

Metody chemického výzkumu

Jan Preisler

Fluorescenční spektroskopie
Fluorescence a další luminiscenční spektroskopie
Doba života, kvantový výtěžek
Intenzita fluorescence, zhášení a samozhášení
Spektra excitační a emisní
Spektrometr a postup měření

Aplikace

Spojení se separačními technikami: CE LIF

1

Molekulová luminiscenční spektroskopie

- Luminiscence je jev, při kterém molekula absorbuje energii (např. ve formě fotonu) a následně ji vyzáří ve formě světla
- Molekulová luminiscenční spektroskopie je významná analytická metoda (nízké detekční meze, selektivita)
- Fluorofor ... skupina v molekule zodpovědná za luminiscenci se nazývá luminofor (fluorescence - fluorofor)

3

Luminiscence

Pro zájemce podrobněji:

C7955 Molekulová luminiscence
Petr Táborský, Jan Preisler

2

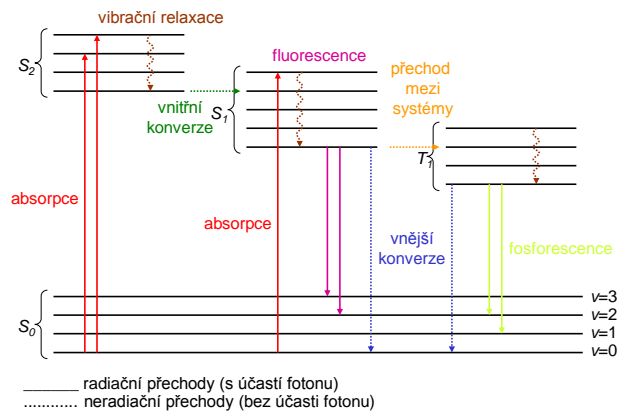
Klasifikace luminiscence

... podle zdroje excitační energie:

- **fotoluminiscence**
- chemiluminiscence
- bioluminiscence
- elektroluminiscence

4

Jablonského diagram



5

Radiační (zářivá) deexcitace

Fluorescence

- Po absorpci záření přechází elektron na jednu z vibračních hladin stavu excitovaného stavu ($S_0 \rightarrow S_n$)
- Vibrační relaxace a vnitřní konverze (přechody v rámci hladin S až na S_1)
- Zářivý přechod na jednu z vibračních hladin základního stavu ($S_1 \rightarrow S_0$)

Fosforescence

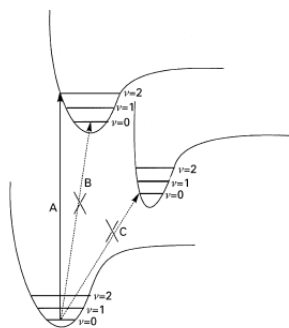
- Elektron přechází z nejnižší vibrační hladiny excitovaného stavu na tripletovou hladinu ($S_1 \rightarrow T_1$)
- Vibračními relaxacemi přechází na nejnižší hladinu T_1
- Zářivý přechod na jednu z vibračních hladin základního stavu (S_0).

Zakázaný přechod ... musí dojít ke změně spinu, aby byl dodržen Pauliho princip \Rightarrow nízká pravděpodobnost přechodu a delší čas vyhasínání.

7

Franck-Condonův princip

- Zářivé přechody: přechod elektronu je podstatně rychlejší než pohyb jader
- V okamžiku vybuzení má molekula v excitovaném stavu stejnou pozici a moment atomových jader jako ve stavu základním
- Excitovaná molekula má vyšší energii, než základní uspořádání, do kterého molekula přechází dodatečně
- K luminiscenci dochází ze základního uspořádání



6

Neradiační (nezářivá) deexcitace

Vibrační relaxace

Po excitaci na jednu z vibračních hladin (v_n) excitovaného stavu (S_n) dochází postupně k přechodu na nižší vibrační hladiny téhož excitovaného stavu. Energie se rozptýlí v okolí (solvent).

Vnitřní konverze

Nezářivý přechod mezi stavy o stejné multiplicitě; typicky $S_n \rightarrow S_{n-1}$; pravděpodobnost vzrůstá při překryvu daných vibračních hladin obou stavů.

Mezisystémový přechod

Elektron může přejít do jedné z vibračních hladin tripletového stavu o podobné energii ($S \rightarrow T_1$). Přímý přechod ($S_0 \rightarrow T_1$) absorpcí fotonu je nepravděpodobný (nutná změna spinu).

8

Neradiační (nezářivá) deexcitace

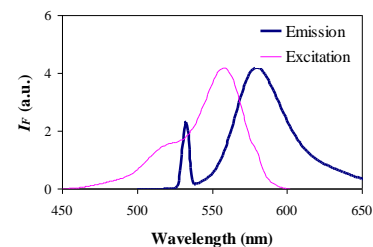
Vnější konverze

Přenos energie do okolní – solvent, rozpuštěné látky, krystalová mřížka. Souvisí se zhášením fluorescence.

9

Emisní a excitační spektra

- **Emisní spektrum**
závislost intenzity luminiscence na vlnové délce; $\lambda_{em} = \text{konst.}$
- **Excitační spektrum** (aktivační, absorpční)
závislost absorpce luminoforu (fluoroforu) na vlnové délce, $\lambda_{em} = \text{konst.}$



(rhodamin B)
11

Časové relace

- Absorpce** $\sim 10^{-15}$ s (-perioda fotonu)
- Vibrační relaxace** $10^{-11} - 10^{-10}$ s
postupný přechod ($\Delta v = 1$), perioda vibračního pohybu $\sim 10^{-13}$ s
- Vnitřní konverze** $\sim 10^{-12}$ s
pravděpodobnost vzrůstá při překryvu vibračních hladin singletů
- Fluorescence** $10^{-10} - 10^{-6}$ s
obvykle z nulového vibračního pásu excitovaného singletu
- Vnější konverze**
energie předána okolí (solvent aj.)
- Fosforescence** $10^{-4} - 10^4$ s
zakázaný přechod (změna stavu spinu)

10

Emisní a excitační spektra

Stokesův posun

Rozdíl mezi vlnovými délkami emisního a excitačního maxima (nm).

Antistokesův posun

Ve vzácných případech může být emisní maximum při kratší vlnové délce než excitační maximum

Nejvyšší výtěžek fluorescence: excitace při $\lambda_{ex \max}$

Fluorescenční záření bývá posunuto k delším vlnovým délkám v důsledku ztráty části energie konverzemi

U fosforescenčních spekter je posun k delším vlnovým délkám ještě výraznější; přechod $T_1 \rightarrow S_0$ je spojen s menším rozdílem energie než přechod z $S_1 \rightarrow S_0$

12

Emisní a excitační spektra

Zrcadlové pravidlo

emisní a excitační spektra organických látek mají podobný tvar, ale jsou zpravidla zrcadlově obrácené

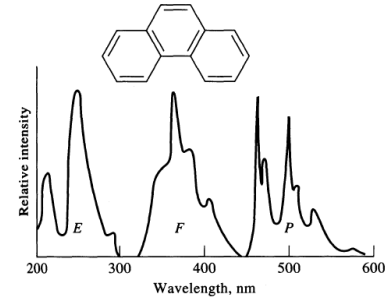
Vavilovův postulát

Tvar emisního spektra není ovlivněn vlnovou délkou excitace a lze excitovat zářením s kteroukoli vlnovou délkou z excitačního spektra.

