

Osnove fluorescence

Luminescenca

- Emisija fotona ob prehodu iz elektronsko vzbujenega stanja

- Poznamo dva tipa luminescence:
 - Relaksacija iz singletnega vzbujenega stanja
 - Relaksacija iz tripletnega vzbujenega stanja

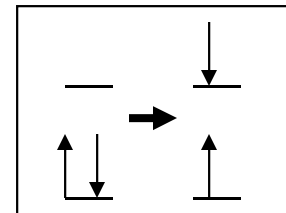
Osnove fluorescence

Singletna in tripletna stanja

- V osnovnem stanju sta v vsaki orbitali dva elektrona, ki morata imeti nasprotni spin (sta sparjena)

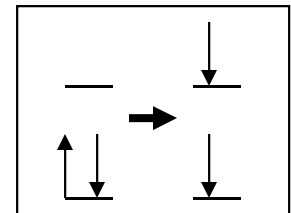
- Singletno vzbujeno stanje

Elektron v višji orbitali ima nasproten spin kot elektron v spodnji orbitali



- Tripletno vzbujeno stanje

Pri elektronu v višji orbitali lahko pride do spontane spremembe spina (spin flip). Procesu pravimo z angleškim izrazom “intersystem crossing.” Elektroni v obeh orbitalah imajo enako orientacijo.



