

PRÀCTICA 6

DETERMINACIÓ QUANTITATIVA DE RIBOFLAVINA PER FLUORIMETRIA

1.- Introducció teòrica

La fluorimetria és una tècnica que presenta substancials avantatges analítiques ja que a la seva especificitat s'uneix la seva gran sensibilitat.

Els processos de fluorescència posseeixen una gran utilitat com a base de tècniques dirigides a la determinació de la intensitat de l'emissió fluorescent, dita senya és funció, després de Kavanagh, de la intensitat de l'emissió de la REM absorbida pel compost fluorescent:

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

on sf és la intensitat de l'emissió fluorescent, k' una constant de proporcionalitat i I_0 i I les intensitats de les radiacions incident i emergent, respectivament.

Després de la llei de Lambert-Beer:

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

on ϵ és el coeficient d'absorció molar si b s'expressa en cm i c en mol·L⁻¹.

Per tant la senyal de fluorescència resulta:

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

Tenint en compte que $e^{-2.303 \epsilon bc}$ equival a una expressió del tipus e^{-x} que pot desenvolupar-se en sèrie:

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

En una aproximació raonablement vàlida es podrà menysprear tots els termes des dels tercer, sempre que $\epsilon bc \leq 0.05$. Així doncs l'expressió corresponent a la senyal de fluorescència serà:

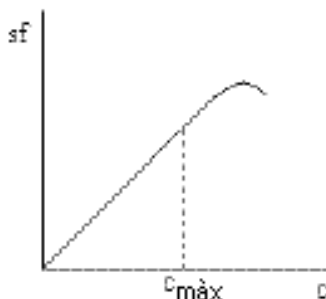
$$sf = k' I_0 [1 - (1 - 2.303 \epsilon bc)] = k' I_0 2.303 \epsilon bc$$

i agrupant termes constants per a un mateix equip instrumental i una determinació donada resulta:

$$sf = k'' c$$

Segons aquesta equació la senyal de fluorescència depèn de la concentració c i de factors instrumentals (angle sòlid vist pel detector $f(\alpha)$, factor quàntic de conversió del detector $f(\lambda)$, pas òptic de la cel·la b , intensitat incident de la radiació excitadora I_0), així com d'altres paràmetres relacionats amb la pròpia substància (coeficient d'absorció molar ϵ , eficàcia quàntica de fluorescència ϕ , tots ells englobats en k'').

A més com l'equació $sf = k''c$ defineix la proporcionalitat lineal entre la senyal i la concentració, tenim la base de l'aspecte quantitatiu de l'espectrofluorimetria, sempre i quan el producte $\epsilon bc \leq 0,05$.



Per tant la linearitat sf vs. c es compleix per a dissolucions diluïdes. En efecte si:

$$\epsilon bc < 0,05$$

$$\epsilon bc_{màx} = 0,05$$

2.-Part experimental

a) Instrumental i reactants

1 Gradeta per a tubs d'assaig.
10 Tubs d'assaig amb taps.
1 Cel·la espectrofluorimètrica de quars.
1 Flascó rentador.
2 Vasos de precipitats de 100mL.
1 Matràs aforat de 100mL.
1 Pera de succió.
2 Pipetes de 10mL.
1 Gradeta per a pipetes.
Espectrofluorímetre.
Riboflavina dissolució aquosa de $5\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$.

b) Procediment experimental

1. Realitzar l'espectre d'excitació i emissió seguint les instruccions de l'instrument.
2. Preparar a partir d'una dissolució de riboflavina de $5\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, 100mL de dissolució de $0,1\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$. A partir d'aquesta dissolució preparem una sèrie de concentracions patró de 0,02, 0,04, 0,06, 0,08 i $0,10\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (10mL de cada concentració).
 - Determinar la intensitat de fluorescència sf de cada dissolució patró (media de tres lectures) i la de la mostra problema.
 - Representar gràficament la intensitat d'emissió dels patrons vs. les seves respectives concentracions.
3. Interpolar la intensitat de fluorescència de la mostra problema en la gràfica anterior per a determinar la concentració de riboflavina.

Dades, mides i càlculs