

Sveučilište J.J. Strossmayera u Osijeku

Odjel za kemiju

Preddiplomski studij kemije

Robert Petrić

Optički senzori utemeljeni na učinku unutarnjeg filtra

Inner filter effect based optical sensors

Završni rad

Mentor: Assist.prof. Aleksandar Sečenji

Osijek, 2019.

Sažetak

U binarnom sustavu optički aktivnih tvari, efekt unutarnjeg filtera uzrokovan je apsorbancijom emisijskog i/ili ekscitacijskog svjetla od strane absorbera. Efekt unutarnjeg filtera može se koristiti kao efikasna analitička kvantitativna metoda. Moguće je određivanje totalnog antioksidativnog kapaciteta korištenjem utemeljene CERAC metode (metoda gdje Ce(IV) selektivno oksidira antioksidativne komponente uzorka) pri čemu se fluorometrijski prati promjena intenziteta fluorescentnog aditiva sa odgovarajućim ekscitacijskim spektrom i velikim Stock-ovim pomakom. Korištenjem fenomena efekta unutarnjeg filtera trebalo bi biti moguće razviti još pouzdaniju i precizniju metodu za određivanje totalnog antioksidativnog kapaciteta uzorka.

Ključne riječi

Efekt unutarnjeg filtera, Fluorescencija, Cerij, Antioksidansi, Totalni antioksidativni kapacitet, CERAC

Abstract

In the binary system of optically active substances, the effect of the internal filter is caused by the absorption of emission and/or excitation light by the absorber. The internal filter effect can be used as an efficient analytical quantitative method. It is possible to determine the total antioxidant capacity using a grounded CERAC method (a method where Ce (IV) selectively oxidises the antioxidant components of the sample), fluorometrically monitoring the change in the intensity of the fluorescence additive emission with an appropriate excitation spectrum and a large Stock shift. Internal filter effect phenomenon can be used to develop a more reliable and accurate method for determining the total antioxidant capacity of a sample.

Keywords

Inner filter effect, Fluorescence, Cerium, Antioxidant, Total antioxidant capacity, CERAC

Sadržaj

Uvod.....	1
Fluorescencija	2
Jablonski dijagram	3
Optički senzori	5
Totalni antioksidativni kapacitet	6
CERAC metoda.....	7
Efekt unutarnjeg filtera.....	8
Optički senzori temeljeni na efektu unutarnjeg filtera	9
Cerij.....	10
Zaključak.....	11
Prilozi	12
Popis literature	13

Uvod

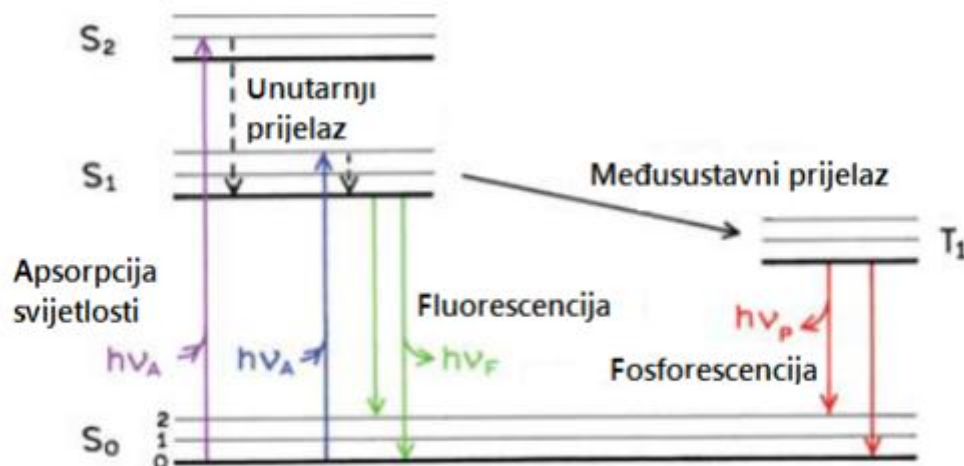
Fluorescencija je zračenje svjetlosti tvari koja ima mogućnost apsorpcije svjetlosti. Pri ekscitaciji ili emisiji zračenja fluorescera uz dodani apsorber koji ima apsorpcijski maksimum jednak apsorpcijskom ili emisijskom maksimum fluorescera, dolazi do interferencije koja rezultira smanjenjem intenziteta emisije odnosno fluorescencije. Ta pojava naziva se efekt unutarnjeg filtera. Efekt unutarnjeg filtera može se koristiti kao kvantitativna metoda zbog nelinearne ovisnosti apsorpcije absorbera i fluorescencije fluorescera to jest zbog eksponencijalne promjene fluorescencije fluorescera u odnosu na apsorpciju absorbera. Zbog te ovisnosti efekt unutarnjeg filtera potencijalno se može koristiti kao vrlo osjetljiva metoda. U praksi bi trebalo biti moguće određivati totalni antioksidativni kapacitet antioksidansa spektroskopskom (fluorometrijskom) CERAC metodom preko efekta unutarnjeg filtera. CERAC metoda se koristi za određivanje totalnog antioksidativnog kapaciteta hrane pri čemu Ce(IV) selektivno oksidira antioksidativne komponente uzorka. Totalni antioksidativni kapacitet odnosi se na ukupnu antioksidacijsku moć svih antioksidansa nekog uzorka (hrane) .

