

Спектроскопија базирана на емисија

Луминисценција (lat. *lumen* - светлост) е заеднички термин за појави на емисија на електромагнетно зрачење (UV/VIS, IR) на атоми и молекули при премин од возбудена (ексцитирана), во основна состојба. При тоа, не настанува ослободување на топлина – т.н. ладна светлина.

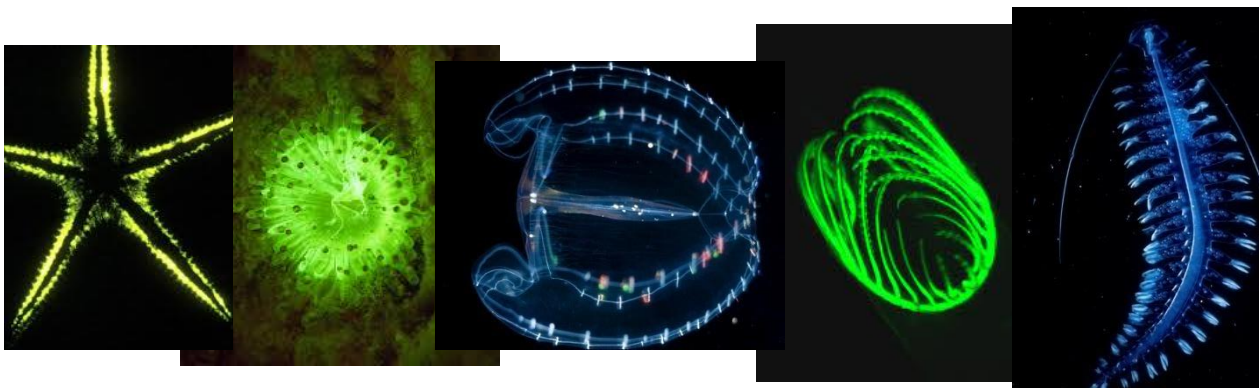
Ослободување фотон по термичката ексцитација е наречено емисија, а **ослободувањето на фотон по апсорпција е наречено фотолуминесценција**.

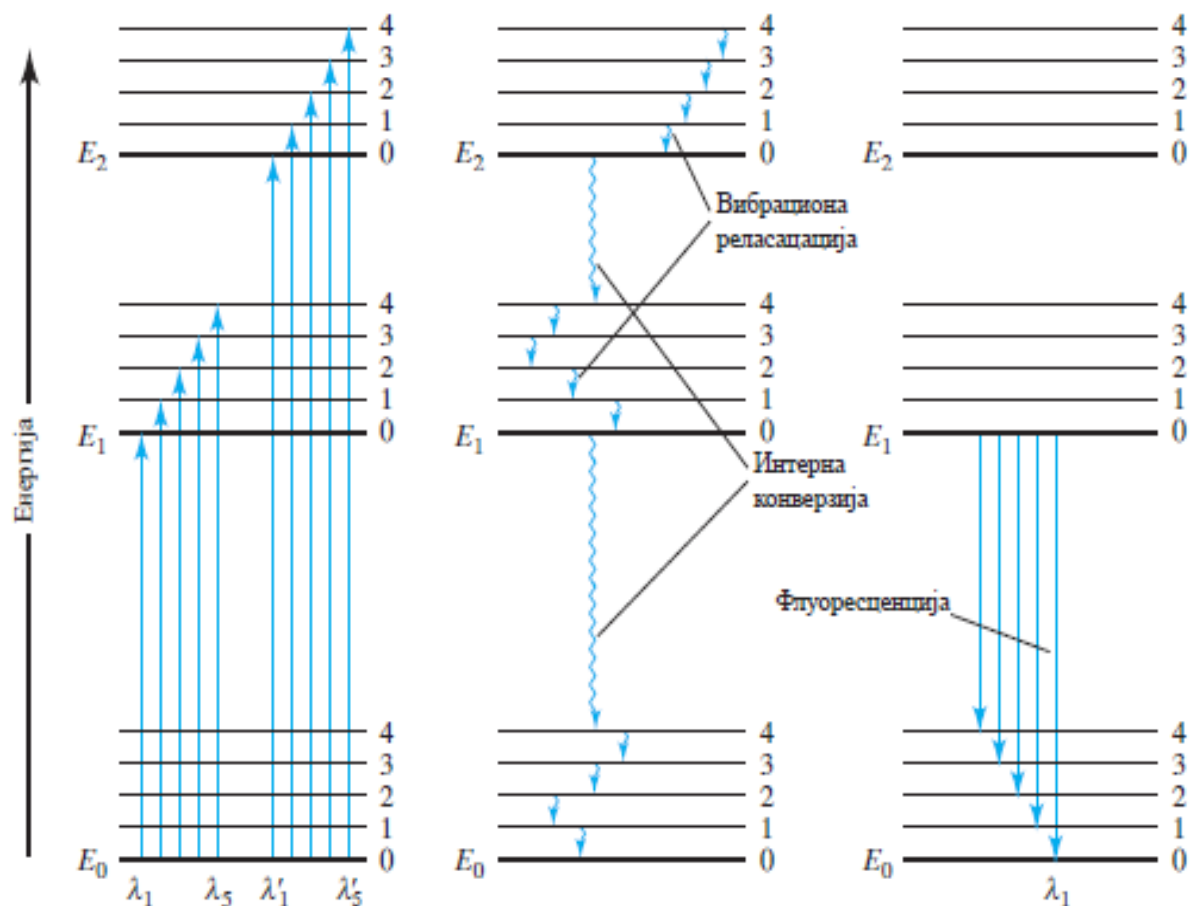
Во **хемилуминесценцијата** и во **биолуминесценцијата**, ексцитацијата настанува како резултат на хемиски, односно биохемиски реакции.

