

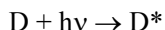
## Ćwiczenie 9

# WYZNACZANIE ODLEGŁOŚCI KRYTYCZNEJ POMIĘDZY CZĄSTECZKAMI DONORA I AKCEPTORA W PROCESIE REZONANSOWEGO PRZENIESIENIA ENERGII (FRET)

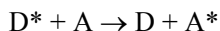
**Zagadnienia:** procesy dezaktywacji stanów elektronowo wzbudzonych (diagram Jabłońskiego), mechanizmy przenoszenia energii wzbudzenia (Förstera i Dextera), fotosensybilizacja, efekt filtru wewnętrznego I i II rodzaju, widma absorpcji i emisji, prawo Lamberta–Beera.

### Wstęp

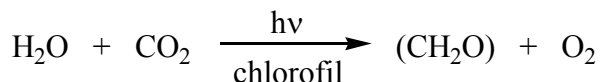
Proces przeniesienia energii ze wzbudzonej cząsteczki do innej cząsteczki w stanie podstawowym odgrywają bardzo ważną rolę w fotochemii i fotobiologii. W tym procesie cząsteczka D wzbudzona w wyniku absorpcji światła:



nazywana jest donorem energii wzbudzenia, a cząsteczka A, która zostaje wzbudzona w wyniku procesu przeniesienia energii, nazywana jest akceptorem energii. Proces przeniesienia energii można przedstawić schematycznie za pomocą prostego równania:



W wyniku tego procesu wzbudzona cząsteczka donora  $D^*$  przechodzi do elektronowego stanu podstawowego (D), a cząsteczka akceptora A ulega wzbudzeniu elektronowemu ( $A^*$ ) [1]. Procesy przenoszenia energii są odpowiedzialne za obserwowaną dla odpowiednich układów donora i akceptora sensybilizowaną emisję (fluorescencję lub fosforescencję) a także za sensybilizowane reakcje fotochemiczne. Przykładem reakcji fotosensybilizowanej jest fotosynteza, wieloetapowy proces obejmujący etapy wymagające światła, jak i etapy zachodzące bez udziału światła. Ostatecznymi produktami procesu fotosyntezy są tlen i węglowodany. Sumaryczny zapis:



nie odzwierciedla wieloetapowości procesu fotosyntezy, ale wskazuje na podstawową rolę absorpcji światła w tym procesie. W pierwszym etapie fotosyntezy cząsteczka

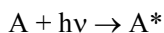
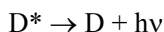
chlorofilu absorbuje światło i ulega wzbudzeniu elektronowemu. Następnie wzbudzona elektronowo cząsteczka chlorofilu przekazuje energię wzbudzenia innym cząsteczkom znajdującym się w układzie fotosyntetycznym. Poznanie mechanizmów przenoszenia energii wzbudzenia miało istotne znaczenie dla wyjaśnienia przebiegu reakcji fotochemicznych, w tym także tych, które zachodzą w układach biologicznych.

W procesie przenoszenia energii może uczestniczyć donor we wzbudzonym stanie singletowym lub trypletowym oraz akceptor w elektronowym stanie podstawowym. W szczególnych warunkach, np. w procesie anihilacji tryplet–tryplet, akceptor może już być w stanie wzbudzonym (trypletowym). Proces przekazywania energii z  $D^*$  do A może być jakościowo opisywany poprzez obserwowany eksperymentalnie zanik (zmniejszenie intensywności) emisji lub reakcji fotochemicznej zachodzących z  $D^*$  (wygaszanie) i pojawienie się emisji lub procesu fotochemicznego charakterystycznych dla akceptora (sensybilizacja) pomimo, że promieniowanie padające na układ  $D + A$  jest absorbowane wyłącznie przez cząsteczki D (donora).

Można wyróżnić dwa podstawowe typy przeniesienia energii wzbudzenia elektronowego [1, 2]:

- 1) promieniste (radiacyjne) przeniesienie energii (proces trywialny),
- 2) bezpromieniste przeniesienie energii.

