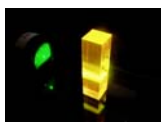


Molekulová luminiscenční spektroskopie

- absorbovaná energie (např. ve formě světelného záření může být přeměněna na světelnou energii o jiné (většinou vyšší) vlnové délce → luminiscence
- skupina v molekule zodpovědná za luminiscenci (fluorescenci) se nazývá luminofor (fluorofor).
- molekulová luminiscenční spektroskopie je významná analytická metoda.



Doporučená literatura

Knihy:

- A. Sharma, S. G. Schulman - [Introduction to Fluorescence Spectroscopy](#)
- J. R. Lakowicz - [Principles of Fluorescence Spectroscopy](#)
- B. Valeur - [Molecular Fluorescence: Principles and Applications](#)

Časopisy:

- [Journal of Fluorescence](#)
(<http://www.springerlink.com/content/1573-4994/>)
- [Journal of Luminescence](#)
(<http://www.sciencedirect.com/science/journal/00222313>)

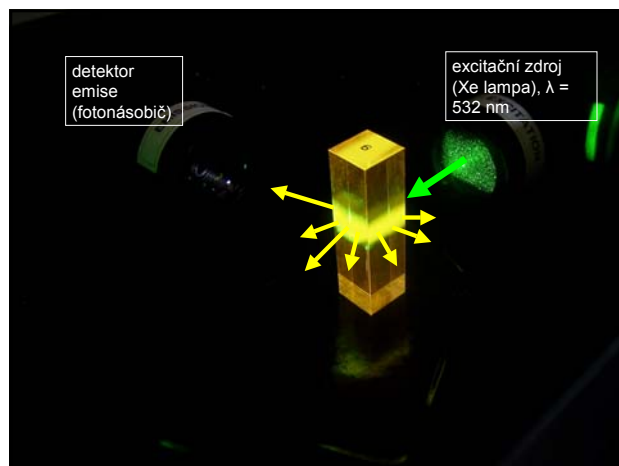
Internet:

- <http://www.fluorescence-foundation.org>



Rozdělení luminiscence podle zdroje excitace

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



Rozdělení spektrometrických metod

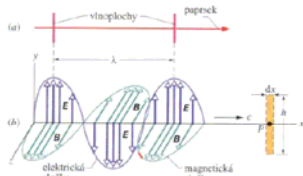
- podstatou většiny spektrometrických metod je sledování interakce elektromagnetického záření s analytem za účelem studia kvality (struktury), nebo kvantitativně
- atomy a molekuly mohou přijímat, nebo odevzdávat energii do okolí
$$\Delta E = E_{\text{přijata}} - E_{\text{odevzdaná}} = h \cdot \nu$$
- tato energie je kvantována
- **absorpce energie**: energie je absorbována valenčními elektrony atomů (AAS), vnitřními elektrony (RTG absorpční spektrometrie), vazebnými i nevazebnými elektrony molekulových orbitalů (UV-Vis spektrometrie), případně při absorpci dochází ke změně rotačních a vibračních stavů molekuly (IČ spektrometrie)
- emise energie: excitovaný atom, nebo molekula, která byla převedena dodáním energie do vyššího (excitovaného) stavu, přechází do základního stavu a vyzáří energii
- **fluorescence** a **fosforescence...**
- zvláštním typem interakce je rozptyl (deformační srážky-Raman, Tyndálův rozptyl, atd.)

Molekulová elektronová struktura

- orbitály a elektrony v molekule, jenž jsou ovlivněny vazebnými interakcemi jsou zodpovědné za vznik elektronových spekter ve viditelné a ultrafialové oblasti spektra
- platí **Pauliho vylučovací princip**
- nejčastější metody výzkumu molekulové elektronové struktury jsou spektrofotometrie (absorbance) v oblasti UV-Vis, luminiscenční spektroskopie.

Světelné záření

- světlo je elektromagnetické vlnění, které se skládá ze dvou složek: **elektrické** a **magnetické**
- vektor elektrické složky kmitá (osciluje) kolmo na směr šíření paprsku
- vektor magnetické složky je kolmý na směr šíření paprsku a zároveň na vektor elektrické složky



Světelné záření

- světelný paprsek je charakterizován frekvencí (ν) oscilace magnetické a elektrické složky (kolikrát za sekundu je vektor složky v maximu), resp. vlnovou délkou (λ)
- rychlost světla (c) ve vakuu je 3×10^8 m/s
- pro rychlost světla platí:

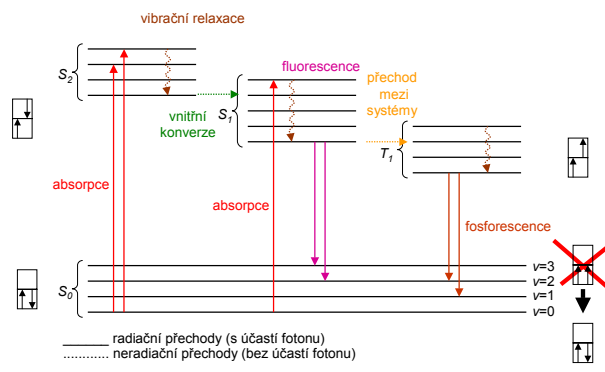
$$c = \lambda \nu$$

- elektricky nabitá částice (elektron) je schopna interakce se světelným vlněním (ovlivnění je dáno elektrickou složkou paprsku).
- přijátá energie (E) je kvantována:

$$E = h \nu$$

- h je **Planckova konstanta** ($h = 6.625 \times 10^{-27}$)

Jablonského diagram



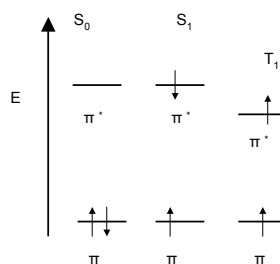
Procesy spojené s excitací molekuly

- absorpce (absorption)
- vibrační relaxace (vibrational relaxation)
- vnitřní konverze (internal conversion)
- fluorescence (fluorescence)
- mezisystémový přechod (intersystem crossing)
- fosforescence (phosphorescence)
- zpožděná fluorescence (delayed fluorescence)

Absorpce energie organickou molekulou

- absorpce je zpravidla způsobena přechody vazebných (případně nevazebných) elektronů v molekule do antivazebných molekulových orbitalů
- u složitějších molekul se většinou jedná o kombinaci několika přechodů

Typy přechodů

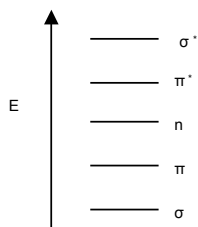


S_1 – singletový excitovaný stav (elektrony mají opačný spin), přechod je spinově dovolený (je pravděpodobný), vysoká intenzita absorpce.

T_1 – tripletový stav, elektrony mají stejný spin, tzv. zakázaný přechod (= méně pravděpodobný), poskytuje pásy s nižší intenzitou, energetický rozdíl je menší oproti S_1

různé elektronové konfigurace π – elektronového systému

Typy přechodů



hladiny energií molekulových orbitalů

Typy přechodů

Přechod $\sigma - \sigma^*$: jednoduché vazby (např. C-C, nebo C-H), vyžadují velkou 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 konjugace vazeb, tím vyšší vlnová délka (energetická hladina nejvyššího obsazeného vazebného orbital se zvýší a energetická hladina nejnižšího nevazebného orbitalu se sníží \rightarrow nižší ΔE), delokalizované π orbitály aromatických systémů \rightarrow rozdíl energií je nízký (absorpce ve Vis oblasti)

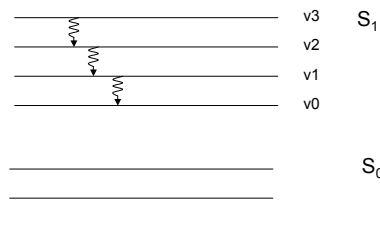
$n - \pi^*$: v molekule je kromě dvojných vazeb přítomen také atom s volným elektronovým párem (N, S, Cl...), nízká energie, ovlivnění $\pi - \pi^*$ přechodu

Typy elektronových přechodů v komplexech kovů

- přechody v rámci iontu kovu vázaného do komplexu (d-d, nebo f-f přechody): dochází ke štěpení podhladin iontu kovu vlivem ligandového pole.
- C-T (charge-transfer) přechody: přenos náboje mezi ligandem a iontem kovu, dochází k přechodu elektronu z orbitalu atomu s výrazně vyšší elektronovou hustotou do orbitalu jiného atomu s menší elektronovou hustotou (buď přechod M-L, nebo L-M), tyto přechody mají vysokou intenzitu v porovnání s přechody d-d.
- elektronové přechody v rámci ligandu vytvořené vlivem elektrostatické interakce s iontem kovu.

Vibrační relaxace

- po excitaci na jednu z vibračních hladin ($v_{0,n}$) excitovaného stavu ($S_{1,n}$) dochází obvykle relaxaci na nejnižší vibrační hladinu nejnižšího excitovaného stavu (molekula vyzářuje tepelnou energii). Tento proces je velice rychlý ($10^{-14} - 10^{-12}$ s). Rychlost vibračních přechodů závisí zejména na teplotě.



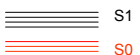
Vnitřní konverze

Obecně jde o přechod mezi nejnižší excitovanou hladinou (S_1) na nejvyšší vibrační hladinu nejnižší singletové hladiny (S_0).

