

# Spettrometria di assorbimento

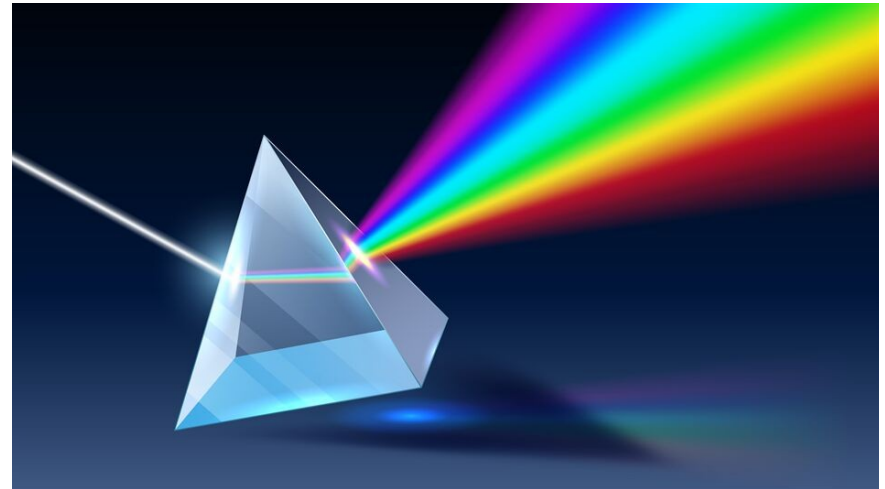
Corso di Laboratorio di Chimica e Biochimica  
Aa 2020-21 Marco Scocchi DSV

# 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 ha un ruolo prominente per le indagini sulle biomolecole.

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

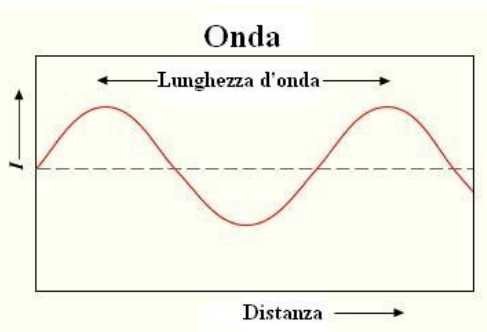


- ▶ **Tecniche spettroscopiche:** utilizzate per studiare la struttura, il microambiente e la dinamica molecolare attraverso l'analisi dell'interazione con le radiazioni elettromagnetiche.
- ▶ Tecniche non distruttive nei riguardi del campione in esame. Spesso possono essere impiegate anche su biomolecole non purificate.

# Le proprietà della radiazione elettromagnetica

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

## Natura ondulatoria



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

$\lambda$  (lunghezza d'onda) e  $\nu$  (frequenza) sono correlate dalla relazione:

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

$c = v$  di propagazione.

