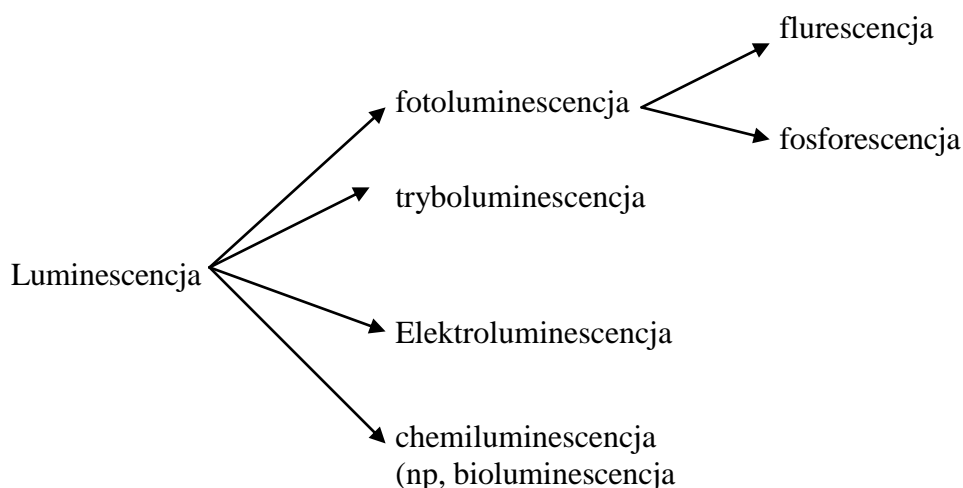


## Spektrofluorymetryczne oznaczanie zawartości glinu w lekach

### 1. Wstęp

Zjawiskiem luminescencji nazywamy rodzaj emisji promieniowania elektromagnetycznego, który następuje w czasie nie krótszym niż  $10^{-10}$  s, po zaabsorbowaniu energii przez atomy lub cząsteczki danej substancji. Na rysunku 1 przedstawiono podział zjawisk luminescencyjnych pod względem czynnika, który je wywołuje.



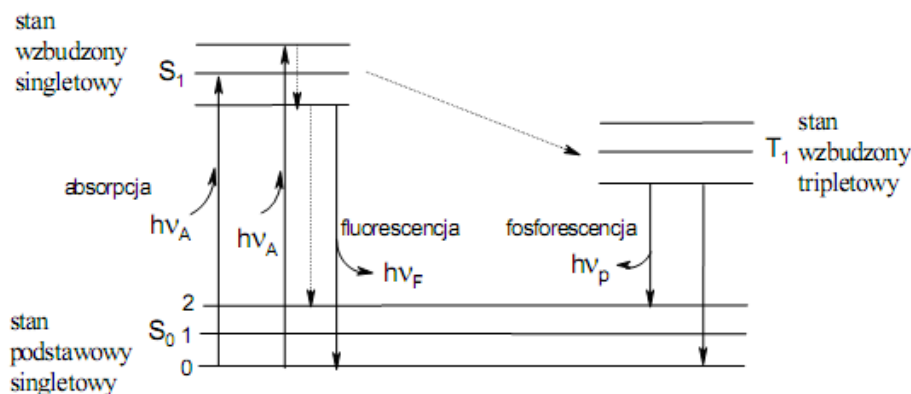
**Rys.1.** Rodzaje luminescencji.

- ✓ Fotoluminescencja – luminescencja wywołana absorpcją fotonów w zakresie UV-Vis.
- ✓ Chemiluminescencja – luminescencja wywołana w wyniku reakcji chemicznych. Interesującym jej przykładem jest bioluminescencja występująca w wyniku procesów biochemicznych zachodzących w organizmach żywych np. świetliki *Phausis splendidula L.*, antarktyczny kryl *Euphausia superba*, organizmy głębinowe.
- ✓ Elektroluminescencja – powstaje na skutek zderzeń cząsteczek obdarzonych ładunkiem elektrycznym z substancją luminezującą.
- ✓ Tryboluminescencja – luminescencja wywołana poprzez tarcie.

### 2. Fotoluminescencja (diagram Jabłońskiego)

Zjawiska fotoluminescencyjne można podzielić według długości czasu pomiędzy pochłonięciem a wyemitowaniem energii na fluorescencję i fosforescencję. Z fluorescencją mamy do czynienia jeśli od pochłonięcia przez cząsteczkę światła do emisji nie upłynęło więcej niż  $10^{-8}$  s. W przypadku gdy czas pomiędzy pochłonięciem energii a wyemitowaniem jest dłuższy niż  $10^{-8}$  s to zjawisko to nosi nazwę fosforescencji.

Zjawisko fluorescencji i fosforescencji można zobrazować za pomocą diagramu przejść elektronowych opisanych przez A. Jabłońskiego (**Rys. 2**).



