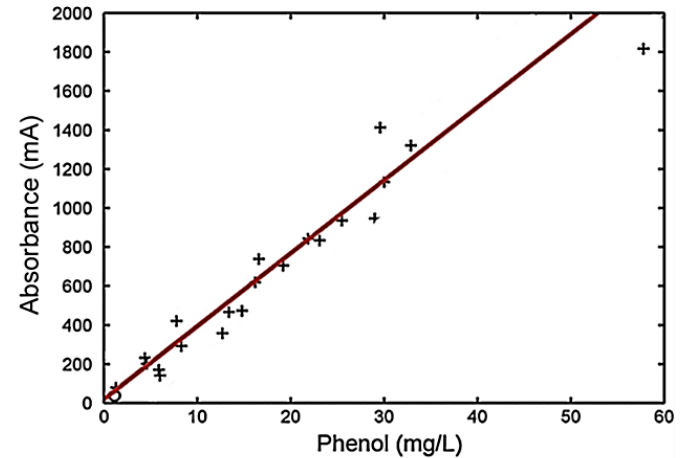


SPETTROFOTOMETRIA E SPETTROFLUORIMETRIA

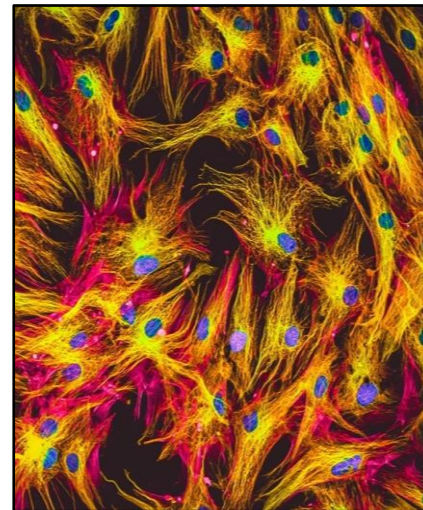


Nella spettrofotometria si ha di solito una dipendenza lineare fra assorbanza e concentrazione (legge di Lambert-Beer)

Le tecniche spettrofotometriche sono le più comuni tecniche analitiche strumentali impiegate in laboratorio



Fluorescenza e chemiluminescenza sono due comuni processi di emissione di radiazione da parte di molecole



Molecole fluorescenti vengono spesso usate come marcatori per sonde biospecifiche

SOMMARIO

- **Spettroscopia**
Interazione radiazione elettromagnetica/materia, spettro elettromagnetico, processi di assorbimento di radiazioni, spettri di assorbimento
- **Analisi spettrofotometrica quantitativa**
Processi di assorbimento, trasmittanza ed assorbanza, legge di Lambert-Beer, definizione operativa dell'assorbanza, derivazione della legge di Lambert-Beer, limitazioni della legge di Lambert-Beer ed errore spettrofotometrico, analisi di miscele
- **Spettri di assorbimento**
Spettri atomici e molecolari, spettri a righe e a bande, spettri di classi di molecole (composti organici, elementi di transizione, lantanidi ed attinidi, complessi di metalli di transizione), assorbimento del solvente
- **Strumentazione**
Componenti di uno spettrofotometro (sorgenti, selettori di lunghezza d'onda, cuvette, rivelatori), configurazioni strumentali (spettrofotometri a singolo e doppio raggio, a matrice di diodi, per piastre microtiter, spettrofotometri portatili)
- **Spettrofluorimetria**
Processi di emissione di radiazione, spettri di emissione, caratteristiche di una emissione (spettri di emissione ed eccitazione, tempo di vita), specie fluorescenti, analisi quantitativa, componenti di uno spettrofluorimetro (sorgenti, selettori di lunghezza d'onda, cuvette, rivelatori), configurazioni strumentali

SPETTROFOTOMETRIA E SPETTROFLUORIMETRIA

RADIAZIONE ELETTROMAGNETICA

Che cos'è la radiazione elettromagnetica?

E' una forma di energia che si propaga attraverso lo spazio o un mezzo trasparente alla radiazione. Può essere indifferentemente descritta come un'onda o come una particella.

Modello ondulatorio

Campi elettrici e magnetici oscillanti che si propagano alla velocità della luce (c).

Nel vuoto $c = 2,998 \times 10^8 \text{ ms}^{-1}$. In un mezzo la velocità di propagazione è inferiore e vale c/n (n è l'indice di rifrazione del mezzo, es. per l'acqua $n = 1,33$).

La radiazione è descritta da parametri quali **lunghezza d'onda** (λ) e **frequenza** (ν).

Questo modello è in grado di spiegare fenomeni quali **riflessione**, **rifrazione**, **interferenza**, **diffrazione**.

Modello corpuscolare

Particelle discrete (fotoni) che si muovono alla velocità della luce.

Ogni fotone possiede una **energia** (E) data da

$$E = h\nu$$

(h è la costante di Planck, $h = 6,626 \times 10^{-34} \text{ Js}$).

Questo modello spiega i fenomeni di **assorbimento** ed **emissione** di radiazione da parte della materia.

SPETTROFOTOMETRIA E SPETTROFLUORIMETRIA

RADIAZIONE ELETTROMAGNETICA

Parametri caratteristici di una radiazione elettromagnetica

Lunghezza d'onda (λ)

Distanza fra due massimi consecutivi dell'onda associata alla radiazione elettromagnetica

Viene usata per descrivere le radiazioni nel **visibile**, **ultravioletto** ed **infrarosso** (es. nm, μm)

Energia (E)

Energia del singolo fotone, in genere espressa in elettronvolt ($1 \text{ eV} = 1,602 \times 10^{-19} \text{ J}$)

Viene usata per descrivere le radiazioni ad alta energia quali **raggi X** e **raggi γ** (es. keV, MeV)

$$E = \frac{hc}{\lambda} = h\nu = hc\bar{\nu}$$

Numero d'onda ($\bar{\nu}$)

Numero di onde per unità di lunghezza
Viene talvolta usata per descrivere le radiazioni nell'**infrarosso** (es. cm^{-1})

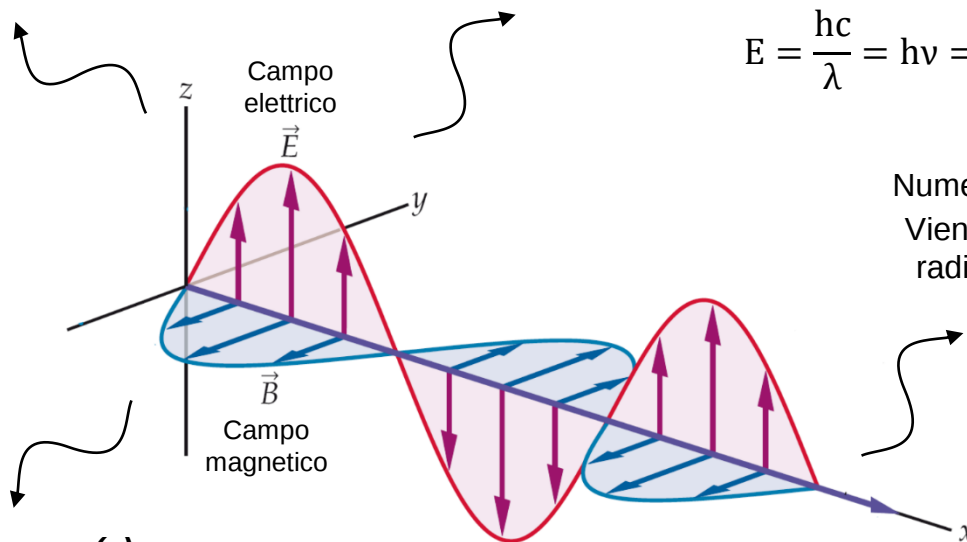
$$\bar{\nu} = \frac{1}{\lambda} = \frac{\nu}{c} = \frac{E}{hc}$$

Frequenza (ν)

Numero di oscillazioni del campo elettromagnetico al secondo, in genere espressa in Hertz ($1 \text{ Hz} = 1 \text{ s}^{-1}$)

Viene usata per descrivere le radiazioni nel campo delle **microonde** e **radioonde** (es. kHz, MHz, GHz)

$$\nu = \frac{c}{\lambda} = \frac{E}{h} = c\bar{\nu}$$

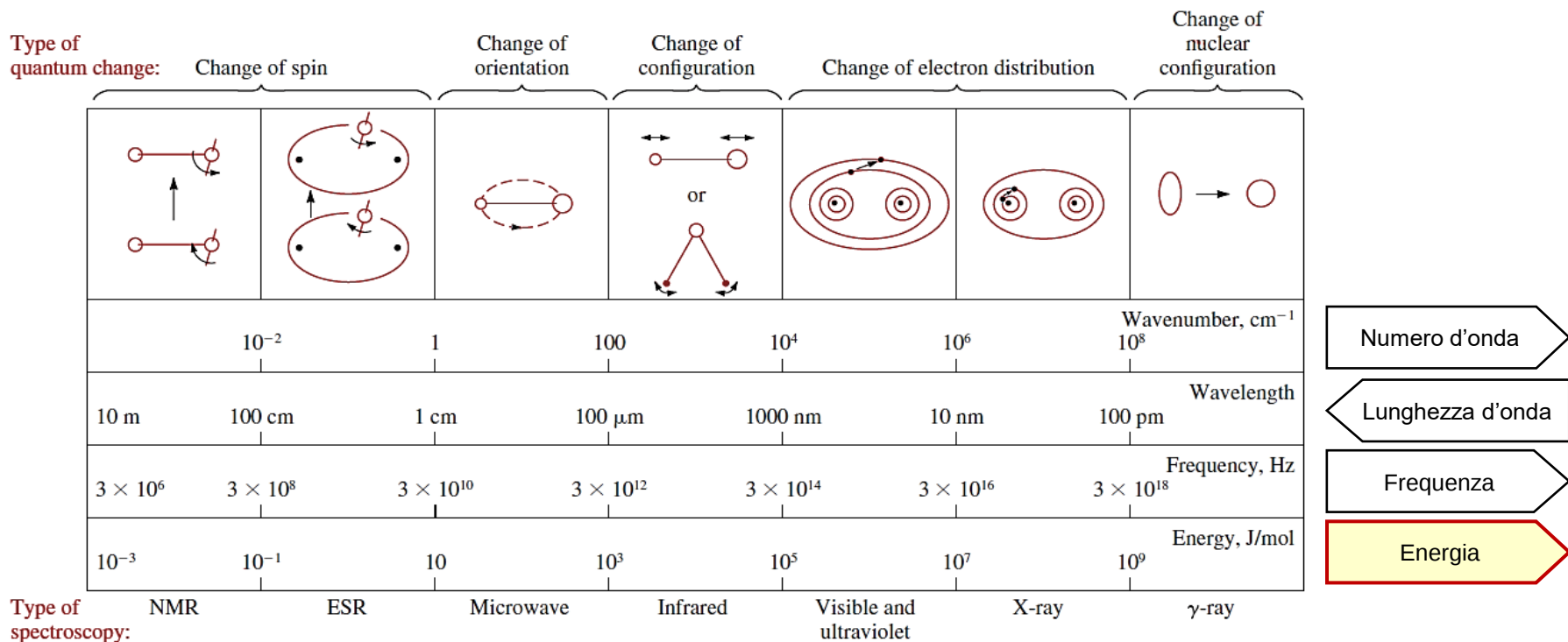


Per una radiazione **energia e frequenza sono fisse** mentre lunghezza d'onda e numero d'onda possono variare in funzione dell'indice di rifrazione del mezzo nel quale essa si propaga.

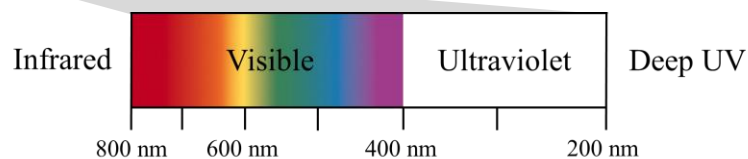
SPETTROFOTOMETRIA E SPETTROFLUORIMETRIA

RADIAZIONE ELETTROMAGNETICA

La radiazione elettromagnetica copre un intervallo virtualmente illimitato (**spettro elettromagnetico**), convenzionalmente suddiviso in base ai processi che si verificano quando la radiazione interagisce con la materia.



Le radiazioni nel campo dell'**ultravioletto** ($\lambda = 200 - 400 \text{ nm}$) e del **visibile** ($\lambda = 400 - 800 \text{ nm}$) sono le più usate in analisi quantitativa, mentre altre zone dello spettro sono più spesso impiegate per analisi qualitative.



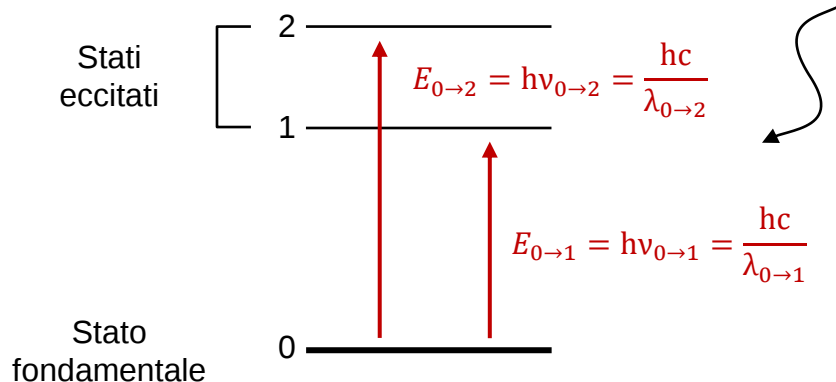
ASSORBIMENTO DI RADIAZIONE

Che cos'è un processo di assorbimento di radiazione?

L'assorbimento di una radiazione elettromagnetica da parte di un atomo o una molecola causa il passaggio dallo **stato fondamentale** (lo stato a minima energia nel quale la specie normalmente si trova) ad uno **stato eccitato** a energia maggiore.

L'energia della radiazione deve essere pari alla **differenza di energia** fra gli stati coinvolti, quindi l'assorbimento può avvenire solo a determinate lunghezze d'onda, caratteristiche della specie in esame.

Esistono anche tecniche analitiche basate su altri processi (es. rifrazione). Queste tecniche sono spesso **poco sensibili e poco selettive** (es. la rifrazione dipende dalla densità di una soluzione), quindi adatte solo per campioni con composizione semplice e relativamente concentrati.



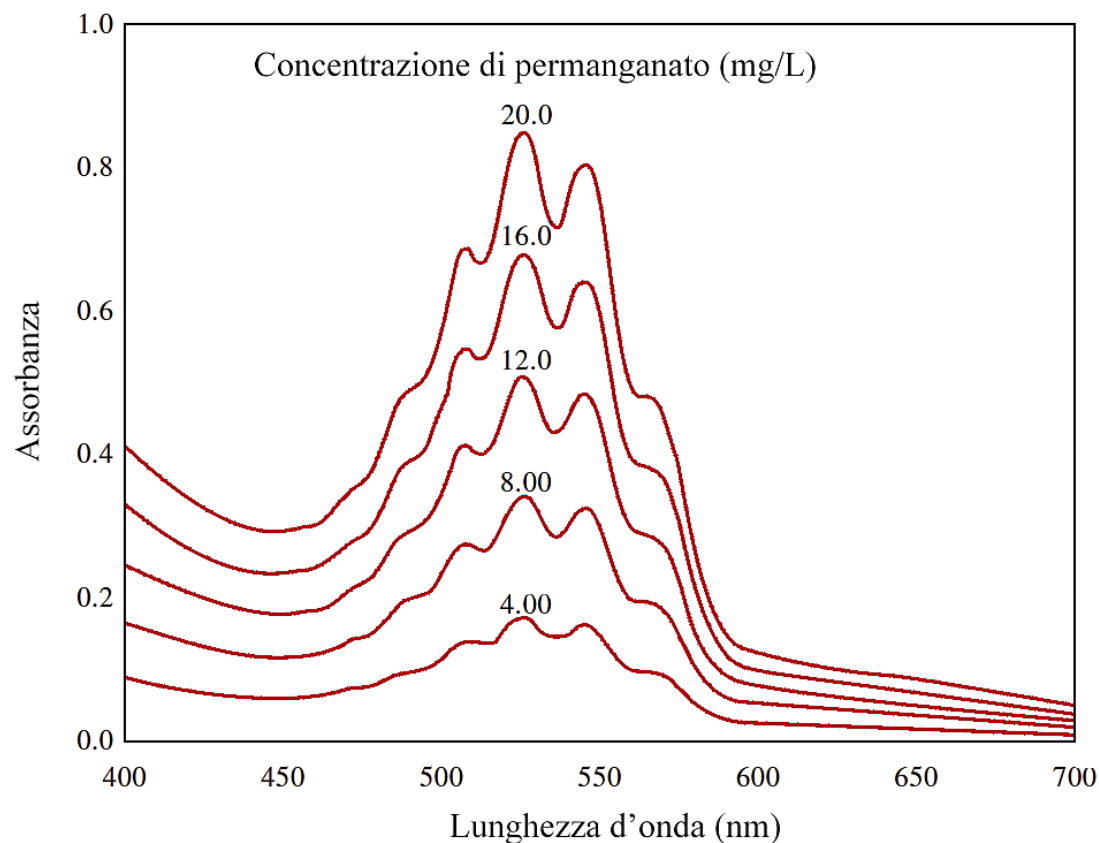
Vengono assorbite soltanto le radiazioni con energia pari alla differenza di energia fra lo stato fondamentale e lo stato eccitato prodotto

SPETTROFOTOMETRIA E SPETTROFLUORIMETRIA

ASSORBIMENTO DI RADIAZIONE

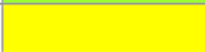
La capacità di una specie di assorbire radiazioni di diverse lunghezze d'onda è descritta dallo ***spettro di assorbimento***. La sua conoscenza è quindi per individuare le condizioni ottimali per una analisi spettroscopica.

L'intensità dell'assorbimento dipende anche dalla concentrazione della specie in esame (nel caso di soluzioni) e da altre variabili (es. solvente, lunghezza d'onda, cammino ottico)



ASSORBIMENTO DI RADIAZIONE

Sostanze con assorbimento nel visibile sono colorate e la zona dello spettro dove si verifica l'assorbimento può essere approssimativamente dedotta dal loro colore (vengono assorbite prevalentemente le radiazioni con un colore **complementare** a quello osservato).

Light Absorbed			Perceived Complementary Color	
Wavelength (nm)	Color			
400-435	Violet		Green-yellow	
435-480	Blue		Yellow	
480-490	Green-blue		Orange	
490-500	Blue-green (cyan)		Red	
500-560	Green		Purple (magenta)	
560-580	Yellow-green		Violet	
580-595	Yellow		Blue	
595-605	Orange		Green-blue	
605-650	Red orange		Blue-green (cyan)	
650-750	Red		Green	

Questo schema può essere usato per individuare il filtro da usare in una misura di assorbimento, es. una soluzione gialla assorbirà prevalentemente nel blu (435 – 480 nm) e quindi dovrà essere usato un filtro che seleziona lunghezze d'onda in questo intervallo.

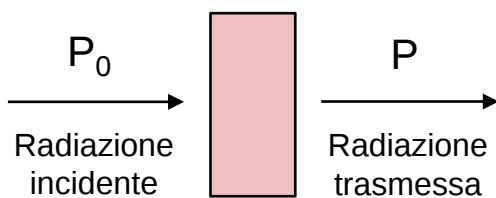
SPETTROFOTOMETRIA E SPETTROFLUORIMETRIA

ANALISI QUANTITATIVA

Come si misura l'assorbimento di radiazione?

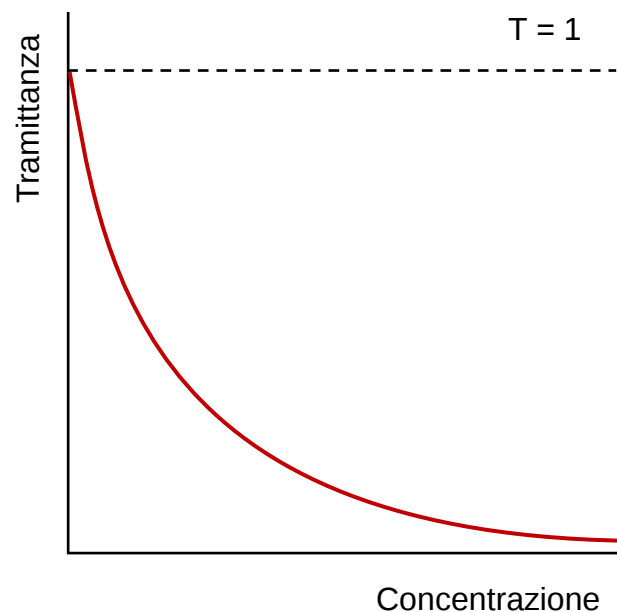
La quantità di radiazione assorbita da un campione (es. una soluzione) viene descritta mediante **trasmissione** e **assorbimento**.

La **trasmissione (T)** è la frazione di luce incidente che attraversa il campione.



$$T = \frac{P}{P_0}$$

Poiché $0 \leq P \leq P_0$ la trasmissione è **compresa fra 0 ed 1**. Talvolta viene usata la **trasmissione percentuale** ($T\% = T \times 100\%$).

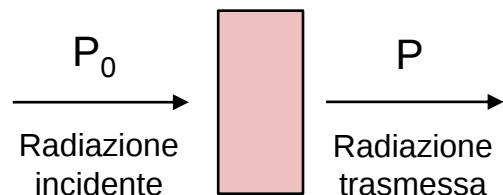


La trasmissione non è correlata linearmente con la concentrazione di analita, quindi questa grandezza non viene usata nelle analisi quantitative.

SPETTROFOTOMETRIA E SPETTROFLUORIMETRIA

ANALISI QUANTITATIVA

L'**assorbanza (A)** è definita a partire dalla trasmittanza secondo la relazione seguente

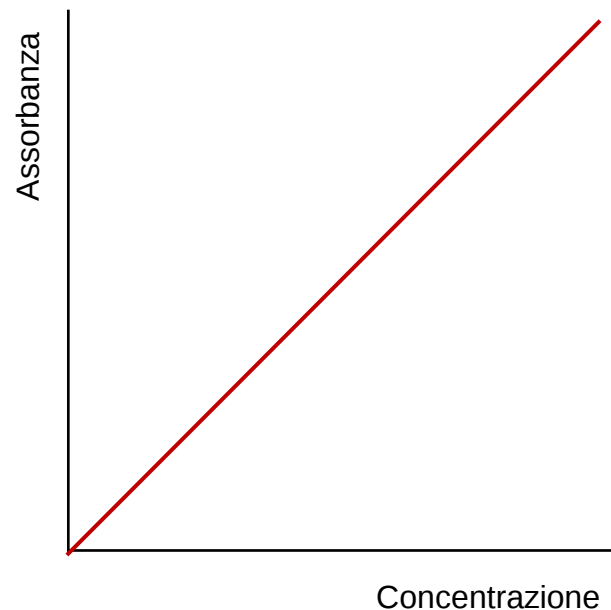


$$A = -\log T = -\log \left(\frac{P}{P_0} \right)$$

L'assorbanza è **compresa fra 0 e ∞** .

Relazione fra trasmittanza e assorbanza

Trasmittanza	Assorbanza
1,000	0,000
0,100	1,000
0,010	2,000
0,001	3,000
...	...



La relazione fra trasmittanza e concentrazione di analita è lineare, pertanto l'assorbanza viene preferita nelle analisi quantitative.

