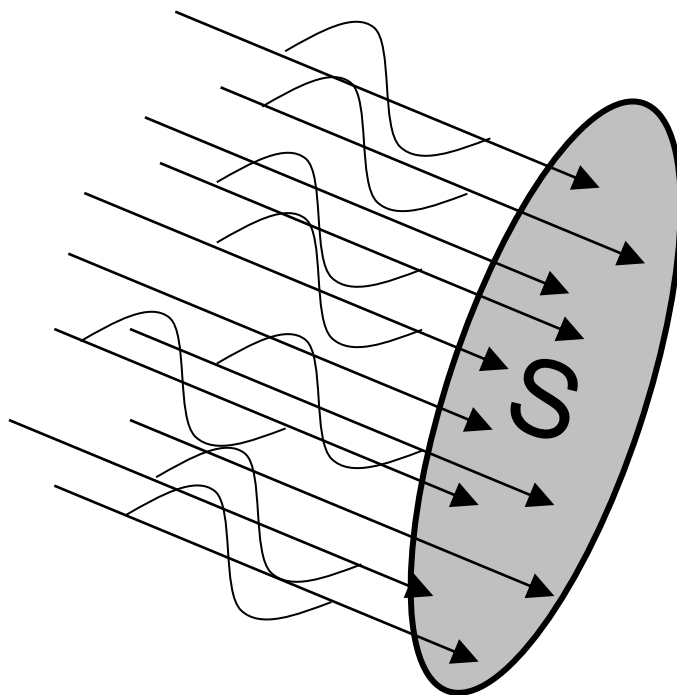
700 nm

$4.3 \cdot 10^{14}$  Hz



# Intenzita

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



# Absorpce

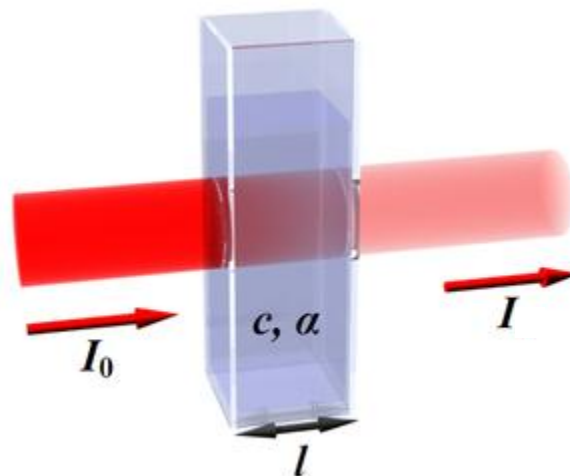
- Látka pohlcuje světlo
- Pro absorpci monochromatického světla

