

## Fluorescenční spektroskopie

### Zadání úlohy:

- 1) Seznamte se s blokovým schématem a principem činnosti spektrofluorimetru Jasco FP-8500.
- 2) Uvedte spektrofluorimetr do chodu a seznamte se s jeho ovládáním.
- 3) Změřte nejdříve 3-dimenzionální (3D) spektrum (excitačně-emisní) anorganických luminoforů
  - a) ZnS(Cu) a
  - b) Y<sub>2</sub>O<sub>2</sub>S(Eu).Najděte excitační vlnovou délku s maximální intenzitou luminiscence. Pak změřte emisní spektra luminoforů při této excitační vlnové délce. V protokolu diskutujte rozdíly v naměřených emisních spektrech těchto dvou luminoforů.
- 4) Změřte při pokojové teplotě emisní spektra zelených listů při excitaci do chlorofylu a (excitační vlnová délka 436 nm) a excitaci do chlorofylu b (excitační vlnová délka 470 nm). V protokolu diskutujte rozdíly v naměřených emisních spektrech při různých excitačních vlnových délkách.

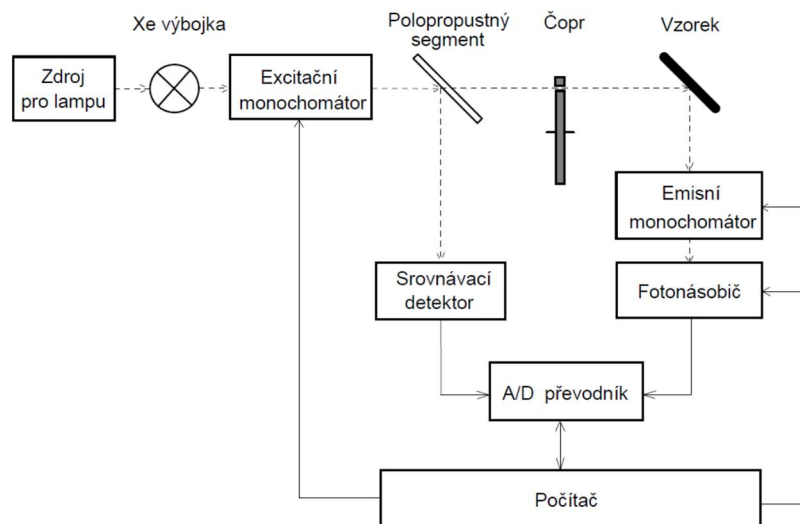
### Seznam pomůcek a chemikálií:

- spektrofluorimetr Jasco FP-8500
- anorganické luminofory ZnS(Cu) a Y<sub>2</sub>O<sub>2</sub>S(Eu) deponované na sklíčku
- zelené listy (hrách, ječmen, ...)

### Teorie

#### ***Blokové schéma spektrofluorimetru***

Měření budeme provádět na spektrofluorimetru FP-8500 (Jasco), který je plně ovládaný počítačem. Světelný svazek pocházející z xenonové výbojky vchází do mřížkového excitačního monochromátoru, který vybírá vhodnou vlnovou délku k excitaci fluorescence (obr. 1). Na polopropustném segmentu je výstupní svazek rozdělen na měřicí a srovnávací. Měřicí svazek je modulován průchodem přes přerušovač, poté dopadá na vzorek, kde budí emisi fluorescenčního záření. Emisní monochromátor skenuje fluorescenční emisní spektrum pro danou excitační vlnovou délku. Detektorem intenzity fluorescenčního signálu po průchodu emisním monochromátorem je fotonásobič. Signál z fotonásobiče je zesílen a digitalizován. Naměřená data jsou uložena do paměti počítače. Srovnávací svazek excitačního světla dopadá na samostatný srovnávací detektor. Podílem signálu z fotonásobiče a signálu ze srovnávacího detektoru je automaticky prováděna korekce na spektrální charakteristiku zdroje excitačního svazku.



**Obr. 1:** Blokové schéma spektrofluorimetru Jasco FP-8500. Přerušované šipky značí světelný signál, zatímco plné šipky signál elektrický.

### **Korekce fluorescenčních spekter**

Obecně je fluorescenční spektrum zatíženo řadou zkreslujících efektů. K základním zkreslujícím efektům patří přístrojové efekty a spektrálně optické efekty ve vzorku.

