



**ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ПРОФЕССИОНАЛЬНОЕ  
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ  
«СЕВЕРО-ОСЕТИНСКИЙ МЕДИЦИНСКИЙ КОЛЛЕДЖ»  
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РСО-АЛАНИЯ**

**МЕТОДИЧЕСКАЯ РАЗРАБОТКА ПРАКТИЧЕСКОГО ЗАНЯТИЯ**

*Учебная дисциплина:* **«ФИЗИКО – ХИМИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ АНАЛИЗА  
И ТЕХНИКА ЛАБОРАТОРНЫХ РАБОТ»**

**ПРАКТИЧЕСКОЕ ЗАНЯТИЕ № 1**

**Тема**

**ФЛУОРЕСЦЕНЦИЯ**

**Цели занятия:**

**Образовательные:**

- Формирование практических умений в профессиональной деятельности.

**Развивающие:**

- Развитие речи, внимания, мышления, умения анализировать, обобщать, оценивать.
- Формирование умений и навыков практического характера.
- Развитие способности к имитации и навыков работы в сотрудничестве.

**Воспитывающие:**

- Способствовать формированию интереса студентов к предмету, воспитывать умение доказывать свое мнение.
- Воспитание культуры общения.
- Воспитывать чувство ответственности за результаты работы.
- Способствовать воспитанию чувства взаимодействия и сотрудничества.

- Создание условий для развития социального опыта будущего специалиста.

**Тип занятия:** сообщение новых знаний.

**Вид занятия:** практическое занятие.

**Метод обучения:** методика актуализации знаний.

**Форма организации:** групповая.

**Средства технической поддержки работы:** таблицы, муляжи, мультимедийные средства обучения

№	Структурные элементы	Содержание занятия	Методы
1	Введение в тему	Приветствие	Монолог
2	Мотивация учебной деятельности	Прослушивание диалога	Монолог Тестирование
3	Решение ситуационной задачи	Выбор правильного решения по предложенной ситуации	Кейс - метод
4	Рефлексия	Высказывание собственного мнения о проделанной работе	Обмен мнениями

**План занятия:**

1. Организационный момент.
2. Мотивация учебной деятельности.
  - Сообщение темы и целей.
3. Организация самостоятельной работы студентов:
  - Инструктаж по проведению практического занятия.
  - Выдача методических указаний.
  - Выполнение задания.
  - Проверка выполненных работ, обсуждение допущенных ошибок и их коррекция.
4. Домашнее задание.
5. Рефлексия.

**Ход занятия:**

1. Организационный момент.
2. Мотивация учебной деятельности:
  - Сообщение темы и целей урока.
  - План занятия для студентов.
  - Опрос студентов.
3. Организация самостоятельной работы студентов.
4. Проверка выполненных работ, обсуждение допущенных ошибок и их коррекция.
5. Домашнее задание.

# СПЕКТРОФЛУОРОМЕТРИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ

Цель настоящей работы- освоить основы флуоресцентного метода анализа на примере измерения флуоресцентных характеристик раствора родамина в большом диапазоне изменения его концентраций и в разных растворителях.

## ВВЕДЕНИЕ

Фотолюминесценцией принято называть свечение вещества, возникшее при переходе его молекул из возбужденного электронного состояния в основное, если возбуждение осуществляется путем поглощения квантов электромагнитного излучения оптического диапазона.

В зависимости от природы энергетических уровней, участвующих в формировании излучения, фотолюминесценция подразделяется на флуоресценцию и фосфоресценцию. Флуоресценция возникает в результате оптического перехода между двумя уровнями одинаковой мультиплетности (как правило, между первым возбужденным  $S_1$  и основным  $S_0$  синглетными

состояниями молекулы) и характеризуется высокой вероятностью спонтанного перехода – малым временем жизни электронно- возбужденного синглетного состояния  $S_1$ . Фосфоресценция в отличие от флуоресценции обусловлена оптическими переходами между уровнями разной мультиплетности (обычно между нижним возбужденным триплетным  $T_1$  и основным синглетным  $S_0$  состояниями молекулы) и отличается весьма малой вероятностью перехода (большим временем жизни триплетного возбужденного состояния  $T_1$ ).

В общем случае возбужденные молекулы теряют избыток энергии не только за счет радиационных переходов, но и безизлучательным путем. Безизлучательные переходы между электронными состояниями одной и той же мультиплетности принято называть внутренней конверсией, а между состояниями разной мультиплетности- интеркомбинационной конверсией.

