

# Capitolo 4

## SPETTROFLUORIMETRIA

### 4.1 INTRODUZIONE

#### 4.1.1 Spettrofluorimetria: perché?

In questa sezione ci soffermeremo sulla spettrofluorimetria, tecnica che sfrutta la disattivazione radiativa di una molecola elettronicamente eccitata. Questa tecnica sta riscuotendo un'attenzione sempre più grande in molti rami della chimica e della biologia, divenendo molto diffusa in applicazioni di grande interesse economico e sociale, quali la diagnostica clinica, le scienze ambientali e l'industria alimentare. Essa può essere infatti utilizzata, ad esempio, per studiare le strutture molecolari, le interazioni tra varie specie e in molti tipi di analisi di campioni in tracce. Tra le varie caratteristiche che rendono la spettrofluorimetria particolarmente interessante, è importante ricordare le seguenti:

- a) una elevatissima sensibilità, tanto che i limiti di rilevabilità possono essere di diversi ordini di grandezza inferiori a quelli della spettrofotometria (in diverse analisi biochimiche vengono determinate quantità dell'ordine del picogrammo ( $10^{-12}$  g) o addirittura del femtogrammo ( $10^{-15}$  g) di sostanza mentre, con particolari accorgimenti, è possibile rilevare anche una singola molecola).
- b) una grandissima selettività, dal momento che è possibile distinguere tracce minime di un composto anche in miscele molto complesse;
- c) una linearità della risposta in un intervallo di concentrazioni molto ampio, generalmente molto maggiore di quello tipico della spettroscopia di assorbimento;
- d) una grandissima versatilità, dovuta sia alla possibilità di scegliere la lunghezza d'onda di eccitazione e quella di emissione, sia alla facilità di campionamento, che permette di analizzare campioni in soluzione e allo stato solido, sia, ancora, alla possibilità di fare uso di fibre ottiche per poter analizzare campioni in qualunque luogo fisico si trovino (per esempio all'interno del corpo umano).

La possibilità di accoppiare la spettrofluorimetria a tecniche separative ha aperto orizzonti ancora più ampi. Inoltre, anche se in questo capitolo ci occuperemo prevalentemente dei fenomeni di fotoluminescenza (cioè dell'analisi della luminescenza proveniente da stati eccitati raggiunti per assorbimento di un fotone), la possibilità di ottenere emissione di luce proveniente da stati eccitati ottenuti tramite reazione chimica (chemiluminescenza), elettrochimica (elettrochemiluminescenza) e fenomeni biologici (bioluminescenza) ha ulteriormente ampliato le possibilità analitiche.

Purtroppo, accanto alla notevole sensibilità e versatilità, la spettrofluorimetria presenta alcune problematiche che rendono meno diretta l'interpretazione del segnale. Uno dei problemi maggiori è che, al contrario del segnale fornito da uno spettrofotometro che rappresenta una grandezza, l'assorbanza, che può essere espressa in una scala assoluta, il segnale prodotto da uno spettrofluorimetro *non è una grandezza assoluta*, perché dipende, come vedremo, dalle caratteristiche del campione e da molteplici fattori strumentali. Nell'assorbimento, infatti, si misura il rapporto tra l'intensità della luce trasmessa e quella incidente, cioè tra due raggi aventi la stessa lunghezza d'onda e posti sullo stesso percorso ottico. Nei normali spettrofluorimetri si misura invece solo l'intensità di emissione ( $I_e$ ) ad una data lunghezza d'onda, captando solamente una frazione della luce emessa.  $I_e$  viene quindi misurata direttamente su di una scala arbitraria, tarata ad una sola estremità ( $I_e = 0$ ). Questo comporta, per esempio, che il segnale rilevato per lo stesso campione varia da strumento a strumento, anche se dello stesso modello, e che può essere collegato alla concentrazione di un analita solo dopo aver preso in considerazione un'ampia serie di fattori, che saranno estesamente trattati nel corso di questo capitolo. In ogni caso, occorre ricordare che la misura ottenuta con spettrofluorimetri non è mai assoluta e *deve pertanto essere espressa in unità arbitrarie* anche dopo le correzioni. Di conseguenza il valore numerico della misura non ha significato fisico: *hanno significato solo i rapporti tra misure effettuate nelle stesse identiche condizioni sperimentali*. Va ricordato inoltre, come sarà ampiamente discusso nel paragrafo 4.3.3, che si può, se si opera incautamente, osservare segnali che non provengono in realtà dal composto in esame, ma che, ad esempio, sono dovuti a impurezze presenti nel campione o nel solvente o ad effetti di scattering Rayleigh e Raman.

In conclusione, sicuramente le tecniche spettrofluorimetriche possono rappresentare un'ottima soluzione (se non l'unica) quando è necessario avere sensibilità elevate, e questo è testimoniato chiaramente dal loro utilizzo sempre maggiore anche in medicina, dove l'alta sensibilità può significare una diagnosi precoce e quindi la possibilità di una terapia efficace. Inoltre, in linea di massima, la strumentazione è generalmente semplice e non molto costosa. Questo fatto, però, può indurre a pensare, in un approccio superficiale, che le tecniche spettrofluorimetriche siano molto facili da usare, e questo può portare talvolta ad errori. Infatti, come vedremo in seguito, per interpretare i dati ottenuti occorre conoscere bene questo tipo di tecnica strumentale, con le sue potenzialità e le sue limitazioni. A questo scopo è dedicato il presente capitolo.

#### 4.1.2 Processi di disattivazione degli stati elettronici eccitati

Prima di affrontare la strumentazione, occorre però richiamare alcuni elementi di fotochimica. Abbiamo visto nei capitoli precedenti come una molecola A passi ad uno stato eccitato mediante l'assorbimento di un fotone; uno stato elettronicamente eccitato è

metastabile e non può vivere a lungo come tale, deve cioè cedere in qualche modo il surplus di energia fornitogli dal fotone. Abbiamo già visto precedentemente i tre principali modi di disattivazione monomolecolari a disposizione di uno stato eccitato:

- 1) reazione fotochimica,
- 2) disattivazione non radiativa,
- 3) disattivazione radiativa.

Come abbiamo visto nel capitolo 1, per descrivere cosa succede ad una molecola dopo che ha assorbito un fotone è molto utile il diagramma di Jablonski (vedi Figura 1.6). Le transizioni tra stati elettronici all'interno di una molecola possono anche essere rappresentate attraverso le curve di Morse (Figura 4.1).

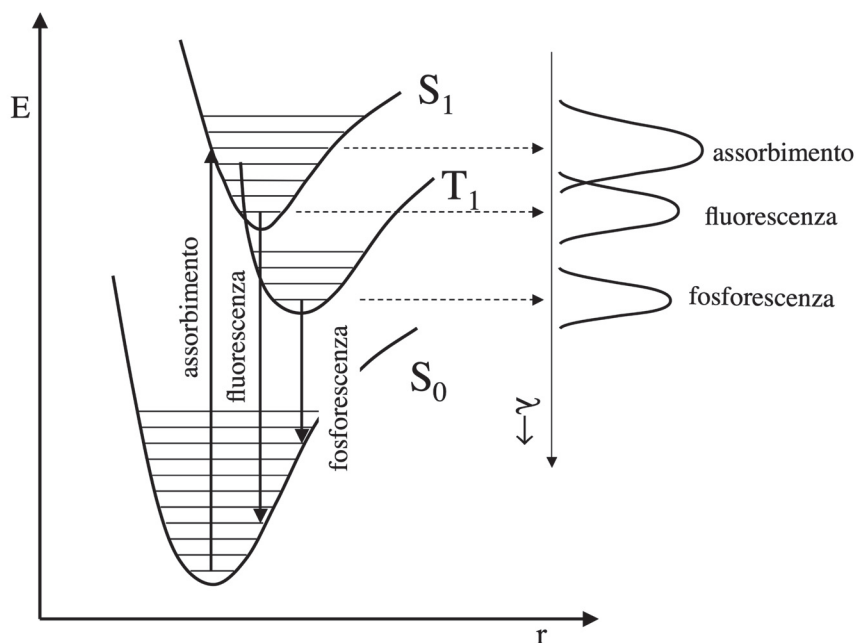


Figura 4.1 – Rappresentazione delle curve di Morse dello stato fondamentale e degli stati più bassi di ciascuna molteplicità per una molecola organica generica.

Per una generica molecola organica la transizione diretta dallo stato fondamentale, generalmente un singoletto, ad uno stato eccitato di tripletto è teoricamente proibita dalle regole di selezione (perché sono stati di diversa molteplicità), il che significa che anche la transizione inversa dal tripletto allo stato fondamentale sarà poco probabile. Quindi, mentre la transizione dallo stato eccitato di singoletto S<sub>1</sub> allo stato fondamentale S<sub>0</sub>, cioè la fluorescenza, può avvenire velocemente (entro  $10^{-9}$ – $10^{-6}$  s), la transizione dallo stato eccitato di tripletto T<sub>1</sub> allo stato fondamentale S<sub>0</sub>, cioè la fosforescenza, richiede almeno  $10^{-4}$  s e può avvenire anche in  $10^2$  s. A questo proposito occorre ricordare che gli atomi pesanti accelerano tutti i processi spin proibiti (sia radiativi che non) rendendoli competitivi rispetto ai corrispondenti processi spin permessi, quindi aumentando la resa di fosforescenza a spese di quella di fluorescenza; lo stesso

effetto lo hanno le specie paramagnetiche (come anche  $O_2$ , che però spegne anche la fosforescenza). Anche l'intersystem crossing  $T_1 \rightarrow S_0$  viene favorito da queste specie, a scapito della fosforescenza.

L'emissione è estremamente sensibile ad impurezze, che possono originare processi bimolecolari di disattivazione degli stati eccitati ("spegnimento" o "quenching") in competizione con l'emissione. Questo effetto è molto maggiore sulla fosforescenza che sulla fluorescenza, perché i tripletti vivono più a lungo dei singoletti e quindi hanno maggiore probabilità di incontrare lo spegnitore: nelle condizioni normali, può bastare una concentrazione di impurezza  $10^{-8}$  M per spegnere metà della fosforescenza, mentre occorre una concentrazione  $10^{-2}$  M per avere lo stesso effetto sulla fluorescenza. Per tutte queste ragioni la fosforescenza di sostanze organiche è un fenomeno raro in soluzione a temperatura ambiente (a causa della presenza di impurezze e dell'ossigeno) e può essere in genere osservata solo in vetri rigidi a basse temperature (ad es. 77 K) o disperdendo la sostanza in una matrice rigida (ad es. polimetilmetacrilato).

Per finire, un accenno ai composti inorganici. Solo pochi sono luminescenti in soluzione a temperatura ambiente: gli ioni di Sm, Eu, Yb, Nd, Tb e Dy e i loro complessi; lo ione  $UO_2^{2+}$  e i complessi di Cr(III), Re(I), Ru(II), Os(II), Ir(III), Pt(II), Pt(IV) e Cu(I) con chelanti organici tipo fenantrolina, dipiridina (= bpy) e chinolina [0601].

## 4.2 LA STRUMENTAZIONE PER LE MISURE DI LUMINESCENZA

Le misure di luminescenza possono avere diversi scopi:

- 1) misura dell'intensità della luminescenza alle varie lunghezze d'onda (*spettri di emissione*),
- 2) determinazione della dipendenza dell'intensità di luminescenza dalla lunghezza d'onda di eccitazione (*spettri di eccitazione*),
- 3) identificazione della natura dello stato eccitato luminescente, per stabilire se l'emissione osservata è una fluorescenza o una fosforescenza,
- 4) determinazione dei rendimenti quantici di luminescenza,
- 5) determinazioni analitiche qualitative e quantitative.

Per questi scopi occorrono gli spettrofluorimetri. Lo schema a blocchi di uno spettrofluorimetro è riportato in Figura 4.2, mentre in Figura 4.3 è riportato il diagramma ottico di uno spettrofluorimetro Perkin-Elmer LS55. Procederemo prima alla spiegazione dei diversi componenti, per poi analizzare le possibilità offerte da questo tipo di strumentazione e gli accorgimenti necessari per compiere un'analisi attendibile e accurata.

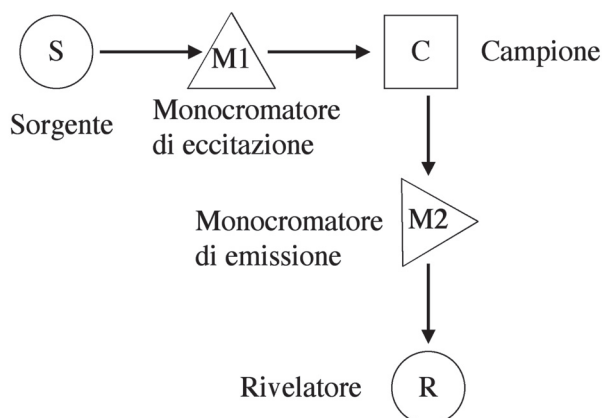


Figura 4.2 – Schema a blocchi di uno spettrofluorimetro.

