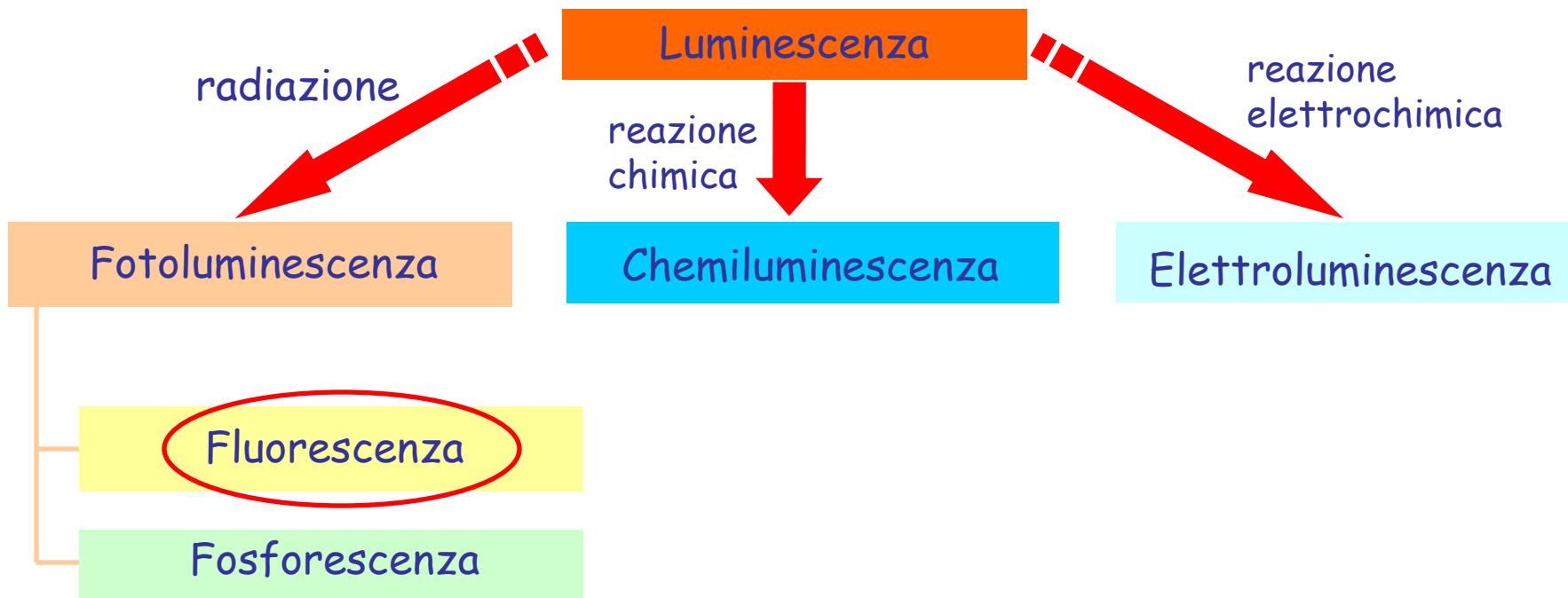


Spettroscopie di luminescenza

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



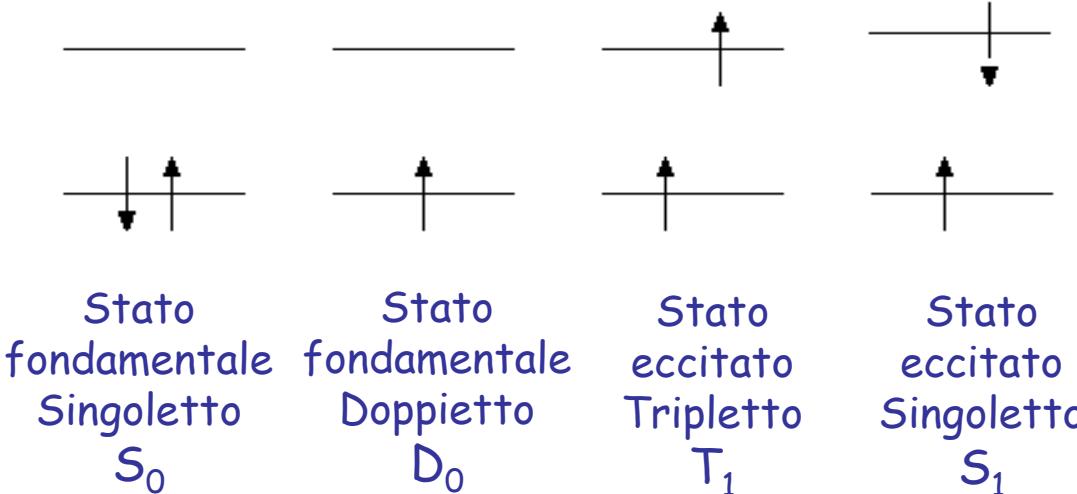
Aspetti del fenomeno della luminescenza

Molteplicità di spin

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

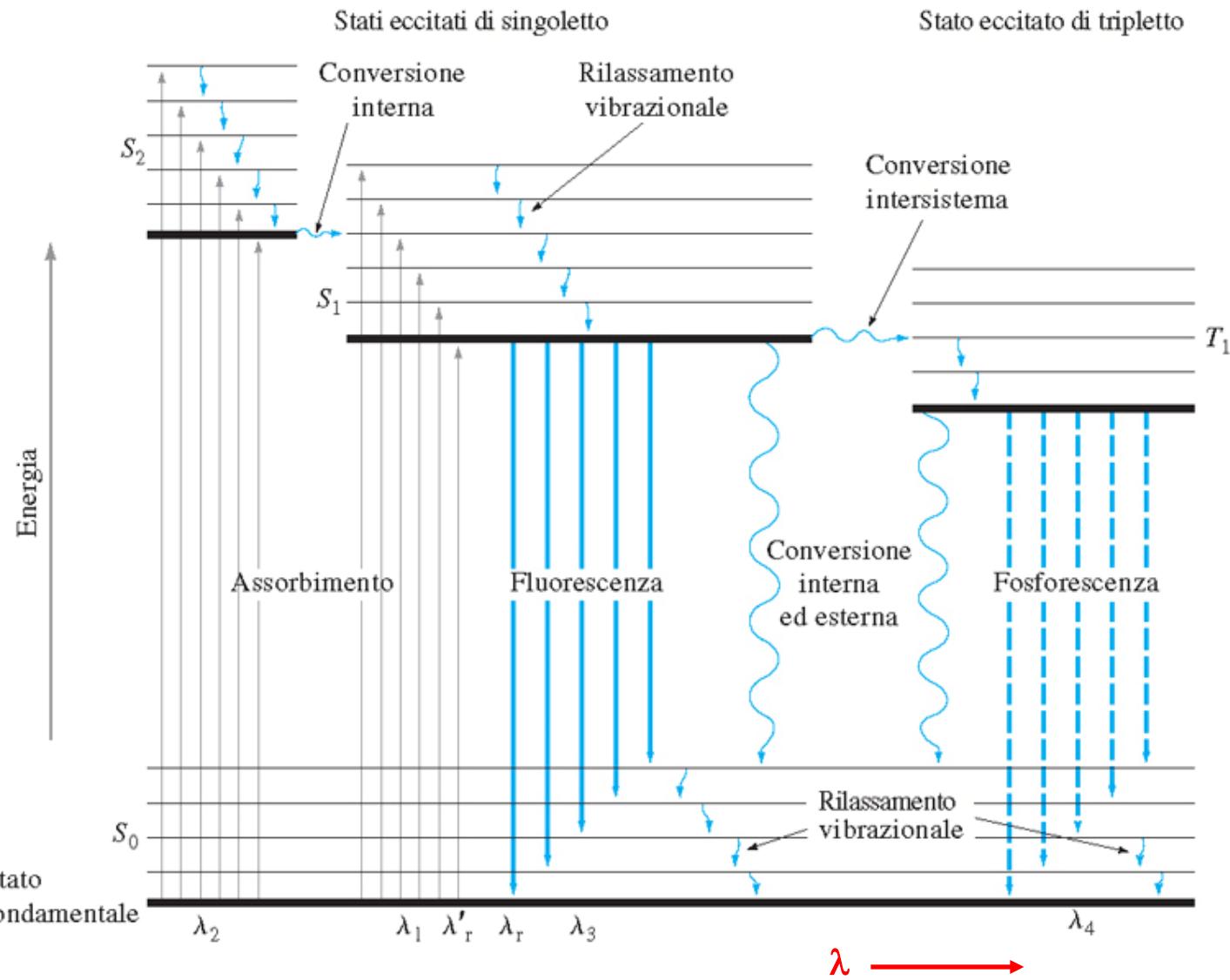
$$2S + 1, \text{ dove } S = \sum_{i=1}^n s_i,$$

