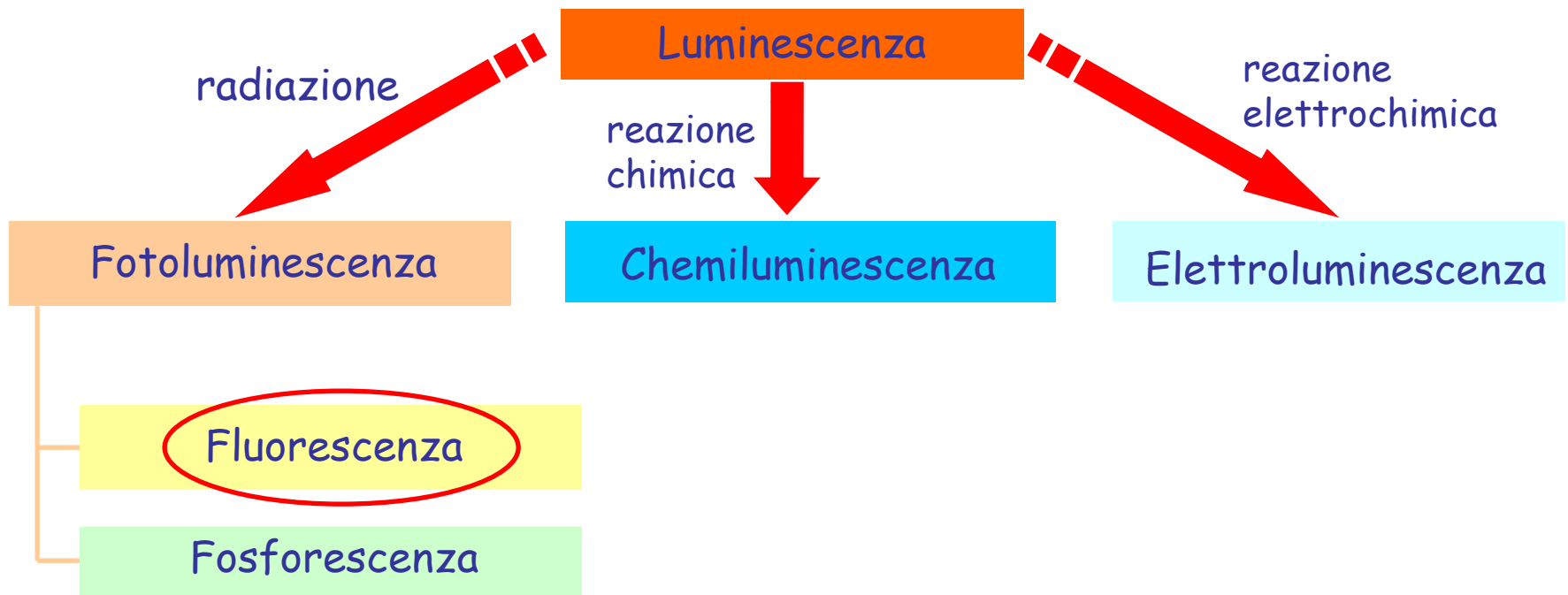


# Spettroscopie di luminescenza

La **luminescenza** è il fenomeno per cui una specie eccitata ad un livello elettronico ad energia più elevata emette radiazione per tornare allo stato fondamentale:



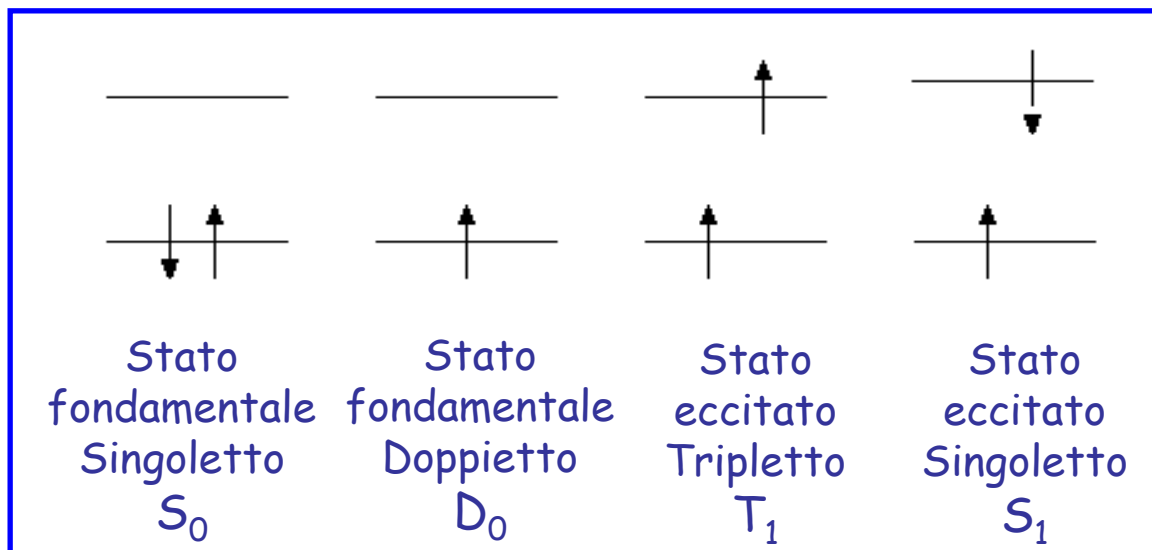
# Aspetti del fenomeno della luminescenza

## Molteplicità di spin

Per un particolare stato elettronico di una molecola la molteplicità di spin è legata alla sommatoria degli spin elettronici:

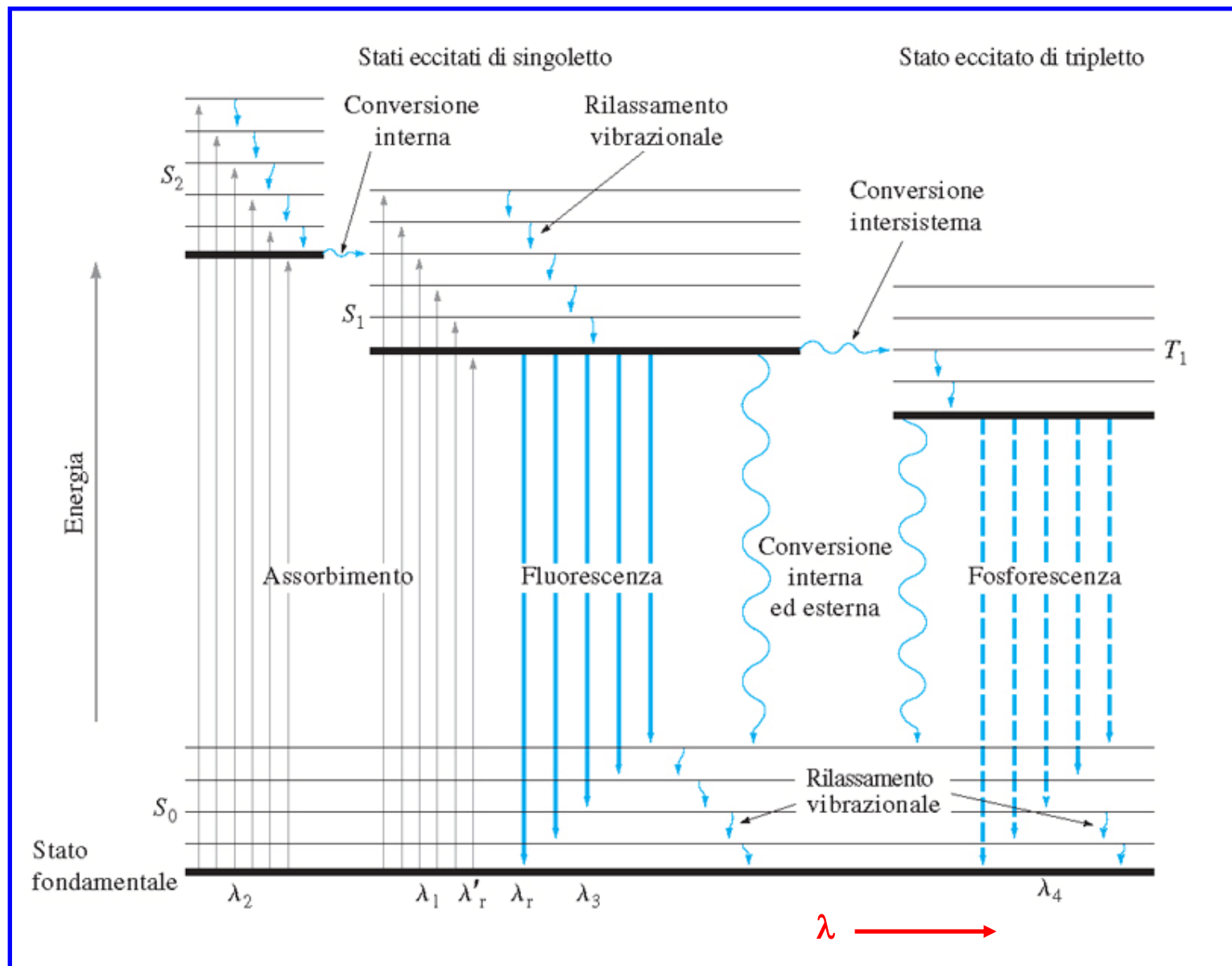
$$2S + 1, \text{ dove } S = \sum_{i=1}^n s_i,$$

con  $s_i$  = numero quantico di spin di ciascun elettrone ( $1/2$  o  $-1/2$ , a seconda dei casi)

