

Pracownia Spektroskopii Molekularnej A

Wydział Chemii Uniwersytetu Warszawskiego.

Semestr zimowy 2010/2011

Widma fluorescencyjne chininy

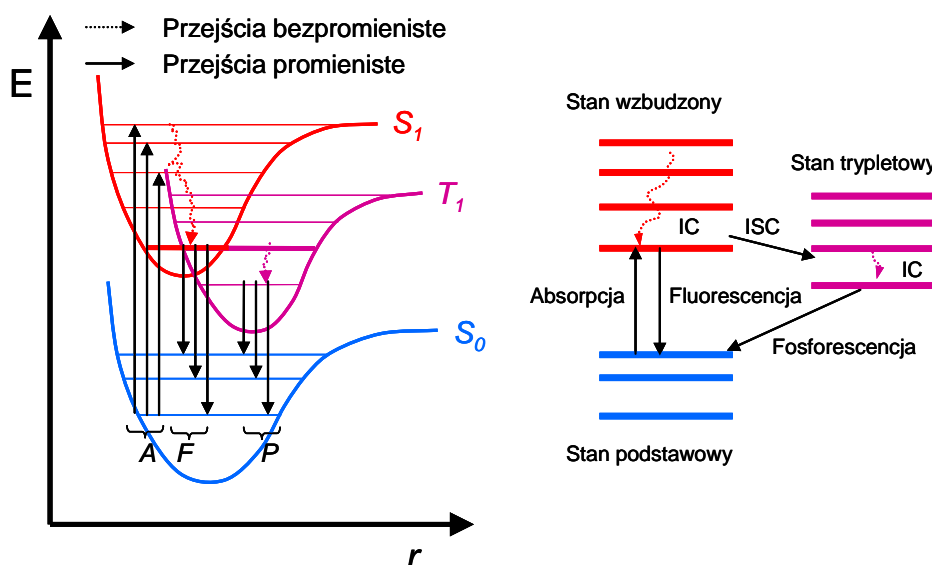
Cel

Celem ćwiczenia jest zapoznanie się ze zjawiskiem fluorescencji oraz metodyką pomiarów widm emisyjnych i ekscytacyjnych. W ramach ćwiczenia badane jest wygaszanie fluorescencji chininy przez jony chlorkowe, a także dyskutowane są możliwe mechanizmy fizyczne tego procesu oraz jego zastosowania praktyczne.

Wstęp

Zjawisko luminescencji polega na spontanicznej emisji fotonu przez molekułę powracającą ze wzbudzonego stanu elektronowego do stanu podstawowego. Jeżeli samo wzbudzenie nastąpiło w wyniku wcześniejszej absorpcji fotonu przez stan podstawowy, to proces emisji możemy określić nieco precyzyjniej jako fluorescencję. Równowaga termiczna może być osiągnięta przez układ również w wyniku bezpromienistej dyssypacji nadmiaru energii stanu wzbudzonego w postaci ciepła. W rzeczywistości molekuly tracą część energii stanu wzbudzonego w sposób bezpromienisty nawet wtedy, gdy podstawową ścieżką powrotu do stanu podstawowego jest fluorescencja. Absorpcja fotonu z zakresu promieniowania UV-Vis, zachodząc najczęściej na zerowym poziomie oscylacyjnym podstawowego poziomu elektronowego, może przenieść molekułę na jeden z wyższych poziomów oscylacyjnych wzbudzonego stanu elektronowego. Jednak promienisty powrót molekuly do stanu „wyjściowego” zachodzi z reguły z zerowego poziomu oscylacyjnego stanu wzbudzonego, co jest poprzedzone pozbyciem się nadmiaru energii w wyniku zderzeń termicznych (sprzyja temu fakt, iż odstęp między poziomami oscylacyjnymi są porównywalne z $k_B T$ - energią termiczną molekuly). Proces ten jest bardzo szybki – dokonuje się w trakcie czasu życia wzbudzonego stanu singletowego i nosi nazwę wewnętrznej konwersji (ang. **IC** – *internal conversion*). Sam proces fluorescencji następuje w momencie promienistego przejścia molekuly z zerowego poziomu oscylacyjnego wzbudzonego stanu elektronowego na dowolny poziom oscylacyjny stanu podstawowego, co przedstawia rys. 1. Tak więc, energia „utracona” przez molekułę na bezpromienistej drodze **IC** w obrębie stanu wzbudzonego odpowiada za przesunięcie widma emisji w kierunku dłuższych fal w stosunku do widma absorpcji,

