

MOLEKULA- SPEKTROSZKÓPIA

1. Molekulaspektrumok jellemzői

- **sáv**os emissziós (flureszcens), vagy abszorpciós (UV-VIS) spektrumok, a Gauss-görbe típusú sávok félértékszélessége nagy (10-50 nm),
- a sávok helye a spektrumban (hullámhossz) és a sávok intenzitásaránya az atomok között létrejött kémiai kötésre (és nem a teljes molekulára) jellemző.

1.1. A molekulapályák szerkezete:

Az atomok közötti kémiai kötés létrejötte során az egyesülő atompályákból a molekulapályák **két sorozata** jön létre :

- **kötő pályák:** ahol alapállapotban a kötésben résztvevő elektronok elhelyezkednek,
- **lazító pályák:** amelyek alapállapotban általában üresek, gerjesztéskor a kötő pályán lévő elektron ide lép fel.
- **nem kötő pálya:** bizonyos atomoknál (pl. O, N, S, halogének) a vegyérték-héjon vannak olyan elektronpárok is , amelyek nem vesznek részt a kötés kialakításában (nem kötő elektronok), de gerjeszthetők.

Szabály: annyi molekulapálya keletkezik ahány atompálya egyesült.

1.2. A lehetséges elektronátmenetek jellemzői

$\sigma \rightarrow \sigma^*$ átmenet

- egyszeres kötésben részt vevő elektron gerjesztésekor jellemző,
- az átmenet gerjesztésére nagy energiájú, távoli ultraibolya sugarak alkalmasak,
- általában nem vizsgálhatóak, mert a gerjesztéshez szükséges sugárzás hullámhossza kisebb, mint 200 nm (itt a levegő oxigénje is gerjesztődik, ill. a molekula széteshet)

$\pi \rightarrow \pi^*$ átmenet

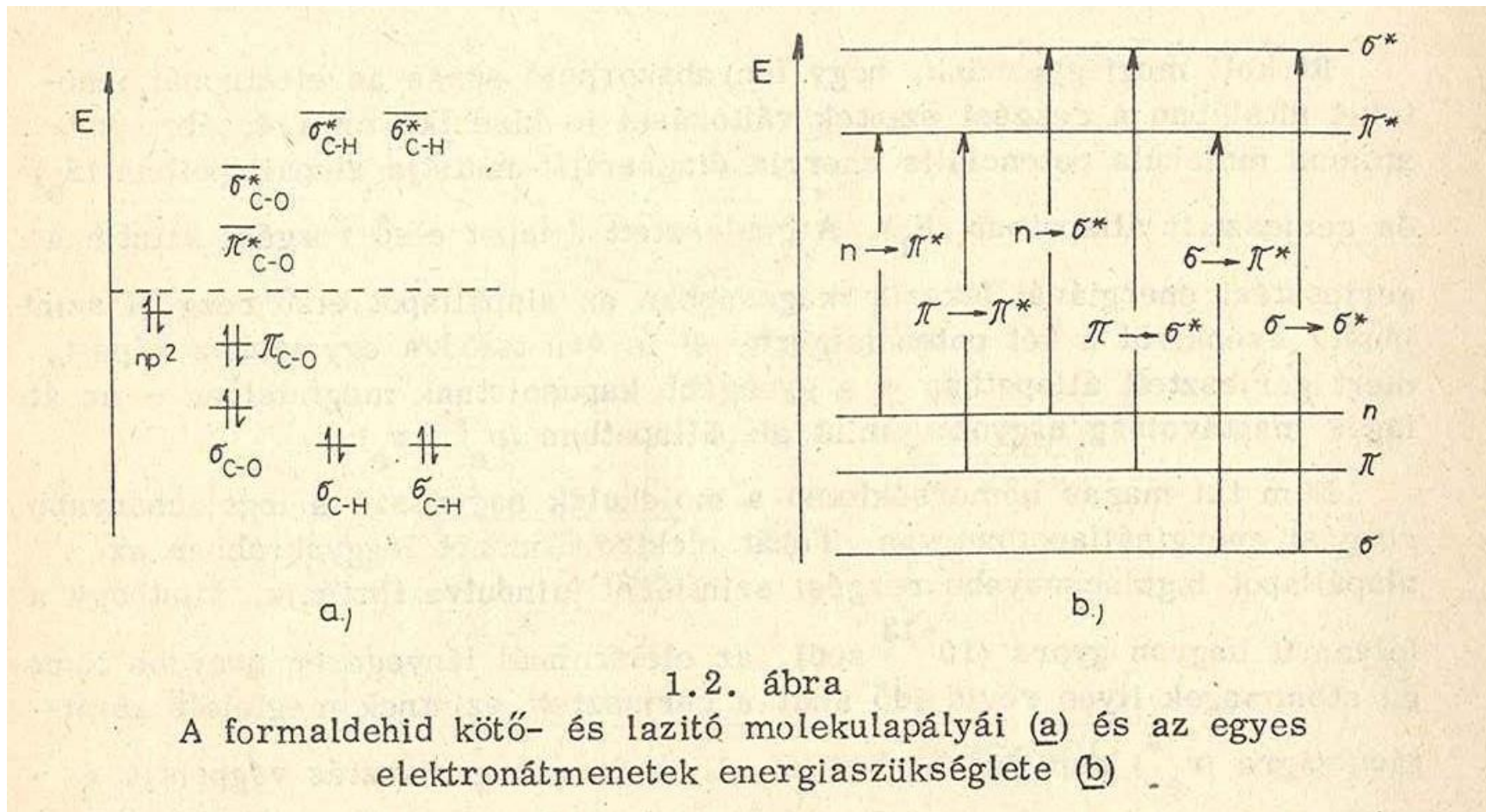
- a telítetlen kettős és hármas kötések tartalmazó vegyületekre jellemző,
- a gerjesztéshez kisebb energia szükséges, mint az egyszeres kötéseknel, így a közeli UV-ben, esetenként a látható tartományban gerjeszthető.

$n \rightarrow \sigma^*$ és $n \rightarrow \pi^*$ átmenetek

- nem kötő, magános elektrópárral rendelkező heteroatomot (O, N, S, halogének) tartalmazó vegyületekben lehetségesek:
- $n \rightarrow \pi^*$ átmenet esetében ez az atom kettős kötésben, illetve heteroaromás gyűrűben található (C=O, C=N, piridin),
- $n \rightarrow \sigma^*$ átmenet esetében egyes kötéssel kapcsolódik a molekulához (alkoholok, éterek, alkil/aryl-halogenidek).

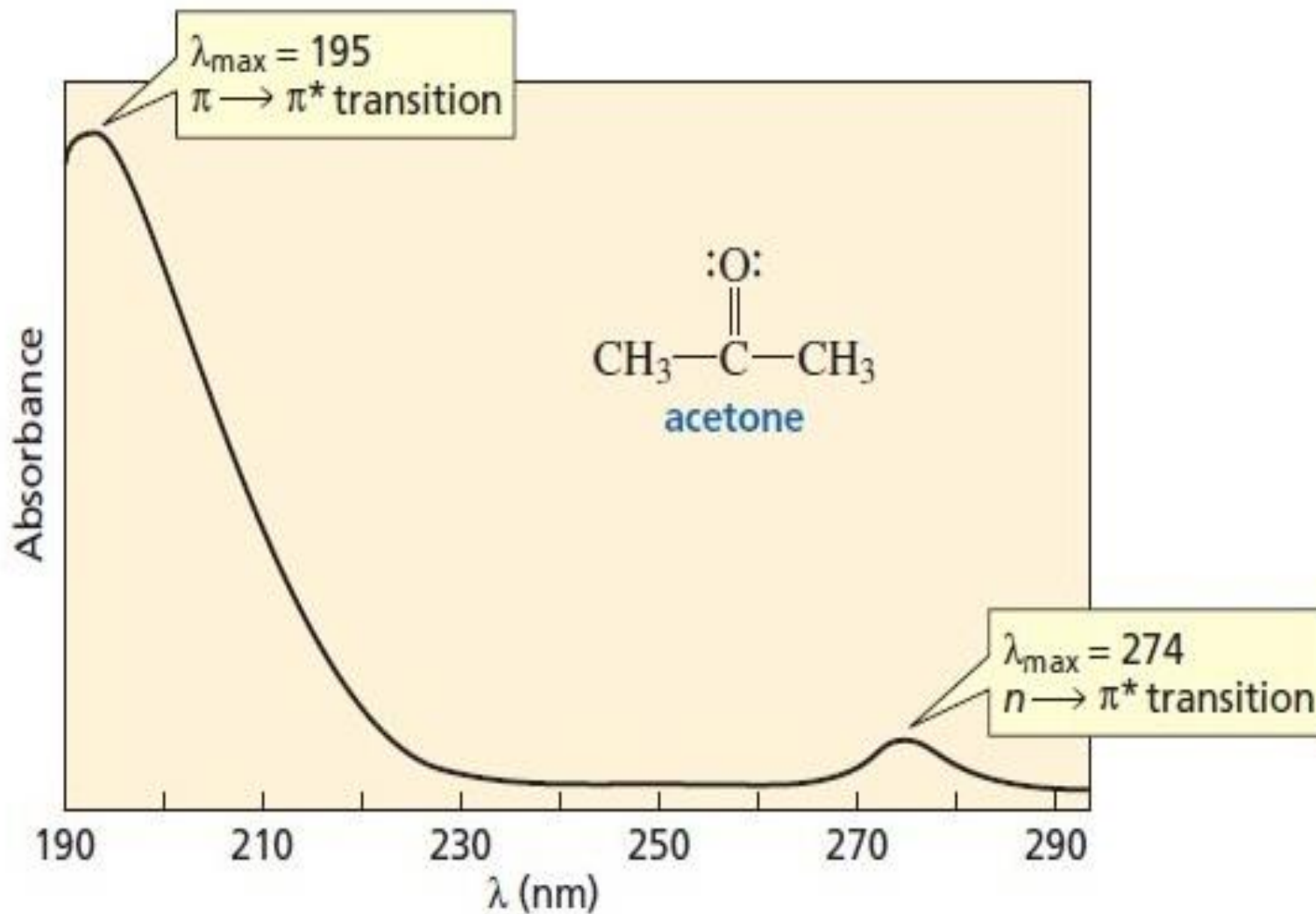
1.1. ábra. A formaldehid molekulapályái és lehetséges elektronátmenetei

(Forrás: Novák L., Kolonits Gy.: Szerves kémiai praktikum, jegyzet, 1985)



1.2. ábra: Az aceton UV molekulaszpektruma

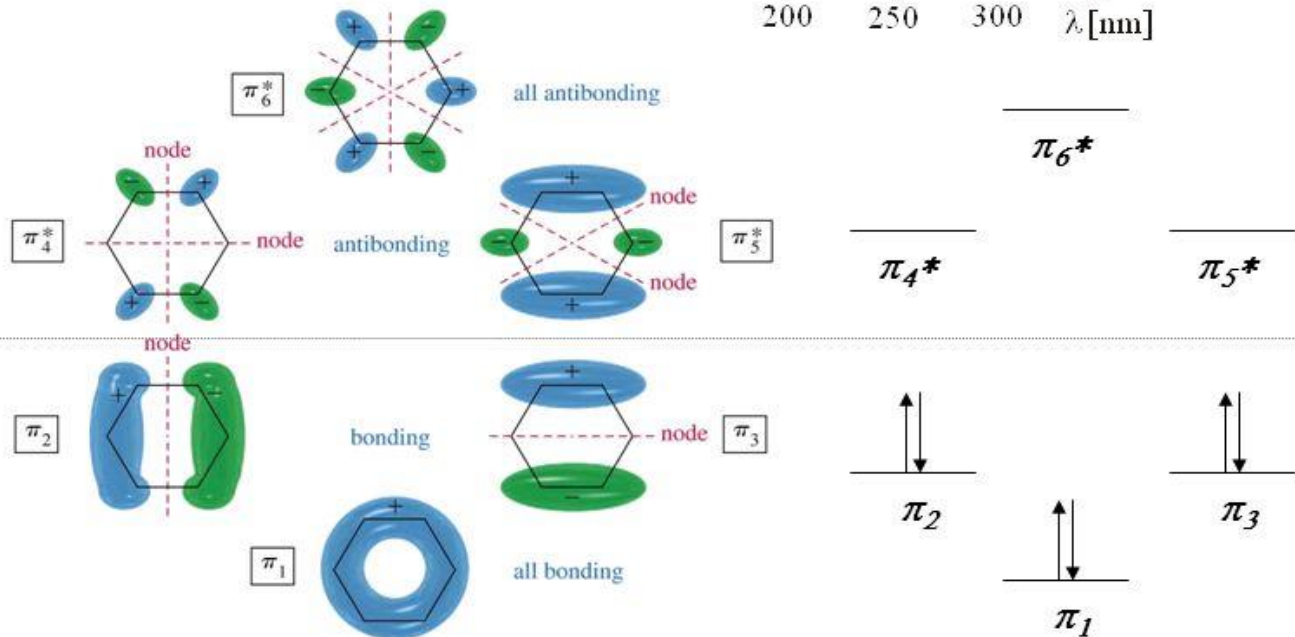
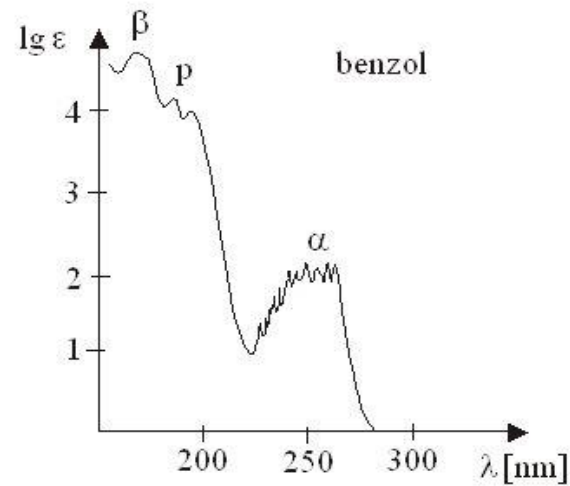
(forrás: www.masterorganicchemistry.com)



