

Министерство образования и науки Российской Федерации
НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ТОМСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

УДТВЕРЖДАЮ
Декан ФФ ТГУ
_____ О.Н. Чайковская
« ____ » _____ 2014 г.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА

**«ИССЛЕДОВАНИЕ СПЕКТРАЛЬНО-
ЛЮМИНЕСЦЕНТНЫХ СВОЙСТВ СМЕСИ
ОРГАНИЧЕСКИХ МОЛЕКУЛ»**

Методические указания

Томск 2014

УДК 535.372

Лабораторная работа «Исследование спектрально-люминесцентных свойств смеси органических молекул»

Методические указания

Рассмотрено и утверждено методической комиссией физического факультета

Протокол № ____ от « ____ » _____ 2014 г.

Председатель комиссии,

_____ к.ф.-м.н. В.М. Вымятнин

Изложены рекомендации для выполнения лабораторной работы по исследованию спектрально-люминесцентных свойств смеси органических молекул. Методические указания разработаны для студентов старших курсов химических и физических специальностей в рамках курсов «Люминесцентные методы анализа», «Межмолекулярные взаимодействия», «Физико-химические методы анализа» и «Физические поля и их действие на биосистемы».

Методическое пособие подготовлено при финансовой поддержке гранта президента РФ на поддержку ведущей научной школы (№ НШ-4297.2010.2).

Лабораторная работа проводится на базе научно-образовательного центра Томского государственного университета «Квантовая химия, спектроскопия и фотоника наноматериалов».

Составители: д.ф.-м.н., профессор Чайковская О. Н.
магистранты ФФ НИ ТГУ Петрова А. Ю. и Аслаповская Ю.С.

Тема: Исследование спектрально-люминесцентных свойств смеси органических молекул

Цель работы: изучение процессов тушения флуоресценции и переноса энергии смеси органических молекул.

Задание:

1. Познакомиться с фотофизическими процессами, протекающими в органических молекулах при возбуждении.
2. Изучить теорию тушения флуоресценции и механизмами переноса энергии.
3. Познакомиться с принципом действия спектрофотофлуориметра *СМ 2203*.
4. Приготовить растворы смеси органических молекул.
5. Получить спектры поглощения, флуоресценции и возбуждения флуоресценции полученных растворов.
6. Проанализировать результаты.

В результате выполнения лабораторной работы студент должен:

Знать:

- физические явления, лежащие в основе метода исследования спектрально-люминесцентных свойств смеси органических молекул;
- принцип работы и конструкцию устройств и прибора, используемого в данном методе исследования;
- практические возможности метода.

Уметь:

- проводить необходимые эксперименты;
- получать результаты, их обрабатывать и анализировать в рамках используемого метода;
- дать оценку использования полученных результатов в практических целях.

ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

Поглощением (абсорбцией) света называется явление потери энергии световой волной, проходящей через вещество.

Явление поглощения широко используется в спектральном анализе веществ, основанном на измерениях спектров частот и интенсивностей линий (полос) поглощения. Структура спектров поглощения определяется составом и строением молекул, поэтому изучение спектров поглощения является одним из основных методов количественного и качественного исследования веществ.

Флуоресценцией называют излучательный переход возбужденного состояния с самого нижнего синглетного колебательного уровня S_1 в основное состояние S_0 .

Тушением флуоресценции называют любые процессы, которые уменьшают интенсивность флуоресценции данного вещества. Механизм тушения флуоресценции бывает разный. К тушению может приводить множество процессов, в том числе тушение при столкновении флуорофора и тушителя (динамическое тушение), реакции в возбужденном состоянии, образование нефлуоресцирующего комплекса тушителя с флуорофором в невозбужденном состоянии (статическое тушение), поглощение флуоресцентного излучения одним флуорофором другим (флуоресцентно-резонансный перенос энергии).

В случае статического тушения между флуорофором и тушителем (в основном состоянии, до поглощения возбуждающего флуоресценцию фотона) образуется комплекс, который не флуоресцирует. В любом случае, чтобы произошло тушение, флуорофор и тушитель должны контактировать. Это - основное требование, которое проявляется в различных приложениях тушения.