Общая схема внутримолекулярных процессов, происходящих после оптического возбуждения молекул, приведена на рис.1. Её называют схемой Яблонского. Вероятность безызлучательных процессов зависит также от взаимодействия возбужденных молекул с окружением.

Все процессы возбуждения можно охарактеризовать константами скоростей соответствующих процессов -  $K_{фл}$ ,  $K_{нк}$  и т.д.

Длительность пребывания молекул в возбужденном состоянии определяется естественным (радиационным)  $\tau_0$  и реальным  $\tau$  временем жизни уровня.

1

Реальное время жизни определяется вероятностью всех процессов, уменьшающих заселенность возбужденного состояния, т.е.

$$\tau = \frac{1}{K_{фл} + K_{ек} + K_{ик}}, \quad \tau_0 = \frac{1}{K_{фл}}$$

Важнейшей характеристикой флуоресценции является ее выход – величина, определяющая долю переходов с испусканием по отношению ко всем процессам, уменьшающим заселенность возбужденного состояния.

Различают квантовый выход - отношение числа фотонов  $N_{ис}$ , испускаемых единицей объема вещества в единицу времени, к числу поглощенных фотонов  $N_{полг}$ :

$$\gamma = \frac{N_{ис}}{N_{полг}},$$

и энергетический выход  $\Gamma$  - отношение испускаемой энергии  $U_{ис}$  и поглощенной  $U_{полг}$ :

$$\Gamma = \frac{U_{ис}}{U_{полг}}$$

Эти величины связаны соотношением

$$\Gamma = \frac{\nu_{фл}}{\nu_{возб}},$$

где  $\nu_{фл}$  - средняя частота- центр тяжести полосы испускания,  $\nu_{возб}$  - частота

возбуждающего излучения.



Рис.1. Диаграмма Яблонского.

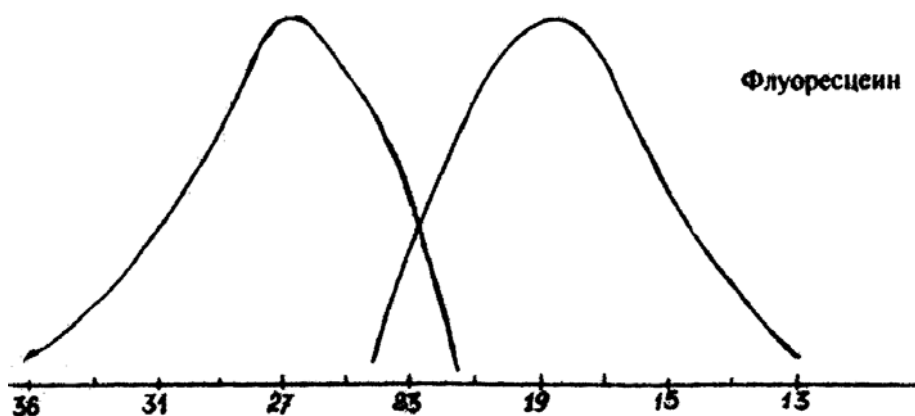


Рис.2. Закон зеркальной симметрии спектров поглощения и флуоресценции.

Квантовый выход связан с константой скорости затухания флуоресценции и константами скорости безызлучательных переходов следующим образом:

$$\gamma = \frac{K_{\text{фл}}}{K_{\text{фл}} + K_{\text{вк}} + K_{\text{ик}} + \dots}$$

Молекулярная флуоресценция имеет ряд особенностей.

1. В конденсированной среде исходным для испускания уровнем обычно является самый нижний возбужденный уровень данной мультиплетности (правило Коша), поскольку для переходов между возбужденными состояниями самым вероятным является процесс внутренней конверсии. Вследствие этого положение полос флуоресценции, как правило, не зависит от того, какой из полосы поглощения соответствует возбуждающий свет.
2. Полоса флуоресценции смещена относительно длинноволновой

полосы поглощения в области более низких энергий, т.е.(закон Стокса).

$$v_{\text{полг}} \geq v_{\text{фл}}$$

3. Контуры полос поглощения и флуоресценции, посторонние в шкале частот, приближенно симметричны относительно вертикали, которая проходит через точку их пересечения (правило вертикальной симметрии Левшина) рис.2. Нередко, однако, это правило не выполняется.

