Лабораторный практикум по курсу «Современная молекулярная спектроскопия»

к.ф.-м.н. Шерин П.С.

Кафедра Химической и Биологической Физики
Физического Факультета
Новосибирского Государственного Университета

Новосибирск, 2018 г.

Аннотация

В настоящем пособии кратко изложены основы оптической спектроскопии электронного возбуждения в конденсированной среде, а также дано описание лабораторной работы, список контрольных вопросов, необходимых для проверки знаний студентов по данной работе, и задание лабораторной работы.

Электронные переходы в органической молекуле в результате оптического возбуждения удобно представлять на диаграмме Яблонского, см. Рис.1. Синглетное основное, первое и второе возбужденные состояния обозначены как S_0, S_1 и S_2, соответственно. Для каждого электронного состояния есть колебательные и вращательные возбужденные состояния, обозначаемые соответствующими индексами 1, 2, 3 и т.д. Переходы между состояниями показаны в виде вертикальных линий, чтобы показать мгновенность поглощения кванта света. Эти переходы происходят на временах порядка 10^{-15} с (1 фемтосекунда), что является слишком коротким интервалом времени для смещения ядер. Это называется принципом Франка-Кондона.

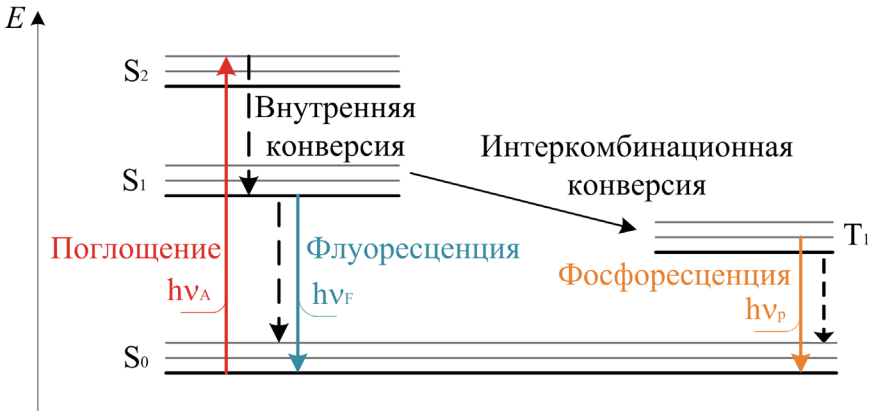


Рис. 1. Диаграмма Яблонского. S_0, S_1, S_2 – синглетные электронные возбужденные состояния, T_1 – триплетное электронное возбужденное состояние, *E* – энергия.

После поглощения кванта света могут происходить следующие процессы. Обычно возбуждение происходит в колебательно возбужденный уровень S_1, S_2 или более высоколежащего электронного возбужденного состояния. В конденсированной среде (жидкий раствор) в молекулах происходит быстрая релаксация в нижнее колебательно невозбужденное S_1 состояние. Этот процесс называется внутренней конверсией, и он происходит за времена порядка 10^{-12} с или быстрее. Поскольку типичные времена жизни флуоресценции составляют величины 10^{-9} – 10^{-8} с, то внутренняя конверсия как правило завершается до излучения (эмиссии) кванта света. Таким образом, как правило, флуоресценция происходит из термически уравновешенного возбужденного состояния S_1, с нижнего колебательного уровня. Это называется правилом Каша.

Важным следствием быстрой внутренней конверсии в нижнее колебательно возбужденное S_1 состояние является независимость общей интенсивности (или квантового выхода) и формы спектра эмиссии молекулы от длины волны возбуждения. Впервые об этом сообщил Вавилов в 1926 г. значительно ранее обобщения, сделанного Каша. Однако, в научной литературе этот закон, как правило, называется правилом Каша, и лишь некоторые исследователи, отдавая дань истории, называют его правилом Вавилова-Каша.

