

# Раздел 2. Экспериментальные методы фотохимии

## **Тема 2.3. Спектроскопические методы.**

1. Абсорбционная спектроскопия.
2. Фотоэлектронная спектроскопия.
3. Люминесценция. Флуоресцентные метки и зонды.
4. Хемилюминесценция и биолюминесценция.
5. Фотометрические детекторы для ВЭЖХ.

## **Тема 2.4. Импульсные методы исследования.**

1. Флеш-фотолиз. Типы установок импульсного фотолиза (кинетическая и спектрографическая).
2. Ламповый и лазерный импульсный фотолиз.
3. Фемтосекундная спектроскопия (pump-probe spectroscopy).
4. Применение импульсного фотолиза для изучения промежуточных продуктов

# Спектроскопия

– физический метод исследования закономерностей взаимодействия электромагнитного излучения (света) с химическим веществом. Такие взаимодействия могут сопровождаться поглощением, излучением или рассеянием электромагнитного излучения.

## Виды спектроскопии

### 1. Атомная спектроскопия (изучает энергетические переходы между электронными орбиталями атомов)

- Атомно-абсорбционная спектроскопия
- Атомно-эмиссионная спектроскопия
- Атомная флуоресценция

### 2. Молекулярная спектроскопия (изучает энергетические переходы между электронными, колебательными, вращательными уровнями энергии молекул)

- Фотоэлектронная спектроскопия
- Оптическая спектроскопия в видимом диапазоне длин волн
- Инфракрасная спектроскопия
- Ультрафиолетовая спектроскопия
- Рентгеновская спектроскопия
- Микроволновая спектроскопия
- Масс-спектрометрия
- Спектроскопия комбинационного рассеяния света
- Ядерный магнитный резонанс
- Электронный парамагнитный резонанс

# Абсорбционная спектроскопия

## 1. Атомно-абсорбционный анализ

Метод основан на просвечивании атомизированных паров исследуемой пробы монохроматическим светом с длиной волны, соответствующей резонансной линии поглощения определяемого элемента.

Анализируемую пробу в виде раствора распыляют в пламя. Атомно-абсорбционный анализ позволяет определить 67 химических элементов.

## 2. Молекулярный абсорбционный анализ - анализ поглощения света молекулами анализируемого вещества в ультрафиолетовой, видимой и инфракрасной областях спектра

Фотоэлектродиметры (ФЭКи) – приборы с двумя фотоэлементами, включенными по принципу противотока. Служат для измерения коэффициента пропускания или оптической плотности растворов. Видимая, УФ, ИК области.

Спектрофотометры – приборы с одним фотоэлементом. Имеют монохроматизаторы, что обеспечивает расширение в УФ и ИК-области спектра и достаточную точность измерений.

## 3. Анализ поглощения и рассеяния световой энергии взвешенными частицами анализируемого вещества (турбидиметрия, нефелометрия, рефрактометрия)

# Молекулярный абсорбционный анализ

**Спектр поглощения** - зависимость величины, характеризующей поглощательную способность вещества (оптической плотности  $D$ , коэффициента экстинкции  $\epsilon$ ) от длины волны  $\lambda$  (частоты  $\nu$ , энергии кванта  $E$ ) **падающего** излучения.

Оптическая плотность  
(Optical Density):

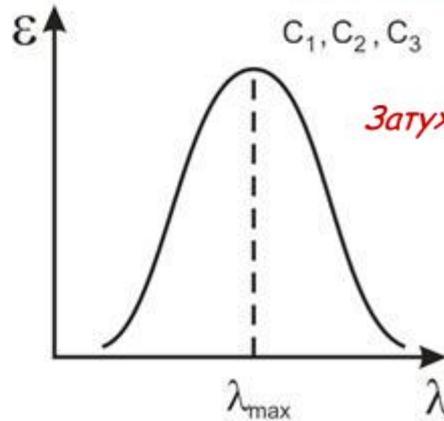
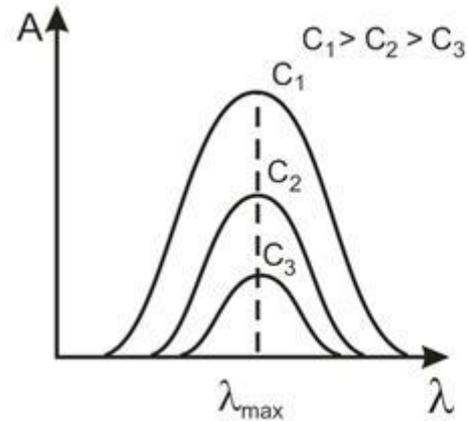
$$D = \log_{10} (I_0 / I) = -\log_{10} (T)$$

Затухание (Absorbance):

$$A = \ln (I_0 / I) = -\ln (T)$$

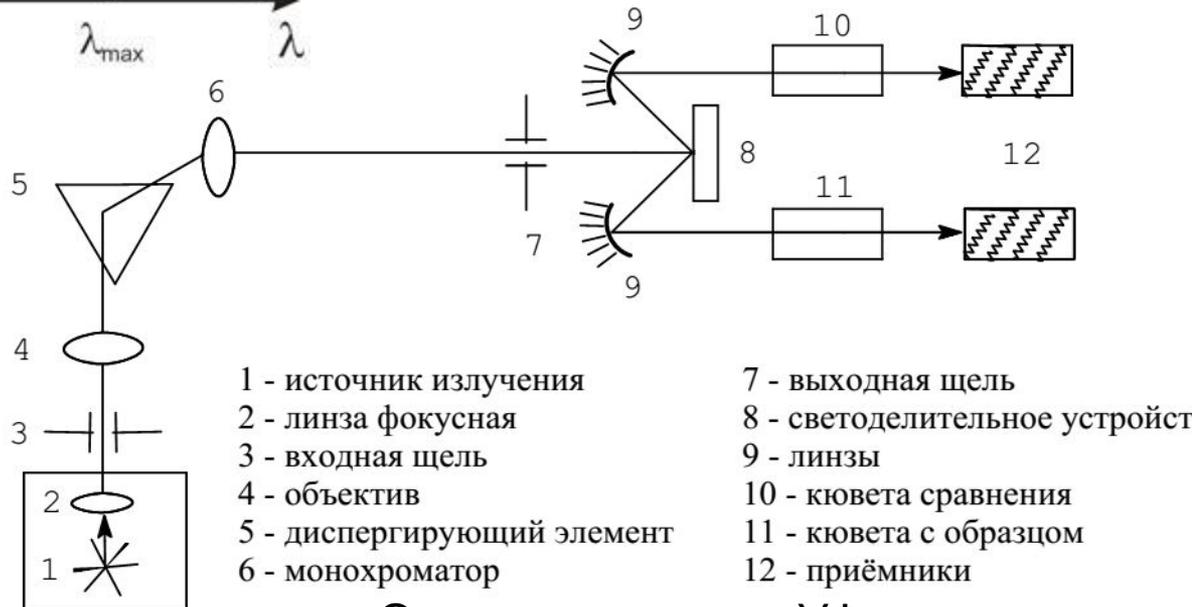
Пропускание (Transmittance):

$$T = I / I_0$$



$$A = \epsilon c l$$

Нижняя граница определяемых концентрация: 0,1-1,0 мкг/мл  
Относительная погрешность: 2-5%