Aditivita spekter

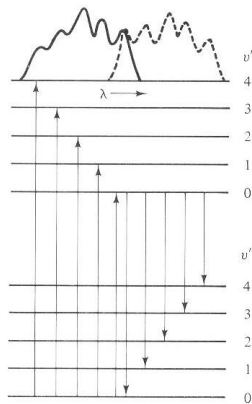
13

Fluorescence a fosforescence



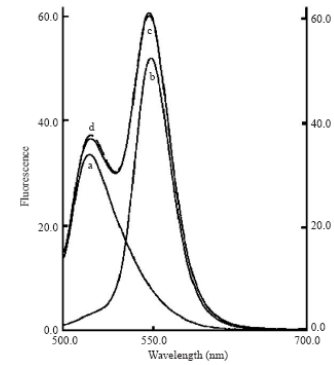
15

Zrcadlové pravidlo



14

Aditivita spekter



16

Základní vztahy

$$A = c \times \epsilon = \log(I_0/I) \quad (\text{Lambert-Beerův zákon})$$

A – absorbance, c – koncentrace, ϵ – absorpční koeficient, x – tloušťka kyvety, I_0 – světelný tok dopadající na vzorek, I – světelný tok prošlý vzorkem

$$I_F = k \phi I_0 (1 - 10^{-c \times \epsilon})$$

I_F – fluorescence (fotony/s), k – podíl emitovaných fotonů, které dorazí na detektor, ϕ – výtěžek fluorescence

$$I_F \sim k \phi I_0 2.3 c \times \epsilon$$

zjednodušený vztah pro nízké koncentrace

17

Stanovení kvantového výtěžku

- fluorescenční standard musí mít absorpční a fluorescenční maximum blízké látce, jejíž kvantový výtěžek stanovujeme

- fluorescenční standardy:
 - roztoky
 - chinin bisulfát (250nm/450nm)
 - naftalén (290nm/330nm)
 - ovalén (342nm/482nm)
 - fluorescein (488nm/503nm)
 - rhodamin B (562nm/573nm)
 - hranoly

$$\Phi_x = \Phi_{st} \frac{I_x A_{st}}{I_{st} A_x}$$

19

Výtěžek luminiscence

Kvantový výtěžek $\Phi = \frac{\Sigma k_{rad}}{\Sigma k_{rad} + \Sigma k_{nrad}}$

$$\phi_k = N_{em}/N_{abs} = I_{em}/I_{abs} = I_{em}/(I_0 - I) \quad \phi_k \leq 1$$

Energetický výtěžek

$$\phi_e = E_{em}/E_{abs} = h\nu_{em}/h\nu_{ex} \quad \phi_e < \phi_k \text{ (Stokesův posun)}$$

N počet fotonů za sekundu

I světelný tok (emitovaný, absorbovaný)

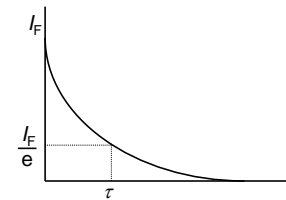
E energie

ν frekvence fotonu

k rychlostní konstanty

18

Vyhasínání luminiscence



Úbytek fluorescence: $-dI_F/dt = k_F I_F$

Exponenciální průběh vyhasínání fluorescence: $I_F = I_{F0} e^{-t/\tau}$

Doba života (luminescence lifetime): $\tau = 1/k_F$

... doba potřebná k poklesu fluorescence na hodnotu $I_{F(t=0)}/e$

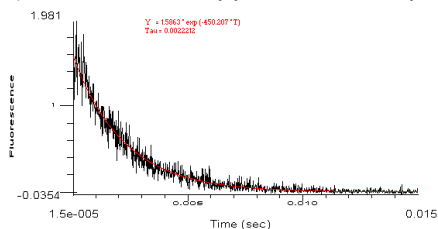
Časově rozlišená (time-resolved) luminiscence

20

Časově rozlišená luminiscence

Vyhodnocení

- poločas vyhasínání luminiscence (luminescence life-time), $\tau_{1/2}$ nebo τ - pokles na $1/2$ nebo $1/e$ počáteční intenzity, nejlépe z log závislosti
- time-gated fluorescence (integrace signálu v definovaném intervalu) – rozlišení mezi analyty s různou dobou vyhasínání



21

Luminiscence organických molekul – obecná pravidla

- podmínkou fotoluminiscence je absorpce
- intenzita luminiscence a posun emise k vyšším vlnovým délkám roste s počtem konjugovaných aromatických kruhů (hyperchromní a bathochromní posun)
- heteroatomy v aromatickém kruhu - vyšší intenzita luminiscence a posun emise k vyšším vlnovým délkám
- heteroatomy mimo aromatický kruhu - vyšší intenzita luminiscence a posun emise k vyšším vlnovým délkám (ale méně, než u heteroatomů v arom. kruhu)
- stabilizace molekuly do planární konfigurace přispívá k zvýšení intenzity luminiscence

23

Struktura látek a luminiscence: typy luminiscenčních přechodů

organické luminofory – typické luminiscenční přechody jsou hlavně:



anorganické luminofory

- a) přechody mezi energetickými hladinami ligandu
- b) přechody mezi energetickými hladinami kovu (d-d, f-f)
- c) kov i ligand („charge transfer“ přechody)

22

Luminiscence organických molekul – obecná pravidla

1. Nasycené uhlovodíky (bez π či n e⁻) obvykle nefluoreskují
2. Nearomatické uhlovodíky s několika dvojnými vazbami fluoreskují zřídka. Sloučeniny s vysoce konjugovanými dvojnými vazbami, např. karoteny, vykazují fluorescenci
3. Aromatické uhlovodíky fluoreskují (π - π^*). Pravděpodobnost fosforescence vzrůstá s výskytem n e⁻ příp. substituentů.
4. Fosforescence podpořena v aromatických molekulách přítomností karbonylové skupiny nebo heteroatomů (n - π^*). Výsledná zvýšená pravděpodobnost přechodu mezi systémy obvykle snižuje intenzitu fluorescence.
5. Substituenty na aromatickém kruhu ovlivňují hladinu nejnižšího excitovaného stavu a mohou dramaticky zvýšit kvantové výtěžky a emisní vlnové délky (červený, bathochromní posun). Donory e⁻, např. -OH, zvyšují fluo. výtěžek, akceptory jej snižují.

24





Luminiscence organických molekul – obecná pravidla

6. Vliv vnitřního těžkého atomu – vliv halidových substituentů: podpora přechodů mezi systémy, $S \leftrightarrow T$.
7. S rostoucí velikostí a konjugovaností aromatického systému roste kvantový výtěžek fluorescence, klesá výtěžek fosforescence.
8. Luminiscence je typická pro molekuly s planární strukturou, které jsou charakteristické vysokou konjugací e^- a slabými interakcemi s rozpouštědly.
9. Fluorescence z atomů kovů se obvykle vyskytuje v rigidních organometalických komplexech, samotný ligand nemusí fluoreskovat. Kromě přechodů v ligandech se na vzniku fluorescence mohou podílet $d e^-$ a $f e^-$ (prvky vzácných zemin).

