

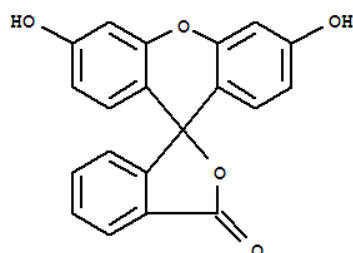
ĆWICZENIE 1

Wyznaczenie stałej Sterna-Volmera dla procesu wygaszania fluorescencji fluoresceiny.

Podstawowe pojęcia: absorpcja, fluorescencja, wygaszanie fluorescencji, wydajność kwantowa fluorescencji. Widmo absorpcji a widmo fluorescencji. Równanie Sterna-Volmera. Szybkość reakcji, stała szybkości reakcji, równania kinetyczne, rząd reakcji, stan stacjonarny, czas relaksacji.

Wstęp

Fluoroforem jest cząsteczka lub grupa funkcyjna zdolna do fluorescencji. Przykładem fluoroforu jest fluoresceina, która w roztworach zasadowych wykazuje zielonożółtą fluorescencję. W ćwiczeniu bada się proces wygaszania fluorescencji fluoresceiny, fluorosensora „czulego” na obecność jonów jodkowych. Na rysunku 1 przedstawiony jest wzór strukturalny cząsteczki fluoresceiny ($C_{20}H_{12}O_5$).

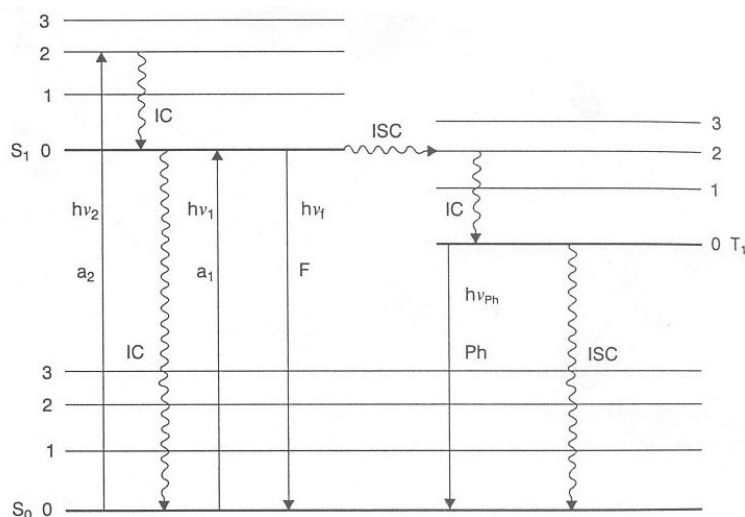


Rys. 1. Wzór strukturalny cząsteczki fluoresceiny.

Teoria

Promieniowanie wysyłane przez atomy lub cząsteczki, które uległy elektronowemu wzbudzeniu dzięki absorpcji światła, nazywamy luminescencją.

Luminescencja towarzyszy powrotowi cząsteczek ze wzbudzonego stanu elektronowego do podstawowego stanu elektronowego. Jeśli emisja promieniowania jest związana z samorzutnym przejściem z pierwszego wzbudzonego stanu singletowego S_1 na podstawowy stan singletowy S_0 : $S_1 \rightarrow S_0 + h\nu$, to luminescencję nazywamy fluorescencją. Na rysunku 2 prezentowany jest schemat zwany diagramem Jabłońskiego. Ten diagram przedstawia różne typy przejść promienistych i bezpromienistych, jakie mogą zachodzić w cząsteczce wieloatomowej po absorpcji przez nią fotonu.