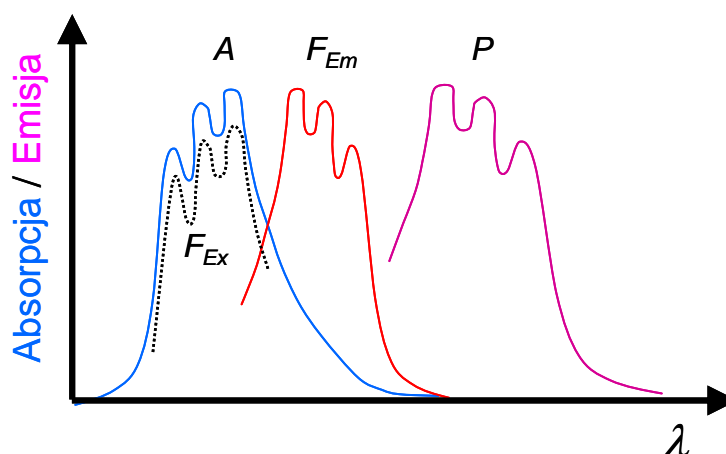
natomiast struktura oscylacyjna stanu podstawowego może mieć swoje odzwierciedlenie w postaci subtelnych pasm widma fluorescencji (rys. 2.).



Rys. 1. Przejścia pomiędzy stanami: podstawowym (S_0) i wzbudzonymi (S_1 , T_1) naniesione na krzywe ich energii potencjalnych (lewy panel) oraz tzw. *Schemat Jabłońskiego* (prawy) tłumaczą relacje pomiędzy absorpcją (A) a fluorescencją (F) i fosforescencją (P). Pozostałe wyjaśnienia zawarte są w tekście.

Z bardziej sporadycznym typem emisji – tzw. fosforescencją – możemy mieć do czynienia wtedy, gdy krzywe energii potencjalnej wzbudzonych stanów singletowych i trypletowych przecinają się, tj. tym samym położeniem jąder atomowych przypisują tę samą energię. Konsekwencją tego może być przejście wzbudzonego stanu singletowego we wzbudzony stan trypletowy (jak to pokazuje rys. 1.: stan S_1 w T_1). Oczywiście, jako przejście między stanami o różnej multipletowości jest to proces wzbroniony i jego zajście wymaga spełnienia pewnych dodatkowych warunków (dużą rolę odgrywa tu sprzężenie spinowo-orbitalne, które sprawia, że zakaz inwersji spinów staje się mniej rygorystyczny). Tego rodzaju przejście nosi nazwę przejścia interkombinacyjnego lub konwersji interkombinacyjnej międzysystemowej (ang. **ISC** – *intersystem crossing*). Proces **ISC** nie przyczynia się jednoznacznie do obniżania energii potencjalnej molekuly, ale umożliwia jego kolejny etap – bezpromienistą **IC** wiodącą do zerowego poziomu oscylacyjnego stanu T_1 . Ostatnim, promienistym etapem fosforescencji jest przeskok molekuly ze stanu T_1 na S_0 , który jako przejście wzbronione zachodzi bardzo powoli, co przekłada się na dramatyczne wydłużenie czasów życia stanów wzbudzonych (i spowolnienie emisji fosforescencji) w stosunku do fluorescencji. Przejścia stanów elektronowych i oscylacyjnych prowadzące do fluorescencji lub fosforescencji ilustrują krzywe energii potencjalnych stanów podstawowego

i wzbudzonego (panel lewy rys. 1.). Typowy Schemat Jabłońskiego opisujący ten problem jest przedstawiony na prawym panelu rys. 1.



Rys. 2 Wyidealizowane i uproszczone relacje pomiędzy widmami absorpcji elektronowej (A), emisji fluorescencji (F_{Em}), oraz fosforescencji (P) odnoszące się do układu krzywych energii potencjalnej z Rys. 1. Czarną kropkowaną linią zaznaczone jest widmo ekscytacyjne fluorescencji (F_{Ex}). Pozostałe wyjaśnienia zawarte są w tekście.

