

Fluorimetrijska istraživanja reakcija nastajanja supramolekulskih kompleksa u otopini

Marinac, Sven

Undergraduate thesis / Završni rad

2024

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:783347>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-28**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)





Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
Kemijски odsjek

Sven Marinac

Student 3. godine Preddiplomskog sveučilišnog studija KEMIJA

Fluorimetrijska istraživanja reakcija nastajanja supramolekulskih kompleksa u otopini

Završni rad

Rad je izrađen u Zavodu za Fizikalnu kemiju

Mentor rada: prof. dr. sc. Vladislav Tomišić

Neposredni voditelj rada: dr. sc. Andrea Usenik

Zagreb, 2024.

Datum predaje prve verzije Završnog rada:

12. srpnja 2024.

Datum ocjenjivanja Završnog rada i polaganja Završnog ispita:

20. rujna 2024.

Mentor rada: prof. dr. sc. Vladislav Tomišić

Potpis:

Sadržaj

§ SAŽETAK.....	VII
§ 1. UVOD.....	1
1.1. Luminescencija, fluorofori i fluorimetrija.....	1
1.1.1. Fluorescencija i fosforescencija	1
1.1.2. Spektrofotometrija i spektrofluorimetrija	5
1.2. Supramolekulska kemija.....	6
1.2.1. Molekulsko prepoznavanje.....	6
1.2.2. Krunasti eteri, ciklodekstrini i kaliksareni.....	7
1.2.3. Konstante stabilnosti kompleksa.....	9
§ 2. PRIKAZ ODABRANE TEME	11
2.1. Spektrofluorimetrijska istraživanja reakcija nastajanja supramolekulskih kompleksa u otopini.....	11
2.1.1. Spektrofluorimetrijske titracije	11
2.1.2. Konstante ravnoteže reakcija kompleksiranja u osnovnom i pobuđenom stanju.....	13
2.1.3. Fotokemijski procesi u supramolekulskim sustavima	14
2.1.4. Kooperativnost i antikooperativnost kompleksiranja	18
2.1.5. Tehnike vremenski razlučene fluorescencije.....	20
2.1.6. Anizotropija fluorescencije	22
§ 3. LITERATURNI IZVORI.....	XXVI

§ Sažetak

Supramolekulska kemija proučava kompleksne strukture sastavljene od više molekulskih podjedinica povezanih nekovalentnim interakcijama. Prilikom nastajanja supramolekulskog kompleksa dolazi do promjene svojstava asociiranih vrsta, a jedno od tih svojstava je sposobnost fluorescencije odnosno fosforescencije. Spektrofluorimetrija se često koristi za proučavanje supramolekulskih reakcija fluorofora, pri čemu se prati ovisnost ekscitacijskih i emisijskih spektara tijekom kompleksiranja. Fluorimetrijski je moguće odrediti konstantu stabilnosti nastalog kompleksa, njegovu stehiometriju i istražiti (anti)kooperativnost vezanja molekule gosta na domaćina. Karakterizacija raznih fotokemijskih i fotofizikalnih procesa, poput prijenosa naboja i energije te stvaranja ekscimera, spada pod domenu spektrofluorimetrijskih istraživanja. Tehnike vremenski razlučene fluorescencije i anizotropije fluorescencije služe za detaljno praćenje dinamike molekulskih interakcija te omogućuju kvantificiranje navedenih fotokemijskih procesa. Dobiveni rezultati pridonose boljem razumijevanju svojstava supramolekula, kao i mehanizama kompleksiranja te otvaraju mogućnosti za primjenu supramolekulskih sustava u razvoju novih materijala i tehnologija.

§ 1. UVOD

1.1. Luminescencija, fluorofori i fluorimetrija

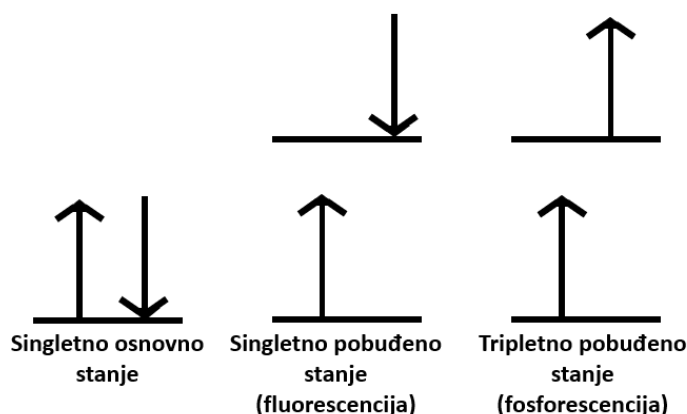
1.1.1. Fluorescencija i fosforescencija

Atomi i molekule nalaze se u diskretnim energijskim stanjima. Najniže energijsko stanje naziva se osnovno stanje, dok se sva viša energijska stanja zovu pobuđenim stanjima. Prilikom izlaganja uzorka elektromagnetskom zračenju dolazi do interakcije fotona i elektrona u (najčešće) valentnoj orbitali. Energija fotona (E) određena je frekvencijom (ν), odnosno valnom duljinom (λ), ekscitacijskog (pobudnog) zračenja preko Planckove jednadžbe:

$$E = h \nu = \frac{h c}{\lambda} \quad (1)$$

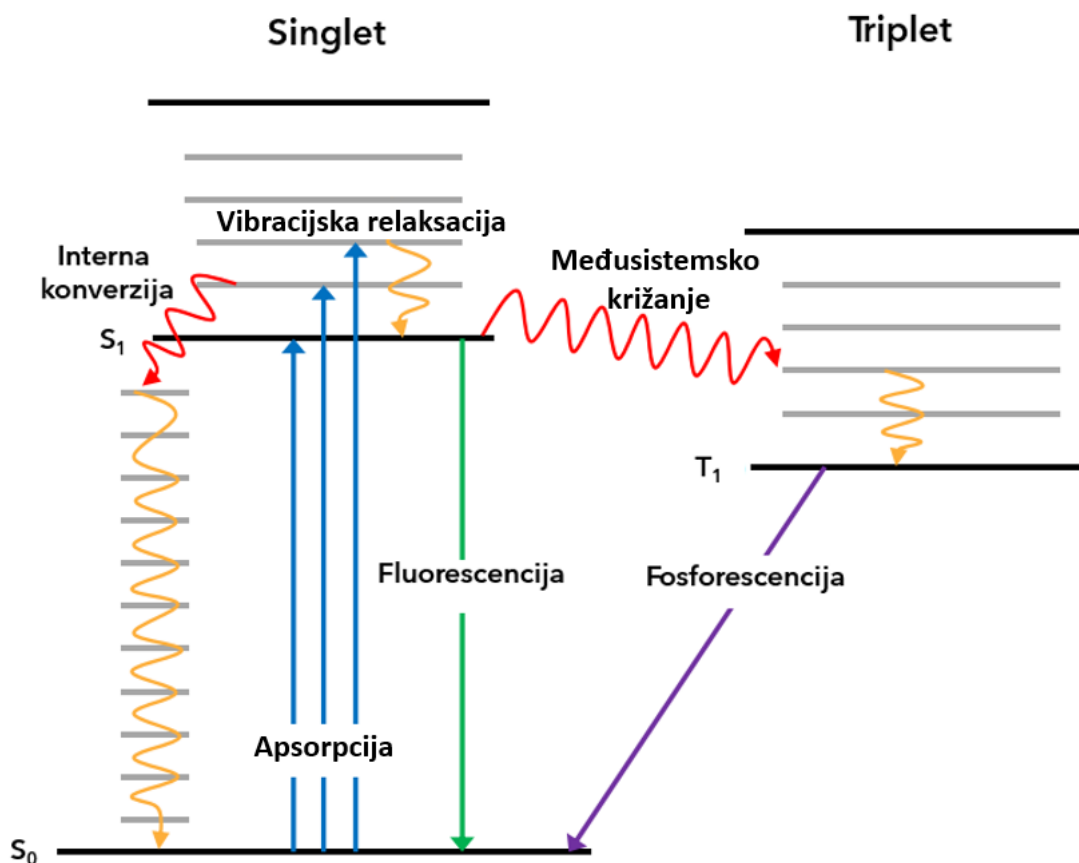
gdje je h Planckova konstanta. Ukoliko energija fotona odgovara energijskoj razlici osnovnog i pobuđenog stanja dolazi do apsorpcije fotona i pobude molekule. Molekula je u pobuđenom stanju vrlo nestabilna. Deaktivacija se odnosi na prijelaz molekule iz pobuđenog u osnovno stanje te se zbiva onim putem koji je najbrži i tijekom kojega molekula provodi najmanje vremena u pobuđenom stanju. Radijacijski prijelazi podrazumijevaju povratak molekule u osnovno stanje uz emisiju fotona. Taj proces se naziva luminescencija te se dijeli na fluorescenciju i fosforescenciju. Neradijacijski prijelazi se odnose na deaktivaciju prilikom koje ne dolazi do emisije fotona.

Razlika između fluorescencije i fosforescencije leži u orijentaciji spina pobuđenog elektrona (shema 1), što rezultira različitim životnim vijekom pobuđenog stanja. U slučaju fluorescencije su elektroni u pobuđenom i osnovnom stanju (orbitali) suprotnog spina, što se naziva pobuđeno singletno stanje. Deaktivacija elektrona je zatim spinski dozvoljena i odvija se velikom brzinom emisijom fotona. Fosforescencija je emisija svjetlosti iz tripletnog pobuđenog stanja. U tripletnom pobuđenom stanju su elektroni u pobuđenoj i osnovnoj orbitali istog spina. Takav je prijelaz spinski zabranjen te su brzine fosforescencije za nekoliko redova veličine manje nego u slučaju fluorescencije. Molekula koja ima sposobnost fluorescencije i/ili fosforescencije naziva se fluorofor.¹



Shema 1. Spin elektrona u singletnom osnovnom stanju te u pobuđenim singletnim (fluorescencija) i tripletnim (fosforescencija) stanjima.

