

# ZÁKLADY LUMINISCENČNÍ SPEKTROMETRIE

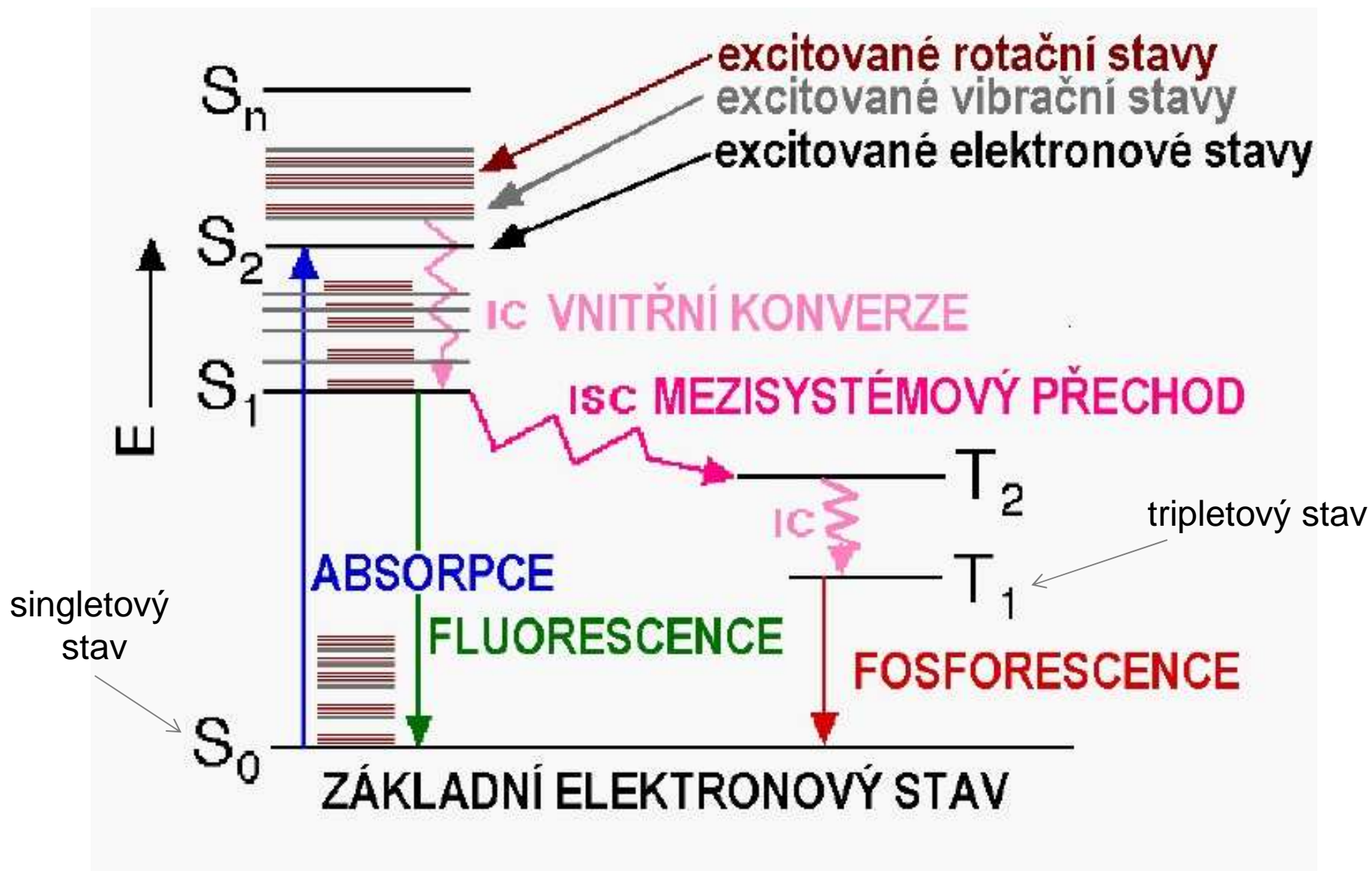


# Co to je luminiscenční spektrometrie?

- využívá se zde fotoluminiscence, tj. sekundárního záření, které molekuly látky vyzařují (emitují) po absorpci primárního (budícího, excitačního) elektromagnetického záření z ultrafialové nebo viditelné oblasti světla
- fotoluminiscence se dělí dle doby trvání – dosvitu – na fluorescenci ( $10^{-9} - 10^{-6}$  s) a na fosforescenci ( $10^{-6} - 10^2$  s)



