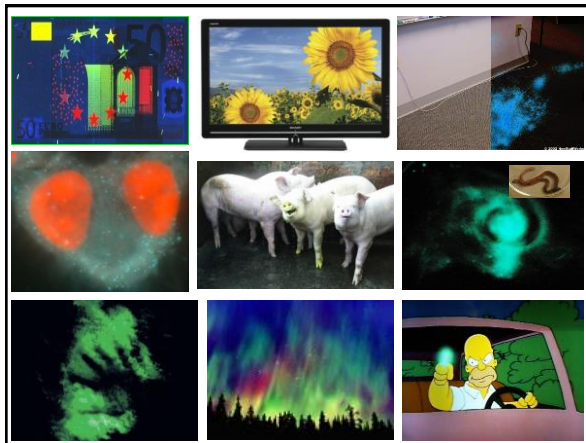


# Molekulová luminiscence C7955

Petr Táborský  
Jan Preisler

Ústav chemie, PřF MU, BRNO



## Doporučená literatura

### Knihy:

A. Sharma, S. G. Schulman - [Introduction to Fluorescence Spectroscopy](#)  
J. R. Lakowicz - [Principles of Fluorescence Spectroscopy](#)  
B. Valeur - [Molecular Fluorescence: Principles and Applications](#)

### Časopisy:

[Journal of Fluorescence](#)  
(<http://www.springerlink.com/content/1573-4994/>)

[Journal of Luminescence](#)  
(<http://www.sciencedirect.com/science/journal/00222313>)

[Luminescence-The Journal of Biological and Chemical Luminescence](#)  
([www.interscience.wiley.com/journal/bio](http://www.interscience.wiley.com/journal/bio))

### Internet:

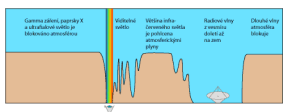
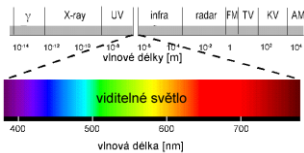
<http://www.fluorescence-foundation.org>  
<http://bart.chemi.muni.cz>



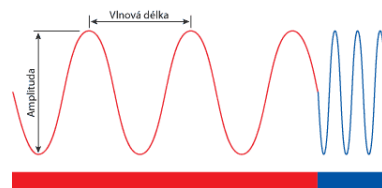
## Světelné záření

- světelný paprsek je charakterizován frekvencí ( $\nu$ ) oscilace magnetické a elektrické složky (kolikrát za sekundu je vektor složky v maximu), resp. vlnovou délkou ( $\lambda$ )
- rychlost světla ( $c$ ) ve vakuu je  $3 \times 10^8$  m/s
- pro rychlost světla platí:
 
$$c = \lambda \nu$$
- elektricky nabitá částice (elektron) je schopna interakce se světelným vlněním (ovlivnění je dáno elektrickou složkou paprsku).
- přijátá energie ( $E$ ) je kvantována:
 
$$E = h \nu$$
- $h$  je Planckova konstanta ( $h = 6.625 \times 10^{-27}$ )

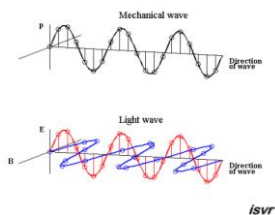
## Viditelné záření - světlo



## Spektrum

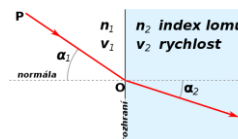


## Vlnění



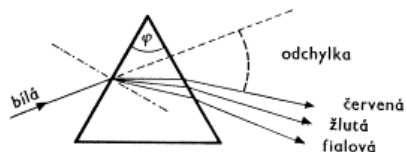
## Snellův zákon

- **Snellův zákon** patří k základním zákonům popisujícím šíření vlnění, které přechází (tzv. lomem) přes rozhraní z jednoho prostředí do jiného prostředí, kde se skokově mění optické vlastnosti prostředí.
- Je důležitou součástí geometrické optiky, kde popisuje lom paprsku světla a obecněji elektromagnetického záření na rovinném rozhraní.
- Nese jméno jednoho z objevitelů, nizozemského matematika W. van Snella
- Ze Snellova zákona plyne, vyjádřeno slovy, že:
  - Při šíření záření z prostředí *opticky řidšího* do *opticky hustšího* prostředí se paprsky lámou směrem ke kolmici (tzv. **lom ke kolmici**).
  - Při šíření záření z prostředí *opticky hustšího* do *opticky řidšího* prostředí se paprsky lámou směrem od kolmice (tzv. **lom od kolmice**).
- Opticky hustším, resp. řidším prostředím je méně prostředí s vyšším, resp. nižším **indexem lomu**.