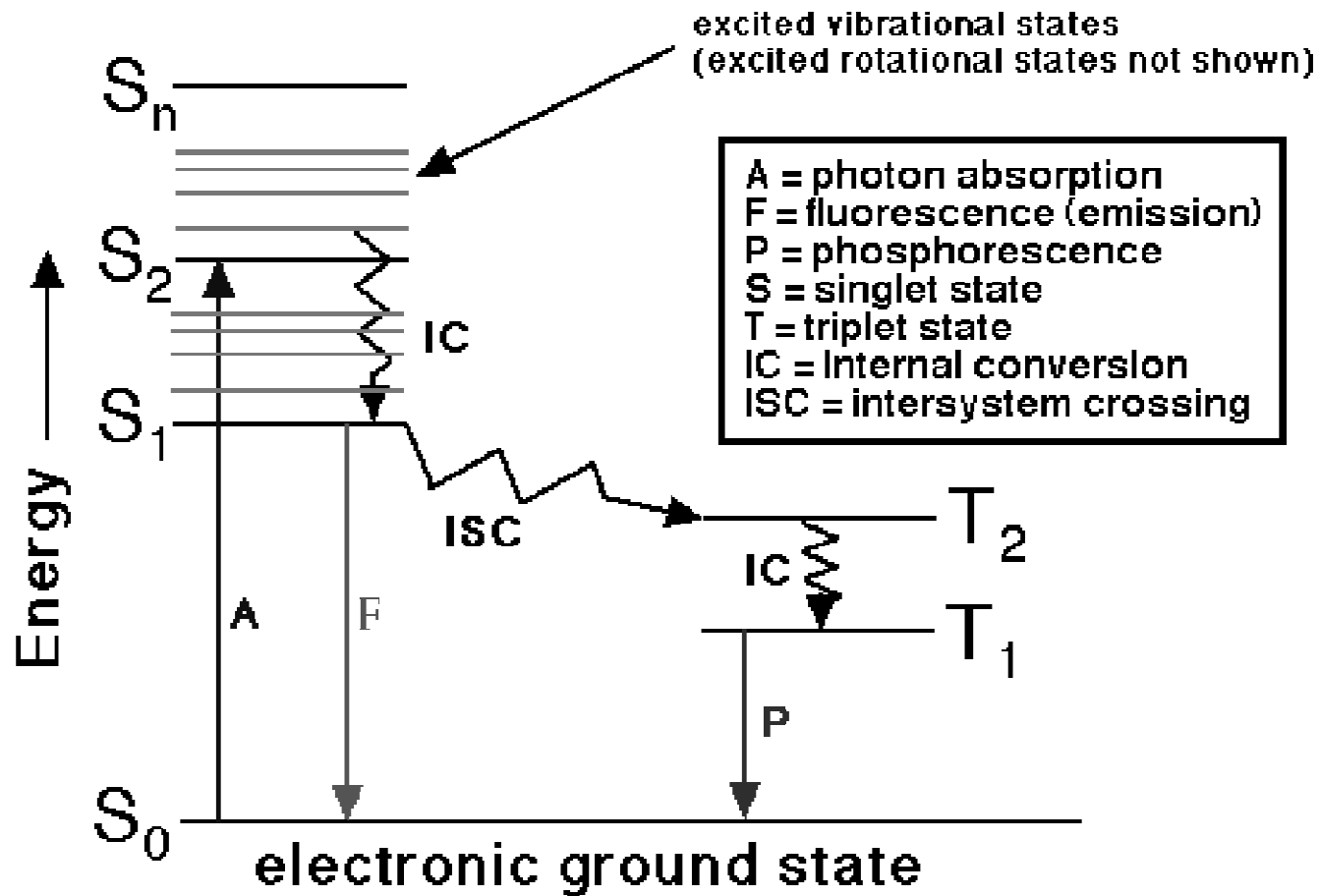
Osnove fluorescence

Tipi luminescence

- Fluorescenca – pri vračanju iz vzbujenega stanja v osnovno ne pride do spremembe spina (singletno stanje → osnovno stanje)
- Fosforescenca – pri prehodu iz tripletnega vzbujenega stanja v osnovno stanje mora priti do spremembe spina
- Fluorescenca je nekaj velikostnih redov hitrejši proces kot fosforescenca

Osnove fluorescence

Energijski diagram (Jablonskijev diagram)



Porazdelitev po energijskih nivojih pri fluorescenci

- Za tipične elektronske in vibracijske energijske nivoje lahko izračunamo delež molekul v zgornjem in spodnjem nivoju

$$\frac{n_{zgornji}}{n_{spodnji}} = \exp\left(-\frac{\Delta E}{kT}\right)$$

$k=1.38 \cdot 10^{-23} \text{ JK}^{-1}$ (Boltzmannova konstanta)

$\Delta E =$ energijska razlika

Procesi pri fluorescenci

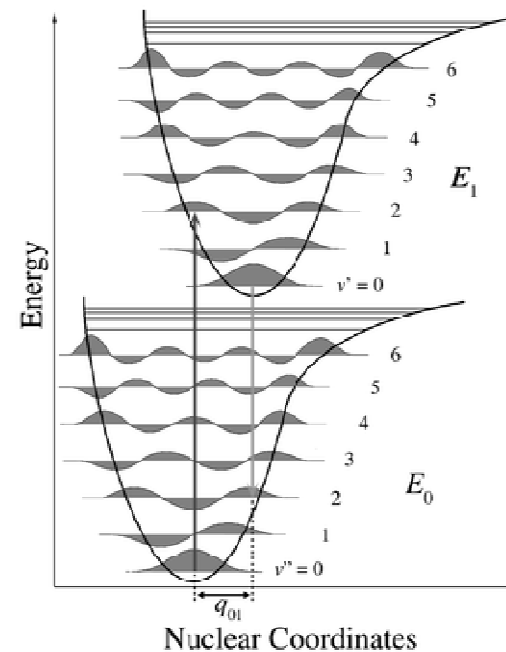
Vzbujanje

- Pri sobni temperaturi se molekule nahajajo v osnovnem elektronskem in vibracijskem stanju
- Molekule nato presvetlimo s svetlobo resonančne frekvence
- Za absorpcijo velja Beer-Lambertov zakon

ϵ – molekularna absorptivnost (extinction) ($M^{-1} \text{ cm}^{-1}$);

odvisna je od valovne dolžine, velikost predstavlja verjetnost absorpcije pri tej valovni dolžini

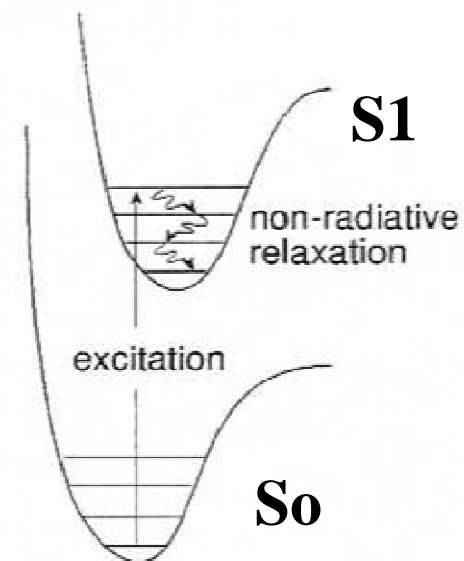
- Vzbujanje – kromofor v molekuli absorbira svetlobo in molekula preide v višje elektronsko in vibracijsko vzbujeno stanje S_1 ali S_2
- Proces absorpcije je zelo hiter (10^{-15} s) in je mnogo hitrejši od prehodov med vibracijskimi stanji → “vertikalen” prehod (Franck-Condonov princip).



