

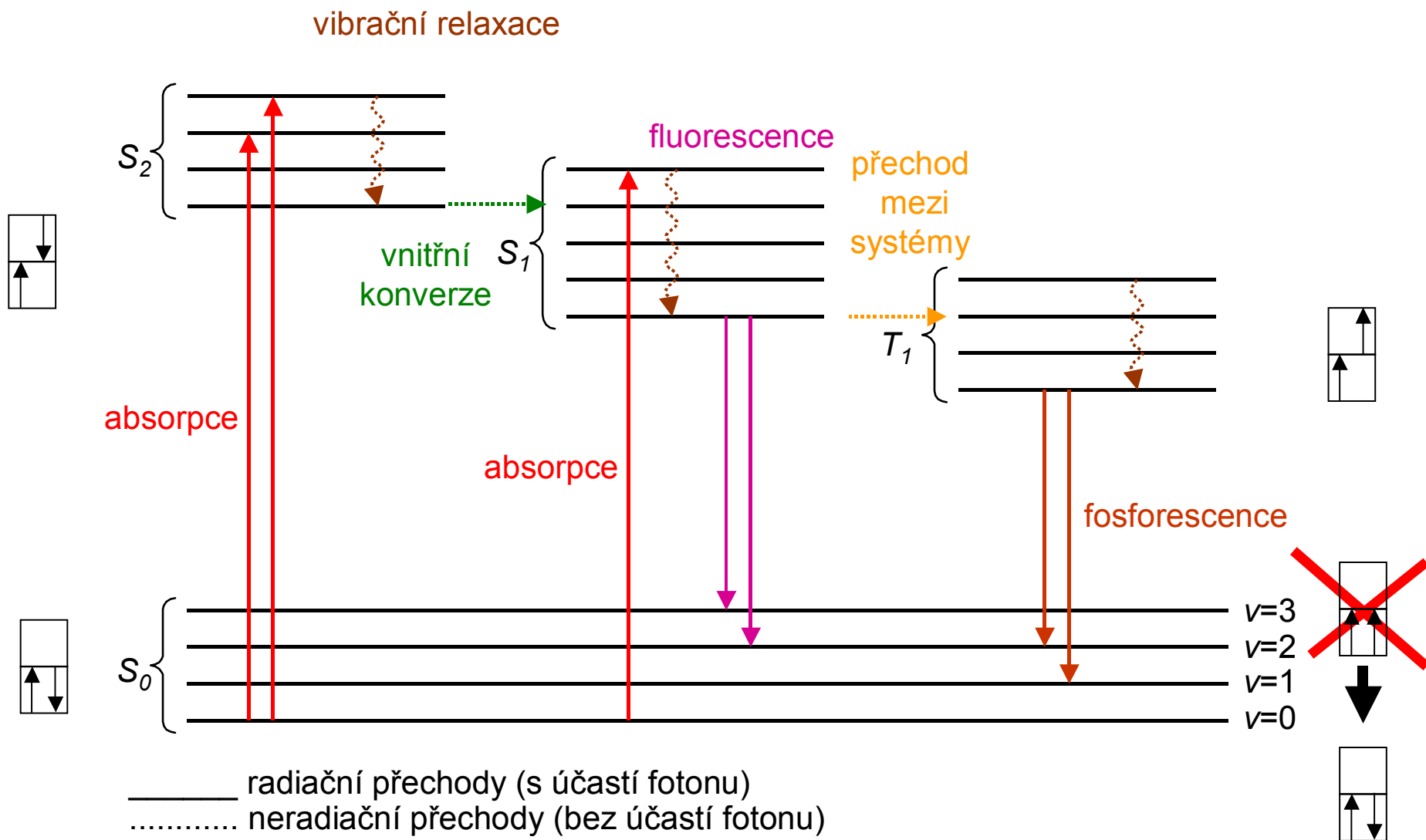
# Analýza organických látek

Luminiscenční spektroskopie

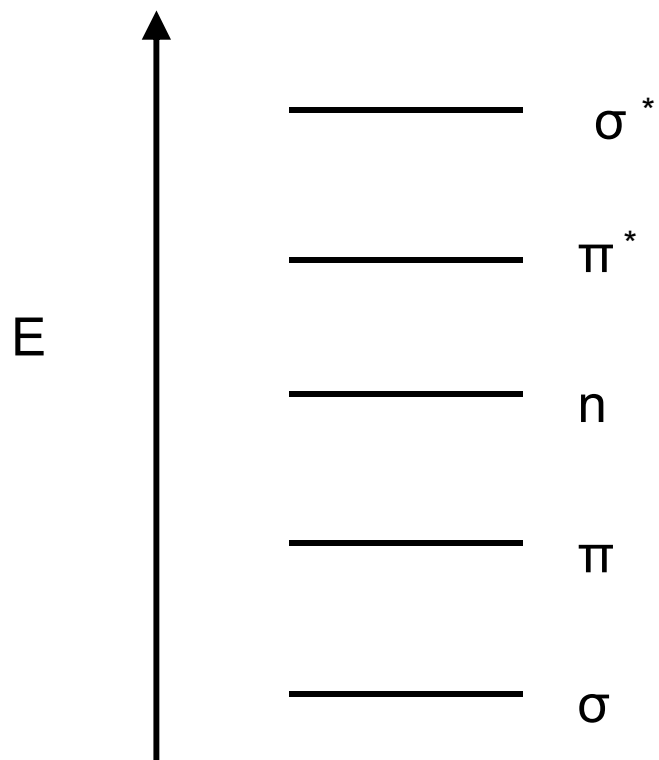
# Rozdělení luminiscence podle zdroje excitace

- **fotoluminiscence** - absorpce energie ve formě světla
- **chemiluminiscence** a **bioluminiscence** - zdrojem energie je chemická, nebo biochemická reakce
- **elektroluminiscence** –zdrojem je el. proud
- **thermoluminiscence** – zdrojem je tepelná energie
- **radioluminiscence** – zdrojem je radioaktivní záření
- **triboluminiscence** – zdrojem je mechanická energie
- **krystaloluminiscence** – krystalizace je doprovázena luminiscencí
- další zdroje (sonoluminiscence, atd.)

# Jablonského diagram



# Typy přechodů



*hladiny energií molekulových orbitalů*

# Typy přechodů

**Přechod  $\sigma - \sigma^*$**  : jednoduché vazby (např. C-C, nebo C-H), vyžadují velikou energii (méně než 190nm, vakuová oblast)

**Přechod  $n - \sigma^*$**  : nutná přítomnost atomu s volným elektronovým párem (N, S, I, Cl, Br), absorpce kolem 200nm.

**Přechod  $\pi - \pi^*$** : sloučeniny s dvojnými a trojnými vazbami, čím lepší konjugance vazeb, tím vyšší vlnová délka (energetická hladina nejvyššího obsazeného vazebného orbital se zvýší a energetická hladina nejnižšího nevazebného orbitalu se sníží → nižší  $\Delta E$ ), delokalizované  $\pi$  orbitaly aromatických systémů → rozdíl energií je nízký (absorpce ve Vis oblasti)

**$n - \pi^*$** : v molekule je kromě dvojných vazeb přítomen také atom s volným elektronovým párem (N, S, Cl...), nízká energie, ovlivnění  $\pi - \pi^*$  přechodu

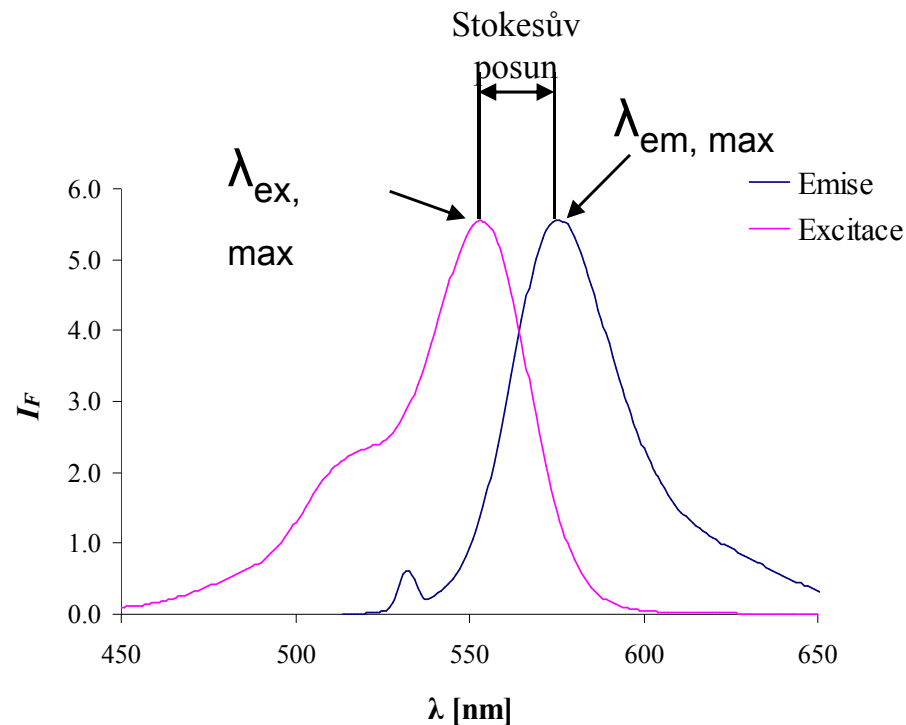
# Luminiscence molekuly je charakterizována:

emisní spektrum (emisní maximum), excitační  
spektrum (excitační maximum), Stokesův posun,  
kvantový výtěžek, čas vyhasínání luminiscence

# Emisní a excitační spektra

**emisní spektrum** (fluorescenční resp. fosforescenční spektrum): závislost intenzity luminiscence na vlnové délce. Měří se při konstantní  $\lambda_{\text{ex}}$ .

