

Spettroscopia di assorbimento

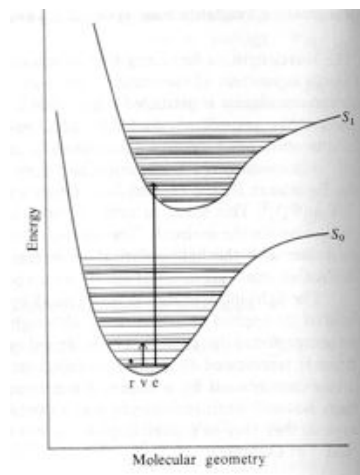
La luce nel visibile e nel vicino ultravioletto eccita **transizioni elettroniche** nelle molecole

Luce visibile: $\lambda = 600 \text{ nm} = 6 \times 10^{-5} \text{ cm} = (E = 16667 \text{ cm}^{-1} (1/\lambda)), E \approx 50 \text{ kcal/mol}$

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

Table 7-1
Biologically useful spectroscopic regions

Typical wavelength (cm)	Approximate energy (kcal mole ⁻¹)	Spectroscopic region	Techniques and applications
10 ⁻¹¹	3 × 10 ⁸	γ-Ray	Mössbauer
10 ⁻⁸	3 × 10 ⁵	X-ray	X-ray diffraction, scattering
10 ⁻⁵	3 × 10 ²	Vacuum UV	Electronic spectra
3 × 10 ⁻⁵	10 ²	Near UV	Electronic spectra
Carbon-carbon bond energy			
6 × 10 ⁻³	5 × 10 ¹	Visible	Electronic spectra
10 ⁻³	3 × 10 ⁰	IR	Vibrational spectra
RT at ambient temperature			
10 ⁻²	3 × 10 ⁻¹	Far IR	Vibrational spectra
10 ⁻¹	3 × 10 ⁻²	Microwave	Rotational spectra
10 ⁰	3 × 10 ⁻³	Microwave	Electron paramagnetic resonance
10	3 × 10 ⁻⁴	Radio frequency	Nuclear magnetic resonance



1

Unità di misura

$$E \times N = 195 \text{ kJ} \times \text{mol}^{-1} \approx 47 \text{ kcal} \times \text{mol}^{-1}$$

$$\lambda = 600 \text{ nm} \Rightarrow \lambda^{-1} = 16667 \text{ cm}^{-1} \Rightarrow (hc/\lambda) \sim 3.3 \times 10^{-19} \text{ J} \sim 2 \text{ eV} \sim 47 \text{ kcal} \times \text{mol}^{-1}$$

$$E = h\nu = \frac{hc}{\lambda} \quad hc = 1.99 \times 10^{-23} \text{ J} \times \text{cm}$$

$$1 \text{ eV} = 1.6 \times 10^{-19} \text{ J}$$

$$h = 6.63 \times 10^{-34} \text{ J} \times \text{sec}$$

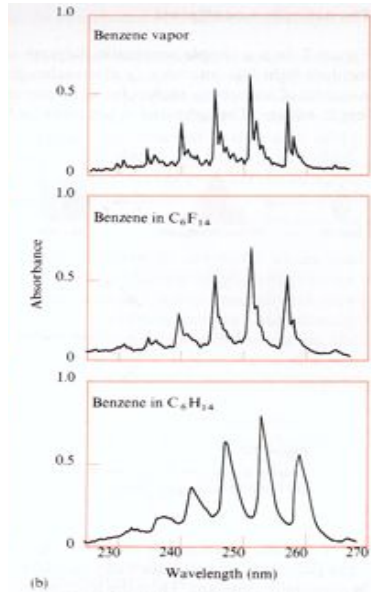
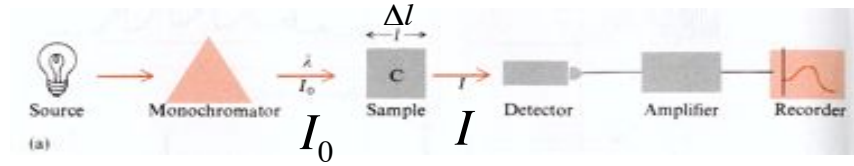
$$c = 3 \times 10^{10} \text{ cm} \times \text{sec}^{-1}$$

$$N = 6 \times 10^{23}$$

$$1 \text{ cal} = 4.186 \text{ J}$$

2

Apparato sperimentale



Risultato di un tipico esperimento

Problema dell'allargamento delle righe spettrali dovuto alle interazioni intermolecolari anche con il solvente

3

Studiando molecole di interesse biologico come proteine o DNA, [si lavora in soluzione](#):

$$A_{TOT} = A_{solvente} + A_{soluto} \Rightarrow A_{soluto} = A_{TOT} - A_{solvente}$$

e dunque occorre fare **due misure** per ricavare il dato di **assorbimento** che ci interessa.

