



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA ELEKTROTECHNIKY A KOMUNIKAČNÍCH  
TECHNOLOGIÍ

ÚSTAV BIOMEDICÍNSKÉHO INŽENÝRSTVÍ

FACULTY OF ELECTRICAL ENGINEERING AND COMMUNICATION  
DEPARTMENT OF BIOMEDICAL ENGINEERING

## MĚŘENÍ SPEKTRÁLNÍCH CHARAKTERISTIK FLUORESCENČNÍCH NAPĚŤOVĚ-CITLIVÝCH BARVIV

MEASUREMENT OF SPECTRAL CHARACTERISTICS OF FLUORESCENT VOLTAGE-SENSITIVE  
DYES

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

DUŠAN PAVLÍK

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

prof. Ing. IVO PROVAZNÍK, Ph.D.

BRNO 2009



VYSOKÉ UČENÍ  
TECHNICKÉ V BRNĚ

Fakulta elektrotechniky  
a komunikačních technologií

Ústav biomedicínského inženýrství

# Bakalářská práce

bakalářský studijní obor  
Automatizační a měřicí technika

**Student:** Dušan Pavlík

**ID:** 72984

**Ročník:** 3

**Akademický rok:** 2008/2009

## NÁZEV TÉMATU:

**Měření spektrálních charakteristik fluorescenčních napětově-citlivých barviv**

## POKYNY PRO VYPRACOVÁNÍ:

Prostudujte možnosti měření spektrálních charakteristik sloučenin pomocí spektrofotometrie. Dále prostudujte vlastnosti napětově-citlivých barviv používaných pro snímání elektrické aktivity živého organismu. Proveďte základní měření spektrálních charakteristik sloučenin pomocí spektrofotometru a ověřte základní zákonitosti. Navrhněte metodiku měření spektrálních charakteristik napětově-citlivých barviv a měření realizujte.

## DOPORUČENÁ LITERATURA:

LAKOWICZ, J. R.: Principles of Fluorescence Spectroscopy. Second Edition, Kluwer Academic/Plenum Publ., New York, 1999.

PROSSER V. a kol.: Experimentální metody biofyziky, Academia, Praha, 1989.

**Termín zadání:** 9.2.2009

**Termín odevzdání:** 1.6.2009

**Vedoucí práce:** prof. Ing. Ivo Provazník, Ph.D.

**prof. Ing. Pavel Jura, CSc.**

*Předseda oborové rady*

## UPOZORNĚNÍ:

Autor bakalářské práce nesmí při vytváření bakalářské práce porušit autorská práva třetích osob, zejména nesmí zasahovat nedovoleným způsobem do cizích autorských práv osobnostních a musí si být plně vědom následků porušení ustanovení § 11 a následujících autorského zákona č. 121/2000 Sb., včetně možných trestněprávních důsledků vyplývajících z ustanovení § 152 trestního zákona č. 140/1961 Sb.

### Abstrakt

Práce se zabývá optickým měřením vlastností látek s využitím absorpční a fluorescenční spektroskopie. Je zde vysvětlen princip fluorescence, který má přímou souvislost s měřením spektrálních charakteristik tzv. napětově-citlivých barviv (konkrétně di-4-ANEPPS). Toto barvivo se používá pro bezkontaktní (optické) snímání elektrické aktivity organismu, přičemž se využívá jeho napětově závislého spektrálního posunu po navázání na buněčnou membránu. Správná aplikace tohoto fluorescenčního barviva je však závislá na mnoha faktorech – jedním z nich je zde diskutovaná a proměřená spektrální závislost na bezprostředním okolí použitého fluorescenčního barviva di-4-ANEPPS.

### Klíčová slova

Fluorescence, napětově citlivá barviva, spektrální charakteristiky, spektrofotometr, spektrofluorimetr, buněčný potenciál, di-4-ANEPPS

### Abstract

This bachelor thesis deals with optical measurement of substances properties in practical service of absorption and fluorescent spectroscopy. The work specifies the principle of fluorescence, which has direct association with spectral characteristics measurement of so-called voltage-sensitive dyes (in this instance di-4-ANEPPS). This dye is used for contactless (optical) imaging of organisms electric activity in practical service of its voltage dependent spectral shift after binding itself on cell membrane. However, the right application of this fluorescent dye is dependent on too many factors – one of them, discussed and measured in this work, is di-4-ANEPPS spectral dependency on its immediate environment.

### Keywords

Fluorescence, voltage sensitive dyes, spectral characteristics, spectrophotometer, spectrofluorimeter, cell potencial, di-4-ANEPPS

### Bibliografická citace

PAVLÍK, D. *Měření spektrálních charakteristik fluorescenčních napětově-citlivých barviv*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta elektrotechniky a komunikačních technologií, 2009. 48s.

### Prohlášení

„Prohlašuji, že svou bakalářskou práci na téma *Měření spektrálních charakteristik fluorescenčních napěťově-citlivých barviv* jsem vypracoval samostatně pod vedením vedoucího bakalářské práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou všechny citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce.

Jako autor uvedené bakalářské práce dále prohlašuji, že v souvislosti s vytvořením této bakalářské práce jsem neporušil autorská práva třetích osob, zejména jsem nezasáhl nedovoleným způsobem do cizích autorských práv osobnostních a jsem si plně vědom následků porušení ustanovení § 11 a následujících autorského zákona č. 121/2000 Sb., včetně možných trestněprávních důsledků vyplývajících z ustanovení § 152 trestního zákona č. 140/1961 Sb.“

V Brně dne: **1. června 2009**

.....  
podpis autora

### Poděkování

Děkuji vedoucímu bakalářské práce Prof. Ing. Ivu Provazníkovi, Ph.D. za účinnou metodickou, pedagogickou a odbornou pomoc a další cenné rady při zpracování mé bakalářské práce.

V Brně dne: **1. června 2009**

.....  
podpis autora

## OBSAH

<b>1. ÚVOD .....</b>	<b>7</b>
<b>2. FLUORESCENCE .....</b>	<b>8</b>
2.1 Definice fluorescence.....	9
2.2 Délka dohasínání fluorescence.....	11
2.3 Spektrální charakteristiky .....	11
2.4 Základní zákonitosti fluorescence.....	13
2.4.1 Stokesův posuv .....	13
2.4.2 Nezávislost emisních spekter na excitační vlnové délce .....	13
2.4.3 Zákon zrcadlové symetrie mezi absorpčním a emisním spektrem .....	15
2.5 Kvantový výtěžek fluorescence .....	16
2.6 Zhášení fluorescence.....	17
2.7 Využití fluorescence .....	17
<b>3. NAPĚŤOVĚ CITLIVÁ BARVIVA .....</b>	<b>19</b>
3.1 Požadavky .....	19
3.2 di-4-ANNEPS .....	20
3.2.1 Mechanismus .....	21
<b>4. ABSORPČNÍ SPEKTROFOTOMETRIE.....</b>	<b>26</b>
4.1 Měření absorpčních spekter .....	26
<b>5. ZÁVĚR.....</b>	<b>28</b>
<b>LITERATURA .....</b>	<b>29</b>
<b>SEZNAM OBRÁZKŮ .....</b>	<b>30</b>
<b>SEZNAM TABULEK .....</b>	<b>31</b>
<b>SEZNAM GRAFŮ .....</b>	<b>32</b>
<b>SEZNAM PŘÍLOH.....</b>	<b>33</b>
<b>PŘÍLOHA 1</b> Měření molární koncentrace roztoku malachitové zeleně pomocí spektrofotometru .....	<b>34</b>
<b>PŘÍLOHA 2</b> Měření excitačně emisních spekter di-4-ANEPPS.....	<b>41</b>

## 1. ÚVOD

Práce se zabývá měřením spektrálních charakteristik fluorescenčního napětově citlivého barviva označovaného jako di-4-ANEPPS. Toto fluorescenční barvivo se používá pro bezkontaktní měření akčních potenciálů vznikajících napříč buněčných membrán. Jeho specifická vlastnost – napětově závislý spektrální posun – se projevuje pouze při správném navázání do buněčné membrány.

Princip měření elektrické aktivity organismu spočívá v osvětlení barviva specifickou vlnovou délkou, při které dochází k jeho nejefektivnější excitaci a následném snímání emitovaného světla, které je rozdílné od použitého budícího světla. Při takovémto měření je nutné přesně znát spektrální charakteristiky použitého barviva, které jsou navíc závislé na okolním prostředí. Je potřeba vědět vlnovou délku světla pro správnou excitaci barviva a správnou emisní vlnovou délku při které dochází ke zmiňované fluorescenci.

Mechanismus fluorescenčních tzv. napětově citlivých barviv umožňuje registrovat napětové změny v buněčných membránách, jelikož tato barviva vykazují v přítomnosti elektrického potenciálu spektrální posun v emitovaném záření. Pokud tedy pro snímání používáme určitý optický filtr propouštějící úzkou oblast vlnových délek obsažených ve fluorescenčním spektru daného barviva, registrujeme při změně akčních potenciálů změnu intenzity vyzařovaného světla.

Cílem bylo proměřit spektrální charakteristiky výše zmíněného fluorescenčního barviva, ověřit jejich tvar a průběh v různých prostředích za použití spektrofluorimetru, diskutovat získané výsledky a zpracovat metodologii takovéhoho měření.

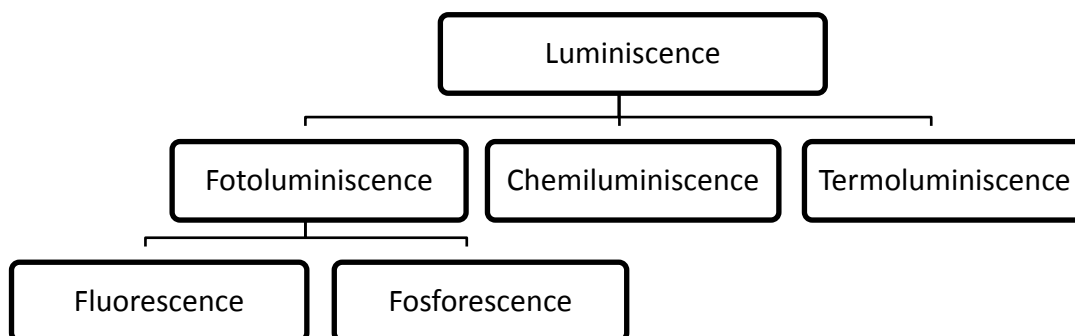
Spektrofluorimetrickému měření předcházelo vlastní měření úlohy na absorpčním spektrofotometru, kde bylo cílem ověřit platnost Lambert-Beerova zákona při měření molární koncentrace látky obsažené v rozpouštědle a zpracování metodologie spektrofotometrického měření.

## 2. FLUORESCENCE

Fluorescenci jako fyzikální jev řadíme mezi tzv. luminiscenční jevy (Obrázek 1), které jsou charakteristické emisí záření z dané látky. Látky schopné fluorescence nazýváme fluorofory. Obecně se jedná o látky schopné emitovat elektromagnetické záření převážně z oblasti viditelného spektra. Tato emise záření nastává jako odezva na dodání určitého množství energie, kterou je schopný daný fluorofor absorbovat a poté postupně část přijaté energie vyzařovat po určitý časový úsek do svého okolí. Tento čas, po který daný fluorofor emituje záření do svého okolí nazýváme jako délka dohasínání fluoroforu.

Absorbci určitého kvanta záření, které nese určité množství energie, se daný fluorofor dostane do tzv. excitovaného stavu – stavu o vyšší energii než je jeho základní (klidová) energie. Obecně znázorňujeme tyto přechody v tzv. Jablonského energetickém diagramu, který zobrazuje jednotlivé energetické hladiny a přechody mezi nimi. Po excitaci se snaží daný fluorofor dostat zpět z vyšších obsazených energetických hladin do rovnovážného stavu, přičemž se tak může dít dvěma způsoby – zářivými a nezářivými přechody. Zářivými přechody dochází během deexcitace k emisi světelného kvanta do okolí a tím obecně pozorujeme luminiscenci mezi kterou patří kromě již zmíněné fluorescence také zpožděná fluorescence a fosforescence. Mezi nezářivé přechody spadají jevy jako přeměna energie na teplo, vnitřní a mezisystémová konverze a další.

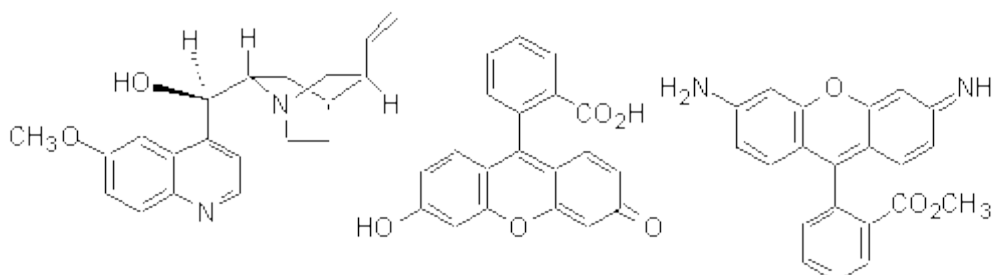
V dalších podkapitolách jsou jednak podrobněji popsány jednotlivé jevy zmíněné v předešlých dvou odstavcích a rovněž jsou uvedeny další zvláštnosti a zákonitosti fluorescenčních molekul. Podrobnější pojednání lze najít např. v (1), (2).



**Obrázek 1** Schématické rozdělení luminiscence



Fluorescence se nejčastěji vyskytuje u aromatických molekul. Některé typické fluorescenční látky (fluorofory) jsou ukázány na obrázku níže (Obrázek 2).



