

Barevné principy absorpce a fluorescence

Fluorescenční metody ve vědách o živé přírodě

Ctirad Hofr

Světlo je elektromagnetické vlnění

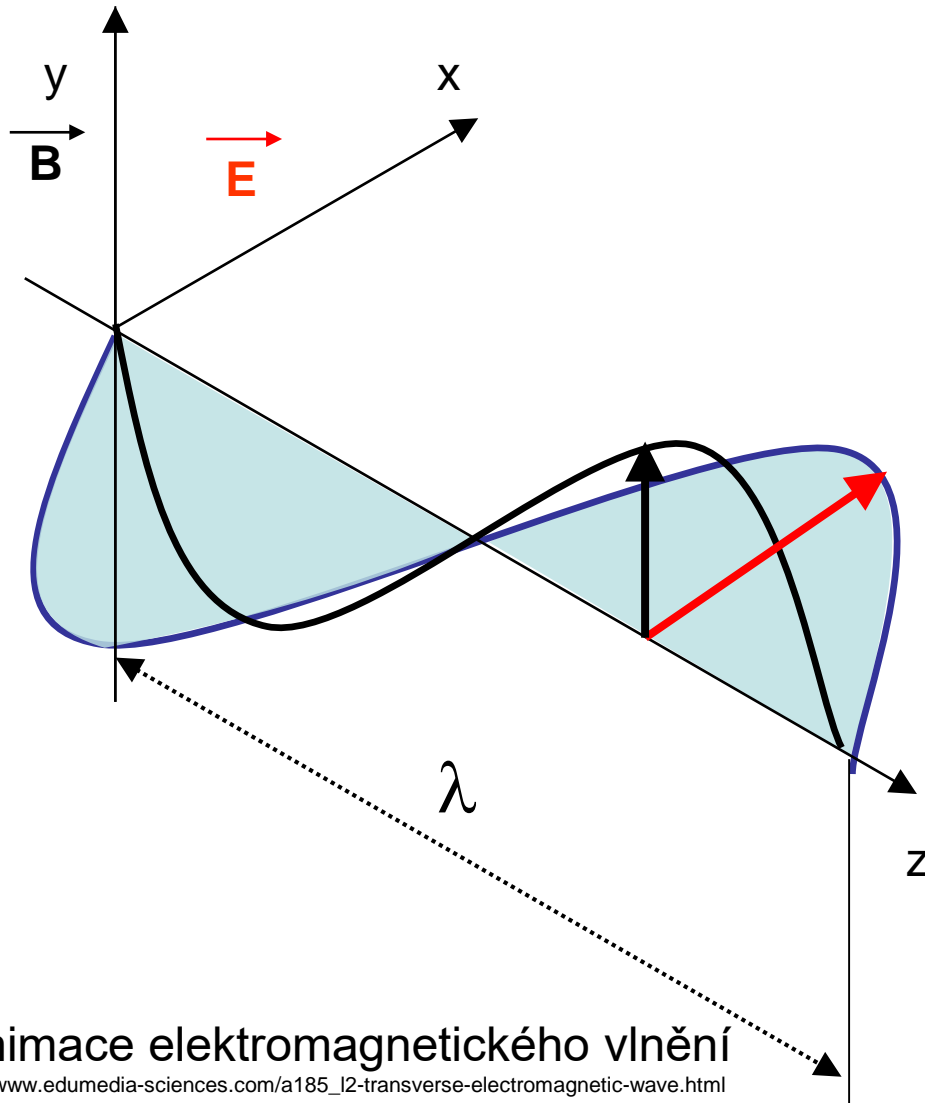
- Skládá se z elektrické složky a magnetické složky, které kmitají ve fázi v na sebe kolmých rovinách
- Světlo je charakterizováno frekvencí f a vlnovou délkou λ
- Frekvence f určuje kolikrát za sekundu vlnění kmitne, udává se v $\text{Hz} = \text{s}^{-1}$
- Vlnová délka udává délku, kterou za jeden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

$$c = \lambda f$$

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**

$$E = h f$$

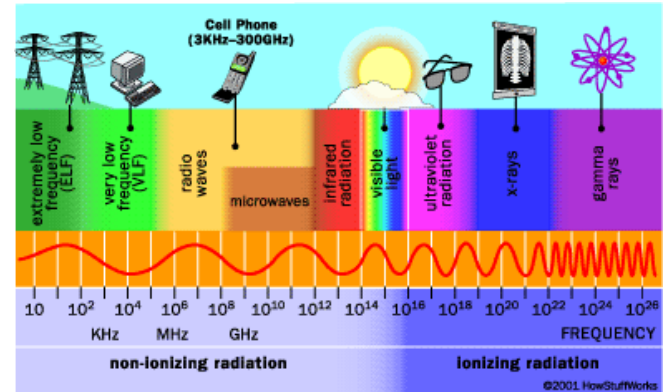
Čím je větší frekvence, tím je
větší energie záření.

**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.

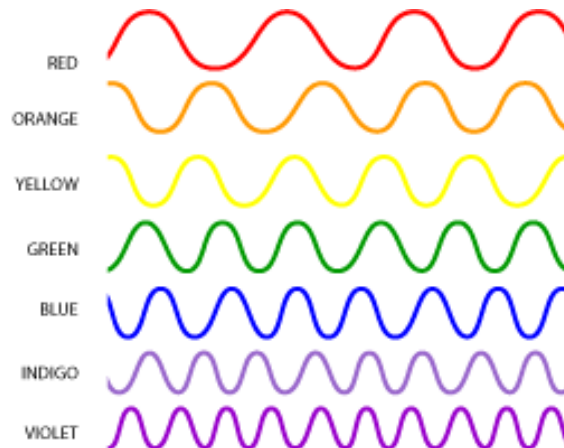
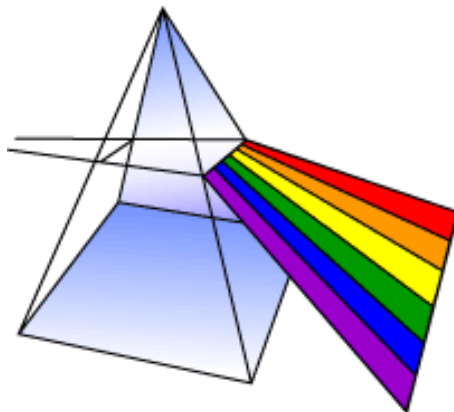