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

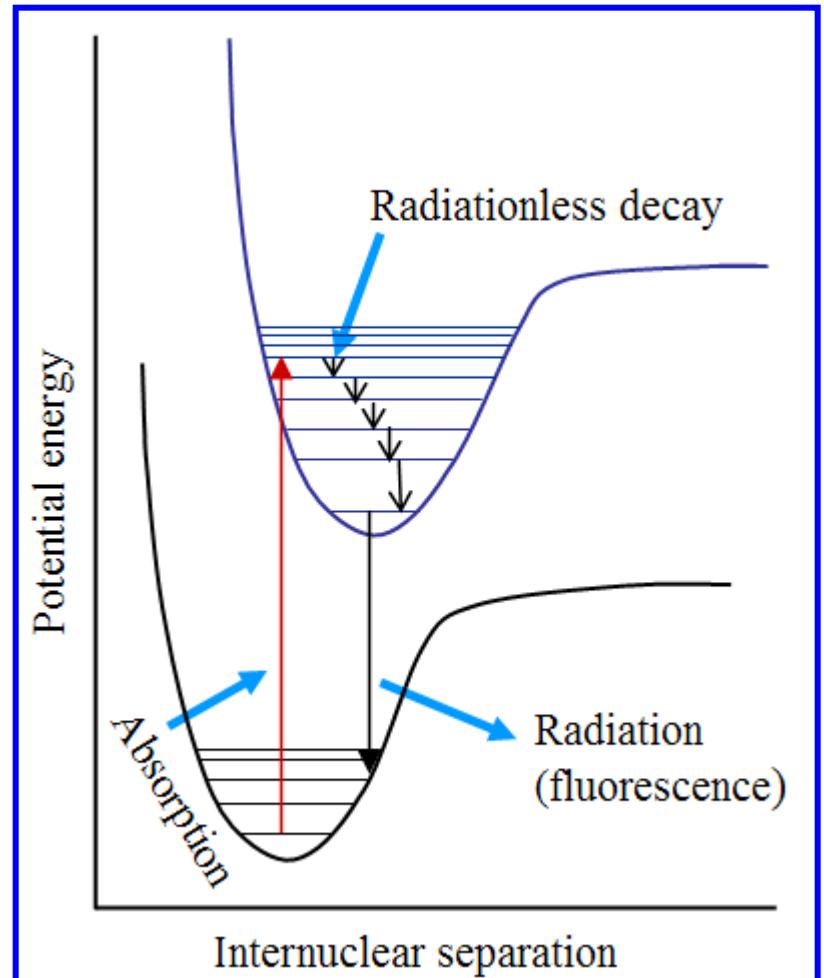


Lo stato T_1 ha energia inferiore a quella dello stato S_1 .

Diagramma di Jablonski



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



Assorbimento della radiazione di eccitazione:

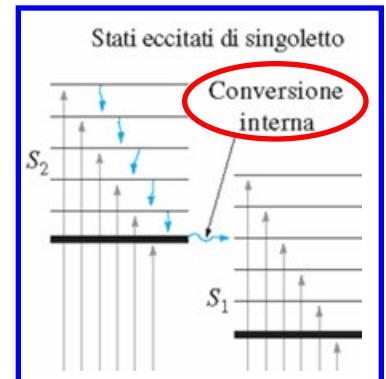
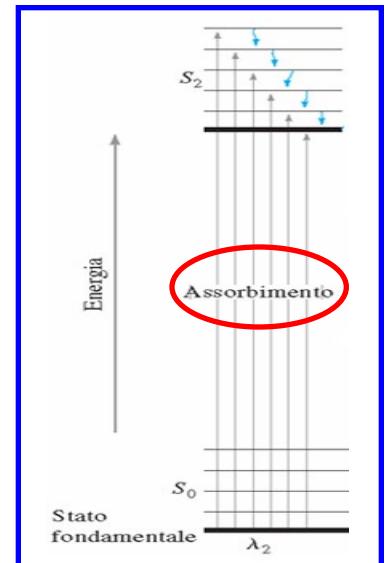
avviene in tempi dell'ordine di $10^{-15} - 10^{-13}$ s e porta il sistema ad uno degli stati vibrazionali associati al livello elettronico eccitato della molecola, con maggiore probabilità per quello con configurazione dei nuclei più simile a quella dello stato fondamentale (**Principio di Franck-Condon**);

Rilassamento vibazionale:

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

Conversione interna:

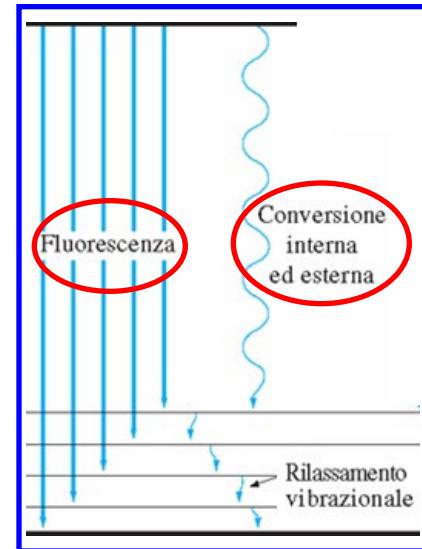
è la transizione dallo stato vibazionale fondamentale, associato ad un livello elettronico superiore, verso uno stato vibazionale eccitato associato ad un livello elettronico di energia inferiore, un processo che precede la fluorescenza, con tempistiche dell'ordine di $10^{-11} - 10^{-9}$ s;



Fluorescenza:

è l'emissione di radiazione (in tempi dell'ordine di 10^{-10} - 10^{-7} s), di solito ad una lunghezza d'onda **maggior**e di quella di eccitazione (*Stokes shift*).

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

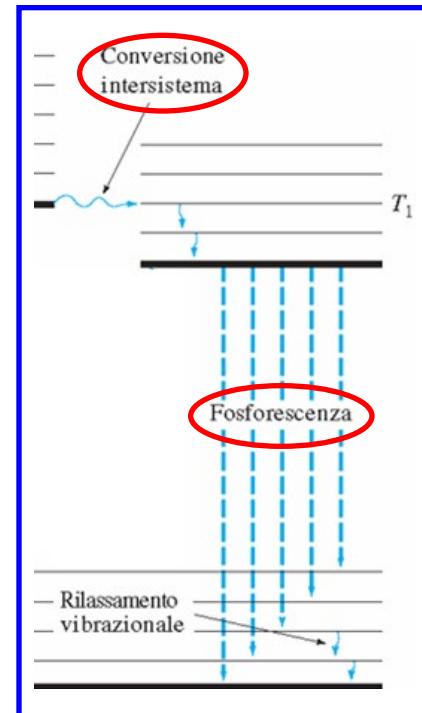


Conversione esterna:

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 (formalmente si tratta di una transizione "proibita");



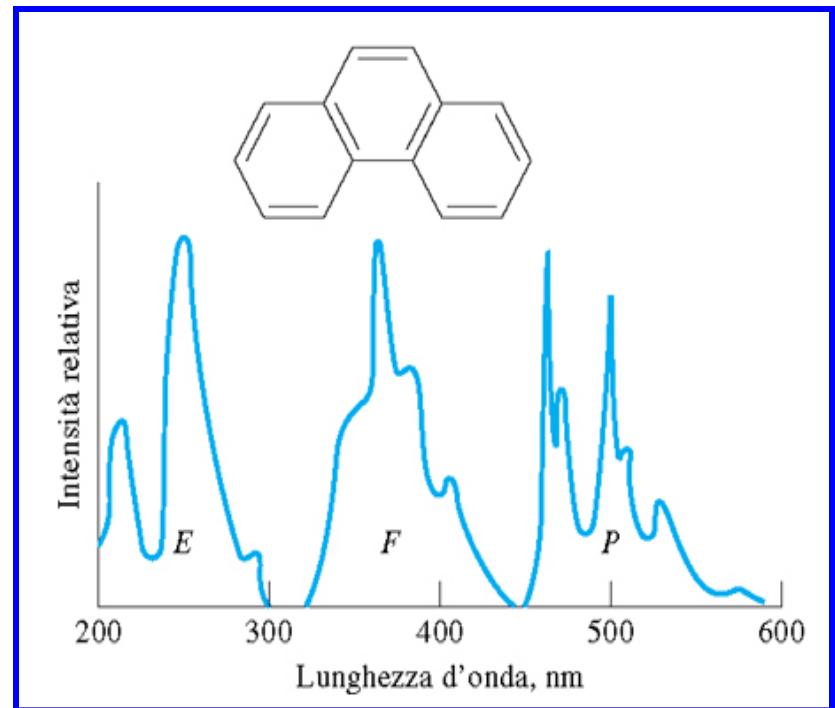
Predissociazione: si verifica quando la conversione interna porta la molecola ad un livello vibrazionale (di uno stato elettronico inferiore) di energia tale da causare la rottura di un legame;

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

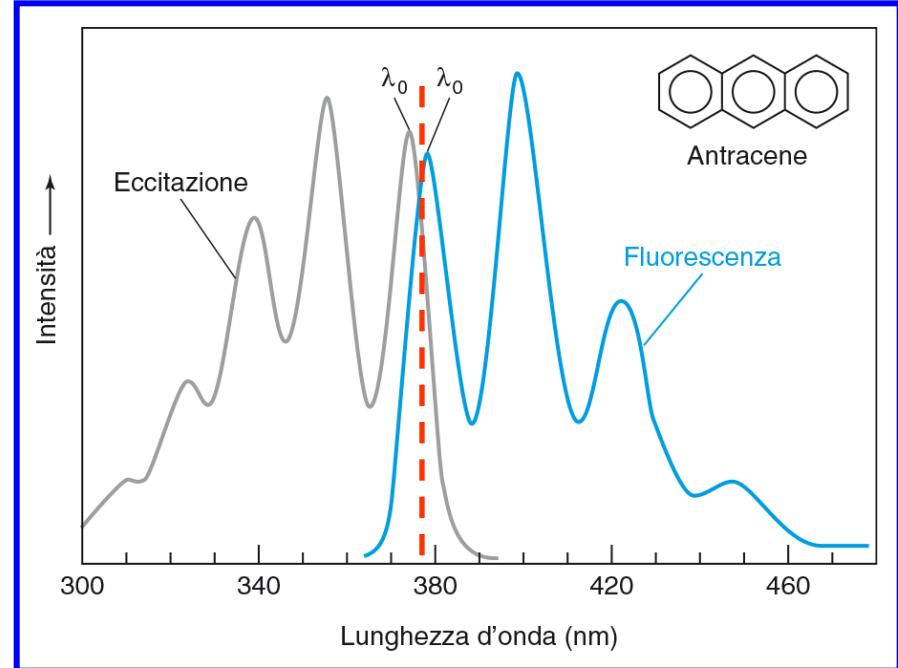
Spettri di eccitazione (E):

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.