SPETTROFOTOMETRIA E SPETTROFLUORIMETRIA

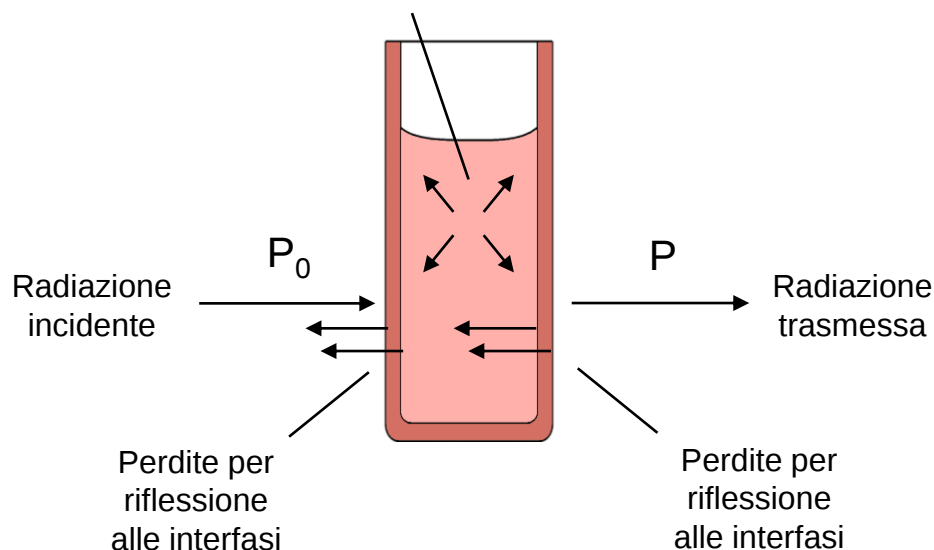
ANALISI QUANTITATIVA

Per una misura spettrofotometrica corretta è fondamentale l'uso di un **bianco**.

In una cella per misure spettrofotometriche si verifica sempre (anche in assenza di assorbimento) una diminuzione della intensità della radiazione trasmessa, pertanto l'assorbanza deve essere misurata usando un bianco (es. una cella contenente solo il solvente) come riferimento.

Questo fenomeno è dovuto prevalentemente a riflessioni alle interfacce fra aria, cella e soluzione. Se trascurato può portare a errori significativi (la riduzione dell'intensità della radiazione che attraversa una cella è tipicamente del 5 – 10%).

Perdite per diffusione nella soluzione (es. dovuta a particolato in sospensione)



Definizione operativa di assorbanza

$$A = -\log \left(\frac{P_{\text{campione}}}{P_{\text{bianco}}} \right)$$

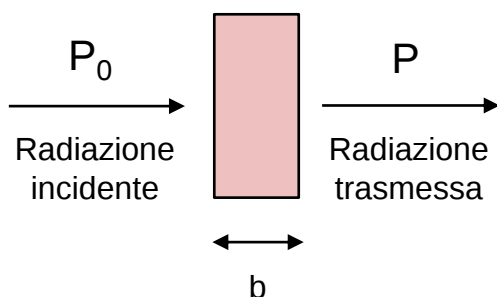
In una misura spettrofotometrica l'assorbanza viene misurata utilizzando questa relazione

SPETTROFOTOMETRIA E SPETTROFLUORIMETRIA

ANALISI QUANTITATIVA

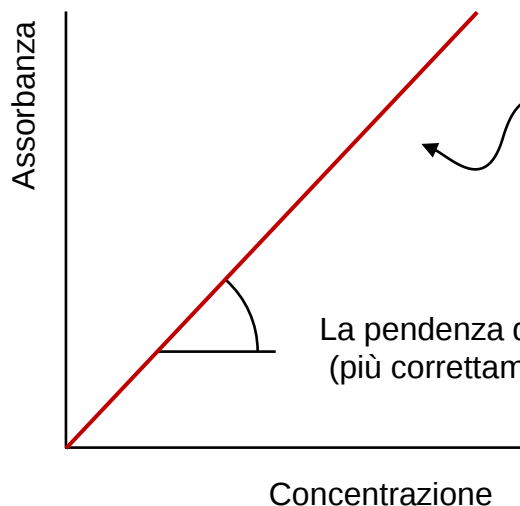
Qual è la relazione fra assorbanza e concentrazione?

Assorbanza e concentrazione sono legate dalla **legge di Lambert-Beer**, che contiene anche il cammino ottico (lo spessore della soluzione attraversata dal fascio di radiazione).



$$A = \epsilon bc$$

Questa notazione si usa se la concentrazione è in mol L^{-1} e allora ϵ è definita **assorbanza specifica molare**. Siccome A è adimensionale e b è di solito in centimetri, le dimensioni di ϵ sono $\text{L mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$. Per altre unità di concentrazione si definisce una **assorbanza specifica (a)**, le cui dimensioni dipendono dalle unità di concentrazione usate (es. a è in $\text{L g}^{-1} \text{cm}^{-1}$ se la concentrazione è in g L^{-1}).



La legge di Lambert-Beer descrive la **curva di calibrazione** di un metodo di analisi spettrofotometrico

La pendenza dipende da ϵ
(più correttamente da ϵb)

La legge di Lambert-Beer può essere anche dedotta da considerazioni teoriche (Skoog 660 – 662).

SPETTROFOTOMETRIA E SPETTROFLUORIMETRIA

ANALISI QUANTITATIVA

La conoscenza della **assorbività specifica** è fondamentale in una analisi spettrofotometrica.

Analita

Lunghezza d'onda

Ambiente

Solvente e pH (per specie protonabili) possono modificare significativamente l'assorbimento da parte della specie in esame.

Anche se assorbività specifiche sono riportate è sempre preferibile **determinarle sperimentalmente** al momento della analisi.

Le informazioni per la scelta della lunghezza d'onda sono ottenibili dallo **spettro di assorbimento** misurato nelle adatte condizioni sperimentali

Iodio elementare



Etanolo Acetone Cloroformio

Fenolftaleina



pH acido pH basico

SPETTROFOTOMETRIA E SPETTROFLUORIMETRIA

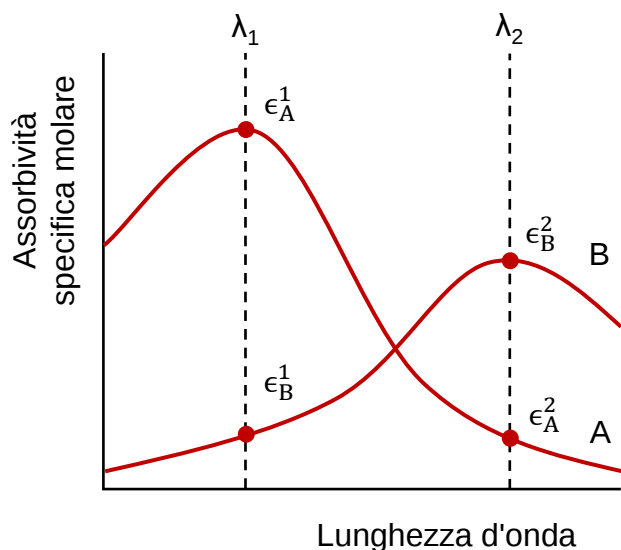
ANALISI QUANTITATIVA

Come si analizza una miscela di due analiti?

Una miscela di due specie con assorbimenti sovrapposti può essere analizzata sfruttando la additività delle assorbanze.

$$\text{In una soluzione si ha sempre } A = \Sigma A_i = \Sigma \epsilon_i b c_i.$$

Misure separate di assorbanza effettuate a due lunghezze d'onda scelte in modo che le assorbanze specifiche molari delle specie siano molto differenti tra di loro permettono di ricavare la composizione della miscela.



Sistema di equazioni per ricavare le concentrazioni

$$\begin{cases} A(\lambda_1) = \epsilon_A^1 b c_A + \epsilon_B^1 b c_B \\ A(\lambda_2) = \epsilon_A^2 b c_A + \epsilon_B^2 b c_B \end{cases}$$

La procedura può essere generalizzata ad una miscela di n componenti effettuando misure ad un numero di lunghezze d'onda **almeno pari al numero delle specie da determinare**.

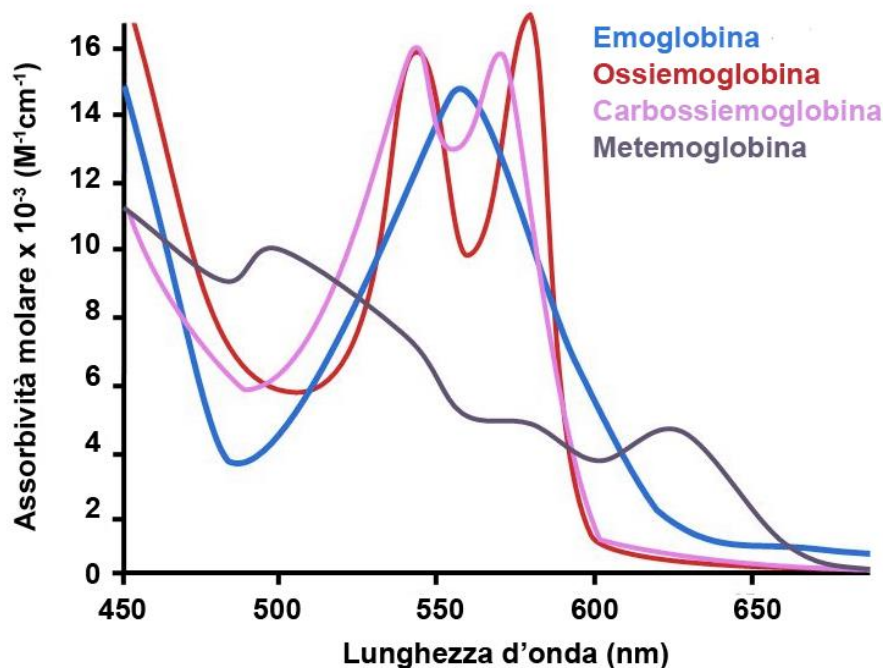
SPETTROFOTOMETRIA E SPETTROFLUORIMETRIA

ANALISI QUANTITATIVA

Un **ossimetro** viene usato in analisi clinica per misurare lo stato di ossigenazione del sangue. Le varie forme di emoglobina (emoglobina libera, ossiemoglobina, carbossiemoglobina, ecc.) vengono determinate con misure a diverse lunghezze d'onda sfruttando i diversi spettri di assorbimento.

Lo stato di ossigenazione del sangue viene definito attraverso parametri quali la **frazione di ossiemoglobina ($FO_2Hb\%$)**.

$$FO_2Hb\% = \frac{\text{ossiemoglobina}}{\text{emoglobina totale}} \times 100$$



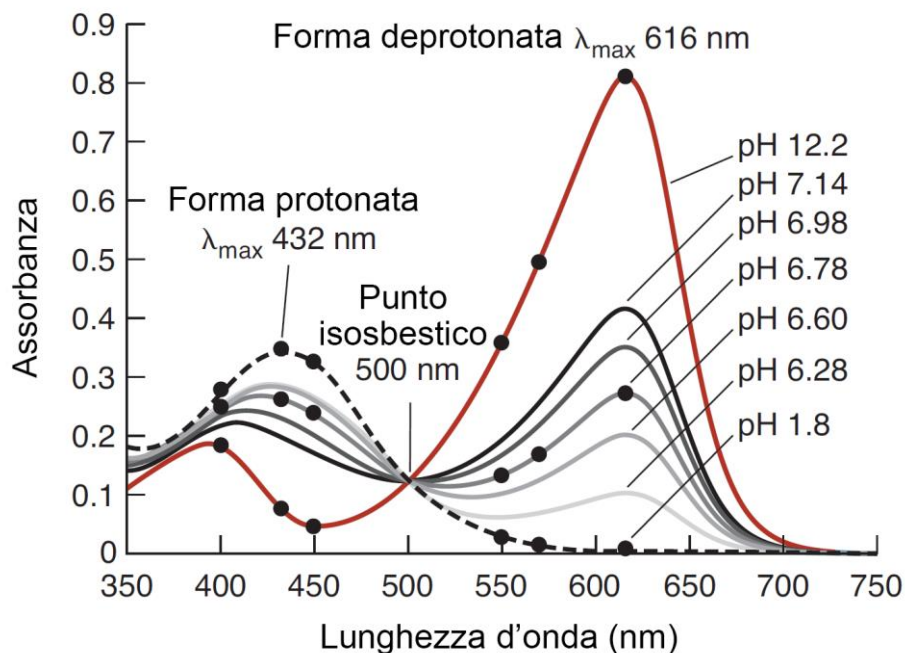
SPETTROFOTOMETRIA E SPETTROFLUORIMETRIA

ANALISI QUANTITATIVA

Come cambia lo spettro di assorbimento in presenza di un equilibrio?

Se le specie coinvolte presentano spettri di assorbimento differenti si osservano uno o più **punti isosbastici** (punti nei quali l'assorbanza è costante indipendentemente dalla posizione dell'equilibrio).

I punti isosbastici si verificano dove le specie hanno la **stessa assorbività specifica molare** (a queste lunghezze d'onda l'assorbanza totale dipende solo dalla somma delle concentrazioni delle specie).



Spettri di soluzioni contenenti un indicatore acido-base
ottenuti a diversi pH

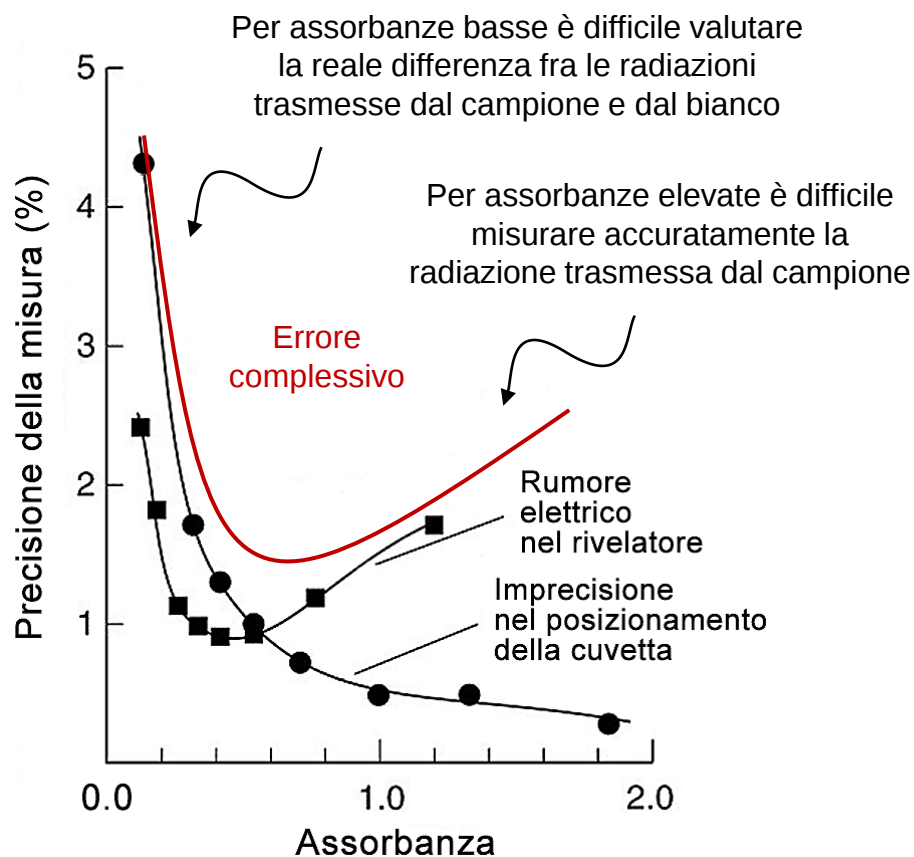
SPETTROFOTOMETRIA E SPETTROFLUORIMETRIA

ANALISI QUANTITATIVA

Qual è l'errore in una misura spettrofotometrica?

In una misura spettrofotometrica l'errore è minimo in un intervallo intermedio di valori di assorbanza (l'entità dell'errore e l'intervallo di assorbanze entro il quale la misura è più affidabile dipendono comunque dallo strumento usato).

Un intervallo di valori di assorbanza adeguato potrebbe essere da 0,1 – 0,2 a 1,5 – 2,0.



SPETTROFOTOMETRIA E SPETTROFLUORIMETRIA

ANALISI QUANTITATIVA

Fino a che punto è valida la legge di Lambert-Beer?

Le deviazioni osservate sperimentalmente dalla legge di Lambert-Beer ***riguardano sempre la relazione fra assorbanza e concentrazione.***

Deviazioni reali

Si verificano se non sono valide le assunzioni alla base della legge di Lambert-Beer.

Deviazioni chimiche

Si verificano in presenza di variazioni nella composizione della soluzione legate alla presenza di equilibri.

Deviazioni strumentali

Si verificano a causa di limitazioni della strumentazione, non contemplate dalla legge di Lambert-Beer.

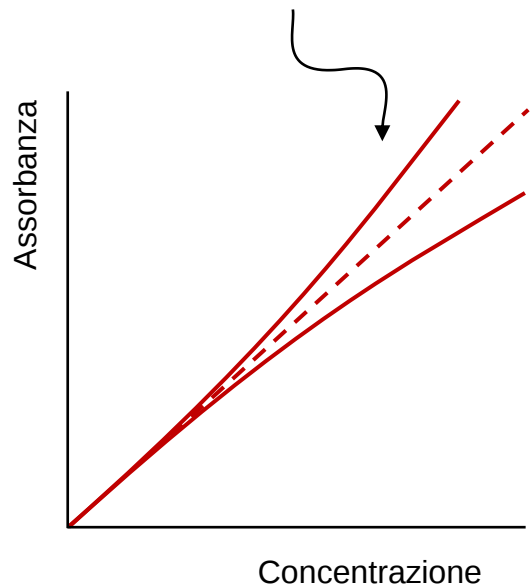
SPETTROFOTOMETRIA E SPETTROFLUORIMETRIA

ANALISI QUANTITATIVA

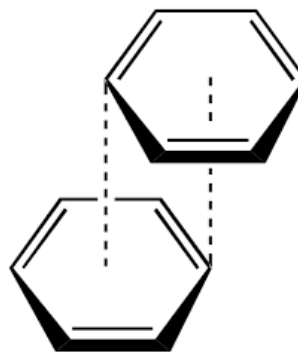
Deviazioni reali

Si verificano se l'assorbanza specifica molare **varia con la concentrazione** a causa delle interazioni fra le molecole dell'analita (più intense a concentrazioni elevate).

Non è possibile **prevedere la direzione** della deviazione (le interazioni intermolecolari possono sia aumentare che diminuire la capacità di assorbimento dell'analita)



La concentrazione alla quale si verificano le deviazioni dipende dalla forza delle interazioni fra le molecole di analita (per alcuni analiti l'effetto è evidente già a $10^{-4} - 10^{-5}$ M). Un fenomeno simile può verificarsi anche al variare della concentrazione di un elettrolita (le concentrazioni richieste sono in genere abbastanza elevate).



Interazioni intermolecolari fra molecole di benzene dovute alla sovrapposizione degli orbitali molecolari π

Non si possono impedire le interazioni intermolecolari, pertanto si cerca di evitare questo fenomeno **operando in soluzioni diluite**.

SPETTROFOTOMETRIA E SPETTROFLUORIMETRIA

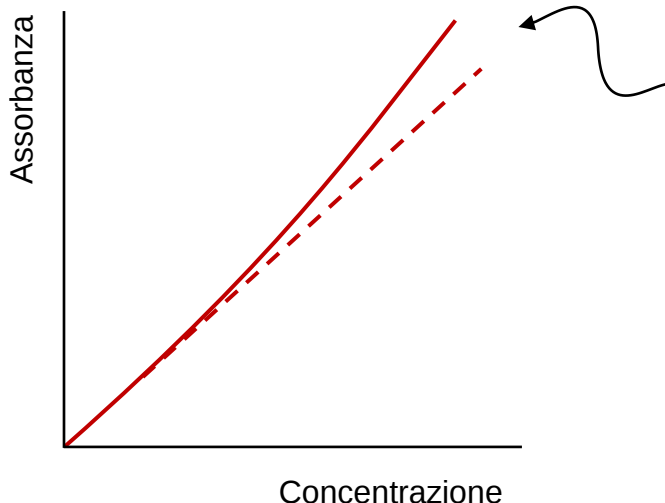
ANALISI QUANTITATIVA

Deviazioni chimiche

Si verificano quando l'analita è coinvolto in equilibri influenzati dalla concentrazione e che producono specie con differente assorbimento.

Le deviazioni sono dovute allo spostamento dell'equilibrio al variare della concentrazione (le singole specie seguono ancora la legge di Lambert-Beer).
Possono causare questa deviazione equilibri quali, es., acido-base, complessazione e dimerizzazione.

Curva di calibrazione relativa alla determinazione della specie A_2 soggetta ad una reazione di dissociazione ($A_2 \rightarrow 2A$)



All'aumentare della concentrazione l'equilibrio si sposta maggiormente nella direzione del dimero ($2A \rightarrow A_2$), determinando un incremento di assorbanza superiore a quello atteso

Anche qui non è possibile **prevedere la direzione** della deviazione (dipende dallo spettro di assorbimento delle specie e dalla lunghezza d'onda di misura)

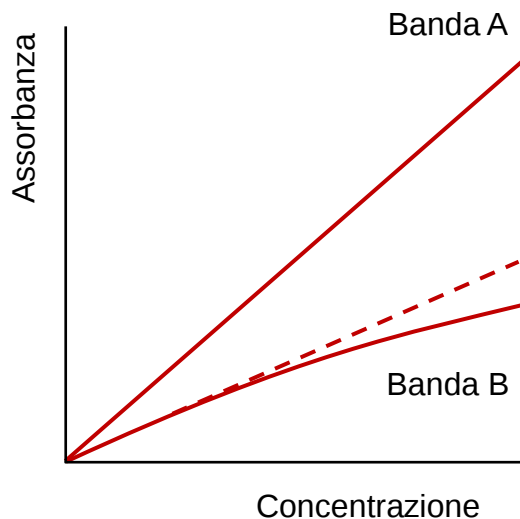
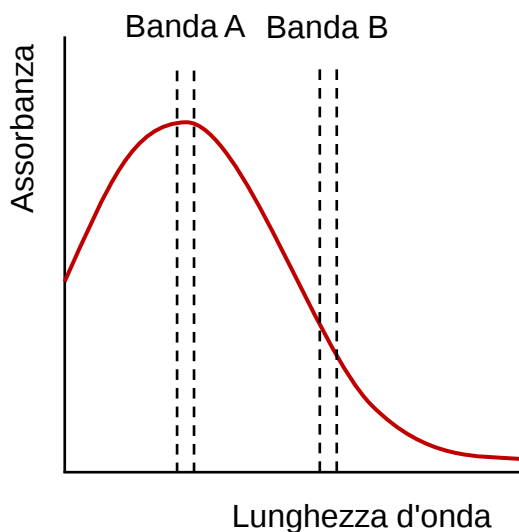
Questo fenomeno può in linea di principio essere evitato (se il sistema lo permette) **effettuando le misure in un punto isosbastico**.

SPETTROFOTOMETRIA E SPETTROFLUORIMETRIA

ANALISI QUANTITATIVA

Deviazioni strumentali

La legge di Lambert-Beer è rigorosamente valida per **radiazioni monocromatiche** ma sul campione viene sempre inviato un intervallo di lunghezze d'onda. Se in questo intervallo l'assorbanza dell'analita è costante ciò non rappresenta un problema, in caso contrario si hanno **deviazioni negative** dalla legge di Lambert-Beer.



La curva di calibrazione ottenuta in un massimo di assorbimento ha una **pendenza maggiore** (un altro motivo per preferire la misura a questa lunghezza d'onda)

Questo fenomeno può essere ridotto agendo a livello strumentale e/o sul metodo di analisi.

