

Ćwiczenie 1

MIKROSKOP FLUORESCENCYJNY. POMIAR WYDAJNOŚCI KWANTOWEJ FLUORESCENCJI ANTRACENU, PERYLENU ORAZ 9,10-DIFENYLOANTRACENU W ROZTWORZE

Zagadnienia: procesy dezaktywacji stanów wzbudzonych (diagram Jabłońskiego), prawa absorpcji promieniowania (prawo Lamberta–Beera, prawo addytywności absorpcji), prawo Stokesa, fluorescencja, definicje: wydajności kwantowej fluorescencji i metody jej wyznaczania, kinetyka fluorescencji, czas życia fluorescencji, typy fluorescencji, schemat blokowy spektrofotometru i spektrofluorymetru.

1. Mikroskop fluorescencyjny

Wstęp teoretyczny

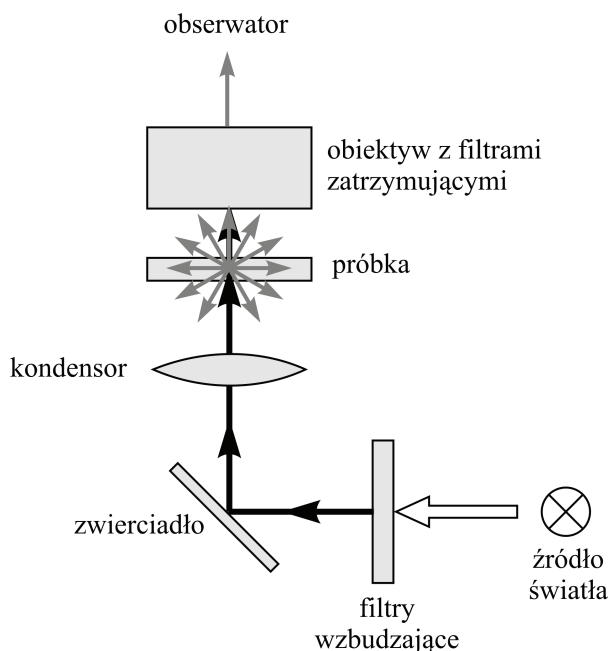
Zastosowanie mikroskopu fluorescencyjnego

W poniższym ćwiczeniu mikroskop fluorescencyjny wykorzystywany jest do naoczego zilustrowania świecenia określonych substancji krystalicznych pod wpływem oświetlenia światłem o określonych długościach fali λ . Główne zastosowanie znajduje on w histochemii, tzn. w identyfikacji makromolekularnych substancji znajdujących się w komórkach i tkankach. Przy wykrywaniu makromolekuł w preparacie stosuje się odpowiednie barwniki zwane fluorochromami. Technika ta oparta jest na powinowactwie ujemnie naładowanych anionowych grup makromolekuł tkanek z dodatnio naładowanymi zasadowymi fluoryzującymi barwnikami (albo odwrotnie na podstawie wiązania kwaśnych fluoryzujących barwników z kationowymi grupami makromolekuł tkanek) lub na innym specyficznym oddziaływaniu barwnika i makrocząsteczki biologicznej. Z wyników reakcji i miejsc, w których zaszły, możemy ocenić, jakie substancje (lub przynajmniej grupy chemiczne) znajdują się w określonych tkankach lub komórkach.

Budowa i działanie mikroskopu fluorescencyjnego

Głównymi częściami mikroskopu fluorescencyjnego są: źródło światła, filtry wzbudzające oraz zatrzymujące. Światło ze źródła (lampa rtęciowa wysokociśnieniowa HBO 50) przechodzi przez odpowiedni układ filtrów, dobieranych w zależności od

żądaney długości fali wzbudzającej λ . Następnie światło o znanym już zakresie długości fal (dobrano go na podstawie wspomnianego powyżej układu filtrów), zostaje odbite od zwierciadła odbijającego umieszczonego pod stolikiem mikroskopu i skupione przez stolikowy kondensator, który jest skonstruowany tak, że intensywna wiązka pada na preparat umieszczony na szkiełku mikroskopowym. Światło emitowane przez kryształy i niezaabsorbowane światło wzbudzające wpada do obiektywu. W obiektywie znajdują się filtry zatrzymujące, które absorbują nadwyżkę wzbudzającego światła przepuszczając jednakże widzialną fluorescencję kryształów. Dlatego obserwator widzi obraz samoświecącego obiektu na tle „ciemnego pola”. Ogólny schemat budowy mikroskopu fluorescencyjnego przedstawiono na rysunku 1.



