

Použití luminiscenční spektroskopie v analytické chemii

Luminiscenční analýza

Kvantitativní analýza:

$$F = k \phi \Phi_0 2.3 c / \epsilon$$

Vysoká citlivost metody:

- použití laserů
- odezva na relativně malé změny v okolí

Luminiscenční stanovení

- nativní luminiscence
- tvorba luminiscenčních komplexů
- luminiscenční značky
- luminiscenční sondy
- propojení s dalšími metodami

Vnitřní a vnější luminiscence

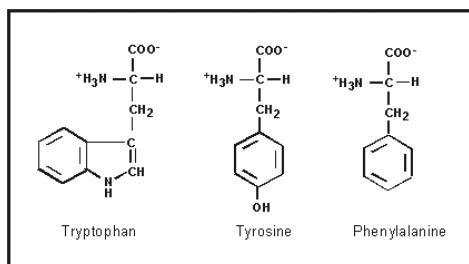
- vnitřní/*intrinsic* (nativní luminiscence) – molekuly lze stanovit bez výrazného zásahu do sledovaného systému, zpravidla aromatické látky
- vnější/*extrinsic* luminiscence – do sledovaného systému přidáme fluoreskující činidlo (barvivo), jehož fluorescence bude závislá na koncentraci analytu, případně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

Nativní luminiscence

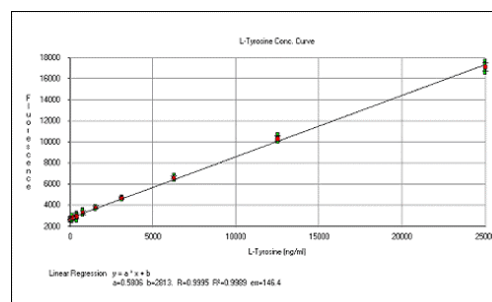
Class	Compounds*
aromatic amino acids	phenylalanine (F) tyrosine (F) tryptophan (F, P)
vitamins	vitamin A (F) vitamin B ₂ (F) vitamin B ₆ (F) vitamin B ₁₂ (F) vitamin E (F) folic acid (F)
catecholamines	dopamine (F) norepinephrine (F)
pharmaceuticals and drugs	quinine (F) salicylic acid (F, P) morphine (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)

sloučenina	λ_{ex}^{max} (nm)	λ_{em}^{max} (nm)
indole group	270-290	330-350
LSD	325	365
quinine	347	448
papaverine	315	347
berberine	352 a 432	548
caffeine	270	303
purine	265	380
adenosine	272	390
cytosine	267	313
uracil	258	309
3-hydroxocoumarin	316	372
riboflavin	370 a 440	565
GFP	400 a 475	510
nicotinamids	470	515
cyanocobalamin	275	305
calciferol	348	420
retinol	325	470

Peptidy, proteiny, AK

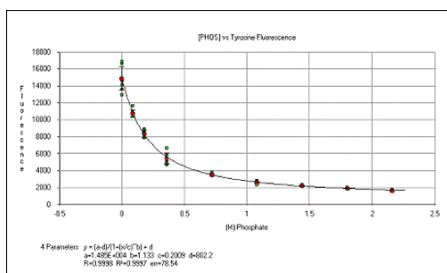


Stanovení aminokyselin



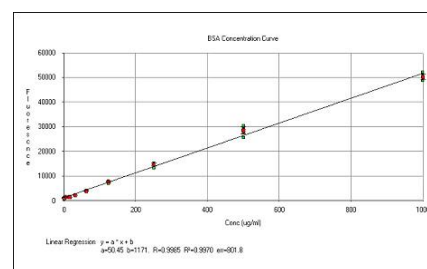
www.biotek.com

Stanovení aminokyselin



www.biotek.com

Stanovení proteinů



www.biotek.com

Nativní fluorescence proteinů – vliv polarity okolního prostředí

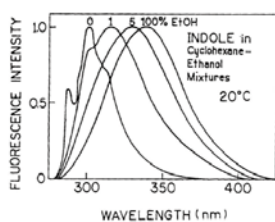
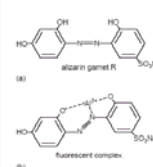


Figure 16.5. Emission spectra of indole in cyclohexane, ethanol, and their mixtures at 20 °C. From Ref. 23.

