

FLUORIMETRICKÉ STANOVENÍ FLUORESCEINU

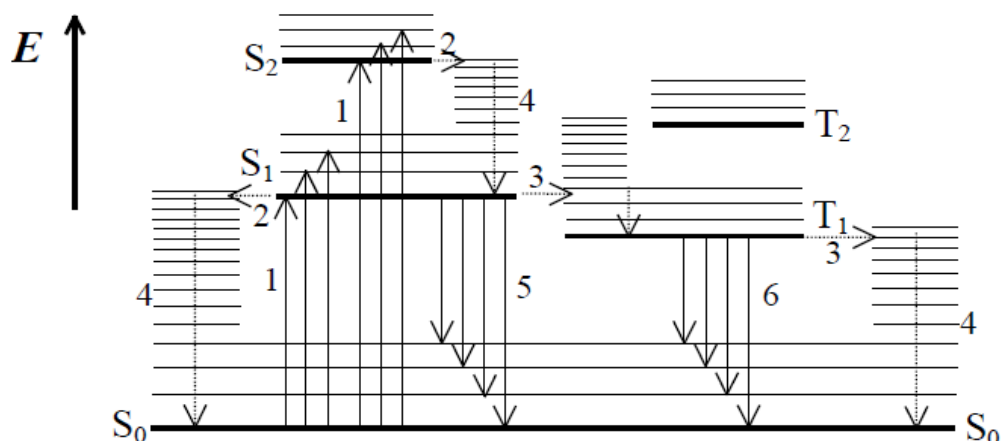
*návod vznikl jako součást bakalářské práce Martyiny Vidrmanové
„Fluorimetrie s využitím spektrofotometru SpectroVis Plus firmy Vernier“
(http://is.muni.cz/th/268973/prif_b/Bakalarska_prace.pdf)*

Teorie

Fluorimetrie využívá jevu **fotoluminiscence**. Fluoreskující látka je excitována monochromatickým světlem, čímž se některý z valenčních elektronů vybudí do vyšší energetické hladiny. Při návratu zpět do původního energetického stavu promaří část energie jako teplo, část vyzáří ve formě fotonu. Energie emitovaného záření je proto vždy nižší než energie záření excitačního, tj. emitované světlo má větší vlnovou délku. Emitované světlo se snímá zpravidla ve směru kolmém na excitační paprsek a po průchodu **emisním monochromátorem** se jeho intenzita měří **fotonásobičem**.

V základním stavu S_0 většinou obsazují vždy dva elektrony stejný elektronový stav s opačným spinem. Jejich spiny se vzájemně kompenzují, takže celkové spinové kvantové číslo molekuly je 0. Takový stav molekuly je označován jako **singletní**. I po excitaci jednoho valenčního elektronu na vyšší elektronovou hladinu mohou elektrony zachovat svůj celkový spin, což je vyznačeno řadou excitovaných singletních stavů molekuly S_1 , S_2 atd. Po excitaci však již dva elektrony nejsou spárovány a jejich celkové spinové kvantové číslo také může mít hodnotu 1. Molekula se pak nachází ve stavu označovaném jako **tripletní**, kterých opět může být celá řada (T_1 , T_2 ,...). Přechody molekuly mezi singletním a tripletním stavem jsou o několik řádů pomalejší, než podobné přechody uvnitř řady singletních stavů a uvnitř řady tripletních stavů.

Každý elektronový stav je v důsledku vibračního pohybu molekuly, který zvyšuje její celkovou energii, tvořen sérií **vibračních hladin**. Hladina elektronového stavu s nejnižší vibrační energií je označována jako základní vibrační hladina elektronového stavu. Ve stavu tepelné rovnováhy se za normálních teplot převážná část molekul nachází na základní vibrační hladině stavu S_0 . Při absorpci záření je energie absorbovaného fotonu spotřebována na převedení molekuly do excitovaného stavu.



obr. 1 – Schéma energetických hladin molekuly a přechodů mezi nimi

S₀ – základní stav, S₁, S₂ – excitované singletní stavy, T₁, T₂ – excitované tripletní stavy; 1 – absorpce záření, 2 – vnitřní konverze, 3 – mezisystémový přechod, 4 – vibrační relaxace, 5 – fluorescence, 6 – fosforescence

Při absorpci záření je energie absorbovaného fotonu spotřebována na převedení molekuly do excitovaného stavu (děj 1). Po absorpci fotonu excitovaná molekula velmi rychle předává získanou energii svému okolí a tzv. nezářivými přechody (vnitřní konverze – děj 2, mezisystémový přechod – děj 3) následovanými vibrační relaxací (děj 4) se dostává postupně do nižších excitovaných stavů. Pomalejší bývá většinou až nezářivý přechod ze základní vibrační hladiny prvního excitovaného stavu S₁ do základního stavu S₀. Teprve mezi těmito hladinami se vedle nezářivých přechodů může uplatnit přechod spojený s vyzářením (emisí) fotonu. Tato emise záření je označována jako **fluorescence** (děj 5). Její doba dosvitu po přerušení excitace bývá řádově 10⁻⁶ až 10⁻⁹ s. Většinou až z hladiny S₁ se případně uplatní i nezářivý mezisystémový přechod do některého z tripletních stavů. Zářivý přechod ze základní vibrační hladiny nejnižšího tripletního stavu T₁ do základního stavu S₀ má dlouhou dobu dosvitu řádu 10⁻³ až 10¹ s a je označován jako **fosforescence** (děj 6).

