

MOLEKULARNA LUMINISCENČNA SPEKTROMETRIJA

Fluorescirajo mnoge aromatske in heterociklične spojine, zlasti take z več konjugiranimi dvojnimi vezmi npr. aromatski ogljikovodiki, purini, nukleozidi, vitamin K, vitamin A, fenoli). Mnoge druge spojine lahko z ustreznimi reagenti pretvorimo v produkte, ki fluorescirajo (npr. aminokisljine).

Tabela A. Primerjava molekularne absorpcijske spektrometrije in fluorimetrije

	Spektrometrija	Fluorimetrija
Območje	$10^{-3} - 10^{-6}$ mol/L	$10^{-6} - 10^{-9}$ mol/L
Ponovljivost	2 %	2-5 %
Selektivnost	dobra do srednja	srednja
Cena	nizka do srednja	srednja
Hitrost	dobra do srednja	srednja

Naloge

1. Kinin določamo v dveh urinskih vzorcih pacientov, ki ju s kininsko terapijo zdravijo proti malariji. Naredili smo pet meritev fluorescence, kot je povzeto v preglednici.

Tabela 1. Rezultati petih meritev fluorescence v arbitrarnih enotah (AU)

A	B	C	D	E
Destilirana voda	Standard $\chi_{\text{kinin}} = 2 \mu\text{g/mL}$	Urin, ki ne vsebuje kinina	Vzorec urina 1	Vzorec urina 2
1,7	50,2	14,3	82,8	58,7

Za vseh pet primerov v preglednici je bil postopek enak. Z dodatkom raztopina amonijaka k 2 mL raztopine (A do E) smo zvišali pH na 9 in kinin ekstrahirali s 4 mL kloroforma. Iz 2 mL kloroformskega ekstrakta smo nato ekstrahirali kinin z 2 mL raztopine žveplove kisline (0,05 mol/L) in izmerili moč fluorescence pri 450 nm. Uporabite rezultate meritev in izračunajte koncentracijo kinina v vzorcih urina obeh pacientov.

2. Za določitev cinka v vzorcu po metodi standardnih dodatkov smo pripravili standardno raztopino cinkovega klorida koncentracije 0,1 mmol/L ($M_{\text{cinkov_klorid}} = 136$ g/mol; $M_{\text{Zn}} = 65,38$ g/mol). V štiri lije ločnike smo odmerili 5 mL preiskovane raztopine. Dodatki standardne raztopine (V_{st}) so navedeni v preglednici. Po trikratni ekstrakciji s 5 mL tetraklorometana ($\rho = 1,48$ g/mL), ki je vseboval presežek 8-hidroksikinolina, smo ekstrakte razredčili na 25 mL. Rezultati merjenja fluorescence so v preglednici.

Tabela 2. Rezultati merjenja fluorescence za raztopine vzorca z različnimi standardnimi dodatki

Lij ločnik	1.	2.	3.	4.
V_{st} (mL)	0	4	8	12
Fluorescenca (AU)	7,65	13,95	19,6	25,8

- a) Razložite, zakaj ekstrakcijsko topilo vsebuje dodatek 8-hidroksikinolina?
- b) Izračunajte koncentracijo cinka v vzorcu in jo izrazite v enotah ppm!

3. S fluorimetrijo določamo koncentracijo kinina v pijačah. Valovna dolžina vzbujanja je 350 nm, valovna dolžina emisije je 450 nm. Iz osnovne standardne raztopine kinina (0,1 mg/L) smo pripravili niz kalibracijskih raztopin za metodo kalibracijske premice, kot nakazuje preglednica in izmerili fluorescenco.

$$1) \chi_{\text{D}} = 2,83 \mu\text{g/mL}; \chi_{\text{E}} = 1,83 \mu\text{g/mL}; \quad 2) \chi_{\text{Zn}} = 6,73 \text{ mg/L}; \quad 3) \chi_{\text{kinin}} = 62,5 \text{ ppm}$$

Tabela 3. Podatki za določitev kinina z metodo kalibracijske premice

Raztopina	Slepa	1	2	3	4	5
$V_{\text{standarda}}$	0	4	8	12	16	20
$V_{\text{H}_2\text{SO}_4}$ (0,05 mol/L)	20	16	12	8	4	0
Fluorescenca (AU)	0	39,5	75,8	109,2	138,8	182

Vzorca smo odmerili 0,1 mL in ga z raztopino žveplove kisline (0,05 mol/L) v 100 mL volumetrični steklenici razredčili do oznake. Rezultat meritve fluorescence v arbitrarnih enotah je bil 113. Koncentracijo kinina v vzorcu izrazite v ppm in g/L.

MOLEKULARNA LUMINISCENČNA SPEKTROMETRIJA

VPRAŠANJA

1. Katere tehnike uvrščamo k molekularni luminiscenčni spektrometriji? Kaj jim je skupno in v čem so razlike med njimi?
2. V čem je temeljna razlika med fluorescenco in fosforescenco, če izhajamo iz energijskega diagrama molekul?
3. Zakaj pri vodnih raztopinah na sobni temperaturi ne opazimo fosforescence?
4. V kakšnem odnosu sta valovna dolžina vzbujevalne in valovna dolžina emitirane svetlobe? Kaj pa odnos med energijo vzbujanja in energijo emisije?
5. Kakšen je matematični izraz, ki povezuje intenziteto fluorescence s koncentracijo? Kakšen pomen ima za ta izraz geometrija fluorescenčnega spektrometra?
6. Kaj je kvantni izkoristek?
7. Katere temeljne enote gradijo fluorescenčni spektrometer?
8. Kakšna je razlika med spektrometričnima celicama (kivetama) za molekularno absorpcijsko spektrometrijo in fluorescenčno spektrometrijo.
9. V čem je prednost dvožarkovnega instrumenta.
10. Kakšna je razlika med nekorigirano in korigirano fluorescenco.
11. Katere temeljne stopnje ima fluorescenčno merjenje
12. Kaj je značilnost sinhronnega merjenja.
13. Kaj je značilnost merjenja, za katerega uporabljamo angleški iz »ratiometric measurement«. Kaj je njegova prednost in kje ga uporabljamo?
14. Kakšne so značilnosti molekularne fluorescenčne spektrometrije, če jih primerjamo z značilnostmi molekularne absorpcijske spektrometrije.
15. Zakaj fluorescenčnega merjenja ne moremo uporabljati v raztopinah s previsoko koncentracijo analita? Katere težava v splošnem nastopijo pri analizi zelo razredčenih raztopin analita.
16. Naštete primere uporabe fluorescenčne spektrometrije.
17. Kako lahko z merjenjem fluorescence spremljamo metabolizem celic? Kako izvajamo meritve?

SLIKOVNA PODPORA

Jablonski diagram in primerjava vzbujevalnega in emisijskega spektra ter »quantum dots«

<http://www.photobiology.info/Visser-Rolinski.html>

Fluorescenčna mikroskopija za vizualizacijo metabolizma celic

<http://www.nikoninstruments.com/Information-Center/Fluorescence>

<http://www.rsc.org/chemistryworld/News/2011/March/08031103.asp>

Določanje sekvence DNA

<http://users.rcn.com/jkimball.ma.ultranet/BiologyPages/D/DNAsequencing.html>

- 1) $\gamma_D = 2,83 \mu\text{g/mL}$; $\gamma_E = 1,83 \mu\text{g/mL}$; 2) $\gamma_{Zn} = 6,73 \text{ mg/L}$; 3) $\gamma_{\text{kinin}} = 62,5 \text{ ppm}$