

Come determinare una concentrazione ignota?

Nell'attività di laboratorio molte volte è necessario conoscere la concentrazione ignota di una sostanza in soluzione

- es: esperimento di diffusione; rilascio di sostanze da biomateriali etc.
- Durante test *in vitro*: quantificare le sostanze prodotte dalle cellule, glucosio, proteine, aminoacidi etc...

COME FARE?



Quale tecnica usare

Ci si basa su alcuni fattori:

- Soluzioni colorate (assorbono nel visibile);
- Soluzioni che assorbono UV;
- Soluzioni fluorescenti;
- Valore presumibile di concentrazione;

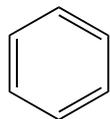


Spettrofotometria UV-visibile

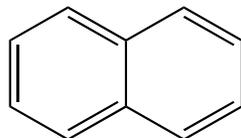
- Assorbono visibile: sostanze colorate



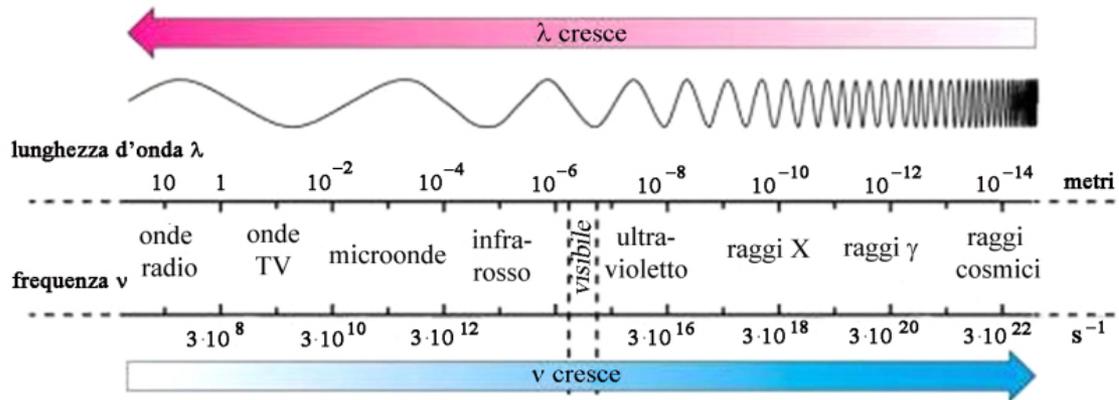
- Sostanze che assorbono nell'UV:
 - Insaturazioni $C=C$, $C\equiv C$
 - Carbonile $C=O$
 - Sistema benzenico



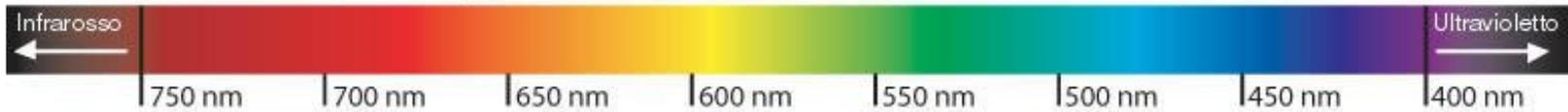
- Derivati naftalenici



Spettrofotometria UV-visibile



Spettro di luce visibile all'occhio umano



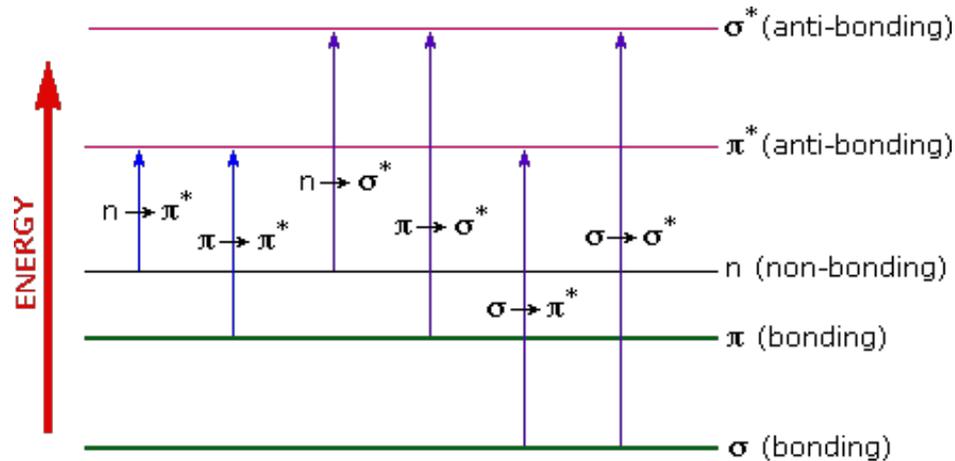
$$E = h\nu$$

E energia associata alla radiazione

h costante di Plank

ν Frequenza

Interazione radiazione molecola



$$E = h\nu$$

$$\lambda = c/\nu$$

ASSORBIMENTO:

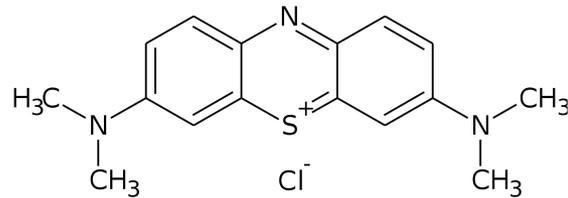
quando atomi o molecole vengono eccitati da adatte radiazioni elettromagnetiche ("hv") e passano a stati energetici maggiori

TIPO DI TRANSIZIONE	LUNGHEZZA D'ONDA DELLA RADIAZIONE NECESSARIA PER OTTENERE LA TRANSIZIONE	La λ necessaria per la transizione è tanto maggiore quanto minore è il dislivello energetico
$\sigma \rightarrow \sigma^*$	110 – 135 nm	
$\pi \rightarrow \pi^*$	160 – 255 nm	
$n \rightarrow \sigma^*$	> 285 nm	

Gli elettroni π sono 'meno legati' e risultano perciò più facilmente eccitabili rispetto ai σ ; per esempio per eccitare gli elettroni π dell'etilene occorre una quantità di energia corrispondente ad una radiazione di 180nm (vicino U.V.) contro i 120nm (lontano U.V.) della radiazione necessaria per eccitare gli elettroni σ . Più aumentano i legami π meno energia serve e si va nel visibile (sostanze colorate)

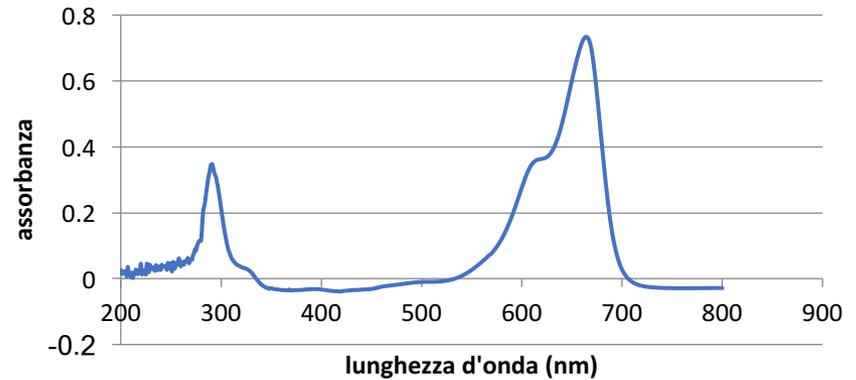
Interazione radiazione molecola

Più aumentano i legami π meno energia serve e si va nel visibile (sostanze colorate)



Blu di metilene

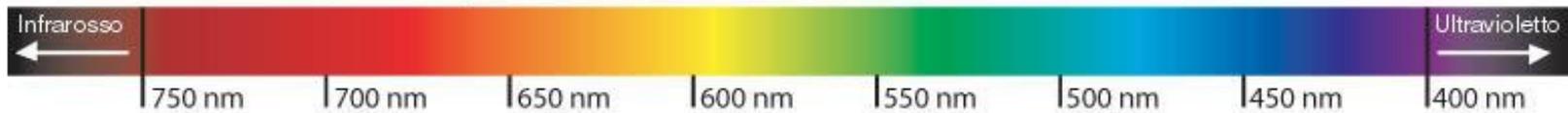
assorbimento blu di metilene



Radiazione assorbita	λ (nm)	Colorazione osservata
Violetto	400-430	Giallo Verdastro
Blu	430-490	Giallo-Arancio
Blu-verde	490-510	Rosso
Verde	510-530	Porpora
Giallo-verde	530-560	Violetto
Giallo	560-590	Blu
Arancio	590-610	Blu-verdastro
Rosso	610-730	Blu-verde