**Obrázek 2** Struktury typických fluoroforů – chinin, fluorescein, rhodamin

Jeden velice rozšířený fluorofor obsažený ve známém nápoji „Tonic water“ je chinin. Jestliže vystavíme sklenici tonicu slunečnímu záření, můžeme s velkou pravděpodobností pozorovat na povrchu slabé modré záření. Toto záření je nejvíce viditelné, jestliže pozorujeme sklenici s nápojem v pravém úhlu vzhledem ke směru slunečních paprsků a pokud použijeme méně polární rozpouštědlo – například do nápoje přidáme alkohol. Chinin obsažený v nápoji je excitován ultrafialovým zářením obsaženým ve slunečním světle. Při návratu do základního stavu emituje modré záření s vlnovou délkou přibližně 450 nm. První kdo provedl a zaznamenal takovéto pozorování fluorescence byl v roce 1845 Sir John Frederick William Herschel. Do dnešních dnů zůstává fluorescence chininu jako jedna z nejvíce používaných ukázek fluorescence. (1)

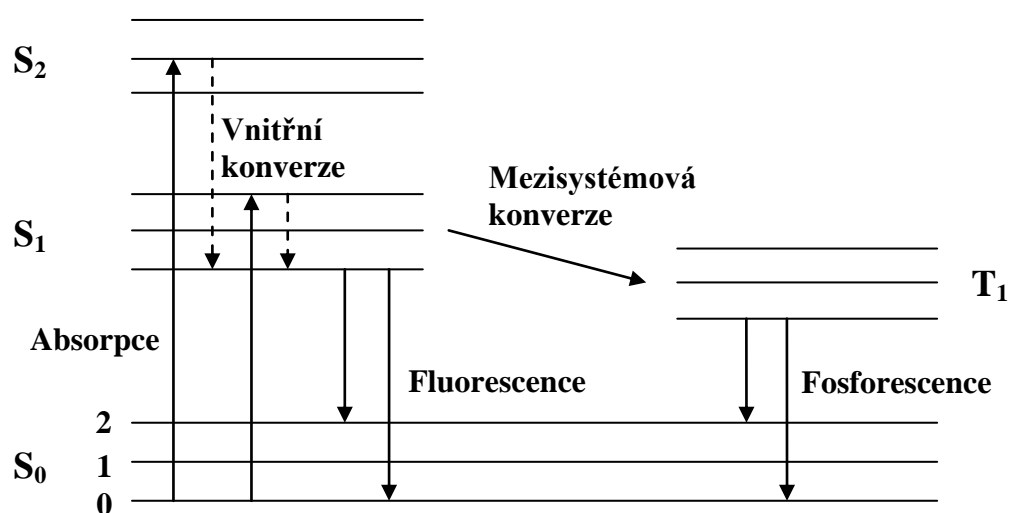
Mezi další běžně známé fluorofory patří například fluorescein nebo rhodamin, jejichž stopy můžeme nalézt v protimrzoucích směsích, které mohou za podobných podmínek vykazovat slabě zelené, popřípadě oranžovo-červené záření.

## 2.1 DEFINICE FLUORESCENCE

Jak již bylo uvedeno výše, fluorescence spadá spolu s fosforescencí mezi luminiscenční jevy, které jsou nejčastěji způsobeny elektromagnetickým zářením z oblasti viditelného, popřípadě ultrafialového světla. Co však tyto dva podobné jevy

jeden od druhého odlišuje je jednak způsob jakým tyto jevy nastávají a dále tzv. délka dohasínání.

Pro znázornění jednotlivých pochodů, které nastávají využijeme Jablonského energetický diagram (Obrázek 3), s vyznačenými energetickými hladinami a přechody, které se během procesu objevují. Jablonského diagram je často používán jako výchozí bod při diskuzi absorpce a emise záření. Existuje v několika formách pro různá zobrazení molekulárních pochodů, které mohou nastat při jejich excitaci. Tyto schématické diagramy nesou jméno po prof. Alexandru Jablonském, který je považován za otce fluorescenční spektroskopie.



**Obrázek 3** Jablonského diagram znázorňující energetické hladiny a energetické přechody molekuly

Jednotlivé singletní stavy jsou znázorněny pomocí symbolů  $S_0$ ,  $S_1$ ,  $S_2$ . V každém z těchto elektronových energetických hladin může dále fluorofor existovat v jednotlivých vibračních hladinách označených čísly 0,1,2. V tomto schématu jsou znázorněny pouze základní interakce.

Po absorpci záření následuje několik procesů. Fluorofor je obvykle excitován do některé z vyšších vibračních hladin stavu  $S_1$  nebo  $S_2$ . Až na drobné výjimky molekuly v kondenzované fázi velmi rychle relaxují na nejnižší vibrační hladinu stavu  $S_1$ . Tento přechod je nazýván vnitřní konverzí a nastává během  $10^{-12}$  s. Jelikož doba dohasínání fluorescence trvá řádově  $10^{-8}$  s, vnitřní konverze, která proběhne asi

10000x rychleji, je obecně dokončena ještě před emisí. Z tohoto důvodu nastává fluorescence nejčastěji z nejnižší energetické vibrační hladiny stavu  $S_1$ .

Návrat do základního stavu obvykle nastává na některou z vyšších vibračních hladin základního stavu  $S_0$ , který během  $10^{-12}$  s přechází na rovnovážný stav. Fluorescence je tedy spinově dovolený zářivý přechod, obvykle z rovnovážné vibrační hladiny stavu  $S_1$  do některé z vibračních hladin základního stavu  $S_0$ .

Excitované molekuly ve stavu  $S_1$  se mohou také dostat díky spinové konverzi do prvního tripletního stavu  $T_1$ . Emise ze stavu  $T_1$  se označuje jako fosforescence a vzhledem k fluorescenci je posunuta do vyšších vlnových délek (nižších energií). Konverze ze stavu  $S_1$  do stavu  $T_1$  se nazývá mezisystémová konverze. Jelikož je ale přechod z  $T_1$  do základního rovnovážného stavu zakázaný, je přechod z tohoto stavu o několik řádů pomalejší než u fluorescence. (1)

## 2.2 DÉLKA DOHASÍNÁNÍ FLUORESCENCE

Proces, během kterého dochází k excitaci molekuly vlivem dodání energie a následné deexcitaci trvá určitou dobu. Tento čas, který je vymezený excitací molekuly a jejím návratem do rovnovážného stavu se nazývá délka dohasínání fluorescence  $\tau$  a pohybuje se řádově kolem 10 ns. Fluorescenční emise je náhodný proces a pouze několik málo molekul emituje fotony přesně po dobu  $t = \tau$ . Doba dohasínání je definována jako průměrný čas molekuly strávený v excitovaném stavu až do návratu do rovnovážného stavu. Při jednoduchém exponenciálním rozložení je 63% fotonů vyzářených před časem  $t = \tau$  a 37% fotonů v čase  $t > \tau$ . (2)

Při fosforescenci je doba dohasínání delší než 10 ns a lze ji obvykle pozorovat i po ukončení buzení narozdíl od fluorescence, při které emise záření prakticky ihned mizí s ukončením buzení.

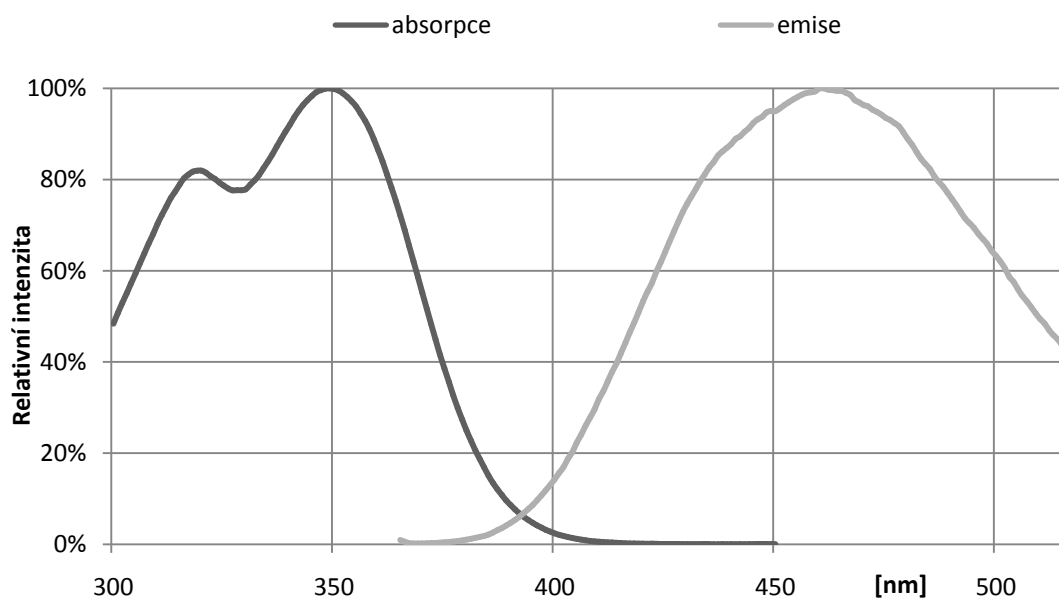
## 2.3 SPEKTRÁLNÍ CHARAKTERISTIKY

Každá fluorescenční látka je charakterizována excitačním a emisním pásem (Graf 1). Excitační pás je rozsah vlnových délek, při kterých dochází vlivem dodání energie k excitaci molekuly. Vlnová délka, při které dochází k nejefektivnější

excitaci molekuly, charakterizuje tzv. maximum excitačního pásu. Při použití této vlnové délky k excitaci dochází k nejintenzivnější fluorescenci.

Spektrum fluorescence je charakterizováno emisním pásem s maximem, kterému odpovídá určitá vlnová délka, při které pozorujeme nejintenzivnější fluorescenci. Vzdálenost těchto maxim se nazývá Stokesův posuv. Tento rozdíl mezi energií absorbovaného a emitovaného záření je způsoben energetickými ztrátami, které se projevují během excitace fluorescenční molekuly. Z tohoto důvodu je vlnová délka emitovaného světla vyšší než použitá délka budicího světla.

Další vlastností je nezávislost relativního tvaru emisního spektra na použité excitační vlnové délce. Pokud pro excitaci molekuly použijeme vlnovou délku odpovídající maximu excitačního pásu, dosáhneme při fluorescenci nejvyšší možné intenzity. Při změně excitační vlnové délky dostaneme stejné emisní spektrum, které se bude lišit pouze vyzařovanou intenzitou. Proto je vždy nejvýhodnější použít k excitaci vlnovou délku odpovídající maximu excitačního pásu a fluorescenci registrovat na vlnové délce odpovídající maximu v emisním pásu.



**Graf 1** Excitačně emisní spektrum chininu

## 2.4 ZÁKLADNÍ ZÁKONITOSTI FLUORESCENCE

Fluorescence vykazuje několik charakteristických rysů. Výjimky jsou možné, nicméně pokud některý z charakteristických rysů zmíněných v dalších podkapitolách chybí, lze usuzovat, že daný fluorofor bude mít nějaké speciální vlastnosti popřípadě chování. (1)

### 2.4.1 Stokesův posuv

Z Jablonského energetického diagramu (Obrázek 3) je zřejmé, že energie vyzářená při emisi je typicky menší než energie pohlcená při absorpci. Tento jev je způsoben tím, že emise záření nastává z nižších energetických hladin, než z těch, na které byla látka vybuzena. S tím souvisí jev, že fluorescenci pozorujeme na vyšších vlnových délkách než kterými byl fluorofor excitován. Rozdílu v energiích mezi maximy absorpčního a emisního pásu se říká Stokesův posuv. Tento jev poprvé pozoroval Sir G. G. Stokes v roce 1852.

Energetické ztráty mezi excitací a emisí jsou všeobecně pozorovatelné u všech roztoků fluorescenčních molekul. Jedna z příčin Stokesova posuvu je velmi rychlý zánik vyšších energetických vibračních hladin a jejich přechod na nejnižší vibrační hladinu stavu  $S_1$ . Jako další příčinu lze uvést přechod ze stavu  $S_1$  na některou z vyšších vibračních hladin základního stavu  $S_0$ . Oba zmíněné přechody vedou ke ztrátě excitační energie.

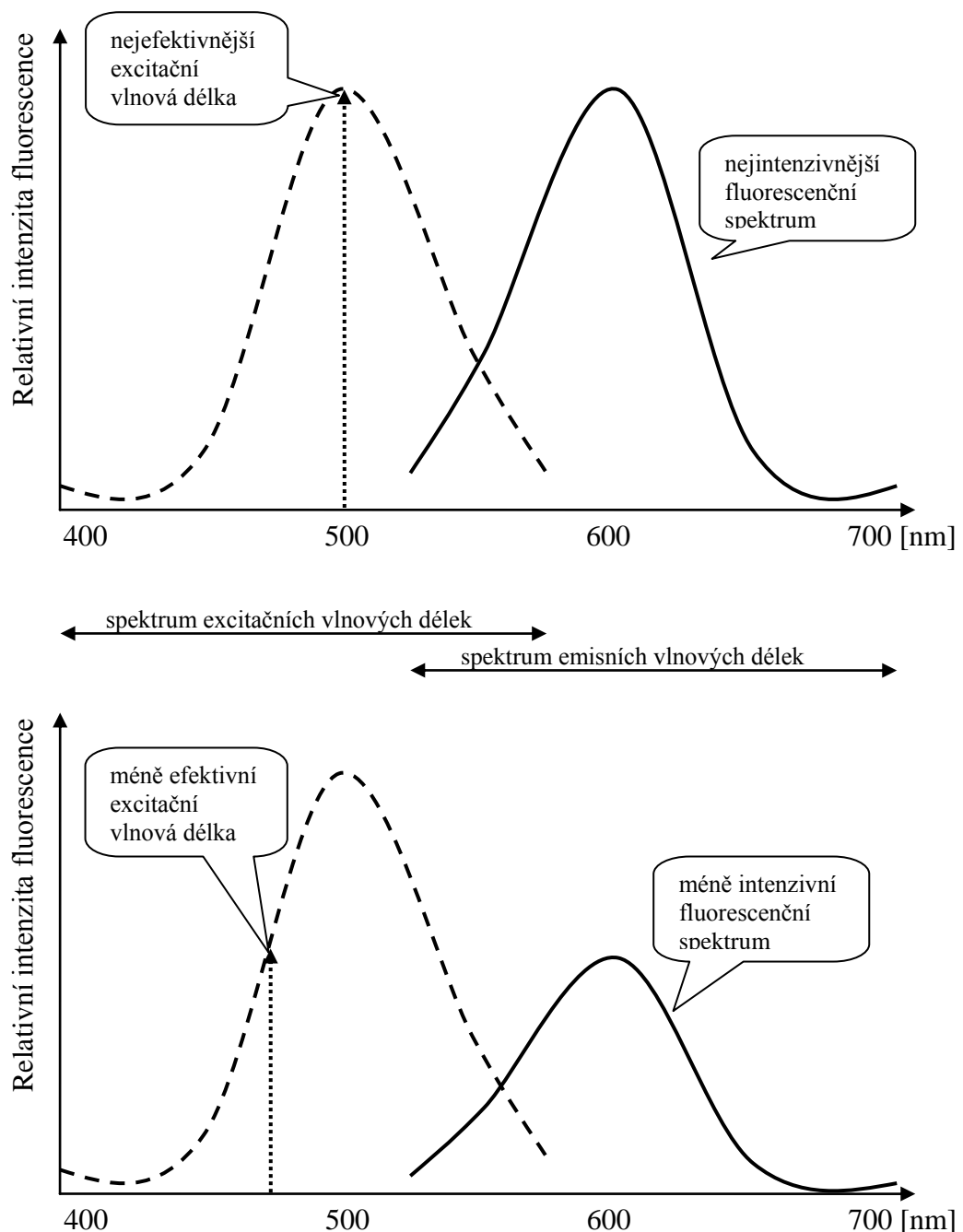
### 2.4.2 Nezávislost emisních spekter na excitační vlnové délce

Další z charakteristických rysů fluorescence je nezávislost fluorescenčního emisního spektra na použité vlnové délce budícího záření. Tato důležitá zákonitost se označuje jako tzv. Kashovo pravidlo. Okamžitě po excitaci fluoroforu do vyšších elektronových a vibračních hladin se přebytečná energie rozptýlí a fluorofor se ocitne na nejnižší vibrační hladině stavu  $S_1$ . Z důvodu této rychlé relaxace jsou emisní spektra až na výjimky nezávislá na excitační vlnové délce (energii). (1)

Relativní tvar emisního spektra zůstane zachován při použití libovolné excitační vlnové délky, která spadá do absorpčního pásu daného fluoroforu. Jediné co se bude se změnou excitační frekvence měnit je relativní intenzita fluoroforu. Pokud použijeme vlnovou délku spadající do absorpčního maxima, obdržíme

nejintenzivnější fluorescenci, jejíž spektrum bude složeno z vlnových délek spadajících do emisního spektra daného fluoroforu.