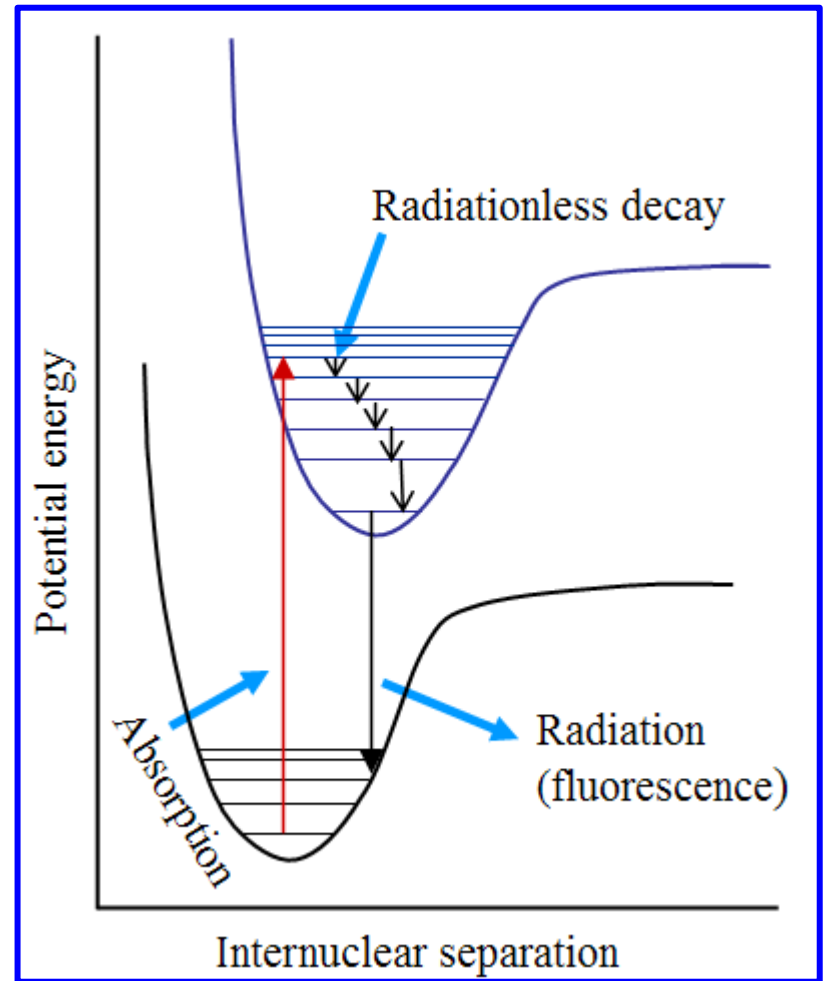


Lo stato  $T_1$  ha energia inferiore a quella dello stato  $S_1$ .

# Diagramma di Jablonski



Rappresentazione dei fenomeni di assorbimento e di decadimento non radiativo e radiativo (fluorescenza) in cui si evidenzia l'andamento dell'energia potenziale in funzione della distanza inter-nucleare sia per lo stato fondamentale che per il livello elettronico eccitato.



## Assorbimento della radiazione di eccitazione:

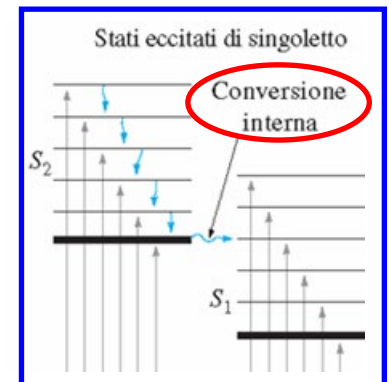
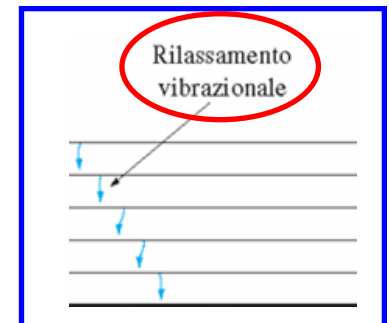
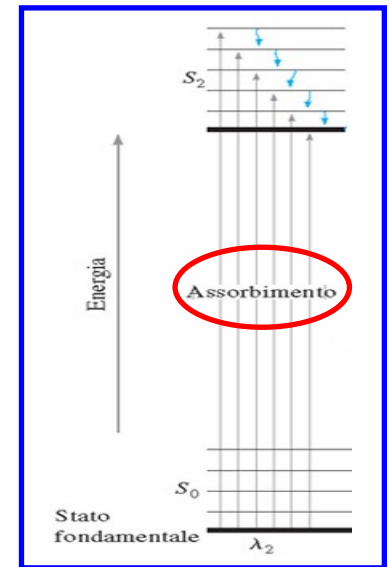
avviene in tempi dell'ordine di  $10^{-15} - 10^{-13}$  s e porta il sistema ad uno degli stati vibrazionali associati al livello elettronico eccitato della molecola, con maggiore probabilità per quello con configurazione dei nuclei più simile a quella dello stato fondamentale (**Principio di Franck-Condon**);

## Rilassamento vibrazionale:

avviene immediatamente dopo l'eccitazione ( $10^{-12}$  s), per cui tutti i processi successivi di luminescenza hanno origine dallo stato vibrazionale fondamentale associato al livello elettronico eccitato;

## Conversione interna:

è la transizione dallo stato vibrazionale fondamentale, associato ad un livello elettronico superiore, verso uno stato vibrazionale eccitato associato ad un livello elettronico di energia inferiore, un **processo che precede la fluorescenza**;



## Fluorescenza:

è l'emissione di radiazione, di solito ad una lunghezza d'onda **maggiore** di quella di eccitazione (**Stokes shift**).

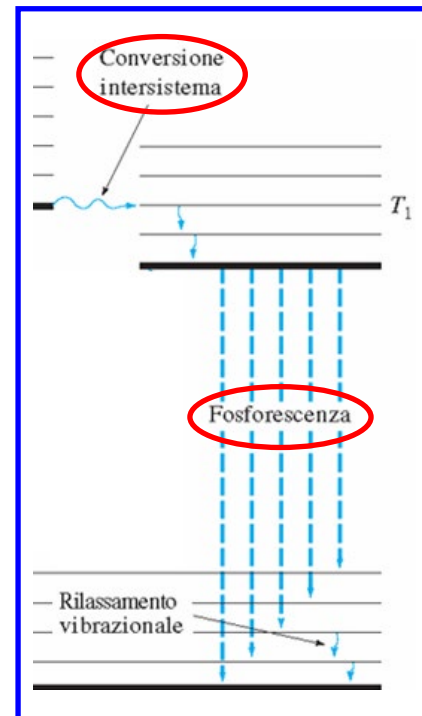
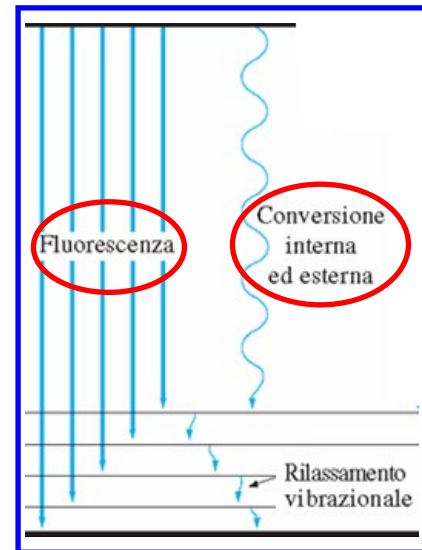
In caso di emissione alla "stessa" lunghezza d'onda la fluorescenza si definisce "**di risonanza**".

