

2. Szerves anyagok oldatának fotolumineszcencia színekének meghatározása

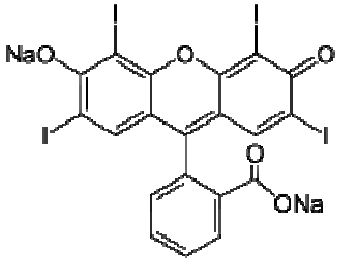
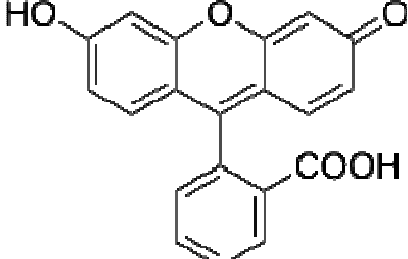
1. Elméleti háttér

- jelenség kvantitatív leírása

Fotolumineszcencia alatt azt a jelenséget értjük, amikor az anyag ultraibolya vagy látható fénysugárzás hatására gerjesztődik, majd az elnyelt energia fény formájában, az elnyelttel azonos vagy nagyobb hullámhosszúságú (kisebb energiájú) fényként sugározódik ki. A fotolumineszcencia molekulák, atomok és ionok esetében is megfigyelhető.

A gerjesztett állapot élettartama leggyakrabban 10^{-9} - 10^{-6} s, vagyis az elektron a gerjesztést követően ns- μ s időtartam elteltével visszakerül az alacsonyabb energiaszintre. Ezt a fajta fotolumineszcenciát **fluoreszcenciának** nevezzük. Amennyiben a fénykibocsátás a μ s-tól akár sok 100 másodpercen keresztül, csökkenő intenzitással folytatódik, akkor ezt a jelenséget **foszforeszcenciának** nevezzük. A lumineszkáló anyagok neve **fluorofor**.

Mivel a különböző fluorofor anyagok besugárzást követően eltérő spektrális tartományú sugárzást bocsátanak ki, a fluoreszcencia spektroszkópia szelektív analitikai módszer, kvalitatív és kvantitatív meghatározásra alkalmas. Azok a molekulák mutatnak jó hatásfokú fotofluoreszcenciát, amelyek aromás jellegűek vagy többszörösen konjugált kettős kötést tartalmaznak, továbbá merev, sík szerkezetűek.

	
<p>Eritrozín (E127) (más néven FD&C Red 3) egy fluoreszcens, meggyaszínű, szén alapú fluorin, melyet élelmiszerek, festékek színének módosítására, fogászati és radiológiai célokra, valamint különböző biológiai sejtfestésekre használnak. Erős fény hatására elbomlik.</p>	<p>Fluorescein is a synthetic organic compound available as a dark orange/red powder soluble in water and alcohol. It is widely used as a fluorescent tracer for many applications. Fluorescein is a fluorophore commonly used in microscopy, in a type of dye laser as the gain medium, in forensics and serology to detect latent blood stains, and in dye tracing.</p>

A fluoreszcenciás fénysugárzás intenzitása arányos a besugárzó fény intenzitásával, a fényelnyelés „erősségével” és az elnyelő anyag koncentrációjával. Ezt a következő kifejezés írja le:

$$I = k \cdot I_0 \cdot \varepsilon \cdot c$$

ahol:

- c : a minta koncentrációja,
- ε : az elnyelés (besugárzás) hullámhosszán érvényes moláris abszorpciós koefficiens,
- I_0 : a besugárzó monokromatikus fény intenzitása,

-k: a küvettára és a műszerre jellemző állandó és a vizsgálandó vegyület ún. kvantumhatásfokát összegző állandó.

A koncentrációval való lineáris függés csak igen híg oldatokban, közelítőleg a 10^{-4} - 10^{-8} mól/dm³ tartományban teljesül. A fluoreszcencia intenzitását gyakran befolyásolja az oldat pH-ja és az oldószer anyagi minősége is. Egy spektroluminométerrel a következő méréseket lehet elvégezni:

Gerjesztési színekép: az emissziós színekép egy adott hullámhosszán mért sugárzás hullámhossz szerinti intenzitás eloszlása. Itt az emittált fény hullámhossza állandó, és a gerjesztő fény hullámhosszát változtatjuk.

