



## Ćwiczenie G9

# Zastosowania zjawiska fluorescencji

## I. Zagadnienia do opracowania

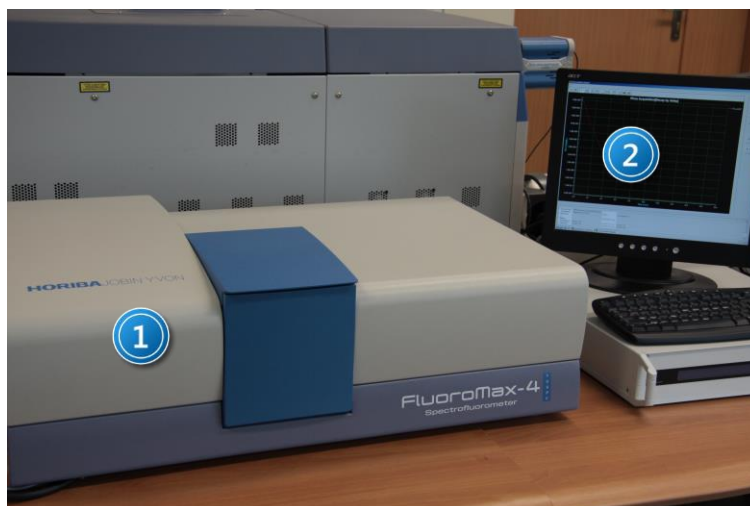
1. Energia wewnętrzna cząsteczek wieloatomowych.
2. Procesy dezaktywacji stanów wzbudzonych cząsteczek wieloatomowych. Zjawisko fluorescencji.
3. Reguła Stokesa.
4. Parametry pasma spektralnego.
5. Wybrane, podstawowe obserwowalne fluorescencji:
  - widmo fluorescencji;
  - wydajność kwantowa fluorescencji,
  - zanik natężenia fluorescencji.
6. Budowa i zasada działania spektrofluorymetru.
7. Zastosowania zjawiska fluorescencji w różnych dziedzinach nauki.

## II. 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.

### III. Zestaw przyrządów.

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

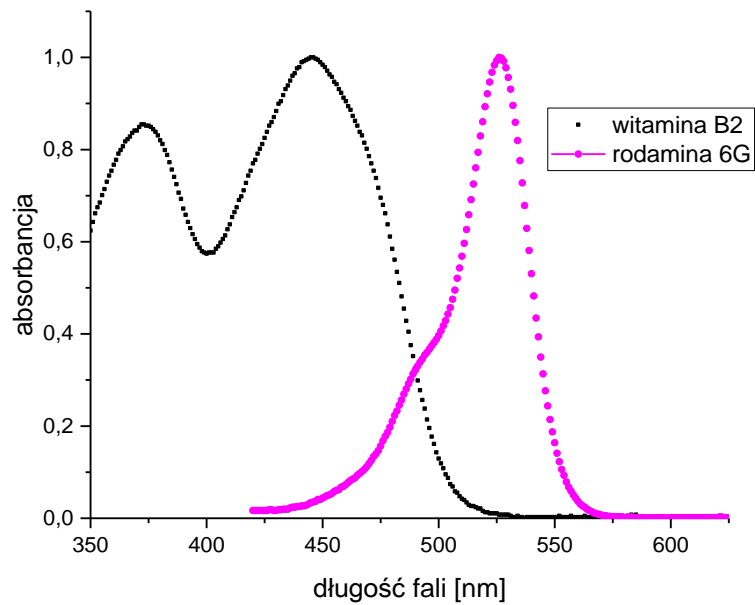
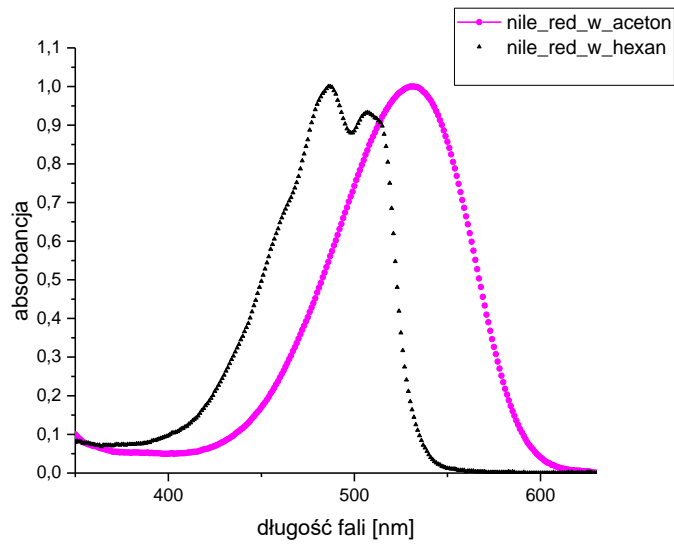