Fluorescencija

Luminescencija je emisija vidljive svjetlosti iz molekule. Razlikujemo fotoluminescenciju, kemiluminescenciju i elektroluminescenciju. Fluorescencija je tip fotoluminescencije. To je zračenje svjetlosti tvari koja ima mogućnost apsorpcije svjetlosti (UV/VIS) ili neke vrste ionizirajućeg zračenja. Apsorbacijom elektromagnetskog zračenja molekule tvari prelaze u pobuđeno stanje, što znači da elektroni prelaze iz homo (highest occupied molecular orbital) u lomo (lowest unoccupied molecular orbital), a pri prijelazu natrag u osnovno stanje oslobađa se energija u obliku topline, vibracija i najbitnije vidljive svjetlosti. Fluorescencija je vrlo brz proces te prestankom ekscitacije prestaje i fluorescencija. Ulaskom ekscitirajuće svjetlosti (svjetlosti koja pobuđuje molekulu) u gustu otopinu fluorescencija dolazi do ekscitacije, a time i fluorescencije samo prvog sloja tvari. Do takve pojave dolazi jer prolazom ekscitirajućeg svjetla kroz gustu otopinu dolazi do slabljenja intenziteta ulaznog svjetla te daljnja ekscitacija nije moguća. Kod otopina male gustoće slabljenje fluorescencije kroz otopinu je zanemarivo. Intenzitet fluorescencije otopina koje sadrže više fluorescencija jednaka je sumi intenziteta fluorescencije pojedinih fluorescencija. To znači da kada se pomjешaju dvije otopine koje sadrže fluorescencije, jačina fluorescencije bit će jednaka sumi jačina fluorescencija. Fluorescencija se tipično opaža kod aromatskih spojeva. Jedan od poznatijih takvih spojeva je kinin koji se nalazi u toniku (piće). Ekscitacija kinina se odvija izlaganjem UV svjetlosti te se emisija odvija na valnim duljinama oko 450nm.

