

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования
«Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет
им. Н.И. Лобачевского»
(ННГУ)


Директор НИИ химии
ННГУ им. Н.И. Лобачевского
Е.В. Сулейманов
« 22 » сентября 2020 г.



**Методика измерения квантового выхода флуоресценции и квантовой
эффективности флуоресценции совместно с интегрирующей сферой**

г. Нижний Новгород
2020 г.

Список исполнителей

Должность	Фамилия И.О.	Подпись
Ответственный исполнитель, профессор каф. химии нефти (нефтехимического синтеза), д.х.н.	Гришин И.Д.	

Содержание

Принцип метода	4
Средства измерений	5
Вспомогательные средства, материалы и реактивы	5
Требования к квалификации исполнителя и технике безопасности	5
Условия измерений	6
Подготовка к проведению измерений	6
Определение квантового выхода флуоресценции	6
Определение квантовой эффективности (абсолютного квантового выхода)	10

Настоящая методика предназначена для определения квантового выхода флуоресценции и квантовой эффективности флуоресценции образцов с использованием интегрирующей сферы.

Принцип метода

Люминесцентные методы анализа основаны на регистрации спектров испускания молекул, находящихся в возбужденном состоянии. Спектр люминесценции молекулы зависит от ее электронного строения, может рассматриваться как ее характеристика, а его регистрация может быть использована для идентификации соединения или его количественного определения. В зависимости от способа генерации возбужденного состояния молекулы различают фотолюминесценцию, рентгенолюминесценцию, электролюминесценцию, хемилюминесценцию, биолюминесценцию и т.д. В зависимости от мультиплетности возбужденного электронного состояния молекулы люминесценция подразделяется на флуоресценцию и фосфоресценцию. Флуоресценция возникает при переходах между уровнями одинаковой мультиплетности (при переходах с возбужденного синглетного уровня на основной синглетный уровень), а фосфоресценция – между уровнями различной мультиплетности (при переходах с триплетного на основной синглетный уровень). Частным и наиболее важным случаем флуоресценции является фотофлуоресценция, возникающая под действием излучения видимого или ближнего УФ-диапазона.

Важными характеристиками процессов флуоресценции являются квантовый выход и квантовая эффективность. Под квантовым выходом флуоресценции понимают величину, равную отношению числа излученных квантов света к числу поглощенных. Традиционным методом определения квантового выхода является метод эталонного красителя, основанный на использовании образца сравнения, в качестве которого выступает вещество, квантовый выход флуоресценции которого известен с большой точностью.

Альтернативным методом определения квантового выхода флуоресценции является метод интегрирующей сферы. Он основан на сравнении интегральных световых потоков люминесценции исследуемого вещества и отраженного возбуждающего света. Инструментом для определения квантового выхода в данном случае служит полая сфера, покрытая изнутри слоем вещества с высоким коэффициентом диффузного отражения во всем диапазоне длин волн, используемых в эксперименте. Метод интегрирующей сферы позволяет определить абсолютный квантовый выход, также называемый квантовой эффективностью.

Средства измерений

- Спектрофлуориметр RF-6000 производства фирмы Shimadzu, снабженный интегрирующей сферой.
- Спектрофотометр UV-1800 производства фирмы Shimadzu,
- Система сбора и обработки данных для спектрофлуориметра: компьютер с программным обеспечением LabSolutions RF (для управления спектрофлуориметром) и LabSolutions UV-vis (для управления спектрофотометром).
- Весы лабораторные общего назначения по ГОСТ 24104, специального класса точности, с наибольшим пределом взвешивания 200 г.
- Колбы мерные 1-25-2, 1-1000-2, ГОСТ 1770.
- Микрошприцы вместимостью 100, 2500 мм³, например, производства фирмы Hamilton, погрешность дозирования не более 2 % полного объема.