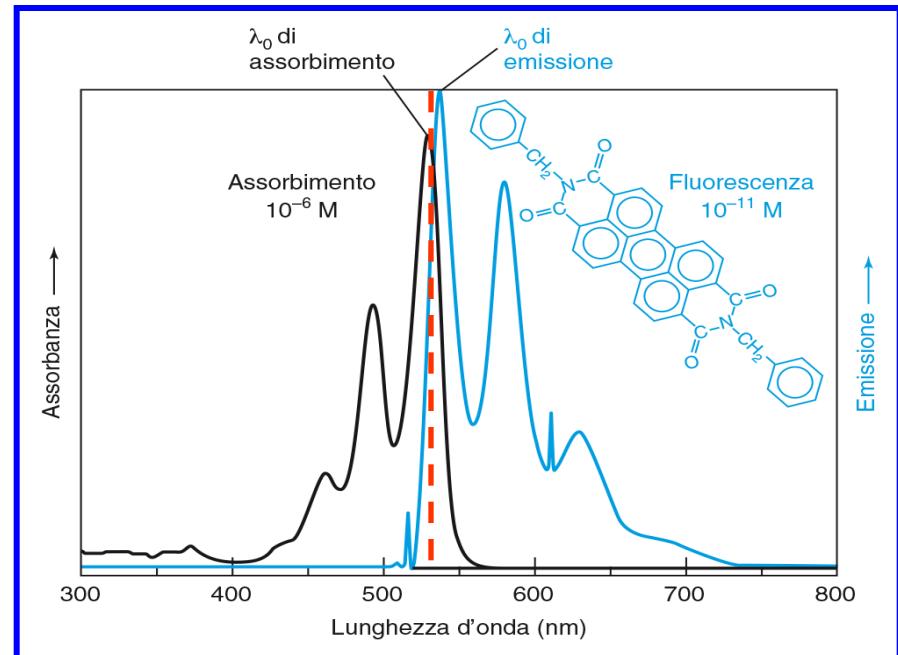
Spettri di emissione (fluorescenza F e fosforescenza P): vengono registrati eccitando il sistema ad una particolare lunghezza d'onda e misurando l'intensità di luminescenza in funzione della lunghezza d'onda;



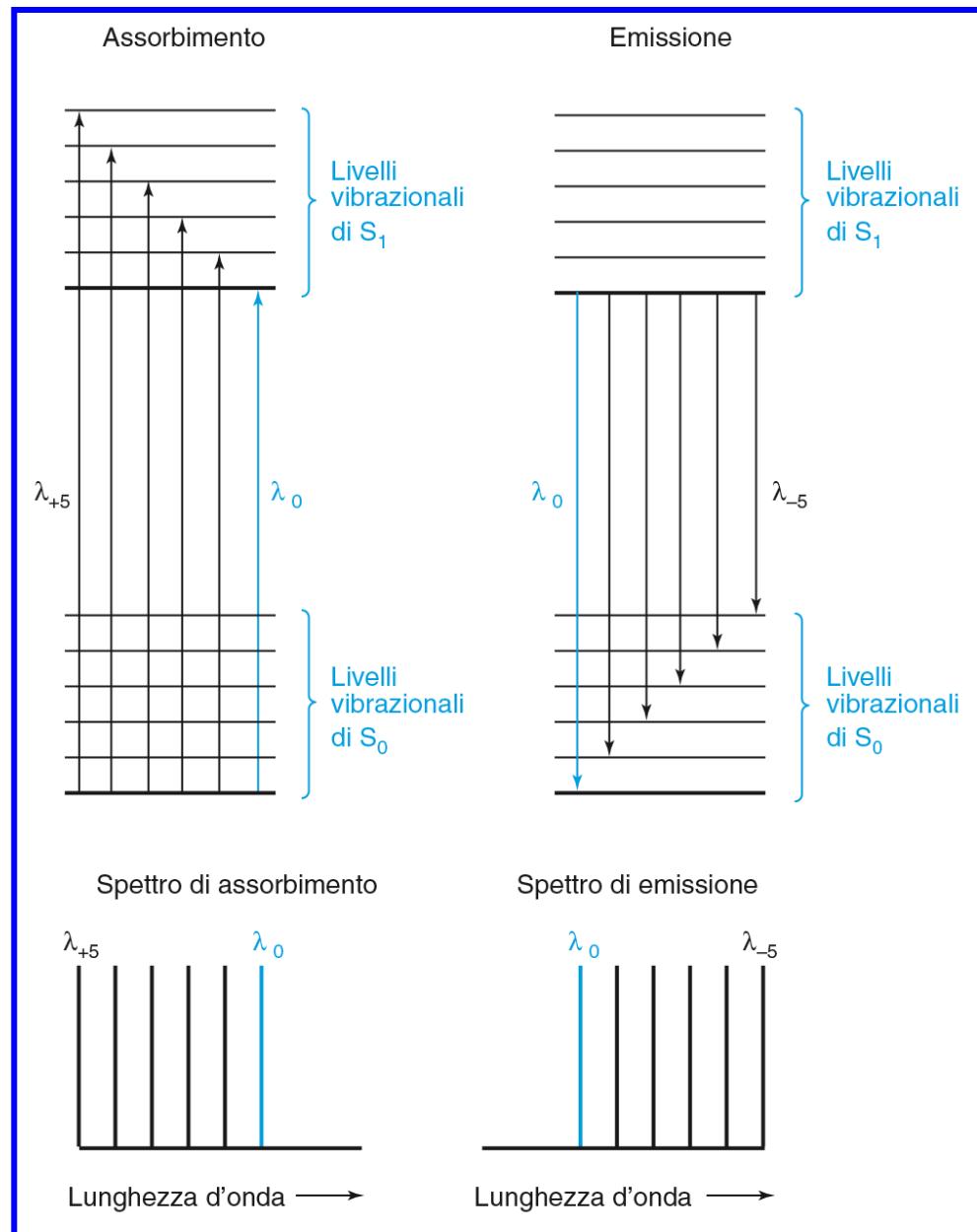
Nei casi in cui anche la struttura vibrazionale sia visibile (ad esempio quando si opera in solventi poco polari o non polari) lo spettro di fluorescenza e quello di eccitazione (a sua volta pressoché identico a quello di assorbimento) possono apparire quasi simmetrici rispetto ad un asse verticale.



Questo è particolarmente evidente nel caso di molecole aventi una struttura planare e caratterizzate da un'elevata coniugazione, quali, ad esempio, l'antracene e il bis-(benzilimmido)-perilene.



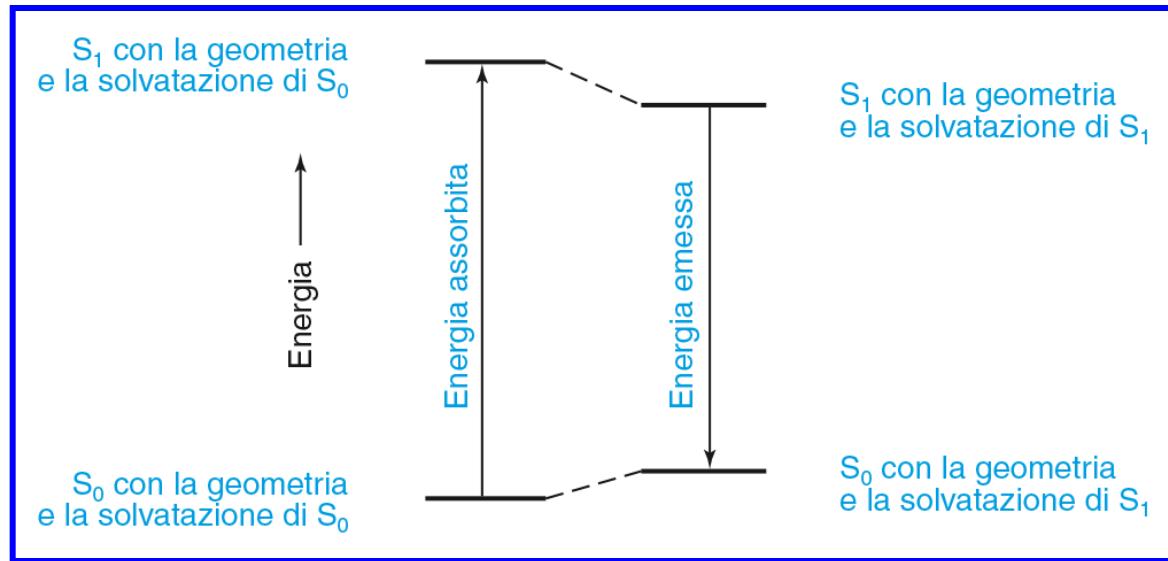
L'effetto è tanto più evidente quanto più le differenze di energia fra livelli vibrazionali contigui (associati ai livelli elettronici coinvolti nell'eccitazione e nell'emissione) e le probabilità di transizione sono paragonabili:



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 (λ_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 Φ_f .

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

fluorescenza

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

fosforescenza

Con K si indicano le **costanti di velocità** (ossia il numero di processi per unità di tempo) dei processi di:

f = fluorescenza; ci = conversione interna; isc = 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

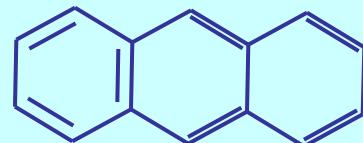
$\sigma \rightarrow \sigma^*$: portano di solito alla dissociazione della molecola e quindi non generano fluorescenza;

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

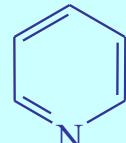
Struttura molecolare

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.