Widma emisyjne przedstawiają zależność intensywności emitowanego promieniowania od długości fali, gdy fluorescencja jest wzbudzana monochromatyczną wiązką światła. Natomiast widma ekscytacyjne pokazują jak wzbudzanie fluorescencji wiązką światła o zmieniającej się długości fali wpływa na intensywność emisji promieniowania przy jednej, ustalonej długości. Z reguły (od której są pewne wyjątki podyktowane m. in. selektywnością procesu wzbudzenia chromofora) widma emisyjne wzbudzone są promieniowaniem o długości dającej najsilniejszą fluorescencję (maksimum absorpcji), a widma ekscytacyjne mierzone są przy λ odpowiadającej maksimum emisji. Widma ekscytacyjne przypominają kształtem widma absorpcji elektronowej, co odzwierciedla dość oczywisty fakt, iż źródłem energii wypromieniowywanej w akcie fluorescencji są fotony wcześniej zaabsorbowane (przy założeniu, że dla danego wzbudzenia istnieje promienista ścieżka powrotu do stanu podstawowego).

Fluorescencja jako metoda badawcza

Szczególną właściwością fluorescencji jest to, że otoczenie fluoryzującej molekuly (fluorofora) ma bardzo silny wpływ zarówno na intensywność emisji, jak i położenie jej maksimum, co wynika przede wszystkim z oddziaływań środowiska na stan wzbudzony. Na przykład nawet niewielkie zmiany przenikalności dielektrycznej (wg nowszej nomenklatury: „elektrycznej”) medium mogą bardzo silnie zmieniać widma fluorescencji. Dzięki temu

metody oparte o fluorescencję odgrywają bardzo ważną rolę w biofizyce i biologii molekularnej. Na przykład naturalna fluorescencja aromatycznych reszt aminokwasowych białek może dostarczać unikalnych informacji na temat stopnia ich zwinięcia (obserwowanego jako stopień izolacji aromatycznego aminokwasu od wodnego środowiska) i dynamiki fałdowania się struktur III-rzędowych.

W świetle istnienia różnych – promienistych i bezpromienistych scenariuszy powrotu molekuly ze stanu wzbudzonego do stanu podstawowego bardzo ważne staje się znalezienie miary stopnia, w jakim przejściu temu towarzyszy emisja fotonów. Rolę tę spełnia tzw. *wydajność kwantowa* (ang. *quantum yield*) fluorescencji (Φ) zdefiniowana jako:

$$\Phi = N_{Em}/N_{Ab}$$

gdzie N_{Em} jest liczbą fotonów wyemitowanych, a N_{Ab} liczbą fotonów zaabsorbowanych. Wielkość Φ dla danego fluorofora jest stała tylko w bardzo dobrze zdefiniowanych warunkach wzbudzenia i pod nieobecność jakichkolwiek czynników prowadzących do tzw. wygaszania (ang. *quenching*) fluorescencji. Obecność tych czynników (*quencher*) będzie zawsze prowadzić do obniżenia wydajności kwantowej fluorescencji, co makroskopowo przejawia się przede wszystkim obniżeniem jej intensywności, a co może stać się również sposobem badania oddziaływań międzymolekularnych.

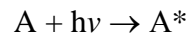
Wygaszanie fluorescencji

Jako dość intuicyjną można przyjąć tezę, że intensywność fluorescencji próbki – np. roztworu fluorofora – będzie wprost proporcjonalna do jego stężenia. Jednak bardzo łatwo można pokazać, że rosnące stężenie fluorofora będzie – poprzez absorpcję – ograniczać dostępność wiązki wzbudzającej dla jego „głębiej” schowanych molekuł, których fluorescencja stanie się przez to słabsza. To odstępstwo od liniowości (widoczne zwłaszcza w zakresie wyższych stężeń fluoroforów) jest jednak trywialnym przypadkiem osłabienia fluorescencji związanym ze zmianą gęstości optycznej ośrodka raczej niż z jego molekularnymi właściwościami. Dwa nietrywialne mechanizmy wygaszania fluorescencji wynikają z:

- Tworzenia się niefluoryzującego kompleksu wygaszacz (Q) – fluorofor w stanie podstawowym (A) – mówimy o tzw. wygaszaniu statycznym,

- Oddziaływania wygaszacza (Q) ze stanem wzbudzonym (A*) prowadzącym do bezpromienistego powrotu do stanu podstawowego – mówimy wtedy o wygaszaniu dynamicznym bądź kolizyjnym, gdyż następuje ono w toku zderzeń A* i Q.