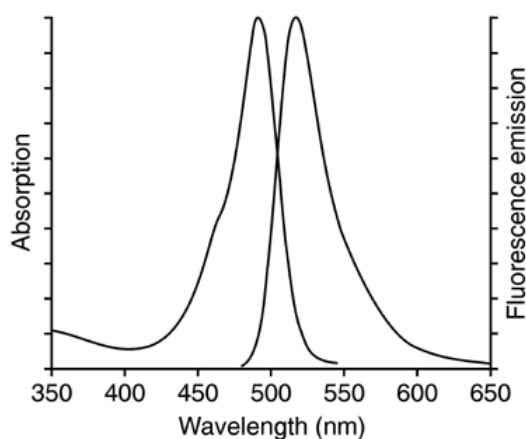


Rys. 2. Diagram Jabłońskiego. S_0 , S_1 i T_1 oznaczają odpowiednio stany singletowe i trypletowy, a_1 , a_2 - absorpcja fotonu, F – fluorescencja, Ph – fosforescencja, IC – konwersja wewnętrzna, ISC – konwersja międzysystemowa. Strzałkami prostymi oznaczone są przejścia promieniste, a falistymi – przejścia bezpromieniste.

Wzbudzenie zachodzi z reguły z najniższego poziomu oscylacyjnego podstawowego stanu elektronowego, ponieważ w temperaturze pokojowej większość cząsteczek znajduje się na tym poziomie. Stan dla poziomu $v = 0$ odpowiada w przybliżeniu minimum energii potencjalnej cząsteczek. Na rysunku 2 zaznaczono strzałkami drogę przejścia od stanu podstawowego S_0 do wzbudzonego S_1 w wyniku absorpcji kwantu światła. W konsekwencji cząsteczka przechodzi z zerowego poziomu oscylacyjnego podstawowego stanu elektronowego na zerowy (a_1) lub wyższy (a_2) poziom oscylacyjny pierwszego stanu wzbudzonego. Czas życia cząsteczki w stanie wzbudzenia S_1 zależy od następujących procesów: 1) fluorescencji, F, 2) reakcji chemicznej, 3) przejścia bezpromienistego, IC (tzw. konwersja wewnętrzna), i 4) przejścia (bezpromienistego) międzysystemowego lub interkombinacyjnego (ang.

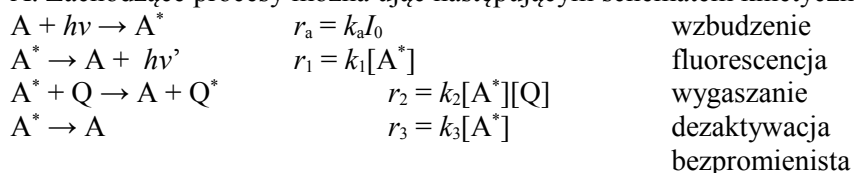
intersystem crossing), ISC, z S_1 do T_1 . W przypadku konwersji wewnętrznej nadmiar energii termicznej wytworzony w tym procesie jest przekazywany do otoczenia w postaci ciepła. Przejściu interkombinacyjnemu towarzyszy inwersja spinu, co powoduje powstawanie stanu trypletowego. Czas życia stanu T_1 jest zależny od następujących procesów: 1) fosforencencji, Ph, czyli przejścia promienistego z T_1 do S_0 2) reakcji chemicznych, 3) przejścia interkombinacyjnego, ISC, czyli przejścia bezpromienistego z T_1 do S_0 . Fosforencja i konwersja wewnętrzna (przejścia ze stanu T_1 do S_0) są procesami wzbronionymi, co jest powodem stosunkowo długiego czasu życia najniższych wzbudzonych stanów trypletowych.

Widmo fluorescencji jest zawsze przesunięte w kierunku fal dłuższych w stosunku do widma absorpcji. Kształt pasma absorpcji i emisji zależy od rozkładu energii poziomów oscylacyjnych stanów S_0 i S_1 . Rozkład ten jest często jednakowy dla obydwóch stanów i dlatego widmo emisji jest niemal zwierciadlanym odbiciem widma absorpcji. Na rysunku 3 przedstawione są widma absorpcji i fluorescencji fluoresceiny.



Rys. 3. Widmo absorpcji (lewe) i fluorescencji (prawe) fluoresceiny.

