

מעבדה שנה ג' בכימיה פיזיקאלית - ספקטרוסקופיה אופטית וזמני חיים בפאזה מעובה (TCSPC)

הקדמה:

בניסוי זה אנו רואים שינוי משמעותי בתכונות כימיות באמצעות עירור מולקולה ממצב יסוד אלקטרוני למצב מעורר. השינוי שאנו רואים הינו שינוי בערך ה- ρK_a , כלומר שינוי במידת חומציות המולקולה. מולקולות בהם מתרחש אפקט שכזה נקראות פוטו-חומצות. בניסוי זה אנו נלמד על העקרונות של ספקטרוסקופיה אופטית, בדגש על ספקטרום בליעה אופטית ופלורסנציה. נלמד למדוד זמני דעיכה פלורסנטיים בשיטת Time-correlated single photon counting (TCSPC). בניסיון אנו מקשרים את תוצאות המדידה בטכניקת TCSPC ובספקטרום הפלורסנציה לשינוי בערך ה- ρK_a של המולקולה 8-Hydroxypyrene-1,3,6-trisulfonic acid, שהיא פוטו חומצה נפוצה.

חומר קריאה למפגש ראשון (קבצים מצורפים):

1. [יסודות הספקטרוסקופיה האופטית](#)
M. Sauer, J. Hofkens, and J. Enderlein:
Handbook of Fluorescence Spectroscopy and Imaging.
Basic Principles of Fluorescence Spectroscopy – p.1-p. 21
2. [כימיה של פוטו-חומצות](#)
J. F. Ireland and P. A. H. Wyatt:
Acid-Base Properties of Electronically Excited States of Organic Molecules-
p.131- p.159
3. [אופטיקה ומכשור ניסיוני](#)
Ocean Optics – USB2000 Fiber Optic Spectrometer,
Deuterium Tungsten-Halogen Calibration Light Source.

מונחים שצריך להכיר לקראת הניסוי:

העברת יחידות אנרגיה eV, Joule, wavenumber

Vibronic states

- The Born-Oppenheimer approximation
- Transition moments
- Oscillator strength
- The Franck-Condon principle
- Absorption spectra
- Vibrational relaxation

Fluorescence

- Fluorescence spectrum
- The mirror symmetry relation
- The radiative lifetime

Radiationless transitions

- Singlet-singlet internal conversion
- Intersystem crossing
- Triplet states
- Energy gap

חומר קריאה נוסף:

Spectroscopy in general

1. Birks, "Photophysics of Aromatic Molecules".
2. P. Atkins, "Physical Chemistry" CH 13-14: "Molecular spectroscopy 1,2"
3. Schulman, "Fluorescence and Phosphorescence Spectroscopy", pp 1-60 (library position: 541.224 Sch).
4. J.M. Hollas, "Modern Spectroscopy", John Willey and Sons (1998).
5. [Beer-Lambert Law](#)

Single photon counting technique

1. Shaver and Love, in "Progress in Analytical Chemistry", Vol. 8, p.249.
2. Love and Shaver, in "Analytical Chemistry", Vol. 48, pp 364 A (1976).

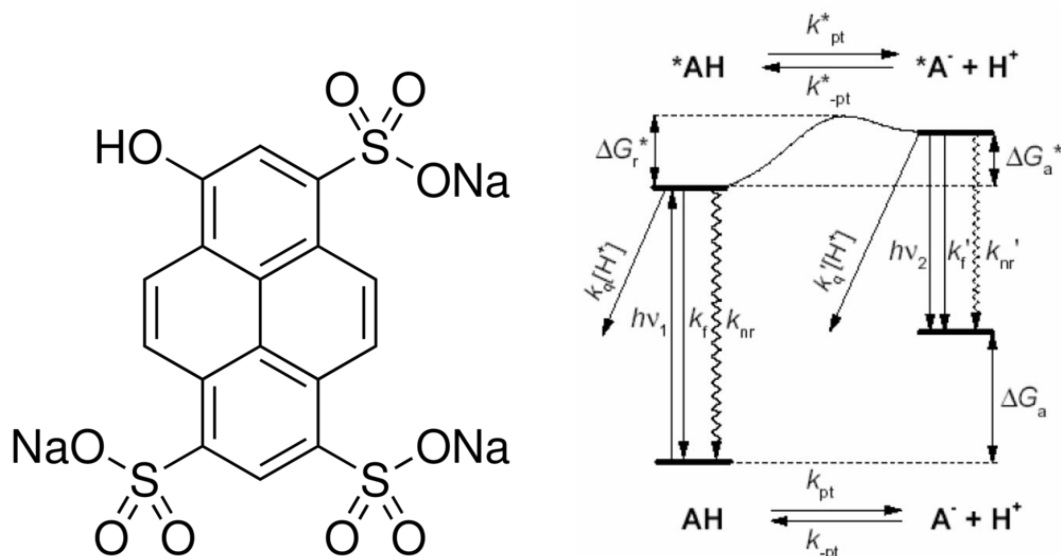
ניסיון א' – ספקטרום בליעה של HPTS כפונקציה של pH.