25

Fotoluminiscence aromatických látek

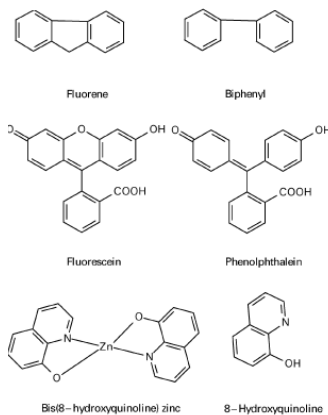
Fluorescence of linear aromatics in EPA at 77K*

Compound	Φ_f	λ_{ex} (nm)	λ_{em} (nm)	ϕ_f	τ_f (s)
Benzene 	0.11	205	278	0.26	7
Naphthalene 	0.29	286	321	0.1	2.6
Anthracene 	0.46	365	400	<0.01	0.04
Naphthacene 	0.60	390	480	—	—

*EPA is a mixture of ethanol, isopropanol, and ether.

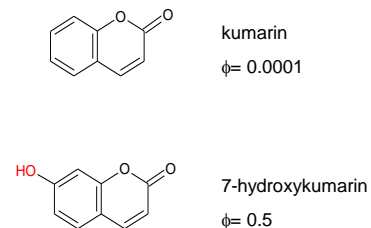
27

Struktura a luminiscence



26

Substituce aromátů skupinami zvyšujícími konjugaci



vliv substituentů: $CR_3 < CH_3 < SR < SH < NH_2 < OR < OH$

28

Vliv některých substituentů

Effect of substituents on luminescence of aromatic compounds^a

Substituent	ϕ_F	ϕ_P
Alkyl	Slight	Increase
Hydroxyl, methoxyl	Increase	Increase
Carboxyl, keto	Large decrease	Large increase
Nitro, nitroso	Decrease	Increase
Primary, secondary, or tertiary amine	Increase	Increase
Sulfhydryl	Decrease	—
Sulfonic acid	Slight	—
Halogen	Decrease	Increase
Cyanide	Increase	—

^aEffect on ϕ_F and ϕ_P relative to the parent compound.

29

Luminiscence – vliv prostředí

Teplota

obvykle snižuje luminiscenci v důsledku vyššího dynamického zhášení

Solvent

viskozita – vyšší viskozita = méně kolizí, zvýšení fluorescence
polarita a schopnost tvorby H můstků ovlivňují povahu exc. stavu
 např. pro $\pi-\pi^*$ je excitovaný stav obvykle polárnější a zvýšení polarity solventu snižuje energii exc. stavu více než energii stavu základního, což vede k červenému posunu fluorescence. U přechodu $n-\pi^*$ je tomu naopak.

pH

fluorescence protonované a neprotonované formy se mohou výrazně lišit
 mezi pK_a excitovaném a základním stavu může být řádový rozdíl

Vliv externího těžkého atomu

zvýšení fosforescence podpořením přechodů mezi systémy

31

Vliv vnitřního těžkého atomu

Internal heavy-atom effect illustrated for 1-substituted naphthalenes^a

Compound	ϕ_F	λ_F (nm)	ϕ_P	λ_P (nm)	τ_F (s)	k_{int} (s ⁻¹)
Naphthalene	0.55	325	0.051	469.5	2.6	1×10^7
1-Fluoronaphthalene	0.84	316	0.056	473	1.5	2×10^7
1-Chloronaphthalene	0.058	319	0.30	483	0.29	1.5×10^8
1-Bromonaphthalene	0.0016	320	0.27	483	0.018	5×10^8
1-Iodonaphthalene	<0.0005	—	0.38	480	0.002	$<3 \times 10^8$

^aMeasurements in ethanol-ether at 77 K.

30

Zhášení luminiscence

Jevy vedoucí k redukcí intenzity luminiscence

- statické zhášení** - např. nefluorescenční komplex, energii absorbuje jiná část molekuly atd.
- dynamické (kolizní) zhášení** – srážka s molekulou zhášedla (např. solventu)
- vnitřně-filtrační efekt** (reabsorpce u molekul s malým Stokesovým posunem)
- fotovybělování** – degradace luminoforu vlivem světla, kterým excitujeme
- koncentrační zhášení** (nelinearita při vyšších koncentracích)

32

Instrumentace - fluorimetr

Fluorimetr

- měření celkové fluorescence
- kvantitativní analýza
- zdroj záření: lampa nebo laser (větší citlivost stanovení)
- místo monochromátoru(ů) může být filtr

Spektrofluorimetr

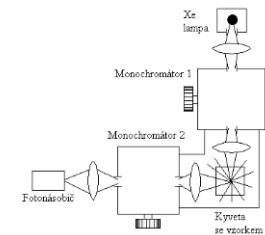
- měření fluorescenčních (emisních a excitačních) spekter
- zdroj záření: zpravidla lampa (možnost volby vlnové délky exc. záření)
- možné další režimy (synchronní sken, časově závislá fluo aj.)

33

Instrumentace

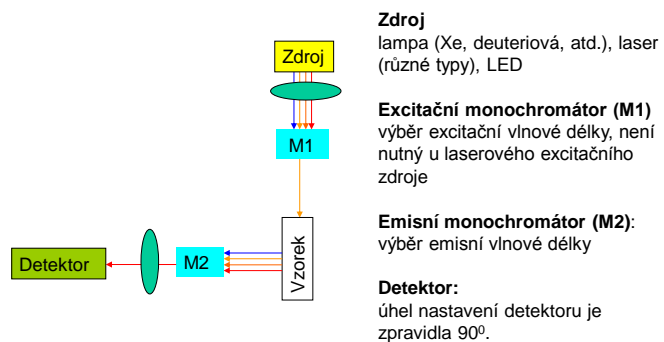


AMINCO- Bowman, Series 2 (AB-2)



35

Měření fotoluminiscence



34

Zdroje excitačního záření

- Lampa
- Laser
- LED

36

Lampa

Typ

xenonová (200-1500nm, UV-Vis)

deuteriová (185-370 nm, hlavně UV oblast)

rtuťová výbojka (253.4 nm a 302.6 nm)



Výhody

zpravidla možnost výběru z velkého rozmezí vlnových délek a nízká cena

Nevýhody

slabý výkon (při vybrané vlnové délce)

37

Laser

Jako zdroje excitačního záření lze použít pulsní i kontinuální lasery

Výhody

vysoký výkon při dané vlnové délce

koherence

prostorové vlastnosti paprsku (zaostření, kompatibilita s mikrometodami)

pulsní lasery pro studium časově závislé fluorescence

Nevýhody

rel. vysoká cena

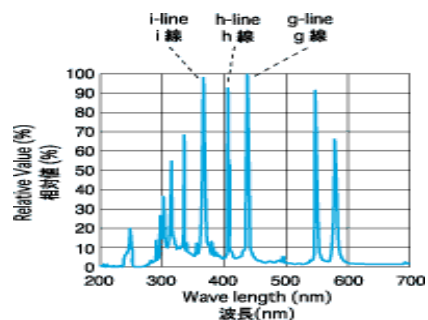
fixní excitační vlnová délka

Laditelné lasery

diskrétně a kontinuálně laditelné lasery

39

Typické spektrum lampy



38

Běžné lasery

Laser Source	Wavelength (nm)
Ar-ion (air cooled)	457, 472, 476, 488, 496, 501, 514
Ar-ion (full frame)	275, 300, 305, 333, 351, 364, 385, 457, 472, 476, 488, 496, 501, 514
Ar-ion (full frame, frequency doubled)	229, 238, 244, 248, 257
Ar-Kr	350-360, 457, 472, 476, 488, 496, 501, 514, 521, 531, 568, 647, 752
He-Cd	325, 354, 442
He-Ne	543, 594, 604, 612, 633
Excimer	
XeCl (pulsed)	308
KrF (pulsed)	248
Nitrogen (pulsed)	337
Nitrogen pumped dye (tunable)	360-950
Solid state	
YAG (frequency doubled)	532
YAG (frequency quadrupled)	266
Diode lasers	
frequency doubled (LiNbO3)	415
frequency doubled (KTP)	424
frequency tripled (Nd-doped YLiF)	349