# Energetické hladiny molekuly



# Popis

- v **singletovém stavu** má molekula sudý počet elektronů (jedna polovina má spiny orientovány opačně než druhá polovina) a celkové spinové kvantové číslo molekuly  $S = 0$
- základní stav je vždy singletový (všechny vazebné i nevazebné hladiny jsou obsazeny dvěma elektrony – Pauliho princip)
- pokud dojde k přechodu elektronu na vyšší hladinu (excitace), ale tento elektron má opačný spin než elektron v orbitalu, ze kterého došlo k excitaci, tak je spinové číslo opět rovno nule a molekula se nachází v singletovém stavu  $S_1, S_2, \dots$
- v tzv. **tripletovém stavu** má ale elektron, excitovaný na vyšší hladinu, stejný spin jako zbylý elektron na neúplně obsazené hladině základního stavu a celkové spinové kvantové číslo molekuly  $S = 1$ .
- energie tripletových stavů je vždy nižší než singletových a rozdíl jejich energií se označuje jako singlet-tripletové štěpení

Wolfgang Pauli (1900 - 1958)  
Nobelova cena za fyziku 1945

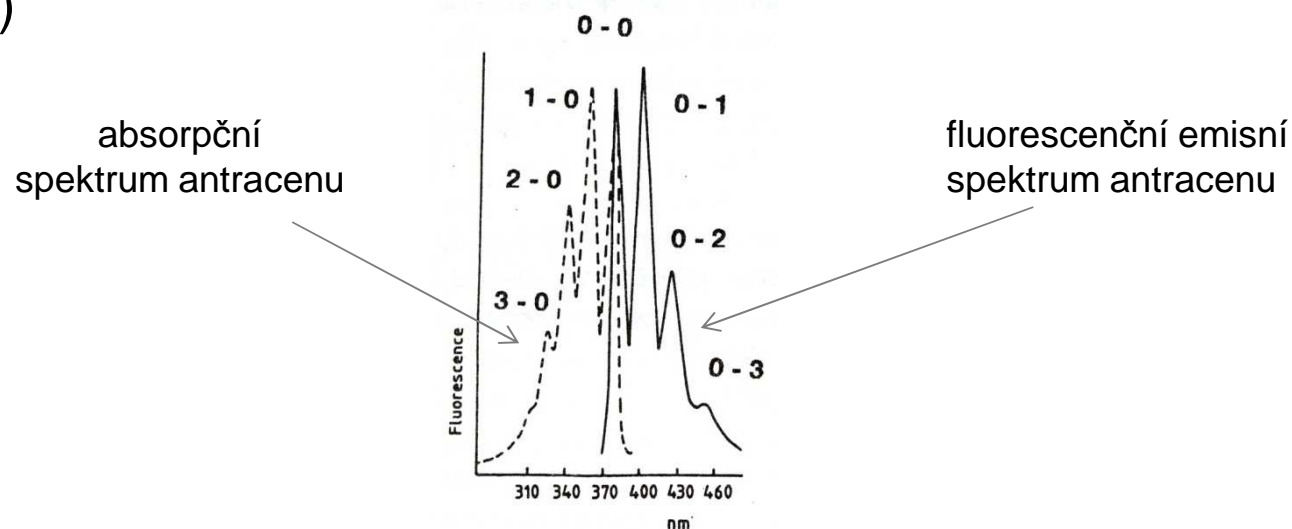


# Rozlišení fluorescence a fosforescence

- z excitovaného stavu  $S_1$  se může molekula vrátit do základního stavu  $S_0$  třím způsobem:
  - ⇒ **nezářivou vnitřní konverzí** ( $10^{-5} - 10^{-7}$  s), kdy se přebytečná energie uvolní ve formě tepla
  - ⇒ **zářivým přechodem** na různé vibrační hladiny stavu  $S_0$  – **fluorescencí** ( $10^{-6} - 10^{-9}$  s)
  - ⇒ v molekulách, kde nejsou tak velké rozdíly v energii singletového stavu  $S_1$  a tripletového stavu  $T_1$ , může molekula přejít ze stavu  $S_1$  do stavu  $T_1$  tzv. mezisystémovým přechodem ( $10^{-6}$  s), následnou vibrační relaxací zaujme molekula nejnižší vibrační energetickou hladinu stavu  $T_1$  ( $v = 0$ ), z níž může přejít na různé vibrační hladiny stavu  $S_0$  **zářivým přechodem** – **fosforescencí** ( $10^{-6} - 10^2$  s); takovýto přechod je ale výběrovými pravidly zakázaný, ale je pozorovatelný v důsledku spin-orbitální interakce.