- **Lambert-Beerův zákon:**

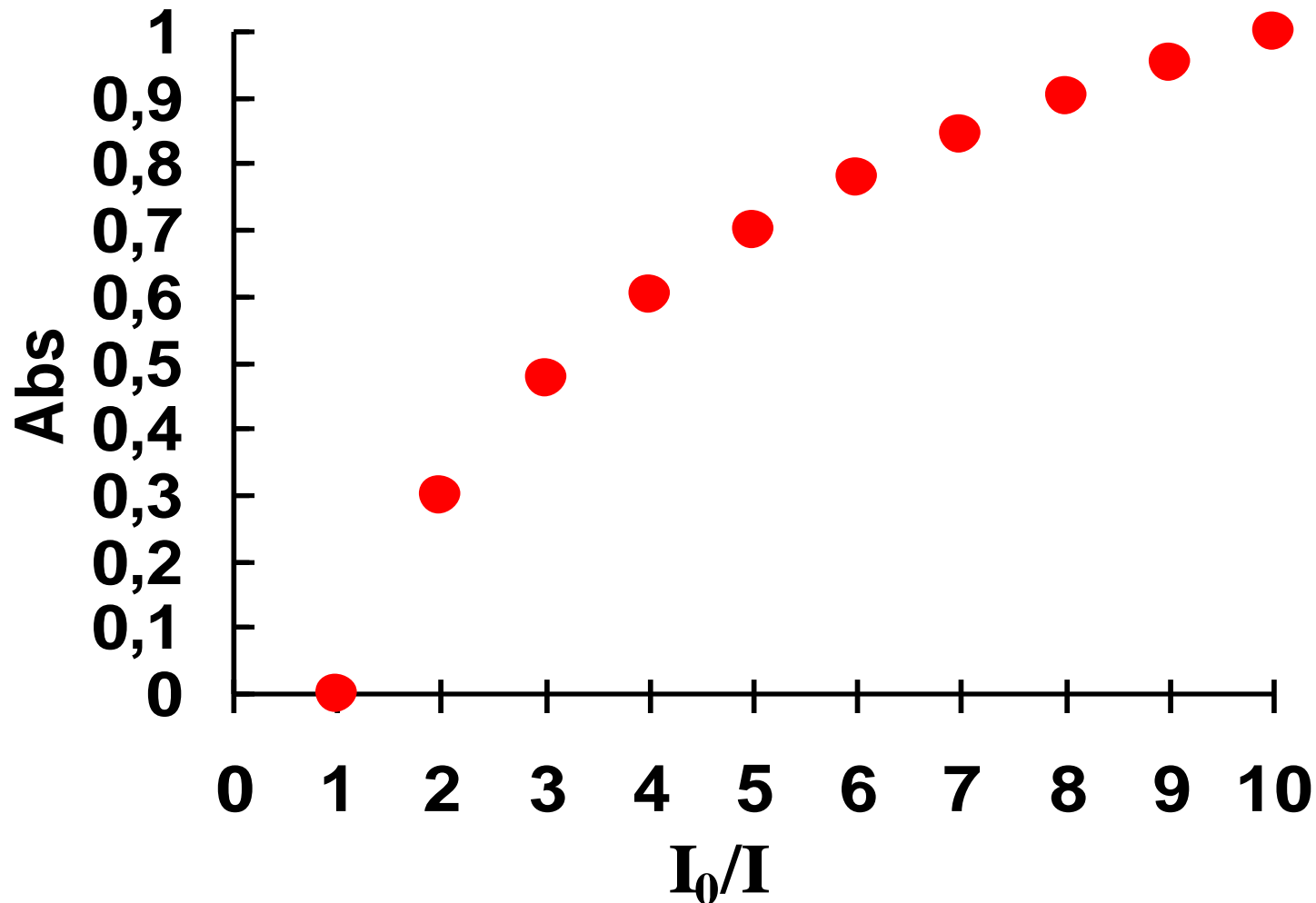
Absorbance je přímo úměrná koncentraci a tloušťce vrstvy roztoku

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

$\varepsilon$ =molární extinční koeficient látky,  $c$ -koncentrace,  $l$ -délka optické dráhy