40

LED

- light-emitting diodes
- rozvoj CD, DVD, blue ray
- běžné v IR a Vis, nyní i v UV
- pro fluorimetrii vhodné UV a Vis LED



- Vis: 450 - 800
- UV: 285 – 400

41

Detektory

Požadavky

- vysoká citlivost
- široký dynamický rozsah

Fotonásobič (PMT)

Charge-Coupled Device (CCD)

Diode array (DA)

43

Monochromátory

- **Filtr**
- **Hranol**
- **Mřížka**

42

Instrumentace pro časově rozlišenou luminiscenci

excitace zábleskovou lampou

obvykle pro časy delší než desítky mikrosekund (nejčastěji Xe lampa)

excitace pulsním laserem

velmi krátké trvání pulsu

femtosekundové lasery (Heisenbergův princip: $\Delta\tau$ vs. $\Delta\nu$)

44

Srovnání absorpční a luminiscenční spektroskopie v oblasti UV-Vis

Spektroskopie v oblasti UV-Vis $A = c \times \epsilon = \log(I_0/I)$

Absorpční spektroskopie: měření poměru dvou světelných toků
+ přesnost (odolnost vůči změnám abs. hodnoty světelného toku Φ_0)
- citlivost při (nepatrný rozdíl mezi I_0/I při nízké koncentraci analytu)

Luminiscenční spektroskopie $F \sim k \phi I_0 \cdot 2.3 c \times \epsilon$

Luminiscenční spektroskopie: měření vyzářené energie
+ vysoká citlivost při použití citlivého detektoru (i jednotlivé fotony)
- přesnost (fluorescence je přímo úměrná excitačnímu světelnému toku (I_0);
projevuje se u ní negativně kolísání excitačního zdroje

45

Využití luminiscence v chemickém výzkumu

- stanovení anorganických a organických sloučenin a biosloučenin
- stanovení sloučenin s vlastní fluorescencí
- stanovení anorganických iontů a prvků (tvorba chelátů s organickými činidly)
- fluorimetrická **indikace ekvivalenčního bodu** (stanovení Ca^{2+} , Ba^{2+} , Sr^{2+} chelatometricky za přítomnosti fluorexonu)
- fluorescenční **acidobazické indikátory**: naftylamin (pH 3.4 – 4.8), chininbissulfát (pH 3.0 – 5.0), akridin (pH 4.8 – 6.6)
- **oxidačně redukční fluorescence**: Hg^{2+} oxiduje thiamin na thiochrom (fluoreskuje)
- široká škála biologických aplikací: **informace o kvantitě, struktuře, vzájemných interakcích a lokalizaci**

47

Další režimy spektrofluorimetru

3D spektra

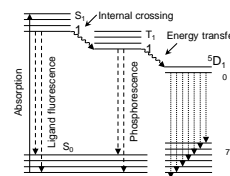
- emisní spektrum vs. excitační
- emisní (resp. excitační spektrum) vs. čas
- vyhasínání luminiscence vs. emisní spektrum

Synchronní sken

- Současný sken obou monochromátorů
- Stokesův posun je konstantní
- Stokesův posun není konstantní (jen speciální případy)

46

Luminiscence lanthanoidů - příklad anorganické luminiscence



„Anténový efekt“ – ligand absorbuje energii, která je převedena na centrální iont, který vyzáří kvantum energie

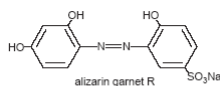
Charakteristické rysy luminiscence lanthanoidů:

- dlouhé časy vyhasínání
- dlouhý Stokesův posun
- ostré píky náležící energetickým přechodům mezi hladinami

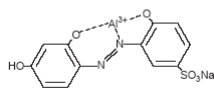
48

Příklady stanovení anorganických iontů

Chelating Agent	Metal Ions
8-hydroxyquinoline	Al ³⁺ , Be ²⁺ , Zn ²⁺ , Li ⁺ , Mg ²⁺ (and others)
flavonol	Zr ²⁺ , Sn ⁴⁺
benzoin	B ₄ O ₇ ²⁻ , Zn ²⁺
2',3,4',5,7-pentahydroxyflavone	Be ²⁺
2-(o-hydroxyphenyl) benzoxazole	Cd ²⁺



(a)



(b)

Stanovení Al³⁺ fluorimetricky s alizarinem

49

Derivatizace

Vnitřní (nativní) x vnější luminiscence - značky a sondy

Molekuly bez vlastní (vnitřní, nativní, přirozené) luminiscence lze derivatizovat luminiscenčními značkami/sondami

Detekce jednotlivých molekul a obsahu jednotlivých buněk

„single molecule/cell detection“)

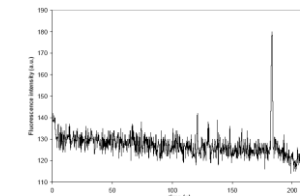


Fig.2 Rhodamin B (c = 1x10⁻¹² mol.l⁻¹)

51

Příklady luminiscenčních stanovení – organické látky a biomolekuly s vlastní fluorescencí

Class	Compounds ^a
aromatic amino acids	phenylalanine (F) tyrosine (F) tryptophan (F, P)
vitamins	vitamin A (F) vitamin B ₂ (F) vitamin B ₆ (F) vitamin B ₁₂ (F) vitamin E (F) folic acid (F)
catecholamines	dopamine (F) norepinephrine (F)
pharmaceuticals and drugs	quinine (F) salicylic acid (F, P) morphine (F) barbiturates (F) LSD (F) codeine (P) caffeine (P) sulfanilamide (P)
environmental pollutants	polycyclic aromatic hydrocarbons: pyrene (F) benzo[a]pyrene (F) organothiophosphorous pesticides (F) carbamate insecticides (F) DDT (P)

50

Výběr fluorescenčních značek

Kritéria:

spektrální vlastnosti (excitace, emise, kvantový výtěžek atd.)

vazebné místo (-NH₂, -SH skupina a další)

podmínky reakce (pH, koncentrace...)

další vlastnosti (acidobazicitá, hydrofobicitá ...)

52

Fluorescenční značky a sondy

fluorescenční značky (fluorescent labels)

nevlastní (extrinsic fluorescence) fluorofory, které se ke sledovaným biomolekulám (proteinům, peptidům, ligandům, oligonukleotidům a jiným) vážou kovalentní vazbou

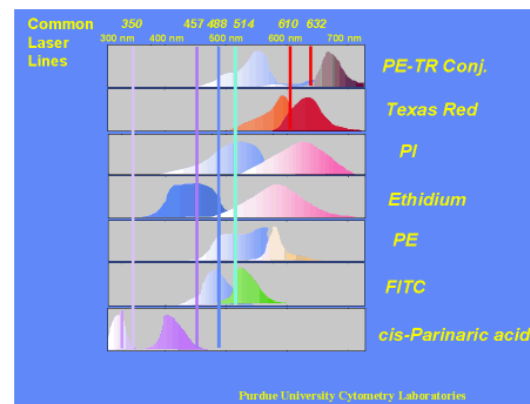
fluorescenční sondy (fluorescent probes)

nevlastní fluorofory, které se ke sledované struktuře vážou nekovalentně a často přitom mění své fluorescenční vlastnosti