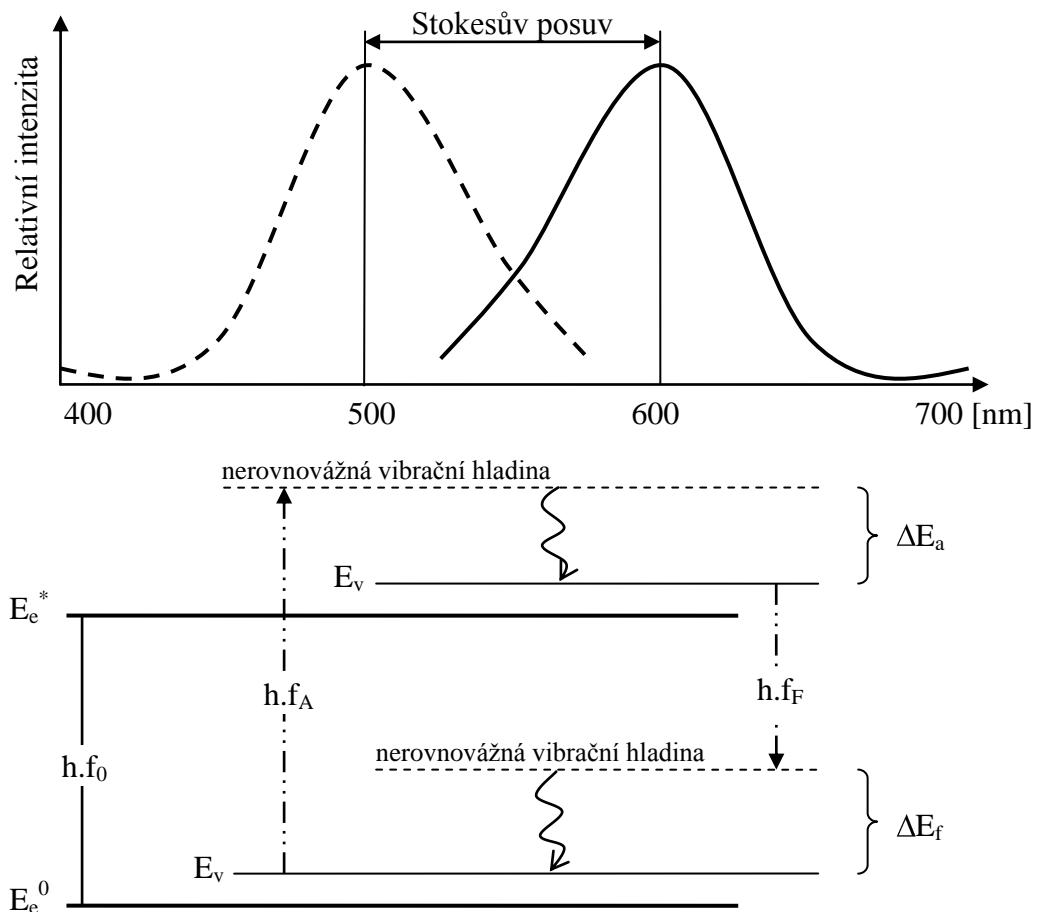
Při ozáření fluoroforu jinou vlnovou délkou než odpovídající maximu absorpčního pásu bude intenzita fluorescence vzhledem k předešlé nižší, ale její spektrum bude obsahovat stejné vlnové délky jako v předešlém případě. Popsaný jev je zobrazen na následujícím Obrázek 4.



**Obrázek 4** Závislost tvaru emisního spektra na vlnové délce excitace

### 2.4.3 Zákon zrcadlové symetrie mezi absorpčním a emisním spektrem

Tato zákonitost se projevuje u velkého množství fluorescenčních molekul. Na obrázku dole (Obrázek 5) osa symetrie obou pásů protíná osu energií právě v bodě, odpovídající kvantu energie, které odpovídá čistě elektronovému přechodu  $E_e^* - E_e^0$ . Fotony  $h \cdot f_A$  a  $h \cdot f_F$  se stejnou relativní pravděpodobností absorpce nebo emise jsou rozloženy ve stejné vzdálenosti vlevo a vpravo od bodu odpovídajícímu čistě elektronovému přechodu. Tato vzdálenost není však nic jiného než přebytek vibrační energie, který molekula získá při absorpci nebo emisi. Většina molekul se nachází v rovnovážné vibrační hladině  $E_v$ , která odpovídá tepelné rovnováze molekuly s okolím. Zrcadlová symetrie je způsobena tím, že absorpce i emise kvanta záření z odpovídajících si vibračních hladin základního a excitovaného stavu mají stejnou relativní pravděpodobnost. Maxima v absorpčním a emisním pásu tedy odpovídají nejpravděpodobnější hodnotě přírůstku vibrační energie. Rozdílu v energiích mezi maximy absorpčního a emisního pásu se říká Stokesův posuv. (2)

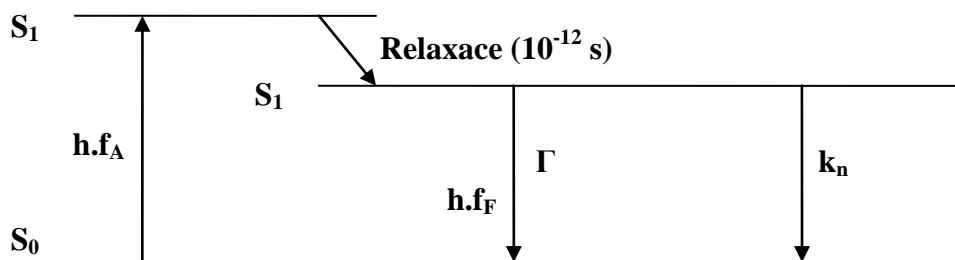


**Obrázek 5** Zrcadlová symetrie a změny vibrační energie při absorpci a emisi

## 2.5 KVANTOVÝ VÝTĚŽEK FLUORESCENCE

Kvantovým výtěžkem rozumíme poměr počtu emitovaných fotonů k počtu absorbovaných fotonů. Látky s největším kvantovým výtěžkem blízcím se číslu 1 dosahují nejzářivější emise.

Pro demonstraci kvantového výtěžku je nejlepší použít zjednodušený Jablonského diagram (Obrázek 6). V tomto diagramu jsou schválně vynechány relaxační procesy vedoucí do stavu  $S_1$ . Místo toho jsou zde zobrazené procesy zodpovědné za návrat do rovnovážného stavu  $S_0$ . Konkrétně nás zajímá míra emisivity ( $\Gamma$ ) a nezářivých přechodů ( $k_n$ ) daného fluoroforu.



Obrázek 6 Zjednodušený Jablonského diagram

Kvantový výtěžek fluorescence je dán jako poměr počtu emitovaných fotonů k počtu absorbovaných. Oba procesy vyjádřené těmito dvěma konstantami „vyliďňují“ excitované stavy. Kvantový výtěžek  $Q$  je tedy definován jako:

$$Q = \frac{\Gamma}{\Gamma + k_n}$$

Kvantový výtěžek se může blížit číslu 1 pokud konstanta charakterizující míru nezářivých přechodů je mnohem menší než míra emisivity. Jinými slovy platí-li podmínka:

$$k_n \ll \Gamma$$

Uvedený vztah pro kvantový výtěžek platí přesně pouze v ustáleném stavu. Ve skutečnosti fluorescence nejprve s časem narůstá a pak postupně dohasíná, proto je potřeba hodnotu kvantového výtěžku definovat obecněji. Podrobnější matematický aparát lze nalézt v publikacích (1), (2).



## 2.6 ZHÁŠENÍ FLUORESCENCE

V roztocích fluoroforů může docházet k řadě interakcí, které mohou ovlivnit intenzitu fluorescence. Pokud pomineme zdánlivé zhášení fluorescence, které vzniká triviálním pochodem jako důsledek optických vlastností měřeného vzorku (např. neúměrná absorbance, zákal, vysoký rozptyl světla, apod.) pak zbývají dva základní mechanismy zhášení a to tzv. dynamický a statický.

K dynamickému zhášení fluorescence dochází srážkovým mechanismem s molekulou zhášedla, která musí ke fluoroforu difundovat během doby života jeho excitovaného stavu. Po střetu obou molekul se fluorofor navrácí nezářivě do svého základního stavu.

Při statickém zhášení se vytváří nefluorescentní komplex. V obou případech však musí dojít k vzájemnému dotyku mezi molekulami. Na tomto základním požadavku jsou založeny i aplikace zhášení fosforescence pro zjišťování toho, zda jsou fluorofory přístupné pro molekuly zhášedla. Ve viskózním rozpouštědle je difúzní rychlost malá a tudíž i zhášení bude odpovídajícím způsobem potlačeno. Ze zhášení fluorescence můžeme někdy obdržet i informaci o lokalizaci fluoroforu ve studovaném systému. Budeme-li předpokládat, že fluorofor je navázán k bílkovině nebo k buněčné membráně, která je pro zhášedlo nepropustná a fluorofor bude uvnitř makromolekuly, pak můžeme vyloučit jak statické tak i dynamické zhášení fluorescence. (2)

## 2.7 VYUŽITÍ FLUORESCENCE

Emisní spektroskopie je velmi citlivou metodou pro získávání informací o nejrůznějších strukturních a dynamických aspektech biologických objektů. Díky rozvoji nových světelných zdrojů, jako jsou lasery, a mnoha zlepšeními v oblasti generace i detekce velmi krátkých světelných pulsů spolu s počítačovou analýzou časově závislých emisních dat se stále více zvětšuje pole použití různých luminiscenčních metod ve výzkumu tkání, jednotlivých buněk i biologických makromolekul.

Velmi podstatnou úlohu má fluorescenční spektroskopie při studiu konformací a dynamismu biologických systémů. Přitom se využívá tří základních metodických přístupů:

První spočívá v závislosti emisních vlastností chromoforu (nebo přesněji fluoroforu) na jeho bezprostředním okolí. Změn emisních spekter a kvantových výtěžků se užívá ke studiu polárnosti zajímavých míst v makromolekulách a k detekci konformačních změn, ke kterým může dojít v důsledku změněných podmínek nebo při interakci systému s malými molekulami.

Druhý přístup je založen na studiu přenosu elektronové excitační energie mezi molekulami donoru a akceptoru. Luminiscence umožňuje získat informace o vzdálenosti mezi těmito molekulami, jakož i o změnách, ke kterým dochází, je-li systém nějakým způsobem ovlivňován.

Třetí aplikací je využití polarizované luminiscence pro určování velikosti, tvaru a ohebnosti makromolekul v roztoku, stanovení orientace a výzkum pohybů molekul a stupně uspořádanosti v biologických membránách. (2)

### 3. NAPĚŤOVĚ CITLIVÁ BARVIVA

Napěťově citlivá barviva slouží primárně k prostorovému mapování rozložení napěťového potenciálu spojeného s tkáněmi, jednotlivými buňkami nebo organely. Pro tyto účely bylo vyvinuto několik univerzálně použitelných fluorescenčních barviv mezi něž patří například di-5-ASP, di-4-ANEPPS, di-8-ANEPPS, TMRM nebo TMRE.

Jedná se o fluorescenční sondy citlivé na elektrický potenciál vznikající napříč biologických membrán jako důsledek nerovnováhy koncentrace iontů v extracelulárním a intracelulárním prostoru. Tyto fluorescenční sondy jsou schopné na základě měnicího se potenciálu měnit svoje spektrální charakteristiky a tím podávat optické informace o membránovém potenciálu do svého okolí.

Jejich využití spočívá především v registraci akčních potenciálů vznikajících v srdečních buňkách. Způsob registrace akčních potenciálů srdečních buněk při použití fluorescenčních barviv spočívá v optickém snímání povrchu celého autonomně tepajícího srdce, které bylo před vlastním měřením izolováno a poté uměle udržováno při životě a vyživováno pomocí fyziologického roztoku. Poté co je srdce stabilizováno, proběhne jeho napuštění vhodným napěťově citlivým barvivem. Tím je po určité době srdce připraveno pro bezkontaktní optické snímání akčních potenciálů a jejich směru šíření.