**Rys.2.** Schemat diagramu Jabłońskiego poziomów elektronowo-oscylacyjnych:

-----> procesy bezpromienne, —————> przejścia promienne.

Całkowitą energię cząsteczki  $E$  można zdefiniować jako sumę składników odpowiadających trzem rodzajom ruchu w cząsteczce:

$$E = E_e + E_{osc} + E_{rot}$$

gdzie:  $E_e$  - energia elektronowa,  $E_{osc}$  - energia oscylacyjna,  $E_{rot}$  - energia rotacyjna.

Znaczące różnice wartości wymienionych powyżej typów energii ( $E_e \gg E_{osc} > E_{rot}$ ) stanowią przyczynę, dla której odpowiednie widma pojawiają się w charakterystycznych zakresach spektralnych. Absorpcja promieniowania optycznego z zakresu dalekiej podczerwieni (największa długość fali promieniowania optycznego, a zatem najmniej energetyczna) może przyczyniać się tylko do zmian energii rotacji. Zmiany energii elektronowej może powodować jedynie promieniowanie z zakresu nadfioletu i widzialnego (UV/Vis).

Każda cząsteczka posiada charakterystyczny dla siebie układ poziomów energetycznych - elektronowych, oscylacyjnych i rotacyjnych. W wyniku absorpcji promieniowania ultrafioletowego lub widzialnego cząsteczka przechodzi w wysokoenergetyczny stan wzbudzony. Cząsteczka w stanie wzbudzonym dąży do osiągnięcia stanu równowagi czyli do stanu, w którym energia całkowita przyjmuje wartość minimalną.

W większości cząsteczek elektrony w stanie podstawowym są sparowane (na każdym orbitalu znajdują się po dwa elektrony, a ich spiny są przeciwne) – jest to tzw. stan singletowy. Absorpcja energii może spowodować przeniesienie elektronu na poziom o wyższej energii bez zmiany multipletowości (singletowy stan wzbudzony). Po wzbudzeniu nadmiar energii może zostać uwolniony poprzez emisję fotonów – luminescencję (**Rys. 2** – linie ciągłe) lub w procesach bezpromienistych (**Rys. 2** – linie przerywane). Zgodnie z regułą Stokes'a – Lommela widmo fluorescencji przesunięte (przesunięcie Stokes'a) jest wobec widma promieniowania absorbowanego w kierunku fal o większej długości. Dzieje się tak, ponieważ przejścia emisyjne nie odbywają się z osiągniętego podczas wzbudzenia poziomu oscylacyjnego, lecz z najniższego poziomu oscylacyjnego danego stanu wzbudzonego. Cząsteczka w stanie wzbudzonym ulega bezpromienistej konwersji wewnętrznej (relaksacji

oscylacyjnej) z utratą energii oscylacyjnej do najniższego poziomu oscylacyjnego na wzbudzonym poziomie elektronowym. Wyemitowany foton przy przejściu z tego stanu do stanu podstawowego ma więc energię mniejszą niż foton wzbudzający, a widmo fluorescencji przesuwają się w stronę fal dłuższych.

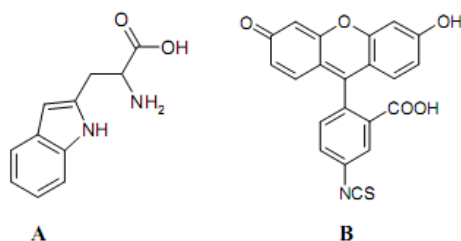
Fluorescencja i fosforescencja różnią się czasem zaniku, co ma związek z różnym mechanizmem przejść elektronowych. Zjawisko fluorescencji zachodzi, gdy elektron przechodzi bezpośrednio ze stanu wzbudzonego do niższego, o tej samej multipletowości. Ze zjawiskiem fosforescencji mamy do czynienia, gdy po relaksacji oscylacyjnej następuje przejście międzysystemowe ze wzbudzonego stanu singletowego do wzbudzonego stanu tripletowego  $T_1$  (elektrony nie są sparowane, ich spiny zwrócone są w tym samym kierunku) i dopiero później do stanu podstawowego. Ponieważ przejście promieniste między stanami  $T_1$  i  $S_0$  jako stanami o różnej multipletowości jest wzbronione, więc cząsteczka przez długi czas przebywa w elektronowym stanie wzbudzonym, nim wreszcie, łamiąc multipletową regułę wyboru, wypromieniuje foton i wróci do podstawowego stanu elektronowego. To zjawisko nazywamy fosforescencją.