# Závislost absorbance na poměrné intenzitě dopad. a prošlého světla



# 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  $\tau$  (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

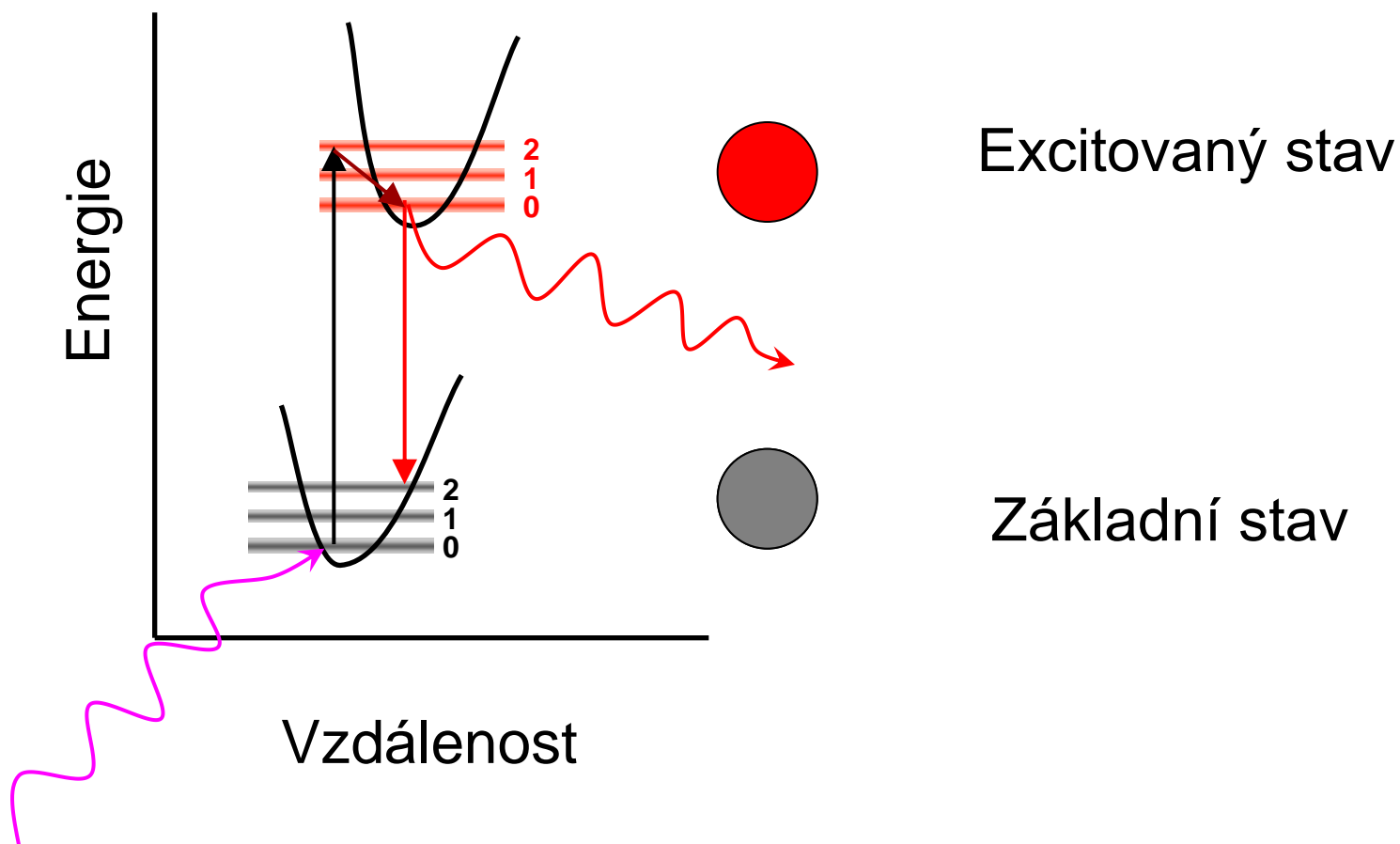
