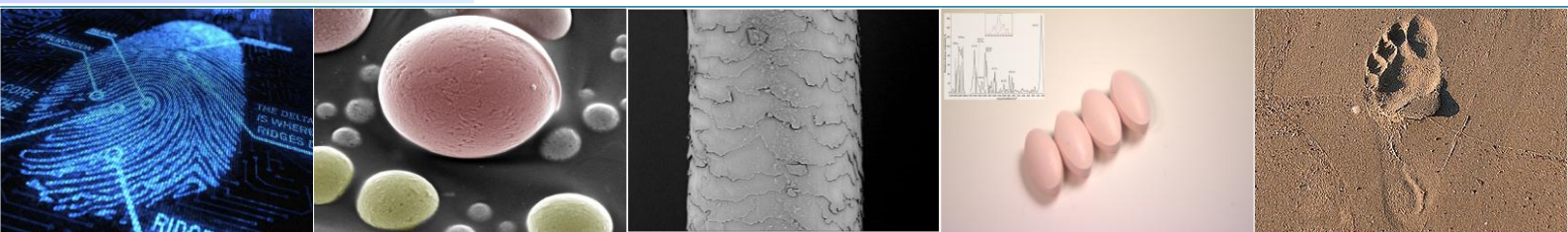


Ćwiczenie 9

Zjawisko fluorescencji i jego zastosowanie w laboratoriach kryminalistycznych



I. Cel ćwiczenia

Celem ćwiczenia jest zapoznanie się z zjawiskiem fluorescencji i możliwościami jego zastosowań w kryminalistyce.

Dodatkowo studenci będą mogli zapoznać się ze zjawiskiem chemiluminescencji.

Pytanie organu procesowego: Czy w skład dostarczonych przez prowadzącego materiałów dowodowych mogą wchodzić te same fluorofory?

II. Wstęp teoretyczny

Luminescencja jest jedną z form oddawania zaabsorbowanej energii przez atomy czy cząsteczki, którą możemy zarejestrować w postaci widma. Jest bardzo czułą metodą badawczą pozwalającą zidentyfikować różne substancje.

Luminescencja (*lumen* po łacinie znaczy światło), to promieniowanie, które nie jest pochodzenia termicznego. Według Wawilowa: „Luminescencja to nadwyżka promieniowania ciała nad promieniowaniem temperaturowym tego samego ciała w danej części widmowej i w danej temperaturze, która ponadto charakteryzuje się skończonym czasem świecenia, to znaczy nie zanika natychmiast po przerwaniu wzbudzenia.”

W zależności od tego w jaki sposób molekula została przeniesiona do stanu wzbudzonego wyróżniamy **fotoluminescencję**, bioluminescencję, chemiluminescencję, termoluminescencję, tryboluminescencję, eletroluminescencję, elektronoluminescencję lub sonoluminescencję.

Fotoluminescencja jest wywołana przez pochłonięcie promieniowania elektromagnetycznego z obszaru widzialnego lub ultrafioletu. Pochłonięta energia jest następnie wyemitowana także w postaci światła, na ogół o mniejszej energii niż energia światła wzbudzającego. Fotoluminescencje dzielimy na **fluorescencję** i fosforescencję.

Molekuły wykazujące zjawisko fluorescencji nazywamy fluoroforami i mogą być pochodzenia naturalnego (witamina B₂, chlorofil) bądź sztucznego (rodamina 6G, akrydon).

Każda molekula posiada charakterystyczny dla siebie układ poziomów energetycznych – elektronowych, oscylacyjnych i rotacyjnych. Jeśli molekule dostarczymy odpowiednią

energię, znajdzie się ona np.: na wyższych poziomach oscylacyjnych wzbudzonego stanu elektronowego (w stanie wzbudzonym).

Zanim dojdzie do fluorescencji molekula w stanie wzbudzonym przetrwa liczne zderzenia z innymi molekułami. W wyniku tych zderzeń straci nadwyżkę energii wzbudzenia i osiągnie stan równowagi cieplnej z otoczeniem po ok 10^{-12} s. W stanie tym przebywa wystarczająco długo (10^{-8} - 10^{-9} s), aby mogła nastąpić fluorescencja do oscylacyjnych poziomów stanu podstawowego S_0 .

Zgodnie z teorią Kasy fluorescencja niemal zawsze następuje ze stanu S_1 , niezależnie od tego który stan singletowy został wzbudzony ($S_1, S_2...$).

