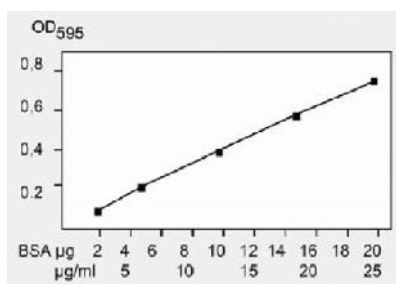


### 3.GAIA:UM-IKUSGAIA. XURGAPEN ESPEKTROSKOPIA

1. Sarrera
2. Oinarria
  - Xurgapena eta Transmittantzia
  - Lambert-Beer legea
3. Instrumentazioa
4. Laginaren prestaketa
5. Kromoforo naturalak
6. Xurgapenean eragiten dute faktoreak
7. Aplikazioak

#### 1. Sarrera

**Bradford metodoa:** Proteinen tintzioa egiten da coomassie urdinarekin. Honek pH-aren arabera, bere xurgapen maximoa uhin-luzera desberdinetan du. Hain zuzen ere, pH azidotan dagoenean, kolore marroixka du; proteinekin elkartzean aldiz (eraztun aromatikodunekin) beste uhin luzera batean xurgatzen du. 595 nm-tan xurgapena neurtuz gero, proteina kontzentrazioa kalkulatu daiteke, izan ere, absorbantzia linealki proportzionala da proteinen kontzentrazioarekiko. Kontzentrazio hauek ondorioztatu ahal izateko, aldeztu aurretik zuzen patroia bat egiten da kontzentrazio jakinako seroalbumina (BSA) laginak erabiliz.

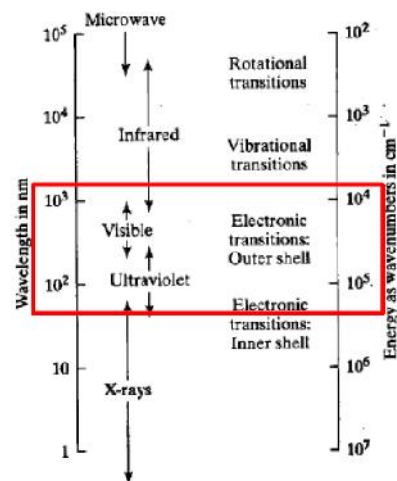
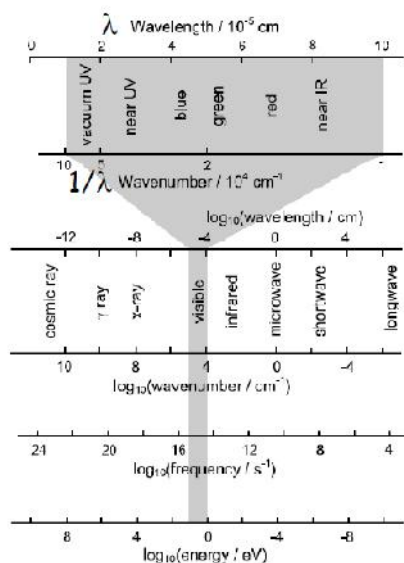


Xurgapen espektroskopia desberdinak daude, baina gu UM-ikusgaian zentratuko gara.

Table E1.1. Absorption spectroscopies

$\lambda$ (m)	$\nu$ (Hz s <sup>-1</sup> )	$E$ (kJ mole <sup>-1</sup> )	Method
$\sim 3$	$\sim 10^9$	$\sim 10^{-4}$	Radio-frequency NMR
$\sim 0.1-0.01$	$\sim 10^9-10^{10}$	$\sim 10^{-1}-10^{-2}$	Microwave rotational and EPR spectroscopy
$\sim 10^{-4}-10^{-5}$	$\sim 10^{12}-10^{13}$	$\sim 1-10$	IR vibrational spectroscopy
$\sim 8 \times 10^{-7}-4 \times 10^{-7}$	$\sim 5 \times 10^{14}-10^{15}$	$\sim 200$	Visible electronic spectroscopy
$\sim 10^{-7}$	$\sim 4 \times 10^{15}$	$\sim 10^3$	UV electronic spectroscopy
$\sim 10^{-10}$	$\sim 10^{18}$	$\sim 10^6$	X-ray absorption electronic spectroscopy
$\sim 10^{-13}$	$\sim 10^{21}$	$\sim 10^9$	$\gamma$ -ray Mössbauer spectroscopy

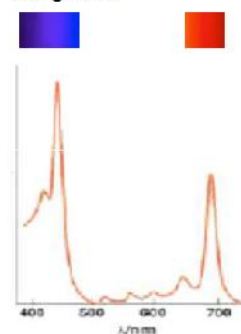
*Methods in Molecular Biophysics*, I. N. Serdyuk, N. R. Zaccai & J. Zaccai, Cambridge University Press, 2007



### UM/IK espektroen adibideak:

-Klorofilaren xurgapen espektroa: klorofila landareetako pigmentu naturala da, kolore berdekoa. Erradiazio jarrai bat igorritz gero, klorofilak erradiazio elektromagnetikoaren bi uhin-luzera tartetan xurgatzen duela ikus daiteke. Lortutako espektroan bi xurgapen-banda agertuko dira, gorria bata (600-700 nm) eta urdinean bestea. Beraz, argi gorria eta urdina xurgatzen ditu, baina argi berdea ez, hau transmititu egiten du. Gure begiek transmititutako argi berdean ikusten dutenez, guretzat klorofilak kolore berdea du.

Xurgatuta

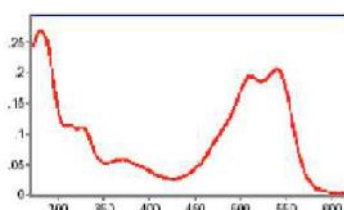


Transmititua



-Tindatzaile gorri baten xurgapen espektroa: Pigmentu gorri batek xurgatzen duen erradiazioa aztertzen dugunean, argi urdina eta berdea xurgatzen dituela ikusiko dugu, eta gorria transmititzen duela (ez du xurgatzen). Begiek islatutako argi gorria ikusten dute.

Xurgatuta



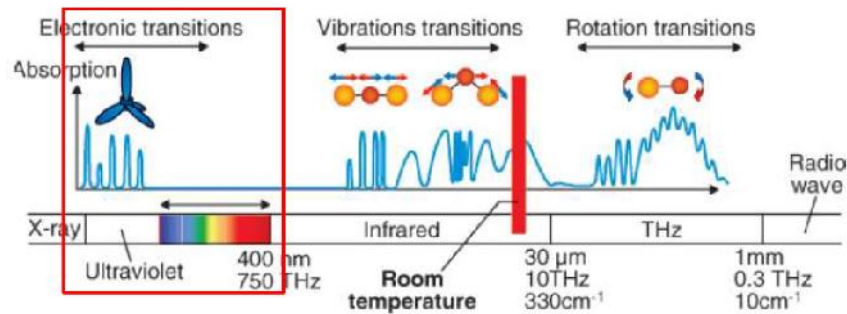
Transmititua



## 2. Oinarriak

UM/ ikuskorra:

- Trantsizio elektronikoak: maila energetiko desberdineko orbital atomiko/molekular artean ematen dira. Gehienbat trantsizio elektronikoak aztertuko ditugu, izan ere, biomolekula batzuei ezaugarri bereizgarriak ematen dizkie.



$n \rightarrow \pi^*$  eta  $\pi \rightarrow \pi^*$  trantsizioak:

Konposatu organikoaren xurgapen banda gehienak trantsizio hauek direla eta lortzen dira.  $200 < \lambda < 700$  nm-tako uhin luzeera tartean eta bi trantsizioak lotura bikoitzak edo hirukoitzak dauzkaten konposatuetan ematen dira ( $\pi$  orbitalak).

