

VILNIAUS UNIVERSITETAS
FIZIKOS FAKULTETAS
KVANTINĖS ELEKTRONIKOS KATEDRA
BIOFOTONIKOS LABORATORIJA

Laboratorinis darbas (BPFT)

Biologinių pigmentų fluorescencijos tyrimas

VILNIUS
2004

1. Darbo tikslas

Ištirti įvairių medžiagų (dažiklių tirpalų, biologinių pigmentų bei sensibilizuotų audinių)* pagrindinius fluorescencijos dėsningumus.

2. Darbo uždutys

1. Spektrofotometru išmatuoti tiriamojo bandinio ir etaloninio dažiklio tirpalo sugerties spektrus.

2. Vienodomis žadinimo ir registracijos sąlygomis išmatuoti tiriamojo bandinio ir etaloninio dažiklio tirpalo fluorescencijos spektrus.

3. Sunormuoti sugerties ir fluorescencijos spektrus. Patikrinti veidrodinio atspindžio dėsnį. Įvertinti fluorescencijos maksimumo bangos ilgį, Stokso poslinkį ir apskaičiuoti grynai elektroninio šuolio dažnį ν_0 .

4. Palyginamuoju būdu apskaičiuoti tiriamojo bandinio fluorescencijos kvantinį našumą.

3. Teorinė dalis

3.1. Absoliučiai juodo kūno spinduliavimas ir liuminescencija

Gamtoje yra stebimos įvairios spinduliavimo rūšys:

– chemiluminescencija – spinduliuojantis kūnas naudoja savo viduje vykstančių cheminių reakcijų išlaisvintą energiją;

– biochemiluminescencija – biologinis objektas naudoja biocheminių vyksmų metu išlaisvintą energiją;

– fotoluminescencija – spinduliuojantis kūnas naudoja sugertą šviesos energiją;

– elektroluminescencija – dujos ar garai naudoja elektros išlydžio energiją;

– šiluminis spinduliavimas – kūnas spinduliavimo metu naudoja šiluminę energiją.

Iš visų žinomų spinduliavimo rūšių šiluminis spinduliavimas išsiskiria viena išskirtine savybe. Tegu tam tikroje erdmėje, kurios sienelės visiškai atspindi šviesą, yra patalpintas įkaitintas kūnas. Jei per laiko vienetą šis kūnas išspinduliuos daugiau energijos nei sugėrė, tai jo temperatūra turės mažėti (ir atvirkščiai). Tokiu būdu spinduliuotės intensyvumas didės ar mažės, kol pagaliau nusistovės pusiausvyros būseną. Tokia pusiausvyros būseną yra stabili. Bet kaip ją pažeidus, sistema vėl sugrįš į stabilią būseną. Tokiu būdu galima teigti, kad šiluminis spinduliavimas yra pusiausvyris.

Priešingai šiluminiam, bet koks kitos rūšies spinduliavimas yra nepusiausvyris. Išnagrinėkime, pavyzdžiui, fotoluminescencijos atvejį. Tarkime, kad šviesa sužadintas kūnas yra patalpintas spinduliuotės nesugėriamajame erdmėje, kurios sienelės visiškai atspindi šviesą. Šio kūno spinduliuotė laikui bėgant slops. Nežiūrint į tai, kad šis kūnas sugers dalį atspindėtos nuo sienelių šviesos (kurios gali

* Tiriamąjį objektą parenka dėstytojas ar laborantas

išilti), jis niekuomet nebesugrįš į pradinę būseną. Juk tam, kad grąžinti kūną į pradinę būseną, reikia jį žadinti trumpesnio bangos ilgio šviesa, nei jis spinduliuoja (Stokso dėsnis). Taigi, šis pavyzdys rodo, kad fotoluminescencija – tai nepusiausvyrisis spinduliavimas. Analogiškai išnagrinėję ir kitas spinduliavimo rūšis gausime tą pačią išvadą: visos nešiluminio spinduliavimo rūšys yra nepusiausvyrojo pobūdžio. Šiluminis spinduliavimas kartais vadinamas temperatūriniu.

Pagrindinis dydis, apibūdinantis kūno šiluminį spinduliavimą, yra jo temperatūra. Keliant kokio nors kūno (pvz., anglies, metalų ar jų oksidų) temperatūrą, spinduliuotė tampa vis ryškesnė, o jos spektras pasipildo vis trumpesnėmis bangomis. Be to, pastebėta, kad skaidrūs kūnai (kvarcas, stiklas ir kt.) sugeriantys toje pačioje temperatūroje spinduliuoja skirtingo ryškio šviesą. Šį dėsnį 1809 m. pirmasis suformulavo Pnevė: jei du kūnai per laiko vienetą sugeria skirtingą energijos kiekį, tai ir jų spinduliuotė turi būti skirtinga. Kiekybinę šio dėsnio išraišką 1859 m. pateikė Kirchofas (Kirchhoff). Kūno šiluminiam spinduliavimui kiekybiškai aprašyti įvedamos spinduliavimo ir sugerties pajėgumų sąvokos. Spinduliavimo pajėgumas E – tai energijos srautas, spinduliuojamas kūno vienetinio paviršiaus visomis kryptimis. Tuomet, remiantis aukščiau išdėstytomis mintimis, akivaizdu, kad įkaitinto kūno spinduliavimo pajėgumas E priklauso nuo jo temperatūros T bei spektrinio dažnio ν , kuriame matuojamas energijos srautas

$$d\Phi = E_{\nu,T} d\nu; \quad (1)$$

čia $E_{\nu,T}$ - koeficientas, nusakantis kūno, kurio temperatūra yra T , spinduliavimo (ν spektriniame dažnyje) pajėgumą.

Jei į kūno ploto vienetą krenta šviesos srautas $d\Phi$, tai tam tikrą jo dalį $d\Phi'$ sugers šis kūnas. Santykis kūno sugertos šviesos srauto $d\Phi'$ su kritusiu į jį $d\Phi$ yra vadinamas kūno sugerties pajėgumu A , t.y.

$$A = \frac{d\Phi'}{d\Phi}. \quad (2)$$

Maksimali galima A vertė yra 1. Kūnus, kurių sugerties pajėgumas visų temperatūrų ir dažnių intervale $A_{\nu,T}=1$, Kirchofas pavadino absoliučiai juodais kūnais.

Absoliučiai juodo kūno spektrinį spinduliavimo pajėgumą pažymėję $\varepsilon_{\nu,T}$, o sugerties $\alpha_{\nu,T}$, galima užrašyti Kirchofo dėsnį

$$\frac{E_{\nu,T}}{A_{\nu,T}} = \frac{\varepsilon_{\nu,T}}{\alpha_{\nu,T}} = \varepsilon_{\nu,T}, \quad (3)$$

kadangi $\alpha_{\nu,T}=1$.

Gamtoje paprastai sutinkame kūnus, kurie negali būti priskirti absoliučiai juodiems. Jų $A_{\nu,T}<1$. Tokie kūnai vadinami nejuodais kūnais.

Iš Kirchofo dėsnio (3) seka, kad $E_{\nu,T}=\varepsilon_{\nu,T} \cdot A_{\nu,T}$. Vadinasi, nejuodiems kūnams (kurių $A_{\nu,T}<1$) spinduliavimo pajėgumas $E_{\nu,T}<\varepsilon_{\nu,T}$. Tai reiškia, kad nejuodo kūno spinduliavimo pajėgumas bet kokiam dažniui negali būti didesnis už absoliučiai juodo kūno, esančio toje pačioje temperatūroje, spinduliavimo pajėgumą.

Kirchofo dėsnis iš esmės nusako, kad absoliučiai juodo kūno spinduliavimo pajėgumas yra dažnio ir jo temperatūros funkcija, t.y. $\varepsilon_{\nu,T}=f(\nu,T)$. Tiriant šios funkcijos išraišką pradžioje buvo suformuluotas Stefano (Stefan) ir Bolcmano (Boltzmann) dėsnis, nusakantis suminį absoliučiai juodo kūno spinduliavimo pajėgumą ε_T :

$$\varepsilon_T = \int_0^{\infty} \varepsilon_{\nu,T} d\nu = \sigma T^4, \quad (4)$$

čia σ – Bolcmano konstanta.