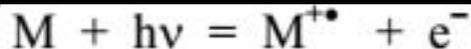


Оптическая схема УФ-спектрометра

# Фотоэлектронная спектроскопия

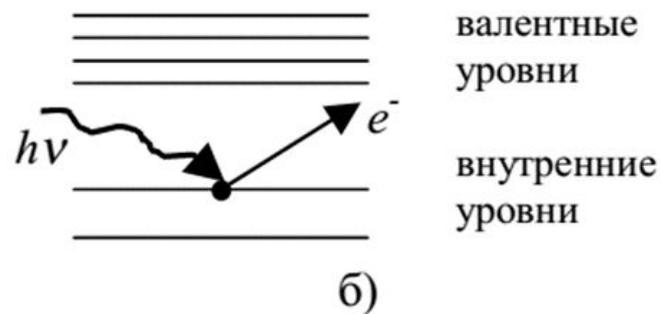
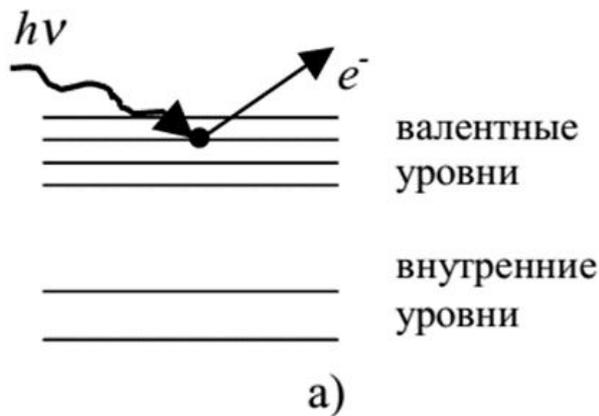
- является ионизационным методом и основана на фотоэлектронном эффекте.

В эксперименте пары вещества, находящиеся в глубоком вакууме, облучаются монохроматическим излучением высокой энергии, которое способно вызвать фотоионизацию отдельных молекул.



Энергия фотонов расходуется на отрыв электрона (эта часть энергии определяет потенциал ионизации  $I_i$  и  $E_{i\text{кин}}$ ):

$$h\nu = I_i + E_{i\text{кин}} \text{ (уравнение баланса)}$$



а) – **УЭС (UPS)** – спектроскопия ультрафиолетовых фотоэлектронов, служит для испускания фотоэлектронов из валентной оболочки или молекулярных орбиталей. (1,7 – 100 эВ или  $\sim 10 - 730$  нм)

б) – **РЭС (XPS)** – спектроскопия рентгеновских фотоэлектронов, может выбивать  $e^{-}$  либо из внутр. оболочки, либо из валентной оболочки.

Исследуемые электроны испускаются верхним слоем исследуемого материала толщиной 1-10 нм, в сверхвысоком вакууме.

# Определение и классификация люминесценции

Определение Вавилова: люминесценция – это свечение, избыточное над тепловым (при заданной температуре и длине волны) и характеризующееся длительностью, превышающей период световых колебаний

Классификация люминесценции:

1) по длительности свечения:

Флуоресценция  $\tau < 10^{-5}$  с ( $10^{-9}$ – $10^{-6}$ с)

Фосфоресценция  $\tau > 10^{-5}$  ( $10^{-3}$ –10с);

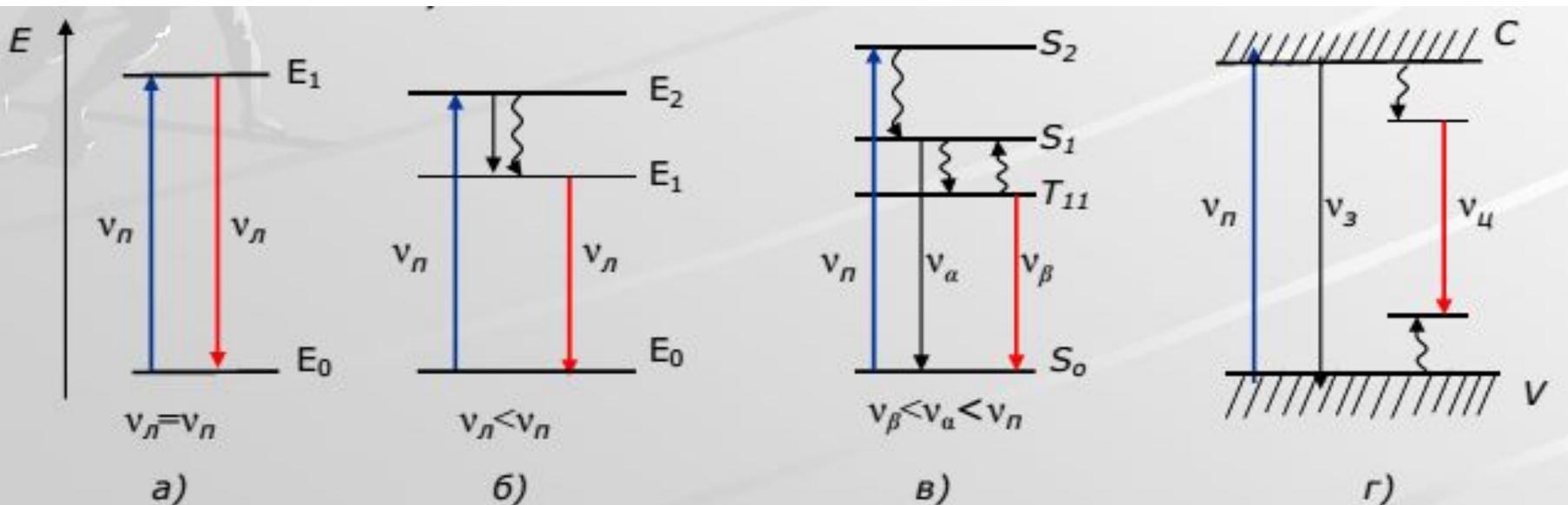
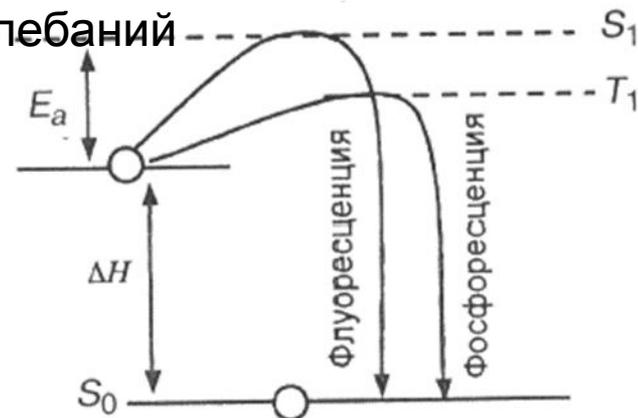
2) по механизму возникновения люминесценции:

а) Резонансная

б) Спонтанная

в) Метастабильная

г) Рекомбинационная



# Люминесценция

## 3) по способу возбуждения:

- Фотолюминесценция — свечение под действием света (видимого и УФ-диапазона).
- Хемилюминесценция — свечение, использующее энергию химических реакций;
- Катодолюминесценция — вызвана облучением быстрыми электронами (катодными лучами);
- Сонолюминесценция — люминесценция, вызванная звуком высокой частоты;
- Радиолюминесценция — при возбуждении вещества ионизирующим излучением;
- Триболлюминесценция — люминесценция, возникающая при растирании, раздавливании или раскалывании люминофоров. Триболлюминесценция вызывается электрическими разрядами, происходящими между образовавшимися наэлектризованными частями — свет разряда вызывает фотолюминесценцию люминофора.
- Биолюминесценция — способность живых организмов светиться, достигаемая самостоятельно или с помощью симбионтов.
- Электролюминесценция — возникает при пропускании электрического тока через определённые типы люминофоров.
- Термолюминесценция — люминесцентное свечение, возникающее в

# Спектрофлуориметрия

$$\Phi = \frac{N_{em}}{N_{abs}}$$

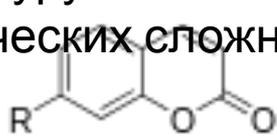
**Флуориметры** – это приборы, предназначенные для изучения концентраций вещества посредством измерений интенсивности флуоресценции при его облучении. Флуориметрический метод отличается высокой чувствительностью и позволяет изучать:

- возбужденные состояния молекул,
- фотохимические реакции,
- динамику молекулярных быстрых процессов,
- структуру и свойства биологических и химических сложных объектов.

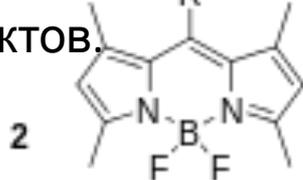
## 1. Малые органические флуорофоры:

борфторидные комплексы

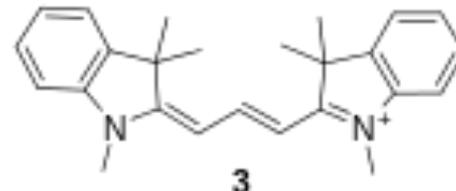
дипирролилметена (BODIPY)



кумарин 1

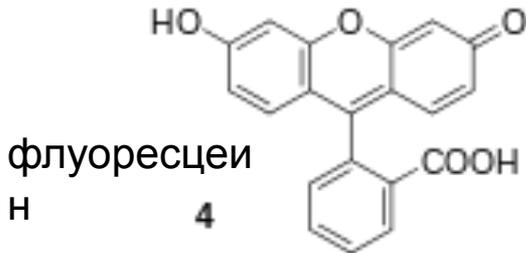


2



3

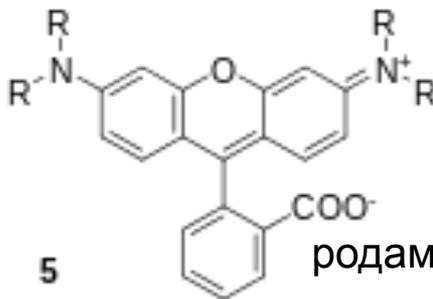
цианиновые красители



флуоресцеин

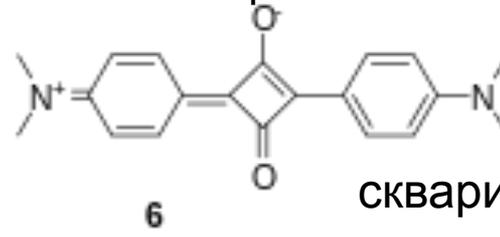
Н

4



5

родамин



6

сквариин

Н

**2. Полупроводниковые нанокристаллы, или квантовые точки** - при уменьшении физических размеров частиц полупроводника до нанометровых они начинают проявлять свойства, отличные от объёмных полупроводников