Според траењето на ефектот, се дели на:

флуоресценција- трае само додека има взаеMODEЈСТВО со побудувачот

фосфоресценција- трае и по престанокот на интеракцијата





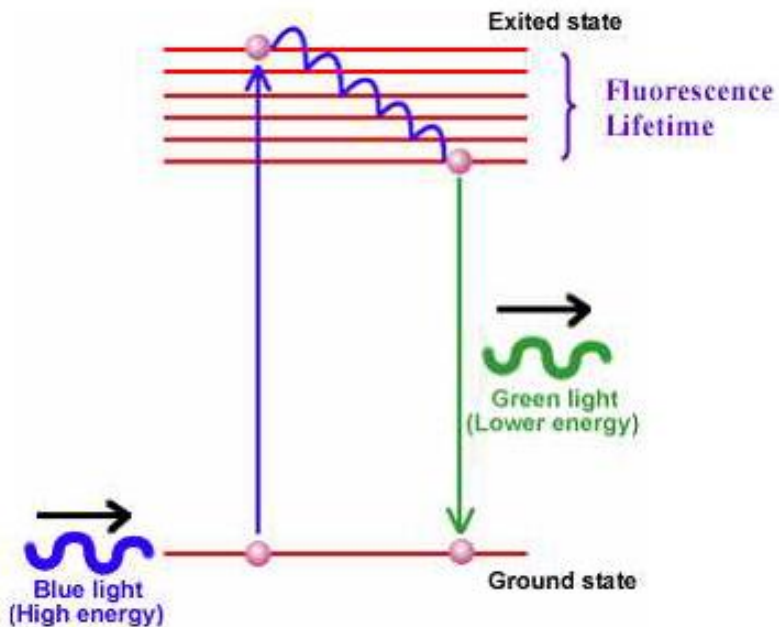
(а) Молекуларна апсорпција (б) Релаксација без емитување на зрачење (в) Флуоресценција

Слика 23-12. Дијаграм на енергетски нивои кој покажува процеси до кои доаѓа за време на (а) апсорпција на упадното зрачење, (б) нерадијантна релаксација, и (в) флуоресцентна емисија од молекули. До апсорпција обично доаѓа за 10^{-15} s, додека вибрациона релаксација се јавува за 10^{-10} до 10^{-11} s од временската скала. Внатрешната конверзија помеѓу различните енергетски состојби е исто така многу брза (10^{-12} s), додека времето на траењето на флуоресценцијата е обично од 10^{-5} до 10^{-10} s.

ФЛУОРЕСЦЕНЦИЈА

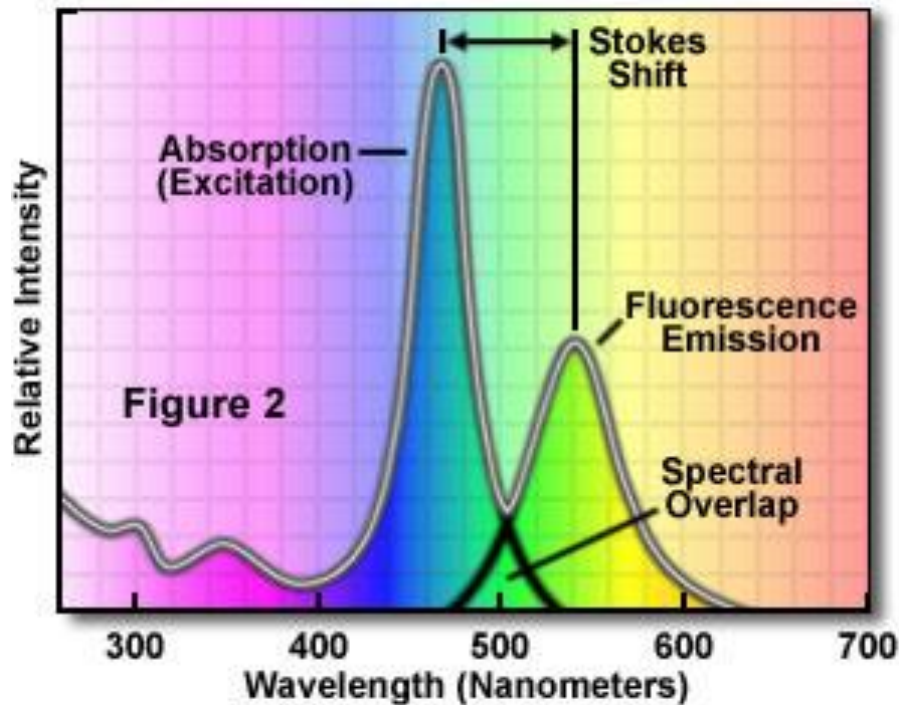
Флуоресценцијата се јавува кога молекулата од најниското вибрационно енергетско ниво на една ексцитирана електронска состојба се враќа во пониска електронска енергетска состојба со емитирање на фотон.

