

# Keemiliste ühendite tuvastamine lahuses fluorestsentsi kaudu

Valter Kiisk

Viimati redigeeritud: 2. oktoober 2019. a.

Töö eesmärk.....	1
Tööülesanne.....	1
Töövahendid.....	1
1. Sissejuhatus.....	1
2. Proovid.....	3
3. Töö käik.....	3
4. Protokoll vormistamine.....	3

## Töö eesmärk

Fluorestsentsi nähtusega ja seda iseloomustavate kiirguskarakteristikutega tutvumine; kogemuse omandamine lahuste fluorestsentsi mõõtmiseks kaasaegse spektrofluorimeetriga; analüütilise spektroskoopia võimalustega tutvumine fluorestsentsi näitel.

## Tööülesanne

Mitmesuguste orgaaniliste lisandite tuvastamine ja nende sisalduse kvantitatiivne hindamine vesilahuses fluorestsentsi mõõtmise teel, fluorestsentsi kvantsaagise määramine võrdlusmeetodil.

## Töövahendid

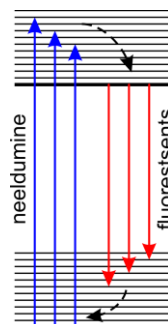
Spektrofluorimeeter FluoroMax-4P, küvetid värvainete vesilahustega.

## 1. Sissejuhatus

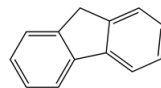
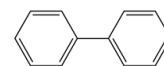
Luminesentsentsiks nimetatakse sellist kiirguse emissiooni ainst, mis ei ole soojusliku päritoluga, st ületab aine soojuskiirgust antud temperatuuril. Selline kiirgus järelkult saabki tekkida vaid mingit laadi *mittesoojusliku* energia arvel, mis — vastandina kuumutamisele — ergutab spetsiifiliselt vaid teatud seisundeid ja protsesse aines. Kõige tavalisem luminesentsiliik on fotoluminesents, mis tekib aine optilisel kiiritamisel (harilikult UV kiirgusega). Pärast ergastamise peatamist luminesents ei lakka hetkeliselt, sest aine on endiselt ergastatud seisundis. Täheldatav järelhelendus on reeglina siiski väga lühikese kestusega, sageli nanosekundite diapsoonis, ja seega praktiliselt hetkeline. Sellist laadi luminesentsi nimetatakse fluorestsentsiks.

Fluorestsentsi võivad anda mitmesugused aatomid ja molekulid, paiknegu nad siis gaasilises faasis, lahuses või tahkes maatriksis. Praktilistes rakendustes (luminesentslambid, valgusdiodid, plasmakuvarid, valgusvõimendid, laserid jms) on oluline roll mitmesugustel luminesentsmaterjalidel, mis põhinevad harilikult lisanditega aktiveeritud anorgaanilistel tahkistel (näiteks  $Y_2O_3:Eu$ , mis tekitab punast kiirguskomponenti luminesentslambis, või YAG:Ce, mis annab kollast kiirguskomponenti valgetes LED-lampides). Seevastu analüütilise spektroskoopia jaoks (põhiliselt keemia ja bioloogia rakendused, aga ka keskkonnauuringud) on oluline eelkõige vedelas keskkonnas (vesi või mõni muu lahusti) lahustunud molekulide detekteerimine neeldumise või fluorestsentsi kaudu.

