

Fluorescenční spektrofotometrie a její aplikace v materiálově orientovaných vědách

Miroslav Gremlica

Bakalářská práce
2010



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

nascannované zadání s. 1

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická
Ústav fyziky a mater. inženýrství
akademický rok: 2009/2010

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Miroslav GREMLICA**
Studijní program: **B 2808 Chemie a technologie materiálů**
Studijní obor: **Chemie a technologie materiálů**
Téma práce: **Fluorescenční spektrofotometrie a její aplikace
v materiálově orientovaných vědách**

Zásady pro vypracování:

1. Zpracujte literární rešerši (max. v rozsahu 30 A4 stránek) na téma aplikace fluorescenčních metod v materiálově orientovaných vědách.
2. Stručně popište jev fluorescence, popište Jablonskeho diagram.
3. Zaměřte se zejména na oblast koloidně-povrchové chemie a biochemie.
4. Provedte měření excitačních a emisních spekter vybraných typů fluoroforů, případně naměřte jejich koncentrační závislost.
5. 4) Citujte veškerou použitou literaturu, včetně webovských stránek.
6. 5) Zpracujte seznamy tabulek, obrázků, grafů a zkratk.

nascannované zadání s. 2

Rozsah práce:

Rozsah příloh:

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

1. P.C. Hiemenz, R. Rajagopalan: Principles of Colloid and Surface Chemistry. Third Edition. Marcel Dekker, Inc., New York, Basel (1997). ISBN 0-8247-9397-8.

Vedoucí bakalářské práce:

prof. Ing. Lubomír Lapčík, Ph.D.
Ústav fyziky a mater. inženýrství

Datum zadání bakalářské práce:

15. února 2010

Termín odevzdání bakalářské práce:

2. června 2010

Ve Zlíně dne 15. února 2010



doc. Ing. Petr Hlaváček, CSc.
děkan



Mgr. Aleš Mráček, Ph.D.
ředitel ústavu

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že

- beru na vědomí, že odevzdáním diplomové/bakalářské práce souhlasím se zveřejněním své práce podle zákona č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, bez ohledu na výsledek obhajoby ¹⁾;
- beru na vědomí, že diplomová/bakalářská práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému dostupná k nahlédnutí, že jeden výtisk diplomové/bakalářské práce bude uložen na příslušném ústavu Fakulty technologické UTB ve Zlíně a jeden výtisk bude uložen u vedoucího práce;
- byl/a jsem seznámen/a s tím, že na moji diplomovou/bakalářskou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, zejm. § 35 odst. 3 ²⁾;
- beru na vědomí, že podle § 60 ³⁾ odst. 1 autorského zákona má UTB ve Zlíně právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona;
- beru na vědomí, že podle § 60 ³⁾ odst. 2 a 3 mohu užít své dílo – diplomovou/bakalářskou práci nebo poskytnout licenci k jejímu využití jen s předchozím písemným souhlasem Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně, která je oprávněna v takovém případě ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které byly Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně na vytvoření díla vynaloženy (až do jejich skutečné výše);
- beru na vědomí, že pokud bylo k vypracování diplomové/bakalářské práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tedy pouze k nekomerčnímu využití), nelze výsledky diplomové/bakalářské práce využít ke komerčním účelům;
- beru na vědomí, že pokud je výstupem diplomové/bakalářské práce jakýkoliv softwarový produkt, považují se za součást práce rovněž i zdrojové kódy, popř. soubory, ze kterých se projekt skládá. Neodevzdání této součásti může být důvodem k neobhájení práce.

Prohlašuji,

- že jsem na bakalářské práci pracoval samostatně a použitou literaturu jsem citoval.

Ve Zlíně 1.6.2010

.....
Podpis studenta

¹⁾ zákon č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, § 47 Zveřejňování závěrečných prací:

(1) Vysoká škola nevdělečně zveřejňuje disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce, u kterých proběhla obhajoba, včetně posudků oponentů a výsledku obhajoby prostřednictvím databáze kvalifikačních prací, kterou spravuje. Způsob zveřejnění stanoví vnitřní předpis vysoké školy.

(2) Disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce odevzdané uchazečem k obhajobě musí být též nejméně pět pracovních dnů před konáním obhajoby zveřejněny k nahlížení veřejnosti v místě určeném vnitřním předpisem vysoké školy nebo není-li tak určeno, v místě pracoviště vysoké školy, kde se má konat obhajoba práce. Každý si může ze zveřejněné práce pořizovat na své náklady výpisy, opisy nebo rozmnoženiny.

(3) Platí, že odevzdáním práce autor souhlasí se zveřejněním své práce podle tohoto zákona, bez ohledu na výsledek obhajoby.

²⁾ zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 35 odst. 3:

(3) Do práva autorského také nezasahuje škola nebo školské či vzdělávací zařízení, užije-li nikoli za účelem přímého nebo nepřímého hospodářského nebo obchodního prospěchu k výuce nebo k vlastní potřebě dílo vytvořené žákem nebo studentem ke splnění školních nebo studijních povinností vyplývajících z jeho právního vztahu ke škole nebo školskému či vzdělávacího zařízení (školní dílo).

³⁾ zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 60 Školní dílo:

(1) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení mají za obvyklých podmínek právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla (§ 35 odst. 3). Odpírá-li autor takového díla udělit svolení bez vážného důvodu, mo

(2) hou se tyto osoby domáhat nahrazení chybějícího projevu jeho vůle u soudu. Ustanovení § 35 odst. 3 zůstává nedotčeno.

(3) Není-li sjednáno jinak, může autor školního díla své dílo užít či poskytnout jinému licenci, není-li to v rozporu s oprávněnými zájmy školy nebo školského či vzdělávacího zařízení.

(4) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení jsou oprávněny požadovat, aby jim autor školního díla z výdělku jím dosaženého v souvislosti s užitím díla či poskytnutím licence podle odstavce 2 přiměřeně přispěl na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložily, a to podle okolností až do jejich skutečné výše; přitom se přihlédne k výši výdělku dosaženého školou nebo školským či vzdělávacím zařízením z užití školního díla podle odstavce 1.

ABSTRAKT

Předložená bakalářská práce se zabývá problematikou fluorescenčních spektrálních metod v materiálovém inženýrství. Fluorescence je fotochemický proces, při kterém dojde absorpci a následné emisi světla. Probíhá při vlnové délce viditelného a ultrafialového záření. Emitované světlo má jinou vlnovou délku než světlo absorbované. Měříme fluorescenční spektrum, jako závislost intenzity záření na vlnové délce pomocí fluorescenčního spektrometru.

Klíčová slova: Fluorescence, absorpce, emise, Jabloňského diagram, Stokesův posuv, fluorescenční spektrofotometr,

ABSTRACT

Bachelor thesis presented is studying problematic of fluorescence spectroscopic methods in material engineering. Fluorescence is a photochemical process in which takes place absorption and subsequent emission of light. It is realized at visible and ultraviolet radiation wavelength. Emitted light has a different wavelength than the absorbed light. There is measured fluorescence and absorbance spectrum, as a radiation wavelength dependency of intensity of emitted as well as of absorbed light by means of fluorescence spectrometer.

Keywords:

Fluorescence, absorption, emission, Jablonski diagram, The Stokes shift, Fluorescence spectroscopy

Rád bych tímto poděkoval svému vedoucímu prof. Ing. Lubomíru Lapčíkovi, Ph.D. za pomoc a vedení při vypracování této bakalářské práce.

