

## TROJROZMERNÉ FLUORESCENČNÉ SPEKTRÁ – RIEŠITELNÝ PROBLÉM AJ PRE STARŠIE PRÍSTROJE

KATARÍNA DUBAYOVÁ<sup>a</sup>, JAROSLAV KUŠNÍR<sup>a</sup>  
a MILOŠ HANUS<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Ústav lekárskej chémie a biochémie, Lekárska fakulta, Univerzita Pavla Jozefa Šafárika, Trieda SNP 1, 040 66 Košice, e-mail: dubayova@central.medic.upjs.sk, <sup>b</sup>Kurská 25, 040 22 Košice, Slovenská republika

Došlo dňa 26.I.2000

Kľúčové slová: spektrofluorimeter, fluorescenčné spektrum, vrstevnicová mapa, albumín, riboflavín, kyselina acetylsalicylová, pyridoxín

### Úvod

Špecifita fluorescencie látok vyplýva zo závislosti intenzity od dvoch vlnových dĺžok, excitačnej a emisnej  $F = f(\lambda_{ex}; \lambda_{em})$ . Pre každú látku je možné namerať emisné spektrá pri rôznych excitačných vlnových dĺžkach a naopak. Zoradenie takto nameraných jednotlivých spektier v priestore, tj. vytvorenie závislosti intenzity fluorescencie od viacerých (postupne sa zvyšujúcich) hodnôt excitačnej a emisnej vlnovej dĺžky, vedie ku vzniku trojrozmerného grafu. Prezentácia fluorescenčných spektier vo forme trojrozmerných grafov dáva možnosť na komplexné využitie všetkých informácií o analyzovanej látke. Spektrum každého fluorofóru, alebo zmesi fluorofórov má oveľa vyššiu vypovedaciu hodnotu, ak sa sníma pri viacerých excitačných, či emisných vlnových dĺžkach. Klasicky snímané emisné spektrá pri konštantnej vlnovej dĺžke excitačného svetla a opačne, nezodpovedajú požiadavkám na rozlíšenie hlavne v oblasti biochemického výskumu. Preto sa preferuje trojrozmerná fluorescenčná analýza. Na interpretáciu výsledkov trojrozmernej fluorescenčnej analýzy sa v praxi využíva najmä počítačová forma špeciálnych vrstevnicových máp. (Analogia zemepisných máp: vrstevnice predstavujú oblasti s rovnakou intenzitou fluorescencie, súradnicová poloha na mape je kvalitatívnou, „kóta“ kvantitatívnou charakteristikou fluoreskujúcej látky.)

Vrstevnicová mapa zobrazuje podstatne väčší počet podrobností, než klasické spektrum v podobe jednej krivky. Uzavreté vrstevnice sú charakteristickou fluorescenciou analyzovanej látky a môžu slúžiť na identifikáciu fluorescenčných zložiek v komplikovanej zmesi, prípadne potvrdiť alebo vyvrátiť identitu dvoch zmesí. Vrstevnicové mapy takto slúžia ako selektívny odtlačok<sup>1</sup>.

Technika trojrozmernej fluorescenčnej analýzy bola využitá aj pri identifikácii farbiva na zvyšku plátna, ktoré bolo nájdené pri archeologických vykopávkach. Na základe vytvorenej fluorescenčnej vrstevnicovej mapy farbiva na nájdenej textilii a porovnaním so štandardami prírodných farieb na vybraných typoch materiálov (hodváb, bavlna) sa podarilo identifikovať nielen pôvod farby, ale aj typ tkaniny<sup>2</sup>.

Trojrozmerné grafické výstupy nameraných veličín umožňujú

dnes komerčne vyrábané spektrofluorimetre vyššej kategórie. Technicky najprepracovanejším prístrojom na takéto merania je fluorescenčný spektrofotometer Hitachi model F-4500 s adekvátnou počítačovou výbavou<sup>3</sup>. Praktická dostupnosť týchto prístrojov je však z cenových dôvodov pre väčšinu bežných laboratórií málo reálna. Preto sme modernizovali starší, avšak koncepčne veľmi dobre riešený fluorescenčný spektrometer Perkin-Elmer Model 3000.