Vėliau 1893 m. Vinas (Wien) teoriškai suformulavo antrąjį absoliučiai juodo kūno spinduliavimo dėsnį:

$$\varepsilon_{\nu,T} = \frac{c^5}{\lambda^5} f\left(\frac{c}{\lambda T}\right); \quad (5)$$

čia c – šviesos greitis terpėje (vakuume), o f – funkcija, kurios Vinas neįstengė nustatyti. Nors šiame Vino dėsnyje funkcija $f(c/\lambda T)=f(\nu/T)$ nėra užrašyta, tačiau iš jo gaunama viena svarbi išvada. Panagrinėkime, kaip elgiasi šiluminio spinduliavimo maksimumas ε_{\max} . Šiuo tikslu išdiferencijavę (5) ir prilyginę nuliui gauname šitokią išraišką:

$$\lambda \cdot \varepsilon_{\max} \cdot T = const. \quad (6)$$

Ši lygtis išreiškia taip vadinamą Vino poslinkio dėsnį, kuris teigia, kad absoliučiai juodo kūno spinduliuotės spektrinio intensyvumo maksimumas, keliant temperatūrą, slenka į trumpųjų bangų pusę. Šiuo dėsniu pagrįsta pirometrija.

Vėliau buvo bandoma gauti tikslią funkcijos $f(\nu/T)$ išraišką. Relėjus (Rayleigh) ir Džinsas (Jeans) pateikė šitokią minėtos funkcijos išraišką:

$$\varepsilon_{\nu,T} = \frac{2\pi\nu^2}{c^2} kT. \quad (7)$$

Ši Relėjaus ir Džinso formulė neblogai aprašo šiluminės spinduliuotės energijos pasiskirstymą ilgabangiam šlaite, tuo tarpu trumpabangiam šlaite ji prieštarauja eksperimentui. Šis prieštaravimas į fizikos istoriją įėjo „ultravioletinės katastrofos“ pavadinimu: dažniui didėjant $\varepsilon_{\nu,T}$ monotoniškai auga iki begalybės – neturi maksimumo. Šio prieštaravimo, aprašant Kirchofo funkcijos $\varepsilon_{\nu,T}$ išraišką, priežastis glūdi klasikinės fizikos pagrindiniuose postulatuose, pagal kuriuos bet kokios sistemos energija gali tolydžiai kisti, t.y. ji gali įgauti bet kokias artimas vertes.

Minėtą prieštaravimą panaikino Plankas (Planck), įvedęs kvantuoto energijos spinduliavimo principą, pagal kurį dažnio ν osciliatorius gali spinduliuoti tik tam tikromis porcijomis:

$$E_0 = h\nu; \quad (8)$$

čia h – Planko konstanta ($h=6,625 \cdot 10^{-34}$ J·s). Šį kvantavimo principą pritaikęs absoliučiai juodo kūno spinduliavimui aprašyti, jis pateikė šitokią absoliučiai juodo kūno spinduliavimo pajėgumo formulę:

$$\varepsilon_{\nu,T} = \frac{8\pi\nu^2}{c^3} \frac{h\nu}{e^{\frac{h\nu}{kT}} - 1}, \quad (9)$$

arba

$$\varepsilon_{\lambda,T} = \frac{2\pi c^2}{\lambda^5} \frac{h}{e^{\frac{hc}{\lambda kT}} - 1}. \quad (9')$$

Tai Planck'o formulės, gerai aprašančios absoliučiai juodo kūno spinduliuotės energinį pasiskirstymą spektre.

Gamtoje paprastai mes sutinkame kūnus, kurie nėra absoliučiai juodi. Realių kūnų šiluminio spinduliavimo spektras skiriasi nuo absoliučiai juodo kūno spektro. Spektrai sutampa, kai vietoj tikros kūno temperatūros į (9) arba (9') formulę įrašoma skaistinės temperatūros T_R vertė. Skaistinė temperatūra – tai tokia temperatūros vertė, kuriai esant realaus ir absoliučiai juodo kūnų spinduliuočių intensyvumų pasiskirstymai sutampa. T_R vertė yra mažesnė už tikrąją kūno temperatūrą. Praktikoje ryškuminė temperatūra nustatoma specialiu prietaisu optiniu pirometru.

3.2. Daugiatomių molekulių fluorescencija ir sugertis

Ankstesniame skyriuje (3.1) buvo parodyta, kad liuminescencija, skirtingai nei šiluminis spinduliavimas, yra nepusiausvyrisis vyksmas. Vavilovas (Vavilov), nagrinėdamas įvairių medžiagų liuminescencijos reiškinių, atkreipė dėmesį į tai, kad liuminescencija iš visų kitų nešiluminio spinduliavimo rūšių išsiskiria tik spinduliavimo trukme. Jis pateikė tokį apibrėžimą: liuminescencija yra vadinamas nuosavas nepusiausvyrisis perteklinis sužadintų dalelių švytėjimas tuo atveju, jei jo trukmė 10^{-10} s arba ilgesnė.

Liuminescencija yra perteklinis dalelių švytėjimas ta prasme, kad jis viršija temperatūrinį (arba šiluminį) spinduliavimą, kaip kad seka iš Kirchofo dėsnio (3).

Panagrinėkime daugiatomųjų molekulių elektroninius energijos lygmenis bei šuolius tarp jų.