Дальнейшие переходы из нижнего колебательно возбужденного S_1 состояния могут включать в себя излучательный переход в основное состояние S_0 (флуоресценция), аналогичный безызлучательный переход в S_0 состояние (внутренняя конверсия) и конверсию спина с образованием триплетного состояния T_1 (интеркомбинационная конверсия).

Переход в основное S_0 состояние может происходить в высоколежащие колебательные уровни, которые быстро (10^{-12} с) приходят в термическое равновесие. Важным следствием

эмиссии с переходом на высоколежащие колебательные уровни S_0 состояния является зеркальная симметрия спектра эмиссии относительно спектра поглощения $S_0 \rightarrow S_1$. Эта симметрия происходит из-за того, что зачастую электронное возбуждение незначительно меняет положение ядер в молекуле. Т.е. расстояния по энергии между колебательными уровнями являются близкими как для основного, так и возбужденного состояний. Как результат, для симметричных молекул колебательная структура проявляется как в спектрах поглощения, так и эмиссии, что может быть хорошо проиллюстрировано случаем перилена в бензоле, см. верхнюю часть Рис.2. В случае отсутствия симметрии в структуре молекулы наблюдаются широкие полосы; один из таких случаев приведен на нижней части Рис.2.

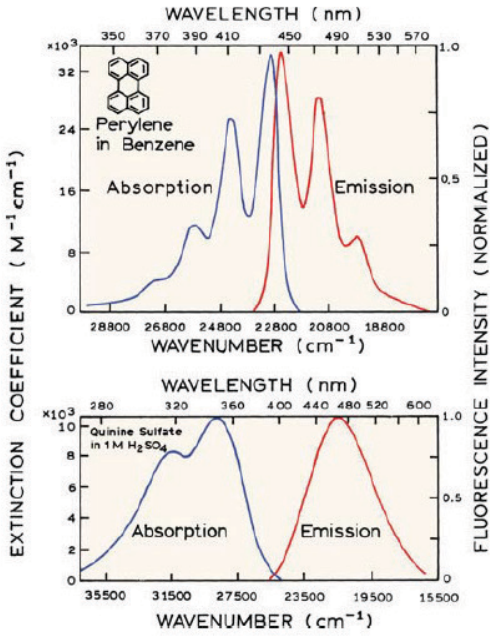


Рис. 2. Спектры поглощения (синий цвет) и эмиссии (красный цвет) перилена (верхняя панель) и хинина (нижняя панель). Данные приведены из источника [Principles of Fluorescence Spectroscopy, J.R. Lakowicz, Springer Science+Business Media, 2006, с. 4].

Основными каналами гибели T_1 состояния являются излучательный (фосфоресценция) и безызлучательный (интеркомбинационная или T-S конверсия) переходы в S_0 состояние. Поскольку эти переходы запрещены по спину, то константы скорости этих процессов на несколько порядков меньше аналогичных переходов между уровнями одной мультиплетности. В силу низкого значения константы скорости фосфоресценции ее итоговая интенсивность очень мала, что сильно затрудняет ее регистрацию. Дополнительные затруднения в регистрации этого излучения вызывает эффективное тушение триплетных состояний молекулярным кислородом, присутствующем в следовых количествах даже в дегазированных растворах. Вследствие вышеизложенного, за редкими исключениями, в конденсированной среде при комнатной температуре фосфоресценция не наблюдается.

Таким образом, на основании диаграммы Яблонского можно сделать следующие выводы:

1. В случае присутствия в растворе одного химически чистого соединения форма спектра эмиссии не зависит от длины волны возбуждения.
2. Спектр эмиссии всегда по энергии ниже спектра поглощения.
3. Спектр эмиссии является зеркально симметричным относительно спектра поглощения S_0 -> S_1.

