



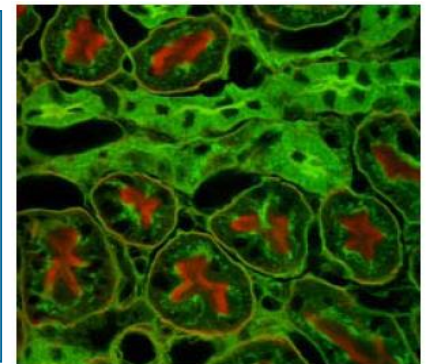
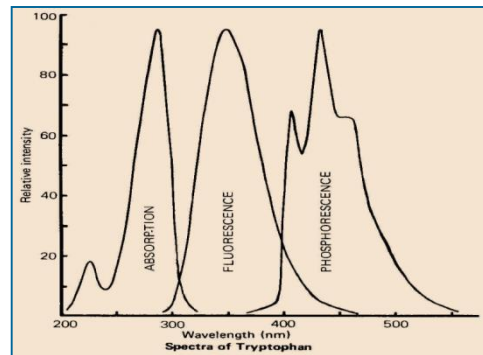
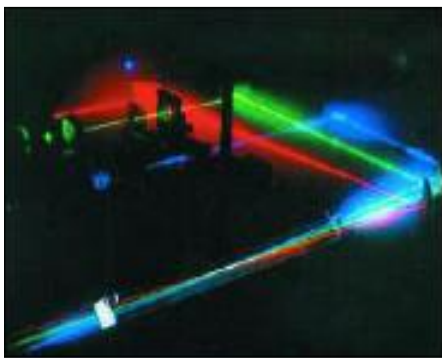
Τμήμα Χημείας Πανεπιστήμιο Κρήτης

Εργαστήρια Λείζερ – Εφαρμογές στη Χημεία

ΧΗΜ-425

Εαρινό εξάμηνο 2019-20 (22.05.2020)

2. Φασματοσκοπία Φθορισμού



Φασματοσκοπία Φθορισμού

Εισαγωγικές έννοιες

Ενεργειακά διαγράμματα – Φάσματα φθορισμού, φωσφορισμού

Βασικές φωτοφυσικές διεργασίες (μεταβάσεις)

Κινητική θεώρηση - Κβαντική απόδοση – Χρόνος ζωής φθορισμού

Τυπική οργανολογία φασματοσκοπίας φθορισμού

Ειδικά θέματα

Παράγοντες που προσδιορίζουν την εκπομπή φθορισμού

Μεταφορά ενέργειας διέγερσης

Ανισοτροπία (πόλωση) φθορισμού

Φθορισμός από πολυ-φωτονική διέγερση

Μικροσκοπία φθορισμού

Βιβλιογραφία για μελέτη

ΑτΦΧ: Κεφ. 13, ΗΒ: Ch. 5.6

M E Diaz-Garcia, R Badia-Laino, Fluorescence – Overview

(in *Encyclopedia of Analytical Science 2nd Edition*, pp. 97-103, Eds P. Worsfold, A. Townshend, C. Poole, Elsevier 2005)

M E Diaz-Garcia, R Badia-Laino, Time-resolved Fluorescence

(in *Encyclopedia of Analytical Science 2nd Edition*, pp. 128-138, Eds P. Worsfold, A. Townshend, C. Poole, Elsevier 2005)

N.W. Barnett, P.S. Francis, Luminescence – Overview

(in *Encyclopedia of Analytical Science 2nd Edition*, pp. 305-315, Eds P. Worsfold, A. Townshend, C. Poole, Elsevier 2005)

L.F. Capitán Vallvey, Luminescence – Solid Phase

(in *Encyclopedia of Analytical Science 2nd Edition*, pp. 315-322, Eds P. Worsfold, A. Townshend, C. Poole, Elsevier 2005)

<https://www.sciencedirect.com/referencework/9780123693976/encyclopedia-of-analytical-science>

J. R. Lacowicz

Principles of Fluorescence Spectroscopy, 3rd Edition, Springer 2006

Φασματοσκοπία φθορισμού

Ενεργειακά διαγράμματα – Φάσματα φθορισμού, φωσφορισμού

Γνώση της ηλεκτρονιακής δομής των μορίων (δηλαδή της ενεργειακής διευθέτησης των μοριακών τροχιακών και της κατάληψης αυτών με ηλεκτρόνια) οδηγεί στην κατάρτιση των αντιστοίχων διαγραμμάτων ενεργειακών καταστάσεων μέσω των οποίων ερμηνεύονται οι πειραματικά παρατηρούμενες μοριακές φασματοσκοπικές μεταβάσεις.

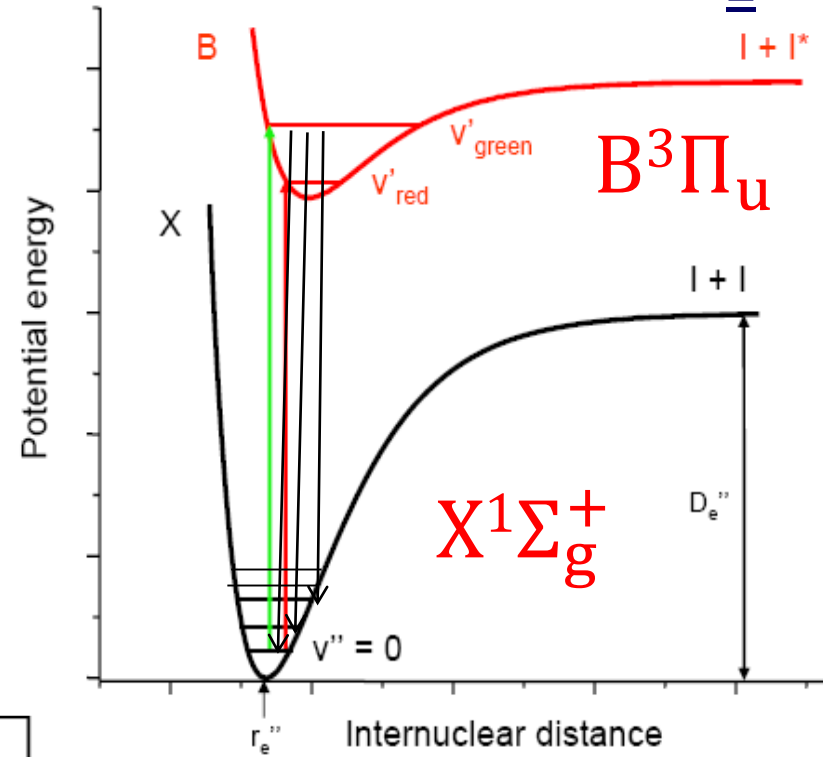
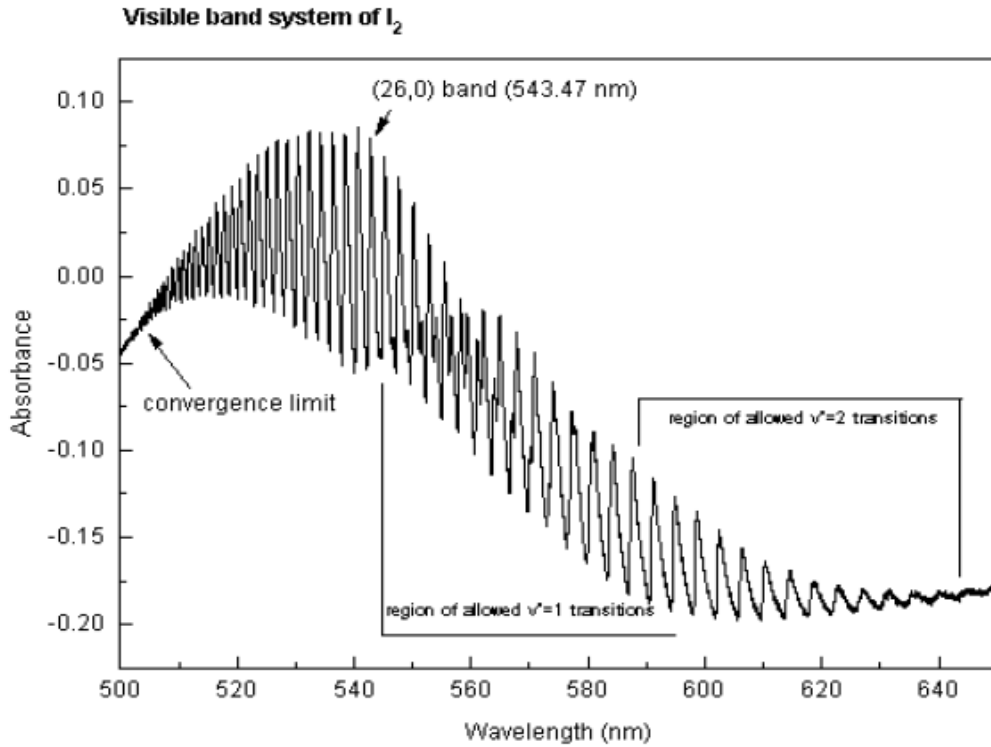
Σε σημαντικό βαθμό τα ανωτέρω προκύπτουν με την αντίστροφη σειρά, δηλαδή μέσω των μοριακών φασμάτων (απορρόφησης ή εκπομπής) που καταγράφονται στο πείραμα εξάγονται πληροφορίες για το ενεργειακό τοπίο των μορίων και την ηλεκτρονιακή δομή αυτών.

Η μοριακή φασματοσκοπία φθορισμού αποτυπώνει ηλεκτρονιακές μεταβάσεις οι οποίες όμως εμπεριέχουν και πληροφορία για τη δονητική υφή των ηλεκτρονιακών καταστάσεων (ηλεκτρο-δονητική υφή) ενώ υπό ειδικές συνθήκες (μικρά μόρια σε αέρια φάση) είναι εφικτή η παρατήρηση και της περιστροφικής υφής των μεταβάσεων.

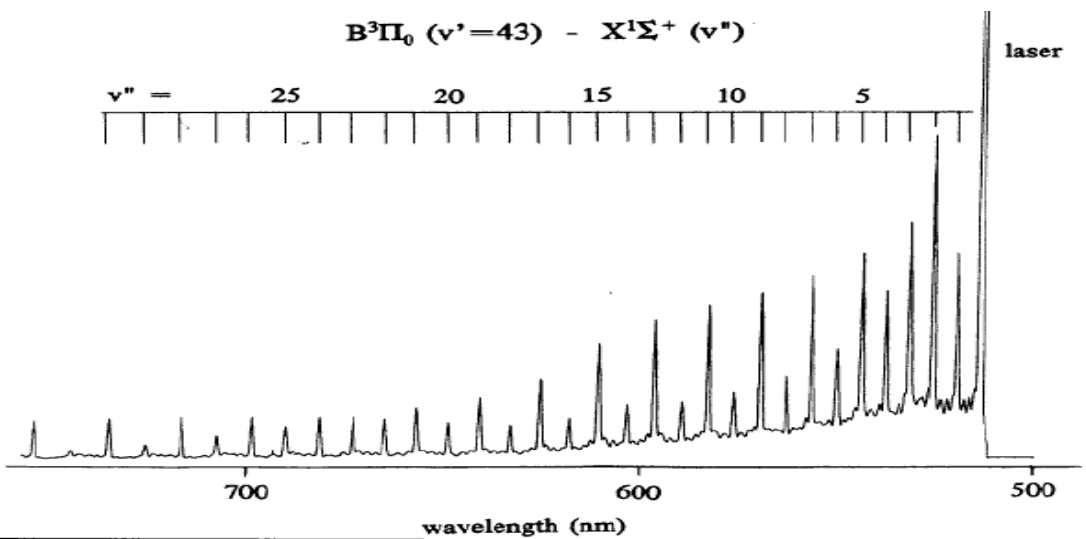
Οι κανόνες επιλογής (λαμβάνουν υπόψη τη συμμετρία και το spin των ηλεκτρονιακών καταστάσεων) και προσδιορίζουν την πιθανότητα (ισχύ ή ένταση) των μεταβάσεων και το χαρακτηριστικό χρόνο ζωής των διεγερμένων καταστάσεων.

Σημαντικό ρόλο στις ιδιότητες αυτές διαδραματίζουν η μοριακή γεωμετρία, το περιβάλλον (διαλύτες, πολικότητα, θερμοκρασία) και οι διάφορες ενδο- ή δια-μοριακές αλληλεπιδράσεις.

Απορρόφηση και φθορισμός σε διατομικά μόρια (I_2)



$B^3\Pi_0 (v' = 43) - X^1\Sigma^+ (v'')$



Η θέση και οι φασματικές κορυφές απορρόφησης και εκπομπής **διατομικών μορίων** ερμηνεύονται με ακρίβεια μέσω των χαρακτηριστικών ενεργειακών διαγραμμάτων δυναμικής ενέργειας (Morse) κάθε ηλεκτρονιακής κατάστασης και των αντιστοίχων δονητικών επιπέδων. Οι καταστάσεις υποδηλώνονται με βάση τη συμμετρία και την πολλαπλότητα spin.

Figure 1. Laser-induced fluorescence spectrum of iodine, using an Ar^+ laser at 514.5 nm

Κανόνες επιλογής ηλεκτρο-δονητικών μεταβάσεων

Θεωρούμε ηλεκτρονικές μεταβάσεις με δονητική υφή (ηλεκτροδονητικές μεταβάσεις)
Υποθέτουμε ότι το μόριο συμπεριφέρεται ως ηλεκτρικό δίπολο που αλληλεπιδρά με το ΗΠ της ακτινοβολίας.

Η διπολική ροπή έχει δύο ανεξάρτητους όρους, την διπολική ροπή των πυρήνων του μορίου (μ_N) και αυτήν των ηλεκτρονίων (μ_e)

$$\begin{aligned} \langle e'v's' | \boldsymbol{\mu} | e''v''s'' \rangle &= \langle e'v's' | \boldsymbol{\mu}_N + \boldsymbol{\mu}_e | e''v''s'' \rangle \\ &= \langle e'v's' | \boldsymbol{\mu}_N | e''v''s'' \rangle + \langle e'v's' | \boldsymbol{\mu}_e | e''v''s'' \rangle \end{aligned} \left. \vphantom{\begin{aligned} \langle e'v's' | \boldsymbol{\mu} | e''v''s'' \rangle \\ = \langle e'v's' | \boldsymbol{\mu}_N + \boldsymbol{\mu}_e | e''v''s'' \rangle \\ = \langle e'v's' | \boldsymbol{\mu}_N | e''v''s'' \rangle + \langle e'v's' | \boldsymbol{\mu}_e | e''v''s'' \rangle \end{aligned}} \right\} \begin{array}{l} \text{Προσέγγιση Born} \\ \text{Oppenheimer} \end{array}$$

$\langle e' || e'' \rangle = 0$ Λόγω
Ορθοκανονικότητας

$$\begin{aligned} &\approx \langle v' | \boldsymbol{\mu}_N | v'' \rangle \langle e' | e'' \rangle \langle s' | s'' \rangle + \langle e' | \boldsymbol{\mu}_e | e'' \rangle \langle v' | v'' \rangle \langle s' | s'' \rangle \\ &= \langle e' | \boldsymbol{\mu}_e | e'' \rangle \langle v' | v'' \rangle \langle s' | s'' \rangle \end{aligned}$$

παράγοντας
Franck-Condon

$$\Delta S = 0, \Delta \Sigma = 0$$

$$\Delta \Lambda = 0, \pm 1, \Delta \Omega = 0, \pm 1$$

$$g \leftrightarrow u$$

$$\Sigma^+ \rightarrow \Sigma^+, \Sigma^- \rightarrow \Sigma^-$$

$$A_g \in \Gamma(e') \otimes \Gamma(x, y, z) \otimes \Gamma(e'')$$

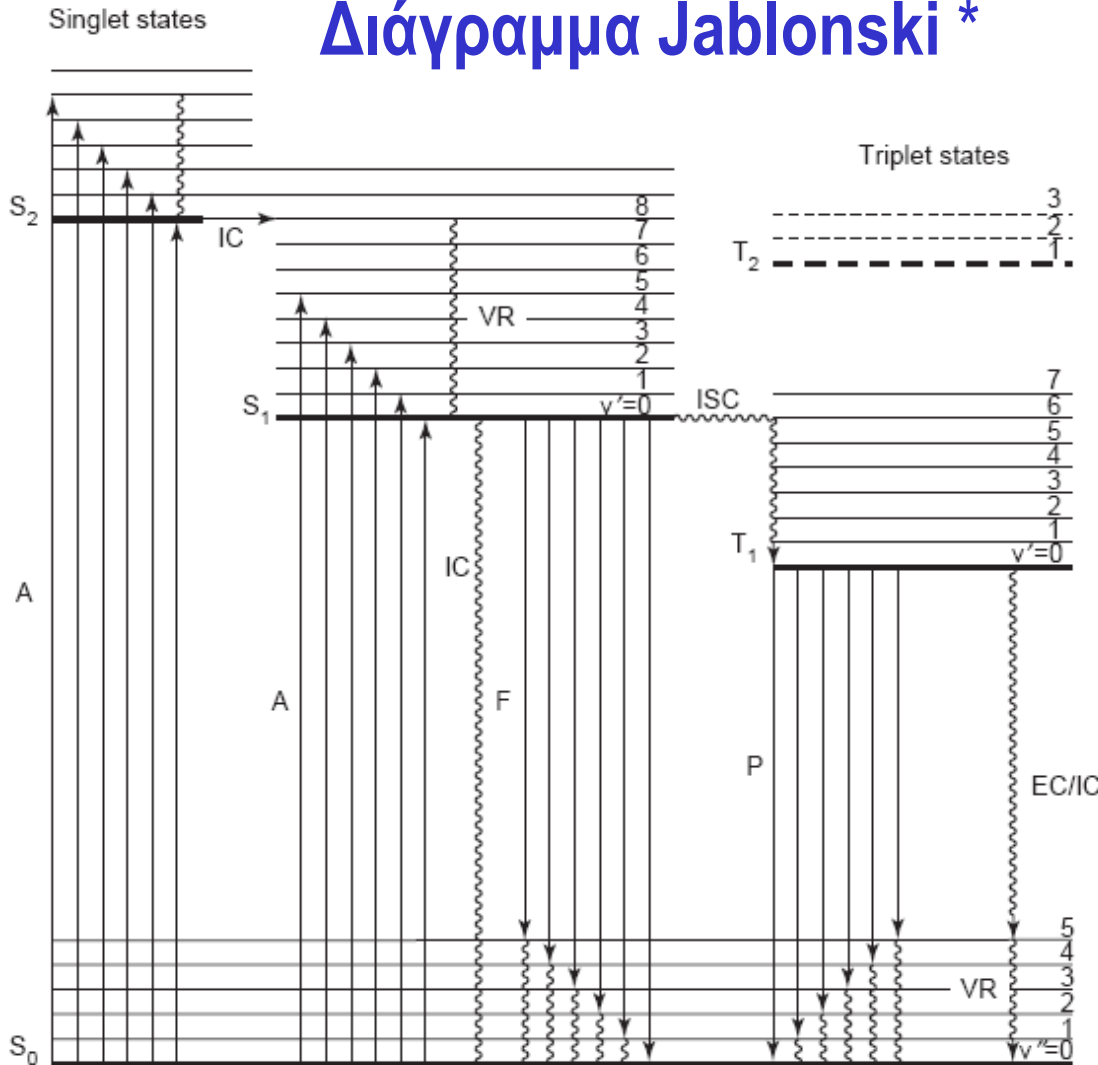
Π.χ. Επιτρεπτές: $^1\Sigma \rightarrow ^1\Pi, ^3\Pi \rightarrow ^3\Delta, ^1\Delta \rightarrow ^1\Delta, ^1\Delta_u \rightarrow ^1\Delta_g$

Π.χ. Απαγορευμένες $^1\Sigma \not\rightarrow ^3\Pi, ^1\Sigma \not\rightarrow ^1\Delta, ^3\Sigma \not\rightarrow ^1\Sigma, ^1\Sigma_g \not\rightarrow ^1\Sigma_g$

Ηλεκτρονιακή φασματοσκοπία πολυατομικών μορίων

Βασικές φωτοφυσικές διεργασίες

Διάγραμμα Jablonski *



A : Απορρόφηση (Διέγερση)

**Ακτινοβολική αποδιέγερση
(Radiative processes)**

F : Φθορισμός ($\Delta S = 0$)

P : Φωσφορισμός ($\Delta S \neq 0$)

**Μη-ακτινοβολική αποδιέγερση
(Non-radiative processes)**

VR : Δονητική χαλάρωση

IC : Εσωτερική μετατροπή

ISC: Δια-συστηματική
διασταύρωση

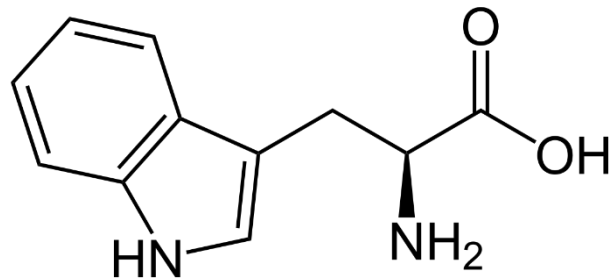
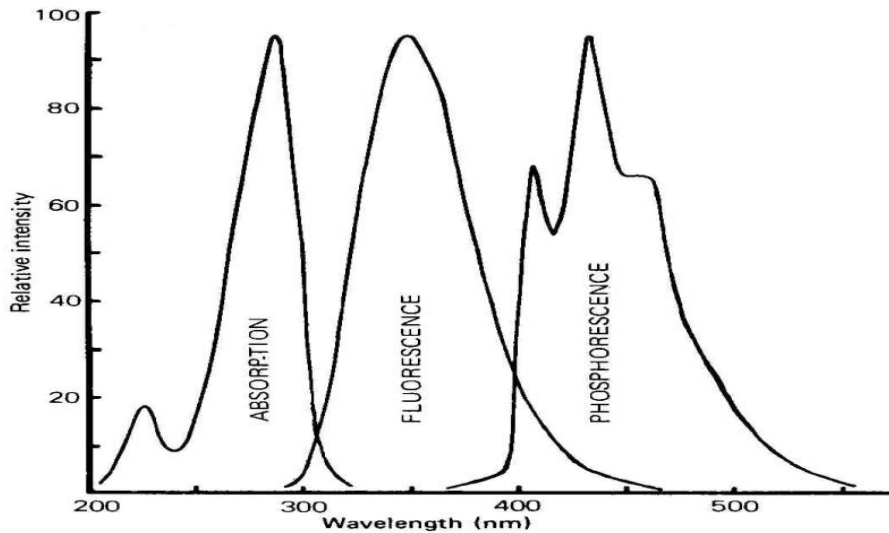
Φωτοχημεία

Διάσπαση δεσμών ή χημικές
αντιδράσεις μέσω διεγερμένων
καταστάσεων

* <https://fizyka.umk.pl/~lum98/aj.html>

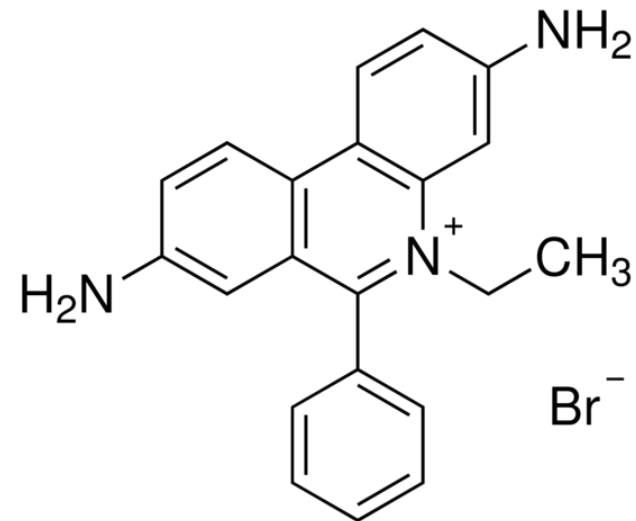
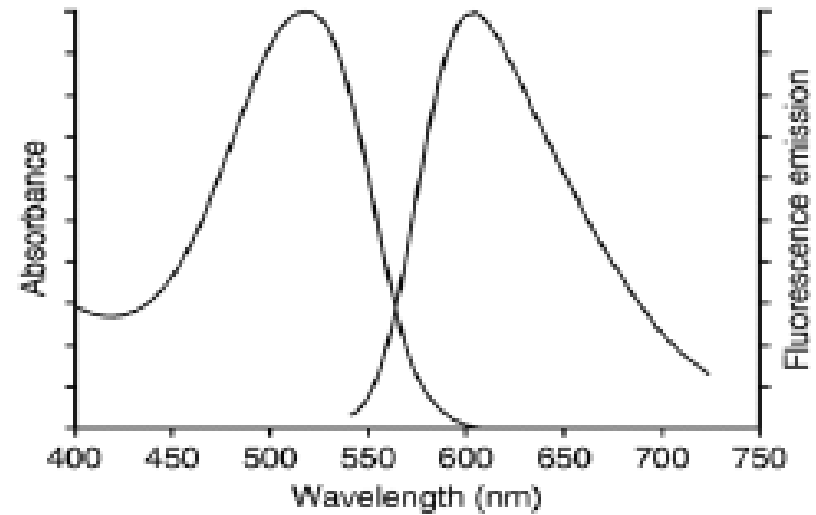
Απορρόφηση – Φθορισμός - Φωσφορισμός

Tryptophan (Trp)

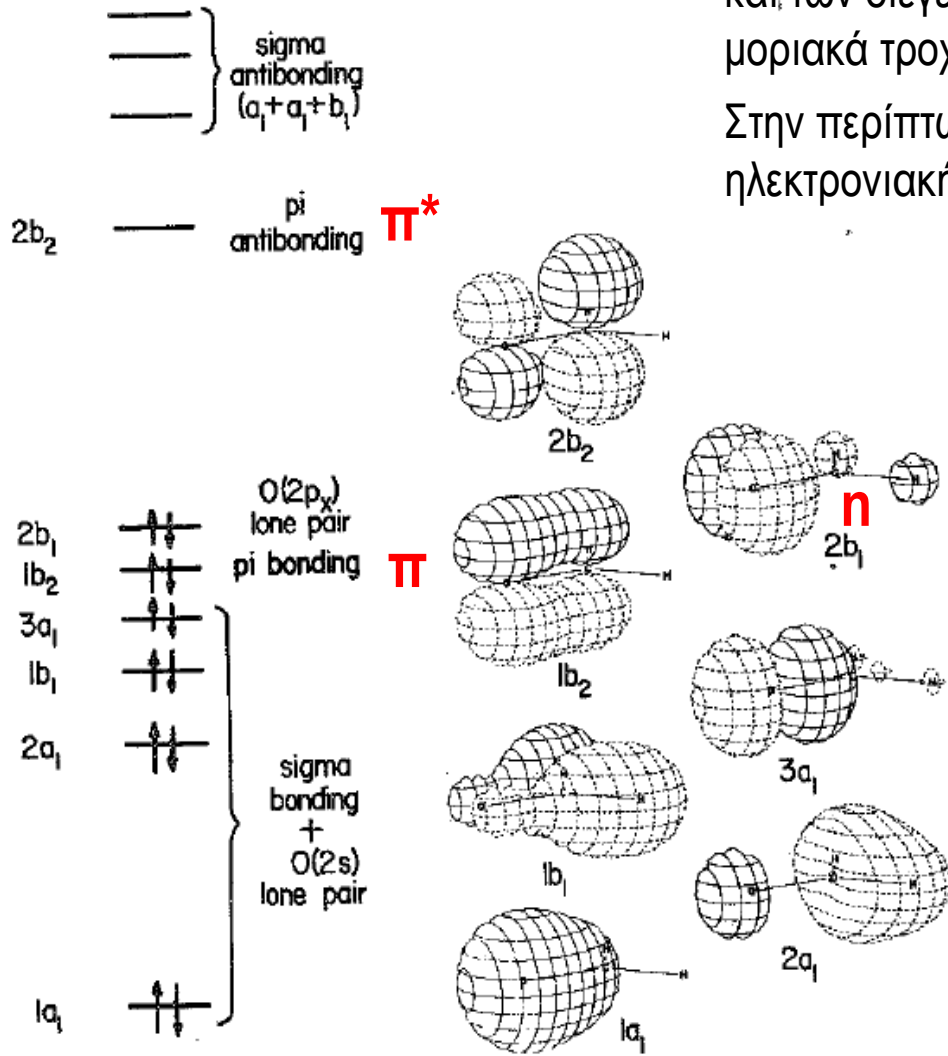
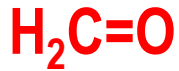


Η θέση και η υφή των φασματικών ταινιών απορρόφησης και εκπομπής σε πολυατομικά μόρια ερμηνεύεται ποιοτικά μέσω απλοποιημένων ενεργειακών διαγραμμάτων Jablonski και βασικών φωτοφυσικών διεργασιών.

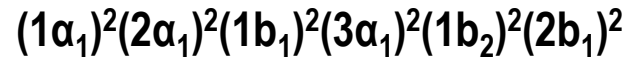
Ethidium Bromide (DNA bound)



Ενεργειακά διαγράμματα μοριακών τροχιακών

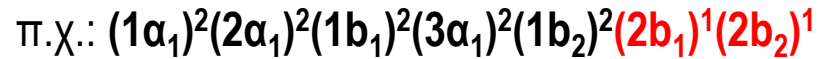


Στα πολυατομικά μόρια, η φύση και οι ιδιότητες της βασικής και των διεγερμένων καταστάσεων προσδιορίζεται από τα μοριακά τροχιακά HOMO και LUMO και τη συμμετρία αυτών. Στην περίπτωση της φορμαλδεΐδης (ομάδα συμμετρίας C_{2v}) η ηλεκτρονιακή διάταξη στη βασική κατάσταση είναι:



Η βασική κατάσταση συμβολίζεται ως: 1A_1

Οι διεγερμένες καταστάσεις προσδιορίζονται με βάση το τροχιακό LUMO στο οποίο καταλήγει το e , όμως σε κάθε περίπτωση προκύπτουν δύο καταστάσεις ίδιας συμμετρίας αλλά διαφορετικής πολλαπλότητας spin: singlet και triplet.



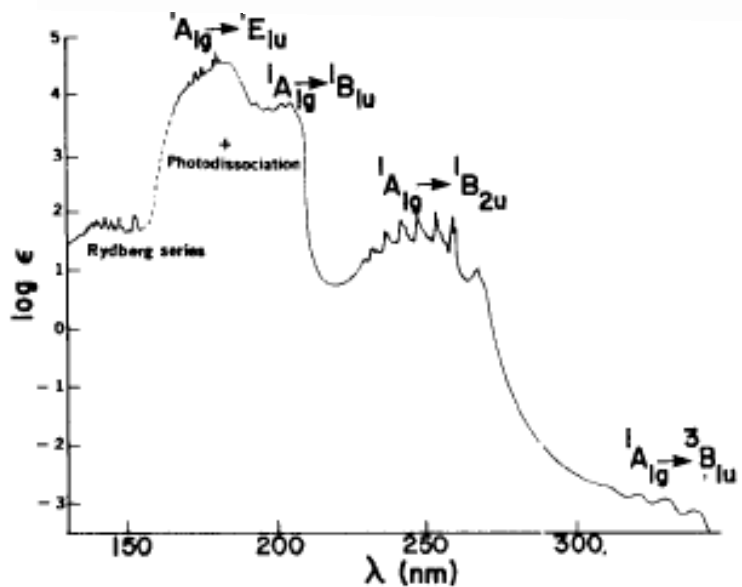
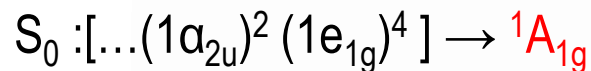
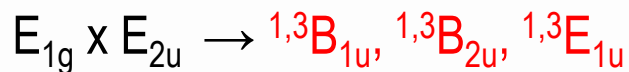
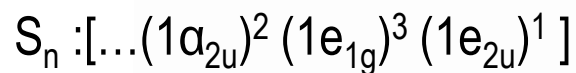
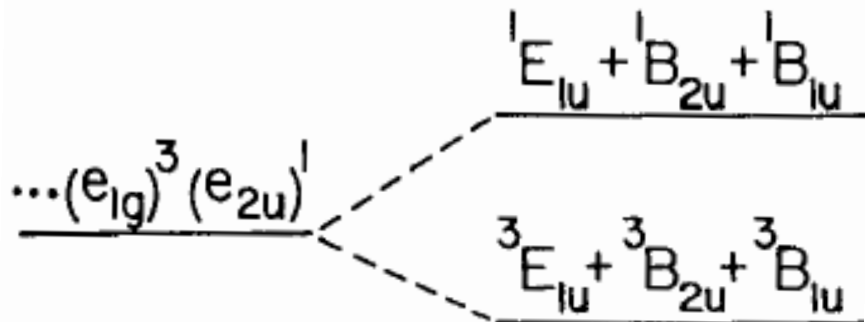
Οι διεγερμένες καταστάσεις είναι: 1A_2 και 3A_2 και ισχύει: $E(^1A_2) > E(^3A_2)$

Συχνά η μετάβαση υποδηλώνεται με τον τύπο των τροχιακών που εμπλέκονται και αντίστοιχα οι διεγερμένες καταστάσεις.

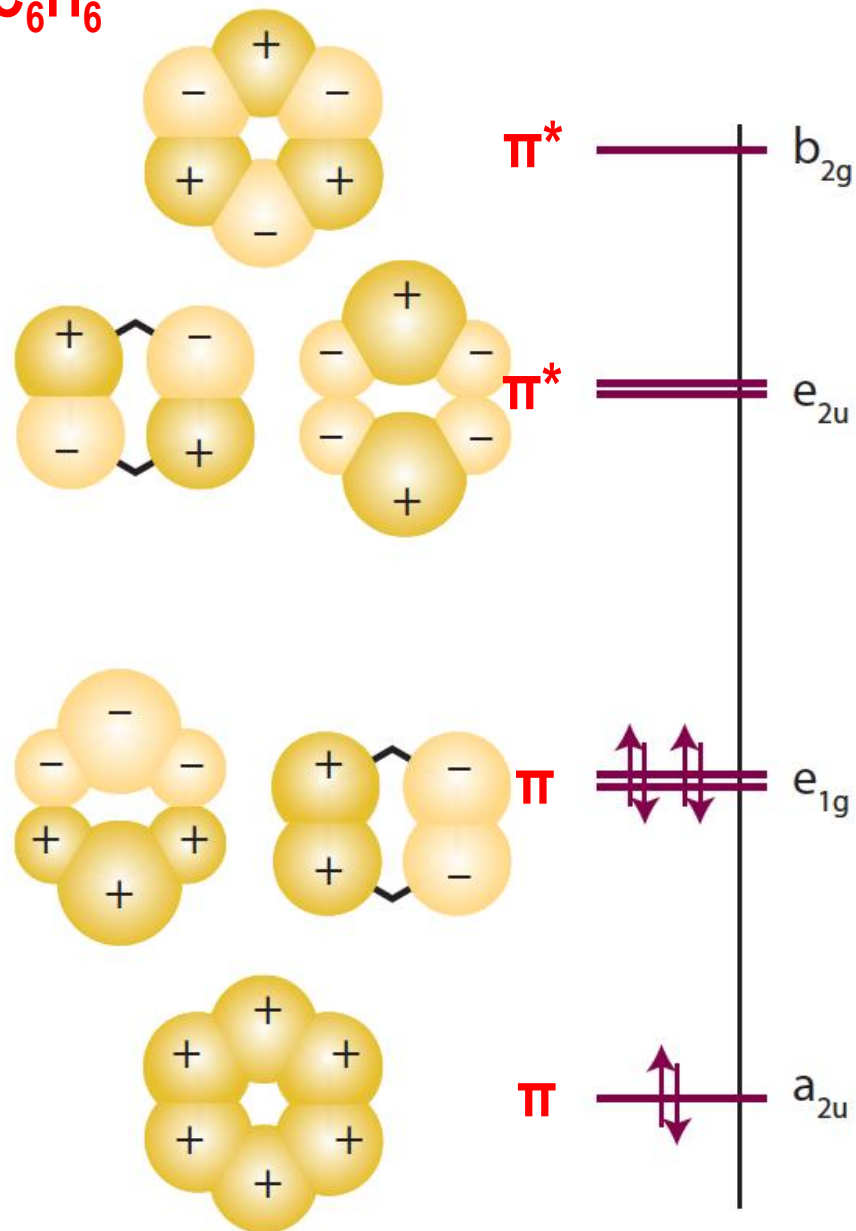


Fig. 4-36. Valence molecular orbitals of formaldehyde. Contour diagrams are as described in Fig. 4-27 and reproduced from W.L. Jorgensen and L. Salem, *The Organic Chemist's Book of Orbitals*, Academic Press, N.Y., 1973.

