

## Ćwiczenie 8

# WYZNACZANIE ŚREDNIEJ LICZBY AGREGACJI SURFAKTANTÓW METODĄ WYGASZANIA FLUORESCENCJI

**Zagadnienia:** struktura i klasyfikacja surfaktantów, układy micelarne, diagram Jabłońskiego, wygaszanie fluorescencji, równanie Sterna–Volmera

### Wstęp

Surfaktanty (ang. *surface active agent*), inaczej środki powierzchniowo czynne, to związki chemiczne posiadające zdolność zmieniania właściwości powierzchniowych cieczy, w której są rozpuszczone. Zdolność tę zawdzięczają swojej asymetrycznej budowie. Składają się z części niepolarniej (hydrofobowej, lipofilowej), którą jest zwykle długi łańcuch węglowodorowy, oraz z części polarnej (hydrofilowej, lipofobowej) o charakterze jonowym lub dipolowym. Polarna „głowa” wykazuje powinowactwo do wody i innych polarnych rozpuszczalników, a niepolarny „ogon” do cieczy niepolarnych. Z tego też względu surfaktanty nazywa się często związkami amfifilowymi. Z racji swojej specyficznej budowy wykazują one tendencję do agregacji i tworzenia struktur o rozmiarach koloidalnych, np. monowarstw na granicy pomiędzy fazami lub miceli w fazie objętościowej roztworu surfaktantu.

Surfaktanty można podzielić na dwie grupy:

- surfaktanty jonowe – ich polarna grupa obdarzona jest ładunkiem elektrycznym:
  - surfaktanty anionowe, np. siarczany alkilowe jak dodecylosiarczan sodu, SDS, sulfoniany (dodecylobenzenosulfonian sodu, LAS) oraz sole wyższych kwasów karboksylowych (mydła);
  - surfaktanty kationowe, np. czwartorzędowe sole amoniowe jak bromek cetylotrimetyloamoniowy, CTAB;
  - surfaktanty amfoteryczne (zwitterionowe); posiadają dwie naładowane grupy o przeciwnym znaku; wypadkowy ładunek cząsteczki zależy od pH roztworu.
- surfaktanty niejonowe – ich polarna grupa ma charakter dipolowy jednak nie posiada ładunku elektrycznego.

Cząsteczki surfaktantu wprowadzone do roztworu wodnego ulegają rozpuszczeniu mimo obecności długiego łańcucha węglowodorowego dzięki solwatacji polarnej głowy przez cząsteczki rozpuszczalnika. Ponieważ pomiędzy polarnymi grupami cząsteczek surfaktantu występuje odpychanie elektrostatyczne możliwe jest utworzenie homogenicznego roztworu. Jeśli surfaktant ma charakter jonowy, wówczas w miarę wzrostu jego stężenia wzrasta siła jonowa roztworu i w rezultacie zmniejsza się

odpychanie elektrostatyczne pomiędzy polarnymi fragmentami cząsteczek. Ponadto zmniejsza się łatwość, z jaką rozpuszczane są łańcuchy węglowodorowe. Przy pewnym stężeniu surfaktantu tendencja do rozpuszczania kolejnych cząsteczek zostaje zrównoważona przez siły przeciwdziałające temu procesowi. Następuje wówczas samorzutna (spontaniczna) organizacja (porządkowanie) cząsteczek surfaktantu w fazie objętościowej roztworu, to jest tworzenie miceli. Stężenie surfaktantu, przy którym obserwuje się ten proces nazywane jest **krytycznym stężeniem micelizacji** (CMC, ang. *critical micelle concentration*). Dalsze dodawanie surfaktantu do roztworu powoduje tworzenie kolejnych form zagregowanych, nie zwiększa jednak stężenia wolnych cząsteczek. Agregaty cząsteczek surfaktantu powyżej krytycznego stężenia micelizacji są termodynamicznie trwałe i pozostają w stanie równowagi dynamicznej z pojedynczymi cząsteczkami surfaktantu w roztworze oraz cząsteczkami tworzącymi inne micelle.

