

SPETTROFOTOMETRIA UV/VIS



TECNICHE SPETTROSCOPICHE

Le **tecniche spettroscopiche** sono tutte quelle tecniche basate sull'**interazione tra la materia e le radiazioni elettromagnetiche**.

La luce, il calore ed altre radiazioni elettromagnetiche sono vibrazioni di campi magnetici ed elettrici che si propagano nello spazio.

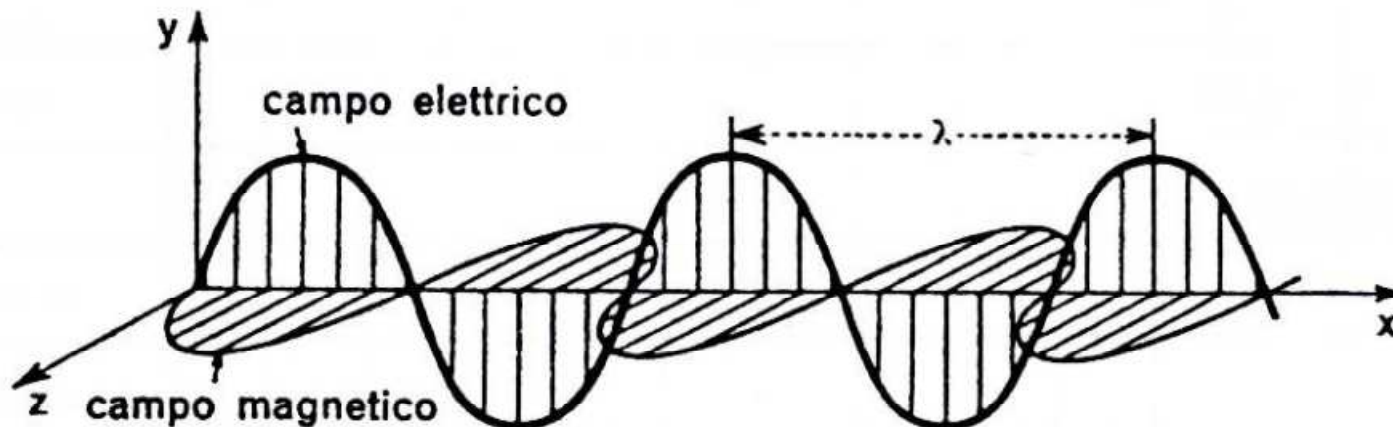
Frequenza (**v**) il numero di vibrazioni nell'unità di tempo

Lunghezza d'onda (**λ**) distanza tra due punti adiacenti in fase (ad esempio tra due massimi consecutivi)

Velocità di propagazione(**c**) dipende dal mezzo in cui si propaga la radiazione.

$$\lambda = c/v$$

λ è **inversamente**
proporzionale a v



E' utile anche considerare queste radiazioni elettromagnetiche come un treno di particelle chiamate **fotoni** o **quanti**.

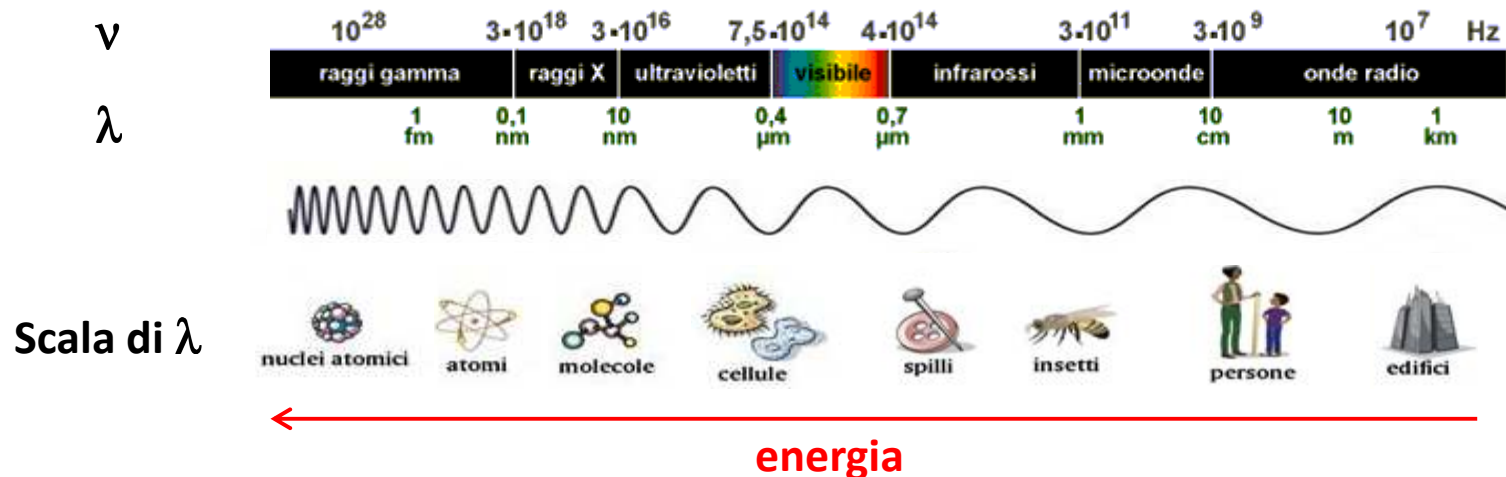
La λ di una radiazione elettromagnetica è in relazione con l'energia contenuta in un quanto mediante la relazione