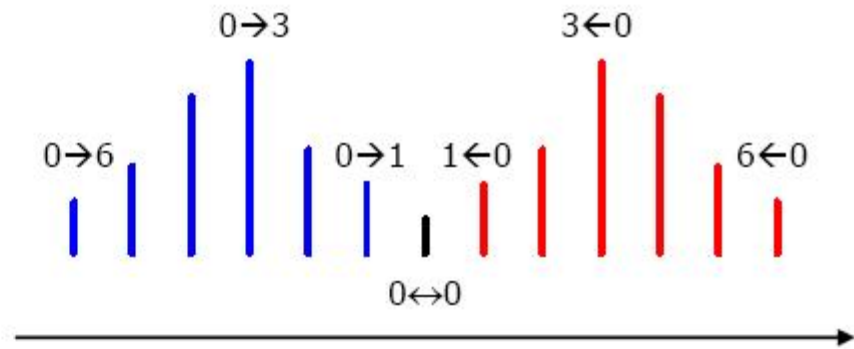
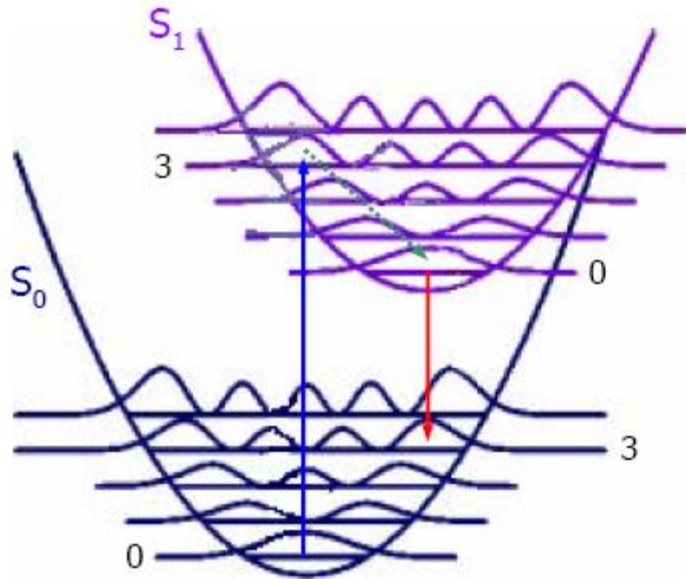
Ενεργειακά διαγράμματα μοριακών τροχιακών-καταστάσεων



C_6H_6

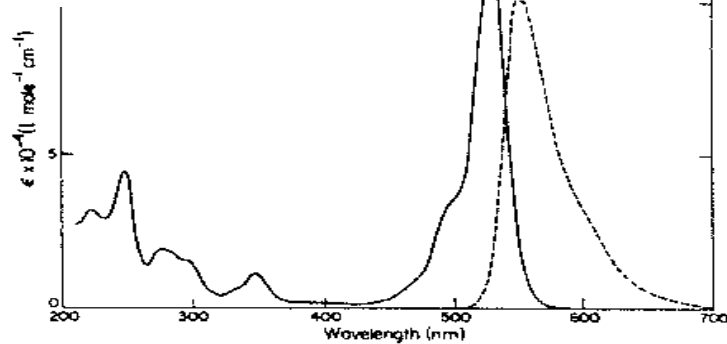
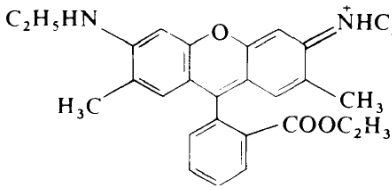


Αρχή Franck-Condon - Κανόνας Kasha



Ηλεκτροδονητικές μεταπτώσεις σύμφωνα με τους κανόνες επιλογής (συμμετρία καταστάσεων) και την αρχή **Franck-Condon**.

Μετατόπιση
Stokes



Κανόνας του Kasha

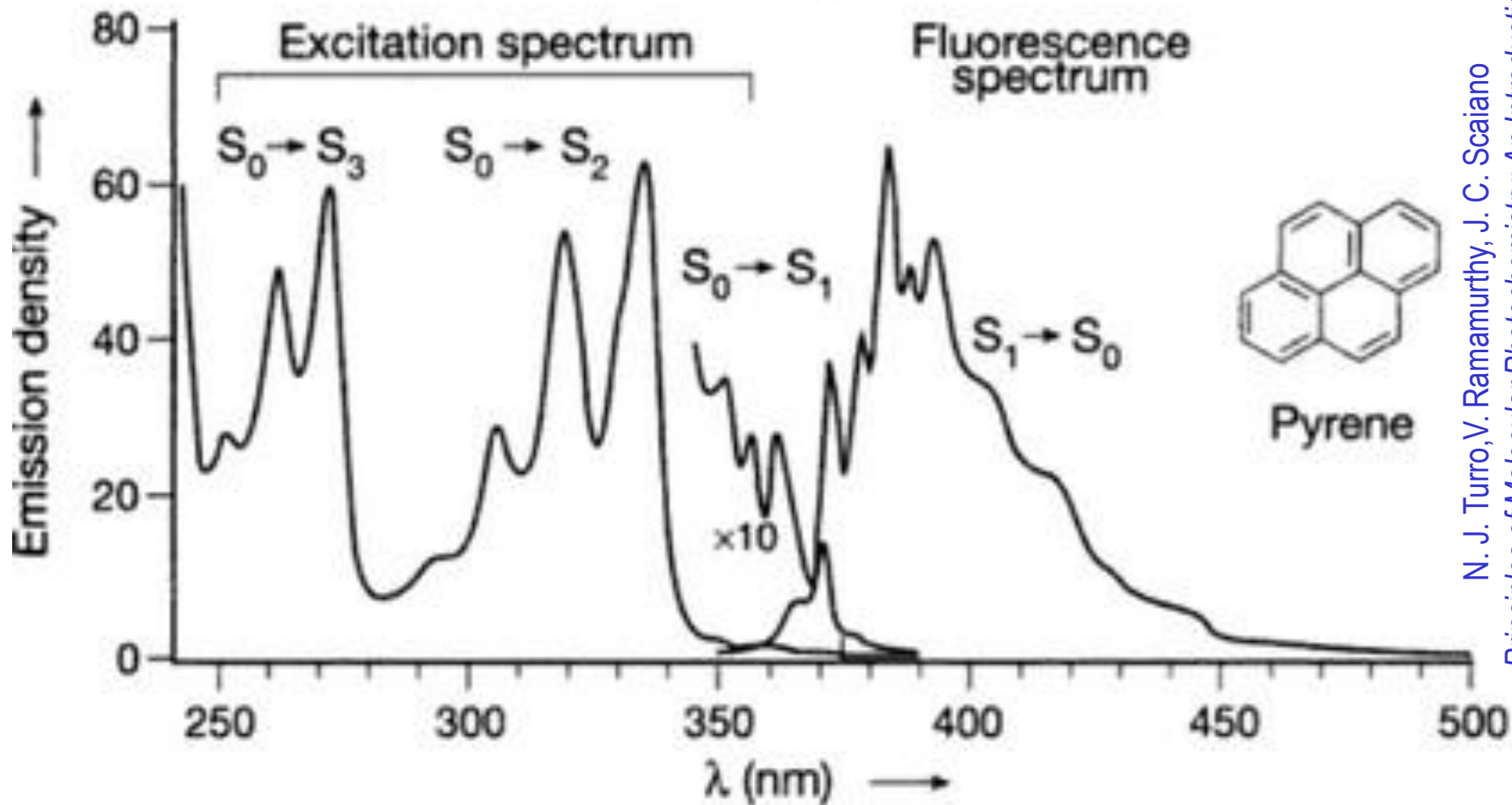
Σε διαλύματα οργανικών μορίων παρατηρείται εκπομπή φθορισμού μόνο από την χαμηλότερη ηλεκτρονικά διεγερμένη, μοναδιαία (singlet) κατάσταση και το χαμηλότερο ταλαντωτικό επίπεδο αυτής.

Εξ αιτίας των «κατακόρυφων» μεταβάσεων απορρόφησης και φθορισμού παρατηρείται μετατόπιση Stokes) στο μέγιστο του φάσματος φθορισμού προς μεγαλύτερα λ (αυτό επιτείνεται σε πολικούς διαλύτες ιδιαιτέρως αν η διαφορά της διπολικής ροπής μεταξύ S_0 και S_1 είναι μεγάλη).

Μετατόπιση Stokes : $(\tilde{\nu}_{abs})_{\max} - (\tilde{\nu}_F)_{\max}$

Φθορισμός – Φωσφορισμός (Φάσματα εκπομπής - διέγερσης)

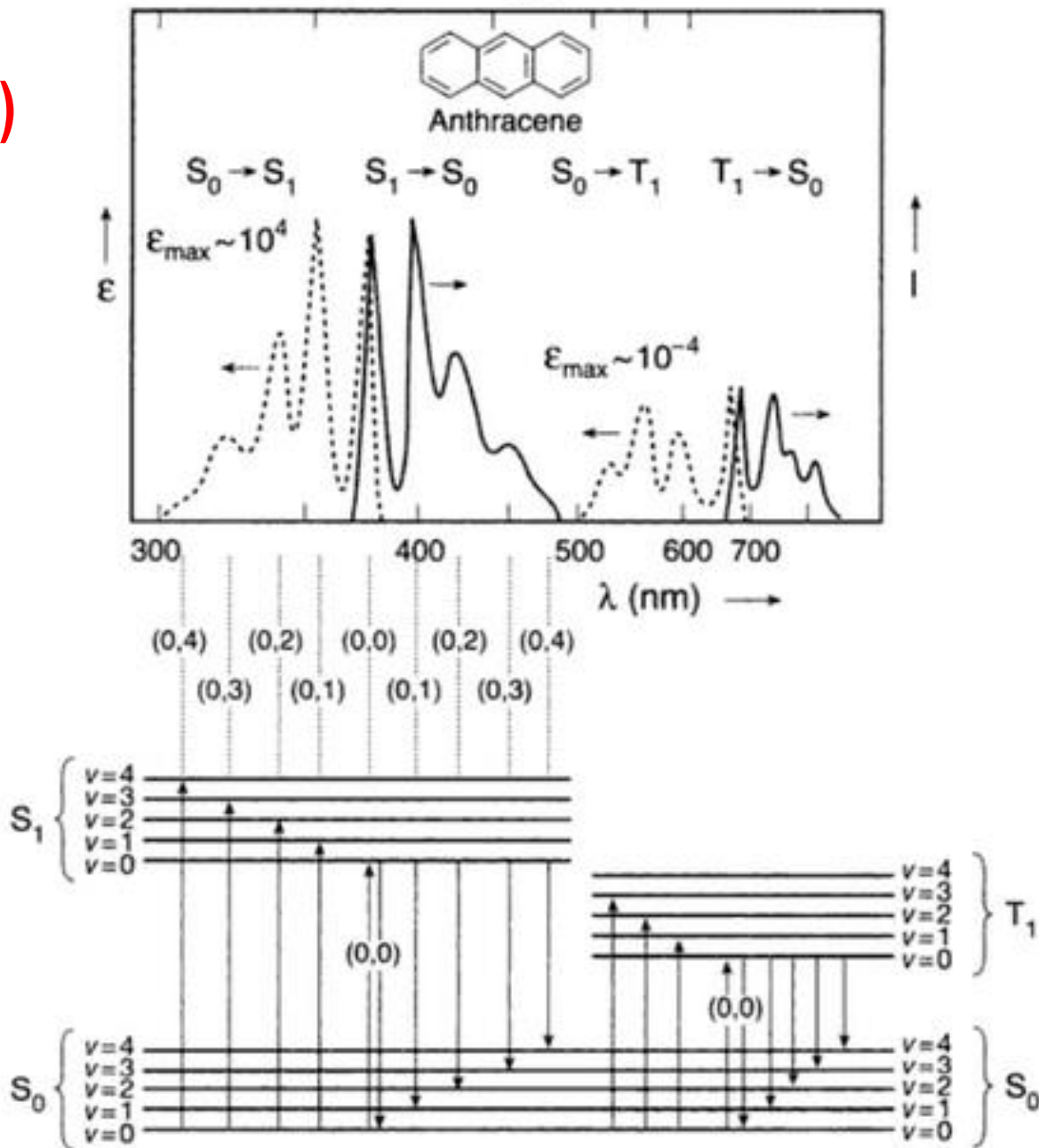
Pyrene (Py)



N. J. Turro, V. Ramamurthy, J. C. Scaiano
Principles of Molecular Photochemistry: An Introduction

Φθορισμός – Φωσφορισμός (Φάσματα εκπομπής - διέγερσης)

Anthracene (Anth)

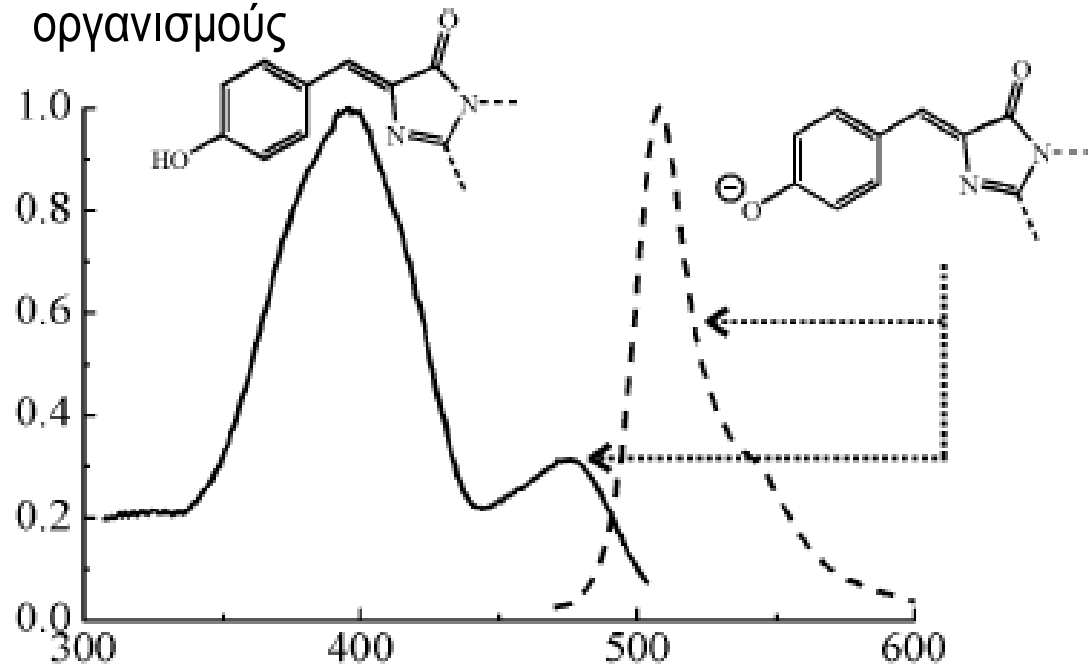


Green Fluorescent Protein (GFP)



Η μέδουσα *Aequorea Victoria* εμφανίζει βιοφωταύγεια (bioluminescence) εξαιτίας του αυθόρμητου σχηματισμού (χωρίς μεσολάβηση ενζύμου) ενός χρωμοφόρου στο εσωτερικό της δομής (β -sheet barrel) της πρωτεΐνης, το οποίο φθορίζει ισχυρά, καθώς είναι προστατευμένο από παράγοντες που οδηγούν σε απόσβεση του φθορισμού.

Η έκφραση του γονιδίου της GFP σε κύτταρα βοηθάει σημαντικά στη μελέτη διεργασιών σε κύτταρα, ιστούς, οργανισμούς



The Nobel Prize in Chemistry 2008 was awarded jointly to Osamu Shimomura, Martin Chalfie and Roger Y. Tsien, "for the discovery and development of the green fluorescent protein, GFP".

http://nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/2008/

Green Fluorescent Protein (GFP)

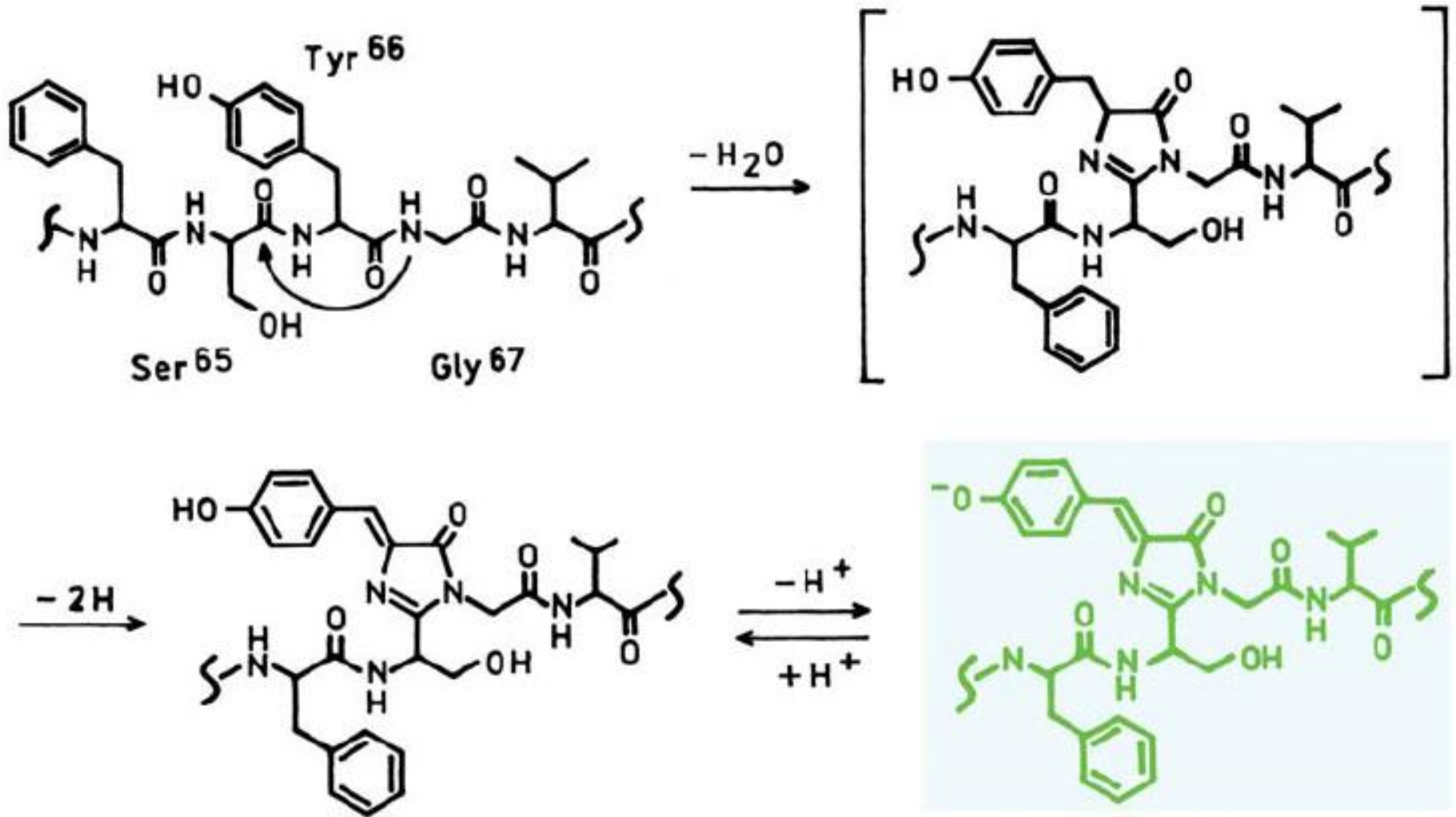
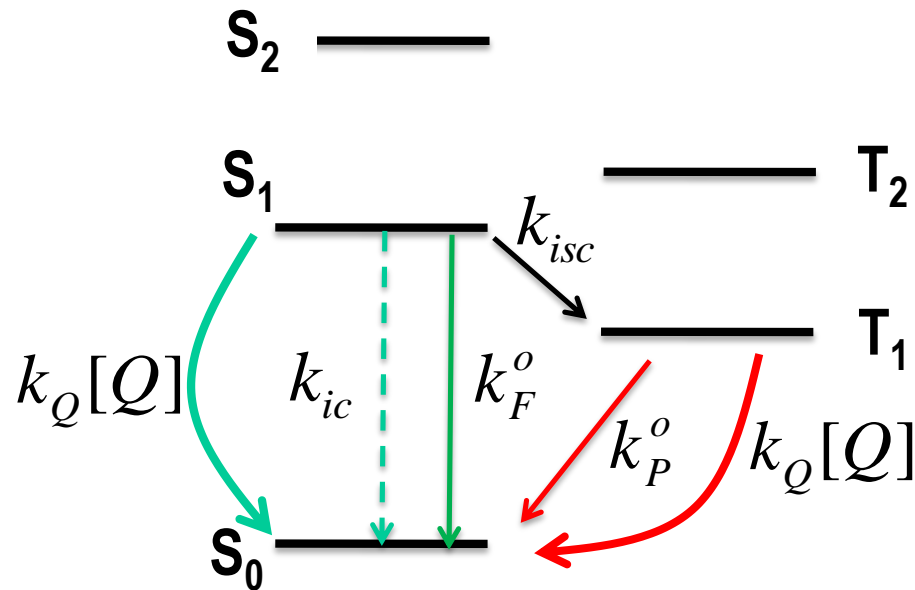


Figure 3.34. Spontaneous formation of the fluorophore in GFP by the serine–tyrosine–glycine residues. From [115]

Με κατάλληλες μεταλλάξεις και τροποποίηση της αλληλουχίας των αμινοξέων επιτυγχάνεται αντίστοιχη τροποποίηση του χρωμοφόρου και μεταβολή των οπτικών του ιδιοτήτων με αποτέλεσμα την εμφάνιση εκπομπής στο κίτρινο (YFP) ή το ερυθρό (RFP). Παρατηρείται επίσης αυξημένη φωτοσταθερότητα.

Κινητική (Δυναμική) θεώρηση φθορισμού

Η αποδιέγερση της διεγερμένης κατάστασης S_1 πραγματοποιείται μέσα από ένα σύνολο (παράλληλων) κινητικών διεργασιών 1^{ης} τάξης (ή ψευδο-1^{ης} τάξης)



Ακτινοβολική αποδιέγερση

F : Φθορισμός ($\Delta S = 0$)

P : Φωσφορισμός ($\Delta S \neq 0$)

Μη-ακτινοβολική αποδιέγερση

VR : Δονητική χαλάρωση

IC : Εσωτερική μετατροπή

ISC : Δια-συστηματική διασταύρωση

Q : Άλλες διεργασίες αποδιέγερσης (π.χ. κρούσεις, μεταφορά ενέργειας)

$$-\frac{d[S_1]}{dt} = k_F[S_1] \Rightarrow [S_1]_t = [S_1]_{t=0} e^{-k_F t}$$

$$\tau_F = \frac{1}{k_F} = \frac{1}{k_F^o + k_{ic} + k_{isc} + k_Q[Q]}$$

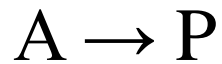
$$I_F(t) = I_F(t=0) e^{-k_F t} = I_F(t=0) e^{-t/\tau_F}$$

$$\phi_F = \frac{k_F^o}{k_F} = \tau_F k_F^o$$

$$\phi_P = ? \quad \phi_{ISC} = ?$$

Κινητική (Δυναμική) θεώρηση φθορισμού

Διεργασία 1^{ης} τάξης



$$-dA/dt = kA \Rightarrow \dots \Rightarrow A_t = A_0 e^{-kt}$$

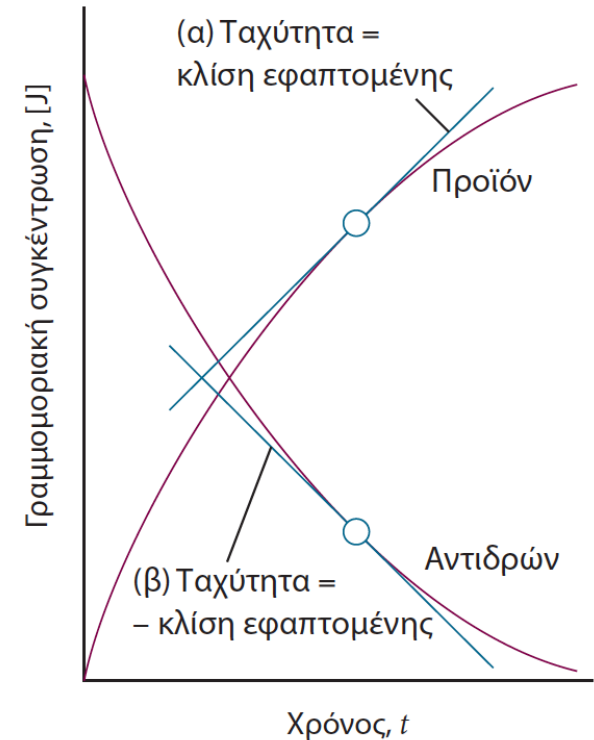
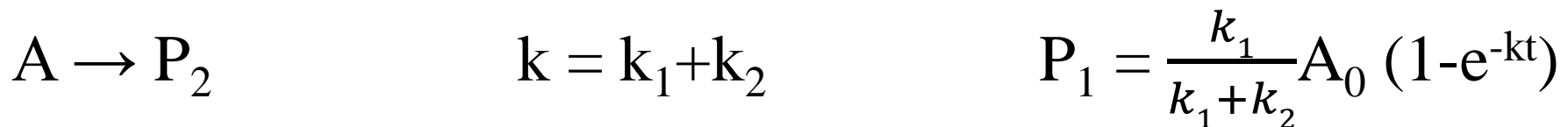
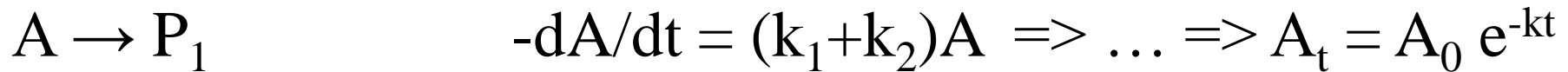
$$P_t = A_0 (1 - e^{-kt})$$

Διεργασία ψευδο-1^{ης} τάξης



$$-dA/dt = k_Q A Q = k_Q Q A = k' A \Rightarrow \dots \Rightarrow A_t = A_0 e^{-k't}$$

Παράλληλες διεργασίες 1^{ης} τάξης



Κινητική (Δυναμική) θεώρηση φθορισμού

Κβαντική απόδοση φθορισμού, φ_F

$$\varphi_F = \frac{k_F^o}{k_F^o + k_{ic} + k_{isc} + k_Q[Q]} \left(= \frac{\text{photons emitted}}{\text{photons absorbed}} \right)$$

Ακτινοβολική αποδιέγερση

F : Φθορισμός ($\Delta S = 0$)

P : Φωσφορισμός ($\Delta S \neq 0$)

Χρόνος ζωής φθορισμού, τ_F

$$I_F(t) = I_F(t=0)e^{-k_F t} = I_F(t=0)e^{-t/\tau_F}$$

Μη-ακτινοβολική αποδιέγερση

VR : Δονητική χαλάρωση

IC : Εσωτερική μετατροπή

ISC : Δια-συστηματική διασταύρωση

Q : Άλλες διεργασίες αποδιέγερσης
(π.χ. κρούσεις, μεταφορά ενέργειας)

Φασματοφωτομετρία φθορισμού

$$-\log \left[\frac{I}{I_0} \right] = -\log T = A = \epsilon b C$$

$$\Delta I = I_0(1 - 10^{-\epsilon b C})$$

$$I_F = KI_0\varphi_F(\epsilon b C)$$

Στο όριο χαμηλών τιμών της απορρόφησης ($A < 0.2$) η ένταση της εκπομπής είναι ανάλογη της συγκέντρωσης του χρωμοφόρου.

Άσκηση

Η οργανική ένωση, 1-μέθυλο-ναφθαλένιο έχει

$k_F^o = 5,2 \times 10^6 \text{ s}^{-1}$ και $k_{isc} = 1,1 \times 10^7 \text{ s}^{-1}$.

Να υπολογισθεί η κβαντική απόδοση φθορισμού (k_{ic} και k_Q αμελητέα) και ο χρόνος ζωής φθορισμού.

Κινητική (Δυναμική) θεώρηση φθορισμού

Μέτρηση χρόνου ζωής φθορισμού, τ_F

Time-resolved fluorescence spectroscopy

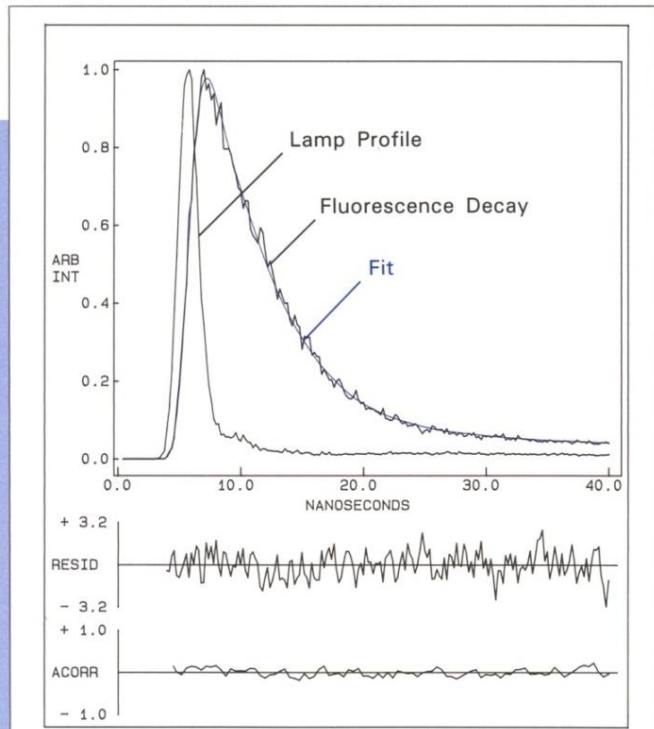


Figure 1. Rapid fluorescence lifetime determination of perylene with the StrobeMaster. The entire data set was collected in less than 25 seconds! The lifetime is measured as 5.07 ns. Excitation: 405 nm. Emission: 465 nm. $\chi^2 = 1.04$. Note the excellent agreement with the results in Figure 2. The residuals and the autocorrelation function appear in each TimeMaster plot.

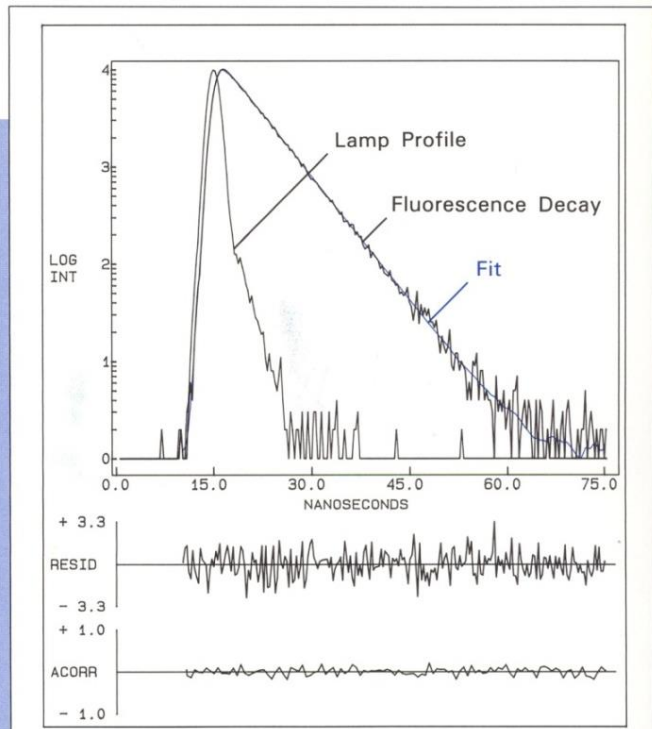


Figure 2. Fluorescence lifetime determination of perylene with the TCSPC-1000. The lifetime is 5.03 ns. Excitation: 405 nm. Emission: 465 nm. $\chi^2 = 1.06$. Several minutes were required for the collection of the data. The results are presented as log intensity vs. time.

$$I_F(t) = I_F(t=0)e^{-k_F t} = I_F(t=0)e^{-t/\tau_F}$$

Κινητική (Δυναμική) θεώρηση φθορισμού

Μέτρηση χρόνου ζωής φθορισμού, τ_F

Άσκηση

Κατόπιν διέγερσης διαλύματος ανθρακενίου σε κυκλοεξάνιο με πηγή λέιζερ που εκπέμπει παλμούς χρονοδιάρκειας 5 ns στα 355 nm (3^η αρμονική Nd:YAG) καταγράφεται η ένταση του εκπεμπόμενου φθορισμού στα 400 nm με τη βοήθεια φωτοπολλαπλασιαστή και παλμογράφου ταχείας απόκρισης.

Από τις τιμές της έντασης να προσδιορισθεί ο χρόνος ζωής φθορισμού του ανθρακενίου.

t (ns)	I_F
10	36000
20	28000
30	23000
40	18500
50	14500
70	9500
100	4900
150	1600
200	500

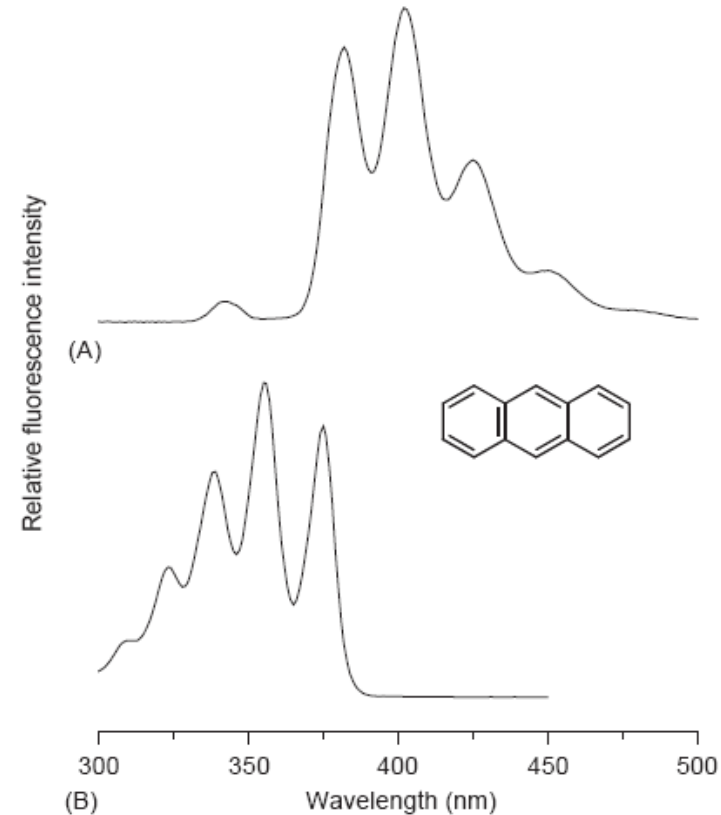
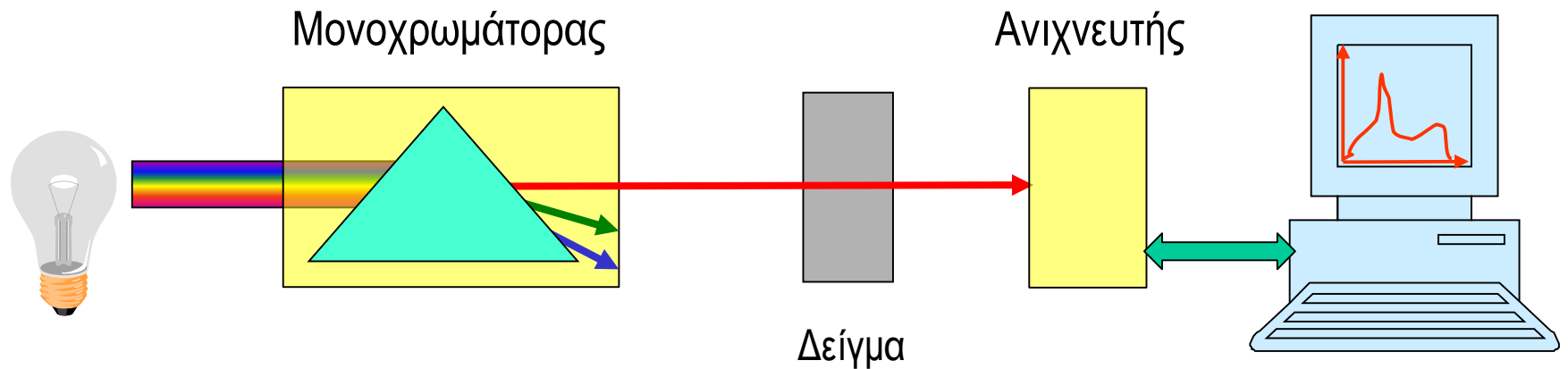


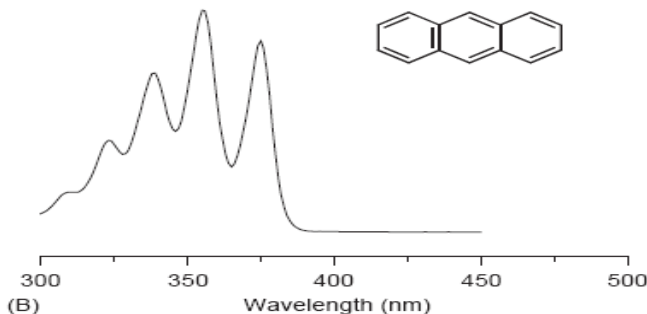
Figure 4 Fluorescence spectra of anthracene ($1 \mu\text{g ml}^{-1}$) in ethanol. The emission spectrum (A) was obtained with $\lambda_{\text{ex}} = 340 \text{ nm}$ and the excitation spectrum (B) was obtained with $\lambda_{\text{em}} = 379 \text{ nm}$.