$\lambda$  e  $\nu$  sono inversamente proporzionali

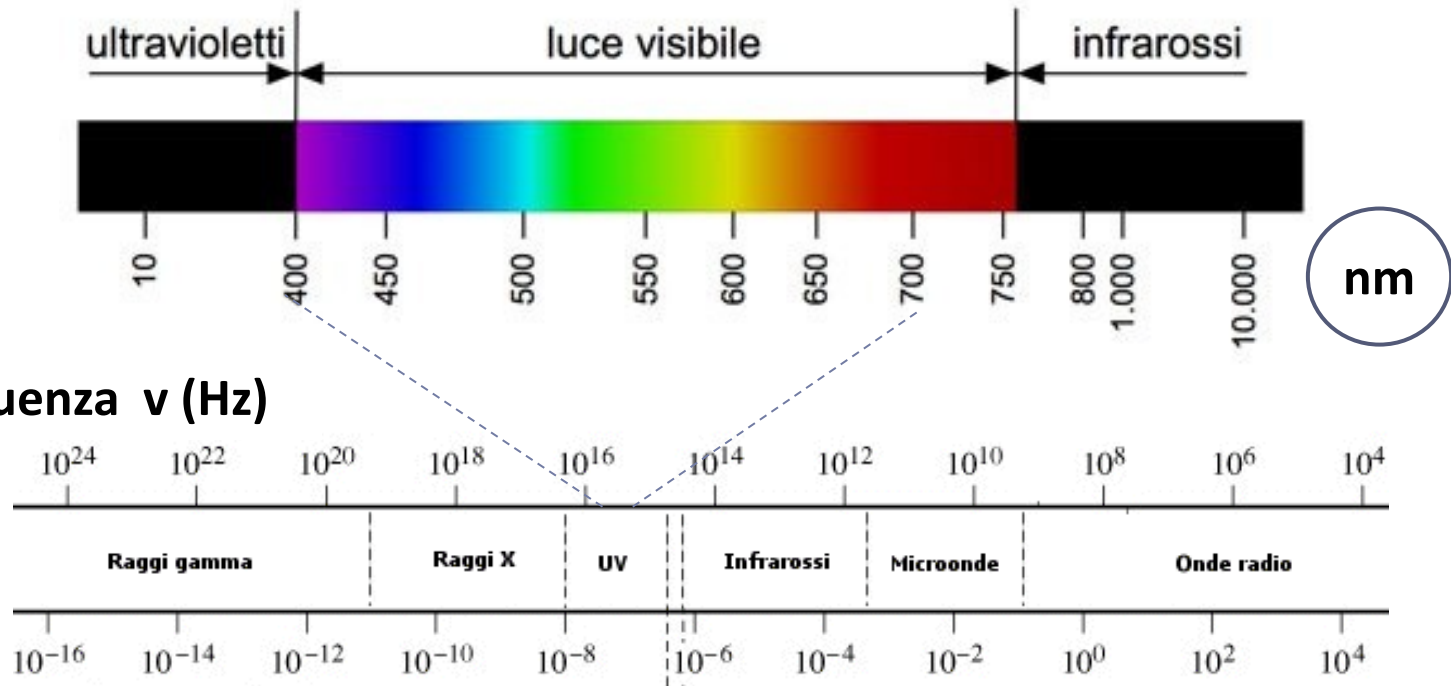
## Natura corpuscolare

Consiste in "pacchetti" discreti di energia "fotoni", la cui energia  $E$  dipende dalla frequenza  $\nu$

$E$  e  $\nu$  sono direttamente proporzionali

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


# La spettro elettromagnetico




Lunghezza d'onda  $\lambda$  (m)

Luce visibile:  $\lambda = 380$  nm e  $780$  nm

# Che accade quando una radiazione luminosa colpisce una molecola ?

$\gamma$	< 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 $\mu$ m		transizioni vibrazionali
Microonde	100 $\mu$ m- 1 cm		transizioni rotazionali
onde radio	1 cm- metri		assorbimento nucleare



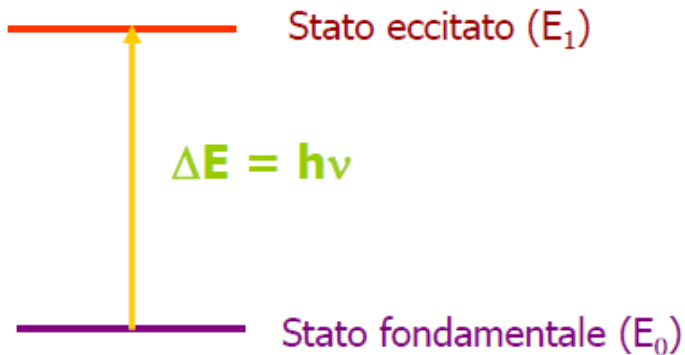
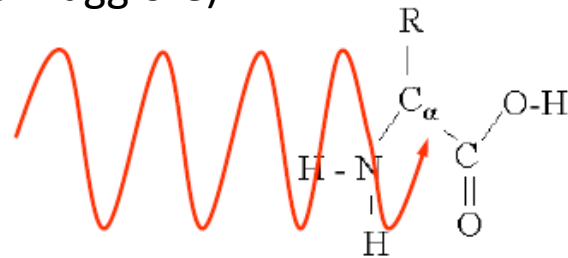
Le molecole interagiscono con la radiazione elettromagnetica assorbendo o cedendo energia passando da stati di energia minore a stati di energia maggiore (assorbimento) o viceversa (emissione)

