




Univerzita Palackého  
v Olomouci

## Instrumentální metody (ACH/IM)

### Molekulová fotoluminiscenční spektrometrie

(c) David MILDE

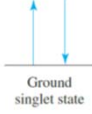
1




Univerzita Palackého  
v Olomouci

## Teoretický základ


- Fotoluminiscence = detekce záření vyvolaného jiným zářením o odlišené E. Dělí se na:
  - **Fluorescenci** – změna E stavů molekuly (elektronových a vibračních) bez změny spinu  $e^-$ , krátký dosvit do  $\sim 10^{-5}$  s, dovolený typ přechodu;
  - **Fosforescenci** – změna E stavů molekuly se změna spinu  $e^-$  do tripletového stavu, dlouhý dosvit až  $10^1$  s, spinově zakázaný přechod.
- Základní ( $n$ ,  $\pi$ ) a excitované stavy ( $\pi^*$ ) molekulového elektronového orbitalu:
  - Singletový stav (S): spárované spiny 2  $e^-$
  - Tripletový stav (T): 2 nespárované  $e^-$  se stejným spinem
  - Dubletový stav: lichý  $e^-$  u radikálu, může zaujmout dvě orientace (v magnetickém poli)



Ground singlet state



Excited singlet state



Excited triplet state

2

2

Univerzita Palackého  
v Olomouci

## Teoretický základ – Jablonského diagram

– Alexander Jabłoński (Polsko) vysvětlil jako první typy absorpčních a emisních přechodů u molekul v roce 1933.

- plné čáry – zářivé přechody (s účastí fotonu)
- tečkované „čáry“ – nezářivé přechody (bez účastí fotonu)

3

3

Univerzita Palackého  
v Olomouci

## Teoretický základ – typy přechodů

– Fotoluminiscence je třístupňový proces:

1. **Excitace molekul** ze stavu  $S_0$  ( $n, \pi$ ) a základního vibračního stavu do vyšších vibračních hladin singletového stavu  $S_1$  nebo  $S_2$ .
2. Vyhasínání excitovaného stavu nezářivými procesy (**vnitřní konverzí a vibrační relaxací**) → základní vibrační hladina  $S_1$ . U některých molekul (př. s těžkými prvky Br, I) dochází **mezisystémovým přechodem** ke změně spinu a přechodu na  $T_1$ .
3. **Deexcitace** = přechod na některou vibrační hladinu  $S_0$  zářivým (**fluorescence** nebo **fosforescence**) nebo nezářivým (vnější konverze = předání E okolí) procesem.

4

4

Univerzita Palackého  
v Olomouci

## Teoretický základ

- Vzhledem ke ztrátě  $E$  během vyhasínání excitovaného stavu platí:  
 $E_{em} < E_{abs}$  tedy  $\lambda_{em} > \lambda_{ex}$
- Stokesův posun: rozdíl mezi maximy absorpčního a emisního pásu.
- Časový průběh procesů sleduje časově rozlišená fluorescenční spektrometrie (*time resolved fluorescence*).
- Ustálená fluorescence (*steady state fluorescence*) – při buzení z kontinuálního zdroje se sleduje střední hodnota  $I_f$ .



Zrcadlová symetrie absorpčního a fluorescenčního spektra

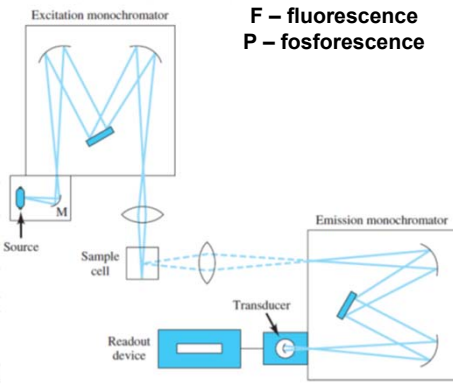
5

5

Univerzita Palackého  
v Olomouci

## Instrumentace


- **Schéma fluorescenčního spektrometru:**
- **Záření se šíří všemi směry!**
- **Zdroje záření:**
  - Xe vysokotlaká výbojka,
  - laditelný laser (bez  $M_{exc}$ ).
- **Mřížkové monochromátory**
- **Detektor:**
  - fotonásobič (pro Xe výbojku),
  - CTD (pro lasery).
- **Rozlišení F a P:**
  - využívá se různé doby dosvitu,
  - rotující sektory před a za vzorek.