Mitmesugused orgaanilised värvained on tuntud kui suure efektiivsusega kromofoorid ja luminofoorid lahustes ja polümeermaatriksites. Nende neeldumis-, kiirgus- ja ergastusspektrid sisaldavad enamasti ühte (vahel ka mitut) väga intensiivset ja laia spektraalriba. Kõige primitiivsem energiataasemete skeem molekuli spektraalomaduste kirjeldamiseks on kujutatud kõrvaltoodud joonisel, kus on näidatud põhi- ja ergastatud elektronseisund koos kaasnevate võnkenivoodega. Tulenevalt elektron-võnkeseisundite omavahelisest interaktsioonist toimub kõige efektiivsem valguse neeldumine molekuli põhiseisundist ergastatud elektronseisundi kõrgematele võnketasemetele, millele järgneb kiire relaksatsioon madalaimatele võnkesisunditele. Sõltuvalt molekuli ehitusest võib nüüd järgneda footoni emissioon, kui molekul relakseerub tagasi põhielektronseisundisse. See siire toimub eelistatult jällegi kõrgematele võnketasemetele. Kirjeldatud mudel ennustab ühte laia neeldumisriba ja ühte samalaadset kiirgusriba, mis on neeldumisribaga võrreldes nihutatud suuremate lainepikkustele (Stokes'i seadus). Vahepealse mittekiirgusliku relaksatsiooni tõttu molekul „unustab ära“ ergastava kiirguse lainepikkuse ning kiirgusspekter sellest enam ei sõltu. Mõningatel molekulidel võivad spektris eristuda ka individuaalsed vibroonsed üleminekud, andes molekulile iseloomulikuma spektraalse „sõrmejälje“. Kõrgema energiaga elektronseisundid võivad tekitada täiendavaid neeldumisribasid UV piirkonnas.

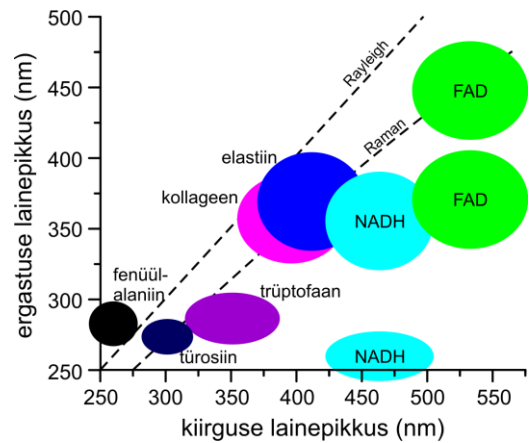
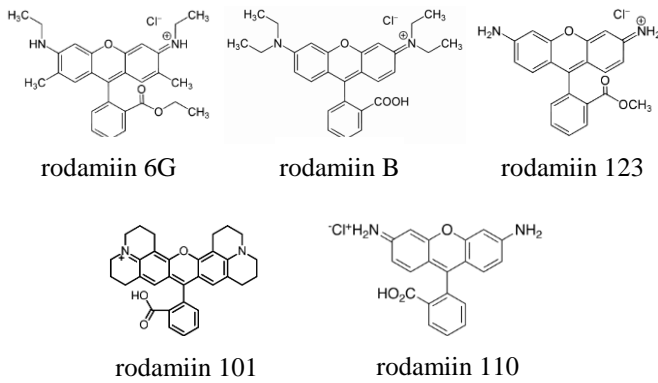


Primaarne fluorestsentsi efektiivsus/tugevust karakteriseeriv kvantiteet on footoni kiirgamise tõenäosus (pärast seda, kui molekul on ergastunud). Seda nimetatakse fluorestsentsi kvantsaagiseks ( $\eta$ ). See sõltub nii molekuli ehitusest, temperatuurist kui ka ümbruskonnast. Jäikadel molekulidel on fluorestsentsi kvantsaagis reeglina suurem, sest selliseid molekule on raskem panna võnkuma. Näiteks:

fluoreen,  $\eta = 1,0$ bifenüül,  $\eta = 0,2$ 

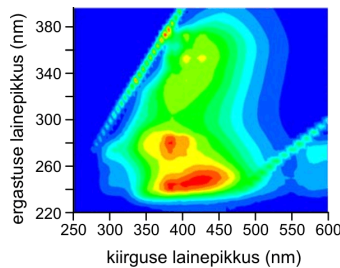
Kvantsaagist mõjutab/vähendab ka raskemate elementide sisaldus molekuli struktuuris või ümbrisevas keskkonnas, pörkeinteraktsioon fluorestsentsi kustutavate molekulidega (Stern-Volmeri seadus), keskkonna pH tase, jm.

