

Спектрофлуориметрический анализ

Пискунова Ольга, Делинkevич Мария, Б06-205

31 декабря 2024 г.

1 Аннотация

Цель работы: изучение спектрофлуориметрического анализа на примере растворов родамина 6G разных концентраций; исследование тушения флуоресценции родамина 6G йодид-ионами.

Задачи работы:

- Приготовить растворы заданных концентраций и снять спектры флуоресценции и поглощения родамина 6G;
- Исследовать зависимость интенсивности флуоресценции от концентрации флуорофора и тушителя (йодид-ионы)
- Сделать выводы о соответствии экспериментальных зависимостей теоретическим, о выполнимости закона Бугера-Ламберта-Бэра для заданных концентраций, закона Штерна-Фольмера, о процессе димеризации

Оборудование: - спектрофлуориметр/спектрофотометр Avantes, Shimadzu UV-1800;

- автоматические дозаторы переменного объема на 10-100 мкл и 100-1000 мкл со сменными наконечниками;
- пробирки объемом 10 мл;
- кюветы флуориметрические с длиной оптического пути 2 мм и 10 мм, объем 600 мкл;
- кюветы флуориметрические с длиной оптического пути 3 мм и 10 мм, объем 1000 мкл;
- раствор Родамина 6G концентрацией 200 мкМ (в дистиллированной воде);
- раствор тушителя KI концентрацией 0,1 М (в дистиллированной воде);
- дистиллированная вода;

2 Введение

2.1 Оптические спектры. Фотолюминесценция

Физическая природа люминесценции состоит в излучательных переходах атомов или молекул из возбуждённого состояния в основное. На основе приближения Борна-Оппенгеймера внутреннюю энергию молекулы E можно представить суммой:

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

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

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.

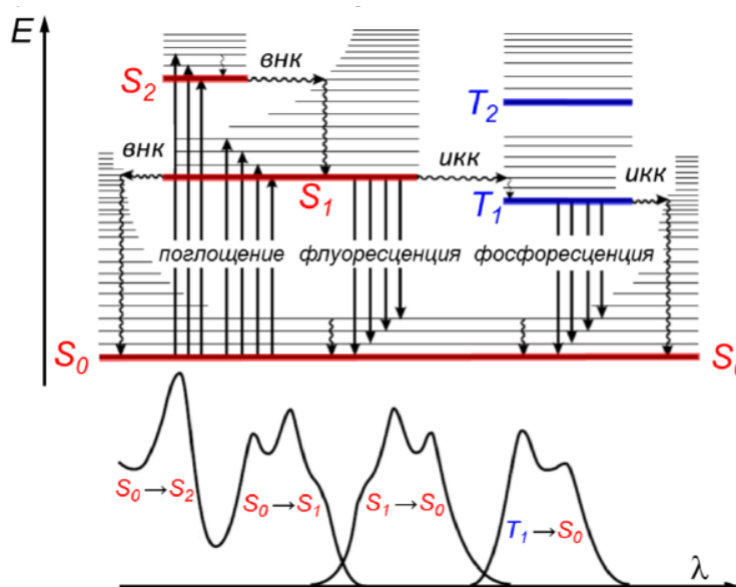


Рисунок 1 – Диаграмма Яблонского.

На этой диаграмме буквами S обозначены синглетные состояния молекулы. Суммарный спин S всех электронов молекулы в таком состоянии равен 0, мультиплетность $= 2S + 1 = 1$. Если суммарный спин молекулы $S = 1$, то мультиплетность $= 2S + 1 = 3$, и молекула находится в триплетном состоянии (T_1 , T_2 и т.д.). Это означает, что молекула может находиться в одном из трех состояний, вырожденных по энергии, и отличающихся друг от друга проекцией спина. При поглощении света молекула переходит на один из колебательных подуровней возбужденного электронного состояния. При сохранении мультиплетности возбужденное состояние будет синглетным. Если возбуждаемый электрон меняет направление спина, возбужденное состояние будет триплетным. Таким образом, одному основному состоянию соответствует набор разных возбужденных состояний — синглетных и триплетных.