Procesi pri fluorescenci

Ne radiativna relaksacija

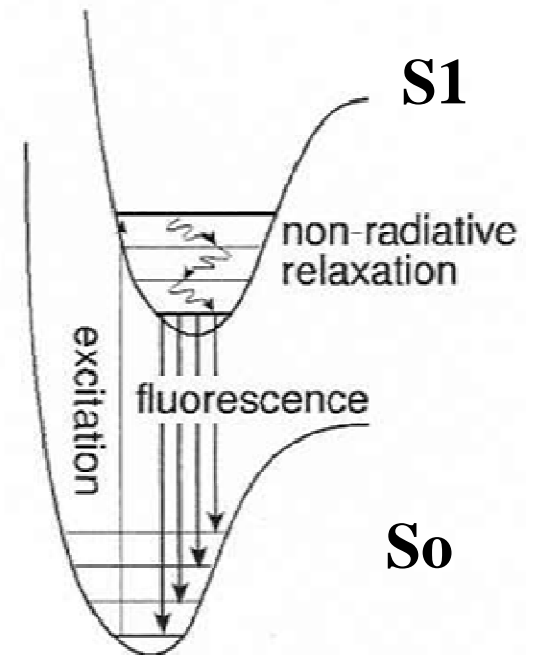
- V vzbujenem stanju se elektron nahaja v protivezni orbitali, zato so atomi v vezi šibkeje povezani → elektron tako preide na višje vibracijsko vzbujeno stanje S_1 kot pa ga je imel v osnovnem stanju
- Vibracijska deaktivacija poteka preko intermolekularnih trkov s topilom in ostalimi molekulami, proces traja nekje 10^{-12} s (mного hitreje kot fluorescenca)



Procesi pri fluorescenci

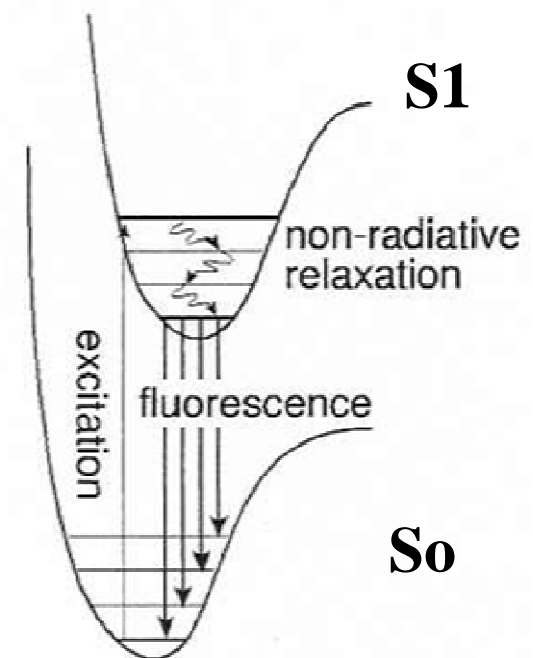
Emisija

- Molekula se vrne iz najnižjega vibracijskega stanja S_1 na vibracijsko stanje S_0 in pri tem emitira svetlobo (10^{-5} do 10^{-8} s)
- Relaksacija v osnovno stanje poteče hitreje kot pa ne-radiacijska relaksacija
- Energija emitirane svetlobe je nižja kot absorbirane



Procesi pri fluorescenci

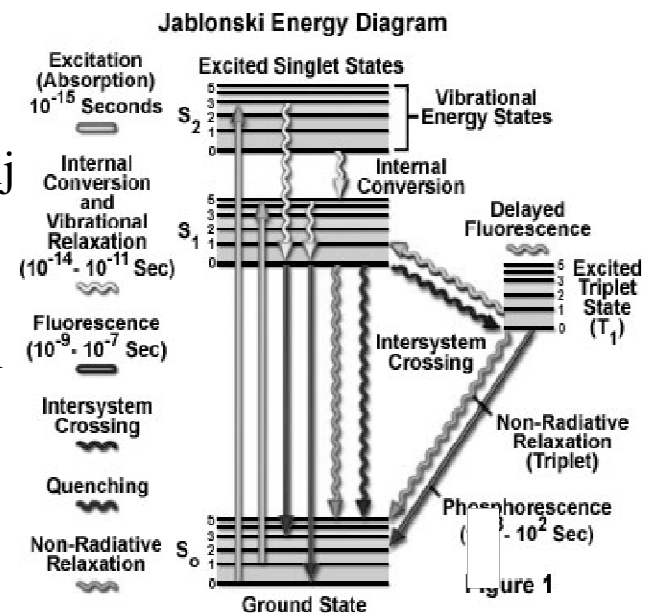
- Emisija je odvisna od relaksacije iz najnižjega vibracijskega stanja na S_1
- Pri molekulah je fluorescenčna emisija neodvisna od vzbujevalne svetlobe