F – fluorescence  
P – fosforescence

6

6

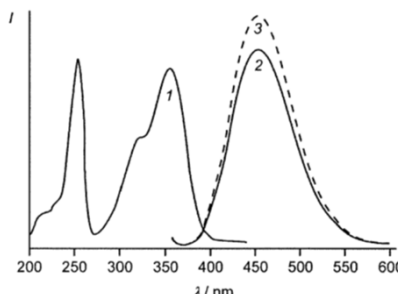

 Univerzita Palackého  
v Olomouci

## Instrumentace – měření spekter

- Přítomnost 2 monochromátorů dovoluje měřit:
  - Excitační spektrum – závislost  $I_F$  na  $\lambda_{ex}$  při konstantní  $\lambda_{em}$ ; slouží k nalezení vhodné  $\lambda$  pro buzení luminiscence,
  - Emisní spektrum – závislost  $I_F$  na  $\lambda_{em}$  při konstantní  $\lambda_{ex}$ ; získáme „klasické“ fluorescenční spektrum.


(1) Excitační spektrum (vhodné  $\lambda$  pro excitaci 250 a 350 nm)  
 (2) Emisní spektrum,  $\lambda_{ex} = 250$  nm  
 (3) Emisní spektrum,  $\lambda_{ex} = 350$  nm

- Tvar emisního spektra nezávisí na  $\lambda_{ex}$  a naopak tvar excitačního spektra neovlivňuje volba  $\lambda_{em}$ .



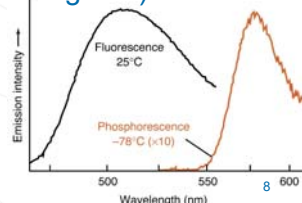
**Spektra chininu** 7

7


 Univerzita Palackého  
v Olomouci

## Instrumentace

- **Kyvety:** křemenné, skleněné či plastové kyvety se 4 leštěnými okénky, obvykle  $l = 1$  cm.
- **Rozpouštědla:** destilovaná voda, otestovaná na přítomnost fluoreskujících kontaminantů (detergenty, maziva, ...).
- **Fluorescence** je obecně citlivější (i o několik řádů) než měření absorpčních spekter.
- **Fosforescence** v analytické chemii se obvykle neměří; je třeba nízké  $t$  a velmi zředěných roztoků ve viskózních rozpouštědlech nebo pevných vzorků (př. tenkovrstvá chromatografie).
- Podmínky měření:
  - Totální spektrum: spojení excitačního a emisního spektra do 2D obrazu;
  - Synchronní spektrum: stejnou rychlostí se skenuje excitační i emisní spektrum s konstantní diferencí:  $\Delta\lambda = \lambda_{em} - \lambda_{ex}$ .



8

Univerzita Palackého  
v Olomouci

## Vztah mezi fluorescencí a strukturou molekuly

- **Fluorofor** = fluoreskující molekula.
- Silně fluoreskují: molekuly s konjugovaným systémem dvojných vazeb, aromáty, některé heterocykly a některé cheláty kovů.
- $I_F$  podporuje rigidní struktura molekuly.

pyridine      furan      quinoline      isoquinoline      fluorene  $\Phi \rightarrow 1$       biphenyl  $\Phi \rightarrow 0.2$

thiophene      pyrrole      indole      nonfluorescing      fluorescing

Nefluoreskující molekuly      Fluoreskující molekuly      8-hydroxychinolin, komplex se Zn <sup>9</sup>

9


Univerzita Palackého  
v Olomouci

## Aplikace: kvalitativní analýza

- Interpretace fluorescenčního spektra – porovnání spektra neznámé látky se spektry standardů nebo spektry v knihovně.
- Ovlivnění  $\Phi_F$  substituenty:  $-\text{NO}_2$  snižuje,  $-\text{OH}$  zvyšuje.
- Pokud látka nefluoreskuje, je možné ji derivatizovat fluoreskujícím činidlem (př. dansylchlorid).
- **Korekce spekter:**
  - korekce pozadí = odstranění Rayleighova a Ramanova rozptylu rozpouštědla a temného proudu detektoru → provádí se proměřením rozpouštědla za identických podmínek.
  - korekce excitačního/ a emisního spektra = eliminace zkreslení spekter vlivem přístroje (zdroj záření, monochromátor, odezva detektoru, ...) → získají se korekční faktory, kterými se pak upravují reálná spektra.

