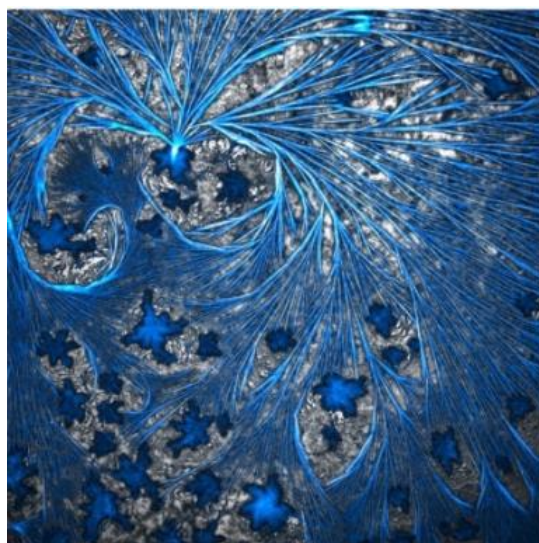


**А.В. Вениаминов, Е.П. Колесова,
А.О. Орлова**

**ФИЗИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ
ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ ГИБРИДНЫХ
НАНОСТРУКТУР**



**Санкт-Петербург
2021**

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РОССИЙСКОЙ
ФЕДЕРАЦИИ

УНИВЕРСИТЕТ ИТМО

А.В. Вениаминов, Е.П. Колесова, А.О. Орлова
ФИЗИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ
ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ ГИБРИДНЫХ
НАНОСТРУКТУР

УЧЕБНО-МЕТОДИЧЕСКОЕ ПОСОБИЕ

РЕКОМЕНДОВАНО К ИСПОЛЬЗОВАНИЮ В УНИВЕРСИТЕТЕ
ИТМО

по направлению подготовки 12.04.03 Фотоника и оптоинформатика
в качестве Учебно-методического пособия для реализации основных
профессиональных образовательных программ высшего образования
магистратуры

 УНИВЕРСИТЕТ ИТМО

Санкт-Петербург
2021

Вениаминов А.В., Колесова Е.П., Орлова А.О., Физические механизмы функционирования гибридных наноструктур– СПб: Университет ИТМО, 2021. – 84 с.

Рецензент(ы):

Баранов Александр Васильевич, доктор физико-математических наук, профессор, профессор факультета фотоники, Университета ИТМО.

Учебно-методическое пособие предназначено для магистрантов факультета фотоники, обучающихся по профилю «Физика наноструктур» по направлению подготовки 12.04.03 «Фотоника и оптоинформатика» и содержит описание лабораторных работ к дисциплине «Физические механизмы функционирования гибридных наноструктур». Пособие также может быть рекомендовано студентам старших курсов физико-технических специальностей, а также магистрантам, специализирующимся в области применения оптических методов в нанотехнологии.



Университет ИТМО – ведущий вуз России в области информационных и фотонных технологий, один из немногих российских вузов, получивших в 2009 году статус национального исследовательского университета. С 2013 года Университет ИТМО – участник программы повышения конкурентоспособности российских университетов среди ведущих мировых научно-образовательных центров, известной как проект «5 в 100». Цель Университета ИТМО – становление исследовательского университета мирового уровня, предпринимательского по типу, ориентированного на интернационализацию всех направлений деятельности.

© Университет ИТМО, 2021

© А.В. Вениаминов, Е.П. Колесова, А.О. Орлова, 2021

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	4
ПОГЛОЩЕНИЕ СВЕТА И ЛЮМИНЕСЦЕНЦИЯ	5
Лабораторная работа №1 Условия формирования и оптические свойства J-агрегатов псевдоизоцианина	11
Лабораторная работа №2 Проверка выполнения принципа аддитивности спектров поглощения и люминесценции наночастиц	15
Лабораторная работа №3 Особенности регистрации спектров поглощения и люминесценции пространственно неоднородных сильно рассеивающих образцов	20
Лабораторная работа №4 Люминесцентные свойства самоорганизованных наноструктур	27
Лабораторная работа №5 Детектирование активных форм кислорода с использованием химических сенсоров	30
Лабораторная работа №6 Определение оптимальных условий для безызлучательного резонансного переноса энергии в комплексах квантовых точек с органическими молекулами	36
Лабораторная работа №7 Оптические свойства комплексов квантовых точек с органическими молекулами в водных средах	41
Лабораторная работа №8 Условия формирования и характеристики металлокомплексов азокрасителей	51
Лабораторная работа №9 Условия формирования и оптические характеристики комплексов квантовых точек с молекулами азокрасителя	56
Приложение А Описание устройства приборов и принципов их работы	61

ВВЕДЕНИЕ

Учебно-методическое пособие к дисциплине "Физические механизмы функционирования гибридных наноструктур" по магистерской программе "Физика и технология наноструктур" разработан с учётом специфики подготовки магистрантов по направлению 12.04.03 "Фотоника и оптоинформатика". Пособие также может быть рекомендовано студентам старших курсов физико-технических специальностей, а также магистрантам, специализирующимся в области применения оптических методов в нанотехнологиях.

Основная цель настоящего пособия: привить студентам навыки научно-исследовательской работы в области физики наноструктур и продемонстрировать широкие возможности использования методов оптической и люминесцентной спектроскопии и микроскопии в различных научных экспериментах при исследовании наноструктурированных материалов. Пособие позволяет студентам получить навыки проведения измерения оптических характеристик образцов наноструктурированных материалов, включая гибридные структуры на их основе, на современном спектральном и микроскопическом оборудовании.

Описания лабораторных работ содержат краткие теоретические сведения. В основу лабораторных работ легли экспериментальные методики и результаты ряда научно-исследовательских работ, выполненных в Университете ИТМО.

Данное пособие является доработанной и дополненной версией пособия 2014 года.

ПОГЛОЩЕНИЕ СВЕТА И ЛЮМИНЕСЦЕНЦИЯ

Наночастицы по своим размерам больше органических молекул и объединяют физические и химические свойства молекул с оптическими свойствами наночастиц. Поэтому в ряде случаев для исследования взаимодействия наночастиц с электромагнитным излучением мы можем использовать законы взаимодействия излучения с молекулами. Кроме того, в состав гибридных структур с наночастицами достаточно часто входят органические молекулы, которые и определяют функциональные свойства структур в целом, например как генератора АФК или сенсоров на ионы металлов и т.д.

Электронные спектры молекул – это молекулярные спектры, обусловленные квантовыми переходами молекулы из одного электронного состояния в другое [1].

Электронные спектры поглощения органических соединений находятся в УФ и видимой областях спектра. В большинстве случаев воспринимаемый нами цвет окрашенных предметов есть результат избирательного поглощения веществом определенных цветов в непрерывном спектре. Спектр поглощения – зависимость степени ослабления света от его длины волны (или частоты, или волнового числа, или энергии кванта) – и есть объективная характеристика поглощательной способности вещества по отношению к свету различных длин волн. В большинстве современных приборов регистрируется зависимость оптической плотности D от длины волны, $D = \lg(I_0/I)$, где I_0 – интенсивность падающего излучения, I – интенсивность прошедшего через образец излучения. Согласно закону Бугера-Ламберта-Бера, коэффициент пропускания раствора составляет

$$I/I_0 = 10^{-\varepsilon Cl} \quad (1)$$

где C – молярная концентрация (моль/л = М); l – длина оптического пути (см), ε – молярный коэффициент экстинкции (ослабления), имеющий размерность площади (сечения поглощения) в расчёте на моль вещества ($\text{М}^{-1}\text{см}^{-1}$). Спектр поглощения обычно выражается в виде спектральной зависимости (зависимости от длины волны) оптической плотности [2]

$$D = \varepsilon Cl = \lg(I_0/I) \quad (2)$$

или коэффициента ε .

Согласно теории поглощения света, молекула может поглотить только тот квант света, энергия которого ($h\nu$) соответствует разнице энергии между двумя энергетическими уровнями молекулы:

$$h\nu = E_i - E_j \quad (3)$$

Колебательное или вращательное движение молекул тоже квантуется, т.е. колебательная или вращательная энергия поглощается или теряется только дискретными порциями.

На рисунке 1.1 приведена упрощенная 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, показанных на рисунке 1.1 тонкими линиями. Они, в свою очередь, расщепляются на тесно расположенные вращательные уровни (не показаны на рисунке).

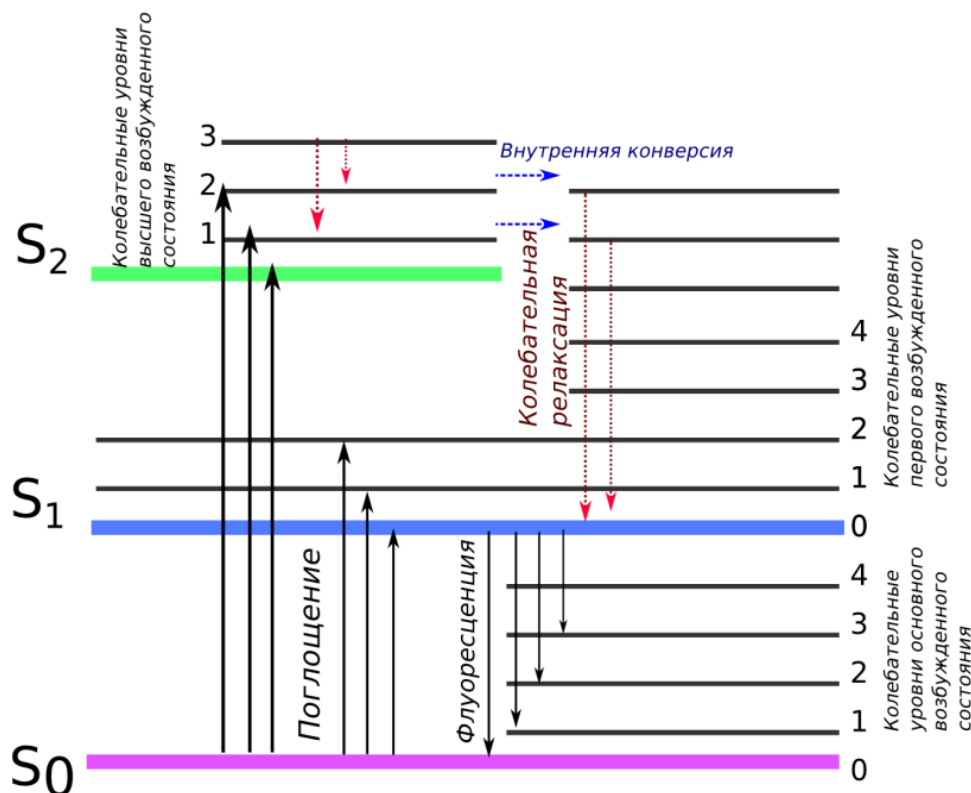


Рисунок 1 - Схема энергетических уровней органических молекул

При нормальных условиях большинство молекул находятся в основном электронном состоянии S_0 и при поглощении света переходят в одно из высших возбужденных состояний.

В электронных спектрах поглощения проявляются переходы из основного (S_0) в возбужденные состояния S_1, S_2, \dots, S_n , но также могут проявляться полосы, соответствующие переходам на колебательные уровни возбужденных состояний.

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 моль $^{-1}$ см $^{-1}$.

Зависимость коэффициента экстинкции от длины волны падающего на образец излучения называется спектром поглощения вещества. В случае однокомпонентного раствора коэффициент экстинкции (ϵ) может быть выражен через зарегистрированную оптическую плотность образца с помощью закона поглощения света Бугера-Ламберта-Бера:

$$\epsilon = D / C \cdot l \quad , \quad (4)$$

где ε – коэффициент экстинкции ($M^{-1}cm^{-1}$); $D = \lg(I_0 / I)$ – оптическая плотность, I_0 – интенсивность падающего на образец излучения; I – интенсивность прошедшего через образец излучения; C – концентрация исследуемого вещества ($M = \text{моль/л}$), d – длина оптического пути/толщина кюветы (см).

При поглощении фотона электрон переходит на одну из свободных орбиталей (т.е. на новый энергетический уровень), и молекула оказывается в возбужденном состоянии. В зависимости от длины волны поглощенного излучения молекула может оказаться в любом из возможных возбужденных состояний (рис. 1).

Молекула, попавшая на верхние колебательные уровни любого возбужденного состояния, быстро теряет избыток колебательной энергии при столкновениях с окружающими молекулами (этот процесс, называемый колебательной релаксацией, показан вертикальными пунктирными стрелками на рис. 1). В возбужденных состояниях выше первого возможна внутренняя конверсия – переход электрона с нижних колебательных уровней верхнего возбужденного состояния на равные по энергии верхние колебательные уровни низшего возбужденного состояния. Как только происходит внутренняя конверсия, молекула теряет избыток колебательной энергии в результате колебательной релаксации. В результате этих процессов, имеющих высокие константы скоростей, молекула, находящаяся в любом из высших возбужденных состояний, быстро оказывается на нижнем колебательном уровне первого электронно-возбужденного состояния. Однако внутренняя конверсия из этого уровня в основное состояние – значительно более медленный процесс. Поэтому в первом электронном состоянии наблюдаются процессы испускания. Молекула испускает флуоресценцию при переходе с уровня 0 состояния S_1 на любой колебательный уровень основного состояния.

Образование электронно-возбужденных молекул может быть не только результатом поглощения ими квантов света, но и следствием химических реакций, электрического разряда и др. Поэтому в зависимости от источника энергии при возбуждении молекул говорят о разных типах люминесценции. Рассмотренная выше флуоресценция является одной из разновидностей фотолюминесценции, т.е. люминесценции, возбуждаемой светом.

Общее определение люминесценции было дано выдающимся советским ученым, академиком Сергеем Ивановичем Вавиловым: «Люминесценцией тела в данной спектральной области называют избыток излучения над температурным при условии, что это избыточное излучение обладает конечной длительностью, превышающей период световых колебаний» [3].

Свечение, сопровождающее химические реакции, называется хемилюминесценцией (слабая хемилюминесценция сопровождает, например, свободно-радикальное цепное окисление органических соединений, включая липиды). Многие живые организмы, например светляки, бактерии, некоторые морские организмы, способны испускать интенсивный свет в результате реакций, катализируемых специфическими ферментами; такое свечение называют биолюминесценцией. В физике известны явления

термолюминесценции, электролюминесценции, сонолюминесценции, триболюминесценции. Эти термины указывают на то, что причиной образования электронно-возбужденных молекул в этих случаях является нагревание образцов, пропускание электрического тока, воздействие ультразвуком, трение поверхностей.

Схема на рис. 1 позволяет объяснить эмпирические законы люминесценции, которые и послужили основой для самой схемы. Это правило Стокса-Ломмеля, правило Каша, правило Лёвшина и закон Вавилова [4].

1. Правило Стокса-Ломмеля

Спектром люминесценции (флуоресценции или фосфоресценции) называют зависимость

$$I = f(\lambda) \quad (5),$$

где I – интенсивность люминесценции в относительных единицах, измеренная на длине волны λ . Согласно правилу Стокса-Ломмеля, максимум спектра люминесценции лежит в более длинноволновой области по сравнению с длинноволновой полосой поглощения того же соединения. Это означает, что средняя энергия квантов флуоресценции меньше средней энергии поглощенных квантов. Причина такого явления уже была отчасти рассмотрена выше – это превращение части энергии поглощенного фотона в тепловую энергию окружающих молекул. При комнатной температуре поглощение происходит с нулевого уровня основного состояния, а испускание – с нулевого уровня первого возбужденного состояния. Поэтому только один переход, называемый 0-0 переход, имеет одинаковые значения энергии для поглощения и флуоресценции, а остальным переходам соответствуют большие или меньшие энергии. Пересечение спектров поглощения и люминесценции соответствует длине волны 0-0 перехода.

2. Правило Каша

Правило Каша относится к форме спектра флуоресценции при возбуждении объекта светом разных длин волн. Как было рассмотрено выше, испускание кванта флуоресценции всегда происходит с первого возбужденного состояния, что определяется соотношением констант скоростей внутренней конверсии и колебательной релаксации с верхних состояний, и скоростей испускания. Это означает, что какой бы длиной волны ни была возбуждена молекула, излучение будет происходить из одного и того же состояния молекулы, и спектр флуоресценции во всех случаях будет одинаковым. Следовательно, спектр флуоресценции не зависит от длины волны возбуждающего излучения.

3. Правило Лёвшина

Правило Лёвшина, называемое также законом зеркальной симметрии, утверждает, что спектры флуоресценции по форме зеркально симметричны длинноволновой полосе спектра поглощения, если они построены в шкале частот (энергий). Иллюстрацией этого правила могут служить спектры поглощения и флуоресценции антрацена, приведенные на рис. 2. Форма полос

поглощения и флуоресценции определяется распределением колебательных уровней состояний S_0 и S_1 по энергиям и вероятности переходов на них. Это распределение часто одинаково для основного и первого возбужденного состояния, и геометрия молекул в электронно-возбужденном состоянии мало изменяется по сравнению с основным состоянием.

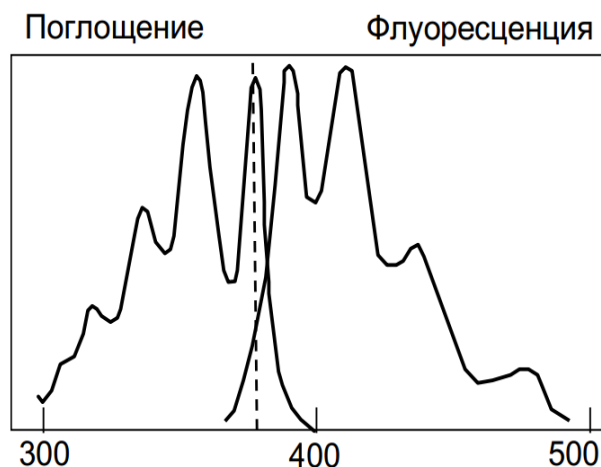


Рисунок 2 - Правило зеркальной симметрии спектров поглощения и флуоресценции (правило Лёвшина)

4. Закон Вавилова

Закон Вавилова заключается в том, что квантовый выход флуоресценции не зависит от длины волны возбуждения люминесценции. Квантовым выходом люминесценции называют отношение числа квантов, высвеченных в виде люминесценции, к числу поглощенных образцом квантов. Очевидно, что эта величина может принимать значения от 0 до 1.

От чего зависит квантовый выход? Поглощение кванта света в области основного электронного перехода приводит к образованию молекулы в возбужденном состоянии (см. рис. 1.1) т. е. в состоянии S_1 . Вероятность перехода молекулы из состояния S_0 в состояние S_1 при поглощении фотона равна единице и не зависит от длины волны поглощенного фотона. Излучательный переход молекулы с нижнего подуровня возбужденного состояния происходит с вероятностью η , меньшей единицы, и сопровождается высвечиванием кванта флуоресценции. Очевидно, что η и есть квантовый выход флуоресценции. Он меньше единицы, поскольку есть некоторая вероятность $(1 - \eta)$ безызлучательных переходов в основное состояние непосредственно или через триплетное состояние, а также других способов растраты энергии.

$$\eta = \frac{\text{Число квантов флуоресценции}}{\text{Число поглощенных квантов}} \quad (6)$$

Сущность закона Вавилова состоит в том, что на каком бы уровне возбужденного состояния ни оказалась молекула при поглощении фотона (а это зависит от длины волны возбуждающего света), вопрос о том, быть ли переходу излучательным или нет, решается только после того как молекула растратила часть энергии возбуждения в тепло (разную в разных случаях) и оказалась на

нижнем колебательном подуровне нижнего уровня возбужденного состояния (где она находится дольше всего).

Описание устройства приборов, используемых при проведении лабораторных работ, приведено в приложении А настоящего пособия «Описание устройства приборов и принципов их работы».

ЛИТЕРАТУРА

1. Л.А. Грибов, В.И. Баранов, Д.Ю. Зеленцов. Электронно-колебательные спектры многоатомных молекул. Теория и методы расчета. «Наука», М., 1997, 471 с.
2. А.Н. Теренин. Фотоника молекул красителей и родственных органических соединений. «Наука», Л., 1967, 616 с.
3. В.Л. Левшин. Фотолюминесценция жидких и твердых веществ. «Наука», Л., 1951, 262 с.
4. Паркер. Фотолюминесценция растворов. М: Мир, 1972.

Лабораторная работа №1

УСЛОВИЯ ФОРМИРОВАНИЯ И ОПТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА J- АГРЕГАТОВ ПСЕВДОИЗОЦИАНИНА

ЦЕЛИ РАБОТЫ:

- Приобретение навыков регистрации узкополосных спектров поглощения и люминесценции;
- определение концентраций псевдоизоцианина йодида в электролите, достаточных для формирования J-агрегатов.

ОБОРУДОВАНИЕ И РЕАКТИВЫ:

- Спектрофотометр UV Probe 3600 (Shimadzu, Япония);
- спектрофлуориметр CaryEclipse (Varian, Австралия);
- фотометрические кюветы;
- псевдоизоцианин йодид;
- диметилсульфоксид;
- электролит;
- дозаторы.

ОБЪЕКТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ:

- Раствор псевдоизоцианина йодида (ПИЦ) в ДМСО;
- раствор J-агрегатов ПИЦ в электролите.

ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ СВЕДЕНИЯ:

Полиметиновые красители представляют важный класс органических соединений, имеющих большое практическое применение, прежде всего в фотографическом процессе. Одной из особенностей молекул полиметиновых красителей является их склонность к агрегации путем самосборки [1]. В зависимости от строения молекул красителей и их окружения они образуют агрегаты различного строения и состава, начиная от простейших – димеров (сложных молекул, составленных из двух более простых молекул, называемых мономерами) и заканчивая сложными полимолекулярными образованиями, такими как H- и J-агрегаты.

Особый интерес представляют J-агрегаты, которые характеризуются упорядоченной структурой и специфическими свойствами, что, в частности, проявляется в способности J-агрегатов выступать в качестве спектральных сенсбилизаторов в фотографическом процессе [2]. В последнее время были найдены новые перспективные применения J-агрегатов - в частности, при создании светодиодных устройств, для преобразования частоты лазерного излучения и др. Оптические и транспортные свойства J-агрегатов, помимо строения молекул красителей, определяются их собственной морфологией и молекулярно-кристаллическим строением, поэтому получение достоверной

информации о J-агрегатах необходимо для успешного создания оптоэлектронных наноматериалов с новыми полезными свойствами.

Механизм самообразования J-агрегатов заключается в образовании нитевидных макромолекул красителей псевдоизоцианового ряда при больших концентрациях красителя в растворах в присутствии галоидных анионов (F-, Cl-, Br- и т.п.). Плоские молекулярные катионы красителя в нитевидных макромолекулах ориентированы параллельно друг другу наподобие колоды карт. При этом они образуют в макромолекуле обобществленную электронную систему, составленную из сопряженных π -орбиталей отдельных молекул. Эта упорядоченная полимерная агрегация обратимо переходит в состояние беспорядочной ассоциации или распадается при изменении условий (растворителя, температуры и т.п.).

При образовании макромолекул такого рода максимум полосы поглощения катионов исчезает, заменяясь исключительно узким и высоким пиком поглощения, сдвинутым в длинноволновую область относительно положения полос мономерной формы [3]. Ширина этой новой полосы примерно в десять раз меньше мономерной полосы, значения коэффициента экстинкции составляют $4,3 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ см}^{-1}$ вместо обычного значения $(0,5-1) \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ см}^{-1}$. Природа аниона на положении максимума J-полосы не сказывается.

Спектр люминесценции J-агрегатов состоит также из очень узкого максимума, почти точно совпадающего с узким максимумом полосы поглощения. Следует отметить, что мономерные молекулярные ионы псевдоизоцианиновых красителей, на которые распадаются J-агрегаты, имеют достаточно низкий квантовый выход люминесценции. Поэтому на практике не удается зарегистрировать сигнал люминесценции от мономерной формы псевдоизоцианина [4].

ПОРЯДОК ВЫПОЛНЕНИЯ РАБОТЫ

1. Измерение спектра поглощения мономерной формы псевдоизоцианина в ДМСО.
2. Определение условий формирования и спектрально-люминесцентных свойств J-агрегатов

На этом этапе работы необходимо определить условия формирования J-агрегатов ПИЦ. Для этого необходимо сделать несколько последовательных добавок микроколичеств концентрированного раствора мономерной формы ПИЦ в ДМСО в кювету с электролитом и определить минимальную концентрацию молекул ПИЦ в смеси ДМСО и электролита, достаточную для образования J-агрегатов ПИЦ. После каждой добавки ПИЦ в электролит проводится регистрация спектров поглощения образца. При достижении необходимой концентрации ПИЦ в образце в спектре поглощения появится новая узкая полоса, соответствующая поглощению J-агрегатов. На этом шаге проведения измерений необходимо зарегистрировать спектр люминесценции образца на спектрофлуориметре Cary Eclipse (Varian).

Порядок проведения измерений:

1. Получить у преподавателя необходимые вещества, фотометрические кюветы с длинами оптического пути 0.2 и 1 см и дозаторы.
2. Приготовить раствор ПИЦ в электролите с минимальной концентрацией ПИЦ, заведомо недостаточной для образования *J*-агрегатов (образец «2»).
3. Произвести измерение спектров поглощения образца «2».
4. Постепенно увеличивая концентрацию ПИЦ в образце «2» путем добавления микроколичеств ПИЦ, добиться образования *J*-агрегатов с отчетливой узкой полосой поглощения. После каждой добавки регистрировать спектр поглощения. Необходимым требованием выполнения этого этапа работы является уменьшение ширины щелей монохроматора прибора до их минимальных значений, так как полоса поглощения исследуемых *J*-агрегатов является чрезвычайно узкой (см. описание лабораторной установки, выбрать ширину щелей «1»).
5. В случае формирования *J*-агрегатов в образце «2» после произведенных добавок ПИЦ (в спектре поглощения исследуемого раствора обнаружена отчетливая полоса *J*-агрегатов) необходимо измерить спектры люминесценции образца «2» на спектрофлуориметре Cary Eclipse Varian. Для этого необходимо выполнить следующие действия: 1) перелить образец «2» в фотометрическую кювету с длиной оптического пути 0,2 см; 2) установить кювету с образцом «2» в кюветное отделение под углом 45° к направлению распространения возбуждающего оптического излучения и зарегистрировать спектр люминесценции.

