

Spektrálne Metody UV-Vis, Luminiscencia

Jozef Hritz

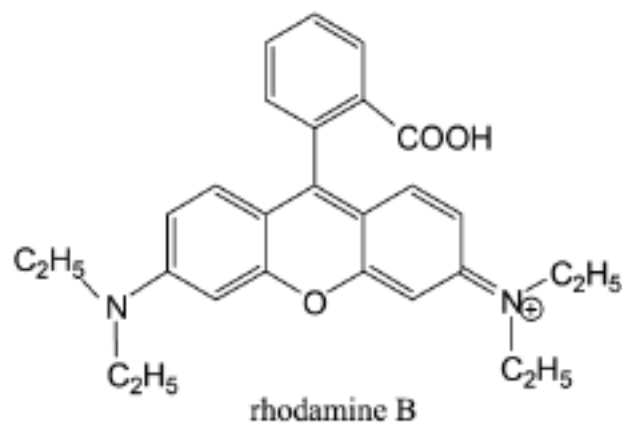
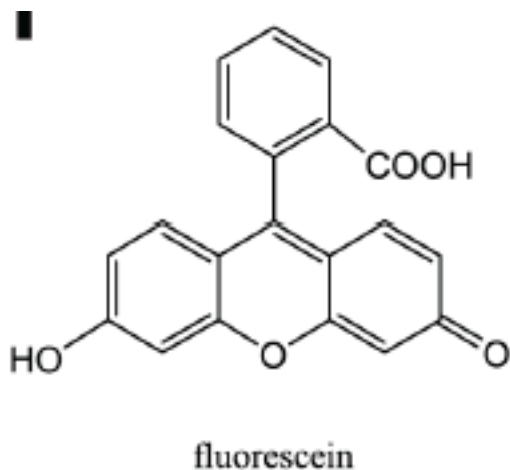
jozef.hritz@ceitec.muni.cz

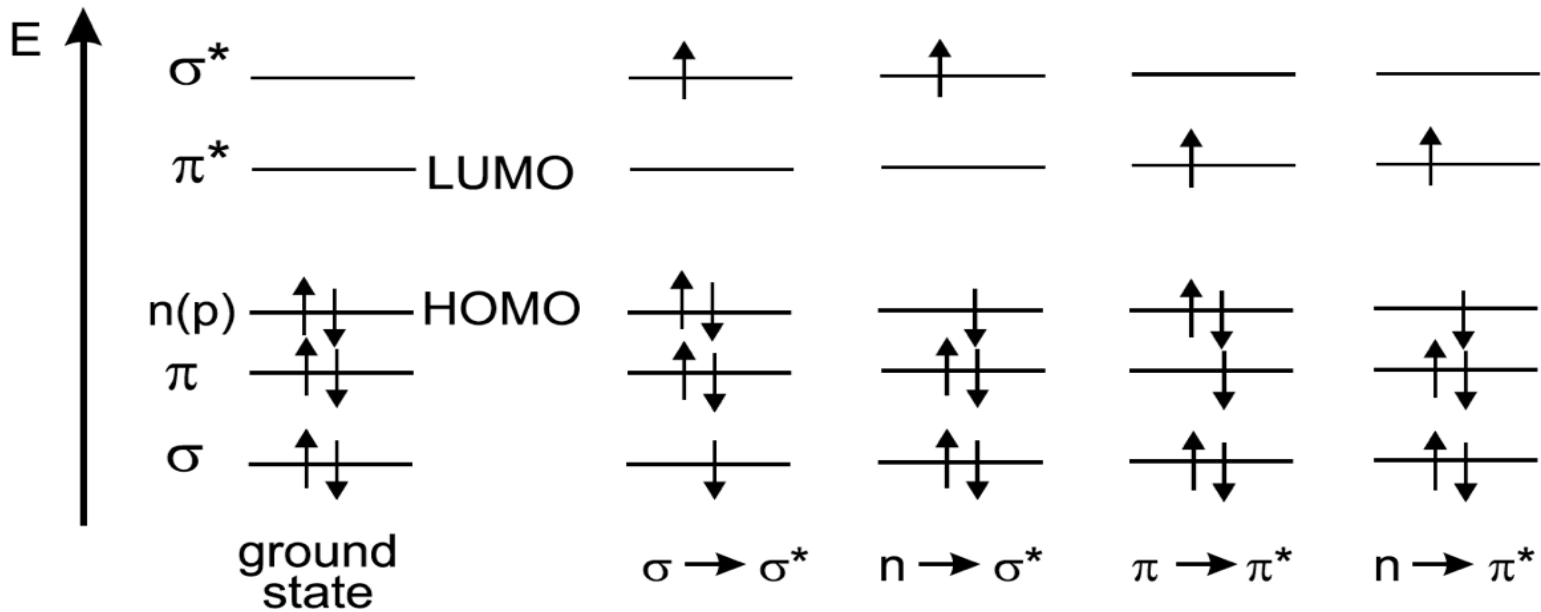
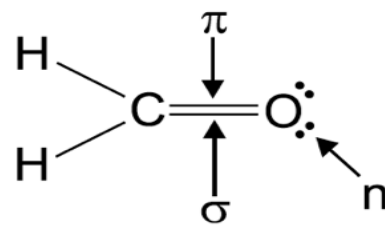
Lakowicz, J. R. (2006) Principles of Fluorescence Spectroscopy

Nápad na praktickú aplikáciu: Kontrola čistoty mäsa na bytúnku

Typické fluorofóry

- **Fluoroforum** nazývame látku schopnú absorbovať a emitovať svetlo.
- Molekuly obsahujúce konjugované π elektróny





σ^* - σ malokedy vedú ku luminiscencii. Veľmi vysoká energia ($\lambda < 250\text{nm}$) vedie zväčša ku disociácii molekúl

Emisie sú najčastejšie pre prechody $\pi^* - \pi$, niekedy aj $\pi^* - n$

Interakcia fotónov a atómov:

- **Absorpcia**

može nastať, keď sa fotón zrazí s atómom alebo molekulou, pričom odovzdá svoju energiu, atom/molekula sa presunie na vyššiu energetickú úroveň, kde môže zostať určitý, ale obmedzený čas (životnosť excitovaného atómu/molekuly)

- **Emisia**

Keď sa excitovaný atom/molekula vráti na svoju pôvodnú energetickú hladinu, dojde k predaniu rozdielovej energie buď žiarením (radiačný prechod), alebo vo forme tepla (neradiačný prechod).

- Molekula sa do excitovaného stavu môže dostať fyzikálnymi procesmi (napr. absorpcia svetla), mechanickými procesmi (napr. trením), alebo chemickými procesmi (napr. chemické reakcie)
- Prijatím tejto energie sa atomy alebo molekuly dostávajú do menej stabilných energetických stavov a prebytočnej energie sa zbavujú vyžiaréním fotonu.
- **Luminiscenciou** nazývame emisiu svetla atómu, alebo molekuly, ktorá sa odohráva z excitovaného do základného stavu elektrónu
- Luminiscencia sa formálne delí na **fluorescenciu** a **fosforescenciu** v závislosti na charaktere elektronového excitovaného stavu.

Druhy elektromagnetického žiarenia

- **Monochromatické**

Žiarenie obsahuje "jednu" vlnovú dĺžku (lepšie veľmi blízke vlnové dĺžky); je možné získať z polychrómneho žiarenie pomocou monochromátora (filter, hranol, mriežka).

- **Polychromatické**

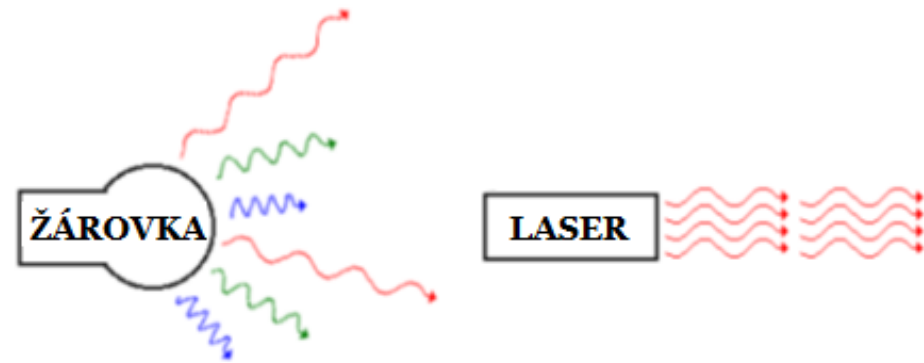
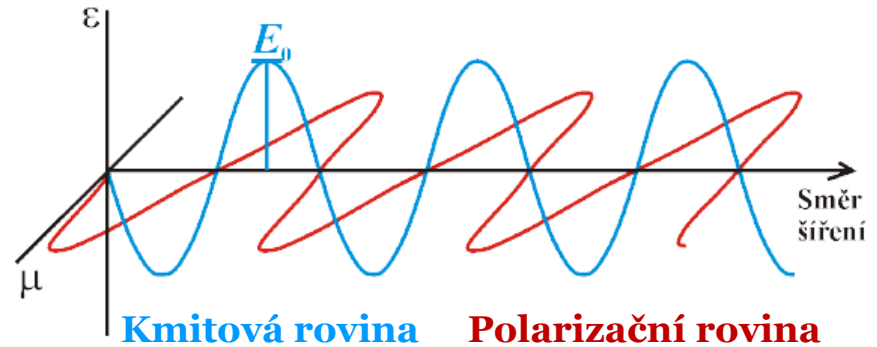
Žiarenie obsahuje rôzne vlnové dĺžky a nemôže byť koherentné (žiarovka, slnko).

- **Koherentné**

Žiarenie vychádza z jedného zdroja a zachováva si rovnakú vlnovú dĺžku, fázu a amplitúdu na určitú vzdialenosť alebo po určitú dobu (laser).

- **Nekoherentné**

Žiarenie pochádza z jedného zdroja, ale nezachováva si svoj koherentný charakter ("rozchádza sa").



