

Министерство образования Российской Федерации
Московский физико-технический институт (национальный исследовательский
университет)

Спектрофлуориметрический анализ

Лабораторная работа студентов группы Б04-901
Аксеновой Светланы
Гариной Ольги

Долгопрудный, 2022

Содержание

1	Теоретическая часть	2
1.1	Оптические спектры. Фотолюминесценция	2
1.2	Основные законы флуоресценции	4
1.3	Фотометрический метод анализа концентраций веществ	5
1.4	Тушение флуоресценции	7
2	Экспериментальная установка	9
3	Ход работы	10
3.1	Исследование зависимости спектров поглощения и флуоресценции растворов родамина 6G от концентрации	10
3.2	Исследование тушения флуоресценции родамина 6G йодид-ионами	12
4	Вывод	12
5	Список литературы	15

Цель работы: исследовать спектры флуоресценции и поглощения родами-на 6G и явление тушения флуоресценции йодид-ионами.

1 Теоретическая часть

Способностью излучать электромагнитные волны обладают все вещества, но можно выделить группу соединений, особым свойством которых является способность испускать излучение, возбуждаемое каким-либо источником энергии и не обусловленное нагреванием веществ. Это излучение, продолжающееся в течение времени, значительно превышающего период световых колебаний, называют люминесценцией. Вещества, способные люминесцировать, называются люминофорами.

В зависимости от способа возбуждения люминофора различают много типов люминесценции. В данной работе будет изучаться фотолюминесценция - свечение вещества, возникающее под действием излучения в УФ и видимой областях спектра. Соединения, способные фотолюминесцировать, получили название флуорофоров.

1.1 Оптические спектры. Фотолюминесценция

Физическая природа люминесценции состоит в излучательных переходах электронов атомов или молекул из возбуждённого состояния в основное. Обычно энергии электронных, колебательных и вращательных уровней связаны соотношением $E_{эл} \gg E_{кол} \gg E_{вр}$. В этом случае можно использовать приближение Борна-Оппенгеймера:

$$E = E_{эл} + E_{кол} + E_{вр}, \quad (1)$$

где E - внутренняя энергия молекулы.

Изменение энергий происходит не непрерывно, а дискретно. При этом разность энергий ΔE между двумя ближайшими энергетическими состояниями определяется уравнением:

$$\Delta E = \Delta E_{эл} + \Delta E_{кол} + \Delta E_{вр}, \quad (2)$$

где энергии переходов связаны соотношением $\Delta E_{эл} \gg \Delta E_{кол} \gg \Delta E_{вр}$. Таким образом, переходы между соответствующими энергетическими уровнями лежат в различных диапазонах длин волн, что облегчает их исследование и интерпретацию.

Энергетические состояния молекулы и возможные электронные переходы могут быть представлены в виде схемы уровней энергии – диаграммы Яблонского, где каждый электронный уровень расщепляется на ряд колебательных подуровней, а каждый колебательный – на ряд вращательных подуровней (рис. 1). На этой диаграмме буквами S_0 , S_1 , S_2 обозначаются синглетные состояния молекулы, T_1 , T_2 - триплетные. Мультиплетность зависит от спина молекулы как $M = 2S + 1$.

При поглощении света молекула переходит на один из колебательных подуровней возбужденного электронного состояния (рис. 1). При сохранении мультиплетности возбужденное состояние тоже будет синглетным. Если же возбуждаемый электрон меняет направление спина, возбужденное состояние будет триплетным. Таким образом, одному основному состоянию соответствует набор разных возбужденных состояний — синглетных и триплетных.

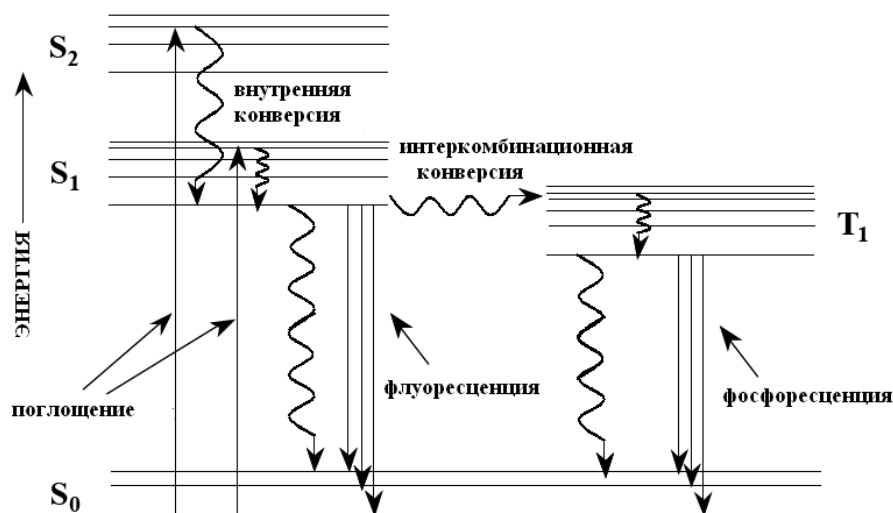


Рисунок 1 – Диаграмма Яблонского

Излучательный переход между двумя состояниями одинаковой мультиплетности называется **флуоресценцией**, он является наиболее вероятным. Типичное время жизни такого возбужденного состояния составляет $10^{-11} - 10^{-8}$ с.

Спектр поглощения – зависимость интенсивности поглощения света (при прохождении через вещество) от длины волны.

Спектр испускания (спектр флуоресценции) – это распределение фотоиндуцированного свечения по длинам волн. Графически спектр представляет собой зависимость интенсивности свечения от длины волны испускаемого света.

Спектром возбуждения флуоресценции называют зависимость интенсивности испускания при фиксированной длине волны испускания от длины волны возбуждающего света, в разбавленных растворах чаще всего совпадает со спектром поглощения вещества.