### Experimentálna časť

#### Chemikálie

Hovädzí sérový albumín (Merck, SRN), acylpyrín (Slovakofarma Hlohovec), riboflavín, injekčný roztok (Léčiva Praha), pyridoxín, injekčný roztok (Léčiva Praha), B-komplex (Léčiva Praha). Koncentrácie vodných roztokov: acylpyrín 200 mg.l<sup>-1</sup>, albumín 40 mg.l<sup>-1</sup>, riboflavín 10 mg.l<sup>-1</sup>, pyridoxín 5 mg.l<sup>-1</sup>.

#### Prístroje a zariadenia

Fluorescenčný spektrometer Perkin-Elmer model 3000 (PE 3000), rok výroby 1981 s pripojeným počítačom PC Pentium so softwarom Spektro<sup>4</sup>, novo vyvinuté hardwarové rozhranie.

#### Metódy

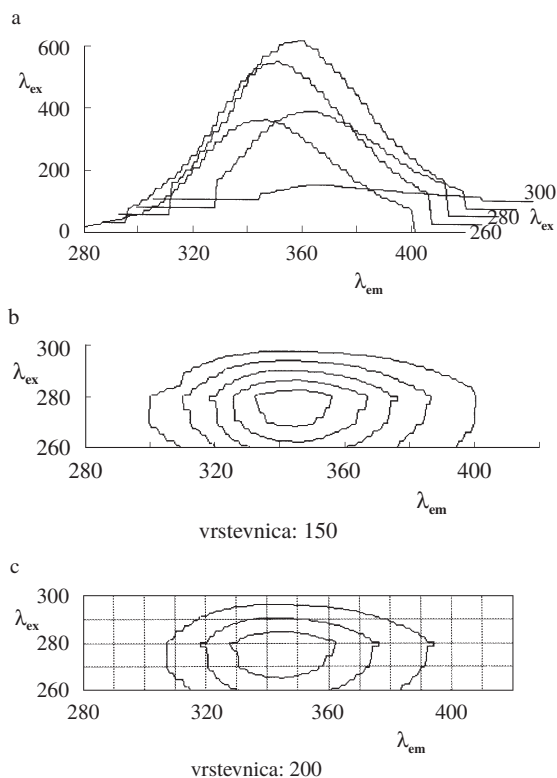
Emisné spektrá boli snímané pri excitačných vlnových dĺžkach začínajúcich pri 260 nm a zvyšujúcich sa po 10 nm až do hodnoty 600 nm. Emisný monochromátor bol nastavený na počiatočnú vlnovú dĺžku posunutú vždy o 20 nm vyššie oproti excitačnej, aby sa eliminovali rozptylové javy. Vrstevnicové mapy boli vytvorené okamžite po ukončení merania programom Spektro.

### Výsledky a diskusia

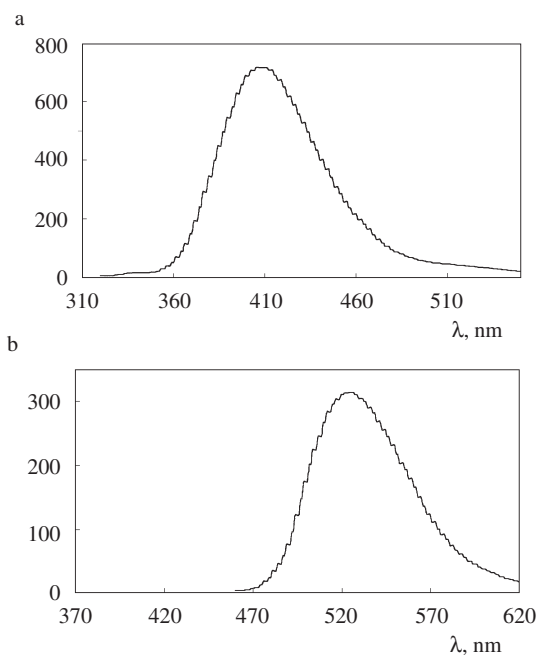
Technická úprava výstupu nameraných spektrálnych veličín prístroja Perkin-Elmer Model 3000, jeho pripojenie na PC Pentium a program Spektro<sup>4</sup>, ktorý bol vytvorený podľa našich požiadaviek a predstáv, umožňuje analyzovať fluorescenčný materiál rôznymi spôsobmi a interpretovať namerané hodnoty vo vhodnej grafickej forme na vysokej úrovni.

