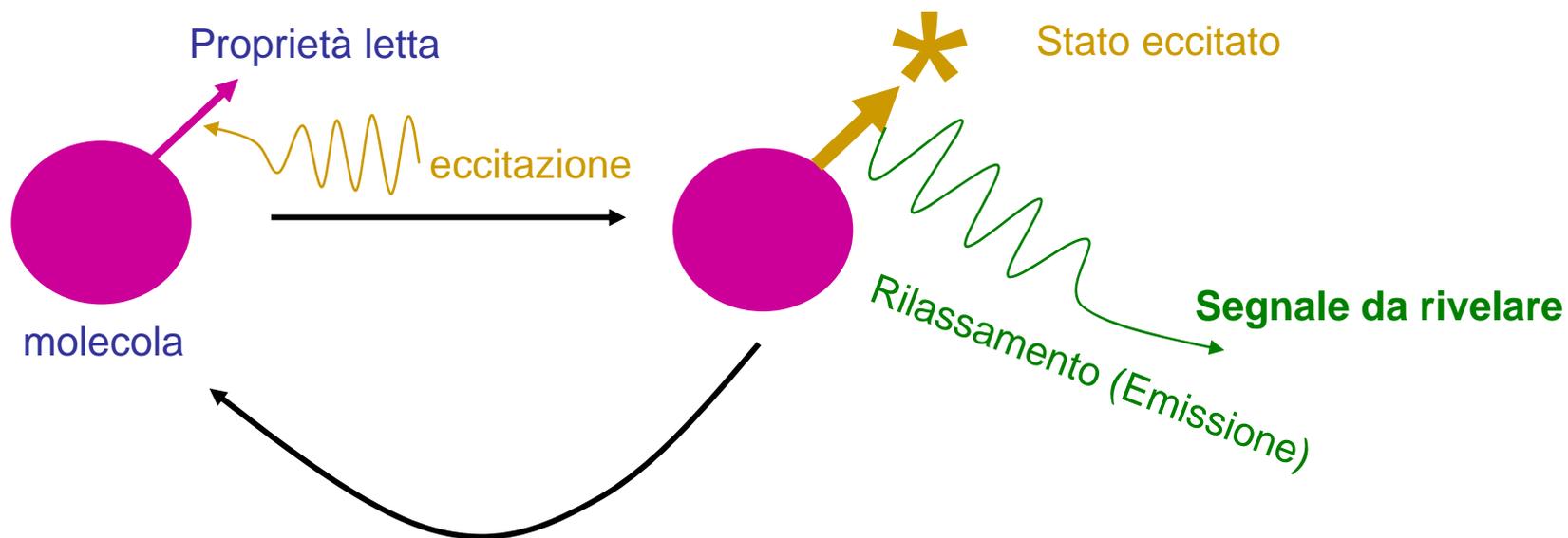


## Spettroscopia di assorbimento UV-visibile

Le spettroscopie sono impiegate come strumenti analitici fondamentali per la determinazione dei composti chimici e dei loro gruppi funzionali. La spettroscopia di assorbimento UV-visibile (UV-Vis), Infrarossa (IR) e di risonanza magnetica nucleare (NMR) sono di uso diffuso nei laboratori di ricerca.

Sono spettroscopie nel senso classico del termine:



Questo schema vale per la spettroscopia di emissione e per quella di assorbimento, assai più diffusa.

# La scala di energia delle tecniche spettroscopiche

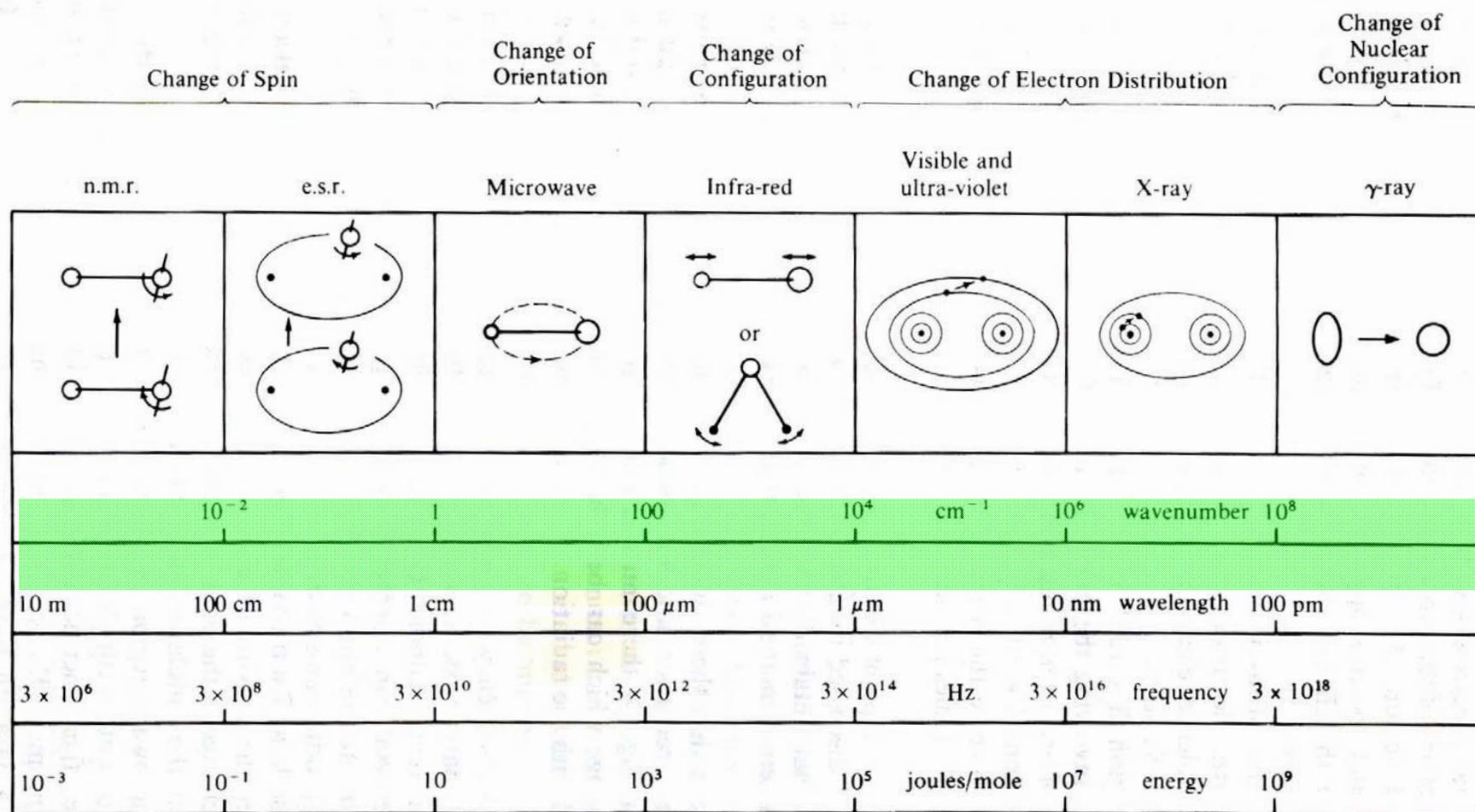
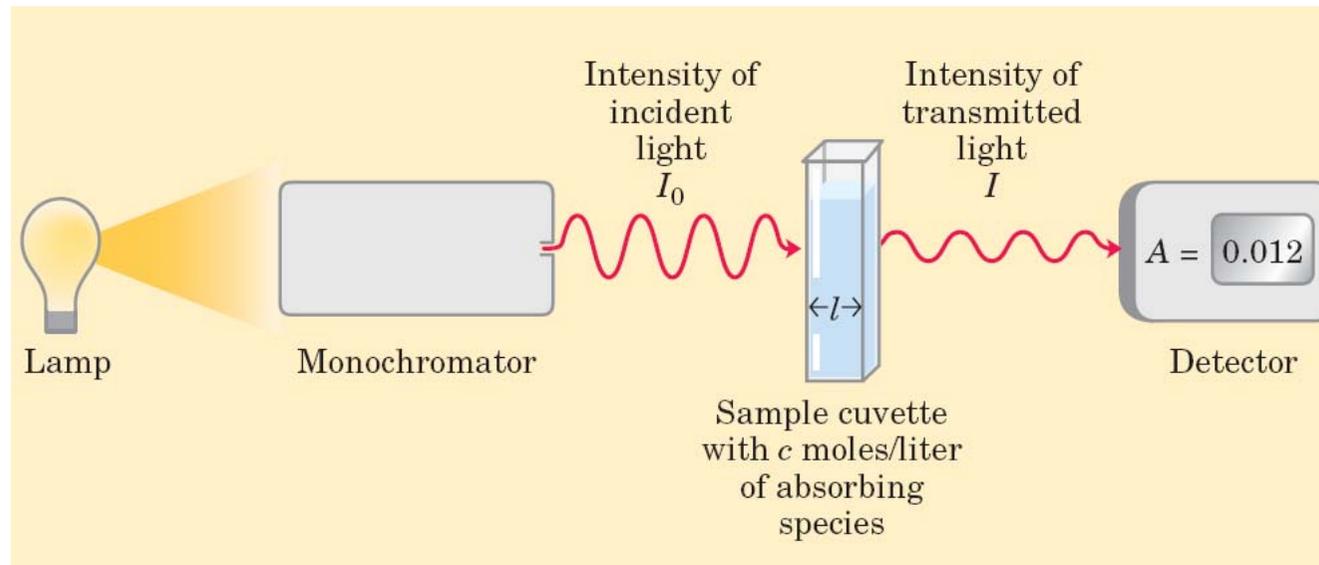