# 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 dallo stato fondamentale a stati eccitati (stato energetico maggiore)

Visibile : 380 - 780 nm

UV (vicino Ultravioletto ) : 190 - 380 nm



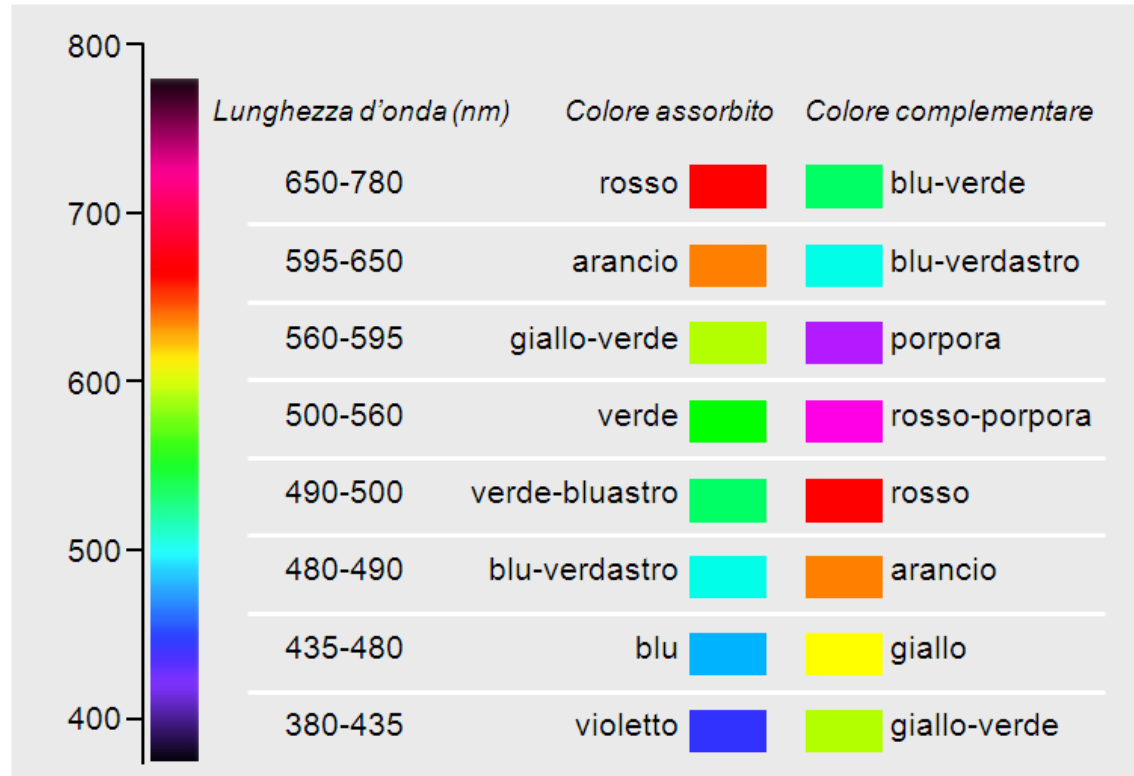
Perché si abbia assorbimento della radiazione, l'energia del fotone eccitante deve essere esattamente **uguale alla differenza di energia fra lo stato fondamentale ed uno degli stati eccitati** della specie assorbente :  $h\nu = \Delta E$

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**



Gli oggetti appaiono colorati perché essi assorbono la luce di particolari lunghezze d'onda riflettendo le altre quindi agli occhi giungono solo le  $\lambda$  riflesse. Le differenti lunghezze d'onda vengono interpretate dal cervello come colori.

# Misura dell'assorbimento: la trasmittanza

Un campione attraversato da una radiazione elettromagnetica di assorbe la luce quando la **radiazione incidente** di intensità  $I_0$ , ad una determinata  $\lambda$  ( $190 \text{ nm} < \lambda < 780 \text{ nm}$ ) attraversando il campione diminuisce ad una intensità  $I$  inferiore.