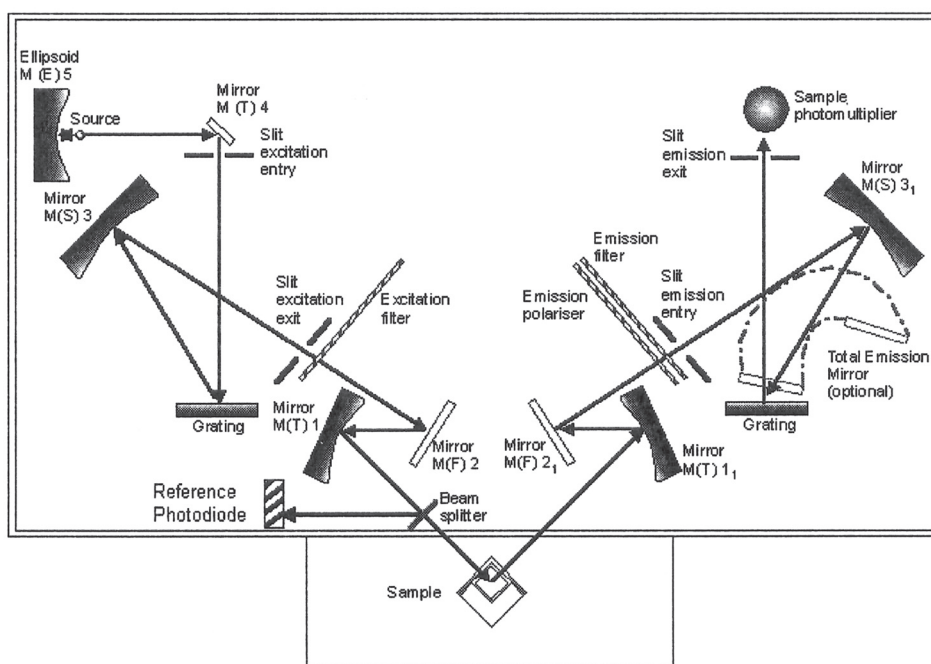


Figura 4.3 – Schema ottico di uno spettrofluorimetro Perkin-Elmer LS55, riprodotto con permesso.

### 4.2.1 Sorgente luminosa

Essa è necessaria per eccitare il campione in esame, cioè per generare gli stati eccitati di cui si vuole osservare l'emissione quando si sfrutta la fotoluminescenza. Quando lo stato elettronico eccitato viene generato attraverso reazioni chimiche, come nel caso della chemi- e bio-luminescenza, la sorgente luminosa deve invece essere spenta. Gene-

ralmente la sorgente nella strumentazione convenzionale è una lampada a xeno, il cui spettro (Figura 4.4) è continuo dai 250 fin oltre i 1000 nm. Come si può osservare, però, l'intensità di emissione della lampada non è costante con la lunghezza d'onda, e questo fatto deve essere tenuto in considerazione quando si opera con uno spettrofluorimetro. Infatti, come si può osservare dall'equazione 4-1, la quantità di fotoni emessi ( $I$ ) da un campione è direttamente proporzionale al numero di fotoni assorbiti ( $I_a$ ) che, a parità di assorbanza, è direttamente proporzionale all'intensità di luce incidente sul campione  $I_i(\lambda_{exc})$  che è, appunto, dipendente dalla lunghezza d'onda selezionata.

$$I_1(\lambda_{exc}) = \Phi \times I_a(\lambda_{exc}) = \Phi \times I_i(\lambda_{exc}) \times (1 - 10^{-A(\lambda_{exc})}) \quad (4-1)$$

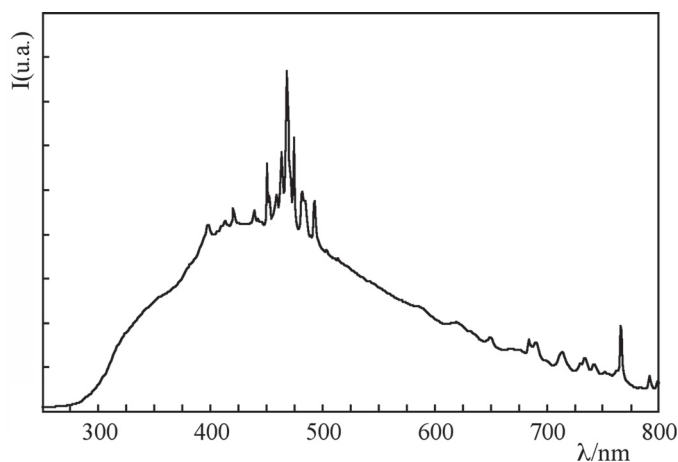


Figura 4.4 – Spettro di una lampada a xeno da 450 W.

Se un campione ha, per esempio, la stessa assorbanza a 250 nm e a 450 nm il numero di fotoni emessi che raggiungono il rivelatore è molto maggiore (e quindi il segnale è migliore) se si eccita a 450 nm piuttosto che a 250 nm. La dipendenza dell'intensità della lampada dalla lunghezza d'onda è inoltre la principale causa della necessità di correggere gli spettri di eccitazione, argomento che verrà discusso al paragrafo 4.3.2.

Attualmente si possono trovare in commercio spettrofluorimetri dotati di sorgente continua (solitamente di 150 o 450 W), la cui intensità è cioè costante nel tempo, o pulsata, caratteristica che si ottiene scaricando, ad intervalli regolari, un condensatore attraverso la lampada. Tipicamente le lampade pulsate negli spettrofluorimetri commerciali più comuni generano impulsi luminosi con la frequenza di rete (50 Hz, cioè ogni 20 ms) della durata di pochi  $\mu$ s (Figura 4.5). Esse hanno inoltre un minore consumo di energia (8-15 W), caratteristica che permette di minimizzare eventuali reazioni fotochimiche del campione e il riscaldamento delle parti ottiche dello strumento. Infine, esse offrono anche la possibilità di determinare tempi di vita più lunghi di 10  $\mu$ s (generalmente fino a circa 100 s) e di fare spettri risolti nel tempo, la cui applicazione più comune è quella di separare lo spettro di fosforescenza da quello di fluorescenza (quest'ultima possibilità è discussa nel paragrafo 5.2.2). È comunque da sottolineare che la sensibilità degli strumenti dotati di sorgente continua a 450 W è generalmente più elevata di quella offerta dagli strumenti con sorgente pulsata.

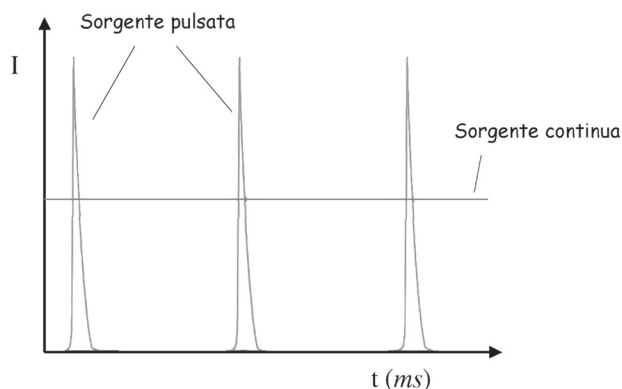


Figura 4.5 – Schema dell'andamento temporale di una sorgente pulsata e di una continua.

Dal momento che l'intensità della lampada di uno spettrofluorimetro può variare con la  $\lambda$  e nel tempo (variazioni dell'alimentazione di rete, invecchiamento, etc.) i più moderni spettrofluorimetri prelevano una piccola parte del raggio proveniente dalla lampada dopo essere stato disperso dal monocromatore di eccitazione M1; tale porzione di luce viene quindi inviata ad un fotomoltiplicatore di riferimento, che corregge automaticamente l'intensità in uscita dal rivelatore per le variazioni di intensità della sorgente (vedere Figura 4.3). Tale modalità è spesso chiamata "ratio mode".

È infine da sottolineare come alcuni strumenti prevedano la possibilità di eccitare il campione tramite sorgenti laser, facendo entrare la luce a valle del monocromatore di eccitazione, non necessario in questo caso, essendo la luce del laser monocromatica. La possibilità di utilizzare laser permette di aumentare notevolmente la sensibilità dello strumento, aumentando l'intensità della luce incidente, e diminuendo il rumore, soprattutto per la diminuzione della luce diffusa.

#### 4.2.2 Monocromatori di eccitazione e di emissione

Il monocromatore di eccitazione M1 serve a selezionare dalla luce proveniente dalla lampada la lunghezza d'onda che va ad eccitare il campione; quello di emissione, M2, serve invece a selezionare la lunghezza d'onda della luce emessa dal campione, che viene poi inviata al rivelatore. Negli spettrofluorimetri più recenti essi sono dei reticoli, che consentono di minimizzare gli effetti dovuti alla luce diffusa; tuttavia presentano lo svantaggio, come vedremo nel paragrafo 4.3.3, di portare negli spettri di emissione e di eccitazione alla comparsa di bande di ordine superiore, svantaggio facilmente eliminabile con appropriato uso di filtri. È opportuno ricordare anche che per i monocromatori la percentuale di luce trasmessa dipende dalla lunghezza d'onda selezionata.

#### 4.2.3 Porta campione

La disposizione normalmente più utilizzata per l'analisi di soluzioni prevede la geometria descritta nella Figura 4.6b, in cui la luminescenza viene misurata con un angolo di

90° rispetto alla luce eccitatrice, in modo da minimizzare la quantità di luce eccitatrice raccolta dal rivelatore.

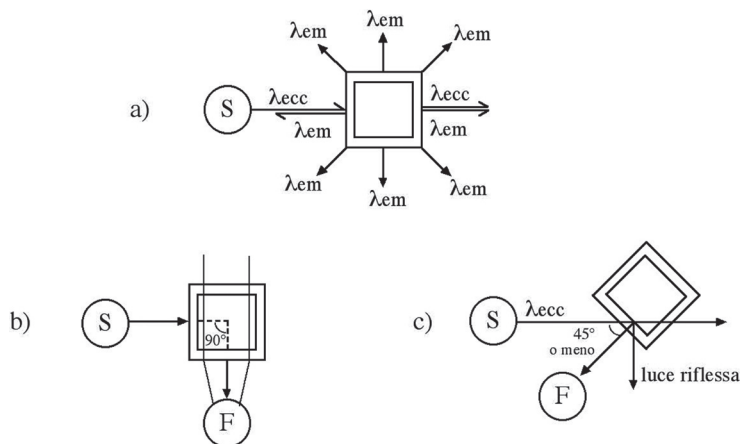


Figura 4.6 – Differenze tra le direzioni di propagazione della luce di eccitazione e della luce emessa (a); rappresentazione della geometria del portacampione per soluzioni diluite (b) o per solidi o soluzioni molto concentrate (c).

Quest'ultima non sarà mai comunque nulla, a causa dello scattering dovuto alle molecole stesse (solvente e soluto), alla presenza di piccole particelle in sospensione (anche come polvere) e al cambiamento di indice di rifrazione che esiste all'interfaccia aria-parete della cella e parete-soluzione. Per ovviare in parte a quest'ultimo problema, la cella è generalmente mascherata in modo che il rivelatore veda solo la zona centrale del liquido illuminato e non le facce laterali della cella (Figura 4.6b). L'utilizzo di questa disposizione a 90° ha comunque, come si vedrà in seguito, un effetto rilevante sul grafico segnale *vs.* concentrazione dell'analita, in quanto la frazione di luce eccitatrice assorbita nella porzione della cella "osservata" dal rivelatore non è lineare rispetto alla assorbanza della soluzione (secondo la Legge di Lambert-Beer). Per analisi di solidi, di soluzioni ad alta densità ottica e di campioni molto torbidi, viene invece usata una geometria a 45° o minore (Figura 4.6c). Infatti, in questi casi tutta la luce eccitatrice viene assorbita (o diffusa) nel primo strato del campione e, con una geometria a 90°, solo una piccola parte della luce emessa cadrebbe nel cono di osservazione del rivelatore (vedi paragrafo 4.6).