Οργανολογία φασματοσκοπίας απορρόφησης

Καταγραφή του φάσματος απορρόφησης διαλύματος χρωμοφόρου



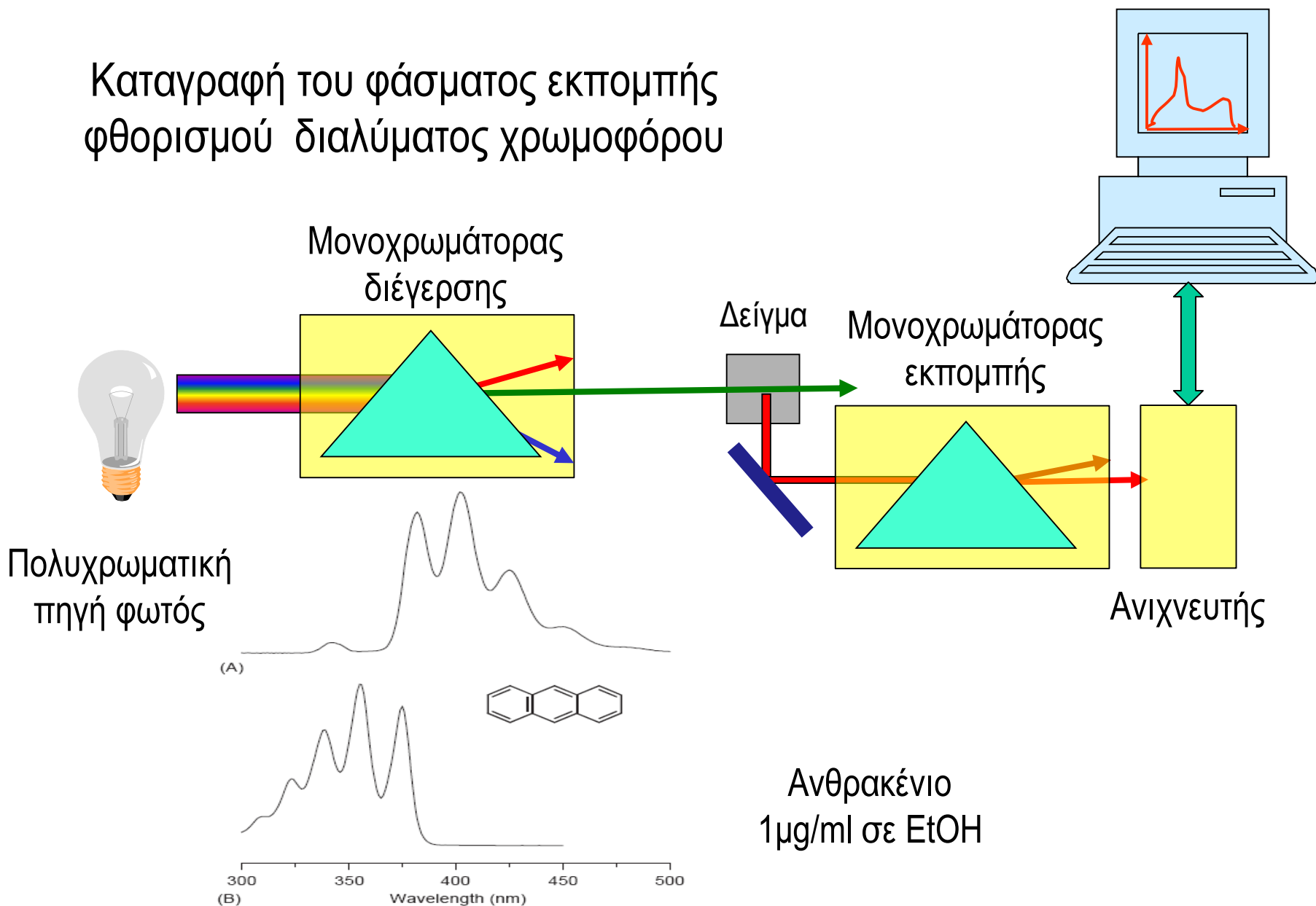
Πολυχρωματική
πηγή φωτός



Ανθρακένιο
1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ σε EtOH

Οργανολογία φασματοσκοπίας φθορισμού

Καταγραφή του φάσματος εκπομπής
φθορισμού διαλύματος χρωμοφόρου



Φασματοφωτόμετρο φθορισμού – Τεχνικά χαρακτηριστικά

Πηγή διέγερσης – Μονοχρωμάτορας

Φάσμα εκπομπής, I(λ)

Ένταση και σταθερότητα

Φασματικό εύρος («μονοχρωματικότητα»), δλ (λ/δλ)

Πόλωση

Ευθυγράμμιση δέσμης

Δείγμα

Υγρό, στερεό

Γεωμετρία ακτινοβολήσης (90°, Front face observation)

Απορρόφηση (πυκνά ή αραιά διαλύματα – inner filter effects)

Σκέδαση (Rayleigh, Raman, Mie)

Ανίχνευση

Συλλογή εκπεμπόμενης ακτινοβολίας

Φασματική διακριτική ικανότητα, δλ

Ευαισθησία ανιχνευτή, S(λ)

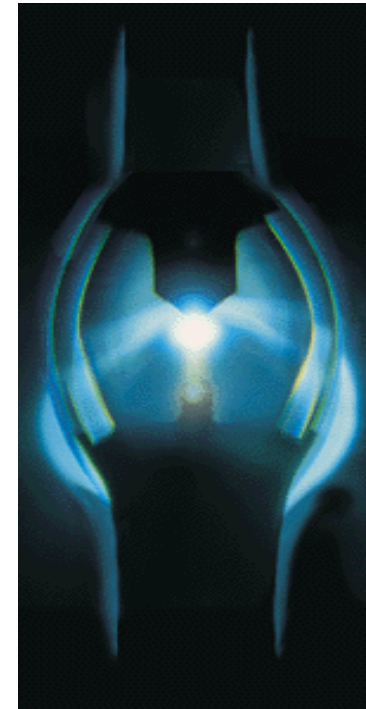
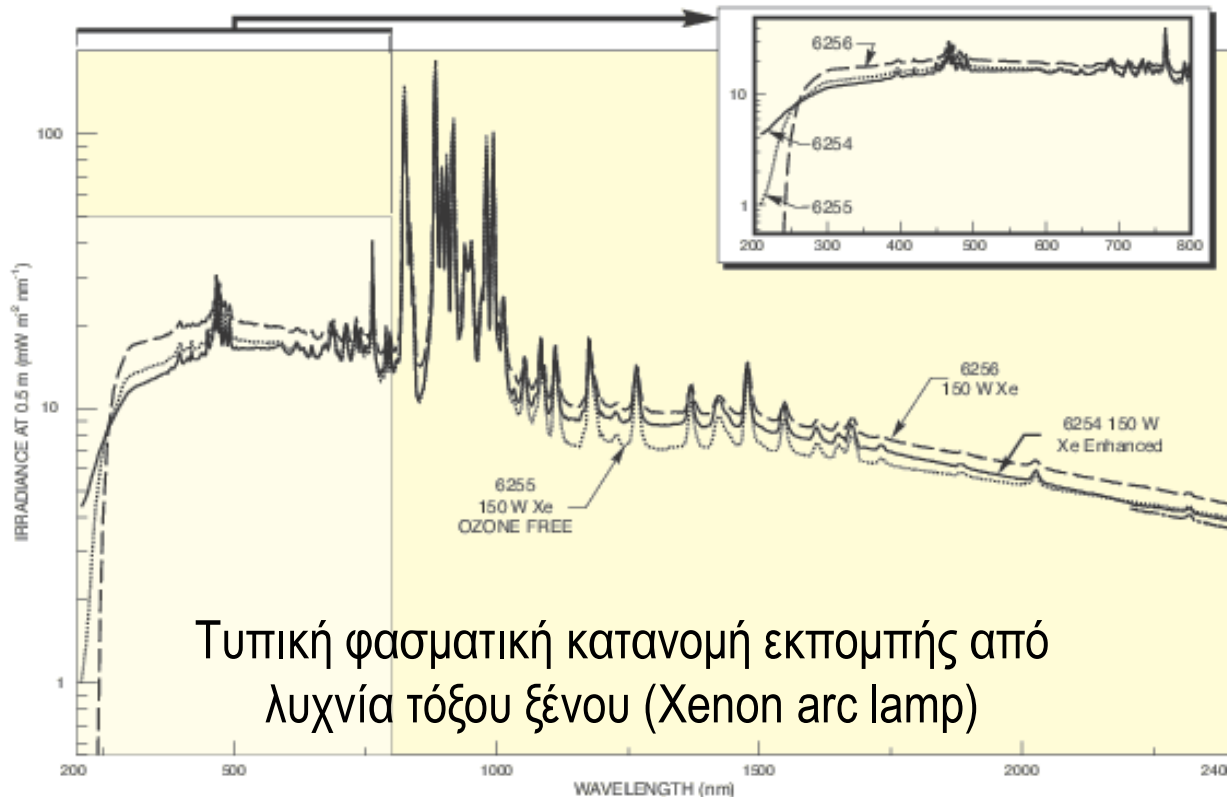
Φασματοφωτόμετρο φθορισμού – Τεχνικά χαρακτηριστικά

Πηγή διέγερσης – Μονοχρωμάτορας

Φάσμα εκπομπής, $I(\lambda)$

Ένταση και σταθερότητα

Η φασματική κατανομή έντασης στη διεγείρουσα δέσμη, $I(\lambda)$, προσδιορίζεται τόσο από τη φωτεινή ισχύ της λυχνίας όσο και από την αποτελεσματικότητα περίθλασης του φράγματος στο μονοχρωμάτορα διέγερσης.



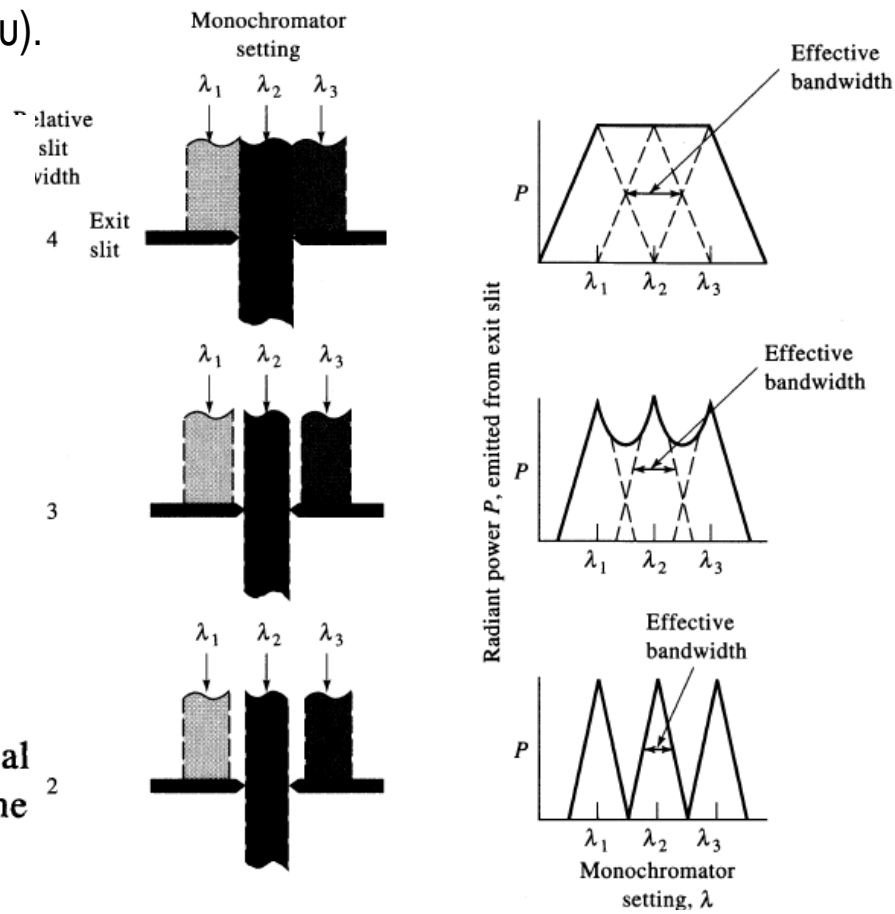
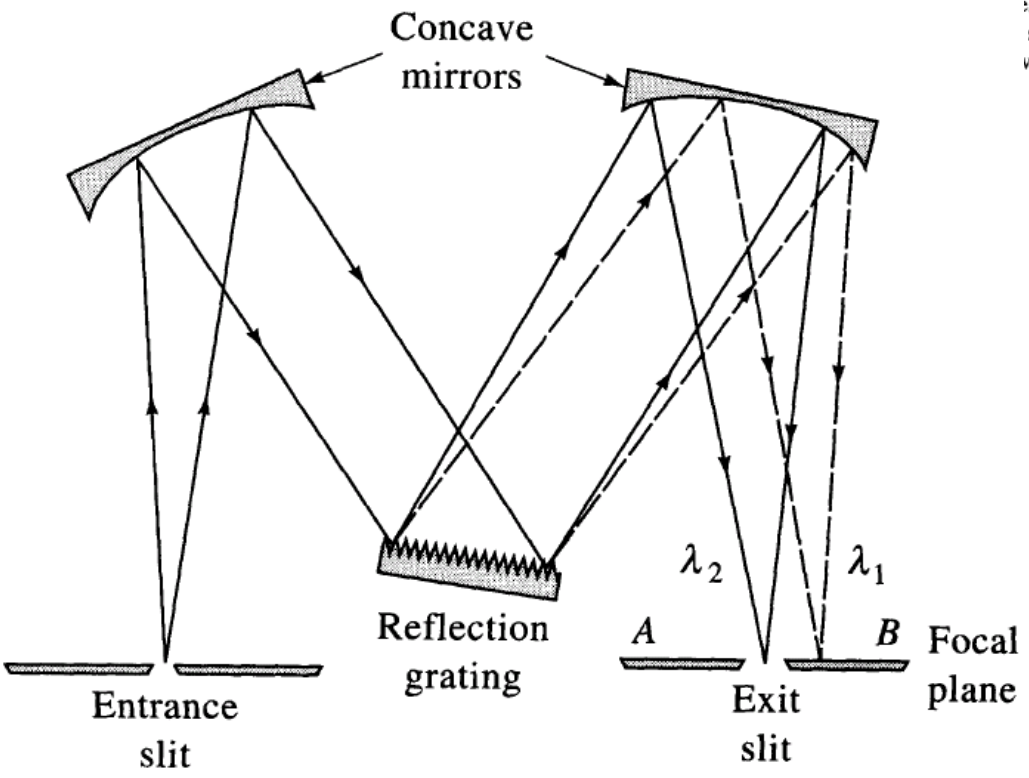
Φασματοφωτόμετρο φθορισμού – Τεχνικά χαρακτηριστικά

Πηγή διέγερσης – Μονοχρωμάτορας

Φάσμα εκπομπής, $I(\lambda)$

Φασματικό εύρος («μονοχρωματικότητα»), $\delta\lambda$ ($\lambda/\delta\lambda$)

Το φασματικό εύρος της διεγείρουσας προσδιορίζεται από τα χαρακτηριστικά του μονοχρωμάτορα (φράγμα περίθλασης, εστιακό μήκος και το άνοιγμα των σχισμών εισόδου και εξόδου).



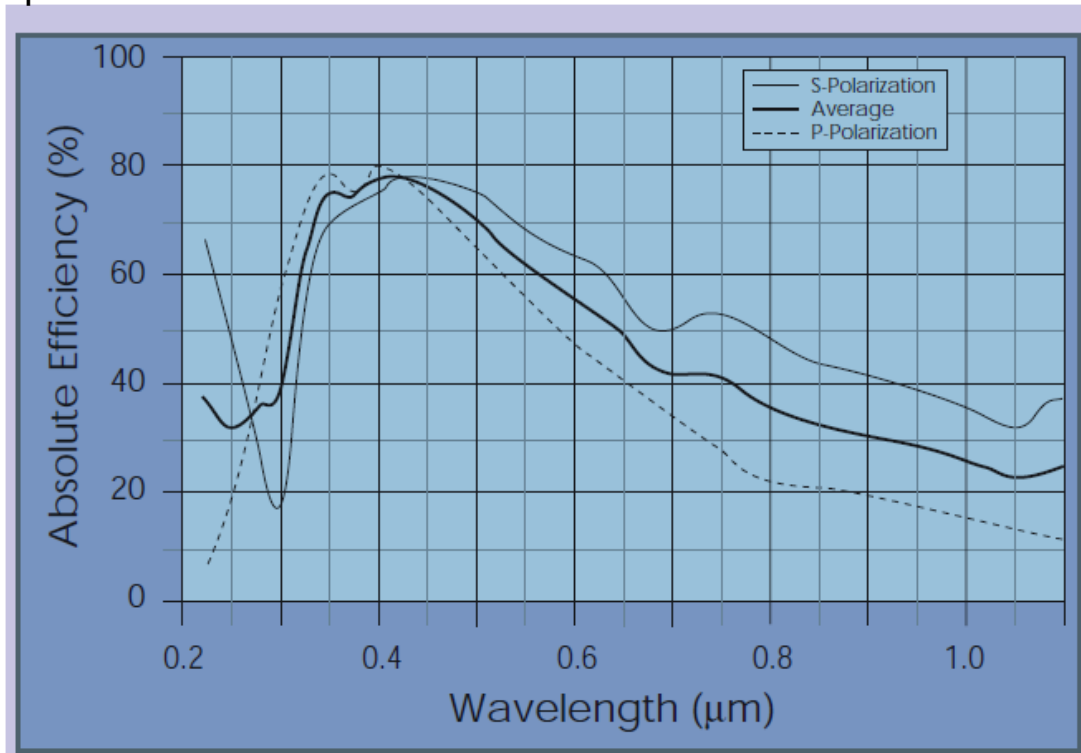
Φασματοφωτόμετρο φθορισμού – Τεχνικά χαρακτηριστικά

Πηγή διέγερσης – Μονοχρωμάτορας

Φάσμα εκπομπής, $I(\lambda)$

Πόλωση

Η αποτελεσματικότητα περίθλασης (diffraction efficiency) του φράγματος στο μονοχρωμάτορας διέγερσης (και εκπομπής) εξαρτάται από τα χαρακτηριστικά πόλωσης της ακτινοβολίας. Αυτό είναι σημαντικό και πρέπει να ελέγχεται στις περιπτώσεις που πραγματοποιούνται μελέτες ανισοτροπίας φθορισμού, δηλαδή διέγερση με πολωμένη ακτινοβολία και παρατήρηση εκπομπής μέσω πολωτών.



Φασματοφωτόμετρο φθορισμού – Τεχνικά χαρακτηριστικά

Δείγμα

Υγρό, στερεό

Γεωμετρία ακτινοβολήσης (90° , Front face observation)

Απορρόφηση (πυκνά ή αραιά διαλύματα – inner filter effects)

Σκέδαση (Rayleigh, Raman, Mie)

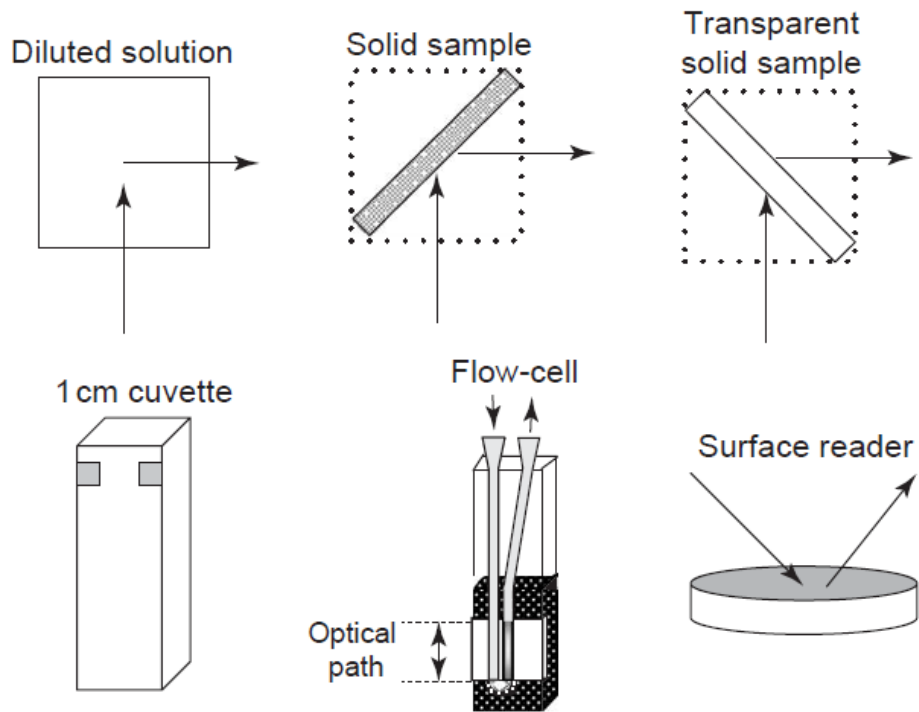


Figure 3 Sample geometry and typical cell for fluorescence measurements.

Ο τύπος του δείγματος (π.χ. στερεό, διαυγές διάλυμα, διάλυμα με υψηλό βαθμό σκέδασης (θολό)) προσδιορίζει το είδος του φορέα (κυψελίδα, δισκίο, πλακίδιο) και τη γεωμετρία ακτινοβολήσης και παρατήρησης της εκπομπής.

Στην περίπτωση διαυγών διαλυμάτων επιλέγεται η παρατήρηση της εκπομπής από το εσωτερικό της κυψελίδας κάθετα ως προς την κατεύθυνση της δέσμης διέγερσης καθώς αυτή η γεωμετρία ελαχιστοποιεί τη σκέδαση.

Στην περίπτωση οπτικώς πυκνών διαλυμάτων στα οποία η διείσδυση της διεγείρουσας είναι ελάχιστη, η παρατήρηση της εκπομπής γίνεται κάθετα ως προς τη διεγείρουσα από την πρόσθια πλευρά της κυψελίδας (front face).

Φασματοφωτόμετρο φθορισμού – Τεχνικά χαρακτηριστικά

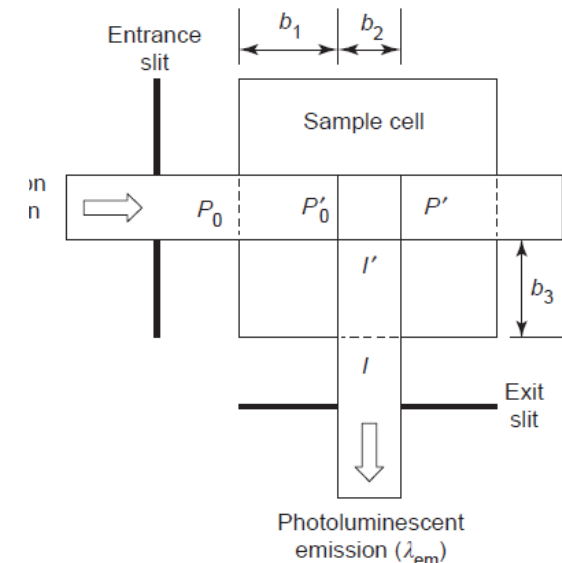
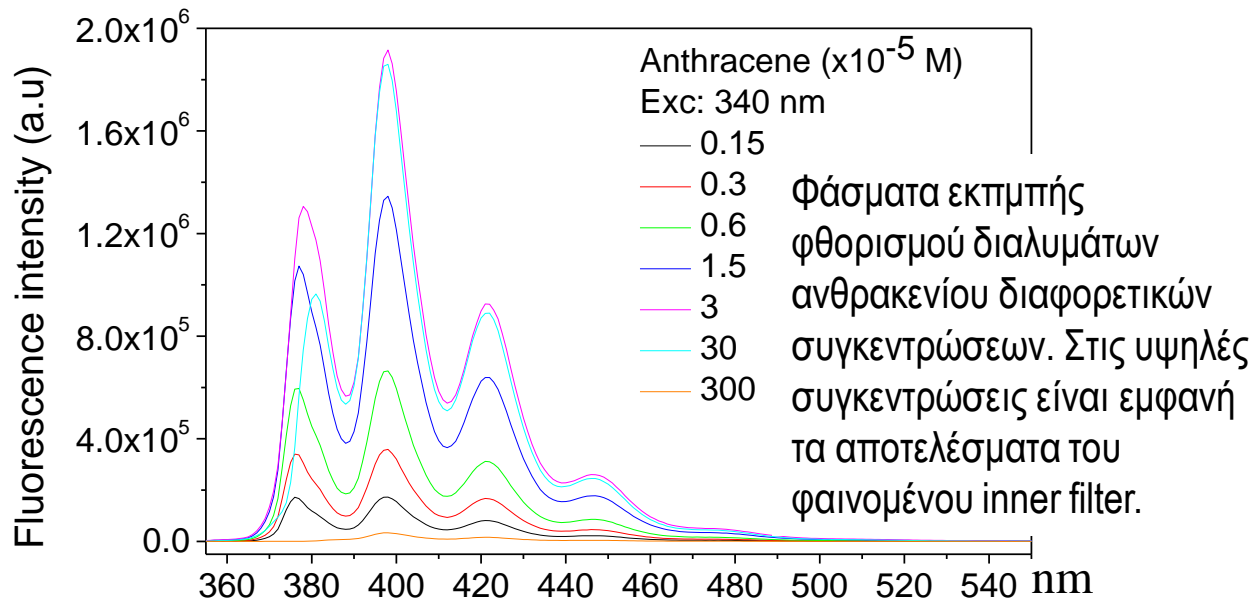
Δείγμα

Απορρόφηση (πυκνά ή αραιά διαλύματα – inner filter effects)

Ενώ στο όριο χαμηλών τιμών της απορρόφησης διαλύματος του χρωμοφόρου ($A < 0.2$), η ένταση της εκπομπής φθορισμού είναι σε πολύ καλή προσέγγιση ανάλογη της συγκέντρωσης του χρωμοφόρου ($I_F \sim C$), σε περιοχές τιμών $A > 0.2$ παρατηρούνται αποκλίσεις από τη γραμμικότητα.

Αυτό οφείλεται στο ότι το ποσοστό διέγερσης στο κέντρο της κυψελίδας, απ' όπου συλλέγεται η οπτική εκπομπή, είναι μειωμένο καθώς υπάρχει δραστική απορρόφηση στο πρόσθιο τμήμα της κυψελίδας.

Για αντίστοιχους λόγους η εκπομπή αλλοιώνεται φασματικά στην περιοχή των χαμηλών μηκών κύματος καθώς τμήμα αυτής απορροφάται από τον όγκο του διαλύματος μέσω του οποίου διέρχεται .



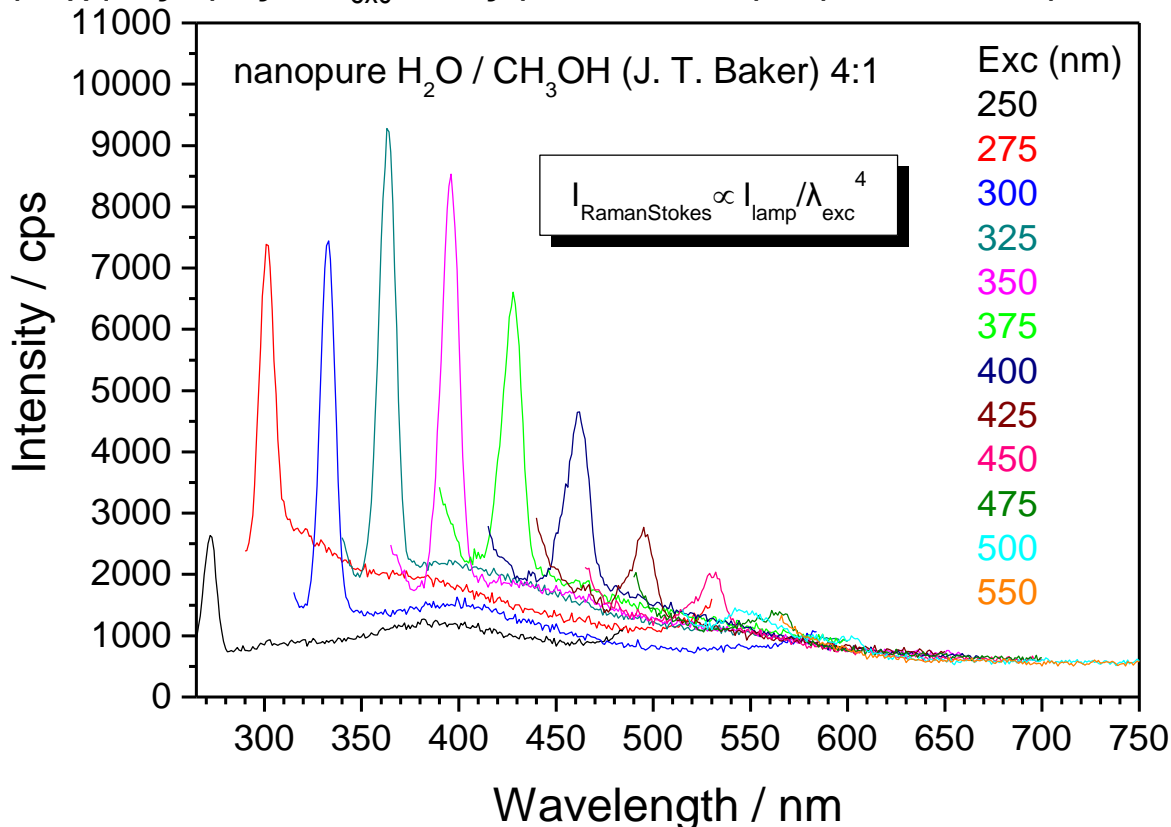
Φασματοφωτόμετρο φθορισμού – Τεχνικά χαρακτηριστικά

Δείγμα

Σκέδαση (Rayleigh, Raman, Mie)

Η διεγείρουσα δέσμη αλληλεπιδρά με το διαλύτη και παράγει χαρακτηριστικές φασματικές ταινίες που οφείλονται στη σκέδαση Stokes Raman.

Οι ταινίες αυτές παράγονται κατά κύριο λόγο από ταλαντώσεις έκτασης δεσμών C-H ή O-H (ευρίσκονται στην περιοχή $2800 - 3700 \text{ cm}^{-1}$) και αυτό αντιστοιχεί σε μερικές δεκάδες nm στη θετική περιοχή ως προς το λ_{exc} όπως φαίνεται στα φάσματα που παρατίθενται.



Η ένταση της ταινίας Raman αποτελεί παράμετρο της ευαισθησίας του ανιχνευτικού συστήματος του φθορισμομέτρου και παρουσιάζεται στα τεχνικά του χαρακτηριστικά.

Step = 1 nm

Integration time = 1 s

Slit_{exc} = 5 nm

Slit_{em} = 1 nm

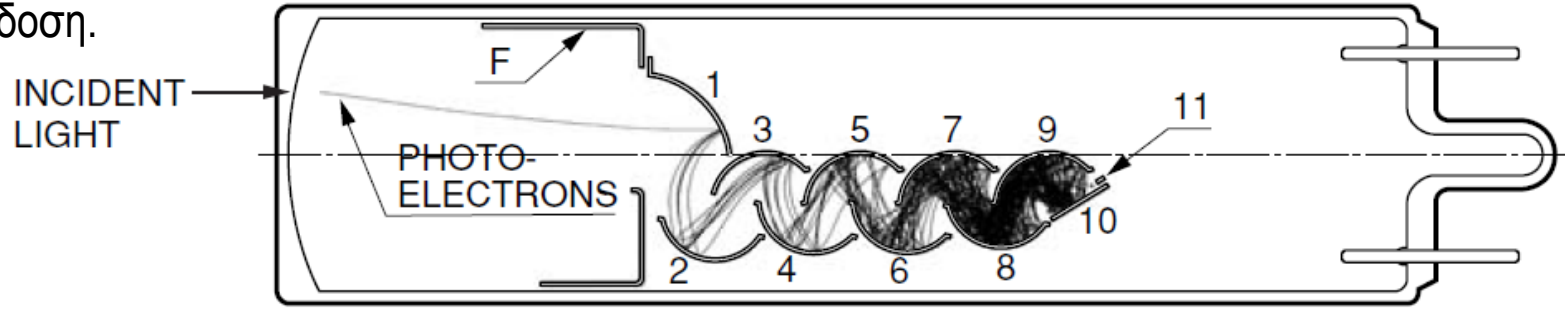
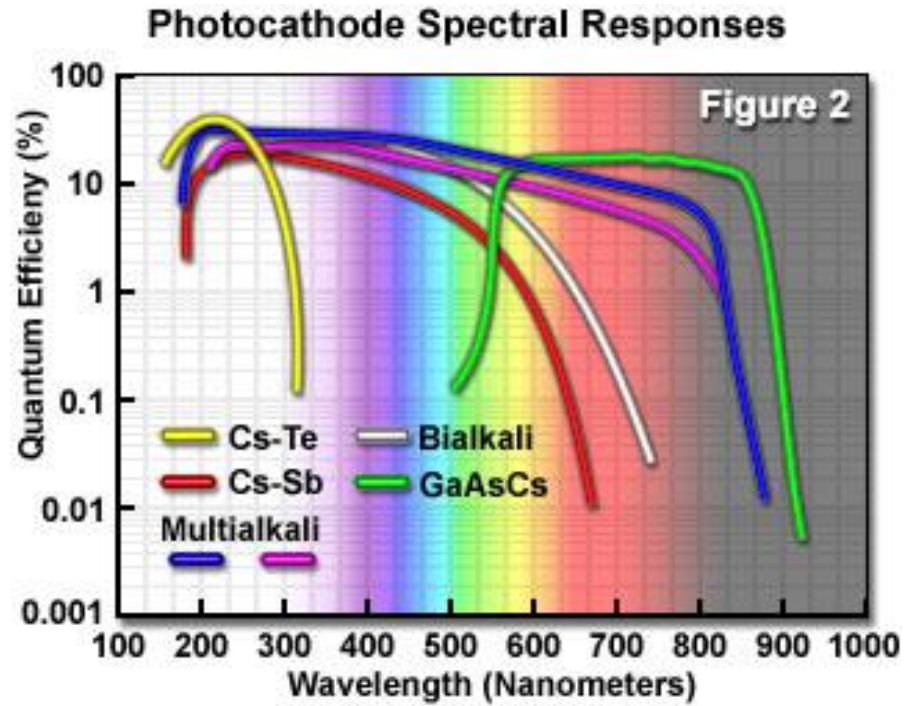
Φασματοφωτόμετρο φθορισμού – Τεχνικά χαρακτηριστικά

Ανίχνευση

Συλλογή εκπεμπόμενης ακτινοβολίας
Φασματική διακριτική ικανότητα, δλ
Ευαισθησία ανιχνευτή, $S(\lambda)$

Φωτοπολλαπλασιαστής (PMT)

Εκπομπή ηλεκτρονίων από φωτοκάθοδο
(φωτοηλεκτρικό φαινόμενο) και πολλαπλασιασμός
(ενίσχυση) τους μέσω διαδοχικών δυνόδων.
Το υλικό της καθόδου προσδιορίζει τη φασματική
περιοχή ευαισθησίας του ανιχνευτή και την κβαντική
απόδοση.



1 to 10 = DYNODES
11 = ANODE
F = FOCUSING ELECTRODE

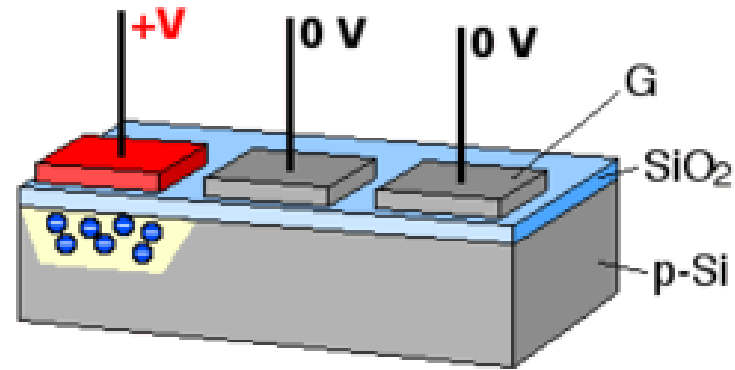
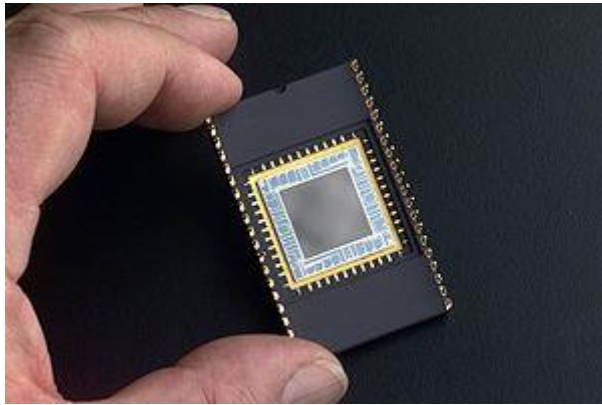
Figure 2-5: Linear-focused type

Φασματοφωτόμετρο φθορισμού – Τεχνικά χαρακτηριστικά

Ανίχνευση

Ανιχνευτές σύζευξης φορτίου CCD (charge coupled device)

Έχουν υψηλή ευαισθησία και παρέχουν χωρική (2-d) πληροφορία.



Μέτρηση της έντασης, I , ακτινοβολίας εκπεμπόμενης από πηγή

Ένταση πηγής

$$I(\lambda) = \frac{dn_{\lambda}}{dt}$$

Δυναμικό/pixel

$$V(\tau) = \frac{q(\tau)}{C}$$

Αριθμός
φωτονίων

$$n_{\lambda}(\tau) = \int_0^{\tau} I(\lambda) dt$$

Σήμα

$$S \propto V(\tau) \propto n_{\lambda}(\tau)$$

Φορτίο/pixel

$$q(\tau) = K \phi_{\lambda} n_{\lambda}(\tau)$$

http://en.wikipedia.org/wiki/Charge-coupled_device

Φασματοφωτόμετρο φθορισμού

Φασματοσκοπία εκπομπής φθορισμού

καταγράφει το φάσμα της εκπομπής που παράγεται με διέγερση του δείγματος σε συγκεκριμένο μήκος κύματος, λ_{exc} .