Foton – základné vzťahy

Energia fotonu:

$$E = h\nu = \frac{h}{\lambda_0}$$

Hmotnosť fotonu:

$$m = \frac{h\nu}{c_0^2} = \frac{h}{\lambda_0 c_0^2}$$

c je rýchlosť svetla ($3 \times 10^8 \text{ m/s}$)

$h = 6.65 \times 10^{-34} \text{ J}\cdot\text{s}$ ($4.1 \text{ }\mu\text{eV/GHz}$)
je Planckova konstanta

•Príklad:

Foton $\lambda_0 = 570 \text{ nm}$ ($\nu = 5,26 \cdot 10^{14} \text{ Hz}$)

$m = 3,9 \cdot 10^{-34} \text{ kg}$ ($m_e = 9,1 \cdot 10^{-31} \text{ kg}$)

$E = 2,1 \text{ eV}$

$E = 170 \text{ kJ/mol}$

$E = 2,82 \cdot 10^{-25} \text{ J}$

průchod
atmosférou

pásmo

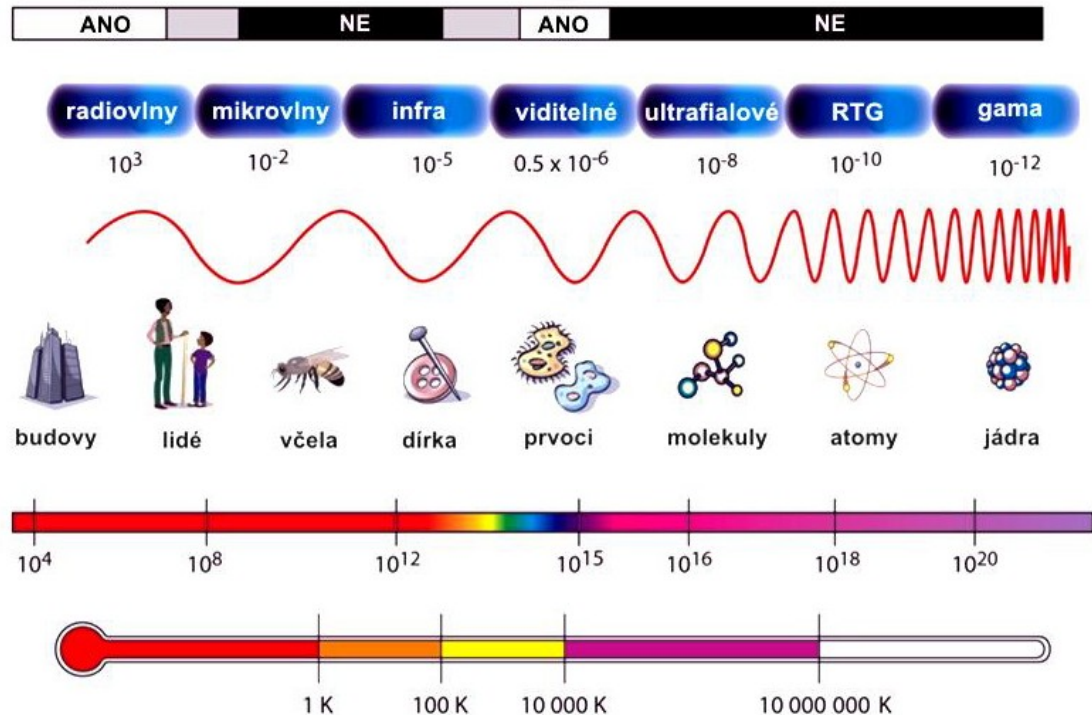
vlnová délka
[m]

předmět
stejně
velikosti

frekvence
[Hz]

teplota
[K]

Elektromagnetické spektrum



Viditeľné svetlo

Svetelné žiarenie s vlnovou dĺžkou $\lambda = 400 - 800 \text{ nm}$.

Je absorbované a emitované elektrónmi v atómoch a molekulách, keď e^- prechádzajú medzi energetickými hladinami.

<u>Barva</u>	Vlnová dĺžka	Frekvence
<u>červená</u>	~ 625 až 740 nm	~ 480 až 405 THz
<u>oranžová</u>	~ 590 až 625 nm	~ 510 až 480 THz
<u>žltá</u>	~ 565 až 590 nm	~ 530 až 510 THz
<u>zelená</u>	~ 520 až 565 nm	~ 580 až 530 THz
<u>azurová</u>	~ 500 až 520 nm	~ 600 až 580 THz
<u>modrá</u>	~ 430 až 500 nm	~ 700 až 600 THz
<u>fialová</u>	~ 380 až 430 nm	~ 790 až 700 THz

Absorpcia žiarenia

Interakcia látky X (atóm, molekula) so žiarením vhodnej energie E (v závislosti od počtu hladín látka absorbuje pri rôznych λ):

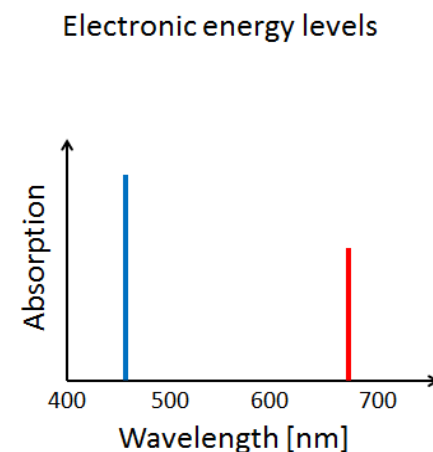
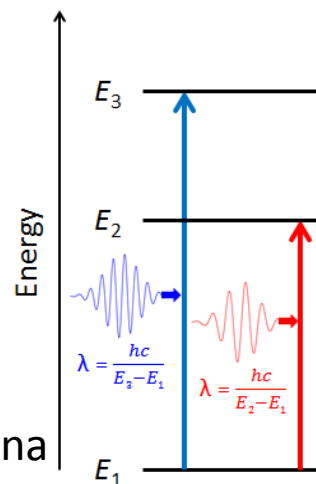


Usporiadaná množina vlnových dĺžok, ktoré látka absorbuje, sa nazýva absorpčné spektrum.

Absorbované λ sú charakteristické pre určitú látku → látku je možné identifikovať alebo posúdiť jej štruktúru (kvalitatívna analýza).

Miera absorpcie, t. j. množstvo absorbovaného žiarenia, je vyjadrená absorbanciou - A (kvantitatívna analýza)

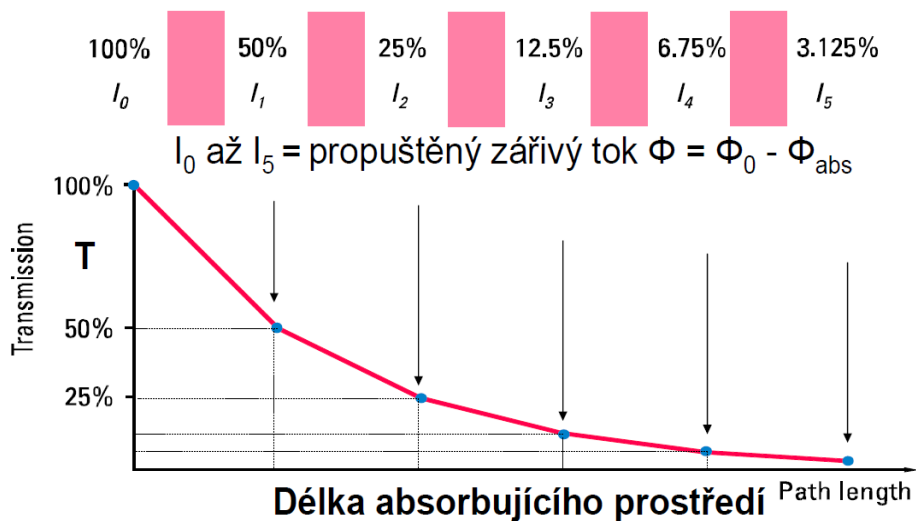
V spektrách sa prejavujú iba prechody povolené výberovými pravidlami.



Odvození Lambert-Beerova zákona

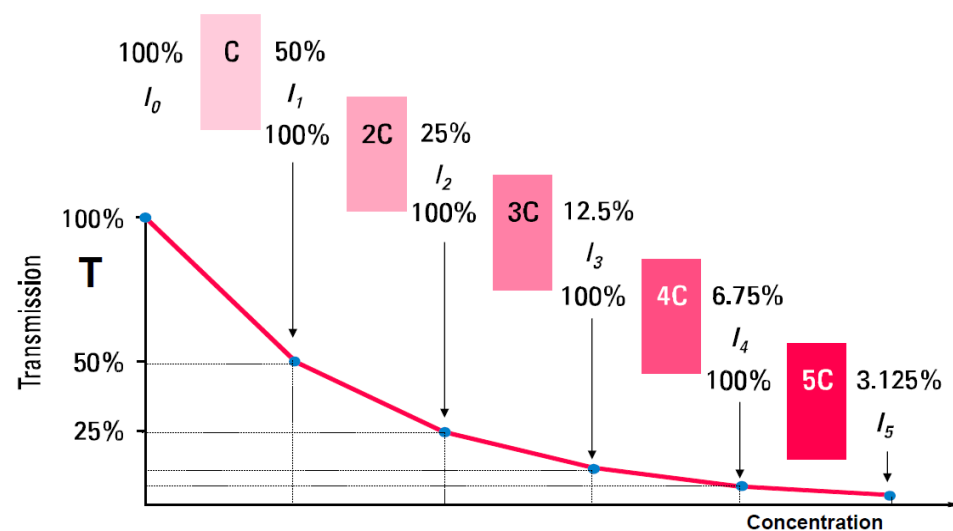
1. Transmittance a délka absorbujičího prostředí: zákon Bouguer-Lambert

$$T = \Phi / \Phi_0 = e^{-\text{konst.} \times \text{délka absorb. prostředí}}$$



2. Transmittance a koncentrace: zákon Beerův

$$T = \Phi / \Phi_0 = e^{-\text{konst.} \times \text{délka absorb. prostředí}}$$



Odvození Lambert-Beerova zákona

Transmittance

$$T = (\Phi/\Phi_0); (\Phi/\Phi_0) \times 100 (\%)$$

Φ_0 dopadající záření, Φ propuštěné záření (zářivý tok)

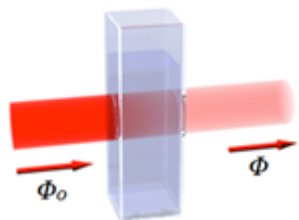
Absorbance

$$A = \log(\Phi_0/\Phi) = -\log T; 0 \leq A \leq \infty$$

Bouguer-Lambert-Beerův zákon

$$A = -\log T = -\log(\Phi/\Phi_0) = \log(\Phi_0/\Phi)$$

$$A = \epsilon \cdot l \cdot c; 0 \leq A \leq \infty$$



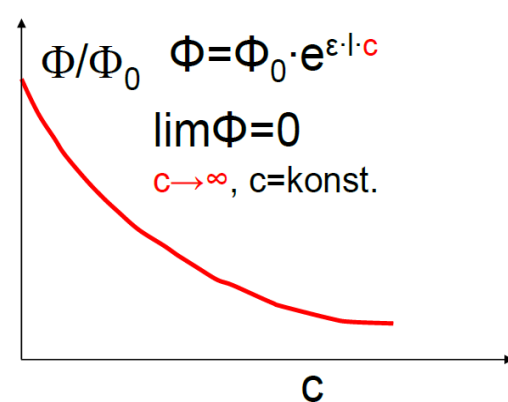
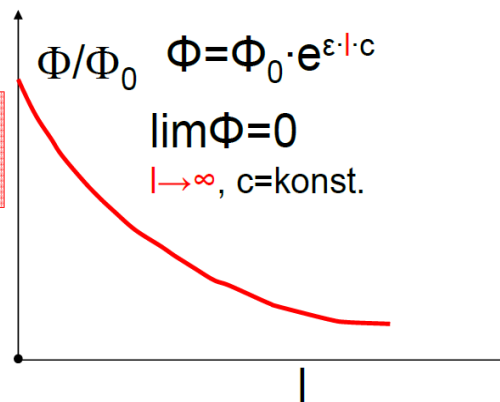
$$\begin{aligned} d\Phi &= \Phi - \Phi_0 \\ -d\Phi &= k \cdot \Phi \cdot dl \\ -d\Phi/\Phi &= k \cdot dl \end{aligned}$$

$$\int_{\Phi_0}^{\Phi} -\frac{d\Phi}{\Phi} = k \int_0^l dl \quad \int \frac{dx}{x} = \ln x \quad \int -\frac{dx}{x} = -\ln x = \ln \frac{1}{x}$$

$$\ln(\Phi_0/\Phi) = k \cdot l \quad k = \epsilon_{\lambda} \cdot c$$

ϵ_{λ} je molární absorpční koeficient při λ
 c je koncentrace

$$\frac{\Phi}{\Phi_0} = \exp(\epsilon_{\lambda} \cdot l \cdot c) \Rightarrow \Phi = \Phi_0 \exp(-\epsilon_{\lambda} \cdot l \cdot c)$$



