

**МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
КРАСНОЯРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ**

**Проверка правила зеркальной симметрии
спектров поглощения и люминесценции
у растворов красителей**

Методические указания

Красноярск 2002

Авторы-составители А.Г. Сизых, Е.А. Слюсарева.

Проверка правила зеркальной симметрии спектров поглощения и люминесценции у растворов красителей: Метод. указания / Краснояр. гос. ун-т; Авт.-сост. А.Г. Сизых, Е.А. Слюсарева. - Красноярск, 2002. – 22 с.

Предназначены для студентов 4-го курса физического факультета университета специализаций «Квантовая электроника» и «Медицинская физика», а также могут быть полезны студентам, изучающим молекулярную спектроскопию.

Печатаются по решению редакционно-издательского совета Красноярского государственного университета

Красноярский
государственный
университет, 2002

Содержание

1. ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ	4
1.1. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЛЮМИНЕСЦЕНЦИИ. ВИДЫ ЛЮМИНЕСЦЕНЦИИ. ФОТОЛЮМИНЕСЦЕНЦИЯ. ОБЩИЕ ЗАКОНОМЕРНОСТИ ЛЮМИНЕСЦЕНЦИИ.....	4
1.2. ЗАКОН ПОГЛОЩЕНИЯ СВЕТА. ФОТОВОЗБУЖДЕНИЕ.....	4
1.3. КЛАССИФИКАЦИЯ МОЛЕКУЛ ПО СЛОЖНОСТИ. ОБРАЗОВАНИЕ ПОЛОС ПОГЛОЩЕНИЯ И ИСПУСКАНИЯ СЛОЖНЫХ МОЛЕКУЛ.....	5
1.4. УСТАНОВЛЕНИЕ СВЯЗИ МЕЖДУ ЭЛЕКТРОННЫМИ ПОЛОСАМИ ПОГЛОЩЕНИЯ И ИСПУСКАНИЯ СЛОЖНЫХ МОЛЕКУЛ	6
1.4.1. Специфика процессов поглощения и релаксации.....	6
1.4.2. Правило Стокса.....	6
1.4.3. Закон зеркальной симметрии Левишина.....	7
1.4.4. Универсальное соотношение Степанова	11
1.5. КРАСИТЕЛИ – ПРИМЕР СЛОЖНЫХ МОЛЕКУЛ. ОСНОВНЫЕ ФОТОФИЗИЧЕСКИЕ ПРОЦЕССЫ В КРАСИТЕЛЕ.....	12
2. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ	14
2.1. ПРИГОТОВЛЕНИЕ ОБРАЗЦОВ РАСТВОРОВ.....	14
2.2. МЕТОДИКА ИЗМЕРЕНИЯ СПЕКТРОВ ПОГЛОЩЕНИЯ	14
2.3. МЕТОДИКА ИЗМЕРЕНИЯ СПЕКТРОВ ЛЮМИНЕСЦЕНЦИИ.....	14
2.3.1. Выбор условий возбуждения	14
2.3.2. Факторы, искажающие форму спектра. Исправление спектров люминесценции.....	15
2.3.4. Описание установки для регистрации спектров люминесценции	18
3. ЗАДАНИЕ	20
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.	21

1. Теоретическая часть

1.1. Определение люминесценции. Виды люминесценции.
Фотолюминесценция. Общие закономерности люминесценции

Тепловое излучение нагретых тел является фоном, по отношению к которому регистрируются все вторичные свечения. Вторичные свечения – это отражение и рассеяние света, излучение оптических квантовых генераторов, излучение Вавилова-Черенкова, люминесценция и др.

Люминесцентное излучение можно определить как спонтанное излучение, избыточное над тепловым, имеющее конечную длительность, превышающую период световых колебаний, и возникающее при спектроскопическом переходе атомов, молекул, кристаллов из возбужденных электронных состояний в основное и в более низкорасположенные возбужденные. Наиболее вероятный процесс – переход в основное состояние. Характерной особенностью люминесценции является протекание в молекулах между актами поглощения и излучения промежуточных процессов.

Возбужденные состояния могут быть получены различными способами, поэтому люминесценцию часто различают в зависимости от предыстории возникновения возбуждения: при бомбардировке ионами - ионолюминесценция, электронами - катодолюминесценция, при использовании химических реакций - хемолюминесценция или биолюминесценция, электрических полей - электролюминесценция, при возбуждении светом - фотолюминесценция. Фотолюминесценция возникает при облучении в полосе поглощения вещества.

В последние десятилетия люминесцентные методы анализа состояния вещества получили особое признание в связи с использованием лазерных источников возбуждения. Обладая большой чувствительностью, эти методы позволяют работать при очень малых концентрациях исследуемого вещества и незаменимы в биологии и медицине. В основе этих методов лежит измерение спектральных, поляризационных, пространственных и временных характеристик люминесценции.

1.2. Закон поглощения света. Фотовозбуждение

Уменьшение интенсивности света в процессе поглощения определяется соотношением:

$$dI = -Icdl, \quad (1)$$

где I – интенсивность света, падающая на границу слоя dl , c – концентрация поглощающего вещества, ϵ - коэффициент молярной экстинкции, зависящий от частоты падающего света.

Интегрирование выражения (1) приводит результату, известному как закон Бугера-Ламберта- Беера [1]:

$$I_l = I_0 e^{-\varepsilon(v)cl}, \quad (2)$$

где I_0 - интенсивность падающего на образец света, I_l - значение интенсивности после прохождения слоя толщины l . Применимость данного закона ограничивается следующими допущениями: ослабление потока определяется только числом поглощающих частиц, находящихся на его пути, и не зависит от интенсивности потока и от взаимного влияния молекул. Последнее предположение справедливо лишь для достаточно разбавленных растворов.

