

## Luminesentsispektroskoopia I Põhimõtted

(Fluorestsentsispektroskoopia)

Üks kõige madalamat avastamispiiri ja laiemat eritehnikate variatsiooni võimaldav spektroskoopiline meetod

Joseph R. Lakowicz, *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, 3<sup>rd</sup> Edition, Springer, 2006

18.10.2018

1

## Molekulide olekud

- Vaatleme paarisarvulise elektronide arvuga molekule:
  - **singletne molekul**: kõik elektronid on paardunud
  - **tripletne molekul**: on kaks paardumata elektroni
- Lähteolekus on enamasti tavalisi molekule singletsed
  - Tähistatakse **S<sub>0</sub>**
- Osakesed, millel on üks paardumata elektron on **vabad radikaalid**
  - Vabad radikaalid on **dublettsed molekulid**

18.10.2018

2

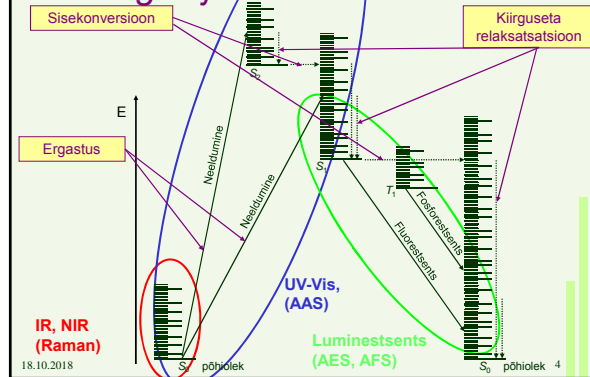
## Molekulide olekud

- Singletsete osakeste **ergastumisel** läheb osake üldjuhul üle singletsesse ergastunud olekusse
  - räägitakse singlett-singlett üleminekutest
  - näiteks olekusse S<sub>1</sub> või S<sub>2</sub>
  - seejuures enamasti mõnele vibratsiooniergastusnivoole
  - kui seda tahta rõhutada, siis näiteks teise singletse oleku kolmandat vibratsiooniergastuse alamnivood tähistatakse S<sub>2</sub><sup>v3</sup>
- singlett-triplett üleminekud on kvantmehaanika järgi keelatud ja seetõttu harvad

18.10.2018

3

## Kiirgus ja molekulide ehitus



18.10.2018

4

## Ergastunud molekuli relaksatsioon

- Olgu ergastus (ca 10<sup>-15</sup> s jooksul) toimunud olekusse S<sub>2</sub><sup>v3</sup>
- Väga kiiresti (ca 10<sup>-12</sup> s jooksul) toimuvad järgmised üleminekud:
  - S<sub>2</sub><sup>v3</sup> → S<sub>2</sub><sup>v0</sup> (→) S<sub>1</sub><sup>vn</sup> → S<sub>1</sub><sup>v0</sup>
  - Esimest ja kolmandat nimetatakse **võnkerelaksatsiooniks**
  - S<sub>2</sub><sup>v0</sup> ja S<sub>1</sub><sup>vn</sup> vahel olev **sisekonversiooniüleminek** ei ole nii kiire (10<sup>-10</sup> .. 10<sup>-12</sup> s)
  - Need on kiirguseta protsessid ja energia muundub soojuseks

18.10.2018

5

## Ergastunud molekuli relaksatsioon

- Olekust S<sub>1</sub><sup>v0</sup> edasi on neli võimalust:
  - **Sisekonversioon**: kiirguseta üleminek olekusse S<sub>0</sub><sup>vn</sup> ja sealt edasi S<sub>0</sub>
    - protsessi aeg 10<sup>-10</sup> .. 10<sup>-12</sup> s
  - **Väliskonversioon**
  - **Fluorestsents**: kiirgusega üleminek olekusse S<sub>0</sub><sup>vn</sup> ja sealt edasi kiirguseta üleminek olekusse S<sub>0</sub>
    - protsessi aeg enamasti 10<sup>-9</sup>..10<sup>-8</sup> s
  - **Intersüsteemne üleminek** olekusse T<sub>1</sub><sup>vn</sup> ja sealt edasi kiirguslik üleminek olekusse S<sub>0</sub>
    - See kiirguslik üleminek on **Fosforestsents**
      - protsessi aeg 10<sup>2</sup> .. 10<sup>6</sup> s (aeglane protsess)

