

PRÁCTICA 6

DETERMINACION CUANTITATIVA DE RIBOFLAVINA POR FLUORIMETRIA

1.- Introducción teórica

La fluorimetría es una técnica que presenta sustanciales ventajas analíticas, pues a su especificidad se une su gran sensibilidad.

Los procesos de fluorescencia poseen una gran utilidad como base de técnicas dirigidas a la determinación de la intensidad de la emisión fluorescente, dicha señal es función, según Kavanagh, de la intensidad de la emisión de la REM absorbida por el compuesto fluorescente:

$$sf = k'(I_0 - I)$$

donde sf es la intensidad de la emisión fluorescente, k' una constante de proporcionalidad e I_0 e I las intensidades de la radiación incidente y emergente, respectivamente.

Según la *ley de Lambert-Beer*:

$$\log\left(\frac{I_0}{I}\right) = \epsilon bc \qquad I = I_0 \cdot 10^{-\epsilon bc} \qquad I = I_0 \cdot e^{-2.303\epsilon bc}$$

donde ϵ es el *Coefficiente de absorción Molar* si b se expresa en cm y c en mol·L⁻¹.

Por tanto la señal de fluorescencia, resulta:

$$sf = k'(I_0 - I_0 \cdot e^{-2.303\epsilon bc}) = k' I_0 (1 - e^{-2.303\epsilon bc})$$

Teniendo en cuenta que $e^{-2.303\epsilon bc}$ equivale a una expresión del tipo e^{-x} que puede desarrollarse en serie:

$$e^{-2.303\epsilon bc} = 1 - 2.303\epsilon bc + \frac{(2.303\epsilon bc)^2}{2!} - \frac{(2.303\epsilon bc)^3}{3!} + \dots$$

En una aproximación razonablemente válida, se podrán despreciar todos los términos a partir del tercero, siempre que $\epsilon bc \leq 0.05$. Así pues, la expresión correspondiente a la señal de fluorescencia será:

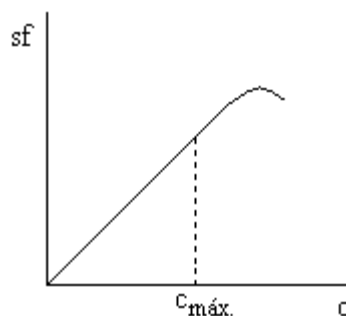
$$sf = k' I_0 [1 - (1 - 2.303\epsilon bc)] = k' I_0 2.303\epsilon bc$$

y agrupando términos constantes para un mismo equipo instrumental y una determinación dada resulta:

$$sf = k'' c$$

Según esta ecuación la señal de fluorescencia depende de la concentración c y de factores instrumentales (ángulo sólido visto por el detector, $f(\alpha)$; factor de conversión cuántico del detector, $f(\lambda)$, paso óptico de la cubeta, b , intensidad incidente de la radiación excitadora (I_0), así como de otros parámetros relacionados con la propia sustancia (coeficiente de absorción molar, ϵ ; eficacia cuántica de fluorescencia, ϕ ; todos ellos englobados en k'').

Y como la ecuación $sf=k''c$, define la proporcionalidad lineal entre la señal y la concentración, tenemos la base del aspecto cuantitativo de la espectrofluorimetría, siempre y cuando el producto $\epsilon bc \leq 0.05$.



Por tanto la linealidad sf y c se cumple para disoluciones diluidas. En efecto, sí:

$$\epsilon_{bc} < 0.05$$

$$\epsilon_{bc_{\text{máx.}}} = 0.05$$

2.- Parte experimental

a) Instrumental y productos

1 Gradilla
10 Tubos de ensayo con tapón
1 Cubeta de cuarzo
1 Frasco lavador
2 Vasos de precipitados de 100 mL
1 Matraz aforado de 100 mL
1 Pera de goma
2 Pipetas de 10 mL
1 Soporte para pipetas
Espectrofluorímetro
Riboflavina solución acuosa de 5 mg/L.

b) Procedimiento experimental

1. Realizar el espectro de excitación y emisión siguiendo las instrucciones del instrumento.
2. Preparar a partir de una disolución riboflavina de 5 mg/L, 100 mL de disolución de 0.1 g/mL. A partir de esta disolución preparamos una serie de concentraciones patrón de 0.02, 0.04, 0.06, 0.08 y 0.10 g/mL (10 mL de cada concentración).
 - Determinar la intensidad de fluorescencia (sf) de cada disolución patrón (media de tres lecturas) y la de la muestra problema
 - Representar gráficamente la intensidad de emisión de los patrones frente a sus respectivas concentraciones.
3. Interpolar la intensidad de fluorescencia de la muestra problema en la gráfica anterior para determinar la concentración de riboflavina.

Datos, medidas y cálculos