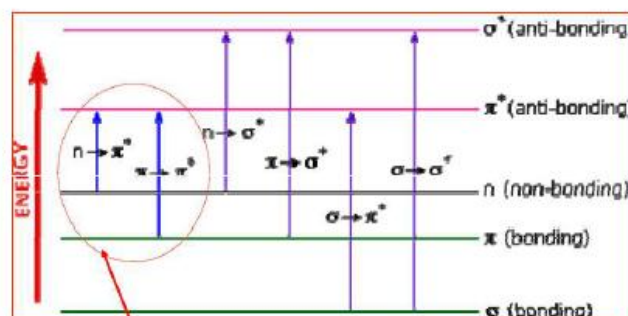
Bi trantsizio hauek zenbait berdintasun badituzte ere, desberdintasunak ere badituzte:

- $n \rightarrow \pi^*$   $\epsilon$  baxua dute ( $10\text{-}100 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ )
- $\pi \rightarrow \pi^*$   $\epsilon$  altua dute ( $100\text{-}1000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ )

Disolbatzailearen polaritateak xurgapen banden kokapena eta intentsitatea aldatu dezake.

UM /ikuskorra ezaugarriak:

- Banda zabalak lortzen dira
- Neurketa oso sentikorrak dira. Ondorioz, analisi kualitatibo eta kuantitatiboak egiteko aukera ematen digu.
- Xurgapen ( $a$ ) edo transmitantzia neurketak ( $T$ ) egiten dira (emaitzak  $Y$  ardatzean adierazten direlarik). Hauek kontzentrazio eta konjugazioaren menpekoak dira.
- $\Pi$  motako sistemai buruzko informazio ematen digu.

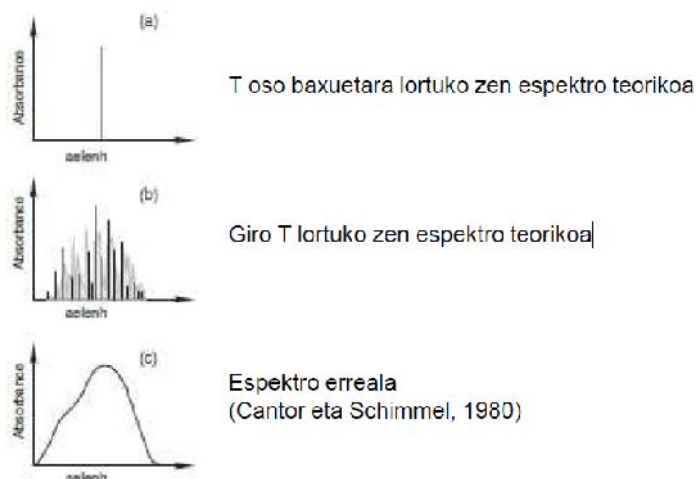


De HOMO (Highest occupied molecular orbital) A LUMO (Lowest unoccupied molecular orbital)

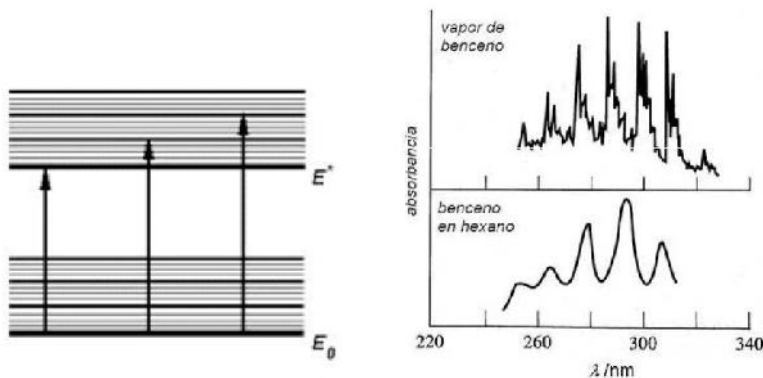
## Banden Zabalerak:

Frank Condon-en printzipioaren arabera, trantsizio elektronikoak hurrengo maila elektronikoko maila bibrazional desberdinetara eman daitezke. Ondorioz, jauziak energia aldaketa desberdina izango du. Hau horrela, ez dugu trantsizio bakar bat ikusiko aukera desberdinak baizik (energia aldaketa desberdintasuna dela eta, uhin-luzera ere pixka bat aldatu egiten delako). Espektroskopia mota honetan ez da banda bakarrik azalduko.

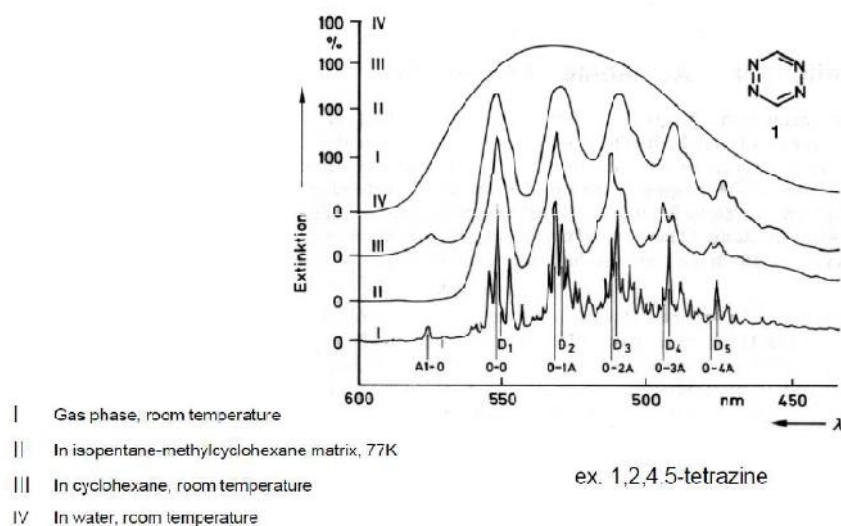
Tenperaturak ere eragina du banden zabaleran, partikulen distribuzioa aldatzen baitu. Bestalde, sistemak disolbatzailearekin elkarrekintzak izaten dituela ere kontuan hartu behar da. Adibidea: Espektro erreala dira baina baldintza desberdinetan.



- Banda bakoitzaren **intensitatea** probabilitate kuantikoarekiko proportzionala da.
- Banden zabalerak aldiz, molekulen  
arteko elkarrekintzen araberakoa da.



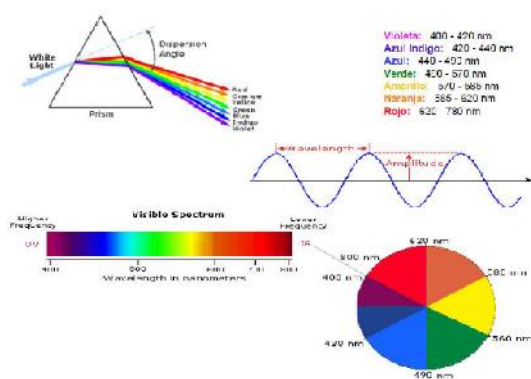
Emaitzei alderatuz, gas fasean egindako neurketek erresoluzio handiagoa dutela esan daiteke, eta txikitu egiten dela neurketa berdinak matrizean, ziklohexano disoluzioan, edo uretan eginez gero. Beste modu batera esanda, erresoluzioa pixkanaka jaitsiz doa, ingurune baldintzak aldatu ahala.



### Molekula baten kolorea vs xurgatzen duen argiaren kolorea:

Ikusten dugun substantzia baten kolorea, substantziak transmititutako argia da, ez xurgatutakoa.

Absorbed Light		Observed (transmitted) color
Wavelength nm	Corresponding color	
400	violet	yellow-green
425	indigo blue	yellow
450	blue	orange
490	blue-green	red
510	green	purple
530	yellow-green	violet
550	yellow	indigo blue
590	orange	blue
640	red	blue-green
730	purple	green



### Kromoforoak:

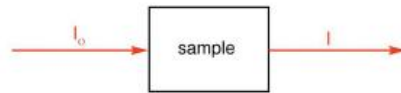
UM-ikusgaiko xurgapenaren erantzule den molekula atala da. Orokorrean, kromoforo arruntenek  $C=C$  ( $\pi \rightarrow \pi^*$ ) eta  $C=O$  ( $n \rightarrow \pi^*$ ) loturak dituzte.