Излучательный переход между состояниями разной мультиплетности называется **фосфоресценцией**. Время жизни возбужденного состояния при фосфоресценции значительно больше, чем при флуоресценции, и составляет $10^{-4} - 10^{-2}$ с. За счет длительного времени жизни триплетного состояния, молекулы, пребывающие в нем, легко теряют свою энергию в различных безызлучательных процессах. К внутримолекулярным безызлучательным переходам относятся **внутренняя** и **интеркомбинационная** конверсия. В первом случае переход происходит между состояниями с одинаковой, а во втором – с разной мультиплетностью.

1.2 Основные законы флуоресценции

В многоатомных молекулах спектр испускания сдвинут относительно спектра возбуждения в длинноволновую область, сдвиг между положением максимумов спектра поглощения и флуоресценции называется **стоксовым** (рис. 2), а само правило - **законом Стокса**. Это связано с протеканием процессов релаксации с верхних подуровней и расщеплением нижнего уровня (рис. 1).

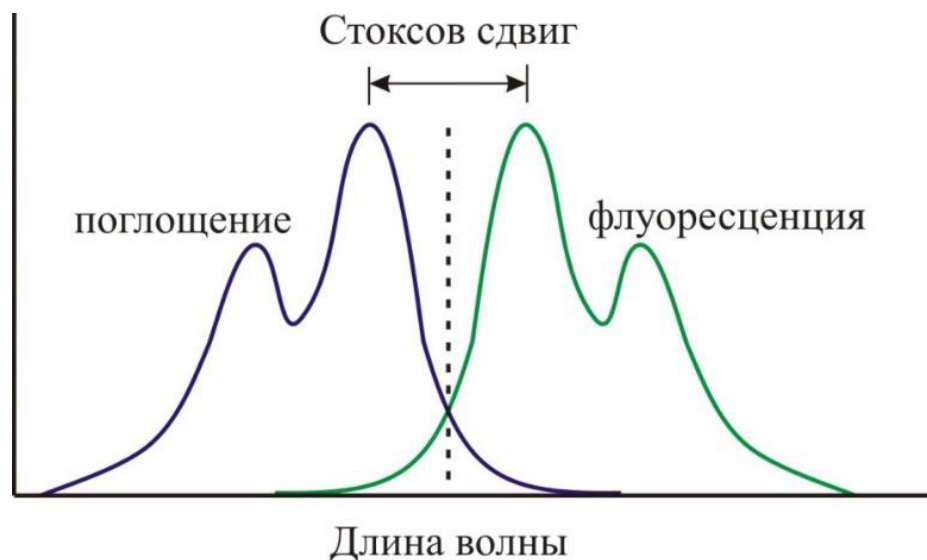


Рисунок 2 – Иллюстрация закона Стокса и правила Левшина

Спектр испускания и возбуждения флуоресценции, как правило, зеркально симметричны относительно прямой, проходящей через точку их пересечения перпендикулярно оси длин волн – (рис. 2). Это закономерность получила название **правила Левшина**. Оно обусловлено сходством распределения колебательных подуровней по энергиям у основного и возбужденного состояний. В некоторых случаях наблюдаются отклонения от правила зеркальной симметрии, вызванные геометрическими перегруппировками в молекуле или реакциями в возбужденном состоянии.

Так как время электронного перехода намного меньше, чем время, характерное для молекулярных колебаний, то переход происходит при неизменном положении ядер в молекулах и их окружении. Следовательно, переход можно представить вертикальной линией, соединяющей различные поверхности потенциальной энергии (**принцип Франка-Кондона**), наиболее вероятным окажется переход на тот колебательный уровень, который имеет тоже значение межъядерного расстояния в точке поворота колебаний (рис. 3).

Согласно **правилу Каши**, излучение фотона (флуоресценция и фосфоресценция) происходит только с низшего возбужденного электронного состояния молекулы. Исключение из правила Каши проявляется только тогда, когда энергии возбужденных уровней сильно различаются.

При комнатной температуре большая часть молекул находится на нижнем колебательном уровне основного электронного состояния (в соответствии с распределением Больцмана). Кроме электронных (0-0) переходов, существует

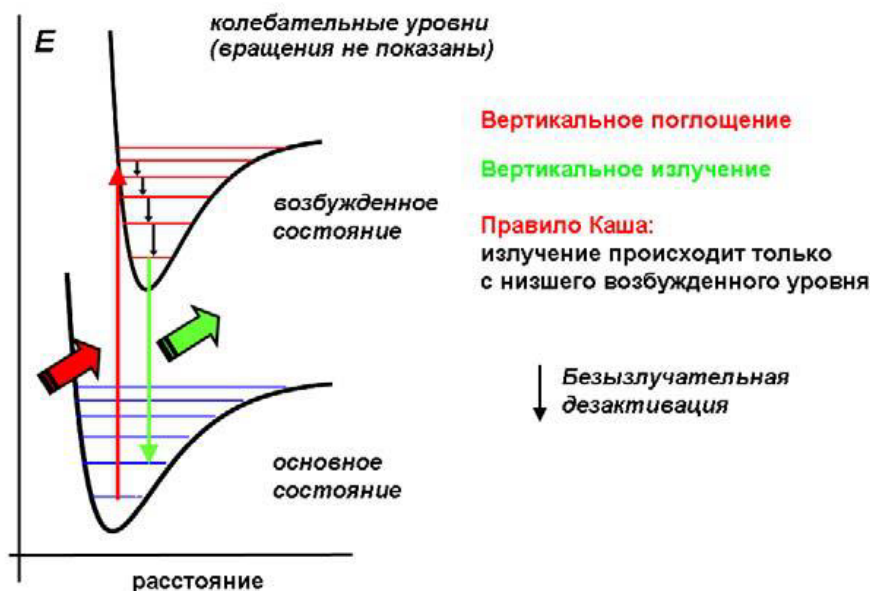


Рисунок 3 – Потенциальные энергии основного и возбужденного состояний двухатомной молекулы AB