Rozpatrzmy proces wzbudzenia cząsteczek substancji A w wyniku absorpcji padającego światła $h\nu$ oraz drogi utraty energii zaabsorbowanej przez cząsteczki A. Zachodzące procesy można ująć następującym schematem kinetycznym:



Symbole r_a , r_1 , r_2 , r_3 oznaczają szybkości poszczególnych procesów, a k_1 , k_2 , k_3 są stałymi szybkości odpowiednio: fluorescencji cząsteczek wzbudzonych A^* , bezpromienistego przenoszenia energii od cząsteczek A^* do cząsteczek wygaszacza Q i dezaktywacji bezpromienistej cząsteczek A^* . Szybkość r_a procesu wzbudzenia cząsteczek substancji A jest równa liczbie moli fotonów $h\nu$ absorbowanych przez te cząsteczki w jednostce czasu i w jednostce objętości, a tym samym jest równa liczbie moli cząsteczek A ulegających w tych warunkach wzbudzeniu. Ponieważ z prawa Lamberta-Beera wynika, że liczba zaabsorbowanych fotonów jest proporcjonalna do natężenia padającego promieniowania I_0 (stężenie niewzbudzonych cząsteczek pozostaje w zwykłych warunkach wzbudzenia praktycznie stałe), zatem $r_a = k_0 = k_a I_0$ (k_0 jest stałą szybkości reakcji rzędu zerowego, a k_a jest wielkością stałą w danych warunkach doświadczalnych).

W stanie stacjonarnym szybkości procesów aktywacji i dezaktywacji muszą być równe: $r_a = r_1 + r_2 + r_3$, stąd

$$k_a I_0 = k_1[A^*] + k_2[A^*][Q] + k_3[A^*] \quad (1)$$

Wydajność kwantowa fluorescencji Φ jest stosunkiem liczby kwantów wyemitowanych do liczby pochłoniętych kwantów promieniowania wzbudzającego:

$$\Phi = \frac{k_1[A^*]}{k_a I_0}, \quad (2)$$

to

$$\Phi = \frac{k_1}{k_1 + k_3 + k_2[Q]}. \quad (3)$$

W nieobecności cząsteczek wygaszających Q, $[Q] = 0$, wydajność kwantowa Φ_0 jest równa

$$\Phi_0 = \frac{k_1}{k_1 + k_3}, \quad (4)$$

stąd

$$\frac{\Phi_0}{\Phi} = 1 + \frac{k_2}{k_1 + k_3}[Q] = 1 + k_2 \tau [Q] \quad (5)$$

Równanie to nosi nazwę równania Sterna-Volmera. Zamiast stałymi szybkości poszczególnych procesów operuje się często czasami relaksacji $\tau = 1/k$, które są miarą czasu życia poszczególnych stanów. W równaniu (5) czas $\tau = 1/(k_1 + k_3)$ określa czas życia stanu wzbudzonego w nieobecności cząsteczek wygaszających. Wygaszanie fluorescencji polega na zmniejszeniu jej natężenia w wyniku oddziaływania substancji fluoryzującej z substancją wygaszającą (wygaszaczem).

Część praktyczna

Metoda

Celem ćwiczenia jest zbadanie wpływu stężenia substancji wygaszającej na intensywność fluorescencji (I) barwnika (fluoresceiny). Zatem, korzystając ze spektrofluorometru, rejestruje się widma fluorescencji przygotowanych roztworów zawierających fluoresceinę i jodek potasu.

Odczynniki i aparatura

- roztwór fluoresceiny o stężeniu 0.01 mol/dm^3 w obecności $0.1 \text{ mol/dm}^3 \text{ NaOH}$
- roztwór jodku potasu o stężeniu 0.05 mol/dm^3
- 10 probówek o pojemności 10 ml
- pipety automatyczne o pojemności 5 ml, 1 ml, 0.1 ml
- 3 zlewki o pojemności 500 ml, 100 ml, 25 ml
- tryskawka
- spektrofluorometr