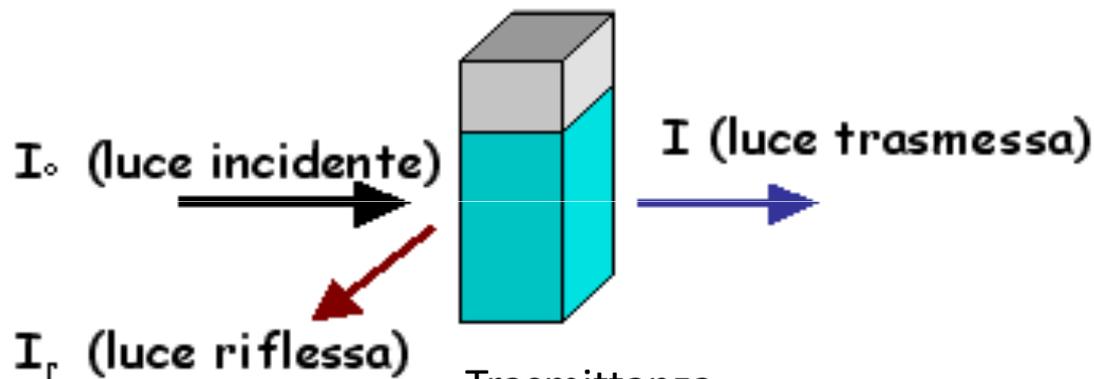
La colorazione di alcuni oggetti o di determinate sostanze deriva dal fatto che questi assorbono parte di questa luce (determinate lunghezze d'onda): il risultato è che noi vediamo soltanto i colori che non vengono assorbiti.

Spettro di luce visibile all'occhio umano



Interazione radiazione soluzione

- quando una radiazione attraversa una soluzione, viene assorbita più o meno intensamente a seconda della concentrazione; in altre parole l'assorbimento dipende dalla concentrazione.



Trasmittanza

$$T = I/I_0$$

$T = 1$ la radiazione è completamente trasmessa $I = I_0$

$T = 0$ la radiazione è completamente assorbita $I = 0$

Legge Lambert-Beer

- $A = \log 1/T$ $A = c\varepsilon l$

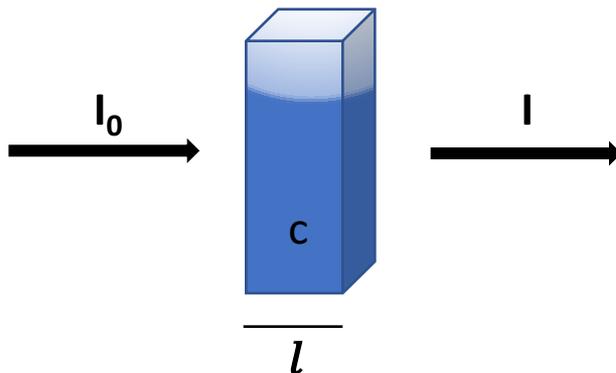
A = assorbanza (adimensionale)

c = concentrazione della soluzione (M)

ε = coefficiente di estinzione molare ($\text{mol}^{-1} \text{L cm}^{-1}$)

l = cammino ottico (cm)

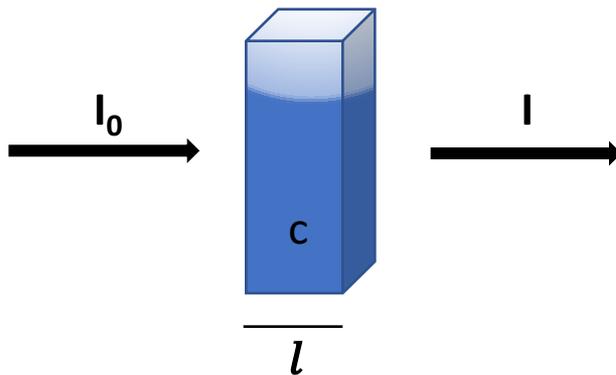
ε = caratteristico della sostanza ad un λ , determinato sperimentalmente, dipende dal solvente, dal pH, è indipendente dalla T



Validità della Legge Lambert-Beer

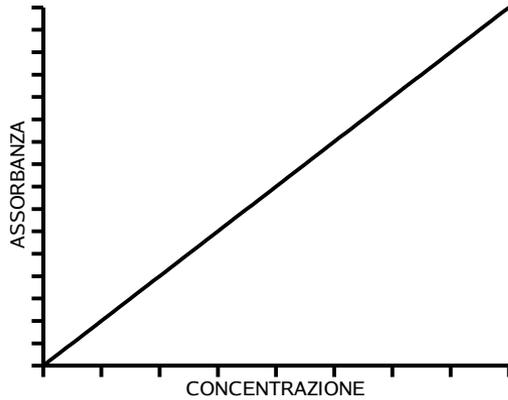
$$A = c\varepsilon l$$

- Soluzioni diluite (concentrazioni elevate causano maggiore rifrazione, quindi maggiore dispersione del raggio)
- Radiazioni monocromatiche
- Non avvengano reazioni chimiche con il solvente
- Assorbimento del solvente trascurabile