Дијаграм на Јаблонски



Квантитативен израз за ефикасноста на флуоресценцијата е **квантен принос**, Φ_f , кој одговара на делот од ексцитираните молекули коишто се враќаат во основна состојба со флуоресценција. Вредноста на квантниот принос се движи од 1, кога секоја молекула од ексцитирана состојба се релаксира преку флуоресценција, до 0, кога флуоресценцијата воопшто не учествува во релаксацијата.

Стоксово поместување



Со флуоресценција молекулата се враќа од најниското ексцитирано вибрационо енергетско ниво во основна електронска состојба – флуоресценцијата се јавува во широк интервал на бранови должини.

Промената на енергијата за флуоресцентна емисија е, општо земено, помала од онаа за апсорпција - **молекулскиот флуоресцентен спектар е поместен кон повисоки бранови бранови должини во споредба со апсорпциониот спектар.**

Познати ли се такви молекули?

CRIME SCENE CHEMISTRY - LUMINOL

What triggers luminol's chemiluminescence?



BLOOD



BLEACH



FAECES

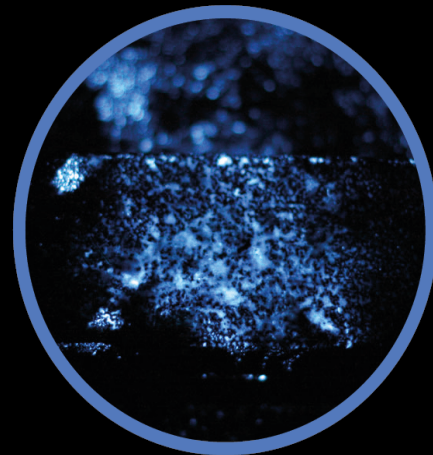
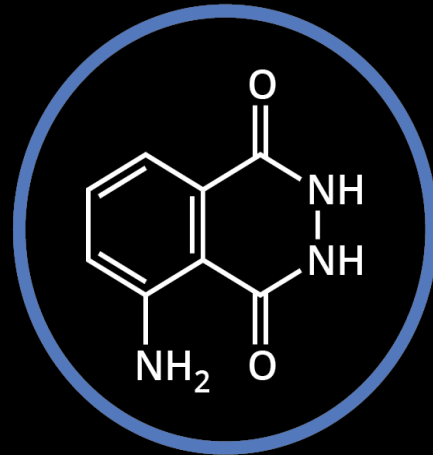


URINE

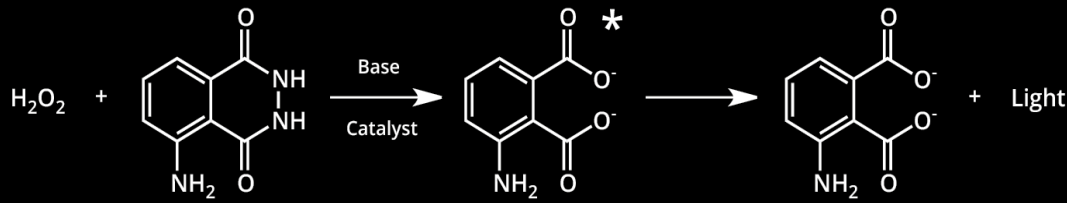


HORSERADISH

The reaction that triggers luminol's chemiluminescence has to be catalysed. The iron in blood can carry out this role, but luminol can also be oxidised by bleach to achieve the same effect. Enzymes in faeces and horseradish can also help trigger the reaction.



How luminol reacts to produce light



Luminol solution also contains an oxidising agent, such as hydrogen peroxide, and a base. In the presence of a catalyst, the reaction produces energy, promoting electrons in the product to higher energy levels, before they fall back down and release their excess energy as light.

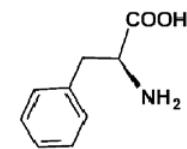
Кои молекули се флуоресцентни?

Флуоресценцијата - кај молекули за кои најниската енергетска апсорпција е $\pi \rightarrow \pi^*$ преминот.

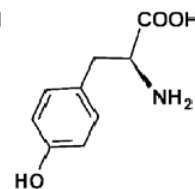
- Нехетероциклични ароматични соединенија,
- Супституцијата во ароматичниот прстен има ефект врз Φ_f :
 - Присуството на електрон-акцепторни групи (NO_2) ја намалува вредноста на Φ_f ,
 - Внесувањето на електрон-донорни групи (OH) ја зголемува вредноста на Φ_f .

Флуоресценцијата расте за ароматични прстенести системи и за ароматични молекули со планарна структура.