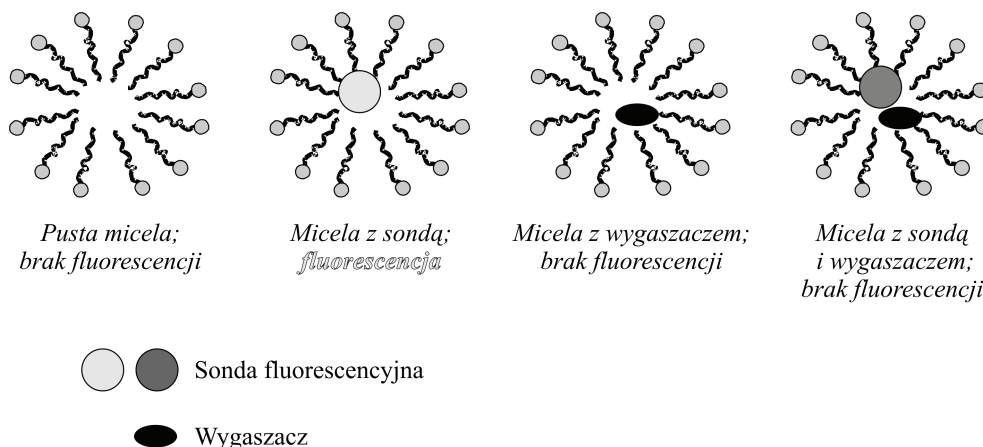
Osiągnięciu krytycznego stężenia micelizacji towarzyszy skokowa zmiana właściwości fizycznych roztworu surfaktantu (min. przewodnictwa elektrycznego, lepkości, napięcia powierzchniowego). Ponadto, dzięki obecności miceli, przy stężeniu surfaktantu powyżej cmc rozpuszczeniu (solubilizacji) w danym rozpuszczalniku ulegać mogą substancje normalnie słabo lub w ogóle w nim nie rozpuszczalne. Wszystkie te właściwości roztworów surfaktantów wykorzystać można do wyznaczenia krytycznego stężenia micelizacji.

Oprócz krytycznego stężenia micelizacji wielkością charakteryzującą dany surfaktant jest **średnia liczba agregacji** ( $N_{agg}$ ), która odpowiada średniej liczbie cząsteczek surfaktantu w miceli. Jest to uśredniona wartość dla pewnej ilości miceli będących dynamicznymi strukturami wymieniającymi pojedyncze cząsteczki surfaktantu pomiędzy sobą i roztworem.

Liczba agregacji zależy od:

- struktury surfaktantu (długości łańcucha węglowodorowego, charakteru polarnej „głowy”, rodzaju przeciwjonu związanego z cząsteczką surfaktantu). Surfaktanty z dłuższymi łańcuchami węglowodorowymi mają niższe cmc i większą liczbę agregacji w porównaniu do swoich analogów o krótszych łańcuchach. Surfaktanty niejonowe mają niższe cmc oraz większą liczbę agregacji w porównaniu do swoich jonowych odpowiedników o takiej samej długości łańcucha węglowodorowego. W przypadku surfaktantów jonowych, im silniej przeciwjony związane są z cząsteczką surfaktantu, tym niższe jest cmc takiego związku i tym wyższa liczba agregacji,
- siły jonowej roztworu. Zwiększenie siły jonowej roztworu surfaktantu poprzez dodatek soli obniża cmc i jednocześnie zwiększa liczbę agregacji, ponieważ osłabione zostają odpychania elektrostatyczne pomiędzy polarnymi fragmentami cząsteczek. Efekt ten jest najsilniej widoczny w przypadku surfaktantów jonowych,
- stężenia surfaktantu,
- w niewielkim stopniu od temperatury.

Średnią liczbę agregacji wyznaczyć można wykorzystując tzw. sondy fluorescencyjne, tj. związki charakteryzujące się dużą wydajnością kwantowa fluorescencji, dobrane tak, aby dobrze rozpuszczalne były w hydrofobowym wnętrzu miceli, a bardzo słabo rozpuszczalne w rozpuszczalniku, w którym micelle te powstały. Do wodnego roztworu surfaktantu o stężeniu powyżej krytycznego stężenia micelizacji (większość cząsteczek zagregowana w micelle), wprowadza się fluoryzującą substancję, która jest nierozpuszczalna lub bardzo słabo rozpuszczalna w wodzie. Dzięki obecności miceli zostaje ona rozpuszczona (przeprowadzona do roztworu) i można zmierzyć jej widmo fluorescencji. Następnie wprowadza się odpowiednio dobrany związek (również bardzo słabo rozpuszczalny w wodzie), który wygasza fluorescencję sondy i rejestruje kolejne widma fluorescencji przy stałym stężeniu surfaktantu i wzrastających stężeniach wygaszacza lub przy stałym stężeniu wygaszacza i wzrastających stężeniach surfaktantu. Istota opisaney metody polega na tym, że w układzie zawierającym zarówno sondę jak i wygaszacz rozpuszczone w micelach (obecnych w nadmiarze względem tak sondy jak i wygaszacza), wygaszanie staje się mniej efektywne wraz ze wzrostem stężenia miceli, ponieważ zmniejsza się prawdopodobieństwo, że w tej samej miceli znajdzie się zarówno sonda jak i wygaszacz (rysunek 1).