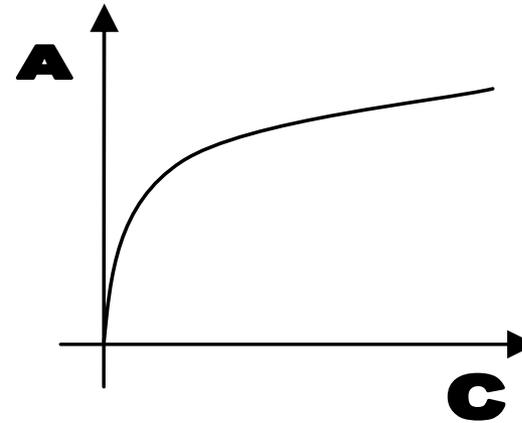


Legge Lambert-Beer

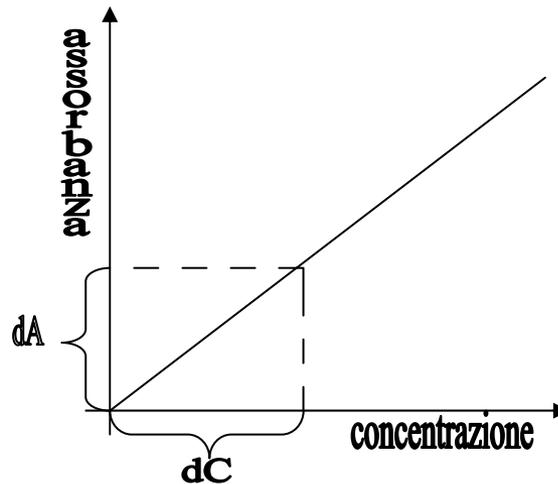
$$A = c\epsilon l$$



Soluzioni diluite



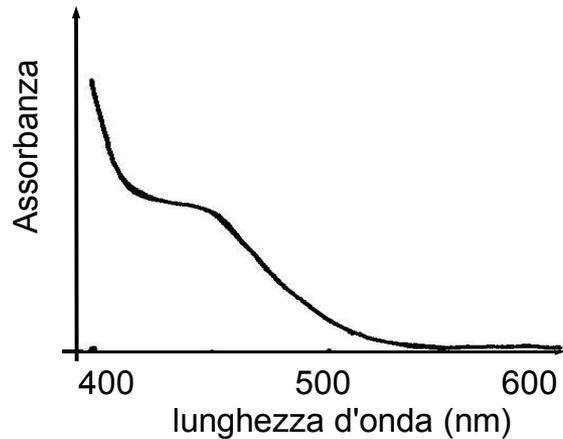
Soluzioni concentrate



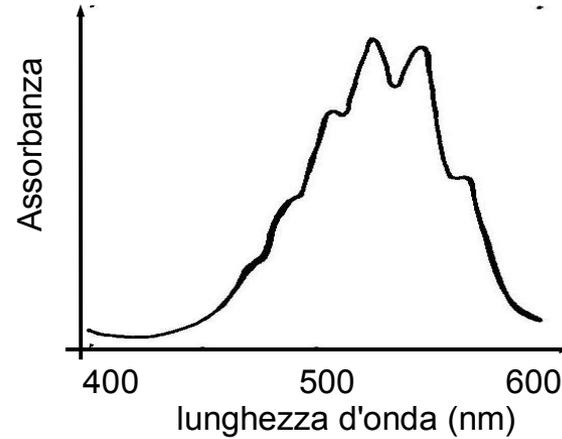
$$\epsilon = dA / dC$$

Scelta della lunghezza d'onda

$$A = c \epsilon l$$



soluzione $K_2Cr_2O_7$



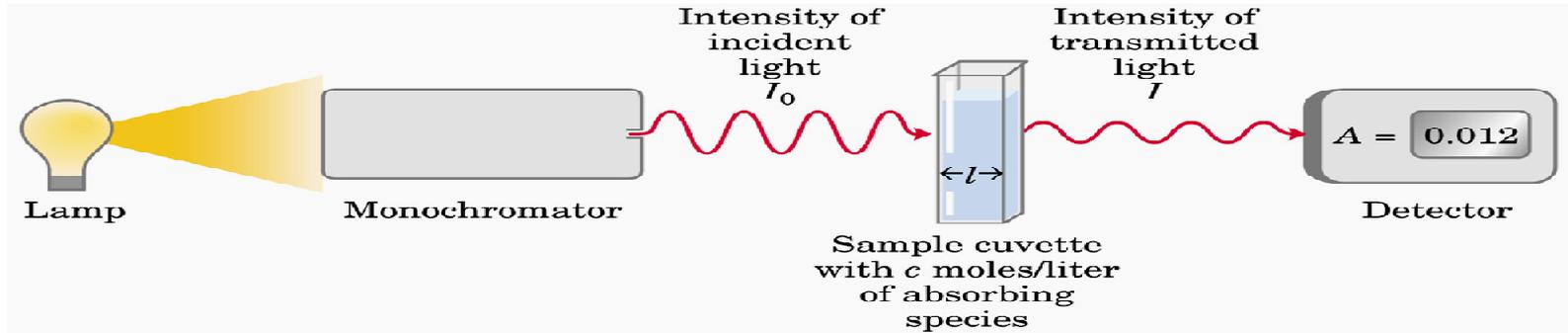
soluzione $KMnO_4$

La lunghezza d'onda viene scelta:

- L'assorbimento è massimo (per motivi di sensibilità: se l'assorbimento è alto è possibile rilevare basse conc di sostanza)
- È al centro di un picco largo (per precisione, per piccole variazioni di lunghezza d'onda danno errori minimi)

Spettrofotometro

Schema di uno spettrofotometro

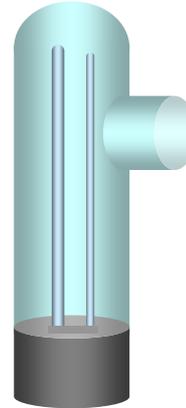


- Sorgente di luce policromatica
- Monocromatori: filtri o elemento disperdente (prisma)
- Cella o cuvetta: contiene il campione
- Rivelatore: trasforma il segnale luminoso in impulso elettrico
- Sistema di elaborazione dati: il segnale del rivelatore viene amplificato e trasmesso ad un pc

Spettrofotometro

Sorgente di luce policromatica

- lampada ad incandescenza, tungsteno, quarzo iodio per il visibile (350-2200 nm)
- per la regione UV lampade a scarica in un gas, deuterio (160-380 nm)



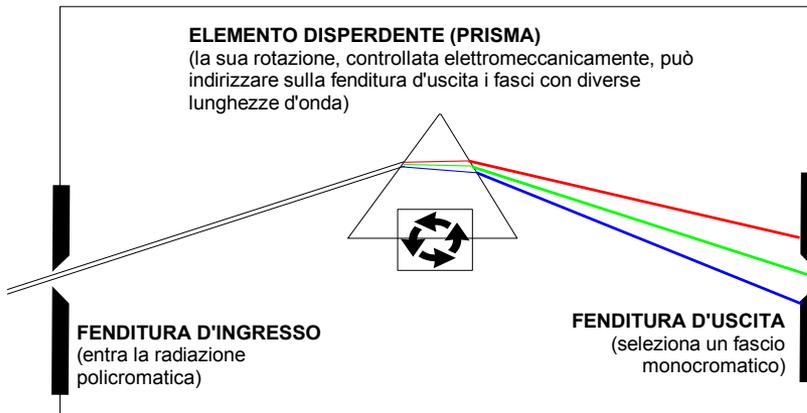
Le due lampade sono presenti entrambe nello spettrofotometro e vengono opportunamente intercambiate dal meccanismo interno, oppure lampada a **xenon che copre UV-vis (190-1100 nm)**



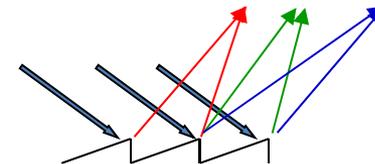
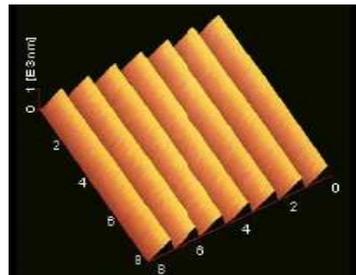
Spettrofotometro

Monocromatori

- *Filtri*: che bloccano una parte della luce e lasciano passare solo la parte desiderata, ma con notevoli ampiezze (250 nm), usati nei colorimetri
- *Elementi disperdenti*: che separano le varie componenti della radiazione e ne permettono la successiva selezione della banda desiderata
 - Prisma: disperde le radiazioni con diversa λ grazie al fenomeno della rifrazione. Quando un raggio di luce passa da un mezzo ad un altro subisce una deviazione di un angolo inversamente proporzionale alla λ della radiazione (cioè, radiazioni con diversa λ subiscono diversa deviazione).



Reticoli: svolgono la stessa funzione del prisma, ma il loro funzionamento è basato sulla riflessione. Sono costituiti da serie di solchi o fenditure parallele tracciati su una superficie lucida a distanza ravvicinata: il fenomeno è quello che si osserva guardando obliquamente la superficie di un CD.



Spettrofotometro

Cella o cuvetta

- Trasparenti a tutte le λ che si utilizzano
- Geometria definita
- Cammino ottico preciso: in genere 1 cm



UV

quarzo o
silice fusa

Visibile

vetro o
plastica

Intervallo di trasparenza:

- Silice 150-3000 nm
- Vetro 375-2000 nm
- Plastica 380-800 nm

Spettrofotometro

Rivelatori

Sono dispositivi capaci di produrre un segnale elettrico che dipende dall'energia delle radiazioni che lo investono. Tale segnale elettrico (proporzionale all'intensità luminosa) viene poi trasferito a un indicatore analogico o elaborato per via elettronica in modo più o meno complesso.

In UV-visibile si possono utilizzare:

- celle fotovoltaiche e celle fotoconduttive;
- fototubi e fotomoltiplicatori;
- fotodiodi.

Sistema di elaborazione dati

Il segnale proveniente dal rivelatore viene opportunamente amplificato e un amperometro ne rileva l'intensità.

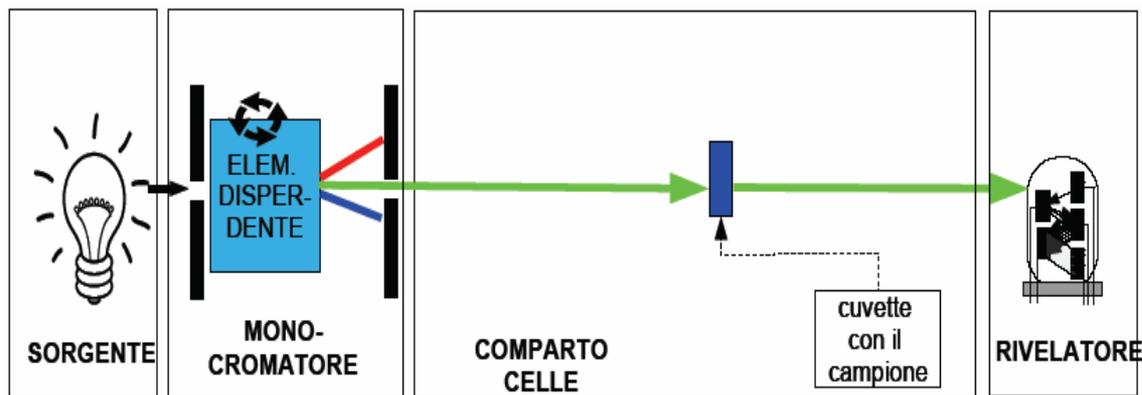
Il lettore converte quindi il segnale elettrico in un valore numerico proporzionale all'intensità del segnale, e questo valore va da 0 a 100.

Ponendo pari a 100 il valore del segnale in assenza del campione, otteniamo la trasmittanza e da questa l'assorbanza.