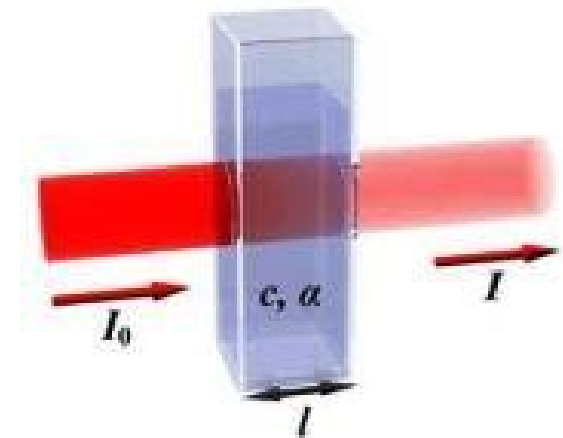
Il rapporto tra luce trasmessa e luce incidente:

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

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

Può essere espressa come %

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



$I_0$  = intensità di luce incidente

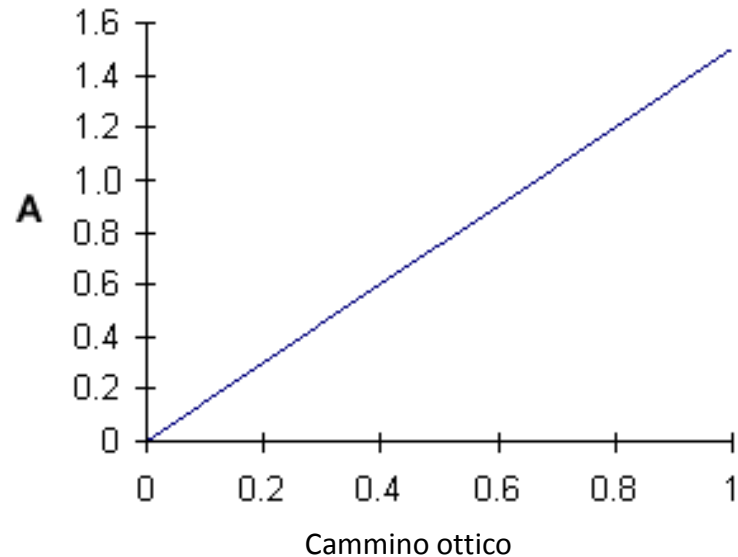
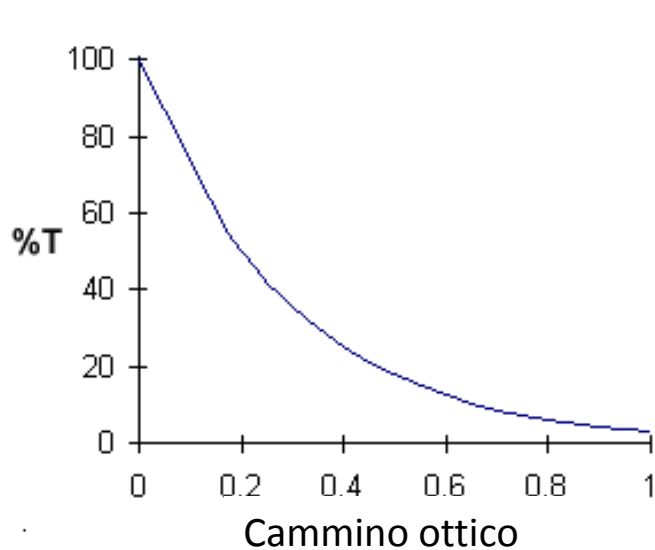
$I$  = intensità di luce trasmessa

$l$  = cammino ottico = spessore della soluzione attraversato dalla luce



# Relazione tra trasmittanza e assorbanza

$l$  = cammino ottico = spessore della soluzione attraversato dalla luce



Trasmittanza: non linearmente correlata alla lunghezza del cammino ottico, il decadimento è esponenziale

