



Universiteit Utrecht

Faculteit  
Bètawetenschappen  
Scheikunde



## Fluorescine en pH

lesbrief vwo

# Lesbrief: Fluorescentie en pH

Versie januari 2015

## **Gepubliceerd en gedistribueerd door**

Universiteit Utrecht

Departement Scheikunde

Onderwijsinstituut Scheikunde

Padualaan 8

3584 CH Utrecht

Nederland

Telefoon: 030-2539339

E-mail: science.vwo.chem@uu.nl

Deze opdracht was een stagopdracht voor de OCEP cursus 2008

Orientatie op Communicatie en Educatieve Praktijk

Stagiares/ontwikkelaars: Roel Baars/Winnie Meijer

Stagebegeleider: Iris Caris, Onderwijsinstituut Scheikunde

© 2008 Onderwijsinstituut Scheikunde, Universiteit Utrecht, Nederland

Mits deze bron wordt vermeld is het toegestaan om zonder voorafgaande toestemming van bovenstaande uitgever deze uitgave geheel of gedeeltelijk te kopiëren dan wel op andere wijze te verveelvoudigen. Het Onderwijsinstituut Scheikunde stelt het op prijs geïnformeerd te worden over het gebruik van deze uitgave en de ervaringen die ermee zijn opgedaan.

# Fluorescentie en pH

## Geïntegreerde opdracht over fluoresceïne

(auteurs: Winnie Meijer & Roel Baars – versie: september 2008)

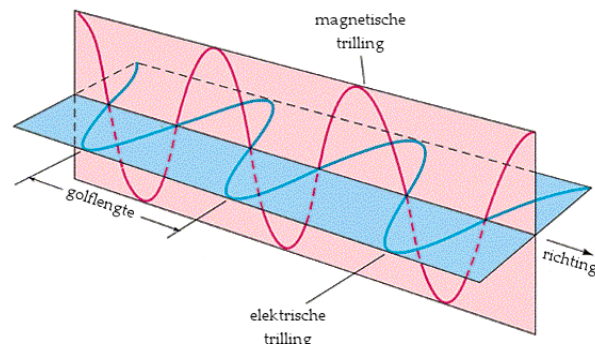
### Introductie

In deze lesbrief maak je kennis met het begrip fluorescentie. Dit is een speciale eigenschap van stoffen om onder instraling van een bepaald soort licht een ander soort licht uit te stralen. Fluorescentie heeft veel toepassingen in de wetenschap, maar ook in het dagelijks leven. Daarnaast kijk je in deze lesbrief naar de invloed van de zuurgraad (pH) op stoffeïenschappen, zoals de fluorescentie en de kleur van stoffen.

### Theorie

#### Licht

Als je het over licht hebt, heb je het meestal over zichtbaar licht, maar in feite is ‘licht’ veel meer dan alleen zichtbare licht. Veel algemener is het op te vatten als **elektromagnetische straling**, de voortbeweging van een elektrische en magnetische golf door de ruimte (zie Figuur 1).

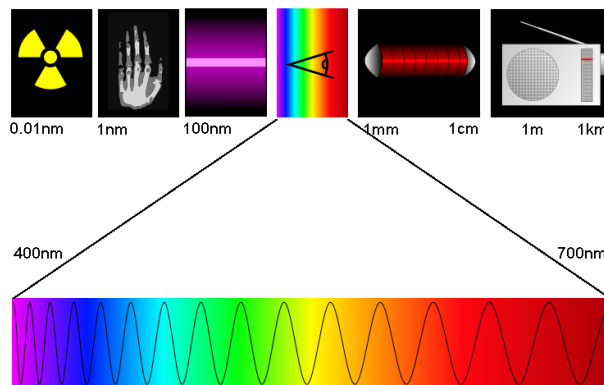


**Figuur 1.** Licht is elektromagnetische straling: een elektrische en magnetische golf die zich verplaatst.

Een misschien merkwaardige eigenschap van licht is dat de straling op twee manieren kunt bekijken: als golven of als deeltjes (**fotonen**).