Značky a sondy jsou velmi důležitými nástroji především v bioanalytice

53

Výběr fluorescenční značky – spektrální vlastnosti



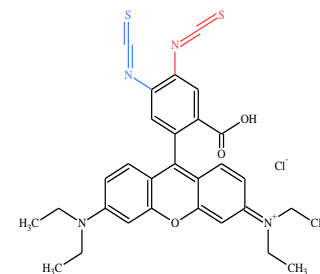
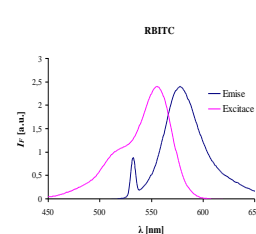
55

Použití luminiscenčních značek

- analytické stanovení (příp. v kombinaci se sep. metodou)
- fluorescenční mikroskopie, značení buněk a tkání
- fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH)
- měření vzdálenosti funkčních skupin (FRET)
- průtoková cytometrie
- fluorescenční „imunoassays“

54

Výběr fluorescenční značky – spektrální vlastnosti

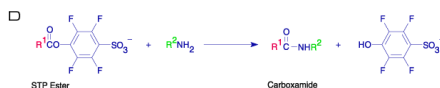
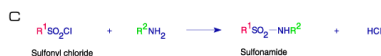
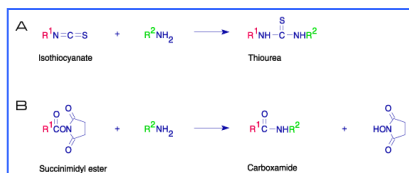


Analyt: peptidy, aminokyseliny, aminosloučeniny
 Nd:YAG (x2): 532 nm rhodaminB isothiokyanát
 Ar*: 488 nm fluorescein isothiokyanát

56

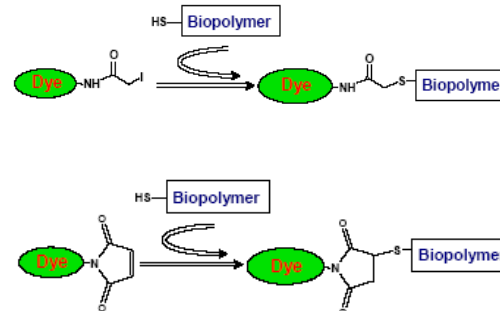
Fluorescenční značky

- Klasifikace fluorescenčních značek podle vazebného místa biomolekuly:
 - aminová skupina
 - thiolová skupina
 - další



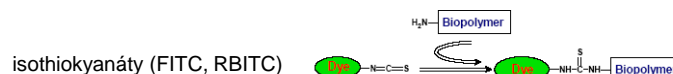
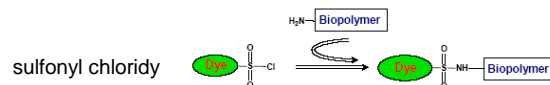
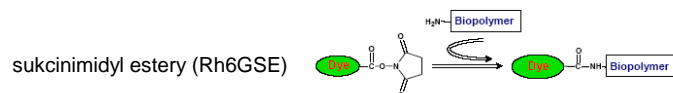
57

Výběr fluorescenční značky dle vazebného místa: thiol-reaktivní značky



59

Výběr fluorescenční značky – vazebná místa: amino-reaktivní značky



58

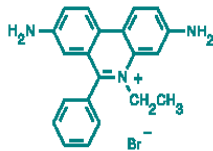
Fluorescenční imunoanalytické metody

- Fluorescence Immuno Assay (FIA)
- Fluorescence Polarization Immuno Assay (FPIA)
- Time Resolved Fluorescence Immuno Assay (TR-FIA)
- Elektroluminiscenční, chemiluminiscence a další
- Enzymatické metody s luminiscenční detekcí
- náhrada radioimuno technik s příchodem levných laserů a kvůli vyšší bezpečnosti
- detekční limity obou metod jsou srovnatelné (až $10^{-12} \text{ g.l}^{-1}$)

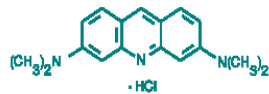
60

Fluorescenční sondy pro NK

- Vizualizace a identifikace RNA a DNA
- Různé principy interakce, např. „vmezeření“ barviva do šroubovice DNA (ethidium bromid)



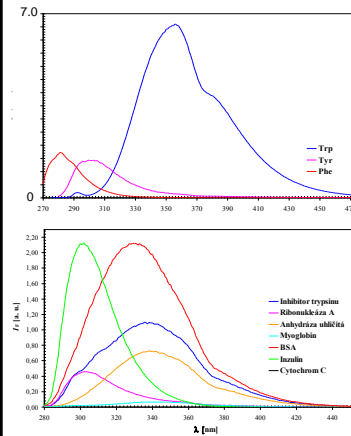
ethidium bromid



akridinová oranž

61

Nativní fluorescence aminokyselin, proteinů a peptidů



	Trp	Tyr	Phe
λ_{max} (nm)	348	303	282
ϕ	0.20	0.14	0.04
τ_f (ns)	2.6	3.6	6.4
Abs λ_{max} (nm)	280	274	257
Abs ϵ_{max}	5600	1400	200
$R_{\text{max}} \cdot \phi$	11	2	0.008

63

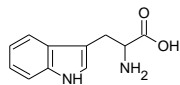
Nativní fluorescence peptidů a proteinů

V peptidech a proteinech fluoreskují zejména: W, Y a F.

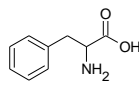
W fluoreskuje nejvíce, Y je nejpochetnější, W může zhasět Y.

Excitace v oblasti UV, emise od 280 nm po 400 nm.

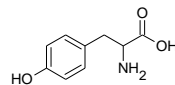
Dále mohou fluoreskovat různé prostetické části proteinů (např. kofaktory), ale mohou také zhasět...



tryptofan (W)



fenylalanin (F)

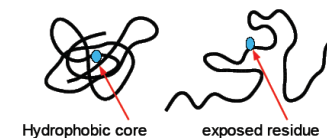


tyrosin (Y)

62

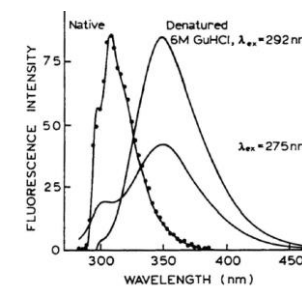
Nativní fluorescence peptidů a proteinů

Unfolded (nesbalený):
volná rotace, více kolíží,
větší vliv polárnějšího
solventu



Folded (fixní konformace):
méně kolíží, fluorescence je
ovlivněna nepolárním
jádem proteinu

Se zvyšující se polaritou
prostředí (konformace, solvent)
roste emisní maximum



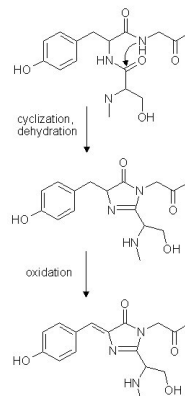
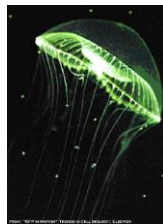
Green Fluorescent Protein (GFP)

Zeleně fluoreskující protein (GFP)- izolován z medúzy.

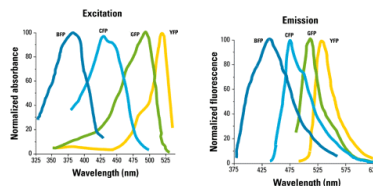
Fluorescence pochází z konjugovaného systému vzniklého cyklizací vedlejšího řetězce proteinu a následnou oxidací sekvence Ser-Tyr-Gly.