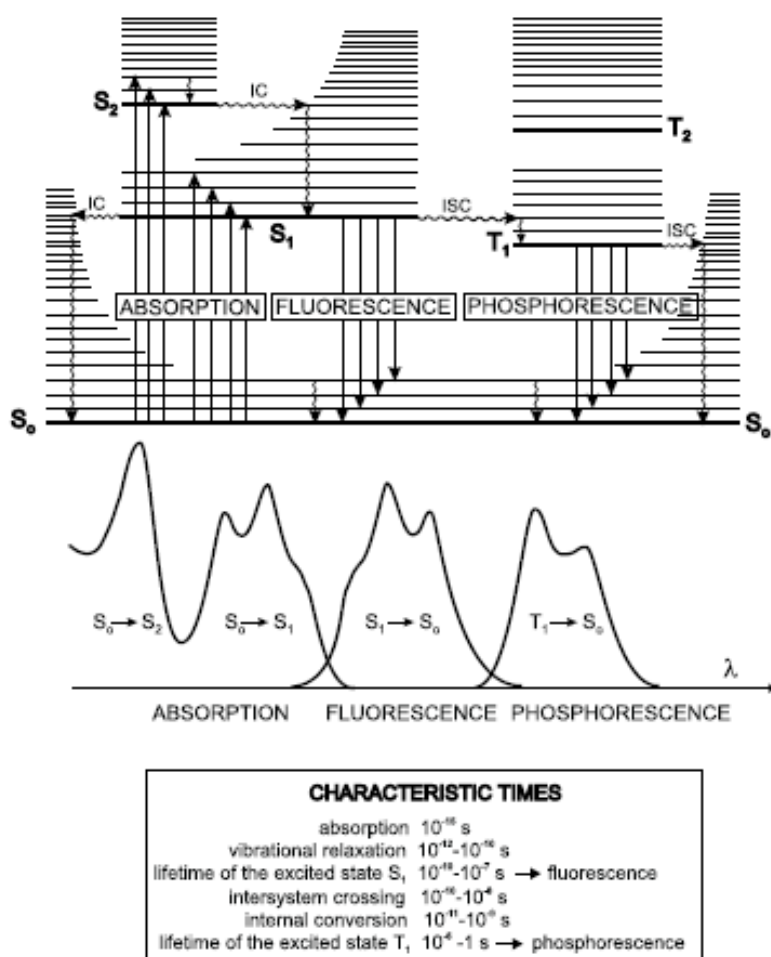
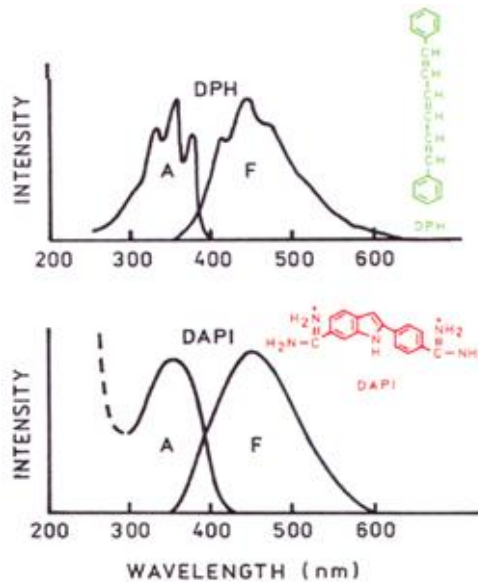


Diagram Jabłońskiego, widma absorpcji, fluorescencji oraz fosforescencji [Źródło: B. Valeur, *Molecular Fluorescence Principles and Applications*, 2001, Wiley-VCH]

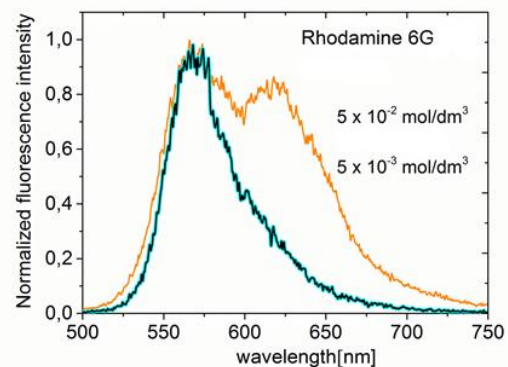
Stokes i Lommel ustalili, że:

- pasmo fluorescencji i jego maksimum są przesunięte w stronę długofalową względem pasma absorpcji;
- pasma absorpcji i fluorescencji częściowo się nakrywają.

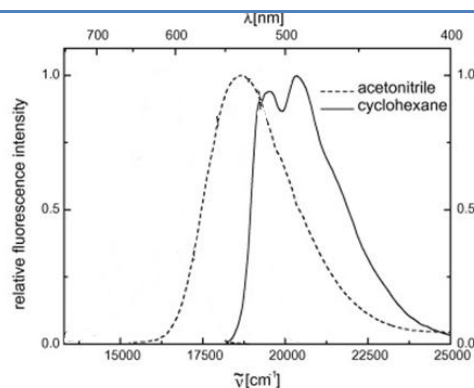


Przykładowe widma absorpcji (po lewej stronie) i fluorescencji (po prawej stronie) DPH oraz DAPI [Źródło: J.R. Lakowicz, "Principles of fluorescence spectroscopy", zmienione]

Widma fluorescencji mogą zmieniać się w zależności od stężenia barwnika, użytego rozpuszczalnika (pH, lepkość), temperatury.



