



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Název: **Fluorimetrie**

Školitel: **Bc. Miroslav Matoušek**

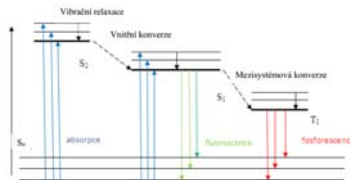
Datum: **19. 9. 2013**



Reg. č. projektu: CZ.1.07/2.3.00/20.0148
Název projektu: Mezinárodní spolupráce v oblasti "in vivo" zobrazovacích technik

Co je to fluorimetrie?

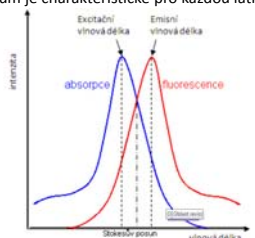
- metoda, které se používá k měření intenzity fluorescenčního záření emitovaného analytem
- Fluorofory – látky, které vykazují fluorescenci
- Luminiscence – pozorování a měření luminiscenčního záření, které emituje zkoumaná látka
 - Fotoluminiscence
 - fluorescence
 - fosforescence
 - Chemiluminiscence, bioluminiscence, elektroluminiscence, termoluminiscence, sonoluminiscence...



- Absorbpcí elektromagnetického záření (modré šipky) přecházejí molekuly látek ze základního singletového elektronového stavu S_0 do různých vibračních hladin excitovaného singletového elektronového stavu S_1 a S_2 . K deexcitaci molekuly dochází buď zářivými přechody (luminiscence; zelené a červené šipky) nebo nezářivými přechody (vnitřní konverze, mezisystémová konverze, vibrační relaxace; černé šipky).

Vlastnosti fluorescence

- Zkoumaná látka musí mít takovou molekulovou strukturu, která by byla schopná absorbovat záření
- Vlnová délka emisního záření je větší nebo rovna vlnové délce excitačního světla (Stokesův zákon) $\lambda_{emit} > \lambda_{excit}$
- Excitační a emisní spektra jsou zrcadlově symetrická a často se zčásti překrývají.
- Stokesův posun - rozdíl mezi emisním a excitačním maximem
- anti-Stokesův posun, kdy se emisní spektrum posune ke kratší vlnové délce při zvyšování intenzity fluorescence.
- Fluorescenční spektrum je charakteristické pro každou látku.

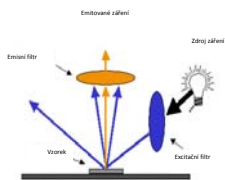


Charakteristika fluorescence

- Intenzita fluorescence
 - zhášení (srážkové, statické, samozhášení)
 - fotovybělování
 - pH
- Emisní a excitační spektra
- Kvantový výtěžek
- Doba života excitovaného stavu

Princip fluorimetrie

- Fotoluminiscence.
- Fluoreskující látka je excitována monochromatickým zářením
 - Dojde k vyrušení některého z valenčních elektronů do vyšší energetické hladiny.
 - Při návratu zpět do původního energetického stavu je část energie uvolněna ve formě tepla, část je vyzařena ve formě fotonu.
- → **Energie emitovaného záření je proto vždy nižší než energie záření excitačního, tj. emitované světlo má větší vlnovou délku.**
- Ve srovnání se spektrofotometrickými metodami:
 - vyšší specifčnost (excitační (tj. absorpční) i emisní spektrum)
 - vyšší citlivost (fotonsčítací měření („přijem“) probíhá v kolmé směru a při jiné vlnové délce, než která je „vysílána“, tj. signál není „zmeščen“ vyslaným zářením).
- Technická úskalí:
 - citlivost na
 - změny pH, iontové síly, polarity
 - měřicí činnosti
 - „ztluště“ fluorescence



Použití fluorimetrie

- Určování koncentrace látek
 - (bio)chemické analýzy
 - použití fluorogenního substrátu
 - fluorescenční značení biomolekul
- Studium vlastností látek
 - kvantové tečky
 - nanočástice
- Bioimaging

Popis (spektr)fluorimetru

- Obecné schéma spektrofluorimetru:



- Fluorimetr Infinite M200

– Multifunkční fluorimetr Infinite M200 pro je určen pro měření fluorescence (excitace 230 – 850 nm, emise 280 – 850 nm) i absorpance (230 – 1000 nm) na mikrotitračních destičkách.



- Carestream Xtreme

– In vivo zobrazovací systém
 – fluorescenční analýza (excitace 410 – 760 nm, emise 535 - 830 nm)

Děkuji za pozornost!



10-AU Fluorometer