#### **Přístrojové efekty:**

- Spektrální charakteristika budícího světelného zdroje
- Spektrální propustnost všech prvků excitační a detekční soustavy
- Spektrální citlivost fotokatody fotonásobiče
- Závislost spektrální a geometrické šířky štěrbiny monochromátoru (souvisí s disperzí)
- Přístrojová funkce monochromátoru
- Stupeň polarizace detekované fluorescence a jiné

#### **Praktická korekce přístrojových efektů:**

Ke korekčním kalibračním měřením se používá standardní emisní lampy (obvykle kalibrovaná žárovka), detektor o známé křivce spektrální citlivosti (např. vakuový optický termočlánek) nebo luminiscenční standard.

Moderní spektrofluorimetry dovolují přístrojové zkreslující efekty eliminovat automaticky nebo pomocí programových procedur zabudovaných přímo do ovládacího menu řídicího systému. U spektrofluorimetru FP-8500 je korekce na spektrální charakteristiku excitačního svazku zajištěna zařazením přidavného srovnávacího detektoru (obr. 1). Spektrální závislost propustnosti celé excitační soustavy lze eliminovat proměřením excitačního spektra známého standardu (rhodamin B v ethylenglykolu, 5,5 g/L). Korekční hodnoty se ukládají do paměti řídicího počítače. Zkorigované excitační soustavy může být použito ke korekci detekční soustavy spektrofluorimetru (emisní monochromátor a detektor). K tomuto účelu se používá měření intenzity světla rozptýleného na difúzním segmentu při synchronním měřícím módu (to je s paralelní změnou vlnové délky excitačního a emisního monochromátoru).

#### **Spektrálně optické efekty ve vzorku:**

- Reabsorpce fluorescence
- Sekundární fluorescence

- Efekt vnitřního filtru
- Spektrální závislost odrazivosti a rozptylu světla
- Nehomogenní absorpce

Při měření fluorescenčních spekter silně zředěných roztoků (absorbance < 0,05) lze spektrálně optické efekty ve vzorku považovat za zanedbatelné.

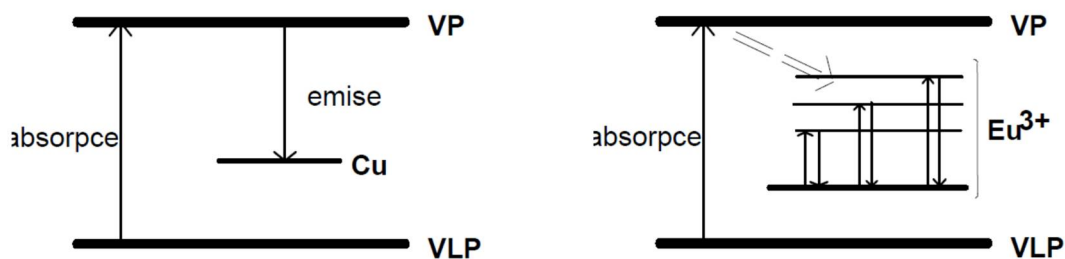
### ***Ohyb na mřížce excitačního monochromátoru***

Spektrofluorimetr Jasco FP-8500 používá pro excitační i emisní monochromátor optickou mřížku a ne optický hranol. Na každém vrypu (štěrbíně) optické mřížky dochází k ohybu (difrakci) světla a následně k interferenci ohybových vln pocházejících z jednotlivých vrypů (štěrbín) mřížky. Výsledkem je difrakční obrazec s interferenčními maximy a minimy. Optické mřížky jsou konstruovány tak, aby se „nechtěné“ ohybové a interferenční jevy maximálně vzájemně vyrušily. Nicméně i tak, na výstupu excitačního monochromátoru lze detekovat ne jenom světlo o požadované vlnové délce, ale i světlo s celočíselnými násobky požadované vlnové délky. Jinými slovy, daný vzorek by mohl být ozařován ne jenom světlem o požadované vlnové délce, ale i světlem o vlnové délce celočíselných násobků požadované vlnové délky. Bylo by proto třeba vhodně volit excitační vlnovou délku a detekovaný interval emisních vlnových délek (při měření emisního spektra), aby celočíselný násobek excitační vlnové délky nezasahoval do detekovaného intervalu emisních vlnových délek. Pokud tento požadavek nelze realizovat, musíme se být vědomi, že součástí měřeného signálu by mohl být i „artefakt“, který nemá se spektrálními vlastnostmi vzorku nic společného. Moderní spektrofluorimetry však mezi excitační monochromátor a vzorek automaticky vkládají filtry, které odfiltrují celočíselné násobky požadované excitační vlnové délky a tím zabraňují vzniku zmíněného artefaktu.