несколько колебательных переходов, интенсивности которых зависят от разности равновесных положений и формы потенциальных кривых основного и возбужденного состояний (рис. 4). Только если равновесные межъядерные состояния в основном и возбужденном состоянии равны, наиболее интенсивным является 0-0 переход. Наиболее вероятными переходами являются 0-0 и 0-2 (поглощение) и 0-2 (испускание) (рис. 4). Иные переходы менее вероятны, поскольку в них молекула должна мгновенно приобрести избыток кинетической энергии. Общая форма полосы поглощения определяется принципом Франка-Кондона, а ее огибающая называется огибающей Франка-Кондона.

Для оценки интенсивности фотолюминесценции обычно используется относительная величина, называемая квантовым выходом ϕ :

$$\phi = \frac{n_F}{n_a}, \quad (3)$$

где n_F - число испущенных, а n_a - число поглощенных квантов. Чем больше квантовый выход, тем эффективнее преобразование возбуждающего света в излучение флуоресценции.

Закон Вавилова для квантового выхода: квантовый выход не зависит от длины волны возбуждения, если выполняется закон Стокса, т.е. если длина волны возбуждающего света меньше длины волны флуоресценции.

1.3 Фотометрический метод анализа концентраций веществ

Для истинных растворов поглощение света проявляется в ослаблении светового потока после прохождения через объект. При прохождении монохроматического света с интенсивностью I_0 через слой вещества (l) интенсивность света уменьшится до интенсивности I . В разбавленных растворах (при концентрации

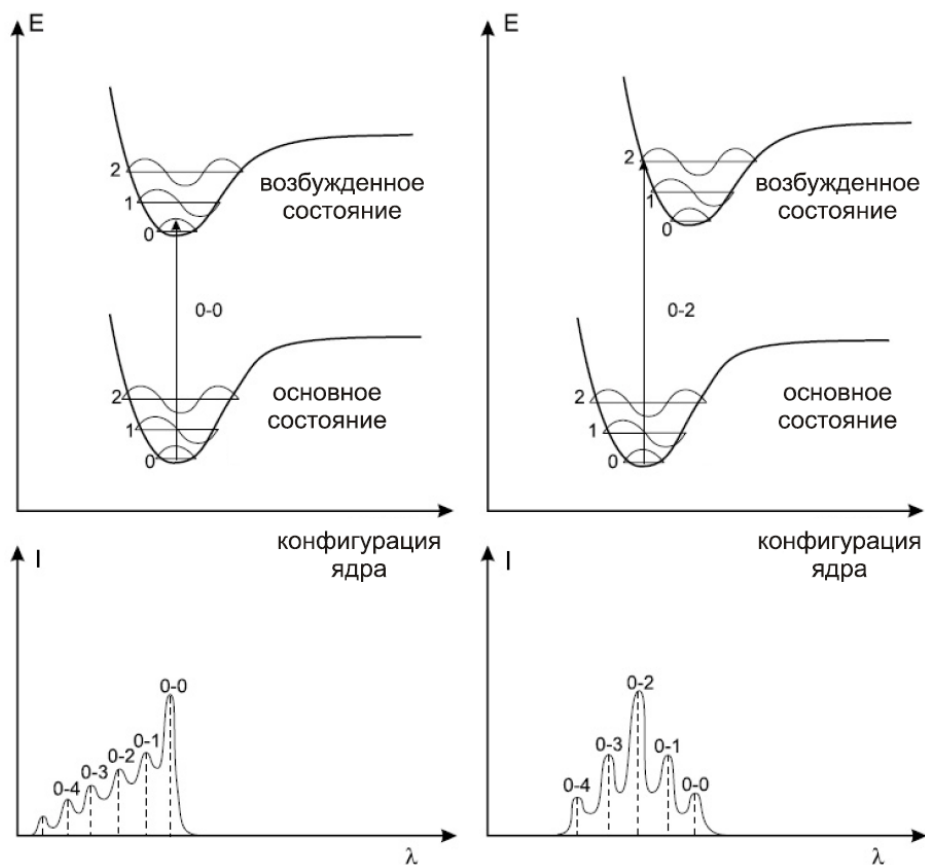


Рисунок 4 – Вверху: типичная диаграмма распределения потенциальной энергии с изображенными вертикальными переходами. Внизу: форма полос поглощения; вертикальными пунктирными линиями показаны полосы поглощения, которые были зафиксированы для пара, сплошной линией – в растворе уширенные линии.

$< 0.01 \text{ M}$) поглощение веществом монохроматического излучения выражается законом Бугера-Ламберта-Бэра:

$$I = I_0 10^{-\varepsilon Cl} \approx I_0 e^{-2.3 \varepsilon Cl}, \quad (4)$$

где ε - молярный коэффициент экстинкции, C - концентрация вещества (М), поглощающего свет, l - толщина слоя вещества, через который прошел свет.

Для количественного описания способности вещества поглощать излучение обычно используются два параметра – пропускание (T) и оптическая плотность (D). Величина пропускания задается отношением I/I_0 и обычно выражается в процентах. Оптическая плотность определяется как отрицательный логарифм пропускания:

$$D = \log \frac{I_0}{I} = -\lg T. \quad (5)$$

Как следует из закона Бугера-Ламберта-Бэра, величина оптической плотности пропорциональна молярной концентрации вещества:

$$D = \varepsilon Cl. \quad (6)$$

Таким образом, если известен молярный коэффициент экстинкции вещества, можно легко определить его концентрацию по поглощению.