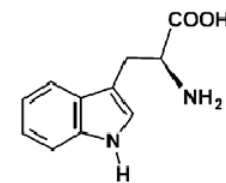
Endogenous Fluorophores	Excitation Max. (nm)	Emission Max. (nm)
<u>Amino acids:</u>		
Tryptophan	280	350
Tyrosine	275	300
Phenylalanine	260	280
<u>Structural Proteins:</u>		
Collagen	325,360	400,405
Elastin	290,325	340,400
<u>Enzymes and Coenzymes:</u>		
flavin adenine dinucleotide	450	535
reduced nicotinamide dinucleotide	290,351	440,460
phosphate	336	464
<u>Vitamins:</u>		
Vitamins A	327	510
Vitamins K	335	480
Vitamins D	390	480
<u>Vitamins B₆ compounds:</u>		
Pyridoxine	332,340	400
Pyridoxamine	335	400
Pyridoxal	330	385
Pyridoxic acid	315	425
Pyridoxal phosphate	5'-330	400
Vitamin B ₁₂	275	305
<u>Lipids:</u>		
Phospholipids	436	540,560
Lipofuscin	340-395	540, 430-460
Ceroid	340-395	430-460, 540
Porphyrins	400-450	630,690



phenylalanine

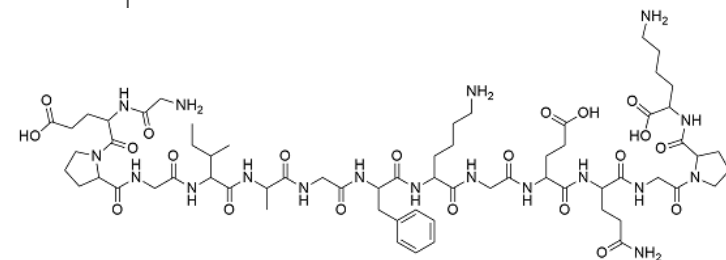


tyrosine



tryptophan

Внатрешни **ФЛУОРО**фори



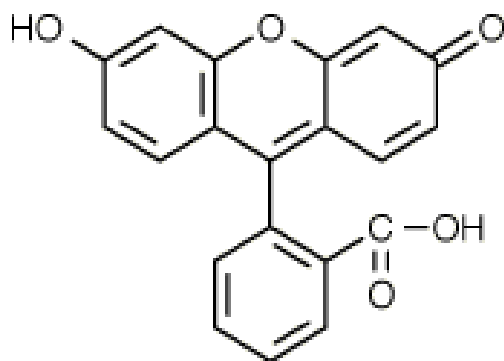
Type II-Collagen

ФЛУОРОФОРИ (аналогно на хромофори)

Флуоресцентни органски соединенија

- Ароматични
- Најниско ексцитирано ниво е $\pi \rightarrow \pi^*$
- Кондензирани прстени
- Планарна структура

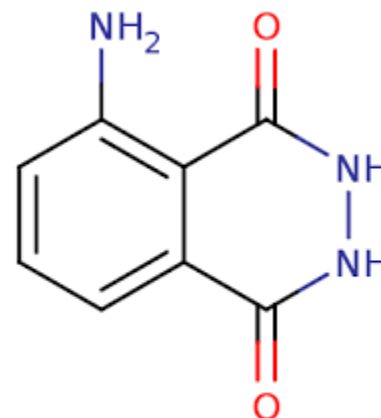
Надворешни флуорофори



флуоресцеин



Етидиум бромид



Луминол

Некои примери на органски соединенија од биохемиска и фармацевтска важност, како и од важност за животната средина, коишто покажуваат природна флуоресценција и фосфоресценција

Класа	Соединенија
ароматични аминокиселини	фенилаланин (F) тирозин (F) триптофан (F, P)
витамини	витамин А (F) витамин В ₂ (F) витамин В ₆ (F) витамин В ₁₂ (F) витамин Е (F) фолна киселина (F)
катехоламини	допамин норепинефрин (F)
фармацевтски препарати и лекови	хинин (F) салицилна киселина (F, P) морфиум (F) барбитурати LSD (F) кодеин (P) кофеин (P) сулфаниламид (P)
загадувачи на животната средина	полициклични ароматични јаглеводороди: пирен (F) бензо[а]пирен (F) органофосфорни пестициди (F) карбаматни инсектициди (F) ДДТ (P)

Интензитетот на флуоресценцијата, I_f , е пропорционален на количеството зрачење од изворот на екситација, што е апсорбирано, и квантниот принос на флуоресценцијата

$$I_f = k\Phi_f(P_0 - P_T)$$

каде што k е константа поврзана со ефикасноста на собирањето и на детекцијата на флуоресцентната емисија.

Од Беровиот закон е познато дека: $\frac{P_T}{P_0} = 10^{-\epsilon lc}$

каде што c е концентрација на флуоресцентните хемиски видови. Решавањето на равенката за P_T и замената во првата равенка дава, по упростувањето,