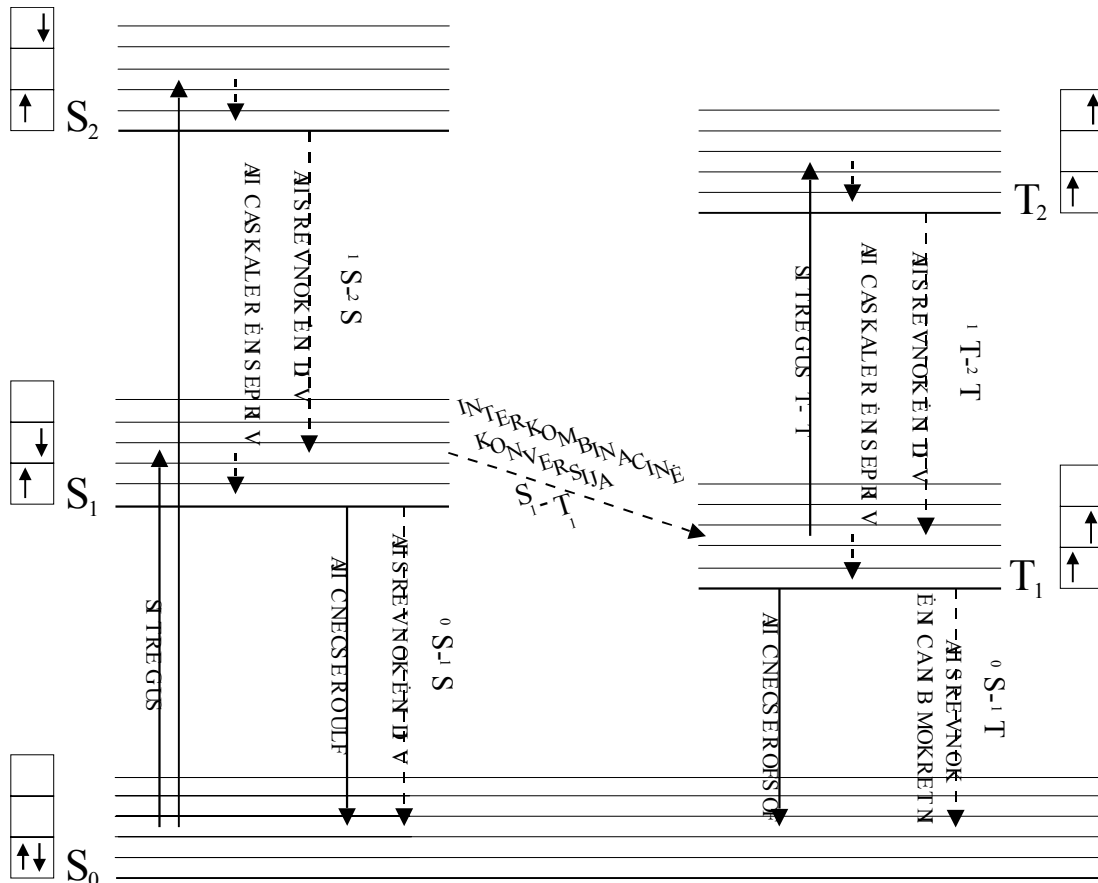
Pagrindinėje būsenoje visos molekulinės orbitalės yra užpildytos elektronų poromis. Pagal Pauli draudimo principą vienoje orbitalėje esančių elektronų sukinių yra priešingi, todėl pagrindinės būsenos suminis sukinyvis lygus nuliui. Sužadinus molekulę viršutinio sluoksnio elektronas peršoka į aukštesnę orbitalę. Elektrono sukinyvis gali būti orientuotas ta pačia arba priešinga kryptimi. Tokiu būdu sužadinta molekulė gali būti dvejopų būsenų, kurių suminiai sukinių yra 0 ir 1. Išoriniame arba vidiniame magnetiniame lauke pirmuoju atveju sukinių projekcija gali įgyti vieną vertę (0), antruoju – tris vertes (-1, 0 ir 1), todėl šios būsenos atitinkamai vadinamos singletinėmis ir tripletinėmis. Paprastai daugiatomųjų molekulių pagrindinės būsenos yra singletinės. Išimtį sudaro kai kurios diviatomės molekulės (pvz., O_2), kurių pagrindinė būsena yra tripletinė. 1 pav. pavaizduota daugiatomės molekulės Jablonskio (Jablonski) pasiūlyta energijos lygmenų diagrama. Žadinant šviesa, medžiagos molekulės iš pagrindinės singletinės S_0 būsenos pereina į aukštesnes sužadintas singletines būsenas (S_1, \dots, S_n). Daugiatomųjų molekulių kiekvienas energinis lygmuo turi daug virpesinių-rotacinių polygmenų, todėl sugerties spektrų juostos yra išplitusios. Be to, sugerties spektro juostų išplitimą sąlygoja ir tarpmolekulinė sąveika.

Sužadintos molekulės nespinduliniu keliu sparčiai (10^{-13} s) relaksuoja į to paties sužadinto elektroninio lygmens nulinių virpesinių polygmenų. Toks vyksmas vadinamas virpesine relaksacija. Nespindulinis šuolis tarp elektroninių lygmenų vadinamas vidine konversija. Galiausiai sužadinta molekulė atsiduria S_1 lygmens nuliniame virpesiniame polygmenyje. Iš žemiausio sužadinto energinio lygmens S_1 galimi trys relaksacijos vyksmai: vidinė konversija $S_1 \rightarrow S_0$, interkombinacinė konversija $S_1 \rightarrow T_1$ ir fluorescencija – molekulės sugrįžimas į pagrindinę S_0 būseną išspinduliuojant fotoną. Šių vyksmų tikimybės priklauso nuo energinio tarpo ΔE tarp S_1 ir S_0 lygmenų. Kuo ΔE didesnis, tuo vidinės konversijos $S_1 \rightarrow S_0$ tikimybė mažesnė, o fluorescencijos tikimybė didesnė. Dėl šios priežasties dažikliai, kurių pagrindinės sugerties juostos yra raudonojoje arba artimojoje infraraudonojoje spektro srityje (700 – 1200 nm) paprastai fluorescuoja silpnai arba fluorescencija iš viso nestebima. Tokių dažiklių fluorescencijos kvantinis našumas padidėja žemose temperatūrose, kai vidinės konversijos tikimybė sumažėja. Taigi, fluorescencijos tikimybė (tuo pačiu ir kvantinis našumas) priklauso nuo konkuruojančių vyksmų, kurie mažina sužadintojo S_1 lygmens užpildą.

1 pav. pavaizduotoje daugiatomės molekulės lygmenų diagramoje pažymėti galimi elektroniniai šuoliai bei sužadintos molekulės deaktivacijos vyksmų keliai. Žemiau pateikta trumpa deaktivacijos vyksmų schema (skliausteliuose pateikti šių vyksmų spartos konstantų žymėjimai $k=1/\tau$, kur τ yra vyksmo trukmė, ir apytikslės jų vertės):

sužadanimas ($k_z \sim 10^{18} \text{ s}^{-1}$)
 vidinė konversija ($k_{v1} \sim 10^{10} - 10^{13} \text{ s}^{-1}$)
 vidinė konversija ($k_v \sim 10^{10} \text{ s}^{-1}$)
 interkombinacinė konversija ($k_{ST} \sim 10^7 \text{ s}^{-1}$)
 interkombinacinė konversija ($k_T \sim 10^{-2} - 10^2 \text{ s}^{-1}$)
 fluorescencija ($k_{fl} \sim 10^8 - 10^{11} \text{ s}^{-1}$)
 fosforescencija ($k_{fosf} < 10^6 \text{ s}^{-1}$)
 užlaikytoji fluorescencija ($k_{užfl}$)

$h\nu_0 + S_0 \rightarrow S_1 (S_2, \dots, S_n);$
 $S_n, \dots, S_2 \rightarrow S_1 + \text{šiluma};$
 $S_1 \rightarrow S_0 + \text{šiluma};$
 $S_1 \rightarrow T_1 + \text{šiluma};$
 $T_1 \rightarrow S_0 + \text{šiluma};$
 $S_1 \rightarrow S_0 + h\nu_{fl};$
 $T_1 \rightarrow S_0 + h\nu_{fosf};$
 $T_1 + \text{šiluma} \rightarrow S_1 \rightarrow S_0 + h\nu_{fl}.$



1 pav. Daugiaatomės molekulos energijos lygmenų diagrama.

Pagal švytėjimo trukmę liuminescencija skirstoma į fluorescenciją ($10^{-11} - 10^{-8}$ s), fosforescenciją ($> 10^{-6}$ s) ir užlaikytąją fluorescenciją (vidinės virpesinės ar išorinės šiluminės energijos dėka vyksta šuolis iš T_1 į S_1 lygmenį, iš kurio ir vyksta fluorescencija). Užlaikytoji fluorescencija būdinga medžiagoms, kurių energinis tarpas tarp S_1 ir T_1 lygmenų yra mažas (maždaug kT eilės). Tokiu būdu užlaikytosios fluorescencijos dažnis lygus fluorescencijos dažniui, tačiau švytėjimo trukmė yra žymiai ilgesnė.

3.3. Pagrindiniai sugerties ir fluorescencijos dėsniai

Šviesos sugertį vienalytėse sistemose aprašo Bugero (Bouguer) dėsnis:

$$I = I_0 e^{-kl}; \quad (10)$$

čia I_0 yra kritusios, o I - praėjusios šviesos intensyvumas, l – optinio kelio ilgis (bandinio ar kiuvetės storis). Dydis k yra vadinamas sugerties koeficientu. Šviesos sugertį pigmentų silpnuose tirpaluose aprašo Bugero ir Bero (Beer) dėsnis:

$$I = I_0 e^{-\alpha n l}; \quad (11)$$

čia α yra sugerties rodiklis, n – pigmento molekulių skaičius tūrio vienetė (cm^{-3}). Skaičiavimuose patogiau naudoti dešimtainius logaritmus, todėl (11) dėsnį galima parašyti kitaip:

$$I = I_0 10^{-\varepsilon c l}. \quad (12)$$

Šioje formulėje ε vadinamas ekstinkcijos koeficientu arba tiesiog ekstinkcija. Medžiagos tirpalo koncentracija c išreiškiama $\text{mol/l} = M$, optinio kelio ilgis l – cm , todėl ekstinkcijos koeficiento dimensija yra $M^{-1} \text{cm}^{-1}$. Išlogaritnavus (12) formulę

$$\lg \frac{I_0}{I} = \varepsilon c l. \quad (13)$$

Dydis $T = I/I_0$ vadinamas bandinio pralaidumu, o $D = \varepsilon c l$ – bandinio optiniu tankiu. Taigi, (13) formulę galima perrašyti taip:

$$\lg \frac{1}{T} = \varepsilon c l = D. \quad (14)$$

Aprašant šviesos sugerties molekulinėse sistemose vyksmą, yra įvedama molekulių, patalpintų šviesos sraute, sugerties akto statistikinės tikimybės sąvoka, t.y. molekulių sugerties skerspjūvis σ . Sugerties akto tikimybė, perskaičiuota vienai molekulei, yra vadinama sugerties skerspjūviu:

$$\sigma = \frac{k}{n}; \quad (15)$$

čia n – molekulių skaičius tūrio vienetė. Sugerties skerspjūvio dimensija yra cm^2 .

