

Luminiscence



Luminiscence

□ emise světla látkou, která je způsobená:

- světlem (**fotoluminiscence**) → fluorescence, fosforescence
- chemicky (**chemiluminiscence**) → bioluminiscence
- teplem (**termoluminiscence**) → termoluminisc. dozimetry
- zvukem (**sonoluminiscence**)
- mechanicky (**mechanoluminiscence**)
 - triboluminiscence (třením)
 - fraktoluminiscence (lámáním)
 - piezoluminiscence (tlakem → elast. deformace))

Fluorescence

- sekundární záření po absorpci elektromagnetického záření
(od fosforescence se liší dobou, po kterou trvá sekundární záření, když přestalo působit záření primární) tzv. **dosvit**
 - **fluorescence** 10^{-8} až 10^{-5} s
 - **fosforescence** 10^{-2} s až několik dní
- Anorganické sloučeniny - fluorescence poměrně zřídka (např. u *solí vzácných zemin, uranylu, thallia*).
- Organické látky - fluorescence častěji, nejintenzivnější a analyticky nejvíce využitelná u sloučenin s *aromatickými cykly*.

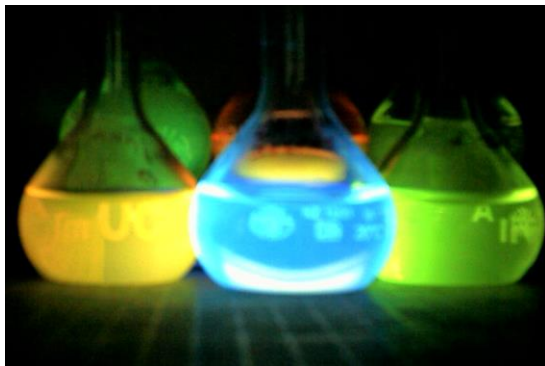
Fluorescence ze života



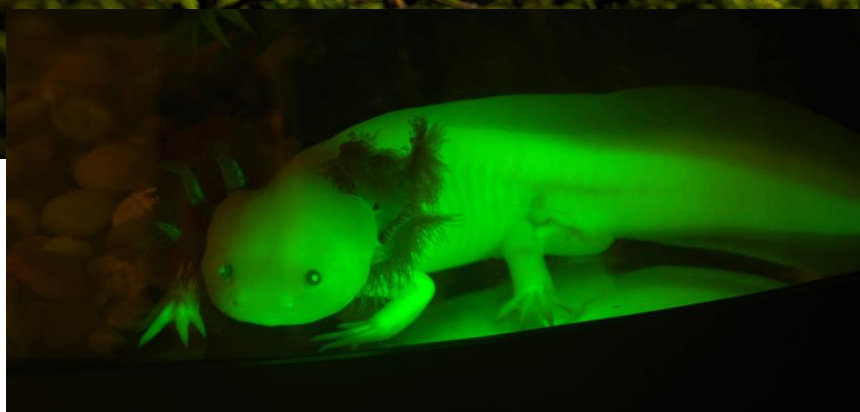
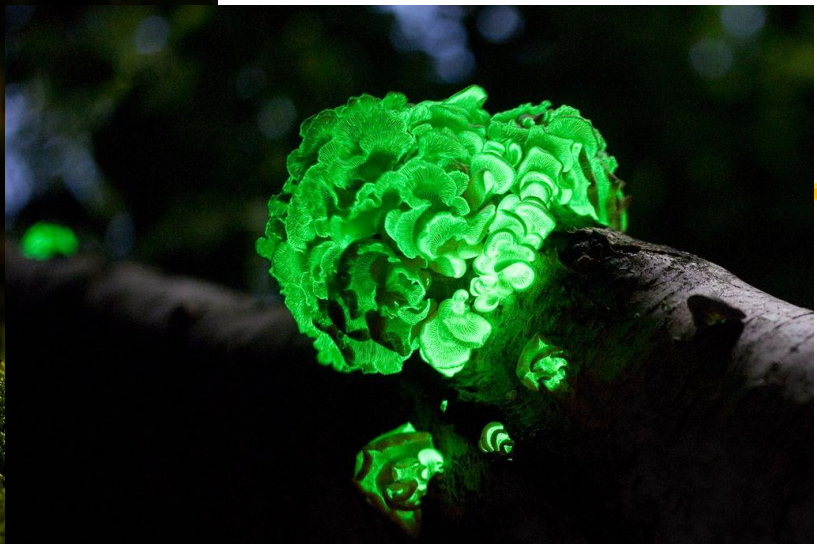
tonik – obsahuje chinin



