

Assorbimento

Jan Peter Ebbing, Beatrice Fiumara, Giovanni Laganà

7 Marzo 2024

Indice

1	Introduzione teorica	2
1.1	Interazione della luce con una molecola	2
1.2	Legge di Beer-Lambert	3
1.2.1	Coefficiente di estinzione e sezione d'urto	4
2	Apparato sperimentale	5
3	Procedura sperimentale	6
4	Analisi dati	6
5	Conclusioni	10

Abstract

Questo esperimento indaga la cinetica di assorbimento della rodamina da parte di una pastiglia di agarosio. Inizialmente trasparente, la pastiglia viene immersa in una soluzione di rodamina, risultando in un graduale assorbimento del colorante che trasforma il suo colore verso l'arancione. Ciò comporta una corrispondente diminuzione dell'assorbanza della soluzione di rodamina nel tempo. Si è quindi studiato il rate di ingresso della rodamina nel gel di agarosio tramite misure periodiche dell'assorbanza della soluzione di quest'ultima; osservando che segue una legge cinetica esponenziale.

1 Introduzione teorica

La spettroscopia di assorbimento UV-VIS è il ramo della scienza che studia l'interazione della radiazione elettromagnetica con la materia per sondarne le proprietà.

In questo esperimento si vuole sfruttare l'assorbimento per studiare la diffusione della rodamina, un colorante fluorescente, all'interno di un gel di agarosio. Quest'ultimo è un polimero polisaccaride che presenta dei pori di dimensione del μm all'interno dei quali la rodamina riesce a penetrare.

1.1 Interazione della luce con una molecola

È possibile studiare l'interazione tra la radiazione elettromagnetica e le molecole mediante il modello *semi-classico*, nel quale la luce è descritta tramite la teoria classica dell'elettromagnetismo, mentre la molecola tramite la meccanica quantistica. Le componenti della molecola responsabili dell'assorbimento sono dette *cromofori*, che in questo modello vengono trattati come dipoli elettrici (in prima approssimazione) rispetto all'interazione con la radiazione elettromagnetica.

Se vale che la lunghezza d'onda della radiazione incidente è molto maggiore delle dimensioni del cromoforo, allora è possibile trascurare la dipendenza spaziale del campo elettrico rispetto alle dimensioni della molecola che interagisce con esso. Quindi per un'onda piana consideriamo:

$$\mathbf{E}(t) = \mathbf{E}_0(e^{2\pi i\nu t} + e^{-2\pi i\nu t}),$$

dove \mathbf{E}_0 è l'ampiezza del campo elettrico.

Per il cromoforo si considerano due possibili stati: $\psi_a^{(0)}$ e $\psi_b^{(0)}$, rispettivamente lo stato fondamentale ed il primo stato eccitato non perturbati. A tali stati corrispondono i livelli energetici E_a ed E_b , ovvero gli autovalori dell'hamiltoniana imperturbata \hat{H} (equazioni [1]).

$$\begin{aligned}\hat{H}\psi_a^{(0)} &= E_a\psi_a^{(0)} \\ \hat{H}\psi_b^{(0)} &= E_b\psi_b^{(0)}\end{aligned}\tag{1}$$

Nell'approssimazione di dipolo della distribuzione di carica del cromoforo (globalmente neutro), il termine che regola l'accoppiamento tra l'onda elettromagnetica incidente e il sistema del cromoforo è l'Hamiltoniana di perturbazione dipendente dal tempo:

$$\hat{H}'(t) = -\boldsymbol{\mu} \cdot \mathbf{E}(t)$$

dove μ è il momento di dipolo elettrico della molecola, cioè il termine dominante della distribuzione di carica elettrica molecolare espansa in serie di multipolo. In presenza di perturbazione, l'equazione di Schrödinger diventa

$$[\hat{H} + \hat{H}'(t)]\psi = i\hbar \frac{d\psi}{dt}\tag{2}$$

e la funzione d'onda al tempo t è una combinazione lineare delle funzioni d'onda imperturbate:

$$\psi(t) = C_a(t)e^{-\frac{i}{\hbar}E_a t}\psi_a + C_b(t)e^{-\frac{i}{\hbar}E_b t}\psi_b, \quad (3)$$

dove i coefficienti C_a e C_b , dipendenti dal tempo, valgono a $t = 0$ rispettivamente 1 e 0, in quanto la molecola si trova inizialmente nello stato fondamentale.