Program Spektro je autorský program na počítačové spracovanie hodnôt nameraných fluorescenčným spektrofotometerom PE 3000. Umožňuje registráciu všetkých typov spektier v číselnej aj grafickej podobe a ich archiváciu. Na znázornenie spektra je možné v ľubovoľnom bode veľmi presne odčítať hodnotu vlnovej dĺžky a jej odpovedajúcu intenzitu fluorescencie. Viaceré spektrá je možné znázorniť s farebným odlíšením. Program umožňuje sčítanie, odčítanie spektier aj výpočet priemeru viacerých meraní. Namerané údaje je možné exportovať do iných grafických programov (napr. Excel). Samozrejmom súčasťou programu je tlač zobrazených spektier.

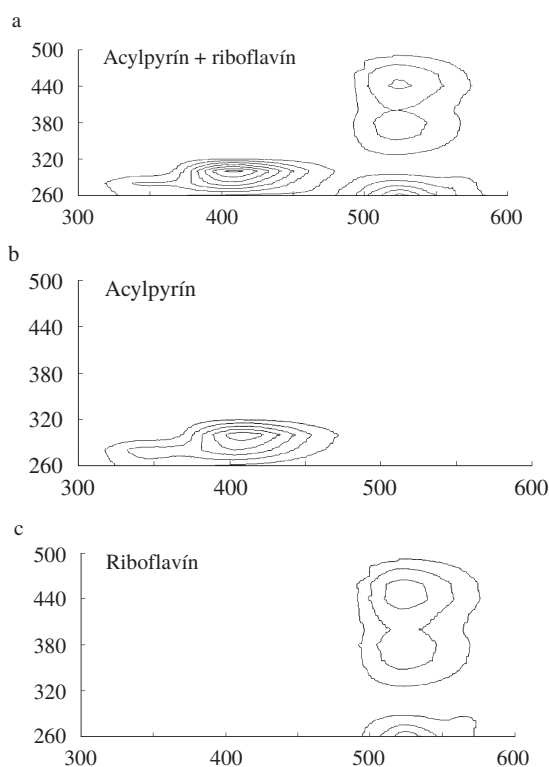
Výsledky trojrozmernej fluorescenčnej analýzy je možné v programe Spektro prezentovať vo forme trojrozmerného grafu, ale aj v jeho dvojrozmernej alternatíve, vo forme vrstevnicových spektrálnych máp (obr. 1). Na vrstevnicovej ma-



Obr. 1. Trojrozmerné spracovanie fluorescenčných spektier vodného roztoku albumínu. Usporiadanie emisných spektier v priestore (a), vrstevnicová mapa – 150 jednotiek relatívnej fluorescence (b), vrstevnicová mapa so zobrazenou mriežkou – 200 jednotiek relatívnej fluorescence (c)



Obr. 2. Jednoduché emisné spektrum modelovej zmesi (acylpyrín + riboflavín) snímané pri excitačnom maxime kyseliny acetylsalicylovej  $\lambda_{ex} = 300$  nm (a) a riboflavínu  $\lambda_{ex} = 440$  nm (b). Identifikovateľná je vždy iba jedna zložka zmesi