#### 4.2.4 Rivelatore

Come rivelatori, negli spettrofluorimetri convenzionali vengono normalmente utilizzati dei fotomoltiplicatori. Il limite di sensibilità del fotomoltiplicatore è normalmente governato dal livello di corrente "buia", che è il segnale proveniente dal fototubo rivelatore anche quando su di esso non arriva luce. La corrente di buio è causata dall'attivazione termica del fototubo, e può essere diminuita per raffreddamento. È assolutamente necessario sottolineare che la sensibilità dei fotomoltiplicatori dipende dalla lunghezza d'onda della radiazione incidente (Figura 4.7), e che per questo motivo vengono costruiti dalle case pro-



dottrici fotomoltiplicatori aventi diverse curve di risposta a seconda della zona di lunghezze d'onda da esplorare, per rispondere alle diverse esigenze di indagine. È pertanto essenziale scegliere tra i fotomoltiplicatori disponibili in commercio quelli più adatti alle proprie necessità, soprattutto se si devono registrare luminescenze che cadono verso il rosso.

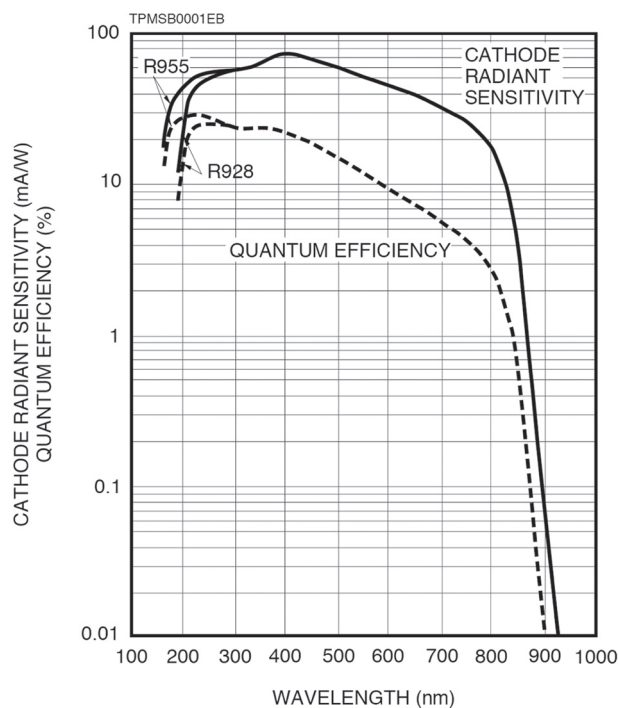


Figura 4.7 – Curva di risposta di due fotomoltiplicatori (Hamamatsu R955 ed R928) con buona sensibilità fino a 800 nm, di ampia diffusione commerciale.

Una scelta errata del tipo di rivelatore può infatti portare a non osservare segnali altrimenti facilmente visibili. La forte dipendenza della sensibilità dei fotomoltiplicatori dalla lunghezza d'onda, alla quale si somma in misura minore la risposta non lineare del monocromatore di emissione, è la causa principale del fatto che gli spettri di emissione ottenuti sperimentalmente, come vedremo nel paragrafo successivo, non sono “corretti” per cui, nel caso debbano essere confrontati con spettri ottenuti in altre condizioni sperimentali, devono essere moltiplicati per opportuni fattori strumentali.

## 4.3 SPETTRI DI EMISSIONE E DI ECCITAZIONE E LORO CORREZIONE

### 4.3.1 Spettri di emissione

Gli spettri di emissione sono in grado di fornire importanti informazioni sulla natura e sull'energia dello stato eccitato emittente e possono essere utilizzati in chimica analitica

qualitativa (lo spettro di emissione è caratteristico del luminifero) e quantitativa (l'intensità del segnale dipende dalla concentrazione, come vedremo in seguito).

Per registrare uno spettro di emissione, il campione viene eccitato ad una lunghezza d'onda fissa,  $\lambda_{exc}$ , alla quale assorbe e, muovendo il monocramatore di emissione, si misura come varia l'intensità di luminescenza al variare della lunghezza d'onda di emissione  $\lambda_{em}$ . È importante sottolineare che, in questo caso di registrazione di spettri di emissione, il monocramatore di eccitazione (M1, fig. 4.2) viene fissato ad una certa lunghezza d'onda, mentre il monocramatore di emissione (M2, fig. 4.2) esamina un intervallo di lunghezze d'onda più o meno ampio. Il diagramma delle curve di Morse di Figura 4.1 ci permette di comprendere il rapporto che intercorre tra spettro di assorbimento e spettro di emissione di una sostanza. Consideriamo di farne lo spettro di emissione eccitando nella prima banda di singoletto eccitato  $S_1$ . La sostanza può emettere da  $S_1$ , e in tal caso avrà emissione di fluorescenza, oppure può dare intersystem crossing a  $T_1$  e, se da tale stato si ha emissione, si osserverà la fosforescenza. Al massimo si possono dunque osservare due bande di emissione (fluorescenza + fosforescenza), o una banda sola (fluorescenza o fosforescenza) oppure nessuna banda (la sostanza non emette né fluorescenza né fosforescenza). Dove cadranno tali bande di emissione rispetto alle bande di assorbimento? Sempre a  $\lambda$  maggiore dell'ultima banda di assorbimento (Figura 4.1). Di regola, al massimo una parte dell'ultima banda di assorbimento si sovrappone alla banda di emissione, perché lo stato eccitato è sempre almeno un po' distorto rispetto allo stato fondamentale, con una distanza di legame maggiore. In altre parole, se consideriamo, ad es., il diagramma delle curve di Morse di una generica molecola biatomica (Figura 4.8) e ricordando che sia in assorbimento che in emissione vale il principio di Frank-Condon (vedi cap. 1), notiamo che:

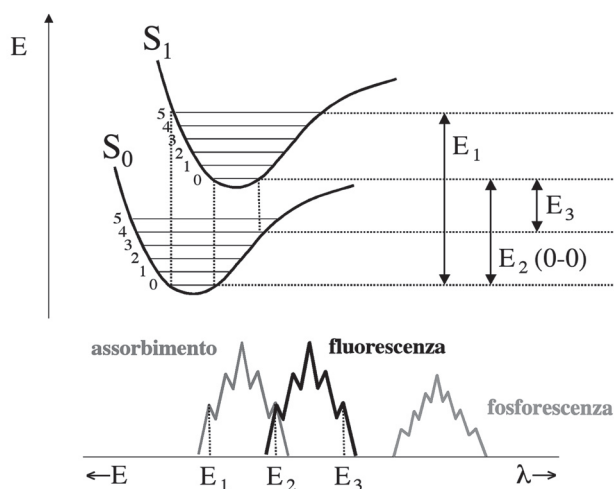


Figura 4.8 – Diagramma delle curve di Morse per una generica molecola biatomica.

a) in assorbimento, la transizione 0-0 è quella a minima energia e quindi corrisponde all'origine della banda di assorbimento dalla parte delle  $\lambda$  lunghe; se però lo stato fon-

damentale e lo stato eccitato sono distorti l'uno rispetto all'altro in misura sufficiente da non aver sovrapposizione della 0-0 in assorbimento con emissione, tale origine della banda di assorbimento è solo un limite superiore.

- b) in fluorescenza, la transizione 0-0 è la transizione a massima energia, corrispondente quindi all'origine della banda di fluorescenza dalla parte delle  $\lambda$  corte; da notare però che, se lo stato eccitato è sufficientemente distorto rispetto al fondamentale, l'origine della banda di fluorescenza dalla parte delle  $\lambda$  corte è a energia minore della transizione. Se, come rappresentato dal diagramma di Figura 4.8, io avessi lo spettro vibrazionalmente risolto, vedrei che la banda di fluorescenza appare come l'immagine speculare dell'ultima banda di assorbimento ( $S_0 \rightarrow S_1$ ). Lo spettro di fluorescenza è tipicamente l'immagine speculare dell'ultima banda di assorbimento, perché la spaziatura vibrazionale dei due stati fondamentale ed eccitato è spesso simile. Lo stesso si potrebbe dire della fosforescenza rispetto all'assorbimento  $S_0 \rightarrow T_1$ , ma quest'ultimo processo è solitamente fortemente proibito, per cui la banda corrispondente ha  $\epsilon$  piccolissimo e non è praticamente mai visibile nello spettro di assorbimento. Con lo spettro di assorbimento (transizioni  $S_0 \rightarrow S_n$ ), la fosforescenza non ha in genere alcuna relazione, tranne che deve cadere ben oltre l'ultima banda (quella a E minore). Un buon esempio per queste considerazioni è quello offerto dall'antracene (Figura 4.9).

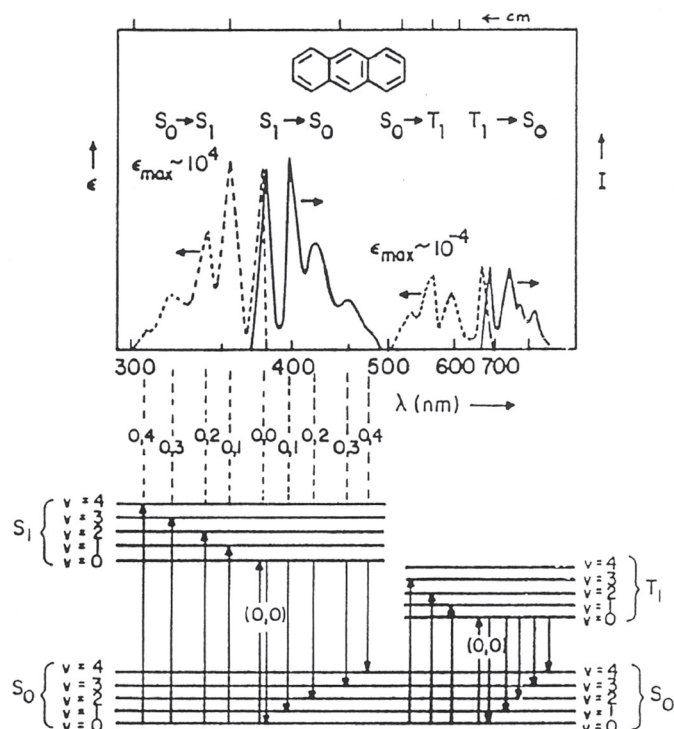


Figura 4.9 – Spettri di assorbimento (linee tratteggiate) e di emissione (linee continue) dell'antracene in soluzione. La parte inferiore mostra le basi per le attribuzioni vibrazionali. (riprodotto con permesso da: N. J. Turro, V. Ramamurthy, J. Scaiano, *Modern Molecular Photochemistry of Organic Molecules*, Univ. Science Books, in stampa.

Se lo spettrofluorimetro lavora in “ratio mode” (e quindi corregge per le variazioni di intensità di emissione della lampada in funzione della  $\lambda$  e del tempo), gli unici due fatto-

ri strumentali che occorre considerare per la correzione degli spettri sono la diversa risposta del fotomoltiplicatore e la diversa trasmissione del monocromatore al variare di  $\lambda_{em}$  (vedi paragrafo 4.2.4). In assenza di opportune correzioni, si possono avere errori nella posizione dei massimi della banda, nei rapporti massimo-massimo e massimo-minimo, e, in generale, nella forma stessa della banda. Tale distorsione è tanto più accentuata quanto più cambia la risposta del fotomoltiplicatore al variare della lunghezza d'onda (soprattutto verso il rosso).

Per correggere gli spettri di emissione, il sistema più preciso è quello di usare una lampada tarata, di cui cioè si conosce con precisione lo spettro di emissione (quanti/s nm), fornito dalla casa costruttrice della lampada. Questo viene confrontato con lo spettro di emissione ottenuto dal nostro strumento inviando direttamente la luce di questa lampada tarata sul monocromatore di emissione (facendo attenzione ad attenuare il segnale, usando fenditure di emissione strette e una tensione del fotomoltiplicatore bassa); facendo il rapporto tra questi 2 spettri si ottengono i valori, lunghezza d'onda per lunghezza d'onda, per i quali bisogna moltiplicare gli spettri sperimentali da correggere. Un esempio di questo tipo di correzione è riportato in fig. 4.10.

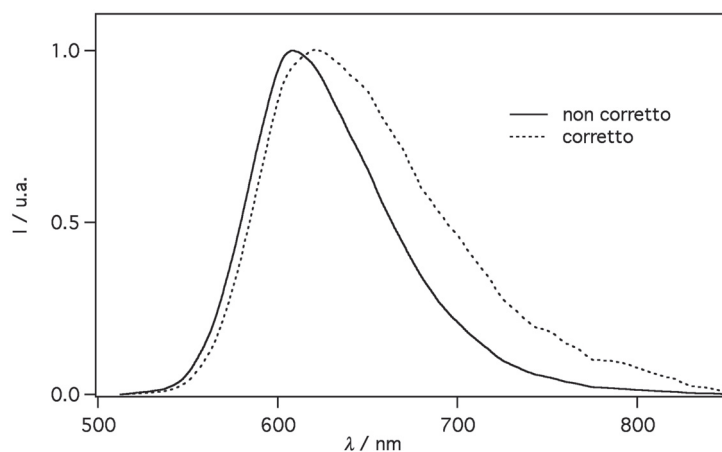


Fig. 4.10 – Spettro di emissione di  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$  in acqua, prima e dopo la correzione per la sensibilità spettrale del sistema di rivelazione.