## Conversione esterna:

è la disattivazione di uno stato elettronico eccitato legata all'interazione fra la molecola eccitata e quelle del solvente o di altri soluti;

**Conversione intersistema (intersystem crossing):** è un processo di inversione dello spin di un elettrone eccitato, con passaggio da uno stato di singoletto ad uno stato di tripletto.

Precede il processo di **fosforescenza**, che è molto più lento (da  $10^{-4}$  a  $10$  s) della fluorescenza, per la difficoltà degli stati di tripletto a tornare a stati di singoletto (è una transizione "proibita");



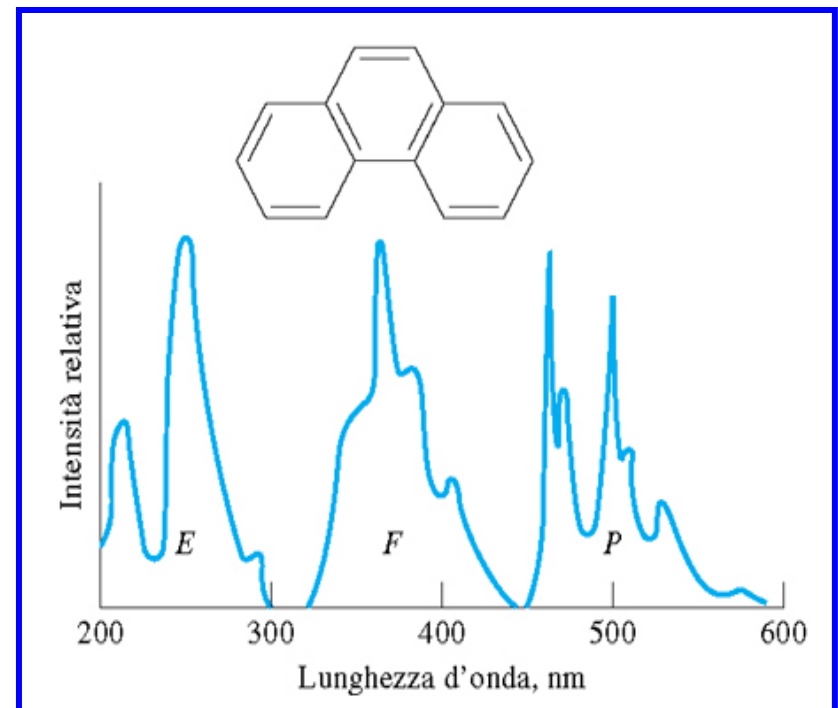
**Predissociazione:** si verifica quando la conversione interna porta la molecola ad un livello vibrazionale (di uno stato elettronico inferiore) di energia tale da causare la rottura di un legame;

**Dissociazione:** è la rottura di un legame associata direttamente all'assorbimento della radiazione di eccitazione.

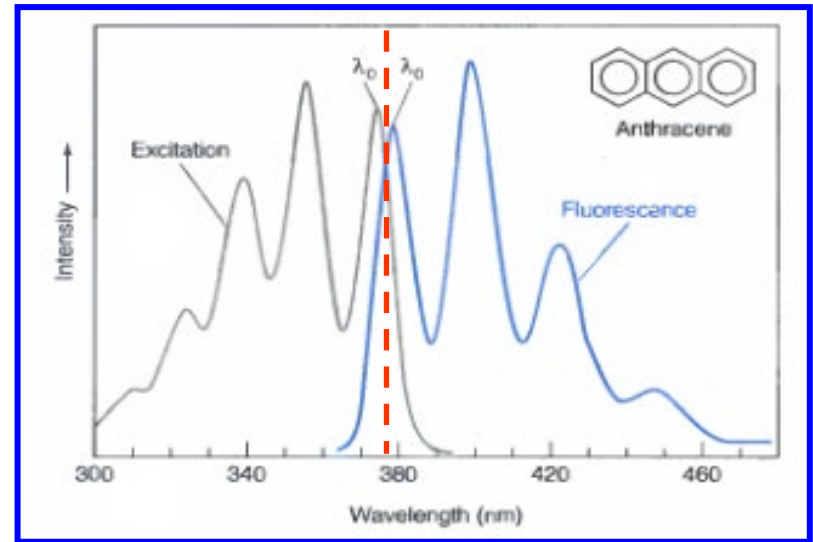
### Spettri di eccitazione (E):

vengono ottenuti registrando l'intensità di luminescenza ad una lunghezza d'onda fissa mentre si varia quella della radiazione di eccitazione, che viene riportata in ascissa.

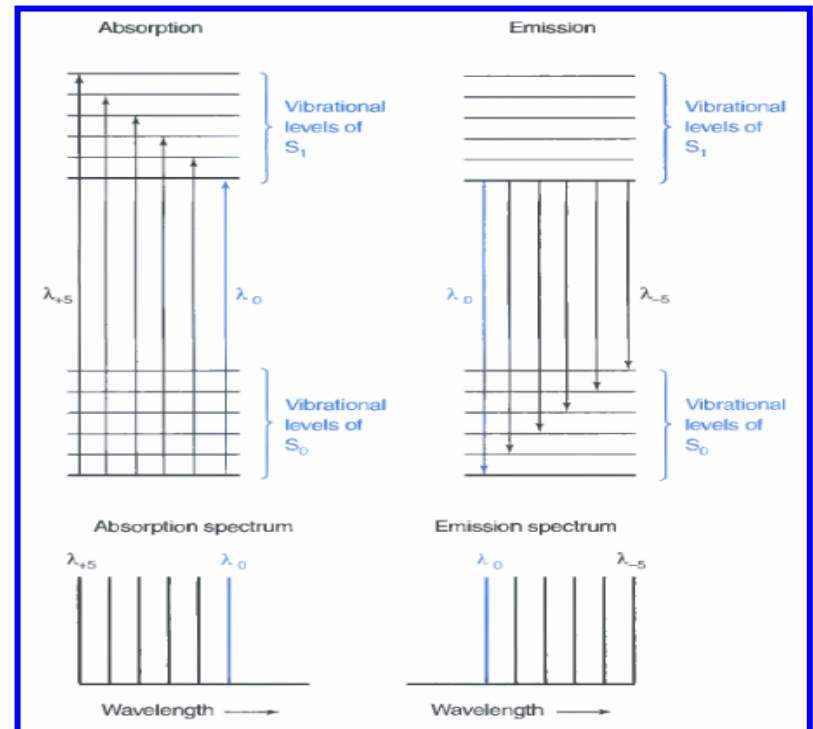
**Spettri di emissione (fluorescenza F e fosforescenza P):** vengono registrati eccitando il sistema ad una particolare lunghezza d'onda e misurando l'intensità di luminescenza in funzione della lunghezza d'onda;



Nei casi in cui anche la struttura vibrazionale sia visibile (ad esempio quando si opera in solventi poco polari o non polari) lo spettro di fluorescenza e quello di eccitazione (a sua volta pressoché identico a quello di assorbimento) possono apparire quasi simmetrici rispetto ad un asse verticale:



L'effetto è tanto più evidente quanto più le differenze di energia fra livelli vibrazionali contigui (associati ai livelli elettronici coinvolti nell'eccitazione e nell'emissione) e le probabilità di transizione sono paragonabili:

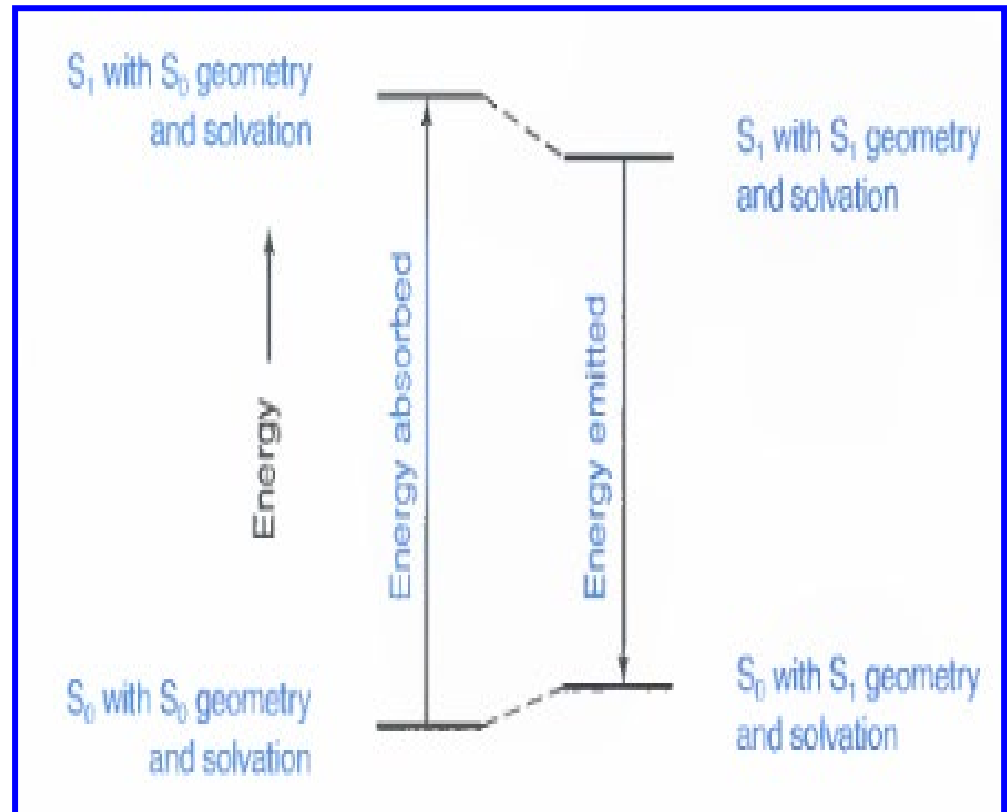




E' importante sottolineare che quando si osserva anche fluorescenza di risonanza le lunghezze d'onda della radiazione di eccitazione e di quella emessa relative alle transizioni fra livelli vibrazionali fondamentali ( $\lambda_0$ ) non sono esattamente identiche.

Il fenomeno è legato:

- ✓ alla diminuzione di energia del livello elettronico eccitato ( $S_1$ ) quando la geometria e la solvatazione della molecola eccitata tornano ad essere quelle più favorevoli per tale livello;
- ✓ all'aumento di energia del livello elettronico fondamentale ( $S_0$ ), a seguito del mantenimento della geometria e della solvatazione tipiche del livello  $S_1$  dopo la diseccitazione radiativa.



## Resa quantica di luminescenza

**Definizione generale:** è il rapporto fra il numero di fotoni emessi per fluorescenza o fosforescenza e quello dei fotoni assorbiti dalla radiazione di eccitazione; si indica con  $\Phi_f$ .

$$\Phi_f = \frac{K_f}{K_f + K_{ci} + K_i + K_{ce} + K_{pd} + K_d}$$

fluorescenza

$$\Phi_p = \frac{K_i}{K_f + K_{ci} + K_i + K_{ce} + K_{pd} + K_d} \cdot \frac{K_p}{K_p + K_{nr}}$$

fosforescenza

Con K si indicano le **costanti di velocità** dei processi di:

f = fluorescenza; ci = conversione interna; i = conversione intersistema;  
ce = conversione esterna; pd = predissociazione; d = dissociazione;  
p = fosforescenza, nr decadimento non radiativo da uno stato di tripletto.

# Fattori che influenzano la resa quantica di fluorescenza

## Tipo di transizione

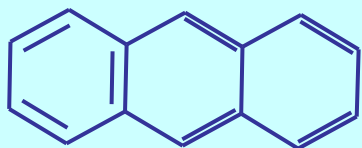
$\sigma \rightarrow \sigma^*$ : portano di solito alla dissociazione della molecola e quindi non generano fluorescenza;

$\pi \rightarrow \pi^*$  e  $n \rightarrow \pi^*$ : danno buone rese quantiche di fluorescenza, soprattutto le prime (hanno una probabilità di transizione maggiore)

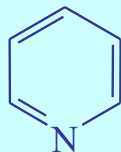
## Struttura molecolare

molecole aventi anelli aromatici, gruppi carbonilici, doppi legami ad elevata coniugazione, presentano buona fluorescenza grazie alla facilità delle transizioni  $\pi \rightarrow \pi^*$ .

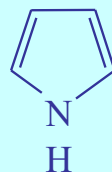
La condensazione di più anelli aromatici coplanari e la presenza di atomi diversi dal carbonio in anelli aromatici sono fattori ulteriormente favorevoli.



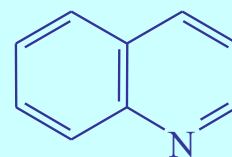
antracene



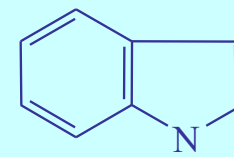
piridina



pirrolo



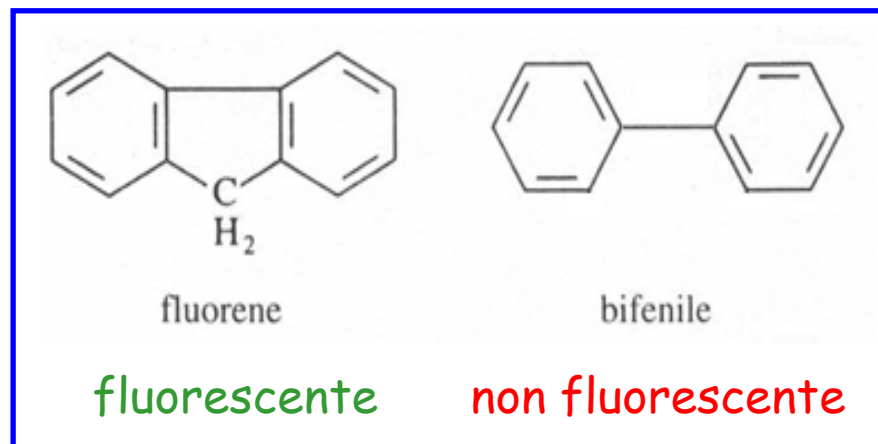
chinolina



indolo

## Rigidità strutturale

la mancanza di rigidità nella molecola sfavorisce la fluorescenza a causa dell'aumento della probabilità di conversione interna, che può portare anche alla disattivazione senza emissione di radiazione



## Effetto dell'atomo pesante

la presenza di un atomo di peso elevato nella molecola aumenta la probabilità di conversione intersistema allo stato di tripletto e quindi favorisce la fosforescenza a scapito della fluorescenza:

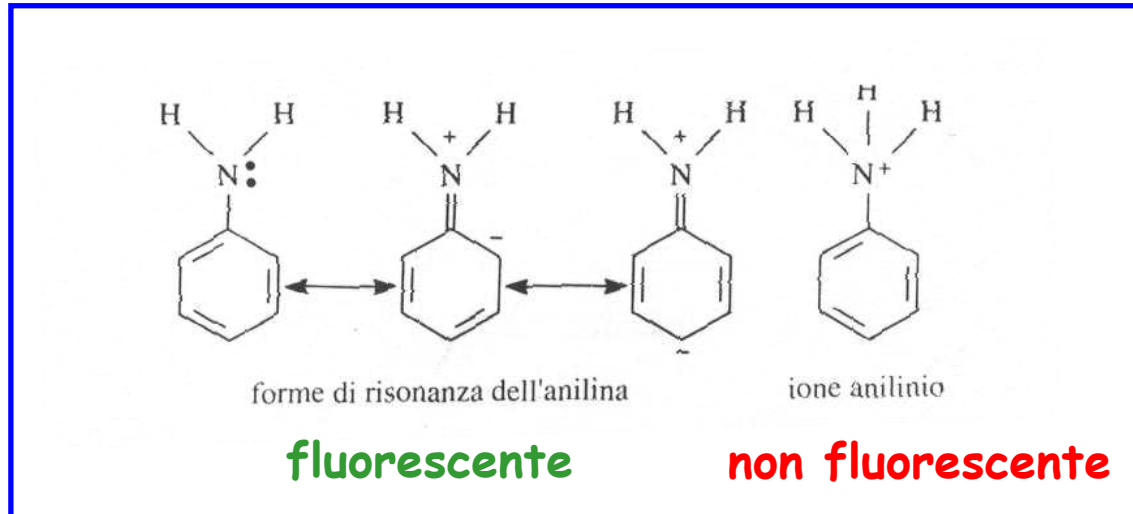
| Composto      | Formula    | $\lambda_{\text{fluor}}$ / nm | Int. rel. fluorescenza |
|---------------|------------|-------------------------------|------------------------|
| Fluorobenzene | $C_6H_5F$  | 270-320                       | 10                     |
| Clorobenzene  | $C_6H_5Cl$ | 275-345                       | 7                      |
| Bromobenzene  | $C_6H_5Br$ | 290-380                       | 5                      |
| Iodobenzene   | $C_6H_5I$  | -----                         | 0                      |