18.10.2018

6

## Konkurents relaksatsiooni- protsesside vahel

- Relaksatsiooniprotsesside karakteristikud ajad iseloomustavad vastavate protsesside tõenäosust
- Mida lühem on protsessi karakteristik aeg, seda tõenäosem on vastav protsess
- **Eelistatult kulgeb kiirem protsess!**
  - Teiste sõnadega: protsess, mille tõenäosus on kõrgem

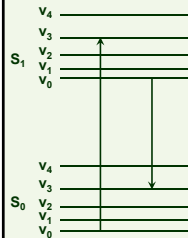
18.10.2018

7

## Stokes'i ja anti-Stokes'i fluorestsents

### Stokes'i fluorestsents

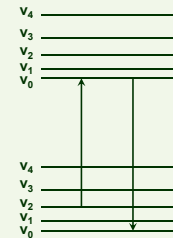
$$E_{\text{fluorestsents}} < E_{\text{ergastav}}$$



18.10.2018

### Anti-Stokes'i fluorestsents

$$E_{\text{fluorestsents}} > E_{\text{ergastav}}$$



8

## Stokes'i ja anti-Stokes'i fluorestsents

- Kuna tavalisel temperatuuril on rõhuv enamus molekule olekus  $v_0$ , siis on rõhuv enamus fluorestsentsi kvante Stokes'i kvandidid

18.10.2018

9

## Luminesentsispektrid

- Erinevalt UV-Vis spektritest on kaks muudetavat lainepikkust
  - ergastuskiirguse lainepikkus
  - emissioonikiirguse lainepikkus
- Seega saab spektreid registreerida erineval moel
  - **ergastusspektrid**
    - Mõõdetakse fluorestsentsi intensiivsust (kindlal lainepikkusel või summaarset), varieerides ergastuse lainepikkust
  - **emissiooni- e. fluorestsentsispektrid**
    - Mõõdetakse fluorestsentsi intensiivsust erinevatel lainepikkustel hoides ergastuslainepikkuse konstantse

18.10.2018

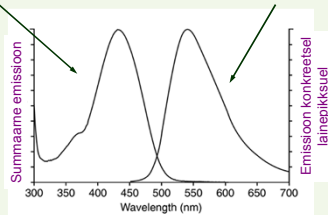
10

## Näide

- Alexa Fluor 430

### Ergastusspekter

### Emissioonispekter



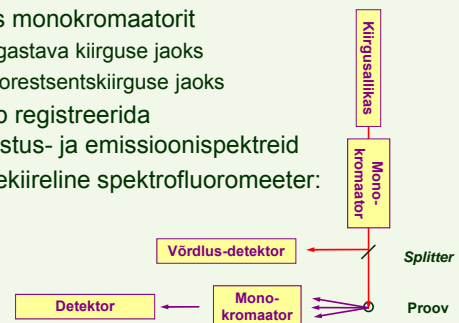
Pilt: Joseph R. Lakowicz, *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, 3<sup>rd</sup> Edition, Springer, 2006

18.10.2018

11

## Spektrofluoromeetrid

- Kaks monokromaatorit
  - ergastava kiirguse jaoks
  - fluorestsentskiirguse jaoks
- Saab registreerida ergastus- ja emissioonispektreid
- Kahekiireline spektrofluoromeeter:



18.10.2018

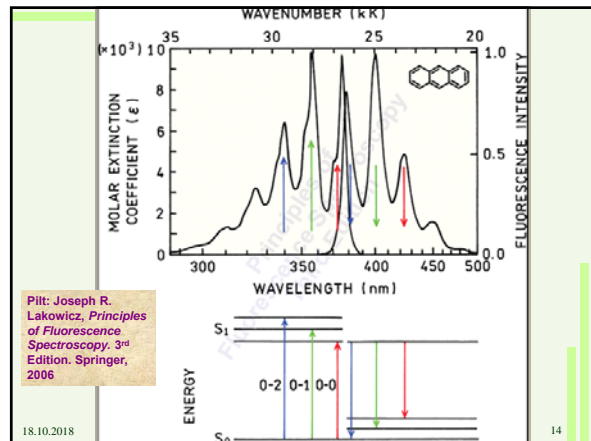
12

## Spektrite omadused

- Ergastusspekter on lühema lainepikkuse juures kui kiirgusspekter
- Spektriribad on küllaltki laiad ja mittekarakteristlikud
- Spektrid on sageli üsna sümmeetrilised
  - Fluorestsents toimub peaaegu alati  $S_1$  olekust
  - $S_1$  ja  $S_0$  vibratsiooninivood on sarnased.