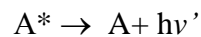
Zastanówmy się jak te procesy można opisać ilościowo. Dla procesu absorpcji:



możemy przyjąć, iż jego szybkość jest proporcjonalna do liczby molekuł w stanie A (n_A):

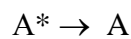
$$v_{\text{Abs}} = k_A n_A$$

analogicznie dla emisji:



$$v_{\text{Em}} = k_E n_{A^*}$$

a dla przejść bezpromienistych:



$$v_{\text{BP}} = k_B n_{A^*}$$

gdzie k_A , k_E i k_B są stałymi szybkości tych przejść. Tak więc, w warunkach *steady-state*, gdy fluoryzuje stała ilość molekuł ($dn_{A^*}/dt = 0$):

$$v_{\text{Abs}} = v_{\text{Em}} + v_{\text{BP}}$$

a więc:

$$k_A n_A = (k_B + k_E) n_{A^*}$$

i stąd:

$$n_{A^*} = k_A n_A / (k_B + k_E)$$

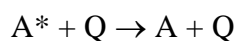
Ponadto, jeżeli przyjmujemy, że wydajność kwantowa nie zmienia się w czasie, to:

$$\Phi = k_E n_{A^*} / k_A n_A$$

wobec czego

$$\Phi^0 = k_E / (k_B + k_E)$$

Tę najwyższą możliwą wartość Φ obserwowaną gdy w układzie nie ma wygaszania oznaczmy jako Φ^0 . W przeciwnym wypadku mamy do czynienia z kolejną bezpromienistą ścieżką powrotu układu do stanu podstawowego zależną od stężenia wygaszacza oddziałującego ze stanem wzbudzonym (rozważamy w tym miejscu proces wygaszania kolizyjnego):



traktując ten proces jako reakcję chemiczną II-rzędu możemy przyjąć, że:

$$v_Q = k_Q n_{A^*} [Q]$$

a uwzględniając jak proces wygaszania fluorescencji wpłynie na liczbę molekuł w stanie wzbudzonym:

$$n_{A^*} = k_A n_A / (k_B + k_E + k_Q [Q])$$

i na wydajność kwantową fluorescencji zapiszemy:

$$\Phi = k_E / (k_B + k_E + k_Q [Q])$$

A zatem

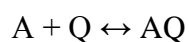
$$\Phi^0/\Phi = 1 + k_Q [Q] / (k_B + k_E)$$

Ponieważ mierzona intensywność fluorescencji odpowiada wprost jej wydajności kwantowej w danych warunkach, prowadzi nas to do jednej z postaci tzw. równania Sterna-Volmera:

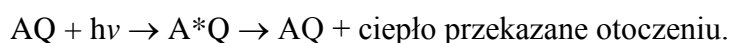
$$F^0/F = 1 + K_{SV} [Q],$$

w którym stała K_{SV} charakteryzuje kolizyjne oddziaływanie molekuł wygaszacza (Q) ze stanem wzbudzonym fluorofora.

Jeżeli rozważymy teraz mechanizm statyczny wygaszania fluorescencji polegający na wiązaniu się molekuł Q ze stanem podstawowym A w nieczynnym fluorescencyjnie kompleksie AQ ze stałą równowagi K :



Kompleks AQ może ulegać wzbudzeniu, ale powrót do stanu do stanu podstawowego może dokonać się tylko na sposób bezpromienisty:



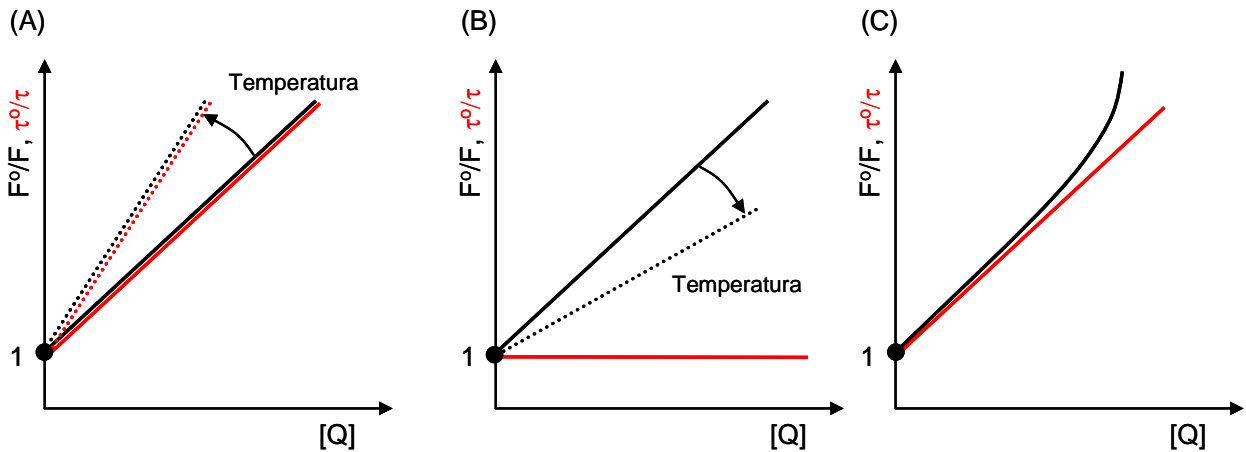
Uwzględnienie wpływu powstawania kompleksu AQ (o stałej trwałości K) z całkowitym pominięciem mechanizmu kolizyjnego doprowadzi nas do równania:

$$F^0/F = 1 + K [Q]$$

A zatem zależności intensywności fluorescencji od stężenia *quencher*a są nierozróżnialne w przypadku mechanizmów wygaszania wyłącznie kolizyjnych bądź wyłącznie statycznych. W często spotykanej sytuacji, gdy wygaszanie przebiega według mieszanego mechanizmu - molekuly Q oddziałują zarówno na stany A jak i A^* - równanie przybierze postać:

$$F^0/F = (1 + K_{SV} [Q]) (1 + K[Q])$$

a zależność F^0/F od $[Q]$ wyjątkowo nabierze nieliniowego charakteru. Pozostaje jednak pytanie: w jaki sposób możemy określić który mechanizm jest odpowiedzialny za wygaszanie fluorescencji jeżeli samo badanie wpływu stężenia molekuł Q na intensywność fluorescencji nie prowadzi do rozstrzygnięcia tego problemu?



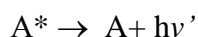
Rys. 3. Wykresy Sterna-Volmera: Przejawy kolizyjnego (A), statycznego (B) i mieszanego (C) mechanizmu wygaszania fluorescencji (przez Q) obserwowane za pomocą klasycznej (F^0/F) i czasowo rozdzielczej (τ^0/τ) fluorescencji. Pozostałe wyjaśnienia zawarte są w tekście.

Okazuje się, że rozwiązaniem może okazać się śledzenie wpływu temperatury i lepkości na wykresy F^0/F od $[Q]$. W mechanizmie kolizyjnym rosnąca liczba zderzeń molekuł wygaszacza i fluorofora w stanie A^* sprzyjać będzie bezpromienistemu powrotowi do stanu podstawowego. A zatem wygaszanie kolizyjne będzie efektywniejsze wraz ze wzrostem temperatury. Natomiast wyższa temperatura będzie destabilizować niefluoryzujące molekuly kompleksu AQ powstającego w toku wygaszania statycznego, obniżając jednocześnie efektywność tej drogi wygaszania (rys. 3.). Tak właśnie dzieje się w przypadku powstawania kompleksu kofeiny (wygaszacz) z białkowym fluoroforem – albuminą ludzkiego serum (HSA). Pomocna diagnostycznie jest również wiedza na temat wpływu lepkości na efektywność wygaszania fluorescencji: wyższa lepkość będzie wpływać w niewielkim stopniu na trwałość kompleksu AQ , a zatem i efektywność statycznego quenchingu. Z drugiej strony, można przyjąć, że szybkość wygaszania kolizyjnego (k_Q) jest podyktowana szybkością dyfuzji molekuł Q do molekuł fluorofora w stanie A^* . Zważywszy na zależność współczynnika dyfuzji (D) od lepkości (η) określoną równaniem Stokesa-Einsteina:

$$D = k_B T / 6\pi r \eta$$

możemy przyjąć, że rosnąca lepkość będzie obniżać liczbę zderzeń A*-Q, a przez to i efektywność kolizyjnego wygaszania. Należy podkreślić, że o ile ten tok rozumowania jest generalnie słuszny, „ilościowe” stosowanie równania Stokesa-Einsteina do określania k_Q przez molekuly wygaszaczy o rozmiarach (r) porównywalnych bądź mniejszych od molekul cieczy, w której zachodzi dyfuzja, jest problematyczne.

Istnieje jednak jeszcze jedno, bardziej eleganckie podejście do problemu określania mechanizmu wygaszania fluorescencji. Zwróćmy najpierw uwagę, że proces spontanicznej emisji fotonu przez stan wzbudzony:



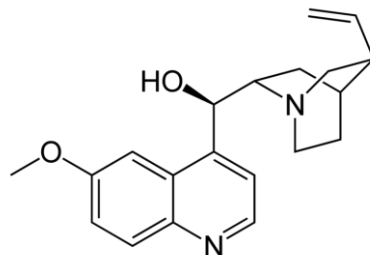
jest z punktu widzenia kinetyki chemicznej procesem I rzędu. Jeżeli wzbudzimy molekuly fluorofora krótkim pulsem światła, po czym będziemy rejestrować intensywność emisji fluorescencji w czasie, przekonamy się, że jej stopniowy zanik jest opisany eksponencjalnymi równaniami analogicznymi do tych przedstawiających szybkość rozpadów promienio-twórczych. Wygodnie jest również wprowadzić czas życia fluorescencji, τ :

$$F(t) = F_0 \exp(-t/\tau),$$

w celu opisanie szybkości spadku intensywności fluorescencji w czasie ($F(t)$); początkowa fluorescencja w chwili ‘zero’ jest tu dla odmiany oznaczona z dolnym indeksem (F_0). Badanie wpływu różnych czynników na czasy τ fluorescencji za pomocą tzw. czasowo rozdzielczej spektroskopii fluorescencyjnej umożliwia m.in. stwierdzenie, czy spadek intensywności fluorescencji wynika z globalnego skrócenia czasu życia stanów A^* w próbce (τ krótsze od wartości maksymalnej τ_0), czy z tego, że część molekul fluorofora nie świeci w ogóle ($\tau=0$), a część świeci bez zmian ($\tau=\tau_0$). Te dwa scenariusze przedstawione na rys. 3. odnoszące się do – odpowiednio – wygaszania kolizyjnego i statycznego są rozróżnialne wyłącznie metodami spektroskopii czasowo rozdzielczej. Dopasowanie eksperymentalnie obserwowanego zaniku fluorescencji liniową sumą modułów $[\exp(-t/\tau)]$ o różnych ‘ τ ’ pozwala ustalić homogeniczność zaniku fluorescencji, oddziaływań w układzie fluorofora, a w szczególności odpowiedzieć definitywnie na pytanie o mechanizm wygaszania.

Chinina

Chinina (Rys. 4.) jest alkaloidem o właściwościach antymalarycznych. Ze względu na swój intensywnie gorzki smak jest wykorzystywana w produkcji toników. Po rozpuszczeniu w rozcieńczonym kwasie siarkowym chinina wykazuje fluorescencję w zakresie widzialnym.



Rys. 4. Molekuła chininy. Pozostałe wyjaśnienia zawarte są w tekście.