## Temperatura, solvente, presenza di ossigeno

l'aumento della temperatura aumenta la probabilità di conversione esterna e sfavorisce la fluorescenza; l'uso di solventi con atomi pesanti o la presenza di ossigeno disciolto ha lo stesso effetto, agendo, però, sulla conversione intersistema

## Effetto del pH

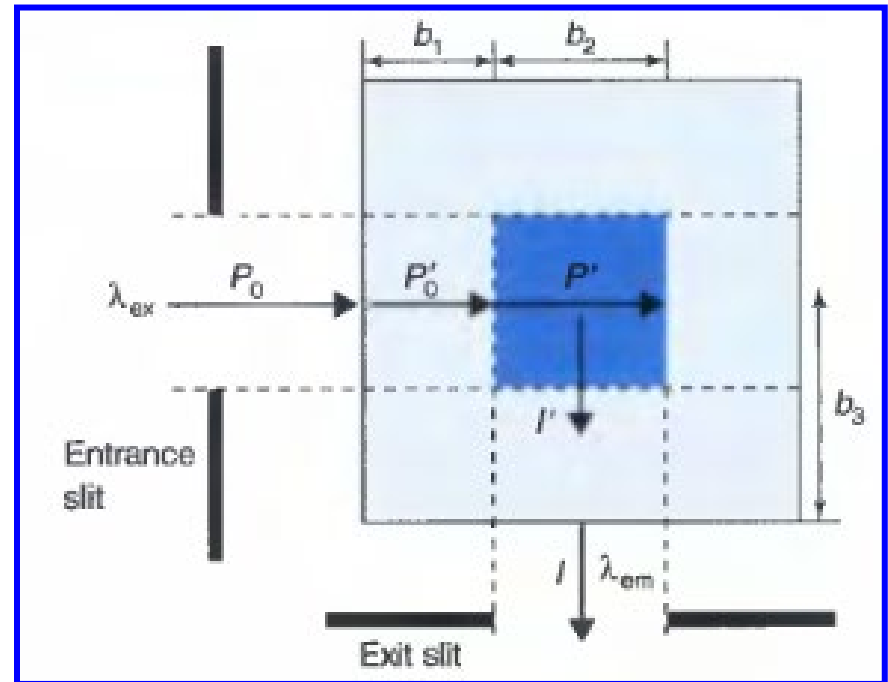
la variazione di pH agisce spesso sulla coniugazione di specie acido-base, influenzando la fluorescenza



## Relazione fra intensità di fluorescenza e concentrazione

La potenza della radiazione di fluorescenza osservata al rivelatore è legata alla concentrazione della specie fluorescente presente nel campione da una complessa relazione che tiene conto dei fenomeni di assorbimento relativi sia alla radiazione di eccitazione che a quella di emissione da parte del campione stesso.

Nel caso più generale, ossia ipotizzando di raccogliere la radiazione emessa ad un angolo di  $90^\circ$  rispetto a quella di eccitazione, si può descrivere il fenomeno immaginando che le fenditure di ingresso e di uscita nel modello abbiano sezione quadrata e quindi che individuino un cubo al centro della cuvetta da cui deriva la radiazione di fluorescenza osservata.



La potenza della radiazione che colpisce la faccia sinistra del cubo è pari a:

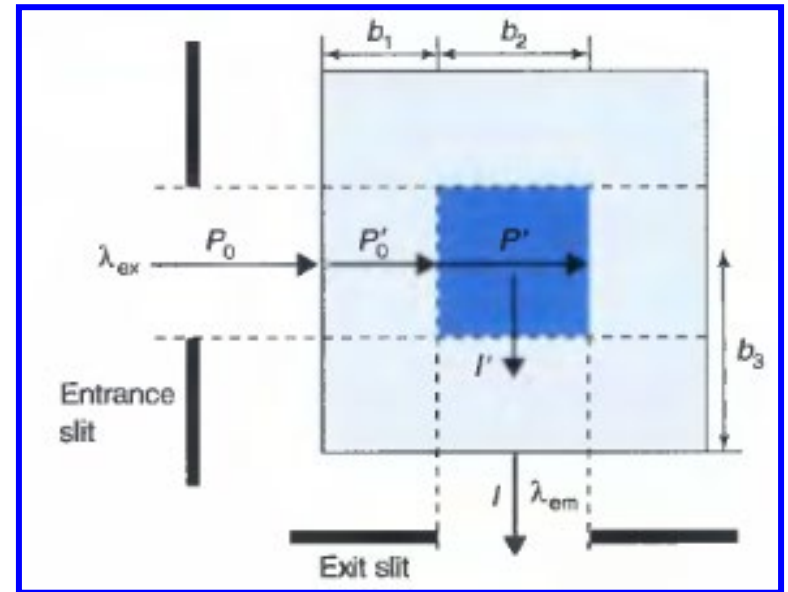
$$P_0' = P_0 \times 10^{-\varepsilon_{ex} b_1 c}$$

dove  $\varepsilon_{ex}$  è l'assorbività molare per la radiazione di eccitazione e  $b_1$  il cammino che separa la faccia sinistra della cuvetta da quella del cubo.

Di fatto la radiazione di potenza  $P_0'$  viene progressivamente assorbita man mano che si propaga verso destra ed in corrispondenza della faccia destra del cubo (il cui lato corrisponde a  $b_2$ ) diventa pari a:

$$P' = P_0' \times 10^{-\varepsilon_{ex} b_2 c}$$

La differenza  $P_0' - P'$  rappresenta la potenza assorbita nella regione del cubo e l'intensità di fluorescenza emergente dal cubo,  $I'$ , è ad essa proporzionale:



$$I' = k' (P_0' - P')$$

dove  $k'$  è una costante correlata alla resa quantica di fluorescenza, dunque legata alla specie fluorescente e alle condizioni della misura.

D'altra parte l'intensità  $I'$  non è uguale a quella osservata all'esterno della cuvetta ( $I$ ) perché occorre tener conto del suo assorbimento da parte della soluzione presente fra il punto di emissione e la faccia della cuvetta posta in basso nello schema.

In prima approssimazione si può considerare che il cammino ottico relativo all'assorbimento della radiazione emessa sia  $b_3 = b_1 + b_2/2$ .

Tenendo conto dell'assorbività molare della radiazione emessa,  $\epsilon_{em}$ , si otterrà:

$$I = I' \times 10^{-\epsilon_{em} b_3 c} = k' (P_0' - P') \times 10^{-\epsilon_{em} b_3 c} =$$

$$= k' P_0' (1 - 10^{-\epsilon_{ex} b_2 c}) \times 10^{-\epsilon_{em} b_3 c} = k' P_0' 10^{-\epsilon_{ex} b_1 c} \times (1 - 10^{-\epsilon_{ex} b_2 c}) \times 10^{-\epsilon_{em} b_3 c}$$



Se la concentrazione  $c$  è sufficientemente bassa gli esponenti delle potenze di 10 indicate nella formula tendono a 0 da valori negativi, dunque le potenze stesse tendono al valore 1.

Di fatto tale approssimazione può essere apportata alle potenze esterne alla parentesi mentre sarebbe eccessiva per quella in parentesi, perché porterebbe ad un annullamento di  $I$ .

