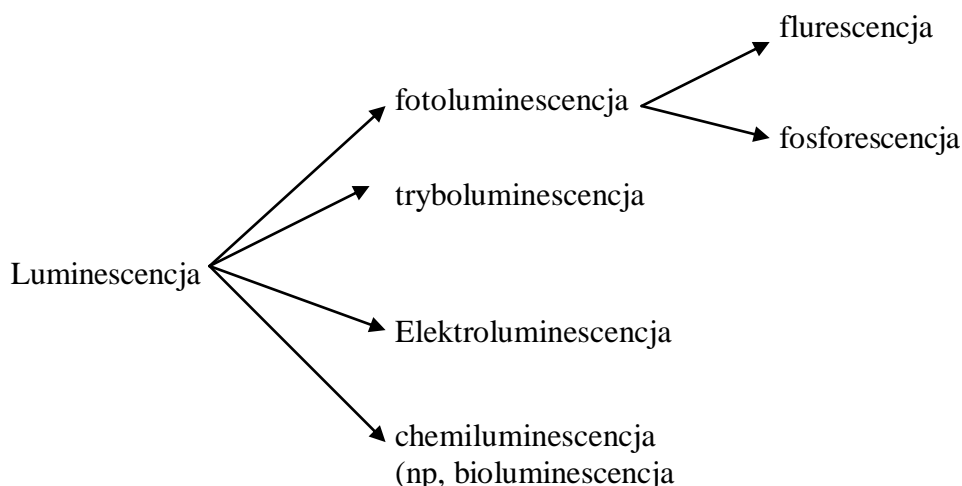


Spektrofluorymetryczne oznaczanie zawartości tiaminy

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.



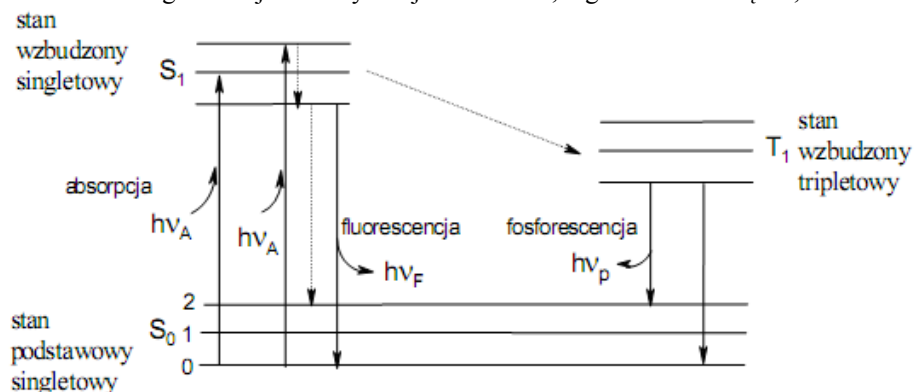
Rys.1. Rodzaje luminescencji.

- ✓ 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

Zakład Chemii Nieorganicznej i Analitycznej – dr J. Pusz, mgr inż. E. Pieniążek, E. Woźnicka
fluorescencji przesuwa się w stronę fal dłuższych.

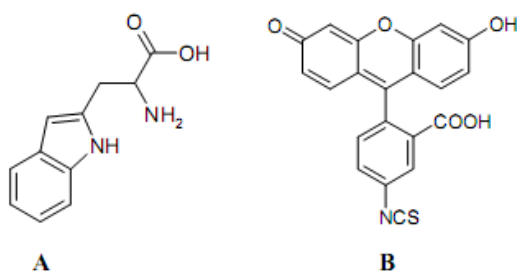
Fluorescencja i fosforescencja różnią się czasem zaniku, co ma związek z różnym mechanizmem przejść elektronowych. Zjawisko fluorescencji zachodzi, gdy elektron przechodzi bezpośrednio ze stanu wzbudzonego do niższego, o tej samej multipletowości. Ze zjawiskiem fosforescencji mamy do czynienia, gdy po 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:

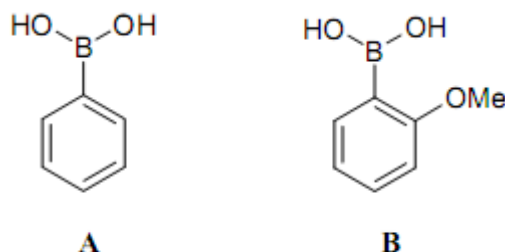
1. Związki aromatyczne i heterocykliczne
2. Niektóre barwniki (np. fluoresceina, eozyna, rodamina)
3. Związki biologiczne:
 - a. aromatyczne aminokwasy (np. tryptofan),
 - b. zasady nukleinowe (adenina, guanina, cytozyna, tymina, uracyl) w DNA i RNA,
 - c. chlorofil i karotenoidy (barwniki roślinne),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

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: Φ_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, β -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	Φ_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° 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 spektrofluorymetrii powinny być odgazowane. Jeżeli stężenie tlenu w roztworze wynosi 10^{-3} M, wówczas dla większości związków natężenie promieniowania fluorescencji zmniejsza się o 20%.