ОБРАБОТКА ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ДАННЫХ

1. Определение оптической плотности

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

1.2 Из анализа полученных спектров поглощения определить:

$D(\lambda)_{max}$ - величину оптической плотности в максимуме полосы поглощения, для которой получен коэффициент экстинкции, в спектрах поглощения мономерных форм ПИЦ в ДМСО и *J*-агрегатов ПИЦ.

2. Определение концентрации органических молекул

Рассчитать концентрации ПИЦ в образцах «1» и «2», пользуясь формулой Бугера-Ламберта-Бера. На основании полученных спектров поглощения *J*-агрегатов определить концентрацию псевдоизоцианина в электролите, достаточную для формирования *J*-агрегатов.

СОДЕРЖАНИЕ ОТЧЕТА:

1. Спектры поглощения и люминесценции мономерной формы и *J*-агрегатов ПИЦ, зарегистрированных в стандартной и тонкой кюветах.

2. Полученные у преподавателя характеристики образцов (коэффициенты экстинкции). Таблица с результатами необходимых вычислений.
3. Оценка концентраций псевдоизоцианина в электролите, достаточных для формирования *J*-агрегатов ПИЦ.

Работа является доработанной версией работы из пособия [5].

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

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. Дать определение понятию флуоресценция.
5. Чем обусловлено относительное расположение спектров поглощения и флуоресценции вещества?
6. Дать определение понятию *J*-агрегаты.
7. При каких условиях формируются *J*-агрегаты?
8. Провести анализ спектров люминесценции *J*-агрегатов ПИЦ, зарегистрированных в стандартной и тонкой кюветах. Чем обусловлено расхождение в форме спектров люминесценции в данном случае?

ЛИТЕРАТУРА

1. Б.И. Шапиро. Молекулярные ансамбли полиметиновых красителей. Успехи химии, 2006, том 75, № 5, с 484-510.
2. В.В. Егоров, М.В. Алхимов. «Теория *J*-полосы: от экситона Френкеля к переносу заряда», 2007. УФН, том 177, № 10.
3. А.Н. Теренин. Фотоника молекул красителей и родственных органических соединений. «Наука», Л., 1967, 616 с.
4. Паркер. Фотолюминесценция растворов. М: Мир, 1972.
5. Громова Ю.А., Мартыненко И.В., Орлова А.О. Практическое использование наноструктур. Санкт-Петербург: СПб: НИУ ИТМО, 2014.

Лабораторная работа №2

ПРОВЕРКА ВЫПОЛНЕНИЯ ПРИНЦИПА АДДИТИВНОСТИ СПЕКТРОВ ПОГЛОЩЕНИЯ И ЛЮМИНЕСЦЕНЦИИ НАНОЧАСТИЦ

ЦЕЛИ РАБОТЫ:

- Приобретение навыков формирования многокомпонентного люминесцирующего раствора квантовых точек с заданным соотношением интенсивности флуоресценции отдельных компонентов;
- приобретение навыков первичной обработки и анализа экспериментальных данных.

ОБОРУДОВАНИЕ И РЕАКТИВЫ:

- Спектрофотометр UV Probe 3600 (Shimadzu, Япония);
- спектрофлуориметр Cary Eclipse (Varian, Австралия);
- фотометрические кюветы;
- полупроводниковые квантовые точки двух размеров;
- неполярные растворители.

ОБЪЕКТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

- Коллоидные растворы полупроводниковых КТ разного размера;
- смешанный раствор КТ двух размеров.

ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ СВЕДЕНИЯ

Полупроводниковые коллоидные квантовые точки (КТ) представляют собой люминесцирующие нанокристаллы с размерами от единиц до десятков нанометров [1].

В таких нанокристаллах, вследствие малых размеров, существенны квантово-размерные эффекты, которые играют ключевую роль в оптоэлектронных свойствах КТ. Энергетический спектр квантовой точки существенно отличается от спектра объёмного полупроводника. В квантовой точке движение носителей заряда пространственно ограничено по всем трём измерениям, поэтому электрон в таком нанокристалле ведёт себя как в трёхмерной потенциальной "яме". Это приводит к тому, что энергетический спектр кристалла из непрерывного превращается в дискретный, и возникает эффект размерного квантования (рис. 2.1).

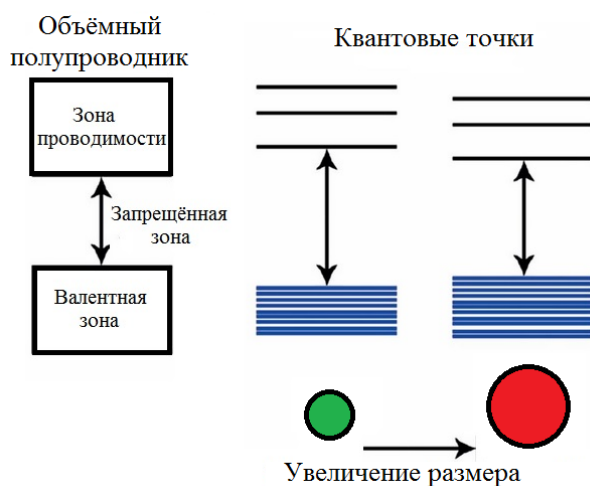


Рисунок 2.1 — Схематическое представление трансформации зонной структуры объёмного полупроводникового материала при его уменьшении до КТ разных размеров

Имеется несколько стационарных уровней энергии для электрона и дырки с характерным расстоянием между ними: $\frac{\hbar^2}{2md^2}$, где d – это диаметр квантовой точки.

Таким образом, энергетический спектр КТ зависит от её размера. Как и в случае перехода между уровнями энергии в атоме, при переходе носителей заряда между энергетическими уровнями в КТ может излучиться либо поглотиться фотон. Частотами переходов, т.е. длиной волны поглощения или флуоресценции, легко управлять, меняя размеры квантовой точки. Поэтому КТ ещё часто называют "искусственными атомами". В терминах полупроводниковых материалов это можно назвать возможностью контроля эффективной ширины запрещенной зоны.

Коллоидные КТ являются хорошей альтернативой традиционным органическим люминофорам [2, 3]. В КТ сочетается высокий молярный коэффициент экстинкции ($10^6 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), поглощение в широком спектральном диапазоне, высокий квантовый выход люминесценции (до 100%) и хорошая фото- и химическая стабильность. Это открывает широкие возможности для эффективного применения КТ в качестве люминесцентных меток и сенсоров и позволяет им успешно конкурировать с традиционными органическими красителями для детектирования и диагностики в биологии и медицине. КТ также применяются в оптоэлектронных устройствах, таких как светоизлучающие диоды и плоские светоизлучающие панели, лазеры, ячейки солнечных батарей и фотоэлектрических преобразователей.

Дискретная структура энергетических уровней квантовых точек проявляется в первую очередь в спектрах поглощения. На рисунке 2.2 представлены спектры поглощения и люминесценции растворов CdSe КТ разных размеров. Благодаря узкому распределению КТ по размерам на спектрах хорошо различаются полосы поглощения, соответствующие межзонным оптическим переходам между различными электронными и дырочными квантовыми состояниями.

В оптических свойствах КТ квантово-размерный эффект проявляется и в спектрах люминесценции, которая соответствует энергии рекомбинации электрон-дырочной пары, приводя к изменению положения полосы люминесценции в зависимости от размера КТ.

Как и в случае органических молекул, спектры люминесценции всегда сдвинуты относительно полосы поглощения, что обусловлено тем, что в нанокристаллах с гексагональной структурой в переходах поглощения и излучения участвуют разные дырочные подзоны, а также потерей энергии возбуждения на фононные колебания.

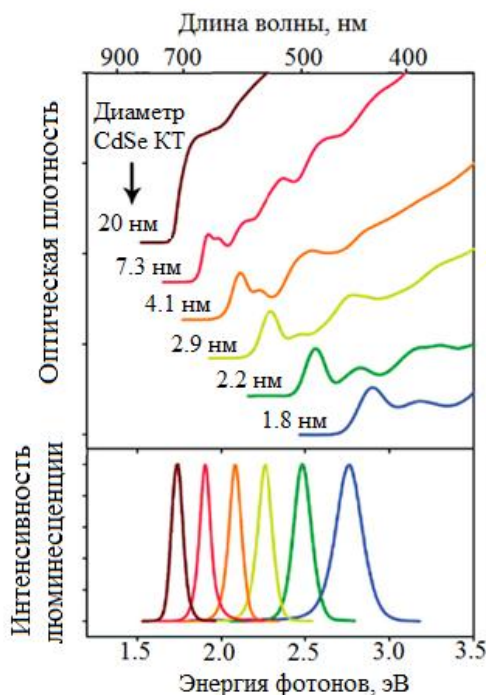


Рисунок 2.2 — Спектры поглощения и люминесценции CdSeКТ различных размеров

ПОРЯДОК ВЫПОЛНЕНИЯ РАБОТЫ

1. Приготовить растворы двух размеров КТ произвольной концентрации в фотометрических кюветах, определить объемы полученных растворов $V_{КТ1}$ и $V_{КТ2}$.
2. Зарегистрировать спектры поглощения и флуоресценции растворов КТ. Значение длины волны возбуждающего света для регистрации спектров флуоресценции выдает преподаватель.
3. Определить оптические характеристики КТ:
 - 3.1. По спектрам поглощения растворов КТ определить оптическую плотность на длине волны возбуждающего света ($D_{КТ1}$ и $D_{КТ2}$).
 - 3.2. По полученным спектрам поглощения растворов КТ рассчитать: 1) коэффициент экстинкции в максимуме экситонной полосы поглощения [4]; 2) коэффициент экстинкции на выбранной длине волны возбуждения флуоресценции; 3) концентрацию полученных растворов.

3.3. По спектрам флуоресценции определить положение максимумов полос флуоресценции КТ.

4. Рассчитать отношение интенсивности флуоресценции КТ к оптической плотности на длине волны возбуждения флуоресценции λ ($\varphi_{КТi} \sim I_{КТi}/D_{КТi}$).

5. Приготовить раствор смеси КТ двух разных размеров с заданным соотношением интенсивности полос флуоресценции (k , выдается преподавателем). Для этого необходимо выполнить следующие действия:

5.1. Получить у преподавателя значение соотношения интенсивности флуоресценции КТ двух размеров (k) в смешанном растворе.

5.2. Рассчитать необходимое соотношение объемов растворов КТ двух средних размеров, используя соотношение

$$\frac{V_{КТ1}}{V_{КТ2}} = k \cdot \frac{\varphi_{КТ2} \cdot D_{КТ2}}{\varphi_{КТ1} \cdot D_{КТ1}} \quad (2.1)$$

где k – заданное соотношение интенсивности флуоресценции двух размеров КТ в смешанном растворе, $\varphi_{КТ1,2}$ – отношение интенсивности флуоресценции КТ к оптической плотности на длине волны возбуждения флуоресценции, $D_{КТ1,2}$ – оптическая плотность на длине волны возбуждающего света в спектре поглощения растворов двух размеров КТ.

5.3. Приготовить смешанный раствор КТ двух размеров.

5.4. Зарегистрировать спектры поглощения и флуоресценции смешанного раствора.

6. Проверить выполняемость принципа аддитивности оптических плотностей в смешанном растворе по формуле

$$D_{смеси}(\lambda) = k_1 \cdot D_1(\lambda) + k_2 \cdot D_2(\lambda) \quad (2.2)$$

Здесь D_1 , D_2 , $D_{смеси}$ – оптические плотности растворов КТ двух размеров, и оптическая плотность смешанного раствора КТ на длине волны возбуждения флуоресценции. k_1 , k_2 – коэффициенты, учитывающие соотношение объема раствора КТ одного размера в смешанном растворе к начальному объему раствора КТ этого размера.

СОДЕРЖАНИЕ ОТЧЕТА

1. Спектры поглощения и флуоресценции растворов КТ двух размеров.

2. Таблица с представленными результатами расчетов оптических характеристик КТ двух размеров:

Раствор	Положение экситонной полосы поглощения $\lambda_{экс}$, нм	Коэффициент экстинкции ϵ на длине волны возбуждения флуоресценции, $M^{-1}cm^{-1}$	Положение максимума полосы флуоресценции, $\lambda_{экс}$, нм	Интенсивность флуоресценции $I_{фотн. ед.}$	Оптическая плотность на длине волны возбуждения флуоресценции, D	$\varphi_f = I_{ф}/D$
КТ 1						
КТ 2						

3. Спектры поглощения и флуоресценции смешанного раствора КТ.
4. Вывод о выполнении принципа аддитивности оптических плотностей в смешанном растворе КТ, подкрепленный расчетами.

Работа является доработанной версией работы из пособия [5].

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. С какой энергетической характеристикой полупроводниковой квантовой точки связано положение ее длинноволновой полосы поглощения?
2. В какой части спектра поглощения коллоидного раствора квантовых точек проявляется зависимость спектра флуоресценции от длины волны падающего излучения и чем она обусловлена?
3. Каким условиям должны отвечать компоненты смешанного раствора, чтобы для них выполнялся принцип аддитивности оптических плотностей.

ЛИТЕРАТУРА

1. 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.
2. J. R. Lakowicz «Principles of Fluorescence Spectroscopy», 2006 Springer Science+Business Media, LLC.
3. Берштейн И.Я., Каминский Ю.А. Спектрофотометрический анализ в органической химии. Л.: Химия, 1986. 200 с.
4. W. William Yu, Lianhua Qu et. al. Experimental Determination of the Extinction Coefficient of CdTe, CdSe, and CdS Nanocrystals. Chem. Mater. 2003, 15, 2854-2860.
5. Громова Ю.А., Мартыненко И.В., Орлова А.О. Практическое использование наноструктур. Санкт-Петербург: СПб: НИУ ИТМО, 2014.

Лабораторная работа №3

ОСОБЕННОСТИ РЕГИСТРАЦИИ СПЕКТРОВ ПОГЛОЩЕНИЯ И ЛЮМИНЕСЦЕНЦИИ ПРОСТРАНСТВЕННО НЕОДНОРОДНЫХ СИЛЬНО РАССЕИВАЮЩИХ ОБРАЗЦОВ

ЦЕЛИ РАБОТЫ:

- Приобретение навыков использования светофильтров при работе на стандартных спектральных приборах;
- приобретение навыков регистрации и анализа спектров люминесценции и спектров поглощения сильно рассеивающих и неоднородных тонкопленочных образцов с внедренными полупроводниковыми квантовыми точками.

ОБОРУДОВАНИЕ И РЕАКТИВЫ:

- Спектрофотометр UV Probe 3600 (Shimadzu, Япония);
- спектрофлуориметр Cary Eclipse (Varian, Австралия);
- оптоволоконная приставка для спектрофлуориметра;
- набор оптических цветных стекол.

ОБЪЕКТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ:

- Полиэтилентерефталатные трековые мембраны с внедренными полупроводниковыми квантовыми точками.

ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ СВЕДЕНИЯ

Внедрение наночастиц в различные твердотельные матрицы позволяет создавать композитные материалы с уникальными физическими свойствами. Основное требование к матрице для оптических приложений – прозрачность в необходимом спектральном диапазоне. Наиболее часто в качестве матриц выступают стекла и полимерные материалы.

В случае использования стекла формирование наночастиц должно происходить на стадии варки, что накладывает достаточно жесткие ограничения на состав и функциональные свойства наночастиц. Использование пористых стекол позволяет как осуществлять синтез наночастиц непосредственно в порах стекла, так и внедрять уже готовые наночастицы [1].

Хотя полимерные материалы зачастую уступают стеклам по своим оптическим и эксплуатационным качествам, благодаря простоте обработки и низкой стоимости полимеры стали одним из самых распространенных типов матриц для создания оптических наноматериалов [2]. Полимерные материалы обладают малой плотностью и высокой ударопрочностью. Огромный ассортимент коммерчески доступных материалов позволяет подобрать оптимальное сочетание физических свойств, при этом полимеры легко

подвергаются поверхностной модификации и структурированию, совместимы со многими неорганическими веществами и биологическими объектами.

В качестве оптических сред используют в основном прозрачные аморфные линейные и сшитые полимеры, или сополимеры, находящиеся в стеклообразном состоянии. Наиболее важные оптические свойства полимеров – показатель преломления и светопоглощение – определяются их химическим строением. Кроме того, оптические свойства аморфных стеклообразных полимеров зависят от возможной надмолекулярной организации полимера, которая формируется в зависимости от условий его получения и переработки [3].

Полимерные материалы предназначены в основном для работы в видимой области спектра. За пределами видимой области в ультрафиолетовой и ближней инфракрасной зонах светопропускание полимеров падает, и эффективность их применения снижается.

Существует множество различных способов внедрения наночастиц в полимерные матрицы. По общему подходу к созданию композитных структур эти способы можно объединить в три основные группы:

а) введение наночастиц в раствор полимера. В этом случае формирование наноматериала происходит при испарении растворителя. При этом важным фактором является растворимость наночастиц в полимере. Так как хотя такой подход и является одним из самых технологически простых, склонность наночастиц к образованию агломератов может привести к формированию сильно рассеивающего образца с высокой пространственной неоднородностью.

б) связывание молекул мономера с оболочкой или непосредственно с поверхностью наночастиц и последующая полимеризация гибридной смеси. Данный способ позволяет избежать образования макроагрегатов из наночастиц, однако требует использования специфической химии.

в) инкапсуляция наночастиц в полимерные микроструктуры (микросферы и т.п.).

Оригинальным типом полимерных матриц являются трековые мембраны. Трековые мембраны представляют собой тонкие полимерные плёнки со сквозными порами различной формы (рис. 3.1).

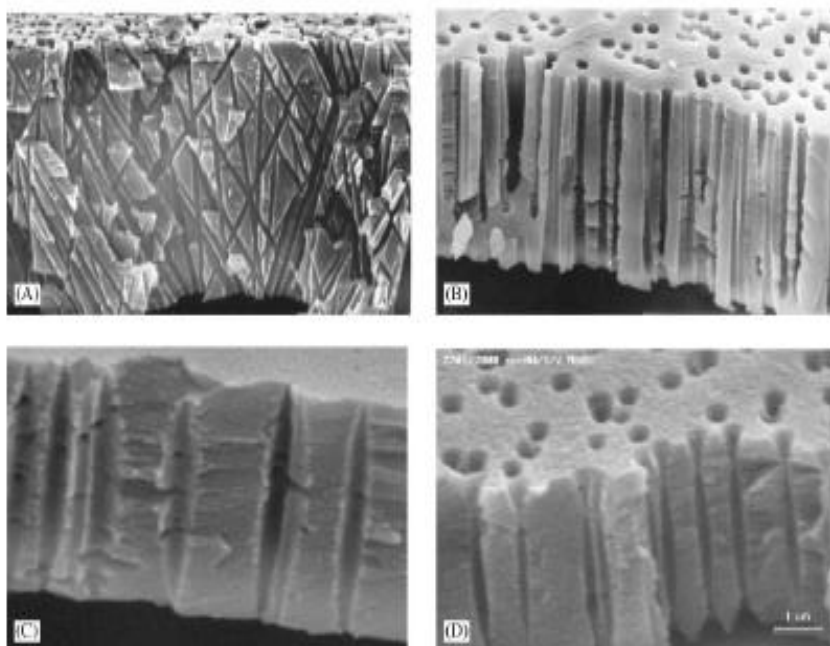


Рисунок 3.1 - Изображения срезов трековых мембран, полученные на электронном микроскопе: А) поликарбонатная ТМ с цилиндрическими непараллельными порами; В) полипропиленовая ТМ со слабо коническими параллельными порами; С) полиэтилен-терефталатная ТМ с сигарообразными порами; D) полиэтилен-терефталатная ТМ с порами в виде «галстука» [4]

Трековые мембраны изготавливаются в два этапа (рис. 3.2). Сначала под определенным углом к поверхности полимерная пленка облучается потоком быстрых ионов. В результате в местах пролета ионов полимерные цепочки разрываются, образуя латентные треки. При этом вокруг каждого латентного трека образуются области, характеризующиеся частичным разрывом полимерных цепей. На втором этапе пленка обрабатывается высококонцентрированным щелочным раствором. В частности, для полиэтилентерефталата обычно используют NaOH. В результате травления в пленке в местах латентных треков образуются сквозные поры, форма и размер которых определяются условиями травления.

Приповерхностный слой трековых пор в результате частичного разрыва полимерных цепочек характеризуется меньшей плотностью по сравнению с объемным полимером, а в результате травления в нем формируются полости, куда могут быть внедрены наночастицы.

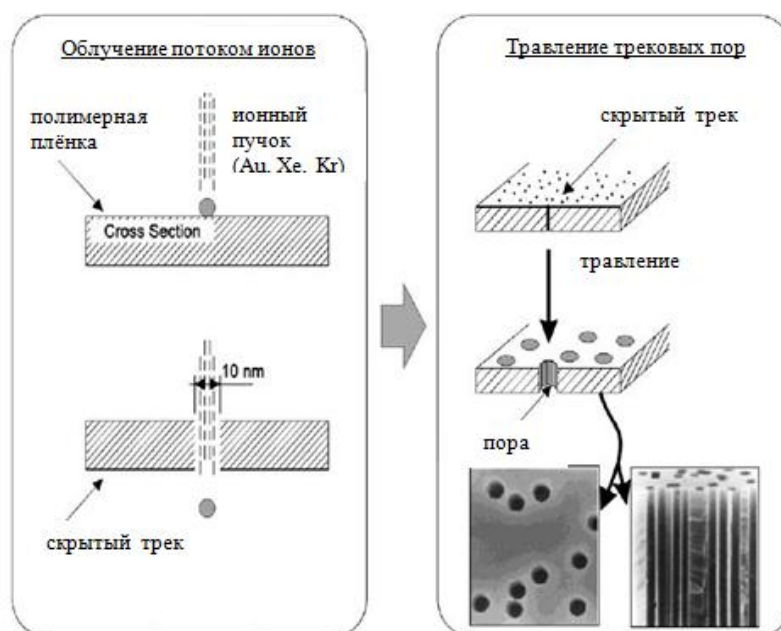


Рисунок 3.2 - Процесс формирования полимерных трековых мембран: а) облучение полимерной пленки потоком быстрых ионов; б) формирование пор

Тонкие пленки являются нестандартными образцами для характеристики спектроскопическими методами [5]. Полимерные пленки в общем случае представляют собой сильно рассеивающие, пространственно неоднородные образцы. Высокое рассеяние обычно обусловлено низким качеством поверхности и флуктуациями плотности полимера. В случае с композитными материалами данные факторы могут усугубляться неравномерным распределением частиц в матрице и образованием крупных агрегатов.

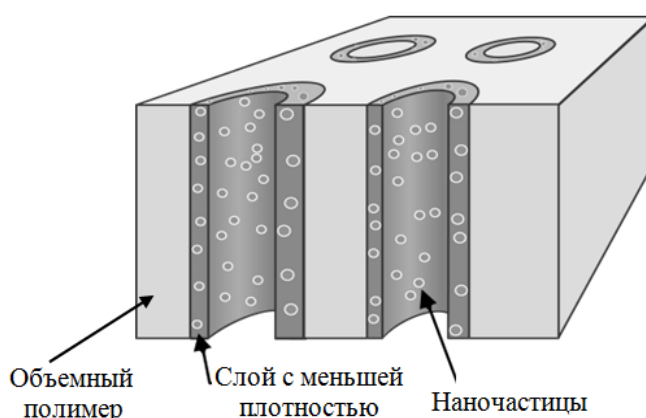


Рисунок 3.3 - Схематическое изображение трековой мембраны с внедренными наночастицами

При этом геометрия данных объектов такова, что для корректного измерения спектров поглощения и люминесценции зачастую требуется использование оптоволоконной приставки, что позволит регистрировать спектры с нескольких областей и делать выводы о неоднородности образца. Подробнее об этом в приложении А «Описание устройства приборов и

принципов их работы»). Регистрация люминесценции обычно осуществляется с относительно небольшого участка образца. Пространственная неоднородность образцов может приводить к получению недостоверной информации при однократном измерении. Таким образом, появляется необходимость в регистрации люминесценции от различных участков образца и в последующей статической обработке данных.

При наличии случайных погрешностей наблюдаемые значения измеряемой величины при многократных измерениях случайным образом рассеяны относительно ее истинного значения. В этом случае действительное значение находят как наиболее вероятное из серии отсчетов, а погрешность характеризуют шириной интервала, который с заданной вероятностью показывает истинное значение.

Наилучшей оценкой истинного значения величины X является *выборочное среднее значение*

$$\langle x \rangle = \frac{\sum_{n=1}^N x_n}{N}, \quad (3.1)$$

где x_n – отсчет величины N , – число отсчетов.

Для оценки разброса отсчетов при измерении используется *выборочное среднее квадратическое отклонение отсчетов*

$$S_x = \sqrt{\frac{\sum_{n=1}^N (x_n - \langle x \rangle)^2}{N - 1}}. \quad (3.2)$$

Выборочное среднее является случайной величиной, и его разброс относительно истинного значения измеряемой величины оценивается *выборочным средним квадратическим отклонением среднего значения*

$$S_{\langle x \rangle} = \frac{S_x}{\sqrt{N}}. \quad (3.3)$$

Доверительным интервалом называется интервал $[\langle x \rangle - \Delta, \langle x \rangle + \Delta]$, который с заданной степенью достоверности включает в себя истинное значение измеряемой величины.

Доверительной вероятностью (надежностью) результата серии наблюдений называется вероятность α , с которой доверительный интервал включает истинное значение измеряемой величины.

Случайную составляющую погрешности принято выражать как полуширину доверительного интервала. *Случайная составляющая погрешности многократных измерений*

$$\Delta_x = t_\alpha \times S_{\langle x \rangle}, \quad (3.4)$$

где t_α – безразмерный коэффициент доверия (коэффициент Стьюдента).