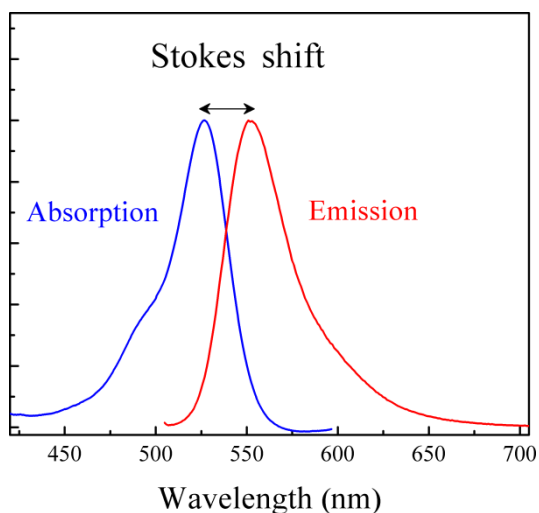
Jablonski dijagram

Singletno stanje je stanje u kojem elektroni imaju sparni spin. Apsoorbicijom određenog kvanta energije, elektron prelazi u praznu orbitalu. Ukoliko se održava antiparalelni spin tih elektrona, takvo stanje naziva se pobuđeno singletno stanje. Takvo stanje je nestabilno te se zbog toga javlja težnja elektrona da se vrata u osnovno stanje. Prijelaz u osnovno stanje događa se vrlo brzo uz emisiju fotona. Trajanje fluorescencije je približno 10ns (10×10^{-9} s), to je prosječno vrijeme potrebno za povratak elektrona u osnovno stanje. Analogno fosforescencija je emisija svjetla preko pobuđenog tripletnog stanja u kojem pobuđeni elektron ima isti spin kao i elektron u osnovnom stanju. Prijelaz nazad u osnovno stanje je zabranjen te brzina emisije je spora pa je time trajanje fosforescencije od nekoliko mili sekundi do nekoliko sekundi. U pravilu je moguće i duže trajanje čak i do nekoliko minuta pri čemu se pobuđeni elektroni polako vraćaju u osnovno stanje (primjer takve emisije su igračke koje svijetle u mraku). Relaksacija ili povratak u osnovno stanje se može odvijati radijativnim i neradijativnim procesima. Kod radijativnih procesa dolazi do emisije fotona te su to fluorescencija i fosforescencija, a kod neradijativnih procesa ne dolazi do emisije fotona.



*slika 1

Jablonski dijagram opisuje elektronske prijelaze iz osnovnih stanja u pobuđenastanja elektrona, a taj prijelaz u pobuđeno stanje je posljedica apsorpcije svjetla. Ova vrsta dijagrama dobila je naziv po profesoru Alexanderu Jablonskom kojeg se smatra ocem fluorescencijske spektroskopije. Tipični Jablonski dijagram prikazan je slikom jedan. Singletno osnovno prvo i drugo elektronsko stanje su označeni s S_0 , S_1 , S_2 . Pri svakom od navedenih energijskih nivoa spoj može postojati u bilo kojem od vibracijskih enegijskih nivoa označenih s 0, 1, 2. Prijelazi energijskih stanja označeni su vertikalnim linijama koje prikazuju trenutnu apsorbciju svjetla. Trajanje prijelaza je oko 10^{-15} sekundi. Apsorbicijom svjetla dolazi do ekscitacije molekule na jednu od viših vibracijskih nivoa S_1 ili S_2 . Nadalje, dolazi do relaksacije do najnižeg vibracijskog nivoa S_1 procesom koji se naziva unutarnja konverzija. Trajanje ovog procesa je 10^{-12} sekundi ili manje. Unutarnja konverzija se u pravilu odvija prije fluorescencije. Molekule čiji elektroni se nalaze u pobuđenom S_1 stanju mogu biti podvrgnute konverziji spina u tripletno stanje T_1 . Emisija relaksacije iz T_1 stanja naziva se fosforescencija te se u pravilu odvija pri većim valnim duljinama to jest manjom energijom od fluorescencije. Prijelaz elektrona iz S_1 u T_1 naziva se križanje među sustavima.[4.] Neradijativni prijelazi mogu biti vibracijski prijelazi elektrona u stanja niže energije, pri čemu ostaju u istom elektronskom stanju ili mogu biti reakcija fluorescencija s otapalom. U radijativnom prijelazu dolazi do oslobađanja fotona pri čemu elektron prelazi u niže (osnovno) elektronsko stanje. Prijelaz iz homo položaja u lumo položaj je moguć samo kada je razlika energija između njih dovoljno mala da pri apsorpciji svjetlosti (energije) može doći do skoka elektrona odnosno do prijelaza elektrona.



*slika2

Emisijski maksimum pri povratku elektrona u osnovno stanje se uvijek nalazi na većoj valnoj duljini nego apsorbancijski maksimum, odnosno veća količina energije je apsorbirana nego što je otpuštena emisijom. Stokesov pomak ili ta razlika u količini energije je posljedica neradijativnih prijelaza. Zbog te razlike u energiji, iako apsorbanacija može biti u UV spektru, emisija je gotovo uvijek u VIS spektru. [4.]

Optički senzori

Optički senzori su analitički uređaji koji mogu u stvarnom vremenu dati kontinuirane rezultate o prisutstvu specifičnih spojeva ili iona u kompleksom uzorku. Fluorometar je optički senzor pomoću kojeg se mjere parametri fluorescencije (intenzitet, valna duljina, vrijeme života). Standardni fluorometar sastoji se od izvora svjetlosti (laser, LED), monokromatora (rešetka, prizma, optički filter) koji nije potreban uvijek već samo kada izvor svjetlosti nije monokromatski, pretinca za ispitivanje i referentni uzorak i detektora. Fluorometrijske metode vrlo su osjetljive i selektivne te imaju široku primjenu u analitičkoj kemiji, najčešće su to kvantitativne metode.