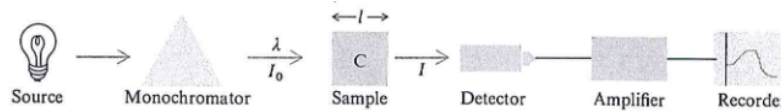
L'obiettivo è calcolare il rate a cui la luce causa transizioni dallo stato ψ_a allo stato ψ_b ; quest'ultimo si trova derivando rispetto al tempo la probabilità di transizione P_{ab} , che è proporzionale a $|C_b(t)|^2$. Inserendo la [3] nella [2] e sviluppando i conti (tenendo conto solo della componente di assorbimento e non di quella di emissione stimolata) si arriva a:

$$\frac{dP_{ab}}{d\tau} = \frac{2\pi}{3\hbar^2} |\mu_{ba}|^2 I_\nu(\nu).^1$$

dove $I_\nu(\nu)$ è la densità di energia dell'onda elettromagnetica incidente sul campione a frequenza ν , mentre il fattore $\frac{2\pi}{3\hbar^2} |\mu_{ba}|^2$ è detto *coefficiente di assorbimento di Einstein* e si indica con B_{ab} .²

1.2 Legge di Beer-Lambert

L'assorbimento è descritto dalla legge di Beer-Lambert. Nell'immagine seguente è riportato un diagramma dell'apparato sperimentale per una tipica misura di assorbimento: dopo essere passato da un monocromatore, un fascio di luce di intensità I_0 e lunghezza d'onda λ incide per un tratto l su un campione, costituito da una soluzione di molecole assorbenti di concentrazione C (mol/l). Una parte della luce incidente è assorbita dalle molecole del campione, mentre un'altra è trasmessa con intensità $I < I_0$.



Consideriamo un sottile strato di campione dl perpendicolare alla direzione di propagazione della luce. La frazione di luce assorbita attraverso tale strato sarà direttamente proporzionale al numero di molecole assorbenti presenti in quest'ultimo, ovvero:

$$-\frac{dI}{I} = \varepsilon' C dl, \quad (4)$$

dove la costante di proporzionalità ε' è indipendente dalla concentrazione per un sistema di molecole non interagenti, mentre dipende invece dalla lunghezza d'onda λ della luce incidente. Integrando sull'intero campione, otteniamo

$$-\ln \frac{I}{I_0} = \varepsilon' Cl,$$

Convertendo il logaritmo alla base 10, troviamo la forma canonica della legge di Beer-Lambert:

$$A(\lambda) \equiv -\log(I/I_0) = \varepsilon(\lambda) Cl, \quad (5)$$

in cui $\varepsilon = \varepsilon'/2.303$ è detto *coefficiente di estinzione molare*, mentre la quantità A prende il nome di *assorbanza*. Misure precise di A si hanno per valori di assorbanza nell'intervallo 0.1 – 2: valori minori indicano che solo una piccola frazione della luce incidente è assorbita dal campione, mentre valori maggiori indicano che solo una piccola parte della luce incidente è trasmessa e raggiunge il rivelatore.

¹Si noti che τ rappresenta un tempo sufficientemente grande affinché la perturbazione possa agire.

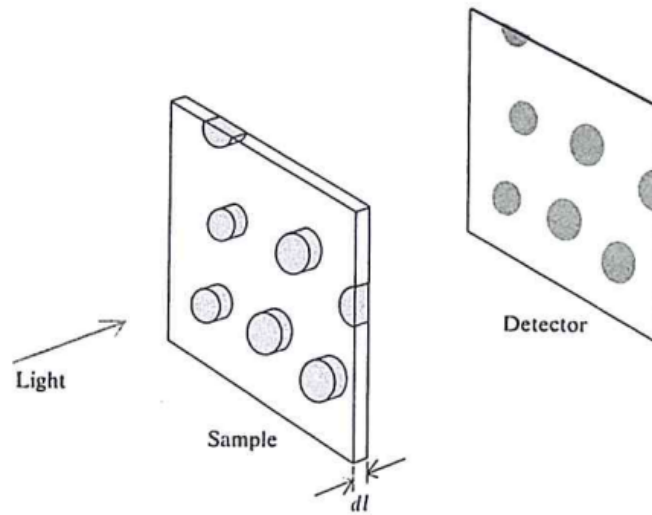
² $\mu_{ba} \equiv \langle \psi_a^0 | \boldsymbol{\mu} | \psi_b^0 \rangle$