Wykonanie ćwiczenia

1. Sporządzić roztwory zawierające 0.1 cm^3 roztworu fluoresceiny o stężeniu 0.01 mol/dm^3 oraz różne objętości wody i roztworu jodku potasu o stężeniu 0.05 mol/dm^3 . Wymagane objętości roztworu KJ są podane w tabeli 1; objętość całkowita poszczególnych przygotowywanych roztworów powinna wynosić 5 cm^3 . Do probówek należy dodawać objętości poszczególnych cieczy w kolejności: najpierw wody, następnie roztworu jodku potasu, a na końcu – roztworu fluoresceiny. Zawartość danej probówki dobrze wymieszać, tak, by fluoresceina była rozproszona w całej objętości próbki. Roztwory fluoresceiny należy chronić przed światłem, a bezpośrednio przed pomiarem należy je dokładnie wymieszać.
2. Zarejestrować widma fluorescencji fluoresceiny w zakresie od 500 do 600 nm, przy długości fali wzbudzenia (λ_{ex}) równej 492 nm, w nieobecności wygaszacza i w jego obecności o różnym stężeniu. Żeby otrzymać widmo fluorescencji barwnika, jego cząsteczki wzbudza się światłem o takiej długości fali, przy której występuje maksimum absorpcji barwnika. Zatem, zgodnie z rysunkiem 3, dla fluoresceiny $\lambda_{\text{ex}} = 492 \text{ nm}$.
3. Z zarejestrowanych widm odczytać maksymalną wartość intensywności fluorescencji (czyli wartość fluorescencji w maksimum widma, tj. przy długości fali około 525-530 nm).
4. Wyniki pomiarów umieścić w tabeli 1.

Tabela 1

L.p.	Objętość dodanego roztworu KJ [cm ³]	Objętość wody [cm ³]	Stężenie KJ, c [mol/dm ³]	Maksymalna intensywność fluorescencji, I	I_0/I
1	0	4.9			
2	0.25	4.65			
3	0.5	4.4			
4	0.75	4.15			
5	1	3.9			
6	1.5	3.4			
7	2	2.9			
8	3	1.9			
9	4	0.9			
10	4.9	0			

Obliczenia

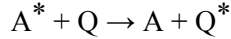
Na podstawie danych z tabeli sporządzić wykres I_0/I w funkcji stężenia wygaszacza (czyli jodku potasu), c . I_0 jest intensywnością fluorescencji dla $c = 0$. Zgodnie z równaniem Sterna-Volmera [równanie (5)] należy oczekiwać liniowej zależności I_0/I od stężenia substancji wygaszającej, ponieważ $I_0/I = \Phi_0/\Phi$. Przy wyższych stężeniach wygaszacza mogą wystąpić dodatnie odstępstwa od liniowości. Takie odstępstwa przy wyższych stężeniach wygaszacza są spowodowane mechanizmem zderzeniowym (kinetycznym) wygaszacza i tworzeniem kompleksu pomiędzy cząsteczkami fluoryzującego barwnika i wygaszacza. Celem znalezienia współczynnika proporcjonalności $k_2/(k_1+k_3) = k_2\tau$, zwanego stałą Sterna-Volmera lub stałą wygaszania, należy dla prostoliniowego przebiegu zależności $I_0/I = f(c)$ wyznaczyć współczynnik kierunkowy prostej.

Dyskusja

1. Podać, w jakich jednostkach wyrażona jest stała Sterna-Volmera i jaki jest sens fizyczny tej wielkości.
2. Oszacować, do jakiej wartości stężenia wygaszacza otrzymuje się prostoliniowy przebieg zależności $I_0/I = f(c)$.

Część druga ćwiczenia

Równanie Sterna-Volmera jest stosowane w przypadku wygaszania dynamicznego, które zachodzi, gdy wygaszacz (Q) oddziałuje kolizyjnie z fluoroforem (A) znajdującym się w stanie wzbudzenia:

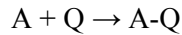


Równanie (5) można zapisać w postaci:

$$I_0/I = \Phi_0/\Phi = 1 + K_{SV}[Q] \quad (6)$$

Zgodnie z równaniem (6) otrzymuje się zależność liniową $I_0/I = f([Q])$ dla wygaszania dynamicznego.

