

Fondamenti di spettrofotometria

Spettroscopia UV/Vis

Spettroscopia

Definizione: Lo studio della struttura e della dinamica della materia (in biologia delle molecole) attraverso l'analisi dell'interazione con la luce

Principio : La lunghezza d'onda della luce (la sua energia) determina il modo in cui questa interagisce con la materia

Serve per :

- Quantificare molecole

- Identificare molecole

- Analizzare cambiamenti dinamici nella composizione o nella struttura delle molecole (cinetica di reazioni ...)

Proprietà della luce

La Radiazione Elettromagnetica

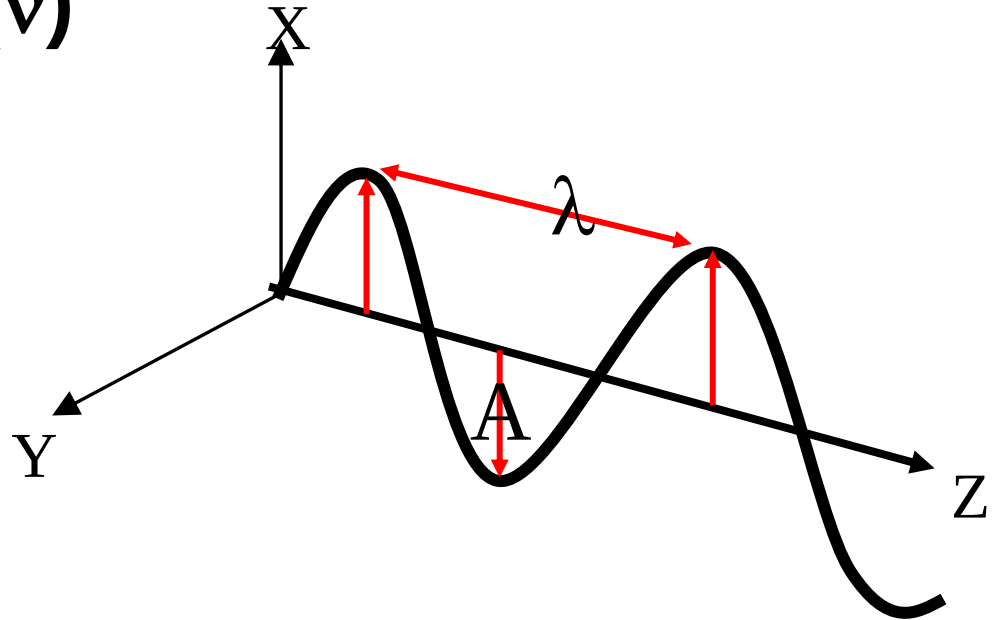
- Secondo la meccanica quantistica la radiazione elettromagnetica ha una doppia natura. Essa possiede le proprietà di un'onda e di un corpuscolo

NATURA ONDULATORIA

lunghezza d'onda (λ)

frequenza (ν)

$$\nu = c / \lambda$$



Parametri di un'onda:

Lunghezza d'onda (λ): distanza tra due massimi

Frequenza (ν): numero di oscillazioni in 1 secondo (Hz = 1 ciclo/s)
nel vuoto $c \cong 3 \cdot 10^8$ m/s.

Frequenza e lunghezza d'onda sono **INVERSAMENTE PROPORZIONALI**

NATURA CORPUSCOLARE

Una radiazione elettromagnetica consiste in “pacchetti discreti” di energia, chiamati **FOTONI**, la cui energia dipende dalla frequenza, secondo l'equazione:

$$E = h \cdot \nu$$

dove h indica la costante di Planck: $h = 6.63 \cdot 10^{-34} \text{ J} \cdot \text{s}$
L'energia di un fotone viene a volte espressa anche in elettron-volt ($1\text{eV} = 1.6 \cdot 10^{-19} \text{ J}$).

$$E = h \cdot \nu$$

→ **ENERGIA E FREQUENZA SONO DIRETTAMENTE PROPORZIONALI**

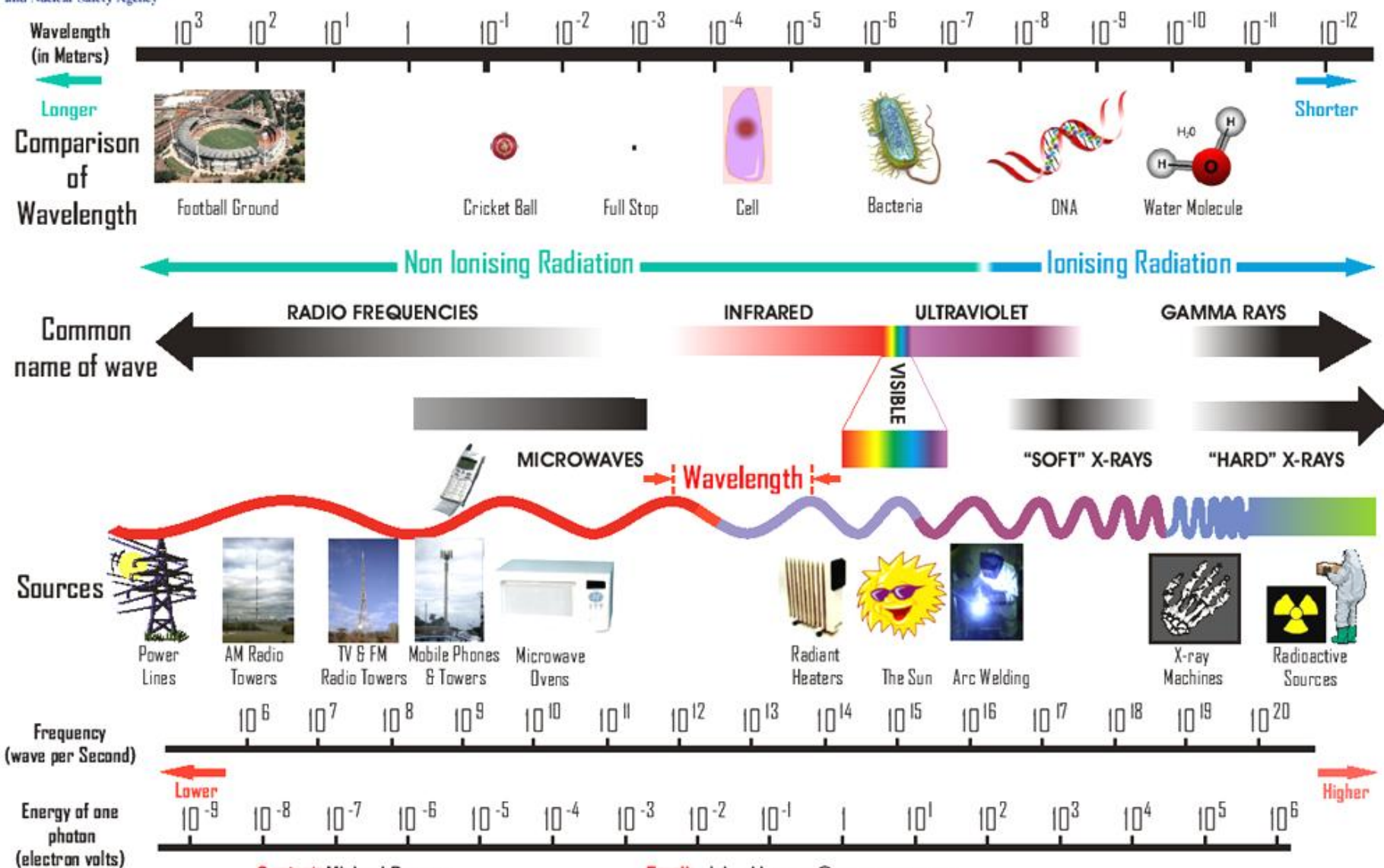
Questa relazione ci indica l'energia associata a ciascun fotone per ogni fascio di frequenza ν .

Un fascio di luce è più o meno intenso a seconda che porti più o meno fotoni nell'unità di tempo, ma **l'energia di ciascun fotone** (il *quanto di energia*), è sempre la stessa per una determinata frequenza della radiazione.



Australian Government
Australian Radiation Protection
and Nuclear Safety Agency

THE ELECTROMAGNETIC SPECTRUM

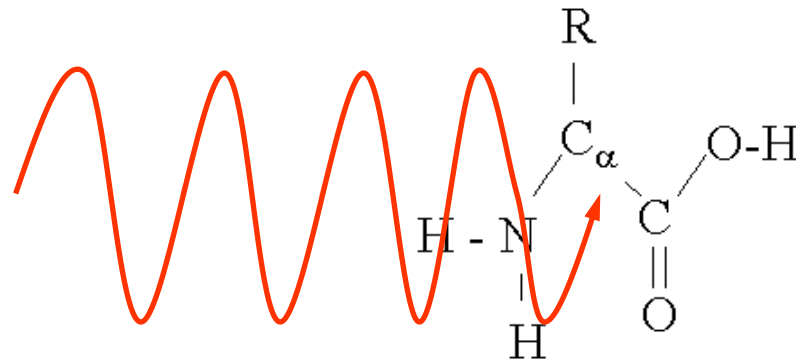


Contact: Michael Bangay

Email: michael.bangay@arpansa.gov.au

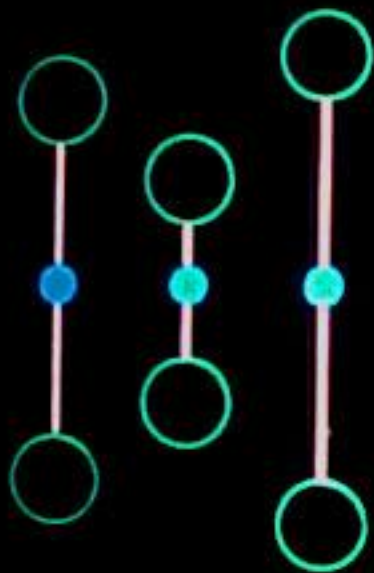
Che accade quando una radiazione luminosa colpisce una molecola ?

- L'energia di una sorgente luminosa **interagisce** con le proteine (molecole) in diversi modi.
- A livello dei legami **atomici** vediamo la **promozione di elettroni** a più alti livelli energetici.

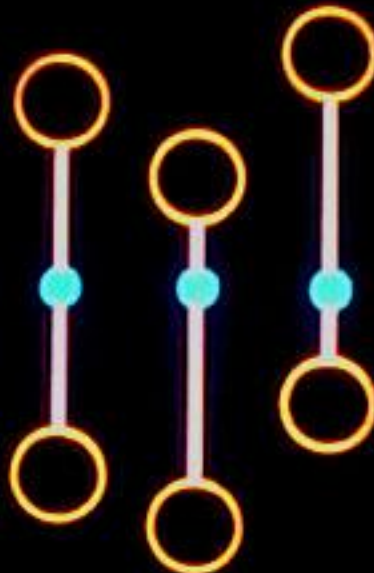


- A livello **molecolare** vediamo **assorbimento** ed **emissione** della luce.
- Le **transizioni** tra livelli energetici non sono limitate agli elettroni. I legami chimici possono andare incontro a una varietà di livelli energetici vibrazionali e atomi connessi da legami covalenti possono ruotare l'uno rispetto all'altro.

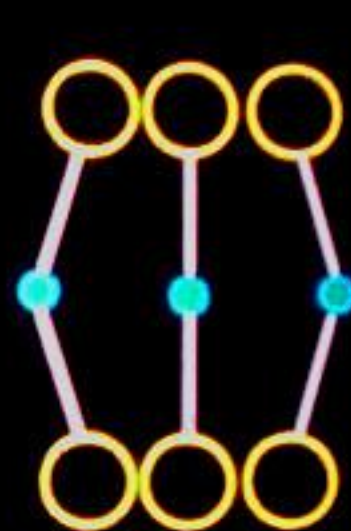
CARBON DIOXIDE VIBRATIONS



(A)
SYM.
STRETCH



(B)
ASYM.
STRETCH



(C)
BENDING
(2)

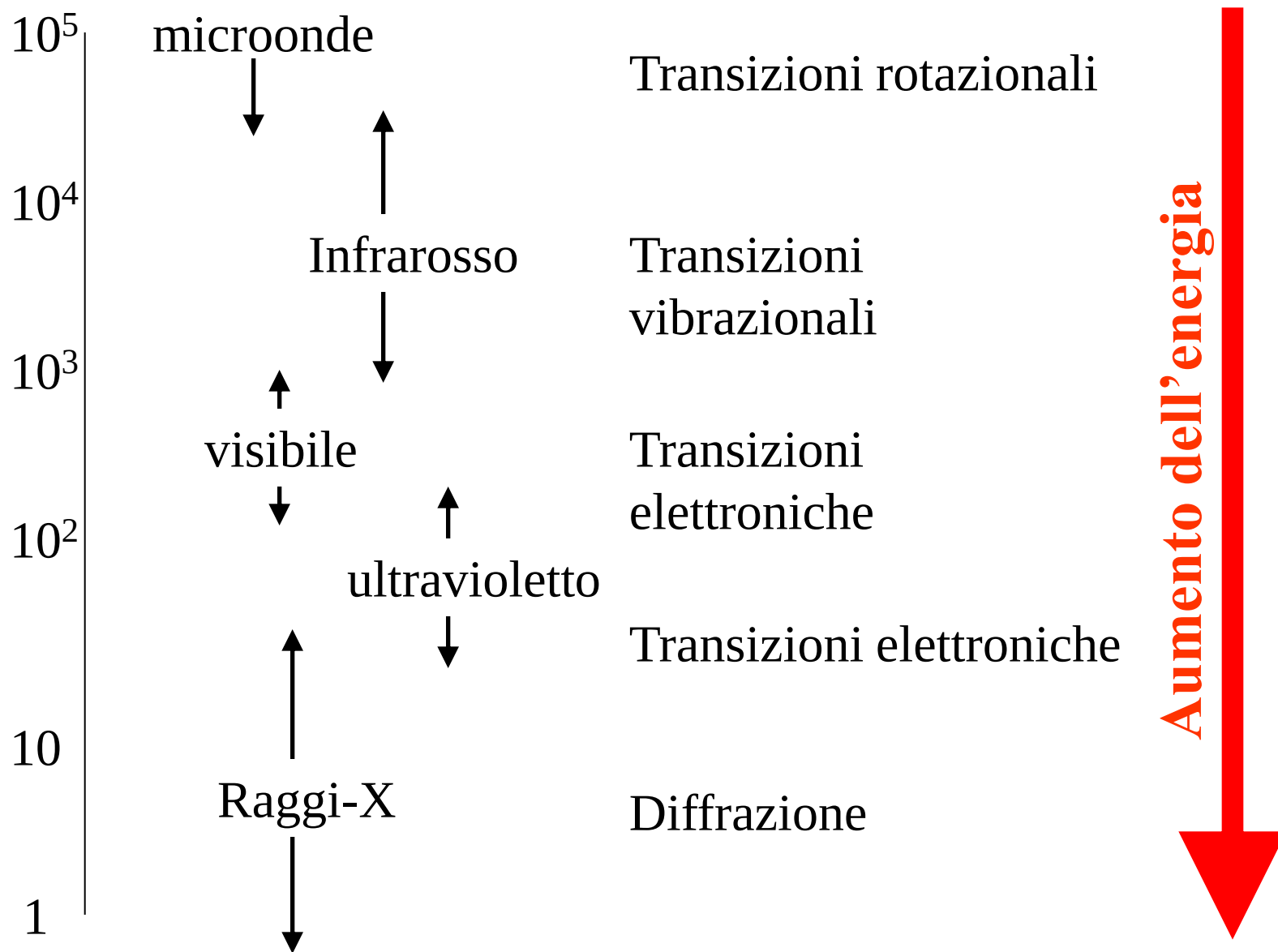
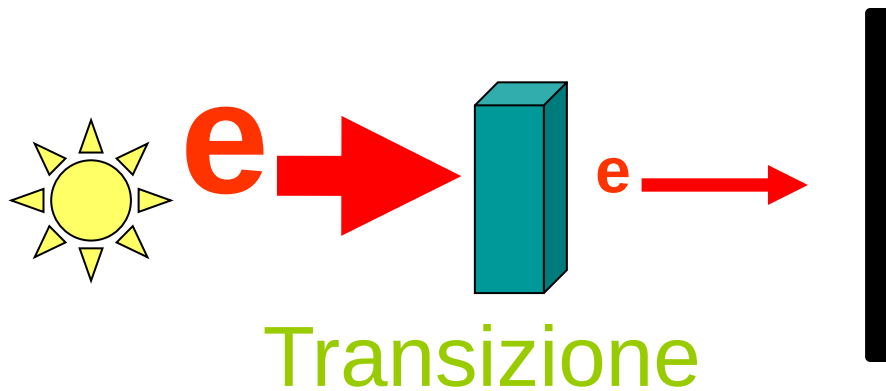


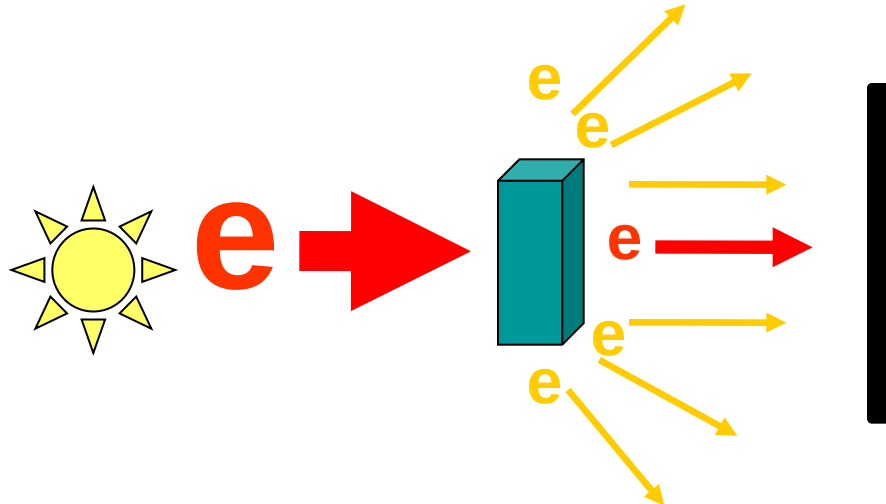
Tabella 9.1 Interazione della radiazione elettromagnetica e di varie parti o “strutture” della materia

Fenomeno	Regione dello spettro	Lunghezza d'onda
Nucleare	Gamma	0.1 nm
Elettroni interni	Raggi X	0.1-1.0 nm
Ionizzazione	Ultravioletto	0-200 nm
Elettroni di valenza	Ultravioletto vicino e visibile	200-800 nm
Vibrazioni molecolari	Infrarosso vicino e infrarosso	0.8-25 μm
Rotazione e orientamento dello spin elettronico in campi magnetici	Microonde	400 μm -30 cm
Orientamento dello spin nucleare in campi magnetici	Onde radio	100 cm e oltre

- Una **transizione** avviene quando l'energia di una molecola cambia da uno stato all'altro.



- L'**assorbimento** avviene quando la radiazione causa un aumento di energia nel sistema con cui interagisce.



- L'**emissione** avviene quando la radiazione è prodotta da un sistema durante una transizione da un alto livello energetico a uno più basso

Spettroscopia

Definizione: Lo studio della struttura e della dinamica della materia (in biologia delle molecole) attraverso l'analisi dell'interazione con la luce

Principio : La lunghezza d'onda della luce (la sua energia) determina il modo in cui questa interagisce con la materia

Spettri di emissione e di assorbimento

Si ottiene uno **spettro di assorbimento** quando si analizza un fascio di luce dopo che ha attraversato una sostanza.

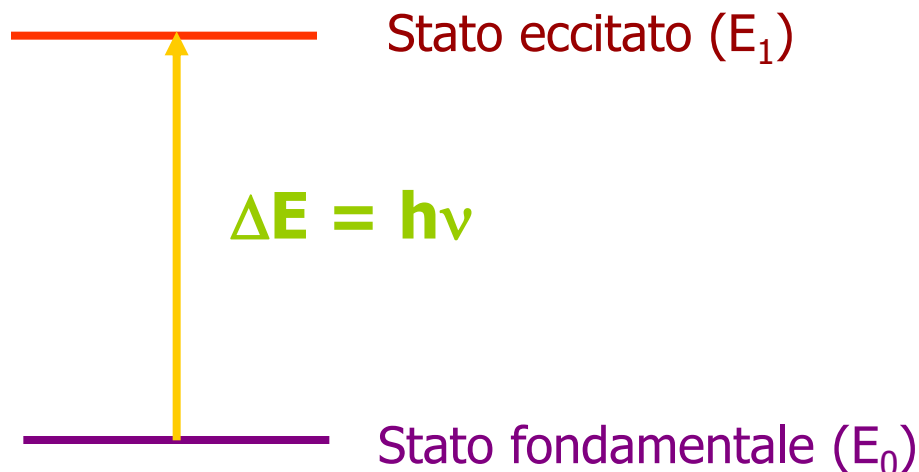
Si ottiene uno **spettro di emissione** quando si analizza un fascio di luce emesso, in opportune condizioni, da una sostanza.