Излучательный переход между двумя состояниями одинаковой мультиплетности называется **флуоресценцией**, разной мультиплетности — **фосфоресценцией**.

2.2 Основные законы флуоресценции

Закон Стокса: В многоатомных молекулах спектр испускания сдвинут относительно спектра возбуждения в длинноволновую область. Это связано с протеканием процессов релаксации с верхних подуровней и расщеплением нижнего уровня. Сдвиг между положением максимумов спектра поглощения и флуоресценции называется **стоксовым сдвигом**.

Правило Левшина: Спектры испускания и возбуждения флуоресценции, как правило, зеркально-симметричны относительно прямой, проходящей через точку их пересечения перпендикулярно оси длин волн. Оно обусловлено сходством распределения колебательных подуровней по энергиям у основного и возбужденного состояний.

Принцип Франка-Кондона: Электронный переход с излучением светового кванта можно представить вертикальной линией, соединяющей различные поверхности потенциальной энергии, причем наиболее вероятным окажется переход на тот колебательный уровень, который имеет то же значение межъядерного расстояния в точке поворота при колебаниях, поскольку вероятность обнаружить молекулу в этих точках выше.

Правило Каши: Излучение фотона (флуоресценция и фосфоресценция) происходит только с низшего возбужденного электронного состояния молекулы.

Правило Вавилова: Квантовый выход ($\phi = \frac{n_F}{n_a}$) не зависит от длины волны возбуждения, если выполняется закон Стокса, т.е. если длина волны возбуждающего света меньше длины волны флуоресценции.

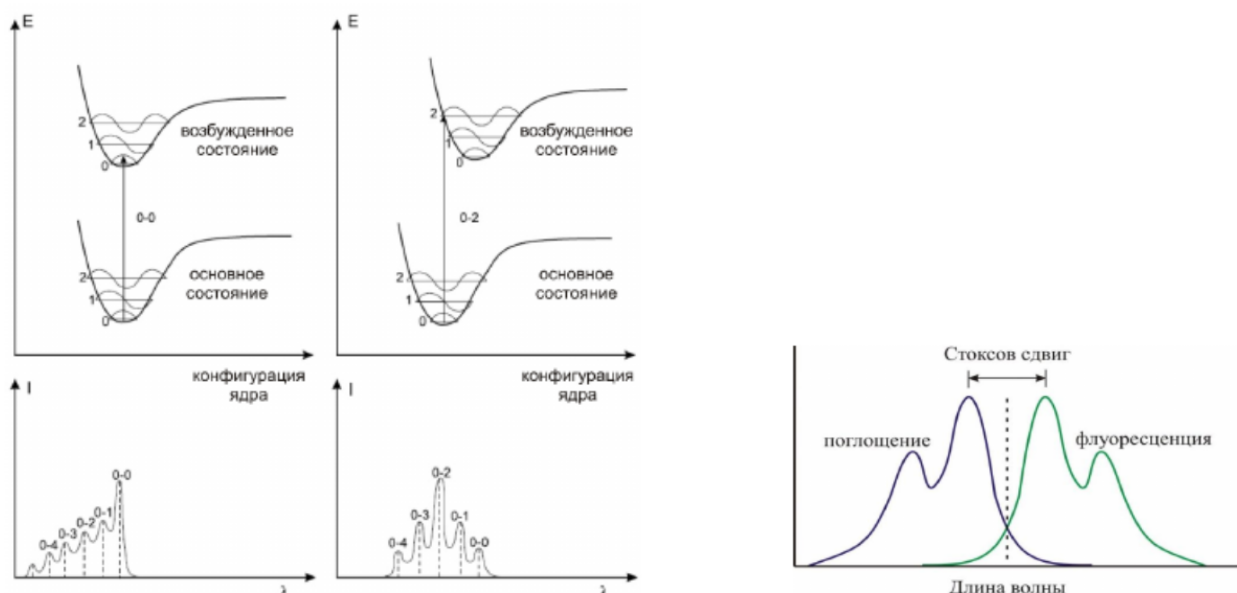


Рисунок 2 – Принцип Франка-Кондона. Иллюстрация закона Стокса и правила Левшина.

