

Molekulska fluorescenčna spektrometrija

Pri vzbujanju molekul s svetlobo le-te preidejo iz osnovnega v vzbujeno stanje. Molekule večine spojin izgubijo absorbirano energijo v obliki sproščene toplote pri trkih z drugimi molekulami. Nekatere spojine pa pri vračanju v osnovno stanje del energije oddajo v obliki svetlobe. Emitirana svetloba ima daljšo valovno dolžino kot absorbirana svetloba. Pojav imenujemo fluorescenca.

Za raztopine z nizko koncentracijo analita velja, da je intenziteta fluorescence linearno sorazmerna koncentraciji analita in intenziteti vzbujevalne svetlobe. Če so vsi eksperimentalni parametri konstantni, velja zveza:

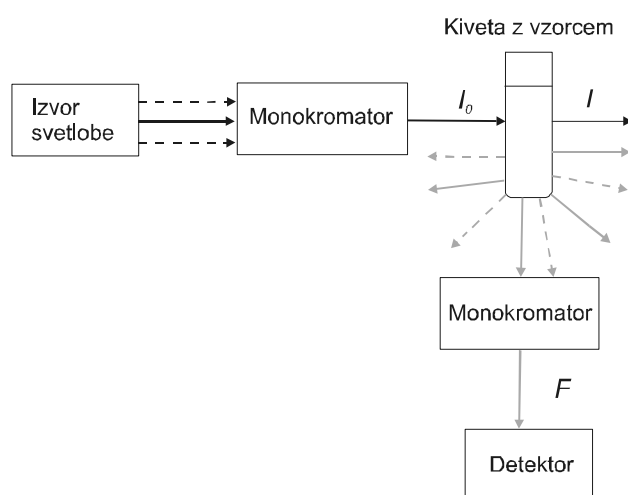
$$F = k \cdot c,$$

pri čemer je F intenziteta fluorescence, k je konstanta, c pa koncentracija analita.

Pri višjih koncentracijah zveza ni več linearna, saj molekule analita znatno absorbirajo emitirano svetlobo (samoabsorpcija).

Aparatura za molekulska fluorescenčna spektroskopija je sestavljena iz izvora svetlobe, monokromatorja za izbiro valovne dolžine vzbujevalne svetlobe, kivete, monokromatorja za izbiro valovne dolžine fluorescirane svetlobe in detektorja. Intenziteto fluorescence merimo pod kotom 90° glede na vpadni žarek.

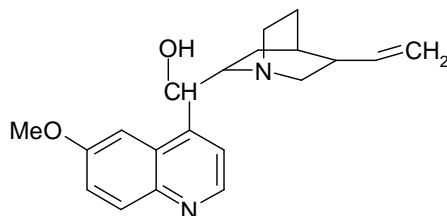
Selektivnost pri molekulska fluorescenčni spektroskopiji dosežemo z izbiro primerne valovne dolžine vzbujevalne in emitirane svetlobe. Intenziteta fluorescence je odvisna od eksperimentalnih pogojev in kemijske oblike, v kateri se analit nahaja.



Schema aparature za molekulska fluorescenčno spektroskopijo

8a. vaja: DOLOČITEV KININA Z MOLEKULSKO FLUORESCENČNO SPEKTROMETRIJO Z METODO STANDARDNEGA DODATKA

Če kinin v razredčeni kislini vzbujamo s svetlobo primerne valovne dolžine, močno fluorescira.



Kinin



Eksperimentalni del

Aparatura:

Luminiscenčni spektrometer

Postopek:

V 50 mL bučko odpipetirajte 1 mL pijače Schweppes in z 0,05 mol/L H₂SO₄ dopolnite do oznake. Nato v šest 50 mL bučk odpipetirajte po 1 mL tako pripravljene raztopine vzorca. Prvo bučko z 0,05 mol/L H₂SO₄ dopolnite do oznake. V ostalih pet bučk po vrsti dodajte 200 μL, 400 μL, 600 μL, 800 μL in 1000 μL standardne raztopine kinina s koncentracijo 5 μg/mL in z 0,05 mol/L H₂SO₄ dopolnite do oznake.

Za slepo raztopino vzemite 0,05 mol/L H₂SO₄.

Kinin vzbujamo s svetlobo valovne dolžine 350 nm. Valovna dolžina, ki ustreza maksimumu fluorescence, je 450 nm. Pri tej valovni dolžini izmerite intenziteto fluorescence za pripravljene raztopine.