**excitační** (aktivační, „absorpční“) spektrum: závislost absorpce luminoforu (fluoroforu) na vlnové délce. Měří se při konstantní  $\lambda_{\text{em}}$ .



# Emisní a excitační spektra

- **Stokesův posun**: rozdíl mezi emisním a excitačním maximem (v nm)
- **Kashovo pravidlo**: **tvar** emisního spektra není ovlivněn vlnovou délkou excitace a lze excitovat zářením s kteroukoli vlnovou délkou z excitačního spektra
- **nejvyšší intenzita luminiscence**: excitace vlnovou délkou rovnou excitačnímu maximu
- **fosforescenční spektra jsou posunuta k vyšším vlnovým délkám**, neboť přechod z  $T_1$  do  $S_0$  je spojen s menším rozdílem energie, než přechod z  $S_1$  do  $S_0$



# Základní vztahy

$$A = c / \varepsilon = \log (\Phi_0 / \Phi) \quad (\text{Lambert-Beerův zákon})$$

$A$  – absorbance,  $c$  – koncentrace,  $\varepsilon$  – absorpční koeficient,  $l$  – tloušťka květy,  
 $\Phi_0$  - záření vyslané na vzorek,  $\Phi$  - záření prošlé vzorkem

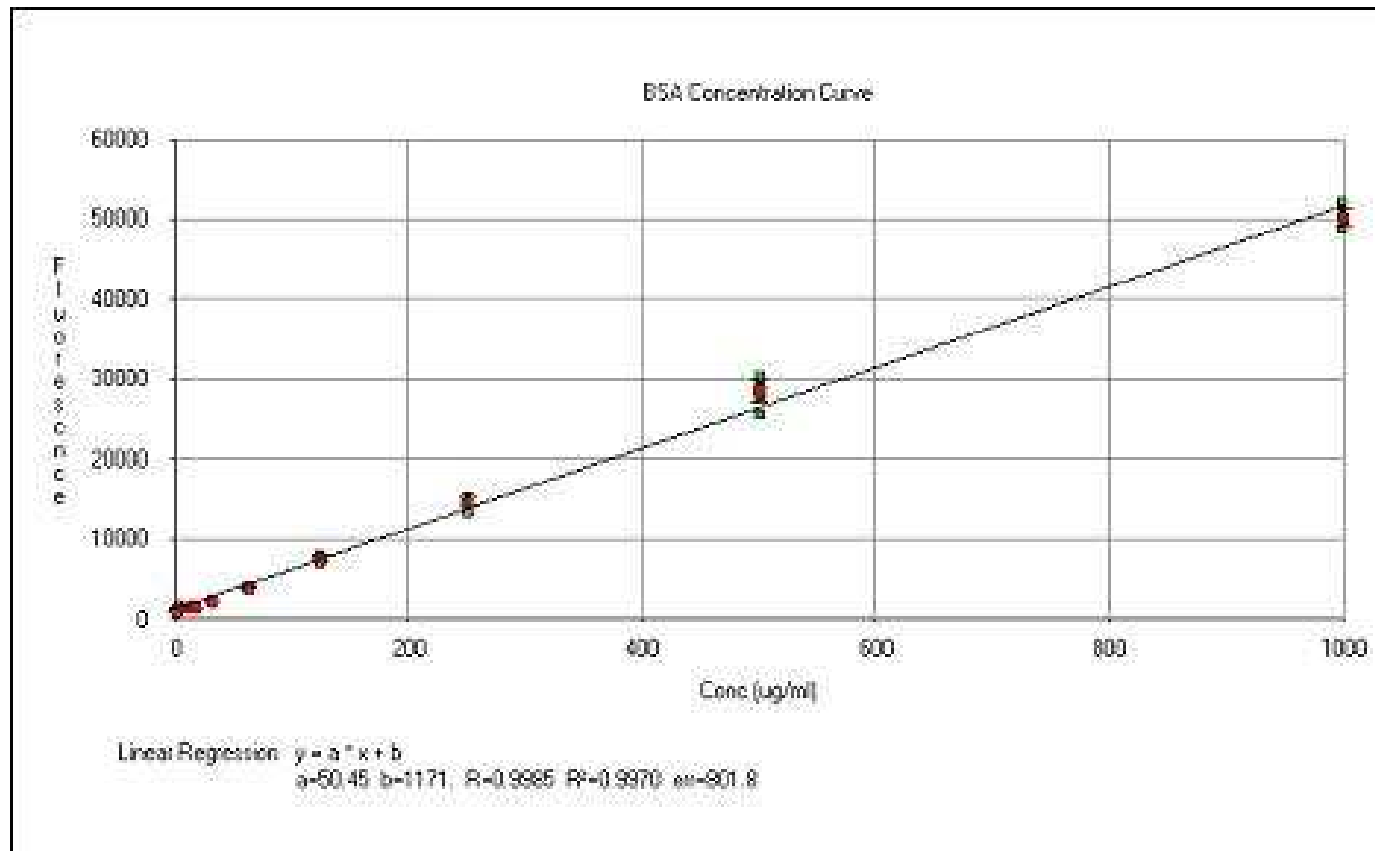
$$F = k \varphi \Phi_0 (1 - 10^{-c/\varepsilon})$$

$F$  – fluorescenční signál (fotony/s),  $k$  – podíl emitovaných fotonů, které dorazí na detektor,  $\varphi$  – výtěžek luminiscence

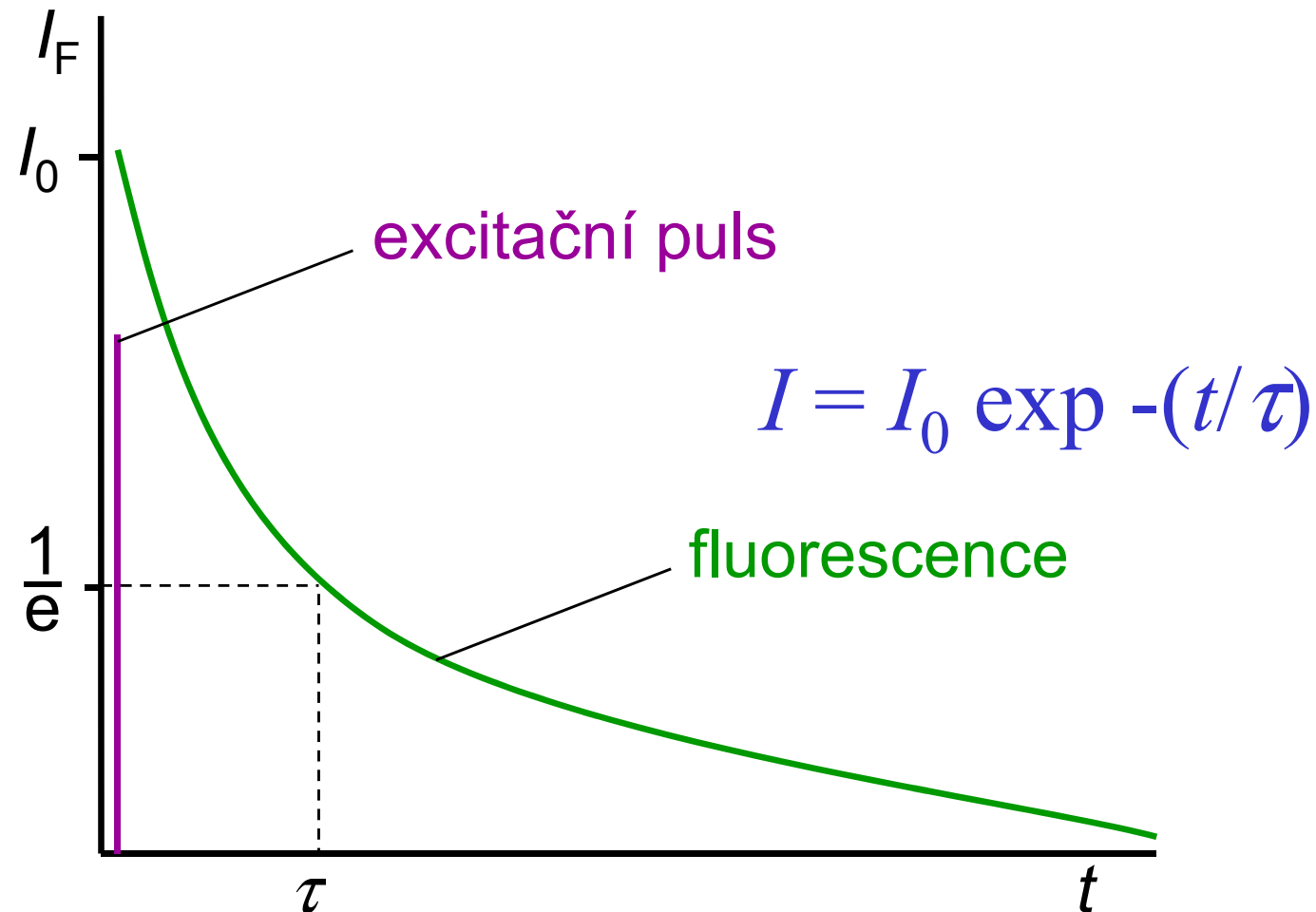
$$F = k \varphi \Phi_0 2.3 c / \varepsilon$$

zjednodušený vztah pro nízké koncentrace

# Stanovení proteinů



# Časově rozlišená luminiscence



- **Doba života** (luminescence lifetime):  $\tau = 1/k_F$ 
  - kvalitativní a strukturní analýza, studium polohy fluoroforu

