

Fluorestsents-spektroskoopia

Üks madalaimat avastamispiiri ja mitmeid eritehnikaid võimaldav spektroskoopiline meetod

Märts 2008

1

Molekulide olekud

- Vaatleme paarisarvulise elektronide arvuga molekule:
 - **singletno molekul**: kõik elektronid on paardunud
 - **tripletne molekul**: on kaks paardumata elektroni
- Lähteolekus on enamasti tavalisi molekule singletsed
 - Tähistatakse S_0
- Osakesed, millel on üks paardumata elektron on **vabad radikaalid**
 - Vabad radikaalid on **dubletsed molekulid**

Märts 2008

2

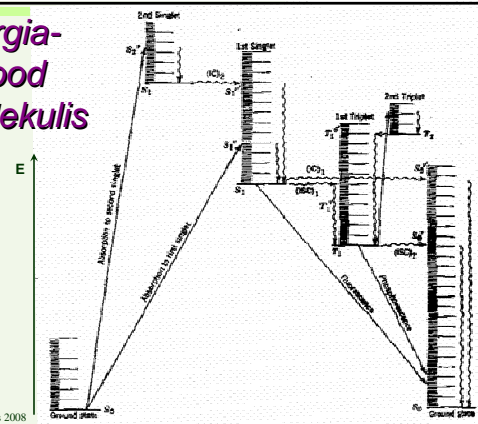
Molekulide olekud

- Singletsete osakeste **ergastumisel** läheb osake üldjuhul üle singletsesse ergastunud olekusse
 - räägitakse singlett-singlett üleminekutest
 - näiteks olekusse S_1 või S_2
 - seejuures enamasti mõnele vibratsiooniergastusnivoole
 - kui seda tahta rõhutada, siis näiteks teise singletse oleku kolmandat vibratsiooniergastuse alamnivood tähistatakse S_2^{v3}
- singlett-triplett üleminekud on kvantmehaanika järgi keelatud ja seetõttu harvad

Märts 2008

3

Energianivood molekulis



Märts 2008

Ergastunud molekuli relaksatsioon

- Olgu ergastus toimunud olekusse S_2^{v3}
- Väga kiiresti (ca 10^{-12} s jooksul) toimuvad järgmised üleminekud:
 - $S_2^{v3} \rightarrow S_2^{v0} (\rightarrow) S_1^{vn} \rightarrow S_1^{v0}$
 - Esimest ja kolmandat nimetatakse **võnkerelaksatsiooniks**
 - S_2^{v0} ja S_1^{vn} vahel olev **sisekonversiooniüleminek** ei ole nii kiire ($10^{-6} \dots 10^{-12}$ s)
 - Need on kiirguseta protsessid ja energia muundub soojuseks

Märts 2008

5

Ergastunud molekuli relaksatsioon

- Olekust S_1^{v0} edasi on neli võimalust:
 - **Sisekonversioon**: kiirguseta üleminek olekusse S_0^{vn} ja sealt edasi S_0
 - protsessi aeg $10^{-6} \dots 10^{-12}$ s
 - **Väliskonversioon**
 - **Fluorestsents**: kiirgusega üleminek olekusse S_0^{vn} ja sealt edasi kiirguseta üleminek olekusse S_0
 - protsessi aeg $10^{-6} \dots 10^{-12}$ s
 - **Intersüsteemne üleminek** olekusse T_1^{vn} ja sealt edasi kiirguslik üleminek olekusse S_0
 - See kiirguslik üleminek on **fosforestsents**
 - protsessi aeg $10^2 \dots 10^{-6}$ s (aeglane protsess)

Märts 2008

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!**

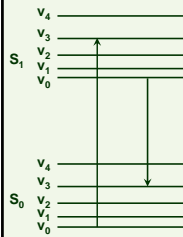
Märts 2008

7

Stokes'i ja anti-Stokes'i fluorestsents

Stokes'i fluorestsents

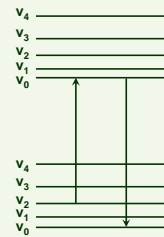
$$E_{\text{fluorestsents}} < E_{\text{ergastav}}$$