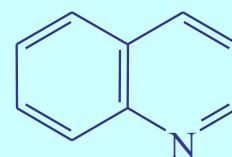
anthracene



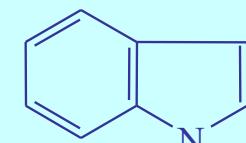
piridina



pirrolo



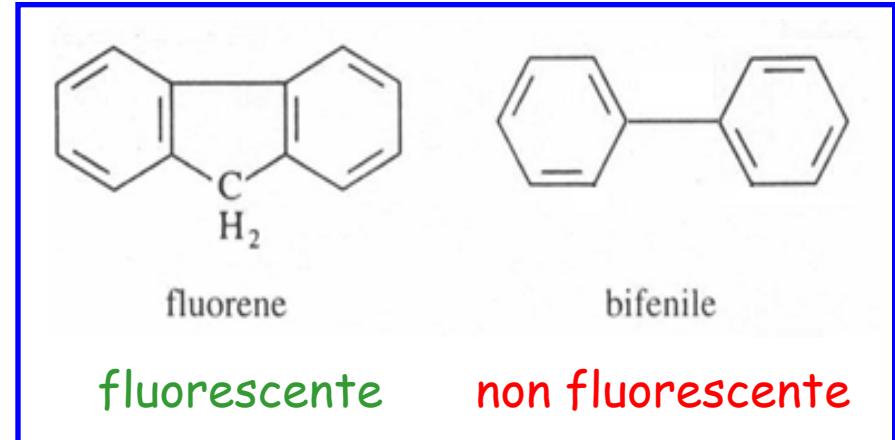
chinolina



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:

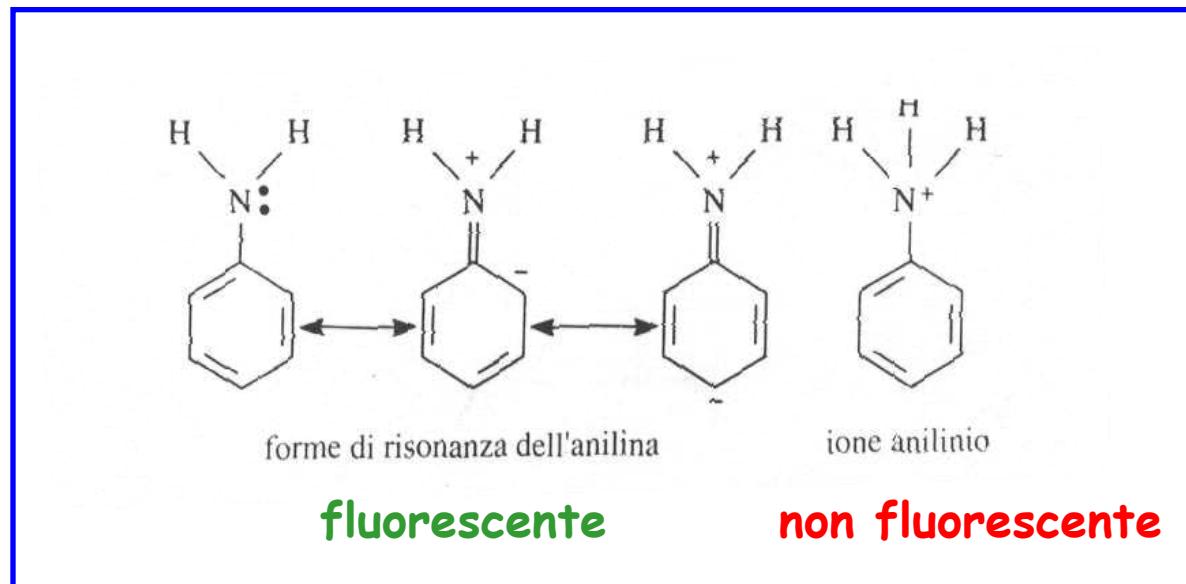
Composto	Formula	λ_{fluor} / nm	Int. rel. fluorescenza
Fluorobenzene	C_6H_5F	270-320	10
Clorobenzene	C_6H_5Cl	275-345	7
Bromobenzene	C_6H_5Br	290-380	5
Iodobenzene	C_6H_5I	-----	0

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 dissolto 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



Fluorescenza di composti aromatici

La tabella a lato evidenzia quanto il sostituente presente sull'anello benzenico possa influenzare l'intensità relativa di fluorescenza.

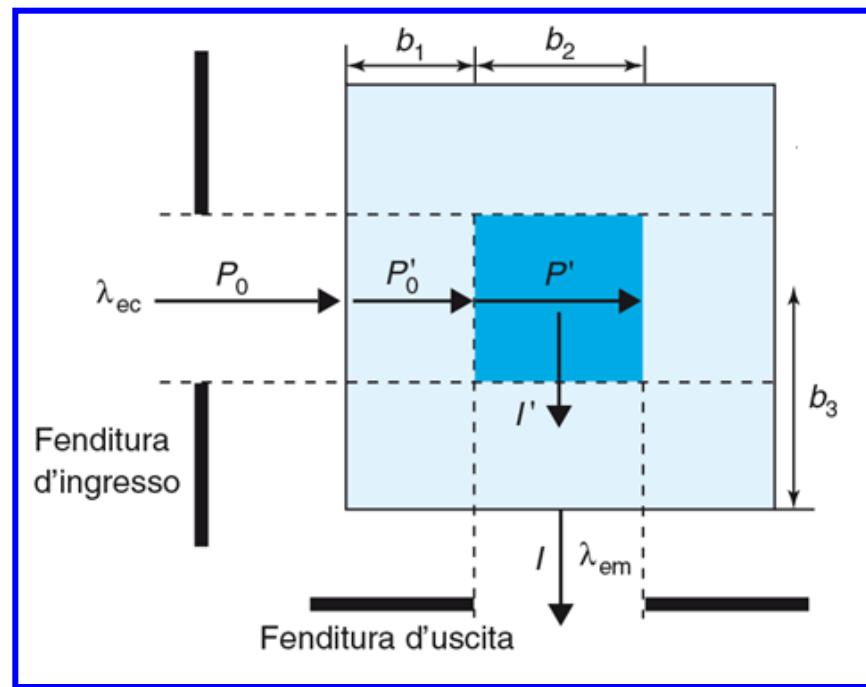
La tabella ripropone anche l'effetto della sostituzione sull'anello aromatico da parte di un atomo di alogeno e quello della protonazione del gruppo amminico primario nel caso dell'anilina.

Compound	Relative Intensity of Fluorescence
Benzene	10
Toluene	17
Propylbenzene	17
Fluorobenzene	10
Chlorobenzene	7
Bromobenzene	5
Iodobenzene	0
Phenol	18
Phenolate ion	10
Anisole	20
Aniline	20
Anilinium ion	0
Benzoic acid	3
Benzonitrile	20
Nitrobenzene	0

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.

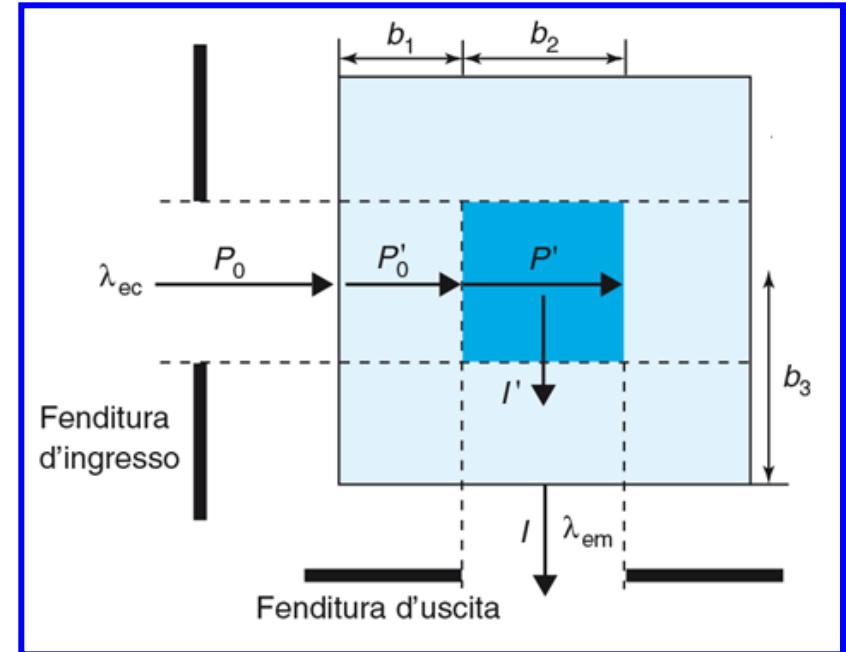
Nel caso più generale, ossia ipotizzando di raccogliere la radiazione emessa ad un angolo di 90° rispetto a quella di eccitazione, si può descrivere il fenomeno immaginando che le fenditure di ingresso e di uscita nel modello abbiano sezione quadrata e quindi che individuino un cubo al centro della cuvetta 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 ε_{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, ϵ_{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:

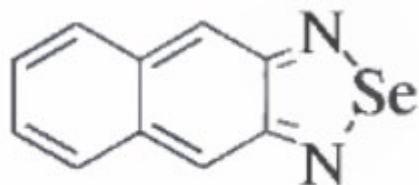
$$I = k' P_0 \varepsilon_{ex} b_2 c \ln 10 = k' P_0 2.303 \varepsilon_{ex} b_2 c$$

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.