Emissziós színekép: egy adott hullámhossznál történő gerjesztést követő emittált fény hullámhossz szerinti intenzitás eloszlása. Tehát itt a gerjesztési fény hullámhossza állandó, az emittált fény hullámhosszát változtatjuk.

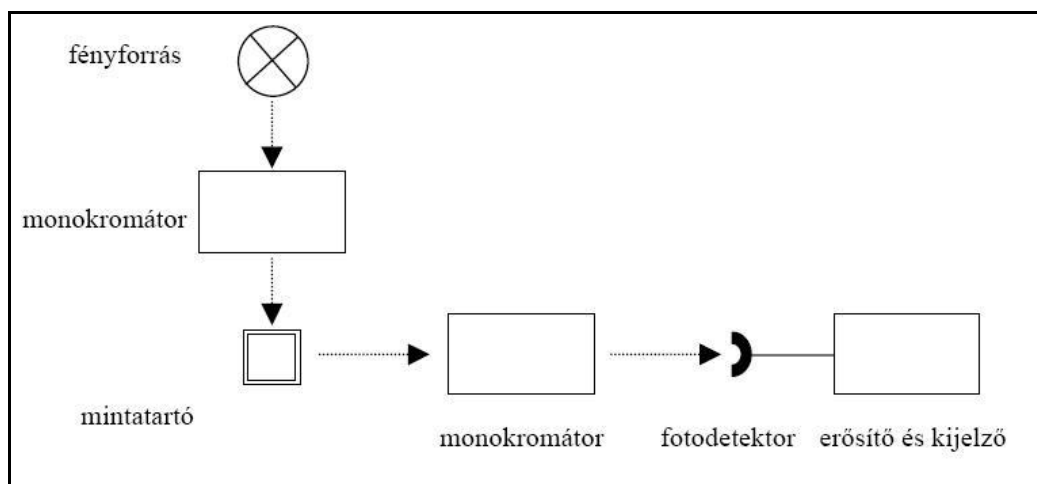
A *gerjesztési-emissziós színekép* mérését *szinkrongerjesztésnek* nevezzük azt a mérési módszert, amikor meghatározott különbséget tartva a gerjesztő fény és a megfigyelt fény hullámhossza között, szinkron pásztázzuk a minta abszorpciós és emissziós spektrum tartományát.

A fotolumineszcencia spektroszkópiai módszer előnyei:

- nagy érzékenység: a besugárzó fény növelésével a kimutatási hatás növelhető
- szelektivitás: kevesebb vegyület mutat fotolumineszcenciát, mint fényelnyelést
- különböző fluorszekáló vegyület egymás mellett is meghatározható
- a kimutatási határ nagyon kicsi: akár 1 ppt alatti is lehet jó hatásfokú vegyületek esetében

2. Mérőberendezés

Egy spektroluminométer általános felépítését mutatja a 2.1. ábra.