Klasický způsob snímání srdečních akčních potenciálů spočívá v použití mikroelektrod, které se umístí na konkrétní jedno místo / buňku. Tímto měřením však získáme pouze akční potenciál jedné konkrétní buňky, popřípadě za použití více elektrod získáme sumu akčních potenciálů. Navíc se jedná o kontaktní měření.

#### 3.1 POŽADAVKY

Na základě rychlosti časové odezvy na změnu membránového potenciálu se napěťově citlivá barviva dělí do dvou hlavních skupin – rychlá a pomalá. Pouze rychlé fluorescenční sondy jsou vhodné pro zaznamenávání elektrofyzilogických odezev, kvůli jejich schopnosti sledovat v časové oblasti jednotek mikrosekund změny akčního membránového potenciálu.

Při vývoji napětově-citlivých barviv jsou na jejich vlastnosti kladeny tyto požadavky:

- Je nutné, aby barvivo obsahovalo chromofor, který je schopný při přechodu ze základního klidového stavu do excitovaného stavu vyprodukovat co největší pohyb volného náboje a tím způsobit co největší měřitelnou spektrální změnu spojenou s vnějším elektrickým polem.
- Schopnost barviva navázat se na buněčnou membránu se současným požadavkem na správnou orientaci (kolmo na membránu – paralelně s vnějším elektrickým polem).
- Schopnost barviva zůstat co nejdéle navázané na buněčné membráně.
- Minimalizovat u daného barviva tzv. photobleaching (proces vybělování).
- Minimalizovat postraní efekty použitého barviva na organismus nejen při použití světla, ale i bez použití světla. (3)

### 3.2 DI-4-ANNEPS

Skupina ANEP (AminoNaphthylEthenylPyridinium) barviv vyvinutých Leslie Loew patří mezi nejstálejší a nejpoužívanější fluorescenční sondy používané k detekci submilisekundových změn membránového potenciálu. Primární účel tohoto barviva je fluorescenční mapování srdečních tkání, kde vykazuje díky svému 1- vysokému poměru signálu k rušení a 2-relativně vysoké změně fluorescence ku změně elektrického potenciálu ( $\sim 10\%/100\text{mV}$ ) značný náskok oproti jiným napětově citlivým fluorescenčním barvivům. Ukázalo se, že toto barvivo může sloužit jako velmi cenný prostředek pro studium elektrofysiologie srdečních tkání. Je schopné odhalit postupnou depolarizaci celé srdeční tkáně při defibrilaci nebo při přítomnosti nejrůznějších toxinů.

Ukázalo se však také, že toto barvivo může při vystavení vysoké intenzitě osvětlení nebo při vysokých koncentracích působit toxicky na jednotlivé srdeční buňky. Bylo zdokumentováno, že takovéto podmínky (intenzita osvětlení, koncentrace) vedou ke stavu trvalé hyper-kontrakce buněk, kde se zbytkový potenciál ustálí na  $-30\text{mV}$  a další depolarizace nenastávají. Navíc k podivu, zmíněná toxicita se projevuje jen v určitých místech srdeční tkáně.

Jelikož toto barvivo vykazuje nepatrnou intenzitu fluorescence, je nutné používat velmi citlivé detektory k zaznamenání změn v intenzitě fluorescence. Zde nastává otázka, jaká je nejefektivnější kombinace barviva a světelné intenzity k získání co největší změny fluorescence během akčních potenciálů, při současném vyloučení toxicity.

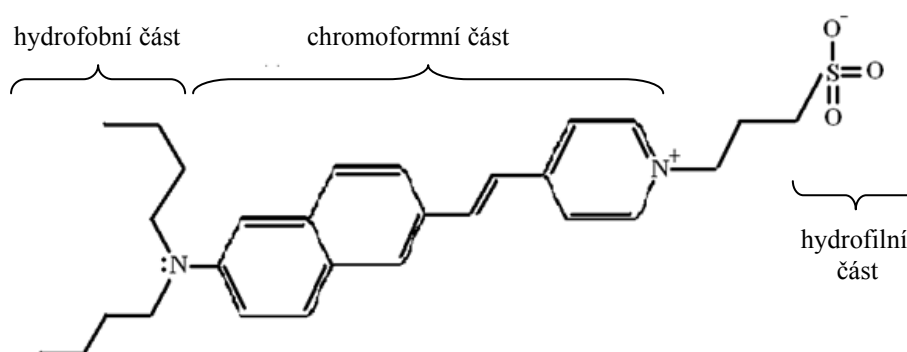
Dostupná literatura se v této otázce značně rozchází. Několik experimentů bylo provedeno s různými intenzitami světla a s různými koncentracemi barviva. Nicméně nebyla zde zjištěna žádná závislost mezi těmito dvěma faktory. Navíc ne všechny pokusy byly aplikovány na srdeční tkáň. Obecně existuje velice málo publikací zabývajících se tímto problémem. To vše navíc činí značné problémy při experimentování s těmito barvivy – nejen že je potřeba rozhodnout které konkrétní hodnoty (koncentrace, intenzita) jsou vhodné pro daný experiment a shromáždění dat, ale navíc je potřeba ještě určit, které hodnoty ještě nebudou pro dané buňky toxické. To vše bere cenný čas a peníze a odrazuje od větších experimentů. (4)

Chemický vzorec	Molární hmotnost	Absorpční maximum	Emisní maximum	Extinkční koeficient
$C_{28}H_{36}N_2O_3S$	480,66 g/mol	497 nm	705 nm	$42000 M^{-1} \cdot cm^{-1}$

**Tabulka 1** Vlastnosti di-4-ANNEPS

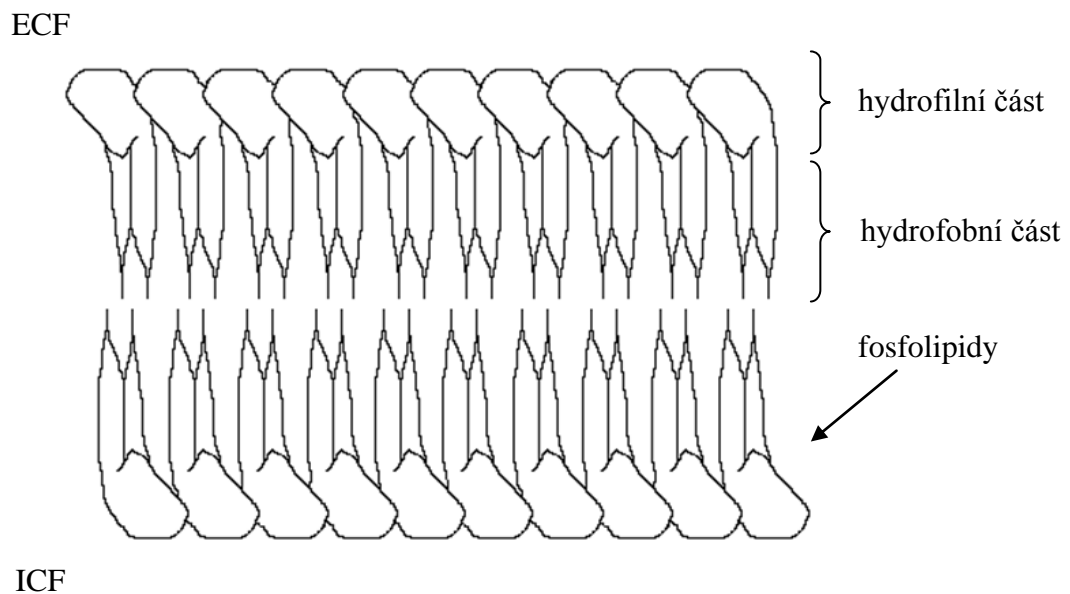
### 3.2.1 Mechanismus

Tato barviva díky své struktuře (Obrázek 7) jsou mimořádně vhodná pro měření změn potenciálu na buněčných membránách, tvořených dvojitou vrstvou fosfolipidů.



**Obrázek 7** Struktura molekuly barviva di-4-ANEPPS

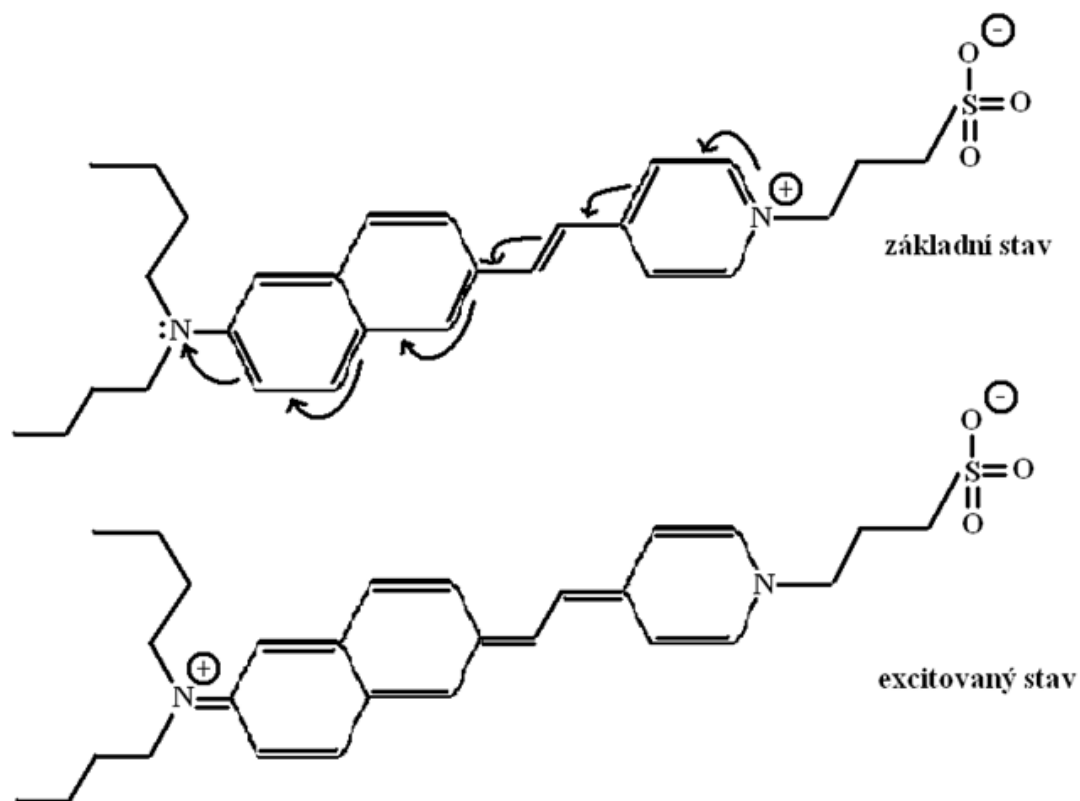
Základní strukturální jednotkou buněčné membrány je dvojvrstva fosfolipidů, ve které jsou jejich hydrofilní konce (tvořené zbytkem kyseliny fosforečné) orientovány do vodného prostředí v okolí buňky a do cytoplazmy. Hydrofobní konce tvořené mastnými kyselinami jsou orientovány do středu lipidové dvojvrstvy (Obrázek 8).



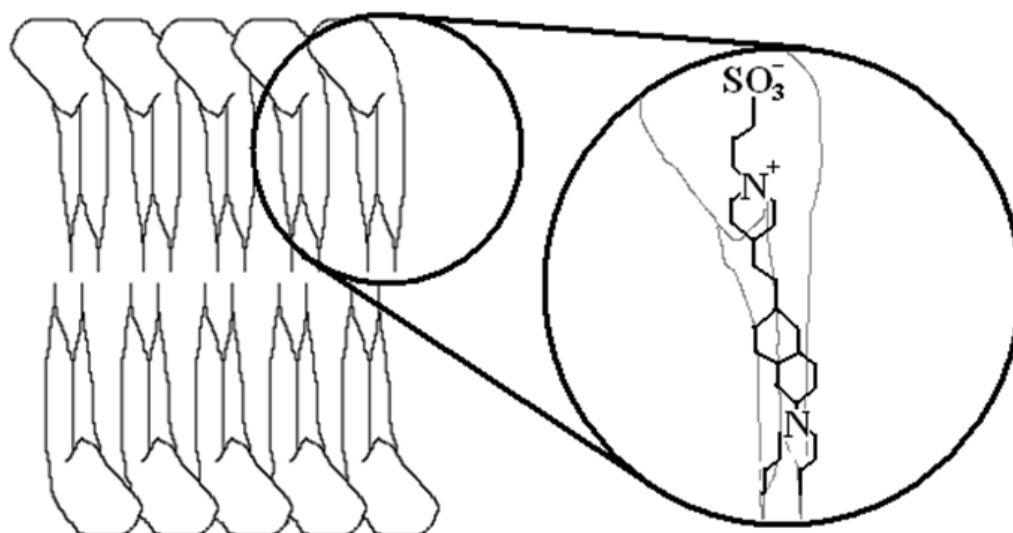
**Obrázek 8** Struktura buněčné membrány (řez)

Zhruba lineární struktura barviva obsahuje na jednom konci hydrofilní část, kterou je schopné se vázat na vnější stranu buněčné membrány. Na druhém konci naopak obsahuje lipofilní část, která zase umožňuje navázání do vnitřku membrány. Uvnitř struktury tohoto barviva pak je chromoforní část, u které při excitaci dochází k velkému posuvu kladného náboje s atomu dusíku přes celý chromofor (tento kladný náboj má svůj protějšek na atomu kyslíku - navenek je tedy molekula neutrální) (Obrázek 9). Tento přesun náboje je způsoben vnitřní elektronovou reorganizací při zmíněné excitaci barviva zářením.

Co je ale nejdůležitější je to, že molekula barviva je vázána napříč membránou (díky hydro-filním/fobním koncům) (Obrázek 10) a tudíž paralelně s vnitřním potenciálem membrány a při excitaci se zmíněný kladný náboj pohybuje rovněž paralelně s potenciálem membrány.



