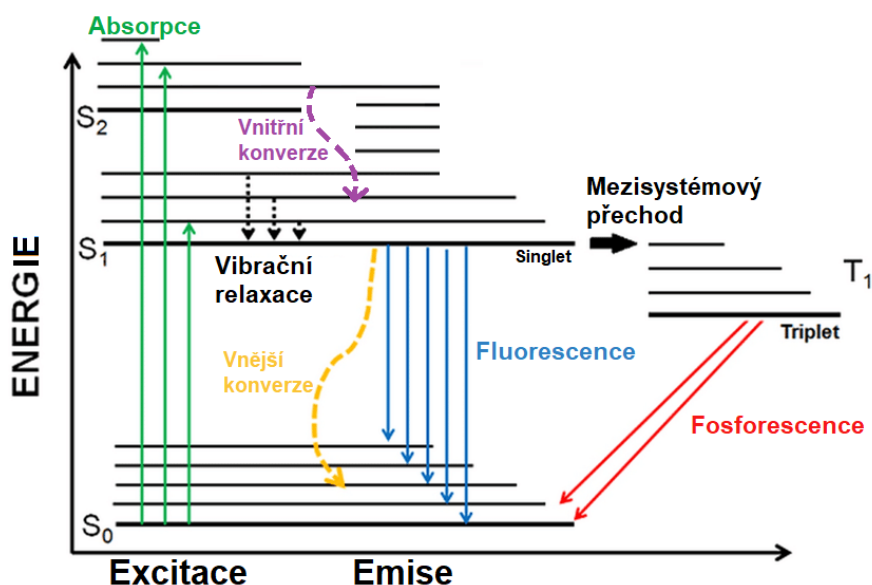


1. Fluorimetrické stanovení chininu v nealkoholických nápojích

Úvod

Fluorimetrie je analytická metoda využívající schopnosti některých látek emitovat fluorescenční záření v ultrafialové nebo viditelné oblasti po předchozím převedení do excitovaného stavu. K převedení do vzbuzeného stavu (k excitaci vzorku) je zpravidla využívána absorpce ultrafialového nebo viditelného záření. Stručně si vysvětlíme fyzikálně-chemický princip této metody.

Na obr. 1 je znázorněno zjednodušené schéma energetických hladin v molekule se sudým počtem elektronů. 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 singletový. I po excitaci jednoho valenčního elektronu na vyšší elektronovou hladinu mohou elektrony zachovat svůj celkový spin, což je vyznačeno řadou excitovaných singletových stavů molekuly S_1, S_2 . Pokud po excitaci dva elektrony nejsou spárovány, jejich celkové spinové kvantové číslo také může mít hodnotu 1. Molekula se pak nachází ve stavu označovaném jako tripletový, kterých může být celá řada (na obr. 1 T_1). Přechody molekuly mezi singletovým a tripletovým stavem jsou o několik řádů pomalejší, než podobné přechody uvnitř řady singletových či tripletových stavů. Každý elektronový stav je v důsledku vibračního pohybu molekuly tvořen sérií vibračních hladin. 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 (zelené šipky na obr. 1). Protože pravděpodobnost takového přechodu se pro jednotlivé hladiny liší, závisí schopnost molekuly absorbovat fotony na vlnové délce absorbovaného záření. Tuto závislost popisuje absorpční spektrum látky, tedy závislost absorbance nebo absorpčního koeficientu látky na vlnové délce.



Obr. 1 Schéma energetických hladin molekuly a přechodů mezi nimi (Jablonského diagram): S_0 – základní singletový stav, S_1 a S_2 – excitované singletové stavy, T_1 – excitovaný tripletový stav