Neradijacijski prijelazi (često shematski prikazani na dijagramu Jablonskog, slika 1) omogućuju brži i energijski povoljniji povratak molekule iz pobuđenog u osnovno stanje prilikom čega ne dolazi do emisije. Molekuli su, prilikom pobuđenja, dostupna sva vibracijska stanja, a koje će stanje zauzeti ovisi isključivo o energiji ekscitacijskog zračenja. Kako se emisija fotona odvija jedino iz osnovnog vibracijskog stanja, potreban je mehanizam zvan vibracijska relaksacija koji omogućuje molekuli prijelaz u najniže vibracijsko stanje prije emisije fotona. Interna konverzija podrazumijeva prijelaz molekule u niže elektronsko stanje istog multipliciteta bez emisije svjetlosti. Ovaj proces deaktivacije je čest kada su elektronska stanja dovoljno blizu da dolazi do preklapanja vibracijskih stanja. U tom je slučaju deaktivacija vrlo brza te ne dolazi do fluorescencije. Međusistemska križanje (engl. *intersystem crossing*) jedan je od rjeđih fotofizikalnih procesa jer uključuje prijelaz između elektronskih stanja različitog multipliciteta. Mogućnost takvog prijelaza je povećana kada su u otopini prisutni teški atomi (npr. brom i jod). Naime, u slučaju teških atoma su pojačane spin-orbitala interakcije (engl. *spin-orbit coupling*) koje dalje cijepaju energijske razine što uzrokuje preklapanje vibracijskih stanja. Također je moguća i eksterna konverzija koja nije prikazana na dijagramu Jablonskog. Prilikom takve vrste deaktivacije dolazi do izmjene energije između pobuđene molekule i molekule otapala ili neke druge otopljene tvari.^{2,3}



Slika 1. Dijagram Jablonskog prikazuje razne fotofizikalne procese koji se mogu odviti u molekuli. Radiacijski prijelazi su prikazani ravnim linijama a neradiacijski valovitim. (Prilagođeno prema ref. 4.)

Kvantno iskorištenje je omjer emitiranih fotona u odnosu na apsorbirane fotone. Njegova vrijednost prikazuje koliko dobro određena tvar fluorescira ili fosforescira. Kod fluorescencije najveće kvantno iskorištenje imaju prijelazi niske energije poput $\pi^* \rightarrow \pi$ i $\pi^* \rightarrow n$ (gdje π označava pi orbitale, a n nevezne orbitale). Posljedica toga je da najintezivnije fluoresciraju aromatske molekule niske energije $\pi^* \rightarrow \pi$ prijelaza. Kod fosforescencije su $\pi^* \rightarrow n$ prijelazi najvećeg kvantnog iskorištenja jer su manje sklone deaktivaciji u tripletnom stanju i posjeduju najmanju vjerojatnost za međusistemski prijelaz. Apsorpcija u dalekom UV području je rijetka jer dolazi do cijepanja veza organskih molekula pri radijaciji od 200 nm, radi toga su $\sigma \rightarrow \sigma^*$ prijelazi tijekom fluorescencije rijetko proučavani.^{1,2}

Priroda kemijske strukture molekule u smislu fleksibilnosti i rigidnosti ima značajan utjecaj na luminescenciju. Vrlo fleksibilne molekule u pravilu slabije fluoresciraju zbog veće

mogućnosti deaktivacije putem neradijacijskih prijelaza (najčešće interne i eksterne konverzije). Suprotno tome, rigidne molekule imaju veći potencijal za fluorescenciju radi nemogućnosti deaktivacije neradijacijskim putem. Molekule s prostranjenim π elektronskim sustavom, poput visoko konjugiranih i aromatskih molekula, omogućuju veću delokalizaciju π -elektrona što ih čini niže energije. Smanjenje energije π -elektrona prati smanjenje energije $\pi^* \rightarrow \pi$ prijelaza, što ih čini učestalijima i povećava kvantno iskorištenje fluorescencije. Sposobnost fluorescencije raste porastom broja aromatskih prstenova te stupnjem kondenzacije i konjugacije.^{1,2}

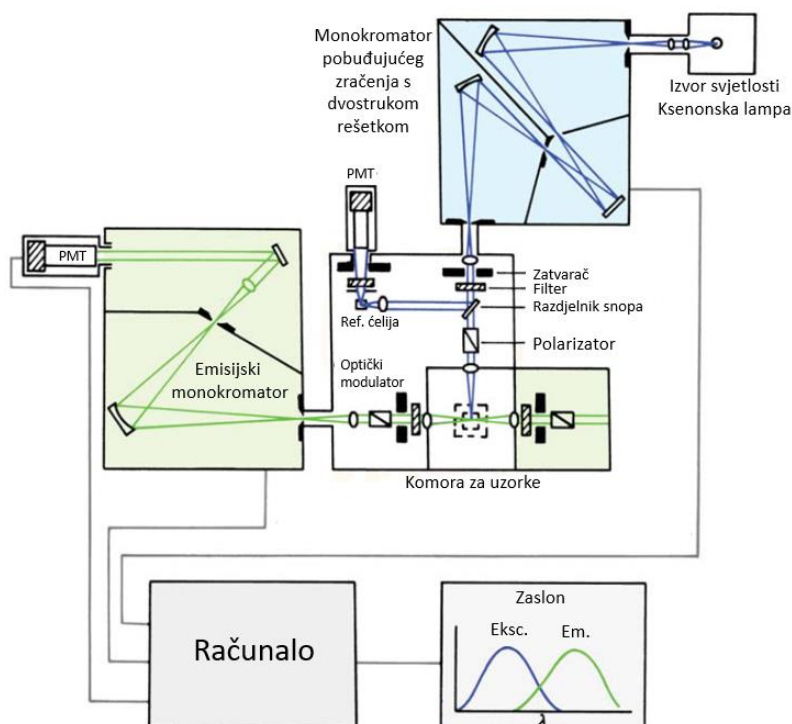
Otapalo također ima značajan utjecaj na fluorescenciju. Naime, viskozna i polarna otapala obično povećavaju kvantno iskorištenje fluorofora jer smanjuju učestalost eksterne konverzije. Prisutnost teških atoma olakšava međusistemska križanja što pojačava fosforescenciju (prijelaz elektrona iz singletnog u tripletno pobuđeno stanje), ali smanjuje fluorescenciju. Elektron-akceptorske skupine stabiliziraju pobuđeno stanje, dok elektron-donorske skupine stabiliziraju osnovno stanje; u oba slučaja dolazi do smanjenja razlike između osnovnog i pobuđenog stanja što povećava sposobnost fluorescencije. Promjena vrijednosti pH otopine može uzrokovati protoniranje ili deprotoniranje bazičnih ili kiselih bočnih lanaca fluorofora. Time se mijenja broj mogućih rezonancijskih struktura molekula, što utječe na stabilnost pobuđenog stanja. Ovisno o strukturi molekule, promjena pH može smanjiti ili povećati njezinu fluorescenciju.

Gašenje (engl. *quenching*) je proces smanjenja intenziteta fluorescencije dodatkom tvari Q (engl. *quencher*) koja uslijed interakcije sa fluoroforom smanjuje njegovu sposobnost fluorescencije. Ovisno o vrsti interakcije, gašenje fluorescencije može biti dinamičko i statičko te do njega može doći reakcijom u pobuđenom stanju. Dinamičko gašenje smanjuje kvantno iskorištenje i životni vijek fluorescencije kolizijom fluorofora i Q uz djelovanje eksterne konverzije. Otopljeni molekulski kisik je često zaslužan za takvu vrstu gašenja kada se eksperimenti provode u otopinama. Statičko gašenje podrazumijeva sparivanje fluorofora i Q u kompleks čija je sposobnost fluorescencije značajno manja. Osim toga, postoji i gašenje reakcijom u pobuđenom stanju, koje se temelji na razlikama u fizikalnim i kemijskim svojstvima molekule u osnovnom i pobuđenom stanju. Kada fluorofor prijeđe u pobuđeno stanje, Q reagira s pobuđenom molekulom (za koju ima veći afinitet), onemogućujući povratak u osnovno stanje radijacijskim prijelazom.¹⁻³

1.1.2. Spektrofotometrija i spektrofluorimetrija

Kao što je prethodno objašnjeno, za prijelaz elektrona u pobuđeno stanje potrebno je zračenje određene energije, tj. valne duljine. Postavi li se detektor iza ozračenog uzorka moguće je izmjeriti pad intenziteta zračenja onih valnih duljina kod kojih dolazi do apsorpcije. Upravo na tome se temelji spektrofotometrija. Apsorpcijski spektar prikazuje količinu apsorbiranog zračenja pri različitim valnim duljinama.

Prilikom snimanja ekscitacijskog spektra mjeri se fluorescencija pri stalnoj valnoj duljini uslijed promjene valne duljine ekscitacijskog zračenja. Pomoću ekscitacijskog spektra je moguće odrediti koliko dobro zračenje različitih valnih duljina pobuđuje molekulu. Emisijski spektar prikazuje intenzitet emitirane svjetlosti, u ovom slučaju fluorescencije, pri različitim valnim duljinama. Ekscitacijski i emisijski spektri snimaju se spektrofluorimetrom (slika 2). Vrsta elektromagnetske spektroskopije koja detektira i mjeri fluorescenciju analiziranog uzorka naziva se fluorimetrija. Prednost spektrofluorimetrijskih istraživanja nad spektrofotometrijskim je ta što se fluorescencija može detektirati pri vrlo slabom intenzitetu, tj. pri znatno nižim koncentracijama istraživanih spojeva te je također moguće zapaziti fotokemijske procese.



Slika 2. Shematski prikaz instrumenta za mjerenje fluorescencije. (Prilagođeno prema ref. 1.)

