

**CORSO DI METODI  
MATEMATICI E FISICI:  
LABORATORIO DI FISICA APPLICATA**

**NOME:**

**COGNOME:**

**Docente: Prof. Carlo Altucci**

**ANNO ACCADEMICO 2013-2014**

# ESERCITAZIONE N°1

## Determinazione della concentrazione di specie in soluzione per via spettrofotometrica

### 1. Obiettivi

La spettrofotometria nel campo del visibile (350-750 nm) e dell'ultravioletto (190-350 nm) (range comunemente esplorato da uno spettrofotometro convenzionale UV-visibile) ha una vastissima serie di applicazioni sia per quel che riguarda la determinazione e l'identificazione della struttura di molecole sia per quel che riguarda problemi analitici (determinazioni quantitative). La spettrofotometria UV-Visibile, infatti, rappresenta un metodo molto potente per l'analisi quantitativa di soluzioni diluite ( $10^{-3}$  -  $10^{-5}$  M). Il metodo analitico si basa sulla Legge di Lambert-Beer, che esprime la relazione lineare tra concentrazione ed assorbimento misurato ad una definita lunghezza d'onda.

### 2. Concetti di Spettroscopia

Spettroscopia elettronica. Trasmittanza ed assorbanza. Legge di Lambert-Beer.

### 3. Esperimenti

#### 3.1 Strumentazione

Gli spettrofotometri convenzionali che operano nell' UV-Visibile possono essere a singolo o a doppio raggio. I primi sono quelli meno costosi. Quelli a doppio raggio sono più complessi, specialmente dal punto di vista ottico e meccanico. In particolare nello spettrofotometro a doppio raggio è presente un sistema più complesso di specchi e prismi per rendere il raggio monocromatico, oltre ad un dispositivo per sdoppiare il raggio. Nonostante le diversità tra i due strumenti, le parti essenziali che li compongono si possono così schematizzare:

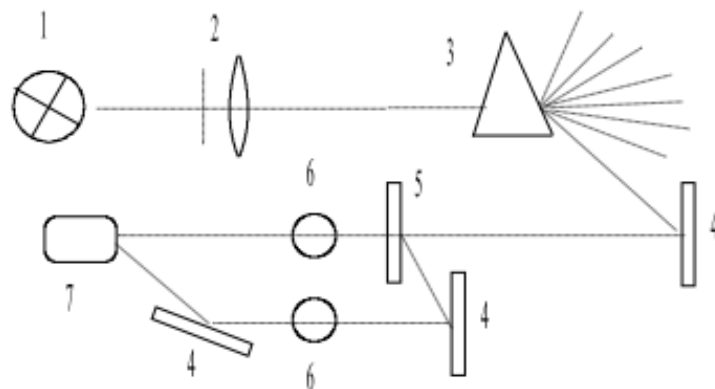


Figura 1: Schema di uno spettrofotometro

1) Sorgente luminosa a filamento di tungsteno per il visibile e a vapori di deuterio per l'UV. La radiazione emessa è policromatica.

2) Sistema di fenditure, filtri e lenti per focalizzare, filtrare e indirizzare il fascio di luce in modo opportuno.

3) Monocromatore, ossia un apparecchio per isolare una certa banda di lunghezze d'onda quasi monocromatica. È costituito da un elemento disperdente (ad es. prisma) e da due sottili fenditure che servono come entrata ed uscita della radiazione; la fenditura d'entrata definisce uno stretto fascio

luminoso che va a cadere sull'elemento disperdente. La fenditura d'uscita fa passare solo una stretta frazione di lunghezze d'onda.

4) Serie di specchi per indirizzare il raggio

5) Un eventuale sistema di specchi (chopper) che divide il raggio di luce in due raggi di uguale intensità (spettrofotometro a doppio raggio).

6) Alloggiamento per le cuvette.

7) Rivelatore (elemento sensibile all'intensità della radiazione elettromagnetica) che trasforma il segnale ottico in segnale elettrico.

Il segnale viene analizzato o digitalizzato per ottenere il valore numerico dell'assorbanza,  $A$ , alle varie lunghezze d'onda. Allo strumento può essere collegato un registratore a carta per disegnare lo spettro oppure, eventualmente, una stampante o un computer.

Nello spettrofotometro a raggio singolo vi è un solo alloggiamento per le cuvette: in questo caso per ogni lunghezza d'onda è necessario determinare l'assorbimento del solvente (il "bianco") per sottrarlo dall'assorbimento del campione in soluzione.

Nello spettrofotometro a doppio raggio vi sono due alloggiamenti per le cuvette: uno per la cuvetta contenente il solo solvente e l'altro per la cuvetta contenente la soluzione campione. Un sistema elettronico esegue il confronto automatico ad ogni lunghezza d'onda dell'assorbimento delle due cuvette e sottrae il valore dell'assorbimento del solvente a quello della soluzione. Si ottiene così il valore d'assorbimento del solo soluto. Le cuvette (generalmente di spessore 1 cm) che si utilizzano nel visibile sono di vetro mentre quelle per l'UV sono di quarzo (poiché il vetro perde la sua trasparenza per lunghezze d'onda minori di 350 nm).