Rys. 1. Ogólny schemat budowy mikroskopu fluorescencyjnego

Cel ćwiczenia

Celem tej części ćwiczenia jest zapoznanie się z budową i działaniem mikroskopu fluorescencyjnego oraz zaobserwowanie fluorescencji pochodzącej od badanych kryształów. Uzyskane wyniki uwzględniające przedział wzbudzenia, barwę świecenia oraz długość fali światła fluorescencji należy zestawić w tabeli.

Wykonanie ćwiczenia

1) Uruchomienie mikroskopu fluorescencyjnego (**aparaturę włącza i uruchamia asystent**).

Zaznajomić się z otrzymanymi preparatami i z działaniem mikroskopu fluorescencyjnego. Dokładny schemat budowy układu optycznego mikroskopu z urządzeniem fluorescencyjnym przedstawiono na rys. 1 w instrukcji obsługi (*instrukcja obsługi urządzenia fluorescencyjnego znajduje się na sali ćwiczeń przy aparacie*). Dowolny preparat umieścić w odpowiednich uchwytach na stoliku mikroskopu. Pokrętłami przesuwu wzdłużnego i poprzecznego stolika doprowadzić preparat do położenia pod obiektywem. Plamka świetlna z lampy musi padać na preparat. Pokrętłem przesuwu zgrubnego doprowadzić obiektyw do położenia, w którym widoczny jest nieostry obraz preparatu. Następnie ruchem pokrętła drobnego uzyskać ostry obraz preparatu w świetle przechodzącym.

W biegu promieni z lampy rtęciowej wprowadzić odpowiednio wybrane filtry (patrz tabela 2), w celu uzyskania odpowiedniego przedziału światła wzbudzającego (dobór przedziału wzbudzenia dokonujemy na podstawie analizy załączonych widm absorpcji UV-Vis preparatów). W obiektywie montujemy odpowiedni filtr zatrzymujący niezaabsorbowane promieniowanie wzbudzające.

Tabela 1

Nr próby	Kryształ	Pasma absorpcji (nm)	Przedział wzbudzenia (nm)	Barwa świecenia	Długość światła fluorescencji (nm)
0	Cukier				
1	9,10 DFA				
2	Antracen oczyszczony				
3	Antracen nieczyszczony				
4	Pyren				
5	Perylen				
6	Zasada Y _t				
7	Fenantrolina				
8	4-aminofalimid				
9	Siarczan chininy				

2) Test na sprawdzenie układu fluorescencji kryształów

Korzystając z instrukcji obsługi mikroskopu obserwujemy preparat cukru. Stosujemy filtr zatrzymujący GG9 oraz przedział wzbudzenia $\lambda = 300\text{--}400$ nm. Wynik testu jest

pozytywny, gdy przy ww. filtrach wzbudzających i zatrzymujących, preparat cukru nie świeci – ciemne pole.

3) Obserwacja świecenia kryształów

Obserwację przeprowadzamy przy użyciu filtrów wzbudzających $\lambda = 300\text{--}400\text{ nm}$ = 300–400 filtru zatrzymującego do $\lambda = 400\text{ nm}$. Należy zaobserwować możliwie dokładnie barwę świecenia poszczególnych kryształów. Wyniki przedstawić według tabeli 1 (skorzystać z widm absorpcji preparatów).