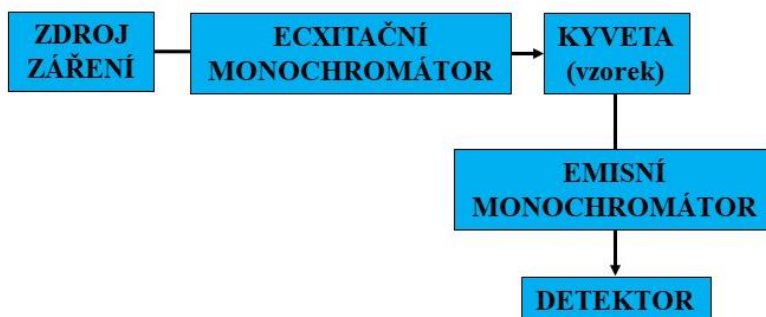
Po absorpci fotonu excitovaná molekula velmi rychle předává získanou energii svému okolí a tzv. nezářivými přechody (vnitřní konverze a mezisystémový přechod) následovanými vibrační relaxací se dostává postupně do nižších excitovaných stavů. Pomalejší bývá většinou až nezářivý přechod ze základní vibrační hladiny prvního excitovaného stavu S_1 do základního stavu S_0 . Teprve mezi těmito hladinami se vedle nezářivých přechodů může uplatnit přechod spojený s vyzářením (emisí) fotonu. Tato emise záření je označována jako fluorescence. Její doba dosvitu po přerušení excitace bývá řádově 10^{-6} až 10^{-9} s. Až z hladiny S_1 se případně uplatní i nezářivý mezisystémový přechod do excitovaného tripletového stavu T_1 . Zářivý přechod ze základní vibrační hladiny nejnižšího tripletového stavu T_1 do základního stavu S_0 má dlouhou dobu dosvitu řádu 10^{-3} až 10^1 s a je označován jako fosforescence. Vzhledem k tomu, že molekula před emisí fotonu fluorescenčního záření ztratí část energie dodané fotonem excitačního záření, je (až na výjimky) vlnová délka fluorescenčního záření větší než vlnová délka excitačního záření. Tato informace nám usnadní volbu emisní vlnové délky při měření.

V přítomnosti jediného absorbujícího a fluoreskujícího analytu je fluorescenční tok Φ_F úměrný absorbovanému toku záření Φ_A a kvantovému výtěžku φ_F (tj. poměru počtu fluoreskujících fotonů k počtu absorbovaných fotonů):

$$\Phi_F = k\varphi_F\Phi_A = k\varphi_F(\Phi_0 - \Phi) = k\varphi_F\Phi_0(1 - 10^{-\varepsilon bc})$$

kde ε je molární absorpční koeficient pro excitační vlnovou délku, k je konstanta charakterizující optický systém, Φ_0 tok dopadajícího záření a Φ tok prošlého záření. Pro nízké koncentrace je fluorescenční tok přímo úměrný koncentraci fluoroforu a lze tedy použít klasickou metodu kalibrační křivky s lineární závislostí.

Přístroje používané pro měření fluorescenčního záření jsou známé pod názvem fluorimetry. Jestliže je přístroj možno použít i k proměření excitačních a emisních spekter, bývá označován jako spektrofluorimetr. Na obr. 2 je blokové schéma jednopaprskového spektrofluorimetru s 90° konstrukcí. Obsahuje výkonný zdroj záření, jímž je nejčastěji xenonová vysokotlaká výbojka emitující záření v ultrafialové i viditelné oblasti, obvykle od 200 do 900 nm. K výběru konkrétních úzkých intervalů vlnových délek slouží dva monochromátory konstrukce Czerny-Turner. Nejběžnějším detektorem záření je fotonásobič. Vzorky určené k analýze jsou umístovány nejčastěji do kyvet, které se vyrábějí z křemenného skla nebo některých plastů (UV-polymer, polystyren). Plastové kyvety, které budeme používat, jsou propustné pro záření od cca 230 nm. Všechny 4 stěny kyvet jsou pro záření průchozí. Přístroje zpravidla obsahují také tzv. shuttery (uzávěrky), jež slouží k mechanickému zabránění proudu fotonů.

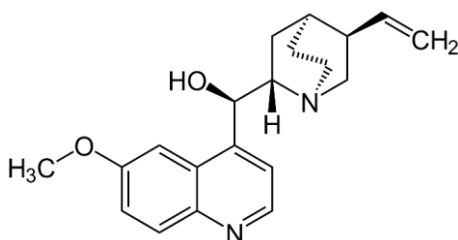


Obr. 2: Blokové schéma spektrofluorimetru

UPOZORNĚNÍ: V laboratoři jsou k dispozici plastové kyvety o čtvercovém průřezu s vnitřním rozměrem 1 cm a o výšce 4 cm. Všechny čtyři stěny jsou průhledné a jsou částečně propustné i v UV oblasti. Pro měření je důležité, aby v oblasti, kde jimi prochází excitační a měřený emisní paprsek, byly