OBSAH

ÚVOD	9
I TEORETICKÁ ČÁST	10
1 PODSTATA FOTOCHEMIE	11
1.1 SVĚTLO	11
1.1.1 Vlnový charakter	11
1.1.2 Částicový charakter	12
1.2 ZÁKLADNÍ FOTOCHEMICKÉ ZÁKONY A PRAVIDLA	12
1.2.1 Fotochemické zákony	12
2 LUMINISCENCE	13
2.1 ROZDĚLENÍ LUMINISCENCE	13
2.2 FOTOLUMINISCENCE.....	14
2.2.1 Excitovaný stav a jeho vlastnosti	15
2.2.2 Zhasínání excitovaných stavů	15
3 FLUORESCENCE	18
3.1 CHARAKTERIZACE FLUORESCENČNÍHO SPEKTRA.....	18
3.1.1 Stokesův posun.....	18
3.1.2 Základní vztahy fluorescenčního spektra.....	20
3.1.3 Doba života excitovaného stavu.....	22
3.1.4 Vliv prostředí na absorpční a emisní spektrum.....	22
3.2 FLUOROFORY	23
Fluorescein – FITC.....	23
3.3 NÁSTROJE PRO MĚŘENÍ FLUORESCENCE	24
3.4 SPEKTROFOTOMETR	24
3.4.1 Zdroj záření	25
3.4.2 Monochromátory	26
3.4.3 Kyveta	27
3.4.4 Fotonásobič	27
3.5 ANALYTICKÉ VYUŽITÍ FLUORESCENČNÍ SPEKTROFOTOMETRIE.....	28
3.5.1 Kvantitativní analýza	28
3.5.2 Kvalitativní analýza	28
ZÁVĚR	30
SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	31
SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK	33
SEZNAM OBRÁZKŮ	34
SEZNAM TABULEK	35

ÚVOD

Fluorescence je vědní obor fotochemie, který byl objeven na konci 19. století. Spadá do oblasti luminiscence, která je založena na emisi světla z látky. Tato emise nastává při návratu elektronu z excitovaného stavu na stav základní. Známe více druhů luminiscence, ale fluorescence je emise nejrychlejší, její přechod z excitovaného stavu je 10^6 - 10^9 s⁻¹. Takto rychlý přechod je možný proto, jelikož emise nastane z nízké energetické hladiny S₁ se stejnou multiplicitou.

Fluorescence má mnoho uplatnění. Asi nejširší má v analytické chemii, při kvantitativní a kvalitativní analýze. Dále pak nachází uplatnění v medicíně, potravinářství, biochemii. Zvláštní obor jsou tzv. fluorescenční sondy. Kdy dojde k nevlastní fluorescenci, teda kdy se na látku naváže fluoreskující sonda pomocí nekovalentní vazby a dojde ke změně fluorescence. Díky tomu pak dokážeme označit proteiny, nukleonové kyseliny nebo také DNA a pozorovat v lidském těle.

Proto se fluorescenci přikládá v poslední době stále větší obliba, než fosforescenci a jiným luminiscenčním procesům.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 PODSTATA FOTOCHEMIE

V klasické chemii se zabýváme reakcemi látek v základním stavu. Ve fotochemii se soustředíme na stavy s vyšší energetickou hladinou (excitované stavy) a jejich přechod zpátky na základní hladinu. Základním principem fotochemie je absorpce světla (fotonu) látkou a následná reakce nebo změna elektronového stavu molekuly.

1.1 Světlo

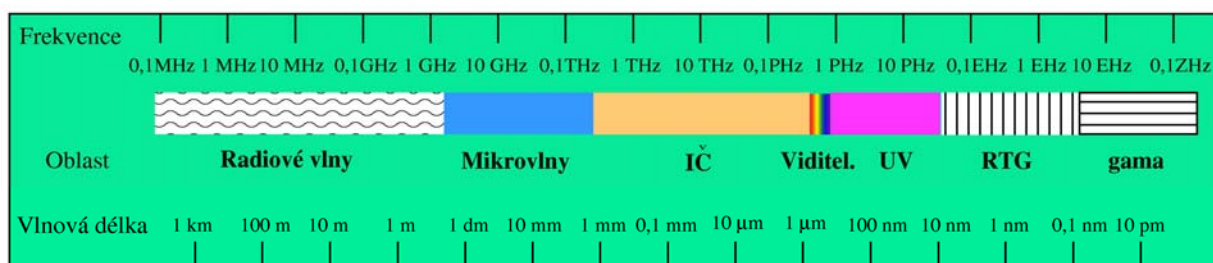
Světlo je velmi významnou formou energie. Díky světlu vidíme předměty, které buď sami vyzařují, nebo odrážejí, pohlcují či propouštějí světelné záření. Je dokázáno, že člověk získá asi 90% informací pomocí zraku, respektive pomocí světla. Jelikož si nedovedeme představit, jak světlo vypadá, přisuzujeme mu 2 charaktery – vlnový a částicový. [3]

1.1.1 Vlnový charakter

V roce 1865 odvodil J.C.Maxwell teorii, že světlo je jednou z forem elektromagnetické energie, která se šíří ve formě vln. Popsal to jako oscilaci elektrické a magnetické složky na sebe kolmé. Všechny druhy elektromagnetického záření (radiové vlny, infračervené záření, světlo, gama paprsky aj.) se pohybují ve formě vln a ve vakuu rychlostí světla. Viditelné záření má vlnovou délku 400–750 nm. Vlnová délka je dána frekvencí. Vztah mezi těmito dvěma veličinami je: [10]

$$\lambda = \frac{c}{f}$$

Kde λ je vlnová délka [m], c je rychlost světla ve vakuu [$c=3 \cdot 10^8 \text{ m} \cdot \text{s}^{-1}$] a f je frekvence [s^{-1}].



Obrázek 1 Elektromagnetické spektrum. [19]

Tato teorie popisu světla vedla k objasnění různých vlastností, jako např. odraz, polarizaci, lom světla. [1] [17]

1.1.2 Částicový charakter

Při popisu absorpce světla nebo jeho emise však teorie o vlnovém charakteru nestačí a proto na začátku 20. století zavedl Max Planck, že světlo existuje jako určité množství energie, tzv. světelné kvantum. Světelné kvantum popisuje určitou velikost energetické hladiny ve, kterých může částice existovat. Tuto částici nazýváme *foton*. Kdy velikost energie fotonu udává vztah:

$$E = h \cdot f$$

kde E je energie částice [J], h je Planckova konstanta [$h=6,6 \cdot 10^{-34}$ J.s] a f je frekvence záření [s^{-1}]. Foton je stabilní částicí, má nulovou klidovou hmotnost a nulový elektrický náboj. Jelikož se elektromagnetické záření pohybuje rychlostí světla, musí se i foton pohybovat rychlostí světla. Proto energie záření je přímo úměrná frekvenci. Energii, kterou foton nese, lze absorbovat nebo emitovat s interakcemi s jinými částicemi. Tuto teorii se dále zabývá kvantová fyzika. [1] [2] [15]

1.2 Základní fotochemické zákony a pravidla

1.2.1 Fotochemické zákony

První fotochemický zákon byl formulován chemiky Christian von Grotthus a John Draper na počátku 19. století:

„Chemickou změnu soustavy vyvolá pouze záření soustavou absorbované.“

Druhý fotochemický zákon upřesňuje platnost prvního fotochemického zákona, který na základě vývoje kvantové teorie odvodili Johannes Stark a Albert Einstein:

„Počet aktivovaných molekul se rovná počtu absorbovaných světelných kvant (fotonů.)“

Jinými slovy: 1 foton = 1 transformace.

Další důležitý zákon je zákon o zachování energie:

V jakémkoliv izolovaném systému může být energie transformována z jednoho druhu na jiný, ale nemůže být vytvořena nebo zničena. [1]

2 LUMINISCENCE

Luminiscenci poprvé definoval již v roce 1889 E. Wiedemann, až na pár malých úprav, které zavedl A. M. Gurvič je luminiscence známá jako:

„Luminiscence je definována jako spontánní záření tělesa, představující přebytek nad teplotním zářením, které je charakterizováno dozníváním, jehož trvání značně převyšuje periodu světelných kmitů“ [3].

Jinak řečeno, látka, která absorbuje záření o vhodné vlnové délce, se nabudí do excitovaného stavu, tj. stav s vyšší energetickou hladinou. Tuto dodanou energii pak po určité době zpětně vyzáří ve formě elektromagnetického záření. Přitom musí platit, že doba života excitovaného stavu musí být delší, než perioda světelných oscilací $\tau=10^{-15}$ s.

Luminiscenci vykazuje většina organických látek, nositelem luminiscenčního záření je molekula. U anorganických látek také dochází k vzniku luminiscenčního záření, ale to již není zapříčiněno molekulou, ale pomocí shluku atomů, tzv. krystalů [4].