Masno koncentracijo kinina v pijači Schweppes (v μg/mL) izračunajte na dva načina:

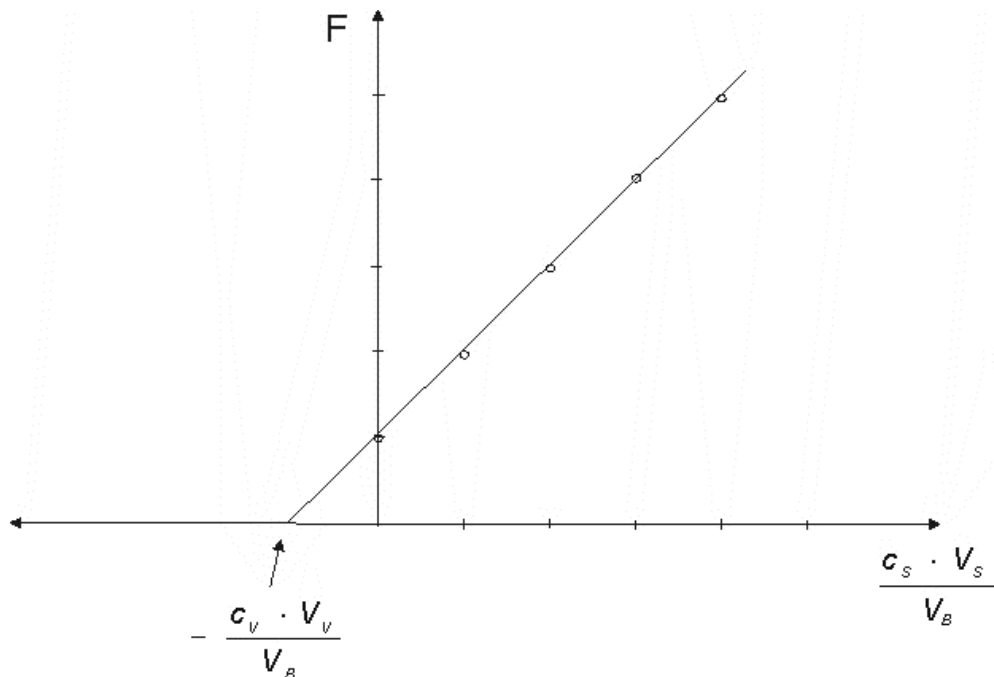
a) *grafično*

Načrtajte graf - na x-os nanašajte koncentracijo standardnega dodatka v pripravljenih raztopinah, c_{SD}:

$$c_{SD} = \frac{c_s \cdot V_s}{V_B} ,$$

pri čemer je c_s koncentracija analita v izhodnem standardu (5 μg/mL), V_s volumen standardnega dodatka, V_B pa volumen bučke. Na y-os nanašajte izmerjeno intenziteto fluorescence.

V primeru, ko je zveza linearna, lahko koncentracijo analita v vzorcu c_V določimo z ekstrapolacijo dobljene premice na absciso. Računsko se da pokazati, da x koordinata točke, v kateri premica seka abscisno os, pomeni negativno vrednost koncentracije analita v redčenem vzorcu (y koordinata je enaka 0):



Grafični način določitve koncentracije analita z metodo standardnega dodatka

b) računsko

Za izračun upoštevajte le en (najmanjši) standardni dodatek. Velja:

$$F_V = k \cdot \frac{c_V \cdot V_V}{V_B}$$

$$F_{V+S} = k \cdot \frac{c_V \cdot V_V + c_S \cdot V_S}{V_B}$$

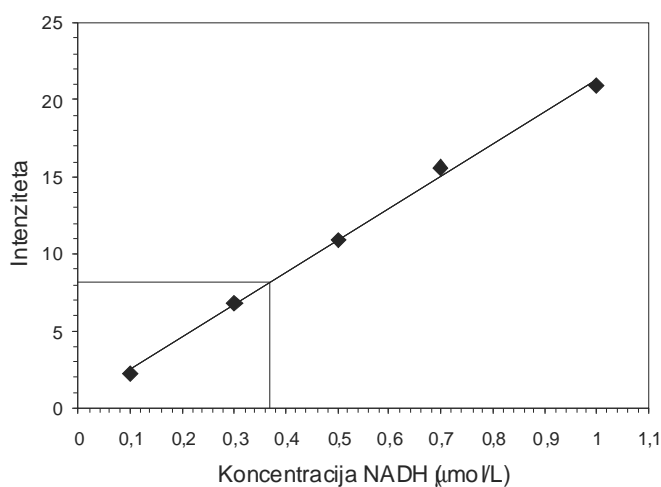
Računska naloga:

Pri merjenju intenzitete fluorescence za nikotinamid adenin dinukleotid (NADH) smo dobili naslednje podatke:

Koncentracija NADH ($\mu\text{mol/L}$)	Intenziteta fluorescence
0,1	2,2
0,3	6,8
0,5	10,9
0,7	15,6
1,0	20,9
5 x redčen vzorec	8,1

Določite koncentracijo NADH v vzorcu!

Načrtamo graf: intenziteta fluorescence v odvisnosti od koncentracije NADH. Narišemo umeritveno premico in odčitamo koncentracijo NADH v redčenem vzorcu:



$$X_{vz}' = 0,37 \mu\text{mol/L}$$

$$X_{vz} = 5 \cdot X_{vz}' = 5 \cdot 0,37 \mu\text{mol/L} = 1,85 \mu\text{mol/L}$$

V vzorcu je 1,85 $\mu\text{mol/L}$ NADH.