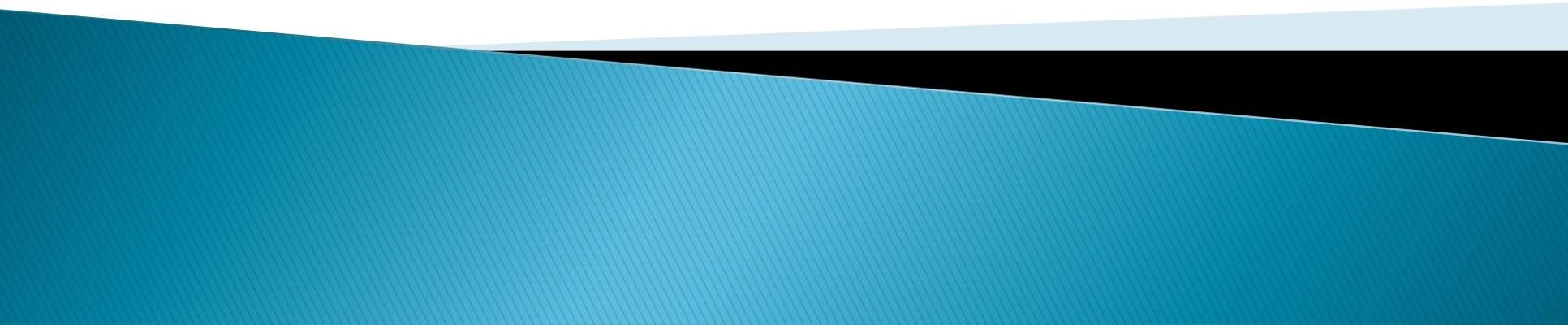


Spettrometria di assorbimento

Corso di Laboratorio di Chimica e Biochimica

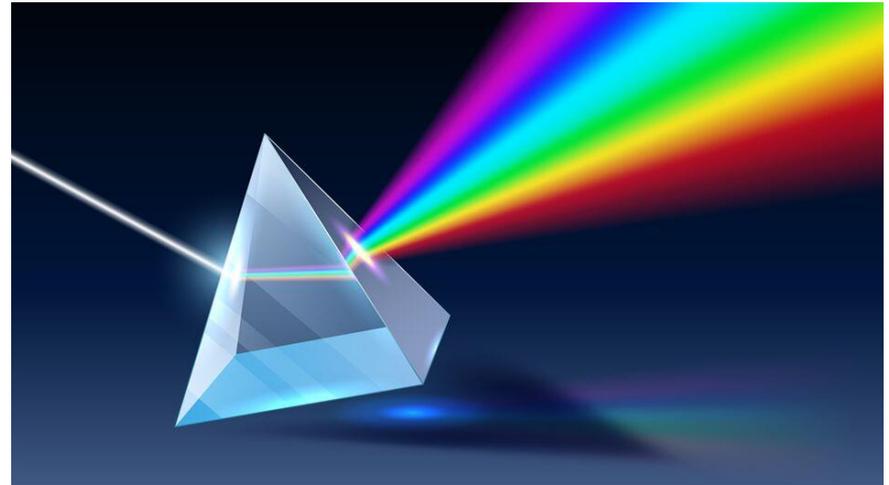
Aa 2019–20 Marco Scocchi DSV



Spettrometria di assorbimento

La spettrometria di assorbimento (spettrofotometria) UV-visibile si basa sull'assorbimento di radiazioni elettromagnetiche monocromatiche nel campo della luce visibile e dell'UV (ultravioletto) da parte di molecole.

LA spettrometria trova applicazione nella determinazione qualitativa e quantitativa di numerose sostanze organiche (biomolecole) ed inorganiche in vari campi.



- ▶ Appartiene alle **tecniche spettroscopiche**: studiano la struttura e della dinamica della materia attraverso l'analisi dell'interazione con la luce (radiazione elettromagnetica). Ruolo prominente per le indagini sulla costituzione della materia. Tecniche non distruttive nei riguardi del campione in esame. Spesso possono essere impiegate anche su sostanze non purificate.

