

Day 1

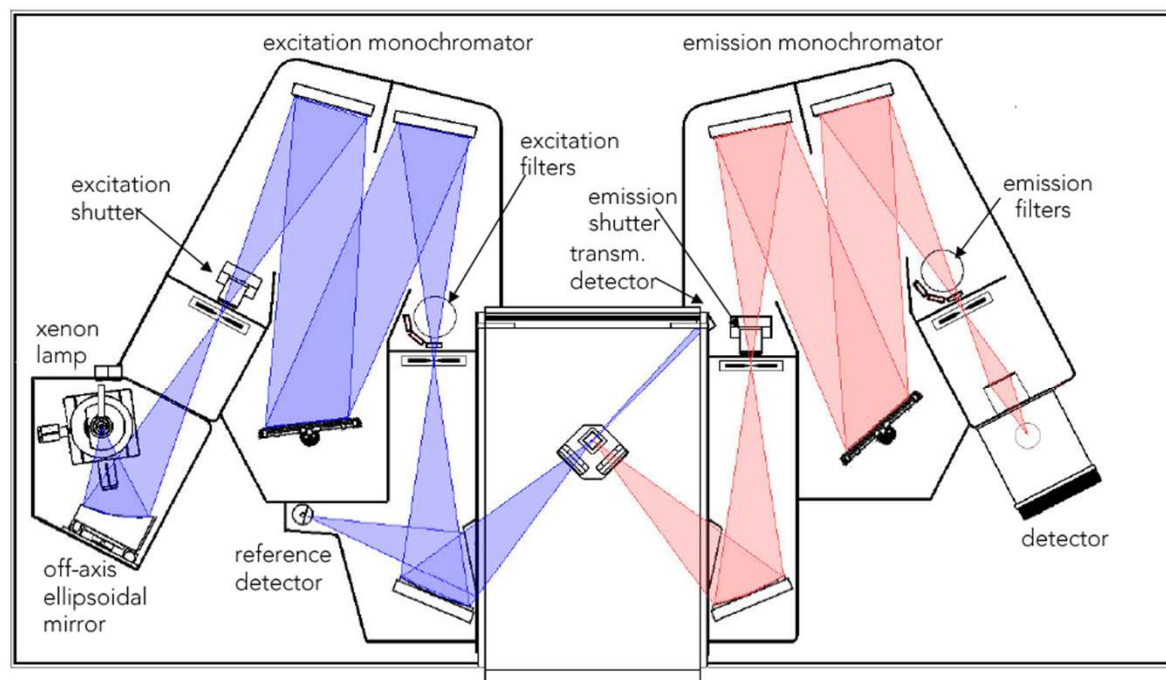
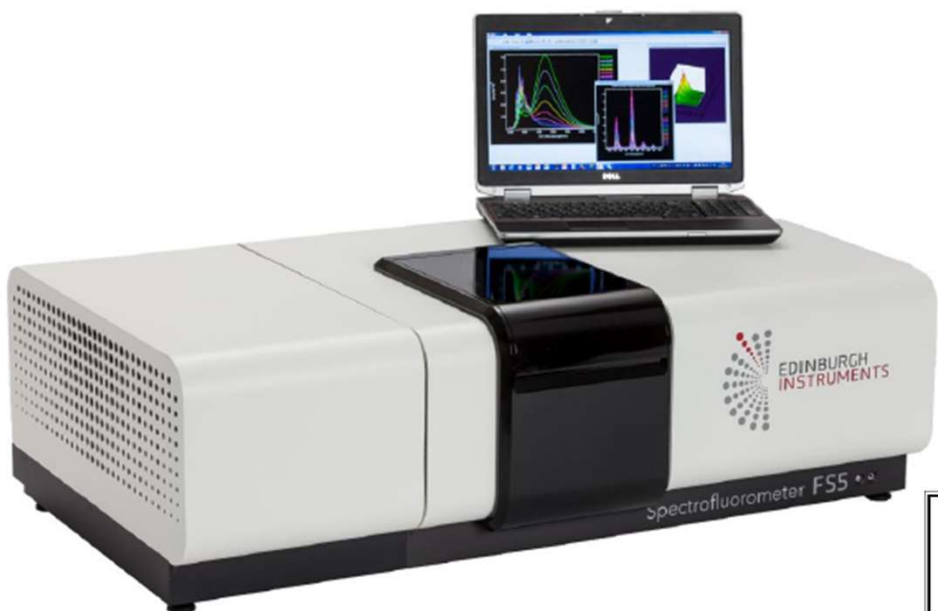
- Growth of tri-pyrene boroxine (TPB) film on Au substrate.  
(310°C, 15 min)