La potenza  $10^{-\varepsilon_{ex} b_2 c}$  si può tuttavia **espandere in serie**:

$$1 - \varepsilon_{ex} b_2 c \ln 10 + (\varepsilon_{ex} b_2 c \ln 10)^2 / 2! - (\varepsilon_{ex} b_2 c \ln 10)^3 / 3! + \dots$$

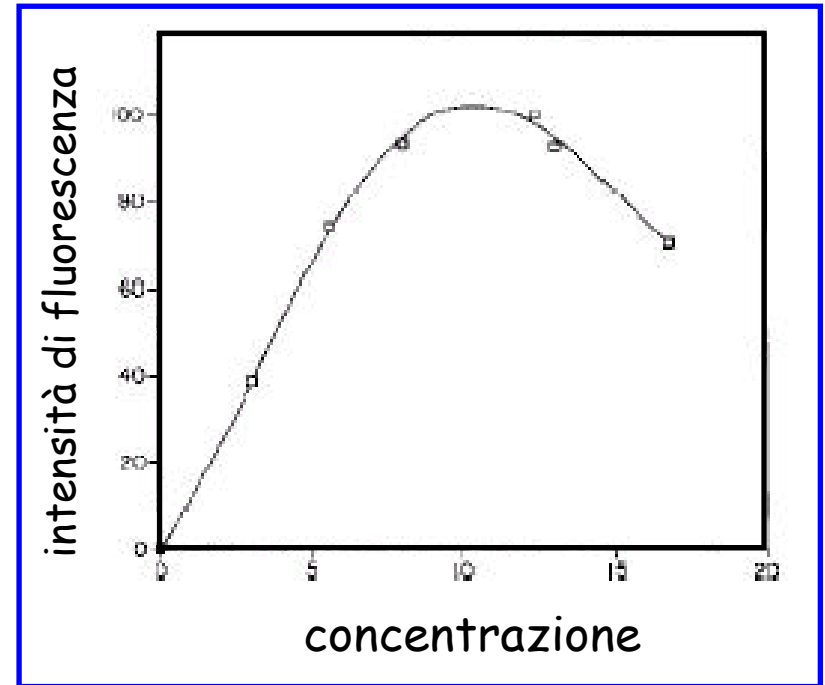
se il termine  $\varepsilon_{ex} b_2 c$  è sufficientemente piccolo (ossia almeno inferiore a  $10^{-2}$ ), il che accade per concentrazioni molto basse, le potenze superiori della serie assumono valore trascurabile e la stessa si può troncare ai primi due termini.

Ne deriva che:

$$I = k' P_0 \varepsilon_{ex} b_2 c \ln 10 = k' P_0 2.303 \varepsilon_{ex} b_2 c$$

In definitiva, a basse concentrazioni l'intensità di fluorescenza dipende linearmente dalla concentrazione, dalla potenza della radiazione di eccitazione e dall'ampiezza delle fenditure di ingresso/uscita.

Superato un certo limite di concentrazione entra in gioco l'**autoassorbimento**, ossia l'assorbimento della radiazione di eccitazione (**primario**) o di quella emessa (**secondario**).



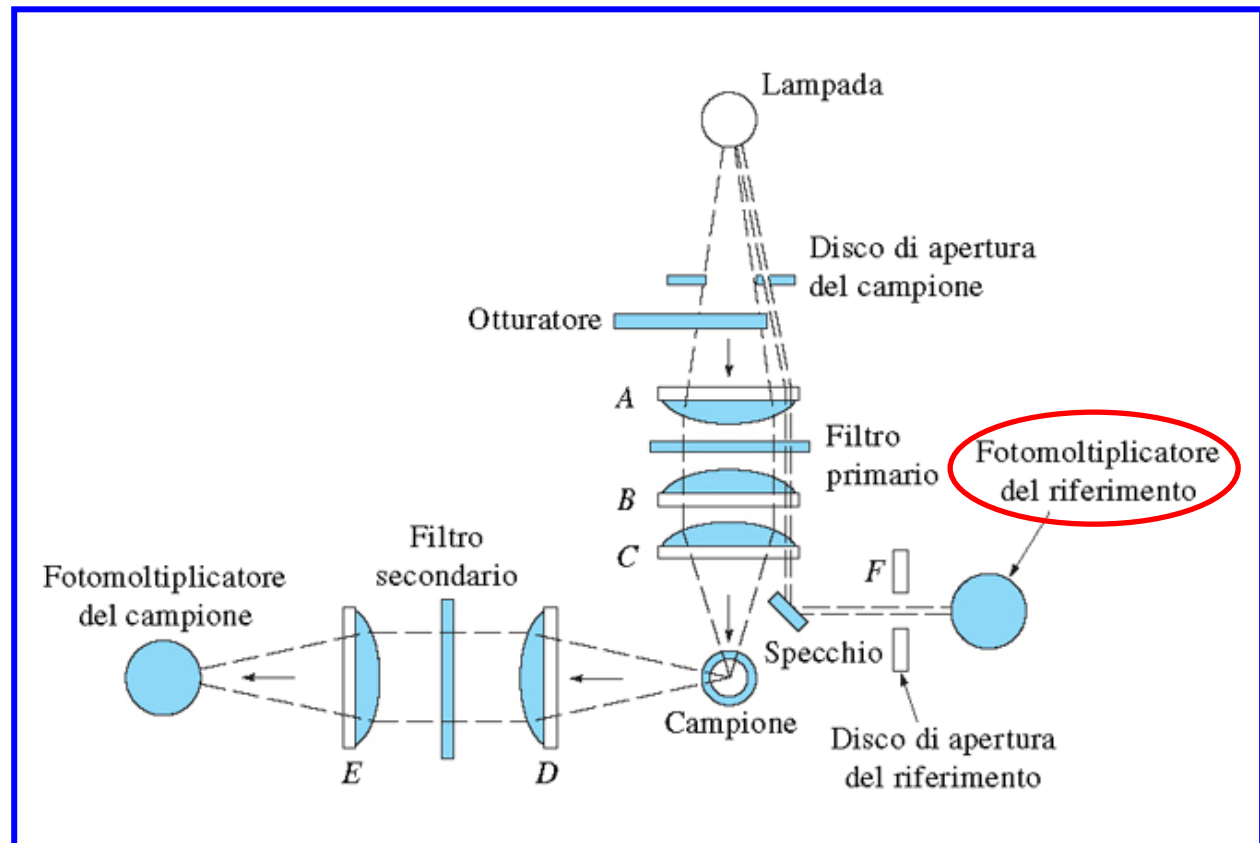
Ad elevate concentrazioni sull'andamento dell'intensità di fluorescenza può influire anche il fenomeno dell'**autoestinzione (self quenching)**, ossia il trasferimento di energia fra molecole di analita eccitate, che causa diseccitazione senza emissione di radiazione.

# Strumentazione per la spettroscopia di fluorescenza

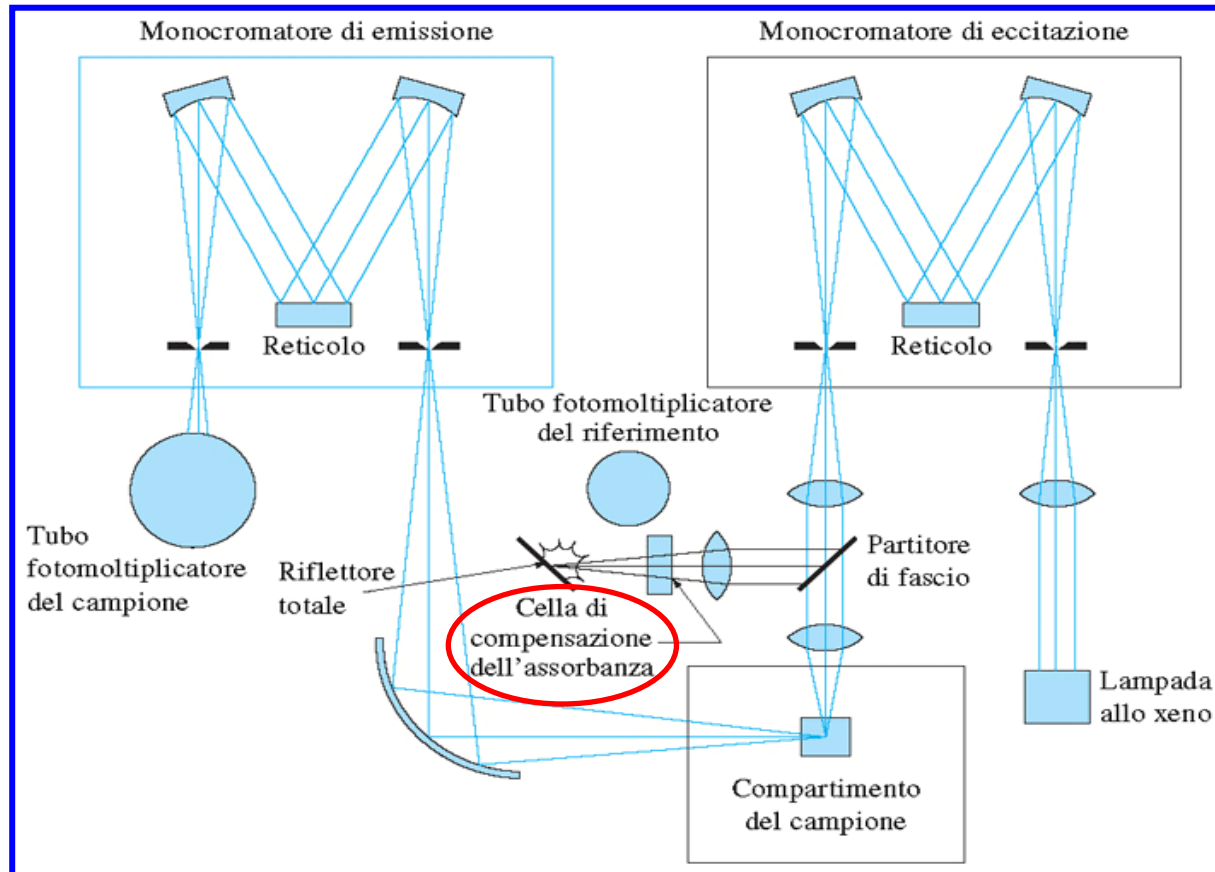
Anche in questo caso esiste una classificazione fra strumenti che lavorano a lunghezze d'onda fissate (**fluorimetri**) e strumenti in grado di registrare spettri (**spettrofluorimetri**).