### 3. Substancje fluoryzujące

Substancjami wykazującymi zjawisko luminescencji są między innymi następujące związki organiczne:

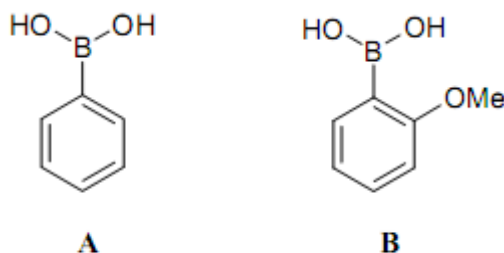
1. Związki aromatyczne i heterocykliczne
2. Niektóre barwniki (np. fluoresceina, eozyna, rodamina)
3. Związki biologiczne:
  - a. aromatyczne aminokwasy (np. tryptofan),
  - b. zasady nukleinowe (adenina, guanina, cytozyna, tymina, uracyl) w DNA i RNA,
  - c. chlorofil i karotenoidy (barwniki roślinne),
  - d. niektóre witaminy i hormony.

Związki fluoryzujące można podzielić na następujące grupy: wewnętrzne, zewnętrzne oraz wskaźniki fluorescencyjne. Jednym z przykładów wewnętrznego fluoroforu jest wyżej wymieniony aminokwas tryptofan (**Rys. 3, A**), zawierający w swojej strukturze grupę indolową, dzięki czemu wykazuje fluorescencję (długość fali wzbudzenia wynosi 280 nm, długość fali emisji 340 nm). W przypadku gdy badana próbka nie posiada odpowiednich właściwości spektralnych, możliwa jest jej modyfikacja chemiczna za pomocą fluoroforu zewnętrznego. Jednym z przykładów jest izotiocyjanian fluoresceiny (FITC) (**Rys. 3, B**). Reaguje on z wolnymi grupami aminowymi (obecnymi na przykład w strukturze białka), dzięki czemu związek nie wykazujący fluorescencji może być analizowany metodami fluorescencyjnymi.



**Rys.3.** A – struktura tryptofanu, B – struktura izotiocyjanianu fluoresceiny (FITC).

Do grupy wskaźników fluorescencyjnych należą związki, których właściwości spektralne ulegają zmianie pod wpływem obecności odpowiedniego związku lub jonu. Jednym z przykładów są kwasy boronowe (**Rys. 4**), które tworzą cykliczne estry z *cis*-diolami (cukry, np. glukoza). W zależności od struktury kwasu boronowego obserwuje się wzrost bądź spadek intensywności fluorescencji na skutek reakcji estryfikacji.



**Rys. 4.** Przykładowe struktury kwasów boronowych: A - kwas fenylboronowy, B - *o*-metoksyfenylboronowy.

#### 4. Wydajność kwantowa

Wydajność kwantowa fluorescencji określona jest jako stosunek całkowitej liczby fotonów emitowanych przez cząsteczkę wysyłającą promieniowanie fluorescencyjne w całym zakresie widma fluorescencji do całkowitej liczby zaabsorbowanych fotonów o danej częstotliwości:

$$\Phi_f = \frac{I_f}{I_a}$$

gdzie:  $\Phi_f$  - wydajność kwantowa fluorescencji,  $I_f$  – natężenie promieniowania emisji  
 $I_a$  - natężenie promieniowania wzbudzającego.

Nieznaną wydajność kwantową danej substancji można wyznaczyć wykorzystując jako standard np. siarczan chininy,  $\beta$ -naftol w określonych rozpuszczalnikach. Siarczan chininy w roztworze kwasu siarkowego jest bardzo często wykorzystywanym wzorcem fluorescencyjnym. Wynika to z faktu, iż jego widma absorpcji i fluorescencji praktycznie się nie nakładają, niezależnie od stężenia i pH roztworu oraz są stabilne ze względu na procesy fotochemiczne. Poniższa tabela przedstawia wydajność kwantową wybranych związków chemicznych.

**Tab. 1** Wydajność kwantowa wybranych związków chemicznych. Jako wzorca użyto roztworu chininy w kwasie siarkowym ( $10^{-3}$  M)

Związek chemiczny	$\Phi_f$
9-aminoakrydyna (woda)	0,98
9-aminoakrydyna (etanol)	0,99
fluoresceina (0,1 N NaOH)	0,92
trypaflawina (woda)	0,54
antracen (benzen)	0,29
antracen (heksan)	0,33

Wartość wydajności kwantowej nie jest parametrem stałym dla danej substancji. Istnieje bowiem wiele czynników wpływających na jej obniżenie (wygaszanie fluorescencji).

## 5. Czynniki wpływające na fluorescencję

Na wyniki pomiarów fluorescencyjnych wpływ mają następujące czynniki: temperatura, rozpuszczalnik, stężenie substancji fluoryzującej, obecność zanieczyszczeń wykazujących fluorescencję, pH roztworu, obecność tlenu i innych substancji wygaszających fluorescencję.