GFP má dva výrazné excitační pásy (kolem 395 a 475 nm) a maximum emise je 508 nm. V živém organismu je energie získána chemickou reakcí (chemiluminiscence).

Po modifikaci DNA mohou produkovat GFP také jiné organismy (bakterie, mušky, savčí buňky...)



GFP, YFP a další...



Proteiny s výraznou vlastní (vnitřní) fluorescencí jsou využívány:

- neinvazivní fluorescenční „marker“ přímo v živých buňkách
- sledování exprese genu
- interakce protein-protein

66

Spojení separačních technik a fluorescence

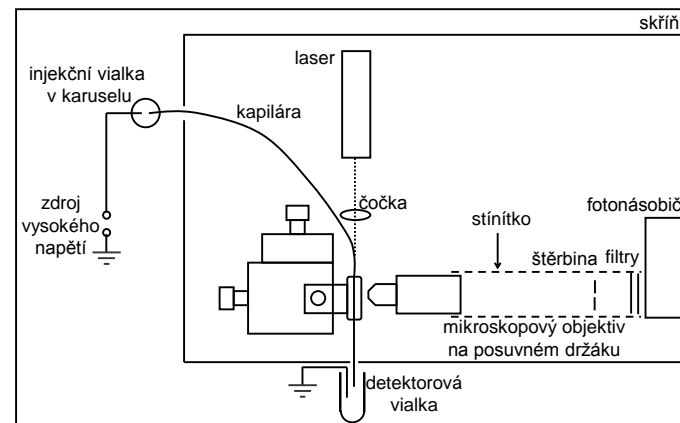
Kolonové i planární separační techniky - HPLC, CE, ITP, 2D GE aj.

Laser výhodný jako zdroj excitačního záření zvláště pro on-column detekci u mikrokolonových sep. technik

- LIF (laser induced fluorescence)
- kompatibilita laserového paprsku s mikrokolonovými technikami
 - dostatečný světelný tok i při rel. malém výkonu laseru (~mW)
 - vyšší toky způsobují bělení
- pro danou třídu analytů, resp. derivátů zvolen vhodný laser podle vlnové délky
- jednoduchá sestava: demonstrace na CE LIF

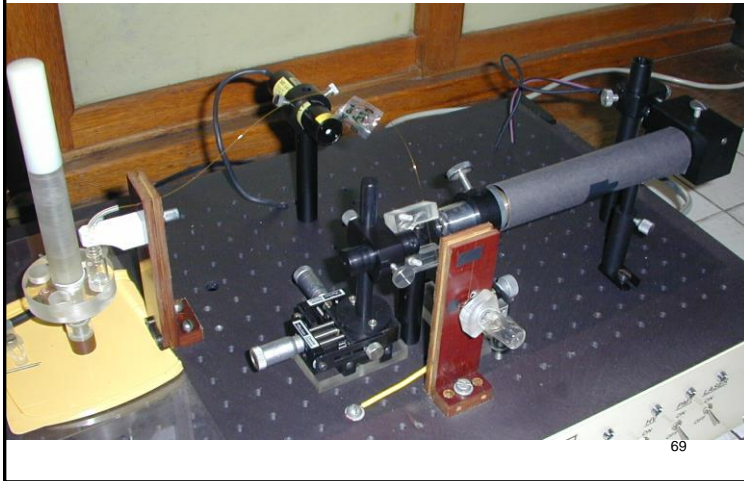
67

CE LIF: schema



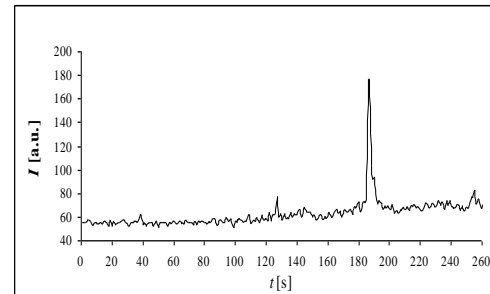
68

Konstrukce CE LIF



69

Př. 1: Limit detekce (LOD)

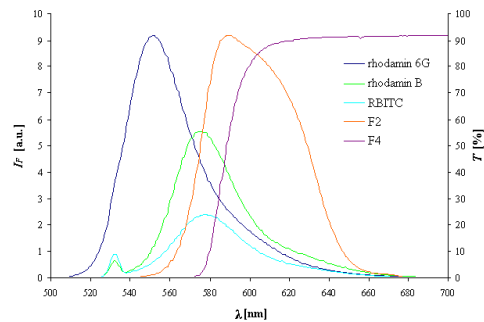


Analyt: Rhodamin B, $c = 1 \times 10^{-12}$ mol/l, excitace: 532 nm, 5 mW; emise: > 560 nm, kapilára: 50 mm *i.d.*, 375 mm *o.d.*, $l = 30/37$ cm, dávkování: $U = 5$ kV, $t_r = 10$ s nebo $\Delta h = 2$ cm, $t_r = 30$ s, separace: 0,02 mol/l fosfát v 10% MeOH, pH 10; $U = 10$ kV

LOD ~ 2×10^{-13} mol/l ... ~ 10^2 molekul

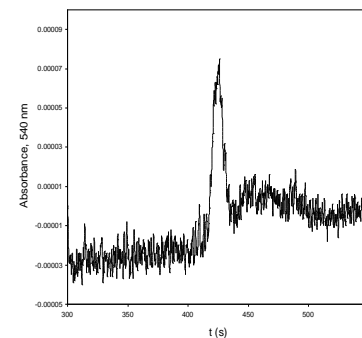
71

Výběr luminiscenčního barviva – spektrální vlastnosti



70

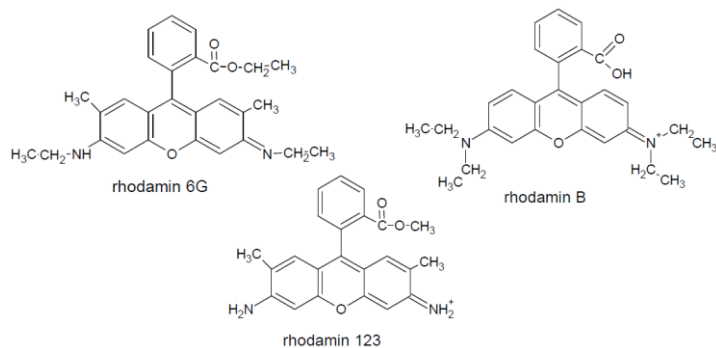
LOD: srovnání s absorbanční detekcí



Analyt: Rhodamin B, $c = 1 \times 10^{-5}$ mol/l (při obdobném dávkování)