Но в некоторых случаях наблюдаются отклонения от линейной зависимости между концентрацией и оптической плотностью. Причинами таких отклонений могут быть рассеяние света, люминесценция и ассоциация.

Часто оказывается, что интенсивность флуоресценции пропорциональна концентрации лишь в ограниченном диапазоне оптических плотностей (рис. 5). Из-за поглощения, вследствие закона Бугера-Ламберта-Бера, интенсивность света в центре кюветы меньше интенсивности света, падающего на кювету. Поскольку интенсивность флуоресценции пропорциональна интенсивности падающего света, то кажущийся выход флуоресценции будет ниже, чем для бесконечно разбавленного раствора (рис. 5). Эта особенность называется **эффектом внутреннего фильтра**.

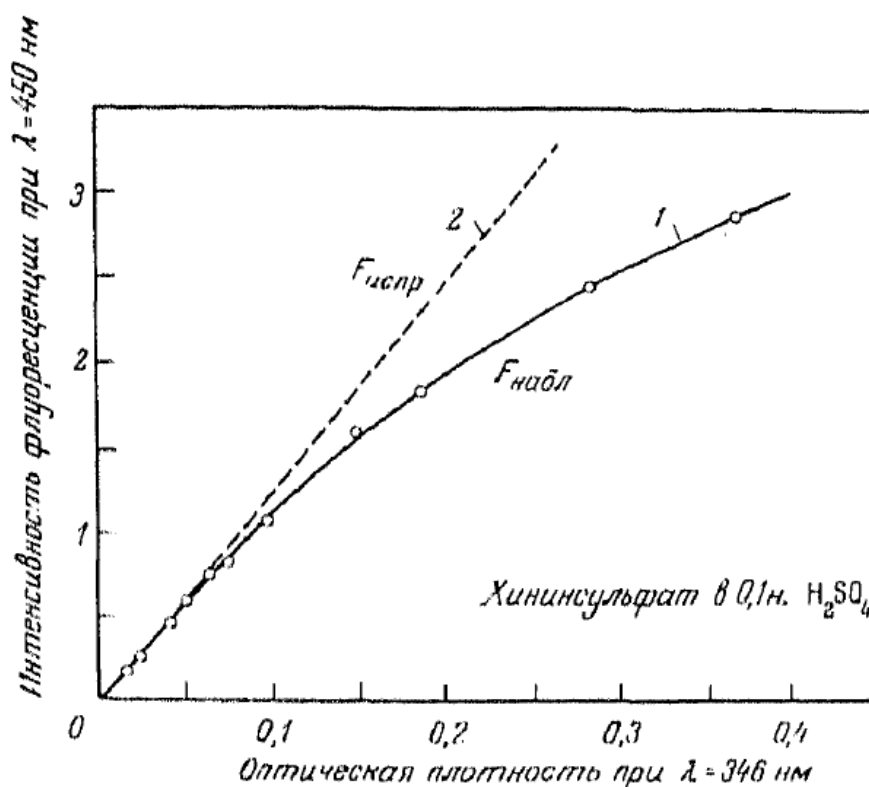


Рисунок 5 – Демонстрация эффекта внутреннего фильтра

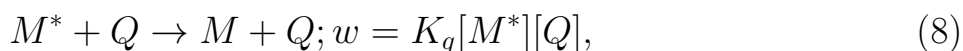
Допустим, что образец имеет значительную оптическую плотность как при длине волны возбуждения, так и при длине волны испускания: $D_{\text{возб}}$ и $D_{\text{исп}}$. Интенсивности излучения и испускания ослабляются при этом в $10^{-D_{\text{возб}}/2}$ и $10^{-D_{\text{исп}}/2}$ раз соответственно. Исправленная интенсивность флуоресценции при этом приблизительно равна:

$$F_{\text{испр}} = F_{\text{набл}} 10^{(D_{\text{исп}} + D_{\text{возб}})/2}. \quad (7)$$

1.4 Тушение флуоресценции

Тушением флуоресценции называют любые процессы, которые уменьшают интенсивность флуоресценции данного вещества. Рассмотрим тушение, связанное со случайными столкновениями между флуорофором и гасителем (туши-

телем), которое называется динамическим, и тушение, обусловленное образованием нефлуоресцирующего комплекса между флуорофором и гасителем – статическое тушение. Для каждого из них требуется контакт между молекулами флуорофора и гасителя. Гаситель должен диффундировать к флуорофору в течение времени нахождения последнего в возбужденном состоянии. В результате контакта флуорофор возвращается в основное состояние без излучения фотона. Для динамического тушения флуоресценции реакция взаимодействия флуорофора и гасителя имеет вид:



где M^* и M - флуорофор в возбужденном и невозбужденном состоянии, Q - гаситель, w - скорость бимолекулярной реакции, K_q - бимолекулярная константа скорости тушения.

Эта реакция описывается уравнением Штерна-Фольмера:

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_q\tau_0[Q] = 1 + K_{\text{дин}}[Q], \quad (9)$$

где F_0 , F - интенсивность флуоресценции в отсутствие и в присутствии гасителя соответственно, τ_0 - время затухания флуоресценции в отсутствии гасителя, $[Q]$ - концентрация гасителя, $K_{\text{дин}} = K_q\tau_0$ - штерн-фольмеровская константа тушения. График $F_0/F([Q])$ отсекает отрезок на оси F_0/F равный 1, и имеет наклон, равный $K_{\text{дин}}$ (рис. 7)