Таблица 3.1 - Коэффициенты Стьюдента

a =0,68		a =0,95		a =0,99	
n	$t_{a,n}$	n	$t_{a,n}$	n	$t_{a,n}$
2	2,0	2	12,7	2	63,7
3	1,3	3	4,3	3	9,9
4	1,3	4	3,2	4	5,8
5	1,2	5	2,8	5	4,6
6	1,2	6	2,6	6	4,0
7	1,1	7	2,4	7	3,7
8	1,1	8	2,4	8	3,5
9	1,1	9	2,3	9	3,4
10	1,1	10	2,3	10	3,3
15	1,1	15	2,1	15	3,0
20	1,1	20	2,1	20	2,9
30	1,1	30	2,0	30	2,8
100	1,0	100	2,0	100	2,6

ПОРЯДОК ВЫПОЛНЕНИЯ РАБОТЫ

1. Зарегистрировать спектры поглощения образцов без интегрирующей сферы.
 2. Установить интегрирующую сферу. Для этого выполнить последовательность операций:
 - 2.1. Выключить спектрофотометр.
 - 2.2. Вытащить блок со стандартным держателем образцов и вставить блок с интегрирующей сферой.
 - 2.3. Подключить кабели фотоумножителя и PbS детектора к разъемам на приборе. Подсоединить кабель фотоумножителя к заземлению.
- Включить прибор и повторить последовательность действий по инициализации. Записать спектр поглощения образца.

Внимание! Демонтаж и установка интегрирующей сферы осуществляется только в присутствии преподавателя!

3. Измерить спектры пропускания светофильтров, определить, какой из светофильтров должен устанавливаться в канал возбуждения, какой - в канал регистрации.
4. Установить волноводную приставку в спектрофлуориметр. Для этого вставить переходник от приставки в кюветное отделение таким образом, чтобы окошки ввода и вывода излучения в оптоволокно находились напротив соответствующих каналов прибора. Убедиться, что свет проходит по волокну. Для этого выбрать длину волны возбуждения в видимом диапазоне, установить минимально низкую скорость сканирования и посмотреть, попадает ли световое пятно на образец. В случае, если свет не попадает на образец, отрегулировать положение переходника в кюветном отделении, используя резиновые подкладки. После этого вернуться к средней скорости сканирования

и выбрать длину волны возбуждения и диапазон регистрации люминесценции, исходя из спектров поглощения образца и параметров фильтров.

5. Зарегистрировать спектр люминесценции образца без фильтров и с фильтрами;

В схеме с установленными фильтрами зарегистрировать спектры люминесценции с 10 различных областей образца.

СОДЕРЖАНИЕ ОТЧЕТА

1. Спектры поглощения образцов, зарегистрированные с интегрирующей сферой и без.
2. Выводы о роли интегрирующей сферы в регистрации спектров поглощения
3. Спектры люминесценции образцов с фильтрами и без фильтров.
4. Оценка пространственной неоднородности образца.

Работа является доработанной версией работы из пособия [6].

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Какие факторы необходимо учитывать для корректной записи спектров поглощения и люминесценции тонкоплёночных полимерных образцов?
2. Объяснить принцип работы интегрирующей сферы. Можно ли с её помощью записывать спектры поглощения непрозрачных образцов?
3. Зачем используют светофильтры при записи спектров люминесценции? Как осуществляется выбор светофильтров?
4. Каким образом можно оценить степень пространственной неоднородности образцов?

ЛИТЕРАТУРА

1. А.И. Гусев. Наноматериалы, наноструктуры, нанотехнологии. М.: Физматлит. 2009. 416 с. ISBN 978-5-9221-0582-8I.
2. D.G. Hendershot/ Organometallic chemical vapor deposition and characterization of indium phosphide nanocrystals in Vycor porous glass. *Ap.Phys. let.*, 1993, Т. 63, № 24, с. 3324-3326.
3. M.P. Pileni. *Nanocrystals forming mesoporous structures*. John Wiley&Sons, 2006.
4. P. Apel. Track etching technique in membrane technology/ *Radiation measurements*. 2001. Т. 34, с. 559-566.
6. J. R. Lakowicz «Principles of Fluorescence Spectroscopy», 2006 Springer Science+Business Media, LLC.
7. Громова Ю.А., Мартыненко И.В., Орлова А.О. Практическое использование наноструктур. Санкт-Петербург: СПб: НИУ ИТМО, 2014.

Лабораторная работа №4

ЛЮМИНЕСЦЕНТНЫЕ СВОЙСТВА САМООРГАНИЗОВАННЫХ НАНОСТРУКТУР

ЦЕЛЬ РАБОТЫ:

- Приобретение навыков работы на люминесцентном конфокальном микроскопе;
- приобретение навыков первичной обработки и анализа люминесцентных изображений и локальных спектров люминесценции самоорганизованных слоев коллоидных нанокристаллов.

ОБОРУДОВАНИЕ И РЕАКТИВЫ:

- Конфокальный люминесцентный микроскоп LSM710 (Zeiss, Германия);

ОБЪЕКТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

- Образцы самоорганизованных слоев коллоидных нанокристаллов на диэлектрических подложках.

ПОРЯДОК ВЫПОЛНЕНИЯ РАБОТЫ

1. Под руководством преподавателя выполнить настройку и фокусировку конфокального микроскопа в режиме регистрации люминесцентных изображений.
2. На конфокальном микроскопе [1] зарегистрировать 5 изображений образца в проходящем свете и в канале люминесценции в режиме “Channel mode”, используя для освещения образца лазер с длиной волны излучения 405 нм и выбранный преподавателем объектив. Должна быть проанализирована максимальная площадь сканирования. Участки сканирования должны быть выбраны следующим образом: центральная точка первого участка должна находиться примерно в середине образца, а середины второго, третьего, четвертого и пятого участков должны находиться в серединах I, II, III и IV квадрантов, считая, что начало координат совпадает с центром образца.
3. Провести первичный анализ полученных изображений образца.
 - 3.1. Определить минимальный структурный элемент сухого слоя нанокристаллов [2] по изображению в канале пропускания, оценить латеральные размеры этого элемента.
 - 3.2. Сопоставить данный элемент изображения в проходящем свете с соответствующим элементом в люминесцентном изображении. Оценить латеральные размеры люминесцирующего элемента.
 - 3.3. Сделать вывод о наличии/отсутствии нелюминесцирующих элементов в сухом слое НК.
 - 3.4. Сделать вывод о наличии/отсутствии упорядоченной структуры, состоящей из минимальных элементов.

3.5. Сделать вывод о наличии/отсутствии упорядоченной структуры во всех зарегистрированных областях образца.

4. Для одной из проанализированных областей образца зарегистрировать локальные спектры люминесценции в режиме “Lambda mode”, выбрав максимальную при выбранном объективе площадь сканирования и минимальный структурный элемент сухого слоя.

5. Для образца, в котором наблюдается упорядоченная структура НК, зарегистрировать локальные спектры люминесценции с различных участков структуры и сопоставить между собой полученные локальные спектры люминесценции (положение максимума, ширина полосы и интенсивность). Основываясь на результатах сопоставления, сделать вывод о наличии/отсутствии пространственной сегрегации НК по размерам из ансамбля одного среднего размера [3].

СОДЕРЖАНИЕ ОТЧЕТА

1. Изображения 5 участков образца, зарегистрированных в режиме «Channel Mode» в канале пропускания и в канале люминесценции. На изображениях должен быть выделен минимальный элемент структуры.

2. Описание изображений, содержащее результаты анализа самоорганизованных нанокристаллов согласно п. 3 раздела «Порядок выполнения работы».

3. Люминесцентное изображение участка образца, полученное на конфокальном микроскопе в режиме «Lambda Mode».

4. Спектры люминесценции, полученные при регистрации спектров люминесценции с максимально возможной области, а также с минимального элемента структуры.

5. Спектры люминесценции, полученные при регистрации спектров люминесценции с разных участков упорядоченной структуры.

6. Таблица, в которой приведены данные о локальных спектрах люминесценции образца.

№	Положение максимума, нм	Положение максимума, эВ	Ширина на половине высоты, нм	Ширина на половине высоты, эВ	Относительная интенсивность люминесценции, отн. ед.

8. Выводы о наличии/отсутствии пространственной сегрегации НК по размерам в упорядоченной структуре.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Экспериментальные проявления ферстеровского переноса энергии в упорядоченных структурах квантоворазмерных нанокристаллов.
2. Благодаря чему конфокальная микроскопия обеспечивает увеличение контраста изображения?
3. Причины возникновения упорядоченной структуры в сухих слоях коллоидных нанокристаллов на диэлектрических подложках.

ЛИТЕРАТУРА

1. Г.М. Свищев Конфокальная микроскопия и ультрамикроскопия живой клетки. М.: Физматлит, 2011. 120 с.
2. А.И. Гусев Наноматериалы, наноструктуры, нанотехнологии. М.: Физматлит. 2009. 416 с. ISBN 978-5-9221-0582-8I
3. Паркер. Фотолюминесценция растворов, глава 3 – аппаратура и методы эксперимента. М.: Мир,1972.

Лабораторная работа №5

ДЕТЕКТИРОВАНИЕ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ХИМИЧЕСКИХ СЕНСОРОВ

ЦЕЛЬ РАБОТЫ:

- Приобретение навыков обнаружения и идентификации активных форм кислорода, генерируемых фотосенсибилизаторами под действием внешнего электромагнитного излучения, с использованием химических сенсоров.

ОБОРУДОВАНИЕ И РЕАКТИВЫ:

- Спектрофотометр UV Probe 3600 (Shimadzu, Japan);
- фотометрическая кювета;
- фотосенсибилизатор активных форм кислорода (АФК);
- химический сенсор;
- дистиллированная вода;
- дозаторы;
- источник внешнего излучения.

ОБЪЕКТ ИССЛЕДОВАНИЯ:

- Водный раствор сенсибилизатора АФК.

ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ СВЕДЕНИЯ

В основном состоянии молекулярный кислород представляет собой относительно стабильную молекулу, спонтанно не реагирующую с различными макромолекулами. Это объясняется его электронной конфигурацией: основная форма кислорода в атмосфере ($^3\text{O}_2$) находится в триплетном состоянии. Однако аэробные организмы сталкиваются с постоянной опасностью, связанной с тем, что многие процессы с участием молекулярного кислорода сопровождаются образованием так называемых активных форм кислорода, АФК (ROS, Reactive Oxygen Species), обладающих чрезвычайно высокой реакционной способностью [1].

Молекула кислорода (O_2) содержит два неспаренных электрона и, таким образом, является *бирадикалом*. Однако неспаренные электроны расположены так, что молекула O_2 остаётся относительно стабильной. Тем не менее, если молекула присоединяет дополнительный электрон, образуется высоко реакционноспособный *супероксид-радикал* ($-\text{O}_2^-$). Следующая стадия восстановления приводит к *пероксид-аниону* ($-\text{O}_2^{2-}$), который легко связывает протоны и вследствие этого переходит в *пероксид водорода* (H_2O_2). Присоединение третьего электрона ведёт к расщеплению молекулы на ионы O_2^- и O^- . В то время как O_2^- - путём присоединения двух протонов

образует **воду**, протонирование O- приводит к особо опасному *гидроксил-радикалу* (-OH). Присоединение четвёртого электрона и заключительное протонирование O- заканчивается образованием воды. На рисунке 5.1 представлены электронные структуры некоторых АФК.

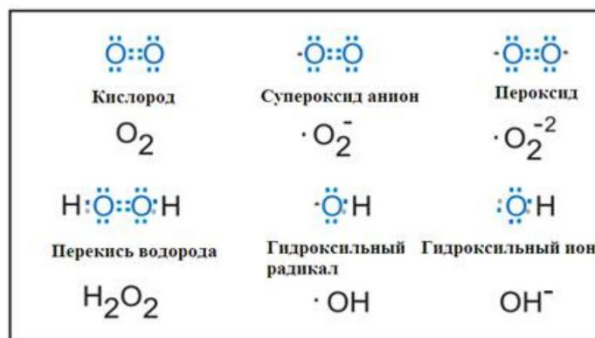
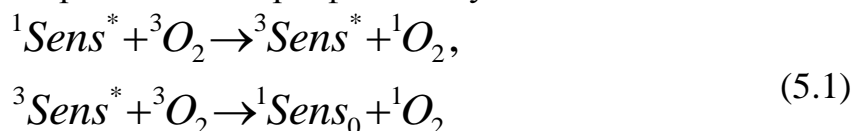


Рисунок 5.1 - Электронные структуры некоторых АФК

В 1928 г. Малликен, основываясь на теории молекулярных орбиталей, пришел к заключению, что молекула кислорода при фотовозбуждении способна заселять два низколежащих синглетных уровня [2]. Малликен предсказал существование еще одной полосы поглощения примерно у 1500 нм, которая в то время не была известна. В 1933–1934 гг. предсказание Малликена получило экспериментальное подтверждение [3]. Новая полоса была действительно обнаружена при ~1270 нм в спектрах поглощения жидкого кислорода и кислорода атмосферы.

В 1943 г. Теренин указал на то, что правила сохранения спина разрешают два механизма генерации 1O_2 красителями при фотовозбуждении:



где 1Sens_0 , ${}^1Sens^*$ и ${}^3Sens^*$ – молекулы фотосенсибилизаторов в основном и возбужденном синглетном и триплетном состояниях соответственно. Первый механизм возможен для ограниченного круга фотосенсибилизаторов, у которых энергетический зазор между триплетным и синглетным состояниями больше энергии одного из синглетных уровней кислорода. Второй механизм возможен для гораздо более широкого круга фотосенсибилизаторов, триплетный уровень которых расположен выше одного из синглетных уровней кислорода (рис. 5.2).

В 1952 г. Теренин и Ермолаев обнаружили эффективный процесс обменно-резонансного переноса энергии между триплетными уровнями молекул красителей [4]. Образование 1O_2 – следствие того же механизма с той разницей, что акцептором энергии является не краситель, а кислород. Оба предложенных Терениным механизма генерации 1O_2 были позже экспериментально обнаружены в газовой фазе и растворах.

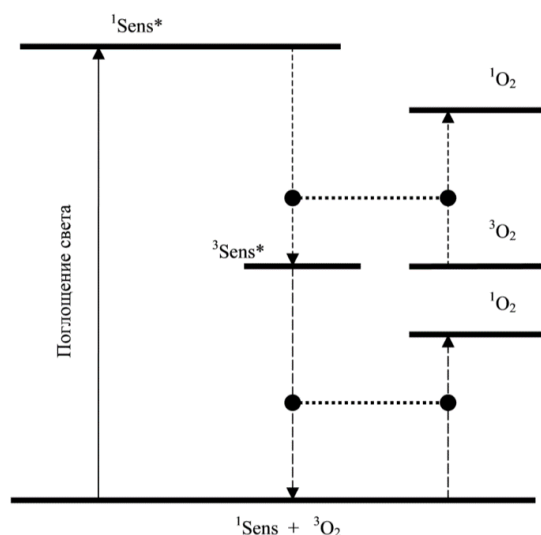


Рисунок 5.2 - Энергетическая схема механизмов генерации синглетного кислорода синглетным и триплетным состояниями красителей (механизмы Теренина). Горизонтальные прерывистые линии показывают, что дезактивация соответствующего возбужденного состояния красителя сопряжена с переходом кислорода в возбужденное состояние

Общим для всех этих соединений является их высокая реакционная способность. Все активные формы кислорода характеризуются наличием неспаренных электронов или нестабильных химических связей. АФК отличаются друг от друга реакционной способностью, временем жизни и механизмом воздействия на объекты.

Активные формы кислорода образуются как побочный продукт функционирования дыхательной цепи митохондрий, ферментами NADPH-оксидазами, ксантиноксидазой, ферментами эндоплазматического ретикулума и др [5]. Определение внутриклеточной концентрации АФК может выступать в качестве средства диагностики многих видов заболеваний. Кроме того, взаимодействие клеток с АФК приводит к так называемому окислительному стрессу и дальнейшему апоптозу или некрозу клетки. Этот факт нашел широкое применение в разработке систем для терапии бактериальных инфекций и онкологических заболеваний. Многие типы наноструктурированных материалов (сенсibilизаторов АФК), способных генерировать АФК с высокой эффективностью, показали антибактериальную активность на различных штаммах бактерий, в том числе устойчивых к антибиотикам. Сенсibilизаторы АФК нашли широкое применение в фотодинамической терапии онкологических заболеваний (ФДТ), принцип действия которой основан на способности фотосенсibilизаторов накапливаться в тканях опухоли и под действием излучения генерировать АФК.

Методы регистрации АФК можно классифицировать как прямые и непрямые [6]. К прямым методам регистрации синглетного кислорода можно отнести регистрацию кислорода на длине волны 1270 нм. Большинство приемников чувствительны в спектральной области до 800 нм. Кроме того,

регистрация люминесценции синглетного кислорода, характеризующейся коротким временем затухания люминесценции, является нетривиальной экспериментальной задачей. Непрямые методы основаны на взаимодействии АФК с зондирующей молекулой для получения более стабильного, долгоживущего продукта [7].

Аспекты, которые стоит учитывать при выборе метода регистрации АФК:

- (1) чувствительность;
- (2) селективность;
- (3) способность проводить измерения с быстрым разрешением по времени.

Спектроскопические методы регистрации (поглощение, люминесценция) являются наиболее широко применяемыми способами регистрации АФК в лабораторных условиях. Другие аналитические методы обнаружения АФК, такие как электронный парамагнитный (спиновый) резонанс (ЭПР), ядерный магнитный резонанс (ЯМР), дериватизация с участием специфичной функциональной группы и сопутствующей масс-спектрометрией (МС), также могут быть весьма полезны, но зачастую характеризуются высокой стоимостью и технической сложностью.

ПОРЯДОК ВЫПОЛНЕНИЯ РАБОТЫ:

1. Приготовить растворы сенсбилизатора АФК и сенсора, измерить их спектры поглощения, оценить концентрацию стоковых растворов. Необходимые данные о химическом составе и концентрации стокового раствора сенсбилизатора и химического сенсора сообщает преподаватель.
2. Зарегистрировать спектр поглощения сенсора АФК, определить по спектру положение максимума полосы поглощения сенсора.
3. Определить коэффициент экстинкции фотосенсбилизатора АФК на длине волны внешнего излучения, используемого для перевода сенсбилизатора в возбужденное состояние. Информацию о параметрах источника внешнего излучения сообщает преподаватель.
4. Приготовить смешанный водный раствор сенсбилизатора АФК и химического сенсора с концентрациями, заданными преподавателем.
5. Зарегистрировать спектр поглощения полученного образца.
6. Начать облучение образца внешним источником излучения, длина волны которого лежит в области поглощения сенсбилизатора АФК. В течение облучения периодически перемешивать раствор. Время экспозиции сообщает преподаватель.
7. Периодически регистрировать спектры поглощения образца и оценивать изменение оптической плотности в максимуме полосы поглощения химического сенсора. Количество периодов облучения задает преподаватель.

ОБРАБОТКА ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ДАННЫХ

1. Построить спектры поглощения образца, содержащего сенсibilизатор АФК и химический сенсор, соответствующие разному времени облучения образца.
2. Проанализировать изменение оптической плотности сенсора в максимуме полосы поглощения сенсора.
3. Построить и проанализировать зависимость оптической плотности в максимуме полосе поглощения сенсibilизатора АФК от времени воздействия внешнего излучения на образец.
4. Построить зависимости изменения оптической плотности сенсора ($\Delta D_{\text{сенсор}}$) и сенсibilизатора АФК ($\Delta D_{\text{сенсibilизатор}}$) от времени облучения образца.
5. Сделать выводы о наличии/ генерации АФК сенсibilизатором.

СОДЕРЖАНИЕ ОТЧЕТА

1. Спектры поглощения сенсibilизатора АФК и химического сенсора.
2. Спектры поглощения полученного раствора в течение облучения образца внешним излучением.
3. Таблица с зависимостью оптической плотности сенсора и сенсibilизатора от времени облучения.

№ цикла облучения	Время облучения, t мин	$D_{\text{сенсор}}$	$\Delta D_{\text{сенсор}} (D_0 - D_t)$	$D_{\text{сенсibilизатор}}$	$\Delta D_{\text{сенсibilизатор}} (D_0 - D_t)$
1					
2					
3					
....					

4. Выводы о генерации АФК сенсibilизатором.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Механизм образования некоторых АФК за счет присоединения дополнительных электронов.
2. Положение максимума люминесценции синглетного кислорода.
3. Необходимое условие для осуществления генерации синглетного кислорода по механизму Теренина.
4. На чем основаны не прямые методы детектирования АФК?

ЛИТЕРАТУРА

1. Новиков К. Н. Свободно-радикальные процессы в биологических системах при воздействии факторов окружающей среды. Монография. – 2011.
2. Mulliken R.S. // *Nature*. 1928. V. 122. No 3075. P. 505.
3. Ellis J. M., Kneser H.O. // *Z. Physik*. 1933. B. 86. No 3. S. 583–591.
4. Теренин А.Н., Ермолаев В.Л. // *Докл. АН СССР*. 1952. Т. 85. № 3. С. 547–550.
5. Dharmaraja A. T. Role of reactive oxygen species (ROS) in therapeutics and drug resistance in cancer and bacteria // *Journal of Medicinal Chemistry*. – 2017. – Т. 60. – №. 8. – С. 3221-3240.
6. Zafiriou O. C. et al. Molecular probe systems for reactive transients in natural waters // *Marine Chemistry*. – 1990. – Т. 30. – С. 45-70.
7. Burns J. M. et al. Methods for reactive oxygen species (ROS) detection in aqueous environments // *Aquatic Sciences*. – 2012. – Т. 74. – №. 4. – С. 683-734.

Лабораторная работа №6

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОПТИМАЛЬНЫХ УСЛОВИЙ ДЛЯ БЕЗЫЗЛУЧАТЕЛЬНОГО РЕЗОНАНСНОГО ПЕРЕНОСА ЭНЕРГИИ В КОМПЛЕКСАХ КВАНТОВЫХ ТОЧЕК С ОРГАНИЧЕСКИМИ МОЛЕКУЛАМИ

ЦЕЛЬ РАБОТЫ:

- Определение оптимального размера квантовых точек заданного химического состава для эффективного переноса энергии от квантовых точек к органическим молекулам.

ОБОРУДОВАНИЕ И РЕАКТИВЫ:

- Спектрофотометр UV Probe 3600 (Shimadzu, Япония);
- спектрофлуориметр Cary Eclipse (Varian, Австралия);
- фотометрические кюветы;
- полупроводниковые квантовые точки;
- органический краситель.

ОБЪЕКТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

- Коллоидные растворы КТ разного размера;
- коллоидный раствор органических молекул.

ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ СВЕДЕНИЯ

В настоящее время большой интерес представляет создание гибридных структур с уникальными характеристиками, возникающими в результате комбинирования свойств компонентов, входящих в их состав. В частности, интенсивно ведутся работы по созданию и исследованию свойств комплексов коллоидных полупроводниковых нанокристаллов, квантовых точек (КТ), с органическими соединениями. Уникальные свойства КТ позволяют использовать их в качестве универсального донора энергии в гибридных структурах с органическими молекулами.

Перенос энергии – это способность одной компоненты системы передать энергию возбуждения другой компоненте. Одним из механизмов переноса энергии является диполь-дипольный безызлучательный резонансный перенос энергии (Förster Resonant Energy Transfer, FRET), теория которого была разработана Фёрстером [1].

FRET можно определить как явление, при котором первично возбуждённая частица (молекула, ион, комплекс) – донор энергии вступает во взаимодействие с другой частицей – акцептором энергии, находящимся на расстоянии, меньшем длины волны излучения первой. В результате взаимодействия появляется дополнительная вероятность для перехода частицы донора в основное состояние с одновременным переходом частицы акцептора из основного состояния в возбуждённое (рисунок 6.1).

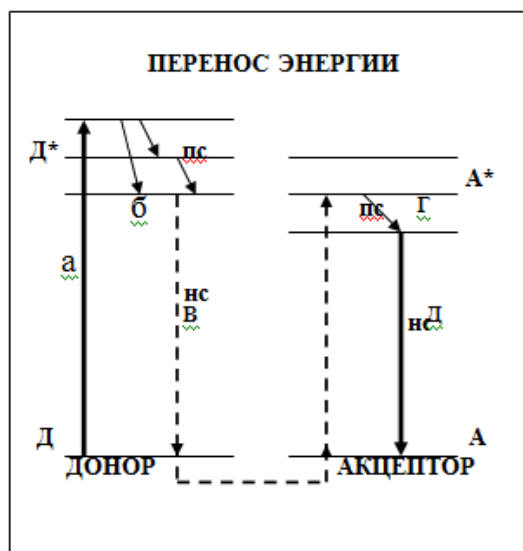


Рисунок 6.1 - Схема безызлучательного переноса энергии

Этот процесс приводит к тушению люминесценции донора и увеличению интенсивности люминесценции акцептора.

Квантовомеханическую теорию безызлучательного переноса энергии между молекулами в растворах впервые разработал в 1947 году Фёрстер. Полученное им выражение для вероятности переноса энергии содержит только экспериментально измеряемые величины. Теория Фёрстера прошла широкую экспериментальную проверку и подтверждена многочисленными прямыми экспериментами. Следует отметить, что до сих пор основная масса экспериментальных результатов по безызлучательному переносу энергии удовлетворительно описывается в рамках теории Фёрстера, исключая случаи, когда в переносе энергии участвуют запрещённые переходы.

Весь процесс переноса энергии можно разбить на ряд этапов: (рисунок 6.1)

- а) поглощение молекулой донора энергии с переходом в возбуждённое состояние (поглощение кванта света);
 - б) колебательная релаксация в возбуждённом состоянии донора;
 - в) передача возбуждения от донора к акцептору;
 - г) колебательная релаксация в молекуле акцептора;
- скорости процессов «б» и «г» велики и равны $10^{11}-10^{12} \text{ с}^{-1}$;
- процесс «г» очень важен в акте безызлучательного переноса энергии, так как при этом система выходит из резонанса и обратный перенос энергии становится невозможным;
- д) излучение или деградация энергии в акцепторе.