**milisekundy až sekundy**

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

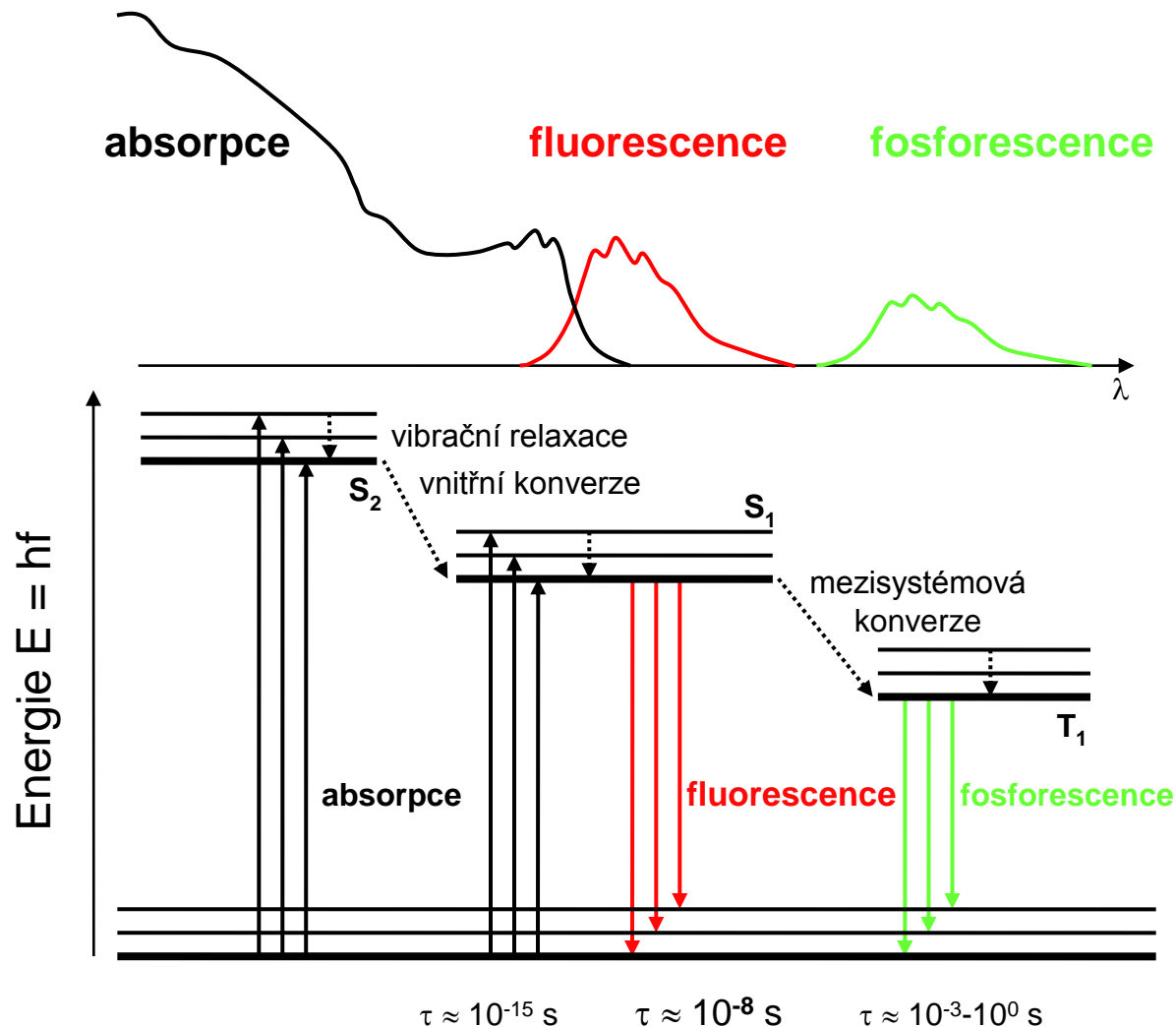
# Frank-Condonův princip o „lenosti jader“ při absorpci