Le proprietà della radiazione elettromagnetica (luce)

- ▶ La radiazione elettromagnetica ha una doppia natura. Essa possiede sia proprietà di un'onda e di una particella priva di massa (corpuscolo)

Natura ondulatoria



$$E = h\nu = h \frac{c}{\lambda}$$

λ (lunghezza d'onda) e ν (frequenza) sono correlate dalla relazione:

$$\lambda = c/\nu \quad c \simeq 3 \times 10^8 \text{ m/s}$$

λ e ν sono inversamente proporzionali

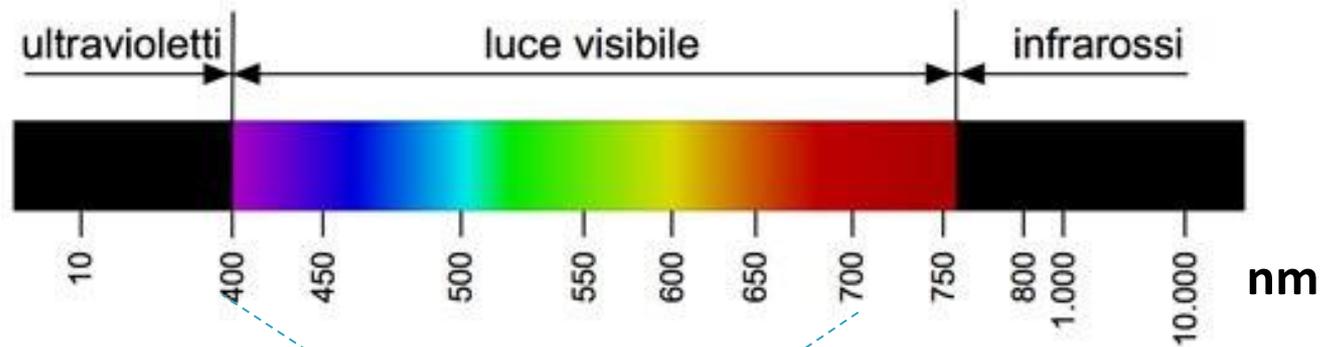
Natura corpuscolare

Consiste in "pacchetti" discreti di energia "fotoni", la cui energia E dipende dalla frequenza ν

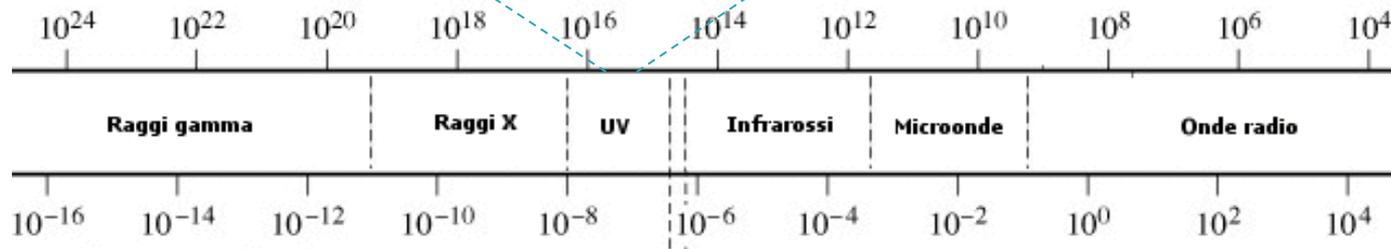
h indica la costante di Planck: $h = 6.63 \cdot 10^{-34} \text{ J s}$

E e ν sono direttamente proporzionali

La spettro elettromagnetico



Frequenza ν (Hz)



Lunghezza d'onda λ (m)

Che accade quando una radiazione luminosa colpisce una molecola ?