400 nm

700 nm

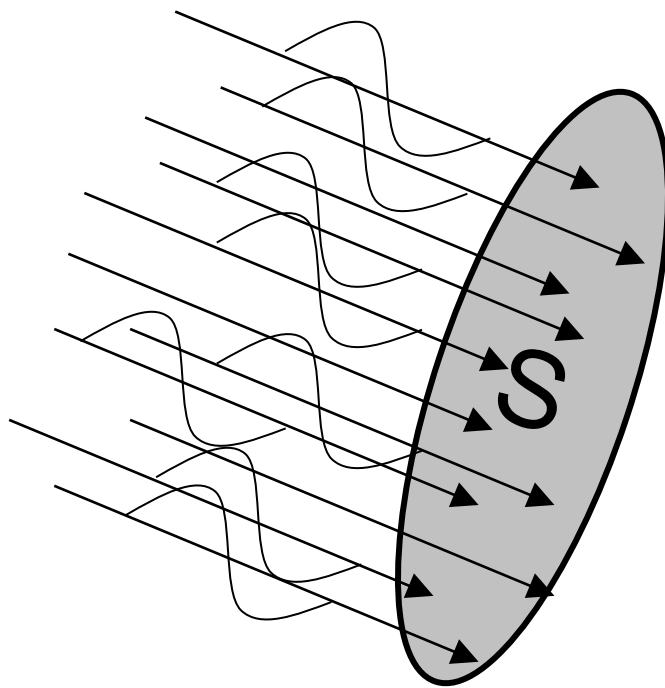
$7.5 \cdot 10^{14}$ Hz

$4.3 \cdot 10^{14}$ Hz



Intenzita

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



Absorpce

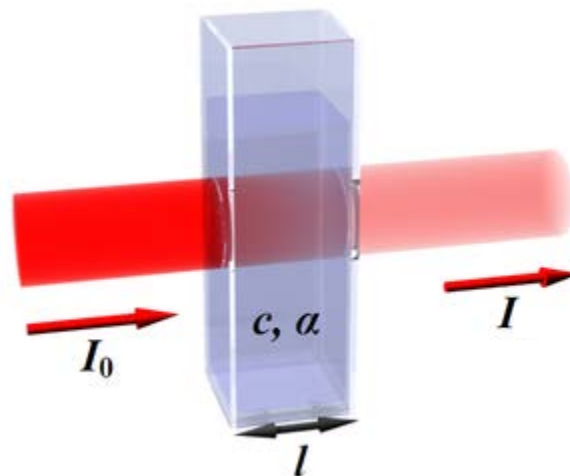
- Látka pohlcuje světlo
- Pro absorpci monochromatického světla

- **Lambert-Beerův zákon:**

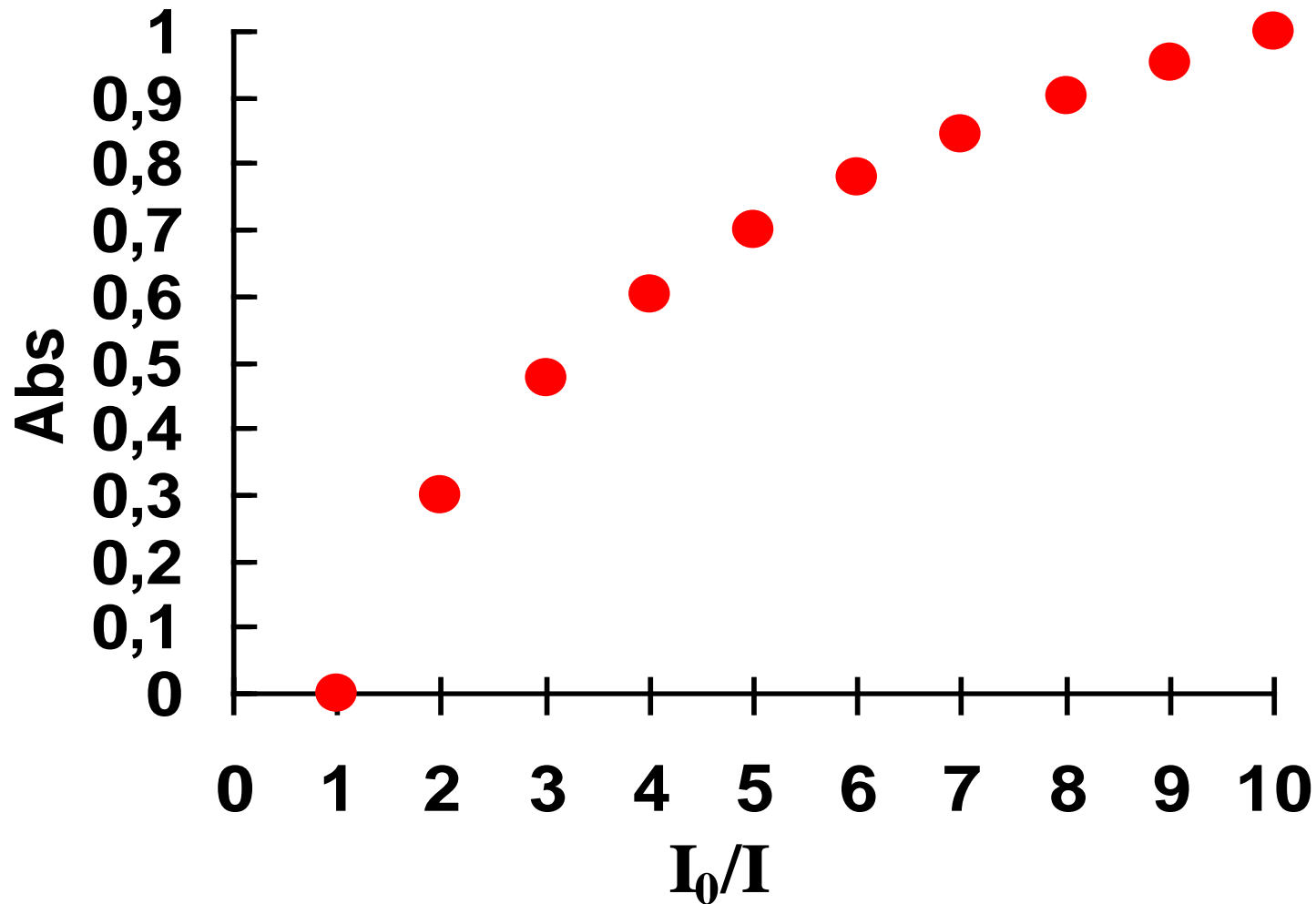
Absorbance je přímo úměrná koncentraci a tloušťce vrstvy roztoku

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

ε =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 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**