Utile convertirla in una grandezza linearmente proporzionale ad  $l$ :  
l'assorbanza ( $A$ )

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

# Relazione tra trasmittanza e assorbanza

---

<b>I</b>	<b>I<sub>0</sub></b>	<b>T</b>	<b>T%</b>	<b>A</b>
<b>100</b>	<b>100</b>	<b>1</b>	<b>100%</b>	<b>0,00</b>
<b>90</b>	<b>100</b>	<b>0,9</b>	<b>90%</b>	<b>0,05</b>
<b>80</b>	<b>100</b>	<b>0,8</b>	<b>80%</b>	<b>0,10</b>
<b>50</b>	<b>100</b>	<b>0,5</b>	<b>50%</b>	<b>0,30</b>
<b>30</b>	<b>100</b>	<b>0,3</b>	<b>30%</b>	<b>0,52</b>
<b>20</b>	<b>100</b>	<b>0,2</b>	<b>20%</b>	<b>0,70</b>
<b>10</b>	<b>100</b>	<b>0,1</b>	<b>10%</b>	<b>1,00</b>
<b>1</b>	<b>100</b>	<b>0,01</b>	<b>1%</b>	<b>2,00</b>

I = intensità di luce trasmessa

I<sub>0</sub> = intensità di luce incidente

# La legge di Lambert-Beer

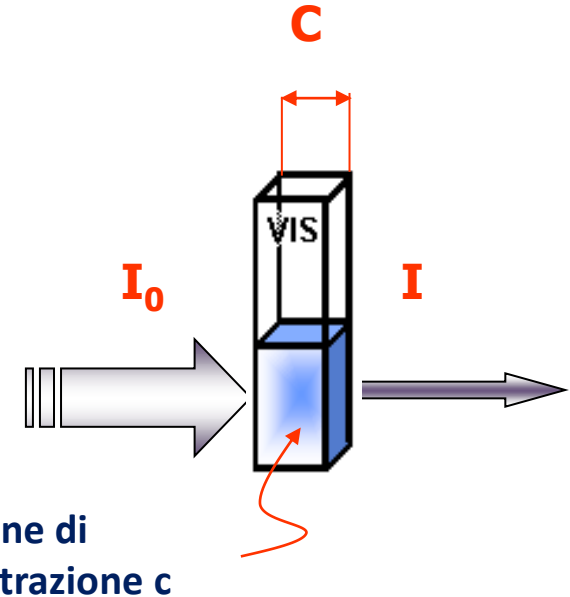
L'assorbanza **A** è proporzionale alla concentrazione della sostanza assorbente, e allo spessore della soluzione attraversata (cammino ottico).

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

$c$  = 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.

**Soluzione di  
concentrazione  $c$**

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

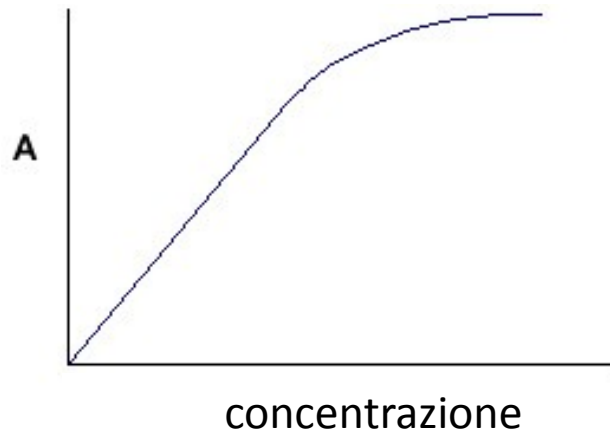
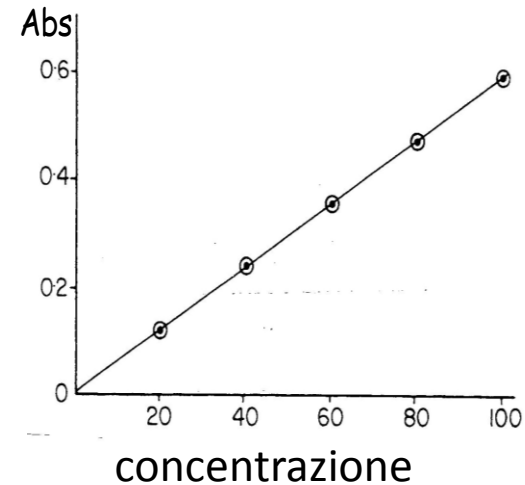
Unità di misura: [ $M^{-1}, \text{cm}^{-1}$ ] dipende dalla:

Specie chimica analizzata  
 $\lambda$  della radiazione assorbita  
Natura del solvente

# La legge di Lambert-Beer (II)

Dal valore di  $\epsilon$  si può ricavare  $c$  del campione da misure sperimentali di assorbanza (A o Abs)

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



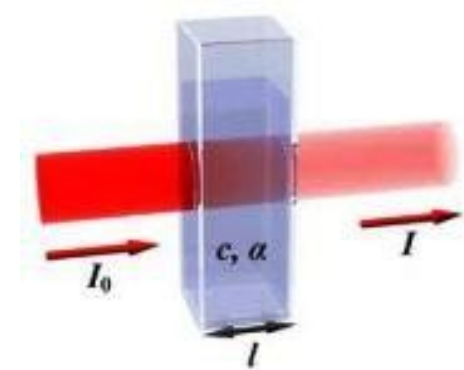
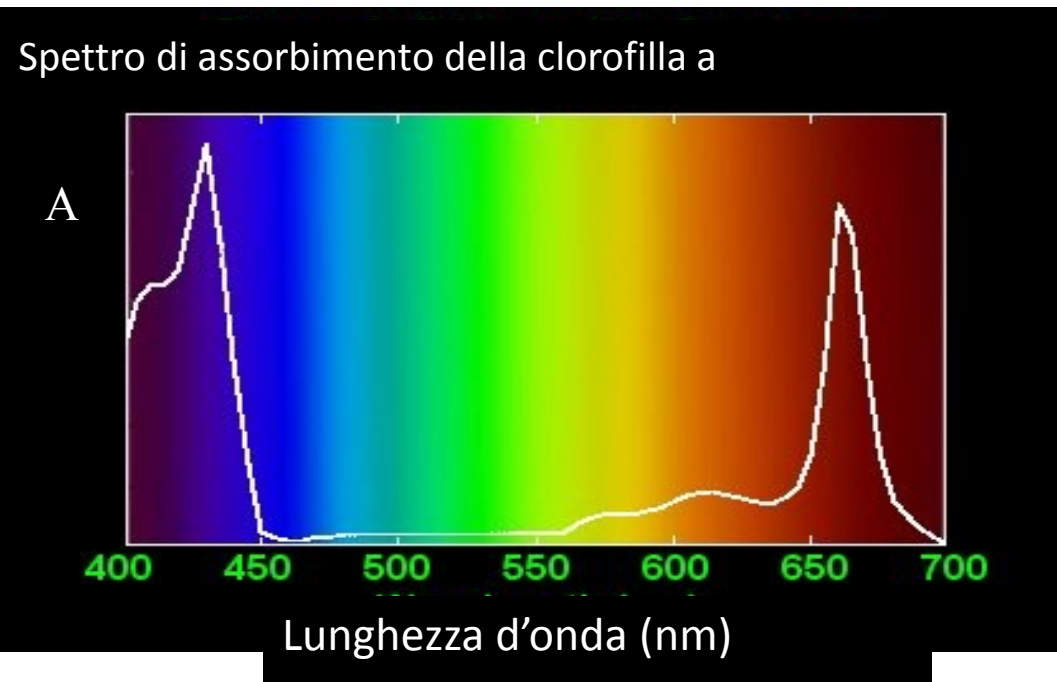
Assorbanza e concentrazione sono proporzionali solo per soluzioni diluite (<10 mM)

Si osservano deviazioni dalla linearità verso il basso dovute a interferenze per vicinanza.