10

10


 Univerzita Palackého  
v Olomouci

## Aplikace: kvantitativní analýza

- Měří se  $I_F$  při konstantních  $\lambda_{ex}$  a  $\lambda_{em}$ .
- $I_F$  je přímo úměrná zářivému toku absorbovaného záření:

$$I_F = k\Phi_F(P_0 - P_T)$$

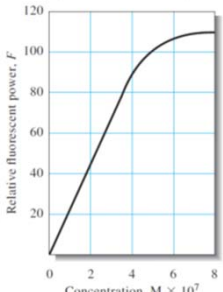
kvantový výtěžek fluorescence  $\Phi_F = \frac{\text{počet emitovaných fotonů}}{\text{počet absorbovaných fotonů}}$

z Lambertova-Beerova zákona  $\frac{P}{P_0} = 10^{-\varepsilon\lambda c}$


$$I_F = 2,3k\Phi_F\varepsilon\lambda cP_0$$

- Pro  $A < 0,05$  lze rovnici zjednodušit:

$$I_F = k'c$$



11


 Univerzita Palackého  
v Olomouci

## Aplikace: kvantitativní analýza

- Faktory ovlivňující kvantitativní měření:
  - změna teploty při měření (ovlivnění viskozity vzorku),
  - změna pH (chemická rovnováha fluoroforu),
  - reabsorpce – emitované záření je při vysokých koncentracích absorbováno jinou molekulou fluoroforu,
  - zhášení fluorescence (*quenching*) – interakce excitovaného fluoroforu s okolím  $\Rightarrow$  deexcitace molekuly nezářivými přechody:  $M^* \rightarrow M + E$ ,
  - rozklad fluoroforu – intenzivní záření může způsobit rozklad analytu.

12

12



Univerzita Palackého  
v Olomouci

## Aplikace: kvantitativní analýza

- Kvantitativní fluorescenční metody lze použít pro stanovení anorganických, organických i biochemicky významných látek.
- Výhoda fluorescenčních metod: i o několik řádů vyšší citlivost ve srovnání s absorpčními metodami.
- Stanovení anorganických látek: viz další slide.
- Stanovení organických látek:
  - aminokyseliny, koenzymy, nukleové kyseliny, proteiny, steroidy, ...
  - polycyklické aromatické uhlovodíky (PAU), naftoly, salicylová kyselina, močová kyselina, adrenalin, ...
  - léčiva: warfarin, prokain, barbituráty, peniciliny, opiáty, LSD, ...
  - bojové látky: sarin, tabun.
- Aplikační oblasti: analýza potravin, farmacie, výzkum přírodních látek, klinická analýza.

13

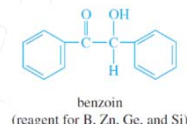
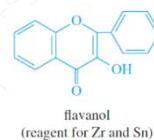
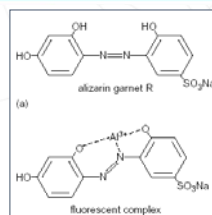
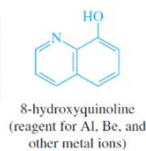
13



