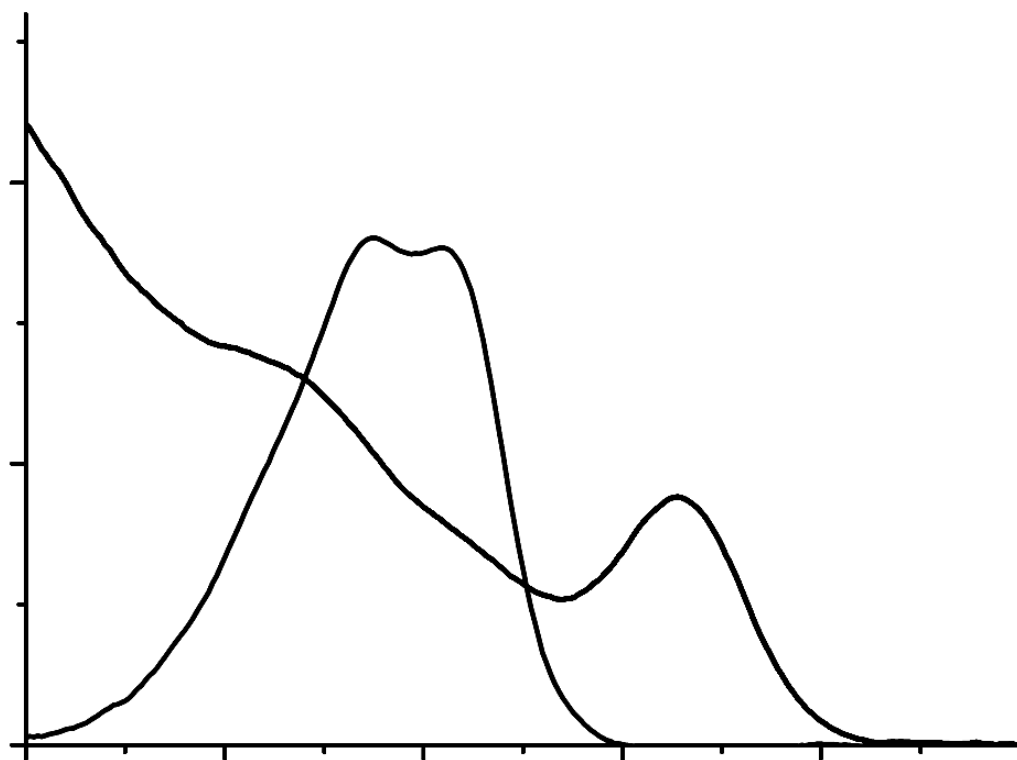


Г.Н. Виноградова, Ю.А. Громова,
М.С. Губанова, В.Г. Маслов, А.О. Орлова

ТЕХНИКА ФИЗИЧЕСКОГО ЭКСПЕРИМЕНТА В СИСТЕМАХ С ПОНИЖЕННОЙ РАЗМЕРНОСТЬЮ. ЧАСТЬ 3



Санкт-Петербург

2011

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

**САНКТ-ПЕТЕРБУРГСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ
ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ
ИНФОРМАЦИОННЫХ ТЕХНОЛОГИЙ, МЕХАНИКИ И ОПТИКИ**

**Г.Н. Виноградова, Ю.А. Громова,
М.С. Губанова, В.Г. Маслов, А.О. Орлова**

**ТЕХНИКА ФИЗИЧЕСКОГО ЭКСПЕРИМЕНТА
В СИСТЕМАХ С ПОНИЖЕННОЙ
РАЗМЕРНОСТЬЮ. ЧАСТЬ 3**



Санкт-Петербург

2011

Г.Н. Виноградова, Ю.А. Громова, М.С. Губанова, В.Г. Маслов, А.О. Орлова. Техника физического эксперимента в системах с пониженной размерностью. Часть 3. Лабораторный практикум. – СПб: НИУ ИТМО, 2011. – 41 с.

Лабораторный практикум предназначен для магистрантов второго курса факультета Фотоники и оптоинформатики, обучающихся по магистерской программе 200700.68.05 «Оптика наноструктур» по направлению подготовки 200700 «Фотоника и оптоинформатика» и содержит описание шести лабораторных работ к дисциплине «Методы и техника физического эксперимента». Практикум также может быть рекомендован студентам старших курсов физико-технических специальностей, а также магистрантам, специализирующимся в области применения оптических методов в нанотехнологиях.

Рекомендовано к изданию Ученым Советом Факультета Фотоники и оптоинформатики. Протокол Совета № 7 от 17.11.2011 г.



В 2009 году Университет стал победителем многоэтапного конкурса, в результате которого определены 12 ведущих университетов России, которым присвоена категория «Национальный исследовательский университет». Министерством образования и науки Российской Федерации была утверждена программа его развития на 2009–2018 годы. В 2011 году Университет получил наименование «Санкт-Петербургский национальный исследовательский университет информационных технологий, механики и оптики».

© Санкт-Петербургский национальный исследовательский университет информационных технологий, механики и оптики, 2011

© Г.Н. Виноградова, Ю.А. Громова, М.С. Губанова,
В.Г. Маслов, А.О. Орлова, 2011

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	4
Лабораторная работа №1	
Проверка аддитивности смеси растворов полупроводниковых квантовых точек и органических молекул	5
Лабораторная работа №2	
Проверка спектральной однородности растворов органических молекул и полупроводниковых квантовых точек	17
Лабораторная работа №3	
Настройка светового микроскопа при работе в проходящем свете. Освещение объекта по методу Кёлера	26

ВВЕДЕНИЕ

Лабораторный практикум к дисциплине «Методы и техника физического эксперимента» по магистерской программе «Оптика наноструктур» разработан с учётом специфики подготовки магистрантов по направлению «Фотоника и оптоинформатика».

Основная цель настоящего лабораторного практикума: привить студентам навыки научно исследовательской работы в области физики наноструктур и продемонстрировать широкие возможности использования методов оптической, люминесцентной и зондовой микроскопии в различных научных экспериментах при исследовании наноструктурированных материалов. Кроме того, практикум позволяет продемонстрировать широкие возможности исследования квантовых точек в научных экспериментах различного назначения.

Описания лабораторных работ содержат краткие теоретические сведения. В их основу легли экспериментальные методики и результаты ряда научно-исследовательских работ, сравнительно недавно выполнявшихся Санкт-Петербургском национальном исследовательском университете информационных технологий, механики и оптики.

Первые две работы посвящены регистрации спектров поглощения, возбуждения и флуоресценции растворов органических молекул и полупроводниковых квантовых точек в видимом диапазоне спектра, а также первичной обработке и анализу спектральных данных.

Третья работа посвящена технике подготовке препаратов с квантовыми точками и настройке освещения по Кёлеру традиционного светового микроскопа.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА №1

ПРОВЕРКА АДДИТИВНОСТИ СМЕСИ РАСТВОРОВ ПОЛУПРОВОДНИКОВЫХ КВАНТОВЫХ ТОЧЕК И ОРГАНИЧЕСКИХ МОЛЕКУЛ

М.С. Губанова, А.О. Орлова, В.Г. Маслов

ЦЕЛИ РАБОТЫ:

- получение навыков регистрации спектров поглощения растворов органических молекул и полупроводниковых квантовых точек на спектрофотометре UV-Probe 3600 (Shimadzu);
- получение навыков первичной обработки и анализа спектральных данных.

ОБОРУДОВАНИЕ И РЕАКТИВЫ:

спектрофотометр UV-Probe 3600 (Shimadzu); кюветы с образцами 1, 2, 3.

ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ СВЕДЕНИЯ:

Электронные спектры — это молекулярные спектры, обусловленные квантовыми переходами молекулы из одного электронного состояния в другое.

Электронные спектры поглощения органических соединений находятся в УФ и видимой областях спектра. Согласно теории поглощения света молекула может поглотить только тот квант света, энергия которого соответствует разнице энергии между двумя энергетическими уровнями молекулы:

$$h\nu = E_i - E_j$$

На рисунке 1.1 приведена схема энергетических уровней органической молекулы. Основное электронное состояние обозначается как S_0 , возбужденные синглетные состояния как S_1 , S_2 и т.д. Каждому из этих состояний соответствует набор колебательных состояний.

При нормальных условиях большинство молекул находятся в основном электронном состоянии S_0 и при поглощении света переходят в одно из высших возбужденных состояний. При возбуждении системы в какое-нибудь состояние выше первого возбужденного состояния в результате релаксационных процессов молекула быстро оказывается в самом нижнем возбужденном состоянии S_1 .

В электронных спектрах поглощения проявляются переходы из основного (S_0) в возбужденные состояния S_1 , S_2 , ..., S_n , но также могут

проявляться полосы, соответствующие переходам на колебательные уровни возбужденных состояний.

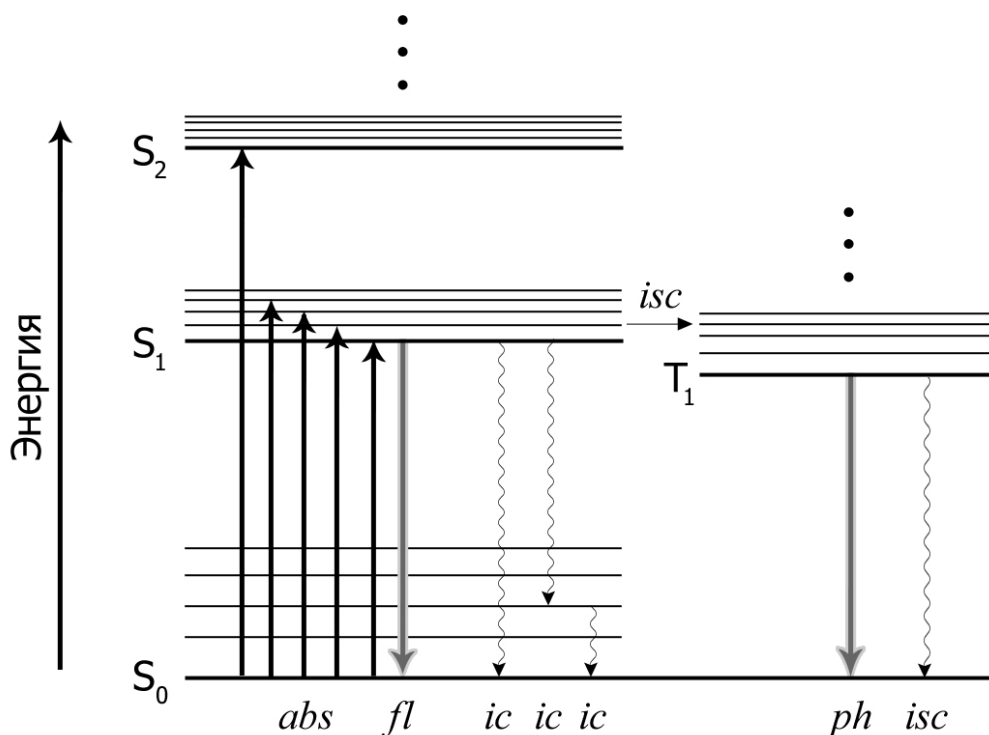


Рисунок 1.1 Схема энергетических уровней органических молекул. Abs – поглощение, fl – флуоресценция, ph – фосфоресценция, ic (internal conversion) – внутренняя конверсия, isc (inter-system crossing) – интеркомбинационная конверсия.

Коллоидные квантовые точки — полупроводниковые нанокристаллы сферической формы, имеющие размеры ядра от 2 нм до 10 нм. Благодаря столь малым размерам, в таких нанокристаллах начинает проявляться эффект размерного квантования — зависимость спектров поглощения и испускания от размера частицы. В видимой области спектра используются квантовые точки CdSe, CdS, CdTe. Спектр поглощения квантовых точек определяется как химическим составом, так и размером ядра, который определяет положение длинноволновой полосы поглощения.

Интенсивность полосы поглощения или, другими словами, поглощательную способность вещества на определенной длине волны характеризует молярный коэффициент экстинкции ϵ , который для органических молекул обычно лежит в пределах от 10^3 до 10^5 л/моль·см, для квантовых точек: от 10^5 до 10^6 л/моль·см.

Зависимость коэффициента экстинкции от длины волны падающего на образец излучения называется спектром поглощения вещества. В

случае однокомпонентного раствора коэффициент экстинкции может быть выражен через зарегистрированную оптическую плотность образца с помощью закона поглощения света Бугера-Ламберта-Бера:

$$\varepsilon = D / Cl,$$

$D = \lg(I_0 / I)$ – оптическая плотность; I_0 – интенсивность падающего излучения; I – интенсивность прошедшего через образец излучения; C – молярная концентрация (моль/литр); l – длина оптического пути (см).

Зависимость оптической плотности от длины волны падающего излучения называется спектром поглощения образца. Для случая однокомпонентного раствора — это спектр поглощения вещества, выраженный в условных единицах и связанный с коэффициентом экстинкции через закон Бугера-Ламберта-Бера.

Для многокомпонентного раствора может наблюдаться две ситуации: 1) взаимодействие между компонентами отсутствует и 2) смешивание компонент приводит к их взаимодействию и, как следствие взаимодействия, к изменению спектров поглощения компонент. В первом случае мы имеем ситуацию, когда для смешанного раствора выполняется принцип аддитивности. Это означает, что зарегистрированный спектр поглощения смешанного раствора является суммой спектров поглощения отдельных компонент:

$$D(\lambda) = D_1(\lambda) + D_2(\lambda) + D_3(\lambda) + \dots + D_n(\lambda)$$

Очевидно, что наличие взаимодействия между компонентами смеси, которое приводит к изменению их спектров поглощения, ведет к нарушению аддитивности спектра поглощения.

По интенсивности полос электронных спектров можно судить о концентрации данного вещества в растворе. По изменению интенсивности отдельных полос судят об увеличении или уменьшении количества отдельных компонентов смеси при изменении условий (например, pH среды), о наличии в системе тех или иных хромофорных групп и их взаимодействии. Методы спектрофотометрии позволяют проводить качественный и количественный анализ структуры и взаимодействия веществ.