### 5.1. Temperatura

Wraz ze wzrostem temperatury lepkość rozpuszczalników maleje, a zatem cząsteczki stają się bardziej ruchliwe. W wyniku częstszych kolizji cząsteczka łatwiej traci energię wzbudzenia w procesach bezpromienistych (Rozdział 2 – diagram Jabłońskiego). Skutkiem tego intensywność fluorescencji maleje.

W zależności od struktury substancji fluoryzującej obserwowany jest różny wpływ temperatury na natężenie emitowanego promieniowania fluorescencji. Dla większości przypadków wraz ze wzrostem temperatury o  $1^\circ$  C intensywność fluorescencji maleje o 1%, jednak np. dla tryptofanu i rodaminy B intensywność fluorescencji maleje o 5% w takich samych warunkach.

### 5.2. Rozpuszczalnik

Wpływ rozpuszczalnika na widma elektronowe związków nazywamy solwatochromizmem. Zmiana położenia i natężenia pasm może wynikać ze specyficznych oddziaływań badanej cząsteczki z cząsteczkami rozpuszczalnika np. powstawanie asocjatów w wyniku wiązań wodorowych.

Jak już wcześniej wspomniano przy omawianiu diagramu Jabłońskiego cząsteczka w stanie wzbudzonym ulega konwersji wewnętrznej z utratą energii oscylacyjnej, w wyniku czego obserwowane jest przesunięcie Stokes'a. Oprócz wewnątrzcząsteczkowych procesów relaksacyjnych, w roztworze występują także międzycząsteczkowe procesy relaksacyjne. W przypadku zastosowania rozpuszczalników polarnych są one przyczyną zjawiska przekształcenia dużej części energii wzbudzenia w ciepło. W zależności od polarności

badanego związku i zastosowanego rozpuszczalnika obserwuje się znaczne różnice w wartości przesunięcia Stokes'a.

Wszystkie rozpuszczalniki używane w spektrofлуориметрии powinny być odgazowane. Jeżeli stężenie tlenu w roztworze wynosi  $10^{-3}$  M, wówczas dla większości związków natężenie promieniowania fluorescencji zmniejsza się o 20%.

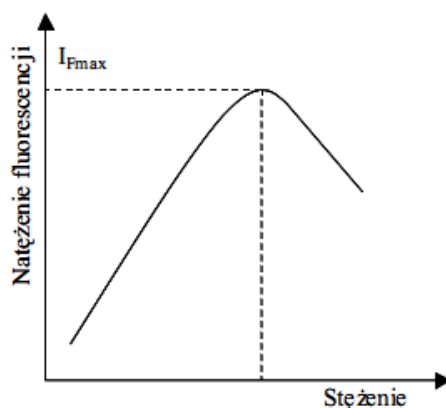
### 5.3. Stężenie substancji fluoryzującej

Stwierdzono, że dla małych stężeń substancji fluoryzującej natężenie promieniowania fluorescencji ( $I_f$ ) jest proporcjonalne do natężenia promieniowania padającego ( $I_0$ ), stężenia substancji fluoryzującej ( $c$ ), grubości warstwy roztworu ( $l$ ) zgodnie ze wzorem:

$$I_f = I_0 K c l,$$

gdzie:  $K$  – wartość stała

Krzywa obrazująca zależność natężenia fluorescencji od stężenia analitu jest prostoliniowa dla małych stężeń analitu w próbce, natomiast dla wyższych stężeń zakrzywia się w kierunku osi odciętych (**Rys. 5**).



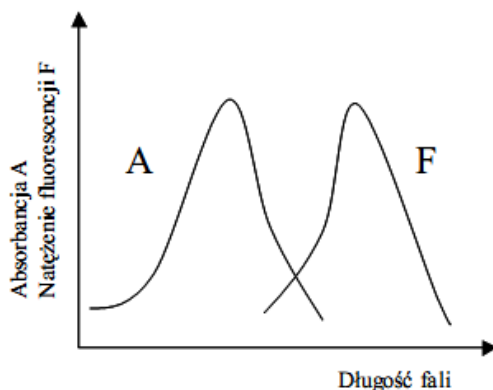
**Rys. 5.** Krzywa zależności natężenia promieniowania fluorescencyjnego od stężenia oznaczanej substancji.

## 6. Metoda fluorymetryczna

Metoda fluorymetryczna opiera się na pomiarze natężenia emitowanego promieniowania fluorescencyjnego powstałego po wzbudzeniu próbki. Intensywność fluorescencji danej substancji jest proporcjonalna do jej stężenia, w pewnym przedziale stężeń.