$$E = h \nu = h c / \lambda$$

h costante di Planck = 6.63×10^{-34} Joule.sec

Tipi di radiazione elettromagnetica

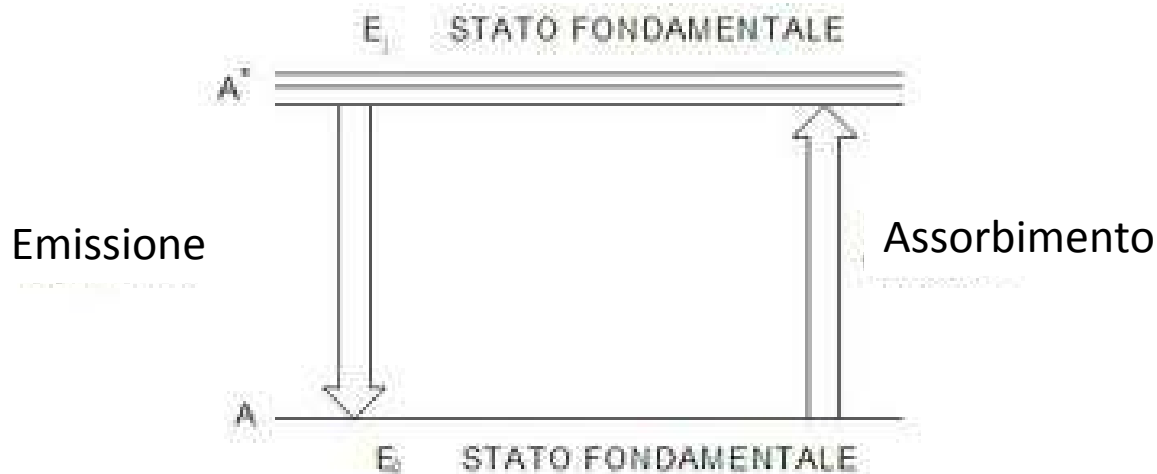
Esistono quindi vari tipi di radiazione elettromagnetica, che differiscono per la loro lunghezza d'onda (e di conseguenza per la loro frequenza ed energia)



PRINCIPIO

Atomi o molecole, trovandosi in campi energetici possono assorbire quantità definite e caratteristiche di energia

- quando atomi o molecole vengono eccitati da adatte radiazioni elettromagnetiche (“ $h\nu$ ”), passando a stati energetici maggiori, si ha il fenomeno di **ASSORBIMENTO**
- quando dagli stati eccitati, ritornano allo stato fondamentale, gli atomi e le molecole emettono quanti di energia sotto forma di radiazioni elettromagnetiche (“ $h\nu$ ”) si ha il fenomeno di **EMISSIONE**



Si ha **assorbimento** di una radiazione elettromagnetica **solo se** la sua **energia** è esattamente **uguale alla differenza di energia tra lo stato fondamentale e uno di quelli eccitati**

Analisi quantitativa

Le determinazioni quantitative sono basate sul fatto che, quando una radiazione attraversa una soluzione, viene assorbita più o meno intensamente a seconda della concentrazione; in altre parole *l'assorbimento dipende dalla concentrazione*.



I_0 l'intensità della radiazione incidente

I l'intensità della radiazione trasmessa.