18.10.2018

13

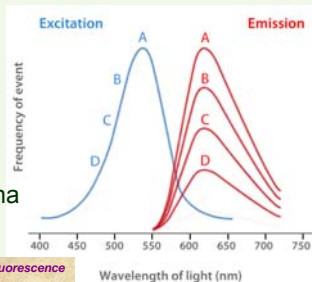


18.10.2018

14

## Spektrite omadused

- Ergastamine neeldumismaksimumist eemal
  - muudab emissiooni intensiivsust
  - ei muuda emissioonijoonet
- Allika lainepikkus ei pea täpselt maksimumile vastama



Pilt: Joseph R. Lakowicz, *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, 3<sup>rd</sup> Edition, Springer, 2006

## Lineaarsus, kvantitatiivne analüüs

- Meetod on üsna heas lähenduses lineaarne
 
$$F = k \cdot C$$
- Lineaarne ala on lai: 3-6 suurusjärku
  - Kuid esineb efekte, mis seda ahendavad
- Kvantitatiivne analüüs käib enamasti tavalisel kalibreerimisgraafiku meetodil

18.10.2018

16

## Luminesentsi ergastamine

- Valgusega ergastamine: fotoluminesents
- Ergastamiseks kasutatakse UV kiirgust või nähtavat valgust
  - Ergastusenergia on elektroonse ergastuse suurusjärgus
- Ergastav kiirgus:
  - peab olema piisavalt intensiivne
  - lainepikkuse muutmise võimalus on enamasti oluline
- Allikas võib olla pidev- või impulssallikas
  - Viimane on kasulik fluorestsentsi eluea mõõtmiseks
- Kiirgus võib olla polariseeritud või mitte

18.10.2018

17

## Allika intensiivsuse olulisus

- Luminesents**
  - Madala kontsentratsiooniga proov: nõrk signaal
  - Mida intensiivsem allikas, seda tugevam signaal**
- UV-Vis neeldumine**
  - Madala kontsentratsiooniga proov: kahe tugeva signaali väike vahe
  - Allika intensiivsuse tõstmine oluliselt ei aita**

18.10.2018

18

## Luminesentsi ergastamine

- **Ksenoon-kaar-lamp**
  - ca 150 – 800 nm
- **Elavhõbe-kaar-lamp**
  - Nii pidev osa kui ka jooned
    - näiteks 579, 580, 546, 436, 408, 405, 254 nm
  - filtritega eraldatakse vajalik välja
- **Laser**
  - Väga intensiivne
  - Väga levinud erirakendustes
  - Võib olla impulssallikas
- **Valgusdiod**

18.10.2018

19

## Molekulide luminesentsi-omadused

- **Mitte kõik molekulid ei fluorestseeri**
  - fluoretsentsiga konkureerib mittekiirguslik relaksatsioon
  - Eelistatult toimub see protsess, mis on kiirem
- Selleks, **et molekul fluorestseeriks:**
  - Molekul peab neelama ergastavat kiirgust
    - Sisuliselt: molekulil peavad olema intensiivsed neeldumisjooned UV või Vis alas
  - Molekul peab olema jäik
  - (Molekulis sees elektronodonoorsed rühmad)

18.10.2018

20

## Kiirguse neelamine

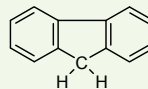
- Kehtib sama loogika, mis UV-Vis spektroskoopias
- Rusikareegel: fluorestseerivad eeskätt ained, millel on intensiivsed neeldumisjooned UV või nähtavas spektris
- Eeskätt:
  - $\pi$ -süsteemidega molekulid
  - metallikompleksid

18.10.2018

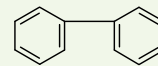
21

## Molekuli jäikus

- Mida jäigem molekul, seda vähem on tal võimalusi mittekiirguslikult relakseeruda
  - Mittekiirguslik relaksatsioon baseerub võnkumistel
  - Mida vähem on molekulil painduvaid osi, seda raskem on tal mittekiirguslikult relakseeruda