Динамическое тушение флуоресценции описывается уравнением Штерна - Фольмера:

$$\frac{F_0}{F} = 1 + k_q \tau_0 [Q] = 1 + K_{\text{дин}} [Q],$$

где F_0 и F - интенсивности флуоресценции в отсутствие и в присутствии тушителя соответственно; k_q - биомолекулярная константа скорости тушения; τ_0 - время затухания флуоресценции в отсутствие тушителя; $[Q]$ - концентрация тушителя; $K_{\text{дин}} = k_q \tau_0$ - константа тушения Штерн-Фольмера. Данные по тушению обычно представляют в координатах F_0/F от $[Q]$, поскольку F_0/F , как ожидается, должно линейно зависеть от концентрации тушителя. График дает, отсекаемый отрезок на оси у, равный единице, и наклон, равный $K_{\text{дин}}$ (рис. 1).

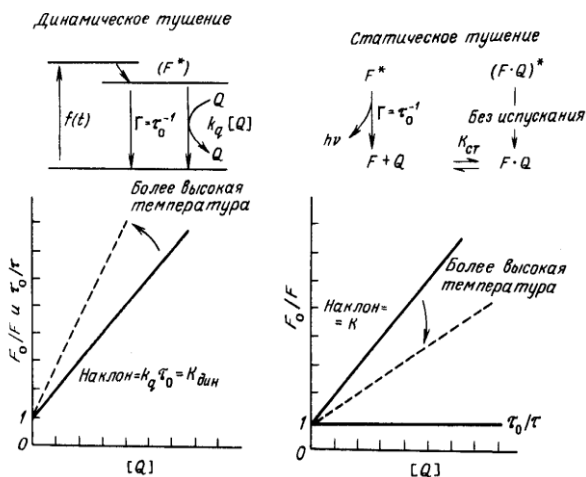


Рисунок 1 - Сопоставление динамического и статического тушения.

Полезно отметить, что $K_{\text{дин}}^{-1}$ равна концентрации тушителя, при которой $F_0/F = 2$, т.е. тушится 50% интенсивности флуоресценции. Прямолинейная зависимость в координатах Штерна-Фольмера обычно указывает на существование в растворе одного типа флуорофоров,

одинаково доступных для тушителя. Если присутствуют два типа флуорофоров и один из них недоступен для тушителя, то график Штерн-Фольмера отклоняется от линейности в сторону оси x . Такой результат часто встречается при тушении флуоресценции триптофана в белках полярными или заряженными тушителями. Эти молекулы с трудом проникают внутрь гидрофобных белков и тушат только остатки триптофана на поверхности белка.

Важно знать, что линейность, наблюдаемая в координатах Штерна - Фольмера, еще не доказывает, что происходит динамическое тушение флуоресценции. В общем случае различить статическое и динамическое тушение можно по их зависимости от температуры и вязкости или, что более предпочтительно, по измерению времени затухания флуоресценции.

Для тушения (и статического и динамического) требуется контакт между молекулами флуорофора и тушителя. В случае динамического тушения тушитель должен диффундировать к флуорофору в течении времени нахождения в возбужденном состоянии. Среднеквадратичное смещение $(\Delta x^2)^{1/2}$ на которое тушитель (кислород) может продиффундировать за время жизни возбужденного состояния τ , составляет $\Delta x^2 = 2 \cdot D \cdot \tau$, где D – коэффициент диффузии. В результате контакта флуорофор возвращается в основное состояние без излучения фотона. В случае статического тушения между флуорофором и тушителем образуется комплекс, который не флуоресцирует.

Важным аспектом динамического тушения выступает увеличение объемов и расстояний в растворе, влияющих на экспериментальные данные, которыми являются интенсивность ли время затухания флуоресценции.

Стоксов сдвиг ($\Delta\nu$). Как правило, всегда наблюдается сдвиг испускания относительно поглощения в сторону

больших длин волн, т.е. потеря энергии (исключение - атомы в газовой фазе).