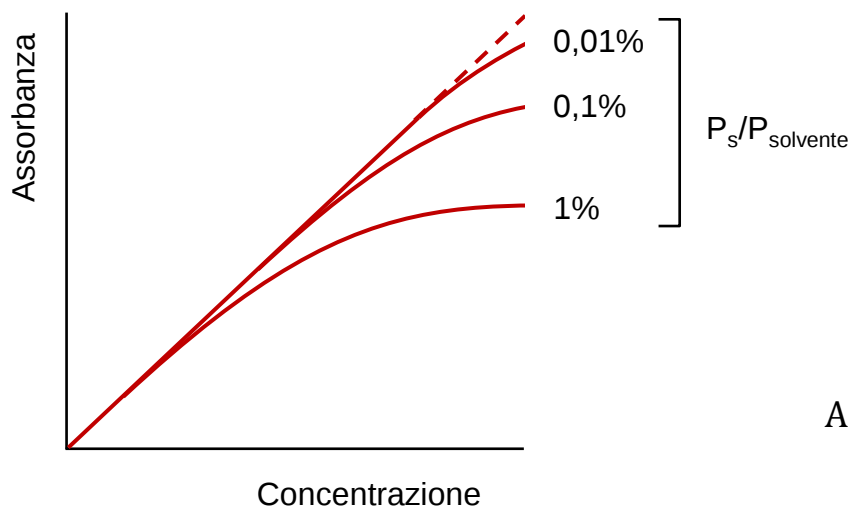
- **Riducendo l'ampiezza** dell'intervallo di lunghezze d'onda (gli strumenti a monocromatore sono spesso migliori di quelli con filtri).
- Effettuando la misura a una lunghezza d'onda dove **l'assorbanza è costante** (un massimo dello spettro di assorbimento).

SPETTROFOTOMETRIA E SPETTROFLUORIMETRIA

ANALISI QUANTITATIVA

La **radiazione diffusa** è la radiazione che giunge al rivelatore senza passare attraverso il campione a causa di fenomeni di diffusione e riflessione all'interno dello strumento. Poiché la sua intensità (P_s) non dipende dal campione, essa pone un limite alle assorbanze misurabili con accuratezza con uno strumento.

Es. se $P_s/P_{\text{solvente}} = 0,1\%$ lo strumento darà un valore di assorbanza pari a 3 anche con campioni che assorbono tutta la luce incidente. Sarà quindi impossibile misurare in modo affidabile assorbanze maggiori di 2 - 2,5.



**Assorbanza in
condizioni ideali**

$$A = -\log\left(\frac{P_{\text{campione}}}{P_{\text{solvente}}}\right)$$

**Assorbanza in
presenza di luce diffusa**

$$A = -\log\left(\frac{P_{\text{campione}} + P_s}{P_{\text{solvente}} + P_s}\right)$$

L'entità della radiazione diffusa dipende dalla **qualità dello strumento**, ma anche dalla **manutenzione** a cui esso è soggetto (es. presenza di polvere sulle parti ottiche).

SPETTROFOTOMETRIA E SPETTROFLUORIMETRIA

APPLICAZIONI ANALITICHE

Le analisi spettrofotometriche nell'UV-Vis sono in prevalenza utilizzate per ***analisi di tipo quantitativo***.

Uno spettro UV-Vis in genere non possiede sufficienti caratteristiche per permettere analisi qualitative.

Facilità e convenienza

Le procedure di analisi sono in genere semplici e la strumentazione base è relativamente economica.

Ampia applicabilità

La maggioranza delle sostanze assorbe nell'UV-Vis (se ciò non si verifica possono essere usate reazioni chimiche che producono specie che assorbono).

Buona sensibilità

Per sostanze con assorbività specifiche molari elevate (es. $10000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) si possono raggiungere limiti di rivelabilità di 10^{-4} - 10^{-5} M .

Buona accuratezza e riproducibilità

L'accuratezza è tipicamente dell'1 - 5% ma può essere migliorata.

Procedura di una analisi spettrofotometrica:
<https://www.youtube.com/watch?v=T0mowDqkdDM>

APPLICAZIONI ANALITICHE

Una delle maggiori limitazioni delle tecniche spettrofotometriche è la **scarsa selettività**, che le rende inadatte all'analisi diretta di miscele complesse.

Questa limitazione può essere superata in vari modi.

Uso di reattivi specifici

Un reattivo specifico per la specie di interesse può essere impiegato per convertirla in una più facilmente determinabile (es. con un assorbimento più intenso o in una zona dello spettro meno soggetta a interferenze).

Accoppiamento con una tecnica separativa

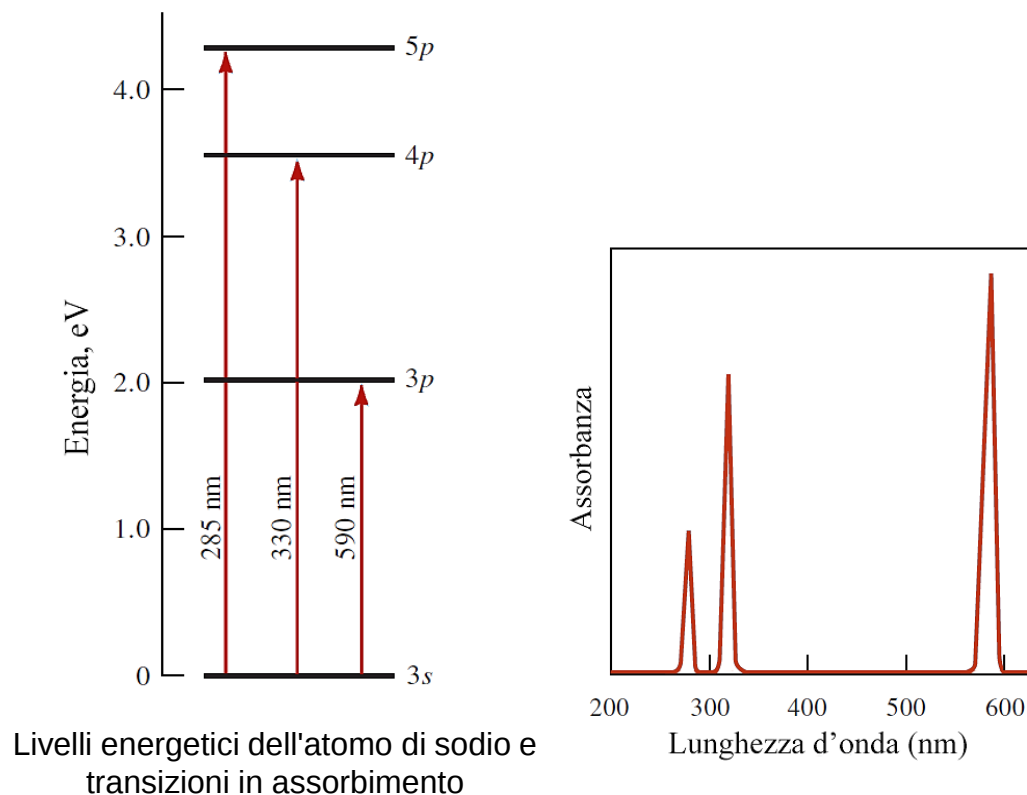
La spettroscopia UV-Vis viene spesso usata come tecnica di rivelazione nelle analisi cromatografiche (es. HPLC) poiché in questo caso la misura viene effettuata dopo la separazione del campione nei singoli costituenti.

NATURA DEGLI SPETTRI DI ASSORBIMENTO

Come si origina uno spettro di assorbimento?

Le caratteristiche di uno spettro di assorbimento dipendono dagli stati energetici della specie in esame.

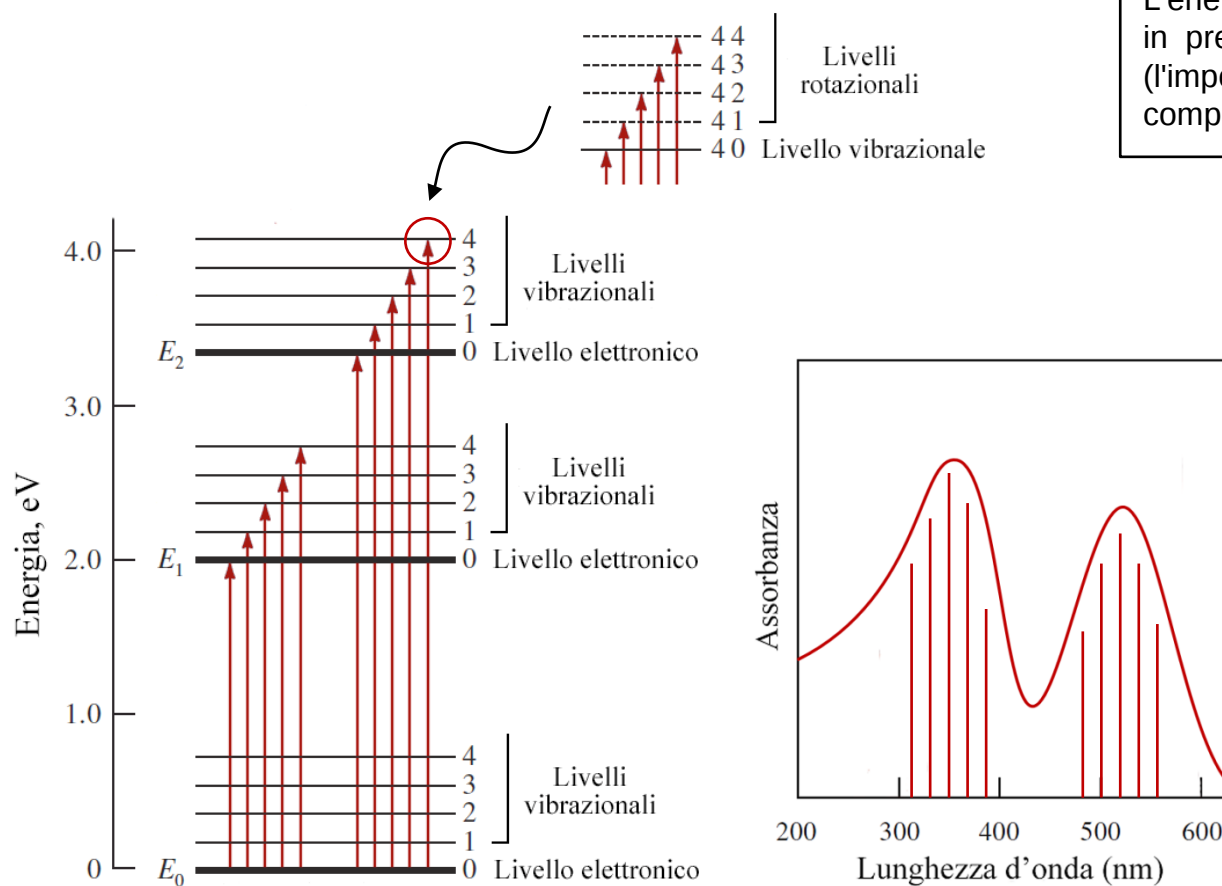
Gli atomi hanno un numero limitato di stati energetici (l'unica forma di energia è quella **elettronica**) e danno **spettri di assorbimento a righe**.



Le righe di assorbimento degli spettri atomici sono sempre molto strette (0,01 nm o meno) e le loro larghezze non possono essere misurate esattamente con la normale strumentazione per misure spettrofotometriche.

NATURA DEGLI SPETTRI DI ASSORBIMENTO

Le molecole hanno una struttura degli stati energetici più complessa poiché l'energia deriva da componenti diverse (**elettronica**, **vibrazionale** e **rotazionale**). Gli spettri di assorbimento molecolari sono **spettri a bande** estesi su ampi intervalli di lunghezze d'onda.

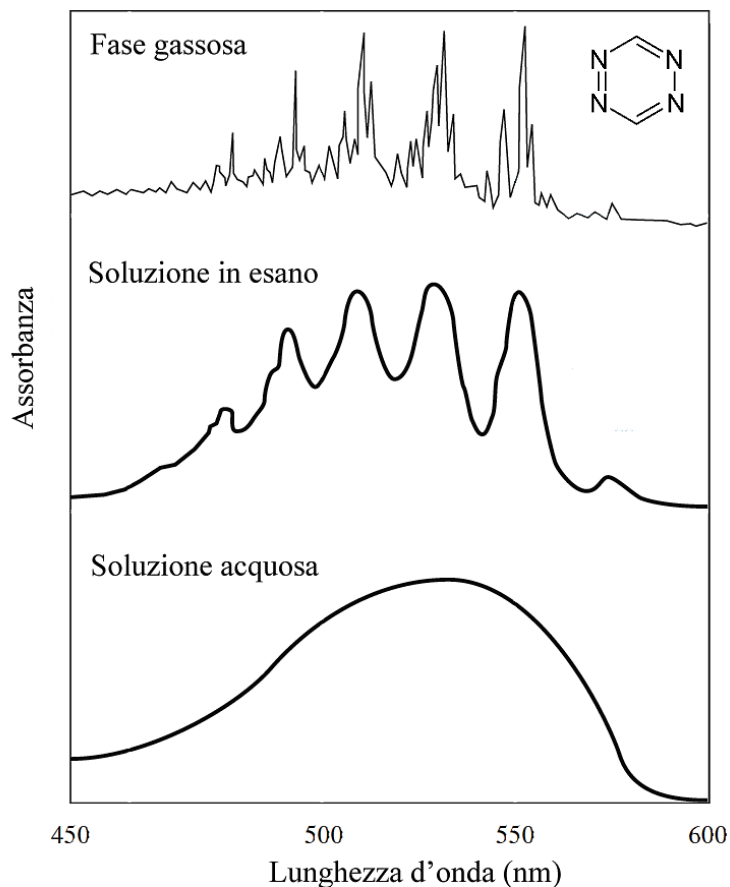


L'energia di uno stato è comunque dovuta in prevalenza alla componente elettronica (l'importanza dei contributi all'energia complessiva è $E_{\text{elett.}} > E_{\text{vibr.}} \gg E_{\text{rot.}}$).

Ogni banda di assorbimento è la somma di molte transizioni singole, ognuna con **variazioni simultanee** di energia elettronica, vibrazionale e rotazionale.

NATURA DEGLI SPETTRI DI ASSORBIMENTO

Le singole transizioni in una banda di assorbimento molecolare non sono in genere osservabili tranne che in condizioni particolari (es. in solventi che interagiscono poco con la molecola o meglio ancora in fase gassosa).

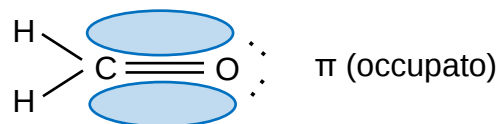
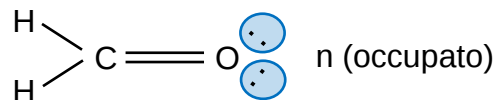
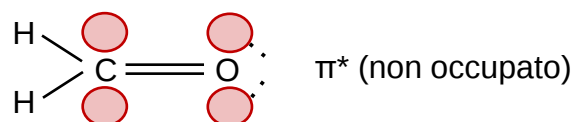
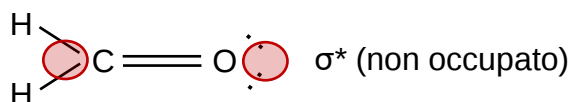


L'assenza di caratteristiche distintive negli spettri UV-Vis in soluzione è una delle ragioni per le quali questa tecnica spettroscopica viene usata in prevalenza per **analisi quantitativa**.

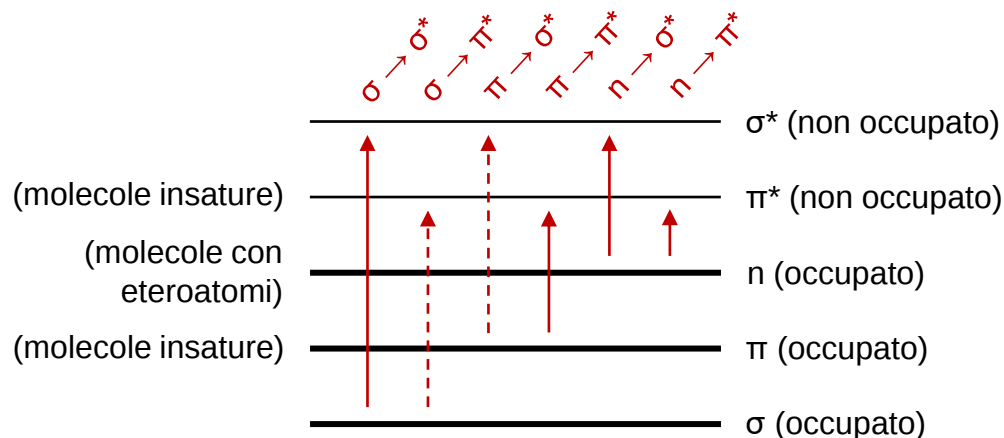
NATURA DEGLI SPETTRI DI ASSORBIMENTO

Composti organici

Le molecole organiche possono possedere vari tipi di orbitali molecolari e quindi si verificano diversi tipi di transizioni elettroniche. Non tutte sono però egualmente probabili (ovvero danno bande di assorbimento intense) e quindi sono rilevanti in ambito analitico.



Orbitali molecolari della formaldeide



Schema degli orbitali di una generica molecola organica e delle possibili transizioni elettroniche in assorbimento)

L'importanza di una transizione in ambito analitico dipende dalla **intensità dell'assorbimento** (bande più intense permettono di misurare concentrazioni inferiori) e dalla **sua lunghezza d'onda** (in ogni caso la lunghezza d'onda della banda deve essere maggiore di 200 nm e per lunghezze d'onda elevate - es. nel visibile - sono meno probabili interferenze da parte di altre sostanze).

NATURA DEGLI SPETTRI DI ASSORBIMENTO

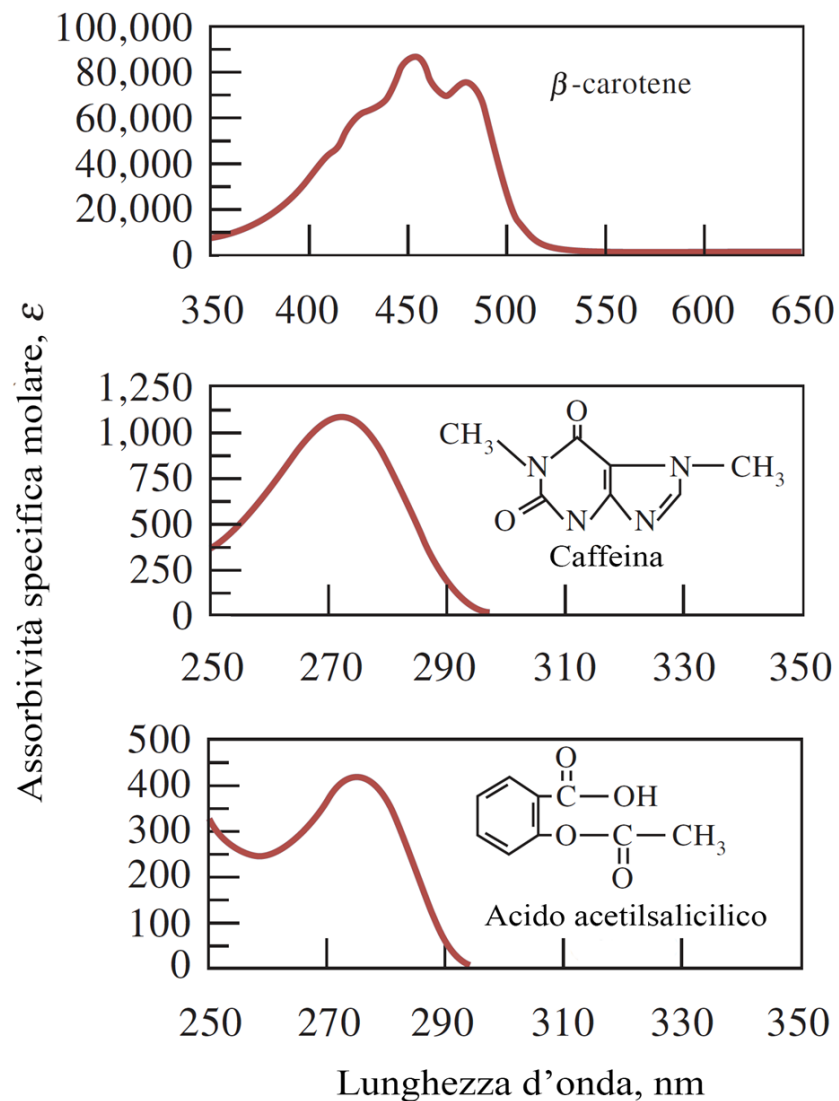
I composti organici di maggior interesse sono quelli con **legami insaturi** e **sistemi aromatici**. Le transizioni $\pi \rightarrow \pi^*$ nei gruppi insaturi producono bande di assorbimento nell'UV-Vis, spesso con elevate assorbanze specifiche molari.

Anche le molecole organiche sature assorbono, ma le loro transizioni ($\sigma \rightarrow \sigma^*$) causano assorbimenti sotto 180 nm, difficilmente osservabili perché in questa zona spettrale assorbono anche i gas atmosferici.

Assorbimenti tipici di alcuni cromofori organici

Chromophore	Example	$\lambda_{\max}$, nm	$\epsilon_{\max}$
Alkene	$\text{C}_6\text{H}_{13}\text{CH}=\text{CH}_2$	177	13,000
Conjugated alkene	$\text{CH}_2=\text{CHCH}=\text{CH}_2$	217	21,000
Alkyne	$\text{C}_5\text{H}_{11}\text{C}\equiv\text{C}-\text{CH}_3$	178	10,000
		196	2,000
		225	160
Carbonyl	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \\ \text{CH}_3\text{CCH}_3 \end{array}$	186	1,000
		280	16
	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \\ \text{CH}_3\text{CH} \end{array}$	180	Large
		293	12
Carboxyl	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \\ \text{CH}_3\text{COH} \end{array}$	204	41
Amido	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \\ \text{CH}_3\text{CNH}_2 \end{array}$	214	60
Azo	$\text{CH}_3\text{N}=\text{NCH}_3$	339	5
Nitro	CH_3NO_2	280	22
Nitroso	$\text{C}_4\text{H}_9\text{NO}$	300	100
		665	20
Nitrate	$\text{C}_2\text{H}_5\text{ONO}_2$	270	12
Aromatic	Benzene	204	7,900
		256	200

NATURA DEGLI SPETTRI DI ASSORBIMENTO



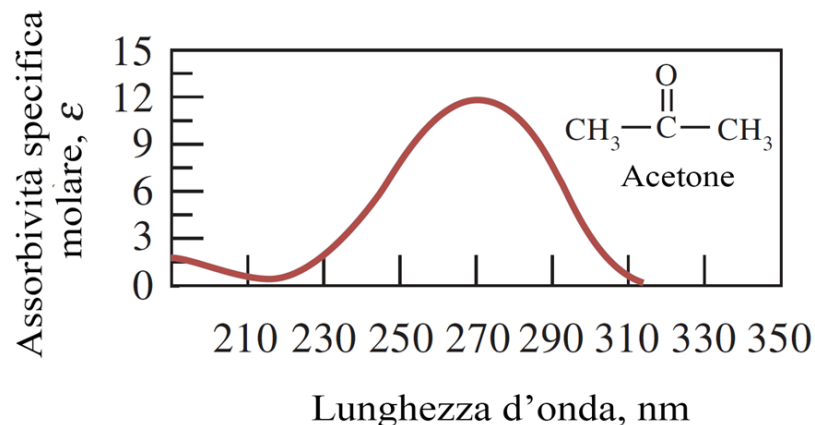
Entro certi limiti è possibile prevedere le caratteristiche principali di uno spettro di assorbimento (es. sistemi insaturi di grandi dimensioni hanno bande di assorbimento **ad energie più basse** e con **assorbività specifiche molari più elevate**)

NATURA DEGLI SPETTRI DI ASSORBIMENTO

Altri tipi di transizioni (**transizioni** $n \rightarrow \sigma^*$ e $n \rightarrow \pi^*$) si verificano in composti organici con eteroatomi contenenti elettroni di non legame (es. ossigeno, azoto) e causano bande di assorbimento nell'UV relativamente deboli (spesso $\epsilon < 100 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

Questi assorbimenti non sono sfruttabili per determinazioni analitiche ma impediscono l'uso di questi composti come solventi in certi intervalli di lunghezze d'onda.