В случае индуктивно-резонансных взаимодействий решение квантовомеханической задачи с выражением интегралов Франка-Кондона через молярный десятичный коэффициент экстинкции $\varepsilon_A(\nu)$ и квантовую спектральную плотность излучения люминесценции $I_D^H(\nu)$ позволяет получить выражение для константы скорости переноса энергии для диполь-дипольных взаимодействий:

$$k_{II}^{dd}(R) = \frac{9000 \cdot \ln 10 \cdot \Phi^2 \cdot q_{0D}}{128 \cdot \pi^5 \cdot n^4 \cdot N \cdot \tau_{0D} \cdot R^6} \times I, \quad (6.1)$$

$$I = \int I_D^H(\nu) \cdot \varepsilon_A(\nu) \cdot \nu^{-4} \cdot d\nu, \quad (6.2)$$

где N – число Авогадро, q_{0D} – квантовый выход донора в отсутствии тушителя, n – коэффициент преломления растворителя, τ_{0D} – время жизни возбужденного состояния донора в отсутствии тушителя, Φ – ориентационный фактор, характеризующий связь углов между направлениями дипольных моментов переходов в доноре и акцепторе с углами между направлениями дипольных моментов переходов в соответствующих молекулах и вектором, соединяющим молекулы донора и акцептора. Если скорость броуновского вращения молекул достаточно велика, то $\Phi^2=2/3$. В случае неподвижных молекул (твёрдые растворы), когда все ориентации дипольных моментов переходов в доноре и акцепторе равновероятны $\Phi^2=0.84 \times 2/3$. I – интеграл перекрытия, отражающий степень спектрального перекрытия люминесценции донора и поглощения акцептора.

Квантовая спектральная плотность излучения люминесценции $I_D^H(\nu)$ является нормированной интенсивностью флуоресценции донора в шкале волновых чисел ν в диапазоне от ν до $\nu + \Delta\nu$, причем суммарная интенсивность принимается равной единице.

Эффективность межмолекулярного диполь-дипольного перехода можно характеризовать критическим расстоянием R_0 – расстоянием между донором и акцептором, на котором вероятность переноса равна вероятности спонтанной дезактивации донора:

$$k_i(R_0) = \frac{1}{\tau_{0D}}. \quad (6.3)$$

Под критическим радиусом R_0 обычно понимается расстояние между донором и акцептором, при котором вероятности излучательной релаксации донора и переноса энергии от донора к акцептору по механизму FRET равны. Тогда

$$k_i^{dd}(R) = \frac{1}{\tau_{0D}} \left(\frac{R_0}{R} \right)^6, \quad (6.4)$$

$$R_0^6 = \frac{9000 \cdot \ln 10 \cdot \Phi^2 \cdot q_{0D}}{128 \cdot \pi^5 \cdot n^4 \cdot N} \int I_D^H(\nu) \cdot \varepsilon_A(\nu) \cdot \nu^{-4} \cdot d\nu.$$

Важно отметить, что формулы (6.1) и (6.2) пригодны в том случае, когда рассматриваемые переходы имеют дипольный характер.

Таким образом, согласно теории Ферстера, для эффективного переноса энергии по механизму FRET в выбранной донорно-акцепторной паре необходимо одновременное выполнение двух условий:

- 1) Расстояние между донором и акцептором не должно превышать критический радиус (R_0).
- 2) Спектр поглощения акцептора должен перекрываться со спектром люминесценции донора (рисунок 6.2). Интеграл перекрытия данных спектров влияет на эффективность переноса энергии.

Один из способов оценки эффективности переноса энергии состоит в использовании формулы Фёрстера:

$$E_t = \frac{1}{1 + \left(\frac{R_{DA}}{R_0}\right)^6} . \quad (6.5)$$



Рисунок 6.2 -Расположения спектров поглощения и люминесценции донорно-акцепторной пары для эффективного переноса энергии

Одним из первоначальных этапов создания подобных комплексов является поиск подходящих донорно-акцепторных пар, между которыми возможен эффективный перенос энергии. В случае квантовых точек эффект размерного квантования позволяет достаточно легко подобрать подходящий донор энергии для выбранной органической молекулы просто изменяя размер нанокристаллов.

ПОРЯДОК ВЫПОЛНЕНИЯ РАБОТЫ

1. Приготовить рабочие растворы органического красителя и квантовых точек двух размеров.
2. Зарегистрировать спектры поглощения и люминесценции рабочего раствора органического красителя.
3. По спектру поглощения определить концентрацию стокового раствора красителя с использованием формулы Бугера-Ламберта-Бера. Коэффициент экстинкции органического красителя получить у преподавателя.
4. Измерить спектры поглощения и люминесценции рабочих растворов квантовых точек двух размеров.
5. Проанализировав спектры люминесценции квантовых точек и спектр поглощения органического красителя, выбрать оптимальную донорно-

акцепторную пару с максимальным перекрытием люминесценции донора и поглощением акцептора [2].

ОБРАБОТКА ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ДАННЫХ

Используя полученные спектры люминесценции донора и поглощения акцептора, рассчитать интеграл перекрытия I и эффективность переноса энергии E_{theor} по формулам (6.2) и (6.5) для выбранной донорно-акцепторной пары.

СОДЕРЖАНИЕ ОТЧЕТА

1. Спектры поглощения органического красителя и спектры люминесценции квантовых точек.
2. Вывод об оптимальной донорно-акцепторной паре.
3. Рассчитанные значения интеграла перекрытия и эффективности переноса энергии для выбранной донорно-акцепторной пары.

Работа является доработанной версией работы из пособия [3].

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Дайте определение безызлучательному переносу энергии.
2. Каким условиям должна удовлетворять донорно-акцепторная пара для осуществления в ней переноса энергии по механизму FRET?
3. Что понимается под критическим радиусом?

РЕКОМЕНДОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. Ермолаев В.Л., Бодунов Е.Н., Свешникова Е.Б., Шахвердов Т.А. /Безызлучательный перенос энергии электронного возбуждения. // Л.: «Наука», (1977) 311 с.
2. I. V. Martynenko, A.O. Orlova, V.G. Maslov, A.V. Baranov, A.V. Fedorov, M. Artemyev. Energy transfer in complexes of water-soluble quantum dots and chlorin e6 molecules in different environments. Beilstein journal of nanotechnology, 2013, T. 4, № 1, с. 895-902.
3. Громова Ю.А., Мартыненко И.В., Орлова А.О. Практическое использование наноструктур. Санкт-Петербург: СПб: НИУ ИТМО, 2014.

Лабораторная работа №7

ОПТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА КОМПЛЕКСОВ КВАНТОВЫХ ТОЧЕК С ОРГАНИЧЕСКИМИ МОЛЕКУЛАМИ В ВОДНЫХ СРЕДАХ

ЦЕЛИ РАБОТЫ:

- Приобретение навыков формирования комплексов квантовых точек с органическими молекулами в водных средах;
- приобретение навыков анализа зависимости люминесцентных свойств квантовых точек от концентрации органических молекул в растворе.

ОБОРУДОВАНИЕ И РЕАКТИВЫ:

- Спектрофотометр UV Probe 3600 (Shimadzu, Япония);
- спектрофлуориметр Cary Eclipse (Varian, Австралия);
- фотометрические кюветы;
- водорастворимые полупроводниковые квантовые точки;
- водный раствор органических молекул.

ОБЪЕКТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ:

- Водные растворы комплексов квантовых точек с органическими молекулами

ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ СВЕДЕНИЯ

Среди органических молекул существует большой класс органических красителей – тетрапиррольных соединений, способных эффективно генерировать активные формы кислорода и, в частности, синглетный кислород. В настоящее время тетрапиррольные соединения (порфирины и производные фталоцианинового ряда) вызывают большой интерес с точки зрения терапии злокачественных новообразований. При введении в организм они обладают способностью селективно накапливаться в зараженных участках ткани. Под воздействием излучения с длиной волны, соответствующей одному из максимумов поглощения вещества, тетрапиррольные соединения способны генерировать синглетный кислород. Эта активная форма кислорода разрушает окружающие клетки ткани. На этом принципе основан фотодинамический эффект и сравнительно новый метод лечения онкологических заболеваний — фотодинамическая терапия рака (ФДТ), в которой тетрапиррольные соединения выступают в роли фотосенсибилизатора.

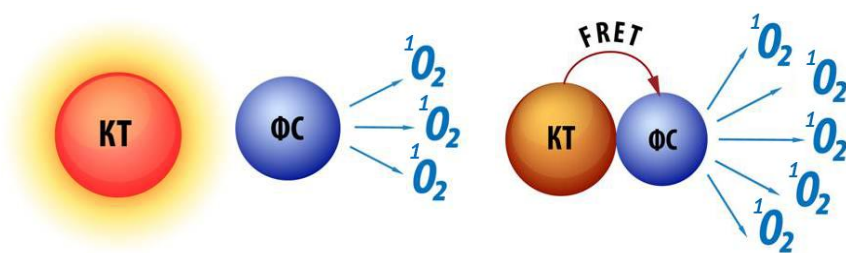


Рисунок 7.1 - Система квантовая точка (КТ) - молекула фотосенсибилизатора (ФС) с эффективной генерацией синглетного кислорода для терапии онкологических заболеваний: между КТ и молекулой осуществляется безызлучательный резонансный перенос энергии (FRET)

Все тетрапиррольные соединения, которые применяются в ФДТ, имеют ряд существенных недостатков: высокая токсичность, длительный период выведения из организма, необходимость индивидуального подбора источника возбуждающего излучения. Создание комплексов на основе полупроводниковых КТ и тетрапиррольных соединений позволит увеличить эффективность генерации синглетного кислорода благодаря безызлучательному переносу энергии по механизму безызлучательного резонансного переноса энергии (FRET) от КТ к молекуле. В настоящее время в мире активно ведутся исследования по созданию комплексов полупроводниковых нанокристаллов с различными органическими молекулами фотосенсибилизаторов. Поскольку квантовые точки имеют широкий диапазон поглощения света, то для комплексов типа КТ/ОМ решается проблема селективного подбора источника возбуждающего излучения. Увеличение эффективности генерации синглетного кислорода может позволить снизить терапевтическую дозу фотосенсибилизатора, либо время облучения поражённых участков ткани [1].

В применении к комплексам КТ с тетрапиррольными соединениями можно рассматривать три основных механизма связывания: ковалентное связывание, координационное связывание и электростатическое взаимодействие. Создание комплексов КТ с органическими молекулами в общем случае означает простое смешивание растворов двух компонент. Однако у каждого типа связывания квантовых точек с органическими молекулами в комплекс имеются свои особенности.

Ковалентный тип связывания. В данном случае компоненты связываются в комплекс при помощи ковалентной связи, образованной перекрытием (обобществлением) пары валентных электронных облаков. Как показано на рис. 7.2, ковалентное связывание КТ и молекул тетрапиррольного ряда обычно проводится с использованием специальных молекул-линковщиков карбодиимида N -ethyl- N (3-succinimide)carbodiimide) и гидроксисукцимида (N -hydroxysuccinimide), которые используются для связывания карбоксильной группы ($-\text{COOH}$) с амино группой ($-\text{NH}_2$). Некоторые тетрапиррольные соединения имеют функциональные карбоксильные или аминогруппы, для создания этих групп на поверхности КТ их предварительно солубилизируют молекулами тиольного ряда или пассивируют пептидами.

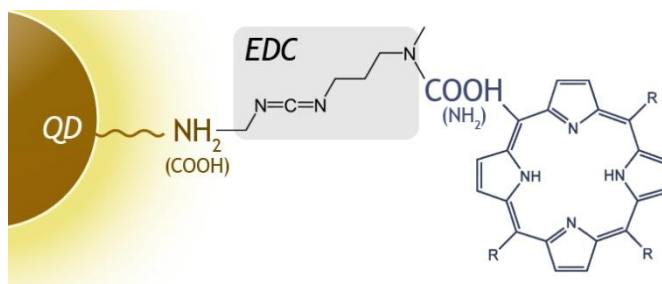


Рисунок 7.2 - Схема ковалентного связывания КТ и тетрапиррольной молекулы

К числу достоинств данного типа связывания следует отнести: высокую степень устойчивости комплексов, полное отсутствие их диссоциации при обычных условиях, достаточно жестко фиксированное расстояние между КТ и тетрапиррольной молекулой в комплексе. Недостатками являются: относительная трудоемкость получения комплексов, наличие ограничений на используемые объекты (необходимость наличия аминогруппы с одной стороны и карбоксильной группы с другой), а также относительно большие расстояния между КТ и молекулой, что ограничивает эффективность всех типов взаимодействий между ними, включая внутрикомплексный перенос энергии фотовозбуждения.

Электростатическое взаимодействие является самым простым и легким способом образования комплексов, который заключается в том, что противоположно заряженные компоненты в растворе притягиваются друг к другу с помощью кулоновских сил, как представлено на рис. 7.3.

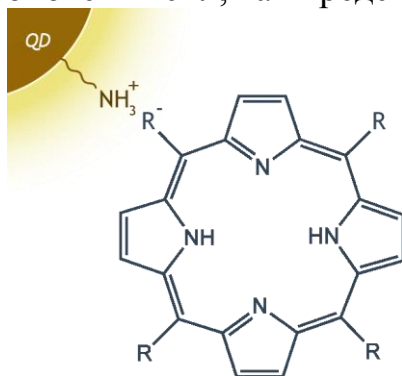


Рисунок 7.3 - Схема электростатического взаимодействия КТ и тетрапиррольной молекулы

Разноименный заряд компонентов комплекса образуется при диссоциации молекул солилизатора КТ и функциональных групп тетрапиррольных соединений в растворе. Он прост в реализации: как правило, достаточно приготовить отдельно растворы КТ и тетрапиррольного соединения нужных концентраций и слить их вместе. Однако, как показывают существующие исследования, при электростатическом взаимодействии могут возникать различные изменения спектральных форм тетрапиррольного компонента, что может привести к изменению его фотофизических свойств.

Если в экспериментах по образованию комплексов между водорастворимыми квантовыми точками и тетрапиррольными соединениями в качестве тетрапиррольного компонента используется металлопроизводное, способное к присоединению осевых лигандов, то это обстоятельство также может быть использовано как один из механизмов комплексообразования. Координационное связывание, возможно, является наиболее распространенным типом связывания при образовании комплексов КТ с тетрапирролами. При этом целесообразно различать два случая: (1) лиганд со стороны тетрапиррола координируется на поверхностный атом металла КТ и (2) лиганд со стороны органической оболочки КТ координируется на центральный атом металла тетрапиррольного кольца, как показано на рис. 7.4.

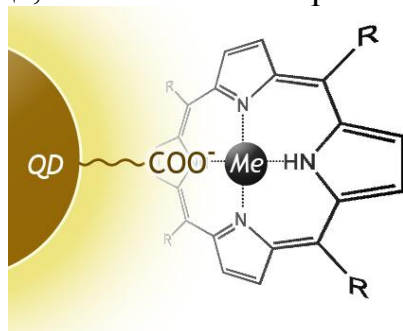


Рисунок 7.4- Схема координационного связывания КТ и тетрапиррольной молекулы

Координационный тип связывания в комплекс КТ с тетрапиррольными молекулами наиболее просто реализовать в гидрофобных системах, поскольку в водных средах поверхность квантовых точек и молекулы, как правило, заряжены. Это приводит к тому, что кулоновское взаимодействие между КТ и молекулами препятствует образованию координационной связи. Так, в случае противоположно заряженных частиц в большинстве случаев комплексы образуются в результате электростатического взаимодействия разноименно заряженных групп на поверхности КТ и молекул. В случае же одноименно заряженных КТ и тетрапирролов между частицами возникает кулоновское взаимодействие, которое приводит к возникновению энергетического барьера и тем самым препятствует образованию координационной связи. В последнем случае образование координационной связи в водных средах возможно, однако эффективность этого процесса напрямую зависит от величины поверхностного заряда КТ и молекул. В данной работе комплекс КТ с органической молекулой создавался за счет электростатического взаимодействия разноименно заряженных КТ и молекулы.

Одним из наиболее характерных проявлений комплексообразования является тушение люминесценции квантовых точек в результате связывания в комплекс с тетрапиррольными или им подобными молекулами [2]. В большинстве случаев при исследовании процессов комплексообразования изучается концентрационная зависимость эффективности тушения люминесценции КТ от концентрации молекул. Целесообразно различать два случая тушения люминесценции в комплексе: (1) случай, когда присоединение

к КТ хотя бы одной молекулы приводит к полному тушению люминесценции КТ и (2) случай, когда такое присоединение приводит к частичному тушению люминесценции КТ. Первый из указанных случаев более прост в рассмотрении, так как в этом случае вся наблюдаемая люминесценция квантовых точек относится к нанокристаллам, не связанным в комплекс.

Независимо от типа связывания, предельное число молекул, которые в каждом конкретном случае могут быть присоединены к одной квантовой точке, зависит от числа поверхностных атомов металла и, соответственно, числа молекул солибилизатора. В силу размера КТ число поверхностных атомов металла и/или число молекул солибилизатора, как правило, составляет несколько десятков, как схематично представлено на рис. 7.5.

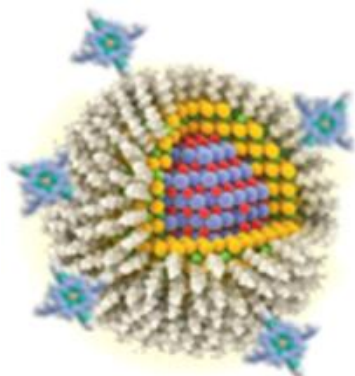


Рисунок 7.5 - Схема возможной стехиометрии комплекса КТ-тетрапиррольная молекула с соотношением среднего числа органических молекул на одну квантовую точку $n \geq 1$

В этом случае количество органических молекул, связанных в комплекс с квантовыми точками, должно подчиняться статистическому распределению Пуассона. Будем также предполагать выполнение следующих условий:

1. В смеси КТ и молекул тушителя наблюдается люминесценция только свободных КТ.
2. Присоединение хотя бы одной молекулы тушителя к КТ полностью тушит люминесценцию КТ.
3. Для определенности будем также предполагать, что равновесие комплексообразования полностью смещено в сторону комплексов, т.е. свободные молекулы тушителя в смеси отсутствуют.

Обозначим через A ($0 < A < 1$) часть КТ, способных связываться с молекулами тушителя. Соответственно $(1 - A)$ – часть КТ, которые не могут образовывать комплекс с молекулами. Тогда вероятность того, что с КТ связаны x молекул, определяется формулой Пуассона:

$$P(x, t) = \frac{t^x}{x!} e^{-t}, \quad (7.1)$$

где t – среднее число органических молекул, связанных с одной КТ, способной образовывать комплекс с молекулой тушителя в смеси. Очевидно, что среднее число молекул, приходящихся на одну КТ, будет определяться выражением

$$t = \frac{C_M}{C_{КТ} \cdot A}, \quad (7.2)$$

где C_M – концентрация молекул в смеси, $C_{КТ}$ – общая концентрация КТ в растворе. Таким образом, концентрационная зависимость интенсивности люминесценции квантовых точек в комплексах с молекулами носит экспоненциальный характер.

Поскольку люминесцируют только свободные КТ, то относительная интенсивность люминесценции КТ в смеси с молекулами будет определяться выражением

$$\frac{I}{I_0} = A \exp\left(-\frac{C_M}{AC_{КТ}}\right) + (1 - A), \quad (7.3)$$

где I – интенсивность люминесценции КТ в смеси с молекулами, I_0 – люминесценция КТ в отсутствие молекул тушителя.

Анализ экспериментальных концентрационных зависимостей эффективности тушения люминесценции КТ при связывании с тетрапиррольными молекулами позволяет получить информацию о стехиометрии комплексов и физическом механизме тушения люминесценции нанокристаллов. На рис. 7.6 приведена зависимость интенсивности люминесценции квантовых точек CdSe/ZnS от соотношения компонентов в смеси ($n = C_M / C_{КТ}$).

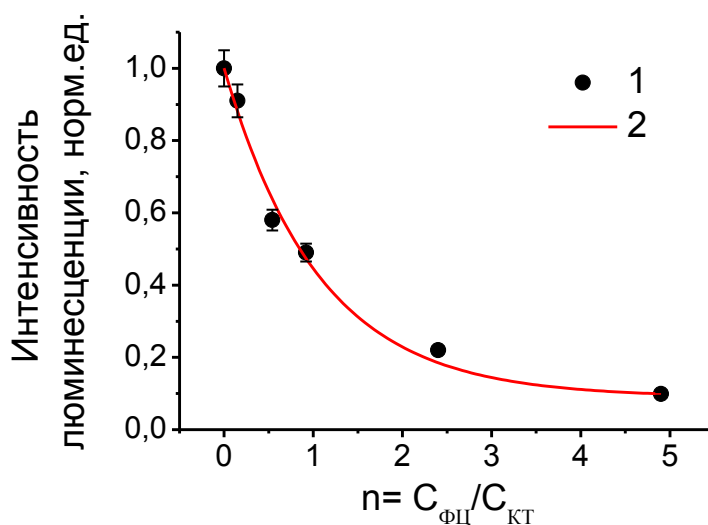


Рисунок 7.6 - Зависимость интенсивности люминесценции (I/I_0) CdSe/ZnS КТ от соотношения концентраций $C_M / C_{КТ}$ в комплексах КТ/ФЦ: 1 - экспериментальные данные; 2 - аппроксимация функцией $y = 0,91 \cdot \exp(-0,94 \cdot n) + 0,09$

Анализ тушения люминесценции КТ при добавлении молекул фталоцианина (рис. 7.6) показывает, что зависимость относительной интенсивности люминесценции квантовых точек I/I_0 от n близка к экспоненциальной: $I/I_0 = 0,91 \cdot \exp(-0,94 \cdot n) + 0,09$ с показателем экспоненты

~ 0.94 , $A = 0.91$. Заметим, что показатель экспоненты здесь имеет физический смысл среднего числа КТ, которые образуют комплекс с одной молекулой, следовательно, в данном эксперименте одна молекула фталоцианина в среднем тушит одну квантовую точку. Значения $A=0.91$ показывают долю КТ, связанных с молекулами, в данном случае высокие показатели A показывают, что практически все квантовые точки в растворе связаны с молекулами фталоцианина.

В комплексах с тетрапиррольными молекулами физический механизм тушения люминесценции нанокристаллов является принципиально важным, поскольку КТ в данном случае используются в качестве доноров энергии. Практически во всех работах, в которых тушение люминесценции квантовых точек в комплексах с тетрапиррольными молекулами рассматривается как результат переноса энергии фотовозбуждения от КТ к молекулам, предполагается, что перенос энергии осуществляется по механизму FRET [3]. Основными проявлениями FRET в эксперименте являются тушение люминесценции донора и увеличение интенсивности люминесценции акцептора. Измерение этих величин позволяет определить эффективность FRET.

В предыдущей лабораторной работе предлагалось вычислить эффективность FRET $E_{.theor.}$ с использованием формулы Фёрстера:

$$E_{.theor.} = \frac{1}{1 + \left(\frac{R_{DA}}{R_0} \right)^6}, \quad (7.4)$$

где R_{DA} – расстояние между донором и акцептором; R_0 – критический радиус (расстояние между донором и акцептором на котором вероятность переноса энергии равна вероятности спонтанной дезактивации донора).

Следует отметить, что формула Ферстера не учитывает возможность возникновения конкурентных каналов безызлучательной дезактивации возбужденного состояния донора при комплексообразовании, что может приводить к тушению интенсивности люминесценции донора. Очевидно, что в тех случаях, когда в комплексе между донором и акцептором имеется тесный контакт, вероятность возникновения новых каналов безызлучательной дезактивации донора достаточно велика. И тогда применение формулы (7.4) становится некорректным. Также при комплексообразовании зачастую происходит существенное возмущение органических молекул, сопровождающееся изменением их спектральной формы и квантового выхода люминесценции. Эти изменения должны быть также учтены при оценке эффективности FRET.

Поэтому более корректным способом оценки эффективности FRET является экспериментальное измерение тушения люминесценции донора и сенсбилизации люминесценции акцептора. Если в комплексе с квантовыми точками тетрапиррольная молекула сохраняет способность люминесцировать,

экспериментальную эффективность переноса энергии можно определить следующим образом:

$$E_{\text{exp}} = \frac{I_{\text{сенси}}(\lambda_{\text{КТ}}^{\text{ex}}) \cdot D_M(\lambda_M^{\text{ex}})}{I_M(\lambda_M^{\text{ex}}) \cdot D_{\text{КТ}}(\lambda_{\text{КТ}}^{\text{ex}}) \cdot F}, \quad (7.5)$$

где $I_{\text{сенси}}$ – интенсивность сенсibilизированной донором люминесценции акцептора (с учетом вклада прямого возбуждения люминесценции акцептора; I_M – интенсивность люминесценции акцептора, связанного в комплекс с донором, в отсутствие возбуждения донора; $\lambda_{\text{КТ}}$ и λ_M – длины волн возбуждения люминесценции, на которых доминирующий вклад в поглощение смеси имеет квантовые точки и молекулы красителя соответственно; F – степень тушения люминесценции КТ:

$$F = 1 - \frac{I}{I_0}, \quad (7.6)$$

где I , I_0 – интенсивность люминесценции КТ в присутствии и отсутствии молекул соответственно.

Применение формулы (7.5) является более корректным, чем формулы (7.4), поскольку возможно и в тех случаях, когда образование комплексов приводит к появлению дополнительных безызлучательных процессов в доноре (КТ), а также в тех случаях, когда квантовый выход люминесценции акцептора в комплексе отличается от квантового выхода люминесценции свободного акцептора.