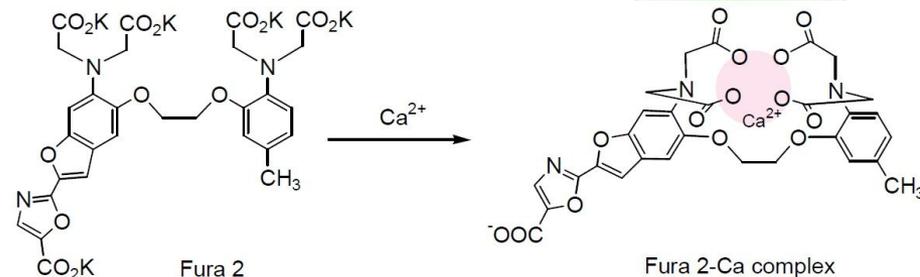
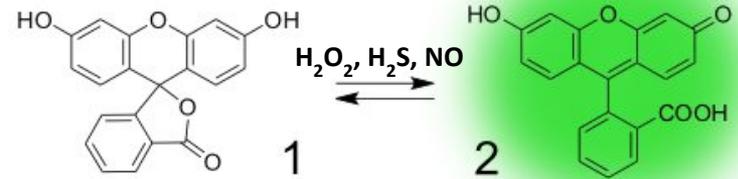
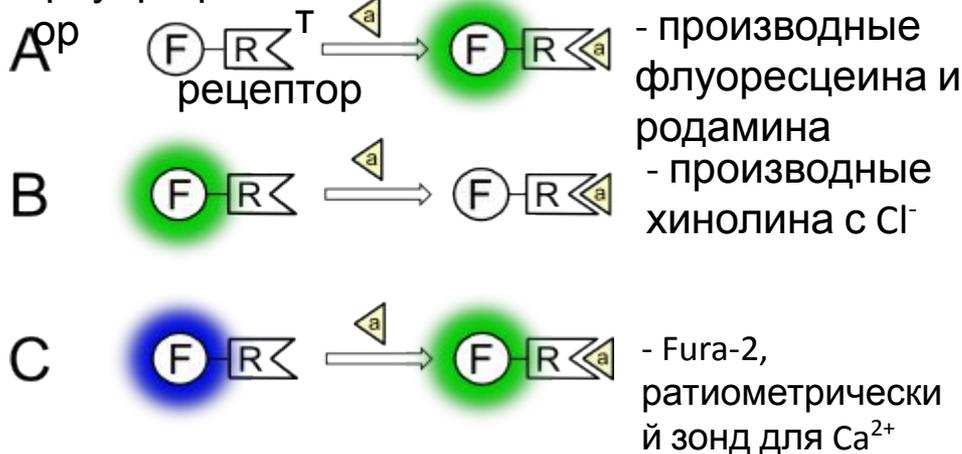
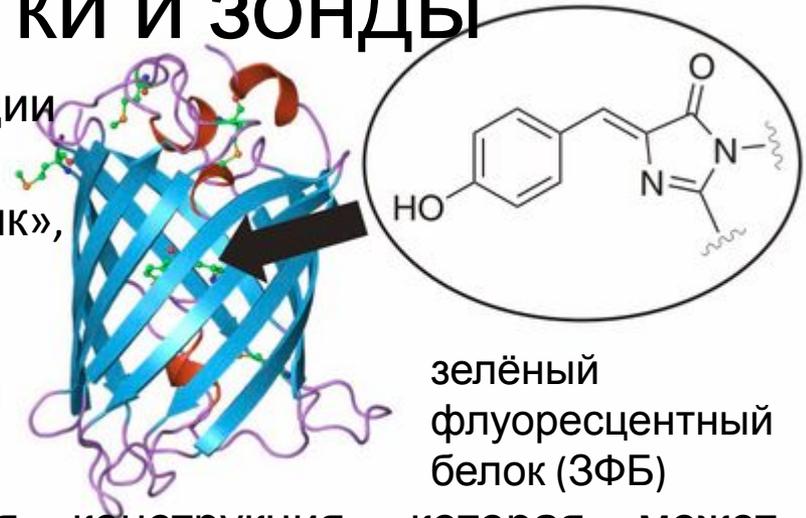
CdSe 13→24нм:  $\lambda_{em} = 500 \rightarrow 610\text{нм}$

# Флуоресцентные метки и зонды

**Флуоресцентные метки** – для идентификации наличия или пространственного положения исследуемой молекулы - как пассивный «маяк», который сигнализирует о месте нахождения молекулы, к которой привязана.

**Флуоресцентные белки** - мечение зелёным флуоресцентным белком

**Флуоресцентный зонд** - молекулярная конструкция, которая может существовать в двух состояниях: «выключенном» и «включённом», т.е. изменяет один из параметров флуоресценции (интенсивность, время жизни, максимум спектра флуоресценции), когда связывается со своей мишенью; удобный инструмент для визуализации и квантификации распределения химических веществ (сигнальных молекул в клетках)



# Хемилюминесценция

- люминесценция (свечение) тел, вызванная химическим воздействием (например, свечение фосфора при медленном окислении), или при протекании химической реакции (например, каталитические реакции некоторых эфиров щавелевой кислоты с пероксидом водорода в присутствии люминофора).

Исходные реагенты  $\rightarrow M$ . Элементарный акт возбуждения  $M \rightarrow P + P^*$ .

Испускание кванта света  $P^* \rightarrow P + h\nu$ .

## Эмпирические законы хемилюминесценции:

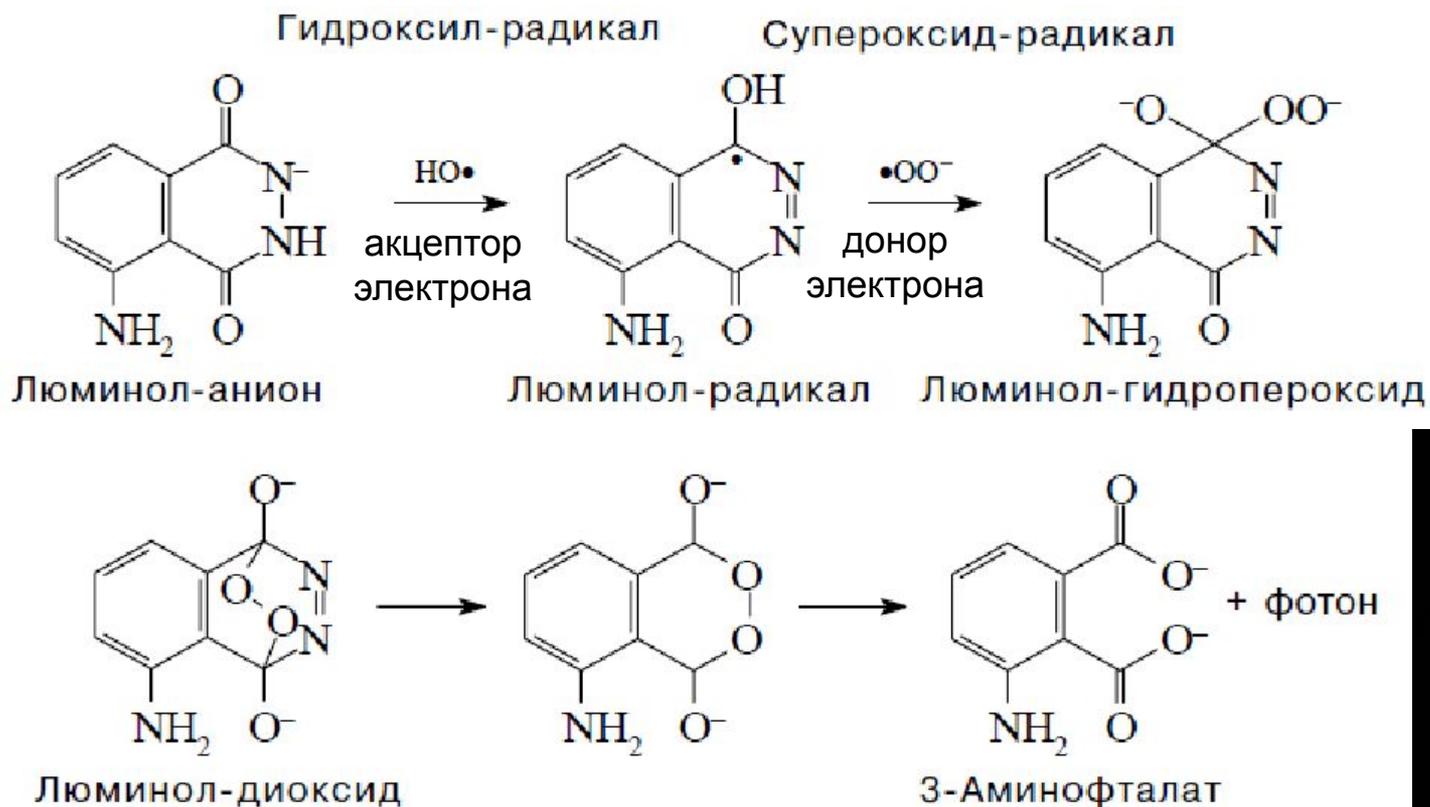
1. Как правило, спектр хемилюминесценции является аналогом спектра фосфоресценции, а не спектра флуоресценции.
2. Величина квантового выхода в хемилюминесцентных реакциях обычно очень мала (из триплетного  $n, \pi^*$ -состояния для карбонильных соединений  $\Phi \leq 10^{-4} - 10^{-5}$ )  $\rightarrow$  используют **метод сенсбилизации свечения** - активированная (непрямая) хемилюминесценция:  $A + A^* \rightarrow A + A^*$