Definiamo **Trasmittanza** $T = I/I_0$

Trasmittanza : $0 \leq T \leq 1$

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

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

Definendo **Assorbanza (A) o Densità Ottica (O.D)** = $\log 1/T$

$$T = 10^{-\epsilon c l} \longrightarrow \log I/I_0 = -\epsilon c l$$

$$A = \epsilon c l$$

Legge di Lambert Beer

A = assorbanza (non ha unità di misura)

C = concentrazione della soluzione o specie chimica in esame (moli/litro)

l = cammino ottico (cm), ovvero spessore dello strato attraversato dalla radiazione incidente

ϵ = coefficiente di assorbimento molare, caratteristico della sostanza ($\text{mol}^{-1} \text{L cm}^{-1}$)

Che cos'è ϵ ???

$$A = \epsilon cl$$

$$\epsilon = A / cl$$

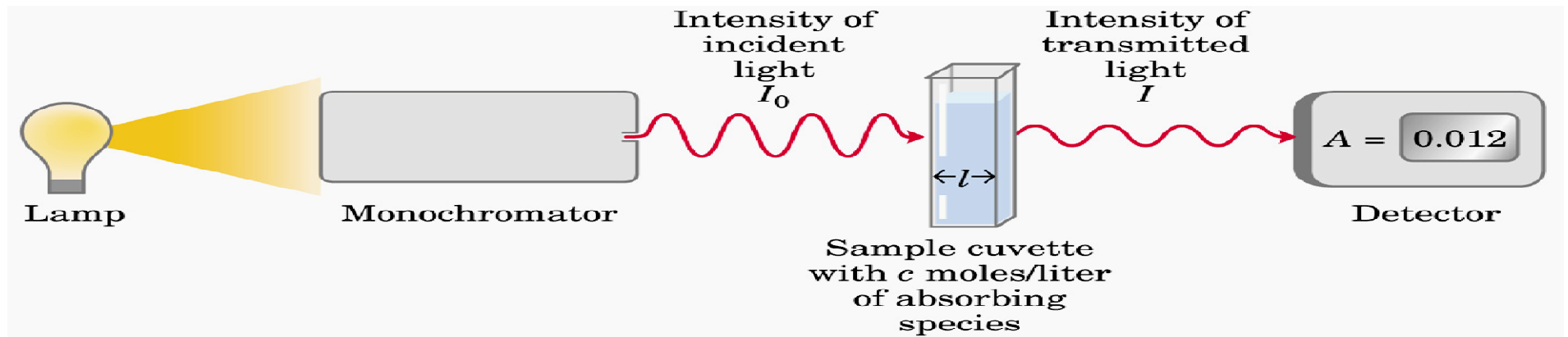
Se $l=1\text{cm}$ e $c=1\text{M}$ \longrightarrow $\epsilon = A$

Il coefficiente di estinzione molare (ϵ) rappresenta l'Assorbanza (o Densità Ottica) di una soluzione con concentrazione 1M e a cammino ottico unitario (1cm)

Validità della legge di Lambert-Beer:

- la luce incidente è monocromatica
- l'assorbimento del solvente è trascurabile
- all'aumentare della concentrazione si ha un aumento dell'indice di rifrazione e quindi una maggior dispersione del raggio nell'attraversare la soluzione stessa
- non si verificano reazioni chimiche delle molecole del campione fra loro o con il solvente

Com'è fatto uno Spettrofotometro



I componenti essenziali sono:

- Sorgente di luce policromatica (tungsteno per il visibile, deuterio per l'UV)
- Filtro o monocromatore (per selezionare una banda di λ definita)
- Cella o cuvetta contenente il campione
- Detector (trasforma il segnale luminoso in impulso elettrico)

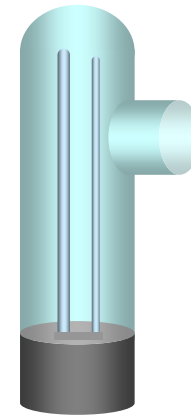
SORGENTI PER IL UV/VISIBILE

- Si utilizza una **lampada al tungsteno** (comune lampadina)
- Intervallo di utilizzazione: $\lambda=350-2200$ nm
- Utilizzabile per il visibile e il vicino infrarosso



Lampada al Deuterio $D_2 \rightarrow \lambda$ nell'UV

- $D_2 + \text{energia elettrica} \longrightarrow D_2^* \longrightarrow D_2 + h\nu$
- Intervallo di utilizzazione: $\lambda= 160-380$ nm