Innym rodzajem wygaszania jest wygaszanie statyczne. W tym przypadku między wygaszaczem a fluoroforem tworzy się w stanie podstawowym niefluoryzujący kompleks:



Stała kompleksowania, K_{kompl} jest dana wzorem:

$$K_{kompl} = \frac{[A-Q]}{[A][Q]} \quad (7)$$

Stężenie całkowite fluoroforu jest równe:

$$[A_0] = [A] + [A-Q] \quad (8)$$

Po wprowadzeniu równania (8) do zależności opisanej wzorem (7), otrzymuje się:

$$K_{kompl} = \frac{[A_0] - [A]}{[A][Q]} = \frac{[A_0]}{[A][Q]} - \frac{1}{[Q]} \quad (9)$$

Odpowiednie przekształcenie równania (9) daje zależność liniową $I_0/I = f([Q])$ dla wygaszania statycznego:

$$\frac{I_0}{I} = \frac{[A_0]}{[A]} = 1 + K_{kompl}[Q] \quad (10)$$

Odstępstwa od liniowości zależności: $I_0/I = f([Q])$ świadczą o zachodzeniu zarówno wygaszania dynamicznego jak i statycznego. W takim przypadku korzysta się z zależności:

$$\frac{I_0}{I} = (1 + K_{SV}[Q]) \cdot (1 + K_{kompl}[Q]) \quad (11)$$

z której, po odpowiednich przekształceniach i wprowadzeniu podstawienia

$$\frac{I_0}{I} = 1 + K_{poz}[Q] \quad (12)$$

otrzymuje się zależność liniową $K_{poz} = f([Q])$:

$$K_{poz} = \left(\frac{I_0}{I} - 1 \right) \frac{1}{[Q]} = (K_{SV} + K_{kompl}) + K_{SV} K_{kompl}[Q] \quad (13)$$

Wykonanie ćwiczenia

Wykonanie drugiej części ćwiczenia jest bardzo podobne do poprzedniej, z tą różnicą, że zamiast roztworu jodku potasu o stężeniu 0.05 mol/dm^3 , stosuje się roztwór o stężeniu 0.2 mol/dm^3 , a w miejsce wody - roztwór chlorku potasu o stężeniu 0.2 mol/dm^3 .

1. Sporządzić roztwory zawierające 0.1 cm^3 roztworu fluoresceiny oraz podane w tabeli 2 odpowiednie objętości roztworów KJ i KCl.
2. Zarejestrować widma fluorescencji fluoresceiny w warunkach podanych w poprzedniej części ćwiczenia i odczytać z nich maksymalną wartość intensywności fluorescencji.
3. Wyniki pomiarów umieścić w tabeli 2.

Tabela 2

L.p.	Objętość dodanego roztworu KJ [cm^3]	Objętość dodanego roztworu KCl [cm^3]	Stężenie KJ, c [mol/dm^3]	Maksymalna intensywność fluorescencji, I	I_0/I	K_{poz}
1	0	4.9				
2	0.25	4.65				
3	0.5	4.4				
4	0.75	4.15				
5	1	3.9				
6	1.5	3.4				
7	2	2.9				
8	2.5	2.4				
9	3	1.9				
10	3.5	1.4				
11	4	0.9				
12	4.9	0				

Obliczenia

Wyznaczyć dla każdego stężenia KJ wartości K_{poz} z równania (12), a następnie metodą regresji liniowej parametry prostej $K_{\text{poz}} = f(c)$ z równania (13). Oszacować wartości stałej kompleksowania, K_{kompl} i stałej Sterna-Volmera, K_{SV} , wiedząc, że wartość stałej K_{SV} jest większa od wartości stałej K_{kompl} .

Dyskusja

1. Porównać wartości stałej Sterna-Volmera, K_{SV} , wyznaczone w pierwszej i drugiej części ćwiczenia.
2. Dlaczego w tej części ćwiczenia zamiast wody używa się roztworu chlorku potasu?

Literatura cytowana

- [1] P. W. Atkins, *Chemia fizyczna*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2003, rozdz. 17.3.
- [2] K. Pigoń, Z. Ruziewicz, *Chemia fizyczna. T2*. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2007, rozdz. 11.7.4-11.7.6.
- [3] L. Sobczyk, A. Kiswa, K. Gatner, A. Koll, *Eksperymentalna chemia fizyczna*, PWN, Warszawa 1982.

Zagadnienia dodatkowe

Pojęcia: fluorofor i fluorosensor, luminescencja. Diagram Jabłońskiego. Przejścia promieniste i bezpromieniste. Konwersja wewnętrzna, przejście interkombinacyjne. Wygaszanie dynamiczne i statyczne.