# Fluorescenční spektrometrie

- **fluorescence** = přechod elektronů z nejnižší vibrační hladiny ( $v = 0$ ) stavu  $S_1$  do různých vibračních hladin základního stavu  $S_0$
- z toho vyplývá, že fluorescence do nejnižší vibrační hladiny stavu  $S_0$  vyžaduje stejnou energii jakou molekula absorbuje při excitaci do nejnižší vibrační hladiny stavu  $S_1$
- energie záření, které molekula může emitovat fluorescencí, je tedy menší nebo nejvýše rovna energii záření, které je molekula schopna absorbovat, proto je fluorescenční spektrum posunuto k vyšším vlnovým délkám ve srovnání se spektrem absorpčním (**batochromní posun**)



# Matematický popis

- experimentální doba života fluorescence

$$\tau_F = \frac{1}{\sum_i k_i},$$

kde  $k_F$  je rychlostní konstanta fluorescence

- skutečná doba trvání fluorescence

$$\tau_{OF} \cong \frac{10^{-4}}{\varepsilon_{\max}},$$

kde  $\varepsilon_{\max}$  je molární absorpční koeficient ( $\text{l.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ )

- poměr  $\tau_F/\tau_{OF}$  ( $q_F$ ) je **kvantový výtěžek fluorescence** = podíl excitovaných elektronů, které se vrací do základního stavu fluorescenčním přechodem

# Matematický popis

- **intenzita fluorescence**,  $I_F$ , je úměrná kvantovému výtěžku fluorescence,  $q_F$ , a absorbovanému toku záření dle vztahu

$$I_F = k \cdot q_F \cdot (\Phi_0 - \Phi) = k \cdot q_F \cdot \Phi_0 \cdot (1 - 10^{\varepsilon_\lambda \cdot l \cdot c}),$$

kde  $\Phi_0$  je zářivý tok budícího záření dopadající na vzorek,  $\Phi$  je zářivý tok zeslabený absorpcí po průchodu vzorkem – vztah mezi nimi udává Bouguer-Lambert-Beerův zákon,  $k$  je přístrojová konstanta

- ve zředěných roztocích je  $I_F$  **přímo úměrná koncentraci** látky v roztoku  $c$ , tloušťce optické vrstvy  $l$ , intenzitě dopadajícího záření  $\Phi_0$ , kvantovému výtěžku fluorescence  $q_F$  a molárnímu absorpčnímu koeficientu  $\varepsilon_\lambda$  při vlnové délce  $\lambda$  excitačního záření



Bouguer

$$I_F = 2,303 \cdot k \cdot \varepsilon_\lambda \cdot q_F \cdot \Phi_0 \cdot l \cdot c$$

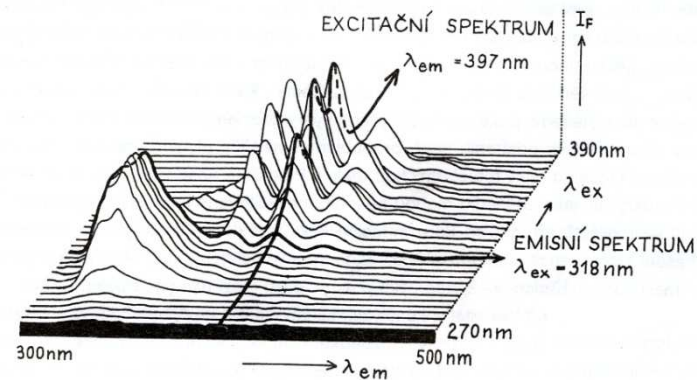
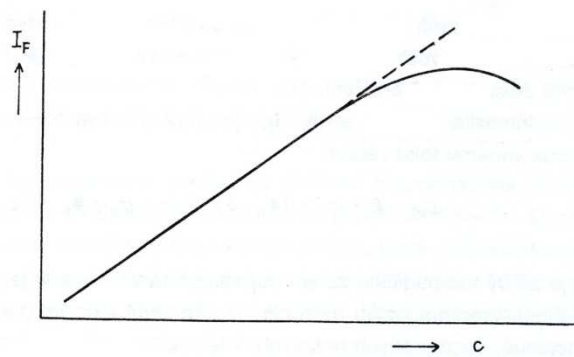