## Fluorimetri

Il **fotomoltiplicatore del riferimento** misura eventuali fluttuazioni di  $P_0$



# Spettrofluorimetri



La **cella di compensazione dell'assorbanza** consente di valutare la reale potenza della radiazione di eccitazione, ossia quella corretta per il fenomeno dell'autoassorbimento primario. In questo modo è possibile risalire a valori affidabili della resa quantica di fluorescenza alle varie lunghezze d'onda di eccitazione.

# Differenze fondamentali rispetto alle misure di assorbimento

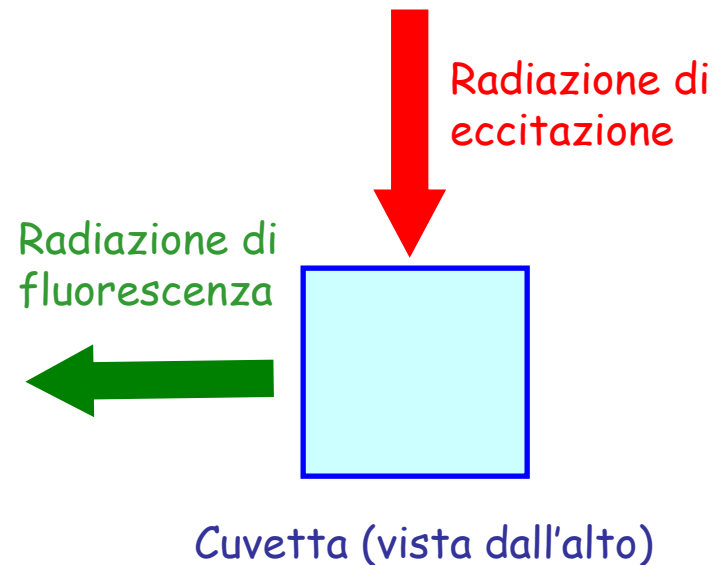
## Sorgenti

La dipendenza diretta del segnale di fluorescenza dalla potenza della radiazione incidente porta all'uso di sorgenti ad alta potenza quali:

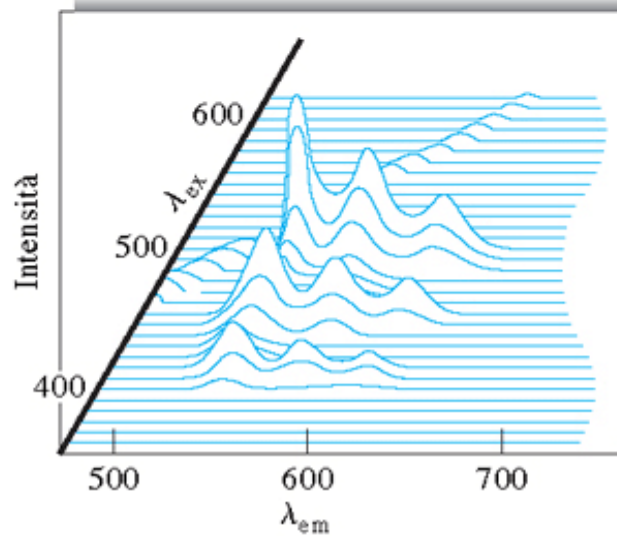
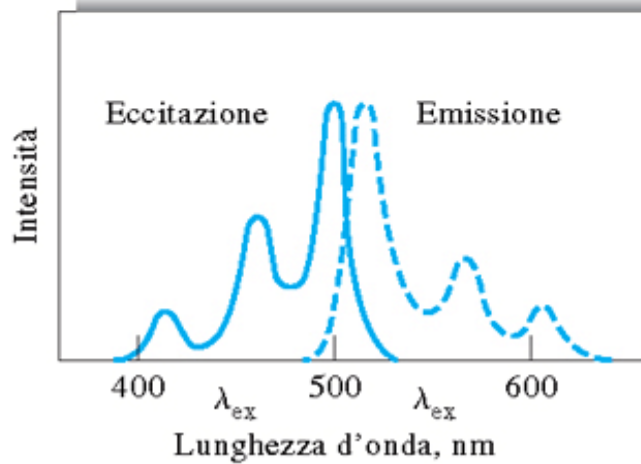
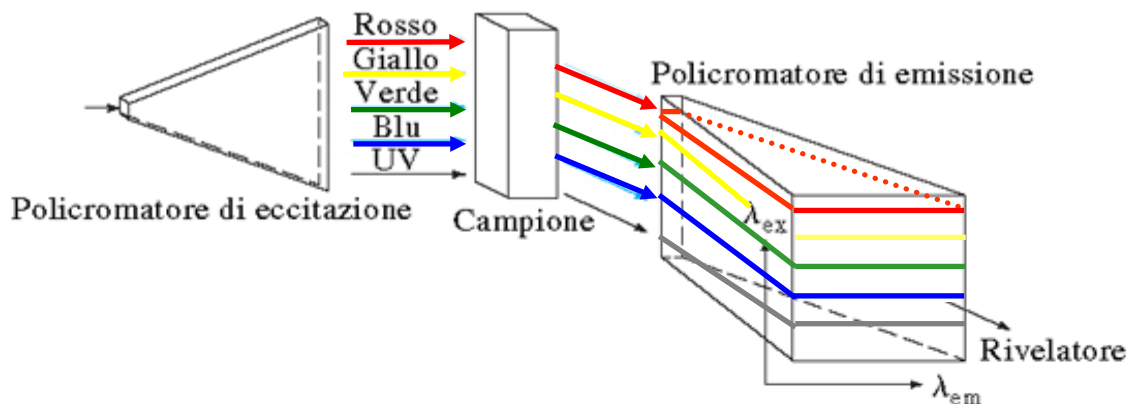
- ✓ lampade a vapori di mercurio (spettro a righe)
- ✓ lampade ad arco in xeno (spettro continuo da 300 a 1300 nm)

## Angolo di raccolta della radiazione di fluorescenza

La radiazione di fluorescenza viene raccolta di solito ad un **angolo di 90 gradi rispetto a quella incidente**, per ridurre gli effetti della diffusione della radiazione nella soluzione e sulle pareti della cella, nonché l'eventuale autoassorbimento.



# Strumentazione per misure di luminescenza totale



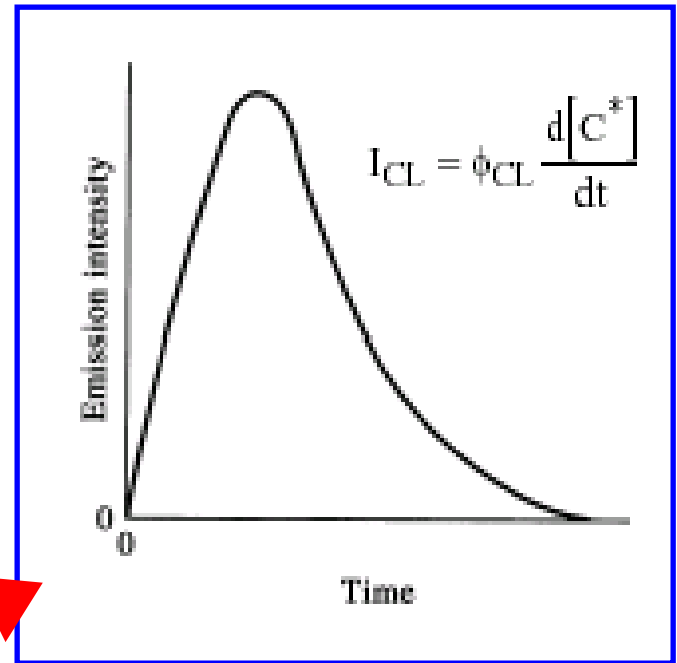
# Chemiluminescenza

Radiazione di chemiluminescenza viene prodotta dal ritorno allo stato fondamentale di una specie eccitata formatasi durante una reazione chimica:

Un tipico sistema chemiluminescente è:



con sensibilità all'NO da 1 ppb a 10 ppt.