Kromě dějů výše zmíněných se může uplatnit i vliv dalších komponent přítomných v roztoku, které deaktivují stav S₁ a tak zhasí fluorescence. Tyto látky jsou označovány jako **zhášedla** (angl. „quenchers“). Mezi nejběžnější zhášedla patří kyslík a také látky obsahující prvky s vyšším atomovým číslem. I samotná fluoreskující látka může při vyšších koncentracích snižovat kvantový výtěžek. Hovoříme pak o koncentračním zhasení fluorescence.

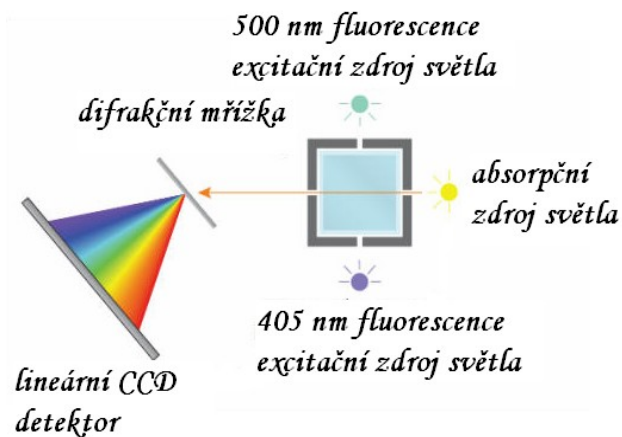
I když tvar emisního spektra není závislý na podmínkách excitace, mění se celkový fluorescenční zářivý tok. Proto je účelné použít jako charakteristiku emisních vlastností látky spektrální zářivý tok vztažený např. na spektrální zářivý tok v maximu této závislosti. Takto definované emisní spektrum je bezrozměrné a v maximu má hodnotu 1. Pokud fluoreskující roztok v kyvetě čtvercového průřezu obsahuje jedinou absorbující složku, která má schopnost fluoreskovat, platí pro absorpci excitačního záření Lambertův-Beerův zákon

$$A = c \cdot l \cdot \varepsilon$$

kde A je absorbance roztoku, ε je molární absorpční koeficient složky, l je tloušťka kyvety a c je látková koncentrace fluoreskující složky v roztoku.

Přístroj pro měření fluorescenčního záření je označován jako fluorimetr. Pokud můžeme přístrojem měřit excitační a emisní spektra, bývá pro zdůraznění této skutečnosti používáno označení **spektrofluorimetr**. Schéma fluorimetru je znázorněno na **obr. 2**.

Ze záření vysílaného intenzivním excitačním zdrojem izolujeme primárním (excitačním) filtrem nebo monochromátorem záření těch vlnových délek, které chceme použít pro excitaci vzorku. Toto záření dopadá na vzorek a excituje v něm fluorescenční záření. Fluorescenční záření vystupuje ze vzorku všemi směry. Jenom jeho část vystupuje v takovém směru, že prochází přes sekundární (emisní) filtr nebo monochromátor a dopadá na fotoelektrický detektor. Zde vyvolá elektrický signál, který se dále zesiluje a měří. Jeho velikost je mírou fluorescenčního zářivého toku vysílaného vzorkem na vlnových délkách izolovaných emisním filtrem (monochromátorem). Podmínky buzení jsou přitom určeny zdrojem excitačního záření a primárním filtrem (nastavením excitačního monochromátoru). Pokud je přístroj v excitačním optickém systému vybaven monochromátorem, můžeme plynule měnit vlnovou délku, na kterou je tento monochromátor nastaven, a zaznamenat excitační spektrum vzorku. Pokud je přístroj vybaven monochromátorem v emisním optickém systému, můžeme plynule měnit vlnovou délku, na kterou je nastaven tento monochromátor, a zaznamenat emisní spektrum vzorku.



obr. 2 – Schéma SpectroVis Plus spektrometru



obr. 3 – spektrometr SpectroVis Plus

Úkoly

1. Seznámení s metodou fluorimetrie
 - Obecná instrumentace
2. Stanovení koncentrace fluoresceinu
 - Příprava kalibračních roztoků fluoresceinu
 - Měření absorbance a fluorescence kalibračních roztoků
 - Stanovení koncentrace fluoresceinu ve známém a neznámém vzorku při dvou vlnových délkách
3. Vyhodnocení analýzy
 - kalibrační závislost, limity detekce

Chemikálie

Fluorescein, methanol

Přístroje

Vernier SpectroVis Plus

Sklo + pomůcky

25 ml odměrná baňka (5×), mikropipeta (20-200 μL), křemenná kyveta, 50 ml a 25 ml kádinka