Вспомогательные средства, материалы и реактивы

- кювета кварцевая для спектрофлуориметра сечением 10*10 мм с плоскопараллельными гранями с четырьмя полированными сторонами Hellma 101-QS.
- Вода для лабораторного анализа (деионизованная), ГОСТ Р 52501,
- Спирт этиловый абсолютный, ГОСТ 33881,
- Родамин Б, производства Sigma-Aldrich, кат. № Si83698
- Уранин А, производства Sigma-Aldrich, кат. № 46960
- Сульфат хинина, производства Sigma-Aldrich, кат. № 22640
- Серная кислота, стандарт-титр, 0,1 н., ТУ2642-01-56278322

Допускается применение других средств измерений с метрологическими характеристиками и оборудования с техническими характеристиками не хуже, а также реактивов и материалов по качеству не ниже вышеуказанных.

Требования к квалификации исполнителя и технике безопасности

Измерения выполняются оператором, имеющим опыт работы в области спектроскопии, прошедшим проверку знаний по технике безопасности, пожарной безопасности промышленной санитарии, техническое обучение и сдавшим экзамен на право допуска к самостоятельной работе.

При выполнении измерений необходимо соблюдать требования техники безопасности при работе с химическими реактивами по ГОСТ 12.1.007, требования пожарной безопасности по ГОСТ 12.1.004 и ГОСТ 12.1.018 и электробезопасности при работе с электроустановками по ГОСТ 12.1.019, а также требования, изложенные в технической документации на спектрофлуориметр и спектрофотометр.

Условия измерений

При выполнении измерений в помещении лаборатории необходимо соблюдать

следующие условия:

- атмосферное давление $101,3 \text{ кПа} \pm 3 \text{ кПа}$;
- температура воздуха рабочего помещения $20 \pm 5 \text{ }^\circ\text{C}$;
- относительная влажность воздуха не более 80 % при температуре $25 \text{ }^\circ\text{C}$;
- напряжение в сети $220 \pm 10 \text{ В}$;
- частота переменного тока $50 \pm 1 \text{ Гц}$.

Подготовка к проведению измерений

Подготовка к анализу

Для проведения анализа можно применять стеклянную, полиэтиленовую, тефлоновую или полипропиленовую посуду. Вся химическая посуда, применяемая при установлении градуировочной характеристики, предварительно обрабатывается спирто-щелочной смесью.

Посуду предварительно моют дистиллированной или деионизованной водой, затем спирто-щелочной смесью, ополаскивают деионизованной водой до нейтральной реакции (контроль pH по индикаторной бумаге) и высушивают. Посуда маркируется. Чистую посуду хранят в закрытом виде.

Кварцевые кюветы обрабатывают хромовой смесью, ополаскивают деионизованной водой до нейтральной реакции (контроль pH по индикаторной бумаге) и высушивают.

0,1 н. раствор серной кислоты готовят растворением содержимого стандарт-титра в 1 л деионизированной воды в мерной колбе.

Определение квантового выхода флуоресценции

Методика определения квантового выхода флуоресценции рассмотрена на примере родамина Б как исследуемого вещества и уранина А как вещества с известным квантовым выходом.

Приготовление растворов исследуемого вещества и стандарта проводят следующим образом. Навеску вещества порядка 1 мг растворяют в мерной колбе вместимостью 25 см^3 и доводят до метки соответствующим растворителем. Помещают 2,5 мл полученного раствора в кювету и проводят определение спектра поглощения при помощи спектрофотометра при следующих параметрах регистрации:

Тип спектра:	поглощение
Скорость сканирования:	средняя
Ширина щели:	2 нм

Оптическая плотность полученного раствора в диапазоне исследуемых длин должна находиться в интервале 0,01 - 0,1. Если оптическая плотность превосходит значение 0,1 проводят разбавление раствора чистым растворителем до достижения требуемых значения оптической плотности. Если оптическая плотность ниже 0,1 увеличивают навеску вещества и проводят повторное растворение в мерной колбе.

