

## FLUORESCENCJA BARWNIKÓW ORGANICZNYCH I JEJ ZASTOSOWANIE W ILOŚCIOWEJ ANALIZIE LUMINESCENCYJNEJ

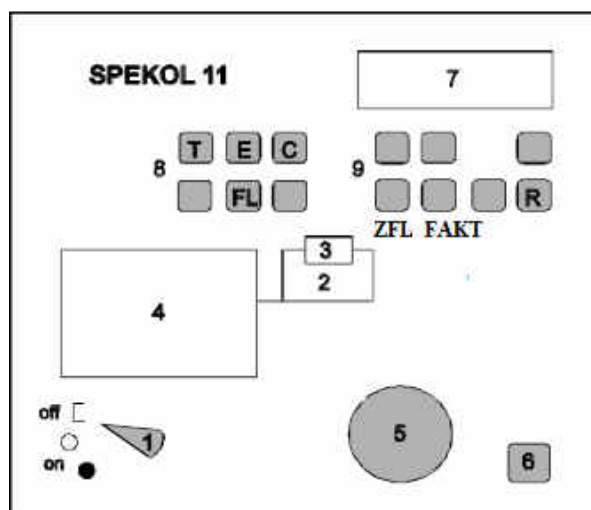
### Cel ćwiczenia

Celem ćwiczenia jest zapoznanie się ze zjawiskiem luminescencji i wykorzystanie go do ilościowej analizy w praktyce laboratoryjnej. W związku z tym konieczne jest sporządzenie widma wzbudzeniowego fluorescencji w zakresie widzialnym wodnego roztworu fluoresceiny. Należy wykonać pomiary natężenia fluorescencji w zależności od długości fali światła wzbudzającego i na podstawie otrzymanych danych wykreślić tę zależność. Z wykresu odczytujemy długość fali odpowiadającą maksimum natężenia fluorescencji. Otrzymaną długość fali odpowiadającą maksimum fluorescencji wykorzystujemy przy wyznaczaniu natężenia fluorescencji w funkcji stężenia roztworu. Otrzymana krzywa kalibracji ma zastosowanie przy ilościowej analizie badanych roztworów.

### Aparatura i roztwory

1. Spektrofotometr typu „SPEKOL 11”.
2. Roztwór fluoresceiny.
3. Substancja wygaszająca fluorescencję.

**UWAGA !** Po wejściu na salę przyrząd pomiarowy SPEKOL-11 włączyć do sieci i nacisnąć włącznik sieciowy (6). Po upływie ok. 20 min przyrząd jest gotowy do pomiarów.



1. Przełącznik przesłony światła.
2. Uchwyt kuwety.
3. Kuweta.
4. Pojemnik z fotokomórką.
5. Bęben do nastawiania długości fali.
6. Przycisk wyłącznika sieciowego.
7. Okienko wskaźnikowe.
8. Klawiatura "rodzaj pomiaru".
9. Klawiatura wprowadzania danych dotyczących pomiaru.

Schemat płyty czołowej „SPEKOL 11”