Отношение интенсивности света, прошедшей через слой толщины l к величине падающей интенсивности I_0 , носит название пропускания T слоя:

$$T = \frac{I_l}{I_0} = e^{-\varepsilon(v)cl}. \quad (3)$$

Десятичный логарифм величины T^{-1}

$$D = \lg \frac{1}{T} = \lg \frac{I_0}{I_l} \quad (4)$$

называют оптической плотностью D слоя.

1.3. Классификация молекул по сложности. Образование полос поглощения и испускания сложных молекул

Отличие от линейчатых атомных спектров спектры поглощения и люминесценции молекул полосатые или даже сплошные. Важнейшая роль в формировании структуры спектров молекул принадлежит явлению перераспределения колебательной энергии внутри молекулы с вероятностью W . В зависимости от соотношения между W и величиной, обратной длительности возбужденного состояния $1/\tau$ (вероятностью излучательного перехода), многоатомные молекулы по классификации Непорента [2] разделяются на простые ($W \ll 1/\tau$), сложные ($W \gg 1/\tau$) и полусложные, занимающие промежуточное положение. В настоящей работе в качестве объекта исследования выбраны так называемые сложные молекулы.

Утвердившаяся в настоящее время в научной литературе точка зрения относительно происхождения сплошных электронно-колебательных спектров сложных молекул связана с протеканием процессов внутримолекулярной колебательной релаксации. Спектр сложной молекулы рассматривается как непрерывный набор вероятностей франк-кондоновских переходов, дискретность которых нарушена вследствие уширения уровней из-за внутримолекулярных взаимодействий колебаний. Было экспериментально подтверждено, что при переходе от растворов к парам форма сплошных спектров флуоресценции и поглощения молекул остается

неизменной, т.е. определяется внутримолекулярными процессами. Этот вывод справедлив для сложных молекул с их сильным внутримолекулярным взаимодействием колебаний.

Формирование электронных полос сложных молекул происходит в результате наложения двух статистических распределений: распределения вероятностей переходов между любыми парами электронно-колебательных состояний (конфигурационное распределение) и распределения молекул по колебательным уровням исходного электронного состояния (тепловое распределение). Форма спектра поглощения зависит от конкуренции двух величин: вероятности электронно-колебательного перехода $B(E_{\text{кол}}'', E_{\text{кол}}')$ с нижнего уровня $E_{\text{кол}}''$ на верхний $E_{\text{кол}}'$ и плотности колебательных уровней в верхнем электронном состоянии $g'(E_{\text{кол}}')$ [3]:

$$B(v) = B(E_{\text{кол}}'', E_{\text{кол}}') g'(E_{\text{кол}}'). \quad (5)$$

Первая величина убывает по мере увеличения запаса колебательной энергии в возбужденном электронном состоянии (в соответствии с принципом Франка-Кондона), а вторая при этом возрастет. В результате формируется максимум, который не является информативным в отношении энергетической структуры электронно-колебательного состояния молекулы, а свидетельствует лишь о конкуренции вышеуказанных процессов.

1.4. Установление связи между электронными полосами поглощения и испускания сложных молекул

1.4.1. Специфика процессов поглощения и релаксации

Первая закономерность заключается в том, что при стоксовом возбуждении монохроматическим светом (спектральной линией) в любом месте полосы поглощения испускается вся полоса флуоресценции целиком с неизменным распределением в ней интенсивности. Постоянство спектра испускания при изменении частоты возбуждающего монохроматического света в широких пределах приводит к важному заключению о механизме этого внутримолекулярного процесса. При поглощении монохроматического излучения возбуждается только один из электронно-колебательных уровней энергии. Если при этом испускается целый набор фотонов, то это значит, что между актом поглощения и актом испускания происходит перераспределение энергии между колебательными степенями свободы молекулы, формирующее состояние, исходное для испускания. Такая нивелировка различных состояний возбуждения является внутренним свойством молекулы и не вызвана взаимодействием молекулы с окружающей средой.

1.4.2. Правило Стокса

Спектры флуоресценции и поглощения сложных молекул имеют ряд закономерностей. Спектр испускания красителей представляет собой полосу, сдвинутую по отношению к полосе поглощения в сторону длинных волн.

Такова *вторая* закономерность явления флуоресценции, которая носит название правила Стокса, согласно которому частота излученного света всегда меньше частоты поглощенного света. Разность энергий возбуждения и излучения в разреженных парах расходуется на перераспределение первичной колебательной энергии между другими колебательными степенями свободы (колебательными модами), играющими роль внутримолекулярного теплового резервуара. В конденсированных средах избыток колебательной энергии с большей вероятностью сбрасывается в окружение возбужденной молекулы.

1.4.3. Закон зеркальной симметрии Левшина

Спектральные кривые поглощения и испускания – взаимное зеркальное отражение по отношению к вертикали на рис. 1. Эта *третья* закономерность спектра флуоресценции – правило зеркальной симметрии была установлена В. Л. Левшиным (1931 г.).

