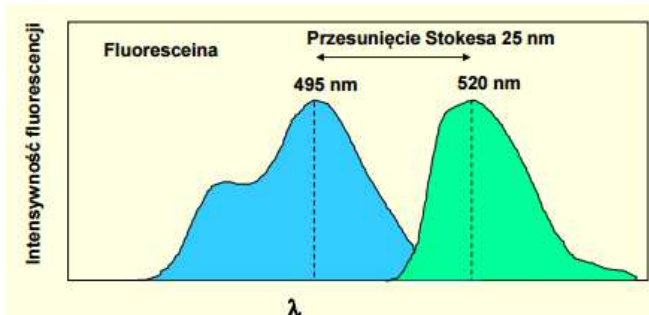


Ćwiczenie 11. Interakcja światła z materią. Spektrofluorymetryczne oznaczanie zawartości chininy

Zjawisko emitowania przez niektóre związki chemiczne promieniowania w zakresie widzialnym, wzbudzonego pod wpływem promieniowania o krótszej długości (zazwyczaj ultrafioletowego) określane jest mianem *fluorescencji*. Pod wpływem promieniowania wzbudzającego elektrony przechodzą na wyższy poziom energetyczny, a wracając do poziomu wyjściowego emitują promieniowanie (promienisty zanik energii). Istnieją zasadniczo dwa mechanizmy zaniku promienistego. W przypadku *fluorescencji* samorzutna emisja promieniowania ustaje w ułamku sekundy ($t = 10^{-9} - 10^{-8}$ s) po ustaniu wzbudzenia (usunięciu promieniowania wzbudzającego). Natomiast samorzutna emisja promieniowania na sposób *fosforescencji* może trwać znacznie dłuższy czas (zwykle kilka sekund, ale znane są związki zdolne do emisji światła nawet przez godziny). Sugeruje to, że fluorescencja polega na natychmiastowej zamianie zaabsorbowanego promieniowania w energię ponownie wypromieniowaną, natomiast fluorescencja charakteryzuje się istnieniem stanu przejściowego, gdzie zmagazynowany nadmiar energii powoli jest wypromieniowany. Różnice w mechanizmie obserwowanych przejść doskonale ilustruje *diagram Jabłońskiego* (patrz materiały dodatkowe).

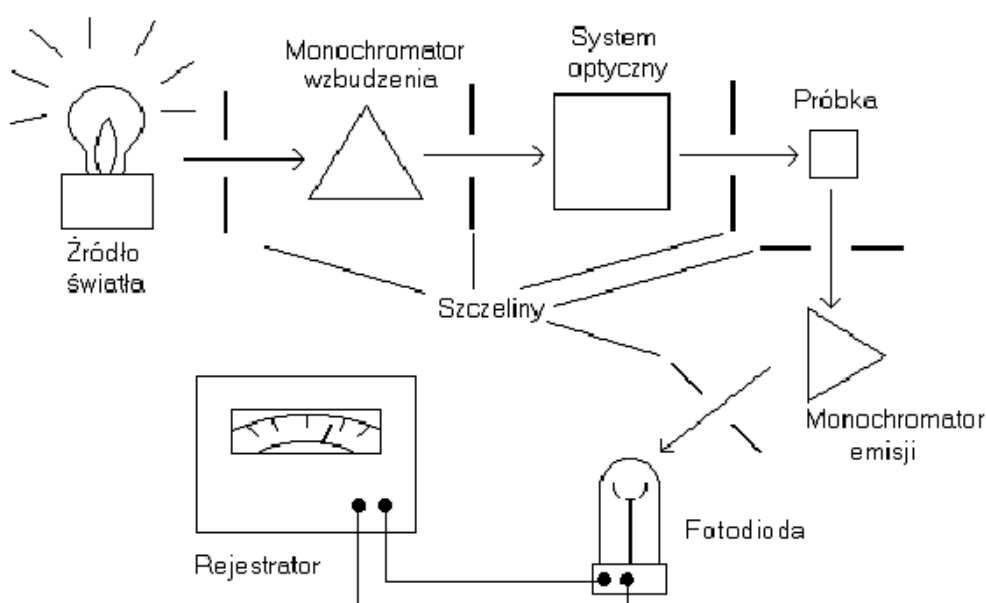
Porównując widmo absorpcji i widmo promieniowania emitowanego przez daną substancję możemy zaobserwować przesunięcie widma emisji w kierunku fal dłuższych. Wynika to z faktu, że fotony