Mitmed värvained esinevad seeriatena (rodamiin, kumariin jpt), kus spektraalriba on seeria lõikes timmitav väikeste muudatustega orgaanilise molekuli struktuuris. Näiteks rodamiini seeria mõned esindajad on järgmised:



Oma intensiivse fluorestsentsi ja selle spektraalomaduste tõttu on värvained rakendust leidnud timmitava lainepikkusega värvilasereis, fluorestsentsmarkeritena ja valguse konverteeritena. Orgaaniliste luminofooride peamiseks probleemiks rakendustes on nende vähene fotostabiilsus: kestev intensiivne kiiritamine kutsub esile fotokeemilised muutused (nt molekulide lagunemise), mille tulemusel aine fluorestsentsomadused degradeeruvad.

Intensiivne fluorestsents on kasulik ka analüütilise spektroskoopia vaatevinklist, seda enam et fluorestsentsi mõõtmine on potentsiaalselt hulga tundlikum võrreldes neeldumisega. Paraku orgaanilistel molekulidel on reeglina laiad, mit-spetsiifilised neeldumis- ja kiirgusribad, mille tõttu vastavate analüütide eristamine proovis on raskendatud. Samas, kui kahel ainel on sarnased kiirgusspektrid, võivad neil olla vähemalt mõnevõrra erinevad neeldumisribad, või kui neeldumisribad kattuvad, võivad selgemalt eristuda kiirgusspektrid. Selle tõttu mõningat perspektiivi pakub fluorestsentsi ergastus-kiirgusmaatriksi ehk totaalspektri mõõtmine. Fotoluminestsentsil on spektraalses mõttes kaks koordinaati (vabadusastet): ergastava kiirguse lainepikkus  $\lambda_{\text{erg}}$  ja detekteeritava kiirguse lainepikkus  $\lambda_{\text{det}}$ . Fluorestsentsi ergastusspekter (st sõltuvus ergastava kiirguse lainepikkusest) suuresti järgib neeldumisspektrit. Totaalspekter kaardistabki süstemaatiliselt fluorestsentsi tugevust sõltuvana mõlemast spektraalkoordinaadist ja seeläbi kombineerib nii neeldumis- kui ka kiirgusspektris jälgitavaid spektraalsõltuvusi. Tulemuseks on mõnesugune kahemõõtmeline „maastik“, kus „kõrgendikud“ esinevad sellistes kohtades, kus mõni komponent proovis nii neelab kui ka kiirgab valgust. Näiteks mõnede tuntud bioloogiliste ainete jaoks võiks vastav „kaart“ välja näha järgmine:



Totaalspektris on esindatud ka hajumine (juhu kui viimane on intensiivselt võrreldav fluorestsentsiga). Eelkõige on selleks Rayleigh hajumine, mis kulgeb kirjeldatud „maastikul“ ilmselt piki sirget, mis vastab tingimusele  $\lambda_{\text{erg}} = \lambda_{\text{det}}$  (või teises järjus  $2\lambda_{\text{erg}} = \lambda_{\text{det}}$ ). Piisavalt nõrga fluorestsentsi korral võib olla tuvastatav ka lahusti Raman-hajumine. Sel juhul muidugi  $\lambda_{\text{erg}}$  ja  $\lambda_{\text{det}}$  on lahustimolekuli vastava võnkesageduse võrra nihkes.