Figure 1.4 The regions of the electromagnetic spectrum.

## Come funziona la spettroscopia di assorbimento UV-vis



**Figure 3.9.** Ultraviolet/visible absorption spectroscopy experiment. Light of a single wavelength ( $\lambda$ ) and intensity ( $I_0$ ) is passed through a sample held in a cuvette. Some of this light may be absorbed by the sample. This is detected as a decreased intensity of transmitted light ( $I$ ) compared to incident light.  $\log I_0/I$  is measured as absorbance

Per rendere la misura quantitativa, serve una cella di misura accoppiata (**bianco**)

I dati sono rappresentati come un diagramma di assorbimento ( $\epsilon$ ) rispetto alla lunghezza d'onda ( $\lambda$ )

L'assorbimento dovrebbe seguire la legge di Lambert-Beer

$$\epsilon = 1/cl (\log_{10} I_0/I) \text{ l mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$$

## Come funziona la spettroscopia di assorbimento UV-vis

Gli spettri UV-Vis sono ottenuti dagli elettroni negli orbitali molecolari che sono eccitati e compiono una transizione. Alcune semplici eccitazioni sono mostrate di sotto:

<i>Chromophore</i>	<i>Transition notation†</i>	$\lambda_{\max}$ , <i>nm</i>
$\sigma$ -bonded electrons $\diagup \text{C}-\text{C} \diagdown$ and $\diagup \text{C}-\text{H}$	$\sigma \rightarrow \sigma^*$	~ 150
Lone-pair electrons $-\ddot{\text{O}}-$	$n \rightarrow \sigma^*$	~ 185
$-\ddot{\text{N}} \diagdown$	$n \rightarrow \sigma^*$	~ 195
$-\ddot{\text{S}}-$	$n \rightarrow \sigma^*$	~ 195
$\diagup \text{C}=\ddot{\text{O}}$	$n \rightarrow \pi^*$	~ 300
$\diagup \text{C}=\ddot{\text{O}}$	$n \rightarrow \sigma^*$	~ 190
$\pi$ -bonded electrons $\diagup \text{C}=\text{C} \diagdown$ (isolated)	$\pi \rightarrow \pi^*$	~ 190

I gruppi chimici che contengono gli elettroni responsabili per l'assorbimento sono detti **cromofori**

## Che tipo di informazioni si possono estrarre

### ALCHENI    Dieni coniugati e polieni

All'aumento della coniugazione:

la lunghezza d'onda di assorbimento  $\lambda_{\max}$  si sposta verso lunghezze d'onda maggiori

Più alta lunghezza d'onda significa **minore energia**

Aumento della coniugazione



Aumento della lunghezza d'onda



Assorbimento si sposta dall'UV verso le regioni visibili dello spettro

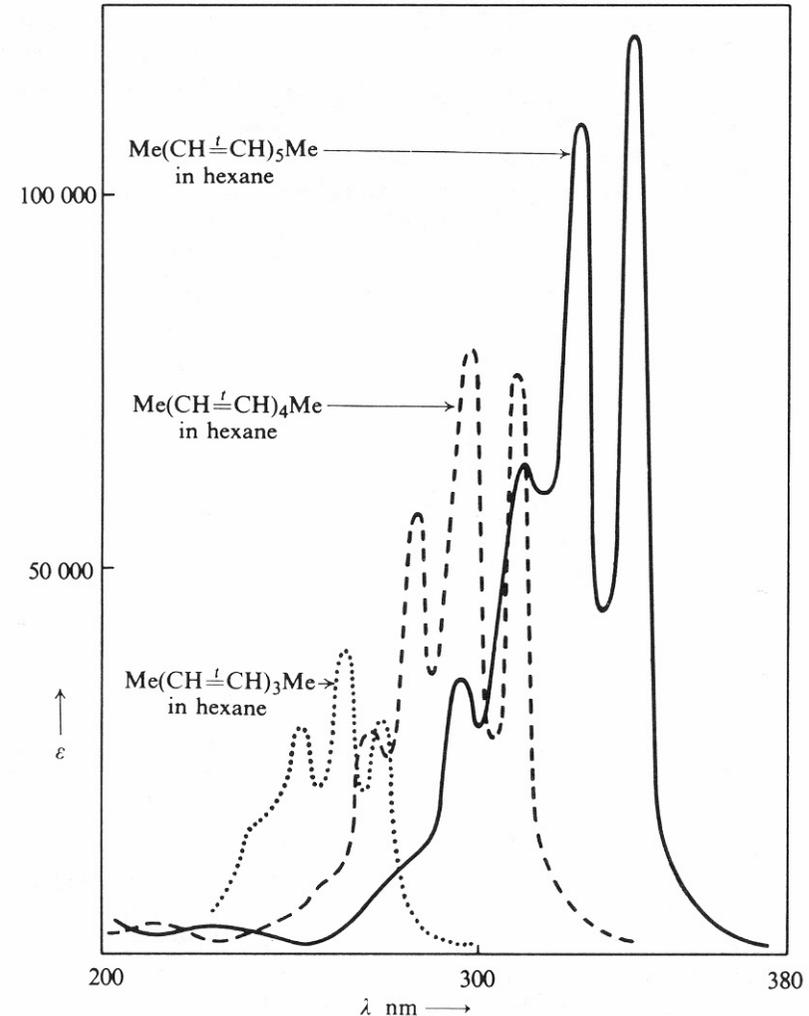


Fig. 1.3

(Replotted from Nayler and Whiting, *J. Chem. Soc.*, 1955, 3042.)