W pierwszym etapie znajduje się długość fali promieniowania wzbudzającego, dla której przypada maksimum absorpcji. Następnie przy wyznaczonej zgodnie z powyższym opisem długości fali sporządzane jest widmo emisji i uzyskiwana jest informacja o długości fali emisji i maksimum fluorescencji. Jak już wcześniej wspomniano widma promieniowania absorbowanego i emitowanego są przesunięte względem siebie (przesunięcie Stokes'a), a także w większości przypadków zwierciadlane symetrycznie względem prostej prostopadłej

do osi odciętych i przechodzącej przez punkt przecięcia się krzywych obu widm (**Rys. 6**).

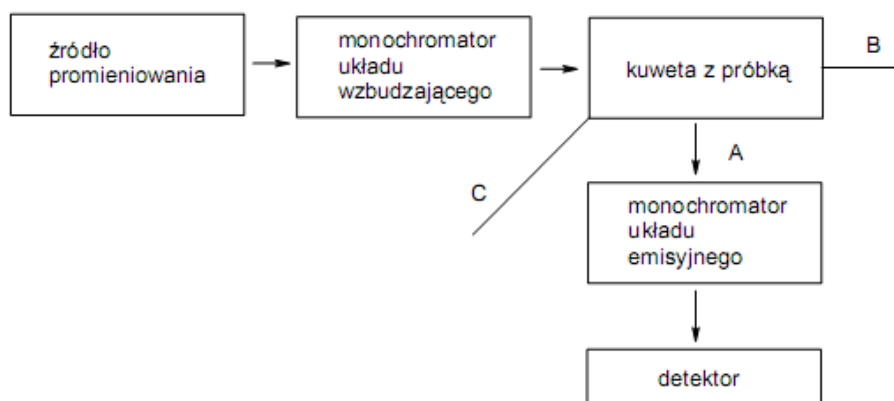


**Rys. 6.** Widma absorpcji (A) i fluorescencji (F) tego samego związku.

Na podstawie serii wzorców o wzrastającym stężeniu oznaczanego składnika przygotowuje się krzywą wzorcową zależności intensywności fluorescencji od stężenia analitu.

## 7. Schemat blokowy aparatury używanej do pomiarów fluorescencyjnych

Aparatura służąca do pomiarów fluorescencyjnych jest bardzo różnorodna, ale można wyróżnić zasadnicze części, z których każdy aparat się składa. Są to: źródło promieniowania wzbudzającego, monochromator promieniowania wzbudzającego, komora pomiarowa z uchwytem na kuetę, monochromator promieniowania emitowanego oraz detektor (**Rys. 7**).



**Rys. 7.** Schemat blokowy spektrofluorymetru: A - detektor umieszczony prostopadle do kierunku promieniowania wzbudzającego, B - detektor umieszczony współosiowo, C - detektor umieszczony pod kątem 45°.

Źródłem promieniowania wzbudzającego najczęściej są lampy rtęciowe i ksenonowe. Oprócz nich stosuje się także lampy wodorowe, deuterowe, halogenowe i wolframowe. Widma promieniowania tych lamp różnią się między sobą, znajdują się w innych obszarach spektralnych. Coraz częściej jako źródło promieniowania wzbudzającego stosuje się lasery w technice pomiarów fluorescencyjnych zwanej LIF (ang. Laser-induced fluorescence). Następnymi elementami w układzie pomiarowym są monochromatory. Zastosowanie tego urządzenia pozwala na wybór wiązki światła o danej długości fali. Często zamiast monochromatorów stosuje się filtry optyczne do wybierania długości fali. Najczęściej stosowanymi detektorami służącymi do rejestracji fluorescencji są fotopowielacze. Detektor może być ustawiony różnie wobec kierunku promieniowania wzbudzającego (**Rys. 7**, oznaczenia A, B, C). Jednak najczęściej ustawia się go prostopadle ze względu na to, że do monochromatora dochodzi światło emitowane przez próbkę, a nie światło przechodzące przez próbkę.

## 8. Zastosowanie fluorymetrii

Jednym z zastosowań fluorymetrii są badania kliniczne. Niezwykła czułość tej metody pozwala na oznaczanie aminokwasów we krwi i innych płynach fizjologicznych, szczególnie wtedy, gdy jest dostępna niewielka ilość próbki. Rutynowo wykonuje się oznaczenia fluorymetryczne substancji o znaczeniu biologicznym takich jak np: ryboflawina, tiamina, kwas foliowy.

Jednym z przykładów zastosowania fluorymetrii w biotechnologii jest badanie aktywności enzymów. W takich pomiarach monitoruje się reakcję, w której substrat nie fluoryzujący (lub słabo fluoryzujący) przekształcany jest w fluoryzujący produkt.

W nowoczesnych laboratoriach szeroko stosuje się mikroskopy fluorescencyjne np. do wizualizacji obiektów biologicznych. Przykładem są barwniki używane do sprawdzania żywotności komórek pozwalające na procentowe określenie ilości komórek żywych i martwych.