На практике, одним из важных следствий правила Каша является возможность проверки чистоты химического соединения по флуоресценции. Для этого исследователи записывают так называемые спектры флуоресцентного возбуждения: зависимость сигнала флуоресценции на фиксированной длине волны от длины волны возбуждающего излучения. Поскольку интенсивность флуоресценции линейно зависит от количества поглощенного света, то, в случае единственного химически чистого соединения в растворе, спектр возбуждения должен совпадать со спектром поглощения. Как правило запись спектров возбуждения проводится на нескольких длинах волн по спектру флуоресценции (см. Рис. 3). Совпадение профилей спектров возбуждения со спектром поглощения указывает на так называемую «оптическую» чистоту вещества. Последнее означает, что если примеси и присутствуют в растворе, то их вклад в спектры поглощения и эмиссии незначителен.

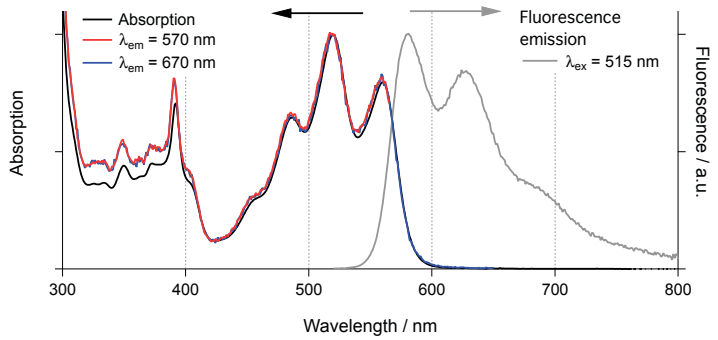


Рис. 3. Спектры поглощения (черный цвет), флуоресцентной эмиссии (серый цвет) и флуоресцентного возбуждения (красный и синий цвет для длин волн эмиссии 570 и 670 нм, соответственно) для триангуленового красителя в водном растворе. Данные приведены из источника [Wallabregue A. et. al. // J.Am.Chem.Soc. **2016**, 138, 1752-1755].

Сольватохромия

Рассмотренная выше диаграмма Яблонского включает только основные процессы, не учитывая различные взаимодействия между исследуемой молекулой в возбужденном состоянии и молекулами растворителя. Одним из наиболее значительных взаимодействий является диполь-дипольное взаимодействие, которое может приводить к изменению положения нижнего S_1 состояния по энергии относительно Франк-Кондоновского состояния. Рассмотрим это явление подробней.

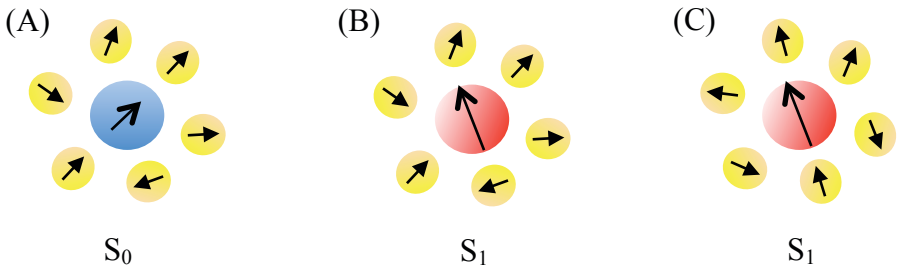


Рис. 3. Схематичное изображение молекулы в полярном растворителе: (A) в S_0 состоянии в равновесии с молекулами растворителя, (B) в S_1 состоянии до переориентации молекул растворителя (неравновесное состояние) и (C) в S_1 состоянии в равновесии с молекулами растворителя.

Распределение зарядов (электронной плотности) внутри молекулы определяет дипольный момент этой молекулы. В S_0 состоянии исследуемая молекула находится в равновесии с окружающими ее молекулами растворителя (Рис. 3А). Если молекулы растворителя обладают дипольным моментом (полярные растворители), то они ориентированы по электрическому полю, создаваемому исследуемой молекулой. Переход в электронно-возбужденные состояния изменяет распределение электронной плотности в исследуемой молекуле, что меняет дипольный момент как по направлению, так и его абсолютной величине (Рис. 3В). Как следствие, молекулы растворителя переориентируются относительно новой конфигурации электрического поля (Рис. 3С). Переориентация молекул растворителя относительно исследуемой молекулы приводит к изменению положения нижнего колебательно возбужденного S_1 состояния по энергии относительно Франк-Кондоновского состояния. Данный процесс называется релаксацией растворителем или сольватационной релаксацией. С точки зрения регистрируемых спектров поглощения и эмиссии это приводит к их сдвигу в красную область (батохромный сдвиг) или в синюю область (гипсохромный сдвиг) наблюдаемого спектра в зависимости от структуры молекулы и растворителя. Эти сдвиги называют сольватохромными, а исследование влияния растворителя на спектры – сольватохромией.