Lahuste mõõtmisel toimub fluorestsentsi vaatlemine alati ristivas konfiguratsioonis, mis minimeerib hajumise ja on ühtlasi sobilik ka kvantitatiivseteks mõõtmisteks, sest analüüdi piisavalt väikeste kontsentratsioonide korral (st kui neeldumus  $A$  on hulga väiksem ühest) võime eeldada, et neeldunud kiirguse hulk ja seega ka registreeritava fluorestsentsi tugevus on võrdelised kontsentratsiooniga (mol/L). Kahjuks erinevalt neeldumisest fluorestsentsisignaali tugevus ei ole üheselt määratud vaid analüüdi kontsentratsiooniga (ja küveti paksusega), vaid sõltub veel ka kvantsaagisest, spektri kujust/laiusest ja kõige rohkem kasutatava seadme efektiivsusest, seetõttu võrde tegur konkreetse aine fluorestsentsi tugevuse ja analüüdi kontsentratsiooni vahel tuleb antud spektraalseadme puhul eksperimentaalselt kindlaks teha. Küll aga on mainitud lihtsa geomeetria ja nõrga neeldumise eeldusel teoreetiliselt leitav kahe erineva proovi fluorestsentsi intensiivsuste suhe

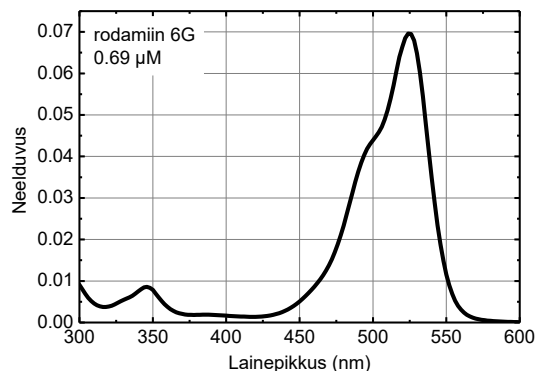
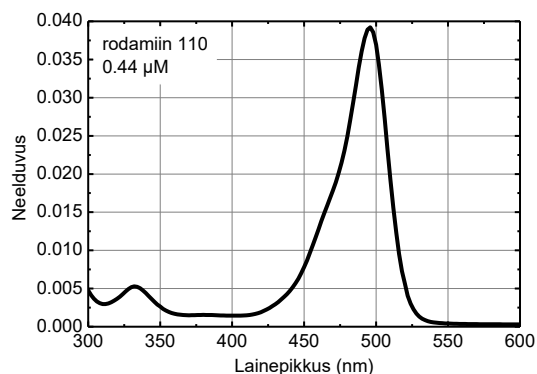
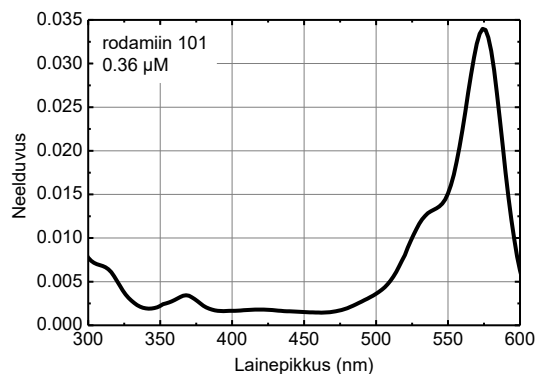
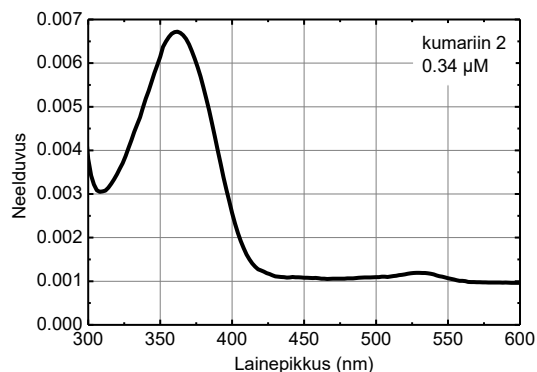
$$\frac{I_2}{I_1} = \frac{A_2}{A_1} \times \frac{\eta_2}{\eta_1} \times \left( \frac{n_1}{n_2} \right)^2. \quad (1)$$

Siin  $I$  mõõdab summaarset fluorestsentsi footonite hulka (mis on ilmselt võrdeline kiirgusriba pindalaga),  $\eta$  on kvantsaagis ja  $n$  on lahuse murdumisnäitaja (viimane mõjutab seda, kui tugevasti küvetist väljuvad valguskiired hajuvad eri suundadesse). See avaldis on fluorestsentsi mõõtmiste jaoks mingil määral analoogilises rollis nagu Beeri seadus neeldumisspektroskoopias.