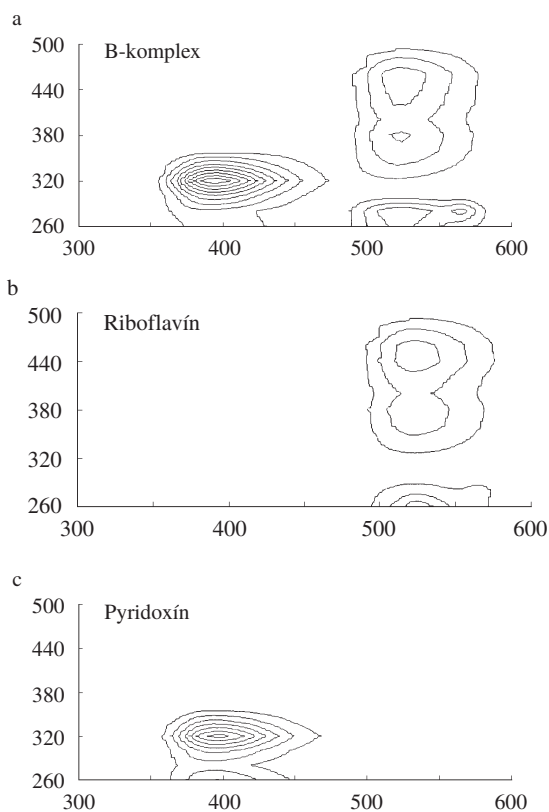
Obr. 3. Fluorescenčná vrstevnicová mapa roztoku modelovej zmesi (acylpyrín + riboflavín) a jednotlivých zložiek – acylpyrínu, riboflavínu. V zmesi sú identifikovateľné všetky zložky

pe os  $x$  reprezentuje emisnú, os  $y$  excitačnú vlnovú dĺžku. Vrstevnice spektrálnej mapy spájajú body s rovnakou intenzitou fluorescence. Hustotu vrstevníc je možné zadávať s ľubovoľným odstupom intenzity fluorescence. Orientáciu na mape uľahčuje mriežka, ktorú je možné podľa zväženia zobraziť (obr. 1). V programe Spektro sa automaticky zobrazujú súradnice akéhokoľvek miesta na vrstevnicovej mape pri pohybe myšou po mape. Jednotlivé fluorescenčné pásma sa dajú farebne odlíšiť.

Na grafickom zobrazení trojrozmerných emisných fluorescenčných spektier vo forme vrstevnicových spektrálnych máp chceme demonštrovať možnosti veľmi podrobnej spektrálnej charakteristiky niektorých látok.

Trojrozmerná fluorescenčná analýza je zvlášť výhodná pri skúmaní zmesi fluorescenčných látok. Klasickou fluorescenčnou analýzou (emisné spektrum snímané pri vlnovej dĺžke excitačného maxima) je málokedy možné odhaliť prítomnosť ďalších látok s odlišnými fluorescenčnými charakteristikami, než má práve meraná látka. Ako modelovú zmes sme zvolili vodný roztok kyseliny acetylsalicylovej (acylpyrín) v prítomnosti riboflavínu. Emisné spektrum modelovej zmesi snímané pri excitačnom maxime kyseliny acetylsalicylovej nezaregistruje prítomnosť riboflavínu a naopak (obr. 2). Vrstevnicová mapa tieto obmedzenia nemá a dokazuje grafickú výnimočnosť najmä pri porovnávaní – identifikácii čistých látok alebo zmesí (obr. 3). Jednotlivé fluorofóry prítomné vo vzorke vytvárajú v plošnom zobrazení máp uzavreté, alebo polouzavreté krivky s presne vymedzenými súradnicami. Takýto obrázok plne charakterizuje totožnosť meranej vzorky.