Märts 2008

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

Märts 2008

9

Fluorestsentsispektrid

- 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

Märts 2008

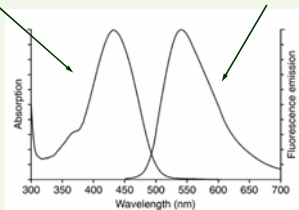
10

Fluorestsents-spektrid

- Alexa Fluor 430

Ergastusspekter

Emissioonispekter



Märts 2008

11

Spektrite omadused

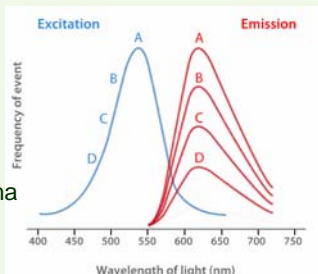
- Ergastusspekter on lühema lainepikkuse juures kui kiirgusspekter
- Spektrijooned on küllaltki laiad ja mittekarakteristlikud
- Ergastusspekter on välja venitatud lühema lainepikkuse poole
- Emissioonispekter on välja venitatud pikema lainepikkuse poole

Märts 2008

12

Spektrite omadused

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



Märts 2008

Fluorestsentsi ergastamine

- Ergastamiseks kasutatakse UV kiirgust või nähtavat valgust
 - Ergastusenergia on elektroonse ergastuse suurusjärgus
- Ergastav kiirgus:
 - peab olema piisavalt intensiivne
 - lainepikkuse muutmise võimalus on enamasti oluline

Märts 2008

14

Fluorestsentsi ergastamine

- **Ksenoon-kaar-lamp**
 - pidevallaikas (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
- **Valgusdiod**

Märts 2008

15

Molekulide fluorestsents-omadused

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

Märts 2008

16

Kiirguse neelamine

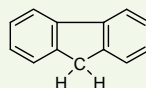
- Kehtib sama loogika, mis UV-Vis spektroskoopias
- Rusikareegel: fluorestsenteerivad eeskätt ained, millel on intensiivsed neeldumiskoored UV või nähtavas spektris
- Eeskätt:
 - π -süsteemidega molekulid
 - metallikompleksid

Märts 2008

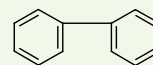
17

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
Fluorestsenteerib



Bifenüül
Ei Fluorestsenteeri

Märts 2008

18

Molekuli jäikus

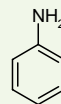
- Väga paljud metallikompleksid on jäigad
 - metall orienteerib ligandid tugevalt enda ümber
 - kelaatsete ligandidega kompleksid on eriti jäigad
- Metallikomplekside fluorestsentsi kasutatakse metallide määramiseks

Märts 2008

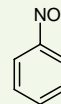
19

Elektrodoonorsed rühmad

- Mida rohkem on molekulis elektrodoonoreid rühmi ja mida vähem elektronaktseptoreid rühmi, seda kõrgem on fluorestsentsi tõenäosus



Aniliin
Fluorestseerib

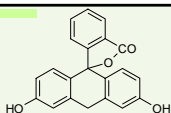


Nitrobenseen
Ei Fluorestseeri

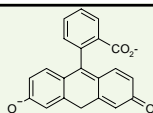
Märts 2008

20

Näited



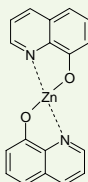
Fluorestseiin neutr. kk-s
Ei fluorestseeri



Fluorestseiin aluselises kk-s
Fluorestseerib



8-Hüdroksükinoliin
Fluorestseerib nõrgalt



8-Hüdroksükinoliini Zn kompleks
Fluorestseerib tugevalt

Märts 2008

21

Fluorestsentsi efektiivsus

- Ka molekulide korral, mis fluorestseerivad, ei põhjusta mitte iga neeldunud kvant fluorestsentsi
- Fluorestsentsi saagis e. fluorestsentsi kvant-efektiivsus Φ_E :

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

n_{fl} – fluorestseerivate kvantide hulk

n_{abs} – neeldunud kvantide hulk

- Fluorestsentsi kustumine – efektiivsuse langus (Näiteks lahustunud O_2 mõjul)

Märts 2008

22

Avastamispriid

- Fluorestsents sobib jälgede määramiseks
- Avastamispriid sõltuvad erakordselt tugevalt analüüdist
 - Fluorestsentsi jaoks sobivaid aineid saab määrata avastamispriididega ppm-de ja ppb-de suurusjärgus

Märts 2008

23

Lineaarsus, kvantitatiivne analüüs

- Meetod on üsna heas lähenduses lineaarne

$$F = k \cdot C$$

- Lineaarne ala on lai: 3-6 suurusjärku
 - Kuid esineb igasuguseid efekte, mis seda ahendavad
- Kvantitatiivne analüüs käib enamasti tavalisel kalibreerimisgraafiku meetodil

Märts 2008

24

Aparatuuri ehitus

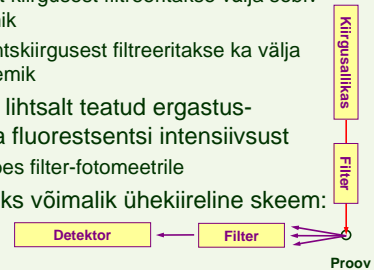
- Tava-kasutuses on levinumad kaks aparadi-konstruksiooni:
 - filter-fluoro(i)meetrid
 - spektrofluoro(i)meetrid
- Kõrgetasemelisemad:
 - laserfluorestsents-süsteemid
 - mikroskoopia/imaging
 - LIF, ...