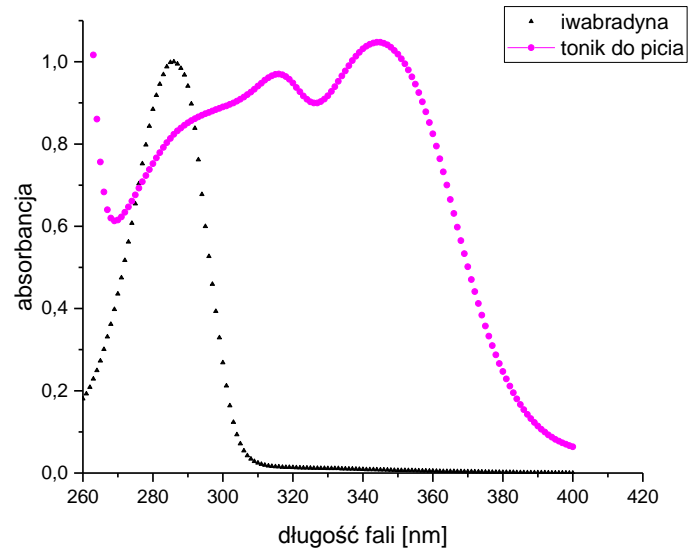
### IV. Wykonanie doświadczenia i opracowanie wyników

1. Zapoznaj się z instrukcją działania spektrofluorymetru dostępną w *Dodatku B*.
2. Zmierz widma fluorescencji przygotowanych próbek (do wyboru przez prowadzącego zajęcia np.: chlorofil a, beta-karoten, fluoresceina, NR). Wybierz długość fali światła wzbudzającego na podstawie widm absorpcji. Dla danego związku pomiary przeprowadź w tych samych warunkach (szczeliny, kuweta). Omów z prowadzącym czynniki mogące mieć wpływ na kształt i położenie widma emisji.
3. Nanieś otrzymane widma fluorescencji na jeden wykres.
4. Unormuj otrzymane widma do jedności.
5. Przeanalizuj otrzymane wyniki zgodnie ze wskazówkami prowadzącego zajęcia (położenie maksimum widma, szerokość połówkowa widma).

## 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 pomiarową.

2. Włączyć zasilanie poszczególnych elementów układu:
  - włączyć zasilanie spektrofлуorymetru (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 spektrofлуorymetr.
4. Uruchomić główną aplikację pod nazwą *FluorEssence V3* pozwalającą na gromadzenie danych pomiarowych. Jej ikona umieszczona jest na pulpicie 1, Zdjęcie 3.
5. W oparciu o widma absorpcji próbek umieszczonych w *Dodatku A* ustalić obszary długości fal 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.