Aukščiau aprašyti pagrindiniai fluorescencijos dėsningumai rodo, kad tarp sugerties ir fluorescencijos vyksmų yra tam tikras ryšys. Pabandykime nustatyti šį ryšį idealioms molekulėms, kurių fluorescencijos tikimybė būtų lygi 1.

Jei šviesos srauto intensyvumas yra I , tai fotonų skaičius bus $I/h\nu$, o sugertų fotonų skaičius tūrio vienetė $\sigma n I/h\nu$. Tuomet idealioms molekulėms nuostovaus žadinimo sąlygomis sugertų fotonų skaičius per 1 s turi būti lygus išspinduliuotų fotonų skaičiui:

$$\sigma n \frac{I}{h\nu} = k_{fl} n^*; \quad (16)$$

čia k_{fl} - fluorescencijos spartos konstanta [s^{-1}], n^* - sužadintų molekulių koncentracija. Perrašome (16) išraišką:

$$\sigma(\nu) n \frac{I}{h\nu} = \frac{k_{fl}(\nu) n^* h\nu_{fl}}{h\nu_{fl}}; \quad (17)$$

čia ν_{fl} - fluorescencijos dažnis, h – Planko konstanta, $\sigma(\nu)n = k(\nu)$.

Nuostovaus žadinimo sąlygomis kairėje lygybės pusėje esantis narys $I/h\nu = \text{const.}$, o dešinėje pusėje esantis narys $k_{fl}(\nu)n^* h\nu_{fl}$ išreiškia fluorescencijos intensyvumą I_{fl} . Tada (17) išraišką galima užrašyti šitaip:

$$k(\nu) \cdot \text{const} = \frac{I_{fl}}{h\nu_{fl}}. \quad (18)$$

Ši išraiška naudojama sugretinant sugerties ir fluorescencijos spektrus, o taip pat skaičiuojant grynai elektroninio šuolio dažnį. Ji yra išvesta idealioms molekulėms, kai kiekvieną sugerties aktą lydi fluorescencijos aktas. Tačiau praktikoje, molekulių fluorescencijos kvantinis našumas $\varphi_{fl} < 1$. Nežiūrint į tai, (18) išraiška turi savo prasmę

ir šiuo atveju. Lyginant sugerties ir fluorescencijos spektrus, (18) formulėje vietoje sugerties koeficiento galima naudoti ekstinkcijos koeficientą $\varepsilon(\nu)$.

Fluorescencija apibūdinama jos trukme $\tau_{fl}=1/k_{fl}$. Realiai matuojame jos gyvavimo trukmę τ_g , mažesnę už tikrąją τ_{fl} , nes lygmens S_1 užpildos mažėjimas sąlygotas kelių deaktivacijos vyksmų: fluorescencijos (k_{fl}), vidinės (k_V) ir interkombinacinės (k_{ST}) konversijų bei gesinimo (k_g), jeigu tirpale yra gesiklio (pvz., deguonies). Taigi, tikroji fluorescencijos gyvavimo trukmė

$$\tau_g = \frac{1}{k_{fl} + k_V + k_{ST} + k_g[Q]}; \quad (19)$$

čia $[Q]$ – gesiklio koncentracija.

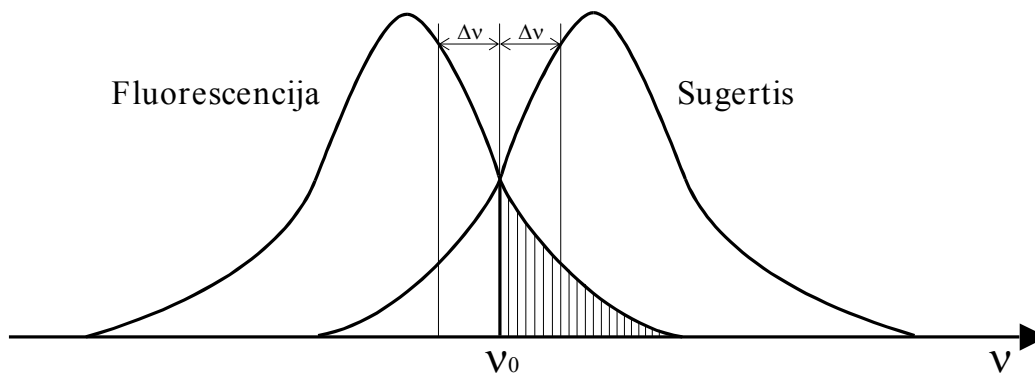
Fluorescencijai būdingi tam tikri dėsniniai. Egzistuoja ir išimtys, bet jos yra retos. Jei pigmentams koks nors iš žemiau išvardintų dėsninių negalioja, tai galima daryti išvadą, kad ši medžiaga pasižymi ypatingomis savybėmis.

3.3.1. Fluorescencijos spektro nepriklausomumas nuo žadinančios spinduliuotės bangos ilgio

Fluorescencijos spektras paprastai nepriklauso nuo žadinančios šviesos bangos ilgio. Tai rodo, kad susidaro tam tikra konkreti, nepriklausanti nuo žadinančios spinduliuotės bangos ilgio, sužadintosios molekulės būseną, iš kurios ir vyksta fluorescencija. Ši būseną – tai žemiausias virpesinis pirmosios sužadintos elektroninės S_1 būsenos polygmenis. Iš šio dėsnio seka, kad fluorescencija galima tik iš žemiausio sužadinto S_1 elektroninio lygmens. Jei molekulė sužadinama į aukštesnįjį S_2 elektroninį lygmenį, tai ji greitai nespinduliniu būdu (vidinė konversija) relaksuos į S_1 elektroninį lygmenį, o vėliau virpesinės relaksacijos keliu atsiders žemiausiame virpesiniame elektroninės būsenos polygmenyje. Gilesnė fizikinė priežastis to fakto, kad nestebima molekulių fluorescencija iš aukštesnių sužadintų elektroninių lygmenų (egzistuoja labai retos išimtys) yra ta, kad nespindulinio šuolio tikimybė priklauso nuo energinio tarpo tarp lygmenų. Kadangi energinis tarpas tarp aukštesniųjų sužadintų elektroninių lygmenų mažėja, tai ir nespindulinio šuolio tikimybė smarkiai didėja. Taigi, tarp aukštesniųjų elektroninių lygmenų galimi tik nespinduliniai šuoliai.