**Obrázek 9** Přesun kladného náboje během excitace

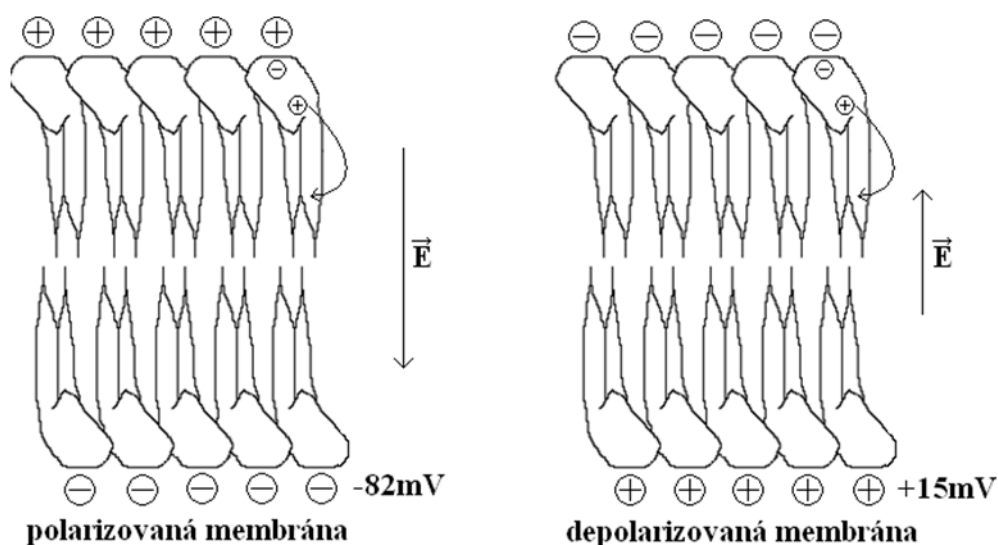


**Obrázek 10** Umístění molekuly di-4-ANEPPS v buněčné membráně

Potenciál buněčné membrány závisí na jejím stavu. Při polarizovaném stavu (v klidu) je vnitřek membrány oproti vnějšku negativní. Membránový potenciál je v tomto rovnovážném stavu udržován na hodnotě kolem  $-82\text{mV}$ . Vektor elektrického pole uvnitř membrány v tomto stavu směřuje do vnitřku buňky. Při depolarizaci membrány se vnitřek membrány stává vzhledem k vnějšku naopak kladný a dosahuje napětí asi  $+15\text{mV}$  a vektor elektrické intenzity se v tomto stavu obrací a směřuje z vnitřku buňky do vnějšího prostředí.

V tomto měnícím se potenciálu je paralelně umístěna molekula barviva na níž dochází právě k pohybu onoho kladného náboje. To má za následek různé hodnoty energie, které jsou nutné k překonání tohoto úseku jak při excitaci tak při emisi, kdy se kladný náboj vrací zpět.

Z předešlého vyplývá, že pokud se membrána, na kterou jsou navázány molekuly barviva nachází v polarizovaném stavu je při excitaci barviva přesun kladného náboje souhlasný se směrem elektrického pole napříč membránou. To má za následek snížení energetického rozdílu mezi základním a excitovaným stavem molekuly barviva a tzv. RED SHIFT (posun k vyšším vlnovým délkám s nižší energií) excitačního a emisního spektra. Při depolarizaci membrány je popsán jev přesně opačný a výsledkem je tzv. BLUE SHIFT (Obrázek 11).



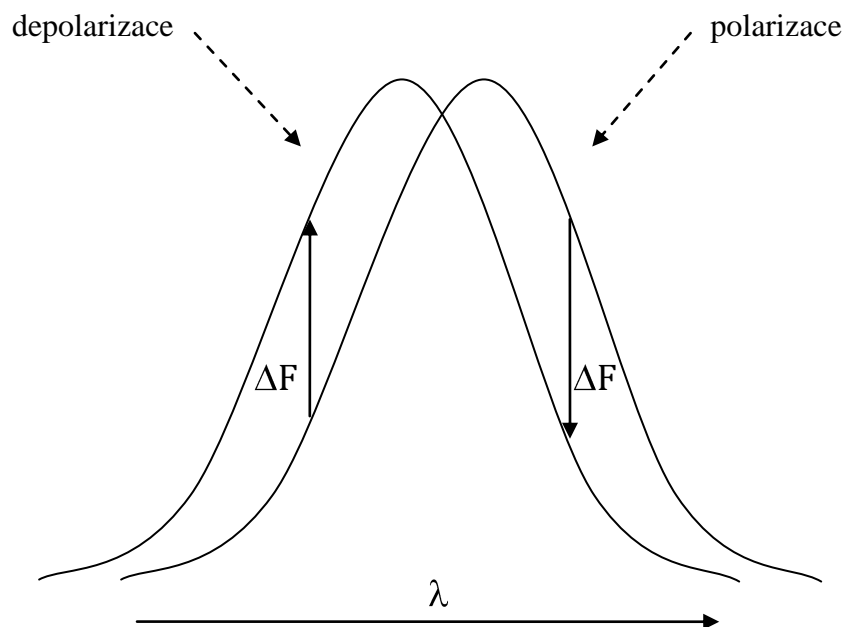
Obrázek 11 Polarizovaná a depolarizovaná membrána



Pokud budeme zaznamenávat intenzitu fluorescence pomocí selektivního filtru, který propouští vlnové délky z pravé části (RED WING) fluorescenčního spektra, budeme při změně akčního potenciálu registrovat pokles intenzity fluorescence. Naopak při použití selektivního filtru, propouštějícího vlnové délky z levé části fluorescenčního spektra, budeme registrovat zvýšení intenzity fluorescence (Obrázek 12).

V ideální případě bychom měli pozorovat pouze spektrální posun bez jakékoliv změny tvaru nebo amplitudy spektra. Pro nejlepší registraci změn fluorescence bychom měli vybrat vlnové délky z nejstrmější části spektra, kde je změna fluorescence největší.

Pokud měříme relativní změnu fluorescence  $\Delta F/F$ , je vhodnější měřit na krajních částech spektra, kde hodnota jmenovatele je malá. Nejméně vhodné je měřit  $\Delta F/F$  v maximu spektra, jelikož  $\Delta F$  je zde minimální a  $F$  maximální. Tzn. že v tomto bodě bychom měřili s nejmenší citlivostí.



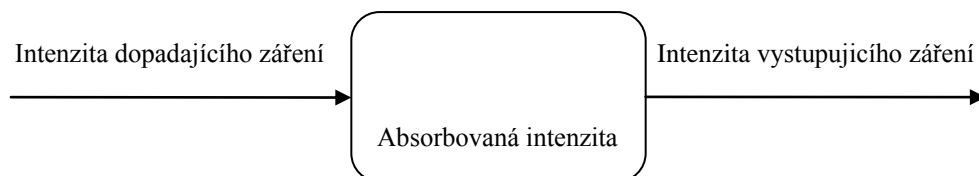
**Obrázek 12** Napěťově závislý spektrální posun

## 4. ABSORPČNÍ SPEKTROFOTOMETRIE

Absorpční metody patří mezi nejužívanější metody molekulární optické spektroskopie. Podle druhu sledovaných molekulárních přechodů rozlišujeme elektronovou absorpční spektroskopii, která využívá optické záření blízké infračervené, viditelné nebo ultrafialové oblasti ( $\lambda < 1 \mu\text{m}$ ), a vibrační absorpční spektroskopii, spadající do infračerveného spektrálního oboru (obvyklý interval  $\lambda = 3 \div 25 \mu\text{m}$ ). Informace stejné povahy, jaké jsou obsaženy v infračervených absorpčních spektrech, lze získat i ze spekter Ramanova rozptylu. (2)

### 4.1 MĚŘENÍ ABSORPČNÍCH SPEKTER

Cílem absorpčních měření je stanovení spektra absorbance daného vzorku. Při absorpčním měření je část intenzity, která vstupuje do vzorku absorbována a zbytek intenzity v ideálním případě projde a je zaznamenán jako vystupující intenzita (Obrázek 13).



**Obrázek 13** Absorpce vzorku

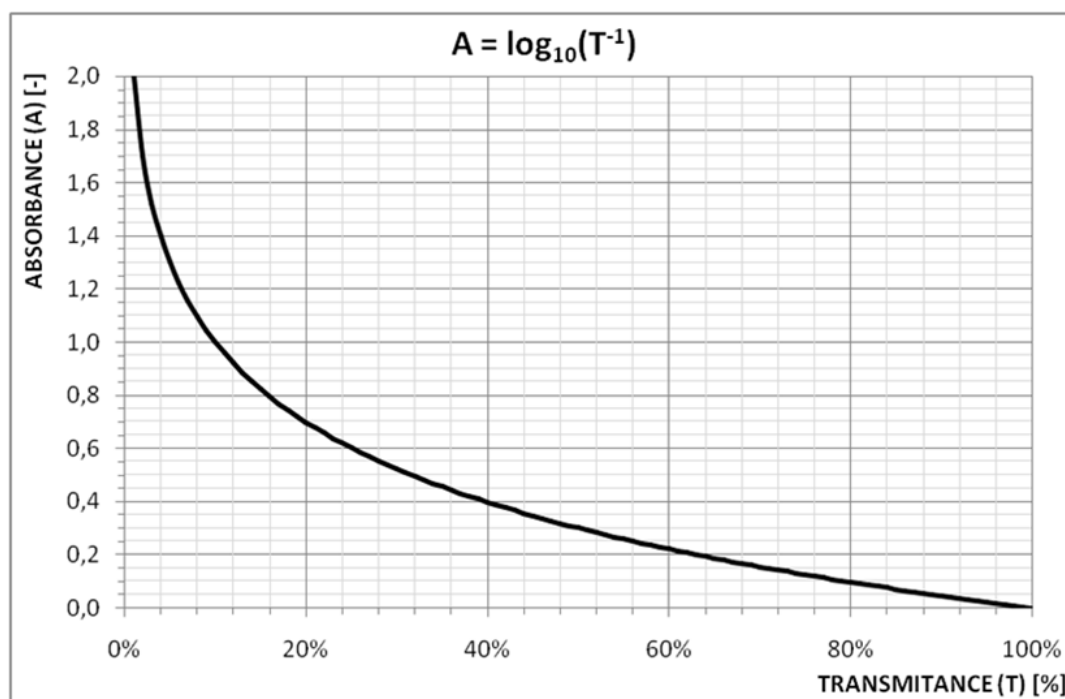
Nejjednodušší a zároveň nejrozšířenější metodou stanovení absorpčních spekter vzorku je měření propustnosti  $T(\lambda)$  definované jako poměr intenzity záření vystupujícího ze vzorku  $I_{vz}$  ku intenzitě  $I_0$  záření dopadajícího:

$$T(\lambda) = \frac{I_{vz}}{I_0}$$

Na většině absorpčních spektrofotometrů lze rovněž přímo měřit hodnotu absorbance  $A(\lambda)$ , což je záporně vzatý dekadický logaritmus z propustnosti  $T(\lambda)$ :

$$A(\lambda) = -\log_{10} T(\lambda) = \log_{10} \frac{I_0}{I_{VZ}}$$

Grafickou závislost mezi absorbancí  $A$  a transmitancí (propustností)  $T$  lze vidět na následujícím grafu (Graf 2).



**Graf 2** Závislost absorbance na transmitanci

Závislost propustnosti či absorbance na vlnové délce (frekvenci) nazýváme absorpční spektrum. Absorpční spektrum je tvořeno absorpčními pásy. Absorpční pás charakterizujeme polohou jeho maxima, propustností (nebo absorbancí) v maximu a tvarem. Absorpční spektrum slouží k identifikaci sloučenin, zejména organických, s chromoforními skupinami, apod.

Podrobněji o postupu měření a příkladu využití absorpční spektrofotometrie se lze dočíst v příloze (**Příloha 1**), kde je uvedený protokol z realizovaného spektrofotometrického měření.

## 5. ZÁVĚR

Před vlastním spektrofotometrickým měřením spektrálních charakteristik napětově-citlivých barviv na spektrofotometru, bylo nejprve nutné získat a osvojit si základní znalosti při měření základních absorpčních spekter na spektrofotometru.

Pro tento účel jsem navrhl laboratorní úlohu spočívající v určení molárních koncentrací roztoků malachitové zeleně, jejichž konkrétní hodnoty jsem předem připravil a poté vypočítal z jednotlivých absorbancí vzorků získaných z měření na spektrofotometru. Jednalo se o úlohu na ověření platnosti Lambert-Beerova zákona. Protokol z tohoto prvního měření je uveden v Příloze 1 (Příloha 1). Připravené koncentrace a získaná data si vzájemně odpovídaly. Součástí je i popsání postupu při práci a měření pomocí spektrofotometru k této úloze.

Po získání základních znalostí a principů týkajících se měření s fluorescenčními barvivy, byla změřena úloha, jejímž cílem bylo jednak proměřit absorpční a fluorescenční spektra daného barviva a ověřit závislost těchto spekter na použitém rozpouštědle a provést na toto téma diskuzi. Rozbor z provedeného měření a pracovní postup takového měření pomocí spektrofotometru jsou uvedeny v Příloze 2 (Příloha 2).

## LITERATURA

1. **Lakowicz, J. R.** *Principles of Fluorescence Spectroscopy, Second Edition*. New York : Kluwer Academic / Plenum Publ., 1999. 0-306-46093-9.
2. **Prosser, V. a kol.** *Experimentální metody biofyziky*. Praha : Academia, 1989. 80-200-0059-3.
3. **Rosenbaum, D. S. and Jalife, J.** *Optical Mapping of Cardiac Excitation and Arrhythmias*. Boston : Blackwell Publishing, 2001. 0879934816.
4. *The Handbook - A Guide To Fluorescent Probes and Labeling Technologies. Invitrogen*. [Online] Invitrogen Corporation, Říjen 2008.  
<http://probes.invitrogen.com/handbook/>.
5. *Fluorescence SpectraViewer*. [Online] Invitrogen, 2008.  
<http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/support/Research-Tools/Fluorescence-SpectraViewer.html>.
6. **Prahl, Scott.** *Malachite Green*. [Online] Oregon Medical Laser Center, 2007.  
<http://omlc.ogi.edu/spectra/PhotochemCAD/html/malachiteGreen.html>.
7. *LOT-Oriel - Lasers, Optics, Technology*. [Online] LOT Oriel Group Europe.  
[http://www.lot-oriel.com/site/site\\_down/ls\\_irradiance\\_deen06.pdf](http://www.lot-oriel.com/site/site_down/ls_irradiance_deen06.pdf).
8. **Holeček, M.** *Regulace metabolismu cukrů, tuků, bílkovin a aminokyselin*. Praha : Grada Publishing, 2006. 80-247-1562-9.
9. **Sekora, J.** *Metodologie optického snímání elektrické aktivity srdce*. Brno : Vysoké učení technické, FEKT, ÚBMI, 2008.

