

### Esercitazione 4: FLUORIMETRIA

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

Molecola analizzata: **Chinino**: Sostanza naturale fluorescente con una resa quantica elevata ( $\Phi = 0,55$ ) con proprietà antipiretiche, analgesiche ed antimalariche. Presente in diverse bevande (acqua di acqua tonica o brillante, cui conferisce 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
- Soluzione di NaCl 5M in acqua
- Provette di tipo eppendorf da 1,5 ml e 2 ml
- Pipette da 20, 200, e 1000  $\mu\text{l}$
- 1 ml di campione di bevanda contenente chinino in quantità da determinare
- Cuvette per misure di fluorescenza (4 facce ottiche) ed assorbimento (2 facce ottiche)

#### Trovare la regione dello spettro UV-vis in cui il chinino emette fluorescenza e misurala

- 1 Analizzare 1 ml della soluzione madre di chinino a disposizione (100  $\mu\text{g/ml}$  in 50 mM  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) allo spettrofotometro **in cuvette da assorbanza** per identificare una lunghezza d'onda di forte assorbanza del chinino ( $\lambda_{\text{ex}}$ ), facendo uno spettro di assorbimento tra 280 nm e 650 nm.
- 2 Sulla base del picco di assorbanza ricavare la ( $\lambda_{\text{em}}$ ) del chinino sapendo che presenta uno spostamento di Stokes di circa 100 nm.
- 3 Scegliere tra i filtri a disposizione (tabella a lato) associati al fluorimetro quello più adatto a rilevarne la fluorescenza.
- 4 Determinare il valore di fluorescenza (espressa in FSU, Fluorescence Standard Unit) **in cuvette da fluorescenza** di 2 ml della stessa soluzione di chinino (100  $\mu\text{g/ml}$  in 50 mM  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) e del 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 Preparare una diluizione seriale di NaCl in acqua da usare per valutare gli effetti dell'NaCl. Partendo dalla soluzione a disposizione 5 M NaCl, preparare 500  $\mu\text{L}$  (volume finale) di NaCl 0,5 M e 0,05 M.
- 6 Preparare i campioni di bibita da analizzare secondo lo schema sottostante, in modo che il volume finale di ogni campione sia 2 ml.

| Campione | V bibita | H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> | Volumi aggiuntivi                 | V finale | Tipo di campione                   |
|----------|----------|--------------------------------|-----------------------------------|----------|------------------------------------|
| Bianco   | -        | 2ml                            | -                                 | 2ml      | Bianco                             |
| c1       | 0,2 ml   | 1,8 mL                         | -                                 | 2 ml     | Campione bibita                    |
| c2       | 0,2 ml   | 1,75 mL                        | 50 $\mu\text{L}$ H <sub>2</sub> O | 2 ml     | Campione bibita con acqua          |
| c3       | 0,2 ml   | 1,75 mL                        | 50 $\mu\text{L}$ NaCl 50 mM       | 2 ml     | Valutazione effetto sale su bibita |
| c4       | 0,2 ml   | 1,75 mL                        | 50 $\mu\text{L}$ NaCl 0,5 M       | 2 ml     | Valutazione effetto sale su bibita |
| c5       | 0,2 ml   | 1,75 mL                        | 50 $\mu\text{L}$ NaCl 5 M         | 2 ml     | Valutazione effetto sale su bibita |

- 7 Preparare una serie di diluizioni seriali decimali della soluzione di chinino 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  (soluzione madre) in 50 mM H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, in modo da ottenere soluzioni da 2 ml ciascuna alla concentrazione finale di 10, 1, 0,1 0,01 0,001  $\mu\text{g}/\text{ml}$  (ricordarsi di numerare le provette, es d1, d2, etc ). NB! Mescolare ad ogni passaggio!
- 8 Misurare la fluorescenza dei campioni C1-C5 utilizzando la  $\lambda_{\text{em}}$  determinata in precedenza, usando la soluzione di H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 50 mM come bianco.
- 9 Misurare la fluorescenza dei campioni d1-d6 utilizzando la  $\lambda_{\text{em}}$  determinata in precedenza.
- 10 Costruire la retta di calibrazione (con file excel) con i risultati dei campioni **d1-d5** riportando sugli assi il logaritmo in base 10 dell'intensità di emissione di fluorescenza (in unità arbitrarie, u. a.) in funzione del logaritmo in base 10 della concentrazione. NB! Valutare se aggiungere anche il valore della soluzione concentrata misurata al punto 4.
- 11 Utilizzando la retta di calibrazione **determinare la concentrazione di chinino** ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) presente nel campione **c1**. Attenzione! Per ottenere poi la concentrazione di chinino **nella bevanda**, moltiplicare i valori ottenuti per il fattore di diluizione applicato per effettuare le misure.
- 12 **Osservare 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%). Calcolare l'eventuale influenza in % rispetto al controllo senza NaCl.  
Misurare anche l'assorbanza dei campioni c1-c5 alla  $\lambda$  trovata al punto 1 e determinare se la presenza del sale causa una variazione anche dei valori di assorbanza o se è specifica per la fluorescenza.
- 13 Per visualizzare direttamente la fluorescenza illuminare tutti i campioni con una lampada UV a lunghezza d'onda opportuna (attenzione! proteggere parti esposte: viso, mani e soprattutto occhi tramite schermi idonei). Ciò permette di vedere la luce di fluorescenza e stimarne grossolanamente la quantità.