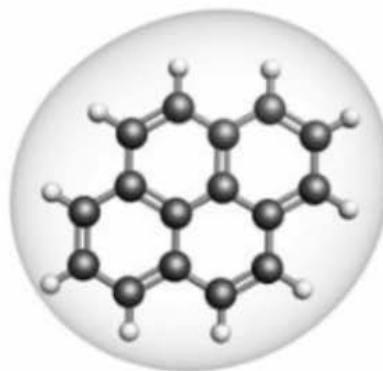
Doba dohasínání řádově

milisekundy až sekundy

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

Komentovaný úvod -fluorofor

Definition of Fluorescence



Fluorophore molecule

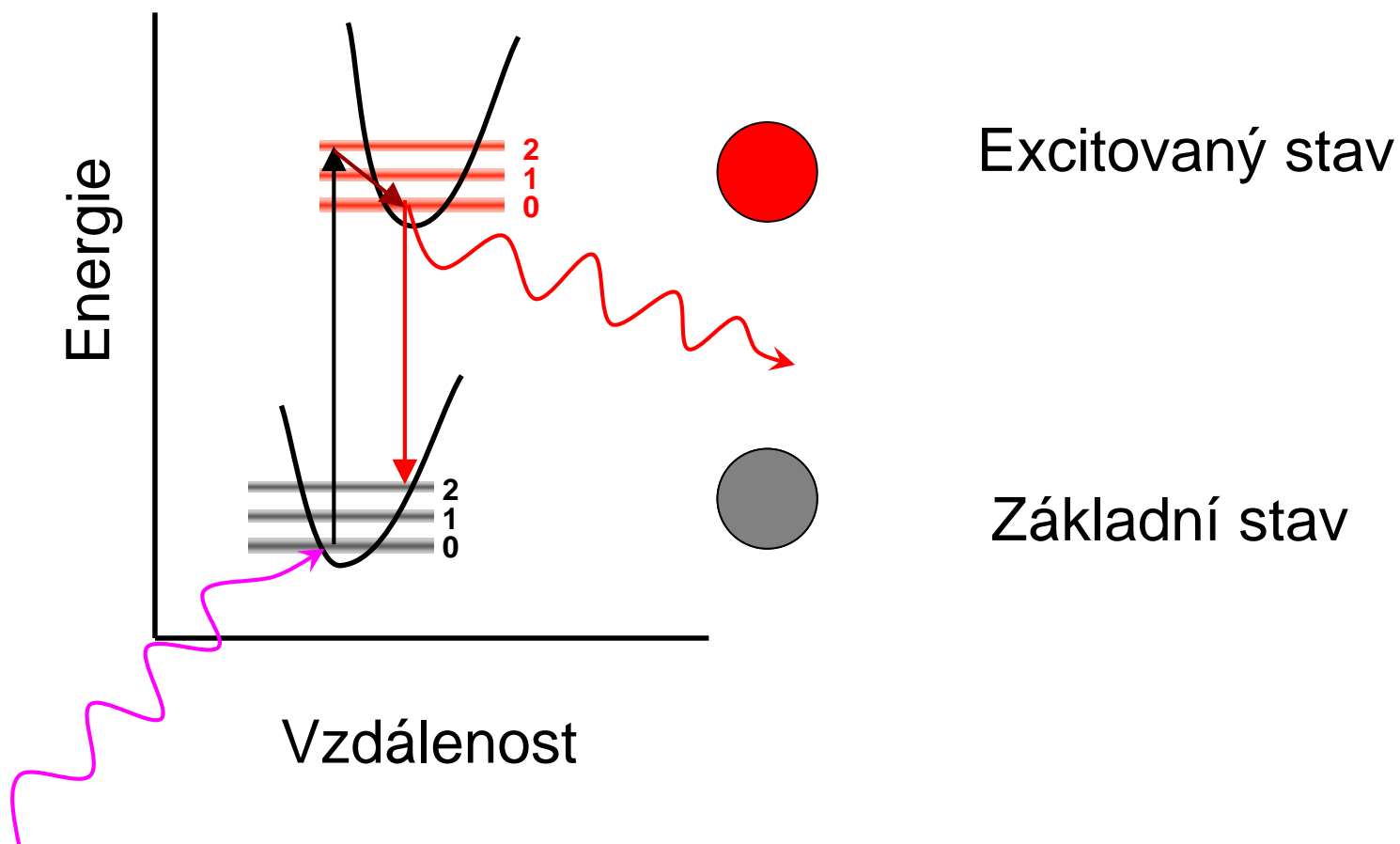
Jak poznáme flouorofor?

- molekula je **planární**
- **aromatická**: obsahuje konjugované vazby

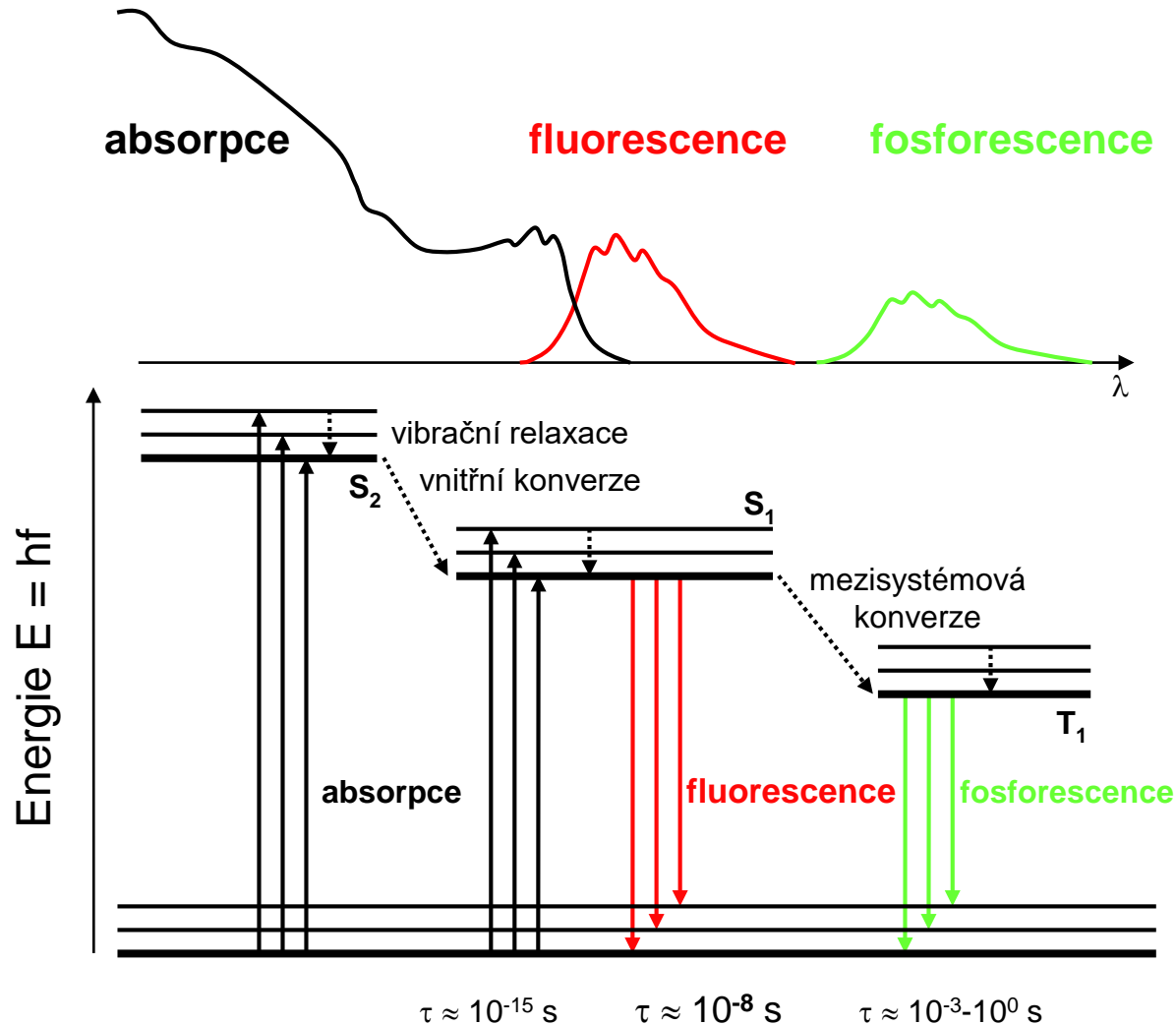
Frank-Condonův princip o „lenosti jader“ při absorpci