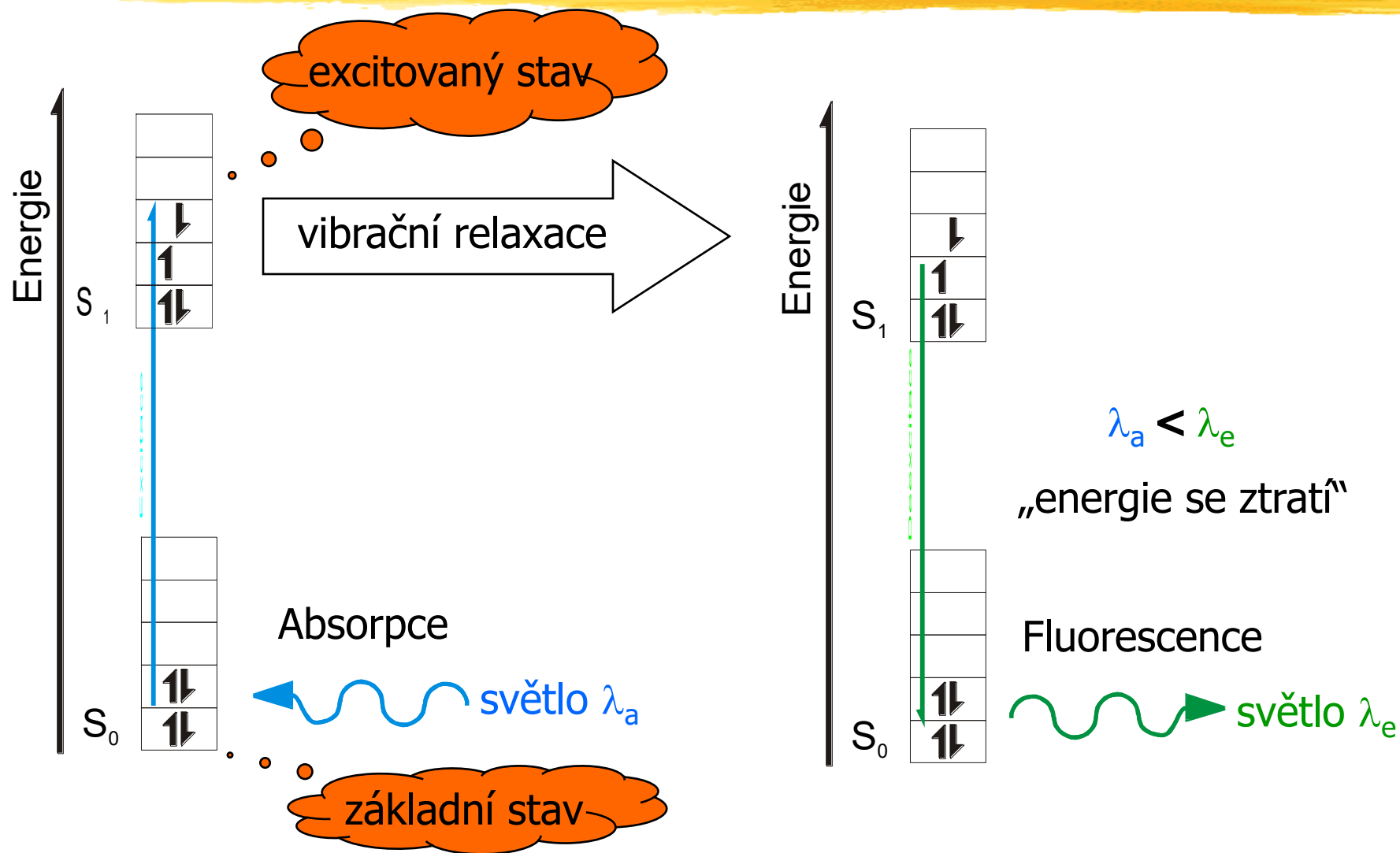
bankovky – ochranné fluorescenční prvky



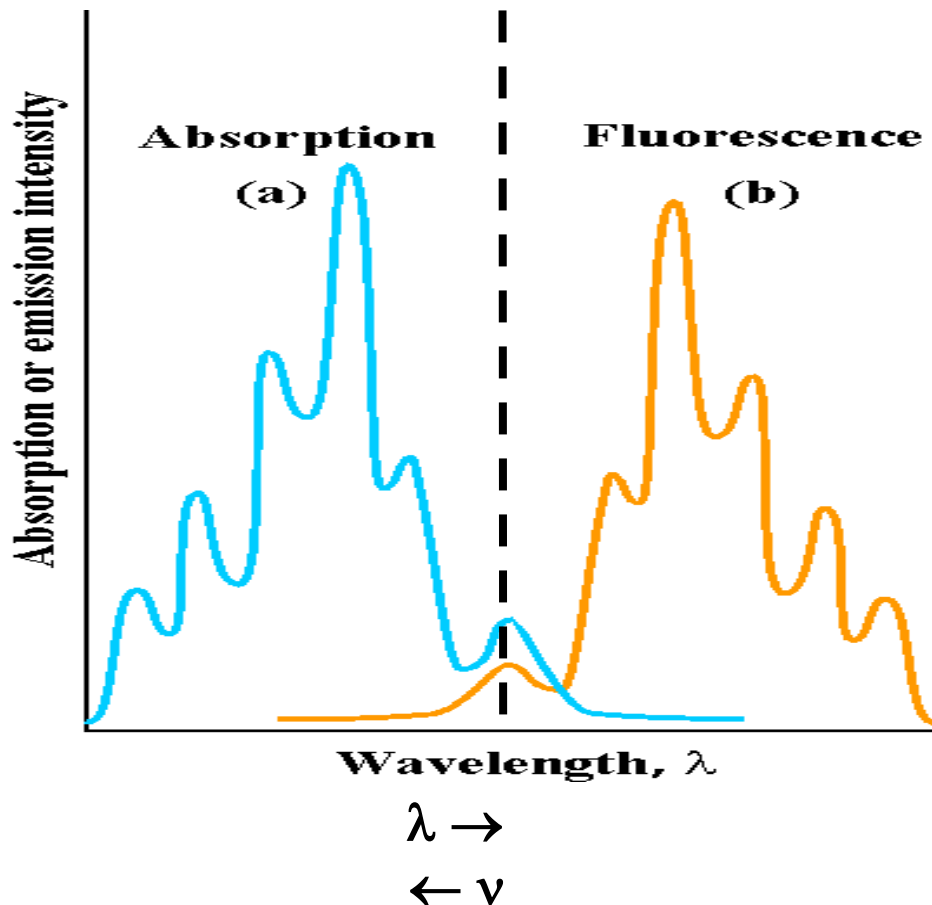
fluorescenční barviva, uprostřed roztok chininsulfátu



Fluorescence

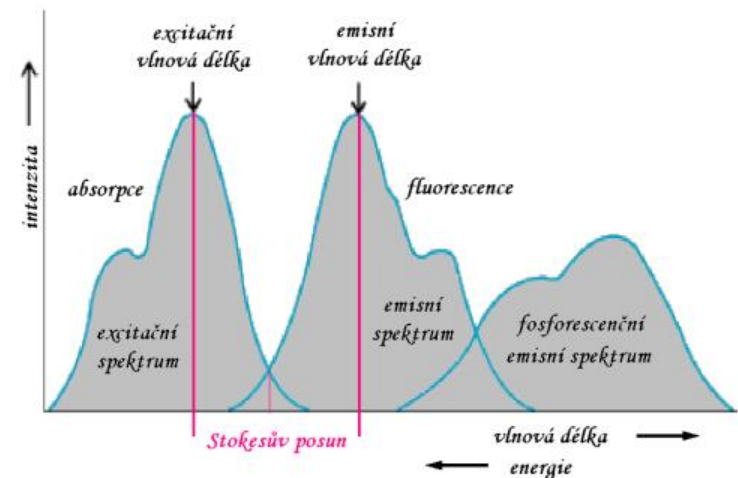


Fluorescenční spektrum

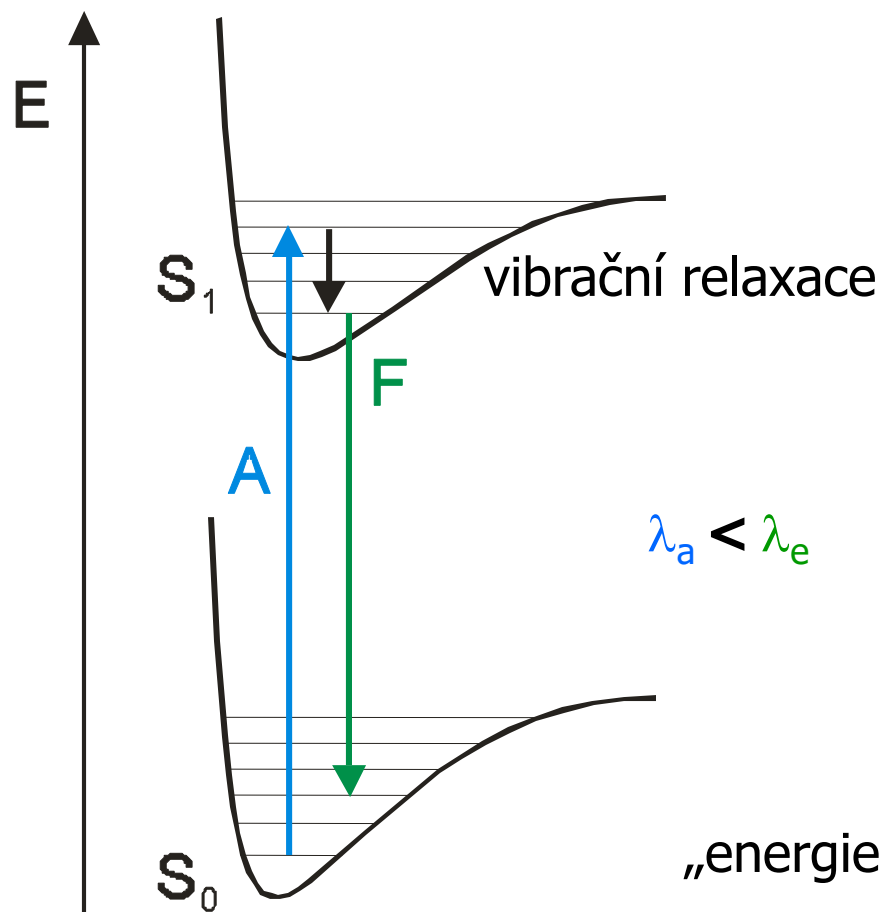


fluorescenční spektrum

- posunuto k delším vlnovým délkám než původní absorpční spektrum (**Stokesův posun**)
- k němu zrcadlově symetrické



Kam se ztrácí energie?



absorpce – rychlá 10^{-15} s
geometrie se nemění –
vertikální přechod

Frank-Condonův princip

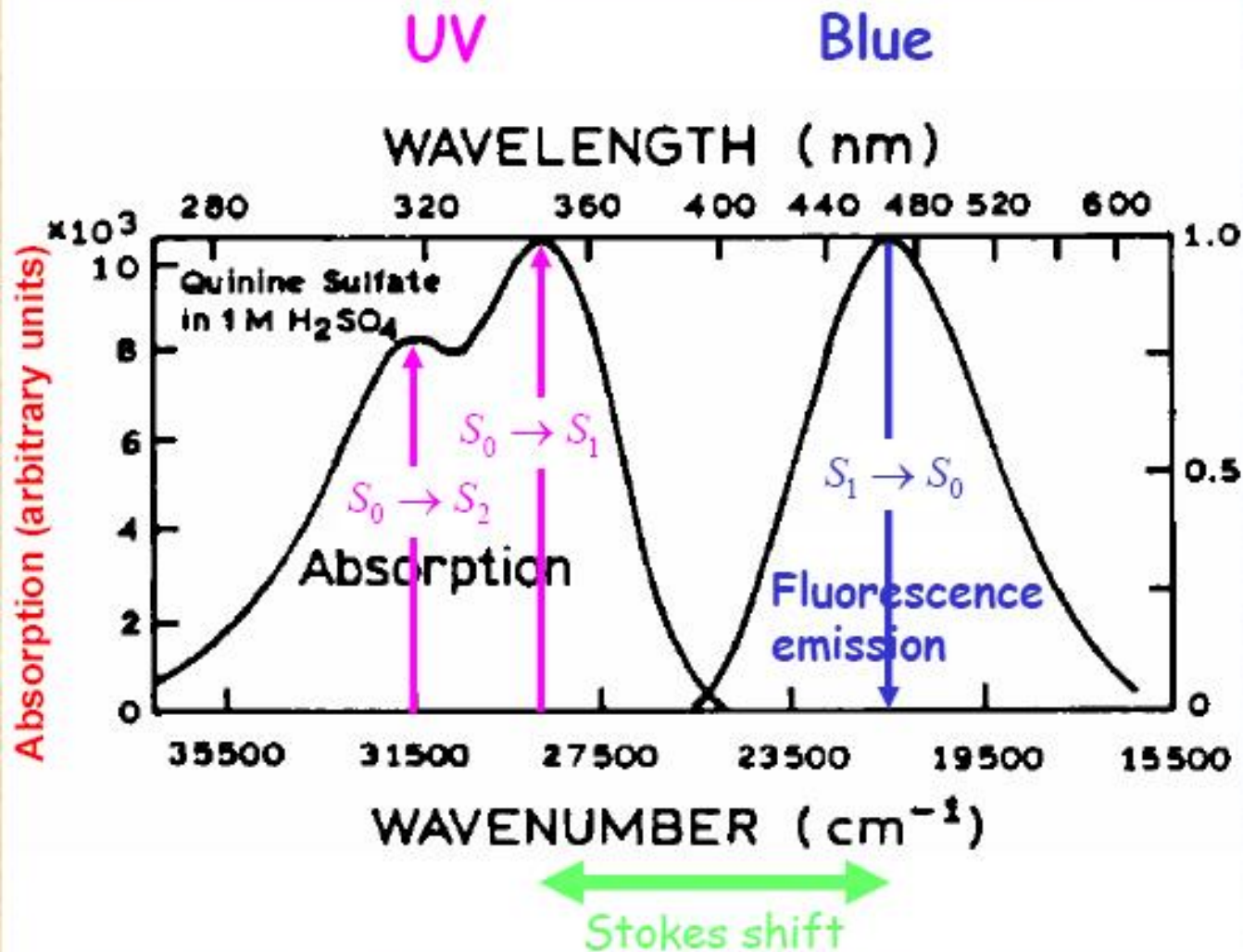
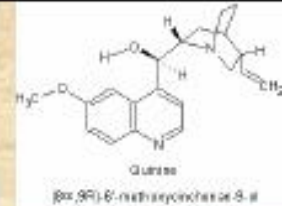
vibrační (nezářivá) deaktivace
– nadbytek E se uvolní ve
formě tepla