promieniowania emitowanego mają niższą energię (a zatem dłuższą długości fali, rys. 1) niż fotony promieniowania wzbudzającego. Zjawisko to zaobserwowano po raz pierwszy w 1852 roku i od nazwiska odkrywcy nazwano je *przesunięciem Stokesa*. Tak jak na rys. 1 możemy zaobserwować, że widmo emisji fluorescencji (zielone) jest przesunięte w stosunku do widma absorpcji (niebieskie) w stronę fal dłuższych (efekt batochromowy). Samo widmo wzbudzenia fluorescencji często pokrywa się z widmem absorpcji.

Urządzeniem wykorzystywanym do pomiaru fluorescencji jest spektrofluorymetr. Zawiera on: źródło światła, dwa monochromatory, komorę do której wstawiamy badaną próbę i detektor (Ryc. 2). Układ aparatu jest podobny jak w spektrofotometrze, z dwoma istotnymi wyjątkami. Pierwszą różnicą jest obecność dwóch monochromatorów - jednego koniecznego dla wyboru fali wzbudzenia i drugiego, dla analizy długości fali światła emitowanego. Po drugie, detektor jest umiejscowiony pod kątem 90° do promienia

wzbudzającego. Dzięki takiemu układowi eliminuje się wpływ światła przechodzącego przez próbkę (rejestruje się tylko światło emitowane). Po wzbudzeniu próbki, fluorescencja emitowana jest we wszystkich kierunkach, a pomiar jej intensywności jest możliwy dzięki fotodiodzie. Źródłem światła jest najczęściej lampa ksenonowa, emitująca promieniowanie w zakresie 200 - 1400 nm. Układ optyczny kieruje światło do monochromatora wzbudzenia, gdzie określana jest długości fali i wielkość szczeliny przez które światło pada na próbkę. Z uwagi na fakt, że chcemy obserwować emisję światła pod kątem kątowym fluorymetryczne muszą posiadać cztery ścianki boczne przepuszczające światło w takim samym stopniu (nie możemy używać kuwet z zmatowianymi ścianami jak w spektrofotometrze). Światło wzbudzące powoduje przejście elektronów na wyższy stan energetyczny (zjawisko absorpcji), a następnie ich powrót na stan podstawowy co obserwujemy jako emisję światła. Monochromator emisyjny umożliwia skierowanie światła o określonej długości do detektora (fotopowielacza), który generuje prąd proporcjonalny do intensywności emitowanego światła.



Ryc. 2. Schemat budowy/działania fluorymetru

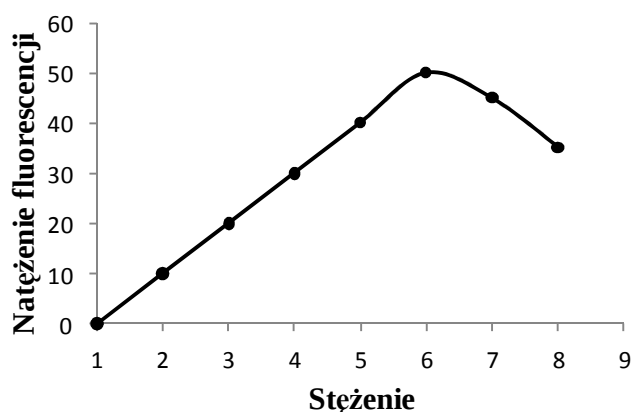
Istnieje zależność między natężeniem fluorescencji (I_f), a natężeniem światła wzbudzonego (I_o) i stężeniem związku fluoryzującego (c), co możemy zapisać jako:

$$I_f = I_o \cdot k \cdot c \cdot l$$

gdzie: k - jest współczynnikiem fluorescencji

l - grubość warstwy badanego roztworu (grubość kuwety pomiarowej)