Сольватационные смещения спектров поглощения ($\Delta E_{абс}$) и флуоресценции ($\Delta E_{фл}$) могут быть записаны следующим образом:

$$\Delta E_{абс} = E_{абс}(ваккум) - E_{абс}(раствор) = \frac{\vec{\mu}_o(\vec{\mu}_в - \vec{\mu}_o)}{4\pi\varepsilon_0 a^3}\left[\varphi(\varepsilon_p) - \varphi(n^2)\right] \quad (1)$$

$$\Delta E_{фл} = E_{фл}(ваккум) - E_{фл}(раствор) = \frac{\vec{\mu}_в(\vec{\mu}_в - \vec{\mu}_o)}{4\pi\varepsilon_0 a^3}\left[\varphi(\varepsilon_p) - \varphi(n^2)\right] \quad (2)$$

$$\varphi(\varepsilon_p) = \frac{\varepsilon_p - 1}{\varepsilon_p + 2} \quad (3а)$$

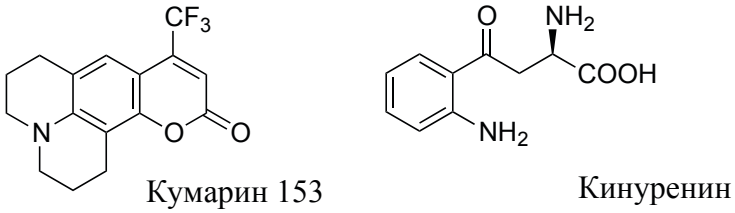
$$\varphi(n^2) = \frac{n^2 - 1}{n^2 + 2} \quad (3б)$$

где $\vec{\mu}_o$ – дипольный момент молекулы в основном состоянии S_0, $\vec{\mu}_в$ – дипольный момент в нижнем колебательно возбужденном S_1 состоянии, a – радиус растворенной молекулы в приближении, что она является сферой, ε_p – диэлектрическая проницаемость и n – коэффициент преломления растворителя. Как правило, дипольный момент молекулы измеряется в единицах Дебая (1 Д = 3.336×10^{-30} Кл×м). Разница по энергии между максимумами поглощения и эмиссии называется сдвигом Стокса. Комбинация этих уравнений приводит к уравнению, описывающему зависимость сдвига Стокса от полярности растворителя. Это выражение называется уравнением Липперта-Матага:

$$\Delta E_{абс} = \Delta E_{абс} - \Delta E_{фл} = \frac{(\vec{\mu}_в - \vec{\mu}_o)^2}{4\pi\varepsilon_0 a^3}\left[\varphi(\varepsilon_p) - \varphi(n^2)\right] \quad (4)$$

Необходимо отметить, что это уравнение не учитывает множество различных взаимодействий между растворенным веществом и молекулами растворителя, такими как межмолекулярные водородные связи или внутримолекулярный перенос заряда. В первой части лабораторной работы мы познакомимся с молекулой кумарин 153 (см. химическую структуру на Рис. 4), чьи спектральные свойства хорошо описываются уравнением

Липперта-Матага, а во второй части – с ярким исключением из этого правила, молекулой кинуренина.



Кумарин 153 Кинуренин

Рис. 4. Химические структуры кумарина 153 (слева) и кинуренина (справа).

