

# *Zaawansowana chemia*

Katedra Chemii Ogólnej i Nieorganicznej

Część 1 – spektroskopia fluorescencyjna (dr inż. Krzysztof Zamojć)

Część 2 – spektrofotometria UV-Vis (dr Aleksandra Tesmar)

Część 3 – miareczkowanie potencjometryczne (dr hab. Dariusz Wyrzykowski)

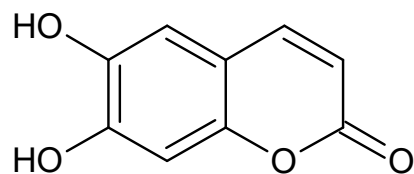
---

## Cel ćwiczenia

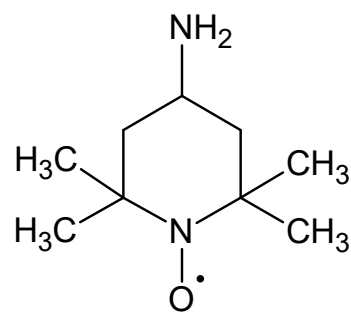
Celem całego ćwiczenia jest zaproponowanie mechanizmu reakcji pomiędzy 6,7-dihydroksykumaryną a stabilnym rodnikiem nitroksylowym 4-amino-TEMPO.

Nie da się tego zrobić dysponując wynikami uzyskanymi z jednej techniki – jest to jednak łatwe zadanie po analizie wyników z pomiarów fluorescencyjnych, spektrofotometrycznych oraz potencjometrycznych, a także zapoznaniu się z podstawową literaturą.

Wzory półstrukturalne 6,7-dihydroksykumaryny oraz 4-amino-TEMPO są przedstawione poniżej.



6,7-dihydroksykumaryna



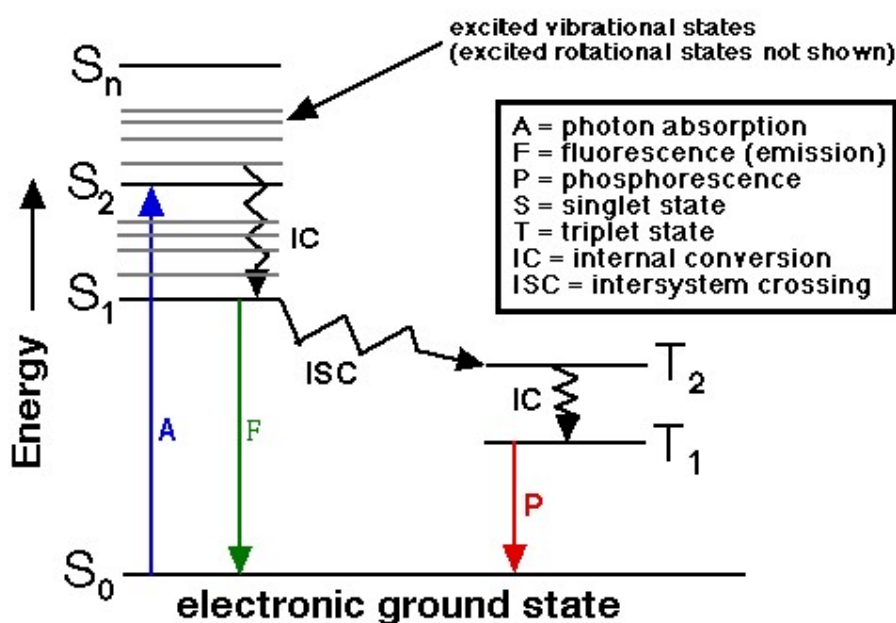
4-amino-TEMPO

# Część 1 – dr inż. Krzysztof Żamojć (spektroskopia fluorescencyjna)

## Podstawy teoretyczne

### 1. Fizyczne podstawy luminescencji

Każda cząsteczka chemiczna charakteryzuje się typowym dla siebie układem elektronowych, oscylacyjnych oraz rotacyjnych poziomów energetycznych. Szereg możliwych zjawisk, jakie następują po akcie absorpcji kwantu energii przez daną cząsteczkę przedstawia się schematycznie na tzw. diagramie przejść energetycznych Jabłońskiego (rysunek 1).