Als je de straling als een golf beschouwt, dan heeft het een golflengte (en frequentie). Het hele gebied aan golflengtes wordt het elektromagnetisch **spectrum** genoemd. In het spectrum kun je verschillende gebieden onderscheiden. Het gebied van het zichtbare licht (golflengten van 380 nm tot 780 nm) is daar maar een klein stukje van (zie Figuur 2). Andere bekende gebieden zijn het ultraviolet licht (UV-straling, bekend van blacklight en zonnebanken) met golflengten tussen de 100 nm en 380 nm en het infrarood licht (IR-straling, bekend van de sauna of terraswarmers) met golflengten

tussen de 780 nm en 1 cm. Verder omvat het spectrum ook gammastraling, röntgenstraling, microgolven en radiogolven.



**Figuur 2.** Het elektromagnetische spectrum met het zichtbare deel

Als je elektromagnetische straling als fotonen beschouwt, dan heeft het foton een snelheid (de lichtsnelheid) en een **energie**. De energie kan berekend worden met:

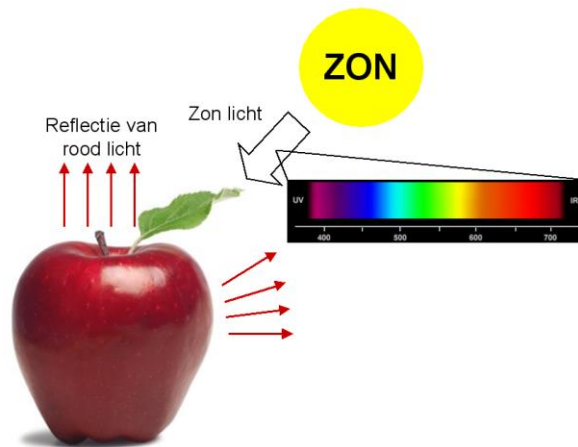
$$E = h \cdot f = (h \cdot c) / \lambda \quad (1)$$

In deze formule is  $E$  de energie van één foton (in joule),  $h$  de constante van Planck ( $h = 6,626 \cdot 10^{-34}$  J s),  $f$  de frequentie (in 1/s),  $c$  de lichtsnelheid ( $c = 2,998 \cdot 10^8$  m/s) en  $\lambda$  de golflengte van het licht (in m).

De formule laat zien dat de energie van het foton evenredig is met de frequentie en omgekeerd evenredig met de golflengte. Dit betekent dat als de golflengte van de straling langer wordt, dat de energie afneemt en omgekeerd.

### Absorptie

Een eigenschap van moleculen en atomen is dat ze licht (fotonen) kunnen **absorberen**. Dit verschijnsel komt in het dagelijks leven voor als de **kleur** van een stof of voorwerp. Stel je neemt een rode appel en je houdt die in gewoon zonlicht (zonlicht bestaat uit o.a. alle golflengten zichtbaar licht), dan zullen de blauwe en groene tinten van het zonlicht worden geabsorbeerd en de rode tinten worden weerkaatst (gereflecteerd). Alleen het gereflecteerde licht komt in je ogen en daardoor zie je dat de appel rood is (zie Figuur 3).



**Figuur 3.** Reflectie van rood licht door de appel, waardoor deze er rood uit ziet.

Op het niveau van moleculen en atomen gebeurt in principe hetzelfde. Een molecuul, ion of atoom kan bepaalde golflengten licht absorberen en de andere golflengten niet. Welke golflengten dit zijn hangt af van het *soort* molecuul, ion of atoom.