2.1 Rozdělení luminiscence

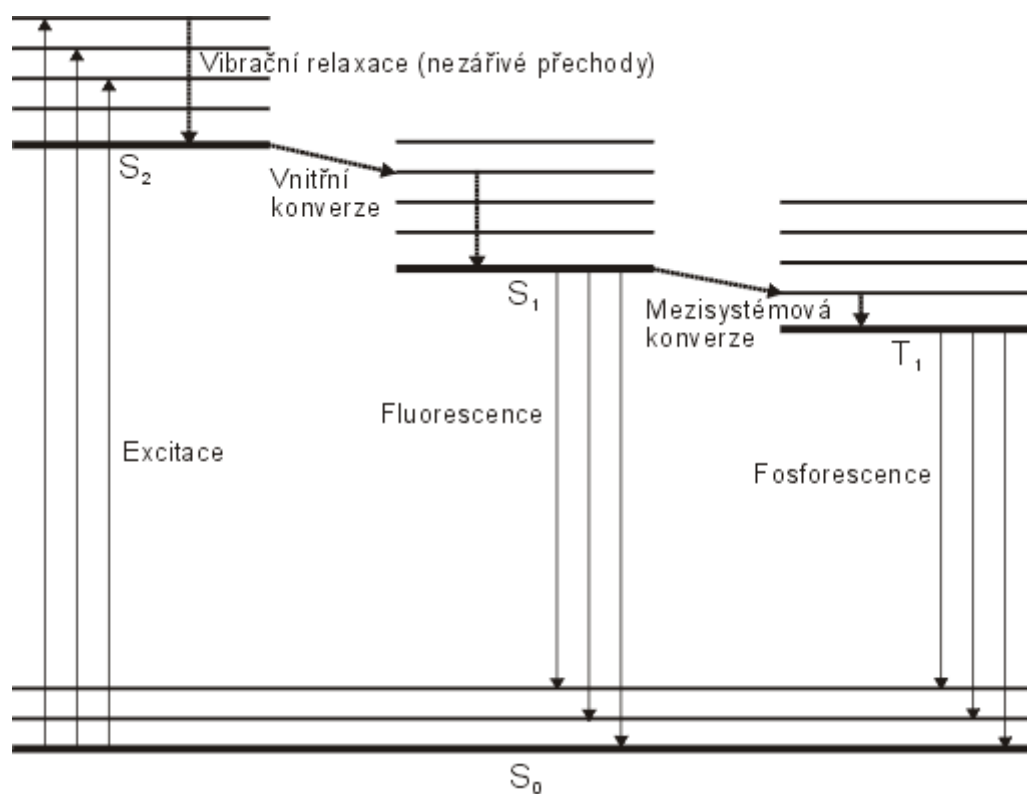
Luminiscenci rozdělujeme podle způsobu, jakým je dodávána excitační (budící) energie.

- *Fotoluminiscence* – excitační energie je dodávána ve formě viditelného nebo UV záření.
- *Elektroluminiscence* – energie je dodávána přiložením elektrického pole a průchodu elektrického proudu látkou. Nejvhodnějšími látkami jsou vesměs polovodiče se širokým zakázaným pásem.
- *Chemiluminiscence* – existuje pouze pro určitý typ exotermních chemických reakcí, kdy uvolněné reakční teplo nebo jeho část je vyzářena ve formě světla.
- a další typy: *Bioluminiscence*, *Katodoluminiscence*, *Mechanoluminiscence*, atd.

Z hlediska využití je nejdůležitější fotoluminiscence, která se využívá v analytické chemii, biochemii, u polovodičů atd [1, 3].

2.2 Fotoluminiscence

Při fotoluminiscenci dochází k interakci fotonu o frekvenci UV nebo VID záření s částicí a dojde k předání energie valenčním elektronům molekuly. Většinou se vyskytuje u organických molekul s dvojnými vazbami (například aromatické uhlovodíky). Absorpce závisí převážně na struktuře a skupenství látky, ale také na teplotě, pH a jiných faktorech prostředí. Při absorpci záření využijí valenční elektrony dodanou energii na možnost dostat se na vyšší hladinu do tak zvaného excitovaného stavu. V excitovaném stavu nevydrží elektrony dlouho, proto mají relativně krátkou dobu života a dojde k návratu do základního stavu. Jak tyto procesy probíhají, vysvětluje Jabloňského diagram [1, 5].



Obrázek 2 – Jabloňského diagram: S_0 – základní stav; S_1, S_2 – excitované singletové stavy; T_1, T_2 – excitované tripletové stavy.

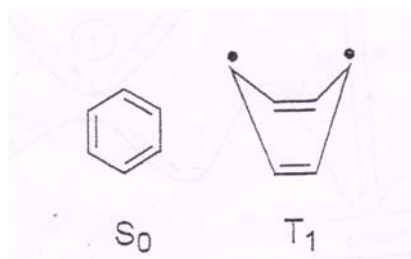
2.2.1 Excitovaný stav a jeho vlastnosti

Při absorpci 1 fotonu molekulou v základním stavu S_0 , dojde k excitaci jednoho valenčního elektronu do nejbližšího neobsazeného orbitalu s vyšší energií do tzv. excitovaných stavů. Známe 2 druhy těchto stavů:

- Singletový stav* - S_1 – charakterizovaný energií E_S , kde jsou spiny obou elektronů antiparalelní; Stav S_2, S_3, \dots - relaxují v krátkém čase nezářivými pochody do stavu S_1 .
- Tripletový stav* - T_1, T_2 – charakterizovaný energií základního stavu E_T , kde jsou spiny obou elektronů paralelní. Stav T_2, T_3, \dots - relaxují v krátkém čase nezářivými pochody do stavu T_1 . Tento stav je získán mezisystémovým zakázaným přechodem ze stavu S_1 [1].

Při excitaci molekuly jsou přeorganizovány pouze elektrony. Tento jev se nazývá *Frankův-Condonův princip*. Elektron je před excitací umístěn na orbitalu $1s$, po excitaci je přemístěn do orbitalu jiného typu např. $2p$ (jiný tvar a symetrie), toto určuje prostorovou distribuci elektronové hustoty a dochází ke změně elektrického dipólu. Při přechodu z $1s$ do s_2 orbitalu je celková změna dipólu nulová, takže se nevytváří dipól [1].

Tvar molekuly v excitovaném stavu může být zcela jiný jak v stavu základním, Je to způsobeno rozdílnou elektronovou konfigurací. Elektronová konfigurace způsobuje hybridizaci atomů v excitovaném stavu a je doprovázena změnou délky vazeb nebo rozložení elektronové hustoty v atomu. Jako názorný příklad můžeme uvést excitaci benzenu ve stavu S_0 a T_1 [1].



Obrázek 3 – Změna geometrie u benzenu ve stavu S_0 a T_1 .

2.2.2 Zhasínání excitovaných stavů

Jak jsem se už zmínil dříve, tak doba života excitovaných molekul je krátká, protože dochází k emisi získané energie absorpcí, tzv. *zhasínání excitovaných stavů*. Dochází

k přechodu z excitovaného stavu do stavu základního. Tato emise se může projevat různými způsoby:

1) Zářivé přechody

- Excitované molekuly přechází z vyššího energetického stavu do nižšího, díky tomu že vyzařuje energii ve formě fotonu.
- Rozlišujeme mezi samovolnou (spontánní) emisí a stimulovanou emisí. Spontánní je když k vyzáření dojde bez účinku vnějšího zdroje záření. U stimulované emise dochází k tomu, že účinkem vnějšího elektromagnetického záření, které vstoupí do excitované molekuly a vyvolá elektromagnetickou poruchu molekuly, která vede k vyzáření energie ve formě fotonu o stejné frekvenci, jako dopadající vnější elektromagnetické záření [1].
- Přechod $S_1 \rightarrow S_0$ je dovolený emisní proces, který je charakterizován rychlostní konstantou $k_f = 10^6 - 10^7 \text{ s}^{-1}$. Tento přechod se nazývá **Fluorescence**.
- Přechod $T_1 \rightarrow S_0$ je zakázaný emisní proces, který je charakterizován rychlostní konstantou $k_p = 10^{-2} - 10^{-4} \text{ s}^{-1}$. Tento přechod se nazývá **Fosforescence**.
- **Zabrzdná fluorescence** – díky složitým vícestupňovým mechanismům je mnohem pomalejší přechod na základní hladinu. Např. triplet-triplet anihilace, termicky aktivovaná zabrzdná fluorescence.
- **Rezonanční fluorescence** – vyznačuje se tím, že délka vlny absorbovaného záření je stejná jako délka vlny emitovaného záření [1].