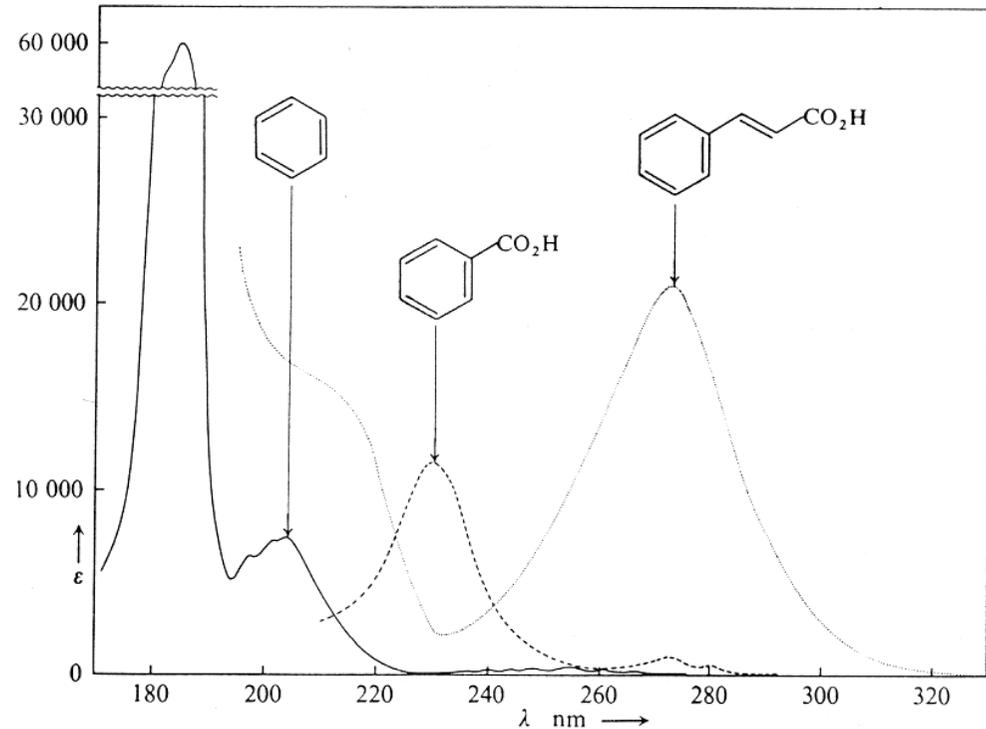
## Che tipo di informazioni si possono estrarre

### AROMATICI Benzene e benzeni sostituiti

I derivati del benzene come il toluene o analoghi (piridina) assorbono a lunghezze d'onda molto simili

MA se la sostituzione sul benzene coinvolge un sistema che contiene elettroni che possono essere donati all'anello, c'è un aumento della lunghezza d'onda di assorbimento (minore energia)

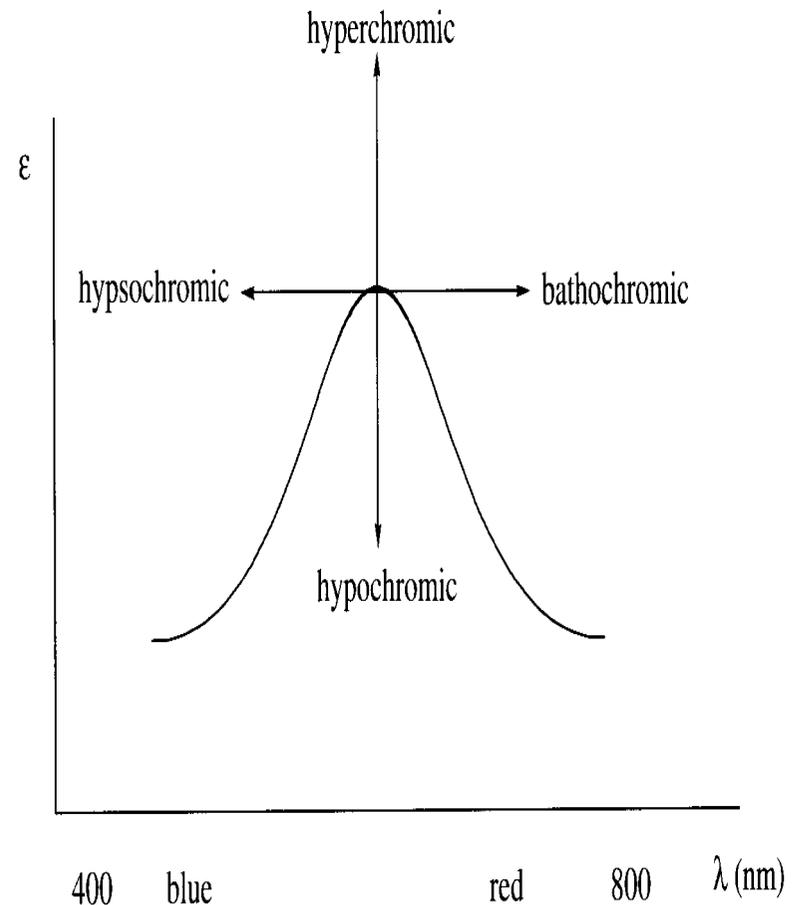
Quali gruppi contengono elettroni che possono essere donati all'anello benzenico?



# Nomenclatura spettrale

## Spettroscopia UV-vis

- Regione dei raggi X soffici (UV lontano)
  - 100 - 200 nm
  - Il quarzo, O<sub>2</sub> e CO<sub>2</sub> assorbono fortemente in questa regione
  - Lavaggio con N<sub>2</sub> va bene fino a 180 nm
- Regione del quarzo (UV vicino)
  - 200 – 350 nm
  - La sorgente luminosa è in genere una lampada a deuterio (D<sub>2</sub>)
- Regione visibile
  - 350 – 800 nm
  - La sorgente è una lampada a tungsteno



## Tutti i composti organici assorbono nell'UV

- Gruppi contenenti i legami C-C e C-H; gruppi isolati come C=C assorbono nel lontano UV per cui non sono di facile utilizzo
- Cromofori importanti sono  $R_2C=O$ ,  $-O(R)C=O$ ,  $-NH(R)C=O$  e i composti poliinsaturi
- La concentrazione deve essere tale che l'assorbanza sia tra 0,2 e 0.7 per ridurre l'errore sperimentale

## Taglio di lunghezze d'onda dei solventi comuni

**TABLE 9.2** Solvents Used in UV Spectroscopy

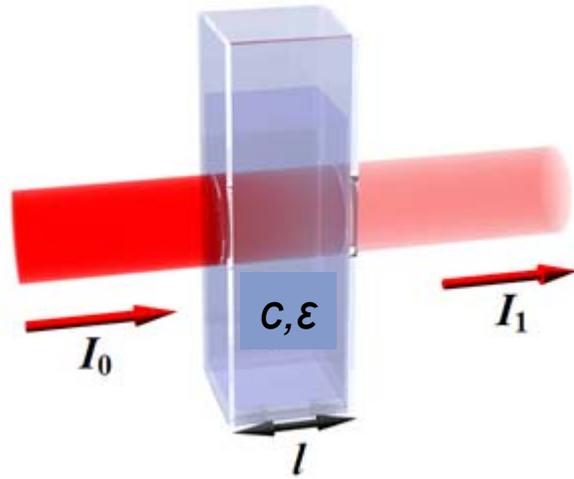
<i>Solvent</i>	$\lambda$ cut-off (nm)
water	205
acetonitrile	210
cyclohexane	210
diethyl ether	210
ethanol	210
hexane	210
methanol	210
dioxane	220
tetrahydrofuran	220
dichloromethane	235
chloroform	245
carbon tetrachloride	265
benzene	280
acetone	300

