

Espectroscopía UV-Vis para el análisis de muestras líquidas y sólidas.

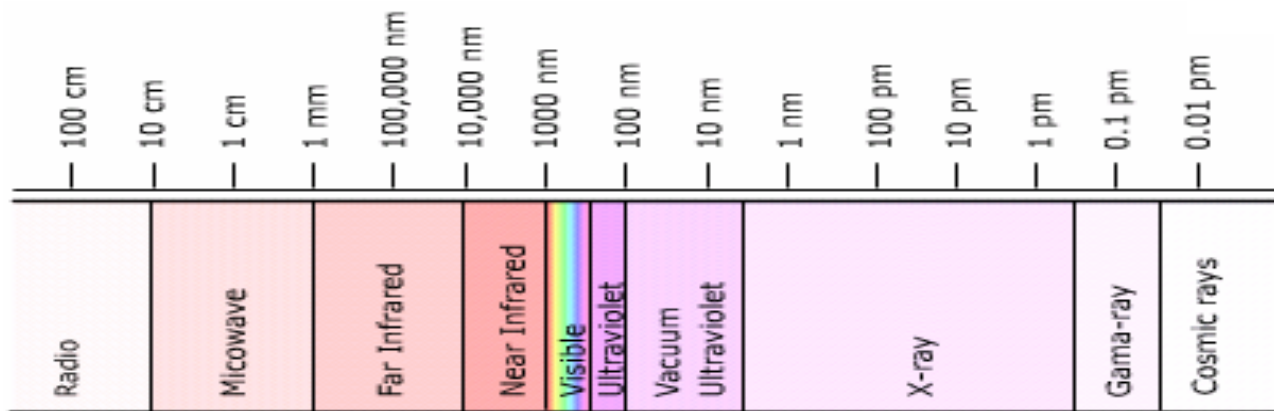
Instituto Nacional de Toxicología
Madrid, 1 de octubre 2013

Fernando Tobalina
Agilent Technologies



Agilent Technologies

Espectroscopía UV-Vis.

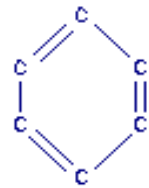


Todas las moléculas orgánicas son capaces de absorber la radiación electromagnética en esa zona del espectro (casi todas también en IR).

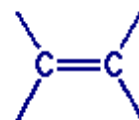
Las energías de excitación relacionadas con los electrones que forman los enlaces más sencillos son muy elevadas de forma que su absorción se restringe a la zona del UV de vacío (<185 nm), lo que conlleva problemas de trabajo experimental.

Por encima de 185 nm la absorción se restringe a enlaces más complejos o ciertos grupos funcionales (cromóforos) con electrones de valencia con energías de excitación más bajas.

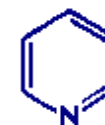
Transiciones en la zona UV-VIS

Molecule	Transition	$\lambda_{\max}$ (nm)
Ethane $\begin{array}{c} \text{H} & \text{H} \\ & \\ \text{H}-\text{C}- & \text{C}-\text{H} \\ & \\ \text{H} & \text{H} \end{array}$	$\sigma \rightarrow \sigma^*$	135
Methanol $\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{H}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{H} \end{array}$	$\sigma \rightarrow \sigma^*$ $\eta \rightarrow \sigma^*$	150 183
Ethylene $\begin{array}{c} \text{H} & \text{H} \\ & \\ \text{C}=\text{C} \\ & \\ \text{H} & \text{H} \end{array}$	$\pi \rightarrow \pi^*$	175
Benzene 	$\pi \rightarrow \pi^*$	254
Acetone $\begin{array}{c} \text{H} & \text{O} & \text{H} \\ & & \\ \text{H}-\text{C}- & \text{C}- & \text{C}-\text{H} \\ & & \\ \text{H} & & \text{H} \end{array}$	$\eta \rightarrow \pi^*$	290

Desplazamientos por enlaces conjugados



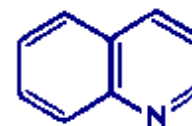
$\lambda_{\max}$ 180-200 nm
 $\epsilon = 10,000$



$\lambda_{\max}$ 250 nm



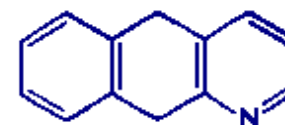
$\lambda_{\max}$ 217 nm
 $\epsilon = 21,000$



$\lambda_{\max}$ 290 nm



$\lambda_{\max}$ 258 nm
 $\epsilon = 35,000$



$\lambda_{\max}$ 360 nm

Marcadores e indicadores

Sustancias con espectros de absorción intensos en la zona UV-Vis que pueden utilizarse como.