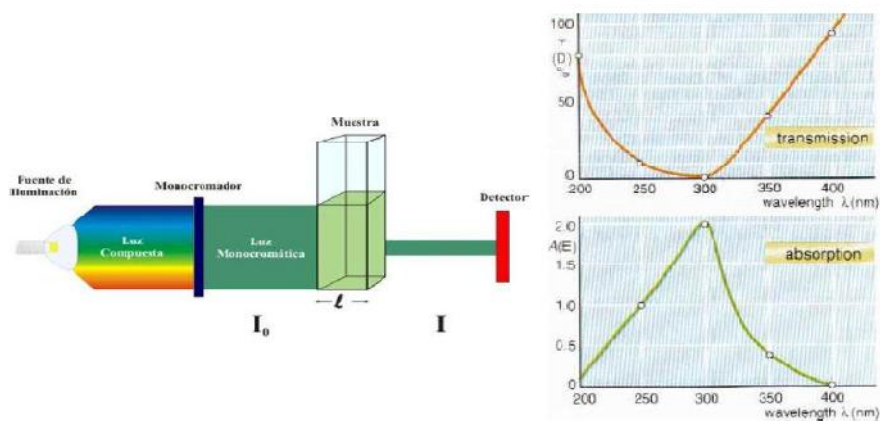
$$A = -\log T = \log \frac{I_0}{I}$$

$I_0$  = intensity of the light entering the sample

$I$  = intensity of the light leaving the sample



Espekto jarrai bat igortzeko gai den argi iturria jartzen da, eta gure intereseko argi monokromatikoa aukeratuko dugu (uhin luzera bakarrekoa). Horrekin gure lagina irradiatu, eta transmititutako intentsitatea neurtuko da. Xurgapen eta transmitantziak kontrako joera dute, baina ez dira guztiz bata bestearen ispilu irudia.



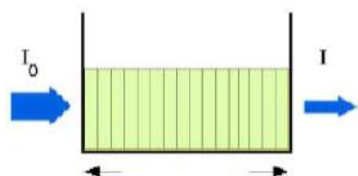
### Lambert-Beer legea:

Argiaren xurgapena zeharkatzen duen materiaren propietateekin erlazionatzen du.

#### 1. Lambert-en legea:

“Medio batek xurgatzen duen argiaren frakzioa, argi intzidentearen ( $I_0$ ) intentsitatearekiko independentea da; eta medioaren geruza bakoitzak, zeharkatzen duen argiaren frakzio berdina xurgatzen du”.

Beste modu batera esanda, laginaren luzera geruza desberdinetan zatituz gero, geruza bakoitzak modu berean xurgatuko du argi hori. Xurgapenaren eta luzeraren arteko erlazioa medioaren araberakoa da.



$I_0$ : argi intzidentea  
 $I$ : transmititutako argia  
 $l$ : luzeera  
 $k$ : medioaren konstantea

$$\log \frac{I_0}{I} = kl$$

#### 2. Beer-en legea:

Medio garden batek xurgatzen duen argi kantitatea, argiak zeharkatzen dituen kromoforo molekula kopuruarekiko proportzionala da.



$k \rightarrow [ ]$  zuzenki proportzionalak

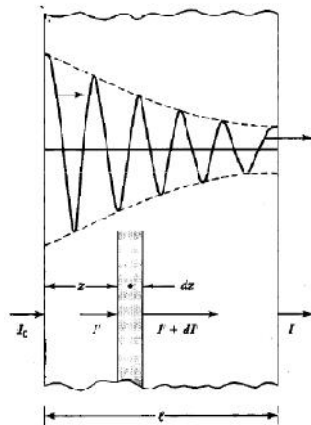
$$k = \epsilon c$$

Bi legeak konbinatuz:

**Lambert-Beer legea**

$\epsilon$ : xurgapen koefiziente molarra  
 $c$ : kromoforoaren kontzentrazioa  
 $l$ : luzera optikoa

$$A = \log \frac{I_0}{I} = \epsilon c l$$



*Beer-Lambert Law:*

Intensity of a monochromatic radiation that passes an absorbing substance decreases exponentially.

$$\frac{dI}{I} = -\epsilon c dl$$

$$\int_{I_0}^I \frac{dI}{I} = \int_0^l -\epsilon c dl$$

$$\ln \frac{I}{I_0} = -\epsilon c l$$

$$-\log \frac{I_0}{I} = -\log T = 2.303 \cdot \epsilon c l$$

$$A = \epsilon c l$$

- **A: absorbantzia**, argi intzidentearekin konparatuz ( $I_0$ ), laginetik ateratzen den argiaren murrizketa.

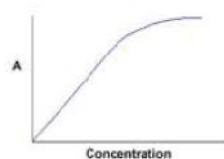
$$A = \log I_0/I.$$

- **$\epsilon$  xurgapen koefiziente molarra** (molekula baten xurgapena  $\lambda$  konkretu batean). Kromoforo motaren arabera da ( $M^{-1}cm^{-1}$ ).
- **C:** kromoforoaren kontzentrazioa laginean (M).
- **l:** paso optikoaren luzera (cm).

$$A = \epsilon c l$$

Legeak **muga** batzuk ditu:

1. Legearen muga errealak: kontzentrazio muga da, xurgapena eta kromoforoaren kontzentrazioa linealki proportzionalak dira kontzentrazio tarte batean. Kontzentrazio oso altuetan ( $c > 0,01$  M) linealtasuna galtzen da. Horregatik, lehenago guk aztertu nahi dugun tartean linealtasuna mantentzen den jakin beharko da.

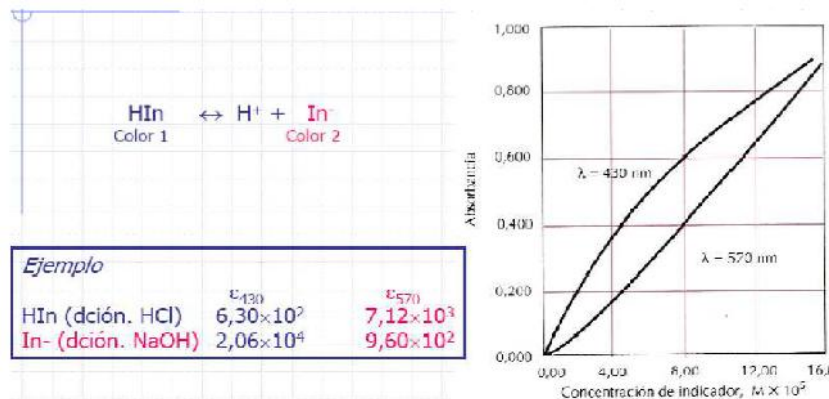




## 2. Mugapen kimikoak:

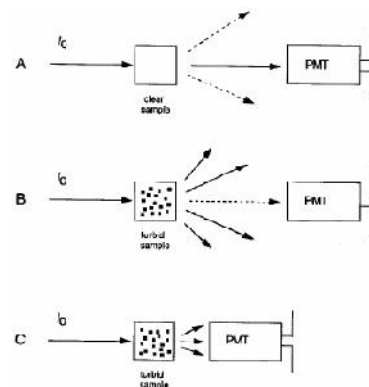
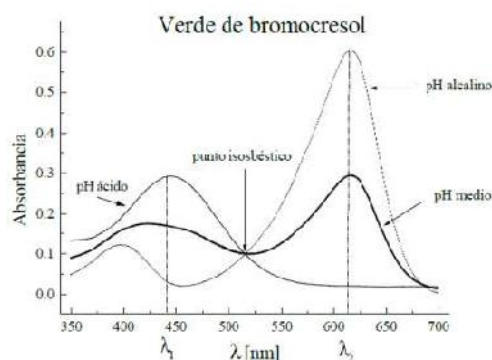
- Aztergai den kromoforoa disoziatzen denean, produktuak xurgapen propietate desberdinak eskuratzen ditu.
- Kromoforoa dimerizatu edo oligomerizatzen denean.

Adibidez, molekula protonatuta edo protonatu gabe badago, absorbantzia maximoa uhin-luzera desberdinetan izango du. Ondorioz, ez dira linealki proportzionalak, disoziatzen ari delako.