- vibrační hladiny S_0 sahají až k vibračním hladinám S_1 . Elektron se tak může přejít mezi S_1 a S_0 bez toho, aby se výrazně změnila jeho energie.



- vibrační hladiny S_0 a S_1 jsou blízko sebe a za jistých okolností může elektron přejít díky tunelovému efektu. Pravděpodobnost tohoto děje se zvyšuje se zmenšením vzdáleností mezi hladinami.



Mezisystémový přechod singlet-triplet

- tripletová hladina leží níže, než hladina S_1 (elektrony se stejným spinem se tolik neodpužují, jako v případě stavu S_1)
- přechod z S_1 do T_1 se děje podobným mechanismem jako je vnitřní konverze
- tento proces zahrnuje změnu spinu elektronu a je málo pravděpodobný (tzv. spinově zakázaný přechod)
- „spinově povolené“ vibrační procesy (vibrační relaxace a vnitřní konverze) trvají $\sim 10^{-14}$ s, zatímco „spinově zakázané“ procesy $\sim 10^{-8}$ s (srovnatelné s fluorescencí)

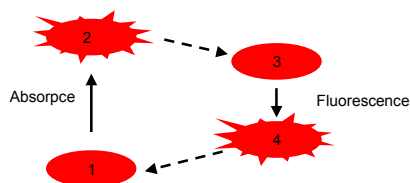
Fluorescence

- alternativou k mezisystémovému přechodu, nebo vnitřní konverzi je ztráta energie ve formě světla (UV-Vis oblast)
- k emisi světla dochází z nejnižší vibrační hladiny S_1 na jednu z vibračních hladin S_0
- Franck-Condonův princip
- čas fluorescence je $\sim 10^{-7}$ až 10^{-9} s

Franck-Condonův princip

- molekuly mají v základním a v excitovaném stavu obecně různé dipólové momenty i polarizovatelnosti (je to způsobeno elektrostatickými interakcemi s okolím molekuly – např. solvatací)
- okamžitě po absorpci není excitovaná molekula v rovnovážném stavu a do rovnovážného stavu se dostane až dojde k vyrovnání sil, které na ní působí
- doba potřebná pro molekulární relaxace je mnohem delší, než je rychlost elektronového přechodu, ale obvykle kratší, než doba života excitovaného stavu
- emisi dochází ze stavu, kdy již bylo dosaženo rovnovážné konfigurace
- okamžitě po vyzáření světla se molekula nachází v nerovnovážném stavu → vibrační relaxace na základní hladině

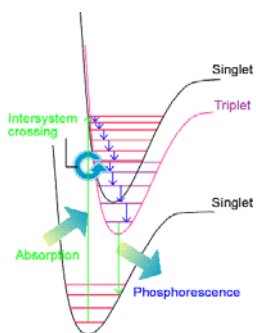
- 1 – rovnovážná konfigurace v základním stavu
 2 – nerovnovážná konfigurace v excitovaném stavu (Franckův-Condonův stav)
 3 – rovnovážná konfigurace v excitovaném stavu
 4 – nerovnovážná konfigurace v základním stavu (Franckův-Condonův stav)



Fosforescence

- hladina T_1 má nižší energii, než S_1
- zářivý přechod z nejnižší hladiny tripletového stavu na základní stav → vyšší vlnová délka, než u fluorescence
- „zakázaný“ přechod = jeho pravděpodobnost je menší → delší čas přechodu ($\sim 10^{-5}$ až sekundy)
- fosforescence, stejně jako fluorescence, je typická pro aromatické látky
- méně častý jev, než fluorescence
- fosforescenci konkurují: kolizní deaktivace s molekulami solventu, zchášení, fotochemické reakce, přenos energie...
- často je fosforescence pozorována jen za nízkých teplot (menší pravděpodobnost nezářivé deaktivace)

Fosforescence



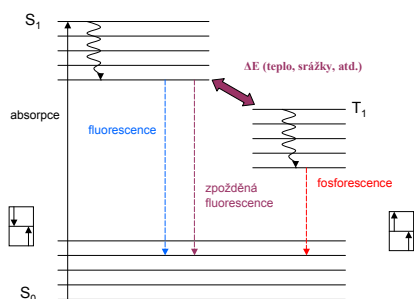
Zpožděná fluorescence

„příznaky“ zpožděné fluorescence:

1. čas vyhasínání tohoto procesu je srovnatelný s časem vyhasínání fosforescence
2. vlnová délka emitovaného záření je stejná jako u fluorescence