Для определения длины волны, на которой следует определять квантовый выход флуоресценции, проводят регистрацию спектра возбуждения исследуемого вещества (родамин Б). 2,5 мл исследуемого раствора помещают в кварцевую кювету и проводят регистрацию спектра возбуждения при следующих параметрах спектрофлуориметра:

Тип спектра:	возбуждение
Длина волны испускания:	568 нм
Скорость сканирования	200 нм/мин
Чувствительность:	низкая
Ширина щели возбуждения:	3 нм
Ширина щели испускания:	3 нм

Среди веществ с известными выходами флуоресценции выбирают соединение, спектр возбуждения которого перекрывается со спектром возбуждения исследуемого вещества. В качестве стандартного вещества для определения квантового выхода флуоресценции родамина Б был выбран уранин А.

В кварцевую кювету помещают 2,5 мл спиртового раствора уранина А и проводят регистрацию спектра возбуждения при следующих параметрах:

Тип спектра:	возбуждение
Длина волны испускания:	520 нм
Скорость сканирования	200 нм/мин
Чувствительность:	низкая
Ширина щели возбуждения:	3 нм
Ширина щели испускания:	3 нм

На рисунке 1 приведены зарегистрированные спектры возбуждения. Как видно из полученных данных, спектры возбуждения перекрываются, что подтверждает правильность выбора стандарта. В качестве длины волны для определения квантового выхода был выбран максимум на спектре возбуждения – 498 нм.

Для предотвращения ошибки в измерении квантового выхода, связанной с гашением флуоресценции за счет поглощения необходимо, чтобы оптическая плотность исследуемых растворов на длине волны возбуждения не превышала величину 0,05. Для этого нужно еще раз проанализировать зарегистрированные спектры поглощения и при необходимости разбавить растворы и переснять спектры поглощения.

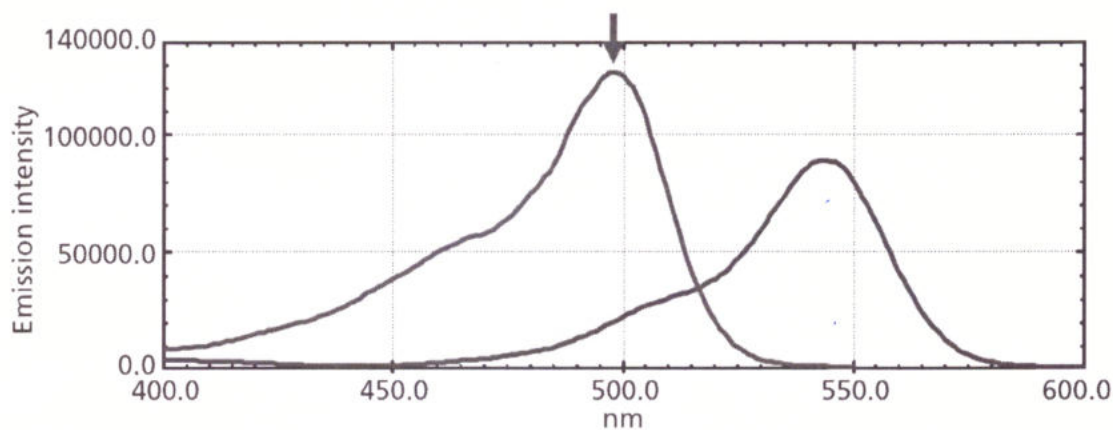


Рис 1. Спектры возбуждения флуоресценции уранина А (красный) и родамина Б (синий) в этаноле.

На рисунке 2 приведены спектры поглощения растворов родамина Б и уранина А. Как видно из спектров, величина оптической плотности на длине волны 498 нм не превышает значения 0,05, что отвечает требуемым условиям.