Одной из основных причин возникновения стокового сдвига является быстрая релаксация на нижний колебательный уровень состояния S_1 , а так же происходит переход на возбужденные колебательные уровни состояния S_0 , что приводит к дополнительной потере колебательной энергии. К тому же стоковый сдвиг может быть увеличен благодаря влиянию растворителя на флуорофоры. Испускание без сдвига наблюдается только тогда, когда концентрации газа достаточно малы для того, чтобы возбужденные молекулы не претерпевали столкновений с другими молекулами до процесса испускания. Такие столкновения приводят к релаксации.

Явление переноса энергии заключается в том, что молекула донора D^* переходит из возбужденного состояния в основное, одновременно передавая свою энергию молекуле акцептора A , которая при этом переходит в возбужденное состояние: $D^*+A \rightarrow D+A^*$.

Скорость переноса энергии зависит от степени перекрытия спектра испускания донора со спектром поглощения акцептора, относительной ориентации дипольных моментов переходов и расстояния между молекулами. Именно эта зависимость от расстояния привела к широкому использованию переноса энергии для измерения расстояний между донорами и акцепторами.

При переносе энергии происходит тушение флуоресценции D^* и испускание акцептора A^* . Перенос энергии может происходить по двум механизмам: излучательному и безизлучательному. Для осуществления излучательного переноса энергии необходимо, чтобы молекула акцептора поглощала фотоны, испущенные молекулой донора, и наблюдается тогда, когда среднее расстояние между донором и акцептором больше длины

волны. Излучательный перенос зависит от таких оптических свойств образца, как размер кюветы с образцом, оптические плотности образца на длинах волн возбуждения и флуоресценции и точная геометрия пучков возбуждающего и испускаемого света. Процесс излучательного переноса не требует никакого взаимодействия между молекулами, а его эффективность зависит от степени перекрывания спектров испускания, квантового выхода, коэффициентов молярного поглощения, концентрации. Безызлучательный перенос энергии содержит богатую информацию, касающуюся подробностей строения молекул донорно-акцепторных пар. Такой вид переноса энергии требует некоторого взаимодействия между молекулами донора и акцептора и может происходить, если спектр испускания донора перекрывается со спектром поглощения акцептора так, что некоторые колебательные переходы имеют практически ту же энергию, что и соответствующие переходы для акцептора.

Любые явления, которые оказывают влияние на расстояние d - а, будут влиять на скорость переноса энергии, что позволяет их количественно охарактеризовать.

Поглощение и испускание света хорошо демонстрирует диаграмма уровней энергии, предложенная Яблонским (**диаграмма Яблонского**) (рис. 2). У каждой молекулы одновременно существуют две системы электронных уровней: синглетных S_n и триплетных T_n .

Переходы между различными электронными уровнями обозначены вертикальными линиями. Такое представление используется, чтобы наглядно показать мгновенную природу поглощения света.



Рисунок 2 - Диаграмма Яблонского.

Положение 0-0 перехода одинаково для спектров поглощения и флуоресценции, но спектр излучения в целом и его максимум всегда сдвинуты по сравнению со спектром поглощения и его максимумом в сторону длинных волн. Обычно различия между колебательными уровнями основного и возбужденного состояний сходны, поэтому спектр флуоресценции повторяет спектр поглощения (правило зеркальной симметрии Левшина) (рис. 3). Каждому уровню, обозначенному на диаграмме Яблонского, соответствует набор колебательных состояний.

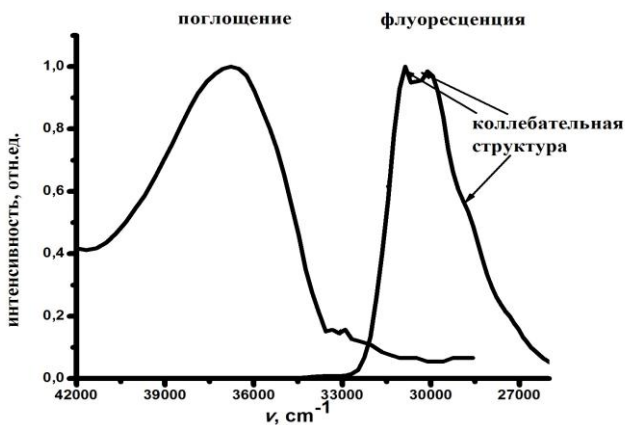


Рисунок 3 - Правило зеркальной симметрии.

