

## Ćwiczenie 5 i 6

### WYZNACZANIE PARAMETRÓW WYGASZANIA FLUORESCENCJI AKRYDYNY PRZEZ ZWIĄZKI TIOORGANICZNE METODAMI STACJONARNYMI (A) I CZASOWO ROZDZIELCZYMI (B)

**Zagadnienia:** podstawowe prawa fotochemiczne, diagram Jabłońskiego, procesy dezaktywacji stanów wzbudzonych (promieniste i bezpromieniste), kinetyka fluorescencji, czas życia stanów wzbudzonych, równanie Sterna–Volmera (wyprowadzenie), budowa spektrofotometru i spektrofluorymetru.

#### Wstęp

Szczegółowa analiza reakcji chemicznych z udziałem cząsteczek w stanach wzbudzonych (zarówno singletowych, jak i trypletowych) napotyka na wiele trudności, ze względu na ich krótkie czasy życia oraz niewielkie stężenia produktów i stanów wzbudzonych. Dokładna analiza widm absorpcji i emisji umożliwi jednak zbadanie niektórych właściwości stanów wzbudzonych cząsteczek, które tworzą się w wyniku absorpcji światła, a następnie emitując energię przechodzą do niższych stanów. Przykładem takiego „powrotu” cząsteczki do niższego stanu jest fluorescencja. Cząsteczka fluoryzuje w wyniku przejścia promienistego z zerowego poziomu oscylacyjnego wzbudzonego stanu singletowego na dowolny oscylacyjno-rotacyjny poziom stanu podstawowego. W przypadku rozpatrywania fizycznych procesów dezaktywacji wzbudzonego stanu singletowego należy liczyć się też z innymi, obok fluorescencji możliwymi drogami dezaktywacji: dezaktywacją bezpromienistą i zjawiskiem wygaszania. Procesy te zostały przedstawione na rysunku 1 w rozdziale Wprowadzenie.

Zjawiskiem wygaszania nazywamy dezaktywację cząsteczki wzbudzonej w wyniku oddziaływania z wygaszaczem w procesie bezpromienistym. Wygaszanie może odbywać się poprzez przeniesienie energii lub przeniesienie elektronu (patrz: Wprowadzenie). Znajomość tego procesu pozwala na bardzo skuteczne badanie kinetyki i mechanizmów reakcji fotochemicznych [1–5].

Rozpatrzmy rozcieńczony roztwór substancji D, na który pada światło monochromatyczne absorbowane przez cząsteczki D, które w ten sposób przechodzą do stanu wzbudzonego, np.  $S_1$ . Wg przybliżenia stanu stacjonarnego szybkość przejścia cząsteczek do stanu wzbudzonego musi być równa sumie szybkości wszystkich procesów dezaktywujących ten stan:

$$I_a = (k_f + k_{IC} + k_{ISC} + k_q[Q])[S_1] \quad (1)$$

gdzie  $I_a$  – natężenie promieniowania absorbowanego w molach fotonów  $\text{dm}^{-3} \text{s}^{-1}$ .

Wydajność kwantową fluorescencji  $\Phi_f$  definiuje się jako stosunek szybkości fluorescencji do szybkości absorpcji fotonów przez cząsteczki w stanie podstawowym:

$$\Phi_f = \frac{I_f}{I_a} = \frac{k_f[S_1]}{I_a} \quad (2)$$

Wykorzystując powyższe równania otrzymujemy:

$$\Phi_f = \frac{k_f[S_1]}{(k_f + k_{IC} + k_{ISC} + k_q[Q])[S_1]} \quad (3)$$

Dla stężenia wygaszacza równego zero ( $[Q] = 0$ ) wydajność kwantową fluorescencji można zapisać jako:

$$\Phi_f^0 = \frac{k_f}{k_f + k_{IC} + k_{ISC}} \quad (4)$$

Dzieląc stronami dwa ostatnie równania uzyskujemy:

$$\frac{\Phi_f^0}{\Phi_f} = 1 + K[Q] \quad (5)$$

gdzie  $K$  jest stałą wygaszania [ $\text{mol}^{-1}\text{dm}^3$ ]:

$$K = \frac{k_q}{k_f + k_{IC} + k_{ISC}} \quad (6)$$

Jeżeli do wyprowadzonego wyrażenia w miejsce mianownika podstawimy czas życia stanu wzbudzonego w nieobecności substancji wygaszającej, opisany zależnością:

$$\tau_S^0 = \frac{1}{k_f + k_{IC} + k_{ISC}} \quad (7)$$

otrzymamy wtedy bardzo ważną zależność zwaną równaniem Sterna–Volmera:

$$\frac{\Phi_f^0}{\Phi_f} = 1 + K[Q] = 1 + k_q \tau_S^0[Q] \quad (8)$$

Wielkość  $k_q$  [ $\text{dm}^3\text{mol}^{-1}\text{s}^{-1}$ ] w tym równaniu nazywamy stałą szybkości wygaszania. Zgodnie z definicją wydajności kwantowej fluorescencji, iloraz  $\Phi_f^0/\Phi_f$  możemy przedstawić jako stosunek natężenia fluorescencji w nieobecności wygaszacza do natężenia fluorescencji w obecności substancji wygaszającej. W takim przypadku równanie Sterna–Volmera przyjmie ostatecznie postać:

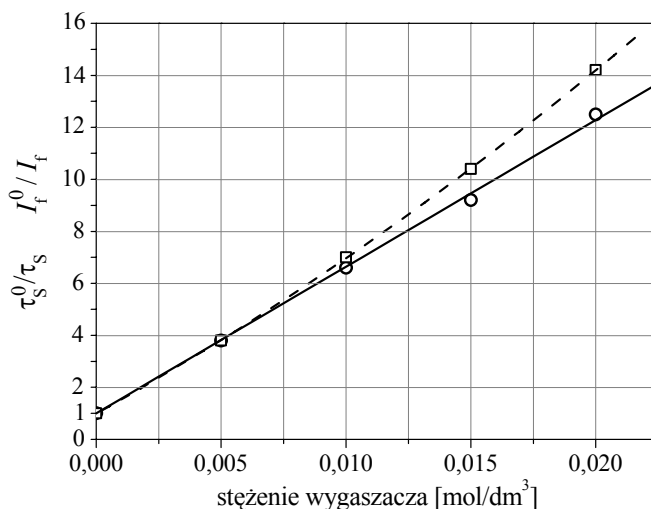
$$\frac{I_f^0}{I_f} = 1 + k_q \tau_S^0[Q] \quad (9)$$

Korzystając z definicji czasu życia stanu wzbudzonego (mierzonego jako czas zaniku /życia/ fluorescencji) w obecności i nieobecności wygaszacza, podobna do opisanej wyżej procedura prowadzi do innej formy równania Sterna–Volmera:

$$\frac{\tau_s^0}{\tau_s} = 1 + k_q \tau_s^0 [Q] \quad (10)$$

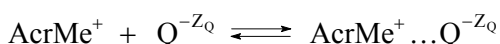
W równaniu tym wartości  $\tau_s^0$  i  $\tau_s$  to odpowiednio czasy życia fluorescencji (wzbudzonego stanu singletowego) w nieobecności i w obecności wygaszacza,  $k_q$  oznacza stałą szybkości wygaszania, a  $[Q]$  to stężenie molowe wygaszacza. Równanie Sterna–Volmera znajduje bardzo często zastosowanie do wyznaczania stałej szybkości ( $k_q$ ) reakcji wygaszania [1–5].

Krzywe Sterna–Volmera oparte na pomiarach intensywności fluorescencji wykazują często znaczne odchylenia od prostoliniowości, szczególnie dla wysokich stężeń wygaszaczy, gdy uwidaczniają się oddziaływania pomiędzy reagentami w stanach podstawowych, tzw. wygaszanie statyczne. Jego przykładem może być oddziaływanie kulombowskie anion–kation pomiędzy cząsteczką mającą ulec wzbudzeniu (kation), a wygaszaczem (anion). Efekty te obserwowane były dla wygaszania fluorescencji kationu pirydynowego ( $\text{Pyr}^+$ ) przez halogenki, siarczany i związki tioorganiczne [6] oraz dla wygaszania fluorescencji kationu 10-metyloakrydynowego ( $\text{AcrMe}^+$ ) przez związki bioorganiczne obdarzone ładunkiem [7]. Dla krzywych Sterna–Volmera uzyskanych z pomiarów czasów życia (tzw. wygaszanie dynamiczne) podobne odchylenia od prostoliniowości nie są obserwowane, ponieważ wielkością bezpośrednio mierzoną jest czas życia stanu wzbudzonego, na który nie ma wpływu to, jakim oddziaływaniami ulega badana cząsteczka przed wzbudzeniem.