## Disperze světla

- Při tomu světla dochází k tomu, že se rozkládá na jednotlivé vlnové délky. Příčinou toho je závislost rychlosti světla v látkách na frekvenci – **disperze světla**. Při normální disperzi se rychlost světla zmenšuje s frekvencí. Ve vakuu k disperzi nedochází.
- Při průchodu rozhraním se nemění frekvence světla, mění se však rychlost světla a tím i **vlnová délka**.

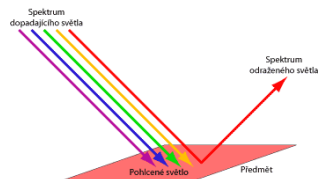


$$\lambda = vT = \frac{v}{f}$$

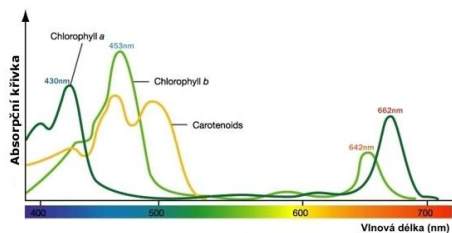
## Teorie Barevnosti

### Fyzikální základy barevnosti

Rozdílní interakce barev jsou důsledkem pohlcení částí záření (to tvoří proud fotonů, tj. kvant energie) o určité vlnové délce. Lidské oko je schopné vnímat záření o vlnové délce 400 až 760 nm. Záření o vlnové délce pod 400 nm je ultrafialové záření (UV), záření nad 760 nm je infračervené (IC). Záření v těchto oblastech nevyvolává zrakové vjem a je pro lidské oko neviditelné. Pokud je záření v celém intervalu viditelného světla, jeví se jako bílé. Záření o vlnových délkách v intervalu viditelného světla vyvolává zrakový dojem uvedený v tabulce. Je zde uvedena i barva doplňková, která se vytvoří smíšením nepohlceného světla. Pokud předmět pohltí z bílého záření, záření o určité vlnové délce, odráží se do oka zbyvajících částí a oko má vjem doplňkové barvy.



| Vlnová d. [nm] | Barva       | Doplňková   |
|----------------|-------------|-------------|
| 400 - 435      | fialová     | zelenožlutá |
| 435 - 480      | modrá       | žlutá       |
| 480 - 490      | zelenomodrá | oranžová    |
| 490 - 500      | modrozelená | červená     |
| 500 - 560      | zelená      | purpurová   |
| 560 - 580      | zelenožlutá | fialová     |
| 580 - 595      | žlutá       | modrá       |
| 595 - 605      | oranžová    | zelenomodrá |
| 605 - 730      | červená     | modrozelená |
| 730 - 760      | purpurová   | zelená      |



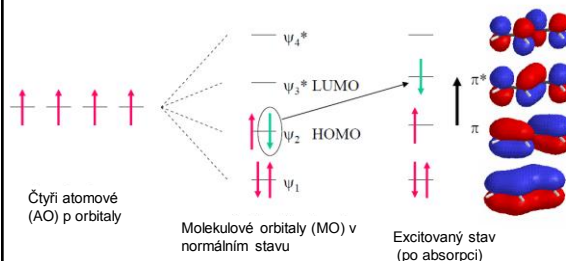
V zelené škále rostliny rostou pomaleji nebo vůbec ne. V podstatě je zelená jediný typ světla, které rostlinné chloroplasty nevyužívají. To je také důvod, proč je to jediná barva odražená od listů (to je co vidíme).

## Molekulová elektronová struktura

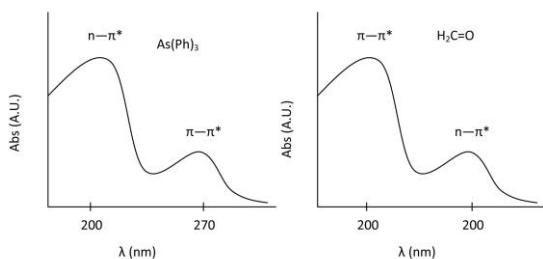
- orbitály a elektrony v molekule, jenž jsou ovlivněny vazebnými interakcemi jsou zodpovědné za vznik elektronových spekter ve viditelné a ultrafialové oblasti spektra
- platí **Pauliho vylučovací princip**
- nejčastější metody výzkumu molekulové elektronové struktury jsou spektrofotometrie (absorbance) v oblasti UV-Vis, luminiscenční spektroskopie.