Limitace Lambert-Beerova zákona

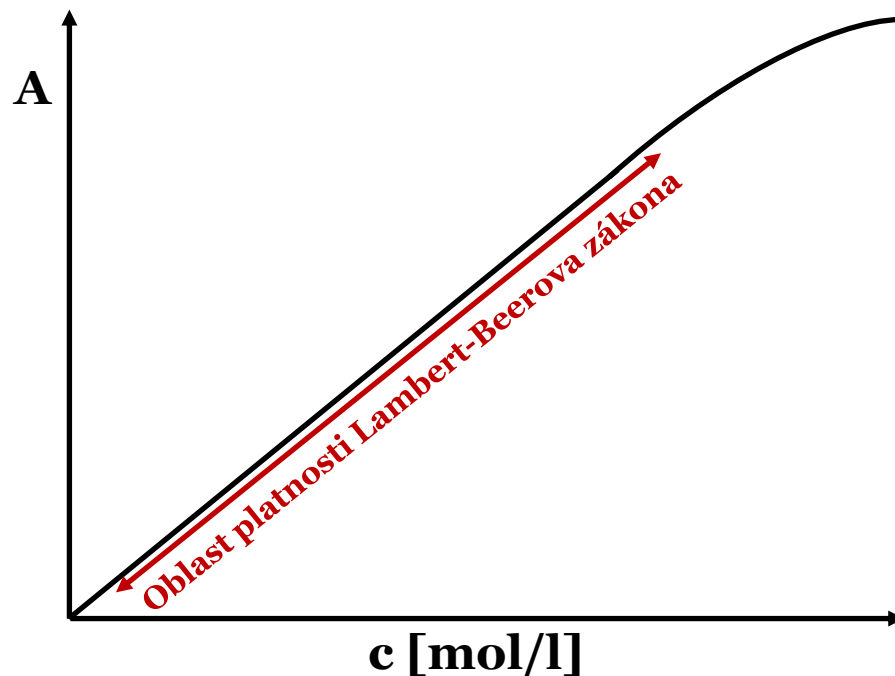
- Odchylka ϵ_λ při vysokých koncentracích ($>10^{-2}$ mol/l) vlivem elektrostatických interakcí
- Částečný rozptyl světla na částicích přítomných ve vzorku
- Fluorescence nebo fosforescence vzorku
- Nedokonale monochromatické záření
- Nekoherentní světelné záření

Nejpřesnější výsledky jsou získávány v rozsahu absorbancí 0,2-0,7!

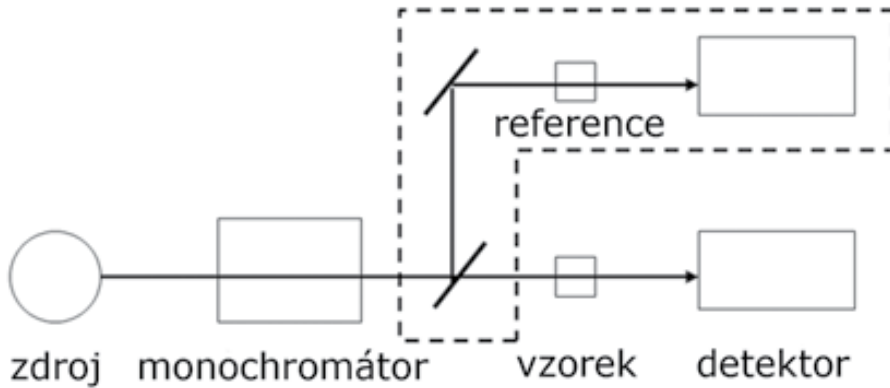
Od hodnot absorpance $> 0,7$ výrazně narůstá chyba měření!

Bouguer-Lambert-Beerův zákon

$$A = \epsilon \cdot l \cdot c ; 0 \leq A \leq \infty$$



UV-VIS spektrofotometrie



dvoupaprskové

jednoprskové

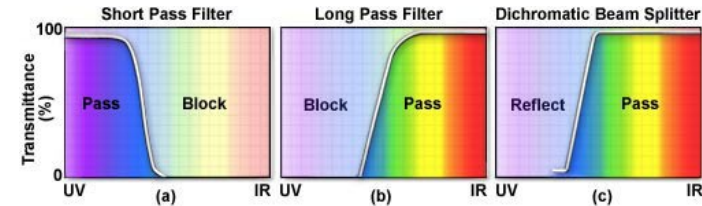
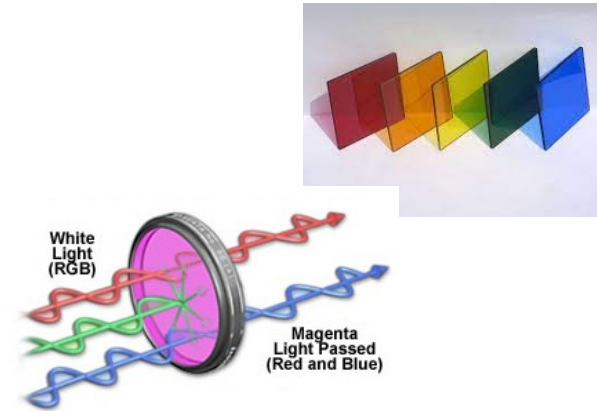


Figure 2

Zdroje záření

Xe lampa (200 – 1 000 nm)

H₂, D₂ výbojka (160 – 380 nm)

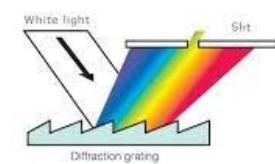
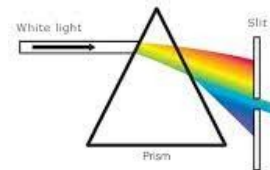
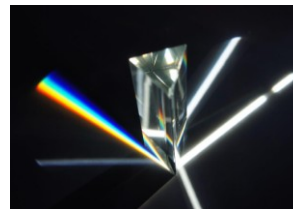
W, W-X žárovka (320 – 2 400 nm)

Monochromátor

Hranol

Mřížka

Filtry



Optické analytické metody

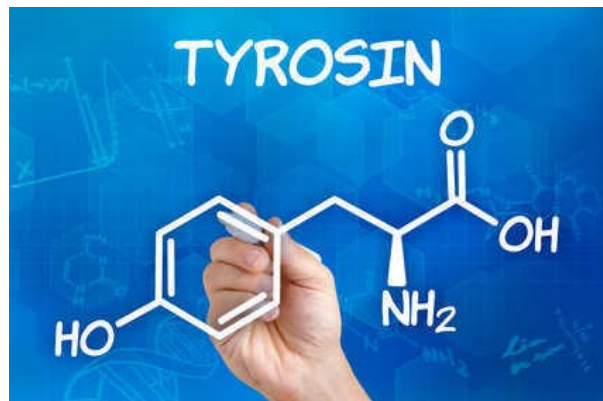
UV-VIS spektrofotometrie Přístroje



Optické analytické metody

UV-VIS spektrofotometrie v Biofyzikální chemii

Stanovování koncentrace biologických látek



Peptidová vazba, $\lambda = 200 - 215 \text{ nm}$

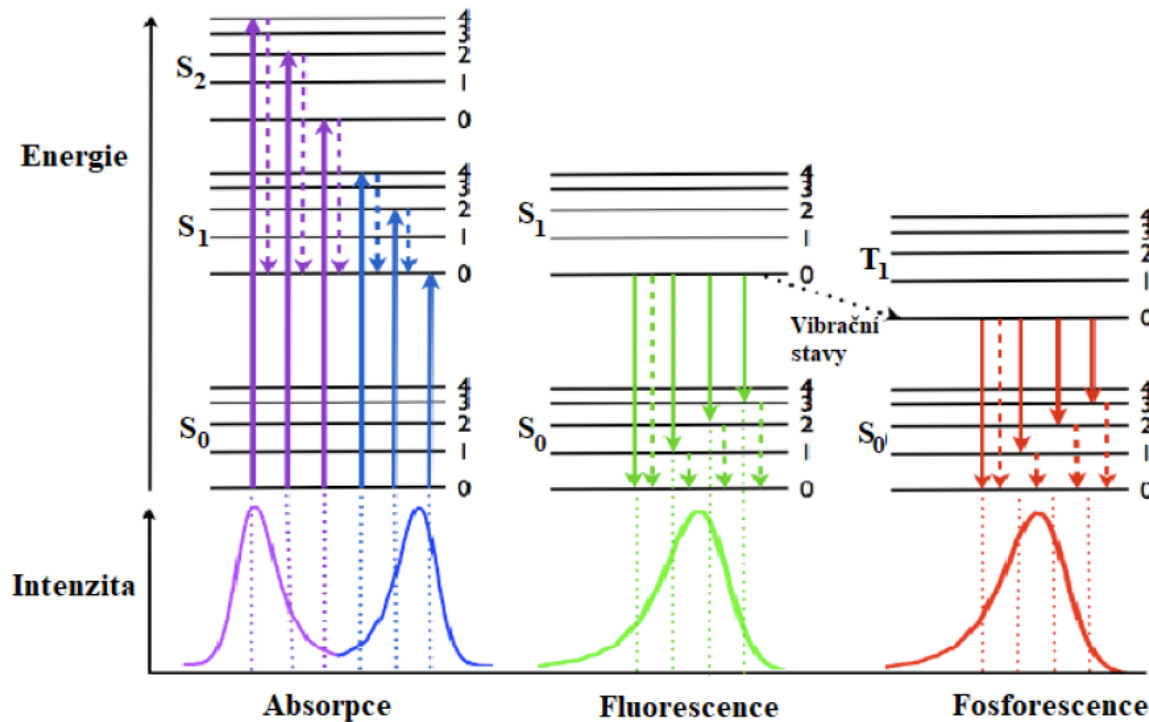
Aromatické AK, $\lambda = 280 \text{ nm}$

Zakalené roztoky bílkovin, $\lambda = 280 \text{ nm}$ a $\lambda = 330 \text{ nm}$, $A = A_{280} - A_{330}$

DNA, $\lambda = 260 \text{ nm}$, nebo $\lambda = 260 \text{ nm}$ a $\lambda = 280 \text{ nm}$, $A = A_{260} / A_{280}$

Optické analytické metody

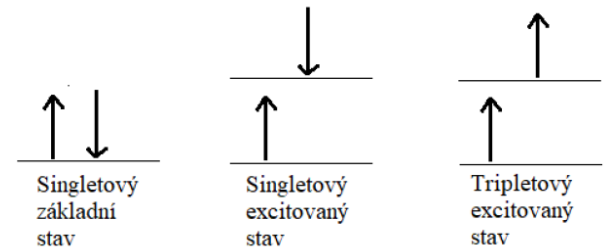
Fluorescence



Pauliho vylučovací princip

Princip kvantové mechaniky, který říká, že žádné dva elektrony v atomu nemohou být ve stejném kvantovém stavu.