Влияние растворителя на фотофизические свойства молекулы

Наличие электрон-донорных и электрон-акцепторных функциональных групп в структуре молекулы может приводить к такому явлению как внутримолекулярный перенос заряда при переходе $S_0 \rightarrow S_1$. Этим термином обозначается существенная перегруппировка электронной плотности в молекуле, приводящая к тому, что в состоянии S_1 разные части молекулы приобретают отчетливо выраженные различные заряды на разных функциональных группах молекулы. Внутримолекулярный перенос заряда приводит к сильному изменению дипольного момента при переходе $S_0 \rightarrow S_1$ и, как следствие, значительному сдвигу спектра флуоресценции относительно поглощения даже в неполярных растворителях. В полярных растворителях, а также тех, которые способны быть донорами водородной связи (протонные растворители), также может наблюдаться существенное ускорение канала безызлучательной гибели S_1 состояния. Как следствие, это приводит к уменьшению интенсивности флуоресценции или, иными словами, уменьшению времени жизни S_1 состояния.

Одним из таких примеров является молекула кинуренина (см. Рис. 4), которая обладает амино- и карбонильной группами, которые являются донором и акцептором электронной плотности, соответственно. В результате внутримолекулярного переноса заряда при переходе $S_0 \rightarrow S_1$ наблюдается существенный сдвиг полосы флуоресценции относительно полосы поглощения (сдвиги Стокса $5\text{-}7\times10^3$ $см^{-1}$ в зависимости от растворителя). Другим следствием этого переноса заряда является ускорение внутренней конверсии $S_1 \rightarrow S_0$ в случае протонных растворителей. Ранее было показано, что при смене молекулярного окружения, в котором отсутствуют межмолекулярные водородные связи (апротонные органические растворители), на среду, насыщенную этими связями (протонные органические растворители, вода), наблюдается уменьшение величин квантового выхода и времени жизни флуоресценции кинуренина на два порядка. Это означает, что при переходе из одной среды в другую кинуренин полностью меняет свое поведение с эффективного излучения света на его практически полное отсутствие.

Очень малое время жизни S_1 состояния кинуренина в водном растворе вместе с крайне малым выходом триплетных состояний означает эффективное преобразование энергии фотона в тепло. Это свойство кинуренина играет важную роль в биологии, а именно в защите тканей глаза от УФ излучения: кинуренин содержится в больших количествах в хрусталике глаза человека, где выполняет роль молекулярного УФ фильтра, предохраняя хрусталик и сетчатку от УФ излучения Солнца.

Используемые экспериментальные установки

Для регистрации спектров поглощения исследуемых молекул в растворителях будет использоваться спектрофотометр Agilent HP8453. Схема данного прибора приведена на Рис 5. Свет от вольфрамовой и дейтериевой ламп, проходя через линзу, поглощается находящимся в кювете раствором. Далее свет, прошедший через исследуемый образец, фокусируется на дифракционную решетку и раскладывается в спектр по длинам волн. Соответствующие интенсивности для каждой длины волны детектируются фотодиодной линейкой, и на выходе записывается спектр поглощения исследуемого раствора. В данном и последующих экспериментах будет использована стандартная кварцевая кювета с сечением 1 см × 1 см.

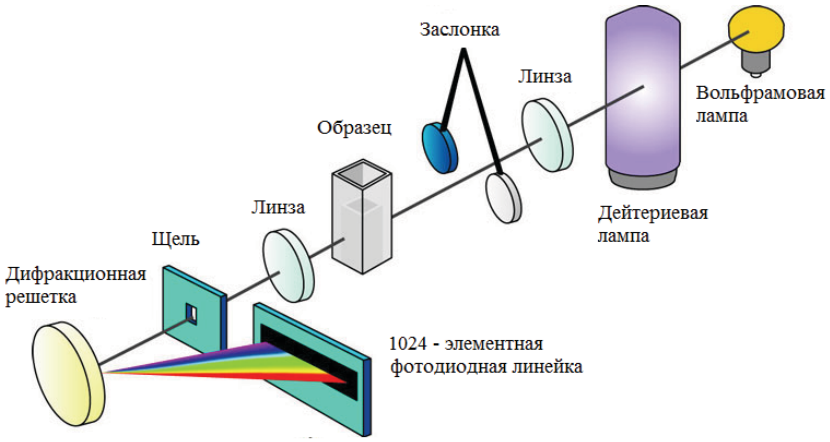


Рис. 5. Оптическая схема спектрофотометра Agilent HP8453.