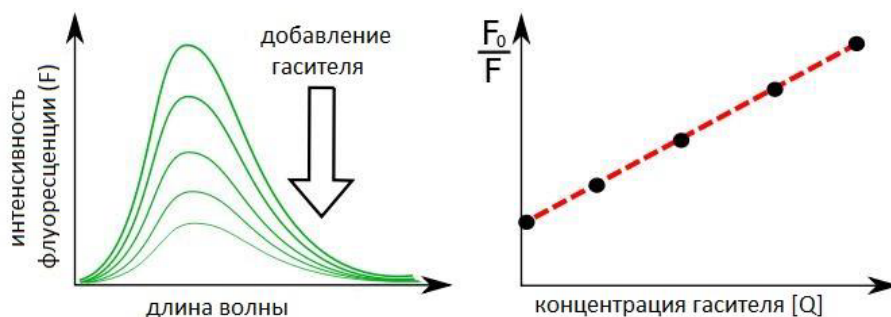


Рисунок 6 – Зависимость интенсивности флуоресценции от концентрации гасителя

Частота столкновений флуорофора с гасителем дается выражением:

$$Z = K_0[Q], \quad (10)$$

где K_0 - диффузионно-контролируемая бимолекулярная константа скорости, которая может быть вычислена по уравнению Смолуховского:

$$K_0 = \frac{4\pi R_{\Sigma} D_{\Sigma} N}{1000}, \quad (11)$$

где R_{Σ} - радиус столкновения, D_{Σ} - сумма коэффициентов диффузии флуорофора и гасителя, N - число Авогадро.

Частота столкновений связана с бимолекулярной константой скорости тушения через эффективность тушения ω :

$$K_q = K_0\omega. \quad (12)$$

Радиусы можно определить из молекулярных масс и плотностей исследуемого вещества. Коэффициент диффузии можно вычислить по уравнению Стокса-Эйнштейна:

$$D = \frac{kT}{6\pi\eta R}, \quad (13)$$

где k - постоянная Больцмана, η - вязкость растворителя, T - температура, R - радиус молекулы.

В этой работе в качестве гасителя динамического типа используются ионы йода. Известно, что тяжелые галогены увеличивают константу интеркомбинационной конверсии в триплетное состояние из-за спин-орбитального взаимодействия, возбужденного в синглетном состоянии флуорофора и галогена. Так как время жизни в триплетном состоянии относительно большое, то такое состояние сильно тушится другими процессами.

Как уже отмечалось, статическое тушение происходит в результате образования флуоресцирующего комплекса MQ :



Как только произошло поглощение света, комплекс медленно возвращается в основное состояние без испускания фотона.

Зависимость интенсивности флуоресценции от концентрации гасителя:

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_{\text{ст}}[Q], \quad (15)$$

где $K_{\text{ст}}$ - константа ассоциации комплекса.

2 Экспериментальная установка

Оборудование и материалы:

- спектрофлуориметр Avantes (рис. 7);
- спектрофотометре Shimadzu UV-1800;
- автоматические дозаторы переменного объема на 100-1000 мкл со сменными одноразовыми наконечниками;
- пробирки объемом 10 мл;
- емкость для сбора отработанных реактивов и использованных наконечников;

- раствор Родамина 6G концентрацией $2 \cdot 10^{-4}$ М;
- раствор тушителя KI концентрацией 0.1 М;
- дистиллированная вода;
- кюветы флуориметрические с длиной оптического пути от 2 мм до 1 см, объем до 4 мл.