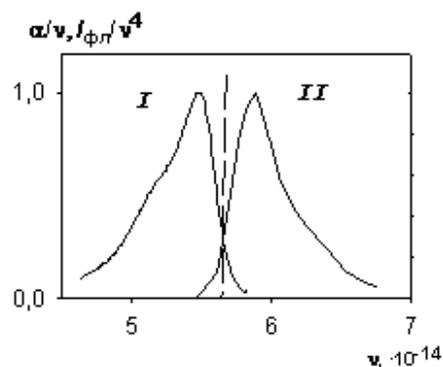


Рис.1. Взаимное расположение нормированных контуров поглощения (II) и флуоресценции (I) водных растворов эозина К

Объяснение зеркальности полос дано Д.И. Блохинцевым (1939 г.) при учете следующих предположений [3]:

1) системы колебательных уровней основного и возбужденного электронных состояний соответствуют друг другу по величине энергии ($E_{jкол}' = E_{jкол}'' = E_j$, $j=0,1,2,\dots$), имеют одинаковые волновые функции ($\Psi_{jкол}' = \Psi_{jкол}'' = \Psi_j$, $j=0,1,2,\dots$), одинаковое распределение молекул по колебательным уровням ($f(E_{кол}') = f(E_{кол}'') = f(E_{кол})$) и одинаковые плотности колебательных уровней ($g'(E_{кол}') = g''(E_{кол}'') = g(E_{кол})$);

2) взаимодействие электронного движения с ядерным настолько мало, что матричный элемент дипольного момента электронного перехода \bar{M}_{ik}^0 можно считать независимым от координат ядер:

$$\begin{aligned} \bar{M}_{ik}(E_{кол}', E_{кол}'') &= \int \Psi_{эл}' \Psi_{кол}' \bar{\mu} \Psi_{эл}'' \Psi_{кол}'' d\tau_{эл} d\tau_{кол} = \\ &= \int \Psi_{эл}' \bar{\mu} \Psi_{эл}'' d\tau_{эл} \int \Psi_{кол}' \Psi_{кол}'' d\tau_{кол} = \bar{M}_{ik}^0 \int \Psi_{кол}' \Psi_{кол}'' d\tau_{кол}. \end{aligned} \quad (6)$$

Распределение интенсивности в полосах поглощения и испускания определяются:

- а) заселенностью исходных уровней,
- б) вероятностью каждого отдельного электронно-колебательного перехода,
- в) плотностью колебательных уровней в конечном электронном состоянии.

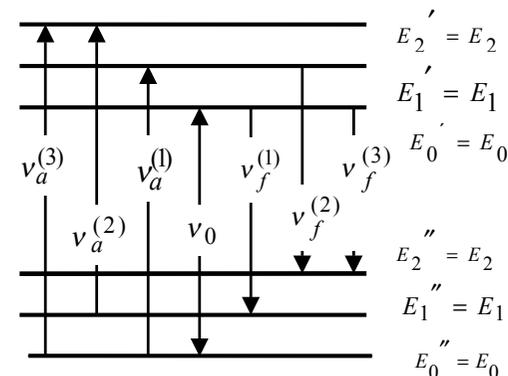


Рис.2. Схема образования зеркально-симметричных полос

Рассмотрим два электронных состояния, каждому из которых соответствует свой набор колебательных уровней (рис.2). Сравним переходы: $\nu_a^{(1)}$, которому соответствует коэффициент Эйнштейна $B(E_0'', E_1')$ и $\nu_f^{(1)}$, которому соответствует коэффициент Эйнштейна $A(E_0', E_1'')$. На рис. 2 видно, что частоты $\nu_a^{(1)}$ и $\nu_f^{(1)}$ расположены симметрично относительно частоты ν_0 на расстоянии $\Delta\nu = \frac{E_1 - E_0}{h}$ от нее. Соответствующие этим

переходам коэффициенты Эйнштейна можно выразить через моменты \vec{M} переходов.

$$B(E_0'', E_1') = \frac{8\pi^3}{3h^2} |\vec{M}_{0''1'}|^2, \quad (7)$$

$$A(E_0', E_1'') = \frac{64\pi^4}{3hc^3} \nu_f^3 |\vec{M}_{0'1''}|^2, \quad (8)$$

где ν_f - частота испускания. Используя (1), получаем:

$$\frac{A(E_0', E_1'')}{B(E_0'', E_1')} = \frac{A(E_0, E_1)}{B(E_0, E_1)} = \frac{8\pi h}{c^3} \nu_f^3. \quad (9)$$

Таким образом для пары различных и симметричных относительно ν_0 частот $\nu_a^{(1)}$ и $\nu_f^{(1)}$ получаем соотношение коэффициентов Эйнштейна

такого же вида, как и для коэффициентов B_{ki} и A_{ik} одной и той же частоты ν_{ki} . Аналогичное рассуждение можно провести для любой пары симметричных частот.

Общая вероятность $\overline{B(\nu)}$ поглощения света частоты ν получится, если учесть, что не все молекулы в нижнем электронном состоянии имеют одинаковую колебательную энергию $E_{кол}''$, а распределены по последовательности колебательных уровней. Тогда

$$\overline{B(\nu)} = \int_0^\infty f''(E_{кол}'') B(\nu) dE_{кол}'' \quad (10)$$

В состоянии термодинамического равновесия распределение $f''(E_{кол}'')$ является бoльцмановским

$$f''(E_{кол}'') = p'' g''(E_{кол}'') \exp\left(-\frac{E_{кол}''}{kT}\right), \quad (11)$$

где p'' - нормирующий множитель. В этом случае полная форма полосы поглощения $\overline{B(\nu)}$ описывается выражением:

$$\overline{B(\nu)} = \int_0^\infty p'' B(E_{кол}'', E_{кол}') g'(E_{кол}') g''(E_{кол}'') \exp(-E_{кол}''/kT) dE_{кол}'' \quad (12)$$

Аналогичные рассуждения позволяют получить выражение для полосы люминесценции:

$$\overline{A(\nu)} = \int_0^\infty A(E_{кол}'', E_{кол}') g''(E_{кол}'') f'(E_{кол}') dE_{кол}'. \quad (13)$$

Их отношение равно:

$$\frac{\overline{A(\nu)}}{\overline{B(\nu)}} = \frac{8\pi h}{c^3} \nu_f^3. \quad (14)$$