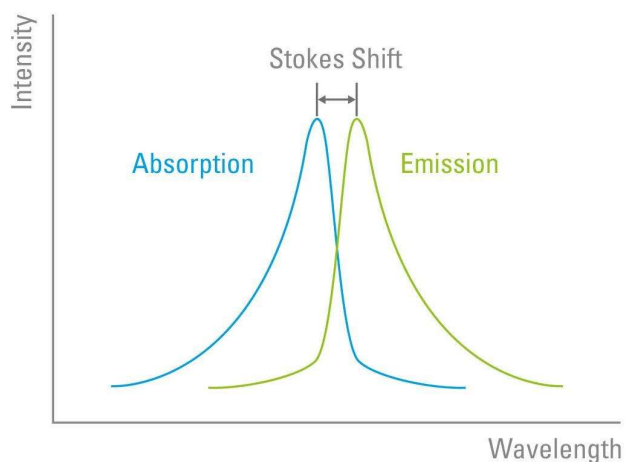


Rysunek 1. Diagram Jabłońskiego.

(źródło: <https://snauka.pl>)

W większości cząsteczek w stanie podstawowym elektrony są sparowane (elektrony o przeciwnym spinach zajmują ten sam orbital), co określamy jako stan singletowy (S). Dla wyjaśnienia stan trypletowy (T) oznacza stan, w którym elektrony w orbitalu nie są sparowane (posiadają te same spiny). W wyniku absorpcji kwantu światelnego (A) o odpowiedniej energii cząsteczka przechodzi ze stanu podstawowego ( $S_0$ ) na jeden z poziomów oscylacyjnych pierwszego stanu wzbudzonego ( $S_1$ ) lub wyższych stanów wzbudzonych ( $S_2, \dots, S_n$ ). Powrót cząsteczki z wyższych poziomów oscylacyjnych danego stanu wzbudzonego do jego najniższego poziomu oscylacyjnego nazywamy relaksacją oscylacyjną. Czas życia cząsteczki w stanie wzbudzonym mieści się w przedziale  $10^{-10} - 10^{-5}$  s. Powrót cząsteczki do stanu podstawowego

może odbywać się na drodze promienistej (przejście pomiędzy stanami o tej samej multipletowości to fluorescencja (**F**), zaś przejście pomiędzy stanami o różnej multipletowości to fosforescencja (**P**)) lub bezpromienistej (przejście pomiędzy stanami o tej samej multipletowości to konwersja wewnętrzna (**IC**), zaś przejście pomiędzy stanami o różnej multipletowości to przejście interkombinacyjne/międzysystemowe (**ISC**)). Przejścia elektronowe pomiędzy stanami o tej samej multipletowości (singlet-singlet oraz tryplet-tryplet) są dozwolone, zaś przejścia pomiędzy stanami o różnej multipletowości (singlet-tryplet oraz tryplet-singlet) są wzbronione. Wyemitowany przy przejściu ze stanu wzbudzonego do stanu podstawowego foton ma mniejszą energię niż foton wzbudzający. Z tego powodu widmo emisji fluorescencji jest przesunięte w kierunku fal dłuższych w stosunku do widma absorpcji, co określamy jako przesunięcie Stokesa (rysunek 2).