Для того, чтобы определить интенсивность сенсibilизированной донором люминесценции акцептора $I_{\text{сенси}}$ при возбуждении светом с длиной волны преимущественного поглощения КТ, необходимо вычислить вклад прямого возбуждения донора в зарегистрированную интенсивность люминесценции смеси $I_{\text{смеси}}^{\text{зар}}$ и вычесть его из зарегистрированной люминесценции смеси $I_{\text{смеси}}^{\text{зар}}$ по формуле:

$$I_{\text{сенси}}(\lambda_{\text{КТ}}^{\text{ex}}) = I_{\text{смеси}}^{\text{зар}}(\lambda_{\text{КТ}}^{\text{ex}}) - \frac{I_M(\lambda_M^{\text{ex}})D_{\text{КТ}}(\lambda_{\text{КТ}}^{\text{ex}})}{D_M(\lambda_M^{\text{ex}})}. \quad (7.7)$$

ПОРЯДОК ВЫПОЛНЕНИЯ РАБОТЫ

1. Приготовить раствор КТ с рабочей концентрацией КТ $C_{\text{КТ}}$ в диапазоне 10^{-7} – 10^{-6} М (размер КТ выбирается в ходе предыдущей работы).
2. Зарегистрировать спектры поглощения и люминесценции раствора КТ.
3. По спектру поглощения КТ вычислить концентрацию КТ $C_{\text{КТ}}$ в растворе.
4. Получить стоковый раствор красителя у преподавателя. Добавить в раствор КТ порцию раствора красителя так, чтобы соотношение концентраций $n = C_M / C_{\text{КТ}}$ в смеси стало 0.25 (одна молекула красителя на четыре КТ). Для выполнения этого пункта воспользоваться вычисленным в предыдущей

лабораторной работе значением концентрации раствора красителя C_M , затем определить объем добавки стокового раствора красителя V_M в раствор КТ по формуле:

$$V_M = \frac{C_{КТ} n V_{КТ}}{C_M}, \quad (7.8)$$

где $V_{КТ}$ – объем раствора КТ.

5. Зарегистрировать спектры поглощения смешанного раствора.
6. Выбрать длины волн возбуждения люминесценции образца необходимые для оценки эффективности FRET. Для этого проанализировать спектры поглощения КТ (полученные в пункте 2) и красителя (взять из предыдущей лабораторной работы). Выбрать λ_{EX} в спектральной области, где находится локальный минимум поглощения красителя, при этом поглощение КТ велико.
7. Зарегистрировать спектры люминесценции.
8. Сделать несколько добавок красителя так, чтобы соотношение компонентов в смеси было равно 0.5; 0.75; 1 и 2, после каждой добавки мерить спектры поглощения и люминесценции.

ОБРАБОТКА ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ДАННЫХ

1. Построить спектры поглощения и люминесценции смеси для всех добавок.
2. По спектрам поглощения смесей вычислить концентрации красителя C_M и соотношение концентраций КТ и красителя $n = C_M / C_{КТ}$ для всех добавок.
3. Проанализировать спектры люминесценции КТ для всех добавок и построить зависимость относительной интенсивности люминесценции КТ (I/I_0) от соотношения концентрации КТ и красителя в смеси n .
4. Аппроксимировать полученную кривую экспоненциальной функцией. Сделать вывод о доле КТ, связанных с молекулами красителя в смеси и среднем числе КТ, которые образуют комплекс с одной молекулой красителя.
5. Вычислить экспериментальную эффективность FRET E_{exp} для добавки с соотношением концентрации КТ и молекул $n = 1$ по формулам (7.5)–(7.7).

СОДЕРЖАНИЕ ОТЧЕТА

1. Спектры поглощения и люминесценции раствора КТ, органического красителя и смешанных растворов для всех добавок.
2. График зависимости относительной интенсивности люминесценции КТ (I/I_0) от соотношения концентрации КТ и красителя в смеси n .
3. Функция аппроксимации зависимости относительной интенсивности люминесценции КТ (I/I_0) от соотношения концентрации КТ и красителя в смеси n и выводы о доле КТ, связанных с молекулами красителя в смеси и среднем числе КТ, которые образуют комплекс с одной молекулой красителя.
4. Значение экспериментальной эффективности FRET E_{exp} .

Работа является доработанной версией работы из пособия [4].

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Объясните механизмы связывания в комплекс квантовых точек и тетрапиррольных молекул для генерации синглетного кислорода. В чем преимущества и недостатки этих способов?
2. Какой физический смысл имеет показатель экспоненты в кривых тушения люминесценции квантовых точек в комплексах с органическими молекулами?
3. В каких случаях применение формулы Ферстера для оценки эффективности переноса энергии в выбранной донорно-акцепторной паре может являться некорректным?

ЛИТЕРАТУРА

1. V. Maslov, A. Orlova, A. Baranov. / Combination Therapy: Complexing of QDs with tetrapyrrols and other dyes. In: "Photosensitisers in medicine, environment, and security". // V. Ahsen, T. Nyokong Eds. Part II, Chapter 3 (Springer-Verlag. 1st Edition., 2011, Approx. 250 p. 10 illus., ISBN: 978-90-481-3870-8 Due: September 30, 2011.
2. A.O. Orlova, I.V. Martynenko, V.G. Maslov, A.V. Fedorov, Y.K. Gun'ko, A.V. Baranov. Investigation of complexes of CdTe quantum dots with the AlOH-sulphophthalocyanine molecules in aqueous media. J. Phys. Chem. C, 117(44) 23425–23431 (2013).
3. Ермолаев В.Л., Бодунов Е.Н., Свешникова Е.Б., Шахвердов Т.А. / Безызлучательный перенос энергии электронного возбуждения. // Л.: «Наука», (1977) 311 с.
4. Громова Ю.А., Мартыненко И.В., Орлова А.О. Практическое использование наноструктур. Санкт-Петербург: СПб: НИУ ИТМО, 2014.

Лабораторная работа №8

УСЛОВИЯ ФОРМИРОВАНИЯ И ХАРАКТЕРИСТИКИ МЕТАЛЛОКОМПЛЕКСОВ АЗОКРАСИТЕЛЕЙ

ЦЕЛЬ РАБОТЫ:

- Приобретение навыков формирования металлокомплексов азокрасителей в водных растворах;
- приобретение навыков анализа образования металлокомплексов азокрасителей в водных растворах.

ОБОРУДОВАНИЕ И РЕАКТИВЫ:

- Спектрофотометр UV Probe 3600 (Shimadzu, Япония);
- фотометрические кюветы;
- раствор азокрасителя;
- соль металла;
- дистиллированная вода.

ОБЪЕКТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ:

- Металлокомплексы азокрасителей в водных средах.

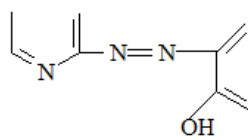
ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ СВЕДЕНИЯ

Фотометрические сенсоры могут быть применены для качественного и количественного анализа по изменениям оптической плотности в электронном спектре поглощения.

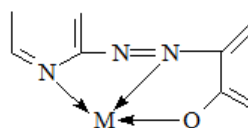
Концентрация веществ, поглощающих в видимой и ближней ультрафиолетовой области спектра, достаточно просто определяется из спектра поглощения по закону Бугера-Ламберта-Бера. Однако далеко не все вещества имеют характеристические электронные спектры поглощения, поэтому спектроскопия поглощения редко используется для идентификации веществ. Кроме того, многие вещества, как например, ионы металлов, не поглощают в видимой области спектра, поэтому такие вещества нельзя детектировать напрямую фотометрическими методами. Принцип действия фотометрических сенсоров основан на прохождении специфических химических реакций, приводящих к возникновению характеристических полос в спектрах поглощения. Это означает, что в присутствии анализируемого вещества в спектре поглощения вещества, используемого в качестве чувствительного сенсорного элемента, возникают новые характеристические полосы поглощения.

Гетероциклические азосоединения широко применяются для фотометрического определения многих ионов [1]. Данные вещества образуют координационные комплексы с ионами металлов. Большинство гетероциклических соединений являются трехдентатными лигандами, т.е. в образовании металлокомплекса участвуют электронные подсистемы трех

гетероатомов азокрасителя. Функциональной группировкой, определяющей их реакционную способность является группа



которая координирует ион металла атомом N гетероцикла, атомом O гидроксильной группы и одним атомом азота азогруппы. При этом образуется комплекс



К преимуществам данного типа сенсора можно отнести:

- высокую чувствительность ко многим ионам;
- значительный батохромный сдвиг максимума поглощения при комплексообразовании;
- применимость закона Бугера-Ламберта-Бера в широких интервалах концентраций определяемого иона;
- отсутствие влияния компонентов буферных смесей различного состава, применяемых для создания оптимальной кислотности, на поглощение комплексов;
- стабильность оптической плотности растворов во времени;
- широкий интервал кислотности, в котором оптическая плотность максимальна и практически постоянна;
- отсутствие ассоциации молекул и ионов реагентов комплексов в растворах.

Основным недостатком гетероциклических азосоединений в качестве фотометрических сенсоров на ионы металлов является низкая селективность. Большинство данных соединений взаимодействуют с широким спектром ионов, при этом положение максимумов поглощения различных металлокомплексов конкретного азосоединения обладают незначительными сдвигами. Для повышения селективности используют различные приемы. В частности, подбирают условия проведения реакции способствующие комплексообразованию красителя с выбранным ионом, или опираются при идентификации на форму всего спектра поглощения, а не только на положение максимума.

Следует отметить, что не все реагенты и комплексы растворимы в воде, в то время как ионы металлов обычно детектируются в водных растворах. При создании двухфазных систем происходит образование комплексов и их экстракция либо в гидрофобную либо в водную фазу. Однако экстракция комплексов не всегда количественна.

Образование металлокомплексов азокрасителей может происходить только при определенном уровне кислотности среды, так как в зависимости от pH азокраситель может находиться в различных формах. Например, 1-(2-

пиридилазо)-2-нафтол (ПАН) в зависимости от величины рН способен находиться в 3 формах: нейтральной (желтая), кислой (желто – зеленая) и щелочной (сиреневая). На рисунке 8.1 приведена структура ПАН в различных формах.

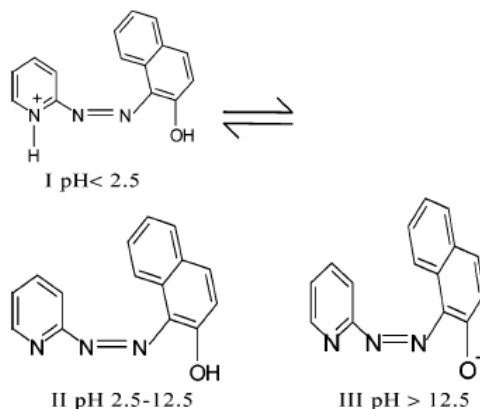


Рисунок 8.1 - Структура ПАНа при различных значениях рН

Пороговая чувствительность фотометрического сенсора определяется молярным коэффициентом экстинкции. В этом случае минимально определяемая концентрация аналита в пробе зависит исключительно от чувствительности оборудования.

Устойчивость является важной характеристикой комплексного соединения, поскольку величины констант устойчивости комплексов и констант диссоциации комплексов позволяют расчетным путем найти оптимальные условия определения концентрации ионов металлов и сделать реакцию неорганического иона с выбранным лигандом максимально селективной. Устойчивость комплексного соединения зависит от многих факторов, определяемых химическим строением красителя, и в первую очередь от дентантности лиганда, т.е. от количества гетероатомов координирующихся на ион металла. Замена хотя бы одного из гетероатомов в азосоединение на углерод существенно снижает устойчивость комплексов.

2. Химическое равновесие

Проще всего понять суть химического равновесия на примере обратимой химической реакции [2]. Пусть есть обратимая реакция:



Если предположить, что прямая и обратная реакция проходят в одну стадию, то скорости этих реакций будут прямо пропорциональны концентрациям реагентов: скорость прямой реакции

$$v_1 = k_1 \cdot [A] \cdot [B], \quad (8.2)$$

скорость обратной реакции

$$v_2 = k_2 \cdot [C] \cdot [D], \quad (8.3)$$

где квадратными скобками обозначены молярные концентрации реагентов. По мере протекания прямой реакции концентрации исходных веществ А и В снижаются, соответственно, уменьшается и скорость прямой реакции. Скорость же обратной реакции, которая в начальный момент равна нулю (нет продуктов

С и D), постепенно увеличивается. Когда скорости прямой и обратной реакций сравниваются, концентрации всех веществ – А, В, С и D не изменяются со временем. Это значит, что реакция достигла положения равновесия. Следует подчеркнуть, что при химическом равновесии обе реакции – и прямая, и обратная – продолжают идти, однако их скорости равны и поэтому в системе не наблюдается изменений.

Важнейший параметр, характеризующий обратимую химическую реакцию – константа равновесия химической реакции K . Если записать для рассмотренной обратимой реакции условие равенства скоростей прямой и обратной реакции в состоянии равновесия

$$k_1 \cdot [A]_p \cdot [B]_p = k_2 \cdot [C]_p \cdot [D]_p, \quad (8.4)$$

то

$$[C]_p \cdot [D]_p / [A]_p \cdot [B]_p = k_1 / k_2 = K. \quad (8.5)$$

Таким образом, при равновесии отношение концентрации продуктов реакции к произведению концентрации реагентов постоянно, если постоянна температура. Описанный способ вывода константы равновесия, основанный на скоростях прямой и обратной реакций, в общем случае использовать нельзя, так как для сложных реакций зависимость скорости от концентрации обычно не выражается простым уравнением или вообще неизвестна. Тем не менее, в термодинамике доказывается, что конечная формула для константы равновесия оказывается верной.

Для комплексов с соотношением частиц 1:1 константа равновесия может быть определена следующим образом (в литературе данная константа часто обозначается как β):

$$K = \frac{[C_{complex}]}{[C_a] \cdot [C_b]}, \quad (8.6)$$

где – $C_{complex}$ – концентрация комплексов в смеси; C_a – концентрация в смеси частиц a , не связанных в комплекс; C_b – концентрация в смеси частиц b , не связанных в комплекс.

ПОРЯДОК ВЫПОЛНЕНИЯ РАБОТЫ

1. Зарегистрировать спектр поглощения раствора азокрасителя.
2. Взять навеску соли металла и растворить в предложенном объеме дистиллированной воды. Массу навески определяет преподаватель.
3. Порционно добавлять раствор ионов металла к раствору азокрасителя, после каждой добавки регистрировать спектр поглощения. Увеличивать концентрацию ионов металла в растворе до тех пор, пока амплитуда полосы поглощения металлокомплекса не перестанет увеличиваться. Объем добавки указывает преподаватель.

СОДЕРЖАНИЕ ОТЧЕТА:

1. Спектр поглощения азокрасителя и расчет его концентрации по формуле 1, коэффициент экстинкции в максимуме полосы поглощения свободной формы азокрасителя выдает преподаватель.
2. Оценка концентрации раствора соли металла.
3. Концентрация ионов металла в растворе азокрасителя после единичной добавки, рассчитанная по формуле:

$$C = C_0 \frac{v}{V}, \quad (8.7)$$

где C_0 – концентрация раствора ионов металла, определенная по формуле 10; v – объем добавки; V – объем раствора азокрасителя.

4. Спектры поглощения образца для каждой добавки раствора ионов металла и расчет концентрации металлокомплексов, коэффициент экстинкции металлокомплексов (на длине волны 560 нм) выдает преподаватель.
5. Зная исходную концентрацию азокрасителя (C_{dye}) и концентрацию металлокомплексов (C_{complex}) рассчитать концентрацию азокрасителя, не связанного в комплекс (C_{free}):

$$C_{\text{free}} = C_{\text{dye}} - C_{\text{complex}} \quad (8.8)$$

6. Рассчитать константы комплексообразования по формуле (8.6).
7. Выводы по проделанной работе.

Работа является доработанной версией работы из пособия [3].

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ:

1. Объяснить принцип работы фотометрических сенсоров.
2. Пояснить преимущества и недостатки использования гетероциклических соединений в качестве фотометрических сенсоров.
3. Что такое химическое равновесие и как оно проявляется при образовании металлокомплексов азокрасителей?
4. Как определить константу комплексообразования по экспериментальным данным?

ЛИТЕРАТУРА

1. В. М. Иванов. Гетероциклические азотосодержащие азосоединения /М.: Наука, 1982. – 230с.
2. Б. Н. Афанасьев, Ю. П. Акулова. Физическая химия / СПб.: Лань, 2012. 416 с, глава 6.
3. Громова Ю.А., Мартыненко И.В., Орлова А.О. Практическое использование наноструктур. Санкт-Петербург: СПб: НИУ ИТМО, 2014.

Лабораторная работа №9

УСЛОВИЯ ФОРМИРОВАНИЯ И ОПТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ КОМПЛЕКСОВ КВАНТОВЫХ ТОЧЕК С МОЛЕКУЛАМИ АЗОКРАСИТЕЛЯ

ЦЕЛЬ РАБОТЫ:

- Приобретение навыков формирования комплексов полупроводниковых квантовых точек с молекулами азокрасителя;
- приобретение навыков первичного анализа оптических свойств сформированных комплексов.

ОБОРУДОВАНИЕ И РЕАКТИВЫ:

- Спектрофотометр UV Probe 3600 (Shimadzu, Япония);
- спектрофлуориметра Cary Eclipse (Varian, Австралия);
- фотометрические кюветы;
- раствор полупроводниковых квантовых точек;
- раствор гетероциклического азокрасителя.

ОБЪЕКТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ:

- Комплексы полупроводниковых квантовых точек с молекулами азокрасителя.

ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ СВЕДЕНИЯ

Сегодня люминесцентные сенсоры получили достаточно широкое распространение [1]. Это обусловлено тем фактом, что использование в качестве детектируемого сигнала люминесцентного отклика позволяет обнаруживать значительно меньшие количества веществ по сравнению с фотометрическим способом регистрации. Для решения сенсорных задач распространено создание комплексов квантовых точек с органическими молекулами, в которых выполняются условия для переноса энергии. В присутствии анализируемого вещества условия переноса энергии изменяются, и как следствие, изменяется интенсивность люминесценции квантовой точки. Детектируемое вещество может также адсорбироваться непосредственно на поверхность квантовой точки, однако такой подход обладает низкой селективностью.

В спектрофотометрии концентрация веществ пропорциональна оптической плотности:

$$c \sim D = \lg(I_0/I) \quad (9.1)$$

где I_0 – интенсивность светового потока, падающего на образец, I – интенсивность потока, прошедшего через образец.

Следовательно, фактором, определяющим минимально обнаружимую концентрацию, является минимально измеримая разность между I_0 и I . Для

достижения высокой чувствительности необходимо с высокой точностью измерять интенсивность светового потока. Точность измерения оптической плотности на стандартных приборах в кювете толщиной 1 см обычно составляет около 0.001. Для молекул средних размеров значение коэффициента экстинкции редко достигает 10^5 . Подставляя это значения в уравнение Бугера-Ламберта-Бера, получим, что минимальная концентрация вещества, определяемая методом абсорбционной спектрофотометрии, составляет 10^{-8} моль/л.

С другой стороны, если исключить эффекты, связанные с перепоглощением света в образцах с высокой концентрацией, интенсивность люминесценции пропорциональна произведению концентрации вещества на интенсивность возбуждающего света:

$$I_{\text{lum}} \sim c \cdot I_{\text{ex}} \quad (9.2)$$

Современными фотоумножителями можно зарегистрировать чрезвычайно низкие интенсивности света, и, следовательно, используя очень высокие интенсивности возбуждающего света, можно определить крайне низкие концентрации. Чувствительность спектрофлуориметра лимитируется в принципе лишь максимальной интенсивностью возбуждающего света. В идеальных условиях предельная измеримая концентрация имеет порядок 10^{-12} моль/л. Однако применение люминесцентной спектроскопии для количественных оценок затруднено тем, что интенсивность сигнала люминесценции для одного и того же образца будет меняться в зависимости от геометрии измерения и от характеристик конкретного спектрофлуориметра.

Одним из подходов для создания сенсоров на основе квантовых точек является использование комплексов на основе квантовых точек и органических молекул [2]. Для присоединения органической молекулы к квантовой точке существует несколько способов:

- электростатическое взаимодействие между заряженными группами молекул солибилизатора квантовых точек и органическими молекулами;
- ковалентное связывание органической молекулы с молекулами солибилизатора
- метод координационной связи: непосредственное присоединение молекулы к атомам на оболочке КТ.

В большинстве случаев материал и размер квантовых точек выбирают таким образом, чтобы в комплексе с органическими молекулами выполнялись условия для эффективного диполь-дипольного переноса энергии от квантовых точек к молекулам, а люминесценция КТ в комплексе была частично или полностью потушена.

Принцип работы сенсорного элемента на основе квантовых точек основан на изменении интенсивности люминесценции КТ в присутствии анализируемого вещества. Изменение интенсивности люминесценции КТ может происходить или за счет изменения условий для внутрикомплексного переноса энергии или за счет диссоциации комплексов КТ/азокраситель [3].

Рассмотрим принцип действия люминесцентного диссоциативного сенсора на ионы металла на основе комплексов квантовых точек и органических молекул (см. рис. 9.1).

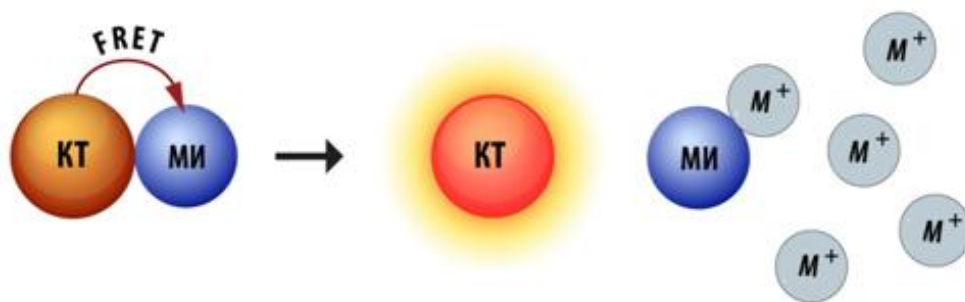


Рисунок 9.1 - Люминесцентный диссоциативный сенсор на ионы металла

В первый момент времени люминесценция КТ в комплексе с органической молекулой потушена. Вообще говоря, физический механизм тушения люминесценции в данном случае не принципиален, важно, чтобы данный процесс был обратим. В присутствие вещества (аналита), константа комплексообразования с которым для органического соединения выше, чем с КТ, химическое равновесие системы смещается в сторону образования комплексов азокраситель/металл, а диссоциация комплекса КТ/азокраситель приводит к разгоранию люминесценции КТ.

Гетероциклические азокрасители – класс веществ, образующих комплексы с различными ионами металлов. В частности, данные соединения способны координироваться на атомы металлов на поверхности квантовых точек. Например, если смешать растворы 1-(2-пиридилазо)-2-нафтола (ПАН) и квантовых точек CdSe/ZnS, будет наблюдаться координация молекул ПАН на атомы цинка на оболочке КТ. Так как образование металлокомплексов приводит к изменению спектра поглощения красителя, то в случае комплексообразования с КТ в спектре поглощения также появиться характерная полоса металлокомплекса. Если положение полосы поглощения данного металлокомплекса совпадает с положением полосы люминесценции КТ (что легко достигается выбором КТ соответствующего размера), то будет наблюдаться тушение люминесценции квантовых точек за счет безызлучательного резонансного переноса энергии от КТ к металлокомплексу на оболочке данной КТ. А так как при координировании красителя на поверхность КТ обеспечивается минимально возможное расстояние между донором и акцептором энергии, то в этом случае эффективность тушения люминесценции КТ будет близка к 100%.

В растворе квантовые точки и молекулы азокрасителя находятся в состоянии химического равновесия. Это означает, что при определенных концентрациях компонент в зависимости от значения константы образования металлокомплекса на поверхности КТ в растворе будет находиться определенное число комплексов КТ/азокраситель и определенное число свободных компонентов (КТ и молекул азокрасителя). Эффективность комплексообразования будет зависеть от соотношения концентраций

квантовых точек и азокрасителя в растворе и от константы комплексообразования. Таким образом, в присутствии ионов металлов, для которых константа комплексообразования для данного красителя выше, чем константа комплексообразования с атомами на поверхности КТ, равновесие будет смещено в сторону комплексообразования со свободными ионами металла (аналитом). Уменьшение числа комплексов с КТ будет приводить к увеличению интенсивности люминесценции квантовых точек. На данном принципе основано действие люминесцентного сенсора на основе комплекса КТ и молекул азокрасителя.

ПОРЯДОК ВЫПОЛНЕНИЯ РАБОТЫ

1. Зарегистрировать спектры поглощения и люминесценции раствора квантовых точек, по формуле Бугера-Ламберта-Бера определить концентрацию КТ.
2. Зарегистрировать спектр поглощения азокрасителя, определить его концентрацию.
3. Порционно добавлять раствор азокрасителя к раствору КТ так, чтобы соотношение компонентов (краситель/КТ) составляло: 0.25, 0.5, 1, 2, 5, 10, каждый раз регистрировать спектры поглощения и спектры люминесценции раствора.
4. Для каждого соотношения компонентов в смеси по амплитуде полосы поглощения металлокомплекса азокрасителя, определить концентрацию данных комплексов и их % содержание от общей концентрации молекул азокрасителя в смеси. Коэффициент экстинкции металлокомплекса азокрасителя сообщает преподаватель.
5. Для каждого соотношения компонентов в смеси определить среднее число молекул азокрасителя, приходящееся на одну КТ.
6. Для каждого соотношения компонентов в смеси определить относительную интенсивность люминесценции КТ в смеси:

$$I' = \frac{I}{I_0}$$

где I и I_0 – интенсивность люминесценции КТ в присутствии и в отсутствие молекул азокрасителя соответственно.

СОДЕРЖАНИЕ ОТЧЕТА

1. Спектры поглощения и люминесценции КТ
2. Спектры поглощения азокрасителя
3. Таблица с концентрациями: КТ, раствора азокрасителя, концентрациями азокрасителя в смешанном растворе при соотношении компонентов 0.25, 0.5, 1, 2, 5, 10.
4. Зависимость % содержания молекул азокрасителя, связанных в комплекс с КТ, от соотношения компонентов в смеси (n).
5. Зависимость среднего числа молекул азокрасителя, приходящихся на одну квантовую точку, от n .

6. Зависимость относительной интенсивности люминесценции КТ в смеси (I') от n .
7. Выводы по работе.