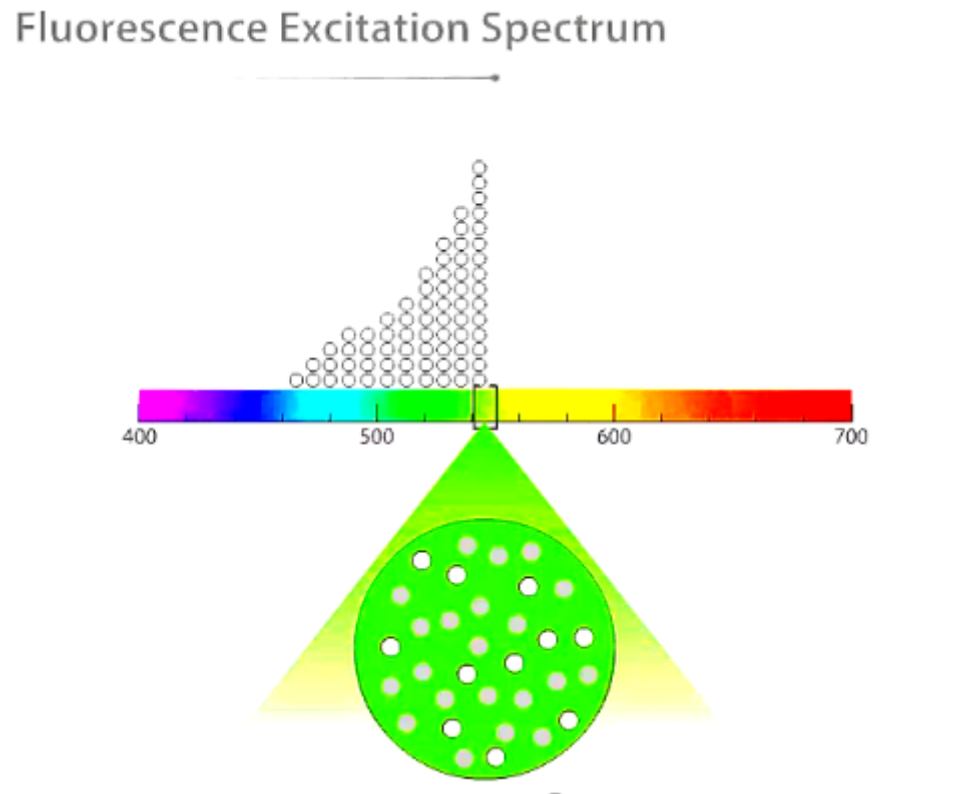
Absorpce a emise energie molekulou



Zářivé a nezářivé přechody mezi elektronově vibračními stavy molekuly



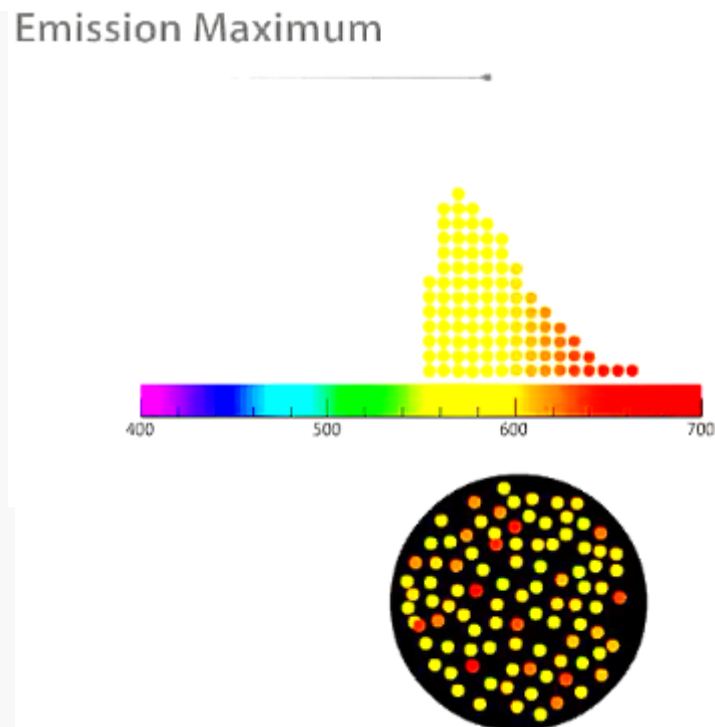
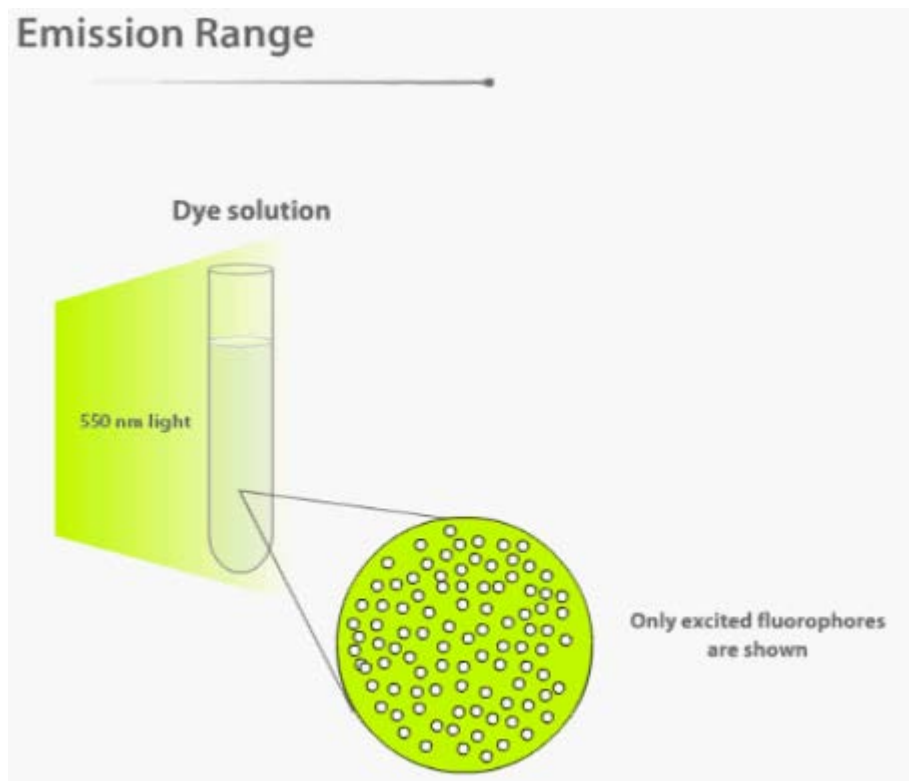
Vznik absorpčního=excitačního spektra



Výukový materiál společnosti Invitrogen

Absorpční=excitační spektrum znázorňuje pravděpodobnost, že při dané vlnové délce dojde k excitaci fluoroforu **dopadajícím světlem**.