Per una stessa molecola lo spettro di emissione e di assorbimento sono pressappoco come il positivo e il negativo di una fotografia, nel senso che una radiazione presente nello spettro di emissione sarà mancante in quello di assorbimento.

Principio :

Quando una radiazione passa attraverso uno strato di sostanza solida, liquida o gassosa, alcune frequenze possono essere **rimosse** selettivamente mediante assorbimento, cioè un processo in cui **l'energia elettromagnetica viene trasferita** agli atomi, ioni o molecole che costituiscono il campione.

L'assorbimento di radiazione **promuove** queste particelle dal loro stato normale (**fondamentale**) a uno o più stati **eccitati** ad energia **più alta**.



Secondo la teoria quantistica, gli atomi, le molecole o gli ioni possiedono soltanto un numero limitato di livelli energetici **discreti**; 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.

Su questo principio si basano sia la spettroscopia di assorbimento sia quella di emissione.

- spettroscopia di **ASSORBIMENTO**: quando atomi o molecole vengono eccitati e passano a stati energetici maggiori
- spettroscopia di **EMISSIONE**: dagli stati eccitati, ritornando allo stato fondamentale, le particelle riemettono energia sotto forma di radiazioni elettromagnetiche ($h\nu$)

Spettro di assorbimento

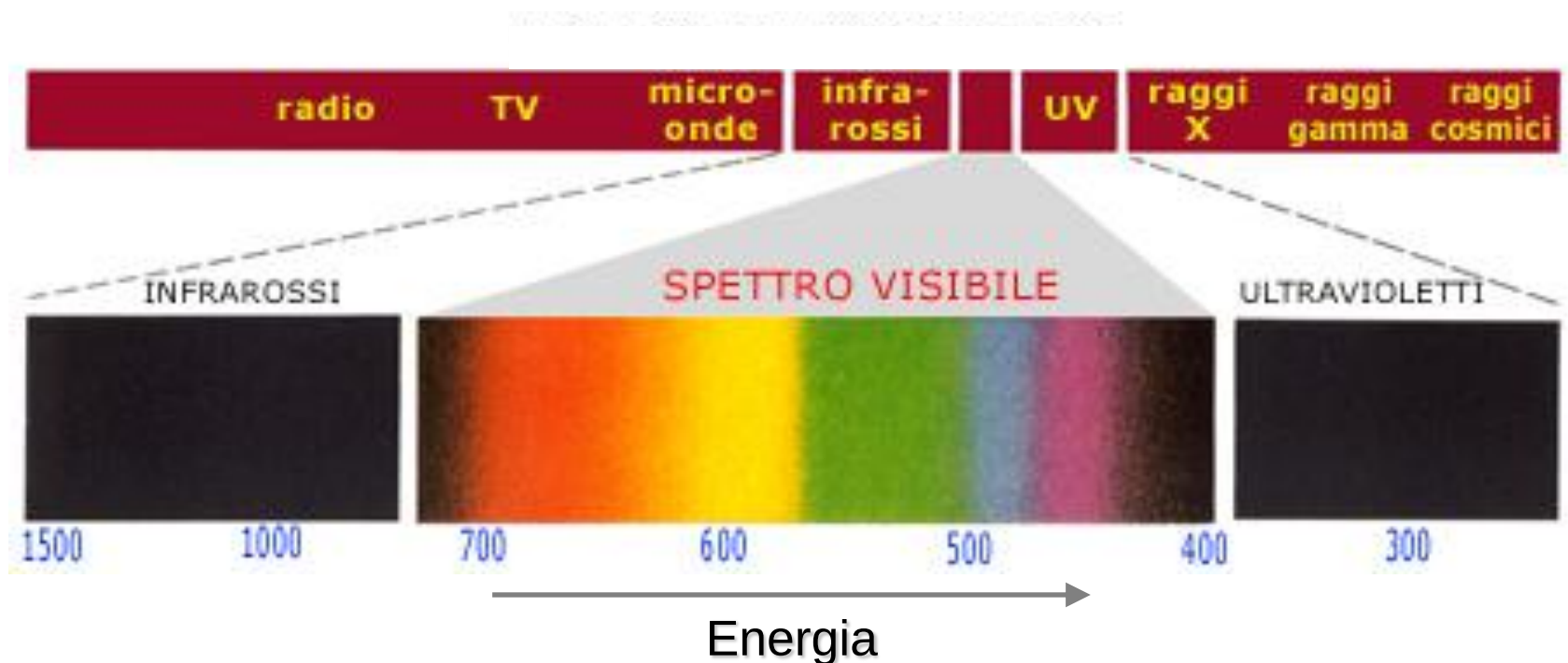
- Quando la luce colpisce un campione, le lunghezze d'onda con energia idonea a promuovere il salto degli elettroni dallo stato basale a quello eccitato sono **rimosse** dallo spettro trasmesso

Energia delle radiazioni

Nella tecnica **uv-vis** si impiegano radiazioni nell'intervallo 200-800 nm, la cui energia è sufficiente ad attivare transizioni elettroniche, che causano il passaggio di elettroni degli strati esterni a stati eccitati

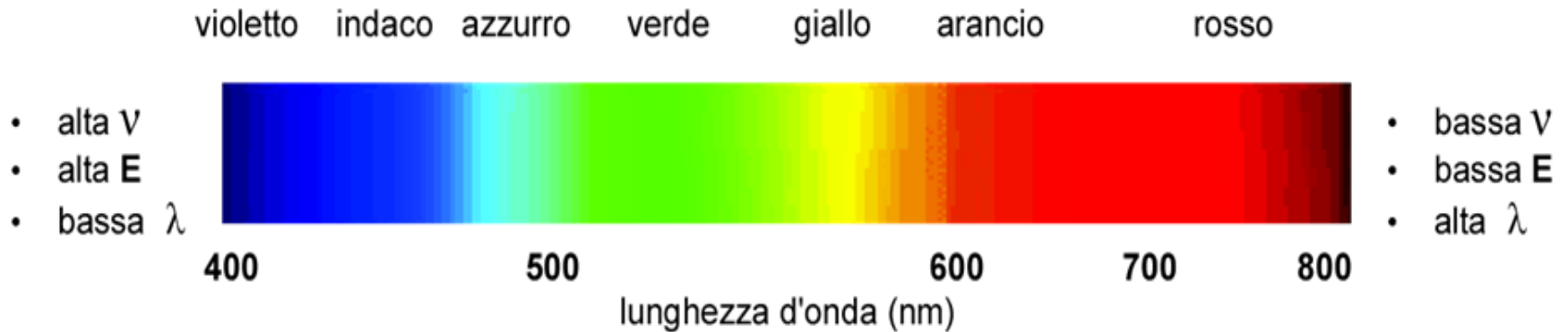
UV (Ultravioletto) $\Rightarrow$ 200 - 400 nm

Visibile $\Rightarrow$ 400 - 800 nm



La luce visibile

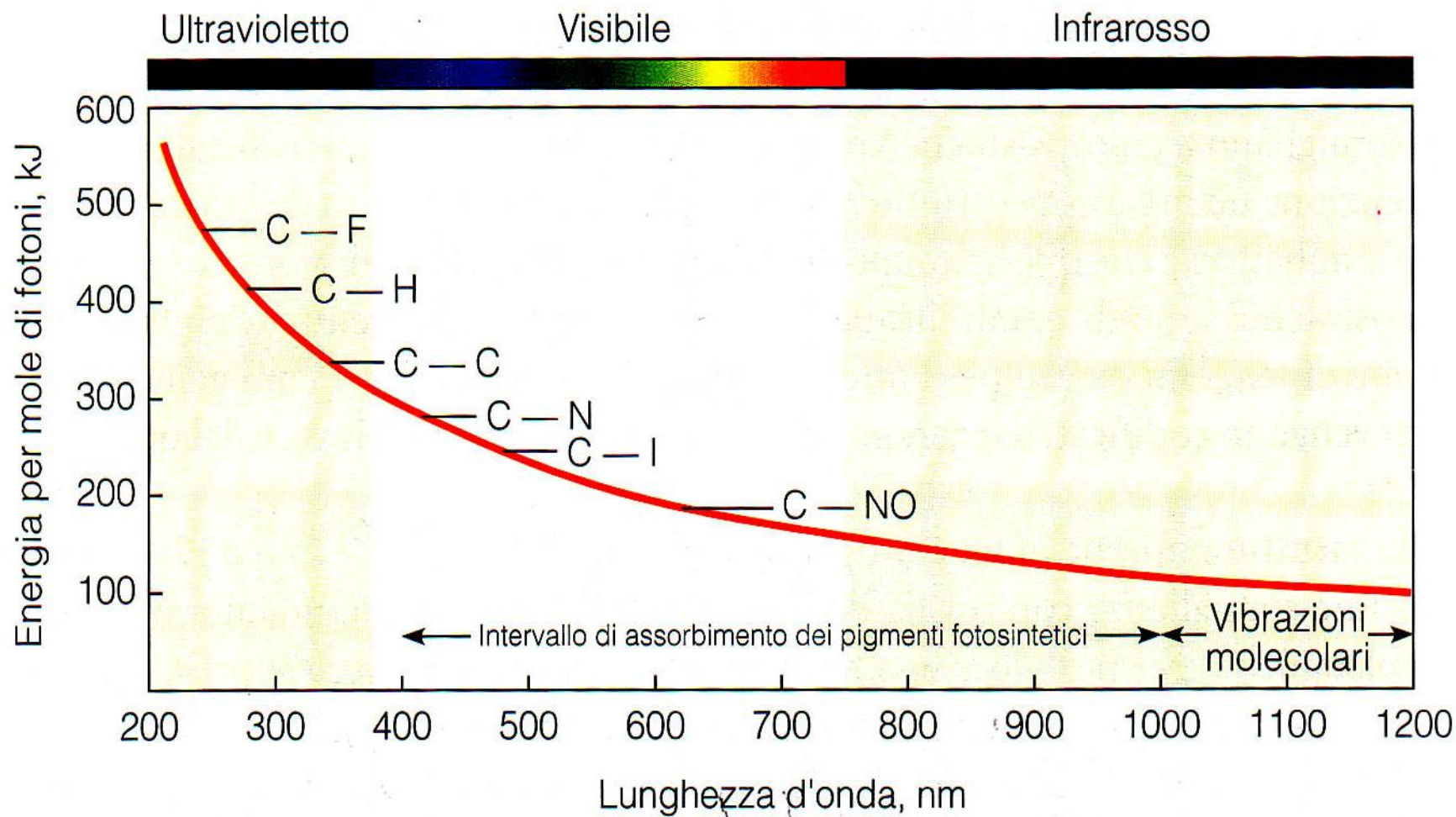
La radiazione visibile rappresenta solo una piccola parte dello spettro elettromagnetico:



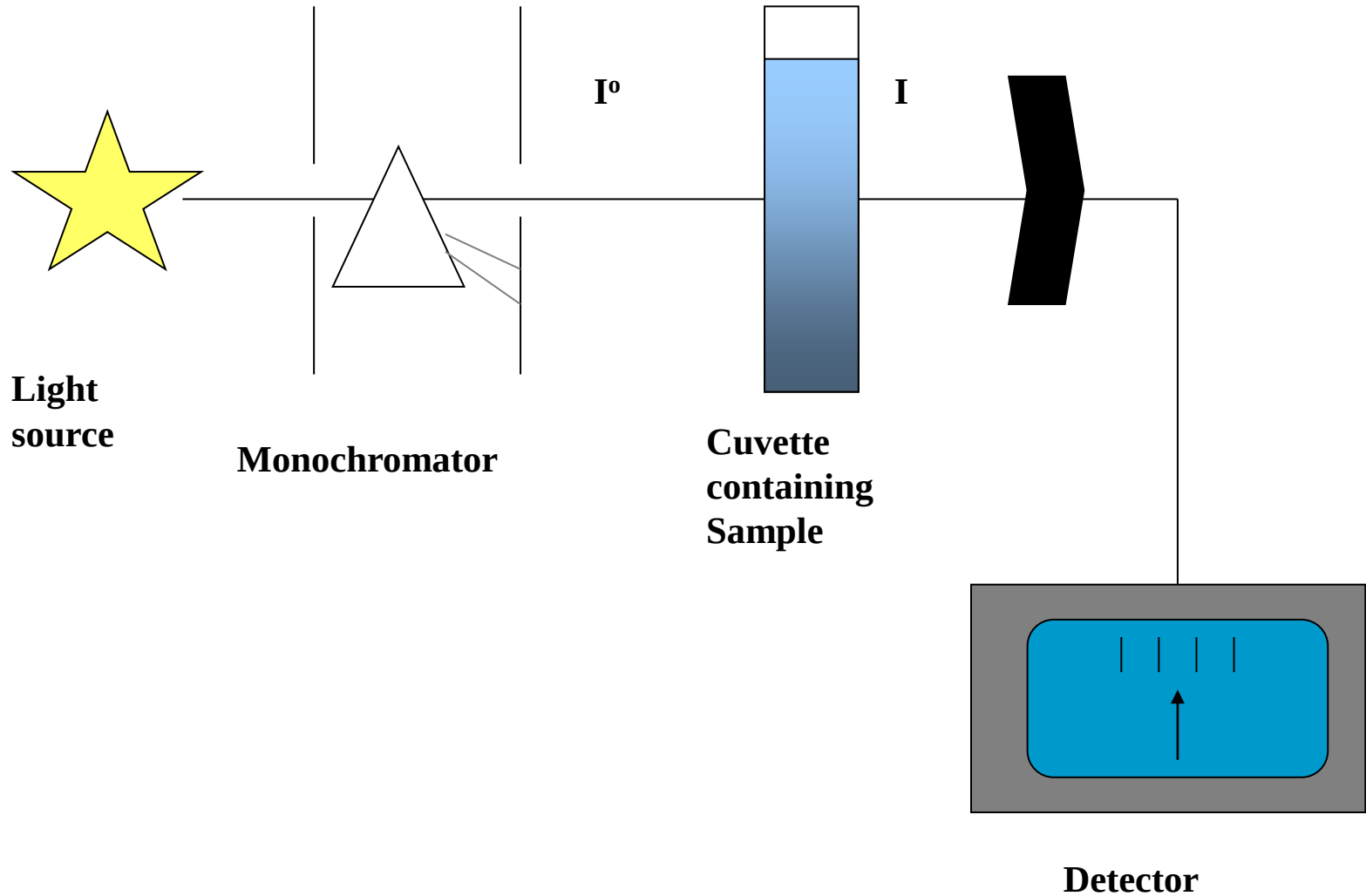
Alle diverse radiazioni visibili che differiscono per la loro lunghezza d'onda (quindi per la loro diversa frequenza ed energia) corrispondono i diversi colori.

Colori della luce visibile

Lunghezza d'onda	Assorbita	Osservata
380-420	violet	green-yellow
420-440	violet-blue	yellow
440-470	blue	orange
470-500	blue-green	red
500-520	green	purple
520-550	yellow-green	violet
550-580	yellow	violet-blue
580-620	orange	blue
620-680	red	blue-green
680-780	purple	green



Gli spettri di assorbimento sono misurati tramite **spettrofotometri**



MONOCROMATORE

Quando un raggio di luce bianca colpisce un prisma di vetro viene scomposto in diversi colori (come nell'arcobaleno).

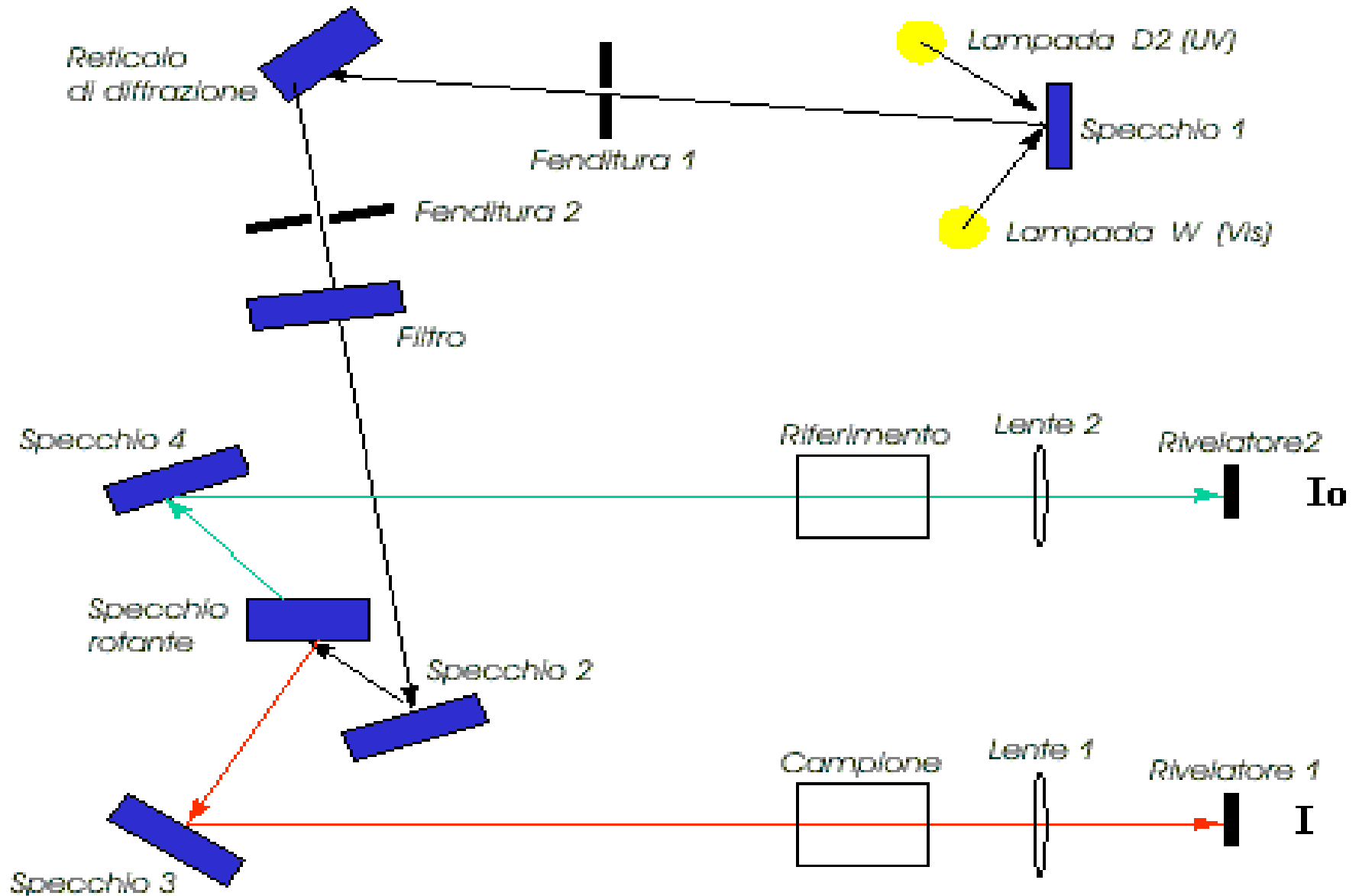
La scomposizione (**dispersione**) in diversi colori tramite un prisma si spiega in quanto:

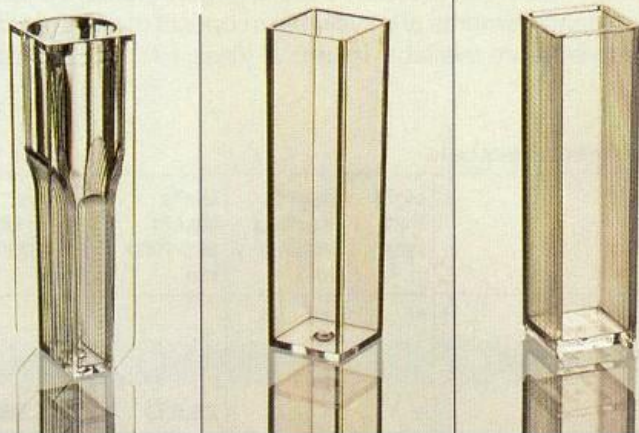
- la luce “bianca” è in realtà un miscuglio di radiazioni di diversa frequenza e quindi corrispondenti a tutti i colori;
- quando un raggio di luce passa da un mezzo ad un altro viene deviato (fenomeno detto “**rifrazione**”): l'entità della deviazione dipende dalla lunghezza d'onda del raggio incidente.