Lunghezze d'onda minime di lavoro per alcuni solventi



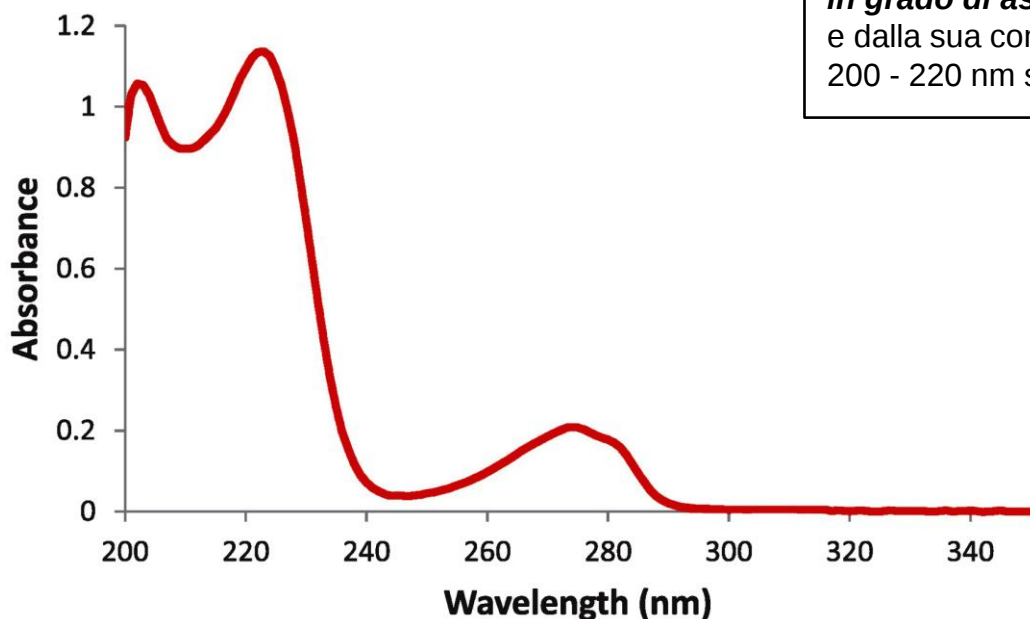
Solvente	Lunghezza d'onda (nm)
Acetonitrile	190
Acqua	190
Cicloesano	195
Esano	195
Metanolo	200
Etanolo	205
Etere	215
Cloruro di metilene	220
Cloroformio	240
Tetracloruro di carbonio	260

NATURA DEGLI SPETTRI DI ASSORBIMENTO

Quali sono gli spettri di assorbimento delle macromolecole biologiche?

Lo spettro di assorbimento UV-Vis di una **proteina** presenta un massimo intorno a 275 - 280 nm dovuto agli aminoacidi con residui aromatici (es. triptofano, tirosina) e, in misura minore, sulfidrilici (es. cisteina).

L'intensità dell'assorbimento dipende dal **numero di aminoacidi in grado di assorbire** (quindi dal peso molecolare della proteina e dalla sua composizione aminoacidica). Altre bande intense a 200 - 220 nm sono dovute ai legami peptidici.



Spettro di assorbimento UV-Vis dell'albumina sierica bovina

Una formula per calcolare l'assorbività specifica molare di una proteina è la seguente (n_{SS} è il numero delle cisteine che formano legami S-S):

$$\epsilon_{280} = 5500 \times n_{Trp} + 1490 \times n_{Tyr} + 125 \times n_{SS}$$

I risultati ottenuti sono in genere corretti entro il 5%.

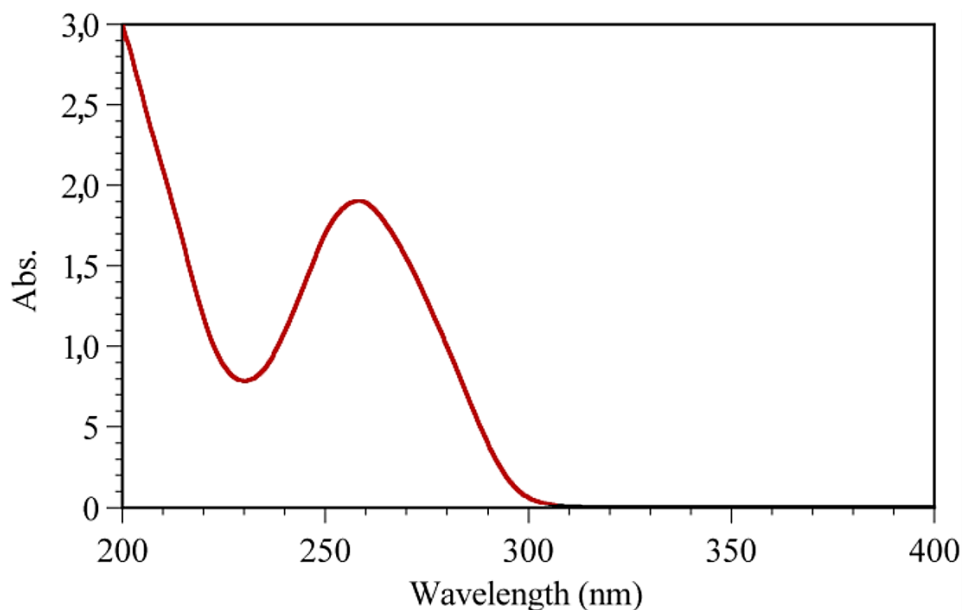
NATURA DEGLI SPETTRI DI ASSORBIMENTO

Gli **acidi nucleici** assorbono intorno a 260 nm a causa di transizioni $\pi \rightarrow \pi^*$ negli anelli pirimidinici e purinici. L'assorbimento è molto intenso e può essere utilizzato per quantificare direttamente DNA o RNA in soluzione (es. durante una procedura di estrazione).

Assorbività specifiche molari a 260 nm delle basi del DNA in un dsDNA

nucleobases	$\epsilon_{260 \text{ nm}} [\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}]$
cytosine	6600
guanine	11700
thymine	8600
adenine	13700

L'intensità dell'assorbimento è maggiore se il DNA si trova sotto forma di filamento singolo (ssDNA) piuttosto che di doppia elica (dsDNA). Questo diverso assorbimento viene comunemente utilizzato per determinare sperimentalmente la **temperatura di melting** di una sequenza di DNA.



Spettro di assorbimento di DNA di salmone

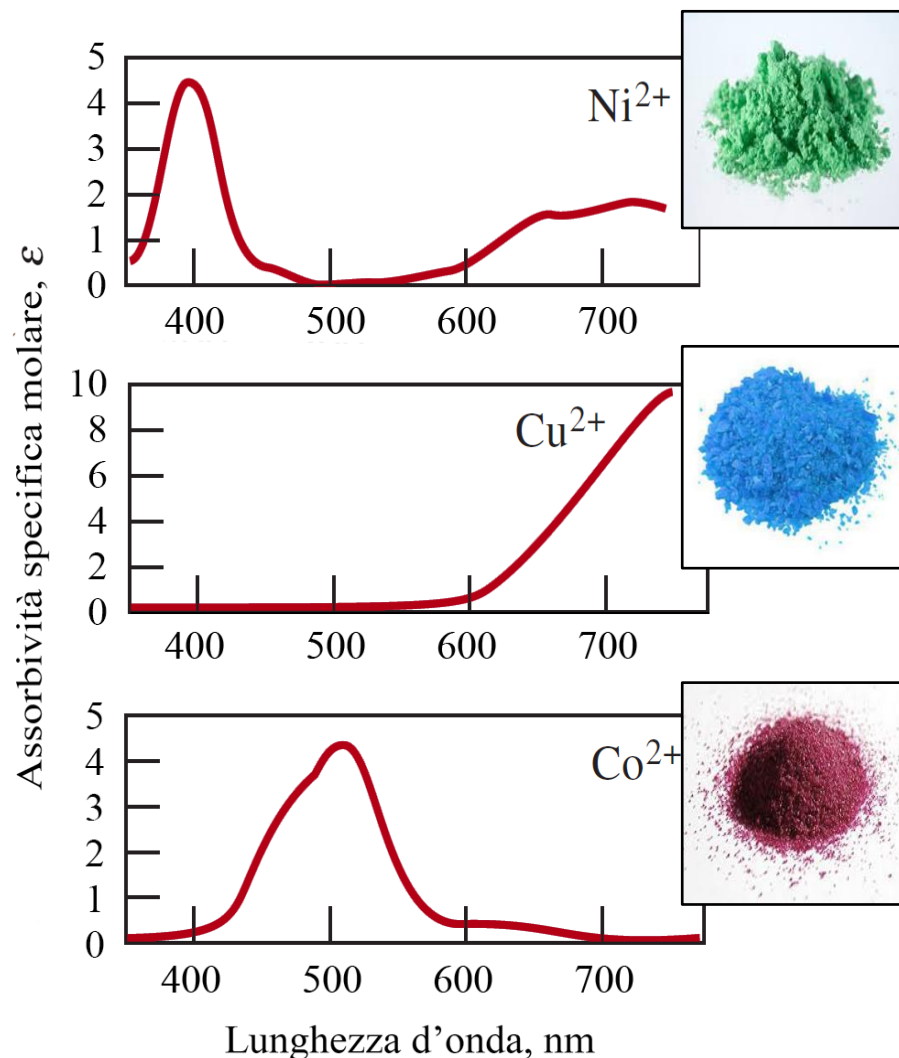
NATURA DEGLI SPETTRI DI ASSORBIMENTO

Composti inorganici

Gli ioni dei metalli di transizione (in particolare con configurazioni $d^1 - d^9$) assorbono nel visibile a causa di transizioni negli orbitali 3d e 4d (**transizioni $d \rightarrow d$**).

Le bande di assorbimento sono molto deboli, sufficienti per colorare sali solidi e soluzioni concentrate ma non adatte per applicazioni analitiche.

Lo spettro di assorbimento dipende anche dalle molecole nella prima sfera di coordinazione dello ione: CuSO_4 anidro è bianco, CuSO_4 idratato e le soluzioni acquose di Cu^{2+} sono azzurre (il colore del complesso $\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_4^{2+}$) mentre in presenza di NH_3 il colore è più intenso per la formazione del complesso $\text{Cu}(\text{NH}_3)_4^{2+}$.

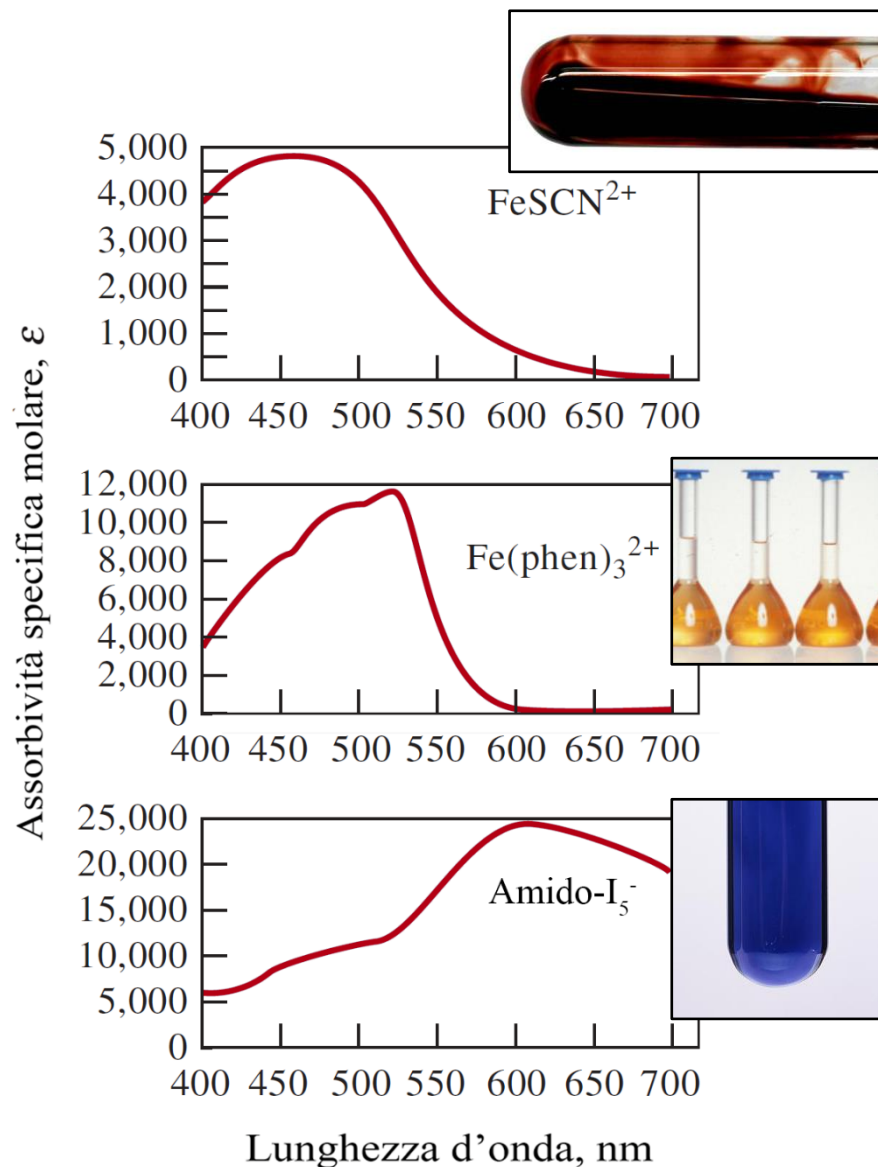


NATURA DEGLI SPETTRI DI ASSORBIMENTO

I metalli di transizione vengono spesso determinati per via spettrofotometrica facendoli reagire con leganti organici. I complessi risultanti possiedono intense bande di assorbimento dovute a **transizioni di trasferimento di carica** (transizioni dove l'assorbimento di radiazione determina il trasferimento di un elettrone da un orbitale del legante ad uno del metallo o viceversa).

Questo tipo di transizioni è particolarmente vantaggioso per analisi spettrofotometriche.

- L'assorbimento è nel visibile.
- Le assorbività specifiche molari sono elevate.
- Il legante non assorbe alle stesse lunghezze d'onda, quindi è possibile usarne un eccesso per garantire una complessazione veloce e completa del metallo.



SPETTROFOTOMETRIA E SPETTROFLUORIMETRIA

STRUMENTAZIONE

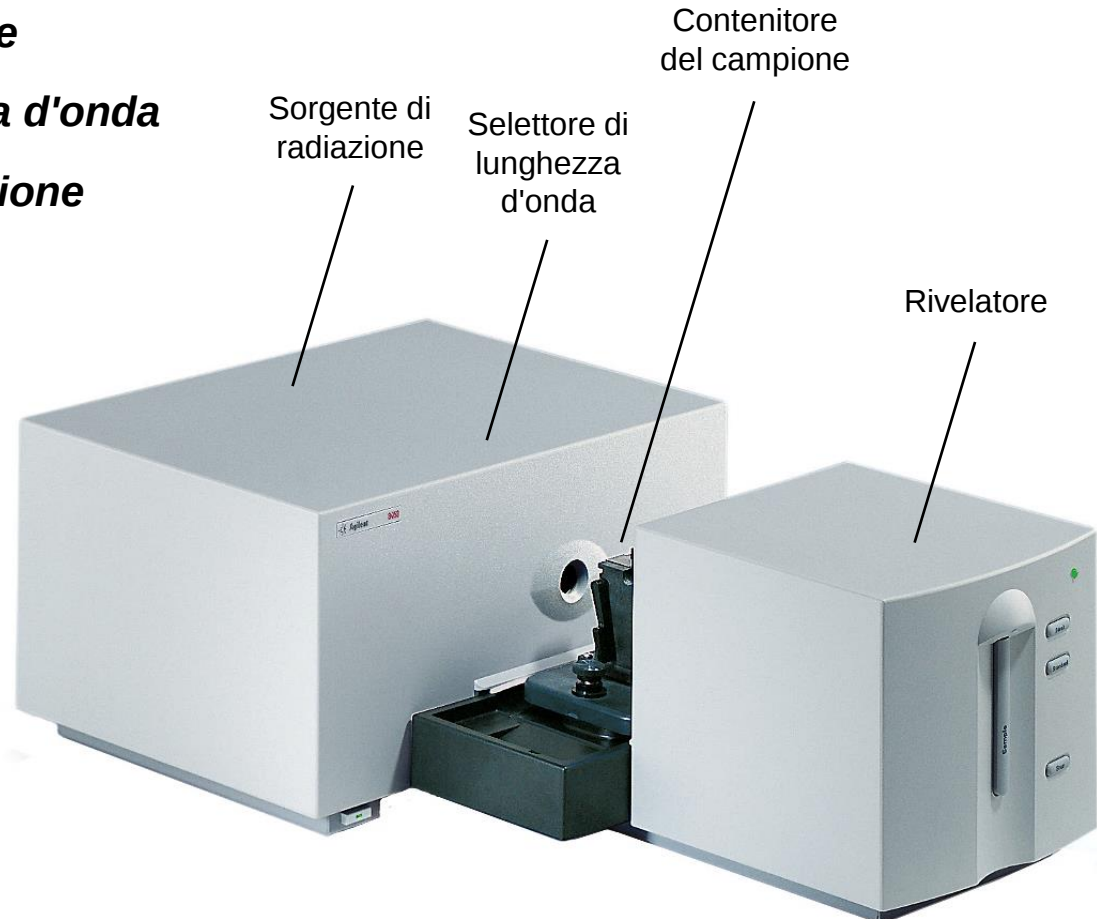
Gli strumenti per misure di assorbimento nell'UV-Vis (**fotometri** e **spettrofotometri**) consistono in quattro componenti principali.

Sorgente di radiazione

Selettore di lunghezza d'onda

Contenitore del campione

Rivelatore



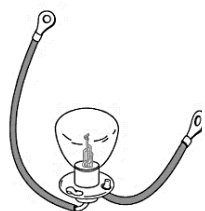
Il selettore di lunghezza d'onda si trova in genere **prima del campione** per evitare che esso venga investito da tutta la radiazione emessa dalla sorgente.

SPETTROFOTOMETRIA E SPETTROFLUORIMETRIA

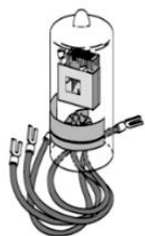
STRUMENTAZIONE

Sorgenti di radiazione

Vengono utilizzate **sorgenti a spettro continuo** accoppiate a sistemi per selezionare la lunghezza d'onda più adatta all'analisi. Molti strumenti usano due sorgenti combinate per coprire tutto lo spettro UV-visibile.

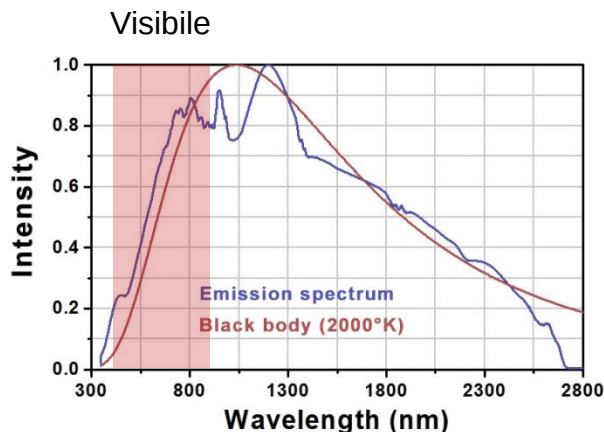


Sorgente a tungsteno
o tungsteno-alogeno

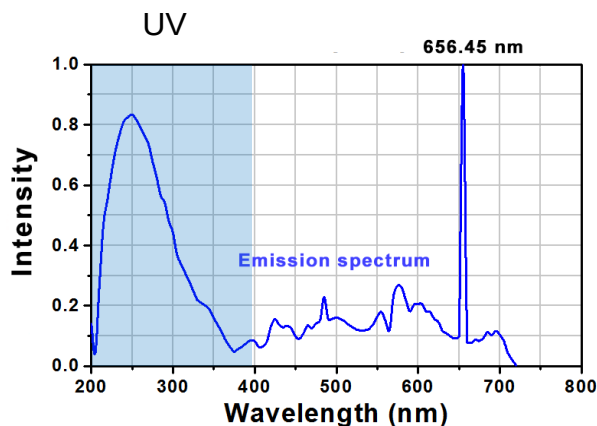


Sorgente a deuterio

Per alcune applicazioni (es. spettroscopia atomica) sono utilizzate anche **sorgenti con spettro a righe**.



Lo spettro è assimilabile a quello di un corpo a temperature di 2000 – 2500°K e copre l'infrarosso ed il visibile ma non l'ultravioletto



Il processo alla base della emissione (dissociazione di molecole di D_2 eccitate) produce in prevalenza radiazione UV

Le lampade a tungsteno e a deuterio sono usate in coppia perché permettono di coprire tutto lo spettro UV-visibile.

SPETTROFOTOMETRIA E SPETTROFLUORIMETRIA

STRUMENTAZIONE

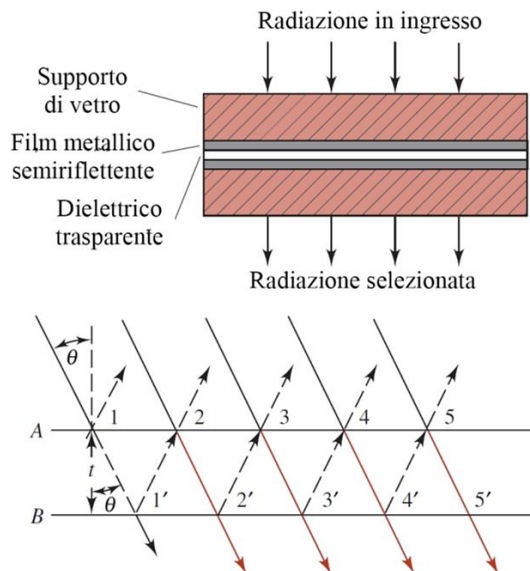
Selettori di lunghezze d'onda

Un **filtro** lascia passare solo un certo intervallo di lunghezze d'onda (per effettuare misure a diverse lunghezze d'onda è quindi necessario avere più filtri). Si usano di solito filtri ad interferenza, caratterizzati da bande passanti strette e quindi particolarmente adatti per misure di assorbanza.