Tabela 2

Charakterystyka filtrów

Nr gniazdka	Symbol filtra	Przedział transmisji (nm)	Maksimum transmisji (nm)	Transmisja (%)
1	BG/12/2	340–500	420	67
2	VG4	450–650	547	64
3	BG12/2	340–480	420	85
4	UG1/3,5	300–410	370	50
5	GG13/2	380–650	550	87
6	UG1/1,5	300–415	317	62
7	BG19/2	280–650	500	80
8	NG10/1	400–600	530	49
zatrzymujący	GG9	400–600	500–600	85
zatrzymujący	G9/OG1	500–650	525–650	50

Tabela 3

Długości światła barwnego

Długość fali fluorescencji (nm)	Barwa
400–440	fioletowa
440–480	niebieska
480–490	zielononiebieska
490–500	niebieskozielona
500–560	zielona
560–580	żółtozielona
580–595	żółta
595–605	pomarańczowa
605–750	czerwona

2. Pomiar wydajności kwantowej fluorescencji antracenu, perylenu oraz 9,10-difenyloantracenu w cykloheksanie

Wstęp teoretyczny

Każdy związek chemiczny ma charakterystyczny dla siebie układ poziomów energetycznych (elektronowych i oscylacyjnych), tzn. odległości między tymi poziomami są różne dla różnych związków chemicznych. Pomiedzy poziomami energetycznymi zachodzą przejścia promieniste dające w efekcie widmo absorpcji lub emisji, jak i przejścia bezpromieniste. W wyniku pochłonięcia promieniowania cząsteczka przechodzi do stanu wzbudzonego, z którego może tracić energię w wyniku różnych procesów dezaktywacji. Procesy te przedstawia tzw. diagram Jabłońskiego – (rozdział Wprowadzenie, rys. 1).

Istnieje pięć głównych procesów dezaktywacji najniższego stanu singletowego S_1 : fluorescencja (F), konwersja wewnętrzna (IC), przejście interkombinacyjne (międzysystemowe, ISC), reakcja fotochemiczna (R) oraz wygaszanie (Q). Reakcje te wraz z odpowiednimi wyrażeniami opisującymi szybkości procesów przedstawione zostały poniżej:

Reakcja	Szybkość procesu	Nazwa procesu
$A(S_0) + hv \rightarrow A^*(S_1)$	I_a	Absorpcja
$A^*(S_1) \rightarrow A(S_0) + hv_f$	$k_f[A^*(S_1)]$	Fluorescencja
$A^*(S_1) \rightarrow A(S_0) + \text{ciepło } (\Delta Q)$	$k_{ic}[A^*(S_1)]$	Konwersja wewnętrzna
$A^*(S_1) \rightarrow A^*(T_1) + \text{ciepło } (\Delta Q)$	$k_{isc}[A^*(S_1)]$	Przejście międzysystemowe
$A^*(S_1) \rightarrow B$	$k_r[A^*(S_1)]$	Reakcja fotochemiczna
$A^*(S_1) + Q \rightarrow A(S_0) + Q'$	$k_q[A^*(S_1)][Q]$	Wygaszanie

gdzie:

- S_1, T_1 – najniższe stany wzbudzone – singletowy i trypletowy,
- k_x – stałe szybkości odpowiednich procesów,
- $[A^*(S_1)]$ – stężenie cząsteczek A we wzbudzonym stanie S_1 ,
- $[Q]$ – stężenie wygaszacza.

Fluorescencja jest jednym z procesów dezaktywacji najniższego stanu wzbudzonego S_1 . Jest to przejście promieniste między stanami o tej samej multipletowości, gdzie cząsteczka wzbudzona przechodzi z poziomu wyższego na niższy, z emisją fotonu, czyli kwantu promieniowania $h\nu_f < h\nu$ (gdzie $h\nu$ to kwant promieniowania wzbudzającego). Zachodzi ona głównie z zerowego poziomu oscylacyjnego stanu S_1 , na dowolny poziom oscylacyjny stanu S_0 . Fluorescencja jest procesem bardzo szybkim, dla którego stała szybkości $k_f \cong 10^6 - 10^9 \text{ s}^{-1}$.