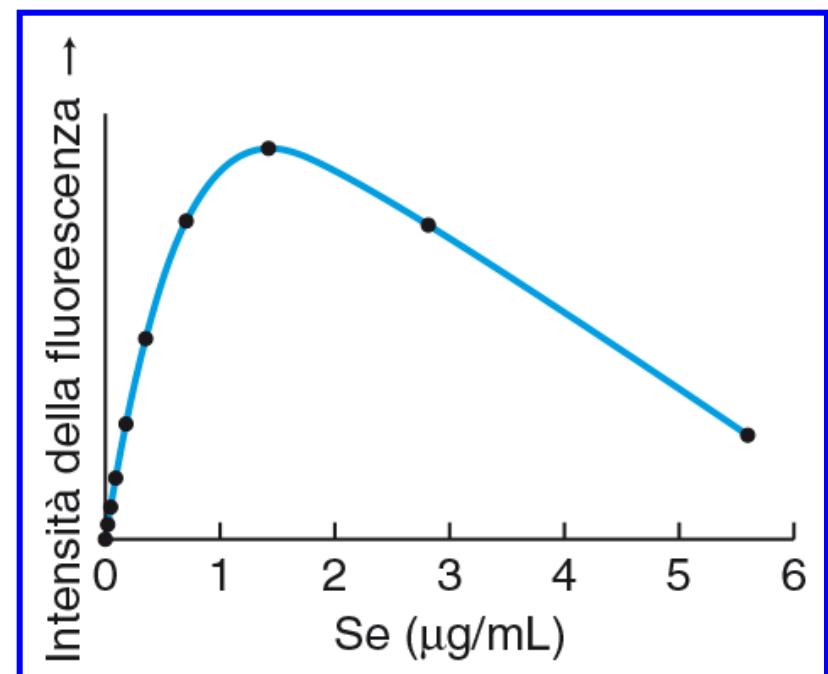
Superato un certo limite di concentrazione entra in gioco l'**autoassorbimento**, ossia l'assorbimento della radiazione emessa (**secondario**).

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.

A titolo di esempio, la figura a lato mostra come evolve con la concentrazione l'intensità di fluorescenza del complesso:



impiegato per rivelare il selenio contenuto nelle nocciole.

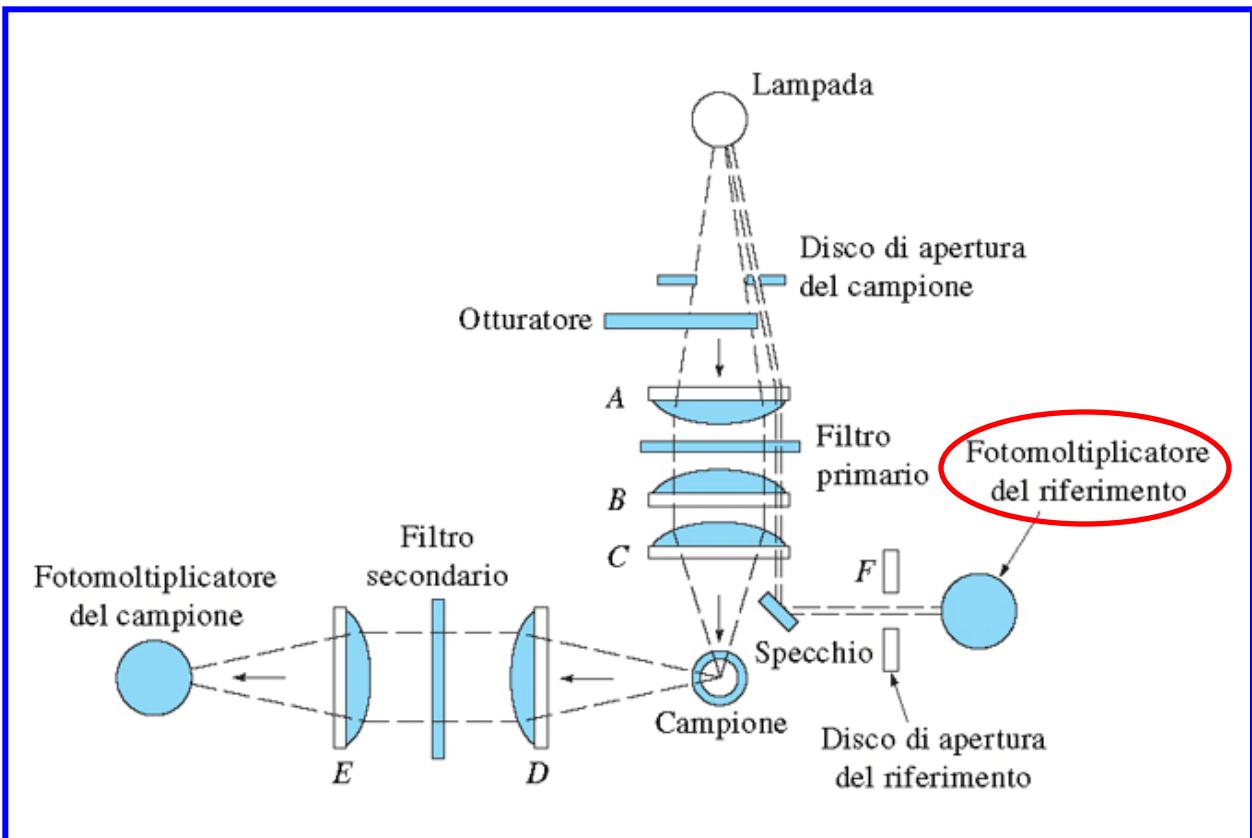


Strumentazione per la spettroscopia di fluorescenza

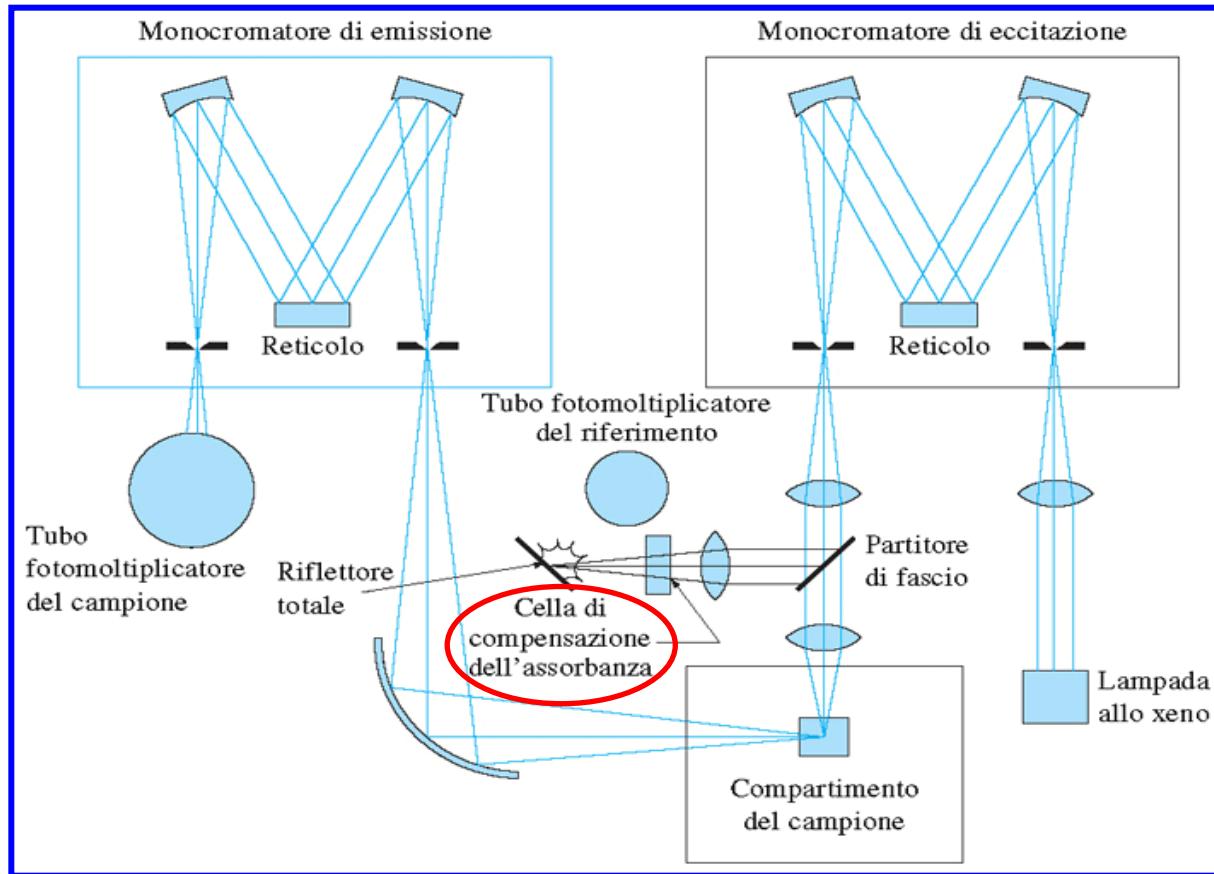
Anche in questo caso esiste una classificazione fra strumenti che lavorano a lunghezze d'onda fissate (**fluorimetri**) e strumenti in grado di registrare spettri (**spettrofluorimetri**).