Kao izvor svjetlosti najčešće se koristi ksenonska lampa jer omogućuje zračenje visokog intenziteta pri valnim duljinama iznad 250 nm. Monokromatori služe za odabir ekscitacijske i emisijske valne duljine zračenja. Rezolucija spektra je regulirana pukotinama (engl. *slits*) koje omogućuju prolaz zračenja određene valne duljine uz minimalnu pogrešku. Povećanjem rezolucije (sužavanjem pukotina) dolazi do smanjenja intenziteta zračenja, stoga je važno osigurati povoljan odnos tih dvaju čimbenika kako bi se optimalno izmjerio fluorescencijski spektar. Emitirano zračenje (fluorescencija) detektira se pomoću fotomultiplikatora (engl. *photomultiplier tube*, PMT). Razdjelnik snopa reflektira dio ekscitacijskog zračenja u referentnu ćeliju koja sadrži stabilan referentni fluorofor, što omogućuje korekcije za pad intenziteta na izvoru svjetlosti i druga odstupanja. Polarizatori služe tijekom snimanja anizotropije fluorescencije.¹

1.2. Supramolekulska kemija

1.2.1. Molekulsko prepoznavanje

Supramolekula je definirana od strane J.-M. Lehna kao kompleksna i organizirana jedinica nastala asocijacijom dviju ili više kemijskih vrsta povezanih molekulskim interakcijama.⁵ Njihova je struktura rezultat interakcija poput vodikovih veza, koordinacije i hidrofobnih interakcija. Svojstva supramolekula su različita od sume svojstava individualnih komponenti.⁶

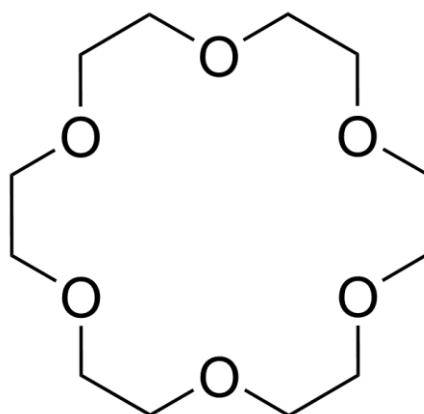
Molekulsko prepoznavanje čini osnovu supramolekulske kemije. Prilikom stvaranja svih supramolekulskih sustava dolazi do selektivne molekulске kombinacije. Molekule koje imaju mogućnost prepoznavanja drugih molekula najčešće se nazivaju molekule domaćini dok se molekule koje bivaju prepoznate nazivaju molekulama gosta. Zbog toga se disciplina koja istražuje takve procese naziva kemija domaćin-gost. Glavni koncept molekulskog prepoznavanja je mehanizam ključ-brava, kojega je prvi predložio Emil Fischer, koji je naglasio važnost strukturne kompatibilnosti između domaćina i gosta.⁶

Molekulsko prepoznavanje je moguće putem raznih molekulskih interakcija i njihovih kombinacija. Elektrostatske interakcije prisutne su između dviju suprotno nabijenih kemijskih vrsta te, ovisno o njihovom naboju, mogu biti privlačne ili odbojne. Jakost elektrostatskih interakcija relativno je velika u usporedbi s ostalim nekovalentnim interakcijama. Također treba

spomenuti dipol-dipol i ion-dipol interakcije. Stvaranje vodikove veze je moguće između odgovarajućih funkcijskih skupina (skupine koje sadrže vodik vezan za elektronegativan atom i skupine s elektronegativnim atomom sa slobodnim elektronskim parom). Veza nastaje kada su navedene skupine domaćina i gosta pravilno orijentirane. U slučaju prepoznavanja to omogućuje veliku specifičnost interakcije. Važnost prepoznavanja temeljenog na ostvarivanju vodikovih veza vidljiva je kod sparivanja nukleotidnih baza u molekuli DNA. Koordinacijsko vezanje je prisutno kod metalnih iona i atoma bogatih elektronima, pri čemu nastaju metal-ligand interakcije umjerene jakosti. Koordinacijske veze mogu biti prisutne i u kompleksima aniona. Van der Waalsove interakcije, iako vrlo slabe i nespecifične, vrlo su bitne radi činjenice da su prisutne u svim molekulama i molekulskim sustavima. Posljedica su interakcije dipola uslijed trenutne neravnotežne raspodjele elektronske gustoće. Iako su pojedinačne interakcije gotovo zanemarive, njihovo ukupno djelovanje može znatno doprinjeti molekulskom prepoznavanju. Kod molekula koje se strukturno komplementarne, van der Waalsove interakcije su znatno izraženije. π - π interakcije se opažaju između aromatskih prstena onda kada su međusobno paralelni. Prilikom takve orijentacije dolazi do preklapanja orbitala što uzrokuje smanjenje energije i stabilizira sustav.^{6,7}

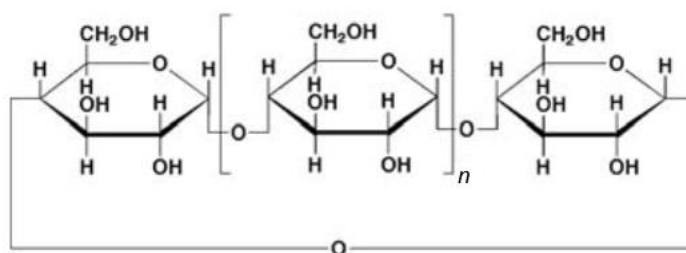
1.2.2. Krunasti eteri, ciklodekstrini i kaliksareni

Krunasti eteri su prve sintetski dobivene molekule domaćini, nastali kao nusprodukt organske sinteze bisfenola.⁶ Primjer krunastog etera (18-kruna-6) prikazan je na slici 3. Pedersen je 1967. godine predložio strukturu u kojoj se metalni ion nalazi unutar cikličkog etera, tj. domaćin nosi gosta kao krunu, od čega i potječe naziv krunasti eteri. Elektronegativni kisikovi atomi tvore vezno mjesto za metalne i amonijeve ione putem dipol-ion interakcija. Za ostvarivanje interakcije krunastog etera i kationa važna je podudarnost veličine veznog mjesta i iona. Fleksibilnost krunastog etera dopušta određen stupanj slobode tijekom kompleksiranja, što dovodi do raznih načina vezanja metalnog iona.⁶



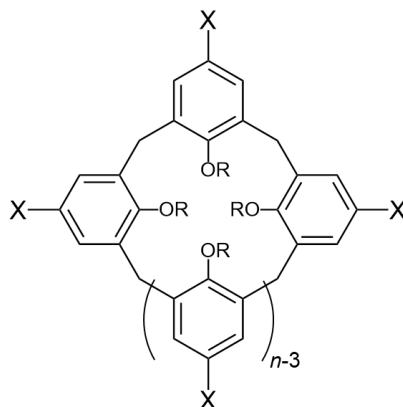
Slika 3. Struktura etera 18-kruna-6.

Ciklodekstrini (slika 4) su makrociklički oligosaharidi koji se sastoje od glukoznih jedinica povezanih α -1,4-glikozidnim vezama. Imaju jedinstvenu sposobnost da stvaraju inkluzijske komplekse s nepolarnim i amfifilnim molekulama zbog svoje hidrofobne šupljine i šuplje prestenaste strukture, dok im njihova hidrofilna vanjska površina omogućuje dobru topljivost u vodi. Hidroksilne skupine ciklodekstrina moguće je modificirati različitim fluoroforima, nepolarnim (npr. alkilnim i aromatskim) i polarnim (npr. karboksilnim) te ionskim skupinama. Modifikacijama se postiže specifičnost vezanja i moguće je optimizirati određena svojstva ciklodekstrina poput topljivosti, površinskog naboja i mogućnosti luminescencije, čime se proširuje njihova primjena.⁶

Slika 4. Struktura ciklodekstrina; n predstavlja broj glukoznih jedinica.

Kaliks[n]areni su makrociklički spojevi izgrađeni od n fenolnih podjedinica povezanih metilenskim mostovima u o -položaju fenola (slika 5). Sadrže gornji (širi) i donji (uži) obod koji služe kao vezno mjesto gosta te se relativno lako modificiraju. Funkcionalizacijom fenolnih OH skupina moguće je dobiti različite derivate kaliksarena, čime se proširuje mogućnost vezanja širokog spektra organskih molekula, iona i biomolekula. Konformacijska izomerija

kaliksarena ima ključnu ulogu prilikom kompleksiranja. Naime, ovisno o orijentaciji fenolnih skupina kaliksareni iste molekulske formule mogu vezati goste različitih veličina i različit broj molekula gosta.⁶⁻⁸



Slika 5. Struktura kaliks[n]arena: n predstavlja broj fenolnih jedinica; X i R predstavljaju moguće supstituirane skupine.

1.2.3. Konstante stabilnosti kompleksa

Reakcija kompleksiranja L (liganda) i M (ion ili molekula) pri čemu nastaje kompleks stehiometrije 1:1, može se prikazati sljedećom jednačinom:



Standardna konstanta stabilnosti kompleksa (K°) definirana je izrazom:

$$K^\circ = \prod_i a_i^{v_i} \quad (3)$$

gdje su a_i aktiviteti vrsta prisutnih u otopini, a v_i njihov stehiometrijski koeficijent. Standardna konstanta stabilnosti kompleksa LM je dakle:

$$K_{11}^\circ = \frac{a_{LM}}{a_L a_M} = \frac{[LM]\gamma_{LM}c^\circ}{[L]\gamma_L[M]\gamma_M} \quad (4)$$

gdje su γ_i koeficijenti aktiviteta vrsta prisutnih u otopini. U daljnjem tekstu razmatraju se samo idealne otopine, dakle koeficijenti aktiviteta se mogu aproksimirati s 1 iz čega slijedi:

$$K_{11} = \frac{[LM]}{[L][M]} \quad (5)$$

U slučaju nastajanja kompleksa stehiometrije 1:1 i 1:2



konstanta stabilnosti kompleksa LM_2 definirana je kao:

$$K_{12} = \frac{[LM_2]}{[LM][M]} \quad (7)$$

Zapišemo li reakciju nastajanja kompleksa LM_2 u jednom koraku:



moguće je definirati kumulativnu konstantu stabilnosti kompleksa sljedećim izrazom:

$$\beta_{12} = \frac{[LM_2]}{[L][M]^2} \quad (9)$$

Konstanu stabilnosti kompleksa moguće je odrediti fluorimetrijskom titracijom (pogl. 2.1.1). Ta se eksperimentalna tehnika temelji na promjeni fluorescencije liganda prilikom reakcije kompleksiranja. Fluorimetrijskom titracijom također je moguće odrediti (anti)kooperativnost vezanja (pogl. 2.1.4) te proučavati određene fotokemijske procese (pogl. 2.1.3). Metode vremenski razlučene fluorescencije (pogl. 2.1.5) omogućuju mjerenje brzine fotokemijskih procesa i detaljniju karakterizaciju reakcija kompleksiranja. Mjereći anizotropiju fluorescencije (pogl. 2.1.6) moguće je strukturno opisati supramolekulski kompleks te detaljno pratiti reakciju njegova nastajanja.⁶

§ 2. PRIKAZ ODABRANE TEME

2.1. Spektrofluorimetrijska istraživanja reakcija nastajanja supramolekulskih kompleksa u otopini

2.1.1. Spektrofluorimetrijske titracije

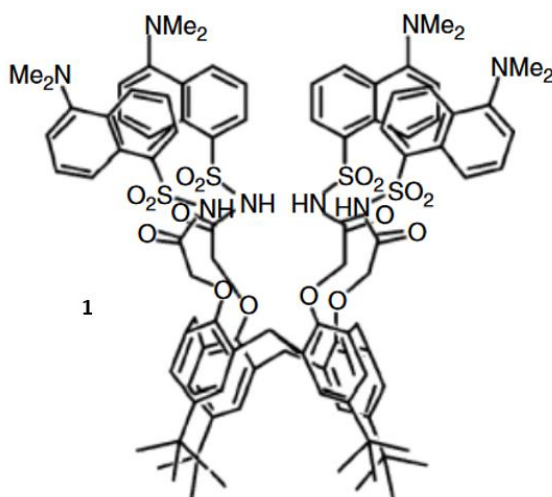
Neki spojevi, zbog svoje strukture, intrinzično fluoresciraju, dok se nefluorescentne vrste mogu dodatno funkcionalizirati fluorofornim skupinama (npr. dansilna skupina, fluorescin, rhodamin). Osnovne informacije o fluoroforu, poput kvantne efikasnosti luminescencije i molarnog apsorpcijskog koeficijenta, moguće je prikupiti iz apsorpcijskih i emisijskih spektara. Promjene emisijskih, odnosno fluorescencijskih spektara uzrokovane asocijacijom domaćina i gosta koriste se prilikom fluorimetrijskih titracija za određivanje stehiometrije nastalih kompleksa te njihovih konstanti stabilnosti.