Fluoreen  
Fluorestseerib



Bifenüül  
Ei Fluorestseeri

18.10.2018

22

## Molekuli jäikus

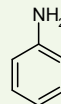
- Väga paljud metallikompleksid on jäigad
  - metall orienteerib ligandid tugevalt enda ümber
  - kelaatsete ligandidega kompleksid on eriti jäigad
- Metallikomplekside fluoretsentsi kasutatakse metallide määramiseks

18.10.2018

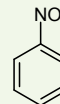
23

## Elektrodoorsed rühmad

- Mida rohkem on molekulis elektrodoorseid rühmi ja mida vähem elektronaktseptoorseid rühmi, seda kõrgem on fluoretsentsi tõenäosus



Aniliin  
Fluorestseerib

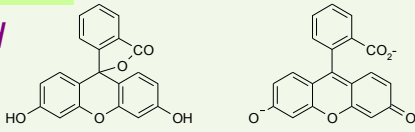


Nitrobenseen  
Ei Fluorestseeri

18.10.2018

24

## Näited

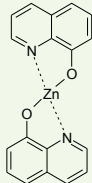


Fluoresteiin neutr. kk-s  
Ei fluoresteeri

Fluoresteiin aluselises kk-s  
Fluoresteerib



8-Hüdroksükinoliin  
Fluoresteerib nõrgalt



8-Hüdroksükinoliini Zn kompleksi  
Fluoresteerib tugevalt

18.10.2018

25

## Rakendatavus

- IR spektri annavad peaaegu kõik ained
- UV-Vis spektri annavad paljud ained
- Fluorestsents on omane vähestele ainetele

Luminesentsi kasutamine analüüsis baseerub enamasti derivaatidel või mürgistatud ainetel

18.10.2018

26

## Luminesentsi kvantefektiivsus

- Ka molekulide korral, mis luminesseerivad, ei põhjusta mitte iga neeldunud kvant luminesentsi
- Luminesentsi kvantsaagis e. **Luminesentsi kvant-efektiivsus**  $\Phi$ :

$$\Phi = \frac{n_{fl}}{n_{abs}}$$

$n_{fl}$  – luminesseerivate kvantide hulk

$n_{abs}$  – neeldunud kvantide hulk

- Luminesentsi kustumine – efektiivsuse langus (Näiteks lahustunud  $O_2$  mõjul)
  - Enamasti mittekiirguslike protsesside tõenäosuse suurenemise kaudu

18.10.2018

27

## Luminesentsi kvantefektiivsus

- Luminesentsi kvantsaagise võib väljendada ka erinevate protsesside kiiruste kaudu:

$$\Phi = \frac{\Gamma_{fl}}{\Gamma_{fl} + k_{nr}}$$

$\Gamma_{fl}$  – Luminesentsi kiiruskonstant

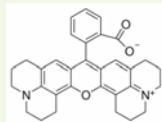
$k_{nr}$  – Mittekiirguslike protsesside summaarne kiiruskonstant

- Mitteluminesseerivad ained ei luminesseeri sellepärast, et mittekiirguslikud protsessid on palju kiiremad

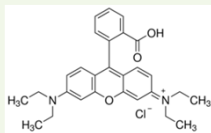
18.10.2018

28

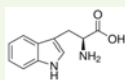
## Näited Kvantefektiivsusest



- Rhodamine 101  
 $\Phi = 100\%$   
– Etanool,  $\lambda = 450$  nm



- Rhodamine B  
 $\Phi = 31\%$   
– Vesi,  $\lambda = 514$  nm



- Trüptofaan  
 $\Phi = 13\%$   
– Vesi,  $\lambda = 280$  nm

Pildid: Sigma-Aldrich

Andmed: [www.iss.com](http://www.iss.com)

29

## Avastamisperiid

- Luminesents sobib jälgede määramiseks**
- Avastamisperiid sõltuvad erakordselt tugevalt aineist
  - Sobivaid aineid saab määrata avastamisperiididega ppb-de suurusjärgus
    - Aromaatsed amiinid, PAH'id, dibensofuraanid...
  - Derivatiseerimine on levinud

