

Optické metody
(pokračování) –
fluorescence, fluorimetrie

Luminisceční metody



Luminiscence – je emise světla při návratu elektronu z excitovaného stavu na nižší energetickou hladinu

Druhy luminiscence:

Fluorescence

- Fosforescence
- Chemiluminiscence

Vzájemně se liší:

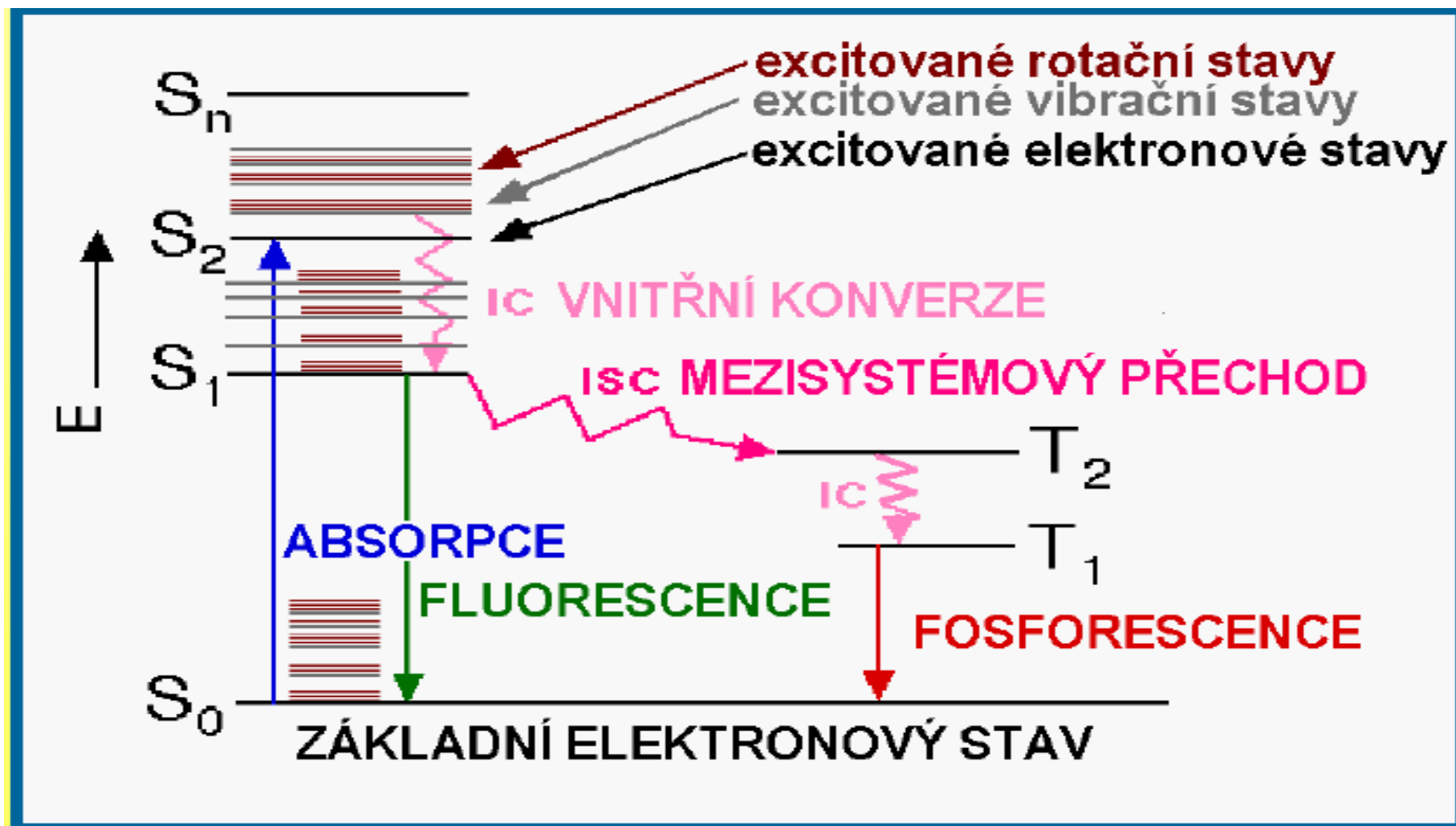
- způsobem aktivace elektronu do excitovaného stavu
- způsobem vyzáření energie