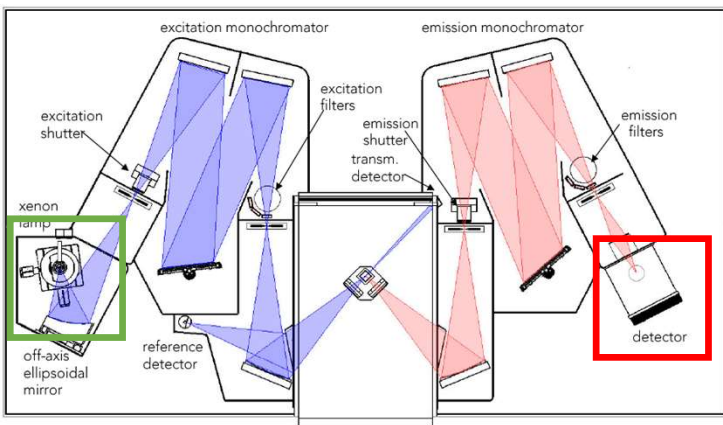


- Pyrene in toluene:  $10^{-2}$  M e  $10^{-6}$  M
- Time resolved spectra on single molecule and excimer signal ( $10^{-2}$ M and  $0.5 \cdot 10^{-2}$ M)
- IRF measurement
- Data fitting

Day 2

- QY measurement of Py in water and in toluene
- (and in Py/Au)
- Data analysis





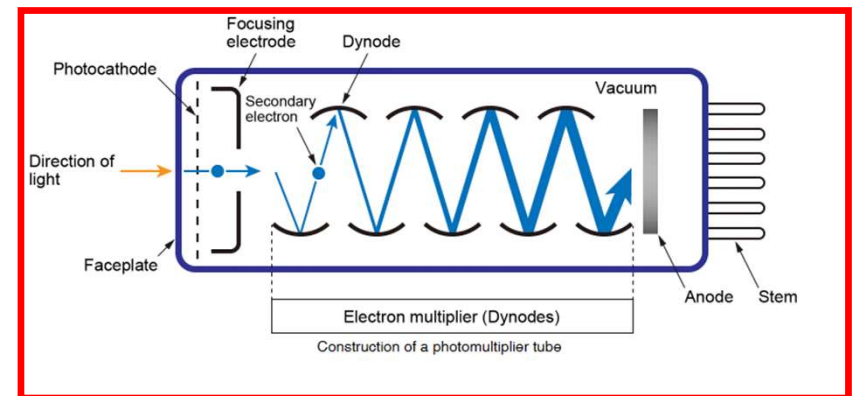
### Lampada allo Xenon: lampada ad arco

Il bulbo in quarzo impedisce che venga trasmessa radiazione con  $\lambda < 200$  e che venga generato ozono nel laboratorio.



### Detector:

Fotomoltiplicatore a 9 dinodi.  
max cps 1500000 (meglio non superare 500000)