Rys. 1.

Dobierając wygaszacz należy sprawdzić czy widmo absorpcji wybranej sondy nie pokrywa się z widmem absorpcji wygaszacza. Jeśli warunek ten jest spełniony, oznacza to, że można selektywnie wzbudzić sondę. Warto pamiętać również o tym, że widmo fluorescencji sondy powinno w możliwie małym stopniu pokrywać się z ewentualnym widmem fluorescencji wygaszacza, jeśli wzbudzenie sondy nie było całkowicie selektywne. Pozwala to na znalezienie takiej długości fali, przy której monitorować można intensywność fluorescencji sondy bez udziału fluorescencji wygaszacza (analityczna długość fali).

Stosując opisaną metodę wyznaczania liczby agregacji należy pamiętać o następujących jej ograniczeniach:

- aby układ mógł być traktowany jako „statyczny”, czas przebywania tak sondy jak i wygaszacza w micelach powinien być dłuższy niż czas życia stanu wzbudzonego sondy (tj. nie może być migracji sondy i/lub wygaszacza w czasie życia stanu wzbudzonego);
- wygaszanie musi być całkowite, tj. fluoryzować mogą tylko sondy w tych micelach, w których nie ma cząsteczki wygaszacza. Statyczny charakter wygaszania sprawdzić można mierząc czasy zaniku fluorescencji (metodą zliczania pojedynczych fotonów) w funkcji stężenia wygaszacza. Mimo malejącej intensywności fluorescencji, czas jej zaniku powinien pozostać niezmienny, zwiększa się bowiem liczba cząsteczek, których fluorescencja została wygaszona (stąd spadek intensywności), natomiast fluorescencja pozostałych cząsteczek (w micelach bez wygaszacza) pozostaje niezmienną;
- należy znać stężenie wygaszacza w micelach; nie zawsze jest ono równe całkowitemu stężeniu wygaszacza;
- stężenie sondy powinno być dobrane tak, aby na jedną micelę przypadła nie więcej niż jedna fluoryzująca cząsteczka. Zbyt wysokie stężenie sondy może mieć wpływ na liczbę agregacji. Wygaszacz jest zwykle stosowany w tak niskich stężeniach, że spełnia oba powyższe warunki;
- zakłada się, że cząsteczki zarówno fluorescencyjnej sondy jak i wygaszacza rozmieszczone są w micelach wg rozkładu Poissona.

Jako pierwsi metodę wyznaczania liczby agregacji w oparciu o stacjonarne pomiary wygaszania fluorescencji zaproponowali N. J. Turro i A. Yekta wykorzystując sześciowodny chlorek tris-(2,2'-bipirydylo)rutenu (II) jako luminescencyjną sondę oraz 9-metyloantracen jako wygaszacz. Sonda ta stosowana może być tylko przy wyznaczaniu  $N_{agg}$  surfaktantów anionowych, ponieważ jej wiązanie się z micelami oparte jest na przyciąganiu elektrostatycznym kation metalu – ujemnie naładowana micela. W metodzie tej zakłada się całkowite wygaszanie, co prawdziwe jest tylko dla micel z  $N_{agg} \leq 120$  oraz przyjmuje się, że całkowite stężenie wygaszacza jest jego stężeniem w micelach. Przy tak poczynionych założeniach można powiązać zmierzony spadek intensywności fluorescencji  $I/I_0$  ( $I$  – intensywność fluorescencji przy danym stężeniu wygaszacza,  $I_0$  – intensywność fluorescencji w nieobecności wygaszacza) ze stężeniem wygaszacza  $c_Q$  oraz stężeniem miceli  $c_M$  za pomocą poniższego równania:

$$\frac{I}{I_0} = \exp\left(-\frac{c_Q}{c_M}\right) \quad (1)$$

Stężenie miceli wyrazić można jako:

$$c_M = \frac{c_{surf} - c_{mon}}{N_{agg}} \quad (2)$$

gdzie  $c_{surf}$  jest całkowitym stężeniem surfaktantu,  $c_{mon}$  stężeniem pojedynczych cząsteczek surfaktantu (często przyjmowanym jako równe bądź zbliżone do cmc), a  $N_{agg}$  średnią liczbą agregacji. Po podstawieniu równania (2) do równania (1) otrzymuje się następujące wyrażenie:

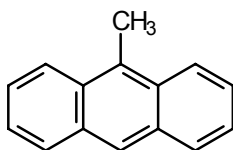
$$\ln\left(\frac{I_0}{I}\right) = \frac{c_Q N_{agg}}{c_{surf} - c_{mon}} \quad (3)$$

które można przekształcić odpowiednio do postaci:

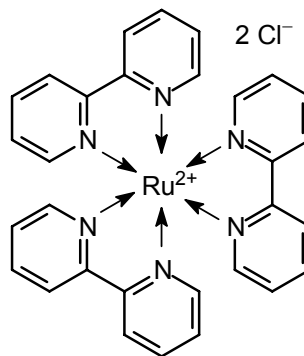
$$\left[\ln\left(\frac{I_0}{I}\right)\right]^{-1} = \frac{c_{surf}}{c_Q N_{agg}} - \frac{c_{mon}}{c_Q N_{agg}} \quad (4)$$

Bazując na powyższych równaniach można wyznaczyć średnią liczbę agregacji dwiema metodami: **A)** korzystając z równania (4) można wyznaczyć średnią liczbę agregacji mierząc intensywność fluorescencji badanego roztworu przy stałym stężeniu wygaszacza i wzrastającym stężeniu surfaktantu  $c_{surf}$ . Przedstawiając na wykresie zależność  $[\ln(I_0/I)]^{-1}$  funkcji stężenia surfaktantu i stosując regresję liniową, ze współczynnika kierunkowego prostej, znając  $c_Q$ , oblicza się średnią liczbę agregacji; **B)** w analogiczny sposób, korzystając z równania (3), można wyznaczyć  $N_{agg}$  znając intensywności fluorescencji roztworów o stałym stężeniu surfaktantu i wzrastającym stężeniu wygaszacza oraz zakładając, że stężenie pojedynczych cząsteczek surfaktantu  $c_{mon}$  będzie równe krytycznemu stężeniu micelizacji  $c_{CMC}$ . Na wykresie przedstawia się zależność  $\ln(I_0/I)$  funkcji stężenia wygaszacza  $c_Q$  i z parametrów takiej prostej uzyskanych z regresji liniowej oblicza się średnią liczbę agregacji.

Stosując jedną z powyższych metod można w stosunkowo nieskomplikowany sposób badać wpływ elektrolitu na liczbę agregacji. W tym celu należy prowadzić pomiary w obecności różnych stężeń wybranej soli, np. chlorku sodu.



9-metyloantracen  
(wygaszacz)



chlorek tris-(2,2'-bipirydylo)rutenu (II)  
(sonda fluorescencyjna)

## Cel ćwiczenia

Celem ćwiczenia jest wyznaczenie średniej liczby agregacji surfaktantu anionowego w oparciu o pomiary wygaszania fluorescencji kompleksu Ru (II) przez 9-metylo-antracen w obecności rosnących stężeń surfaktantu (metoda A).

## Wykonanie ćwiczenia i opracowanie wyników

### 1) Widmo absorpcji sondy w roztworze surfaktantu

Dla wodnego roztworu SDS o stężeniu  $1 \times 10^{-2}$  mol/dm<sup>3</sup> zawierającego chlorek tris-(2,2'-bipirydylo)rutenu (II) o stężeniu  $7,2 \times 10^{-5}$  mol/dm<sup>3</sup> rejestrujemy widmo absorpcji w zakresie 300–650 nm stosując roztwór wodny surfaktantu jako odnośnik.