γ	< 0,1 nm		emissione nucleare
raggi X	0,1-10 nm		transizioni elettroniche (elettroni interni)
UV	10-380 nm		transizioni elettroniche (elettroni di valenza)
Vis	380-780 nm		transizioni elettroniche (elettroni di valenza)
IR	780 nm-100 μ m		transizioni vibrazionali
Microonde	100 μ m- 1 cm		transizioni rotazionali
onde radio	1 cm- metri		assorbimento nucleare



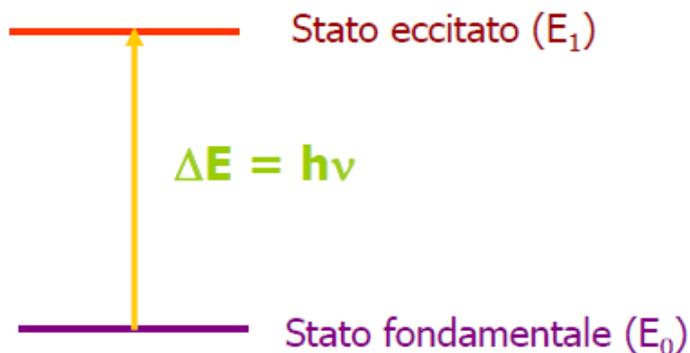
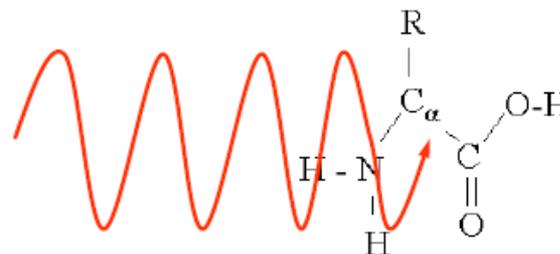
Le molecole interagiscono con la radiazione elettromagnetica assorbendo o cedendo energia passando da stati di energia minore a stati di energia maggiore (assorbimento) o viceversa (emissione)

Spettrofotometria di assorbimento UV-Vis

Nella tecnica di assorbimento Uv-Vis si impiegano radiazioni nell'intervallo 190-780 nm, la cui energia è sufficiente ad **attivare transizioni elettroniche nei campioni (atomi, molecole)**, che causano il passaggio di elettroni degli strati esterni a stati eccitati (stato energetico maggiore)

Visibile : 380 - 780 nm

UV (vicino Ultravioletto): 190 - 380 nm



Perché si abbia assorbimento della radiazione, l'energia del fotone eccitante deve essere esattamente uguale alla differenza di energia fra lo stato fondamentale ed uno degli stati eccitati della specie assorbente : $h\nu = \Delta E$

Utilizzi:

- ✓ Identificare molecole
- ✓ Quantificare le molecole
- ✓ Analizzare cambiamenti nelle molecole (cinetiche di reazione)

Assorbimento della luce e colore complementare

Quando la luce colpisce un campione, le lunghezze d'onda con energia idonea a promuovere il salto degli elettroni allo stato eccitato sono **rimosse dallo spettro trasmesso**



Noi vediamo gli oggetti colorati perché essi assorbono la luce di particolari lunghezze d'onda riflettendo le altre quindi ai nostri occhi giungono solo le lunghezze riflesse. Le differenti lunghezze d'onda vengono interpretate dal cervello come colori.

Misura dell'assorbimento: la trasmittanza

Quando un campione è attraversato da una radiazione elettromagnetica di $190 \text{ nm} < \lambda < 780 \text{ nm}$ c'è assorbimento quando la **radiazione incidente** di intensità I_0 di una determinata λ attraversando il campione viene trasmessa ad un rivelatore ad una intensità I inferiore.

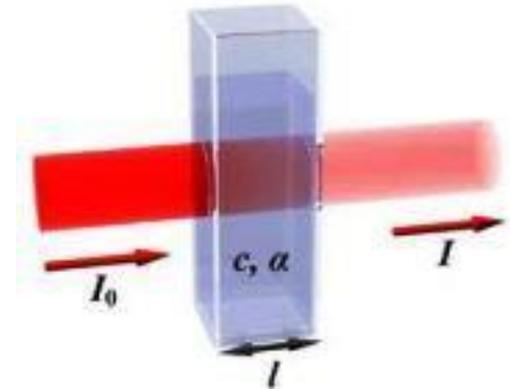
Il rapporto tra luce trasmessa e luce incidente:

$$\text{Trasmittanza } T = \frac{I}{I_0} \quad 0 \leq T \leq 1$$

La **trasmittanza** esprime quale frazione della luce incidente ha attraversato il campione senza essere assorbita