Stanovení anorganických iontů

Komplexující činidlo	Iont kovu
8-hydroxychinolin	Al ³⁺ , Be ²⁺ , Zn ²⁺ , Li ⁺ , Mg ²⁺ a další
Flavonal	Zr ²⁺ , Sn ⁴⁺
2-(o-hydroxyfenyl) benzoaxazol	Cd ²⁺
1,10 - fenntrolin	Ln ³⁺
Různá azobarviva	Al ³⁺ , Be ²⁺ , In ³⁺ , Hf(IV), Th(IV), Sc ³⁺ , Ca ²⁺ , Mg ²⁺ , Sn(IV), Y ³⁺
Benzoín	B ₄ O ₇ ²⁻ , Zn ²⁺



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.

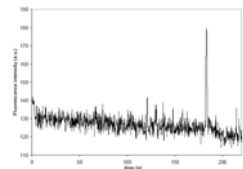
Derivatizace fluoroforem

Vnitřní (nativní) x vnější luminiscence

luminiscenční značky a sondy

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

Omezení: lze detekovat i jednotlivé molekuly („single molecule detection“) obsahující silné luminofory, problém je jejich navázání na analyt...



Rhodamin B ($c = 1 \times 10^{-12} \text{ mol.l}^{-1}$)

Výběr fluorescenčních značek

kritéria pro výběr:

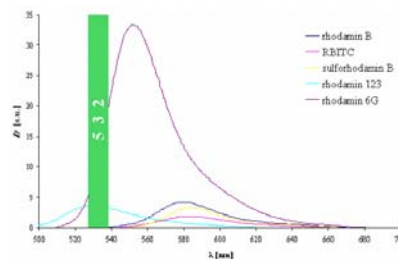
spektrální vlastnosti (excitace, emise, kvantový výtěžek atd.)

vazebné místo ($-\text{NH}_2$, $-\text{SH}$ skupina a další)

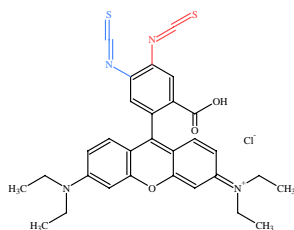
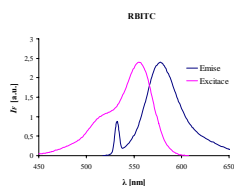
podmínky reakce (pH, koncentrace...)

hydrofobicita

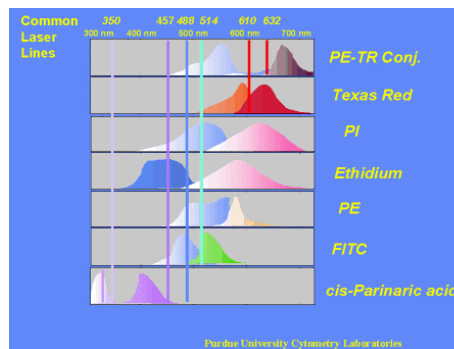
Výběr luminiscenčního barviva – spektrální vlastnosti



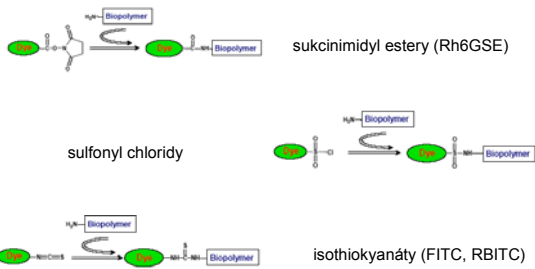
Výběr luminiscenčního barviva – spektrální vlastnosti