Tijekom reakcije kompleksiranja dolazi do promjene fluorescencije fluorofora. Asocijacijom gosta može doći do raznih konformacijskih i strukturnih promjena te promjena u elektronskoj gustoći, što utječe na sposobnost fluorescencije te dovodi do vidljivih promjena u karakterističnom spektru liganda. Prilikom titracijskog eksperimenta u otopinu u kojoj je prisutan ligand postepeno se dodaje određena količina otopine gosta. U otopini su prisutni nevezani ligand i novonastali kompleks koji se međusobno razlikuju po svojstvima fluorescencije. Ta razlika omogućuje kvantitativno praćenje reakcije nastajanja kompleksa.

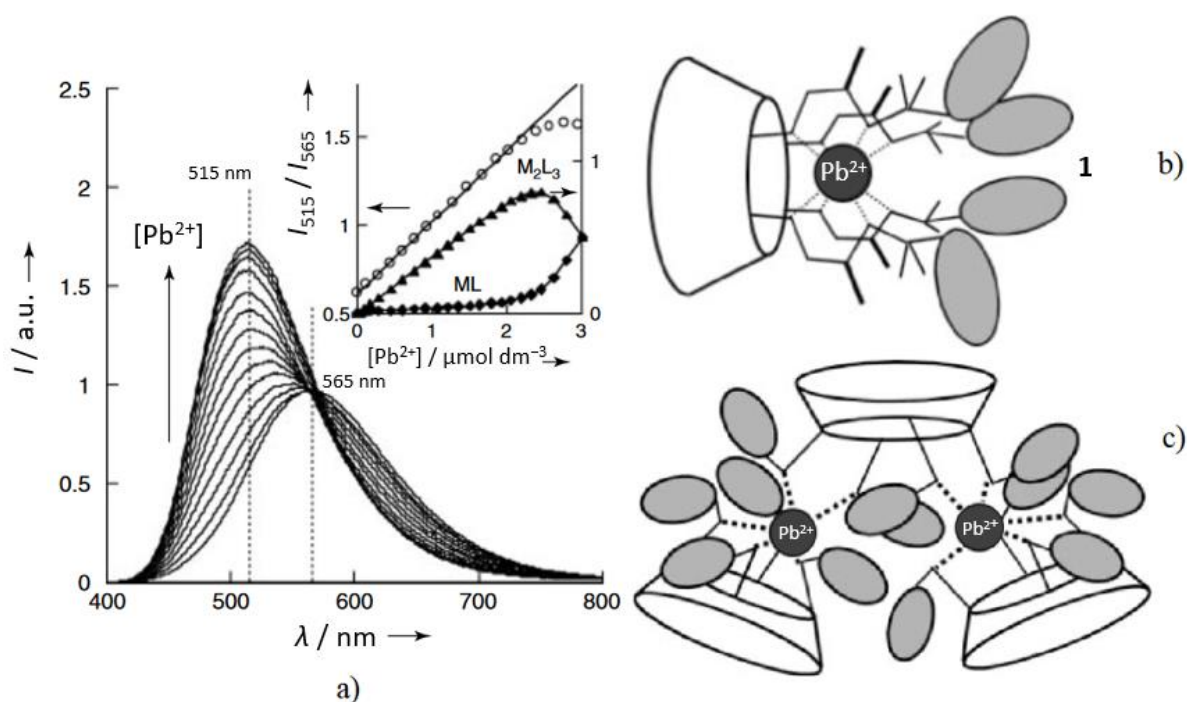
U daljnjem tekstu pretpostavlja se da je ovisnost apsorbancije ili intenziteta fluorescencije o koncentraciji liganda u otopini linearna, te da gost ne apsorbira niti emitira elektromagnetsko zračenje. U slučaju nastajanja vrlo stabilnog kompleksa, ovisnost fluorescencije spoja pri određenoj valnoj duljini o omjeru množina gosta i liganda mijenja se linearno do množinskog omjera koji odgovara njegovoj stehiometriji, a nakon toga se fluorescencija gotovo ne mijenja.⁹

Kao primjer će poslužiti kaliks[4]aren s četiri dansilne skupine **1** (slika 6) koji je vrlo selektivan za katione olova. Na temelju analize emisijskog spektra (slika 7a), ustanovljeno je

da uslijed dodatka Pb^{2+} nastaju dva različita kompleksa stehiometrije 1:1 (slika 7b) i 2:3 (slika 7c) vrlo visokih konstanti stabilnosti ($\log K_{11} = 10,0$ i $\log K_{23} = 33,5$).¹⁰



Slika 6. Kaliks[4]aren s četiri dansilne skupine na donjem obodu **1**. (Preuzeto iz ref. 10.)

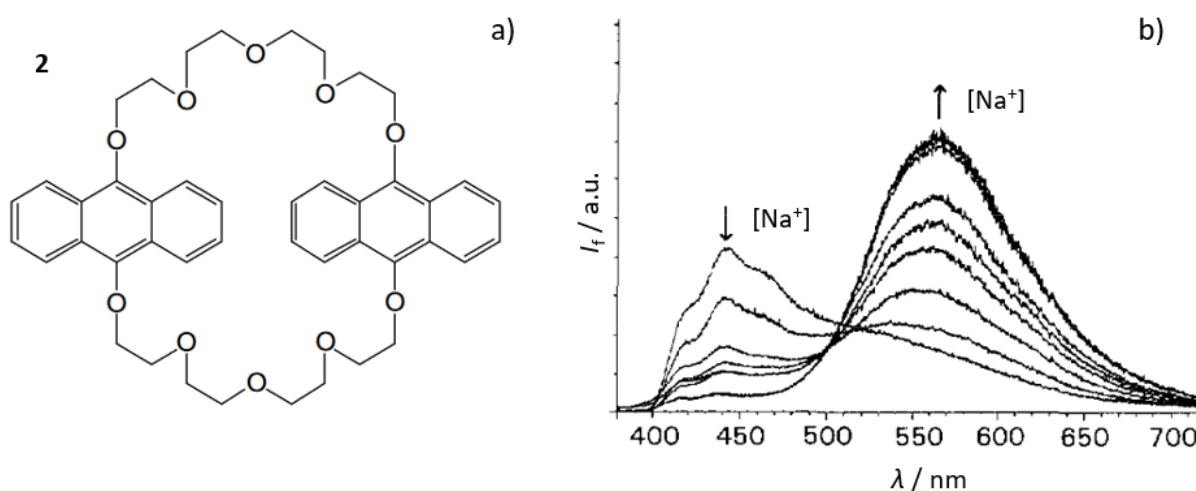


Slika 7. a) Fluorimetrijska titracija liganda **1** ($c = 3,6 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$) s Pb^{2+} u $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ (60:40 V/V) pri pH = 5,2, $\lambda_{\text{exc}} = 350 \text{ nm}$. Shematski prikaz kompleksa **1**: Pb^{2+} stehiometrije b) 1:1 i c) 3:2. (Prilagođeno prema ref. 10.)

2.1.2. Konstante ravnoteže reakcija kompleksiranja u osnovnom i pobuđenom stanju

U supramolekulskim sustavima gdje je fluorofor uključen u stvaranje veze s drugom vrstom njegova sposobnost vezanja razlikuje se u osnovnom i u pobuđenom stanju. Razlog tomu je redistribucija naboja u pobuđenom stanju koja uzrokuje promjenu u elektrostatskim interakcijama domaćina i gosta ili konformacijska promjena inducirana apsorpcijom elektromagnetskog zračenja. Ako je asocijacija/disocijacija kompleksa moguća tijekom životnog vijeka molekule u pobuđenom stanju, tada se konstanta stabilnosti kompleksa razlikuje za osnovno i pobuđeno stanje. Konstantu stabilnosti kompleksa za osnovno stanje moguće je odrediti primjerice spektrofotometrijskom ili fluorimetrijskom titracijom. Konstanta stabilnosti za pobuđeno stanje može se procijeniti spektrofluorimetrijskom titracijom. Prilikom određivanja konstante stabilnosti kompleksa za pobuđeno stanje nužno je, iako rijetko moguće radi vrlo kratkog životnog vijeka pobuđene vrste, zadovoljiti uvjet da se ravnoteža postigne u pobuđenom stanju.^{6,9}

U reakciji kompleksiranja bisantraceno-krunastog etera **2** (slika 8a) s dva Na⁺ u acetonitrilu uočena je bolja sposobnost vezanja u pobuđenom nego u osnovnom stanju. Kumulativna konstanta stabilnosti kompleksa stehiometrije 1:2 u osnovnom stanju određena na temelju spektrofotometrijske titracije iznosi $4,2 \times 10^4 \text{ mol}^{-2} \text{ dm}^6$, dok konstanta stabilnosti kompleksa u pobuđenom stanju određena spektrofluorimetrijskom titracijom (slika 8b) iznosi $1,0 \times 10^5 \text{ mol}^{-2} \text{ dm}^6$.