72

Př. 2: Separace rhodaminových barviv

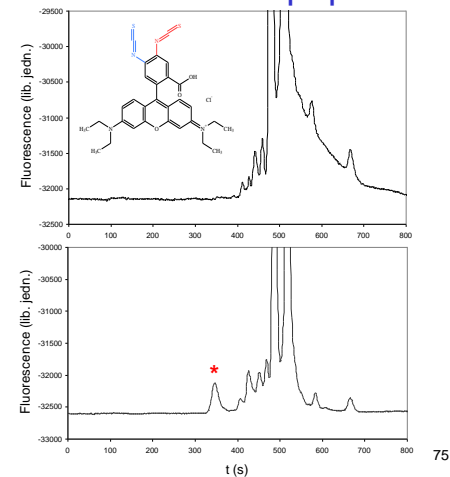


73

Př. 3: CE LIF značeného peptidu

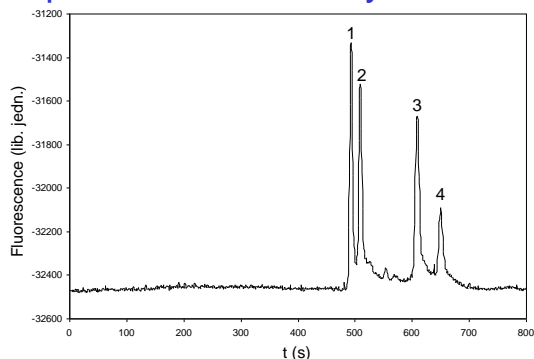
blank
RhBITC

značený peptid
P-RhBITC



75

Separace rhodaminových barviv



BGE: 50 mM kys. citrónová v 10 % EtOH (v/v)/NaOH (pH = 2,5)

Píky: 1, 2 - Rh 123, 3 - Rh 6G, 4 - Rh B

74

Př. 4: Stupeň fosforylace rodiny proteinů AHP?

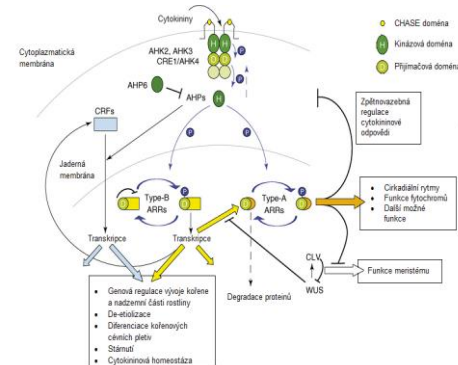
Cytokinová signální dráha rostlin

A. thaliana proteiny AHP (Arabidopsis Histidinephospho-transfer Proteins)

AHP1-5 fungují jako proteiny HPT

doména HPT s evolučně konzervovaným strukturním motivem XHGXKGSXS

Role fosforylace na His?



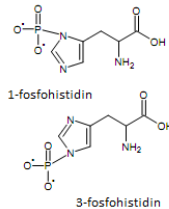
To, J.P., Kieber, J.J. Trends Plant Sci. 2008, 13, 85-92

76

Fosfohistidin (pHis)

typ fosforylované aminokyseliny	prostředí		
		kyselé	zásadité
O-fosfáty	fosfoserin	stabilní	nestabilní
	fosfothreonin	stabilní	nestabilní
	fosfotyrosin	stabilní	stabilní
N-fosfáty	fosfohistidin	nestabilní	stabilní
	fosfoaspartát	nestabilní	nestabilní
	fosfoglutamát	nestabilní	nestabilní
acyl-fosfáty	fosfoarginin	nestabilní	stabilní
	fosfolysin	nestabilní	stabilní
S-fosfáty	fosfocystein	stabilní	stabilní

- 2 izomery pHis
- 6 % z celkového počtu fosfoproteinů



SICKMANN, A; MEYER, HE. *Analyst*. 2005, 130, 9, s. 1263-1270.

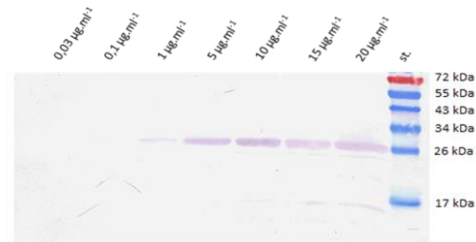
...nelze separovat 2D PAGE ⇒ CE-LIF

- separace v nativním prostředí
- specifická
- fúzní proteiny AHP-GFP

77

WB standardu GFP

Western blot standardu GFP



0,03 - 20 µg.ml⁻¹ vždy v objemu 30 µl

LOD

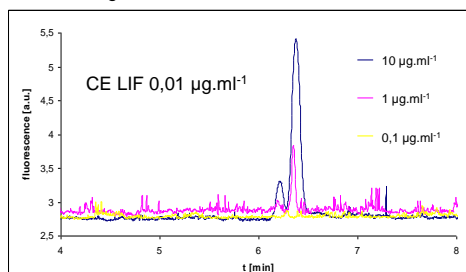
Western blot ~1,0 µg.ml⁻¹

CE-LIF ~0,01 µg.ml⁻¹

79

CE-LIF standardu GFP

Elektroforegram standardu GFP



$\Delta h = 3$ cm, $t_{inj} = 5$ s, $U = 8$ kV, 50 mM Tris se 50 mM NaCl, $pH = 9,0$

1. Craig, D. B.; Wong, J. C. Y.; Devichi, N. J., *Biomedical Chromatography* 1997, 11 (4), 205-206.
2. Zhang, H. F.; Ma, L.; Liu, X.; Lu, Y. T., *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* 2004, 804 (2), 413-420.
3. Korf, G. M.; Landers, J. P.; Okane, D. J., *Analytical Biochemistry* 1997, 251 (2), 210-218.

LOD [ng/ml]	LOD [M]	V [nl]	Ref.
0,08	$3,0 \cdot 10^{-12}$	17	1
-	$1,3 \cdot 10^{-10}$	3	2
90	$3 \cdot 10^{-9}$	1,9	3
10	$4,1 \cdot 10^{-10}$	0,6	tato práce

78

Př. 5: Stanovení potravinářských barviv



Available online at www.sciencedirect.com

ScienceDirect

Journal of Chromatography A, 1141 (2007) 206–211

JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY A

www.elsevier.com/locate/chroma

Sensitive determination of erythrosine and other red food colorants using capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection

Markéta Ryvolová, Petr Táborský, Patrik Vrábek, Pavel Kránský, Jan Preisler*

Department of Analytical Chemistry, Faculty of Science, Masaryk University, Kotlářská 2, 611 37 Brno, Czech Republic

Received 3 July 2006; received in revised form 1 December 2006; accepted 5 December 2006

Available online 22 December 2006

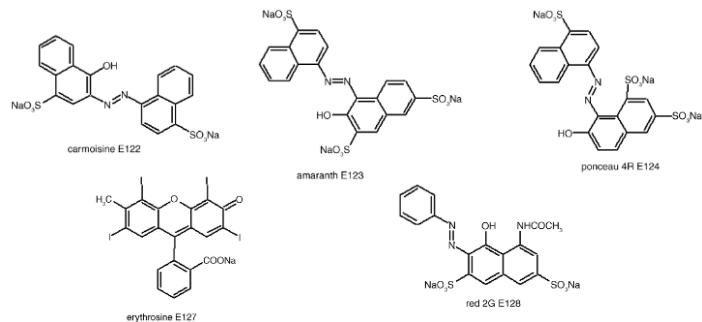
Abstract

Capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection (CE-LIF) was applied to separation and sensitive determination of red food colorants. Dixie pumped frequency-doubled Nd:YAG laser (532 nm) was used as an excitation source in a laboratory-built CE-LIF system. For highly fluorescent erythrosine B (E127), an extrapolated limit of detection (LOD) of 0.4 ng mL^{-1} ($S/N=3$) was achieved. Extrapolated LODs of other tested red additives, such as carmoisine, E122 (0.5 µg mL^{-1}); amarant, E123 (0.2 µg mL^{-1}); poncau 4R, E124 (0.3 µg mL^{-1}) and red 2G, E128 (0.3 µg mL^{-1}) were about one-order lower compared to results obtained with CE with absorbance detection in UV/vis (CE-UV/vis). The main advantages of using CE-LIF for analysis of food samples are high selectivity and minimization of matrix effect. To our knowledge, this is the first use of CE-LIF for determination of red food colorants.