Proces zachodzący zgodnie z mechanizmem promienistego przeniesienia energii można przedstawić w następujący sposób:



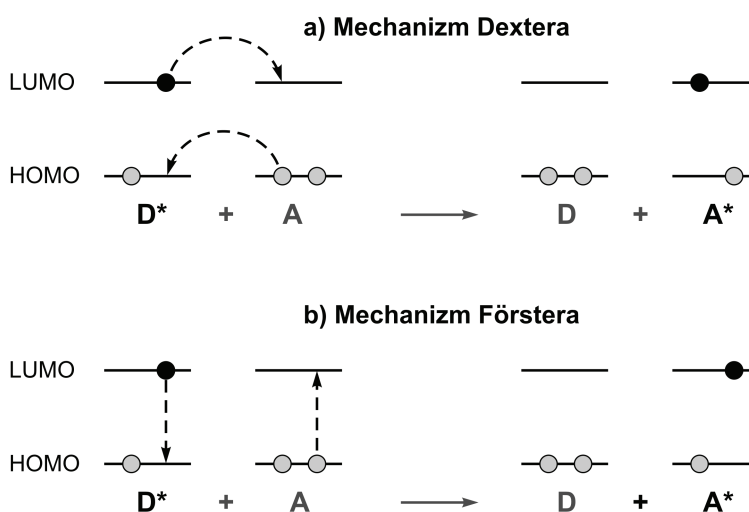
W mechanizmie tym można wyróżnić dwa etapy: cząsteczka D wzbudzona w wyniku absorpcji światła emituje kwant  $h\nu$ , a następnie kwant światła  $h\nu$  (foton) jest absorbowany przez znajdujące się w układzie cząsteczki A. Ten typ przeniesienia energii może wystąpić, gdy cząsteczki donora (D) emitują, a cząsteczki akceptora (A) absorbują światło (promieniowanie z zakresu UV-VIS) w podobnym zakresie spektralnym, tzn. występuje nakrywanie się widm emisji donora i absorpcji akceptora w pewnym zakresie spektralnym. Wydajność procesu przeniesienia energii zgodnie z tym mechanizmem jest proporcjonalna do wydajności kwantowej emisji donora D oraz absorpcji akceptora A w zakresie spektralnym odpowiadającym nakrywaniu się widm emisji donora i absorpcji akceptora. Prawdopodobieństwo reabsorpcji kwantu światła  $h\nu$  przez cząsteczkę A jest odwrotnie proporcjonalne do kwadratu odległości między cząsteczkami D oraz A. Przeniesienie energii z  $D^*$  do A zachodzące według mechanizmu trywialnego nie powoduje zmian czasu życia emisji donora. Eksperymentalnie taki proces przeniesienia energii jest obserwowany jako zmiana kształtu pasma emisji donora (efekt filtra wewnętrznego II rodzaju).

Proces przekazywania energii elektronowej ze wzbudzonych cząsteczek  $D^*$  do cząsteczek akceptora A, podczas którego nie występuje zjawisko emisji i reabsorpcji fotonu, nazywa się bezpromienistym przekazywaniem energii. W przeciwieństwie do mechanizmu trywialnego, bezpromieniste przeniesienie energii jest procesem

jednoetapowym i nie uczestniczą w nim inne indywidua przejściowe poza  $D^*$  oraz  $A^*$ . Proces przekazywania energii wg tego mechanizmu następuje w wyniku oddziaływania cząsteczek wzbudzonego donora z cząsteczkami akceptora. Przeniesienie energii wzbudzenia według tego mechanizmu powoduje zmniejszenia czasu życia ( $\tau_D$ ) wzbudzonej cząsteczki donora.

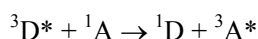
Znane są dwa główne procesy (mechanizmy) bezpromienistego przenoszenia energii [1, 2]:

- 1) mechanizm wymienny (Dextera),
- 2) mechanizm rezonansowy (Förstera).