**Rys. 1.** Krzywe Sterna–Volmera dla wygaszania fluorescencji  $^1(\text{AcrMe}^+)^*$  przez kwas 3,3'-tiodipropionowy (ładunek  $Z_Q = -2$ ) z pomiarów czasów życia (—○—) i intensywności fluorescencji (-□-)

Przykładowe porównanie krzywych Sterna–Volmera uzyskanych z pomiarów czasów życia i intensywności fluorescencji  $\text{AcrMe}^+$  przez odpowiedni wygaszacz obdarzony ładunkiem ujemnym przedstawia rys. 1. Zakrzywienie krzywych (uzyskanych z zależności względem  $[\text{Q}]$ ), obserwowane szczególnie dla wysokich stężeń wygaszaczy, sugeruje udział zarówno składowej statycznej, jak i dynamicznej w procesie wygaszania. Wygaszanie statyczne zdefiniować można jako oddziaływanie pomiędzy anionami wygaszaczy a kationem akrydyniowym, zachodzące w roztworze jeszcze przed absorpcją promieniowania. W rezultacie takiego oddziaływania dochodzi do utworzenia nieemitującego kompleksu ( $\text{AcrMe}^+ \dots \text{Q}^{-Z_Q}$ ).



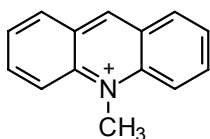
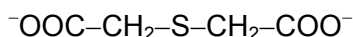
Dowodem eksperymentalnym na powstawanie takiego kompleksu w stanie podstawowym są wyniki badań stacjonarnych wygaszania fluorescencji kationu 10-metyloakrydyniowego ( $\text{AcrMe}^+$ ), a ściślej zaobserwowane odchylenia od liniowości w równaniu Sterna–Volmera. Ponieważ część cząsteczek akrydyny związana zostaje w postaci nieemitującego kompleksu, intensywność fluorescencji obniża się bardziej, niż miałyby to miejsce w przypadku oddziaływania wygaszacza tylko ze stanem wzbudzonym akrydyny. Wygaszanie statyczne zmniejsza intensywność fluorescencji, nie wpływa natomiast na czas życia stanu wzbudzonego kationu akrydynowego. Wygaszanie dynamiczne to rezultat oddziaływania pomiędzy wygaszaczem a kationem akrydyniowym po jego wzbudzeniu w wyniku absorpcji promieniowania. Wygaszanie dynamiczne skraca czas życia fluorescencji stanu wzbudzonego, co jednocześnie obniża intensywność obserwowanej fluorescencji.

Tabela 1

Niekóre stałe fizykochemiczne pochodnych akrydyny

Związek	$\tau_s^0$ , [ns] <sup>a)</sup>	$\Phi_f$	$E_s$ , [kJ/mol]
Acr	8,4 <sup>1)</sup>	0,33	315
$\text{AcrH}^+$	28,9 <sup>2)</sup>	0,66	270
$\text{AcrMe}^+$	33,1	0,86	268

<sup>a)</sup> mierzone w roztworze wodnym przy odpowiednim pH: <sup>1)</sup> pH=10; <sup>2)</sup> pH=3

kation 10-metyloakrydyniowy ( $\text{AcrMe}^+$ )

kwas 2,2'-tiodioctowy (Q)

## **CZEŚĆ A**

### **Wykonanie ćwiczenia 5**

Celem ćwiczenia jest wyznaczenie stałych szybkości wygaszania fluorescencji 10-metyloakrydyny w wodzie przez związki tioorganiczne posiadające grupy obdarzone ładunkiem elektrycznym, w oparciu o zmierzone widma absorpcji i fluorescencji. Stężenia wygaszacza zostały dobrane w ten sposób, aby udział wygaszania statycznego był zanedbywalnie mały. Pozwala to na korzystanie z uproszczonej wersji równania Sterna–Volmera (równanie 9).