2) Nezářivé přechody

- vyskytují se mezi vibračně-rotačními hladinami
- nemění se energie systému, proto nedochází k emisi záření
- **Vnitřní konverze** – dovolený přechod mezi stavy se stejnou spinovou multiplivitou, např. $S_1 \rightarrow S_2$. A je charakterizován rychlostní konstantou k_{ic} .
- **Mezisystémový přechod** – zakázaný přechod mezi excitovanými stavy s rozdílnou spinovou multiplivitou, např. $S_1 \rightarrow T_1$. Je charakterizován rychlostní konstantou k_{isc} .

- **Vibrační relaxace** – přechod z vyšších vibračních stavů do základního stavu za uvolnění tepla. [1]

3) *Fotochemické reakce*

- dojde ke změně látky, např.: $A+h\nu\rightarrow B$

3 FLUORESCENCE

Fluorescence je spontánní jev, při kterém dojde z excitovaného stavu molekuly k samovolnému vyzáření fotonu, tzv. emisi záření. Pro fluorescenci je charakteristická doba dosvitu po ukončení excitaci v řádu 10^6 až 10^9 s⁻¹. Při tomto přechodu dochází ze stavu S₁ do stavu S₀ (základní stav). Pouze u některých molekul jako je např. azulén, může dojít k přechodu ze stavu S₂.

Chceme-li aby molekula fluoreskovala, musíme splnit některé principy:

- Absorpce záření o dané vlnové délce nesmí způsobit chemickou přeměnu molekuly.
- Mezisystémový přechod ze stavu S₁ do T₁ musí být natolik pomalý, aby nedošlo k přechodu dřív, než dojde k fluorescenci.
- Bimolekulární procesy nesmí konkurovat.
- Geometrické uspořádání molekuly pozitivně ovlivňuje účinnost fluorescence [1].

3.1 Charakterizace fluorescenčního spektra

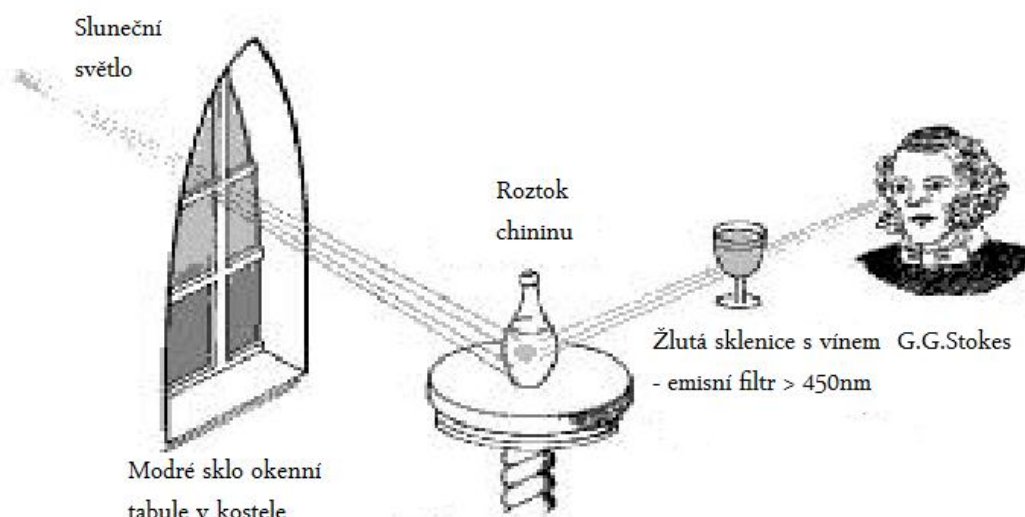
Fluorescenční spektrum je dána závislostí absorbance systému na vlnové délce. Dá se charakterizovat několika základními pojmy.

3.1.1 Stokesův posun

V roce 1852 G. G. Stokes na univerzitě v Cambridge sledoval průchod slunečního světla přes okenní tabuli do nádoby s roztokem chininu. Přes sklenici vína pozoroval okem, jak se z ultrafialového světla stává viditelné světlo [5].

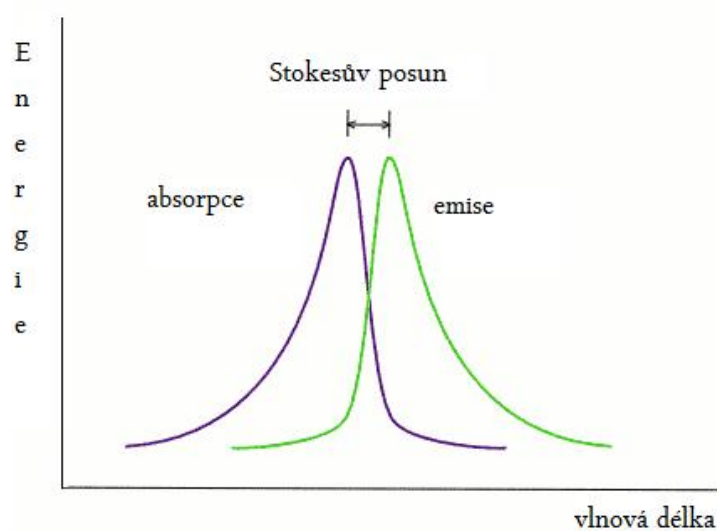
Po tomto pokus definoval G. G. Stokes zákon, který je doteď znám pod názvem Stokesův posuv. Ukazuje na to, jak se změní energie fotonu absorbovaného oproti fotonu, který vyzáří fluorofor při přechodu z excitovaného stavu do základního stavu.

Rozdíl mezi energií fotonů absorbovaných a vyzářených je charakteristická pro každou molekulu a nazývá se Stokesův posun. Neboli vlnová délka fluorescenčního záření je větší jako vlnová délka absorpčního záření, viz. Obrázek 5 [5].



Obrázek 4 – Stokesův pokus s roztokem chininu [5].

Tyto ztráty jsou vyvolané nezářivými procesy (relaxací vibrační energie a vnitřní konverzí), když se molekula nachází v excitovaném stavu. Tento druh relaxace je známý jako Kashovo pravidlo. Proto emise nastane ze stavu S_1 .



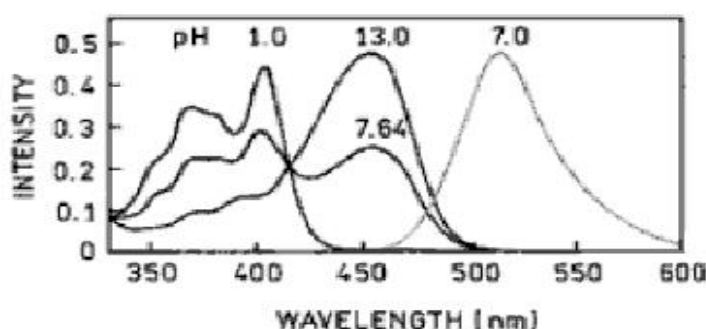
Obrázek 5 – Stokesův posun.

Výjimky ze zrcadlové symetrie absorpčního a emisního spektra jsou obvykle důsledkem rozdílného geometrického uspořádání atomových jader v excitovaném stavu oproti uspořádání ve stavu základním. Výjimky tvoří i molekuly s citlivostí na různé pH. Např. fluorofor 1-hydroxypyren-3,6,8-trisulfát (HPTS), který má jiné emisní spektrum při nízkém a vyso-

kém pH. Je to způsobeno hydroxylovou skupinou, která je ionizována při nízkém pH a proto vykazuje větší Stokesův posuv než u molekul s vyšším pH [5].

Další výjimky tvoří biochemické fluorofory, např. fenol a tyrosin. U těchto látek závisí na koncentraci [5].

Šířka emisního spektra je závislá na teplotě, čím vyšší teplota tím bude širší emisní spektrum a naopak, čím nižší teplota tím užší spektrum [1].



Obrázek 6 – Absorpční (pH= 1; 7,64 a 13) a emisní spektrum (pH=7) pro 1-hydroxypyren-3,6,8-trisulfonát ve vodě.

3.1.2 Základní vztahy fluorescenčního spektra

1) Kvantový výtěžek Φ_f

Pomocí kvantového výtěžku hodnotíme účinnost fluorescence. Kvantový výtěžek fluorescence je procento počtu emitovaných fotonů k počtu absorbovaných fotonů.

$$\Phi_f = \frac{\nu_f}{\nu_a}$$

Kde: ν_f ...rychlost fluorescence; ν_a ...rychlost absorpce

Kvantový výtěžek u fluorescence je závislý na účinnosti vedlejších deaktivčních procesů, mezi tyto procesy patří mezi systémový přechod z S_1 na T_1 a nezářivé přechody. Φ_f reprezentuje účinnost emise. Není závislý na vlnové délce excitačního záření, tzv. *Vavilovovo pravidlo* [1] [12].