## Przebieg ćwiczenia

### I. Pomiar natężenia fluorescencji w zależności od długości fali wzbudzenia w zakresie od 470 - 560 nm.

1. Nalać wody destylowanej do kuwetki do 3/4 jej wysokości; wstawić do uchwytu kuwetek (2);
2. Wprowadzić kuwetkę w bieg promieni za pomocą uchwytu zmieniacza kuwetek  
Uchwyt zmieniacza kuwetek **przesuwamy w dół**, obracamy go o  $180^{\circ}$ , **podnosimy do góry** do poprzedniego położenia – powoduje to wprowadzenie kuwetki w bieg promieni światła wzbudzającego.
3. Obrócić przełącznik przesłony światła (1) na pozycję środkową (między „ON” i „OFF” - znak [o]).  
Na bębnie (5) ustawić długość fali **490 nm**.
4. Nacisnąć klawisz **FL** – przyrząd jest zaprogramowany na pomiar fluorescencji.  
*Migają światła diod nad klawiszami Z-FL MIN i FAKT.*  
Klawisze tej grupy służą do wprowadzania parametrów dla przetwarzania wartości pomiarowych i innych sygnałów informacyjnych dla mikroprocesora.
5. Nacisnąć klawisz **Z-FL MIN** – następuje nastawienie punktu zero dla próbki z wodą destylowaną.  
*Migają diody nad klawiszami FAKT i R.*
6. Nacisnąć klawisz **FAKT** – w okienku (7) obserwujemy wskazanie zapamiętanej wartości czynnika 1.000.
7. Wprowadzić drugą kuwetkę napełnioną **wyjściowym** roztworem fluoresceiny na drogę promieni monochromatora. Czynność tę wykonujemy jak w pkt.2.
8. Nacisnąć klawisz **FAKT**, a po chwili klawisz **R**.  
Wygaśnięcie diody przynależnej do klawisza R powoduje automatyczne nastawienie stopnia wzmocnienia, sterowane wielkością czynnika wprowadzonego do pamięci. Po samoczynnym dostrojeniu przyrządu, w okienku (7) pojawia się wartość natężenia fluorescencji badanego roztworu.
9. Obracając bębniem (5) zmieniać długość fali od **470 do 560 nm**, odczytując co **10 nm** w okienku wskaźnikowym (7) wartość natężenia fluorescencji.  
Odczyt wykonać po około 10 sek od wprowadzenia próbki w bieg promieni, niezależnie od wyświetlanych wartości.
10. Otrzymane wyniki zapisać w tabeli nr 1.
11. Na podstawie danych z tabeli nr 1 wykreślić zależność natężenia fluorescencji od długości fali światła wzbudzającego  $f = f(\lambda)$  obok widma emisyjnego fluoresceiny (druga strona sprawozdania) oraz znaleźć długość fali, przy której obserwuje się maksimum natężenia fluorescencji.

### II. Pomiar zależności natężenia fluorescencji roztworu fluoresceiny od jego stężenia.

1. Sporządzić z wyjściowego roztworu fluoresceiny **7 próbek** o objętości **10 cm<sup>3</sup>** o różnych stężeniach.
2. Odmierzyć po 1; 2; 3; 4; 6; 8 i 10 cm<sup>3</sup> roztworu wyjściowego do 7 próbek za pomocą pipety, a następnie uzupełnić każdy z roztworów wodą destylowaną do objętości 10 cm<sup>3</sup>.
3. Za pomocą bębna (5) ustawić monochromator na długość fali odpowiadającą maksimum natężenia fluorescencji odczytanej z wykresu otrzymanego z pomiarów przeprowadzonych w punkcie I.
4. Przygotowane roztwory wlewać kolejno do kuwetki pomiarowej, począwszy od roztworu o **najniższym** stężeniu i odczytać wartości pomiarowe pojawiające się w okienku wskaźnikowym (7).
5. Wyniki pomiarów wpisać do tabeli nr 2.

**UWAGA ! próbki po pomiarze przelać ponownie do odpowiednich probówek - będą potrzebne w dalszej części ćwiczenia.**

6. Na podstawie wykonanych pomiarów sporządzić wykres zależności natężenia fluorescencji w funkcji stężenia roztworu – w ten sposób otrzymamy krzywą kalibracyjną  $f = f(c)$ .
7. Określić nieznane stężenia roztworów (o nieznannej wartości) fluoresceiny  $C_1$  i  $C_2$ .
8. Roztwory  $C_1$  i  $C_2$  wlewać kolejno do kuwetki pomiarowej i zanotować pojawiające się w okienku (7) wskazania.
9. Na podstawie krzywej kalibracji (punkt 6) i odczytanych wartości natężenia fluorescencji znaleźć nieznane stężenia roztworów.

### **III. Pomiar wpływu substancji wygaszającej fluorescencję na natężenie emisji**

1. Do roztworów sporządzonych w punkcie II.2 dodać po 0,2 ml roztworu jodku potasu (KJ), zamieszać i odczekać 5 minut.
2. Zanotować kolejno dla każdej próbki pojawiające się w okienku (7) wskazania.
3. Dane z pomiarów wpisać do tabeli 3.  
Efekt rozcieńczenia wynikający z powiększenia objętości próbki jest minimalny i zanedbujemy go.
4. Na podstawie otrzymanych wyników wykreślić zależność natężenia fluorescencji od stężenia roztworu (na tym samym wykresie co dla pkt. 6) i porównać z wykresem bez wygaszania.

