

SPEKTROFLUORYMETRIA

ZAGADNIENIA DO PRZYGOTOWANIA

Diagram Jabłońskiego; fluorofory; reguły charakteryzujące fluorescencję: reguła Stokesa, reguła symetrii zwierciadlanej, reguła Kasy, reguła Wawiłowa; wydajność kwantowa fluorescencji; czas życia fluorescencji; wygaszanie fluorescencji (dynamiczne i statyczne), równanie i wykres Sterna-Volmera;

APARATURA

- Spektrofotometr Cary50 Bio (Varian), kuwety kwarcowe;
- Spektrofluorymetr CaryEclipse (Varian);

ODCZYNNIKI

fluoresceina, rodamina B, rodamina G6, metanol (cz.d.a.), 0,5 M KI, 0,5 M KCl;

WYKONANIE ĆWICZENIA:

1. Wykreślanie widm absorpcji i emisji fluorescencji znaczników fluorescencyjnych.

Przygotować roztwór rodaminy G6 (lub rodaminy B) w metanolu. Wykreślić widmo absorpcji w zakresie 300-650 nm, wyznaczyć maksima absorpcji. Rozcieńczyć próbkę metanolem tak, aby przy fali wzbudzającej absorbancja nie przekraczała wartości 0,2. Zmierzyć widmo emisji fluorescencji rodaminy G6 (rodaminy B) w zakresie 450-650 nm wzbudzając próbkę światłem o różnych długościach fali (szerokość obu szczelin: 5 nm). Wyznaczyć maksima emisji w otrzymanym widmie, porównać z maksimami absorpcji.

2. Porównanie wygaszania fluorescencji fluoresceiny przez jony halogenkowe.

a) Przygotować roztwór wyjściowy fluoresceiny. W tym celu należy pobrać 0,2 ml roztworu fluoresceiny o stężeniu 7×10^{-4} M w 0,1 M NaOH i dopełnić wodą destylowaną do objętości 20 ml.

b) Wykreślić widmo absorpcji fluoresceiny w zakresie 250-700 nm, a następnie widmo emisji fluorescencji (400-700 nm) wzbudzając próbkę światłem o długości fali 284 nm (szerokość obu szczelin: 2,5 nm).

c) Przygotować serię roztworów fluoresceiny (końcowa objętość = 1,5 ml) zawierających kolejno: 0,015 ml; 0,037 ml; 0,075 ml; 0,15 ml; 0,3 ml; 0,45 ml 0,5 M KI. Wykreślić widma emisji jw.

d) Przygotować roztwór wyjściowy fluoresceiny wg pkt. a), a następnie serię roztworów wg pkt. c) zawierających 0,5 M KCl. Wykreślić widma emisji jw.

3. Określenie wpływu stężenia związku fluoryzującego na intensywność fluorescencji.

a) Przygotować serię wodnych roztworów (100 ml) zawierających odpowiednio 1×10^{-3} g, 1×10^{-4} g, 1×10^{-5} g związku fluoryzującego. Porównać intensywność świecenia poszczególnych roztworów w świetle UV. Zarejestrować widmo absorpcji w zakresie 250-600 nm.

b) Określić długość fali wzbudzenia i wykreślić widma emisji fluorescencji wszystkich roztworów w zakresie 400-700 nm.

Opracowanie i dyskusja wyników:

1. Wyznaczone maksima absorpcji i emisji (w nm oraz w cm^{-1}) oraz przesunięcie Stokesa (w cm^{-1}) umieścić w tabeli. Opisać zarejestrowane widma absorpcji i emisji fluorescencji, przedstawić przykłady reguł charakteryzujących fluorescencję.
2. Obliczyć stężenie fluoresceiny, KI i KCl w badanych roztworach oraz stosunek I_0/I . Wyniki zebrać w tabeli. Na podstawie otrzymanych wyników przygotować wykres Sterna-Volmera (I_0/I vs $[Q]$).

równanie Sterna-Volmera:

$$\frac{I_0}{I} = 1 + K_{SV} [Q]$$

gdzie: I_0 - intensywność emisji fluorescencji bez wygaszacza
 I - intensywność emisji fluorescencji z wygaszczem
 K_{SV} - stała Sterna-Volmera [M^{-1}]
 Q - stężenie wygaszacza [M]

$$K_{SV} = k_q \times \tau_0$$

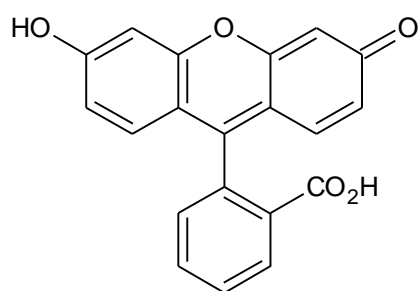
k_q - stała szybkości wygaszania fluorescencji [$\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$]
 τ_0 - czas życia fluorescencji (przy braku wygaszacza)

3. Z wykresu wyznaczyć stałą Sterna-Volmera.
4. Wyznaczyć stałą szybkości wygaszania fluorescencji fluoresceiny k_q z τ_0 i K_{SV} dla obu wygaszaczy. Przeprowadzić dyskusję wyników. Który wygaszcz jest bardziej efektywny?
5. Wyjaśnić wpływ stężenia związku fluoryzującego na intensywność fluorescencji.

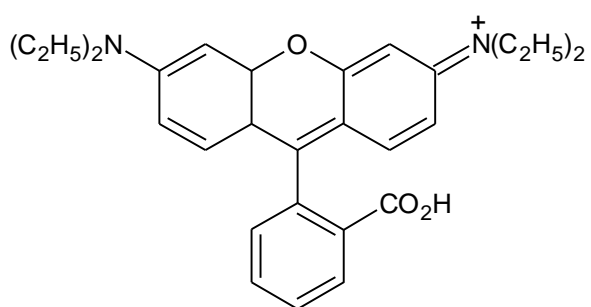
LITERATURA:

1. W. Szczepaniak „Metody instrumentalne w analizie chemicznej”, Wydawnictwo Naukowe PWN;
2. P. Suppan "Chemia i światło" Wydawnictwo Naukowe PWN, 1997;
3. D. Wróbel "Spektroskopia układów molekularnych" w "Biofizyka dla biologów" praca zbiorowa pod redakcją M. Bryszewskiej i W. Leyko, Wyd. Naukowe PWN, 1997;
4. A. Kozik, M. Rapała-Kozik, I. Guevara-Lora "Analiza instrumentalna w biochemii. Wybrane problemy i metody instrumentalnej biochemii analitycznej" seria wydawnicza IBM UJ, 2001;
5. J. Lakowicz „Principles of fluorescence spectroscopy” Springer, New York, 2006;

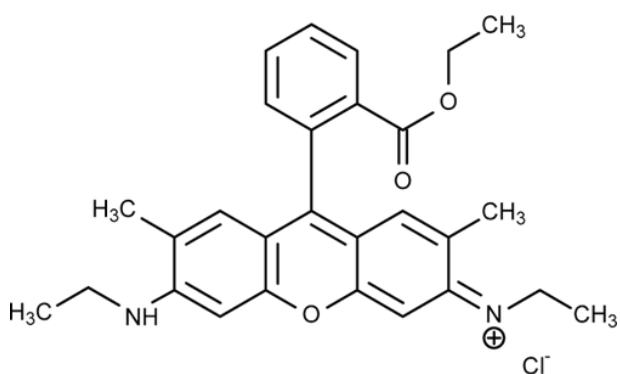
Struktury wybranych fluoroforów:



fluoresceina



rodamina B



rodamina G