Для измерения спектров поглощения используют специальные оптические приборы — спектрофотометры, состоящие из источника света, кюветного отделения для образцов, монохроматора (призма или дифракционная решетка) и детектора. Сигнал от детектора регистрируется в виде непрерывной кривой (спектра поглощения) и в виде таблиц.

В ходе выполнения работы предлагается:

- 1) измерить спектры поглощения трех растворов — квантовых точек, органических молекул и их смеси;
- 2) по известным коэффициентам экстинкции определить концентрации растворов отдельных компонент;
- 3) при условии, что концентрация компонент в смеси известна, построить спектры поглощения отдельных компонент, для которых концентрация совпадает с концентрацией данной компоненты в смеси;
- 4) построить спектр поглощения, который является суммой спектров, полученных в п.3;
- 5) сравнить зарегистрированный спектр поглощения смеси со спектром поглощения, построенным в 4: сопоставить число полос поглощения в двух спектрах, положение и форму полос поглощения;
- 6) на основании сравнения расчетного и зарегистрированного спектров поглощения смеси сделать вывод о выполнимости принципа аддитивности для данных компонент.

ОПИСАНИЕ ЛАБОРАТОРНОЙ УСТАНОВКИ:

Для измерений в лабораторной работе используется спектрофотометр UV-probe 3600, который предназначен для проведения спектральных исследований в широкой области спектра – от УФ до ближнего ИК. Оптическая схема прибора приведена на рисунке 1.2.

Спектрофотометр серии UV3600 имеет предварительный монохроматор с двумя решетками и основной монохроматор также с двумя решетками. Это и есть двойной монохроматор, в котором используется 4 решетки. UV3600 способен выполнять различные измерения в широком спектральном диапазоне от 185 нм в УФ области до 3300 нм в ближней ИК области.

На рисунке 1.2 приведена оптическая схема спектрофотометра. Свет от дейтериевой лампы (D2) или галогенной лампы (WI) собирается зеркалом M1 и проектируется на входную щель S1 (ширина и высота щели фиксированы). Переключение источников света полностью автоматическое – источник света выбирается в соответствии с длиной волны. После включения прибора и установки связи с программой UVProbe происходит инициализация прибора, при которой зеркало поворачивается к источнику так, чтобы получить максимальный световой поток. Белый свет, проходя через щель S1, попадает в предварительный монохроматор, который состоит из зеркала и двух вогнутых дифракционных решеток, которые используются в зависимости от длины волны.

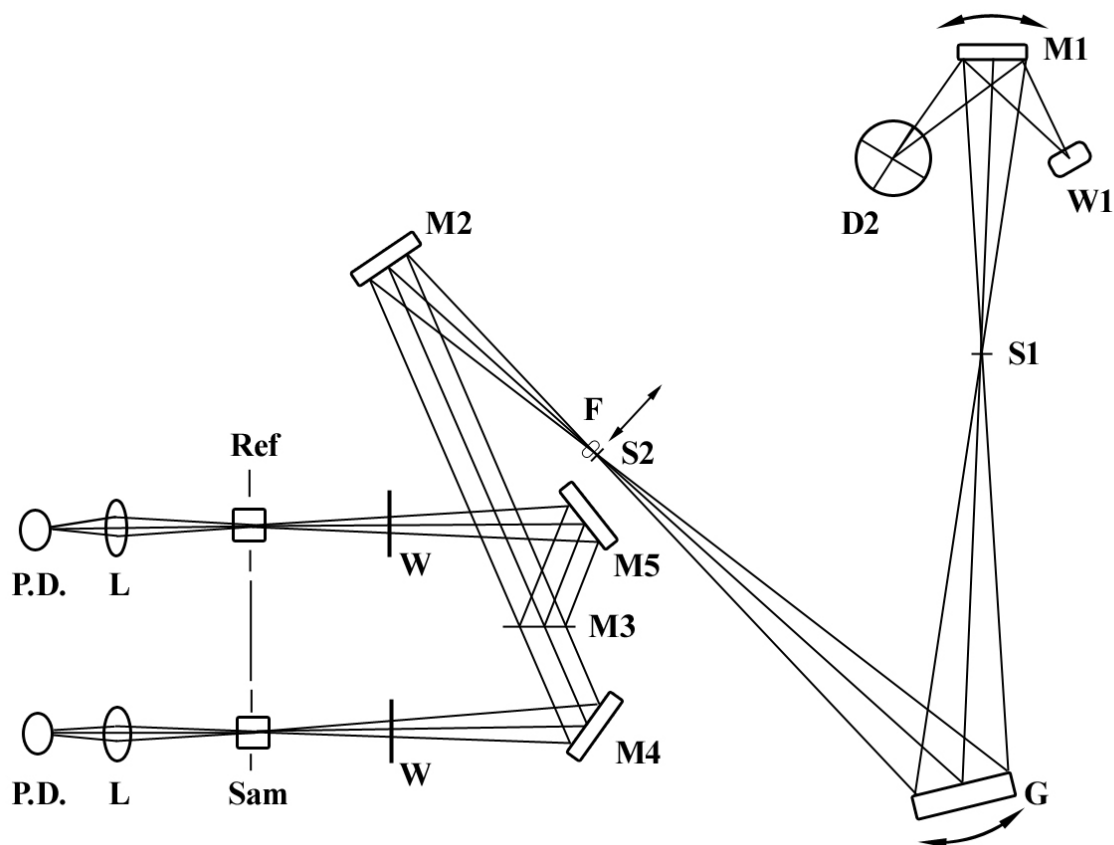


Рисунок 1.2. Оптическая схема спектрофотометра. D2 – Дейтериевая лампа; W1 – Галогенная лампа; F – Фильтр; G – Дифракционные решетки; S1 – Входная щель; S2 – Выходная щель; W – Window пластины; M1-M5 – Зеркала (M3 – полу-зеркало); L – Объектив; Ref – Канал сравнения; Sam – Канал образца; PD – Фотодиоды.

Белый свет после щели S1 отражается и разлагается решеткой в спектр в плоскости промежуточной щели. Монохроматический свет через щель попадает в основной монохроматор типа Черни – Тернера, который содержит две плоских дифракционных решетки и два зеркала (На рисунке 1 в схеме прибора двойной монохроматор и промежуточная щель для упрощения обозначены одним элементом G). Дифракционные решетки используются в зависимости от длины волны. Свет, разложенный основным монохроматором, собирается на выходной щели S2. Щели S2 и промежуточная работают вместе и могут переключаться в 11 положений. Свет, проходящий через выходную щель (S2), фильтруется от дифракционных максимумов более высокого порядка на фильтре F. Затем свет отражается на зеркале M2 и попадает на расщепитель, который состоит из зеркал (M3-5) и модулятора. Здесь свет делится модулятором на луч канала образца и канала сравнения.

В спектрофотометре UV-3600 используются три детектора: ФЭУ и полупроводниковые на InGaAs и PbS. Высокая чувствительность схемы измерения и крайне низкий уровень рассеянного света позволяют решать новые технологические задачи.

Программное обеспечение UV-Probe дает возможность работать в следующих режимах:

- *спектральный* — регистрация поглощения, пропускания или отражения, сканирование по длине волны с возможностью последующей обработки спектра (определение положения максимумов и минимумов, арифметические операции, расчет площади, сглаживание, обратные величины, логарифмирование, производная с 1 до 4 порядка);
- *фотометрический (количественный)* — измерение на одной или нескольких (до 3) выбранных длинах волн, построение градуировочной кривой методом К-фактора, одноточечным или многоточечным;
- *кинетический* — регистрация изменения измеряемой величины во времени;
- *генератор отчетов* — свободное или по шаблону размещение материала (спектры, таблицы, комментарии и др.).

1. Подготовка прибора.

Перед проведением измерений прибор нужно включить и подготовить к работе следующим образом:

- 1.1 Включить прибор в сеть.
- 1.2 Включить компьютер, с которым связан прибор.
- 1.3 Запустить на компьютере программу для проведения измерений «UV-Probe», с помощью которой и осуществляется полное управление процессом работы прибора.
- 1.4 Нажать кнопку соединения с прибором «Connect», после чего запустится процесс инициализации, в ходе которого будет проверено состояние всех функциональных составляющих на готовность к работе (рис. 1.3).
- 1.5 Установить параметры регистрации в окне «Spectrum Method», вызываемым кнопкой «М» на панели инструментов (рис. 1.4). Альтернативный путь: «Edit → Method...». Необходимо установить следующие значения параметров:

Wavelength range: Start 800 to End 200

Scan Speed: medium

Sampling interval: 1.0

Scan Mode: Single

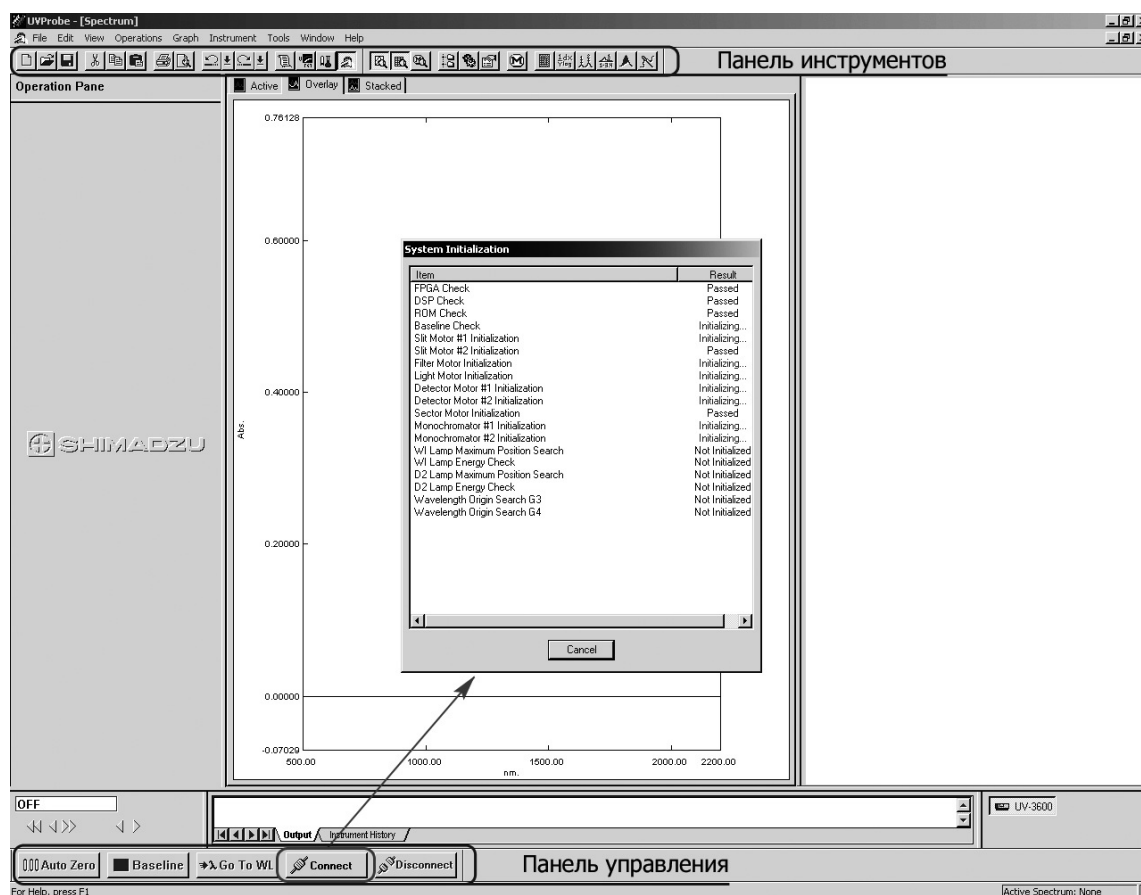


Рисунок 1.3. Инициализация спектрофотометра UV3600.

- 1.6 На панели управления нажать кнопку «Baseline», ввести диапазон измерений: от 800 до 200 нм, и прописать базовую линию, нажав кнопку «ОК» диалогового окна.
- 1.7 Нажать кнопку «Go To WL» и перевести прибор на длину волны 500 нм.
- 1.8 Произвести обнуление, нажав кнопку «Auto Zero».
- 1.9 После приведенной выше настройки и подготовки прибора, необходимо измерить спектр воздуха для контроля точности. Измерение спектров производится по нажатию кнопки «Start» на нижней панели. Сохранение полученного спектра выполняется в соответствии с пунктом 3 «Сохранение полученных данных».

После проведения вышеперечисленных действий прибор готов к работе.

2. Регистрация спектров поглощения.