Fluorescence

A decorative graphic at the top of the slide consists of two groups of three circles. The first group on the left has a solid light purple circle, a white circle with a light purple outline, and another solid light purple circle. The second group on the right has a solid light purple circle, a white circle with a light purple outline, and another solid light purple circle.

- druh luminiscence, u níž dochází k emisi světla v čase kratším než 10^{-8} s
- Je to emise elektromagnetického záření při přechodu mezi dvěma stavy téže multiplicity (obvykle dvěma singlety)
- molekuly absorbují světlo při jedné vlnové délce (excitační) a reemitují při větší vlnové délce (emisní)

Fluorescence a fosforescence



Fluorofory



- látky, které fluoreskují. Většina obsahuje konjugované dvojně vazby

Přirozené fluorofory

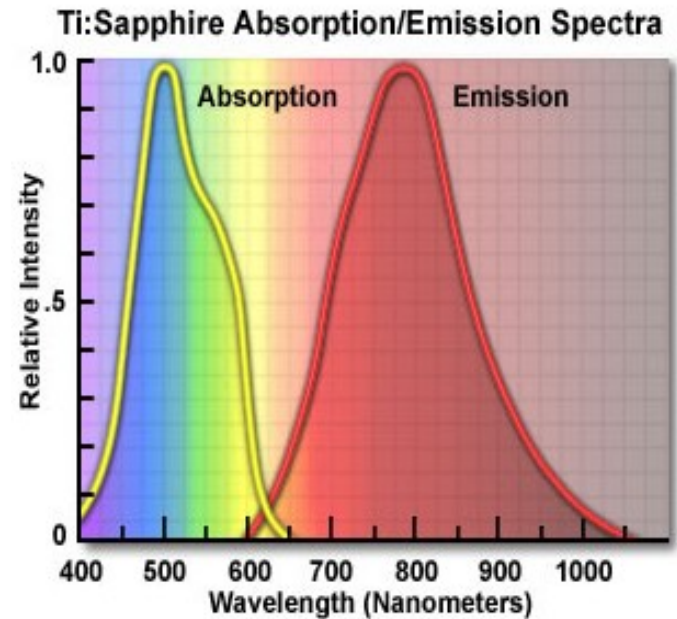
- Tryptofan
- porfyriny

Analytické fluorofory

- Fluorescein
- Methylumbelliferon
- Methylumbelliferonfosfát (MUP)
- Cheláty lanthanidů (Europium)

