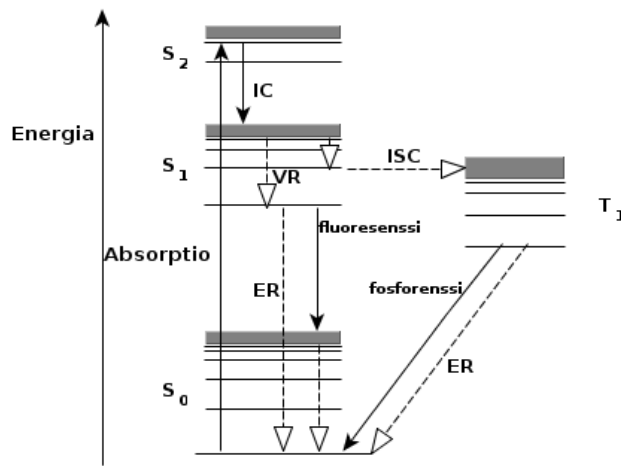


# Fluoresenssi ja fluoresenssin sammuttaminen

Timo Pekkanen

Fluoresenssi on ilmiö, jossa molekyyli absorboi fotonin ja sitten varsin nopeasti emittoi fotonin, jonka aallonpituus on joko samansuuruinen tai pidempi kun absorboitavan fotonin aallonpituus. Fluoresoivaa ainetta kutsutaan fluoroforiksi. Absorption ja emission välinen aika fluoresenssissa on tyypillisesti  $10^{-12} - 10^{-6}$  s.<sup>1</sup> Fluorofori tyypillisesti absorboi UV-säteilyä tai näkyvää valoa ja emittoi näkyvää valoa. Fluorofori voi siis hehkua pimeässä, kun se altistaan UV-säteilylle. Fluoresenssin tarkempi mekanismi voidaan esittää Jablonskin diagrammin avulla (kuva 1).



Kuva 1

(IC = internal conversion, ISC = intersystem crossing, EC = external conversion, VR = vibrational relaxation, NRR = nonradiative relaxation). Katkoviivat ovat siirtymiä, joissa ei emittoitu fotonia.

Kun fluorofori kuvassa absorboi fotonin, tapahtuu siirtymä  $S_0 \rightarrow S_2$ . Useimpien molekyylien perustila on singlettitila (happi on poikkeuksellisesti tripletti). Yleensä viritys tapahtuu tilalle  $S_1$ , mutta siirtymä voi tapahtua myös korkeammalle viritystilalle. Kuvassa  $T_1$  on itse asiassa pienenergisin viritystilalla, mutta siirtymä on epätodennäköinen, koska spektroskopian valintasääntöjen mukaan  $\Delta S = 0$ . Elektronisen siirtymien ohella tapahtuu myös virittyminen korkeammalle värähtelytilalle, koska siirtymä tapahtuu "pystysuoraan" (Frank-Condonin periaate). Luultavasti tapahtuu myös siirtymä korkeammalle rotaatiotilalle, mutta koska niiden energiat ovat suhteellisen pieniä, ne voidaan jättää

huomioimatta yksinkertaisessa tarkastelussa.

Kun molekyyli on virittynyt tilalle  $S_2$ , niin se nopeasti relaksoituu värähtelyn perustilalle (VR). Jos  $S_2$  ja  $S_1$  energiatasot ovat lähellä toisiaan, niin molekyyli voi relaksoitua tilalta  $S_2$  tilalle  $S_1$  (IC) ja edelleen värähtelyn perustilalle. Nämä pienienenergisiet siirtymät aiheutuvat molekyylien törmäyksistä ja energiaa vapautuu lämpönä, eikä fotoneita emittoitu. Kun molekyyli relaksoituu tilalta  $S_1$  tilalle  $S_0$ , niin molekyyli emittoi fotonin, jonka aallonpituus, kuten kuvasta voidaan päätellä, on pidempi kuin absorboitavan säteilyn aallonpituus. Tämä siis selittää, miksi jotkin aineet säteilevät näkyvän valon alueella, kun ne altistetaan UV-säteilylle. Molekyylien väliset törmäykset selittävät myös säteilyksettömän siirtymän(EC) tilalta  $S_1$  perustilalle.

Jos  $S_1$  tilan ja  $T_1$  tilan energiat ovat sekoittuneet, niin voi tapahtua kielletty siirtymä  $S_1 \rightarrow T_1$ . Kun molekyyli silloin relaksoituu  $T_1$ :n perusvärähdystilalle, niin ei enää ole sallittuja siirtymiä alemmille energiasoilte. Tällöin viritystila voi kestää jopa tunteja. Todellisuudessa molekyyli relaksoituu pikkuhiljaa perustilalle ei-sallitun  $T_1 \rightarrow S_0$  -siirtymän kautta. Tällöin vapautuu fotoni ja tätä ilmiötä kutsutaan fosforenssiksi.