emise – nadbytek E se uvolní
jako foton (*zářivá deaktivace*)

„energie se ztrácí do vibračních pohybů“

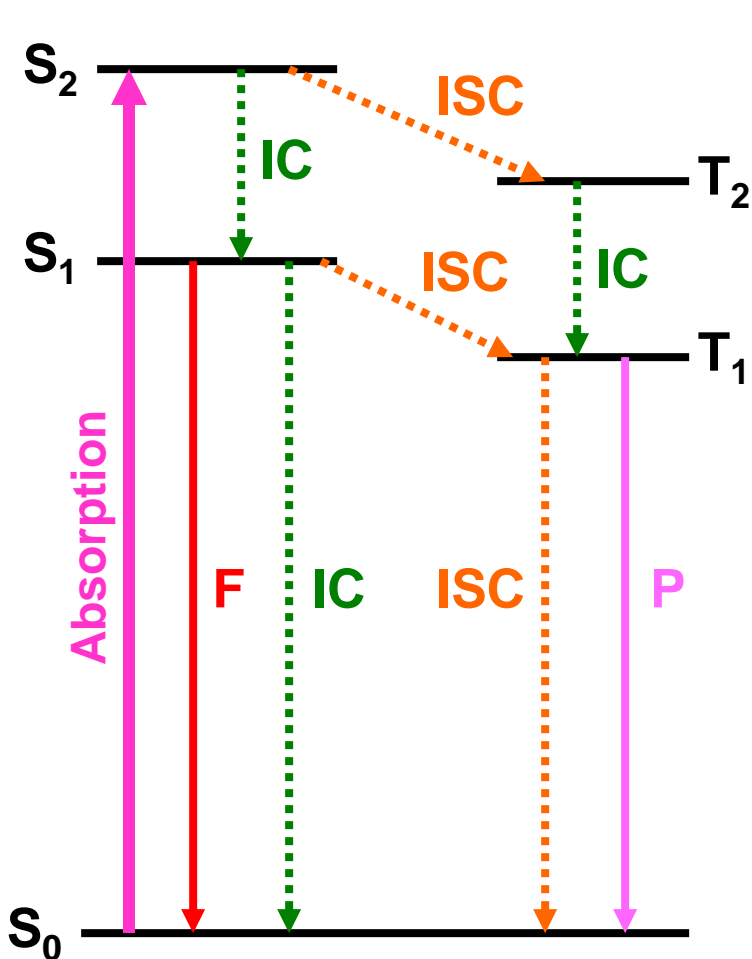
POZOR: u atomů platí $\lambda_a = \lambda_e$

Absorption spectrum of quinine



Note that the spectra are broad, because of **solvent broadening**

Monomolekulární procesy vyhasínání



Nezářivé pochody

IC Internal Conversion
(vnitřní konverze)

$S \rightarrow S$ or $T \rightarrow T$ – nemění se spin

ISC Inter-System Crossing
(mezi-systémové křížení)

$S \rightarrow T$ or $T \rightarrow S$ – mění se spin

Zářivé pochody

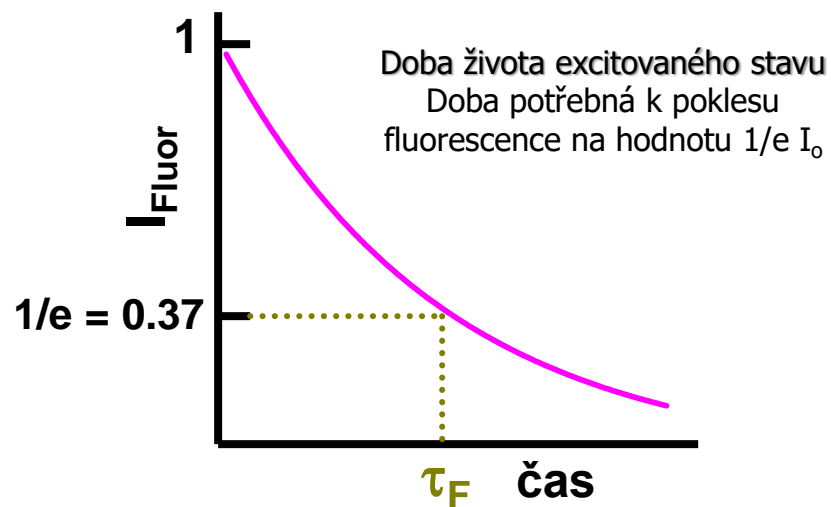
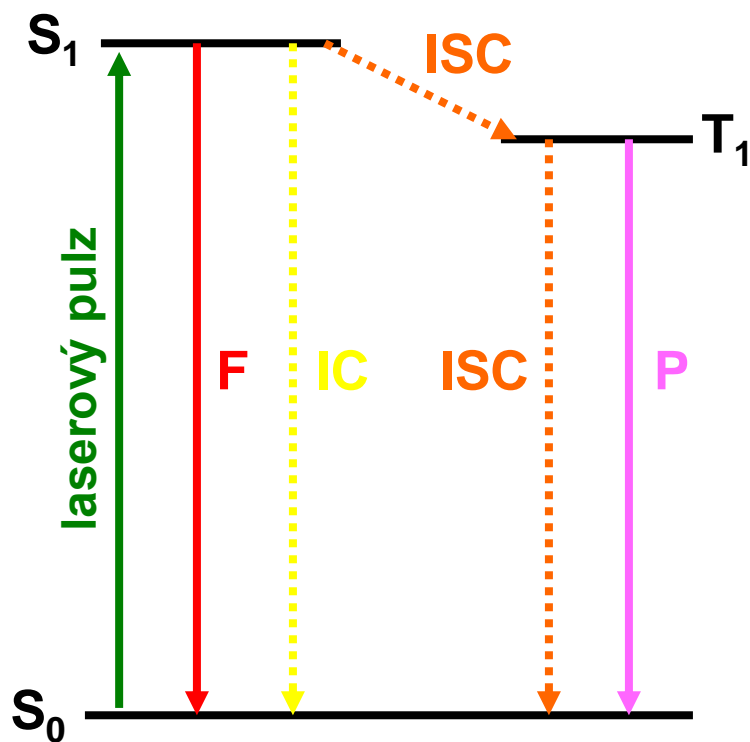
F Fluorescence