Do wyznaczenia zawartości (ilości) substancji wykazującej fluorescencję stosuje się zazwyczaj *metodę krzywej wzorcowej* (zależność intensywności fluorescencji do stężenia próbki). Jest to niezwykle ważne w metodach fluorescencyjnych, gdyż natężenie fluorescencji zależy od wielu czynników (np.: pH roztworu, temperatury, rodzaju rozpuszczalnika, obecności substancji wygaszających lub wzmacniających fluorescencję itp.). Dodatkowo może dochodzić też do zjawiska określanego jako *wygaszanie stężeniowe* (ryc. 3). W rozcieńczonych roztworach intensywność fluorescencji jest proporcjonalna do stężenia substancji fluoryzującej. Jednak gdy stężenie substancji fluoryzującej przekroczy pewną granicę, intensywność fluorescencji zaczyna maleć. Wynika to najprawdopodobniej z asocjacji cząsteczkowej – cząsteczki mogą tworzyć dimery i większe konglomeraty cząsteczek, co preferuje rozpraszanie energii pomiędzy oscylacyjne stopnie swobody. W tych warunkach zachodzi również wtórna absorpcja promieniowania emitowanego. Powoduje to częściowy zanik fluorescencji, co przedstawia ryc. 3. Zatem do określenia stężenia możemy wykorzystywać tylko ten zakres, w którym jest liniowa zależność fluorescencji.



Ryc. 3. Zależność natężenia fluorescencji od stężenia badanego związku

Zjawisko fluorescencji wykorzystywane jest do wykrywania i identyfikacji związków chemicznych oraz do ich ilościowego oznaczania. Wykazują ją przede wszystkim związki organiczne zawierające skondensowane pierścienie aromatyczne oraz związki metaloorganiczne. Fluorescencyjna analiza jakościowa stosowana jest w chemii analitycznej i farmaceutycznej, w toksykologii i w badaniach środków spożywczych, zwłaszcza do wykrywania zafałszowań.

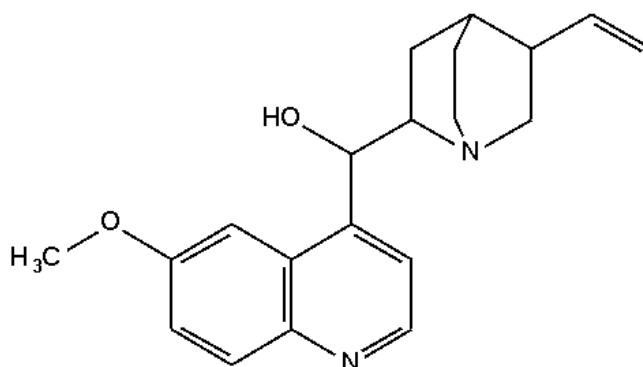
Przed przystąpieniem do oznaczeń fluorymetrycznych należy ustalić podstawowe parametry, do których należy:

- Dobranie optymalnej długości fali promieniowania wzbudzającego
- Dobranie optymalnej długości fali promieniowania emitowanego
- Ustalenie dozwolonego zakresu stężeń badanej substancji.

Chinina – lek przeciw malarii i składnik napojów orzeźwiających

Chinina jest alkaloidem chinolinowym, występującym w korze drzewa chinowego (*Chinchona succirubra*) rosnącego w Andach. Korę tego drzewa zaczęto sprowadzać z Peru do Europy od XVII wieku, jako cudowne lekarstwo na „ciężką gorączkę”. Był to pierwszy i przez wiele lat jedyny lek przeciwko zimnicy (malariai). Z względu na swoje działanie znalazł też zastosowanie w leczeniu innych schorzeń (usprawnia trawienie, wspomaga wydzielanie soków żołądkowych, łagodzi skurcze mięśni, osłabia przewodnictwo nerwowe), a w ostatnich czasie pochodne chininy były też testowane jako środek wspomagający leczenie zakażenia koronawirusem.

Chinina jest trucizną protoplazmatyczną, tzn. działa toksycznie na wszystkie komórki, wykazując przy tym liczne działania niepożądane. Działa porażająco na enzymy oksydoredukcyjne, co prowadzi do wstrzymania oddychania tkankowego, a tym samym do hamowania czynności życiowych komórek roślinnych i zwierzęcych. To właśnie te właściwości powodują, że skutecznie zwalcza w organizmie człowieka pasożytnicze pierwotniaki z rodzaju *Plasmodium*, wywołujące malarię.