Zpožděná fluorescence



Princip

- jde o **termální excitaci** molekuly s nejnižší hladiny tripletového stavu zpět na nejnižší hladinu excitovaného singletového stavu (je to reverzibilní mezisystémový přechod (*reverse intersystem crossing*) mezi T_1 a S_1)
- k fluorescence dochází po návratu na S_1 (proto je vlnová délka je stejná jako u „běžné“ fluorescence)
- mezisystémový přechod způsobuje zdržení celého děje (čas vyhasínání je mnohem delší, než u „běžné“ fluorescence)

Typy termální excitace

- **E-typ zpožděné fluorescence** – probíhá u pevných vzorků a je doprovázen zahříváním systému, případně statistickou fluktuací elektronů mezi hladinami (jen pokud rozdíl mezi tripletovou hladinou a excitovaným singletem není příliš vysoký). Jedná se o jednofotonovou absorpci a závislost mezi intenzitou emise a intenzitou budícího záření je lineární. Poprvé byl tento jev pozorován u eosinu (E-typ).
- **P-typ zpožděné fluorescence** – k excitaci dochází po kolizi dvou molekul v tripletovém stavu. Jedna molekula v tripletovém stavu odevzdá nezářivě svoji energii druhé molekule v tripletovém stavu a ta přejde do excitovaného singletu (*triplet-triplet annihilation*). Rozdíl mezi S_1 a T_1 mohou být vyšší, než u typu E. Je to dvoufotonová absorpce (excitace dvou molekul), proto je intenzita fluorescenční emise přímo úměrná čtverci intenzity budícího záření. Tento jev byl poprvé pozorován u pyrenu (P-typ).

Vliv prostředí na luminiscenci

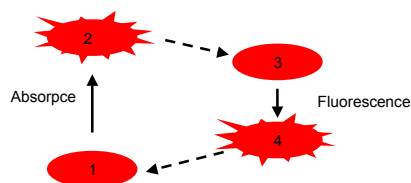
Vliv vnějšího prostředí na fluorescence

- okolní prostředí (rozpouštědlo, pH, atd.) má ve fluorescenční spektroskopii větší vliv na výslednou podobu spekter, než spektrofotometrie (UV-Vis)

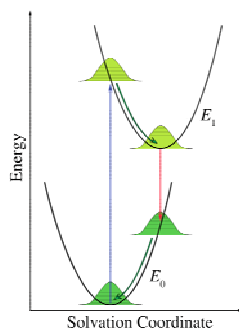
?

- větší vliv okolí na molekuly v excitovaném stavu

- 1 – rovnovážná konfigurace v základním stavu
- 2 – nerovnovážná konfigurace v excitovaném stavu (Franckův-Condonův stav)
- 3 – rovnovážná konfigurace v excitovaném stavu (závisí na okolí molekuly)
- 4 – nerovnovážná konfigurace v základním stavu (Franckův-Condonův stav)



Franck-Condonův princip - solvatace



<http://en.wikipedia.org>

Vliv rozpouštědla

- možnosti interakcí mezi molekulou analytu a rozpouštědla: dipól-dipól, dipól-indukovaný dipól, vodíkové můstky...
- rozpouštědla, která tvoří vodíkové můstky mají vliv na n- π^* přechody (tato rozpouštědla se chovají jako velmi slabé Brønstedovy kyseliny a atomy s ne vazebnými elektrony jako zásady a částečně přijímají proton)
- polarita rozpouštědla nejvíce ovlivňuje π - π^* (polární rozpouštědla snižují energii π^*)

Zhášení luminiscence (luminescence quenching)

- luminiscenci konkuruje jiný děj, který vede k poklesu intenzity luminiscence
- všechny možné procesy zhášení ještě nejsou zcela vysvětleny
- dynamické (někdy též kolizní) a statické zhášení

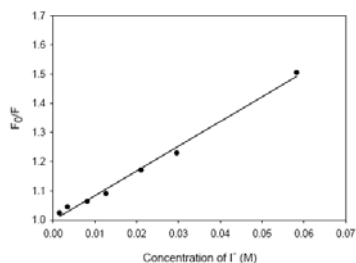
Dynamické zhášení luminiscence

- k interakci mezi zhášečem a potenciálním fluoroforem dojde po excitaci, kdy excitovaná molekula vytvoří „komplex“ s jinou částicí (molekulou, „species“), který nefluoreskuje – dojde k vytvoření nových hladin a dojde k deexcitaci vnitřní konverzí. Typická je např. tvorba komplexu s kyslíkem rozpuštěným v rozpouštědle (oxidace), I⁻, Cs⁺, akrylamidem, atd.

$$F_0/F = 1 + K_{SV} [Q]$$

- Stern-Volmerova rovnice: F_0 je intenzita fluorescence bez zhášeďa, F je intenzita fluorescence se zhášeďem, K_{SV} je Stern-Volmerova zhášeďící konstanta, Q je koncentrace zhášeďa
- dynamické zhášení snižuje τ