3.3.2. Stokso dėsnis

1852 m. Stoksas pastebėjo, kad medžiagų fluorescencijos bangos ilgis λ_{fl} yra visuomet didesnis už sugertos šviesos bangos ilgį λ_s . Fluorescuojančių molekulių tirpaluose ir kristaluose tarp sužadinimo ir spinduliuotės susidaro neišvengiami energijos nuostoliai (išimtį sudaro atomai dujinėje fazėje). Pagrindinė priežastis yra ta, kad sužadintoji molekulė greitai relaksuoja į žemiausią virpesinį S_1 lygmens polygmenį, iš kurio ir vyksta spindulinis šuolis (fluorescencija). Taigi, yra išspinduliuojama tik dalis sugertos energijos. Likusi energijos dalis $h\nu_s - h\nu_{fl}$ sukaupiama molekulėse perteklinės šiluminės energijos forma, kuri yra atiduodama aplinkai. 2 pav. pateiktos daugiaatomių molekulių į maksimumus normuotos sugerties ir liuminescencijos kreivės. Fluorescencijos juosta dalinai persikloja su sugerties juosta. Juostų persiklojimo srityje, kur $\nu_{fl} > \nu_s$ (užbrūkšniuota sritis), Stokes'o dėsnis negalioja. Tai antistoksinė sritis ($\nu_{fl} > \nu_s$), kurioje molekulė išspinduliuoja didesnės energijos kvantą nei sugėrė. Pagal energijos tvermės dėsnį tai gali įvykti tik tuomet, kai molekulė trūkstantį energijos dalį kompensuoja virpesinės energijos sąskaita.



2 pav. Fluorescencijos ir sugerties spektrai.

Lomelis (Lommel) pašalino šį Stokso dėsnio prieštaravimą jį pakoregavęs tokiu būdu: liuminescencijos spektras ir jo maksimumas visuomet pasislinkęs sugerties spektro ir jo maksimumo atžvilgiu į ilgabangę pusę. Šis dėsnis vadinamas apibendrintu Stokes'o arba kartais Stokes'o ir Lommel'io dėsniu, kurį galima užrašyti taip:

$$h\nu_{fl}^{\max} < h\nu_s^{\max}. \quad (20)$$

3.3.3. Veidrodinio atspindžio dėsnis

Šis dėsnis yra išvestinis iš aukščiau pateiktų. Jį galima suformuluoti šitaip: normuoti sugerties $k(\nu)$ ir fluorescencijos $I_{fl}(\nu)/\nu$ spektrai yra veidrodiskai simetriški tiesės, einančios per spektrų persikirtimo tašką ir statmenos absčių (dažnių) ašiai, atžvilgiu.

Taigi, remiantis šiuo dėsniu sugerties ir fluorescencijos spektrų taškai yra nutolę nuo simetrijos taško ν_0 vienodu atstumu $\Delta\nu$ (2 pav.). Matematiškai tai galima užrašyti taip:

$$\begin{aligned} \nu_s - \Delta\nu &= \nu_0, \\ \nu_{fl} + \Delta\nu &= \nu_0. \end{aligned} \quad (21)$$

Sudėjus šias lygybes, gauname matematinę veidrodinio atspindžio dėsnio išraišką:

$$\nu_s + \nu_{fl} = 2\nu_0. \quad (22)$$

Šią lygybę galima perrašyti šitaip:

$$\nu_s - \nu_{fl} = 2(\nu_s - \nu_0). \quad (23)$$

Pastaroji išraiška yra patogi veidrodinio atspindžio dėsniui tikrinti. Šiuo tikslu braižoma funkcija $f(\nu_s) = \nu_s - \nu_{fl}$. Pagal (23) lygtį, galiojant veidrodinio atspindžio dėsniui, gaunama tiesė, kurios kampinis koeficientas lygus 2.

Griežtai kalbant, veidrodinio atspindžio dėsnis galios, kai bus patenkinta atitinkamų sugerties ir fluorescencijos juostų dažnių ir intensyvumų simetrija. Pagal veidrodinio atspindžio dėsnį sugerties ir fluorescencijos dažnių vertėms, simetrinėms ν_0 atžvilgiu, intensyvumai turi būti lygūs:

$$bB(\nu_s) = A(\nu_{fl}), \quad (24)$$

čia B ir A – Einšteino (Einstein) koeficientai sugerčiai ir savaiminiam spinduliavimui, b – tam tikras normavimo koeficientas, įvestas dėl to, kad fluorescencijos intensyvumas matuojamas santykiniais vienetais. Pasinaudojus (21) sąryšiu pastarąją lygybę galima perrašyti taip:

$$bB(\nu_0 + \Delta\nu) = A(\nu_0 - \Delta\nu). \quad (25)$$

Pabandykime aprašyti intensyvumų pasiskirstymą sugerties ir dažnių juostose. Tegul $\rho(E_v)$ yra virpesinių lygmenų E_v užpildymo tankio funkcija pagrindinėje S_0 elektroninėje būsenoje, o $\alpha(E_v, \nu_s)$ – šuolio, kurio metu molekulė sugers šviesos kvantą $h\nu_s$, tikimybė. Tuomet galime užrašyti sugerties intensyvumo pasiskirstymo lygtį:

$$I_s(\nu) = nh\nu \int_{E_v=0}^{\infty} \rho(E_v) \alpha(E_v, \nu_s) dE_v. \quad (26)$$

Analogiškai užrašome ir spinduliniam šuoliui iš sužadintojo lygmens:

$$I_{fl}(\nu) = nh\nu \int_{E_v^*=0}^{\infty} \rho(E_v^*) f(E_v^*, \nu_{fl}) dE_v^*, \quad (27)$$

čia $\rho(E_v^*)$ - virpesinių lygmenų užpildymo tankio funkcija sužadintoje S_1 elektroninėje būsenoje, $f(E_v^*, \nu_{fl})$ – spindulinio šuolio, kurio metu molekulė išspinduliuoja šviesos kvantą $h\nu_{fl}$, tikimybė.

Tuo atveju, kai simetrinėms ν_0 atžvilgiu sugerties ir fluorescencijos dažnių vertėms intensyvumai yra lygūs, pasinaudojus (25), (26) ir (27) formulėmis galime užrašyti

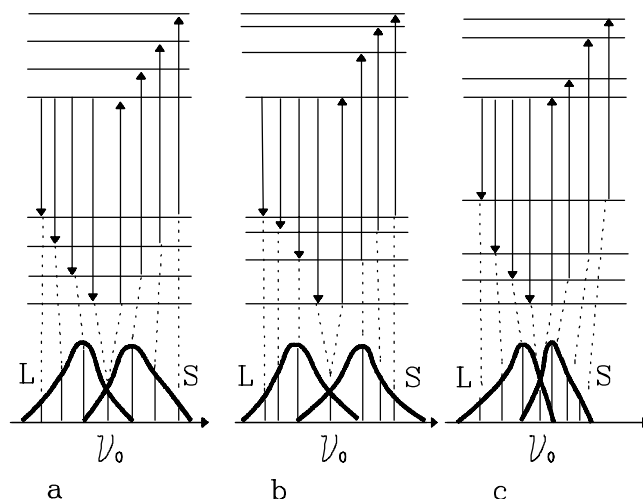
$$b \int_{E_v} \rho(E_v) B(E_v, \nu_0 + \Delta\nu) dE_v = \int_{E_v^*=0}^{\infty} \rho(E_v^*) A(E_v^*, \nu_{fl}) dE_v^*. \quad (28)$$

Iš šios formulės seka, kad veidrodinio atspindžio dėsnis pilnai galioja, kai (20) lygybėje yra tenkinamos šios sąlygos:

$$\rho(E_v) = \rho(E_v^*), \quad (29)$$

$$bB(E_v, \nu_0 + \Delta\nu) = A(E_v^*, \nu_0 - \Delta\nu). \quad (30)$$

(29) sąlyga reikalauja, kad molekulių virpesinių lygmenų užpilda tiek pagrindinėje, tiek ir sužadintoje būsenose būtų lygi, t.y. molekulių virpesinių lygmenų struktūra pagrindinėje ir sužadintoje būsenose išliktų vienoda. Tai iliustruoja 3 pav., a, kuriame pavaizduotas molekulės harmoninio osciliatoriaus modelis (pagrindinėje ir sužadintoje elektroninėse būsenose virpesiniai poligmenys išsidėstę vienodai ir



3 pav. Elektroninių-virpesinių lygmenų ir šuolių tarp jų diagrama:

a) simetriniai liuminescencijos (L) ir sugerties (S) spektrai (harmoninio osciliatoriaus modelis); b) simetriniai liuminescencijos ir sugerties spektrai (harmoninio osciliatoriaus modelis); c) nesimetriniai liuminescencijos ir sugerties spektrai (anharmoninio osciliatoriaus modelis).

ekvidistanciškai). Šiuo atveju dažnių simetrija galios. Veidrodinio atspindžio simetrija galios ir anharmoninio osciliatoriaus atveju (3 pav., b), kai virpesiniai polygmenys išsidėstę neekvidistanciškai, bet jų išsidėstymas pagrindinėje ir sužadintoje būsenose vienodas. Jei pagrindinėje ir sužadintoje elektroninėse būsenose virpesinių polygmenių išsidėstymas nevienodas, tuomet sugerties ir fluorescencijos dažnių simetrija nebus stebima. Toks atvejis pavaizduotas 3 pav., c.