V roce 1925 formuloval fyzik Wolfgang Pauli.



Objav Fluorescencie



XXX. *On the Change of Refrangibility of Light.* By G. G. STOKES, M.A., F.R.S.,
Fellow of Pembroke College, and Lucasian Professor of Mathematics in the
University of Cambridge.

Received May 11,—Read May 27, 1852.

1. THE following researches originated in a consideration of the very remarkable phenomenon discovered by SIR JOHN HERSCHEL in a solution of sulphate of quinine, and described by him in two papers printed in the Philosophical Transactions for 1845, entitled 'On a Case of Superficial Colour presented by a Homogeneous Liquid internally colourless,' and 'On the Epipolic Dispersion of Light.' The solution of quinine, though it appears to be perfectly transparent and colourless, like water, when viewed by transmitted light, exhibits nevertheless in certain aspects, and under certain incidences of the light, a beautiful celestial blue colour. It appears from the experiments of Sir JOHN HERSCHEL that the blue colour comes only from a stratum of fluid of small but finite thickness adjacent to the surface by which the light enters.

* I confess I do not like this term. I am almost inclined to coin a word, and call the appearance *fluorescence*, from fluor-spar, as the analogous term *opalescence* is derived from the name of a mineral.

Fluorescenciou nazývame jav pri ktorom je svetlo emitované atómom alebo molekulou po ohraničenej dobe nasledujúcej po absorpcii elektromagnetického žiarenia

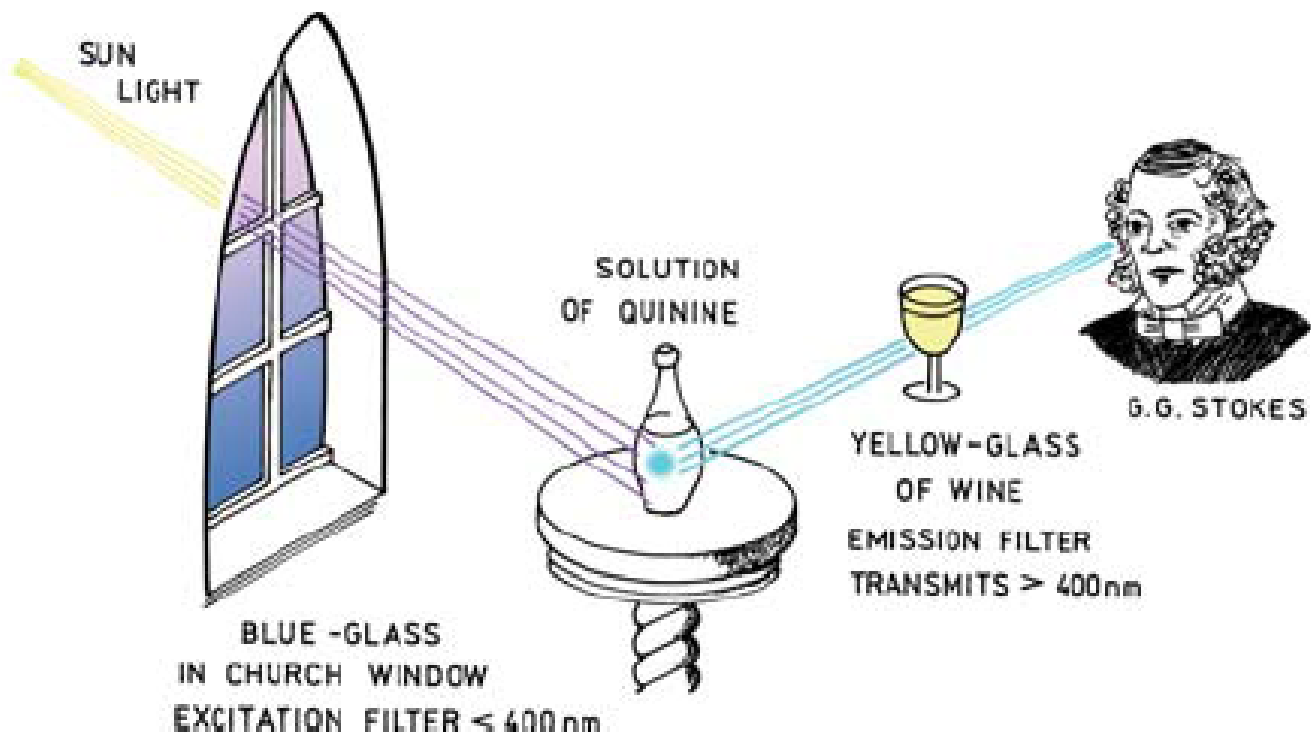


Figure 1.6. Experimental schematic for detection of the Stokes shift.

Energetické hladiny v molekule

$$E_{n,v,J} = E_n + E_v + E_J$$

E_n -elektrónová energia

E_v -vibračná energia

E_J -rotačná energia

Kvalitatívne porovnanie jednotlivých energetických komponent:

$$E_n(\text{UV-VIS}) \gg E_v(\text{IR}) \gg E_J(\text{MW})$$

Čo určuje tvar absorpčného spektra?

Frank-Condonov princíp:

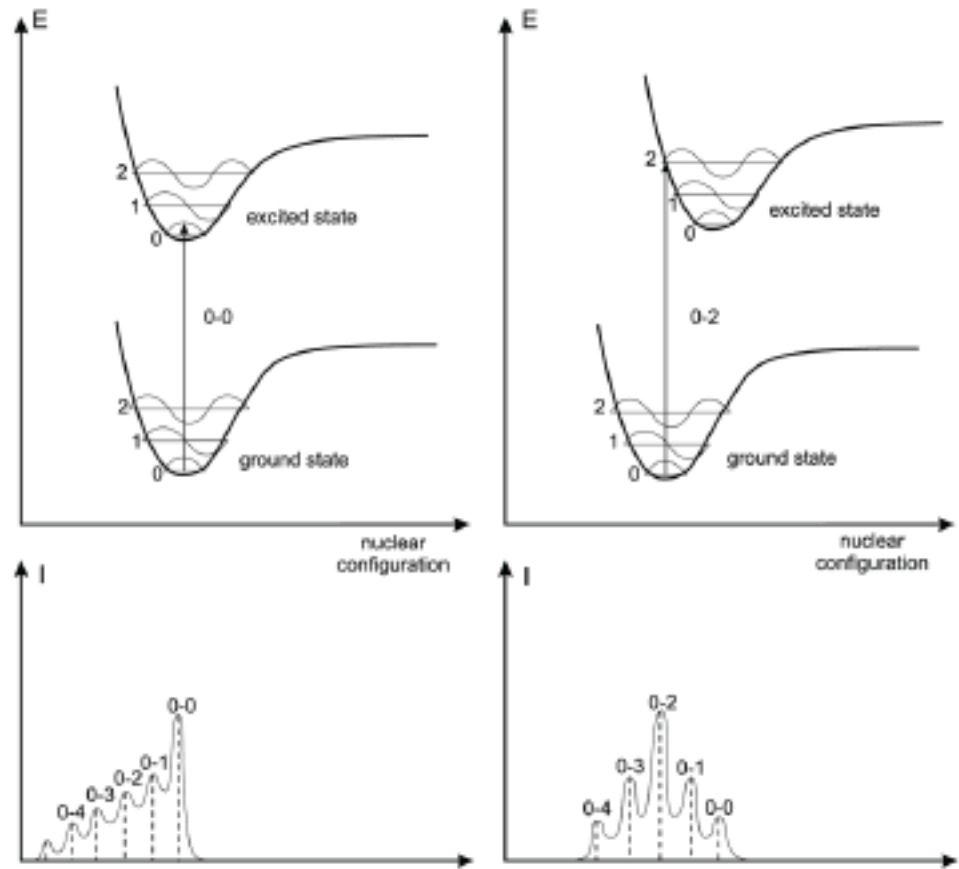
Vertikálne prechody elektrónu, ktoré sa odohrávajú na omnoho rýchlejšej časovej škále ako pohyb jadier atómov. Pravdepodobnosť prechodu závisí od prekryvu vibračných vlnových funkcií

Absorbancia 10^{-15}s

Vibrácie atómov $10^{-12}\text{s}-10^{-10}\text{s}$

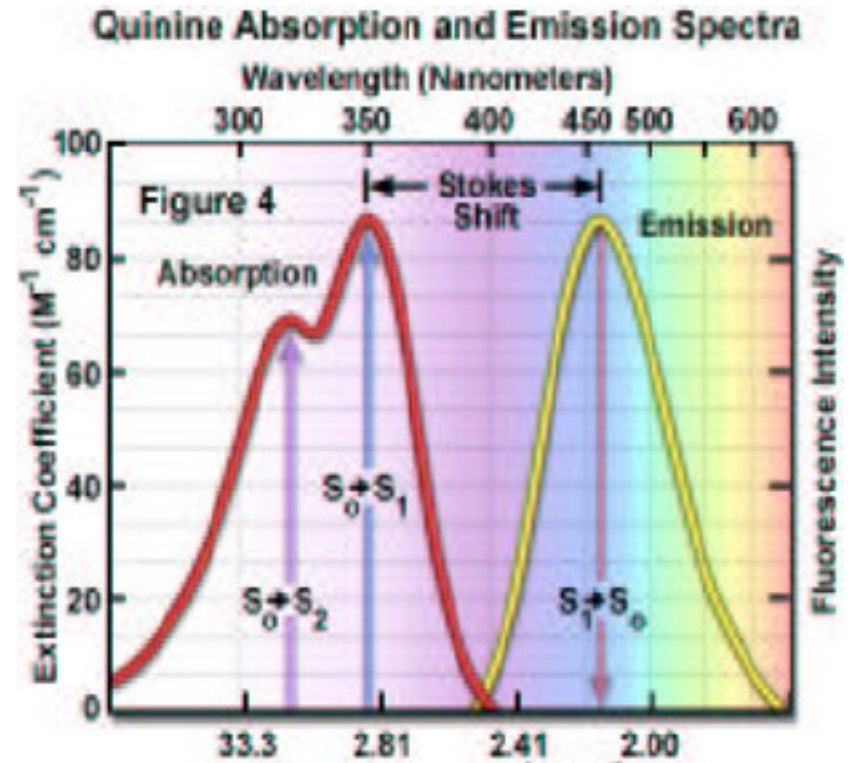
Termálna relaxácia $10^{-15}\text{s}-10^{-12}\text{s}$