Fluorimetri

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

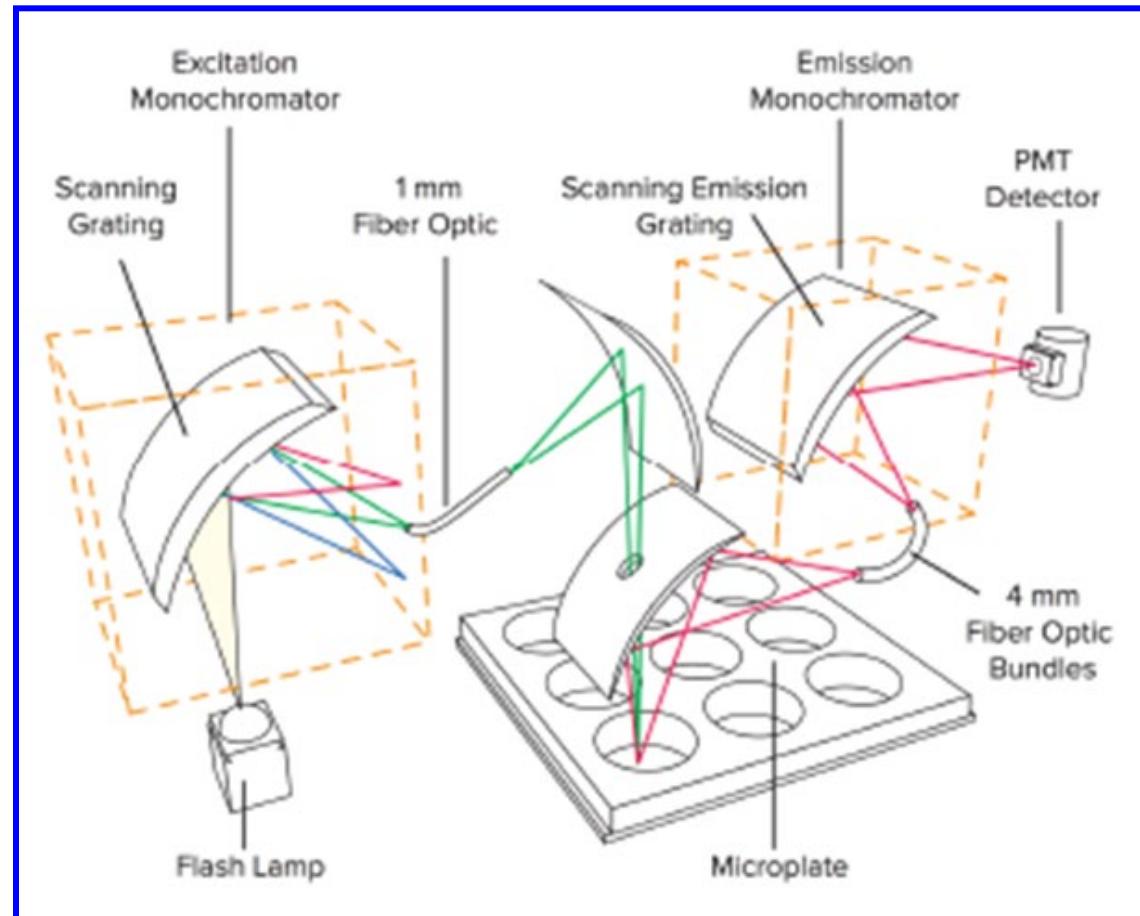


Spettrofluorimetri



La **cella di compensazione dell'assorbimento** 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.

In questo speciale tipo di spettrofluorimetro, adibito a lettore di fluorescenza da micropiastre, un monocromatore concavo seleziona una specifica lunghezza d'onda di eccitazione. Si noti che il fascio di luce policromatica in arrivo dalla sorgente pulsata (flash lamp) non è collimato, in questo caso, e, analogamente, i fasci di luce alle varie lunghezze d'onda in uscita dal monocromatore non sono collimati ma convergenti.



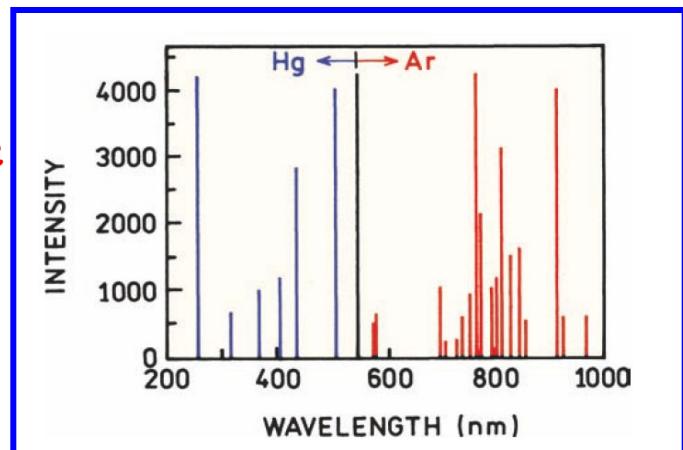
Uno specifico fascio di radiazione di eccitazione viene convogliato da una fibra ottica verso uno specchio e da questo inviato su un particolare pozzetto della micropiastra. La radiazione di fluorescenza (policromatica) emessa dal pozzetto viene raccolta da un'altra fibra ottica e da essa inviata verso un ulteriore monocromatore concavo, per la selezione della radiazione di emissione ad una particolare lunghezza d'onda, successivamente rivelata da un PMT.

Differenze fondamentali rispetto alle misure di assorbimento

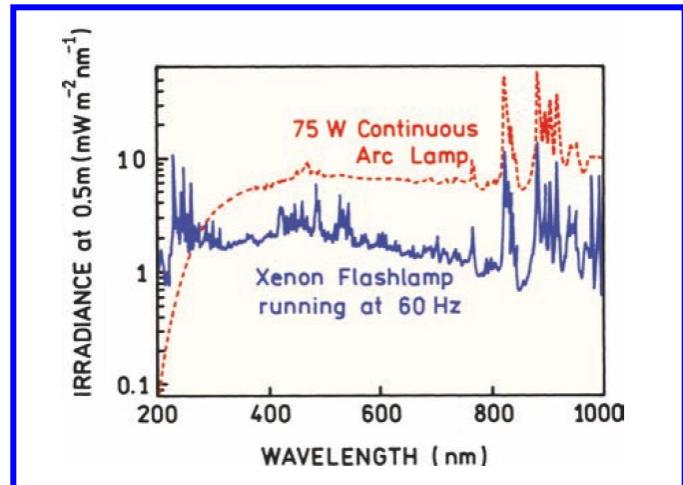
Sorgenti

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 o di mercurio/argon a bassa pressione (spettro a righe) :



- ✓ lampade ad arco elettrico generato nell'argon o nello xeno (spettro continuo da 200 a 1000 nm)

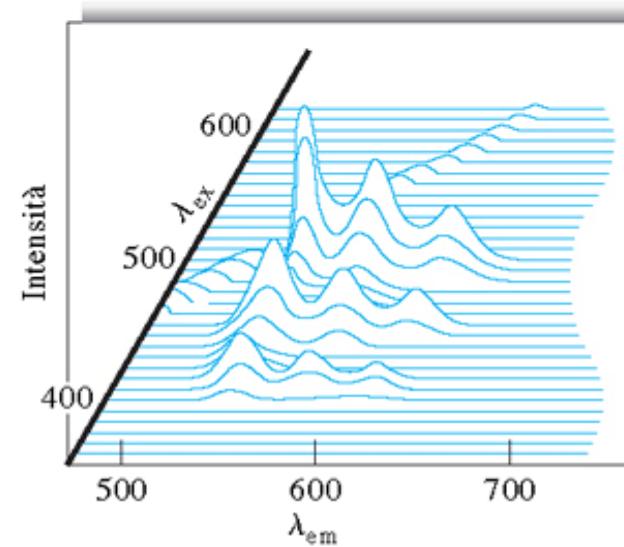
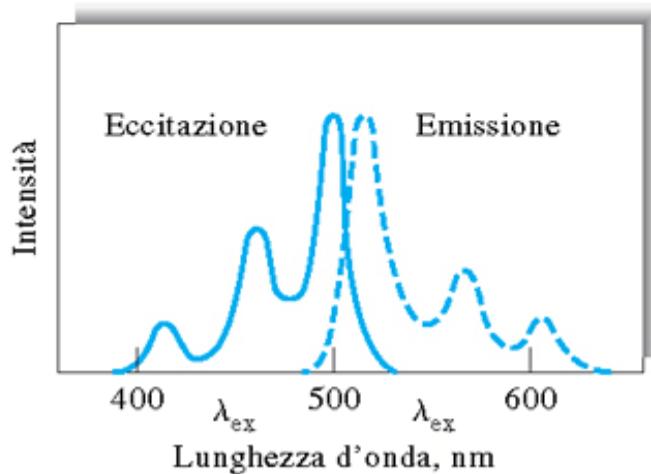
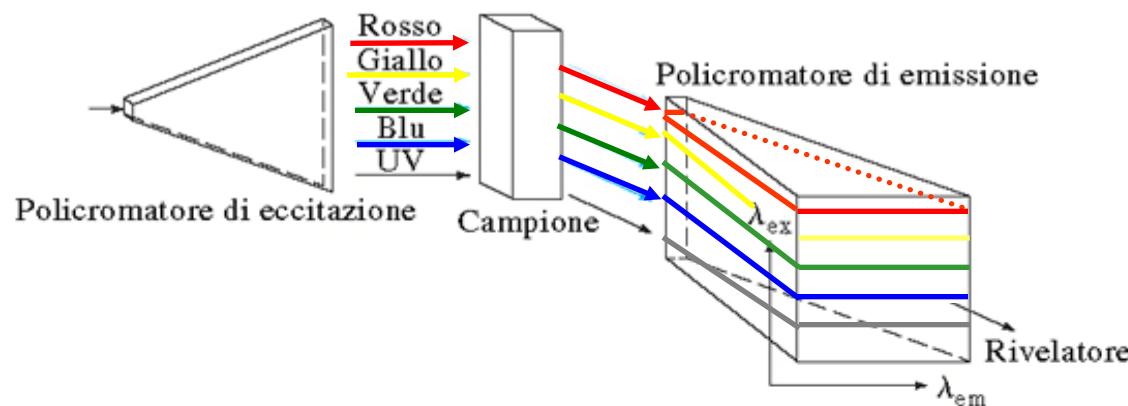


Cuvette

Nelle comuni applicazioni la radiazione di fluorescenza viene raccolta ad un angolo di 90 gradi rispetto alla direzione della radiazione incidente, per ridurre gli effetti della diffusione della radiazione nella soluzione e sulle pareti della cella, nonché l'eventuale autoassorbimento, quindi tutte le pareti delle cuvette sono trasparenti.