Ryc. 4. Wzór chininy. Chinina jest krystalicznym, białym proszkiem, słabo rozpuszczalnym w wodzie, o silnie gorzkim smaku. Z kwasami tworzy sole, które są dobrze rozpuszczalne w wodzie.

Chinina wykazuje działanie depresyjne na ośrodkowy układ nerwowy: działa przeciwgorączkowo (hamuje ośrodek termoregulacji), przeciwbólowo i uspokajająco. Zmniejsza napięcie mięśni gładkich, w następstwie czego dochodzi do rozszerzenia naczyń krwionośnych i obniżenia ciśnienia krwi. W małych dawkach uczuła mięsień macicy na bodźce skurczowe – więc dawniej wykorzystywano ją do wywołania słabej akcji porodowej (w dużych dawkach może wywoływać poronienia - wykazuje też właściwości uszkadzające płód). Należy pamiętać, że chinina jest związkiem toksycznym. Jej nadużywanie może prowadzić do przewlekłego, ostrego zatrucia, którego głównymi objawami są: zaburzenia

widzenia, omamy słuchowe i zaburzenia równowagi. Przyjęcie dużych dawek (powyżej 8-15 g doustnie) może być śmiertelne dla dorosłego człowieka. Szczególnie zainteresowanie chininą wykazuje medycyna komunikacyjna, ze względu na charakter wywoływanych przez nią zaburzeń, szczególnie niebezpiecznych w zawodach, które wymagają skupienia i koncentracji. Podczas badań przeprowadzonych na amerykańskich pilotach wykryto, że dzienna dawka 100 mg chininy, wystarcza do spowodowania zaburzeń równowagi, czy wywołania dezorientacji przestrzennej. U niektórych osób po takiej dawce rejestrowano złe samopoczucie, senność, trudności w odczytywaniu wskazań na tarczach przyrządów pilotażowo-nawigacyjnych. Dlatego też amerykańskich pilotów obowiązuje zakaz zasiadania za sterami samolotów przez 72 godziny po wypiciu toniku, aby wyeliminować ewentualne następstwa związane z działaniem chininy zawartej w tym napoju.

Tonik jest spożywany dla swojego wyrafinowanego smaku i orzeźwiających właściwości. Swoją specyficzny smak z subtelną nutą goryczki zawdzięcza chininie. Historia toniku sięga czasów brytyjskiego panowania w Indiach, gdzie chinina powszechnie była stosowana jako lekarstwo na gorączkę, a jej zażywanie chroniło przed malarią i jej nawrotami. Chinina w dawkach leczniczych (*dziennie podawano pacjentom nawet 500-2000 mg*) ma jednak mocno gorzki smak, więc Brytyjczycy mieszała ją z ginem i dodawali cytryny. Z czasem napój ten stał się coraz bardziej popularny i w 1858 roku został opatentowany pod nazwą *tonic*. Obecnie toniki zawierają tak małą ilość chininy, że napój ten nie może być traktowany jako antidotum na malarię - można mówić jedynie o jej wpływie chininy na smak. Charakterystyczny smak toniku przyczynił się do popularności tego napoju - stanowi składnik wielu drinków, wśród których pierwsze miejsce zajmuje oczywiście gin z tonikiem.

W 1988 r. Główny Inspektor Sanitarny Kraju wprowadził zakaz sprzedaży w Polsce napoju tonik z dodatkiem chininy. Zamiast chininy dodawano podobny smakowo substytut goryczki. Obecnie od wielu już lat zakaz ten nie obowiązuje, ale informacja że chinina znajduje się w napoju musi być podana na opakowaniu. W Unii Europejskiej za dopuszczalną dawkę uznaje się 7,5 mg/ 100 ml. Sprzedawany w sklepach tonik może zawierać 21 – 83 mg chlorowodoru chininy w 1 litrze płynu^{1,2}. Gaszenie pragnienia tonikiem w upalny dzień może powodować, że przyjęcie względnie dużych ilości chininy negatywnie wpłynie na sprawność zawodową pilotów, kierowców, operatorów maszyn, jak również może wpływać na stan zdrowia (zwłaszcza kobiet w ciąży i dzieci).