Dynamické zhášení



Zhášení fluorescence fluoresceinu za přítomnosti I⁻

Zhášení luminiscence

- statické zhášení: ke „komplexaci“ dochází v základním stavu (vytvoří se nefluoreskující komplex). Luminiscence jsou pak schopny jen disociované molekuly, ale rychlost disociace je malá ve srovnání s se zářivými přechody (- zářivé přechody jsou neefektivní). Typický příklad – komplexace těžkým kovem (snížení fluorescence kys. salicylové po komplexaci Fe(III).)

$$F_0/F = 1 + K_a[Q]$$

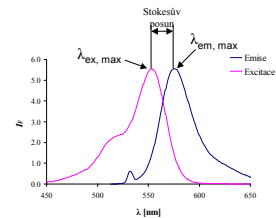
Luminiscence molekuly je charakterizována:

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

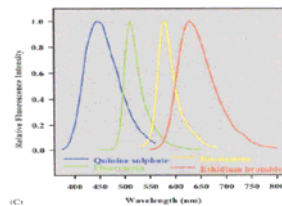
Emisní a excitační spektra

emisní spektrum (fluorescenční resp. fosforescenční spektrum): závislost intenzity luminiscence na vlnové délce. Měří se při konstantní λ_{ex} .

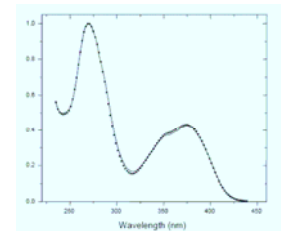
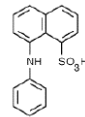
excitační (aktivační, „absorpční“) spektrum: závislost absorpce luminoforu (fluoroforu) na vlnové délce. Měří se při konstantní λ_{em} .



Emisní spektrum



Excitační spektrum



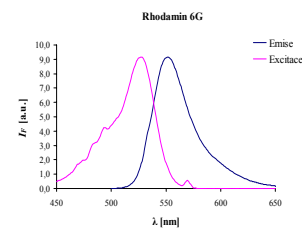
Excitační a absorpční spektrum mají podobný tvar, jestliže absorbuje pouze ta část molekuly odpovědná také za fluorescenci

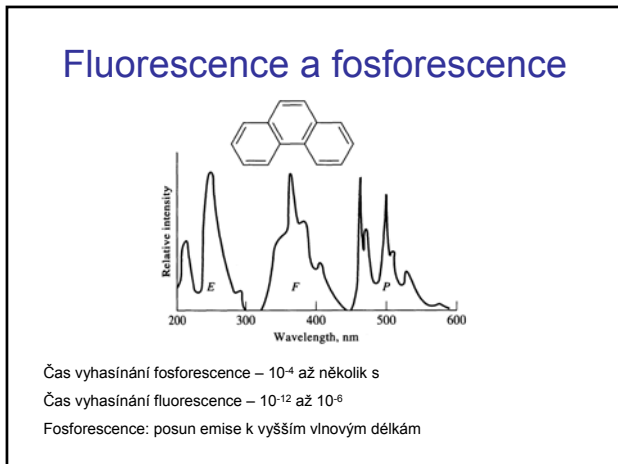
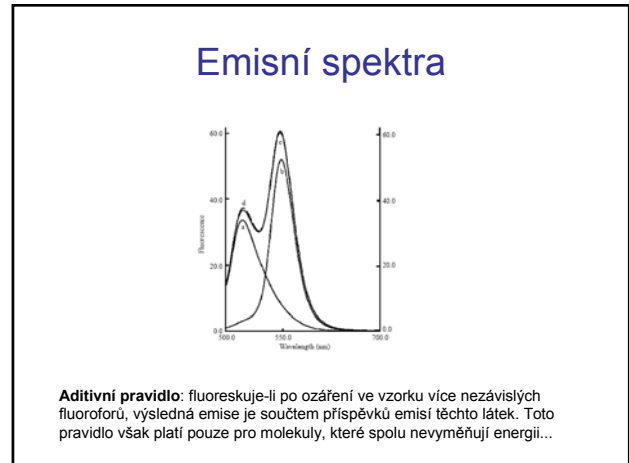
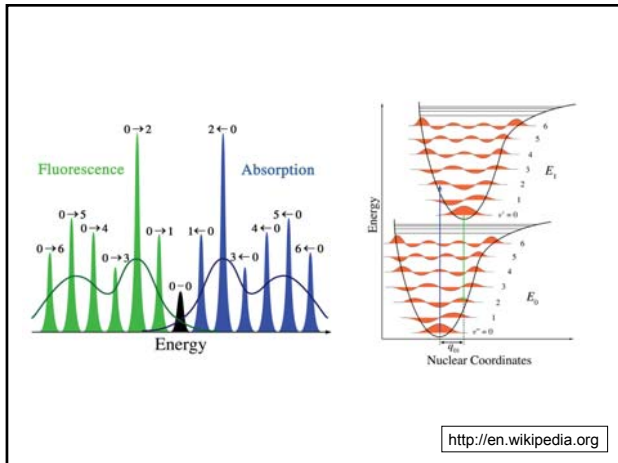
Emisní a excitační spektra