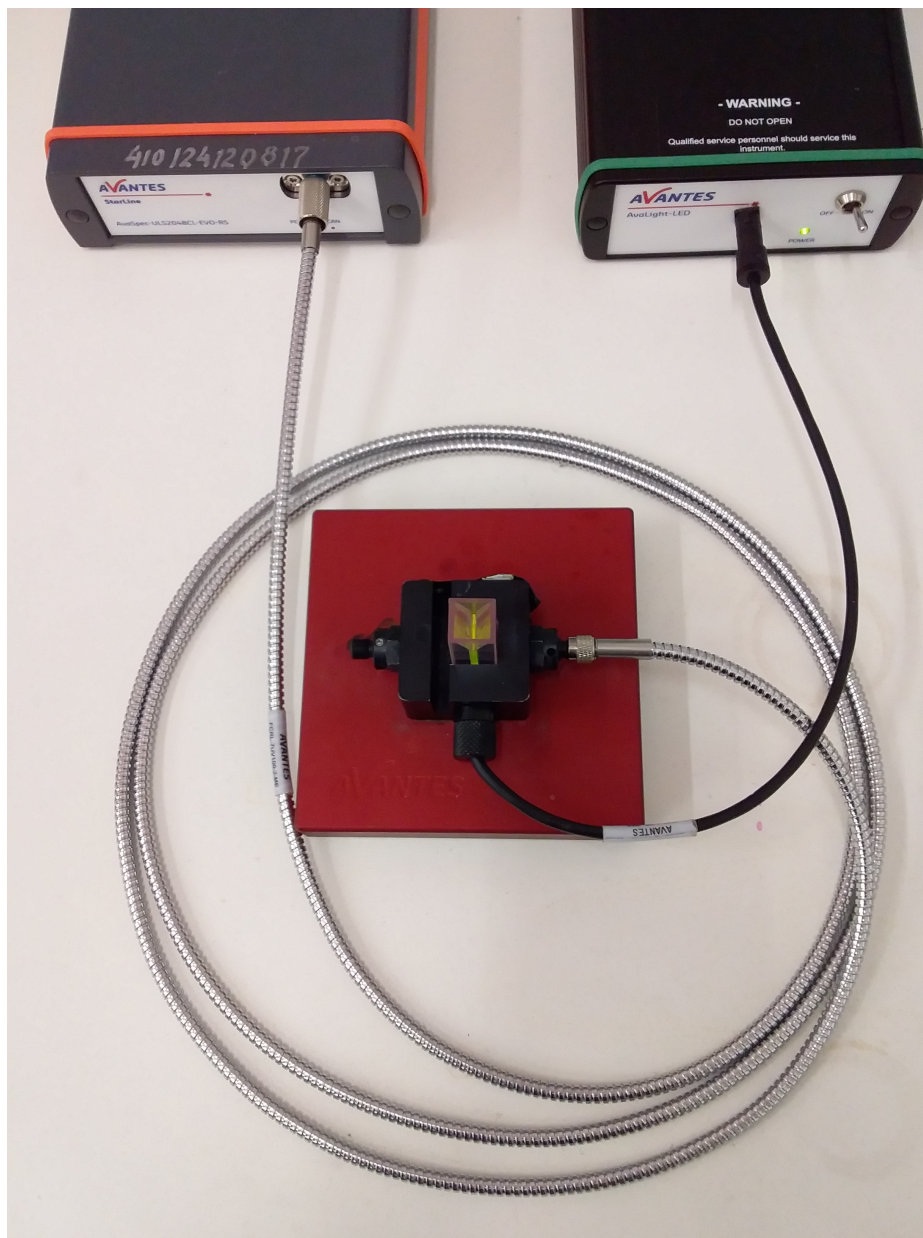


Рисунок 7 – Спектрофлуориметр/спектрофотометр Avantes

3 Ход работы

3.1 Исследование зависимости спектров поглощения и флуоресценции растворов родамина 6G от концентрации

Были приготовлены водные растворы родамина 6G с различным значением концентрации родамина ($2 \cdot 10^{-4}$, 10^{-4} , $2 \cdot 10^{-5}$, 10^{-5} , $5 \cdot 10^{-6}$, $2 \cdot 10^{-6}$ М). Для

$C_{\text{род}}$	$C_{\text{дим}}$
$2 \cdot 10^{-4}$	$2 \cdot 10^{-11}$
10^{-4}	$5 \cdot 10^{-12}$
$2 \cdot 10^{-5}$	$2 \cdot 10^{-13}$
10^{-5}	$5 \cdot 10^{-14}$
$5 \cdot 10^{-6}$	$1 \cdot 10^{-14}$
$2 \cdot 10^{-6}$	$2 \cdot 10^{-15}$

Таблица 1 – Концентрация димера в растворе в зависимости от концентрации родамина

каждого раствора был измерен спектр флуоресценции (рис. 8), также была выполнена регистрация спектров поглощения (рис. 9)

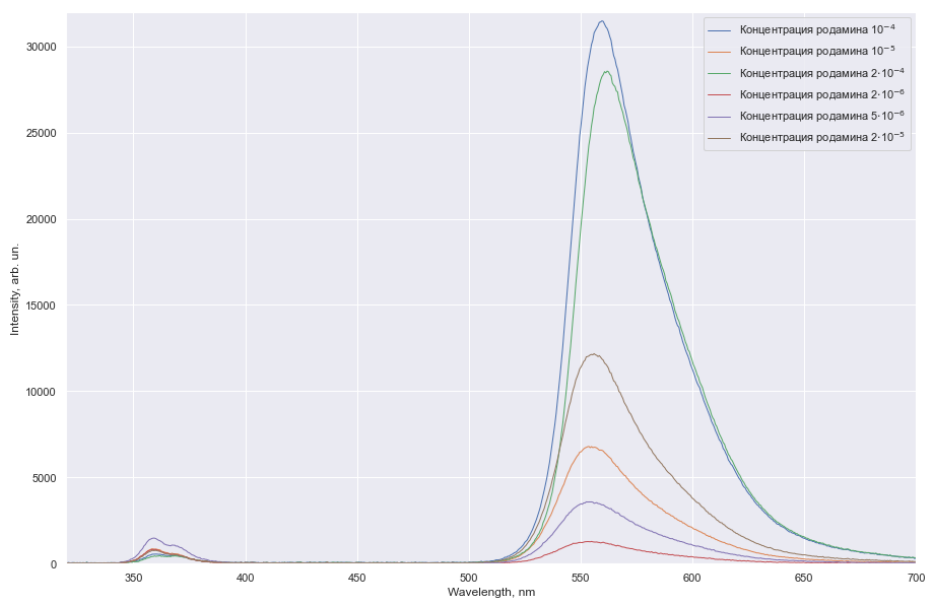


Рисунок 8 – Спектры флуоресценции для раствора родамина 6G для разных его концентраций

Максимумы спектров зависят от концентрации родамина в растворе: чем больше, тем максимальное значение выше. Между ними наблюдается стоксов сдвиг. Также спектры зеркально симметричны относительно друг друга при низких концентрациях, что говорит о том, что выполняется правило Левшина. При больших концентрациях максимум спектра поглощения начинают раздвигаться, чего не происходит на спектрах флуоресценции. Раздвоение пика обусловлено высокой концентрацией образовавшихся димеров родамина, которая происходит при достаточно высоких концентрациях вещества в растворителе. Из константы диссоциации димера $K_{\text{дим}} = 5 \cdot 10^{-4}$ М были получены концентрации димеризованного родамина в растворах (табл. 1).