Φασματοσκοπία διέγερσης φθορισμού

αποτυπώνει το φάσμα της απορρόφησης η οποία είναι υπεύθυνη για την παρατηρούμενη εκπομπή φθορισμού

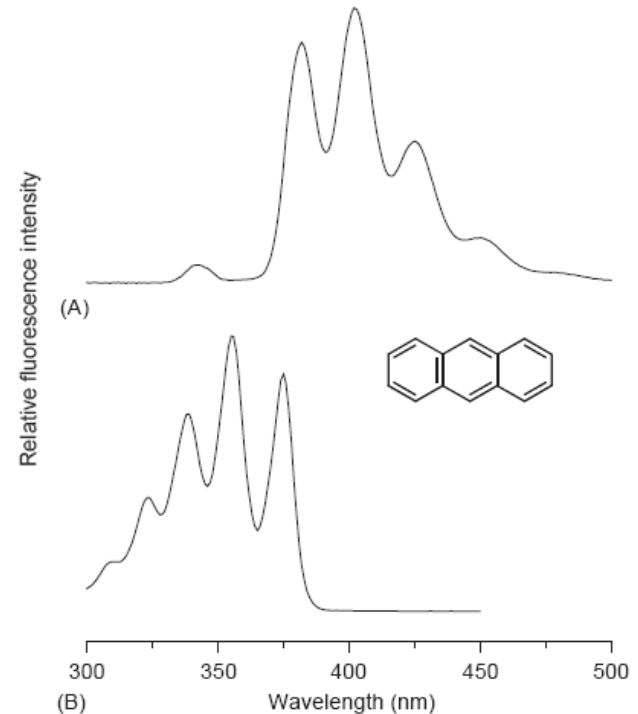
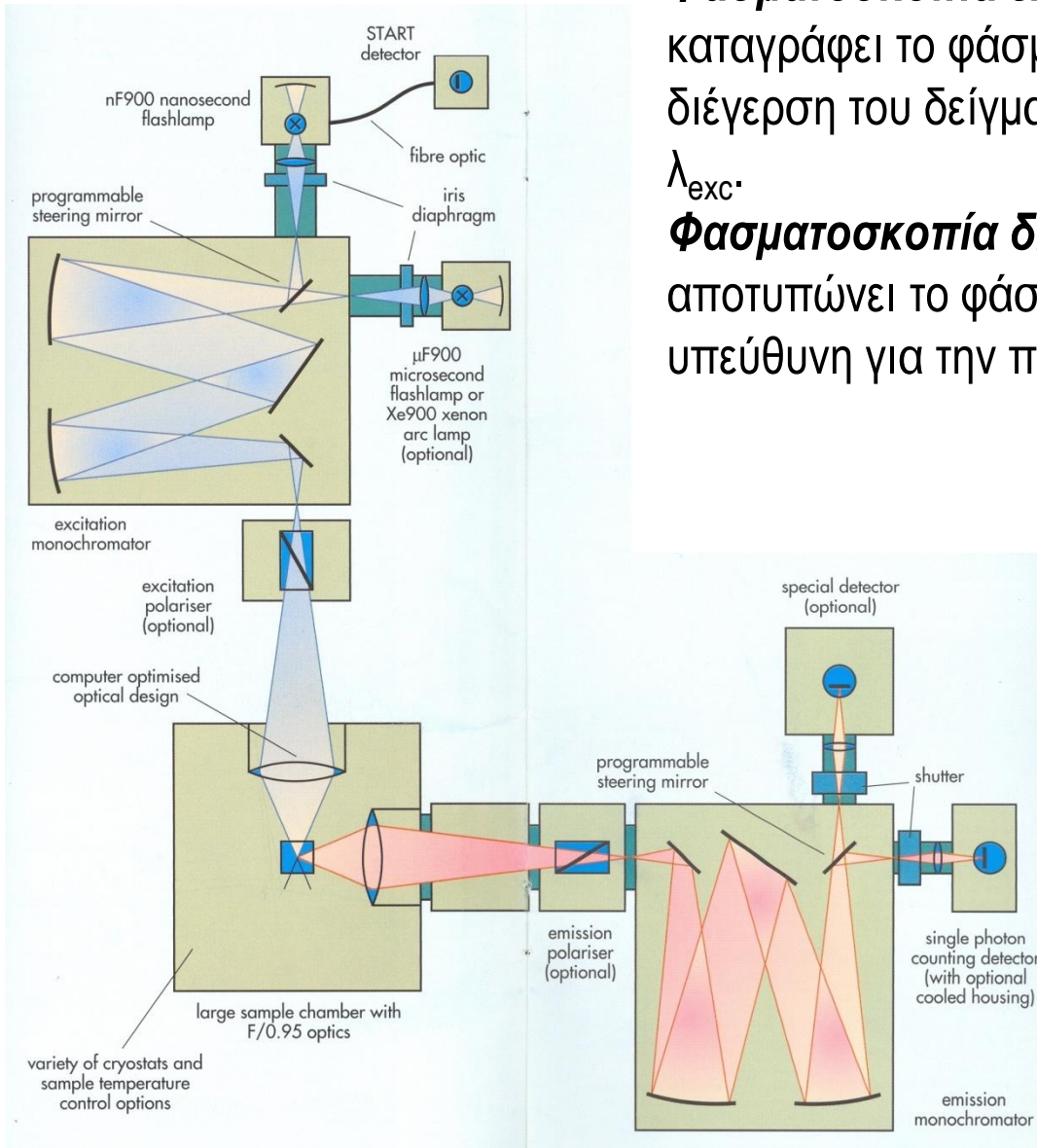


Figure 4 Fluorescence spectra of anthracene (1 μg ml⁻¹) in ethanol. The emission spectrum (A) was obtained with $\lambda_{exc} = 340$ nm and the excitation spectrum (B) was obtained with $\lambda_{em} = 379$ nm.



SPECTROFLUOROMETER

FS5



FluoroMax v. 2.0 (1 Oct 2011)

FluoroMax[®]-3 & FluoroMax[®]-P



Operation Manual

<http://www.isainc.com>

Rev. 2

In the USA:

Jobin Yvon Inc.
3880 Park Avenue, Edison, NJ 08820
Tel: 1-732-494-8990
Fax: 1-732-494-6157
E-Mail: usa@jobinyvon.com
1-800-333-5946

In France:

15-18, rue du Canal
91165 Lagny-sur-Seine cedex
Tel: (33) 1 64 54 13 00
Fax: (33) 1 64 00 03 19

Japan:

(81) 35223 0140
China: (86) 10 6536 6542
Germany: (49) 69 46 23 17-0
Italy: (39) 057 80 47 62
U.K.: (44) 2962960142

www.jobinyvon.com



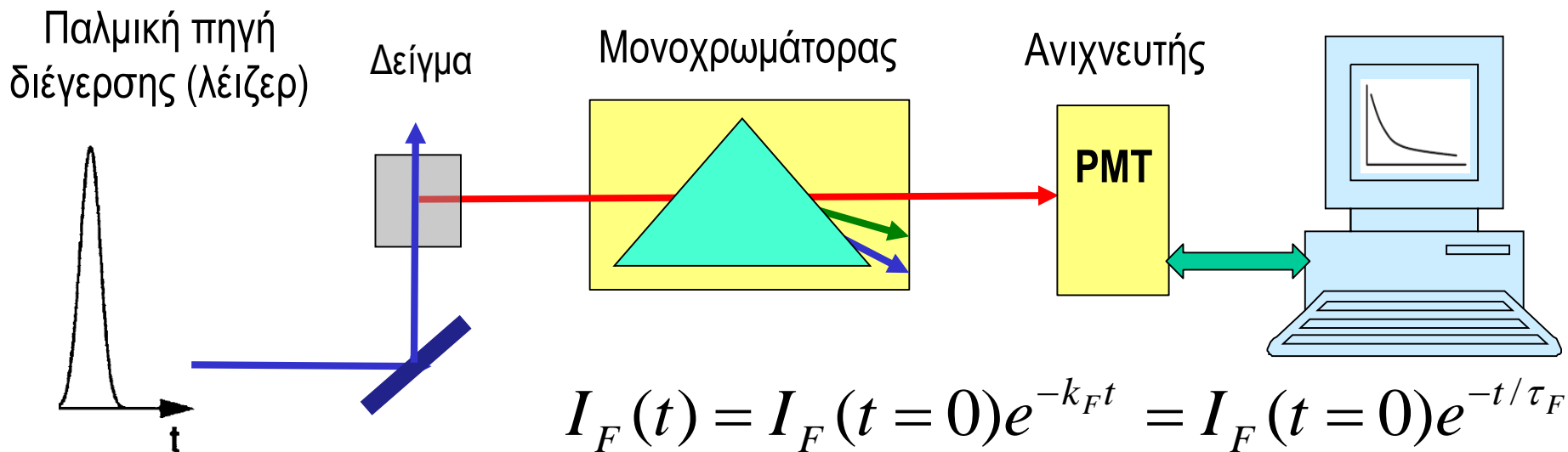
HORIBA GROUP

EMISSION • FLUORESCENCE • THERMICS • GRATINGS & DEN • Raman • SPECTROSCOPIC SYSTEMS • THIN FILMS

Κινητική (Δυναμική) θεώρηση φθορισμού

Χρονικώς αναλυόμενη φασματοσκοπία φθορισμού (time-resolved fluorescence spectroscopy)

Μετρήσεις του χρόνου ζωής φθορισμού (τ_F) επιτρέπουν τον κινητικό χαρακτηρισμό των διεργασιών αποδιέγερσης και την παρακολούθηση και κατανόηση των μηχανισμών ενδομοριακών ή/και διαμοριακών αλληλεπιδράσεων (π.χ. μεταφορά ενέργειας διέγερσης, κινήσεις διαλύτη κλπ).



Πειραματικά οι μετρήσεις χρόνου ζωής φθορισμού απαιτούν τη χρήση παλμικών πηγών διέγερσης (κυρίως λείζερ), εύρους παλμού στην περιοχή ps μέχρι ns, και ανιχνευτικών διατάξεων που επιτρέπουν την αξιόπιστη καταγραφή ταχειών μεταβολών έντασης ακτινοβολίας.

Χρονικώς αναλυόμενη φασματοσκοπία φθορισμού

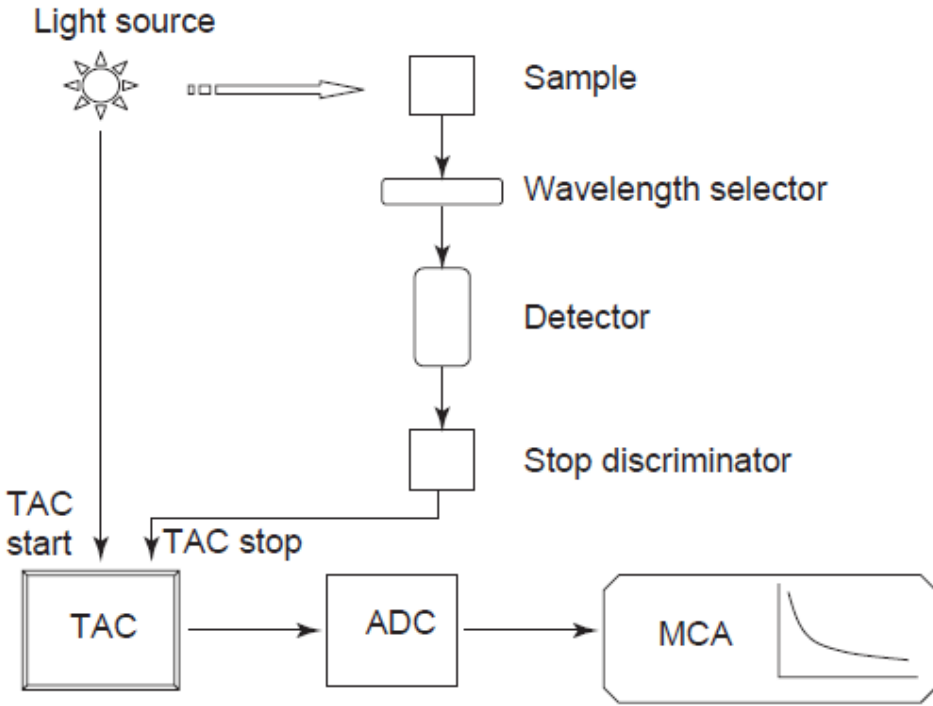


Figure 3 Basic components of a time-correlated single-photon counting system.

Η στατιστική αποτίμηση των γεγονότων εκπομπής μεμονωμένου (ενός) φωτονίου φθορισμού ως προς το χρόνο που μεσολαβεί από την άφιξη του παλμού διέγερσης στο δείγμα μέχρι την εκπομπή του φωτονίου αποδίδει την εικόνα της αποδιέγερσης φθορισμού (πιθανότητα (συχνότητα γεγονότων εκπομπής) ως προς το χρόνο).

Time-Correlated Single-Photon Counting (TCSPC)

Η τεχνική βασίζεται σε διέγερση από παλμικό λέιζερ ($\tau_{\text{pulse}} \sim 1\text{--}50 \text{ ps}$) που λειτουργεί σε υψηλό ρυθμό επανάληψης ($50\text{--}100 \times 10^6$ παλμοί/s).

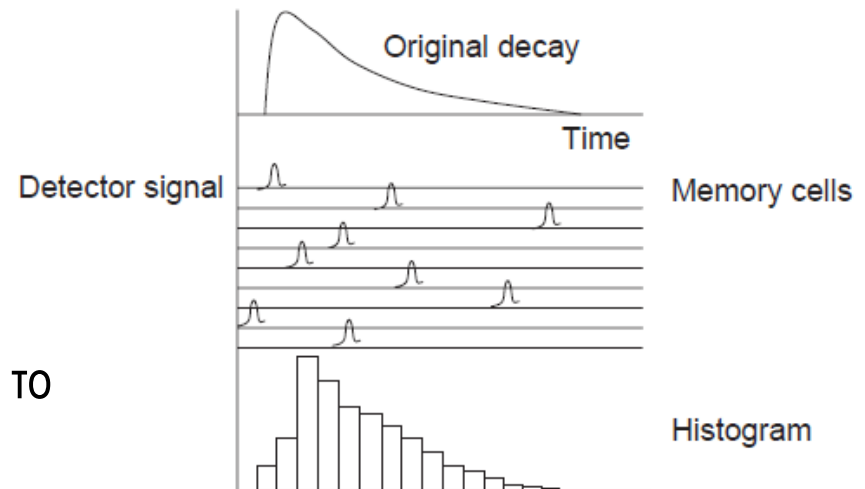


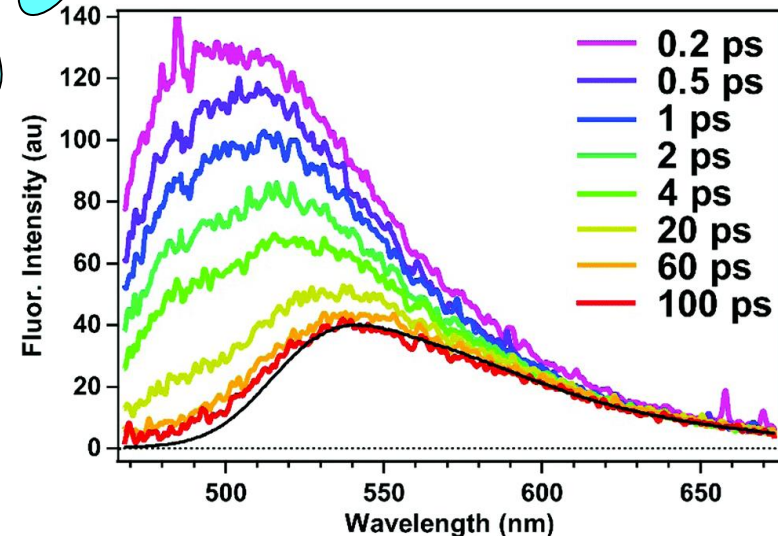
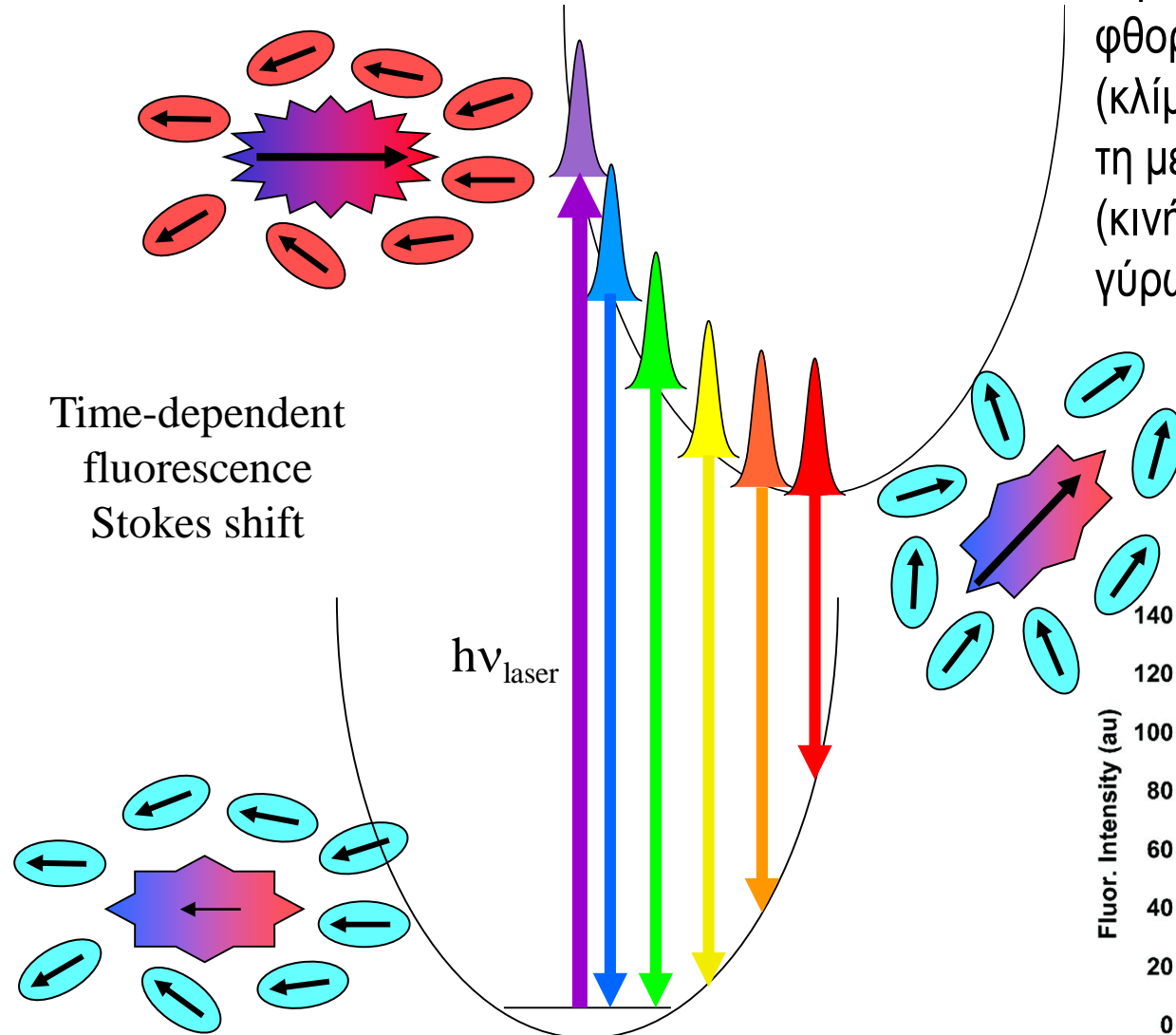
Figure 4 TCSPC measurement principle. The random nature of the events recorded yields a luminescence decay histogram. The memory cells are memory addresses to record a photon at a specified time interval.

Χρονικώς αναλυόμενη φασματοσκοπία φθορισμού

Χρονική μεταβολή μετατόπισης Stokes

Η μεταβολή των φασμάτων εκπομπής φθορισμού ως προς το χρόνο (κλίμακα λίγων δεκάδων ps) επιτρέπει τη μελέτη του προσανατολισμού (κινήσεων) των μορίων του διαλύτη γύρω από το χρωμοφόρο.

Time-dependent
fluorescence
Stokes shift



Παράγοντες που προσδιορίζουν το φθορισμό

Μοριακοί παράγοντες

Ηλεκτρονιακή Δομή

- χαρακτήρας θεμελιώδους και διεγερμένων καταστάσεων
- παρουσία βαρέων ατόμων (*heavy atom effect – spin –orbit coupling*)

Μοριακή δομή

- έκταση συζυγίας (μέγεθος μορίου)
- χαρακτηριστικές ομάδες
- ευμετάβλητη διαμόρφωση λόγω δονήσεων, περιστροφών
- διαμοριακές αλληλεπιδράσεις

Περιβάλλον

Διαλύτης

πολικότητα, ιξώδες

Θερμοκρασία

Παράγοντες που προσδιορίζουν το φθορισμό

Μοριακοί παράγοντες

Ηλεκτρονιακή Δομή

- *χαρακτήρας θεμελιώδους και διεγερμένων καταστάσεων ($n\pi^*$, $\pi\pi^*$)*

$$k_{isc} = \frac{2\pi}{\hbar} \left| \left(\int \Psi_T \hat{H}_{so} \Psi_S d\tau \right) \right|^2 \rho(E_T)$$

$$= \beta_{isc} \left| \left(\int \Psi_{vT} \Psi_{vS} \right) \right|^2 \rho(E_T) \quad (\text{FCWDoS})$$

$$ISC = f(\Delta E_{ST}; n\pi^*, \pi\pi^*; Z)$$

$$\text{Energy gap law} : \log(k_{isc}) \sim - |\Delta E(S_1 - T_{1,2})|$$

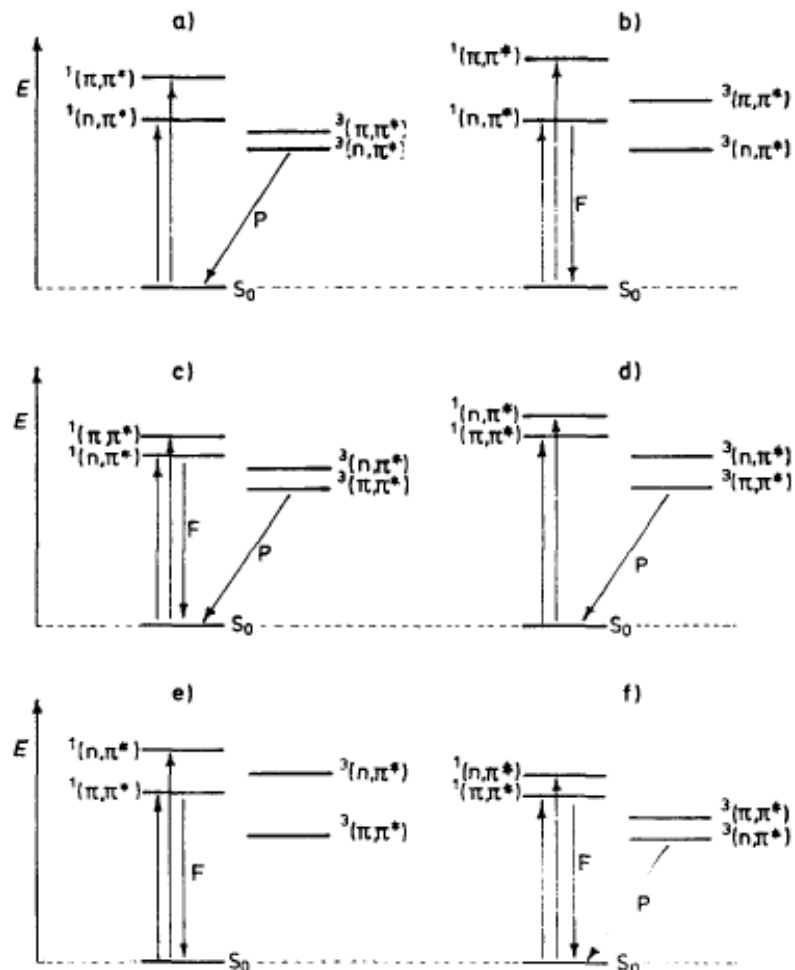
Κανόνες El-Sayed

$${}^1(n\pi^*) \leftrightarrow {}^3(\pi\pi^*)$$

$${}^1(\pi\pi^*) \leftrightarrow {}^3(n\pi^*) \quad \text{Επιτρεπτές}$$

$${}^1(n\pi^*) \leftrightarrow {}^3(n\pi^*)$$

$${}^1(\pi\pi^*) \leftrightarrow {}^3(\pi\pi^*) \quad \text{Απαγορευμένες}$$



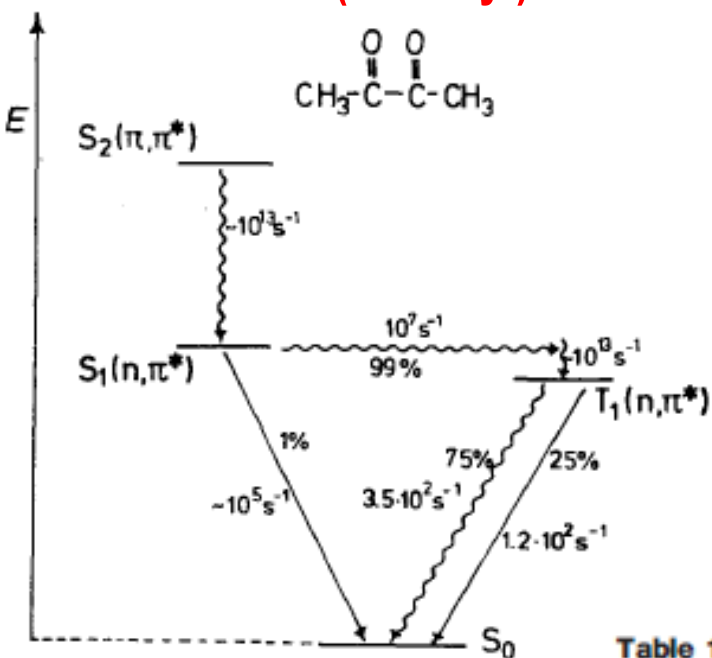
Παράγοντες που προσδιορίζουν το φθορισμό

Μοριακοί παράγοντες

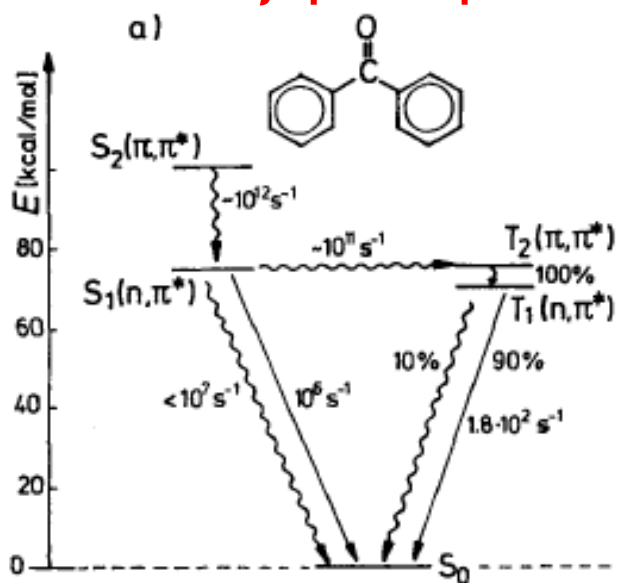
Ηλεκτρονιακή Δομή

- *χαρακτήρας θεμελιώδους και διεγερμένων καταστάσεων ($n\pi^*$, $\pi\pi^*$)*

Διακετύλιο (Biacetyl)



Βενζοφαινόνη



1-χλωρο-ναφθαλένιο

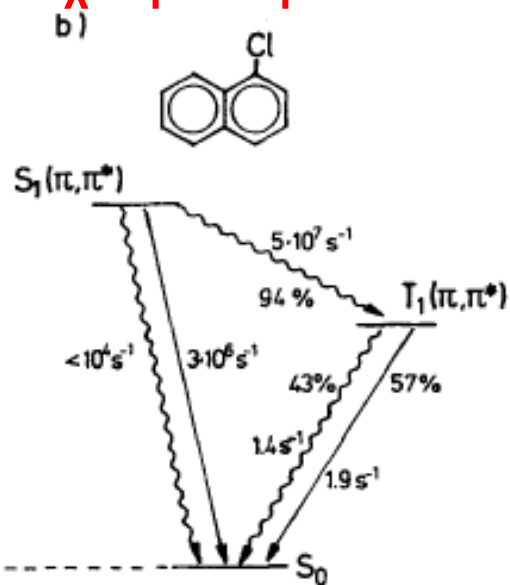


Table 1 A comparison of n, π^* and π, π^* singlet states

	n, π^*	π, π^*
Molar absorptivity ($1 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)	$10-10^3$	10^3-10^5
Lifetime(s)	$10^{-7}-10^{-5}$	$10^{-10}-10^{-7}$
Energy difference between S_1 and T_1	Small	Often large
Rate constant for intersystem crossing (k_i)	$> k_i$	$< k_i$

Παράγοντες που προσδιορίζουν το φθορισμό

Μοριακοί παράγοντες

Ηλεκτρονιακή Δομή

- παρουσία βαρέων ατόμων (*heavy atom effect – spin-orbit coupling*)

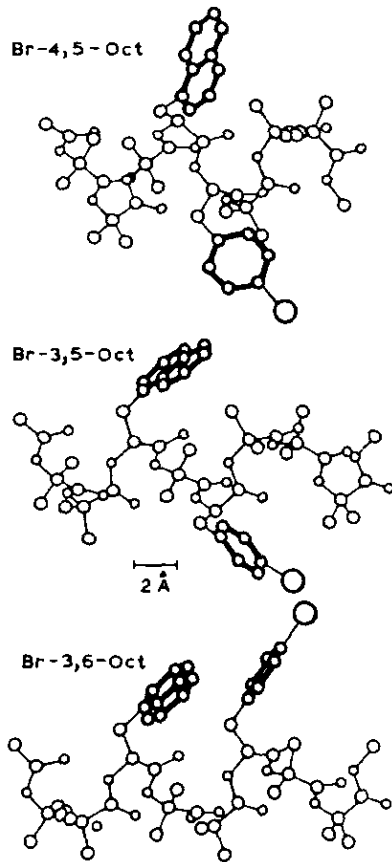


Figure 8.35. Structure of peptides containing naphthylalanine and *p*-bromophenylalanine, separated by 0 (*top*), 1 (*middle*), or 2 (*bottom*) amino acid residues. Revised and reprinted, with permission, from Ref. 66, Copyright © 1993, American Chemical Society.

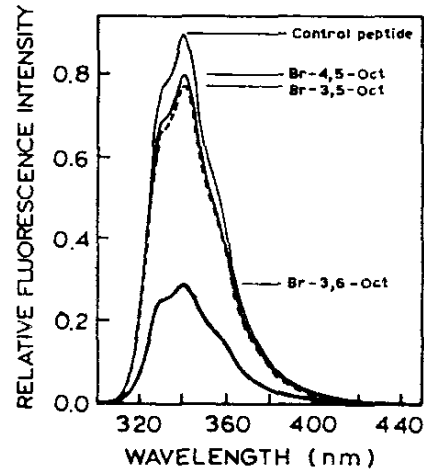


Figure 8.36. Emission spectra of the peptides shown in Figure 8.45. Also shown is the emission spectrum of a control peptide with a *p*-benzylalanine group in place of *p*-bromophenylalanine. Revised and reprinted, with permission, from Ref. 66, Copyright © 1993, American Chemical Society.

Στα εικονιζόμενα οκταπεπτίδια, η παρουσία Br στο αμινοξύ βρωμοφαινυλ-αλανίνη (Br-Phe) επιδρά (εξ αποστάσεως) στη διαδικασία ISC που λαμβάνει χώρα σε άλλο αμινοξύ, ναφθυλ-αλανίνη (Nar), προκαλώντας μείωση της κβαντικής απόδοσης φθορισμού όπως φαίνεται στα φάσματα φθορισμού.

Παράγοντες που προσδιορίζουν το φθορισμό

Μοριακοί παράγοντες

Μοριακή δομή

- έκταση συζυγίας

Aromatic hydrocarbons.

(a) benzene

(b) naphthalene

(c) acenaphthalene

(d) anthracene

(e) phenanthrene

(f) benz[b]anthracene

(g) benz[a]anthracene

(h) chrysene

(i) pyrene

(j) benz[c]phenanthrene

(k) pentacene

(l) dibenzo[a,c]anthracene

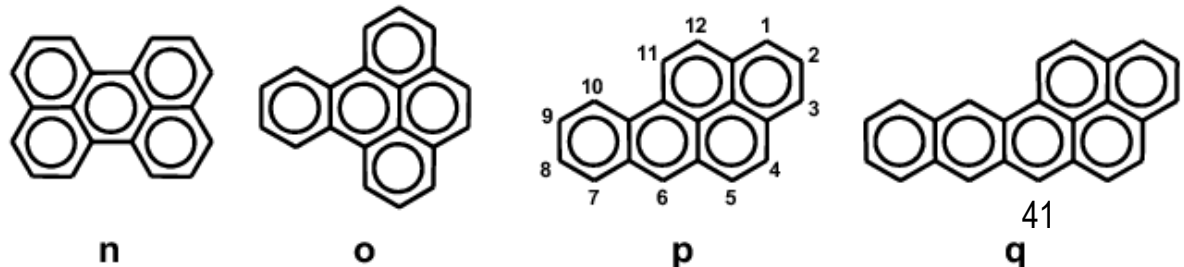
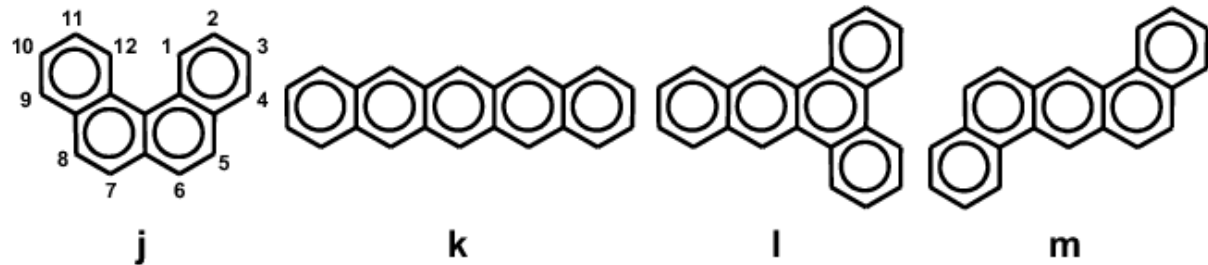
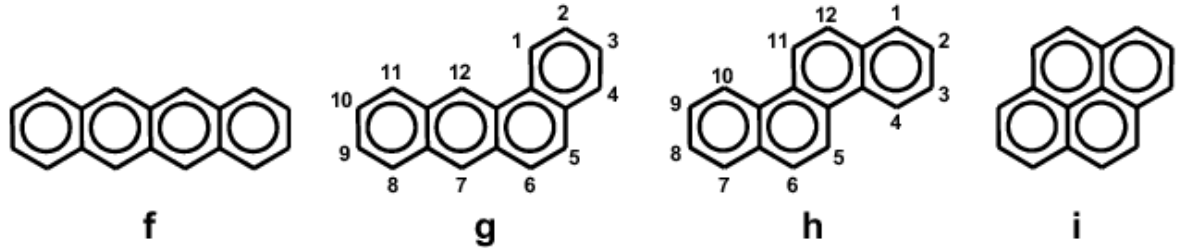
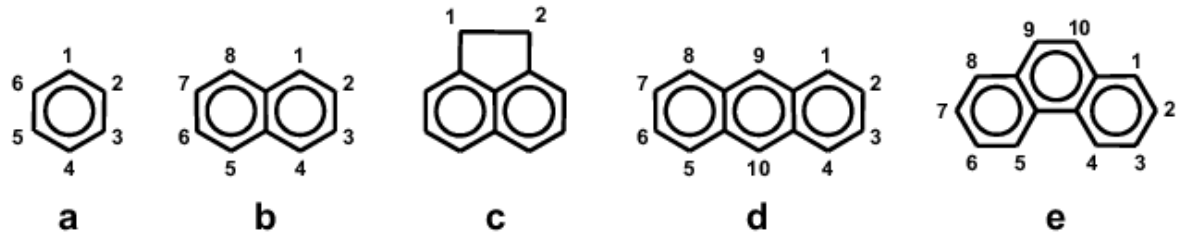
(m) dibenz[a,h]anthracene

(n) perylene

(o) benzo[e]pyrene

(p) benzo[a]pyrene

(q) naphtho[2,3-a]pyrene.



Παράγοντες που προσδιορίζουν το φθορισμό

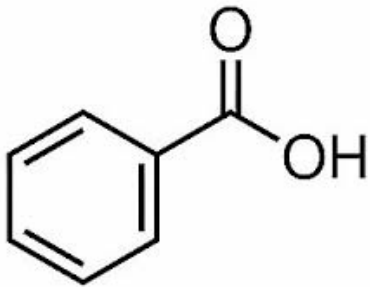
Μοριακοί παράγοντες

Μοριακή δομή

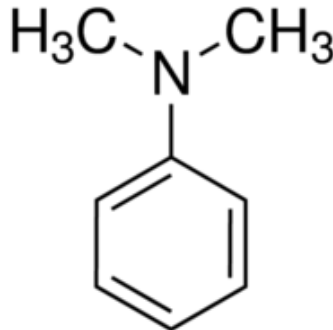
- χαρακτηριστικές ομάδες

Εισαγωγή σε ένα φθορίζον μόριο υποκαταστατών-χαρακτηριστικών ομάδων που εκχωρούν ηλεκτρονιακή πυκνότητα (electron donating groups) οδηγεί εν γένει στην αύξηση της κβαντικής απόδοσης φθορισμού.

Υποκαταστάτες που έλκουν ηλεκτρόνια οδηγούν γενικά σε μείωση της κβαντικής απόδοσης φθορισμού.

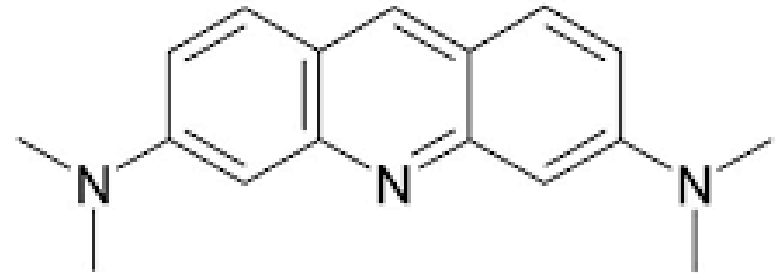


Benzoic acid ($\Phi_F = 0$)

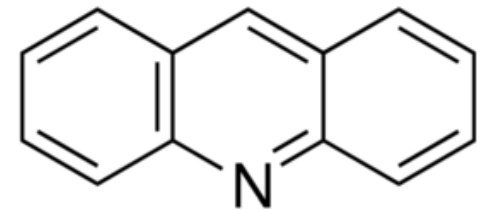


N,N dimethylaniline ($\Phi_F = 0.19$)

Acridine Orange ($\Phi_F = 0.2$)



Acridine ($\Phi_F = 0.008$)

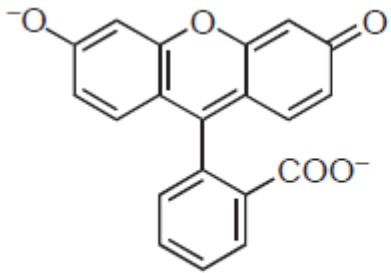


Παράγοντες που προσδιορίζουν το φθορισμό

Μοριακοί παράγοντες

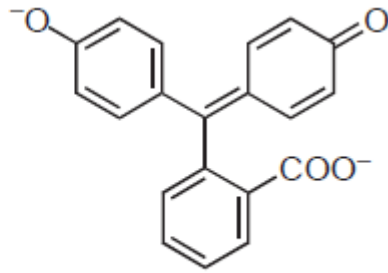
Μοριακή δομή

- *ευμετάβλητη διαμόρφωση λόγω δονήσεων, περιστροφών*



(1)

Fluorescein

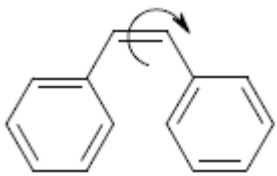


(2)

Phenolphthalein

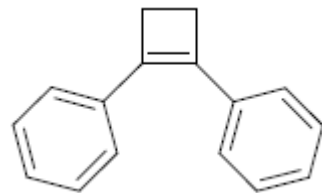
$$\Phi_1 > \Phi_2 \quad [(k_{ic})_1 < (k_{ic})_2]$$

Η αποδιέγερση της 2 πραγματοποιείται και μέσω μοριακών δονήσεων και περιστροφών (αυξημένη k_{ic}) σε αντίθεση με την 1 η οποία εμφανίζει ακαμψία εξαιτίας του ετεροκυκλικού δακτυλίου



$$k_{iso} \neq 0$$

$$\Phi_F(298K) = 0.05$$



$$k_{iso} = 0$$

$$\Phi_F(298K) = 1$$

Στο cis-στιλβένιο ευνοείται η ισομερίωση προς τη μορφή trans μέσω της διεγερμένης κατάστασης.