# Cromofori

- Strutture delle macromolecole che contengono gli elettroni che sono 'spostati' dai fotoni.
- Solo quelli che assorbono sopra i 200 nm sono utili
  - $n \rightarrow \pi^*$  nei chetoni è circa a 300 nm: è l'unico cromoforo isolato di interesse
  - Tutti gli altri cromofori di interesse sono sistemi coniugati di qualche tipo

TABLE 9.1 Summary of UV  $\lambda_{\max}$  and Transition Types for Simple Chromophores

Chromophore	Compound	Transition	$\lambda_{\max}$ (nm)	$\epsilon$
C-H	CH <sub>4</sub>	$\sigma \rightarrow \sigma^*$	122	
C-C	C <sub>2</sub> H <sub>6</sub>	$\sigma \rightarrow \sigma^*$	135	
C=C	C <sub>2</sub> H <sub>4</sub>	$\pi \rightarrow \pi^*$	103	15000
			174	5500
C=C=C	C <sub>3</sub> H <sub>4</sub>	$\pi \rightarrow \pi^*$	170	4000
			227	630
C $\equiv$ C	R-C $\equiv$ C-R'	$\pi \rightarrow \pi^*$	178	10000
			196	2000
			223	160
C-O	R-O-R	$n \rightarrow \sigma^*$	180	500
C-O	R-O-R'	$n \rightarrow \sigma^*$	180	3000
C-N	Amino	$n \rightarrow \sigma^*$	190-200	2500-4000
C-S	R-S-H	$n \rightarrow \sigma^*$	195	1800
C-S	R-S-R	$n \rightarrow \sigma^*$	235	180
C=O	Aldehyde/Ketone	$n \rightarrow \sigma^*$	166	16000
		$\pi \rightarrow \pi^*$	189	900
		$n \rightarrow \pi^*$	270	10-20
C=O	Carboxylic acid	$n \rightarrow \pi^*$	200	50
C=O	Carboxylate	$n \rightarrow \pi^*$	210	150
C=O	Ester	$n \rightarrow \pi^*$	210	50
C=O	Amide	$n \rightarrow \pi^*$	205	200
C=N	(NH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> C=NH	$n \rightarrow \pi^*$	265	15
C $\equiv$ N	CH <sub>3</sub> C $\equiv$ N	$\pi \rightarrow \pi^*$	<170	
N=N	Me-N=N-Me	$n \rightarrow \pi^*$	350-370	15
N=O	Me <sub>3</sub> NO	$n \rightarrow \pi^*$	300	100
			665	120
N=O	Me <sub>3</sub> NO <sub>2</sub>	$n \rightarrow \pi^*$	276	27
C=C=O	Et <sub>2</sub> C=C=O	$\pi \rightarrow \pi^*$	227	360
		$n \rightarrow \pi^*$	375	20
C-Cl		$n \rightarrow \sigma^*$	173	200
C-Br		$n \rightarrow \sigma^*$	208	300
C-I		$n \rightarrow \sigma^*$	259	400



## Legge di Lambert-Beer

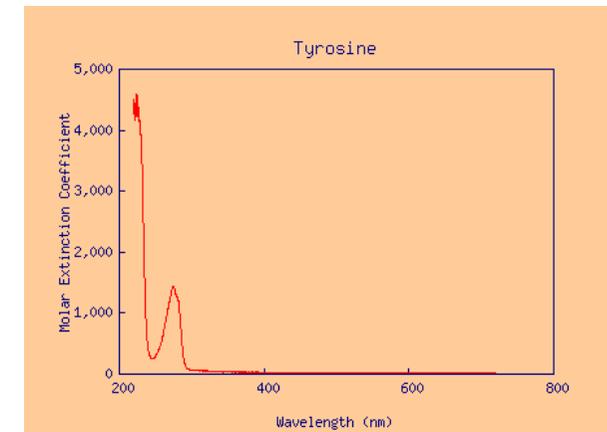
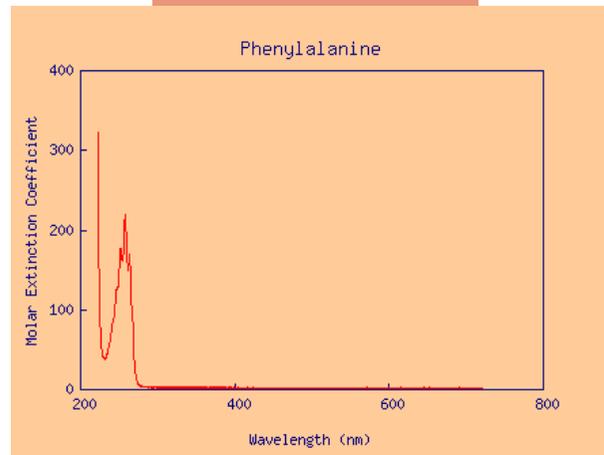
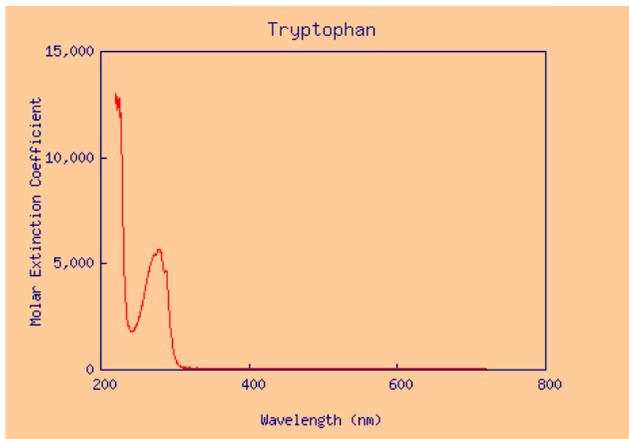
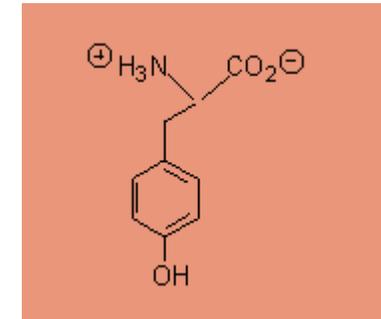
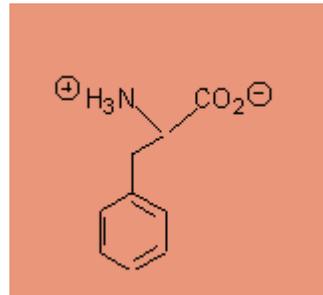
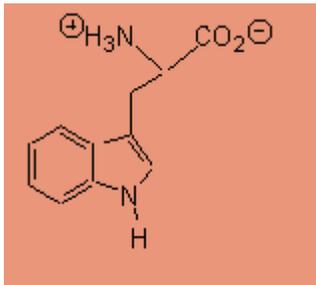
$$\log_{10} \frac{I_0}{I} = A = \epsilon l c$$

- $I_0$  = Intensità della luce incidente
- $I$  = Intensità della luce trasmessa
- $\epsilon$  = coefficiente di estinzione molare
- $l$  = lunghezza del cammino ottico della cella
- $c$  = concentrazione molare del campione