¹ Czajkowska A, Bartodziejska B, Gajewska M. Ocena zawartości chlorowodoru chininy w napojach bezalkoholowych typu tonik. *Bromat. Chem. Toksykol.* 2012; 45(3):433-438

² Lawson-Wood K, Evans K. Determination of Quinine in Tonic Water Using Fluorescence Spectroscopy. *PerkinElmer Appl. Note - Fluoresc. Spectrosc.*, 2013; (https://www.perkinelmer.com/lab-solutions/resources/docs/APP_Quinine_in_Tonic_Water_014133_01.pdf)

Wykonanie ćwiczenia:

Celem ćwiczenia jest określenie zawartości chininy w toniku. W tym celu zostanie wykorzystana bardzo czuła metoda fluorymetryczna. Dla porównania pomiary zostaną też wykonane z użyciem metody spektrofotometrycznej (pomiar absorbancji).

1. Obsługa fluorymetru:

Włączanie aparatu:

- Włączyć jednostkę główną – przełącznik z lewej strony, na tylnej ścianie aparatu. Powinien uruchomić się wentylator lampy. Ponieważ w trakcie pracy lampy dochodzi do powstawania ozonu zaleca się uruchomienie dodatkowego wentylatora w szybie wentylacyjnym. W tym celu podłączyć wtyczkę zasilacza do gniazdka zasilającego.
- Włączyć zasilacz lampy (przycisk POWER), a następnie po ok. 1 min wcisnąć przycisk IGNITE, co spowoduje uruchomienie lampy i na obudowie zasilacza zapali się dioda LAMP.
- Włączyć fotopowielacz – przełącznik POWER (z pozycji OFF do pozycji HV)
- Ustawić długość fali światła wzbudzającego (EXCITATION WAVELENGTH) i emitowanego (EMISSION WAVELENGTH) oraz wielkość szczelin (SLIT).
- Po ustawieniu czułości (pokrętło FINE ADJUST) wyzerować wskazania fotopowielacza (za pomocą pokrętła BLANK ADJUST). Przy zasłoniętej przesłonie powinien wskazywać 0. Odsłonięcie przesłony, jeśli w komorze pomiarowej nie ma próby nie wpływa na odczytywaną wartość.
- Wstawić badaną próbę do komory pomiarowej. Komorę zakryć nakrywką.
- Przy wciśniętym przycisku przesłony (obok komory pomiarowej) następuje pomiar fluorescencji – zanotować odczytaną wartość.
- Pokrętło MULTIPLIER FINE ADJUST służy do ustawienia skali rejestrowanych wartości. Zbyt duży sygnał (powyżej 100 % skali) może przyczynić się do uszkodzenia fotopowielacza. Standardowo pomiary rozpoczynamy przy ustawieniu MULTIPLIER przy 1 (wtedy maksymalna odczytywana wartość na aparacie równa się 1 i odczyt wartości 45 na skali dolnej (100) oznacza 0,45; a wartość 14 przy odczytana przy ustawieniu MULTIPLIER na skali górnej (3) będzie odpowiadać fluorescencji równej 1,4. *Można też wyniki przemnażać: przy ustawieniu 1 odczytujemy 45, natomiast przy ustawieniu 3: uzyskamy 135 (3×45)*)

Wyłączanie aparatu:

- Wyłączyć fotopowielacz (przełącznik POWER z pozycji HV do OFF)
- Wyłączyć zasilacz lampy (POWER)
- Odczekać ok. 2-5 min, aż wystygnie lampa i wyłączyć jednostkę główną

UWAGA: Wyłączenie gorącej lampy skraca jej żywotność i może być przyczyną jej uszkodzenia.