Для регистрации спектров эмиссии будет использован спектрофлуориметр Edinburgh Instruments FLSP920 (Рис. 6). Свет от ксеноновой лампы 1, фокусируется на входных щелях монохроматора 2 (схема Черни-Тернера). Поворотом дифракционной решетки происходит выбор заданной длины волны. Далее свет выбранной длины волны, проходя через выходную щель с помощью линзы фокусируется и поглощается образцом в камере 3. Флуоресценция, излучаемая образцом, проходит через собирающую линзу и попадает в выходной монохроматор 4, аналогичный входному. После монохроматора 4 свет поступает в детектор 5 (охлаждаемый микроканальный фотоумножитель), измеряющий интенсивность падающего света. Таким образом, на выходе записывается спектр флуоресценции в виде зависимости интенсивности $I(\lambda)$.

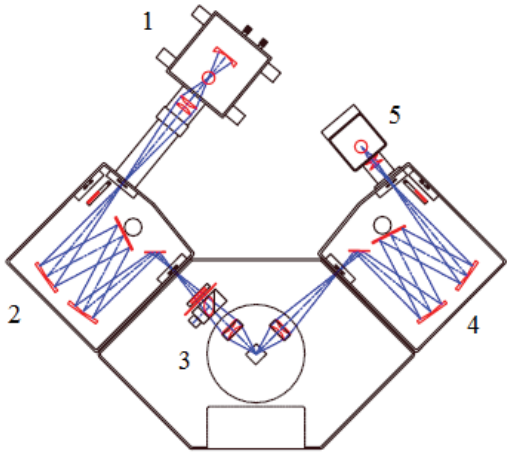


Рис. 6. Схема работы спектрофлуориметра Edinburgh Instruments FLSP920.

Для записи время-разрешенной флуоресценции будет использован метод время-коррелированного счета фотонов (Time-Correlated Single Photon Counting, TCSPC). Этот метод позволяет детектировать времена жизни флуоресценции от пикосекунд до микросекунд. В этом методе образец облучается низкоинтенсивными импульсами лазера с высокой частотой (5-20 МГц). Время-коррелированный сигнал флуоресценции записывается с помощью фотоумножителя, работающего в режиме счета фотонов. Итоговый временной профиль гибели флуоресценции (или кинетики гибели флуоресценции) получается в результате суммирования сигналов в каждый момент времени. Типичные примеры временных профилей представлены на Рис. 7. Значение времени жизни флуоресценции получается путем аппроксимации экспериментально измеренного временного профиля с экспоненциальной функцией, численно свернутой с аппаратной функцией прибора (иными словами, временным профилем импульса лазера). Использование одной экспоненциальной функции справедливо в случае химически чистого вещества, присутствующего в образце в одной форме. В случае, если излучающих форм две или более (различные кислотно-основные равновесия) или в растворе присутствуют посторонние примеси (наиболее частая ситуация), то это может приводить к сложному профилю гибели флуоресценции. Тогда необходимо использование суммы нескольких экспоненциальных функций, каждая из которых будет соответствовать эмиссии от различных излучающих молекул.