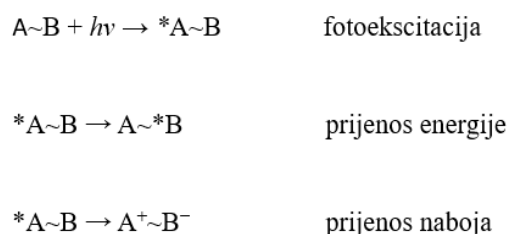
Slika 8. a) Bisantraceno-krunasti eter **2**. b) Fluorimetrijska titracija liganda **2** u pobuđenom stanju s Na⁺ u acetonitrilu, $\lambda_{\text{exc}} = 370 \text{ nm}$. (Prilagođeno prema ref. 11.)

Sukcesivne konstante stabilnosti kompleksa u osnovnom stanju iznose $K_{11} = 1,78 \times 10^2 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3$ i $K_{12} = 2,36 \times 10^2 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3$, dok u pobuđenom stanju poprimaju vrijednosti $K_{11} = 2,00 \times 10^2 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3$ i $K_{12} = 5,00 \times 10^2 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3$. Pretpostavljeni uzrok većih konstanti ravnotežereakcije u pobuđenom stanju je strukturna promjena nastala prilikom pobude liganda.¹¹

2.1.3. Fotokemijski procesi u supramolekulskim sustavima

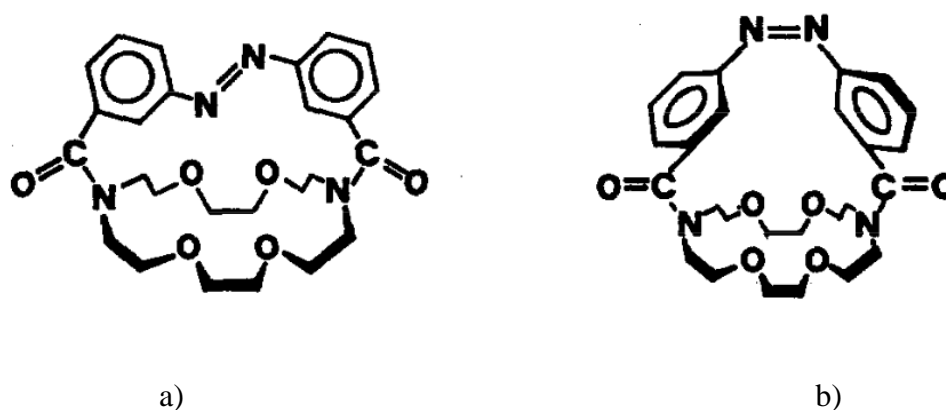
Prvi korak svakog fotokemijskog i fotofizikalnog procesa je, naravno, apsorpcija fotona prilikom čega molekula prelazi u pobuđeno stanje. To pobuđeno stanje čini energijski bogatu, nestabilnu vrstu koja se mora podvrgnuti nekoj vrsti deaktivacije. Osim već spomenutih radijacijskih i neradijacijskih puteva deaktivacije, u slučaju supramolekula, postoji mogućnost fotokemijske razgradnje.¹²

Ostali fotokemijski procesi mogući kod supramolekula uključuju prijenos elektrona, prijenos energije, prijenos naboja, stvaranje ekscimera i fotoizomerizaciju. Zamislimo li da je supramolekula načinjena od podjedinica A i B povezanih nespecifičnom vezom (~), prijenos elektrona i prijenos energije možemo prikazati shemom 2. Pobudom supramolekule zapravo dolazi do pobude jedne od njenih podjedinica. Prije nego li se pobuđena molekula vrati u osnovno stanje, može doći do prijenosa energije na drugu podjedinicu i njene pobude. Mehanizam prijenosa energije otvara mogućnost postojanja sustava u kojemu jedna podjedinica apsorbira fotone, dok je druga podjedinica zaslužna za emisiju. Uslijed pobude može doći i do fotoinduciranog prijenosa elektrona (engl. *photoinduced electron transfer*, PET), gdje jedna podjedinica otpusti elektron dok ga druga primi. Iako supramolekula ostaje neutralna vrsta, lokalno su prisutne dvije podjedinice suprotnog naboja.



Shema 2. Prikaz fotoekscitacije, prijenosa energije i prijenosa elektrona; A~B označava kompleks, A domaćina, a B gosta.

Naboj prisutan na podjedinicama pojačava njihovo međusobno privlačenje, no istovremeno čini obje podjedinice reaktivnijima. Za proces prijenosa elektrona relevantni termodinamički parametri su oksidacijski i redukcijski potencijali parova A^*/A^+ i A^*/A^- . Radi veće količine energije, podjedinica u pobuđenom stanju je jači reducens, odnosno jači oksidans od iste podjedinice u osnovnom stanju. Prilikom ozračivanja supramolekulske vrste može doći do instantnog prijenosa elektrona gdje, za razliku od prije navedenog prijenosa, ne dolazi do pobuđenja molekule već nastaju ionske vrste. U supramolekulama sačinjenim od više podjedinica uzastopni prijenos energije ili elektrona može uzrokovati separaciju naboja i migraciju energije preko velikih udaljenosti. Ekscimer (engl. *excimer*) predstavlja pobuđeni dimer, a nastaje interakcijom pobuđene molekule s molekulom u osnovnom stanju prilikom čega dolazi do vezanja. Takvu vrstu moguće je identificirati spektrofluorimetrijski jer fluorescira pri većoj valnoj duljini od pobuđene molekule. U slučaju interakcije pobuđene molekule s različitom molekulom u osnovnom stanju dolazi do stvaranja ekscipleksa (engl. *exciplex*). I ekscimer i ekscipleks su kratkoživuće vrste te disociraju onda kada se pobuđena molekula vrati u osnovno stanje. Fotoizomerizacija obuhvaća izomerizaciju molekule uslijed apsorpcije fotona. Takva pojava je korisna kod molekula poput krunastih etera s vezanim azobenzenom čija *trans* konformacija veže male metalne katione poput Li^+ i Na^+ , dok *cis* konformacija veže veće katione poput K^+ i Rb^+ (slika 9).^{9,12}

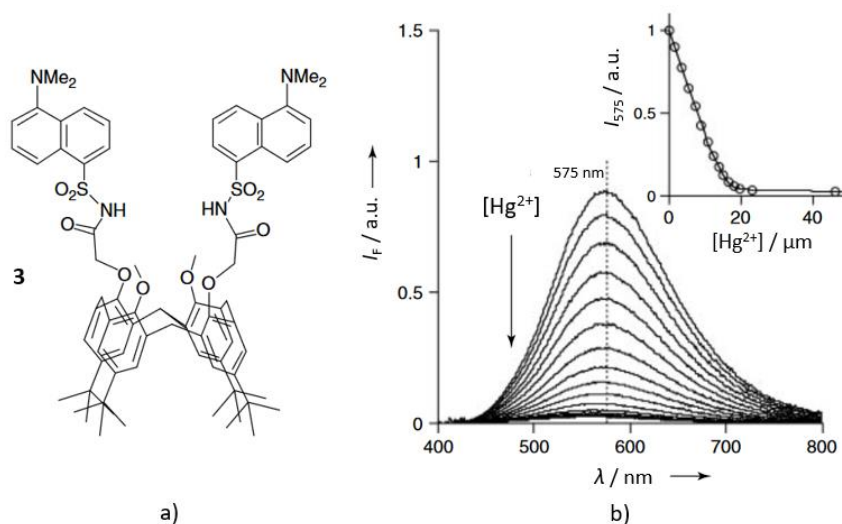


Slika 9. Krunasti eter s vezanim azobenzenom u a) *trans* konformaciji i b) *cis* konformaciji.

Promatrajući emisijski spektar liganda ili kompleksa, moguće je dobiti informacije o fotokemijskim procesima koji se zbivaju. Pojava nove emisijske vrpce upućuje na stvaranje ekscimera ili ekscipleksa, dok smanjenje fluorescencije može biti povezano s prijenosom elektrona tijekom asocijacije. Pad intenziteta fluorescencije donora, popraćen rastom

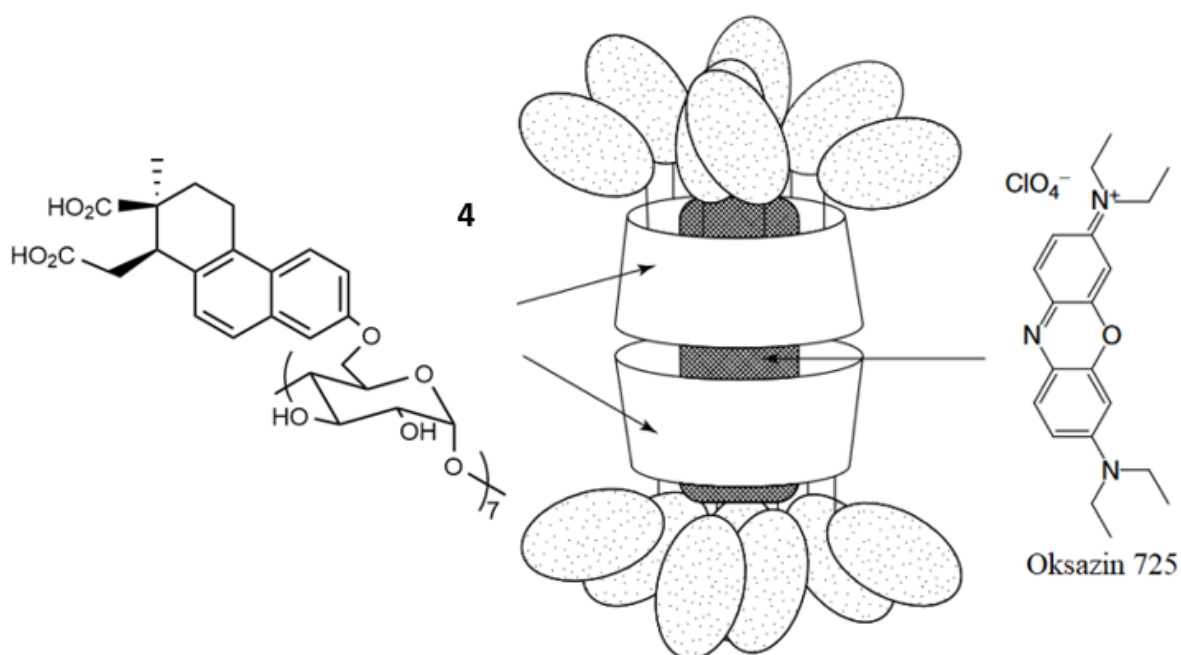
fluorescencije akceptora, sugerira prijenos energije, čija efikasnost može biti procijenjena pomoću pada/rasta intenziteta fluorescencije.⁹