$S_1 \rightarrow S_0$ emise fotonu

P Fosforescence

$T_1 \rightarrow S_0$ emise fotonu

Doby života - lifetimes



τ_F = doba života fluorescence

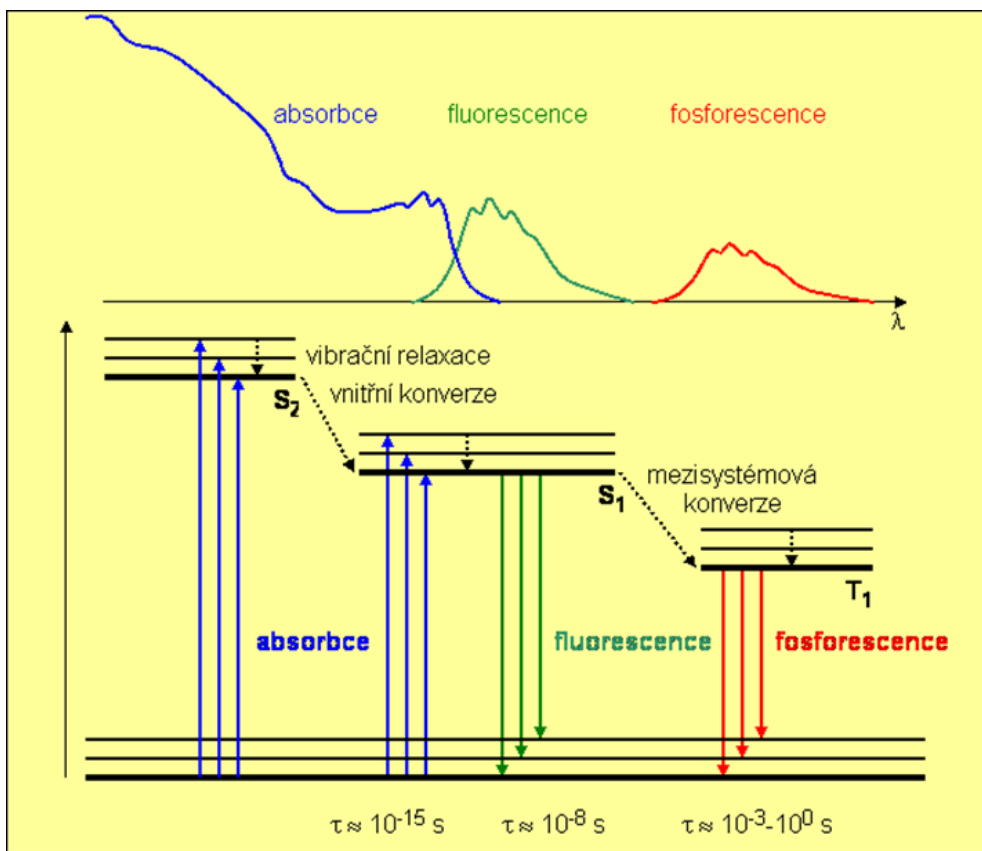
$\tau_F = 1 - 100 \text{ ns}$

τ_P = doba života fosforescence

$\tau_P = 1 \text{ ms} - \text{dny}$

$\tau_P \gg \tau_F$ protože přechody Triplet-Singlet jsou spinově zakázány

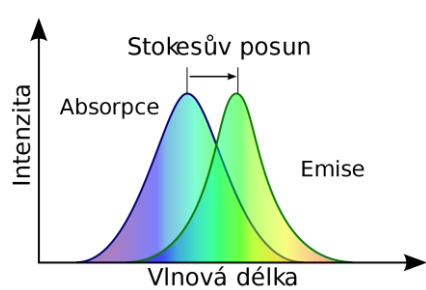
Doba trvání jednotlivých procesů



Absorpce	10^{-15} s
Fluorescence	10^{-8} s
Fosforescence	$\gg 10^{-8}$ s (ms – s)
Vibrační relaxace	10^{-12} - 10^{-13} s
Vnitřní konverze	10^{-6} - 10^{-12} s
Mezisytemová konverze	10^{-4} - 10^{-12} s

Vibrační relaxace – molekula ve vyšším vibr. stavu snižuje svou E přechodem na nejnižší vibrační podhladinu excit. (i zákl.) stavu

Vnitřní konverze – molekula na nejnižší vibr. podhladině exc. stavu přechází do vibr. podhladiny nejnižšího energ. stavu



Vlastnosti fluorescence

1. Aby látka **emitovala** fluorescenční světlo, **musí** světlo **absorbovat**
2. Vlnová délka fluorescenčního světla $>$ vlnová délka excitačního světla
 (Stokesův zákon) $\lambda_{\text{emit}} > \lambda_{\text{excit}}$
 Delší $\lambda \approx$ menší $E \Rightarrow E_{\text{fluorescence}} < E_{\text{absorbované světlo}}$
3. Intenzita fluorescence \ll intenzita excitačního světla
4. Fluorescenční světlo je **emitováno všemi směry** nezávisle na směru excitačního světla
5. Fluorescence **postupně mizí**
6. Intenzita fluorescence je úměrná intenzitě excitačního světla I_0 , hustotě vzorku C a **efektivnosti fluorescence** (kvantový výtěžek κ)
7. **Každá látka má své charakteristické fluorescenční spektrum**
8. **Absorpční a fluorescenční spektra tvoří zrcadlové obrazy**
9. **Fluorescenční světlo má různý stupeň polarizace**

Kvantový výtěžek

- kvantový výtěžek fluorescence

$$\phi = \frac{N_{emit}}{N_{absorb}}$$

- kvantové výtěžky fluorescence jsou výrazně nižší než 1

Kvantový výtěžek - standardy

Tab. 6.1. Standards for the determination of fluorescence quantum yields

Range	Compound	Temp. (°C)	Solvent	Φ_F	Ref.
270–300 nm	Benzene	20	Cyclohexane	0.05 ± 0.02	1
300–380 nm	Tryptophan	25	H ₂ O (pH 7.2)	0.14 ± 0.02	2
300–400 nm	Naphthalene	20	Cyclohexane	0.23 ± 0.02	3
315–480 nm	2-Aminopyridine	20	0.1 mol L ⁻¹ H ₂ SO ₄	0.60 ± 0.05	4
360–480 nm	Anthracene	20	Ethanol	0.27 ± 0.03	1, 5
400–500 nm	9,10-diphenylanthracene	20	Cyclohexane	0.90 ± 0.02	6, 7
400–600 nm	Quinine sulfate dihydrate	20	0.5 mol L ⁻¹ H ₂ SO ₄	0.546	5, 7
600–650 nm	Rhodamine 101	20	Ethanol	1.0 ± 0.02	8
				0.92 ± 0.02	9
600–650 nm	Cresyl violet	20	Methanol	0.54 ± 0.03	10

- 1) Dawson W. R. and Windsor M. W. (1968) *J. Phys. Chem.* 72, 3251.
- 2) Kirby E. P. and Steiner R. F. (1970) *J. Phys. Chem.* 74, 4480.
- 3) Berlman I. B. (1965) *Handbook of Fluorescence Spectra of Aromatic Molecules*, Academic Press, London.
- 4) Rusakowicz R. and Testa A. C. (1968) *J. Phys. Chem.* 72, 2680.
- 5) Melhuish W. H. (1961) *J. Phys. Chem.* 65, 229.
- 6) Harnai S. and Hirayama F. (1983) *J. Phys. Chem.* 87, 83.
- 7) Meech S. R. and Phillips D. (1983) *J. Photochem.* 23, 193.
- 8) Karstens T. and Kobs K. (1980) *J. Phys. Chem.* 84, 1871.
- 9) Arden-Jacob J., Marx N. J. and Drexhage K. H. (1997) *J. Fluorescence* 7(Suppl.), 91S.
- 10) Magde D., Brannon J. H., Cramers T. L. and Olmsted J. III (1979) *J. Phys. Chem.* 83, 696.

Doba života

- nezbytná charakteristika látky a její interakce s okolím
- doba života excitovaného stavu = doba potřebná k poklesu fluorescence na hodnotu $1/e I_0$
- obtížně měřitelná (10 ns)
- měří se metodou
 - pulzní
 - harmonickou (fázová modulace)

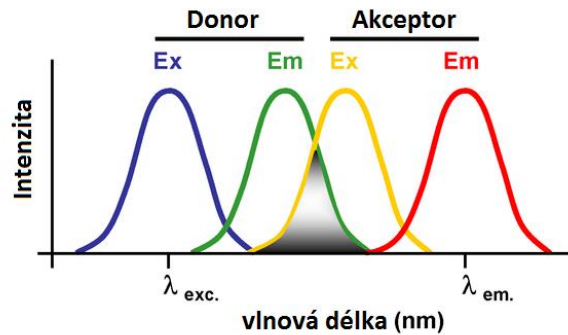
Zhášecí procesy

- ❑ kolizní procesy
 - ❑ kolizí s jinou látkou, která zajistí nezářivou deexcitaci (O_2 , I^- , akrylamid)
- ❑ statické zhášení
 - ❑ tvorba komplexu v základním stavu, který nefluoreskuje (jednotlivé složky ale samotné fluoreskují)
- ❑ přenos energie
 - ❑ FRET – fluorescenční (Försterův) rezonanční přenos energie
- ❑ reakce přenosu náboje
- ❑ fotochemické reakce
 - ❑ po excitaci dochází k chemické reakci molekuly

Využití



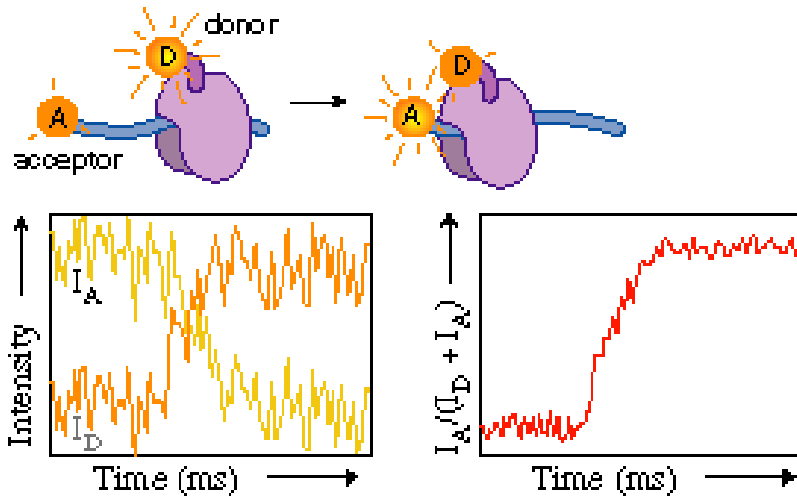
- ❑ **kvalitativní analýza** - podle zbarvení, resp. tvaru fluorescenčního spektra můžeme usuzovat na přítomnost dokazované látky
- ❑ **kvantitativní analýza** - podle intenzity záření na její množství
- ❑ fluorescenční detektory se používají i při některých separačních metodách
- ❑ časté využití v biovědách