Для измерения спектральных характеристик образца необходимо установить в кюветное отделение прибора кювету с образцом. Кюветное отделение должно плотно закрываться крышкой до щелчка. После того, как образец установлен, произведена подготовка прибора и установлены

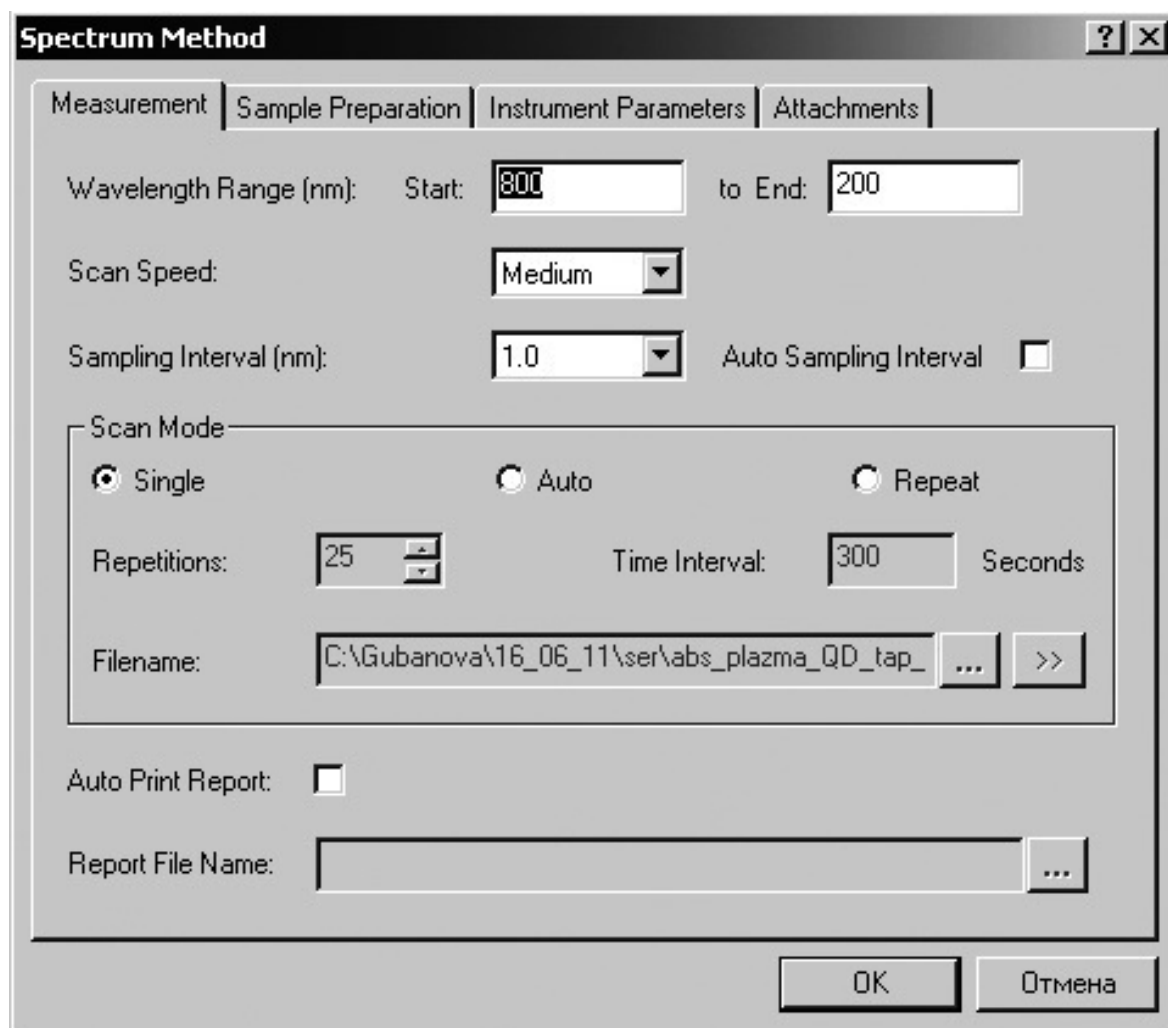


Рисунок 1.4. Установка необходимых параметров регистрации спектров.

нужные параметры, для начала измерения нужно нажать кнопку «Start» в программе «UV-Probe». Будет записан некоторый спектр, который необходимо сохранить.

3. Сохранение полученных данных.

Сохранение в программе «UV-Probe» производится в два этапа:

- 3.1** Сразу после того, как измерение закончилось, на экране появляется диалоговое окно «New Data Set» (рис. 1.5), в котором нужно ввести имя файла и выбрать место предполагаемого сохранения, нажав кнопку «...». Далее после нажатия кнопки «ОК» в этом диалоговом окне, пользователь сохраняет файл в собственном формате программы.

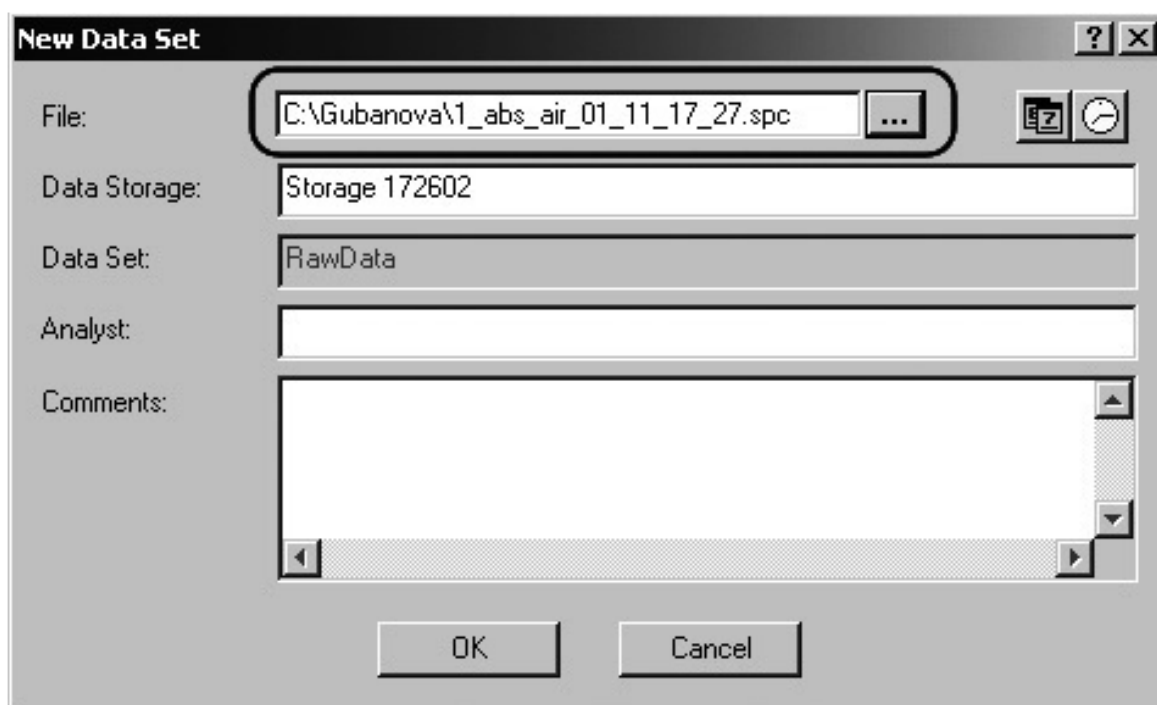


Рисунок 1.5. Сохранение зарегистрированных спектров.

3.2 После того, как спектр сохранен в формате программы, его нужно сохранить на жесткий диск или любой другой хранилище информации. Для этого нужно выполнить команду «File – Save as...». В открывшемся диалоговом окне убедиться (рис. 1.6), что указано нужное имя файла и место сохранения, и сохранить файл в двух форматах: Spectrum Files (*.spc) и Data Print Table (*.txt). Первый тип файла сохраняет программный файл, а с помощью второго можно построить спектр в любой программе работы с графиками и произвести обработку данных.

ПОРЯДОК ПРОВЕДЕНИЯ РАБОТЫ:

Для выполнения лабораторной работы нужно произвести измерение спектров поглощения трех образцов с помощью спектрофотометра UV-probe 3600: образец «1» — раствор органических молекул, образец «2» — раствор квантовых точек (КТ), образец «3» — раствор смеси КТ с органическими молекулами.

Для этого нужно выполнить следующие действия.

1. Включить прибор и подготовить его к измерениям, как указано в пункте 1 раздела «Описание лабораторной установки».
2. Установить кювету с образцом «1» в кюветное отделение.
3. Приступить к измерению, нажав кнопку «Start» («Описание лабораторной установки», пункт 2).
4. Полученный спектр сохранить («Описание лабораторной установки», пункт 3)

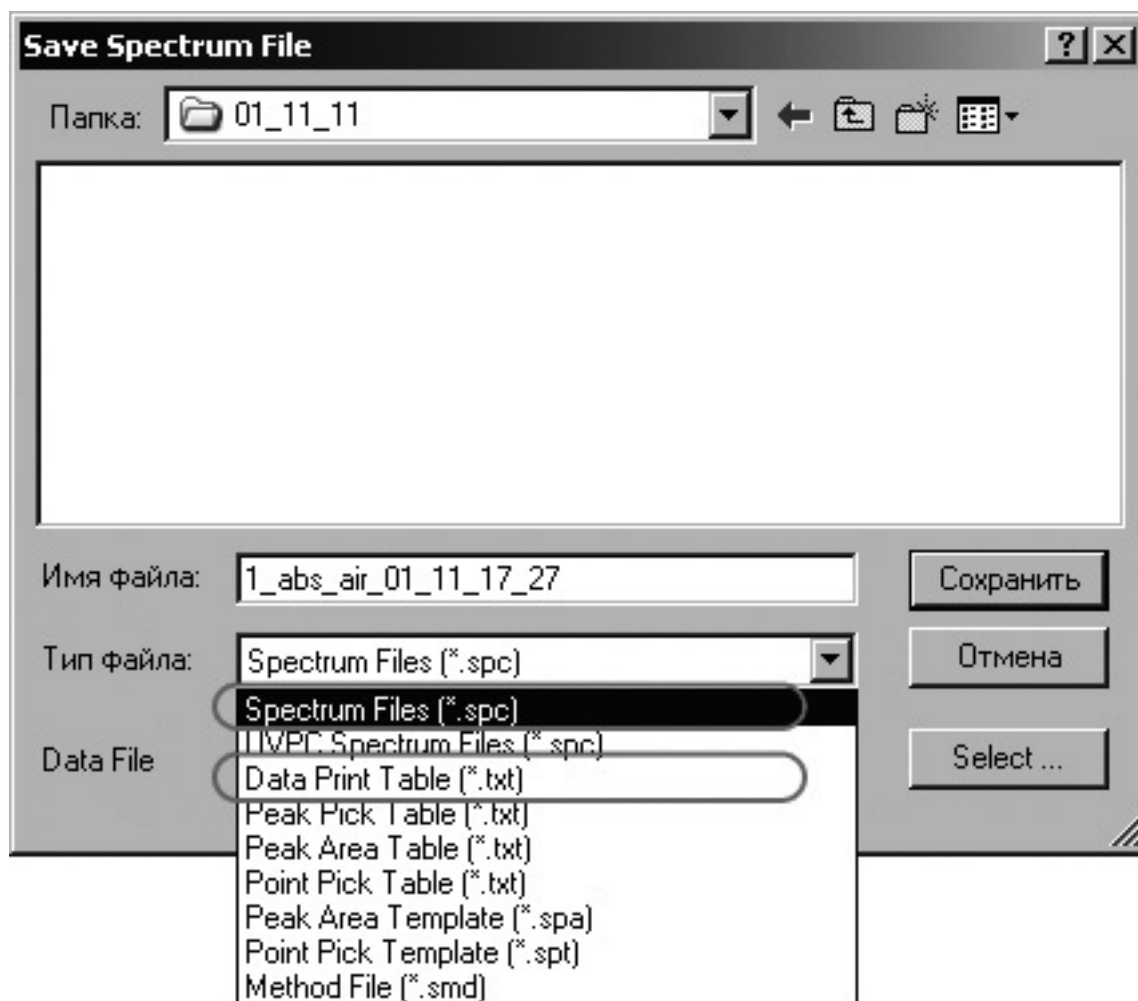


Рисунок 1.6. Сохранение зарегистрированных спектров в виде файлов.

5. Повторить пункты 2-4 с образцами “2” и “3”.

После измерения спектров поглощения образцов получить у преподавателя значения коэффициентов экстинкции органических молекул и квантовых точек для определенных длин волн и концентрации этих компонент в смеси — $\varepsilon(\lambda)_{OM}$, $\varepsilon(\lambda)_{КТ}$, $C_{OM}^{смесь}$, $C_{КТ}^{смесь}$.

ОБРАБОТКА ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ДАННЫХ:

1. Определение оптической плотности.

1.1 Построить графики спектров поглощения образцов $D(\lambda)$, импортировав в программу обработки спектральных данных (например, “Origin” или “MSEhel”) файлы данных спектров поглощения трех образцов с расширением *.txt (файл - экспортировать.. - ASCII).

1.2 Из анализа полученных спектров поглощения определить $D(\lambda)_{max}$ — величину оптической плотности в спектрах поглощения

растворов квантовых точек и органических молекул в максимуме полосы поглощения, для которой получен коэффициент экстинкции.

2. Определение концентрации органических молекул и КТ.

Рассчитать концентрации квантовых точек ($C_{КТ}$) и органических молекул ($C_{ОМ}$) в отдельных растворах, пользуясь формулой Бугера-Ламберта-Бера.

3. Проверка аддитивности.

Для того, чтобы проверить, является ли раствор квантовых точек с органическими молекулами (образец «3») аддитивной смесью отдельных компонент, нужно получить линейную комбинацию двух спектров поглощения: 1) раствора органических молекул и 2) раствора КТ для концентраций, соответствующих их концентрациям в смеси. А затем сравнить полученный спектр с измеренным.

Для этого нужно выполнить следующие действия:

3.1 Определить коэффициенты умножения для спектров отдельных растворов:

$$k_{КТ(ОМ)} = \frac{C_{КТ(ОМ)}^{смесь}}{C_{КТ(ОМ)}}$$

где $C_{КТ(ОМ)}^{смесь}$ — концентрация квантовых точек (органических молекул) в смешанном растворе; $C_{КТ(ОМ)}$ — концентрация квантовых точек (органических молекул) в растворах отдельных компонент.

3.2 С помощью коэффициентов $K_{КТ(ОМ)}$ привести спектры отдельных компонент в соответствие концентрациям квантовых точек и органических молекул в смеси. Для этого нужно в программе обработки данных домножить исходные значения оптической плотности на $K_{КТ}$ и на $K_{ОМ}$.

3.3 В программе обработки спектральных данных построить график линейной комбинации зависимостей $D(\lambda)$ для отдельных компонент, домноженных на рассчитанные коэффициенты. Сравнить рассчитанный спектр с измеренным спектром смеси квантовых точек с органическими молекулами, построив эти два спектра на одном графике. При сравнении зарегистрированного и расчетного спектров поглощения смеси необходимо сравнить число, спектральное положение и форму полос в спектрах поглощения. Сделать выводы.

СОДЕРЖАНИЕ ОТЧЕТА:

1. Теоретическая часть.
2. Схема лабораторной установки.
3. Рисунок 1: измеренные спектры поглощения трех образцов на одном графике. Характеристика спектров: какие характерные полосы поглощения наблюдаются, интенсивности и положения полос.
4. Полученные у преподавателя характеристики образцов (коэффициенты экстинкции). Таблица с результатами необходимых измерений и вычислений.
6. Рисунок 2: рассчитанный и зарегистрированный спектры поглощения смеси.
7. Выводы.