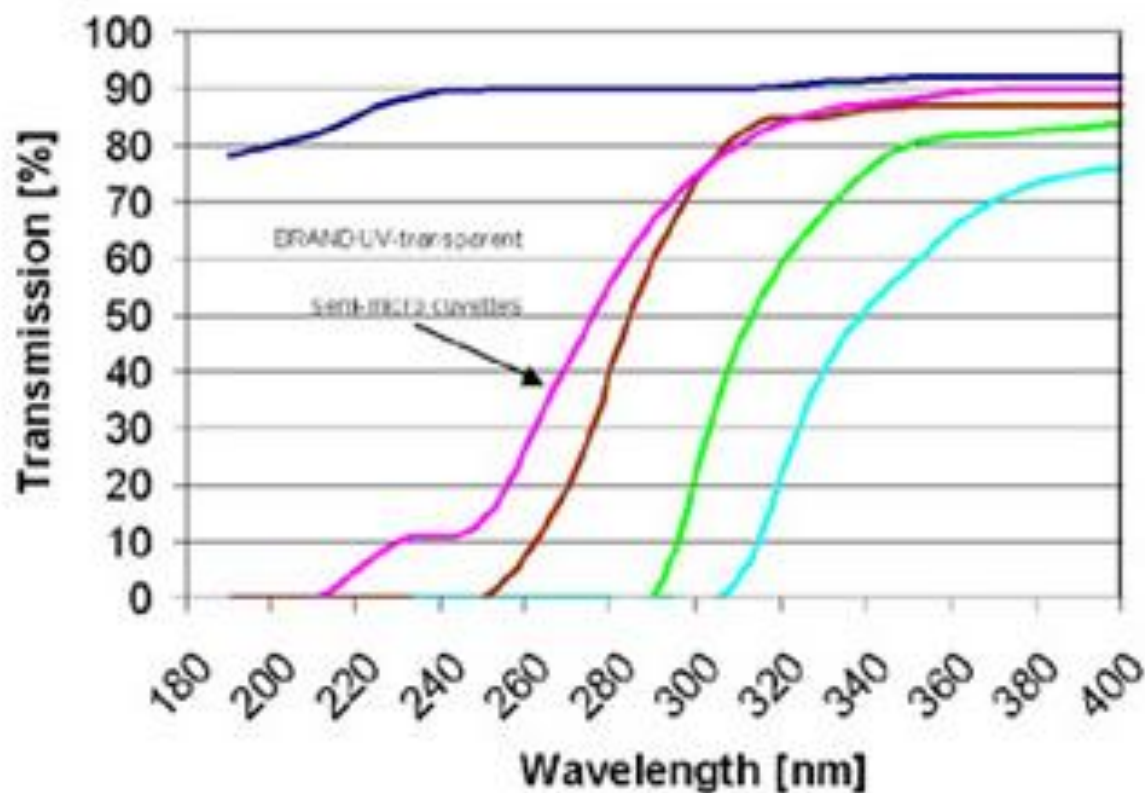
Una radiazione di un solo colore ottenuta tramite dispersione, caratterizzata da una ben precisa lunghezza d'onda e frequenza, viene detta fascio di luce **MONOCROMATICA**. Si parla invece di fascio di luce **POLICROMATICA** quando esso è costituito da radiazioni di frequenza e lunghezza d'onda diverse. La luce bianca proveniente dal sole è policromatica.

Schema di uno spettrofotometro a doppio raggio





UV LIGHT TRANSMISSION OF SEMI-MICRO SIZE CUVETTES



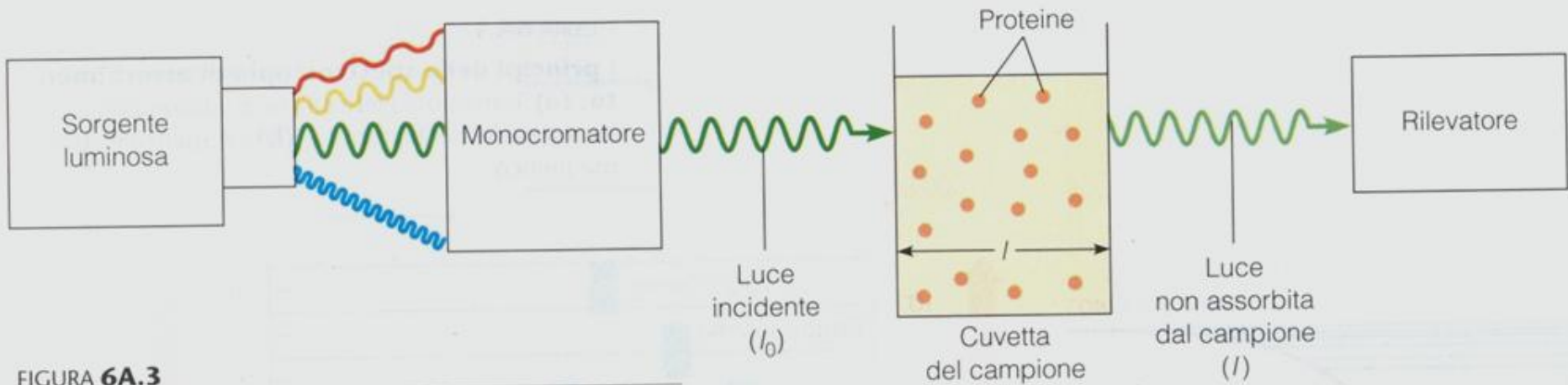


FIGURA 6A.3

Misura dell'assorbimento della luce mediante uno spettrofotometro.

$$\text{Trasmittanza} = T = I/I_0$$

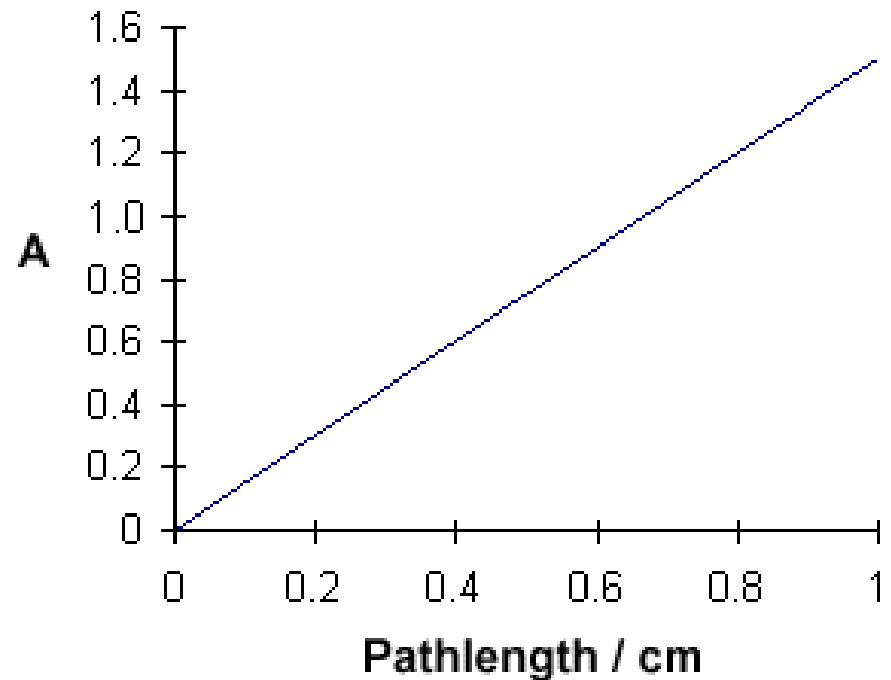
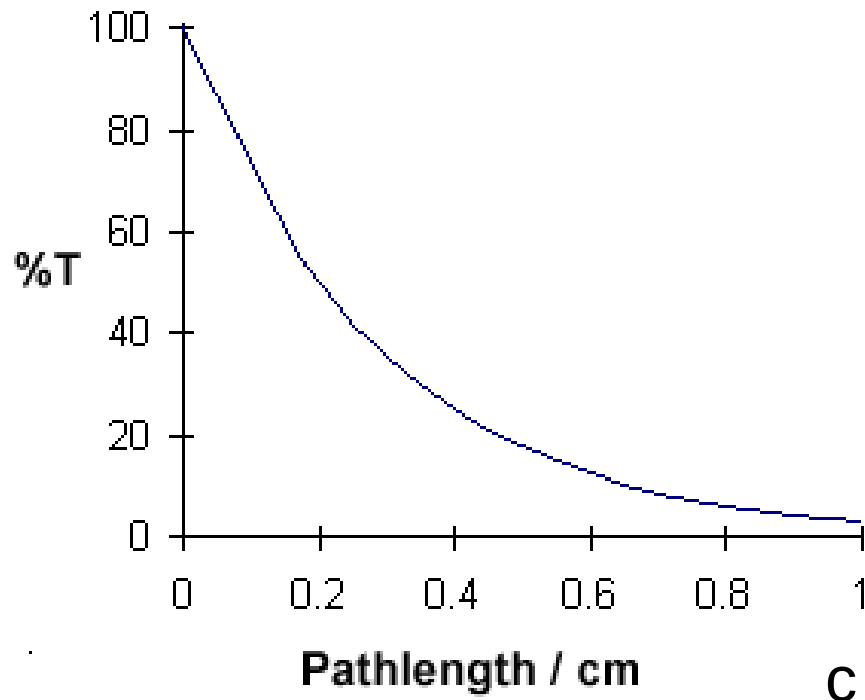
$$\text{Assorbanza} = A = \log 1/T = \log I_0/I$$

$$\text{Assorbanza} = A = \epsilon_{\lambda} c d$$

La legge di Lambert-Beer

$$A = \varepsilon_{\lambda} c d$$

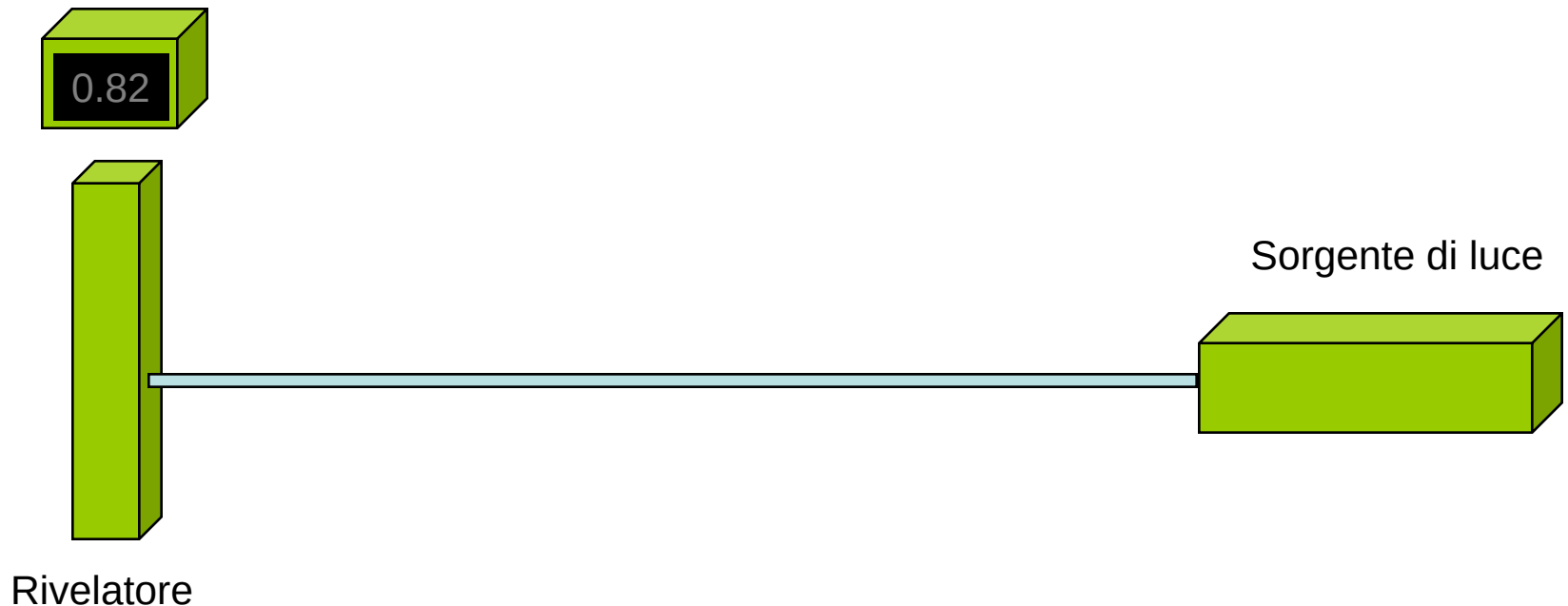
Path length / cm	0	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0
%T	100	50	25	12.5	6.25	3.125
Absorbance	0	0.3	0.6	0.9	1.2	1.5