Παράγοντες που προσδιορίζουν το φθορισμό

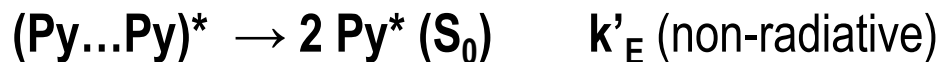
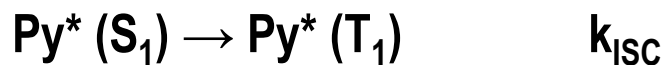
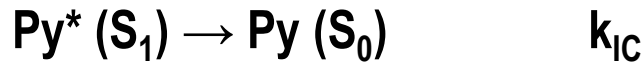
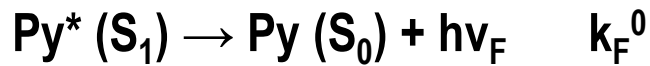
Μοριακοί παράγοντες

Μοριακή δομή

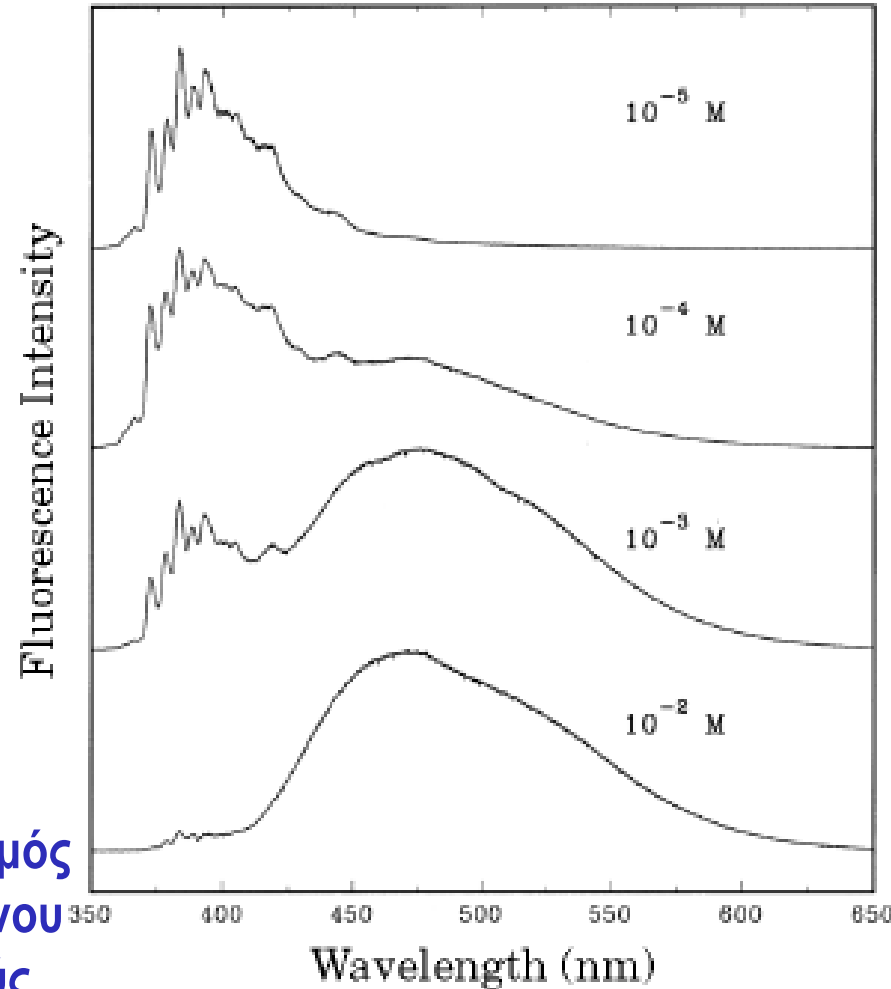
- διαμοριακές αλληλεπιδράσεις (εξ επαφής)

Διαλύματα πυρενίου υψηλής συγκέντρωσης αλλά και κρύσταλλοι στερεού πυρενίου εμφανίζουν έντονη και ευρεία εκπομπή χωρίς φασματική υφή στην περιοχή 400-600 nm.

Που οφείλεται η εκπομπή αυτή ?



Σχηματισμός
διεγερμένου
διμερούς
(excimer)



Φάσματα εκπομπής φθορισμού διαλυμάτων πυρενίου σε εξάνιο (10^{-5} – 10^{-2} M).

λ_{exc} : 337 nm

D. A. van Dyke et al, J. Chem. Educ. **75**, 615-620 (1988)

Παράγοντες που προσδιορίζουν το φθορισμό

Μοριακοί παράγοντες

Μοριακή δομή

- διαμοριακές αλληλεπιδράσεις
(αποδιέγερση λόγω κρούσεων)

$$\tau_F^Q = \frac{1}{k_F^Q} = \frac{1}{k_F^o + k_{ic} + k_{isc} + k_Q[Q]} \Rightarrow$$

$$\frac{1}{\tau_F^Q} = \frac{1}{\tau_F} + k_Q[Q] \Rightarrow \frac{\tau_F}{\tau_F^Q} = 1 + \tau_F k_Q[Q] \Rightarrow$$

$$\frac{\varphi_F}{\varphi_F^Q} = \frac{I_F}{I_F^Q} = 1 + \tau_F k_Q[Q]$$

Stern-Volmer
equation / plot

$$k_Q = \frac{4\pi RDN}{1000} = \frac{4\pi N}{1000} (R_F + R_Q)(D_F + D_Q)$$

Εξίσωση Smoluchowski

$$D = \frac{k_B T}{6\pi\eta R}$$

Εξίσωση Stokes –Einstein

$$R \approx 5\text{\AA}, \quad \eta \approx 0.89 \times 10^{-3} \text{ Pa s}, \quad D \approx 10^{-5} \text{ cm}^2\text{s}^{-1}$$

Fluorescence Quenching

or

“Measuring photophysical reactivity”

Fluorophore : PSA (pyrene sulfonic acid)

Quencher : KI $\lambda_{exc} : 335 \text{ nm}$

J. Chem. Educ. 69 (1992) 424

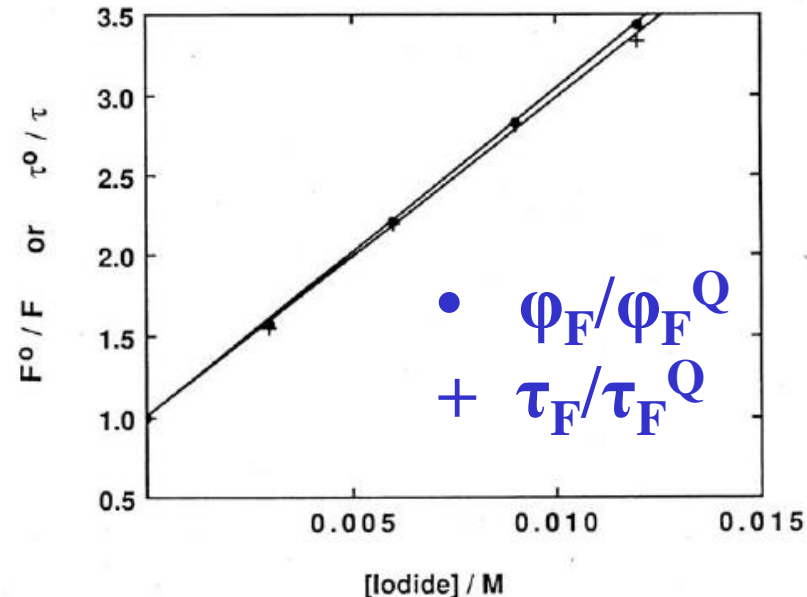


Figure 3. Fluorescence intensity and lifetime of PSA plotted against the concentration of iodide ion. The excitation wavelengths for the fluorescence intensity and lifetime measurements were 335 and 337 nm, respectively. In both experiments the fluorescence emission was monitored at 395 nm. The solid circles correspond to τ^0/τ and the crosses to F^0/F .

Παράγοντες που προσδιορίζουν το φθορισμό

Μοριακοί παράγοντες

Μοριακή δομή

- διαμοριακές αλληλεπιδράσεις
(αποδιέγερση λόγω κρούσεων)

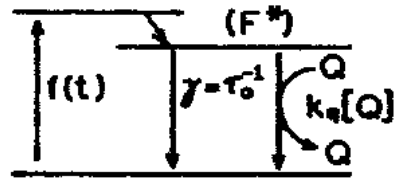
Fluorescence Quenching

or

“Measuring photophysical reactivity”

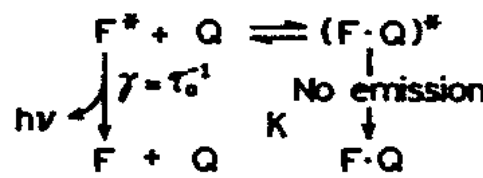
Dynamic quenching

Collisional Quenching



Static quenching

Static Quenching

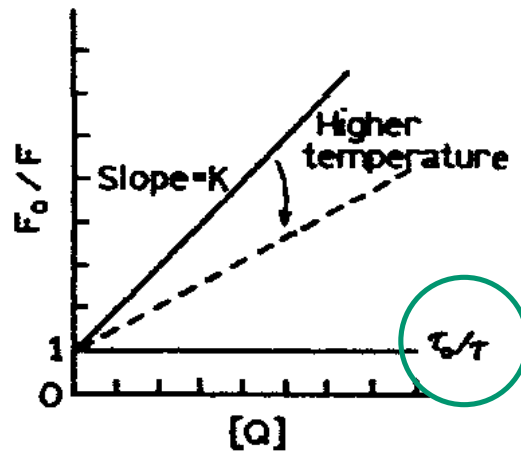
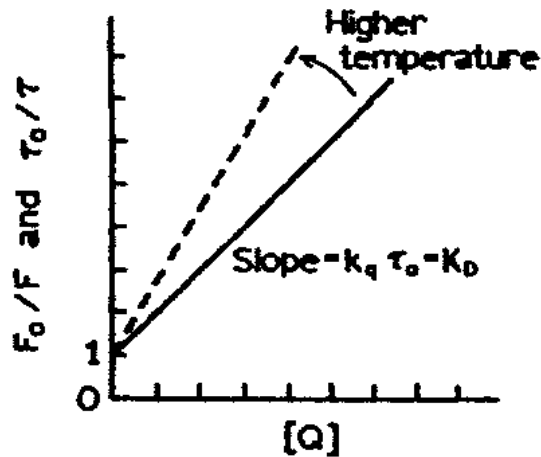


Εφαρμογές στη

Βιοχημεία/φυσική

Δομή και δυναμική

βιομορίων



«Molecular Probes»

<https://www.thermofisher.com/gar/en/home/brands/molecular-probes.html>

J. R. Lacowicz, *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, Springer 2006, Κεφ. 8. (8.1 – 8.5)

Figure 8.1. Comparison of dynamic (collisional) and static quenching.

Παράγοντες που προσδιορίζουν το φθορισμό

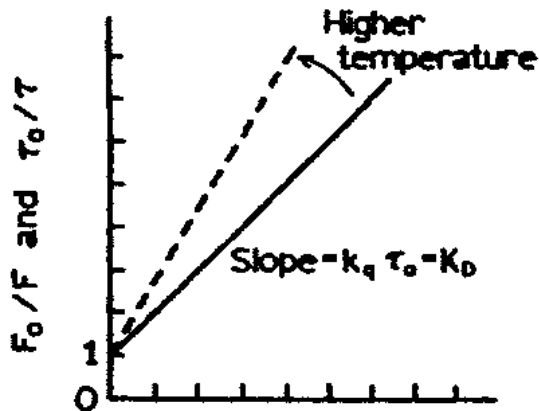
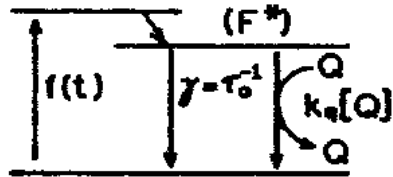
Μοριακοί παράγοντες

Μοριακή δομή

- διαμοριακές αλληλεπιδράσεις
(αποδιέγερση λόγω κρούσεων)

Dynamic quenching

Collisional Quenching

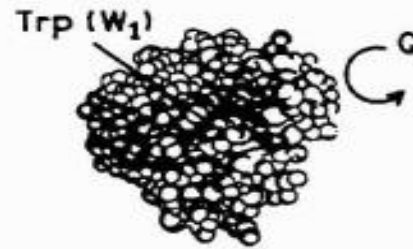


$$\frac{I}{I_Q} = \frac{\varphi}{\varphi_Q} = \frac{\tau}{\tau_Q} = 1 + k_Q \tau [Q] \quad \left(= \frac{F_0}{F} \right)$$

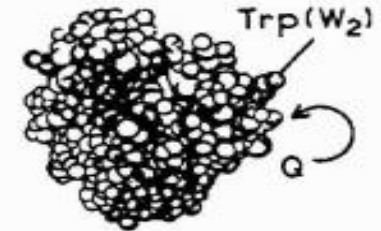
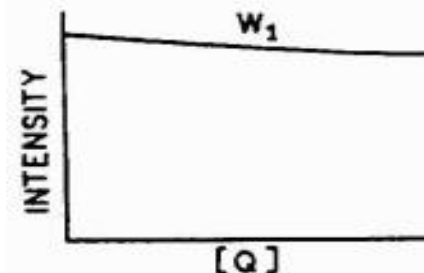
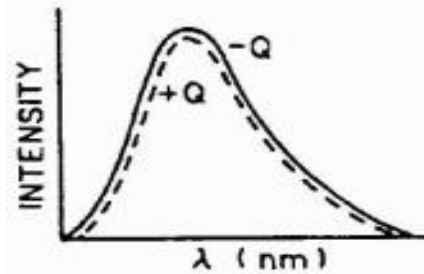
Fluorescence Quenching

or

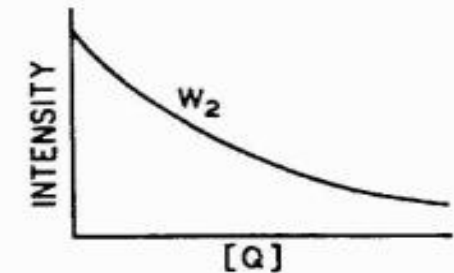
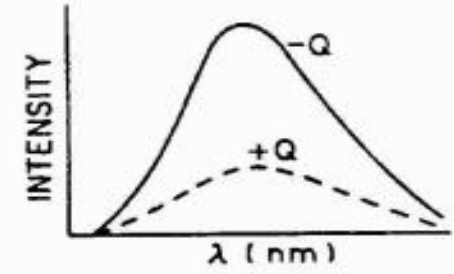
“Measuring photophysical reactivity”



Buried Tryptophan



Surface Tryptophan



Παράγοντες που προσδιορίζουν το φθορισμό

Μοριακοί παράγοντες

Μοριακή δομή

- διαμοριακές αλληλεπιδράσεις
(αποδιέγερση λόγω κρούσεων)

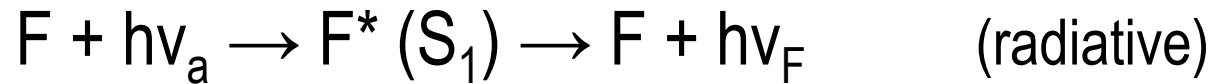
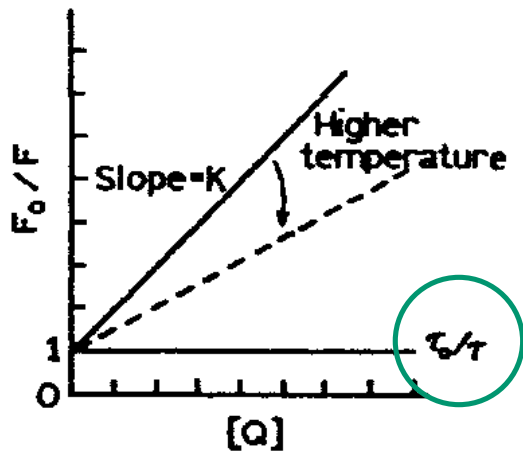
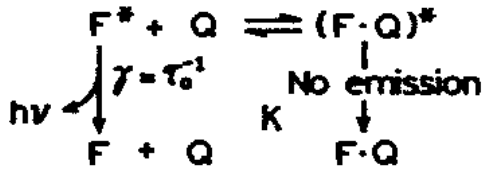
Fluorescence Quenching

or

“Measuring photophysical reactivity”

Static quenching

Static Quenching



$$\frac{I}{I_Q} = \frac{[F]_{\text{tot}}}{[F]} = \frac{[F] + [FQ]}{[F]} = \frac{[F](1 + K[Q])}{[F]} \Rightarrow$$

$$\frac{I}{I_Q} = \frac{\varphi}{\varphi_Q} = \frac{\tau}{\tau_Q} = 1 + K[Q] \quad \left(= \frac{F_0}{F} \right)$$

Παράγοντες που προσδιορίζουν το φθορισμό

Μοριακοί παράγοντες

Μοριακή δομή

- διαμοριακές αλληλεπιδράσεις
(αποδιέγερση λόγω κρούσεων)

Επίδραση O₂ στην εκπομπή

Φθορισμού: S₁ [O₂(³Σ_g⁻)] → T₁

Φωσφορισμού: T₁ + O₂(³Σ_g⁻) → S₀ + O₂(¹Δ_g)

$$\frac{\varphi_F}{\varphi_F^Q} = \frac{\tau_F}{\tau_F^Q} = 1 + \tau_F k_Q [Q]$$

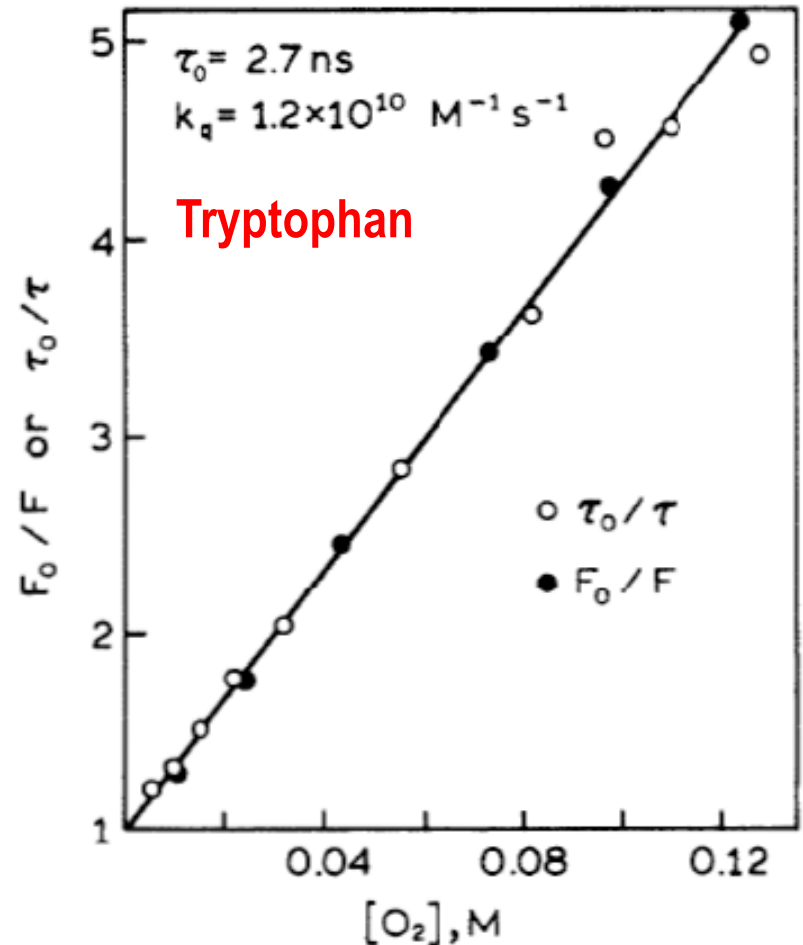
Q = O₂ Typical [O₂] = 1x10⁻³ M

D(O₂) = 2.5x10⁻⁵ cm² s⁻¹

D(Trp) = 0.66x10⁻⁵ cm² s⁻¹

$$\sqrt{\langle r^2 \rangle} = r_{RMS} = \sqrt{D_Q \tau_F}$$

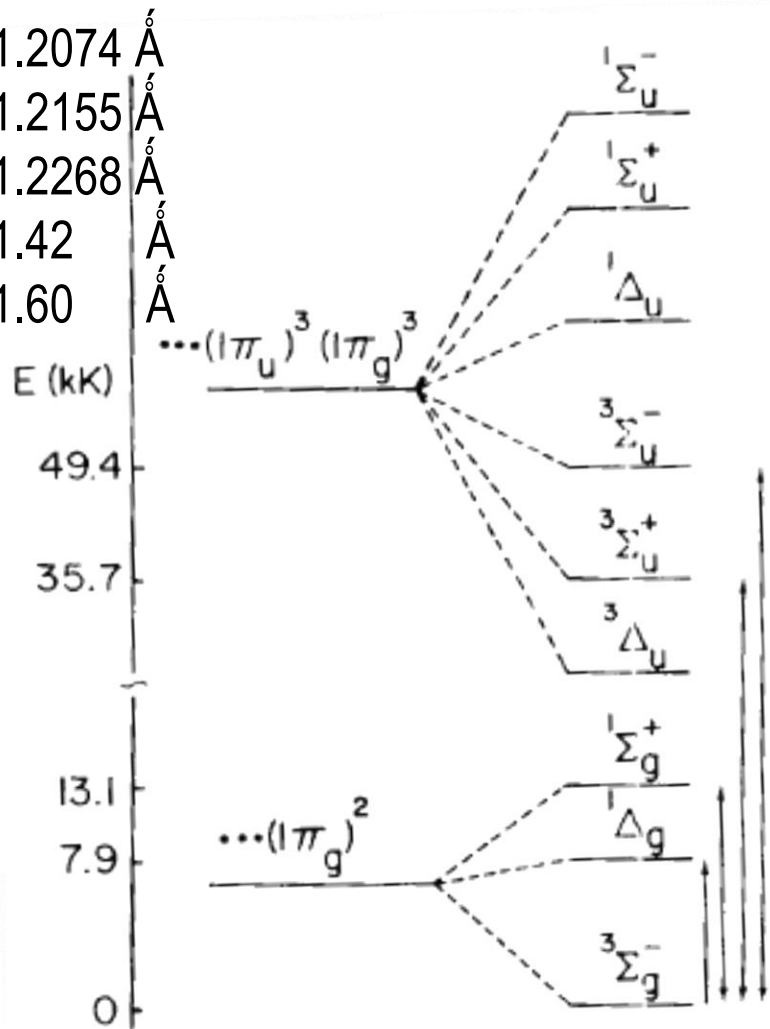
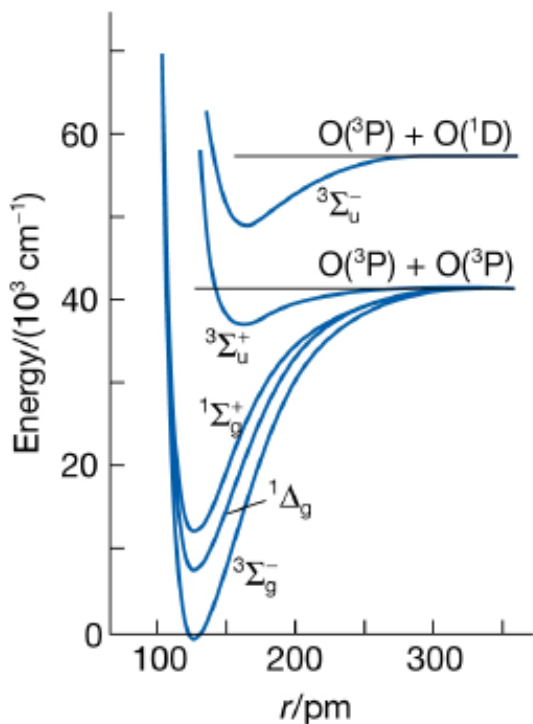
At-ΦΧ, Κεφ. 20.10



Ενεργειακές καταστάσεις O₂

Κατάσταση	Ηλεκτρονιακή διάταξη	Ενέργεια στάθμης $v = 0$	$\tilde{\nu}_e$	r_e
$^3\Sigma_g^-$	$(\pi_u)^4(\pi_g)^2$	0 cm ⁻¹	1580 cm ⁻¹	1.2074 Å
$^1\Delta_g$	$(\pi_u)^4(\pi_g)^2$	7882,39 cm ⁻¹	1509 cm ⁻¹	1.2155 Å
$^1\Sigma_g^+$	$(\pi_u)^4(\pi_g)^2$	13120,9 cm ⁻¹	1433 cm ⁻¹	1.2268 Å
$^3\Sigma_u^+$	$(\pi_u)^3(\pi_g)^3$	35713 cm ⁻¹	819 cm ⁻¹	1.42 Å
$^3\Sigma_u^-$	$(\pi_u)^3(\pi_g)^3$	49363 cm ⁻¹	700 cm ⁻¹	1.60 Å

P.W. Atkins, J. de Paula, Physical Chemistry



Παράγοντες που προσδιορίζουν το φθορισμό

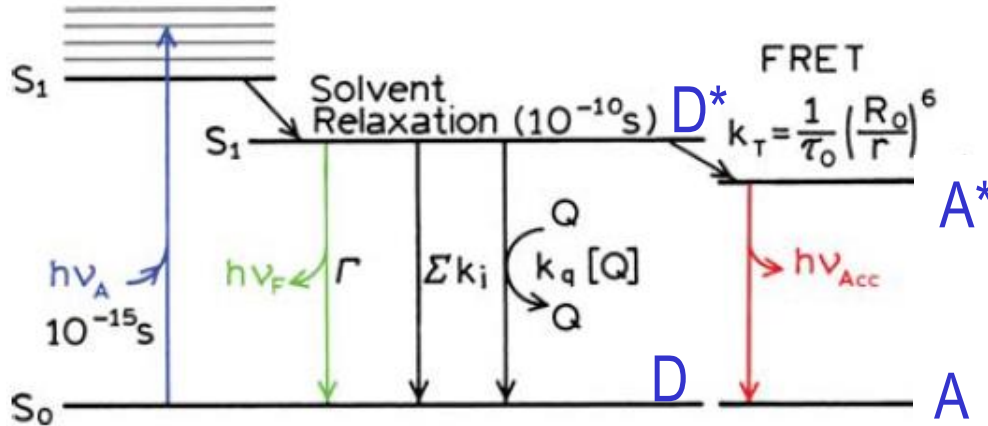
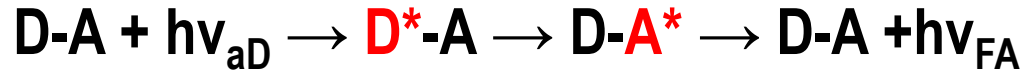
Μοριακοί παράγοντες

Μοριακή δομή

- ενδο-μοριακές αλληλεπιδράσεις

Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET)

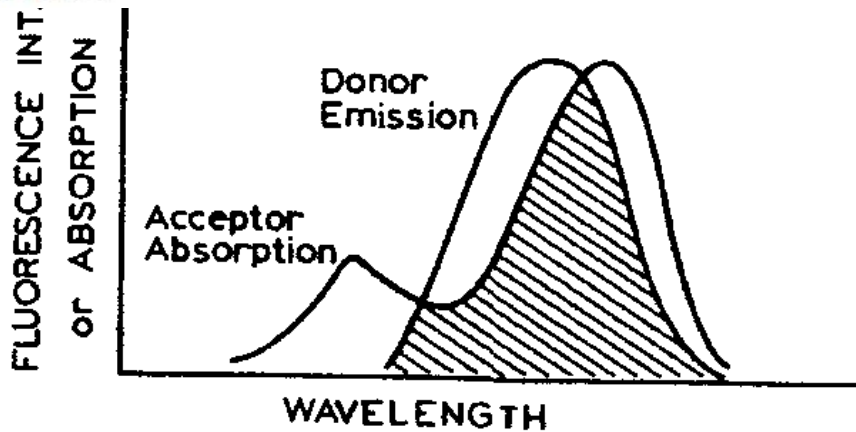
“A molecular ruler”



Υπάρχει η δυνατότητα μεταφοράς ενέργειας διέγερσης από ένα χρωμοφόρο σε ένα άλλο υπό την προϋπόθεση ότι :

- 1) αυτά ευρίσκονται κοντά (αποστάσεις της τάξης : 3-30 Å) και
- 2) υπάρχει επικάλυψη του φάσματος απορρόφησης του δέκτη με το φάσμα εκπομπής του δότη.

Figure 1.14. Jablonski diagram with collisional quenching and fluorescence resonance energy transfer (FRET). The term Σk_i is used to represent non-radiative paths to the ground state aside from quenching and FRET.



Η σταθερά ταχύτητας της διεργασίας μεταφοράς ενέργειας διέγερσης εξαρτάται από την απόσταση δότη-δέκτη και είναι **ανάλογη του R⁻⁶**.

Ως αποτέλεσμα είναι εφικτός ο προσδιορισμός ενδομοριακών αποστάσεων με βάση το φαινόμενο FRET.

Εφαρμογές στη μελέτη δομής βιοπολυμερών.

J. R. Lacowicz, *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, Springer 2006, Κεφ. 13. (13.1 – 13.3)

Interactions Between Molecules

Ομοιοπολικός
δεσμός

Ιοντικός δεσμός

ΑΣΘΕΝΕΙΣ
ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ

Δεσμός H

$$V \sim \frac{1}{r^n}$$

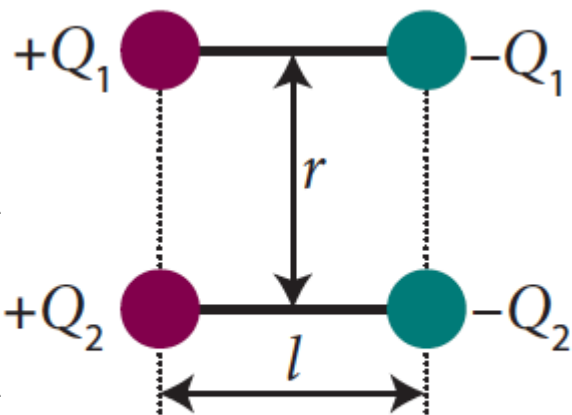
Type of Interaction	Distance Dependence	Example	Order of Magnitude (kJ mol ⁻¹) ^a
Covalent bond ^b	No simple expression	H–H	200–800
Ion–ion	$\frac{q_A q_B}{4\pi\epsilon_0 r}$	Na ⁺ Cl ⁻	40–400
Ion–dipole	$\frac{q\mu}{4\pi\epsilon_0 r^2}$	Na ⁺ (H ₂ O) _n	5–60
Dipole–dipole	$\frac{2}{3} \frac{\mu_A^2 \mu_B^2}{(4\pi\epsilon_0)^2 r^6} \frac{1}{k_B T}$	SO ₂ SO ₂	0.5–15
Ion-induced dipole	$\frac{1}{2} \frac{\alpha q^2}{4\pi\epsilon_0 r^4}$	Na ⁺ C ₆ H ₆	0.4–4
Dipole-induced dipole	$\frac{\alpha\mu^2}{4\pi\epsilon_0 r^6}$	HCl C ₆ H ₆	0.4–4
Dispersion	$\frac{3}{4} \frac{\alpha^2 I}{r^6}$	CH ₄ CH ₄	4–40
Hydrogen bond	No simple expression	H ₂ O ⋯ H ₂ O	4–40

^a The actual value depends on distance of separation, charge, dipole moment, polarizability, and the dielectric constant of the medium.

^b This is listed for comparison purposes only.

Αλληλεπιδράσεις διπόλου - διπόλου

Η ηλεκτροστατική ενέργεια αλληλεπίδρασης μεταξύ 2 διπόλων εξαρτάται από τη διπολική ροπή του καθενός, τη μεταξύ τους απόσταση και τον σχετικό προσανατολισμό τους.



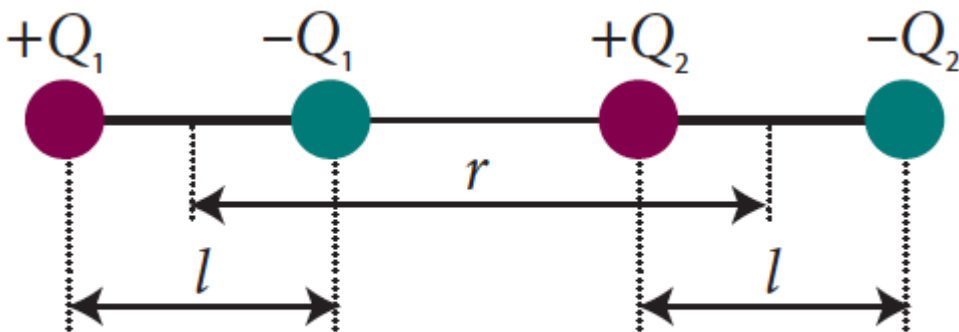
Εικ. 11

$$V_{dd} = \frac{\vec{\mu}_1 \cdot \vec{\mu}_2}{4\pi\epsilon_0 |\vec{r}_{12}|^3} - \frac{3(\vec{\mu}_1 \cdot \vec{r}_{12})(\vec{\mu}_2 \cdot \vec{r}_{12})}{4\pi\epsilon_0 |\vec{r}_{12}|^5}$$

Στην περίπτωση της παράλληλης διεύθεσης ο δεύτερος όρος στη γενική σχέση μηδενίζεται, οπότε η ενέργεια αλληλεπίδρασης ισούται με:

$$V_{dd} = \frac{\vec{\mu}_1 \cdot \vec{\mu}_2}{4\pi\epsilon_0 |\vec{r}_{12}|^3}$$

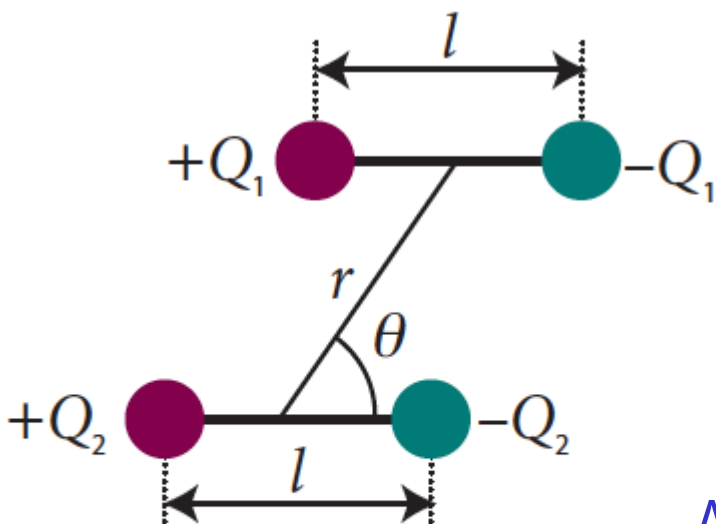
Να προσδιορίσετε το πρόσημο της ενέργειας αν η διεύθεση είναι παράλληλη ή αντι-παράλληλη



Στην περίπτωση συγγραμμικής διεύθεσης η ενέργεια ισούται με:

$$V_{dd} = -\frac{\vec{\mu}_1 \cdot \vec{\mu}_2}{2\pi\epsilon_0 |\vec{r}_{12}|^3}$$

Αλληλεπιδράσεις διπόλου - διπόλου



Εικ. 13

Στην περίπτωση παράλληλου προσανατολισμού των διπόλων υπό γωνία θ (βλ. εικόνα) η ενέργεια αλληλεπίδρασης δίνεται από τη σχέση:

$$V_{dd} = \frac{\mu_1 \mu_2 (1 - 3 \cos^2 \theta)}{4\pi \epsilon_0 |\vec{r}_{12}|^3}$$

Αν τα δίπολα κινούνται ελεύθερα, δηλ ο σχετικός προσανατολισμός τους μεταβάλλεται συνεχώς, η μέση ενέργεια αλληλεπίδρασης μηδενίζεται.

Όμως επειδή τα δίπολα ακόμη και αν περιστρέφονται ελεύθερα τείνουν να λάβουν κατά προτίμηση σχετικό προσανατολισμό που ελαχιστοποιεί την ενέργεια αλληλεπίδρασης. η μέση τιμή της οποίας (αλληλεπίδραση Keesom) εξαρτάται και από τη

θερμοκρασία και παρέχεται από τη σχέση: $\langle V_{dd} \rangle = - \frac{2\mu_1^2 \mu_2^2}{3(4\pi \epsilon_0)^2 k_B T |\vec{r}_{12}|^6}$

Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET)

Μοριακοί παράγοντες

Μοριακή δομή

- ενδο-μοριακές αλληλεπιδράσεις

Theodor Förster

Μεταφορά ενέργειας διέγερσης μέσω συντονισμού από αλληλεπιδράσεις διπόλου-διπόλου.