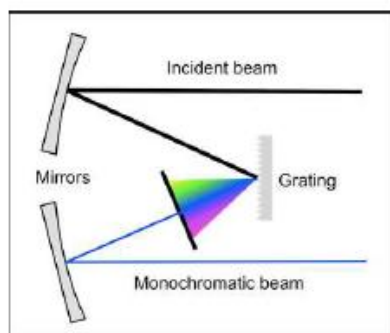
- Argiaren dispertsioa gerta daiteke: lagina ez bada gardena, dispertsioa gertatu (norabide desberdinetan hedatu) eta detektorean jasotako argia igorritakoaren zati bat baino ez da izango.
- Fluoreszentzia edo fosforeszentzia badago, neurtutako xurgapenean aldaketa bat eragin dezake.
- pH aldaketak ere garrantzitsuak dira, kromoforoek ezaugarri espektroskopiko desberdinak baitituzte.

Horrelakoetan, puntu isobestikoa bilatzen da, uhin-luzera horretan, edozein pHtan gaudela ere xurgapenaren eta kontzentrazioaren artean proportzionaltasuna mantenduko da.



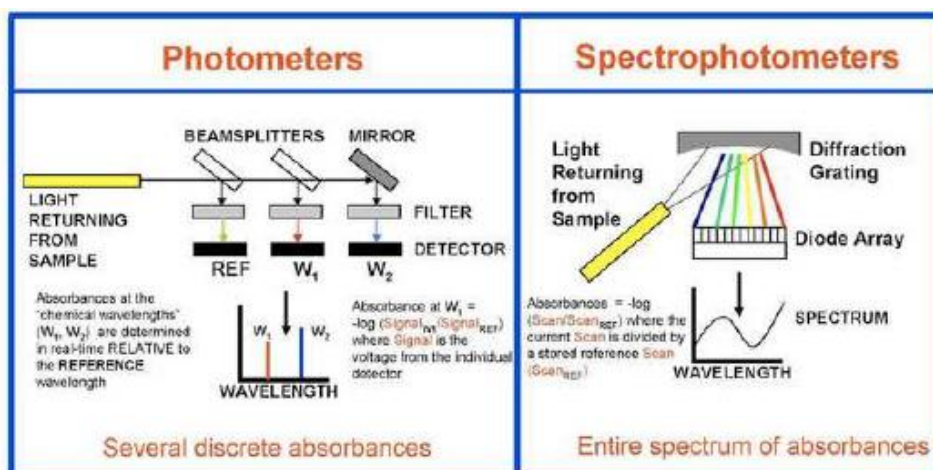
**Figure 2:** Properties of ideal turbidimeter and spectrophotometers. For a clear sample, the position of the detector (PMT, photomultiplier tube) is unimportant (A). If a turbid sample is examined in a spectrophotometer where the PMT is far removed from the cuvette (B), the instrument will behave as a sensitive turbidimeter because it will detect little of the scattered light. If a turbid sample is examined in a spectrophotometer where the PMT is close to the cuvette (C), the instrument will detect absorbance even though much of the light is scattered.

3. Mugapen instrumentalak: instrumentuak ez dira perfektuak. Lambert-Beer legea betetzeko, erradiazio monokromatikoa (uhin luzera bakarra) erabili behar da eta hori lortzeko, filtro eta monokromadoreak ondo funtzionatu behar dute. Hala ez bada, beste erradiazio batzuk izan ditzakegu, xurgapenaren balioan eragina izango dutelarik.



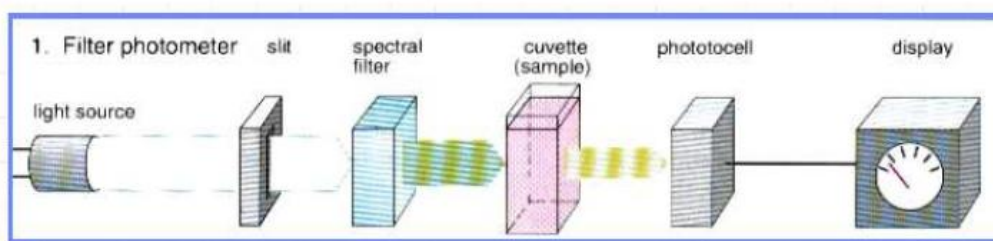
### 3. Instrumentazioa:

Bi motatako instrumentuak bereizten dira: fotometroak eta espektrofotometroak.

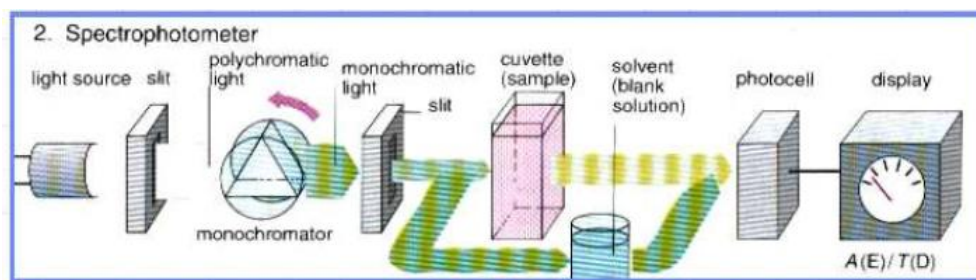


- |   |  |
|---|--|
| <ul style="list-style-type: none"> <li>• <math>\lambda</math> aukeratzeko iragazkiak.</li> <li>• Ikusgairako</li> <li>• Merkeak</li> <li>• Ezin dira xurgapen espektroak lortu</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>• <math>\lambda</math> aukeratzeko monokromadoreak</li> <li>• UM/ikusgai eta Infragorrian</li> <li>• Izpi bakar edo bikoitza</li> <li>• Xurgapen espektroak lortu daitezke</li> </ul> |
|---|--|

Fotometroan, argi iturri bat egoten da, arrailadura, filtro edo iragazkia, lagina eta detektorea egongo dira.

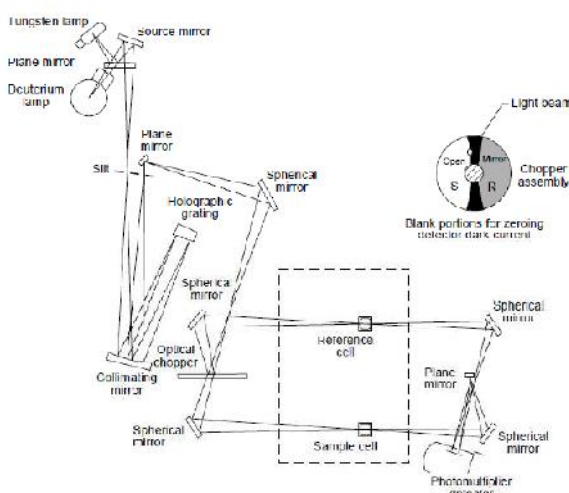
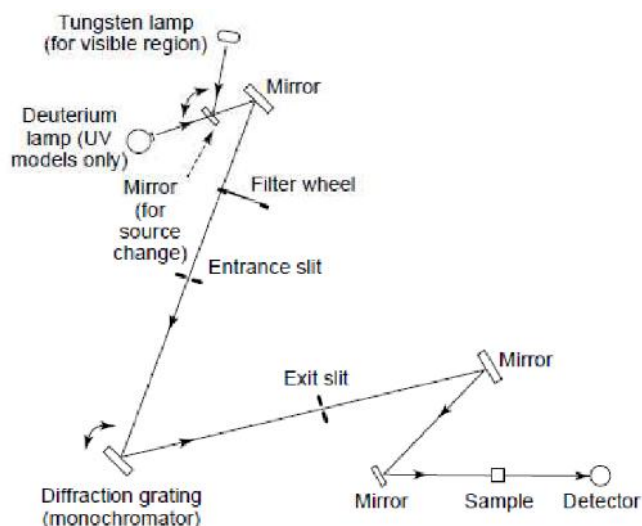


Espektrofotometroan aldiz, argi iturria, arrailadura, monokromadorea, laginak (baita erreferentziako lagina ere), eta detektorea.