Univerzita Palackého  
v Olomouci

## Aplikace: kvantitativní analýza

Ion	Reagent	Wavelength, nm		Sensitivity, µg/mL	Interference
		Absorption	Fluorescence		
Al <sup>3+</sup>	Alizarin garnet R	470	500	0.007	Be, Co, Cr, Cu, F <sup>-</sup> , NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> , Ni, PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> , Th, Zr
F <sup>-</sup>	Al complex of Alizarin garnet R (quenching)	470	500	0.001	Be, Co, Cr, Cu, Fe, Ni, PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> , Th, Zr
B <sub>3</sub> O <sub>3</sub> <sup>2-</sup>	Benzoïn	370	450	0.04	Be, Sb
Cd <sup>2+</sup>	2-( <i>o</i> -Hydroxyphenyl)-benzoxazole	365	Blue	2	NH <sub>3</sub>
Li <sup>+</sup>	8-Hydroxyquinoline	370	580	0.2	Mg
Sn <sup>4+</sup>	Flavanol	400	470	0.1	F <sup>-</sup> , PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> , Zr
Zn <sup>2+</sup>	Benzoïn	—	Green	10	B, Be, Sb, colored ions



14

14





Univerzita Palackého v Olomouci

## Další luminiscence



**Chemiluminiscence:** chemická reakce produkuje molekuly v excitovaném stavu, které emitují fotony.  
 $[A] + [B] \rightarrow [\text{excitovaný meziprodukt}] \rightarrow [\text{produkty}] + h\nu$

Př.: luminol +  $H_2O_2 \rightarrow 3\text{-aminoftalát}^* \rightarrow 3\text{-aminoftalát} + h\nu$   
 Př.: chemiluminiscenční senzory plynů ( $NO$ ,  $O_3$ , ...)  
 Př.: imunoanalytické techniky s luminiscenční detekcí

**Bioluminiscence:** k reakcím produkujícím molekuly v excitovaném stavu dochází v biologických systémech, např. světlušky, medúzy, některé ryby.  
 Základní princip je oxidace luciferinu (biologický pigment), při níž se 96 % energie emituje ve formě záření a 4 % ve formě tepla:  
 $\text{luciferin} + O_2 \rightarrow \text{oxyluciferin} + h\nu$

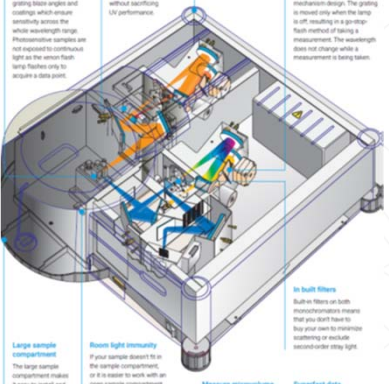
luminol

15

Univerzita Palackého v Olomouci

## Spektrofluorimetry



**Superior optical design**  
 Excellent sensitivity is a result of using a unique, precise xenon flash lamp coupled with optimized grating laser optics and coatings which ensure sensitivity across the whole wavelength range. Photoactive samples are not exposed to continuous light as the xenon flash lamp flashes only to acquire a data point.

**Extended sensitivity**  
 Red-sensitive photomultiplier tube detection extends sensitivity up to 900nm without sacrificing UV performance.

**Small footprint**  
 The Cary Eclipse occupies only 600 mm (24 inches) of bench space.

**Fast scanning**  
 The Cary Eclipse scans at 24,000 rpm/min without peak shifts due to the monochromator drive mechanism design. The grating is moved only when the lamp is off, resulting in a gentle flash method of lamp measurement. The wavelength does not change while a measurement is being taken.

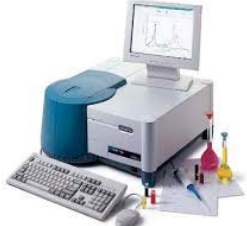

**Large sample compartment**  
 The large sample compartment makes it easy to install and remove accessories, and fit your own research apparatus.

**Room light immunity**  
 If your sample doesn't fit in the sample compartment, or it is easier to work with an open sample compartment, then simply leave the lid off. The xenon xenon flash lamp and sophisticated digital processing on the Cary Eclipse mount light immunity for fluorescence measurements.

**Measure microvolume samples**  
 Reduced volume cuvettes as low as 10 µl are available. The horizontal beam profile ensures excellent sensitivity even with such low volumes.

**In built filters**  
 Built-in filters on both monochromators ensure that you don't have to buy your own to minimize scattering or exclude second-order stray light.

**Superfast data collection**  
 Scan the whole wavelength range in less than 3 seconds.

16

16