Применение измерения собственной хемилюминесценции:

- 1) изучение кинетики и механизма цепных реакций пероксидного окисления липидов  
$$2 ROO \cdot + 2 {}^1O_2 \rightarrow 2 ROH + 2 RO \cdot + 2 {}^1O_2 \rightarrow 2 O_2 + h\nu (634-703 \text{ nm})$$
(вспышка хемилюминесценции при добавлении ионов  $Fe^{2+}$ );
- 2) люминесценция фагоцитов (образование АФК в клетках, активир-я люминолом)
- 3) определение антиоксидантной активности химических веществ (лекарств) и биологических жидкостей (плазмы крови);
- 4) клинические лабораторные исследования.

# Хемилюминесценция люминола

Схема реакций люминола в присутствии активных форм кислорода (АФК) - смеси супероксидных, пероксидных и гидроксильных радикалов



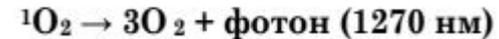
# Биолюминесценция

- свечение живых организмов

1. Митогенетические лучи Гурвича – слабое ультрафиолетовое излучение клеток, которое индуцирует деление окружающих клеток.
2. Сверхслабое свечение Вавилова (собственная хемилюминесценция клеток и тканей)

практически всегда сопровождает процессы жиз  $\text{ClO}^- + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Cl}^- + \text{H}_2\text{O} + {}^1\text{O}_2$

- Реакции активных форм кислорода
- Реакции перекисного окисления липидов
- Реакции с участием окиси азота



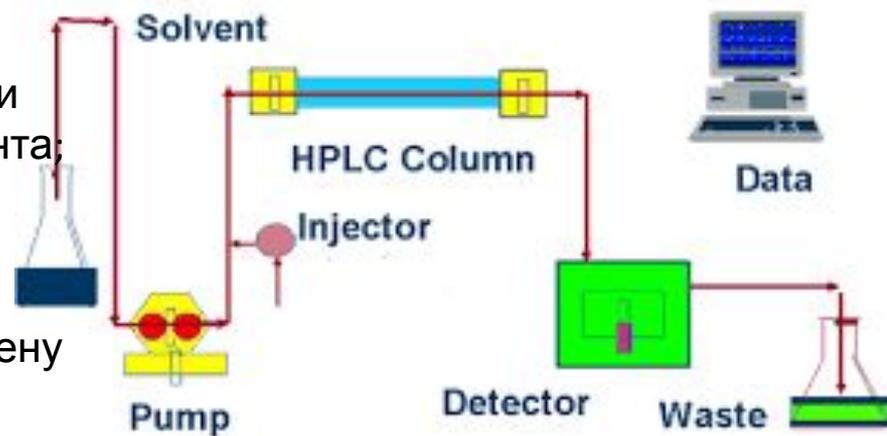
3. Активированная биохемилюминесценция (химические и биохимические активаторы биохемилюминесценции, физические факторы)

- Люминесцентные бактерии - кишечные бактерии у многих морских видов, паразиты у ракообразных, как сапрофиты – на останках животных.
- Динофлагеллаты – одноклеточные водоросли (фосфоресценция океана). Свет исходит из органелл (сцинтиллонов), которые начинают светиться при изменении pH.
- Ракообразные.
- Кишечнополостные.
- Светляки (свечение запускается нервным импульсом, при распаде циклического пероксида, синтез которого требует АТФ, люциферина и кислорода).

# Фотометрические детекторы для ВЭЖХ

## Жидкостная хроматография:

- ситовая - разница в растворимости молекул при их прохождении (фильтрации) через слой сорбента;
- адсорбционная - разница в адсорбируемости молекул, проходящих через слой сорбента, покрытых неподвижной фазой;
- в ионообменной - разница в способности к обмену ионами с ионообменниками;



В зависимости от природы подвижной (ПФ) и неподвижной (НПФ) фазы различают:

- **нормально-фазовую** - полярная НПФ (силикагель), ПФ – неполярная
- **обращенно-фазовую** - неполярная НПФ (C8, C18), полярная ПФ.