- **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

Zrcadlové pravidlo

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





Základní vztahy

$A = c / \varepsilon = \log(\Phi_0 / \Phi)$ (Lambert-Beerův zákon)
 A – absorbance, c – koncentrace, ε – absorpční koeficient, l – tloušťka květy, Φ_0 - záření vyslané na vzorek, Φ - záření prošlé vzorkem

$F = k \varphi \Phi_0 (1 - 10^{-c\varepsilon l})$
 F – fluorescenční signál (fotony/s), k – podíl emitovaných fotonů, které dorazí na detektor, φ – výtěžek luminiscence

$F = k \varphi \Phi_0 2.3 c l \varepsilon$
 zjednodušený vztah pro nízké koncentrace

„Čas života“ (lifetime) fluoroforu

- nestudujeme jednu molekulu s fluoroforem, ale mnoho molekul s populací elektronů na excitovaných hladinách
- na základě studia systému z mnoha molekulami určujeme „čas života“ určité molekuly s fluoroforem

$$dn^*/dt = -n^* \Gamma + f(t)$$

n^* je počet excitovaných částic, t je čas, Γ je rychlostní konstanta emise fluorescence, $f(t)$ je časová jednotka (čas excitace)

- jestliže k excitaci dojde v čase $t = 0$, pak:

$$dn^*/dt = -n^* \Gamma$$

pro počet excitovaných molekul lze rovnici zapsat takto:

$$n^*(t) = n^*(0) \exp \Gamma t$$

jestliže:

$$\tau = \Gamma^{-1}$$

pak:

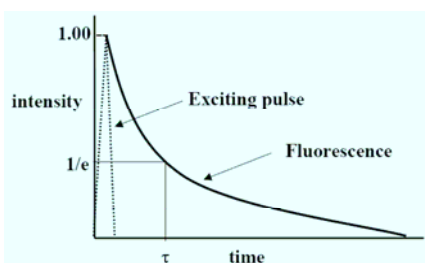
$$n^*(t)/n^*(0) = e^{-t/\tau}$$

τ je tedy čas, kdy 1/e molekul (36.8%) je v základním stavu

Čas života luminiscence

křivka vyhasínání má pro stejné „species“ exponenciální průběh

$$n^*(t)/n^*(0) = e^{-t/\tau}$$



Čas života

- čas života excitované molekuly lze spočítat, ale zpravidla to neodpovídá naměřenému τ ...
- na molekulu v excitovaném stavu působí okolní molekuly (Franc-Condonův princip)
- příklad teoretického výpočtu podle Stickler-Bergovy rovnice:

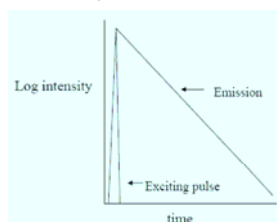
$$\tau_m^{-1} = 2.88 \times 10^{-9} n^2 \langle \nu_f^{-3} \rangle \int \epsilon(\bar{\nu}) d\ln \bar{\nu}$$

$$\langle \nu_f^{-3} \rangle = \frac{\int F(\bar{\nu}) d\nu}{\int F(\bar{\nu}) \nu^{-3} d\nu}$$

Vyhasínání luminiscence

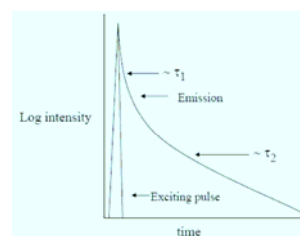
- počet excitovaných částic je úměrný intenzitě luminiscence:

$$I_t = \alpha e^{-t/\tau}$$



Vyhasínání luminiscence

- jestliže je v systému více komponent („species“), které po excitaci za daných podmínek vykazují luminiscenci, potom má výsledná křivka multiexponenciální charakter



Výtěžek luminiscence

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

k_f rychlost emisního procesu (fluorescence)

k_i rychlost nezáživých přechodů (teplo, relaxace...)

k_x rychlost mezikryštalových přechodů

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

- kvantový výtěžek:

$$\phi_k = N_{emf}/N_{abs} = I_{emf}/I_{abs} = I_{emf}/(I_0 - I)$$

$\phi_e < \phi_k$ (Stokesův posun)

- energetický výtěžek:

$$\phi_e = E_{emf}/E_{abs} = h\nu_{emf}/h\nu_{ex}$$

Pure & Appl. Chem., Vol. 60, No. 7, pp. 1107-1114, 1988.
Printed in Great Britain.
© 1988 IUPAC