La legge di Lambert-Beer

$$A = \varepsilon_{\lambda} c d$$

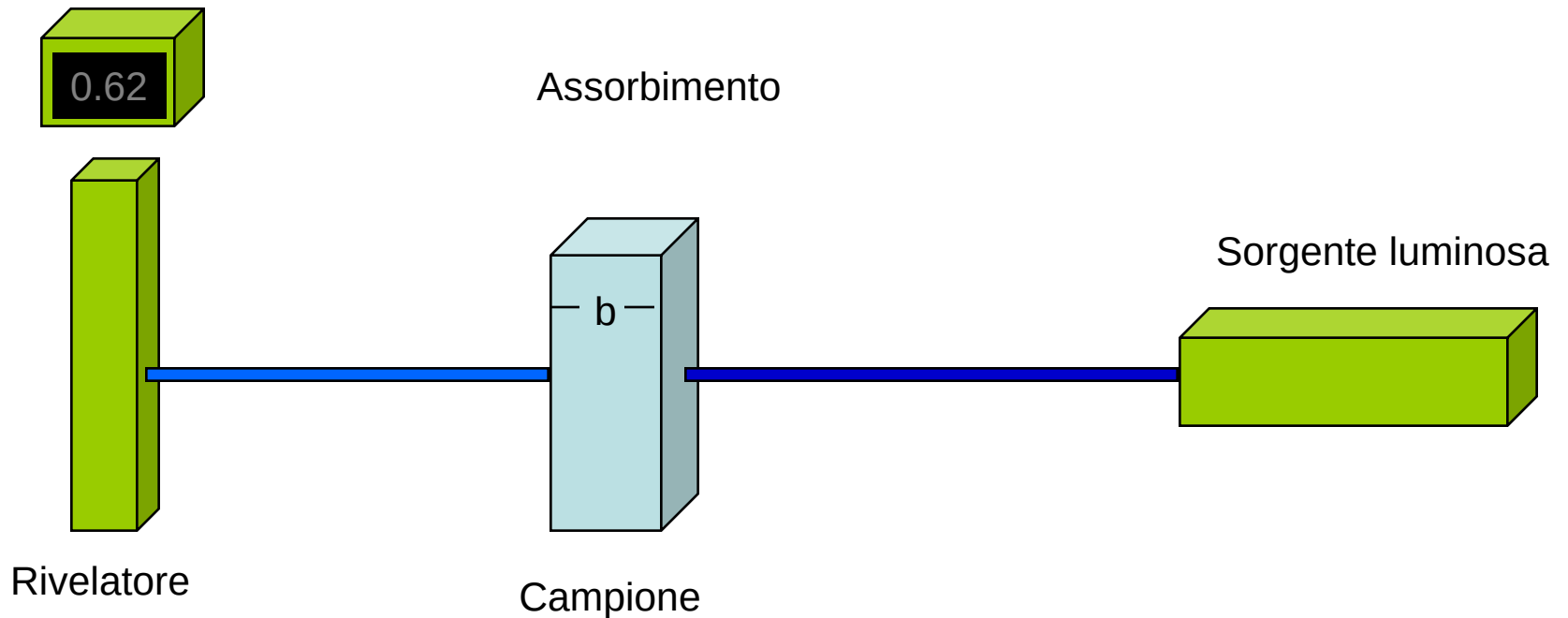
Dipendenza dalla profondità, d



La legge di Lambert-Beer

$$A = \varepsilon_{\lambda} cd$$

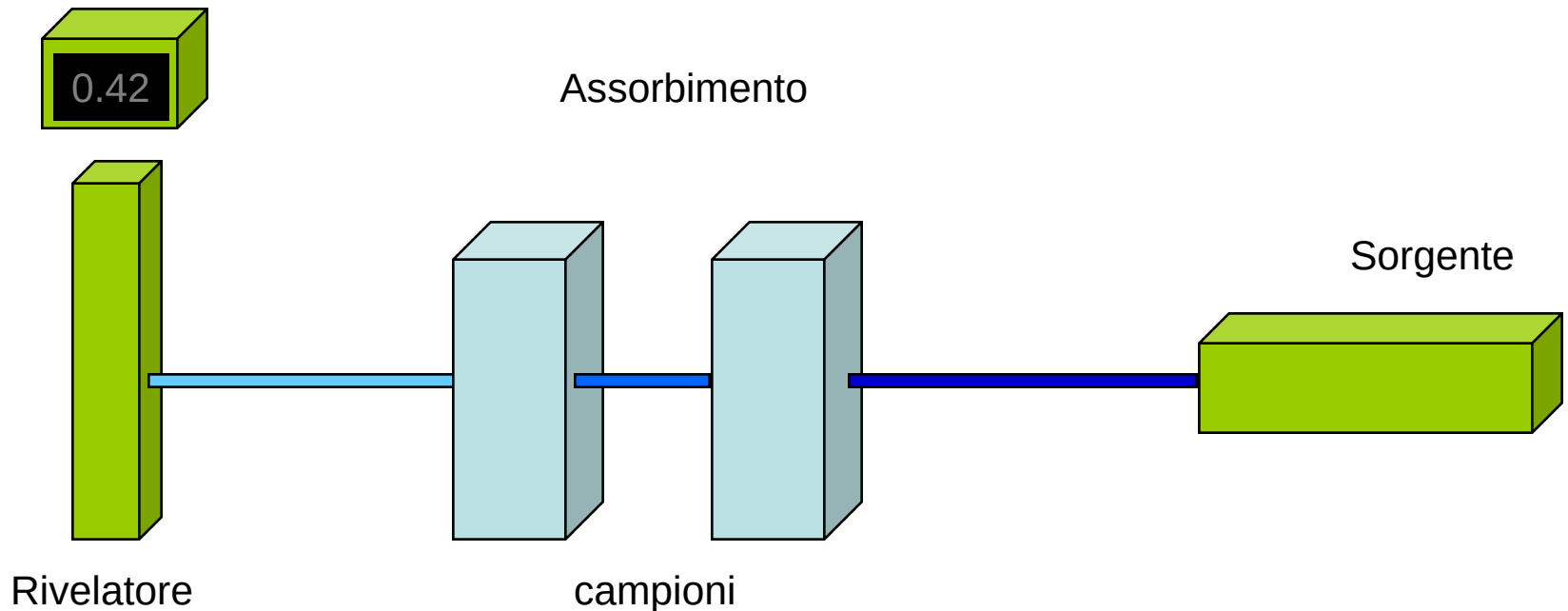
Dipendenza dalla profondità, d



La legge di Lambert-Beer

$$A = \varepsilon_{\lambda} cd$$

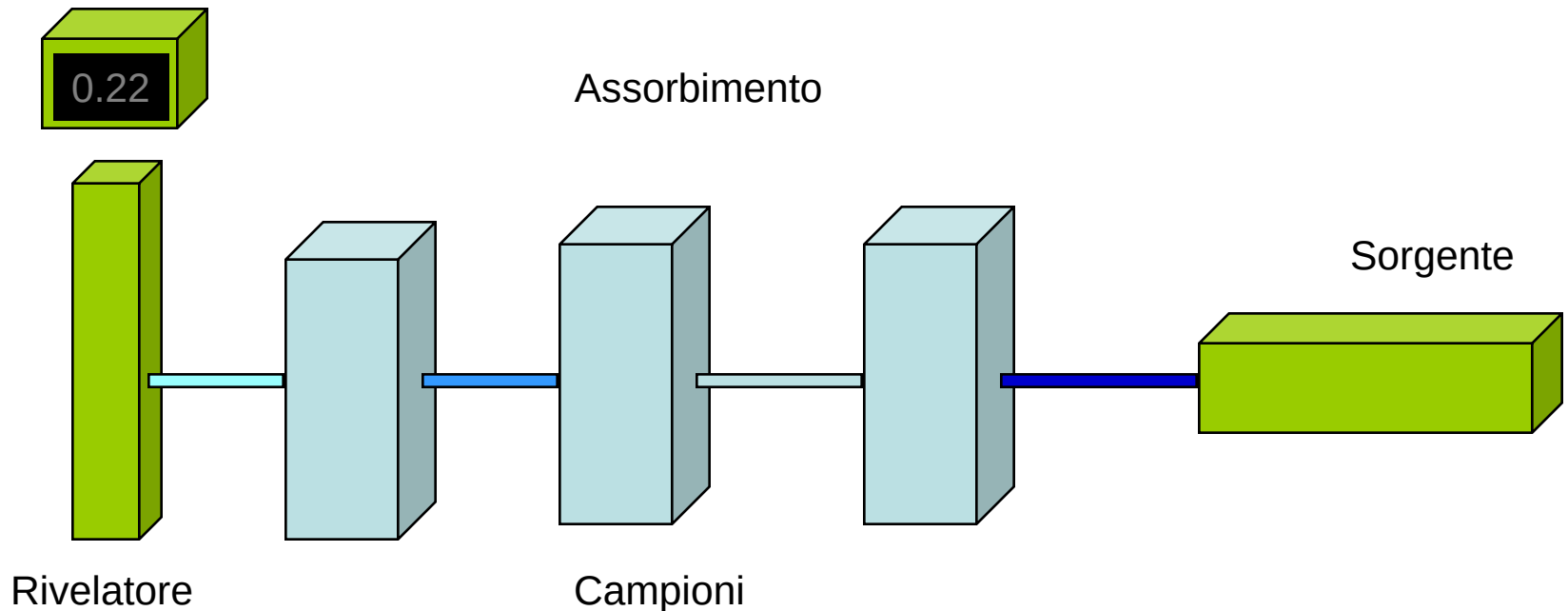
Dipendenza dalla profondità, d



La legge di Lambert-Beer

$$A = \varepsilon_{\lambda} c d$$

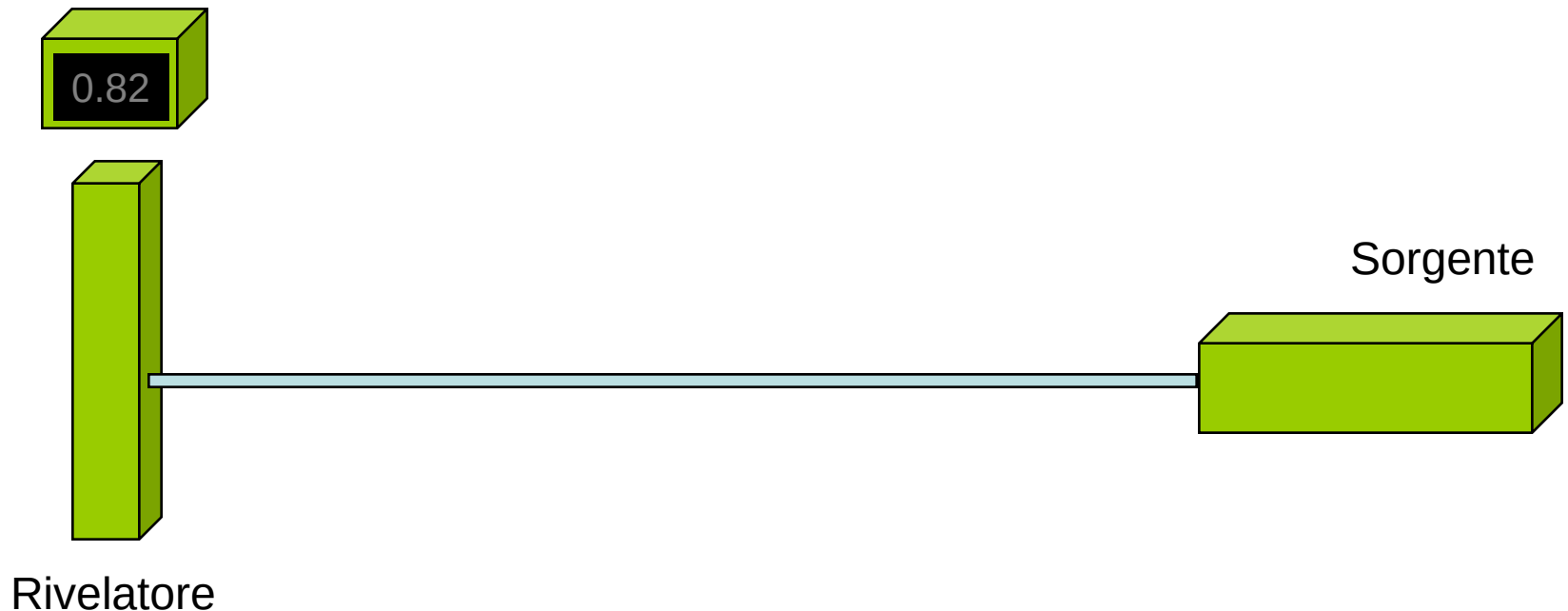
Dipendenza dalla profondità, d



La legge di Lambert-Beer

$$A = \varepsilon_{\lambda} c d$$

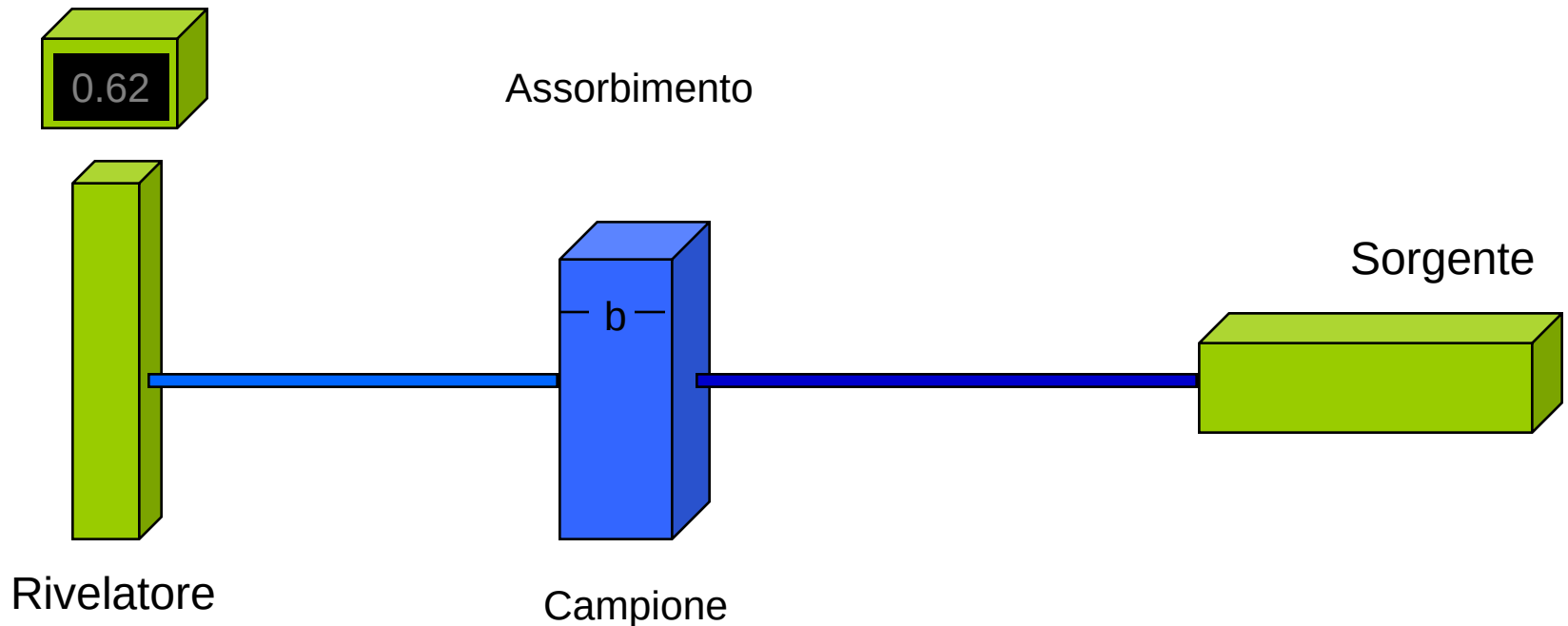
Dipendenza dalla concentrazione, c



La legge di Lambert-Beer

$$A = \varepsilon_{\lambda} c d$$

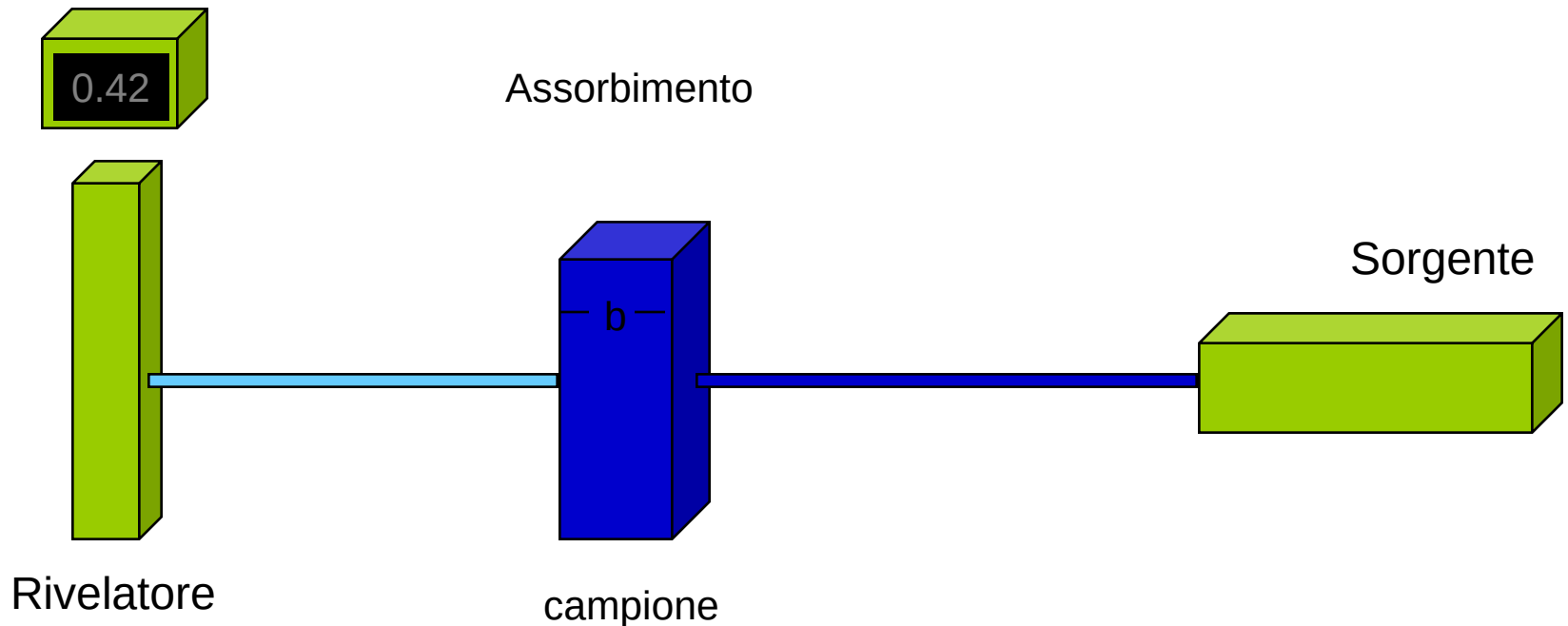
Dipendenza dalla concentrazione, c



La legge di Lambert-Beer

$$A = \varepsilon_{\lambda} c d$$

Dipendenza dalla concentrazione, c



La legge di Lambert-Beer

$$A = \varepsilon_{\lambda} c d$$

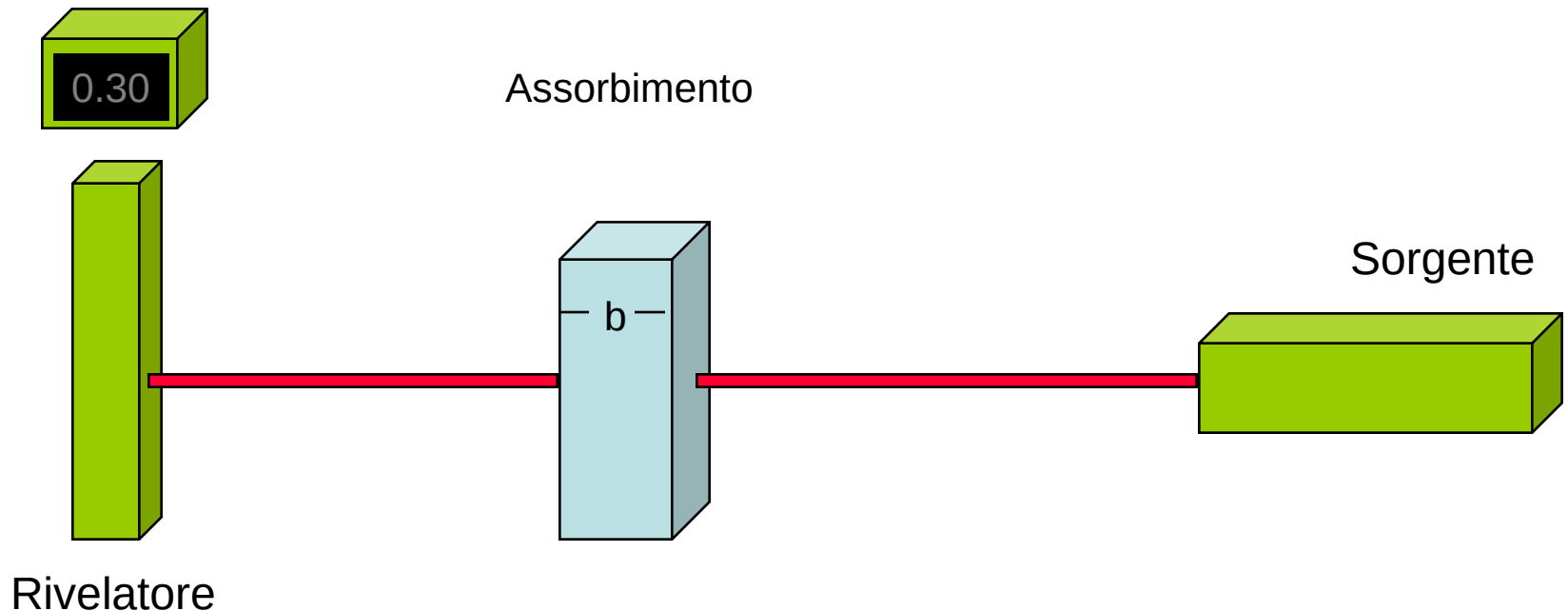
Dipendenza dalla lunghezza d'onda, λ



La legge di Lambert-Beer

$$A = \varepsilon_{\lambda} c d$$

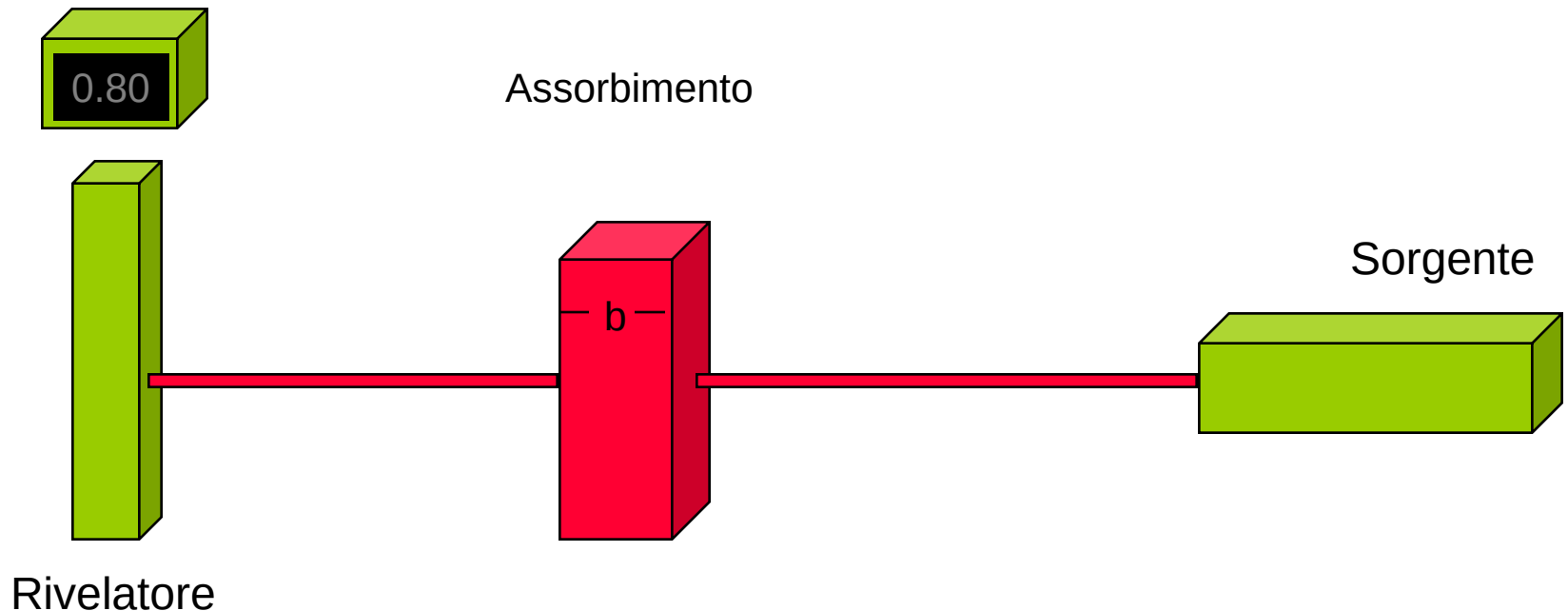
Dipendenza dalla lunghezza d'onda, λ



La legge di Lambert-Beer

$$A = \varepsilon_{\lambda} cd$$

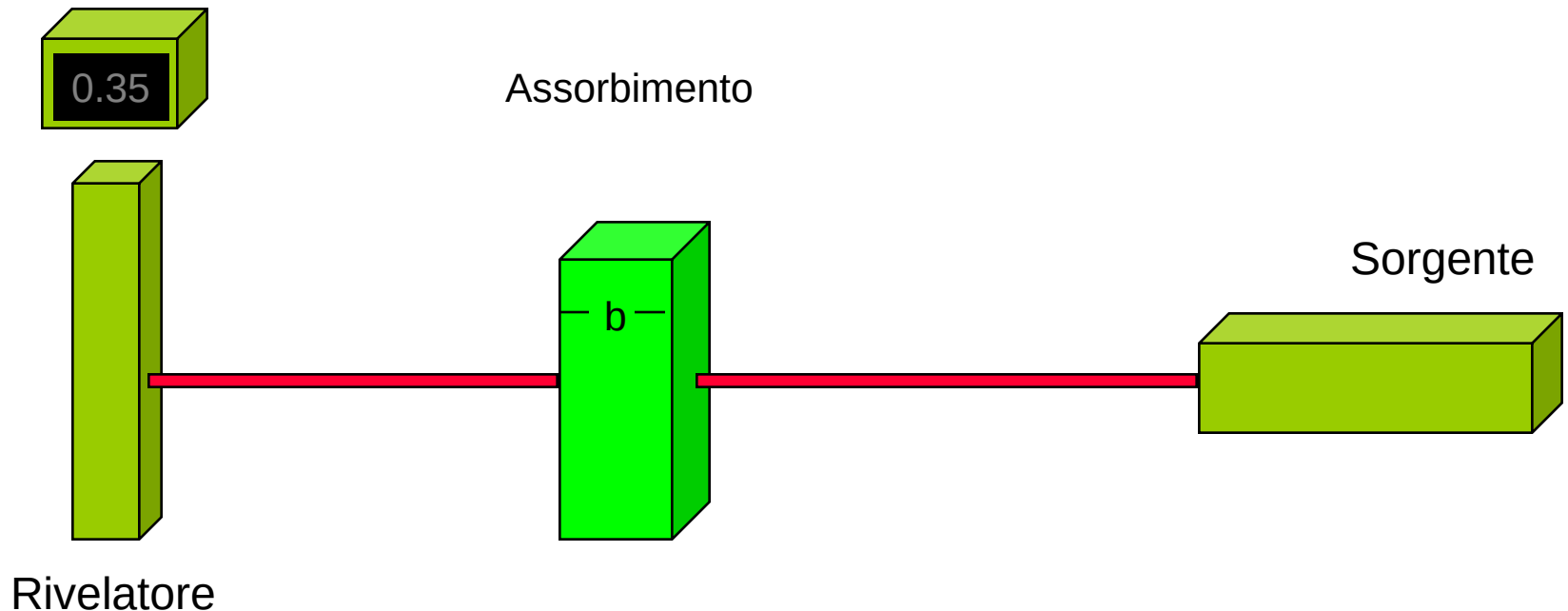
Dipendenza dalla lunghezza d'onda, λ



La legge di Lambert-Beer

$$A = \varepsilon_{\lambda} cd$$

Dipendenza dalla lunghezza d'onda, λ



Il **coefficiente di estinzione molare** (ε_λ) è caratteristico di una determinata molecola ad una determinata lunghezza d'onda.