На опыте обычно измеряются не коэффициенты Эйнштейна, а пропорциональные им величины: объемная мощность U_v^{ucn} испускания, т.е. энергия, испускаемая молекулой за единицу времени в единице объема и коэффициент поглощения k_v , см^{-1} . Пренебрегая вынужденным испусканием, запишем:

$$U_v^{ucn} = h\nu_{ik} A_{ik} N_i, \quad (15)$$

$$k_v = \frac{U_v^{nozl}}{\rho(\nu)c} = \frac{h\nu_{ki}}{c} B_{ki} N_k, \quad (16)$$

где N_i , N_k - населенности i и k - уровней соответственно, см^{-3} , $\rho(\nu)$ - объемная плотность энергии, $\text{эрг}\cdot\text{см}^{-3}$, c - скорость света, $\text{см}\cdot\text{с}^{-1}$. Учитывая соотношения (15-16), получаем

$$\frac{U_v^{ucn}}{\nu_f^4} \sim \frac{k_v}{\nu_a}. \quad (17)$$

Выражение (12) показывает, что для выполнения правила зеркальности в шкале частот необходимо откладывать по оси ординат величину $\frac{k_v}{\nu_a}$ для

спектра поглощения, а величину $\frac{U_v^{ucn}}{\nu_f^4}$ - для спектра люминесценции.

Последнее обстоятельство весьма существенно, так как изменение величины, откладываемой по оси ординат, особенно для спектра испускания, может исказить форму полосы. Судить о том, соблюдается ли для данной молекулы зеркальность в шкале частот, можно только при правильном выборе ординат.

Математически правило зеркальной симметрии может быть записано в виде:

$$\nu_{\text{погл}} + \nu_{\text{люм}} = 2\nu_0, \quad (18)$$

где $\nu_{\text{погл}}$ - частота поглощаемого света, $\nu_{\text{люм}}$ - симметричная ей частота в спектре флуоресценции, ν_0 - частота воображаемой линии симметрии, проходящей через точку пересечения обоих спектров. Нетрудно видеть, что частота симметрии совпадает с частотой чисто электронного перехода в предположении, что $E_{0\text{кол}}' = E_{0\text{кол}}''$. Выражение (18) может быть преобразовано к виду

$$\nu_{\text{погл}} - \nu_{\text{люм}} = 2(\nu_{\text{погл}} - \nu_0). \quad (19)$$

Откладывая по оси ординат $\Delta\nu = \nu_{\text{погл}} - \nu_{\text{люм}}$, а по оси абсцисс - $\nu_{\text{погл}}$, мы должны получить линейную зависимость с угловым коэффициентом при $\nu_{\text{погл}}$, равным двум. Построение этой линейной зависимости является удобным способом проверки выполнимости правила зеркальной симметрии спектров поглощения и люминесценции.

Правило зеркальной симметрии строго выполняется для растворов и паров широкого круга сложных молекул. Вместе с тем у многих молекул зеркальная симметрия спектров наблюдается лишь качественно, а отступление от закона симметрии указывают на отступление от идентичности характеристик электронно-колебательных состояний молекулы.

1.4.4. Универсальное соотношение Степанова

Четвертая закономерность заключается в выполнении «универсального соотношения» между спектром флуоресценции и спектром поглощения для сложных молекул в парах и растворах. Объемная мощность испускания U_v^{ucn} связана с коэффициентом поглощения k_v при любой частоте ν следующей зависимостью:

$$\frac{U_v^{ucn}}{k_v} = Q\nu^3 e^{-\frac{h(\nu-\nu_e)}{kT}}, \quad (20)$$

где Q - постоянная, зависящая от условий возбуждения спектра испускания, ν_e - частота чисто электронного перехода, h - постоянная Планка, k - постоянная Больцмана, T - температура. Универсальное соотношение справедливо, если выполняются следующие условия: 1) за время жизни возбужденного состояния (до акта испускания) успевает установиться равновесное распределение возбужденных молекул по

колебательным уровням; 2) поглощение и испускание происходит в одной и той же молекуле; 3) поглощение каждого кванта приводит к возбуждению, т.е. отсутствует тушение первого рода. Б.И. Степанов (1957 г.) показал, что если универсальное соотношение выполняется, то спектр люминесценции по своей форме должен совпадать со спектром теплового испускания системы, который определяется законом Кирхгофа. Используя универсальное соотношение Степанова, можно определить частоту чисто электронного перехода, колебательную температуру, колебательную теплоемкость.

1.5. Красители - пример сложных молекул. Основные фотофизические процессы в красителе

Типичным примером сложных молекул служат красители. В состав большинства органических красителей в качестве основного структурного элемента входит шестичленное бензольное кольцо. Оно обычно повторяется несколько раз, сочетаясь с другими кольцами (пиридиновым, азиновым, оксазиновым и др.), присутствие которых в структуре молекулы дает название целым классам органических красителей. Ксантеновые красители имеют структуру, характеризуемую системой четырех бензольных колец, три из которых характеризуют структуру ксантена. Пример красителя этого класса - эозин (тетрабромфлуоресцеин) (рис. 3), а также флуоресцеин и эритрозин, которые содержат в качестве заместителей вместо брома водород и йод соответственно [4].