Widma fluorescencji dla Rodaminy 6G dla różnych stężeń związku.



Widma fluorescencji dla Nile Red w różnych rozpuszczalnikach.

Przykładowe zastosowania fluorescencji w kryminalistyce:

- Ślady krwi w warunkach laboratoryjnych można wykryć przy użyciu luminolu, który w reakcji z krwią w odpowiednich warunkach zaczyna świecić (chemiluminescencja – pokaz na zajęciach).

- Badania fluorescencyjne pozwalają również na ujawnianie śladów linii papilarnych wykazujących fluorescencję własną lub z zastosowaniem chemicznych metod wizualizacji. Fluorescencja własna może być wynikiem zanieczyszczenia śladów substancjami fluoryzującymi (np. narkotykami, atramentem, zwiększoną ilością w pocie witaminy B₂). Drugą opcją jest ujawnienie śladów pozostawionych na podłożach wykazujących fluorescencję. Ślady uwiadcniają się wówczas w postaci ciemnych kształtów na tle świecącego podłoża.

Metody kontrastująco – fluorescencyjne stosowane są do śladów ujawnionych cyjanoakrylanem, wykazują słaby kontrast z podłożem, co utrudnia właściwą rejestrację śladu. Wymagają one dodatkowego kontrastowania, przy użyciu barwników fluorescencyjnych: ardrox (nazwa handlowa barwnika fluorescencyjnego), rodamina 6G, safranina.

Zjawisko fluorescencji stosowane jest również szeroko w innych metodach badawczych, np. w mikroskopii fluorescencyjnej, a także w technikach zabezpieczeń banknotów i dokumentów.

III. Literatura

1. K.Pigoń, Z.Ruziewicz, „*Chemia fizyczna*”, PWN, Warszawa 1986r.
2. J. Kęcki „*Podstawy spektroskopii molekularnej*”, Warszawa, PWN 1998.
3. P.Borowski , „*Wybrane zagadnienia spektroskopii molekularnej*” Wydawnictwo UMCS, Lublin 2001.
4. B. Valeur- “*Molecular Fluorescence. Principles and Applications*”, 2001 Wiley-VCH
5. S. Paszyc, „*Podstawy fotochemii*”, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 1992.
6. P. Suppan, „*Chemia i światło*”, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 1997.
7. J.R. Lakowicz, “*Principles of fluorescence spectroscopy*”, Springer 2006.
8. A. Kawski „*Fotoluminescencja roztworów*”, Warszawa, PWN 1992.
9. I. Sołtyszewski, P. Polak – „*Badania kryminalistyczne*”, Wyd. UMW. Olsztyn, 2007.

IV. Zagadnienia do opracowania

1. Energia wewnętrzna cząsteczek wieloatomowych.
2. Oddziaływanie promieniowania elektromagnetycznego z molekułami wieloatomowymi.
3. Procesy dezaktywacji stanów wzbudzonych cząsteczek wieloatomowych. Zjawisko fluorescencji.
4. Reguła Stokesa.
5. Parametry pasma spektralnego.
6. * Dodatkowo podstawowe obserwowane fluorescencji:
 - widmo emisji;
 - wydajność kwantowa emisji;
7. Budowa i zasada działania spektrofluorymetru.

V. Zestaw przyrządów.

1. Spektrofluorymetr firmy Horiba Jobin Yvon, model FluoroMax 4 TCSPC.
2. Zestaw komputerowy.



VI. Wykonanie doświadczenia i opracowanie wyników

1. Zapoznaj się z instrukcją działania spektrofluorymetru dostępną w *Dodatku B*.
2. Zmierz widma fluorescencji przygotowanych próbek (do wyboru przez prowadzącego zajęcia). Wybierz długość fali światła wzbudzającego na podstawie widm absorpcji umieszczonych w *Dodatku A*. Dla danego związku pomiary przeprowadź w tych samych warunkach (szczeliny, kuweta).
 - a. badanie widma fluorescencji leku: np.: iwabradyna – lek na serce;
 - b. badanie widma fluorescencji barwnika używanego w wizualizacji śladów: rodamina 6G (wpływ stężenia barwnika na widmo emisji);
 - c. badanie widma fluorescencji pochodnej witaminy B₂;
 - d. badania widma fluorescencji toniku do picia. Spróbuj odpowiedzieć na pytanie dlaczego tonik do picia „świeci”?
 - e. badania widma fluorescencji Nile Red w różnych rozpuszczalnikach (wpływ rozpuszczalnika na widma fluorescencji).
3. Nanieś otrzymane widma fluorescencji dla danego podpunktu (a, b, c, d, e) na jeden wykres .
4. Unormuj otrzymane widma do 1.
5. Przeanalizuj otrzymane wyniki. Można w tym celu posłużyć się tabelką zawierającą położenia maksimów pasm fluorescencji lub stworzyć własną.