stěny pokud možno dokonale průhledné. Každá nečistota nebo poškození povrchu způsobí zeslabení měřeného fluorescenčního signálu. Nedotýkejte se proto stěn kyvety zhruba v oblasti spodních 3 cm a při manipulaci ji držte spíše za hrany v horní části. Při čištění kyvetu opláchněte vodou. Kyvety neotírejte a neleštěte, protože se snadno poškrábou, a tím znehodnotí. Kapky na vnější stěně je možno opatrně vysát hranou filtračního papíru nebo buničitou vatou. Čistotu okének kontrolujte prohlédnutím kyvety proti světlu. I slabě znečištěná okénka (ulpěné kapky, otisky prstů) zkreslují měření fluorescence. Při vkládání kyvety do držáku ve spektrofluorimetru pokud možno zachovávejte orientaci kyvety, protože vlastnosti jednotlivých okének kyvety se mohou lišit.

Účelem práce je stanovit chinin v doneseném vzorku nealkoholického nápoje s obsahem tohoto alkaloidu. Chinin $C_{20}H_{24}N_2O_2$ ($M_r = 324,42$) je přírodní alkaloid se strukturálním vzorcem na obr. 3.



Obr. 3: Strukturální vzorec chininu

Chinin se vyskytuje v kůře tropických stromů rodu *Cinchona*. Stále ještě je významným lékem proti malárii. Má výrazně hořkou chuť a je proto přidáván do některých typů nápojů. Oba dusíkové atomy v molekule chininu mohou být protonizovány. S kyselinami tvoří chinin soli. Fluorescence chininu je zhášena chloridovými ionty při koncentracích nad $0,05 \text{ mmol l}^{-1}$.

Excitační a emisní maxima chininu lze očekávat u těchto vlnových délek:

- První excitační pík s maximem u 250 nm, odpovídá přechodu $S_0 \rightarrow S_2$.
- Druhý excitační pík s maximem u 350 nm, odpovídá přechodu $S_0 \rightarrow S_1$.
- Jediný emisní (fluorescenční) pík s maximem u 450 nm, odpovídá přechodu $S_1 \rightarrow S_0$.