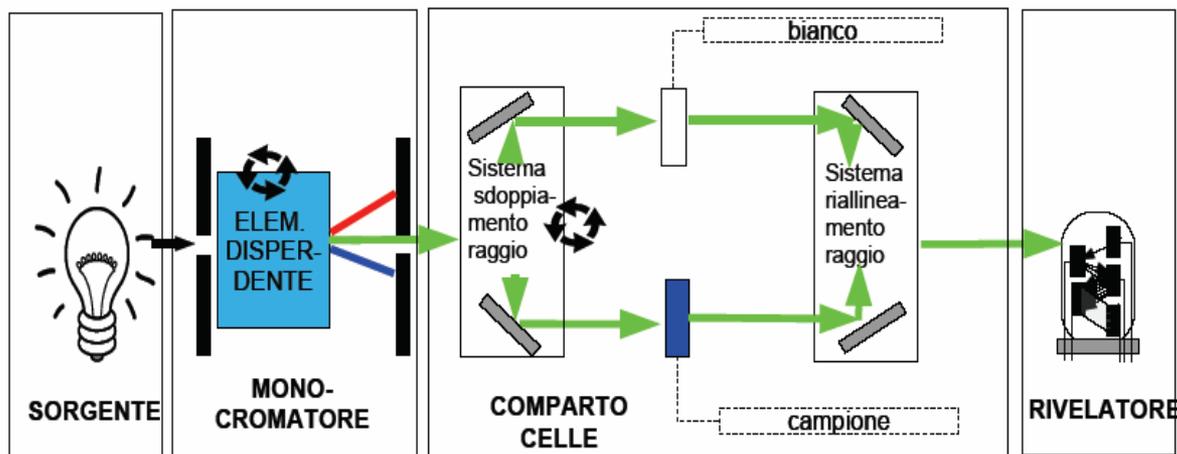
Tipi di spettrofotometro

Spettrofotometri **monoraggio**

La difficoltà sta nel fatto che per ogni misura, per ogni λ , si deve ripetere l'azzeramento contro il bianco, oppure registrare prima lo spettro del bianco, poi lo spettro del campione ed infine sottrarre al secondo il primo (procedura che può risultare macchinosa).



Spettrofotometri a **doppio raggio**



Un sistema invia due raggi, identici per frequenza e intensità, uno attraverso il campione e l'altro attraverso il bianco, per cui si ha un confronto continuo tra l'assorbanza del campione e quella del bianco.

Tipi di spettrofotometro

Spettrofotometro a piastre

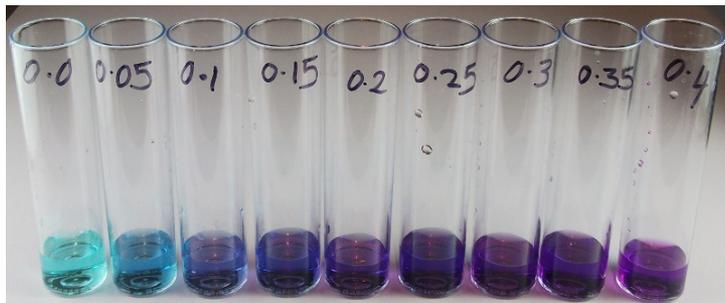


Analisi quantitativa

Come si determina la concentrazione ignota?

Retta di taratura

Preparare soluzioni a concentrazioni note: diluizioni partendo da una soluzione madre (quali strumenti e come si fanno le diluizioni?)



Accorgimenti:
maneggiare la
cuvetta dalla
pareti ruvide, MAI
dalla superficie
liscia

Lettura spettrofotometro di ogni soluzione,
compreso il bianco, ad una det. lunghezza
d'onda



Valori di assorbanza relativi ad ogni concentrazione

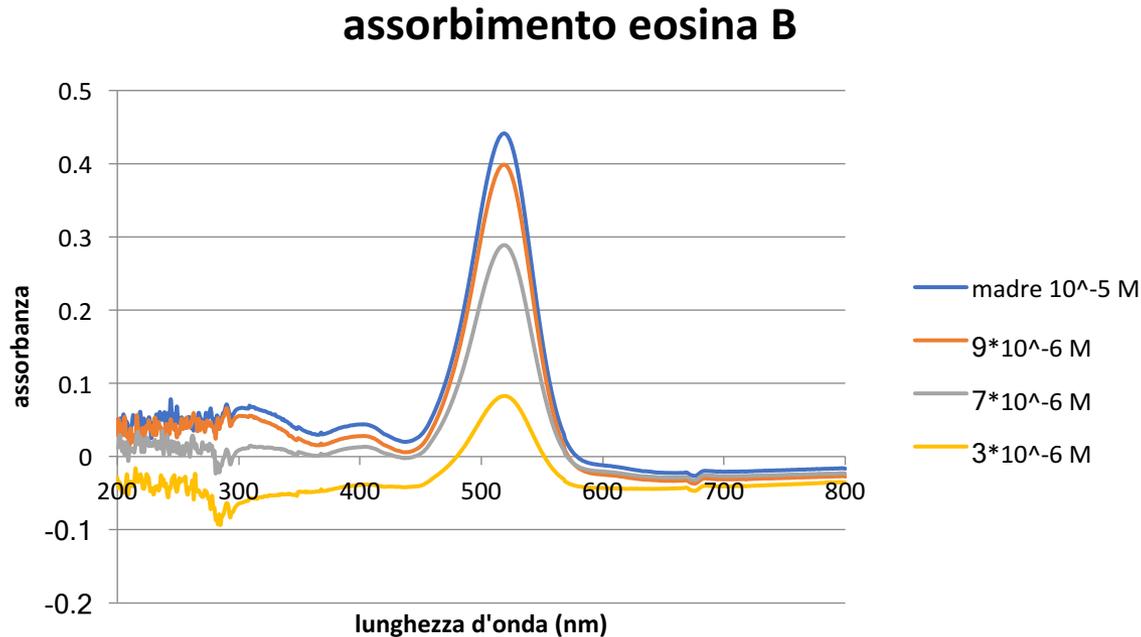


Analisi quantitativa

Come si determina la concentrazione ignota?

Retta di taratura

Lettura spettrofotometro di ogni soluzione ad una det. lunghezza d'onda.
Se non si conosce la λ si fa lettura spettro intero: λ max assorbimento

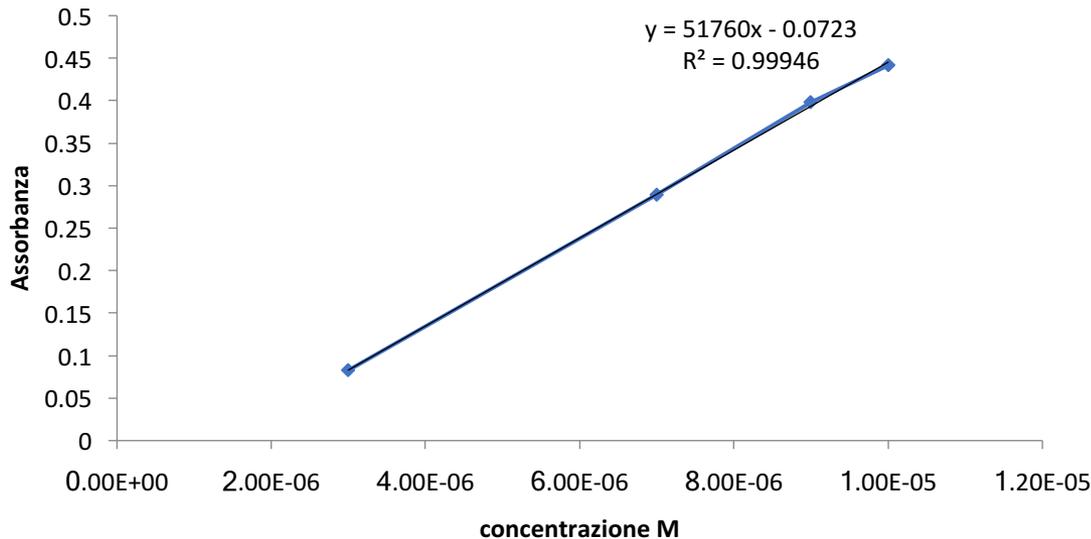


Analisi quantitativa

Come si determina la concentrazione ignota?

Retta di taratura

retta taratura (519 nm)



$$A = c\epsilon l$$

Come determino ϵ ?

Per avere una maggiore accuratezza nella misura è bene fare la retta (4-5 punti) di taratura almeno in duplicato

Lettura concentrazione incognita \longrightarrow

0.299749

Come ottengo il valore della concentrazione?

Analisi quantitativa

Come si determina la concentrazione ignota?