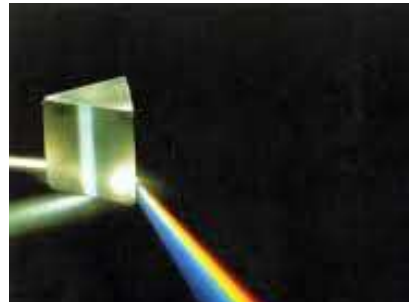
SELETTORE DI LUNGHEZZA D'ONDA

MONOCROMATORI

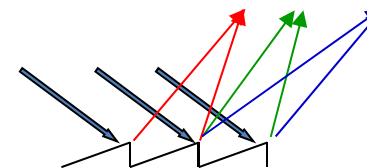
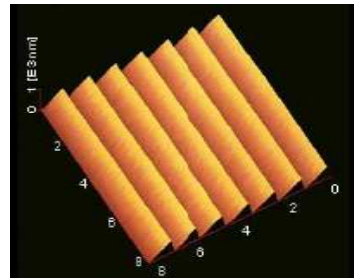
Mediante un monocromatore è possibile:

- Selezionare una qualsiasi lunghezza d'onda all'interno dell'intervallo di utilizzazione del monocromatore
- Effettuare una scansione di lunghezze d'onda
- I monocromatori in uso attualmente sono:

➤ **Prismi**



➤ **Reticoli**



CONTENITORI PER IL CAMPIONE (CUVETTE)

- Devono essere trasparenti a tutte le λ che si utilizzano
- Devono essere di geometria definita



quelle più comunemente utilizzate per analisi quantitative hanno un cammino ottico di 1 cm

UV
quarzo o
silice fusa

Visibile
vetro o
plastica

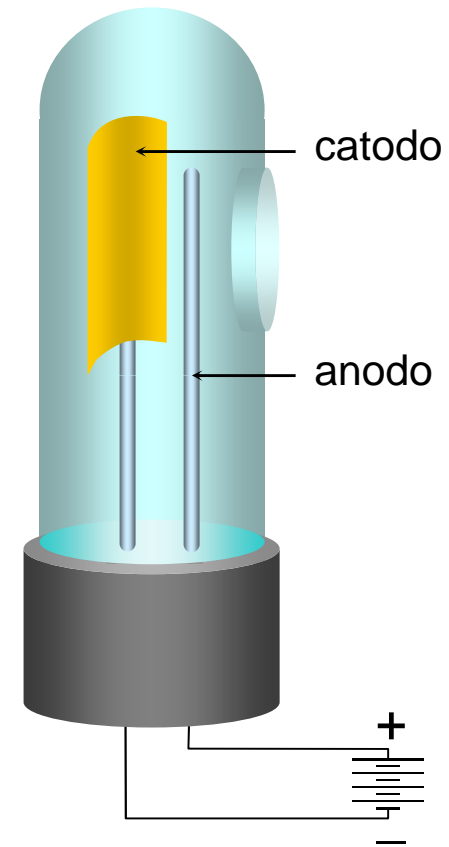
Intervallo di trasparenza:

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

RIVELATORI

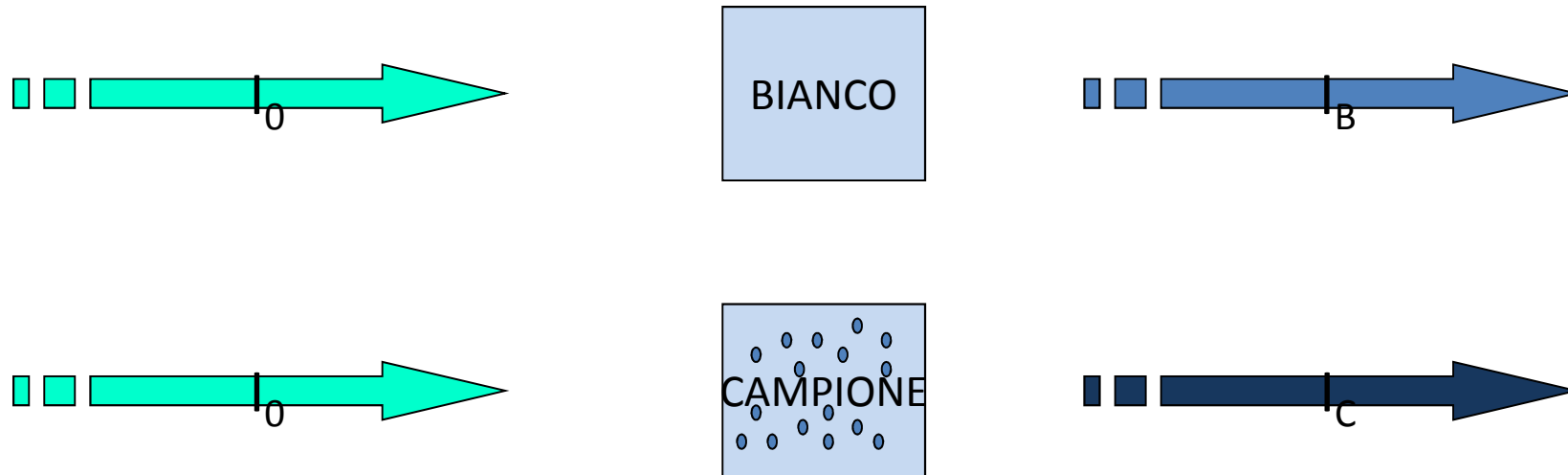
Fototubo

- Si basa sull'effetto fotoelettrico: un fotone incide sul catodo rivestito di un materiale fotosensibile, provocando l'emissione di un elettrone
- I fototubi sono soggetti ad un rumore di fondo (dark current) causato da effetti termici



IL BIANCO

L'assorbanza effettivamente misurata risente quindi di numerosi fattori non legati alla concentrazione della sostanza in esame, portando ad errori nella determinazione della concentrazione di quest'ultima.



Per aggirare questo problema, prima di misurare l'assorbanza del campione in esame, lo strumento lo confronta con il "bianco", cioè una celletta identica a quella del campione e che contiene una soluzione il più possibile simile a quella del campione ma in cui è assente la sostanza in esame. Lo strumento misura allora

$$T = I_C / I_B$$

SPETTROMETRIA
IN
BIOCHIMICA

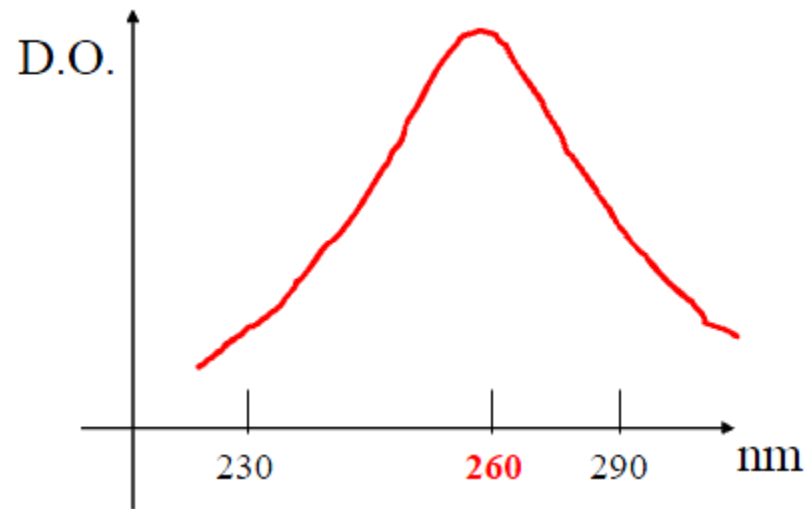
Nelle proteine solo alcuni aminoacidi sono in grado di assorbire nello spettro UV/visibile.

	$\lambda_{\max}(\text{nm})$	$\epsilon(\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1})$
tryptophan:	280	5600
tyrosine:	274	1400
phenylalanine:	257	200

Ogni proteina ha un ϵ differente che può essere stimato tramite:

$$\epsilon (280\text{nm}): \text{num}(\text{Trp}) \times 5600 + \text{num}(\text{Tyr}) \times 1400 + \text{num}(-\text{S}-\text{S}) \times 125$$

SPETTROMETRIA E ACIDI NUCLEICI



Massimo assorbimento a 260nm

Per un acido nucleico non è possibile stabilire ϵ .

Si usa il coefficiente di estinzione specifico (**K**) determinato sperimentalmente (soluzione $[\]=1\text{ mg/ml}$)

K (DNA doppia elica)= 21

K (DNA singola elica)= 23

K (RNA)= 25

Per cui

$$c=A/K$$