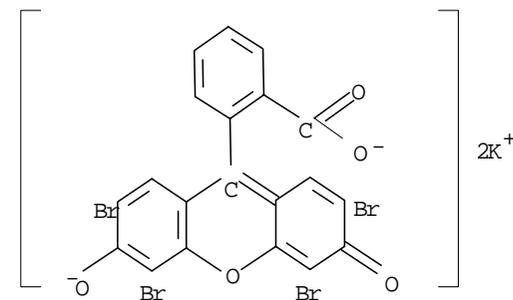


Рис. 3. Калиевая соль тетрабромфлуоресцеина

К отличительным свойствам красителей можно отнести широкие (около 3000 см^{-1}) электронно-колебательные спектры поглощения в видимой и УФ областях, связанные с первым синглет-синглетным переходом и переходами в высоковозбужденные состояния. Первый триплетный уровень располагается обычно на $20-40 \text{ кДж моль}^{-1}$ ниже возбужденного синглетного уровня. У ряда красителей благодаря наличию тяжелых атомов имеет место

нарушение интеркомбинационного запрета ($\Delta S \neq 0$), приводящее к эффективному заселению триплетного уровня. У таких красителей наблюдается излучение, обусловленное переходом из триплетного состояния в основное, называемое *фосфоресценцией*. В отличие от флуоресценции, фосфоресценция имеет большую длительность послесвечения и ее спектр сдвинут в длинноволновую сторону.

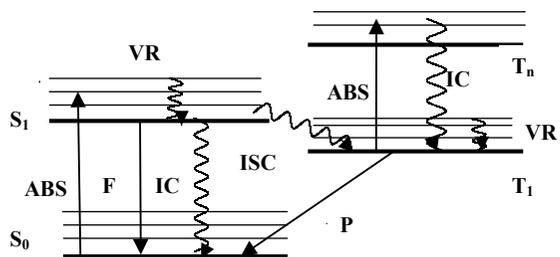


Рис.4. Процессы возбуждения и дезактивации для органической молекулы (диаграмма Яблонского) [5]: S_0, S_1 – синглетный основной и первый возбужденный уровни соответственно, T_1, T_n – триплетные первый и высшие возбужденные уровни, ABS – поглощение, F – флуоресценция, ISC – интеркомбинационная конверсия, P – фосфоресценция, IC – внутренняя конверсия, VR – колебательная релаксация

Ряд основных спектральных характеристик водных растворов ксантеновых красителей приведены в таблице.

Краситель	Энергия первого синглетного уровня, кДж·моль ⁻¹	Коэффициент молярной экстинкции, л·моль ⁻¹ ·см ⁻¹	Максимум полосы поглощения, нм	Квантовый выход флуоресценции
Флуоресцеин	231	(5-8.8)·10 ^{4*}	486-491*	0.92
Эозин	231	5.08·10 ⁴	511-515*	0.2
Эритрозин	221	5.7·10 ⁴	521	0.02
Родамин С	207	0.93·10 ⁴	545	0.97

**Примечание.* Если для некоторой величины в таблице указаны два значения, то это соответственно наибольшее и наименьшее из известных в литературе значений.

2. Экспериментальная часть

Для проверки правила зеркальной симметрии необходимо приготовить образцы растворов красителей и зарегистрировать их спектры поглощения и люминесценции.

2.1. Приготовление образцов растворов

Перед приготовлением раствора красителя необходимо рассчитать концентрацию раствора (в моль/литр), обеспечивающую при толщине кюветы $l=1$ см оптическую плотность в максимуме спектра $D \approx 1$. Выбор диапазона значения оптической плотности определяется значением минимальной погрешности величины пропускания в пределах от 10% до 45% (оптическая плотность 1 ± 0.2) [6]. Найденную концентрацию целесообразно перевести в г/мл, воспользовавшись величиной молярной массы красителя. Взвешивание необходимого количества красителя на 10 мл раствора осуществляется на аналитических весах с соблюдением всех правил взвешивания сыпучих веществ. В случае, если точность взвешивания и измерения объема не обеспечивают приготовление указанного количества раствора, то конечную концентрацию необходимо получить путем n -кратного разбавления.

Внимание: при взвешивании и приготовлении раствора необходимо соблюдать аккуратность. Не допускайте попадания красителя и растворителя на кожу, одежду и оборудование!

2.2. Методика измерения спектров поглощения

Для измерения спектров поглощения красителей используется спектрофотометр СФ-26 со следующими характеристиками:

Спектральный диапазон, нм от 186 до 1100

Диапазон измерения коэффициента пропускания, % от 3 до 100

Основная погрешность измерения коэффициента пропускания, % абс, не более 1

Принцип действия и схема установки приведена в техническом описании и инструкции по эксплуатации к спектрофотометру СФ-26.

На спектрофотометре измеряется пропускание или оптическая плотность раствора относительно растворителя. Методика измерений изложена в описании к спектрофотометру.

2.3. Методика измерения спектров люминесценции

2.3.1. Выбор условий возбуждения

При изучении люминесценции оптически плотных образцов могут быть допущены ошибки, связанные с эффектом реабсорбции или эффектом внутреннего фильтра. Реабсорбция происходит в результате поглощения фотонов люминесценции вещества в области перекрытия спектров

поглощения и люминесценции. При этом будет ослабляться интенсивность в коротковолновой части спектра люминесценции (рис. 5).

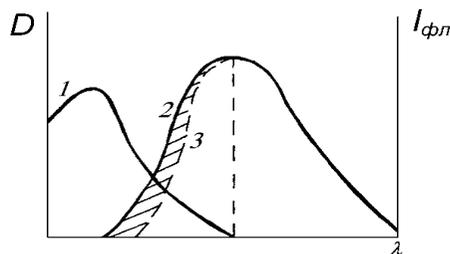


Рис. 5. Искажение спектров флуоресценции в результате реабсорбции: 1-спектр поглощения, 2 и 3 – неискаженный и искаженный соответственно спектры флуоресценции

Эффект реабсорбции можно значительно уменьшить выбором геометрии фронтального возбуждения образца. Используемое расположение зависит от типа излучаемого образца и целей исследования. Для непрозрачных твердых тел, а также растрескавшихся или поликристаллических образцов лучше всего использовать фронтальное возбуждение. Для слабопоглощающих растворов надежность регистрации полезного сигнала люминесценции снижается наличием фона, который возникает за счет рассеяния возбуждающего света, флуоресценции стенок кювет, примесей в растворителе т.д. Так как рассеянный свет и флуоресценция кюветы меньше при освещении под прямым углом, то данная геометрия наиболее предпочтительна. Выбор расположения для умеренно поглощающих растворов определяется целью исследования и величиной ожидаемого эффекта внутреннего фильтра.