<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/cphc.201000733>

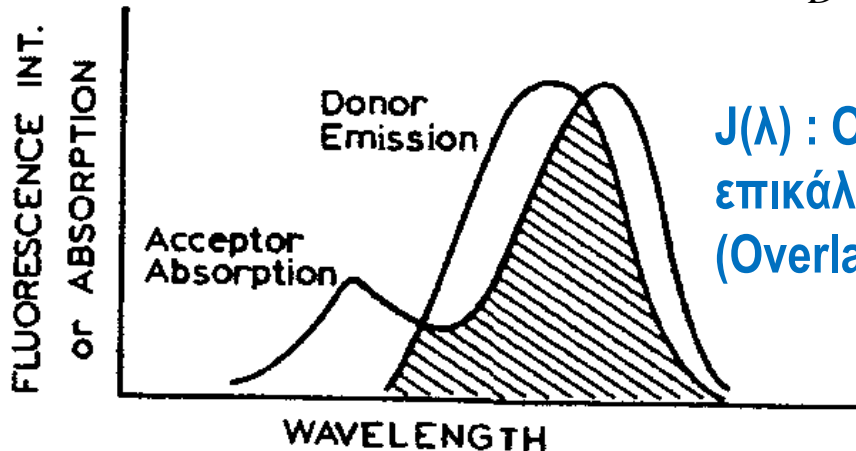
$$k_{ET} = \frac{2\pi}{\hbar} |\langle \Psi_{D^*A} | \hat{H}_{ET} | \Psi_{DA^*} \rangle|^2 \rho_E = \beta_{ET}^{Coulomb} \langle \nu_{D^*A} | \nu_{DA^*} \rangle^2 \sim \left(\frac{\vec{\mu}_D \vec{\mu}_A}{R_{DA}^3} \right)^2 J(\lambda)$$

$$k_{ET}(R) = \frac{1}{\tau_F^D} \left(\frac{R_0}{R} \right)^6$$

$$E = \frac{k_{ET}(r)}{k_{ET}(r) + k_F^D + k_{ISC}^D + k_{IC}^D}$$

$$= 1 - \frac{\tau_{D-A}}{\tau_D} = \frac{R_0^6}{R_0^6 + R^6}$$

Αποτελεσματικότητα μεταφοράς (Transfer efficiency)



$J(\lambda)$: Ολοκλήρωμα επικάλυψης (Overlap integral)

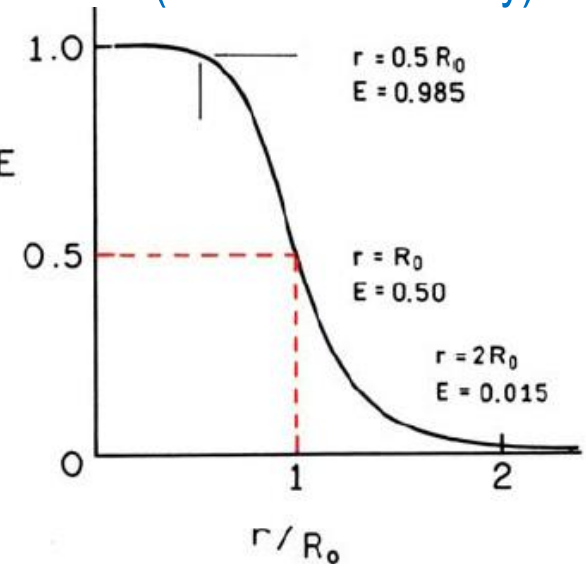


Figure 13.2. Dependence of the energy transfer efficiency (E) on distance. R_0 is the Förster distance.

Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET)

Μοριακοί παράγοντες

Μοριακή δομή

- ενδο-μοριακές αλληλεπιδράσεις

Theodor Förster

Μεταφορά ενέργειας διέγερσης μέσω συντονισμού από αλληλεπιδράσεις διπόλου-διπόλου.

<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/cphc.201000733>

$$k_{ET} = \frac{2\pi}{\hbar} |\langle \Psi_{D^*A} | \hat{H}_{ET} | \Psi_{DA^*} \rangle|^2 \rho_E = \beta_{ET}^{Coulomb} \langle \psi_{D^*A} | \psi_{DA^*} \rangle^2 \sim \left(\frac{\vec{\mu}_D \vec{\mu}_A}{R_{DA}^3} \right)^2 J(\lambda)$$

$$k_{ET}(R) = \frac{1}{\tau_F^D} \left(\frac{R_0}{R} \right)^6$$

$$k_T(r) = \frac{Q_D \kappa^2}{\tau_D r^6} \left(\frac{9000 (\ln 10)}{128 \pi^5 N n^4} \right) \int_0^\infty F_D(\lambda) \epsilon_A(\lambda) \lambda^4 d\lambda \quad [1]$$

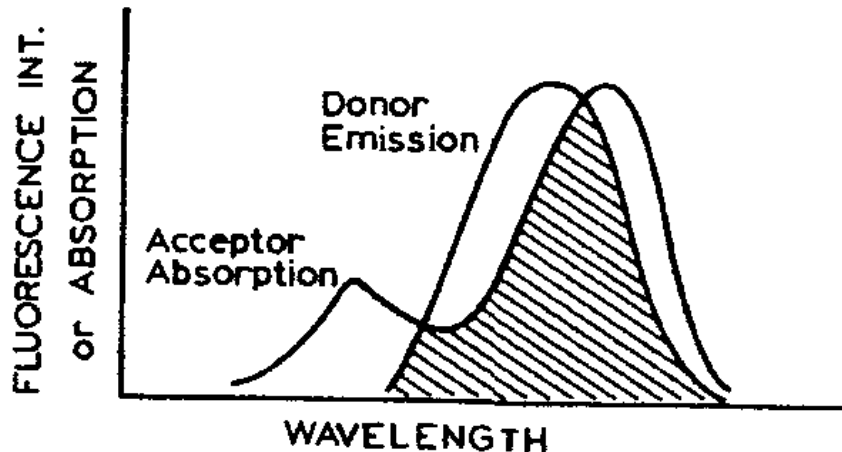
κ: παράγοντας προσανατολισμού,

$$\kappa_{\perp} = 0, \kappa_{\parallel} = 4, \langle \kappa \rangle = 2/3$$

$$J(\lambda) = \frac{\int_0^\infty F_D(\lambda) \epsilon_A(\lambda) \lambda^4 d\lambda}{\int_0^\infty F_D(\lambda) d\lambda}$$

Ολοκλήρωμα επικάλυψης
(Overlap integral)

$$R_0^6 = \frac{9000 (\ln 10) \kappa^2 Q_D}{128 \pi^5 N n^4} \int_0^\infty F_D(\lambda) \epsilon_A(\lambda) \lambda^4 d\lambda$$



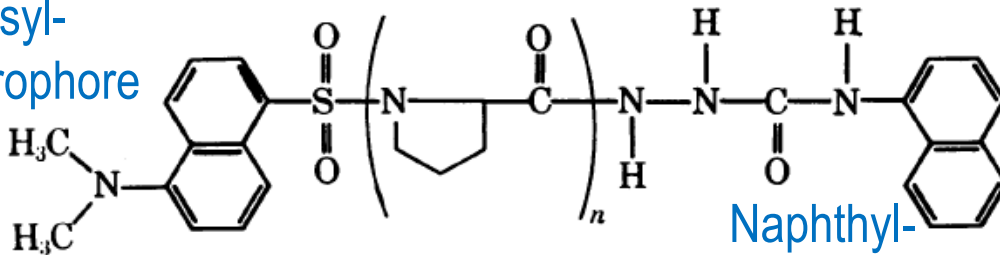
Παράγοντες που προσδιορίζουν το φθορισμό

Μοριακοί παράγοντες

Μοριακή δομή

- ενδο-μοριακές αλληλεπιδράσεις (by design !)

Dansyl-
fluorophore



R = 12-46 Angström

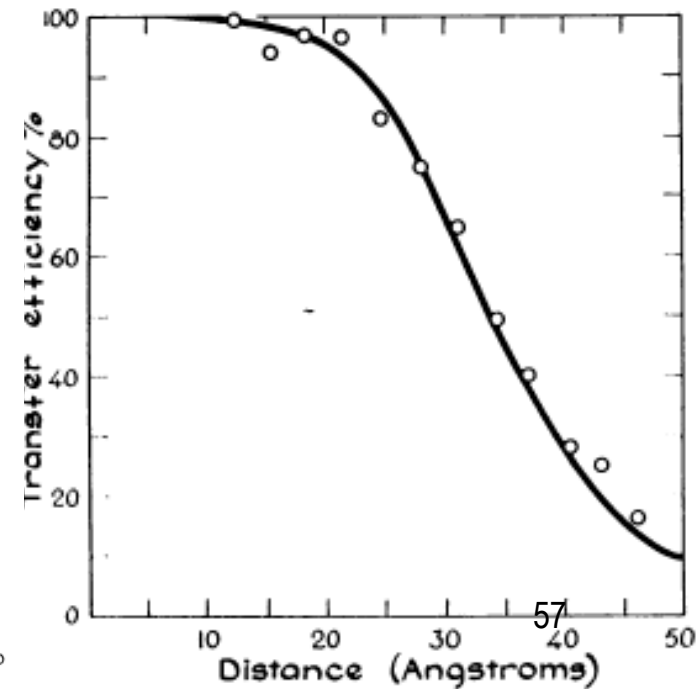
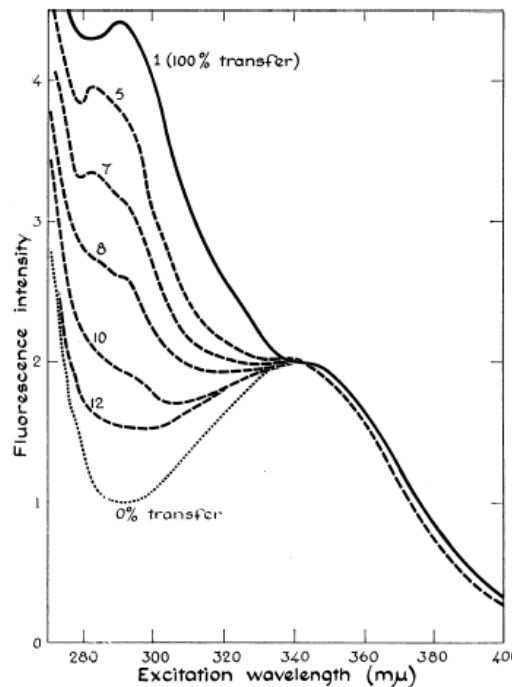
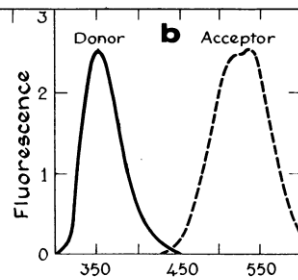
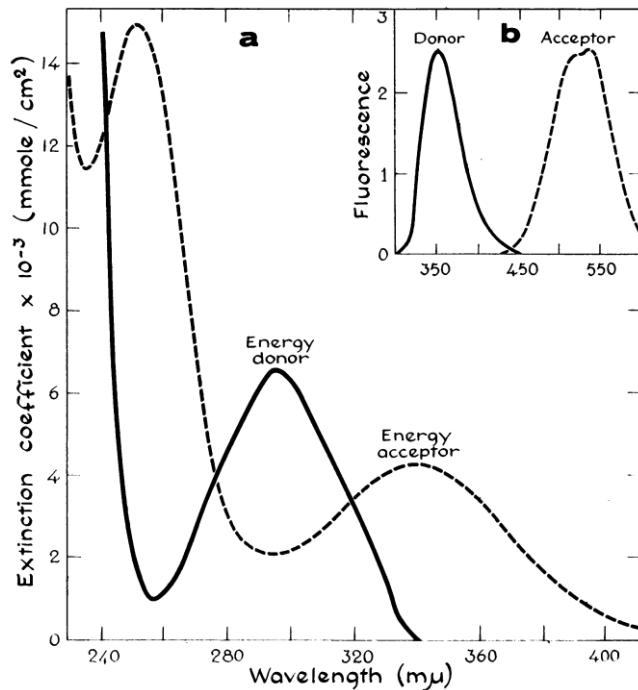
n = 1 to 12

FRET : "A molecular ruler"

Απόδοση μεταφοράς ενέργειας

$$E = \frac{k_{ET}(r)}{k_{ET}(r) + k_F^D + k_{ISC}^D + k_{IC}^D}$$

$$= 1 - \frac{\tau_{D-A}}{\tau_D} = \frac{R_0^6}{R_0^6 + R^6}$$



Παράγοντες που προσδιορίζουν το φθορισμό

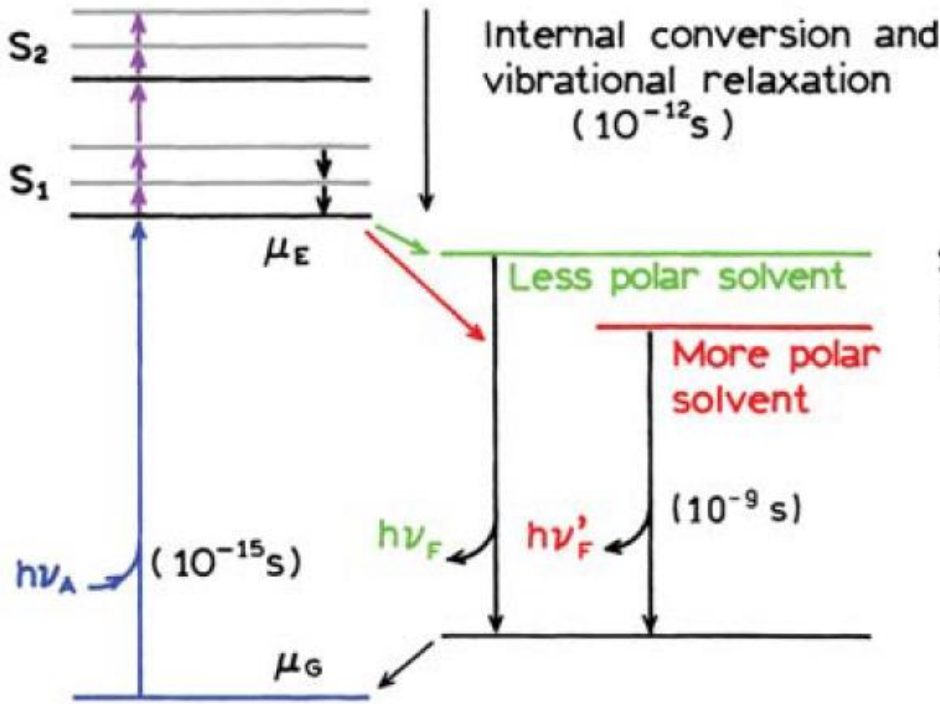
Περιβάλλον

Διαλύτης

πολικότητα, ιξώδες

Κατά την ηλεκτρονιακή διέγερση μεταβάλλεται η **διπολική ροπή** του μορίου, μ .

Ως αποτέλεσμα διαλύτες διαφορετικής πολικότητας σταθεροποιούν σε διαφορετικό βαθμό τις καταστάσεις S_0 και S_1 .



Έτσι, πειραματικά, παρατηρείται μετατόπιση του φάσματος εκπομπής ως προς το φάσμα απορρόφησης (Stokes shift: vibrational relaxation + solvent).

Η ερμηνεία της μετατόπισης ερμηνεύεται γενικά με τη θεώρηση ότι ο διαλύτης είναι ένα ομοιογενές διηλεκτρικό μέσο με **διηλεκτρική σταθερά, ϵ** , και με βάση αυτό προκύπτει η **σχέση Lippert** που ποσοτικοποιεί τη μετατόπιση του μεγίστου εκπομπής σε σχέση με το μέγιστο απορρόφησης.

Solvent relaxation (10^{-10} s)

Υπάρχουν και ειδικές περιπτώσεις αλληλεπίδρασης χρωμοφόρου-διαλύτη λόγω σχηματισμού δεσμών H ή εξαιτίας μεταβάσεων μεταφοράς φορτίου.

Figure 6.1. Jablonski diagram for fluorescence with solvent relaxation.

$$\nu_A - \nu_F = \frac{2}{hc} \left(\frac{\epsilon - 1}{2\epsilon + 1} - \frac{n^2 - 1}{2n^2 + 1} \right) \frac{(\mu_E - \mu_G)^2}{a^3} + c$$

Μελέτες συμπεριφοράς διαλυτών και επιδιαλύτωσης ιόντων και μορίων (solvation).

Μετρήσεις πολικότητας σε μεμβράνες και βιολογικά υποστρώματα.

Παράγοντες που προσδιορίζουν το φθορισμό

J. R. Lacowicz, *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, Springer 2006, Κεφ. 6. (6.1 – 6.4)

Περιβάλλον

Διαλύτης

πολικότητα, ιξώδες

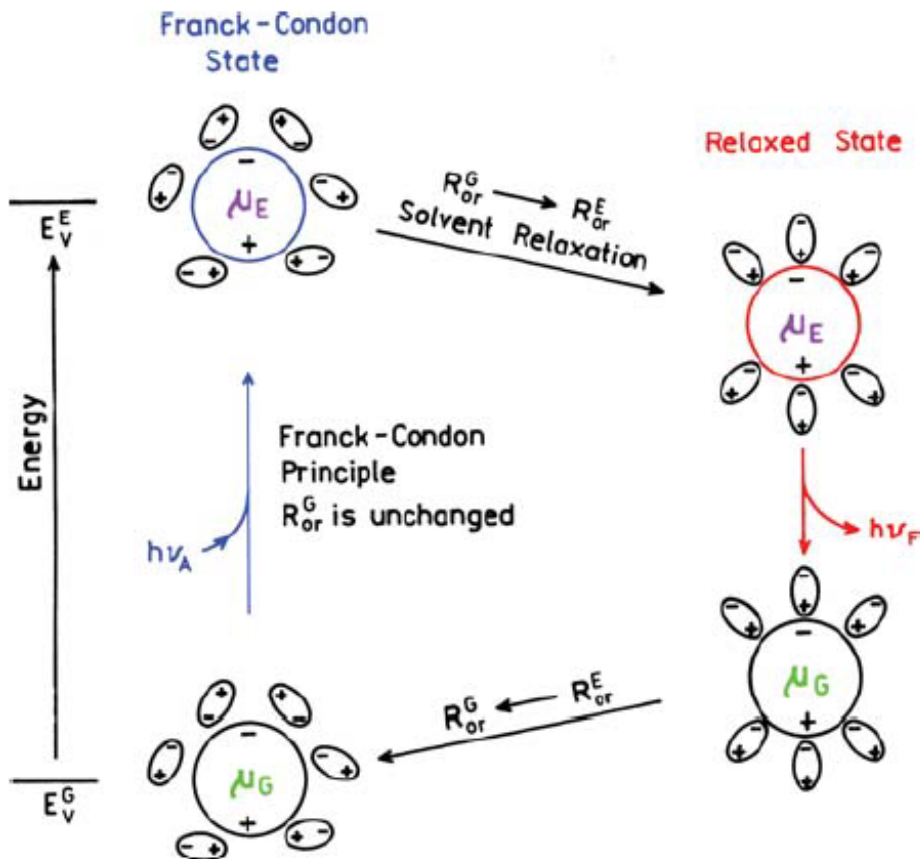


Figure 6.7. Effects of the electronic and orientation reaction fields on the energy of a dipole in a dielectric medium, $\mu_E > \mu_G$. The smaller circles represent the solvent molecules and their dipole moments.

$$\nu_A - \nu_F = \frac{2}{hc} \left(\frac{\epsilon - 1}{2\epsilon + 1} - \frac{n^2 - 1}{2n^2 + 1} \right) \frac{(\mu_E - \mu_G)^2}{a^3} + c$$

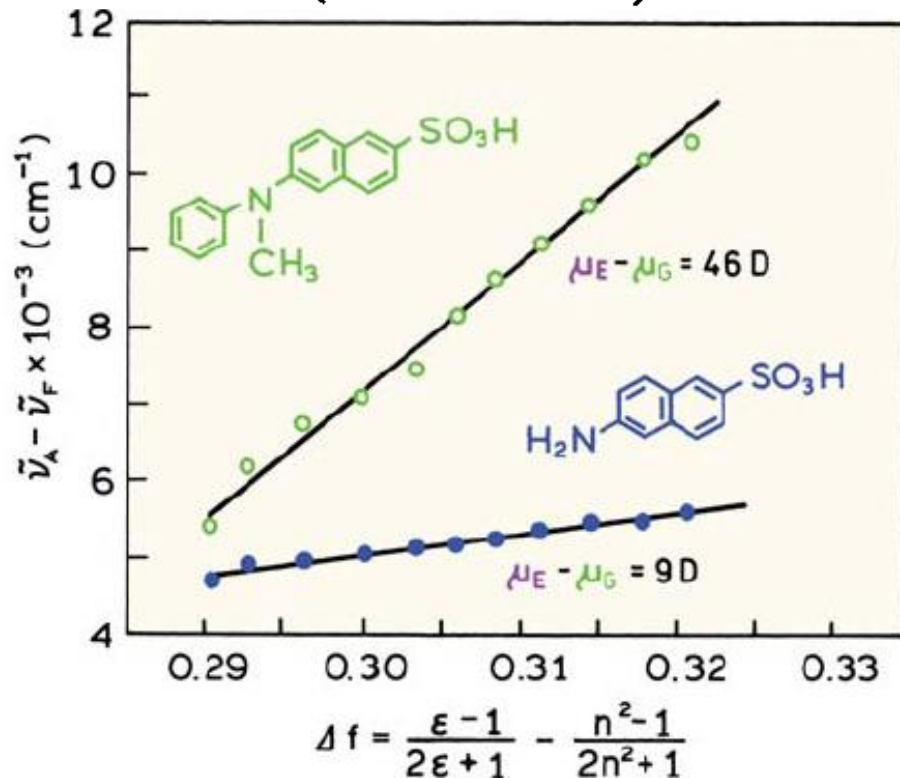


Figure 6.9. Lippert plots for two naphthylamine derivatives in ethanol-water mixtures. Data are shown for N-phenyl-N-methyl-6-aminonaphthalene-2-sulfonate (○) and 6-aminonaphthalene-2-sulfonate (●). Revised and reprinted with permission from [10]. Copyright © 1971, American Chemical Society.

Παράγοντες που προσδιορίζουν το φθορισμό

Περιβάλλον

Διαλύτης

πολικότητα, ιξώδες

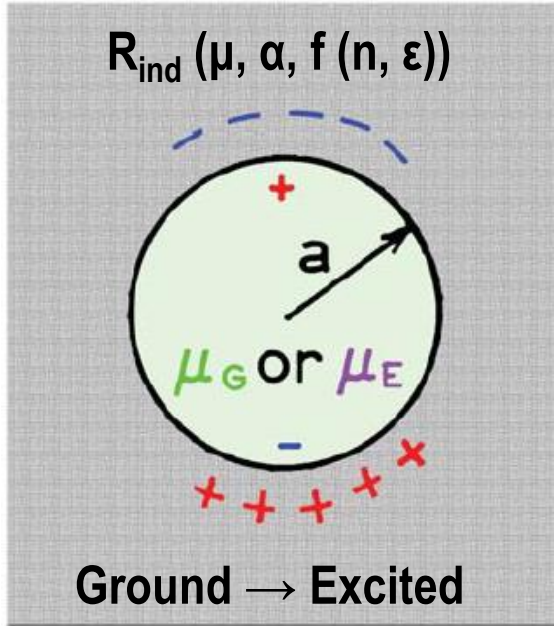


Figure 6.5. Dipole in a dielectric medium.

$$W_{dipole} = -\vec{\mu} \cdot \vec{R}_{ind} \quad \text{Ενέργεια αλληλεπίδρασης διπόλου-διαλύτη.}$$

$$|\vec{R}_{ind}| = \frac{2\mu}{\alpha^3} f \quad \text{Επαγόμενο ηλεκτρικό πεδίο λόγω πόλωσης του διαλύτη εξαιτίας του διπόλου.}$$

f : πολωσιμότητα

Σε πεδίο υψηλής συχνότητας: $f(n) = (n^2-1)/(2n^2+1)$ (ηλεκτρόνια)

Σε πεδίο χαμηλής συχνότητας: $f(\epsilon) = (\epsilon-1)/(2\epsilon+1)$ (ανα-προσανατολισμός)

ΑΠΟΡΡΟΦΗΣΗ

$$E^G = E_v^G - \mu_G R_e^G - \mu_G R_{or}^G \quad E^E = E_v^E - \mu_E R_e^E - \mu_E R_{or}^E$$

$$\tilde{\nu}_A = \left(\frac{1}{hc} \right) [(E_v^E - E_v^G) - (\mu_E - \mu_G) R_{or}^G - \mu_E R_e^E + \mu_G R_e^G]$$

ΕΚΠΟΜΠΗ

$$E^E = E_v^E - \mu_E R_e^E - \mu_E R_{or}^E \quad E^G = E_v^G - \mu_G R_e^G - \mu_G R_{or}^G$$

$$\tilde{\nu}_F = \left(\frac{1}{hc} \right) [(E_v^E - E_v^G) - (\mu_E - \mu_G) R_{or}^E - \mu_E R_e^E + \mu_G R_e^G]$$

$$\tilde{\nu}_A - \tilde{\nu}_F = \frac{2}{hc} \left(\frac{\epsilon-1}{2\epsilon+1} - \frac{n^2-1}{2n^2+1} \right) \frac{(\mu_E - \mu_G)^2}{\alpha^3} + \dots$$

Παράγοντες που προσδιορίζουν το φθορισμό

Περιβάλλον

Διαλύτης

πολικότητα, ιξώδες

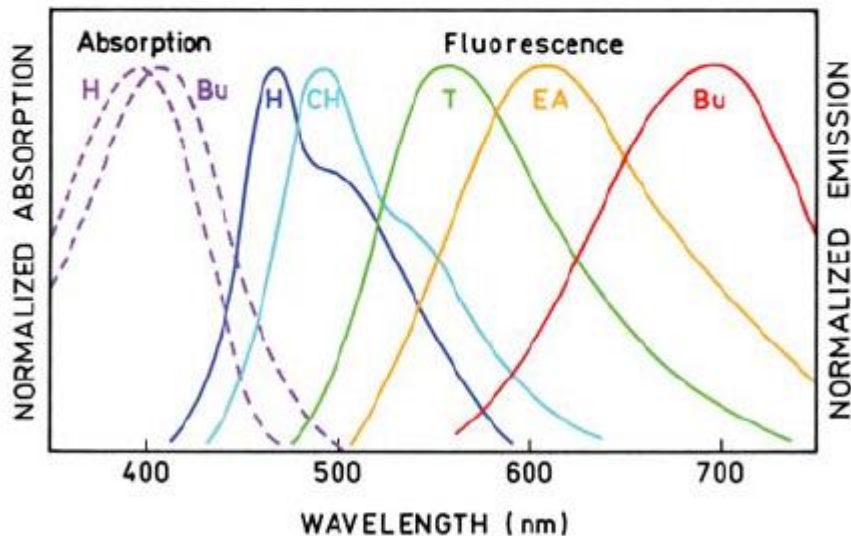
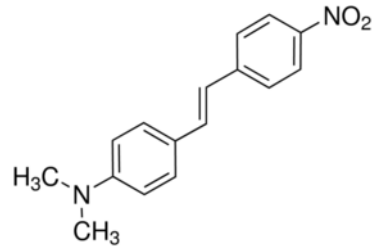


Figure 6.2. Photograph and emission spectra of DNS in solvents of increasing polarity. H, hexane; CH, cyclohexane; T, toluene; EA, ethyl acetate; Bu, n-butanol.

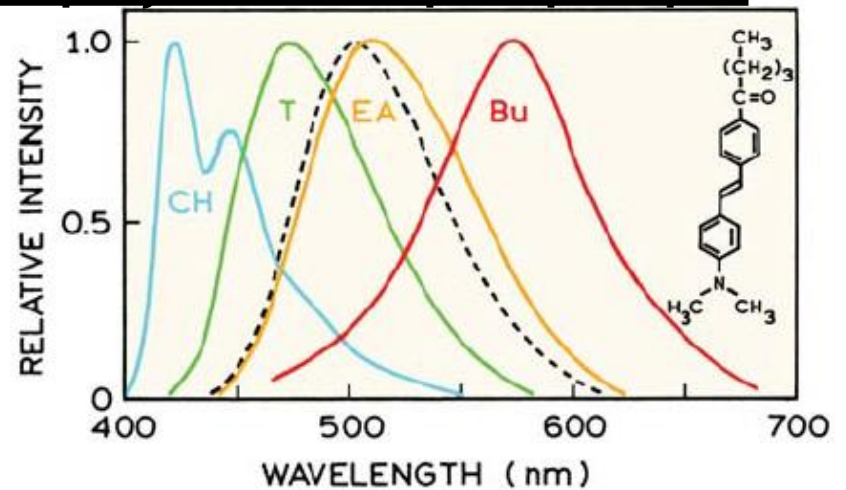


Figure 6.3. Corrected fluorescence emission spectra of DOS in cyclohexane (CH), toluene (T), ethyl acetate (EA), and butanol (Bu). The dashed line shows the emission of DOS from DPPC vesicles. Revised from [1].

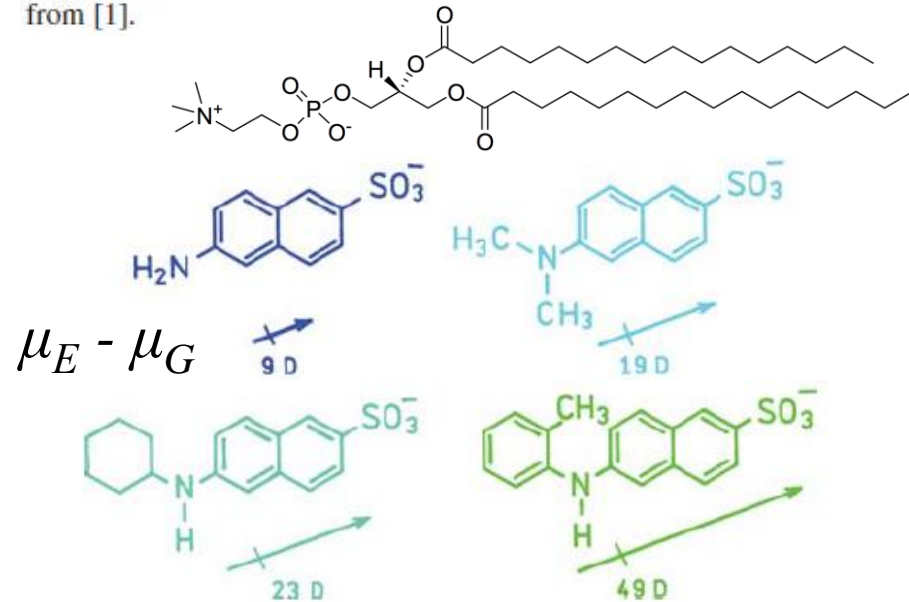


Figure 6.10. Chemical structure and change in dipole moment $\Delta\mu = \mu_E - \mu_G$ for naphthylamine derivatives.

Παράγοντες που προσδιορίζουν το φθορισμό

Περιβάλλον

Διαλύτης

πολικότητα, ιξώδες

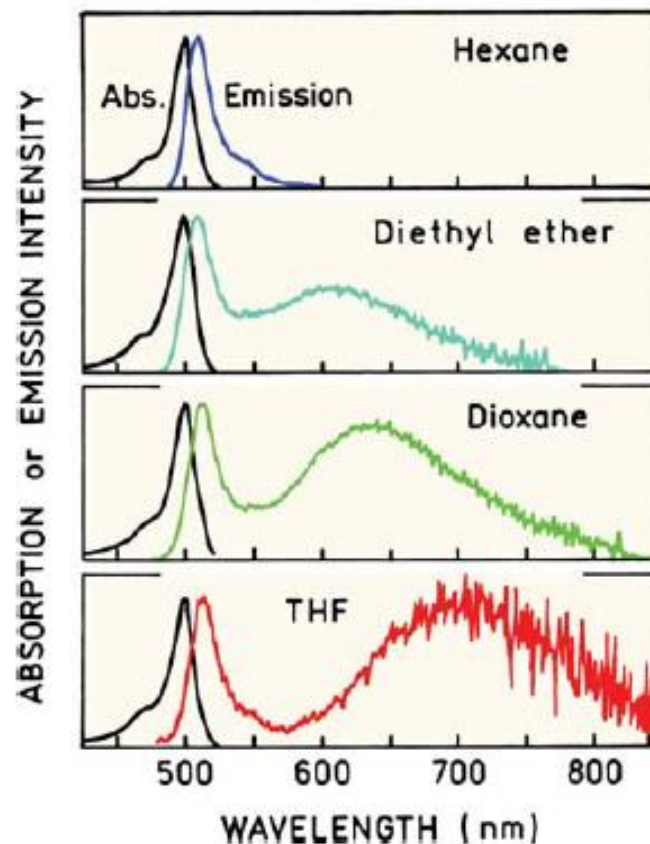
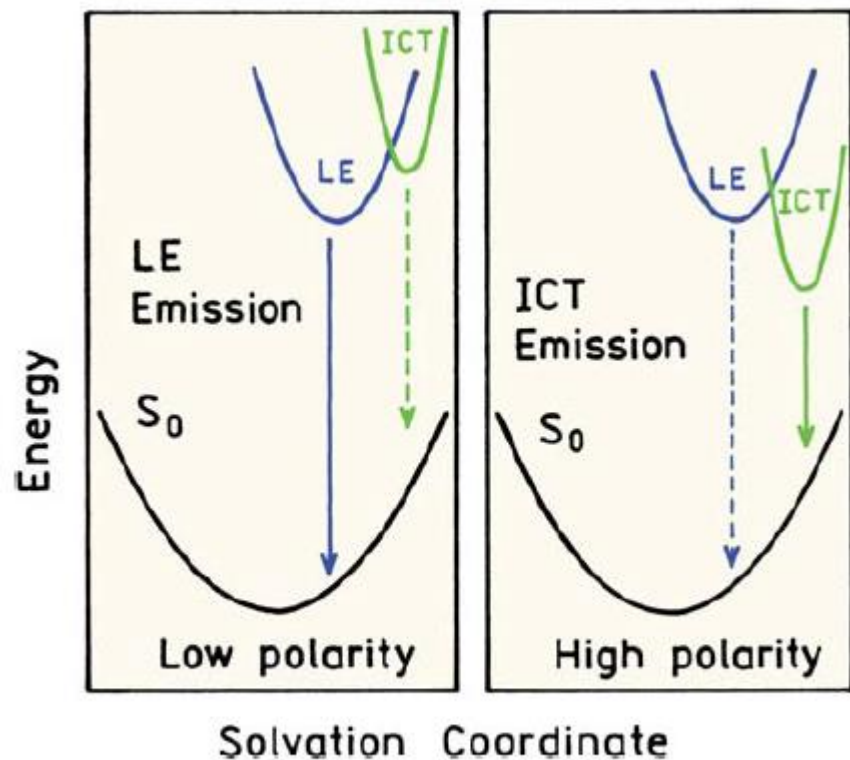
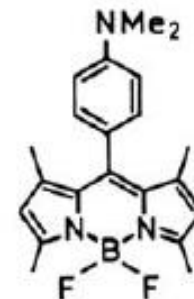


Figure 6.29. Emission spectra of a dimethylamino-substituted Bodipy probe. Tetrahydrofuron (THF). Revised and reprinted with permission from [67]. Copyright © 1998, American Chemical Society.

Figure 6.34. Effect of solvent polarity on the energies of LE and ICT states. Revised from [79].

Παράγοντες που προσδιορίζουν το φθορισμό

Περιβάλλον

Διαλύτης

πολικότητα, ιξώδες

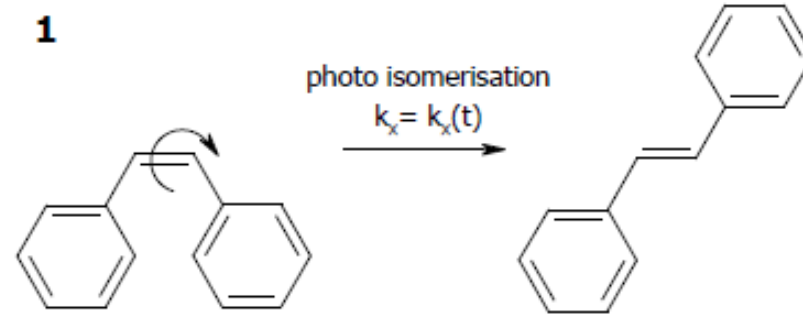
Θερμοκρασία



Trans - Stilbene



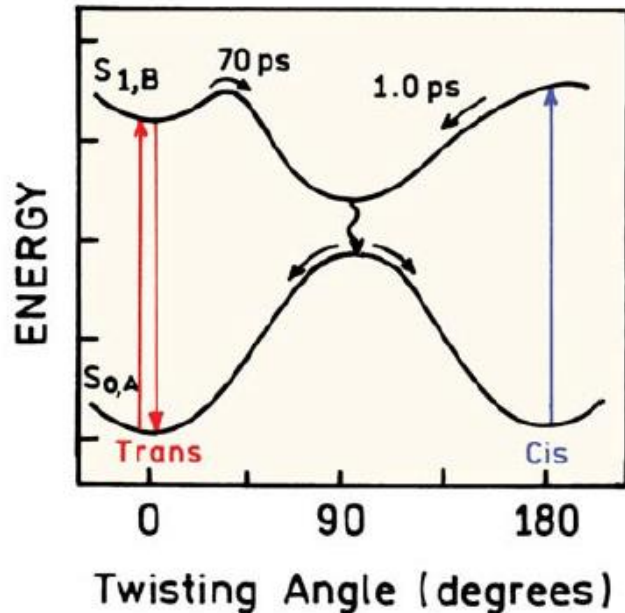
Cis - Stilbene



$$\phi(298 \text{ K, organic solvent}) = 0.05$$

$$\phi(298 \text{ K, glycerol}) = 0.15$$

$$\phi(77 \text{ K, organic solvent}) = 0.75$$



Στο cis-στιλβένιο ευνοείται η ισομερίωση προς τη μορφή trans μέσω της διεγερμένης κατάστασης.

Όμως, παρουσία διαλύτη υψηλού ιξώδους η περιστροφή γύρω από το δεσμό C-C και κατά συνέπεια η ισομερίωση επιβραδύνεται με αποτέλεσμα αύξηση της εκπομπής φθορισμού.