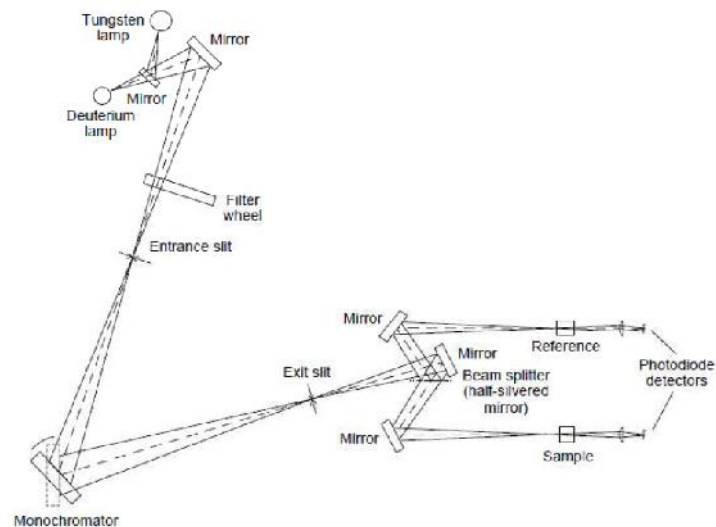
Izpi bakarreako edo izpi bikoitzekoa izan daiteke. Izpi bikoitzekoa den kasuetan, detektagailu bakarra edo bikoitza izan dezake. Gainera, izpi bikoitzeko espektrofotometroak erabiliz gero, lagina eta erreferentzia aldi berean irakurtzen dira eta erreferentziaren seinalea laginari kentzen zaio.

**Izpi bakarra:** argi iturria (bat baino gehiago) dago eta argi hori monokromadoretik pasako da intereseko erradiazioa lortzeko. Ispilu bidez gure laginera heldu eta ondoren detektagailura joango da bertan detektatu ahal izateko.



**Izpi bikoitza eta detektagailu bakarra:** argi iturritik argia monokromadorera pasako da eta ispilu bidez puntu jakin batetara. Bertan izpia 2-tan banatzen da (berdinak), bat erreferentzia laginera joango da eta bestea gure lagina dagoen kubetara. Lagina eta erreferentzia aldi berean irakurtzen dira eta erreferentziaren seinalea laginari kentzen zaio.

## Izpi bikoiza eta detektore bikoitza



Argi iturriak jarraiak izan daitezke (tarte batean), edo etenak (uhin luzera jakin batean igorri dezake). Azken hauen adibide laserrak dira. Bata zein bestea aukeratzeko orduan argi iturria zertarako erabili behar den pentsatu beharra dago. Beti ere interesgarria izaten da aukeraturiko espektro tartean erradiazioa konstantea edo egonkorra izatea, neurketan zehar aldaketarik ez izateko.

ESPEKTROSKOPIAN ERABILITAKO ITURRIAK			
	Iturria	$\Delta\lambda$ (nm)	ESPEKTROSKOPIA MOTA
JARRAIK	Xenon Lanpara	250-600	Fluoreszentzia molekularra eta Raman
	H <sub>2</sub> eta D <sub>2</sub> lanparak	160-380	Xurgapen molekularra (UV)
	Tungstenoko lanpara	350-2200	Xurgapen molekularra (Vis./gertuko IR)
	Tungstenoko lanpara/halogenoa	240-2500	Xurgapen molekularra (UV/Vis./gertuko IR)
	Nicrom Lanpara	750-20000	Xurgapen molekularra (IR)
	Nernst Lanpara	400-20000	Xurgapen molekularra (IR)
ETENA	Iturri Globala	1200-40000	Xurgapen molekularra (IR)
	Katodo luiseko lanpara	UV-Vis.	Xurgapen eta fluoreszentzia atomikoa
	Elektrodo gabeko deskarga lanpara	UV-Vis.	Xurgapen eta fluoreszentzia atomikoa
	Turrun metalikoko lanpara	UV-Vis.	Xurgapen atomikoa, Fluoreszentzia molekularra eta Raman
	LASER lanpara	UV-Vis.-IR	Xurgapen molekularra, Fluoreszentzia molekularra eta Raman

### 3.1 Lanpara

- Argi ultramoreko espektroak egiteko lanpara arruntenak deuterio edo hidrogeno lanparak dira. Hala ere, hauek zenbait desabantaila izan ditzakete: beroa... Ultramore-ikusgaiko espektroak egiteko aldiz, espektrofotometroek tungsteno edo tungsteno/halogeno lanparak dituzte.

Deuterio edo Hidrogeno  
lanpara



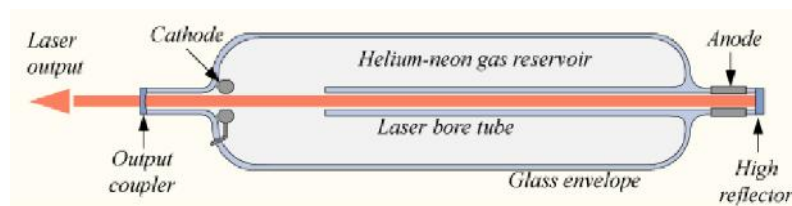
Ultra Morea: 160-380nm

Tungsteno, tungsteno/halogeno  
lanparak

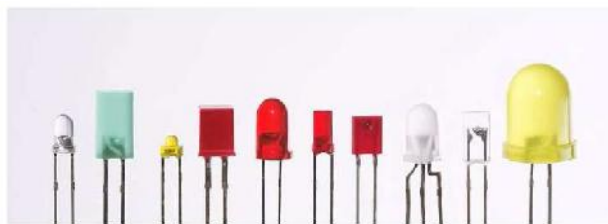


Ultra More/ikusgaia:  
240-2500nm

- Intentsitate altuko iturri monokromatikoak: erradiazio eteneko lanparetan ohikoenak laserrak dira. Laserretik irtendako fotoi guztiek uhin luzera berdina dute. Laser batek ez digu xurgapen espektroa egiteko balio, baina beste aplikazio batzuetarako oso erabilgarria da, mikroskopia konfokalean esaterako laserrak erabiltzen dira.



- LED-ak , argia igortzen duten Diodoak: etenen barnean kokatzen dira eta nahiko ohikoak izaten dira. Horrez gain merkeak dira eta kolore ezberdinetakoak izan daitezke. Hau horrela, LED lanpara desberdinak erabiliz, espektro osoak lor ditzakegu (espektroak eraiki daitezke uhin-luzera desberdineko argi eteneko lanpara desberdinak erabiliz). Laserrak baino intentsitate gutxiago izaten dute eta bizi denbora luzea.



### 3.2 Argi hautatzaileak

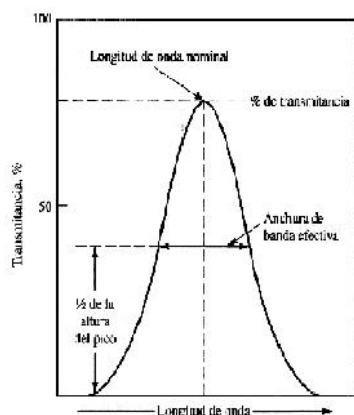
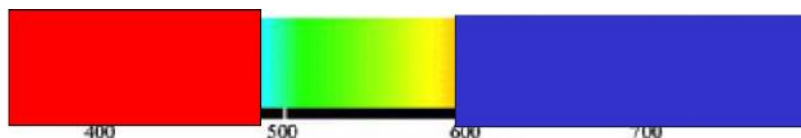
- Iragazkiak:

Fotometroetan argia hautatzeko iragazkiak erabiltzen dira, eta espektrofotometroentzat zein fluorimetroentzat ere balio du. Argi hautatzaile moduan edo hautatzaile hauen osagarri moduan erabili daitezke.

Espektroaren banda batetarako %100 transmitantzia dute. Hala ere, balio hau ideala da, ez da errealia.

Beheko irudian urdin argia-berdea-horia ikusten den tartean transmitantzia altua duela joko dugu. Banda horretatik kanpo geratzen dena xugatu egiten du eta soilik erdiko zatian dauden koloreak pasatzen uzten ditu, banda horretan soilik dagoena erradiatuz. Beraz banda horretatik gora eta beheko guztia xurgatzen dute.



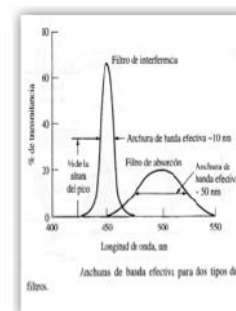


Transmitantzia maximoa lortzeko behar den uhin luzera ematen da grafikoan, eta baita zein den bandaren zabalera (banda efektiboa): altuera maximoaren erdian bandak duen zabalera da. Beraz iragazki bat erosterakoan transmitantzia maximoa lortzeko behar den uhin luzera eta banda efektiboaren zabalaren datuak eman behar dizkigute.