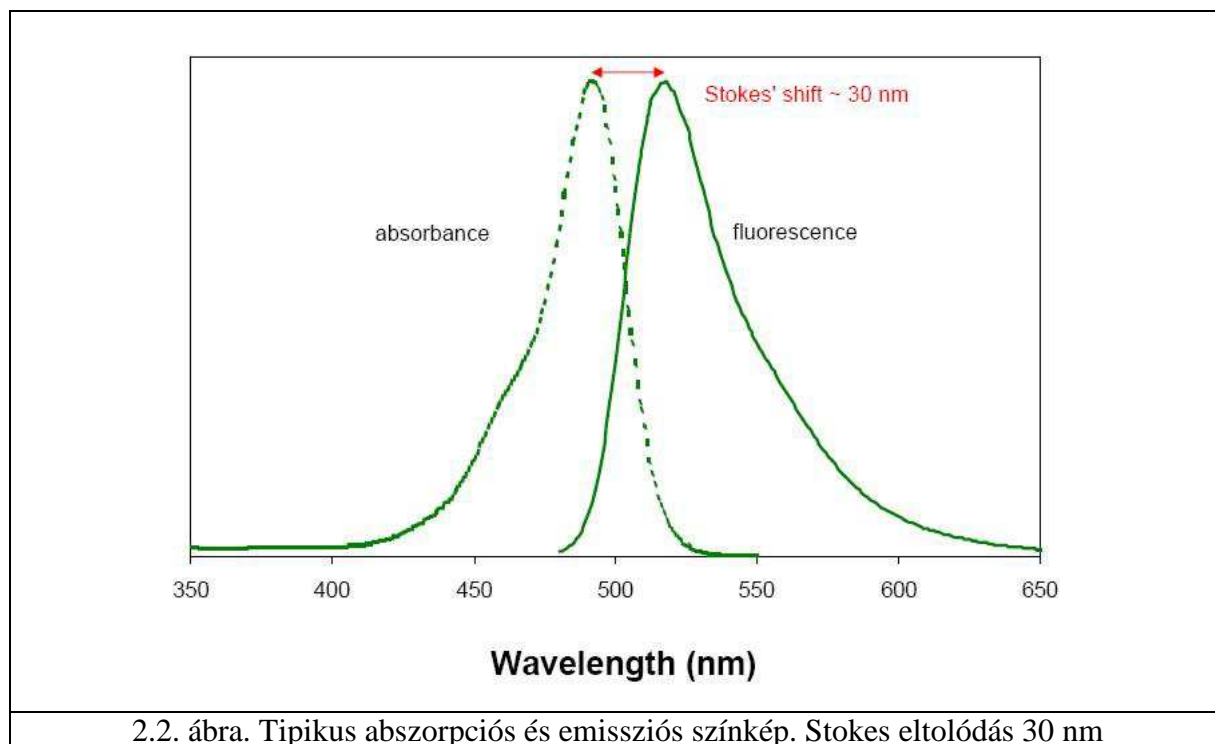


2.1. ábra. A spektroluminométer vázlatos felépítése

A korszerű spektroluminométerekben két monokromátor van, az egyik a gerjesztő, a másik pedig a megfigyelő oldalon, ezzel meg lehet határozni mind a **gerjesztési**, mind az **emissziós** (fluoreszcencia, foszforeszcencia) **színeképet**, valamint fel lehet venni a **gerjesztési-emissziós színeképet**.

A gerjesztést és a detektálást végző optikai elemek egymással szöget (leggyakrabban derékszöget) zárnak be. Ez az elrendezés biztosítja leginkább, hogy a gerjesztő fényvel azonos hullámhosszon történő megfigyelés esetén a szórt fény minél kevésbé zavarjon. A lumineszcencia fény

érzékelésére alapozódó technika detektorai (fotocellák, diódák) ma már nagyon nagy érzékenységek lehetnek. Ezért kell különös gondot fordítani arra, hogy a zavaró fények (fényszóródás az oldat molekuláin, a berendezés belső elemein, stb.) minél kisebb mértékben jussanak a detektorba.



A gyakorlaton használt műszer egy Perkin Elmer LS 50B típusú korszerű, számítógép vezérelt spektroluminométer, amely képes fluoreszcencia és foszforeszcencia mérésére is. A műszerben a gerjesztést egy 20 kW impulzus energiájú xenon villanólámpa biztosítja. Az impulzusok időtartama 10 μ s.

A fényforrásból származó fény először egy Monk-Gillieson típusú monokromátoron halad át, ami 200-800 nm hullámhossztartományban bocsát ki monokromatikus gerjesztő fényt. A lumineszcencia fényt egy hasonló felépítésű monokromátor bontja fel, aminek spektrális tartománya 200-900 nm terjedelmű. Az emittált fény intenzitását egy fotoelektron sokszorozó érzékeli. Annak elektromos jelét egy számítógép dolgozza fel.



