

Analisi spettroscopica di biomolecole

Metodi spettroscopici: generalità.

Spettroscopia ultravioletta. Transizioni elettroniche. Cromofori.

Dicroismo circolare: principi, effetto Cotton e exciton coupling.

Spettri CD di proteine e informazioni sulla loro conformazione.

Spettrometria di massa: determinazione del peso molecolare.

Principali tecniche di ionizzazione: EI, ionizzazione chimica, FAB, electrospray.

Spettrometria di massa MALDI-TOF. Trappola ionica.

Principali frammentazioni di catene polipeptidiche e informazioni di sequenza.

Spettroscopia di risonanza magnetica nucleare. Spin nucleare. Transizioni tra stati di spin.

Risonanza del protone, spostamenti chimici ed accoppiamenti spin-spin.

Magnetizzazione microscopica e macroscopica. Modello vettoriale. Rilassamento.

Sensibilità dell'esperimento NMR. Spettroscopia NMR in trasformata di Fourier.

Risonanza del ^{13}C e spostamenti chimici.

Spettroscopia NMR bidimensionale. Principali esperimenti bidimensionali: COSY, NOESY, HMQC, HMBC.

Effetto nucleare Overhauser. Dipendenza dell'effetto Noe dalla distanza internucleare.

L'uso del NOESY per la determinazione delle distanze interprotoniche e per analisi conformazionali di proteine.

Determinazione della sequenza di una catena polipeptidica attraverso tecniche 2D.

Due programmi a confronto

Metodi spettroscopici

Generalità.

UV

Individuazione gruppi funzionali

CD

Analisi conformazionale

Spettrometria di massa

Tecniche

Sequenza e conformazione di un polipeptide

Spettroscopia di risonanza magnetica nucleare.

Generalità

^1H NMR

^{13}C NMR

Tecniche bidimensionali

Effetto Noe

Sequenza e conformazione di un polipeptide

Metodi spettroscopici

Generalità.

UV

Individuazione gruppi funzionali

IR

Individuazione di gruppi funzionali

Spettrometria di massa

Tecniche

Struttura delle molecole organiche

Spettroscopia di risonanza magnetica nucleare.

Generalità

^1H NMR

^{13}C NMR

Tecniche bidimensionali

Effetto Noe

Struttura delle molecole organiche

Dal composto organico alla sua formula molecolare

➤ Individuazione dei gruppi funzionali

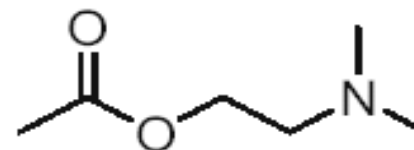
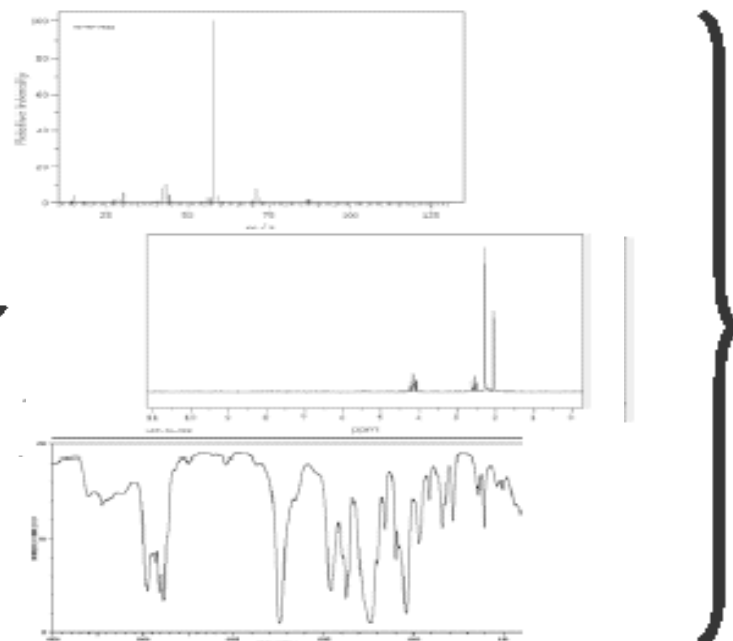
Spettroscopia UV e IR

➤ Determinazione della formula bruta e preliminari informazioni sulla struttura molecolare

Spettrometria di massa

➤ Relazioni tra gli atomi nelle molecole: struttura molecolare

Spettroscopia NMR



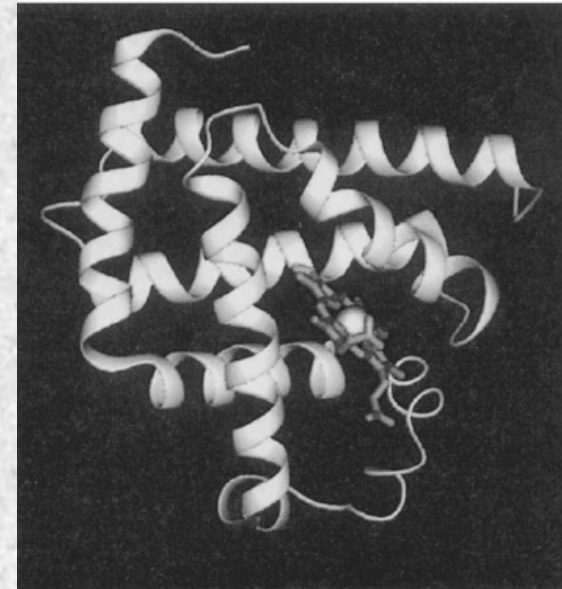
Dalla formula molecolare alla conformazione

Le proteine



Struttura primaria:
Spettrometria di massa e
spettroscopia NMR

Struttura secondaria:
Spettroscopia NMR
bidimensionale e Dicroismo
circolare



? Cosa si intende per spettroscopia

Spettroscopia

- Il nome spettroscopia deriva dal latino *spectrum* che vuol dire immagine...
- Questa disciplina racchiude in sé l'insieme delle tecniche, dette appunto spettroscopiche attraverso le quali è possibile risalire ad alcune proprietà dei corpi o delle molecole.
- La spettroscopia ci dà informazioni sulle proprietà strutturali dei corpi, studiando l'interazione della materia con l'energia elettromagnetica.

Le tecniche spettroscopiche riguardano le interazioni tra radiazione elettromagnetica e materia

Cos'è la radiazione elettromagnetica?

Come interagisce con un composto organico?

Che informazioni possiamo ricavare?