Bi motetakoak izan daitezke: xurgapenekoak (ikusgaia) eta interferentziazkoak (UM-ikusgaia eta IR).



Interferentziazko iragazkiak dielektriko garden baten eraikitzen dira  $\text{CaF}_2$  edo  $\text{MgF}_2$ . Gatz hauek ezaugarri dielektrikoak dituzte eta horregatik, espektroaren banda bakarra transmititzen dute gainerakoa xurgatuz. Transmititzen uzten duten bandaren zabalera efektiboa estuagoa eta transmitantzia hobea izango dute, eta beraz aproposagoak.



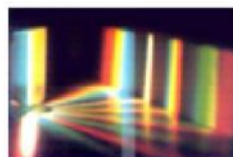
- Monokromadoreak: elementu dispersatzaileak

Prisma eta difrakzio sareak daude talde honen barnean eta 2 elementu hauek dispersioa sortzen duten elementuak dira, uhin luzera konkretu bat aukeratzeko erabiltzen dira.

#### Prisma

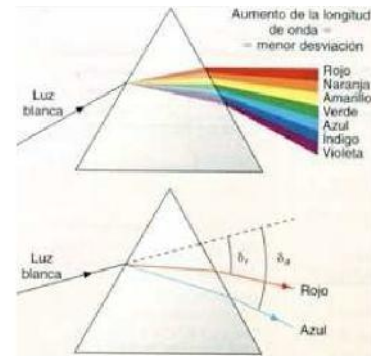


#### Difrakzio Sareak

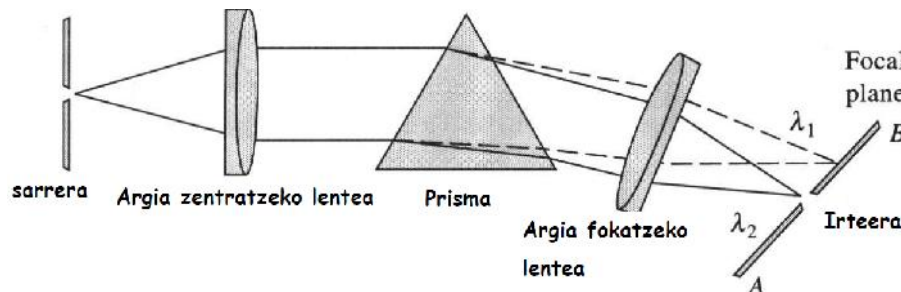


**Prisma:** erradiazioa sarrerako arrailadura batetik pasatzen da, eta honek argia lente batetik modu egokian pasaraztea eragiten du (argia zentratzeko lentea). Honek erradiazioa modu egokian kokatzen du prismara iristeko.

Prismak duen ezaugarria ondorengoa da: bertara iristen den argia errefrakzio-indizearen arabera dispersatu egiten da (errefrakzio-indizea erradiazioaren uhin luzeraren arabera da). Argi izpi zuri hori uhin-luzera ezberdinetako erradiazio ezberdinetan banatzen da. 2 aldiz gertatzen den fenomeno da, prismen sartzen eta irteten denean. Aipatu moduan, norabidearen angelua uhin luzeraren arabera da.

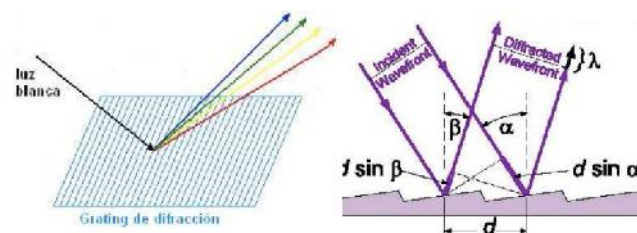


Prismatik irtendako izpia beste lente batetik pasako da eta honek argia irteerako arrailaduran fokatuko du (jada banatuta dagoena), nolabait lenteari esker gure intereseko argia arrailaduratik pasatzea lortzen da.



**Difrakzio Sarea:** argiaren difrakzioa burutzen da baina kasu honetan prisma bat izan beharrean sare itxura duen metalezko gainazal bat erabiltzen da. Gainazal horretan modu periodiko batean kokka edo hertz batzuk daude eta argia hertz hauetara iristean, uhin luzeraren arabera dispersatzen da. Beraz, sare honetara argi zuria iristean, berriz ere difrakzioa gertatu eta argi hori uhin luzeraren arabera banatzea lortzen da. Distantziaren arabera difrakzio era batera edo bestera gertatuko da.

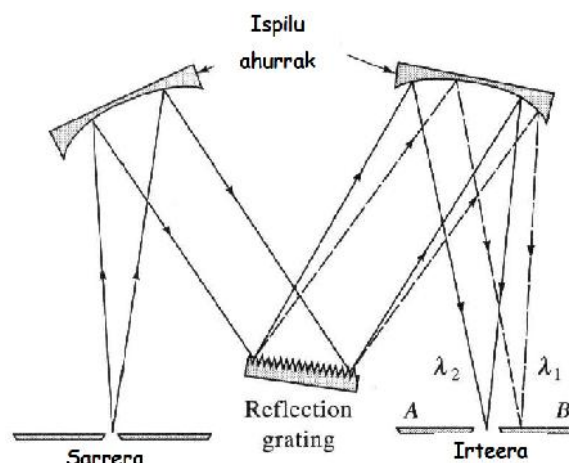
Honen adibide dira CD eta DVDen atzealdea. Bertan patroia periodiko batzuk irudikatuta datoz, espiralak direnak, eta argia difraktatu egiten da, erradiazioak bereizita ikusiz.



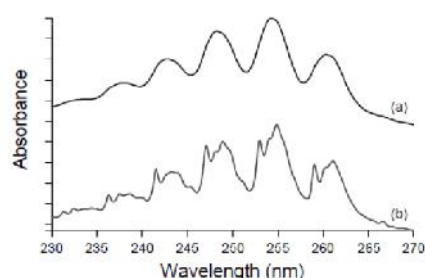
Erradiazioa sarrera arrailaduratik ispilatu ahurren difrakzio sarrera iristen da eta bertatik argi zuria uhin luzera ezberdinetan banatzen da. Bigarren ispiluari esker, izpiak berriz islatu eta irteerako arrailaduratik pasako dira, gure intereseko uhin luzera duen erradiazioa soilik irteten delarik. Lenteak beharrean askotan ispilatuak ditugu.

Arrailadura edo arrakalaren zabalera erregulatu daiteke, zenbat eta estuagoa izan orduan lortuko dugu gure uhin luzera zehatzagoa izango da, baina aldi berean fotoi gutxiago irtengo dira. Beraz, arrailaduraren zabalarekin joka dezakegu behatu nahi dugunaren arabera.

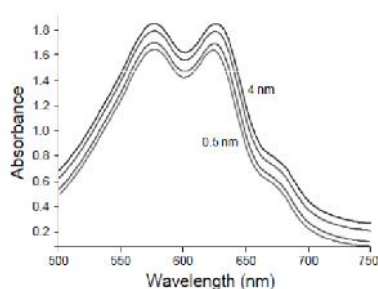




Zarata dagoen kasuetan, arrailadura horren zabalera estutzea komeni izaten da. Izan ere, grafikoan ikus daitekeen moduan, arrailaduraren zabalera 2nm-takoa denen (a) lerroa lortuko genuke. Aldiz, lagin berdinean zarataren interferentzia kentzean, zabalera estutuz 0,5nm-tara laginaren espektrora hobea lortzen da (b)



Slit-aren zabalaren arabera enpresoluzioa banda estututa lagin batetan (lagina bentzena gasa) (a) zabalera 2 nm, (b) zabalera 0,5 nm.



Zabalera ezberdinen efektua banda zabalera laginaren kasuan (efektua ez)

lerroa.

Beste kasu batzuetan aldiz, arrailaduraren zabalera aldatu arren, espektrora ia ez du aldaketarik jasaten.