Teoria microscopica fenomenologica

$\frac{N_A c}{10^3}$ = numero di molecole per cm^3 ; c = concentrazione = moli/ lit (molarità).



$\frac{N_A c}{10^3} \pi r^2$ = ostacolo totale "visto" da un raggio incidente in 1 cm^3 di soluzione, (r = raggio della singola molecola)

P = **probabilità** che una molecola assorba la radiazione incidente = $P(\lambda)$

$$-\frac{I - I_0}{I_0} = -\frac{\Delta I}{I_0} = \frac{N_A c}{10^3} (\pi r^2 P) \Delta l = \frac{N_A c}{10^3} \sigma \Delta l = c \varepsilon' \Delta l \quad \varepsilon' = \frac{N_A}{10^3} \sigma$$

σ = sezione d'urto [ha le dimensioni di una superficie] legata al tipo di molecole

4

Teoria dell'assorbimento

$$-\Delta I = c\varepsilon'(\lambda)I\Delta l \Rightarrow \frac{dI}{I} = -c\varepsilon' dl$$

ε' è il **coefficiente di estinzione molare** e dipende dall'assorbimento (transizioni elettroniche) delle molecole in esame

c è la **concentrazione** delle molecole espressa in moli/litro (1 mol=quantità in grammi pari al peso molecolare della sostanza corrisponde ad un numero di Avogadro di molecole)

$$\frac{dI}{I} = -c\varepsilon' dl$$

↓ integro

$$\ln\left(\frac{I_0}{I}\right) = c\varepsilon'(\lambda)L$$

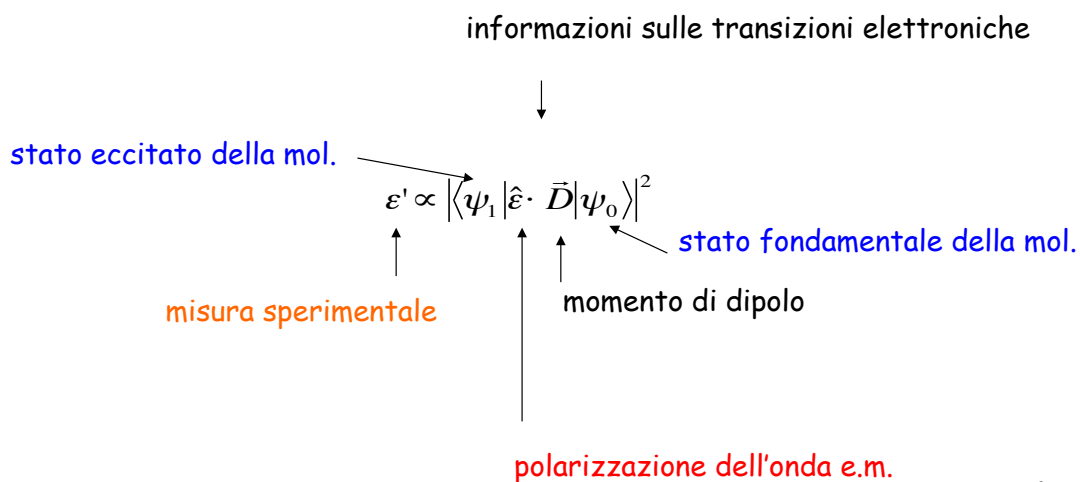
L'**assorbanza** si ha passando dal \ln al \log : $\ln a = \ln 10 \log a \approx 2.3 \log a$

$$A(\lambda) \equiv \log\left(\frac{I_0}{I}\right) = c\varepsilon(\lambda)L \in [0, \infty] \qquad \varepsilon = \frac{\varepsilon'}{2.3}$$

5

La sezione d'urto σ è legata al **coefficiente di estinzione molare** ε' :

$$\frac{N_A}{10^3} \sigma = \varepsilon'$$



6

Simmetria e orbitali molecolari

Per **molecole biatomiche** definiamo come λ il **numero quantico** che definisce la proiezione del momento angolare totale lungo l'asse della molecola

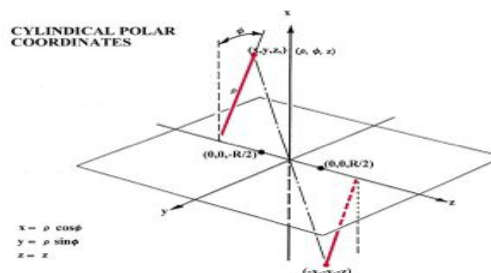
simmetria dell'orbitale

$\lambda = 0$, orbitali σ , rotazioni qualsiasi

$\lambda = 1$, orbitali π , rotazioni 180°

$\lambda = 2$, orbitali δ , rotazioni 90°

...