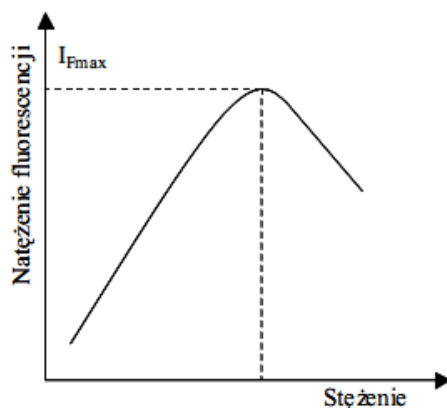
5.3. Stężenie substancji fluoryzującej

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**).

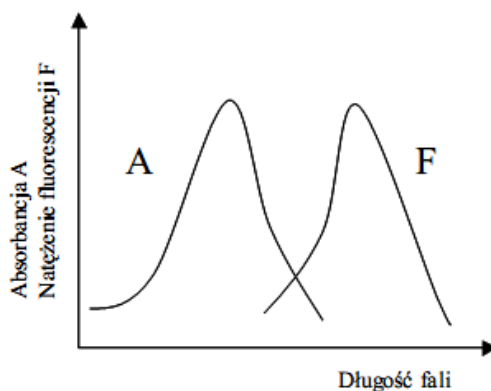


Rys. 5. Krzywa zależności natężenia promieniowania fluorescencyjnego od stężenia oznaczanej substancji.

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**).

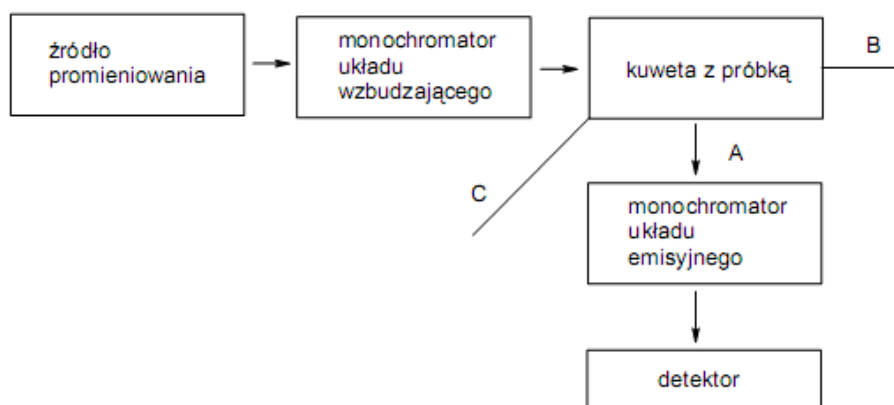


Rys. 6. Widma absorpcji (A) i fluorescencji (F) tego samego związku.

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 są różniące 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,

Zakład Chemii Nieorganicznej i Analitycznej – dr J. Pusz, mgr inż. E. Pieniążek, E. Woźnicka
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.

Pośród 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. Próbkę powinna być przygotowywana i przechowywana w tych samych warunkach, jak roztwory wzorcowe używane do przygotowania krzywej kalibracyjnej
- Wysoki koszt aparatury pomiarowej.

Literatura

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.

Spektrofluorymetryczne oznaczanie zawartości tiaminy

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

Sprzęt

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

Odczynniki

- roztwór chlorowodorku tiaminy o stężeniu 100 µg/ml w 0,05 mol/l roztworze kwasu siarkowego (VI)
- roztwór kwasu siarkowego (VI) (H₂SO₄) o stężeniu 0,05 mol/l
- roztwór wodorotlenku potasu (KOH) o stężeniu 5,4 mol/l (**roztwór 1**)
- 4 % roztwór heksacyjanożelazianu (III) potasu [K₃Fe(CN)₆] (**roztwór 2**)
- **odczynnik utleniający sporządzić bezpośrednio przed użyciem poprzez zmieszanie roztworu (1) i roztworu (2) w stosunku 25:1**

Przygotowanie odczynnika utleniającego (na świeżo)

- W zlewce o pojemności 100 ml przygotować odczynnik utleniający. W tym celu należy zmieszać **60 ml roztworu wodorotlenku potasu** (5,4 mol/l) z **2,4 ml roztworu heksacyjanożelazianu (III) potasu** (4%). Mieszaniny utleniającej nie należy przechowywać dłużej niż przez 4 godziny.