Poichè è definito come

$$A = \varepsilon_\lambda cd$$
$$\varepsilon_\lambda = A / cd$$

si esprime in $\text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$

Applicazioni degli spettri di assorbimento

- **Misure Quantitative** – determinazione di concentrazioni
- **Calcoli di velocità di reazioni**
- **Studi strutturali** – folding, assemblaggio, denaturazione, cambiamenti di struttura, legame di ligandi
- **Enzimatici**. Ad es. analisi degli intermedi delle reazioni
- **Identificazione** di composti (vitamine, ormoni). Utile per identificare proteine con cromofori particolari
- **Studi immunologici** – tramite kit commerciali

- **Misure Quantitative** – determinazione di concentrazioni

Molte sostanze “non intrinsecamente colorate” possono essere dosate facilmente mediante saggi colorimetrici che valutano quantitativamente la assorbanza di un **complesso tra la sostanza ed un colorante specifico**.

Saggi colorimetrici di comune impiego

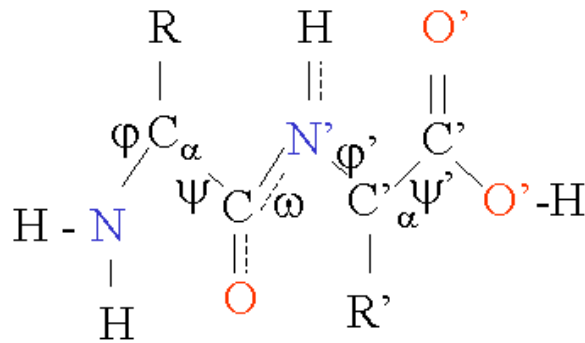
Sostanza	Reagente	λ (nm)
Fosfato inorganico	Molibdato d'ammonio, H_2SO_4 , 1,2,4-aminonaftolo, $NaHSO_3$, Na_2SO_3	600
Aminoacidi	(a) Ninidrina	570 (prolina 420)
	(b) Sali rameici	620
Legami peptidici	Biureto (tampone tartrato alcalino, sale rameico)	540
Fenoli, tirosina	Folin (fosfomolibdato, fosfotungstato, sale rameico)	660 o 750 (750 più sensibile)
Proteine	(a) Folin	660
	(b) Biureto	540
	(c) Reagente BCA (acido bicinconinico)	562
	(d) Coomassie Brilliant Blue	595
Carboidrati	(a) Fenolo, H_2SO_4	Variabile, per esempio glucosio 490, xilosio 480
	(b) Antrone (antrone, H_2SO_4)	620 o 625
Zuccheri riducenti	Dinitrosalicilato, tampone tartrato alcalino	540
Pentosi	(a) Bial (orcinolo, etanolo, $FeCl_3$, HCl)	665
	(b) Cisteina, H_2SO_4	380-415
Esosi	(a) Carbazolo, etanolo, H_2SO_4	540 o 440
	(b) Cisteina, H_2SO_4	380-415
	(c) Arsenomolibdato	Di solito 500-570

Sostanza	Reagente	λ (nm)
----------	----------	----------------

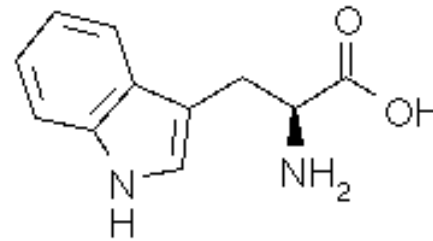
Glucosio	Glucosio ossidasi, perossidasi, o-dianisidina, tampone fosfato	420
Chetoesosi	(a) Resorcinolo, tiurea, acido acetico, HCl	520
	(b) Carbazolo, etanolo, cisteina, H ₂ SO ₄	560
	(c) Difenilamina, etanolo, acido acetico, HCl	635
Esosoamine	Ehrlich (aldeide dimetilamino benzoica, etanolo, HCl)	530
DNA	Difenilamina	595
RNA	Bial (orcinolo, etanolo, FeCl ₃ , HCl)	665
α -chetoacidi	Dinitrofenilidrazina, Na ₂ CO ₃ , acetato di etile	435
Steroli	Reattivo di Liebermann-Burchardt (anidride acetica, H ₂ SO ₄ , cloroformio)	625
Ormoni steroidei	Reattivo di Liebermann-Burchardt	425
Colesterolo	Colesterolo ossidasi, perossidasi, 4-aminoantipirina, fenolo	500

Alcune sostanze (molecole) sono intrinsecamente colorate (assorbono la luce) a causa della presenza di **gruppi cromofori**

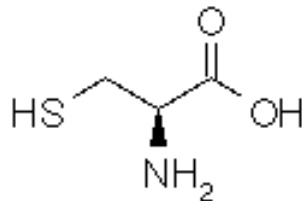
I cromofori nelle proteine



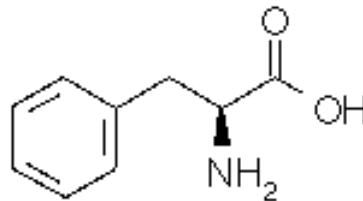
The peptide bond



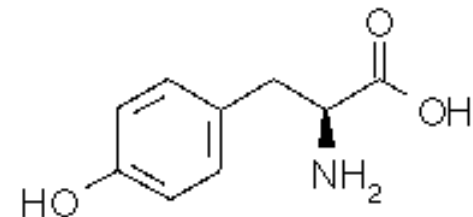
trp w Tryptophan



cys c Cystein

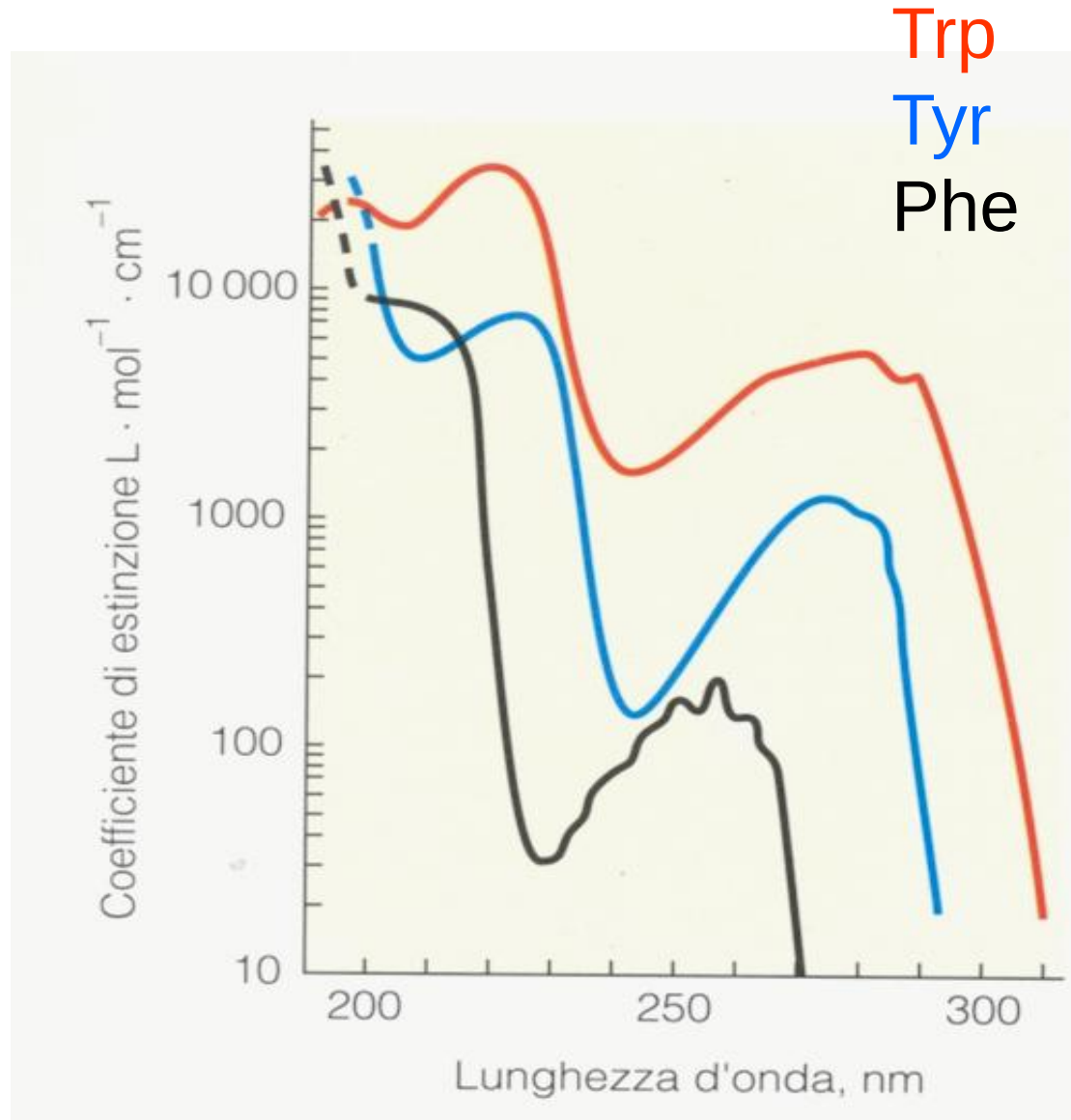


phe f Phenylalanin



tyr y Tyrosin

Gli a.a. aromatici assorbono nell'UV
(scala log)



Chromophores in proteins

✚ the important chromophores to remember are:

	λ_{max} (nm)	ϵ (M ⁻¹ cm ⁻¹)	
backbone:	195		
	220		
tryptophan:	280	5600	← both these peaks are very useful
	219	47000	
tyrosine:	274	1400	
	222	8000	←
phenylalanine:	193	48000	
	257	200	
	206	9300	
	188	60000	

Determinazione dei coefficienti di estinzione molare

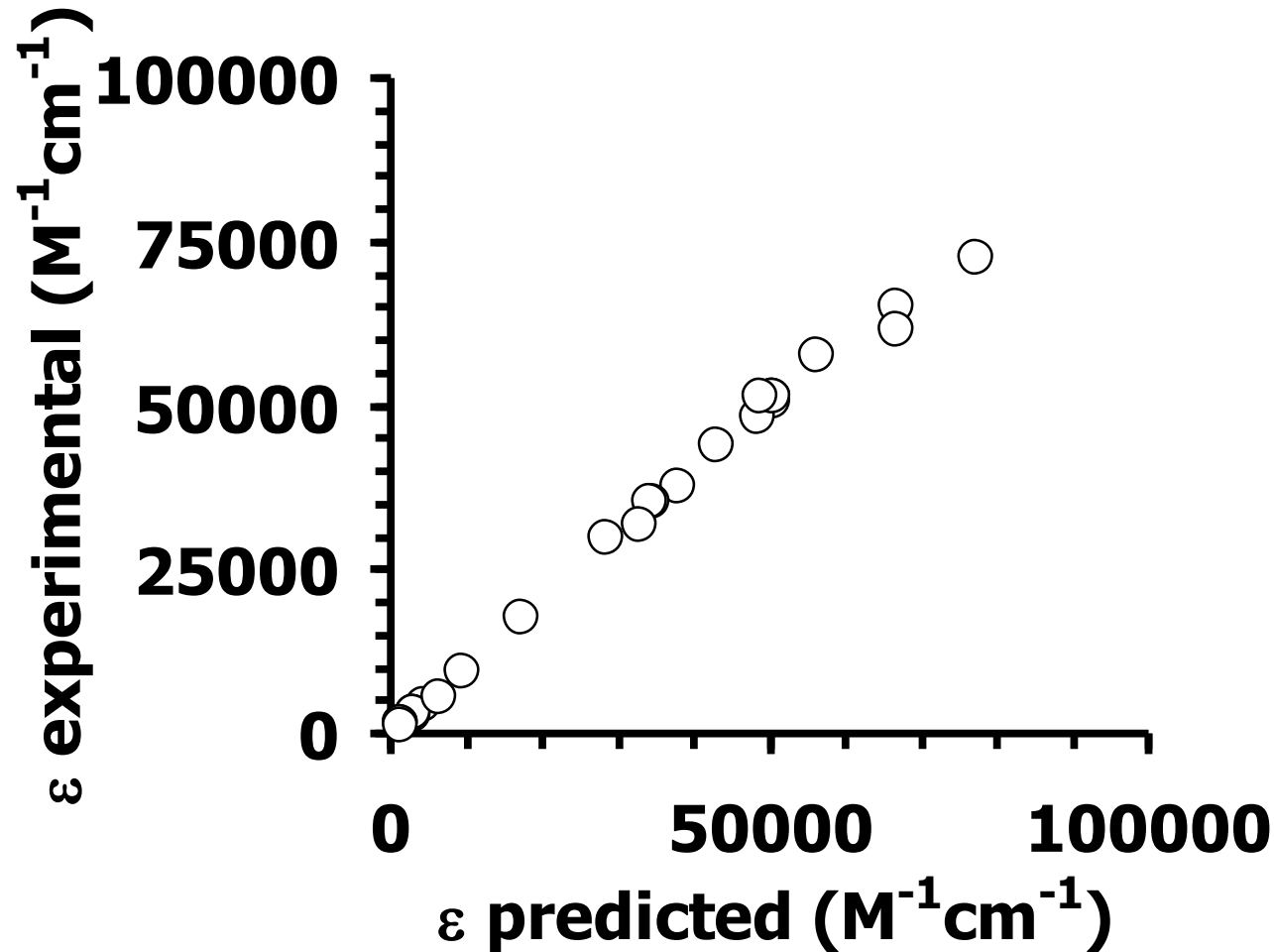
✚ I valori di ϵ delle proteine possono essere stimati sulla base della composizione aminoacidica

$$\begin{aligned}\epsilon (280\text{nm}) = & \quad \# \text{ of Trp's} \times 5500 + \\ & \quad \# \text{ of Tyr's} \times 1490 + \\ & \quad \# \text{ of disulfides} \times 125 \text{ (-S-S-)}\end{aligned}$$

predizioni:

<http://ca.expasy.org/tools/protparam.html>

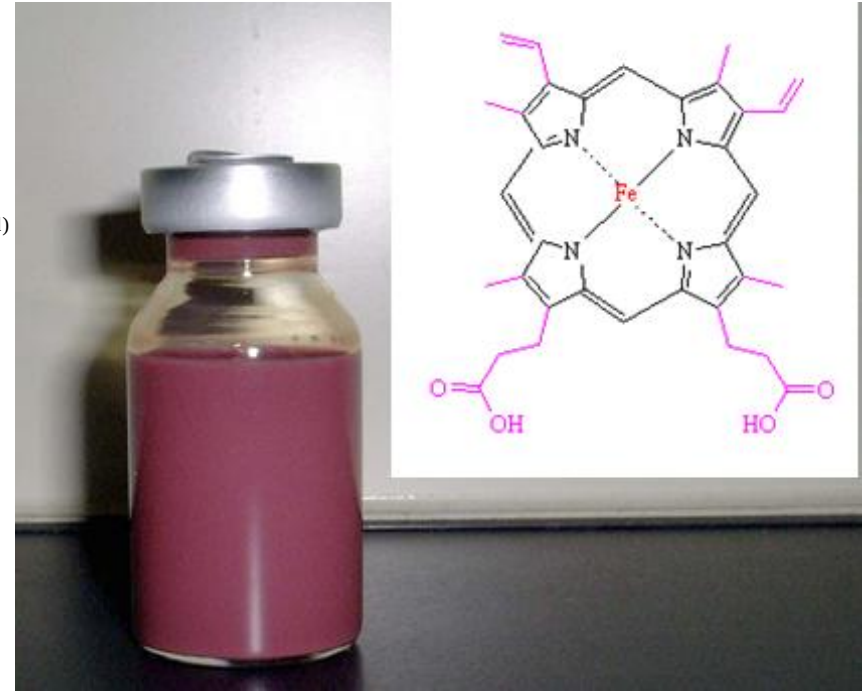
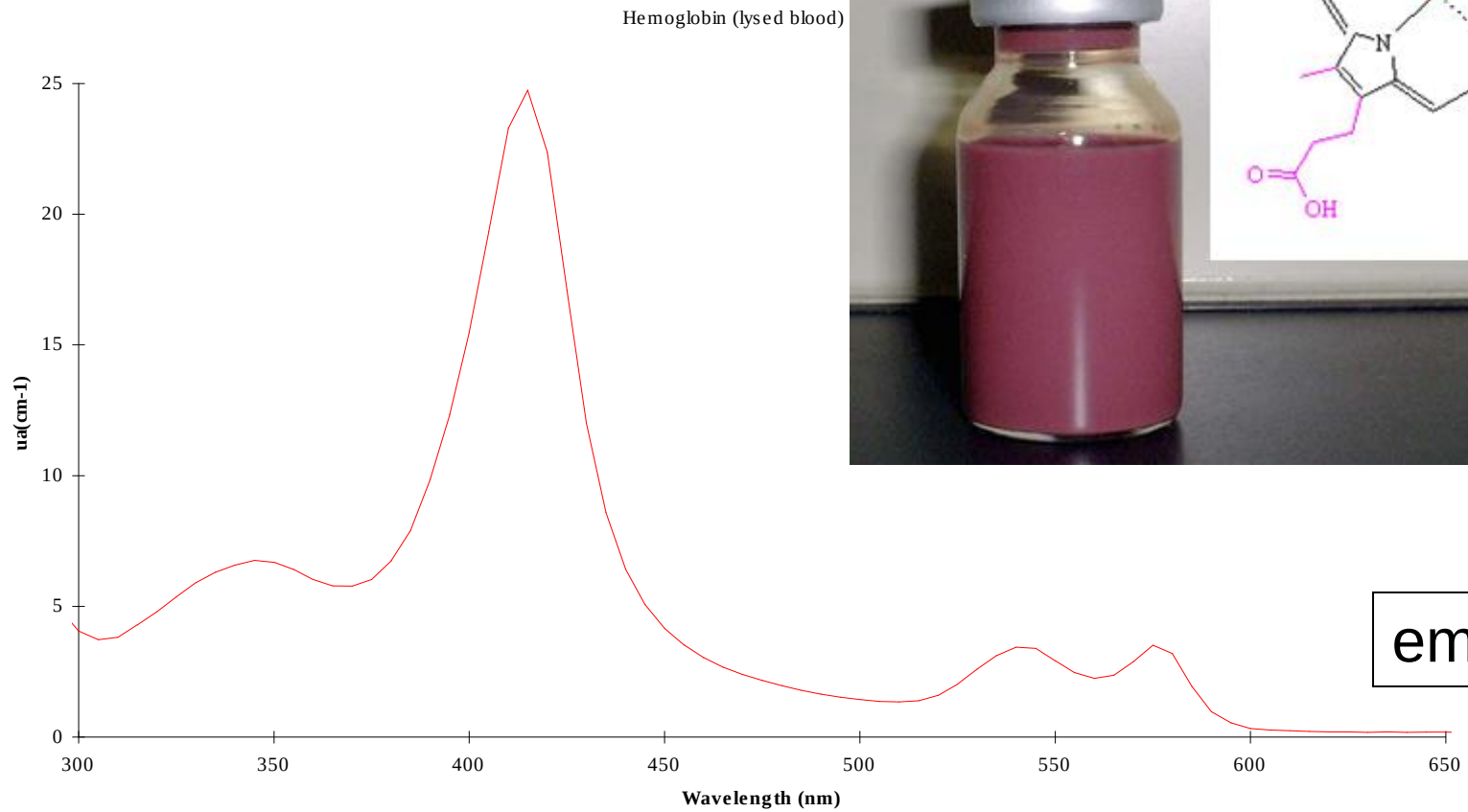
✚ I valori teorici di ϵ sono accurati