Per **molecole biatomiche omonucleari** si può considerare inoltre l'operatore di simmetria per riflessione rispetto all'origine:

$$R\psi(\vec{r}) = \psi(-\vec{r}) \Rightarrow \begin{cases} = \psi(\vec{r}) \equiv \psi_g(\vec{r}) \\ = -\psi(\vec{r}) \equiv \psi_u(\vec{r}) \end{cases}$$

g = gerade (pari); u = ungerade (dispari)

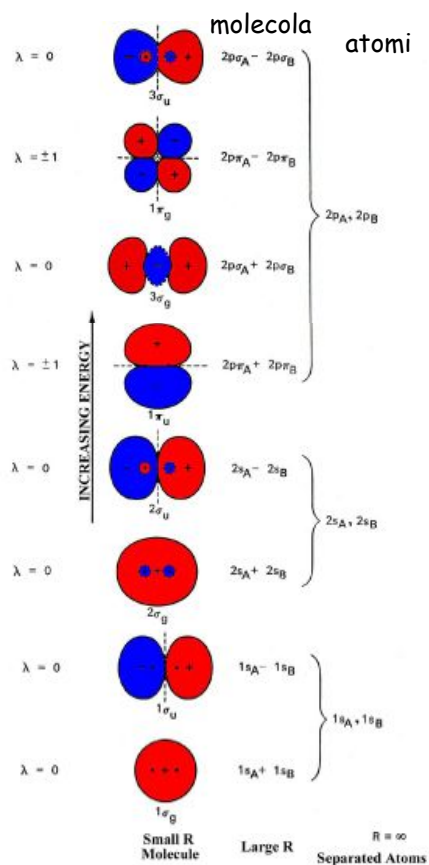
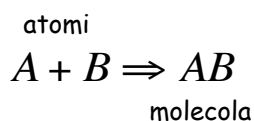
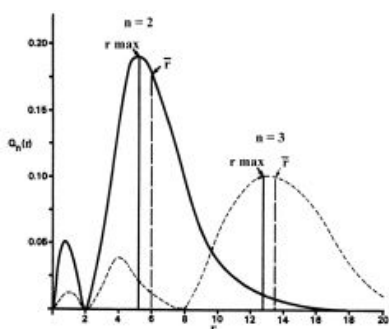
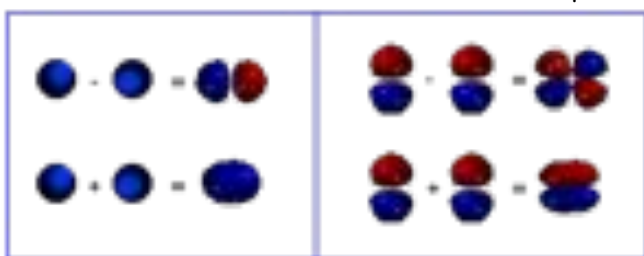
7

L.C.A.O.

linear combination of atomic orbitals

orbitali atomici s

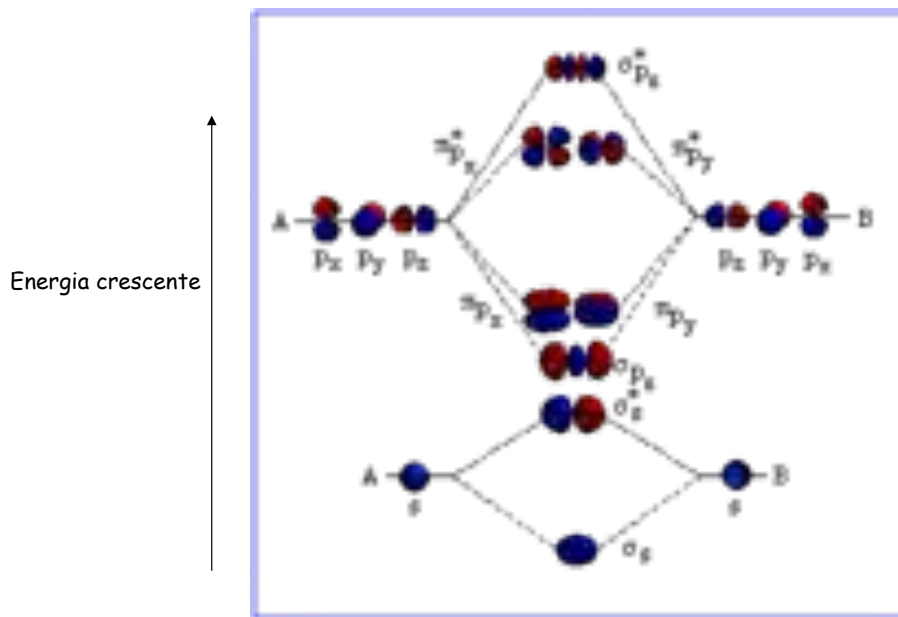
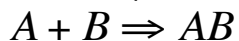
orbitali atomici p



Molecole biatomiche eteronucleari

Non possiedono le proprietà di simmetria *g* e *u*

Metodo di approssimazione LCAO-MO (linear combination of atomic orbitals)