Fluorescenčná emisia 10^{-9}s

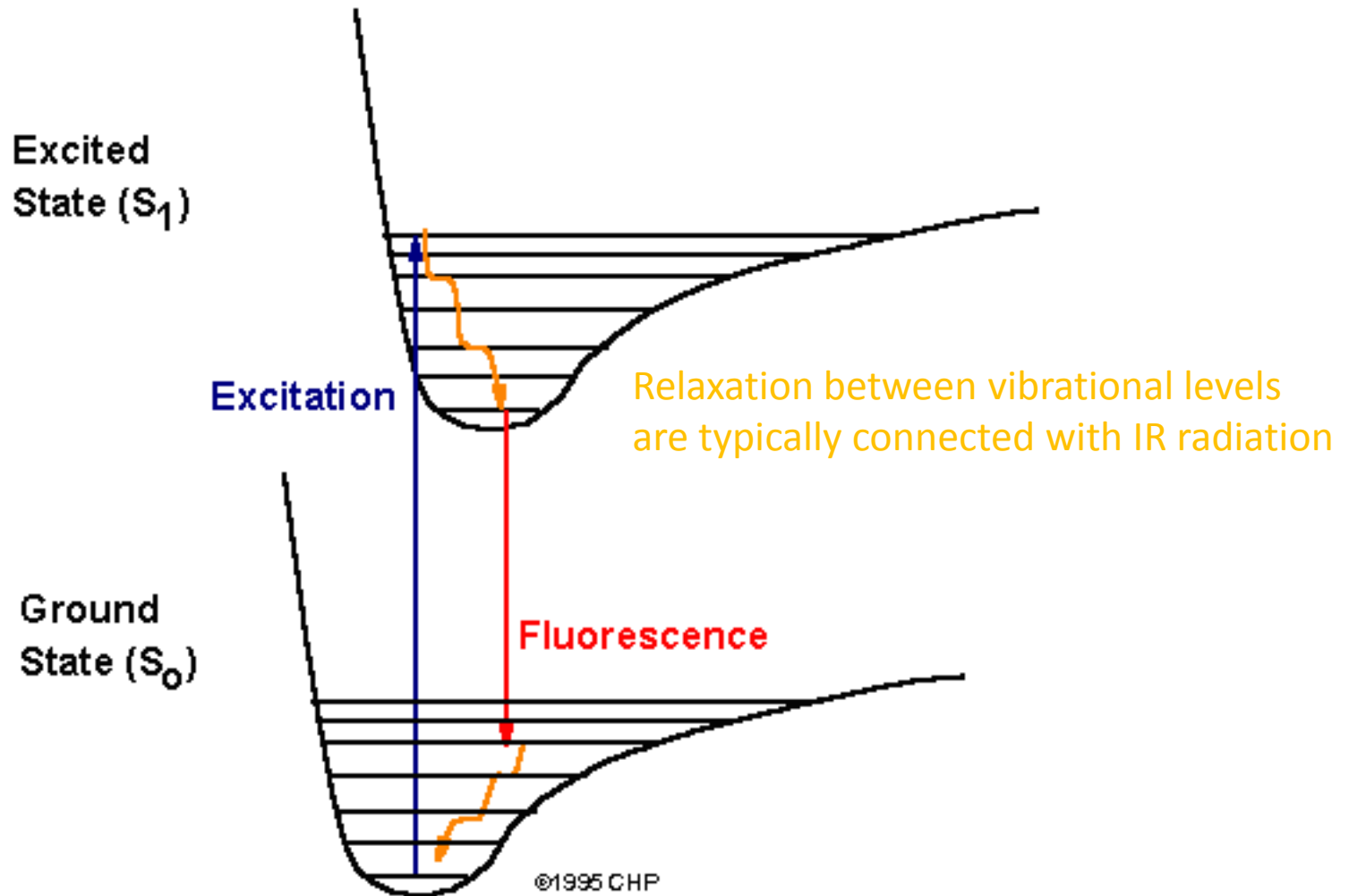


Typické charakteristiky fluorescenčných spektier

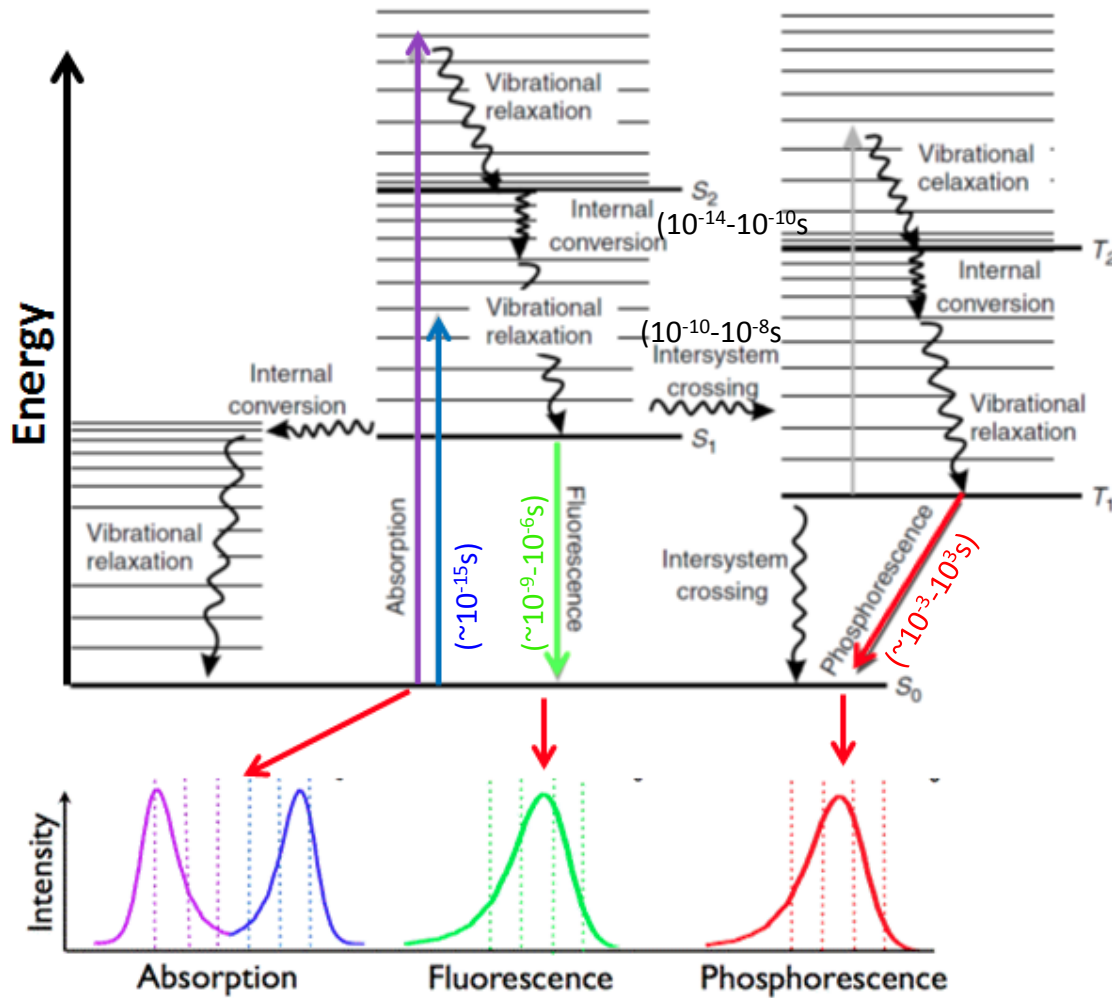
- Stoksov posun
- Nezávislosť emisného spektra na excitačnej vlnovej dĺžke
- Excitačné spektrum “rozumne sa správajúcich molekúl” je prakticky totožné s absorpčným spektrom
- Emisné spektrum je vo väčšine prípadoch takmer zrkadlovým obrazom absorpčného/excitačného spektra



Kasha's Rule



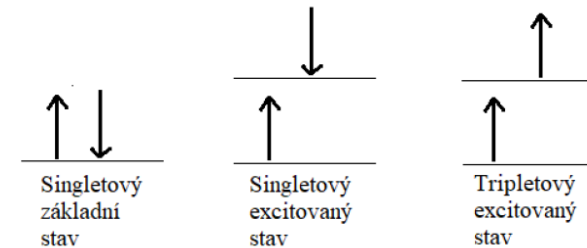
Jablonského diagram



Pauliho vylučovací princip

Princip kvantové mechaniky, který říká, že žádné dva elektrony v atomu nemohou být ve stejném kvantovém stavu.

V roce 1925 formuloval fyzik Wolfgang Pauli.



Kvantový výťažok

$$\Phi = \frac{\textit{počet emitovaných fotónov}}{\textit{počet absorbovaných fotónov}}$$

$$\phi = \frac{k_f}{k_f + k_i + k_{ec} + k_{ic} + k_{pd} + k_d}$$

k_f = fluorescenčná rýchlostná konštanta

k_i = medzi-systémová výmenná rýchlostná konštanta

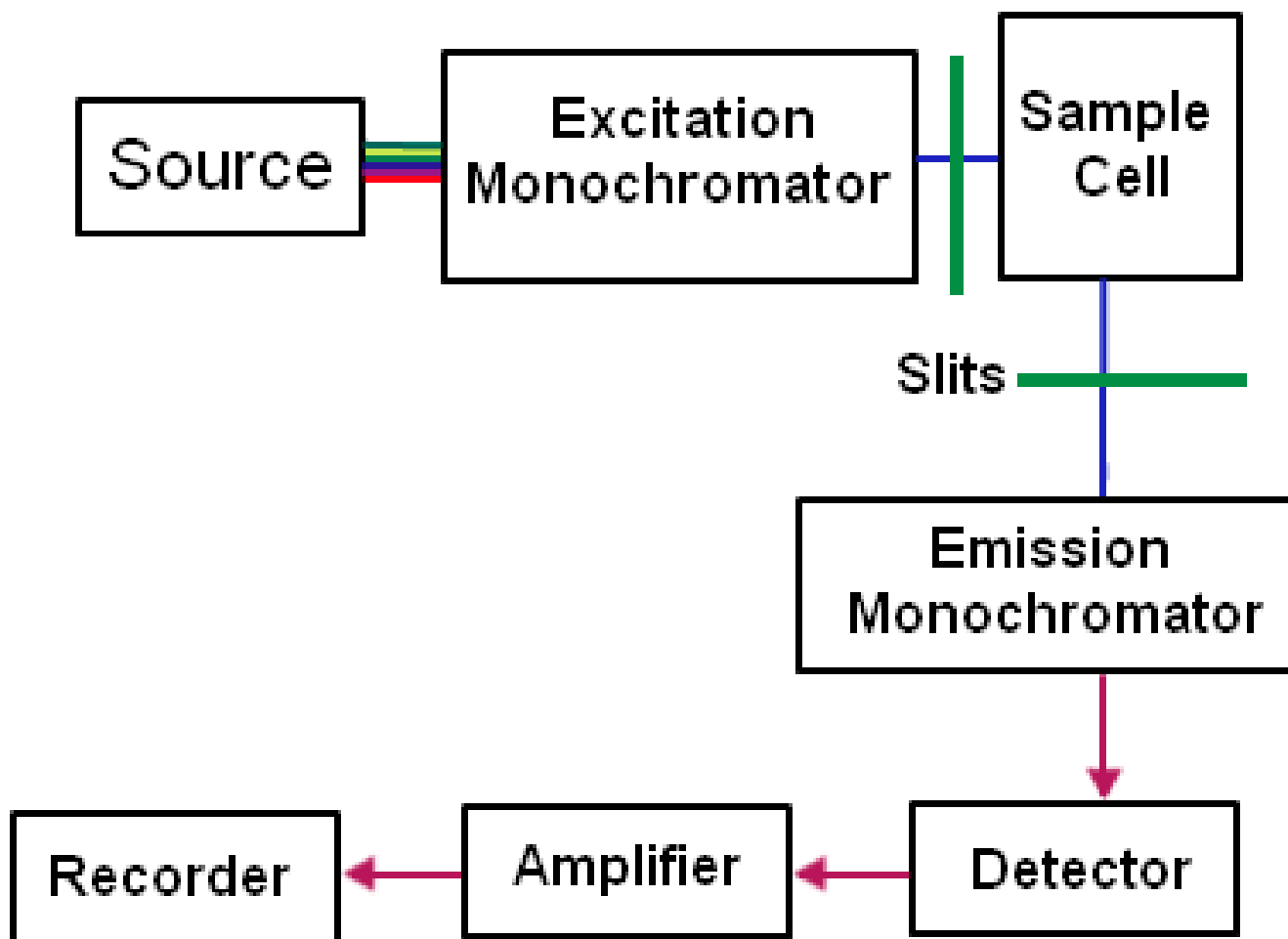
k_{ec} = rýchlostná konštanta externej konverzie