Märts 2008

25

Filter-fluoromeetrid

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

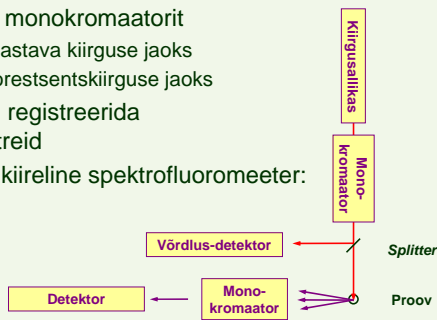


Märts 2008

26

Spektrofluoromeetrid

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



Märts 2008

27

Kromatograafias detektorina

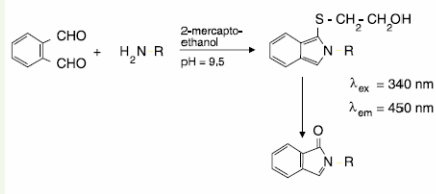
- Fluorestsentsil baseeruv detektor on küllaltki levinud detektor vedelik-kromatograafias
- Põhiline probleem: enamus aineid ei fluorestseeri
- Nende korral aitab sageli **derivatiseerimine**
 - Analüüdi molekul viiakse mõne sobiva reagenti abil sellisesse vormi, mis fluorestseerib

Märts 2008

28

Derivatiseerimise näide: OPA, orto-Ftaalaldehüüd

- Muundab aminohapped fluorestsentseerivateks indoolderivaatideks
- Aminohapete analüüsil üks tsentraalseid reagente



Märts 2008

29

Nõuded proovile

- Proovid enamasti lahuse kujul
- Spetsiaalses fluorestsentsiküvetis
 - Valgus siseneb otsast, väljub küljelt

Märts 2008

30

Rakendused

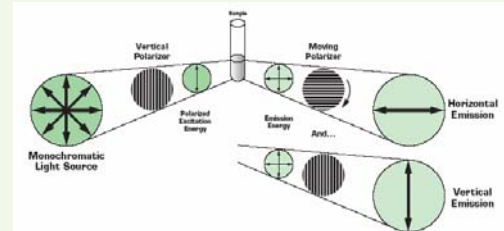
- Klassikaline: metallide määramine fluorestsents-reagentidega
 - selle kasutusala on tähtsus on vähenemas
- Keskkonna, tervisekaitse jms analüüs
 - PAH-id, aromaatsed amiinid
- O₂ sensor (fluorestsentsi kustumise baasil)
- Biokeemilised analüüsid ja uuringud
 - igasuguste bio-aktiivsete ainete määramine fluorestsents-markeritega
 - immuno-analüüs (valgud, viirused, ...)

Märts 2008

31

Fluorestsents-polarisatsioon

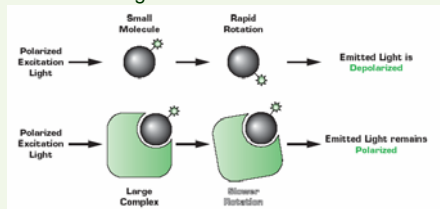
- Ergastav kiirgus on polariseeritud
- Kui ergastunud olek “seisab paigal” siis on ka emiteeritav kiirgus polariseeritud



32

Fluorestsents-polarisatsioon

- Väikesed molekulid pöörlevad lahuses kiiresti – **polarisatsioon kaob**
 - seondumata fluorestsents-marker
- Suured molekulid pöörlevad aeglaselt – **polarisatsioon säilib**
 - makromolekuliga seondunud fluorestsents-marker



33

Fluorestsents-spektroskoopia eelised-puudused

- Eelised:
 - madalad avastamispiirid
 - lai lineaarne ala
 - miniaturiseeritav (HPLC detektorina)
 - vajadusel on väga kõrge selektiivsus saavutatav (immuno-analüüs)
- Puudused:
 - rakendusala mõnevõrra piiratud
 - kohati kapriisne

Märts 2008

34