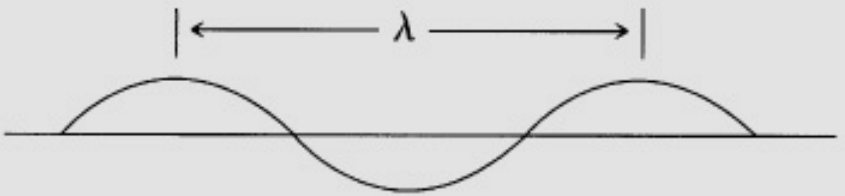
LA RADIAZIONE ELETTROMAGNETICA

- **Dalla fisica sappiamo che una carica elettrica in movimento produce una radiazione elettromagnetica.**
- **Dalla meccanica quantistica essa ha una doppia e contraddittoria natura: corpuscolo e onda.**
- **La luce, le microonde, i raggi X, etc...sono diversi tipi di radiazioni elettromagnetiche.**

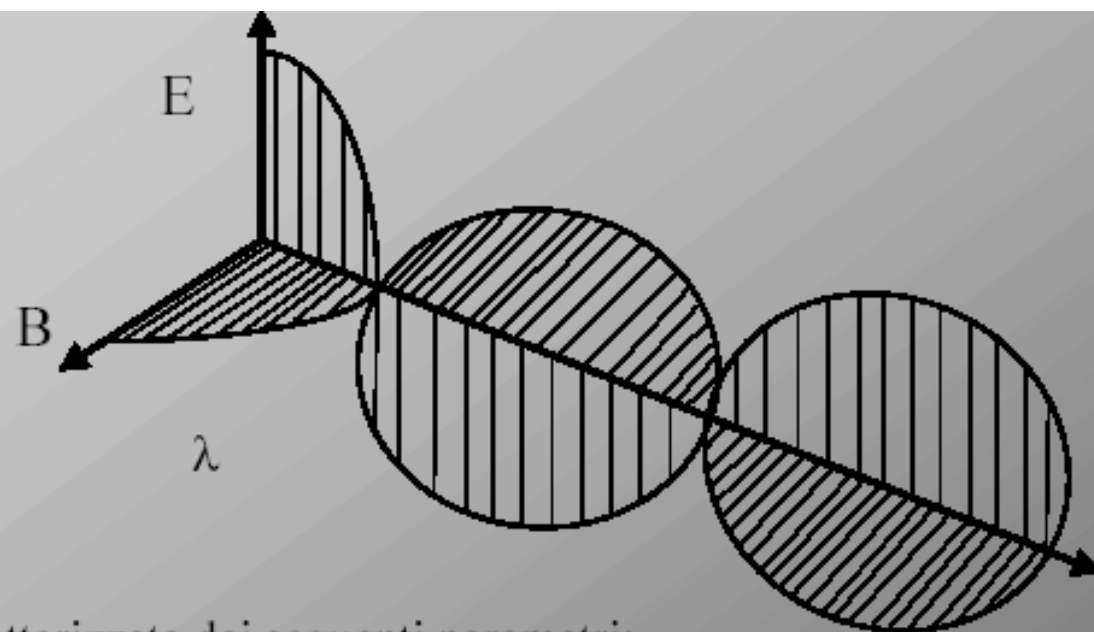
LA RADIAZIONE ELETTROMAGNETICA

La radiazione elettromagnetica è una variazione periodica del campo elettrico e magnetico che si propaga nello spazio alla velocità della luce c (dato che la luce è una radiazione elettromagnetica!), cioè circa $3 \cdot 10^8 \text{ m s}^{-1}$ nel vuoto. Anche se per la fisica classica la radiazione elettromagnetica è un'onda, la fisica quantistica ha dimostrato che essa ha anche caratteristiche corpuscolari. In particolare, la radiazione elettromagnetica è composta da unità elementari di radiazione, dette *fotoni*, ad ognuna delle quali è associata una certa quantità di energia

TABELLA 21.2 Unità di misura comunemente utilizzate per esprimere la lunghezza d'onda (λ)

| Unità | Relazione col metro | Diagramma della lunghezza d'onda |
|------------------------------|-------------------------------------|---|
| Metro (m) | — |  |
| Millimetro (mm) | $1 \text{ mm} = 10^{-3} \text{ m}$ | |
| Micrometro (μm) | $1 \mu\text{m} = 10^{-6} \text{ m}$ | |
| Nanometro (nm) | $1 \text{ nm} = 10^{-9} \text{ m}$ | |
| Angstrom (\AA) | $1 \text{\AA} = 10^{-10} \text{ m}$ | |

Parametri della radiazione



Un'onda è caratterizzata dai seguenti parametri:

frequenza ν

rappresenta il numero di oscillazioni descritte nell'unità di tempo, si misura in herz;

lunghezza d'onda λ

che è data dalla distanza tra due successivi massimi o minimi e si misura in genere in m, mm, micron, nanometri.

i vettori \vec{E} e \vec{B}

che rappresentano rispettivamente il campo elettrico e il campo magnetico associati all'onda.

Parametri della radiazione

L'energia di un quanto è data dalla relazione:

$$E = h\nu$$

da cui si evince che l'energia è direttamente proporzionale alla sua frequenza;

h è la costante di Planck, 6.625×10^{-27} erg sec

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

c è la velocità della luce

Quanto è maggiore la lunghezza d'onda di una radiazione, tanto minore è l'energia ad essa associata.

Lo spettro elettromagnetico

Lo spettro elettromagnetico di una radiazione è la distribuzione in energia (o in lunghezza d'onda o in frequenza) dell'intensità di quella radiazione elettromagnetica.