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



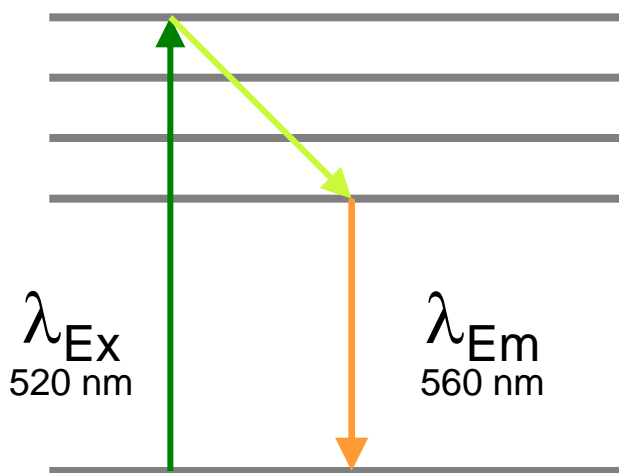
# Barevný animovaný úvod do principu fluorescence

<http://probes.invitrogen.com/resources/education/tutorials/1Intro/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

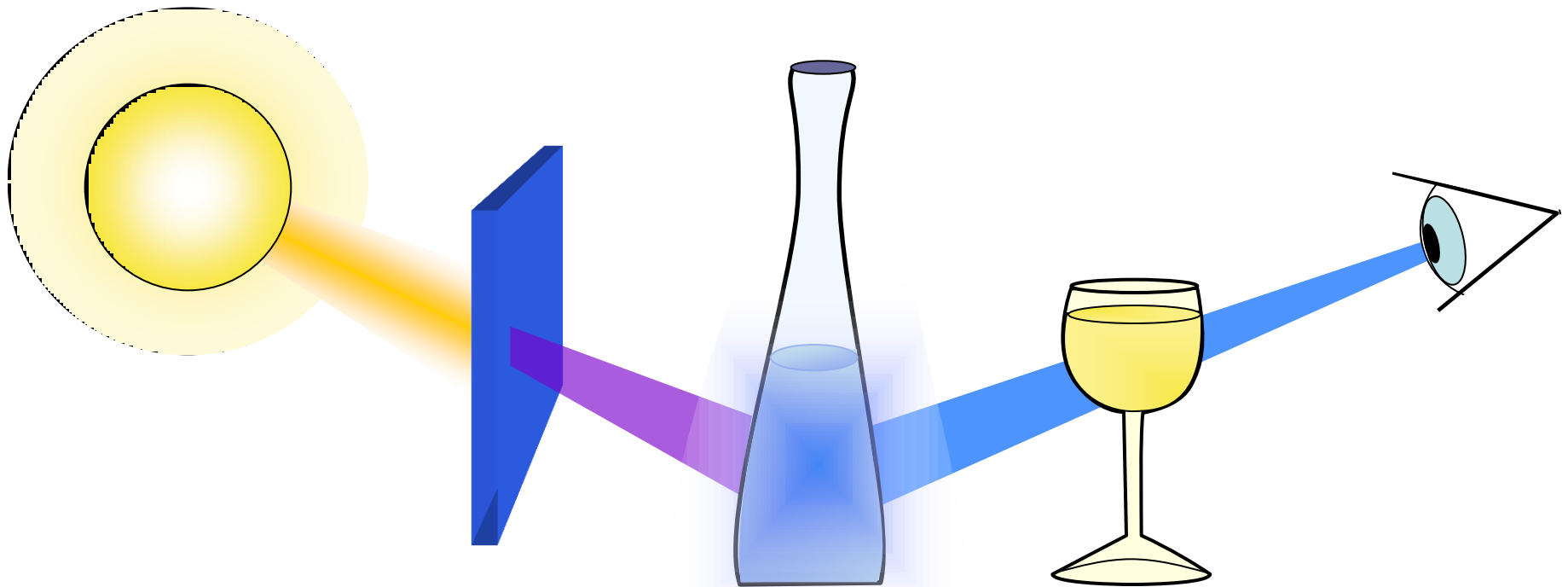
Emise má vždy menší energii (větší vlnovou délku) než je energie absorbovaná (menší  $\lambda$ ).

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



# Experiment G. G. Stokesa

1852, Cambridge



Slunce

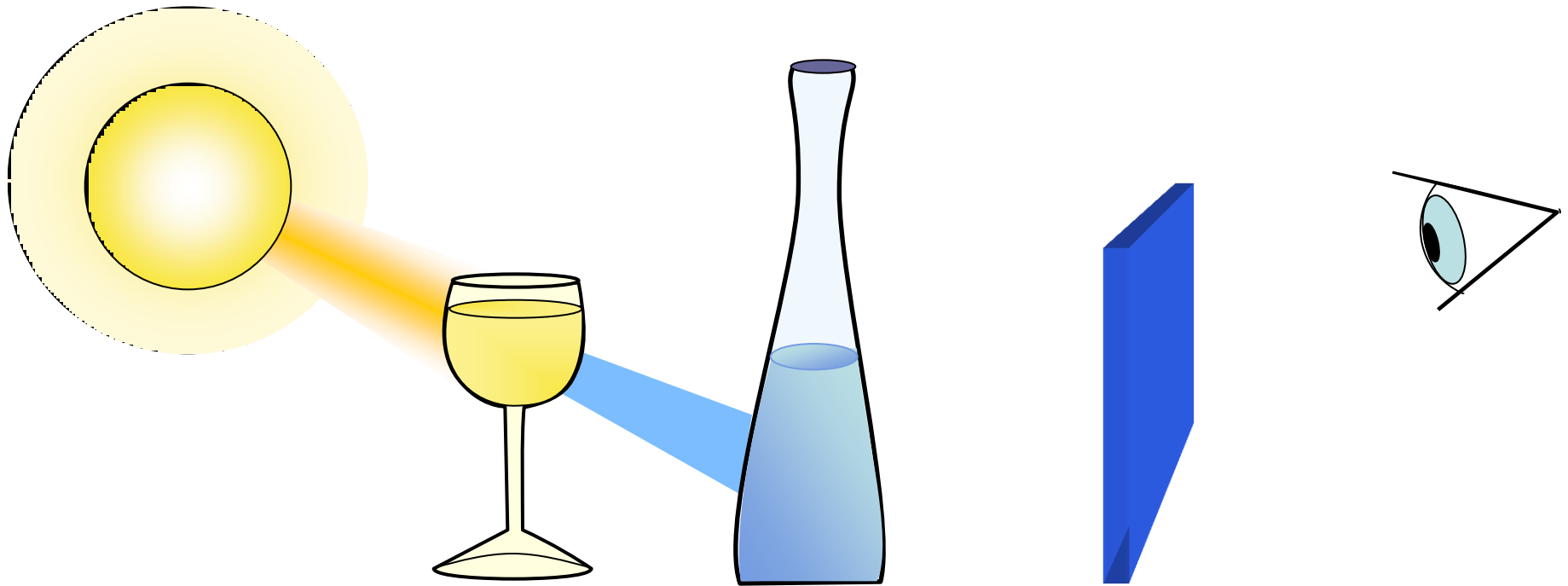
Modré sklo  
okna v kostele  
Propouští světlo s  
 $\lambda < 400 \text{ nm}$   
Excitační filtr

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).