Procesi pri fluorescenci

Interna konverzija in fluorescenčna emisija

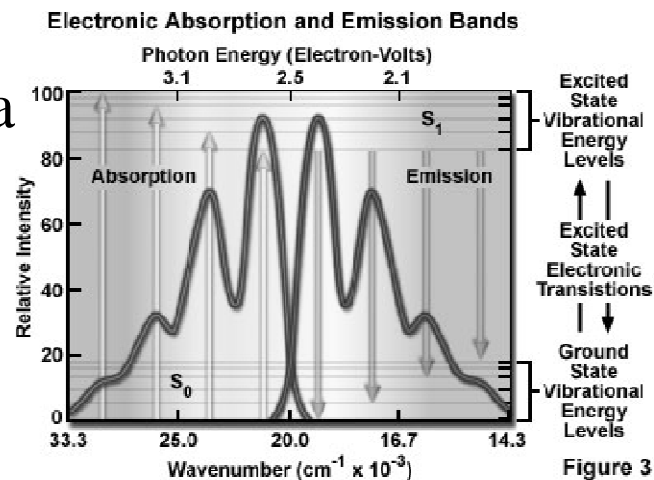
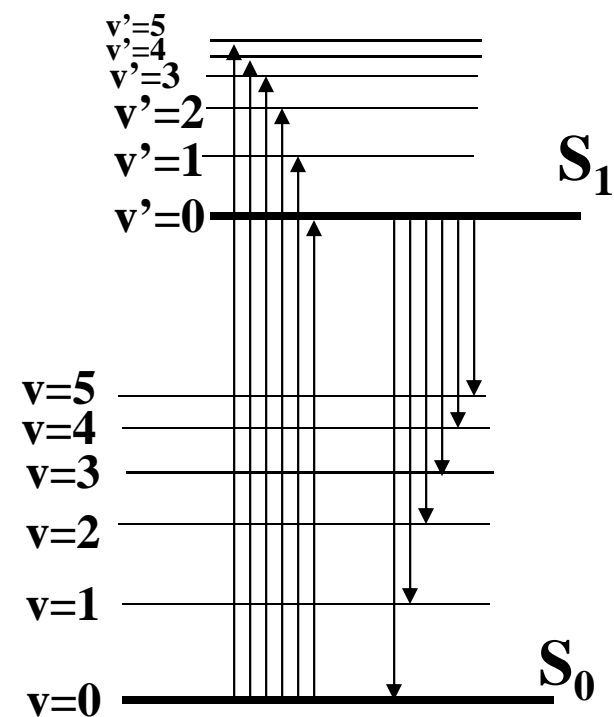
- Pri višjih vzbujenih stanjih so energijski nivoji bolj skupaj
- Verjetnost prekrivanja energijskih nivojev vibracijskih stanj je relativno pri vzbujenih molekulah z višjo energijo, npr. S_{n-1} in S_n
- Tako prekrivanje omogoča prehode med temi vibracijskimi stanji
- **Interna konverzija** je prehod med energijskimi stanji iste multiplicitete in je zelo hitra 10^{-12} s in je mnogo hitrejši proces kot fluorescenca
- Energijska razlika med S_1 in S_0 je mnogo večja, zato je življenska doba v S_1 daljša. V tem primeru radiacijska emisija lahko tekmuje z ne-radiacijsko relaksacijo



Osnove fluorescence

Pravilo ogledala

- Vibracijski nivoji v vzbujenem in osnovnem stanju so podobni
- Absorpcijski spekter predstavlja prehode iz osnovnega stanja v različna vibracijska stanja elektronsko vzbujenega stanja
- Emisijski spekter predstavlja prehode iz najnižjega vibracijskega stanja v elektronskem vzbujenem stanju na različna vibracijska stanja osnovnega stanja
- Spektra sta navidez zrcalni sliki