2.3.2. Факторы, искажающие форму спектра. Исправление спектров люминесценции

Спектр люминесценции образца – это зависимость интенсивности испускания, измеренной в квантах на единичный интервал частоты (или волнового числа) от частоты или волнового числа. Если Q представляет общее число квантов, выходящих из образца через единицу площади в единицу времени, то $dQ/d\tilde{\nu}$ – это интенсивность при волновом числе $\tilde{\nu}$, а график $dQ/d\tilde{\nu}$ в зависимости от $\tilde{\nu}$ является истинным спектром испускания. На практике обычно спектр изображают в относительных, а не в абсолютных единицах.

Если монохроматор, анализирующий спектр флуоресценции, сканируется при постоянной ширине щели и переменной чувствительности фотоумножителя, то получаемая кривая – кажущийся или неисправленный спектр испускания. Для определения истинного спектра на основе

полученной кривой следует внести поправку на три зависящие от волнового числа величины [8]:

- квантовую эффективность фотоумножителя;
- ширину полосы, пропускаемой монохроматором;
- коэффициент пропускания монохроматора.

Сигнал с фотоумножителя $A_{\tilde{\nu}}$ при волновом числе $\tilde{\nu}$, соответствующий кажущемуся спектру испускания равен

$$A_{\tilde{\nu}} = (dQ/d\tilde{\nu})(P_{\tilde{\nu}} B_{\tilde{\nu}} L_{\tilde{\nu}}) = (dQ/d\tilde{\nu})(S_{\tilde{\nu}}), \quad (21)$$

где $P_{\tilde{\nu}}$ – относительная квантовая эффективность фотоумножителя, $B_{\tilde{\nu}}$ – относительная ширина полосы при постоянной ширине щели монохроматора, $L_{\tilde{\nu}}$ – доля света, проходящего через монохроматор. Истинный спектр испускания можно вычислить из наблюдаемой зависимости, разделив ее ординату на соответствующую величину $S_{\tilde{\nu}}$. $S_{\tilde{\nu}}$ – это спектральная чувствительность комбинации монохроматор – фотоумножитель (включая оптику входной щели), которая пропорциональна сигналу с фотоумножителя, который получался бы в случае освещения входной щели источником с постоянным спектральным распределением.

Если имеется ряд соединений, для которых точно определен исправленный спектр флуоресценции, то измерение неисправленных спектров этих соединений на приборе, который надо калибровать, позволяет вычислить спектральную чувствительность с помощью следующего уравнения:

$$S_{\tilde{\nu}} = R_{SL} / (dQ/d\tilde{\nu})_{SL}. \quad (22)$$

Здесь $(dQ/d\tilde{\nu})_{SL}$ представляет собой известное спектральное распределение одного из стандартных соединений, R_{SL} – наблюдаемую величину. Существенно, чтобы образец не содержал других флуоресцирующих веществ и чтобы флуоресценцию измеряли при тех же самых условиях (температура, концентрация, тип растворителя, pH и т.д.), для которых известны стандартные условия распределения.

Эффект реабсорбции можно учесть теоретически [9].

Рассчитаем поправочный коэффициент для учета эффекта реабсорбции, взяв плоскопараллельный образец толщиной l , на который нормально падает монохроматический возбуждающий пучок с интенсивностью I_0 (рис. 6). Рассмотрим люминесценцию элементарного слоя малой толщины Δx , перпендикулярного световому пучку и находящегося на расстоянии x от передней поверхности образца. Так как толщина элементарного объема мала, то эффектами реабсорбции внутри слоя Δx можно пренебречь. Тогда

$$\Delta I_{\lambda}(x) = I(x) \rho \epsilon_{\lambda} c dx \ln 10, \quad (23)$$

где

$$I(x) = I_0 \cdot 10^{-\varepsilon_e cx} \quad (24)$$

а ε_e - коэффициент молярной экстинкции на длине волны возбуждения.

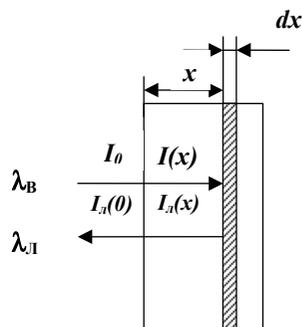


Рис. 6. К выводу поправки на эффект реабсорбции

Вследствие реабсорбции интенсивность регистрируемой люминесценции уменьшится и, если путь люминесценции в образце принять равным пути возбуждающего света (измерение люминесценции производится с передней стенки кюветы), будет определяться соотношением

$$\Delta I_l(0) = \Delta I_l(x) \cdot 10^{-\varepsilon_l cx} \quad (25)$$

Здесь ε_e - молярный коэффициент поглощения при длине волны возбуждения, ε_l - молярный коэффициент поглощения при длине волны измерения люминесценции, c - концентрация люминесцирующего вещества, φ - квантовый выход люминесценции. Чтобы получить выражение для интенсивности люминесценции от всего образца, объединим уравнения (23) - (25)

$$\Delta I_l(0) = I_0 \varphi \ln 10 \varepsilon_e c \cdot 10^{-(\varepsilon_e + \varepsilon_l)cx} \Delta x \quad (26)$$

а затем перейдем к бесконечно малым приращениям и осуществим интегрирование в области x от 0 до l .

$$\Delta I_l(0) = I_0 \varphi \left[1 - 10^{-(D_e + D_l)} \right] \frac{D_e}{D_e + D_l} \quad (27)$$

Здесь D_e и D_l - оптическая плотность раствора в кювете при длине волны возбуждения и измеряемой люминесценции соответственно.