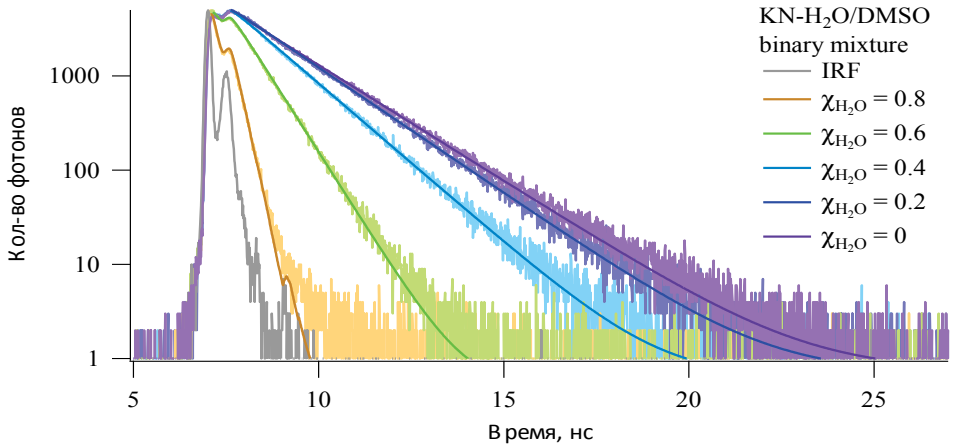


Рис. 7. Временные профили флуоресценции кинуренина в бинарных смесях вода/ диметилсульфоксид с различным составом смеси (мольные доли, χ, измеряемые от 0 до 1). Профили записаны на длине волны 480 нм после возбуждения образцов на 375 нм.

Контрольные вопросы

Флуоресценция

1. Как расположен спектр флуоресценции по отношению к спектру поглощения?
2. Почему спектр флуоресценции зачастую является зеркальным отражением спектра поглощения (первой полосы поглощения)?
3. Что такое спектр возбуждения флуоресценции?
4. В чем заключается правило Вавилова-Каша?

Эффект влияния среды на спектры электронного поглощения и эмиссии

1. Что такое дипольный момент? В каких единицах он измеряется?

2. Что такое энергия сольватации? Какие взаимодействия дают основной вклад в эту энергию?
3. Что такое сольватохромия? В каких случаях наблюдают батохромные сдвиги (в красную область) и гипсохромные сдвиги (в синюю область)?
4. Что такое сдвиг Стокса?

Задания лабораторной работы

1. Сольватохромия

Если дипольный момент молекулы существенно меняется при переходе из основного в возбужденное состояние, то позиция и форма спектров поглощения и эмиссии сильно зависят от полярности окружения. Данная лабораторная работа предоставляет возможность убедиться в этом эффекте, а также оценить изменение дипольного момента молекулы при переходе $S_1 \rightarrow S_0$.

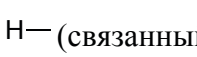
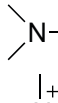
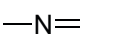
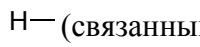
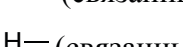
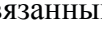
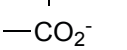
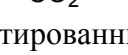
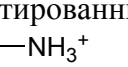
1. Приготовьте растворы кумарина 153 в циклогексане, хлороформе, тетрагидрофуране, и диметилформамиде. Запишите спектры поглощения и эмиссии для каждого растворителя. Для корректной записи спектров эмиссии используйте соответствующие длины волн возбуждения, чтобы полностью записать спектр эмиссии (голубой край спектра эмиссии должен быть зарегистрирован). Как изменяется форма спектров при изменении растворителя?
2. Запишите спектры возбуждения флуоресценции для кумарина 153 в одном из растворителей. Является ли исследуемое вещество «оптически» чистым?
3. Определите положения максимумов поглощения и эмиссии для всех спектров как в единицах длин волн, так и в обратных сантиметрах.
4. Постройте таблицу, содержащую значения положений максимумов спектров поглощения и эмиссии как в длинах волн, так и в обратных сантиметрах, сдвигов Стокса, констант диэлектрической проницаемости, коэффициента преломления и величины $[\varphi(\varepsilon_r) - \varphi(n^2)]$.
5. Постройте график зависимости сдвига Стокса для различных растворителей от величины $[\varphi(\varepsilon_r) - \varphi(n^2)]$ и рассчитайте изменение дипольного момента кумарина 153 в единицах Дебая (1 Д = 3.336×10^{-30} Кл×м) между дипольными моментами в возбужденном и основном состояниях. Для оценки объема, занимаемого молекулой, рассчитайте радиус молекулы методом инкрементов Ван-дер-Ваальса (см. Таблицу 1 и краткое описание метода инкрементов на с.11).