U fluorescence dosahuje kvantový výtěžek hodnot v rozmezí od 0 do 1. U nefluorescenčních látek je kvantový výtěžek roven nule nebo velice blízký nule.

2) Kvantová účinnost Φ

Kvantová účinnost Φ je poměr mezi počtem vzniklých nebo zaniklých částic ku počtu molů vzniklého absorpci 1 molu fotonů. Vyjadřuje pravděpodobnost uskutečnění jednotlivých fotochemických kroků.

3) Zářivý tok emitovaný vzorkem

Je dán Lambert-Beerovým zákonem

$$A = \varepsilon \cdot c \cdot d = -\log T = \log I_0/I$$

kde: A – absorbance [-]; c - koncentrace rozpuštěné látky [$\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$]; d - tloušťka absorbující vrstvy [m]; ε - molární absorpční koeficient [$\text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1} \cdot \text{dm}$]; T - transmitance (propustnost) [-]; I_0 - intenzita vstupujícího paprsku [W/m^2]; I - intenzita paprsku po průchodu absorbujícím prostředím [W/m^2]

4) Intenzita fluorescence

Počet fotonů procházející v jednotkovou plochou za jednotku času.

Tabulka 1 – Fluorescence některých organických molekul.

Molekula	Φ_f	$k_f[\text{s}^{-1}]$	$k_{isc}[\text{s}^{-1}]$	stav
Benzen	~0,2	$2 \cdot 10^6$	10^7	π, π^*
Naftalen	~0,2	$2 \cdot 10^6$	$5 \cdot 10^6$	π, π^*
Anthracen	~0,4	$5 \cdot 10^7$	$5 \cdot 10^7$	π, π^*
Pyren	~0,7	10^6	10^5	π, π^*
Trifenylen	~0,1	$2 \cdot 10^6$	10^7	π, π^*
Stilben	~0,05	10^8	10^9	π, π^*
1-chlornaftalen	~0,05	10^6	$5 \cdot 10^8$	π, π^*
1-bromnaftalen	~0,002	10^6	10^9	π, π^*
1-jodnaftalen	~0,000	10^6	10^{10}	π, π^*
Benzeofenon	~0,000	$2 \cdot 10^6$	$5 \cdot 10^6$	n, π^*
Biacetyl	~0,002	10^5	10^8	n, π^*
Diazabicyklo[2.2.2]oktan	~1,0	10^6	10^5	n, π^*
Aceton	~0,001	10^5	10^9	n, π^*
Hexafluoraceton	~0,1	10^5	10^7	n, π^*

3.1.3 Doba života excitovaného stavu

Doba života je čas, který molekula stráví v excitovaném stavu. Je definován, jako čas potřebný k poklesu na $1/e$ hodnotu počáteční intenzity. Lze vyjádřit vztahem:

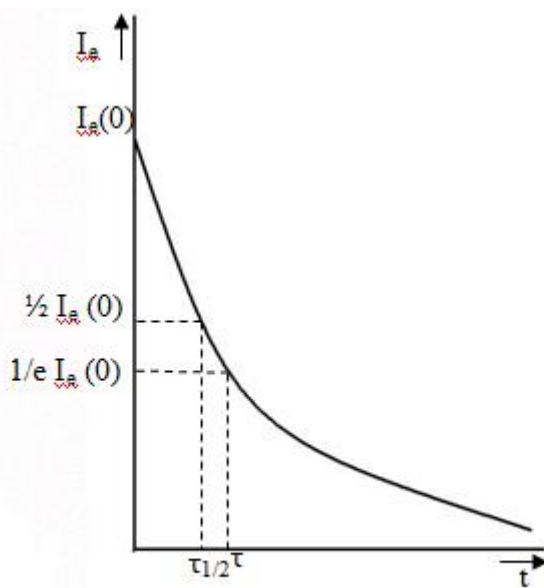
$$\tau = \frac{1}{k_e}$$

Kde τ ...doba života excitovaného stavu; k_e ...rychlostní konstant poklesu emise.

Lze také definovat poločas života excitovaného stavu $\tau_{1/2}$ a je to čas potřebný k tomu, aby se intenzita snížila na polovinu počáteční hodnoty:

$$\tau_{1/2} = \ln \frac{2}{k_e}$$

Kde $\tau_{1/2}$...poločas života excitovaného stavu; k_e ...rychlostní konstant poklesu emise [1].



Obrázek 7 – Závislost intenzity emise I_e na čase t [1].

3.1.4 Vliv prostředí na absorpční a emisní spektrum

V roztocích dochází vlivem elektrostatických interakcí mezi molekulami fluoroforu a rozpouštědla k solvataci fluoreskujících molekul. Vlivem různé solvatace molekul dochází ke změnám optických spekter a to v důsledku toho, že se část absorbované energie spotřebuje na relaxaci molekul rozpouštědla kolem molekuly fluoroforu v excitovaném i základním

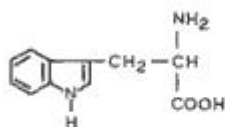
stavu. Z tohoto důvodu je emitovaná energie fluorescenčního záření menší, než by odpovídalo samotnému elektronovému přechodu [12].

3.2 Fluorofory

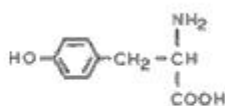
Fluorofory jsou látky, které jsou charakteristické tím, že absorbují záření o vlnové délce UV nebo viditelného záření a následně ho pak emitují o jiné vlnové délce. Emisní záření je pak udáváno funkční skupinou, kterou molekula obsahuje. Typické fluorofory známe: chinin (tonik), fluorescein, rhodamin B (nemrznoucí směsí, fluorescenční značení), akridinová oranž (DNA) atd. [12].

Fluorofory dělíme na:

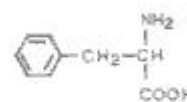
- a) **vlastní** – vyskytují se přirozenou fluorescencí. Mezi látky vyznačující se vlastní fluorescencí patří proteiny tryptofan, tyrozin a fenylalanin



Tryptophan



Tyrosine



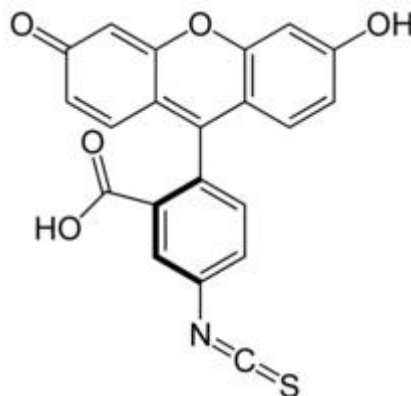
Phenylalanine

Obrázek 8 – Strukturní vzorce tryptofanu, tyrozinu a fenylalaninu.

- b) **nevlastní** – přidává se ke vzorkům, tzv. fluorescenční sondy nebo značky, které přidávají nefluoreskující látce fluorescenci. Pokud se k vzorkům váží kovalentní vazbou tak je nazýváme fluorescenční značky, pokud se váží nekovalentní vazbou tak je nazýváme fluorescenční sondy. Mezi nejznámější patří fluorescein (FITC), rhodamid (TRITC) a jiné deriváty [4-6, 8].

Fluorescein – FITC

Celým názvem fluorescein isothiokyanát s označením FITC, je nejběžněji používané značka pro označení proteinů, peptidů a jiných biomolekul. Jeho funkční skupinou je isothiokyanát $-N = C = S$.



Obrázek 9 – Fluorescein isothiokyanát. [8]

Jeho výhodou je dobrá nasákavost, vysoký kvantový výtěžek fluorescence, ale hlavně jeho snadná měřitelnost. Jeho absorpční maximum je 494 nm a emisní maximum je 521 nm. Stanovení se provádí pomocí skenové mikroskopie nebo průtokové cytometrie [6, 8].

Důležité jsou jeho deriváty, kterým se přikládá stále větší význam. Mají delší dobu vysvícení a více odolná vůči změně pH [8].