## Absorpce energie molekulou

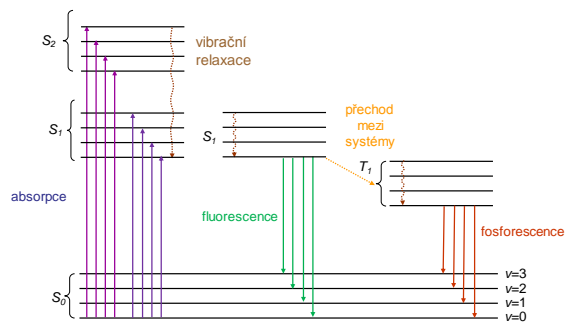
Příklad: molekula butadienu po absorpci energie ve formě fotonu

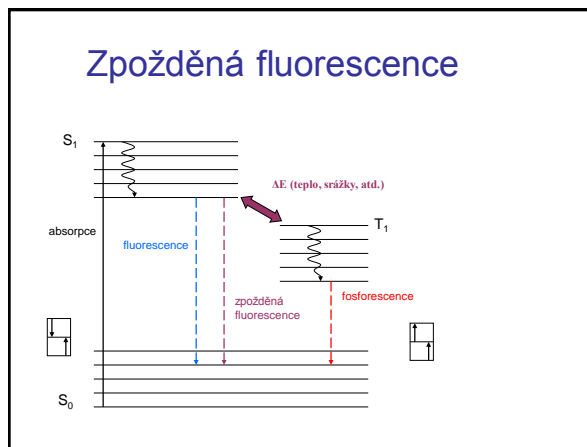
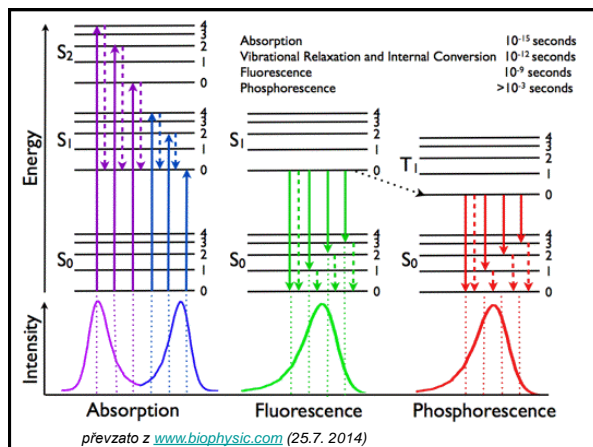


## Absorpce



## Jablonského diagram





## Princip

- jde o **termální excitaci** molekuly s nejnižší hladiny tripletového stavu zpět na nejnižší hladinu excitovaného singletového stavu (je to reverzibilní mezisystémový přechod (*reverse intersystem crossing*) mezi  $T_1$  a  $S_1$ )
- k fluorescenci dochází po návratu na  $S_1$  (proto je vlnová délka je stejná jako u „běžné“ fluorescence)
- mezisystémový přechod způsobuje zdržení celého děje (čas vyhasínání je mnohem delší, než u „běžné“ fluorescence)

## Typy termální excitace

- **E-typ zpožděné fluorescence** – probíhá u pevných vzorků a je doprovázen zahříváním systému, případně statistickou fluktuací elektronů mezi hladinami (jen pokud rozdíl mezi tripletovou hladinou a excitovaným singletem není příliš vysoký). Jedná se o jednofotonovou absorpci a závislost mezi intenzitou emise a intenzitou budícího záření je lineární. Poprvé byl tento jev pozorován u eosinu (E-typ).
- **P-typ zpožděné fluorescence** – k excitaci dochází po kolizi dvou molekul v tripletovém stavu. Jedna molekula v tripletovém stavu odevzdá nezářivě svoji energii druhé molekule v tripletovém stavu a ta přejde do excitovaného singletu (*triplet-triplet annihilation*). Rozdíly mezi  $S_1$  a  $T_1$  mohou být vyšší, než u typu E. Je to dvoufotonová absorpce (excitace dvou molekul), proto je intenzita fluorescenční emise přímo úměrná čtverci intenzity budícího záření. Tento jev byl poprvé pozorován u pyrenu (P-typ).

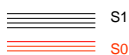
## Vnitřní konverze

Obecně jde o přechod mezi nejnižší excitovanou hladinou ( $S_1$ ) na nejvyšší vibrační hladinou nejnižší singletové hladiny ( $S_0$ ).

- a) vibrační hladiny  $S_0$  sahají až k vibračním hladinám  $S_1$ . Elektron se tak může přejít mezi  $S_1$  a  $S_0$  bez toho, aby se výrazně změnila jeho energie.



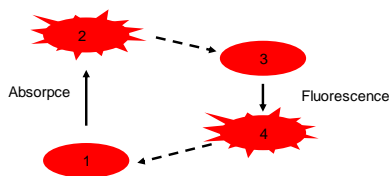
- b) vibrační hladiny  $S_0$  a  $S_1$  jsou blízko sebe a za jistých okolností může elektron přejít díky tunelovému efektu. Pravděpodobnost tohoto děje se zvyšuje se zmenšením vzdáleností mezi hladinami.