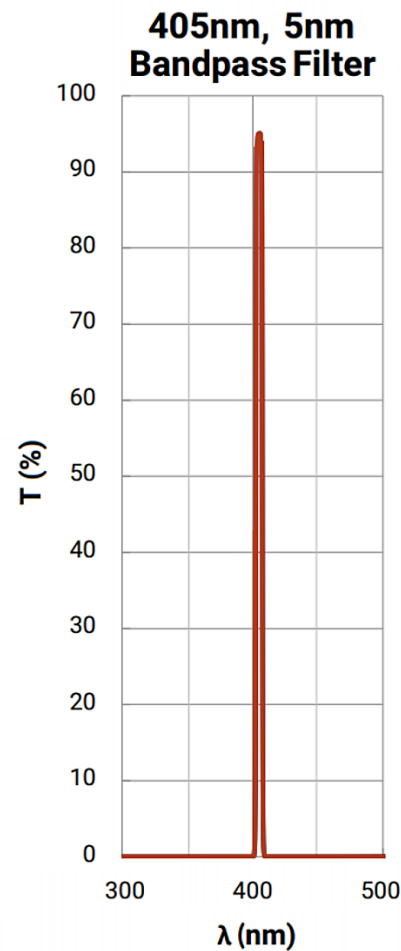


Filtri ottici a interferenza

Uno spettrofotometro con filtri è meno versatile ma questo tipo di strumenti è comunque diffuso in alcuni ambiti (es. analisi chimico-cliniche)



Struttura e funzionamento di un filtro ottico ad interferenza



Curva di trasmissione di un filtro ottico ad interferenza

SPETTROFOTOMETRIA E SPETTROFLUORIMETRIA

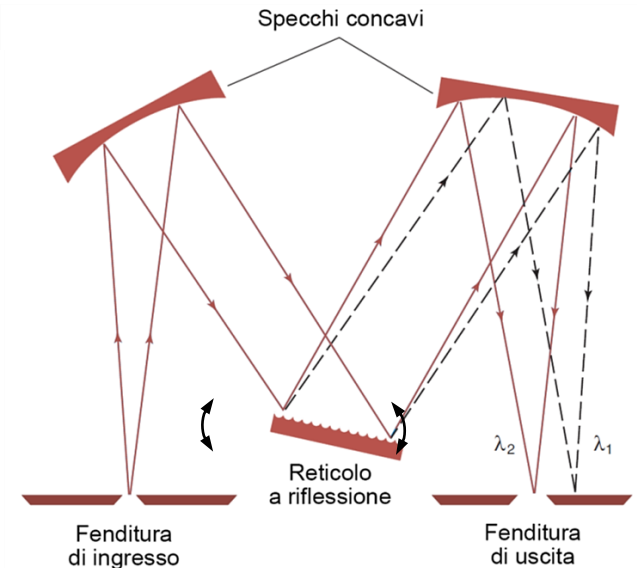
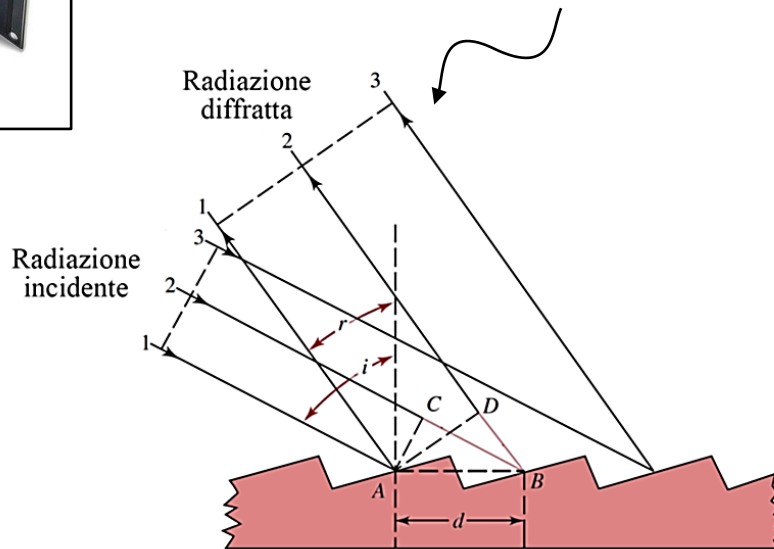
STRUMENTAZIONE

Un **monocromatore** permette di variare in modo continuo la lunghezza d'onda selezionata. I comuni monocromatori sono a reticolo (in genere a riflessione) e, come i filtri ad interferenza, selezionano un intervallo di lunghezze d'onda sfruttando un processo di interferenza.



Reticolo interferenziale a riflessione

Per ogni lunghezza d'onda l'interferenza costruttiva si verifica soltanto a determinati angoli di riflessione



Struttura e funzionamento di un monocromatore a reticolo in riflessione

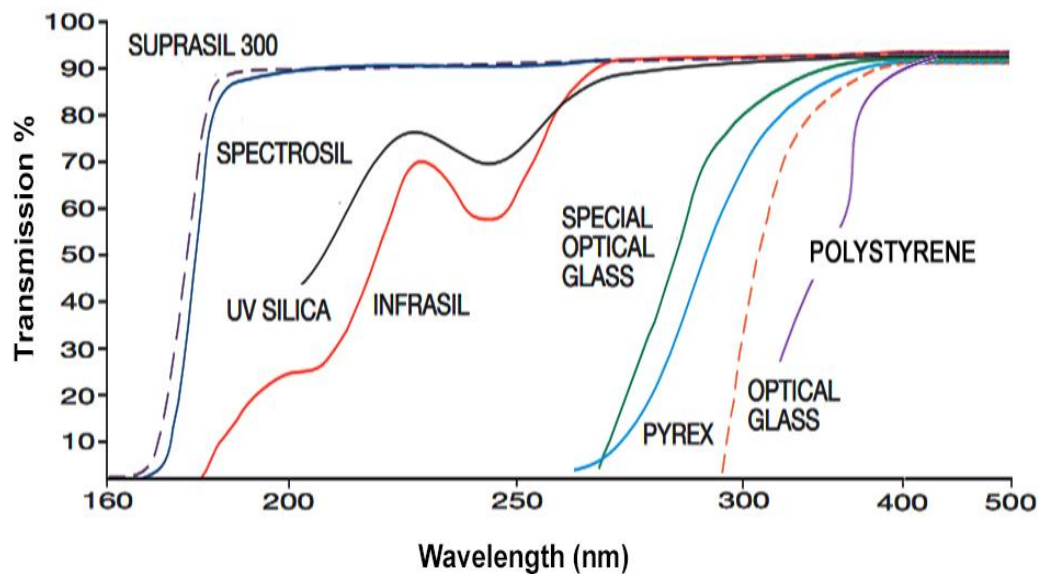
SPETTROFOTOMETRIA E SPETTROFLUORIMETRIA

STRUMENTAZIONE

Contenitori per il campione

Le **celle (cuvette)** per spettrofotometria hanno due facce ottiche contrapposte ed un cammino ottico noto (per le misure più comuni si usano celle da 1,000 cm).

La scelta del materiale della cella è legata al tipo di campione (es. acquoso o in solvente organico) ed alla lunghezza d'onda impiegata (es. visibile oppure UV).



Quarzo



Vetro

Plastica

Il **quarzo** (e in parte il vetro) sono utilizzabili in tutto il campo UV-Vis e con ogni tipo di campione.

I **materiali plastici** (es. polistirene) possono essere utilizzati solo nel visibile (alcune plastiche arrivano fino a 250 - 280 nm) e non resistono a molti solventi organici. Sono però economici e usati se servono **materiali monouso** (es. per analisi chimico-cliniche).

SPETTROFOTOMETRIA E SPETTROFLUORIMETRIA

STRUMENTAZIONE

Celle per spettrofotometria



Quarzo
(1 cm)



Quarzo, per
solventi volatili
(1 cm)



Quarzo, volume
ridotto
(1 cm)



Quarzo, volume
ultraridotto
(1 cm)



Plastica
(1 cm)



Plastica,
volume ridotto
(1 cm)



Quarzo
(2 cm)



Quarzo
(2 mm)



Quarzo
(10 cm)



Quarzo, a
flusso
(1 cm)

La direzione corretta per l'uso è indicata sulla cella (es. con una freccia) oppure le facce non ottiche sono zigrinate o smerigliate.

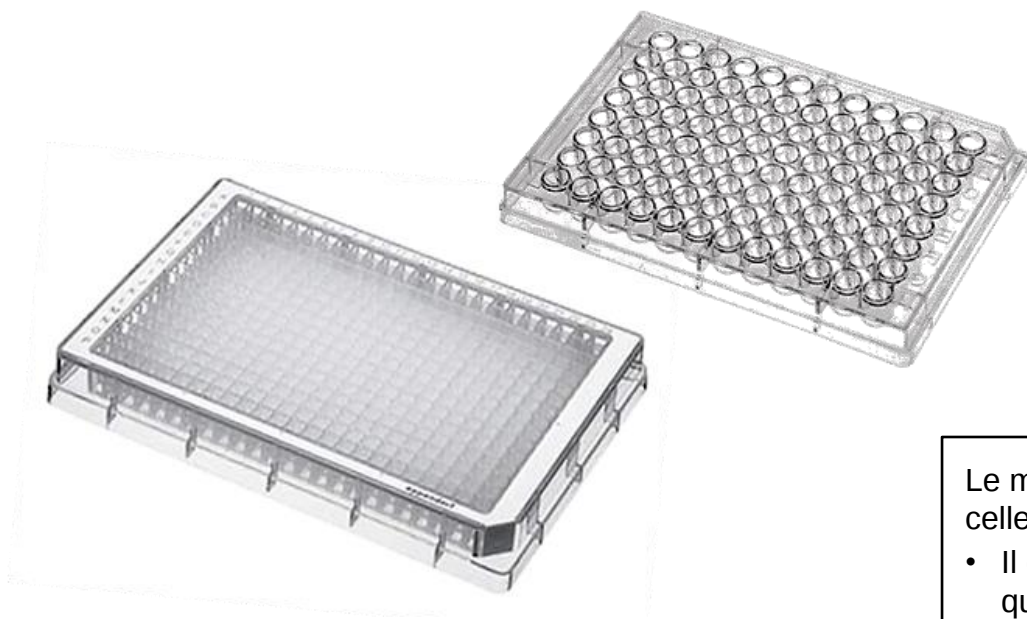
SPETTROFOTOMETRIA E SPETTROFLUORIMETRIA

STRUMENTAZIONE

Le **micropiastre** (o **piastre microtiter**) permettono di effettuare misure su numeri elevati di campioni (tipicamente 96 o 384).

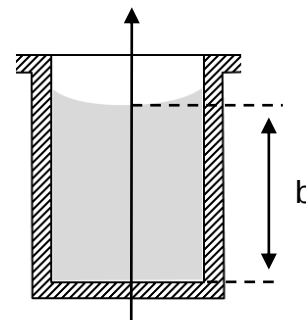
I volumi richiesti sono molto piccoli, dell'ordine di 100 μL (formato a 96 pozzetti) o 20 μL (formato a 384 pozzetti).

Questo tipo di formato è diffuso in campo chimico-clinico, dove i campioni da analizzare sono numerosi e potenzialmente infetti (le comuni micropiastre sono in materiale plastico e quindi monouso).



Piastre microtiter in materiale plastico a 96 e 384 pozzetti

Fascio di radiazione (attraversa il pozzetto in verticale)



Le misure in micropiastra sono meno affidabili di quelle in celle spettrofotometriche convenzionali.

- Il cammino ottico **dipende dal volume del campione**, quindi la misura è influenzata da errori di dispensazione.
- Il menisco superiore (oppure eventuali bolle sulla superficie della soluzione) possono distorcere il fascio di radiazione e alterare il risultato della misura.

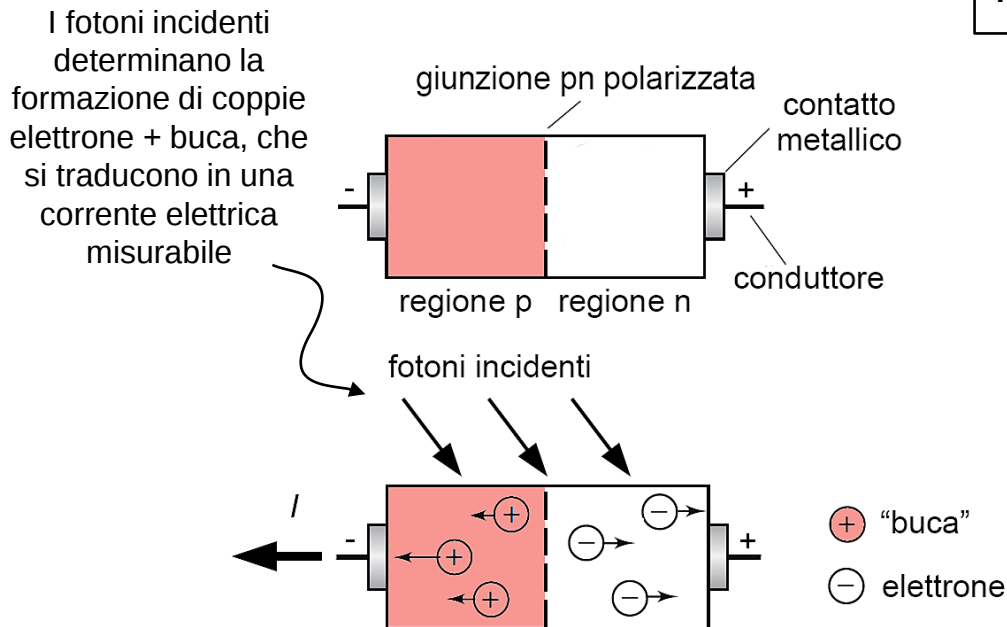
SPETTROFOTOMETRIA E SPETTROFLUORIMETRIA

STRUMENTAZIONE

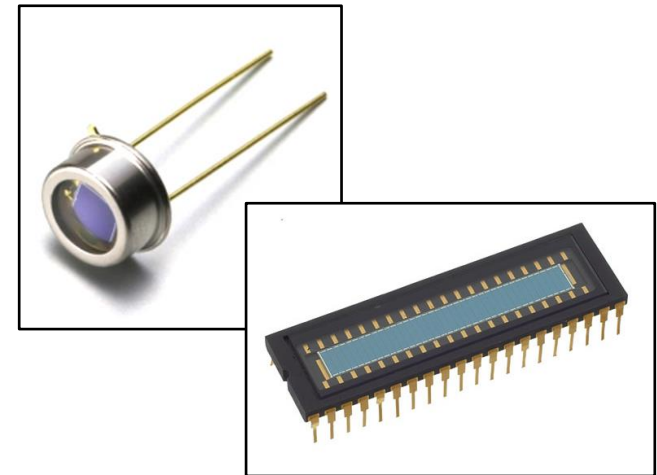
Rivelatori

Il rivelatore converte la radiazione trasmessa dalla cella in un segnale elettrico legato alla sua intensità. In spettrofotometria le intensità delle radiazioni da misurare sono relativamente elevate e non sono necessari rivelatori molto sensibili (la maggior parte degli strumenti utilizza semplici fotodiodi).

Nelle misure di emissione la situazione è diversa (le emissioni sono in genere deboli) e quindi si utilizzano **rivelatori molto sensibili** (es. tubi fotomoltiplicatori).



Schema e principio di funzionamento di un fotodiodo

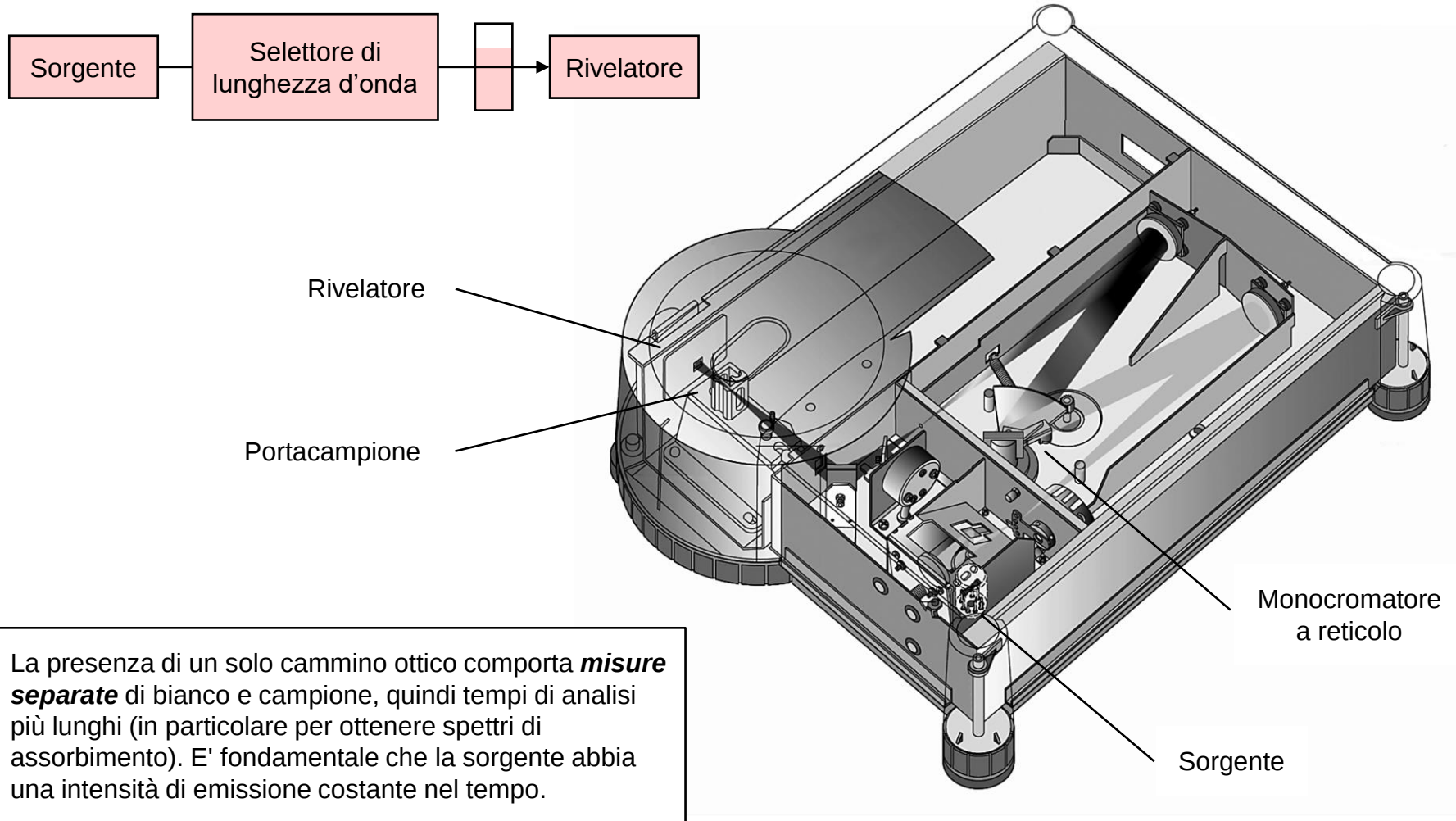


Fotodiodo singolo e rivelatore a matrice di fotodiodi a 32 elementi

SPETTROFOTOMETRIA E SPETTROFLUORIMETRIA

STRUMENTAZIONE

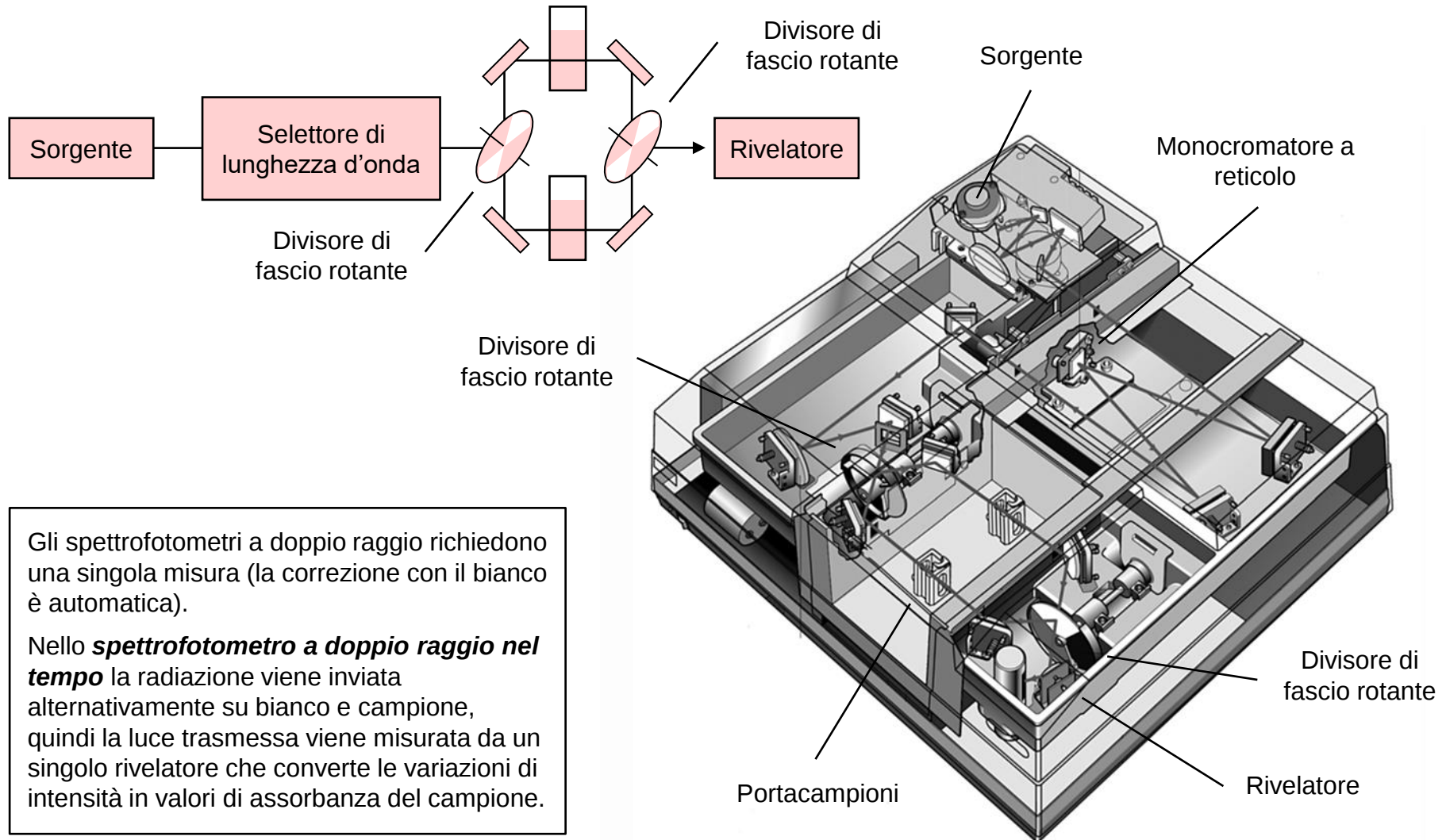
Spettrofotometro a singolo raggio



SPETTROFOTOMETRIA E SPETTROFLUORIMETRIA

STRUMENTAZIONE

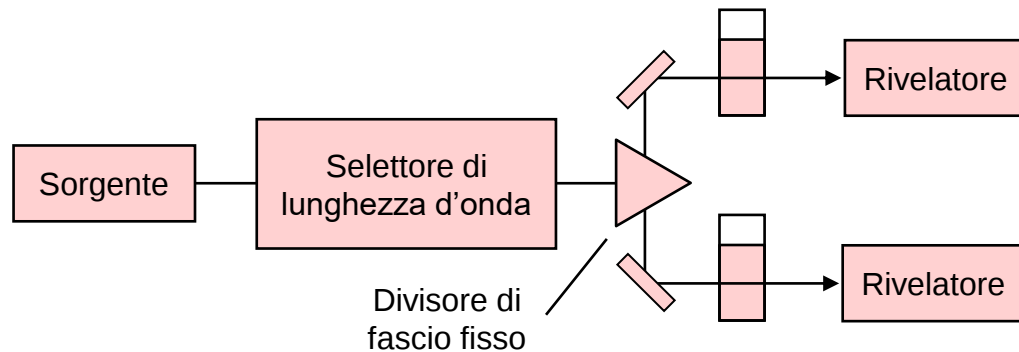
Spettrofotometro a doppio raggio nel tempo



SPETTROFOTOMETRIA E SPETTROFLUORIMETRIA

STRUMENTAZIONE

Spettrofotometro a doppio raggio nello spazio



Rivelatore

Rivelatore

Monocromatore
a reticolo

Portacampioni

Divisore di
fascio fisso

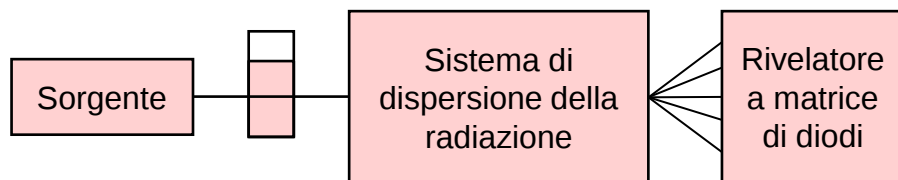
Sorgente

Nello **spettrofotometro a doppio raggio nello spazio** la radiazione viene divisa in due fasci, inviati rispettivamente sul bianco e sul campione. La radiazione trasmessa viene poi misurata da due rivelatori indipendenti.

