

# Fluorimetrie

Fluorimetrie využívá jevu fotoluminiscence. Fluoreskující látka je excitována monochromatickým světlem, čímž se některý z valenčních elektronů vybudí do vyšší energetické hladiny. Při návratu zpět do původního energetického stavu promaří část energie jako teplo, část vyzáří ve formě fotonu. **Energie emitovaného záření je proto vždy nižší než energie záření excitačního**, tj. emitované světlo má větší vlnovou délku. Emitované světlo se snímá zpravidla ve směru kolmém na excitační paprsek a po průchodu emisním monochromátorem se jeho intenzita měří fotonásobičem.

Většina fluorimetrů používá jako excitační i emisní monochromátory interferenční filtry. Dražší přístroje jsou vybaveny optickými mřížkami, takže lze plynule nastavovat excitační i emisní vlnovou délku. V tom případě se hovoří o **spektrofluorimetrii**.



Ve srovnání s fotometrickými metodami má spektrofluorimetrie vyšší specifičnost (kromě absorpčního, tj. excitačního spektra, se bere v úvahu i emisní spektrum látky) i citlivost (díky fotonásobiči lze měřit velmi malé intenzity světla a jelikož se měří ve směru kolmém na excitaci a při jiné vlnové délce, než kterou se excituje, je emitované světlo minimálně „znečištěno“ excitačním zářením). Metoda však naneštěstí skrývá řadu technických úskalí: fluorescenční činidla jsou často velmi citlivá na minimální změny pH, iontové síly či polarity, na přítomnost oxidačních činidel či tzv. zhášeců (látek, které umožní sestup excitovaného elektronu do základní energetické hladiny, aniž by vyzářil foton – často to jsou např. stopová množství některých přechodných kovů), navíc je nutné poměrně nákladné a složité zařízení.

Analytické možnosti spektrofluorimetrie lze dále rozšířit zařazením polarizačních filtrů do excitační i emisní části zařízení – tzv. **polarizační fluorimetrie**. Tato technika využívá skutečnosti, že excitovaný elektron se vrací do základního stavu s určitým zpožděním. Pokud by toto zpoždění bylo zcela zanedbatelné nebo fluoreskující molekuly byly zcela nepohyblivé, zachovalo by si emitované záření stejnou polarizaci jako záření excitační. Jestliže však čas mezi excitací a vyzářením fotonu je postačující pro pootočení excitované molekuly, může být rovina polarizace emisního záření pootočena oproti rovině polarizace excitačního záření. Za laboratorních podmínek je rotační pohyblivost fluoroforů v roztocích postačující k tomu, aby došlo k částečné depolarizaci emisního záření. Malé molekuly přitom mohou rotovat rychleji než velké, takže pomocí polarizační fluorimetrie lze usuzovat na velikost fluoreskující molekuly. Toho se využívá např. v imunochemii, kde lze tímto způsobem rozlišit mezi malou volnou fluorescenčně značenou protilátkou a velkým komplexem této protilátky s antigenem.

Zejména ve výzkumu se používá celá řada dalších variant spektrofluorimetrie: zajímavá data lze např. získat, pokud je vzorek osvětlován velmi krátkými záblesky světla a měří se časový průběh fluorescence, spektrofluorimetr lze připojit k fluorescenčnímu mikroskopu, chromatografu, podobně jako v případě fotometrie lze měřit ve speciálních mikrotitračních destičkách apod.

## Odkazy

### Použitá literatura

- GORE, Michael G., et al. *Spectrophotometry and spectrofluorimetry: a practical approach*. 1. vydání. Oxford : Oxford University Press, 2000. 368 s. The practical approach series; sv. 225. ISBN 0-19-963812-8.

### Externí odkazy

- FIŠAR, Zdeněk. *Fluorescenční spektroskopie v neurovědách. Multimediální podpora výuky klinických a zdravotnických oborů* [online]. Portál 1. lékařské fakulty Karlovy Univerzity v Praze, ©11.2.2009. Poslední revize 22.2.2009, [cit. 2011-12-22]. ISSN = 1804-3143. <<https://portal.lf1.cuni.cz/clanek-851-fluorescencni-spektroskopie-v-neurovedach>>.