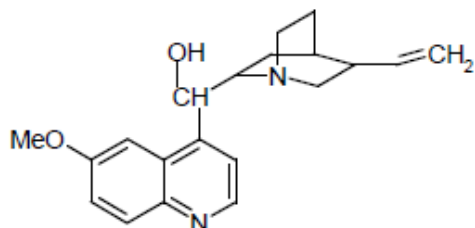


**Esercitazione 4: FLUORIMETRIA Protocollo 3a** (modificato 30/04/2021 Scocchi - Di Stasi)

Scopo della esercitazione: rilevare la fluorescenza del chinino, determinarne la presenza e la concentrazione in un campione in base alla emissione di fluorescenza e studiare i fattori che potrebbero ridurne l'emissione di fluorescenza (quenching).

con  
(acqua



Molecola analizzata: **Chinino:** Sostanza naturale fluorescente una resa quantica elevata ( $\Phi = 0,55$ ) con proprietà antipiretiche, analgesiche ed antimalariche. Presente in diverse bevande tonica o brillante, Schweppes tonica) a cui da il gusto amarognolo.

**Materiali**

- Soluzione di chinino 100  $\mu\text{g/ml}$  in 50 mM  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (soluzione madre).
- Soluzione di  $\text{H}_2\text{SO}_4$  50 mM
- Soluzioni di NaCl 50 mM 0,5 M e 5M
- Provette di tipo eppendorf da 1,5 ml e 2 ml
- Pipette da 20, 200, e 1000  $\mu\text{l}$
- 1 ml di campione contenente chinino in quantità da determinare
- Cuvette per misure di fluorescenza (4 facce ottiche) ed assorbimento (2 facce ottiche)

**Trova la regione dello spettro in cui il chinino emette fluorescenza e misurala**

- 1 Analizza 2 ml della soluzione madre di chinino (100  $\mu\text{g/ml}$  in 50 mM  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) allo spettrofotometro per identificare la lunghezza d'onda di massima assorbanza del chinino ( $\lambda_{\text{ex}}$ ).
- 2 Ricava la ( $\lambda_{\text{em}}$ ) del chinino sapendo che presenta uno spostamento di Stokes di circa 100 nm.
- 3 Scegli tra i filtri a disposizione (tabella a lato) associati al fluorimetro quello più adatto a rilevarne la fluorescenza.
- 4 Determina il valore di fluorescenza della sostanza al fluorimetro (espressa in FSU: fluorescence standard unit) rispetto al solo solvente (bianco =  $\text{H}_2\text{SO}_4$  50 mM).

Kit	Excitation Wavelength	Emission Wavelengths
UV (Cat.# E6072)	365nm	410-450nm
Blue (Cat.# E6071)	460nm	515-570nm
Green (Cat.# E6073)	525nm	580-640nm
Red (Cat.# E6074)	625nm	660-725nm
GFPUV (Cat.# E6075)	365nm	515-570nm

**Determinazione della concentrazione di chinino in un campione e dell'influenza di NaCl sulla fluorescenza**

- 5 Prepara i campioni da analizzare secondo lo schema sottostante, in modo che il volume finale di ognuno sia 2 ml

Campione	V campione	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Volumi di sale	V finale	Tipo di campione
B		2ml		2ml	Bianco
c1	0,2 ml	1,8 mL		2 ml	Campione
c2	0,2 ml	1,8 mL		2 ml	Campione (ripetizione)
c3	0,2 ml	1,75 mL	50 $\mu$ L NaCl 50 mM	2 ml	Valutazione effetto quenching
c4	0,2 ml	1,75 mL	50 $\mu$ L NaCl 0,5 mM	2 ml	Valutazione effetto quenching
c5	0,2 ml	1,75 mL	50 $\mu$ L NaCl 5 M	2 ml	Valutazione effetto quenching

- 6 Prepara una serie di diluizioni seriali decimali, da 2 ml ciascuna, in 50 mM H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, della soluzione di chinino 100  $\mu$ g/ml (soluz madre) in modo da ottenere soluzioni alla concentrazione finale di 10, 1, 0,1 0,01 0,001  $\mu$ g/ml (ricordati di numerare le provette, es d1, d2, etc ).
- 7 Misura la fluorescenza di tutti i campioni utilizzando la  $\lambda_{em}$  determinata in precedenza e la soluzione di H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 50 mM come bianco (B)
- 8 Costruisci la retta di calibrazione (con file excel) con i risultati dei campioni B+d1-d5 riportando il logaritmo dell'intensità di emissione di fluorescenza (in unità arbitrarie, u. a.) in funzione del logaritmo della concentrazione.
- 9 Utilizzando la curva di calibrazione **determina la concentrazione di chinino** ( $\mu$ g/ml) presente nei campioni **c1-c5**.
- 10 Per ottenere la concentrazione nel campione iniziale (es bevanda) ricordati di moltiplicare i valori ottenuti per il fattore di diluizione applicato al campione.
- 11 **Osserva se l'aggiunta progressiva di NaCl** (campioni c3-c5) **causa una variazione dei valori di fluorescenza** del campione rispetto a quelli ottenuti in assenza del sale (significativo se > 10%). Dei campioni c1-c5 misura l'assorbanza alla  $\lambda$  trovata al punto 1 e determina se la presenza del sale causa una variazione dei valori di assorbanza. Rifletti sui risultati.
- 12 Determina la concentrazione di chinino dalla curva di calibrazione (ricordati di moltiplicare per il fattore di diluizione applicato).
- 13 Per visualizzare direttamente la fluorescenza illumina il campione contenente chinino con una lampada a lunghezza d'onda opportuna (attenzione! Proteggiti le parti esposte: viso, mani e soprattutto occhi tramite schemi idonei). Ciò permette di vedere la luce di fluorescenza e stimarne grossolanamente la quantità.

**Preparazione del campione biologico: vedi Protocollo 3b**