Roztwór 10-metyloakrydyny ma tak dobrane stężenie, aby jego absorbancja mierzona w kuwecie o drodze optycznej 1 cm w maksimum pasma absorpcji 10-metyloakrydyny wynosiła około 0,2 – 0,3.

W celu przeprowadzenia eksperymentu wygaszania fluorescencji należy przygotować serię pięciu roztworów o stałym stężeniu 10-metyloakrydyny i wzrastającym (od 0 do ok. 0,05 mol/dm<sup>3</sup>) stężeniu substancji wygaszającej [Q] (kwas 2,2'-tio-dioctowy, M = 150 g/mol). Przygotowujemy serię pięciu kolbek miarowych (5 ml) i naważamy w nich odpowiednią ilość wygaszacza, aby uzyskać jego stężenia podane w tabeli 2. Następnie uzupełniamy kolbki przygotowanym wcześniej wodnym roztworem 10-metyloakrydyny.

Przed przystąpieniem do pomiarów fluorescencji rejestrujemy widma absorpcji (w zakresie 280–500 nm) roztworu bez wygaszacza oraz roztworu z maksymalnym stężeniem wygaszacza, wobec wody jako odnośnika. Widma te normalizujemy do jedności w maksimum pasma absorpcji (ok. 358 nm) w celu identyfikacji ewentualnego pasma absorpcji pochodzącego od utworzonego kompleksu (pary jonowej AcrMe<sup>+</sup>...Q<sup>-</sup>).

Widma fluorescencji rejestrujemy na spektrofluorymetrze w kuwecie kwarcowej o drodze optycznej 1 cm. Parametry takie jak długość fali promieniowania wzbudzającego oraz zakres pomiaru widma fluorescencji dobieramy z pomocą asystenta w oparciu o zmierzone wcześniej widma absorpcji ( $\lambda_{\text{wzbudzenia}} \sim 354$  nm, zakres spektralny  $\sim 360$ –650 nm). Dla kolejnych roztworów odczytujemy odpowiadającą im intensywność fluorescencji obliczając całkowitą powierzchnię pod zarejestrowaną krzywą ( $I_f$ ) oraz intensywność w maksimum fluorescencji ( $I_{fM}$ ). Uzyskane wyniki umieszczamy w tabeli przygotowanej na wzór tabeli 2. Dodatkowo normalizujemy do jedności widma fluorescencji w ich maksimum dla roztworu bez wygaszacza oraz roztworu z maksymalnym stężeniem wygaszacza w celu identyfikacji ewentualnego pasma fluorescencji pochodzącego od utworzonego kompleksu.

Następnie, korzystając z wyników eksperymentalnych, sporządzamy wykres zależności  $I_f^0/I_f$  vs. [Q] oraz  $I_{fM}^0/I_{fM}$  vs. [Q] (krzywe Sterna–Volmera). Stosując regresję liniową, wyznaczamy parametry a i b dla obu prostych. Następnie bazując na równaniu (9) obliczamy wartość stałej szybkości wygaszania kationu 10-metyloakrydyniowego przez badany wygaszacz ( $k_q$ ), pamiętając o podaniu tej wartości we właściwych jednostkach. Czas życia fluorescencji kationu akrydyniowego w nieobecności wygaszacza ( $\tau_s^0$ ) wynosi 33 ns.

Tabela 2

[Q], mol/dm <sup>3</sup>	$I_f$	$I_f^0/I_f$	$I_{fM}$	$I_{fM}^0/I_{fM}$
	intensywność fluorescencji z powierzchni pod krzywą		intensywność fluorescencji z położenia maksimum	
0	$I_f^0 =$	1	$I_{fM}^0 =$	1
0,01				
0,02				
0,03				
0,04				
0,05				

## **CZEŚĆ B**

### **Wykonanie ćwiczenia 6**

Celem tej części ćwiczenia jest wyznaczenie stałych szybkości wygaszania fluorescencji 10-metyloakrydyny w wodzie przez związki tioorganiczne posiadające grupy obdarzone ładunkiem elektrycznym, w oparciu o pomiary czasów życia fluorescencji. Podobnie jak w części A ćwiczenia, stężenia wygaszacza zostały dobrane w ten sposób, aby udział wygaszania statycznego był zanedbywalnie mały. Pozwala to na korzystanie z uproszczonej wersji równania Sterna–Volmera (równanie 10).