Для проверки выполнения закона Бугера-Ламберта-Бера был построен график зависимости максимального значения оптической плотности от концентрации родамина для спектров поглощения (рис. 11). Видно, что зависимость линейная при низких концентрациях, далее прямая пропорциональность не вы-

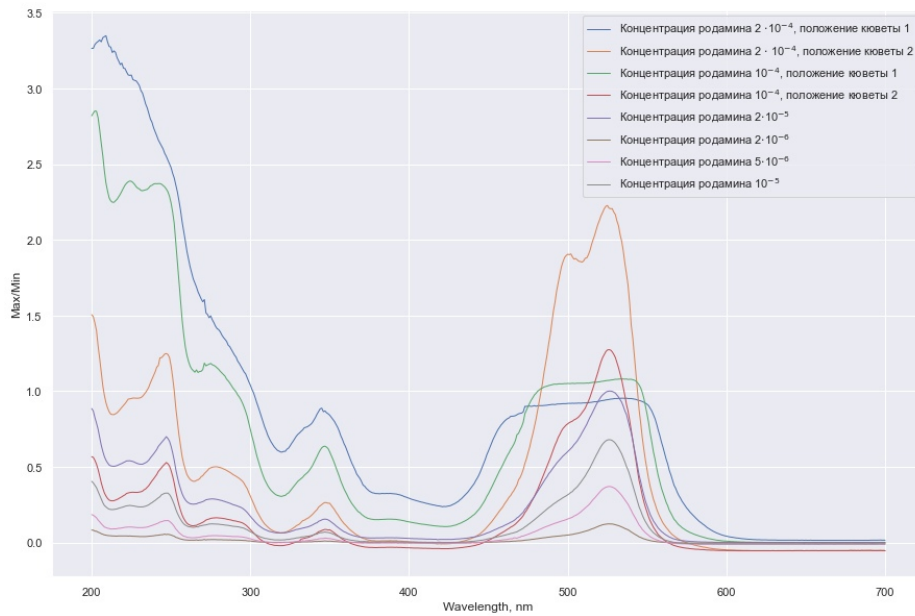


Рисунок 9 – Спектры поглощения для раствора родамина 6G для разных его концентраций

полняется. Это обусловлено эффектом внутреннего фильтра. Учесть его можно с помощью формулы (7). По первым трем точкам был рассчитан коэффициент экстинкции раствора:

$$\varepsilon = (3.4 \pm 2.7) \cdot 10^5 \text{ 1/(M см)}.$$

3.2 Исследование тушения флуоресценции родамина 6G йодид-ионами

Для исследования тушения флуоресценции были приготовлены смеси родамина 6G в концентрации $5 \cdot 10^{-6}$ М и KI с концентрациями 0, $5 \cdot 10^{-3}$, 10^{-2} , $2 \cdot 10^{-2}$, $3 \cdot 10^{-2}$, $5 \cdot 10^{-2}$ и выполнена запись спектров флуоресценции (рис. 12).

Была построена зависимость интенсивности флуоресценции F от концентрации тушителя KI (рис. 12) и F_0/F от концентрации KI (рис. 13), где F_0 - интегральная интенсивность флуоресценции чистого раствора родамина. График на рис. 14 - линейная зависимость, что совпадает с теоретическим предположением. Из наклона прямой, считая время флуоресценции $\tau \approx 10^{-8}$ с, рассчитана эффективность тушения

$$\omega = (91.9 \pm 3.2) \cdot 10^{-4}. \quad (16)$$

4 Вывод

В ходе работы были исследованы спектры флуоресценции и поглощения родамина 6G. В результате была получена зависимость максимума интенсивности

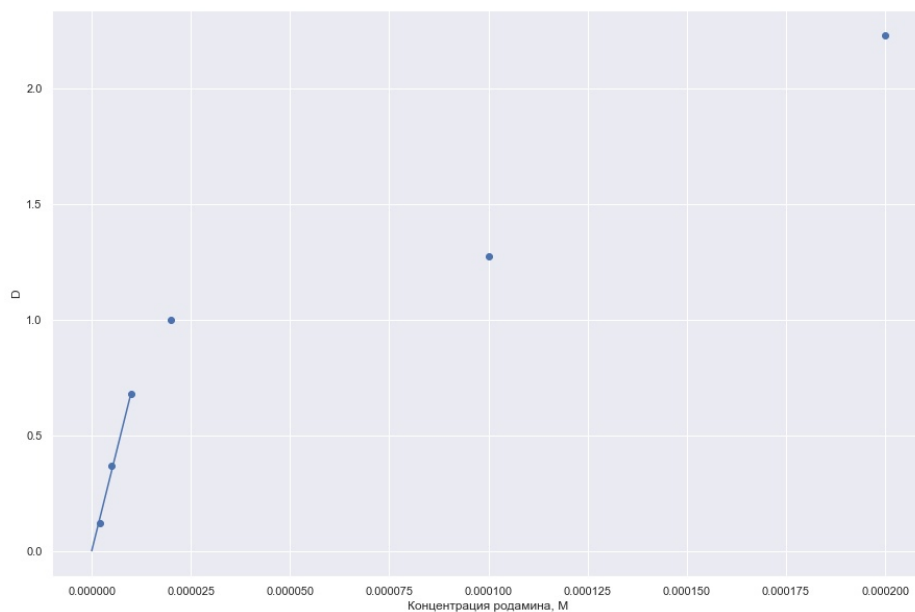


Рисунок 10 – Зависимость оптической плотности от концентрации для спектра поглощения роданина