ВОПРОСЫ ДЛЯ ПОДГОТОВКИ:

1. Чем обусловлен вид спектра поглощения органических молекул?
2. Какие переходы наблюдаются в электронных спектрах поглощения?
3. Какие физические величины связывает между собой закон Бугера-Ламберта-Бера?
4. Необходимое условие для выполнения принципа аддитивности для многокомпонентного раствора.
5. Чем определяется спектр поглощения коллоидных квантовых точек?

РЕКОМЕНДУЕМАЯ ЛИТЕРАТУРА:

1. Оптика. Ландсберг Г.С. 6-е изд., стереот. - М.: ФИЗМАТЛИТ, 2003. - 848 с.
2. С. В. Гапоненко, Н. Н. Розанов, Е. Л. Ивченко, А. В. Федоров, А. В. Баранов, А. М. Бонч-Бруевич, Т. А. Вартамян, С. Г. Пржибельский «Оптика Наноструктур», СПб «Недра», 2005г. – 326 с.
3. J. R. Lakowicz «Principles of Fluorescence Spectroscopy», 2006, 1999, 1983 Springer Science+Business Media, LLC.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА №2

ПРОВЕРКА СПЕКТРАЛЬНОЙ ОДНОРОДНОСТИ РАСТВОРОВ ОРГАНИЧЕСКИХ МОЛЕКУЛ И ПОЛУПРОВОДНИКОВЫХ КВАНТОВЫХ ТОЧЕК

Громова Ю.А., Орлова А.О., Маслов В.Г.

ЦЕЛИ РАБОТЫ:

- получение навыков регистрации спектров флуоресценции и спектров возбуждения флуоресценции растворов на спектрофлуориметре Cary Eclipse (Varian)
- получение навыков первичной обработки и анализа спектров возбуждения флуоресценции растворов.

ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ СВЕДЕНИЯ:

Флуоресценцией называют нетепловое излучение света веществом. В работе исследуется флуоресценция органических флуорофоров и полупроводниковых квантовых точек. К традиционным органическим флуорофорам относятся ароматические соединения.

Одним из наиболее распространенных способов возбуждения флуоресценции является фотовозбуждение. На рисунке 2.1 приведена упрощенная схема энергетических уровней органической молекулы. В результате поглощения кванта света электрон из основного состояния переходит на верхние колебательные уровни какого-то возбужденного электронного состояния. При возбуждении в любое электронное состояние выше первого, имеет место внутренняя конверсия – переход электрона с нижнего колебательного уровня возбужденного состояния на имеющий ту же полную энергию верхний колебательный уровень более низкого электронного состояния. После этого в результате колебательной релаксации происходит потеря избытка колебательной энергии и переход на нижний колебательный уровень. Поэтому, если электрон попадает в любое состояние, расположенное выше самого нижнего колебательного уровня первого электронного возбужденного состояния, то в результате упомянутых процессов он быстро переходит в это состояние. Таким образом, независимо от величины поглощенного молекулой кванта света, молекула оказывается в первом возбужденном электронном состоянии, с которого происходит излучательный (флуоресценция) или безызлучательный переход в основное состояние. Вследствие этого, согласно закону Вавилова, положение и форма спектра флуоресценции вещества не зависят от длины волны

возбуждающего света. При изменении длины волны возбуждающего излучения изменяется только интенсивность регистрируемого спектра.

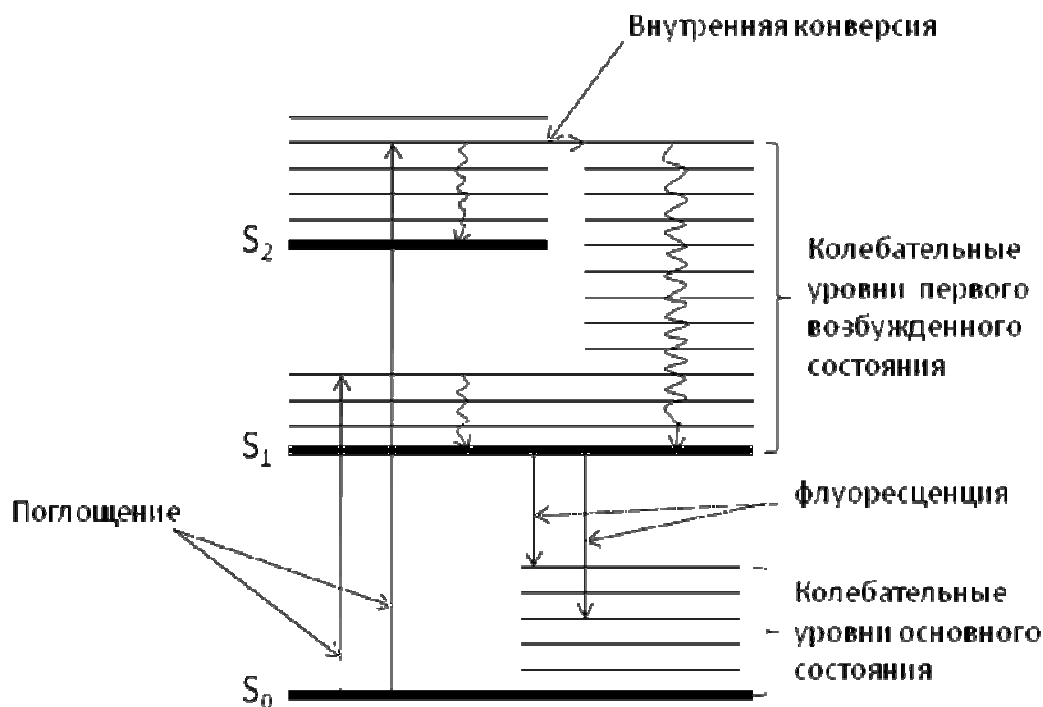


Рис. 2.1. Упрощенная схема энергетических уровней молекул.

Новым классом флуорофоров являются квантовые точки (КТ) — полупроводниковые нанокристаллы, в которых движение носителей заряда ограничено в трех направлениях. В таких структурах возникает эффект размерного квантования, который приводит к зависимости энергетической структуры нанокристаллов от размера частиц. Таким образом, спектральные характеристики квантовых точек напрямую зависят от размера нанокристалла. В видимом диапазоне флуоресцируют квантовые точки CdSe, CdS и CdTe. Для улучшения стабильности характеристик нанокристаллов ядро квантовой точки пассивируют тонким слоем (несколько монослоев) полупроводника с меньшей шириной запрещенной зоны (например, CdSe/ZnS).

Энергетическая структура полупроводниковых квантовых точек схожа с атомарными уровнями энергии. Наличие у КТ фононных степеней свободы приводит к тому, что квантовые точки с точки зрения их энергетической структуры оказываются ближе к молекулярным системам, чем к атомам. Это позволяет применять к данным наночастицам теорию поглощения и испускания света, разработанную для органических молекул. Для квантовых точек одного размера также должен выполняться закон Вавилова — независимость спектра флуоресценции от длины волны возбуждающего излучения. Однако даже в пределах одного синтеза формируются нанокристаллы с

дисперсией по размерам в 5 -15%. Вследствие этого нанокристаллы характеризуются средним размером ядра. Наличие квантооразмерного эффекта приводит к тому, что спектр поглощения коллоидного раствора полупроводниковых квантовых точек одного среднего размера представляет собой суперпозицию спектров поглощения нанокристаллов разного размера, входящих в ансамбль. Вследствие этого при возбуждении флуоресценции квантовых точек в области длинноволновой полосы поглощения (положение этой полосы для КТ одного размера соответствует разнице энергий между верхним энергетическим уровнем в валентной зоне и самым нижним энергетическим уровнем в зоне проводимости полупроводниковой наночастицы) спектр флуоресценции ансамбля нанокристаллов одного среднего размера зависит от длины волны возбуждающего света. В то же время при возбуждении квантами света с большей энергией в силу сильного перекрытия энергетических уровней наночастиц квантовые точки разного размера из ансамбля возбуждаются практически с одинаковой вероятностью. Из этого следует, что зависимость спектра флуоресценции коллоидного раствора полупроводниковых квантовых точек одного среднего размера от длины волны возбуждающего излучения начинает проявляться только в длинноволновой полосе поглощения. Поэтому можно считать, что при возбуждении флуоресценции КТ за пределами данной полосы для раствора квантовых точек, как и в случае органических молекул, спектр флуоресценции ансамбля квантовых точек одного среднего размера не зависит от длины волны возбуждающего света.

Связь интенсивности флуоресценции с коэффициентом поглощения легко найти из закона Ламберта-Бугера-Бера. При низких концентрациях интенсивность флуоресценции определяется выражением:

$$I_f \approx K' \varphi_f \varepsilon c I_0,$$

где K' – геометрический фактор, зависящий от конфигурации регистрирующей установки,

φ_f – квантовый выход флуоресценции,

ε – коэффициент экстинкции,

c – концентрация вещества,

I_0 – интенсивность возбуждающего света.

Данное уравнение помогает понять, как изменяется интенсивность флуоресценции в зависимости от длины волны возбуждающего света. Если с изменением длины волны возбуждающего света его интенсивность остается постоянной, интенсивность флуоресценции однокомпонентного раствора определенной концентрации будет пропорциональна произведению $\varepsilon \varphi_f$. График зависимости этого

произведения от длины волны или частоты возбуждающего света называют истинным спектром возбуждения флуоресценции. Для большинства веществ квантовый выход флуоресценции не зависит от частоты возбуждающего света. Таким образом, истинный спектр возбуждения флуоресценции разбавленного раствора, содержащего одну поглощающую компоненту, будет пропорционален коэффициенту экстинкции, т.е. будет просто спектром поглощения данной компоненты. Следует отметить, что аналогично спектру флуоресценции, спектр возбуждения флуоресценции однокомпонентного раствора не зависит от выбора длины волны регистрации флуоресценции.

ОБЪЕКТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ:

В работе исследуются спектры флуоресценции и возбуждения флуоресценции растворов органических флуорофоров и полупроводниковых квантовых точек. В качестве примеров на рисунке 2.2 приведены спектры поглощения растворов кумарина и КТ CdSe/ZnS (средний размер ядра 2.5 нм) в хлороформе.

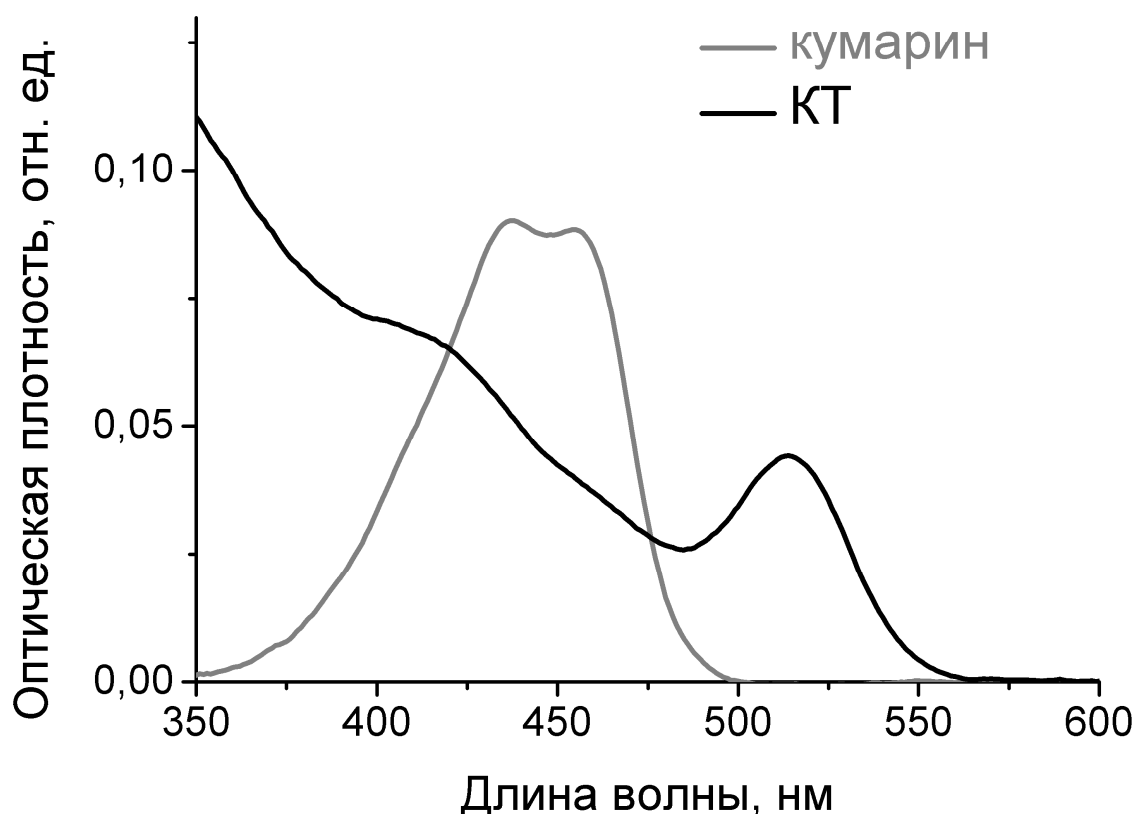


Рис. 2.2 Спектры поглощения органического флуорофора (кумарина) и полупроводниковых квантовых точек (КТ) CdSe/ZnS.