Молекулярная флуоресценция находит широкое применение в физико-химической биологии, являясь из методов качественного и количественного анализа. В его основе лежат зависимость квантового выхода, положения спектра, его форма, поляризация излучения от ряда структурных особенностей флуоресцирующей молекулы и ее взаимодействие с окружением.

Многие молекулы биологического происхождения обладают флуоресценцией, достаточно сильной флуоресценцией обладают белки, содержащие флуоресцирующие аминокислоты- триптофан, тирозин, фенилаланин. Около 90% интенсивности флуоресценции белков обусловлено триптофаном. Он весьма чувствителен к полярности окружения, и анализ флуоресценции белков дает информацию о различных процессах, среди которых можно выделить связывание лигандов, ассоциацию белок-белок и денатурацию. Анализ анизотропии флуоресценции белков дает информацию о динамике взаимодействия белков с окружением.

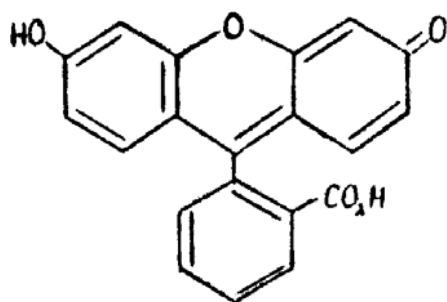
Флуоресценцией обладают также кофакторы, витамины и др.

Во многих случаях флуоресцентные исследования проводят с помощью искусственных флуорофоров- органических красителей различных классов. Их используют в качестве меток и в качестве зондов. Флуоресцентные метки- это обычно красители с поглощением и флуоресценцией в видимой области и с большим квантовым выходом. Их ковалентно связывают с определенными биологическими молекулами. Такие метки являются основной иммунофлуоресцентного анализа.

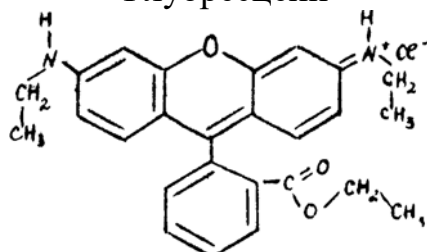
В свою очередь флуоресцентные зонды- это красители, на флуоресцентные характеристики которых сильно влияет окружение. С их помощью измеряют, например, рН внутри клетки, мембранный потенциал, вязкость среды ближайшего окружения и т.п.

Структурные формулы некоторых флуорофоров, используемых в качестве меток и зондов, приведены на рис.3.

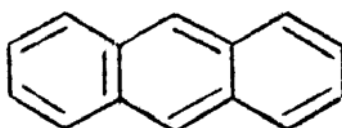
Следует отметить, что измерение спектров флуоресценции- спектрофлуорометрия- значительно более чувствительный метод, чем абсорбционная спектрофотометрия. С помощью современных спектрофлуорометров можно уверенно реагировать флуоресценцию вещества с концентрацией  $10^{-11} \frac{\text{моль}}{\text{л}}$ .



Флуоресцеин



Родамин 6Ж



Антрацен

Рис.3. Формулы некоторых флуорофоров.

## ТУШЕНИЕ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ

В данной работе исследуется тушение флуоресценции красителя родамина-уменьшение интенсивности флуоресценции этого вещества. К тушению приводят многие процессы, в данной работе исследуются два- тушение, связанное со случайными столкновениями между флуорофором и тушителем, которое называется динамическим, и тушение, обусловленное образованием комплекса- статическое тушение. Для тушения (и статического, и динамического) требуется контакт между молекулами флуорофора и тушителя. В случае тушения тушитель должен диффундировать к флуорофору в течение времени нахождения в возбужденном состоянии. В результате контакта флуорофор возвращается в основное состояние без излучения фотона. В случае статического тушения между флуорофором и тушителем образуется нефлуоресцирующий комплекс. В этой работе в качестве тушителя динамического типа используется ион йода. Известно, что тяжелые галогены- иод и бром- увеличивают константу интеркомбинационной конверсии в триплетное состояние из-за спин-орбитального взаимодействия возбужденного в синглетном состоянии флуорофора и галогена. Так как время жизни в триплетном состоянии большое, то такое состояние сильно тушится другими процессами.



В качестве статического тушителя используются сами молекулы родамина, т.к. при увеличении его концентрации начинают образовываться димеры, которые не флуоресцируют.

## ТЕХНИКА ИЗМЕРЕНИЯ СПЕКТРОВ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ

Правильный результата флуоресцентного анализа может быть получен лишь при учете многих факторов, сопутствующих эксперименту. Отметим основные.