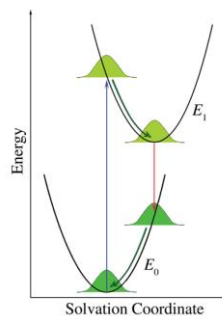
## Franck-Condonův princip

- molekuly mají v základním a v excitovaném stavu obecně různé dipólové momenty i polarizovatelnosti (je to způsobeno elektrostatickými interakcemi s okolím molekuly – např. solvatací)
- okamžitě po absorpci není excitovaná molekula v rovnovážném stavu a do rovnovážného stavu se dostane až dojde k vyrovnání sil, které na ní působí
- dobu potřebnou pro molekulární relaxaci je mnohem delší, než je rychlost elektronového přechodu, ale obvykle kratší, než doba života excitovaného stavu
- emisi dochází ze stavu, kdy již bylo dosaženo rovnovážné konfigurace
- okamžitě po vyzáření světla se molekula nachází v nerovnovážném stavu → vibrační relaxace na základní hladině

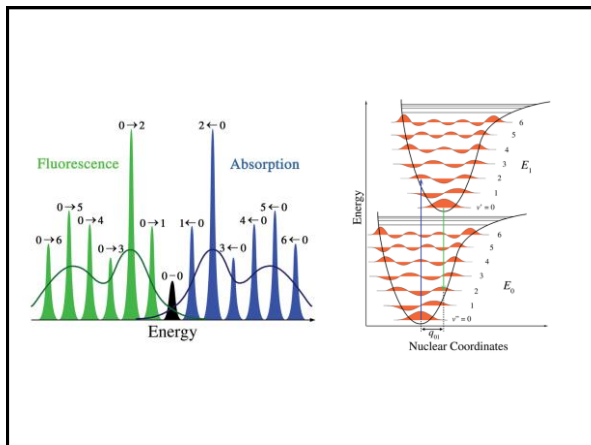
- 1 – rovnovážná konfigurace v základním stavu
- 2 – nerovnovážná konfigurace v excitovaném stavu (Franckův-Condonův stav)
- 3 – rovnovážná konfigurace v excitovaném stavu
- 4 – nerovnovážná konfigurace v základním stavu (Franckův-Condonův stav)



## Franck-Condonův princip - solvatace



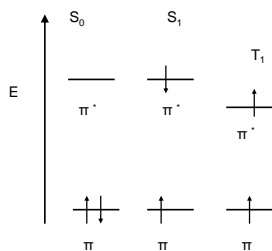
<http://en.wikipedia.org>



## Absorpce energie organickou molekulou

- absorpce je zpravidla způsobena přechody vazebných (případně nevazebných) elektronů v molekule do antivazebných molekulových orbitalů
- u složitějších molekul se většinou jedná o kombinaci několika přechodů

## Typy přechodů

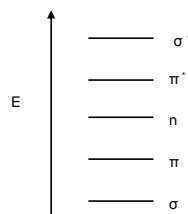


$S_1$  – singletový excitovaný stav (elektrony mají opačný spin), přechod je spinově dovolený (je pravděpodobný), vysoká intenzita absorpce.

$T_1$  – tripletový stav, elektrony mají stejný spin, tzv. zakázaný přechod (= méně pravděpodobný), poskytuje pásy s nižší intenzitou, energetický rozdíl je menší oproti  $S_1$

různé elektronové konfigurace  $\pi$  – elektronového systému

## Typy přechodů



hladiny energií molekulových orbitalů

## Typy přechodů

**Přechod  $\sigma - \sigma^*$** : jednoduché vazby (např. C-C, nebo C-H), vyžadují velkou energii (méně než 190nm, vakuová oblast)

**Přechod  $n - \sigma^*$** : nutná přítomnost atomu s volným elektronovým párem (N, S, I, Cl, Br), absorpce kolem 200nm.

**Přechod  $\pi - \pi^*$** : sloučeniny s dvojnými a trojnými vazbami, čím lepší konjugance vazeb, tím vyšší vlnová délka (energetická hladina nejvyššího obsazeného vazebného orbital se zvýší a energetická hladina nejnižšího nevazebného orbitalu se sníží  $\rightarrow$  nižší  $\Delta E$ ), delokalizované  $\pi$  orbitaly aromatických systémů  $\rightarrow$  rozdíl energií je nízký (absorpce ve Vis oblasti)

**$n - \pi^*$** : v molekule je kromě dvojně vazby přítomen také atom s volným elektronovým párem (N, S, Cl...), nízká energie, ovlivnění  $\pi - \pi^*$  přechodu

## Typy elektronových přechodů v komplexech kovů

- přechody v rámci iontu kovu vázaného do komplexu (d-d, nebo f-f přechody): dochází ke štěpení podhladin iontu kovu vlivem ligandového pole.
- C-T (charge-transfer) přechody: přenos náboje mezi ligandem a iontem kovu, dochází k přechodu elektronu z orbitalu atomu s výrazně vyšší elektronovou hustotou do orbitalu jiného atomu s menší elektronovou hustotou (buď přechod M-L, nebo L-M), tyto přechody mají vysokou intenzitu v porovnání s přechody d-d.
- elektronové přechody v rámci ligandu vytvořené vlivem elektrostatické interakce s iontem kovu.