Výše popsaná vlastnost optických mřížek se nevyskytuje u optických hranolů, kde se výběr požadované vlnové délky světla děje na základě lomu světla. Optické hranoly však mají malou světelnost (hodně světla se ztratí při průchodu hranolem) a mají nelineární závislost geometrické šířky štěrbin na optické šířce štěrbin. Optické mřížky, oproti optickým hranolům, nepohlcují tolik světla a závislost geometrické na optické šířce štěrbin je lineární. Z těchto důvodů jsou monochromátory založené na optické mřížce více časté.

### ***Luminiscence krystalů***

Krystalické luminiscenční materiály se nazývají luminofory. Většina luminoforů patří buď k polovodičům se širokým zakázaným pásem, nebo k izolátorům. Obě tyto skupiny látek jsou charakterizovány zaplněným valenčním pásem (VLP) a prázdným vodivostním pásem (VP), šířka zakázaného pásu (ZP) mezi nimi bývá kolem 3 eV nebo větší – obr. 2. Luminiscenční vlastnosti takových látek jsou závislé na existenci různých poruch jejich krystalové struktury, především na přítomnosti cizích atomů. Pokud tyto příměsi přímo ovlivňují emisní spektrum luminoforu, nazýváme je aktivátory. Jiné příměsi, které neovlivňují luminiscenční spektrum, ale mají vliv např. na doznívání (vytváření tzv. elektronových pastí) nebo na zachování elektrické neutrality mřížky apod., se nazývají koaktivátory.



Obr. 2. Pásový model energetických hladin luminiscenčních krystalů. Vlevo: schéma energetických hladin v  $\text{ZnS}(\text{Cu})$ ; vpravo: schéma energetických hladin v  $\text{Y}_2\text{O}_2\text{S}(\text{Eu})$ . Jednoduché šipky značí absorpci (šipka nahoru) a emisi (šipka dolů), zatímco dvojitá přerušovaná šipka značí nezářivý přenos energie.

Přítomnost aktivátorů a koaktivátorů se projeví v pásovém modelu luminoforu existencí diskretních hladin energie v ZP. Luminiscence pak vzniká přechodem elektronu z VP do VLP, nebo přechodem elektronu z VP na aktivátorovou hladinu (luminiscenční centrum), případně přechodem elektronu z aktivátorové hladiny do VLP. Protože tyto případy luminiscence jsou spojeny s rekombinací elektronu (na vyšší energetické hladině) a „díry“ (po chybějícím elektronu na nižší energetické hladině), nazývá se tato luminiscence rekombinační a je i pro ni typické pásové emisní spektrum. Buzení luminiscence v těchto případech nastává po absorpci vhodné energie přechodem elektronu z VLP do VP. K luminoforům tohoto typu patří především sulfidy (např.  $\text{ZnS}$  nebo  $\text{CdS}$ ), aktivované  $\text{Cu}$ ,  $\text{Ag}$  nebo  $\text{Au}$ . Jejich emise nastává v závislosti na druhu a koncentraci aktivátoru v modré až zelené části spektra.

Vzniká-li luminiscence v důsledku přechodu elektronu mezi vzbuzeným a základním stavem příměsi, které jsou většinou lokalizovány v ZP luminoforu, jedná se o nerekombinační luminiscenci. Příkladem takového materiálu je  $\text{Y}_2\text{O}_2\text{S}-\text{Eu}^{3+}$ . Takový luminofor lze excitovat přechodem elektronu z VLP do VP, ale i přímým buzením aktivátoru, které je ovšem podstatně méně pravděpodobné. Emisní spektrum takových luminoforů je čárové, excitační spektrum by vedle pásu v oblasti absorpční hrany mělo vykazovat i slabší čáry odpovídající přímé excitaci příměsi.