ОПИСАНИЕ ЛАБОРАТОРНОЙ УСТАНОВКИ:

В работе регистрация спектров флуоресценции и возбуждения флуоресценции образцов производится на спектрофлуориметре Cary Eclipse (Varian). Принципиальная схема прибора приведена на 2.3

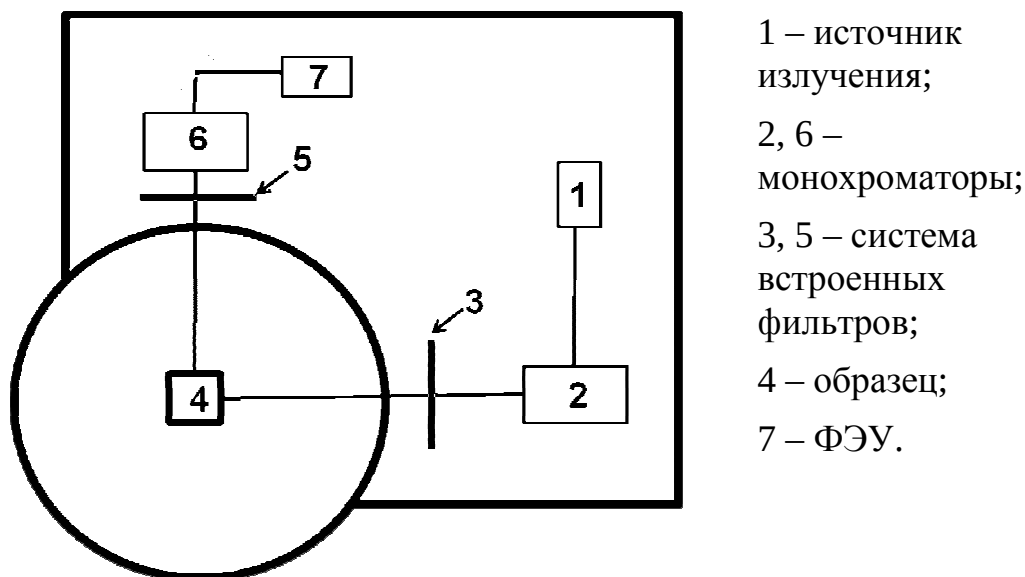


Рис. 2.3. Принципиальная схема спектрофлуориметра Cary Eclipse (Varian).

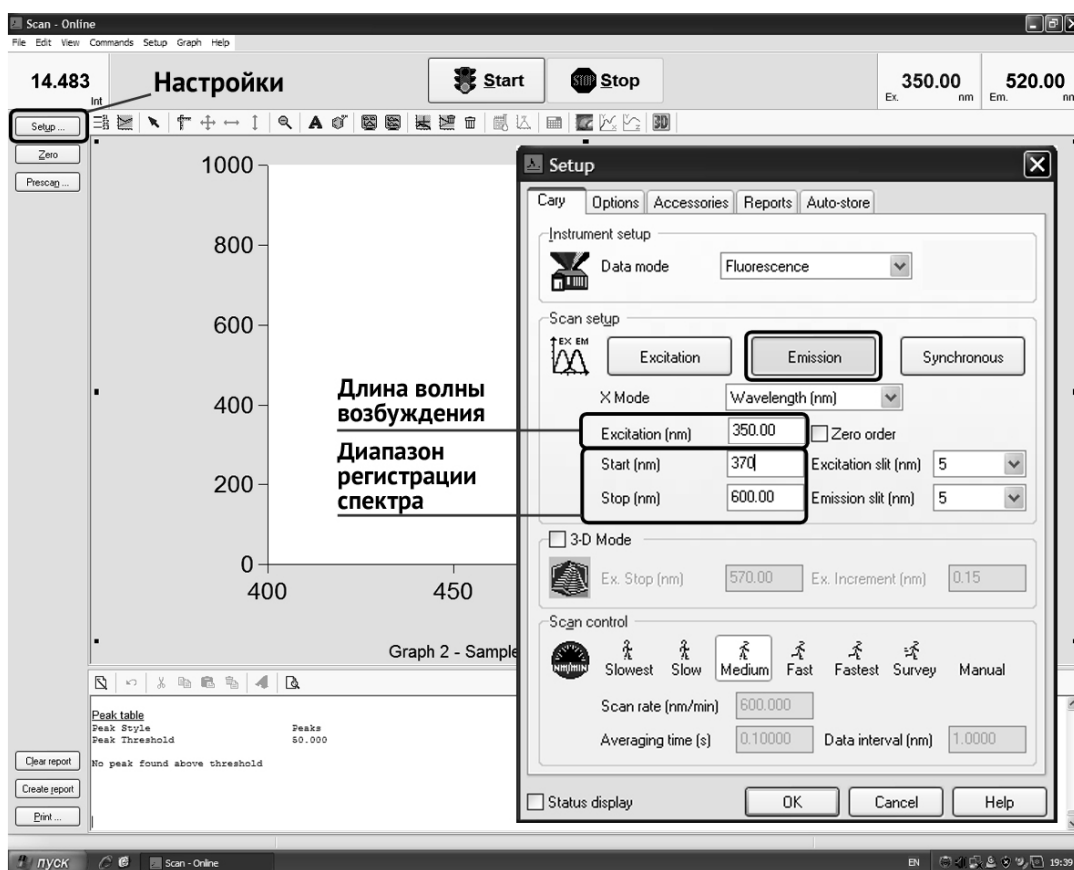
В качестве источника излучения используется ксеноновая импульсная лампа, свет от которой попадает на монохроматор Черни-Тернера, представляющей собой дифракционную решетку. В приборе реализована схема регистрации люминесценции под углом в 90 градусов. Излученный образцом свет так же проходит через монохроматор и подается на фотоэлектронный умножитель (ФЭУ).

ПОРЯДОК ПРОВЕДЕНИЯ РАБОТЫ:

В данной работе предлагается на основании анализа зарегистрированных на трех длинах волн спектров возбуждения флуоресценции растворов выяснить одна или несколько компонент флуоресцируют в исследованных образцах. Образец считается спектрально однородным при условии, что его спектр возбуждения флуоресценции не зависит от выбора длины волны регистрации флуоресценции. Это значит, что при изменении длины волны регистрации флуоресценции в спектре возбуждения флуоресценции изменяется только относительная интенсивность флуоресценции, а положение и соотношение амплитуд полос остается неизменным.

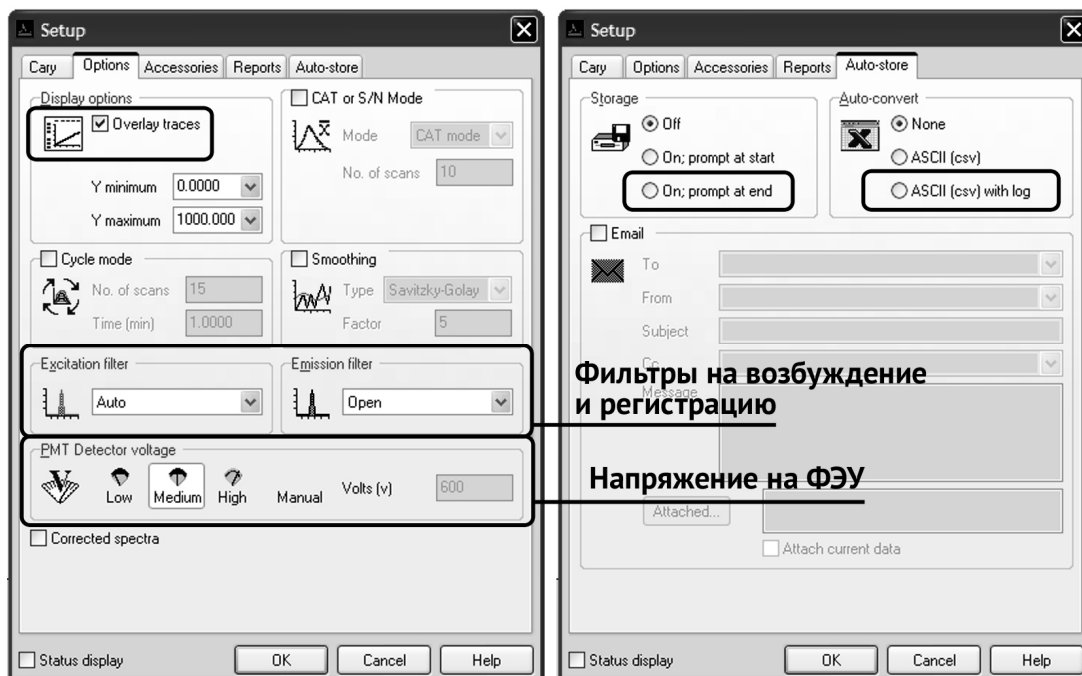
Для этого необходимо выполнить следующие действия:

1. Включить компьютер и прибор.
2. Запустить программу «Scan».
3. В меню настройки («Setup») выбрать регистрацию спектров флуоресценции и используя спектры поглощения исследуемых веществ (см. пример на рис. 2.2), представленных преподавателем перед началом работы, выбрать длину волны возбуждения флуоресценции образцов и спектральный диапазон регистрации спектра флуоресценции. Диапазон регистрации флуоресценции выбрать таким образом, чтобы зарегистрировать весь спектр флуоресценции. Для раствора органического флуорофора длина волны возбуждения флуоресценции выбирается исходя из следующих условий: 1) поглощение флуорофора на данной длине волны отлично от нуля; 2) возбуждение флуоресценции на данной длине волны позволяет полностью зарегистрировать спектр флуоресценции. Для раствора квантовых точек длину волны возбуждения флуоресценции необходимо выбирать в спектральной области, в которой не проявляется эффект размерного квантования.



Во вкладке «Options» поставить галочку перед «Overlay traces», в этом случае все регистрируемые спектры будут отображаться в одном окне. Для фильтров выбрать режим «Auto». В этой же вкладке, если при записи спектра произойдет переполнение ФЭУ и пики флуоресценции

окажутся срезаны, можно снизить напряжение на ФЭУ. Во вкладке «Auto-store» можно выбрать сохранение спектра после записи и автоматическое создание файла с расширением .csv.



- Зарегистрировать спектры флуоресценции предложенных образцов. Для этого установить образцы в кюветное отделение, убедиться, что кювета установлена прозрачной стороной к возбуждающему свету и детектору. Закрыть крышку прибора и нажать кнопку «Start» в основном окне программы. Сохранить зарегистрированный спектр.
- В меню «настройки» выбрать регистрацию спектров возбуждения флуоресценции и выбрать длину волны регистрации в максимуме полосы флуоресценции. Диапазон длин волн для регистрации спектра возбуждения флуоресценции образца выбирается исходя из данных о его спектре поглощения. Зарегистрировать спектр возбуждения флуоресценции первого образца в выбранном диапазоне длин волн.
- Зарегистрировать последовательно два спектра возбуждения флуоресценции первого образца сдвинув длину волны регистрации на 10 нм в область коротких и длинных волн относительно максимума полосы флуоресценции.
- Повторить пункты 5 и 6 для второго образца.
- Для оформления отчета сохранить на электронном носителе (flash, CD, DVD) зарегистрированные в процессе работы спектры образцов в виде файлов с расширением .csv и файлы содержащие

спектры поглощения исследованных в работе веществ (выдаются преподавателем).

ОБРАБОТКА ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ДАННЫХ:

1. Построить спектры флуоресценции исследуемых образцов. Для этого предлагается использовать программу, предназначенную для обработки и отображения в графическом виде экспериментальных данных (например, Origin). Указать положение максимумов флуоресценции образцов, условия регистрации и объяснить выбор длин волн возбуждения флуоресценции образцов.
2. Для каждого образца на одном графике привести спектры возбуждения флуоресценции, зарегистрированные на трех длинах волн люминесценции образца. Указать полосы, спектральное положение и форма которых являются общими для зарегистрированных спектров. Следует учесть, что в зарегистрированных спектрах возбуждения люминесценции образцов помимо полос, относящихся к исследуемому раствору, могут присутствовать пики рассеянного света. Как правило, их достаточно легко отличить от полос, принадлежащих образцу, по ширине пика на половине его высоты. Ширина пика существенно меньше, чем у полос вещества и примерно равна большему из значений, установленных при регистрации ширин щелей монохроматоров возбуждения или регистрации. На этом же графике привести спектр поглощения образца. На спектре поглощения указать полосу, которая проявляется в зарегистрированных спектрах возбуждения люминесценции образцов и пики рассеянного света.
3. На основании сравнения зарегистрированных на различных длинах волн трех спектров возбуждения флуоресценции для каждого из образцов сделать вывод о его спектральной однородности.

СОДЕРЖАНИЕ ОТЧЕТА:

1. Краткое изложение теоретического материала.
2. Принципиальная схема спектрофлуориметра.
3. Спектры флуоресценции и возбуждения флуоресценции (для трех длин волн регистрации) растворов органического флуорофора и полупроводниковых квантовых точек. Для каждого образца привести по два графика: на одном зарегистрированный спектр флуоресценции, на втором – три спектра возбуждения флуоресценции, зарегистрированные на различных длинах волн, и спектр поглощения. На спектрах флуоресценции указать положение длин волн, выбранных при регистрации спектров возбуждения

флуоресценции образцов. На графиках с зарегистрированными спектрами возбуждения флуоресценции и спектром поглощения указать полосы, которые являются общими для всех спектров возбуждения люминесценции и поглощения образца.

4. Указать из каких соображений выбиралась область для регистрации спектров возбуждения флуоресценции образцов.
5. Указать области длин волн, в которых для исследованных образцов (растворов органического флуорофора и полупроводниковых квантовых точек) зарегистрированные спектры возбуждения флуоресценции образцов не зависят от выбора длины волны регистрации.
6. Привести аргументированный вывод о спектральной однородности исследованных в работе образцов. Для раствора полупроводниковых квантовых точек в спектрах возбуждения флуоресценции указать спектральную область, в которой проявляется зависимость спектра от выбора длины волны регистрации флуоресценции. Объяснить причины наблюдающейся зависимости.

ВОПРОСЫ ДЛЯ ПОДГОТОВКИ:

1. Дать определение понятию флуоресценция.
2. Чем обусловлено относительное расположение спектров поглощения и флуоресценции вещества?
3. Как связаны между собой интенсивность флуоресценции вещества и коэффициент поглощения данного вещества на длине волны возбуждающего излучения?
4. Дать определение понятию спектр возбуждения флуоресценции.
5. С какой энергетической характеристикой полупроводниковой квантовой точки связано положение ее длинноволновой полосы поглощения?
6. В какой части спектра поглощения коллоидного раствора квантовых точек проявляется зависимость спектра флуоресценции от длины волны падающего излучения, и чем она обусловлена?