k_{ic} = rýchlostná konštanta internej konverzie

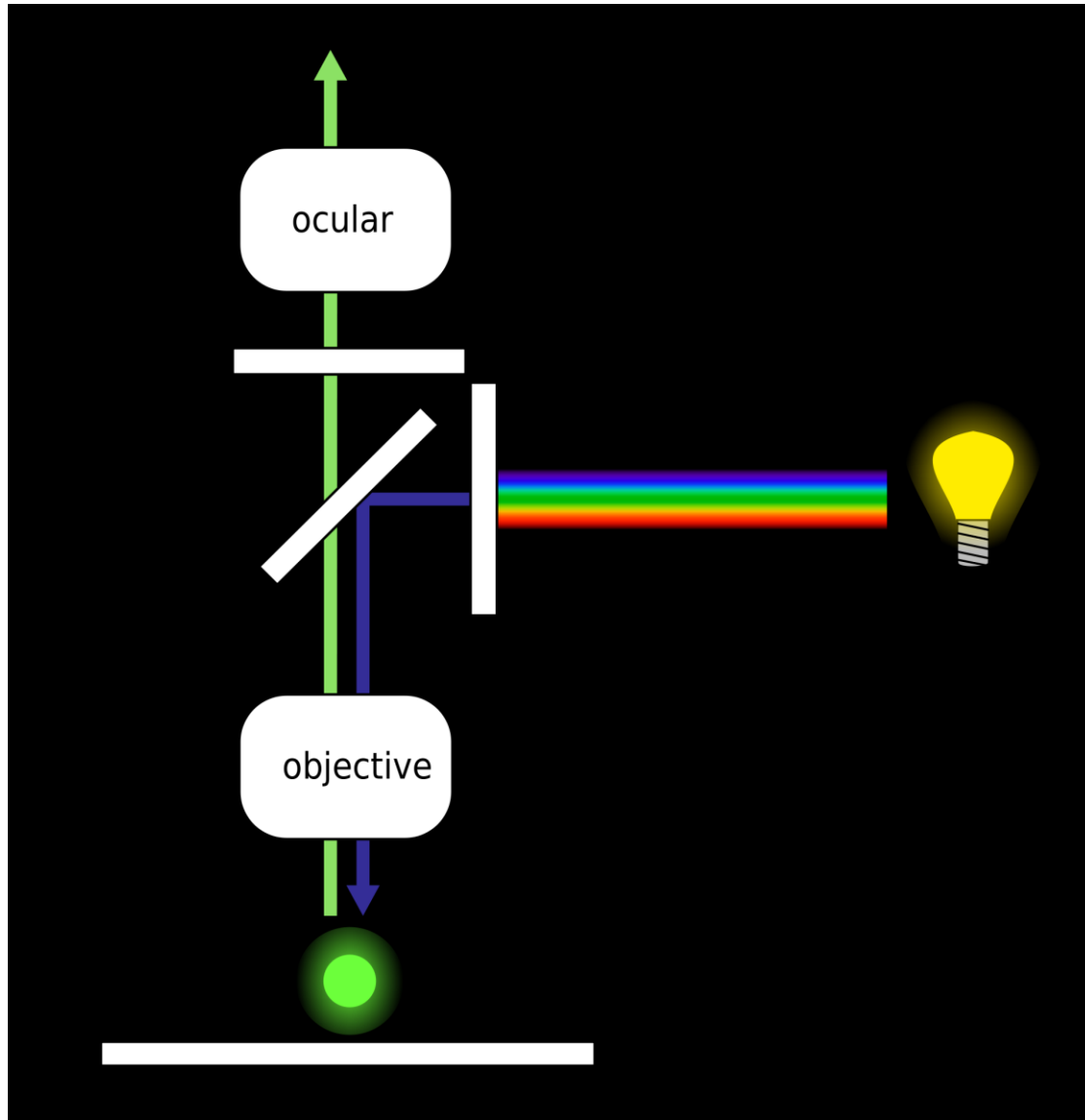
k_{pd} = predisociačná rýchlostná konštanta

k_d = disociačná rýchlostná konštanta

Fluorescenčný spektrofotometer

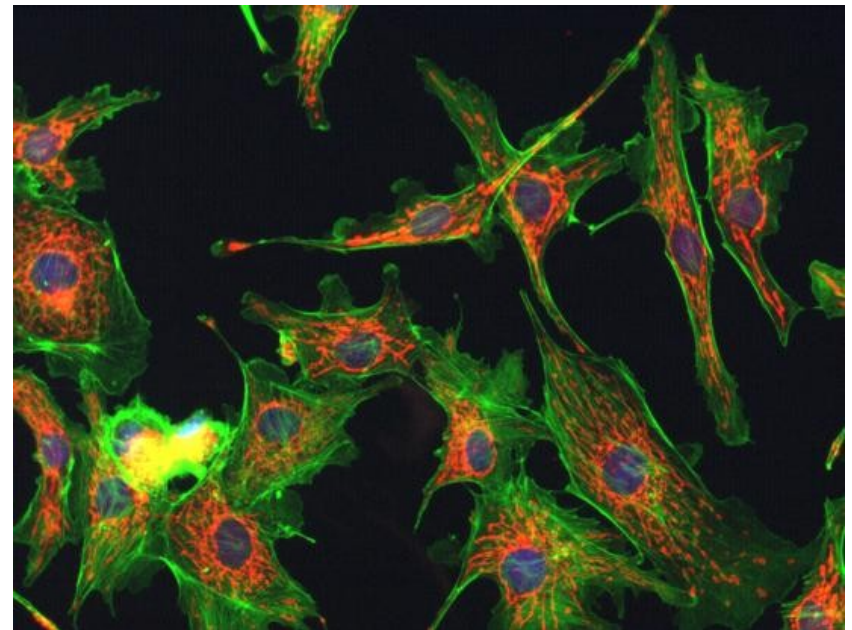
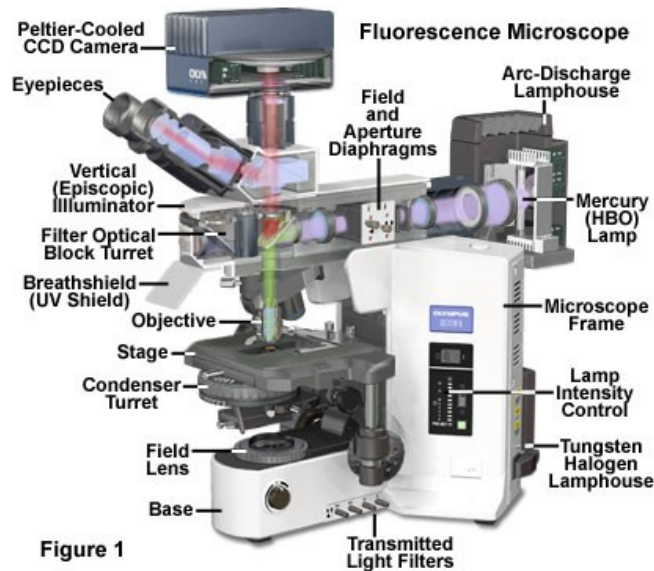


Fluorescenční mikroskop

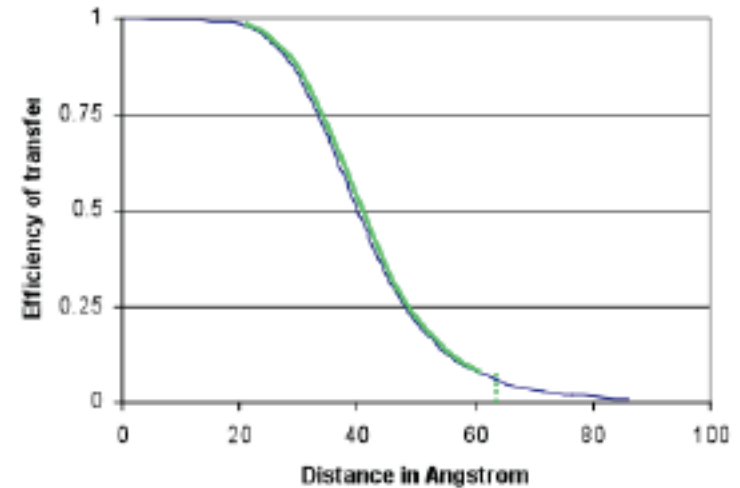
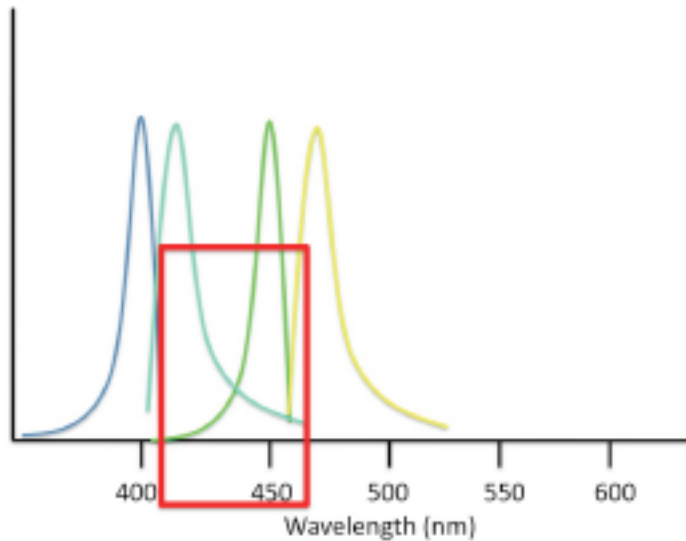


Fluorescence microscopy

- Subcellular fluorescence imaging
 - Combined with recombinantly-expressed fluorophores (GFP, etc.—Roger Tsien) has revolutionized biology.