Le regioni dello spettro elettromagnetico

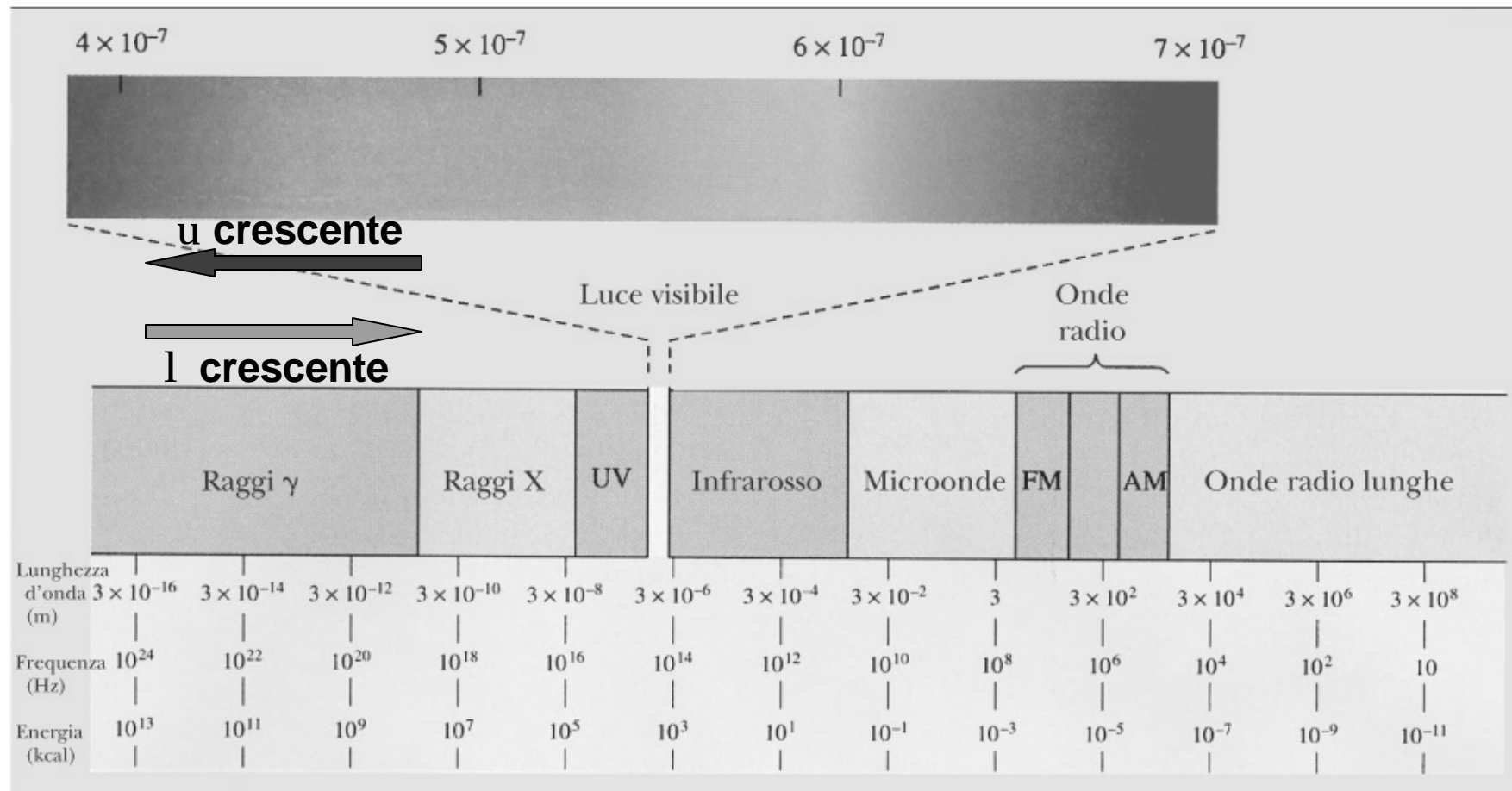
| Regione dello spettro | Lunghezza d'onda (Å) | Lunghezza d'onda (cm) | Frequenza (Hz) | Energia (eV) |
|-----------------------|----------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|------------------|
| Radio | $>10^9$ | >10 | $<3 \times 10^9$ | $<10^{-5}$ |
| Microonde | 10^9-10^6 | $10-0.01$ | $3 \times 10^9 - 3 \times 10^{12}$ | $10^{-5} - 0.01$ |
| Infrarosso | 10^6-7000 | $0.01-7 \times 10^{-5}$ | $3 \times 10^{12}- 4 \times 10^{14}$ | $0.01 - 2$ |
| Visibile | $7000-4000$ | $7 \times 10^{-5} - 4 \times 10^{-5}$ | $4 \times 10^{14}-7.5 \times 10^{14}$ | $2 - 3$ |
| Ultravioletto | $4000-10$ | $4 \times 10^{-5} - 10^{-7}$ | $7.5 \times 10^{14}-3 \times 10^{17}$ | $3- 10^3$ |
| Raggi X | $10-0.1$ | $10^{-7} - 10^{-9}$ | $3 \times 10^{17} - 3 \times 10^{19}$ | $10^3 - 10^5$ |
| Raggi gamma | <0.1 | $<10^{-9}$ | $> 3 \times 10^{19}$ | $> 10^5$ |

L'unità di misura "eV" si legge elettron-volt ed è tipicamente usata per misurare le energie implicate nella fisica atomica. La definizione di eV è la seguente:

1 eV è l'energia acquistata da un elettrone che percorre una distanza di 1 metro in un campo elettrico generato da una differenza di potenziale di 1 volt.

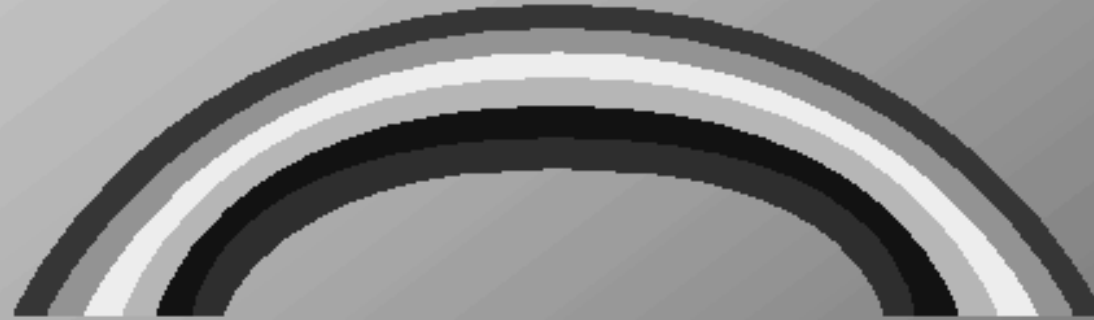
Lo SPETTRO elettromagnetico

TABELLA 21.1 Lunghezza d'onda, frequenza e relazioni energetiche di alcune regioni dello spettro elettromagnetico



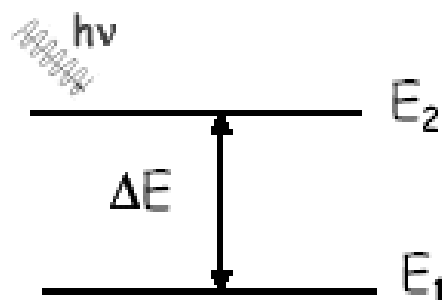
La luce

La luce è quella parte dello spettro elettromagnetico a cui è sensibile l'occhio umano, caratterizzato da lunghezze d'onda che vanno da 400 nm a 700 nm.



Le lunghezze d'onda della luce visibile sono in relazione con i colori che noi percepiamo.

Grandezze e unità di misura in uso nelle spettroscopie



ΔE in Joules

$$\nu = \frac{\Delta E}{h}$$

ν frequenza in Hz (kHz MHz GHz)

$$\omega = 2\pi\nu = \frac{\Delta E}{\hbar}$$

ω frequenza angolare in s^{-1}

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

λ lunghezza d'onda in m (nm)