Wykonanie pomiarów zawartości chininy w napoju typu tonik:

11.1. Pomiar fluorymetryczny

Aby poprawnie dokonać pomiarów korzystamy z substancji wzorcowej, dla której uprzednio wyznacza się maksymalną wartość długości fali światła wzbudzenia (absorpcji) i emisji. W przypadku chininy wynoszą one odpowiednio: długość fali wzbudzenia 350 nm, a emisji 450 nm. Nowoczesne spektrofluorymetry wykonują takie pomiary w sposób automatyczny,

natomiast w starszych wersjach takie pomiary wykonuje się poprzez wykreślenie widma wzbudzenia i widma emisji dla badanej substancji. Po umieszczeniu w komorze pomiarowej określa się wartości promieniowania (E) w zależności od długości fali wzbudzenia (absorpcji światła), a następnie fali emisji. Najpierw zmieniamy długość światła wzbudzającego (stosując przy tym jedną długość światła emisji, w przypadku chininy $\lambda=450$ nm), a następnie zmieniamy długość światła emitowanego (natomiast długość światła wzbudzającego /absorbowanego jest niezmienna i w przypadku chininy wynosi $\lambda=350$ nm). Przykład tak otrzymanego widma przedstawiono na ryc. 1 (niebieskie światło wzbudzające: $\lambda_{\max}=495$ nm i zielone światło emisji: $\lambda_{\max}=520$ nm).

Krzywa wzorcowa siarczanu chininy

- o przygotować wzorcowe roztwory siarczanu chininy o stężeniach: 1 mg/l, 2 mg/l, 3 mg/l; 5 mg/l, 10 mg/l,
- o Ustawić: - EXCITATION WAVELENGTH: 350 nm
- EMISSION WAVELENGTH: 450 nm
- o Dokonać pomiaru fluorescencji roztworów (stosując tą samą kówetę zaczynamy od stężenia najmniejszego do największego). Po wykonanym pomiarze wzorec wlewamy do tej próbówki z której go pobieraliśmy.
- o Jeśli sygnał na detektorze przekracza 100% pokręteł MULTIPLIER FINE ADJUST ustawić odpowiednią czułość, przekręcając na wyższe wartości: 1 > 3 > 10, co spowoduje że odczytywane wartości powinny być odpowiednio zwiększane: 3× lub 10×.
- o Narysować wykres zależności fluorescencji od stężenia chininy (krzywa wzorcowa)

Pomiar zawartości chininy w napoju typu tonik

- o Upřednio odgazowany napój typu *tonic* rozcieńczamy 0,05 M H_2SO_4 . Należy przygotować minimum 2-3 rozcieńczenia: - np. roztwór rozcieńczony 10×, 20× i 50 razy
Wskazówka: Roztwór 50 razy rozcieńczony uzyskamy dodając 0,1 ml toniku do 4,9 ml kwasu siarkowego. Tonik należy rozcieńczać kwasem, gdyż w środowisku kwaśnym fluorescencja chininy ulega wzmocnieniu.
- o Zmierzyć fluorescencję przygotowanych roztworów, a następnie z krzywej wzorcowej odczytać stężenie chininy w badanej próbce. Ponieważ badane roztwory zostały rozcieńczone trzeba wyliczyć zawartość chininy w nierozcieńczonym napoju. W tym celu otrzymaną zawartość przemnażamy przez współczynnik rozcieńczenia, np.:
Przykład: zmierzona wartość fluorescencji dla roztworu 50× rozcieńczonego wynosiła 14 co po odczytaniu z krzywej wzorcowej odpowiada stężeniu 1,25 mg/l. Uwzględniając, że próba została rozcieńczona 50 razy, oznacza to że w napoju typu tonik znajduje się: $50 \cdot 1,25 \text{ mg/l} = 62,5 \text{ mg/ml}$ chininy

Wyliczyć zawartość chininy we wszystkich przygotowanych roztworach i podać wartość średnią.

11.2. Pomiar spektrofotometryczny

Korzystając z spektrofotometru dostępnego na sali ćwiczeń ustawić długość światła na 350 nm. Zmierzyć wartość absorbancji poszczególnych prób wzorcowych (1 – 20 $\mu\text{g/ml}$ chlorowodoru chininy), a następnie absorbancję roztworów zawierających tonik. Korzystając z krzywej wzorcowej lub arkusza kalkulacyjnego Excel (wyznaczanie krzywej wzorcowej w arkuszu może być wprowadzone przez prowadzącego zajęcia) wyznaczyć stężenie chininy w toniku.