# Výtěžek luminiscence

- obecná definice:  $\varphi = k_f / (k_f + k_i + k_x)$

$k_f$  rychlost emisního procesu (fluorescence)

$k_i$  rychlost nezářivých přechodů (teplo, relaxace...)

$k_x$  rychlost mezisystémových přechodů

- jestliže rychlost deaktivčních procesů je pomalá ve srovnání s  $k_f$  potom kvantový výtěžek je vysoký

- kvantový výtěžek:

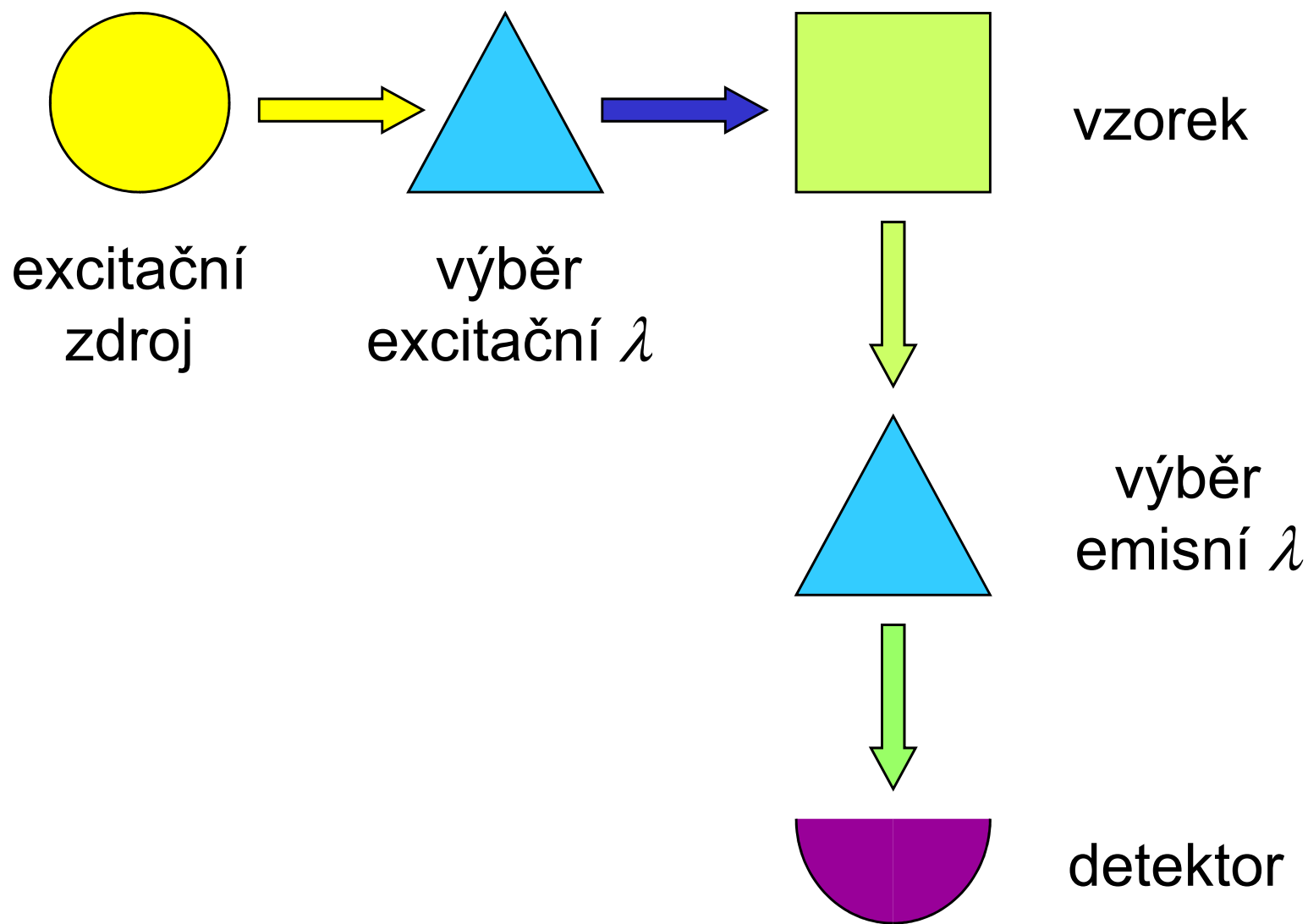
$$\varphi_k = N_{em}/N_{abs} = I_{em}/I_{abs} = I_{em}/(I_0 - I)$$

$$\varphi_e < \varphi_k$$

- energetický výtěžek:

$$\varphi_e = E_{em}/E_{abs} = h\nu_{em}/h\nu_{ex}$$

# Schéma měření fluorescence



# Struktura organických molekul a luminescence – základní pravidla

1. luminescenci většinou nepozorujeme u uhlovodíků bez dvojných vazeb ( $\sigma \rightarrow \sigma^*$  přechod)
2. luminescence je vzácná také u nearomatických uhlovodíků s dvojnými vazbami, někdy pozorujeme slabou fluorescenci molekul obsahujících karbonylovou skupinu v UV oblasti (přechod  $n \rightarrow \pi^*$ ), nebo u vysoce konjugovaných (ale nearomatických) molekul (vitamín A)
3. většina aromatických uhlovodíků jeví dobrou luminescenci ( $\pi \rightarrow \pi^*$  přechod)

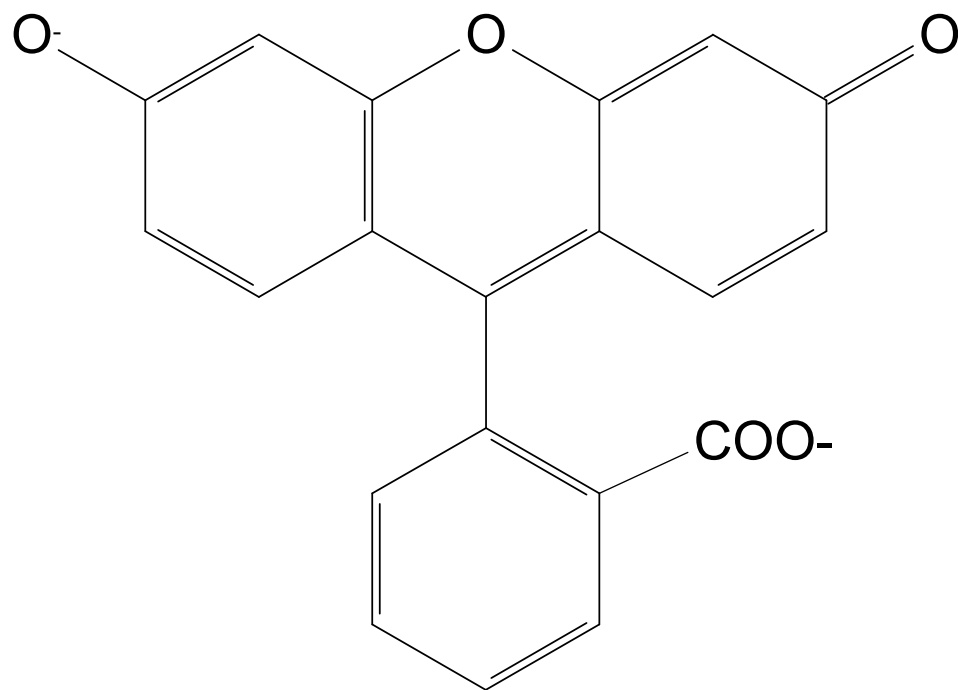
# Základní pravidla

4. Aromatické systémy s přechody  $n \rightarrow \pi^*$  zvyšují intenzitu fluorescence (molekuly obsahují atomy s nevázebnými elektrony – N, O, S). U jednoduchých molekul obsahujících karbonylovou skupinu (např. benzofenony), nebo heteroatomy (pyrimidin, pyrazin) je často pozorována i fosforescence.
5. Skupiny připojené na aromatické jádro často silně ovlivňují fluorescenční vlastnosti molekuly. Tyto skupiny mohou měnit polohu nejnižší vibrační hladiny excitovaného stavu (týká se to jak  $n \rightarrow \pi^*$ , tak i  $\pi \rightarrow \pi^*$  přechodů) – viz. tabulka.