1.2.1 Coefficiente di estinzione e sezione d'urto

Fissata una lunghezza d'onda per la luce incidente sul campione e nota la concentrazione C , si può ricavare ε a partire da misure di assorbanza tramite la legge di Beer-Lambert. Si può mostrare che esiste una relazione tra il coefficiente di estinzione molare e la dimensione delle molecole di soluto che assorbono parte della luce incidente. Consideriamo a tal fine una porzione di soluzione di area A , misurata in cm^2 e spessore dl . Il numero di molecole di soluto per cm^3 è dato da $\frac{CN_A}{1000}$. Di conseguenza, all'interno del volume Adl ci sono $\frac{CN_A Adl}{1000}$ molecole di soluto. Se ogni molecola di soluto ha raggio r , la massima frazione di volume occupata dalle molecole di soluto è

$$f_{max} = \pi r^2 CN_A / 1000$$

Il processo di assorbimento è massimamente efficiente se la luce incidente su una generica molecola di soluto è interamente assorbita da quest'ultima. In questo caso, come mostrato nella figura che segue, la frazione di luce assorbita dal campione coincide con f_{max} ed esiste una relazione ben precisa tra dimensioni molecolari e assorbimento.



Se l'assorbimento da parte di una molecola di soluto non è totale, indicando con P la probabilità che la luce incidente su una molecola sia assorbita da quest'ultima, la frazione di luce assorbita dal campione è pari a Pf_{max} . Di conseguenza, il contributo di ciascuna molecola è dato da

$$\sigma = P\pi r^2$$

ed è detto *sezione d'urto* della molecola. In termini di σ , la frazione di luce assorbita attraverso lo strato dl è $-\frac{dI}{I} = (\sigma CN_A / 1000)dl$ e quindi, confrontando quest'ultima equazione con la (4), troviamo che tra coefficiente di estinzione molare e dimensioni molecolari esiste la seguente relazione:

$$\varepsilon = \pi r^2 P N_A / 2.303$$

2 Apparato sperimentale

Per misurare l'assorbanza della soluzione contenente la rodamina, è stato utilizzato uno spettrofotometro.

Il modello utilizzato è lo Jasco V-570 che opera nella regione del visibile, nello specifico tra i 400 e i 650 nm. Lo spettrofotometro generalmente opera in due modalità: modalità trasmissione o modalità assorbimento. In modalità trasmissione, la luce emessa dalla fonte viene fatta passare attraverso il campione e il detector misura l'intensità della luce trasmessa attraverso il campione. In modalità assorbimento, la luce viene fatta passare attraverso il campione e il detector misura l'intensità della luce assorbita (facendo la differenza tra quella irradiata e quella trasmessa) dal campione. Quest'ultima modalità è stata impiegata ai fini dell'esperimento. Uno schema ottico che rappresenta sinteticamente il funzionamento dello spettrofotometro è presente nell'immagine [1]

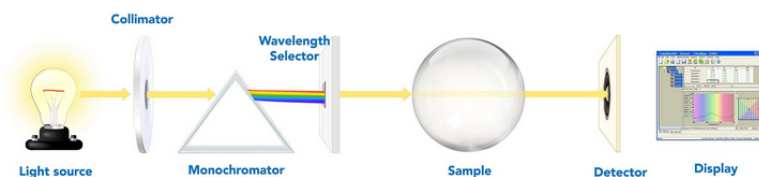


Figura 1. Spettrofotometro: rappresentazione schematica dello spettrofotometro.

Lo spettrofotometro è composto da quattro componenti principali: una *sorgente di luce bianca* (in questo caso una lampada alogena al tungsteno), un *monocromatore* (in questo caso un reticolo di diffrazione con un passo di $0.83 \mu\text{m}$), utile per separare la luce in lunghezze d'onda discrete, un supporto del campione (il modello in esame è dotato di un alloggiamento a due slot) e un *rivelatore* di luce (un fotodiodo nel modello utilizzato).

Dopo essere stata collimata, la luce proveniente dalla lampada passa per il reticolo di diffrazione, quindi attraverso una fenditura. Questo permette di selezionare la lunghezza d'onda di interesse e di collimare il fascio. A questo punto il fascio di luce incide sul campione posto in una cuvetta nell'apposito alloggiamento.