Квантовый выход флуоресценции (φ) и время жизни возбужденного состояния (τ). Квантовый выход флуоресценции показывает, с какой эффективностью проходит данный процесс. Он определяется как отношение количества испускаемых и поглощаемых фотонов. Квантовый выход можно определить с помощью диаграммы Яблонского (см. рис. 2) описывается формулой:

$$\varphi = \frac{\Gamma}{\Gamma+k}$$

где Γ и k — соответствуют процессам уменьшения заселенности возбужденного состояния.

Время жизни возбужденного состояния определяется как среднее время, в течение которого молекула находилась в возбужденном состоянии до того как вернуться в основное состояние. Для флуорофора, описываемого диаграммой Яблонского (см. рис. 2), время затухания равно $\tau = \frac{1}{\Gamma+k}$.

РАБОЧАЯ УСТАНОВКА

Вид и основные характеристики спектрофотофлуориметра **СМ 2203** показаны на рис. 4.

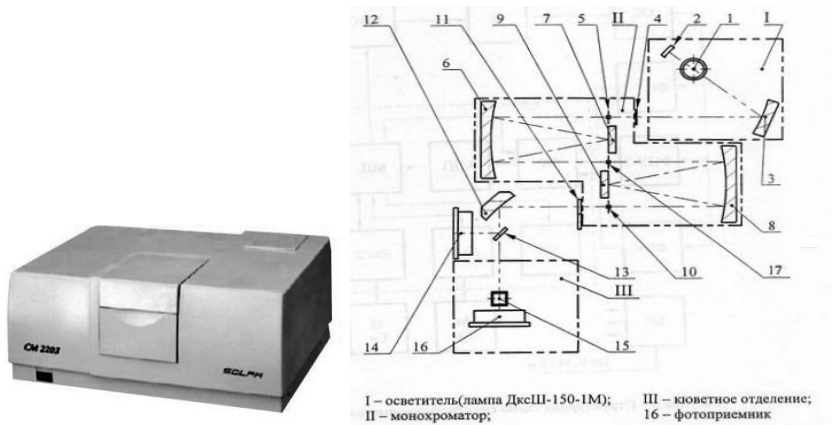


Рисунок 4 – Внешний вид спектрофотофлуориметра **СМ 2203** и оптическая схема в режиме спектрофотометра

Оптическая схема спектрофлуориметра в режиме спектрофотометра состоит из осветителя I, монохроматора II и кюветного отделения III.

Осветитель I включает в себя источник излучения 1 (ксеноновая короткодуговая лампа типа ДКсШ 150-3, имеющая почти непрерывный спектр излучения в области 220-4000 нм), контротражатель 2 и эллипсоидное фокусирующее зеркало 3.

Между осветителем I и монохроматором II установлен блок сменных диафрагм 4, служащий для дискретного изменения светового потока падающего на входную щель 5 монохроматора возбуждения, с целью расширения динамического диапазона работы прибора

Монохроматор возбуждения люминесценции II - двойной, служит для селекции длин волн возбуждающего излучения с низким уровнем рассеянного излучения.

Содержит входную щель **5**, два коллиматорных объектива **6** и **8**, промежуточную щель **29**, выходную щель **10**, две идентичные дифракционные решетки **7** и **9**. Диапазон раскрытия входной и выходной щелей монохроматора от 0 до 4 мм (ширина щелей), высота щелей - 3 мм.

Узел светофильтра **11** служит для устранения излучения высших порядков дифракции.

Кюветное отделение III служит для размещения исследуемого образца. С помощью плоскопараллельной пластинки **13** на фотодиод **14** (типа ФДУК-2) отводится часть излучения с целью контроля нестабильности источника (опорный канал). Излучение, прошедшее кювету **15** с исследуемым образцом, регистрируется фотоприемником **16** измерительного канала. В качестве фотоприемного устройства используется кремниевый фотодиод типа ФДУК-2. Промежуточная щель обозначена цифрой **17**.