## Mezisystémový přechod singlet-triplet

- tripletová hladina leží níže, než hladina  $S_1$  (elektrony se stejným spinem se tolik neodpuzují, jako v případě stavu  $S_1$ )
- přechod z  $S_1$  do  $T_1$  se děje podobným mechanismem jako je vnitřní konverze
- tento proces zahrnuje změnu spinu elektronu a je málo pravděpodobný (tzv. spinově zakázaný přechod)
- „spinově povolené“ vibrační procesy (vibrační relaxace a vnitřní konverze) trvají  $\sim 10^{-14}$  s, zatímco „spinově zakázané“ procesy  $\sim 10^{-8}$  s (srovnatelné s fluorescencí)

## Rozdělení luminiscence podle zdroje excitace

- **fotoluminiscence** - absorpce energie ve formě světla
- **chemiluminiscence** a **bioluminiscence** - zdroj energie je chemická, nebo biochemická reakce
- **elektroluminiscence** - zdrojem je el. proud
- **thermoluminiscence** - zdrojem je tepelná energie
- **radioluminiscence** - zdrojem je radioaktivní záření
- **triboluminiscence** - zdrojem je mechanická energie
- **krystaloluminiscence** - krystalizace je doprovázena luminiscencí
- další zdroje (sonoluminiscence, atd.)



## Zhášení luminiscence (luminescence quenching)

- luminiscenci konkuruje jiný děj, který vede k poklesu intenzity luminiscence
- všechny možné procesy zhášení ještě nejsou zcela vysvětleny
- dynamické (někdy též kolizní) a statické zhášení

## Zhášení luminiscence

- statické zhášení: ke „komplexaci“ dochází v základním stavu (vytvoří se nefluoreskující komplex). Luminiscence jsou pak schopny jen disociované molekuly, ale rychlost disociace je malá ve srovnání s se zářivými přechody (- zářivé přechody jsou neefektivní). Typický příklad – komplexace těžkým kovem (snížení fluorescence kys. salicylové po komplexaci Fe(III).)

$$F_0/F = 1 + K_a[Q]$$

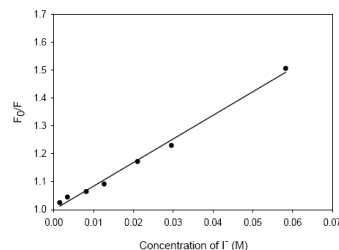
## Dynamické zhášení luminiscence

- k interakci mezi zhášečem a potenciálním fluoroforem dojde po excitaci, kdy excitovaná molekula vytvoří „komplex“ s jinou částicí (molekulou, „species“), který nefluoreskuje – dojde k vytvoření nových hladin a dojde k deexcitaci vnitřní konverzí. Typická je např. tvorba komplexu s kyslíkem rozpuštěným v rozpouštědle (oxidace), I<sup>-</sup>, Cs<sup>+</sup>, akrylamidem, atd.

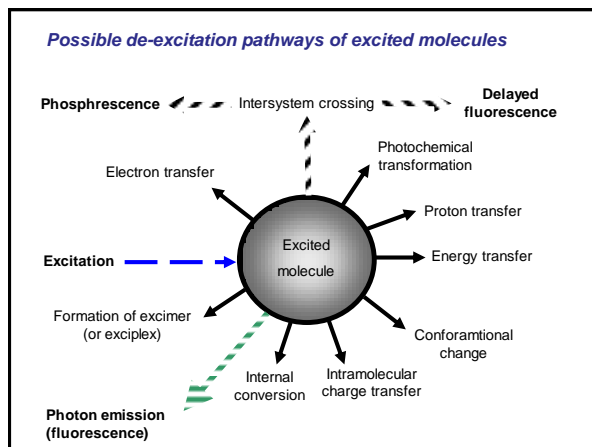
$$F_0/F = 1 + K_{SV} [Q]$$

- Stern-Volmerova rovnice:  $F_0$  je intenzita fluorescence bez zhášeďla,  $F$  je intenzita fluorescence se zhášeďlem,  $K_{SV}$  je Stern-Volmerova zhášeďcí konstanta,  $Q$  je koncentrace zhášeďla
- dynamické zhášení snižuje  $\tau$

## Dynamické zhášení

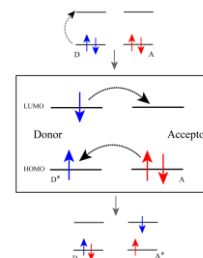


Zhášení fluorescence fluoresceinu za přítomnosti I<sup>-</sup>



## Dexter electron transfer

- theoretically proposed by D. L. Dexter in 1951
- NOT that DEXTER from TV series!
- so called **Dexter energy transfer**
- is a (fluorescence) quenching mechanism in which an excited electron is transferred from one molecule (a donor D) to a second molecule (an acceptor A) via non radiative way
- wavefunction overlap between acceptor and donor is required
- only short distances (typically within 10 Å)