La luce trasmessa giunge al rivelatore e lo strumento calcola l'assorbanza del campione in corrispondenza della lunghezza d'onda selezionata dal monocromatore. Il processo viene ripetuto per tutte le altre lunghezze d'onda del range d'interesse³ e il risultato è lo spettro di assorbimento del campione in tale intervallo.

³Prima dell'inizio della misura, si imposta sia l'intervallo di lunghezze d'onda da indagare sia il *passo*, ovvero la spaziatura tra le lunghezze d'onda selezionate dallo strumento.

3 Procedura sperimentale

Come già anticipato, per stimare il rate di ingresso della rodamina all'interno di una pastiglia di agarosio, si sfruttano gli spettri di assorbimento della soluzione, i quali vengono acquisiti ad intervalli regolari.

Si prepara una soluzione di rodamina $5\mu M$ in un contenitore cilindrico, nel quale si aggiungerà successivamente la pastiglia di agarosio. Innanzitutto è necessario acquisire uno spettro base ($t = 0$), ovvero lo spettro della soluzione di rodamina prima che venga inserita la pastiglia di agarosio.

Quindi si versa in una cuvetta la soluzione di rodamina a concentrazione $5\mu M$, che viene successivamente inserita all'interno dello spettrofotometro e si campiona l'assorbanza in un range di lunghezze d'onda tra 400 nm e 650 nm . Il cammino ottico (larghezza della cuvetta) ha un valore di $l = 0,2\text{ cm}$.

Una volta effettuata la prima misura, si versa nuovamente il campione di soluzione prelevato all'interno del contenitore cilindrico e si attende un intervallo di tempo Δt prima di ripetere nuovamente la misura.

In particolare si sono prese 10 misure ad intervalli temporali di 5 min ed altre 4 ad intervalli di 10 min.

4 Analisi dati

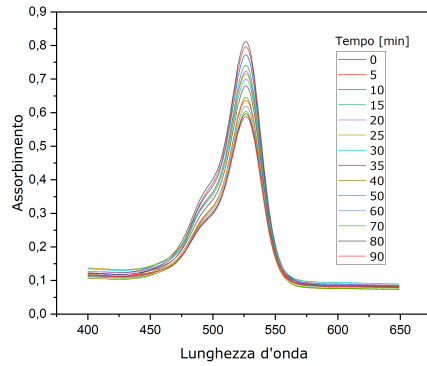
Per determinare il tempo medio \bar{t} di assorbimento della rodamina da parte di una pastiglia di agarosio, è stata impiegata la seguente relazione cinetica:

$$\Delta A = B(1 - e^{-kt}) \quad (6)$$

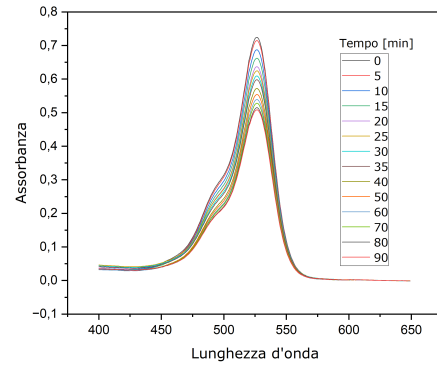
dove $k = 1/\bar{t}$ e ΔA rappresenta la differenza di assorbanza al picco tra lo spettro iniziale (prima dell'aggiunta della pastiglia di agarosio) e lo spettro al tempo t .

A causa di fattori come la diversa faccia della cuvetta esposta al fascio di luce dello spettrofotometro, o l'uso di una cuvetta differente tra una misura e l'altra, sono stati osservati spettri con baseline differenti. Per questo motivo, è stato necessario normalizzare il background portandolo a zero per tutti gli spettri. Questo è stato fatto sottraendo, ad ogni valore acquisito per un dato spettro, la media dei valori di coda corrispondenti a lunghezze d'onda maggiori. In particolare, la media è stata calcolata sui primi 39 valori del dataset, che corrispondono a $\lambda = 612 - 649\text{ nm}$.