Ristuv ergastuse/vaatluse geomeetria on ühtlasi ka kõige levinum konfiguratsioon spektrofluorimeetrite korral, mille ülesanne ongi fotoluminestsentsi kõikide erinevate spektraalkarakteristikate mõõtmine. Selles praktikumis kasutatava spektrofluorimeetri Jobin-Yvon Fluoromax-4P ehitust ja käsitlemist selgitatakse detailselt eraldi juhendis.

## 2. Proovid

Antud on küvett, mis sisaldab mitme erineva orgaanilise värvaine segu vesilahuses. Eesmärk on tuvastada kõik komponendid ja määrata nende kontsentratsioonid. Selle proovi jaoks mõõdetakse ergastus-kiirgusmaatriks tervikuna. Võrdluseks on antud neli küveti teadaoleva koostisega vesilahustega, millest igaüks sisaldab vaid üht värvainet. Nende võrdlusproovide neeldumisspektrid ja kontsentratsioonid on toodud järgnevatel graafikutel.



## 3. Töö käik

Spektrofluorimeetri ehitust ja kasutamist selgitav juhend on eraldi saadaval aineveebis. See tuleks läbi lugeda enne töö alustamist.

Käesolevas praktikumis me kõikidel mõõtmistel registreerime lisaks fotokordisti signaalile ka fotodiodi signaali ja arvutame nende suhte, nii et kõik fluorestsents-signaalid on hiljem kvantitatiivselt võrreldavad. Viimane eeldab mõistagi, et kõik omavahel võrreldavad spektrid on mõõdetud identsete spektraalpiludega. Lisaks laseme aparadi juhtprogrammil detektorite signaalid automaatselt korrigeerida spektraaltundlikkusele, et näha „õige kujuga“ spektraalsõltuvusi.

**1. Töö alustamine.** Lülitage sisse spektrofluorimeeter ja selle juhtarvuti ning käivitage arvuti töölaualt programm **FluorEssence**. Salvestage vaikimisi avatud uus projekt kausta „C:\Kasutajad\Praktikum“ (vastasel korral küsitakse seda pärast esimese mõõtmise lõppu). Asetage fluorimeetrisse objektihoidik, mis on ette nähtud lahuste fluorestsentsi mõõtmiseks standardses 10 mm-se optilise paksusega küvetis.

**2. Võrdlusproovide mõõtmine.** Esmalt tuleb ära mõõta kõigi värvainete individuaalsed kiirgusspektrid (ergastusspektreid me eraldi mõõtma ei hakka, kuna need eeldatavasti sarnanevad olemasolevate neeldumisspektritega). Asetage mõõtekambrisse üks proovidest ja sulgege kambri kaas. Kiirgusspektri mõõtmise seadistamise dialogis tuleb aktiveerida mõlemad detektorid koos spektraaltundlikkuse (**Correction**) ja pimesignaali (**Dark Offset**) arvessevõtmisega, ning mõõdetavateks signaalideks määrata S1 ja S1c/R1c. Kuna antud proovide fluorestsents on võrdlemisi tugev, siis mõistliku signaal-müra suhte saavutamiseks piisab **0,1 s** pikkusest signaali kogumisest ajast katsepunkti kohta kombineerituna spektraalpiluga **1 nm** (kummagi monokromaatori jaoks). Selliseid seadeid kasutame siin ja edaspidi kõikide spektrite mõõtmisel, et saaks hiljem signaali tugevusi omavahel võrrelda.

Fluorestsentsi ergastamise jaoks optimaalne lainepikkus tuleb valida eespool toodud neeldumisspektritest. Kiirguse registreerimise spektraaldiapasoon võiks ulatuda ergastusest umbes **50 nm** sinisesse ning **200 nm** punasesse. Piisavalt siledad spektrid annab skaneerimissamm **2 nm**, mis ühtlasi saabki olema efektiivne spektraallahutus nende spektrite jaoks.