**Rys. 1.** Schematyczne przedstawienie procesu przeniesienia energii wg mechanizmu Dextera i Förstera

Przeniesienie energii wg mechanizmu Dextera zachodzi tylko przy bardzo małych odległościach pomiędzy donorem energii a jej akceptorem. Polega ono na wymianie elektronów pomiędzy cząsteczką  $D^*$  i A (rysunek 1a), która możliwa jest tylko wówczas, kiedy w wyniku nałożenia chmur elektronowych  $D^*$  i A ich elektrony stają się nierozróżnialne. Wzbudzony elektron z cząsteczki  $D^*$  może wówczas przejść do cząsteczki A z jednoczesnym przemieszczeniem się elektronu z cząsteczki A do cząsteczki  $D^*$ . Ponieważ oba procesy przeniesienia elektronu są równoczesne, zarówno D jak i A pozostają w trakcie wymiany elektronów cząsteczkami obojętnymi i nie obserwuje się tworzenia rodnikojonów jako tworów przejściowych. Zgodnie z regułą zachowania całkowitego spinu układu (reguła Wignera), przeniesienie energii tryplet-tryplet wg mechanizmu Dextera jest procesem dozwolonym:

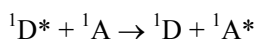


Przejście takie jest zabronione wg mechanizmu rezonansowego, ponieważ w wyniku przeniesienia energii zmianie ulega multipletowość akceptora (stan singletowy staje się stanem trypletowym).

W układzie donora i akceptora (9,10-difenyloantracen i perylen) stosowanym w ćwiczeniu przeniesienie energii następuje w procesie międzycząsteczkowym zgodnie z mechanizmem rezonansowym (Förster resonance energy transfer, FRET). Przeniesienie energii zachodzące według tego mechanizmu to proces, który może zachodzić pomiędzy cząsteczkami znacznie od siebie oddalonymi. Odległości pomiędzy  $D^*$  oraz A mogą wynosić 5–10 nm, a więc znacznie przewyższać rozmiary cząsteczek. W opisie jakościowym proces rezonansowego przeniesienia energii można przedstawić za pomocą układu dwóch sprzężonych ze sobą oscylatorów. W wyniku tego sprzężenia energia może być przeniesiona z jednego oscylatora na drugi (rysunek 1b).

Przeniesienie energii wg mechanizmu rezonansowego jest wynikiem oddziaływania pomiędzy momentem dipolowym przejścia w cząsteczkach donora ( $D^* \rightarrow D$ ) i akceptora ( $A \rightarrow A^*$ ) (oddziaływanie dipol–dipol). Zmiana momentu dipolowego związana z przejściem elektronowym w donorze ( $D^* \rightarrow D$ ) powoduje powstanie pola elektrycznego, które oddziałuje na elektrony cząsteczki A. W wyniku tego oddziaływania następuje przejście jednego elektronu w cząsteczce A z orbitalu o niższej energii na orbital o wyższej energii (stan elektronowo wzbudzony). Temu przejściu elektronowemu towarzyszy także powstanie pola elektrycznego, które z kolei oddziałuje na elektron w cząsteczce donora.

Podobnie jak obydwa oscylatory powinny mieć tę samą częstotliwość dla optymalnego sprzężenia, tak analogicznie przejścia w donorze ( $D^* \rightarrow D$ ) i przejście w akceptorze ( $A \rightarrow A^*$ ) powinny posiadać niemalże tę samą energię. Warunkiem koniecznym w przypadku mechanizmu rezonansowego jest niezmiennosc multipletowości stanu elektronowego zarówno donora jak i akceptora. Najważniejszym i w pełni dozwolonym procesem zachodzącym według tego mechanizmu jest przeniesienie energii singlet–singlet:



Teoretyczny opis procesu przeniesienia energii dipol–dipol w roztworach podał po raz pierwszy Förster. Traktując układ donor–akceptor jako sprzężone oscylatory dipolowe i zakładając, że energia oscylacyjna wzbudzonego donora pozostaje w równowadze termicznej z otaczającym ośrodkiem Förster otrzymał następujące wyrażenie na stałą szybkości przeniesienia energii w przypadku, gdy widmo emisji donora nakłada się na widmo absorpcji akceptora [1]:

$$k_{\text{FRET}} = \frac{9000 (\ln 10) \kappa^2 \Phi_D}{128 \pi^5 N n^4 \tau_D R^6} \times \int_0^\infty f_D(\tilde{\nu}) \varepsilon_A(\tilde{\nu}) \frac{1}{\tilde{\nu}^4} d\tilde{\nu} \quad (1)$$

gdzie: N – liczba Avogadro

$\Phi_D$  – wydajność kwantowa emisji donora

- $n$  – współczynnik załamania ośrodka  
 $\tau_D$  – czas życia stanu wzbudzonego donora  
 $R$  – odległość pomiędzy wzbudzonym donorem  $D^*$  i akceptorem  $A$   
 $\kappa$  – czynnik określony przez przestrzenne orientacje wektorów momentów przejścia, średnia wartość  $\kappa^2 = 2/3$   
 $f_D(\tilde{\nu})$  – funkcja określająca spektralny rozkład emisji donora znormalizowany do jedności (tzn.  $\int_0^\infty f_D(\tilde{\nu}) d\tilde{\nu} = 1$ )  
 $\varepsilon_A(\tilde{\nu})$  – molowy współczynnik absorpcji akceptora dla liczby falowej  $\tilde{\nu}$  ( $\tilde{\nu}$  w  $\text{cm}^{-1}$ ).

Ze wzoru (1) wynika, że stała szybkości przeniesienia energii jest odwrotnie proporcjonalna do szóstej potęgi odległości pomiędzy cząsteczkami donora i akceptora oraz czasu życia stanu wzbudzonego donora. Natomiast zgodnie ze wzorem (1) wartość  $k_{\text{FRET}}$  rośnie wraz ze wzrostem wartości wydajności kwantowej emisji donora energii oraz wartości całki, która opisuje nakrywanie się widma emisji donora i widma absorpcji akceptora. Proces przenoszenia energii będzie najbardziej wydajny wtedy, gdy energie stanów wzbudzonych  $D^*$  oraz  $A^*$  są takie same (stany izoenergetyczne). Wartość parametru  $\kappa$  w równaniu (1) jest zależna od kąta, jaki tworzą momenty przejść elektronowych w cząsteczkach  $D$  i  $A$ . Czynnik ten dla poszczególnych pary  $D + A$  bardzo trudno wyznaczyć; dla przypadkowej przestrzennej orientacji obu cząsteczek przyjmuje się, że  $\kappa^2 = 2/3$ .

Równanie (1) ma zastosowanie w odniesieniu do pojedynczej pary cząsteczek donora i akceptora znajdujących się w odległości  $R$ . Zastosowanie tego równania do układu złożonego z wielu cząsteczek wymaga uśrednienia po wszystkich wartościach, jakie może przyjmować  $R$  w dużym zbiorze cząsteczek. Dlatego też proces rezonansowego przekazywania energii opisuje się często za pomocą tzw. krytycznej odległości  $R_0$ , definiowanej jako odległość, dla której szybkość przeniesienia energii ( $k_{\text{FRET}}$ ) jest równa sumie szybkości wszystkich pozostałych procesów dezaktywujących stan wzbudzony donora ( $1/\tau_D$ ) [1]

$$k_{\text{FRET}} = \frac{1}{\tau_D} \quad (2)$$

Podstawiając równanie (2) do równania (1) otrzymujemy:

$$R_0^6 = \frac{9000 (\ln 10) \kappa^2 \Phi_D}{128 \pi^5 N n^4} \times \int_0^\infty f_D(\tilde{\nu}) \varepsilon_A(\tilde{\nu}) \frac{1}{\tilde{\nu}^4} d\tilde{\nu} \quad (3)$$

Z powyższego równania (3) wynika, że odległość krytyczna może być wyznaczona z widm absorpcji akceptora oraz emisji donora.

### Cel ćwiczenia

Celem ćwiczenia jest wskazanie, który ze związków mieszaniny 9,10-difenyloantracenu (DFA) + perylen (P) może pełnić rolę donora a który akceptora energii wzbudzenia w procesie przeniesienia energii zachodzącym zgodnie z mechanizmem Förstera oraz wyznaczenie wartości odległości krytycznej  $R_0$  dla pary donor–akceptor w oparciu o równanie (4) oraz widma absorpcji i emisji DFA i P w heksanie.