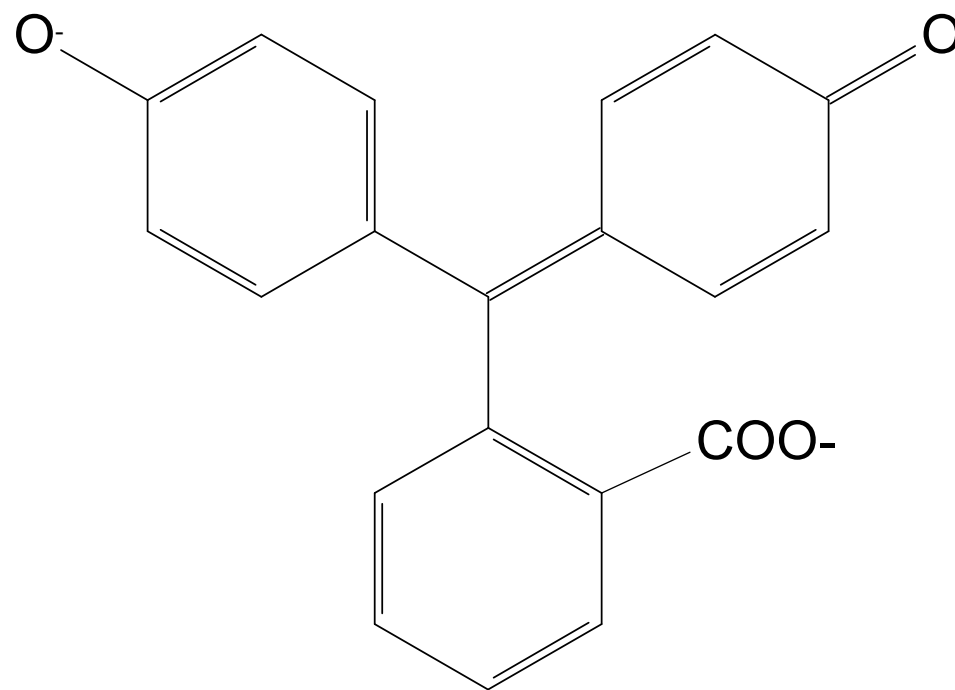
<b>skupina</b>	<b>vliv na <math>\Phi_F</math></b>	<b>vliv na <math>\Phi_P</math></b>
alkyl	nepatrný	zvýšení
hydroxo, methoxo	zvýšení	zvýšení
Karboxylová, keto	velké snížení	velké zvýšení
Nitro, nitroso	snížení	zvýšení
amino	zvýšení	zvýšení
sulfhyrylová	snížení	-
sulfonová	nepatrný	-
kyano	zvýšení	-
X	snížení	zvýšení



6. molekuly s planární a rigidní strukturou mají vyšší kvantový výtěžek, než molekuly s velkým stupněm volnosti (konjugace takových systémů je vyšší, interakce se solventem je nižší (fluorescein x fenolftalein, různá fluorescence isomerů též molekuly)).



Fluorescein (výborné fluorescenční vlastnosti)

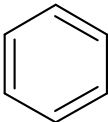
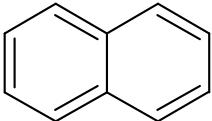
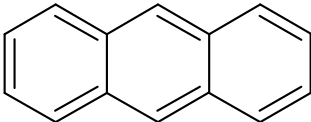
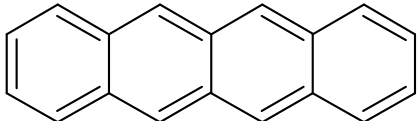


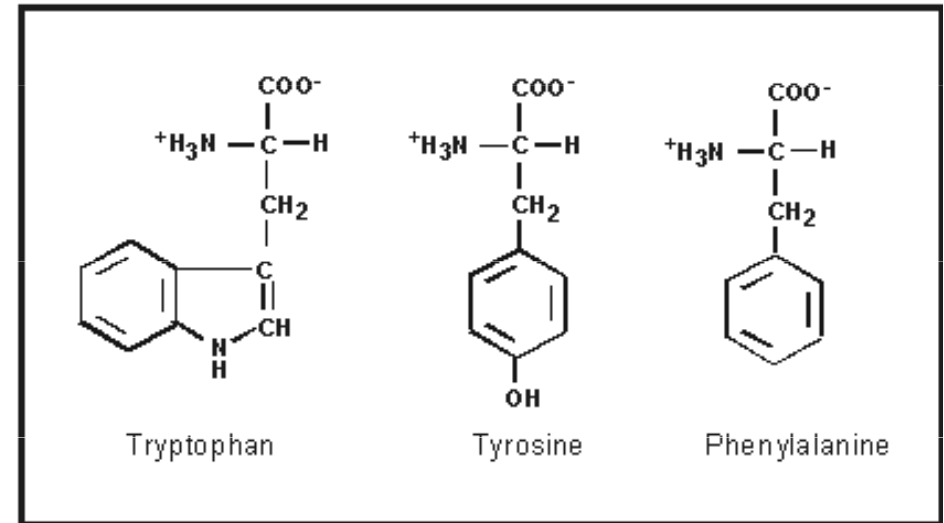
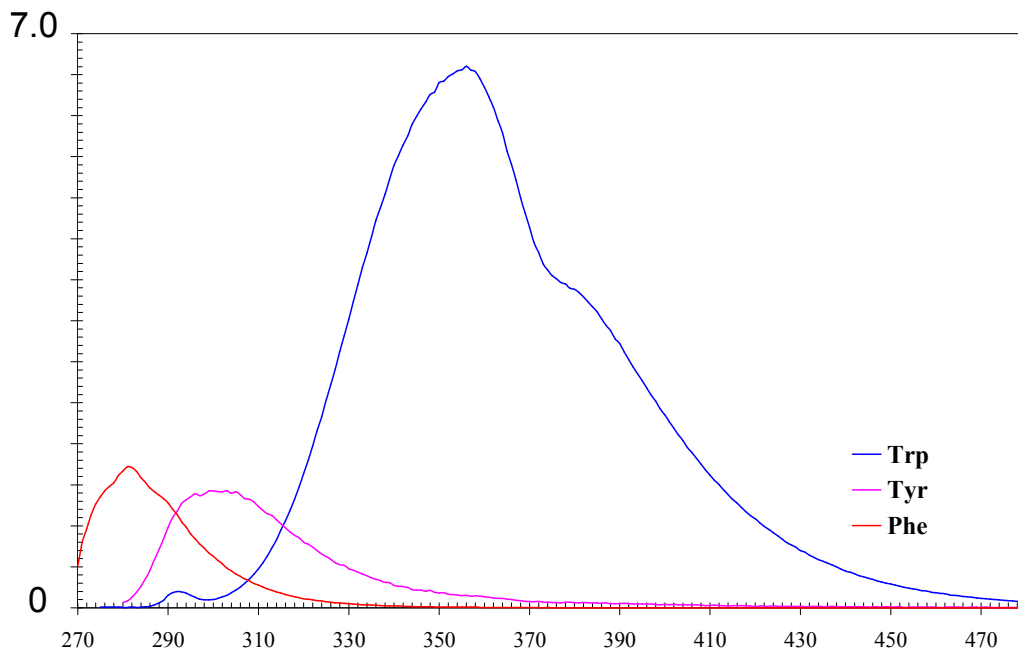
Fenolftalein (barevný, ale nefluoreskující indikátor)

6. jestliže je na aromatickém jádře halový prvek můžeme pozorovat tzv. efekt těžkého atomu: přítomnost těžkého prvku zvyšuje pravděpodobnost přechodu na  $S_0 \rightarrow T_1$ , což má vliv na zvýšení  $\Phi_p$ .
  
7. jestliže jsou aromatická jádra těžké molekuly oddělena alkylovou skupinou je systém slabě, nebo vůbec konjugován (menší kvantový výtěžek, nižší vlnová délka emise).

