

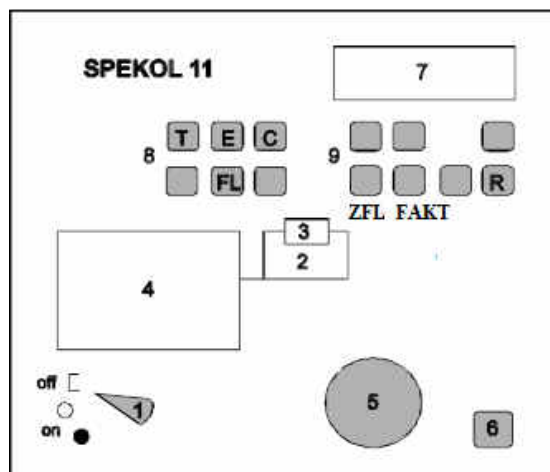
FLUORESCENCJA BARWNIKÓW ORGANICZNYCH I JEJ ZASTOSOWANIE W ILOŚCIOWEJ ANALIZIE LUMINESCENCYJNEJ

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.



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.

rys. Schemat płyty czołowej „SPEKOL 11”

Przebieg ćwiczenia:

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.

I. Pomiar natężenia fluorescencji w zależności od długości fali wzbudzenia.

1. Nalać wodę destylowaną do kuwetki do $\frac{3}{4}$ jej wysokości; wstawić do uchwytu kuwetek (2);
2. Wprowadzić kuwetkę w bieg promieni za pomocą uchwytu zmieniaacza kuwetek.
Uchwyt zmieniaacza kuwetek delikatnie **przesunąć w dół**, włożyć kuwetkę, obrócić uchwyt o 180^0 (do oporu), delikatnie **podnieść go 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]).
4. Ustawić na bębnie (5) długość fali **490 nm**.
5. Nacisnąć klawisz **FL** – przyrząd jest zaprogramowany na pomiar fluorescencji.
Migają diody nad klawiszami Z-FL MIN i FAKT.
6. Nacisnąć klawisz **Z-FL MIN** – następuje nastawienie punktu zero dla próbki z wodą destylowaną.
Migają diody nad klawiszami FAKT i R.
7. Nacisnąć klawisz **FAKT** – w okienku (7) obserwujemy wskazanie zapamiętanej wartości czynnika 1.000.
8. Wprowadzić drugą kuwetkę napełnioną do $\frac{3}{4}$ jej wysokości **wyjściowym** roztworem fluoresceiny, na drogę promieni monochromatora. Czynność tę wykonujemy jak w pkt.2.
9. Nacisnąć klawisz **FAKT**, a po chwili klawisz **R**.
10. Obracając bębniem (5) zmieniać długość fali od **470 do 540 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.
11. Otrzymane wyniki zapisać w tabeli nr 1.
12. 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 różnych stężeniach i objętości **10 ml**.
2. Na pipetę **3** nałożyć końcówkę z pudełka **3**, ustawić odpowiednią objętość na pipecie używając górnego pokrętki.
3. Odmierzyć pipetą po 1; 2; 3; 4; 6; 8 i 10 ml roztworu wyjściowego do 7 próbek, a następnie uzupełnić każdy z roztworów wodą destylowaną do objętości 10 ml. Zamieszać sporządzone roztwory za pomocą szklanej bagietki.
4. Za pomocą bębna (5) ustawić monochromator na długość fali odpowiadającą maksimum natężenia fluorescencji odczytanej z wykresu otrzymanego z pomiarów przeprowadzonych w punkcie I.

5. Przygotowane roztwory wlewać kolejno do kuwetki pomiarowej (do $\frac{3}{4}$ wysokości), począwszy od roztworu o **najniższym** stężeniu i odczytać wartości pomiarowe pojawiające się w okienku wskaźnikowym (7).

Próbki po pomiarze przelać ponownie do odpowiednich probówek - będą potrzebne w dalszej części ćwiczenia.

6. Wyniki pomiarów wpisać do tabeli nr 2.
7. Na podstawie wykonanych pomiarów sporządzić, na papierze milimetrowym, wykres zależności natężenia fluorescencji w funkcji stężenia roztworu – w ten sposób otrzymamy krzywą kalibracyjną **$f = f(c)$** .
8. Określić nieznane stężenia roztworów (o nieznanej wartości) fluoresceiny **C_1** i **C_2** .
9. Roztwory w butelkach **C_1** i **C_2** wlewać kolejno do kuwetki pomiarowej i zanotować pojawiające się w okienku (7) wskazania.
10. Na podstawie krzywej kalibracji (punkt 7) i odczytanych wartości natężenia fluorescencji znaleźć nieznane stężenia roztworów.

III. Pomiar wpływu substancji wygaszającej fluorescencję na natężenie emisji.

1. Na pipetę **2** nałożyć końcówkę z pudełka **2**, ustawić odpowiednią objętość na pipecie używając górnego pokrętki.
2. Do każdego roztworu sporządzonego w punkcie II.3 dodać za pomocą pipety po **200 μ l** roztworu jodku potasu (KJ), zamieszać za pomocą bagietki i odczekać 5 minut.
3. Przygotowane roztwory wlewać kolejno do kuwetki pomiarowej (do $\frac{3}{4}$ objętości), począwszy od roztworu o **najniższym** stężeniu i odczytać wartości pomiarowe pojawiające się w okienku wskaźnikowym.
4. Dane z pomiarów wpisać do tabeli 3.
Efekt rozcieńczenia wynikający z powiększenia objętości próbki jest minimalny i zanedbujemy go.
5. Na podstawie otrzymanych wyników wykreślić zależność natężenia fluorescencji od stężenia roztworu (na tym samym wykresie z pkt. II.7) 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 natężenia 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
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 ml roztworu	1 [ml]	2 [ml]	3 [ml]	4 [ml]	6 [ml]	8 [ml]	10 [ml]	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 ml roztworu	1 [ml]	2 [ml]	3 [ml]	4 [ml]	6 [ml]	8 [ml]	10 [ml]
Stężenie roztworu [mol/dm ³]							
Natężenie fluorescencji							

Widmo emisyjne fluoresceiny