מטרת הניסוי:

מציאת ערך ה- pK_a של HPTS בעזרת ספקטרוטר בליעה, לפי יחסי פסי הבליעה של החומצה והבסיס המצומד.

רקע קצר:

אנו עוסקים בהליך שיווי המשקל של פוטו-חומצה בשם 8-Hydroxypyrene-1,3,6-trisulfonic acid (HPTS) ובהליך הפוטו-פרוטוליטי של פוטו-חומצות:



בסכמה זו, k_{PT}^* ו- k_{PT}^* הם קבועי הקצב לתגובת העברת הפרוטון במצב המעורר, k_f' ו- k_{nr}' הם קבועי הקצב של תהליך הדעכת הפלורסנציה (quenching) ע"י פרוטונים.

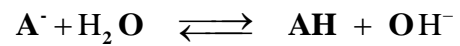
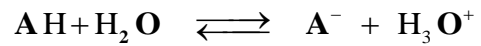
לפי משוואת Henderson-Hasselblach :

$$pH = pK_a + \log \left\{ \frac{[A^-]}{[AH]} \right\}$$

כדי למצוא את ה- pK_a של החומצה, אנו צריכים למצוא את נקודת השוויון בין ריכוז החומצה והבסיס המצומד $pH = pK_a$. זאת נעשה ע"י הכנת מספר תמיסות בופר וביצוע מדידות שונות בכל אחד מתנאי ה- pH השונים.

שבוע 1 – מדידת ספקטרום בליעה

בחלק זה של הניסוי נעסוק במצב היסוד של HPTS ובשיווי המשקל בתהליכי מעבר פרוטון, כלומר:



כשאנו יודעים כי קבועי שיווי המשקל הם:

$$K_B = \frac{[OH^-][AH]}{[A^-]} \qquad K_a = \frac{[H_3O^+][A^-]}{[AH]}$$

הכנת בופרים:

אנו נכין phosphate buffer ע"י שימוש בתמיסות Na_2HPO_4 ו- KH_2HPO_4

כדי לחשב את ריכוזי תמיסות הבופרים נשתמש במשוואת Henderson-Hasselblach :

$$pK_a^{\text{phosphate}} = 6.86 \text{ כש}$$

אנא חשבו מהם ריכוזי התמיסות בהם תשתמשו כדי ליצור את תמיסות הבופר בבקבוקונים של 50ml (אנו נשתמש בתמיסות בריכוז 1M של KH_2HPO_4 ו- Na_2HPO_4) בופר עם pH 4, 10, ו-7 ניתנים לכם.

מהלך הניסוי:

1. הכן מספר בופרים ב-pH משתנה – 4, 6, 6.5, 7, 7.5, 8, 10.
2. הפעל את המערכת הניסיונית (הדלק מחשב ומנורה).
3. בצע מדידות dark.
4. מדוד 2 מ"ל תמיסת הבופר לתוך קיווטת קוורץ. בצע מדידת blank על תמיסת הבופר הזו.
5. הוסף 0.1 ml של תמיסת HPTS לקיוטה.
6. מדוד את ספקטרום הבליעה של HPTS ב-pH הספציפי ושמור את הקובץ.
7. חזור על סעיפים 3-6 עד לסיום מדידת כלל תמיסות הבופר.
8. בהנחה ויש צורך, הכן תמיסות בופר נוספות להעלאת דיוק המדידה

שאלות:

1. כשאנו עוסקים בבליעה ופליטה של פוטונים אנו עוסקים במכאניקת קוונטים – כלומר המעבר הינו בכמויות אחידות ובודדות, לעומת זאת בגרף אנו מקבלים פיקים רחבים ולא קווים חדים. הסבירו את הסיבות לקבלת גרף שכה. באלו תנאים מתקבל ספקטרום קווי?
2. באיזה אורך גל נמצאים פסי הבליעה של החומצה (λ_{AH}) והבסיס המצומד (λ_{A^-})? איך ניתן לדעת מיהו הפס של החומצה ומי של הבסיס?
3. מהו ה- pK_a של HPTS?
4. לקראת הניסוי בשבוע הבא – אם נרצה לעורר צורן ספציפי (AH או A^-) למטרת מדידת ספקטרום הפלורסנציה שלו, כיצד נעשה זאת?