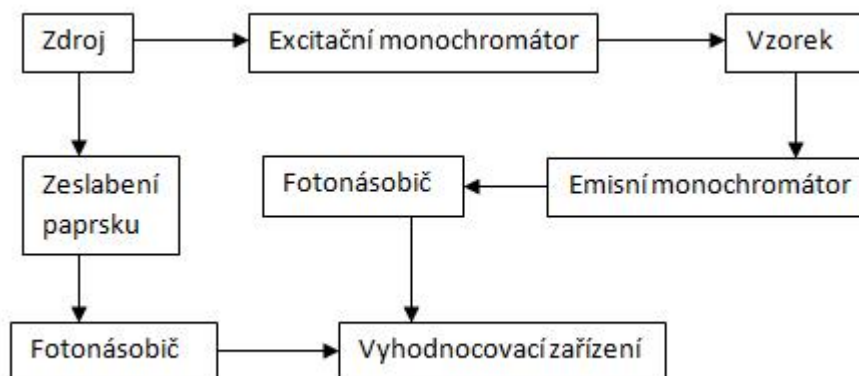
3.3 Nástroje pro měření fluorescence

- 1) *Spektrofotometr* – viz níže.
- 2) *Fluorescenční skenery* – moderní přístroje na měření fluorescence dvojrozměrných makroskopických objektů. Výhodou tohoto přístroje je, že rozlišuje více fluoroforů se stejnými emisními i excitačními spektry.
- 3) *Fluorescenční mikroskopy* – umožňují pozorovat fluorescence dvoj- nebo trojrozměrných objektů.
- 4) *Průtokové cytometry* – měří fluorescence velkého množství jednotlivých buněk a umožňují identifikaci a separaci jejich koncentrační rozložení dle jednotlivých kategorií (z angl. subpopulations) [12, 14].

3.4 Spektrofotometr

K měření fluorescenčního záření látek se využívá spektrofotometrů s fluorescenčními nástavci, které upravují záření na vhodnou vlnovou délku. Pro případ fluorescence je tato vlnová délka v rozsahu ultrafialové a viditelné oblasti. Většinou se používají 2 nástavce,

jeden pro excitaci a druhý pro emisi. Základní schéma fluorescenčního spektrofotometru vypadá takto: [16]



Obrázek 10 – Blokové schéma fluorescenčního spektrofotometru.

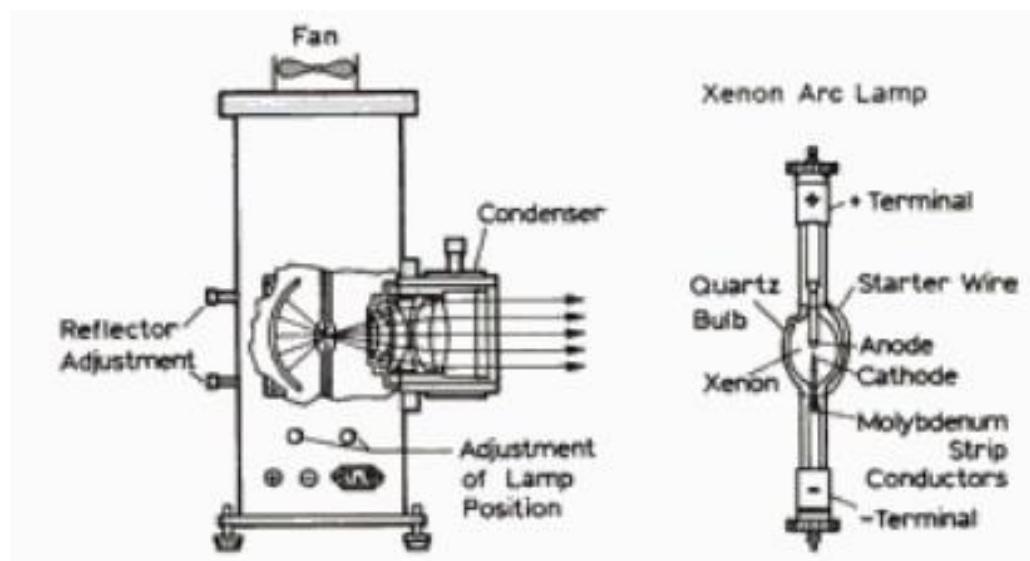
Ze zdroje vychází paprsek na rotující zrcadlový segment, který rozdělí paprsek na dva. Jeden paprsek vstupuje do excitačního monochromátoru, který upraví vlnovou délku na požadovanou frekvenci (viditelné nebo UV). Druhý paprsek slouží jako srovnávací. Po průchodu prvního paprsku monochromátorem dopadá na kyvetu se vzorkem, kde vyvolá fluorescenční emisi. Ta je sledována v pravém úhlu k zdrojovému paprsku a dopadá na emisní monochromátor, který izoluje vhodné vlnové délky záření pro měření na vyhodnocovacím zařízení. Podle toho jak máme zapojené vyhodnocovací zařízení, dělíme dva druhy fluorescenčních spekter [16]:

1. Monochromátor excitace je nastavený na danou vlnovou délku, která je absorbována vzorkem a zaznamenávána vyhodnocovacím zařízením dostaneme – emisní fluorescenční spektrum.
2. Monochromátor a vyhodnocovací zařízení je nastavenou na určitou vlnovou délku fluorescence, zaznamenávají se excitace různých vlnových délek excitačním monochromátorem a získáme – spektrum fluorescenční excitace [1].

3.4.1 Zdroj záření

U fluorescenčních spektrofotometrů se nejčastěji využívá vysokotlaká xenonová oblouková lampa. Tato lampa má rozsah záření od 250nm do 750nm. Xenonová lampa je zdraví škodlivá, její záření poškozuje rohovku a sítnici, proto musí být uchována mimo dosah

lidského oka. Plyn v lampě je pod vysokým tlakem až 10 atmosfér. Životnost je okolo 2000 hodin provozu. [5]



Obrázek 11 – Vysokotlaká xenonová oblouková lampa [5].

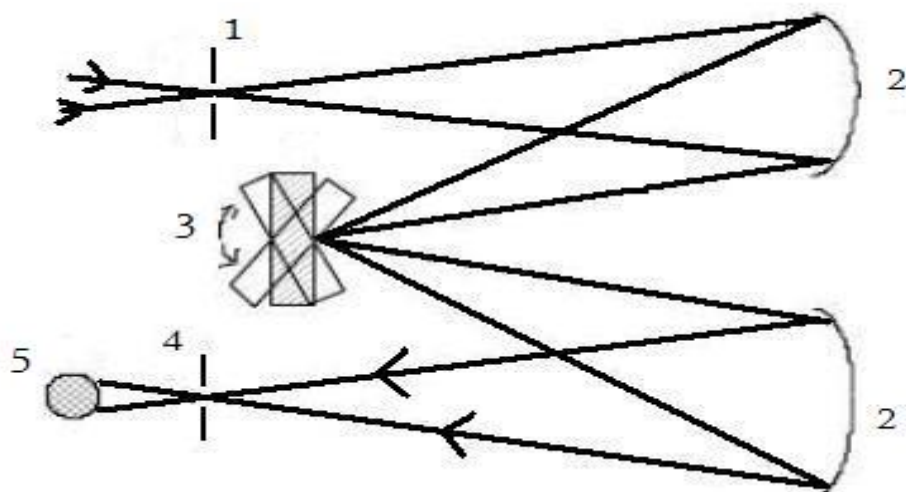
Mezi další často používaný zdrojem záření je vysokotlaká rtuťová lampa. Na rozdíl od Xenonové lampy má větší intenzitu záření, ale je soustředěná do linky [5].

Mnohdy se v drahých přístrojích vyskytují i lasery. Jelikož už sami o sobě vysílají monochromatické záření, není nutné před květou dávat monochromátor. Toto záření má rozsah vlnové délky mezi 360nm a 650nm [5].

3.4.2 Monochromátory

Monochromátor rozkládá pomocí disperzního elementu (hranol nebo difrakční mřížce) polychromatické nebo bílé záření na spektrum o zvolené vlnové délce, neboli úzké spektrální pásmo. K tomuto mu slouží 2 štěrbin, jedna na vstupu a druhá na výstupu. Vstupní štěrbina je široká asi 1 μm a omezuje šířku vstupujícího zařízení. Mřížka monochromátoru bývá zhotovena z keramického materiálu Zerodur, který má nulový koeficient teplotní roztažnosti. Mřížka rozkládá záření na jednotlivé vlnové délky, které pak dopadají na výstupní štěrbinu. Nakláněním mřížky určujeme, kterou vlnovou délku chceme měřit. Takto konstruovaný monochromátor se nazývá Czerny-Turner.