Totalni antioksidativni kapacitet

Izlaganjem organizma velikim količinama reaktivnih kisikovih jedinica (reactive oxygen species – ROS) dolazi do oksidativnog stresa pri čemu može doći do oksidativnog oštećenja stanica. Pod reaktivne kisikove jedinice podrazumjevamo radikale koji sadržavaju nespareni elektron ($\cdot\text{OH}$ i $\text{O}_2\cdot$) ili molekule koje imaju sposobnost privlačenja elektrona drugih molekula (H_2O_2 i HOCl). Ove vrste mogu uzrokovati direktno oštećenje biomolekula ili mogu inicirati radikalne lančane kemijske reakcije u kojima se ROS prenose s jedne molekule na drugu, što rezultira ekstenzivnim oštećenjem stanične strukture kao što su membrane i proteini. Ovakva oštećenja mogu biti uzrok raznih bolesti. Antioksidansi mogu retardirati ili spriječiti ovakve oksidacijske reakcije čime se spriječavaju bolesti uzrokovane oksidativnim stresom. Konzumacija voća i povrća povezana je s manjom učestalosti i nižom stopom smrtnosti uzrokovanom karcinomom, kardiovaskularnim bolestima i cerebrovaskularnim bolestima. Antioksidanse dijelimo u dvije klase: primarni (chain – breaking) i sekundarni (preventive antioxidants). Budući da je hrana biljnog podrijetla bogata antioksidativnim vitaminima, antioksidativnim karotenoidima, antioksidativnim flavonoidima i antioksidativnim antocijaninima, konzumacija voća i povrća je jedan od najefikasnijih načina prevencije bolesti uzrokovanih oksidativnim stresom. Kemijska raznolikost antioksidansa čini njihovu separaciju i kvantifikaciju iz biljnog materijala kompliciranom.[3.] Važno je odrediti metode kojima se može izmjeriti antioksidativni potencijal hrane to jest kako odrediti totalni antioksidativni kapacitet direktno iz ekstrakta voća ili povrća. Totalni antioksidativni kapacitet je integrirani parametar koji odražava ukupnu sposobnost svih antioksidansa uzorka. Mehanizam mjerenja totalnog antioksidativnog kapaciteta se dijeli na mjerenje prijenosa elektrona (electron transfer – ET) i prijenos atoma vodika (hydrogen atom transfer – HAT). U metode temeljene na prijenosu elektrona ubrajamo ABTS/ TEAC (trolox equivalent antioxidant capacity), FCR (folin – ciocalteau reagent), FRAP (ferric ion reducing antioxidant power), CERAC, CUPRAC. U pravilu se metode na temelju prijenosa elektrona češće primjenjuju jer su jeftinije, jednostavnije i fleksibilnije, a time i prikladnije za rutinske eksperimente, s time da te metode daju manje konzistentne rezultate zbog velike ovisnosti o uvjetima reakcije kao što su koncentracija reagensa, pH, otapalima i vremenu inkubacije. Taj problem se može izbjeći standardiziranim uvjetima reakcije.[1.]