2.3 Фотометрический метод анализа концентраций веществ

Фотометрический метод анализа концентраций веществ основан на том, что каждое вещество поглощает излучение только с характерными для него длинами волн. Для истинных растворов поглощение света проявляется в ослаблении светового потока после прохождения через объект, что выражается законом Бугера-Ламберта-Бэра:

$$I = I_0 10^{-\varepsilon Cl} \approx I_0 e^{-2,3 \varepsilon Cl} \quad (3)$$

Для количественного описания способности вещества поглощать излучение обычно используются два параметра – пропускание (T) и оптическая плотность (D):

$$D = \lg \frac{I_0}{I} = -\lg T \quad (4)$$

$$D = \varepsilon Cl \quad (5)$$

Для спектров флуоресценции часто оказывается, что интенсивность флуоресценции пропорциональна концентрации лишь в ограниченном диапазоне оптических плотностей. Из-за поглощения, вследствие закона Бугера-Ламберта-Бэра ($l = 1$ см), интенсивность света в центре кюветы I меньше интенсивности света, падающего на кювету I_0 : $I = I_0 10^{-D}$. Поскольку интенсивность флуоресценции пропорциональна интенсивности падающего света, то кажущийся выход флуоресценции будет ниже, чем для бесконечно разбавленного раствора. Эта особенность называется эффектом внутреннего фильтра.

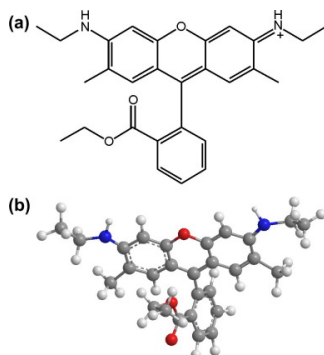


Рисунок 3 – а) Родамин 6G и б) 3D структура.

Допустим, что образец имеет значительную оптическую плотность как при длине волны возбуждения, так и при длине волны испускания: $D_{\text{возб}}$ и $D_{\text{исп}}$. Исправленная интенсивность флуоресценции при этом приблизительно равна:

$$F_{\text{испр}} = F_{\text{набл}} 10^{(D_{\text{возб}} + D_{\text{исп}})/2} \quad (6)$$

2.4 Тушение флуоресценции

Тушением называют любые процессы, приводящие к уменьшению интенсивности флуоресценции данного вещества, как например: реакции в возбужденном состоянии, перенос энергии, образование комплексов или столкновение с молекулой-гасителем. В данной работе выделяют два типа процесса тушения — динамическое и статическое, в ходе которых флуорофор возвращается в основное состояние без излучения фотона. Первое из них связано со столкновениями между флуорофором и гасителем, эта реакция описывается следующими уравнениями:



Уравнение Штерна-Фольмера:

$$\frac{F_0}{F} = 1 + k_q \tau [Q] = 1 + k_{\text{дин}} [Q] \quad (8)$$

где M^* и M — флуорофор в возбужденном и невозбужденном состоянии, Q — гаситель, w — скорость бимолекулярной реакции, k_q — бимолекулярная константа скорости тушения, F_0 , F — интенсивность флуоресценции в отсутствие и в присутствии гасителя соответственно, τ — время затухания флуоресценции в отсутствии гасителя, $[Q]$ — концентрация гасителя, $k_{\text{дин}} = k_q \tau$ — штерн-фольмеровская константа тушения.

Частота столкновений флуорофора с гасителем выражается как:

$$Z = k_0 [Q] = 4\pi R_{\Sigma} D_{\Sigma} N_A [Q] \quad (9)$$

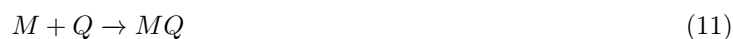
где k_0 — диффузионно-контролируемая (скорость реакции лимитируется сближением частиц в результате диффузии) бимолекулярная константа скорости, вычисленная по уравнению Смолуховского: R — радиус столкновения (обычно за него принимается сумма радиусов молекул флуорофора и гасителя), D — сумма коэффициентов диффузии флуорофора и гасителя, N_A — число Авогадро.