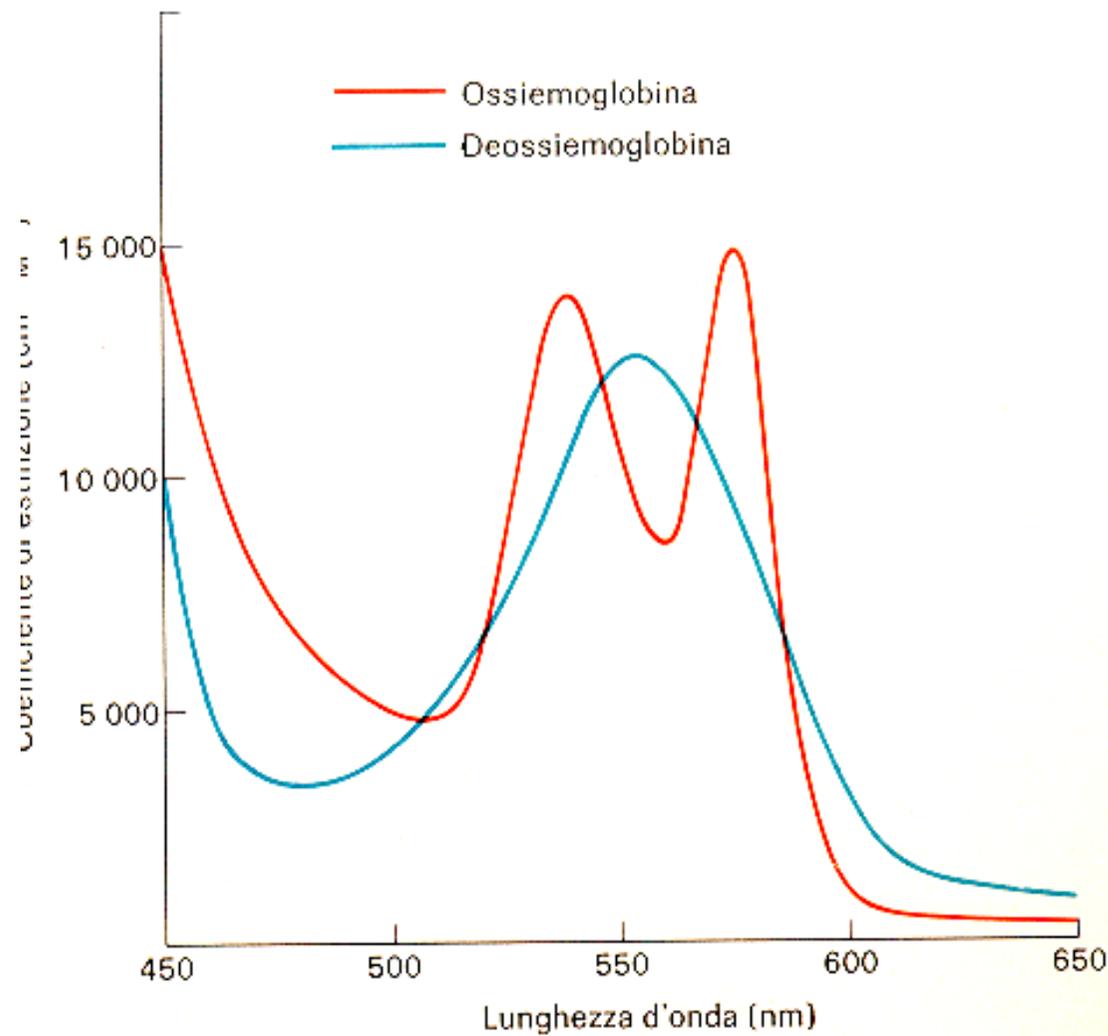
# L'identificazione dei cromofori

- Non è facile identificare un cromoforo
  - Troppi fattori influenzano uno spettro
  - La varietà di strutture è molto ampia
- Altre tecniche sperimentali coadiuvano questa ricerca
  - IR – buono per identificare i gruppi funzionali
  - NMR – il migliore per identificare i legami C-H