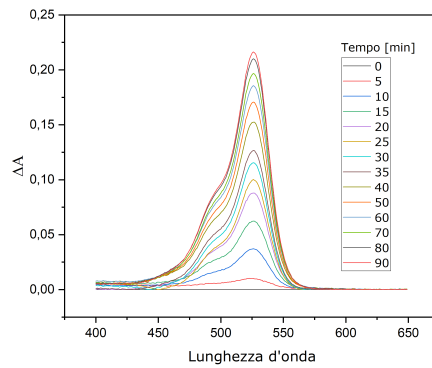
Infine, è stato sottratto a ciascuno spettro quello iniziale, calcolando poi il valore assoluto dei risultati ottenuti, per visualizzare gli spettri corretti.



(a) *Spettri iniziali*



(b) *Fondo normalizzato*



(c) *Plot della differenza degli spettri con quello iniziale*

Figura 2. *Grafici degli spettri di assorbimento nel tempo. la (a) rappresenta gli spettri registrati dallo spettrofotometro; nella (b) le baseline sono state normalizzate a zero ed infine nella (c) è stato sottratto a ciascuno spettro quello al tempo $t = 0$.*

Sono stati fittati gli spettri ottenuti attorno ai picchi con un modello parabolico nell'intervallo di lunghezze d'onda compreso tra 516 e 534 nm, al fine di stimare il valore di assorbanza massima al picco. La lunghezza d'onda corrispondente al picco, λ_p , è stata determinata come segue:

$$\lambda_p = -\frac{b}{2a}, \quad (7)$$

con un errore associato, σ_{λ_p} , calcolato mediante:

$$\sigma_{\lambda_p} = \sqrt{\left(\frac{\sigma_b}{2a}\right)^2 + \left(\frac{b\sigma_a}{2a^2}\right)^2}. \quad (8)$$

A partire da λ_p , è stata calcolata l'assorbanza al picco, A_p , attraverso l'equazione:

$$A_p = a\lambda_p^2 + b\lambda_p + c, \quad (9)$$

e dell'errore associato, σ_{A_p} , espresso da:

$$\sigma_{A_p} = \sqrt{\lambda_p^4 \sigma_a^2 + \lambda_p^2 \sigma_b^2 + \sigma_c^2 + (2a\lambda_p + b)^2 \sigma_{\lambda_p}^2}. \quad (10)$$

Tuttavia, utilizzando le equazioni [7-8-9-10], sono stati ottenuti errori relativi superiori al 100%. Questo è dovuto principalmente alla forte variabilità indotta dal parametro a , il quale contribuisce ad un'elevata incertezza nella determinazione di λ_p (come evidenziato dalla formula (8)). Per ovviare a tale problema, si è optato per la ripetizione dei fit per ciascuna misurazione, adottando come stima dell'errore la deviazione standard dei valori fittati (figura [3]) e come valore atteso la media di questi ultimi. Nonostante ciò, è stato nuovamente riscontrato il problema dell'elevato errore relativo sull'assorbanza al picco A_p , dovuto ad a^4 .

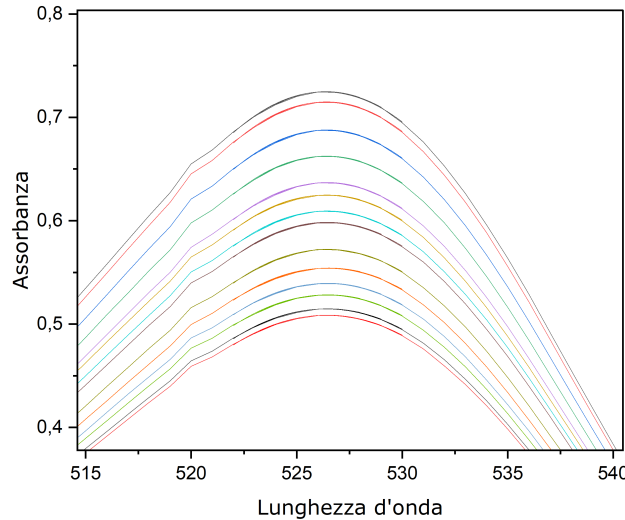


Figura 3. Fit dei picchi degli spettri: si sono effettuati tre fit su tre diversi range di dati con l'idea di fare poi media e deviazione standard dei valori di assorbanza al picco; il risultato è stato fallimentare.