Electronic Absorption and Emission Bands

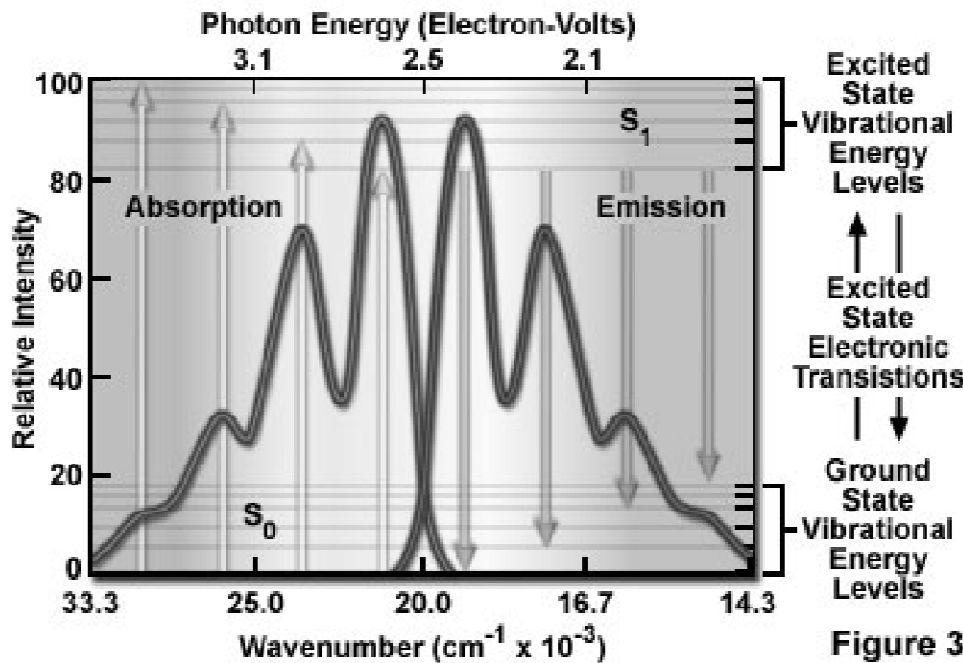
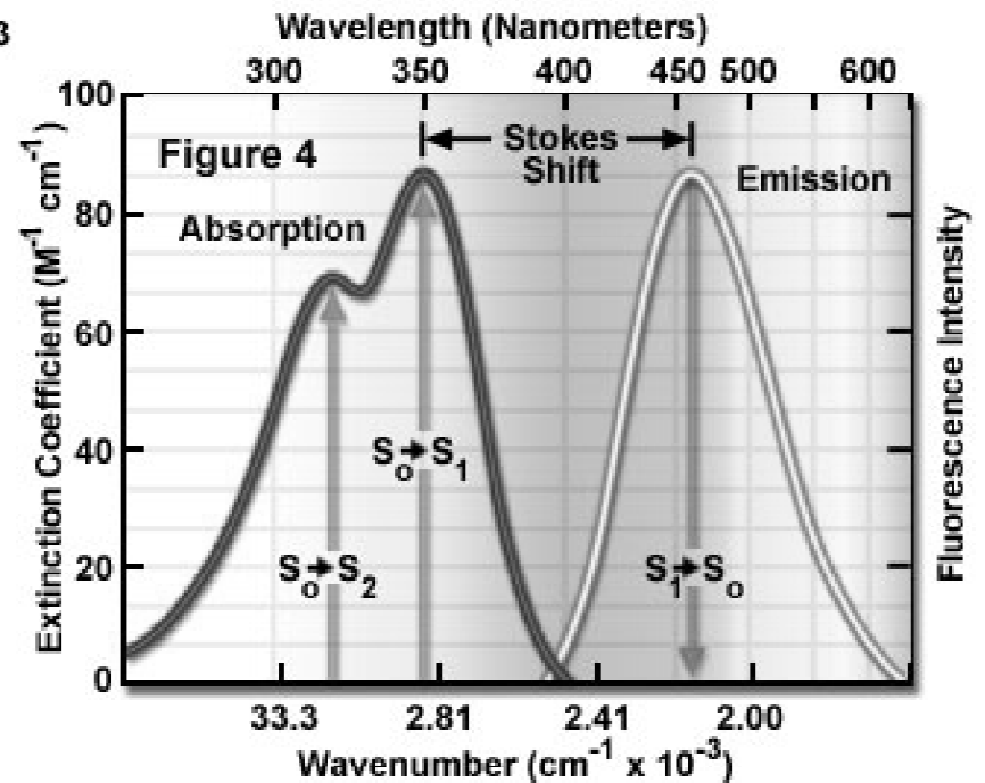


Figure 3

Odstopanje od pravila natopi pri prehodih $S_0 \rightarrow S_2$ ali v celo višja vzbujena stanja