INTERNATIONAL UNION OF PURE
AND APPLIED CHEMISTRY
ORGANIC CHEMISTRY DIVISION
COMMISSION ON PHOTOCHEMISTRY*

REFERENCE MATERIALS FOR FLUORESCENCE MEASUREMENT

Prepared for publication by
DAVID F. EATON

E. I. du Pont de Nemours & Co., C. R. & D. Experimental Station,
Bldg. 328, Wilmington, DE 19898, USA

Stanovení kvantového výtěžku

1) absolutní stanovení (primární metody)

- chemický aktinometr
- kalorimetrie
- kalibrované zdroje záření, korekce spekter, atd.

2) relativní stanovení (sekundární metody)

- srovnání s fluorescenčním standardem

Stanovení kvantového výtěžku

Chemický aktinometr

- roztok šřavelanu železitého absorbuje všechno záření o vlnové délce menší než 490nm
- absorbované záření se velkou účinností redukuje Fe(III) na Fe(II)
- titračně lze určit kolik Fe(III) se přeměnilo na Fe(II) a následně spočítat kolik fotonů prošlo systémem
- uspořádání chemického aktinometru pro určení kvantového výtěžku: kvjeta se vzorkem je obklopena aktinometrickým roztokem, kromě malého okénka, které propustí do vzorku excitační záření. Emitované záření je pak zachyceno do aktinometrického roztoku.

TABLE I. Recommended Fluorescence Quantum Yield References in Various Emission Ranges.[†]

| Region | Compound | Solvent | Φ_f | Ref. |
|------------|-------------------------|--------------------------------------|-----------|------|
| 270-300 nm | Benzene | Cyclohexane | 0.05±0.02 | a |
| 300-380 nm | Tryptophan* | H ₂ O (pH 7.2) | 0.14±0.02 | b |
| 300-400 nm | Naphthalene | Cyclohexane | 0.23±0.02 | c |
| 315-480 nm | 2-Aminopyridine | 0.1 N H ₂ SO ₄ | 0.60±0.05 | d |
| 380-480 nm | Anthracene | Ethanol | 0.27±0.03 | a,e |
| 400-500 nm | 9,10-Diphenylanthracene | Cyclohexane | 0.90±0.02 | f, g |
| 400-600 nm | Quinine Bisulfate | 1 N H ₂ SO ₄ | 0.546 | e, g |
| 600-650 nm | Rhodamine 101 | Ethanol | 1.0±0.02 | h |
| 600-650 nm | Cresyl Violet | Methanol | 0.54±0.03 | i |

Stanovení kvantového výtěžku

$$\text{kvantový výtěžek: } \Phi_k = N_{\text{em}}/N_{\text{abs}}$$

- pro stanovení kvantových výtěžků používáme **fluorescenční standardy** (tj. látky s definovaným kvantovým výtěžkem)
- potřebujeme znát molární absorpční koeficienty (nebo hodnoty absorpční při stejné koncentraci) stanovené látky i standardu pro vlnovou délku excitačního záření
- změříme a porovnáme plochy (F) emisních spekter

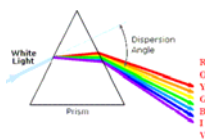
$$\Phi_x = \Phi_{\text{st}} \frac{F_x}{F_{\text{st}}} \times \frac{\epsilon_{\text{st}}}{\epsilon_x}$$

Stanovení kvantového výtěžku - problémy

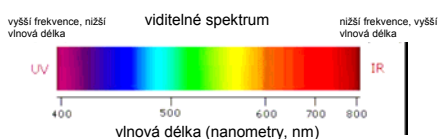
- vnitřně filtrační efekt (samoabsorpce)
- různá citlivost detektoru pro různé vlnové délky
- proměnlivá intenzita excitačního zdroje
- korekce na refrakční index
- polarizační efekt
- nečistoty ve standardech
- rozptyly (Raman, Tyndal)

Trocha historie...

Isaac Newton



1672: bílé světlo lze průchodem přes hranol rozložit na jednotlivé barvy...



Další významné objevy a teorie

Christian Huygens (1692):
světlo je vlnění, vlnová teorie

Hans Christian Oersted (1820):
světelné vlnění má elektrickou a magnetickou složku

Michael Faraday (1831):
rozsířil Oerstedovu teorii – změnou magnetické složky vyvoláme změnu elektrické složky světla

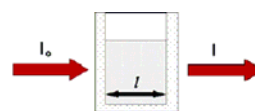
James Clark Maxwell

„Dynamická teorie elektromagnetického pole“ (1865)
Ve své teorii navázal na Newtona, Younga, Foucaulta, Oersteda a Faradaye...