חומר קריאה למפגש שני (קבצים קודמים וקובץ חדש):

1. [חזרה על כימיה של פוטו-חומצות](#)
J. F. Ireland and P. A. H. Wyatt:
Acid-Base Properties of Electronically Excited States of Organic Molecules-
p.131- p.159
Mainly focus on the Forster cycle and pH dependence of fluorescence intensity
2. [יסודות הספקטרוסקופיה האופטית](#)
M. Sauer, J. Hofkens, and J. Enderlein:
Handbook of Fluorescence Spectroscopy and Imaging.
Basic Principles of Fluorescence Spectroscopy – p.22-p. 29
3. [Photon Counting](#) – p.1-p.17

ניסיון ב' – ספקטרום פליטה של HPTS כפונקציה של pH.

מטרת הניסוי:

מציאת ערך ה- pK_a^* של HPTS בעזרת ספקטרום פליטה.

בניסוי הקודם ראינו את ספקטרום הבליעה של החומצה HPTS, כעת אנו רוצים לעורר את הצורונים הספציפיים (AH או A⁻) ולראות את ספקטרום הפליטה שלהם מהמצב המעורר למצב היסוד. ע"י מדידה זו, נוכל לחשב את ה- pK_a^* , כלומר קבוע הפירוק של החומצה במצב המעורר.

מהלך הניסוי:

1. וודא כי ברשותך תמיסות HCl בריכוזים שונים.
2. הפעל את המערכת הניסיונית (הדלק מחשב ומנורה) וודא שהקונפיגורציה היא של מצב הפליטה.
3. בצע מדידת dark. יש לחסר את הרקע הזה מכל מדידות הפליטה.
4. מדוד 2.0 מ"ל תמיסת בופר pH=8 לתוך קיוטת קוורץ.
5. הוסף 0.1 ml של תמיסת HPTS. מדוד ספקטרום פליטה (פלורסנציה). שמור את הקובץ.
6. חזור על מדידות הפליטה ל HPTS בתמיסות pH = 7, 6, 4. שמור את הקבצים.
7. מדוד בזהירות 2.0 ml תמיסת 1M HCl (pH=0) לתוך הקיוטה.
8. הוסף 0.1 ml של תמיסת HPTS לקיוטה ומדוד את ספקטרום הפליטה. שמור את הקובץ.
9. חזור על מדידות הפליטה של HPTS באופן דומה כשהוא מומס בכל אחת מהתמיסות המרוכזות הבאות של HCl: 2M, 2.87M, 6M, 10M (ובהתאמה -1.0, -0.8, -0.5, -0.3). משתמשים בנתונים מהטבלה בעמוד הבא
10. יש לשטוף את הקיוטה במים מזוקקים בין מדידה למדידה.
11. נא להצטייד במשקפי מגן.

Concentration			Density	Molarity	pH	Viscosity	Specific heat	Vapour pressure	Boiling point	Melting point
kg HCl/kg	kg HCl/m ³	Baumé	kg/L	mol/dm ³		mPa·s	kJ/(kg·K)	kPa	°C	°C
10%	104.80	6.6	1.048	2.87	-0.5	1.16	3.47	1.95	103	-18
20%	219.60	13	1.098	6.02	-0.8	1.37	2.99	1.40	108	-59
30%	344.70	19	1.149	9.45	-1.0	1.70	2.60	2.13	90	-52
32%	370.88	20	1.159	10.17	-1.0	1.80	2.55	3.73	84	-43
34%	397.46	21	1.169	10.90	-1.0	1.90	2.50	7.24	71	-36
36%	424.44	22	1.179	11.64	-1.1	1.99	2.46	14.5	61	-30

שאלות:

1. מדוע יש אי התאמה בין ריכוזי החומצות המרוכזות של HCl וה pH שלהן?
2. מדוע ניסוי מדידת pK_a^* לא מבוצע באמצעות תמיסות בופר כמו בניסוי מדידת ה- pK_a ?
3. הצג את גרפי הפלורוסנציה שמדדת על גרף אחד, ותאר איכותית את הפלורוסנציה כתלות ב pH התמיסות. האם תוכל להעריך מתוך גרפים אלו את pK_a^* כמו שחישבת את pK_a ?
4. חשב את pK_a^* מתוך משוואת Forster. (עיין ב " כימיה של פוטו-חומצות ").
5. בהנחה וחישובת את ה- pK_a^* של חומצת HPTS בשתי צורות, השווה בין הערכים והסבר סיבות אפשריות לשוני בניהם. בהנחה וחישובת רק בשיטה אחת, הסבר את יתרונותיה במצב זה.

חומר קריאה למפגש שלישי:

1. [יסודות הספקטרוסקופיה האופטית](#)
M. Sauer, J. Hofkens, and J. Enderlein:
Handbook of Fluorescence Spectroscopy and Imaging.
Basic Principles of Fluorescence Spectroscopy – p.22-p. 29
2. [Photon Counting](#) – p.1-p.17
3. [סיכום](#)
Reversible Diffusion-Influenced Two Step Model and DSE
4. Kinetic isotope effect
https://en.wikipedia.org/wiki/Kinetic_isotope_effect

העשרה:

- [N. Agmon E. Pines and D. Huppert](#)
[Geminate recombination in protontransfer reactions. II. Comparison of diffusional and kinetic schemes](#)

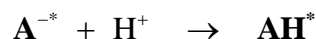
מטרת הניסוי:

מדידת תכונות חומצת HPTS באמצעות Time-resolved emission.