$$\text{Trasmittanza } \% = T \% = 100 * T$$

L = cammino ottico = spessore della soluzione attraversato dalla luce

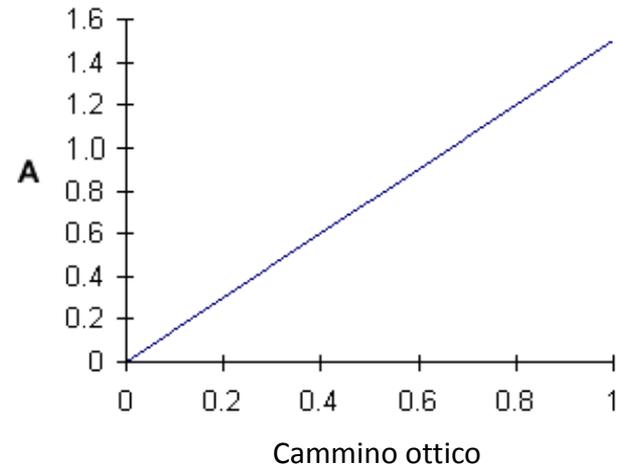
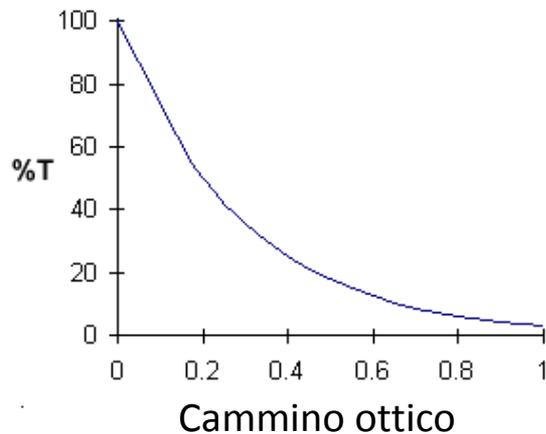


I_0 = intensità di luce incidente
 I = intensità di luce trasmessa

$$\text{Assorbanza } A = \log_{10}(1/T) \quad \rightarrow \quad A = -\log_{10} T$$

Relazione tra trasmittanza e assorbanza

$$\text{Assorbanza } A = \log_{10}(1/T) \quad \rightarrow \quad A = -\log_{10} T$$



La trasmittanza non è linearmente correlata alla lunghezza del cammino ottico

I = intensità di luce trasmessa
 I_0 = intensità di luce incidente

I	I_0	T	$T\%$	A
100	100	1	100%	0,00
90	100	0,9	90%	0,05
80	100	0,8	80%	0,10
50	100	0,5	50%	0,30
30	100	0,3	30%	0,52
20	100	0,2	20%	0,70
10	100	0,1	10%	1,00
1	100	0,01	1%	2,00

La legge di Lambert-Beer

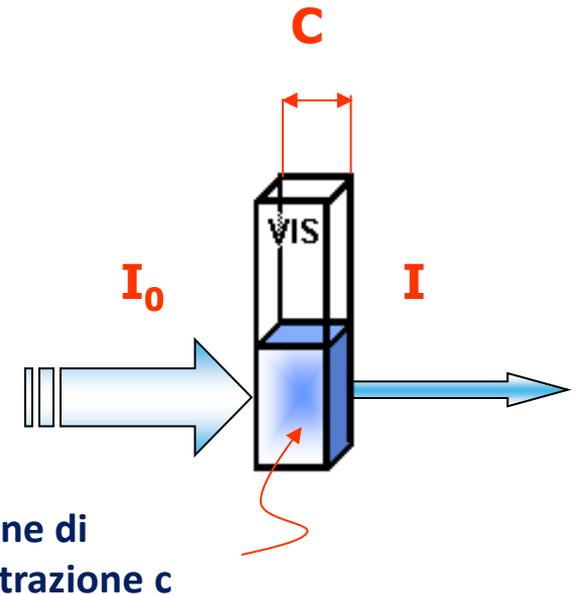
L'assorbanza **A** è proporzionale alla concentrazione della sostanza assorbente, e allo spessore della soluzione attraversata (cammino ottico).

$$A = \epsilon \cdot l \cdot C$$

c = concentrazione
molare della
molecola [M]

coefficiente di assorbimento
molare [$M^{-1} \text{ cm}^{-1}$]

l = cammino ottico
della cella [cm]



Legge di **Lambert-Beer**: lega l'assorbanza alla concentrazione della molecola che assorbe.