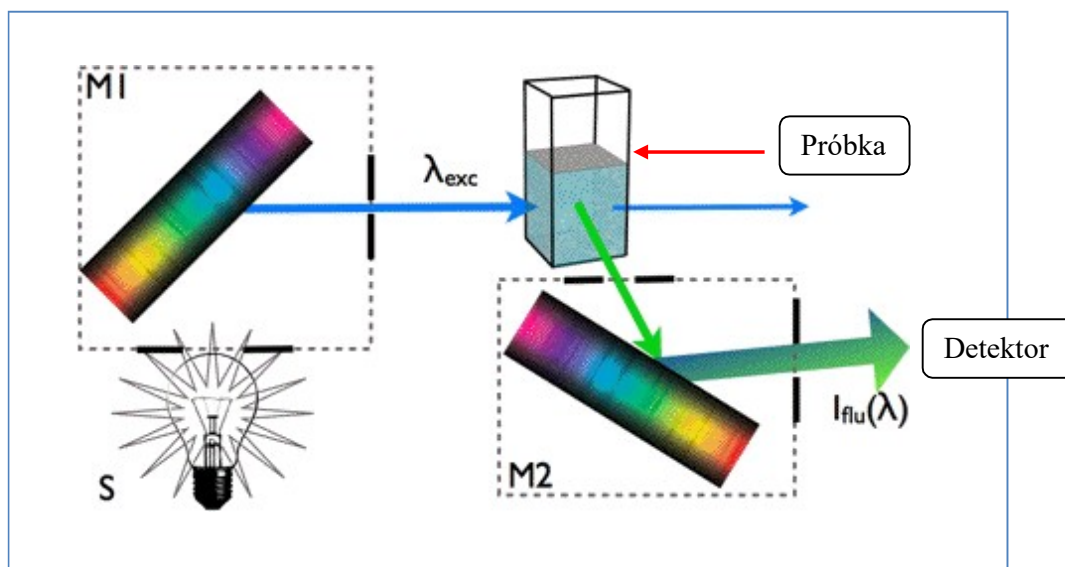


**Rysunek 2.** Widmo absorpcji i emisji pewnego związku z zaznaczonym przesunięciem Stokesa.

(źródło: <http://optoelektro.blogspot.com>)

## 2. Budowa spektrofluorymetru

Przyrządami stosowanymi do pomiarów intensywności fluorescencji, w tym m. in. do rejestrowania widm emisji fluorescencji, są spektrofluorymetry. Przykładowy schemat układu pomiarowego typowego spektrofluorymetru przedstawiono na rysunku 3.



**Rysunek 3.** Schemat układu pomiarowego spektrofluometry.

(źródło: <http://zcha.umed.pl>)

Każdy spektrofluometr zawiera źródło światła, dwa monochromatory, komorę, do której wstawiamy badaną próbkę oraz detektor. Typowymi źródłami promieniowania wzbudzającego (symbol **S** na schemacie) są żarówki wolframowe lub lampy wolframowo-halogenowe (w przypadku wzbudzania w zakresie 400 – 800 nm) oraz lampy deuterowe lub łukowe lampy ksenonowe (w przypadku wzbudzania w zakresie 200 – 400 nm). Jako monochromatory (symbol **M1** i **M2** na schemacie), których głównym zadaniem jest wybór wiązki światła o danej długości fali z widma niemonochromatycznego, stosowane są pryzmaty i siatki dyfrakcyjne. Pierwszy monochromator (**M1**) służy do wybrania określonej długości fali światła wzbudzającego, zaś drugi (**M2**) światła emitowanego. Próbkę przygotowuje się najczęściej w postaci roztworu i umieszcza w kuwecie o grubości 1 cm. Do detekcji promieniowania stosuje się fotopowielacze lub detektory wielokanałowe typu *diode-array*, zaś do rejestracji danych i sterowania procesem pomiarowym służą komputery. Po wzbudzeniu próbki, fluorescencja emitowana jest we wszystkich kierunkach, co narzuca konieczność stosowania kuwet posiadających wszystkie ścianki boczne przepuszczające światło w takim samym stopniu – nie możemy używać kuwet z matowymi ścianami, jak ma to miejsce w badaniach spektrofotometrycznych (rysunek 4).