È opportuno sottolineare che questo fattore ingloba la dipendenza da  $\lambda_{em}$  sia della risposta del fototubo, sia della trasmissione del monocromatore di emissione. Poiché la risposta del fotomoltiplicatore può cambiare con l'uso, è opportuno ottenere la curva di correzione con una certa periodicità (indicativamente almeno ogni 6 mesi) e, naturalmente, tutte le volte che viene sostituito il fotomoltiplicatore. Talvolta questa curva di correzione viene fornita con il software dello strumento; è però importante ricordare che essa è predisposta per il modello di fotomoltiplicatore con il quale lo strumento viene assemblato (cioè per la risposta media che quel modello di rivelatore offre e non per quella dello specifico rivelatore montato sullo strumento, che può essere leggermente diversa), che diventa obsoleta con l'uso e che, infine, perde di ogni valore quando viene cambiato modello di fotomoltiplicatore.

Se non si possiede una lampada tarata, un metodo semplice, ma abbastanza affidabile, è quello di ottenere i necessari fattori di correzione confrontando lo spettro di emissione di una sostanza standard ottenuto con il proprio strumento con lo spettro corretto della stessa sostanza, riportato in letteratura. Gli standard principali e i loro spettri corretti, che coprono la regione tra i 300 e gli 800 nm, sono elencati in ref. [9901].

### 4.3.2 Spettri di eccitazione

Per eseguire uno spettro di eccitazione occorre fissare il monocromatore di emissione (M2, fig. 4.2) ad una certa lunghezza d'onda  $\lambda_{em}$ , in corrispondenza della banda di emissione del campione (generalmente il massimo o una lunghezza d'onda un po' superiore), mentre il monocromatore di eccitazione (M1, fig. 4.2) si muove esplorando l'intervallo spettrale in cui il campione assorbe. Il segnale che ottengo, fatte le debite correzioni, è proporzionale alla probabilità che, inviando un fotone di una opportuna lunghezza d'onda, venga popolato lo stato eccitato responsabile della emissione che vado ad osservare. Se si sta osservando una soluzione contenente un'unica specie luminescente (o un unico picco nell'HPLC) in opportune condizioni sperimentali (principalmente, come vedremo in paragrafo 4.4.1, per  $A < 0.1$  in tutta la regione oggetto di indagine), e se la conversione degli stati eccitati superiori a quello emittente è completa (il caso di gran lunga più comune), lo spettro di eccitazione corretto è proporzionale allo spettro di assorbimento della specie in esame. È bene ricordare che questa proporzionalità implica solamente che i due spettri hanno la stessa forma: come è detto nel paragrafo 4.1.1, i valori di intensità ottenuti con misure spettrofluorimetriche, e quindi anche quelli degli spettri di eccitazione, non hanno significato fisico. Un'implicazione di tipo analitico è, però, che si può ottenere lo spettro di eccitazione di soluzioni la cui assorbanza è così bassa che non è possibile eseguire un normale spettro di assorbimento. Data la proporzionalità tra spettro di eccitazione e di assorbimento si possono così ottenere ulteriori informazioni sulla natura del cromoforo. Gli spettri di eccitazione rivestono inoltre una grande importanza nell'analisi di miscele: in questo caso si otterrà (in mancanza di processi di trasferimento di energia, come vedremo in seguito) uno spettro di eccitazione che sarà proporzionale allo spettro di assorbimento del solo cromoforo di cui si sta osservando l'emissione (aiutando, per esempio, ad identificarlo), dal momento che l'assorbimento della luce da parte delle altre specie non porterà ad emissione di fotoni alla  $\lambda_{em}$  selezionata. È opportuno ricordare che, se l'analita che interessa ha un elevato rendimento quantico, se ne può ottenere uno spettro di eccitazione anche quando il suo assorbimento è trascurabile rispetto agli altri componenti della miscela.

Data la dipendenza della intensità della sorgente eccitatrice e della intensità trasmessa dal monocromatore dalla  $\lambda_{exc}$ , bisogna notare che, registrando semplicemente l'intensità di emissione in funzione della lunghezza d'onda di eccitazione, si ottengono spettri di eccitazione non corretti; anche per gli spettri di eccitazione occorre quindi compiere opportune correzioni. Oggigiorno, gli spettrofluorimetri sono normalmente attrezzati per correggere automaticamente (anche se con qualche imperfezione, specialmente dove sono presenti le righe della lampada, vedi Figura 4.4) gli spettri di eccitazione per questi due fattori strumentali.

In alternativa, il metodo più comune per ottenere l'irradianza spettrale del sistema di eccitazione (che quindi tiene conto sia della lampada che del monocromatore) in funzione della lunghezza d'onda di eccitazione stessa è l'utilizzo di un contatore di fotoni (quantum counter), cioè di una soluzione relativamente concentrata di una sostanza fluorescente avente un rendimento quantico alto e costante al variare della lunghezza d'onda di eccitazione (normalmente la rodamina B, 3 g/L in glicole etilenico,  $\Phi \cong 1$ ). I contatori di fotoni, alle concentrazioni indicate, hanno la proprietà di assorbire tutta la luce incidente nell'intervallo di lunghezze d'onda per i quali sono consigliati (220-580 per la rodamina B, ma con l'esametilindotricarbocianina, 8 g/L in acetonitrile, l'intervallo è 320-800 nm [9901]), e quindi la luce emessa, misurata ad una opportuna lunghezza d'onda di emissione, è proporzionale solo al flusso di fotoni incidente: in tal modo si ottiene l'irradianza spettrale dello strumento. Lo spettro di eccitazione della sostanza in esame può ora essere corretto dividendolo per il profilo della lampada così ottenuto. È opportuno ricordare a questo punto, anche se verrà ripreso nel paragrafo 4.4, che per avere uno spettro di eccitazione corretto è assolutamente necessario che l'assorbanza della soluzione sia  $< 0,1$ , o, ancora meglio  $< 0,05$  (l'errore in questo caso sarà inferiore al 5 %).

Infine, lo spettro di eccitazione può servire per quantificare la presenza di eventuali processi di trasferimento di energia al composto A, di cui stiamo osservando l'emissione, da parte di un altro composto, B, presente nella soluzione. Infatti, in assenza di tali processi, come abbiamo già detto, lo spettro di eccitazione è proporzionale solo allo spettro di assorbimento di A. Viceversa, se questo processo di trasferimento ha un'efficienza unitaria (ovvero, ogni fotone assorbito da B viene trasferito ad A), lo spettro di eccitazione sarà in questo caso proporzionale alla somma dell'assorbimento di A e di B. Nei casi intermedi, invece, lo spettro di eccitazione sarà proporzionale allo spettro di assorbimento di A, più una frazione, pari all'efficienza del processo di trasferimento di energia, dell'assorbimento di B.

### 4.3.3 Presenza negli spettri di bande spurie

Per completare questo paragrafo, occorre fare menzione di altri fattori che possono trarre in inganno utenti non familiari con questa tecnica, facendo comparire nello spettro di emissione (o di eccitazione) bande che nulla hanno a che vedere con la luminescenza reale della sostanza esaminata. Essi sono principalmente tre.

#### *Bande Rayleigh-Tyndall.*

Tali bande sono dovute al fatto che la luce incidente sul campione in esame non è solo assorbita o trasmessa, ma viene anche diffusa in tutte le direzioni, arrivando quindi anche al monocromatore di emissione, da parte delle molecole stesse (solvente e soluto) e dalle interfacce aria-parete della cella e parete-soluzione (Rayleigh scattering) o dalla presenza di piccole particelle in sospensione, ad es., polvere (Tyndall scattering). Questo tipo di luce diffusa si osserverà sempre quando si è costretti ad usare lo strumento in condizioni di grande amplificazione, ad esempio perché la concentrazione del luminifero è molto bassa o perché il suo rendimento quantico è molto piccolo. Questi fenomeni fanno sì che parte della radiazione eccitatrice sia raccolta dal rivelatore insieme alla luminescenza del campione. La frazione di luce diffusa dipende dall'assorbanza del campione alla  $\lambda_{exc}$ ,

e sarà tanto minore quanto maggiore è l'assorbanza. L'ampiezza della banda di scattering dipende dalle fenditure e, nel caso che la banda di luminescenza da registrare sia molto vicina alla lunghezza d'onda di eccitazione, può generare una sovrapposizione dei due segnali con conseguente distorsione della banda di emissione stessa. In questo caso, se possibile, è opportuno spostare la  $\lambda_{em}$  nel caso degli spettri di eccitazione o la  $\lambda_{exc}$  nel caso degli spettri di emissione, e/o restringere le fenditure.

#### *Bande Raman.*

Tali bande derivano dall'interazione dei fotoni della radiazione eccitatrice con i livelli vibrazionali delle molecole del solvente, ai quali cedono una frazione costante della loro energia. Per uno stesso solvente, la differenza tra la  $\lambda_{exc}$  e il massimo della banda Raman è costante in termini di energia ma *non in termini di lunghezza d'onda*. La lunghezza d'onda del massimo della banda Raman dipende sempre dalla  $\lambda_{exc}$  per cui, al contrario di una emissione "reale", si sposta al variare dell'eccitazione stessa. Tutti i solventi aventi legami C-H od O-H mostrano delle bande Raman spostate rispettivamente di circa 2800 o 3400  $cm^{-1}$ . È quindi opportuno, quando si osserva una banda che dista in energia meno di 3400  $cm^{-1}$  dalla  $\lambda_{exc}$ , controllare che essa non sia una banda Raman, o eseguendo uno spettro del bianco (solvente da solo), o variando l'eccitazione: se il massimo di questa banda si sposta variando la lunghezza d'onda eccitatrice essa sarà con ogni probabilità una banda Raman. Se in uno spettro la banda Raman e la banda di luminescenza sono molto vicine, può essere opportuno spostare la  $\lambda_{em}$  nel caso degli spettri di eccitazione o la  $\lambda_{exc}$  nel caso degli spettri di emissione. A questo proposito, occorre ricordare che le bande Raman possono essere osservate anche in eccitazione, quando la  $\lambda_{exc}$  assume un valore tale che la differenza di energia tra essa e la  $\lambda_{em}$  a cui si sta registrando lo spettro equivale ad una transizione Raman.

#### *Bande d'ordine superiore.*

Tali bande derivano dall'uso come monocromatori di reticoli, che funzionano in base al fenomeno della diffrazione. Abbiamo già visto che, assieme all'emissione "vera" del nostro campione, al monocromatore di emissione, la cui orientazione (angolo) seleziona la lunghezza d'onda che giunge al fotomoltiplicatore, arriva anche luce di eccitazione diffusa. Se, ad esempio, eccitiamo con luce di 260 nm una cella contenente solo il solvente (o una soluzione molto diluita di un fluoroforo, Figura 4.11) e facciamo una scansione tra 220 e 800 nm, a 260 nm noi osserveremo il segnale dovuto allo Rayleigh-scattering della luce di eccitazione; quando il mio monocromatore di emissione M2 arriva a 520 nm, esso invia al fotomoltiplicatore, per le leggi della diffrazione, oltre che la luce di questa lunghezza d'onda, anche luce di  $\lambda = 520/m$  (dove m è un numero intero). Quindi, anche se nominalmente sto osservando luce di  $\lambda$  pari a 520 nm, sul mio fotomoltiplicatore incide anche una certa percentuale di luce diffusa di  $\lambda$  pari a 260 nm ( $\lambda/2$ ). Nel mio spettro, osserverò quindi, oltre alla banda Rayleigh a 260 nm, una banda a 520 nm, detta "armonica" (perché d'ordine  $m > 1$ ), di intensità comunque inferiore rispetto alla prima (l'intensità infatti diminuisce con l'aumentare di m). Questo, è opportuno sottolinearlo, non significa che sul mio fotomoltiplicatore stia giungendo "veramente" della luce di  $\lambda = 520$  nm, ma solo che, quando il mio strumento è sistemato per vedere luce a 520 nm, vede anche la luce la cui lunghezza d'onda è una sua frazione intera. Proseguendo nella scansione, a 780 nm

( $m = 3$ ) osserverò nuovamente un picco, però ancora più debole. Per riassumere, nello spettro di emissione (ma, a rovescio, lo stesso vale per gli spettri di eccitazione), se non vengono usati opportuni accorgimenti, posso osservare, oltre alla emissione vera (se c'è), la banda passante, la banda Raman e altre bande con massimi che sono multipli interi della lunghezza d'onda di eccitazione (e che, quindi, a differenza delle emissioni "reali", si spostano con questa, caratteristica molto importante per riconoscerle).