Type	Abbreviation	
Ultra Violet/Visible	UV/VIS	позволяет анализировать как примеси, так и основные компоненты на одной хроматограмме
Photo Diode Array	PDA	«матрица» фотодиодов (более 200) постоянно регистрирует поглощение электромагнитного излучения в режиме сканирования
Fluorescence	FL	обладают очень высокой чувствительностью (10 -1000 выше, чем UV detector) и селективностью
Evaporative Light Scattering	ELS	детектор по светорассеянию испарённого образца
Refractive Index	RI	дифференциальное измерение показателя преломления чистого растворителя и раствора анализируемого вещества в растворителе

# Тема 2.4. Импульсные методы исследования.

## Импульсный фотолиз (flash photolysis)

-метод исследования быстрых химических реакций и их короткоживущих продуктов (время жизни от 1 с до  $10^{-12}$  с)

*Метод разработан в 1949 году М. Эйгеном, Р. Норришем и Дж. Портером, удостоенными Нобелевской премии по химии в 1967 году за это открытие.*

Основан на создании за короткий промежуток времени в реакционной системе неравновесных условий (высокую концентрацию интермедиата) с помощью импульса света.

Для получения достоверных результатов необходимо соблюдать следующие

**условия:**

- Время жизни наблюдаемой частицы должно быть много больше длительности вспышки света.
- Растворитель должен быть прозрачен в области длин волн, где поглощает наблюдаемая частица. Должна быть известна схема реакций, в которые вступает

частица в условиях эксперимента

Различают две разновидности флеш-фотолиза:

**кинетическую фотометрию**

(спектр поглощения интермедиата записывается на определённой длине волны непрерывно и в виде функции  $A=f(t)$ )

**импульсную спектроскопию**

(спектр записывается в момент времени, которому соответствует некоторое определённое время задержки после импульса возбуждающего света)

# Принципиальная схема установки лампового импульсного фотолиза

## Ламповый импульсный фотолиз

Источник возбуждающего света:

**Импульсные лампы** - время вспышки

$ms - \mu s$ , энергия излучения до  $10^3$  Дж

- *трубчатые импульсные ксеноновые лампы* (сплошной спектр излучения, низкий потенциал ионизации, химически инертен)

- *ксеноново-ртутные лампы (UV-VIS); лампы накаливания (VIS)* (с увеличением энергии разряда максимум излучения смещается в УФ область)

Источник зондирующего света:

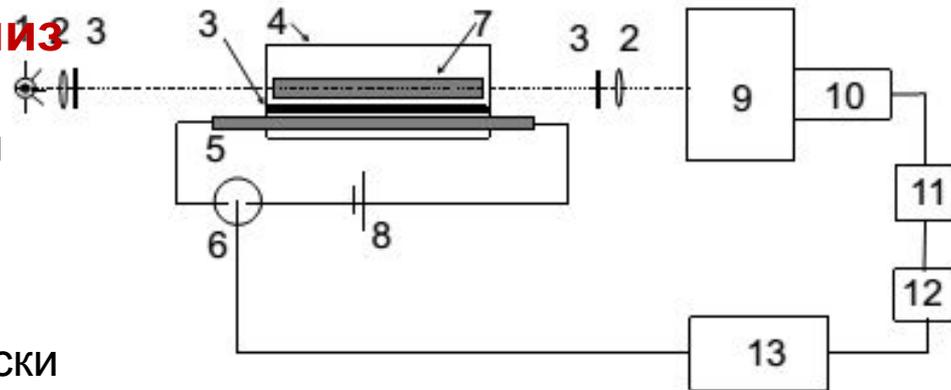
лампы с широким спектром излучения

- ксеноновые газоразрядные лампы

- ксеноново-ртутные лампы (UV-VIS)

- лампы накаливания (VIS); - лампы накаливания с добавками галогенов (VIS-UVA)

Для регистрации интермедиатов вместе с возбуждающим пучком (pump beam) через кювету пропускают зондирующий пучок (probe beam), по поглощению которого и исследуются промежуточные вещества (спектрофотометрические и спектрографические методы регистрации), в том числе ЭПР, ИК-, КР-спектроскопия, масс-спектрометрия, электронная микроскопия и др.



Принципиальная схема установки лампового импульсного фотолиза:

1 - спектроскопическая лампа, 2 - линза,

3 - фильтр, 4 - кюветное отделение,

5 - фотолитическая лампа, 6 - управляемый

разрядник, 7 – кювета с образцом, 8 –

высоковольтный конденсатор, 9 - монохроматор, 10

– фотоумножитель (ФЭУ), 11 - усилитель, 12 -

(АЦП), 13 - компьютер.

# Принципиальная схема установки лазерного импульсного фотолиза

## Наносекундный импульсный фотолиз

Источник возбуждающего света:

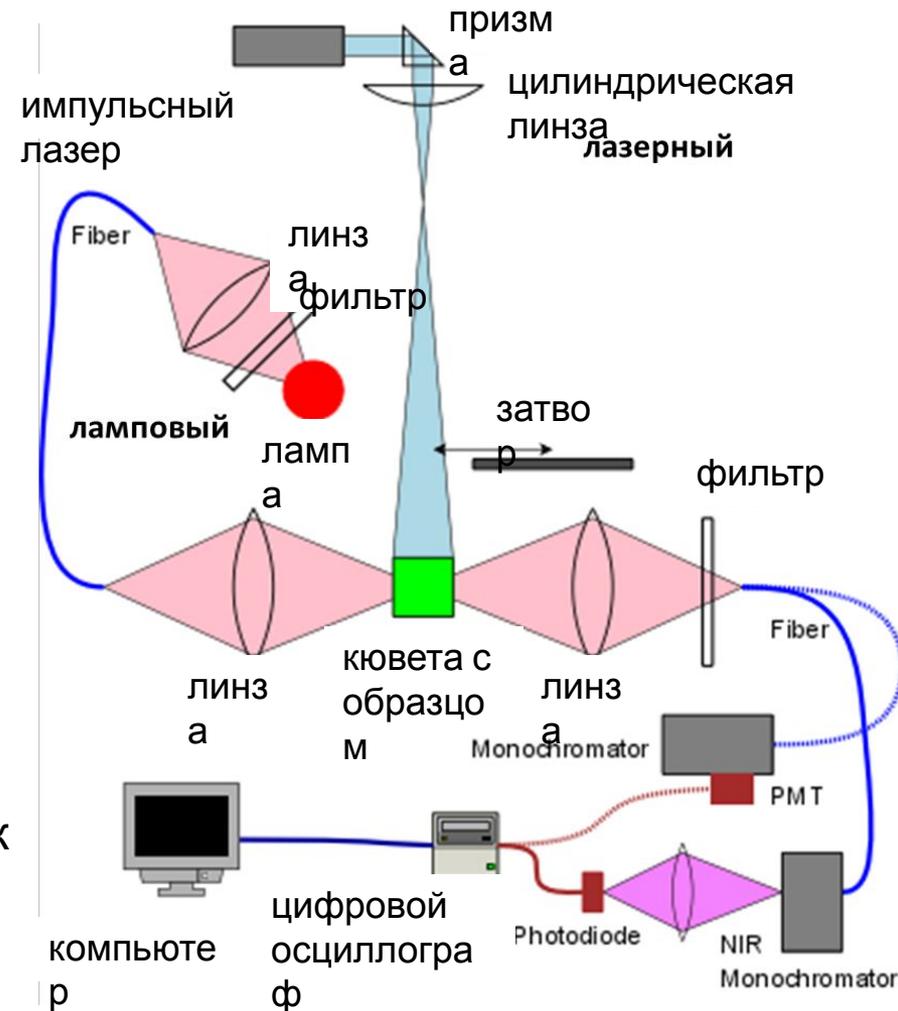
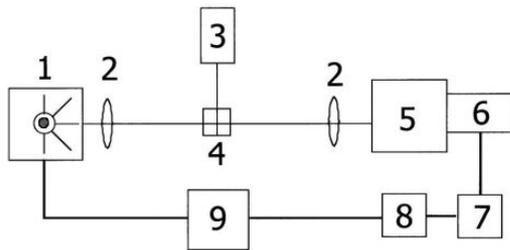
Импульсные лазеры - время вспышки