Уравнение (26) позволяет оценить эффект реабсорбции в двух крайних ситуациях, действительно встречающихся в практике спектрофлуориметрии.

Случай 1. Сильно разбавленные растворы ($D_e + D_l \ll 1$). При этом получаем приближенное значение

$$I_l(0) \approx I_0 \cdot 2,3\varphi D_e \quad (28)$$

Реабсорбция не имеет места, так как $I_l(0)$ не зависит от D_l .

Случай 2. Очень концентрированные растворы ($D_e + D_l \gg 1$). В этом случае уравнение (27) приобретает вид

$$\Delta I_l(0) = I_0 \varphi \frac{D_e}{D_e + D_l} \quad (29)$$

Реабсорбция зависит от соотношения оптических плотностей растворов в области возбуждения и люминесценции.

Таким образом, для уменьшения реабсорбции следует: 1) использовать образцы с низкой оптической плотностью; 2) измерение люминесценции осуществлять с передней стенки; 3) возбуждать люминесценцию в максимуме поглощения вещества.

В многокомпонентных системах фотоны люминесценции могут поглощаться молекулами других веществ, характер искажений спектра люминесценции в таком случае будет полностью определяться формой спектра поглощения веществ в системе.

2.3.4. Описание установки для регистрации спектров люминесценции

Для измерения спектров люминесценции можно использовать установку, собранную на базе спектрально-вычислительного комплекса (рис. 7).

Комплекс спектральный вычислительный универсальный (КСВУ-23) предназначен для выполнения записи спектров в непрерывном режиме в диапазоне от 190 до 1200 нм. В состав комплекса входит монохроматор МДР-23, многоканальная система управления и сбора данных (плата расширения), фотоприемники, блоки питания, IBM-совместимый компьютер. В качестве фотоприемников используются фотоэлектронные умножители (ФЭУ) для регистрации сигналов в разных диапазонах длин волн и фотодиод для измерения уровня сигнала возбуждения. Уверенно регистрируется сигнал с амплитудой в интервале $U_m = 50$ мВ - 5 В. Ошибка измерений не более 0.1%.

Программное обеспечение комплекса имеет функции настройки электронной части платы расширения, управления в режиме сбора информации (записи спектров, оцифровки сигналов), накопления,

усреднения, вычитания шумов, нормировки на интенсивность источника возбуждения, внесения аппаратных поправок в форму спектра люминесценции, контроля за амплитудой входного сигнала, отображения времени каждого измерения и всего эксперимента и др.[7]. В программу управления КСВУ введена возможность снятия данных без перестройки монохроматора, что позволяет наблюдать кинетику различных процессов в оптических средах, определять нестабильность источников излучения.

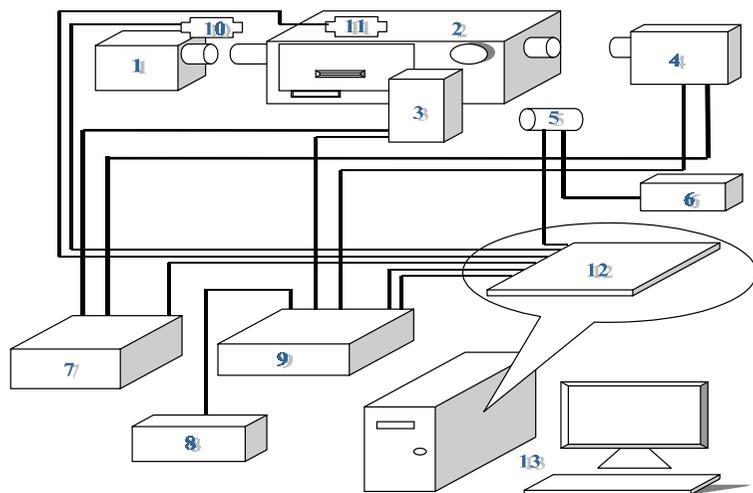


Рис. 7. Блок-схема спектрально-вычислительного комплекса КСВУ-23: 1 - осветитель; 2 - монохроматор МДР-23; 3, 4 - фотоумножители ФЭУ62, ФЭУ100; 5 - фотодиод; 6 - блок питания фотодиода; 7 - высоковольтный блок питания; 8 - блок питания предварительного усилителя; 9 - предварительный усилитель; 10, 11 - шаговые двигатели фильтров и перестройки монохроматора; 12 - плата расширения; 13 - IBM-совместимый компьютер

Осветитель (1) (рис.8) для снятия спектров люминесценции имеет держатель образцов и сферический зеркальный конденсор, защищенные легко открывающимся пластиковым кожухом. Держатель образцов и зеркальный конденсор имеют юстировочные винты. Система позволяет сконцентрировать на входной щели монохроматора слабое свечение люминесценции. Источником возбуждения спектра люминесценции служит ртутная лампа. Монохроматическое излучение одной из линий ртутного спектра выделяется дополнительным монохроматором или стеклянным

светофильтром. Предусмотрен вариант фотовозбуждения одной из линий генерации аргонового лазера.