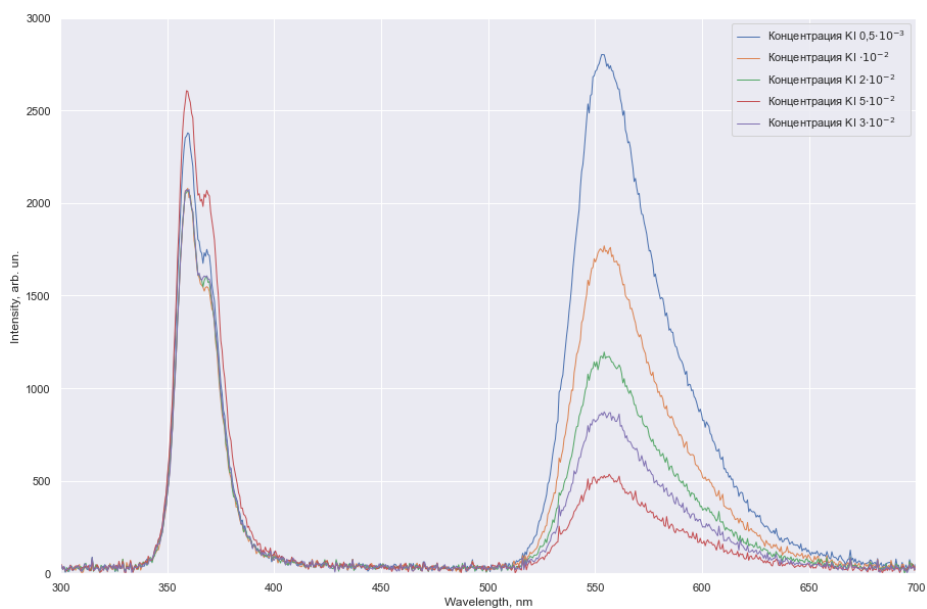


Рисунок 11 – Спектры флуоресценции растворов роданина и тушителя КІ при разных концентрациях КІ

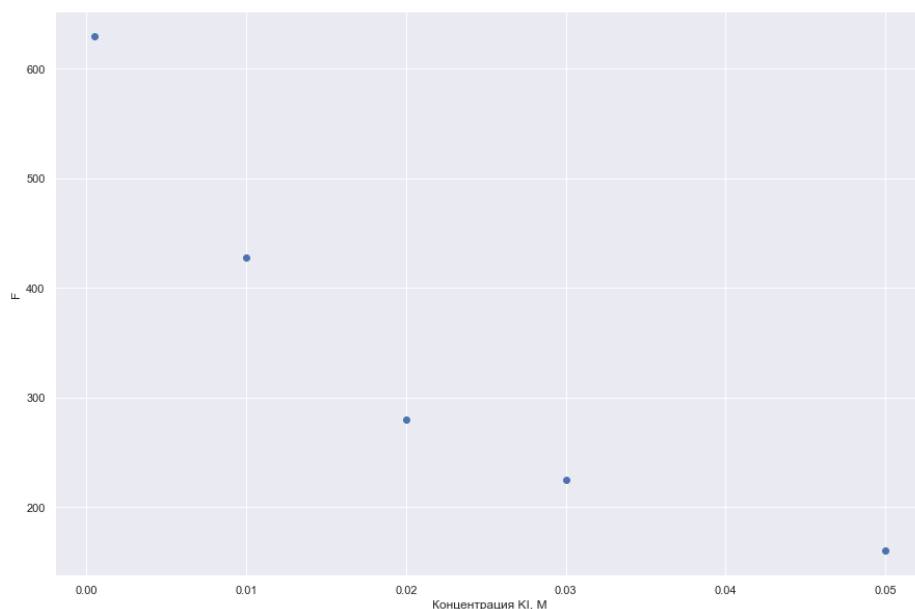


Рисунок 12 – Зависимость интенсивности флуоресценции F от концентрации тушителя KI

спектров от концентрации, которая согласуется с теоретическим предположением. Также экспериментально была проверена выполнимость некоторых основных законов флуоресценции. Для спектров поглощения и флуоресценции выполняется закон Стокса и правило Левшина (при низких концентрациях). Была исследована выполнимость закона Бугера-Ламберта-Бера для спектров поглощения, который выполняется при низких концентрациях родамина, так как при высоких концентрациях усиливается эффект внутреннего фильтра и увеличивается концентрация димеров вещества.

Также был проведен экспериментальный анализ тушения флуоресценции родамина йодид-ионами в зависимости от концентрации тушителя. В результате на опыте была проверена линейная зависимость (9) и рассчитана эффективность тушения.

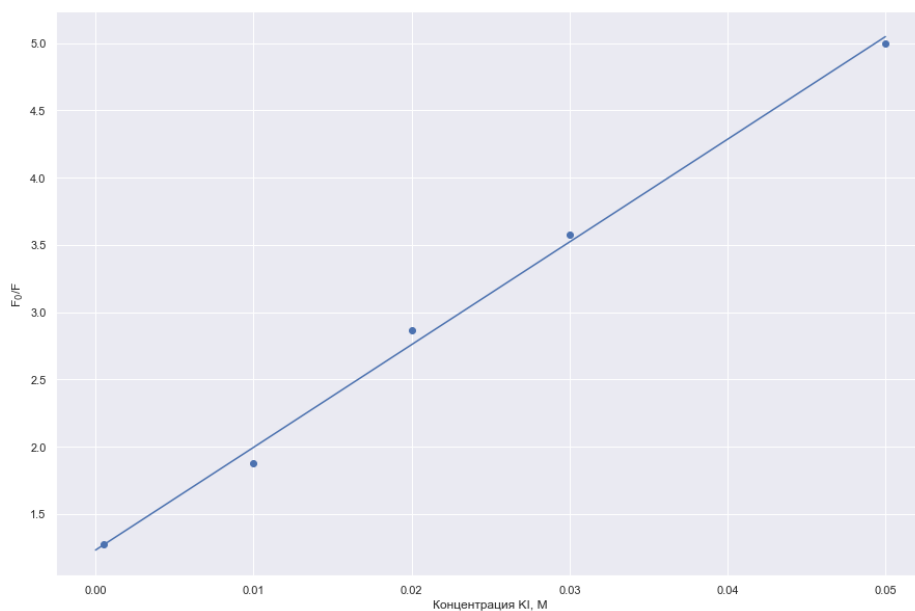


Рисунок 13 – Зависимость F_0/F от концентрации KI

5 Список литературы

1. Спектрофлуориметрический анализ: лабораторная работа / сост.: О.В. Лебедев, Е.А. Мешков, И.И. Новоселов. - М.: МФТИ, 2021. - 25 с.