1.3. ábra. Aromás rendszer elektronátmenetei

Aromás rendszerek

Benzol molekulapályái

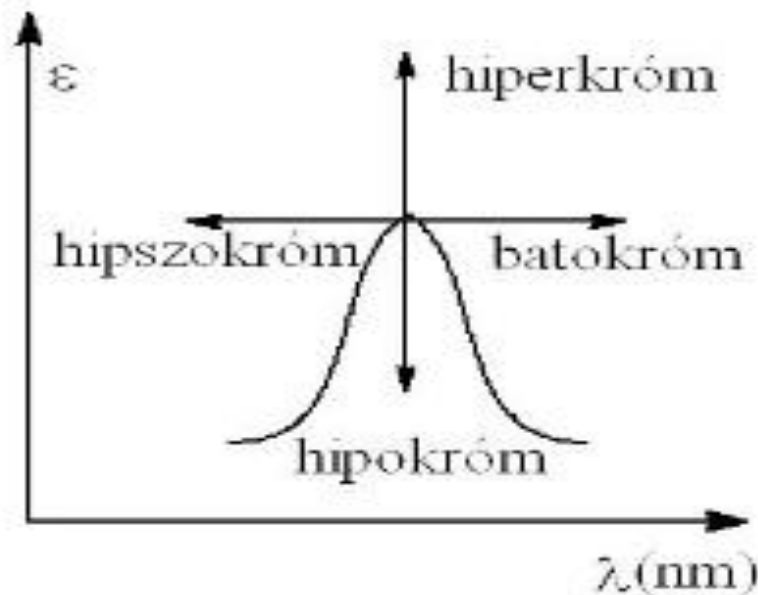


1.3. Az abszorpciót okozó, ill. azt befolyásoló csoportok

Kromofór csoport: az abszorpcióért felelős, könnyen gerjeszthető π -, vagy n-elektronokat tartalmazó csoport csoport a molekulában ($>C=O$, $>C=N-$, $>C=C<$, $-N=N-$, $-NO_2$, $-SO_2$, aril).

Auxokróm csoport: önmagában nem gerjeszthető, de a kromofór csoporttal kölcsönhatásba lépve (induktív, mezomer, sztérikus effektus) megváltoztatja annak abszorpciós hullámhosszát és az abszorpciós sáv intenzitását ($-OH$, $-OR$, $-NH_2$, halogének).

Az auxokróm csoportok által okozott eltolódások



1.4. A molekulaspektrumok sávos jellegének magyarázata

Atomok belső energiájának megváltozása:

$$\Delta E_{\text{atom}} = \Delta E_{\text{elektron}} = h\nu$$

Vagyis: egy foton abszorpciója egy elektronállapot megváltozását okozza!

Következmény: vonalas (0.005-0.02 nm) spektrum.

Molekulák belső energiájának megváltozása:

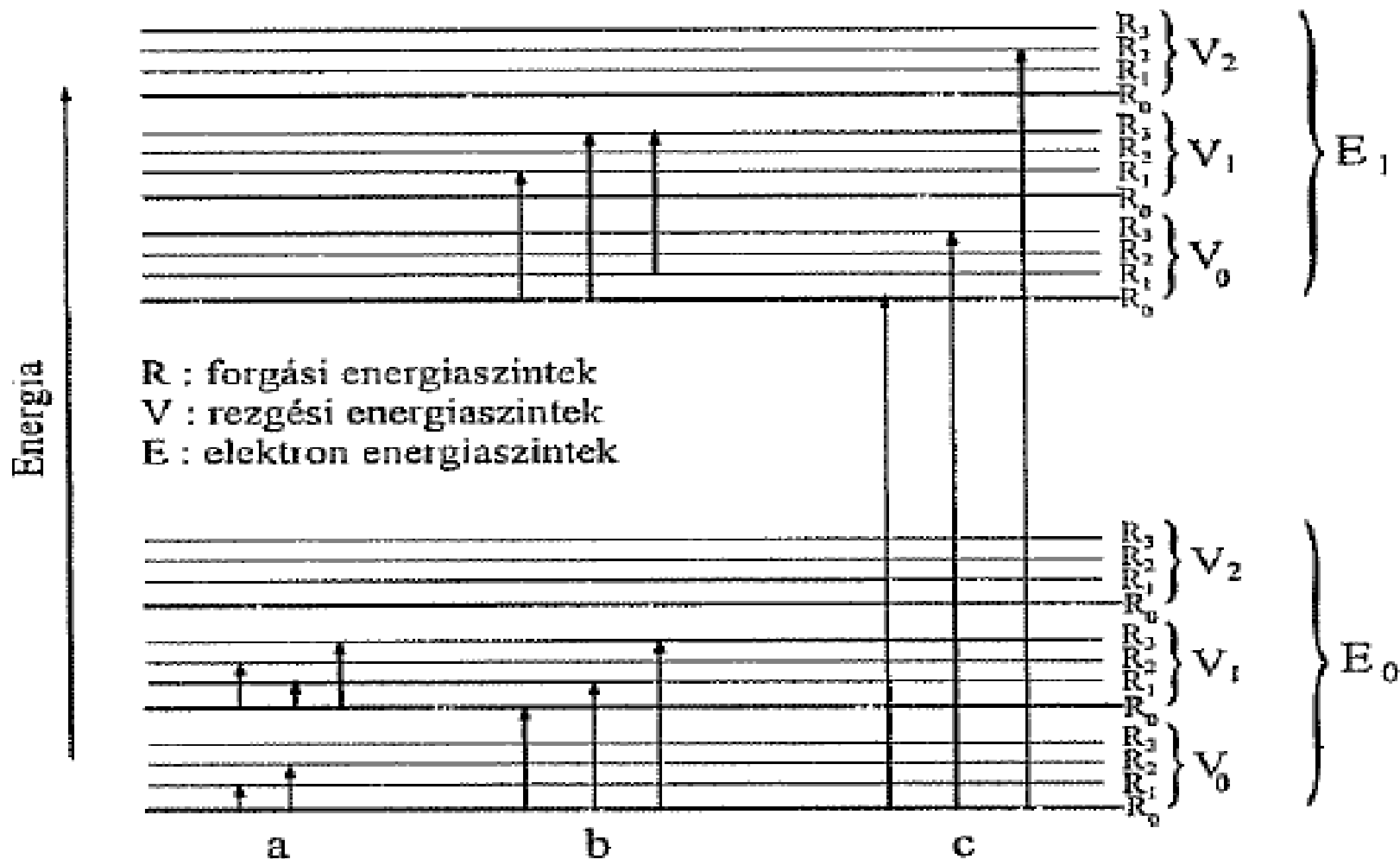
$$\Delta E_{\text{molekula}} = \Delta E_{\text{elektron}} + \Delta E_{\text{rezgési}} + \Delta E_{\text{forgási}} = h\nu$$

Vagyis: egy foton abszorpciója egyidejűleg okozhatja (akár) mindhárom állapot megváltozását!

Következmény: sávos (10-50 nm) spektrum, mivel a rezgési, de különösen a forgási energianívók távolsága (energiakülönbsége) jóval kisebb, mint egy kötő, ill. lazító energianívó közötti távolság:

$$\Delta E_{\text{elektron}} \sim 10 \cdot \Delta E_{\text{rezgési}} \sim 10 \cdot \Delta E_{\text{forgási}}$$

1.4. ábra. Molekulák gerjesztési lehetőségei (az elektron-rezgési-forgási spektrum)



1.5. Molekulaspektroszkópai módszerek csoportosítása

A csoportosítás alapja: milyen energiaátmeneteket tudunk gerjeszteni

Mit gerjesztünk	Hullámhossztartomány	Módszer neve
forgási átmenetek	mikrohullámok (0,3 mm-1 m), távoli infravörös (30-300 mm)	forgási spektroszkópia
rezgési + forgási átmenetek	analitikai infravörös (1-30 mm), közeli infravörös (780-1000 nm)	rezgési (infravörös, IR) spektroszkópia
		Raman spektroszkópia
rezgési + forgási + elektron átmenetek	látható(350-780 nm), ultraibolya (190-380 nm), távoli ultraibolya (10-190 nm)	UV-VIS molekulaspektroszkópia
		Fluoreszcencia spektroszkópia (fluorimetria)

2. UV-VIS spektrofotometria

- - **Molekulaabszorpciós módszer:**
- - Az elemzés az ultraibolya (UV), ritkábban a látható (VIS → visible) tartományban történik (kb. 190- 800 nm).
- - A mérés során a molekulában lévő kettős (hármás) kötés, vagy az aromás rendszer π elektronjának (ritkábban a heteroatom nem kötő elektronjának) gerjesztése (π - π^* , n - π^*) következtében történt fényelnyelésből következtünk a molekula szerkezetére (az elnyelés hullámhossza), ill. koncentrációjára (az elnyelés mértéke → Lambert-Beer törvény).
- - Mivel a molekulák spektruma sávós, a széles sávok miatt a módszer **önállóan nem alkalmas a szerkezet felderítésére**, viszont az intenzív elnyelési sávok érzékeny (egyben alacsony kimutatási határral jellemezhető) mennyiségi analízist tesznek lehetővé.

2.1. UV-VIS spektrofotométerek (I.)

A készülékek fő egységei:

1. Fényforrás: a széles elnyelési sávok miatt megfelelnek a folytonos emissziós spektrumot szolgáltató fényforrások (lámpák)

UV-tartomány: deutérium lámpa

Látható tartomány (VIS): wolfram-halogén lámpa

2. Fényfelbontó egység:

optikai szűrő (üvegszűrő vagy interferencia szűrő)

monokromátor (prizmás, optikai rácson)

3. Mintatartó: küvetta (folyadék mintákhoz)

speciális gázküvetta (gáz halmazállapotú mintákhoz)

speciális mintatartó szilárd mintákhoz (fóliák, fényvédő krémek, UV-szűrő üvegek vizsgálatához)

A mintatartók anyaga az UV-tartományban kvarcüveg, a látható tartományban kvarcüveg, normál üveg, ill. műanyag (plexi).

2.1. UV-VIS spektrofotométerek (II.)

4. Detektor: fotocella
fotoelektron sokszorozó
fotodióda
CCD

5. Jelfeldolgozó, kijelző egység:

- analóg (mutató) műszer
- saját beépített szoftver és képernyő
- PC (megfelelő adatfeldolgozó szoftverrel)

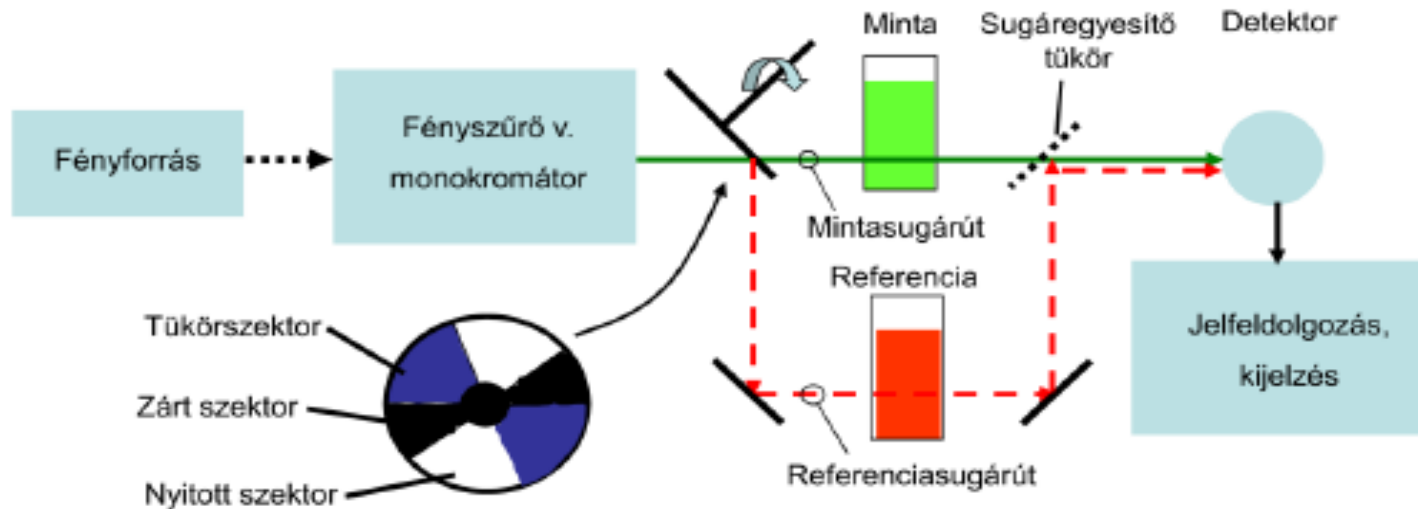
Spektrofotométer típusok: egy fényutas – egy detektoros
– diódasoros
két fényutas – egy detektoros
– két detektoros

2.1. ábra- Egy és két sugárutas UV-VIS spektrofotométer

(Forrás: Analitikai kémia e- jegyzet, szerk.: Pokol Gy., 2011.)