Lambert



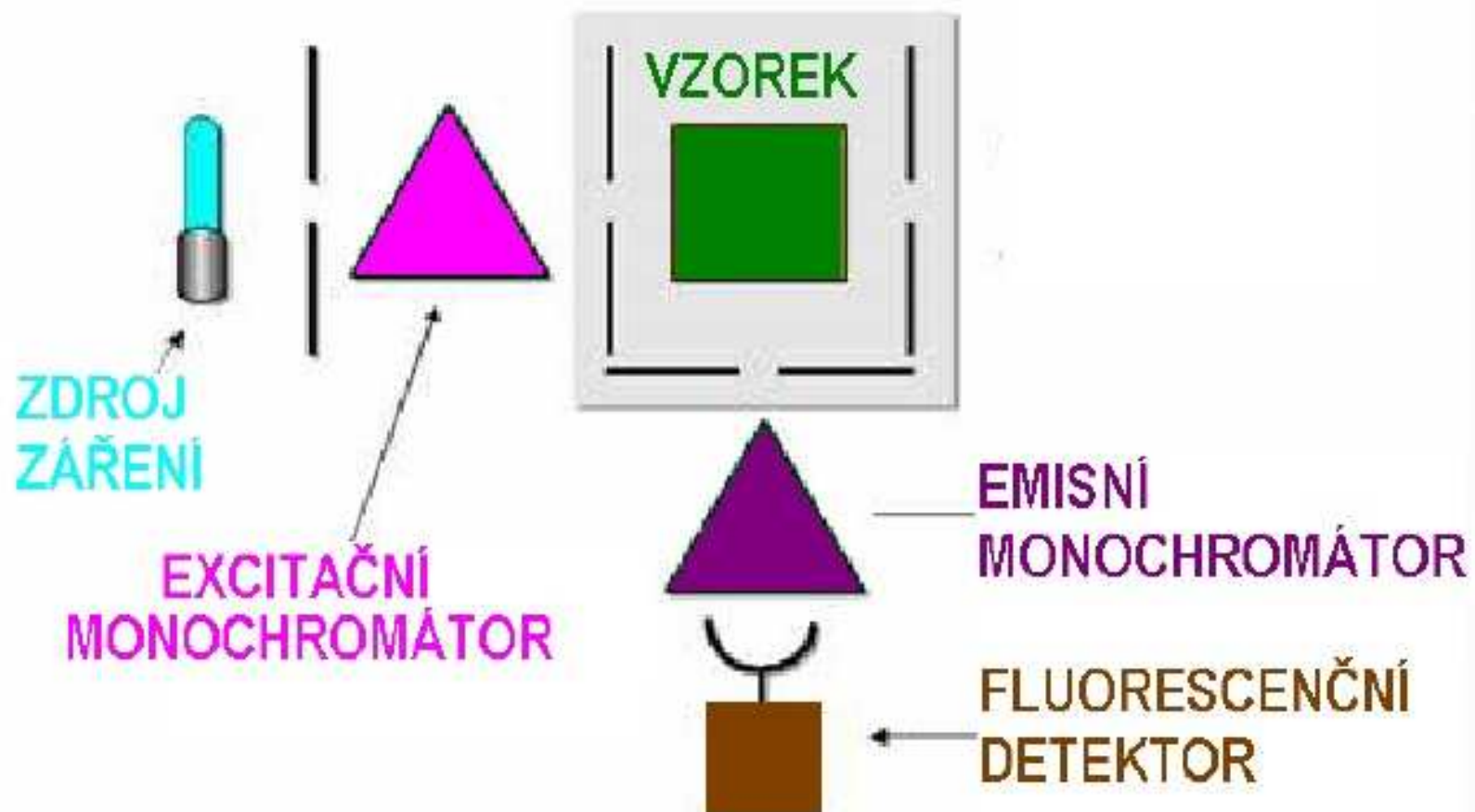
# Další důležité pojmy

- intenzita fluorescence obecně klesá s teplotou
- kalibrační křivka při kvantitativní analýze, čili závislost  $I_F = f(c)$  by měla být lineární, ale v důsledku **samozhášení fluorescence** vykazuje negativní odchylky od linearity v oblasti vyšších koncentrací látky
- závislost  $I_F$  na vlnové délce emitovaného záření, při konstantní vlnové délce budícího záření, se označuje jako **fluorescenční emisní spektrum**
- opačně mluvíme o **fluorescenčním excitačním spektru**
- shoda absorpčního a excitačního spektra se považuje za významné kritérium čistoty látky.