Coefficiente di assorbimento molare ϵ : valore di assorbanza del composto quando [$l = 1 \text{ cm}$] e [$C = 1 \text{ M}$],

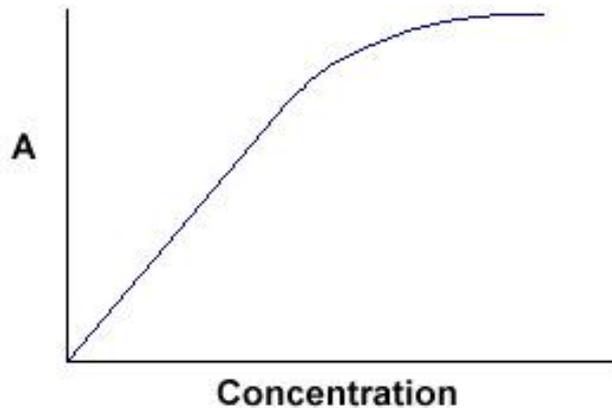
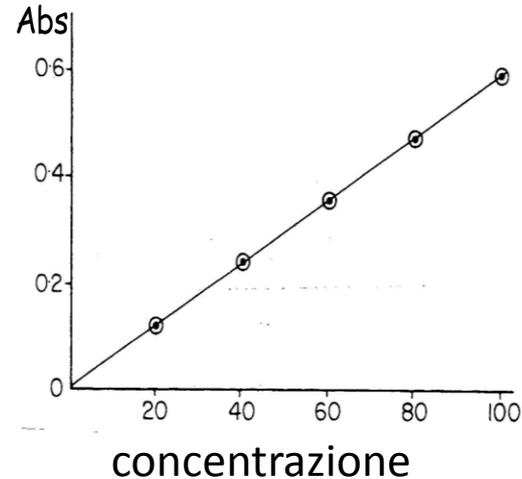
Unità di misura: [M^{-1}, cm^{-1}] dipende da:

- dalla specie chimica analizzata
- dalla lunghezza d'onda della radiazione assorbita
- dalla natura del solvente

La legge di Lambert-Beer (II)

Conoscendo il valore di ϵ si può conoscere c da misure sperimentali di assorbanza (Abs)

$$C = \frac{A}{\epsilon l}$$



assorbanza e concentrazione sono proporzionali solo per soluzioni diluite (<10 mM)