| próbka | Rodamina 6G w wodzie, (małe stężenie) | Rodamina 6G w wodzie, (duże stężenie) | Pochodna witaminy B ₂ w wodzie | Iwabradyna w wodzie | Nile Red w acetonie $\epsilon=20,74$ | Nile Red w hexanie $\epsilon=1,89$ | Tonik do picia |
|-------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|---|---------------------|--------------------------------------|------------------------------------|----------------|
| max. fluorescencji [nm] | | | | | | | |

Zwróć uwagę na kształt widm.

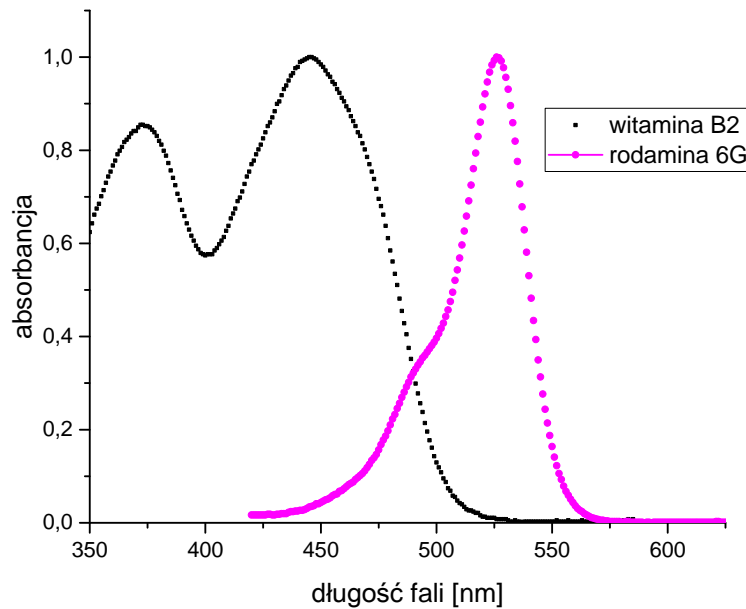
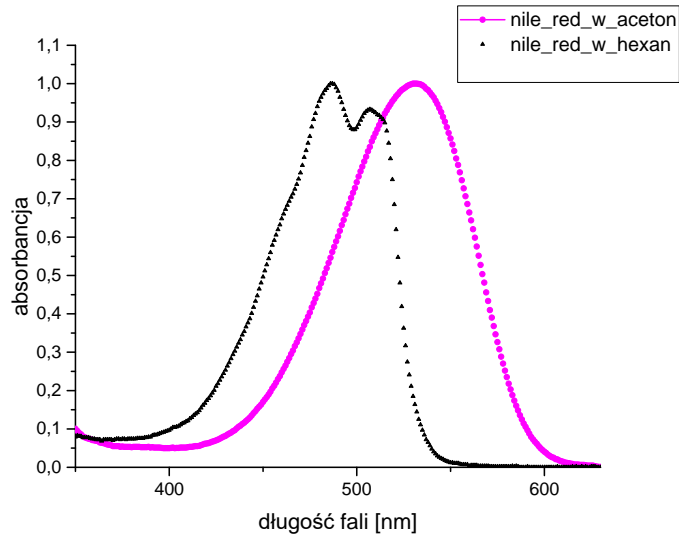
6. Sprawozdanie ma mieć charakter przykładowej opinii biegłego tzn.: zawierać takie elementy jak:

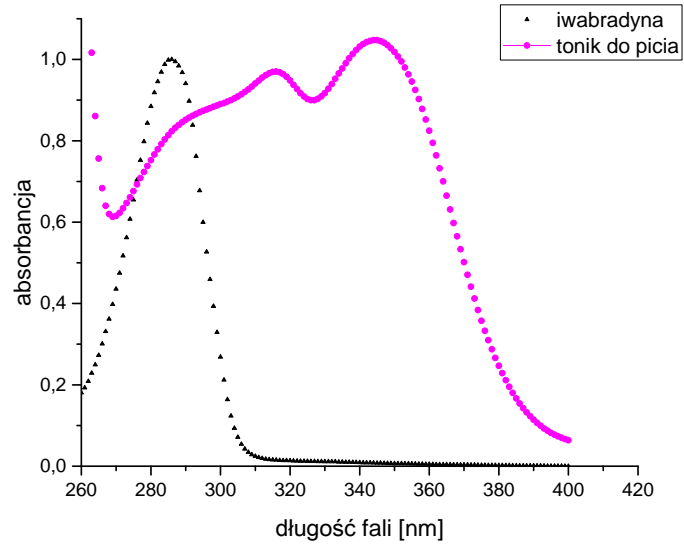
- imię, nazwisko, stopień i tytuł naukowy, specjalność i stanowisko zawodowe biegłego;
- imiona i nazwiska oraz pozostałe dane innych osób, które uczestniczyły w przeprowadzeniu ekspertyzy, ze wskazaniem czynności dokonanych przez każdą z nich, w przypadku opinii instytucji - także pełną nazwę i siedzibę instytucji;
- czas przeprowadzonych badań oraz datę wydania opinii;
- szczegółowy opis nadesłanego materiału dowodowego, porównawczego (sposób zabezpieczenia podczas transportu, opis opakowania, jego cechy ogólne i indywidualne) i cytowane pytania organu procesowego;
- informację o zastosowanych technikach i metodach;
- sprawozdanie z przeprowadzonych badań i obserwacji;
- interpretację wyników i wnioski;
- podpisy wszystkich biegłych, którzy uczestniczyli w wydaniu opinii.