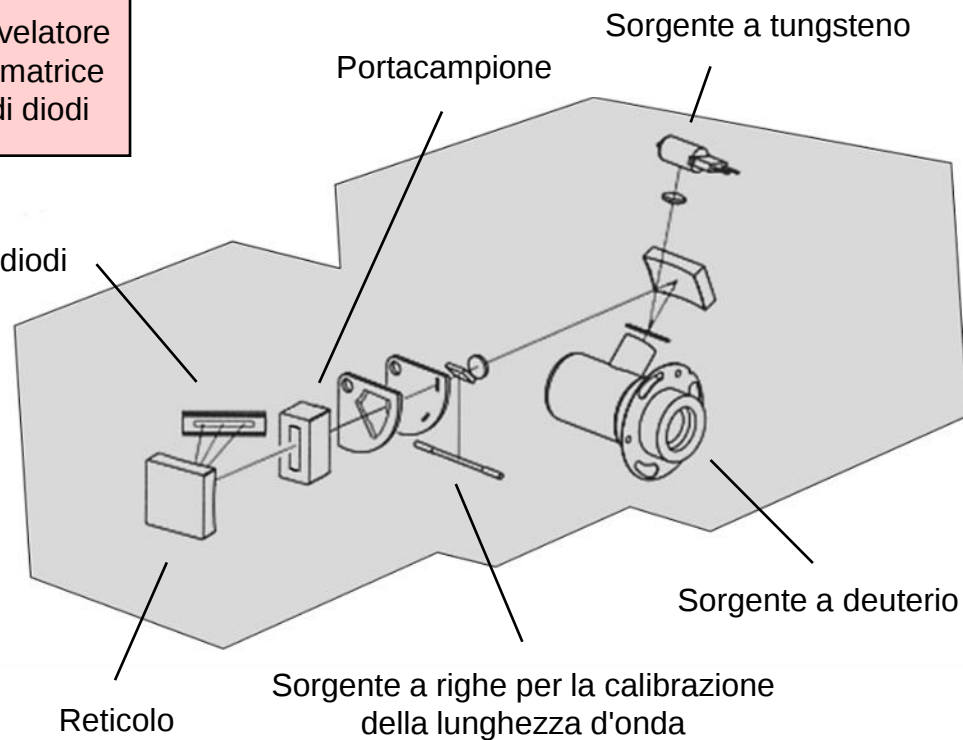
SPETTROFOTOMETRIA E SPETTROFLUORIMETRIA

STRUMENTAZIONE

Spettrofotometro con rivelatore a matrice di diodi



Rivelatore a matrice di diodi



Gli **spettrofotometri con rivelatore a matrice di diodi** sono a singolo raggio e usano un sistema di dispersione della radiazione con il campione posizionato subito dopo la sorgente. Il rivelatore misura simultaneamente le radiazioni trasmesse ad ogni lunghezza d'onda. Questi strumenti acquisiscono uno spettro in tempi brevissimi (es. 1 s) e sono indicati per misure veloci. Hanno però spesso bassa risoluzione (1 – 2 nm) a causa del numero limitato di elementi nel rivelatore.

Spettrofotometro a monocromatore vs. spettrofotometro con rivelatore a matrice di diodi:

<https://www.youtube.com/watch?v=pxC6F7bK8CU>

<https://www.youtube.com/watch?v=OI3plvLhVcc>

SPETTROFOTOMETRIA E SPETTROFLUORIMETRIA

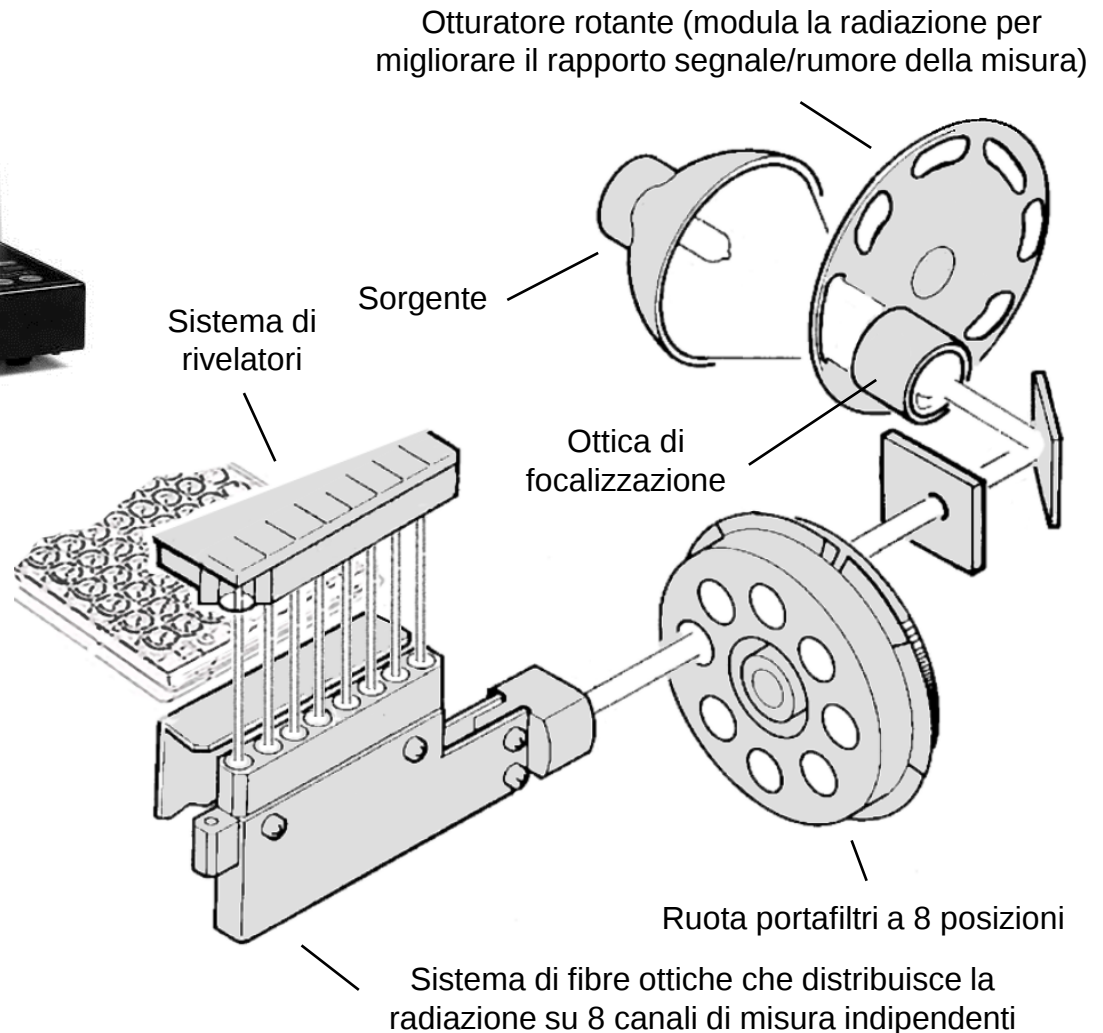
STRUMENTAZIONE

Spettrofotometro per micropiastre



Molti dei modelli in commercio usano filtri ad interferenza (questi strumenti vengono spesso impiegati in campo chimico-clinico dove le misure vengono effettuate a lunghezze d'onda fisse).

In aggiunta alle limitazioni connesse all'uso delle micropiastre, ciò rende questi strumenti **meno performanti** rispetto agli spettrofotometri convenzionali.



SPETTROFOTOMETRIA E SPETTROFLUORIMETRIA

STRUMENTAZIONE

Gli **spettrofotometri portatili** per uso sul campo hanno prestazioni inferiori rispetto agli strumenti da laboratorio ma permettono comunque misure sufficientemente accurate (es. nelle analisi ambientali).

Contenitori per il campione

Spesso vengono impiegati *vials* cilindrici in plastica o vetro (la forma cilindrica non è ottimale per misure spettrofotometriche, ma il tappo facilita operazioni quali l'agitazione del campione dopo l'aggiunta di reagenti)



Rivelatori

Diodi o altri tipi di rivelatori a stato solido

Selettori di lunghezza d'onda

Una sorgente di luce LED emette già radiazioni a una specifica lunghezza d'onda, in alternativa si impiegano sorgenti policromatiche filtri interferenziali o (più raramente) monocromatori

Sorgenti

Sorgenti di radiazione a basso consumo (gli strumenti sono alimentati a batteria), es. LED monocromatici o a luce bianca

SPETTROFOTOMETRIA E SPETTROFLUORIMETRIA

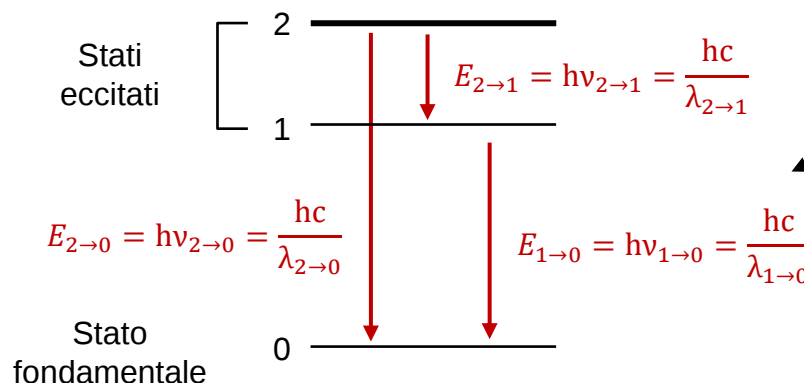
EMISSIONE DI RADIAZIONE

Che cos'è un processo di emissione di radiazione?

Una emissione di radiazione si verifica quando uno stato eccitato, per sua natura instabile, decade allo stato fondamentale o a uno stato eccitato a minore energia.

L'emissione di radiazione (**luminescenza**) è solo uno dei possibili processi di disattivazione di uno stato eccitato, quindi avviene solo se compete efficacemente con gli altri processi di disattivazione (es. dissipazione dell'energia sotto forma di calore).

Come per l'assorbimento, anche la radiazione emessa ha energia pari alla differenza di energia fra i livelli energetici coinvolti ed è quindi caratteristica della specie in esame.



Vengono emesse soltanto le radiazioni con energia pari alla differenza di energia fra lo stato eccitato di partenza e lo stato di arrivo

SPETTROFOTOMETRIA E SPETTROFLUORIMETRIA

EMISSIONE DI RADIAZIONE

Come si può ottenere uno stato eccitato?

I processi di emissione sono classificati in base a come viene ottenuto lo stato eccitato.

Fotoluminescenza

Assorbimento di radiazione (es. fluorescenza, fosforescenza).

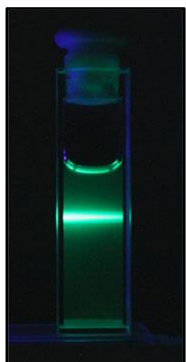
Luminescenza chimica

Reazione chimica (es. chemiluminescenza, bioluminescenza).

Emissione termica

Riscaldamento (es. emissione in fiamma).

Le temperature richieste sono molto elevate (spesso oltre 1000°C) e causano la decomposizione della maggior parte delle specie molecolari. Questo tipo di eccitazione viene usato solo in **spettroscopia atomica**.



Fluorescenza



Chemiluminescenza



Emissione termica

Chemiluminescenza:

https://www.youtube.com/watch?v=8_82cNtZSQE

NATURA DEGLI SPETTRI DI EMISSIONE

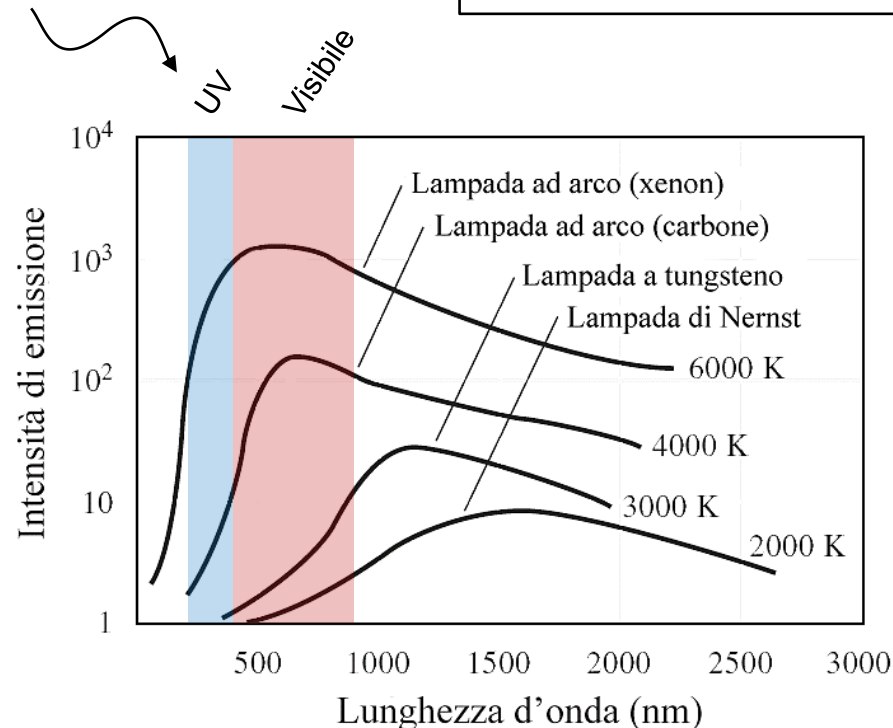
Come si origina uno spettro di emissione?

Come per l'assorbimento, anche per l'emissione le caratteristiche dello spettro dipendono dagli stati energetici della specie in esame.

Una eccezione è l'emissione prodotta da corpi ad elevata temperatura, il cui spettro (**spettro di corpo nero**) non è strutturato e dipende in prima approssimazione solo dalla temperatura.

Tranne nel caso di temperature molto elevate, queste sorgenti emettono poco nell'UV

Molte sorgenti impiegate in strumenti per analisi spettroscopiche presentano questo tipo di emissione.

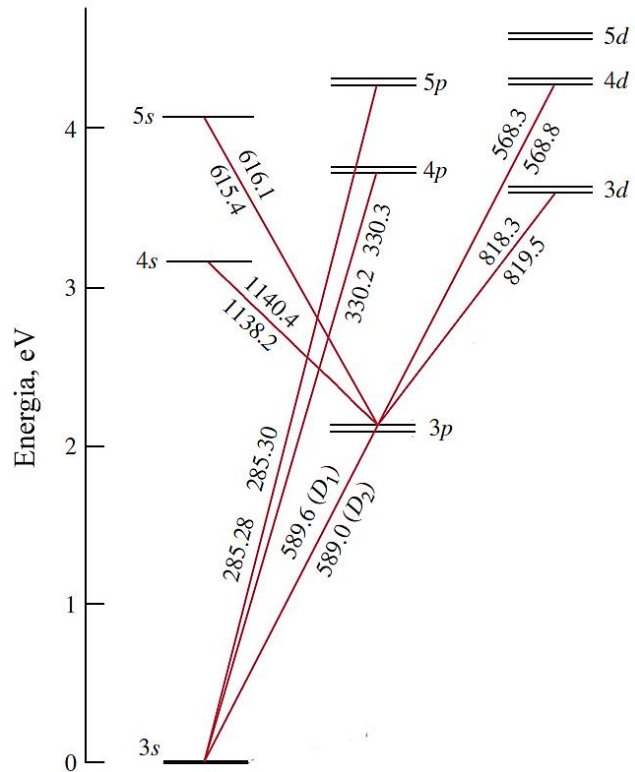


SPETTROFOTOMETRIA E SPETTROFLUORIMETRIA

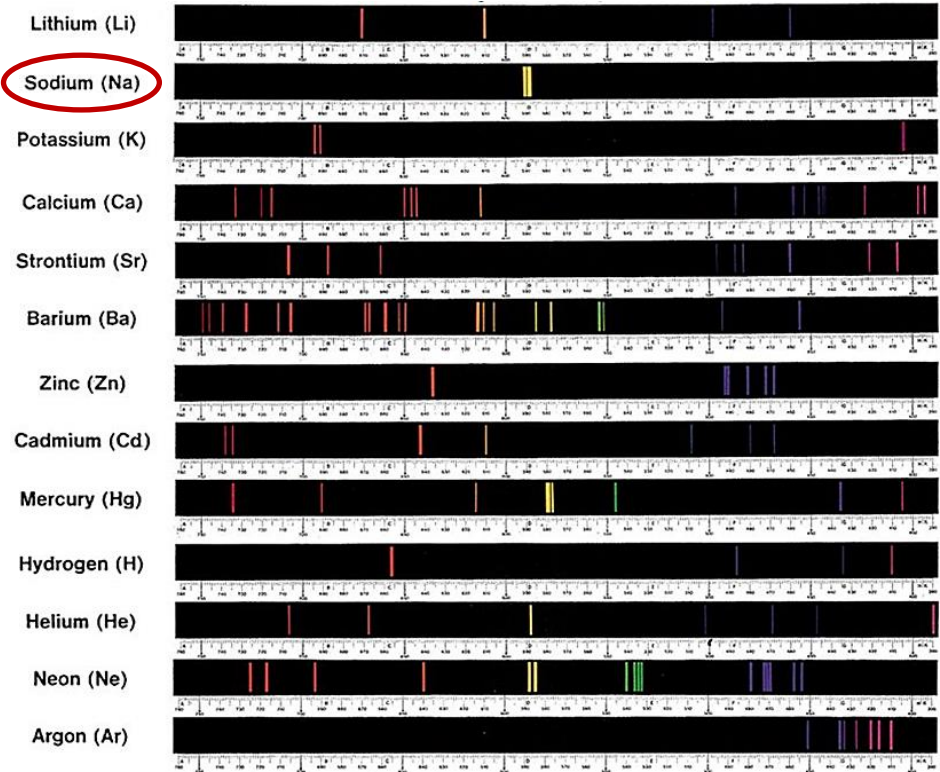
NATURA DEGLI SPETTRI DI EMISSIONE

Gli atomi presentano *spettri di emissione a righe*.

In spettroscopia atomica la lunghezza d'onda dell'emissione può essere usata anche per **identificare** le specie presenti in un campione (ogni atomo emette righe caratteristiche e facilmente riconoscibili).



Livelli energetici dell'atomo di sodio e transizioni in emissione



SPETTROFOTOMETRIA E SPETTROFLUORIMETRIA

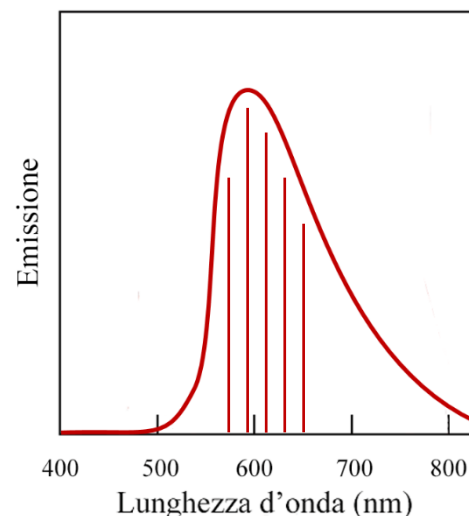
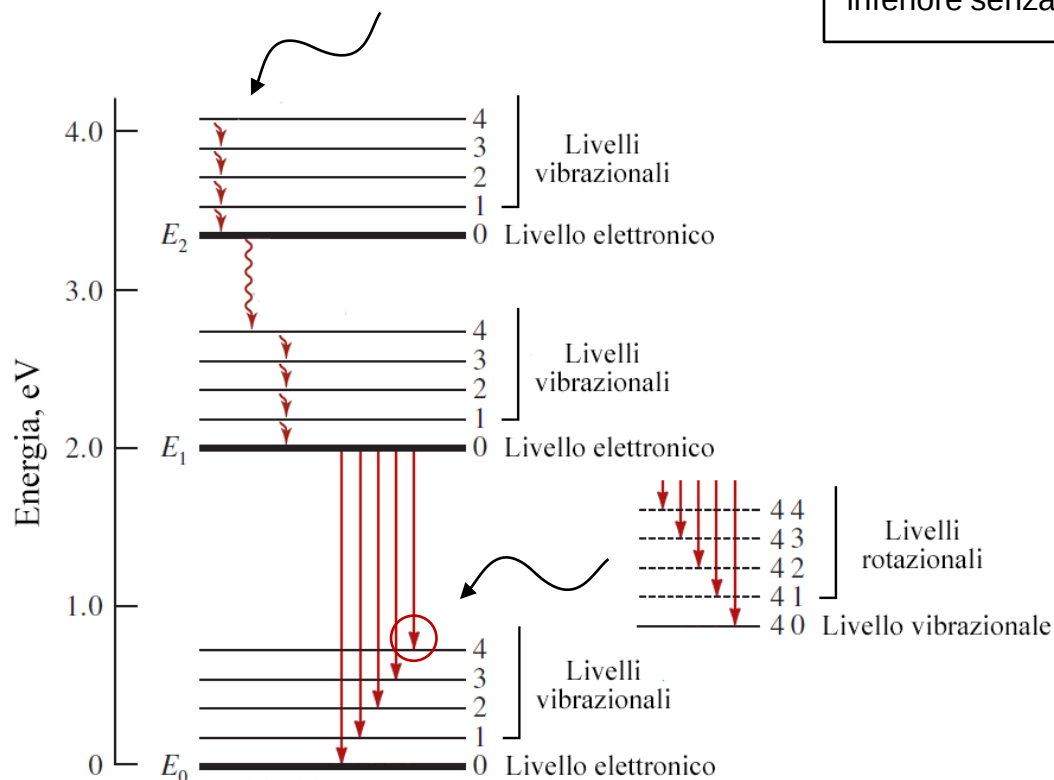
NATURA DEGLI SPETTRI DI EMISSIONE

Le molecole presentano **spettri di emissione a bande**.

In genere l'emissione proviene dallo stato eccitato a **minore energia**, indipendentemente da quale stato sia stato inizialmente prodotto fornendo energia al sistema.

Questo fenomeno è legato alla esistenza di veloci **processi di disattivazione non radiativa**, attraverso i quali gli stati eccitati a maggiore energia decadono a quelli ad energia inferiore senza emissione di radiazione.

Processi di decadimento non radiativo

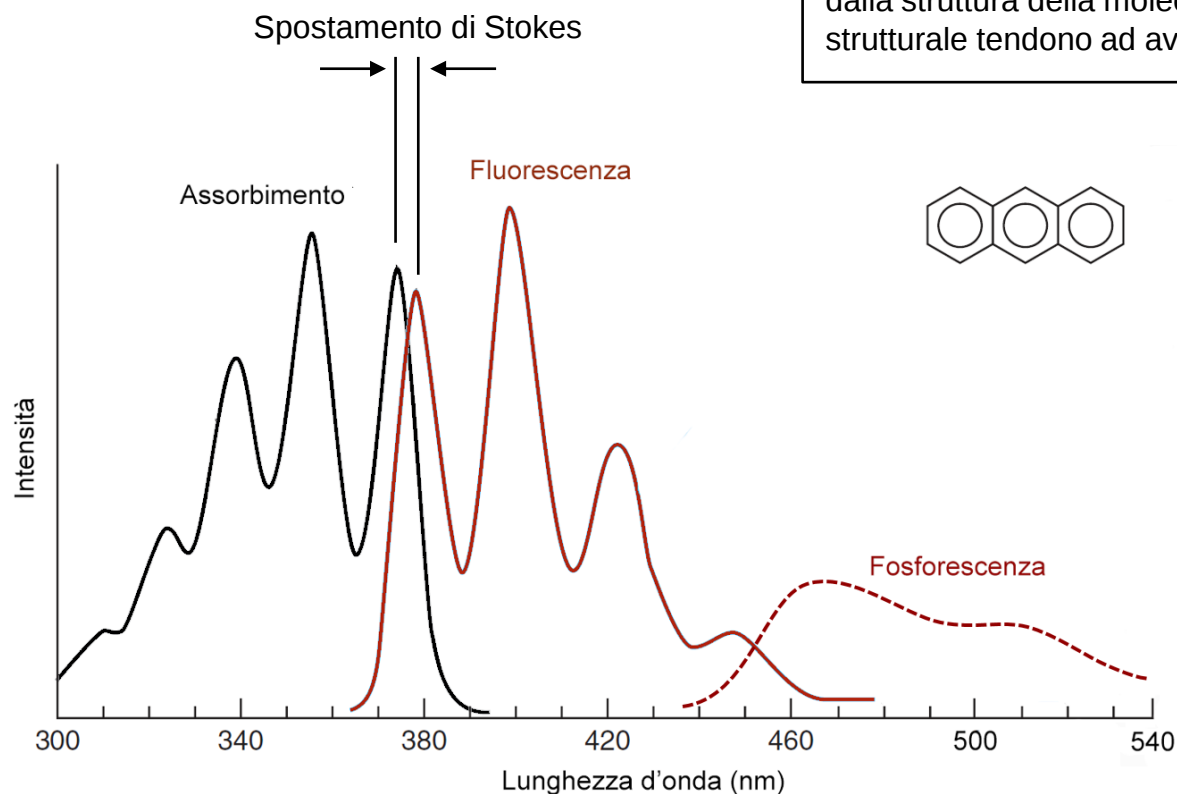


SPETTROFOTOMETRIA E SPETTROFLUORIMETRIA

NATURA DEGLI SPETTRI DI EMISSIONE

A causa dei processi di disattivazione non radiativa e di altri fattori (es. legati alla differente interazione con l'ambiente degli stati eccitati e fondamentale) la radiazione emessa ha sempre una **energia inferiore** (ovvero una maggiore lunghezza d'onda) rispetto a quella di eccitazione.

