

Spektroskopia Laboratorium
Ćwiczenie 7
SPEKTROFLUORYMETRIA

1. Określenie wpływu stężenia związku fluoryzującego na intensywność fluorescencji.

- Mając do dyspozycji roztwór rodaminy G6 o stężeniu $1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ przygotować serię metanolowych roztworów o stężeniach: $0,1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, $10 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, $5 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, $1 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, $0,5 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Porównać intensywność świecenia poszczególnych roztworów w świetle UV. Zarejestrować widmo absorpcji w zakresie 300-700 nm.
- Określić długość fali wzbudzenia i wykreślić widma emisji fluorescencji wszystkich roztworów w zakresie 400-700 nm.

2. Oznaczanie stężenia substancji fluoryzującej w próbce metodą krzywej wzorcowej.

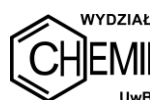
- Dla próbek z punktu 1 wyznaczyć krzywą wzorcową rejestrując widma emisyjne przy maksimum długości fali wzbudzającej. W tym celu zastosuj odpowiednie oprogramowanie urządzenia (szerokość obu szczelin: 2,5 nm).
- Wykorzystując oprogramowanie zarejestruj widmo emisyjne dla próbki o nieznanym stężeniu związku fluoryzującego. Następnie wyznacz stężenie związku fluoryzującego.

3. Porównanie wygaszania fluorescencji fluoresceiny przez jony halogenkowe.

- Przygotować roztwór wyjściowy fluoresceiny. W tym celu należy pobrać 0,25 mL roztworu fluoresceiny o stężeniu $7 \times 10^{-4} \text{ M}$ w 0,1 M NaOH i dopełnić wodą destylowaną do objętości 25 mL.
- Wykreślić widmo absorpcji fluoresceiny w zakresie 250-700 nm, a następnie widmo emisji fluorescencji (400-700 nm) wzbudzając próbkę światłem o długości fali 301 nm (szerokość obu szczelin: 2,5 nm).
- Przygotować dwie serie roztworów fluoresceiny (końcowa objętość = 1,5 mL) zawierających kolejno: 0,037 mL; 0,075 mL; 0,15 mL; 0,3 mL; 0,45 mL 0,5 M KI lub 0,5 M KCl. Wykreślić widma emisji.

Przyrządy, materiały i odczynniki

- Spektrofluorymetr Jasco FP-8500
- roztwór rodaminy G6 ($1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)
- metanol
- roztwór fluoresceiny ($7 \times 10^{-4} \text{ M}$ w 0,1 M NaOH)
- 0,5 M KI
- 0,5 M KCl
- kuwety plastikowe z pokrywkami
- pipeta automatyczna z końcówkami
- buteleczki do przygotowania roztworów z pokrywkami
- woda destylowana
- lampa UV
- kolba miarowa (25 mL) z korkiem



Opracowanie wyników

- Wyznaczone maksima absorpcji i emisji umieścić w tabeli. Opisać zarejestrowane widma absorpcji i emisji fluorescencji, przedstawić przykłady reguł charakteryzujących fluorescencję. Omówić wpływ stężenia na intensywność fluorescencji.
- Narysować krzywą wzorcową i obliczyć, używając odpowiedniego wzoru, stężenie czynnika fluorescencyjnego w próbce o nieznanym stężeniu.
- Obliczyć stężenie fluoresceiny, KI i KCI 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:

$$\frac{I_0}{I} = 1 + K_{SV}[Q], \text{ gdzie:}$$

I_0 - intensywność emisji fluorescencji bez wygaszacza;

I - intensywność emisji fluorescencji z wygaszczem;

K_{SV} - stała Sterna-Volmera [M^{-1}];

Q - stężenie wygaszacza [M]

- Z wykresu wyznaczyć stałą Sterna-Volmera. Przeprowadzić dyskusję wyników. Który wygaszcz jest bardziej efektywny?

Zakres materiału:

- Diagram Jabłońskiego;
- fluorofory;
- reguły charakteryzujące fluorescencję: reguła Stokesa, reguła symetrii zwierciadlanej, reguła Kashy, reguła Wawitowa;
- wydajność kwantowa fluorescencji;
- czas życia fluorescencji;
- wygaszanie fluorescencji (dynamiczne i statyczne), równanie i wykres Sterna-Volmera; wykorzystanie wygaszania fluorescencji w badaniach struktury białek.

Literatura:

- W. Szczepaniak „Metody instrumentalne w analizie chemicznej”, Wydawnictwo Naukowe PWN;
- P. Suppan "Chemia i światło" Wydawnictwo Naukowe PWN, 1997;
- A. Kozik, M. Rąpała-Kozik, I. Guevara-Lora "Analiza instrumentalna w biochemii. Wybrane problemy i metody instrumentalnej biochemii analitycznej" seria wydawnicza IBM UJ, 2001;
- J. Lakowicz „Principles of fluorescence spectroscopy” Springer, New York, 2006