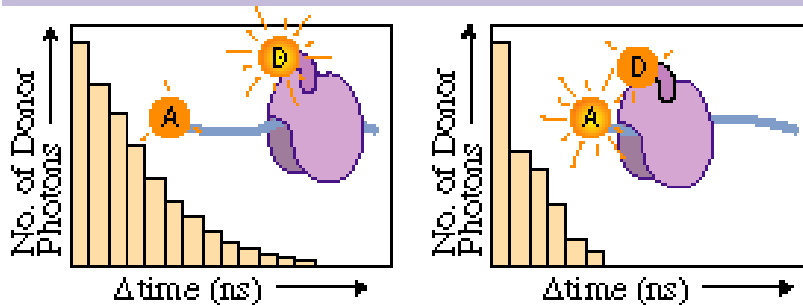
FRET

SINGLE MOLECULE FRET

Two color correlated measurements

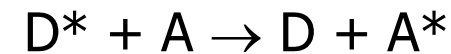


Single molecule time-correlated single photon counting



Fluorescenční (Försterův)
rezonanční přenos (excitační)
energie

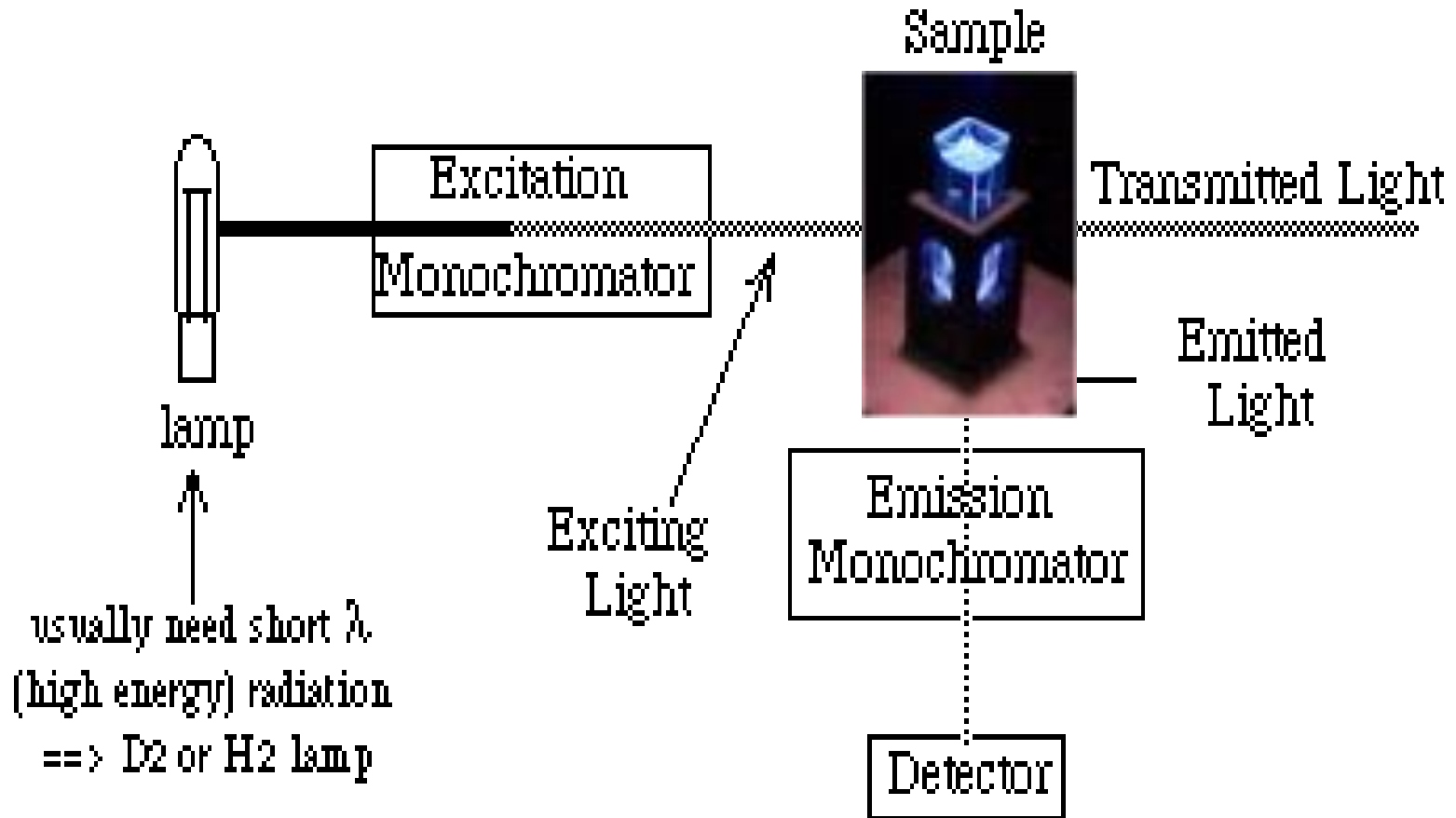
FRET=Förster (Fluorescence)
resonance energy transfer



Excitovaný **donor** (D^*) předává
ex. energii **akceptoru** (A), který
následně **fluoreskuje**

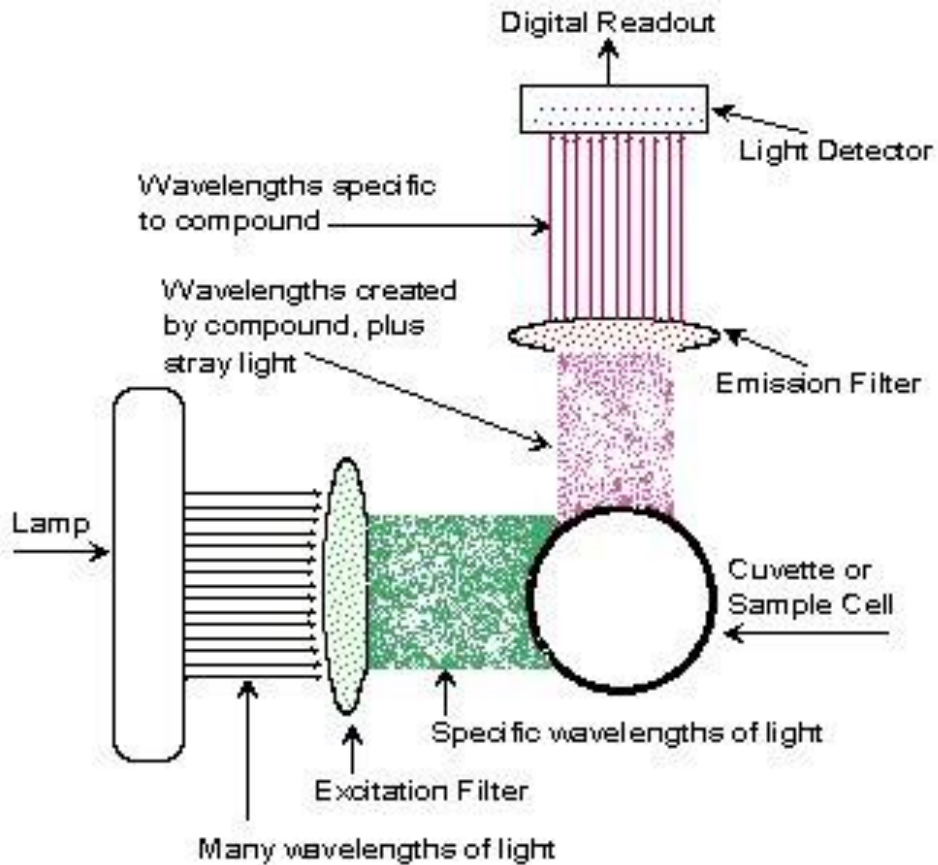
Účinnost FRET závisí na
překryvu em. spektra donoru a
ab. spektra akceptoru a na
vzdálenosti