Из следующей связи будет легко оценивать эффективность тушения w :

$$k_q = k_0 w \quad (10)$$

В данной работе гасителями выступают ионы иода, они, как и бром увеличивают константу интеркомбинационной конверсии в триплетное состояние из-за спин-орбитального взаимодействия, возбужденного в синглетном состоянии флуорофора и галогена. Время жизни в триплетном состоянии довольно продолжительно, поэтому другие процессы успевают тушить флуорофор.

Статическое тушение происходит из-за образования комплекса MQ в основном состоянии, и при поглощении света этот комплекс медленно возвращается в исходное состояние без испускания фотона. Данная реакция описывается следующими уравнениями:



$$k_{\text{stat}} = \frac{[MQ]}{[M][Q]} \quad (12)$$

$$\frac{F_0}{F} = 1 + k_{\text{stat}} [Q] \quad (13)$$

3 Описание установки

В работе используется спектрофлуориметр Avantes и спектрофотометр Shimadzu UV-1800. Схема устройства спектрофотометра: Лампа с непрерывным спектром излучения (например, дейтериевая или

галогеновая) обеспечивает свет в ультрафиолетовом, видимом и ближнем инфракрасном диапазонах. Монохроматор выделяет из спектра источника света узкий пучок света с определенной длиной волны. Свет направляется через кювету с исследуемым образцом. Образец поглощает часть света. Детектор (например, фотоумножитель) измеряет интенсивность прошедшего через образец света.

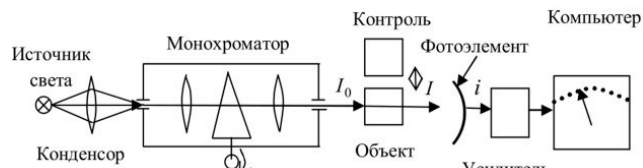


Рисунок 4 – Схема внутреннего устройства прибора.

Схема устройства флуориметра: Лазер или светодиод излучает возбуждающий свет определенной длины волны. Возбуждающий свет проходит через оптическую систему, которая фокусирует его на исследуемый образец. Свет возбуждает молекулы образца, вызывая их флуоресценцию. Флуоресцентный свет, излученный образцом, собирается и направляется в спектрометр. Спектрометр разделяет флуоресцентный свет по длинам волн. Данные от детектора обрабатываются компьютером, и строится спектр флуоресценции - зависимость интенсивности флуоресцентного света от длины волны.

4 Результаты и обсуждение

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

Для следующих опытов необходимо подготовить линейку растворов родамина с разной концентрацией ($2 \cdot 10^{-4}$, 10^{-4} , $2 \cdot 10^{-5}$, 10^{-5} , $2 \cdot 10^{-6}$ М) из стокового $2 \cdot 10^{-4}$ М раствора. Затем снимаем спектры поглощения для каждой концентрации на спектрофотометре Shimadzu UV-1800 (диапазон длин волн от 200 до 800 нм). И так же регистрируем спектр флуоресценции на спектрофотометре Avantes (время измерения - 500 мс, число усреднений - 10, источник излучения - диод(LED)).