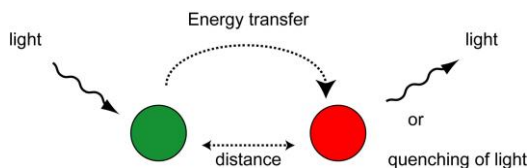


$$k_{ET} \propto J \exp\left[\frac{-2r}{L}\right] \quad J = \int f_D(\lambda) \epsilon_A(\lambda) \lambda^4 d\lambda$$

- Rate of ET is proportional to  $J$  spectral overlap
- $r$  is the separation of D from A
- $L$  is sum of Van der Waals radii of the D and the A

## Förster resonance energy transfer

- so called fluorescence resonance energy transfer (FRET)
- **Theodor Förster** was german physical chemist



- ET between two chromophores (donor D and acceptor A) with appropriate spectral properties
- D may transfer energy to an A through nonradiative dipole-dipole coupling
- efficiency of this ET is inversely proportional to the sixth power of the distance between donor and acceptor
- The method (FRET) is often used in analytical chemistry and biochemistry

## Vliv prostředí na luminiscenci

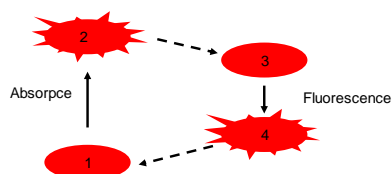
## Vliv vnějšího prostředí na fluorescenci

- okolní prostředí (rozpouštědlo, pH, atd.) má ve fluorescenční spektroskopii větší vliv na výslednou podobu spekter, než spektrofotometrie (UV-Vis)

?

- větší vliv okolí na molekuly v excitovaném stavu

- 1 – rovnovážná konfigurace v základním stavu
- 2 – nerovnovážná konfigurace v excitovaném stavu (Franckův-Condonův stav)
- 3 – rovnovážná konfigurace v excitovaném stavu (závisí na okolí molekuly)
- 4 – nerovnovážná konfigurace v základním stavu (Franckův-Condonův stav)



## Vliv rozpouštědla

- možnosti interakcí mezi molekulou analytu a rozpouštědla: dipól-dipól, dipól-indukovaný dipól, vodíkové můstky...
- rozpouštědla, která tvoří vodíkové můstky mají vliv na  $n-\pi^*$  přechody (tato rozpouštědla se chovají jako velmi slabé Brønstedovy kyseliny a atomy s neváznými elektrony jako zásady a částečně přijímají proton)
- polarita rozpouštědla nejvíce ovlivňuje  $\pi-\pi^*$  (polární rozpouštědla snižují energii  $\pi^*$ )

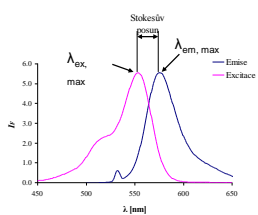
## Luminiscence molekuly je charakterizována:

emisní spektrum (emisní maximum), excitační spektrum (excitační maximum), Stokesův posun, kvantový výtěžek, čas vyhasínání luminiscence

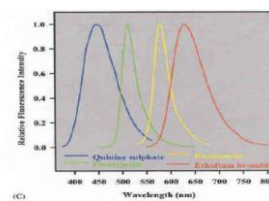
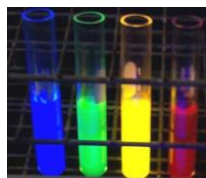
## Emisní a excitační spektra

**emisní spektrum** (fluorescenční resp. fosforescenční spektrum): závislost intenzity luminiscence na vlnové délce. Měří se při konstantní  $\lambda_{ex}$

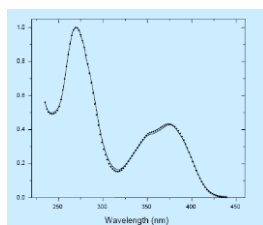
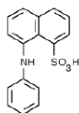
**excitační** (aktivační, „absorpční“) spektrum: závislost absorpce luminoforu (fluoroforu) na vlnové délce. Měří se při konstantní  $\lambda_{em}$ .



## Emisní spektrum



## Excitační spektrum



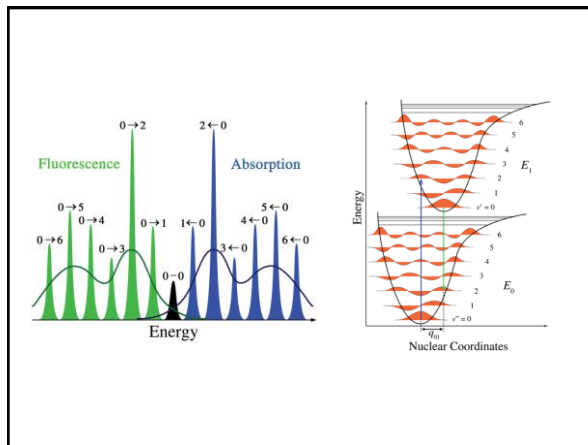
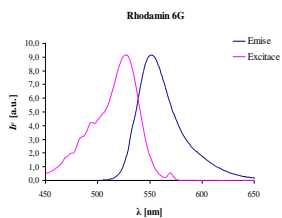
Excitační a absorpční spektrum mají podobný tvar, jestliže absorbuje pouze ta část molekuly odpovídá také za fluorescenci