2.3. ábra. Egy Perkin Elmer LS 50B típusú spektroluminométer

3. A Perkin Elmer LS50B spektroluminométer kezelése

Perkin Elmer LS50B fluoriméter üzembe helyezése

- 1 Fluoriméter bekapcsolása
- 2 Számítógép bekapcsolása (Norton Commander program elindítása: C:\>nc (Enter)):
3. Be kell másolni E meghajtóról a C meghajtóra a **benshare.scn** fület.
E:\>FLDM\APPS> benshare.scn → C:\>FLDM\ APPS> benshare.scn
Alt F1 a panelek közötti kapcsoláshoz. Mindkét panelen a megfelelő könyvtár legyen nyitva.
4. A mérésvezérlő program indítása C-ről: C:\>fldm.bat

Perkin Elmer LS50B fluoriméter működése és kezelése

A berendezés fényforrása egy 10 μ s időtartamú fényimpulzust szolgáltató Xenon villanólámpa. A berendezéssel lehetőség van un. „**folytonos**” **színeképfelvételre** (angol terminológiával: steady-state, amikor nem alkalmazunk „időbontást” a mérés során), de lehetőség van a mikroszekundumos, milliszekundumos időtartományon az **emittált fény időbeli lecsengés mérésére** is (lecsengés mérése, time-resolved measurement).

Hullámhossz beállítás. A villanólámpa, spektrálisan bontatlan (UV és VIS tartományokon egyformán világító) fényéből a gerjesztési monokromátorral választjuk ki a gerjesztő fény hullámhosszát (λ_g). Az emissziós színeképet, az emissziós monokromátor kívánt spektrális tartományon történő (programozott) pásztázásával vesszük fel. A monokromátorok hullámhossz szerinti „beállítását” az optikai rácsaik léptető motorral történő mozgatásával érjük el. A motorok „léptetését” végzi a számítógép programja. A színekép mérés „időpontjának” beállítása. A rövid időtartamú (10 μ s) fényfelvillanást követően lehet beállítani annak az időtartamát, hogy mikor kezdődjön a mérés (késleltetési idő – delay time - τ_d)

4. Minta (vizsgálandó oldat) előkészítés

- fizikai előkészítés (a gyakorlatok előtt külön foglalkozáson)
- kémiai előkészítés (a gyakorlatok előtt külön foglalkozáson)

5. Mérési feladatok

(Az adatforgalmat célszerű pendrive-on bonyolítani)

Oldott szerves anyag emissziós színeképek meghatározása "folytonos" spektroluminométerrel

1. Kapcsolja be a spektroluminométert! Helyezze üzembe a mérőberendezést!
2. Állítsa be a megfelelő gerjesztő hullámhosszat, amely hullámhosszon alacsony lesz az extinkció ($\epsilon(\lambda_g) \cdot c \cdot \Delta d < 0,5$)! Alkalmazzon a mérés során merőleges gerjesztési-megfigyelési geometriát és legyen a gerjesztő nyaláb, valamint a megfigyelt térrész is keskeny! Mérje meg („vegye föl számítógéppel”) a hasáb küvettába töltött oldatok fotolumineszcencia sugárzásának intenzitás-hullámhossz függvényét! Tárolja el a mért spektrumokat (adjon nekik egyértelmű file nevet) és konvertálja a kívánt (ASCII vagy Excel) formátumba! Vegye át pendrive-ra!
3. Állítson be olyan gerjesztő hullámhosszat, amely hullámhosszon nagy lesz az extinkció ($\epsilon(\lambda_g) \cdot c \cdot \Delta d > 0,5$) a mintából jövő sugárzás intenzitás-hullámhossz eloszlás függvényét! Alkalmazzon a mérés során merőleges gerjesztési-megfigyelési geometriát! Mérje meg („vegye föl számítógéppel”) a hasáb küvettába töltött oldatok fotolumineszcencia sugárzásának intenzitás-

hullámhossz függvényét! Tárolja el a mért spektrumokat (adjon neki egyértelmű file nevet) és konvertálja a kívánt (ASCII vagy Excel) formátumba! Vegye át pendrive-ra!

4. Mérje meg „szilárd oldat esetében” a fotolumineszcencia színeképet! Alkalmazzon a mérés során merőleges gerjesztési-megfigyelési geometriát, de a gerjesztés és a megfigyelés is essen a minta ugyanazon felületére!