Efektywność jakiegokolwiek procesu fotofizycznego lub fotochemicznego określa się poprzez wartość wydajności kwantowej Φ , którą definiuje się jako:

$$\Phi = \frac{\text{liczba cząsteczek ulegających przemianom}}{\text{liczba pochłoniętych kwantów}} = \frac{\text{szybkość danego procesu}}{I_a} \quad (1)$$

Dla fluorescencji otrzymujemy:

$$\Phi_f = \frac{k_f[A^*(S_1)]}{I_a} \quad (2)$$

Stosując przybliżenie stanu stacjonarnego dla $[A^*(S_1)]$ tzn. $\frac{d[A^*(S_1)]}{dt} = 0$, szybkość tworzenia się $A^*(S_1)$ równa się szybkości zaniku $A^*(S_1)$ oraz zaniedbując proces wygaszania (przyjmujemy stężenie wygaszacza $[Q] = 0$) uzyskujemy:

$$I_a = k_f[A^*(S_1)] + k_{ic}[A^*(S_1)] + k_{isc}[A^*(S_1)] + k_r[A^*(S_1)]$$

czyli $I_a = (k_f + k_{ic} + k_{isc} + k_r)[A^*(S_1)]$.

Podstawiając do wzoru (2) otrzymujemy:

$$\Phi_f = \frac{k_f}{k_f + k_{ic} + k_{isc} + k_r} \quad (3)$$

Wydajność kwantowa fluorescencji zależy więc od stosunku stałej szybkości fluorescencji do sumy stałych szybkości wszystkich procesów dezaktywujących wzbudzony stan singletowy. Korzystając z definicji czasu życia stanu S_1 :

$$\tau_s = \frac{1}{k_f + k_{ic} + k_{isc} + k_r} \quad (4)$$

otrzymujemy:

$$\Phi_f = k_f \tau_s \quad (5)$$

Tak więc wydajność kwantową fluorescencji można przedstawić jako iloczyn stałej szybkości fluorescencji (określającej prawdopodobieństwo emisji spontanicznej) oraz czasu życia stanu wzbudzonego (czas zaniku fluorescencji).

Korzystając ze wzoru (1) wydajność kwantową fluorescencji można także obliczyć określając całkowitą liczbę fotonów emitowanych w całym zakresie widma fluorescencyjnego przez cząsteczkę wysyłającą promieniowanie fluorescencyjne i porównując tę liczbę z liczbą zaabsorbowanych fotonów o danej częstotliwości. Jeżeli I_f jest całkowitym natężeniem fluorescencji, a I_a jest natężeniem absorbowanego światła, wydajność kwantowa fluorescencji jest równa:

$$\Phi_f = \frac{I_f}{I_a} \quad (6)$$

czyli: $I_f = I_a \Phi_f \quad (7)$

Zgodnie z prawem absorpcji Lamberta–Beera, gdy światło o natężeniu I_0 przechodzi przez jednorodny ośrodek o stężeniu c , to natężenie światła I po przejściu przez ten ośrodek wynosi:

$$I = I_0 10^{-\varepsilon c l} \quad (8)$$

gdzie:

- ε – molowy współczynnik absorpcji ($\text{dm}^3 \text{mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$) dla długości fali promieniowania wzbudzającego
- c – stężenie roztworu (mol dm^{-3})
- l – grubość warstwy roztworu (cm)

Natężenie światła zaabsorbowanego I_a wyliczyć można z różnicy ($I_a = I_0 - I$), otrzymujemy wtedy:

$$I_a = I_0 - I_0 10^{-\varepsilon c l} = I_0 (1 - 10^{-\varepsilon c l}) \quad (9)$$

Rozwinięcie powyższego równania w szereg prowadzi do:

$$I_a = 2,3003 I_0 \varepsilon c l \left[1 - \frac{2,3003 I_0 \varepsilon c l}{2} + \frac{(2,3003 I_0 \varepsilon c l)^2}{6} - \dots \right] \quad (10)$$

Jeżeli absorbancja ($A = \varepsilon c l$) dla danej długości fali światła wzbudzającego λ jest mała ($A < 0,1$), wówczas równanie (9) można przybliżyć do:

$$I_a \approx 2,3003 I_0 \varepsilon c l \quad (11)$$

a intensywność fluorescencji (7) można wyrazić w przybliżeniu jako:

$$I_f \approx 2,3003 I_0 \varepsilon c l \Phi_f \quad (12)$$

Fluorescencja powinna zatem zmieniać się ze zmianą długości fali światła wzbudzającego, w taki sam sposób, jak współczynnik ε dla widma absorpcji. Jeśli dokonamy pomiaru natężenia fluorescencji w maksimum emisji przy zmieniającej się długości fali światła wzbudzającego, ale przy stałym jego natężeniu (I_0), otrzymamy tzw. **widmo wzbudzenia fluorescencji**. Widmo to powinno odpowiadać widmu absorpcji dla badanej substancji. Gdy widmo wzbudzenia różni się istotnie od widma absorpcji oznacza to, że w roztworze znajduje się kilka składników i obserwowana fluorescencja nie pochodzi od substancji, dla której wyznaczono absorpcję.