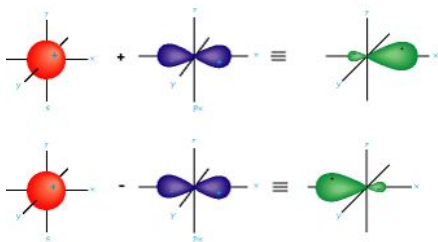


9

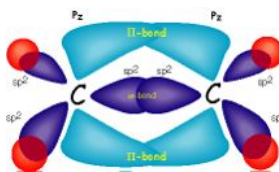
Ibridizzazione

Ibridizzazione = **combinazione lineare di orbitali atomici**

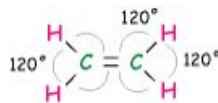
$s+p =$ orbitale sp
2 orb. molecolari



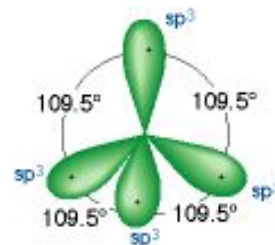
$s+2$ orbitali $p = sp^2$
3 orb. molecolari



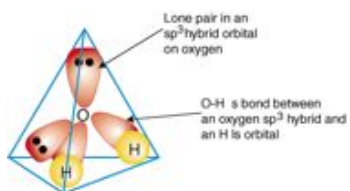
planare



$s+3$ orbitali $p = sp^3$
4 orb. molecolari



Tetrahedral



10

Analisi spettrale della formaldeide



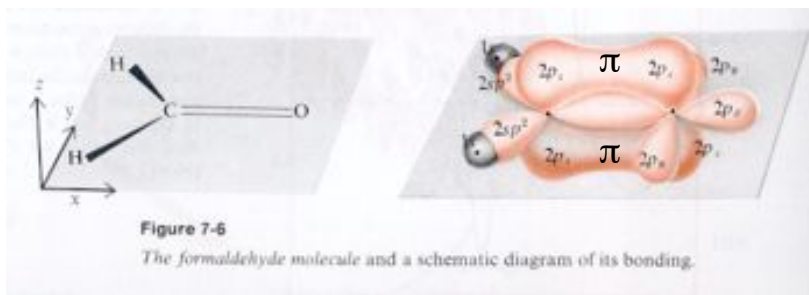
Angolo di legame di 120° → ibridizzazione sp² per gli orbitali atomici del carbonio ovvero si hanno **3 orbitali sp² = (sp²)³**

H, 1 el., (1s)¹

C, 6 el., (1s)²(2s)²(2p)² → (1s)²(2s)(2p_x)(2p_y)(2p_z) → (1s)²(2sp²)³(2p_z) **ibridizzazione**

O, 8 el., (1s)²(2s)²(2p)⁴

Livello fondamentale:
 legami C – H: 2sp²+1s **2 orbitali sp²**
 I legame C – O: 2sp²+2p_x, II legame C – O: 2p_z+2p_z

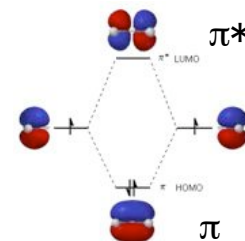
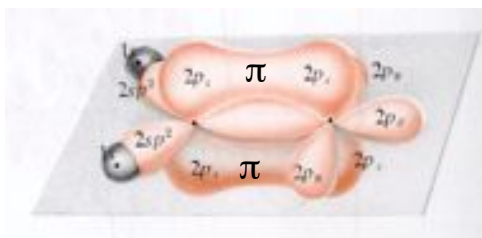


L'orbitale 2p_y nell'ossigeno non fa legami molecolari

11

2 stati eccitati: π*, n

LCAO



$\pi = 2p_z(\text{carbonio}) + 2p_z(\text{ossigeno})$

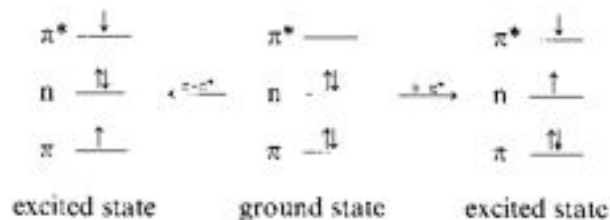
$\pi^* = 2p_z(\text{carbonio}) - 2p_z(\text{ossigeno})$

$n =$ orbitale non legante = 2 el.

nell'orbitale 2p_y dell'ossigeno

(σ = simmetria di ordine ∞ rispetto a rotazioni attorno all'asse C-O nella molecola)

π = simmetria di ordine 2 rispetto a rotazioni attorno all'asse C-O nella molecola)



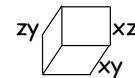
transizione

$$\frac{4\pi^2}{c\hbar^2} \frac{1}{4\pi\epsilon_0} I(\omega_{10}) |\hat{\epsilon}(\omega_{10}) \cdot \bar{D}_{10}|^2$$

momento di dipolo

12

Analisi delle simmetrie



Transizione permessa:

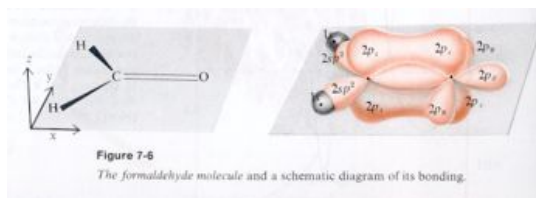
$$\begin{aligned} \langle \pi | \vec{\mu} | \pi^* \rangle &= \\ &= \langle \pi | \mu_x | \pi^* \rangle + \langle \pi | \mu_y | \pi^* \rangle \\ &+ \langle \pi | \mu_z | \pi^* \rangle = \\ &= \langle \pi | \mu_x | \pi^* \rangle \end{aligned}$$

Transizione proibita:

$$\begin{aligned} \langle n | \vec{\mu} | \pi^* \rangle &= \\ &= \langle n | \mu_x | \pi^* \rangle + \langle n | \mu_y | \pi^* \rangle \\ &+ \langle n | \mu_z | \pi^* \rangle = \\ &= 0 \end{aligned}$$

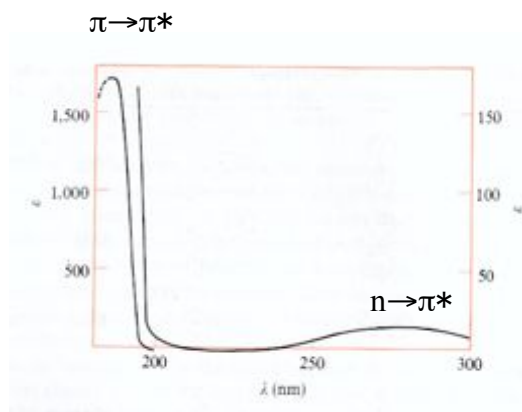
Function:	Viewed along:		Symmetry reflected through:		
	x axis	y axis	xy	xz	yz
Molecular orbitals					
π			Odd	Even	Even
π^*			Odd	Even	Odd
n			Even	Odd	None
Dipole operators					
μ_x			Even	Even	Odd
μ_y			Even	Odd	Even
μ_z			Odd	Even	Even

Figure 7-7
The symmetry of molecular orbitals and dipole operators of formaldehyde.



13

In realtà è possibile osservare anche le transizioni simmetricamente proibite (infatti nella trattazione abbiamo ignorato i **modi vibrazionali**). Tali transizioni però hanno un'intensità pari **solo a circa l'1%** di quella delle transizioni permesse



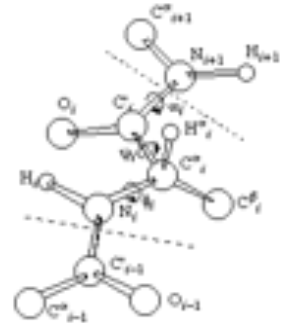
Spettro di assorbimento dell'acetone ($\text{CH}_3\text{—CO—CH}_3$) in n-esano

14

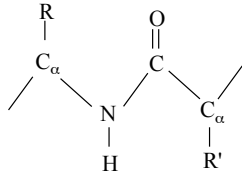
Proteine

I **cromofori** contenuti nelle proteine possono essere divisi in 3 classi:

1. i legami peptidici
2. le catene laterali degli amminoacidi
3. i gruppi prostetici

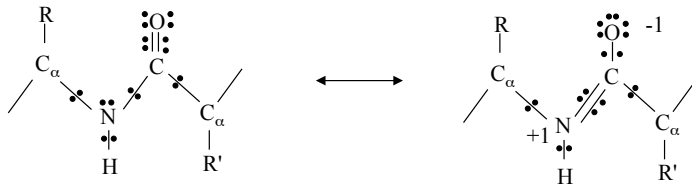
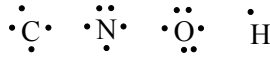


Legami peptidici:



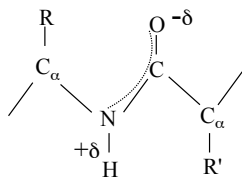
H, 1el., (1s)¹
 C, 6el., (1s)²(2s)²(2p)²
 N, 7el., (1s)²(2s)²(2p)³
 O, 8el., (1s)²(2s)²(2p)⁴

Rappresentazioni di Lewis:



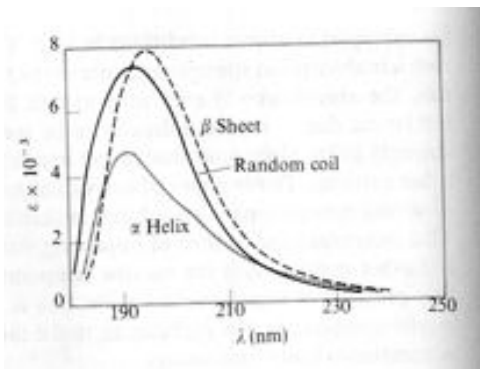
15

Legami peptidici

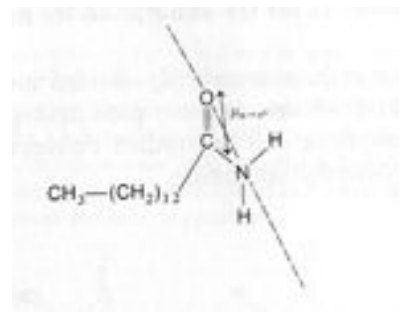


210-220 nm: transizione $n \rightarrow \pi^*$ simmetricamente proibita
 $\epsilon \approx 100$ (el. n localizzato sull'atomo di ossigeno)

190 nm: transizione $\pi \rightarrow \pi^*$ simmetricamente permessa
 $\epsilon \approx 7000$



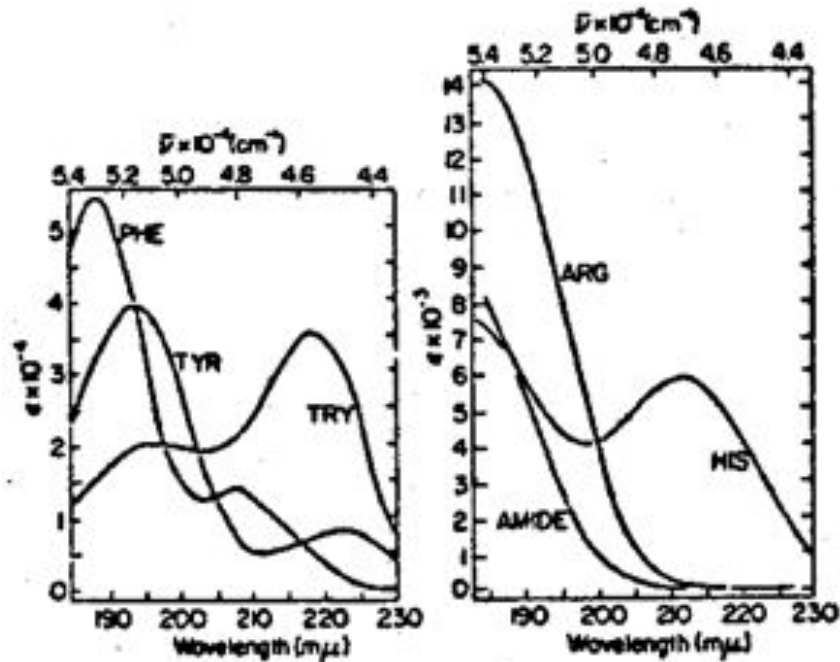
Polilisina in soluzione acquosa a differenti pH



Momento di dipolo del legame peptidico

16

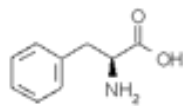
Le catene laterali di: aspartico, glutammico, asparagina, glutamina, lisina, cisteina e istidina assorbono nella medesima regione in cui si trova la banda di assorbimento peptidico "forte" (190 nm).



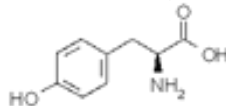
17

Amminoacidi aromatici

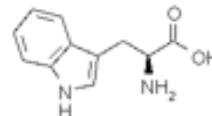
Fenilalanina (Phe, F); Tirosina (Tyr, Y); Triptofano (Trp, W)



phe f Phenylalanin

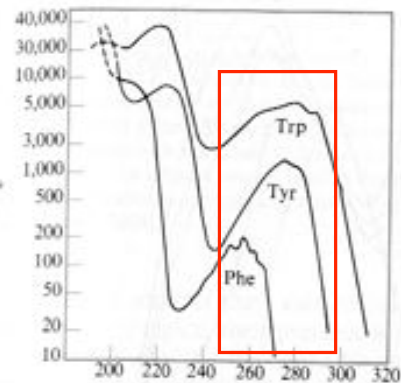


tyr y Tyrosin



trp w Tryptophan

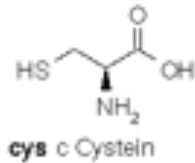
Gli amminoacidi aromatici
assorbono tra 250 e 280 nm