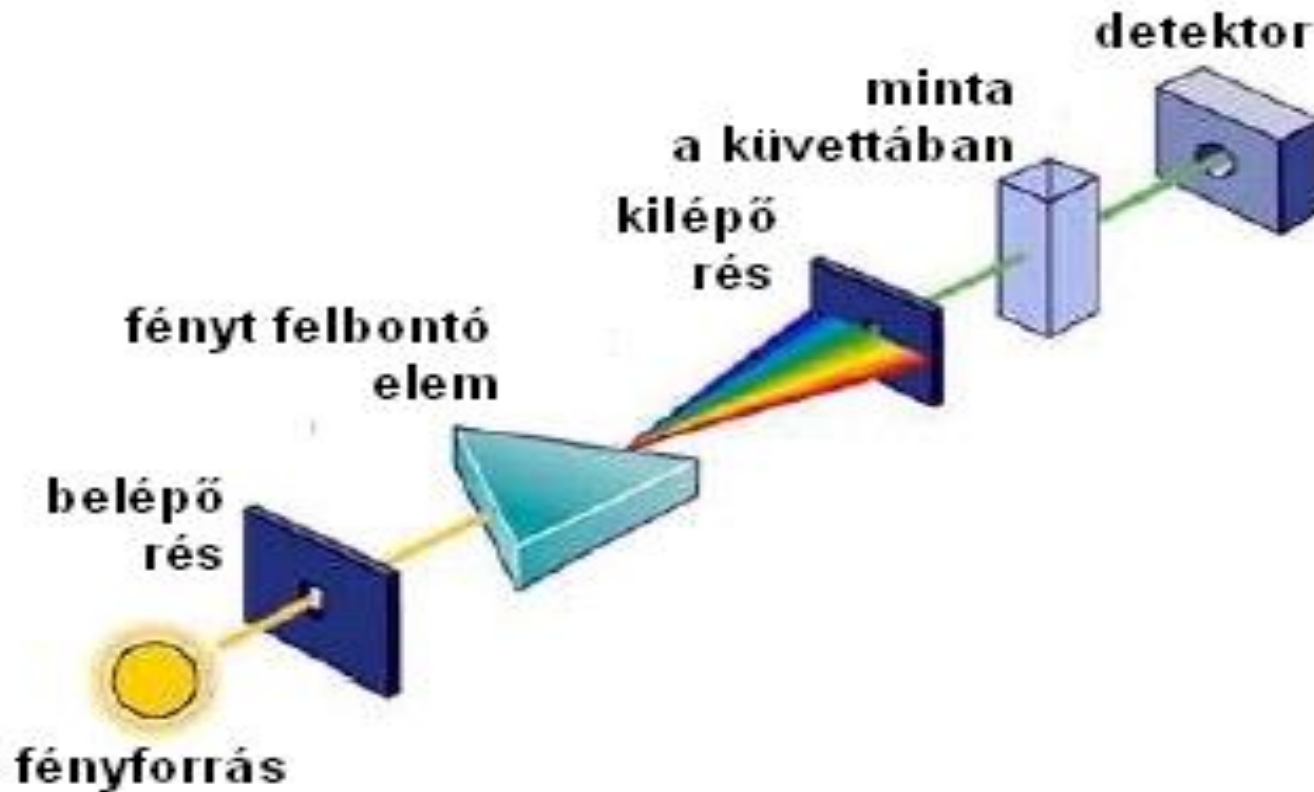
(a) Egysugaras spektrofotométer



(b) Kétsugaras, egydetektoros spektrofotométer

2.2. ábra. Egysugárutas spektrofotométer (térbeli elrendezés)

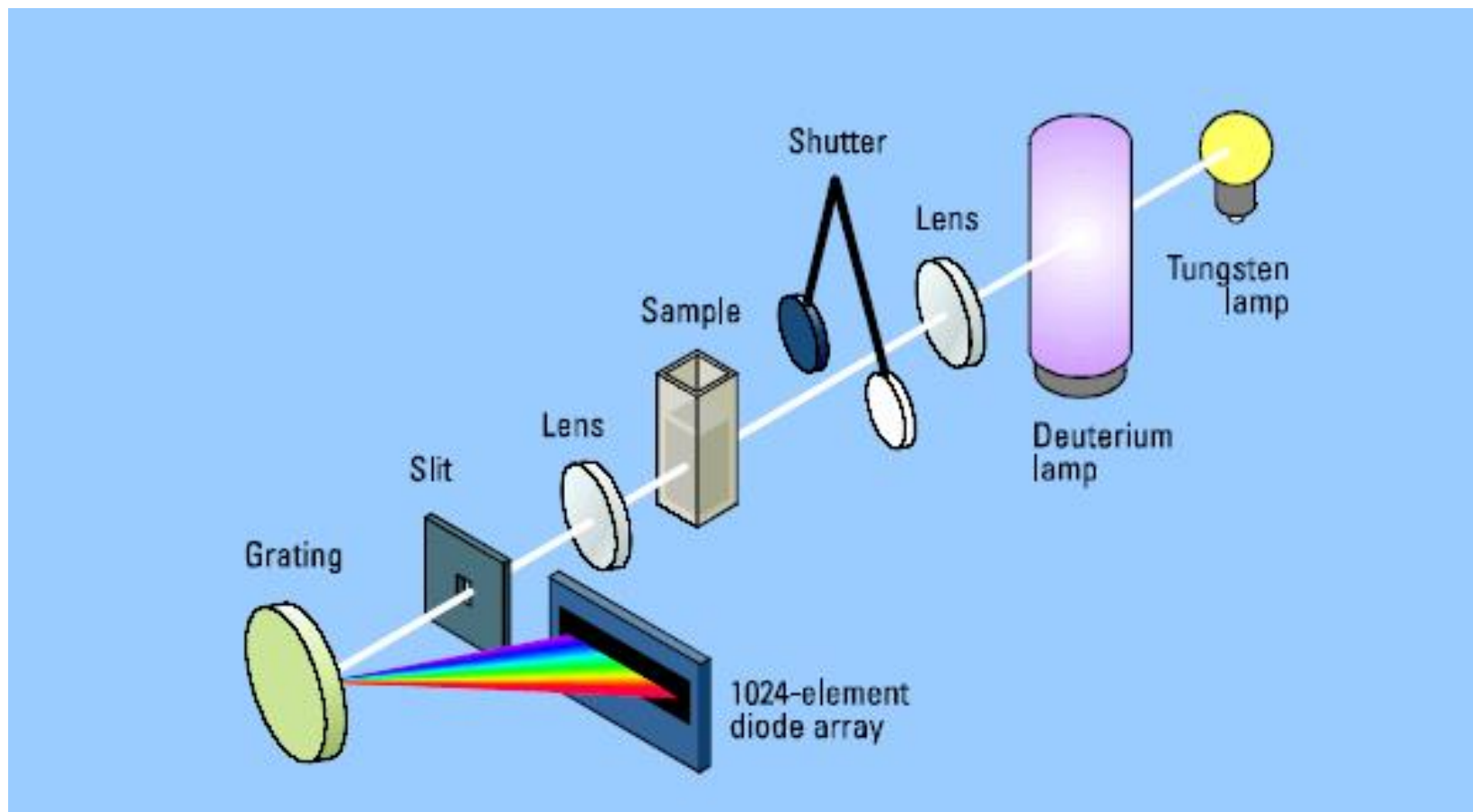
(Forrás: www.vilaglex.hu/Fizika)



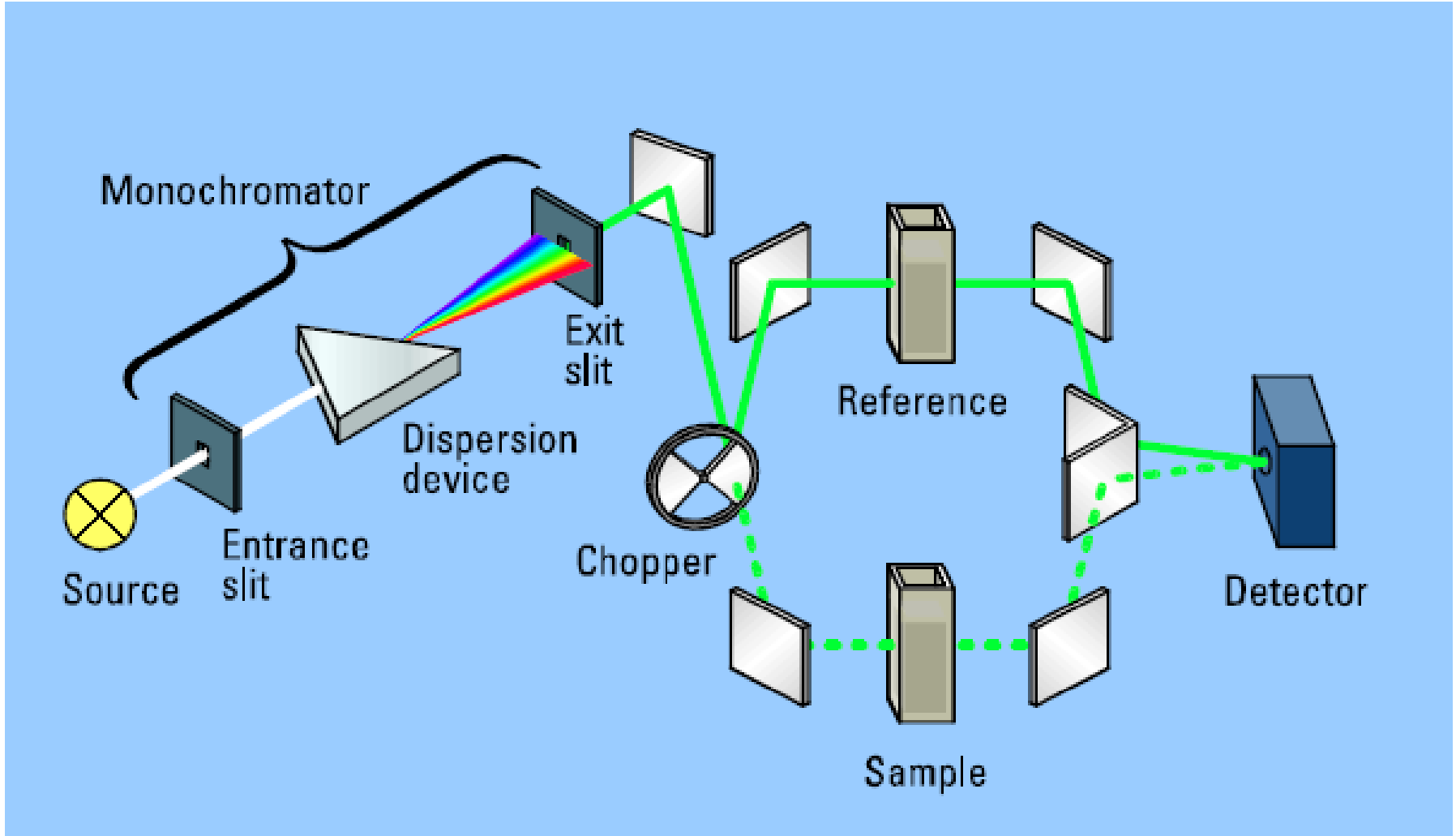
2.3. ábra. Egysugarú, diódasoros spektrofotométer (térbeli elrendezés)

(Forrás: <https://anzdoc.com/spektrofotometria.>)

Alkalmazás: HPLC detektorként



2.4. ábra. Kétsugárutas, egy detektoros spektrofotométer (térbeli elrendezés) (Forrás: <https://anzdoc.com/spektrofotometria.>)