Спектрофотоплуориметр *СМ 2203* является полностью управляемым от компьютера. Он может применяться как в ультрафиолетовой, так и видимой области спектра. *СМ 2203* обеспечивает высокочувствительные и стабильные измерения спектров возбуждения, испускания, синхронных, поляризации, температурных, квантового выхода, поглощения жидких и твёрдых образцов. Высокая чувствительность, надёжность, широкая спектральная область работы и универсальный набор измерительных и программных функций обеспечивают применение *СМ 2203* в различных областях: медицине, биохимии, фармакологии, пищевой промышленности, экологии, химии, криминалистике.

Программные функции

- Коррекция спектров возбуждения и испускания;
- Дифференцирование, интегрирование, сглаживание, интерполяция
- Представление спектров в шкале длин волн или волновых чисел;
- Арифметические действия между спектрами;
- Автоматический поиск максимумов и минимумов в спектре;
- Автоматический и ручной выбор масштаба изображения;
- Вывод на принтер спектров, кинетических кривых, таблиц;
- Создание и хранение методик с последующим выполнением по ним конкретных заданий;
- Сохранение условий и результатов измерений.

Технические характеристики

- Чувствительность отношение сигнал/шум - не менее 160 для Рамановского спектра воды (при выделяемой спектральной полосе пропускания монохроматоров 5 нм и времени усреднения сигнала 2 сек.);
- Монохроматор двойные со сложением дисперсии;
- Выделяемый спектральный интервал произвольный: 0...15 нм;
- Точность установки длины волны $\pm 0,5$ нм;
- Спектральный диапазон 200...820 нм;
- Кюветное отделение однопозиционный термoeлектрически термостатируемый в диапазоне температур 10...60°C кюветодержатель с управляемой магнитной мешалкой;
- Минимальный объем образца 1 мл в стандартной 10 мм кювете;
- Режим спектрофотометра:

- Спектральный диапазон 200...1100 нм;
- Фотометрический диапазон - 0,3...3 Б;
- Точность фотометрирования < 3% (в зависимости от величины поглощения);

- Интерфейс RS232;
- Энергопотребление 220 (± 10 %) В, 50Гц, 350 ВА;
- Вспомогательное оборудование устройство для поляризационных измерений, держатель твёрдых образцов, оптоволоконный зонд для измерения люминесценции вне кюветного отделения, "стандартный" люминесцирующий образец с широкодиапазонным спектром люминесценции.

Измерительные функции

- Измерение спектров испускания, возбуждения, поляризации, поглощения, пропускания и синхронных;
- Определение концентрации при использовании фактора, калибровки по одной точке, многоточечной калибровочной кривой;
- Кинетические измерения на одной, двух, трех длинах волн;
- Измерения относительного квантового выхода;
- Многоволновые измерения люминесценции и поглощения;

Измерение спектров зависимости люминесценции от температуры.

Оценка необходимой степени точности

Данные физических или химических измерений неизбежно включают некоторые ошибки или погрешности. Результатом отдельного экспериментального наблюдения является *измеряемое* значение X . Разность между X и *истинным* значением X_0 данной величины представляет собой ошибку конкретного измерения. На практике, однако, невозможно

выполнить бесконечно большое число измерений. Точность результата чаще всего выражают с помощью *стандартного отклонения* s , которое представляет собой квадратный корень из второго момента распределения относительно среднего значения и является мерой точности результатов измерения. Стандартное отклонение вычисляется по формуле:

$$s = \sqrt{\frac{\sum (X_i - \bar{X})^2}{N - 1}}$$

где X_i – конкретное измеряемое значение; \bar{X} – среднее арифметическое значение; N – число измерений.

Источники ошибок

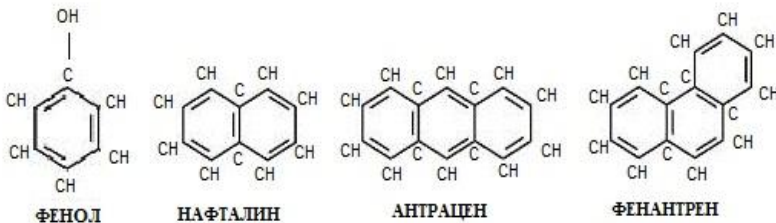
1. Неверный выбор режима работы прибора.
2. Случайные ошибки при закреплении образца.
3. Изменение температуры и влажности помещения в процессе эксперимента.