CERAC metoda

Ce(IV)-based reducing capacity (CERAC) metoda je razvijena kako bi se mogao izmjeriti totalni antioksidativni kapacitet (total antioxidant capacity – TAC) hrane gdje Ce(IV) selektivno oksidira antioksidativne komponente uzorka voća ili povrća, ali ne i citratnu kiselinu i reducirajuće šećere koji nisu klasificirani kao antioksidansi. Metoda se temelji na prijenosu elektrona (electron transfer – ET) između Ce(IV) iona i antioksidansa u optimiziranom mediju sumporne kiseline (0,3 mol/L H₂SO₄ i 0,7 mol/L Na₂SO₄) te određivanju nastalog Ce(III) iona fluorometrijskom metodom. Nastali fluorescentni produkt Ce(III) ima emisijski maksimum pri 360nm s ekscitacijskim maksimumom pri 256nm. Intenzitet fluorescencije povezan je s antioksidativnom sposobnosti uzorka. Razvijena CERAC metoda uspješno je provedena pri određivanju totalnog antioksidativnog kapaciteta spojeva kao što su troloks, kvercetin, galna kiselina, askorbinska kiselina (vitamin C), katehin, kofeinska kiselina, ferulinska kiselina i cistein. Ova metoda određivanja totalnog antioksidativnog kapaciteta se pokazala jednostavnom, jeftinom te daje konzistente rezultate koji se podudaraju s rezultatima ranije razvijenih metoda kao što su ABTS i CUPRAC. Otopina Ce(IV) sulfata u sumpornoj kiselini je relativno stabilna duži period vremena, ali u lužnatijim otopinama nastaju kompleksi tipa Ce(OH)_n⁴⁻ⁿ. Pristupstvo sulfatnih iona (SO₄²⁻) može umanjiti kompleksirajuću mogućnost Ce(IV) s organskim supstratima te time može spriječiti oksidaciju organskih spojeva cerijem, budući da je stvaranje kompleksa Ce(IV) – organski supstrat preduvjet za brzi prijenos elektrona. Redukcijski potencijal Ce(IV) / Ce(III) se smanjuje u prisutstvu većih koncentracija SO₄²⁻ iona pri čemu prevladava stanje više oksidacije. Zbog ovih razloga bitno je naći optimalne uvjete reakcije oksidacije antioksidansa cerijem to jest optimalni omjer koncentracija sumporne kiseline i natrijeva sulfata pri čemu ne dolazi do oksidacije citratne kiseline i reducirajućih šećera. [1.]

Efekt unutarnjeg filtera

Efekt unutarnjeg filtera važan je model neradijacijske konverzije energije u spektrofotometriji koja je rezultat apsorpcije eksitacijskog i/ili emisijskog svjetla od strane absorbera u promatranom sustavu. Intenzitet fluorescencije proporcionalan je intenzitetu ekscitirajućeg svjetla. Prividni kvantni prinos nešto je manji od onog opaženog za beskonačno razrijeđenu otopinu. Ovaj fenomen naziva se efekt unutarnjeg filtera (Inner filter effect; IFE). Efekt unutarnjeg filtera može smanjiti intenzitet ekscitacije (pobuđivanja) ili fluorescencije zbog apsorpcije svjetlosti. Ta apsorpcija ekscitirajuće i/ili emisijske radijacije od strane matriksa umanjuje intenzitet fluorescencije i rezultira nelinearnom ovisnošću između promatranog intenziteta fluorescencije i koncentracije fluorescera. Promjene apsorpcije absorbera prevode se u eksponencijalne promjene fluorescencije fluorescera što povećava osjetljivost i smanjuje prag detekcije. Efekt unutarnjeg filtera prije je smatran greškom pri fluorescencijskim mjerenjima, a danas se koristi kao učinkovita i precizna spektroskopska metoda sa vrlo širokom primjenom. U posljednje vrijeme ova metoda dobiva sve više pozornosti zbog visoke osjetljivosti, selektivnosti i jednostavnosti te neradijacijske prirode. Razlikuju se primarni i sekundarni efekt unutarnjeg filtera. Primarni se efekt unutarnjeg filtera (primary inner filter effect pIFE) odnosi na apsorpciju ekscitacijske radijacije od strane određenih kromofora u promatranj otopini. Sekundarni efekt unutarnjeg filtera (secondary inner filter effect sIFE) se odnosi na apsorpciju emisijske radijacije od strane istih kromofora. Kromofore su dijelovi molekula zaslužni za boju tvari. U svojoj strukturi sadržavaju konjugirane sustave dvostrukih ili trostrukih veza koje služe za apsorpciju svjetlosti pri određenim valnim duljinama. Sekundarni efekt unutarnjeg filtera (sIFE) može se u potpunosti izbjeći u koliko emisijski spektar nalazi pri valnim duljinama pri kojima niti jedna druga komponenta uzorka ne apsorbira svjetlo. Efekt unutarnjeg filtera može se umanjiti ili zanemariti, ali nikada se ne može u potpunosti eliminirati jer kako bi došlo do fluorescencije prvo mora doći do apsorpcije to jest ekscitacije. Zbog toga se pokušava nadoknaditi za utjecaj efekta unutarnjeg filtera te uspostaviti linearnu ovisnost između intenziteta fluorescencije fluorescera i njegove koncentracije. Ispravljeni intenzitet fluorescencije izražava se slijedećom jednačinom

$$\frac{F_{corr}}{F_{obs}} = \frac{2.3dA_{ex}}{1 - 10^{-dA_{ex}}} 10^{gA_{em}} \frac{2.3sA_{em}}{1 - 10^{-sA_{em}}}$$