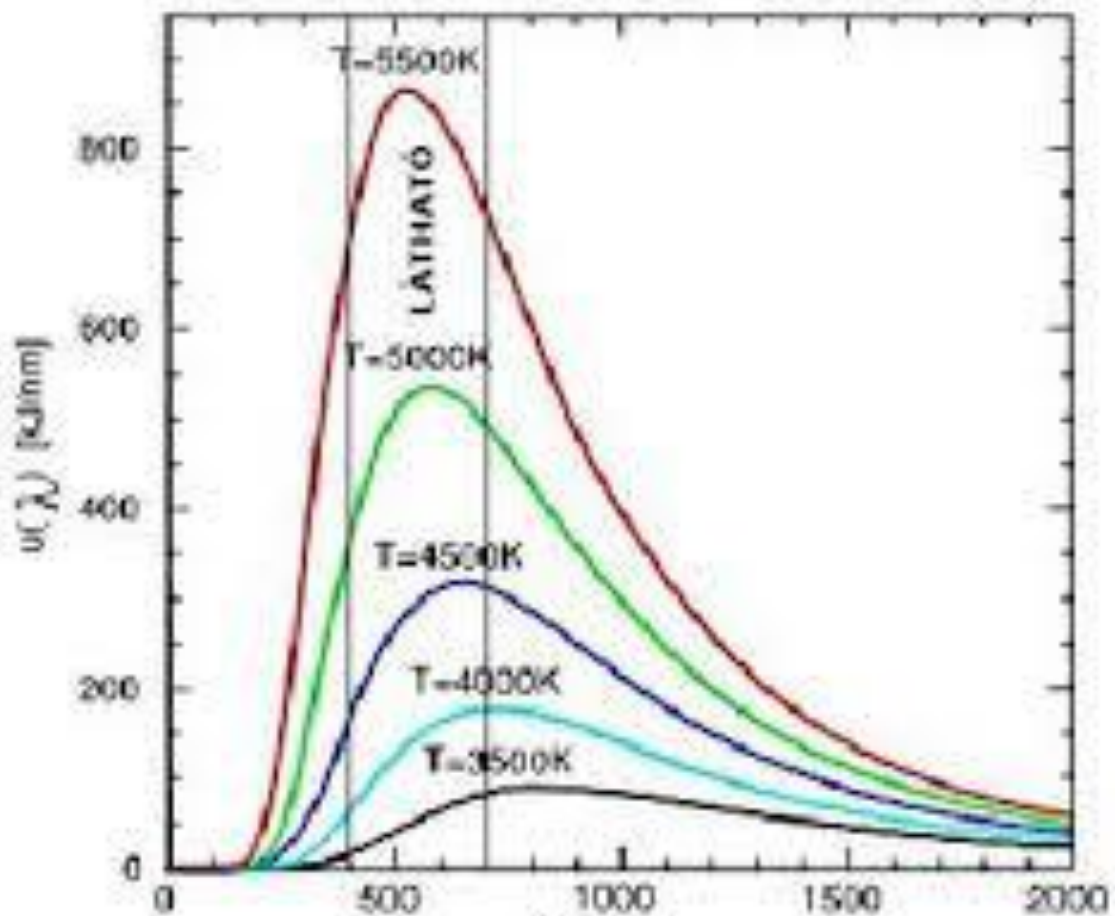


2.1.1. Fényforrások

Látható tartományban (VIS): Wolfram-halogén izzó

- A W szálát 3000-3500 °K-re melegítve a 350-2500 nm (VIS, IR) hullámhossztartományban folytonos sugárzást ad (fekete test sugárzása).
- A sugárzás hullámhossztartománya és intenzitása az izzószál hőmérsékletének függvénye (Wien-féle törvény): $\lambda_{\max} \cdot T \text{ (°K)} = \text{áll.}$
- Halogén (I₂) töltetű lámpa: magasabb hőmérsékleten üzemeltethető → nagyobb fényerő a látható tartományban, hosszabb élettartam.
- **Ultraibolya tartományban (UV): deutérium lámpa**
 - kisülési lámpa: a folytonos sugárzást (160-400 nm) a lámpában lévő kisnyomású D₂ molekula Ar-ívfény (plazma) hatására történő gerjesztődése és a gerjesztett molekula atomizációja közben keletkező UV fotonok adják:
 - $\text{Ar} \rightarrow \text{Ar}^+ + \text{e}^- ; \text{D}_2 + \text{e}^- \rightarrow \text{D}_2^* \rightarrow \text{D}^1 + \text{D}^2 + \text{UV foton}$
 - A folyamat energiamérlege:
 - $E_{\text{elektron}} = E_{\text{gerjesztés}} = E_{\text{D1,kin.}} + E_{\text{D2,kin.}} + h \cdot \nu_{\text{foton}}$

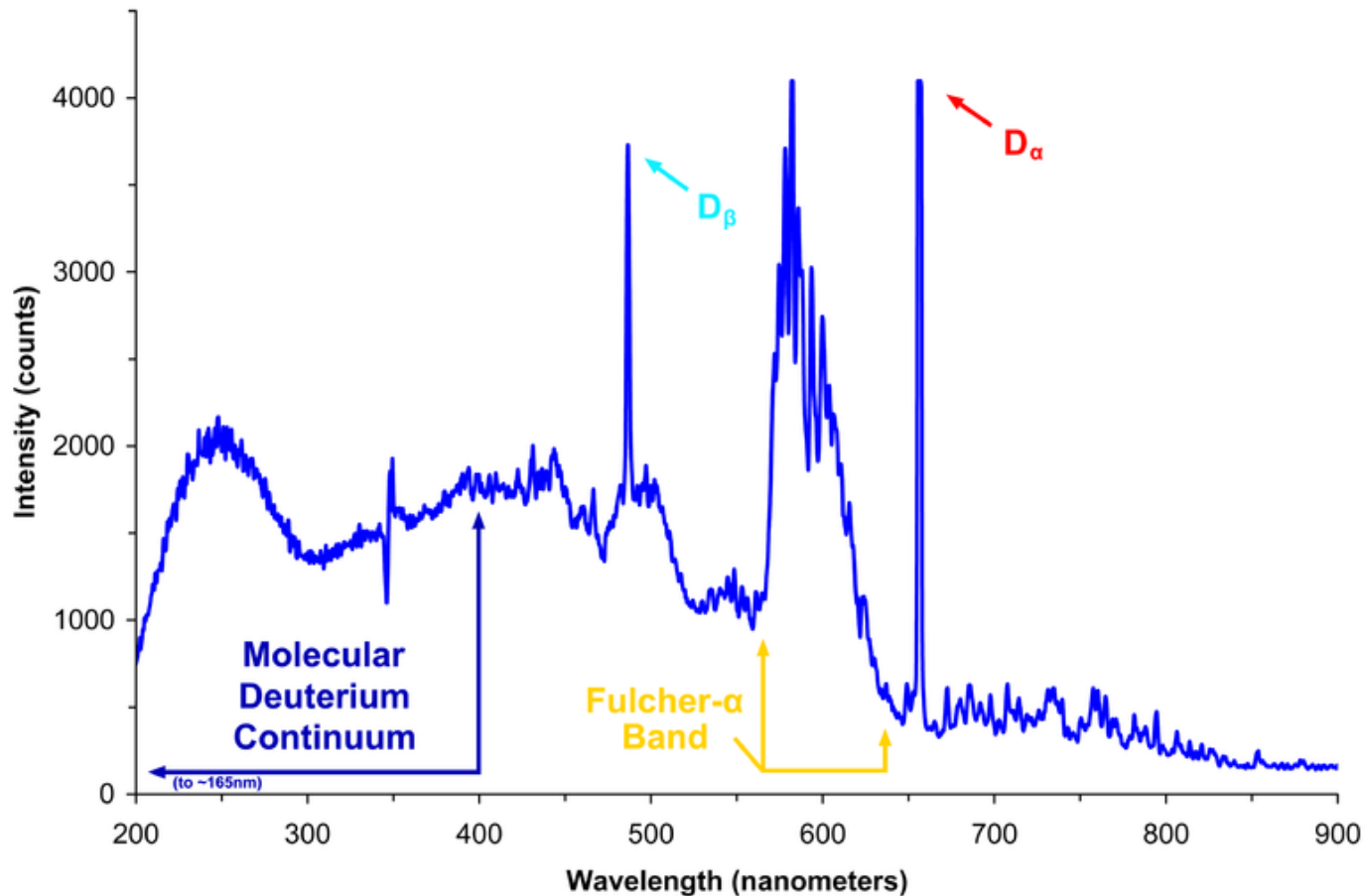
2.5. ábra. Wolfram-halogén izzó spektrumai a hőmérséklet függvényében



2.6. ábra. Deutériumlámpa spektrumai

UV-tartomány: folytonos molekulaszpektrum

Látható tartomány: sávos molekulaszpektrum+ atomvonalak

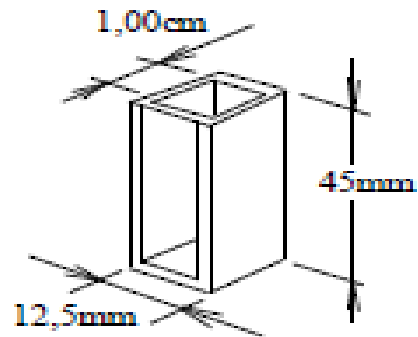


2.7. ábra. Különböző folyadék mintatartók (küveták)

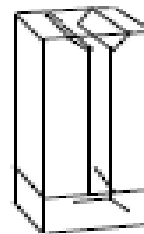
a, b: normál, ill. keskeny küvetta

c: gázküvetta

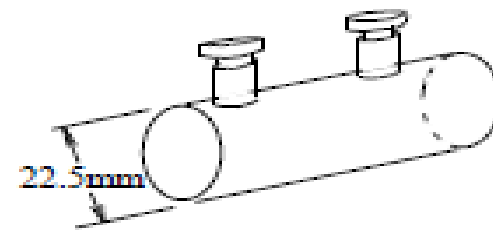
d, e: átfolyó küveták



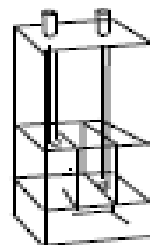
(a)



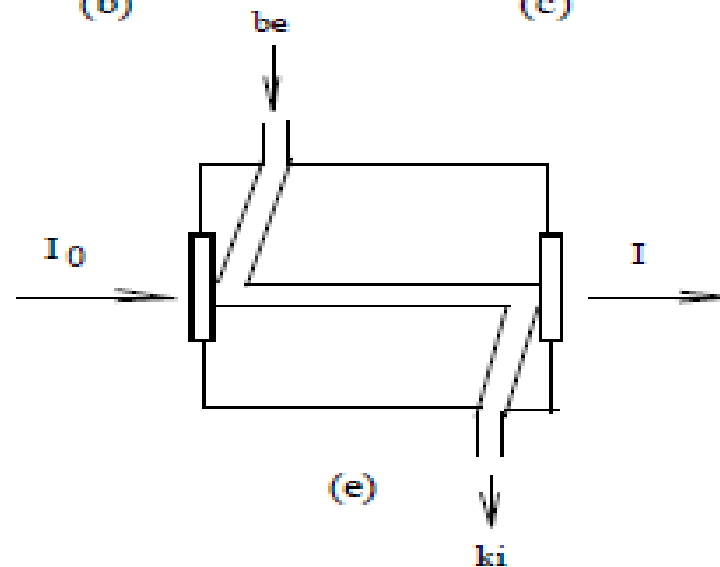
(b)



(c)

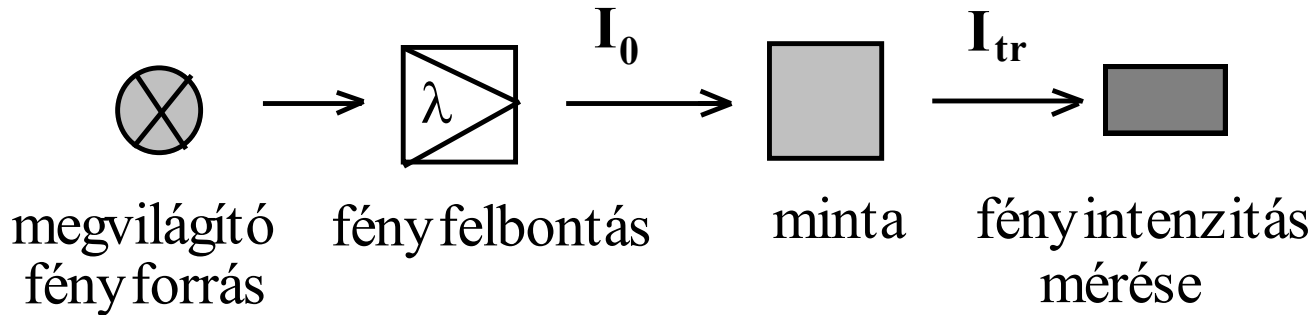


(d)



(e)

2.2. Mennyiségi analízis



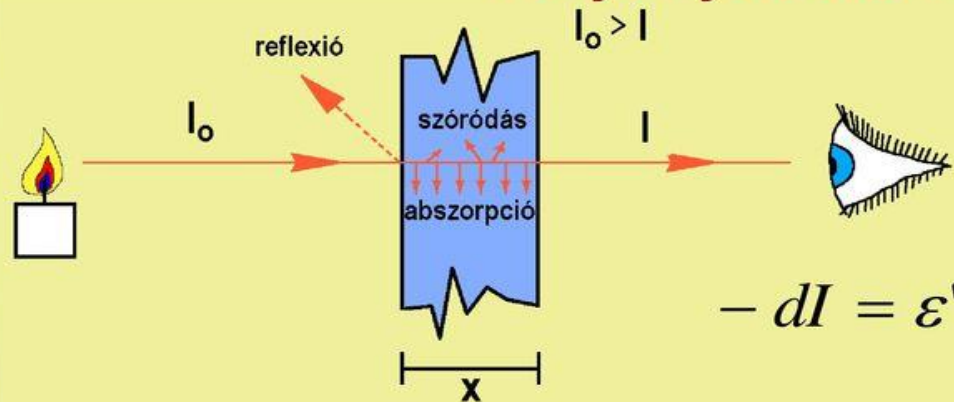
$$A_\lambda = -\lg \frac{I_{tr}}{I_0} = -\lg T = \varepsilon_\lambda \cdot l \cdot c$$