РЕКОМЕНДУЕМАЯ ЛИТЕРАТУРА:

1. С. В. Гапоненко, Н. Н. Розанов, Е. Л. Ивченко, А. В. Федоров, А. В. Баранов, А. М. Бонч-Бруевич, Т. А. Вартанян, С. Г. Пржибельский «Оптика Наноструктур», СПб «Недра», 2005г. – 326 с.
2. С. Паркер «Фотолюминесценция растворов», Издательство «Мир», М, 1972.
3. J. R. Lakowicz «Principles of Fluorescence Spectroscopy», 2006, 1999, 1983 Springer Science+Business Media, LLC.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА №3

НАСТРОЙКА СВЕТОВОГО МИКРОСКОПА ПРИ РАБОТЕ В ПРОХОДЯЩЕМ СВЕТЕ. ОСВЕЩЕНИЕ ОБЪЕКТА ПО МЕТОДУ КЁЛЕРА.

Виноградова Г.Н.

ЦЕЛЬ РАБОТЫ

- Изучение принципа работы и конструкции традиционного светового микроскопа, получение навыков настройки освещения объекта в проходящем свете по методу Кёлера.

Препарат. Объект-микрометр или специально приготовленный амплитудный объект.

Микроскоп и принадлежности: микроскоп МБИ-3; осветитель ОИ-9М; вспомогательный микроскоп МИР-4.

ОБЪЕКТЫ СВЕТОВОЙ МИКРОСКОПИИ

Объекты световой микроскопии могут различаться как по своим общим геометрическим размерам, так и по наличию внутренней структуры, размерам деталей структуры и их оптическим характеристикам. Величина деталей структуры может колебаться в больших пределах. Она может быть сколь угодно малой, но минимальный «достоверно» наблюдаемый размер структуры ограничивается разрешающей способностью микроскопа.

Объекты, исследуемые под микроскопом, условно разделяются на *амплитудные* и *фазовые*. Такое деление предложил Э. Аббе. К объектам необходимо подвести излучение от постороннего источника света. В этом случае свет является «инструментом» исследования вещества.

Амплитудные объекты изменяют амплитуду прошедшего или отраженного света. Если амплитуда меняется в видимом диапазоне длин волн, то такие объекты наблюдают через микроскоп без каких-либо дополнительных оптических устройств. Это происходит во всех случаях, когда существует различие в коэффициентах поглощения образца и среды, в которую он погружен. Окраска такого объекта в проходящем свете, освещенного излучением видимого диапазона длин волн, определяется цветом тех лучей, которые он пропускает. Воспринимаемый глазом цвет является дополнительным к цвету

поглощаемых лучей в том смысле, что вместе они составляют ощущение белого цвета.

Таблица 6.1. Воспринимаемый глазом цвет объекта, имеющего одну полосу поглощения в видимой области спектра.

Область поглощения, нм	Цвет поглощенного излучения	Цвет объекта
400-435	Фиолетовый	Желто-зеленый
435-480	Голубой	Желтый
480-490	Зеленовато-голубой	Оранжевый
490-500	Голубовато-зеленый	Красный
500-560	Зеленый	Пурпурный
560-580	Желто-зеленый	Фиолетовый
580-595	Желтый	Голубой
595-605	Оранжевый	Зеленовато-голубой
605-750	Красный	Голубовато-зеленый

Фазовые объекты вызывают относительное опережение или отставание по фазе волнового фронта, не изменяя амплитуду прошедшего (или отраженного) света. Прошедшая через объект волна оказывается сдвинутой по фазе относительно волны, прошедшей через окружающую объект среду. Это происходит во всех случаях, когда существует различие в показателях преломления образца и среды, в которую он погружен. Такие объекты в обычный микроскоп не видны вследствие того, что глаз (или любой другой приемник излучения) не чувствителен к изменению фазы колебания света. В таких объектах коэффициент контраста изображения равен нулю. Одна из основных задач микроскопии - превратить фазовые изменения в амплитудные.

Как правило, реальные объекты являются амплитудно-фазовыми и делятся на контрастные и слабоконтрастные. При работе в проходящем свете в светлом поле контраст изображения получается за счет поглощения (абсорбции). Толщина микрообъектов, например, отдельных клеток, не превышает нескольких микрон. Для получения контрастного изображения при такой толщине объекта поглощение

вещества должно быть достаточно большим. К таким веществам относится, например, хлорофилл растений. В большинстве случаев естественной абсорбции объекта бывает недостаточно для получения приемлемого изображения. Поэтому объекты, обладающие малым контрастом, подвергают искусственному окрашиванию или при их наблюдении используют различные методы контрастирования.

ПОДГОТОВКА ПРЕПАРАТА ДЛЯ РАБОТЫ С МИКРОСКОПОМ

Самый простой метод - наблюдение амплитудного объекта в проходящем свете в светлом поле в видимой области спектра. Желательно, чтобы толщина объекта не превышала глубину резкости используемого объектива. В зависимости от размера объекта или размера его структур выбирается объектив с соответствующими характеристиками (линейным увеличением и апертурой).

Обычно образец заключают между двумя стеклянными пластинками, которые имеют стандартные размеры и называются *предметным* и *покровным* стеклами (рис. 6.1.).

Как правило, препарат готовят с использованием стереоскопического микроскопа, так как при препарировании руки заняты иглами, пинцетами и другими инструментами.

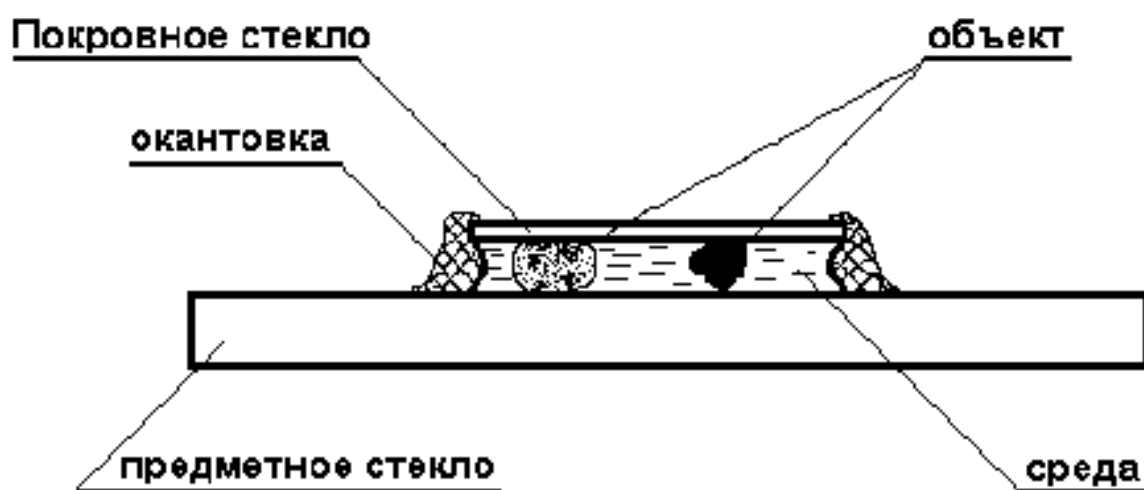


Рис. 6.1. Пример оформления препарата, предназначенного для работы на световом микроскопе.

Подготовка препарата без покровного стекла.

Исследуемый объект кладется на центр предметного стекла (ни в коем случае не делайте это пальцами!). Мягкие, сравнительно крупные объекты переносятся пинцетом, мелкие и хрупкие - с помощью препаровальных игл. При этом острый конец прямой препаровальной иглы слегка увлажняют и прикасаются им к объекту. Объект прилипает,

а после переноса его на предметное стекло достаточно легкого вращения иглы, чтобы он отстал. Сухой иглой можно поправить его положение. Часто без покровного стекла готовят *капельный* препарат и препарат в виде *мазка*.

Капельный препарат. В пипетку набирают исследуемую жидкость и наносят каплю на центр стекла. Каплю можно нанести также с помощью стеклянной палочки.

Препарат в виде мазка. На предметное стекло наносят пару капель исследуемого раствора. Затем вторым стеклом, поставив его под углом на нанесенные капли, размазывают капли вдоль по стеклу (рис. 6.2.). После испарения жидкости препарат в виде мазка готов к дальнейшей работе.

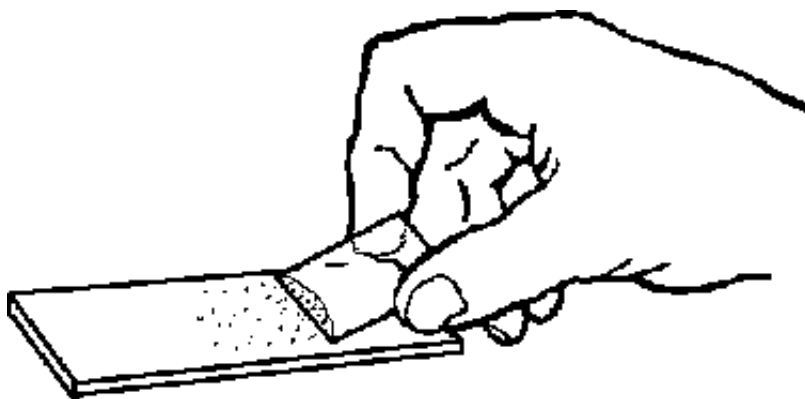


Рис. 6.2. Подготовка препарата – мазка.

Подготовка препарата с покровным стеклом.

На предметное стекло наносится пипеткой или стеклянной палочкой капля иммерсионной среды, например, дистиллированной воды или другой иммерсионной жидкости. В каплю помещается наблюдаемый объект так, чтобы он был полностью погружен в жидкость.

Предварительно подготовленное покровное стекло своей нижней гранью ставят под углом на край нанесенной капли. Перемещением покровного стекла из стороны в сторону добиваются, чтобы вода соприкасалась со всей нижней гранью (рис. 6.3). Затем постепенно опускают покровное стекло на каплю так, чтобы под ним не осталось пузырьков воздуха. Капля воды должна быть таких размеров, чтобы полностью заполнить пространство между предметным и покровным стеклами. Если капля большая, то вода выступает за пределы покровного стекла (стекло «плышет»). Излишек воды следует впитать полоской фильтровальной бумаги. Если жидкости мало - ее следует добавить, поднося пипетку или стеклянную палочку с каплей к краю покровного стекла. В случае образования пузырьков воздуха препарат

необходимо переделать заново. Затем препарат окантовывают. Попадание жидкости на верхнюю поверхность покровного стекла недопустимо.

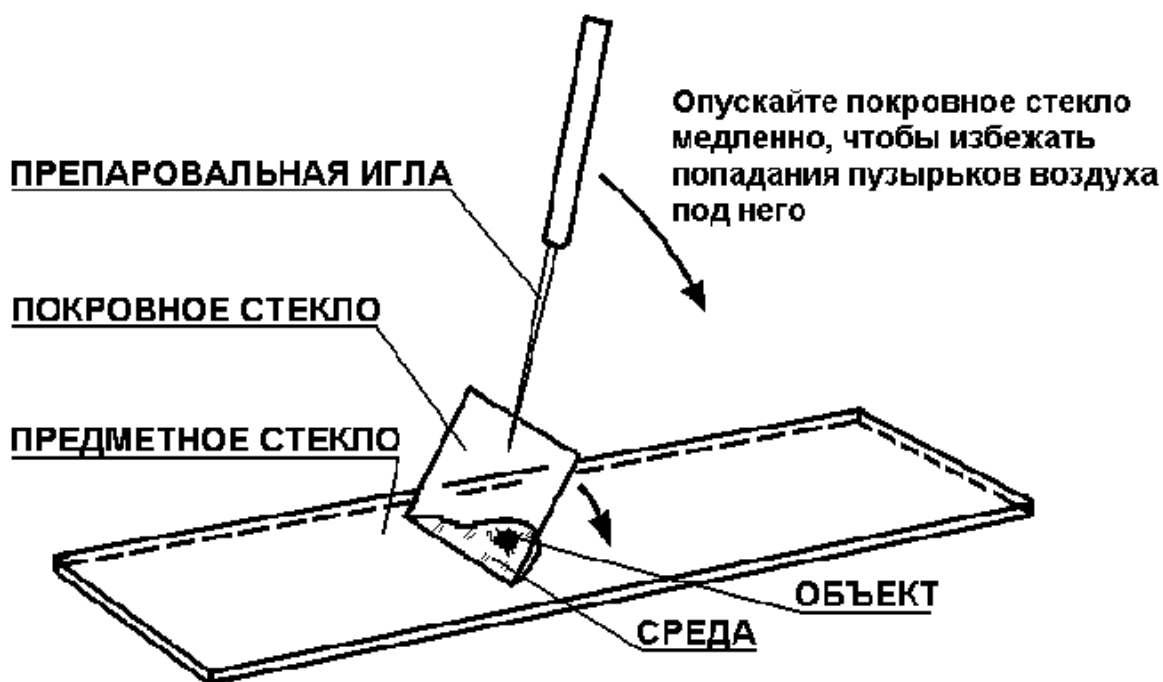


Рис. 6.3. Заключение образца в среду; опускание покровного стекла на предметное стекло с использованием препаровальной иглы.

Окантовка покровных стекол. Покровные стекла окантовывают различными замазками. Состав наносится кистью на смежные поверхности покровного и предметного стекол. Для временных препаратов используется тяжелое масло, вазелин, пчелиный воск, пластилин и т.д. Для постоянных препаратов используется клей, лак, расплавленный парафин и т.д.

ПРЕДМЕТНЫЕ И ПОКРОВНЫЕ СТЕКЛА

Предметные и покровные стекла должны соответствовать по толщине, показателю преломления и дисперсии значениям, принятым при расчете объективов и конденсоров микроскопа (в отечественной промышленности показатель преломления стекла принят равным $n_D = 1,52 \pm 0,01$, а коэффициент дисперсии $v = 60 \pm 2$). В противном случае они будут ухудшать качество изображения.

Особенно важно соблюдать расчетные значения при ответственных экспериментах. При менее ответственных работах можно допустить некоторые отступления этих величин. Требования к предметным и покровным стеклам тем выше, чем больше числовая апертура объективов. Кроме того, в зависимости от метода исследования к ним могут предъявляться дополнительные требования.

Предметные стекла. Предметные стекла используются для размещения объекта с целью его исследования на микроскопе в проходящем свете. Предельная толщина предметного стекла определяется рабочим расстоянием конденсора. Размеры стандартных предметных стекол указаны в таблице 6.2.