Software spettrofotometro a piastra

Absorbance - Endpoint

Basic Parameters | Layout | Concentrations / Volumes / Shaking

Content	Concentr.	Volume 1	Volume 2	Volume 3	Volume 4
S1	30	0	0	0	0
S2	15	0	0	0	0
S3	7.5	0	0	0	0
S4	3.75	0	0	0	0
B		0	0	0	0
X1		0	0	0	0
X2		0	0	0	0
X3		0	0	0	0
X4		0	0	0	0
X5		0	0	0	0
X6		0	0	0	0
X7		0	0	0	0
X8		0	0	0	0
X9		0	0	0	0

Absorbance - Endpoint

Basic Parameters | Layout | Concentrations / Volumes / Shaking

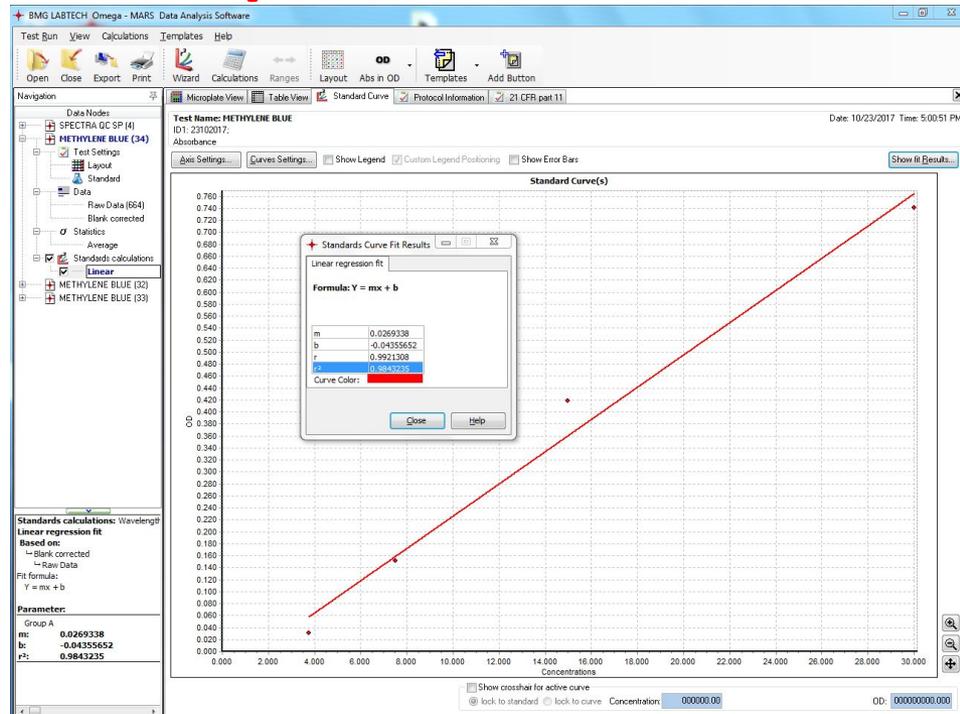
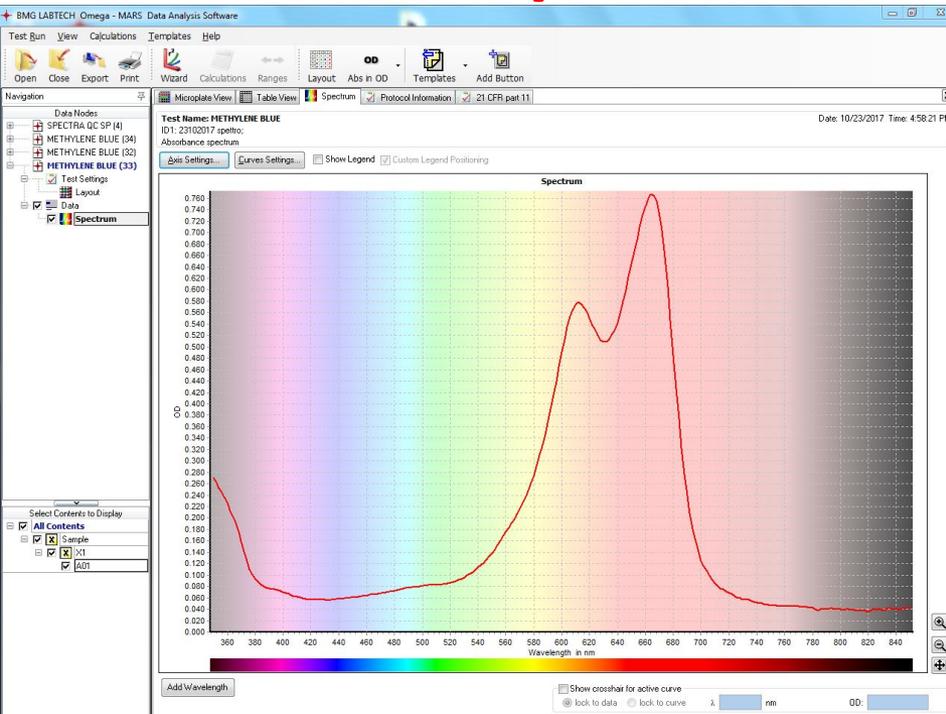
96	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A			X5	X5	X13	X13	S1	S1				
B			X6	X6	X14	X14	S2	S2				
C			X7	X7	X15	X15	S3	S3				
D			X8	X8	X16	X16	S4	S4				
E	X1	X1	X9	X9	X17	X17	B	B				
F	X2	X2	X10	X10	X18	X18						
G	X3	X3	X11	X11	X19	X19						
H	X4	X4	X12	X12								

Blu di metilene

Analisi quantitativa

Come si determina la concentrazione ignota?

Software spettrofotometro a piastra

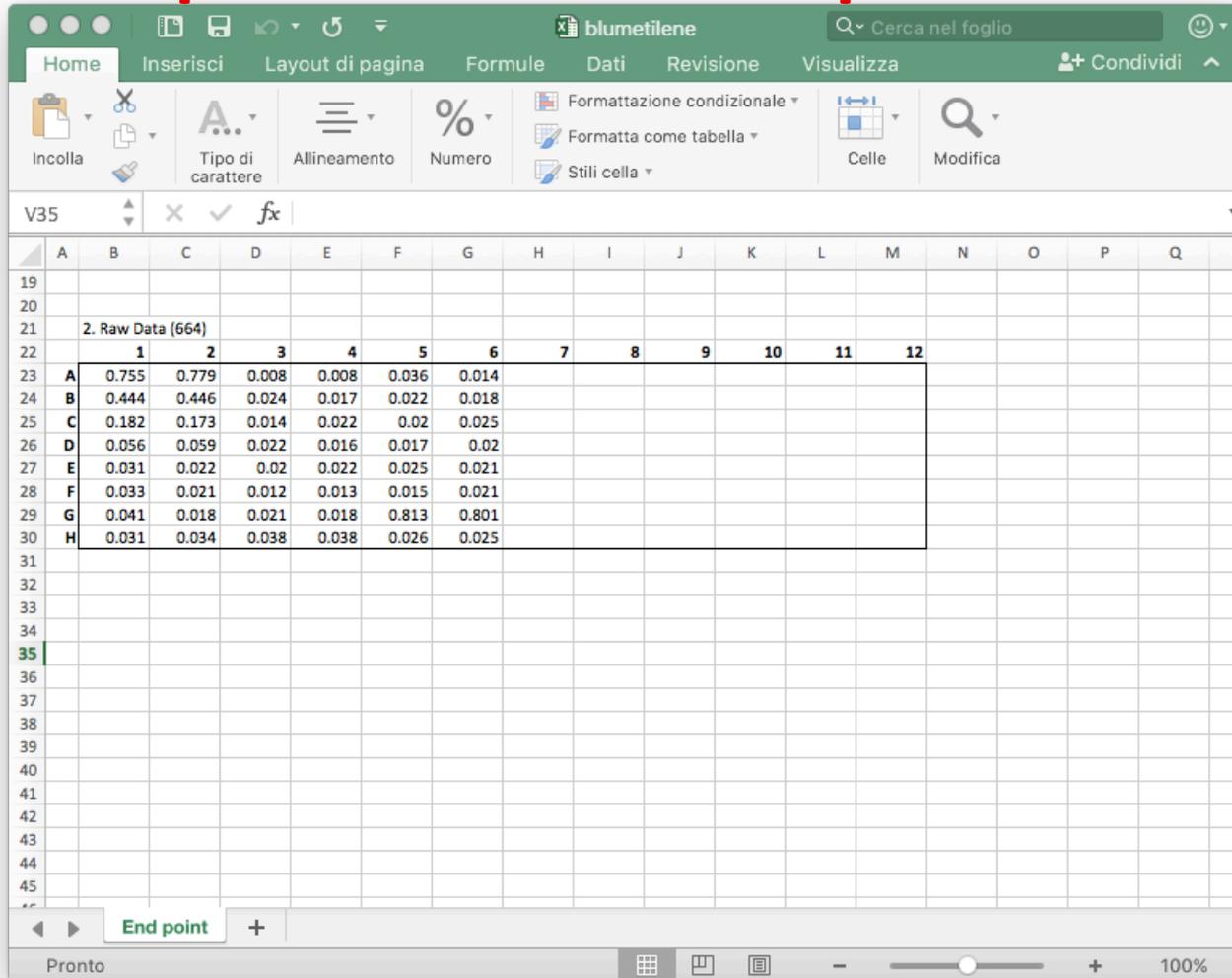


Blu di metilene

Analisi quantitativa

Come si determina la concentrazione ignota?