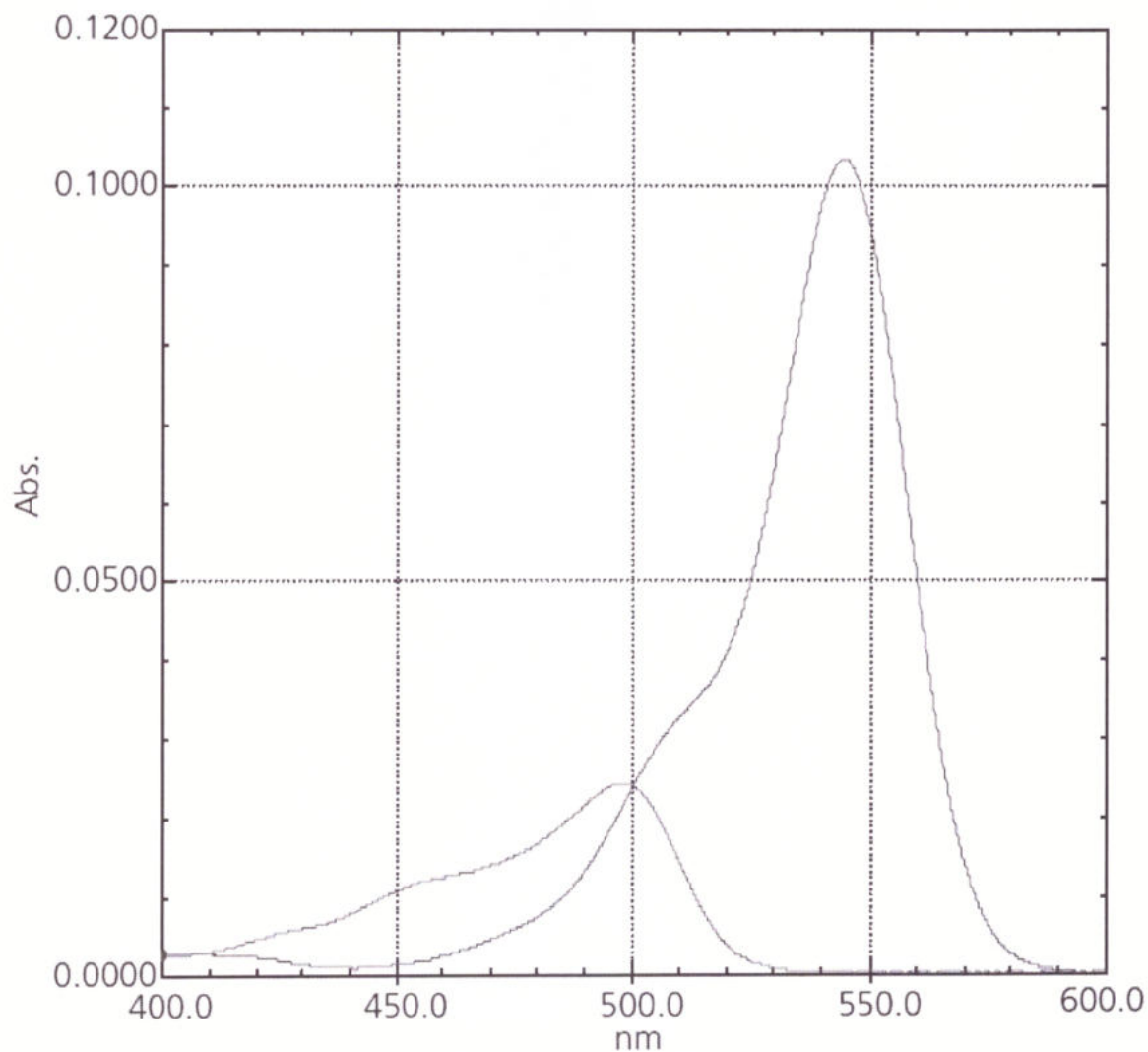


Рис 2. Спектры поглощения уранина А (красный) и родамина Б (синий) в этаноле.