Kaliks[4]aren s dvije dansilne skupine **3** (slika 10a), sličan prethodno spomenutom kaliksarenu **1** (slika 6), vrlo specifično i s velikom osjetljivošću veže Hg^{2+} . Iz slike 10b vidljivo je da se dodatkom Hg^{2+} intenzitet fluorescencije smanjuje, dok skoro u potpunosti nije ugašena. Analizom niza spektara dobivenih titracijskim eksperimentima određena je konstanta stabilnosti kompleksa stehiometrije 1:1 koja iznosi $K_{11} = 1,5 \times 10^7 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3$, te je procijenjena kvantna efikasnost kompleksa od svega 2,5 % kvantne efikasnosti samog kaliksarena **3**. Gašenje fluorescencije uslijed vezanja Hg^{2+} moguće je objasniti prijenosom elektrona. Dansilne skupine, koje imaju ulogu fluorofora, apsorpcijom zračenja i prijelazom u pobuđeno stanje doniraju elektron vezanom Hg^{2+} . Deaktivacija se zatim odvija na nastalom ionu prilikom čega ne dolazi do fluorescencije. Snimanjem spektra u zamrznutoj otopini (EtOH:MeOH = 9:1, V/V pri temperaturi 100 K) moguće je dodatno utvrditi mehanizam gašenja. Naime, takvi uvjeti onemogućuju reorganizaciju molekula otapala prilikom čega nastaje rigidna matrica. Molekule otapala se ne mogu pravilno orijentirati oko novonastalih naboja na ionu i ligandu, što podiže energiju sustava. Prijenos elektrona je zatim manje efikasan, proces se rjeđe odvija, što rezultira manjim smanjenjem intenziteta fluorescencije. Porast fluorescencije u zamrznutoj otopini s obzirom na fluorescenciju u otopini na sobnoj temperaturi potvrđuje mehanizam gašenja.¹³

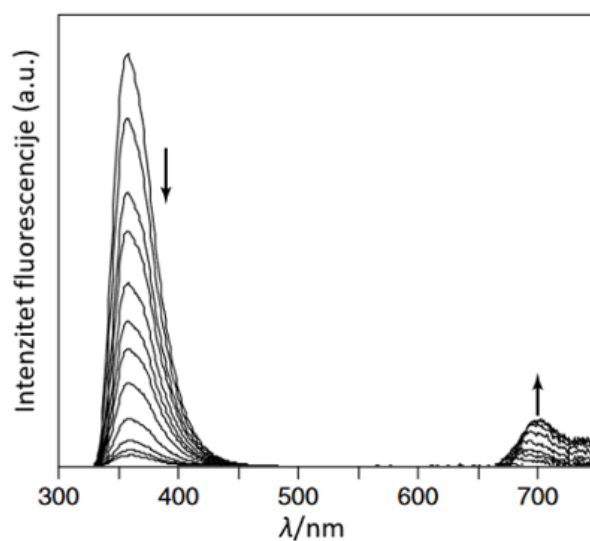


Slika 10. a) Kaliks[4]aren s dvije dansilne skupine. b) Fluorimetrijska titracija liganda **3** ($c = 1,6 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$) s Hg^{2+} u $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ (60:40 V/V) pri $\text{pH} = 4,0$, $\lambda_{\text{exc}} = 350 \text{ nm}$. (Prilagođeno prema ref. 13.)

β -ciklodekstrin koji posjeduje sedam steroidnih naftalenskih fluorofora (**4**, slika 11) stvara inkluzijske komplekse s fluorescentnim bojama. Na slici 11 prikazana je struktura njegova kompleksa s oksazinom 725. Proučavano je nastajanje 1:1 i 2:1 kompleksa, no 1:1 kompleks ne nastaje pri mikromolarnim količinama te će biti zanemaren u nastavku. Na fluorescencijskom spektru (slika 12) vidljiv je pad intenziteta fluorescencije spoja **4** i porast fluorescencije oksazina 725 tijekom titracijskog eksperimenta. Osim što fluorescencija oksazina 725 raste, intenzitet fluorescencije nadmašuje očekivanu vrijednost u slučaju ekscitacije samog spoja. Rezultati fluorimetrije zatim upućuju na prijenos energije između ciklodekstrina **4** i oksazina. Nakon pobude, domaćin predaje apsorbiranu energiju gostu koji zatim prelazi u pobuđeno stanje. Pobuđeni oksazin deaktivacijom emitira zračenje. Analizom fluorimetrijskih podataka dobivena je kumulativna konstanta stabilnosti kompleksa $\beta = 2,4 \times 10^{10} \text{ mol}^{-2} \text{ dm}^6$ i procijenjena je efikasnost prijenosa energije kao približno 1. Budući da je prijenos energije skoro potpun, razlog povišenoj fluorescenciji oksazina može se objasniti puno većom sposobnosti apsorpcije ciklodekstrina **4** nego li je ona oksazina.¹⁴



Slika 11. Shematski prikaz strukture kompleksa ciklodekstrina **4** i oksazina 725 stehiometrije 2:1. (Prilagođeno prema ref. 14.)



Slika 12. Fluorimetrijska titracija liganda **4** ($c = 6,8 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$) s oksazinom 725 u smjesi pufera (pH = 10) i etanola u volumnom omjeru 95:5; $\lambda_{\text{exc}} = 320 \text{ nm}$. (Prilagođeno prema ref. 14.)

2.1.4. Kooperativnost i antikooperativnost kompleksiranja

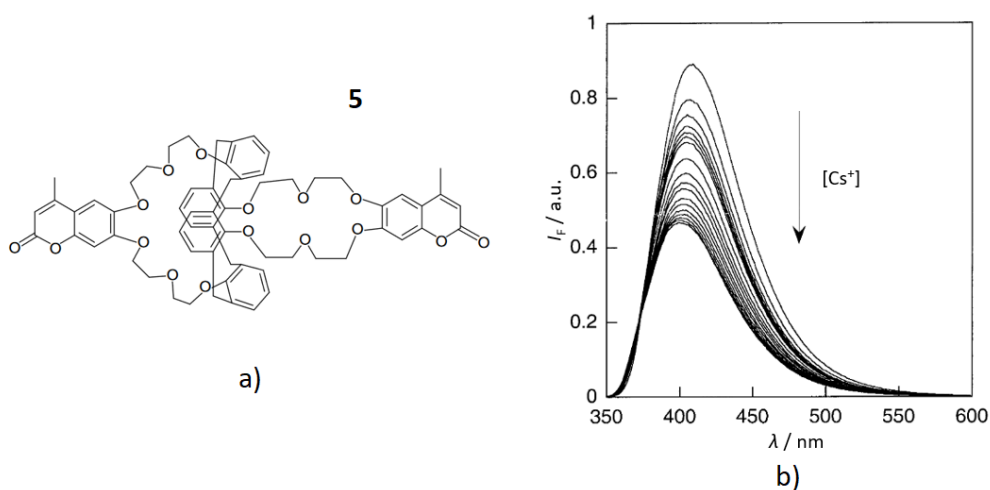
Kada ligand veže više od jedne molekule gosta postoji mogućnost kooperativnog i antikooperativnog vezanja. Naime, vezanjem prve molekule gosta dolazi do promjene fizikalnih i kemijskih svojstava liganda. Kada omjer konstanti ravnoteže reakcija nastajanja kompleksa $K_{1(i+1)}/K_{1i}$ ne odstupa od statistički izračunane vrijednosti (tablica 1), riječ je o nekooperativnom vezanju. U slučaju da je vrijednost $K_{1(i+1)}/K_{1i}$ manja od statističke vrijednosti, vezanje je negativno kooperativno ili antikooperativno. Tada je, porastom broja vezanih molekula, daljnja asocijacija molekule gosta s ligandom sve nepovoljnija. Suprotno tome, pozitivno kooperativno vezanje podrazumijeva veći omjer $K_{1(i+1)}/K_{1i}$ od statistički izračunanog (tablica 1).

Tablica 1. Relativne vrijednosti konstanta stabilnosti za slučaj n identičnih i neovisnih veznih mjesta.

n	K_{11}	K_{21}	K_{31}	K_{41}	K_{51}	K_{61}
2	2	1/2	–	–	–	–
3	3	1	1/3	–	–	–
4	4	3/2	2/3	1/4	–	–
5	5	2	1	1/2	1/5	–
6	6	5/2	4/3	3/4	2/5	1/6

Kooperativni efekt je zapažen tijekom kompleksacije bisantraceno-krunastog etera **2** (slika 6) i dva Na^+ , kao što je vidljivo iz porasta konstante stabilnosti kompleksa prilikom vezanja drugog kationa. Za osnovo stanje vrijedi $K_{12}/K_{11} = 1,33$, dok se u pobuđenom stanju omjer podiže na $K_{12}/K_{11} = 2,50$. U oba slučaja je eksperimentalna vrijednost veća od statistički izračunane, $K_{12}/K_{11} = 0,25$, što znači da je vezanje kooperativno. Asocijacija prvog iona uzrokuje približavanje antracenskih jedinica što pogoduje stvaranju ekscimera i čini vezanje idućeg iona lakše.¹¹

Kaliks[4]biskruna (**5**, slika 13a) služi kao fluorescentni molekularni senzor za ione cezija. Tijekom titracije s Cs^+ dolazi do gašenja fluorescencije, odnosno vezanje kationa uzrokuje smanjenje kvantnog iskorištenja fluorescencije liganda **5**, kao što je vidljivo iz emisijskih spektara (slika 13b). Obradom podataka fluorimetrijske titracije moguće je zaključiti da je riječ o antikooperativnom vezanju. Vezanje prvog iona cezija ($\log K_{11} = 6,68$) otežava vezanje drugog ($\log K_{12} = 3,81$). Omjer $K_{12}/K_{11} = 1,3 \times 10^{-3}$, što je mnogo manja vrijednost od statističke granične vrijednosti od 1/4. Efekt antikooperativnosti vrlo vjerojatno proizlazi od elektrostatskog odbijanja dvaju cezijevih kationa. Također je moguće da prilikom kompleksiranja dolazi do nepovoljne konformacijske promjene slobodnog liganda.¹⁵



Slika 13. a) Kaliks[4]biskruna **5**. b) Fluorimetrijska titracija liganda **5** ($c = 1,9 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$) s Cs^+ u etanolu, $\lambda_{\text{exc}} = 310 \text{ nm}$. (Prilagođeno prema ref. 15.)