Работа является доработанной версией работы из пособия [4].

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. В чем преимущество люминесцентных сенсоров перед фотометрическими?
2. Объяснить принцип действия сенсора на основе комплексов КТ и молекул азокрасителя.
3. От каких параметров системы зависит эффективность диполь-дипольного переноса энергии?

ЛИТЕРАТУРА

1. G. Korotchenkov. Handbook of gas sensor materials. Conventional approaches. Springer, 2013.
2. Gromova Y. A. et al. Fluorescence energy transfer in quantum dot/azo dye complexes in polymer track membranes //Nanoscale research letters. – 2013. – Т. 8. – №. 1. – С. 1-6
3. В. М. Иванов. Гетероциклические азотосодержащие азосоединения / М.: Наука, 1982. – 230с.
4. Громова Ю.А., Мартыненко И.В., Орлова А.О. Практическое использование наноструктур. Санкт-Петербург: СПб: НИУ ИТМО, 2014.

Приложение А

(обязательное)

ОПИСАНИЕ УСТРОЙСТВА ПРИБОРОВ И ПРИНЦИПОВ ИХ РАБОТЫ

1. Спектрофотометр

Для регистрации спектров поглощения в лабораторных работах используется спектрофотометр UV-probe 3600 (Shimadzu), который предназначен для проведения спектральных исследований в широкой области спектра – от УФ до ближнего ИК.

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 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. 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. 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 светоделитель, который состоит из зеркал (M3-5) и модулятора. Здесь свет делится модулятором на луч канала образца и канала сравнения.

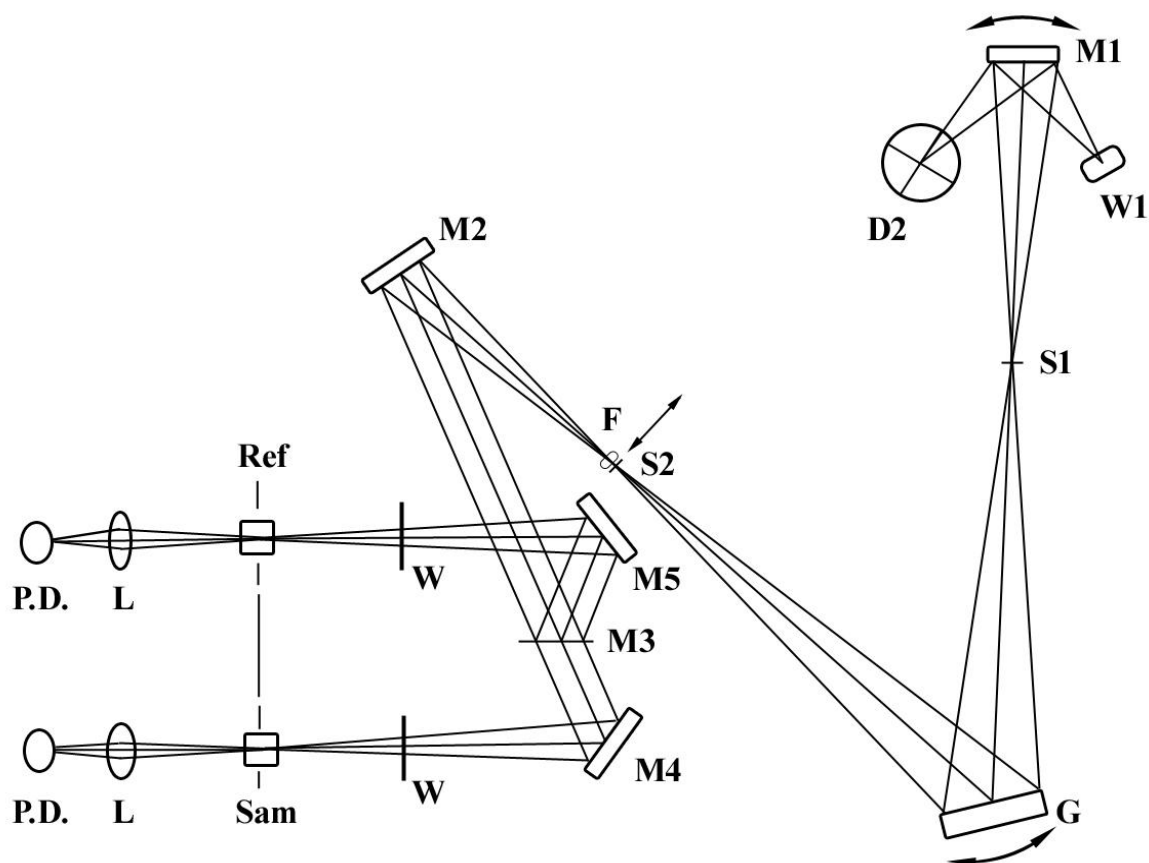


Рисунок 1 - Оптическая схема спектрофотометра: D2 - Дейтериевая лампа; W1 - Галогенная лампа; F – Фильтр; G - Дифракционные решетки; S1 - Входная щель; S2 - Выходная щель; W - Window пластины; M1-M5 - Зеркала (M3 - полу-зеркало); L – Объектив; Ref – Канал сравнения; Sam - Канал образца; PD – Фотодиоды

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 UVProbe 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.).

1.1 Подготовка спектрофотометра к работе

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

1. Включить прибор в сеть.
2. Включить компьютер, с которым связан прибор.
3. Запустить на компьютере программу для проведения измерений «UV-Probe», с помощью которой и осуществляется полное управление процессом работы прибора.
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. 2).

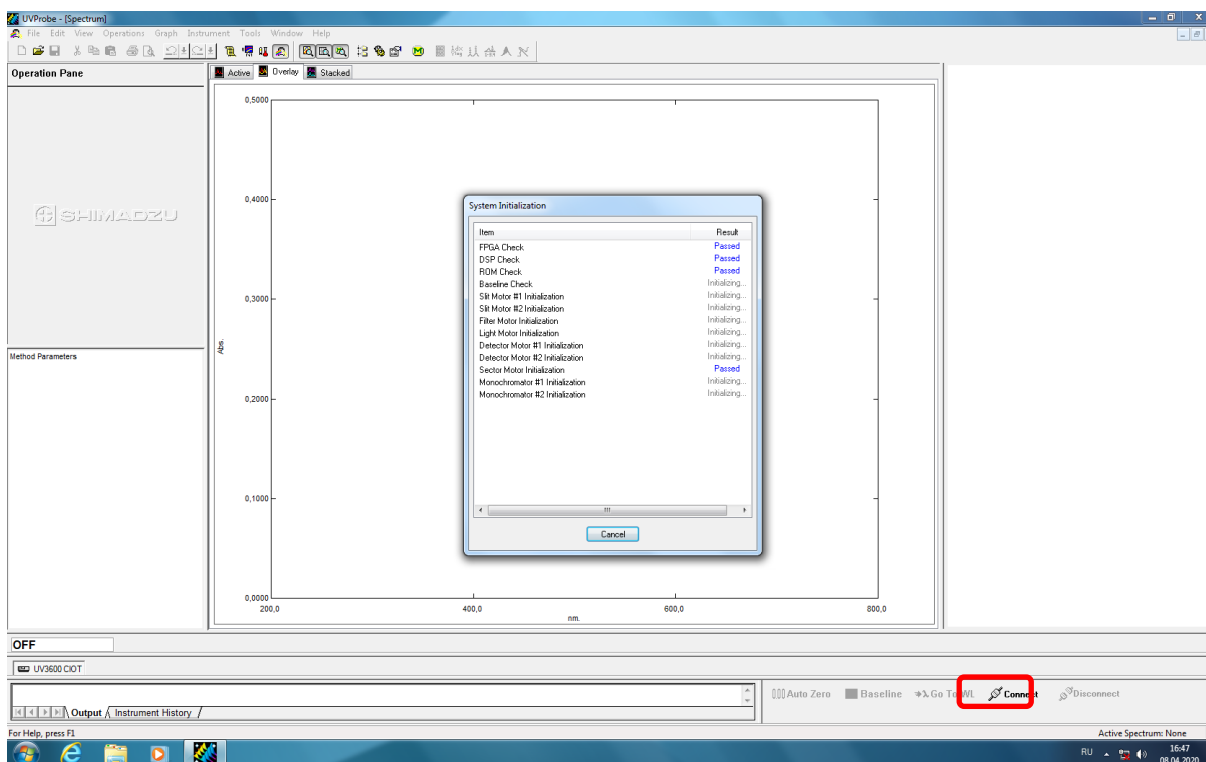


Рисунок 2 - Вид главного окна программы управления спектрофотометром в процессе установки соединения прибора с компьютером

5. Установить параметры регистрации в окне «SpectrumMethod», вызываемым кнопкой «M» на панели инструментов (альтернативный путь: «Edit → Method...»). Необходимо установить следующие значения параметров (рис.2.3):

Wavelengthrange: Start 800 toEnd 200

ScanSpeed: medium

Sampling interval: 1.0

ScanMode: Single

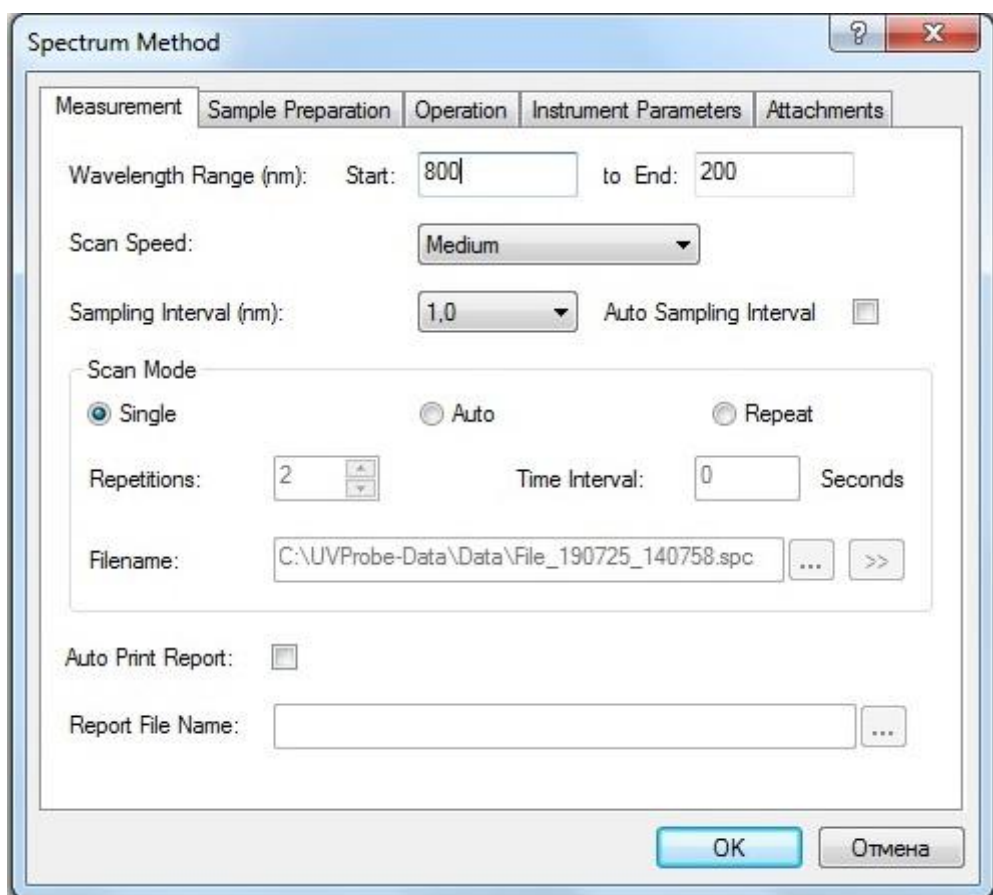


Рисунок 3 - Вид окна программы управления спектрофотометром, в котором задается область сканирования спектров

6. Для изменения ширины щелей монохроматора необходимо в меню **“Spectrum Method”** перейти в раздел **“Instrument Parameters”** и в выпадающем списке ‘Slit Width’ выбрать необходимое значение (рис. 4).

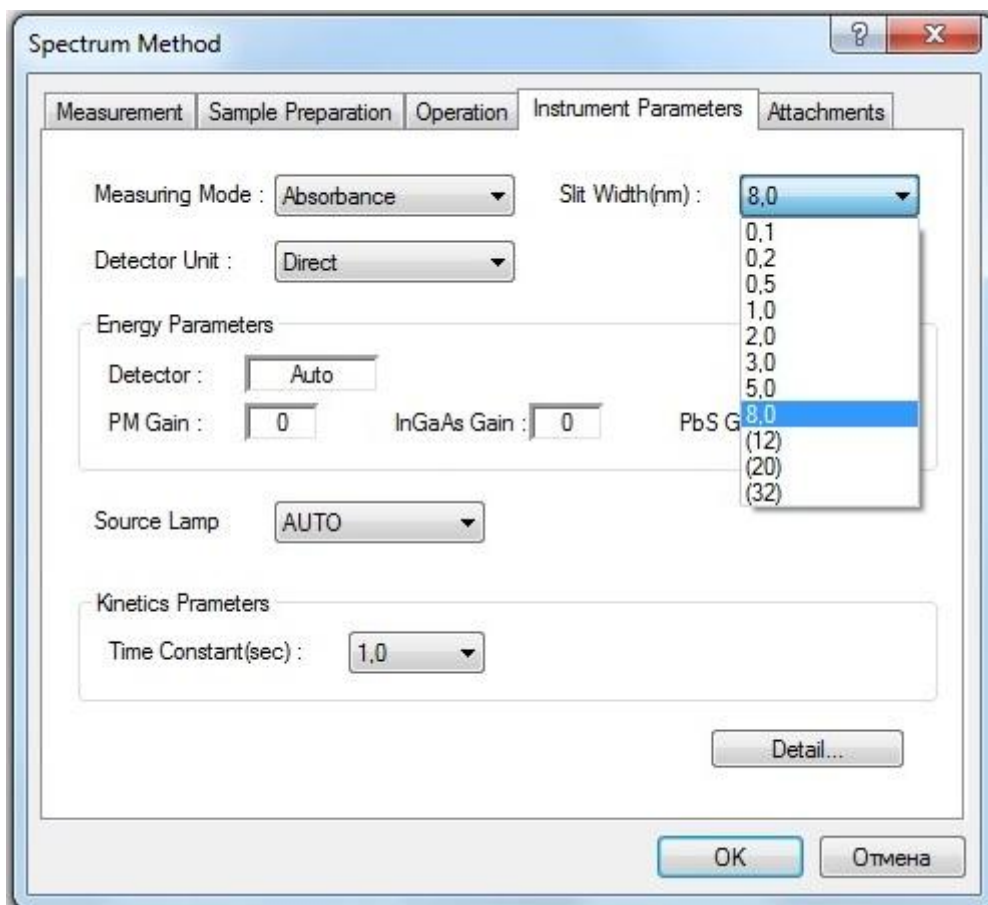


Рисунок 4 - Вид окна программы управления прибором, в котором устанавливается ширина щели монохроматора

7. На панели управления нажать кнопку «**Baseline**», ввести диапазон измерений: от 800 до 200 нм, и прописать базовую линию, нажав кнопку «**OK**» диалогового окна.

8. Нажать кнопку «**GoToWL**» и перевести прибор на длину волны 500 нм.

9. Произвести обнуление, нажав кнопку «**AutoZero**» (рис. 5).

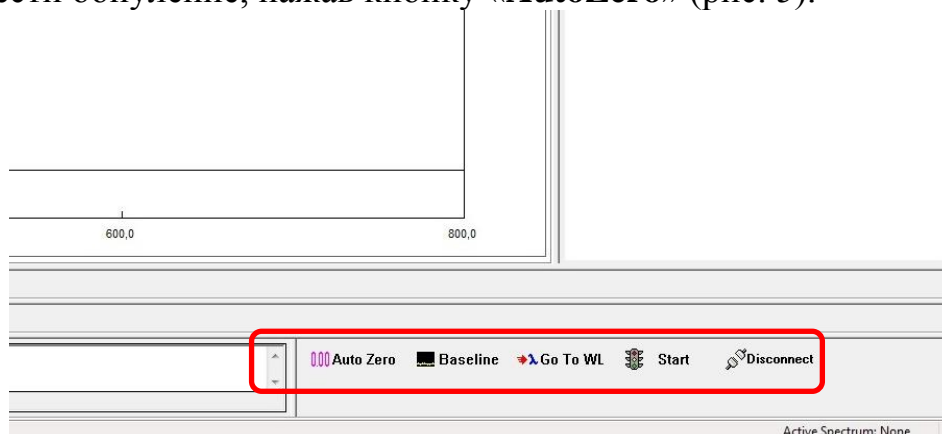


Рисунок 5 - Вид окна программы управления прибором с кнопками «Baseline», «GoToWL», «AutoZero»

10. 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 «Сохранение полученных данных».

После проведения вышеперечисленных действий прибор готов к работе.

1.2. 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 нужные параметры, для начала измерения нужно нажать кнопку «Start» в программе «UV-Probe». После этого в появившемся диалоговом окне (рис. 6.) нужно ввести имя файла и выбрать место предполагаемого сохранения, нажав кнопку «...». После нажатия кнопки «OK» в этом диалоговом окне начнется регистрация спектра.

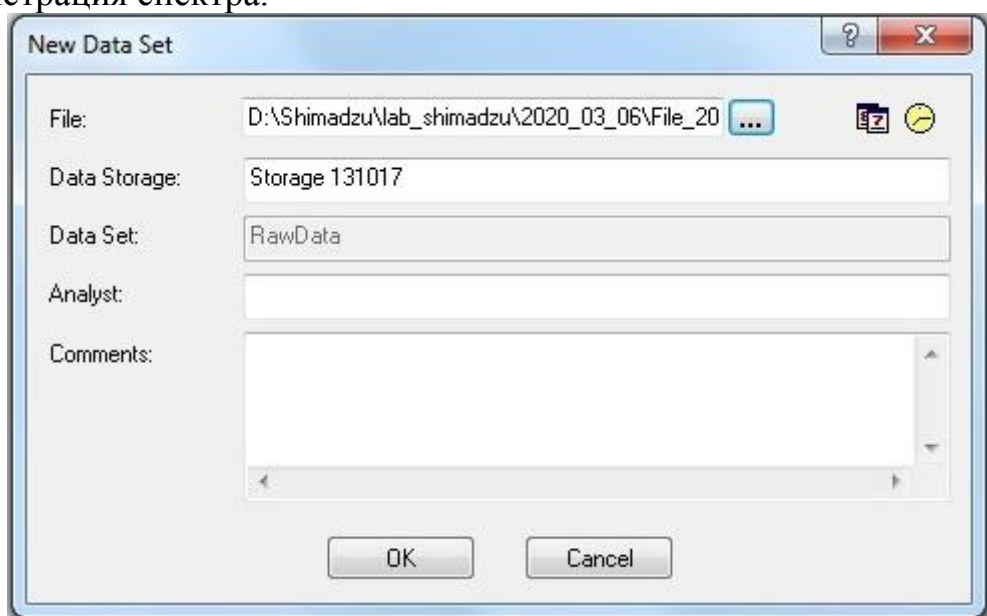


Рисунок 6 - Вид окна программы управления спектрофотометром, которое открывается после нажатия кнопки «Start» при регистрации спектров поглощения

1.3. Сохранение полученных данных

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

- Сохранить зарегистрированный спектр в формате программы, для чего необходимо выполнить команду «File – Save».
- Конвертировать программный файл в текстовый формат, что позволит построить спектр в любой программе работы с графиками и произвести обработку данных. Для этого нужно выполнить команду «File – Save as...». В открывшемся диалоговом окне убедиться (рис. 7), что указано нужное имя файла и место сохранения, и сохранить файл в формате DataPrintTable (*.txt).

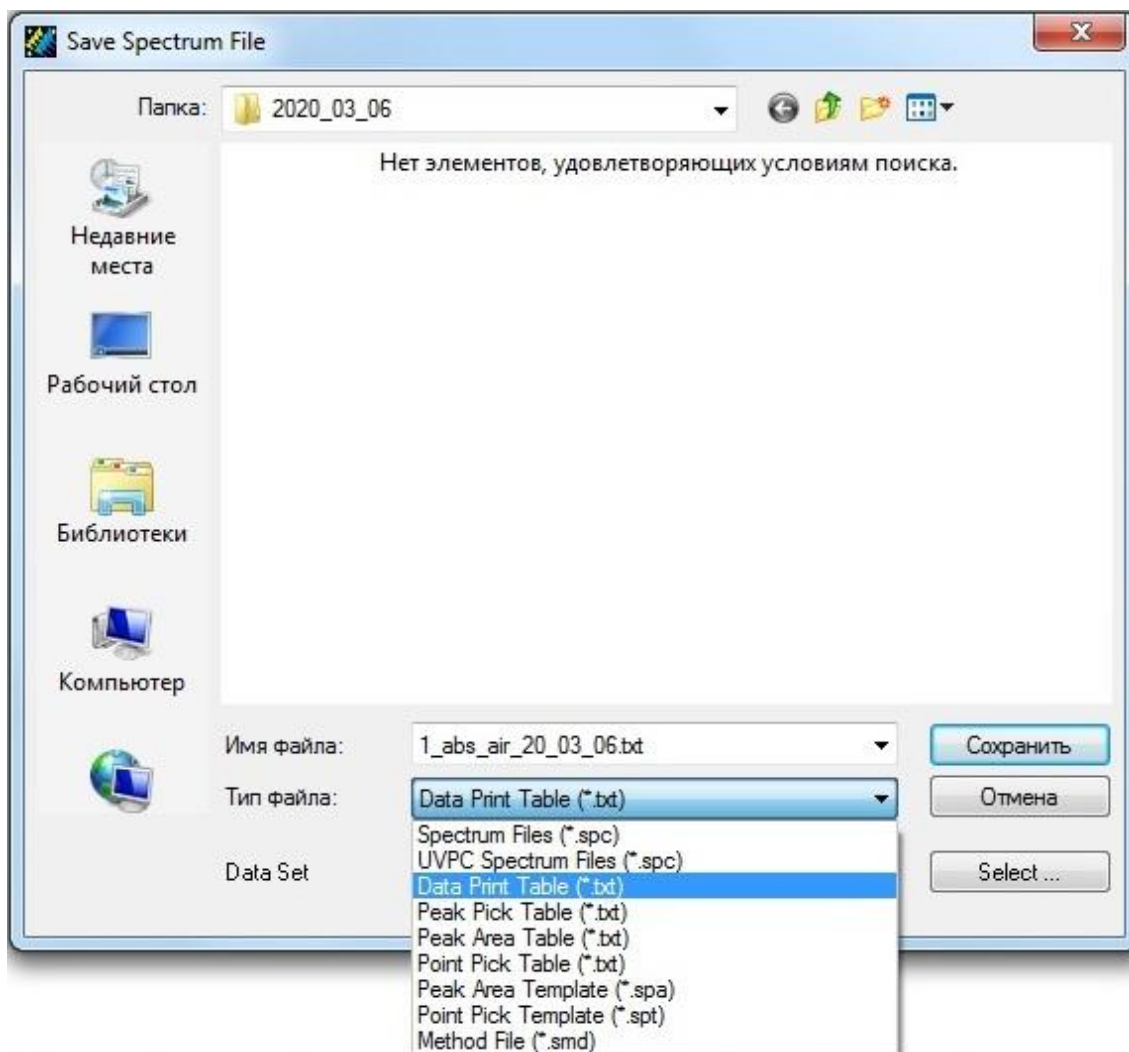
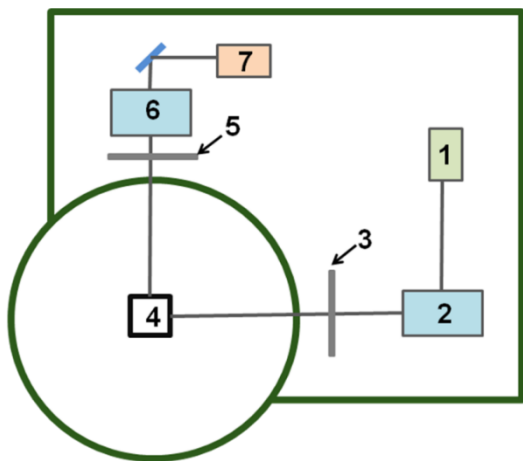


Рисунок 7 - Вид окна программы управления спектрофотометром, в котором задается имя и тип файла для хранения зарегистрированных спектров

2. Спектрофлуориметр

В работе регистрация спектров флуоресценции образцов производится на спектрофлуориметре Cary Eclipse (Varian). Принципиальная схема прибора приведена на рисунке 8.



- 1 - источник излучения
- 2, 6 – монохроматоры
- 3, 5- система встроенных фильтров
- 4 – образец
- 7 – ФЭУ

Рисунок 8 - Принципиальная схема спектрофлуориметра Cary Eclipse

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).

2.1. Подготовка спектрофлуориметра к работе

1. Включить компьютер и прибор.
2. Запустить программу «Scan».
3. В меню настройки («Setup») выбрать регистрацию спектров флуоресценции и, используя спектры поглощения исследуемых веществ, полученные в ходе выполнения первой части работы или предоставленные 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 растворов флуорофоров 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 (рис. 9).
4. Во вкладке «Options» поставить галочку перед «Overlaytraces», 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.