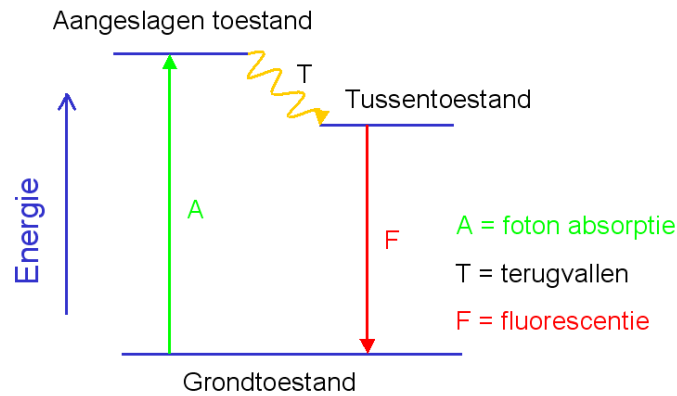
Een belangrijk feit is dat alle deeltjes altijd streven naar een zo laag mogelijke energie. Normaalgesproken bevindt een molecuul, ion of atoom zich met zijn elektronen dan ook in de zogeheten *grondtoestand*, de toestand van laagste energie. Het is door toevoeging van energie, bijvoorbeeld in de vorm van licht, mogelijk om in een toestand van hogere energie te komen, een zogeheten *aangeslagen toestand*. De golflengten licht die kunnen zorgen dat een deeltje in een aangeslagen toestand terecht kan komen zijn *specifiek* voor dat bepaalde deeltje en de absorptie kan alleen plaatsvinden als de energie van een foton overeenkomt met het energieverval tussen de grondtoestand ( $E_g$ ) en een aangeslagen toestand ( $E_a$ ).

$$\Delta E = E_a - E_g = (h \cdot c) / \lambda \quad (2)$$

Ieder atoom of molecuul heeft op deze manier een (groot) aantal karakteristieke energieovergangen ( $\Delta E$ ) om elektronen in aangeslagen toestanden te brengen.

### Fluorescentie

Als een deeltje door het absorptie van een foton in een aangeslagen toestand terecht is gekomen, kan het deeltje ook weer terug naar de grondtoestand. Hierbij komt de energie die erin gestopt is ook weer vrij. Dit kan op verschillende manier gebeuren. Eén manier is dat het deeltje eerst terugvalt naar een *tussentoestand* en daarna pas terugvalt naar de grondtoestand waarbij er een foton met een *lagere* energie (dus langere golflengte) uitgezonden wordt. Dit proces wordt *fluorescentie* genoemd (zie Figuur 4).



**Figuur 4.** Fluorescentie: Een deeltje absorbeert een foton (A) en gaat naar de aangeslagen toestand. Het deeltje valt eerst terug (T) naar de tussentoestand en valt daarna terug (F) naar de grondtoestand onder de uitzending van een foton met een lagere energie.

Mooie (maar ook praktische) toepassingen van fluorescentie kunnen gevonden worden als de fotonen die vrijkomen in het zichtbare gedeelte van het elektromagnetische spectrum liggen.

Een aantal van de belangrijke toepassingen van fluorescentie zijn TL-buizen, televisie beeldbuizen en eurobiljetten. Op eurobiljetten zitten dezelfde soort stoffen die in een TL-buis het UV-licht absorberen en zichtbaar licht uitzenden. Om de echtheid van de biljetten te kunnen controleren lichten verschillende kleuren op wanneer deze onder een UV-lamp worden gehouden (zie Figuur 5).



**Figuur 5.** Fluorescentie van een € 5,- biljet onder een UV-lamp.

### Opgave 1

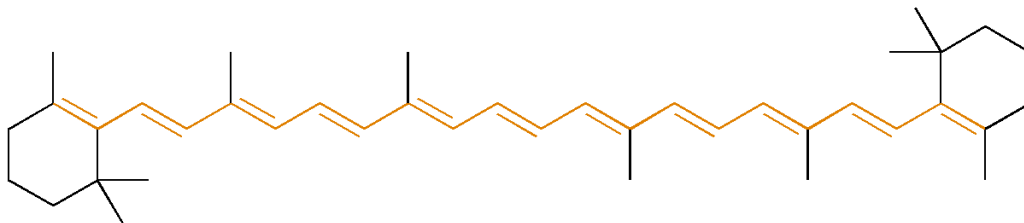
- Bij het terugvallen naar de tussentoestand, raakt het deeltje een deel van zijn energie kwijt. Bedenk een mogelijkheid waar die energie naar toe gaat.
- Een bepaald molecuul dat fluoresceert als er groen licht wordt ingestraald verliest in de stap T een hoeveelheid energie van  $8,4 \cdot 10^{-20}$  J. Bereken welke kleur licht er vrijkomt bij stap F. (Tip: gebruik Binas Tabel 48A)

## Organische stoffen

Een groep stoffen waarbij fluorescentie vaak voorkomt zijn organische stoffen met veel *afwisselende enkele en dubbele bindingen*. Een groep afwisselende enkele en dubbele bindingen worden *geconjugeerde systemen* genoemd.