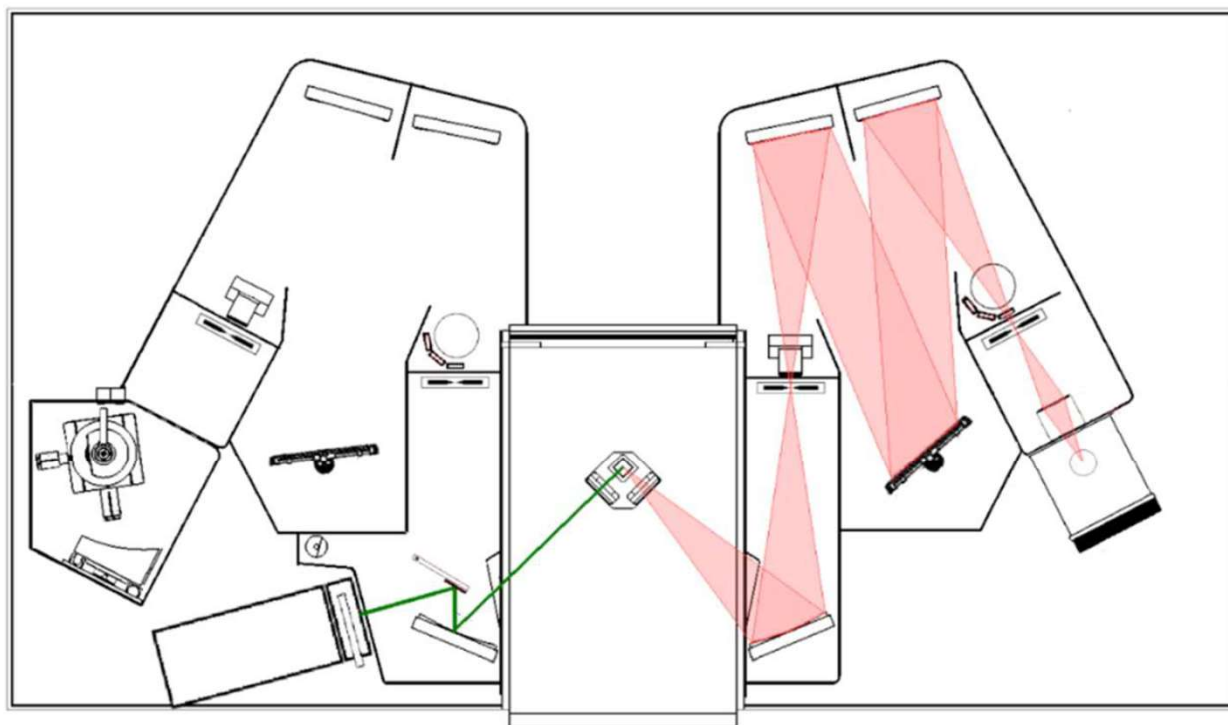


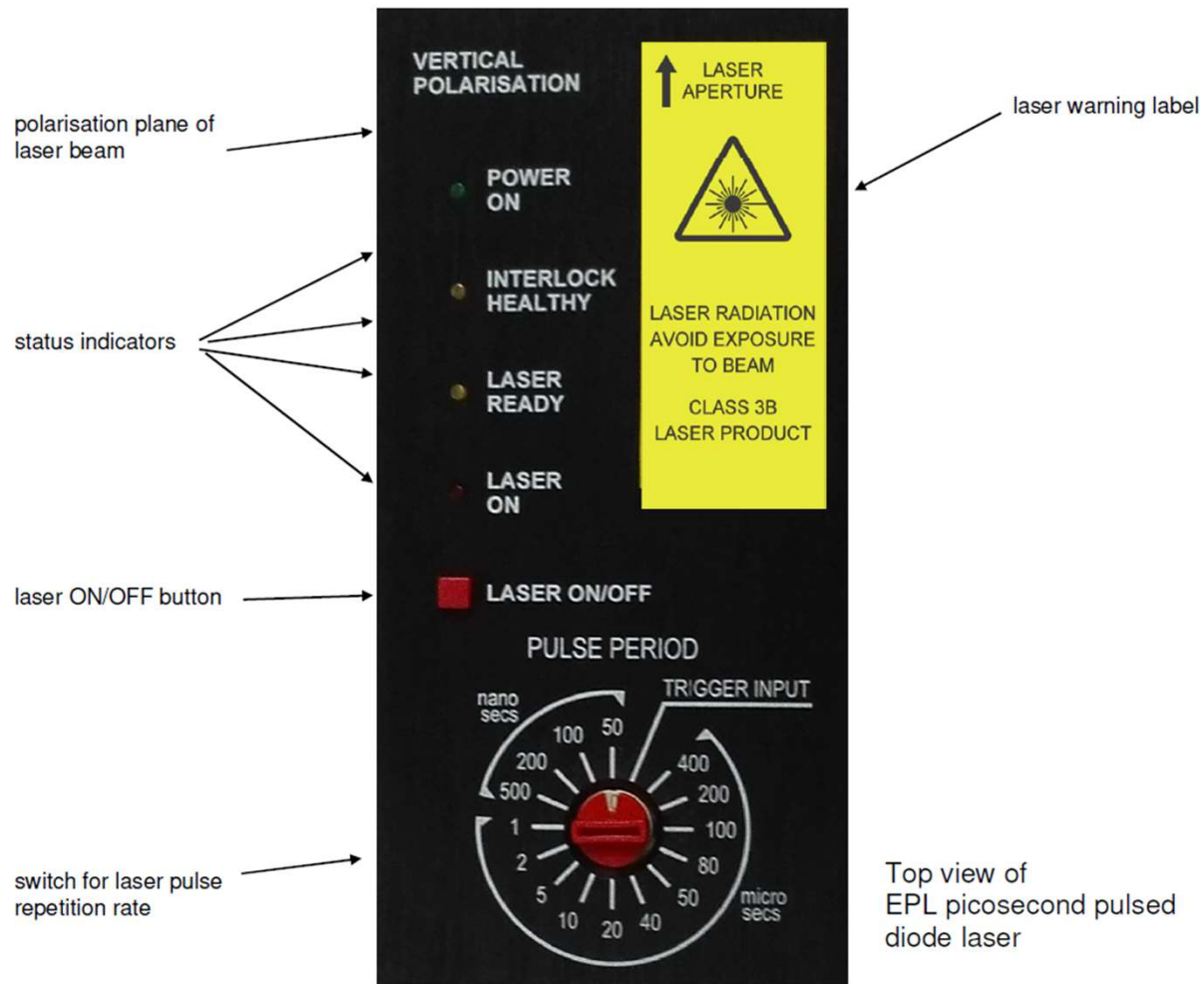
**Shutter in eccitazione:** si chiude quando non c'è una misura in corso (per minimizzare danneggiamenti del campione)