Определение квантового выхода проводят при помощи опции Quantum Yield программного обеспечения LabSolutions RF. Квантовый выход рассчитывается автоматически в соответствии с формулой (1), где Φ – квантовый выход, A – оптическая плотность на длине волны возбуждения, n – показатель преломления растворителя, D – коэффициент разбавления (отношение концентрации раствора, для которого регистрируется спектр флуоресценции к концентрации раствора, для которого регистрируется спектр поглощения и определяется оптическая плотность). Индексы x относятся к исследуемому веществу, индексы c – к стандарту с известным квантовым выходом.

$$\Phi_x = \Phi_c \cdot \frac{A_c}{A_x} \cdot \frac{F_x}{F_c} \cdot \frac{n_x^2}{n_c^2} \cdot \frac{D_x}{D_c} \quad (1)$$

Значения A берутся исходя из описанных выше зарегистрированных спектров поглощения. В случае использования различных растворителей для приготовления растворов стандарта и исследуемого вещества, значения коэффициентов преломления n растворителей берутся из справочных данных или определяются при помощи рефрактометра. Если интенсивность флуоресценции исследуемого раствора выходит за границы области регистрации прибора (происходит насыщение и спектрофлуориметр сигнализирует об ошибке), то проводят разбавление раствора. При этом в формулу вводится коэффициент D , учитывающий отношение концентрации раствора, для которого проводили измерение спектра флуоресценции к концентрации раствора, для которого проводили определение спектра поглощения.

Для проведения анализа необходимо выбирают на панели управления прибора опцию “New Analysis”. В открывшемся окне в соответствующие графы вводят данные для стандартного образца (урапин А): название стандарта, табличное значение квантового выхода, значение коэффициента преломления растворителя, а также определенное значение оптической плотности для выбранной волны возбуждения. Нажимают на кнопку “Measurement” и проводят регистрацию спектра флуоресценции при следующих параметрах прибора:

Длина волны возбуждения:	498 нм
Диапазон волн испускания:	350-700 нм
Скорость сканирования	200 нм/мин
Чувствительность:	низкая
Ширина щели возбуждения:	3 нм
Ширина щели испускания:	3 нм

После регистрации спектра стандартного образца вводят значения коэффициента преломления растворителя, оптической плотности и коэффициента разбавления для исследуемого вещества. После этого проводят регистрацию спектра флуоресценции при тех же параметрах регистрации. На основании заданных значений и полученных спектров флуоресценции (рис. 3) программа автоматически рассчитает величину квантового выхода.