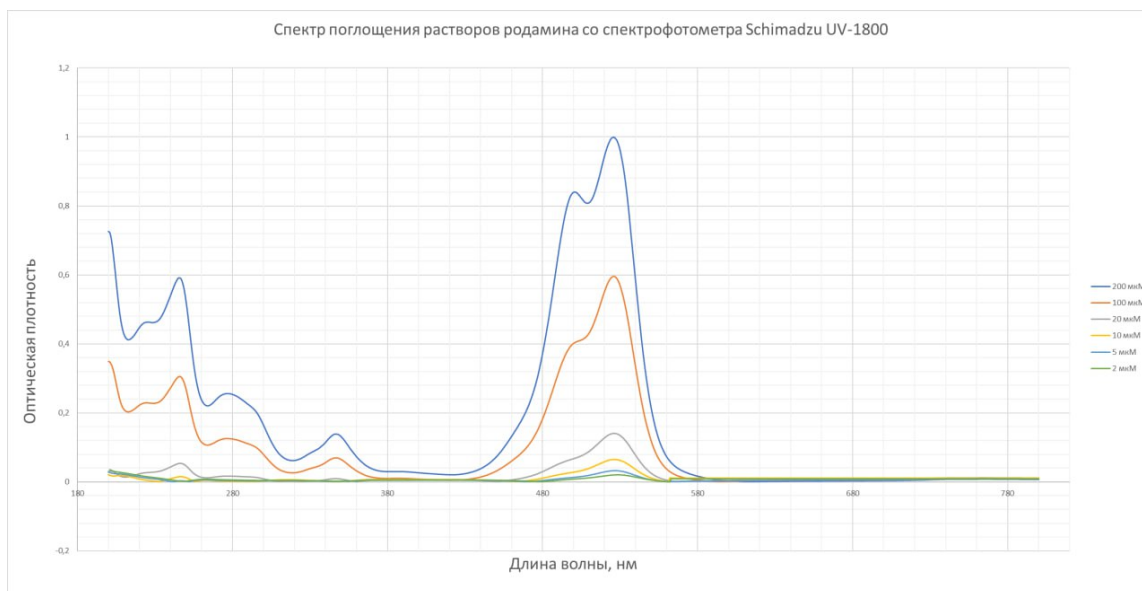


Рисунок 5 – Спектр поглощения растворов родамина со спектрофотометра Shimadzu UV-1800.

Значения оптической плотности нормировались по концентрации и ширине кюветы для каждого из спектров. Для всех концентраций максимум поглощения приходится на 529 нм (табличное значение - 535 нм). С ростом концентрации оптическая плотность растёт (для 1-2 образцов наименьших концентраций), однако можно предположить, что начиная с достаточно высокой концентрации происходит

образование димеров, из-за чего на спектре возникает дополнительный горб (3-4 образца), а у 5 образца заметен отчётливый второй пик.

Образованные димеры уменьшают эффективное количество поглощающих центров, поэтому абсолютное значение оптической плотности "димерного" пика уменьшается. Из закона Бугера-Ламберта-Бэра по второму пику по формуле (5) оценим концентрацию димеров $c = 8.2 \cdot 10^{-5} \text{ М}$. Данный эффект больше всего отражается на форме спектров для образцов 3-5 с наибольшими концентрациями.

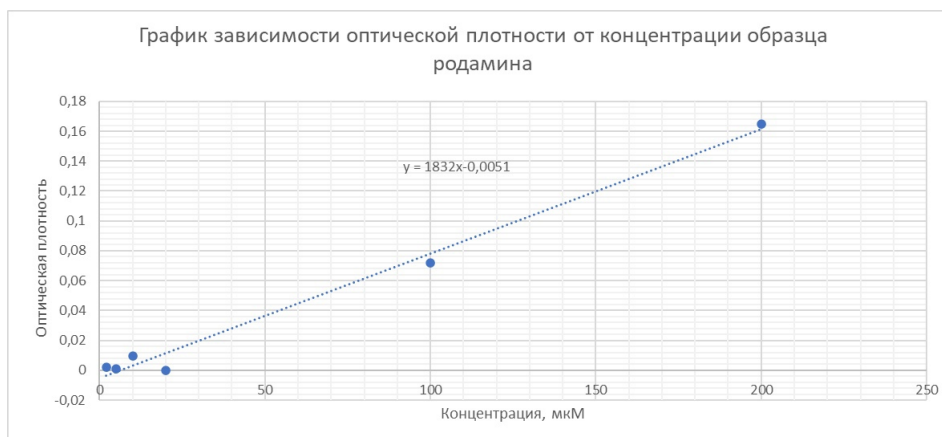


Рисунок 6 – График зависимости оптической плотности от концентрации образца родамина.

Закон Бугера-Ламберта-Бера выполняется для концентраций в нашем опыте (до $2 \cdot 10^{-4} \text{ М}$), что подтверждает линейная зависимость оптической плотности от концентрации (Рис. 6).