1-10 ns

- лазер Nd:YAG, 1064 нм. Усилители (нелинейная оптика) позволяют получать импульсы 2-ой (532 нм), 3-ей (355 нм) и 4-ой (266 нм) гармоник, 10-15 нс, 20-100 мДж.
- азотный лазер, 7 нс, 337 нм
- лазеры на красителях с накачкой от неодимового лазера, 1 - 2 нс, 1-10 мДж
- эксимерные лазеры, 7-15 нс, 10-100 мДж

Источник зондирующего света:

ксеноновые лампы с дополнительным импульсом



Принципиальная схема установки лазерного импульсного фотолиза. 1 – зондирующая лампа, 2 – линза, 3 – лазер, 4 – кювета с образцом, 5 – монохроматор, 6 – фотоумножитель, 7 – усилитель, 8 – АЦП, 9 – компьютер

# Фемтосекундная спектроскопия (pump-probe spectroscopy)

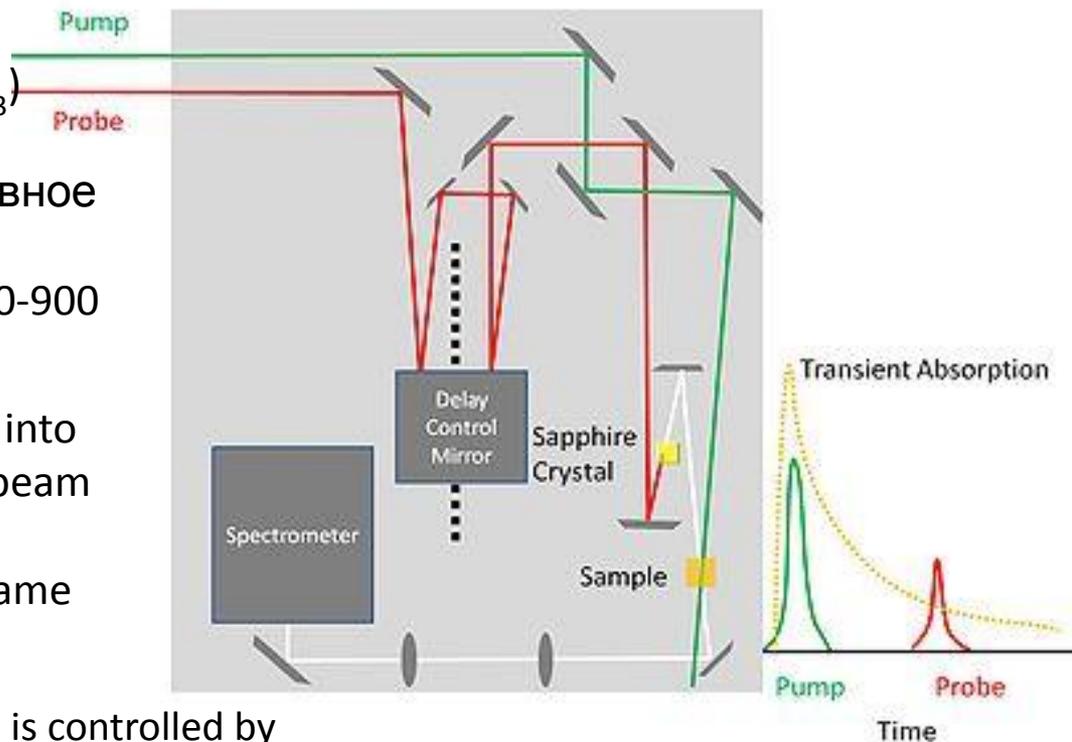
Метод, называемый **pump-probe spectroscopy**, используется для достижения пико- и фемтосекундного разрешения. Создание пикосекундных лазеров (1965г) стало возможным благодаря режиму синхронизации мод – явление, используемое в лазерах для получения коротких импульсов излучения с большой амплитудой, (несколько мод излучения могут складываться и образовывать импульсы очень малой длительности и большой

## Титансапфировый лазер

Ион  $Ti^{3+}$  в сапфировой решетке ( $Al_2O_3$ ) имеет широкую полосу поглощения 514-532нм, где происходит эффективное поглощение излучения накачки, и широкую полосу люминесценции 750-900

нм.  
The monochromatic pump laser (фотолизирующий) pushes the sample into the excited state. After a short delay the beam from broad spectrum probe laser (зондирующий) is passed through the same to measure absorption.

The delay between the pump and the probe is controlled by changing the length of the optical path with moveable mirror.