Odległość  $R_0$  wyznaczamy ze wzoru (4), którego modyfikacja względem wzoru (3) wynika z konieczności znormalizowania do jedności pola powierzchni pod eksperymentalną krzywą fluorescencji  $I_F(\tilde{\nu})$  (wzory 5 i 6).

$$R_0^6 = a \frac{\int_0^\infty I_F(\tilde{\nu}) \varepsilon_A(\tilde{\nu}) \frac{1}{\tilde{\nu}^4} d\tilde{\nu}}{\int_0^\infty I_F(\tilde{\nu}) d\tilde{\nu}} \quad [\text{cm}^6] \quad (4)$$

gdzie:

$$a = \frac{9000 (\ln 10) \kappa^2 \Phi_D}{128 \pi^5 N n^4} \quad \text{dla badanego układu } a = 11,47 \times 10^{-26} [\text{mol}]$$

$I_F(\tilde{\nu})$  – intensywność emisji donora dla liczby falowej  $\tilde{\nu}$   
Znaczenie pozostałych symboli takie jak w opisie równania (1).

$$\frac{1}{A} \int_0^\infty I_F(\tilde{\nu}) d\tilde{\nu} = \int_0^\infty f_D(\tilde{\nu}) d\tilde{\nu} = 1 \quad (5)$$

gdzie  $A$  to czynnik normalizujący o wartości:

$$A = \int_0^\infty I_F(\tilde{\nu}) d\tilde{\nu} \quad (6)$$

Z równania (1) wynika, że  $k_{\text{FRET}} > 0$  tylko wtedy, gdy wartość całki  $\int_0^\infty f_D(\tilde{\nu}) \varepsilon_A(\tilde{\nu}) \frac{1}{\tilde{\nu}^4} d\tilde{\nu}$  zwanej całką nakrywania się widm emisji donora i absorpcji akceptora ma wartość  $> 0$ . Wartość tej całki wyznaczamy obliczając pole powierzchni pod nakrywającymi się krzywymi emisji donora i absorpcji akceptora  $\int_0^\infty I_F(\tilde{\nu}) \varepsilon_A(\tilde{\nu}) \frac{1}{\tilde{\nu}^4} d\tilde{\nu}$  (licznik równania 4), a następnie dzieląc otrzymaną wartość przez pole powierzchni pod krzywą fluorescencji  $\int_0^\infty I_F(\tilde{\nu}) d\tilde{\nu}$  (mianownik równania 4).

## Wykonanie ćwiczenia

W ćwiczeniu wykonywane są obliczenia w programie MS Excel. Konieczne do przeprowadzenia obliczeń dane eksperymentalne pomiarów absorbancji i intensywności fluorescencji (w zależności od długości fali) roztworów 9,10-difenyloantracenu (DFA) oraz perylenu (P) o stężeniu  $c = 2 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$  w cykloheksanie są zamieszczone jako pliki tekstowe:

**UV\_DFA.txt** wartości absorbancji ( $A_{\text{DFA}}$ ) 9,10-difenyloantracenu w zależności od długości fali (nm),

**UV\_P.txt** wartości absorbancji ( $A_{\text{P}}$ ) perylenu w zależności od długości fali (nm),

**F\_DFA.txt** wartości intensywności fluorescencji ( $I_{\text{F\_DFA}}$ ) 9,10-difenyloantracenu w zależności od długości fali (nm),