Opinia powinna być napisana zrozumiałym językiem, a wnioski powinny być bardzo czytelne, zwłaszcza dla organów procesowych (dla prokuratury i sędziego).

Dodatek A

Widma absorpcji badanych próbek





Dodatek B

Instrukcja obsługi stanowiska do pomiaru widm fluorescencji

1. Zapoznać się z układem pomiarowym.



Zdjęcie 1 Układ pomiarowy z zaznaczoną komorą próbek.

2. Włączyć zasilanie poszczególnych elementów układu:



UWAGA!

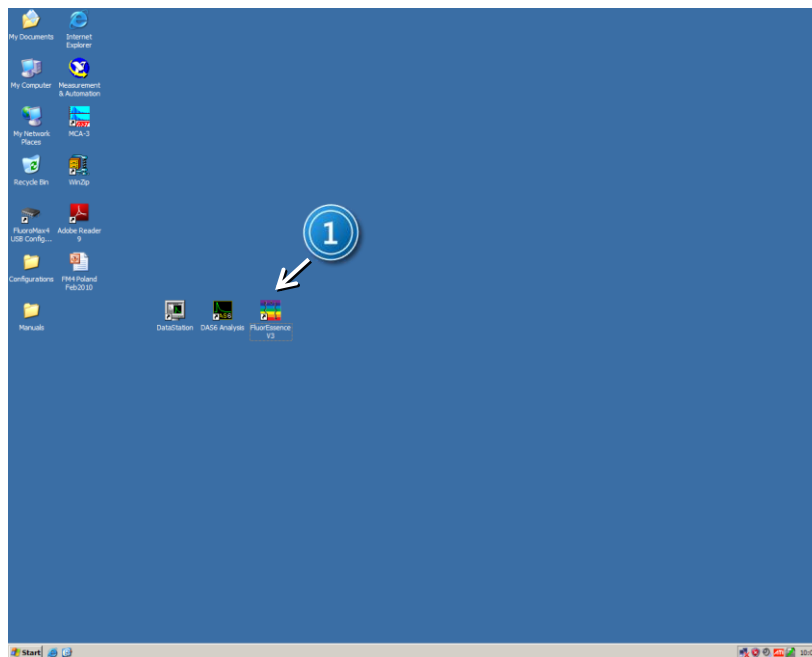
Przed włączeniem zasilania zamknąć komorę próbek 2 na Zdjęciu 1!!!
Wartość liczby zliczeń powinna być niższa od liczby 10^6 .

- włączyć zasilanie spektrofotometru (włącznikiem po prawej stronie obudowy);
 - włączyć komputer (włącznikiem na przedniej płycie obudowy);
3. Sprawdzić czy w porcie USB znajduje się klucz typu *SENTINEL* umożliwiający uruchomienie programu obsługującego spektrofotometr.
 4. Uruchomić główną aplikację pod nazwą *FluorEssence V3* pozwalającą na gromadzenie danych pomiarowych. Jej ikona umieszczona jest na pulpicie 1, Zdjęcie 3.




Zdjęcie 2. Widok wnętrza komory pomiarowej: 1 – uchwyt do ciekłych; 2 – miejsce na filtr w torze emisyjnym.