Försterov Rezonančný Transfer Energie (FRET)



$$E = \frac{R_0^6}{R_0^6 + r^6}$$

R_0 -Försterov polomer/vzdialenost'

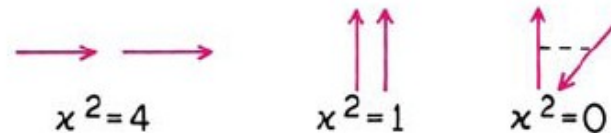
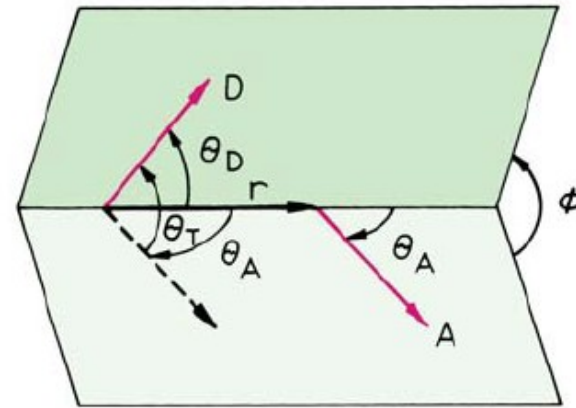
Efektívnosť FRET

$$E = \frac{R_0^6}{R_0^6 + r^6} \quad R_0^6 = \frac{9000(\ln 10)\kappa^2 Q_D}{128\pi^5 N n^4} \int_0^\infty F_D(\lambda) \epsilon_A(\lambda) \lambda^4 d\lambda$$

r – vzdialenosť medzi akceptorom a donorom

κ^2 – popisuje vzájomnú relatívnu orientáciu tranzitných dipólov donoru a akceptora.

Pre flexibilný náhodný pohyb akceptora a donora sa $\kappa^2=2/3$



$$x^2 = (\cos \theta_T - 3 \cos \theta_D \cos \theta_A)^2$$

$$x^2 = (\sin \theta_D \sin \theta_A \cos \phi - 2 \cos \theta_D \cos \theta_A)^2$$

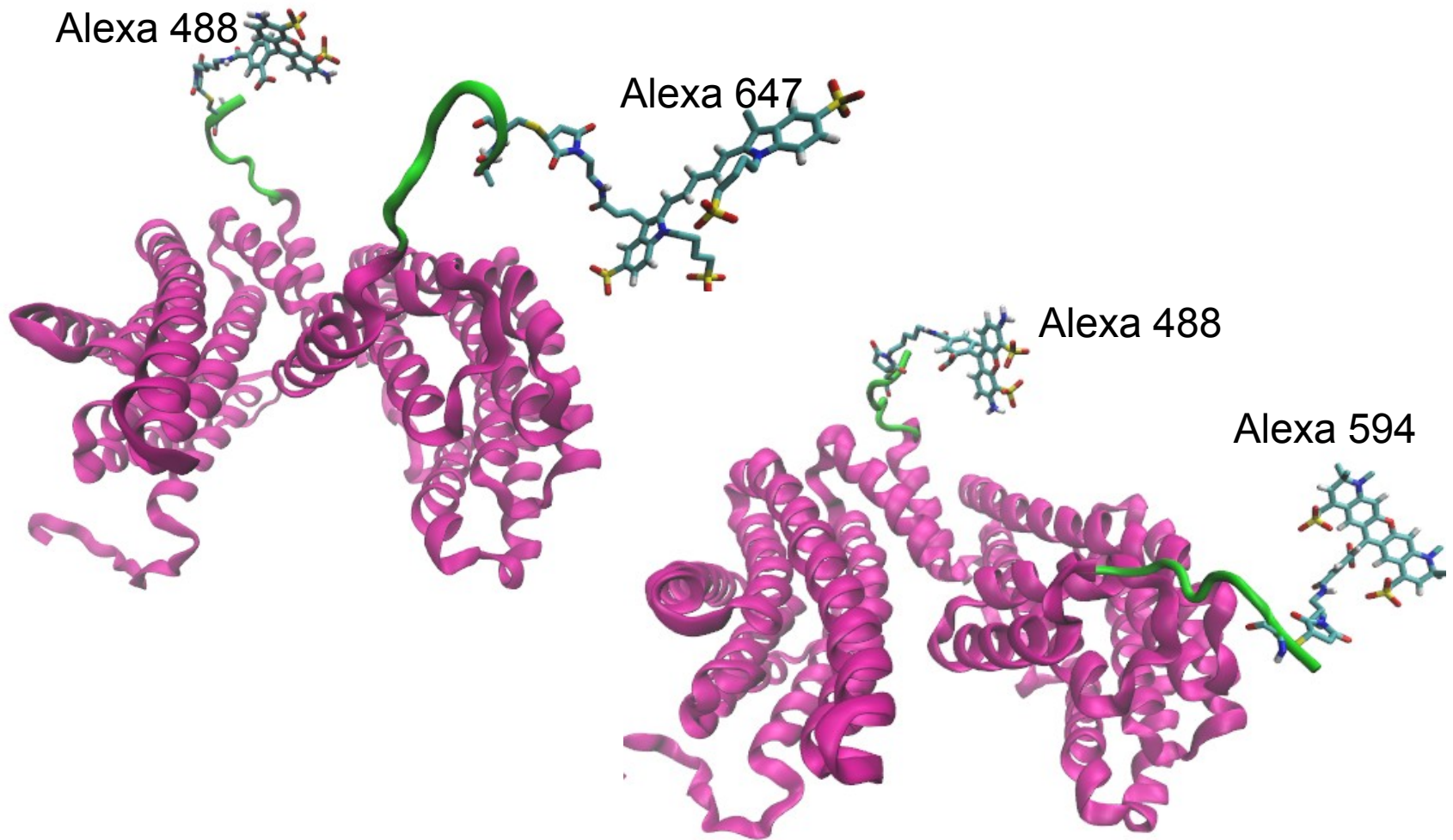
Försterov polomer (R_0) hodnota v angstromoch (Å) reprezentuje hodnotu vzdialenosti pre ktorú má FRET efektívnosť 50%. Pre veľa párov dostupných fluoroforov (hlavne komerčných) sú tieto hodnoty dostupné. Napr.

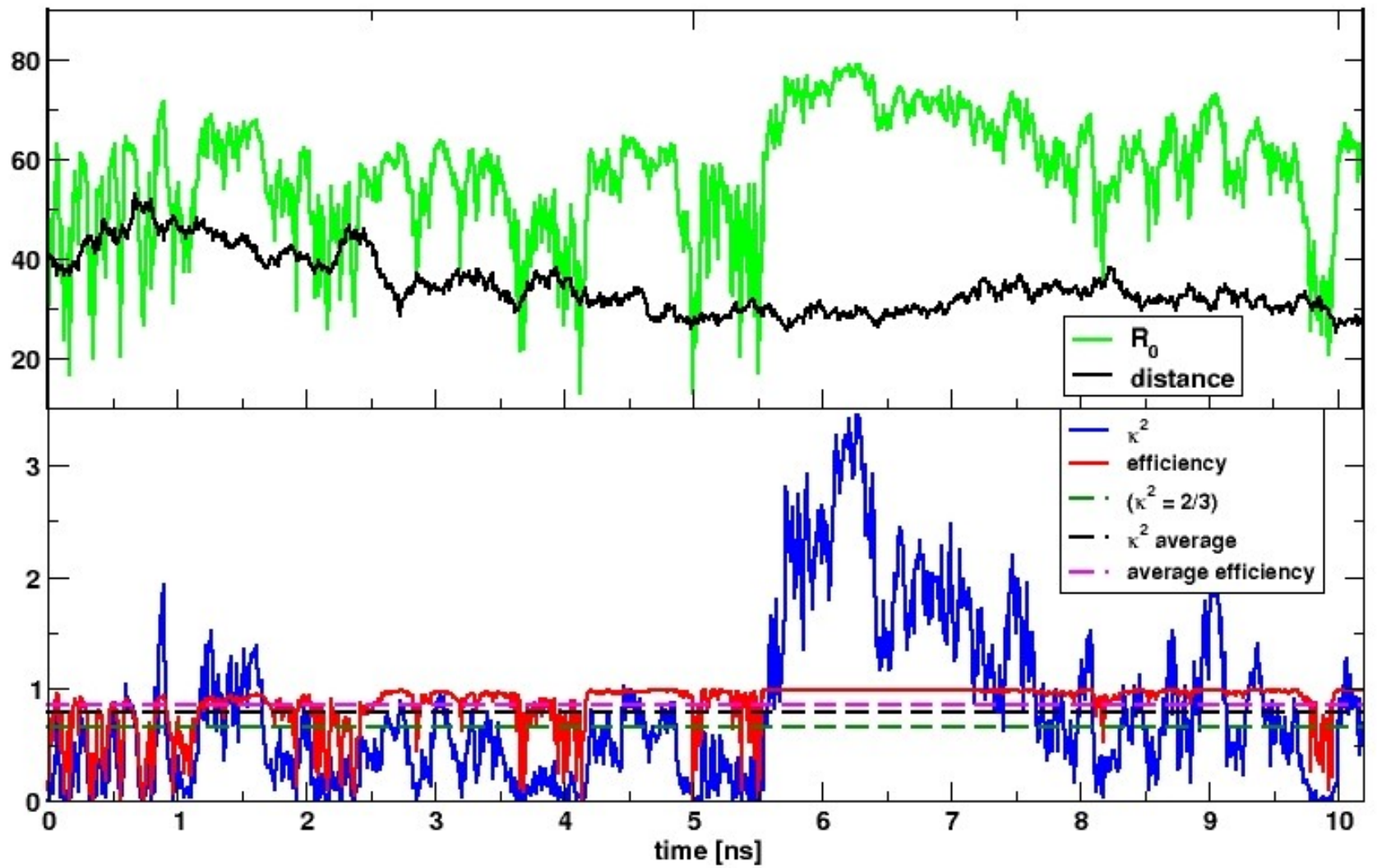
<https://www.thermofisher.com/cz/en/home/references/molecular-probes-the-handbook/tables/r0-values-for-some-alexa-fluor-dyes.html>

Donor	Acceptor					
	Alexa Fluor 488	Alexa Fluor 546	Alexa Fluor 555	Alexa Fluor 568	Alexa Fluor 594	Alexa Fluor 647
Alexa Fluor 350	50					
Alexa Fluor 488	NA	64	70	62	60	56
Alexa Fluor 546		NA		70	71	74
Alexa Fluor 555			NA		47	51
Alexa Fluor 568				NA		82
Alexa Fluor 594					NA	85
Alexa Fluor 647						NA