Instrukcja obsługi spektrofлуorymetru JASCO.

1. Włączyć spektrofлуorymetr naciskając przycisk „ON” (włącznik znajduje się z tyłu aparatu po lewej stronie). Po zaświeceniu się lampy odczekać około 5 minut dla jej stabilizacji.
2. Włączyć komputer i monitor. Lewym przyciskiem myszy wybrać ikonę „pracownia”.
3. Z paska „Programs” wybrać kolejno: „JASCO” i „Spectra Manager”.
4. Po otwarciu okna „Spectra Manager” podwójnie kliknąć lewym przyciskiem myszy na ikonę „Spectrum Measurement”.
5. W otwartym oknie „Spectrum Measurement” kliknąć raz lewym przyciskiem myszy ikonę „Measurement”.
6. Z paska menu wybrać ikonę „Parameter”, po czym w otwartym oknie „Spectrum Measurement – Parameter” wprowadzić następujące parametry:
 - „Measurement Mode”: „Emission Single”,
 - „Excitation Band Width”: 5 nm,
 - „Emission Band Width”: 5 nm,
 - „Response”: „Fast”,
 - „Excitation Wavelength” (długość fali wzbudzenia): według opisu w ćwiczeniu,
 - „Start” (początkowa długość fali w rejestrowanym widmie fluorescencji): według opisu w ćwiczeniu,
 - „End” (końcowa długość fali w rejestrowanym widmie fluorescencji): według opisu w ćwiczeniu,
 - „Data Pitch”: 1 nm,
 - „Scanning Speed”: 60 nm/min lub 125 nm/min,
 - „Display”: „Auto”,
 - „Sensitivity”: „Medium”.Po wprowadzeniu powyższych parametrów zamknąć okno naciskając przycisk „OK”.
7. W oknie „Spectrum Measurement” kliknąć kolejno lewym przyciskiem myszy ikony z obrazkami żarówek: „Ex” i „Em”; kolor żarówek zmieni się z szarego na żółty.
8. Napełnić przeznaczoną do pomiarów spektrofлуorymetrycznych kuetę (wszystkie ścianki takiej kuetę są przezroczyste) badanym roztworem. Badać kolejno roztwory o stopniowo rosnącym stężeniu KJ. Po napełnieniu danym roztworem kuetę (w 3/4 jej objętości), dokładnie wytrzeć jej wszystkie zewnętrzne ścianki, tak by były suche i czyste. Otworzyć komorę spektrofлуorymetru. Trzymając kuetę za górne

części jej krawędzi umieścić ją ostrożnie w spektrofluorymetrze i zamknąć pokrywę aparatu.

Uwaga: Nie pozostawiać otwartej komory spektrofluorymetru – podnosić pokrywę przyrządu tylko i wyłącznie na czas włożenia i wyjęcia kuwety z aparatu!!!

9. W otwartym oknie „Spectrum Measurement” kliknąć ikonę „Start”. W tym momencie rozpoczyna się rejestracja widma fluorescencji badanego roztworu. Po zarejestrowaniu całego widma, na ekranie monitora pojawia się aktywne okno „Spectra Analysis” z widocznym widmem i czerwoną pionową linią. Należy na nią najechać kursorem i naprowadzić linię na maksimum widma. W pasku w dolnej części okna „Spectra Analysis” widoczne są oddzielone od siebie przecinkami wartości długości fali λ i odpowiadającej jej intensywności fluorescencji I . Odczytać i zapisać te wartości.
10. Aby rozpocząć rejestrację kolejnego widma należy przejść z powrotem do okna „Spectrum Measurement”; znajduje się pod spodem, pod oknem „Spectra Analysis”.
11. Po zakończeniu pomiarów i po zatwierdzeniu ich wyników przez prowadzącego ćwiczenie pozamykać wszystkie okna (bez zapisywania) i wyjść z programu poprzez wybranie w oknie „Spectrum Measurement” opcji „Measurement”, a następnie z widocznego paska menu należy wybrać ikonę „Exit”. Na koniec zamknąć okno „Spectra Manager”.