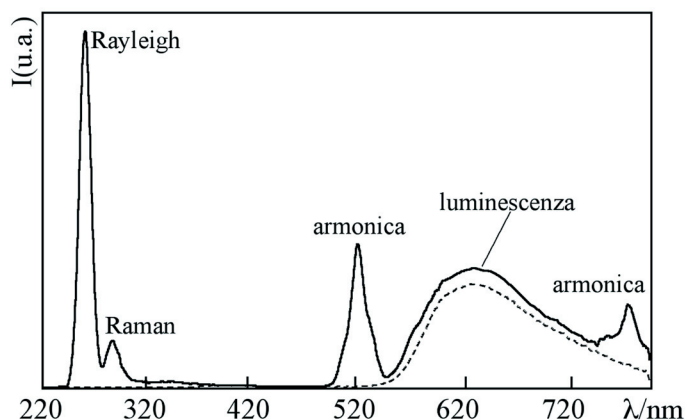


Figura 4.11 – Scansione in emissione di una soluzione diluita di  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$  in acqua, eccitando a 260 nm, in assenza di filtri (linea continua) e con filtro cut-off in emissione ( $T=50\%$  a 385 nm) (linea tratteggiata).

Cosa si può fare per eliminare queste bande spurie? Semplicemente bisogna evitare che la luce eccitatrice diffusa raggiunga il monocromatore di emissione, e ciò si ottiene ponendo nel cammino ottico tra il campione e il monocromatore di emissione opportuni filtri cut-off (cioè trasparenti solo a lunghezze d'onda maggiori di un certo valore, dipendente dal tipo di filtro, vedi paragrafo 3.3 e Figura 4.11). Alcuni strumenti ne hanno un set incorporato, selezionabili tramite computer, anche se può essere opportuno dotarsi di un set di filtri esterno per avere a disposizione un maggior numero di opzioni. Ovviamente il filtro deve essere selezionato in modo tale da non tagliare l'emissione vera, il che vuol dire che la lunghezza d'onda al di sotto della quale il filtro assorbe tutta la luce deve essere compresa tra la lunghezza d'onda di eccitazione (che è quella da mascherare) e quella in cui comincia ad osservarsi l'emissione del campione (che invece non deve essere assorbita dal filtro).

## 4.4 MISURE QUANTITATIVE A LUNGHEZZA D'ONDA FISSA

### 4.4.1 Correzioni legate all'assorbimento del campione alla lunghezza d'onda di eccitazione

Questo paragrafo si occupa delle misure di intensità di luminescenza compiute in soluzione a lunghezza d'onda di eccitazione ( $\lambda_{\text{exc}}$ ) e di emissione ( $\lambda_{\text{em}}$ ) fisse con spettrofluorimetri commerciali, usando una disposizione a  $90^\circ$  (vedi paragrafo 4.2.3). Questo



tipo di misura è di grande importanza per una serie di esperimenti di diverso tipo, quali la determinazione quantitativa di una specie in soluzione, le titolazioni di fluorescenza, gli esperimenti di spegnimento e di sensibilizzazione, le determinazioni del rendimento quantico di fotoreazioni e di fotoluminescenza e in tutti i casi nei quali un segnale di luminescenza è utilizzato per seguire un processo chimico.

Nell'introdurre questo capitolo, abbiamo scritto che un grande vantaggio della spettrofluorimetria risiede nella possibilità di avere una risposta lineare in un intervallo di concentrazioni molto ampio. In generale per avere una risposta lineare occorre che gli effetti dovuti all'assorbimento della luce, sia di quella eccitatrice che di quella emessa, siano trascurabili (cosa voglia dire trascurabile, da un punto di vista quantitativo, lo vedremo nel corso del paragrafo); sostanzialmente questa condizione è soddisfatta sempre con campioni estremamente diluiti. È evidente che l'estrema diluizione rappresenta il vero terreno di sfida della fluorescenza nella chimica analitica, dal momento che ad essa vengono anche richieste sensibilità inferiori a  $10^{-10}$  M. Tuttavia occorre spesso fare misure anche con campioni molto più concentrati, per i quali l'intensità di luminescenza osservata non varia linearmente con la concentrazione, e questa mancanza di linearità può causare, se non se ne capiscono le ragioni, diversi problemi. Riportando in un grafico i valori di intensità di emissione di una determinata sostanza luminescente in soluzione in funzione della sua assorbanza (e quindi della concentrazione) si ottiene una curva come quella mostrata nella Figura 4.12. Come si può osservare, esiste una regione in cui l'intensità cresce in modo lineare a valori di assorbanza molto bassa, per poi raggiungere un massimo (generalmente per  $A$  compresa tra 0.5 ed 1); infine, a valori di assorbanza maggiori l'intensità decresce benché la concentrazione del campione aumenti. Questo andamento sperimentale trae origine dal sommarsi di due fattori distinti, uno che potremmo chiamare di tipo matematico, ed un altro che potremmo chiamare di tipo geometrico.

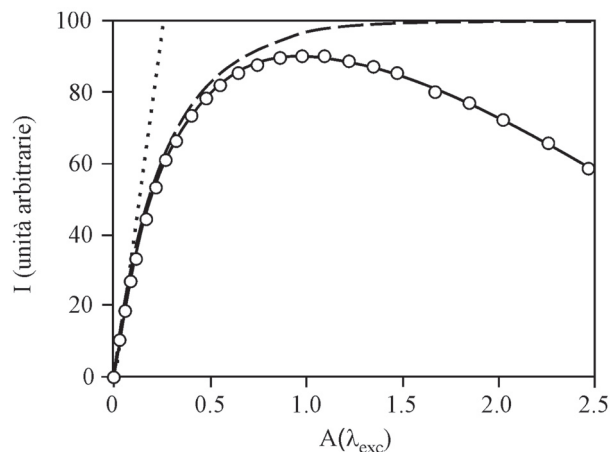


Figura 4.12 – Curva di calibrazione sperimentale ottenuta riportando l'intensità di luminescenza osservata per soluzioni di solfato di chinina in  $H_2SO_4$  0.5 M a diverse concentrazioni. Condizioni strumentali: Spettrofluorimetro Perkin-Elmer LS50,  $\lambda_{exc} = 350$  nm,  $\lambda_{em} = 450$  nm, banda passante 5 nm. La linea tratteggiata rappresenta l'andamento intensità-assorbanza previsto sulla base del solo fattore matematico. La linea punteggiata rappresenta la tangente alla curva sperimentale per  $A(\lambda_{exc}) \rightarrow 0$  ed evidenzia la relazione lineare fra intensità di luminescenza ed assorbanza per  $A < 0.1$ .

Il primo fattore è spiegabile richiamando l'equazione 4-1, che di fatto afferma che il numero di fotoni emessi da un campione ( $I_e$ ) è uguale al numero di fotoni assorbiti ( $I_a$ ) moltiplicati per il rendimento quantico di emissione. Ora, il numero dei fotoni assorbiti, essendo uguale al numero di fotoni incidenti meno il numero dei fotoni trasmessi, non è direttamente proporzionale all'assorbanza, e quindi alla concentrazione, ma, come indicato dalla stessa equazione, è legato ad essa tramite il termine  $(1-10^{-A(\lambda_{exc})})$ . Di fatto, come si dimostra espandendolo in serie, esso si può considerare linearmente proporzionale a  $A(\lambda_{exc})$  per valori di assorbanza inferiori a 0.05 (o, potendo tollerare un errore maggiore, per valori di assorbanza inferiori a 0.1). Questo è il motivo per cui uno spettro di eccitazione di una specie emittente, per poter essere confrontato quantitativamente con quello di assorbimento, va registrato su una soluzione di assorbanza molto bassa (vedi paragrafo 4.3.2). Per valori di assorbanza più elevate tale termine tende a 1: infatti per  $A = 0.5$  esso vale 0.68, per  $A = 1$  è uguale a 0.90, per  $A = 2$  è uguale a 0.99, per  $A = 3$  è uguale a 0.999 e così via. Questo fattore matematico, in definitiva, spiega perché la curva sperimentale mostrata nella Figura 4.12 sia lineare nella zona iniziale; tuttavia, da solo non spiega il comportamento ad alti valori di assorbanza, dal momento che prevede il raggiungimento di un plateau e non una progressiva diminuzione dell'intensità. Questo fenomeno può infatti essere spiegato solo ricorrendo al secondo fattore, quello geometrico. Per comprenderlo dobbiamo ricordare quello che abbiamo già scritto discutendo della strumentazione. Quando la luminescenza viene misurata con un angolo di  $90^\circ$  rispetto alla luce eccitatrice negli spettrofluorimetri commerciali, di solito, per eliminare lo scattering dovuto all'interfaccia aria-parete della cella e parete della cella-soluzione, la cella è generalmente mascherata in modo che il rivelatore veda solo la zona centrale del liquido illuminato e non le sue facce laterali (fig. 4.6b). Diventa quindi importante non solo quanta luce viene emessa dal campione, ma anche in che zona della cella tale luce viene generata. In sostanza, se l'assorbanza della cella è bassa, il raggio di eccitazione è in grado di attraversare tutta la cella prima di subire un'apprezzabile attenuazione (cioè, la luce assorbita è trascurabile rispetto a quella incidente, Figura 4.13). Questo significa che la concentrazione degli stati eccitati è pressoché costante lungo tutto il cammino percorso dal raggio di eccitazione. In queste condizioni rimane valida, a meno di una costante, l'equazione 4-1. Il discorso è completamente diverso ad alti valori di assorbanza; in questo caso infatti, la maggior parte della luce viene assorbita (ed emessa) nei primi millimetri della celletta, zona che il rivelatore non è in grado di vedere: molti fotoni emessi non generano quindi un segnale, e questo è tanto più vero quanto maggiore è l'assorbanza della soluzione (Figura 4.13b). È quindi il modo con cui è predisposto lo strumento che porta al paradosso prima evidenziato, che cioè il segnale di luminescenza osservato diminuisce all'aumentare dell'assorbanza (sopra una certa soglia) dell'analita. Bisogna notare in maniera esplicita che tale effetto è dovuto all'assorbanza totale del campione, anche quella derivante dalla presenza di altre specie presenti oltre al fluoroforo che si sta esaminando.

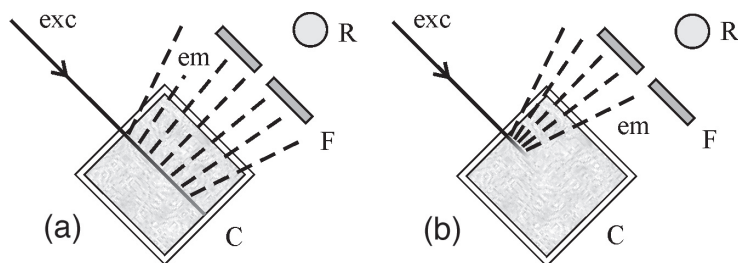


Figura 4.13 – Schema geometrico semplificato di un esperimento di fotoluminescenza con una cella a sezione quadrata per soluzioni con diverso assorbimento alla lunghezza d'onda di eccitazione: (a) assorbanza bassa (<math><0.1</math>) e (b) assorbanza elevata (>2). Legenda dei simboli: exc, luce di eccitazione; em, luce emessa; C, cella; F, fenditura; R, rivelatore.

