

SPEKTROFLUORYMETRYCZNE OZNACZANIE FLUORESCJEINY

Każda cząsteczka posiada charakterystyczny dla siebie układ poziomów energetycznych: elektronowych, oscylacyjnych i rotacyjnych. W wyniku absorpcji promieniowania ultrafioletowego lub widzialnego cząsteczka przechodzi do jednego ze stanów wzbudzonych, a następnie dąży do osiągnięcia stanu równowagi, czyli stanu, w którym energia całkowita przyjmuje wartość minimalną (emisja energii).

Luminescencja to rodzaj emisji promieniowania elektromagnetycznego, który następuje w czasie nie krótszym niż 10^{-10} s po zaabsorbowaniu energii przez atomy lub cząsteczki danej substancji. Ze względu na czynnik, który wywołuje promieniowanie, luminescencję dzielimy na: fotoluminescencję wywołaną absorpcją fotonów w zakresie UV-VIS (fluorescencja, fosforescencja), chemiluminescencję wytwarzaną w trakcie niektórych reakcji chemicznych, bioluminescencję wywołowaną w wyniku procesów biochemicznych zachodzących w organizmach żywych, elektroluminescencję powstającą na skutek zderzeń cząsteczek obdarzonych ładunkiem elektrycznym z luminoforem, tryboluminescencję wywołowaną poprzez tarcie, zginanie, ściskanie, rentgenoluminescencję wywołowaną promieniowaniem rentgenowskim, radioluminescencję czyli świecenie pod wpływem promieniowania α , β , γ , sonoluminescencję wywołowaną ultradźwiękami, termoluminescencję powstającą podczas ogrzewania substancji, która wcześniej została pobudzona przez światło.

Metody fluorymetryczne stosuje się do oznaczania śladowych ilości substancji wykazujących fluorescencję. Zaletą ich jest wysoka czułość (można oznaczać zarówno substancje organiczne, jak i nieorganiczne o stężeniach 0.01 ppm), precyzja (RSD < 1%), selektywność (dają dużą możliwość selekcji poprzez możliwość doboru długości fali promieniowania wzbudzającego oraz emitowanego).

Zasada metody

Fluorymetria to instrumentalna metoda analityczna, która wykorzystuje zjawisko emisji promieniowania fluorescencyjnego przez cząsteczki oznaczanego składnika. Pomiar natężenia promieniowania fluorescencyjnego emitowanego po odpowiednim wzbudzeniu substancji oznaczanej jest wykonywany pod kątem 90° w stosunku do wiązki światła padającego na roztwór. Analiza wykorzystuje zależność natężenia promieniowania fluorescencyjnego od stężenia substancji oznaczanej.

Aparatura

Aparat Specol z przystawką FK.

Odczynniki

Roztwór fluoresceiny o stężeniu 5 μ g/mL.

Roztwór NaOH o stężeniu 0.05 mol/L.

Wykonanie oznaczenia

1. Przygotowanie roztworów do krzywej kalibracji i próbki

Do 6 kolbek miarowych pojemności 50 mL odmierzyć:

a. 0, 1, 2, 3, 4, 5 mL roztworu fluoresceiny

dołączyć próbkę badaną

b. 10 mL 0.05 mol/L roztworu NaOH (roztwór fluoryzuje tylko w środowisku zasadowym)

c. dopełnić wodą destylowaną do objętości 50 mL i dokładnie wymieszać

2. Wykonanie pomiarów

Pomiary natężenia fluorescencji roztworów wzorcowych i próbki badanej wykonać przy $\lambda_{\max} = 491 \text{ nm}$

3. Opracowanie wyników

Używając programu Statistica narysować wykres krzywej kalibracji ($\mathbf{F} = \mathbf{f}(\mathbf{z})$) i odczytać z niej zawartość fluoresceiny w badanej próbce (μg).

W oparciu o równanie prostej $F = az + b$ obliczyć zawartość fluoresceiny w próbce badanej.

$$y = ax + b \leftrightarrow \mathbf{F} = \mathbf{az} + \mathbf{b}$$