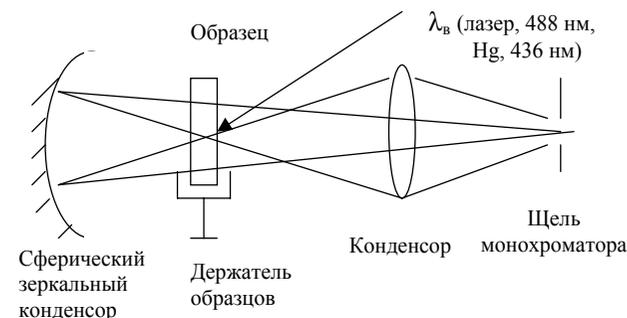


Рис. 8. Схема осветителя

Свет от источника свечения собирается на входной щели монохроматора (2), разлагается в спектр, который сканируется относительно выходной щели в автоматическом режиме.

Фотоумножители (3, 4) позволяют зарегистрировать свечение в разных спектральных диапазонах: ФЭУ62 – 0.37-1.15 мкм, ФЭУ100 в диапазоне 0.17-0.83 мкм, соответственно. Фотодиод ФД-24 (5) используется для контроля за уровнем накачки возбуждения и записи кинетических зависимостей, имеет отдельный высокостабильный блок питания (6).

Высоковольтный блок питания (7) имеет два независимых канала, управляемых внешним сигналом. Диапазон выходных напряжений каждого канала 0...2000В.

Двухканальный инвертирующий предварительный усилитель (9) с блоком питания (8) служит для сопряжения входов усилителей платы расширения и сигнальных цепей ФЭУ. Основным элементом автоматизации является плата расширения (12), с помощью которой осуществляется координация прохождения измеряемых сигналов и сигналов управления измерением.

Шаговый двигатель (10) обеспечивает выбор одного из восьми положений турели входных оптических фильтров. Шаговый двигатель (11) перестраивает положение монохроматора.

Для ознакомления с процедурой запуска регистрации спектра и операциями обработки спектра после регистрации используется инструкция (на рабочем месте).

3. Задание

1. Приготовьте водный раствор одного из органических красителей по выбору (эозина К, флуоресцеина, родамина С) с учетом требования методики измерения спектров поглощения.

2. При помощи спектрофотометра СФ-26 проведите измерение спектра поглощения в полосе первого синглет-синглетного перехода.

3. Получите спектр флуоресценции этого же раствора на установке КСВУ-23, учитывая поправку на спектральную чувствительность установки. Возбуждение красителя осуществите при помощи линии генерации аргонового лазера $\lambda=488$ нм или одной из линий ртути.

4. На одном графике постройте спектр поглощения (в координатах α_ν/ν от ν) и спектр флуоресценции (в координатах I_f/ν^4 от ν), отнормировав при этом спектр флуоресценции по максимуму спектра поглощения красителя.

5. Осуществите проверку правила зеркальной симметрии путем построения линейной зависимости $\Delta\nu=\nu_{\text{погл}}-\nu_{\text{люм.}}$ от $\nu_{\text{погл}}$ и нахождения тангенса угла наклона этой зависимости. Определите значение частоты чисто электронного перехода ν_0 .

7. Выполненная работа представляет собой научное исследование, которое Вы повторили вслед за известными учеными, поэтому необходимо оформить отчет по правилам, принятым в научном сообществе. Отчет должен содержать следующие разделы [10]:

- реферат,
- введение и обзор литературы,
- постановку задачи,
- обоснование методики исследования,
- описание экспериментальной установки и методики измерения,
- результаты эксперимента и их обсуждение,
- выводы,
- список литературы.

Список литературы

1. Теренин А.Н. Фотоника молекул красителей. – Л.: Наука, 1976.
2. Непорент Б.С. // *ЖЭТФ*. Т. 51. – 1951. – с. 472.
3. Мейстер Т.Г. Электронные спектры многоатомных молекул. – Л.: Изд-во ЛГУ, 1969.
4. Неницеску, К.Д. Органическая химия. Т. 2. – М.: Иностран. лит., 1963.
5. Введение в фотохимию органических соединений/ Под ред. проф. Г.О. Беккера. – Л.: Химия, 1976.
6. Практикум по спектроскопии/ Под. ред. проф. Л.В. Левшина. –М.: Изд-во МГУ, 1976.
7. Алфимов Е.Е., Грошев Д.Г., Макуха В.К., Мешалкин Ю.П. Плата расширения для двухфотонного лазерного спектрометра на базе компьютера IBM PC// ПТЭ. – 1998. – №2. – С. 165.
8. Паркер С. Фотолюминесценция растворов. – М.: Мир, 1972.
9. Владимир Ю. А., Потапенко А.Я. Физико-химические основы фотобиологических процессов. – М.: Высш. шк., 1989.
10. Рекомендации по оформлению и защите дипломных и курсовых работ/ Сост.: А.И. Кондрашов, Н.Ю. Романова; КрасГУ. – Красноярск, 2002.

Проверка правила зеркальной симметрии спектров поглощения и люминесценции у растворов красителей

Арнольд Гаевич Сизых, Евгения Алексеевна Слюсарева

Редактор И.А. Вейсиг
Корректор Т.Е. Бастрыгина

Подписано в печать 24.06.2002

Тиражируется на электронных носителях

Заказ 1

Дата выхода 02.07.2002

Адрес в Internet: www.lan.krasu.ru/studies/editions.asp

Отдел информационных ресурсов управления информатизации КрасГУ
660041 г. Красноярск, пр. Свободный, 79, ауд. 22-05, e-mail: info@lan.krasu.ru

Издательский центр Красноярского государственного университета
660041 г. Красноярск, пр. Свободный, 79, e-mail: rio@lan.krasu.ru