Lo **spostamento di Stokes** rappresenta la differenza di energia fra le radiazioni coinvolte nei processi di assorbimento e di emissione dovuti alla stessa transizione elettronica e dipende dalla struttura della molecola (molecole con elevata rigidità strutturale tendono ad avere spostamenti di Stokes inferiori).



In molti casi, siccome i livelli energetici coinvolti sono gli stessi, gli spettri di emissione (almeno quelli di fluorescenza) **sono approssimativamente speculari** rispetto a quelli di assorbimento.

SPETTROFOTOMETRIA E SPETTROFLUORIMETRIA

ANALISI QUANTITATIVA

Come si caratterizza una specie fotoluminescente?

A causa delle intensità di emissione relativamente elevate, la **fluorescenza** è il processo di fotoluminescenza più usato in chimica analitica.

Esiste anche un secondo processo di emissione (**fosforescenza**). Questo fenomeno ha applicazioni analitiche molto più limitate poiché l'emissione è debole e spesso si verifica solo in particolari condizioni (es. allo stato solido o in soluzioni congelate).

La capacità di una specie di emettere fluorescenza è definita attraverso la **resa quantica di fluorescenza** (Φ_F).

$$\Phi_F = \frac{\text{fotoni emessi}}{\text{fotoni assorbiti}}$$

Il valore di Φ_F varia da 0 (specie non fluorescente) a 1 (specie intensamente fluorescenti). Per la fosforescenza esiste un parametro equivalente (Φ_P), generalmente molto inferiore all'unità.

SPETTROFOTOMETRIA E SPETTROFLUORIMETRIA

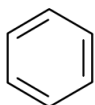
ANALISI QUANTITATIVA

Le specie fluorescenti sono relativamente poche poiché l'emissione si verifica solo se la fluorescenza **compete efficacemente** con gli altri processi di disattivazione dello stato eccitato.

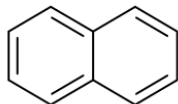
Tale condizione si ottiene più facilmente in molecole insature, con una bassa energia delle transizioni $\pi \rightarrow \pi^*$ (es. ad **elevata aromaticità**) e con una elevata **rigidità strutturale**.

Anche l'ambiente è importante: solventi ad elevata viscosità, basse temperature, adsorbimento su una superficie sono fattori che in genere favoriscono i processi di emissione.

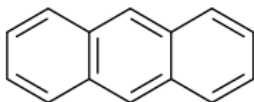
Effetto della aromaticità



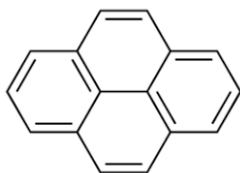
$$\Phi_F = 0,05$$



$$\Phi_F = 0,23$$

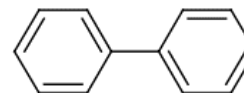


$$\Phi_F = 0,30$$

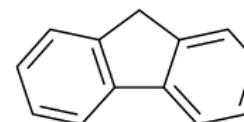


$$\Phi_F = 0,65$$

Effetto della rigidità strutturale



$$\Phi_F = 0,20$$

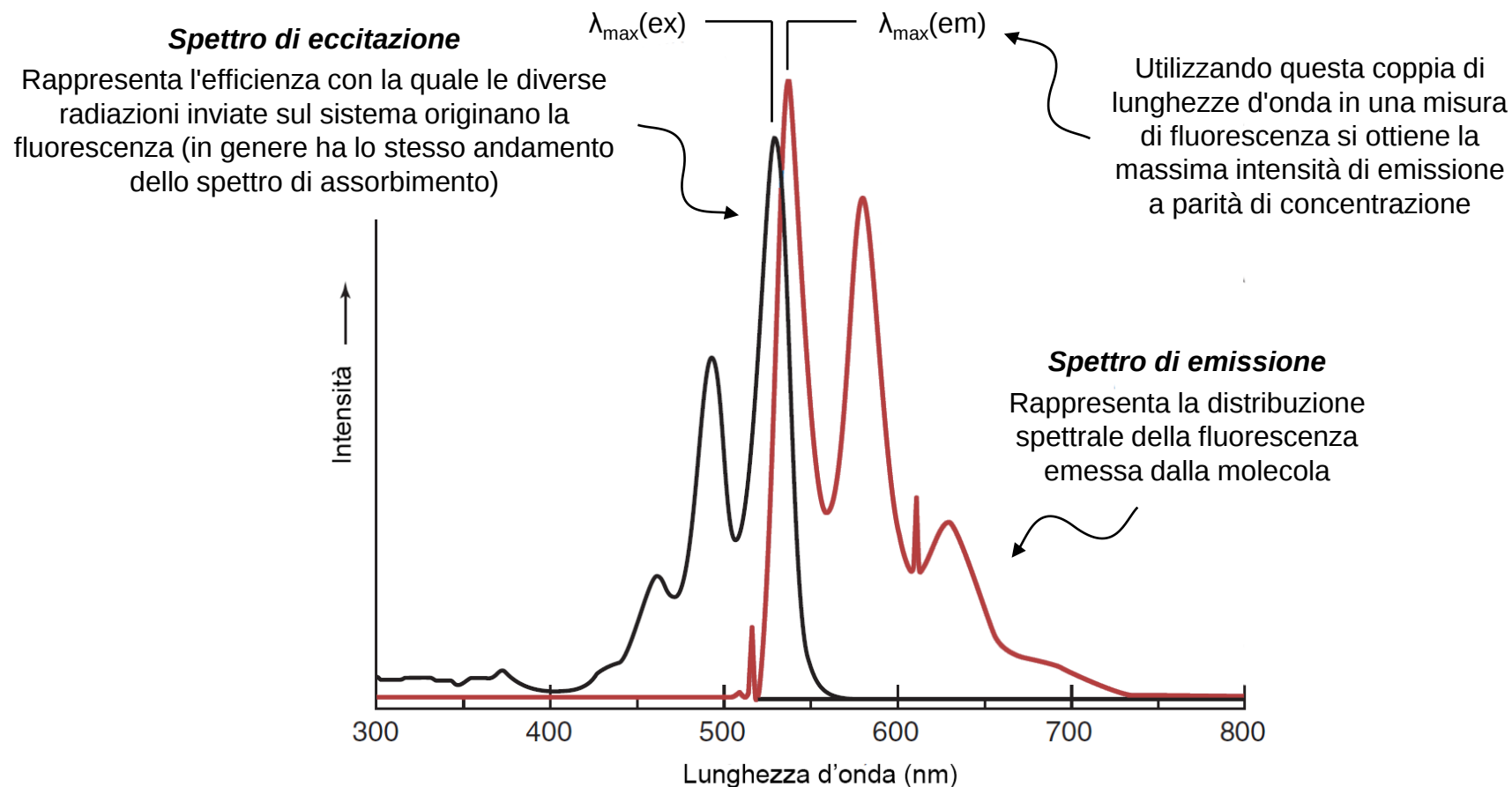


$$\Phi_F = 1,00$$

SPETTROFOTOMETRIA E SPETTROFLUORIMETRIA

ANALISI QUANTITATIVA

Da punto di vista spettrale una specie fluorescente è caratterizzata da due tipi di spettro (*spettro di emissione* e *spettro di eccitazione*).



SPETTROFOTOMETRIA E SPETTROFLUORIMETRIA

ANALISI QUANTITATIVA

Quale è la relazione fra intensità di fluorescenza e concentrazione?

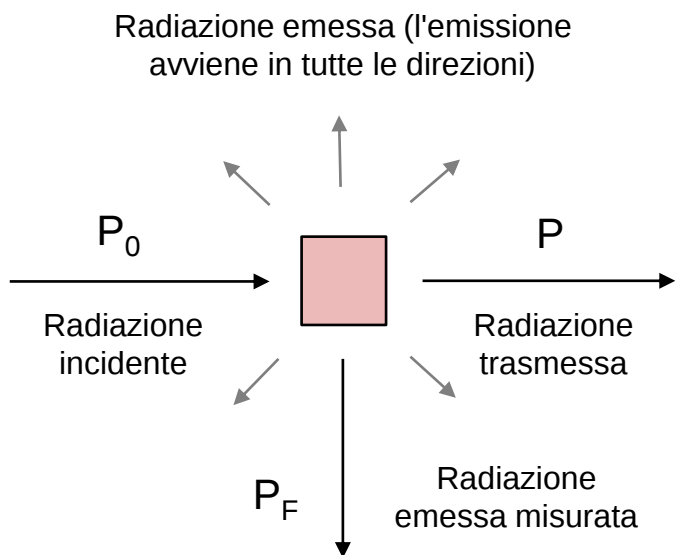
Nella fluorescenza ***non esiste una relazione lineare*** fra segnale e concentrazione.

L'intensità di fluorescenza dipende dalla quantità di radiazione di eccitazione assorbita (che fornisce l'energia necessaria al processo) e dalla resa quantica di emissione della specie in esame secondo la

L'intensità della emissione di fluorescenza dipende dalla potenza della radiazione incidente P_0

$$P_F = k\Phi_F(P_0 - P) = k\Phi_F P_0(1 - 10^{-\epsilon bc})$$

Il coefficiente k dipende (fra le altre cose) dalla frazione di emissione effettivamente misurata e varia con strumento e le condizioni di misura. Pertanto il risultato della misura di emissione ***dipende dallo strumento*** (una curva di calibrazione è specifica per un dato strumento)

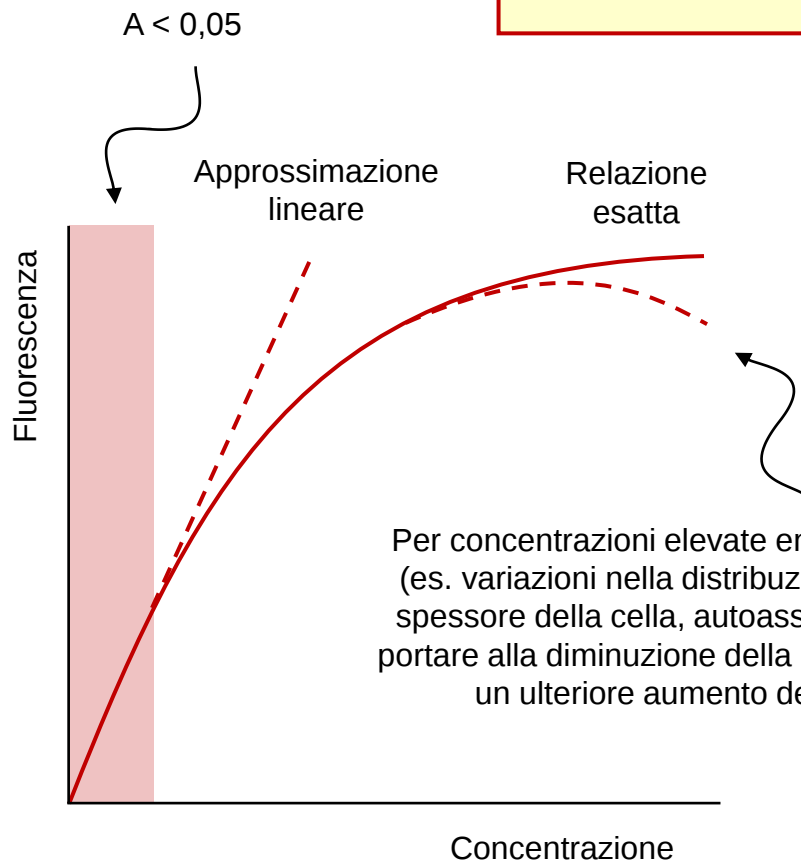


SPETTROFOTOMETRIA E SPETTROFLUORIMETRIA

ANALISI QUANTITATIVA

La curva di calibrazione può comunque essere **approssimata a una retta** se l'assorbanza della soluzione è bassa (in genere si assume una dipendenza lineare per $A < 0,05$).

$$P_F \sim 2,303kP_0\Phi_F\epsilon bc = Kc$$



Per ottenere l'equazione approssimata si utilizza l'espansione in serie di $10^{-\epsilon bc}$, che viene troncata al secondo termine assumendo che ϵbc (ovvero A) sia sufficientemente basso.

$$10^{-\epsilon bc} = 1 - \epsilon bc \ln 10 + \frac{(\epsilon bc \ln 10)^2}{2!} + \dots$$

Per concentrazioni elevate entrano in gioco altri fattori (es. variazioni nella distribuzione dell'emissione nello spessore della cella, autoassorbimento) che possono portare alla diminuzione della intensità di emissione con un ulteriore aumento della concentrazione

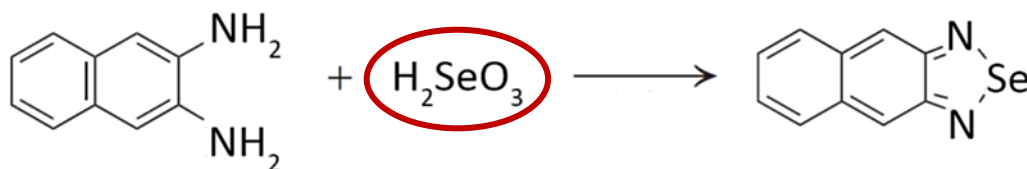
SPETTROFOTOMETRIA E SPETTROFLUORIMETRIA

APPLICAZIONI ANALITICHE

Quali sono le applicazioni delle tecniche di fluorescenza?

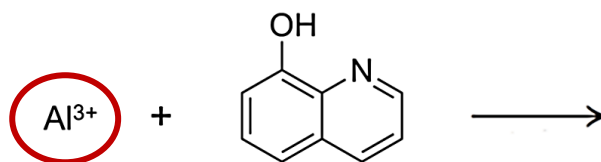
Le tecniche di fluorescenza sono **più sensibili** e con **limiti di rivelabilità inferiori** rispetto alle tecniche di assorbimento, anche se il campo di applicazione è più limitato dato il minore numero di specie determinabili.

Queste tecniche sono comunque usate anche per **specie non fluorescenti**, es. sfruttando reazioni chimiche che portano a prodotti fluorescenti.

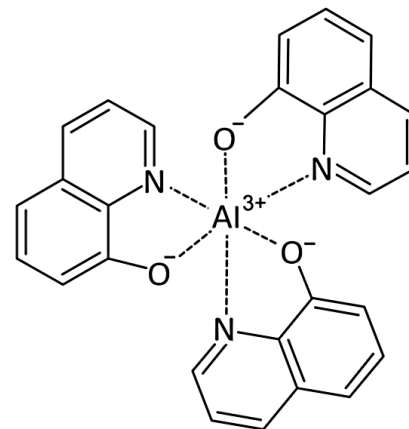


Non fluorescente

Fluorescente



Non fluorescente

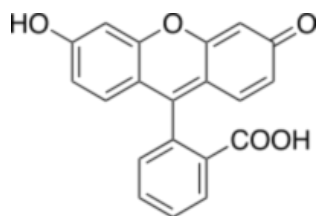


Fluorescente

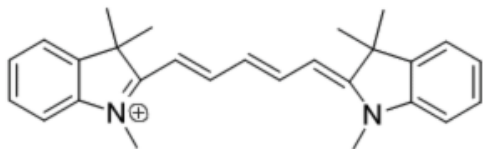
SPETTROFOTOMETRIA E SPETTROFLUORIMETRIA

APPLICAZIONI ANALITICHE

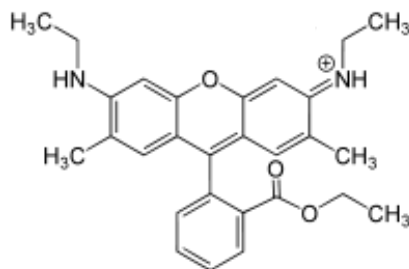
In biochimica molti analiti (es. proteine) vengono determinati mediante fluorescenza usando opportune sonde biospecifiche (es. anticorpi o sonde a DNA) **marcate con fluorofori**.



Fluorescina
($\Phi_F \sim 0,95$)



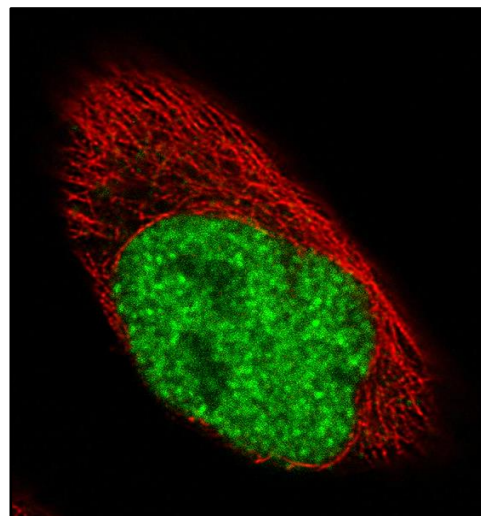
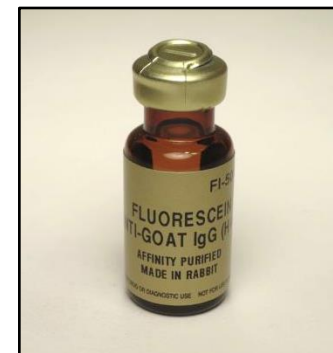
Cianina Cy5
($\Phi_F \sim 0,27$)



Rodammina B
($\Phi_F \sim 0,65$)

Fluorofori usati come marcatori in metodi bioanalitici

Derivato della fluorescina
(isotiocianato di fluorescina, FITC)
utilizzato per la marcatura di
proteine ed anticorpi



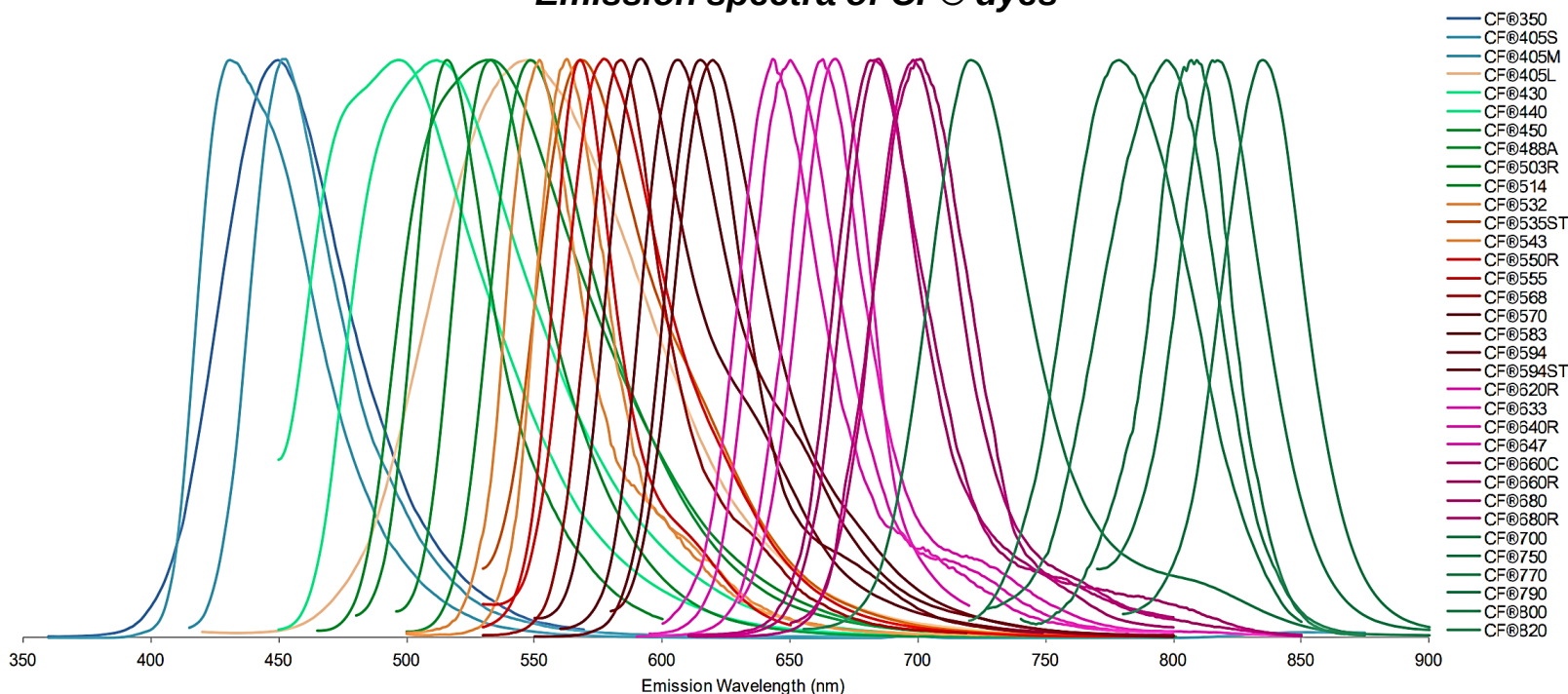
Localizzazione di due
proteine mediante
microscopia di fluorescenza
usando anticorpi marcati
con fluorofori

SPETTROFOTOMETRIA E SPETTROFLUORIMETRIA

APPLICAZIONI ANALITICHE

Per lo sviluppo di metodi multinanalita sono disponibili famiglie di fluorofori con emissioni che coprono tutto lo spettro visibile fino al vicino infrarosso.

Emission spectra of CF® dyes

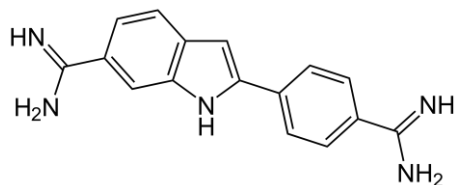


Per informazioni su caratteristiche spettrali e strutture molecolari:
<https://biotium.com/technology/cf-dyes>.

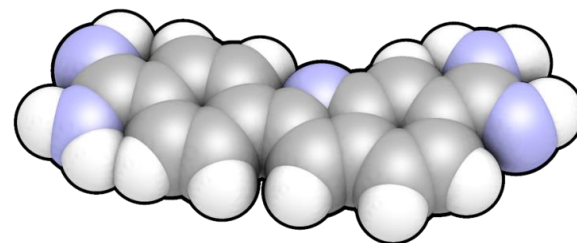
SPETTROFOTOMETRIA E SPETTROFLUORIMETRIA

APPLICAZIONI ANALITICHE

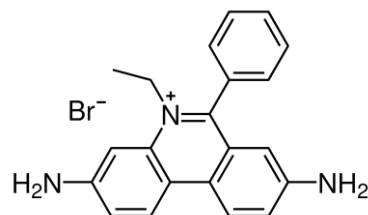
Gli **intercalanti fluorescenti** sono molecole che subiscono un aumento della resa quantica di fluorescenza quando si inseriscono nella doppia elica del DNA. Vengono usati per localizzare il DNA o quantificarlo attraverso misure di fluorescenza.