Roztwory 10-metyloakrydyny z wygaszaczem należy przygotować identycznie jak w części A ćwiczenia. Następnie, na spektrofluorymetrze IBH System 5000 (metodykę pomiaru opisano w drugiej części Ćwiczenia 11) w kuwecie kwarcowej o drodze optycznej 1 cm należy zarejestrować zaniki fluorescencji w badanych roztworach. Do wzbudzania próbki stosować należy diodę laserową o  $\lambda_{wz} = 374$  lub 409 nm (wg wskazań asystenta). Monochromator emisji ( $\lambda_{em}$ ) należy ustawić na maksimum pasma fluorescencji badanego związku, a szczeliny spektrofluorymetru dobrać eksperymentalnie w zależności od rejestrowanej intensywności fluorescencji (pamiętając o tzw. regule 2%).

Po wykonaniu pomiarów czasów życia fluorescencji dla roztworów ze stężeniami wygaszacza od 0 do 0,05 mol/dm<sup>3</sup>, należy zarejestrować funkcję aparaturową dla rozpraszającego roztworu Ludox, ustawiając oba monochromatory na długość fali wzbudzenia (374 lub 409 nm). Zapisać uzyskane wyniki w odpowiednim katalogu na dysku komputera. Uzyskane dane zanalizować programem IBH Data Analysis, który poprzez dopasowanie odpowiedniej funkcji matematycznej do mierzonych zaników fluorescencji pozwala na wyznaczenie czasów życia fluorescencji  $\tau_s$  dla poszczególnych stężeń wygaszacza. Uzyskane dane zestawić w tabeli 3. W oparciu o wyniki eksperymentalne oraz równanie Sterna–Volmera sporządzić wykres zależności  $\tau_s^0/\tau_s$  vs. [Q]. Korzystając z regresji liniowej oraz równania (10) wyznaczyć

stałą szybkości wygaszania wzbudzonego stanu singletowego 10-metyloakrydyny przez badany związek tiorganiczny ( $k_q$ ). Otrzymaną wartość porównać z wynikami uzyskanymi w części A ćwiczenia.

Tabela 3

[Q], mol/dm <sup>3</sup>	$\tau_S$	$\tau_S^0/\tau_S$
0	$\tau_S^0 =$	1
0,01		
0,02		
0,03		
0,04		
0,05		

#### Sprzęt i odczynniki:

- roztwór akrydyny o stęż.  $\approx 10^{-5}$  mol/dm<sup>3</sup> (50 ml);  $A_{358} \approx 0,3$
- wygaszacz (kwas 2,2'-tiodioctowy)
- 5 kolbek miarowych 5 ml
- 2 kuwety do absorpcji 1×1 cm
- kuweta do fluorescencji 1×1 cm
- pipeta automatyczna
- 2 zlewki
- waga analityczna
- spektrofluorymetr Jasco 6200
- spektrofluorymetr IBH System 5000
- spektrofotometr Varian Cary 50 Bio

#### LITERATURA

- [1] S. Paszyc, *Podstawy fotochemii*, PWN, Warszawa 1992.
- [2] P. Suppan, *Chemia i światło*, PWN, Warszawa 1997.
- [3] B. Marciniak (praca zbiorowa), *Metody badania mechanizmów reakcji fotochemicznych*, Wyd. Nauk. UAM, Poznań 1999.
- [4] J.R. Lakowicz, *Principles of fluorescence spectroscopy*, wyd. 2, Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York 1999.
- [5] A. Kawski, *Fotoluminescencja roztworów*, PWN, Warszawa 1992.
- [6] B. Marciniak, J. Rozwadowski, *J. Photochem. Photobiol. A: Chemistry*, **101**, 163–169 (1996)
- [7] T. Pędziński, B. Marciniak, G.L. Hug, *J. Photochem. Photobiol. A: Chemistry*, **150**, 21–30 (2002).