## Emisní a excitační spektra

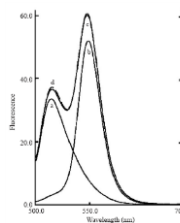
- **Stokesův posun**: rozdíl mezi emisním a excitačním maximem (v nm)
- **Kashovo pravidlo**: tvar emisního spektra není ovlivněn vlnovou délkou excitace a lze excitovat zářením s kteroukoli vlnovou délkou z excitačního spektra
- **nejvyšší intenzita luminiscence**: excitace vlnovou délkou rovnou excitačnímu maximu
- **fosforescenční spektra jsou posunuta k vyšším vlnovým délkám**, neboť přechod z  $T_1$  do  $S_0$  je spojen s menším rozdílem energie, než přechod z  $S_1$  do  $S_0$

## Zrcadlové pravidlo

- emisní a excitační spektra [organických látek](#) mají podobný tvar, ale jsou zpravidla zrcadlově obrácené

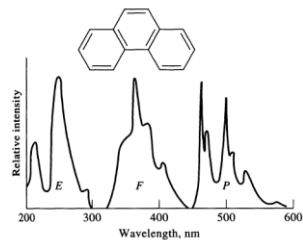


## Emisní spektra



**Aditivní pravidlo:** fluoreskuje-li po ozáření ve vzorku více nezávislých fluoroforů, výsledná emise je součtem příspěvků emisí těchto látek. Toto pravidlo však platí pouze pro molekuly, které spolu nevyměňují energii...

## Fluorescence a fosforescence



Čas vyhasínání fosforescence –  $10^{-4}$  až několik s

Čas vyhasínání fluorescence –  $10^{-12}$  až  $10^{-6}$

Fosforescence: posun emise k vyšším vlnovým délkám

## Základní vztahy

$$A = c l \varepsilon = \log(\Phi_0/\Phi) \quad (\text{Lambert-Beerův zákon})$$

$A$  – absorbance,  $c$  – koncentrace,  $\varepsilon$  – absorpční koeficient,  $l$  – tloušťka kyvety,  
 $\Phi_0$  - záření vyslané na vzorek,  $\Phi$  - záření prošlé vzorkem

$$F = k \varphi \Phi_0 (1 - 10^{-c l \varepsilon})$$

$F$  – fluorescenční signál (fotony/s),  $k$  – podíl emitovaných fotonů, které dorazí na detektor,  $\varphi$  – výtěžek luminiscence

$$F = k \varphi \Phi_0 2.3 c l \varepsilon$$

zjednodušený vztah pro nízké koncentrace

## „Čas života“ (lifetime) fluoroforu

- nestudujeme jednu molekulu s fluoroforem, ale mnoho molekul s populací elektronů na excitovaných hladinách
- na základě studia systému z mnoha molekulami určujeme „čas života“ určité molekuly s fluoroforem

$$dn^*/dt = -n^* \Gamma + f(t)$$

$n^*$  je počet excitovaných částic,  $t$  je čas,  $\Gamma$  je rychlostní konstanta emise fluorescence,  $f(t)$  je časová jednotka (čas excitace)

- jestliže k excitaci dojde v čase  $t = 0$ , pak:

$$dn^*/dt = -n^* \Gamma$$

pro počet excitovaných molekul lze rovnici zapsat takto:

$$n^*(t) = n^*(0) \exp \Gamma t$$

jestliže:

$$\tau = \Gamma^{-1}$$

pak:

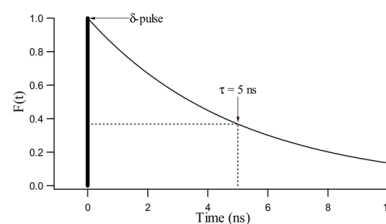
$$n^*(t)/n^*(0) = e^{-t/\tau}$$

$\tau$  je tedy čas, kdy 1/e molekul (36.8%) je v základním stavu

## Čas života luminiscence

křivka vyhasínání má pro stejné „species“ exponenciální průběh

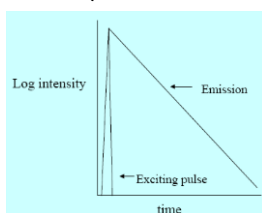
$$n^*(t)/n^*(0) = e^{-t/\tau}$$



## Vyhasínání luminiscence

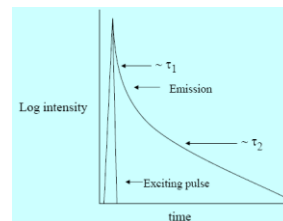
- počet excitovaných částic je úměrný intenzitě luminiscence:

$$I_t = \alpha e^{-t/\tau}$$



## Vyhasínání luminiscence

- jestliže je v systému více komponent („species“), které po excitaci za daných podmínek vykazují luminiscenci, potom má výsledná křivka multiexponenciální charakter



## Výtěžek luminiscence

- obecná definice:  $\Phi = k_f / (k_f + k_i + k_c)$

$k_f$  rychlost emisního procesu (fluorescence)

$k_i$  rychlost nezářivých přechodů (teplo, relaxace...)