### 3.2 Procedimento

L'esperienza prevede la registrazione di tipici spettri proteici di assorbimento. Per fare ciò saranno preparate delle soluzioni contenenti BSA (bovine serum albumin) a diverse concentrazioni partendo da una soluzione stock a titolo noto. Dai valori di assorbanza rivelati a 278 nm sarà poi possibile verificare la legge di Lambert-Beer.

#### Fasi dell'esperienza:

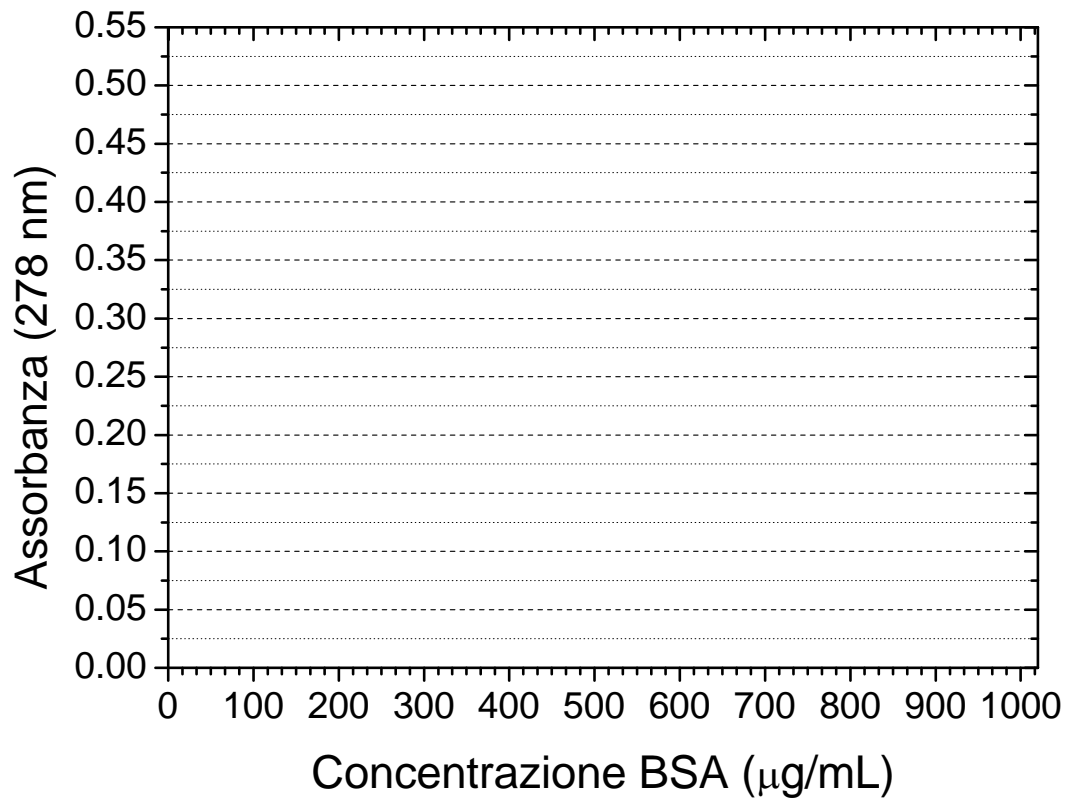
- Preparare 5 ml di una soluzione madre di BSA a concentrazione 1000 mg/L.
- Diluendo la soluzione madre, preparare in eppendorf campioni da 1 mL a diverse concentrazioni di BSA (MW 66.5 kDa).
- Tarare lo spettrofotometro utilizzando solo solvente (PBS = Phosphate Buffered Saline)
- Registrare lo spettro dei vari campioni nell'intervallo tra 210 – 310 nm
- Lettura del valore di assorbanza a 278 nm

Con i dati raccolti riempire la tabella sottostante:

SOLUZIONE	mg/L	µg/mL	moli/L	Assorbanza (278 nm)
Stock	1000			
1	500			
2	200			
3	100			
4	50			
5	20			
Incognita	?	?	?	

#### 4. Trattamento dati

Con i dati in tabella compilare il grafico sottostante dell'assorbanza in funzione della concentrazione di BSA di ogni soluzione. Se il risultato è una retta passante per l'origine degli assi allora significa che l'assorbanza (A) e la concentrazione (c) sono direttamente proporzionali e che la legge di Lambert – Beer ( $A = \epsilon cl$ ) è verificata (l è lo spessore della cuvetta,  $\epsilon$  il coefficiente di estinzione molare).



#### Verificare i dati ottenuti mediante MS-Excel

La pendenza della retta rappresenta il coefficiente di estinzione molare  $\epsilon$  della BSA alla lunghezza d'onda considerata. Il coefficiente  $\epsilon$  corrisponde all'assorbanza di una soluzione a concentrazione 1 M posta in una cuvetta di spessore unitario (1 cm). Il coefficiente di estinzione così calcolato va confrontato con quello presente in letteratura ( $\epsilon_{278\text{nm}} 43824 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ). Dal valore calcolato di  $\epsilon$  determinare il valore della concentrazione della soluzione incognita e confrontarlo con il valore ottenuto usando il coefficiente riportato in letteratura.