Fluorescence

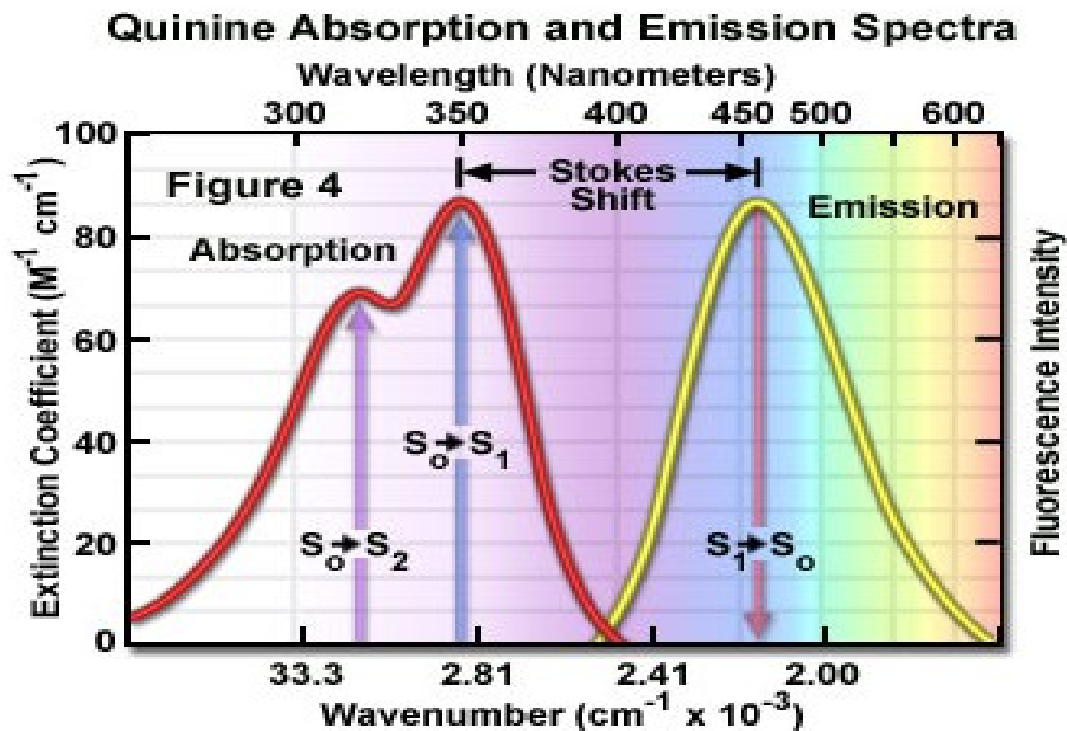
- Při excitaci se molekuly dostanou na vyšší energetickou hladinu a při návratu do základního stavu se část energie vyzáří také ve formě tepla.
- Proto má emitované záření fluoreskujících sloučenin vždy vyšší vlnovou délku (tj. méně energie) než excitační záření, vyvolávající fotoluminiscenci