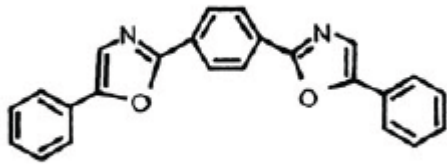
Typickými fluorofory jsou například:

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

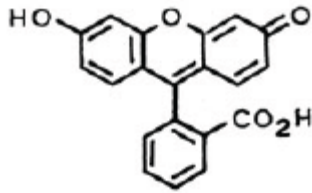


# Využití fluorescence v geografii

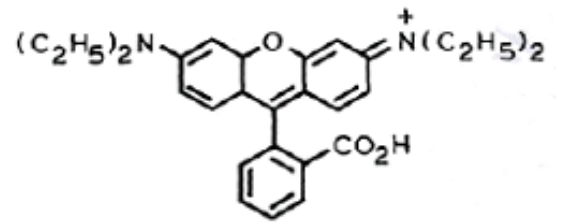




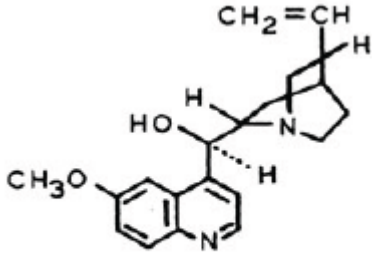
**POPOP**



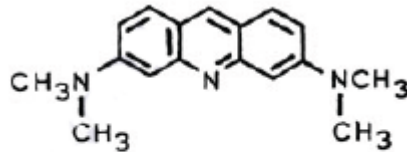
**Fluorescein**



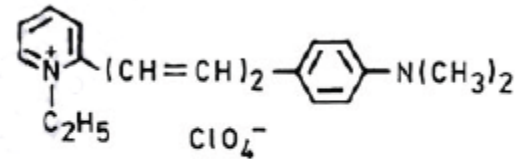
**Rhodamine B**



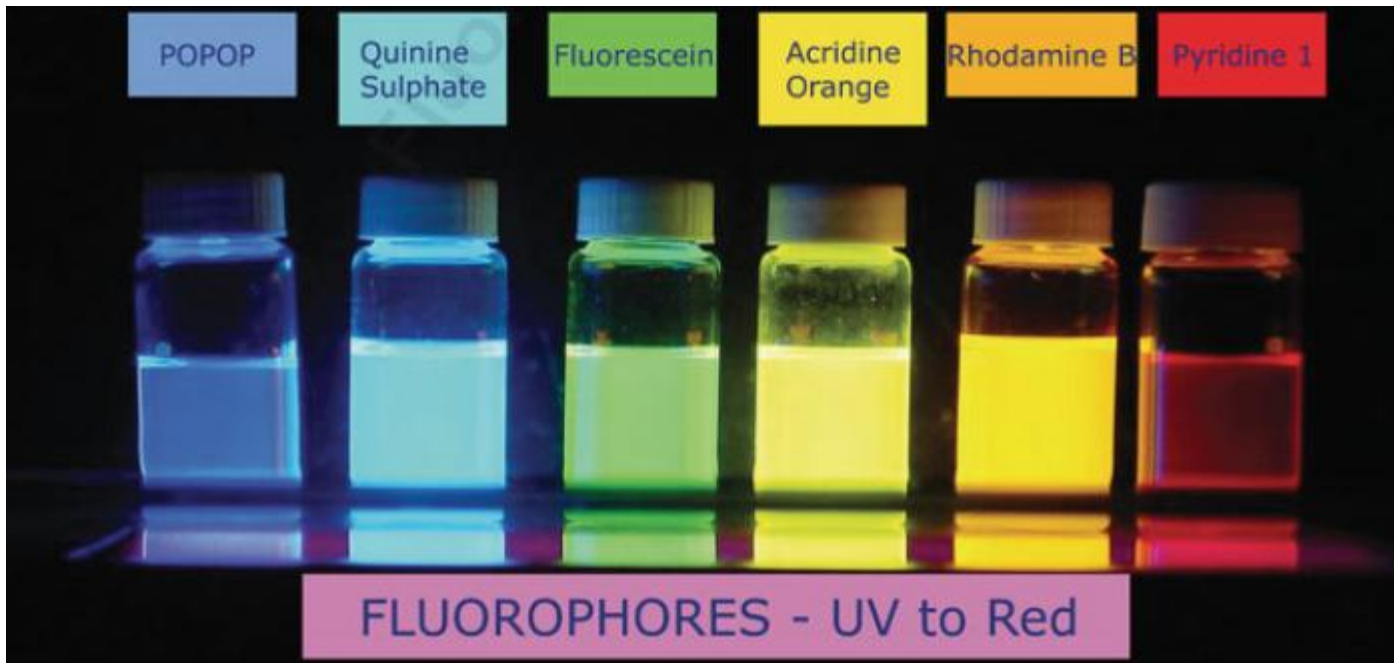
**Quinine**



**Acridine Orange**



**Pyridine 1**



FLUOROPHORES - UV to Red