$$\bar{\nu} = \frac{1}{\lambda} = \frac{\Delta E}{hc}$$

$\bar{\nu}$ numero d'onda in cm^{-1}

$$\bar{\nu}(cm^{-1}) = \frac{10^7}{\lambda(nm)}$$

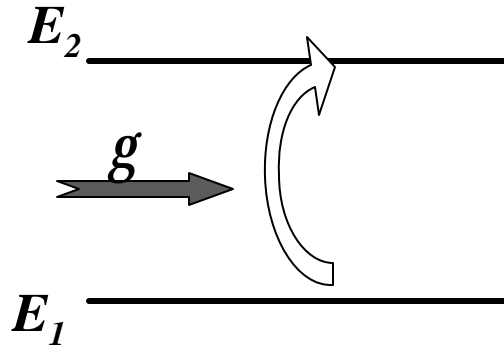
Spettroscopia

12

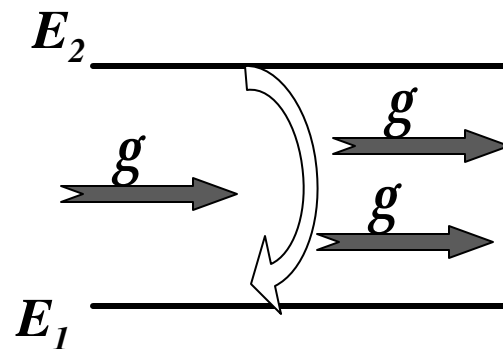
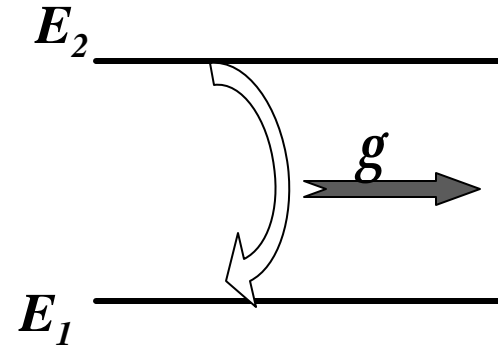
Interazione tra luce e materia

l'interazione radiazione-materia: i tre meccanismi

assorbimento

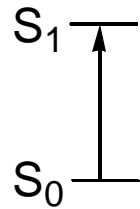


emissione

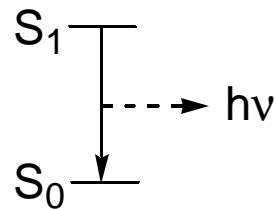


emissione stimolata

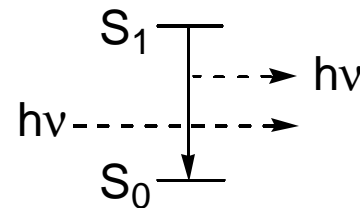
ASSORBIMENTO ed EMISSIONE



(a)



(b)



(c)

Nell'interazione con la radiazione elettromagnetica

Si può avere:

- a) Assorbimento
- b) Emissione spontanea
- c) Emissione stimolata

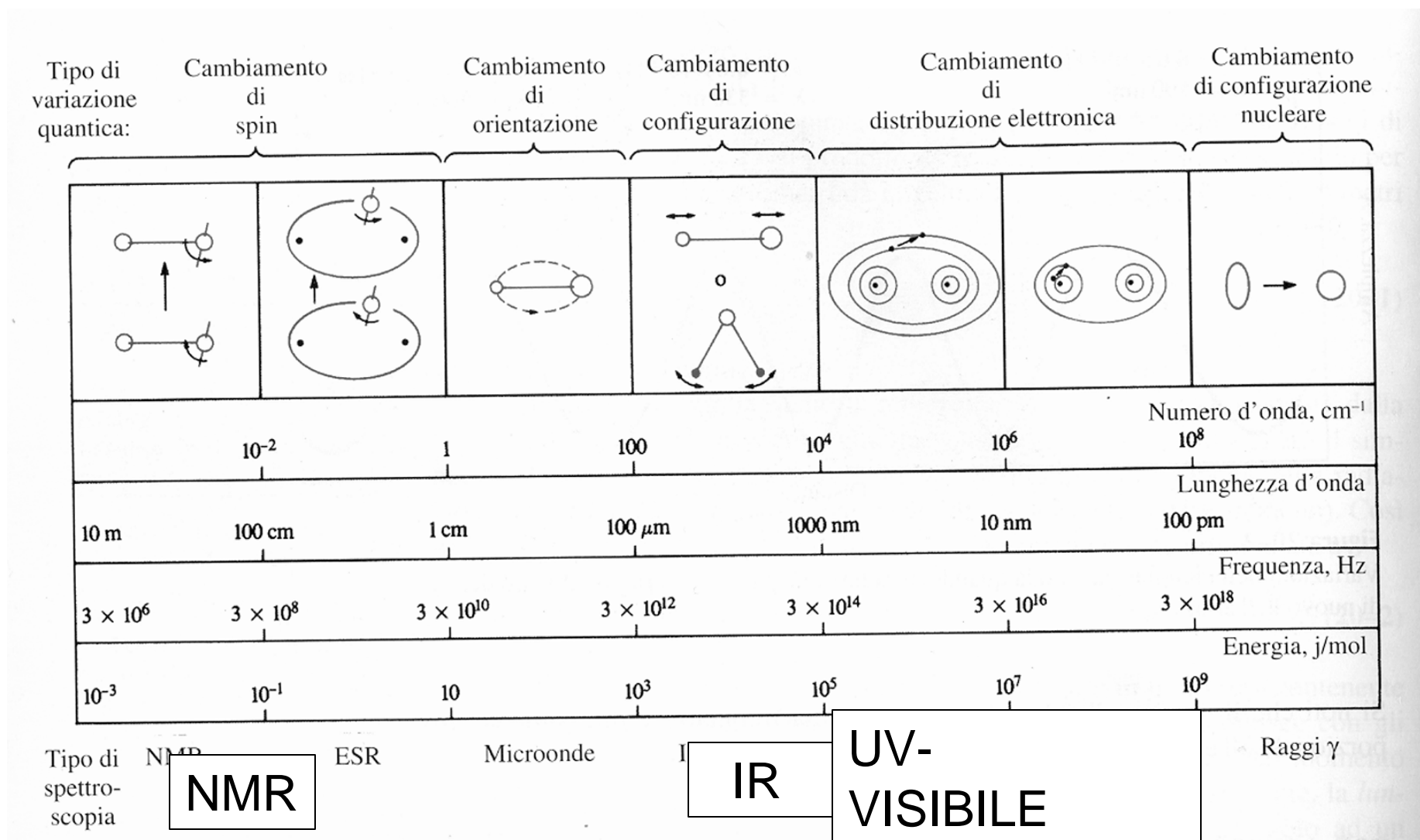
In ogni caso la ΔE fra S_1 e S_0 deve essere *esattamente*:

$$\Delta E = h\nu$$

SPETTROSCOPIA DI ASSORBIMENTO

Se un sistema viene eccitato con energia elettromagnetica di una certa frequenza ν e viene poi ceduta sottoforma di energia termica si ha la **SPETTROSCOPIA DI ASSORBIMENTO**

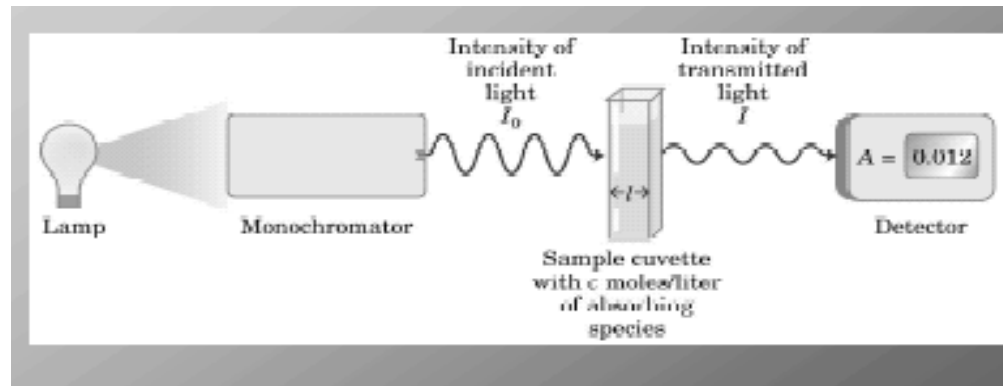
TIPI di SPETTROSCOPIA di ASSORBIMENTO



SPETTROSCOPIA UV-VISIBILE

- Quando un composto contenente un gruppo insaturo è attraversato da una radiazione elettromagnetica della regione del visibile o UV, esso assorbe una certa quantità di energia.
- L'energia assorbita è impegnata dalle molecole per promuovere gli elettroni da orbitali ad energie più basse su orbitali a più alta energia.
- Per misurare la quantità di luce assorbita a ciascuna lunghezza d'onda si usano gli SPETTROFOTOMETRI nel visibile e nell'ultravioletto.