## SEZNAM OBRÁZKŮ

OBRÁZEK 1 SCHÉMATICKÉ ROZDĚLENÍ LUMINISCENCE .....	8
OBRÁZEK 2 STRUKTURY TYPICKÝCH FLUOROFORŮ – CHININ, FLUORESCEIN, RHODAMIN .....	9
OBRÁZEK 3 JABLONSKÉHO DIAGRAM ZNÁZORŇUJÍCÍ ENERGETICKÉ HLADINY A ENERGETICKÉ PŘECHODY MOLEKULY.....	10
OBRÁZEK 4 ZÁVISLOST TVARU EMISNÍHO SPEKTRA NA VLNOVÉ DÉLCE EXCITACE.....	14
OBRÁZEK 5 ZRCADLOVÁ SYMETRIE A ZMĚNY VIBRAČNÍ ENERGIE PŘI ABSORPCI A EMISI .....	15
OBRÁZEK 6 ZJEDNODUŠENÝ JABLONSKÉHO DIAGRAM .....	16
OBRÁZEK 7 STRUKTURA MOLEKULY BARVIVA DI-4-ANEPPS.....	21
OBRÁZEK 8 STRUKTURA BUNĚČNÉ MEMBRÁNY (ŘEZ).....	22
OBRÁZEK 9 PŘESUN Kladného náboje během excitace .....	23
OBRÁZEK 10 UMÍSTĚNÍ MOLEKULY DI-4-ANEPPS V BUNĚČNÉ MEMBRÁNĚ .....	23
OBRÁZEK 11 POLARIZOVANÁ A DEPOLARIZOVANÁ MEMBRÁNA .....	24
OBRÁZEK 12 NAPĚŤOVĚ ZÁVISLÝ SPEKTRÁLNÍ POSUN.....	25
OBRÁZEK 13 ABSORPCE VZORKU .....	26
OBRÁZEK 14 SPEKTRA HALOGENOVÝCH VÝBOJEK (7).....	47
OBRÁZEK 15 EXCITAČNĚ EMISNÍ SPEKTRUM DI-8-ANEPPS (4).....	48

## SEZNAM TABULEK

TABULKA 1 VLASTNOSTI DI-4-ANNEPS .....	21
TABULKA 2 PŘIPRAVENÉ KONCENTRACE JEDNOTLIVÝCH ROZTOKŮ .....	37
TABULKA 3 NAMĚŘENÉ ABSORBANCE JEDNOTLIVÝCH ROZTOKŮ .....	38
TABULKA 4 ABSOLUTNÍ A RELATIVNÍ CHYBY MĚŘENÍ .....	40
TABULKA 5 RELATIVNÍ PERMITIVITA JEDNOTLIVÝCH ROZTOKŮ .....	46
TABULKA 6 POROVNÁNÍ NAMĚŘENÝCH HODNOT U JEDNOTLIVÝCH PROSTŘEDÍ .....	48

## SEZNAM GRAFŮ

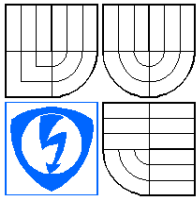
GRAF 1 EXCITAČNĚ EMISNÍ SPEKTRUM CHININU.....	12
GRAF 2 ZÁVISLOST ABSORBANCE NA TRANSMITANCI.....	27
GRAF 3 ABSORPČNÍ SPEKTRUM ROZTOKU MALACHITOVÉ ZELENĚ (4) .....	37
GRAF 4 ZMĚŘENÁ ZÁVISLOST ABSORBANCE NA KONCENTRACI .....	39
GRAF 5 NAMĚŘENÁ EXCITAČNĚ EMISNÍ SPEKTRA DI-4-ANEPPS (PŘED ÚPRAVOU).....	45
GRAF 6 RELATIVNÍ EXCITAČNĚ EMISNÍ SPEKTRA DI-4-ANEPPS (UPRAVENÁ) .....	46



## SEZNAM PŘÍLOH

PŘÍLOHA 1 MĚŘENÍ MOLÁRNÍ KONCENTRACE ROZTOKU MALACHITOVÉ ZELENĚ POMOCÍ SPEKTROFOTOMETRU .....	34
PŘÍLOHA 2 MĚŘENÍ EXCITAČNĚ EMISNÍCH SPEKTER DI-4-ANEPPS .....	41

## PŘÍLOHA 1

 <p>VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ</p>	<b>Název úlohy</b>	Měření molární koncentrace roztoku malachitové zeleně pomocí spektrofotometru
	<b>Jméno</b>	Dušan Pavlík

## ZADÁNÍ:

Proměřte absorpční spektrum malachitové zeleně a nalezněte vlnovou délku při níž dochází k maximální absorpci monochromatického světla.

Připravte pět různě koncentrovaných roztoků malachitové zeleně o předem známých molárních koncentracích. Na těchto vzorcích proveďte spektrofotometrické měření a ze změřených absorbancí vypočítejte u jednotlivých roztoků jejich molární koncentrace.

Zpracujte a vyhodnoťte výsledky měření. Porovnejte molární koncentrace získané pomocí spektrofotometru s předem připravenými.

## ROZBOR:

Při měření koncentrace neznámého roztoku využijeme platnost Lambert-Beerova zákona:

$$\log_{10} \frac{I_0}{I} = \epsilon cb,$$

- kde  $I_0$  intenzita dopadajícího záření,  
 $I$  intenzita prošlého záření,  
 $\epsilon$  molární absorpční koeficient,  
 $c$  molární koncentrace roztoku,  
 $b$  délka světelné dráhy v kyvetě.

Dekadický logaritmus z poměru dopadajícího a prošlého záření nazýváme absorbancí:

$$A = \log_{10} \frac{I_0}{I}$$

Z uvedeného vztahu vyplývá, že absorbance je přímo úměrná koncentraci roztoku. Konstantou úměrnosti je zde součin délky světelné dráhy v kyvetě a molárního absorpčního koeficientu. Molární absorpční koeficient je specifický pro každou látku a je závislý na vlnové délce. Z tohoto vyplývá, že měření absorbance je potřeba provádět při určité vlnové délce. Tato délka by měla odpovídat hodnotě, při níž dochází v roztoku k maximální absorpci záření, aby se zvětšila přesnost spektrofotometrického měření. Danou vlnovou délku  $\lambda_{MAX}$  zjistíme proměřením absorpčního spektra roztoku.

Při zjišťování molárních koncentrací předem připravených roztoků potom budeme měřit absorpci při této vlnové délce. Rovněž při výpočtu koncentrace použijeme molární absorpční koeficient odpovídající danému vzorku a dané vlnové délce  $\lambda_{MAX}$ .

Podstatné je, aby měřená látka nevykazovala fluorescenci a neovlivnila tak měření a připravené roztoky nebyly koncentrovanější než řádově  $10^{-2}$  mol/l, jelikož při vyšších koncentracích dochází k odchýlení od platnosti Lambert-Beerova zákona.

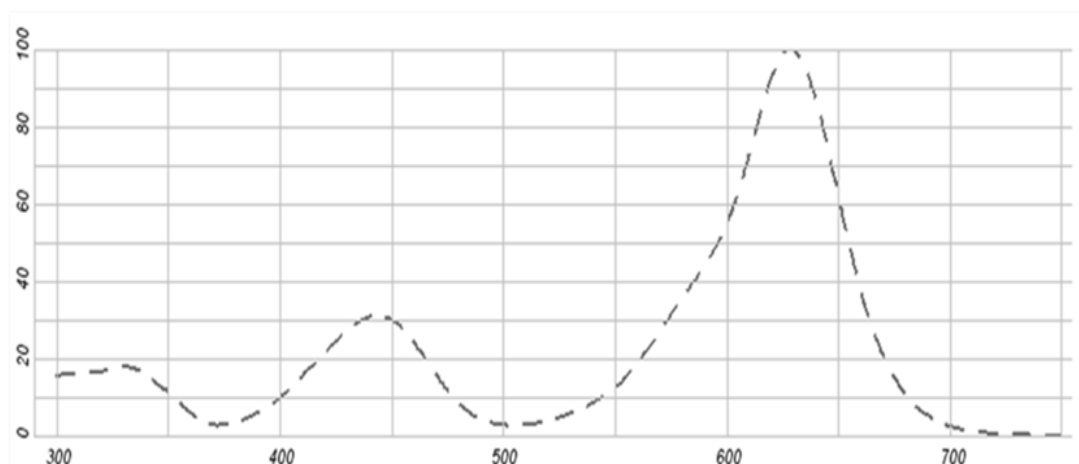
## PRACOVNÍ POSTUP:

1. Připravíme si kyvety vhodné pro měření v oblasti viditelného spektra. Pro toto měření je nejvhodnější kyveta z křemenného skla (typ A) s délkou optické dráhy 1cm. Pokud nejsou kyvety zcela čisté, propláchneme je v destilované vodě a poté v roztoku ethanolu, aby se rychle vysušily. Kyvety nikdy neutíráme – hrozí poškrábání. Při manipulaci s kyvetami je uchopujeme za její dvě boční strany, které se nevyužívají při měření. Před měřením vždy kyvetu několikrát propláchneme v měřeném roztoku.
2. Připravíme zásobní roztoky malachitové zeleně, na kterých budeme provádět měření absorbance. Při přípravě pěti různých koncentrací použijeme mikropipetu a speciální přesné digitální váhy. Roztoky připravujeme v koncentraci nižší než 1mmol/l.
3. Zapneme absorpční spektrofotometr, který po zapnutí spustí vlastní autokalibraci. Po kalibraci přístroje je spektrofotometr připraven k použití.

4. Po autokalibraci je potřeba nejdříve provést měření na tzv. slepém vzorku. Toto měření se provádí z toho důvodu, aby změřená absorpce nebyla součtem jak absorpce měřeného vzorku, tak i použitého rozpouštědla (v našem případě destilované vody). Toto měření se automaticky ve spektrofotometru uloží a při dalším měření se již zobrazuje správná hodnota absorpce.
5. Na spektrofotometru navolíme měření absorpčního spektra v rozsahu vlnových délek  $400 \div 800$  nm. Vložíme kyvetu obsahující vzorek libovolného roztoku a provedeme první proměření absorpčního spektra, které slouží k nalezení absorpčního maxima zkoumaného vzorku.
6. Po odečtení vlnové délky, při které dochází k maximální absorpci přepneme spektrofotometr do módu měření absorpce na konkrétní vlnové délce a zadáme námi odečtenou vlnovou délku odpovídající maximu absorpce.
7. Nyní již můžeme provádět vlastní měření absorpce na připravených vzorcích. Hodnota se zobrazuje téměř ihned, je však nutné nechat měření chvíli ustálit a až po chvíli (cca. 1 minuta) teprve hodnoty zaznamenat.
8. Po ukončení měření vypneme spektrofotometr a použité kyvety opět umyjeme v destilované vodě a ethanolu a necháme samovolně uschnout.
9. Naměřené hodnoty použijeme pro výpočet molárních koncentrací, které by se měli při správném a přesném měření shodovat s předem připravenými. Rovněž by měla platit lineární závislost mezi absorpčními hodnotami roztoku a jeho molární koncentrací.

## MĚŘENÍ:

Při proměření absorpčního spektra docházelo k maximální absorpci při vlnové délce  $\lambda_{MAX} = 617\text{nm}$  (Graf 3). Tato hodnota odpovídá i teoreticky uváděným hodnotám (5). Dále tedy bylo počítáno s vlnovou délkou  $\lambda_{MAX} = 617\text{nm}$ .



**Graf 3** Absorpční spektrum roztoku malachitové zeleně (4)

Pro měření bylo připraveno celkem pět různě koncentrovaných roztoků malchitové zeleně (Tabulka 2). Jako rozpouštědlo byla použita destilovaná voda (DV). Pro přípravu roztoku byl použit 0,3% koncentrát malachitové zeleně (MZ) využívaný dříve jako akvarijní léčivo.

roztok č.	množství koncentráту MZ [g]	čistá hmotnost MZ [g]	objem koncentráту MZ [dm <sup>3</sup> ]	hmotnost DV [g]	objem DV [dm <sup>3</sup> ]	celkový objem roztoku [dm <sup>3</sup> ]	molární koncentrace [mol/dm <sup>3</sup> ]
1	0,0373	0,000112	0,000039	31,8159	0,031880	0,031919	0,000003782
2	0,0488	0,000146	0,000051	33,6650	0,033732	0,033783	0,000004675
3	0,0450	0,000135	0,000047	27,4862	0,027541	0,027588	0,000005279
4	0,0526	0,000158	0,000055	31,1865	0,031249	0,031304	0,000005438
5	0,0580	0,000174	0,000060	25,0797	0,025130	0,025190	0,000007451

Poznámka: MZ = malachitová zeleň, DV = destilovaná voda

**Tabulka 2** Připravené koncentrace jednotlivých roztoků

Jednotlivá množství byla nejprve odvážena a potom přepočtena na objemy ze známých hustot:

$$\rho_{MZ} = 0,960 \text{ g/cm}^3$$

$$\rho_{DV} = 0,998 \text{ g/cm}^3$$

Výsledná molární koncentrace roztoku  $c$  [mol/dm<sup>3</sup>] byla vypočtena podle vzorce:

$$c = \frac{m_{MZ}}{M_{MZ}V_{celk}}$$

kde  $m_{MZ}$  čistá hmotnost malachitové zeleně [g],  
 $M_{MZ}$  molární hmotnost malachitové zeleně [927,02 g/mol],  
 $V_{celk}$  celkový objem připraveného roztoku [dm<sup>3</sup>].

Před měřením absorbance jednotlivých roztoků byl spektrofotometr zkalibrován na tzv. slepém roztoku (pouze destilovaná voda) na vlnové délce  $\lambda_{MAX} = 617\text{nm}$ . Poté byla měřena absorbance na jednotlivých roztocích číslo 1 až 5 (Tabulka 3). Před každým měřením byla kyveta několikrát propláchnuta měřeným roztokem a poté vložena do spektrofotometru.