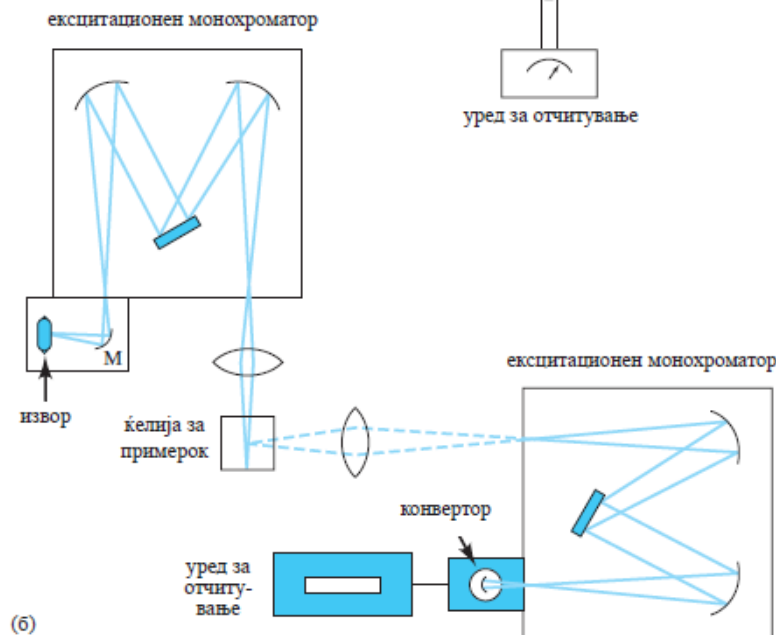
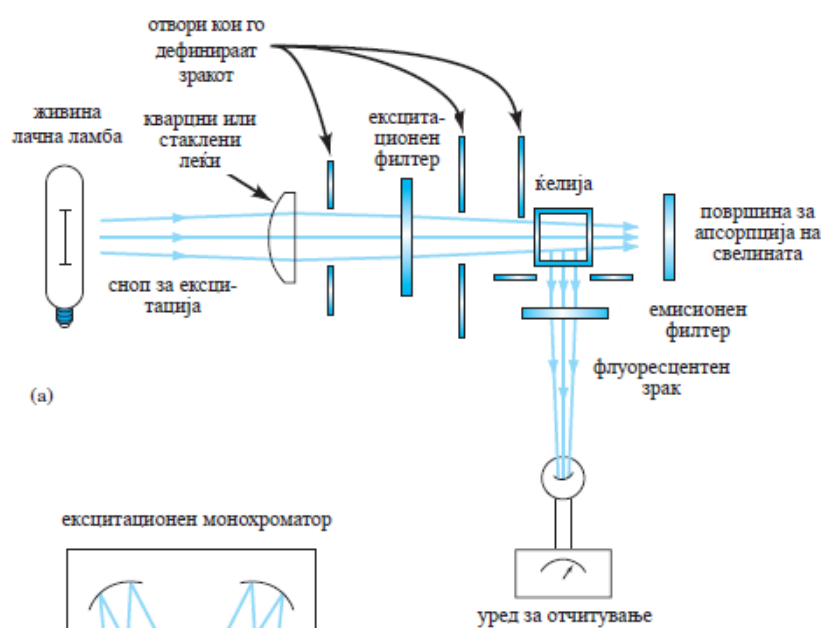
$$I_f = k\Phi_f P_0 (1 - 10^{-\epsilon lc})$$

За ниски концентрации на флуоресцентни видови, кога ϵbc е помало од 0,01, равенката може понатаму да се упрости до

$$I_f = 2,303k\Phi_f P_0 \epsilon lc$$

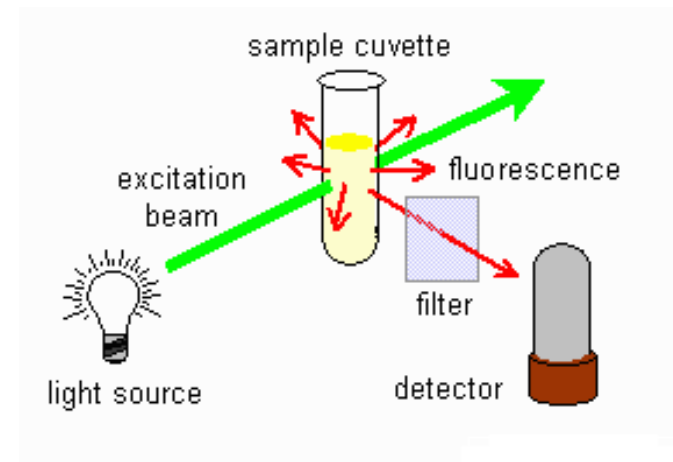
Така, интензитетот на флуоресценцијата е пропорционален со квантната ефикасност, со енергијата на изворот на екситацијата, со моларниот апсорпционен коефициент и концентрацијата на флуоресцентните хемиски видови. Ако константите се вклучат во заедничка константа:

$$I_f = K' P_0 c$$



Слика 23-14. Типичен флуоресцентен инструмент. Во (а) е даден флуорометар со филтер. Треба да се напомене дека емисијата се мери под прав агол во однос на лачната живина ламба како извор. Флуоресцентното зрачење се емитира во сите насоки, а геометријата од 90° овозможува да се избегне упадното зрачење од изворот да оди на детекторот. Спектрофлуорометарот (б) има две решеткасти монохроматори и исто така емисијата се регистрира под прав агол. Двата монохроматори овозможуваат скенирање на експитационите спектри (експитационите бранови должини скенирани при фиксна емисиона бранова должина), емисионите спектри (емисиона бранова должина скенирана при фиксна експитациона бранова должина) или синхрони спектри (скенирани со фиксна бранова должина или заостанување помеѓу двете бранови должини на двата монохроматори).