# 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 rhodaminové flourofory ( $\sim 1$ ) a fluorescein (0.95)

[http://www.iss.com/resources/reference/data\\_tables/FL\\_QuantumYieldStandards.html](http://www.iss.com/resources/reference/data_tables/FL_QuantumYieldStandards.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

$\lambda_{Ex} = \text{konst.}$

$\lambda_{Em}$  scan



# Neměnnost tvaru emisního spektra

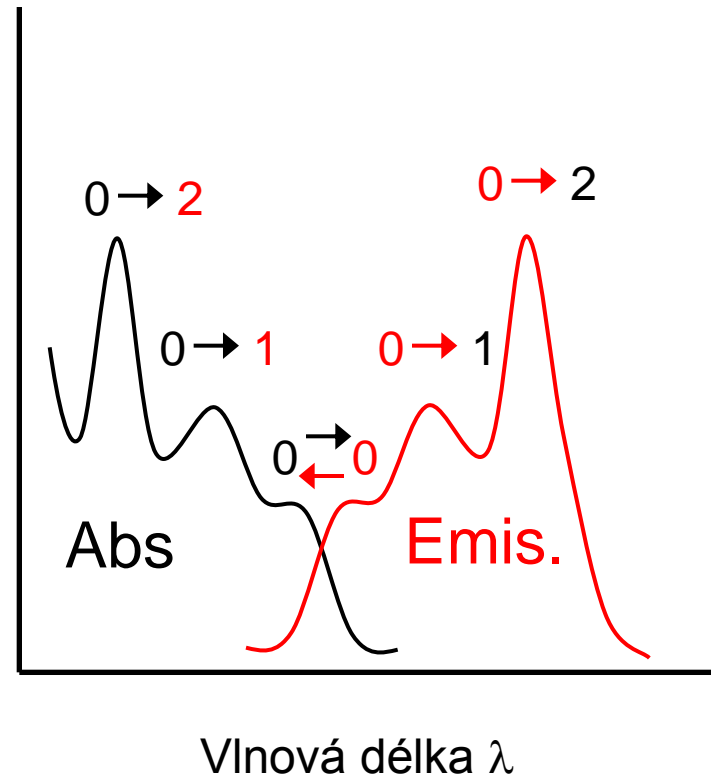
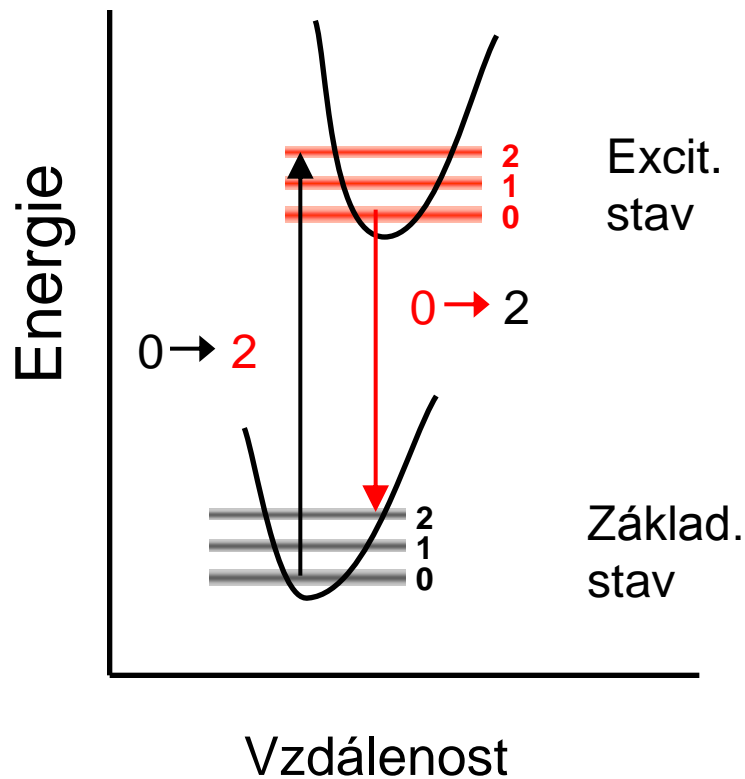
**Tvar emisního spektra je nezávislý na vlnové délce excitace.**