Als twee atomen een dubbele binding vormen worden er in die binding twee energie niveaus gevormd. De grondtoestand, waar de elektronen zich in bevinden, en de aangeslagen toestand, waar elektronen in terecht kunnen komen. De grondtoestand van deze verbinding wordt ook wel het  $\pi$ -niveau genoemd. De aangeslagen toestand wordt het  $\pi^*$ -niveau genoemd. Wanneer een foton geabsorbeerd wordt door het molecuul, gaat een elektron in de dubbele binding van het  $\pi$ -niveau naar het  $\pi^*$ -niveau. Dit wordt een  $\pi \rightarrow \pi^*$  overgang genoemd. Meestal komt de energie die bij deze overgang hoort overeen met de energie van UV-licht.

Als een organisch molecuul een geconjugerd systeem bevat, dan zullen de elektronen in de dubbele bindingen zich gaan verdelen over de hele keten. Hoe meer atomen het geconjugeerde systeem bevat hoe meer  $\pi$ -niveaus en  $\pi^*$ -niveaus er zijn. Hierdoor zijn er veel  $\pi \rightarrow \pi^*$  overgangen mogelijk en kost het weinig energie om elektronen in het  $\pi^*$ -niveau te krijgen. Deze moleculen absorberen vaak licht in het UV-gebied, maar ook in het zichtbare gebied, waardoor dit soort moleculen vaak een kleur hebben. Een voorbeeld hiervan is  $\beta$ -caroteen de stof die wortels oranje kleurt (zie Figuur 6).



**Figuur 6.** De structuur van  $\beta$ -caroteen. Zoals je kunt zien bevat  $\beta$ -caroteen veel afwisselende enkele en dubbele bindingen achter elkaar (een geconjugerd systeem), hier oranje gekleurd.

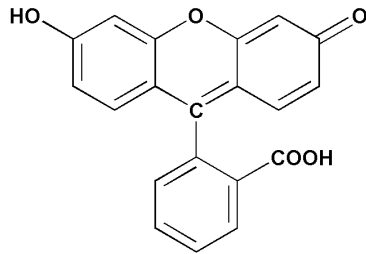
Sommige van dit soort moleculen zijn bekend om naast de absorptie van UV-licht, ook fluorescentie van zichtbaar licht te geven. Hierbij wordt de geabsorbeerde UV-straling dus omgezet naar zichtbaar licht. Voorbeelden van toepassingen van dit soort moleculen zijn kleding en schmink die oplicht onder een blacklight in de disco.

**Let op!** Het hebben van een groot geconjugerd systeem of het goed absorberen van UV-licht betekent niet automatisch dat het molecuul kan fluoresceren.



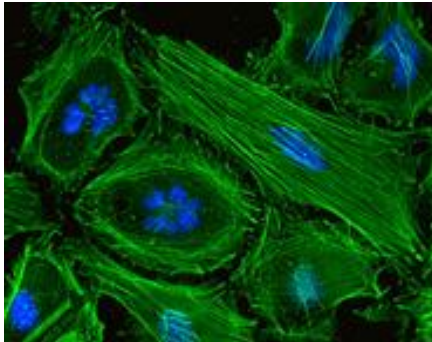
## Fluoresceïne

Een bekend voorbeeld van een stof die UV-licht absorbeert en fluoresceert met zichtbaar licht, is de stof fluoresceïne. Fluoresceïne is een organisch molecuul met een



**Figuur 7.** De structuur van fluoresceïne.

aantal koolstofringen die met elkaar verbonden zijn en een geconjugeerd systeem vormen (zie Figuur 7). Een oplossing van fluoresceïne in water heeft een goede absorptie van licht met een golflengte van 494 nm (zichtbaar licht) en van 290 nm (UV-licht). Wanneer er op een fluoresceïne oplossing UV-licht wordt gestraald vindt er fluorescentie plaats, waarbij licht met een golflengte van 521 nm vrijkomt.