Молекулска флуоресценција



флуорометар

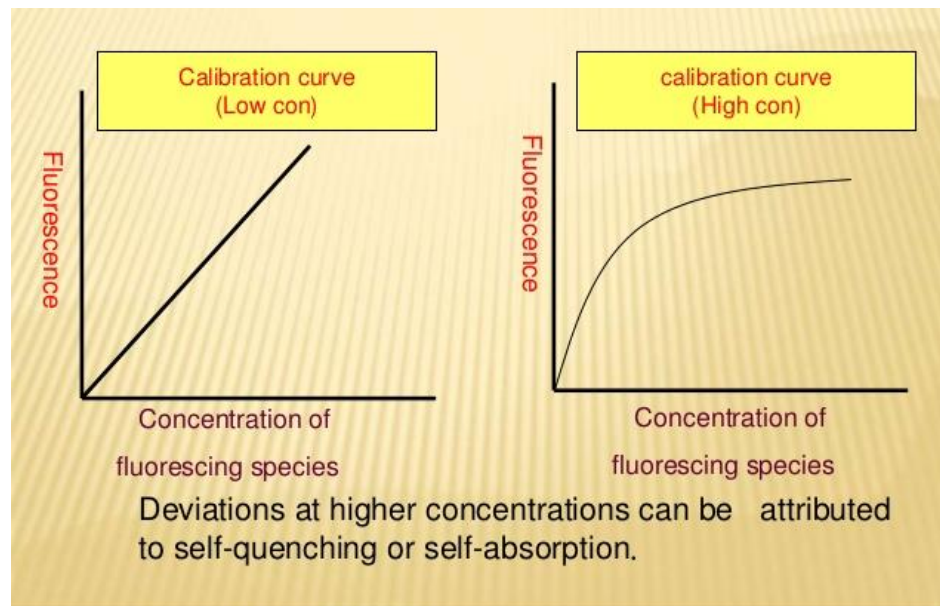
Инструмент за мерење на флуоресценцијата, со филтер за избор на експитациона и емисиона бранова должина.

спектрофлуорометар

Инструмент за мерење на флуоресценцијата, со монохроматор за избор на експитациона и емисиона бранова должина.

Компоненти

Извор	живина/ксенонова лампа
Примарен монохроматор	призма/решетка
Кивета	кварцна
Секундарен монохром.	Детектира емитирана светлина
Детектор	



Интензитетот на флуоресценцијата е пропорционална на концентрацијата, важи за разредени раствори и само во линеарниот дел од кривата (беров закон)

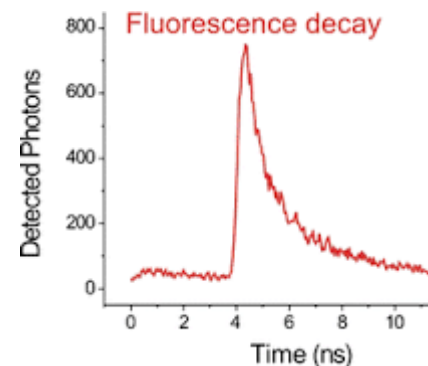
- Стандардизација се врши со серија надворешни стандарди.
- Калибрационите криви се линеарни најмногу до 4-6 реда на големина за флуоресценција и 2-4 реда на големина за фосфоресценција. Калибрационите криви стануваат нелинеарни за високи концентрации на фотолуминесцентните хемиски видови,
- Нелинеарност може да се појави и при ниски концентрации, доколку се присутни флуоресцентни или фосфоресцентни контаминанти.
- квантната ефикасност за емисијата зависи од температурата и од матрицата на примерокот, се контролираат со примена на надворешни стандарди.
- интензитетот на емисијата зависи од моларниот апсорпционен коефициент на фотолуминесцентните хемиски видови, што, од своја страна, зависи од матрицата

Квантитативни примени на молекулската флуоресценција

Директна квантитативна анализа - квантниот принос за флуоресценција на анализот е доволно висок.

Индириктната анализа кога анализот не покажува флуоресценција, или кога квантниот принос за флуоресценција или за фосфоресценција е мал.

- ✓ третманот на анализот со реагенс (флуоресцентен) кој дава производ со флуоресцентни карактеристики.
- ✓ намалувањето на флуоресценцијата кога анализот ќе се додаде на раствор што содржи флуоресцентни молекули. Намалувањето на флуоресценцијата т.е quenching се забележува кога реакцијата меѓу молекулите на анализот и флуоресцентите молекули ја зголемува релаксацијата без емитурање на зрачење, или дава нефлуоресцентен производ.