### **Wymagane wiadomości teoretyczne**

1. Zjawisko luminescencji.
2. Mechanizm powstawania zjawiska fluorescencji i fosforescencji – wyjaśnić w oparciu o diagram Jabłońskiego.
3. Reguła Stokesa.
4. Wydajność energetyczna i wydajność kwantowa fluorescencji. Prawo Wawiłowa.
5. Mechanizmy wygaszania fluorescencji – wygaszanie statyczne i dynamiczne.
6. Wykorzystanie zjawiska fluorescencji w analizie ilościowej.
7. Zastosowanie znaczników fluorescencyjnych w badaniach transportu przez błony komórkowe oraz procesów wewnątrzkomórkowych (badania spektroskopowe i mikroskopowe). Mikroskopia fluorescencyjna i konfokalna.
8. Zastosowanie zjawiska fluorescencji w diagnostyce nowotworów z wykorzystaniem barwników.
9. Zjawisko bioluminescencji.

### **Zalecana literatura**

1. Ćwiczenia laboratoryjne z biofizyki pod red. A. Hendricha i K. Michalak. Wydawnictwo AM, Wrocław, 2005
2. M. Bryszewska, W. Leyko. Biofizyka dla biologów, PWN, Warszawa 1997
3. P. Suppan. Chemia i światło. PWN, Warszawa, 1997
4. Fizyczne metody diagnostyki medycznej i terapii pod red. A. Hryniewiczza i E. Rokity. PWN Warszawa, 2000
5. A.Z. Hryniewicz, E. Rokita. Fizyczne metody badań w biologii, medycynie i ochronie środowiska. PWN Warszawa

<b>Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu Katedra i Zakład Biofizyki i Neurobiologii</b>	<b>Ćwiczenie 4</b> <b>Fluorescencja barwników organicznych i jej zastosowanie w ilościowej analizie luminescencyjnej</b>	
	..... ..... ..... Imiona i nazwiska studentów	Wydział: ..... nr grupy: ..... Data: .....
Ocena:	Podpis prowadzącego ćwiczenia	

I. Pomiar natężenie fluorescencji roztworu fluoresceiny w zależności od długości fali światła wzbudzającego (widmo wzbudzenia).

Tabela 1.

$\lambda$ [nm]	460	470	480	490	500	510	520	530	540	550	560
<b>Natężenie fluorescencji</b>											

II. Pomiar zależności natężenia promieniowania fluorescencji roztworu fluoresceiny od jego stężenia.

Stężenie roztworu wyjściowego wynosi  $1,5 \cdot 10^{-6} \text{ mol/dm}^3$

Tabela 2.

<b>Objętość roztworu wyjściowego fluoresceiny w 10 cm<sup>3</sup> roztworu</b>	<b>1</b> [cm <sup>3</sup> ]	<b>2</b> [cm <sup>3</sup> ]	<b>3</b> [cm <sup>3</sup> ]	<b>4</b> [cm <sup>3</sup> ]	<b>6</b> [cm <sup>3</sup> ]	<b>8</b> [cm <sup>3</sup> ]	<b>10</b> [cm <sup>3</sup> ]	<b>C<sub>1</sub></b> [mol/dm <sup>3</sup> ]	<b>C<sub>2</sub></b> [mol/dm <sup>3</sup> ]
<b>Stężenie roztworu</b> [mol/dm <sup>3</sup> ]									
<b>Natężenie fluorescencji</b>									

III. Pomiar natężenia fluorescencji roztworu fluoresceiny z dodatkiem wygaszacza KJ, w zależności od stężenia fluoresceiny.

Tabela 3.

<b>Objętość roztworu wyjściowego fluoresceiny w 10 cm<sup>3</sup> roztworu</b>	<b>1</b> [cm <sup>3</sup> ]	<b>2</b> [cm <sup>3</sup> ]	<b>3</b> [cm <sup>3</sup> ]	<b>4</b> [cm <sup>3</sup> ]	<b>6</b> [cm <sup>3</sup> ]	<b>8</b> [cm <sup>3</sup> ]	<b>10</b> [cm <sup>3</sup> ]
<b>Stężenie roztworu</b> [mol/dm <sup>3</sup> ]							
<b>Natężenie fluorescencji</b>							

# Widmo emisyjne fluoresceiny