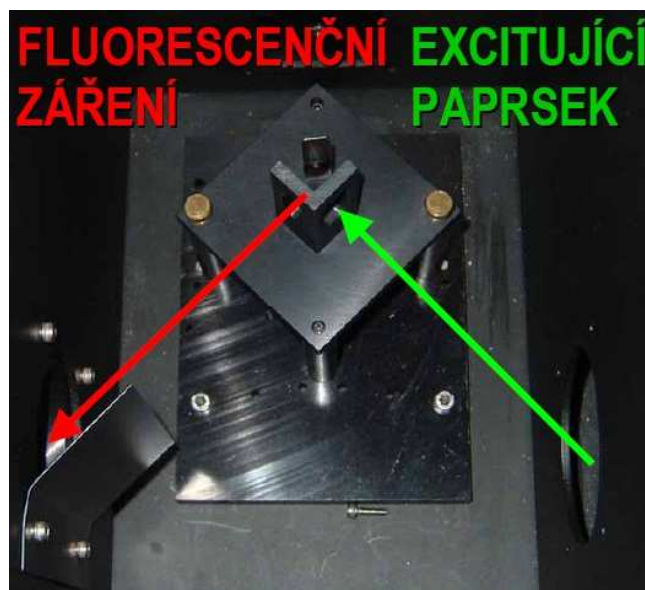
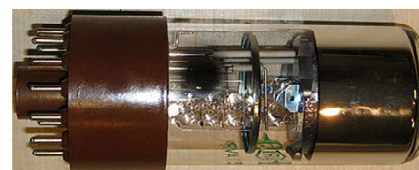
# Instrumentace

## SPEKTROFLUORIMETR



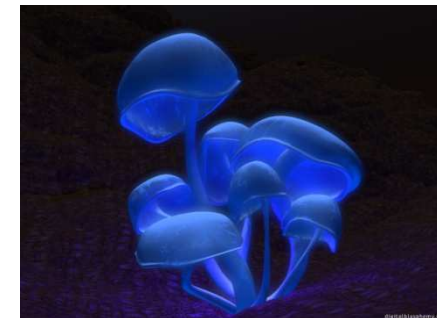
# Instrumentace

- zdroj záření:  
xenonová výbojka, rtuťová výbojka
- křemenné kyvety
- mřížkové monochromátory
- detektor:  
fotonásobiče, fotodiody
- vodící optika



# Využití spektrometrie

- důkazy a stanovení prvků – Al, Be, Ga, Lu, Zr – vznik intenzivně fluoreskujících komplexů reakcí s činidly – morin, rhodamin B, 8-hydroxychinolin (meze detekce až  $10^{-10}$  g.ml<sup>-1</sup>)
- PAU (pyren, chrysen, benzpyren)
- fluoreskující pesticidy ve vodách, aflatoxiny v zrní, oříškách
- klinická analýza – stanovení aminů, aminokyselin po převedení na fluoreskující dansyl – deriváty, atd. (meze detekce až  $10^{-12}$  g)
- fluorimetrický detektor v HPLC (vysokoúčinná kapalinová chromatografie)

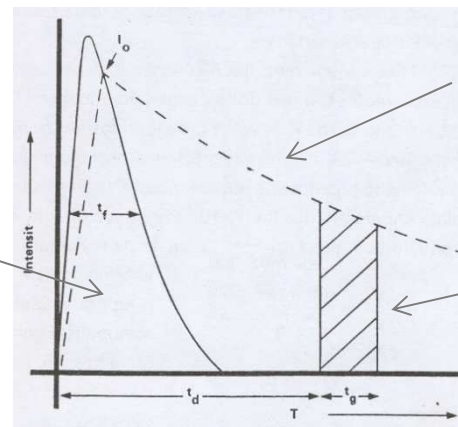


luminiscence (bioluminiscence) mořského korýše

# Fosforescenční spektrometrie

- **fosforescence** = emise ultrafialového nebo viditelného záření z nulové vibrační hladiny tripletového stavu  $T_1$  do různých vibračních hladin základního singletového stavu  $S_0$
- fosforescenční spektrum posunuto k vyšším vlnovým délkám ve srovnání s fluorescenčním spektrem
- problémem je, že molekula většinou uvolní přebytek energie nezářivým přechodem (vnitřní konverzí, fotochemickou reakcí, atd.), než zářivou fosforescencí - toto lze potlačit podchlazením vzorku na teplotu kapalného dusíku (77 K)  $\Rightarrow$  vytvoří se tuhý sklovitý průsvitný roztok; používané rozpouštědlo je směs diethyletheru, izopentanu a ethanolu (5:5:2)