*slika 3

gdje je F_{obs} izmjereni maksimum intenziteta fluorescencije, F_{corr} ispravljeni maksimum intenziteta fluorescencije nakon uklanjanja efekta unutarnjeg filtera iz F_{obs} , A_{ex} predstavlja apsorbanciju pri valnoj duljini ekscitacije (λ_{ex}), a A_{em} predstavlja apsorbanciju pri maksimumu emisije (λ_{em}), s predstavlja debljinu ekscitacijske zrake, g predstavlja udaljenost između ruba ekscitacijske zrake i ruba kivete, a d označava širinu kivete. Ispravljen intenzitet fluorescencije približno je dan jednadžbom

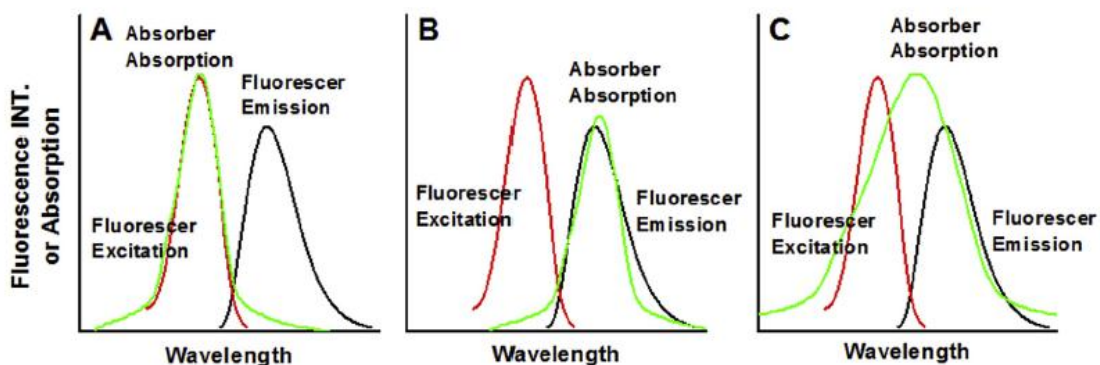
$$F_{corr} = F_{obs} \times 10^{(A_{ex} + A_{em})/2}$$

*slika 4

Efekt unutarnjeg filtera može biti izazvan ne samo fluorescerom nego i bilo kojom komponentom sustava. Svaka promjena fluorescencije povezana promjenom koncentracije analita predstavlja potencijal za upotrebu kao senzor.

Optički senzori temeljeni na efektu unutarnjeg filtera

Kako bi se uspostavio senzor na bazi efekta unutarnjeg filtera potrebne su dvije optičke jedinice, absorber i fluorescer. Kako bi očitavanja bila što kvalitetnija potrebno je da se apsorbcijski spektar absorbera u što većem dijelu preklapa sa ekscitacijskim i/ili emisijskim spektrom fluorescera (slika 5). Tako da se fluorescencija fluorescera mijenja absorberom. Efikasnost efekta unutarnjeg filtera ovisna je o preklapanjima spektara absorbera i fluorescera te je zbog toga vrlo bitno odrediti kvalitetan par absorbera i fluorescera. Apsorbancija absorbera treba biti osjetljiva i selektivna u odnosu na koncentraciju analita dok fluorescencija fluorescera treba biti neovisna o analitu. Čime se osigurava da je fluorescencija indikator u sensorima temeljenim na efektu unutarnjeg filtera. Apsorbancija i fluorescencija trebaju biti neovisne o vanjskim faktorima te se fluorescencija nebi trebala umanjiti absorberom. Zbog toga je bolje kada se naboji absorbera i fluorescera odbijaju. Radi dobivanja kvalitetnih rezultata potrebno je izabrati absorber osjetljiv na analit i fluorescer neosjetljiv na analit te prilagoditi intezitet ekscitacije i emisije fluorescera varirajući absrbciju absorbera. Senzori temeljeni na efektu unutarnjeg filtera predstavljaju visoku fleksibilnost i jednostavnost bez ikakvih ograničenja kemijske veze fluorescera i receptora.