Software spettrofotometro a piastra



The screenshot shows a Microsoft Excel spreadsheet with the following data table:

2. Raw Data (664)												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.755	0.779	0.008	0.008	0.036	0.014						
B	0.444	0.446	0.024	0.017	0.022	0.018						
C	0.182	0.173	0.014	0.022	0.02	0.025						
D	0.056	0.059	0.022	0.016	0.017	0.02						
E	0.031	0.022	0.02	0.022	0.025	0.021						
F	0.033	0.021	0.012	0.013	0.015	0.021						
G	0.041	0.018	0.021	0.018	0.813	0.801						
H	0.031	0.034	0.038	0.038	0.026	0.025						

Analisi quantitativa

Come si determina la concentrazione ignota?

Software spettrofotometro a piastra

The left screenshot shows the 'Absorbance - Endpoint' window with a 96-well plate layout. The right screenshot shows the 'Absorbance - Endpoint' window with a table of concentrations and volumes.

Content	Concentr.	Volume 1	Volume 2	Volume 3	Volume 4
S1	500	0	0	0	0
S2	100	0	0	0	0
S3	20	0	0	0	0
S4	4	0	0	0	0
S5	0.8	0	0	0	0
S6	0.16	0	0	0	0
B		0	0	0	0
X1		0	0	0	0
X2		0	0	0	0
X3		0	0	0	0
X4		0	0	0	0
X5		0	0	0	0
X6		0	0	0	0
X7		0	0	0	0

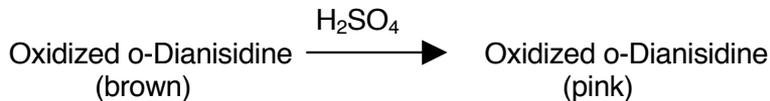
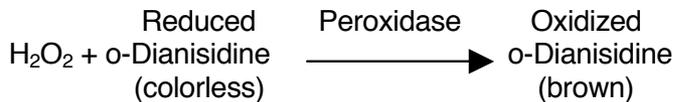
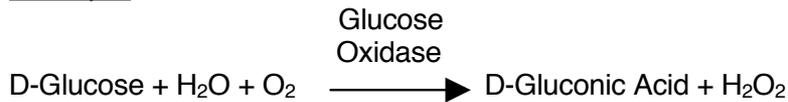
Misura cGMP

Analisi quantitativa

Es. Kit Glucosio

Determinare il glucosio consumato dalle cellule nel mezzo di coltura

Principle



Tube	Water (ml)	Sample (ml)	Glucose Standard (ml)
Reagent Blank	1.00	---	---
Standard # 1	0.98	---	0.02
Standard # 2	0.96	---	0.04
Standard # 3	0.94	---	0.06
Standard # 4	0.92	---	0.08
Test	---	1.00	---

For standards, plot Absorbance at 540 nm (y axis) vs mg of glucose (x axis). If the standard curve is not linear, results will be inaccurate. Repeat assay.

Problemi

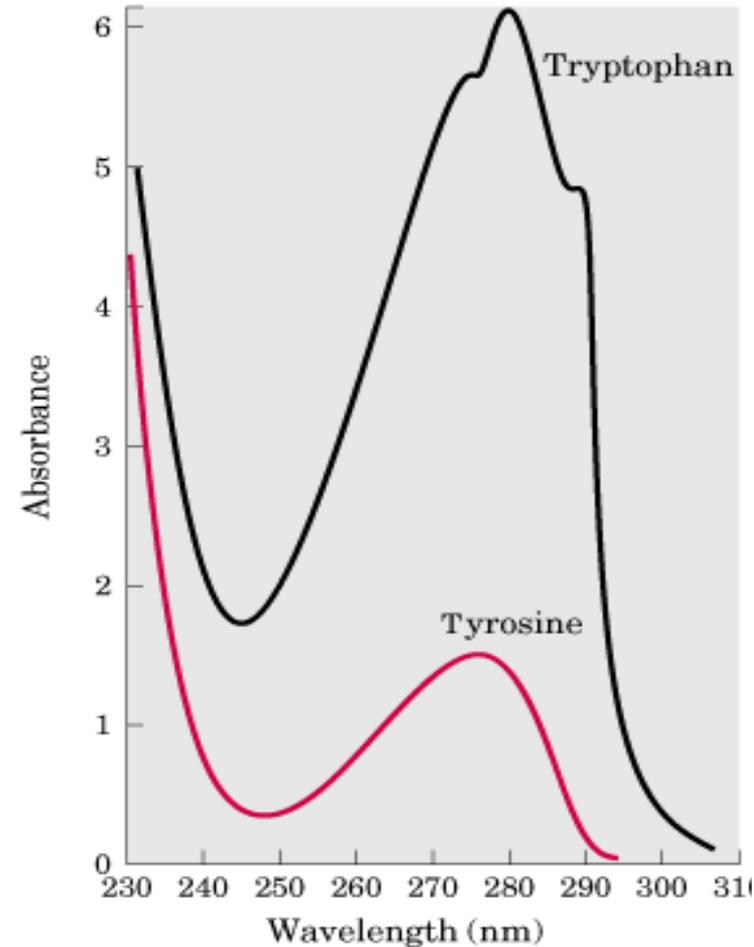
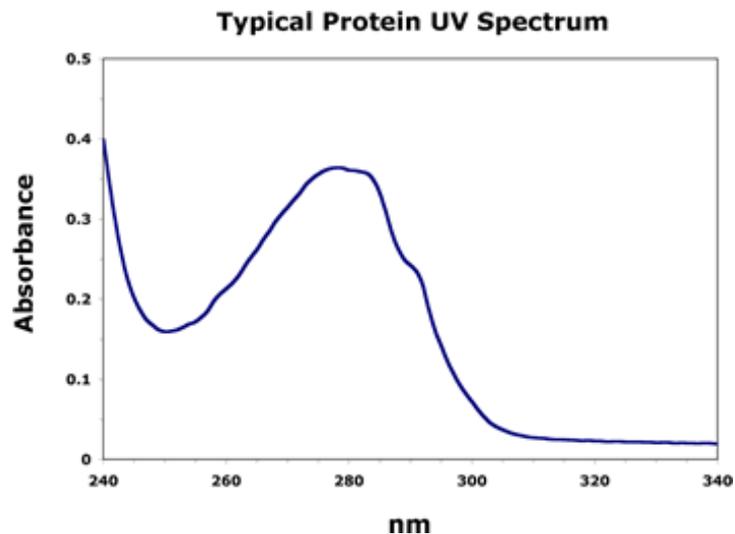
- ✓ Retta taratura inaccurata: errore sperimentale, ripetere
- ✓ Valore troppo alto di A dei campioni incogniti (concentrazione troppo alta o al di fuori della retta di taratura): ripetere la misura diluendo

Analisi quantitativa

Analisi nell'UV

Quantificazione degli aminoacidi e proteine
(la maggior parte assorbe a 280 nm)

	$\lambda_{\max}(\text{nm})$
tryptophan:	280
tyrosine:	274
phenylalanine:	257



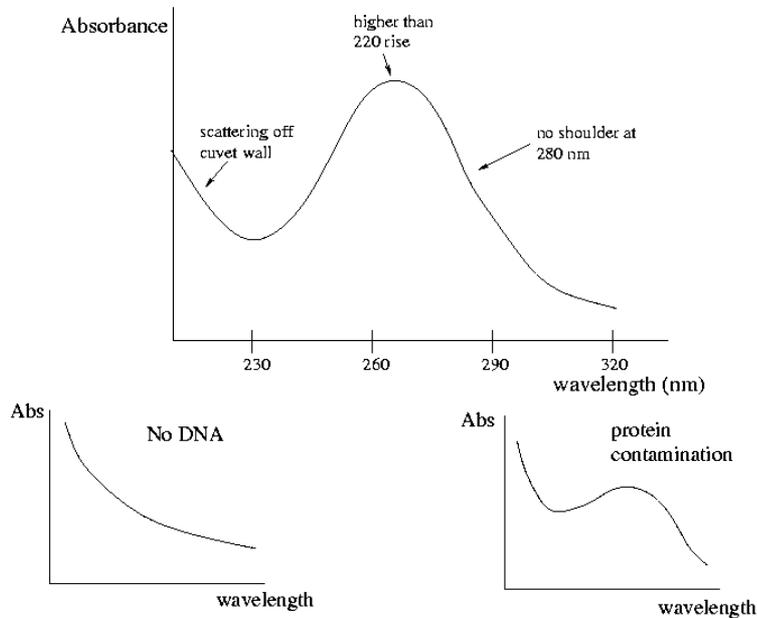
Oppure si può far reagire con una sostanza che dà luogo a ad un composto colorato, ma il campione non si può recuperare

Analisi quantitativa

Analisi nell'UV

Quantificazione DNA e RNA (260 nm) e purezza (280 nm contaminazione con proteine).