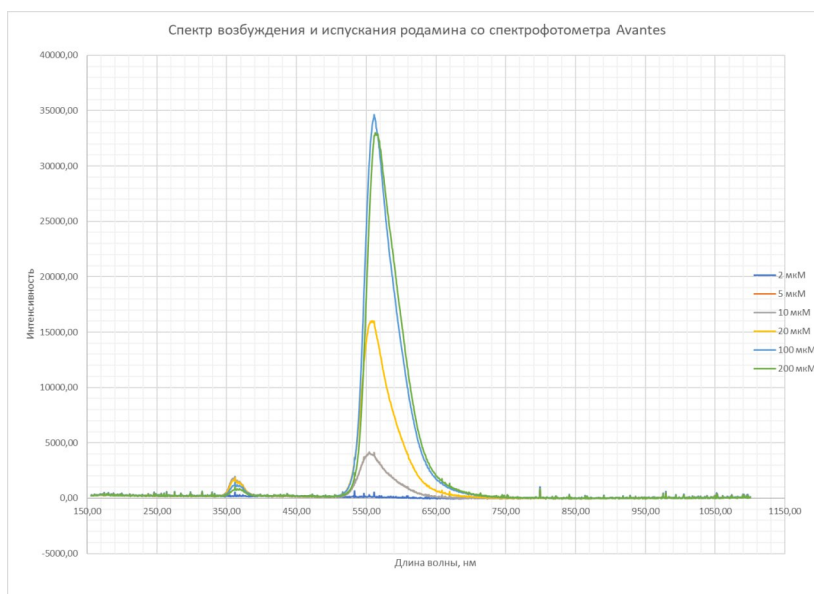


Рисунок 7 – Спектр возбуждения и испускания родамина со спектрофотометра Avantes.

Рассмотрим данные флуоресценции со спектрофотометра Avantes. На спектре (рис. 7) чётко видны первые пики в районе 365 нм, что отвечает возбуждающему излучению диода. Основной пик в среднем находится в районе 560 нм - это максимум испускания в процессе флуоресценции. Необходимо отметить, что спектр сдвинулся в более длинноволновую область относительно спектра поглощения, что объясняется законом Стокса. Видно, что интенсивность флуоресценции на высоких концентрациях не пропорциональна концентрации, что объясняется значительным образованием димеров при 200 мкМ, а также, видимо, при таких оптических плотностях становится значительным эффект внутреннего фильтра.

4.2 Исследование тушения флуоресценции родамина 6G йодид-ионами

В этой работе в качестве гасителя динамического типа используются ионы йода.

1. Проведём регистрацию спектров флуоресценции для шести растворов с различной концентрацией KI. Для этого приготовим серию растворов смесей родамина 6G в концентрации 5 мкМ и KI с концентрациями 0; 5; 10; 20; 30; 50 мМ KI. Установим время накопления (Integration time) равным 500 мс, число усреднений (Averaging) равным 10.

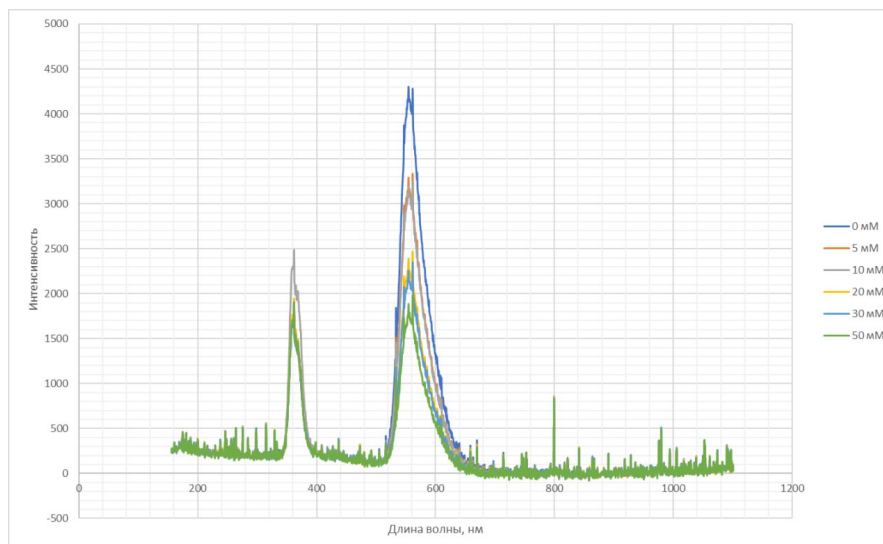


Рисунок 8 – Спектры флуоресценции раствора родамина 6G при различных концентрациях тушителя.