Bouguer-Lambert-Beer törvény: egy adott ($\lambda = \text{áll.}$) hullámhosszon, híg oldatokban:

ahol	A (-)	abszorbancia
	T (-, vagy %)	transzmittancia
	I_t, I_0	az áteresztett (transzmittált), ill. a beeső fény intenzitása
	c (mol/dm³)	koncentráció
	l (cm)	optikai úthossz
	ε (dm³·mol⁻¹·cm⁻¹)	moláris abszorpciós koefficiens

A Bouguer-Lambert-Beer törvény levezetése

Fényelnyelés törvénye



Bouguer: 1729, Lambert: 1760

$$-\frac{\Delta I}{\Delta x} = \varepsilon' I$$

$$x = 0, I = I_0$$

$$-dI = \varepsilon' I dx$$

$$I = I_0 e^{-\varepsilon' x}$$

$$\ln \frac{I_0}{I} = \varepsilon' x$$

Beer: 1852

$$-\frac{\Delta I}{\Delta c} = \varepsilon'' I$$

$$-dI = \varepsilon'' I dc \quad c = 0, I = I_0$$

$$I = I_0 e^{-\varepsilon'' c} \quad \ln \frac{I_0}{I} = \varepsilon'' c \rightarrow A = \log \frac{I_0}{I} = \varepsilon \cdot x \cdot c$$

$$\varepsilon = \varepsilon(\lambda) \rightarrow A = A(\lambda, c) \quad T = \frac{I}{I_0} \quad A = -\log T$$

2.2.1. Az abszorbancia additivitása

ha egy oldatban az adott hullámhosszon több komponens is elnyel, a mért abszorbancia az egyes komponensek abszorbanciáinak összege:

$$\mathbf{A} = \Sigma \mathbf{A}_i = \mathbf{A}_1 + \mathbf{A}_2 + \dots + \mathbf{A}_n = \varepsilon_1 \cdot l \cdot c_1 + \varepsilon_2 \cdot l \cdot c_2 + \dots + \varepsilon_n \cdot l \cdot c_n$$

Kétkomponensű elegy összetételének meghatározása:

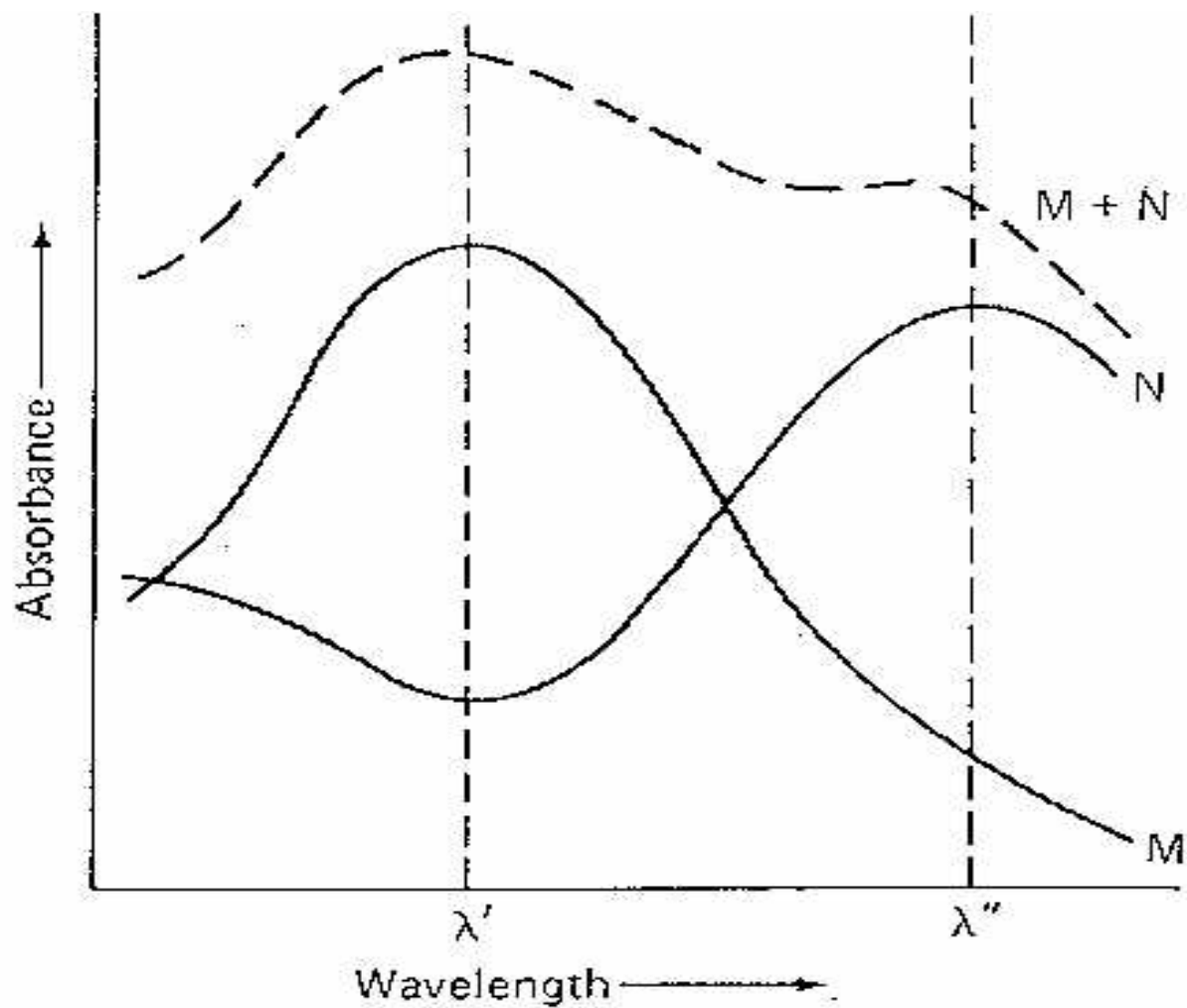
Két olyan hullámhosszon (λ_1, λ_2) mérünk, ahol mindkét komponens elnyel:

1. Először meghatározzuk a tiszta komponensek moláris abszorpciós koefficienseit mindkét hullámhosszon ($\varepsilon_{11}, \varepsilon_{12}, \varepsilon_{21}, \varepsilon_{22}$) ismert koncentrációjú oldatok mérésével,
2. Megmérjük az elegy abszorbanciáját a két hullámhosszon ($\mathbf{A}_1, \mathbf{A}_2$)
3. Megoldjuk a 2 db két ismeretlenes (c_1, c_2) egyenletrendszer:

$$\mathbf{A}_1 = \varepsilon_{11} \cdot l \cdot c_1 + \varepsilon_{12} \cdot l \cdot c_2$$

$$\mathbf{A}_2 = \varepsilon_{21} \cdot l \cdot c_1 + \varepsilon_{22} \cdot l \cdot c_2$$

2.8. ábra. Kétkomponensű (M és N) elegy abszorpciós spektruma és a mérési hullámhosszok kiválasztása



2.2.2. Eltérések a Lambert-Beer-törvénytől

2.2.1. Tömény oldatokban ($c > 10^{-2}$ M)

ϵ nem független a koncentrációtól, mivel az oldat törésmutatója a koncentráció növelésével nő.

10^{-2} M-nál nagyobb koncentrációk esetén: $\epsilon^* = \epsilon \cdot n / (n^2 + 2)^2$

ahol n az oldat törésmutatója

2.2.2. Híg oldatokban ($c < 10^{-2}$ M)

a. Kémiai okokra visszavezethető eltérések

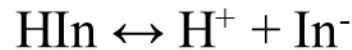
A mérendő oldatban disszociáció, asszociáció, solvatáció, komplexképződés játszódhat le, aminek következtében az abszorbeáló részecskék száma (így a koncentrációja) megváltozik. A jelenség felhasználható egyensúlyi állandó meghatározásához.

Pl. így meghatározható indikátorok pK_i értéke:

az indikátorok két formája (nem disszociált molekula, ill. anion) egymástól eltérő színű, mivel más-más szerkezetűek \rightarrow más-más hullámhosszon abszorbeálnak.

Egyensúlyi állandó meghatározása

Az indikátor (mint gyenge sav) disszociációs egyensúlya:



Egy λ =**állandó hullámhosszon**, ahol mindkét forma elnyel valamilyen mértékben, három pH értéknél mérünk:

1. **pH₁ = 0** (erősen savas közeg): itt az indikátor (gyenge sav) gyakorlatilag nem disszociál, csak **HIn** formában van jelen, melynek elnyelése:

$$A_{HIn} = \varepsilon_{HIn} \cdot l \cdot c$$

Ebből ismert c konc. oldat esetén ε_{HIn} meghatározható.

2. **pH₂ = 14** (erősen lúgos közeg): itt az indikátor (gyenge sav) teljesen disszociál, csak **In⁻** formában van jelen, melynek elnyelése:

$$A_{In} = \varepsilon_{In} \cdot l \cdot c$$

3. **pH₃ ~ pK_i** környékén: az indikátor részlegesen disszociál, mindkét forma jelen van, melyek elnyelése:

$$A = A_{HIn} + A_{In} = \varepsilon_{HIn} \cdot l \cdot c_{HIn} + \varepsilon_{In} \cdot l \cdot c_{In}$$

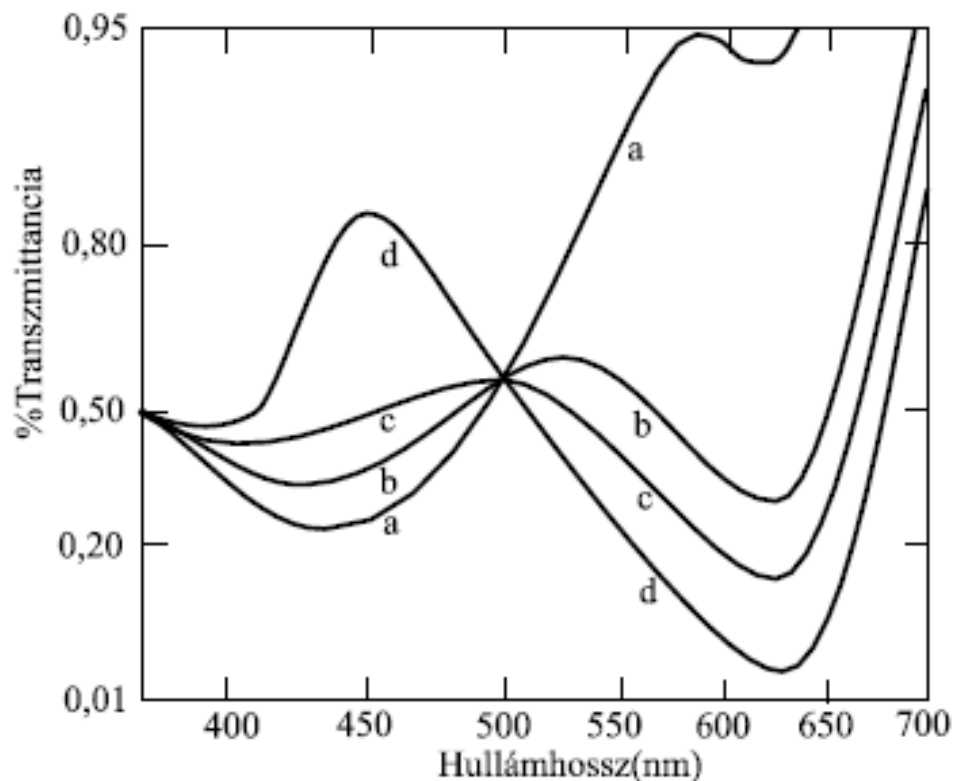
mivel: $c = c_{HIn} + c_{In}$, a két egyenletből c_{HIn} és c_{In} számítható.

Az egyensúlyi állandó: $K_i = \frac{[H^+] \cdot [In^-]}{[HIn]} = \frac{10^{-pH_3} \cdot c_{In}}{c_{HIn}}$

Izobesztikus pont

Ha a kémiai egyensúly mindkét partnere (pl. HIn és In^-) abszorbeálja a sugárzást, és található olyan λ_1 , ahol $\epsilon_{\text{HIn}} > \epsilon_{\text{In}^-}$, valamint olyan λ_2 , ahol $\epsilon_{\text{HIn}} < \epsilon_{\text{In}^-}$, akkor a görbék folytonossága miatt lennie kell legalább egy olyan hullámhossznak, ahol $\epsilon_{\text{HIn}} = \epsilon_{\text{In}^-}$, azaz a görbék metszik egymást.

Ezt a metszéspontot **izobesztikus** pontnak nevezzük. Az izobesztikus pont hullámhosszán mérve meghatározható a vegyület összkoncentrációja.