# Luminiscence a struktura

přechod  $\pi \rightarrow \pi^*$  čím více je v molekule konjugovaných vazeb, tím vyšší má emitované záření vlnovou délku

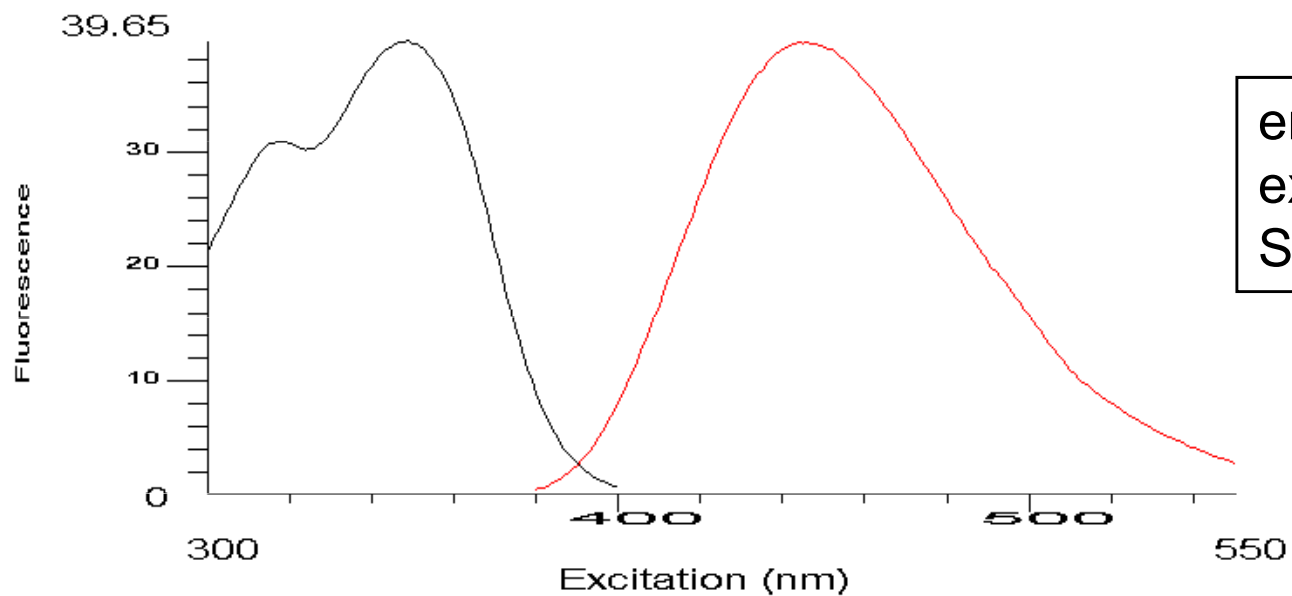
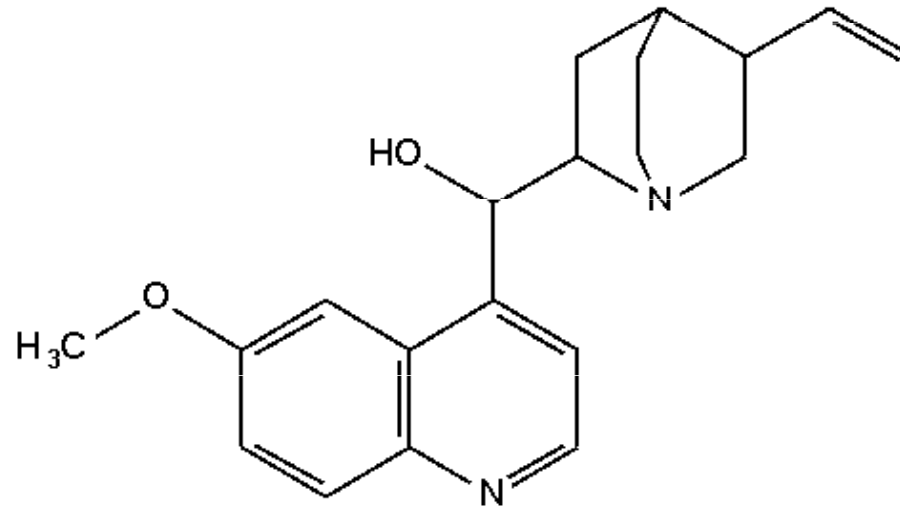
Vzorec	Název	$\lambda_{\text{ex}}$	$\lambda_{\text{em}}$	$\Phi_{\text{F}}$	$\Phi_{\text{P}}$
	Benzén	205	278	0.11	0.26
	Nafatlén	286	321	0.29	0.1
	Antracén	365	400	0.46	<0.01
	Naftacén	390	480	0.60	-



Aminokyselina	Absorpce		Fluorescence	
	Vln.délka (nm)	Abs. koeficient	Vln.délka (nm)	Kvantový výtěžek
Tryptofán (Trp)	280	5,600	348	0.20
Tyrosin (Tyr)	274	1,400	303	0.14
Fenylalanin (Phe)	257	200	282	0.04

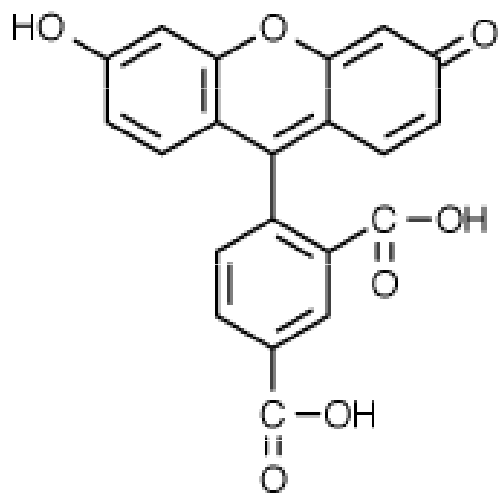
1. P. Pekárková, Bakalářská práce, 2005  
 2. www.biotek.com

# Chinin

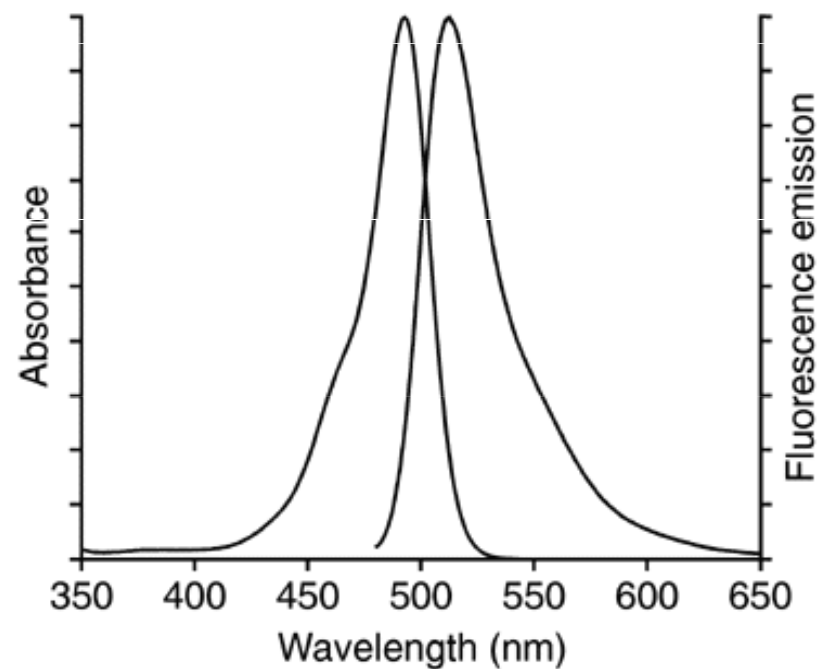


emisní maximum: **446 nm**  
excitační maximum: **349 nm**  
Stokesův posun: **97 nm**

# Deriváty fluoresceinu



excitační maximum: 494 nm  
emisní maximum: 520 nm



# Vnitřní a vnější luminiscence

- vnitřní/**intrinsic** (nativní luminiscence) – molekuly lze stanovit bez výrazného zásahu do sledovaného systému, zpravidla aromatické látké
- vnější/**extrinsic** luminiscence – do sledovaného systému přidáme fluoreskující činidlo(barvivo), jehož fluorescence bude závislá na koncentraci analytu, případně se na něj naváže

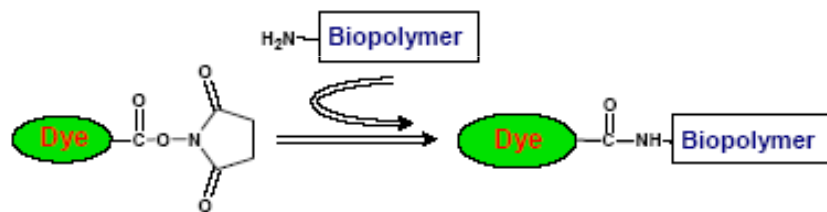
# Fluorescenční značky a sondy

- **fluorescenční značky** (fluorescent labels) jsou vnější (extrinsic fluorescence) fluorofory, které se ke sledovaným biomolekulám (proteinům, peptidům, ligandům, oligonukleotidům a jiným) vážou kovalentní vazbou
- **fluorescenční sondy** (fluorescent probes) jsou vnější fluorofory, které se ke sledované struktuře vážou nekovalentně a často přitom mění své fluorescenční vlastnosti.