Pravilo zrcala velja, če pride do vzbujanja le med $S_0 \rightarrow S_1$

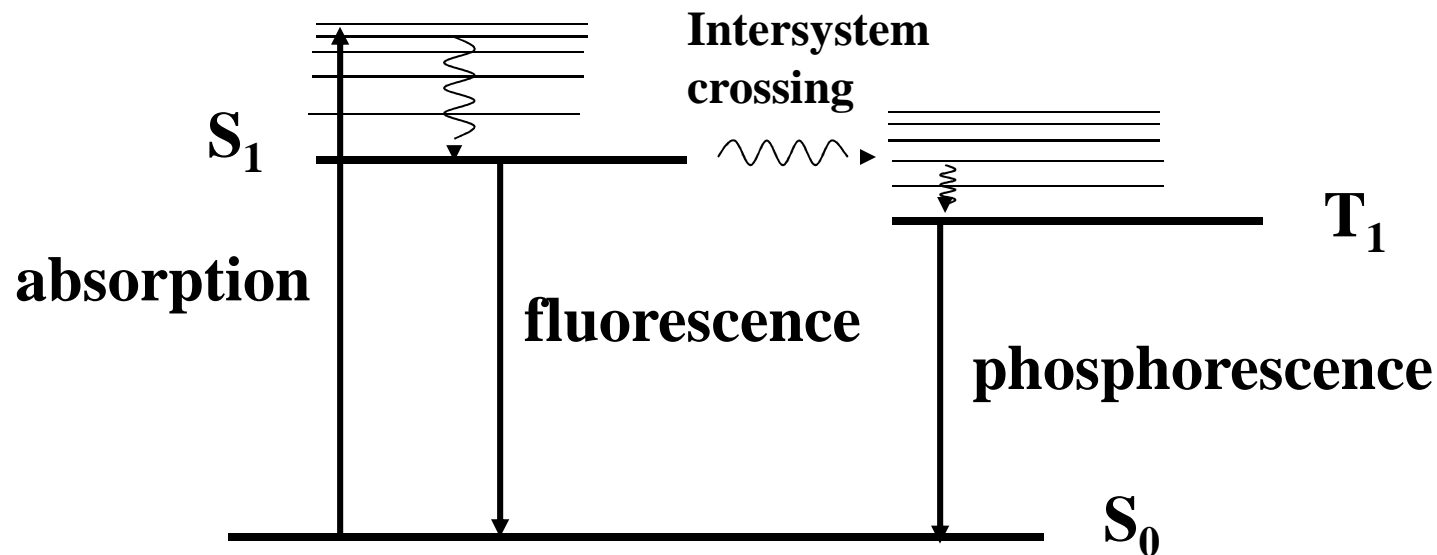
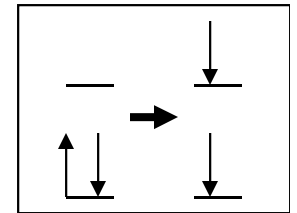
Quinine Absorption and Emission Spectra