**Figuur 8.** Cellen gelabeld met een antilichaam met fluoresceïne

Fluoresceïne heeft verschillende toepassingen in het dagelijks leven. Zo wordt het onder andere gebruikt voor het volgen van rivieren of als toevoeging aan regenwater om lekkages te ontdekken. Fluoresceïne wordt ook gebruikt in biologisch onderzoek. Het kan worden gekoppeld aan antilichamen om bepaalde eiwitten aan te tonen met behulp van een microscoop (zie Figuur 8).

### Opgave 2

Welke kleur heeft licht met een golflengte van 494 nm? En licht met een golflengte van 521 nm?

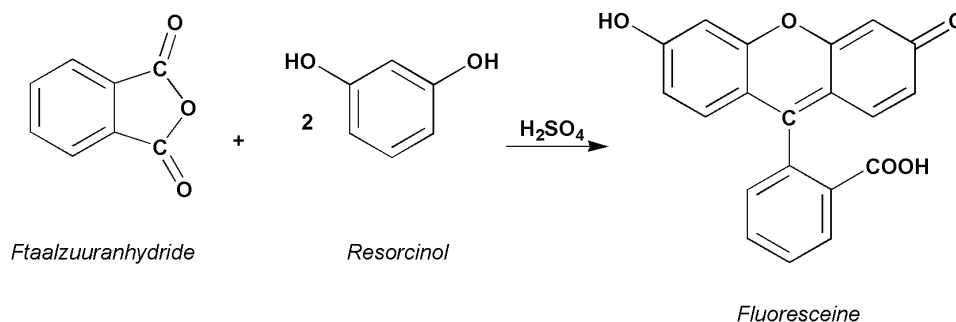


## Experiment 1: Fluoresceïne synthese

### Inleiding

In het volgende experiment ga je zelf fluoresceïne maken. Fluoresceïne wordt gemaakt door middel van een reactie tussen ftaalzuuranhydride en resorcinol met als katalysator geconcentreerd zwavelzuur. Een oplossing van fluoresceïne in water geeft groen licht wanneer het ingestraald wordt met UV-licht.

### Reactievergelijking synthese fluoresceïne



### Materiaal en stoffen

- Reageerbuis + houder + knijper
- Bekerglas (25 mL, 50 mL, 250 mL)
- Spatel, weegschaal en weegbakjes
- Pasteurpipetten
- Bunsenbrander + lucifers
- UV-lamp
- Ftaalzuuranhydride, resorcinol
- 2M zwavelzuur, 1M natronloog

### Veiligheid

Om dit experiment veilig te kunnen uitvoeren gelden naast de algemene laboratoriumregels, de volgende veiligheidseisen:

- Verwarm de reageerbuis voorzichtig en blijf deze tijdens het verwarmen goed zwenken. Er mag niets uitspatten. Richt tijdens het verwarmen de reageerbuis niet op iemand anders en hou deze niet te dicht bij de rand van de zuurkast.
- Zwavelzuur en natronloog zijn beide corrosief! Spoel bij morsen met veel water.
- Resorcinol is giftig, vermijd huidcontact!

## **Uitvoering**

- Weeg ongeveer 0,2 g ftaalzuuranhydride en 0,2 g resorcinol af.
- Breng het ftaalzuuranhydride en de resorcinol over in één reageerbuis.
- Voeg met een pasteurpipetje 3 druppels zwavelzuur toe.
- Verwarm de reageerbuis *kort* in een stille blauwe vlam tot het mengsel smelt en rood wordt (verwarm niet zo hard dat het verkoolt). **Let op!** Richt de buis tijdens het verwarmen niet op iemand anders!
- Laat de vloeistof een beetje afkoelen en vul daarna de reageerbuis voor ongeveer de helft met natronloog.
- Hou de reageerbuis nu tegen het buitenlicht, bekijk hem van boven en bekijk hem van opzij. Wat zie je allemaal?
- Druppel met een pasteurpipet vanuit de reageerbuis een paar druppels in een bekersglas met water en kijk goed wat er gebeurt.
- Bekijk dit bekersglas onder een UV-lamp bij de twee mogelijke golflengten. Vergelijk de lichtintensiteit in beide gevallen.