Dabar panagrinėkime (30) lygybę. ν_0 yra elektroninio šuolio dažnis. Tuomet $h\Delta\nu$ nusako virpesinės energijos pokytį elektroninio virpesinio šuolio metu. Konstanta b yra būdinga duotai medžiagai ir išlieka pastovi visų dažnių vertėms. Kitaip sakant, šuolių iš pagrindinės būsenos virpesinių polygmenių, kurių metu molekulės virpesinė energija pakinta dydžiu ΔE_v , tikimybės bus proporcingos šuolių iš sužadintos būsenos virpesinių polygmenių, kurių metu virpesinė energija pakinta tuo pačiu dydžiu, tikimybėms.

3.4. Fluorescencijos kvantinis našumas

Fluorescencija yra charakterizuojama jos energiniu arba kvantiniu našumu. Energinis našumas - išspinduliuotos E_{fl} ir sugertos E_s energijų santykis:

$$\varphi_{en} = \frac{E_{fl}}{E_s}. \quad (31)$$

Kvantinis našumas – per tą patį laiką išspinduliuotų N_{fl} ir sugertų N_s fotonų skaičių santykis:

$$\varphi_{kv} = \frac{N_{fl}}{N_s}. \quad (32)$$

Nesunku įsitikinti, kad

$$\varphi_{en} = \varphi_{kv} \frac{\nu_{fl}}{\nu_s}, \quad (33)$$

čia ν_{fl} ir ν_s – vidutinės fluorescencijos ir sugerties dažnių vertės. Kadangi $\nu_s > \nu_{fl}$, tai $\varphi_{en} < \varphi_{kv}$.

Pagal Lomelio dėsnį sužadintos molekulės fluorescuoja visomis kryptimis, todėl, matuojant energinį fluorescencijos našumą, reikia tiksliai išmatuoti sugertos ir į visą erdvę išspinduliuotos energijos srautų absoliutines vertes.

Apskaičiuoti fluorescencijos energinį ir kvantinį našumą pagal (31) – (33) formules, remiantis absoliutiniais sugertos ir išspinduliuotos energijos matavimais, yra sudėtinga. Dėl šios priežasties fluorescencijos kvantinis našumas praktikoje dažniausiai matuojamas palyginamuoju būdu. Jo esmę sudaro tai, kad vienodomis eksperimento sąlygomis yra išmatuojami etalono ir tiriamojo tirpalo fluorescencijos integraliniai intensyvumai:

$$\varphi_{kv} = const \cdot \varphi_{kv}^{et} \frac{\int F(\lambda) d\lambda \int c^{et} \varepsilon^{et}(\lambda) d\lambda}{\int F^{et}(\lambda) d\lambda \int c \varepsilon(\lambda) d\lambda}, \quad (34)$$

čia $F(\lambda)$ ir $F^{et}(\lambda)$ - tiriamojo bandinio ir etalono kvantinio intensyvumo funkcijos ($F(\lambda) = I_{fl}/h\nu_{fl}$), φ_{kv}^{et} – etalono fluorescencijos kvantinis našumas, $const$ – spektrų korekcijos koeficientas.

Lygmens S_1 užpildos mažėjimas yra sąlygotas kelių dezaktyvacijos vyksmų: fluorescencijos, vidinės ir interkombinacinės konversijų, todėl fluorescencijos kvantinį našumą galima užrašyti naudojant šių vyksmų spartos konstantas:

$$\varphi_{kv} = \frac{k_{fl}}{k_{fl} + k_V + k_{ST}} \quad (35)$$

Jeigu tirpale yra gesiklio (pvz., deguonies), tai fluorescencijos kvantinis našumas bus mažesnis:

$$\varphi_g = \frac{k_{fl}}{k_{fl} + k_V + k_{ST} + k_g[Q]} \quad (36)$$

Fluorescencijos kvantinių našumų be gesiklio ir esant gesikliui santykį aprašo Šterno (Stern) ir Volmerio (Vollmeer) formulė:

$$\frac{\varphi}{\varphi_g} = 1 + K[Q], \quad (37)$$

kur fluorescencijos gesinimo konstanta

$$K = \frac{k_g}{k_{fl} + k_V + k_{ST}} \quad (38)$$

Atliekant eksperimentą matuojamas fluorescencijos intensyvumas, todėl kvantinį našumą patogiau užrašyti naudojant intensyvumus:

$$\frac{I}{I_g} = \frac{k\varphi I_0}{k\varphi_g I_0} = \frac{\varphi}{\varphi_g} \quad (39)$$

4. Metodiniai paaiškinimai

Prieš pradėdant darbą būtina susipažinti su naudojamų prietaisų aprašais ir saugaus darbo taisyklėmis.

Laboratorinis darbas susideda iš dviejų dalių. Pradžioje užregistruojami tiriamų pavyzdžių (etaloninių dažiklių, biologinių pigmentų tirpalų) fluorescencijos ir sugerties spektrai.

Antroje darbo dalyje apdorojami gauti rezultatai: normuojami sugerties bei fluorescencijos spektrai ir palyginamuoju būdu apskaičiuojamas tiriamo pavyzdžio fluorescencijos kvantinis našumas. Rezultatams apdoroti siūlome naudotis programiniais paketais „Origin“ „Mathcad“ ir pan.

4.1. Sugerties spektrų registravimas

Paruošiami tiriamo dažiklio (porfirininės prigimties pigmento) ir etaloninio dažiklio (pvz., rodamino 6G) vandeniniai arba spiritiniai tirpalai. Dažiklių koncentracijos parenkamos tokios, kad 1 mm kiubetėje optinis tankis neviršytų 1,0 opt.t.vnt.

Tiriamąjį dažiklį ir etaloninį bandinį sugerties spektrų registravimui naudojamas Ocean Optics PC1000 spektrofotometras.

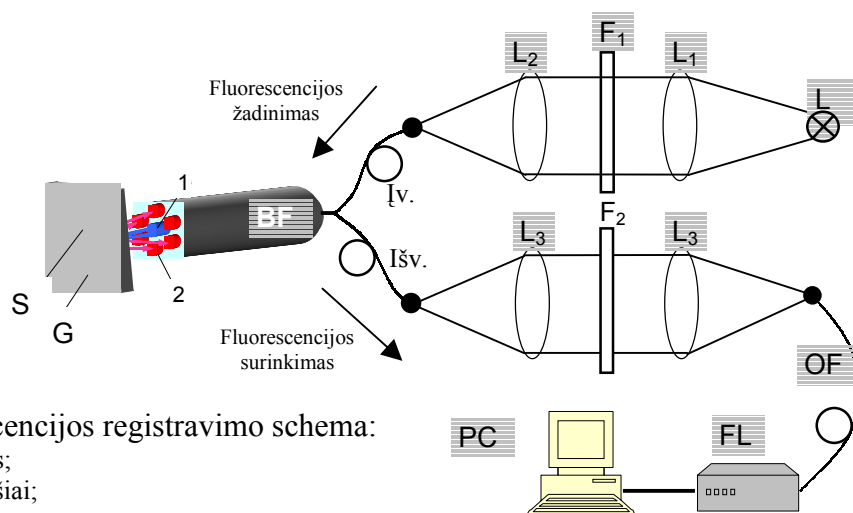
4.2 Fluorescencijos spektrų registravimas