Fluorescenční spektroskop



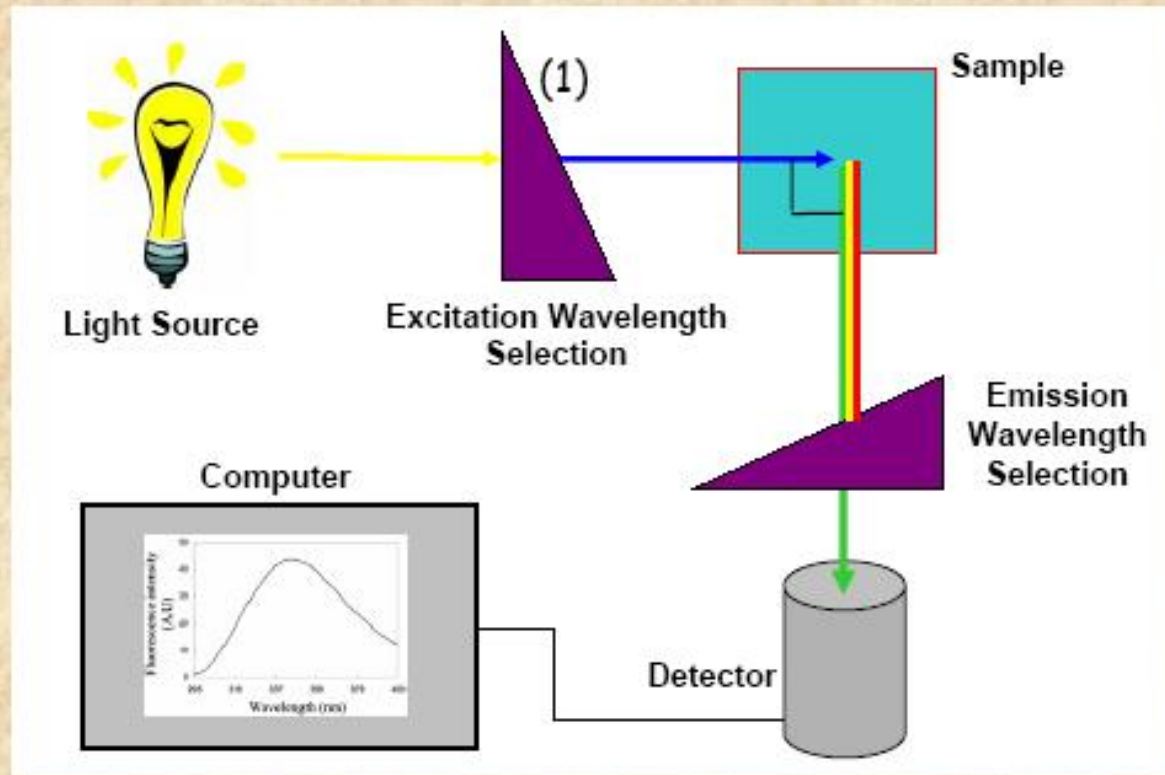
měří se v kolmém směru k excitačnímu záření

Fluorometr (fluorimetr)



Fluorescence Emission Spectrum

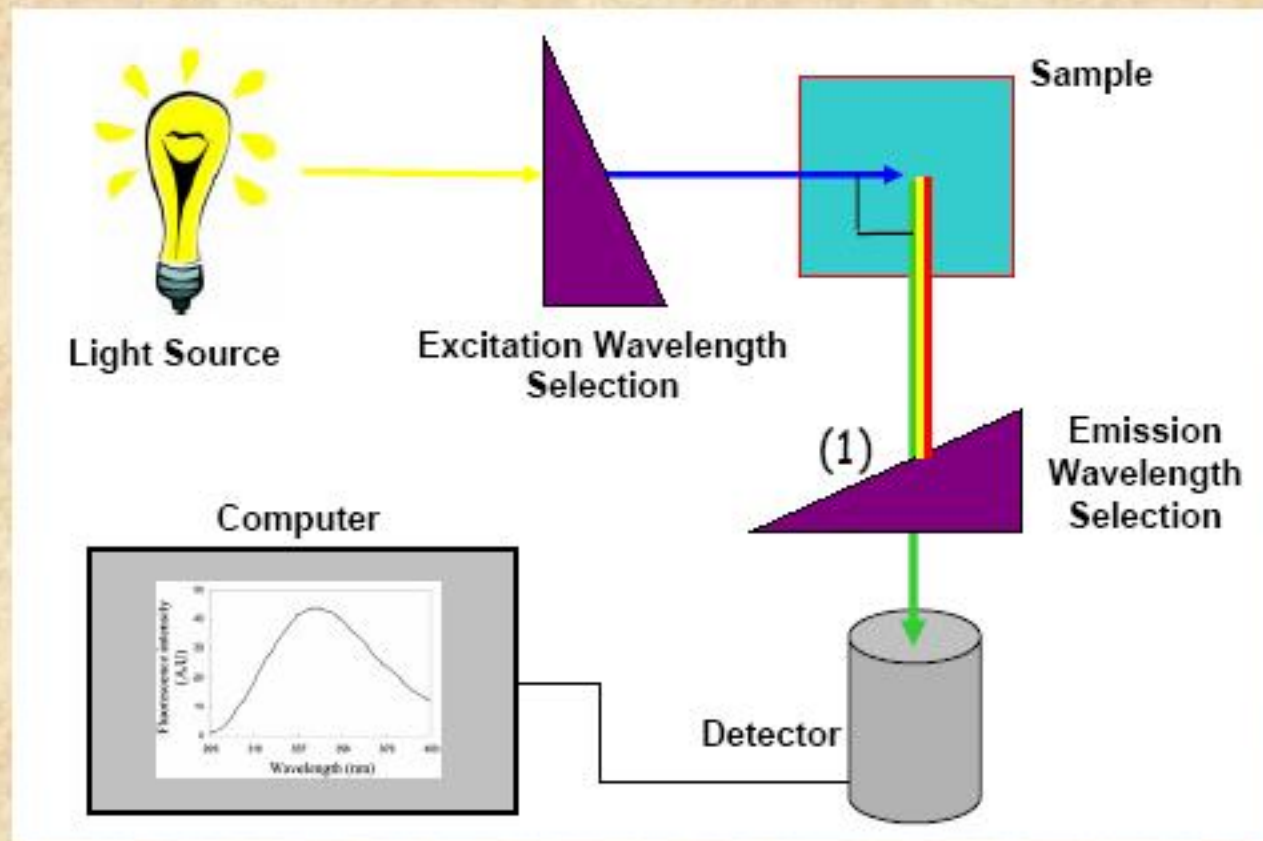
Measure the fluorescence emission spectrum for a fixed excitation wavelength



- (1) Select excitation wavelength
- (2) Illuminate sample with excitation light
- (3) The fluorescence emits in all directions
- (4) Collect fluorescence at 90° with respect to the exciting beam path
- (5) Select an emission wavelength and record the light intensity
- (6) Repeat (5) by scanning across a wide range of emission wavelengths

Fluorescence Excitation Spectrum

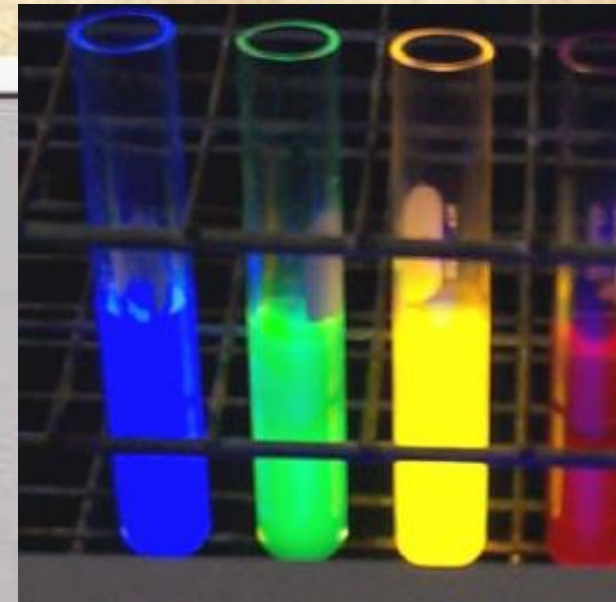
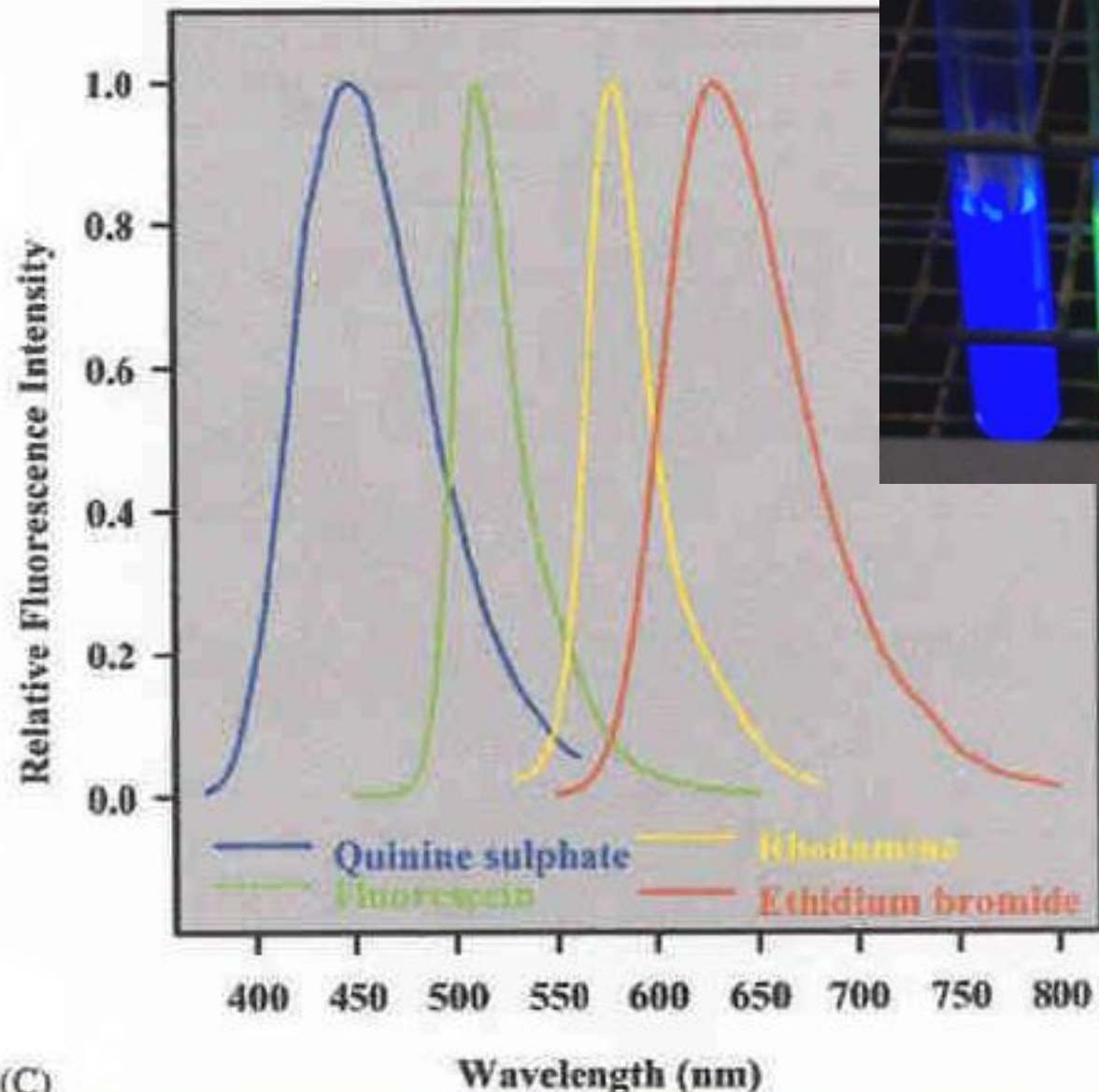
Measure the fluorescence emission at a fixed wavelength, while scanning the excitation wavelength.