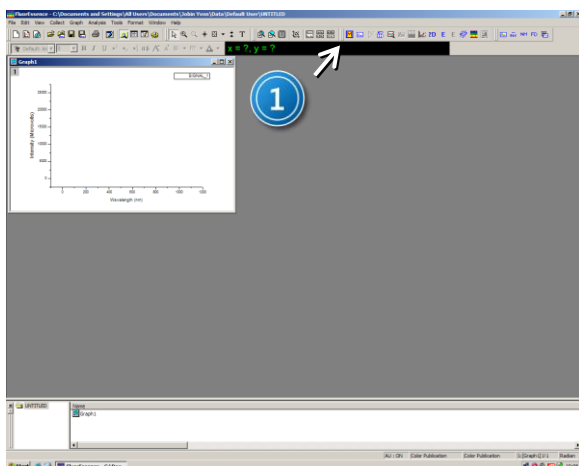
5. W oparciu o widma absorpcji próbek umieszczonych w *Dodatku A* ustalić obszary długości fal



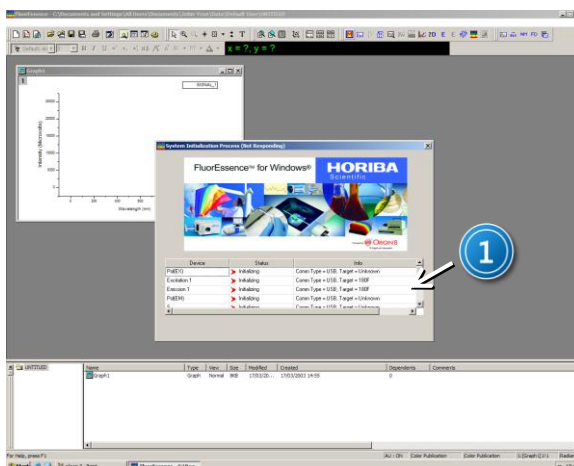
Zdjęcie 3. Widok ekranu po uruchomieniu systemu: 1 – ikona programu FluoroEssence V3.


wzbudzenia oraz luminescencji obu próbek.

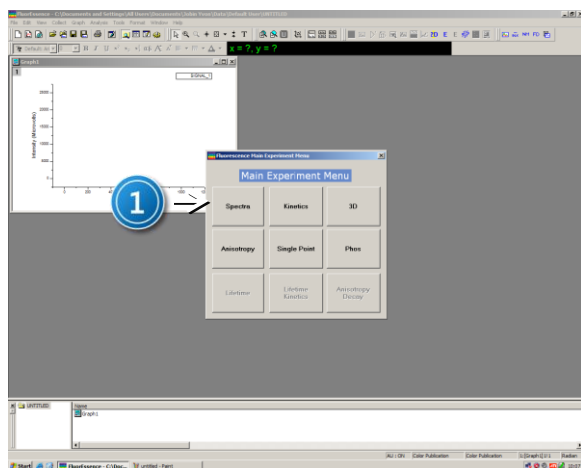
6. W komorze próbek, zamontować wybraną próbkę w specjalnym uchwycie przeznaczonym do montowania próbek ciekłych 1, Zdjęcie 2.
7. Kąt położenia uchwytu próbek ustalić na około 45 stopni.
8. Z paska przycisków przy pomocy ikony  1, Zdjęcie 3 lub poprzez wybór *Experiment Setup* w menu *Collect* uruchomić program pozwalający na wybór jednego z trybów pracy urządzenia.




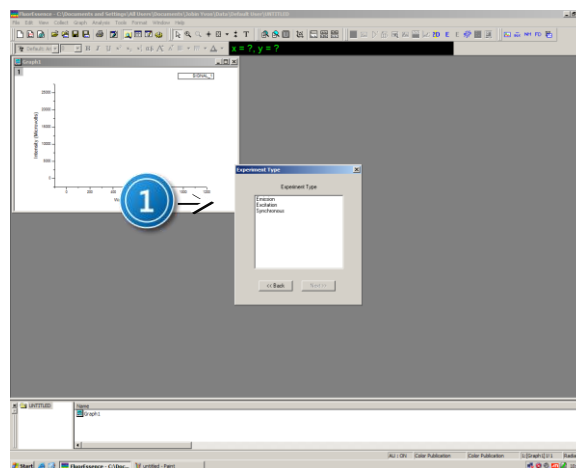
Zdjęcie 4. Widok ekranu programu po uruchomieniu ikony programu FluorEssence V3 znajdującej się na pulpicie: 1 – ikona uruchamiająca program pomiarowy.



Zdjęcie 5. Widok ekranu po uruchomieniu ikony : 1 – widok statusu urządzeń uruchamianych podczas programu.



Zdjęcie 6. Widok ekranu po uruchomieniu ikony : 1 – menu wyboru sprzętowej konfiguracji urządzenia do pomiarów widm wzbudzenia oraz emisji.



Zdjęcie 7. Widok ekranu po wybraniu z menu Main Experiment Menu, Spectra: 1 – menu wyboru typu eksperymentu.