Izobesztikus pont (501 nm). A brómtimolkék spektruma különböző pH-értékeken (a: pH=5,45, b: pH=6,95, c: pH=7,50, d: pH=11,6)

2.2.2.b. Fizikai okokra visszavezethető eltérések

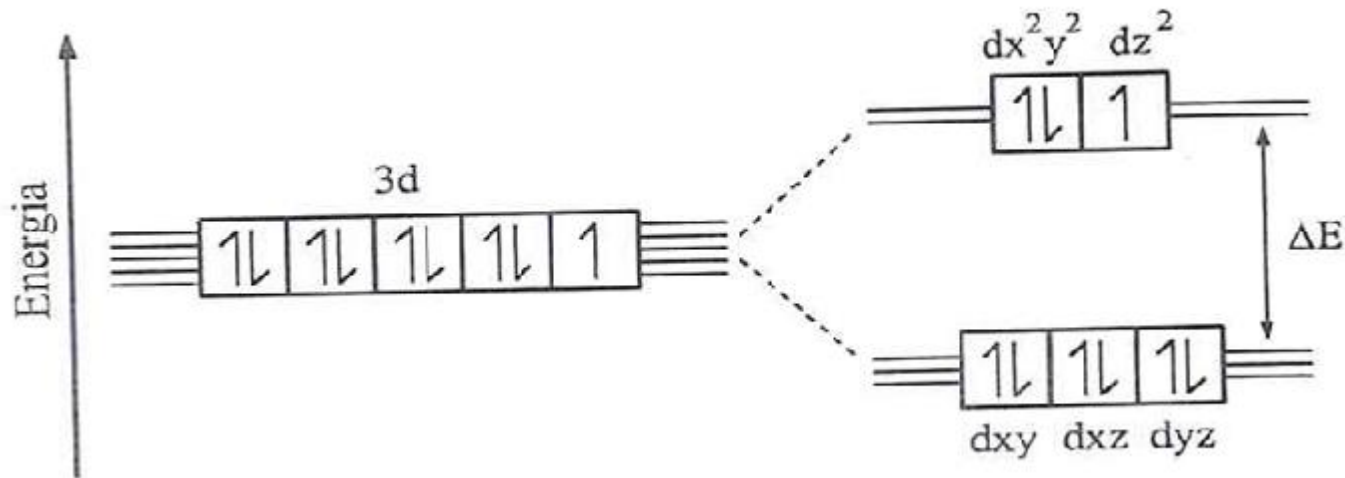
- **A besugárzó fény (I_0) nem szigorúan monokromatikus ($\Delta\lambda$ szélességű)**
Keskeny éles csúcsok esetén ez jelentős hibát okozhat, ezért célszerű az elnyelési sáv maximumához tartozó hullámhosszon mérni.
- **A hőmérséklet hatása**
Alacsonyabb hőmérsékleten az abszorpciós sáv szélessége csökken (a csúcs élesedik), mivel csökken a gerjesztett forgási és rezgési nívók betöltöttsége. A sávmaximum helye a kisebb hullámhosszak felé tolódik el.
Az abszorbancia hőmérsékletfüggése 1-1.5 %/ °C
- **A mérés során változik a fényforrás intenzitása , vagy a jelfeldolgozó erősítése**
Melegszik a lámpa, ezért jobban emittál. A hiba kiküszöbölhető két fényutas készülék alkalmazásával.
- **Változik a detektor érzékenysége (az idő függvényében)**
Ezért jobban preferált a két sugárutas egy detektoros készülék.

2.3. Az UV-VIS spektrofotometria gyakorlati alkalmazásai (I.)

2.3.1. Fémionok mennyiségi meghatározása

A módszer alapja: az átmeneti fémek ionjainak **d pályái** nem teljesen betöltöttek. A komplexképző ligandum hatására az atomi állapotban azonos energiaszintű (degeneráltságú) pályák felhasadnak és létrejön egy kis energiájú átmenet. Mivel az átmenet már a látható fény fotonjaival is gerjeszthető, ezen komplexek oldatai színesek és a színintenzitás arányos a komplex koncentrációjával.

Példa: $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$ komplex d-d energiaátmenete

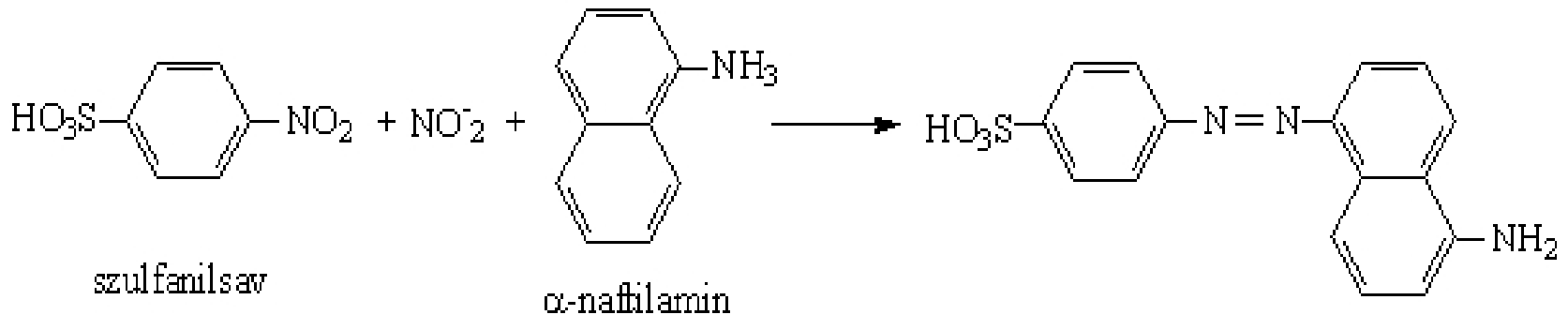


2.3. Az UV-VIS spektrofotometria gyakorlati alkalmazásai (II.)

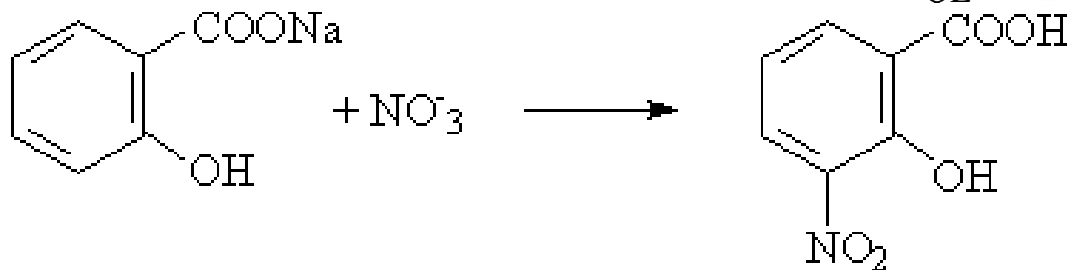
2.3.2. Anionok mennyiségi meghatározása

Példa: nitrit-és nitrácionok meghatározása

a. Gries-Ilosvay reakció alapján : a keletkező termék élénkvörös színű azovegyület. Az NO_3^- NO_2^- - vé történő redukció (Zn+ savas közeg) után mérhető ($c_{\text{QL}}=2$ ppm)



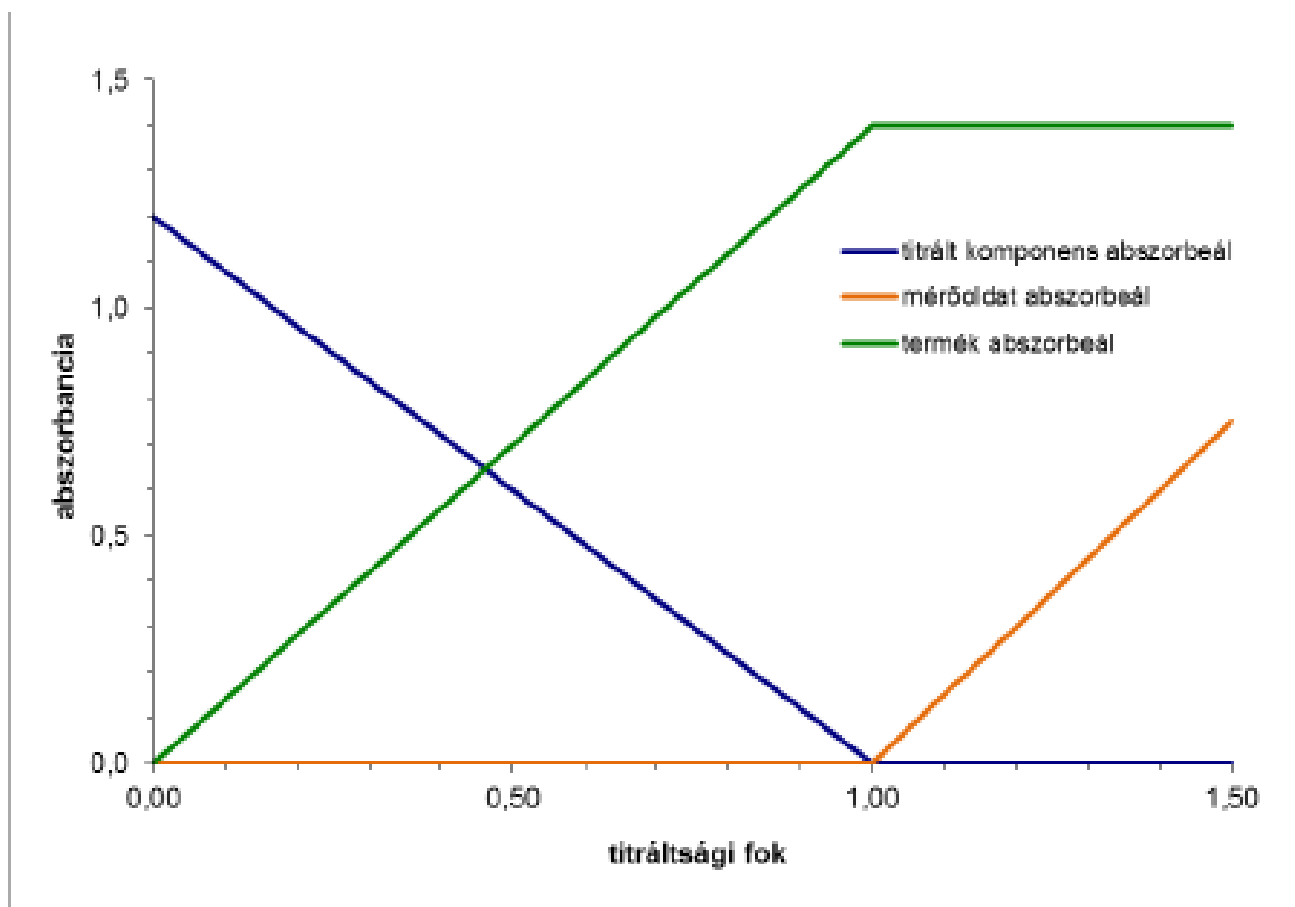
b. Nitrát meghatározása Na-szaliciláttal: erősen savas közegben a benzolgyűrű nitrálása, majd lúgos közegben a sárga színű nitro-származék előáll. melynek színintenzitása arányos a koncentrációval ($c_{\text{OL}}=5$ ppm)