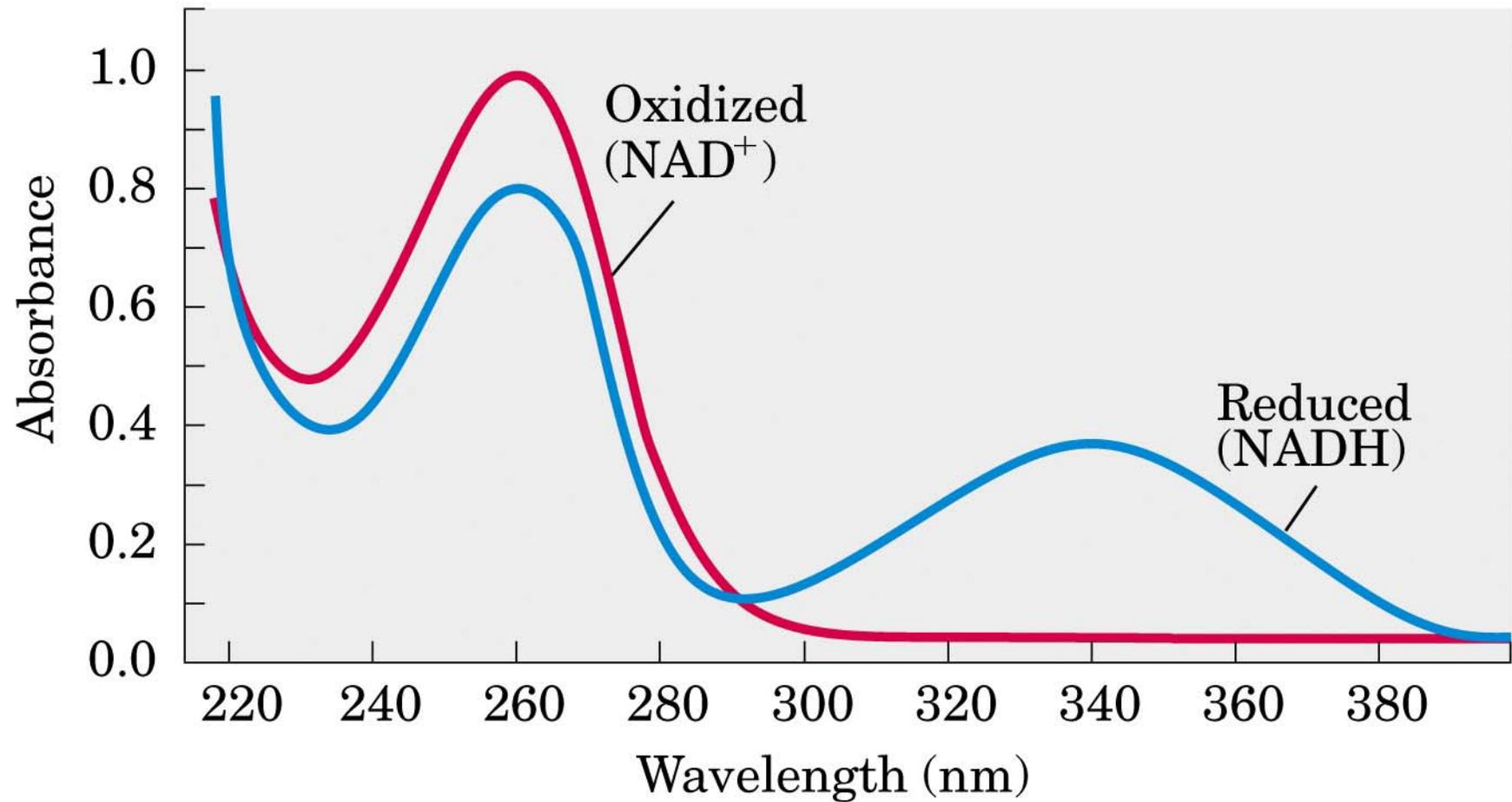
# Assorbimento UV degli amminoacidi



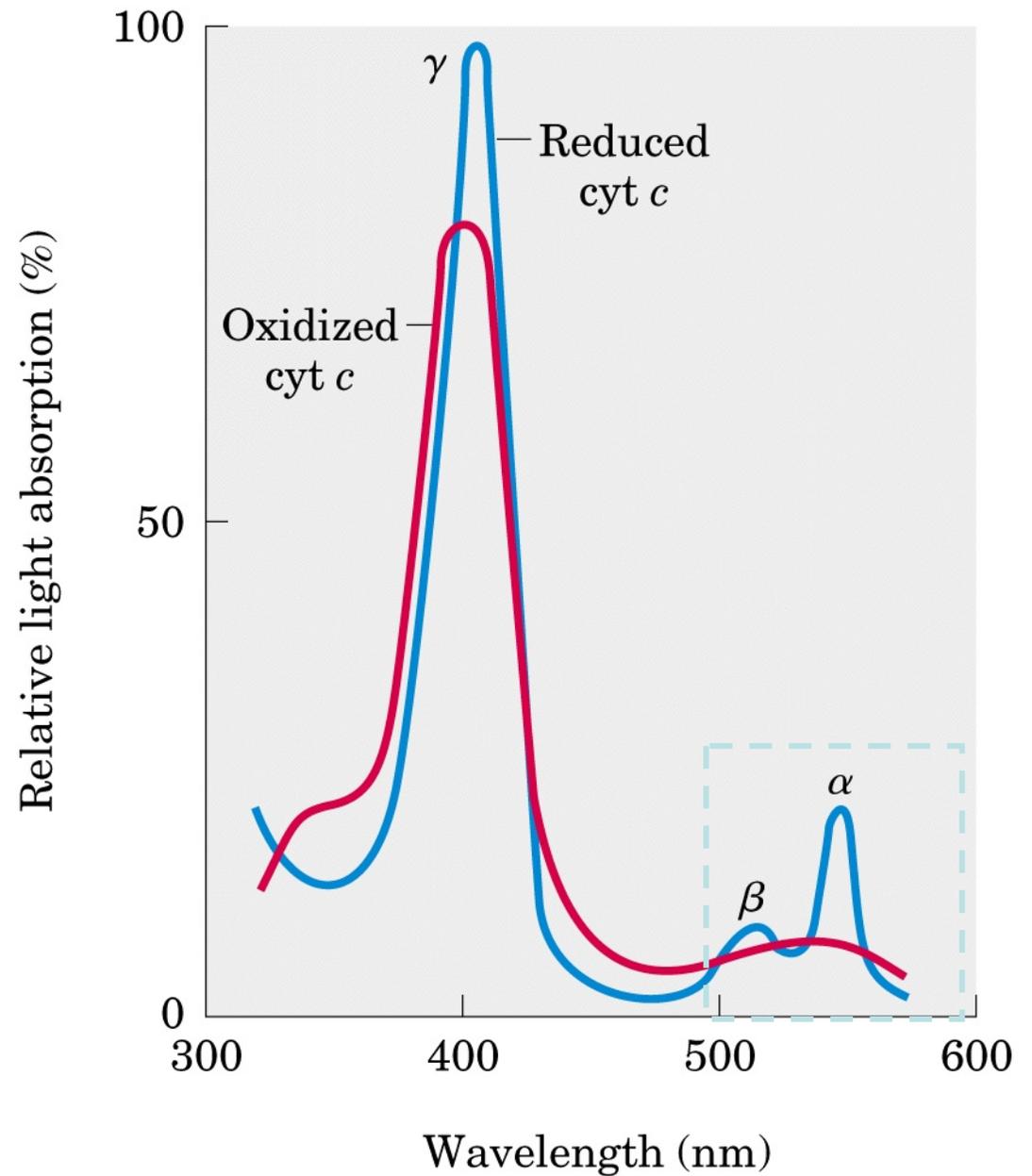
# Il colore del sangue



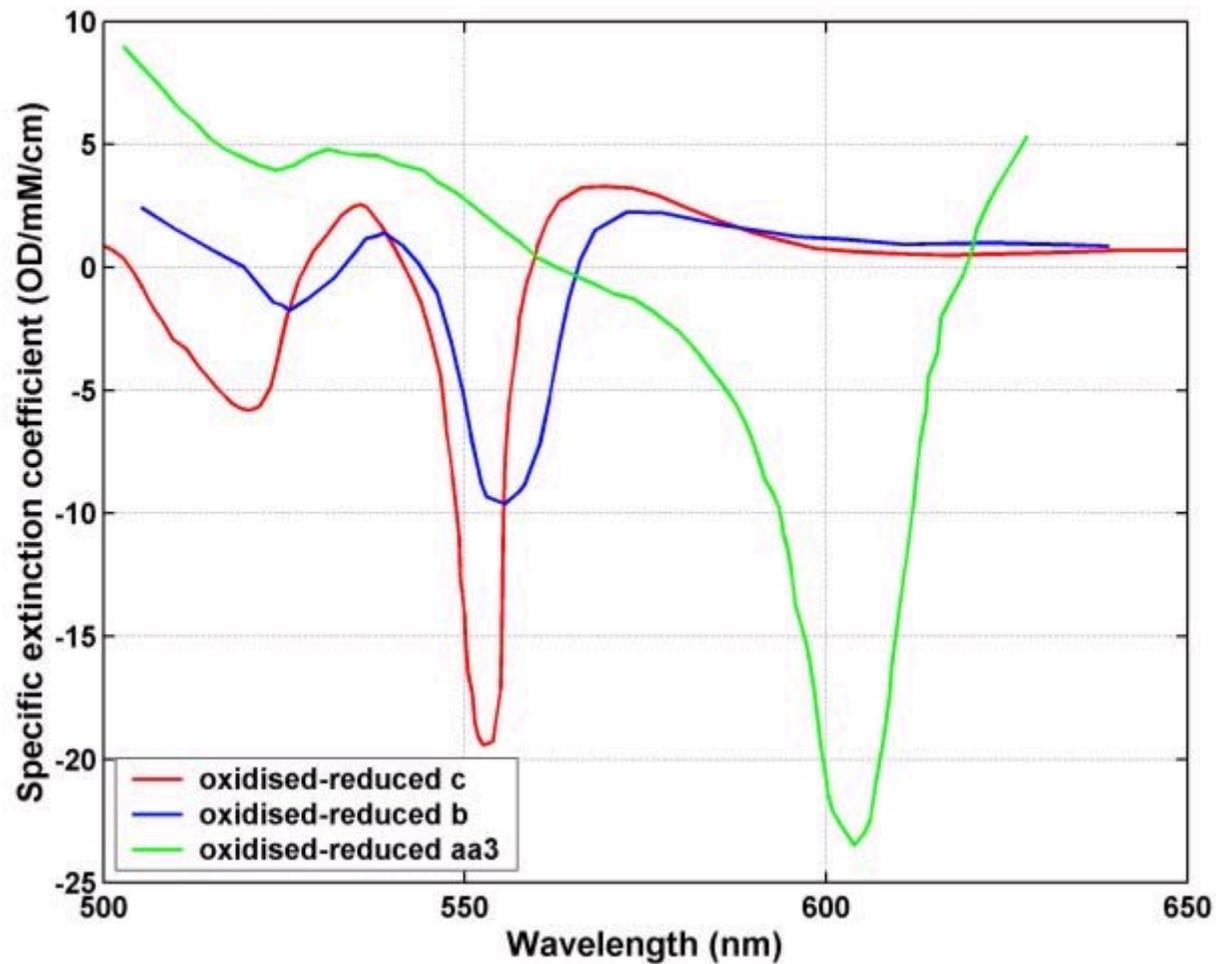
# Gli spettri di $\text{NAD}^+$ e $\text{NADH}$