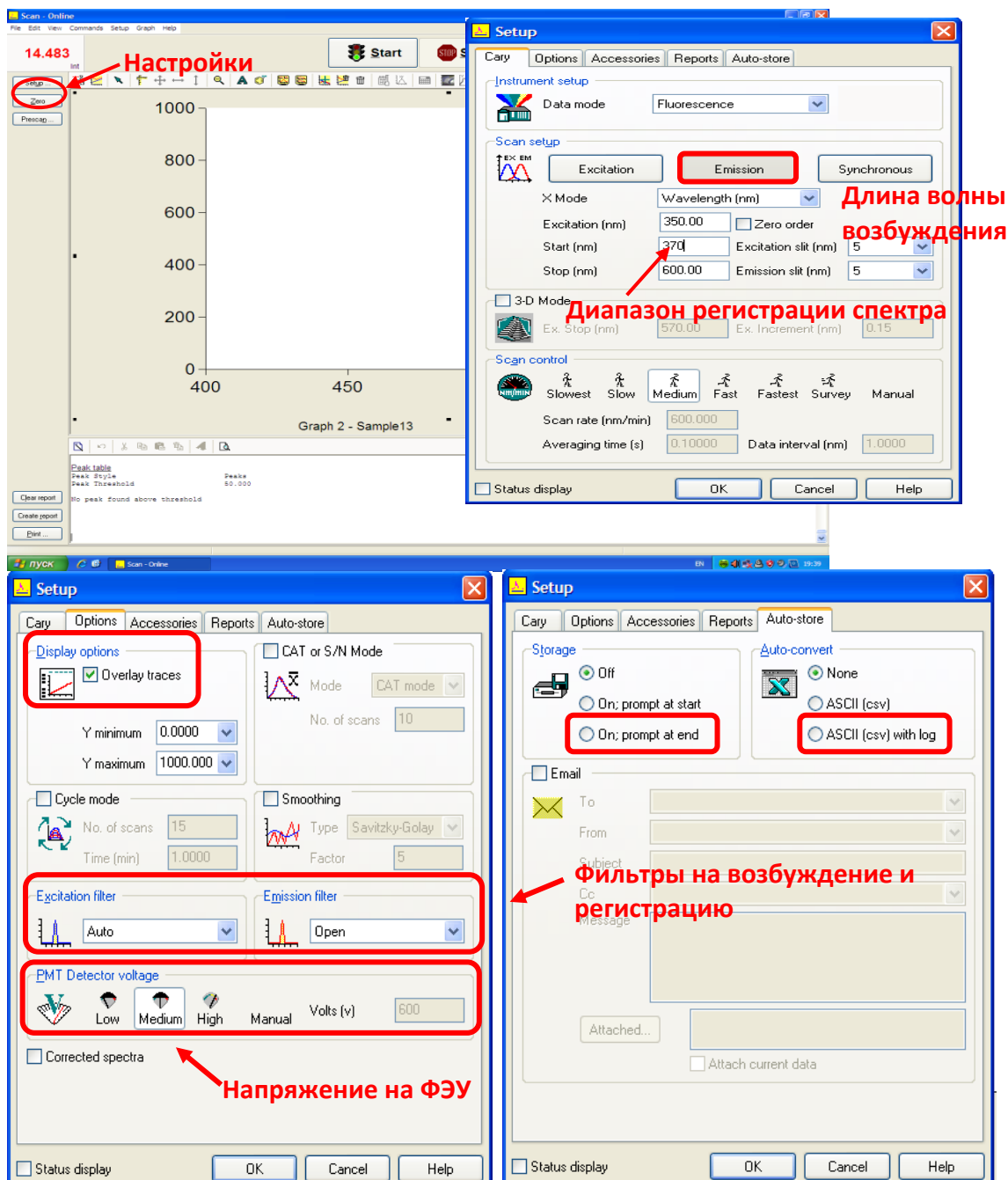


Рисунок 9 - Настройка параметров регистрации спектра люминесценции

5. 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.
6. 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, ранее зарегистрированных в ходе проведения работы.

3. Особенности регистрации спектров поглощения нестандартных образцов

При распространении света через матрицу с некоторыми включениями (частицами) в общем случае возможно три варианта прохождения луча света (рис. 10):

а) поток, проходящий сквозь образец без изменения направления, НЕ прошедший сквозь частицу;

б) поток, прошедший сквозь образец, прошедший сквозь частицу, но не изменивший направления;

в) поток, изменивший направление из-за многократных отражений от частиц.

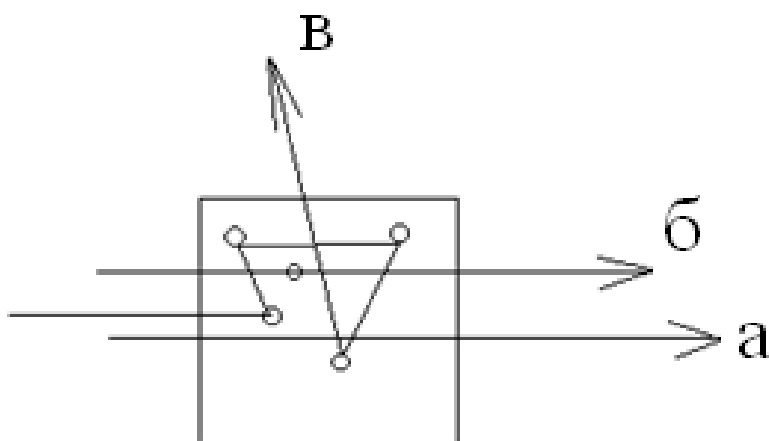


Рисунок 10 - Схематическое изображение прохождения светового потока через неоднородный образец

В случае пространственно неоднородных образцов регистрируемая оптическая плотность будет зависеть от соотношения размеров областей, в которых частицы есть и в которых они отсутствуют. При низких оптических плотностях поглощение будет снижаться в определенное число раз, а при больших – будет происходить искажение спектра. По экспериментальным данным математически возможно восстановить действительное значение оптической плотности.

В случае сильно рассеивающих образцов спектры поглощения удобно записывать с использованием интегрирующей сферы, которая позволяет собрать рассеянный свет и направить его на фотодетектор.

В работе используется интегрирующая сфера ISR-3100 (рис. 11). Рабочий диапазон сферы 220 – 2600 нм, сфера оснащена двумя фотодетекторами – фотоумножителем и PbS фотодетектором, расположенными в нижней и верхней частях сферы соответственно.

Внутренняя поверхность сферы покрыта $BaSO_4$, веществом, которое хорошо отражает падающий свет. Свет, рассеянный образцом, в результате многократных отражений от стенок сферы попадает на фотоприемник. Для записи спектров поглощения в сферу также заводится пучок света из

референтного канала, синхронизированный во времени с пучком, проходящим через образец.

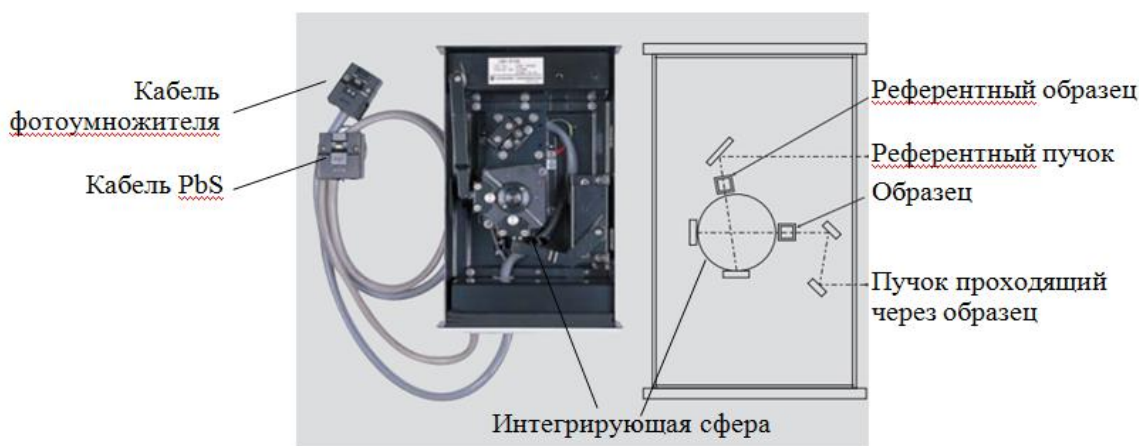


Рисунок 11- Внешний вид блока с интегрирующей сферой (слева) и оптическая схема (справа)

4. Особенности регистрации спектров люминесценции нестандартных образцов

Одним из способов измерения люминесценции нестандартных образцов является использование оптоволоконных приставок. При этом следует учитывать, что использование оптоволоконной приставки, вследствие потерь, существенно снижает интенсивность сигнала. Зачастую в подобных приставках геометрическое положение волноводов таково, что сигнал возбуждения, проходя через образец, попадает непосредственно на вход монохроматора регистрации, поэтому необходимо тщательно подбирать комбинацию фильтров для выделения сигнала люминесценции образца.

Свет, выходящий из монохроматора возбуждения, теоретически не должен содержать никаких других длин волн, кроме той, на которую он настроен, и линии второго порядка дифракционной решетки. На практике же свет, выходящий из монохроматора, содержит небольшую долю всех длин волн, которые входят в монохроматор. Это происходит в результате хаотического рассеяния света поверхностью решетки, различными дефектами и частицами пыли на оптических элементах. Таким образом, независимо от схемы регистрации люминесценции рационально использовать дополнительный фильтр для выделения полосы возбуждающего света. Для лучшего результата в ряде случаев уместно использовать комбинацию нескольких фильтров. При этом необходимо следить, чтобы сами фильтры не люминесцировали, так как это вновь снизит монохроматичность возбуждающего света.

Для регистрации спектров люминесценции неоднородных образцов в работе используется оптоволоконная приставка, схематично изображенная на

Рис. 12. Приставка состоит из держателя (А), на котором располагается исследуемый объект, и волоконно-оптической линии связи (Б).

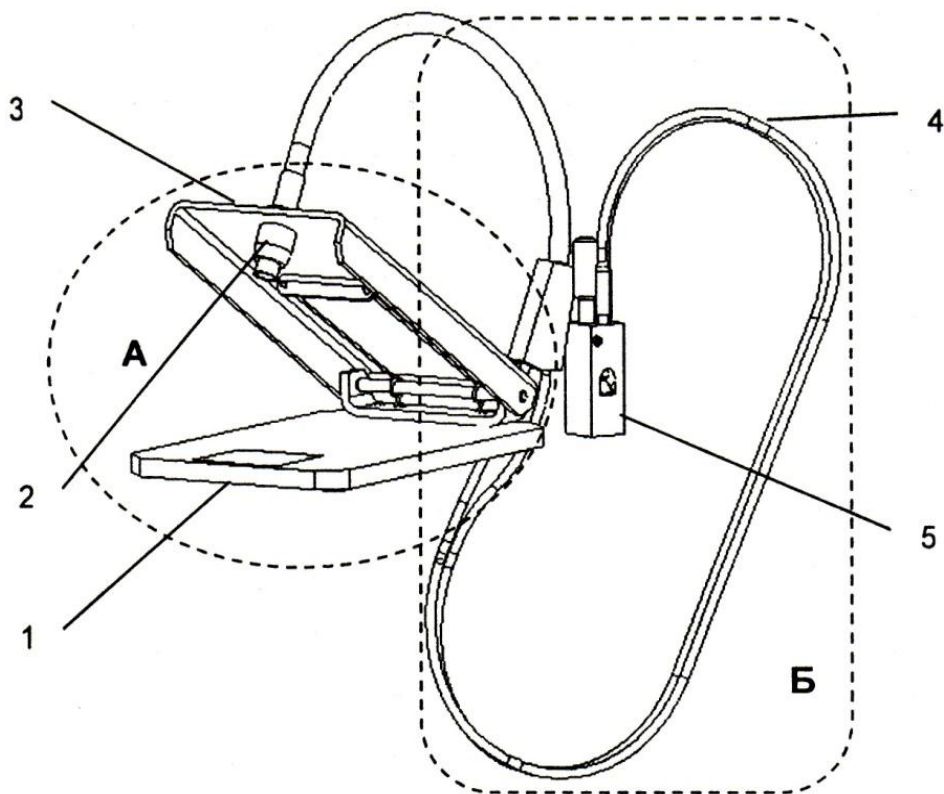


Рисунок 12 - Опволоконная приставка в сборе (1 – платформа; 2 – втулка; 3 – прижимная крышка; 4 – волоконно-оптическая линия связи; 5 – оптический разъём для соединения со спектрофлуориметром)

Волоконно-оптическая линия связи (ВОЛС) состоит из жгута кварцевых световодов (4) и оптического разъёма (5) для соединения со спектрофлуориметром. Оптический разъём устанавливается в кюветное отделение спектрофлуориметра таким образом, чтобы боковые поверхности разъёма с приклеенными в пазах плоскими зеркальцами были обращены в сторону монохроматоров возбуждения и регистрации люминесценции соответственно.

Держатель состоит из платформы (1) и прижимной крышки (3). ВОЛС вставляется в отверстие крышки и закрепляется снизу резьбовой втулкой (2). Исследуемый объект помещается на платформу таким образом, чтобы втулка ВОЛС упиралась в него. Если исследуемый объект является порошком, рекомендуется накрыть его покровным стеклом.

5. Конфокальный люминесцентный микроскоп

Известно, что пространственное разрешение традиционных оптических микроскопов ограничено дифракцией волны видимого света. Разрешение в плоскости, перпендикулярной оптической оси (латеральное), составляет

$$\delta_{lateral} = \frac{\lambda}{2(NA)}, \quad (1)$$

где λ — длина волны излучения, $(NA) = n \cdot \sin\alpha$ — числовая апертура объектива, n — показатель преломления среды между образцом и объективом (воздуха или иммерсионной жидкости), α — половина угла, который «захватывает» объектив. На коротковолновом краю видимого диапазона при использовании иммерсионной оптики с высокопреломляющей иммерсионной жидкостью между объектом и объективом могут разрешаться детали размером менее 200 нм, для "сухой" оптики со средней числовой апертурой ($NA \sim 0.5$) разрешение близко к длине волны. Разрешение вдоль оптической оси (аксиальное) всегда хуже, чем латеральное ($\delta_{axial} > \delta_{lateral}$); оно сильнее, чем латеральное, зависит от числовой апертуры:

$$\delta_{axial} = \frac{n\lambda}{(NA)^2}. \quad (2)$$

Несмотря на далёкое от наномасштабов пространственное разрешение, оптическая микроскопия широко используется при изучении нанообъектов, особенно в биологии. Для надёжной работы на границе разрешения разработаны специальные микроскопы: флуоресцентные, конфокальные, двухфотонные, с насыщенной люминесценцией (STED) и другие. Широкое распространение получила конфокальная микроскопия. На Рисунке 13 приведена оптическая схема конфокального микроскопа. Его отличительной чертой является пространственная фильтрация изображения с помощью конфокальной диафрагмы (пинхола), благодаря которой регистрируется только свет, испущенный малым объёмом объекта в непосредственной окрестности фокуса. Современные конфокальные микроскопы являются сканирующими: в них изображение не наблюдается сразу целиком, как в широкопольных оптических микроскопах, а строится по измеренным значениям интенсивности света (люминесценции или рассеяния, в частности комбинационного), исходящего из последовательно пройденных сфокусированным лазерным лучом точек. При сканировании по трём координатам появляется возможность реконструкции трехмерного изображения объекта (Рис. 13).

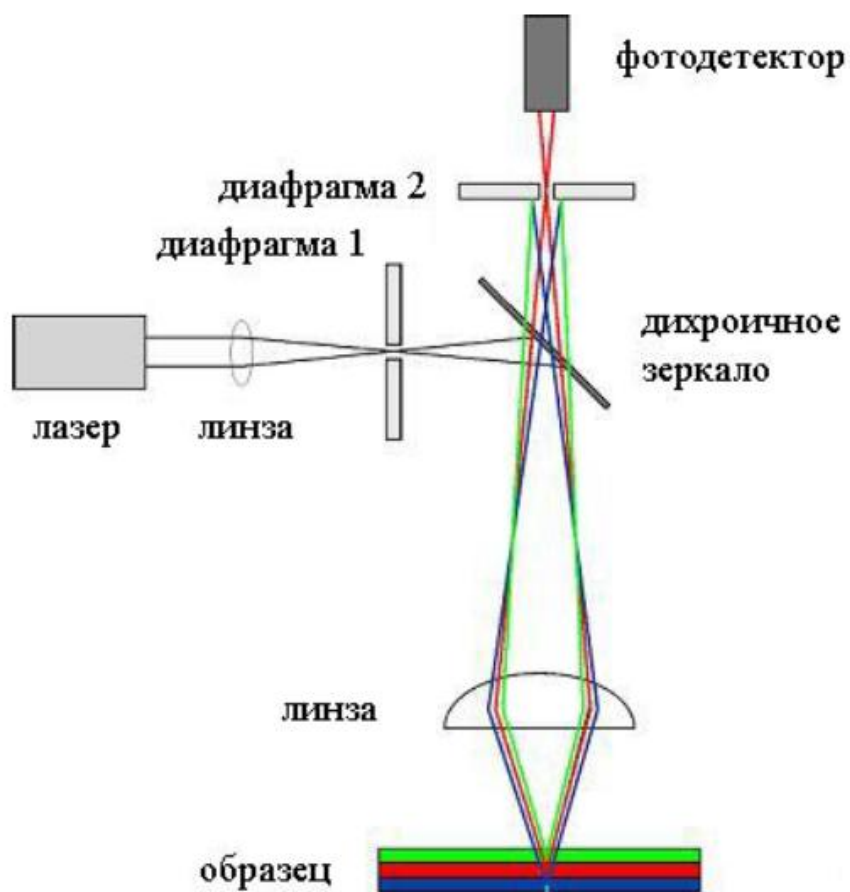


Рисунок 13 - Схема конфокального люминесцентного микроскопа

Пространственное разрешение конфокального микроскопа, как и разрешение обычного (широкопольного) микроскопа, ограничено дифракционным пределом.

Конфокальная микроскопия обеспечивает увеличение контраста изображения за счёт фокусирования возбуждающего излучения лазера с помощью объектива, а также за счёт расположения диафрагмы в плоскости наблюдения перед фотодетектором. Такое увеличение контрастности приводит к возможности разрешения объектов, имеющих различие в интенсивности до 200:1. В конфокальной микроскопии в 1.5 раза улучшается разрешение в плоскости объекта и достигается высокое разрешение вдоль оптической оси. Поэтому конфокальная микроскопия позволяет проводить послойную трёхмерную (3D) реконструкцию объектов (рис.14).

В конфокальном микроскопе есть возможность регистрации спектров люминесценции с очень малых зон образца. Благодаря этому представляется возможным исследовать пространственную неоднородность люминесцентного отклика образца.

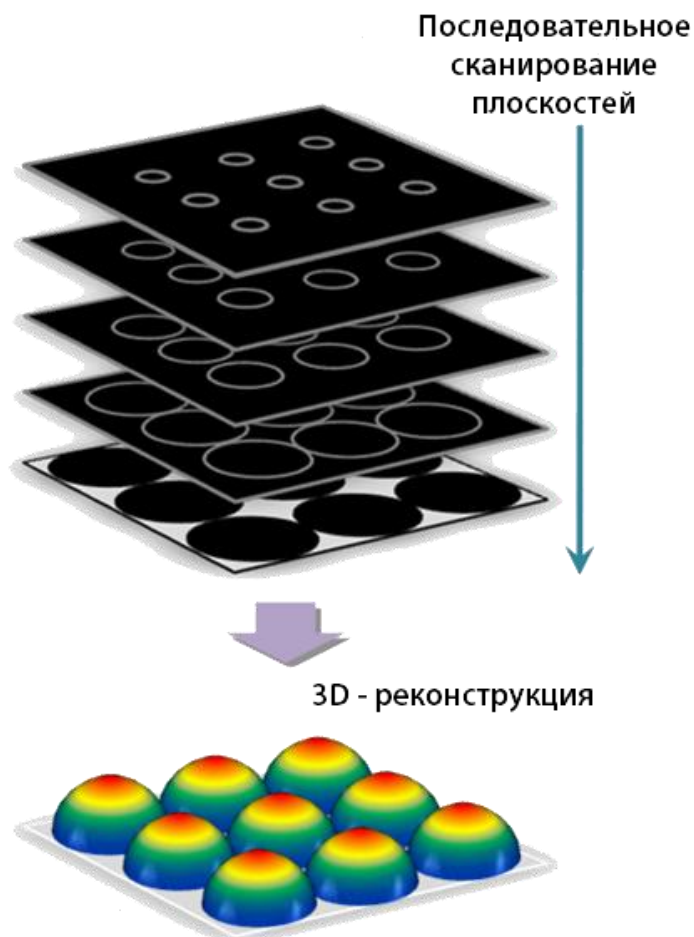


Рисунок 14 - Пример 3D реконструкции с использованием конфокального микроскопа

В конфокальном микроскопе есть возможность регистрации спектров люминесценции с очень малых зон образца. Благодаря этому представляется возможным исследовать пространственную неоднородность люминесцентного отклика образца.

В лабораторной работе используется конфокальный люминесцентный микроскопа LSM 710 (Zeiss, Германия) с программным обеспечением ZEN Black.

5.1. Запуск программного обеспечения микроскопа

1. После запуска программы ZEN открывается главное окно программы (рис. 15). Для удобства запустите окно в его полноэкранном режиме.
2. Для регистрации новых изображений выберите режим «**StartSystem**» в маленьком стартовом окне. Режим «**ImageProcessing**» предназначен для обработки уже существующих изображений.

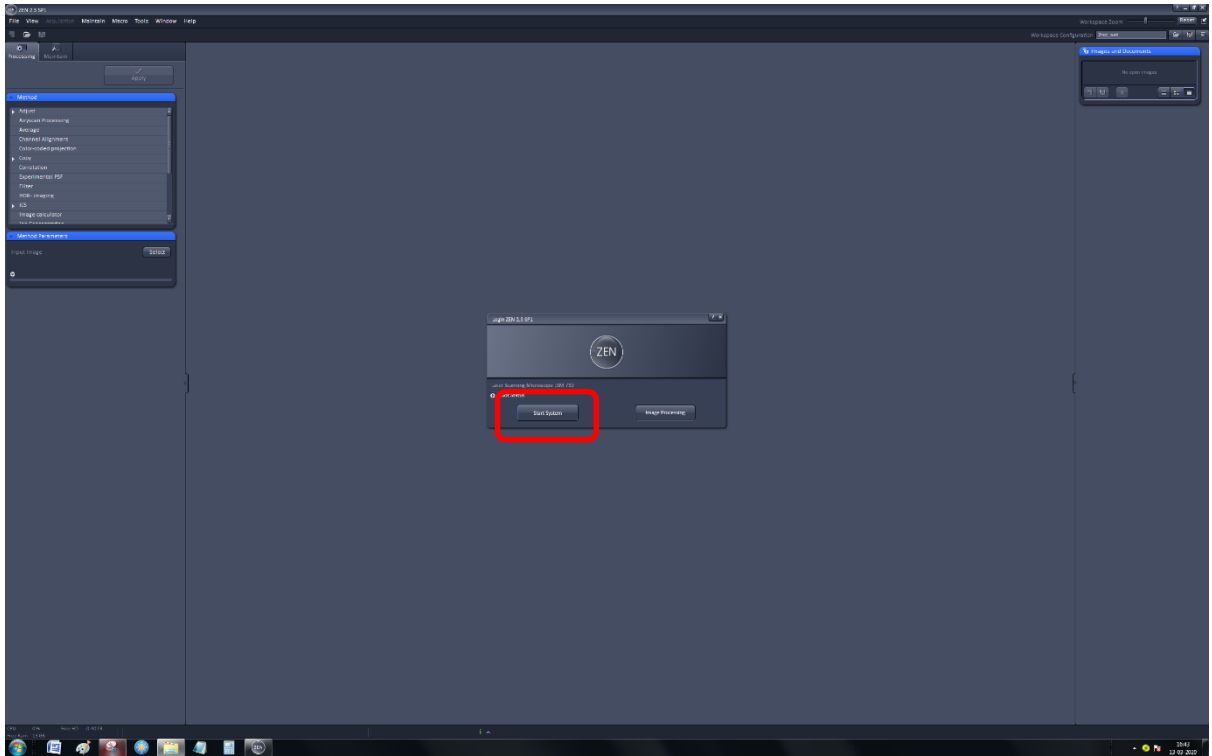
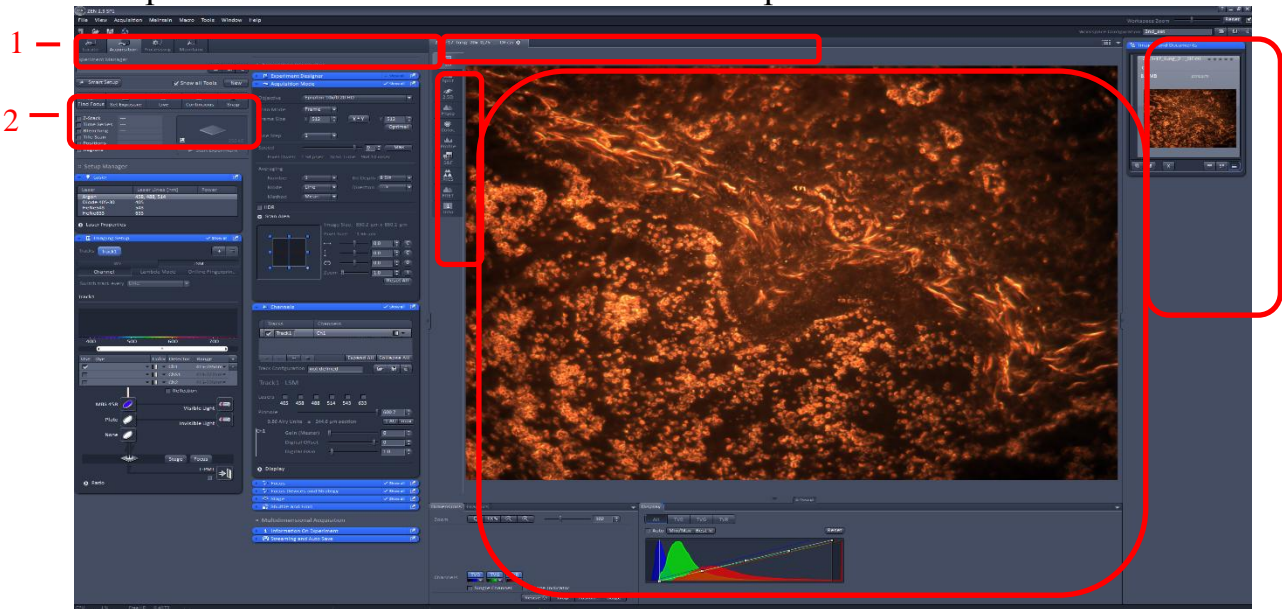


Рисунок 15 - Главное окно приложения ZEN после запуска

После запуска и проверки оборудования программы главное окно программы ZEN(рис. 16), конкретный вид и расположение элементов которого зависит от пользовательских настроек.