2. Построим зависимость интенсивности флуоресценции F и F_0/F от концентрации KI, где F_0 – интенсивность флуоресценции чистого раствора родамина, чтобы из наклона прямой оценить эффективность тушения.

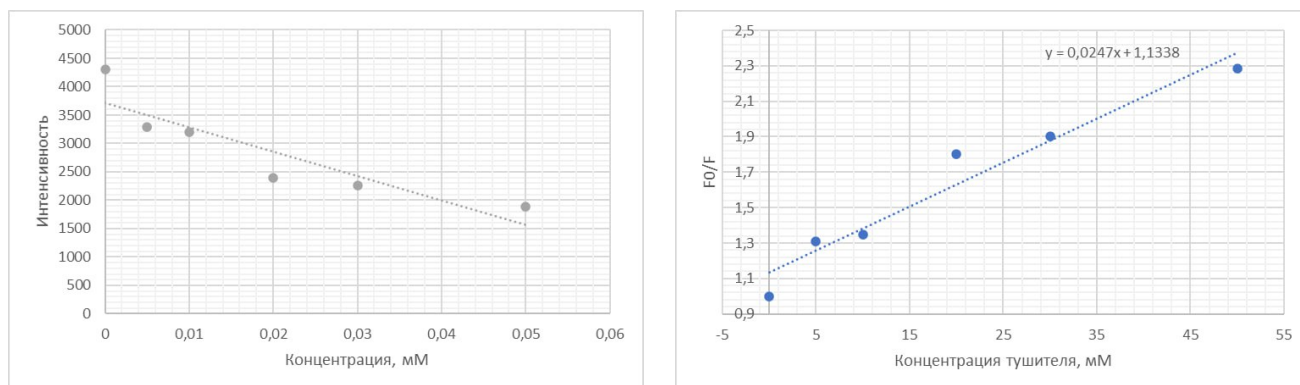


Рисунок 9 – Зависимость интенсивности флуоресценции от концентрации KI.

3. Тогда наклон графика из формулы (8): $k_{\text{дин}} = (24.75 \pm 2.95) \text{ M}^{-1}$

Приняв $k_0 = 10^{10} \frac{\text{M}^{-1}}{\text{с}^{-1}}$ для оценки сверху бимолекулярной константы тушения флуорофора для водных растворов, эффективность тушения из (9) и (10):

$$\omega = \frac{k_{\text{дин}}}{k_0 \tau_0} = 0.247 \pm 0.029$$

В эксперименте подтверждается ожидаемая зависимость интенсивности флуоресценции от концентрации тушителя.

5 Выводы

- В первой части работы зарегистрированы спектры поглощения (max 529 нм), возбуждения и испускания (max 560 нм) растворов родамина разной концентрации. Стоксов сдвиг - смещение спектра флуоресценции в длинноволновую область относительно спектра поглощения.
- Замечены следующие характерные особенности: увеличение максимума поглощения с ростом концентрации, появление дополнительного пика поглощения из-за образования димеров родамина ($c = 8.2 \cdot 10^{-5} \text{ M}$), нарушение прямой пропорциональности между интенсивностью и концентрацией - уменьшение интенсивности флуоресценции вследствие эффекта внутреннего фильтра, образования димеров.
- Для серии образцов родамина концентрации от $2 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ до $2 \cdot 10^{-6} \text{ M}$ показана применимость закона Бугера-Ламберта-Бэра.
- На практике подтверждено, что зависимость интенсивности флуоресценции от концентрации тушителя линейно убывает по закону Штерна-Фольмера. Эффективность тушителя в эксперименте $\omega = 0.247 \pm 0.029$.

6 Список литературы

1. Спектрофлуориметрический анализ: лабораторная работа / сост.: О.В. Лебедев, Е.А. Мешков, И.И. Новоселов. – М.: МФТИ, 2024 – 25 с.
2. Лакович Д. Основы флуоресцентной спектроскопии. М.: Мир 1986
3. Kiefer et al. (2014). Fluorescence spectroscopy of Rhodamine 6G: Concentration and solvent effects