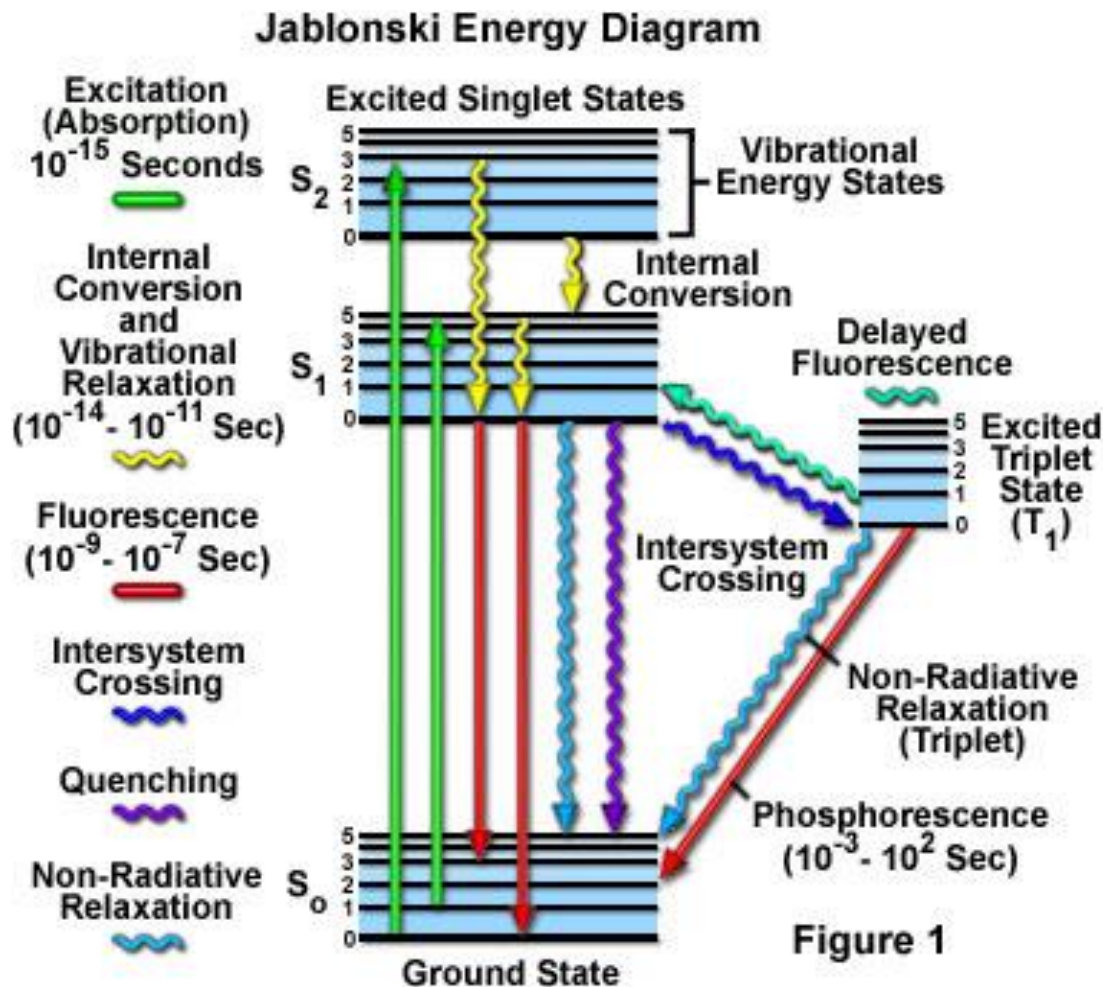
- Indicadores de polaridad de disolventes.
- Indicadores de equilibrios químicos (Acido-Base y Redox)
- Indicadores del entorno molecular.
- Indicadores de agregación y orden molecular.
- Marcadores de actividades enzimáticas.