Occorre sottolineare che la forma della curva di calibrazione di uno strumento, come quella mostrata nella Figura 4.12, dipende dallo strumento e non dal fluoroforo impiegato, sempre che esso non dia fenomeni (aggregazione, spegnimento od altro) dipendenti dalla concentrazione, almeno nell'intervallo di interesse. Variando il fluoroforo infatti può variare il rendimento quantico, e proporzionalmente varierà anche l'intensità osservata su tutto il grafico, mantenendone però invariata la forma. Per le curve di calibrazione, l'uso del complesso  $Ru(bpy)_3^{2+}$  in acqua si è rivelato rispondere ai requisiti necessari. La curva di calibrazione può essere ottenuta aumentando gradatamente la concentrazione del complesso, misurando ogni volta (con lo spettrofotometro) l'assorbanza alla lunghezza d'onda di eccitazione e (con lo spettrofluorimetro) la sua intensità di luminescenza nel massimo di emissione. Occorre precisare a questo punto che, dal momento che il fattore geometrico dipende, anche se non drasticamente, dalla larghezza delle fenditure, può essere opportuno ottenere più curve di calibrazione, ciascuna usando le fenditure più comunemente utilizzate. I vari punti (tra i 20 e i 30 nell'intervallo di assorbanza tra 0 e 2.5) possono essere quindi messi in grafico nel modo illustrato in Figura, ed interpolati con una funzione polinomiale opportuna. La funzione così ottenuta, che possiamo chiamare  $F_g$ , mette in relazione quindi l'intensità osservata dal rivelatore  $I_{obs}$  (e non quella totale,  $I_t$ , come espressa nella equazione 4.1) con l'intensità incidente ed il rendimento quantico del composto in esame, attraverso l'equazione 4-2.

$$I_{obs}(\lambda_{exc}, \lambda_{em}) \propto \Phi \times I_i(\lambda_{exc}) \times F_g(A(\lambda_{exc})) \quad (4-2)$$

È importante sottolineare ancora come la funzione  $F_g$  contenga sia il fattore matematico che quello geometrico. Dal punto di vista analitico è importante avere una relazione lineare tra segnale e concentrazione: per ottenere questo scopo in spettrofluorimetria occorre moltiplicare l'intensità osservata  $I_{obs}$  per un fattore correttivo  $P$  definito come nell'equazione 4-3, ottenendo così un valore di intensità corretto ( $I_{corr}$ ) (equazione 4-4):

$$P(\lambda_{exc}) = \frac{A(\lambda_{exc})}{F_g(A(\lambda_{exc}))} \quad (4-3)$$

$$I_{\text{corr}}(\lambda_{\text{exc}}, \lambda_{\text{em}}) = I_{\text{obs}}(\lambda_{\text{exc}}, \lambda_{\text{em}}) \times P \quad (4-4)$$

Sostituendo le equazioni 4-2 e 4-3 nella 4-4, si ottiene l'equazione 4-5:

$$\begin{aligned} I_{\text{corr}}(\lambda_{\text{exc}}, \lambda_{\text{em}}) &= I_{\text{obs}}(\lambda_{\text{exc}}, \lambda_{\text{em}}) \times P \propto \Phi \times I_i(\lambda_{\text{exc}}) \times F_g(A(\lambda_{\text{exc}})) \times \frac{A(\lambda_{\text{exc}})}{F_g(A(\lambda_{\text{exc}}))} = \\ &= \Phi \times I_i(\lambda_{\text{exc}}) \times A(\lambda_{\text{exc}}) \end{aligned} \quad (4-5)$$

Come si può notare, l'intensità corretta così ottenuta è proporzionale, tramite due fattori costanti ( $\Phi$ , fissando il fluoroforo, e  $I_i(\lambda_{\text{exc}})$ , fissando lo strumento e la lunghezza d'onda di eccitazione), all'assorbanza del campione e, quindi, in assenza di altre specie, alla sua concentrazione. Si può comunque dimostrare [0601] che la proporzionalità tra intensità e concentrazione del cromoforo si può ottenere nello stesso modo, anche in presenza di più specie che assorbono la luce di eccitazione, semplicemente usando per il termine  $P$  ( $\lambda_{\text{exc}}$ ) nell'equazione 4-3 il valore dell'assorbanza della soluzione.

Anche se ad una prima occhiata quanto detto finora può sembrare complicato, in realtà correggere i dati di emissione per i fattori legati all'assorbanza della soluzione alla lunghezza d'onda di eccitazione è relativamente semplice. In modo particolare le operazioni necessarie possono essere riassunte in quattro punti:

- 1) determinare la curva di calibrazione dello strumento (tale operazione deve essere fatta per ogni strumento a disposizione e, preferibilmente, per le fenditure utilizzate) come precedentemente descritto. È bene fare questa operazione con una periodicità almeno annuale;
- 2) determinare l'assorbanza della soluzione alla lunghezza d'onda di eccitazione; tale valore servirà, oltre che ad essere inserito direttamente nell'equazione 4-3, a determinare  $F_g(A(\lambda_{\text{exc}}))$ , inserendolo nell'equazione ottenuta interpolando i dati ottenuti al punto 1. Se l'assorbanza non fosse misurabile perché troppo bassa, questo non rappresenta un problema, perché in queste condizioni sperimentali, come abbiamo più volte ricordato, l'intensità osservata è già direttamente proporzionale alla concentrazione;
- 3) misurare l'intensità di emissione;
- 4) determinare l'intensità di emissione corretta applicando l'equazione 4-4.

Come si può notare, a parte il primo punto che richiede tempo, ma che deve essere eseguito solo di tanto in tanto, le altre tre operazioni sono molto semplici e veloci.

Il vantaggio dell'intensità corretta è che, date due soluzioni aventi concentrazioni diverse ( $C_1$  e  $C_2$ ) di un certo luminoforo, il rapporto tra esse è uguale al rapporto tra le rispettive intensità corrette, in accordo con la seguente equazione:

$$\frac{C_1}{C_2} = \frac{I_{\text{corr}}(1)}{I_{\text{corr}}(2)} \quad (4-6)$$

Perciò, per determinare la concentrazione incognita di un luminoforo, occorrerà dotarsi di una soluzione a concentrazione nota nello stesso solvente della stessa specie, leggere, usando la stessa lunghezza d'onda di eccitazione e di emissione, le intensità di luminescenza e correggerle opportunamente e, infine applicare l'equazione 4-6.

#### 4.4.2 Correzioni legate all'assorbimento del campione alla lunghezza d'onda di emissione

Oltre ai problemi legati all'assorbimento della luce di eccitazione, occorre effettuare una correzione dell'intensità di luminescenza osservata anche quando la soluzione presenta un'assorbanza maggiore di zero alla lunghezza d'onda scelta per monitorare la luminescenza. Il motivo è molto semplice: una volta che il fotone viene emesso dal luminifero all'interno della cella, esso dovrà compiere un certo cammino  $b$  per fuoriuscire dalla cella e poter raggiungere il rivelatore: la presenza di un composto (lo stesso luminifero od altre specie eventualmente presenti) in grado di assorbirlo riduce la probabilità che questo possa succedere, così come previsto dalla legge di Lambert-Beer. Questo fenomeno, noto in fotochimica come trasferimento di energia triviale, non prevede alcuna interazione elettronica tra donatore ed accettore di energia; non può essere pertanto considerato un fenomeno di spegnimento, ma rientra tra quelli che in spettrofluorimetria vengono chiamati effetti di filtro interno.

La soluzione migliore a questo problema è semplicemente quella di selezionare una lunghezza d'onda di emissione per la quale l'assorbanza della soluzione è molto piccola. Se questo semplice accorgimento non fosse possibile, come può capitare, occorre correggere ulteriormente (in aggiunta, quindi, alla correzione discussa nel paragrafo precedente) il dato osservato. Proprio perché si tratta di assorbimento della luce emessa, occorre partire dalla legge di Lambert-Beer. In particolare la frazione di luce emessa  $T(\lambda_{em})$  che viene trasmessa dalla soluzione – e che quindi può generare segnale – è espressa dall'equazione 4-7.

$$T(\lambda_{em}) = 10^{-A(\lambda_{em}) \times b} \quad (4-7)$$

Il valore dell'intensità corretto per questo fattore si ottiene dividendo il valore di intensità per  $T(\lambda_{em})$ , per cui, considerando tutti i fattori la formula completa dell'intensità corretta può essere formulata nel seguente modo:

$$I_{corr}(\lambda_{exc}, \lambda_{em}) = I_{obs}(\lambda_{exc}, \lambda_{em}) \times \frac{P(\lambda_{exc})}{T(\lambda_{em})} = I_{obs}(\lambda_{exc}, \lambda_{em}) \times \frac{A(\lambda_{exc})}{F_g(A(\lambda_{exc}))} \times 10^{A(\lambda_{em}) \times b} \quad (4-8)$$

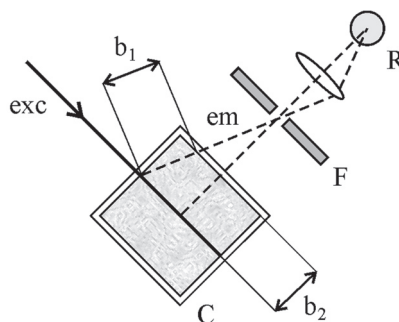


Figura 4.14 – Schema geometrico semplificato nel quale sono evidenziati i diversi cammini ottici  $b_1$  e  $b_2$  percorsi da due raggi di luce emessi in posizioni differenti all'interno della cella.

Per poter utilizzare l'equazione 4-7 occorre determinare il valore di  $b$  che, come abbiamo detto prima, è il cammino che il fotone, una volta emesso, deve compiere all'interno della soluzione per uscire dalla cella e potere poi raggiungere il rivelatore. Come si può vedere dalla Figura 4.14 il cammino di ogni fotone emesso dipende dalla posizione in cui lo stato eccitato viene generato; pertanto è possibile stimare soltanto un valore medio del cammino ottico. Alcuni autori [9901] hanno proposto di inserire  $b = 0.5$  cm (nel caso di celle spettrofluorimetriche di 1 cm di spessore illuminate centralmente) nell'equazione 4-7, ma è bene precisare che si tratta di una approssimazione spesso non soddisfacente. Sulla base della nostra esperienza tale valore può essere superiore di oltre il 40% (questo errore si propaga in maniera esponenziale sul valore dell'intensità corretto!). Occorre quindi procedere ad una determinazione sperimentale di questa grandezza. Il metodo che noi proponiamo è basato sull'utilizzo di due composti: un fluoroforo L che presenti massimi di assorbimento e di emissione molto intensi e ben separati fra loro, ed un "filtro interno" K che mostri un assorbimento elevato nella regione di emissione di L, e il più basso possibile nella sua regione di assorbimento. In tal modo, l'aggiunta della specie K ad una soluzione contenente L modifica molto l'assorbimento alla lunghezza d'onda di emissione (e quindi agisce efficientemente da filtro interno), cambiando in maniera trascurabile l'assorbimento alla lunghezza d'onda di eccitazione (e quindi rendendo poco pesanti le correzioni dovute a questo fattore, che comunque sono fonte di possibili errori). Ovviamente alle concentrazioni di misura devono essere minimi gli effetti di trasferimento di energia (non triviale, ovviamente) e di elettroni. La scelta di sostanze con alto coefficiente di assorbimento molare permette generalmente di lavorare in condizioni sperimentali nelle quali i processi dinamici sono trascurabili, ma in caso di dubbio è bene fare una verifica mediante la determinazione di tempi di vita. Una coppia da noi individuata è quella rappresentata da L = 1,5-dimetossinaftalene e da K = antracene in soluzione di acetone nitrile, sostanze che obbediscono ai requisiti appena descritti. Sperimentalmente si procede aggiungendo al fluoroforo quantità crescenti della specie filtro interno; dopo ogni aggiunta si registra lo spettro di assorbimento della soluzione (in particolare si misura l'assorbanza sia alla lunghezza d'onda di eccitazione che a quella di emissione) e successivamente il valore dell'intensità di emissione alla lunghezza d'onda prescelta. Secondo l'equazione 4-6, durante l'esperimento appena descritto ed in assenza di effetti di diluizione, l'intensità corretta deve rimanere costante, dal momento che la concentrazione del luminoforo non cambia. Quindi l'equazione 4-8 può essere riscritta nella seguente forma:

$$I_{\text{corr}}(\lambda_{\text{exc}}, \lambda_{\text{em}}) \times 10^{-A(\lambda_{\text{em}}) \times b} = I_{\text{obs}}(\lambda_{\text{exc}}, \lambda_{\text{em}}) \times \frac{A(\lambda_{\text{exc}})}{F_g(A(\lambda_{\text{exc}}))} \quad (4-9)$$

che in forma logaritmica diventa:

$$\text{costante} - A(\lambda_{\text{em}}) \times b = \log \left( I_{\text{obs}}(\lambda_{\text{exc}}, \lambda_{\text{em}}) \times \frac{A(\lambda_{\text{exc}})}{F_g(A(\lambda_{\text{exc}}))} \right) \quad (4-10)$$

Mettendo quindi in grafico il termine di destra dell'equazione in funzione di  $A(\lambda_{\text{em}})$  si ottiene (Figura 4.15) una retta avente pendenza  $-b$  che rappresenta il termine che volevamo determinare. Questa misura può essere controllata anche ad intervalli di tempo molto ampi (anche maggiori di un anno, eventualmente dopo ogni volta che viene sostituita la lampada), ma è necessario compierla su ogni strumento, anche se di ugual modello.