### 2) Widmo absorpcji wygaszacza w roztworze surfaktantu

W 5 ml kolbce miarowej do wodnego roztworu SDS o stężeniu  $1 \times 10^{-2}$  mol/dm<sup>3</sup> dodajemy 100  $\mu$ l wyjściowego metanolowego roztworu  $5 \times 10^{-3}$  mol/dm<sup>3</sup> 9-metylo-antracenu. Stężenie wygaszacza w kolbce wynosi wówczas  $1 \times 10^{-4}$  mol/dm<sup>3</sup>. Rejestrujemy widmo absorpcji próbki w zakresie 300–650 nm stosując roztwór wodny surfaktantu jako odnośnik.

3) Na ten sam wykres nanosimy widma absorpcji sondy oraz wygaszacza, aby sprawdzić czy możliwe jest selektywne wzbudzenie sondy. W oparciu o zmierzone widma dobieramy odpowiednią długość fali wzbudzenia wykorzystywaną w dalszych pomiarach.

4) Odpowiednie ilości (5 ml) roztworów o wzrastającym stężeniu surfaktantu ( $c_{surf}$  odpowiednio  $1 \times 10^{-2}$  mol/dm<sup>3</sup>;  $2 \times 10^{-2}$  mol/dm<sup>3</sup>;  $3 \times 10^{-2}$  mol/dm<sup>3</sup>;  $4 \times 10^{-2}$  mol/dm<sup>3</sup>) zawierających chlorek tris-(2,2'-bipirydylo)rutenu (II) o stężeniu  $7,2 \times 10^{-5}$  mol/dm<sup>3</sup> przenosimy do czterech kolbek miarowych i do każdej z nich dodajemy 100  $\mu$ l wyjściowego roztworu  $5 \times 10^{-3}$  mol/dm<sup>3</sup> 9-metyloantracenu w metanolu. W analogiczny sposób przygotowujemy cztery kolejne próbki, do których zamiast roztworu wygaszacza dodajemy 100  $\mu$ l samego metanolu.

5) Mierzmy widma fluorescencji (500–850 nm) ośmiu w ten sposób przygotowanych roztworów, jako długość fali wzbudzenia stosując  $\lambda$  odczytane z widma absorpcji sondy ( $\lambda_{wz} \approx 450$  nm).

6) Z widm zarejestrowanych dla różnych stężeń SDS w nieobecności wygaszacza odczytujemy odpowiadające im intensywności fluorescencji  $I_0$  obliczając pola powierzchni pod zarejestrowanymi krzywymi emisji. Dane wpisujemy do tabeli 1.

7) W analogiczny sposób postępujemy z widmami zmierzonymi w obecności wygaszacza. Odczytane intensywności fluorescencji  $I$  również umieszczamy w tabeli 1.

8) Korzystając z uzyskanych danych sporządzamy wykres  $[\ln(I_0/I)]^{-1}$  funkcji stężenia surfaktantu  $c_{surf}$ .

9) Stosując regresję liniową obliczamy współczynnik kierunkowy prostej opisanej równaniem (4) i obliczamy średnią liczbę agregacji  $N_{agg}$ .

Tabela 1

$c_{surf}$ [mol/dm <sup>3</sup> ]	$c_Q$ [mol/dm <sup>3</sup> ]	$I_0$	$I$	$I_0/I$	$\ln(I_0/I)$	$[\ln(I_0/I)]^{-1}$
$1 \times 10^{-2}$	0		—			
	$1 \times 10^{-4}$	—				
$2 \times 10^{-2}$	0		—			
	$1 \times 10^{-4}$	—				
$3 \times 10^{-2}$	0		—			
	$1 \times 10^{-4}$	—				
$4 \times 10^{-2}$	0		—			
	$1 \times 10^{-4}$	—				

## LITERATURA

- [1] N. J. Turro, A. Sekta, *J. Am. Chem. Soc.*, **1978**, 100, 5951
- [2] K. Goodling, K. Johnson, L. Lefkowitz, B. W. Williams, *J. Chem. Educ.*, **1994**, 71, A8
- [3] J. van Stam, S. Depaemelaere, F. C. de Schryver, *J. Chem. Educ.*, **1998**, 75, 93
- [4] P. J. Tummino, A. Gani, *Biophys. J.*, **1993**, 64, 1580