Další konstrukční zařízení monochromátorů ke například Paschen-Runge, kde je konkávní mřížka umístěna na Rowlandově kružnici a dokáže měřit několik vybraných spektrálních čar najednou [5, 16].



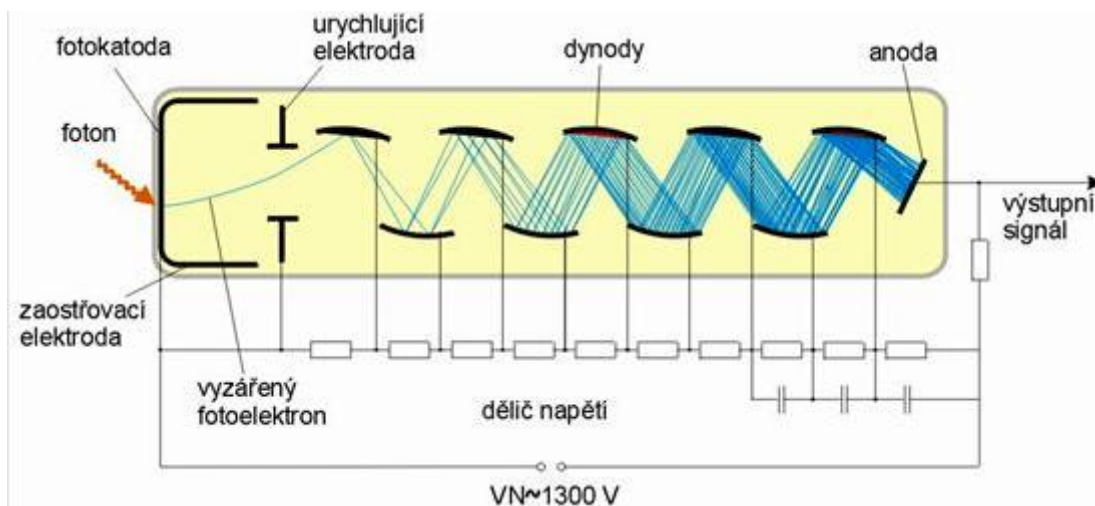
Obrázek 12 – Monochromátor typu Czerny-Turner: 1 – vstupní štěrbinu; 2 - zrcadla; 3 difrakční mřížka; 4 – výstupní štěrbinu; 5 – fotonásobič.

3.4.3 Kyveta

V kyvetě je umístěn vzorek. Kyveta musí být z materiálu, který bude propouštět UV a viditelné záření, proto se používá křemenné sklo. Kyveta musí být dokonale čistá, jinak by docházelo k nežádanému rozptylu světla a došlo by k chybě měření. Umístění kyvety je vždy tak, aby paprsek emitovaného záření se snímal kolmo na paprsek excitačního záření. [16]

3.4.4 Fotonásobič

Běžně používaný jako detektor pro UV a viditelné záření. Přeměňuje dopadající elektromagnetické záření na elektrický proud, který je snadno měřitelný. Proud, který projde fotonásobičem je přímo úměrný intenzitě světla dopadající na detektor. Skládá se z fotokatody a anody a sériově zapojených dynod. Foton dopadá na fotokatodu a na základě fotoelektrického jevu způsobí emisi elektronů. Elektronů dopadají na dynody, které jsou seřazeny od nejmenšího kladného potenciálu k největšímu. Většinou je takto za sebe řazeno 8 až 12 dynod. Na povrchu dynod dojde k sekundární emisi elektronů. Takto seřazené dynody dokážou zesílit slabý elektrický proud vyzářený z fotokatody až milionkrát. Zesílený proud elektronů je pak snadno měřitelný na záznamovém zařízení. [11]



Obrázek 13 – Fotonásobič. [11]

3.5 Analytické využití fluorescenční spektrofotometrie

3.5.1 Kvantitativní analýza

Fluorescenční spektrofotometrie se využívá především ke měření koncentrace, kde nejde koncentrace stanovit pomocí absorbance. Detekční limit je až okolo 10^{-12} mol.dm³. Je schopna měřit velké rovinné molekuly s konjugovanými dvojnými vazbami. V kvantitativní analýze pracujeme metodou kalibračních křivek. Kdy si připravíme sérii standardních vzorků a známé, ale rozdílné koncentraci. Tyto standardy proměříme a vyhodnotíme závislost intenzity záření na obsahu složky. Poté změříme vzorek a z grafu odečteme jeho koncentraci. [16]

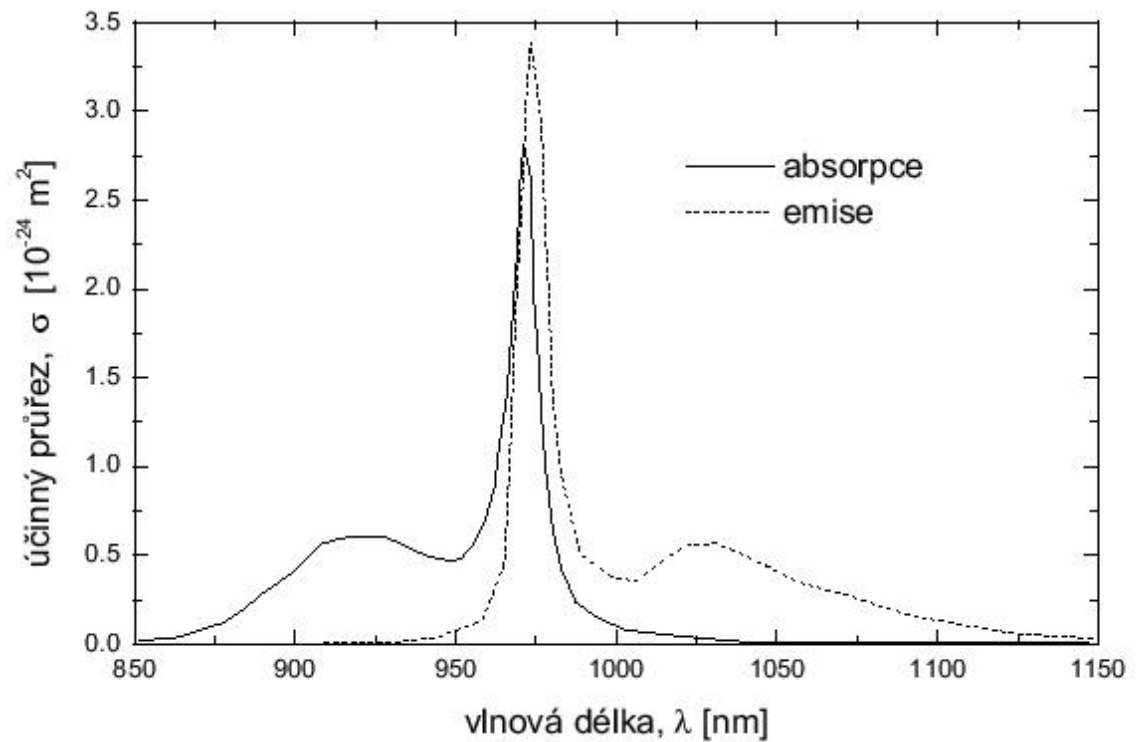
3.5.2 Kvalitativní analýza

Pomocí kvantitativní analýzy můžeme stanovit co za látku je ve vzorku obsažena. Protože každá látka má své charakteristické emisní spektrum, lze takto látky od sebe rozeznávat. Emisní fluorescenční spektrum je závislost intenzity fluorescence na vlnové délce (energi). Jelikož existuje několik přístrojů na měření emisních spekter a může dojít k různým výsledkům pro stejné látky, proto rozlišujeme 2 druhy spekter: [16]

- a) Nekorigovaná – jsou zakreslena charakteristikami přístroje. Jsou zakreslena především z toho důvodu, že detektor je různě citlivý na různé vlnové délky.

- b) Korigovaná – jsou to naměřená emisní spektra vynásobená příslušným korekčním faktorem pro každou vlnovou délku. Tato korigovaná spektra by měli být uváděny v literaturách, aby nedocházelo k chybám. [18]

Ukázka některých absorpčních a emisních spekter:



Obrázek 14 – Absorpční a emisní spektrum ytterbia v křemenném vlákne [13].