**Shutter in emissione:** si chiude quando viene aperto il coperchio (per proteggere il detector)



Schema ottico con sorgente LASER





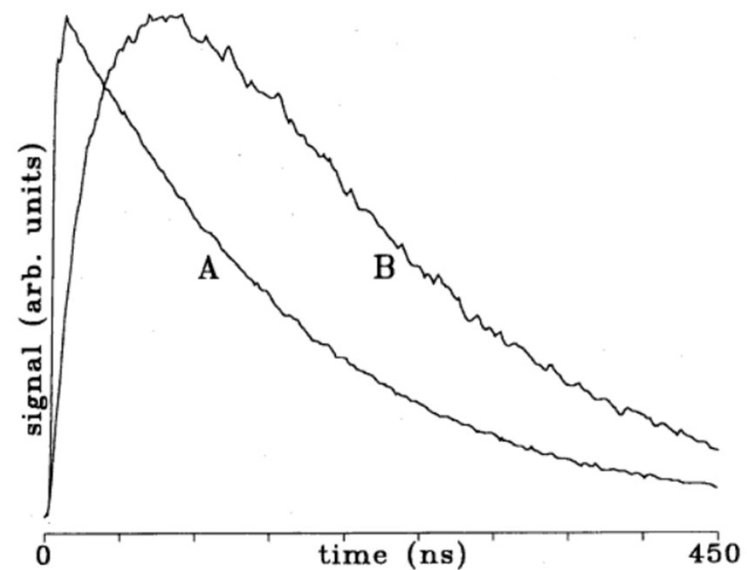
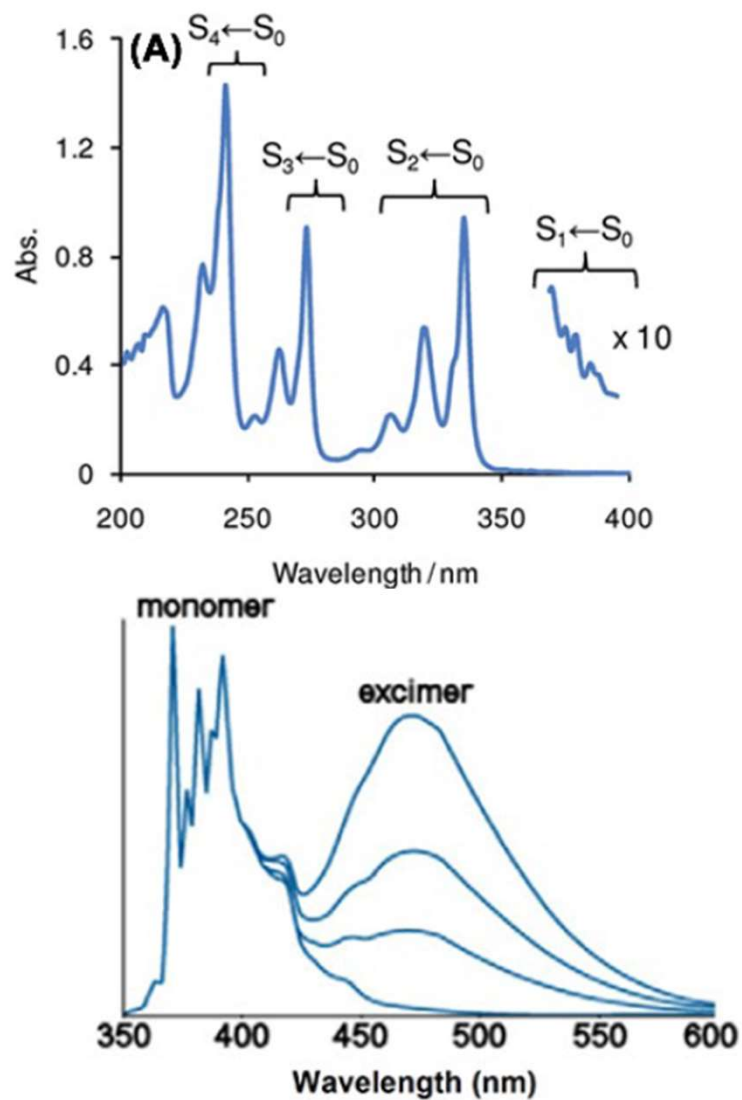
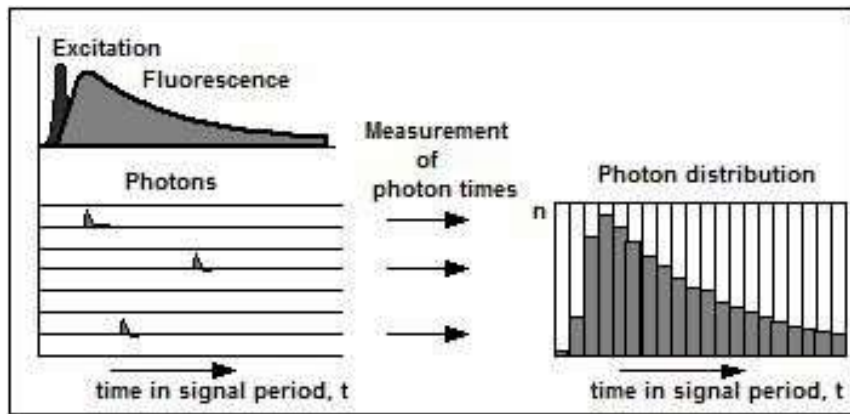