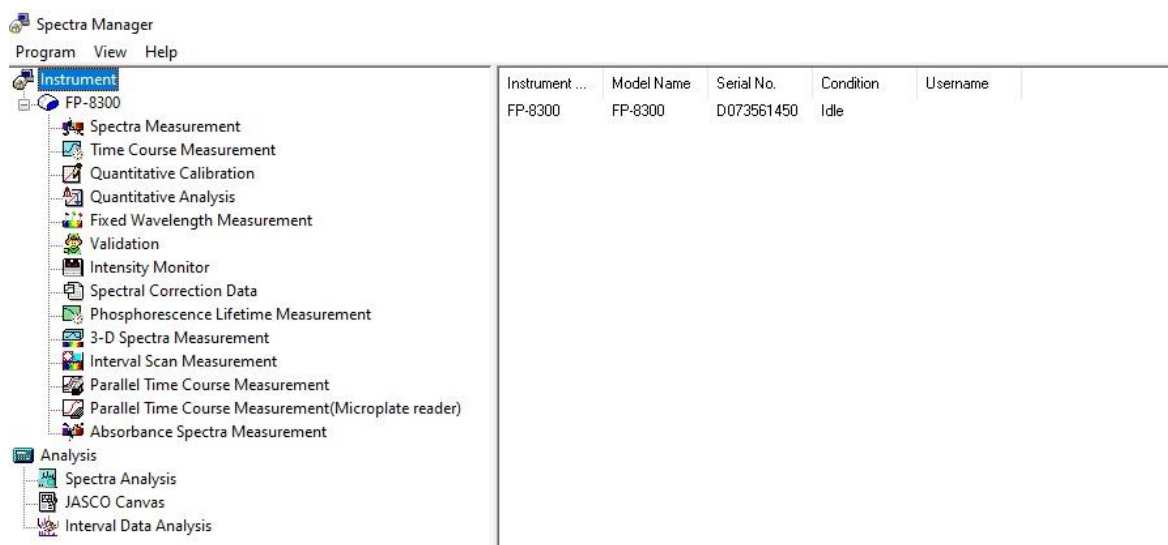
Úkoly

1. Ověřte správnou funkci spektrofluorimetru. Získané údaje porovnejte s doporučenými hodnotami (akceptačními kritérii) výrobce spektrofluorimetru Jasco FP-8300.
2. Pro roztok chininu o $\text{pH} = 2,7$ zvolte vhodné excitační a emisní vlnové délky. Následně proměřte excitační a emisní spektra chininu v závislosti na kyselosti roztoku v oblasti přibližně $\text{pH} = 2,1$ až $\text{pH} = 7,6$.
3. Do 25 ml odměrných baněk připravte 6 kalibračních roztoků v rozsahu hmotnostních koncentrací chininu $0\text{--}2 \text{ mg l}^{-1}$ s ekvidistančními vzdálenostmi mezi jednotlivými kalibračními body při vhodném pH určeném v bodu 2. Zpracujte kalibrační závislost.
4. Určete hmotnostní koncentraci chininu (v mg l^{-1}) ve vzorku doneseného nealkoholického nápoje (typu Tonic). Otestujte výtěžnost stanovení chininu přípravou obohaceného vzorku.

Pracovní postup

V tomto cvičení budeme používat spektrofluorimetr JASCO FP-8300, který má stejnou konstrukci, jako je na obr. 2. Přístroj je doplněn ovládacím a vyhodnocovacím softwarem *Spectra Manager*, jehož úvodní obrazovka je na obr. 4. Budeme používat následující moduly:

[Validation], [Spectra Measurement], [Fixed Wavelength Measurement], [Quantitative Calibration], [Quantitative Analysis].