Oldott szerves anyag gerjesztési színeképek meghatározása "folytonos" spektroluminométerrel

1. Vegye fel adott megfigyelési hullámhossz mellett, alacsony extinkciójú ($\epsilon(\lambda_g) \cdot c \cdot \Delta d < 0,5$), hasábküvettában levő oldatból jövő sugárzás esetében a gerjesztési színeképet! Alkalmazzon a mérés során merőleges gerjesztési-megfigyelési geometriát és legyen a gerjesztő nyaláb, valamint a megfigyelt térrész is keskeny!
2. Vegye fel adott megfigyelési hullámhossz mellett, nagy extinkciójú oldat esetében ($\epsilon(\lambda_g) \cdot c \cdot \Delta d > 0,5$), hasábküvettában levő oldatból jövő sugárzás gerjesztési színeképet! Alkalmazzon a mérés során merőleges gerjesztési-megfigyelési geometriát és a gerjesztés és a megfigyelés is essen a minta ugyanazon felületére!
3. Vesse össze a mért gerjesztési színeképek eloszlását az abszorpciós színeképek eloszlásával! Ábrázolja ezeket egy rajzon!

6. Kiértékelés

1. Számolja ki a mért színeképből a technikai színeképet a reabszorpciót figyelembe vevő összefüggés felhasználásával! Ábrázolja ezeket a színeképeket!
2. Számolja ki a technikai színeképből a valódi színeképet a készülék átviteli függvényével történő korrekció felhasználásával! Ábrázolja a kapott színeképet!
3. A valódi energia (vagy fotonszám)–hullámhossz függvényből számolja ki az energia–hullámszám, $E(\nu)$ és az energia–frekvencia $E(\nu)$ függvényeket, valamint számolja ki a normált eloszlásfüggvényt!
4. Felhasználva az oldott anyag moláris dekadikus extinkció koefficiensének frekvencia függvényét, a Strikler–Berg összefüggés alapján számolja ki a teljes átmeneti valószínűséget (k_e) és a sugárzásos élettartamot (τ_0)!

7. Alkalmazási területek

Elméleti megfontolások alapján azok a molekulák mutatnak intenzív fluoreszcenciát, amelyek aromás jellegűek vagy többszörösen konjugált kettős kötést tartalmaznak, továbbá merev, sík szerkezetűek (pl. naftalin, antracén, fenantrén). A fluoreszcencia spektrofotometriát különösen aromás szerves vegyületek (pl. növényvédőszer-maradványok, egyes szénhidrogének, policiklusos aromás szénhidrogének stb.) kimutatására és mérésére használják környezeti minták elemzése során. Éppen ezért hasonló anyagok folyadékkromatográfiás analízisekor is használatosak fluorimetriás detektorok.

8. Interneten elérhető leírások

1	Fluorescence Spectroscopy http://hu.wikipedia.org/wiki/Műszeres_analitikai_módszerek
2	Jablonski diagram http://en.wikipedia.org/wiki/Jablonski_diagram
3	Fluorescence Spectroscopy http://las.perkinelmer.com/Catalog/CategoryPage.htm?CategoryID=Fluorescence+Spectroscopy

	Műszeres analitikai kémiai laboratóriumi gyakorlatok (Galbács G.–Galbács Z.–Sipos P) http://www.sci.u-szeged.hu/inorg/fls.pdf
	Analitikai gyakorlatok http://ttkhok.elte.hu/~sedit/anal/
	Vízanalitika http://w3.mkk.szie.hu/dep/chem/targyl/vizanal/9_ea.pdf

Kérdések önálló felkészüléshez

1. Mit értünk a fotolumineszcencia jelensége alatt?
2. Mi a fluoreszcencia és foszforeszcencia közötti különbség?
3. Mi biztosítja a fluoreszcencia spektroszkópia módszerének nagy szelektivitását és nagy érzékenységét?
4. Mi a fluoreszcencia spektroszkópia tipikus mérési koncentráció tartománya?
5. Milyen képlettel írható le a fluoreszcenciás intenzitás koncentrációfüggése a lineáris tartományban?
6. Szélesebb koncentrációtartományban milyen alakú kalibrációs görbe jellemző a fluoreszcenciás mérésekre és mi ennek az oka?
7. Általában milyen szerkezetű molekulák mutatnak intenzív fluoreszcenciát ?