1. Для получения истинных спектров флуоресценции и возбуждения необходимо учитывать зависимость от длины волны спектра излучения источника, пропускания монохроматоров и чувствительности фотомножителя.
2. На сигнал флуоресценции всегда накладываются сигналы, обусловленные флуоресценцией примесей растворителя, фоновой засветкой, релеевским и комбинационным рассеянием света, рассеянием, обусловленным мутностью раствора, рассеянным излучением, прошедшим через монохроматоры и т.д.
3. Спектр флуоресценции и ее интенсивность могут зависеть от концентрации исследуемого вещества как из-за изменения оптической плотности на длине волны возбуждения, так и из-за межмолекулярных взаимодействий, влияющих на флуоресцентные свойства молекул.
4. На флуоресцентные параметры исследуемого вещества влияют свойства растворителя (его полярность, вязкость, pH наличие растворенных веществ).

В качестве примера рассмотрим влияние условий освещения образца. Наблюдаемая интенсивность флуоресценции и спектральное распределение могут зависеть от оптической плотности образца и от того, как освещается образец. Наиболее удобно при измерениях флуоресценции наблюдение под прямым углом к середине центрально-освещенной кюветы (рис.5а). Другие варианты расположения включают фронтальное и нецентральное освещение (рис.5б, 5в). Эти способы обычно используют для уменьшения эффектов внутреннего фильтра, обусловленных большими оптическими плотностями или мутностью раствора.

Необходимо учитывать, что интенсивность флуоресценции пропорциональна концентрации лишь в ограниченном диапазоне оптических плотностей. Рассмотрим кювету 1\*1см, которую освещают по центру, а наблюдение ведут под прямым углом (рис.5а). Предположим далее, что оптическая плотность при длине волны возбуждения равна 0,1.

Из определения оптической плотности  $D = \lg \frac{I_0}{I}$  следует, что интенсивность

света в центре кюветы  $I$  равна 0.88/0.

$$D = \lg \frac{I_0}{I_1},$$

—

$I_0$  - интенсивность света падающего на кювету. Поскольку наблюдаемая интенсивность флуоресценции пропорциональна интенсивности падающего света, наблюдаемый выход будет примерно на 10% меньше, чем наблюдаемый для бесконечно разбавленного раствора. Этот эффект называется эффектом внутреннего фильтра. Такие эффекты могут уменьшить либо интенсивность возбуждения в точке наблюдения, либо наблюдаемую флуоресценцию из-за того, что часть ее поглощается. Относительный вклад каждого из процессов зависит от оптических плотностей образца на длинах волн возбуждения и испускания. При фронтальном освещении интенсивность флуоресценции не зависит от концентрации, и оптическая плотность может достигать больших значений- 20 и более.

Однако не существует простых и надежных методов точного определения величин концентрационных эффектов и введения поправок на них.

В работе используется спектрофлуориметр MPF-3 фирмы Хитачи. Его основные характеристики.

Спектральный диапазон: монохроматор возбуждения 200-700нм, монохроматор излучения 220-800нм. Спектральное разрешение от 1 до 40нм плавно регулируется изменением ширины щелей монохроматоров. Скорости развертки спектра 12,5, 25, 50, 100, 150, 300 нм/мин. Источник возбуждения-ксеноновая дуговая лампа.

В приборе используется 90 градусная схема регистрации флуоресценции.

## **РАСПОЛОЖЕНИЕ И НАЗНАЧЕНИЕ ОРГАНОВ УПРАВЛЕНИЯ**

Прибор состоит из следующих блоков: спектрофлуориметр, усилитель, самописец, блок питания, деозонатор с трансформатором. Расположение блоков и основных органов управления показано на рис. 6.

### **Блок спектрофлуориметра.**

1. Emission slit- ширина щели монохроматора флуоресценции в пересчете на спектральное разрешение.
2. Emission wavelength- ручка развертки монохроматора флуоресценции.
3. Wave drive- включение развертки.
4. Scan speed- скорость развертки 1. 12,5, 2. 25, 3. 50, 4. 100, 5. 150, 6. 300нм/мин. Обрато 300нм/мин.
5. Excitation shutter- заслонка возбуждающего света.
6. Excitation wavelength- ручка развертки монохроматора.
7. Excitation slit- ширина щели монохроматора.
8. Meter shunt - кнопка включ/выключ стрелочного индикатора.
9. Filter - переключатель фильтров, через который проходит излучение флуоресценции. Обычно используют два режима: отсутствие фильтра, заслонка.
10. Sample reference- переключатель режимов регистрации. Обычно используются Sample.