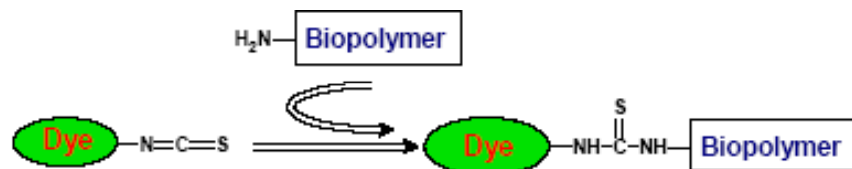
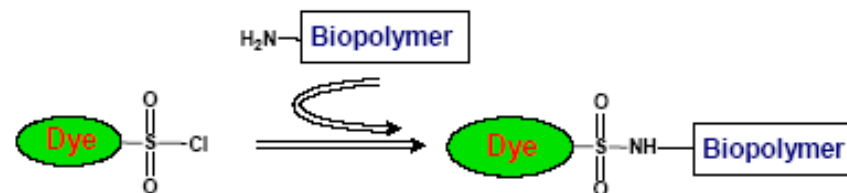
# Fluorescenční značky – vazebná místa

## amino-reaktivní značky



sukcinimidyl estery (Rh6GSE)

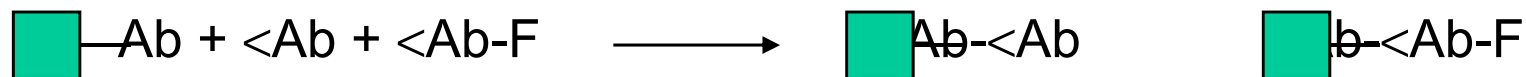
sulfonyl chloridy



isothiokyanáty (FITC, RBITC)

# Fluorescenční imunoanalýza (FIA)

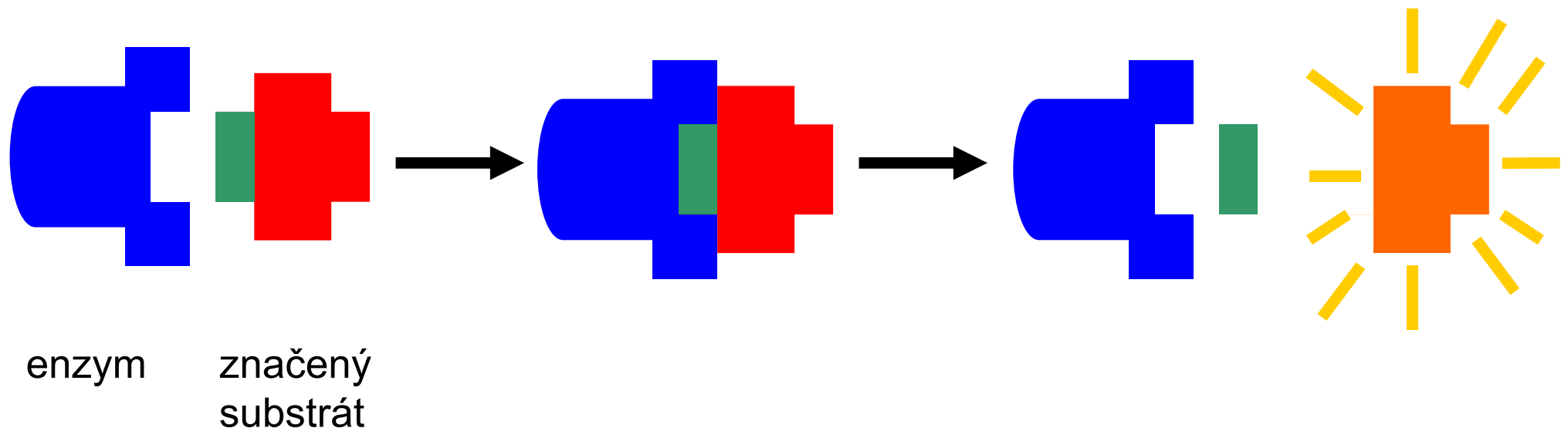
- poprvé použity v roce 1964
- často ovlivněna fluorescencí matrice a samotného vzorku
- může být použita i **TR-FIA** (Time Resolved Fluorescence Immuno Assay). Tato metoda využívá jako značek chelátů s lanthanitých kationtů ( $\text{Eu}^{3+}$ ,  $\text{Tb}^{3+}$ ,  $\text{Sm}^{3+}$  a dalších)
- FIA lze provádět v homogenním i heterogenním prostředí, v kompetitivním i nekompetitivním uspořádání



ukázka kompetitivní FIA v heterogenním prostředí

# Fluorogenní substráty – stanovení enzymatické aktivity

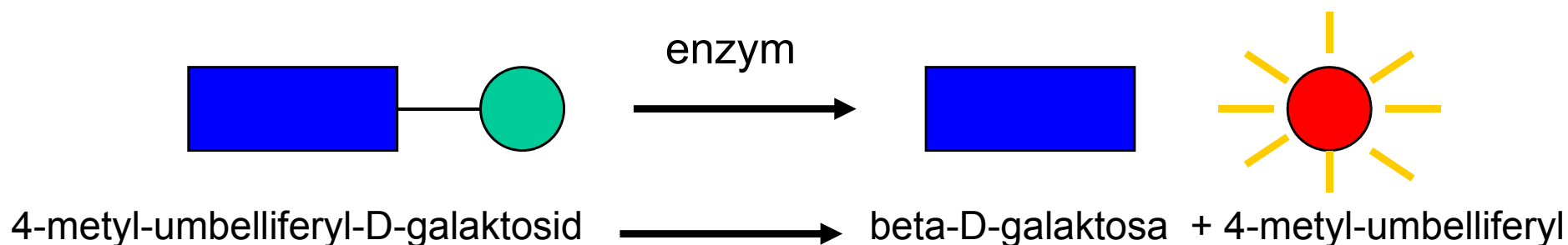
Princip: volný fluorofor má jiné luminiscenční vlastnosti, než když je navázaný na biomolekulu. Fluorofor je na biomolekulu navázán vazbou, kterou štěpí stanovovaný enzym.



# Fluorimetrická EIA

- Enzymoimunoanalýza v homogenním (EIA) a heterogenním prostředí (ELISA)  
Existuje několik možností.

- antigen je značen enzymem
- antigen značený enzymem se sráží s protilátkou
- nesražený antigen s enzymem lze stanovit takto:

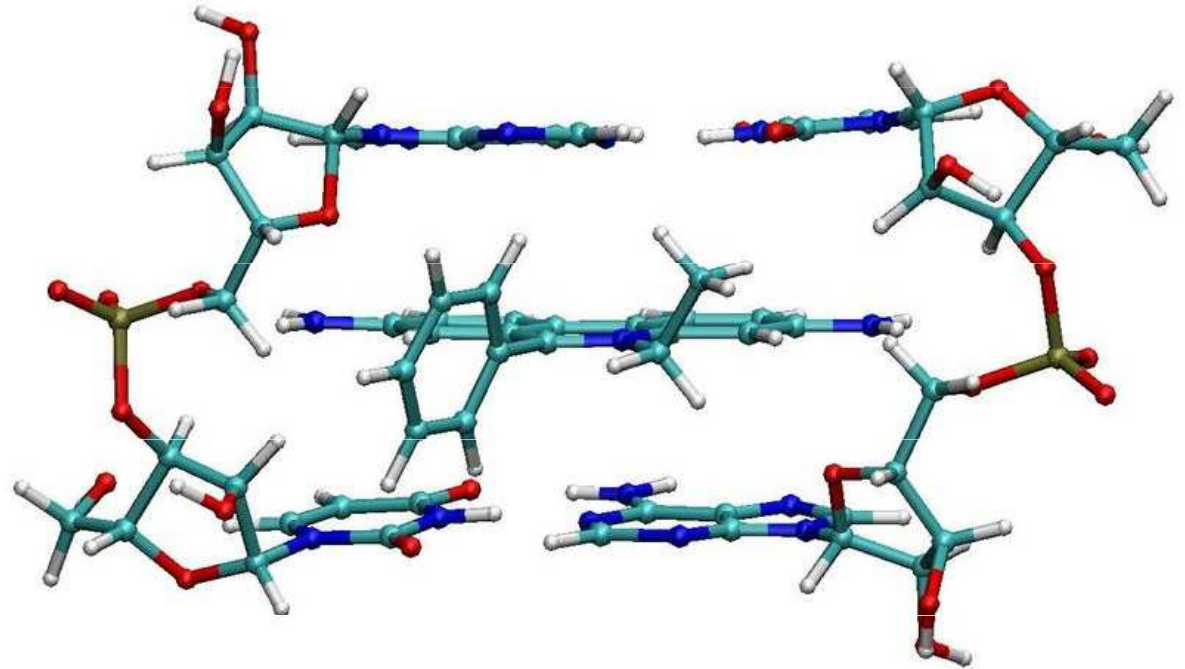
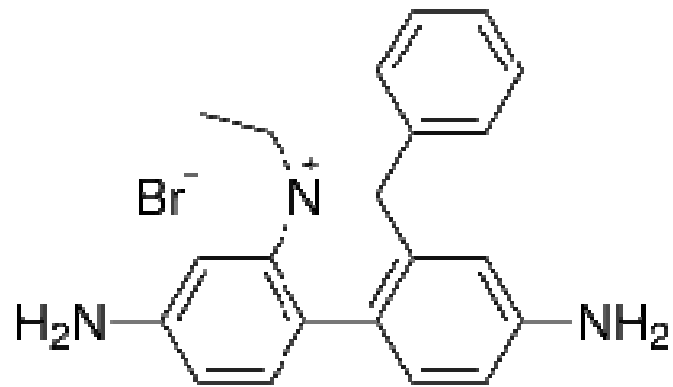


# Fluorescenční sondy

- vnější fluorofory, které se ke sledovaným molekulám, iontům, atd. váží nekovalentní vazbou
- změna fluorescenční vlastností (intenzita emise, posun emisního maxima, změna času vyhasínání)
- Princip: různý vliv na Franck-Condonův excitovaný stav

# Fluorescenční sondy pro NK

- Vizualizace a identifikace RNA a DNA (nukleové báze mají jen slabou luminiscenci)
- Různé principy interakce, např. „vmezeření“ (interkalace) barviva do šroubovice DNA (ethidium bromid)



## Ethidium bromid interkalovaný mezi pár adenin-uracil

- ethidium bromid: ve vodě fluoreskuje jen slabě, při interakci s DNA se intenzita fluorescence zvýší 30x a čas vyhasínání se zvýší z 1.7 ns na 20 ns.