Layout of pump probe spectrograph

# Применение импульсного фотолиза для изучения промежуточных продуктов. I. Триpletные молекулы

## Определение коэффициентов экстинкции триpletного поглощения:

### 1. Метод опустошения основного синглетного состояния

- по уменьшению интенсивности спектра

синглет-синглетного поглощения:

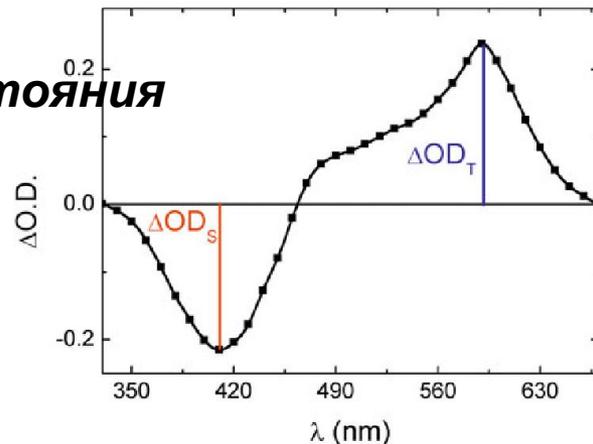
2. Метод дозовой характеристики - по зависимости оптической плотности триplet-триpletного поглощения  $\Delta D$  от мощности фотолитической вспышки:

### 3. Метод триplet-триpletной аннигиляции

- из кинетики дезактивации триpletных молекул:

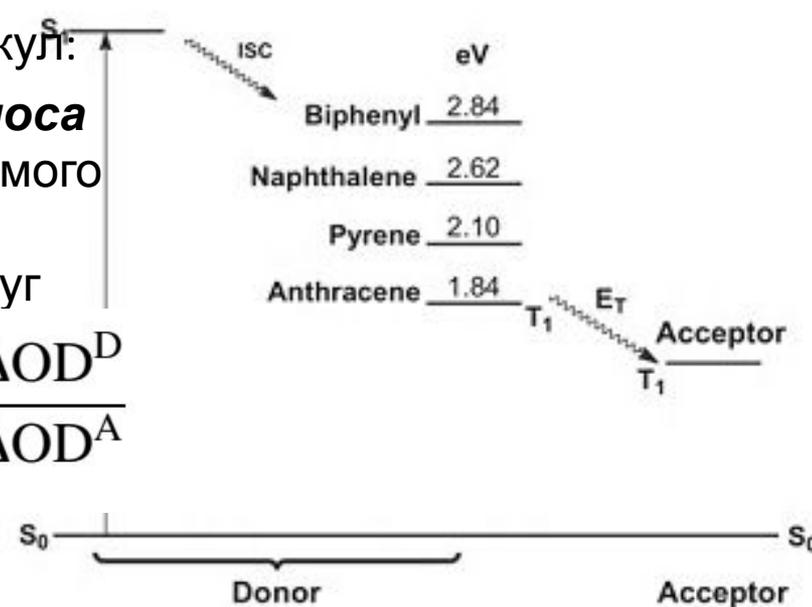
4. Метод триplet-триpletного переноса энергии - сравнение параметров исследуемого спектра известным спектром T-T поглощения подходящей молекулы, которые сменяют друг друга после лазерного импульса за энергии между донором и акцептором

$$\frac{\epsilon_T^D}{\epsilon_S^A} = \frac{\Delta OD^D}{\Delta OD^A}$$



$$\epsilon_T = 16RT/3000\eta k_{отн.}$$

	eV
Biphenyl	2.84
Naphthalene	2.62
Pyrene	2.10
Anthracene	1.84



## Определение квантовых

## выходов

## образования триpletных

# Применение импульсного фотолиза для изучения промежуточных продуктов. I. Триpletные молекулы

## Тушение триpletных молекул:

- кислородом, ионами переходных металлов, тяжелыми атомами, акцепторами и донорами электрона; - триplet-триpletная аннигиляция (взаимодействие двух триpletных молекул между собой), лимитирующая стадия - диффузия триpletных молекул).

Статическое тушение триpletных состояний - уменьшение концентрации триpletных молекул без изменения их времени жизни (образованием комплекса).

Динамическое тушение - уменьшение времени жизни триpletных молекул (обусловлено взаимодействием триpletной молекулы с тушителем).

## Кислотно-основное равновесие триpletных молекул

определена

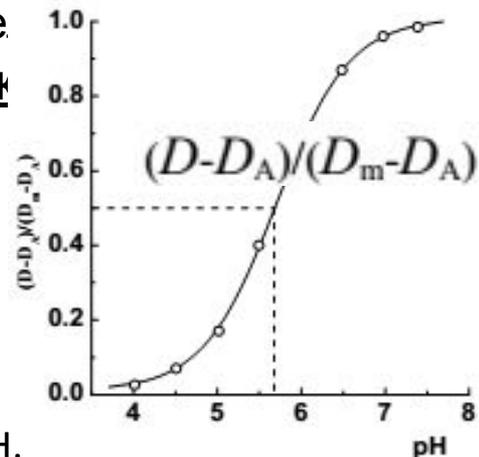
по кривой «титрования» так же легко, как и в основном состоянии, «индикатором» является молекула в своем триpletном состоянии.

$D$  – оптическая пл. T-T поглощения;  $D_m$  – макс. оптическая пл. T-T поглощения при макс. pH, когда поглощает только непротонир.

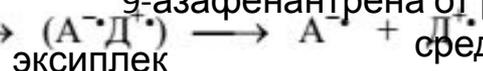
## Реакции переноса

$D_0$  – макс. оптическая пл. T-T поглощения протонир. ф. при малых pH. Энергия возбуждения молекул их потенциал ионизации

уменьшается, а сродство к электрону возрастает на величину энергии возбуждения. В связи с этим реакции переноса электрона при возбуждении молекул становятся более предпочтительными по сравнению с основным состоянием.



Зависимость относительной оптической плотности триplet-триpletного поглощения 9-азафенантрена от pH среды



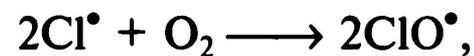
# Применение импульсного фотолиза для изучения промежуточных продуктов.

## II. Замедленная флуоресценция (генерируемая триплетными молекулами)

Если для измерения флуоресценции использовать дополнительную отражающую полупрозрачную пластинку, расположенную на пути зондирующего луча, то в одном эксперименте одновременно можно измерять оптическую плотность поглощения короткоживущих продуктов, например триплет-триплетное поглощение, и интенсивность флуоресценции.

## III. Свободные радикалы

- при импульсном фотолизе смеси кислорода и хлора наблюдается поглощение **радикала ClO<sup>•</sup>**, который затем превращается в исходные соединения;
- исследовано образование **семихиноновых радикалов** при фотоокислении гидрохинонов или фотовосстановлении хинонов;
- триплетные состояния карбонильных соединений при отрыве атома водорода от спиртов, УВ с образованием промежуточных продуктов – кетильных радикалов.



поглощение **радикала ClO<sup>•</sup>**, который затем превращается в исходные соединения;