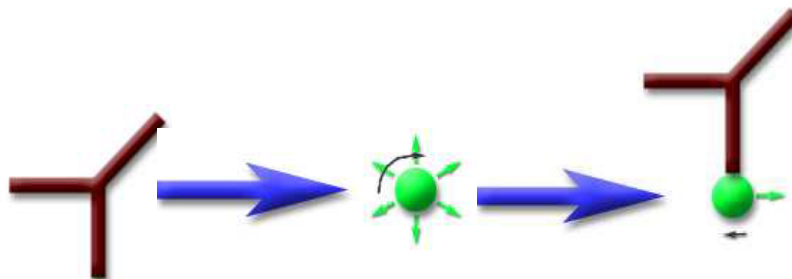
Фактори што влијаат на флуоресценцијата

- | | |
|------------------|---|
| ➤ Концентрација: | Разредени раствори |
| ➤ pH: | Влијае на нето полнежот на молекулата |
| ➤ Температура: | $> T$, повеќе судири – помала флуоресценција |
| ➤ Вискозност: | Висока вискозност – висока флуоресценција |
| ➤ Интерференти: | Намалуваат флуоресценција |
| ➤ Квенчери: | Супстанции кои ја прекинуваат реакцијата |

Флуоресцентно маркирање – оптичка детекција на биолошки структури

Флуоресцентно обележани (маркирани) протеини, нуклеински киселини, мембрани...

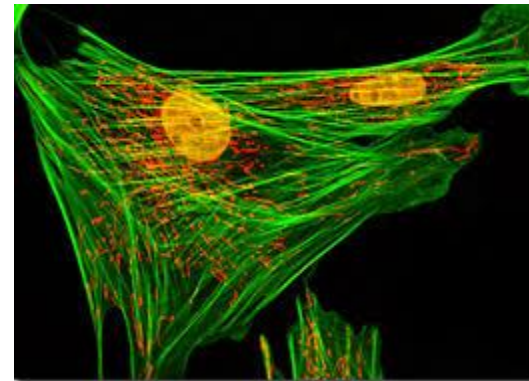
- *In situ* методи на молекуларна биологија
- Структури на протеини
- Интеракции протеин-антитело
- Динамика и структура на мембрана
- Пермеабилност и транспорт на јони низ мембрана
- Динамика на липидите во мембраните
- Динамика и структура на нуклеински киселини...
- ГЕНЕТИКА, ОНКОЛОГИЈА...



нефлуоресцентна
молекула

флуоресцентна
молекула

маркирната молекула
станува флуоресцентна

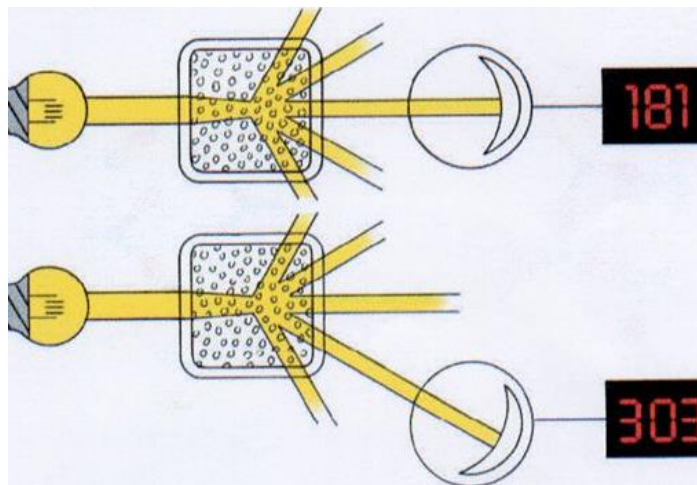


ТУРБИДИМЕТРИЈА/НЕФАЛОМЕТРИЈА

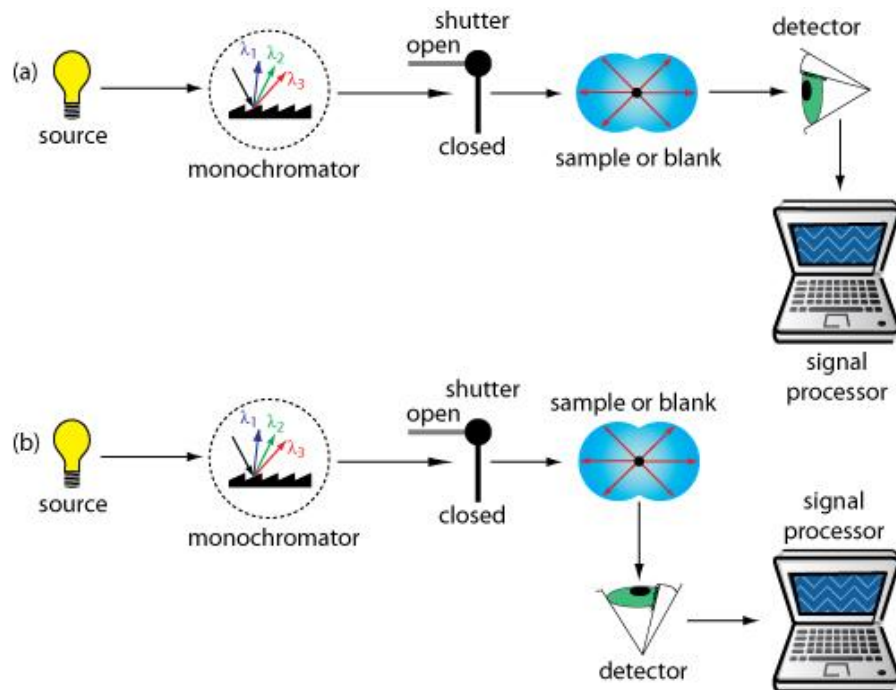


Турбидиметрија и **нефалометрија** се две техники што се базираат на еластичното расејување на електромагнетното зрачење од суспендирани или колоидни честички во раствор.