Procesi pri fosforescenci

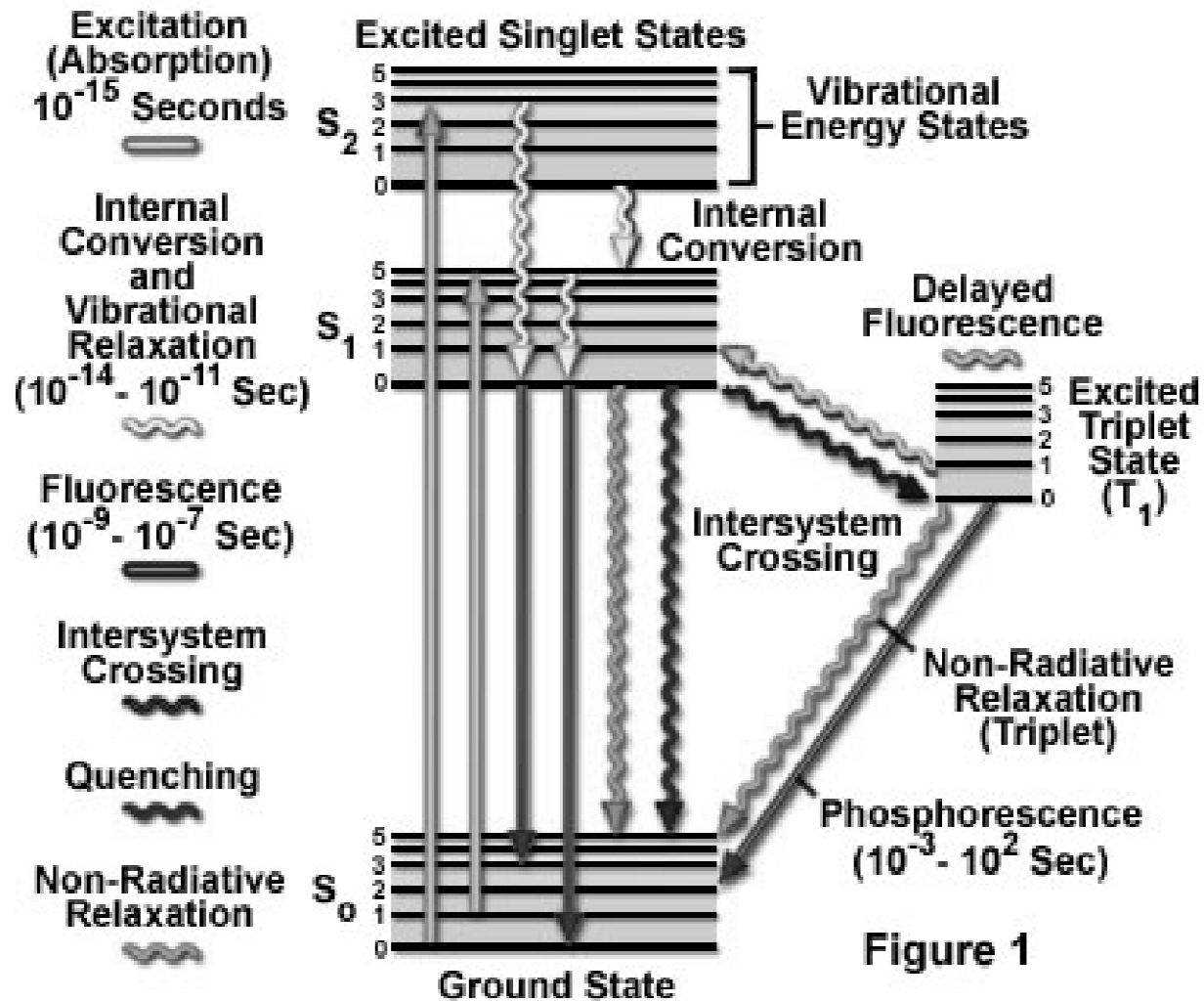
Intersystem crossing

- “Intersystem crossing” je ne-radiativen prehod med stanji različne multiplicitete
- Nastane z inverzijo spina vzbujenega elektrona, pri čemer dobimo dva nesparjena elektrona z isto orientacijo spina (tripletno stanje)
- Taki prehodi so sicer prepovedani
- Do prehodov pride ob prisotnosti težjih atomov (I, Br,..)
- $T_1 \rightarrow S_0$ prehod je prav tako prepovedan, zato je življenska doba T_1 mnogo daljša kot S_1 (10^{-3} - 10^2 s)



Osnove fluorescence

Jablonski Energy Diagram



Kvantni izkoristek in življenska doba

Kvantni izkoristek pri fluorescenci

- Kvantni izkoristek, Φ_f , je definiran:
- V praksi ga določimo s primerjalno meritvijo proti spojini z znanim kvantnim izkoristkom.
- Idealna referenčna spojina mora imeti:
 - enako absorbanco pri izbrani valovni dolžini
 - podobne vzbujevalne-emisijske lastnosti
 - Uporabljeno mora biti isto topilo
 - Približno enako fluorescenco, da uporabljam instrument v linearnem delu

Kvantni izkoristek in življenska doba

Življenska doba

- Druga definicija Φ_f je

kjer je k_r hitrost fluorescenčnega procesa in Σk je vsota vseh deeksitacijskih procesov.

- Če ni drugih procesov je $\Phi_f=1$
- Življenska doba pa je, τ_r ,

Intenziteta fluorescenčne svetlobe

Intenziteta fluorescence (F) pri določeni vzbujevalni (λ_x) in emisijski svetlobi wavelength (λ_m) bo odvisna od absorpcije in kvantnega izkoristka

where,
$$\mathbf{F}(\lambda_x, \lambda_m) = \mathbf{I}_A(\lambda_x)\phi(\lambda_m)$$