# Lo spettro del citocromo c

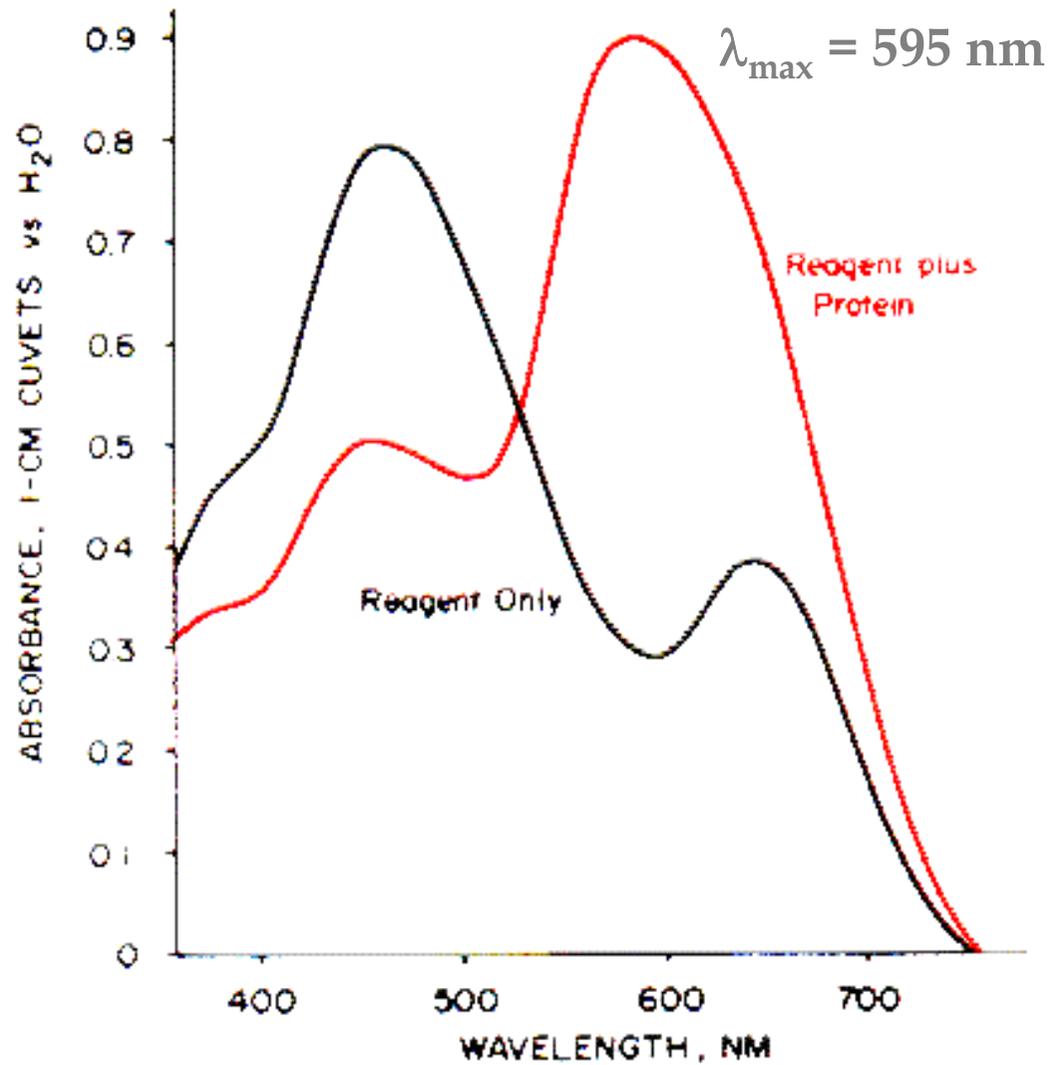


# Spettro differenziale di citocromi





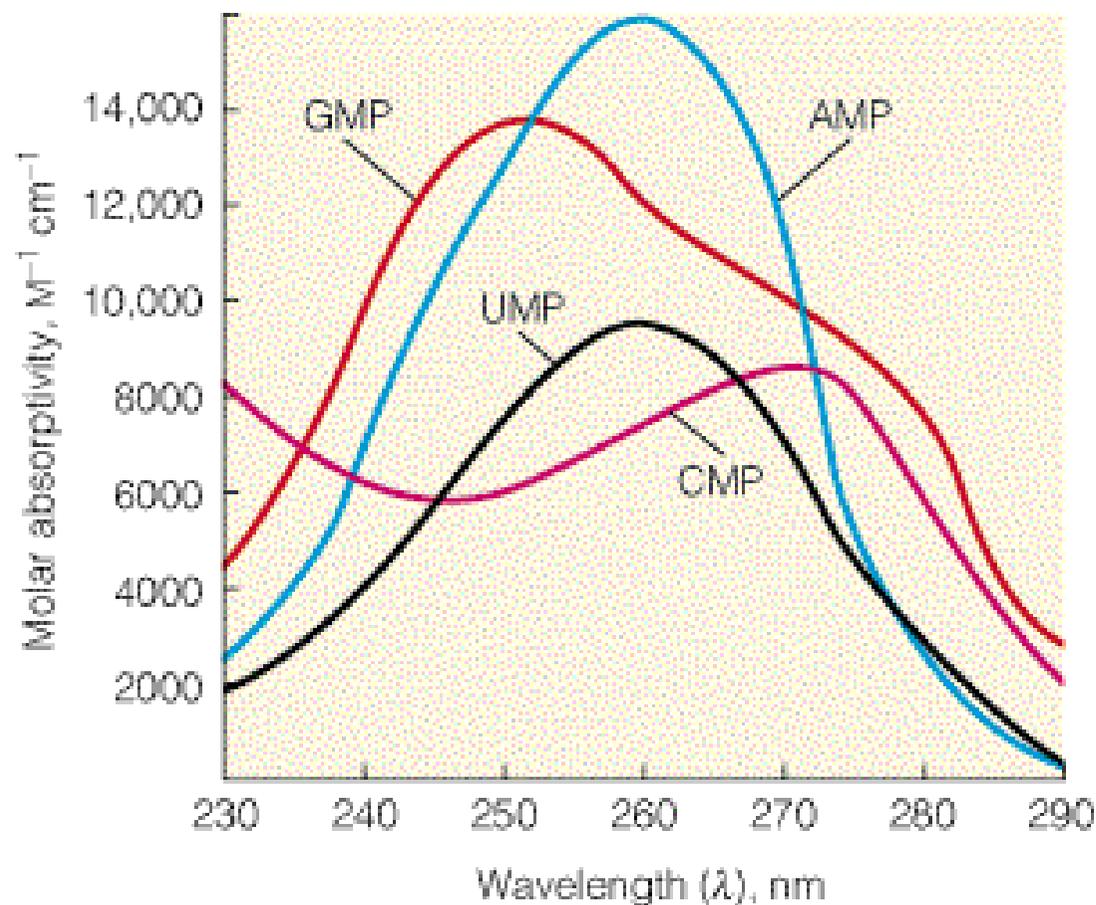
# Metodo di Bradford



*Da: Tietz*

# Assorbimento dei nucleotidi nell'UV

- A causa del loro sistema di doppi legami coniugati, le basi assorbono fortemente nell'UV. Questa proprietà può essere utilizzata per misurare la concentrazione degli acidi nucleici in soluzione mediante spettrofotometria.