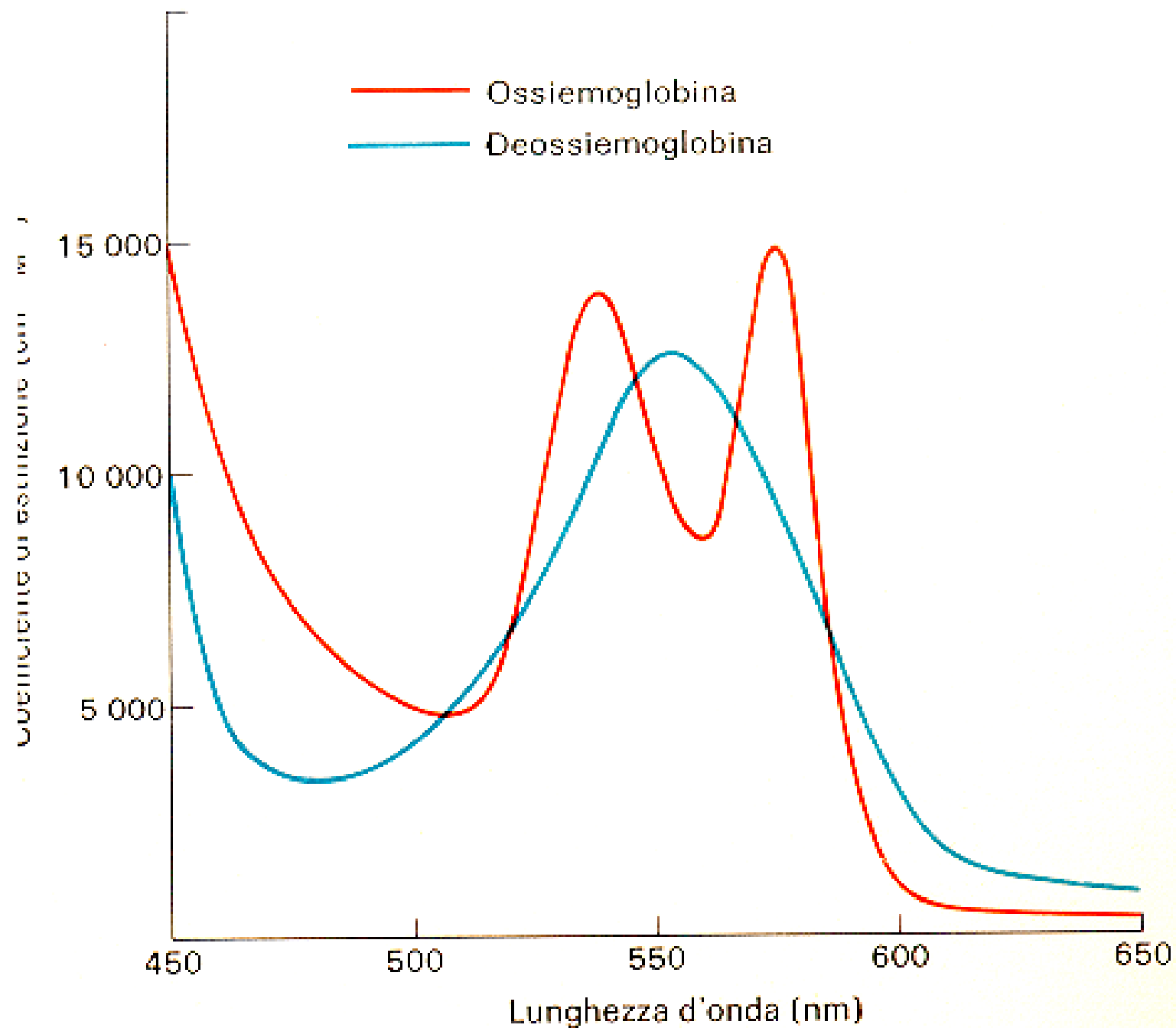


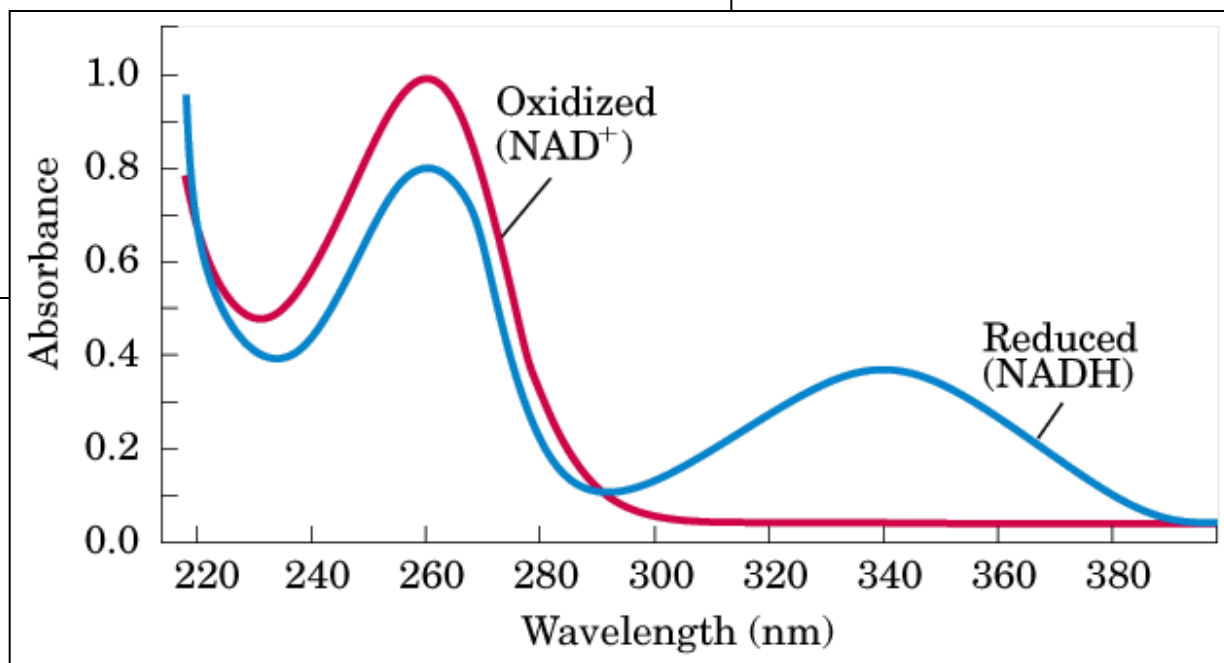
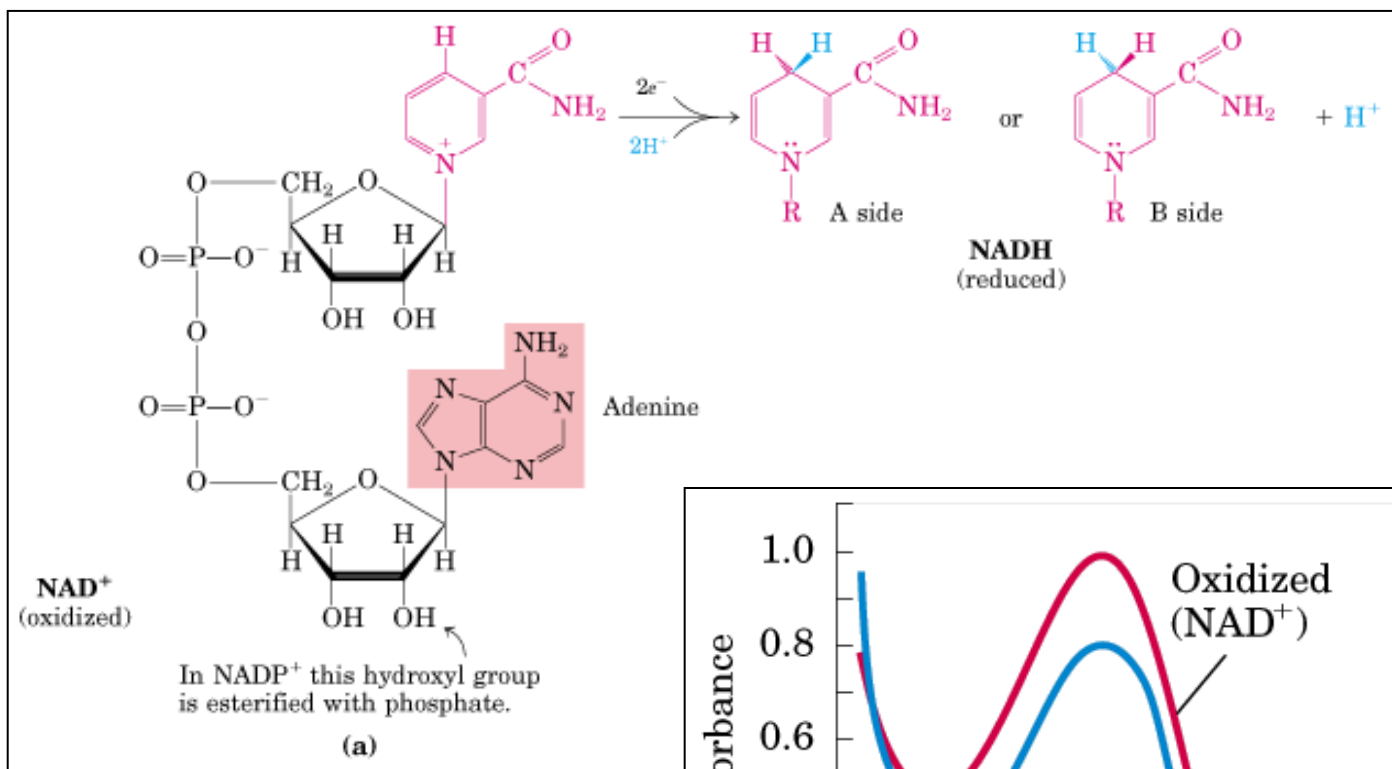
Cosa determina l'assorbanza di un cromoforo?

- I cromofori sono di solito caratterizzati da **doppi legami e sistemi di risonanza**
- Lo spettro di assorbimento di un cromoforo è solo parzialmente determinato dalla sua natura chimica
- **L'ambiente** del cromoforo influenza le proprietà dello spettro
 - **pH**
 - **polarità del solvente**
 - **effetti di orientamento**
- I cromofori possono agire da **molecole reporter** che possono dare informazioni circa il loro ambiente .
- Effetti di protonazione/deprotonazione dovuti a cambiamenti di pH o effetti di ossidazione/riduzione influenzano la distribuzione elettronica dei cromofori
- polarità del solvente. Gli spettri cambiano in differenti solventi.
- Effetti di orientamento derivano da molecole di cromofori vicini. Ad es. hyperchromicity degli acidi nucleici.

Emoglobina

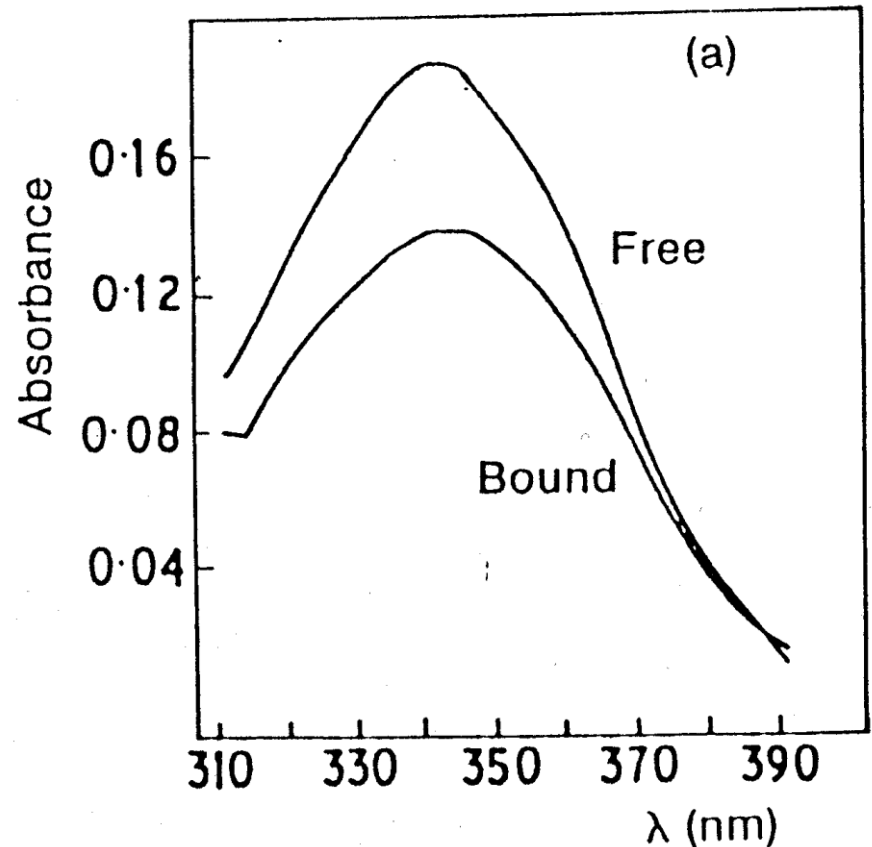






Però...

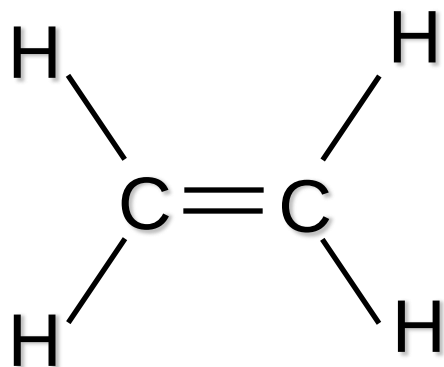
- NADH libero o legato ha assorbimenti (ϵ) diversi
- Si può “titolare” il sito dell'enzima misurando ΔA



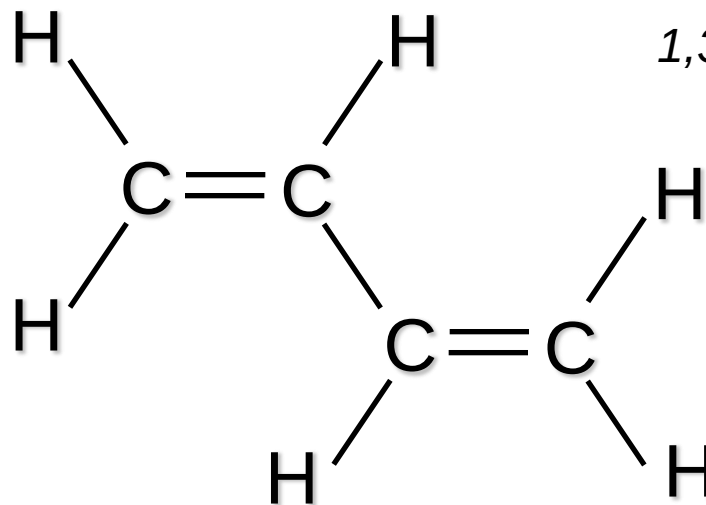
Cosa determina l'assorbanza di un cromoforo?

- I cromofori sono di solito caratterizzati da doppi legami e sistemi di risonanza
- Lo spettro di assorbimento di un cromoforo è solo parzialmente determinato dalla sua natura chimica
- L'ambiente del cromoforo influenza le proprietà dello spettro
 - pH
 - polarità del solvente
 - effetti di orientamento
- I cromofori possono agire da **molecole reporter** che possono dare informazioni circa il loro ambiente .
- Effetti di protonazione/deprotonazione dovuti a cambiamenti di pH o effetti di ossidazione/riduzione influenzano la distribuzione elettronica dei cromofori
- polarità del solvente. Gli spettri cambiano in differenti solventi.
- Effetti di orientamento derivano da molecole di cromofori vicini. Ad es. hyperchromicity degli acidi nucleici.

Un'estesa coniugazione ha un grande effetto sulla λ_{max} ; lo spostamento sarà a lunghezze d'onda **maggiori**