2.3. Az UV-VIS spektrofotometria gyakorlati alkalmazásai (III.)

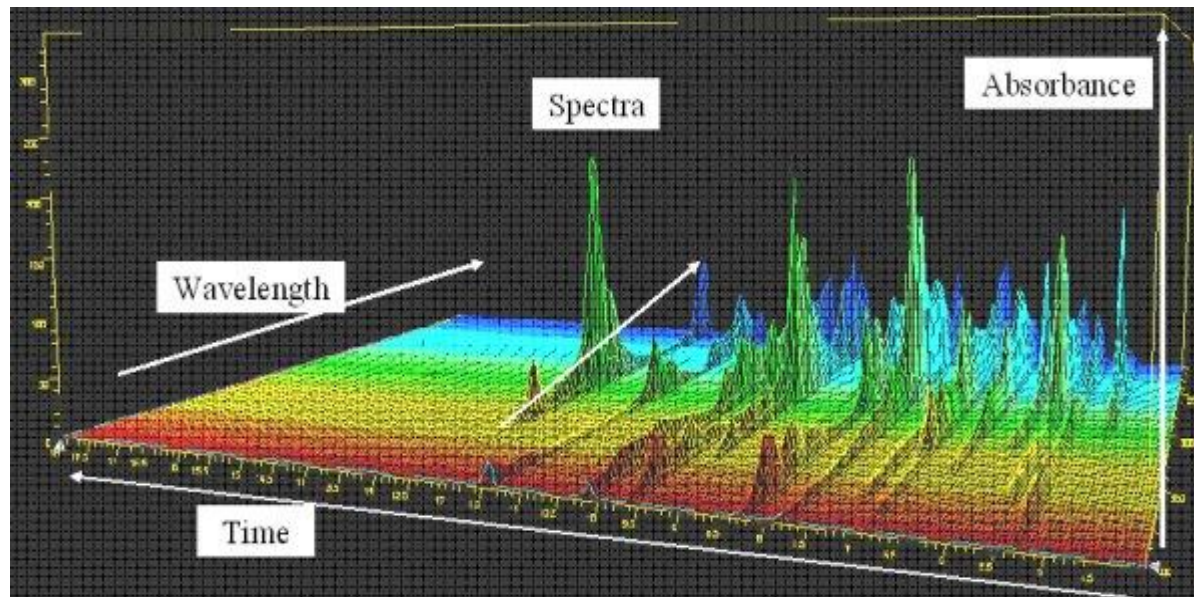
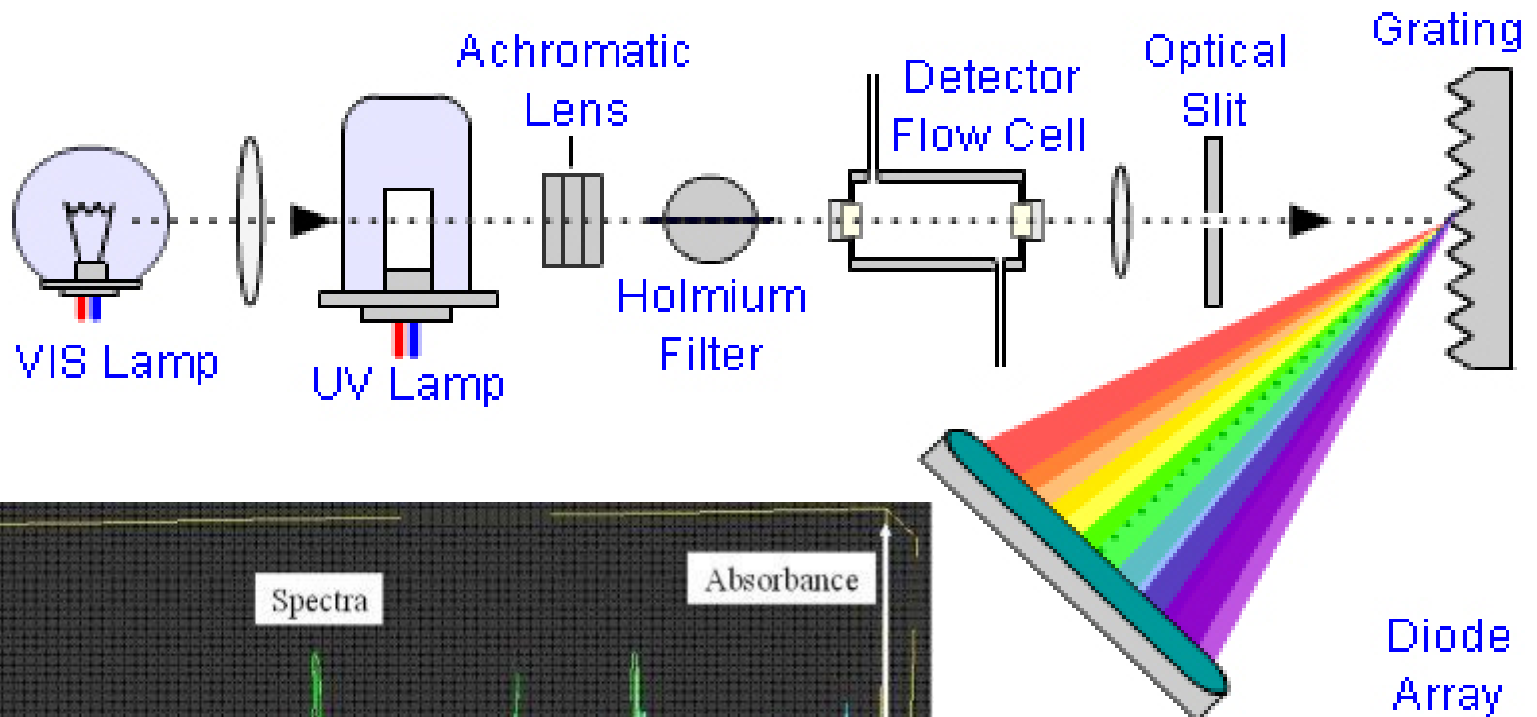
2.3.3. Titrálások nyomon követése (végpontjelzése)

Ha titrálási reakció valamelyik komponense, vagy a keletkező termék színes vegyület a titrálási görbe irányt vált → az egyenértékpont meghatározható.

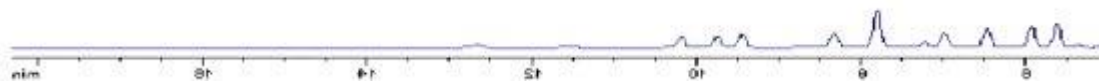


2.3. Az UV-VIS spektrofotometria gyakorlati alkalmazásai (IV.)

2.3.4. HPLC detektorként



Háromdimenziós
spektrum



3. Fluorimetria

3.1. Alapjelenségek, definíciók

Lumineszcencia:

A molekula a különböző módon felvett gerjesztési energiát (ill. annak egy részét) elektromágneses sugárzás formájában (foton kibocsájtásával) adja le (3.1 ábra)

A lumineszcencia fajtái:

1. Kemilumineszcencia: kémiai reakcióban gerjesztett állapotú molekula (termék, közti termék) keletkezik. Ha biokémiai (enzim katalizálta) reakcióban keletkezik: **biolumineszcencia**.

2. Fotolumineszcencia: a molekula gerjesztése elektromágneses sugárzással történik

- **fluoreszcencia:** a gerjesztés ill. a relaxáció alatt a gerjesztett elektron spin állapota nem változik meg, ezért a jelenség gyors.
- **foszforeszcencia:** a gerjesztés ill. a relaxáció közben a gerjesztett elektron spin állapota megváltozik. Mivel az ilyen átmenet tiltott (ezért kis valószínűségű), a gerjesztés és a relaxáció között viszonylag sok idő telik el.

3.2. Fluoreszcencia, ill. foszforeszcencia létrejötte

1. fotonabszorpció: az elektron a gerjesztett állapot egy magasabb rezgési szintjére kerül

1.a. rezgési relaxáció: a molekula alacsonyabb rezgési szintre kerül

2. fluoreszcencia: az elektron a gerjesztett állapot legalsó rezgési szintjéről fotonemisszióval az alapállapot valamelyik rezgési szintjére kerül.

Frank-Condon-elv: a foton emissziója mindig a gerjesztett állapot legalsó rezgési szintjéről történik.

3. külső átalakulás (quenching, kioltás): fotonemisszió nélküli (pl. ütközéses) relaxáció

4. intercrossing system(belső átrendeződés): az elektron spinje átfordul, a molekula szingulett állapotból triplett állapotba kerül

4.a. rezgési relaxáció: a molekula alacsonyabb rezgési szintre kerül

5. foszforeszcencia: az elektron újabb spinátfordulás után fotonemisszióval az alapállapot valamelyik rezgési szintjére kerül.

6. külső átalakulás (quenching, kioltás): fotonemisszió nélküli (pl. ütközéses) relaxáció

3.2. ábra. Különböző spinállapotok értelmezése

Spin: az elektron mágneses momentumának a külső mágneses tér irányához (z tengely iránya) képest lehetséges irányai (értékei: $1/2$: megegyező, $-1/2$: ellentétes)

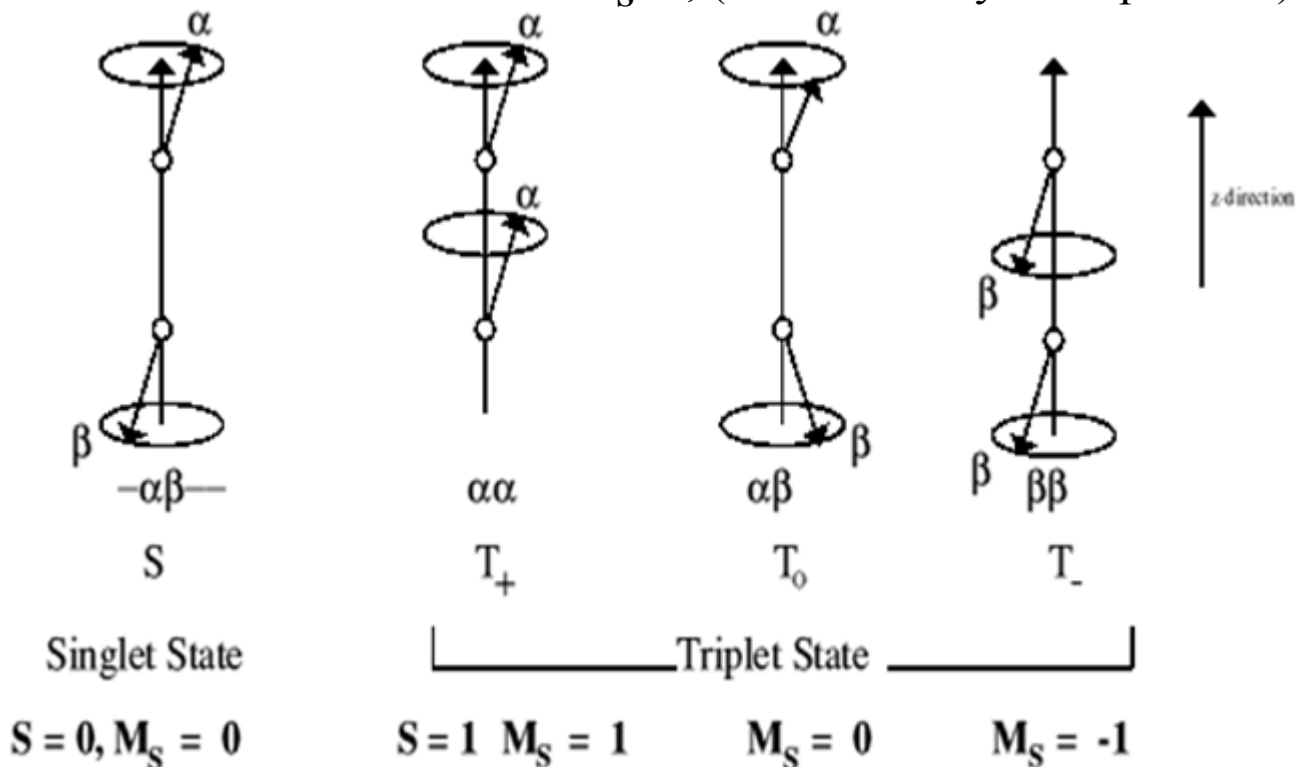
S (eredő spin): az adott elektronpályán lévő elektronok spinjeinek vektoriális összege

M_S : $2S+1$ (lehetséges orientációs állapotok száma)

Szingulett állapot: a két elektron spinje ellentétes: $S = +1/2 + (-1/2) = 0 \rightarrow M_S = 0$

Triplett állapot: $S = +1/2 + 1/2 = 1 \rightarrow M_S = 1$; $S = -1/2 + (-1/2) = -1 \rightarrow M_S = -1$

$S = +1/2 - 1/2 = 0 \rightarrow M_S = 0$, (de van x irányú komponense)



3.3. Fluoreszcencia és a molekulaszervezet

3.3.1. Mely molekulák fluoreszkálnak?

- A delokalizált π -kötéseket tartalmazó aromás vegyületek, többszörösen konjugált kettős kötések tartalmazó vegyületek (pl. poliének).

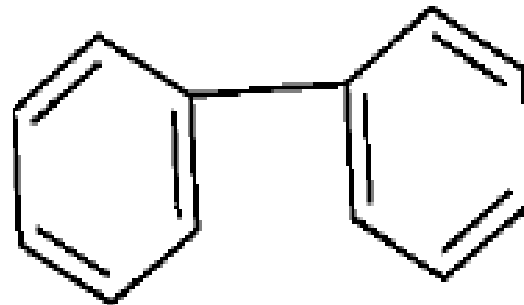
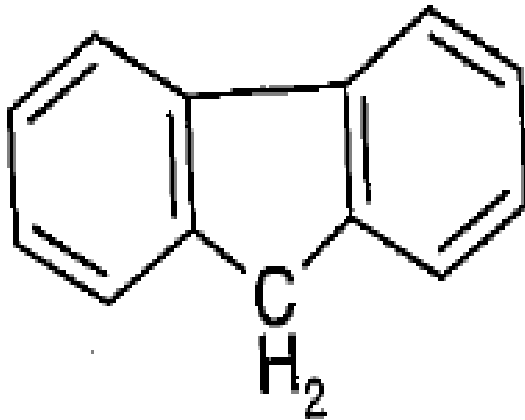
3.3.2. Milyen hatások befolyásolják a fluoreszcenciát?

- Minél merevebb egy molekula, annál inkább hajlamos a fluoreszcenciára, mivel a merevség (és a nagy tömeg) csökkenti a rezgésre való hajlamot, így a gerjesztési energiát inkább kisugározza.
- A molekulában a kromofórhoz kapcsolódó szubsztituensek befolyásolják a fluoreszcencia erősségét:
 - Az elektronküldő csoportok (-OH, -NH₂, -O-alkil, -N-alkil) növelik
 - Az elektronvonzó csoportok (-COOH, -NHCOCH₃) csökkentik, vagy teljesen kioltják (-NO, -NO₂, halogének).
 - Ha a szubsztituens savas vagy bázikus jellegű a fluoreszcencia pH-függő
- A hőmérséklet csökkenti a fluoreszcenciát, mert az oldatban nő a molekulák kinetikus energiája (mozgékonyasága), így az ütközéses kioltás valószínűsége.
- Az erős van der Waals kölcsönhatásra képes oldószerek növelik az ütközéses kapcsolat idejét, így csökkentik a fluoreszcenciát.