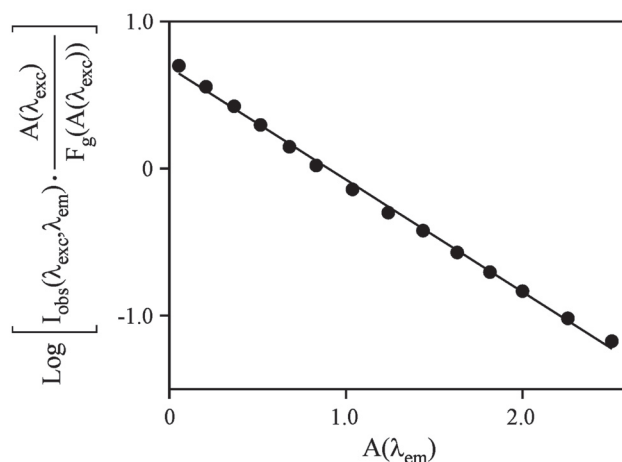


Figura 4.15 – Diagramma del logaritmo dell'intensità di luminescenza di L a  $\lambda_{em}$  con eccitazione a  $\lambda_{exc}$ , corretta per gli effetti di assorbimento alla lunghezza d'onda di eccitazione, in funzione dell'assorbanza della soluzione a  $\lambda_{em}$  dovuta al filtro interno K. L, 1,5-dimetossinaftalene; K, antracene; solvente, acetonitrile;  $\lambda_{exc}$  = 311 nm;  $\lambda_{em}$  = 346 nm. Dalla pendenza della retta si ricava  $b = 0,76$ .

Nel concludere, è bene ribadire che le correzioni illustrate in questo paragrafo sono affette da incertezze spesso difficilmente quantificabili. I dati corretti vanno utilizzati con cautela, in particolar modo quando l'entità della correzione è rilevante rispetto al valore dell'intensità osservata (si può verificare, ad esempio, che l'effetto del riassorbimento della luce emessa può comportare correzioni enormi, facilmente superiori al 100%). L'opzione preferibile resta pertanto quella di evitare di dover correggere i dati in grado considerevole, se possibile, attraverso una scelta oculata delle condizioni sperimentali e strumentali.

#### 4.5 DETERMINAZIONE DEI RENDIMENTI QUANTICI DI LUMINESCENZA

Per stabilire se una sostanza è o meno un buon fluoroforo, occorre conoscere il suo rendimento quantico di emissione, che, come abbiamo già visto, può essere definito come:

$$\Phi = \frac{n^\circ \text{ fotoni emessi}}{n^\circ \text{ fotoni assorbiti}}$$

Il modo più semplice per determinare il rendimento quantico di luminescenza di un fluoroforo è basato sul confronto con uno standard a rendimento quantico noto. I rendimenti quantici di emissione di questi composti di riferimento sono praticamente indipendenti dalla lunghezza d'onda di eccitazione, per cui è possibile usarli in tutto il loro intervallo di assorbimento.

In pratica, il rendimento quantico è generalmente determinato confrontando lo spettro di emissione del fluoroforo in esame con quello di uno standard scelto opportunamente, registrati nelle stesse condizioni sperimentali ( $\lambda$  di eccitazione, fenditure di eccitazione e di emissione); questo confronto viene fatto paragonando le intensità di emissione dei due fluorofori, integrate per tutto l'intervallo di lunghezze d'onda (aree sottese dagli spettri di emissione). Da notare che, poiché generalmente gli spettrofluorimetri usano come monocromatori dei

reticoli, la dispersione della radiazione è lineare con la lunghezza d'onda. Quindi la misura dell'area dello spettro di luminescenza da inserire nel calcolo del rendimento quantico deve essere fatta su uno spettro espresso in funzione di  $\lambda$  e non di frequenza o numero d'onda. L'intervallo delle lunghezze d'onda di emissione e la forma degli spettri da confrontare devono coincidere il più possibile; altrimenti, quando questi requisiti non possono essere soddisfatti, il confronto deve avvenire tra spettri di emissione corretti (vedi [6601, 9401, 9901] e il paragrafo 4.3.1 di questo manuale). In queste condizioni, usando la stessa  $\lambda$  di eccitazione, il rendimento quantico incognito è calcolato usando la formula [7101, 8901, 9901]:

$$\Phi = \Phi_r \frac{I}{I_r} \frac{A_r}{A} \frac{n^2}{n_r^2} \quad (4-11)$$

dove  $\Phi$  è il rendimento quantico di emissione,  $I$  è l'area sottesa dallo spettro in tutto l'intervallo delle  $\lambda$  di emissione,  $A$  è l'assorbanza alla  $\lambda$  di eccitazione, e  $n$  è l'indice di rifrazione del solvente. L'indice  $r$  si riferisce al fluoroforo a rendimento quantico noto.

Questa equazione è sufficientemente corretta solo se l'assorbanza delle soluzioni alla  $\lambda$  di eccitazione è  $< 0,1$ ; questo limite di assorbanza serve anche a minimizzare effetti di filtro interno (riassorbimento della luce emessa), che devono essere considerati quando ci sia sovrapposizione tra la banda di assorbimento a più bassa energia e la banda di emissione (vedi ad es. il caso dell'antracene, Figura 4.9).

Quando non si possono usare soluzioni diluite (cioè  $A \geq 0,1$ ), l'espressione precedente deve includere il fattore  $F_g$  che comprende la dipendenza sia matematica che geometrica di  $I$  vs.  $A$  (vedi Paragrafo 4.4.1):

$$\Phi = \Phi_r \frac{I}{I_r} \frac{F_{gr}}{F_g} \frac{n^2}{n_r^2} \quad (4-12)$$

Comunque, se alla  $\lambda$  di eccitazione l'assorbanza del composto di riferimento e del fluoroforo incognito sono praticamente coincidenti, la formula si riduce a:

$$\Phi = \Phi_r \frac{I}{I_r} \frac{n^2}{n_r^2} \quad (4-13)$$

La presenza del rapporto degli indici di rifrazione dei solventi è dovuta alla considerazione che l'intensità emessa da una sorgente puntiforme in un mezzo di indice di rifrazione  $n_i$  se osservata da un rivelatore posto in un mezzo di indice di rifrazione  $n_o$  è modificata dal rapporto  $(n_i/n_o)^2$  (vedi [9901], pag. 53).

#### 4.5.1 Standard per la determinazione dei rendimenti quantici di fluorescenza

Le misure dei rendimenti quantici di fluorescenza si effettuano generalmente in soluzione fluida a temperatura ambiente. I solventi devono essere di purezza opportuna, adatti per misure di fluorescenza; si consiglia comunque di verificare, nelle condizioni sperimentali usate, l'assenza di emissioni spurie dovute al solvente stesso o a sostanze in esso presenti



(impurezze e/o stabilizzanti). Infine, nello scegliere la  $\lambda$  di eccitazione comune alla specie in esame e allo standard di riferimento, si deve evitare di scegliere zone dello spettro di assorbimento con pendenze molto elevate, per prevenire gli errori (spesso molto grandi) derivanti da possibili differenze sia nei valori di  $\lambda$  (diversa taratura dello spettrofotometro e spettrofluorimetro usati) che nell'ampiezza delle fenditure usate nei due strumenti. Gli standard più comunemente usati sono raccolti in Tabella 4-1; altre compilazioni sono riportate nelle referenze [8801, 8901, 9901, 0601].

Tabella 4-1 Standard di riferimento consigliati per la determinazione dei rendimenti quantici di fluorescenza.

Intervallo $\lambda_{em}$ (nm)	Composto	Solvente	$\Phi^{a,b}$	Referenze
280–330	Fenolo	H <sub>2</sub> O	0,14	[6701, 9901]
		Cicloesano	0,08	[7102]
300–400	Naftalene	Cicloesano	0,23; 0,036 <sup>c</sup>	[7102; 0301]
		EtOH	0,21	[6601, 6801]
310–400	Terfenile	Cicloesano	0,93; 0,82 <sup>c</sup>	[7102; 0301]
315–480	2-Amino piridina	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0,05 M	0,60 <sup>d</sup>	[6802]
		H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0,05-0,5 M	0,66 <sup>c</sup>	[8301]
360–480	Antracene	EtOH	0,27	[6101, 6801, 7102]
390–500	9,10-Difenil antracene	Cicloesano	0,90; 0,95	[8301, 8302; 7701]
		EtOH	0,81; 0,88	[6101; 7701]
380–580	Chinina solfato <sup>e,h</sup>	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0,5 M	0,55; 0,54	[6101; 6801]
		H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0,05 M	0,53	[7702]
400–600	$\beta$ -Carbolina <sup>i</sup>	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0,5 M	0,60	[8501, 9901]
430–560	Perilene	EtOH	0,92	[7101]
		Benzene	0,89; 0,99	[6101; 6801]
480–650	Fluoresceina <sup>g,j</sup>	NaOH 0,1 M	0,92; 0,95	[8902; 7801]
550–700	Rodamina 101	EtOH	1,00	[8001]
550–700	Rodamina 6G	EtOH	0,94 <sup>e</sup>	[9601]
550–700	[Ru(bpy) <sub>3</sub> ] <sup>2+,k</sup>	H <sub>2</sub> O	0,042, 0,028 <sup>l</sup>	[8201]
		MeCN	0,059 <sup>m</sup>	[8202]
580–780	Violetto cresile <sup>n</sup>	MeOH	0,54 <sup>l</sup>	[7901]
600–850	[Os(bpy) <sub>3</sub> ] <sup>2+,k</sup>	MeCN	0,005	[8601]
600–900	[Os(phen) <sub>3</sub> ] <sup>2+,k</sup>	MeCN	0,021	[8601]

<sup>a</sup>Temperatura ambiente; valori assoluti o ottenuti usando standard di riferimento ben caratterizzati e affidabili; soluzioni deossigenate, se non indicato diversamente; <sup>b</sup>Per gli errori, vedere le singole referenze; <sup>c</sup>Valore non assoluto, ottenuto in soluzione aerata usando come standard naftalene in soluzione deossigenata; <sup>d</sup>Valore relativo, usando come standard sia chinina solfato che 9,10-difenilantracene; <sup>e</sup>Misurato col metodo della sfera di integrazione, usando come standard chinina solfato; <sup>f</sup>Soluzione aerata, con notevole spegnimento da parte dell'ossigeno [7102]; per altri commenti, vedere ref. [7101]; <sup>g</sup>Nessuno spegnimento da parte dell'ossigeno [7101]; <sup>h</sup>Sensibile allo spegnimento da parte degli alogeni, cosicché deve essere usato solo acido solforico del più elevato grado di purezza [8101]; <sup>i</sup>9H-Pirido[3,4-*b*]indolo; <sup>j</sup>Deossigenato gorgogliando azoto per evitare fotodegradazione [7101]; <sup>k</sup>Sebbene si tratti di emissione di fosforescenza da uno stato <sup>3</sup>MLCT, il suo tempo di vita relativamente corto (650 ns, H<sub>2</sub>O) rende questo composto più simile agli emettitori di fluorescenza; per questo motivo è incluso in questa tabella; <sup>l</sup>Soluzione aerata; <sup>m</sup>Per altri solventi polari, vedere ref. [8204]; <sup>n</sup>come sale perclorato.

Per facilitare la scelta in base alla zona spettrale e alla forma dello spettro, nelle Figure 4.16-4.18 sono riportati gli spettri di fluorescenza degli standard più usati.

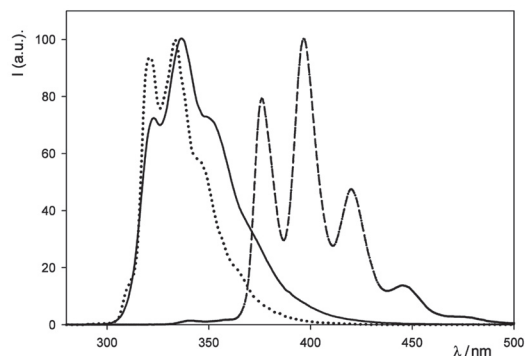


Figura 4.16 – Spettri di emissione non corretti (T ambiente) di standard di riferimento consigliati per l'intervallo di  $\lambda$  di emissione 300-500 nm: naftalene in cicloesano (.....); terfenile in cicloesano (—); antracene in etanolo (---).