Техника безопасности при выполнении работы

Опасность представляют использование электроприборов. Перед началом работы необходимо убедиться в исправности приборов и наличии защитного заземления.

ПОРЯДОК ВЫПОЛНЕНИЯ РАБОТЫ

1. Изучить руководство по эксплуатации прибора
2. Структурные формулы молекул используемых веществ



3. Приготовить водные растворы:

- а) антрацен (10^{-7} г/моль) + нафталин (10^{-5} г/моль);
 б) антрацен (10^{-7} г/моль) + фенантрен (10^{-5} г/моль);
 с) фенантрен (10^{-5} г/моль) + антрацен (10^{-7} г/моль);
 д) антрацен (10^{-7} г/моль) + фенол (10^{-5} г/моль);
4. Снять спектры поглощения и флуоресценции отдельных молекул и их смесей. Спектр флуоресценции смеси молекул записать на разных длинах волн возбуждения флуоресценции (270, 330 и 350 нм).
 5. Записать для всех растворов спектры возбуждения флуоресценции на разных длинах эмиссии.
 6. Перевести данные спектров в табличные значения и построить спектры поглощения исследуемых молекул (рис. 5).

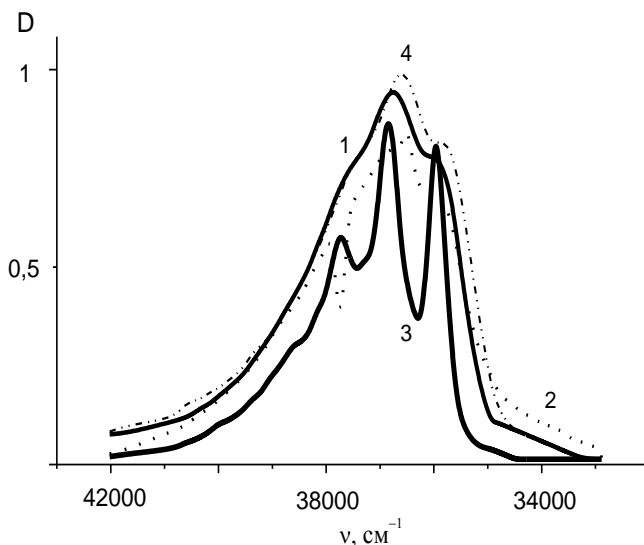


Рисунок 5 - Спектр поглощения фенола в различных растворителях: 1 - этанол, 2 - этанол + 2% ацетона, 3 - гексан, 4 - гексан + 10% этанола

7. Спектры флуоресценции построить отдельно, для каждой длины волны возбуждения (рис. 6 и 7).

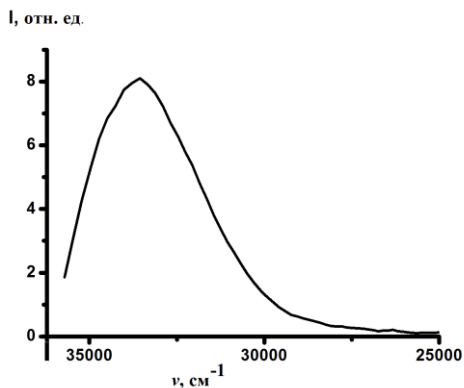


Рисунок 6 - Спектр флуоресценции фенола в воде. Длина волны возбуждения флуоресценции 270 нм.

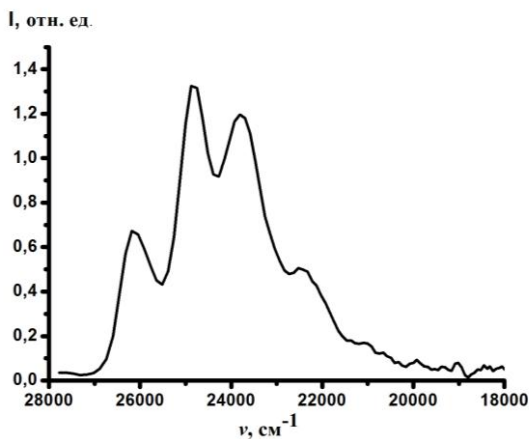


Рисунок 7 - Спектр флуоресценции антрацена в воде. Длина волны возбуждения флуоресценции 350 нм.