ZÁVĚR

V době, kdy G.G.Stokes dělal své první pokusy s chininem, netušil, že fluorescence získá takové možnosti uplatnění jaké můžeme sledovat dnes v technické, biomedicínské a obecně analyticko-chemické praxi. V dnešní době se můžeme setkat s ní skoro na každém kroku. Ať už v medicíně, biochemii, barvivech nebo analytické chemii, kde zejména aplikace fluorescenční mikroskopie má nenahraditelnou úlohu ve výzkumu buněčných systémů. Z technických aplikací se s jevy fluorescence setkáváme také na bankovkách, jako ochrana proti padělání. Největší rozvoj zaznamenává u fluorescenčních sond a značek. Díky tomu sledujeme pohyb proteinů, léků v těle. Nebo také ke sledování znečištění vod, pohyb fytoplanktonu. Jejich pozorování je relativně snadné, ať už lehké instrumentaci nebo označování. K detekci používáme fluorescenční mikroskopy a průtokové cyklometry.

V analytické chemii využíváme fluorescenci ke kvantitativní, ale i kvalitativní analýze. Protože většina molekul, má jiné emisní spektrum, proto je jejich rozeznání jednoduché. Největší výhodou je možnost použití i při velice nízkých koncentracích, tyto koncentrace mohou být, až v řádech 10^{-12} mol.dm⁻³. U klasické absorpční spektroskopie je detekční limit okolo 10^{-6} mol.dm⁻³.

Mezi největší nevýhodu fluorescence patří, že ne všechny molekuly mohou fluoreskovat nebo jim přidat fluoreskující značku. Proto má fluorescence široké, ale přitom ohraničené možnosti použití.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] L. Lapčík, P. Pelikán, M. Čeppan: *Fotochemické procesy*, ed. Alfa, 1989, ISBN 80-050-0049-9.
- [2] VANČURA, Antonín. *Elementární částice*. 1. Praha : Nakladatelství České akademie věd, 1970. 128 s.
- [3] DVOŘÁK, Lubomír; KUPKA, Zdeněk. *Fyzikální podstata a využití luminiscence*. 1. Praha : Státní pedagogické nakladatelství, 1980. 214 s.
- [4] PELANT, Ivan; VALENTA, Jan. *Luminiscenční spektroskopie : I. Objemové krystalické polovodiče*. 1. Praha: Nakladatelství Academia, 2006. 327 s. ISBN 80-200-1447-0.
- [5] LAKOWICZ, Joseph R. *Principles of fluorescence spectroscopy*. 3, ilustrované vydání. [s.l.] : Springer, 2006. 954 s. ISBN 9780387312781.
- [6] *Molecular Probes: The Handbook* [online]. [Cit. 2010-05-27]. Dostupný z WWW: <http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/References/Molecular-Probes-The-Handbook.html>.
- [7] *Fluorofory a jejich amino-reaktivní deriváty* [online]. [Cit. 2010-05-27]. Dostupný z WWW: <http://www.eastport.cz/dodavatele-1-fluorofory-a-jejich-amino-reaktivni-derivaty-805.html?PHPSESSID=53654e8464b0ece711bc0a4d80c31249>.
- [8] *Fluorofory v biomedicině* [online]. [Cit. 2010-05-27]. Dostupný z WWW: <http://www1.lf1.cuni.cz/~zfsisar/fluorescence/soubory/fluorofory.htm>.
- [9] *Principy fluorescenční spektroskopie* [online]. [Cit. 2010-05-27]. Dostupný z WWW: <http://psych.lf1.cuni.cz/fluorescence/soubory/principy.htm>.
- [10] *Fyzik James Clerk Maxwell* [online]. [Cit. 2010-05-27]. Dostupný z WWW: <http://www.converter.cz/fyzici/maxwell.htm>.
- [11] *Encyklopedie fyziky: Fotonásobič* [online]. [Cit. 2010-05-27]. Dostupný z WWW: <http://fyzika.jreichl.com/index.php?sekce=browse&page=747>.
- [12] *Principy fluorescenční spektroskopie* [online]. [Cit. 2010-05-27]. Dostupný z WWW: <http://www1.lf1.cuni.cz/~zfsisar/fluorescence/soubory/principy.pdf>.

- [13] *Vlastnosti vzácných prvků ve skle* [online]. [Cit. 2010-05-27]. Dostupný z WWW: <http://www.ufe.cz/~peterka/opera/dphil2/node9.html>.
- [14] *Přístrojové vybavení pro detekci absorpce a fluorescence* [online]. [Cit. 2010-05-27]. Dostupný z WWW: http://is.muni.cz/el/1431/podzim2008/Bi7230/um/6053971/6056654/03_Pristroje_a.pdf.
- [15] *Skripta z Fyziky II na FT UTB, Elektromagnetické vlny* [online]. [Cit. 2010-05-27]. Dostupný z WWW: http://ufmi.ft.utb.cz/texty/fyzika_2/F2_05.pdf.
- [16] KLOUDA, Pavel. *Moderní analytické metody*. 2003. Ostrava : Pavel Klouda, 2003. 132 s. ISBN 80-86369-07-2.
- [17] *Elektromagnetické spektrum* [online]. [Cit. 2010-05-27]. Dostupný z WWW: <http://tf.czu.cz/~sedlacek/Vyuka/Obrazky/ElmgSpektrum.png>.
- [18] *Fluorimetrie* [online]. [Cit. 2010-05-27]. Dostupný z WWW: <http://www.vscht.cz/anl/lach2/FLUORO.pdf>.
- [19] *Elektromagnetické spektrum* [online]. [Cit. 2010-05-27]. Dostupný z WWW: <http://tf.czu.cz/~sedlacek/Vyuka/Obrazky/ElmgSpektrum.png>.

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

λ ... vlnová délka [m]

c ... rychlost světla [$\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$]

f ... frekvence [s^{-1}]

E ... energie částic [J]

h ... Planckova konstanta [$h=6,6\cdot 10^{-34}\text{J}\cdot\text{s}^{-1}$]

k_f ... rychlostní konstanta fluorescence [s^{-1}]

k_p ... rychlostní konstanta fosforescence [s^{-1}]

k_{ic} ... rychlostní konstanta vnitřní konverze [s^{-1}]

k_{isc} ... rychlostní konstanta mezi systémového přechodu [s^{-1}]

Φ_f ... kvantový výtěžek fluorescence [-]

A ... absorbance [-]

c ... koncentrace látky [$\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$]

ϵ ... molární absorpční koeficient [$\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}\cdot\text{dm}$]

T ... transmittance [-]

I_0 ... intenzita světelného toku na vstupu [W/m^2]

I ... intenzita světelného toku na výstupu [W/m^2]

τ ... doba života [s]

$\tau_{1/2}$... poločas života excitovaného stavu [s]

k_e ... rychlostní konstanta poklesu emise [s^{-1}]

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1 Elektromagnetické spektrum.....	11
Obrázek 2 – Jabloňského diagram: S_0 – základní stav; S_1, S_2 – excitované singletové stavy; T_1, T_2 – excitované tripletové stavy; 1 - absorpce záření; 2 – vnitřní konverze; 3 – mezisystémový přechod; 4 – vibrační relaxace; 5 – fluorescence; 6 - fosforescence.....	14
Obrázek 3 – Změna geometrie u benzenu ve stavu S_0 a T_1	15
Obrázek 4 – Stokesův pokus s roztokem chininu	19
Obrázek 5 – Stokesův posun.....	19
Obrázek 6 – Absorpční (pH= 1; 7,64 a 13) a emisní spektrum (pH=7) pro 1-hydroxypyren-3,6,8-trisulfonát ve vodě.....	20
Obrázek 7 – Závislost intenzity emise I_e na čase t	22
Obrázek 8 – Strukturní vzorce tryptofanu, tyrozinu a fenylalaninu	23
Obrázek 9 – Fluorescein isothiokyanát.....	24
Obrázek 10 – Blokové schéma fluorescenčního spektrofotometru	25
Obrázek 11 – Vysokotlaká xenonová oblouková lampa	26
Obrázek 12 – Monochromátor typu Czerny-Turner: 1 – vstupní štěrbina; 2 - zrcadla; 3 difrakční mřížka; 4 – výstupní štěrbina; 5 - fotonásobič.....	27
Obrázek 13 – Fotonásobič	28
Obrázek 14 – Absorpční a emisní spektrum yterbia v křemenném vlákne	29

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1 – Fluorescence některých organických molekul	21
--	----