Spośród związków nieorganicznych niewiele wykazuje fluorescencję i są to np. sole uranu, ceru, samaru. Do fluorescencyjnego oznaczania jonów innych metali wykorzystuje się zjawisko tworzenia fluoryzujących kompleksów m.in. do oznaczenia glinu, cyny czy indu stosuje się 8-hydroksychinolinę jako odczynnik chelatujący. Innym związkiem tworzącym fluoryzujące kompleksy z kationami metali takich jak bor, beryl, german jest moryna. Kompleksy moryny z jonami metali wykazują różną trwałość w zależności od wartości pH. Dzięki temu dobierając odpowiednie pH można oznaczać jeden pierwiastek w obecności innych.

## 9. Zalety fluorymetrii

- wysoka czułość i selektywność – możliwe oznaczenie stężenia 0,01ppm (0,01 µg/ml)
- możliwość oznaczania związków nieorganicznych oraz organicznych
- możliwość zastosowania w badaniach biologicznych
- możliwość oznaczania związków nie fluoryzujących przez tworzenie fluoryzujących kompleksów

## 10. Wady fluorymetrii



- Duża wrażliwość na warunki otoczenia. Próbką powinna być przygotowywana i przechowywana w tych samych warunkach, jak roztwory wzorcowe używane do przygotowania krzywej kalibracyjnej
- Wysoki koszt aparatury pomiarowej.

## 11. Glin

Glin oznaczany symbolem Al to pierwiastek chemiczny o masie atomowej 26,98 u i liczbie atomowej 13. Wraz z borem, galem, indem i talem należy do 13 grupy układu okresowego – tzw. borowce. Oprócz boru wszystkie pierwiastki tej grupy są pierwiastkami metalicznymi. Odkrycie glinu zawdzięcza się duńskiemu chemikowi i filozofowi – Oerstedowi, który to w 1825 roku w reakcji  $AlCl_3$  z amalgamatem potasowym otrzymał glin.

Al to srebrzystobiały metal o niebieskawym odcieniu jest kowalnym i ciągliwym pierwiastkiem, jednym z najlepszych przewodników ciepła i prądu elektrycznego. W odpowiednich warunkach może być też nadprzewodnikiem. Ze względu na swoje właściwości fizyczne metal ten można nitować, sklejać, spawać, emaliować, odlewać, wyciągać w rury, w cienki drut, a nawet formować w bardzo cienkie folie. Glin jest pierwiastkiem występującym na III stopniu utlenienia, bardzo rzadko na I i II stopniu. Na powietrzu ulega pasywacji i pokrywa się cienką, niewidoczną i szczelną warstewką  $Al_2O_3$  zapobiegającą dalszemu utlenianiu. Wykazuje właściwości amfoteryczne.

Znaczenie użytkowe glinu wciąż wzrasta. Wyroby codziennego użytku, przewody elektryczne, folia aluminiowa to najbardziej znane wykorzystanie glinu. Oprócz wymienionych glin jest składnikiem licznych farb, materiałów wybuchowych i pirotechnicznych. Granulowana forma glinu wykorzystywana jest do wydzielania innych metali tj. chromu, manganu, wanadu z ich tlenków –tzw. aluminotermia. Szerokie zastosowanie znajdują też sole glinu. Chlorek glinu wykorzystywany jest w przemyśle kosmetycznym, a inne związki glinu także w medycynie np. lek przeciw nadkwasocie, środki antyseptyczne i ściągające.

Glin może się dostawać do naszego organizmu:

1. **drogą oddechową** (tu znaczenie ma przede wszystkim narażenie zawodowe),
2. **drogą pokarmową** (żywność i leki stosowane przy nadkwasocie, przeciwzapalne i przeciwbólowe),
3. **przez krew** (dializy i szczepionki),
4. **przez skórę** (kosmetyki oraz żele przeciw stłuczeniom i obrzękom).

Jeśli chodzi o wchłanianie płucne związane z narażeniem zawodowym, to nie jest znana jego wydajność. Prawdopodobnie liczy się wielkość cząstek oraz zawartość w nich związków rozpuszczalnych. Płuca w miarę możliwości oczyszczają się bowiem z pyłów. Pyły mogą też dostać się do organizmu **przez śluzówki nosa** – jest to tzw. transport aksonalny, przez który glin dostaje się bezpośrednio do mózgu.

Badania na zwierzętach wskazują, że aluminium przedostaje się do organizmu przez nieuszkodzoną skórę, nie mamy jednak danych ilościowych. Badania przeprowadzone z aplikacją chlorowodoru glinu na skórę (składnik antyperspirantów) wskazywały na wchłanianie rzędu 0,002 – 0,07%, a więc bardzo słabe. Jednak badania wskazują na konieczność zachowania ostrożności przy stosowaniu na skórę podrażnioną bądź uszkodzoną, bo zwiększa to wchłanianie.