Турбидиметрија - детекторот е во линија со изворот и се мери намалувањето на моќноста на изворот.



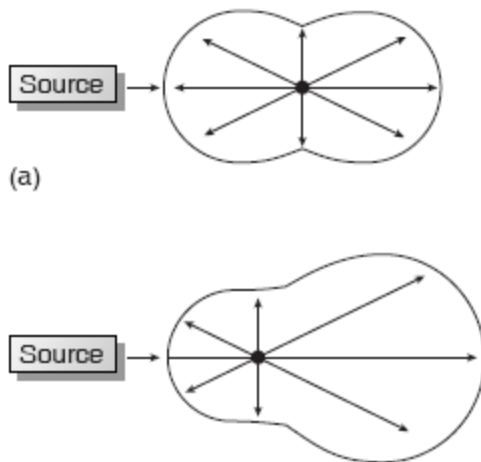
Нефалометрија – ја мери расејана светлина под агол од 90° во однос на изворот. Бидејќи расејаната светлина е многу поголема од пропуштената, нефалометријата е поосетлива од турбидиметријата.



Турбидиметрија –слична со спектрофотометрија, може да користи УВ/ВИС спектрофотометар

Нефалометрија –може да користи спектрофлуорометар.

Концентрацијата зависи од бројот и големината на честичките.



(b) Распределба на зрачењето при Рејлиево расејување (а) и при расејување на големи честички (б).

Споредба меѓу турбидиметрија и нефелометрија

Два главни фактора влијаат на изборот на техника:

1. *Интензитетот на пропуштеното или на расеаното зрачење* во споредба со интензитетот на зрачењето од изворот. Кога растворот содржи мали концентрации на честички коишто се причина за расејувањето, интензитетот на пропуштеното зрачење, I_T , ќе има слична вредност со интензитетот на изворот на зрачењето, I_0 . определувањето на мали разлики меѓу два интензивни сигнали е мошне несигурно. Така, **нефелометријата е поприфатлива за примероци што содржат мало количество честички. Турбидиметријата е подобар избор за примероци со висока концентрација на честичките.**

2. *Големината на честичките коишто се причина за расејување.* За **нефелометриски мерења, интензитетот на расеаното зрачење на 90° ќе биде поголем ако честичките се доволно мали за да превладува Рејлиево расејување.** За поголеми честички, интензитетот на расеаното зрачење е помал за насоката од 90° . Кога се користи извор на ултравиолетово или на видливо зрачење, оптимална големина на честичките изнесува 0,1 до 1 μm .

Големината на честичките што учествуваат во расејувањето е од помала важност за турбидиметријата, во која сигналот претставува релативно намалување на пропуштеното зрачење.

Определување концентрација со турбидиметрија:

Измерената трансмитанца, T , претставува однос помеѓу интензитетот на пропуштеното зрачење од изворот, I_T , и интензитетот на изворот на зрачењето пропуштено низ слепа проба, I_0 .

$$T = \frac{I_T}{I_0}$$

Односот на трансмитанцата и концентрацијата на честичките коишто учествуваат во расејувањето, е сличен на односот даден со Беровиот закон

$$-\log T = klc$$

Определување на концентрација со нефелометрија

Во нефелометријата, односот меѓу интензитетот на расеаното зрачење, I_s , и концентрацијата на честичките коишто учествуваат во расејувањето, (w/v) , е даден со изразот

$$I_s = k_s I_0 c$$

каде k_s е емпириска константа за даден систем, а I_0 е интензитетот на упадното зрачење од изворот. Вредноста на k_s се утврдува од калибрациона крива конструирана со серија стандарди со позната концентрација

- Потребна е **репродуцибилна распределба на големината на честичките на примерокот и на стандардите**,
- потребна е контрола на сите параметри, како што се концентрацијата на реагенсот, редоследот на додавањето на реагенсите, pH, температурата, брзината на мешањето, јонската сила и времето меѓу почетното формирање на честичките и мерењето на трансмитанцата или на расејувањето.
- Во голем број случаи се додаваат **површинско-активни реагенси, како што се глицерин, желатин или декстрин, за стабилизирање на талозите** во колоидна состојба и за спречување на коагулација на честичките.

За успешна примена на овие техники:

1. Се користи **метода на стандардна серија** и концентрацијата на непознатиот аналит се определува од график
2. Мерената вредност зависи од величината и бројот на честички, затоа стандардниот раствор треба да е со сличен број и димензии на честичките како определуваната проба.
3. Колоидните раствори може да таложат, затоа добро се промешуваат пред полнење на киветата и мерењата да се вршат за исто време.
4. Кинетичките реакции даваат подобри резултати во однос на точност, осетливост и прецизност.

Клиничка примена на турбидиметрија

- Определување на вкупни протеини во биолошки раствори со трихлорооцетна киселина
- Определување на активност на амилаза .
- Определување на активност на липаза користејќи триглицериди како супстрат

Клиничка примена на нефалометрија

- Определување на имуноглобулини (IgG, IgE, IgM, IgA) во серум,
- Определување на концентрацијата на серумски протеини; хемоглобин, хаптоглобин, с-реактивен протеин, албумин...