Pole (S) pod krzywą opisującą pasmo fluorescencyjne jest proporcjonalne do natężenia fluorescencji (12), a więc także do wydajności kwantowej fluorescencji.

$$S \approx I_f \approx I_0 \varepsilon c l \Phi_f \quad (13)$$

Stosując substancję o znanej wartości wydajności kwantowej fluorescencji, tzw. standard (np. roztwór siarczanu chininy w rozcieńczonym kwasie siarkowym) oraz promieniowanie o długości fali λ_{wz} do wzbudzenia próbki, na podstawie równania (13) otrzymujemy:

$$S_{sch} = I_0 \varepsilon_{sch}^{\lambda_{wz}} c l \Phi_f^{sch} = I_0 A_{sch}^{\lambda_{wz}} \Phi_f^{sch} \quad (14)$$

Dla badanej substancji (x) przy wzbudzeniu promieniowaniem o tej samej długości fali λ_{wz} równanie (14) przyjmuje postać:

$$S_x = I_0 \varepsilon_x^{\lambda_{wz}} c l \Phi_f^x = I_0 A_x^{\lambda_{wz}} \Phi_f^x \quad (15)$$

Dzieląc stronami równania (15) i (14) i przekształcając uzyskamy wyrażenie na wydajność kwantową fluorescencji badanej substancji x :

$$\Phi_f^x = \frac{S_x}{S_{st}} \frac{A_{st}^{\lambda_{wz}}}{A_x^{\lambda_{wz}}} \Phi_f^{st} \quad (16)$$

Jeśli w badaniach stosuje się różne rozpuszczalniki, to do równania (16) należy wprowadzić poprawkę na współczynniki załamania światła dla linii D sodu tj. przy 589 nm (n), otrzymując równanie w postaci (17)

$$\Phi_f^x = \frac{S_x}{S_{st}} \frac{A_{st}^{\lambda_{wz}}}{A_x^{\lambda_{wz}}} \frac{n_x^2}{n_{st}^2} \Phi_f^{st} \quad (17)$$

Stosowany standard musi posiadać pasmo fluorescencji położone w tym samym zakresie spektralnym co fluorescencja dla badanej próbki. Poza tym, absorbancje dla roztworów standardu i badanej próbki powinny być porównywalne i małe ($A < 0,1$). W przypadku, gdy czułość przyrządu i/lub wydajność kwantowa fluorescencji jest niska, można zastosować roztwory o wyższym stężeniu posiadające absorbancję przekraczającą 0,1. W takim przypadku absorbancje standardu i badanej próbki muszą być porównywalne. Zaleca się aby zastosowany standard i substancja badana były mierzone w tym samym rozpuszczalniku. Jeśli to jest niemożliwe, należy zastosować korekcję uwzględniającą różnicę w wartościach współczynników załamania światła dla linii D sodu (n) dla obu rozpuszczalników.

Wyznaczając w ten sposób wydajność kwantową fluorescencji badanej substancji, należy pamiętać o ograniczeniach związanych m.in. z: efektem filtru wewnętrznego, brakiem monochromatyczności światła wzbudzającego, fluorescencją czystego rozpuszczalnika, wygaszaniem przez tlen oraz fotolizą próbki.

Zalecane przez Interantional Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC) standardy fluorescencji zestawione zostały w tabeli 4.

Cel ćwiczenia

Celem drugiej części ćwiczenia jest oznaczenie wartości wydajności kwantowych fluorescencji antracenu, perylenu oraz 9,10-difenyloantracenu (DFA) w cykloheksanie, w oparciu o standard, jakim jest roztwór wodny siarczanu chininy.