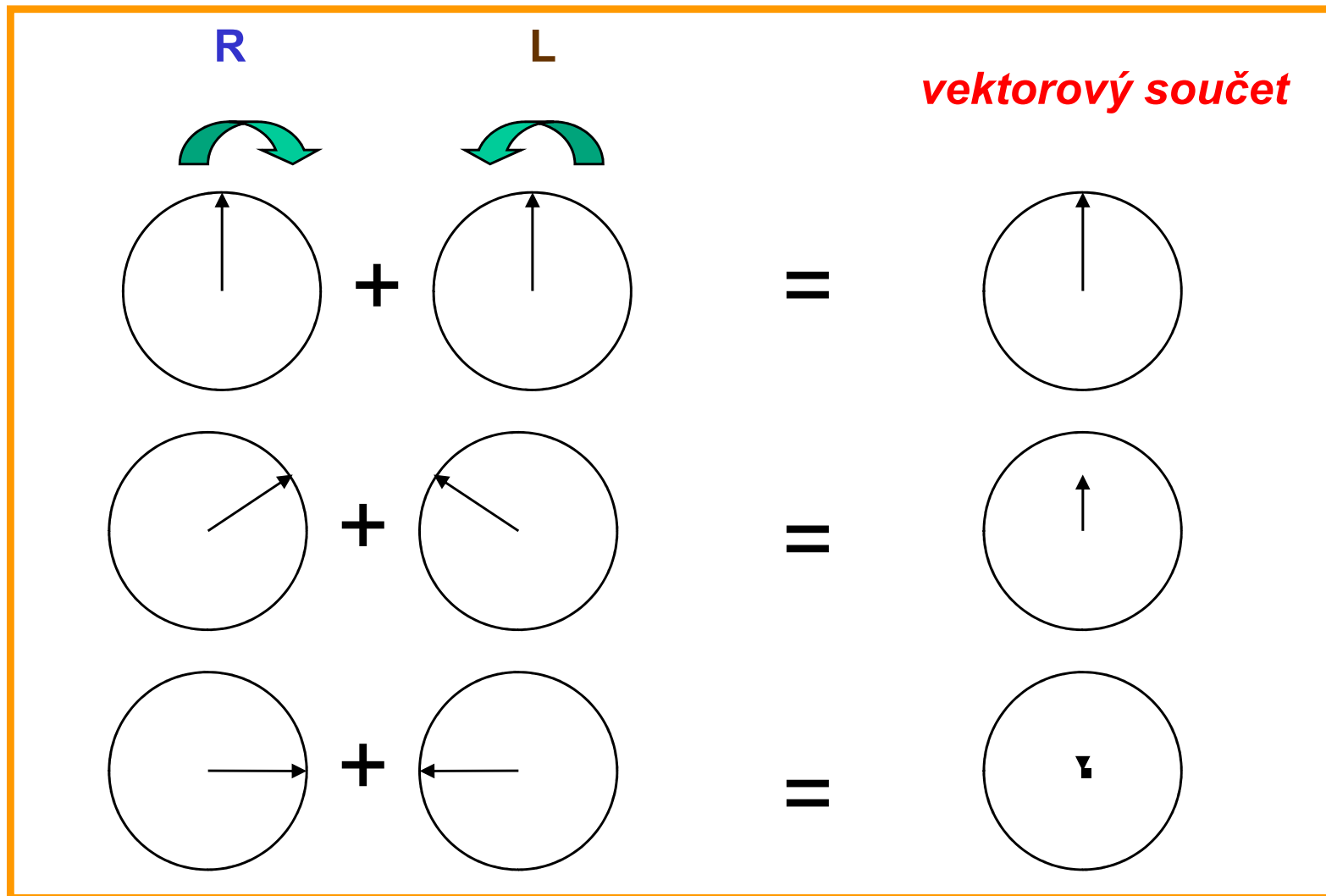
# Analýza organických látek

Chiroptické metody



# Rovinně a cirkulárně polarizované světlo

**Rovinně polarizované světlo** je složené z doprava (R) a doleva (L) **kruhově polarizovaného** světla se shodnou vlnovou délkou (resp. frekvencí) a amplitudou.

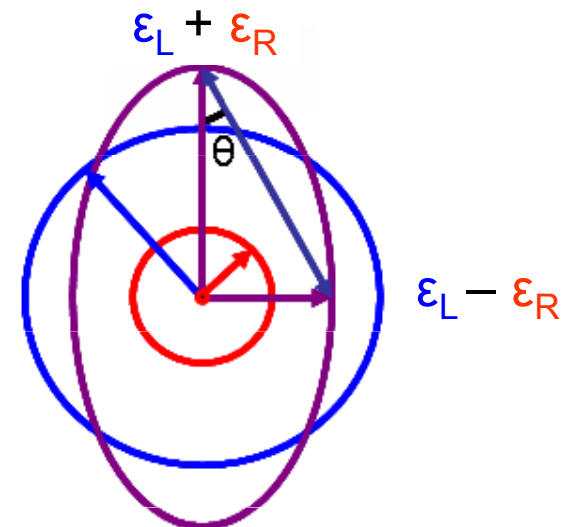


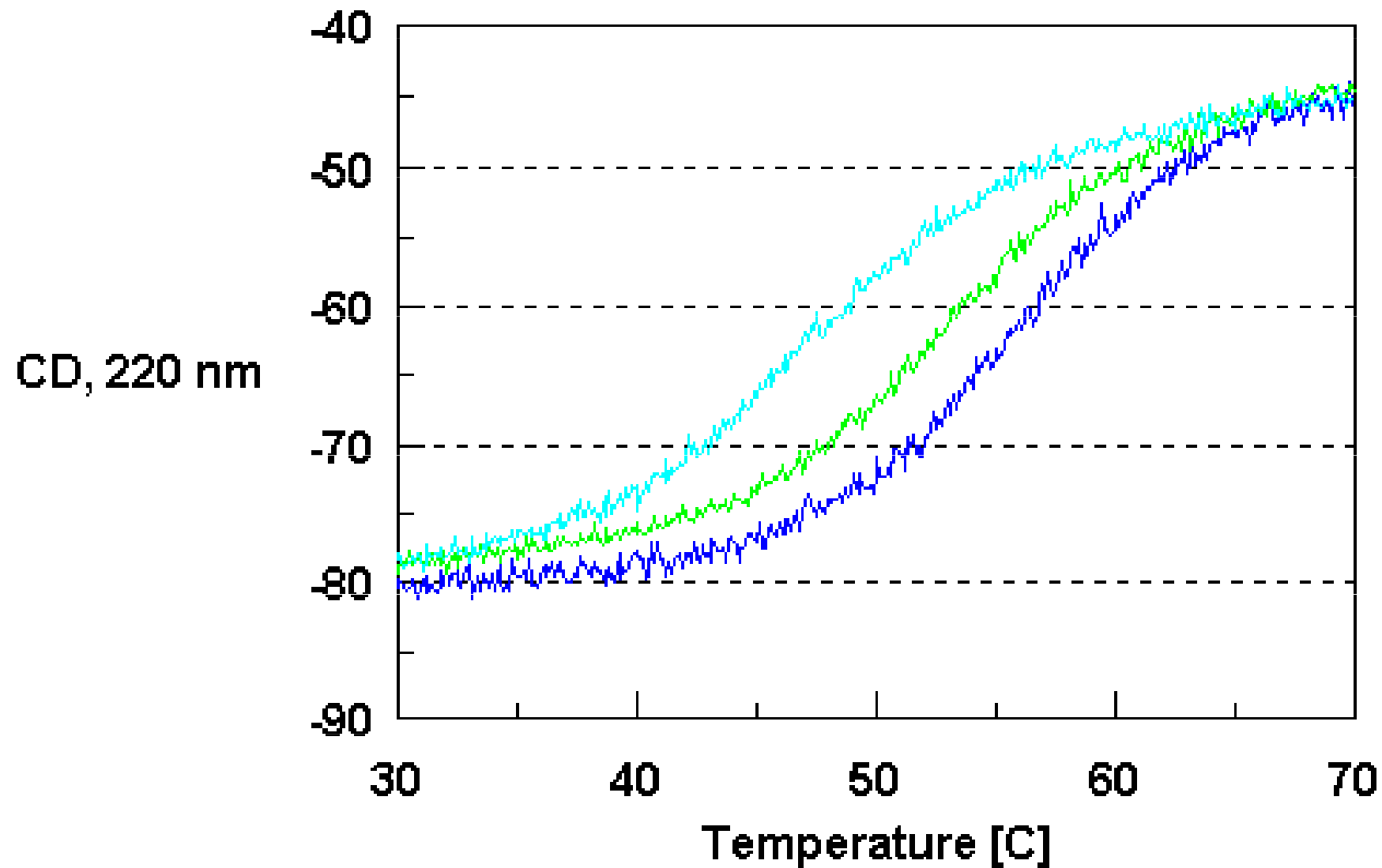
# ORD a CD

- Optická Rotační Disperze (ORD) – závislost velikosti optické aktivity (závislost úhlu stočení) na vlnové délce
- Cirkulární Dichroismus (CD) – jestliže absorpce R a L kruhově polarizované složky záření opticky aktivní látkou je různá, zároveň může být různá velikost optické aktivity