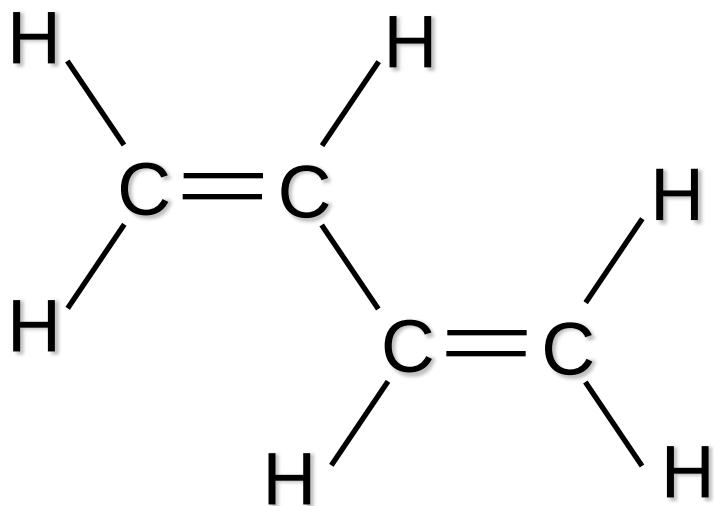


λ_{max} 170 nm

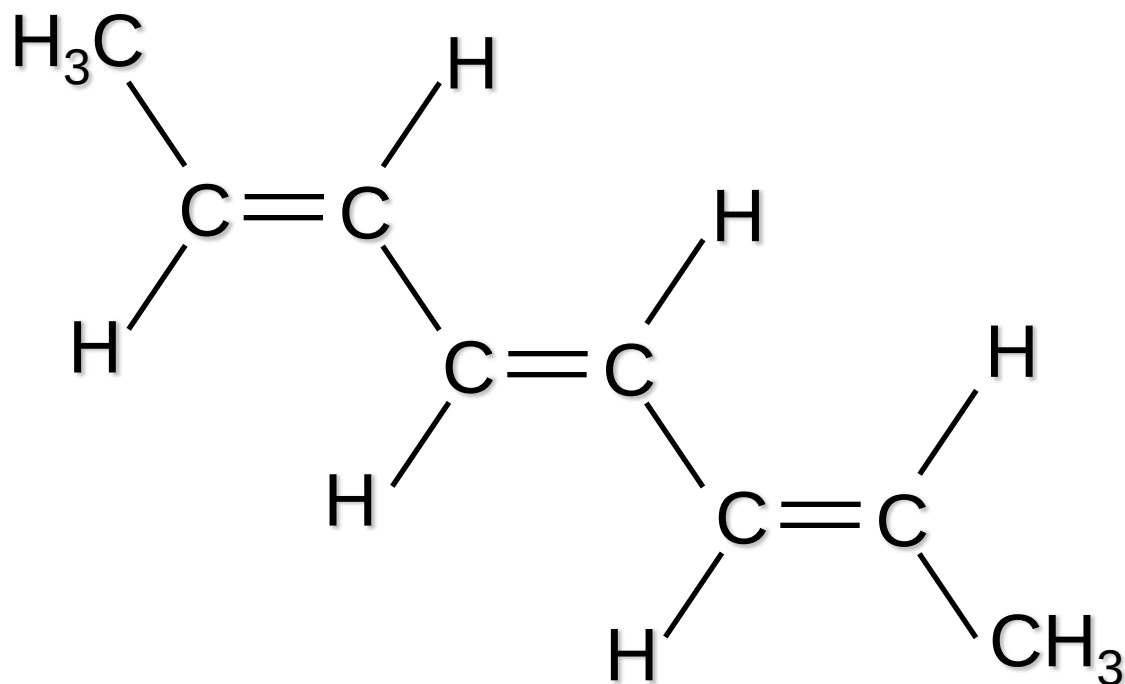


1,3-butadiene

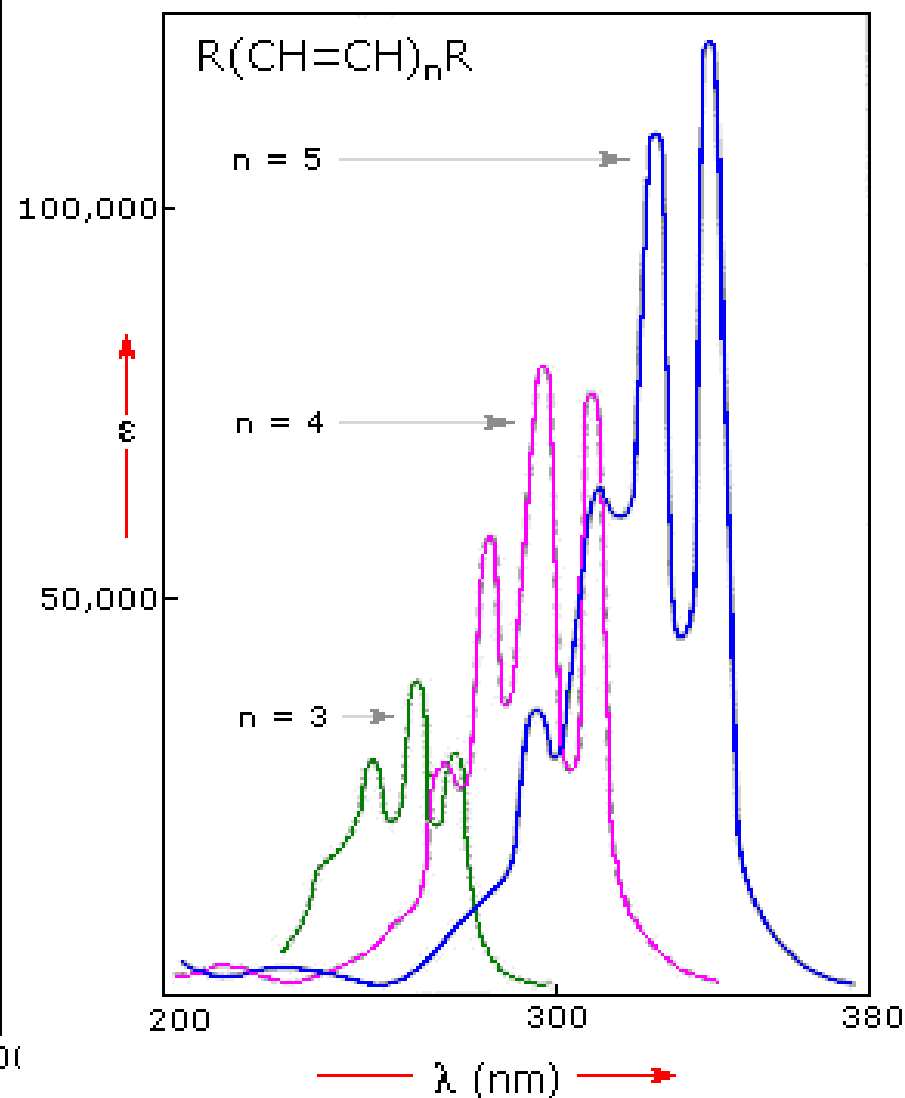
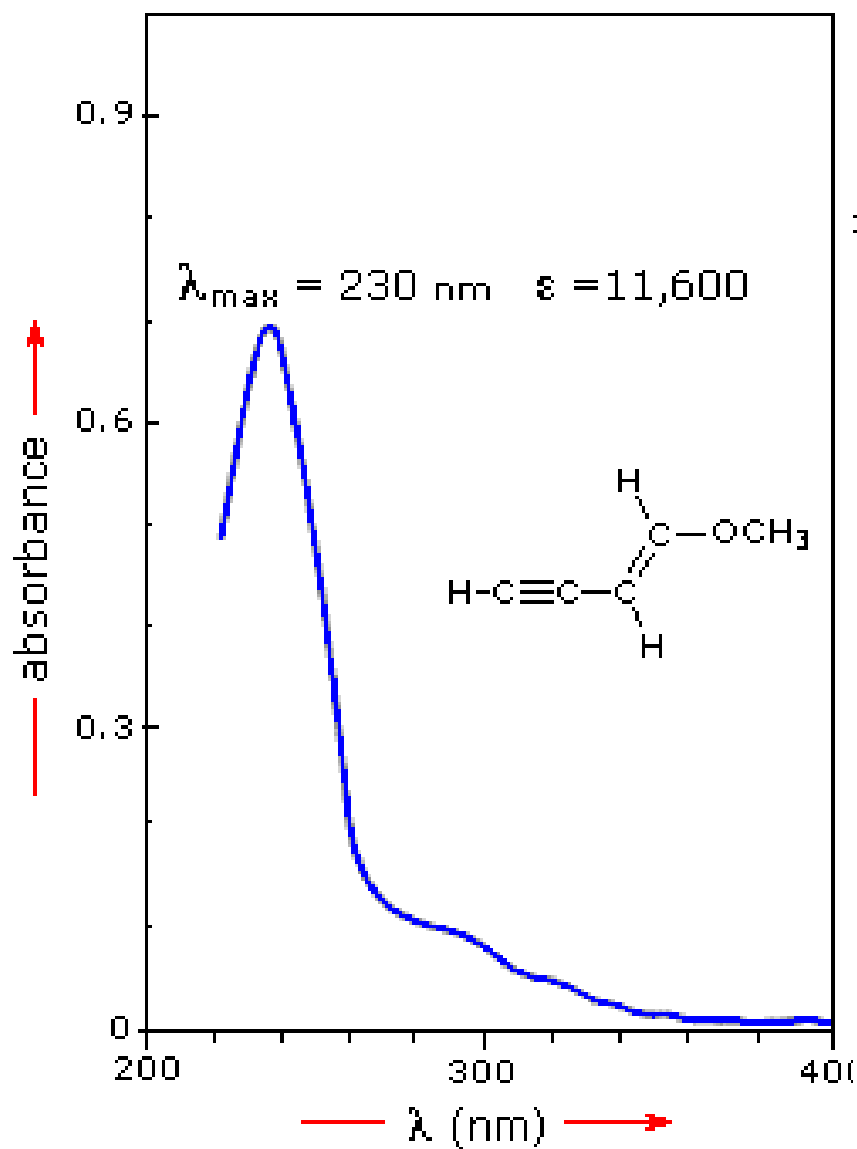
λ_{max} 217 nm

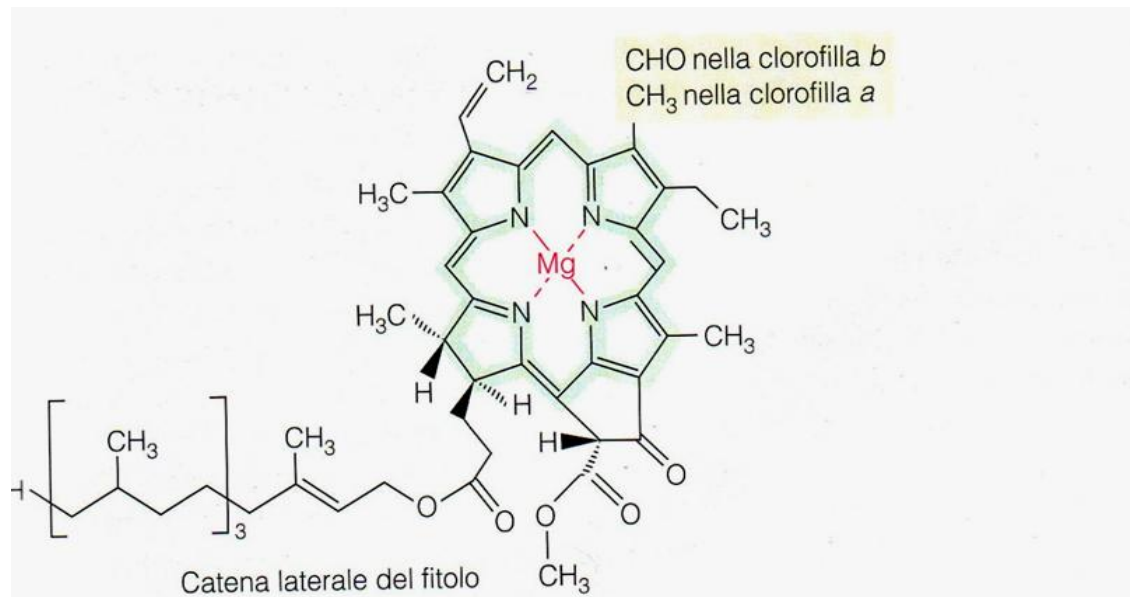


λ_{max} 217 nm
(diene coniugato)

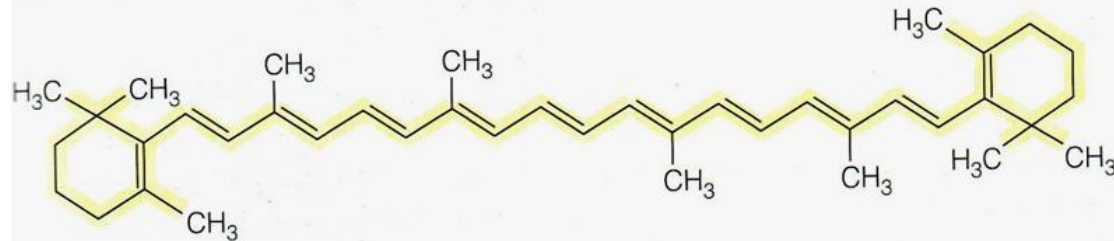


λ_{max} 263 nm
triene coniugato

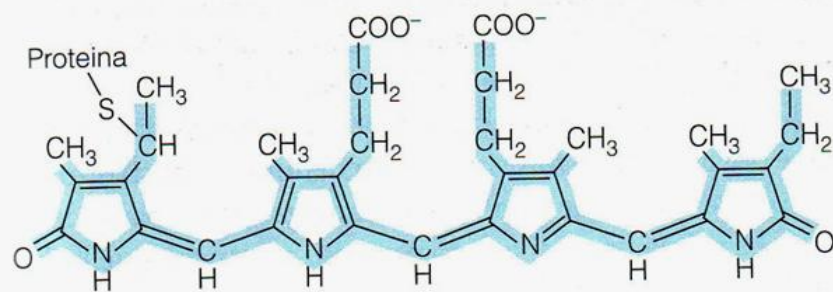




(a) Clorofille *a* e *b*

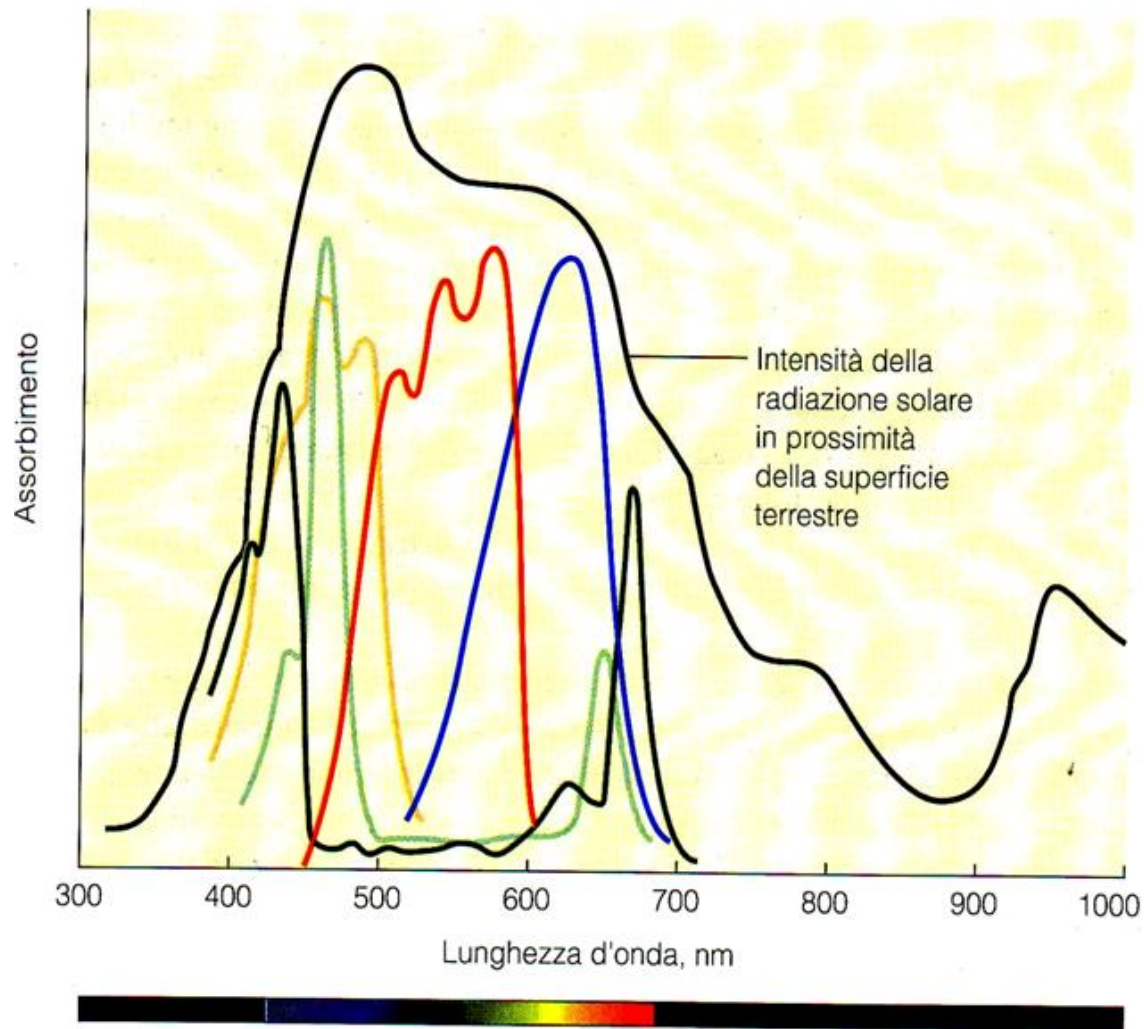


(b) β -Carotene



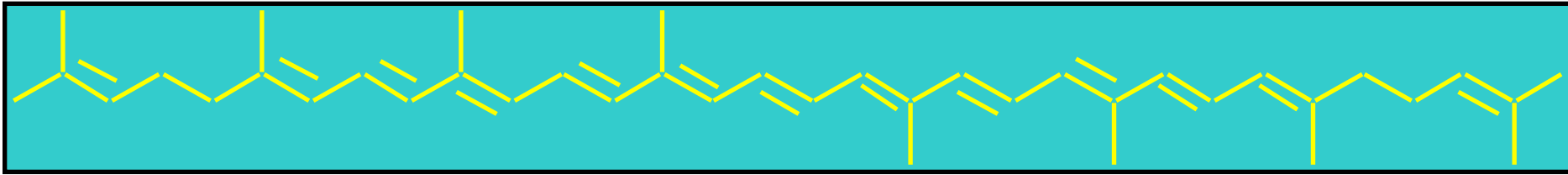
(c) Ficocianina

I pigmenti fotosintetici assorbono la luce perché hanno sistemi di doppi legami coniugati



Lycopene

È il pigmento rosso-arancio del pomodoro



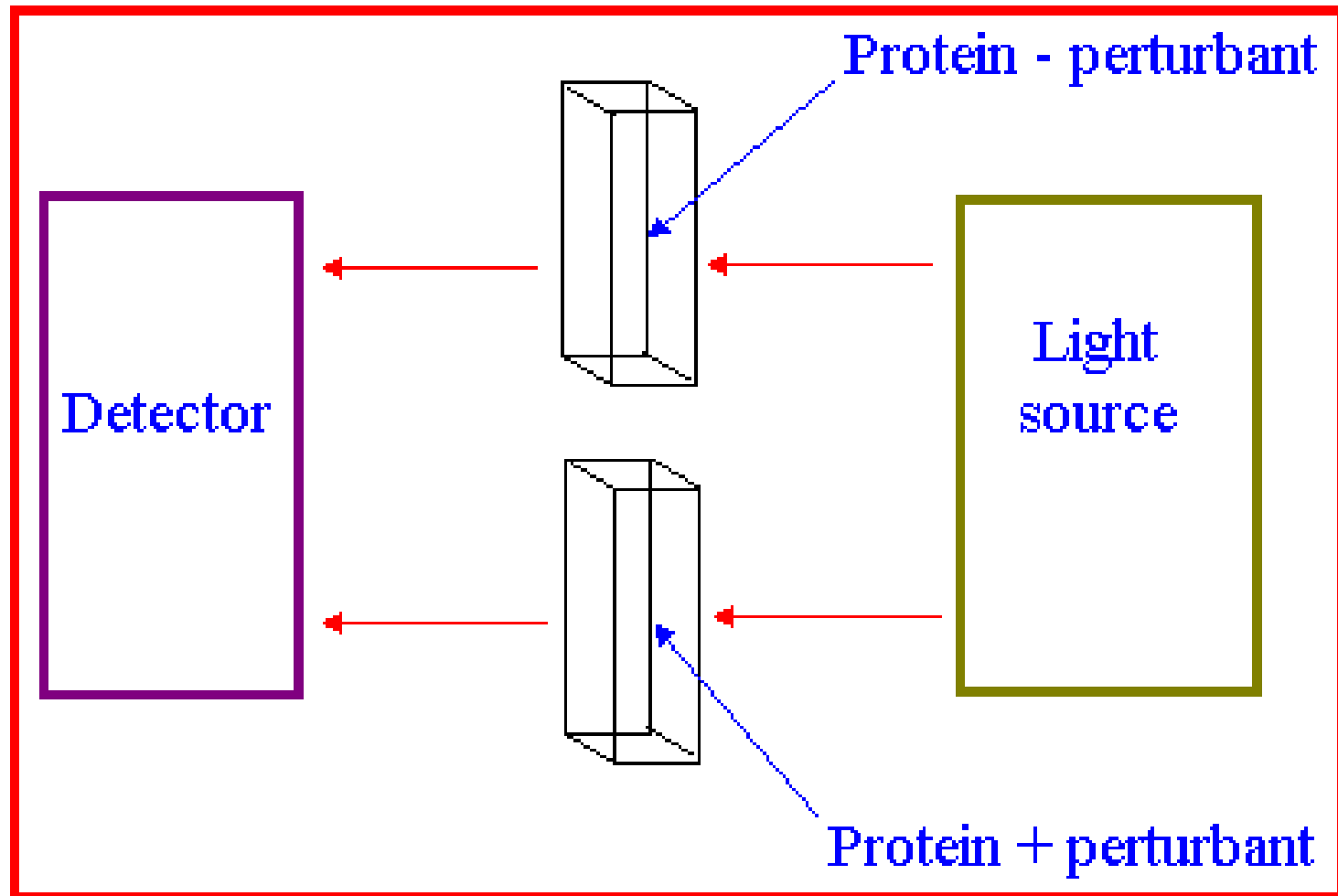
λ_{max} 505 nm

Spettri differenziali e perturbazioni del solvente

Cambiamenti nella lunghezza d'onda della banda di assorbimento possono essere indicativi di cambiamenti nella struttura.