Absorbance of a pure DNA sample



Le concentrazioni di DNA sono molto basse per cui si usa una formula sperimentale.

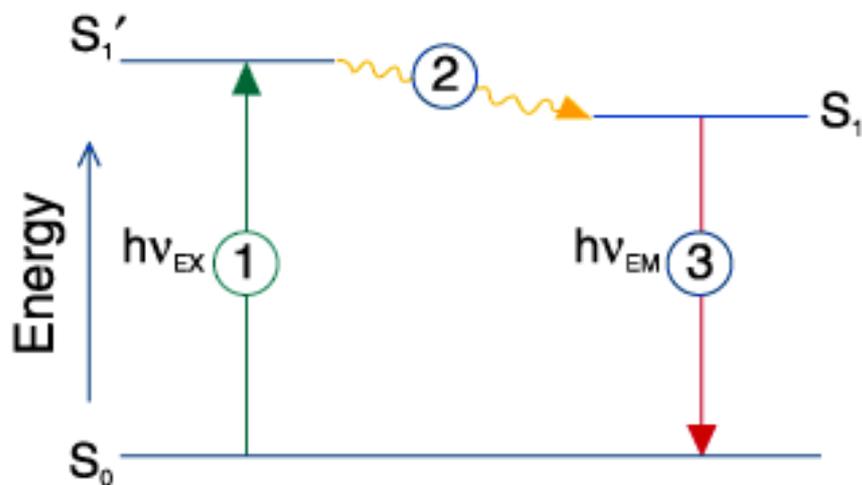
Per il DNA, utilizzando cuvette di 1 cm di cammino ottico ad un valore di assorbanza a 260 nm pari a 1 unità di assorbimento, corrisponde una concentrazione di DNA di 50 µg/ml. Vale la seguente formula semplificata:

1 u.a.260 = 50 µg/ml

Concentrazione di DNA (µg/ml) = A260 x 50 / 1 u.a.

Fluorescenza

Se l'energia acquisita viene in parte riemessa come radiazione elettromagnetica si ha il fenomeno della fluorescenza. Cioè, il ritorno di un elettrone dallo stato eccitato allo stato fondamentale si accompagna all'emissione di un fotone.



1) eccitazione

2) rilassamento 10^{-12} s

decadimento non radiativo isoenergetico fra stati di uguale molteplicità

3) Decadimento radiativo 10^{-9} s

λ della luce fluorescente è sempre maggiore della lunghezza d'onda della luce eccitante.

Sono fluorescenti le molecole con sistemi ad elevata coniugazione:

- Strutture con molti elettroni π coniugati
- Strutture planari con anelli aromatici

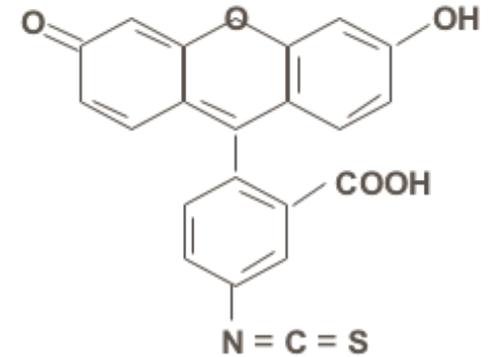
Fluorescenza

Esempi:

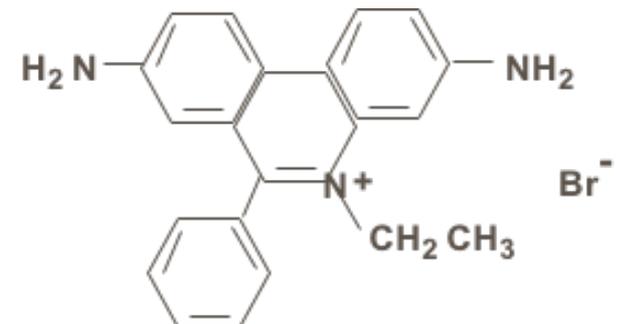
- ✓ FITC (fluoresceina isotiocianato)
- ✓ Bromuro di etidio

Composti di interesse biologico

- Vitamine
- Ormoni
- Clorofille
- Aminoacidi aromatici



Fluorescein isothiocyanate
(FITC)



Ethidium Bromide

Fluorescenza

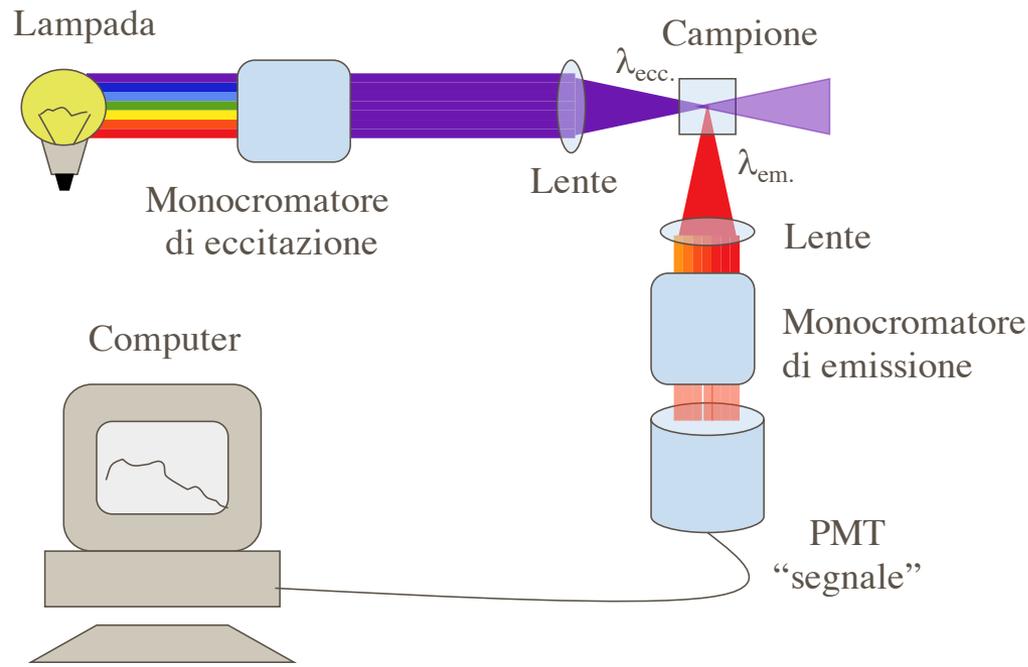
Nella fluorescenza si distingue una luce eccitante ed una luce fluorescente, che sono caratteristiche di ogni molecola fluorescente. La fluorescenza si può sfruttare sia per analisi qualitative, SPETTROFLUORIMETRIA, che quantitative FLUORIMETRIA.

Fluorimetria

- É una metodica di elevata sensibilità, che permette di rilevare quantità dell'ordine di un centinaio di pg (in fotometria l'ordine è dei μg).
- A differenza della fotometria nella quale si misura l'assorbanza, in fluorimetria si misura **l'intensità assoluta della luce fluorescente, IF**. In altri termini in fluorescenza non si fa riferimento a specifici parametri di misura, come trasmissione od assorbanza, e IF viene comunemente espressa in unità arbitrarie.
- **La concentrazione** di una sostanza fluorescente può essere facilmente determinata per semplice **comparazione dell'intensità della luce fluorescente con l'intensità di fluorescenza di una soluzione a concentrazione nota della stessa sostanza.**

Fluorimetro

- Una sorgente luminosa stabile che fornisce l'energia eccitante;
- Filtri od un monocromatore per selezionare la λ della luce eccitante;
- Una cuvetta (campione) per la soluzione in esame;
- Una fotocellula od un fotomoltiplicatore che riceve una frazione fissa della luce fluorescente, ed è connessa con un galvanometro molto sensibile, o con un sistema di amplificazione ed un display digitalico. Il fotomoltiplicatore è in posizione tale da non ricevere le radiazioni della sorgente eccitante che attraversano la soluzione; comunemente è disposto a 90° rispetto alla direzione della luce eccitante.