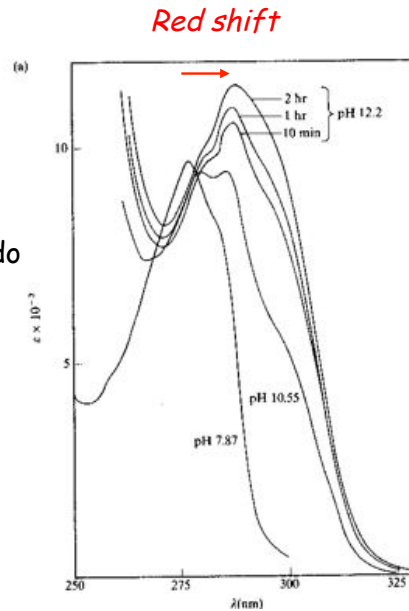
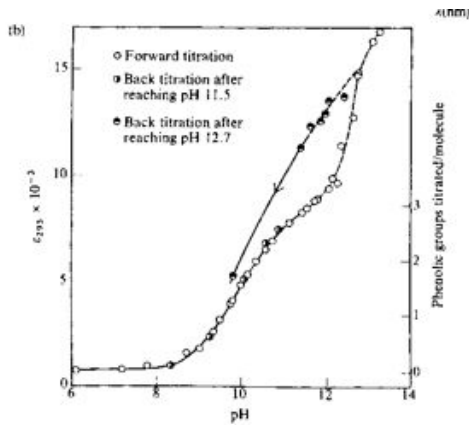
Phe (anello benzenico), 250 nm, $\pi \rightarrow \pi^*$ simmetricamente proibita, $\epsilon \approx 200 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$
 Tyr (anello fenolico), 274 nm, $\pi \rightarrow \pi^*$ simmetricamente permessa, $\epsilon \approx 1400 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$
 Trp (anello indolico), tra 240 e 290 nm, piú transizioni

18

Cistina = ponte disolfuro Cys-Cys, si situa tra 250 e 270 nm, $\epsilon \approx 300 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$



Variazione del coefficiente di estinzione con il pH per una RNasi (denaturazione vista seguendo L'assorbimento di 6 Tyr)



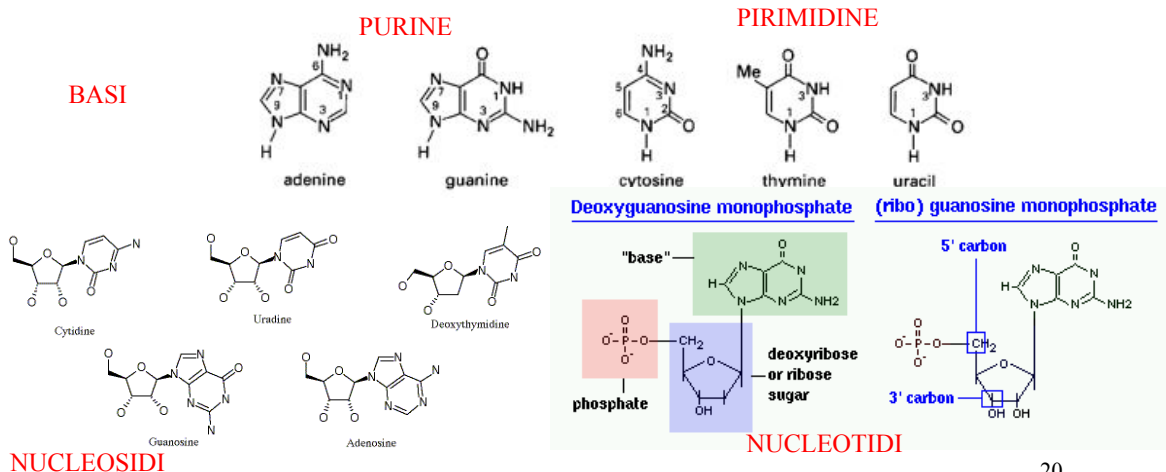
19

Acidi nucleici

L'assorbimento dipende da transizioni che coinvolgono le basi: **purine** e **pirimidine**

Le *basi* da sole non forniscono un modello sufficiente a descrivere l'assorbimento degli acidi nucleici: il **legame glicosidico C-N** è fondamentale per stabilire la "corretta" energia dei livelli elettronici