3.3. ábra. A molekulaszervezet hatása a fluoreszcenciára

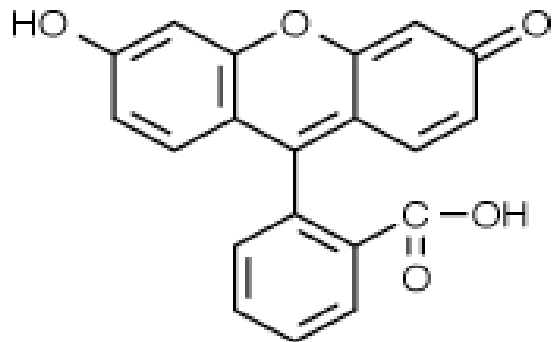
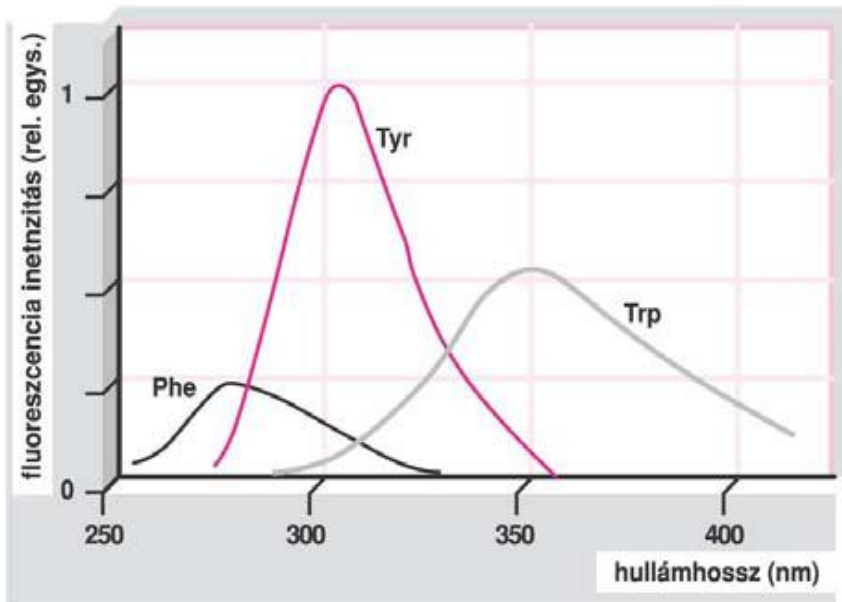
Fluorén: merev szerkezet (a metil csoport miatt) nagy hajlandóság a fluoreszcenciára
kvantumhatásfok (Φ_k) = 1

Bifenil: rugalmas szerkezet, a két fenil csoport külön-külön könnyen rezgésbe hozható, a molekula alig fluoreszkál
kvantumhatásfok (Φ_k) = 0.2



3.4. ábra. Fluoreszkáló anyagok:

1. Aminosavak fluoreszcencia spektruma (Forrás: <https://slideplayer.hu/UV/VIS> molekulaszpektroszkópai módszerek)



2. Fluorescein molekula (festék, indikátor) (Forrás: <https://slideplayer.hu/UV/VIS> molekulaszpektroszkópai módszerek)

3. Fluoreszkáló fehérjemolekula

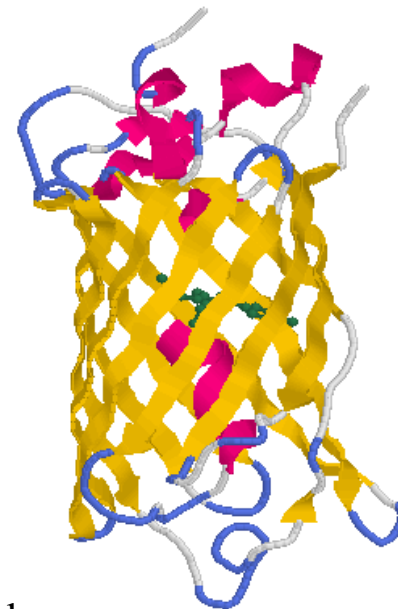
(GFP, Green Fluorescent Protein),

2008: kémiai Nobel díj

Gerjesztés: 396 nm UV, 475 nm kék

Emisszió: 508 nm zöld

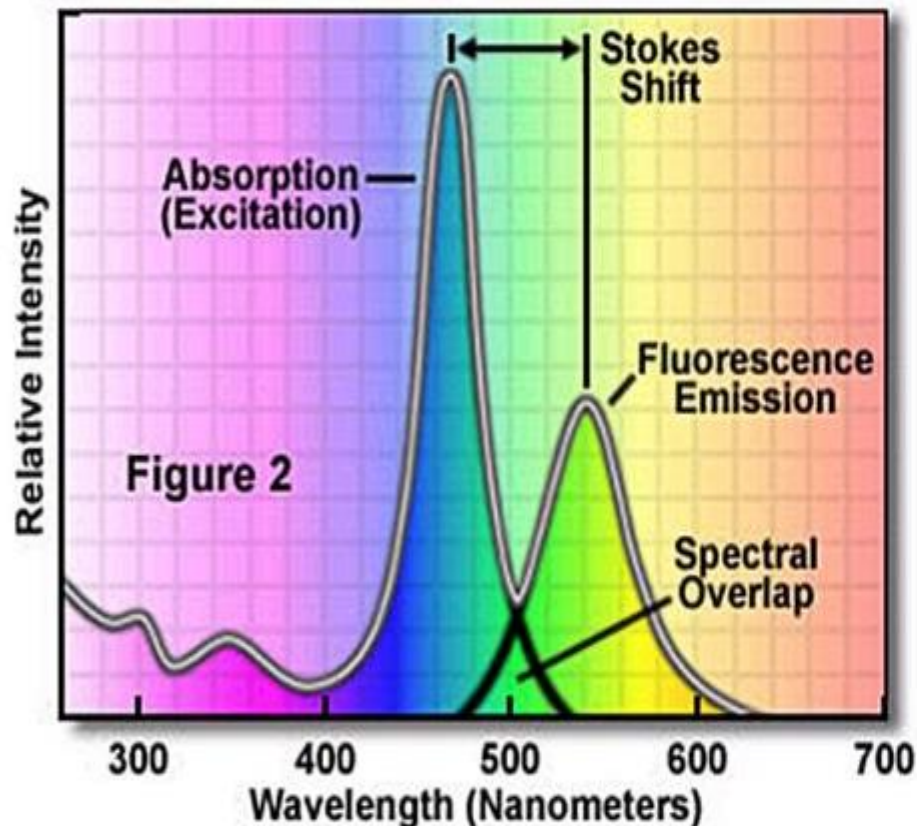
Fluorofór csop.: szerin-tirozin-glicin



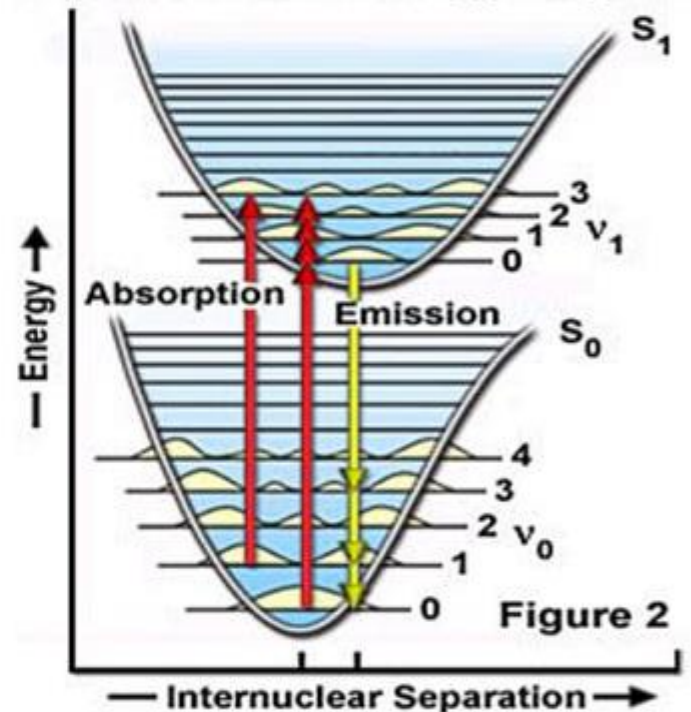
3.4. A fluoreszcencia spektrum

A fluoreszcencia spektrum tükörképe az abszorpciós spektrumnak, csak a fluoreszcencia spektrum sávjai a nagyobb hullámhosszak felé tolódnak el. A gerjesztés általában az UV-tartományban, az emisszió a látható tartományban történik.

Excitation and Emission Spectral Profiles

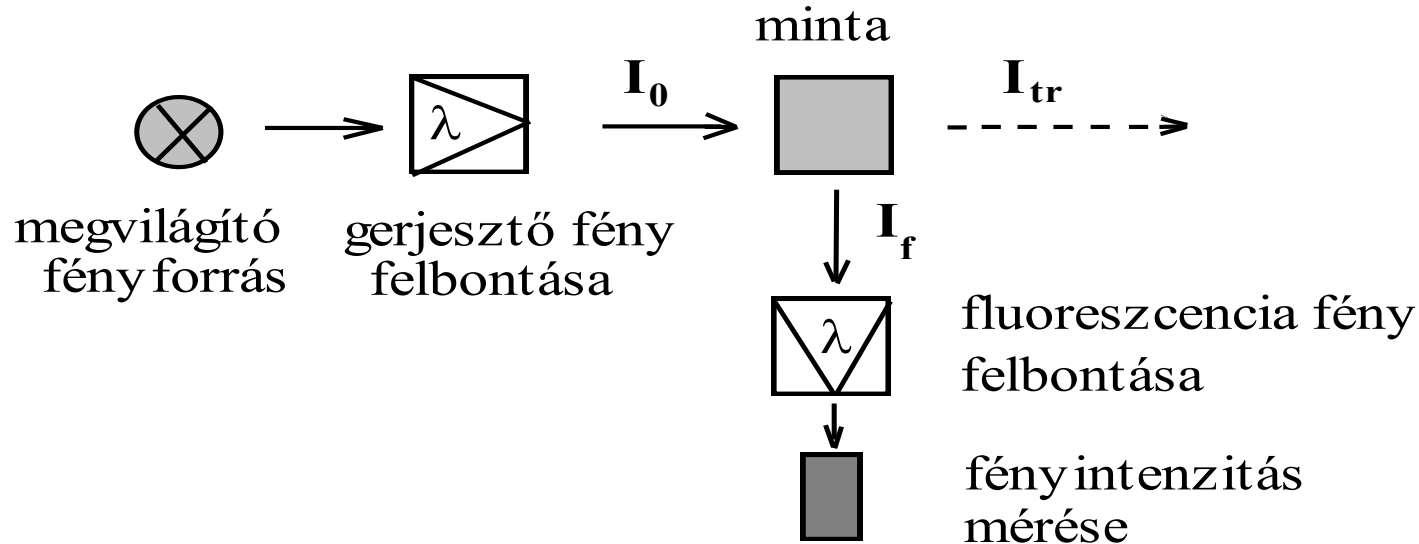


Franck-Condon Energy Diagram



3.5. Mennyiségi analízis

A fotolumineszcenciás (fluoreszcenciás, foszforeszcenciás) módszer mérési elrendezése és analitikai függvénye



$$I_f = k_f I_0 \cdot c$$

- ahol
- I_f az emittált fluoreszcens sugárzás intenzitása,
 - I_0 a besugárzó fény intenzitása,
 - k_f arányossági tényező,
 - c a fluoreszkáló anyag (minta) oldatbeli koncentrációja

3.6. Az abszorpciós és fluoreszcens módszer összehasonlítása

A fluoreszcens módszer előnyei:

1. Két-három nagyságrenddel kisebb kimutatási határ:

A fluoreszcencia intenzitása (I_F) növelhető a megvilágító fényforrás intenzitásának (I_0) növelésével, így nő a mérés érzékenysége, míg abszorpciós módszernél ha növeljük a megvilágító fényforrás intenzitását (I_0), akkor nő a fényelnyelés, de ugyanolyan mértékben nő az átérésztés (I_{tr}) is, így a kettő hányadosa ($T=I_0/I_{tr}$) nem változik.

2. **Jobb a szelektivitása:** kevés anyag fluoreszkál számottevő mértékben.

3. **Jobb az érzékenysége:** a derékszögű elrendezés miatt csak az emittált fény jut a detektorba, így zérus háterjel (zaj) mellett mérünk

A fluoreszcens módszer hátrányai:

1. **Nem robosztus:** a fluoreszcencia mérések nagyon érzékenyek a pH-ra, hőmérsékletre, oldószerre, kioltó anyagok jelenlétére, stb.

2. A kalibrációs fv. **csak kis koncentrációknál (10^{-8} - 10^{-4} M) lineáris**, míg nagy koncentrációknál maximumos (ua. intenzitáshoz két különböző konc. tartozik).

3.7. A lumineszcencia alkalmazásai:

- - **analitikai kémia (fluoreszcencia spektroszkópia→fluorimetria, HPLC detektálás)**
- - biológia, orvostudomány (immunanalitika, sejtvizsgálatok, DNS analízis)
- - világítástechnika (fénycsövek)
- - közlekedés (fluoreszkáló jelzőtáblák, láthatósági mellény, iskolatáska)
- - biztonságtechnika (láthatósági mellény, védőöltözékek)
- - törvényszéki alkalmazások (ujjlenyomat, vérnymok láthatóvá tétele)
- - ásványtan, olajipar (ásványok szennyeződéseinek kimutatása, olaj kimutatása)
- - divat (fluoreszkáló öltözködési cikkek)