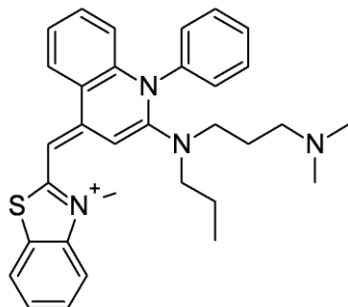
DAPI



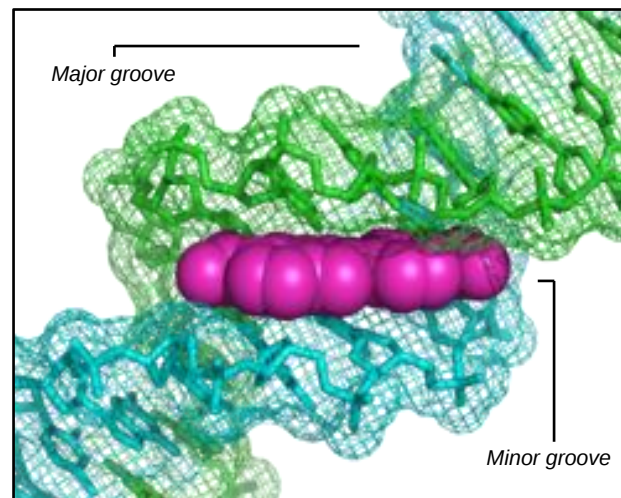
DAPI



Bromuro di etidio



SYBR Green I

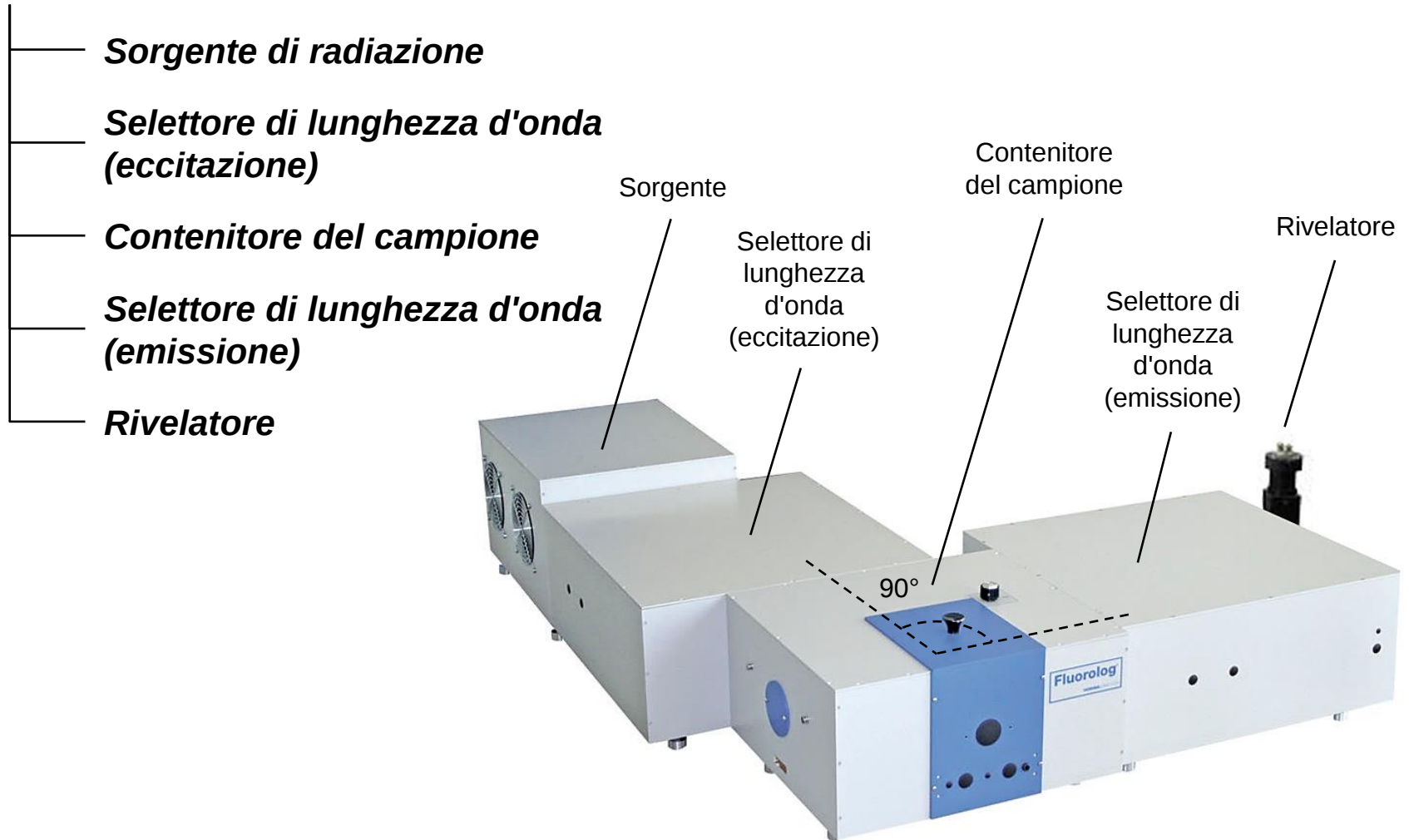


La molecola di un intercalante ha una parte planare e spesso è carica positivamente in modo da legarsi al DNA sfruttando anche interazioni elettrostatiche

SPETTROFOTOMETRIA E SPETTROFLUORIMETRIA

STRUMENTAZIONE

Gli strumenti per misure di fluorescenza (**spettrofluorimetri**) condividono varie componenti con altri strumenti per spettroscopia ottica.

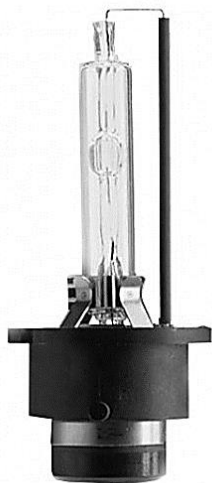


SPETTROFOTOMETRIA E SPETTROFLUORIMETRIA

STRUMENTAZIONE

Sorgenti di radiazione

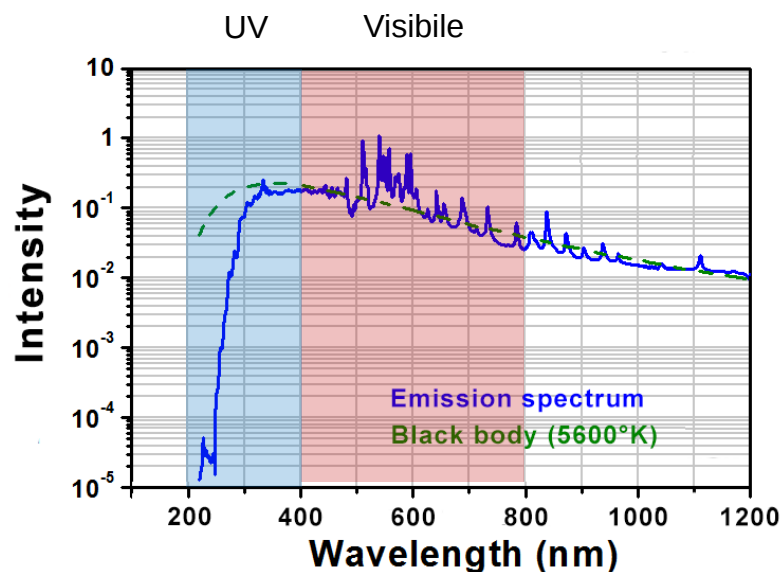
Vengono generalmente usate sorgenti a spettro continuo **di potenza elevata**.



Sorgente a xenon

Lo spettro presenta un continuo associato a temperature molto elevate (la lampada copre tutto il campo UV-Vis e viene quindi usata come sorgente unica)

L'intensità della fluorescenza **dipende dalla potenza della radiazione di eccitazione**, quindi è vantaggioso usare sorgenti intense (in particolare con elevata emissione nell'UV, dove assorbe la maggior parte delle sostanze organiche).



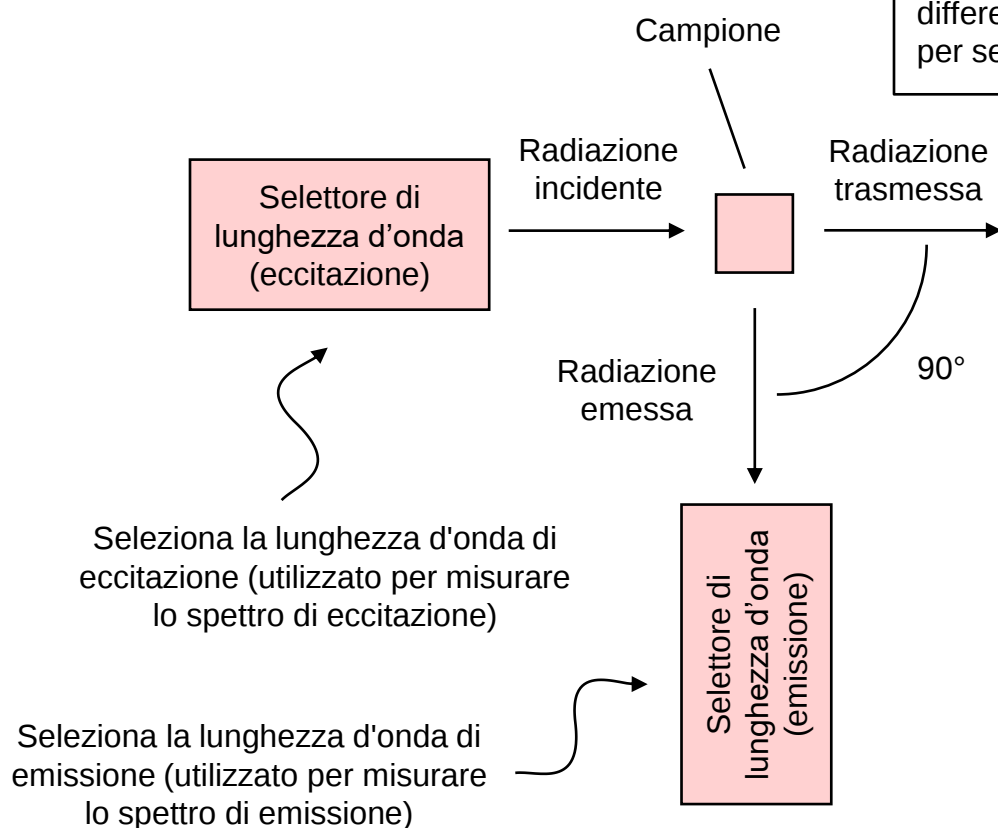
SPETTROFOTOMETRIA E SPETTROFLUORIMETRIA

STRUMENTAZIONE

Selettori di lunghezze d'onda

Gli spettrofluorimetri possiedono **due selettori di lunghezza d'onda** (uno per la radiazione di eccitazione ed uno per quella emessa) posti ad angolo retto in modo che la radiazione di eccitazione non interferisca nella misura.

Con alcuni formati analitici (es. piastre microtiter) questa disposizione non è possibile e si devono usare geometrie differenti (es. fasci leggermente divergenti) o altri sistemi per separare la radiazione di eccitazione da quella emessa.



SPETTROFOTOMETRIA E SPETTROFLUORIMETRIA

STRUMENTAZIONE

Anche gli strumenti per fluorescenza possono usare **filtri** o **monocromatori** per la selezione delle lunghezze d'onda.

Gli strumenti a filtri sono meno versatili ma spesso usati in applicazioni di routine, es. nelle analisi con sonde biospecifiche (es. anticorpi) marcate. Per la marcatura delle sonde si usano sempre gli stessi fluorofori e per ognuno esiste una **coppia di filtri** che seleziona le lunghezze d'onda ottimali di eccitazione ed emissione.

Lunghezza d'onda ottimali di eccitazione ed emissione di alcuni fluorofori

Fluorophore	Fluorescence Color	Excitation (nm)	Emission (nm)
DyLight 405		400	420
Alexa Fluor 405		401	421
Pacific Blue		410	455
Alexa Fluor 488		495	519
FITC		490	525
DyLight 550		562	576
PE		490/565	578
APC		650	661
Alexa Fluor 647		650	665
DyLight 650		654	673
PerCP		490	675
Alexa Fluor 700	 Infrared	702	723

SPETTROFOTOMETRIA E SPETTROFLUORIMETRIA

STRUMENTAZIONE

Contenitori per il campione

Le celle per misure di fluorescenza hanno quattro facce ottiche (i modelli comuni hanno un cammino ottico di 1 cm e possono essere usati anche per misure spettrofotometriche).

Anche in questo caso le celle possono essere di diversi materiali, ma poiché l'eccitazione viene spesso effettuata nell'UV il **quarzo** è il materiale più comune.



Quarzo
(1 cm)



Quarzo, per
solventi volatili
(1 cm)



Quarzo, volume
ridotto
(1 cm)



Quarzo, volume
ultraridotto
(1,5 mm)



Quarzo, a flusso
(1 cm)

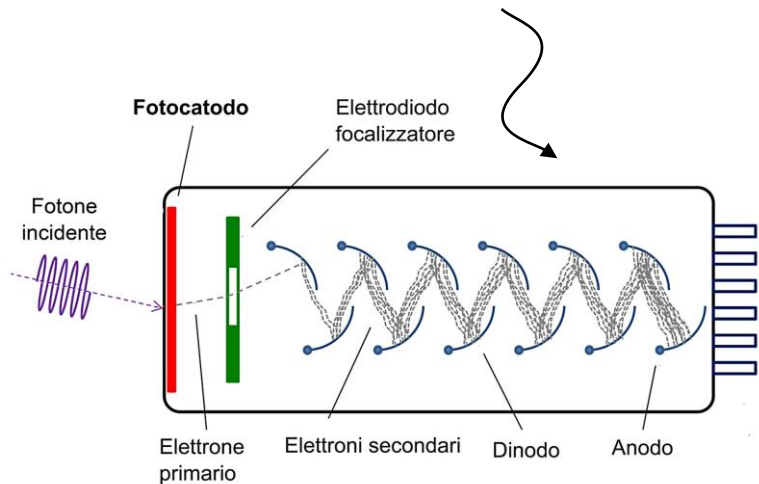
SPETTROFOTOMETRIA E SPETTROFLUORIMETRIA

STRUMENTAZIONE

Rivelatori

Le intensità delle radiazioni misurate in uno spettrofluorimetro sono in genere relativamente basse e per questo motivo vengono impiegati rivelatori ad elevata sensibilità (es. tubi fotomoltiplicatori).

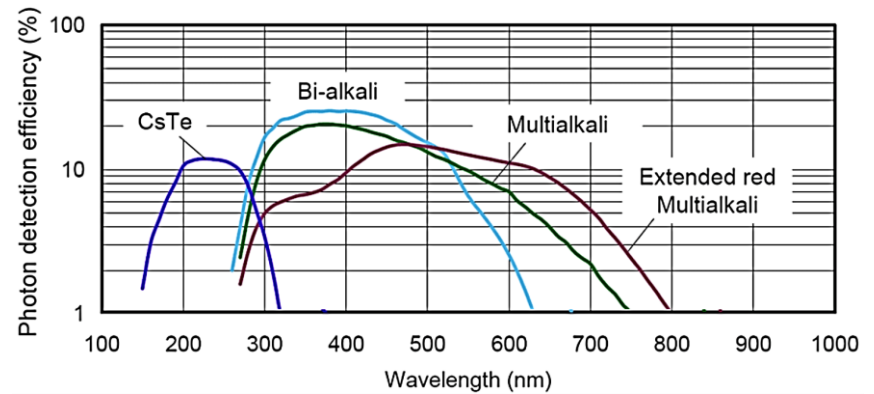
Gli elettroni prodotti nel fotocatodo dai fotoni incidenti vengono amplificati nelle collisioni con i vari dinodi: il risultato è un fattore di amplificazione elevato (fino a $10^6 - 10^8$) che rende possibile la misura di intensità di radiazione molto basse



Funzionamento di un fototubo convenzionale



Tubi fotomoltiplicatori convenzionali o allo stato solido per sistemi miniaturizzati

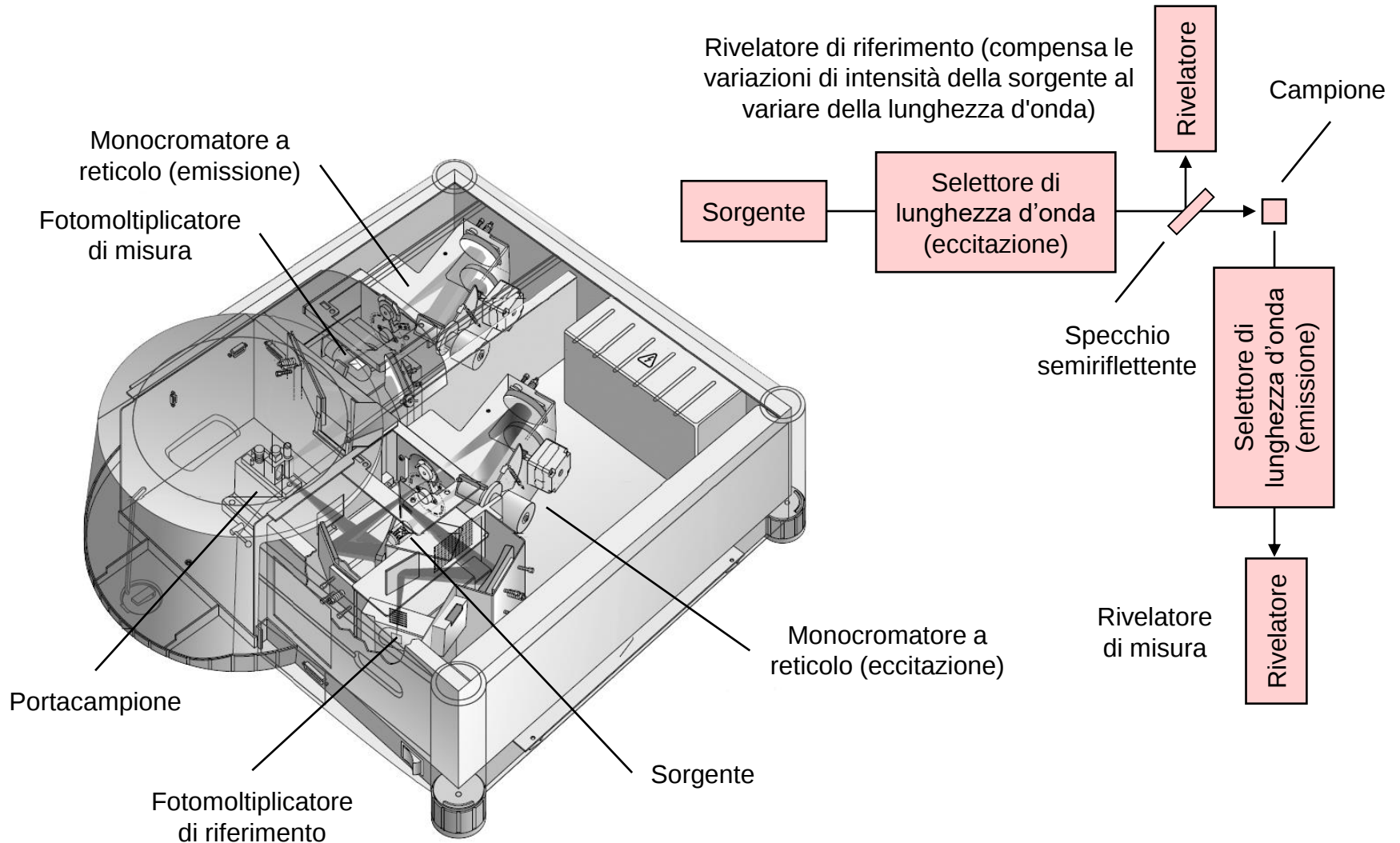


Curve di risposta spettrale di alcuni materiali per fotocatodi

SPETTROFOTOMETRIA E SPETTROFLUORIMETRIA

STRUMENTAZIONE

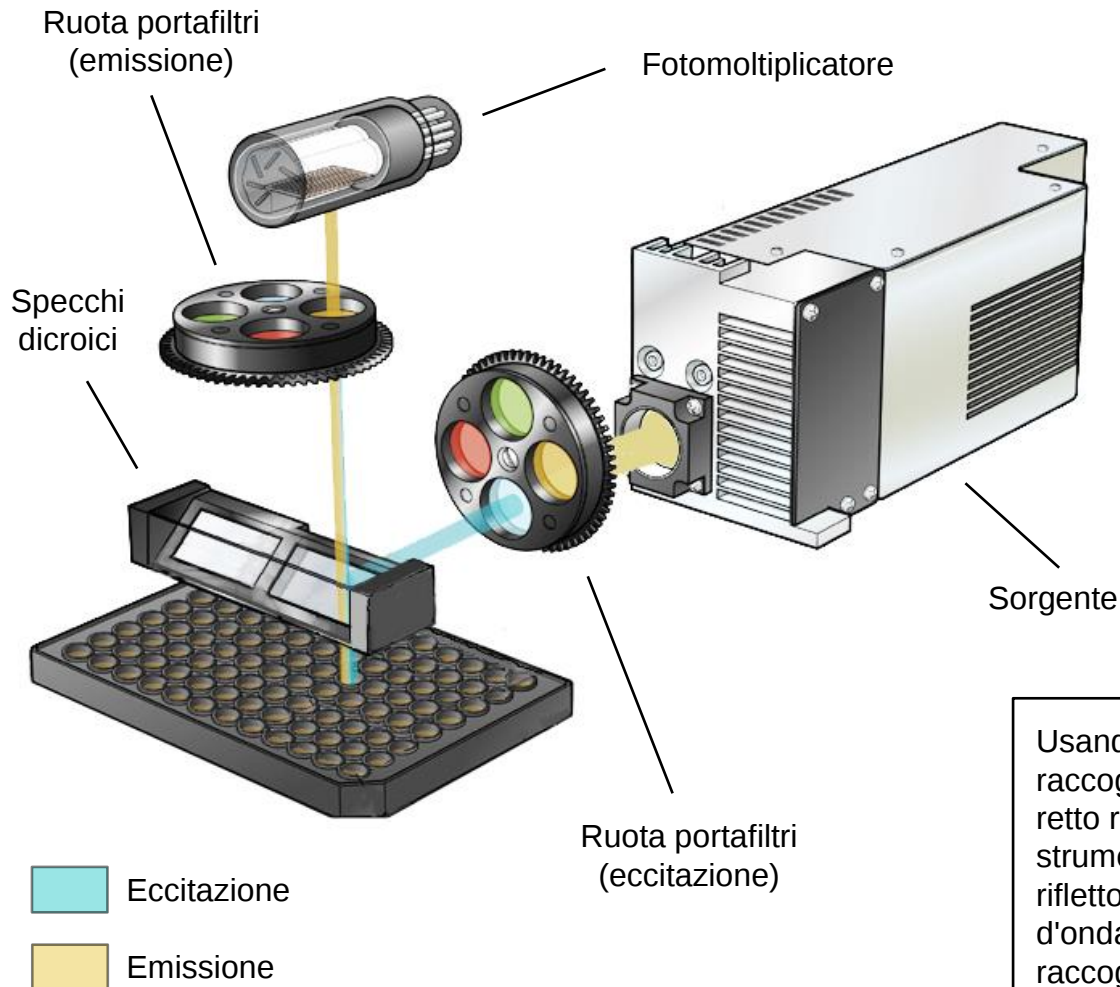
Spettrofluorimetro per cuvette



SPETTROFOTOMETRIA E SPETTROFLUORIMETRIA

STRUMENTAZIONE

Spettrofluorimetro per micropiastre



Usando una micropiastre non è possibile raccogliere la radiazione emessa ad angolo retto rispetto a quella di eccitazione. Questo strumento utilizza **specchi dicroici** (che riflettono solo determinati intervalli di lunghezze d'onda) per inviare la radiazione sul campione e raccogliere l'emissione di fluorescenza usando lo **stesso cammino ottico**.