Figure 2. The time-resolved luminescence of a  $10^{-3}$  M solution of pyrene, following nitrogen-laser excitation. Curve A was detected at 400 nm, and curve B was detected at 500 nm.

Per le misure time-resolved con il laser il detector viene utilizzato nella modalità single-photon counting. L'elettronica effettua il *Time-correlated Single Photon Counting* (TCSPC) ovvero conta il tempo che passa dall'impulso laser al primo fotone che conta.

L'energia di emissione viene impostata al valore del segnale che si vuole misurare e si registrano i tempi creando un istogramma.



L'impulso laser deve arrivare ad intervalli di tempo molto maggiori del tempo di decadimento se si vuole determinare in modo corretto tale tempo. In caso contrario ho che il sistema non diseccita mai completamente.

Una buona norma è che il periodo di ripetizione degli impulsi sia almeno 10 volte il tempo di decadimento che si vuol misurare.

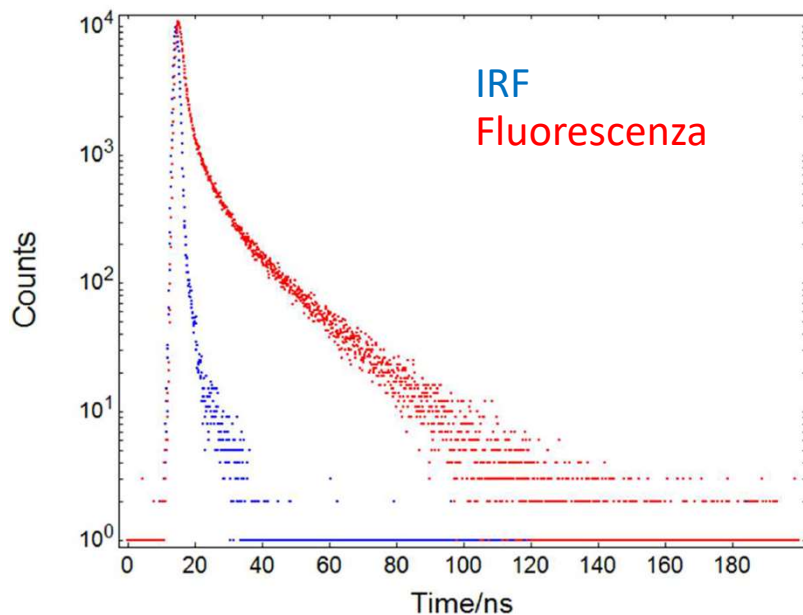
Se il segnale da misurare è troppo intenso più di un fotone potrebbe arrivare nell'intervallo minimo che il detector è in grado di discriminare. La regola data dal costruttore è che il picco di fluorescenza da monitorare non deve avere un'intensità superiore al 5% della repetition rate del Laser.

Esempio: se imposto il laser con  $rr=1\text{MHz}$ , il picco dovrà avere meno di 50000 cps

Se il decadimento è molto veloce, la misura inizia ad essere limitata dalla risoluzione temporale dello strumento (Instrumental Response Function, IRF).

Per determinare quest'ultima, si può misurare l'andamento nel tempo del picco di diffusione alla Rayleigh. Questo è un processo istantaneo e quindi l'allargamento temporale sarà dovuto esclusivamente allo strumento.

Si prende una soluzione con alto fattore di scattering (ad esempio acqua e latte....), si imposta la lunghezza di emissione uguale a quella di eccitazione del laser e si misura il tempo di decadimento.



Se la curva IRF è molto più stretta della curva di decadimento di fluorescenza allora posso ignorare gli effetti della risoluzione strumentale sulla misura. Se le larghezze sono comparabili, il software permette di effettuare una deconvoluzione per ottenere una determinazione più corretta del tempo di decadimento.

La IRF del FS5 è di circa 800 ps. Con la deconvoluzione si riescono a determinare tempi di decadimento fino ai 100 ps (se la sorgente di ha risoluzione migliore).



Un eccimero (*excited dimer*) è un complesso formato da due molecole identiche,  $M^*$ , eccitate, che si legano solo dopo che una delle due è in uno stato elettronico eccitato. Allo stato fondamentale il dimero  $M-M$  non è stabile.