Deviazioni strumentali

# Lo 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.



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

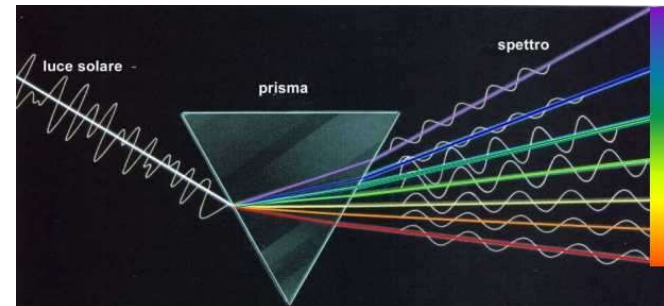
# Lo spettrofotometro



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

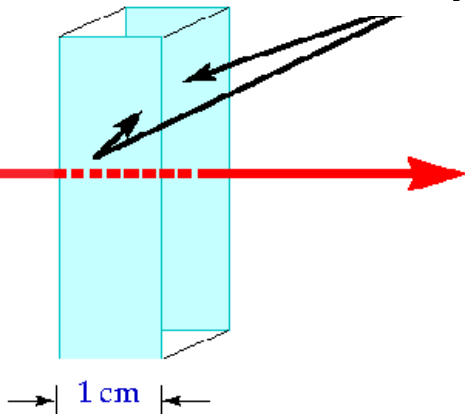


- **elementi disperdenti (prisma o reticolo),** separano le componenti della radiazione selezionano la banda desiderata

# La cella (cuvette) del campione



lati opachi



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

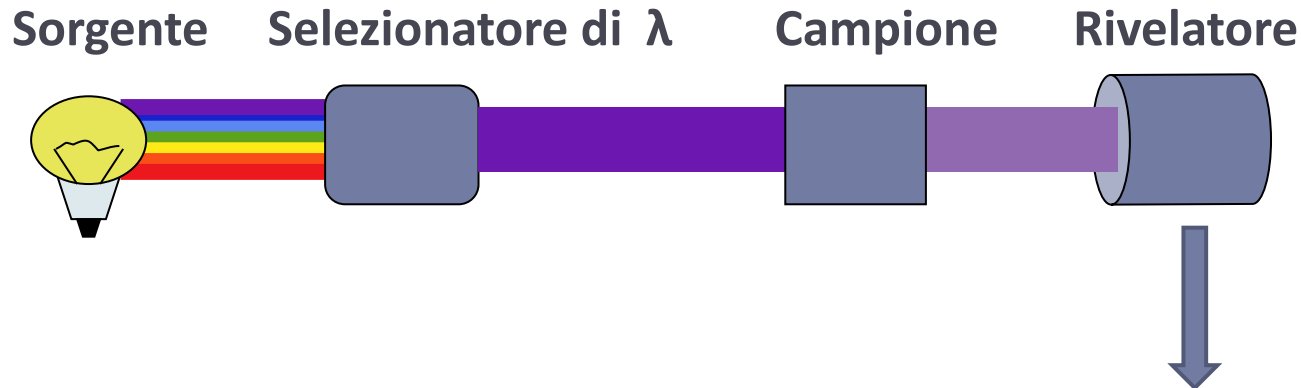
trasparenti alla radiazione con uno spessore definito (cammino ottico).

- UV: celle in quarzo ( $\text{SiO}_2$ ) 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.