Aipatzekoa da xurgapenaren neurketa instrumentuaren arabera aldatzen dela taulan ikus daitekeen bezala. Izan ere, monokromadoreak ez dira idealak eta beti daude errore txiki batzuk. Errore hauek handiagoak edo txikiagoak izango dira espektrofotometroaren arabera.

**Table 1** Observed absorbance readings for three different instrument stray light specifications

True absorbance	1% $T$ stray light <sup>a</sup>	0.01% $T$ stray light <sup>b</sup>	0.0001% $T$ stray light <sup>c</sup>
1.0	0.9788	0.9996	1.0000
2.0	1.8239	1.9957	2.0000
3.0	2.2218	2.9586	3.0000
4.0	2.2924	3.6999	3.9957
5.0	2.3009	3.9586	4.9586

<sup>a</sup> Low-cost or old instrument.

<sup>b</sup> High-performance double-beam instrument.

<sup>c</sup> "Top of the range" double-monochromator, double-beam instrument.

Lehenengo zutabean, benetako balioak agertzen dira; bigarrenetan, merkea eta zaharra den instrumentuarekin lorturikoak; hirugarrenetan, hobe den instrumentuarekin lortutakoak; eta azkenekoan, merkatuan dagoen onenarekin lortutakoak.

Ehunekotan agertzen dena argi galduaren proportzioa da.

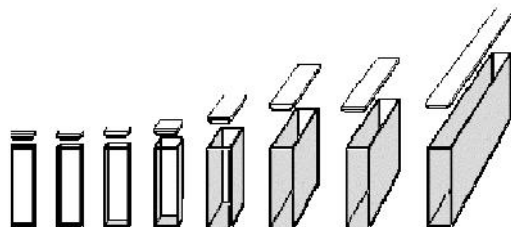
Xurgapen altuenekoa (5.0) neurtzen den kasuetan, instrumentu merkea erabiltzerakoan lortzen den balioa benetakorenaren erdia baino gutxiago dela ikus daiteke. Galdutako argi kopurua handia da eta beraz errorea handiagoa da. Aldiz, benetako balioak txikiagoak direnean, instrumentu honekin neurtutako balioak benetakotik hurbilago daude. Beraz, kontutan izan behar dugu erroreak egon daitezkeela eta erabiltzen ari garen instrumentuaren limiteak ezagutu behar dira; puntu batetik gora neurketak ez baitira fidagarriak. Horregatik, xurgapena 2-koa baino altuagoa denean, lagina diluitzea komeni izaten da.

### 3.3 Kubetak

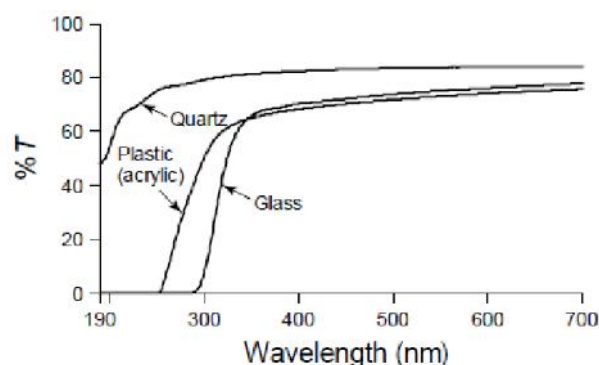
- Plastikozkoak, beirazkoak eta kuartzozkoak:

Plastikoa eta beira espektro ikusgaian erabiltzen dira (350–2000nm), arruntenak eta merkeenak dira. Beira normalean disolbatzaile organikoekin erabiltzen da, izan ere, kasu hauetan ezin dira plastikozkoak erabili. Kuartzoa espektro UM-an erabiltzen da (350nm-tatik behera), garestiagoa da.

Kubetaren tamaina ere ezberdina izan daiteke (0.1–10cm). Paso optikoaren distantzia zenbat eta luzeagoa izan, xurgapena orduan eta handiagoa izango da.



Kubeta ezberdinetatik zenbateko erradiazioa transmititzen den adierazten da ondorengo grafikoan. Uhin luzera nahiko handietan 3 materialek nahiko transmitantzia ona dute, 350nm-tara arte mantendu egiten da. Hortik behera, plastikoa edo beira erabiliz gero, transmitantzia jaitsi egiten da, materiala laginarekin batera xurgatzen ari delako. Errorea ekiditeko kuartzozkoak erabiltzen dira 200 nm inguru arte transmitantzia ona baitute. Hala ere, azken hauek oso garestiak dira eta horregatik ez dira beti erabiltzen.



Kubeten forma ere ezberdina izan daiteke. Bolumena zein denaren arabera, esaterako lagin gutxi dugunean, forma jakineko kubeta batzuk bolumen txikiko laginak neurtzea ahalbideratzen dute (A kubeta). Beste zenbait azpialdetik zabalagoak izaten dira, bertan euli bat sartu eta irabiatu ahal izateko, lagina

homogeneo mantentzeko. Kubetaren paretak beltzak izaten dira, argia soilik gure laginetik pasatzeko.

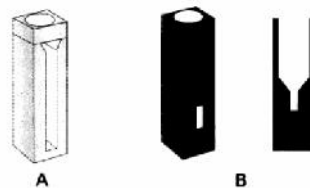


Figure 7-5. Typical absorbance cuvettes.  
(A) Semi-microcuvette. (B) Microcuvette (volume ca. 90  $\mu$ l) constructed with blackened quartz cell walls.

Beste kubeta berezi batzuek 1 $\mu$ l-tako laginen xurgapena neurtzeko aukera ematen dute. Tanta bat jarri DNA, proteinak... bolumen txikiak kuantifikatzeko gai da. Tanta horretara argia erradiatzen da, kontzentrazioak determinatzeko.

Zer neurtu nahi dugunaren arabera beraz, kubeta bat ala beste aukeratuko da.



**TrayCell  
Hellma**

Ventajas:  
-Mide de 0,5 a 7,0  $\mu$ L.  
-concentraciones de dsDNA entre 2 ng/ $\mu$ l y 5.000 ng/ $\mu$ l.



<http://www.traycell.com/>

### 3.4 Detektagailua

Irradiatze-energia seinale elektriko bihurtzen du, ondoren prozesagailu batek guri balio horiek interpretatu eta espektratu moduan emateko. Detektagailu hauek 2 motakoak izan daitezke, fotonikoak eta termikoak.

- Fotonikoak:

Erradiazioaren fotoiak azalera batekin elkarrekiten dute eta ondorioz, elektroiak igorri (fotoigorpena) edo elektroiak kitzikatu eta korrontea sortu (fotoeroapena) daiteke. Detektagailu hauek argi UM/ikuskorrarekin ari garenean erabiltzen dira.

- Termikoak:

Azalera beltz txiki bat erradiazioa xurgatzerakoan berotu egiten da eta hori izango da seinalea, ondoren jasoko duguna. Detektagailu hauek argi infragorriarekin ari garenean erabiltzen dira eta ohikoenak termopareak izaten dira.

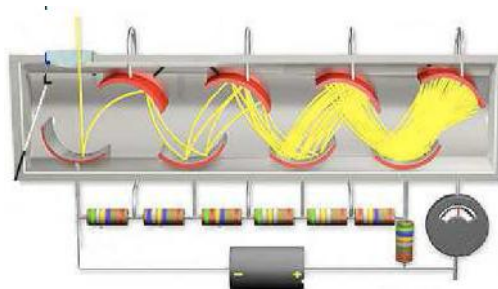
DETEKTAGAILUAK		
	MOTA	$\Delta\lambda$ (nm)
FOTONIKOAK	Fotohodi	150-1000
	Hodi Fotobiderkatzailea	150-1000
	Siliziozko fotodiodoa	350-1100
	Fotoeroaleak	750-3000
	Zelula fotovoltaiko	370-780
TERMIKOAK	Termopareak	600-20000
	Bolometroa	600-20000
	Zelda pneumatikoa	600-40000
	Zelda piroelektrikoa	1000-20000

Jarraian adibide batzuk aztertuko dira:

- Hodi fotobiderkatzailea:

Oso erabilera zabala du seinalea anplifikatzeko gaitasuna duelako.