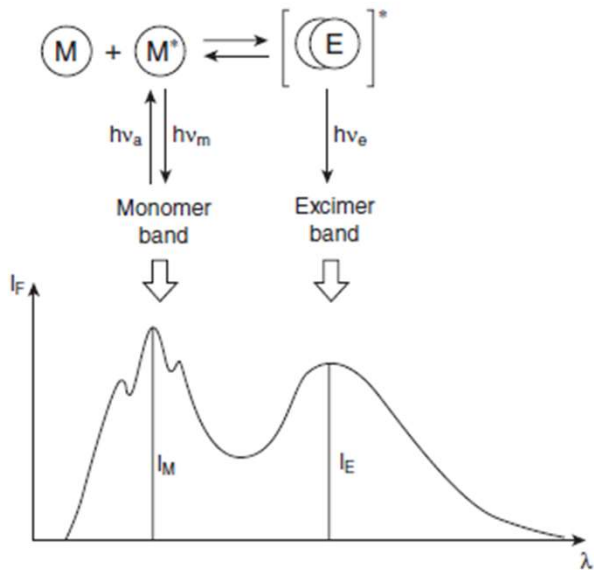
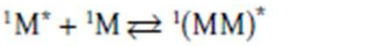
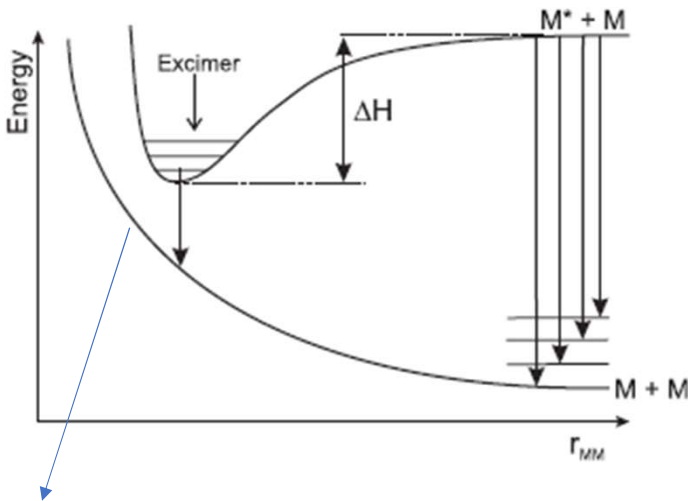
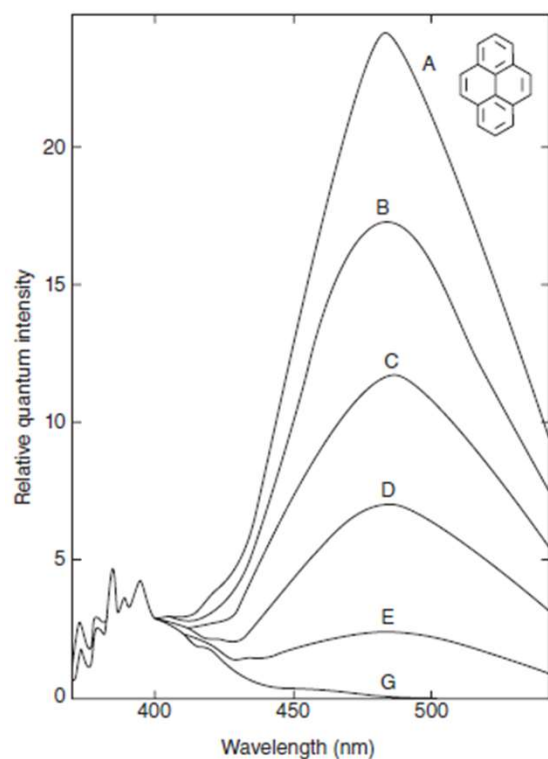


Figure 6.7 Excimer formation, with the corresponding monomer and excimer bands.

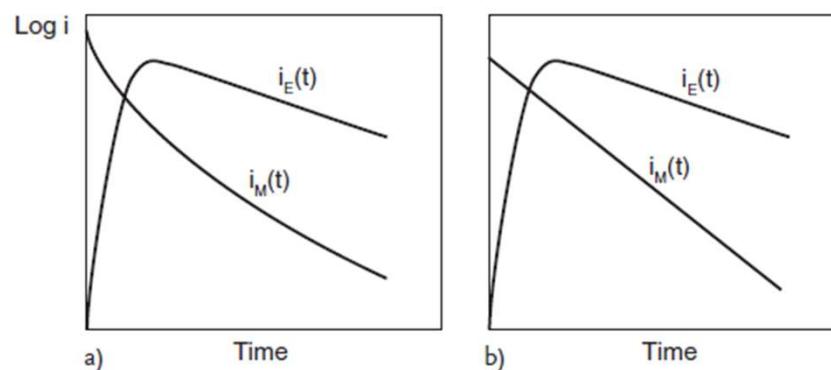


Curva di repulsione tra due molecole in ground state

La formazione di un eccimero richiede che una molecola eccitata incontri una nello stato fondamentale. Tale incontro deve avvenire in tempi brevi rispetto al tempo di decadimento della molecola eccitata. Questo comporta che gli eccimeri si formino con maggiore probabilità in soluzioni molto concentrate o in stati condensati



**Figure 6.8** Fluorescence spectra of pyrene at various concentrations in cyclohexane. A:  $10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ ; B:  $7.75 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ; C:  $5.5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ; D:  $3.25 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ; E:  $10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ; and F:  $10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  (from Birks and Christophorou (1963) *Spectrochim. Acta*, **19**, 401).



**Figure 6.9** Fluorescence decays of the monomer and the excimer. (a) Dissociation of the excimer within excited-state lifetime. (b) No dissociation of the excimer.

Bernard Valeur and Mário Nuno Berberan-Santos

## Molecular Fluorescence

Principles and Applications

## Misura di efficienza quantica (Quantum Yield)

L'efficienza quantica (QY, quantum yield) di fluorescenza è definita come il rapporto tra fotoni di fluorescenza emessi e fotoni assorbiti. Per misurarla si utilizza un accessorio dello spettrofluorimetro ovvero la sfera di integrazione.