# CD

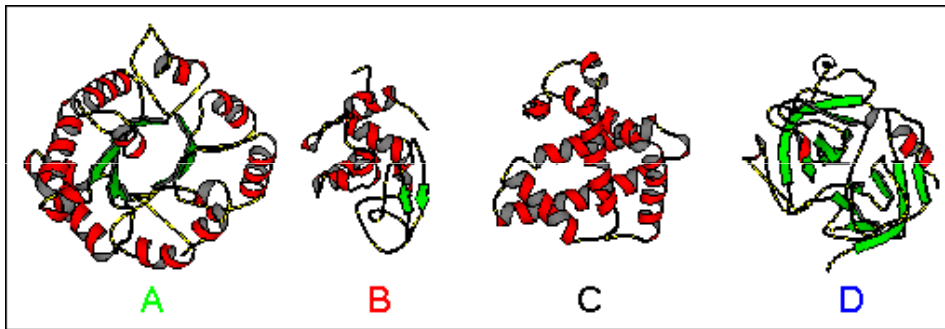
- Jednotka:  $\Delta\varepsilon = \varepsilon_L - \varepsilon_R$
- Jiná jednotka je (molární) elipticita  $[\theta]$
- Přepočet mezi elipticitou a  $\Delta\varepsilon$ :  $[\theta] = 3298,2 \Delta\varepsilon$
- Jednotka  $[\theta]$  : stupně elipticity
- Nejzajímavější oblast pro studium struktury látek: pod 200 nm (pracujeme v dusíkové atmosféře)





„Melting“ experiment: stanovení teploty, při které dochází k rozpletení polynukleotidy (DNA)

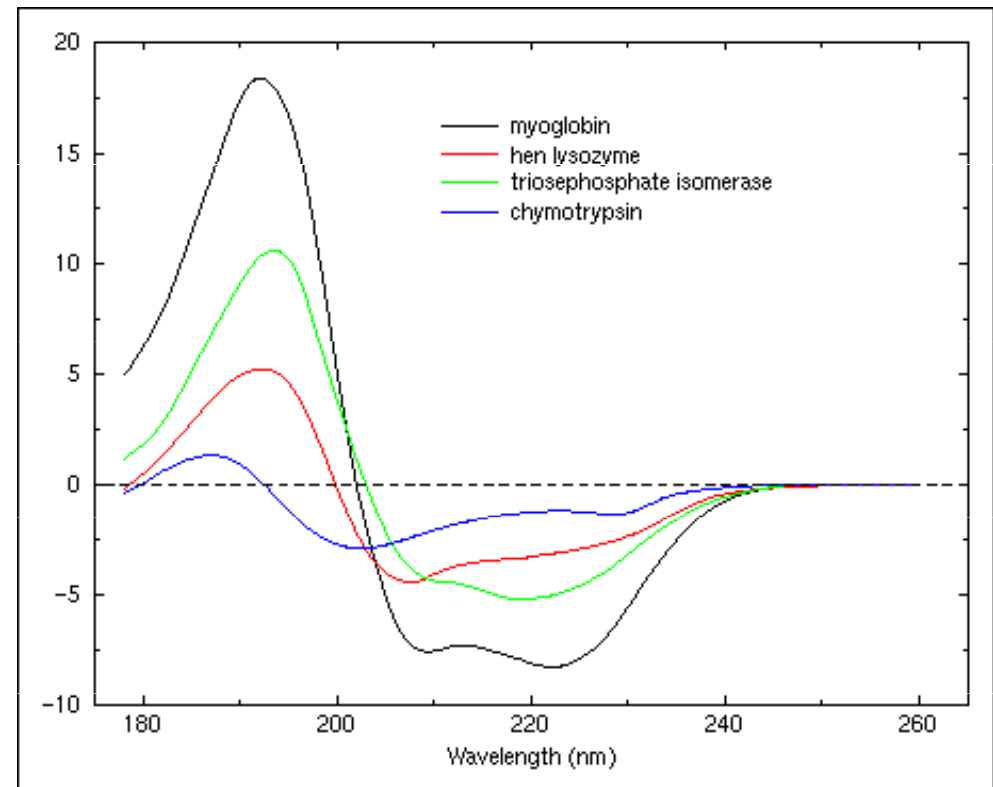
# Využití CD pro studium sekundárních struktur proteinů



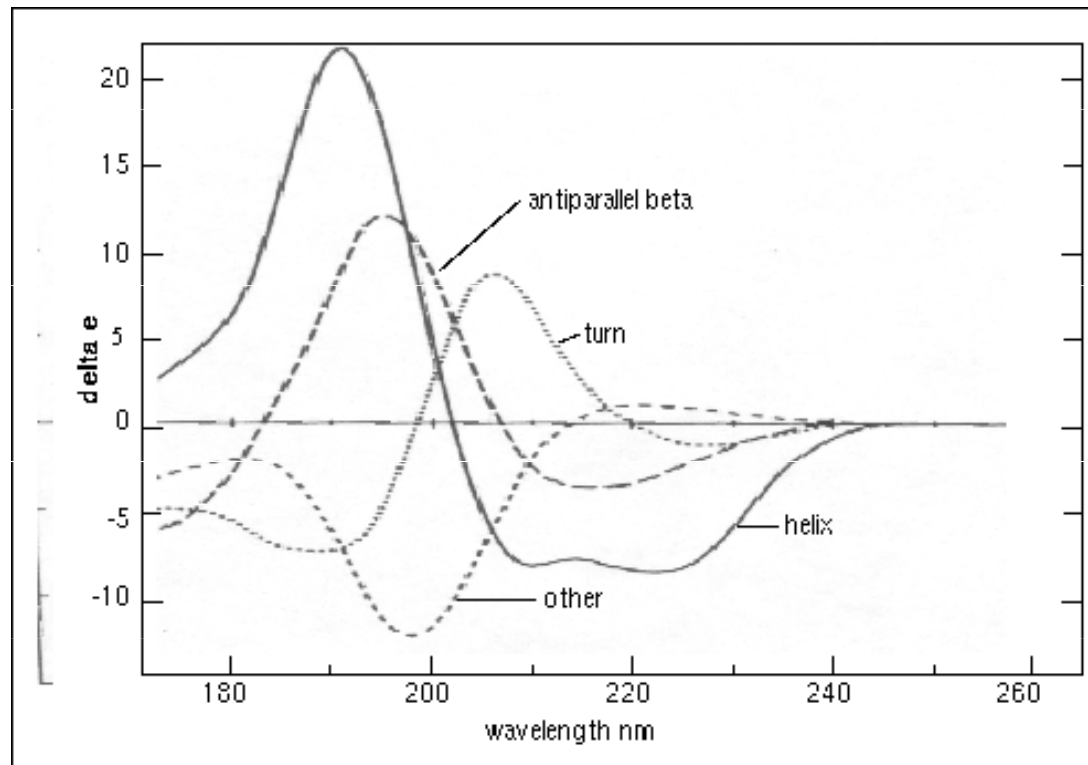
*typy proteinových struktur*

**Sekundární struktura proteinu** (hlavně vzdálená UV oblast): zpravidla kombinace různých základních sekundárních struktur - alfa helix, paralelní, antiparalelní, „beta sheet“ (skládaná struktura), „turn“ a dalších...

Terciární struktura proteinu: měříme hlavně v blízké UV



# Studium sekundární struktury proteinů – „čistá“ spektra



*CD spektra „čistých“ (pure) sekundárních struktur proteinů (Brahms & Brahms, 1980)*

# Výhody x nevýhody

- není v určování sekundární struktury tak specifická jako NMR, nebo RTG strukturní analýza (proteinová krystalografie)
- + možnost použití při různých podmínkách (roztoky, teplota, pH)
- + komplementarita k metodám, kdy je možné měřit jen vzorky v pevné fázi