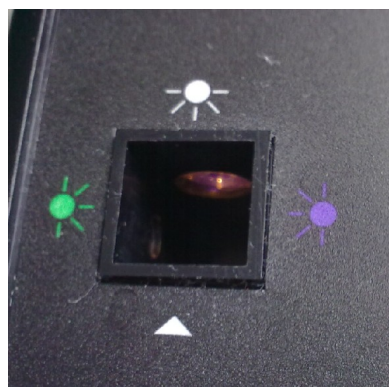
Obecná instrumentace



obr. 4 – spektrometr



obr. 5 – fluorescence



obr. 6 – absorbance

Postup

Příprava kalibračních roztoků

Na analytických vahách navážíme 0,005 g fluoresceinu, rozpustíme v kádince a kvantitativně převedeme do odměrné baňky. Doplníme methanolem po rysku. Pro úplné rozpuštění fluoresceinu vložíme odměrnou baňku do ultrazvukové vany (5 až 10 min). Po vyjmutí odměrné baňky si připravíme z tohoto roztoku kalibrační roztoky. Do 9 odměrných baněk (25 ml) připravíme roztoky o koncentracích $1 - 3 \times 10^{-5}$, jak je uvedeno v tabulce.

Příprava spektrofluorimetru k měření



obr. 7 – zapojení spektrometru

Zapojíme spektrofluorimetr k počítači dle obrázku 7, zapneme program Logger Pro 3, myší klikneme na ikonu Experiment → Calibrate → Spectrometer:1. Počkáme 90 s, pak vložíme do spektrofluorimetru kyvetu s destilovanou vodou → odklikneme Finish Calibration a za pár vteřin můžeme dokončit kalibraci potvrzením OK.

Měření absorbance

Do kyvety připravíme blank, vložíme do fluorimetru, klikneme na collect (zelené tlačítko). Klikneme na stop (červené tlačítko), odečteme hodnotu maximální vlnové délky. Z hodnot části lineárního spektra vypočítáme směrodatnou odchylku, slouží k výpočtu limitu detekce. Proměříme všechny kalibrační roztoky, známý i neznámý vzorek (postupujeme od nejnižší koncentrace po nejvyšší). Zapsané hodnoty absorbance vyneseme do grafu a z kalibrační závislosti koncentrace na absorbanci zjistíme koncentraci fluoresceinu v neznámém vzorku.

Měření fluorescence

Klikneme na ikonu Experiment → Change Units → Spectrometer:1 → Fluorescence 405 nm a proměříme kalibrační roztoky při vlnové délce 405 nm. Hodnoty fluorescence vyneseme do grafu a z kalibračního grafu zjistíme koncentraci neznámého vzorku.

Opět klikneme na ikonu Experiment → Change Units → Spectrometer:1 → Fluorescence 500 nm → a proměříme kalibrační roztoky při vlnové délce 500 nm. Hodnoty fluorescence vyneseme do grafu a z kalibračního grafu zjistíme koncentraci neznámého vzorku.

Vyhodnocení

Do protokolu uvedeme: směrodatnou odchylku (výběrovou), relativní směrodatnou odchylku, směrodatnou odchylku průměru, Grubbsův test, limity detekce.

Směrodatná odchylka

$$s = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}$$

Při malém počtu paralelních stanovení ($n \ll 10$) lze směrodatnou odchylku odhadnout z rozpětí R

$$s_R = k_n \cdot R$$

Relativní směrodatná odchylka

$$s_r = \frac{s}{\bar{x}}$$

Směrodatná odchylka průměru

$$s_{\bar{x}} = \frac{s}{\sqrt{n}}$$

n – počet naměřených hodnot

Grubbsův test

$$T_1 = \frac{\bar{x} - x_1}{S} \quad \text{nebo} \quad T_n = \frac{x_n - \bar{x}}{S}$$

x – naměřená hodnota, s – směrodatná odchylka, T_α – kritická (tabelovaná) hodnota
Je-li $T_1 (T_n) \geq T_\alpha$, výsledek je odlehlý a je třeba vyloučit jej ze souboru testovaných hodnot.

Limit detekce

ΔI ... rozdíl mezi absorbancí (intenzitou fluorescence) blanku a absorbancí
(intenzitou fluorescence) roztoku o nejnižší koncentraci

δ ... směrodatná odchylka části spektra blanku

c_x ... nejnižší koncentrace roztoku

LOD ... limit detekce; nejnižší hodnota, která lze detekovat

$$x = \frac{\Delta I}{3\delta} \quad LOD = \frac{c_x}{x}$$

Tabulka

Pořadí	V (μL) fluores ceinu v baňce	c (mol/l)	A absorbance	F fluorescence při 405 nm	F fluorescence při 500 nm
1.		$1,00 \times 10^{-5}$			
2.		$1,25 \times 10^{-5}$			
3.		$1,50 \times 10^{-5}$			
4.		$1,75 \times 10^{-5}$			
5.		$2,00 \times 10^{-5}$			
6.		$2,25 \times 10^{-5}$			
7.		$2,50 \times 10^{-5}$			
8.		$2,75 \times 10^{-5}$			
9.		$3,00 \times 10^{-5}$			
Vzorek o známé konc.					
Vzorek o nezn.konc.					