È una cavità sferica internamente rivestita con un materiale altamente riflettente e diffusivo (tipicamente Spectralon® o solfato di bario ( $\text{BaSO}_4$ )). All'interno ci sono porte ottiche per l'ingresso del fascio di eccitazione (laser o lampada), il posizionamento del campione (riflettente o trasparente) e una o più porte di uscita verso il monocromatore / detector.

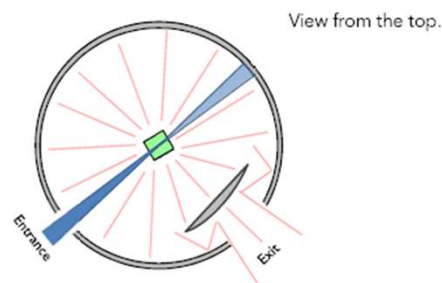


Figure 4. Beam path and sample position for measurements of samples under direct excitation

L'idea è che la sfera raccoglie e integra tutta la luce emessa o trasmessa in ogni direzione, rendendo la misura indipendente dalla geometria o dall'anisotropia del campione.

La misura si effettua in due step:

1. **Misura di riferimento (senza campione o con solo il solvente):** Si illumina la sfera con la sorgente di eccitazione e si misura lo **spettro della radiazione incidente ( $I_0(\lambda)$ )**
2. **Misura con il campione:** Il fascio eccita il campione dentro la sfera. Parte della luce di eccitazione viene assorbita, parte trasmessa o riflessa, e parte riemessa come fluorescenza. Poiché la sfera integra la luce in tutte le direzioni, si ottiene:  $I_{ex}$ : intensità della radiazione di eccitazione rimanente (non assorbita)  $I_{em}$ : intensità totale della luce di emissione (fluorescenza)

L'efficienza quantica sarà:

$$QY = \frac{I_{em}}{I_0 - I_{ex}}$$

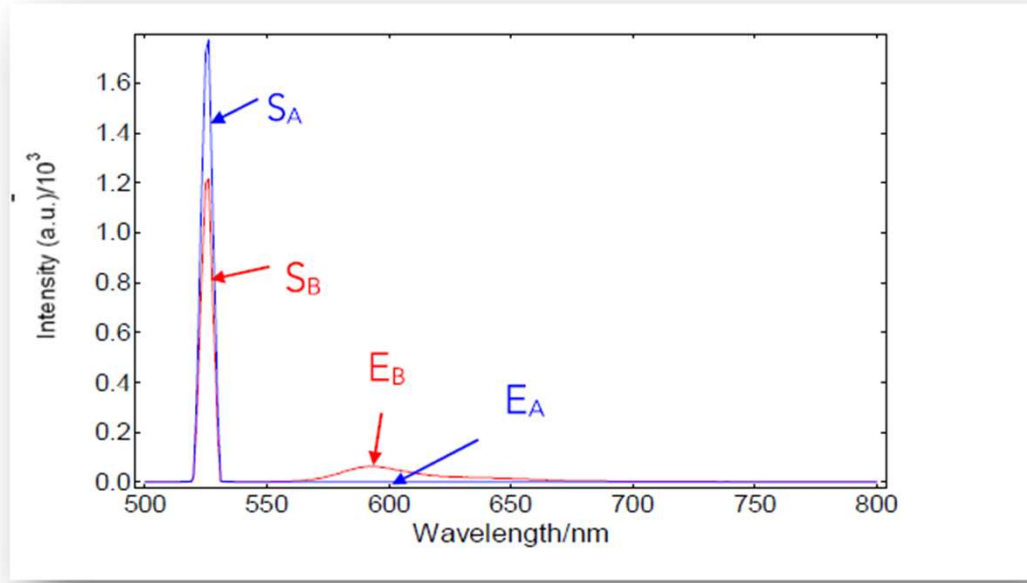


Figure 5. Spectral scans of the excitation scatter region or S-region (peaks on the left) and the emission region (E-region) of the sample and the solvent. The indices "A" and "B" refer to the experimental setup. Note that the quantities  $S_A$ ,  $S_B$ ,  $E_A$ , and  $E_B$  refer to the integral of the scans

The absolute fluorescence quantum yield, calculated with the "Direct Excitation" method is calculated as follows:

$$\eta_D = \frac{E_B - E_A}{S_A - S_B} \quad (2)$$