הקדמה:

באמצעות מדידות ה-steady-state שביצענו בניסויים קודמים, קיבלנו מידע על מצב היסוד באמצעות מדידת ספקטרום הבליעה ועל תכונות המצב המעורר באמצעות מדידת פלורסנציה. בניסוי זה נראה את דעיכת המצבים המעוררים של HPTS באמצעות טכניקת Time-resolved emission, ולא באמצעות מדידות steady-state.

בניסוי זה נכיר את המערכת אשר מבצעת מדידות פלורסנציה התלויות בזמן, כשמדידה זו מאפשרת קבלת מידע מדויק על קצב מעבר הפרוטון מ-HPTS למים וכן קבלת מידע נוסף על קצב מעבר הפרוטון מהמים חזרה ל-HPTS הנמצא במצב ה-A*⁻. בנוסף ניתן להעריך את המנגנון המורכב של תהליך הרקומבינציה:



בתהליך זה צריכים להגיב שני חלקיקים הנמצאים במרחק גדול יחסית. התהליך כולו מושפע ע"י התנועה הדיפוזיונית של הפרוטון אל עבר מולקולת A*⁻. מדידות ה-Time-resolved emission על חומצת HPTS ייעשו במערכת Time correlated single photon counting (TCSPC) שעליה קראתם ברקע התיאורטי לשבוע זה.

אנו נקבל מדידות שנעשו על מולקולת ה-HPTS במים וב D₂O ונראה האם השינוי בין הפרוטון לדיטרון משנה את הליך ה-Geminate recombination.

שאלות הכנה:

1. מהו מקדם הדיפוזיה של פרוטון במים והאם הוא יהיה גדול או קטן מזה של ה- A^- ?
2. תארו מהו Time to amplitude converter (TAC) מהי מטרתו וכיצד הוא פועל?
3. תארו מהו Constant fraction discriminator (CFD) מהי מטרתו וכיצד הוא פועל?
4. תארו מהו Multi-channel analyzer מהי מטרתו וכיצד הוא פועל?

מהלך הניסוי:

כדי לעורר את הדוגמא אנו משתמשים בפולסי לייזר Ti:Shapphire הפועל ב-800nm, הפולס מאופיין בתכונות הבאות:

- הפולס הינו בהרמוניה השנייה של הלייזר- 400nm
- משך הפולס קצר מאוד כ-150fs
- קצב הפולסים הינו מהיר מאוד – 800kHz.

התוצאות אותן נקבל הן של עירור צורוני ה-AH וה- A^- ומדידת דעיכת הסיגנל ב-445nm וב-530nm באמצעות טכניקת ה-TCSPC (האם תוכלו להגיד מדוע אורכי גל אלו נבחרו בהסתמך על ניסויי השבועות הקודמים?)

עיבוד נתונים

1. העבר את קבצי מדידות ה-AH וה- A^- אל מחשבך האישי.
2. צייר את נתוני מדידת ה-AH וה- A^- על אותו הגרף בשתי סקאלות שונות:
 - א. Linear scale
 - ב. Semi-log scale
3. הזז את הפיק של סיגנל ה-AH* ל-0.05ns.
4. את סיגנל ה-AH הכפילו בפקטור $e^{[t/\tau_F]}$ כש $\tau_F = 5.2ns$ (יש לשים לב לסקאלת הזמנים, ציר הזמן של התוצאות הניסיוניות המתקבלות הוא ב-ns) פקטור זה משמש כתיקון לדעיכה של הסיגנל כתוצאה מ non-radiative effects
5. צייר את התוצאה שקבלת בגרף, כאשר הצירים הם $\log I_F$ כנגד $\log t$ ולגרף נקרא log-log plot
6. אנו צפויים לקבל דעיכה שתראה כקו ישר, כלומר סיגנל הפלורסנציה של AH בזמנים ארוכים דועך כחוק חזקה $t^{-\alpha}$. חשב את α מהגרף שהתקבל. הערך התיאורטי של α הינו 3/2 או d/2 כאשר d הוא מימד התווך בו נע הפרוטון. נסה להסביר מהיכן ומדוע מתקבל "זנב פלורסנציה" המקיים את חוק החזקה $t^{-d/2}$ (ראה את הסיכום ברקע התיאורטי השבוע)
7. האם יש אפקט איזוטופי במדידת חוק החזקה של ה-geminate recombination? מדוע?