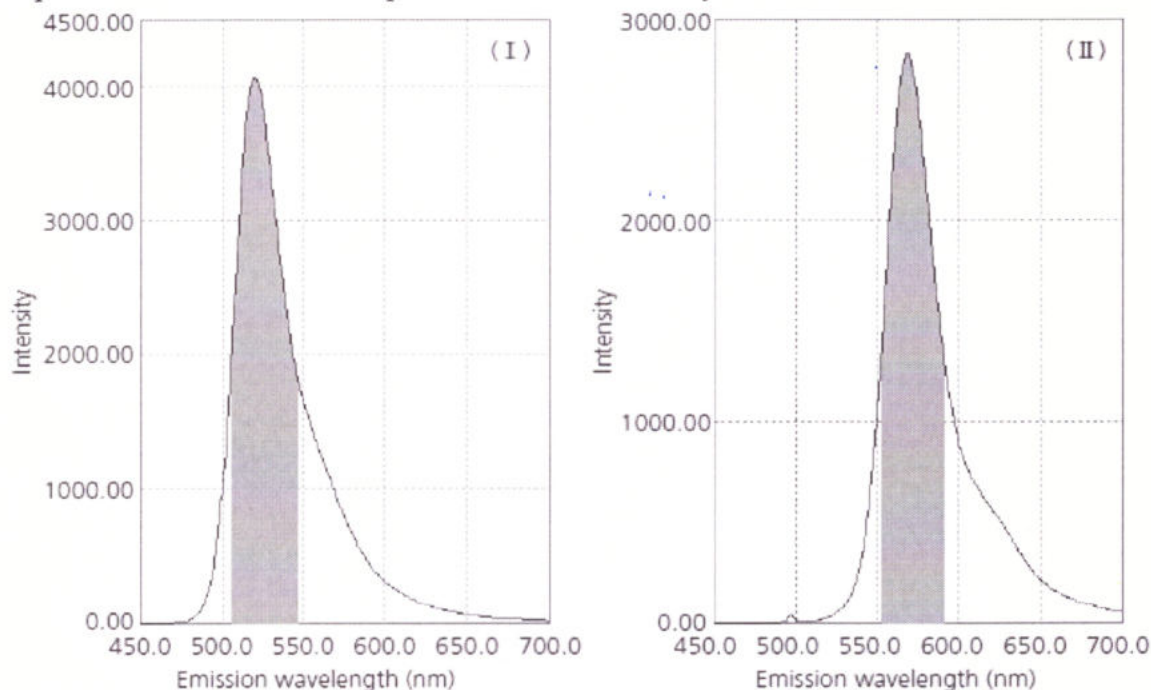


Рис 3. Спектры флуоресценции уранина (I) и родамина Б (II) в этаноле.

На основании того, что квантовый выход уранина А в этаноле составляет 0,97 был определен квантовый выход для родамина Б, который составил 0,7149, что совпадает с диапазоном значений, приведенных в литературе.

Определение квантовой эффективности (абсолютного квантового выхода)

Определение квантовой эффективности является стандартной функцией, реализованной в программном пакете LABsolutions RF. Программа позволяет определять внутреннюю квантовую эффективность и внешнюю квантовую эффективность. Внешняя квантовая эффективность определяется как отношение как отношение числа испущенных образцом квантов света к числу квантов света, попавших в интегрирующую сферу. Внутренняя квантовая эффективность (абсолютный квантовый выход) определяется как отношение числа испущенных образцом квантов к числу квантов, поглощенных образцом. При расчете внутренней квантовой эффективности не учитываются фотоны, рассеянные образцом.

Для определения квантовой эффективности необходимо установить в прибор интегрирующую сферу. Для этого при помощи отвертки с длинным жалом необходимо открутить винты, удерживающие стандартный держатель

кюветы. После этого вытащить держатель кюветы, поместить интегрирующую сферу и зафиксировать ее винтами.

Для определения квантовой эффективности необходимо провести измерение спектра флуоресценции помещенной в интегрирующую сферу кюветы с чистым растворителем, а затем кюветы с растворенным исследуемым веществом.

Определение абсолютного квантового выхода рассмотрено на примере сульфата хинина.

Готовят раствор исследуемого соединения. 5 мг сульфата хинина помещают в мерную колбу объемом 25 мл и доводят до метки 0,1 н. раствором серной кислоты.

В программе LabSolutions RF выбирают режим определения квантовой эффективности. В кварцевую кювету с 4-мя полированными сторонами помещают 2,5 мл 0,1 н. раствора серной кислоты, использовавшегося для приготовления раствора исследуемого вещества. Помещают кювету в интегрирующую сферу, как показано на рисунке 4.