**F\_P.txt** wartości intensywności fluorescencji ( $I_{\text{F\_P}}$ ) perylenu w zależności od długości fali (nm).

- 1) Wprowadzić do arkusza MS Excel dane eksperymentalne pomiarów absorbancji i intensywności fluorescencji (w zależności od długości fali) roztworów 9,10-difenyloantracenu (DFA) oraz perylenu (P) zapisane jako pliki UV\_DFA.txt, UV\_P.txt, F\_DFA.txt oraz F\_P.txt. (Dane>Pobierz dane zewnętrzne>Importuj plik tekstowy...)
- 2) Wartości absorbancji ( $A$ ) dla DFA i P przeliczyć na molowe współczynniki absorpcji ( $\epsilon$ ) stosując prawo Lamberta–Beera:  $\epsilon = A / (c \times l)$ , gdzie stężenie roztworów  $c = 2 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ , a długość drogi optycznej (szerokość kuwety)  $l = 1 \text{ cm}$
- 3) Zarówno dla widm absorpcji jak i fluorescencji, długości fali promieniowania ( $\lambda$ ) wyrażone w nm ( $1 \text{ nm} = 10^{-9} \text{ m}$ ) przekształcić w liczby falowe ( $\tilde{\nu}$ ) korzystając z zależności:  $\tilde{\nu} (\text{cm}^{-1}) = 10^7 / \lambda (\text{nm})$
- 4) Sporządzić dwa wykresy:
  - i. na wykresie (1) przedstawić zależność  $\epsilon$  od liczby falowej  $\tilde{\nu}$  dla DFA oraz  $I_{\text{F}}$  od  $\tilde{\nu}$  dla P (skorzystać z opcji dodatkowej osi Y);
  - ii. na wykresie (2) przedstawić zależność  $\epsilon$  od liczby falowej  $\tilde{\nu}$  dla P oraz  $I_{\text{F}}$  od  $\tilde{\nu}$  dla DFA.

Dla każdego wykresu odczytać zakres spektralny pokrywania się widm absorpcji i emisji. Wskazać donora i akceptor energii oraz zakres spektralny, w którym widma się nakrywają.

- 5) Dla wskazanej pary donora i akceptora energii obliczyć wartość całki znajdującej się w liczniku równania (4):  $\int_0^{\infty} I_{\text{F}}(\tilde{\nu}) \epsilon_{\text{A}}(\tilde{\nu}) \frac{1}{\tilde{\nu}^4} d\tilde{\nu}$ . W tym celu sporządzić wykres zależności  $I_{\text{F}}(\tilde{\nu}) \epsilon_{\text{A}}(\tilde{\nu}) \frac{1}{\tilde{\nu}^4}$  (wartości y) od liczby falowej  $\tilde{\nu}$  (wartości x) (wykres 3). Pole powierzchni pod wykresem równe jest wartości szukanej całki. W zakresie spektralnym, w którym widmo emisji donora nie pokrywa się

z widmem absorpcji akceptora całka wynosić będzie zero. Pole pod krzywą należy obliczyć metodą trapezów wg wzoru: 
$$P = \sum_1^k \frac{(y_i + y_{i+1})(x_{i+1} - x_i)}{2}$$
 (wpisywanego jako formuła w programie MS Excel), gdzie  $l$  i  $k$  oznaczają liczby falowe określające zakres nakrywania się widma emisji donora z widmem absorpcji akceptora.

- 6) Dla tej samej pary donora i akceptora obliczyć wartość całki znajdującej się w mianowniku równania (4):  $\int_0^\infty I_F(\tilde{\nu}) d\tilde{\nu}$  W tym celu sporządzić wykres zależności  $I_F(\tilde{\nu})$  (wartości  $y$ ) od liczby falowej  $\tilde{\nu}$  (wartości  $x$ ) (wykres 4). Wartość całki, a więc pole powierzchni pod krzywą, obliczyć w sposób analogiczny jak w punkcie 5.
- 7) Znając wartości całek w liczniku i mianowniku równania 4 obliczyć odległość krytyczną  $R_0$  dla obserwowanego procesu przeniesienia energii i wyrazić ją w nanometrach.

## LITERATURA

- [1] S. Paszyc, *Podstawy fotochemii*, PWN, Warszawa 1992.  
[2] P. Suppan, *Chemia i światło*, tł. J. Prochorow, PWN, Warszawa 1997.  
[3] J.A. Baltrop, J.D. Coyle, *Fotochemia – podstawy*, PWN, Warszawa 1987.