11. Sample adjust - установка нуля и плавная регулировка чувствительности в режиме sample. Черная ручка-установка нуля, внешняя белая-чувствительность.
12. Между лампой и флуориметром- внешняя заслонка, характерная тем, что во вдвинутом внутрь положении- открыта, а выдвинутом- закрыта.
13. Power - сеть.
14. Start -зажигание лампы. Блок усилителя.
15. Power- сеть.
16. Reference sensitivity- усиление канала сравнения. В режиме sample переключатель должен быть в положении direct.
17. Sample sensitivity- усиление измерительного канала- sample. Положение zero используется при настройке прибора.
18. Dark current- компенсация темнового тока.

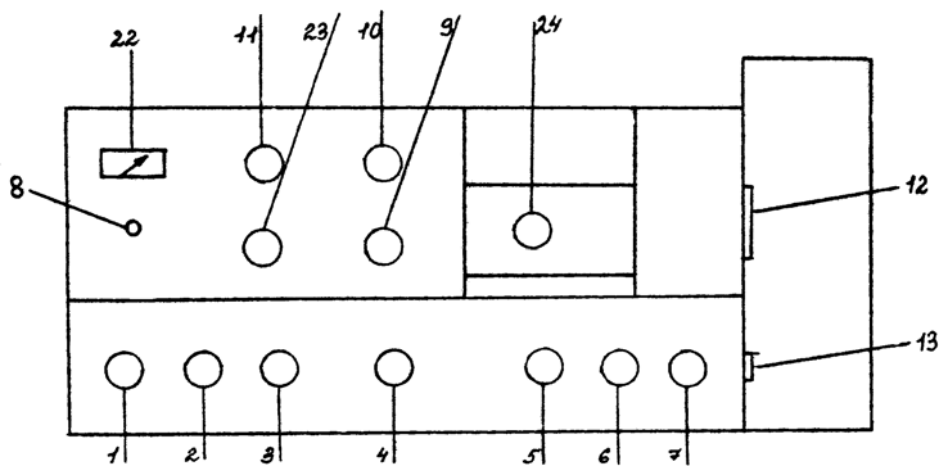


Рис.6. Расположение ручек управления спектрофлуориметра МПФ-3

### Блок самописца.

19. Power- переключатель режимов работы. Off- выключен.  
Amp- включен (прогрев усилителя).  
Servo- включение пера и синхронной протяжки бумаги при включении развертки (основной режим).  
Chart- протяжка бумаги (автономная).

20. Chart speed- скорость протяжки бумаги  
25мм/мин,  
50мм/мин,  
100мм/мин.
21. Chart driver- ручная перемотка бумаги.

### **ВНИМАНИЕ!**

1. НЕ ВКЛЮЧАТЬ ЛАМПУ ПРИ ВЫКЛЮЧЕНИИ ДЕОЗОНАТОРА.
2. НЕ ОТКРЫВАТЬ КЮВЕТНОЕ ОТДЕЛЕНИЕ, НЕ ПОСТАВИВ ФИЛЬТР (9) В ПОЛОЖЕНИЕ S.
3. НЕ ЗАГЛЯДЫВАТЬ В КЮВЕТНОЕ ОТДЕЛЕНИЕ ПРИ ВОЗБУЖДЕНИИ В УФ-ОБЛАСТИ.

### **ВКЛЮЧЕНИЕ ПРИБОРА**

1. Поставьте переключатель sample sensitivity усилителя в положение zero? Filter- в положение S и excitation shatter в положение close/
2. Включите в сеть блок питания и трансформатор деозонатора.
3. Включить Power в положение on последовательно на блоке питания, деозонаторе, усилителе. Затем поставьте Power самописца в положение amp. На каждом блоке при этом должна загораться лампочка.
4. Через 15сек. Нажмите start на блоке питания.
5. Дайте прогреться около 15 мин.
6. Проведите установку нуля пера самописцу черной ручкой 11. Если это не удастся, то установить его вращением винта под крышкой самописца.

### **ВЫБОР РЕЖИМОВ РЕГИСТРАЦИИ**

Этот выбор включает установку длины волны возбуждения, ширины щелей монохроматоров возбуждения и флуоресценции, коэффициента усиления.