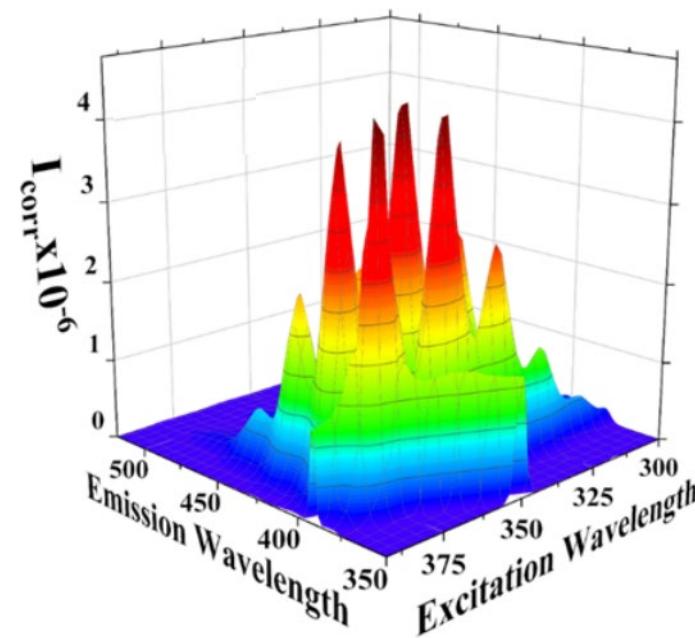
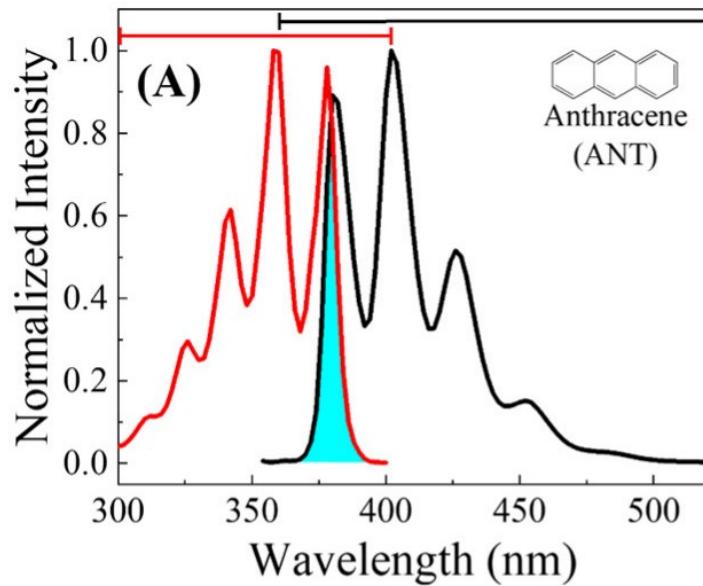


Strumentazione per misure di luminescenza totale



I grafici di luminescenza totale possono essere anche ottenuti con normali spettrofluorimetri, acquisendo via via spettri di eccitazione e di emissione in modo da coprire un ampio intervallo di combinazioni di lunghezze d'onda di eccitazione e di emissione.

Il software strumentale in questo caso ricostruisce i **grafici tridimensionali di luminescenza totale** a partire dai vari spettri acquisiti, come in questo esempio relativo all'antracene:



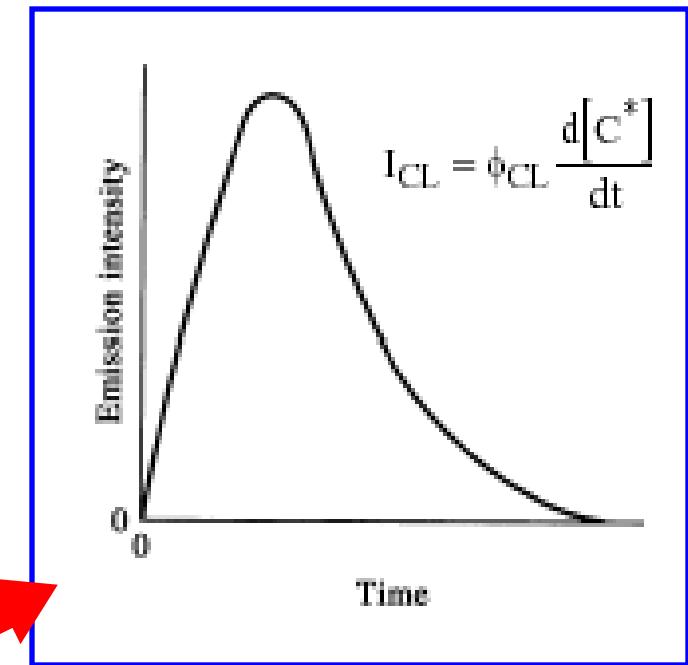
Chemiluminescenza

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

Un tipico sistema chemiluminescente è:

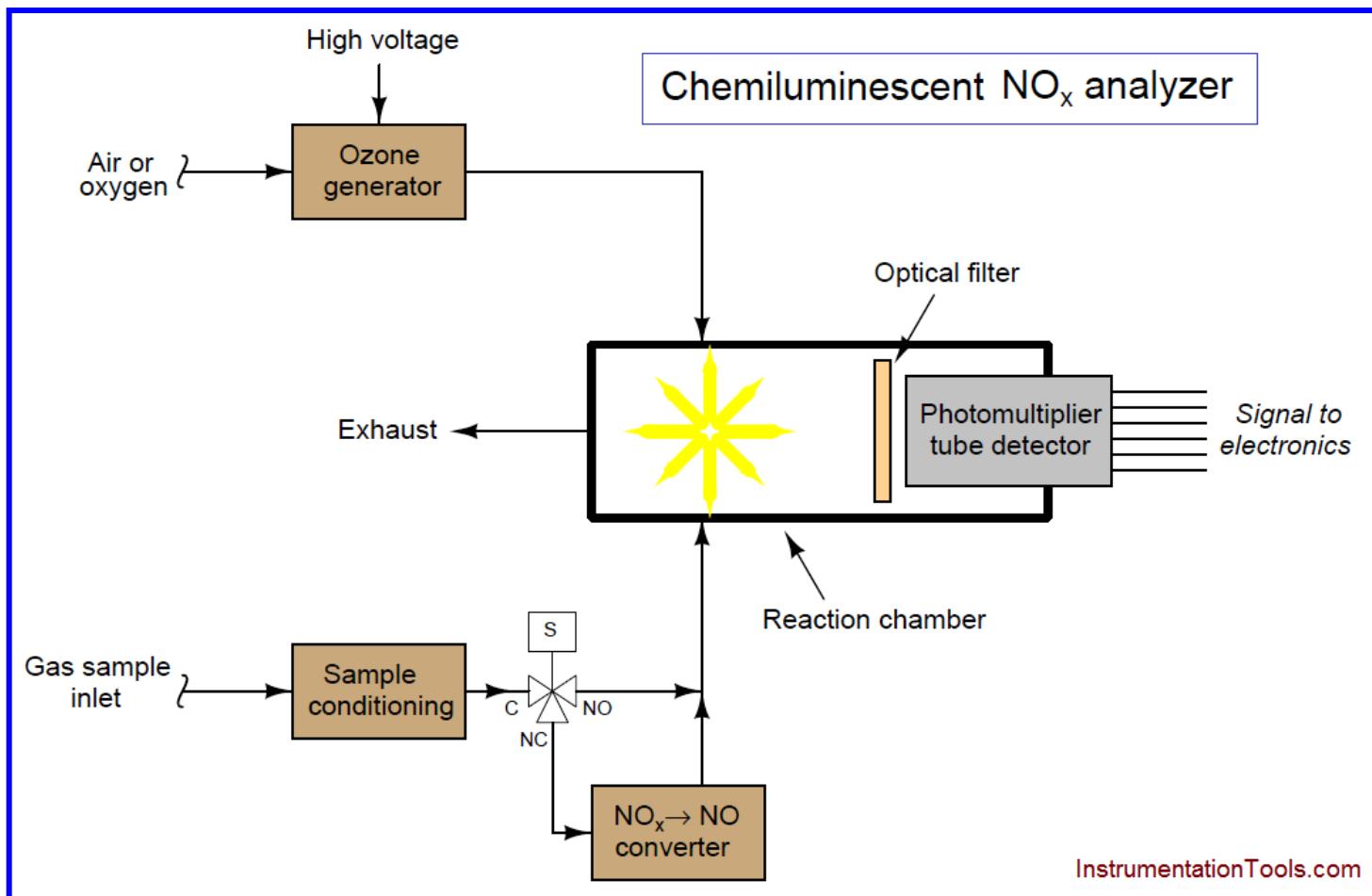


con sensibilità all'NO da 1 ppb a 10 ppt.



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

Schema di un tipico analizzatore di NO_x basato sulla reazione fra NO e O_3

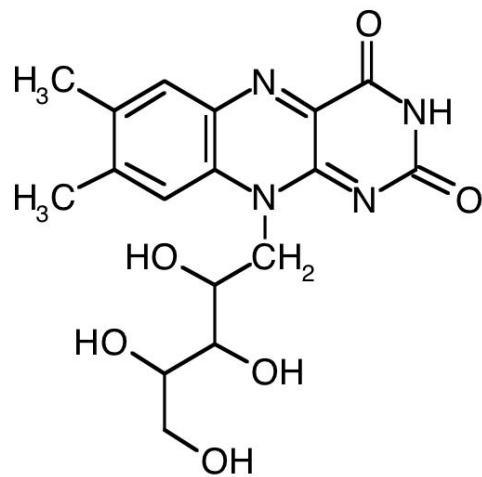


Tipicamente, la camera di reazione è collegata ad una pompa da vuoto, che, oltre ad aspirare la miscela prodotta dal processo (Exhaust) e trasferirla ad un dispositivo che decomponе l'ozono residuo, mantiene una pressione bassa nella camera, riducendo il quenching della chemiluminescenza dell' NO_2^* .

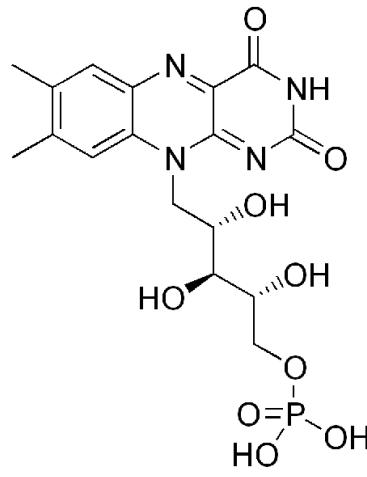
Esercitazione 3: Analisi della riboflavina mediante spettroscopia di fluorescenza molecolare

La Riboflavina (detta anche Vitamina B₂, 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.