- (1) select fixed emission wavelength
- (2) Select an excitation wavelength and measure the intensity at the detector
- (3) Repeat (2) by scanning across a wide range of excitation wavelengths

Examples of Fluorescence Emission Spectra

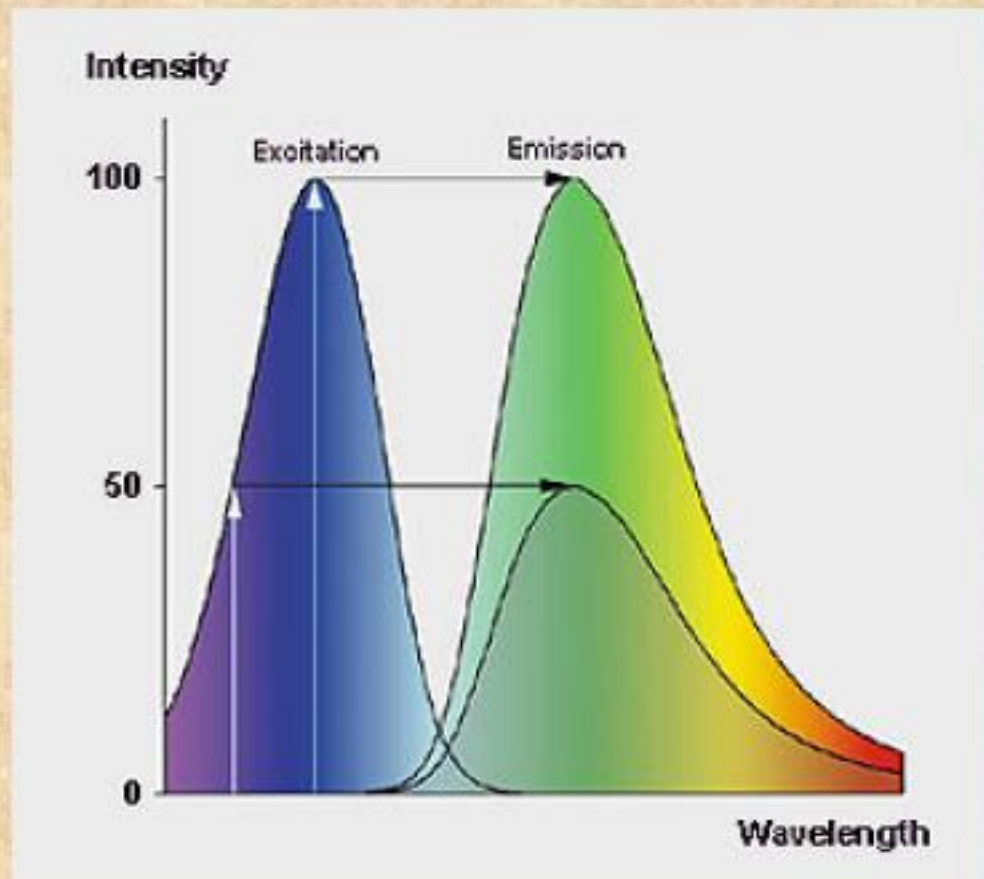
member: In a typical emission spectrum, the excitation wavelength is fixed and the fluorescence intensity versus wavelength is obtained



(C)

1) In a pure substance existing in solution in a unique form, the fluorescence spectrum is invariant, remaining the same independent of the excitation wavelength

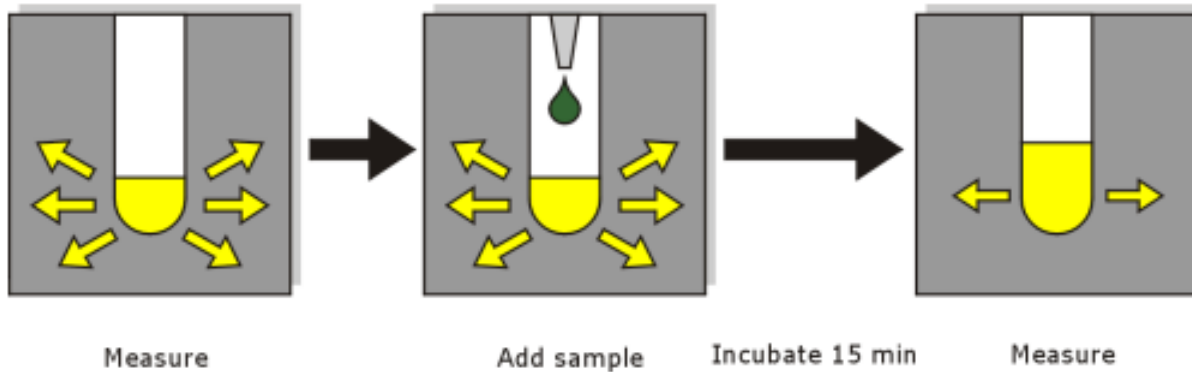
Schematic illustration



A fluorescence molecule is excited with two different wavelengths. The emission spectrum measured for both cases. Note that the shape of the emission spectra is identical, reflecting the emission from the same state (vibrational ground state of S_1). Note that the shape is the same, but the amplitude differs. The amplitude is determined by the intensity of radiation and the excitation efficiency, which is a function of the excitation wavelength.