### Fluorescence

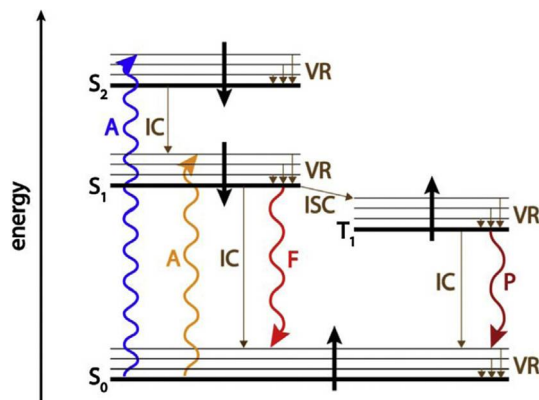
Elektronové stavy většiny molekul lze rozdělit na singletové stavy a tripletové stavy. V singletovém stavu jsou všechny elektrony v molekule spinově spárované (vždy existují páry elektronů s opačným spinem  $+1/2$  a  $-1/2$ ), tzn., že výsledný spin  $S$  je 0, a multiplicita je pak 1 ( $= 2S + 1$ ), čili se jedná o singletový stav. V tripletovém stavu je jedna sada spinů elektronů nepárová (elektrony ve 2 energetických hladinách mají každý spin  $+1/2$ ), tzn., že výsledný spin  $S$  je 1, a multiplicita je pak 3 ( $= 2S + 1$ ), čili se jedná o tripletový stav.

Pro případ excitovaného stavu, když po absorpci kvanta záření se jeden ze spárovaných elektronů přesune ze základního stavu do excitovaného stavu, ale nemění spin, excitovaný stav zůstane singletový. Když se s molekulou něco stane, např. srážka s jinou molekulou, elektron v excitovaném stavu může změnit spin a tím vznikne excitovaný tripletový stav.

Pokud přechody z excitovaného stavu molekuly do základního stavu jsou radiační, tzn., že dochází při přechodu k emisi kvanta záření, této emisi se říká fluorescence, pokud při přechodu do stavu s nižší energií prostřednictvím emise fotonu nedojde ke změně spinu, což je hlavně při přechodu z prvního excitovaného singletového stavu do základního singletového stavu. Na druhé straně, emisi kvanta záření se říká fosforescence, když při přechodu dojde ke změně spinu, to je hlavně při přechodu z excitovaného tripletového stavu do základního singletového stavu. Avšak kvůli existenci Pauliho vylučovacího principu, který říká, že všechny

elektrony musí mít jinou sadu kvantových čísel, nemůže dojít přímo k přechodu z tripletového excitovaného stavu do základního stavu. Proto fosforescence v sobě zahrnuje 2 procesy a to změnu spinu z tripletu na singlet a emisí kvanta záření.

Energetické stavy molekuly a přechody mezi nimi, včetně fluorescence, zachycuje tzv. Jablonského diagram na obr. 3.



Obr. 3. Jablonského diagram energetických hladin molekuly. Tlusté a tenké vodorovné čáry značí elektronové a vibrační hladiny, tlustá šipka značí spin elektronu (+1/2 pro směr nahoru a -1/2 pro směr dolů), S a T označuje singletový a tripletový stav molekuly, dolní index 0 a 1 a 2 značí základní a excitované stavy, tenké šipky značí nezářivé přechody (vibrační relaxaci VR, vnitřní konverzi IC a mezisystémový přechod ISC), vlnící šipky nahoru značí absorpce A, vlnící šipky dolů značí radiační přechody formou fluorescence F a fosforescence P.