Выбор длины волны возбуждения удобно проводить, когда монохроматор флуоресценции поставлен в положение “полное пропускание” (на красной черте). Медленно проворачивая вручную ручку развертки монохроматора возбуждения, зафиксировать длины волн максимального отклонения пера.

Выбор ширины щелей определяется в основном интенсивностью флуоресценции. Нормальные значения от 5 до 10нМ. Следует помнить, что спектральное разрешение определяется в основном шириной щели флуоресценции и увеличивать ее более 10нМ нецелесообразно.

Для выбора коэффициента усиления необходимо сначала найти длину волны максимума флуоресценции, вручную изменяя длину волны регистрации. Регулировкой усиления “ступенчато” и “плавно” добиваются нужного отклонения в максимуме. Эту операцию проводить внимательно, чтобы исключить зашкаливания при регистрации. Менять масштаб регистрации можно ручкой “ступенчато”, т.к. усиление при этом изменяется в точное число раз.

Комбинация скоростей развертки и бумаги можно получить масштаб спектра от 0,125 до 12нМ/мм. Наиболее удобны три масштаба: 0,5нМ/мм- 3-я скорость развертки и “высокая”- бумаги кратно 3НН, 1,0нМ/мм 4НН, 2,0нМ/мм- 4МЕ.

При проведении измерений необходимо контролировать правильность установки режимов регистрации, положение фильтров и заслонок. Самописец должен стоять в положении “servo”. Для начала записи переключатель “wave length drive” поставить в положение “emission”, для прекращения- вернуть в положение OFF.

## ВЫПОЛНЕНИЕ РАБОТЫ

А. Исследование концентрационного тушения флуоресценции родамина 6G в водном растворе.

1. Промыть многократно кювету дистиллированной водой. Налить в нее 2 мл воды.
2. Установить следующие режимы регистрации: щель “возбуждения” 7нМ, щель “флуоресценции”- 5нМ, длина волны возбуждения 530нМ, усиление канала флуоресценции 0,3, ручка плавной регулировки на “min” скорость регистрации 4НН. Установить “0”.
3. Снять на одном графике (один над другим) спектры флуоресценции в интервале 500-700нМ растворов родамина следующих концентрации: 0,0, 0,5, 1,0, 2,0, 5,0, 10мг/л (удобно в воду добавлять рассчитанное количество раствора родамина с концентрацией 10мг/л). Для возврата бумаги в первоначальное положение пользоваться ручкой.

Проинтегрировав графики, построить зависимость интегральной интенсивности от концентрации. Оценить концентрацию начала тушения и среднее расстояние между молекулами при этой концентрации. Молярная масса родамина около 500г/моль.

Б. Тушение ионами йода. Измерение “излучательного” времени жизни.

1. Промыть кювету. Приготовить в ней 2 мл раствора родамина концентрацией 2мг/л.
2. Проверить нуль флуориметра. Установить параметры регистрации те же, что и в пункте А.
3. Снять на одном графике спектры флуоресценции в интервале 500-700нМ для следующих концентраций KI- 0,0;0,005;0,01;0,02;0,03;0,05М. Все растворы получают в обной кювете добавлением 0,1М раствора.

4. Проинтегрировать спектры. Вычислить концентрацию родамина в конечном результате. Построить зависимость  $FC/C_0$  от концентрации иода. Считая

квантовый выход равным 0,8, из наклона прямой получить излучательное время жизни . Диффузионная постоянная для иода в воде  $9.7 \cdot 10^9 \text{ }^1\text{ }_{\text{MC}}$  .

В. Концентрационное тушение в смеси глицерин-вода. Все измерения аналогичны пункту А, только в качестве растворителя используется смесь глицерин-вода 1:1. (учитывая вязкость необходимо проводить перемешивание раствора стеклянной палочкой).

Г. Определение времени жизни в водноглицериновой смеси. Все измерения аналогичны пункту Б, только концентрации К1 в смеси другие- 0,0;0,025;0,05;0,1;0,25;0,5М. Вязкость смеси глицерин-вода 1:1 по объему в 8,5 раз больше вязкости воды. Безусловно все растворы в пунктах В и Г необходимо делить на этой смеси.

### **КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ**

1. Основные параметры флуоресценции. Влияние внешней среды на эти параметры.
2. Принцип Франка-Кондона.
3. Особенность строения флуоресцирующих молекул.
4. Устройство флуориметра. Чем определяется максимальная чувствительность регистрации?
5. Принципы тушения флуоресценции.
6. В чем сходство и различие динамического и статического тушения.