Таблица 6.2. Размеры стандартных предметных стекол

Длина, мм	Ширина, мм	Толщина, мм
46	26	$1 \pm 0,1$
76	26	$1 \pm 0,1$
76	35	$1 \pm 0,1$
80	60	$1 \pm 0,1$
100	80	$1 \pm 0,1$
120	80	$1 \pm 0,1$
120	100	$1 \pm 0,1$

В таблице жирным шрифтом выделены наиболее распространенные размеры предметных стекол.

На практике толщина предметных стекол не должна превышать 1,2 мм. При большей толщине предметного стекла нельзя получить правильного освещения с апланатическим конденсором и конденсором темного поля, особенно при большой апертуре конденсора. Слишком толстое стекло вызывает переисправленность конденсора. Кроме того, из-за малого рабочего расстояния конденсора невозможно получить резкого изображения полевой диафрагмы, особенно, если источник света отодвинут от микроскопа на расстояние, превышающее расчетное.

При проведении ответственных работ следует пользоваться плоскопараллельными стеклами с хорошими поверхностями (допуск на разность толщин по концам 0,05 мм; допуск на кривизну - 12% длины стороны стекла; не допускаются пузыри, камни, мошка и свили, видимые невооруженным глазом).

Покровные стекла. Покровные стекла применяются для закрывания микроскопических препаратов. Форма покровных стекол четырехугольная, реже - круглая. Толщина их бывает разная в пределах (0,1 - 0,2) мм. Толщина 0,17 мм многими фирмами-изготовителями принята в качестве стандарта. Размеры стандартных покровных стекол указаны в таблице 3. В таблице жирным шрифтом выделены наиболее распространенные размеры покровных стекол.

Покровное стекло является очень ответственной оптической деталью в системе объектива микроскопа. Наиболее существенным параметром является толщина покровного стекла, которая при расчете

Таблица 6.3. Номинальные размеры стандартных покровных стекол

Ширина, мм	Длина, мм	Толщина, мм
9	9	0,17
18	18	0,17
20	20	0,17
24	24	0,17
24	48	0,17
30	40	0,17
40	40	0,17
40	60	0,17
60	80	0,17
80	100	0,17

объективов принимается равной 0,17 мм.

Эта величина должна выдерживаться тем точнее, чем больше апертура объектива. Покровные стекла нестандартной толщины можно использовать при числовой апертуре объектива меньше 0,2. Для объективов средних апертур допускается отступление от толщины на 0,02 мм, а для объективов с апертурой больше 0,6 нужно применять стекла расчетной толщины. Сильные сухие объективы дают пониженное качество изображения при самых незначительных отступлениях от номинальной толщины покровного стекла. Часто такие объективы снабжены специальным коррекционным кольцом (при наличии такого кольца необходимо его установить в соответствии с толщиной используемого покровного стекла).

Объективы масляной иммерсии менее чувствительны к изменению толщины покровного стекла, так как показатели преломления покровного стекла и масляной иммерсии очень близки. С иммерсионными объективами следует применять стекла толщиной от 0,10 до 0,17 мм не более. В противном случае можно повредить препарат и фронтальную линзу объектива.

ИММЕРСИОННЫЕ ЖИДКОСТИ

Иммерсионные жидкости служат для заполнения пространства между препаратом и иммерсионным объективом микроскопа, а также между конденсором и предметным стеклом. В таблице 6.4 приведены основные оптические характеристики иммерсионных жидкостей, наиболее часто применяемых в микроскопии.

В последнее время кедровое масло заменяют искусственным маслом, оптические характеристики которого не отличаются от характеристик кедрового масла, например, специальное

Таблица 6.4. Оптические характеристики иммерсионных жидкостей.

Иммерсионная жидкость	Показатель преломления, n_D	Коэффициент дисперсии, ν
Вода дистиллированная	1,3330	55,5
Масло кедровое	1,5150	48,6

нефлуоресцирующее масло, которое не должно флуоресцировать под действием сине-фиолетового и ультрафиолетового излучений.

Водную иммерсию, а, следовательно, и водоиммерсионные объективы, предпочтительней использовать при исследовании живых объектов, находящихся в физиологическом растворе.

РЕКОМЕНДАЦИИ ПО УХОДУ ЗА МИКРООПТИКОЙ

Особое внимание необходимо обращать на чистоту поверхностей оптических деталей. Нельзя дотрагиваться пальцами до линз объективов, конденсоров и окуляров, так как отпечатки пальцев очень трудно удалить с оптических поверхностей. Объективы должны быть либо ввернуты в револьвер, либо уложены в футляры.

На последнюю линзовую поверхность объектива иногда попадают пыль и ворсинки. Удалять их следует струей воздуха, обдувая поверхность с помощью специального баллончика со сжатым воздухом. Удалить загрязнение с этой поверхности чрезвычайно сложно, поэтому в тубусе микроскопа надо всегда оставлять окуляр либо надевать на тубус специальный колпачок. Кроме того, если на внутренних поверхностях линз объектива появится пыль или налет, то ни в коем случае не следует разбирать объектив для чистки. Это можно делать лишь в специальных мастерских, располагающих приспособлениями для сборки и юстировки объективов.

С других наружных оптических поверхностей пыль также удаляется с помощью струи сжатого воздуха или очень мягкой чистой кисточки, а также специальной безворсовой салфеткой.

После работы с иммерсией остатки иммерсии на фронтальных линзах объектива и конденсора нужно удалить фильтровальной бумагой или ватным тампоном, а поверхность осторожно протереть безворсовой салфеткой. Оставшиеся на поверхности после чистки отдельные волокна от тампона удаляются с помощью струи сжатого воздуха. Для того чтобы проверить хорошо ли вычищена поверхность, ее нужно осмотреть через лупу.

Пользоваться спиртом для чистки оптики не рекомендуется, так как спирт, просочившись внутрь оправы, может расклеить линзы.

Особой осторожности требуют поверхности с просветляющим покрытием.

Следует обращать внимание на чистоту поверхностей коллекторной линзы и светофильтров, так как эти поверхности изображаются вблизи плоскости препарата и их грязь неизбежно видна в поле зрения.

ПОРЯДОК РАБОТЫ

1. Ввернуть объективы в гнезда револьвера.
2. Вставить конденсор в кронштейн (снизу вверх до упора). Конденсор закрепить винтом (с накаткой), расположенным на кронштейне сбоку.
3. Установить осветитель перед поворотным зеркалом.
4. Приступить к настройке микроскопа.

Примечание 1

Ирисовые диафрагмы осветителя (полевая диафрагма) и конденсора (апертурная диафрагма) должны быть открытыми (рис.4). Настройку освещения осуществлять без применения светофильтров и рассеивающей пластинки.

Примечание 2

1. *Полевая диафрагма* регулирует размер поля зрения и влияет на уровень рассеянного света. Освещенность изображения при этом остается практически неизменной.
2. *Апертурная диафрагма* влияет на освещенность поля зрения, контраст изображения и количество рассеянного света в приборе. При изменении диаметра апертурной диафрагмы размер поля зрения остается неизменным.
3. *Действительное изображения в микроскопе:*
 - а) наблюдать действительное изображение источника света в выходном зрачке микроскопа за окуляром на экране (в качестве экрана использовать матовое стекло или папиросную бумагу);
 - б) наблюдать изображения объекта и полевой диафрагмы на экране при вынутом окуляре.

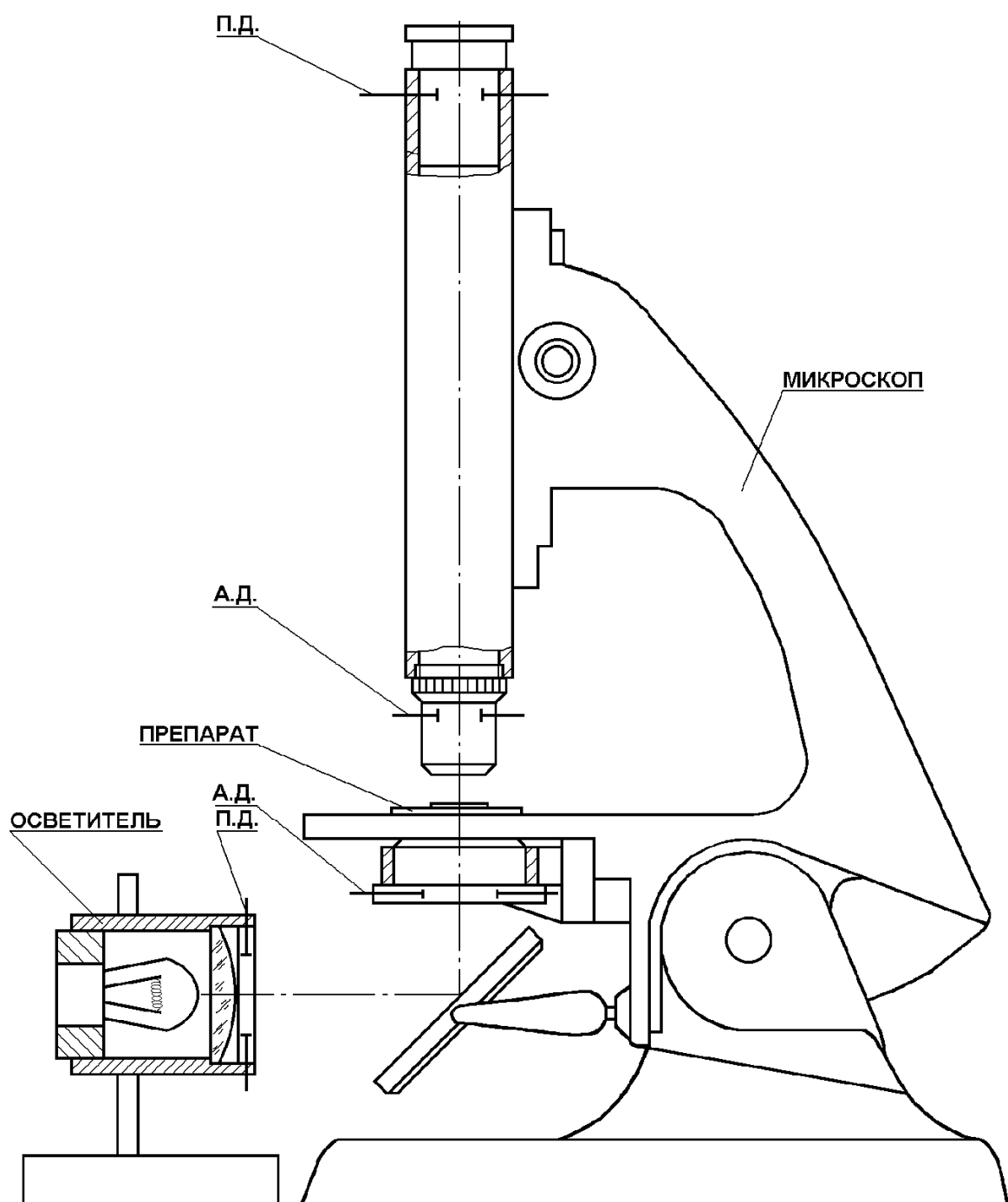


Рис. 6.4. Схема светового микроскопа.

А.Д. – апертурная диафрагма; П.Д. – полевая диафрагма.

Перед настройкой освещения убедитесь, что оптические оси объектива и конденсора центрированы относительно друг друга. Для этого поднимите конденсор в верхнее положение (на столике препарат отсутствует). Поднимите стол таким образом, чтобы между объективом и конденсором зазор стал около 1 мм (ни в коем случае не приводите их в соприкосновение!). Убедитесь в соосности объектива и конденсора, наблюдая их спереди и сбоку. В случае несоосности необходимо центрировать конденсор с помощью трех винтов, находящихся на кронштейне (рис. 6.5.). Опустите стол и конденсор и приступайте к настройке микроскопа.

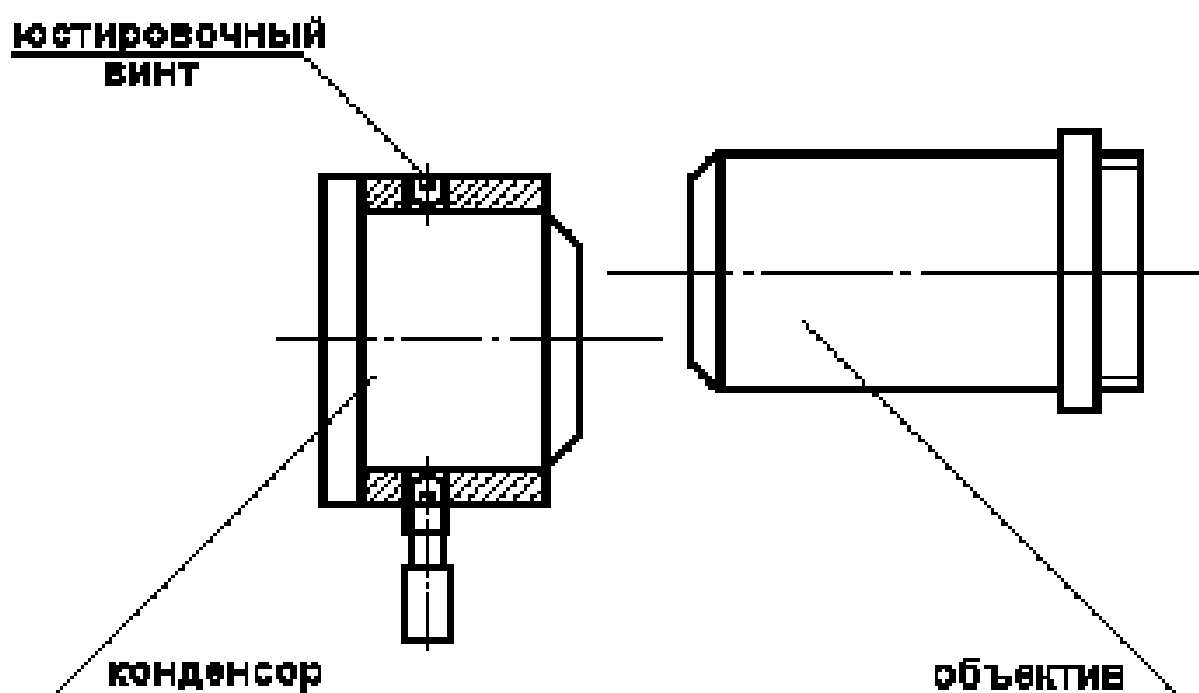


Рис. 6.5. Центрировка конденсора относительно объектива с помощью юстировочных винтов кронштейна.