## **Opgave 3**

- a) Wat zie je gebeuren als je de natronloog toevoegt aan de reageerbuis?
- b) Waarom vindt er al fluorescentie plaats terwijl je niet onder de UV-lamp naar de oplossing kijkt?
- c) Verklaar het verschil tussen je waarnemingen bij de verschillende golflengten UV-licht? Bij welke golflengte is de UV-absorptie het grootst?

## Experiment 2: Analyse fluoresceïne

### Inleiding

In dit experiment ga je het effect van de zuurgraad (pH) op de fluorescentie van fluoresceïne bekijken. Daarnaast ga je kijken naar de absorptie van zichtbaar licht door fluoresceïne. Hierbij wordt gebruik gemaakt van een spectrofotometer. Eerst wordt er een kwalitatief experiment gedaan waarin de fluorescentie alleen wordt bekeken. Hierna ga je een kwantitatief experiment doen waarin je ook aan de fluorescentie gaat meten.

### Spectrofotometer

In de spectrofotometer wordt licht van een bepaalde golflengte ingestraald op een monster in een cuvet. Een deel van het licht wordt door het monster geabsorbeerd. De spectrofotometer meet de intensiteit van het licht dat niet door het monster geabsorbeerd wordt en geeft dit weer als de extinctie (Engels: *absorbance*).

De extinctie wordt uitgedrukt in de wet van Lambert-Beer:

$$A = \varepsilon \cdot c \cdot l \quad (3)$$

Waarbij:  $A$  = de extinctie (geen eenheid),  $\varepsilon$  = de extinctiecoëfficiënt,  $c$  = de concentratie van het monster (mol/L),  $l$  = de afgelegde weglengte (cm)

### Opgave 4

De eenheid van de extinctiecoëfficiënt  $\varepsilon$  is niet geven. Bepaal aan de hand van de eenheden van  $l$  en  $c$  de eenheid van  $\varepsilon$ . De extinctie  $A$  is eenheidloos.

### Materiaal en stoffen

- 2 bekerglazen van 100 mL
- Roerstaafje
- pH-papier
- UV-lamp
- Viltstift
- Spectrofotometer met cuvetten
- Onverdunde fluoresceïne-oplossing (*de oplossing uit de reageerbuis*)
- 1M natronloogoplossing, 1M zoutzuuroplossing

**Tip!** Label al je glaswerk met de stift die je gekregen hebt om verwarring te voorkomen.

### **Uitvoering (kwalitatief)**

- Vul een bekeerglas met ongeveer 50 mL natronloog.
- Vul het tweede bekeerglas met ongeveer 50 mL zoutzuur.
- Druppel in beide bekeerglazen een klein, gelijk aantal druppels van de onverdunde fluoresceïne oplossing.
- Meet de pH van beide oplossingen met een stukje pH-papier.
- Bekijk beide bekeerglazen onder de UV-lamp bij de twee mogelijke golflengten.

### **Opgave 5**

- a) Wat voor verschillen zie je tussen de basische en de zure oplossing als fluoresceïne is toegevoegd?
- b) Bedenk een oorzaak voor dit verschil (of deze verschillen).

### **Uitvoering (kwantitatief)**

- Neem van beide maatbekers een monster voor het meten op de spectrofotometer.
- Stel het apparaat in op 435 nm en stel met behulp van een blanco monster van demiwater het apparaat op nul.
- Meet de extinctie van de monsters bij 435 nm.
- Herhaal de twee bovenstaande stappen voor 494 nm.

### **Opgave 6**

- a) Zet de gemeten extinctie van de basische en zure oplossing in een tabel. Wat is het effect van de pH op de extinctie van beide oplossingen bij de twee verschillende golflengten?
- b) Meet je fluorescentie in de spectrofotometer?
- c) Bedenk een verklaring voor je waarnemingen op basis van de theorie van geconjugeerde systemen.