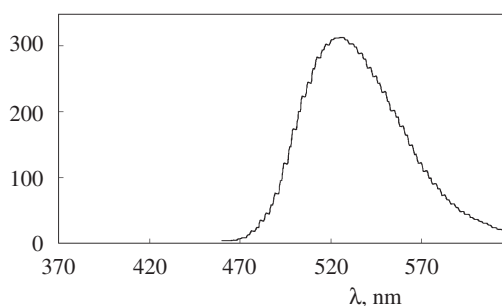
Riboflavin (vitamín B<sub>2</sub>) je aj jednou zo zložiek tablety B-komplexu (B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>5</sub>, B<sub>6</sub>, PP). Na fluorescenčnej vrstevnicovej mape vodného roztoku tablety B-komplexu sa okrem



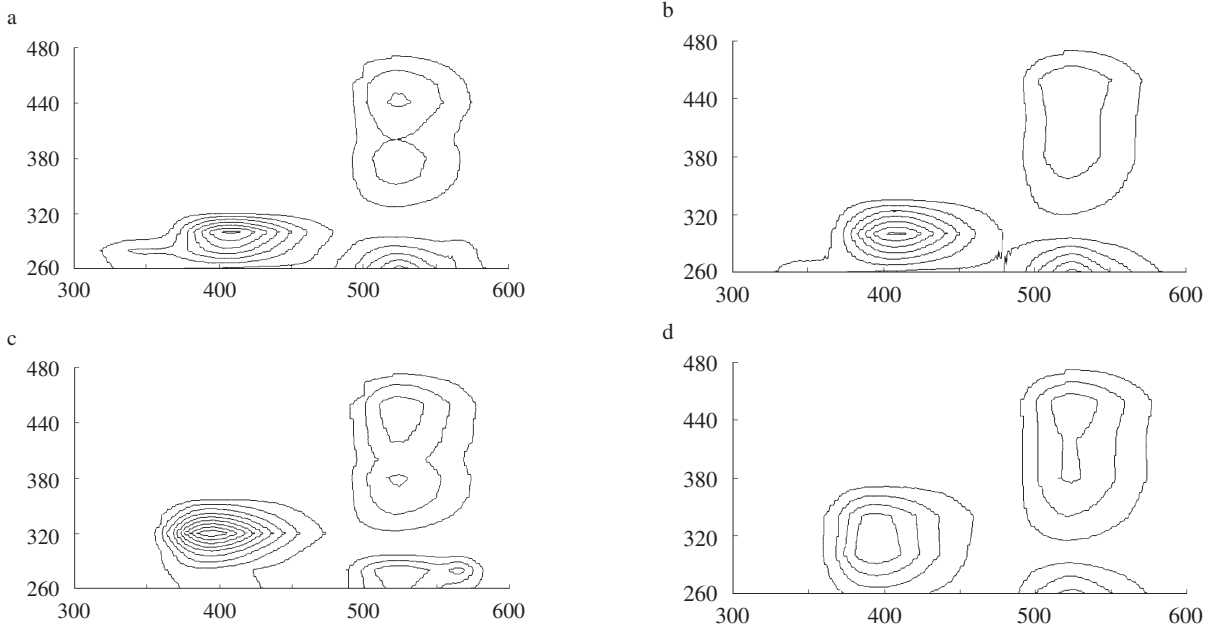
Obr. 4. Fluorescenčná vrstevnicová mapa roztoku B-komplexu a jeho zložiek – riboflavínu, pyridoxínu. V zmesi sú identifikovateľné všetky zložky

riboflavínu prejavuje aj ďalší fluorofór, ktorý predstavuje pyridoxín (B<sub>6</sub>). Jeho totožnosť potvrdzuje vrstevnicová mapa roztoku pyridoxínu (obr. 4). Klasické fluorescenčné spektrum roztoku B-komplexu snímané pri excitačnom maxime riboflavínu nezaznamenalo prítomnosť ďalšieho fluorofóru (obr. 5).