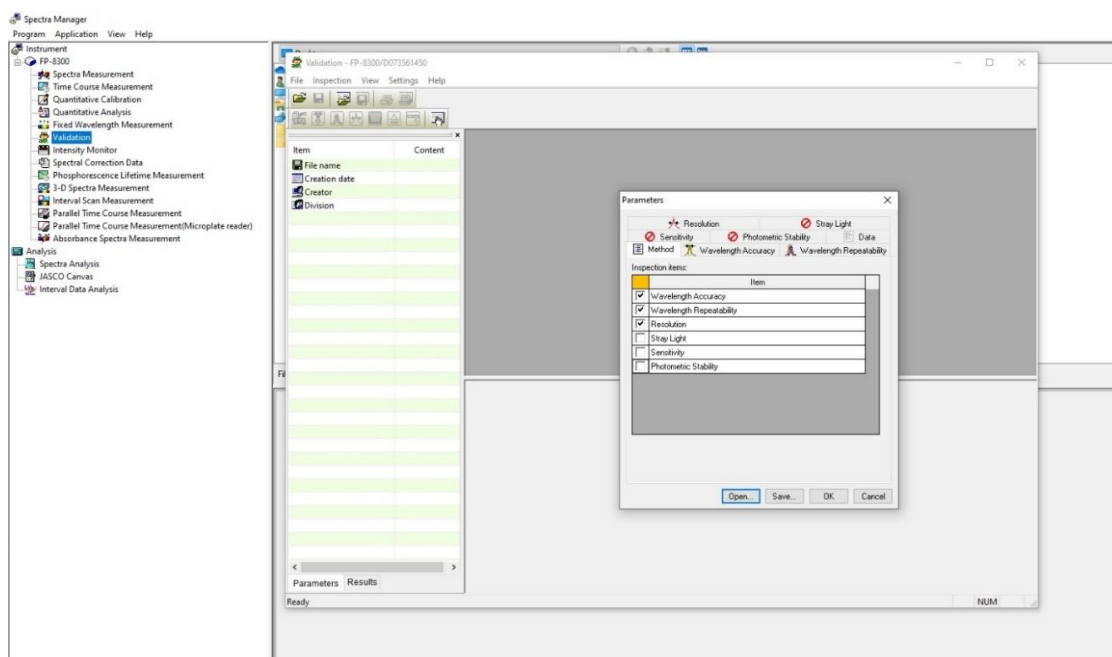


Obr. 4: Úvodní obrazovka ovládacího softwaru Spectra Manager

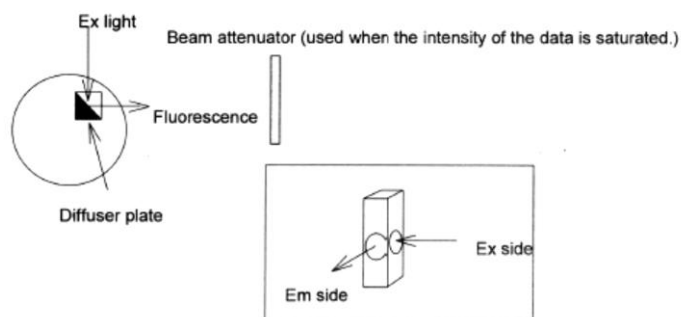
UPOZORNĚNÍ: Při práci se spektrofluorimetrem včetně měření spekter je třeba se vyhnout tomu, aby při otevřené uzávěrci (shutteru) excitačního monochromátoru a zapnutém zdroji záření byl excitační a emisní monochromátor nastaven na stejnou nebo velmi blízkou vlnovou délku. Mohlo by dojít k poškození fotonásobiče z důvodu dopadu velmi intenzivního záření.

Ověření správné funkce spektrofluorimetru:

Po spuštění validačního programu [Instrument → Validation] vybereme následující parametry: *Parameters* – Wavelength Accuracy, Wavelength Repeatability a Resolution (viz obr. 5). Následně spustíme validační měření (*Comprehensive Inspection*) a dle požadavku ze softwaru vložíme difuzní destičku (viz obr. 6). Naměřené hodnoty porovnáme s údaji v tabulce 1. Vzhledem k časové náročnosti validačního testování spektrofluorimetru ho spustíme před zahájením laboratorní práce na dalších bodech.



Obr. 5: Obrazovka ovládacího software při volbě validačních parametrů



Obr. 6: Způsob vkládání difuzní destičky do kyvetového prostoru

Tabulka 1: Akceptační kritéria pro parametry v rámci validace spektrofluorimetru FP-8300

Akceptační kritérium	Monochromátor	λ (nm)	Kritérium
<i>Wavelength Accuracy</i> (Přesnost nastavení vlnové délky)	Ex i Em	253,7	$\pm 1,5$ nm
		365,0	
		435,8	
		546,1	
<i>Wavelength Repeatability</i> (Opakovatelnost vlnové délky)	Ex i Em	546,1	$\pm 1,0$ nm
<i>Resolution</i> (Rozlišení)	Ex i Em	546,1	1,0 nm

Nalezení excitačních a emisních spekter chininu, optimalizace pH

Ze základního roztoku chininu o koncentraci $2,47 \cdot 10^{-5}$ mol l⁻¹ (≈ 8 mg l⁻¹) připravíte do šesti 25 ml odměrných baněk řadu 6 roztoků chininu o koncentraci $5,0 \cdot 10^{-6}$ mol l⁻¹ ($\approx 1,6$ mg l⁻¹) s různou hodnotou pH podle tabulky 2.