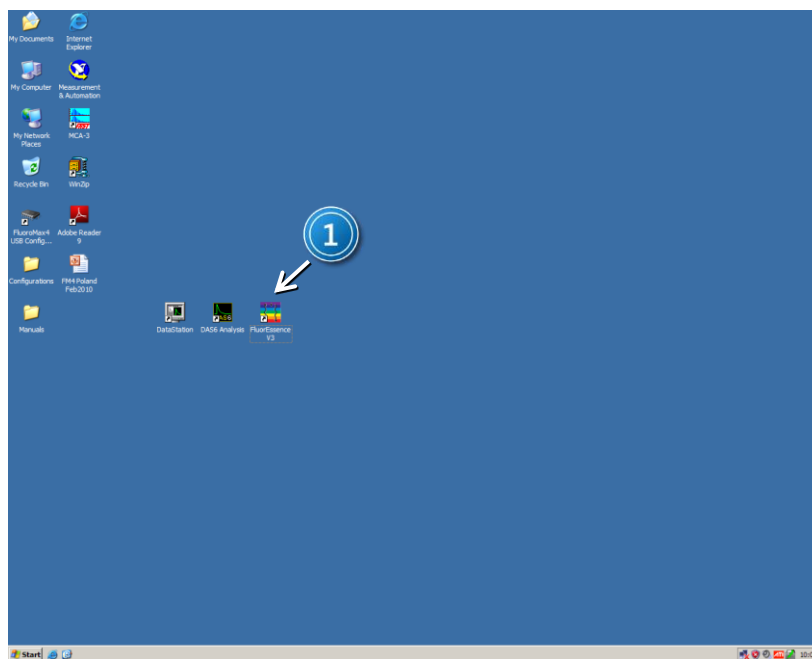


### UWAGA!

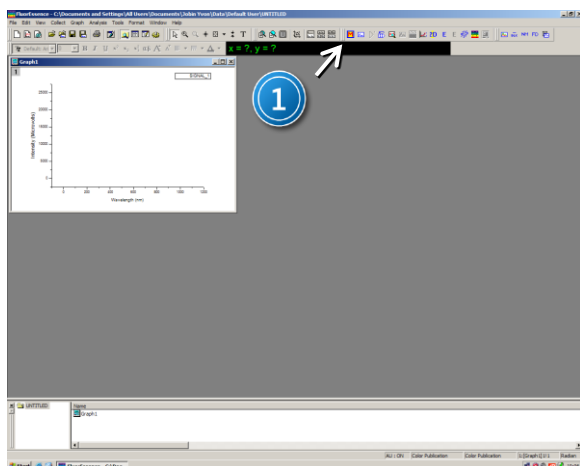
Przed włączeniem zasilania zamknąć komorę próbek 2 na Zdjęciu 1!!!  
Wartość liczby zliczeń powinna być niższa od liczby  $10^6$ .



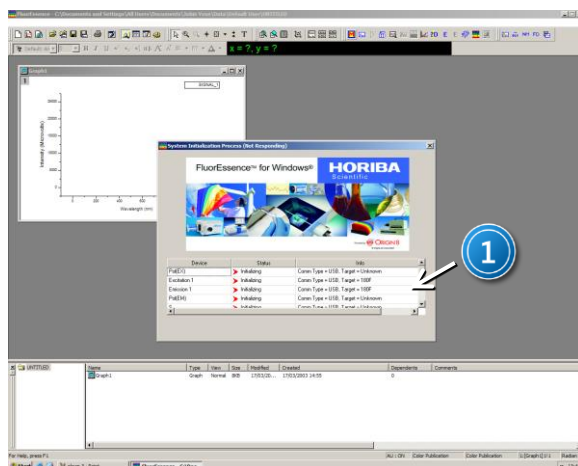
Zdjęcie 2. Widok wnętrza komory pomiarowej: 1 – uchwyt do ciekłych; 2 – miejsce na filtr w torze emisyjnym.




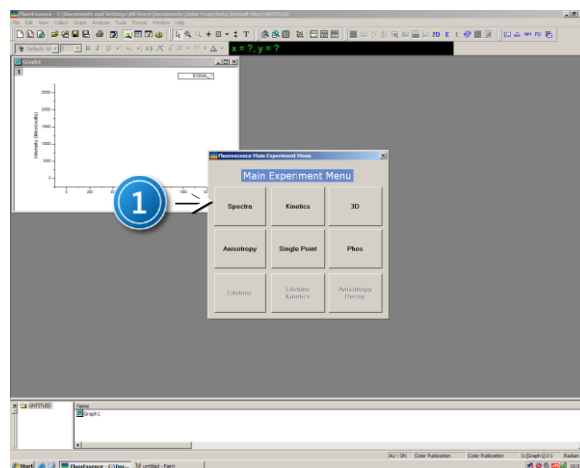
Zdjęcie 3. Widok ekranu po uruchomieniu systemu: 1 – ikona programu FluoroEssence V3.




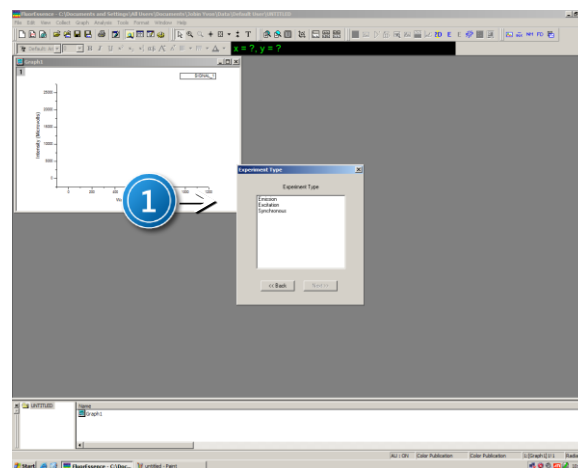
Zdjęcie 4. Widok ekranu programu po uruchomieniu ikony programu FluorEssence V3 znajdującej się na pulpicie: 1 – ikona uruchamiająca program pomiarowy.




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.