W codziennym życiu narażeni jesteśmy na **wchłanianie aluminium z przewodu pokarmowego**. Skala zależy od wielu czynników, takich jak wielkość dawki, stężenia i formy chemicznej związku, obecności innych metali czy też czynników kompleksujących. Według WHO dopuszczalna dawka glinu wynosi 7 mg/kg masy ciała/tydzień, co w przeliczeniu na dzień daje 1mg glinu na 1 kg masy ciała dziennie. Człowiek o średniej masie 70 kg mógłby zatem bez szkodliwego wpływu na zdrowie człowieka przyjąć ok. 70 mg glinu. Szacowane dzienne spożycie glinu waha się w przedziale od 10 do 100 mg glinu. Zalecany przez ekspertów poziom dopuszczalnego przyjmowania glinu możliwy jest tylko i wyłącznie przy zachowaniu odpowiedniego reżimu w przetwórstwie, przygotowywaniu i magazynowaniu żywności oraz odpowiednim stylu życia (np. unikanie przyjmowania leków przeciw nadkwasocie zawierających potężne ilości glinu).

Na podstawie licznych badań stwierdzić można, że glin zawarty jest we wszystkich produktach spożywczych, oczywiście także w żywności nieprzetworzonej, w wyniku skażenia gleby czy wody, to samo tyczy się wody wodociągowej. Dodatkowymi źródłami glinu będą natomiast różne **dotatki do żywności, naczynia, folia aluminiowa, puszki na żywność i napoje, aluminiowe foremki do pieczenia oraz kartony na soki czy mleko wyłożone cienką warstwą aluminium**. Uwalnianie z nich związków rozpuszczalnych glinu zależy będzie od pH żywności oraz od obecności soli kuchennej. Wydaje się więc zasadne ograniczenie użycia tego typu materiałów w kontakcie z jedzeniem i piciem. Badania wykazały, że wielkość migracji jonów glinu zależy od rodzaju aluminium, z którego wykonane jest naczynie, pH żywności, czasu kontaktu oraz obecności soli. Migrację glinu z naczyń aluminiowych do żywności dla wybranych produktów przedstawiono w tabeli 2.

Tab. 2. Migracja glinu z naczyń aluminiowych do żywności [4]

Rodzaj potrawy	Stężenie glinu [mg/kg produktu]		
	Bez gotowania	Gotując w naczyniu	
		aluminiowym	stalowym
pomidory	0,10	75,1	0,16
kapusta	0,13	36,1	0,20
sok jabłkowy	0,13	7,1	0,12
kurczak	0,47	1	0,66
ryż	1,5	1,7	1,7

Obecność glinu w organizmie zaburza procesy metaboliczne przebiegające w organellach komórkowych. Wpływ na metabolizm komórkowy polega, między innymi, na:

1. blokowaniu enzymów aktywowanych przez jony wapnia i magnezu,
2. utrudnianiu podziału komórkowego,
3. degradacji włókien nerwowych.

Związki przekazujące bodźce nerwowe (neurotransmitery) również ulegają blokującej roli glinu. Istnieje prawdopodobieństwo, że glin jest czynnikiem etiologicznym klasycznej choroby Parkinsona i Alzheimerera. Rola glinu w chorobie Alzheimerera jest tematem wielu badań. Uważa się, że glin może działać jako czynnik środowiskowy, przyspieszający rozwój choroby. W badaniach histologicznych mózgu osób zmarłych w wyniku procesów neurodegeneracyjnych stwierdza się wyższy poziom glinu w miejscach objętych zmianami

zwyróżnieniowymi. Według licznych badań stężenie  $Al^{3+}$  w tkance mózgowej osób zmarłych na chorobę Alzheimera wynosi 1-11,5 mg/kg suchej masy, podczas gdy u osób zmarłych z innych przyczyn tylko 0,23-2,7 mg/kg suchej masy. Badania epidemiologiczne również wskazują na wprost proporcjonalną zależność między liczbą zachorowań a stężeniem różnych form glinu dostępnych w środowisku. Dowodem na to jest zwiększona zachorowalność na choroby neurozwyrodnieniowe rdzennych mieszkańców wyspy Guam na Oceanie Spokojnym jak i imigrantów z Filipin, mieszkańców Nowej Gwinei oraz półwyspu Kii w Japonii – terenów bogatych w złoża boksytu. Bliskość skał osadowych bogatych w wodorotlenki glinu pociągała za sobą wysokie stężenie  $Al^{3+}$  w glebach i wodzie pitnej przy równoczesnym niedoborze jonów  $Mg^{2+}$  oraz  $Ca^{2+}$ .