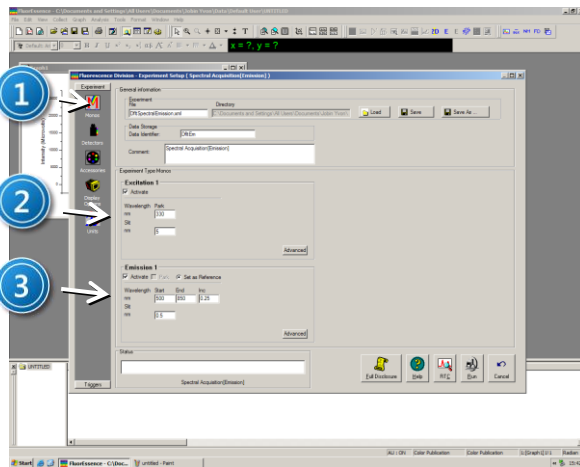
9. Skonfigurować spektrofлуorymetr do pomiaru widm emisji poprzez następujące kroki: z menu *Main Experimental Menu*, należy wybrać kolejno: *Spectra 1* (Zdjęcie 6) a następnie *Emission 1* (Zdjęcie 7).
10. Ustawić konfigurację układu wzbudzającego i detekcyjnego w zakładce *Monos* (1, Zdjęcie 8). W obszarze *Excitation 1* (2, Zdjęcie 9), wpisać długość fali wzbudzającej, określoną na podstawie maksimum pasm absorpcji wybranych próbek, natomiast w obszarze *Emission 1* (3, Zdjęcie 9) wpisać zakres długości fal skanowania emisji.
11. Dobrać filtr krawędziowy lub pasmowy do obserwowanego zakresu długości fal i wstawić go w tor detekcji w miejsce 2 na Zdjęcie 3.
Ustawić parametry detektora w zakładce *Detectors* (1, Zdjęcie 9). W obszarze *Select* (2, Zdjęcie 8) włączyć detektor *S1* z korekcją widmową *Correction*. *Integration time* ustawić na 1 ms,

włączyć korekcję tła *Dark Offset*, zaś w obszarze *Signal Algebra* (3, Zdjęcie 10) klikając na sygnał *S1c* i dalej przy pomocy przycisku *Add* umieść go w oknie *Formulas*.

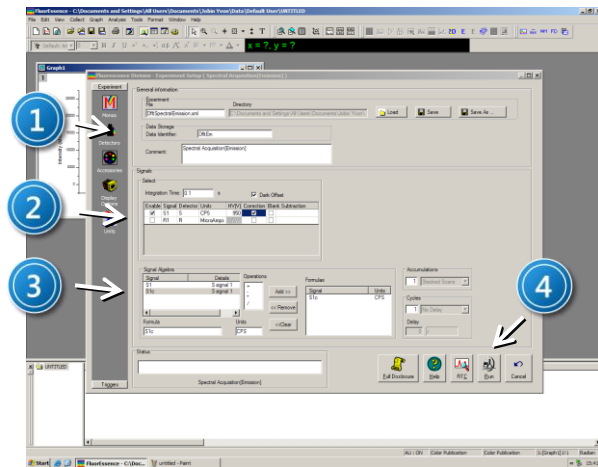


Wskazówka


W trakcie pomiarów widm emisji szerokość szczeliny monochromatora wzbudzającego ustawić na 5 nm, szerokość szczeliny monochromatora detekcyjnego na 0,5 nm, krok skanowania na 0,25 nm natomiast w pomiarze widm wzbudzenia szerokości szczelin ustawić odwrotnie. Zdolność spektralna urządzenia wynosi 4,25 nm/1 mm.



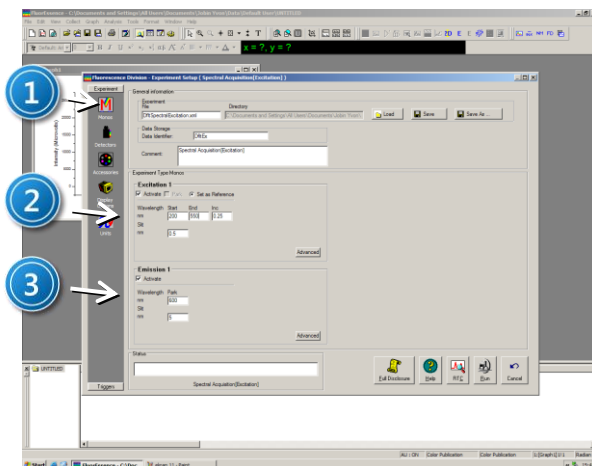
Zdjęcie 8. Widok okna eksperymentalnego pozwalającego na ustawienie parametrów eksperymentu do pomiaru widm emisji: 1 – konfiguracja układu wzbudzającego i detekcyjnego; 2 – ustawienie długości fali wzbudzającej oraz szerokości szczeliny monochromatora wzbudzającego; 3 – konfiguracja układu emisyjnego: początku i końca skanowania, kroku skanowania oraz szerokości szczeliny monochromatora emisyjnego.