Wykonanie ćwiczenia

1. Naważkę 10 mg siarczanu chininy rozpuścić w 5 ml 0,1 M H₂SO₄.
2. 1 ml roztworu rozcieńczyć ok. 50 krotnie w 0,1 M H₂SO₄.
3. Zmierzyć widmo UV-Vis roztworu w kuwecie kwarcowej (10 mm) w zakresie 700–200 nm.
4. Kuwetę przenieść do spektrofluorymetru i zmierzyć widma emisyjne roztworu stosując wzbudzenie przy każdym z pasm elektronowych zaobserwowanych w widmie absorpcji. Zakres pomiaru: od +10 nm od linii wzbudzenia do 700 nm. Prowadzący udzieli pomocy we wprowadzeniu właściwych ustawień fotopowielacza i szczelin spektrofluorymetru.
5. Dokonać pomiaru widma ekscytacji mierząc intensywność fluorescencji w jej maksimum.
6. Przygotować serię rozcieńczeń pierwotnego roztworu chininy od 1 do 10 000 (skala logarymiczna) i zmierzyć widma emisji przy tym samych ustawieniach fotopowielacza i długości fali wzbudzającej. Określić liniowy zakres intensywności fluorescencji w funkcji stężenia fluorofora.
7. Przygotować serię mieszanin roztworu chininy przy stężeniu z zakresu liniowego (określonego w pkt. 6.) w stosunku objętościowym 1:1, objętość całkowita 4 ml, z:
 - a) 0,1 M H₂SO₄,
 - b) etanolem,
 - c) izopropanolem,
 - d) DMSO.

Zmierzyć widma emisji stosując te same ustawienia wzbudzenia i fotopowielacza.

8. Przygotować serię 7 roztworów NaCl w 0,1 M H₂SO₄ w zakresie od 0,2 M NaCl do 2·10⁻⁵ M NaCl, i 0 M NaCl (po ok. 5 ml). Zmieszać roztwory NaCl z roztworem chininy o stężeniu z dolnego zakresu liniowej zależności F-[chinina] w proporcji: 1 ml roztworu

chininy + 2 ml kolejnego roztworu NaCl o zmieniającym się stężeniu + 1 ml 0,1 M H₂SO₄. Przeprowadzić pomiary widm emisyjnych przy wcześniejszych ustawieniach.

9. Powtórzyć eksperyment z pkt. 8., z tym że dodatek 1 ml 0,1 M H₂SO₄ będzie zastąpiony 1 ml gliceryny. Przeprowadzić pomiary widm emisyjnych przy wcześniejszych ustawieniach.

10. Zbadać jak gliceryna wpływa na widmo emisji chininy pod nieobecność chlorków.

Dyskusja i opracowanie wyników:

Przeprowadzić dyskusję podobieństw bądź ich braku w widmach absorpcyjnych i ekscytacyjnych chininy. Jak zmiana długości fali ekscytacji wpływa na położenie pasma emisji? Przedyskutować możliwe źródła odstępstw od liniowości w zależności intensywności fluorescencji od stężenia chininy. Przeprowadzić dyskusję wpływu efektów rozpuszczalnikowych na fluorescencję chininy. Jaki wpływ ma NaCl na fluorescencję chininy – przedstawić wyniki w postaci wykresów Sterna-Volmera. Czy na podstawie wpływu gliceryny na zależność intensywności fluorescencji od stężenia NaCl można rozstrzygać o mechanizmie obserwowanych efektów?

Problem dodatkowy.

Zarejestrować widmo fluorescencji czystej kuwety wypełnionej wodą dejonizowaną przy wzbudzeniu 350 nm; powtórzyć pomiary stosując wzbudzenie przy 400 i 420 nm. Jak można wytłumaczyć obserwowane zjawisko?

Wymagania kolokwialne:

Reguła Francka-Condon.

Reguły wyboru przejść elektronowych.

Struktura oscylacyjna widm elektronowych.

Emisyjne widma elektronowe: fluorescencja i fosforescencja.

Schemat Jabłońskiego.

Przejście interkombinacyjne (międzysystemowe - ISC).

Procesy wygaszania fluorescencji.

Literatura:

- 1) Joanna Sadlej "Spektroskopia molekularna" Wydawnictwa Naukowo-Techniczne
- 2) Zbigniew Kęcki "Podstawy spektroskopii molekularnej" Wydawnictwo Naukowe PWN

Oprac. Wojciech Dzwolak