Světlo je elektromagnetické vlnění. Elektrická a magnetická složka jsou kolmé na směr šíření světla.

Světelné vlnění je charakterizováno vlnovou délkou, frekvencí, rychlostí, amplitudou atd.

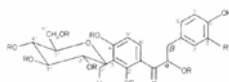
Lambert Beerův zákon



$$A = \log I_0 / I = \epsilon c l$$

Historie fluorescence

Pravděpodobně první zmínka o luminiscenci pochází od španělského lékaře a botanika **Nicolase Monardese** (1577) – zabýval se výzkumem rostlin objevených v Americe a jejich použitím v medicíně. Zaujalo ho namodralá *opalescence* vody, ve které bylo vyvařeno dřevo stromu objeveného v Mexiku (tehdy nazývaného Lignum nephriticum, používaného v XVI-XVII. století k léčení ledvinových potíží). Pravděpodobně se jednalo o dřevo ze stromu *Eynsehardtia polystachia* a fluoreskujícími látkami mohla být směs derivátů **glucosyl-hydroxichalconu**.



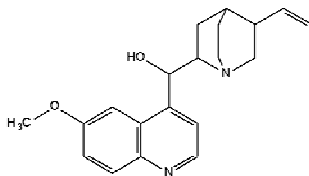
H: X = O, R = H, R' = H
 H: X = O, R = H, R' = OH
 E: X = O, R = Ac, R' = H
 M: X = O, R = Ac, R' = OAc
 Z: X = H₂O, R = Ac, R' = OAc

Historie fluorescence

Robert Boyle (1664) - opakoval **Monardesovy** pokusy a navrhl, že za modré zabarvení je zodpovědná **esenciální síť**, kterou je možné několikanásobnou extrakcí ze dřeva získat. Zjistil také, že po přidání kyseliny do extraktu fluorescence zmizí a po dodání zásady se zase objeví. Nevědomky tak objevil **první fluorescenční pH indikátor...**

Galileo (1612) – popsal fosforescenci tzv. Boloňského kamene.

John Herschel (1845) – pozoroval fluorescenci chininu. Jev nazval epipolická disperze...



George Stokes

Stokes (1819-1903) zavedl pojem *fluorescence* (nahradil jím termín *disperzní odraz*). Název fluorescence pochází od minerálu obsahujícího prvek fluor. Zjistil, že po ozáření UV světlem dochází u některých látek k emisi viditelného světla („...zviditelnění temnoty...“). Dalšími pokusy potvrdil, že po absorpci světla o nižší vlnové délce dochází k emisi světla o vyšší vlnové délce. Tento rozdíl dnes nazýváme **Stokesův posun**.

Další důležité objevy

Adolf von Beyer (1871) – německý chemik, který poprvé připravil sloučeninu *fluorescein*

R. Meyer (1897) – ustavil termín *fluorofor* pro skupinu, která v molekule zodpovědná za fluorescenci (chromofor – skupina zodpovědná za barevnost molekuly- Witt1876).

K. Noack (1887) – uveřejnil seznam 660 látek, u kterých byla pozorována fluorescence, seřazených podle barvy jejich fluorescence.

První teorie

První teorie o vzniku a vlastnostech fluorescence a fosforescence vznikly ve 20. a 30. letech minulého století...

- teorie luminiscenčních center (A. Jablonski)
- kvantový výtěžek a základní postuláty (S. I. Vavilov)
- vyhasínání luminiscence (Gaviola)
- polarizace fluorescence (Weigert, F.Perrin)
- FRET (F. a J. Perrin, Förster)

Moderní objevy

Gregorio Weber (1952) – syntéza dansyl chloridu a jeho použití při kvantifikaci proteinů (začátek rozšíření fluorescenční spektroskopie v biologii a biochemii)

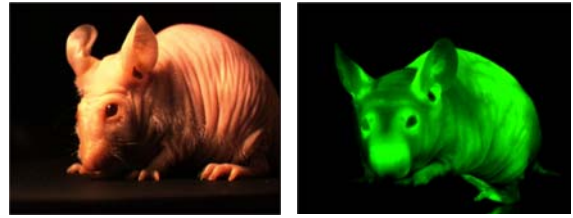
Shimomura, Saiga a Johnson (1962) – objev zeleně fluoreskujícího proteinu v medúze *Aequorea*

Dnes...

Fluorescence Spectroscopy for Characterization and Differentiation of Beers

Ewa Sikorska^{1a}, Tomasz Górecki², Igor V. Khmelinskii³,
Marek Sikorski⁴ and Denis De Keuleleire⁵
J. Inst. Brew. 110(4), 267-275, 2004

Green Fluorescent Pig...



Zeleně fluoreskující laboratorní myš – normálně (vlevo), po ozáření modrým světlem