**Rysunek 4.** Kuwety do pomiarów spektrofluorymetrycznych (w statywie po lewej stronie) oraz spektrofotometrycznych (w statywie po prawej stronie).

### 3. Główne zalety metod spektrofluorymetrycznych

Metody spektrofluorymetryczne pozwalają na detekcję i ilościowe oznaczanie śladowych ilości substancji wykazujących fluorescencję. Do ich głównych zalet należą m. in.:

- a) możliwość oznaczania zarówno związków organicznych, jak i nieorganicznych;
- b) bardzo wysoka czułość, precyzja, dokładność, selektywność;
- c) możliwość stosowania w badaniach biologicznych i biochemicznych;
- d) możliwość oznaczania związków niefluoryzujących poprzez tworzenie fluoryzujących kompleksów.

### 4. Kumaryny

Pochodne kumaryn jako naturalne związki chemiczne są często stosowane w leczeniu. Charakteryzują się one zróżnicowaną aktywnością biologiczną. Wykazują, między innymi, właściwości przeciwutleniające, przeciwzapalne, przeciwwirusowe, przeciwmalaryczne, przeciwzakrzepowe, przeciwbakteryjne i przeciwnowotworowe.

Pochodne kumaryny posiadają interesujące właściwości spektroskopowe – zwłaszcza charakterystykę absorpcji i fluorescencji, która zmienia się wraz z różnorodnością grup funkcyjnych przyłączonych do jej pierścienia – co zostało zgłębione przez dwóch niezależnych naukowców (Wheelocka i Bagchiego). Udowodnili oni, że wprowadzenie do pierścienia kumarynowego w pozycję 4, 6 lub 7 ugrupowania elektronoakceptorowego lub podstawienie w pozycję 3 ugrupowania elektronodonorowego jest odpowiedzialne za zjawisko przesunięcia batochromowego zarówno widma fluorescencji, jak i widma absorpcji. Wykazali oni także, że wprowadzenie do

pierścienia ugrupowania hydroksylowego, które wykazuje właściwości auksochromowe, również wpływa na charakterystykę absorpcji. Kumaryny znane są również jako związki posiadające duże przesunięcie Stokesa – zdecydowało to o tym, że pochodne kumaryny wykorzystywane są jako sensory fluorescencyjne. Czynnikiem, który ma bardzo duży wpływ na właściwości spektroskopowe dihydroksy-podstawionych pochodnych kumaryny, jest pH. W zrozumieniu tego zjawiska bardzo przydatna może być publikacja [1] (plik PDF znajdziecie Państwo w materiałach).

## 5. Stabilne rodniki nitroksylowe

Rodniki nitroksylowe (czasem nazywane nitroksydami), to grupa związków chemicznych zawierających ugrupowanie  $>N-O\cdot$  z niesparowanym elektronem zdelokalizowanym pomiędzy atomem azotu i atomem tlenu. Najbardziej znanym przedstawicielem rodników nitroksylowych jest rodnik 2,2,6,6-tetrametylopiperdyd-1-oksylowy (TEMPO). Wysoka stabilność nitroksydów wynika z kilku aspektów: (i) z efektu delokalizacji niesparowanego elektronu, (ii) obecności czterech grup metylowych w pozycjach  $\alpha$  względem atomu azotu, co uniemożliwia rekombinację dwóch rodników nitroksylowych, (iii) braku atomów wodoru w obu pozycjach  $\alpha$  względem atomu azotu, co uniemożliwia reakcję dysproporcjonacji pomiędzy dwiema cząsteczkami TEMPO.

Stabilne rodniki nitroksylowe są szeroko stosowane w wielu dziedzinach nauki, m. in. w: katalizie, spektroskopii, biochemii, medycynie czy chemii medycznej. Z punktu widzenia syntezy organicznej związki te uchodzą za mało interesujące z uwagi na bardzo małą reaktywność – co wiąże się oczywiście z ich dużą stabilnością.