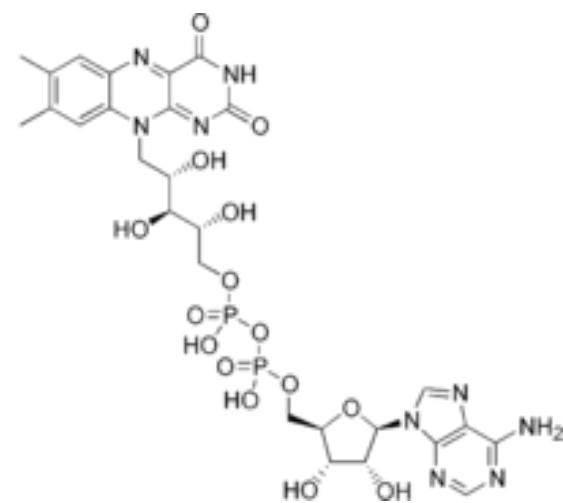
E' il precursore di due composti di fondamentale importanza dal punto di vista biochimico, il Flavin-Mono-Nucleotide (FMN) e il Flavin-Adenin-Dinucleotide (FAD):



Riboflavina



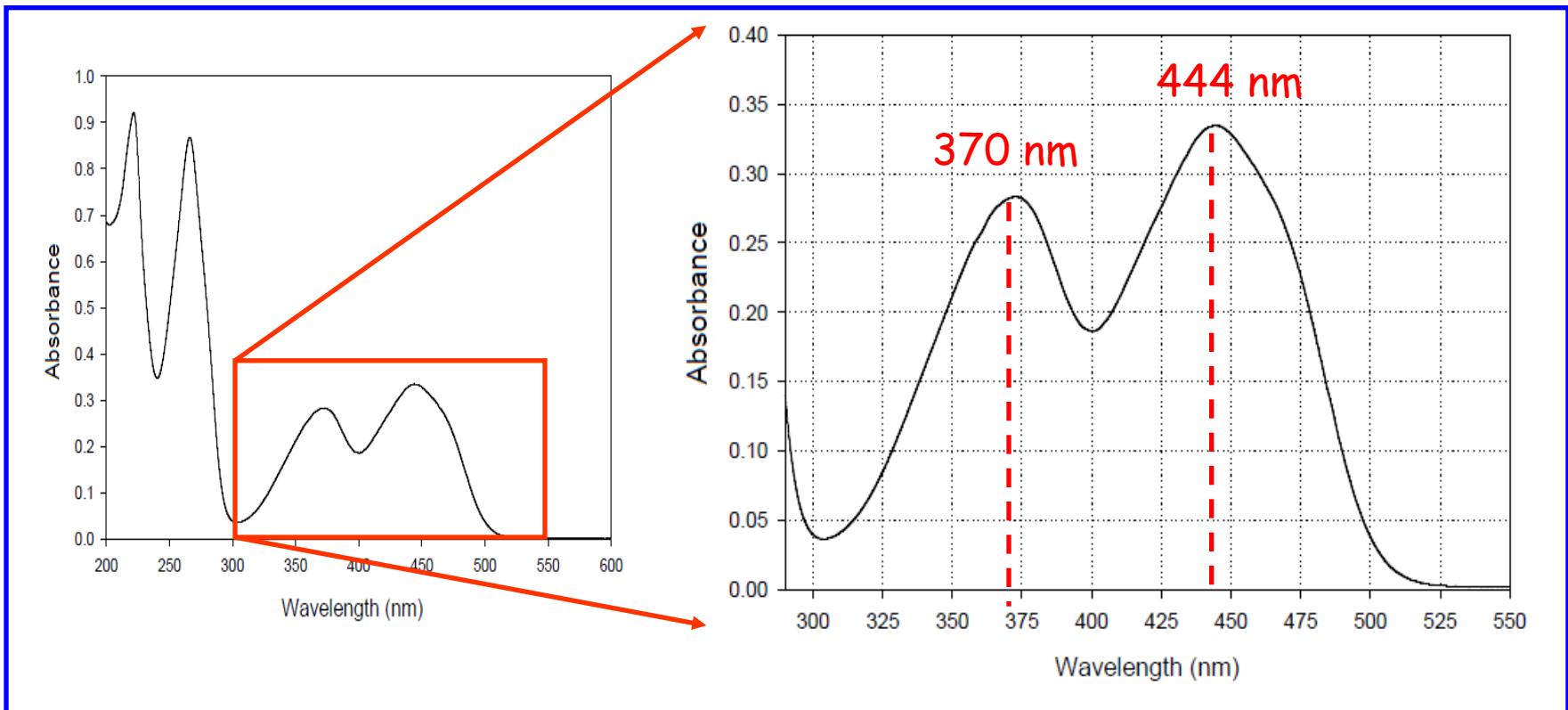
FMN



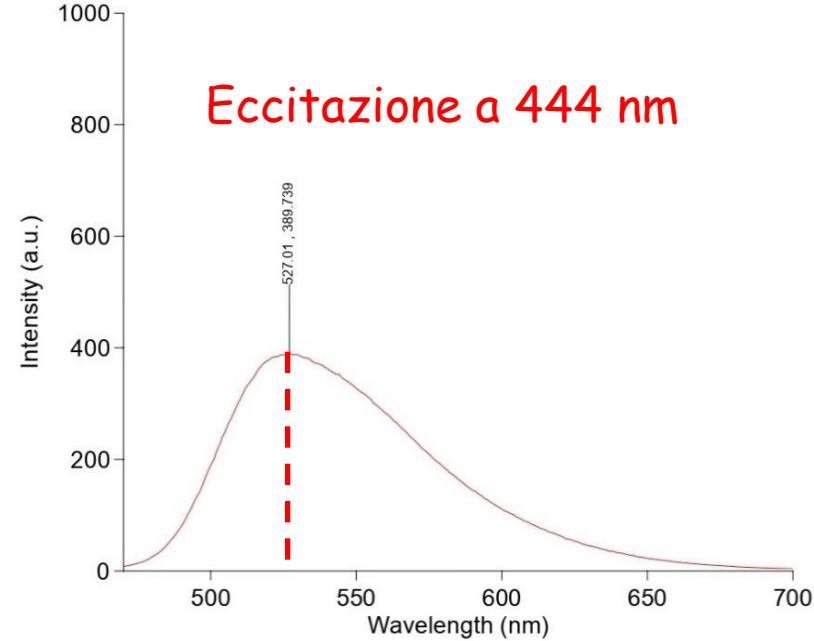
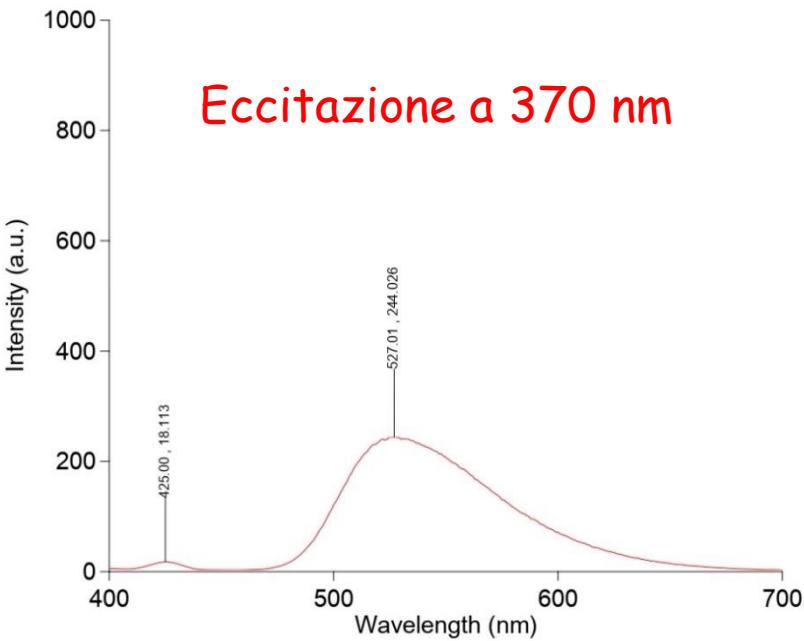
FAD

Principio del metodo

Lo spettro di assorbimento della riboflavina presenta due bande di assorbimento nella regione compresa fra 300 e 500 nm:



Se si eccita la riboflavina a concentrazione 100 ppb con radiazioni aventi lunghezze d'onda prossime a quelle dei due massimi di assorbimento nella regione visible si ottengono **due caratteristici spettri di fluorescenza**:



Osservando le intensità dei massimi di emissione si deduce che la migliore combinazione di lunghezze d'onda per le analisi quantitative sia:

$$\lambda_{\text{ecc}} = 444 \text{ nm} \text{ e } \lambda_{\text{em}} = 527 \text{ nm}$$

Fasi dell'esercitazione

- ✓ Preparazione di quattro ulteriori soluzioni standard di riboflavina (in CH_3COOH 0.0125 M), a concentrazione 2, 10, 20 e 50 ppb, a partire dalla soluzione standard 100 ppb già disponibile sul banco di laboratorio;
- ✓ effettuazione di almeno tre misure di fluorescenza sul solvente e su ciascuna delle cinque soluzioni standard, necessarie per la costruzione di una retta di calibrazione;
- ✓ analisi, sempre in triplicato, di una soluzione incognita di riboflavina, fornita dal docente;

Elaborazione dei dati

- ✓ Interpolazione lineare dei dati di calibrazione e calcolo di pendenza e intercetta della retta, con i relativi intervalli di fiducia, e dei due valori del limite di rivelabilità (LOD) a S/N = 3;
- ✓ estrapolazione della concentrazione della soluzione incognita di riboflavina, con calcolo del relativo intervallo di fiducia.

Strumentazione impiegata: spettrofluorimetro Varian Cary Eclipse