I_A – absorbirana svetloba

ϕ – kvantni izkoristek

Intenziteta fluorescenčne svetlobe

Iz Beer-Lambertovega zakona sledi za razredčene raztopine

$$I_A(\lambda_x) = 2.303I_0\varepsilon(\lambda_x)CL$$

$$\text{for } \varepsilon(\lambda_x)CL \ll 1$$

I_0 – vpadna intenziteta svetlobe

ε – molarni ekstinkcijski koeficient

C – koncentracija

L – dolžina optične poti

Intenziteta fluorescenčne svetlobe

Dobimo končno enačbo:

$$F(\lambda_x, \lambda_m) = I_0 2.303 \varepsilon(\lambda_x) CL \phi(\lambda_m)$$

I_0 – vpadna intenziteta svetlobe

ε – molarni ekstinkcijski koeficient

C – koncentracija

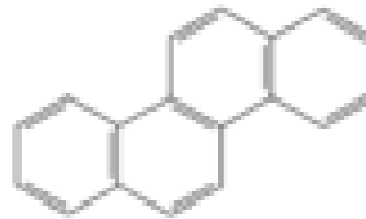
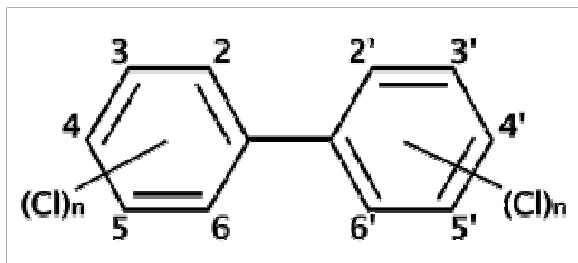
L – dolžina optične poti

ϕ – Kvantni izkoristek

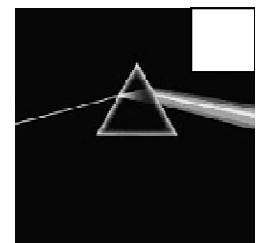
Kaj vpliva na fluorescenco?

Structura:

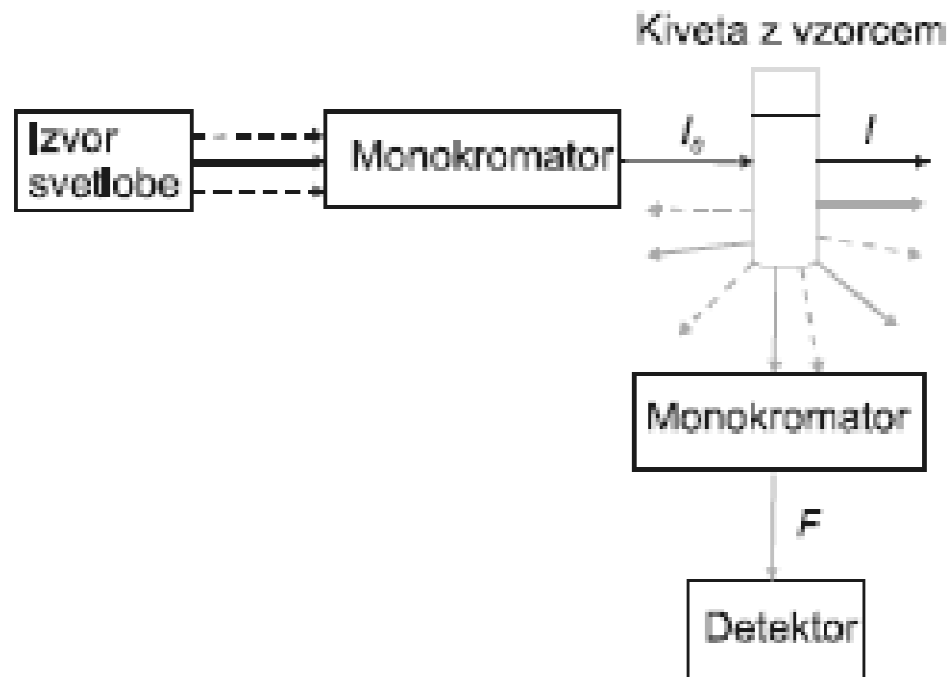
- 1.) Aromatske spojine
- 2.) Rigidne strukture imajo večjo fluorescenco



- 3.) Težki atomi zmanjšajo fluorescenco
- 4.) Fluorescenca se poveča, če so molekule vezane na površino



Instrumentacija



Fluorescenčna tehnika

- Fluorescenca je zelo občutljiva tehnika (meja detekcije je okoli 10^{-8} M)
- Interference:
 - Fluorescenca topila
 - Svetloba v instrumentu
 - Sipanje svetlobe v raztopini na trdnih delcih
- Neidealni spektri:
 - Neidealni vir svetlobe
 - Občutljivost odvisna od valovne dolžine