Yksinkertaiselle fluoroforille on suhteellisen helppo laskea kvanttisaanto eli molekyylin säteilemien fotonien suhde molekyylin absorboimien fotonien määrään. Oletetaan systeemi, jossa tapahtuu ensin viritys  $S_0 \rightarrow S_x$  ja vähän myöhemmin fluoresenssi  $S_1 \rightarrow S_0$ . Tämän lisäksi voi tapahtua myös säteilyksettömiä siirtymiä(EC, IC, ISC). Oletetaan vielä, että muita siirtymiä ei ole ja kaikkien siirtymien nopeus on ensimmäistä kertalukua. Silloin  $S_1$ -tason populaation aikaderivaatta on

$$\frac{dn_{S_1}}{dt} = k_A n_{S_0} - (k_F + k_{NRR}) n_{S_1}, \quad (1)$$

missä  $n_{S_1}$  on  $S_1$ -tilan populaatio ( $1/cm^3$ ),  $k_A$  on absorption nopeusvakio,  $k_F$  on fluoresenssin nopeusvakio,  $k_{NRR}$  on säteilyksettömien siirtymien nopeusvakio ja  $n_{S_1}$  on  $S_1$ -tilan populaatio.  $k_{NRR} = k_{EC} + k_{IC} + k_{ISC}$ . Kun ainetta säteilytetään vakioteholla, niin  $S_1$ -tila saavuttaa vakioipitoisuuden, eli yllä oleva derivaatta menee nolnaan, jolloin

$$n_{S_1} = \frac{k_A n_{S_0}}{k_F + k_{NRR}}. \quad (2)$$

Fotonin(p) absorptio- ja fluoresenssinopeudet tilavuudessa  $V$  tiedetään myös:

$$\Phi_{A,p} = k_A n_{S_0} V \quad \text{ja} \quad \Phi_{F,p} = k_F n_{S_1} V$$

Nyt saadaan kvanttisaanto:

$$\Phi_F = \frac{\Phi_{F,p}}{\Phi_{A,p}} = \frac{k_F n_{S_1} V}{k_A n_{S_0} V} = \frac{k_F k_A n_{S_0}}{k_A n_{S_0} (k_F + k_{NRR})} = \frac{k_F}{k_F + k_{NRR}} \quad (3)$$

Fluoresenssin sammuttamiseen on kaksi pääkeinoa. Dynaaminen ja staattinen sammutus. Dynaamisessa sammuttamisessa liukseen lisätään ainetta, jonka törmäykset virittyneen fluoroforin kanssa aiheuttavat säteilyksettömän siirtymän takaisin perustilalle. Konsentraation pitää kumminkin olla riittävän suuri, jotta sammuttaja-aineen todennäköisyys törmätä fluoroforiin sen viritystilan

elinaikana ei olisi liian pieni. Silloin  $k_{EC} = k_s c_s$  (s = sammutin, c = konsentraatio). Silloin yhtälö(3) saadaan muotoon:

$$\Phi_s = \frac{k_F}{k_F + k_s c_s + k_{IC} + k_{ISC}} \quad (4)$$

Ilman sammuttajaan kvanttisuhde on (ei tapahdu EC):

$$\Phi_F = \frac{k_F}{k_F + k_{IC} + k_{ISC}} \quad (5)$$

Suhde  $\Phi_F/\Phi_s$  on siten

$$\frac{\frac{k_F}{k_F + k_{IC} + k_{ISC}}}{\frac{k_F}{k_F + k_s c_s + k_{IC} + k_{ISC}}} = \frac{k_s c_s}{k_F + k_{IC} + k_{ISC}} + 1 = 1 + \tau k_s c_s = \frac{I_f}{I_s} = \frac{A_f}{A_s}, \quad (6)$$

missä  $\tau k_s$  on niin sanottu Sternerin ja Volmerin vakio. Tämä on siksi kätevä tulos, koska Sternerin ja Volmerin vakio voidaan ratkaista suoran sovitukselta.

Staattinen sammutus vuorostaan perustuu siihen, että sammuttaja-aine ja fluorofoori muodostavat perustiloillaan pysyvän kompleksin. Tässä siis yksinkertaisesti vähennetään liuoksessa olevan fluoroforin määrää. Kaava(6) pätee myös staattiselle sammutukselle ja Sternerin ja Volmerin vakio  $\tau k_s$  on tällöin kompleksin muodostumisvakio.

Yksi hyvin tunnettu fluorofoori on kiniini, jota löytyy muun muassa soodajuomasta. Kun kiniini altistetaan UV-säteilylle, se hehkuu sinisenä.<sup>2</sup> Kiniini absorboi säteilyä alueella 345 nm ja emittoi säteilyä alueella 450 nm.<sup>3</sup> Monista muista fluorofooreista poiketen, kiniinin fluoresenssia ei voida sammuttaa hapen avulla.<sup>2</sup> Halogenidi-ionit (esim.  $Cl^-$ ) kumminkin pystyvät sammuttamaan kiniinin fluoresenssin tehokkaasti. Kokeellisesti määritetty Sternerin ja Volmerin vakio kiniinille, kun sammuttimen käytetään  $Cl^-$ -ioneita, on noin  $133.0 M^{-1}$ .<sup>3</sup>

## Viitteet

- 1 P. W. Atkins and J. de Paula, *Atkins' Physical Chemistry*, Oxford University Press, Oxford, 9th edn, 2010, pp. 505–506, 815–823.
- 2 L. Sacksteder, R. M. Ballew, E. A. Brown, J. N. Demas, D. Nesselrodt and B. A. DeGraff, *Journal of Chemical Education*, 1990, **67**, 1065.
- 3 O. S. Wolfbeis and E. Urbano, *Analytical Chemistry*, 1983, **55**, 1904–1906.