Luminometr

- měří luminiscenci
 - např. chemiluminiscenci nebo její zhášení



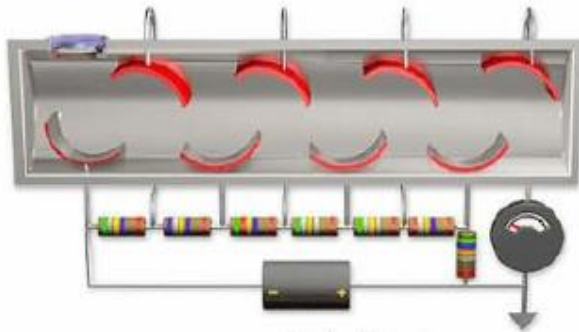
- často bývá kombinován s fluorometrem



např. Fluoroscanner ascent

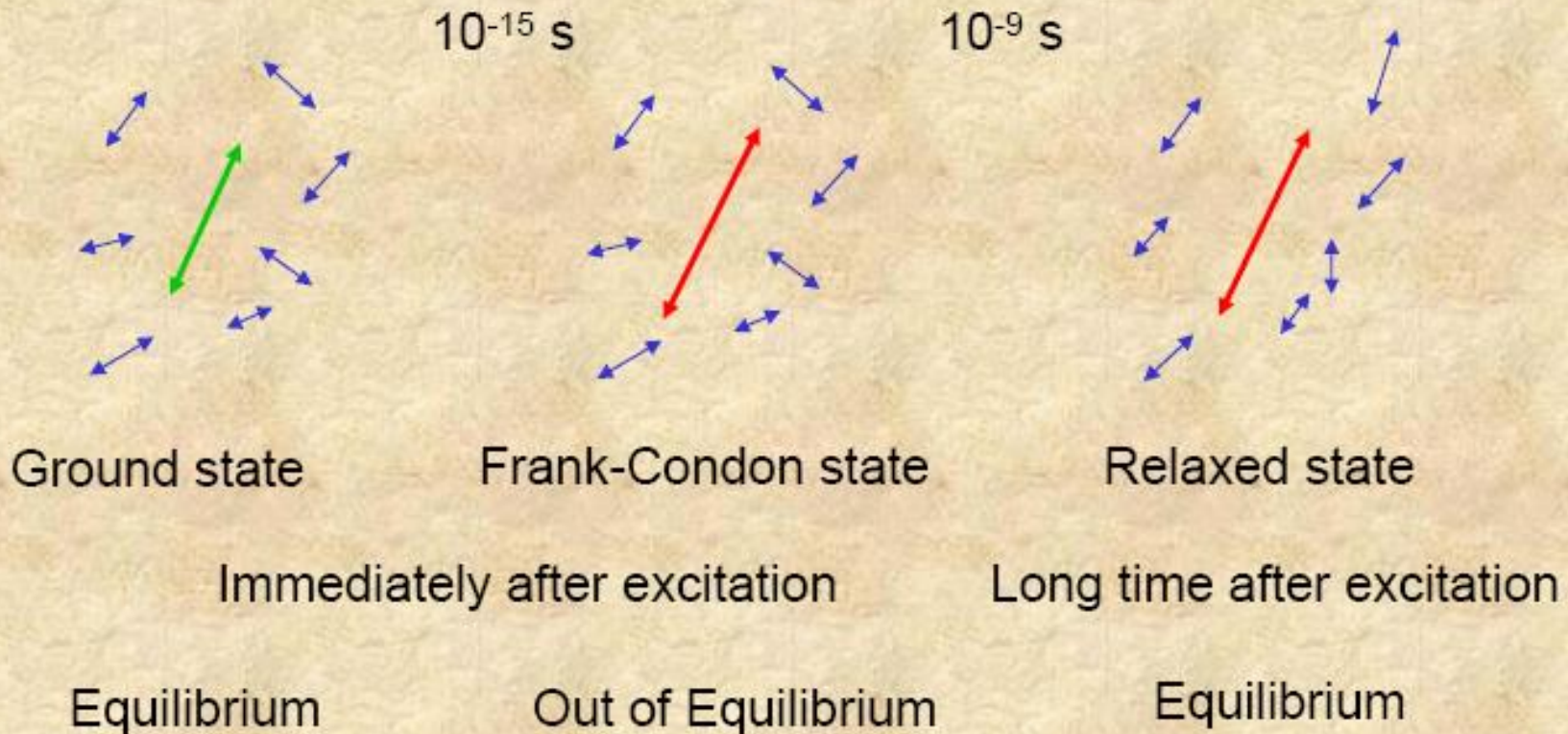
Detektory

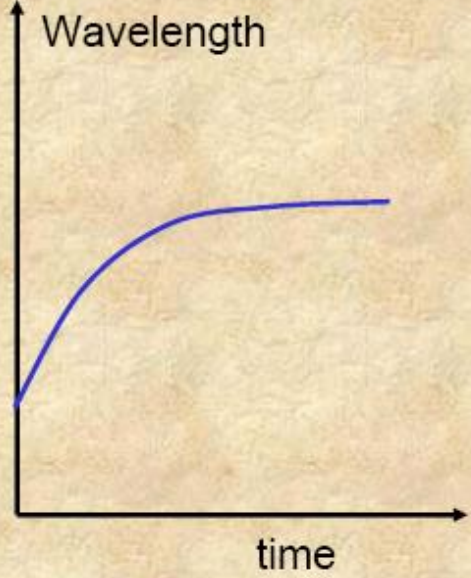
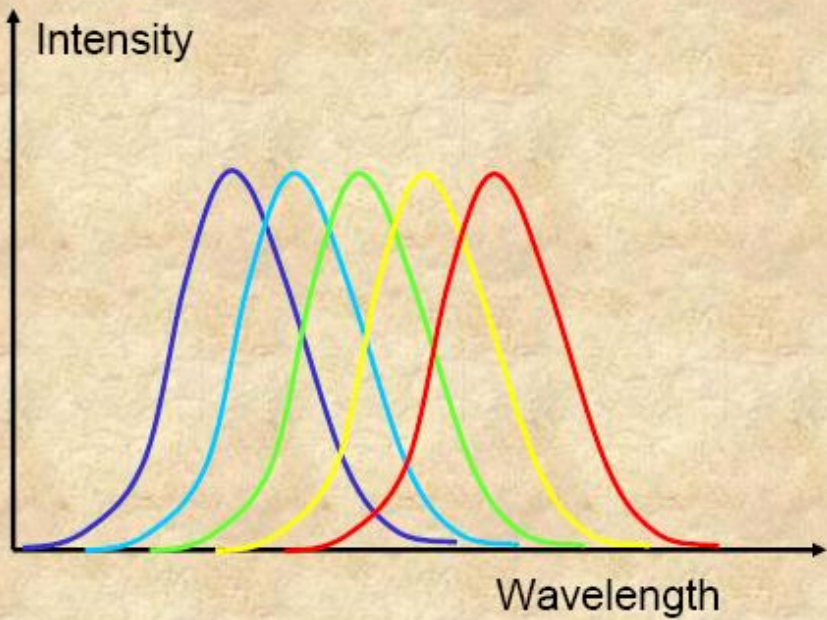
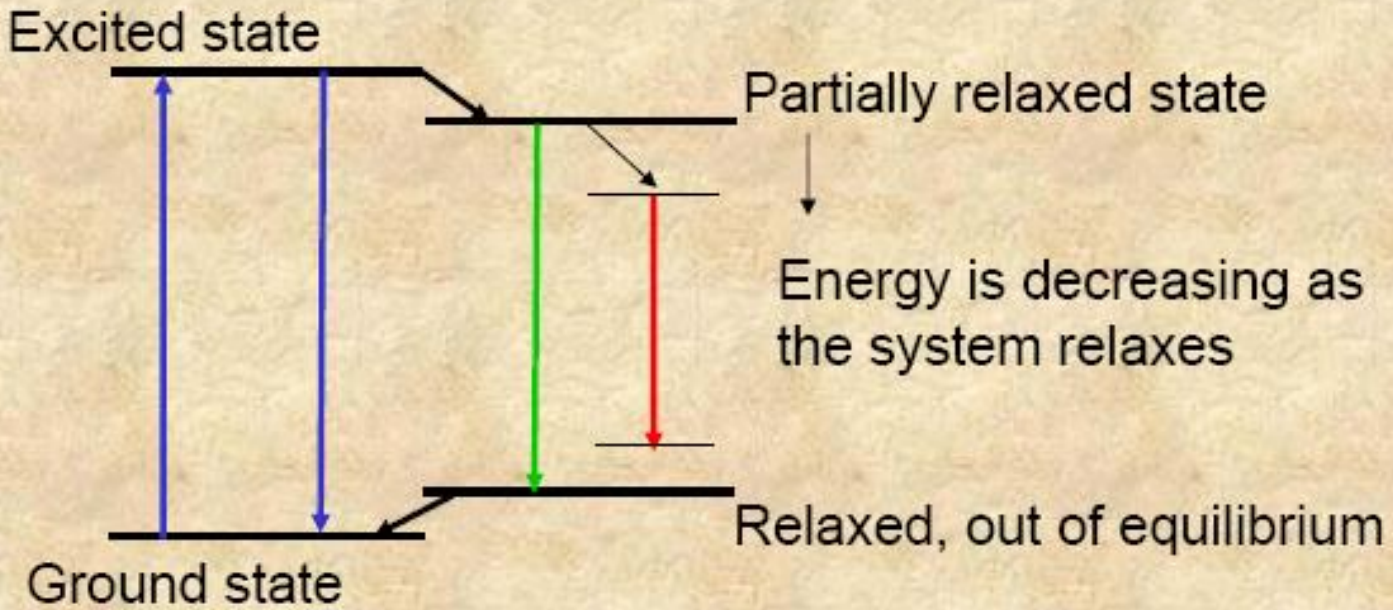
- potřeba měřit nízké intenzity
- často potřeba měřit rychlé dosvity
 - fotonásobiče (photomultiplier tube)



Fluorescence ve vodném prostředí

Solvent dipolar orientation relaxation





Time resolved spectra

Anglické termíny



lamp - lampa, zdroj

sample - vzorek

cuvette, cell - kyveta

fiber optic - optické vlákno

lens - čočka, lupa

laser beam - laserový svazek

ray - paprsek

photomultiplier tube - fotonásobič

dichroic mirror - polopropustné zrcadlo

flash - záblesk, blesk