**Concentrazione Rodamina (EXP – 00)**

Video 01

Strumentazione:

- Bilancia;

- Cuvette (Plastica o Quarzo): → a 4 facce ottiche (utilizzate per la Fluorescenza ad esempio perche la rivelazione avviene a 90°);

→ a 2 facce ottiche (utilizzate nell’Assorbimento poiché il fascio trasmesso è colacquisizionelineare con quello incidente);

- Pipette di plastica;

- Pipette Gilson: 200 – 1000 μl

50 – 200 μl

2 – 20 μl;

- Cilindretti di Vetro;

- Spettrofotometro.

ATT!! Prendere le Cuvette sempre dalla parte superiore per non lasciare impronte sulle facce ottiche.

Video 02

Spettrofotometro:

- Lo utilizziamo in questo esperimento per calcolare l’Assorbanza della soluzione diluita di Rodamina;

- Il fascio trasmesso è collineare a quello incidente;

- Nel Software bisogna impostare:

\_Parameters \_Photometric Mode (che può essere Assorbanza, Trasmittanza o Riflettanza)

\_Ampiezza di Banda 2nm

\_Velocità di Scansione (lasciare quella preimpostata)

\_Range di Acquisizione è la lunghezza d’onda iniziale e quella finale dello spettro di assorbimento che andrà ad acquisire:

\_Start è la lunghezza d’onda maggiore (in questo caso 650nm)

\_End è quella minore (in questo caso 400 nm):

Video 03

Parte Teorica dell’Esperimento:

- Obbiettivo: Preparazione di una soluzione diluita di Rodamina 6G a partire da uno Stock Concentrato;

Calcolo della Concentrazione Iniziale (Ci) dello Stock;

- Per andare a calcolare la concentrazione dello stock andiamo a fare una diluizione di quest’ultimo. Questo perché se andassi a inserire direttamente lo Stock nello Spettrofotometro, l’alta concentrazione dello stock schermerebbe il fascio incidente così che risulterebbe minima, se non nulla, la luce trasmessa;

- Obbiettivo della diluizione quindi è avere valori di Assorbanza intorno allo 0,5;

- Formule:

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| CiVi = CfVf | Dove: | - Ci = concentrazione dello Stock  - Vi = volume dello Stock  - Cf = concentrazione della soluzione diluita  - Vf = concentrazione della soluzione diluita |
| A = εCl | Dove: | - A = assorbanza  - ε = coefficente di estensione molare  - C = concentrazione  - l = lunghezza cammino ottico |

- In questo esperimento ε = 116000 Mol-1cm-1 e, essendo legato strettamente alla lunghezza d’onda di assorbimento, colloca il massimo dello spettro di Assorbimento della Rodamina a 526 nm.

- Quindi per calcolare infine la concentrazione dello Stock posso ricavare l’Assorbanza (sul massimo) con lo Spettrofotometro per poi ricavare, con la seconda formula, la concentrazione Cf . In questo modo, conoscendo Vi e Vf, posso calcolare, con la prima formula, la concentrazione Ci dello Stock.

Video 04

Preparazione del Campione:

- Taro la bilancia con all’interno il cilindretto di vetro per trascurare ques’ultimo;

- Prima calcolo il volume del tampone, quindi dell’acqua;

- Per prelevare e inserire l’acqua nel cilindretto utilizzo le pipette Gilson dopo essersi assicurati di aver posizionato bene il puntale;

ATT!! Quando si usano le pipette Gilson non si deve MAI girarle a testa in su per non far contaminare la punta della pipetta con le varie soluzioni.

- Controlare di aver settato la bilancia in modo tale che ti restituisca già la misura in microlitri;

- Calcolo il volume dell’acqua (VH2O = 1958,7 μl);

- Ritariamo la bilancia con ancora il cilindretto e l’acqua all’interno per calcolare il volume della Rodamina aggiunta;

- Inserisco la Rodamina (VR = 48,38 μl);

- Usare una pipetta di plastica per uniformare la soluzione;

ATT!! Dopo l’utilizzo, buttare i puntali, come le pipette di plastica, nei bidoni appositi per lo smaltimento degli oggetti che sono entrati in contatto con sostanze chimiche (Bidoni Gialli).

- Preparato così il campione, travasarlo nella cuvetta a 4 facce ottiche (poiché poi lo stesso campione verrà utilizzato nell’esperimento 01 riguardante la Fluorescenza).

Video 05

Calcolo dell’Assorbanza:

- Preparato così la soluzione diluita, siccome lo strumento misura anche il contributo di Scattering generato dalle molecole del solvente (l’acqua), preparo una cuvetta con solo l’acqua (in questo caso il volume all’interno della cuvetta è indifferente, basta assicurarsi che sia abbastanza affinché il fascio passi totalmente nel liquido).

- Inseriamo la cuvetta con solo l’acqua nello spettrofotometro e, tenendo gli stessi parametri con cui faremo la misurazione (Assorbimento tra 400 e 650 nm), facciamo partire l’aquisizione dati ottenendo lo spettro di fondo dell’acqua;

ATT!! Se in questa fase di acquisizione di dati si dovessero riscontrare dei picchi di assorbimento, vorrebbe dire o che la soluzione d’acqua è contaminata, oppure che la cuvetta stessa è sporca (essendo per questo esperimento una cuvetta di plastica, NON utilizzare l’acetone per pulirla, ma utilizzare l’etanolo).

- Verificare l’andamento del Rumore di Scattering (~ 1/λ4) e salvare lo spettro;

- “ a questo punto, in teoria, bisognere svuotare la cuvetta e usare essa stessa anche per la soluzione di Rodamina così da tener conto anche di eventuali problemi dovuti alla superfice stessa della cuvetta ”;

- Rinseriamo la cuvetta con la soluzione di Rodamina e facciamo ripartire l’acquisizione dei dati;

- Ottenuto così lo spettro della Rodamina bisogna andare a sottrarre ad esso lo spettro di fondo;

- Per eseguire la sottrazione tra i due spettri trascino lo spettro di fondo su quello della Rodamina e in seguito vado su \_Processing \_Subtraction e verifico il giusto compimento dell’operazione;

- In seguito ci si va a posizionare col cursore a 526 nm (che a seguito di uno svolgimento corretto dell’esperimento, dovrebbe risultare il massimo dello spettro) ottenendo così l’Assorbanza (A = 0,61075);

NOTA: Lo spettro di assorbimento è caratterizzato da due picchi perché ?

Svolgimento a casa

Calcolo delle Concentrazioni:

-Dati iniziali:

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Volume Stock di Rodamina | Vi | 48,38 μl |
| Volume Acqua | VH2O | 1958,7 μl |
| Volume Soluzione Diluita | Vf | 2007,1 μl |
| Assorbanza | A | 0,611 |
| Coefficente di Estensione Molare | ε | 116000 Mol-1cm-1 |
| Lunghezza Cammino Ottico | l | 1 cm |

-Clacolo effettivo:

Dall’equazione A = εCfl otteniamo Cf = 5,27 μM (Concentrazione della Rodamina nella soluzione diluita);

Dall’equazione CiVi = CfVf otteniamo Ci = 218 μM (Concentrazione dello Stock di Rodamina di partenza).