⁴I risultati di questi primi due tentativi non sono stati riportati in quanto privi di significato; come già detto l'errore relativo risultava in entrambi i casi superiore all'100%

Il problema è stato risolto utilizzando una diversa formulazione della funzione parabolica, ovvero:

$$y = y_V + A(x - x_V)^2, \quad (11)$$

nella quale compaiono già le coordinate del vertice della parabola, x_V e y_V , e dunque non è necessaria alcuna propagazione degli errori. Procedendo in questa maniera, tuttavia, si è ricaduti nel problema opposto: incertezze relative su A_p troppo piccole ($\sim 0.1\%$), dovute a un elevato *rapporto segnale-rumore* negli spettri acquisiti (questa cosa può essere osservata nella figura [3]). Considerando ugualmente tali incertezze e trascurando quelle sulle misure di tempo, si sono interpolati i dati raccolti con la funzione (6). Il risultato del fit è riportato nel grafico seguente.

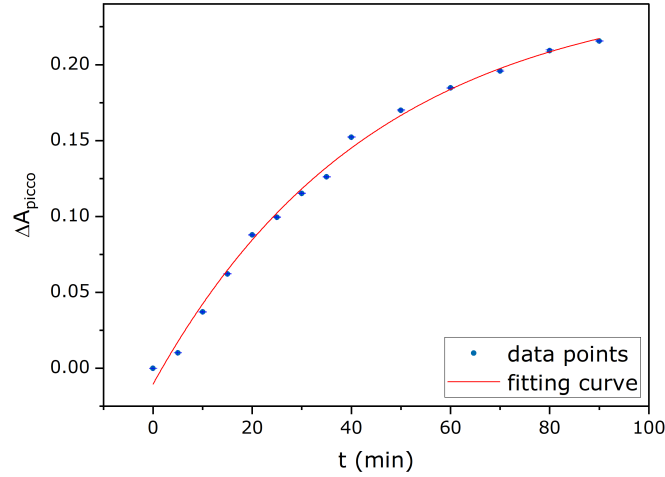


Figura 4. *Fit ΔA vs t*

Qualitativamente l'adattamento al modello teorico sembrerebbe buono; tuttavia, da un'analisi quantitativa risulta: $P(\tilde{\chi}^2 > \tilde{\chi}_o^2) \approx 0\% < 5\%$.

Questo, come già detto in precedenza, è chiaramente dovuto ad una sottostima delle incertezze.

Nella tabella che segue sono invece riportati i valori dei parametri restituiti dal fit, accompagnati dalle relative incertezze.

a	σ_a	b	σ_b	$k \text{ (min}^{-1}\text{)}$	$\sigma_k \text{ (min}^{-1}\text{)}$
1.04	0.02	0.252	0.007	0.022	0.002

Ricordando che $k = 1/\bar{t}$ e propagando opportunamente l'errore⁵, è possibile infine stimare il tempo medio di ingresso della rodamina nella pastiglia di agarosio:

$$\bar{t} = (45 \pm 3) \text{ min}$$

⁵ $\sigma_{\bar{t}} = \bar{t} \cdot \left| \frac{\sigma_k}{k} \right|$

5 Conclusioni

È stato possibile determinare che l'assorbimento della rodamina da parte della pastiglia di agarosio segue una cinetica esponenziale, con un tempo medio di ingresso di (45 ± 3) minuti.

Per via di errori sistematici, dovuti a fattori come l'utilizzo di cuvette diverse o l'inserimento di quest'ultime con facce differenti rivolte verso la sorgente dello spettro-fotometro, è stato necessario rinormalizzare le baseline degli spettri acquisiti; tuttavia questo non ha portato a nessun problema significativo.

L'utilizzo dell'espressione (11) per il fit dei picchi ha consentito di ottenere dei valori dell'assorbanza che qualitativamente ben si adattano all'andamento teorico; tuttavia però l'errore loro associato (prodotto dal fit) risulta molto sottostimato per via dell'elevato rapporto segnale rumore, soprattutto ai picchi.

D'altra parte, utilizzare l'espressione $y = ax^2 + bx + c$ per effettuare il fit e propagare successivamente gli errori, o l'approccio con i tre fit (errore preso come deviazione standard dei tre valori dell'assorbanza calcolati), producono errori eccessivamente sovrastimati (errori relativi $> 100\%$) a causa della forte sensibilità dell'assorbanza dal parametro a del fit.

Per poter stimare in maniera più accurata l'errore, bisognerebbe tener conto degli errori sperimentali e di misura in fase di preparazione delle soluzioni, in quanto sono questi che maggiormente influenzano i valori dell'assorbanza piuttosto che gli errori del fit, che come già detto sono minimi.