2.1.5. Tehnike vremenski razlučene fluorescencije

Pomoću tehnika vremenski razlučene fluorescencije moguće je odrediti konstante brzine fotokemijskih procesa u supramolekulskim sustavima i životni vijek pobuđenog fluorofora. Nužan uvjet je da se vrijeme zbijanja istraživanog fotokemijskog procesa nalazi unutar životnog vijeka pobuđenog stanja. Neke od tih tehnika su pulsna fluorimetrija i fluorimetrija s modulacijom faze.

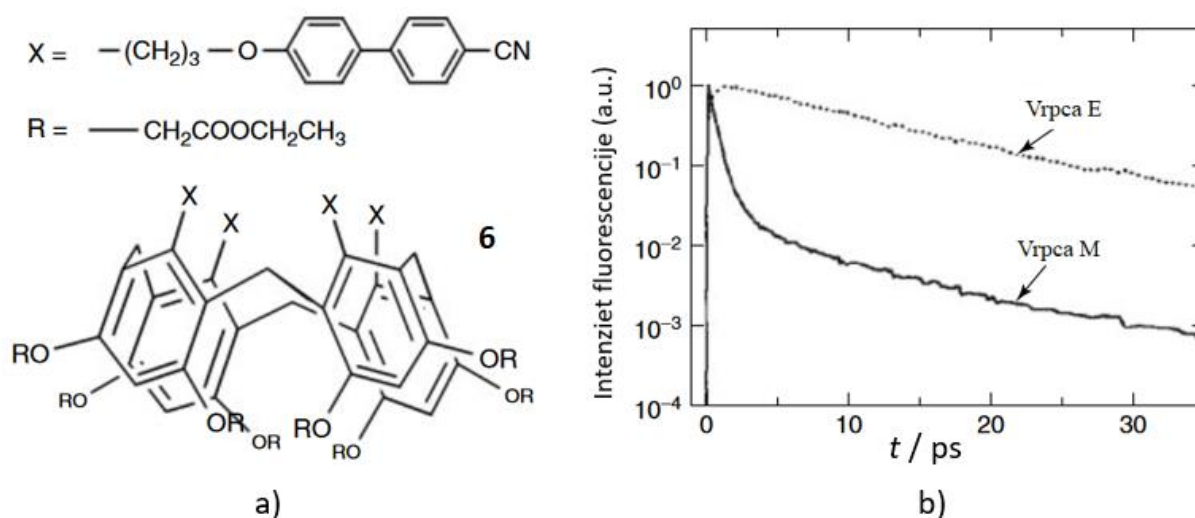
Tijekom pulsne fluorimetrije uzorak se pobuđuje kratkim pulsom elektromagnetskog zračenja nakon čega se mjeri ovisnost fluorescencije o vremenu. Bitno je napomenuti da se istraživani fluorofor određeno vrijeme zadrži u pobuđenom stanju, prije nego li dođe do emisije. Upravo taj vremenski period predstavlja životni vijek fluorofora. Najrasprostranjenija tehnika pulsne fluorimetrije naziva se *singular-photon timing technique* (SPT), temelji se na pretpostavci da je vjerojatnost detektiranja fotona u vremenu t proporcionalna intenzitetu fluorescencije u tom vremenu. Potrebno je provesti veliki broj eksperimenata kako bi se prikupila dovoljna količina podataka koja omogućuje rekonstrukciju ovisnosti intenziteta fluorescencije o vremenu nakon ekscitacijskog pulsa. Tijekom snimanja nužno je ostaviti dovoljno vremena između pulseva kako ne bi došlo do detekcije fotona za kojeg je zaslužan prethodni ekscitacijski puls. Takva distorzija se naziva efekt nakupljanja (*pile-up effect*). Rezolucija SPT je do nekoliko pikosekundi. Također postoje *streak* kamere čija je rezolucija do 200 fs i sustavi s vremenskim prorezima (engl. *time-gated systems*) s rezolucijom do nekoliko femtosekundi. Kao izvor ekscitacijskog zračenja se najčešće koriste bljeskalice, odnosno u novije vrijeme safirni laseri.^{1,9}

Fluorimetrija s modulacijom faze se razlikuje po tome što se, kao ekscitacijsko zračenje, koristi izvor moduliran visokom frekvencijom čime se postiže sinusoidalni oblik intenziteta zračenja tijekom vremena. Pobuđeni fluorofor fluorescira te se intenzitet zračenja također mijenja sinusoidalno tijekom vremena. Radi životnog vijeka fluorofora, sinusoida zaostaje za ekscitacijskim zračenjem. Tijekom eksperimenta mjeri se razlika između dviju sinusoida koja se naziva pomak faza ($\Delta\varphi$). Pomak faza direktno je povezan sa životnim vijekom fluorescencije:

$$\tau = \frac{1}{2\pi f} \tan(\Delta\varphi) \quad (10)$$

gdje τ predstavlja životni vijek fluorescencije, a f frekvenciju modulacije. Osim životnog vijeka fluorescencije također je moguće mjeriti brzine fotokemijskih procesa koji se odvijaju tijekom reakcija stvaranja kompleksa.⁹

S ciljem razvijanja fotoosjetljivih tekućih kristala sintetiziran je kaliks[4]rezorcinaren s četiri vezane cijanobifenilne (CB) podjedinice (**6**, slika 14a). Proučavana je kinetika nastajanja ekscimera liganda **6** i 4-cijano-4-oktiloksibisfenila (8OCB). U spoju **6** i tekućem kristalu 8OCB jedinice CB su međusobno paralelne i iste orijentacije, no u tekućem kristalu nisu vezane za makrociklički spoj, što im olakšava rotaciju. Pomoću tehnike vremenski razlučene fluorescencije (slika 14b) određene su konstante brzine reakcija stvaranja i disocijacije ekscimera liganda **6**, čije vrijednosti iznose $k_f = 1,9 \times 10^9 \text{ s}^{-1}$ i $k_d = 4,0 \times 10^7 \text{ s}^{-1}$. Vrijednosti odgovarajućih konstanti za 8OCB očekivano su veće te iznose $k_f = 4,0 \times 10^9 \text{ s}^{-1}$ i $k_d = 2,0 \times 10^9 \text{ s}^{-1}$. Nastajanje ekscimera otežano je u slučaju liganda **6** radi odbojnih sila između nasuprotnih CB jedinica uzrokovanih dipol-dipol interakcijama, te je potrebna rotacija oko veze s kaliksarenom kako bi one zauzele povoljan položaj. No, nastali ekscimer CB jedinica spoja **6** dodatno je stabiliziran promjenom konformacije, što je vidljivo iz manje konstante brzine disocijacije.¹⁶

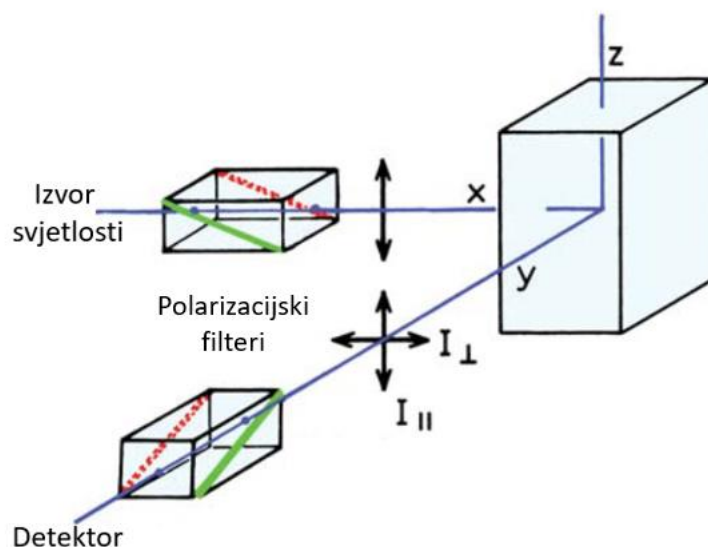


Slika 14. a) Struktura kaliks[4]rezorcinarena s četiri vezane cijanobifenilne podjedinice (**6**). b) Vremenska ovisnost fluorescencije nakon pobuđujućeg pulsa za monomer (M, pri $\lambda = 365 \text{ nm}$) i ekscimer (E, pri $\lambda = 420 \text{ nm}$); $\lambda_{\text{exc}} = 297 \text{ nm}$. (Prilagođeno prema ref. 16.)

2.1.6. Anizotropija fluorescencije

Mjerenjem anizotropije fluorescencije moguće je odrediti veličinu supramolekule i orijentacijsku mobilnost vezanih fluorofora. Također, postoji mogućnost određivanja puta prijenosa energije između identičnih fluorofora, što daje informaciju o njihovoj međusobnoj udaljenosti. Pomoću anizotropije fluorescencije može se pratiti tijek reakcije nastajanja supramolekulskog kompleksa.

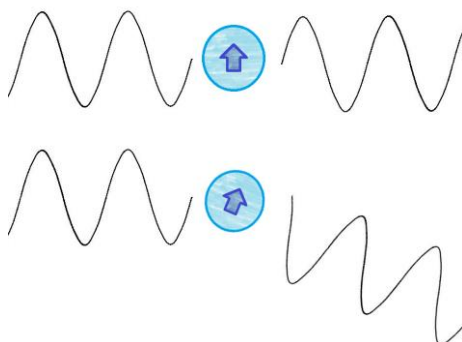
Prilikom mjerenja anizotropije fluorescencije, ekscitacijsko zračenje prolazi kroz polarizacijski filter koji stvara polarizirano zračenje (ono čija se elektromagnetska oscilacija odvija u samo jednoj ravnini). Detektor opremljen polarizacijskim filterom koji je orijentiran u istom smjeru kao i filter na izvoru zračenja zatim mjeri intenzitet emitiranog zračenja. Ovisno o orijentaciji elektromagnetskih valova emitiranog zračenja, detektor registrira određeni udio ukupnog zračenja. Shematski diagram uređaja za mjerenje anizotropije fluorescencije prikazan je na slici 15.