$k_c$  rychlost mezisystémových přechodů

- jestliže rychlost deaktivčních procesů je pomalá ve srovnání s  $k_f$  potom kvantový výtěžek je vysoký

- kvantový výtěžek:

$$\Phi_k = N_{em}/N_{abs} = I_{em}/I_{abs} = I_{em}/(I_0 - I)$$

$\Phi_e < \Phi_k$  (Stokesův posun)

- energetický výtěžek:

$$\Phi_e = E_{em}/E_{abs} = h\nu_{em}/h\nu_{ex}$$

Pure & Appl. Chem., Vol. 60, No. 7, pp. 1107-1114, 1988.  
Printed in Great Britain.  
© 1988 IUPAC.

INTERNATIONAL UNION OF PURE  
AND APPLIED CHEMISTRY

ORGANIC CHEMISTRY DIVISION  
COMMISSION ON PHOTOCHEMISTRY\*

### REFERENCE MATERIALS FOR FLUORESCENCE MEASUREMENT

Prepared for publication by

DAVID F. EATON

E. I. du Pont de Nemours & Co., C R & D, Experimental Station,  
Bldg 328, Wilmington, DE 19898, USA

## Stanovení kvantového výtěžku

### 1) absolutní stanovení (primární metody)

- chemický aktinometr
- kalorimetrie
- kalibrované zdroje záření, korekce spekter, integrační koule atd.

### 2) relativní stanovení (sekundární metody)

- srovnání s fluorescenčním standardem

## Stanovení kvantového výtěžku

### Chemický aktinometr

- roztok šřavelanu železitého absorbuje všechno záření o vlnové délce menší než 490nm
- absorbované záření se velkou účinností redukuje Fe(III) na Fe(II)
- titračně lze určit kolik Fe(III) se přeměnilo na Fe(II) a následně spočítat kolik fotonů prošlo systémem
- uspořádání chemického aktinometru pro určení kvantového výtěžku: kyveta se vzorkem je obklopena aktinometrickým roztokem, kromě malého okénka, které propustí do vzorku excitační záření. Emitované záření je pak zachyceno do aktinometrického roztoku.

TABLE I. Recommended Fluorescence Quantum Yield References In Various Emission Ranges.<sup>†</sup>

| Region     | Compound                | Solvent                              | $\Phi_f$  | Ref. |
|------------|-------------------------|--------------------------------------|-----------|------|
| 270-300 nm | Benzene                 | Cyclohexane                          | 0.05±0.02 | a    |
| 300-380 nm | Tryptophan*             | H <sub>2</sub> O (pH 7.2)            | 0.14±0.02 | b    |
| 300-400 nm | Naphthalene             | Cyclohexane                          | 0.23±0.02 | c    |
| 315-480 nm | 2-Aminopyridine         | 0.1 N H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> | 0.60±0.05 | d    |
| 360-480 nm | Anthracene              | Ethanol                              | 0.27±0.03 | a,e  |
| 400-500 nm | 9,10-Diphenylanthracene | Cyclohexane                          | 0.90±0.02 | f, g |
| 400-600 nm | Quinine Bisulfate       | 1 N H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>   | 0.546     | e, g |
| 600-650 nm | Rhodamine 101           | Ethanol                              | 1.0±0.02  | h    |
| 600-650 nm | Cresyl Violet           | Methanol                             | 0.54±0.03 | i    |

## Stanovení kvantového výtěžku

$$\text{kvantový výtěžek: } \Phi_k = N_{\text{em}}/N_{\text{abs}}$$

- pro stanovení kvantových výtěžků používáme **fluorescenční standardy** (tj. látky s definovaným kvantovým výtěžkem)
- potřebujeme znát molární absorpční koeficienty (nebo hodnoty absorpce) při stejné koncentraci) stanovené látky i standardu pro vlnovou délku excitačního záření
- změříme a porovnáme plochy (F) emisních spekter

$$\Phi_x = \Phi_{\text{st}} \frac{F_x}{F_{\text{st}}} \times \frac{\epsilon_{\text{st}}}{\epsilon_x}$$



## Stanovení kvantového výtěžku - problémy

- vnitřně filtrační efekt (samoabsorpce)
- různá citlivost detektoru pro různé vlnové délky
- proměnlivá intenzita excitačního zdroje
- korekce na refrakční index
- polarizační efekt
- nečistoty ve standardech
- rozptyly (Raman, Tyndal)