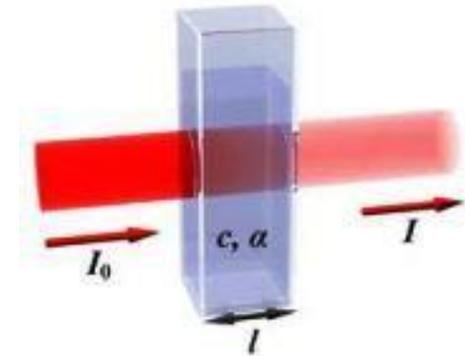
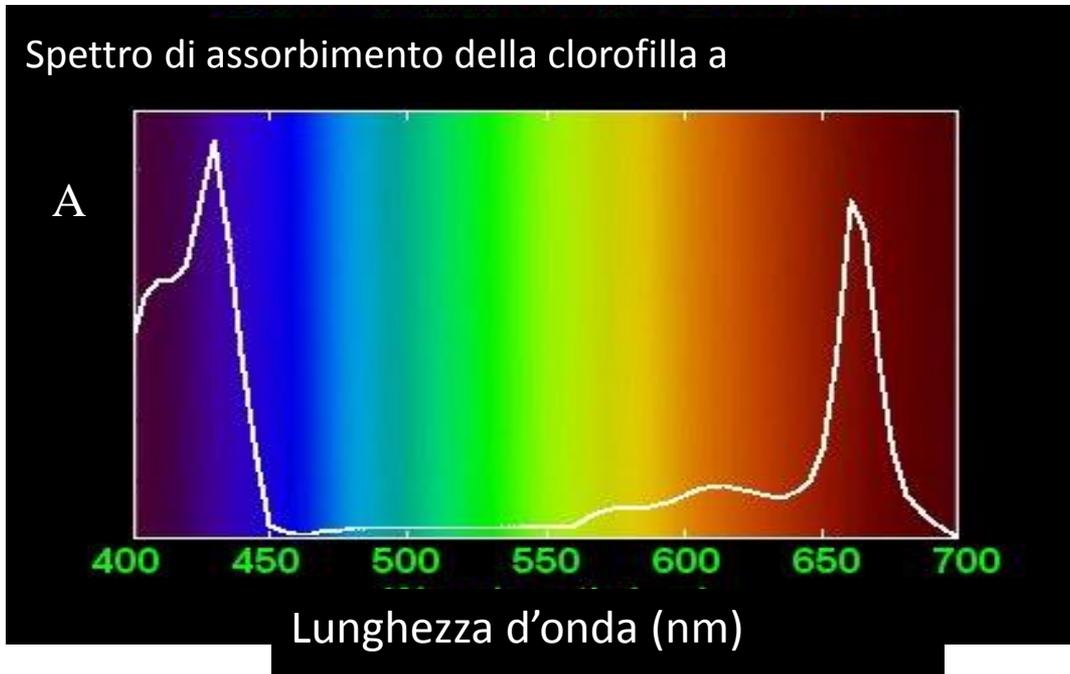
Deviazioni chimiche: si osserva una deviazione dalla linearità verso il basso (interferenze per vicinanza)

Deviazioni strumentali

Spettro di assorbimento

Uno **spettro di assorbimento** è un grafico in cui si riporta l'intensità della radiazione assorbita dal campione (A) in funzione della lunghezza d'onda o frequenza della radiazione stessa. Permette di identificare molecole pure.

Spettro di assorbimento della clorofilla a



Nel caso di un atomo, lo spettro di assorbimento è costituito da righe, mentre per una molecola (sistema più complesso), è costituito da bande

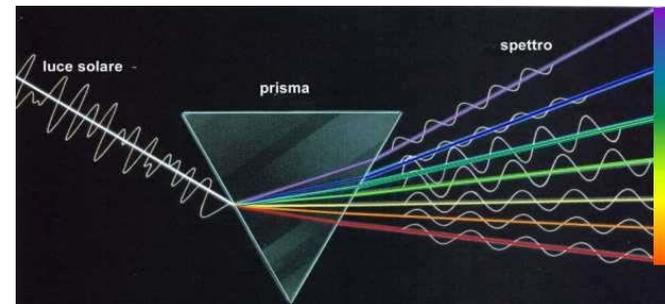
Lo spettrofotometro



Schema a blocchi di uno spettrofotometro UV/vis

Sorgente della radiazione policromatica. Luce visibile: lampade a incandescenza (es. a filamento di tungsteno). Regione UV: lampada a scarica di gas (es. al deuterio).

Monocromatore: sistema ottico disperde la luce policromatica in bande monocromatiche, 2 tipi:
- **filtri interferenziali:** bloccano una parte della luce

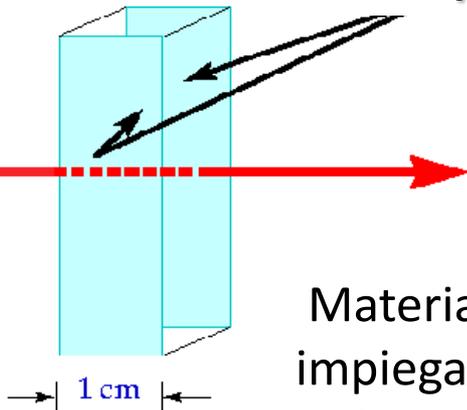


- **elementi disperdenti (prisma o reticolo),** separano le componenti della radiazione selezionano la banda desiderata