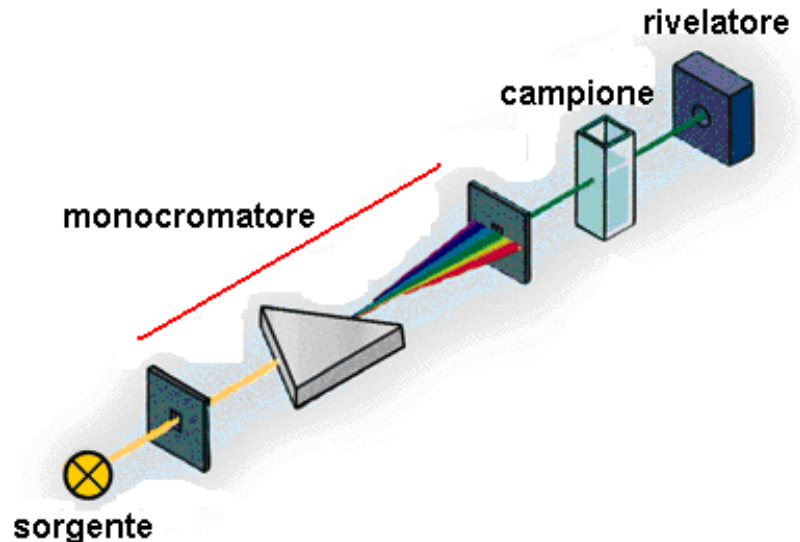
# Spettrofotometri monoraggio

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

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

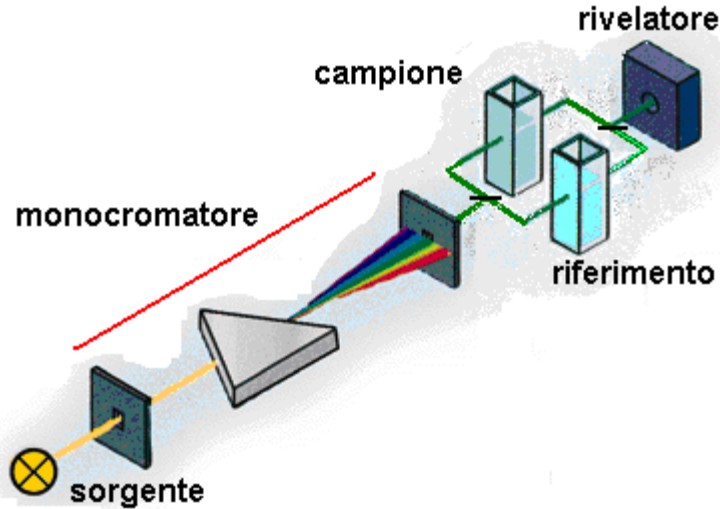


*Jenway*



# 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>

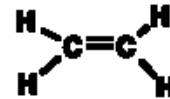
# Molecole che assorbono nel visibile-UV

- ▶ Dipende dalla disposizione degli elettroni:

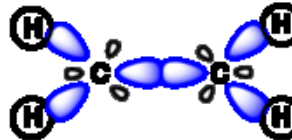
Legami  $\pi$  hanno densità elettronica fuori dall'asse di unione tra i nuclei = minor energia per passare allo stato eccitato  $\pi^*$

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

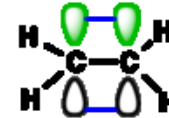
Breaking down the bonding in ethene



Sigma ( $\sigma$ ) bond framework:  
("end-on" overlap)



Pi ( $\pi$ ) 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 nel visibile-UV

Contengono gruppi chimici che assorbono: **cromofori** contengono gruppi aromatici, doppi legami, doppi legami coniugati.

Cromoforo	Esempio	$\lambda_{\max}$ , nm	$\epsilon$ , [M <sup>-1</sup> ,cm <sup>-1</sup> ]
Alchene	C <sub>6</sub> H <sub>13</sub> CH=CH	177	13000
Alchene coniugato	CH <sub>2</sub> =CHCH=CH <sub>2</sub>	217	21000
Carbonile	(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> C=O	186, 280	1000, 16
Carbossile	CH <sub>3</sub> COOH	204	41
Ammide	CH <sub>3</sub> CONH <sub>2</sub>	214	60
Nitro	CH <sub>3</sub> NO <sub>2</sub>	280	22
Aromatico	Benzene (C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> )	204, 256	7900, 200

Aumentando il n di doppi legami coniugati aumenta la  $\lambda$  della luce assorbita

	$\lambda_{\max}$ , nm	$\epsilon$ , [M <sup>-1</sup> ,cm <sup>-1</sup> ]
Adenina	260	15200
Citosina	260	7050
Guanina	260	12010
Timina	260	8400