Hodi bat dago barnean hutsunea duena, eta bertan eremu elektriko bat sortuko duen katodo bat kokatzen da. Erradiazioaren fotoiak iristen direnean, elektroiak askatu eta eremu elektrikoan azeleratzen joango dira (gogoratu katodoak sortzen duela eremu elektriko hau). Elektroiei horiek pixkanaka dinodo plakekin talkak egiten joango dira eta talka bakoitzaren ondorioz elektroiei gehiago askatzen dira, seinalea anplifikatuz. Zenbat eta dinodo gehiago izan, orduan eta anplifikazio handiagoa lortzen da. Gure seinalea ahula den kasuetan oso detektagailu erabilgarria da, izan ere, prozesu berdina 6-14 aldiz errepikatzen bada, seinalea  $10^6$ - $10^8$  aldiz anplifikatzen da.

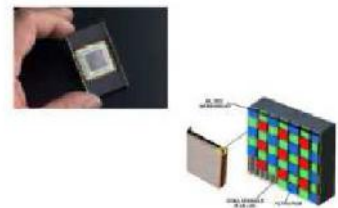


- Karga akoplatuen gailua:

Ez da hain erabilia espektrofotometroetan baina bata bestearen ondoan kokatuta dauden kondentsadore sareetan oinarritzen da, zirkuitu integratu bat da elkarrekin komunikatuta dauden kondentsadoreekin.

2 dimentsiotan kokapen zehatza dute eta fotoien intentsitatearen informazioa gordetzeko gaitasuna dute. Plaka hauek 2 dimentsiotan irudiak osatzeko aukera ematen digute, kondentsadore bakoitzaren kokapena eta bakoitzak jasotako intentsitatea ezaguna baita. Beraz, fotoiaren informazioaz gain, espazioaren inguruko informazioa ere jasotzen da; argazki- zein bideo-kamerek honelako detektagailuak izaten dituzte.

DISPOSITIVO DE ACOPLAMIENTO DE CARGA (CCD)



- Fotodiodoak:



Korronte elektrikoa sortzen da fotodiodoaren material erdieroaleagatik (Si, Ge...). 2 plaka beste material batzuekin kargatzen dira, soberazko elektroiekin (N) edo hutsuneekin (P). Elektroiak soberan dituztenek, azken orbitaleko elektroiak erraz askatzeko gaitasuna dute. Xaflan, elektroiak N-tik P-ra difunditzen dira eta ondorioz eremu elektrikoa sortzen da.





#### 4. Laginaren prestaketa

Neurketak egiten hasi aurretik zenbait puntu daude kontutan hartu beharrekoak:

- Disoluzioetan ezin da materia solidorik egon, bestela dispersioa ematen baita.
- Uhertasunaren neurketa egin behar da, bakterioen dentsitaterik dagoen jakiteko.
- Kubetaren azalera garbia egon behar da.
- Erreferentziarako disoluzio egokiak prestatu behar dira. Neurketak egitean beti jartzen da erreferentzia, eta ez du balio soilik disolbatzailea jartzea. Laginak duen berdina izan behar du kromoforoa izan ezik, hau da erreferentzia laginak baldintza berdinetan egon behar du.
- UMan gasek xurgatzen dute (170-200nm), eta beraz kubeta desgasifikatu behar da. Horretarako hutsunean jartzen da gasak askatu eta neurketa egokiak egiteko.
- Disolbatzaileak gardenak eta puruak izan behar dira. Askotan neurketak egiteko disolbatzaileak filtratu egiten dira, arazo partikula txikiak egon daitezkeelako eta ahalik eta purutasun handiena lortu nahi izaten delako.
- Uhin luzera ( $\lambda$ ) eta xurgapena kalibratu egin behar dira.

#### 5. Kromoforo naturalak

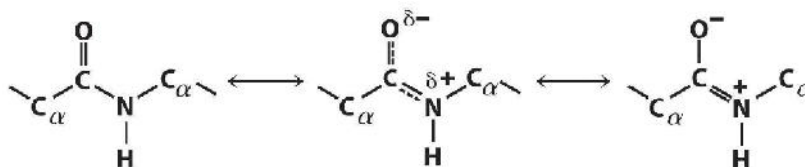
 *Aminoazidoak eta proteinak:*

Lotura peptidikoak berak xurgapena izan dezake (170-220nm), baita hainbat aminoazidoren albo kateek (aromatikoak (280nm) eta zisteina (250nm)) eta talde prostetikoek ere.

Gorritz inguraturik agertzen dira albo kate ezagunenak.

Amino Acid	Chromophore	$\lambda_{\max}$ (nm)	$\epsilon$ ( $M^{-1} cm^{-1}$ )	Assignment
Cysteine	S <sup>-</sup>	235	3 200	$n \rightarrow \sigma^*$
Cystine	—S—S—	250	320	$n \rightarrow \sigma^*$
Phenylalanine	phenyl	257	220	$\pi \rightarrow \pi^*$
Tyrosine	phenolic	274	1 440	$\pi \rightarrow \pi^*$
		222	7 900	$\pi \rightarrow \pi^*$
Tryptophan	indole	280	5 050	$\pi \rightarrow \pi^*$
		219	34 000	$\pi \rightarrow \pi^*$
Histidine	imidazole	211	6 300	$\pi \rightarrow \pi^*$

**Lotura peptidikoa:** Karbono-oxigeno lotura bikoitzak kromoforo egokiak dira neurketa hauetarako. Egitura hau ondoko beste egitura batekin erresonantzia egoeran dago. Kontutan izan behar dugu nitrogenoak karbonoarekin eta oxigenoarekin parteka ditzakeen elektroiak dituela. Erresonantzia bat dago erdiko aldean, partekatu daitezkeen elektroiak marra eten bidez adierazita daude. Ondorioz karga partzial negatiboa sortzen da oxigenoaren aldean eta karga partzial positiboa nitrogenoaren aldean. Momentu dipolar aproposa du, eremu elektrikoarekin elkarrekin eta trantsizioak gertatzeko.



The carbonyl oxygen has a partial negative charge and the amide nitrogen a partial positive charge, setting up a small electric dipole. Virtually all peptide bonds in proteins occur in this trans configuration; an exception is noted in Figure 4-8b.

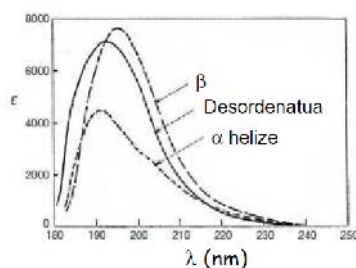
**Poli L-lisinen xurgapen espektroa:** lotura peptidikoak antolaketa ezberdina izan dezake egitura sekundarioaren arabera, hau da, bertan kokatzen diren elektroien kokapena edo egoera ezberdina izan daiteke. Adibide honetan ikus daitekeenez, tenperatura eta pHa aldatzearen ondorioz Poli L-lisinen xurgapen espektroa aldatu egiten da, izan ere, tenperatura eta pH aldaketek lotura peptidikoaren egitura aldatuko dute.

Polilisinaren xurgapen espektroa H<sub>2</sub>O

Desordenatua:  
pH 6,0 25°C.

$\alpha$ -helizea:  
pH 10,8 T 25°C.

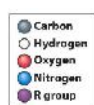
$\beta$ :  
pH 10,8 T 52°C



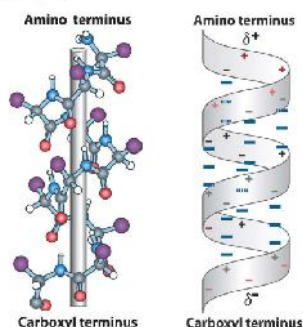
$n \rightarrow \pi^*$  trantsizioa (220)  
 $\pi \rightarrow \pi^*$  trantsizioa (190)

$\beta$ -tik egoera desordenatura ia ez dago aldaketarik;  $\alpha$  helizearen kasuan aldiz, lotura peptidikoaren tolesketak momentu dipolarrean aldaketa eragiten ditu.

Gainera aminoazido ezberdinen artean emandako H zubiak ezberdinak dira  $\alpha$  helizean eta  $\beta$  orrian.  $\beta$ - enek antzekotasun handiagoa dute egoera desegonkorrekoekin.



$\alpha$ -helizea



$\beta$ -orria