## Instrukcja obsługi spektrofluorometru

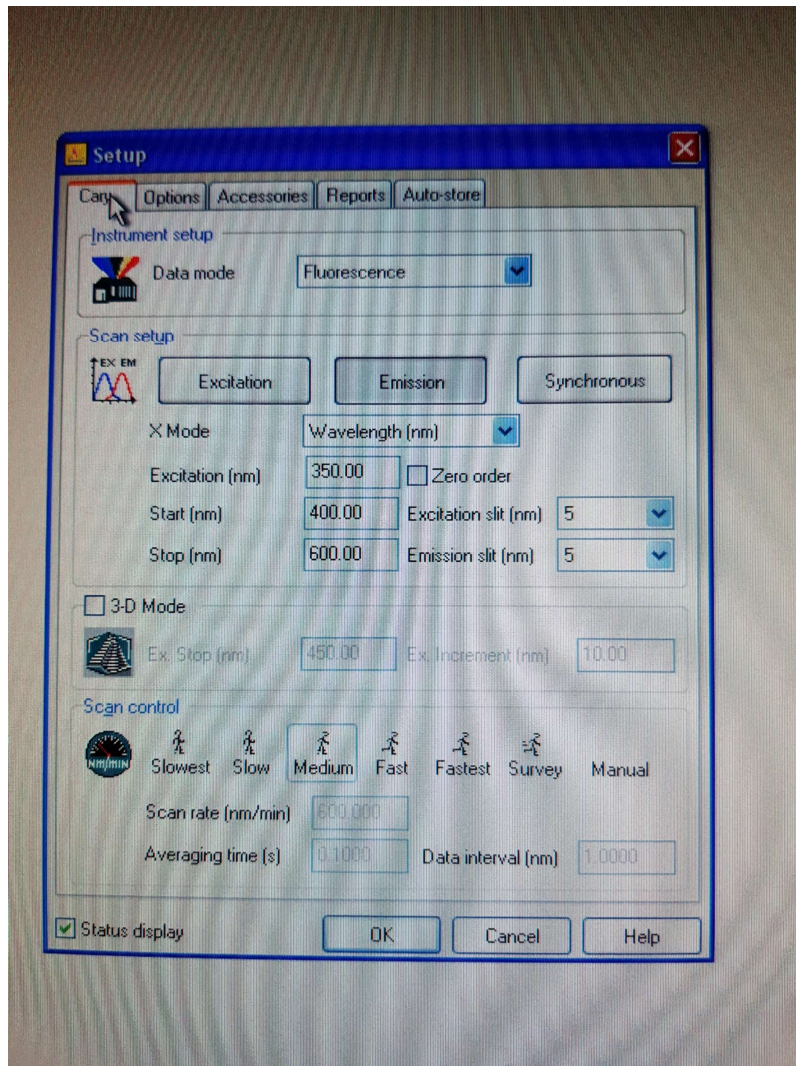
### 1. Uruchomienie urządzenia

Wszystkie pomiary spektrofluorometryczne są prowadzone z użyciem spektrofluorometru *Cary Eclipse Varian*. Spektrofluorometr ten jest wyposażony w kontroler temperatury oraz przystawkę umożliwiającą prowadzenie pomiarów jednocześnie w czterech kuwetach z dodatkową funkcją mieszania. Jednostkę centralną spektrofluorometru włączamy przełącznikiem z prawej strony, na dole przedniej ściany aparatu.