Pro měření byla vybrána kyveta z křemenného skla (typ A) pro oblast viditelných frekvencí s délkou světelné dráhy  $b=1\text{cm}$ . Při výpočtu molární koncentrace byla použita hodnota molárního absorpčního koeficientu  $\epsilon_{\lambda=617\text{nm}} = 147773 \text{ dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  (6).

roztok č.	absorbance [-]	molární koncentrace [mol/dm <sup>3</sup> ]
1	0,537	0,000003634
2	0,692	0,000004683
3	0,781	0,000005285
4	0,790	0,000005346
5	1,110	0,000007512

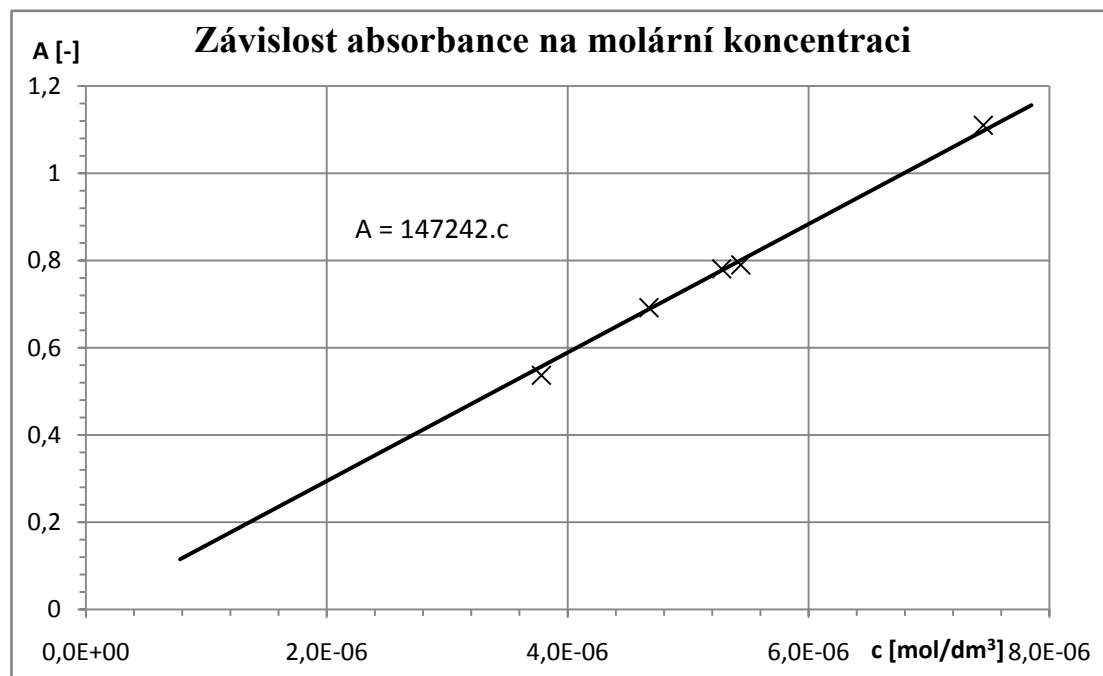
**Tabulka 3** Naměřené absorbance jednotlivých roztoků

Molární koncentrace  $c'$  [mol/dm<sup>3</sup>] byla z naměřené absorbance vypočtena pomocí vzorce:

$$c' = \frac{A}{\epsilon b}$$

kde  $A$  absorbance [-],  
 $e$  molární absorpční koeficient při vlnové délce 617nm [ $dm^3 \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$ ],  
 $b$  délka světelné dráhy v kyvetě [ $cm$ ].

Změřená absorbance v závislosti na připravené molární koncentraci roztoku byla vynesena do grafu (Graf 4) a aproximována lineární funkcí pro ověření platnosti Lambert-Beerova zákona.



**Graf 4** Změřená závislost absorbance na koncentraci

Linearizovaná závislost vychází se strmostí 147242 (viz. Graf 4). Tato hodnota by při přesném měření měla být rovna molárnímu absorpčnímu koeficientu 147773.

Porovnáním připravených a vypočtených koncentrací můžeme zjistit přesnost výsledků měření (absolutní chyba) a přesnost dané měřicí metody (relativní chyba). Zjištěné hodnoty jsou uvedeny v tabulce na další stránce (Tabulka 4).

roztok č.	připravená molární koncentrace [mol/dm <sup>3</sup> ]	vypočtená molární koncentrace [mol/dm <sup>3</sup> ]	$\Delta c$ [mol/dm <sup>3</sup> ]	$\delta c$ [%]
1	0,000003782	0,000003634	-0,000000148	-4,07
2	0,000004675	0,000004683	0,000000008	0,18
3	0,000005279	0,000005285	0,000000006	0,12
4	0,000005438	0,000005346	-0,000000092	-1,72
5	0,000007451	0,000007512	0,000000060	0,80

**Tabulka 4** Absolutní a relativní chyby měření

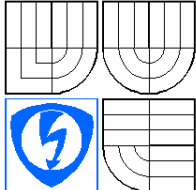
## ZÁVĚR:

Spektrofotometrickým měřením byla ověřena platnost Lambert-Beerova zákona pro koncentrace menší než  $10^{-2}$  mol/l. Měřené koncentrace byly v řádu jednotek  $\mu\text{mol/l}$ . Při měření koncentrace nastala největší chyba měření 4% od „relativně správné“ hodnoty koncentrace připravené předem.

Jelikož tato metoda patří mezi velmi citlivé, nelze vyloučit spoustu chyb, které mají na měření přímý vliv. Při měření musí být dodrženo spoustu zásad – např. čistota skla kyvety, správně připravená koncentrace měřeného roztoku, čas potřebný ke změření a ustálení absorbance, správně zkalibrovaný spektrofotometr atd. I přes snahu vyvarovat se těchto chyb, je vidět, že i přesto měli na měření vliv a do jisté míry hodnoty ovlivnily.



## PŘÍLOHA 2

 <p>VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ</p>	<b>Název úlohy</b>	Měření excitačně emisních spekter di-4-ANEPPS
	<b>Jméno</b>	Dušan Pavlík

## ZADÁNÍ:

Proměřte pomocí spektrofluorimetru excitačně emisní spektra napětově citlivého barviva di-4-ANEPPS v různých prostředích. Měření spekter proveďte v roztoku metanolu (MeOH), dimetylsulfoxidu (DMSO) a Krebsově roztoku (KH).

Vyhodnoťte naměřená spektra a pokuste se zdůvodnit naměřené výsledky.

## ROZBOR:

Každá fluorescenční látka je charakterizována excitačním a emisním pásem. Excitační pás je rozsah vlnových délek, při kterých dochází vlivem dodání energie k excitaci molekuly. Vlnová délka, při které dochází k nejefektivnější excitaci molekul, charakterizuje tzv. maximum excitačního pásu. Při použití této vlnové délky pro excitaci dochází k nejintenzivnější fluorescenci.

Spektrum fluorescence je charakterizováno emisním pásem s maximem, kterému odpovídá určitá vlnová délka, při které pozorujeme nejintenzivnější fluorescenci. Vzdálenost excitačního a emisního maxima se nazývá Stokesův posuv. Tento rozdíl mezi energií absorbovaného a emitovaného záření je způsoben energetickými ztrátami, které se projevují během excitace fluorescenční molekuly a jejím návratu do rovnovážného stavu. Z tohoto důvodu je vlnová délka emitovaného světla vyšší než použitá délka budicího světla.

Další vlastností je nezávislost relativního tvaru emisního spektra na použité excitační vlnové délce. Pokud pro excitaci molekuly použijeme vlnovou délku odpovídající maximu excitačního pásu, dosáhneme při fluorescenci nejvyšší možné intenzity. Při změně excitační vlnové délky dostaneme stejné emisní spektrum, které se bude lišit pouze vyzařovanou intenzitou (relativní tvar spektra zůstane zachován).

Proto je vždy nejvýhodnější použít k excitaci vlnovou délku odpovídající maximu excitačního pásu a fluorescenci registrovat na vlnové délce odpovídající maximu v emisním pásu.

Dále je emisní spektrum fluoroforu silně závislé na polaritě rozpouštědla, obzvláště jedná-li se o polární fluorofor. Tato vlastnost může být na jedné straně užitečná, chceme-li například fluorofor využít k měření polaritě prostředí ve kterém se nachází, na druhé straně naopak tato vlastnost může být nežádoucí, potřebujeme-li aby fluorofor vykazoval v daném prostředí co nejintenzivnější fluorescenci.

Při excitaci fluorescenční molekuly obvykle dochází ke zvětšení jejího dipólového momentu v porovnání s dipólovým momentem v jejím základním (rovnovážném stavu). To je způsobeno tím, že dochází k částečné změně struktury molekuly. Tato změna způsobí, že po excitaci molekuly a změně jejího dipólového momentu dojde ke ztrátě části excitační energie tím, že molekula se musí v roztoku přeorientovat tak, aby dosáhla rovnovážného stavu s okolím. Tato ztráta energie samozřejmě roste s polaritou rozpouštědla. Obecně se tyto energetické ztráty projevují v posuvu emisního spektra do vyšších vlnových délek.

## PRACOVNÍ POSTUP:

1. Vlastnímu měření excitačně emisních spekter předchází poměrně náročná příprava konkrétního fluorescenčního barviva. Tuto přípravu není dobré podcenit, jelikož obecně jsou fluorescenční barviva poměrně finančně nákladná a rovněž nelehce dostupná.
2. Barvivo di-4-ANEPPS se dodává v množství 1 nebo 5 mg v podobě sublimačně vysušeného prášku. Takto je barvivo možné skladovat při pokojové teplotě, na suchém a před světlem chráněném místě zhruba po dobu 6-ti měsíců.
3. V tomto stavu je však barvivo nevhodné k měření. Proto je nutné nejprve připravit tzv. zásobní roztok s nímž potom dále pracujeme. Látky vhodné pro přípravu tohoto zásobního roztoku jsou methanol, DMSO, DMF. V tomto případě připravíme zásobní roztok barviva v DMSO v koncentraci 1mg/ml, což odpovídá zhruba molární koncentraci 2mM. Poté, co je zásobní roztok

připravený, je nutné ho uchovávat při teplotách od 2 do 6 °C a opět pečlivě chránit před slunečním zářením.

4. Poté můžeme přistoupit k přípravě jednotlivých roztoků (prostředí), ve kterých budeme provádět fluorescenční měření. V tomto případě připravíme:

1. Roztok MeOH (methanolu) spolu se zásobním roztokem, tak aby výsledná koncentrace byla  $10^{-5}M$
2. Roztok KH (Krebs-Henseleitův roztok) spolu se zásobním roztokem, tak aby výsledná koncentrace byla rovněž  $10^{-5}M$ .

Složení KH: 118 mmol NaCl, 24 mmol NaHCO<sub>3</sub>, 4,2mmol KCl,  
1,2 mmol KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1,2mmol MgCl<sub>2</sub>, 5,5mmol glukózy,  
10 mmol taurinu, 1,2 mmol CaCl<sub>2</sub>

Připravené roztoky opět nevystavujeme před vlastním měřením slunečnímu záření

5. Nyní lze přistoupit k měření excitačně emisních spekter pomocí spektrofluorimetru. V tomto případě byl použit pro měření spektrofluorimetr AMINCO – Bowman Series 2 (THERMO Electron Corporation). Pro měření vybereme vhodné kyvety (od kyvet pro spektrofotometrická měření se liší tím, že mají průhledné všechny čtyři stěny – jeden směr se používá pro excitační paprsek a druhý směr, který je o 90° pootočený, pro registraci emisního záření). Během měření je nutné zajistit konstantní teplotu roztoků v měřicích kyvetách. Tento spektrofluorimetr obsahuje prvek, který stabilizuje teplotu v měřicích kyvetách. Tuto teplotu ponecháme nastavenou během celého měření na 25°C.

6. Na obslužném SW ke spektrofluorimetru nejprve nastavíme první scan pro určení nejvhodnější excitační a emisní vlnové délky a vložíme první roztok. Dále nastavíme požadovaný rozsah vlnových délek pro proměření excitačně emisních vlnových délek a požadovaný krok s kterým se mění postupně vlnová délka monochromátorů. Při prvním měření se může stát, že naměřená inentzita fluorescence bude mimo rozsah, který je schopen přístroj registrovat. V tomto případě provedeme úpravu intenzity emisního monochromátoru v obslužném SW, tak abychom se vešli do měřicích rozsahů

přístroje. Pokud během měření tuto hodnotu změníme, je nutné (pokud budeme spektra různých roztoků porovnávat) přepočítat naměřené hodnoty intenzit přes klasickou trojčlenku. Tím zajistíme stejná měřítka pro další zpracování naměřených spekter. Toto je obzvláště vhodné, pokud měříme fluorescenci ve dvou různých prostředích, z nichž jedno vykazuje oproti druhému výrazně slabší fluorescenci. Takto popsané měření provedeme i s druhým připraveným roztokem.

7. Naměřená data lze exportovat ve formátu \*.txt. Tato data obsahují sloupec s hodnotami vlnové délky a druhý sloupec s naměřenými intenzitami.
8. Získaná data dále vhodně zpracujeme a zobrazíme (viz. Měření)

## MĚŘENÍ:

Po předchozí přípravě jednotlivých roztoků o koncentracích 2mM se nejprve vložil vzorek barviva v MeOH, na kterém se provedl excitační a emisní scan pro určení hodnot pro nastavení excitačního a emisního monochromátoru přístroje. Přístroj po naměření hodnot graficky zobrazí a určí maxima spekter. Na základě naměřených hodnot byl dále excitační monochromátor nastaven na 468nm a emisní monochromátor na 687nm. Během prvního scanu bylo ještě nutné upravit citlivost detektoru z původní hodnoty 870V na 800V, tak aby naměřený rozsah hodnot byl menší než rozsah přístroje.