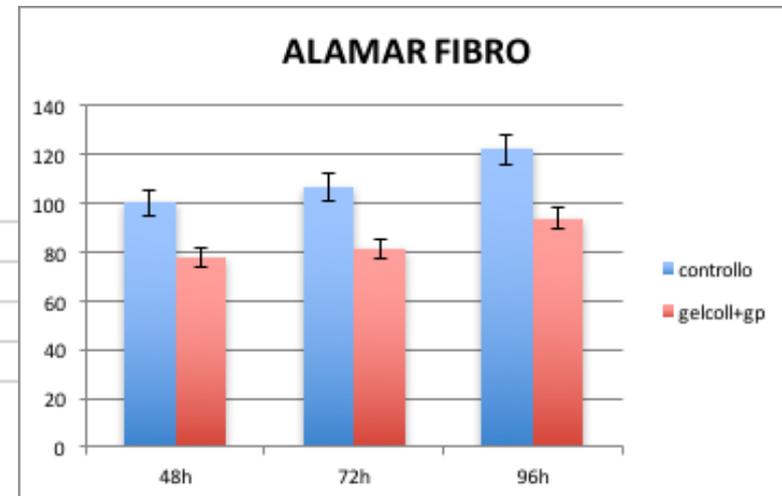
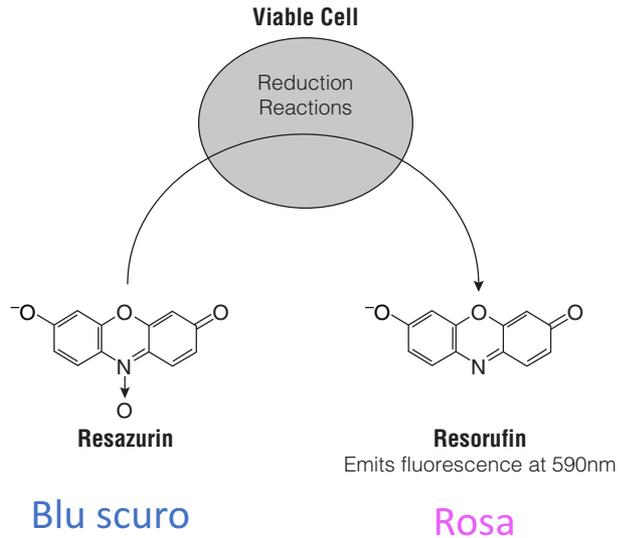
Fluorimetro

Misura quantitativa

- *Ogni volta si deve calibrare il fluorimetro con lo standard, perchè in fluorimetria a differenza della spettrometria per assorbimento, si effettuano misure assolute di intensità luminosa*
- Soluzione Standard a concentrazione nota della sostanza in esame (concentrazione leggermente maggiore della concentrazione presunta nel campione in esame). Letture in unità arbitrarie = unità di luce relativa, RLU.
- Soluzione a concentrazione incognita
- Per lo standard, **C_n**, nota, posta = **100 RLU per I_{F_n}**;
- Per il campione la fluorescenza, **I_{F_i}**, da qui si ricava **C_i**
- **C_n:I_{F_n} = C_i: I_{f_i}**
- Misura della fluorescenza del solvente, **bianco**, che può attenuare la fluorescenza o essere di per se fluorescente

Fluorimetro

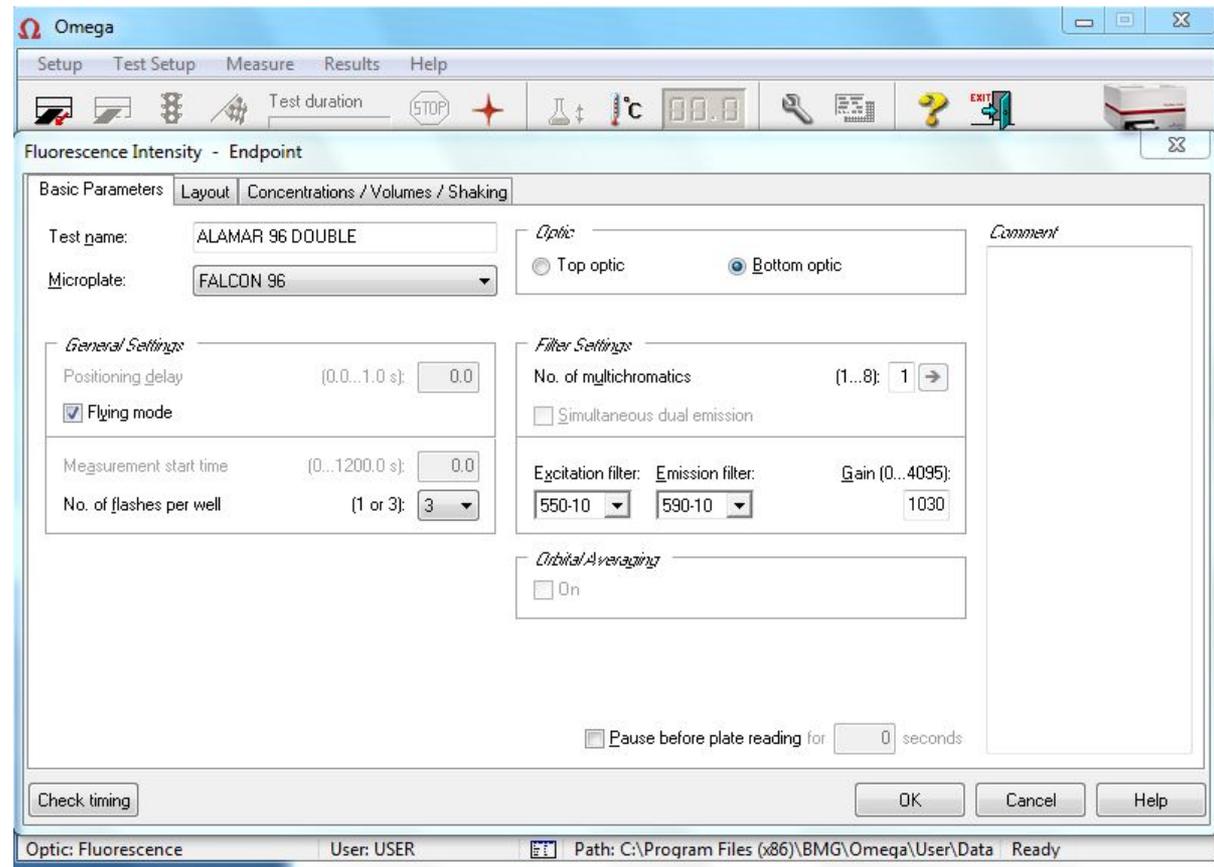
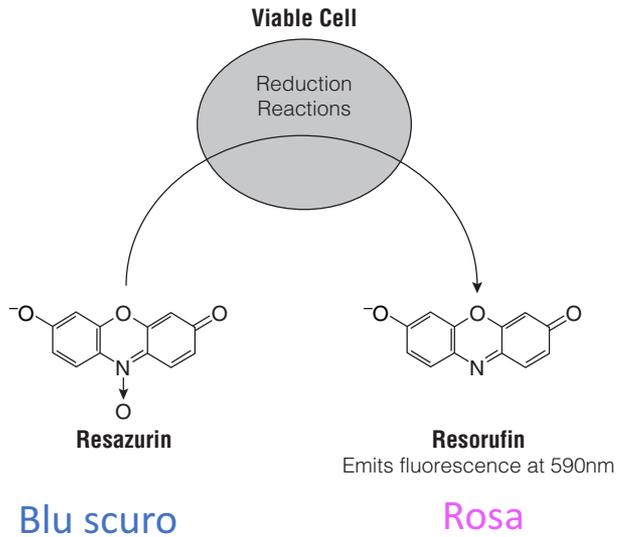
Esempi: Alamar Blue, vitalità cellulare (560Ex/590Em)



	%					
	48h	72h	96h	48h	72h	96h
controllo	50.47917	53.70833	61.45417	100	106.397	121.7416
gelcoll+cp	39.24583	40.89167	47.28333	77.7466	81.00702	93.66901

Fluorimetro

Esempi: Alamar Blue, vitalità cellulare (560Ex/590Em)



Gain: amplificazione del segnale
(il valore viene indicato dallo strumento)