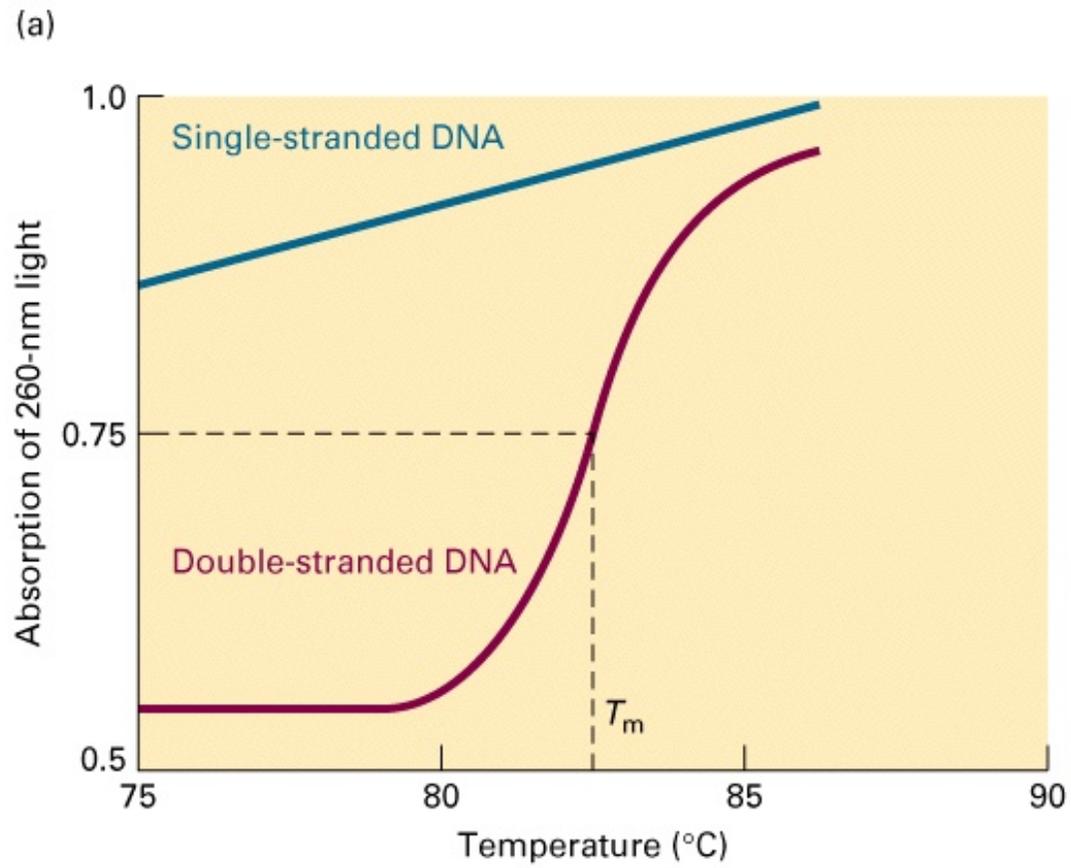
# Denaturazione del DNA

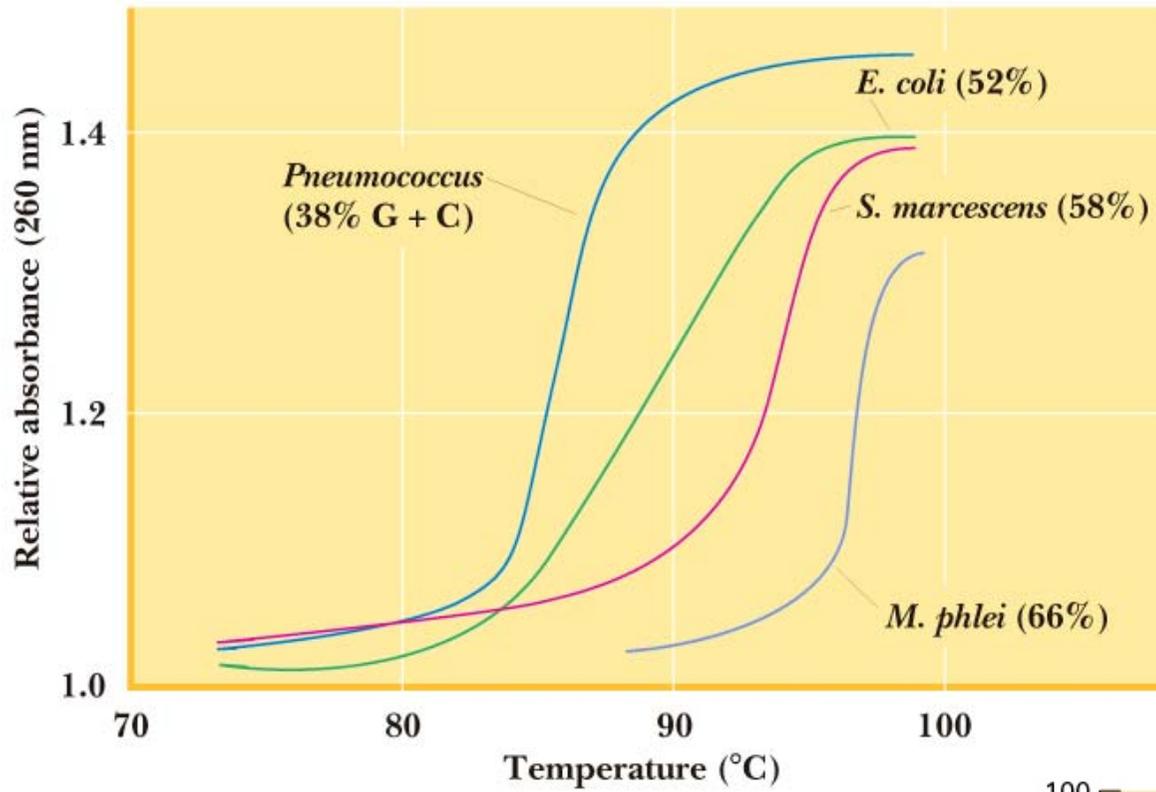
- Si può seguire la denaturazione del DNA a 260 nm
- Basi accoppiate ed impilate assorbono meno nell'UV di quelle "separate" - **effetto ipercromico**
- La temperatura corrispondente a metà dell'aumento osservato nell' $A_{260}$  è definita "**temperatura di *melting***",  $T_m$  o temperatura di fusione del DNA
- **Il valore di  $T_m$  varia con il rapporto GC/AT** - un maggior contenuto di GC conduce ad una  $T_m$  più alta.
- Una maggior forza ionica fa aumentare  $T_m$ , limitando la repulsione elettrostatica tra fosfati

**“Melting” del DNA:  
Assorbanza relativa a 260 nm**

- DNA doppio filamento 1.00
- DNA singolo filamento 1.37
- Basi libere 1.67

# Denaturazione del DNA





Temperatura di  
**“melting”**: dipendenza  
 dalla composizione