Tabulka 2: Příprava 25 ml roztoku o přibližném pH

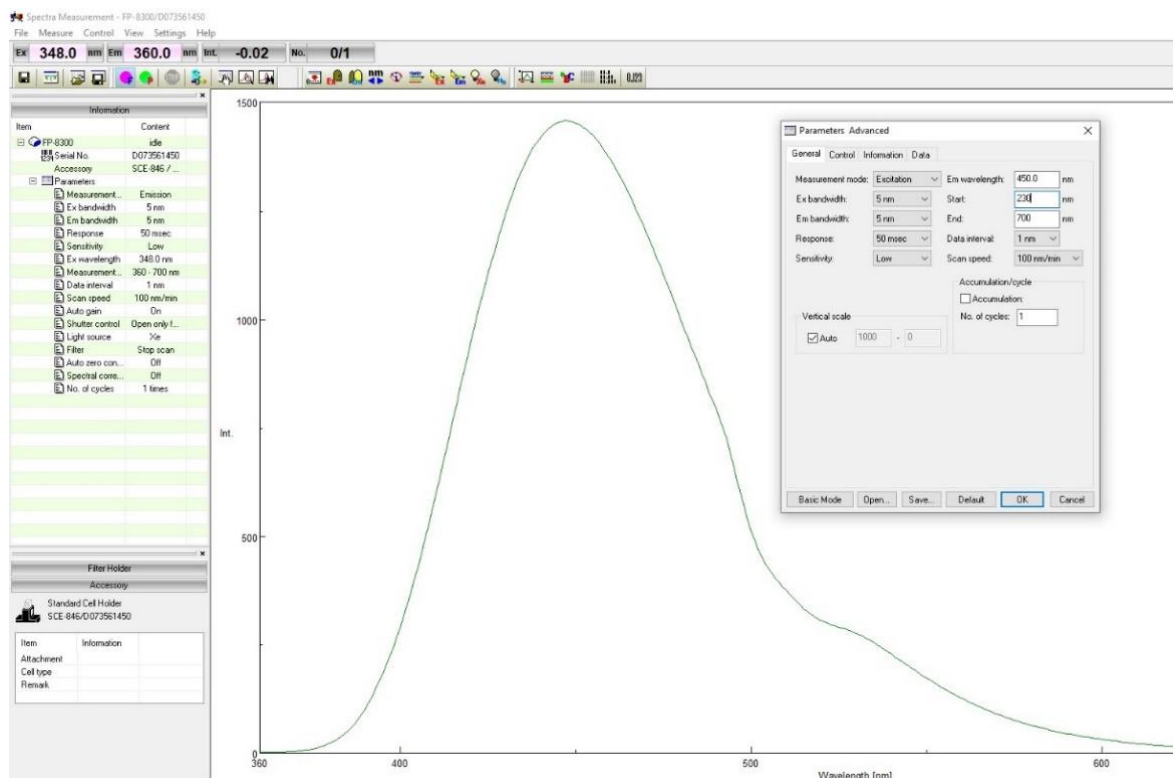
pH	Dávkovaný objem roztoku
2,1	10 ml 0,0125 mol l ⁻¹ H ₂ SO ₄
2,7	2 ml 0,0125 mol l ⁻¹ H ₂ SO ₄
3,4	10 ml 0,0005 mol l ⁻¹ H ₂ SO ₄
4,1	2 ml 0,0005 mol l ⁻¹ H ₂ SO ₄
4,3	1 ml 0,0005 mol l ⁻¹ H ₂ SO ₄
7,6	2 ml fosfátového tlumivého roztoku

0,02 mol l⁻¹ fosfátový tlumivý roztok a 0,0125 mol l⁻¹ H₂SO₄ jsou v laboratoři k dispozici. Zředěná 0,0005 mol l⁻¹ H₂SO₄ se připraví naředěním 0,0125 mol l⁻¹ kyseliny. Pro celou práci vystačíte s 50 ml roztoků 0,0125 mol l⁻¹ H₂SO₄ a 0,0005 mol l⁻¹ H₂SO₄.

Pro připravený roztok o pH = 2,7 se proměří excitační a emisní spektrum chininu. Obě spektra se uloží. Vlnové délky maxim se použijí v dalších experimentech. Po spuštění modulu pro měření spekter [Instrument → Spectra Measurement] vybereme následující parametry, viz obr. 7 (*Measure* → *Parameters*):

- Zvolí se citlivost měření (sensitivity – low).
- Pro zjištění excitační vlnové délky se proměří spektrum v intervalu 230–700 nm při nastavené vlnové délce emisního záření 450 nm. Ze spektra se získají maxima excitačních vlnových délek.

- Pro zjištění emisní vlnové délky se proměří spektrum v intervalu 380–700 nm při nastavené vlnové délce excitačního záření, která byla nalezena při měření excitačního spektra. Ze spektra se získá maximum emisní vlnové délky.



Obr. 7: Obrazovka ovládacího softwaru při měření spekter

Následně změříme intenzitu fluorescenčního záření ve všech 6 připravených roztocích chininu o různém pH. Tento experiment provedeme v modulu pro měření konstantních vlnových délek [Instrument → Fixed Wavelength Measurement], kde nastavíme maxima pro excitaci a emisi z předchozího měření. Zvolíme prostředí, které je pro fluorimetrické stanovení chininu nejvhodnější. Toto prostředí použijete ve všech dalších měřeních. Pro prostředí volte tak, aby intenzita fluorescence byla vysoká a neměnila se příliš se změnou pH, to znamená, aby metoda stanovení byla robustní.