Ακόμη μεγαλύτερη επιβράδυνση παρατηρείται σε χαμηλή θερμοκρασία, οπότε ο διαλύτης ευρίσκεται σε στερεή μορφή

Παράγοντες που προσδιορίζουν το φθορισμό

Περιβάλλον

Διαλύτης

πολικότητα, *ιξώδες*

Θερμοκρασία

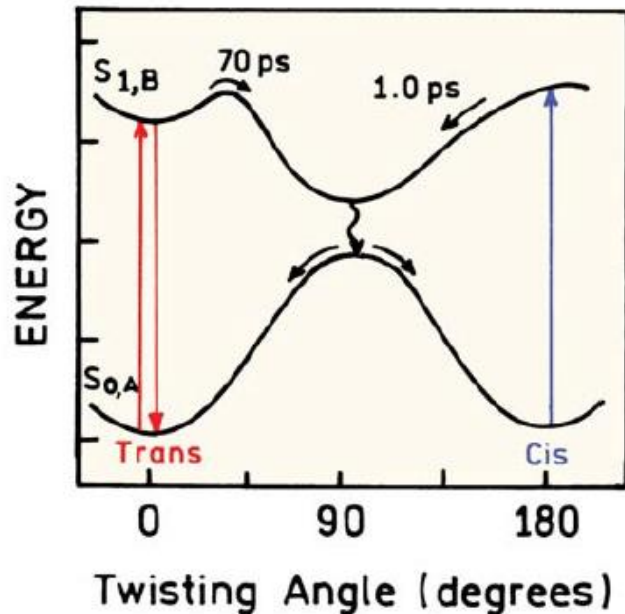


Figure 6.36. Excited-state isomerization of stilbene. From [81].

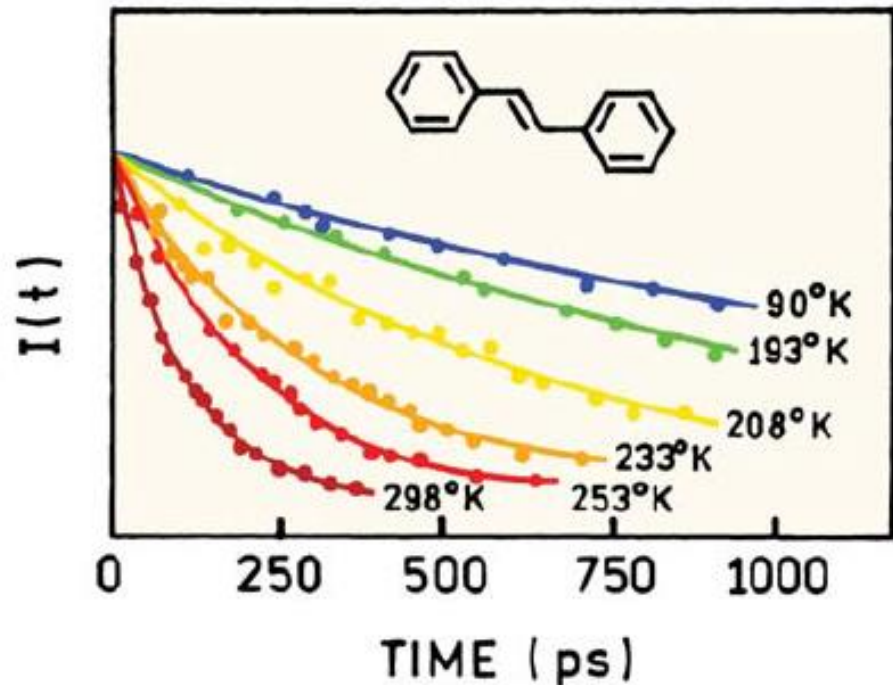


Figure 6.35. Intensity decays of trans-stilbene in methylcyclohexane: isohehexane (3:2). Revised from [80].

Παράγοντες που προσδιορίζουν το φθορισμό

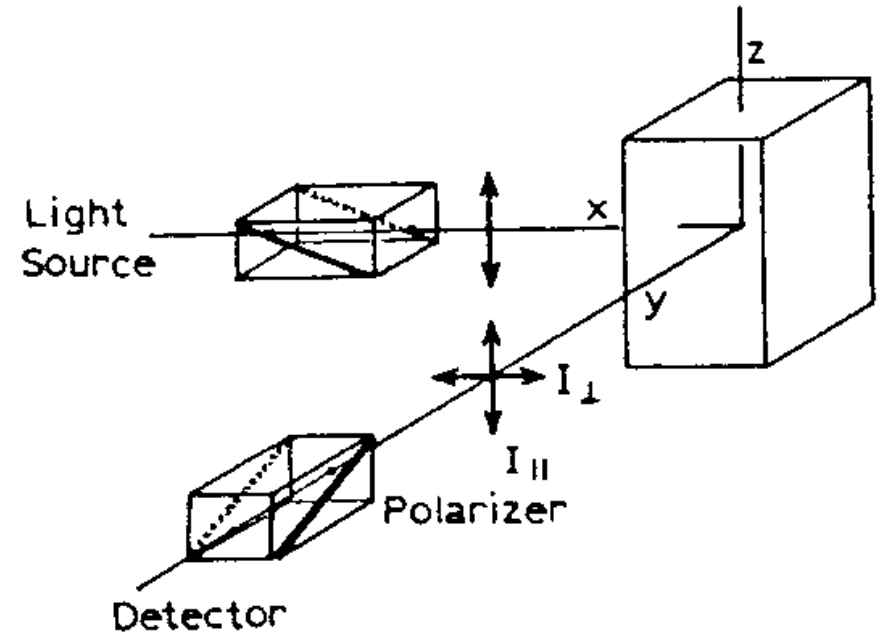
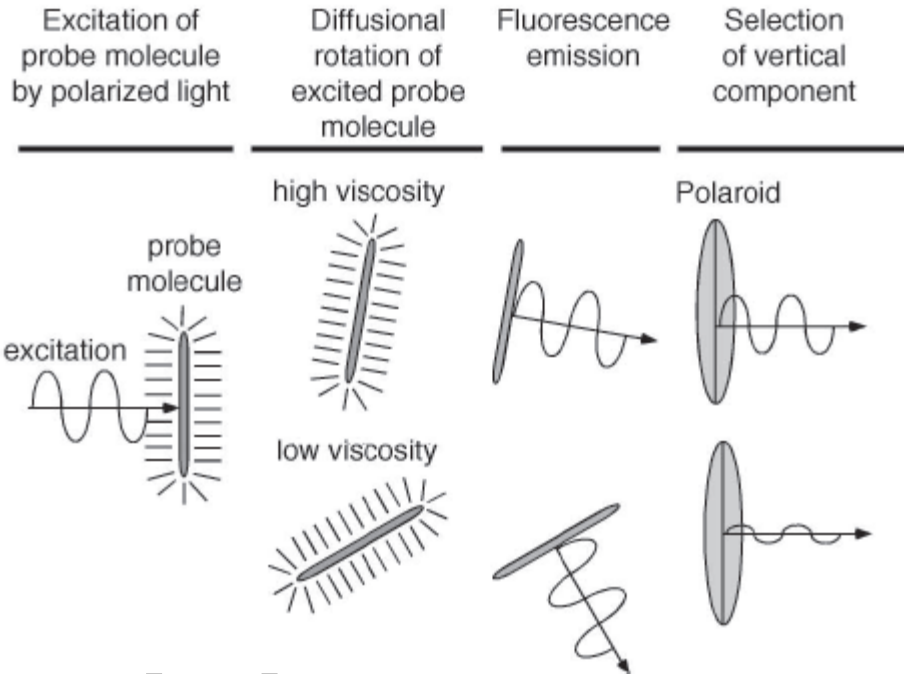
Περιβάλλον

Διαλύτης

πολικότητα, *ιξώδες*

Anisotropy of Fluorescence Polarization
a method to

“measure molecular rotation or solvent viscosity”



$$P = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + I_{\perp}}$$

Πόλωση φθορισμού

$$r = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + 2I_{\perp}}$$

Ανισοτροπία φθορισμού

Παράγοντες που προσδιορίζουν το φθορισμό

Περιβάλλον

Διαλύτης

πολικότητα, *ixwdes*

Rotational anisotropy

$$\frac{r_0}{r} = 1 + \frac{\tau_F}{\tau_{rot}} = 1 + 6D_{rot}\tau_F$$

Perrin eq.

$$\frac{1}{r} = \frac{1}{r_0} + \frac{\tau_F}{r_0\tau_{rot}}$$

$$\tau_{rot} = \frac{\eta V}{RT} = \frac{\eta M}{RT} (\bar{v} + h)$$

$$r_0 = \frac{2}{5} \left(\frac{3 \cos^2 \beta - 1}{2} \right)$$

Fundamental anisotropy

Anisotropy of Fluorescence Polarization a method to

“measure molecular rotation or solvent viscosity”

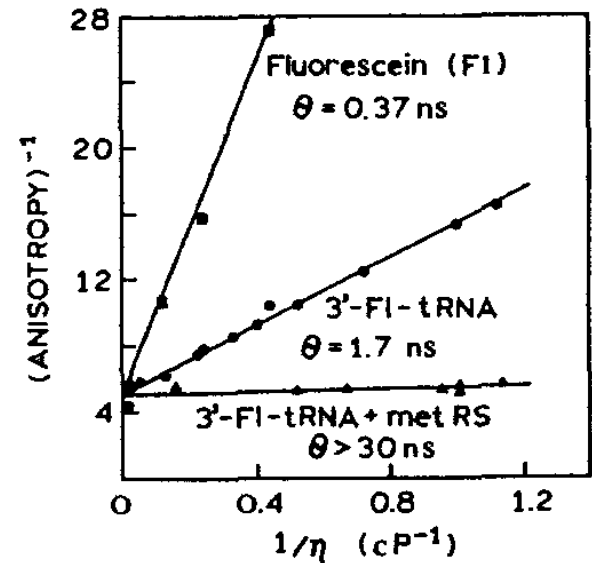


Figure 10.15. Perrin plots for fluorescein (FI, ■) and tRNA^{Met} labeled at the 3'-end with fluorescein (3'-FI-tRNA, ●). Also shown is the plot for the labeled t-RNA when bound to methionyl-tRNA synthetase (met RS, ▲). The experiments were performed at 20 °C. The viscosity η was varied by adding sucrose. Excitation was at 480 nm, and emission was measured at 520 nm. Revised and reprinted, with permission, from Ref. 34, Copyright © 1986, American Chemical Society.

Παράγοντες που προσδιορίζουν το φθορισμό

Περιβάλλον

Διαλύτης

πολικότητα, *ιξώδες*

Rotational anisotropy

Anisotropy of Fluorescence Polarization

a method to

“measure molecular rotation or solvent viscosity”

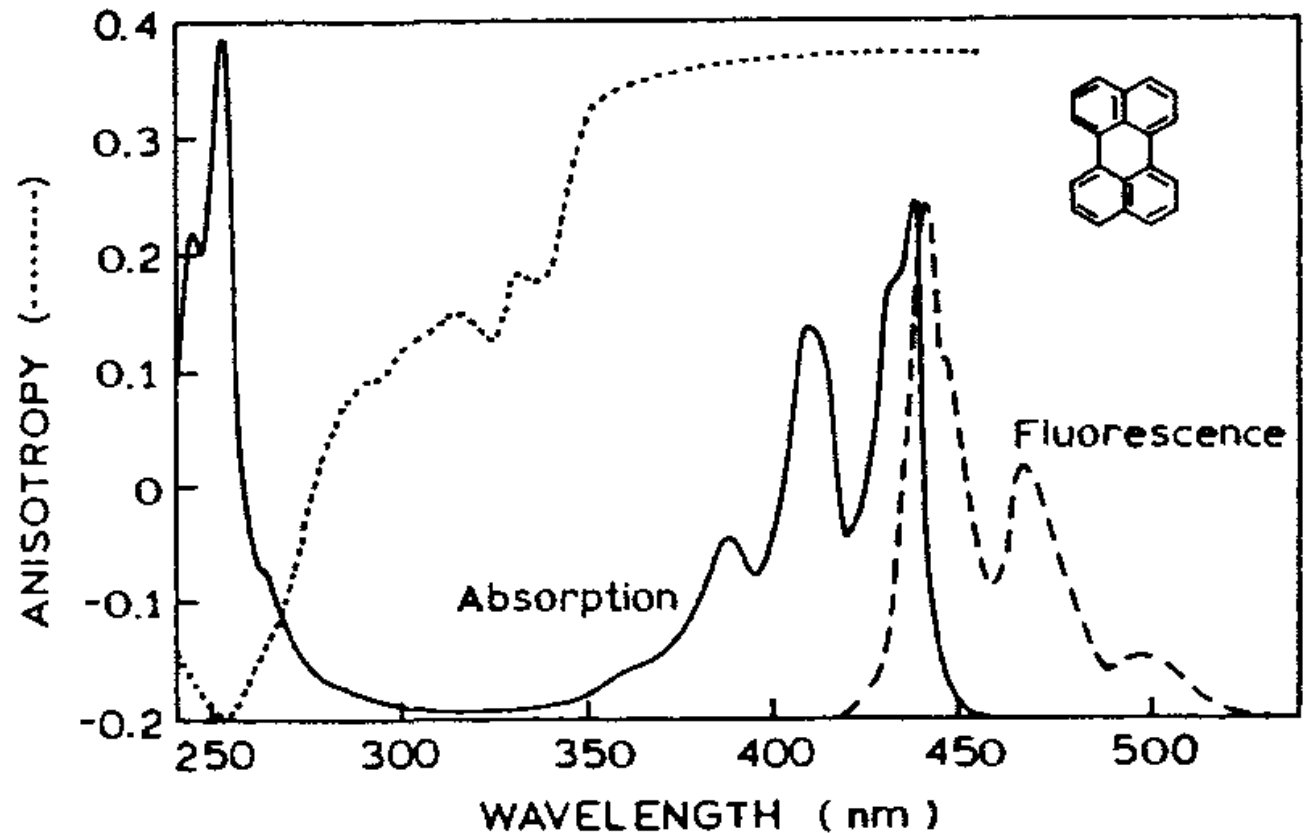


Figure 10.29. Absorption and excitation anisotropy spectra of perylene in propylene glycol.

Παράγοντες που προσδιορίζουν το φθορισμό

Περιβάλλον

Διαλύτης

πολικότητα, *ιξώδες*

Rotational anisotropy

Anisotropy of Fluorescence Polarization
a method to

“measure molecular rotation or solvent viscosity”

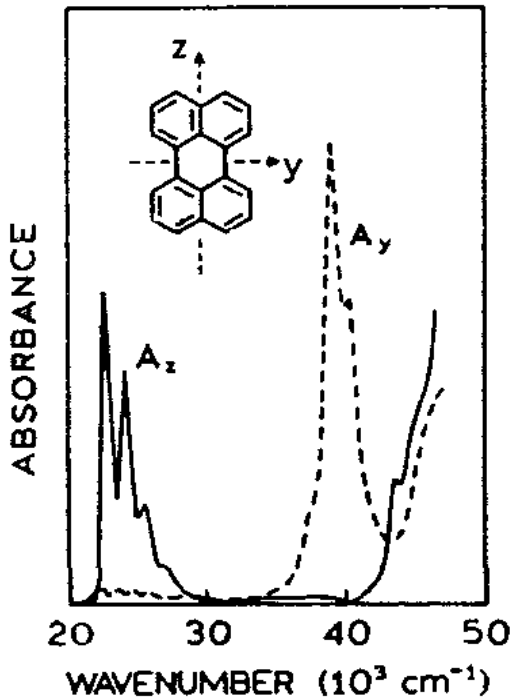


Figure 10.30. Polarized absorption spectra of perylene along the long (z) and short (y) axis. Revised from Ref. 8.

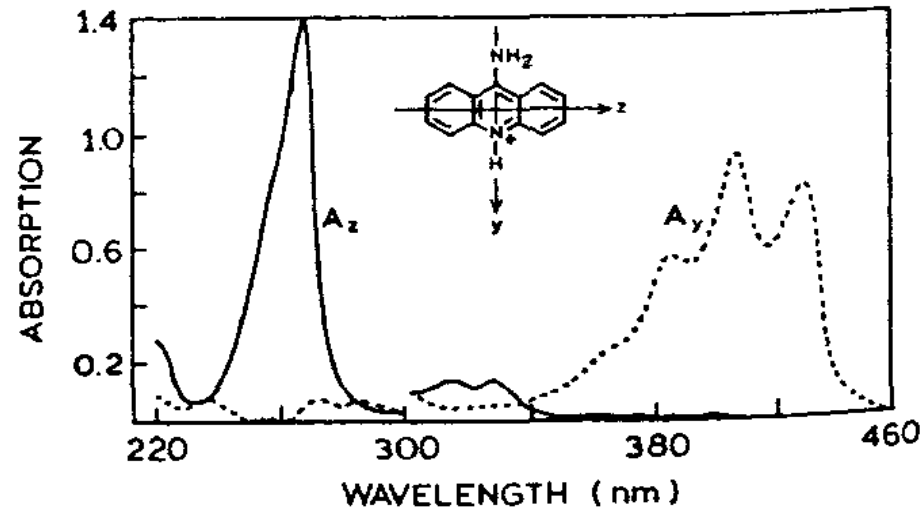


Figure 10.31. Polarized absorption spectra of 9-aminoacridinium in a stretched PVA film. Revised from Ref. 70.

Παράγοντες που προσδιορίζουν το φθορισμό

Περιβάλλον

Διαλύτης

πολικότητα, *ιξώδες*

Rotational anisotropy

Anisotropy of Fluorescence Polarization

a method to

“measure molecular rotation or solvent viscosity”

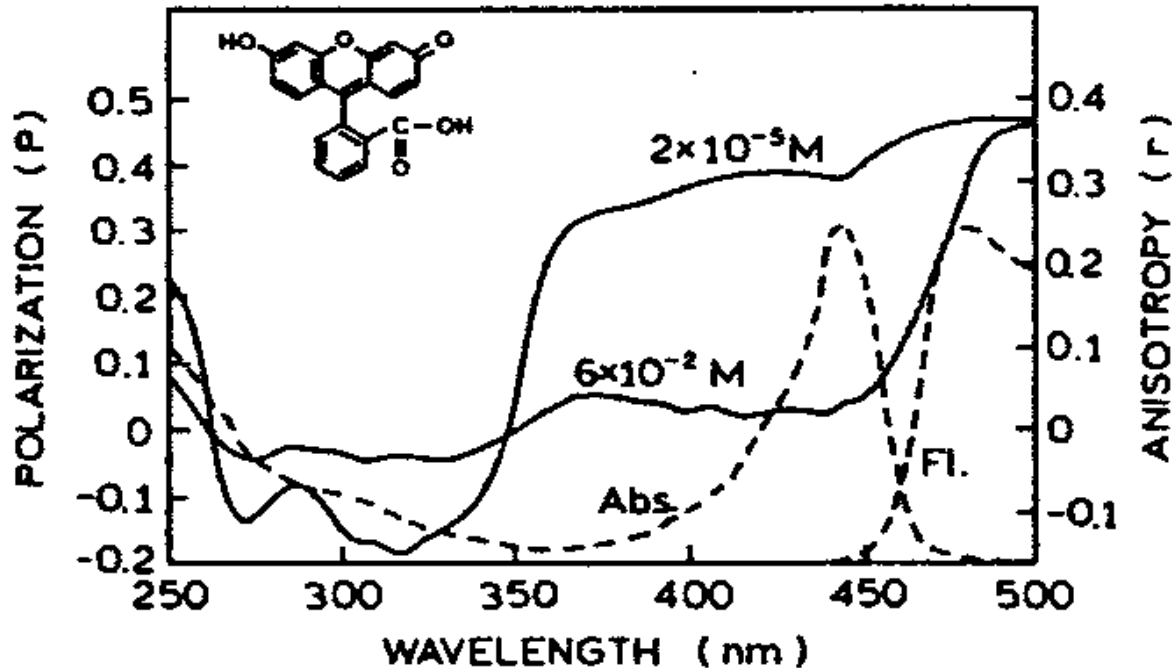


Figure 10.12. Excitation polarization spectra of fluorescein in propylene glycol at $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$. Radiative transfer was avoided by using thin samples, 30–50 μm thick. Revised and reprinted, with permission, from Ref. 18.

Εκπομπή από ανόργανες ενώσεις

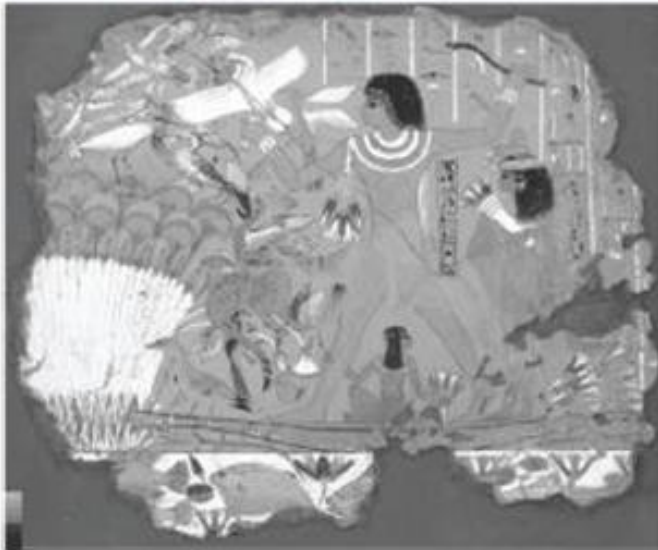
Σύμπλοκες ενώσεις

Ημιαγωγοί, Κβαντικές τελείες (Quantum dots)

Εκπομπή από ανόργανες ενώσεις- μεταλλικά ιόντα

Ion	Excited State	Ground State	λ_{\max} Emission
Mn ²⁺ (3d ⁵)	t ₂ ⁴ e ¹ (⁴ T ₁)	t ₂ ⁴ e ² (⁶ A ₁)	Green-Orange-Red
Sb ³⁺ (5s ²)	5s ¹ 5p ¹	5s ²	Blue
Ce ³⁺ (4f ¹)	4f ⁰ 5d ¹	4f ¹ 5d ⁰	Near UV to Red
Eu ²⁺ (4f ⁷)	4f ⁶ 5d ¹	4f ⁷ 5d ⁰	Near UV to Red
Tm ³⁺ (4f ¹²)	¹ G ₄	³ H ₆	450nm (Blue)
Er ³⁺ (4f ¹¹)	⁴ S _{3/2}	⁴ I _{15/2}	545nm (Green)
Tb ³⁺ (4f ⁸)	⁵ D ₄	⁷ F ₅	545nm (Green)
Pr ³⁺ (4f ²)	³ P ₀	³ H ₅ (³ F ₂)	605(635)nm (Red)
Eu ³⁺ (4f ⁶)	⁵ D ₀	⁷ F ₂	611nm (Red)

Εκπομπή από ανόργανες ενώσεις- μεταλλικά ιόντα



Egyptian blue : $\text{CaCuSi}_4\text{O}_{10}$

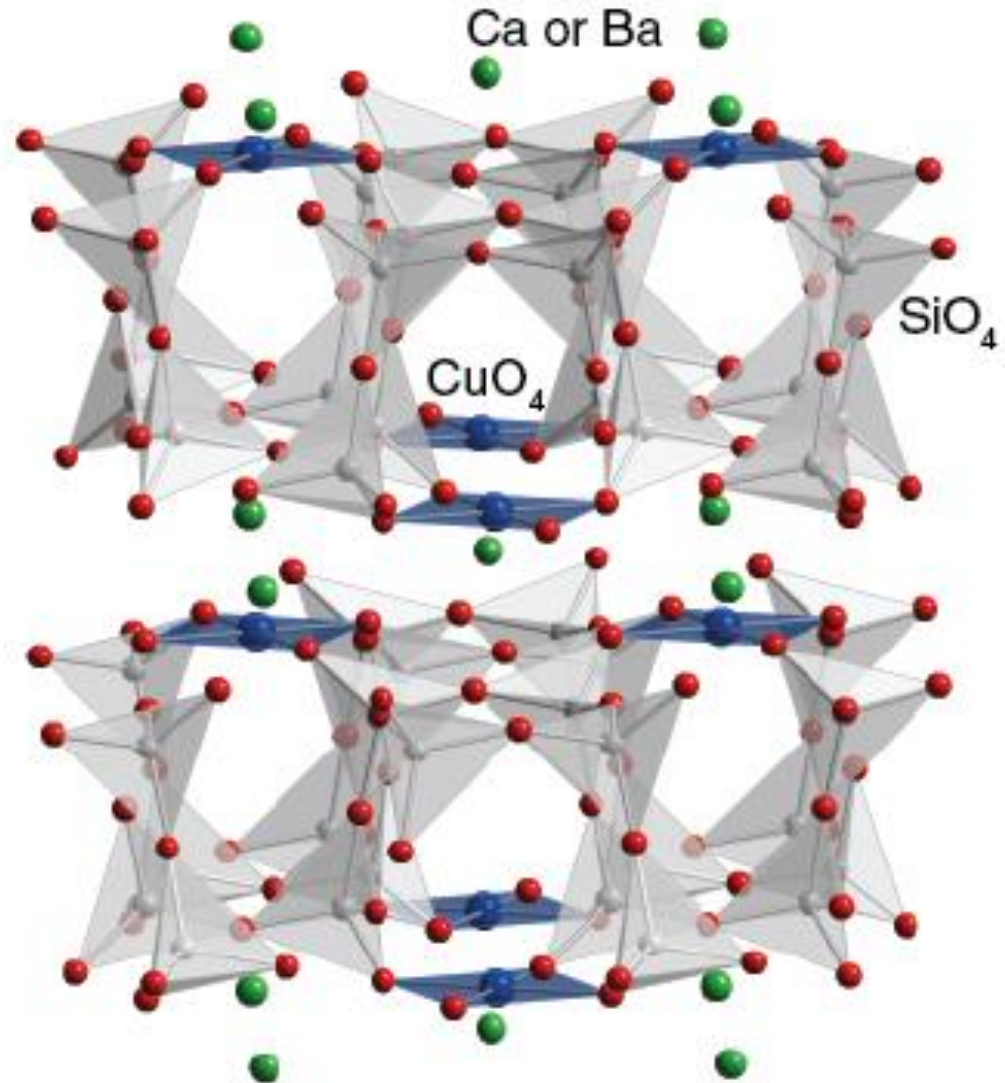


Fig. 1 *Fowling in the marshes* (EA 37977), Nebamun wall painting fragment, British Museum, London, UK: visible (top) and infrared photoluminescence (bottom) images. Bright white areas, which correspond to the presence of Egyptian blue, are caused by luminescence from the pigment. ©The Trustees of the British Museum.

Εκπομπή από ανόργανες ενώσεις- μεταλλικά ιόντα

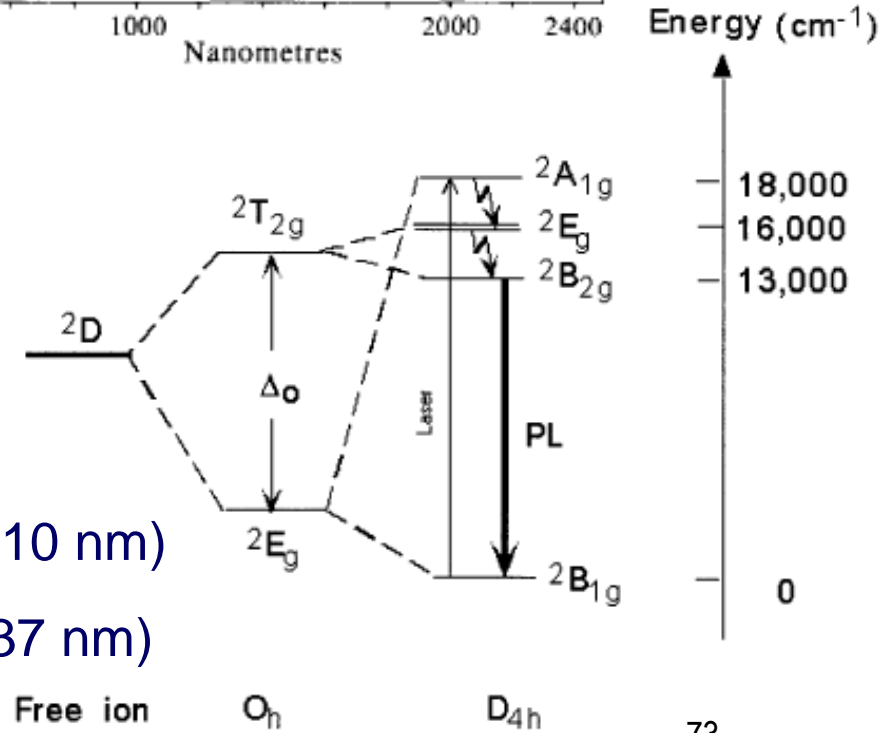
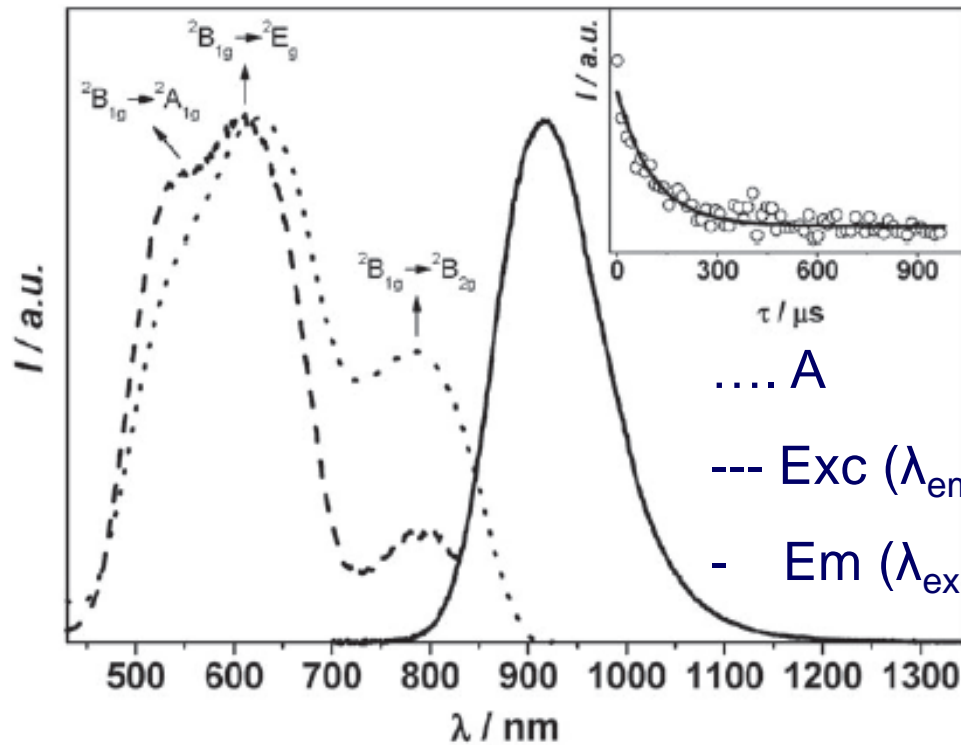
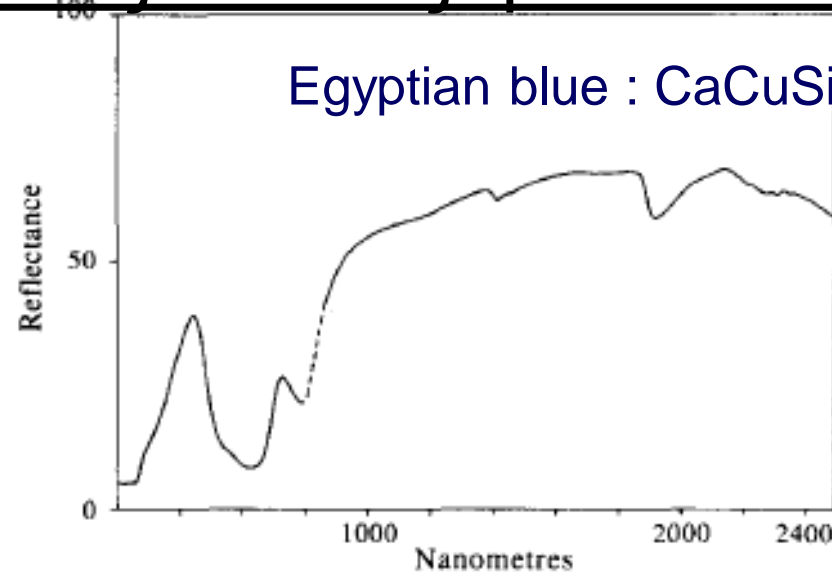
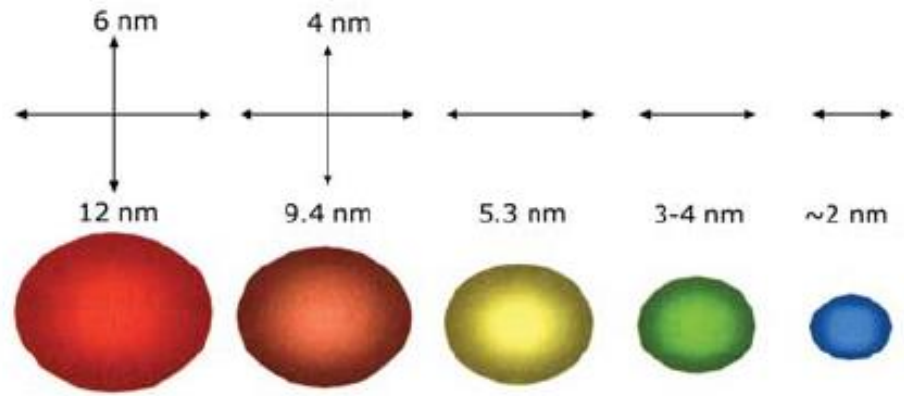


Figure 2. Energy-level scheme for Cu^{2+} .

Εκπομπή από ανόργανες ενώσεις – Κβαντικές τελείες

Ο περιορισμός του μεγέθους σωματιδίων ημιαγωγών σε διαστάσεις της τάξης λίγων νανομέτρων οδηγεί στην εμφάνιση φαινομένων κβαντικού περιορισμού (quantum confinement), που σε βασικό επίπεδο ερμηνεύονται με το πρότυπο του σωματιδίου σε φρέαρ δυναμικού (particle in a box).

$$E_n = \frac{n^2 h^2}{8m} \left(\frac{1}{L_x^2} + \frac{1}{L_y^2} + \frac{1}{L_z^2} \right)$$



Η ενεργειακή διαφορά βασικής και διεγερμένης κατάστασης (ενέργεια ζεύγους e-οπής) είναι συνάρτηση όχι μόνο του ενεργειακού χάσματος του ημιαγωγού αλλά και του μεγέθους του νανοσωματιδίου.

Έτσι ενώ η στοιχειομετρία του ημιαγωγού παραμένει η ίδια η εκπομπή (επανασύνδεση e-οπής) προσδιορίζεται από το μέγεθος του σωματιδίου.



Figure 20.1. Color photographs of cadmium selenide nanoparticles illuminated with a long-wave UV lamp. Revised from [2].

J. R. Lacowicz, *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, Springer 2006, Κεφ. 20. (20.1)

Εκπομπή από ανόργανες ενώσεις – Κβαντικές τελείες

Σε αρχιτεκτονικές πυρήνα-κελύφους (core-shell) τα νανοσωματίδια του ημιαγωγού (π.χ. CdSe) στον πυρήνα προστατεύονται από μια εξωτερική στιβάδα ημιαγωγού υψηλότερου ενεργειακού χάσματος (π.χ. ZnS ή CdS) η οποία περιορίζει ατέλειες στην επιφάνεια που μειώνουν δραστικά την κβαντική απόδοση φθορισμού.

Το σύστημα προστατεύεται περαιτέρω από λεπτό πολυμερικό υμένιο το οποίο είναι βιοσυμβατό και μπορεί να φέρει ενώσεις που διευκολύνουν τη σύνδεση του συστήματος με βιομόρια.

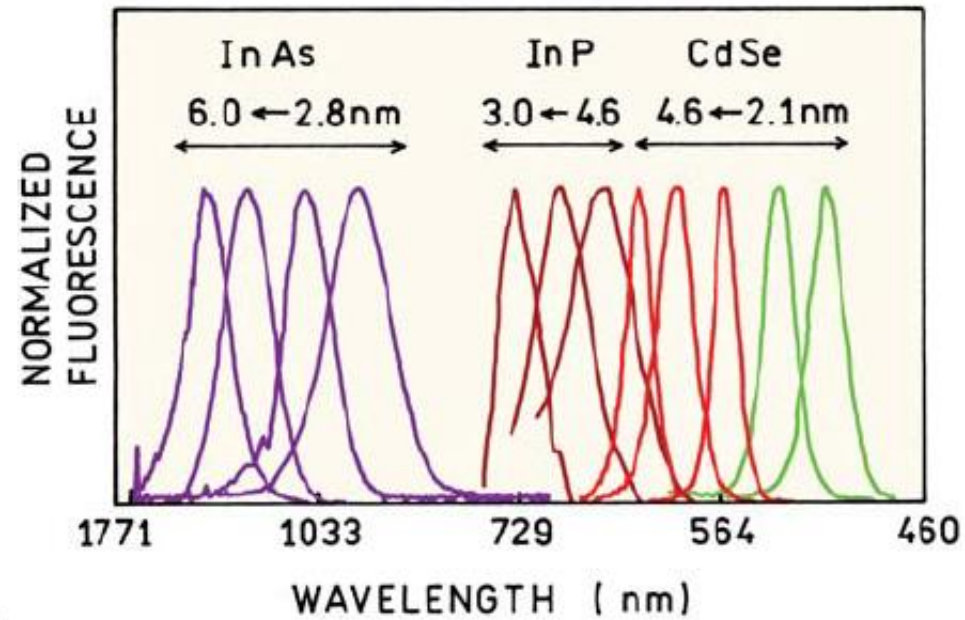
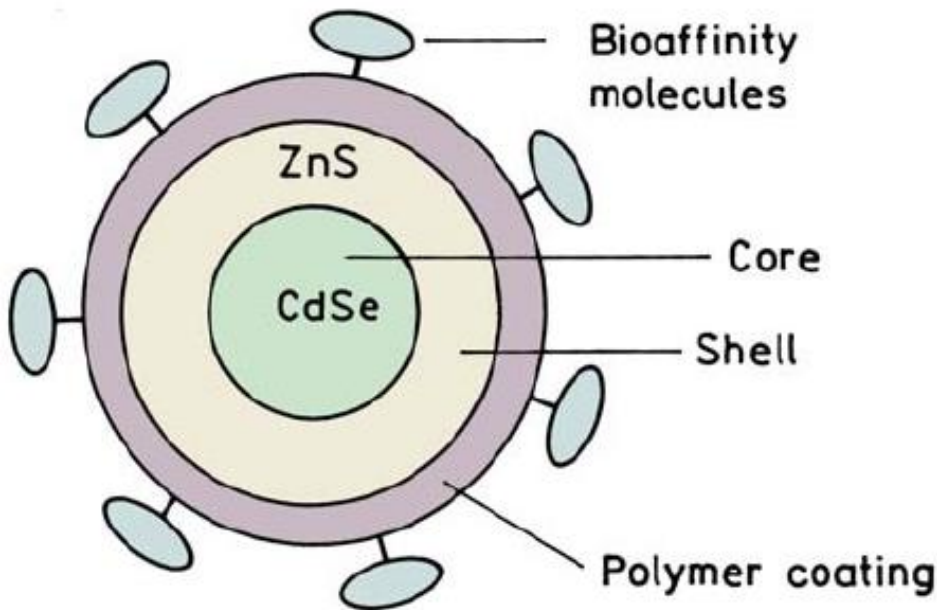


Figure 20.2. Emission spectra of semiconductor nanoparticles. The approximate diameters are labeled on the figure. These are core-shell particles. For CdSe the shell is ZnS or CdS. Revised from [1].