Порядок операций настройки микроскопа представлен на рис. 6.6. Выбранный для настройки объект должен быть обязательно амплитудным.



Рис. 6.6. Порядок операций настройки микроскопа при работе в проходящем свете. Освещение объекта по методу Кёлера.

ПРОВЕРКА И АНАЛИЗ ПРАВИЛЬНОСТИ НАСТРОЙКИ ОСВЕЩЕНИЯ ПО КЁЛЕРУ

1. Изображения препарата и полевой диафрагмы должны быть видны одновременно резко.
2. При вертикальном смещении конденсора расфокусировка изображения полевой диафрагмы должна происходить без смещения ее центра. Смещение центра свидетельствует о нецентрированности оптической системы освещения.
3. Цветной кант края изображения полевой диафрагмы свидетельствует о наличии хроматической аберрации конденсора. При правильной настройке этот кант должен быть равномерным по всему периметру изображения диафрагмы.
4. Необходимость перефокусировки конденсора при затянутой и раскрытой полевой диафрагме свидетельствует о наличии аберрации конденсора - кривизны поля изображения.
5. Двоение изображения полевой диафрагмы является результатом использования поворотного зеркала с внутренним покрытием. Особенно это заметно при затянутой апертурной диафрагме (рис. 6.7 и рис. 6.8).

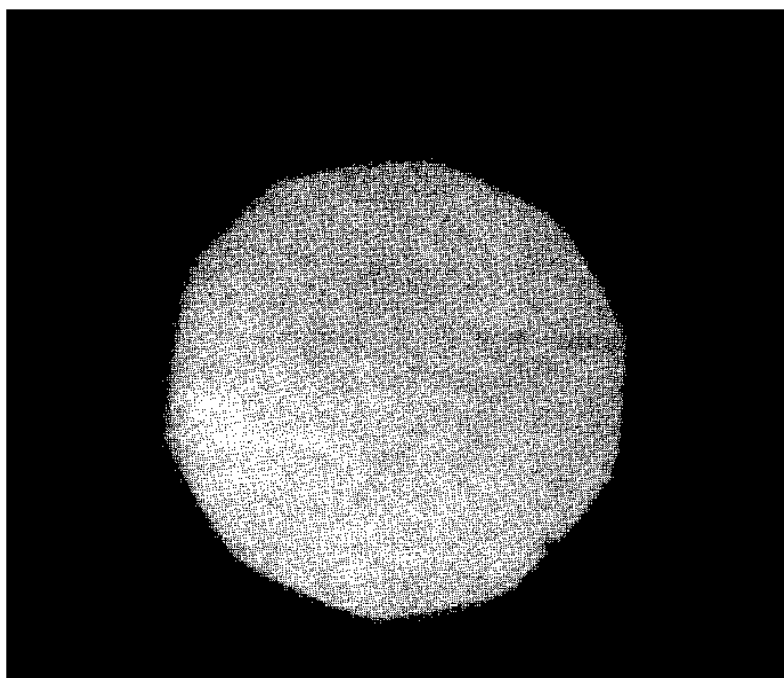


Рис. 6.7. Изображение полевой диафрагмы при использовании поворотного зеркала с наружным покрытием.

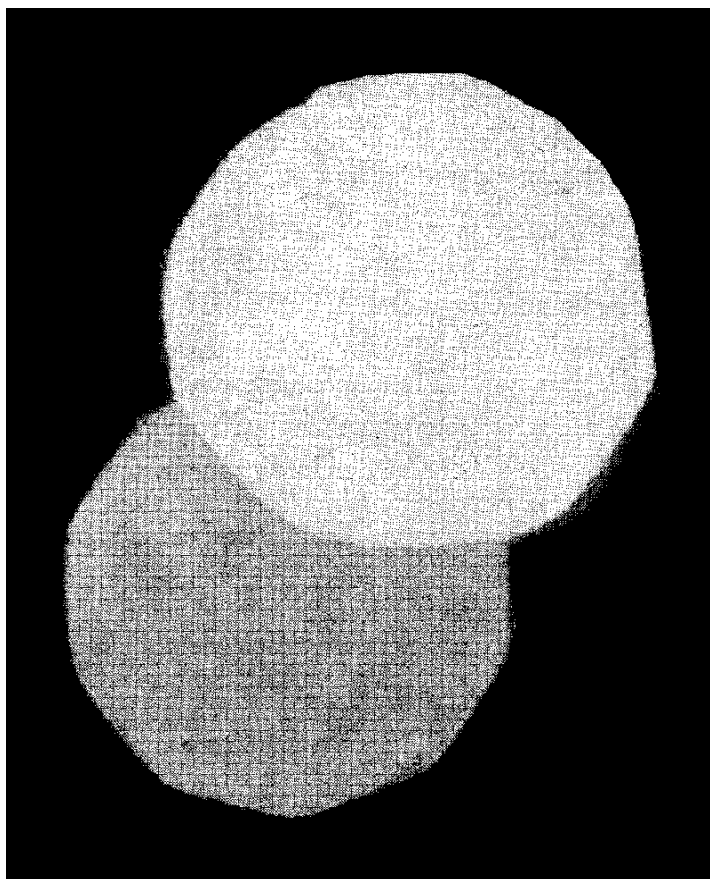


Рис. 6.8. Изображение полевой диафрагмы при использовании поворотного зеркала с внутренним покрытием.

В центре находится изображение диафрагмы, полученное при отражении от зеркального слоя (наиболее яркое). Второе изображение является результатом отражения от наружной поверхности зеркала. Дополнительные изображения приводят к появлению рассеянного света.

6. Оптимальное раскрытие полевой диафрагмы коллектора соответствует совпадению края изображения этой диафрагмы с краем полевой диафрагмы окуляра. При более широком раскрытии полевой диафрагмы контраст изображения объекта снижается (наблюдение через окуляр), а в тубусе микроскопа увеличивается количество рассеянного света (наблюдение через МИР-4).
7. При наблюдении выходного зрачка объектива (вместо окуляра вставляется диафрагма с точечным отверстием или вспомогательный микроскоп МИР-4) одновременно резко должны быть видны изображение источника света и край апертурной диафрагмы (рис. 6.9.). Апертурная диафрагма должна быть центрированной относительно выходного зрачка объектива.

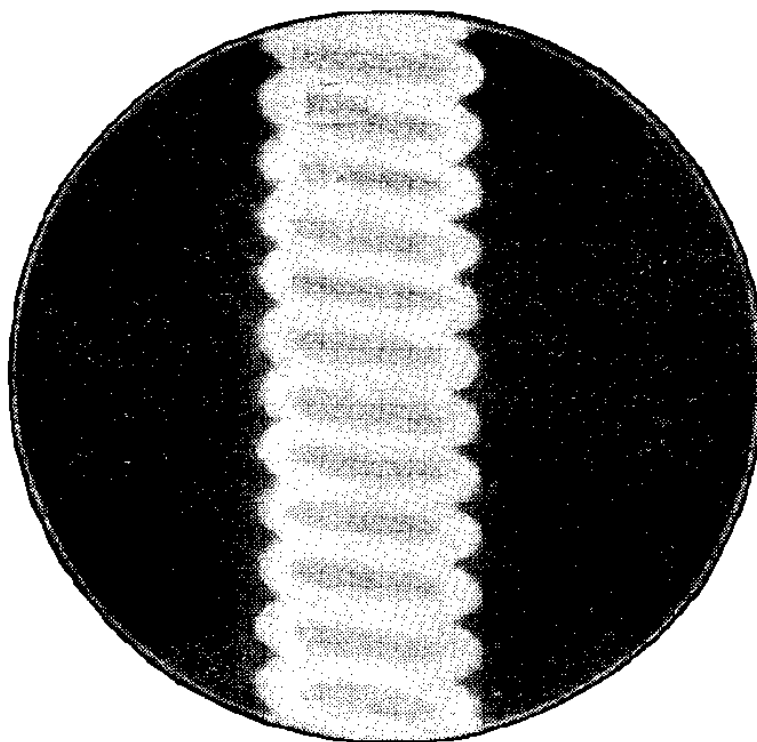


Рис. 6.9. Изображение светящейся нити лампы накаливания в плоскости апертурной диафрагмы конденсора.

Это изображение также должно находиться в выходном зрачке объектива и выходном зрачке микроскопа.

8. Оптимальное раскрытие апертурной диафрагмы соответствует диаметру выходного зрачка объектива. Для повышения контраста иногда ее затягивают до $2/3$ диаметра зрачка объектива. Максимальное раскрытие апертурной диафрагмы соответствует максимальной освещенности поля зрения (наблюдение через окуляр). В этом случае в тубусе микроскопа наблюдается большое количество рассеянного света (наблюдение через МИР-4). Затягивание апертурной диафрагмы приводит к снижению освещенности и повышению контраста изображения при неизменном размере поля зрения.
9. В монохроматическом свете, например, при использовании светофильтра, дефекты изображения диафрагм проявляются в виде размытия их краев.
10. На пустом месте препарата, т.е. рядом с наблюдаемым объектом, освещенность поля зрения должна быть равномерной. Для улучшения равномерности между осветителем и конденсором помещают рассеиватель (матовое или молочное стекло).

ВОПРОСЫ

1. Назовите основные части оптической схемы микроскопа и их назначение.
2. Назовите основные конструктивные части микроскопа и их назначение.
3. Каковы главные отличия между изображениями, созданными объективом и окуляром?
4. Что означают цифры и обозначения на корпусах окуляра, объектива, бинокулярной насадки и конденсора?
5. Как определить общее увеличение микроскопа? Как изменить увеличение?
6. Каково действие полевой и апертурной диафрагм и где должны находиться их изображения?
7. Что необходимо сделать при удалении осветителя от микроскопа и почему?

ЛИТЕРАТУРА

1. К. Михель. Основы теории микроскопа. М.: Государственное издательство технико-теоретической литературы, 1955, 512 с.
2. Г.Е. Скворцов, В.А. Панов, Н.И. Поляков, Л.А. Федин. Микроскопы, М.: Машиностроение, 1969, 512 с.
3. В.А. Панов, Л.Н. Андреев. Оптика микроскопов. М.: Машиностроение, 1976, 430 с.
4. Правила настройки освещения микроскопа [Электронный ресурс] / Интернет-сайт компании «Аконд» – Электрон. дан. – 2011. – Режим доступа: http://www.akondmicro.ru/?issue_id=106, свободный. – Загл. с экрана.
5. Настройка системы освещения по Келеру. [Электронный ресурс] / Интернет-сайт компании «АТМ-практика» – Электрон. дан. – 2011. – Режим доступа: <http://www.atm-practica.ru/ustroystvomikroskopa/>, свободный. – Загл. с экрана.
6. Микроскоп [Электронный ресурс] / Интернет-сайт энциклопедии Wikipedia – Электрон. дан. – 2011. – Режим доступа: <http://ru.wikipedia.org/wiki/Микроскоп>, свободный. – Загл. с экрана.



В 2009 году Университет стал победителем многоэтапного конкурса, в результате которого определены 12 ведущих университетов России, которым присвоена категория «Национальный исследовательский университет». Министерством образования и науки Российской Федерации была утверждена программа его развития на 2009–2018 годы. В 2011 году Университет получил наименование «Санкт-Петербургский национальный исследовательский университет информационных технологий, механики и оптики».

КАФЕДРА ОПТИЧЕСКОЙ ФИЗИКИ И СОВРЕМЕННОГО ЕСТЕСТВОЗНАНИЯ

Кафедра основана в 2002 году под названием «Оптическая физика и современное естествознание» в составе факультета «Фотоники и оптоинформатики». Первым заведующим кафедрой был избран М.Н. Либенсон, возглавлявший лабораторию «Фотофизика поверхности» в Государственном оптическом институте (ГОИ) им. С.И. Вавилова.

В 2004–2006 гг. кафедру возглавлял доктор тех. наук, профессор А.И. Степанов, а с 2006 г. ею руководит доктор физ.-мат. наук, профессор А.В. Федоров.

В настоящее время на кафедре преподают: академик РАН Е.Б. Александров, профессора: А.В. Баранов, Т.А. Вартанян, Н.В. Каманина, Е.А. Коншина, В.Г. Маслов, Е.Ю. Перлин, А.В. Федоров, В.Б. Шилов; доценты: Л.П. Амосова, Г.Н. Виноградова, Г.С. Жданов, В.Л. Комолов, А.О. Орлова, П.С. Парфенов.

Авторы данного учебного пособия – доктор физ.-мат. наук, профессор кафедры Маслов Владимир Григорьевич, кандидаты техн. наук и доценты кафедры Виноградова Галина Николаевна и Орлова Анна Олеговна – известные специалисты в области экспериментальных исследований и диагностики наноструктур различными методами микроскопии и оптической спектроскопии, а также магистранты кафедры Громова Юлия Александровна и Губанова Марина Сергеевна.

Галина Николаевна Виноградова
Юлия Александровна Громова
Марина Сергеевна Губанова
Маслов Владимир Григорьевич
Орлова Анна Олеговна

ТЕХНИКА ФИЗИЧЕСКОГО ЭКСПЕРИМЕНТА В СИСТЕМАХ С
ПОНИЖЕННОЙ РАЗМЕРНОСТЬЮ. ЧАСТЬ 2

Учебно-методическое пособие

В авторской редакции

Дизайн

Верстка

Редакционно-издательский отдел НИУ ИТМО

Зав. РИО

Лицензия ИД № 00408 от 05.11.99

Подписано к печати

Заказ № 2420

Тираж 20 экз

Отпечатано на ризографе

авторский

авторская

Н.Ф. Гусарова

Редакционно-издательский отдел
Санкт-Петербургского национального
исследовательского университета
информационных технологий, механики
и оптики
197101, Санкт-Петербург, Кронверкский пр., 49