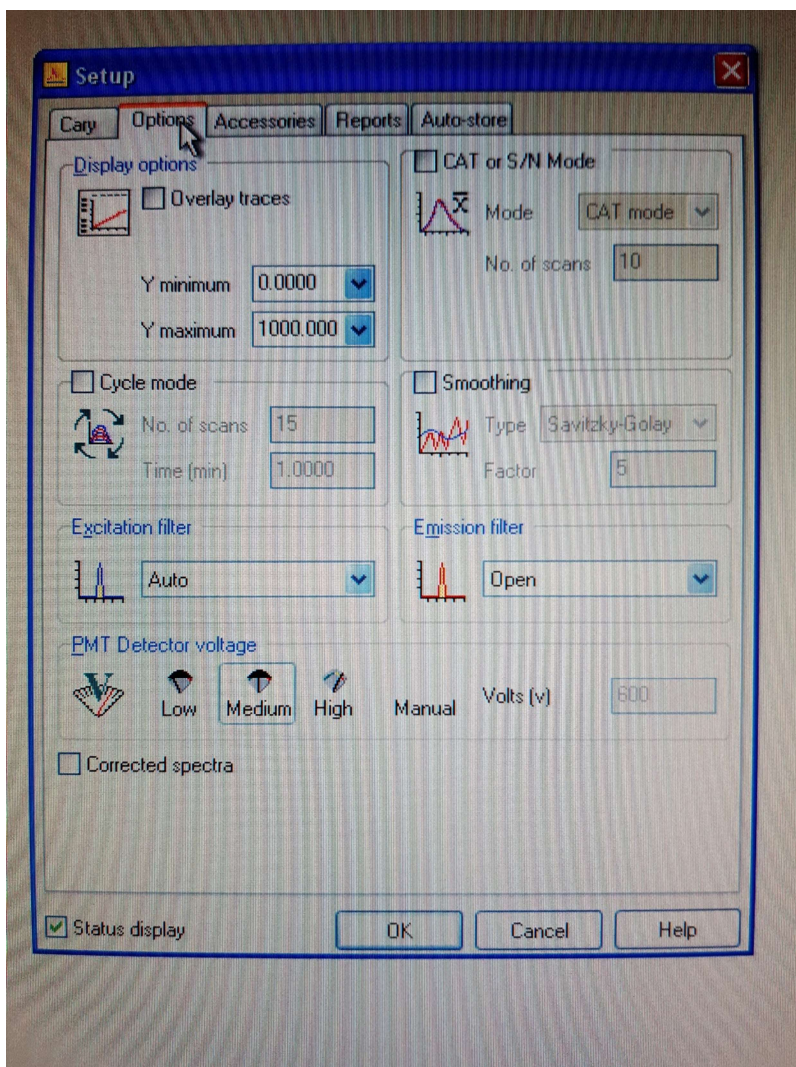
## 2. Ustawienie parametrów pomiarowych w programie do obsługi spektrofotometru

- a) w zakładce *Cary*:
  - (i) w miejscu *Instrument setup/Data mode* wybieramy *Fluorescence*;
  - (ii) w miejscu *Scan setup* wybieramy *Emission*, ustawiamy długość fali wzbudzenia (*Excitation: 350 nm*), ustawiamy zakres długości fali, w którym chcemy rejestrować widmo emisji fluorescencji (*Start: 360 nm; Stop: 600 nm*) oraz ustawiamy szczeliny (*Excitation slit: 5 nm; Emission slit: 5 nm*);
  - (iii) w miejscu *Scan control* niczego nie zmieniamy.



b) w zakładce *Options* niczego nie zmieniamy.