Jediným obmedzením upraveného fluorimetra Perkin-Elmer 3000 je nízka rýchlosť pohybu monochromátorov (max. 240 nm.min<sup>-1</sup>) v porovnaní s fluorimetrom Hitachi F-4500 až 30000 nm.min<sup>-1</sup> (cit.<sup>3</sup>). Ich rýchlosť nie je možné zvýšiť, pretože je daná samotnou konštrukciou prístroja. Preto, hlavne z časových dôvodov, sa snímali emisné spektrá tak, že excitačná vlnová dĺžka sa menila v intervaloch po 10 nm (tj. 260, 270, 280 nm ... 500 nm). Pri príliš veľkých odstupoch (napr. 40 nm) môže dôjsť ku skresleniu fluorescenčných charakteristík (obr. 5). Avšak aj pri takomto zjednodušení je možné rozlíšiť v zmesi jednotlivé fluorescenčné zložky, ba aj odlíšiť dve zmesi, ktoré obsahujú fluorofór s blízskymi spektrálnymi charakteristikami. Ak sa merania robia rovnakým spôsobom, potom sa pri porovnávaní jednotlivých spektrálnych máp tieto chyby eliminujú a znižuje sa iba rozlišovacia schopnosť spektier.



Obr. 5. Jednoduché emisné spektrum roztoku B-komplexu snímané pri excitačnom maxime riboflavínu  $\lambda_{\text{ex}} = 440$  nm. Identifikovateľná iba jedna zložka zmesi



Obr. 6. Porovnanie tvaru fluorescenčných vrstevnicových máp roztoku modelovej zmesi a, b a B-komplexu c, d v závislosti od hustoty merania emisných spektier. Excitačné vlnové dĺžky sa menili po 10 nm a, c alebo po 40 nm b, d

**Záver**

Technickou úpravou staršieho prístroja a vytvorením programu Spektro sme dosiahli úroveň spektrálnych fluorescenčných meraní, porovnateľnú so špičkovým zariadením. Pri kvalitnej mechanickej a elektronickej výbave pôvodného fluorimetra zostalo jediné obmedzenie – rýchlosť pohybu monochromátorov. Následkom je dlhšia doba merania kompletného trojrozmerného spektra – 15 až 20 minút v porovnaní s 1 až 3 minútami u najmodernejších zariadení. Tento časový rozdiel nie je rozhodujúci, pokiaľ sa nemerajú veľké série vzoriek, alebo sa nevyžaduje extrémna „hustota“ emisných spektier. Časový faktor však ustupuje do pozadia, ak sa zoberie do úvahy cena modernizácie – 25 000 Sk a cena nového prístroja okolo 1 500 000 Sk.

**LITERATÚRA**

1. Phelan V.: *Int. Lab. News* 7, 12 (1994).
2. Shimoyama S., Nada Y.: *12th Annual Meeting of Dyes in History and Archaeology, November 25–26, Brussels 1993*.

3. Dokumentačný materiál k fluorescenčnému spektrofotometru HITACHI Model F-4500.
4. Dubayová K., Kušnir J., Hanus M., Synek M.: *Folia Med. Cassov. 54*, 108 (1997).

**Katarína Dubayová<sup>a</sup>, Jaroslav Kušnir<sup>a</sup>, and Miloš Hanus<sup>b</sup>** (<sup>a</sup>*Department of Medicinal Chemistry and Biochemistry, Faculty of Medicine, Pavel Jozef Šafárik University, Košice, Kurská St. 25, Košice, Slovak Republic*): **Three-dimensional Fluorescence Spectra – A Resolvable Problem also with Older Instruments**

The possibility of obtaining fluorescence spectra in the form of three-dimensional graphs after modification of an old spectral fluorimeter is described. A Perkin-Elmer model 3000 instrument was innovated to provide, through a hardware interface, the direct output of measured spectral quantities into a computer, where they are worked up, using a special program Spektro, in the shape of three-dimensional graphs or spectral contour maps. By this modification, the instruments achieve several parameters of the latest superior spectrofluorimeters.