La cella (cuvette) del campione



lati opachi



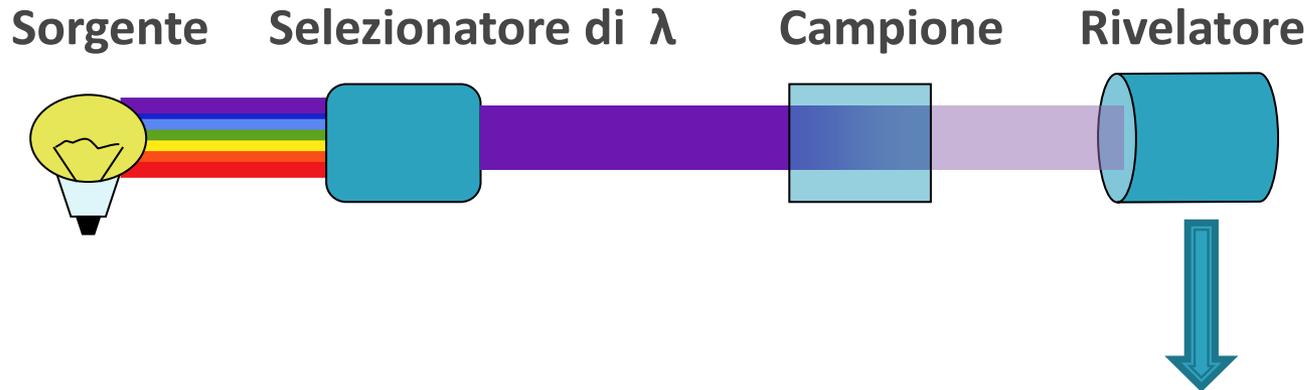
Celle o **cuvette**: contiene il campione da esaminare generalmente in soluzione:
Volumi 0,2-3 ml

Materiali trasparenti alla radiazione impiegata, con uno spessore definito (cammino ottico).

- UV: celle in quarzo (SiO_2) 150-3000 nm.
- In plastica (Vis o UV/vis) (250-800 nm)



Il rivelatore/amplificatore



Trasforma l'intensità della radiazione elettromagnetica giunta ad esso (trasmessa) in un segnale elettrico (misura).

Il segnale amplificato è convertito in un valore numerico proporzionale all'intensità del segnale compreso tra 0 a 100.

Dal rivelatore dipende sia la sensibilità sia l'accuratezza dello strumento.

la sensibilità di uno strumento è il più piccolo valore della grandezza che lo strumento può rilevare.

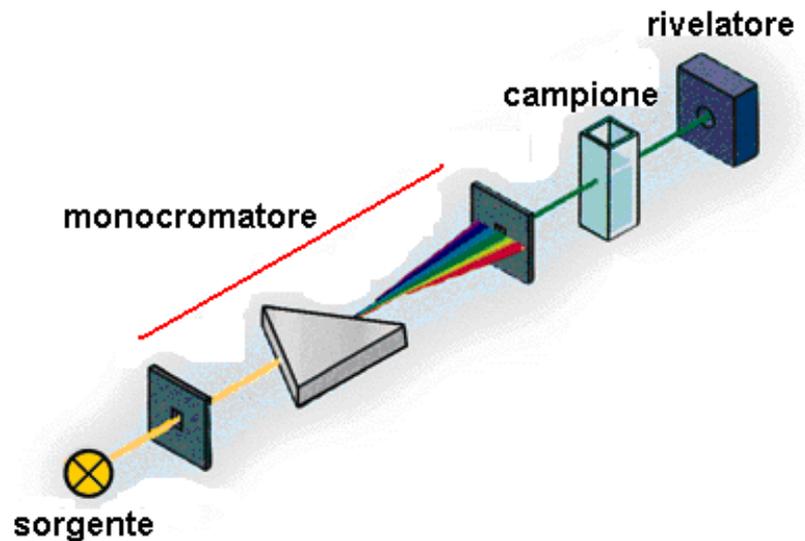
Spettrofotometri monoraggio

Spettrofotometri **monoraggio**: prevalentemente per analisi quantitativa (misure di concentrazione) con misure a singole λ .