Figure 20.3. Schematic of a core-shell NPs with a biologically compatible surface.

Εκπομπή από ανόργανες ενώσεις – Κβαντικές τελείες

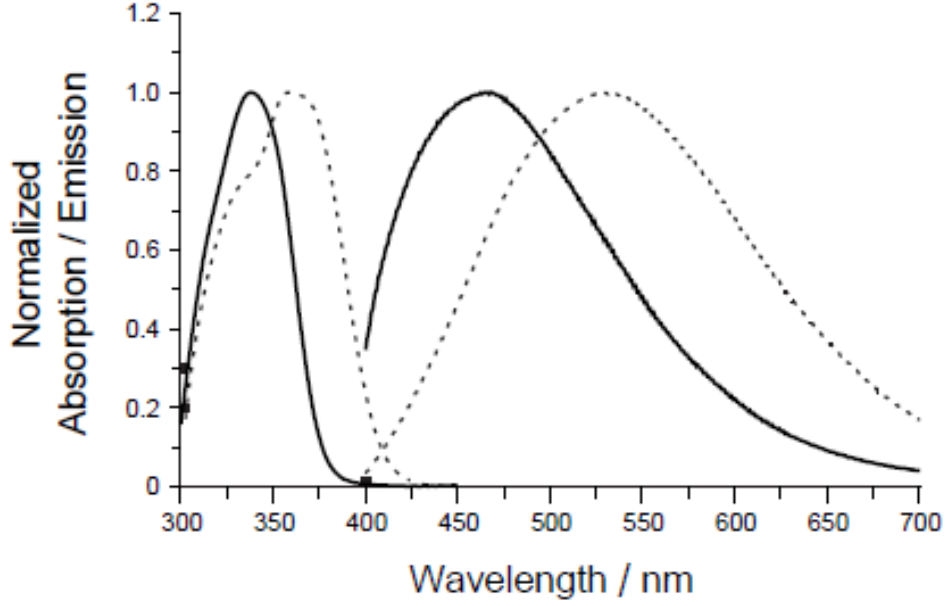
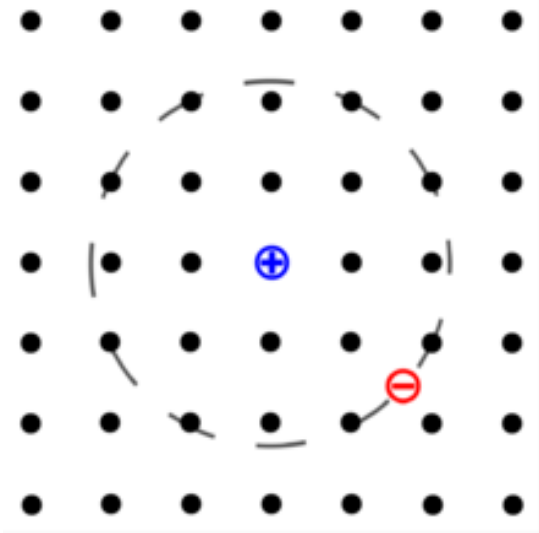
Ενέργεια μετάβασης : $\Delta E = hc/\lambda_{\max} = E_g + \Delta E_q$

Ενέργεια κβαντικού περιορισμού

$$\Delta E_q = E_e + E_h = \frac{h^2}{8R^2} \left(\frac{1}{m_e^*} + \frac{1}{m_h^*} \right)$$

m^* : ανηγμένη μάζα e και οπής στο εξιτόνιο (+,-)

$[m_e^* \approx 0.19m_e \quad m_h^* \approx 0.80m_h]$



Ακτίνα Bohr του εξιτονίου

$$\alpha_B = \frac{h^2 \epsilon}{\pi e^2} \left(\frac{1}{m_e^*} + \frac{1}{m_h^*} \right)$$

$\epsilon = \epsilon_{CdS} \epsilon_0$ ($\epsilon_{CdS} = 5.7$)

$\alpha_B \approx 2 \text{ nm}$

Figure 1. Normalized absorption and emission spectra for nanoparticulate CdS (—) and colloidal CdS(- -).

Πολύ-φωτονική Φασματοσκοπία (Multi-photon spectroscopy)

Οι υψηλές τιμές έντασης που προσφέρουν τα (παλμικά) λέιζερ έχουν ως αποτέλεσμα την πιθανότητα (ταυτόχρονης) απορρόφησης πέραν του ενός φωτονίων από ένα άτομο ή μόριο.

Έτσι όλες οι προαναφερθείσες τεχνικές δύνανται να πραγματοποιηθούν και με απορρόφηση πολλαπλών φωτονίων.

Συνέπειες της πολύ-φωτονικής διαδικασίας : Αλλαγή των κανόνων επιλογής

Οι συνολικοί κανόνες επιλογής είναι το γινόμενο των κανόνων επιλογής που διέπει το κάθε μονοφωτονικό στάδιο της συνολικής διαδικασίας

Π.χ. Για μια διφωτονική διαδικασία ο κανόνας επιλογής ως προς κέντρο συμμετρίας είναι :

$$g \rightarrow u \rightarrow g$$

Άρα για διφωτονικές διαδικασίες οι επιτρεπτές μεταπτώσεις είναι $g \rightarrow g$ και $u \rightarrow u$!!

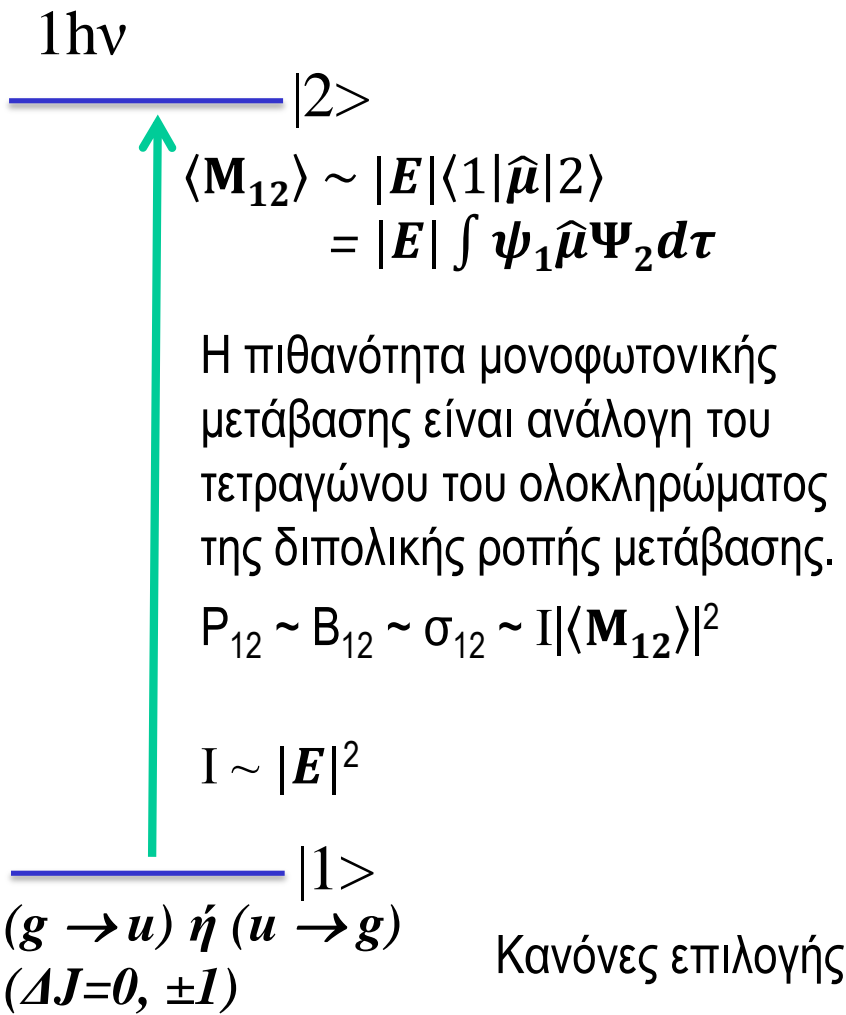
Παρατηρούμε λοιπόν ότι μεταβάσεις που απαγορεύονται με ένα φωτόνιο επιτρέπονται με δύο!

Ένα επιπλέον πλεονέκτημα της πολυφωτονικής διαδικασίας είναι ότι γίνονται εφικτές τιμές ενέργειας διέγερσης, ΔE , διπλάσιες ακόμη ή τριπλάσιες αυτής που αντιστοιχεί στην ενέργεια της μονοφωτονικής διαδικασίας.

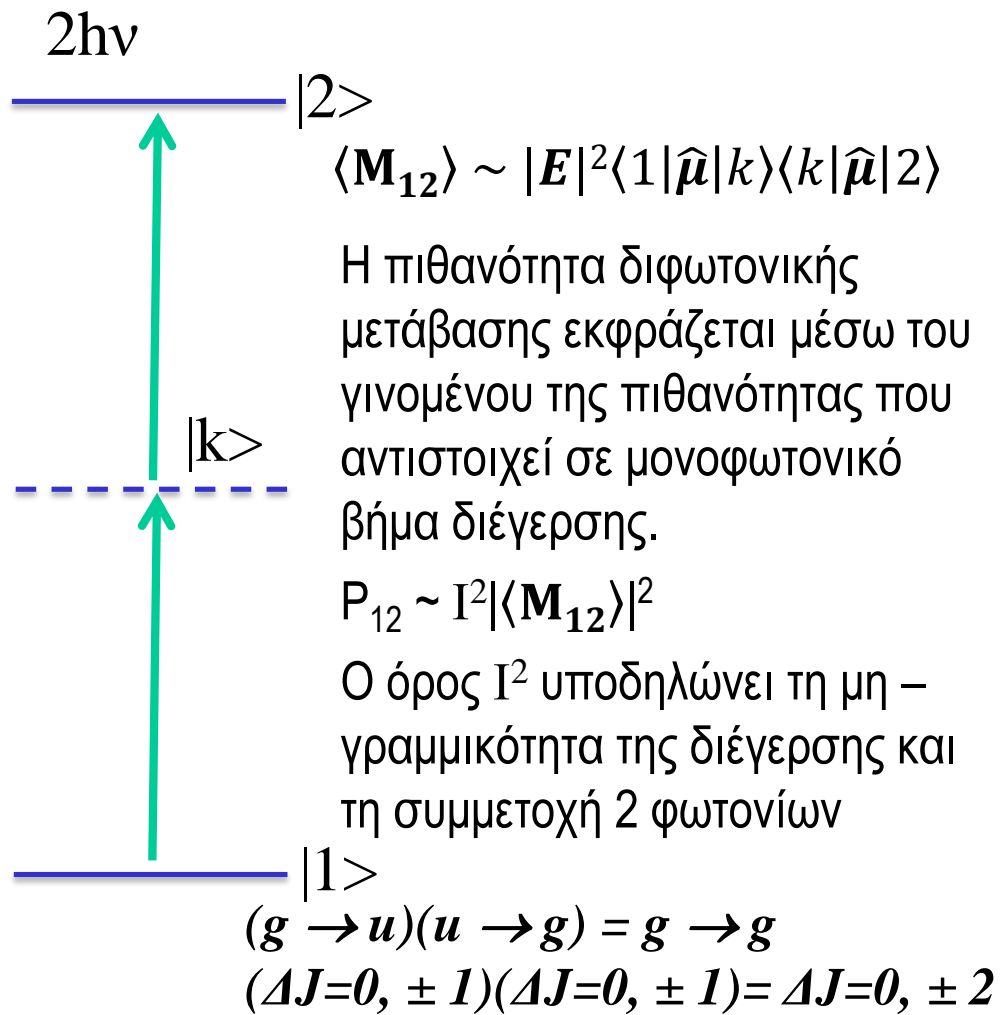
Πολύ-φωτονική Φασματοσκοπία

Διεργασίες πολύ-φωτονικής διέγερσης

Στην πολυφωτονική διέγερση θεωρούμε ότι το σύστημα διέρχεται στιγμιαία από ενδιάμεσες εικονικές καταστάσεις (- - - -)



Κανόνες επιλογής



Πολύ-φωτονική Φασματοσκοπία

Maria Göppert Mayer (June 28, 1906 – February 20, 1972)

Διφωτονική Απορρόφηση σε Άτομα



Maria Göppert Mayer was a German-born American theoretical physicist, and Nobel laureate in Physics for proposing the **nuclear shell model of the atomic nucleus**. She was the second woman to win a **Nobel Prize in physics**, the first being Marie Curie. In 1986, the Maria Goeppert-Mayer Award for early-career women physicists was established in her honor.

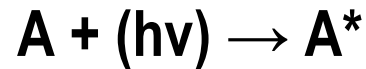
A graduate of the University of Göttingen, Goeppert Mayer wrote her doctoral thesis on the theory of possible **two-photon absorption by atoms** (supervisor Max Born). At the time, the chances of experimentally verifying her thesis seemed remote, but the development of the laser permitted this. Today, the unit for the two-photon absorption cross section is named the Göppert Mayer (GM) unit.

Πολύ-φωτονική Φασματοσκοπία

Κινητική θεώρηση του N. Beer στη μονο- και δι-φωτονική απορρόφηση

Μονοφωτονική απορρόφηση

Θεωρούμε τη διεργασία ως αντίδραση του ατόμου/μορίου A με **ένα** φωτόνιο με συντελεστή ταχύτητας αντίδρασης k, και αναγράφουμε το νόμο της ταχύτητας για τη μεταβολή της πυκνότητας των φωτονίων.



$$dn/dt = - kN n \quad \Rightarrow \quad dn(h\nu) = - kN n(h\nu) dt$$

$$\Rightarrow \quad c \, dn(h\nu) = - (k/c) N [c \, n(h\nu)] c \, dt$$

$$\Rightarrow \quad dI = - (k/c) N I \, dx = - \sigma N I \, dx$$

$$\Rightarrow \quad I(x) = I(x=0) \exp(- \sigma N I) \quad : \text{N. Beer}$$

N: αριθμ. πυκνότητα απορροφητή (ατόμου, μορίου)

n: αριθμ. πυκνότητα φωτονίων

I: ένταση ακτινοβολίας (W/cm^2)

σ (σ_{12}): ενεργός διατομή απορρόφησης ($\text{cm}^2/\mu\text{όριο}$)

Κινητική θεώρηση του N. Beer στη μονο- και δι-φωτονική απορρόφηση

Διφωτονική απορρόφηση

Θεωρούμε τη διφωτονική απορρόφηση ως αντίδραση του ατόμου/μορίου A με **δύο** φωτόνια και συντελεστή ταχύτητας αντίδρασης k' , και αναγράφουμε το νόμο της ταχύτητας για τη μεταβολή της πυκνότητας των φωτονίων.



$$(1/2)dn/dt = -k'N n^2 \Rightarrow \dots$$

$$\Rightarrow dI = - (2k' / (h\nu)c^2) N I^2 dx = - \delta N I^2 dx$$

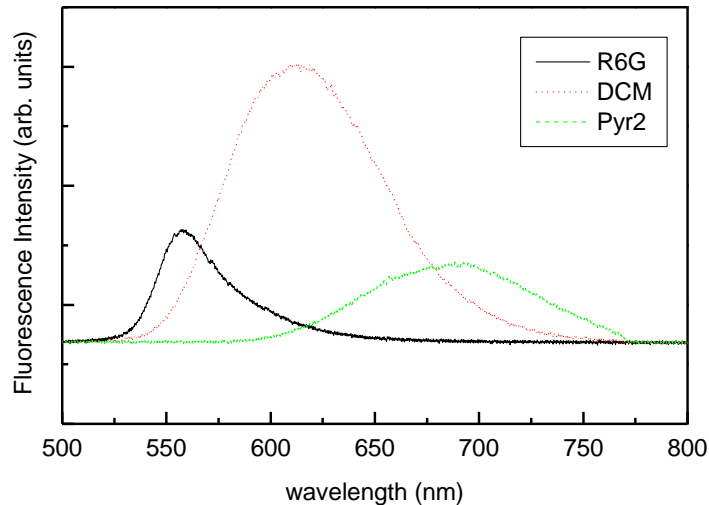
Ολική ενεργός διατομή απορρόφησης: $\sigma_{\text{total}} = \sigma + I\delta$

δ (δ_{12}): ενεργός διατομή διφωτονικής απορρόφησης ($\text{cm}^4/\mu\text{όριο W}$)

Πολύ-φωτονική Φασματοσκοπία

Διφωτονική Φασματοσκοπία Εκπομπής Φθορισμού (2-photon excited fluorescence spectroscopy)

Φάσματα εκπομπής φθορισμού από οργανικές χρωστικές (διαλύματα σε μεθανόλη) κατόπιν διέγερσης με παλμικό λέιζερ Nd:YAG, λ :1064 nm, τ : 10 ns



I_{LASER}	I_{F}
0,202	473
0,427	1458
0,506	2345
0,634	3135
0,828	3794

Να ελεγχθεί η μορφή της καμπύλης $I_{\text{F}} = f[(I_{\text{LASER}})^2]$

$$I_{\text{F}} = \kappa I_0 \phi_{\text{F}} (\epsilon b C)$$

Μono-φωτονική διέγερση

$$I_{2\text{PF}} = \kappa (I_0)^2 \phi_{\text{F}} (\delta b C)$$

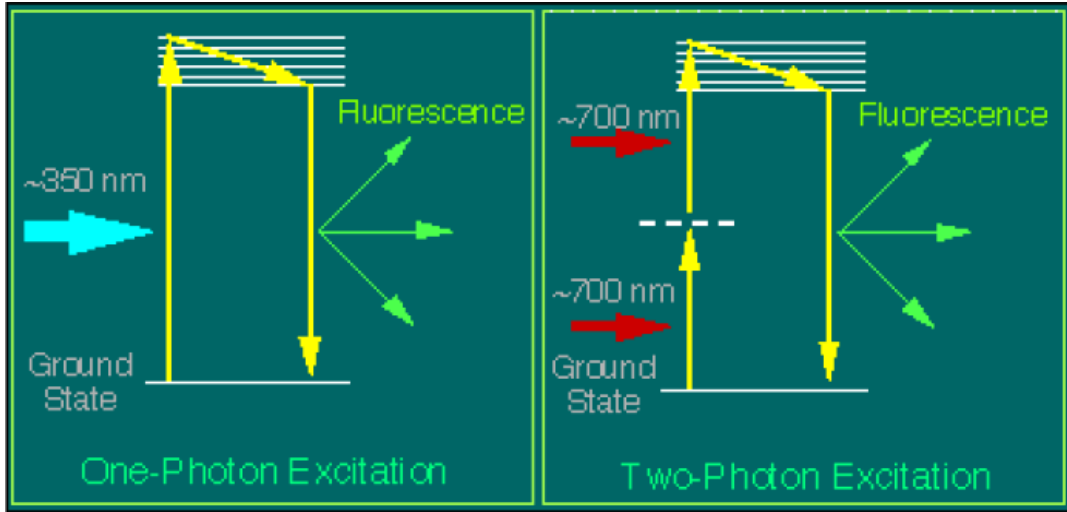
Δι-φωτονική διέγερση

δ : ενεργός διατομή / συντελεστής διφωτονικής απορρόφησης

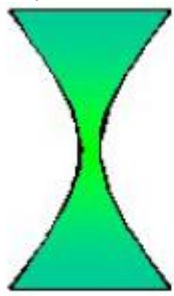
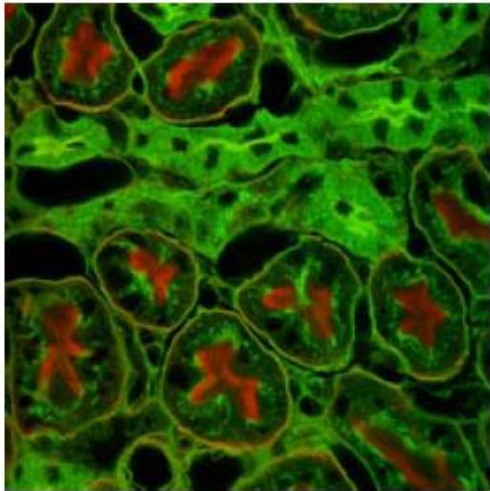
1 GM = 1×10^{-50} cm⁴sec/photon

Πολύ-φωτονική Μικροσκοπία

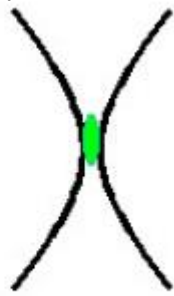
Εφαρμογές Δι- και Πολυ-φωτονικής μικροσκοπίας στη Βιολογία



Η μη-γραμμική εξάρτηση της απορρόφησης από την ένταση οδηγεί σε εντοπισμό της διέγερσης σε μικρή περιοχή του δείγματος, δηλ εκεί όπου η ένταση (W/cm^2) παρουσιάζει μέγιστο. Ως αποτέλεσμα επιτυγχάνεται σημαντική αύξηση της χωρικής ανάλυσης (ευκρίνειας). Η μη γραμμική μικροσκοπία βασίζεται στη χρήση παλμικών πηγών λέιζερ υπερβραχέων παλμών (ultrafast lasers).



One-photon excitation



Two-photon excitation

- + Ευκρίνεια
- + Ευελιξία διέγερσης (λ)
- + Μειωμένη φωτόλυση
- €€€ (femtosecond laser)

Απεικόνιση δι-φωτονικού φθορισμού σε νεφρικά κύτταρα ποντικίου

Πολύ-φωτονική Μικροσκοπία

Σχηματικό διάγραμμα πολυ-φωτονικού μικροσκοπίου

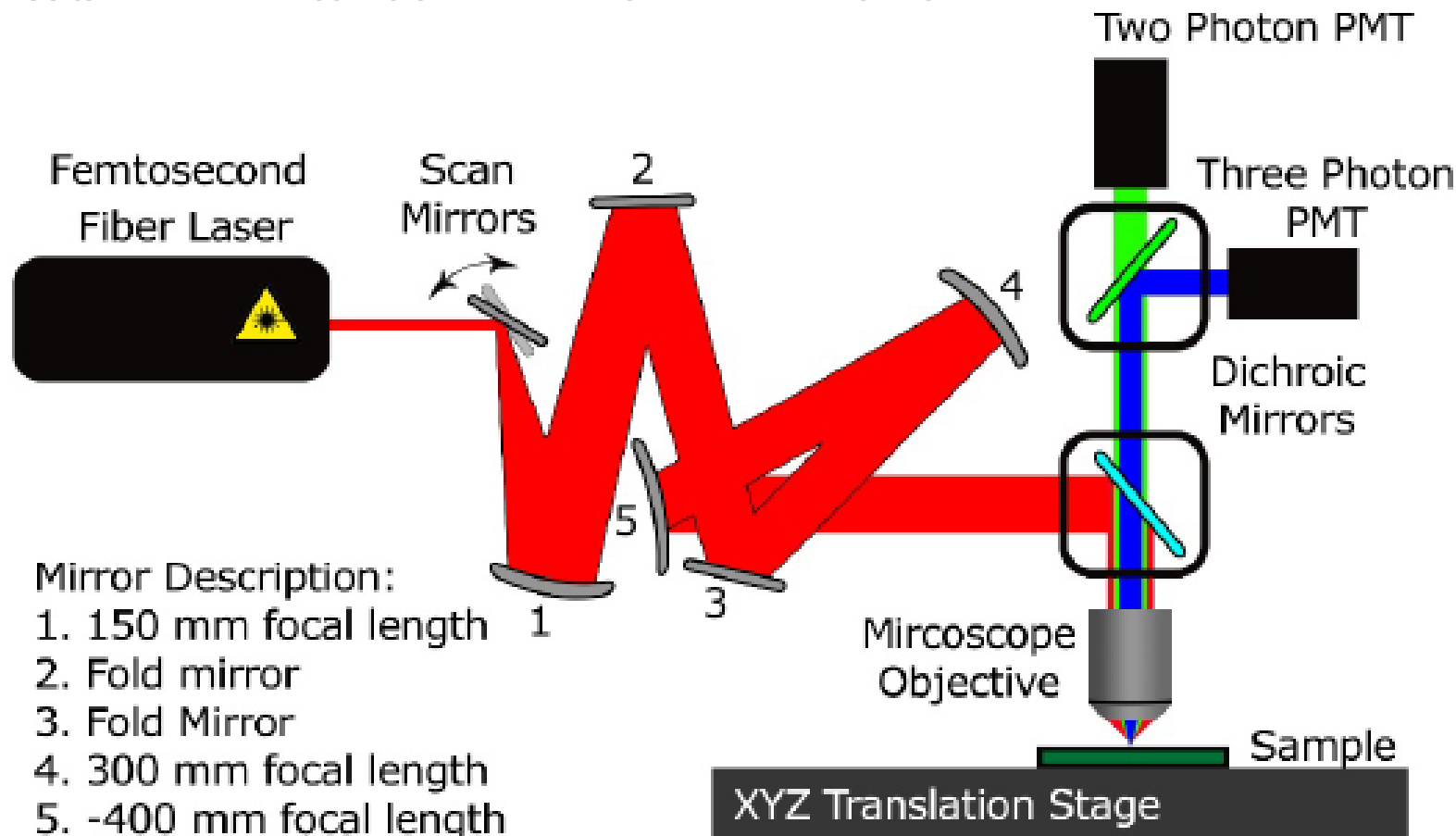


Fig. 1. Schematic diagram of the All-Reflective Multiphoton Microscope. The collimated laser beam is raster scanned using a 2D galvo scanner. The beam is later expanded by reflective optics to fill the back aperture of the objective lens. Dichroic mirrors are utilized to separate the excitation laser light from the back-scattered nonlinear signals from the sample, and also to separate the different generated wavelengths from the sample into appropriate PMT channels.

Πολύ-φωτονική Μικροσκοπία

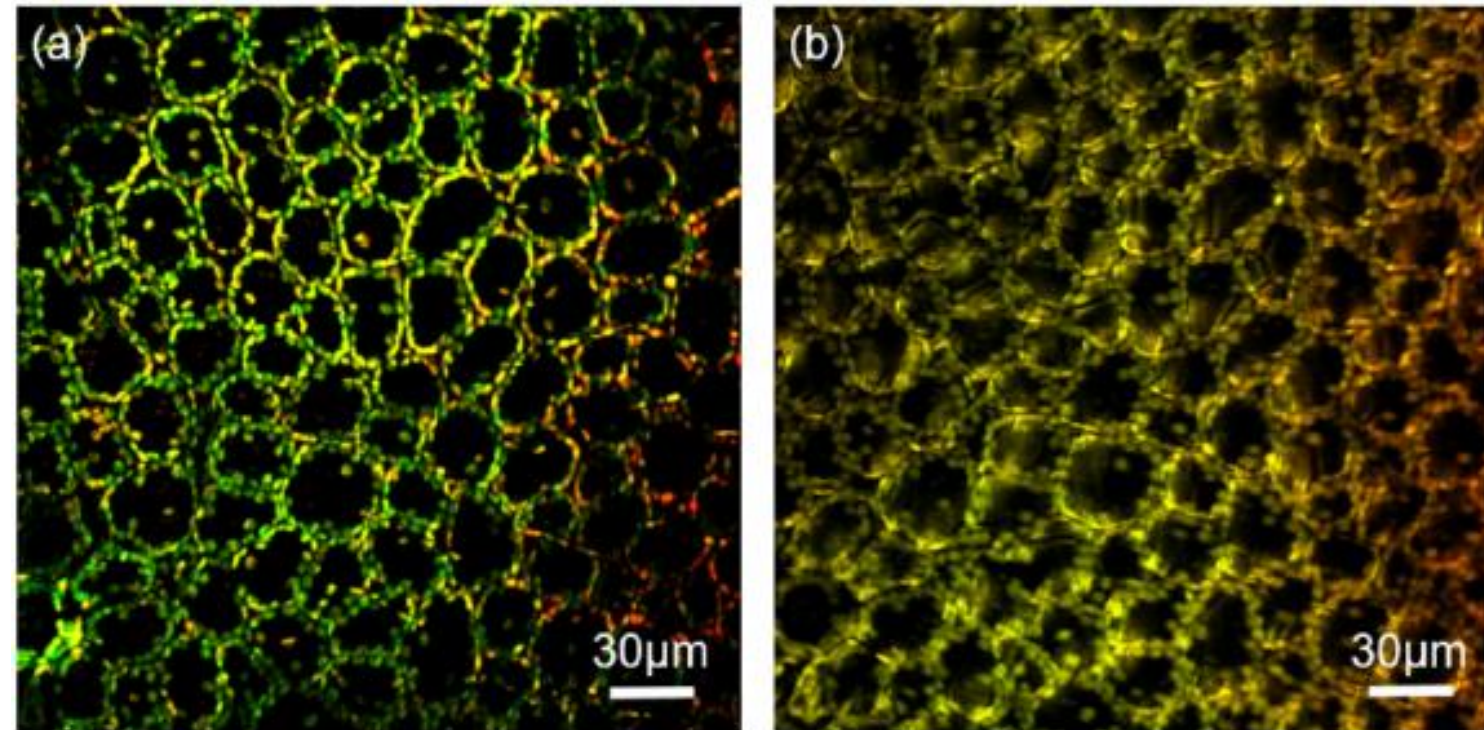


Fig. 4. Multiphoton image of the euphorbia cactus leaf using. (a) 1550nm laser and (b) 1040nm laser. Red color represents the two-photon excited fluorescence (2PEF) and second harmonic generated signal (SHG). Green color illustrates three-photon excited fluorescence (3PEF) and third harmonic generated signal (THG). The focus does not change by changing the source wavelength due to the all-reflective design of the system.

Research Article

Vol. 25, No. 19 | 18 Sep 2017 | OPTICS EXPRESS 23399

Optics EXPRESS

All-reflective multiphoton microscope

BABAK AMIRSOLAIMANI,^{1,2,*} BENJAMIN CROMEY,^{1,2} N. PEYGHAMBARIAN,¹
AND KHANH KIEU¹

¹College of Optical Sciences, University of Arizona, Tucson, AZ 85721, USA

Σε αντιστοιχία με το φαινόμενο της δι-φωτονικής απορρόφησης (-φθορισμού) άλλες μη-γραμμικές διεργασίες (τρι-φωτονική απορρόφηση-φθορισμός, γένεση 2^{ης} και 3^{ης} αρμονικής) προκύπτουν κατά την αλληλεπίδραση υπερβραχέων παλμών λέιζερ (π.χ. 100 femtosecond) και επιτρέπουν τη λεπτομερή μικροσκοπική απεικόνιση δειγμάτων όπως κύτταρα ή βιολογικούς ιστούς.

Εφαρμογές Δι- και Πολυ-φωτονικής μικροσκοπίας στη Βιολογία

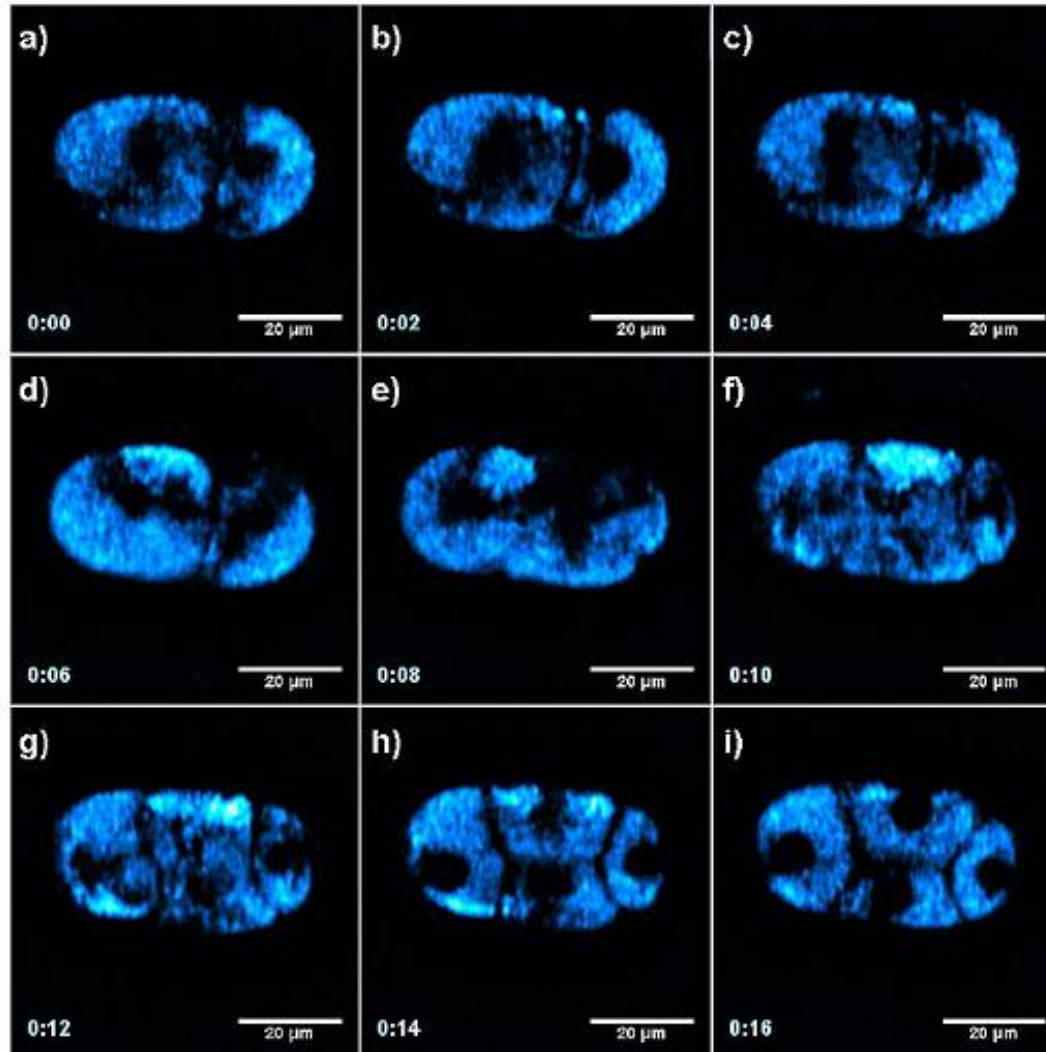
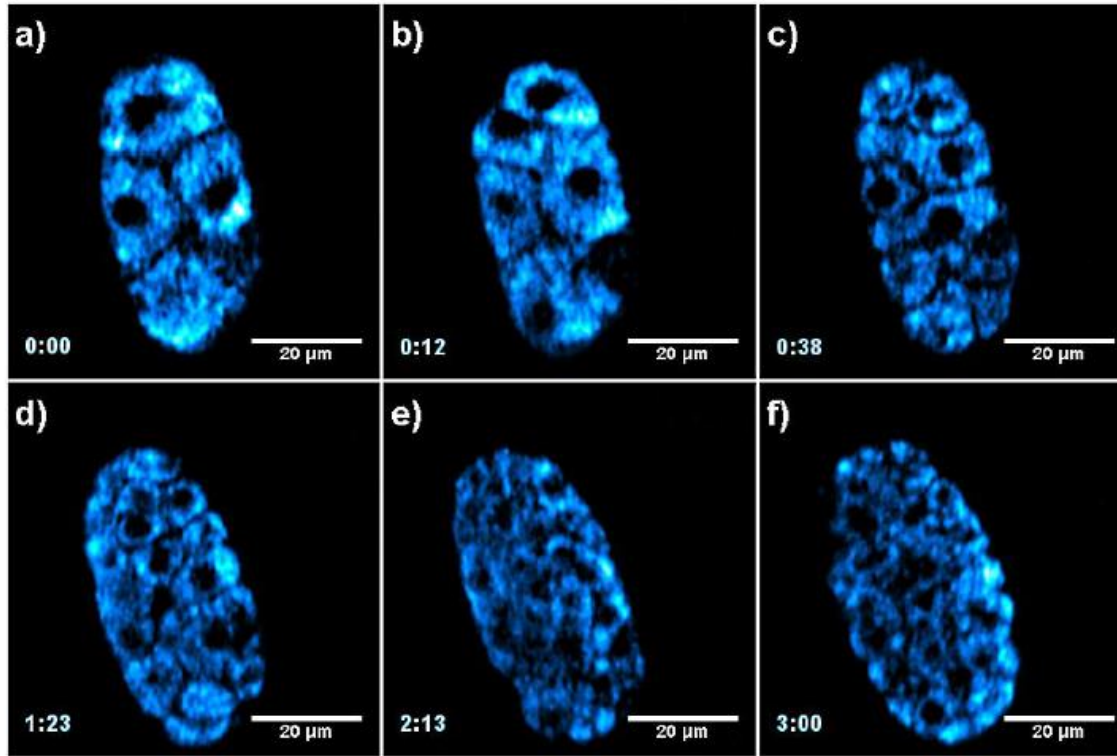


Figure 4.4.2: THG images taken from a C. Elegans embryo. Images show the in vivo asymmetric cell division from two to four cell stage.

Εφαρμογές Δι- και Πολυ-φωτονικής μικροσκοπίας στη Βιολογία



*Figure 4.4.3: THG images recorded from an early stage *C. Elegans* embryo. Images depict the in vivo cell division from four to multiple cell stage.*