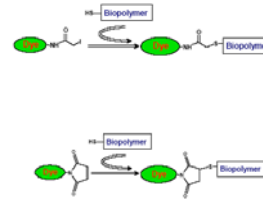
Výběr fluorescenčních barviv



Fluorescenční značky – vazebná místa amino-reaktivní značky



Fluorescenční značky – vazebná místa thiol-reaktivní značky



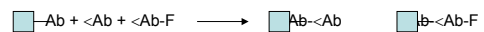
Fluorescenční metody v imunoanalýze

Imunoanalytické metody:

- dříve hlavně tvorba precipitátů
- dnes značené hlavně různým způsobem značené reaktanty (antigeny a protilátky)
- radiometricky, enzymaticky, fluorescenčně (luminiscenčně) značené reaktanty
- enzymové metody mohou mít luminiscenční detekci

Fluorescenční imunoanalýza (FIA)

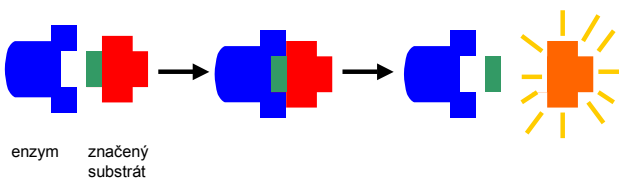
- poprvé použity v roce 1964
- často ovlivněna fluorescencí matrice a samotného vzorku
- může být použita i TR-FIA (Time Resolved Fluorescence Immuno Assay). Tato metoda využívá jako značek chelátů s lanthanitých kationtů (Eu^{3+} , Tb^{3+} , Sm^{3+} a dalších)
- FIA lze provádět v homogenním i heterogenním 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 navázan vazbou, kterou štěpí stanovovaný enzym.

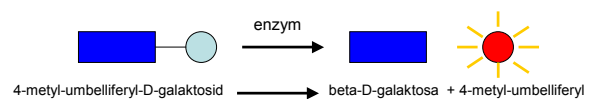


Fluorimetrická EIA

- 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:

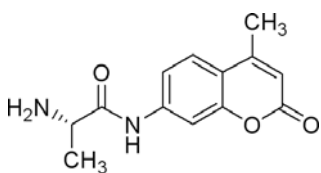


Dělení fluorescenční imunoanalytických metod

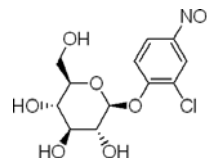
- Fluorescence Immuno Assay (FIA)
- Fluorescence Polarization Immuno Assay (FPIA)
- Time Resolved Fluorescence Immuno Assay (TR-FIA)
- Elektroluminiscenční, chemiluminiscence a další
- Enzymatické metody s luminiscenční detekcí

Radiometrická vs. fluorescenční detekce v imunoanalýze

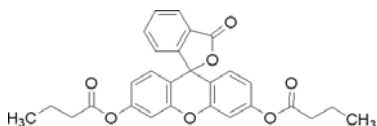
- dříve byla nejcitlivější metodou RIA, ale s příchodem levných laserů je rozšířenější luminiscenční detekce
- detekční limity obou metod jsou srovnatelné (až 10^{-12} g.l⁻¹), ale luminiscenční detekce je bezpečnější a levnější



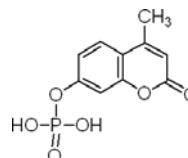
L-Alanine 7-amido-4-methylcoumarin: fluorogenní substrát pro stanovení Aminopeptidáz



2-Chloro-4-nitrophenyl-β-D-glucopyranoside: fluorogenní substrát pro stanovení β-Glucosidase



Fluorescein dibutyrate: fluorogenní substrát pro stanovení esteráz a lipáz



4-Methylumbelliferyl phosphate: fluorogenní substrát pro stanovení fosfatázy

Fluorogenní substráty