© 2006 Elsevier B.V. All rights reserved.

80

Stanovovaná barviva



Excitation and emission maxima, molar absorption coefficients and quantum yields of the studied colorants at 532 nm

		λ_{exc} (nm)	λ_{em} (nm)	ϵ_{532} ($10^4 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)	Φ_F 532
E122	Carmoisine	556	570	1.54	7.4×10^{-6}
E123	Amaranth	552	576	2.07	5.5×10^{-6}
E124	Ponceau 4R	555	575	1.27	9.0×10^{-6}
E127	Erythrosine	524	549	7.72	0.1
E128	Red 2G	550	574	1.12	1.0×10^{-5}

Colorants were dissolved in sodium phosphate buffer (0.02 M, pH 11), concentration of each dye was 1×10^{-5} M.

Př. 6: Stanovení glutathionu v dechu a slinách



Sensitive determination of glutathione in biological samples by capillary electrophoresis with green (515 nm) laser-induced fluorescence detection^{††}

Júlia Hodáková^a, Jan Preisler^a, František Foret^b, Petr Kubáň^{a,b,*}

^a Department of Chemistry, Masaryk University, Kotlářská 2, 611 37 Brno, Czech Republic
^b Bioanalytical Instrumentation, CEITEC Masaryk University, Veveří 97, 602 00 Brno, Czech Republic

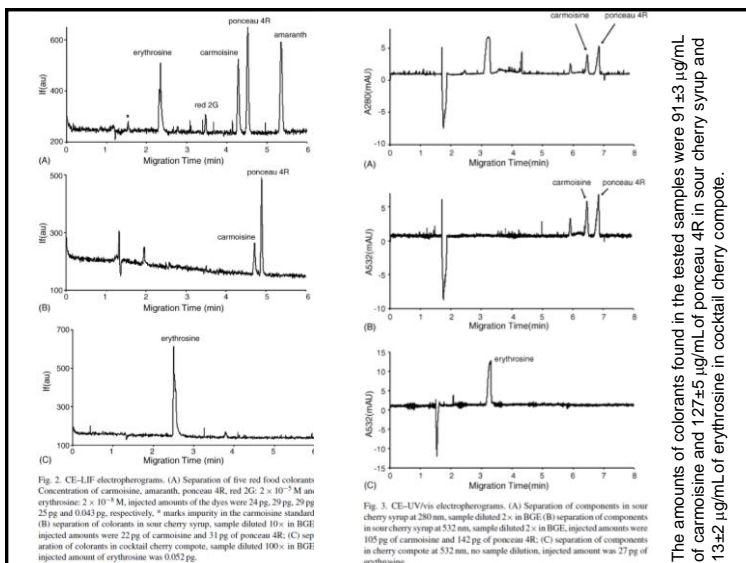
ARTICLE INFO

Article history:
 Received 19 November 2014
 Received in revised form 2 February 2015
 Accepted 20 February 2015
 Available online 26 February 2015

Keywords:
 Capillary electrophoresis
 Laser-induced fluorescence
 Glutathione
 Eosin-5-maleimide

ABSTRACT

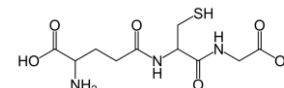
A new sensitive capillary electrophoretic method with laser-induced fluorescence (LIF) was developed for quantitation of glutathione (GSH) in biological samples. Eosin-5-maleimide was used to label the GSH molecule and the formed conjugate was separated in a 15 mM 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid electrolyte at pH 7.0 in less than 3 min. The conjugate was detected with an in-house built LIF system, utilizing an inexpensive 515 nm diode laser module. Studies were performed to optimize the derivatization (the ratio of reagent to analyte, the reaction time, pH, etc.) and separation conditions. Sensitive detection of GSH at concentrations as low as 0.18 nM was obtained. The method was applied in the analysis of biological fluids (exhaled breath condensate, saliva) and was found to be suitable for determination of GSH in these samples at trace levels below 1 nM. To the best of our knowledge, this is the first report on determination of GSH in exhaled breath condensate by capillary electrophoresis (CE).



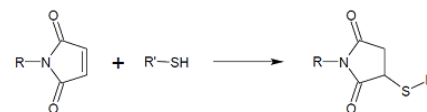
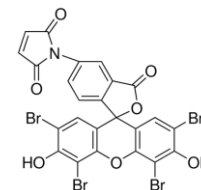
The amounts of colorants found in the tested samples were 91±3 µg/mL of carmoisine and 127±5 µg/mL of ponceau 4R in sour cherry syrup and 13±2 µg/mL of erythrosine in cocktail cherry compote.

Derivatizace glutathionu

Glutathion (GSH)



Eosin-5-maleimid (EMA)



CE LIF standardu GSH

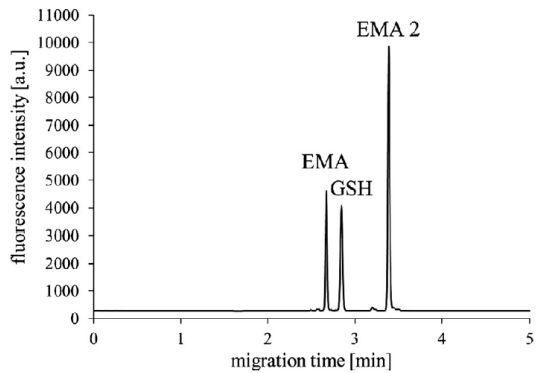


Fig. 1. Separation of EMA and GSH-EMA conjugate. GSH concentration: 100 nM, EMA concentration: 250 nM. The EMA 2 peak corresponds to the EMA decomposition product. CE conditions: separation voltage +15 kV, HD injection 35 s/10 cm, detection: LIF (excitation: 515 nm/emission: >540 nm), BGE: 15 mM HEPES, pH 7.0.

85

CE LIF glutathionu v dechu a slinách

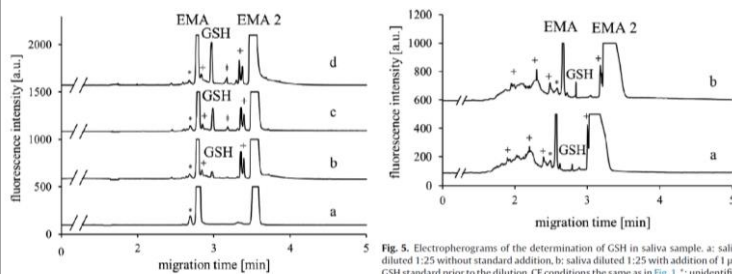


Fig. 4. Electropherograms of the determination of GSH in EBC sample. a: blank sample, no EBC, b: EBC sample without standard addition, c: EBC sample with addition of 1 nM GSH standard, d: EBC sample with addition of 5 nM GSH standard. CE conditions the same as in Fig. 1. *, unidentified peaks due to the EMA reagent, +: unidentified peaks due to the sample matrix, and †: unidentified peak due to the GSH standard.

Fig. 5. Electropherograms of the determination of GSH in saliva sample. a: saliva diluted 1:25 without standard addition, b: saliva diluted 1:25 with addition of 1 μ M GSH standard prior to the dilution. CE conditions the same as in Fig. 1. *, unidentified peaks due to the EMA reagent, +: unidentified peaks due to the sample matrix.

86