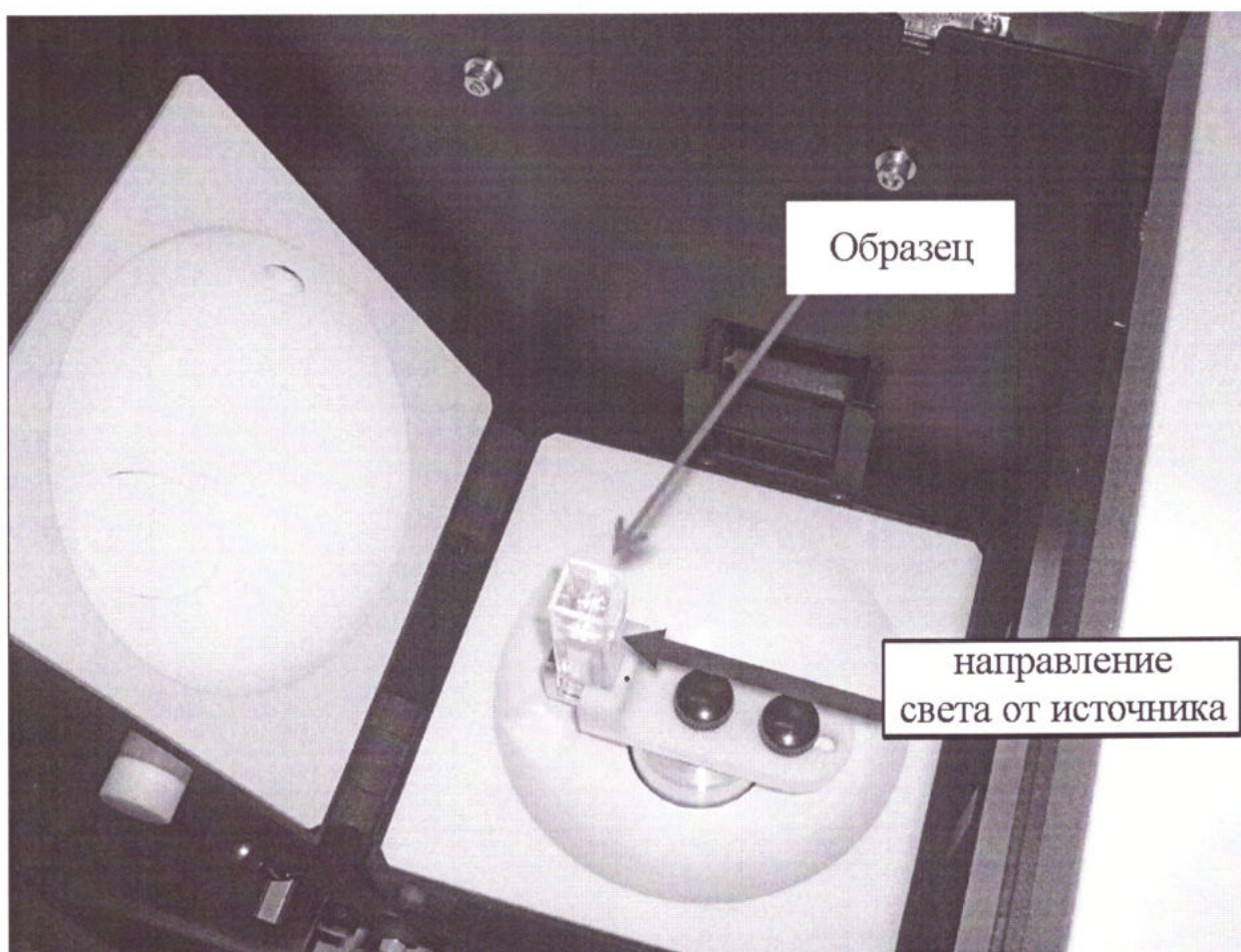


Рис.4. Установка образца в интегрирующую сферу

Проводят регистрацию спектра флуоресценции при следующих параметрах прибора:

Длина волны возбуждения:	350 нм
Диапазон волн испускания:	300-680 нм
Скорость сканирования	200 нм/мин
Чувствительность:	автоматическая
Ширина щели возбуждения:	3 нм
Ширина щели испускания:	3 нм

Открывают интегрирующую сферу, извлекают кювету, выливают из нее растворитель и заливают в кювету 2,5 мл приготовленного раствора сульфата хинина. Закрывают интегрирующую сферу и проводят регистрацию спектра флуоресценции при тех же параметрах регистрации. Величина квантовой эффективности рассчитывается программой автоматически.

Полученное таким образом значение квантовой эффективности для сульфата хинина составило величину 0,5336, что совпадает с диапазоном значений, приведенных в литературе.