Per ogni λ , si sottrae il contributo del solvente a quello del campione: la lettura contro il bianco (solvente).

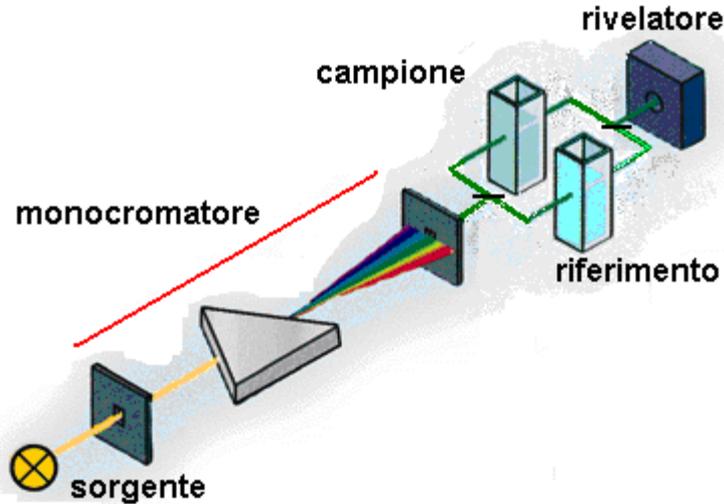


Jenway



Spettrofotometri a doppio raggio

Hanno un sistema che invia due raggi, identici per frequenza e intensità, uno attraverso il campione e l'altro attraverso il solvente (bianco), permette di ottenere un confronto continuo tra l'assorbanza del campione e quella del solvente.



E' possibile registrare continuamente lo spettro di assorbimento. Il doppio raggio è preferito per le applicazioni qualitative.

<https://youtu.be/wxrAELeXlek>

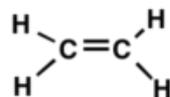
Molecole che assorbono nel visibile-UV

- ▶ Dipende dalla disposizione degli elettroni:

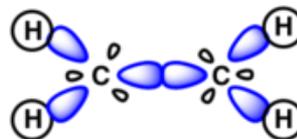
Legami π hanno densità elettronica fuori dall'asse di unione tra i nuclei = minor energia per passare allo stato eccitato π^*

Se aumenta il numero di doppi legami (**coniugati**) aumenta il n di elettroni che possono interagire tra loro nei legami π (e- delocalizzati)

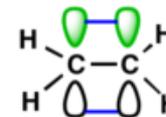
Breaking down the bonding in ethene



Sigma (σ) bond framework:
("end-on" overlap)



Pi (π) bond framework:
("side-on" overlap)



There are 5 sigma bonds in ethene

- 1 C-C sigma bond (sp^2-sp^2)
- 4 C-H sigma bonds (sp^2-H)

One pi bond in ethene

- 1 C-C pi bond

Rappresentazione dell'etilene

Biomolecole che assorbono:

Contengono gruppi chimici che assorbono: **cromofori**

Cromofori con ϵ tra 1000 and 10000 contengono gruppi aromatici, doppi legami, doppi legami coniugati.

Cromoforo	Esempio	λ_{\max} , nm	ϵ , [M ⁻¹ ,cm ⁻¹]
Alchene	C ₆ H ₁₃ CH=CH	177	13000
Alchene coniugato	CH ₂ =CHCH=CH ₂	217	21000
Carbonile	(CH ₃) ₂ C=O	186, 280	1000, 16
Carbossile	CH ₃ COOH	204	41
Ammide	CH ₃ CONH ₂	214	60
Nitro	CH ₃ NO ₂	280	22
Nitrato	C ₂ H ₅ ONO ₂	300, 665	12
Aromatico	Benzene (C ₆ H ₆)	204, 256	7900, 200

Aumentando il n di doppi legami coniugati aumenta la λ della luce assorbita

	λ_{\max} , nm	ϵ , [M ⁻¹ ,cm ⁻¹]
Adenina	260	15200
Citosina	260	7050
Guanina	260	12010
Timina	260	8400