

## OBSAH

<b>1. Elektromagnetické záření a spektrální metody</b>	<b>9</b>
1.1. Popis vlastností elektromagnetického záření	9
1.2. Spektrální charakteristiky záření	9
1.3. Radiometrické charakteristiky	13
1.4. Rozdělení spektrálních metod	16
1.5. Polarizace záření	19
1.5.1. Polarimetrické přístroje	21
1.5.2. Spektropolarimetrie	22
1.6. Koherence	22
<b>2. Optické prostředí a elektromagnetické záření</b>	<b>24</b>
2.1. Interakce látky s elektromagnetickým zářením	24
2.1.1. Maxwellův model	24
2.1.2. Lorenz - Drudeův model	25
2.1.3. Kvantová teorie optických přechodů v semi-klasickém přiblížení	25
2.1.4. Kvantová teorie interakce	26
2.2. Elastická a neelastická interakce optického záření s látkou	26
2.2.1. Elastická interakce optického záření s látkou (rozptyl, odraz, lom, ohyb)	26
2.2.2. Neelastická interakce optického záření s látkou (absorpce, emise)	27
2.3. Mikrostruktura atomů a molekul	28
2.4. Základní a excitované stavy atomů	30
2.5. Energetické hladiny a pohyby molekul	31
2.6. Šíření elektromagnetických vln v optickém prostředí	36
2.7. Vztah mezi absorbcí světla a vnímanou barvou	39
2.8. Látky studované v optické spektroskopii - (v biofyzice)	41
2.8.1. Chromofory	41
<b>3. Optické spektroskopické aparatury</b>	<b>44</b>
3.1. Základní schéma optické spektroskopické aparatury	44

3.2. Zdroje optického záření	46
3.2.1. Záření slunce a oblohy	50
3.2.2. Umělé tepelné zdroje	53
3.2.3. Zdroje výbojové - výbojky	55
3.2.4. Lasery	58
3.2.5. Zářivky	62
3.2.6. LED a LEP	63
3.2.7. Zdroje záření pro infračervenou spektroskopii	63
3.2.8. Synchronové záření	64
3.3. Monochromatizace optického záření (filtry, hranoly, mřížky, interferometry)	65
3.3.1. Filtry	66
3.3.2. Hranoly	70
3.3.3. Mřížky	74
3.3.4. Monochromátory	79
3.3.5. Interferometry	82
3.4. Detektory záření	84
3.4.1. Typy detektorů	85
4. Absorpce elektromagnetického záření	96
4.1. Metody absorpční spektroskopie	96
4.2. Základní vztahy absorpční spektroskopie	96
4.3. Podmínky absorpce záření	97
4.4. Typy elektronových přechodů	101
4.5. Vibronická struktura absorpčních spekter	103
4.6. Vliv mezimolekulových interakcí na elektronová absorpční spektra	104
5. Útlum elektromagnetické vlny v absorbujícím prostředí	108
5.1. Intenzita absorpčního pásu	108
5.2. Útlum elektromagnetické vlny v absorbujícím prostředí	109
5.3. Lambertův zákon	111

5.4. Absorpční koeficient v kondenzované fázi, Beerův zákon	111
6. Metody založené na měření propustnosti, odrazu a rozptylu	117
6.1. Měření absorpčních spekter	117
6.2. Zdroje chyb při měření absorpčních spekter	118
6.2.1. Odchylky vlnové délky	118
6.2.2. Šum	118
6.2.3. Náhodné (boční) světlo	119
6.2.4. Rozptyl světla	120
6.2.5. Spektrální šířka šterbiny	121
6.2.6. Vliv rychlosti skenu	123
6.2.7. Určení srovnávací čáry	124
6.3. Metody založené na měření propustnosti (absorpční spektrofotometr jednopaprskový, dvouprskový)	124
6.4. Příprava vzorků pro měření propustnosti	130
6.5. Reflexní metody	134
6.6. Refraktometrie	136
6.7. Turbidimetrie	137
6.8. Nefelometrie	138
6.9. Fotoakustická spektrometrie	138
7. Užití UV a VIS absorpční spektroskopie	141
7.1. Užití elektronové absorpční spektroskopie v biofyzice	141
7.2. Analytické využití UV a VIS spektroskopie	145
7.2.1. Určení koncentrace látky	145
7.2.2. Určení molárního absorpčního koeficientu	146
7.2.3. Diferenční spektroskopie	147
7.2.4. Derivační spektroskopie	150
7.3. Kalibrační křivka - stanovení koncentrace	151