Bandinių fluorescencija registruojama Ocean Optics S2000Fl spektrofotometru. Fluorescencijos registravimo schema pateikta 4 pav. Fluorescencijos žadinimui naudojamas 1.3 mW galios šviesos diodas (L), kurio emituojamos spinduliuotės maksimumas lokalizuotas ties 400nm. Lęšių sistema (L₁,

L₂) diodo emituojamą šviesos signalą fokusuoja į bifurkacinio šviesolaidžio įvadą. Bifurkacinį šviesolaidį sudaro du tarpusavyje sujungti šviesolaidžiai, o trečiame bifurkacinio šviesolaidžio gale (BF) atskirų šviesolaidžių optinės skaidulos sueina į vieną pluoštą. Eksperimente buvo naudojamas “saulutės” tipo šviesolaidis, kuriame viena šviesolaidžio gija yra centrinė (1), o kitos šešios – išsidėstę aplink ją ratu (2). Fluorescencijos surinkimui naudojamos apskritimu išdėstytos šviesolaidinės skaidulos (bifurkacinio šviesolaidžio išvade – ta pati skaidulų išdėstymo tvarka).

Siekiant atsiriboti nuo išsklaidytos žadinimo šviesos, tarp L₃ ir L₄ statomas filtras F₂, tuo tarpu žadinimo spektrinė sudėtis priklauso nuo filtro F₁ optinių charakteristikų.

Šviesa (per OF šviesolaidį) patekusi į spektrofotometro darbinį bloką (FL), sferinio veidrodžio yra kolimuojama į difrakcinę gardelę. Difraguosią šviesą antrasis sferinis veidrodis išskleidžia ant fotodiodinės liniuotės. Visas bandinio spektras gaunamas vienu laiku. Fotodiodai (su CCD pikseliais) iškrauna kondensatorius, proporcingai patenkančių fotonų srautui. Pasibaigus kaupinimui, spektro analoginis signalas paverčiamas skaitmeniniu, ir iš fluorimetro patenka į personalinį kompiuterį (PC). Monitoriuje matomas fluorescencijos spektras.



4 pav. Fluorescencijos registravimo schema:

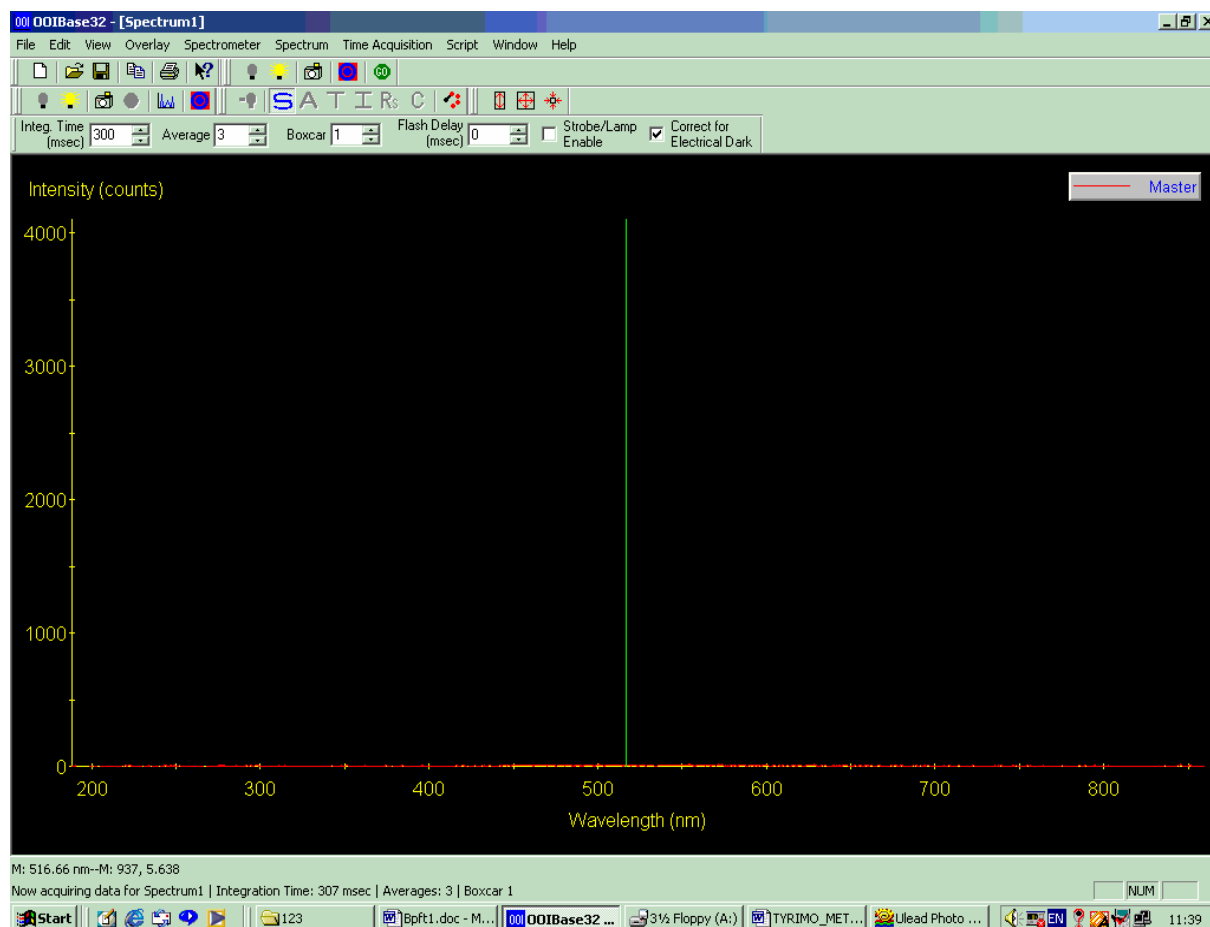
- L – šviesos diodas;
- L₁, L₂, L₃, L₄ – lęšiai;
- F – optiniai filtrai;
- OF – šviesolaidis;
- FL – spektrofotometras (Ocean Optics S2000Fl);
- PC – kompiuteris
- BF – bifurkacinio šviesolaidžio antgalis:
 - 1) skaidula bandinio žadinimui;
 - 2) apskritimu išdėstytos skaidulos bandinio fluorescencijos surinkimui;
- G – stiklas, (arba kiuvetė);
- B – bandinys.

Laboratorinio darbo metu naudojama fluorescencijos spektrų registravimo programa “OOIBase32”. Jos darbo langas pavaizduotas 5 pav.



Prieš pradėdant fluorescencijos matavimą, įjungiamas šviesos diodas. Norint įsitikinti, ar registruojamas fluorescencijos spektras, bifurkacinio šviesolaidžio galas priglaudžiamas pvz., statmenai prie popieriaus. Kompiuterio ekrane turėtų matytis popieriaus fluorescencijos spektras (intensyvi spektrinė juosta 400 – 500 nm srityje).

Prieš atliekant etaloninių dažiklių, biologinių pigmentų tirpalų fluorescencijos matavimus pasirenkamas integravimo laikas “Integ. Time” (nuo jūsų pasirinkimo priklausys registruojamų fluorescencijos juostų intensyvumas).


Pastaba: pasirinkę per mažą integravimo laiką, fluorescencijos spektro galite ir neiškirti iš triukšmų fono. Kiekvienam bandiniui integravimo laikas gali būti skirtingas, pvz. tai priklausys nuo bandinio koncentracijos, fluorescencijos kvantinio našumo. Rekomenduojamas integravimo laikas – apie 3000 ms.





5 pav. OOIBase32 programos darbo langas.