Slika 15. Shematski diagram uređaja za mjerenje anizotropije fluorescencije. (Prilagođeno prema ref. 9.)

Većina fluorofora pobuđenih polariziranim zračenjem emitira zračenje koje je polarizirano u istom smjeru. Poznato je da molekule u otopini nisu statične već se konstantno gibaju i rotiraju. Što je molekula veća te što je otapalo viskoznije i njegova temperatura manja, brzina kretanja i rotacije je manja. Ako dođe do rotacije molekule u periodu između apsorpcije i emisije fotona, usmjerenje emitirane polarizirane svjetlosti razlikovat će se od smjera ekscitacijskog zračenja

(shema 3). Ta se pojava naziva rotacijska difuzija te ju je tijekom mjerenja anizotropije fluorescencije nužno izbjeći ili minimizirati. To se postiže provođenjem eksperimenta pri što nižoj temperaturi u što viskoznijem otapalu mogućem. Minimiziranje rotacijske difuzije sprječava dominaciju signala dobivenih nasumičnom orijentacijom molekule i osigurava detaljan prikaz dinamike istraživanih molekulskih interakcija.^{1,9}



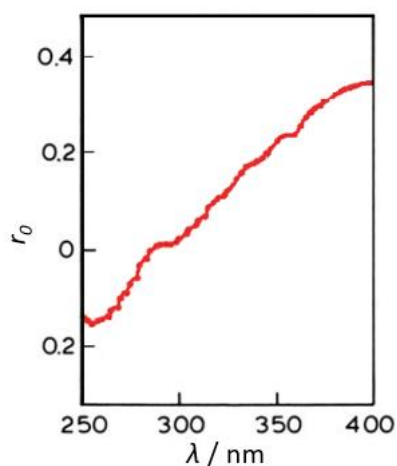
Shema 3. Usmjerenje emitiranog polariziranog zračenja uslijed rotacije molekule.

Intenzitet emitiranog zračenja mjerei se nakon prolaska kroz polarizacijski filter. U slučaju kada je emisijski polarizacijski filter orijentiran paralelno s ekscitacijskim izmjereni intenzitet ima oznaku I_{\parallel} , a kada je njihova orijentacija međusobno okomita očitani intenzitet ima oznaku I_{\perp} . Pomoću tih vrijednosti moguće je izračunati anizotropiju (r):

$$r = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + 2I_{\perp}} \quad (11)$$

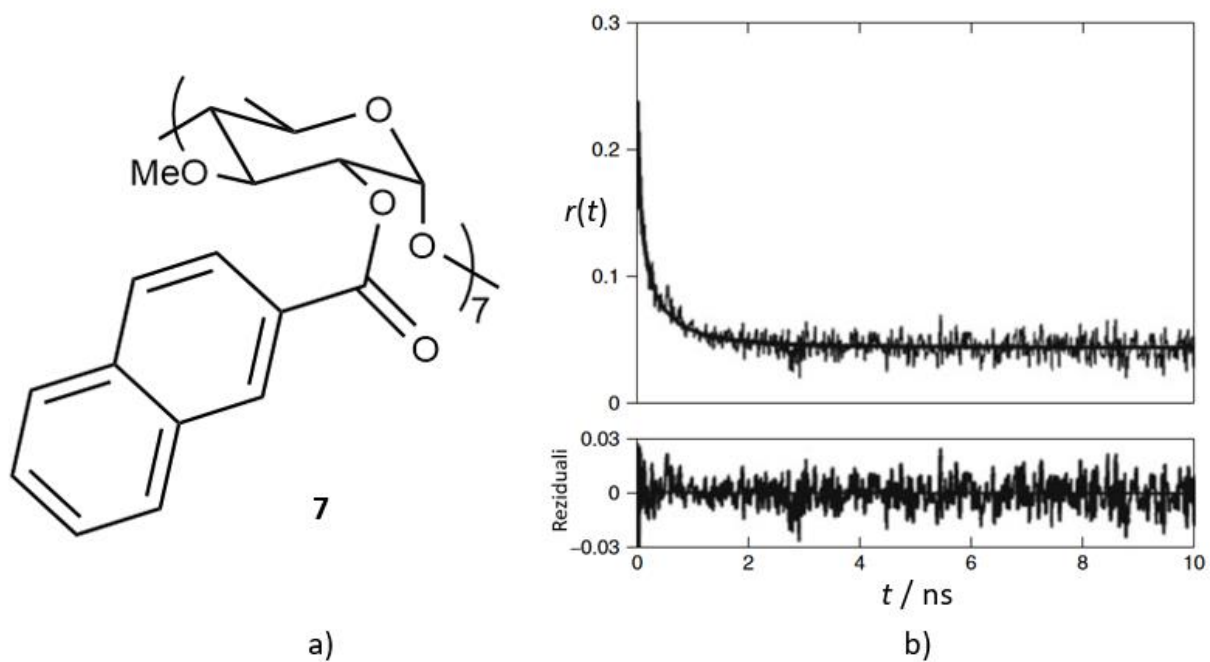
Anizotropija je bezdimenzijska veličina, neovisna o ukupnom intezitetu emisije.

Na slici 16 prikazana je ovisnost anizotropije (r) o valnoj duljini ekscitacijskog zračenja (λ) za 9-antriloksisstearinsku kiselinu u glicerolu.¹⁷ Anizotropija je neovisna o valnoj duljini emisijskog zračenja jer se emisija odvija skoro isključivo iz najnižeg singletnog stanja (S_1). Generalni trend za većinu fluorofora je porast vrijednosti anizotropije s porastom valne duljine ekscitacijskog zračenja, nakon čega dolazi do stagnacije pri većim valnim duljinama (slika 16).^{1,9}



Slika 16. Spektar fluorescencijske anizotropije 9-antriloksisistearinske kiseline u glicerolu pri -52°C . (Prilagođeno prema ref. 17.)

Pomoću anizotropije fluorescencije moguće je detaljno proučiti prijenos energije između identičnih fluorofora. Ciklodekstrin sa sedam vezanih naftoatnih fluorofora (7, slika 17a) izložen je polariziranom ekscitacijskom zračenju.¹⁸ Ekscitacijom jednog naftoata dolazi do vrlo efikasne i brze dipol-dipol izmjene energije između svih sedam naftoata. Taj proces nije moguće detektirati mjerenjem intenziteta fluorescencije jer prijenos energije između identičnih fluorofora (homotransfer) ne utječe na intenzitet fluorescencije niti na životni vijek fluorofora. Vremenski razlučena anizotropija fluorescencije (slika 17b) prikazuje dinamiku prijenosa energije. Vidljivo je da intenzitet fluorescencije pada od početne vrijednosti 0,291 do konačne vrijednosti 0,042 u periodu od otprilike 2 ns. Tijekom dovoljno dugog vremenskog perioda ekscitacija se ravnomjerno dijeli između svih sedam identičnih fluorofora, no samo izravno pobuđen fluorofor emitira polariziranu, dok ostatak emitira depolariziranu svjetlost ($r = 0$). Iz vremenske ovisnosti anizotropije fluorescencije izračunana je recipročna konstanta brzine procesa prijenosa energije koja iznosi 51 ps, a analizom cijeloukupnog spektra dobivena je međusobna udaljenost susjednih fluorofora koja iznosi 6 Å.^{9,18}



Slika 17. a) Ciklodekstrin sa sedam vezanih naftoatnih fluorofora **7**. b) Pad anizotropije fluorescencije liganda **7** u optički čistom rigidnom staklu (9:1 metanol:etanol V/V, pri 110 K). (Prilagođeno prema ref. 18.)

§ 3. LITERATURNI IZVORI

1. J. R. Lakowicz, *Principles of fluorescence spectroscopy*, Springer, New York, 2006, str. 1–110, 371–383.
2. https://chem.libretexts.org/Courses/DePaul_University/Physical_Chemistry_for_Biological_Sciences/09%3A_Molecular_Spectroscopy/9.05%3A_Fluorescence_and_Phosphorescence (datum pristupa 6. lipnja 2024.)
3. S. Mishra, P. Chahal, A. Sharma, A. Arya, G. Gupta, *IJCRT* **9** (2021) 564–579.
4. C. T. Ernest, High-resolution studies of the $\tilde{A}^1A_2 - \tilde{X}^1A_1$ electronic transition of formaldehyde: spectroscopy and photochemistry, Doktorski rad, Univeristy of Miami, 2011, str. 21.
5. J.-M. Lehn, *Supramolecular chemistry: concepts and perspectives*, Wiley, Weinheim, 1995, str. 1–62.
6. K. Ariga, T. Kunitake, *Supramolecular Chemistry: fundamentals and applications*, Spriger, Germany, 2007, str. 1–24.
7. M. Sayed, H. Pal, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **23** (2021) 26085–26107.
8. P. Neri, J. L. Sessler, and M.-X. Wang (eds.), *Calixarenes and Beyond*, Springer International Publishing, Cham, 2016.
9. C. A. Schalley, *Analytical methods in supramolecular chemistry*, 2nd ed., Wiley-VCH, Weinheim, 2012, str. 287–350.
10. R. Métivier, I. Leray, B. Valeur, *Chem. Commun.* (2003) 996.
11. D. Marquis, J-P Desvergne, *Chem. Phys. Lett.* **230** (1994) 131–136
12. V. Balzani, *Tetrahedron*, **48** (1992) 10443–10514.
13. R. Metivier, I. Leray, B. Valeur, *Chem. Eur. J.* **10** (2004) 4480–4490.
14. P. Choppinet, L. Jullien, and B. Valeur, *Chem. Eur. J.* **5** (1999) 3666–3678.
15. I. Leray, Z. Asfari, J. Vicens, B. Valeur, *J. Chem. Soc., Perkin Trans.* **2** (2002) 1429.
16. S. Akimoto, H. Nishizawa, T. Yamazaki, I. Yamazaki, Y. Hayashi, M. Fujimaki, K. Ichimura, *Chem. Phys. Lett.* **276** (1997) 405–410.
17. M. Vincent, B. de Foresta, J. Gallay, A. Alfsen, *Biochemistry* **21** (1982) 708–716
18. M. N. Berberan-Santos, P. Choppinet, A. Fedorov, L. Jullien, B. Valeur, *J. Am. Chem. Soc.* **121** (1999) 2526–2533.