Pro zvolené pH proměříme ještě jednou roztok chininu o koncentraci $5,0 \cdot 10^{-6}$ mol l⁻¹ a vybereme vhodnou citlivost měření (very low, low, medium, high, ...) tak, aby roztok měl intenzitu fluorescenčního záření mezi 5000 a 10000.

Měření kalibračních roztoků, tvorba kalibrační závislosti

Po spuštění modulu pro kalibraci [Instrument → Quantitative Calibration] vybereme a nastavíme postupně následující parametry:

- Vytvoří se nový kalibrační templat (File → New).
- Zvolí se excitační a emisní vlnová délka a metoda odečtu základní linie (1 wavelength).
- Vybere se lineární model pro kalibraci.
- Zkontroluje se, zda je nastaveno otevření excitačního shutteru (uzávěrky) při měření.

Samotné měření kalibrační závislosti se započne provedením nulování (Auto Zero), následně se proměří kalibrační „blank“ a jednotlivé připravené kalibrační roztoky. Do tabulky se vpisují

koncentrace kalibračních roztoků. Na závěr se provede kontrola linearity kalibračního modelu a jeho uložení (*File* → *Save As* – [prijmeni-datum].fclb).

Stanovení chininu ve vzorku nealkoholického nápoje, ověření výtěžnosti

V případě syčeného nápoje je třeba jej zbavit CO₂ v ultrazvukové lázni. Pro orientační proměření signálu vzorků jej zředíte 25× do odměrné baňky a upravte prostředí podle závěrů z bodu 2. V případě potřeby, tedy příliš nízkého signálu nebo naopak příliš vysokého signálu upravte ředění vzorku. Následně proměřte 2× vzorek (dvě nezávislé přípravy) pro dříve zvolené excitační a emisní vlnové délky a s využitím softwaru vyhodnoťte hmotnostní koncentraci chininu ve vzorku.

Toto měření se provede v modulu [Quantitative Analysis]. Po jeho spuštění je nejprve třeba otevřít kalibrační soubor uložený v předchozím bodu (*File* → *New* → *Create New Project* → *Create with a calibration file*). Po provedení nulování (*Auto Zero*) se proměří připravené vzorky, zaznamená se intenzita fluorescenčního záření a koncentrace vyhodnocená z kalibračního modelu.

Na základě zjištěné koncentrace chininu ve vzorku nápoje připravte 2× vzorek obohacený chininem o přibližně 50 %, upravte prostředí, proměřte obohacené vzorky pro dříve zvolené excitační a emisní vlnové délky. S využitím softwaru vyhodnoťte hmotnostní koncentraci chininu a vypočtete výtěžnost stanovení.

Do protokolu uveďte následující výsledky:

- závěry z měření validace spektrofluorimetru,
- grafické znázornění vlivu pH na intenzitu fluorescenčního záření spolu s výběrem vhodného pH prostředí,
- volbu excitační a emisní vlnové délky spolu s vysvětlením,
- kalibrační graf,
- koncentraci chininu ve vzorku nápoje spolu se zohledněním ředění,
- srovnání s mezní hodnotou pro nealkoholické nápoje ve vyhlášce č. 447/2004 Sb.,
- hodnotu výtěžnosti z analýzy obohaceného vzorku spolu s komentářem.

Použitá literatura:

1. Fänrich J., Kolesníková L.: Fluorimetrie. Návod do laboratorního cvičení. VŠCHT Praha.
2. Zvardoň I.: Analýza chininu v nápojích fluorescenční spektrometrií. Bakalářská práce, Univerzita Palackého v Olomouci, 2023.
3. Lawson-Wood K., Evans K.: Determination of Quinine in Tonic Water Using Fluorescence Spectroscopy. Application note. Perkin Elmer, 2018.
4. Manuály ke spektrometru JASCO FP-8300.

Kontrolní otázky

1. Co je to emisní a excitační fluorescenční spektrum?
2. Popište postup při měření excitačního a emisního spektra na spektrofluorimetru vybaveném excitačním a emisním monochromátorem.
3. Jaké děje probíhají v molekulách fluoreskující látky při buzení a emisi fluorescenčního záření?
4. Jak závisí fluorescenční signál na koncentraci fluoreskující látky v roztoku?
5. Popište jednotlivé části spektrofluorimetru.