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>

# Zrcadlová symetrie absorpčního a excitačního spektra

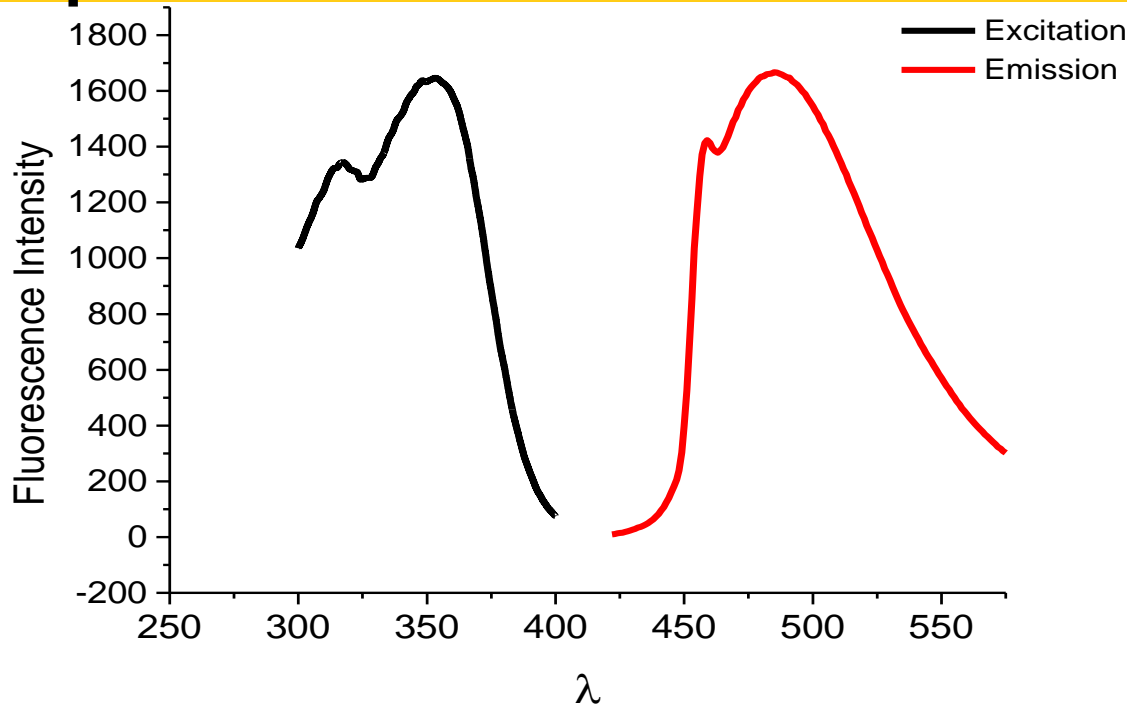


# Zákon zrcadlové symetrie mezi absorpčním a emisním spektrem

Struktura vibračních hladin u základního a excitovaného stavu je stejná, proto absorpce a 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

# Flourescenční excitační a emisní spektrum reálného roztoku



Při měření reálných vzorků se zrcadlová symetrie narušuje vlivem ionizace fluoforu při různém pH, komplexace fluoforu s dalšími molekulami v roztoku, nebo jednoduchým příspěvkem dalších nefluorescenčních molekul k absorbnímu (excitačnímu) spektru.

# Příště:

- Co je potřeba, abychom mohli změřit spektrum fluoroforu?
- Jak můžeme detekovat fluorescenční molekuly v gelu?