2. Влияние растворителя на фотофизические свойства молекулы

Как можно видеть из диаграммы Яблонского, гибель S_1 состояния определяется конкуренцией как минимум трех процессов: флуоресценции, внутренней конверсии и интеркомбинационной конверсии в триплетное состояние. Изменение скорости одного из этих процессов неизбежно приводит к изменению флуоресцентных свойств молекулы: общей интегральной светимости (квантовый выход) и времени жизни. Во второй части лабораторного практикума предлагается познакомиться с методом время-коррелированного счета фотонов (Time Correlated Single Photon Counting, TCSPC) и убедиться в существенном влиянии свойств среды на время жизни флуоресценции на примере природного УФ фильтра хрусталика глаза – кинуренина.

1. Приготовьте растворы кинуренина в воде, этиловом спирте, диметилсульфоксиде. Запишите спектры поглощения и эмиссии, временные профили гибели флуоресценции. На какой длине волны излучения лучше записывать временные профили? Как они изменяются в зависимости от растворителя?
2. Определите время жизни синглетного состояния кинуренина для всех трех растворителей.
3. Установите, с каким из свойств растворителя связана наблюдаемая разница во времени жизни: полярность, коэффициент преломления, свойство быть донором или акцептором водородной связи или поляризуемостью растворителя (последние три параметра являются так называемыми параметрами Камлета и Тафта, α, β и π*, см. Таблицу 2).

Таблица 1. Значения инкрементов Ван-дер-Ваальса для различных атомов или групп [J. T. Edward J. Chem. Educ. **1970**, 47, 261-270].

Атом или группа	Инкремент ($Å^3$)	Атом или группа	Инкремент ($Å^3$)
	5.6		11.3
	8.1		10.1
	11.6		17.9
	13.4		20.1
 (связанный с C)[а]	5.7		7.2
(связанный с C)[б]	5.3		4.6
(связанный с N)	5.2		8.6
(связанный с N^+)	2.3		6.7
 (связанный с O)	7.2		11.0
 (связанный с S)	6.6		17.2
	9.9		14.8
	19.8	 (гидратированный)	71.0
	24.5	 (гидратированный)	11.5
	6.2		27.9

[а] – в углеродной цепи (алканы, алкены, алкины)

[б] – в ароматическом кольце

Метод инкрементов Ван-дер-Ваальса позволяет оценить объем молекулы в виде суммы объемов отдельных атомов (инкрементов), из которых она состоит. В данном методе представляется, что каждый атом имеет некоторый объем в зависимости от его

химической природы и положения в структуре молекулы. Например, атом углерода в углеводородной цепи и ароматическом кольце будет давать различный вклад в общий объем молекулы, см. Таблицу 1. Значения инкрементов для ряда атомов и молекул были эмпирически посчитаны в работе [J. T. Edward J. Chem. Educ. **1970**, 47, 261-270].

Таблица 2. Значения параметров Камлета и Тафта α, β и π* для некоторых растворителей. Данные взяты из [Kamlet M.J. et al., J.Org.Chem. **1983**, 48, 2877-2887].

Растворитель	α	β	π*
ДМСО	0	0.76	1.00
Этанол	0.83	0.77	0.54
Вода	1.17	0.18	1.09

Эмпирические сольватохромные параметры α, β и π* были предложены Камлетом и Тафтом для описания таких свойств растворителей как свойства быть донором (α) и акцептором (β) водородной связи и способности стабилизировать заряд/диполь в растворе (π*). Данные параметры были получены при усреднении нормализованных эффектов растворителя по многим свойствам; более подробно информацию можно найти в работе авторов [Kamlet M.J. et al., J.Org.Chem. **1983**, 48, 2877-2887].