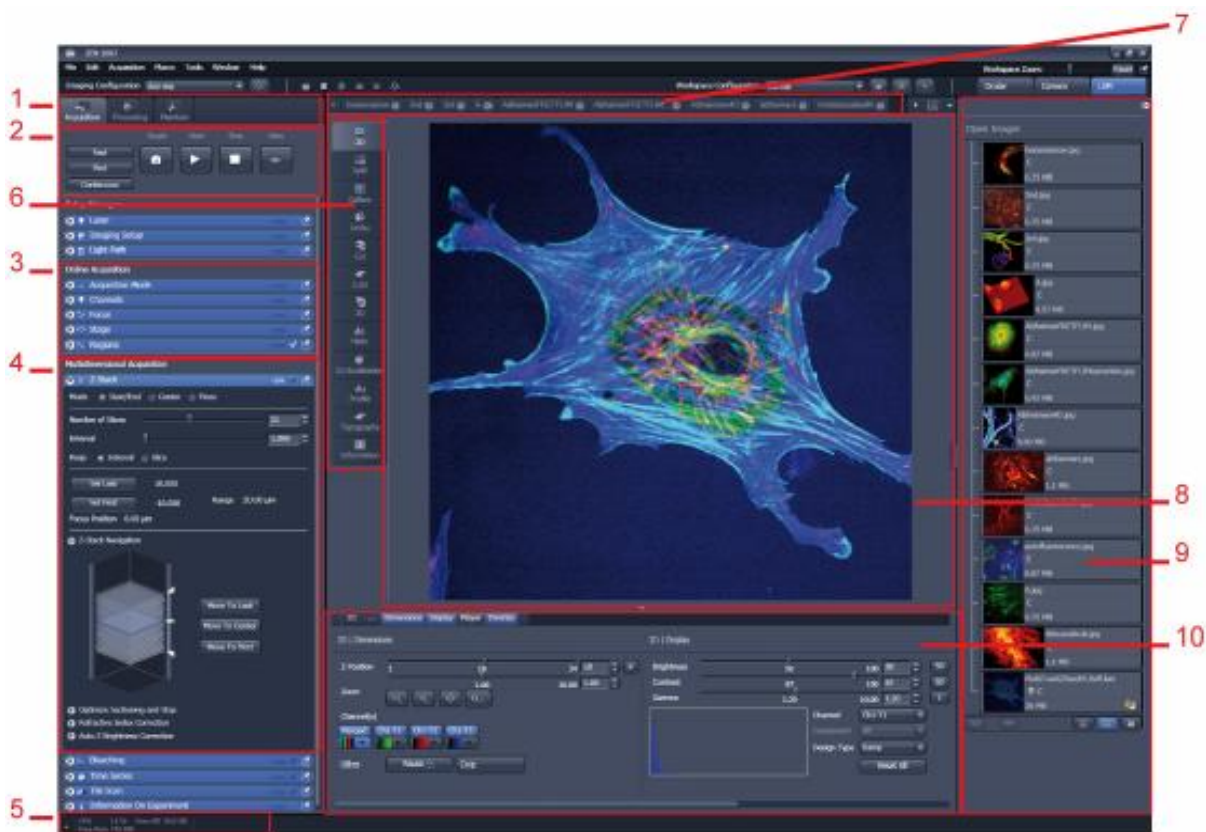


Рисунок 16 - Примеры вида главного окна приложения ZEN после запуска сзагруженными изображениями: 1. Вкладки для переключения между инструментами разных типов; 2. Кнопки управления; 3. Группы инструментов; 4. Окно выбранного инструмента; 5. Строка состояния; 6. Вкладки переключения режимов визуализации изображения; 7. Вкладки переключения изображений; 8. Окно изображения; 9. Реестр обрабатываемых изображений; 10. Средства управления визуализацией

В левой зоне инструментов находятся инструменты для ввода, обработки изображений и инструменты системы технического обслуживания, доступные через 3 основных вкладки (рис. 16, пункт 1). Все функции, необходимые для управления микроскопом и регистрации изображений, находятся во вкладках инструментов (рис. 16, пункты 3 и 4). Они расположены сверху вниз и следуют логике экспериментального процесса. Область для просмотра и взаимодействия с изображениями сосредоточена в центре главного окна программы. Каждое отображаемое изображение может отображаться и/или анализироваться в разных режимах визуализации, доступных через вкладки переключения режимов визуализации изображения, которые можно найти на левой стороне изображения. В соответствии с выбранным режимом визуализации необходимые средства управления визуализацией отображаются в виде блоков управления под каждым изображением. Управление файлами и инструментами обработки данных находится в правой зоне инструментов (см. рис. 2.16).

5.2 Подготовка к регистрации изображения

Перед регистрацией люминесцентного изображения образца необходимо выполнить некоторые настройки.

1. Выбор объектива

Внимание! Смену объектива необходимо осуществлять только в отсутствие образца в конфокальном микроскопе.

Откройте «Acquisition Mode» в левой панели инструментов. В выпавшем окне активируйте объектив (вкладка «Objective»), необходимый для работы (рис 17). Выбранный объектив будет автоматически перемещен на оптическую ось микроскопа.

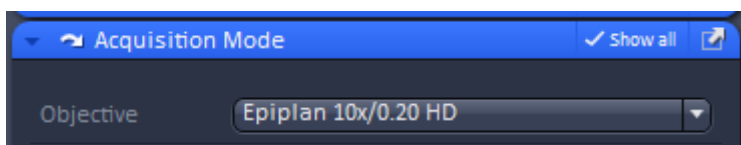


Рисунок 17. Инструмент интерфейса ZEN для выбора объектива

2. Фокусировка

В данном конфокальном микроскопе возможны несколько вариантов визуализации изображения. Это непосредственное наблюдение в окуляр (оно реализуется при выборе закладки «Locate»), регистрация с помощью видеокамеры и система лазерного сканирования («Acquisition»). Закладки «Processing» и «Maintain» служат соответственно для математической постобработки изображений и для обслуживания прибора (Рис. 2.18).

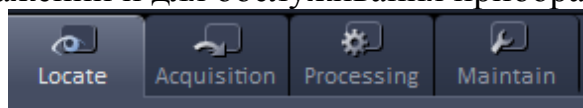


Рисунок 18 - Закладки меню, предназначенные для наблюдения через окуляры, регистрации изображения, постобработки изображения и обслуживания микроскопа

Фокусировка в данной работе должна производиться в режиме непосредственного наблюдения в окуляр микроскопа. Поэтому необходимо переключиться в режим «Locate» и визуальнo сфокусироваться на образец.

5.3. Регистрация люминесцентного изображение образца

Для регистрации люминесцентного изображения образца необходимо переключиться в режим «Acquisition».

Затем следует выбрать режим «Channel Mode», используемый для получения изображений, во вкладке «Image Setup» в левой панели инструментов.

Для создания нескольких спектральных каналов регистрации люминесцентного изображения зайдите во вкладку «Light Path» в левой

панели инструментов. Один канал автоматически создан, создайте еще один канал, поставив галочку в столбце «Use». Теперь следует задать спектральный диапазон детектирования люминесцентного сигнала этих каналов. Это можно сделать, растягивая цветной индикатор в области «Track» (рис. 19).

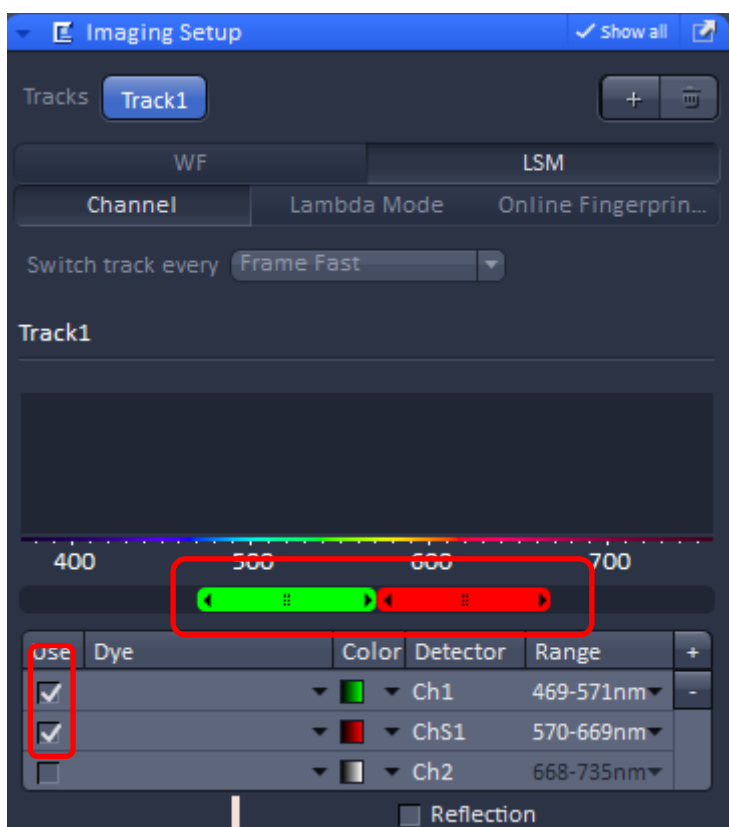


Рисунок 19 - Задание спектральных каналов регистрации люминесценции

В лазерной конфокальной микроскопии преимущественно используются люминесцентные каналы, но также возможно использовать канал пропускания. В режиме «ChannelMode» возможна одновременная регистрация изображений нескольких каналов люминесценции и канала пропускания одного образца. Полученные изображения автоматически совмещаются для формирования единого изображения со всех каналов.

Для того чтобы активировать канал пропускания, необходимо поставить галочку T-PMT во вкладке «LightPath» (рис. 20).

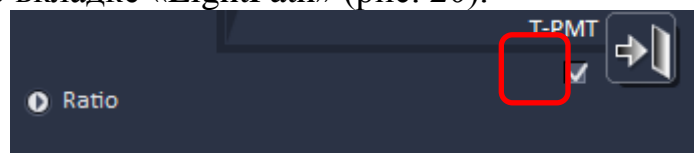


Рисунок 20 - Включение канала пропускания

Вывод изображения в **окне изображения** возможен в нескольких режимах визуализации. Режим «2D» выводит наложенное общее изображение со всех заданных каналов. Чтобы просматривать изображения отдельных каналов, необходимо переключиться в режим «Split». (Рис. 21). Управлять параметрами каждого канала можно во вкладке «Channels» раздела «OnlineAcquisition».

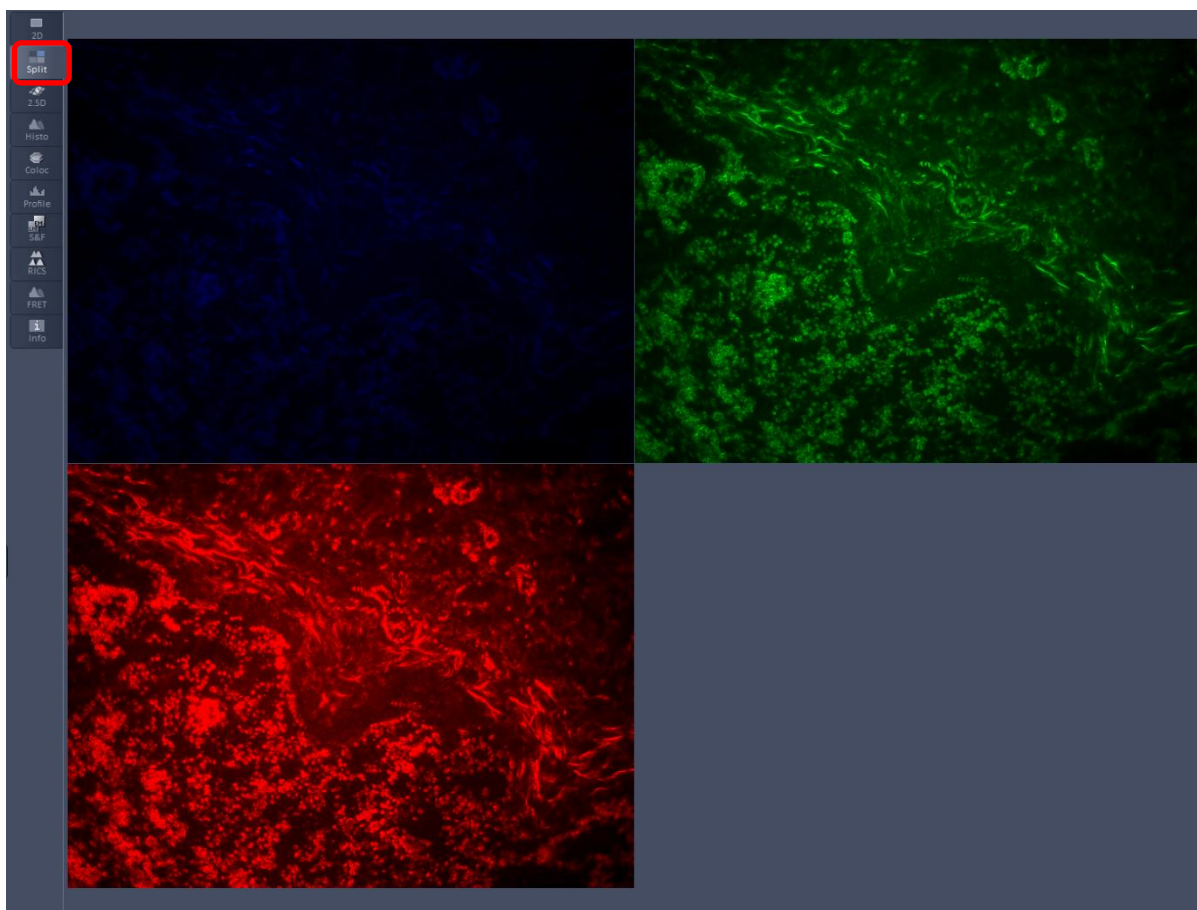


Рисунок 21 - Раздельно показанные люминесцентные изображения, соответствующие трем спектральным каналам

Выбор источника возбуждающего света (лазера) осуществляется во вкладке «LaserTool» в **левой панели инструментов** (рис. 22). В данной работе в качестве источника возбуждения используется полупроводниковый (диодный) лазер с длиной волны излучения 405 нм (LaserDiode 405). Для активации лазера во вкладке «Channels» в области "Setup manager" необходимо поставить галочку у длины волны 405 нм.

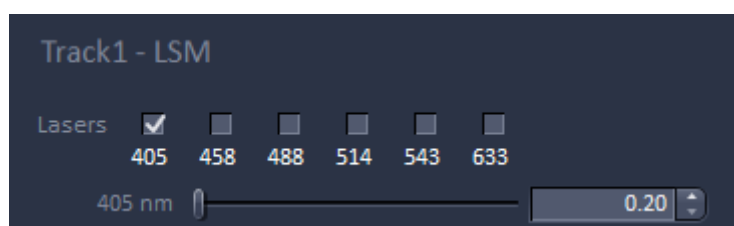


Рисунок 22 - Выбор длины волны лазера, используемого для возбуждения люминесценции (и мощности лазера в процентах от максимальной)

Остальные настройки каналов задает преподаватель или оператор. После этого можно приступить к получению люминесцентных изображений. Вначале необходимо убедиться, что в режиме «Acquisition» изображение сфокусировано в необходимой плоскости образца. Для этого можно воспользоваться режимом регистрации «Continuous», в котором происходит непрерывное сканирование

образца с заданной скоростью. Выбрать скорость сканирования следует в «AcquisitionMode» в **левой панели инструментов** (рис 23).

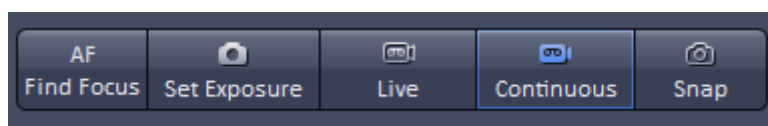


Рисунок 23 - Режимы регистрации

В окне «AcquisitionMode» выберите значение «Speed», равное 9 (рис. 24). В окне изображения появится непрерывно сканируемое изображение образца.

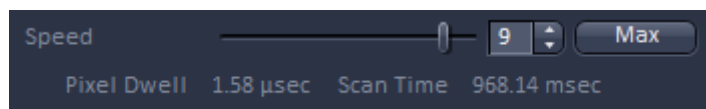


Рисунок 24 - Выбор скорости сканирования.

В этом режиме можно выполнить точную фокусировку на образце, используя привод фокусировки. После того, как будет получено сфокусированное люминесцентное изображение образца, необходимо зарегистрировать люминесцентное изображение, нажав кнопку «Single». Помните, что несохраненные 2D-изображения в активной вкладке изображения будут автоматически переписаны при повторном сканировании.

Чтобы сохранить зарегистрированные или обработанные изображения, выберите «Save» или «Save as» в меню «File». После этого появится окно «Save as».

- Введите имя файла и выберите формат изображения *.czi(этот формат, как и *.ism, является собственным форматом данных LSM Carl Zeiss; файлы *.czi, кроме изображений, содержат дополнительную информацию и аппаратные параметры эксперимента).
- Нажмите на кнопку «Save».

Затем необходимо экспортировать данные («File» - «Export») в одном из общепринятых графических форматов, например *.jpg. Это позволит обращаться к зарегистрированным изображениям без использования специального программного обеспечения. В появившемся окне экспорта выберите «Select file name and save...». Затем выберите имя файла и нажмите «Save».

5.4. Регистрация спектров люминесценции образца

Для регистрации спектров люминесценции необходимо выбрать «Lambda Mode» во вкладке «Imaging Setup». При выборе этого режима в выпадающей зоне «Imaging Setup» отображается длина волны генерации активного лазера и спектральный диапазон регистрации. С помощью этого режима визуализации можно получить люминесцентные изображения образца в выбранном спектральном диапазоне, полученные наложением определенного количества

люминесцентных изображений (сигнала интенсивности люминесценции для каждого пикселя на определенной длине волны регистрации), зарегистрированных последовательно на разных длинах волн регистрации (точнее, в узких спектральных диапазонах шириной от нескольких нанометров). Минимальный шаг между длинами волн регистрации составляет 3.2 нм. Каждое полученное изображение сигнала интенсивности люминесценции визуализируется цветом, соответствующим длине волны регистрации. Затем при наложении полученных изображений формируется общее люминесцентное изображение образца в цвете, приближенном к естественному. Также этот режим предоставляет возможность получения спектров люминесценции. Для этого надо переключиться в режим визуализации «Unmixing».

Следует помнить, что так как в режиме «Lambda» используется новый канал, не связанный с каналами режима «Channels»; параметры для него необходимо задать заново (см. предыдущий пункт).

В рамках выполнения лабораторной работы необходимо получить спектры люминесценции с нескольких локальных областей, входящих в общую область. Инструменты для задания области регистрации находятся в **области управления визуализацией** (рис. 25.).

Для задания максимально возможной в данной конфигурации области регистрации выберите значок прямоугольника в области «Unmixing» и растяните его по границам области изображения образца. Для создания произвольной локальной области регистрации выберите значок круга и разместите его в произвольном месте области изображения образца. После задания всех областей регистрации можно приступить к регистрации спектров и люминесцентного изображения, нажав кнопку «Snap».

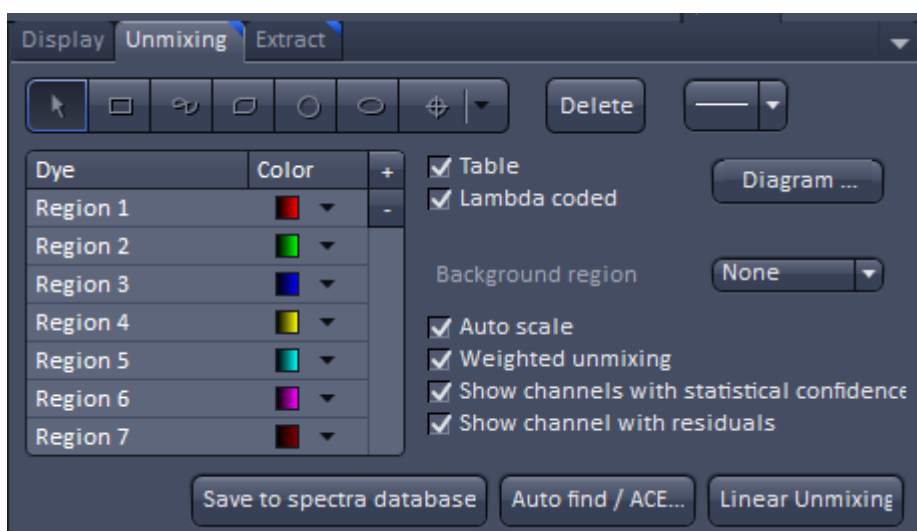


Рисунок 25 - Инструменты для задания области регистрации

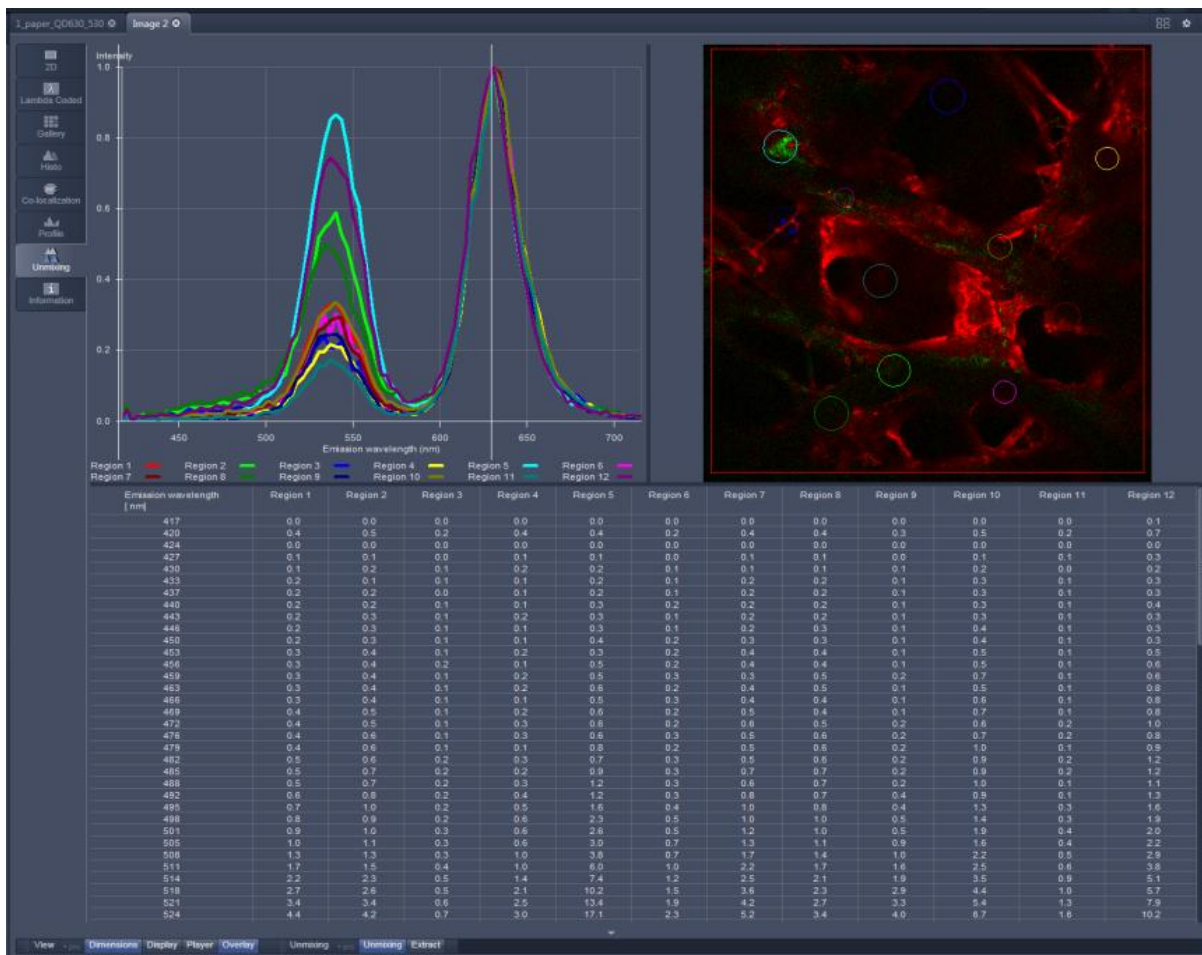


Рисунок 26 - Вид окна вывода изображения с зарегистрированным люминесцентным изображением и спектрами люминесценции в режиме визуализации «Unmixing» режима «Lambda mode»

Спектры люминесценции и люминесцентное микроизображение будут создаваться путем последовательного сканирования люминесцентного сигнала на отдельных длинах волн регистрации люминесценции через заданный шаг длин волн регистрации. Для всех выбранных областей регистрации спектры создаются одновременно и выводятся в окне изображения (рис. 26).

Под областью изображения выводятся данные в табличном формате. Для сохранения этих спектров люминесценции в текстовом формате *.txt необходимо кликнуть правой кнопкой мыши по таблице и выбрать Save table... Затем сохраните полученное люминесцентное изображение, как описано в предыдущем пункте.

Андрей Викторович Вениаминов
Екатерина Петровна Колесова
Орлова Анна Олеговна

**ФИЗИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ
ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ ГИБРИДНЫХ
НАНОСТРУКТУР**

Учебно-методическое пособие

В авторской редакции
Редакционно-издательский отдел НИУ ИТМО
Зав. РИО
Лицензия ИД № 00408 от 05.11.99
Подписано к печати
Заказ №
Тираж
Отпечатано на ризографе

Н.Ф. Гусарова

Редакционно-издательский отдел
Университета ИТМО
197101, Санкт-Петербург, Кронверкский пр., 49, литер А