Fluorescence

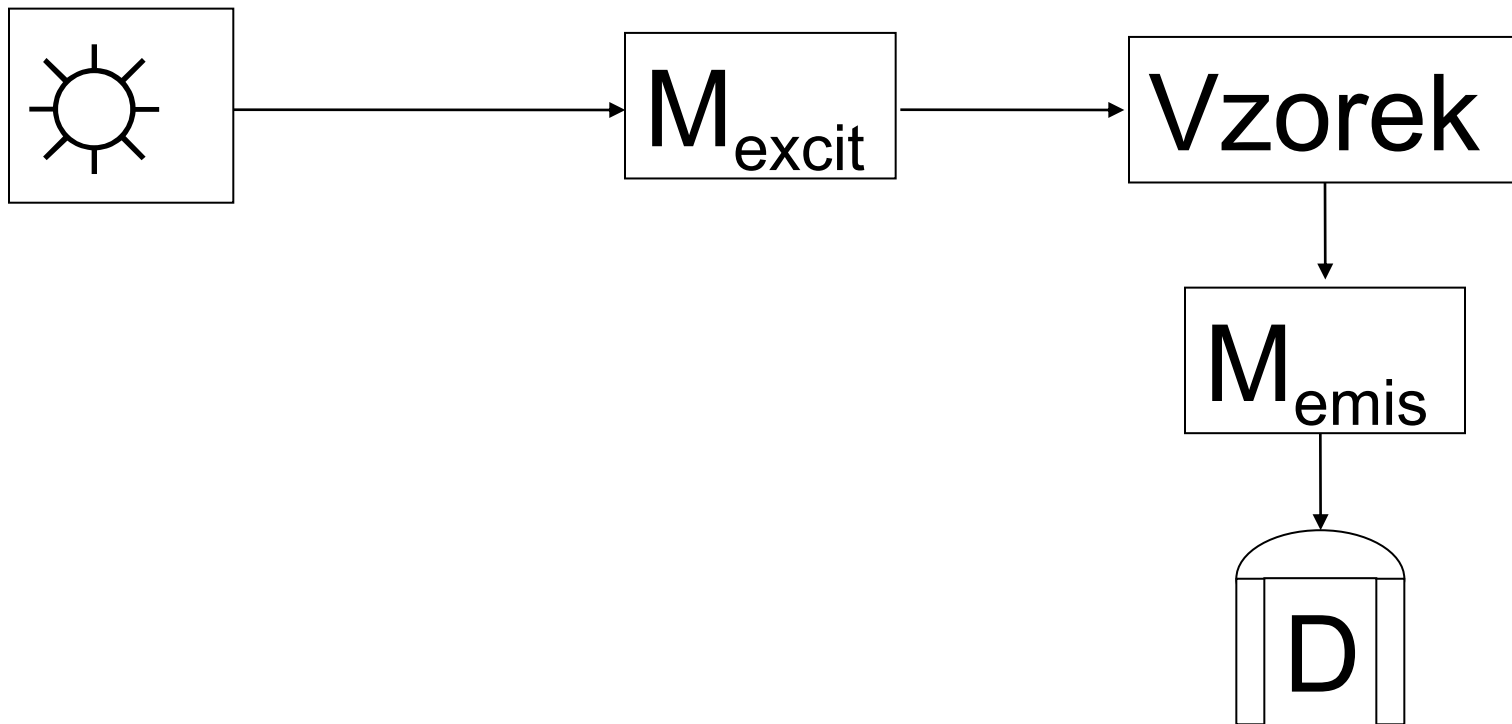
Stokesův posun

rozdíl mezi vlnovou délkou excitačního primárního) a emitovaného (sekundárního) záření



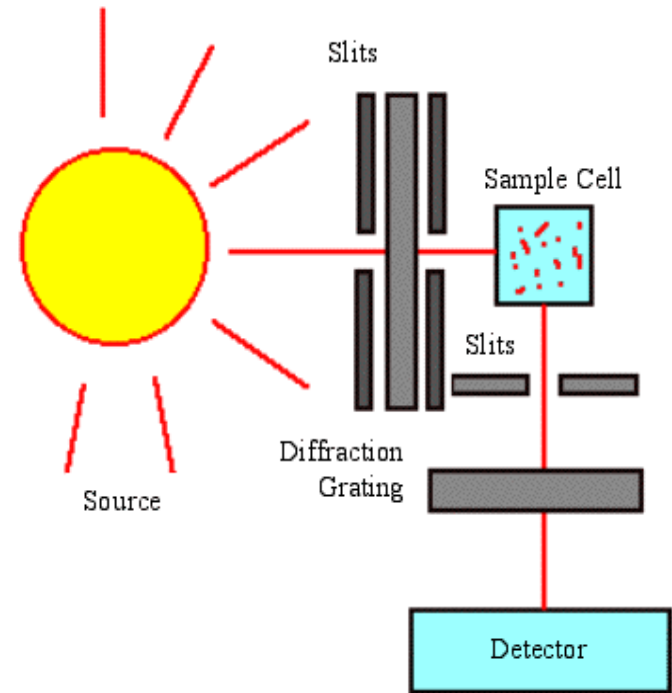
Fluorimetrie

- Přístroje, které se používají k měření intenzity emisního záření se nazývají fluorimetry



Fluorimetry

- Zdroj světla: xenonová nebo xenono-rtuťová lampa (300-550 nm)
- Monochromátor pro výběr excitačního záření
- Absorpční prostředí – křemíková kyveta
- Monochromátor pro sekundární emisní záření
- Detektor: fotonásobič, je umístěn pod úhlem 90° vzhledem ke zdroji záření



Fluorimetrie



- Imunochemické metody s fluorescenční detekcí
- Intenzita fluorescence je úměrná koncentraci fluoroforu
- Metody jsou řádově citlivější než měření absorbance (100-1000x)
- Fluorescence je více specifická, protože existuje jen málo přirozených fluoroforů, které by mohly způsobit interferenci

Fluorimetry



- Automatizované imunoanalyzátory
- Fluorescenční polarizované systémy – TDx, Imx
- DELFIA – imunoreagencie značené europiem
- Průtoková cytometrie