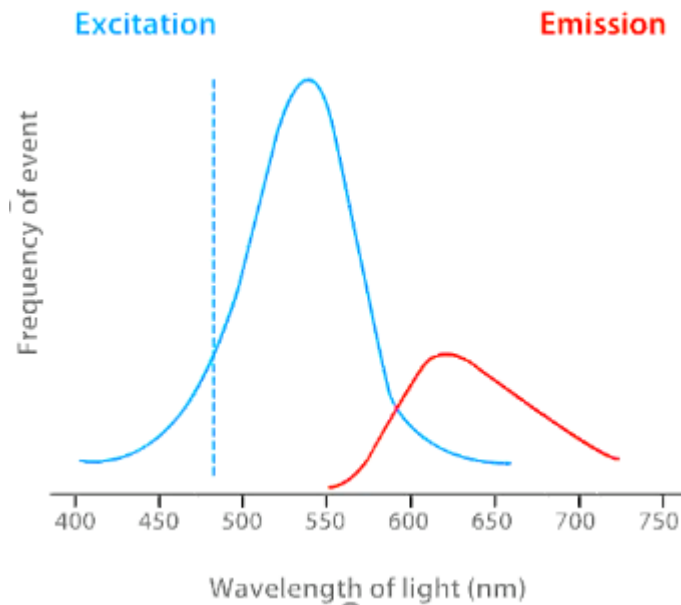
Vznik emisního spektra



Výukový materiál společnosti Invitrogen

Emisní spektrum, určuje pravděpodobnost, že dojde k emisi fluorescence o dané vlnové délce = barvě. **Závisí na fluoroforu** a je jeho charakteristikou.

Závislost intenzity emise na excitační vlnové délce



Stokesův posun

Emitované světlo má vždy menší energii (větší vlnovou délkou) než je energie absorbovaného světla (menší λ).

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

Vznik Stokesova posunu

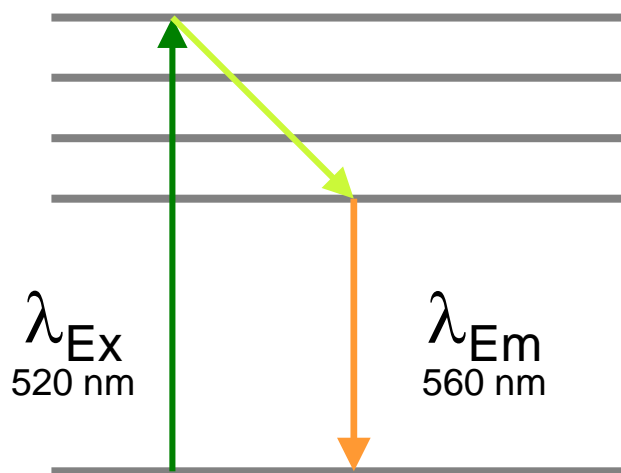


Výukový materiál společnosti Invitrogen

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.