Korrata mõõtmised kõikide võrdlusproovidega.

**3. Tundmatu koostisega proovi mõõtmine.** Tundmatu koostisega proovi jaoks mõõdame fluorestsentsi tervikliku spektraalkarakteristika ergastus-kiirgusmaatriksina. Esmalt tuleks antud neeldumisspektritest ja äsjamõõdetud kiirgusspektritest järgi uurida, millised on fluorestsentsi ergastuse ja emissiooni spektraalvahemikud, mis hõlmaksid kõiki värvaineid. Selle baasil saab valida ergastus- ja kiirgusmonokromaatori skaneerimisvahemikud. Lisaks tuleb aja kokkuhoiu huvides leppida suurema skaneerimissammuga **5 nm** (ka sellisel juhul kulub mõõtmiseks ligi 10 min).

## 4. Protokollis vormistamine

Protokollis tuleb esitada järgmised andmed, arvutused ja graafikud.

**1. Ülevaade.** Seletada oma sõnastuses, mida kujutab endast ergastus-kiirgusmaatriks ehk nn totaalspekter, mida töös mõõdeti. Kirjeldada, milline näeb välja orgaaniliste värvainete (ja nende segude) totaalspekter ja mida saab sealt välja lugeda.

**2. Neeldumis- ja kiirgusspektrid.** Kõikide värvainete jaoks näidata graafikuna (paarikaupa üksteise kõrval) neeldumis- ja kiirgusspektrid. Kiirgusspektrite graafikud vormistada korrektselt neeldumisspektrite eeskujul ja näidata ära, millisel lainepikkusel on fluorestsents ergastatud.

**3. Fluorestsentsi ja kontsentratsiooni seos.** Iga värvaine jaoks arvutada fluorestsentsisignaali tugevus (kiirgusspektri maksimumis) taandatuna ühikulisele kontsentratsioonile (näiteks  $\mu\text{M}$ , kus  $\text{M} \equiv \text{mol/L}$ ).

**4. Totaalspekter.** Tundmatu koostisega proovi totaalspekter tuleb esitada värvitud kontuurgraafikuna (*contour plot*), mille näide on toodud käesolevas juhendis eespool. Moodle's on saadaval juhendid kontuurgraafiku loomiseks levinumates programmides. Näiteks programmis **Origin** tuleb avada totaalspektri andmeid sisaldav töövihik, märgistada lehel XYZ\_S1c/R1c Z-veerg ning valida menüüst **Plot ▶ Contour ▶ XYZ contour**. Värvuste hulka, mastaapimist jms saab seadistada topelt-klõpsuga avanevast dialoogist **Plot Details**. Kõige selgem on kasutada värvusskaalat, kontuurjooned tuleks kõrvaldada. Intensiivsuse (Z) skaala tuleks teha logaritmiline, et nõrgemad signaalid nähtavale ilmuksid — mõningate komponentide sisaldus võib olla suhteliselt väike, või on nende fluorestsentsi kvantsaagis madal.

**5. Ainete tuvastamine.** Tuvastada kõik proovis sisalduvad ained ja tähistada vastavalt kõik piigid totaalspektril. Samuti märgistada ära Rayleigh ja Raman hajumine (juhul kui need on esindatud). Signaali tugevuse järgi määrata ainete kontsentratsioonid proovis.

**6. Lisaülesanne: kvantsaagiste määramine.** Määrake kõikide värvainete kvantsaagised võrdlusmeetodil (valem 1), võttes aluseks, et rodamiin 6G kvantsaagis vesilahuses on 92%.

Korrekttselt vormistatud protokoll tuleb saata PDF-failina e-posti teel praktikumi juhendajale aadressil [kaius.miller\(at\)gmail.com](mailto:kaius.miller(at)gmail.com).