7.4. Koncentrované roztoky	151
7.5. Velmi zředěné roztoky	153
7.6. Současné stanovení koncentrace ve směsi obsahující dvě nebo více složek	154
7.7. Studium chemických rovnováh	156
7.8. Spektrofotometrická titrace	156
7.9. Využití absorpce v UV a VIS oblasti v analytické chemii	156
7.9.1. Stanovení kovů a nekovů	157
7.9.2. Stanovení organických látek	158
7.10. Kinetická měření ("Rate measurement")	159
<b>8. Infračervená spektroskopie, měřící technika a metody</b>	<b>160</b>
8.1. Infračervená spektroskopie (IČ)	160
8.2. Vibrační spektra	162
8.3. Rotační a rotačně-vibrační spektra	162
8.4. Měřící technika a metody spektrální analýzy IČ oblasti (disperzní - klasické a interferenční - fourierovské spektrofotometry)	165
8.4.1. Infračervené disperzní spektrofotometry	166
8.4.2. FT-IR (fourierovské spektrofotometry)	167
8.4.3. Výhody FT-IR	170
8.5. Interpretace a užití vibrační spektroskopie v biofyzice	173
8.5.1. Použití vibrační spektroskopie ke strukturní analýze biofyzikálně zajímavých molekul	174
8.6. Infračervené analyzátoary plynů	175
<b>9. Úvod do luminiscence a fluorescence. Teoretický základ</b>	<b>177</b>
9.1. Základní charakteristiky luminiscence	178
9.1.1. Definice luminiscence	178
9.1.2. Základní veličiny charakterizující luminiscenci	178
9.1.3. Základní třídění luminiscence podle doby dohasínání a podle druhu excitační energie	179
9.1.4. Zákon zachování energie při luminiscenci - Stokesův zákon	180

9.2. Fyzikální principy luminiscence roztoků izolovaných organických molekul	181
9.2.1. Charakteristika luminiscence na základě přechodů mezi elektronově vibračními hladinami složitých molekul	182
9.2.2. Fyzikální definice nezářivých deexcitačních procesů	184
9.2.3. Fyzikální definice zářivých deexcitačních procesů (luminiscence)	184
9.3. Fosforescence a tripletový stav polyatomické molekuly	186
9.3.1. Vznik a deaktivace nejnižšího tripletového stavu	186
9.4. Kvantový výtěžek a doba dohasínání fluorescence	187
9.4.1. Kvantový výtěžek a doba dohasínání fluorescence izolovaných molekul	187
9.4.2. Vliv mezimolekulárních interakcí na kvantový výtěžek a dobu dohasínání fluorescence	189
10. Spektra fluorescence organických látek. Od teorie k aplikaci	195
10.1. Vlastnosti organických fluoroforů	195
10.2. Příčiny pásového charakteru spekter absorpce a fluorescence	196
10.3. Zákon zrcadlové symetrie mezi absorpčním a fluorescenčním pásem	198
10.4. Vliv prostředí na absorpční a emisní spektra	202
10.5. Vybrané přírodní fluorofory, jejich spektrální vlastnosti a aplikace	205
10.5.1. Fluorescence aminokyselin a proteinů	205
10.5.2. Nukleotidy	208
10.5.3. Další příklady přirozené fluorescence makromolekulárních látek	210
10.6. Základní oblasti aplikací umělých fluoroforů	211
10.6.1. Fluorescenční markery bílkovin	211
10.6.2. Membránové sondy	213
10.6.3. DNA sondy	214
10.6.4. Fluorescenční indikátory	214
11. Experimentální zařízení pro měření spekter fluorescence a zásady jeho použití v praxi	216
11.1. Základní typy měření spekter fluorescence	216
11.2. Spektrofluorimetry pro měření v ustáleném stavu	218
11.2.1. Jednopaprskový spektrofluorimetr	218
11.2.2. Základní konstrukční požadavky na spektrofluorimetry	220
11.2.3. Dvouvlňové fluorimetry	223
11.3. Komponenty spektrofluorimetrů a jejich funkce	226
11.3.1. Zdroje záření	226
11.3.2. Monochromátory	227

11.3.3. Detektory záření	227
11.3.4. Vzorkový prostor	228
11.4. Korekce excitačních a emisních spekter fluorescence	230
11.4.1. Korekce excitačních spekter	233
11.4.2. Korekce emisních spekter	234
11.5. Zásady pro správné měření a interpretaci spekter fluorescence	235
11.5.1. Příprava vzorků a obvyklé chyby	235
11.5.2. Výběr vlnových délek a spektrální šířky šterbiny pro detekci emisních a excitačních spekter	239
11.5.3. Výběr rychlosti skenování spektra	242
11.5.4. Fotovybělení ("Photobleaching")	243
11.5.5. Určení pozadí měření	243
11.5.6. Stanovení základních charakteristik spekter fluorescence	245
11.5.7. Vliv teploty na emisní spektra	246
12. Vliv mezimolekulárních interakcí na fluorescenci v biologických vzorcích	249
12.1. Zhášení fluorescence	249
12.1.1. Dynamické zhášení fluorescence	250
12.1.2. Statické zhášení fluorescence	253
12.1.3. Kombinace statického a dynamického zhášení	255
12.1.4. Základní biofyzikální aplikace zhášení fluorescence	257
12.2. Přenos excitační energie	262
12.2.1. Rezonanční teorie přenosu excitační energie	263
12.2.2. Experimentální ověření závislosti $k_{DA}$ na $R_{DA}^6$ pro rezonanční přenos excitační energie	267
12.2.3. Poznámka k výměnnému přenosu excitační energie	271
13. Literatura	272