Componenti dello SPETTROMETRO



SORGENTE: serve ad assicurare un flusso costante di radiazione elettromagnetica alla ν desiderata. Le lampade alogene di quarzo possono arrivare all'UV, ma negli spettrometri UV è di solito usata una lampada a deuterio, in cui una scarica di corrente elettrica è fatta passare in una bassa pressione di deuterio. Altri tipi di radiazione elettromagnetica hanno sorgenti completamente diverse.

MONOCROMATORE: Il monocromatore serve a selezionare la radiazione elettromagnetica di una particolare lunghezza d'onda tra tutte quelle prodotte dalla sorgente.

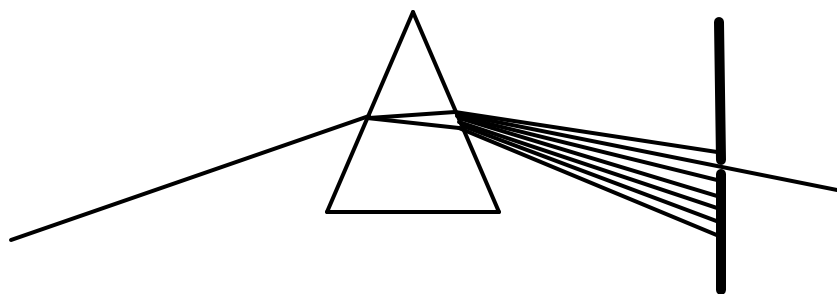
RIVELATORE: è un dispositivo capace di generare un segnale elettrico quando è colpito da una radiazione elettromagnetica.

ELABORATORE del SEGNALE: Il segnale in uscita dal rivelatore può essere utilizzato direttamente per tracciare uno spettro usando un registratore.

MONOCROMATORI

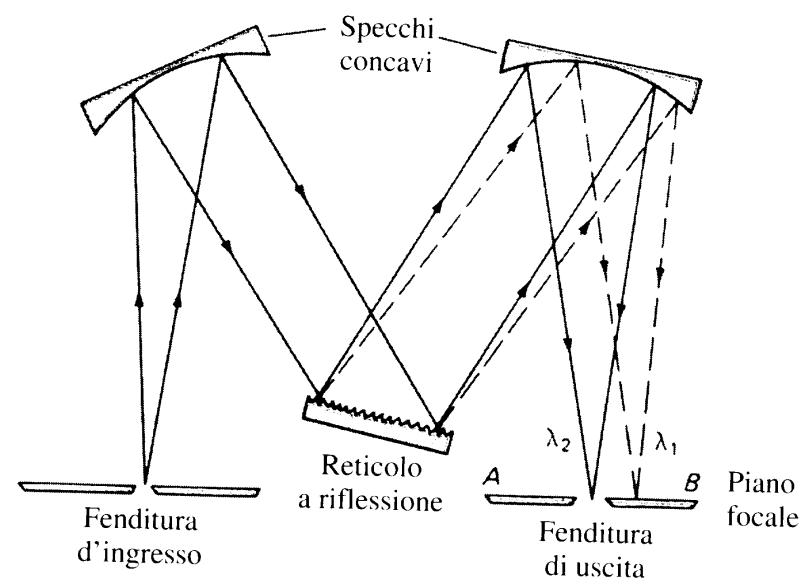
▪ A prisma

è in grado di scomporre la luce bianca nelle sue componenti colorate (ogni colore corrisponde a una certa lunghezza d'onda). Se poniamo una fessura all'uscita del prisma, solo la luce di un colore (= di una lunghezza d'onda) può attraversarla. Si basa sul fatto che il vetro ha un indice di rifrazione diverso per luci di colore diverso.

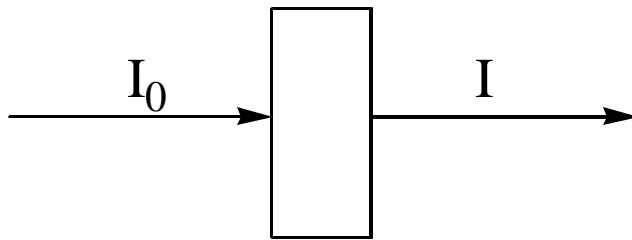


▪ A reticolo

è formato da una superficie riflettente su cui sono ricavate tante scanalature parallele e molto vicine tra loro (la cui distanza deve essere dello stesso ordine di grandezza della lunghezza d'onda della radiazione da rendere monocromatica). Un reticolo di questo tipo, a riflessione, per il fenomeno della diffrazione è in grado di riflettere luci di lunghezze d'onda diverse con angoli diversi, e può quindi essere usato per costruire un monocromatore



Lo spettro UV è un grafico in cui sono riportati sulle ordinate i valori di assorbanza e in ascisse i valori di lunghezza d'onda di tutto l'intervallo esaminato



ASSORBANZA: $A = \log I_0 / I$

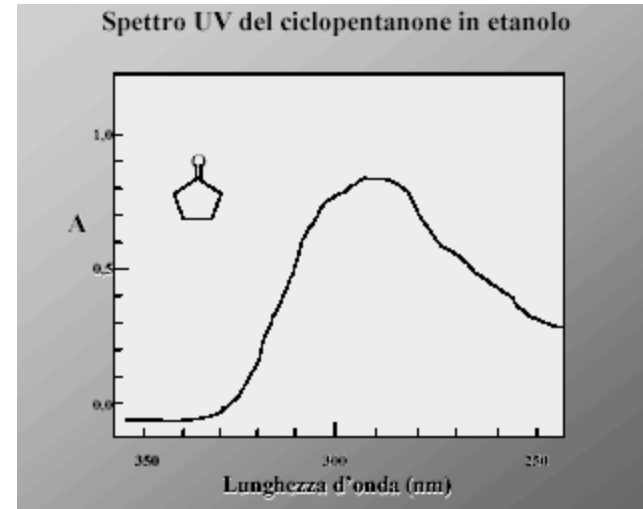
$$0 < A < \infty$$

o anche:

$$A = -\log T$$

TRASMITTANZA $T = I / I_0$,

$$0 < T < 1$$



LEGGE di LAMBERT-BEER

$$A = \epsilon bc$$

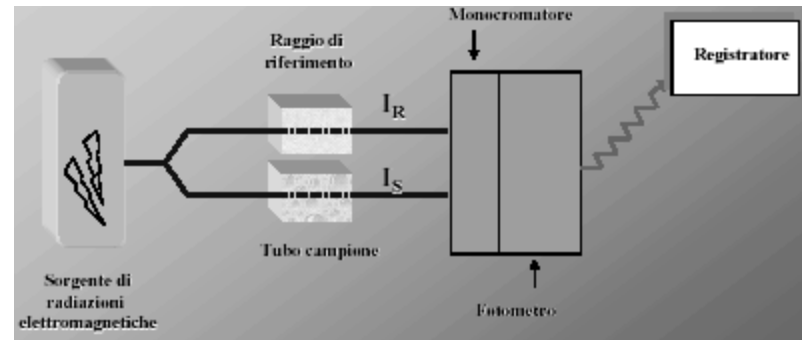
ϵ = coefficiente di estinzione molare

b = lunghezza del cammino ottico (in cm)

c = concentrazione molare

STRUMENTAZIONE

Gli strumenti moderni sono a doppio raggio

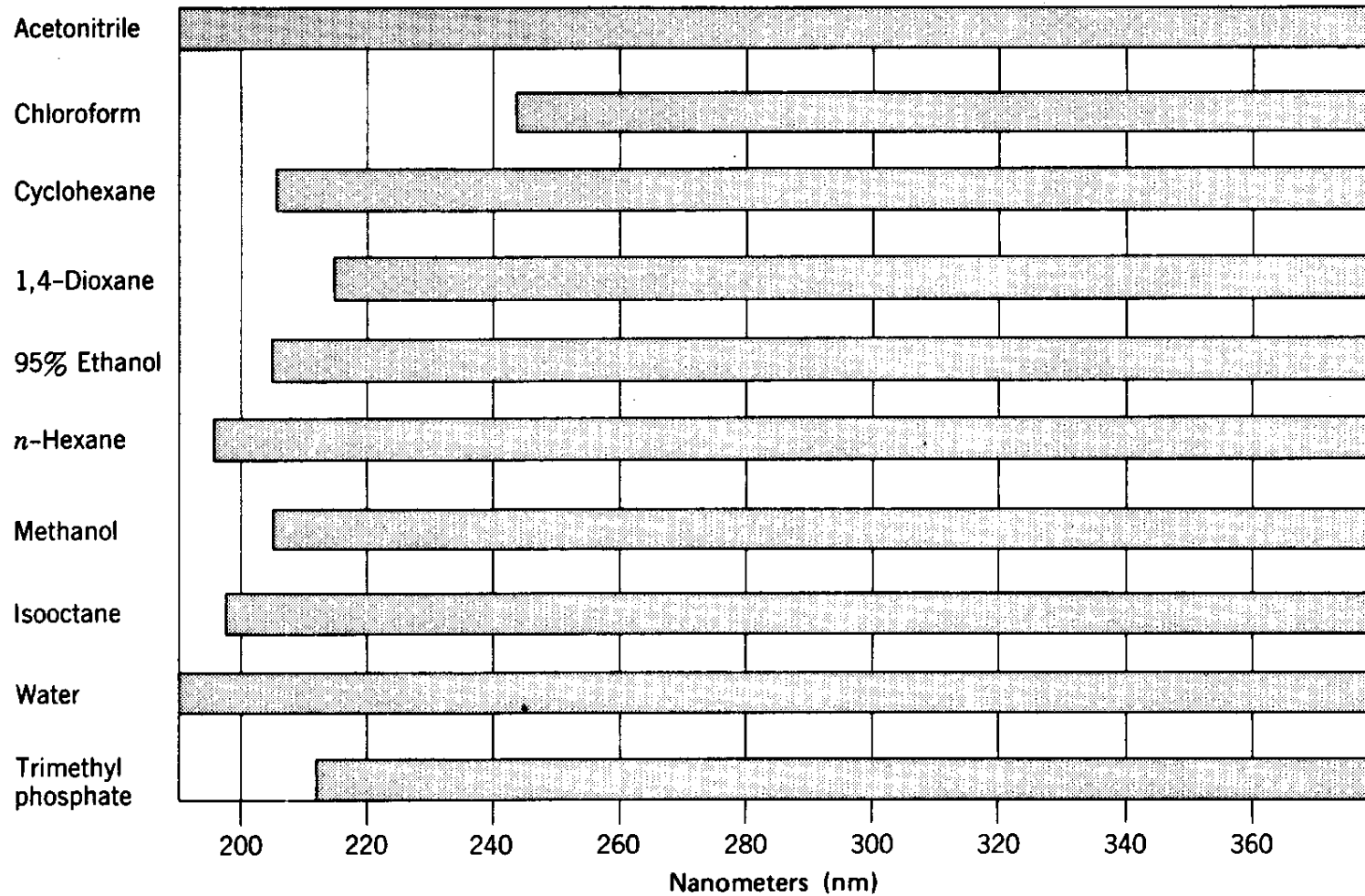


SORGENTE: lampada di tungsteno (visibile) o lampada a scarica di deuterio (UV)

CAMPIONE: si alloggia in celle al quarzo (UV) o in vetro o policarbonato (visibile)

CONCENTRAZIONE: bisogna sceglierla in modo tale che l'assorbanza non superi il valore di 2-3

SCELTA del SOLVENTE



I più usati sono acqua, acetonitrile e etanolo

Spettroscopia UV: definizioni

Cromoforo:

la parte della molecola responsabile dell'assorbimento UV
(per esempio, un carbonile α, β insaturo)

Gruppo auxocromo:

Un gruppo che non è di per sé un cromoforo, ma può modificare l'intensità e la lunghezza d'onda dell'assorbimento di un cromoforo

Shift batocromico:

spostamento di un assorbimento UV verso lunghezze d'onda maggiori
(anche: spostamento verso il rosso)

Shift ipsocromico:

spostamento di un assorbimento UV verso lunghezze d'onda minori
(anche: spostamento verso il blu; non sempre è letterale!!!)

Effetto ipercromico:

aumento dell' ϵ dovuto ad un sostituito del cromoforo.

Effetto ipocromico:

diminuzione dell' ϵ dovuto ad un sostituito del cromoforo.

Classificazione delle transizioni

La più facile interpretazione delle transizioni elettroniche di una molecola organica fa ricorso alla teoria degli orbitali molecolari.