puls excitačního záření  
z xenonové výbojky (10  $\mu$ s)



průběh intenzity fosforescence

měření fosforescence

# Instrumentace

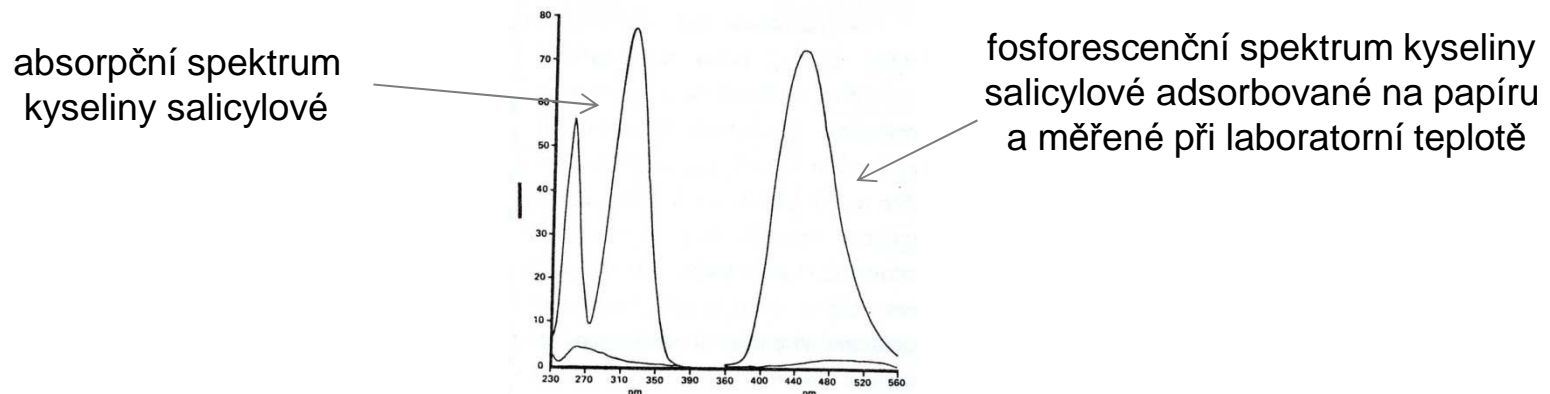
- vzorky se proměřují v úzkých křemenných kyvetách umístěných v křemenné Dewarově nádobě s kapalným dusíkem ve zvláštním držáku
- přístroje:
  - starší **fosforoskopy**  $\Rightarrow$  rotující přerušovač paprsku – měření fosforescence při zcloněném budícím záření
  - spektrální fluorimetry** – umožňují měřit fosforescenci i fluorescenci; používají pulsní zdroj záření (xenonová výbojka) a fotonásobič jako detektor



James Dewar (1842 – 1923)

# Využití spektrometrie

- některé polární látky se mohou nanést na vhodný nosič (filtrační papír, celuloza, silikagel) a po vysušení vykazují fosfoescenci i při laboratorní teplotě
- anorganické tuhé látky někdy fosforeskují ve formě prášků
- měření fosforescence i ve vodném prostředí, obsahujícím **micely** (mají hydrofilní povrch a vnitřní hydrofobní část, ve které může být méně polární molekula vzorku chráněna před srážkami s okolními molekulami, čímž se zvýší kvantový výtěžek fosforescence) nebo **cyklodextriny** (tvorba inkluzních komplexů)
- využití k analýze pesticidů, PAHů ve vzduchu a ve vodách, prvků vzácných zemin, sloučenin uranu





# DĚKUJI ZA POZORNOST

- **literatura:**
- Jandera P., *Atomová a molekulová spektroskopie se zaměřením na stopovou analýzu kontaminantů, Díl B – Molekulová spektroskopie v organické analýze*, Univerzita Pardubice, Pardubice, 2006, str. 59 – 72.
- Matějka P., *Absorpční fotometrie, přednášky*, VŠCHT Praha, Praha, 2005.