8. Построить схему Яблонского (рис. 8) для смеси Антрацен + Фенантрен, а так же отметить на схеме энергии, принадлежащие к исходным молекулам (антрацену и фенантрону). Заполнить табл. 2.

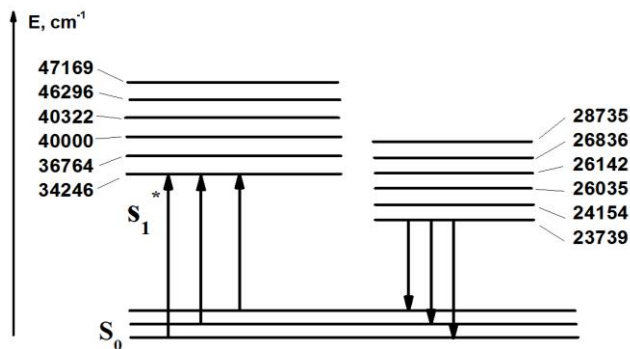


Рисунок 8. Энергетическая диаграмма Яблонского для молекул антрацена, фенантрена и их смеси (см табл. 1).

Таблица 1. Максимумы электронных и колебательно-вращательных полос поглощения и флуоресценции (cm^{-1}) исследуемых молекул.

фотофизический процесс	антрацен	фенантрен	антрацен + фенантрен
поглощение	46296	40322	47169
	40000	36764	40322
	36764	34246	3664
флуоресценция	23739	24154	23739
	26142	25652	26035
	26836	27324	27015
		28735	28735

9. Аналогично построить схемы Яблонского для других растворов смесей.
10. Анализируя схему Яблонского, а так же построенные спектры поглощения и флуоресценции, определить для каждого раствора, за счет какого процесса происходят изменения положения и интенсивности полос в спектрах.
11. Заполнить таблицу спектрально-люминесцентных свойств исследуемых молекул (табл. 2).

Таблица 2. Спектрально-люминесцентные характеристики исследуемых молекул.

Молекула	$\lambda_{\text{погл.}}$, нм	$\lambda_{\text{фл.}}$, нм	ϕ	τ	$\Delta\nu_{1/2}$, см^{-1}
Антрацен					
Фенантрен					
Нафталин					
Фенол					

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Что такое поглощение?
2. Что такое флуоресценция?
3. Что такое перенос энергии?
4. Назовите фотофизические процессы, которые происходят в молекуле после поглощения кванта света?
5. Какие изменения наблюдаются в спектрах поглощения и флуоресценции молекул при введении в раствор добавки?
6. В чем различие между динамическим и статическим тушением флуоресценции?
7. Что показывает отклонение от линейности на графике Штерна-Фольмера?

8. В чем заключается механизм переноса энергии между молекулами? Перечислите основные типы переноса энергии между молекулами.

ЛИТЕРАТУРА

1. Лакович Дж. Основы флуоресцентной спектроскопии. – М.: Мир, 1986. – 488 с.
2. Паркер С. Фотолюминесценция растворов. – М.: Мир, 1972. – 510 с.
3. Пентин Ю.А., Вилков Л.В. Физические методы исследования в химии // Резонансные и электрооптические методы. – М.: Высшая школа, 1989. – 288 с.
4. Непорент Б.С. Молекулярная фотоника / Под ред. А.А. Красновский. – Л.: Наука, 1970. – 440 с.
5. Теренин А.Н. Фотоника молекул красителей. – Л.: Наука, 1967. – 616 с.
6. Беккер Г.О. Введение в фотохимию органических соединений. – Л.: Химия, 1976. – 379 с.
7. Барлтроп Дж., Койл Дж. Возбужденные состояния в органической химии. – М.: Мир, 1978. – 445 с.
8. Крашенников А.А. Спектроскопия фотопревращений в молекулах. – Л.: Наука, 1977. – С. 46 – 61.
9. Шмидт В. Оптическая спектроскопия для химиков и биологов. – М.: Техносфера, 2007. – 368 с.