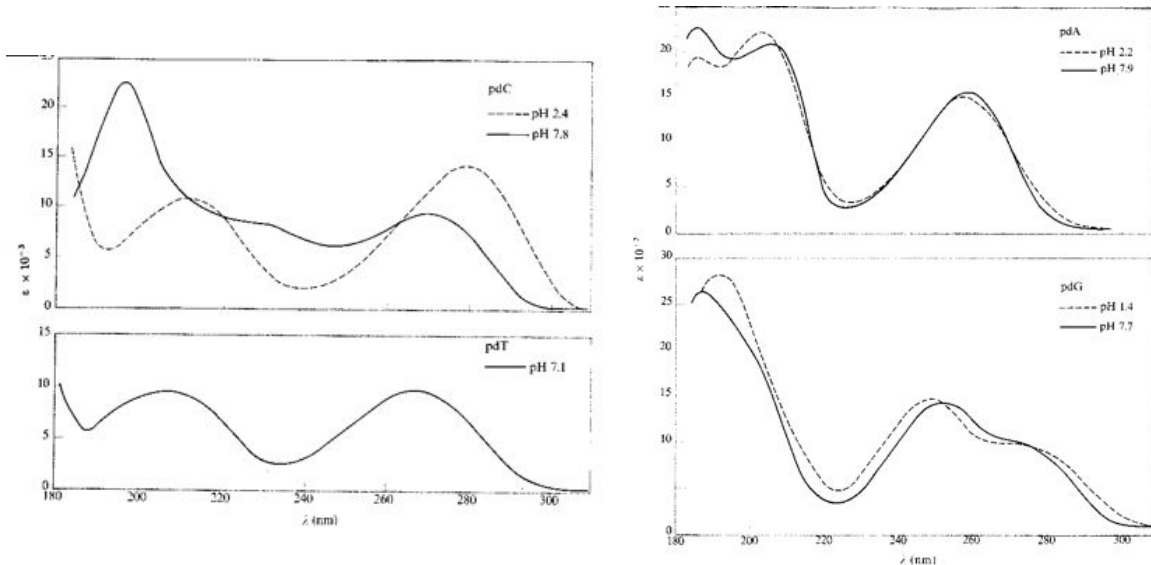
Le N⁹-metil purine e le N¹-metil piramide rappresentano un modello molto migliore



20

Acidi nucleici

assorbono a ~ 260 nm



21

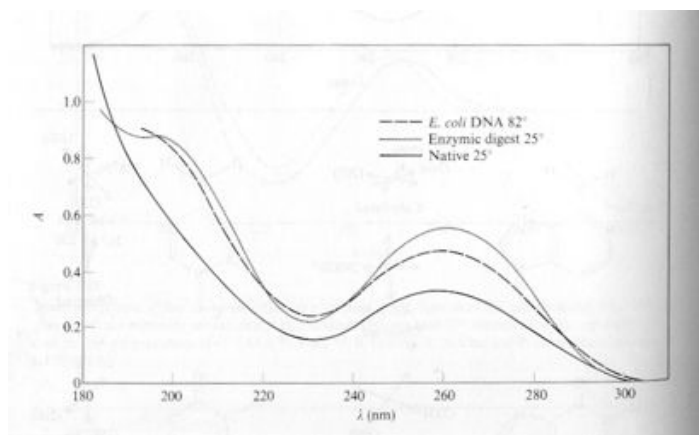
Influenza dell'ambiente in cui si situa il cromoforo

Si possono avere influenze differenti che portano a variazioni di

- intensità (altezza dei picchi)
- energia (posizione dei picchi)
- tempi di eccitazione (larghezza dei picchi)

Tali influenze dipendono da:

- pH locale
- costante dielettrica
- rigidità del mezzo
- presenza di gruppi vicini capaci di particolari interazioni chimiche (trasferimento di carica o legame metallico ...)

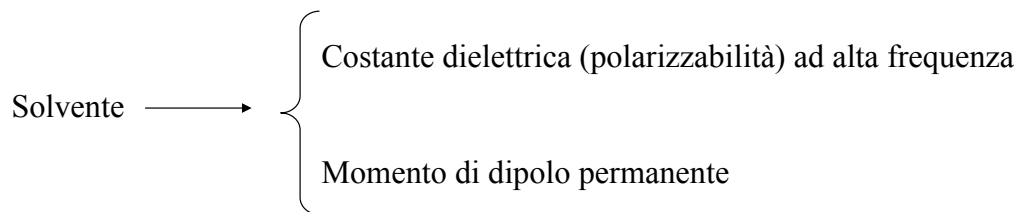


Triptofano all'interno di una proteina o esposto in acqua

ambiente non polare

ambiente polare

L'interazione con un solvente polare tende ad abbassare l'energia dei vari livelli elettronici **in proporzione al loro momento di dipolo elettrico** in modo che livelli con un momento di dipolo più grande hanno un'energia maggiormente abbassata.



23

La polarizzabilità ad alta frequenza risponde alle variazioni indotte da una transizione elettronica ($t = 10^{-15}$ sec)

Lo stato eccitato di solito possiede un momento di dipolo più alto



e dunque viene depresso maggiormente rispetto allo stato fondamentale dalla presenza del solvente polare: $\pi \rightarrow \pi^*$ picco traslato ad energia più bassa in presenza del solvente polare: **Red shift**

$\pi \rightarrow \pi^*$ red shift

$n \rightarrow \pi^*$ blue shift

n è localizzato sul singolo atomo (orbitale atomico) e interagisce ancor più fortemente con il solvente (legami idrogeno): **blue shift**

24

Proteine

210-220 nm: transizione $n \rightarrow \pi^*$ simmetricamente proibita
 $\epsilon \approx 100$ (el. n localizzato sull'atomo di ossigeno del legame pept.)



Energia maggiore (blue shift) in un ambiente acquoso (polare)

250-300 nm: transizione dei residui aromatici $\pi \rightarrow \pi^*$



Energia minore (red shift) in un ambiente acquoso (polare)