*slika 5, Dijagrami prikazuju preklapanje apsorpcijskog spektra apsorbera s emisijskim ili ekscitacijskim spektrom fluorescera.

Cerij

Cerij je element s oznakom Ce, atomskog broja 58 i relativne atomske mase 140.115. Pripada skupini lantanoida, skupini elemenata koji se u prirodi najčešće nalaze u obliku oksida te elementi u toj skupini vrlo često imaju slična svojstva. Elementi iz te skupine imaju paramagnetična svojstva. Cerij se u pokusu efekta unutarnjeg filetra može koristiti kao apsorber što znači da će on apsorbirati svjetlo. U ovom pokusu, koristiti će se Ce(IV) koji će se reducirati u Ce(III), koji ima ekscitacijski maksimum pri valnoj duljini od 256nm, a emisijski maksimum pri valnoj duljini od 360nm.

Zaključak

S obzirom na važnost antioksidansa za ljudsko zdravlje bilo je važno razviti i metode mjerenja ukupne antioksidativne moći antioksidansa u hrani. CERAC metoda je spektroskopska metoda koja se temelji na fluorescenciji koja je popraćena efektom unutarnjeg filtera. Korištenjem CERAC metode Ce(IV) selektivno oksidira antioksidativne komponente uzorka pri čemu se cerij reducira u Ce(III). Uz dodatak fluorescentnog aditiva sa odgovarajućim ekscitacijskim spektrom i velikim Stock-ovim pomakom, može se fluorometrijski pratiti promjena koncentracije Ce(IV) i na taj način odrediti totalni antioksidativni kapacitet uzorka koji govori o antioksidativnoj moći uzorka (najčešće voća ili povrća). Fluometrijskim mjerenjima dolazi do greške uzrokovane apsorbancijom ekscitacijskog ili emisijskog svjetla. Danas se zna za taj fenomen te je poznato da se on može iskoristiti za vrlo precizna kvantitativna mjerenja. Efekt unutarnjeg filtera prije je smatran pogreškom, a danas je poznato da se može koristiti kao vrlo pouzdana, jeftina, precizna metoda s vrlo niskim pragom detekcije. Te se iz ovih razloga može naslutiti da se korištenjem optičkih senzora baziranih na efektu unutarnjeg filtera uz korištenje CERAC metode može razviti jeftina, jednostavna, precizna i pouzdana metoda za određivanje totalnog antioksidativnog kapaciteta.

Prilozi

Slika 1 – Jablanov dijagram, preuzeto s google images

Slika 2 – Stokes shift, preuzeto s google images

Slika 3 – jednadžba, preuzeto iz Inner filter effect-based fluorescent sensing systems: A review, Chen; Yu; Wang, 2017

Slika 4 – jednadžba, preuzeto iz Inner filter effect-based fluorescent sensing systems: A review, Chen; Yu; Wang, 2017

Slika 5 – uvjeti efekta unutarnjeg filtera, preuzeto iz Inner filter effect-based fluorescent sensing systems: A review, Chen; Yu; Wang, 2017

Popis literature

1. D. Ozyurt, B. Demirata, R. Apak, *Determination of Total Antioxidant Capacity by a New Spectrofluorometric Method Based on Ce(IV) Reduction: Ce(III) Fluorescence Probe for CERAC Assay*, Springer Science+Business Media, LLC 2011 (
2. H. Sies, *Experimental Physiology*, 82. (1997), 292-295
3. H. Wang, G. Cao, R. L. Prior, *Journal of agricultural and food chemistry* 44 (1996), 701-705
4. J. R. Lakowicz, *Principles of Fluorescence Spectroscopy Second Edition*, Springer Science+Business Media, Baltimore, 2013
5. M. Lin, H. Y. Zou, T. Yang, Z. X. Liu, H. Liu and C. Z. Huang, *Nanoscale* 5. (2016), 1-9
6. M. Kubista, R. Sjoback, S. Eriksson, B. Albinsson, *Analyst*, 3. (1994), 417-419
7. R.W. Sabnis, *Handbook of Fluorescent Dyes and Probes*, Wiley, New Jersey, 2015
8. S. Chen, J. L. Yu, J.H. Wang, *Analytica Chimica Acta* 99 (2018) , 13-26