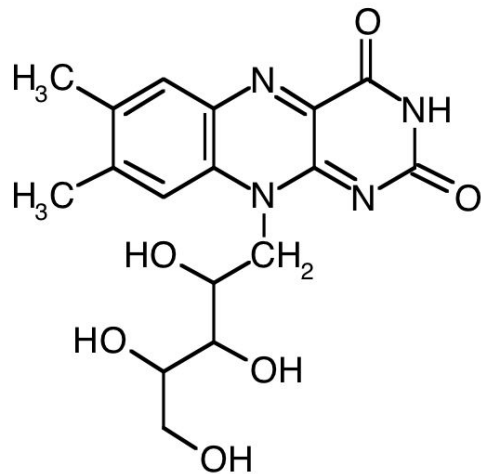


L'intensità della radiazione di chemiluminescenza ( $I_{\text{CL}}$ ) è legata alla resa quantica della specie chemiluminescente ( $\phi_{\text{CL}}$ ) e alla sua velocità di formazione ( $d[\text{C}^*]/dt$ ).

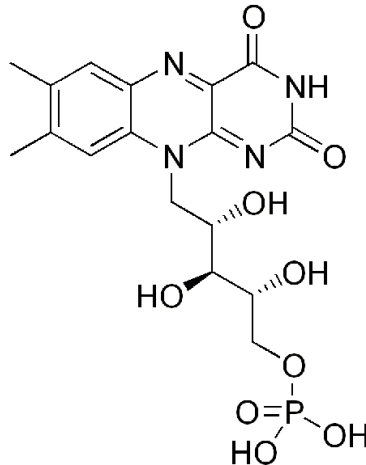
## Esercitazione 3: Analisi della riboflavina contenuta nel latte mediante spettroscopia di fluorescenza molecolare

La **Riboflavina** (detta anche **Vitamina B<sub>2</sub>**, **Vitamina G** o **lactoflavina**) è una vitamina idrosolubile presente in numerosi alimenti (fra cui latte, uova, vegetali) e caratterizzata da una **spiccata tendenza alla fluorescenza**, nonché da un'elevata fotosensibilità.

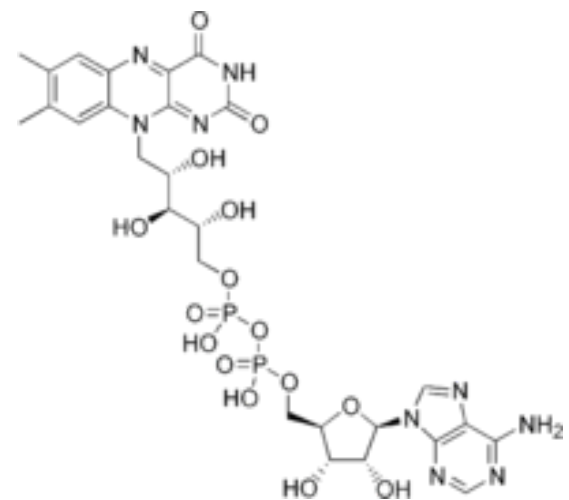
È il precursore di due composti di fondamentale importanza dal punto di vista biochimico, il **Flavin-Mono-Nucleotide (FMN)** e il **Flavin-Adenin-Dinucleotide (FAD)**:



**Riboflavina**



**FMN**



**FAD**

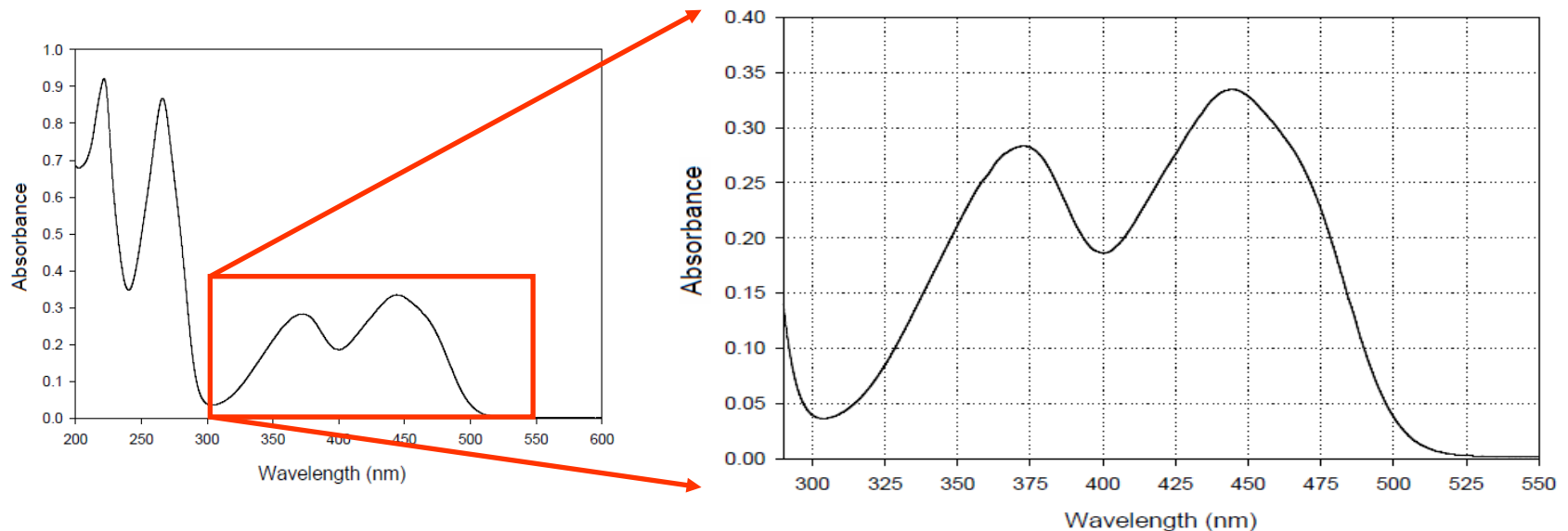


## Principio del metodo

Nel latte la riboflavina è presente in **concentrazioni dell'ordine di 1 mg/L (ppm)**, ampiamente rivelabili con la spettroscopia molecolare di fluorescenza su un campione sottoposto a **pre-trattamento per la rimozione delle caseine**.

## Fasi dell'esercitazione

- ✓ Valutazione dello spettro di assorbimento della riboflavina in soluzione acquosa e **scelta di due lunghezze d'onda di eccitazione nella regione 300-550 nm**.



- ✓ preparazione di una soluzione standard 100  $\mu\text{g/L}$  di riboflavina (100 ppb) in  $\text{CH}_3\text{COOH}$  0.02 M a partire da una soluzione madre 10 mg/L (10 ppm);
- ✓ registrazione degli spettri di fluorescenza della riboflavina 100 ppb alle due lunghezze d'onda di eccitazione scelte;
- ✓ registrazione dello spettro di eccitazione della riboflavina 100 ppb in corrispondenza della lunghezza d'onda relativa al massimo dello spettro di fluorescenza: scelta della coppia di lunghezze d'onda di lavoro;
- ✓ preparazione di altre quattro soluzioni standard di riboflavina (sempre in  $\text{CH}_3\text{COOH}$  0.02 M) a concentrazione 2, 10, 20 e 50 ppb, a partire dalla soluzione standard 100 ppb;
- ✓ effettuazione di almeno tre misure di fluorescenza su ciascuna delle cinque soluzioni standard e costruzione di una retta di calibrazione;
- ✓ calcolo dei due valori del limite di rivelabilita' (LOD) a  $S/N = 3$ ;
- ✓ preparazione del campione di latte: precipitazione delle caseine in ambiente acido, centrifugazione e prelievo del surnatante (siero);

- ✓ diluizione 1:20 (v/v) del surnatante in acqua ed effettuazione, in duplicato, della misura di fluorescenza, nelle stesse condizioni impiegate per la calibrazione;
- ✓ estrapolazione della concentrazione di riboflavina nel campione di latte.

# Strumentazione impiegata: spettrofluorimetro Varian Cary Eclipse