Sporządzenie wzorcowych roztworów chlorowodorku tiaminy

- Do 6 ponumerowanych kolbek o pojemności 50 ml odmierzyć kolejno: 0,0; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 i 3,0 ml **roztworu chlorowodorku tiaminy** o stężeniu **100 µg/ml** i uzupełnić do objętości końcowej 12 ml roztworem kwasu siarkowego (VI) (0,05 mol/l) zgodnie ze schematem zamieszczonym w tabeli:

L.p.	Objętość roztworu chlorowodorku tiaminy o stężeniu 1 µg/ml [ml]	Objętość roztworu H ₂ SO ₄ o stężeniu 0,05 mol/l [ml]
1.	0,0 (ślepa próba)	12,0
2.	0,5	11,5
3.	1,0	11,0
4.	1,5	10,5
5.	2,0	10,0
6.	3,0	9,0

- Otrzymuje się wzorce chlorowodorku tiaminy o stężeniu **0,00; 2,5; 5,0; 7,5; 10,0; 5,0 µg/ml**

Przygotowanie roztworów próbek badanych (zadanie)

- Na wadze analitycznej odważyć **2 g drożdży instant**.
- Przygotowaną odważkę rozpuścić w 25 ml wody destylowanej (odmierzonej pipetą), następnie odwirować.
- Do kolby odmierzyć **5 ml roztworu próby badanej (zadanie)**, dodać **7 ml 0,05 mol/l roztworu kwasu siarkowego (VI)**.
- Do sporządzonych roztworów wzorcowych chlorowodoru tiaminy oraz do roztworu próby badanej dodać **po 8 ml odczynnika utleniającego i odczekać 10 minut**.

- **Tabletkę witaminy B1** rozetrzeć w moździerzu porcelanowym.
- Na wadze analitycznej odważyć 0,04-0,05 g rozartej tabletki.
- Odważkę przenieść ilościowo do kolby o objętości 50 ml i rozpuścić w wodzie destylowanej.
- Roztwór przesączyć.
- Do kolby odmierzyć **5 ml roztworu próby badanej (zadanie)**, dodać **7 ml 0,05 mol/l roztworu kwasu siarkowego (VI)**.
- Do sporządzonych roztworów wzorcowych chlorowodoru tiaminy oraz do roztworu próby badanej dodać **po 8 ml odczynnika utleniającego i odczekać 10 minut**.

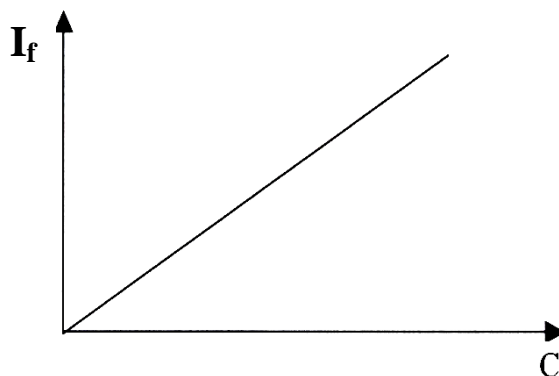
Wykonanie pomiarów natężenia fluorescencji

- Pomiar natężenia fluorescencji należy wykonać zgodnie z instrukcją obsługi spektrofluorymetru dla wzorcowych roztworów chlorowodoru tiaminy i roztworu próbek badanych.
- Zmierzyć natężenie fluorescencji badanych roztworów przy optymalnych długościach fali wzbudzenia λ_{EX} i emisji λ_{EM}
- Pomiar natężenia fluorescencji dla próby badanej (zadanie) należy powtórzyć 3 razy.
- Wyniki pomiarów zestawić w tabeli:

L.p.	Stężenie chlorowodoru tiaminy [$\mu\text{g/ml}$]	Natężenie fluorescencji I_f
1.	0,00 (próba ślepa)	
2.	2,5	
3.	5,0	
4.	7,5	
5.	10,0	
6.	15,0	
	zadanie	
	zadanie	
	zadanie	

Opracowanie wyników

- Od wartości natężenia fluorescencji każdego roztworu wzorcowego chlorowodoru tiaminy należy odjąć wartość natężenia fluorescencji ślepej próby.
- Sporządzić wykres kalibracyjny tj. zależności natężenia fluorescencji od stężenia chlorowodoru tiaminy $f(C)=I_f$. Na wykresie umieścić legendę (model aparatu, nazwę oznaczanej substancji, długość drogi optycznej, analityczną długość fali wzbudzenia λ_{EX} i emisji λ_{EM}).



- ❖ Z wykresu kalibracyjnego odczytać stężenie tiaminy w próbce badanej (zadanie)
- ❖ Obliczyć stężenie tiaminy w próbce badanej (zadanie)