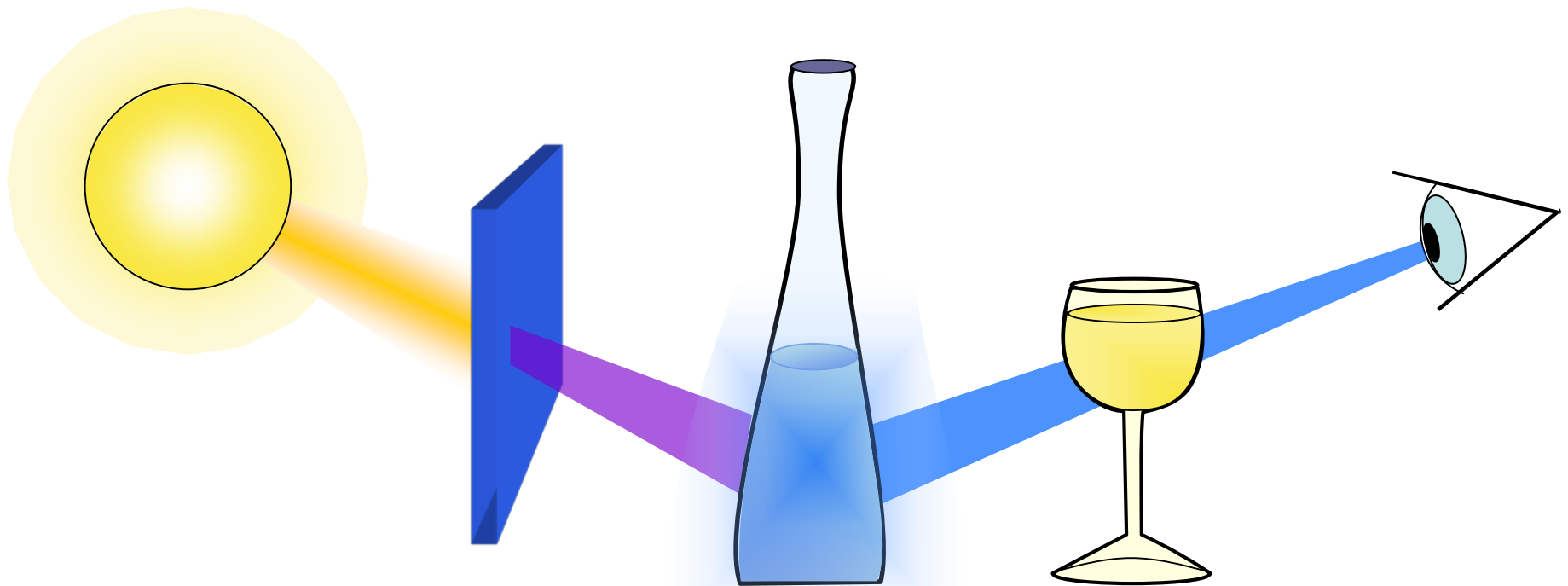
Stokesův posun

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. Stokesa

1852, Cambridge



Slunce

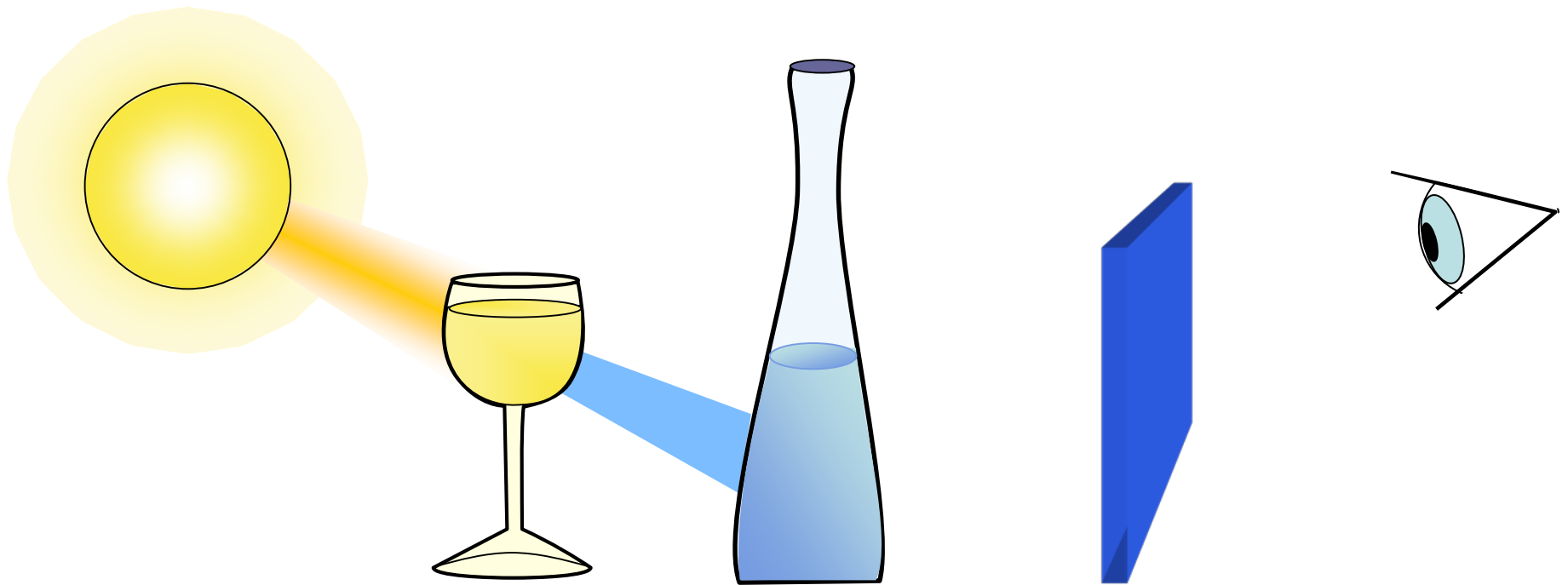
Modré sklo
okna v kostele
Propouští světlo s
 $\lambda < 400 \text{ nm}$
Excitační filtr

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.

Barevný animovaný úvod do principu fluorescence

<https://www.youtube.com/watch?v=SGFir1jFNBM>

Typické fluorofory

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

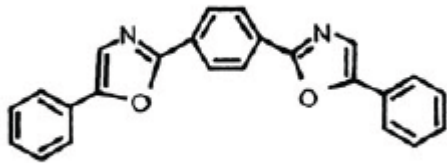
Typickými fluorofory jsou například:

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

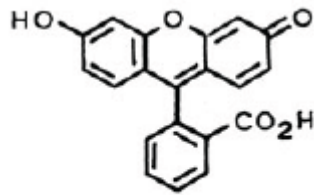


Využití fluorescence v geografii

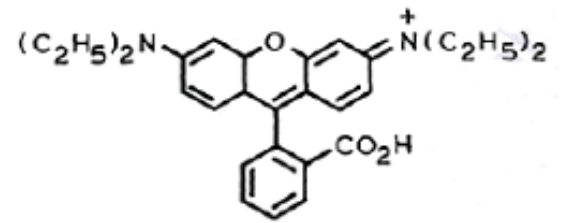




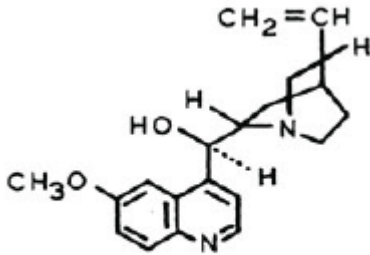
POPOP



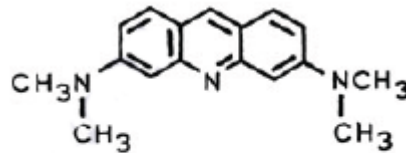
Fluorescein



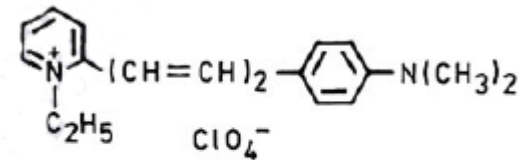
Rhodamine B



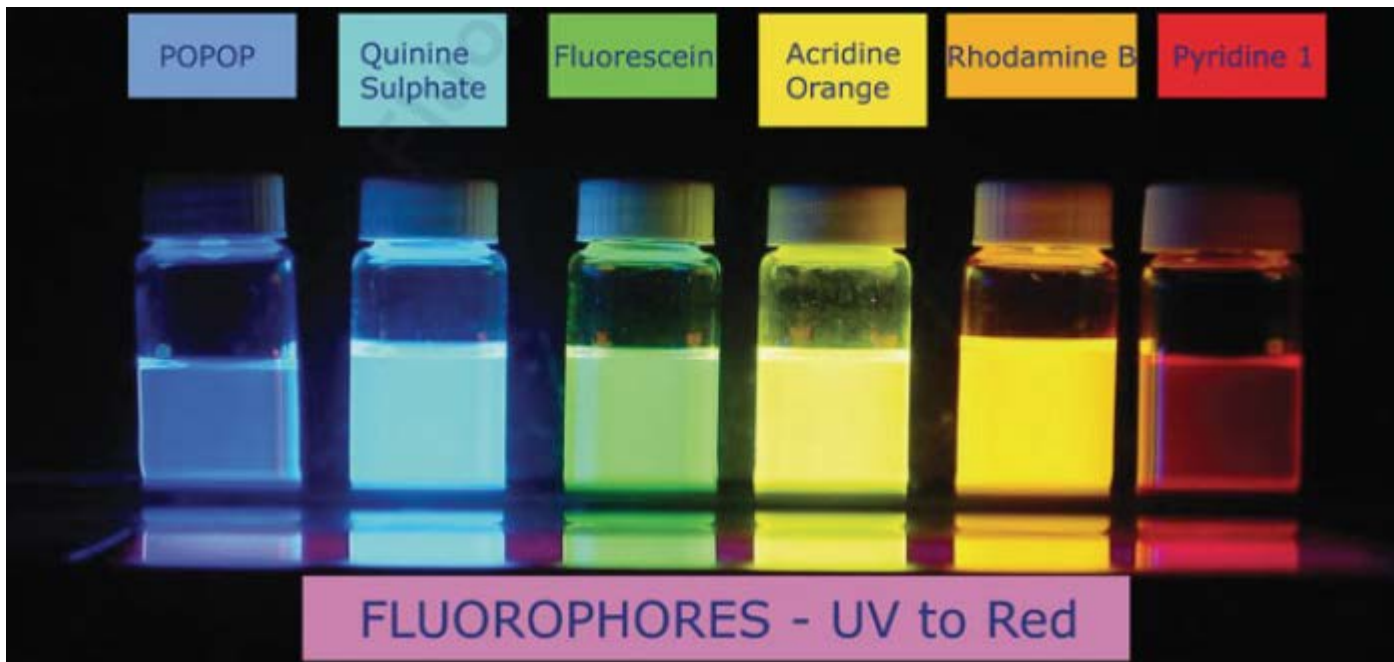
Quinine



Acridine Orange



Pyridine 1



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 (~ 1) a fluorescein (0.95)

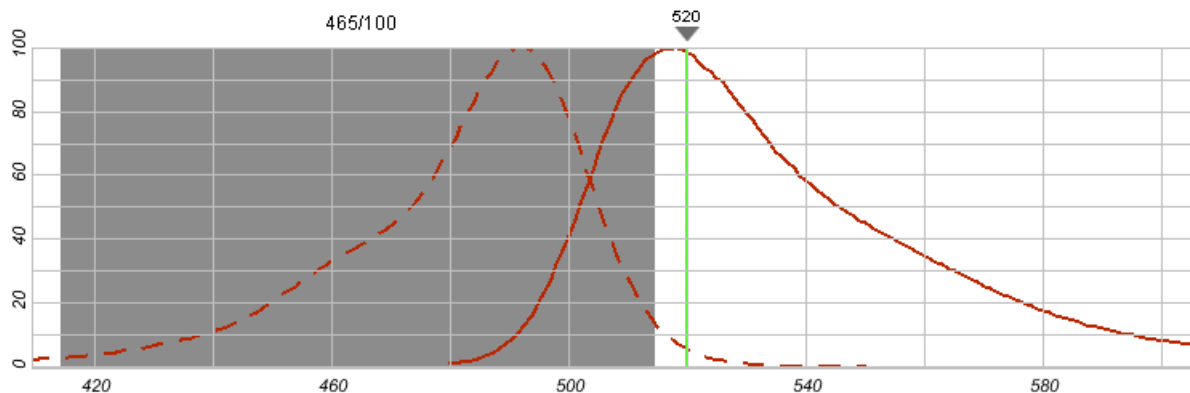
http://www.iss.com/resources/reference/data_tables/FL_QuantumYieldStandards.html

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

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

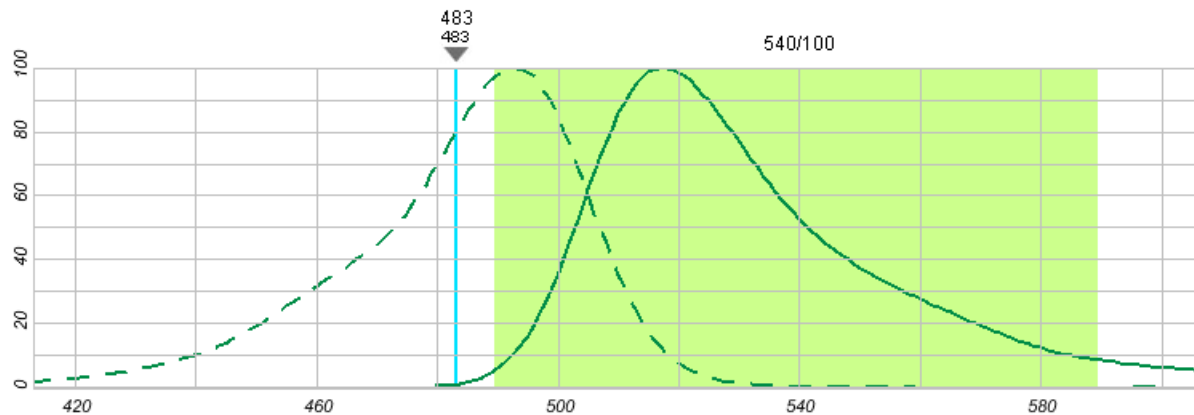


Emisní spektrum

Závislost intenzity fluorescence na vlnové délce při konstantní excitační vlnové délce