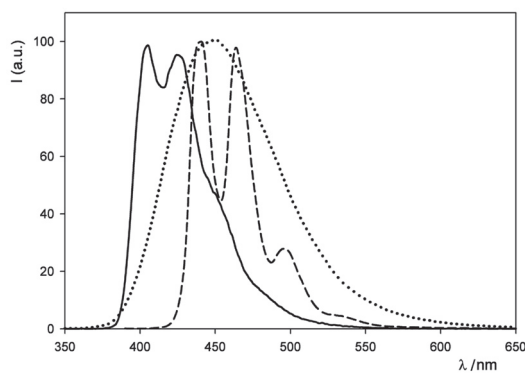


Figura 4.17 – Spettri di emissione non corretti (T ambiente) di standard di riferimento consigliati per l'intervallo di  $\lambda$  di emissione 350-650 nm: 9,10-difenilantracene in cicloesano (—); chinina solfato in  $H_2SO_4$  0.5 M (.....); perilene in cicloesano (---).

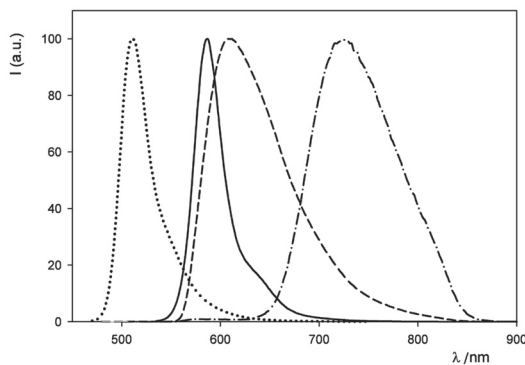


Figura 4.18 – Spettri di emissione non corretti (T ambiente) di standard di riferimento consigliati per l'intervallo di  $\lambda$  di emissione 450-900 nm: fluoresceina in NaOH 0.5 M (.....); rodamina 101 in etanolo (—);  $Ru(bpy)_3Cl_2$  in acqua (---);  $Os(bpy)_3(PF_6)_2$  in acetoneitrile (-.-.-).

#### 4.5.2 Standard per la determinazione dei rendimenti quantici di fosforescenza

Come detto all'inizio di questo capitolo, la fosforescenza è un'emissione dovuta ad una transizione radiativa spin-proibita da uno stato eccitato di molteplicità diversa rispetto allo stato fondamentale. In molti casi la fosforescenza è possibile osservarla a temperatura ambiente solo in matrici solide o a basse temperature (azoto liquido a 77 K o temperature più basse) in matrici congelate, condizioni in cui sono minimizzati i processi bimolecolari di spegnimento dello stato eccitato emittente a vita lunga. Le stesse raccomandazioni sui solventi date nel paragrafo precedente per la fluorescenza valgono anche per le misure della fosforescenza. Per una lista di solventi organici adatti a formare vetri trasparenti a 77 K, vedere [0601].

Nelle misure dei rendimenti quantici di fosforescenza si possono usare valori di assorbanza elevati ( $> 0,1$ ), poiché gli effetti di filtro interno sono generalmente trascurabili a causa del largo Stokes shift della banda di emissione. La Tabella 4-2 elenca alcuni standard secondari per la determinazione approssimata ( $\pm 15\%$ ) di rendimenti quantici di fosforescenza [8901, 0601].

Tabella 4-2 Standard di riferimento per la determinazione dei rendimenti quantici di fosforescenza.

Intervallo $\lambda_{em}$ (nm)	Composto	Solvente	$\Phi^f$	Referenze
340–450	Benzene <sup>b</sup>	EPA <sup>c</sup>	0,23; 0,18	[5201, 5501; 7201]
400–550	Benzofenone <sup>b</sup>	EPA Freon 113 (298 K)	0,74 ~0,01	[5201, 5501, 7001] [7802]
400–550	Xantone <sup>b</sup>	EtOH-etere	0,44	[7001]
460–560	Naftalene <sup>b</sup>	EPA	0,04	[7201]
500–650	Biacetile <sup>b</sup>	esano	~0,05 <sup>d</sup>	[7802]
1062	Tris(1,1,1,5,5,5- esafluoroacetilaceto- nato)neodimio(III)	THF- <i>d</i> <sub>8</sub>	0,003 <sup>d</sup>	[0001]

<sup>a</sup> Valori a 77 K, salvo diversa indicazione. <sup>b</sup> Standard consigliati nella referenza [8901]. <sup>c</sup> Etanolo/isopentano/etere (2:5:5). <sup>d</sup> 298 K.

## 4.6 MISURE DI LUMINESCENZA SU SOLIDI

### 4.6.1 Introduzione

Le misure di luminescenza su campioni solidi, nonostante non differiscano di molto da quelle in soluzione, possono essere complicate da una serie di fattori legati alla disomogeneità e all'opacità del materiale o all'alta concentrazione di molecole fluorescenti. In

generale è molto frequente registrare segnali molto intensi non dovuti alla luminescenza del campione, per cui l'interpretazione degli spettri di luminescenza di campioni solidi è sempre molto critica.

#### 4.6.2 Configurazione front-face o right-angle

Come visto in precedenza, la configurazione a  $90^\circ$  (right-angle) (Figura 4.6b) fra il raggio di eccitazione ed il sistema di rilevazione (monocromatore e rivelatore) è quella più diffusa e conveniente per le misure di fluorescenza in soluzioni diluite. Nel caso di campioni che presentino una elevata assorbanza od una grande opacità questa configurazione risulta però inefficiente, in quanto la parte del campione che viene osservata dallo strumento non è in realtà eccitata in maniera significativa. Si preferisce quindi una configurazione in cui l'angolo fra il raggio di eccitazione e la direzione di rilevazione è inferiore ai  $90^\circ$ , configurazione che viene detta front-face (Figura 4.6c). Si utilizzano spesso angoli di  $45^\circ$  o  $37^\circ$ , anche se è in genere preferibile disporre di portacampioni ad angolo variabile, in modo da consentire di ottimizzare il segnale di luminescenza cercando di minimizzare i segnali parassiti. Il principale disturbo nelle misure di luminescenza su solidi deriva da fenomeni di scattering della luce di eccitazione; anche utilizzando bande passanti piuttosto strette, infatti, i monocromatori non riescono a fornire luce realmente monocromatica. La presenza di luce diffusa alla stessa lunghezza d'onda della fluorescenza in esame può quindi diventare significativa in condizioni in cui lo scattering da parte del campione porti tale radiazione a raggiungere il rivelatore. Un disturbo di questo tipo può essere ridotto utilizzando sorgenti laser per una eccitazione estremamente monocromatica. I campioni vengono normalmente preparati in forma di film su apposito supporto (es. vetro), lastrine o polvere, anche se è possibile, utilizzando opportuni accessori (in particolare fibre ottiche) e configurazioni strumentali opportune, misurare la luminescenza di qualunque oggetto. L'utilizzo di una configurazione front face e la scarsa trasparenza spesso comporta che le misure di luminescenza su solidi coinvolgano solo la parte più esterna del campione per una profondità normalmente dell'ordine dei micrometri. Trattandosi pertanto di misure "superficiali" anche nel caso di campioni in polvere si cerca di distribuire i granuli in modo da ottenere una dispersione omogenea con spessore sottile su un supporto trasparente come vetro o quarzo utilizzando, se necessario, un mezzo disperdente inerte come l'olio minerale.

#### 4.6.3 Disomogeneità del campione

Nel caso di campioni fortemente disomogenei si possono misurare segnali molto diversi in funzione della posizione del campione. Il segnale misurato è infatti quello che proviene dalla parte di campione risultante dalla intersezione della superficie eccitata e quella osservata dal rivelatore. Se questa area di intersezione è piccola, il sistema di misura sarà estremamente sensibile al posizionamento del campione e in grado anche di discriminare una distribuzione disomogenea della fluorescenza del campione; questo ovviamente se è possibile controllare la posizione del campione in modo sufficientemente accurato. L'intensità di luminescenza misurata è, infatti, in generale fortemente dipendente dalla posizione del campione per ragioni puramente geometriche.

#### 4.6.4 Effetto della concentrazione

Confrontando le proprietà di un fluoroforo allo stato solido o disperso in un solido con quelle dello stesso in soluzione si osservano spesso differenze di grossa entità. Una ragione molto comune è dovuta al fatto che molte molecole che in soluzione sono luminescenti lo sono solo debolmente quando si aggregano. Questo fenomeno che si verifica anche in piccoli aggregati o dimeri è noto come autospegnimento ed è comune a moltissimi fluorofori organici. I processi di autospegnimento sono in ogni caso dipendenti dalla concentrazione e dipendono dal tipo di aggregazione.

#### BIBLIOGRAFIA

- [5201] Gilmore, E.H.; Gibson, G.E.; McClure, D.S. *J. Chem. Phys.* **1952**, *20*, 829-836.
- [5501] Gilmore, E.H.; Gibson, G.E.; McClure, D.S. *J. Chem. Phys.* **1955**, *23*, 399-399.
- [6101] Melhuish, W.H. *J. Phys. Chem.* **1961**, *65*, 229-235.
- [6601] Parker, C.A.; Joyce, T.A. *Trans. Faraday Soc.* **1966**, *62*, 2785-2792.
- [6701] Chen, R.F. *Anal. Lett.* **1967**, *1*, 35-42.
- [6801] Dawson, W.R.; Windsor, M.W. *J. Phys. Chem.* **1968**, *72*, 3251-3260.
- [6802] Rusakowicz, R.; Testa, A.C. *J. Phys. Chem.* **1968**, *72*, 2680-2681.
- [7001] Hunter, T.F. *Trans. Faraday Soc.* **1970**, *66*, 300-309.
- [7101] Demas, J.N.; Crosby, G.A. *J. Phys. Chem.* **1971**, *75*, 991-1024.
- [7102] Berlman, I.B. *Handbook of Fluorescence Spectra of Aromatic Molecules*; Academic Press: New York (NY), 2<sup>nd</sup> Ed., 1971.
- [7201] Li, R.; Lim, E.C. *J. Chem. Phys.* **1972**, *57*, 605-612.
- [7701] Mardelli, M.; Olmsted, J. III *J. Photochem.* **1977**, *7*, 277-285.
- [7702] Adams, M.J.; Highfield, J.G.; Kirkbright, G.F. *Anal. Chem.* **1977**, *49*, 1850-1852.
- [7801] Brannon, J.H.; Magde, D. *J. Phys. Chem.* **1978**, *82*, 705-709.
- [7802] Turro, N.J. (ed.) *Modern Molecular Photochemistry*; Benjamin: Menlo Park, 1978, p. 117-118.
- [7901] Magde, D.; Brannon, J.H.; Cremers, T.L.; Olmsted, J. III *J. Phys. Chem.* **1979**, *83*, 696-699.
- [8001] Karstens, T.; Kobs, K. *J. Phys. Chem.* **1980**, *84*, 1871-1872
- [8101] Miller, J.N. (ed.) *Standards in Fluorescence Spectrometry*; Chapman & Hall: London, 1981.
- [8201] Nakamaru, K. *Bull. Chem. Soc. Japan* **1982**, *55*, 2697-2705.
- [8202] Nakamaru, K. *Bull. Chem. Soc. Japan* **1982**, *55*, 1639-1640.
- [8301] Meech, S.R.; Phillips, D. *J. Photochem.* **1983**, *23*, 193-217.
- [8302] Hamai, S.; Hirayama, F. *J. Phys. Chem.* **1983**, *87*, 83-89.
- [8501] Ghiggino, K.P.; Skilton, P.F.; Thistlethwaite, P.J. *J. Photochem.* **1985**, *31*, 113-121.
- [8601] Kober, E.M.; Caspar, J.V.; Lumpkin, R.S.; Meyer, T.J. *J. Phys. Chem.* **1986**, *90*, 3722-3734.

- [8801] Eaton, D.F. *Pure Appl. Chem.* **1988**, *60*, 1107-1114.
- [8901] Scaiano, J.C. (ed.) *Handbook of Organic Photochemistry*; CRC Press: Boca Raton, 1989, vol. I.
- [8902] Shen, J.; Snook, R.D. *Chem. Phys. Lett.* **1989**, *155*, 583-586.
- [9401] Hofstraat, J.W.; Latuhihin, M.J. *Appl. Spectrosc.* **1994**, *48*, 436-447.
- [9601] Fischer, M.; Georges, J. *Chem. Phys. Lett.* **1996**, *260*, 115-118.
- [9901] Lakowicz, J.R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy, 2nd Ed.*; Kluwer: New York, 1999, 698 p.
- [0001] Iwamuro, M.; Wada, Y.; Kitamura, T.; Nakashima, N.; Yaganida, S. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2000**, *2*, 2291-2296.
- [0301] a) Biagini, M. *Tesi di Diploma*; Dip. di Chimica, Università di Bologna, 2003; b) Credi A., Dip. di Chimica, Università di Bologna, comunicazione privata.
- [0601] Montalti, M; Credi, A.; Prodi, L.; Gandolfi, M.T. *Handbook of Photochemistry, 3rd Ed.*; CRC: Boca Raton, 2006.