L'uso di **denaturanti** o diversi **solventi** può essere utile per ottenere informazioni sulla struttura della proteina, e studiare i suoi cambiamenti conformazionali

Spettroscopia differenziale



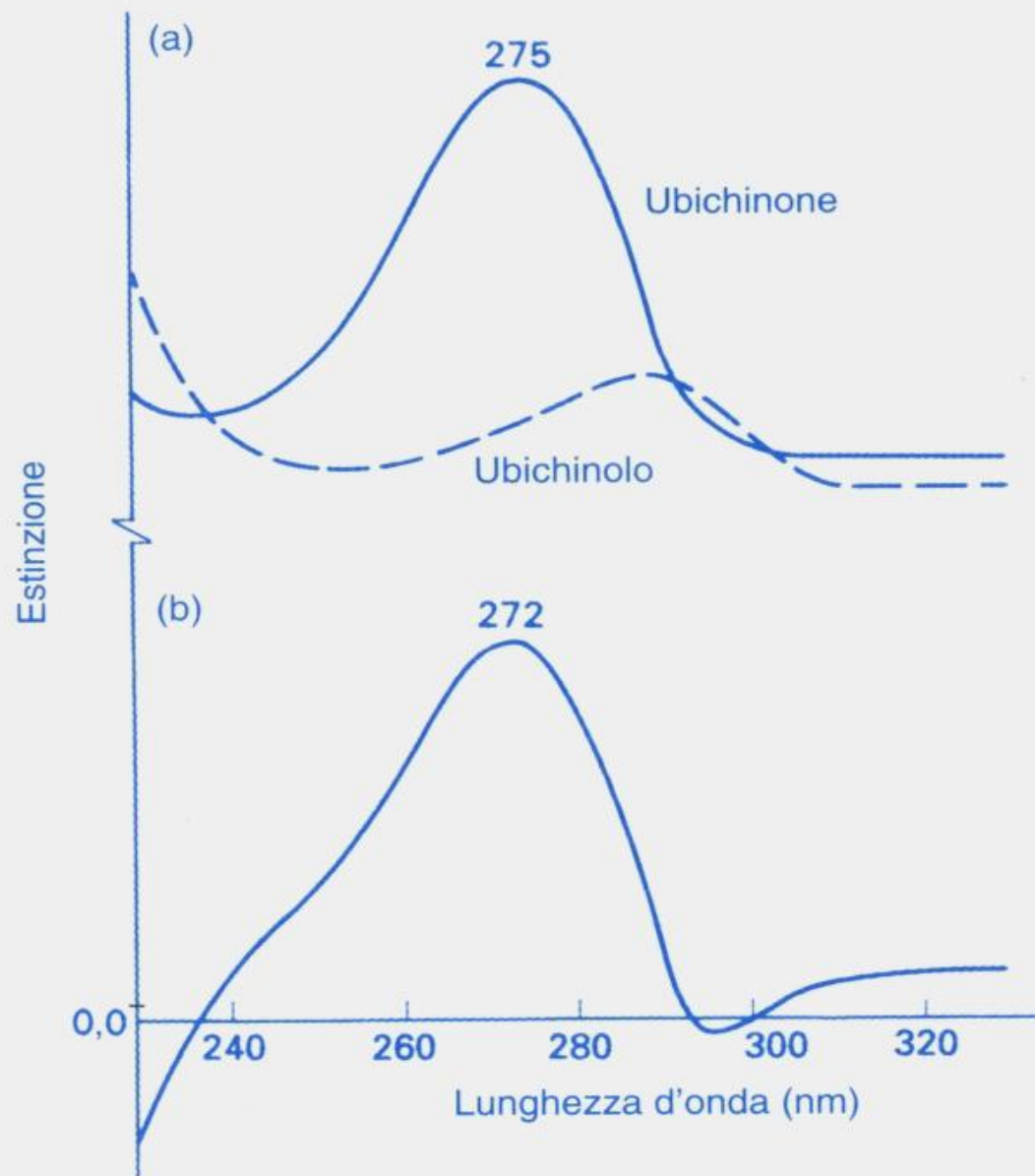
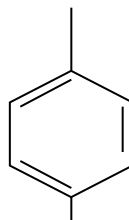
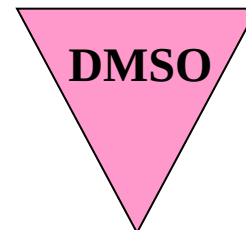
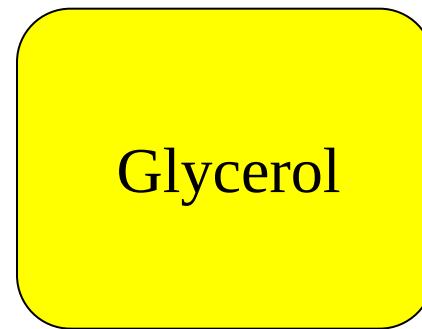
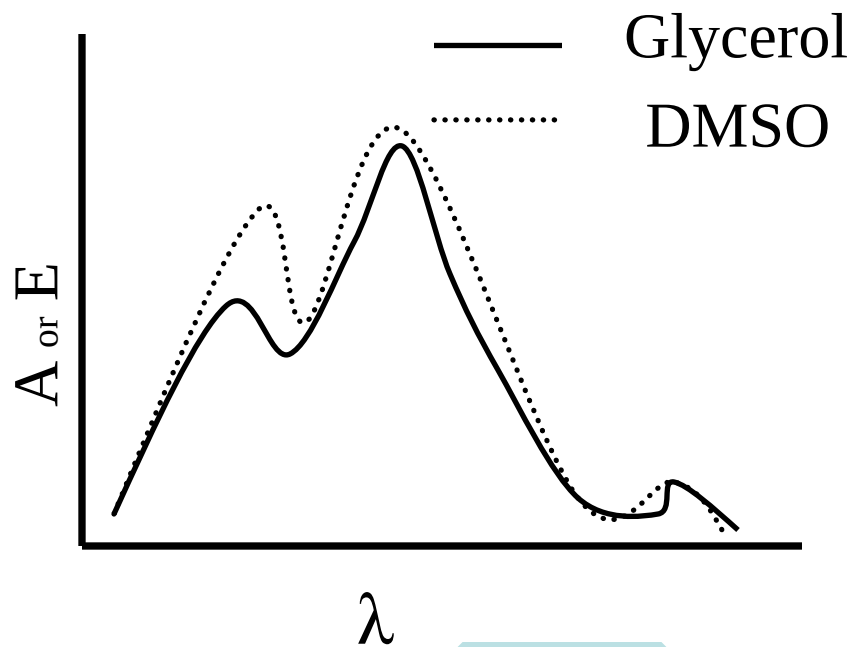
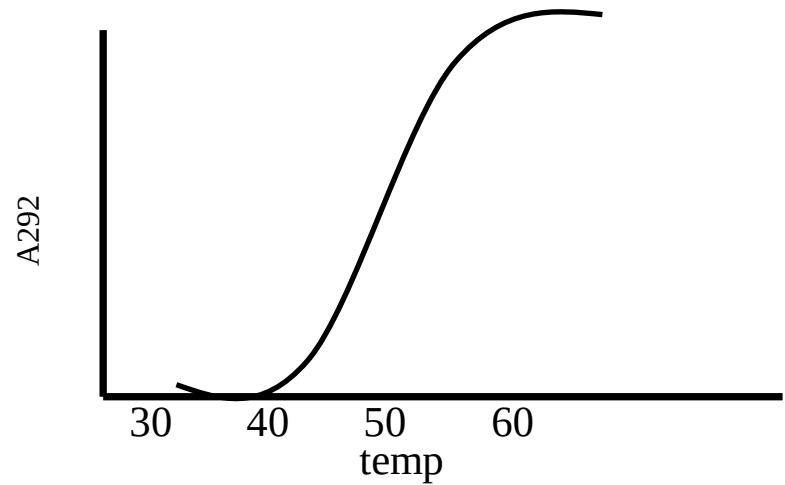
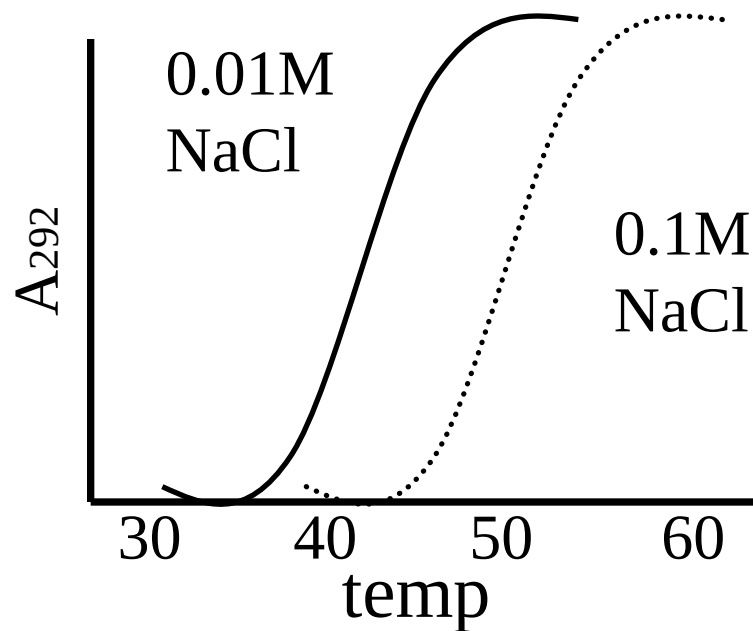
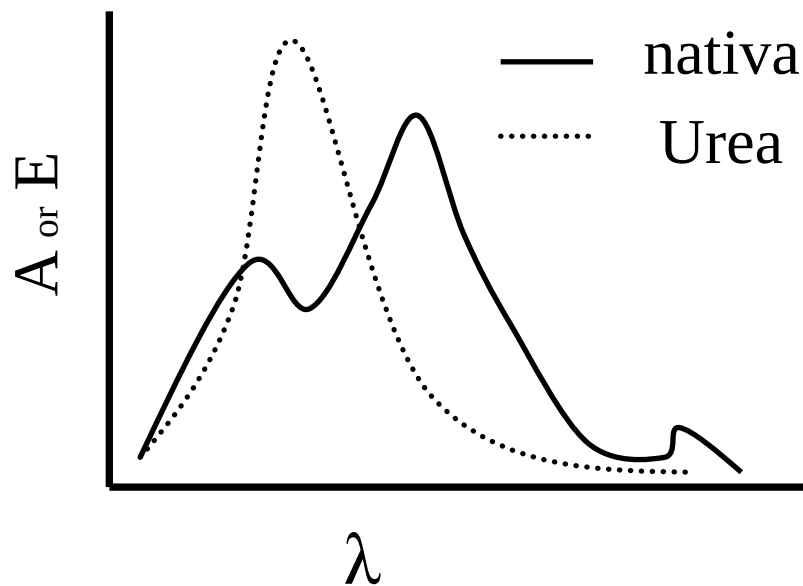


Figura 9.8 Spettro assoluto (a) e differenziale (b) dell'ubichinone e dell'ubichinolo.

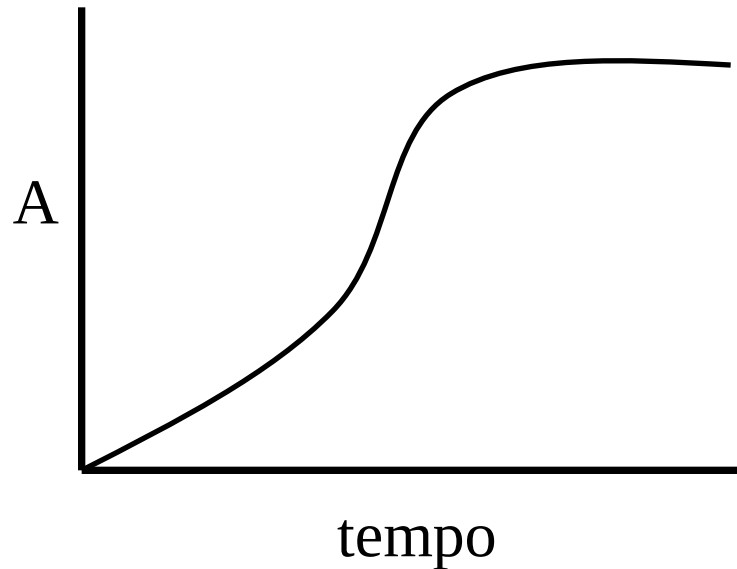


Protein



- Spettri di proteine **native** o **denaturate** possono essere usati per studiare le cinetiche di denaturazione/rinaturazione
- La **stabilità** delle proteine in diversi tamponi può essere studiata in diversi tamponi misurando il suo unfolding in **funzione della temperatura**

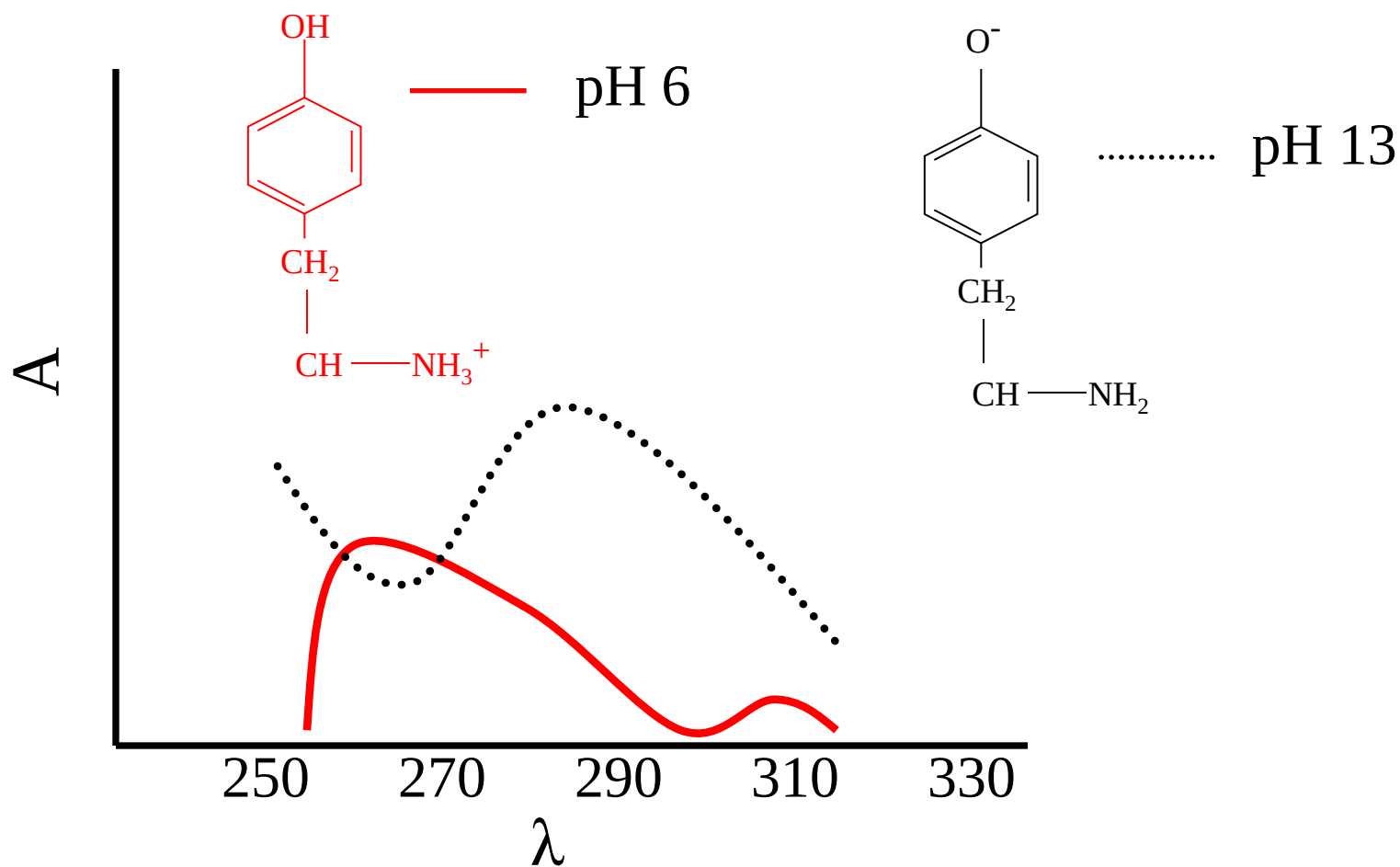
- Se il prodotto di una reazione è un cromoforo, è possibile usare la spettroscopia di assorbimento elettronico per studiare la **cinetica enzimatica**



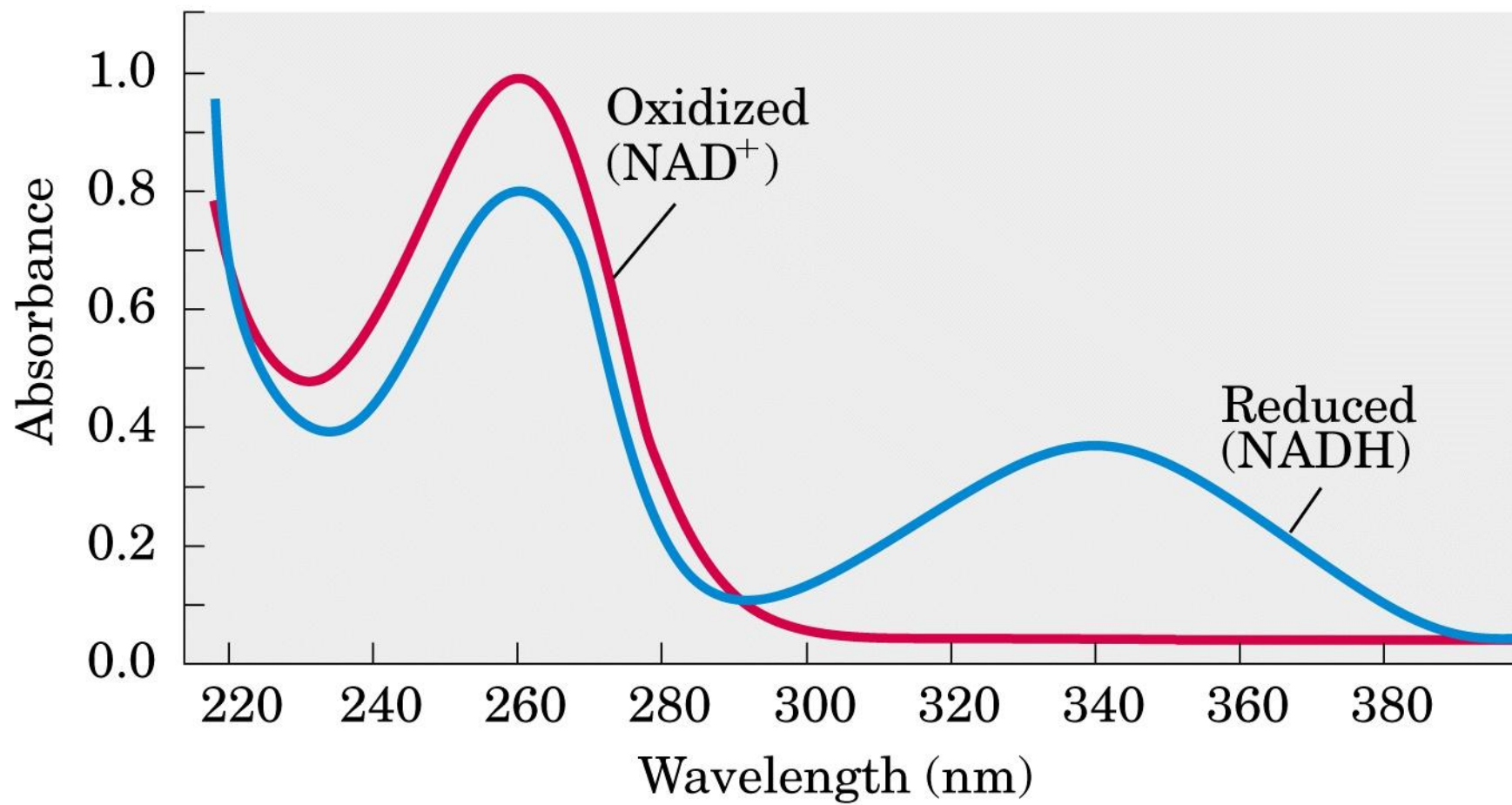
Cosa determina l'assorbanza di un cromoforo?

- I cromofori sono di solito caratterizzati da doppi legami e sistemi di risonanza
- Lo spettro di assorbimento di un cromoforo è solo parzialmente determinato dalla sua natura chimica
- L'ambiente del cromoforo influenza le proprietà dello spettro
 - pH
 - polarità del solvente
 - effetti di orientamento

Effetti di protonazione/deprotonazione dovuti a cambiamenti di pH o effetti di ossidazione/riduzione influenzano la distribuzione elettronica dei cromofori



- Effetti di protonazione deprotonazione



(b)