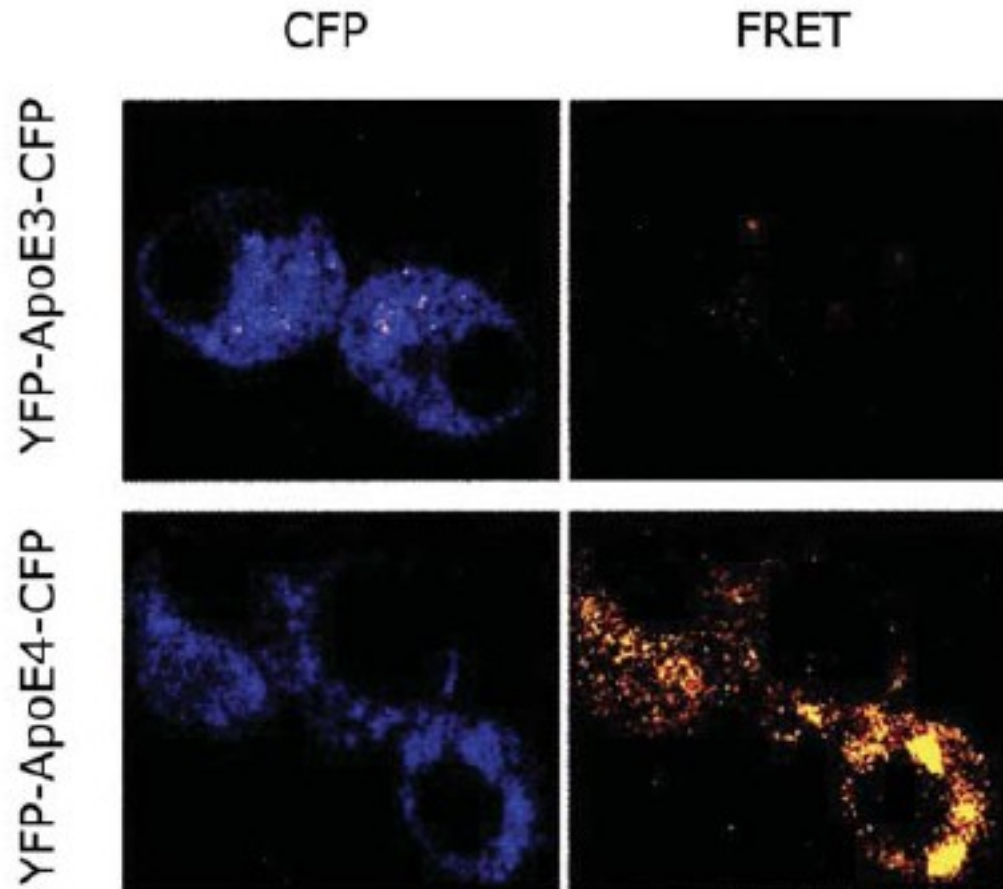
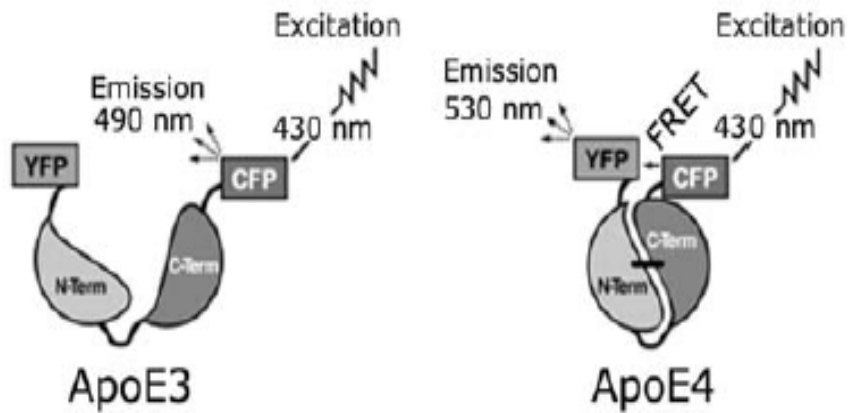
Príklad: Vypočítajte efektívnosť FRETu medzi AF488 a AF647 pre ich vzdialenosť 5 nm keď viete, že ich preferovaná vzájomná orientácia je charakterizovaná $\kappa^2=0.5$.

MD simulácie Hanky Zigovej

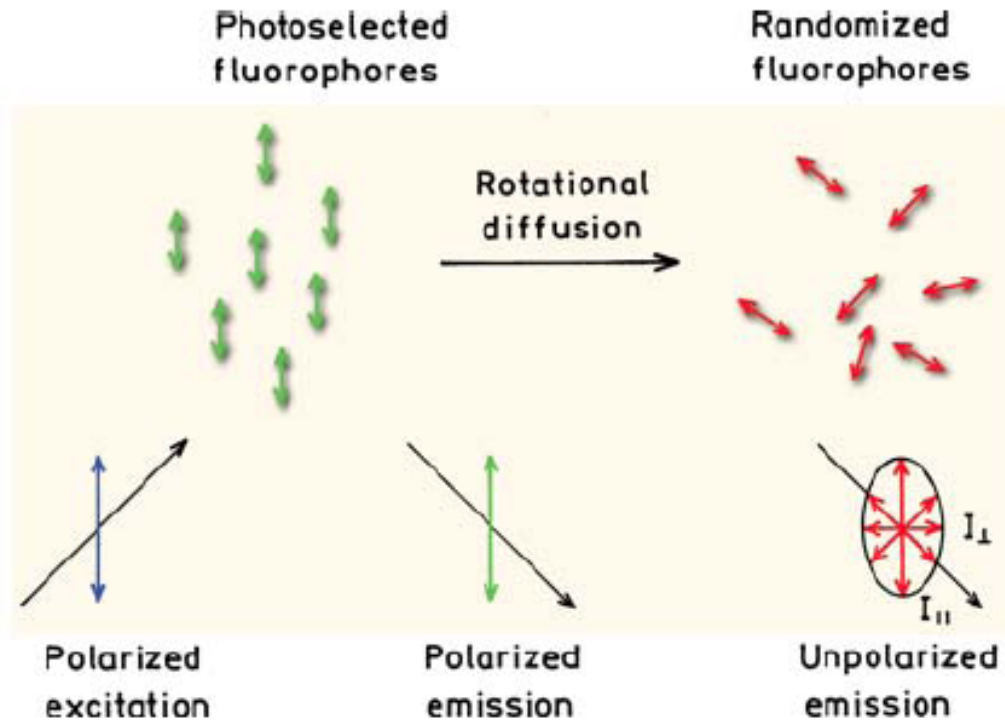




Monitorovanie skladania proteínov in vivo



Fluorescenčná anizotropia



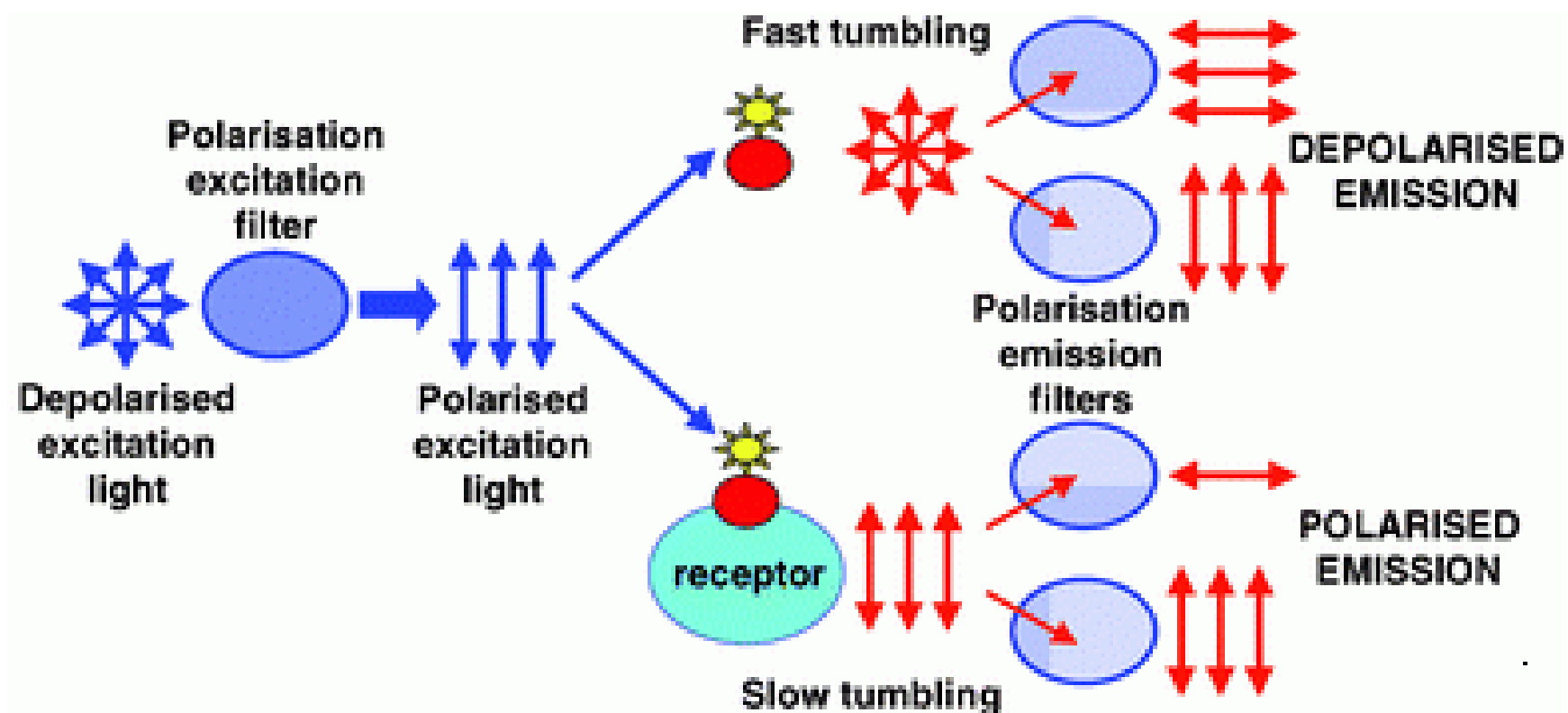
Anizotrópia

$$r = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + 2I_{\perp}}$$

Polarizácia:

$$P = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + I_{\perp}}$$

Viazanie ligandu do receptoru



Praktické výhody v porovnaní s inými experimentálnymi technikami

- veľmi vysoká citlivosť
 - nízke nároky na množstvo meranej vzorky
 - možnosť quantifikovať silné interakcie charakterizované nízkou hodnotou disociačnej konštanty
- relatívne nízka finančná náročnosť na prípravu vzorky ako aj meranie na fluorimeteri
- Špecifické značenie fluorescenčnou farbičkou dosť často netriviálne

Ďalšie čítanie

- Lakowicz, J. R. (2006) Principles of Fluorescence Spectroscopy

<http://xibalba.lcg.unam.mx/~rgalindo/bioquimica/BQPosgrado2011/V>

PurificacionEspectroscopia/PrinciplesofFluorescenceSpectroscopy3rd.pdf)