Również w Europie odnotowywano zwiększoną liczbę zgonów wywołanych starczą demencją w wyniku większego narażenia na glin. Badania tomografii komputerowej pacjentów z 88 gmin w Anglii i Walii również potwierdzają tezę o korelacji choroby Alzheimera z zawartością glinu. W gminach w których stężenie glinu w wodach pitnych przekraczała 0,11 mg/l zapadalność na chorobę Alzheimera była 1,5 razy wyższa niż w rejonach, gdzie poziom glinu w wodzie pitnej był niższy niż 0,01 mg/l [4].

1. A. Filipowicz-Szymańska, J. Łopacińska, Materiały do ćwiczeń, Politechnika Warszawska, Warszawa 2009.
2. A. Cygański, Metody spektroskopowe w chemii analitycznej, Warszawa, Wydawnictwo Naukowo-Techniczne 2002.
3. J. Kęcki, Podstawy spektroskopii molekularnej, Warszawa, PWN 1998.
4. J. Zuziak, , M. Jakubowska, Glin w otoczeniu i jego wpływ na organizmy żywe, Analit 2 (2016) 110–120

## Spektrofluorymetryczne oznaczanie zawartości glinu w Altacecie

**Cel ćwiczenia:** Zapoznanie z metodyką pomiarów spektrofluorymetrycznych w badaniach związków aktywnych biologicznie.

### Zasada oznaczenia.

W metodzie tej wykorzystuje się tworzenia chelatowego kompleksu glinu z moryną (prawdopodobnie o składzie 1:1), wykazującego intensywną zieloną fluorescencję.

### Sprzęt

- spektrofluorymetr Hitachi F – 2710
- kuweta kwarcowa
- zlewki, kolby miarowe, pipetki Pasteura, pipety szklane,

### Wykonanie ćwiczenia.

Podstawowy roztwór glinu: rozpuścić 0,4397 g ałunu  $KAl(SO_4)_2 \cdot 12H_2O$  w wodzie z dodatkiem 3 kropel stężonego kwasu siarkowego(VI) i rozcieńczyć roztwór wodą w kolbie miarowej o pojemności 25 ml. 1 ml tego roztworu zawiera 1 mg Al.

Roztwór o stężeniu 0,01 mg Al/ml otrzymać przez odpowiednie rozcieńczenia roztworu podstawowego w kolbie o pojemności 100 ml.

### Przygotowanie roztworów wzorcowych.

Do 5 kolb miarowych pojemności 25 ml odmierzyć: 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 3,0 ml roztworu soli glinu o stężeniu 0,01 mg/ml, dodać po 10 ml wody redestylowanej, 3 ml 0,1-proc. alkoholowego roztworu moryny i kwasu octowego (roztwór 80-proc.) o pH 3. Roztwory uzupełnić wodą redestylowaną do kreski, wymieszać i odstawić. Po **20 min** zmierzyć natężenie fluorescencji, które odczytuje się na skali transmitancji (skala liniowa), przy  $\lambda = 436$  nm względem wody jako odnośnika.

### Przygotowanie roztworów próbek badanych

1. Na wadze analitycznej odważyć **1 g żelu Altacet**.
  2. Przygotowaną odważkę rozpuścić w kolbie o objętości 100 ml w wodzie redestylowanej.
  3. Do dwóch kolbek miarowych pojemności 25 ml pobrać po 5 ml roztworu badanego i wykonać oznaczenie w ten sam sposób, jak w przypadku roztworów wzorcowych.
- 
1. **Tabletkę Altacetu** rozetrzeć w moździerzu porcelanowym.
  2. Na wadze analitycznej odważyć 1 g rozartej tabletki.
  3. Odważkę przenieść ilościowo do kolby o objętości 100 ml i rozpuścić w wodzie destylowanej.
  4. Roztwór przesączyć.
  5. Do kolby o objętości 100 cm<sup>3</sup> przenieść ilościowo 1 ml roztworu próby badanej. Kolbę uzupełnić wodą i wymieszać.
  6. Do dwóch kolbek miarowych pojemności 25 ml pobrać po 5 ml roztworu badanego i wykonać oznaczenie w ten sam sposób, jak w przypadku roztworów wzorcowych.

### Opracowanie wyników

1. Od wartości natężenia fluorescencji każdego roztworu wzorcowego glinu należy odjąć wartość natężenia fluorescencji ślepej próby.
2. Sporządzić wykres kalibracyjny tj. zależności natężenia fluorescencji od stężenia glinu  $f(c)=I_f$ . Na wykresie umieścić legendę (model aparatu, nazwę oznaczanej substancji, długość drogi optycznej, analityczną długość fali wzbudzenia  $\lambda_{EX}$  i emisji  $\lambda_{EM}$ ). wykreślić krzywą wzorcową  $I_F = f(c)$ ,
3. Na podstawie krzywej wzorcowej i zmierzonej wartości natężenia fluorescencji obliczyć stężenie glinu w badanym roztworze, a następnie przeliczyć na zawartość glinu w żelu/tabletce altacetu.