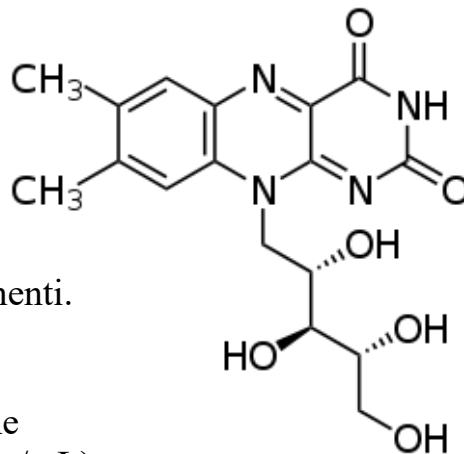


## Esercitazione 3: analisi spettrofluorimetrica della riboflavina

### Principio del metodo

La **riboflavina** (nota anche come **vitamina B<sub>2</sub>**):

è una vitamina idrosolubile presente in numerosi alimenti. Essendo caratterizzata da un'elevata resa quantica di fluorescenza nella regione del visibile, la riboflavina verrà rivelata e quantificata, a livelli di concentrazione dell'ordine delle decine di parti per miliardo (ppb o ng/mL), sfruttando la spettroscopia di fluorescenza molecolare.



### Strumentazione

Spettrofluorimetro  
Varian Cary Eclipse.



### Soluzioni

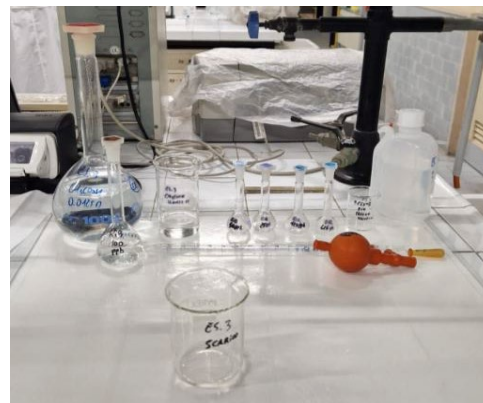
Soluzione di CH<sub>3</sub>COOH 0.0125 M: tale soluzione, già disponibile sul banco di laboratorio, sarà impiegata come solvente per la preparazione di tutte le soluzioni di riboflavina.

Soluzione standard di riboflavina, 100 ppb (ng/mL): questa soluzione, già disponibile e conservata in un armadietto posto sotto cappa, per prevenire la degradazione della riboflavina a seguito dell'esposizione diretta alla luce, sarà impiegata per la preparazione di tutte le altre soluzioni necessarie per le operazioni di calibrazione.

## Preparazione delle altre soluzioni standard di riboflavina e costruzione del grafico di calibrazione

A partire dalla soluzione 100 ppb di riboflavina preparare le seguenti quattro soluzioni, prelevando i volumi delle soluzioni indicate e portando a volume con  $\text{CH}_3\text{COOH}$  0.0125 M in **matracci da 20 mL**:

- 1) soluzione 50 ppb: 10 mL di soluzione 100 ppb;
- 2) soluzione 25 ppb: 10 mL di soluzione 50 ppb;
- 3) soluzione 12.5 ppb: 10 mL di soluzione 25 ppb;
- 4) soluzione 6.25 ppb: 10 mL di soluzione 12.5 ppb



Porre estrema cura sia nel prelevare i volumi indicati che nel portare a volume nei matracci. Da tale cura dipenderà fortemente la qualità dei dati di calibrazione e della successiva quantificazione. Fare attenzione a non confondere fra loro le diverse soluzioni.

Portarsi sul desktop del computer che gestisce lo spettrofluorimetro, che sarà già acceso, così come lo strumento, e cliccare sull'icona **Simple Reads**. Essa consentirà di accedere al menu delle letture di intensità di fluorescenza, fissata la coppia di  $\lambda_{\text{exc}}$  e  $\lambda_{\text{em}}$ .

Impostare i seguenti parametri, ottimali per la rivelazione della riboflavina:

**Excitation  $\lambda$  : 444 nm**      **Excitation slit: 10 nm**

**Emission  $\lambda$  : 525 nm**      **Emission slit: 10 nm**

**Average time: 5 s**

L'ultimo parametro impostato implica che l'intensità di fluorescenza emessa sarà mediata su un tempo di 5 secondi, per attenuare eventuali fluttuazioni del responso strumentale.

La lettura dell'intensità emessa partirà dopo aver cliccato sul tasto **Read**.

Le letture di intensità di fluorescenza saranno effettuate, **in triplicato, prima sulla soluzione di  $\text{CH}_3\text{COOH}$  0.0125 M e poi su ciascuna delle cinque soluzioni di riboflavina, da 6.25 a 100 ppb, nell'ordine.** Questa successione ridurrà il rischio di alterazione di una misura a seguito di contaminazione della cuvetta da parte della soluzione analizzata in precedenza (sebbene la cuvetta dovrà essere accuratamente sciacquata con acqua deionizzata fra una misura e l'altra).

Per dare inizio alle letture riempire la cuvetta disponibile sul banco di laboratorio con la **soluzione di  $\text{CH}_3\text{COOH}$  0.0125 M.**

Asciugare la cuvetta accuratamente, verificare l'assenza di corpuscoli sospesi al suo interno e procedere con la misura delle intensità di fluorescenza, che in questo caso sarà riferita al **bianco**.

Al termine delle tre misure, i cui valori verranno via via annotati dal computer nel file già aperto (oltre che visualizzate volta per volta in una finestra posta a sinistra in alto), passare alla soluzione di riboflavina **6.25 ppb**, sempre dopo aver sciacquato e asciugato la cuvetta.

Procedere allo stesso modo per le restanti soluzioni (si otterranno 18 misure in tutto) e salvare il file di calibrazione con un nome che contenga il nome del gruppo (ad es. **GrA\_calib\_riboflavina**) e l'estensione .FBSR. Anche in questo caso occorrerà salvare poi il file in formato PDF, in modo da poterlo copiare su pen drive al termine dell'esperienza.

I dati di intensità di fluorescenza contenuti in tale file per le cinque soluzioni e per il bianco (18 valori in tutto) saranno utilizzati, nel corso della stesura della relazione, per la costruzione della retta di calibrazione ed il calcolo dei relativi parametri (pendenza, intercetta, coefficiente di correlazione,  $\text{LOD}_1$  e  $\text{LOD}_2$ ).

**I dati ottenuti alle varie concentrazioni andranno utilizzati tal quali, senza mediarli.**

Si noti che in questo caso la retta di calibrazione non passerà per l'origine degli assi perché l'intensità di fluorescenza del bianco risulterà lievemente superiore a 0.

### **Analisi della soluzione incognita di riboflavina**

Una volta completata la calibrazione, si potrà passare all'analisi della soluzione incognita di riboflavina preparata dal docente e disponibile sul banco di laboratorio.

A tal fine occorrerà sciacquare la cuvetta, riempirla con la soluzione incognita e procedere alla misura dell'intensità di fluorescenza, sempre in triplicato.

Con i dati ottenuti sarà possibile risalire, partendo dall'equazione della retta di calibrazione, alla concentrazione incognita e calcolarne poi l'intervallo di fiducia, come spiegato a lezione.