Tabela 4

Standardy fluorescencji (wg [6])

Zakres emisji [nm]	Nazwa związku	Rozpuszczalnik	Wydajność kwantowa Φ_f
270–300	Benzen	Cykloheksan	$0,05 \pm 0,02$
300–380	Tryptofan	Woda (pH = 7,2)	$0,14 \pm 0,02$
300–400	Naftalen	Cykloheksan	$0,23 \pm 0,02$
315–480	2-Aminopirydyna	0,1 N H ₂ SO ₄	$0,60 \pm 0,05$
360–480	Antracen	Etanol	$0,27 \pm 0,03$
400–500	9,10-Difenyloantracen	Cykloheksan	$0,90 \pm 0,02$
400–600	Siarczan chininy	1 N H ₂ SO ₄	0,546
600–650	Rodamina 101	Etanol	$1,0 \pm 0,02$
600–650	Fiolet krezolowy	Metanol	$0,54 \pm 0,03$

Wykonanie ćwiczenia

Wykonanie ćwiczenia polega na zmierzeniu widm fluorescencji i absorpcji roztworów a) antracenu, b) perylenu oraz c) 9,10-difenyloantracenu (DFA). Pomiar absorpcji należy wykonać na jednym z dwóch spektrofotometrów UV-Vis typu Varian Cary 300 Bio (dwuwiązkowy) lub Varian Cary 50 (jednowiązkowy), natomiast widma fluorescencji na spektrofluorymtrze PERKIN-ELMER typu LS 50B lub JASCO FP 6200. Natężenie fluorescencji można też zmierzyć na Spekolu z przystawką fluorescencyjną.

Stosowane roztwory (o stężeniach rzędu 10^{-5} mol dm^{-3})

- roztwór (1) siarczanu chininy w 1 N H₂SO₄
- roztwór (2) antracenu w cykloheksanie
- roztwór (3) perylenu w cykloheksanie
- roztwór (4) DFA w cykloheksanie

Kolejność czynności:

1. Zmierzyć widma absorpcji wszystkich roztworów w zakresie 240–450 nm w kuwetach 1 cm stosując wodę jako odnośnik dla roztworu (1) i cykloheksan jako odnośnik dla pozostałych roztworów.

2. W oparciu o zmierzone widma absorpcji wybrać długość fali promieniowania wzbudzającego λ_{wz} do pomiarów fluorescencji próbek. Odczytać wartość absorbancji dla wszystkich roztworów przy wybranej długości fali.
3. Zmierzyć widma fluorescencji wszystkich roztworów w zakresie 370–650 nm w kuwecie 1 cm, jako długość fali promieniowania wzbudzającego stosując wybrane uprzednio λ_{wz} . Szczeliny wzbudzenia i emisji ustawić na 5.
4. Zmierzyć widma fluorescencji rozpuszczalników w identycznych warunkach, w celu upewnienia się, że nie wykazują one fluorescencji.
5. Odczytać wielkości powierzchni pod krzywymi fluorescencji uzyskanymi dla wszystkich czterech związków.
6. Korzystając ze wzoru (17) obliczyć wydajność kwantową fluorescencji antracenu, perylenu oraz 9,10-difenyloantracenu (DFA) w cykloheksanie w oparciu o standard, jakim jest wodny roztwór siarczanu chininy ($\Phi_f^{sch} = 0,55$). Współczynniki załamania światła dla cykloheksanu i wody wynoszą odpowiednio 1,426 oraz 1,333.

LITERATURA

- [1] S. Paszyc, *Podstawy fotochemii*, PWN, Warszawa 1992.
- [2] B. Marciniak (praca zbiorowa), *Metody badania mechanizmów reakcji fotochemicznych*, Wyd. Nauk. UAM, Poznań 1999.
- [3] N.J. Turro, *Modern Molecular Photochemistry*, Benjamin/Cummings, Menlo Park 1978.
- [4] A. Barltrop, J.D. Coyle, *Fotochemia – podstawy*, PWN, Warszawa 1987.
- [5] C.A. Parker, *Fotoluminescencja roztworów*, Mir, Moskwa 1972.
- [6] D.F. Eaton, „Reference materials for fluorescence measurement”, *Pure & Appl. Chem.*, Vol. 60, No 7, pp. 1107–1114, 1988.
- [7] J.R. Lakowicz, *Principles of fluorescence spectroscopy*, wyd. 2, Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York 1999.