- In una molecola costituita da n atomi, le funzioni d'onda atomiche interagiscono tra loro dando origine ad n funzioni d'onda definite orbitali molecolari che matematicamente costituiscono la combinazione lineare degli orbitali molecolari.
- Una metà degli orbitali molecolari ha energia più bassa degli orbitali atomici di partenza, mentre l'altra metà ha energia più alta. I primi sono definiti orbitali di legame, i secondi di antilegame.
- Un orbitale molecolare possiede carattere di legame tra due generici nuclei p e q quando i coefficienti c_p e c_q dei relativi orbitali atomici (C_p e C_q) hanno lo stesso segno; carattere di antilegame se hanno segno opposto.

$$\text{➤ } y = c_p C_p + c_q C_q$$

- Gli orbitali molecolari si indicano come s e p in base alla diversa simmetria delle funzioni d'onda: i s hanno una elevata densità elettronica tra i nuclei mentre nella stessa zona i p hanno densità nulla.
- Una molecola può anche possedere elettroni di non legame che giacciono in orbitali di tipo n .

Le transizioni elettroniche possono essere classificate sulla base delle caratteristiche degli orbitali coinvolti in:

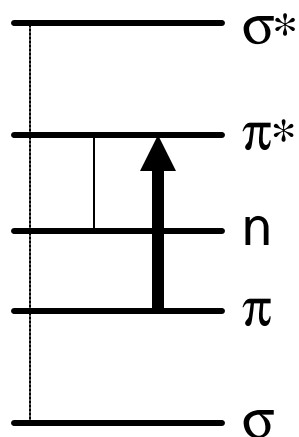
$s-s^*$: sono transizioni intense che avvengono tra orbitali con energia molto diversa e quindi possono essere indotte da radiazioni ad energia molto elevata. Le transizioni $s-s$ cadono in una zona di frequenze non accessibile ai normali spettrometri.

$p-p^*$: sono transizioni molto intense osservabili nella zona dell'UV. Molecole contenenti due o più doppi legami coniugati mostrano assorbimenti sopra i 200 nm fino a raggiungere, per sistemi insaturi molto estesi, la zona del visibile.

$n-s^*$: sono transizioni abbastanza intense associate agli elettroni di non legame che perciò possono essere osservate soltanto per molecole con eteroatomi: CH_3OH assorbe a 185 nm e lo CH_3I a a 250 nm

$n-p^*$: sono transizioni molto deboli ma facilmente osservabili perché cadono perché cadano a lunghezza d'onda più alta di qualsiasi altra transizione e in zone dello spettro abbastanza sgombre.

RELAZIONI GENERALI fra STRUTTURA e PROPRIETA' UV



- I composti saturi non danno assorbimento UV
- Gruppi funzionali contenenti legami π possono dare assorbimento nella regione 200-800 nm. Tali gruppi funzionali insaturi sono detti *cromofori*
- Le transizioni $n \rightarrow \pi$ sono quelle che richiedono meno energia ma sono proibite e le corrispondenti bande sono caratterizzate da basso coefficiente di estinzione molare ($\epsilon < 100$).

TRANSIZIONI $\pi \rightarrow \pi^*$

- Danno luogo alle cosiddette bande K
- Hanno coefficienti di estinzione molare alti ($\sim 10^4$)
- La λ_{\max} dipende da
 - ❖ numero di doppi legami (si parte da 210 nm per il butadiene e bisogna sommare 30 nm per ogni doppio legame in più)
 - ❖ sostituenti sul sistema coniugato
 - ❖ presenza di cicli

TRANSIZIONI $\pi \rightarrow \pi^*$

(n di doppi legami)

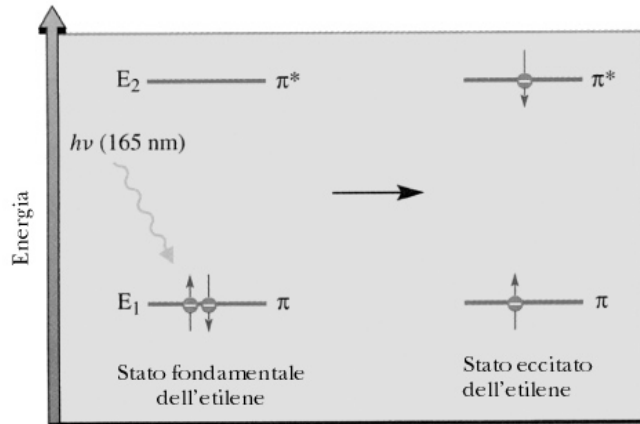


FIGURA 14.9

Eccitazione elettronica dell'etilene: transizione $p \rightarrow p^*$. L'assorbimento di radiazione ultravioletta provoca il passaggio di un elettrone da un orbitale molecolare (OM) p di legame ad un OM di antilegame nello stato eccitato. Lo spin dell'elettrone non cambia.

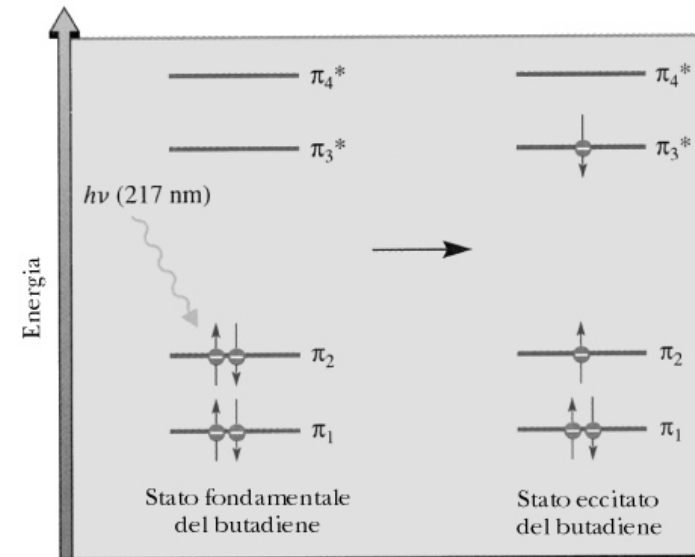
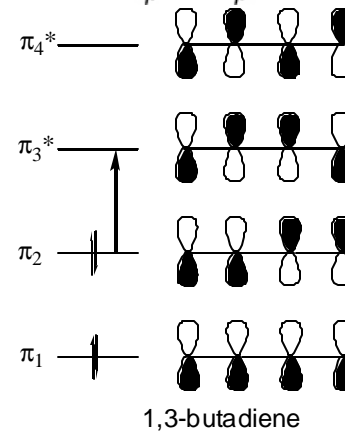
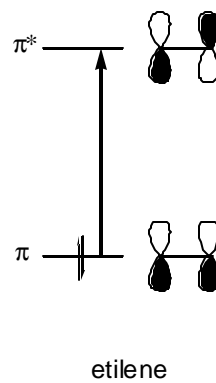


FIGURA 14.10

Eccitazione elettronica dell'1,3-butadiene: una transizione $p \rightarrow p^*$.



Composti carbonilici

Sono presenti due transizioni

$\pi \rightarrow \pi^*$ nel lontano UV a ~ 150 nm

$n \rightarrow \pi^*$ (BANDA R) 270-300 nm con ϵ molto bassi (<100)

AROMATICI

Sono possibili varie transizioni $\pi \rightarrow \pi^*$.