Intensyvumo skalė pasirenkama atitinkamai pagal spektro pikų aukštį. Tai galima padaryti paspaudus “Set scale”  klavišą įrankių paletėje. Norint atsiriboti nuo prietaiso vidinių trikdžių, o taip pat nuo trikdžių atsirandančių dėl pašalinės šviesos, reikia užregistruoti tamsinį spektrą. Tuo tikslu išjungžiama šviesa bei diodas. Tamsinis spektras užregistruojamas komanda “Store dark”. Įrankių paletėje šią komandą atitinka  klavišas.

Pastaba: integravimo laikas, spektrų vidurkinimo parametrai kurie buvo nustatyti tamsinio spektro registravimo metu, negali būti keičiami eksperimento eigoje. Jei vis dėlto nusprendėte padidinti ar sumažinti kurį nors iš parametru, tamsinis spektras (pakeitus parametrus) turi būti užregistruojamas iš naujo, ir tolimesni tyrimai atliekami esant naujiems nustatymams. Intensyvumo bei bangos ilgio skalė eksperimento metu gali būti keičiama tamsinio spektro papildomai neregistruojant.

Tamsinis spektras turi būti atimamas iš registruojamo spektro. Tai atliekama komanda “Substract dark spectrum”. Įrankių paletėje tai atitinka  klavišas. Po šios operacijos ekrane turėtų matytis „švaresnis“ (su mažiau trikdžių) signalas.

Prieš registruojant tiriamųjų dažiklių fluorescenciją, bifurkacinio šviesolaidžio antgalis yra įtvirtinamas į laikiklį. Kiuvetė su tiriamuoju tirpalu priglaudžiama prie antgalio. Kaip ir matuojant popieriaus fluorescencijos spektrą, antgalis turi būti statmenas kiuvetės sienelei.

Spektras registruojamas komanda „Snapshot“. Įrankių paletėje tai atitinka  klavišas. Užregistruotas spektras įrašomas į pasirinktą aplanką atliekant „File“ – „Save“ – „Processed“ komandų seką. Įrašius spektrą, klavišas „Snapshot“  atspaudžiamas ir prie šviesolaidžio galo priglaudžiama kiuvetė su kitu tiriamuoju dažikliu.

Pastaba: visi matavimai atliekami tamsoje. Stovas, kuriame įtvirtintas šviesolaidis, statomas taip, kad kuo mažiau patektų diodo bei nuo monitoriaus sklindanti šviesa.

4.3 Pagrindinių fluorescencijos dėsningumų patikrinimas

1. Pagal turimus duomenis apskaičiuojama fluorescencijos fotonų srauto kvantinio intensyvumo funkcija $I_{fl}/h\nu_{fl}$.

2. Nubraižomi ištirtų bandinių sugerties $D=f(\nu)$ bei fluorescencijos $F(\nu)=I_{fl}/h\nu_{fl}$ spektrai. Po to spektrai sunormuojami į tą pačią vertę ties fluorescencijos ir ją atitinkančios sugerties juostos intensyvumo maksimumu.

3. Pagal spektrinių juostų susikirtimo tašką nustatomas grynai elektroninio šuolio dažnis ν_0 .

4. Vienodoms sunormuotų į maksimumus sugerties ir fluorescencijos spektrų intensyvumų vertėms apskaičiuojama ir nubraižoma funkcija $f(\nu_s)=\nu_s-\nu_{fl}$. Įvertinamas gautos tiesės kampinis koeficientas.

4.4 Fluorescencijos kvantinio našumo nustatymas

Norint palyginamuoju būdu apskaičiuoti pigmentų kvantinį našumą reikia vienodomis sąlygomis užregistruoti etaloninio dažiklio ir tiriamo pigmento tirpalų sugerties ir fluorescencijos spektrus. Pageidautina, kad fluorescencijos spektrai būtų registruojami naudojant ploną kiuvetę.

Kaip jau minėjome, pigmento fluorescencijos kvantinis našumas išreiškiamas (32) formule. Jei bandiniai yra žadinami monochromatiniu šviesos šaltiniu (šaltinio spektrinės linijos pusplotis $\Delta\nu_z$ yra žymiai mažesnis už pigmento sugerties juostos pusplotį $\Delta\nu$, t.y. $\Delta\nu_z \ll \Delta\nu$), tai nuostovaus žadinimo sąlygomis sugertų fotonų skaičius, tenkantis vienam ploto vienetui per laiko vienetą, bus lygus

$$N_s = \frac{(I_0 - I)}{h\nu_z} = \frac{I_0(1 - T)}{h\nu_z}, \quad (41)$$

čia I_0 ir I – krintančio į bandinį ir praėjusio pro jį žadinančios šviesos pluoštelių intensyvumai, T – bandinio pralaidumas žadinančiai šviesai.

Bandinio molekules, sugėrusios N_s fotonų, išspinduliuos N_{fl} fotonų visomis sferos kryptimis vienodai (Lomelio dėsnis). Todėl, registruodami fluorescencijos signalą tam tikra pastovia kampine apertūra, galime užrašyti

$$N_{fl} = a \int \frac{I_{fl}(\nu) d\nu}{h\nu_{fl}}, \quad (42)$$

čia a yra proporcingumo koeficientas, $I_{fl}(\nu)$ – spektrinis fluorescencijos intensyvumas. Tuomet bandinio fluorescencijos kvantinį našumą galima išreikšti taip:

$$\varphi = a \frac{\int \frac{I_{fl}(v)dv}{h\nu_{fl}}}{I_0(1-T)}. \quad (43)$$

Proporcingumo koeficientą a galime apskaičiuoti, jei paimsime etaloninio dažiklio tirpalą, kurio kvantinis našumas φ^{et} yra žinomas, ir tomis pačiomis sąlygomis užregistruosime jo fluorescencijos spektrą. Iš (43) formulės etaloninio dažiklio atveju apskaičiuojamas proporcingumo koeficientas:

$$a = \varphi^{et} \frac{I_0(1-T^{et})}{\int \frac{I_{fl}^{et}(v)}{h\nu_{fl}^{et}} dv}, \quad (44)$$

čia T^{et} - etaloninio dažiklio tirpalo pralaidumas, $I_{fl}^{et}(v)$ – etaloninio dažiklio tirpalo fluorescencijos spektrinis intensyvumas. Tada tiriamo pigmento fluorescencijos kvantinio našumo išraišką galima užrašyti taip:

$$\varphi = \varphi^{et} \frac{(1-T^{et}) \int \frac{I_{fl}(v)}{h\nu_{fl}} dv}{(1-T) \int \frac{I_{fl}^{et}(v)}{h\nu_{fl}^{et}} dv}. \quad (45)$$

Kaip seka iš (45) lygties tiriamo pigmento kvantiniam našumui apskaičiuoti reikia:

- 1) apskaičiuoti tiriamo pigmento fluorescencijos kvantinio intensyvumo funkcijos $I_{fl}(v)/h\nu_{fl}$ plotą;
- 2) apskaičiuoti etaloninio dažiklio fluorescencijos kvantinio intensyvumo funkcijos $I_{fl}^{et}(v)/h\nu_{fl}^{et}$ plotą;
- 3) išmatuoti tiriamo pigmento pralaidumą T žadinančios šviesos bangos ilgiui;
- 4) išmatuoti etaloninio dažiklio pralaidumą T^{et} žadinančios šviesos bangos ilgiui.

5. Kontroliniai klausimai

1. Absoliučiai juodo kūno spinduliavimo dėsniai. Planko formulė.
2. Kokia yra skaistinės temperatūros fizikinė prasmė?
3. Fluorescencija, jos pagrindiniai dėsningumai.
4. Fluorescencijos registravimo būdai. Fluorimetrai.

6. Literatūra

1. Л.В.Лёвшин, А.М.Салецкий. Люминесценция и её измерения. М., МУ, 1989.
2. J.R. Lakowicz, "Principles of fluorescence spectroscopy" Kluwer Academic/Plenum Publishers, Second Edition (1998).
3. А.Н.Теренин. Фотоника молекул красителей и родственных органических соединений. Л., Наука, 1967.