18.10.2018

30

## Luminestsentsispektroskoopia aparaat

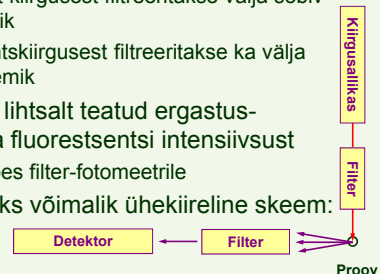
- Tava-kasutuses on levinumad kaks aparaadikonstruktsiooni:
  - filter-fluoro(i)meetrid
  - spektrofluoro(i)meetrid
- Kõrgetasemelisemad:
  - laserfluorestsents-süsteemid
    - mikroskoopia/imaging
    - Luminestsentsi eluea mõõtmised, ...

18.10.2018

31

## Filter-fluoromeetrid

- Kaks filtrit
  - Ergastavast kiirgusest filtreeritakse välja sobiv lainevahemik
  - Fluorestsentskiirgusest filtreeritakse ka välja vajalik vahemik
- Saab mõõta lihtsalt teatud ergastustingimustega fluorestsentsi intensiivsust
  - vastab umbes filter-fotomeetrile
- Aparatuuri üks võimalik ühekiireline skeem:

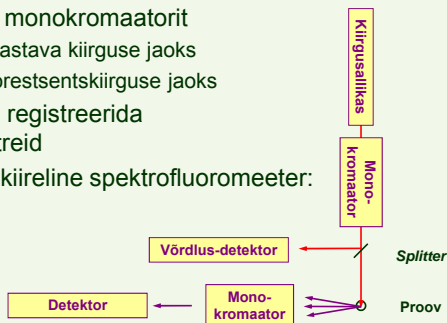


18.10.2018

32

## Spektrofluoromeetrid

- Kaks monokromaatorit
  - ergastava kiirguse jaoks
  - fluorestsentskiirguse jaoks
- Saab registreerida spektreid
- Kahekiireline spektrofluoromeeter:



18.10.2018

33

## Moodsad süsteemid

- Mikroplaatidelt mõõtvad (*high-throughput*) süsteemid
- Mikroskoopiad
- Eluea mõõtesüsteemid
- ...

18.10.2018

34

## Kromatograafias detektorina

- Fluorestsentsil baseeruv detektor on küllaltki levinud detektor vedelik-kromatograafias
- Põhiline probleem: enamus aineid ei fluorestseeri
- Nende korral aitab sageli **derivatiseerimine**

– Analüüdi molekuli viiakse mõne sobiva reagenti abil sellisesse vormi, mis sobib kasutatavale anslüüsimeetodile

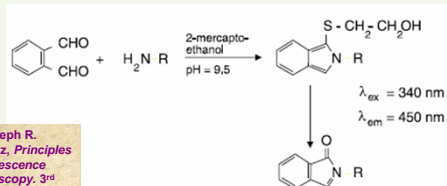
- Käesoleval juhul: fluorestseerib

18.10.2018

35

## Derivatiseerimise näide: OPA, orto-Ftaalaldehüüd

- Muundab aminohapped fluorestseerivateks indoolderivaatideks
- Aminohapete analüüsil üks tsentraalseid reagente



Pilt: Joseph R. Lakowicz, *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, 3<sup>rd</sup> Edition. Springer, 2006

18.10.2018

36

## Nõuded proovile

- Proovid enamasti lahuse kujul
- Proovi käsitlemine
  - Klassikaline: Spetsiaalses fluorestsentsiküvetis
    - Valgus siseneb otsast, väljub küljelt
  - Uuemad lahendused:
    - Mikroplaadid

18.10.2018

37

## Rakendused

- **Analüütiline keemia**
  - Klassikaline: metallide määramine luminescents-reagentidega
    - selle kasutusala tähtsus on väike, aga on suurenemas
  - Keskkonna, tervisekaitse jms analüüs
    - PAH-id, aromaatsed amiinid, ... (üldiselt LC)
  - Optilised sensorid
    - Tavalisim: O<sub>2</sub> sensor (luminescentsi kustumise baasil)
- **Biokeemilised analüüsid ja uuringud**
  - Bio-molekulide vastasmõjud ja dünaamika (ensüüm-substraat kompleksid jne)
  - Mitmesugused mikroskoopiad

18.10.2018

38