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

λ_{Em} scan

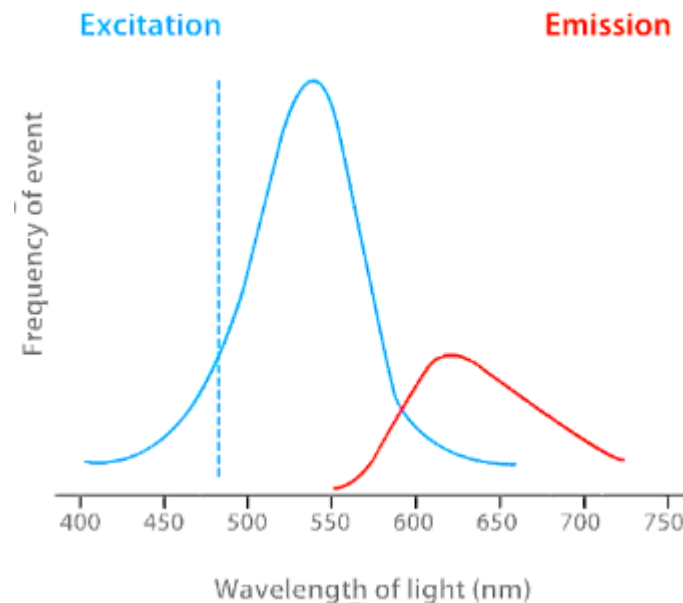


Neměnnost tvaru emisního spektra

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

NEzávislost tvaru emisního spektra na excitační vlnové délce

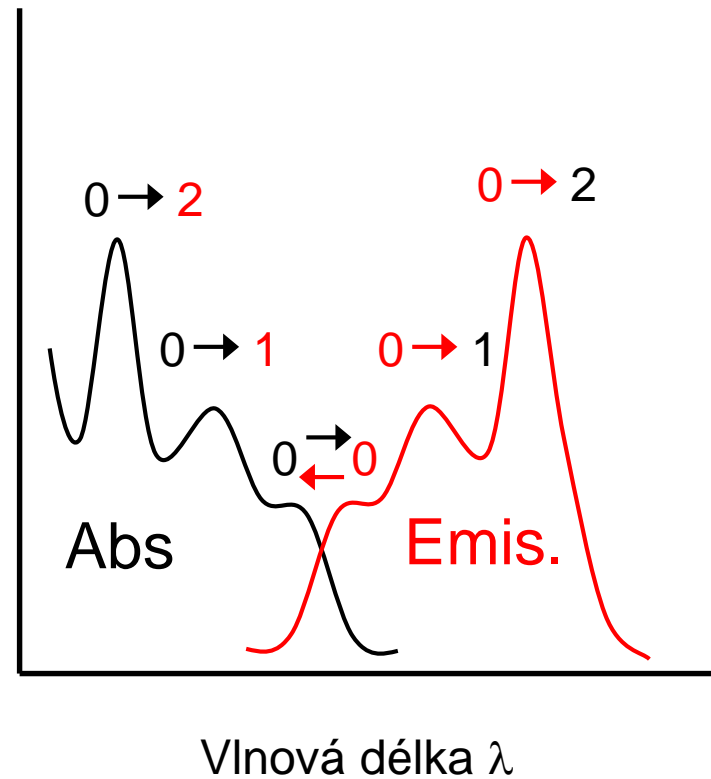
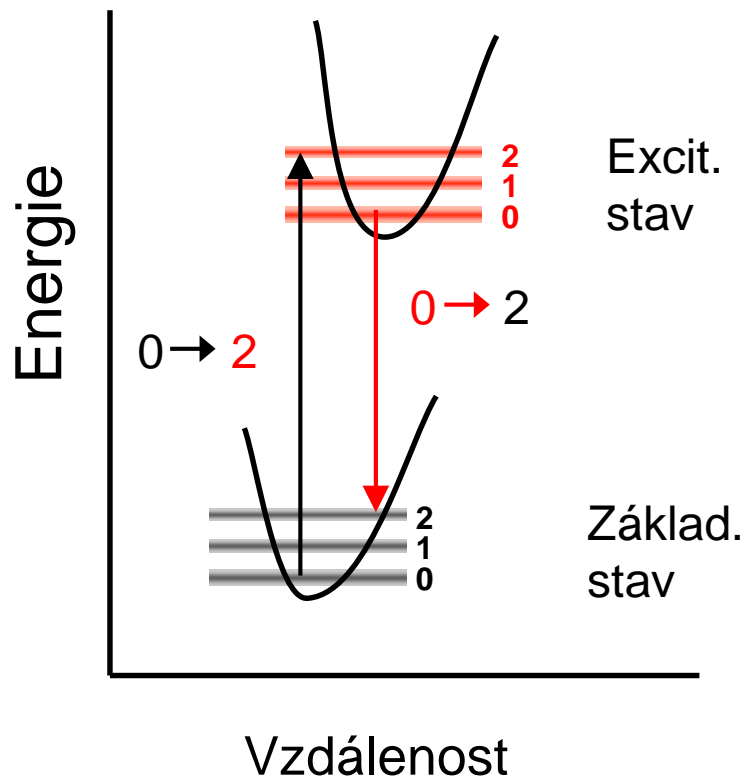


Zákon zrcadlové symetrie mezi absorpčním a emisním spektrem

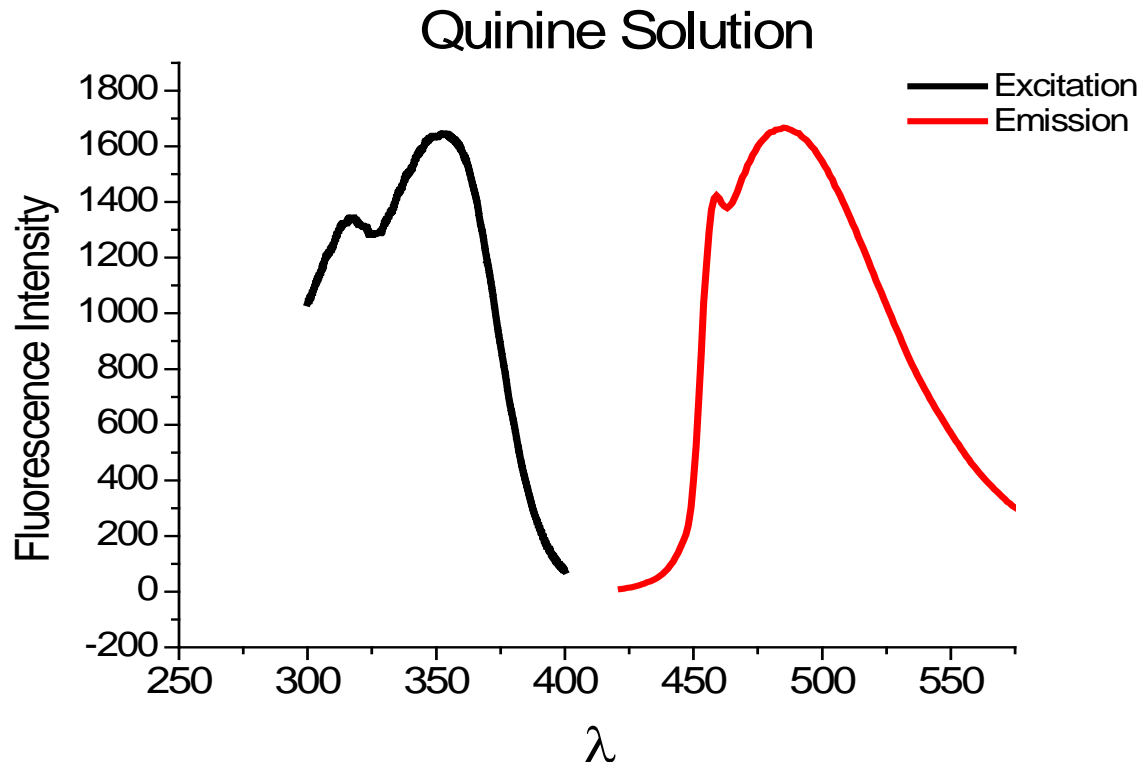
Struktura vibračních hladin u základního a excitovaného stavu je stejná, proto absorpce a emise z odpovídajících si vibračních hladin může nastat se stejnou pravděpodobností. To má za následek zrcadlovou symetrii absorpčního spektra a emisního fluorescenčního spektra.

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

Zrcadlová symetrie absorpčního a excitačního spektra



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 absorpčnímu (excitačnímu) spektru.

Literatura

- Lakowicz J.R.: Principles of Fluorescence Spectroscopy. Third Edition, Springer + Business Media, New York, 2006.
- Fišar Z.: FLUORESCENČNÍ SPEKTROSKOPIE V NEUROVĚDÁCH
<http://www1.lf1.cuni.cz/~zfishar/fluorescence/Default.htm>

Poděkování

Grafika z knihy Principles o Fluorescence byla pro účely této přednášky laskavě poskytnuta profesorem J.R. Lakowitzem.