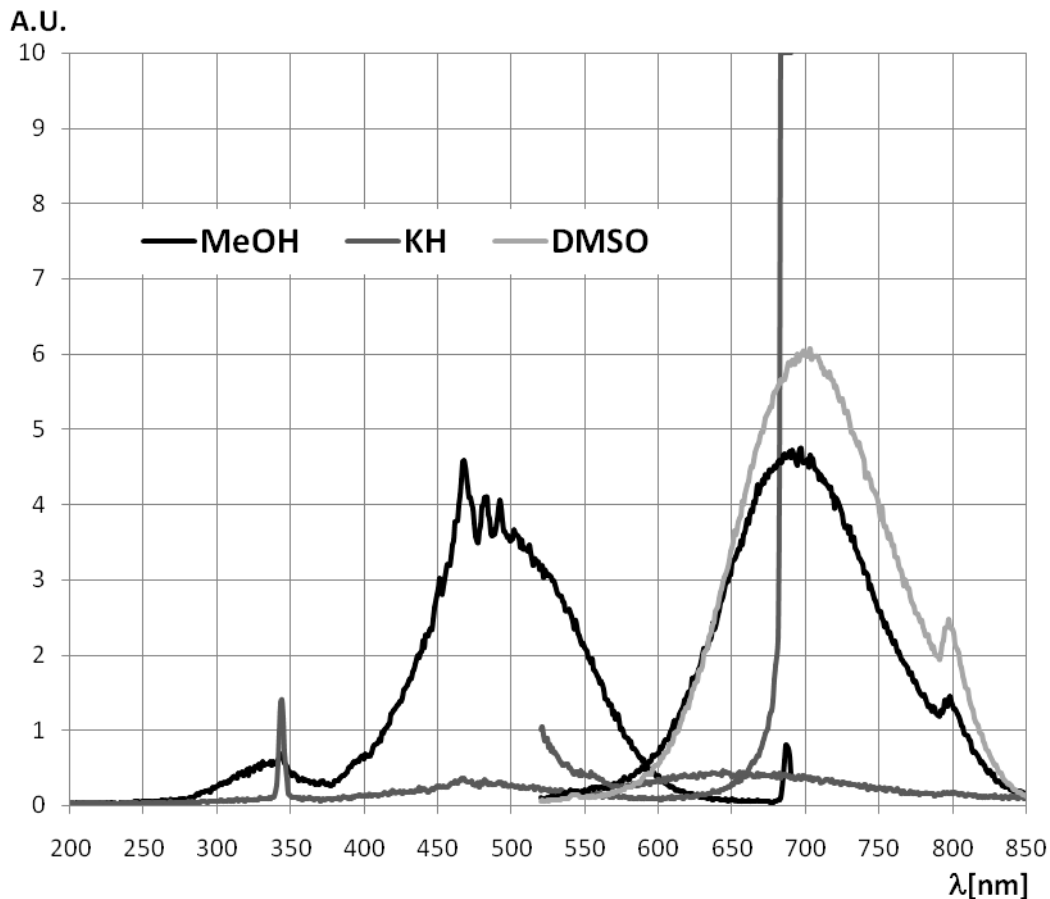
Po prvním měření došlo postupně na proměření spekter barviva v jednotlivých prostředích. U roztoku KH bylo nutné zvětšit citlivost detektoru na 870V z důvodu slabé fluorescence. Původní nastavené parametry monochromátorů zůstaly nezměněny.

Během měření byla udržována teplota roztoku v měřicích kyvetách na 25°C. Přístroj umožňuje regulovat teplotu podle potřeby, respektive dokáže během měření zachovat konstantní teplotu a tím zaručit stejné podmínky pro všechna měření.

Po dokončení měření byla naměřená data exportována z formátu \*.txt do tabulkového editoru, v kterém byla zobrazena a zpracována.

Naměřená data byla nejprve graficky zobrazena tak, jak byla naměřena bez jakýchkoliv úprav. Výsledek lze vidět na následujícím grafu (Graf 5).

Neupravená naměřená spektra v absolutních hodnotách

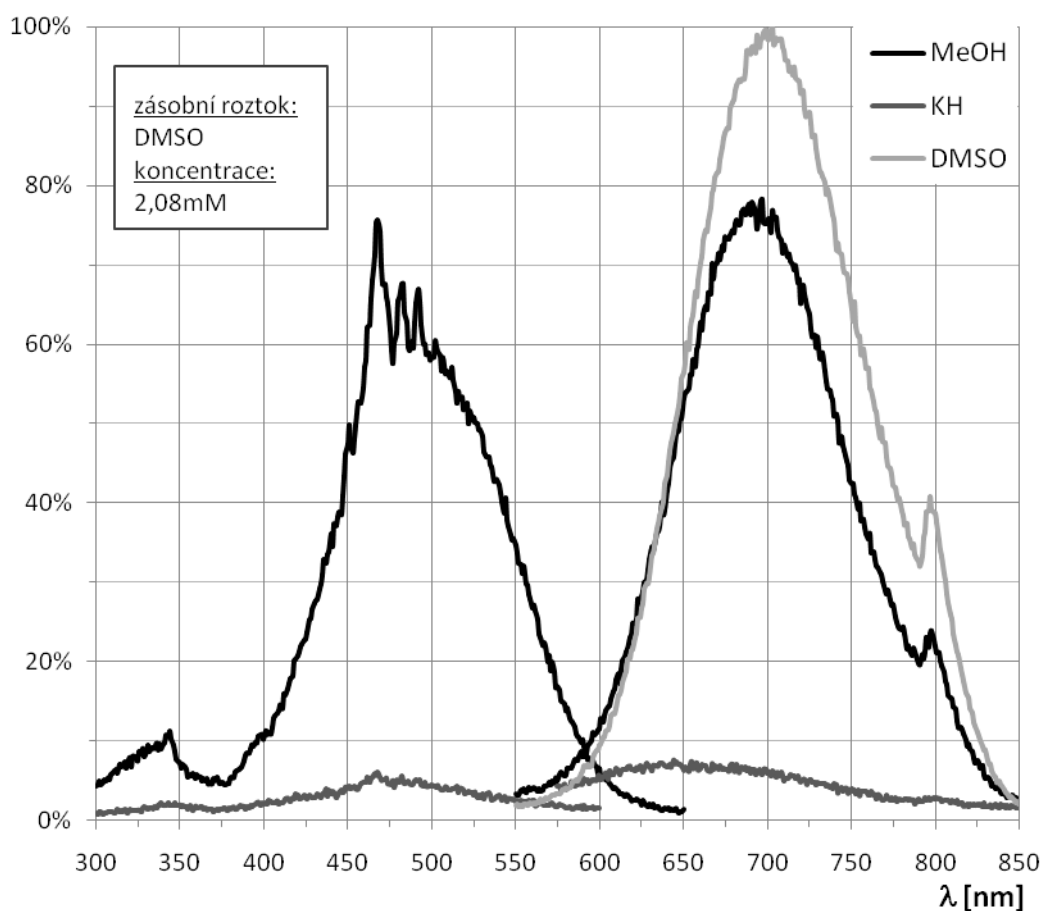


**Graf 5** Naměřená excitačně emisní spektra di-4-ANEPPS (před úpravou)

V grafu č.5 lze vidět data tak, jak byla získána. Tento graf obsahuje určité rysy, které nemají s excitačně emisními spektry nic společného a lze je přisuzovat chybám měření. Jedná se o pík na vlnové délce cca 345nm. Tento pík přísluší 2.harmonické frekvenci použité excitační lampy. Rovněž pík na vlnové délce 685nm, který přísluší 1.harmonické frekvenci. Při dalším zpracování hodnot budou tyto dva píky odstraněny.

V dalším grafu (Graf 6) jsou spektra již upravená a jsou vůči sobě relativní – lze porovnat jednotlivé intenzity fluorescence ve třech různých prostředích.

**Excitačně emisní spektra di-4-ANEPPS**  
(koncentrace roztoků  $10^{-5}M$ )



**Graf 6** Relativní excitačně emisní spektra di-4-ANEPPS (upravená)

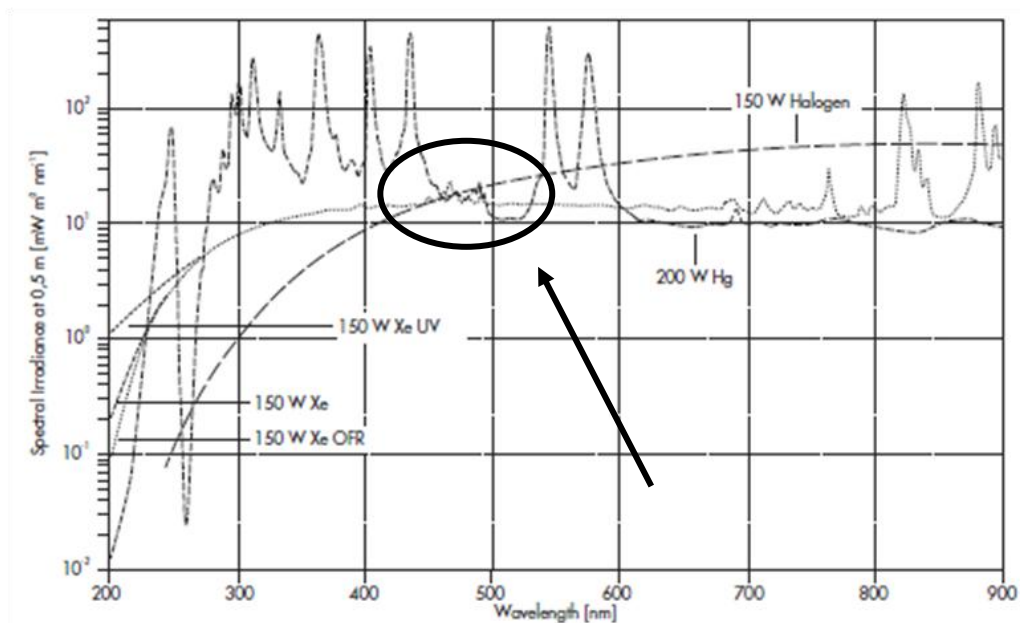
Z grafu 6 je vidět, že každé prostředí vykazovalo různou intenzitu fluorescence. Podle teoretických předpokladů by se intenzita fluorescence měla snižovat s rostoucí polaritou rozpouštědla. Jednotlivé hodnoty relativní permitivity jsou uvedeny v následující tabulce (Tabulka 5).

	methanol	DMSO	voda
<b>rel. permitivita <math>\epsilon_r</math></b>	33,8	46,7	78,5

**Tabulka 5** Relativní permitivita jednotlivých roztoků

Z tabulky 5 plyne, že nejintenzivněji by mělo barvivo fluoreskovat v MeOH (rozpor) a nejméně v Krebsově roztoku KH (shoda). Zde je možná dobré uvést, proč při reálném měření na živých buňkách, které jsou právě uměle vyživovány tímto roztokem (KH) je dosahováno poměrně dobrých výsledků co se týče intenzity fluorescence. Barvivo ve vodném prostředí obecně nefluoreskuje, ale pokud se právě naváže na buněčné membrány, dochází ke zlepšení fluorescence a proto jsou již výsledky měřitelné a lepší než v tomto případě, kde je barvivo pouze rozpuštěno ve vodném prostředí roztoku KH.

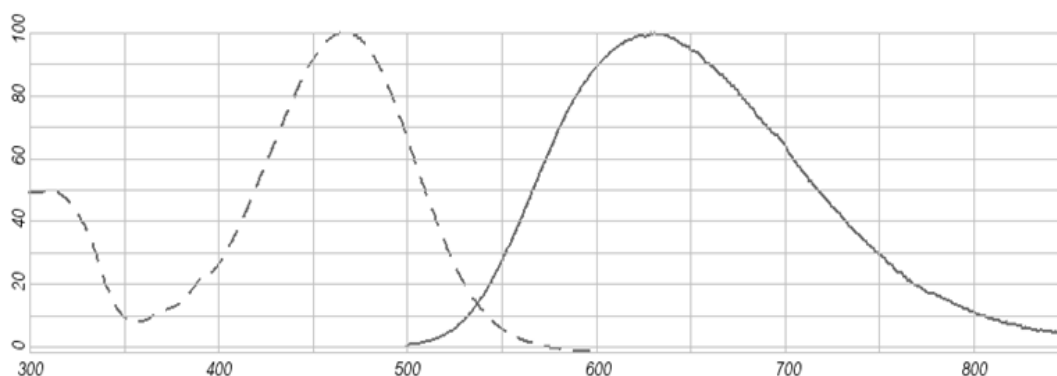
Další věc, která by nemusela mít přímo souvislost s excitačně emisními spektry je oblast několika menších píků v oblasti excitačního maxima MeOH (oblast kolem 475nm). Je možné, že toto zvlnění bylo způsobeno použitým zdrojem světla. Podle specifikací výrobce spektrofluorimetru je jako zdroj světla použita Xe 150W výbojka, jejíž spektrum vykazuje právě v této oblasti podobné píky, které se právě mohli projevit při měření spekter. Nicméně použitý zdroj světla by měl být na měřeném rozsahu poměrně stabilizovaný a proto tato teorie není jistá. Spektrum Xe 150W výbojky je zobrazeno na následujícím obrázku (Obrázek 14).



**Obrázek 14** Spektra halogenových výbojek (7)

Poslední věc, která ne zcela musí souviset s naměřenými spektry může být jemné zvlnění všech naměřených spekter v celém rozsahu. Toto zvlnění by mohlo být způsobeno nastavenou velkou citlivostí přístroje, popřípadě by mohlo být zapříčiněno slabým znečištěním měřicích kyvet. Jakékoliv nečistoty, ať již na povrchu kyvety nebo v roztoku, způsobují rozptyl světla a tím mohou zapříčinit toto zvlnění.

Pro srovnání spekter lze uvést spektra di-8-ANEPPS (Obrázek 15).



**Obrázek 15** Excitačně emisní spektrum di-8-ANEPPS (4)

## ZÁVĚR:

Prakticky byla ověřena závislost excitace emisních spekter na použitém prostředí. Jednotlivé hodnoty maxim a Stokesův posun jsou uvedeny v následující tabulce (Tabulka 6).

Prostředí	Excitace (max)	Emise (max)	Stokesův posun	Rel. intenzita (max)
MeOH	475nm	690nm	215nm	0,78
DMSO	-	700nm	-	1,0
KH	460nm	650nm	190nm	0,08

**Tabulka 6** Porovnání naměřených hodnot u jednotlivých prostředí

Během zpracování hodnot se vyskytlo mnoho jevů, které nepřímou souvisí s excitace emisními spektry a které by měli být před prezentací naměřených spekter eliminovány, jelikož jsou způsobeny chybami měření (diskutováno v předchozí kapitole „Měření“).