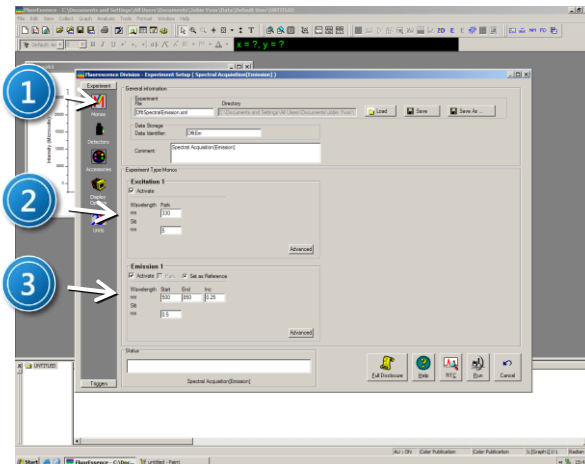
Zdjęcie 7. Widok ekranu po wybraniu z menu Main Experiment Menu, Spectra: 1 – menu wyboru typu eksperymentu.

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.
9. Skonfigurować spektrofлуорыметр 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.

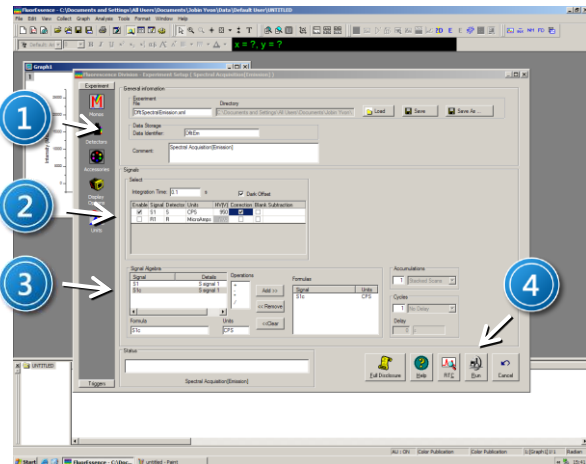


11. Dobrać filtr krawędziowy lub pasmowy do obserwowanego zakresu długości fal i wstawić go w tor detekcji w miejsce 2 na *Zdjęcie 3*.

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*.



*Zdjęcie 8. Widok okna eksperymentalnego pozwalającego na ustawienie parametrów eksperymentu do pomiaru widm emisji: 1 – konfiguracja układu wzbudzącego 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.*



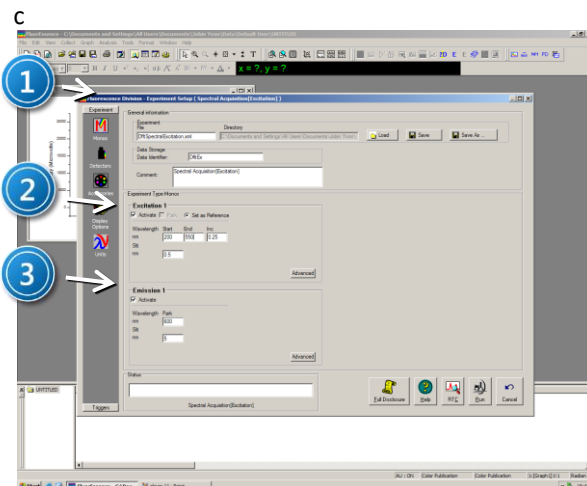
## Wskazówka

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.

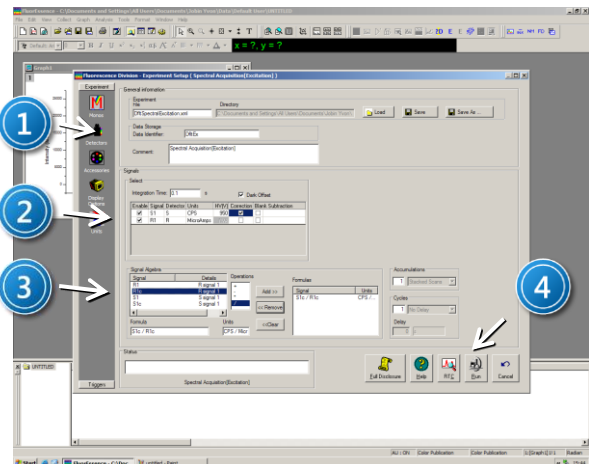
12. Uruchomić pomiar poprzez naciśnięcie klawisza *Run* (4, *Zdjęcie 9*). Po zakończeniu pomiaru dane zostaną automatycznie przesłane do programu *Origin*.
13. Na podstawie zmierzonego widma emisji wyznaczyć maksimum luminescencji, dobrać filtr krawędziowy lub pasmowy przepuszczający wyznaczoną długość 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 wzbudających 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 umieścić 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 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 umieścić w oknie Formulas.



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

18. Uruchomić pomiar poprzez naciśnięcie klawisza Run (4, Zdjęcia 8 i 10). Po zakończeniu pomiaru dane zostaną automatycznie przesłane do programu Origin.