In particolare, il benzene presenta 3 bande di assorbimento, a

λ_{\max} 184 ($\epsilon = 60.000$),

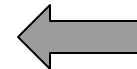
λ_{\max} 204 (7900)

I_{\max} **254 (200)**

Banda E1

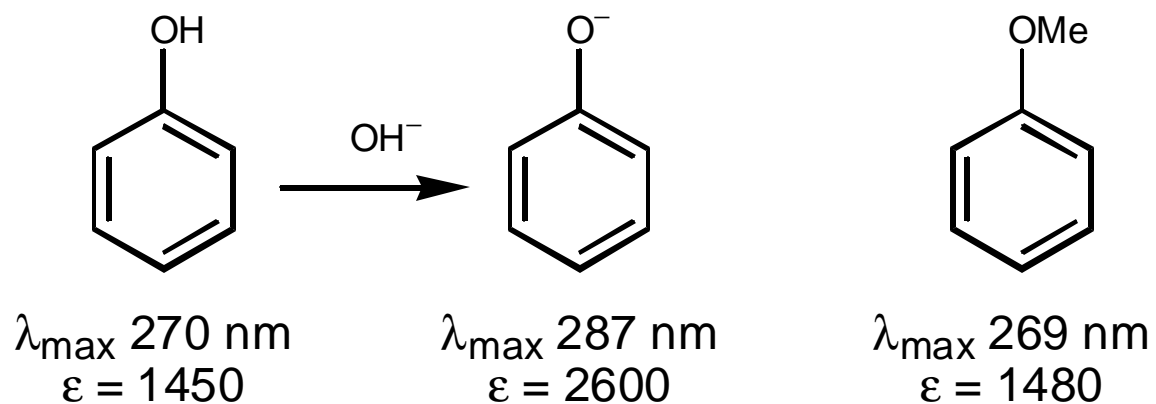
Banda E2

Banda B

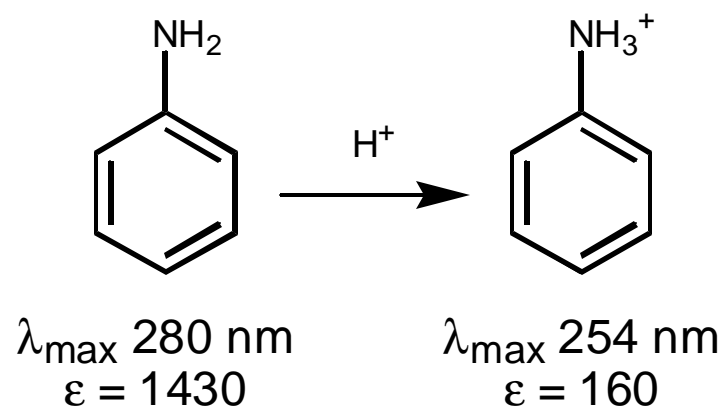


Banda a struttura fine di solito usata a scopi di indagine strutturale

Analisi UV di fenoli e aniline



(shift batocromico)



(shift ipsocromico)

SPETTROSCOPIA UV

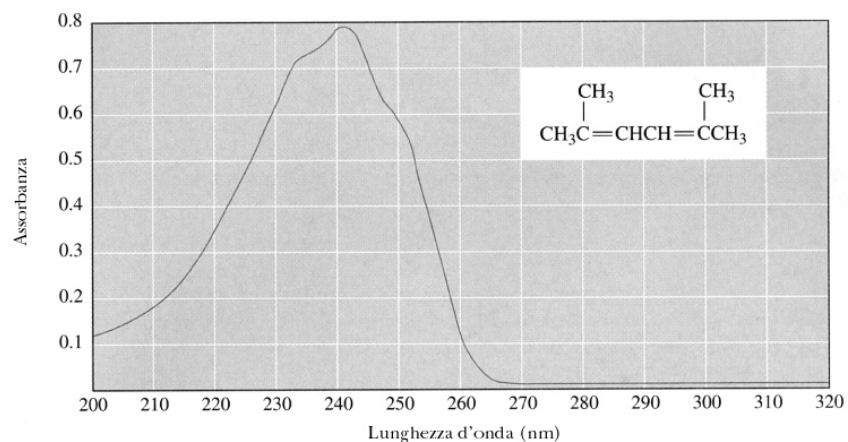
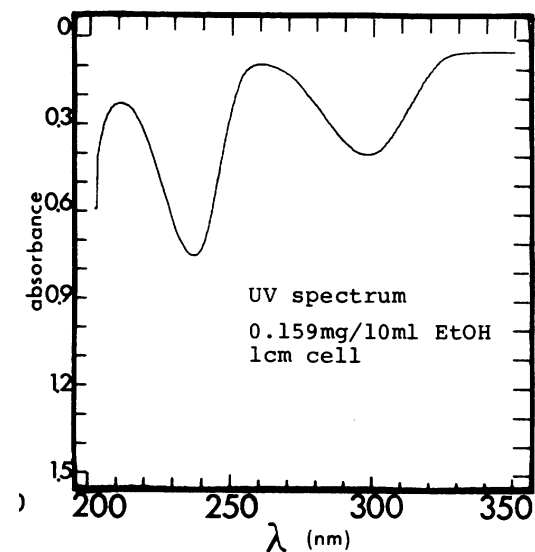


FIGURA 14.8
Spettro ultravioletto del 2,5-dimetil-2,4-esadiene (in metanolo).



PERCHE' SI OSSERVA UNA BANDA LARGA?

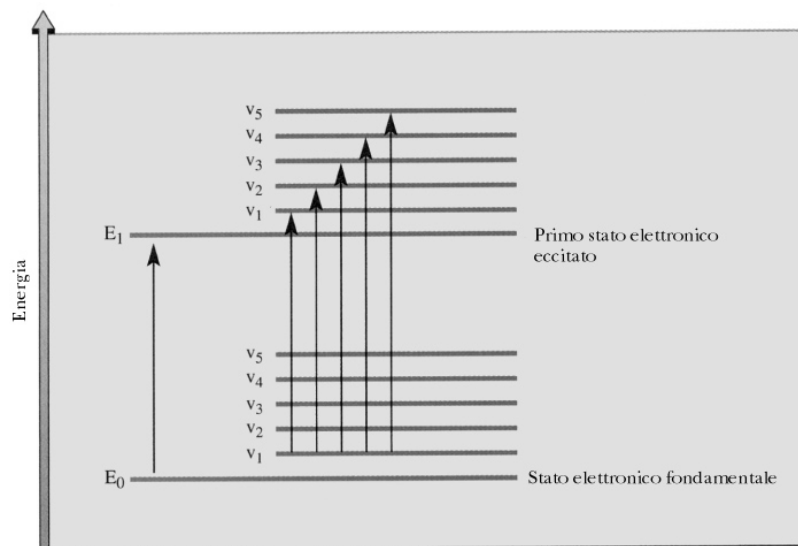


FIGURA 14.11
Livelli energetici elettronici E_1 e E_2 cui sono associati livelli energetici vibrazionali. Vi sono pure, non rappresentati, livelli energetici rotazionali.

Non è detto che la transizione più probabile sia quella che porta allo stato vibrazionale fondamentale dello stato elettronico eccitato.