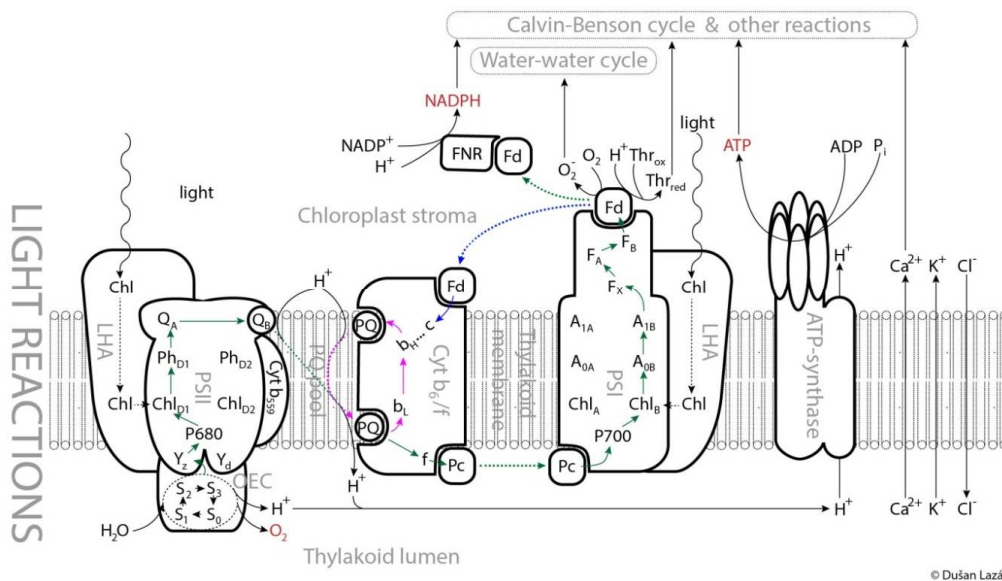
### Fluorescence chlorofylu

Fotosyntéza vyšších rostlin je charakteristická přítomností chlorofylů (Chl, Chl a a Chl b) ve světloběrných anténách (LHA) fotosystému II (PSII) a fotosystému I (PSI). Primární účel absorpce dopadajícího světleného záření chlorofylu je použití energie záření na primární (tzv. světlené) reakce fotosyntézy, to je na přenos elektronů v thylakoidní membráně uvnitř chloroplastu, který finálně vede ke tvorbě molekul s velkou redukční silou (NADPH) a které jsou zásobárnou energie (ATP), viz obr. 4. Část absorbované energie se však také vyzáří formou fluorescence chlorofylu.

*In vivo* přenáší Chl b svou excitační energii na Chl a s velmi vysokou účinností, a proto Chl b nemá žádnou fluorescenci *in vivo*. Fluorescenční emisní spektrum Chl *in vivo* listu při pokojové teplotě je charakterizováno dvěma pásy, z nichž vyšší má vrchol při asi 685 nm (pološířka asi 20 nm) a menší má vrchol při asi 735 nm (pološířka asi 50 nm). Tyto pásy jsou označeny jako F685 a F735. Fluorescence obou pásů při pokojové teplotě pochází hlavně z PSII a je zde pouze malý příspěvek PSI, který se zvyšuje při vlnových délkách delších než 685 nm.

Protože listy jsou opticky husté prostředí (= koncentrace Chl je velká), emisní spektrum listu je zkresleno silnou reabsorpcí fluorescence Chl, která snižuje výšku pásu F685 a zvyšuje výšku pásu F735. Pro získání správného fluorescenčního emisního spektra Chl je třeba použít správný matematický postup nebo je nutné spektrum změřit s kapalnými (suspenze chloroplastů nebo thylakoidních membrán) velmi zředěnými vzorky.

Pro měření emisního spektra listu je důležité, aby byl vzorek před samotným měřením po určitou dobu osvětlen ( $\approx 1$  min) a ve skutečnosti vzorek emitoval ustálenou fluorescenci, jinak v době detekce konkrétního spektra dojde k tzv. indukčnímu jevu (= změna intenzity fluorescence v čase), což ovlivní detekované intenzity fluorescence a tím i tvar spektra.



Obr. 4. Schéma fotosyntetického aparátu a příslušných reakcí v thylakoidní membráně chloroplastu listu.

#### Literatura:

- Frank a kol. (2002) Resolution of the photosystem I and photosystem II contributions to chlorophyll fluorescence of intact leaves at room temperature. *Biochimica et Biophysica Acta* 1556, 239–246
- Labiadh a Hidouri (2017) ZnS quantum dots and their derivatives: Overview on identity, synthesis and challenge into surface modifications for restricted applications. *Journal of King Saud University – Science* 29, 444–450
- Mishra a kol. (2018) Zinc sulfide nanoparticles. *Journal of Applied Spectroscopy* 85, 743-748
- Peng a kol. (2006) Synthesis and photoluminescence of ZnS:Cu nanoparticles. *Optical Materials* 29, 313-317
- Pokhrel a kol. (2015) Electronic and optical properties of Er-doped Y<sub>2</sub>O<sub>2</sub>S phosphors. *Journal of Material Chemistry C* 3, 11486
- Sundarakannan a Kottaisamy (2021) Synthesis and characterization of near UV excitable Y<sub>2</sub>O<sub>2</sub>S:Eu<sup>3+</sup> entrapped ZnO for white light emitting diode applications. *Journal of Solid State Chemistry* 293, 121739
- Tseng a kol. (1998) Spectral properties of Eu<sup>3+</sup>-activated yttrium oxysulfide red phosphor. *Thin Solid Films* 330, 173-177