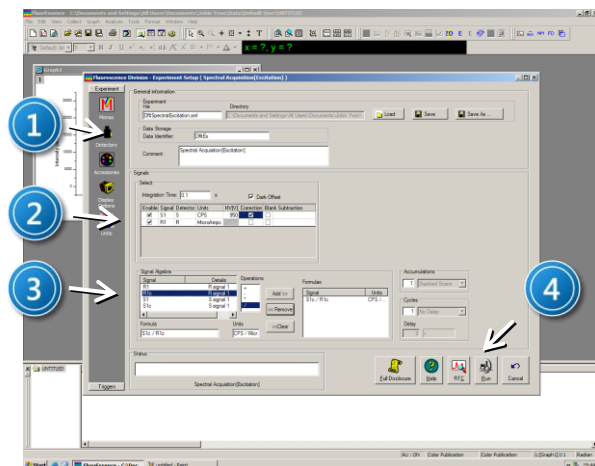
Zdjęcie 9. Widok okna eksperymentalnego pozwalającego na ustawienie parametrów detektora w trakcie pomiarów widm emisji: 1 – konfiguracja detektora; 2 – ustawienie parametrów czasu ekspozycji detektora oraz wyboru sygnałów; 3 – okno algebraicznych operacji na mierzonym sygnale; 4 – przycisk *Run* uruchamiający pomiar.

12. Uruchomić pomiar poprzez naciśnięcie klawisza *Run* (4, Zdjęcie 9). Po zakończeniu pomiaru dane zostaną automatycznie przesłane do programu *Origin*.
13. Na podstawie zmierzonego widma emisji wyznaczyć maksimum luminescencji, dobrać filtr krawędziowy lub pasmowy przepuszczający wyznaczoną długość fali oraz wstawić go w tor detekcji (2, Zdjęcie 3).
14. Zmierzyć widmo wzbudzenia wykonując kolejno następujące kroki: z paska menu przy pomocy ikony  1, Zdjęcie 4 lub poprzez wybór *Experiment Setup* w menu *Collect* a następnie z menu *Main Experimental Menu*, wybrać kolejno: *Spectra* (1, Zdjęcie 4), *Excitation* (1, Zdjęcie 3). W zakładce *Monos* (1, Zdjęcie 5) w obszarze *Excitation 1* (2, Zdjęcie 10) wpisać zakres długości fal wzbudzających próbkę: Start 250 nm, End 550 nm zaś w obszarze *Emission 1* (3, Zdjęcie 11) w pozycji *Wavelength peak* należy wpisać wyznaczoną wielkość maksimum pasma.
15. Ustawić parametry detektora w zakładce *Detectors* (1, Zdjęcia 9 i 11). W obszarze *Select* (2, Zdjęcie) włączyć detektory *S1* z korekcją widmową *Correction* i *R1*. *Integration time* ustawić na

- 1 ms, włączyć korektę tła *Dark Offset*, zaś w obszarze *Signal Algebra* (3, Zdjęcie) klikając kolejno na sygnał *S1c* podzielony przez sygnał *R1c* i dalej przy pomocy przycisku *Add* iloraz umieść w oknie *Formulas*.
16. Uruchomić pomiar poprzez naciśnięcie klawisza *Run* (4, Zdjęcia 9 i 11). Po zakończeniu pomiaru dane zostaną automatycznie przesłane do programu *Origin*
17. Ustawić parametry detektora w zakładce *Detectors* (1, Zdjęcia 8 i 10). W obszarze *Select* (2, Zdjęcie) włączyć detektory *S1* z korektą widmową *Correction* i *R1*. *Integration time* ustawić na 1 ms, włączyć korektę tła *Dark Offset*, zaś w obszarze *Signal Algebra* (3, Zdjęcie) klikając kolejno na sygnał *S1c* podzielony przez sygnał *R1c* i dalej przy pomocy przycisku *Add* iloraz umieść w oknie *Formulas*.
18. Uruchomić pomiar poprzez naciśnięcie klawisza *Run* (4, Zdjęcia 8 i 10). Po zakończeniu pomiaru dane zostaną automatycznie przesłane do programu *Origin*.



Zdjęcie 10. Widok okna eksperymentalnego pozwalającego na ustawienie parametrów eksperymentu do pomiaru widm wzbudzenia: 1 – konfiguracja układu wzbudzającego i detekcyjnego; 2 – ustawienie zakresu długości fal monochromatora wzbudzającego: początku i końca skanowania oraz szerokości szczeliny monochromatora wzbudzającego; 3 – ustawienie długości fali emisyjnej oraz szerokości szczeliny monochromatora emisyjnego.



Zdjęcie 11. Widok okna eksperymentalnego pozwalającego na ustawienie parametrów detektora w trakcie pomiarów widm wzbudzenia: 1 – konfiguracja detektora; 2 – ustawienie parametrów czasu ekspozycji detektora oraz wyboru sygnałów; 3 – okno algebraicznych operacji na mierzonym sygnale; 4 – przycisk *Run* uruchamiający pomiar.