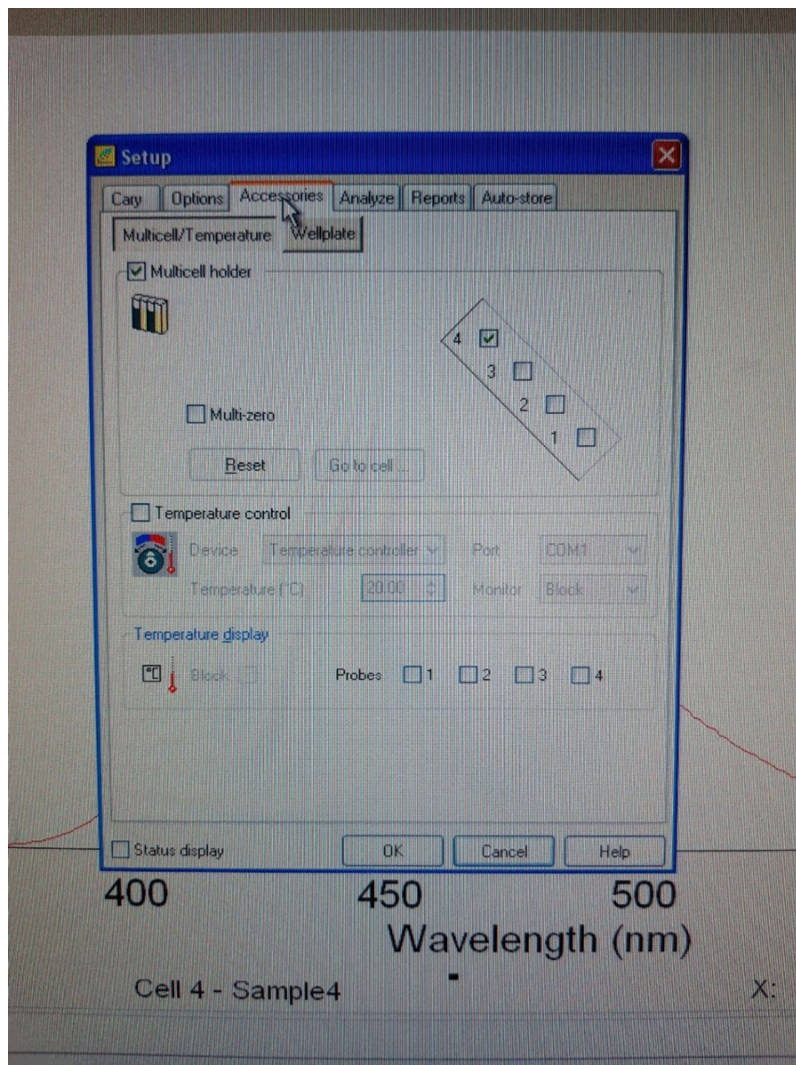


c) w zakładce *Accessories*:

(i) wybieramy podzakładkę *Multicell/Temperature*;

(ii) w miejscu *Multicell holder* wybieramy liczbę kuwet, w których będziemy prowadzili pomiar oraz ich położenie w urządzeniu;

(iii) w miejscu *Temperature control* wybieramy temperaturę, w której chcemy prowadzić pomiar.



- d) w zakładce *Analyze* niczego nie zmieniamy.
- e) w zakładce *Reports* niczego nie zmieniamy.
- f) w zakładce *Autostore* niczego nie zmieniamy.
- g) dla potwierdzenia wszystkich ustawień klikamy *OK*.

### 3. Rozpoczęcie pomiarów

- a) Wkładamy do komory pomiarowej badaną próbkę. Komorę zakrywamy nakrywką.
- b) Klikamy Start, po czym rozpoczyna się pomiar intensywności fluorescencji w funkcji ustawionej wcześniej długości fali – program rejestruje widmo emisji fluorescencji badanej próbki.
- c) Zmieniamy próbkę i w ten sposób rejestrujemy widma emisji fluorescencji wszystkich próbek.

#### **4. Zakończenie pomiarów i wyłączenie aparatu**

Zamykamy program i wyłączmy jednostkę centralną spektrofluorymetru przełącznikiem z prawej strony, na dole przedniej ściany aparatu.

#### **Wykonanie ćwiczenia i interpretacja wyników**

Państwa zadaniem w tej części ćwiczenia jest sporządzenie (na jednym wykresie) 21 widm emisji fluorescencji 6,7-dihydroksykumaryny ( $c = 10 \mu\text{M}$ ) w obecności różnych ilości 4-amino-TEMPO (0 – 100  $\mu\text{M}$ ), a następnie zastanowienie się, co może być przyczyną obserwowanych zmian. Plik z danymi niezbędnymi do przygotowania widm znajduje się w „Materiałach dla studentów”.