

FLUORESCENCJA BARWNIKÓW ORGANICZNYCH I JEJ ZASTOSOWANIE W ILOŚCIOWEJ ANALIZIE LUMINESCENCYJNEJ

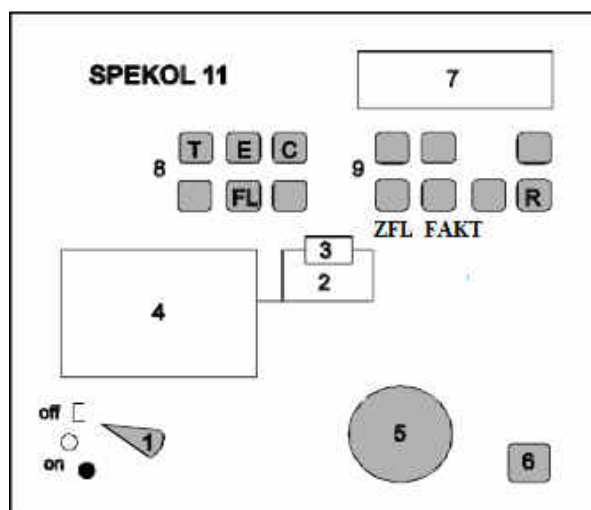
Cel ćwiczenia

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 zmieniaacza kuwetek
Uchwyt zmieniaacza kuwetek **przesuwamy w dół**, obracamy go o 180^0 , **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 cm³** o różnych stężeniach.
2. Odmierzyć po 1; 2; 3; 4; 6; 8 i 10 cm³ roztworu wyjściowego do 7 próbek za pomocą pipety, a następnie uzupełnić każdy z roztworów wodą destylowaną do objętości 10 cm³.
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 nieznanej 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

Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu Katedra i Zakład Biofizyki i Neurobiologii	Ćwiczenie 20 Fluorescencja barwników organicznych i jej zastosowanie w ilościowej analizie luminescencyjnej	
	 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.

λ [nm]	460	470	480	490	500	510	520	530	540	550	560
Natężenie fluorescencji											

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.

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

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

Tabela 3.

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

Widmo emisyjne fluoresceiny