En análisis toxicológico y forense.

- Screening de drogas.
- Determinaciones colorimétricas. (Amonios, nitratos, hemoglobinas, amilasas)
- Análisis de tintas y documentos.
- Análisis de color, vidrios, piedras preciosas y muestras sólidas.



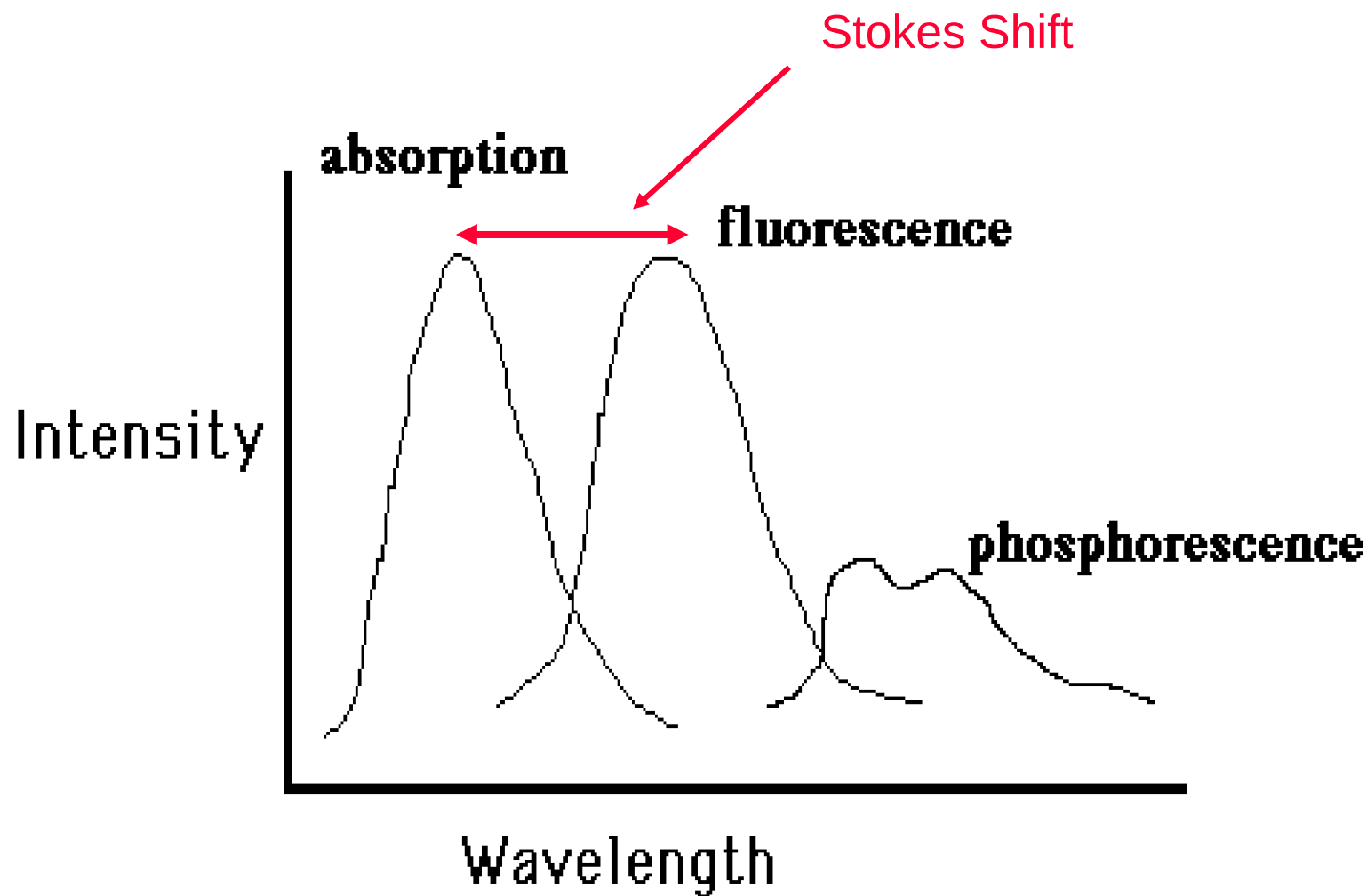
Procesos de absorción-emisión molecular



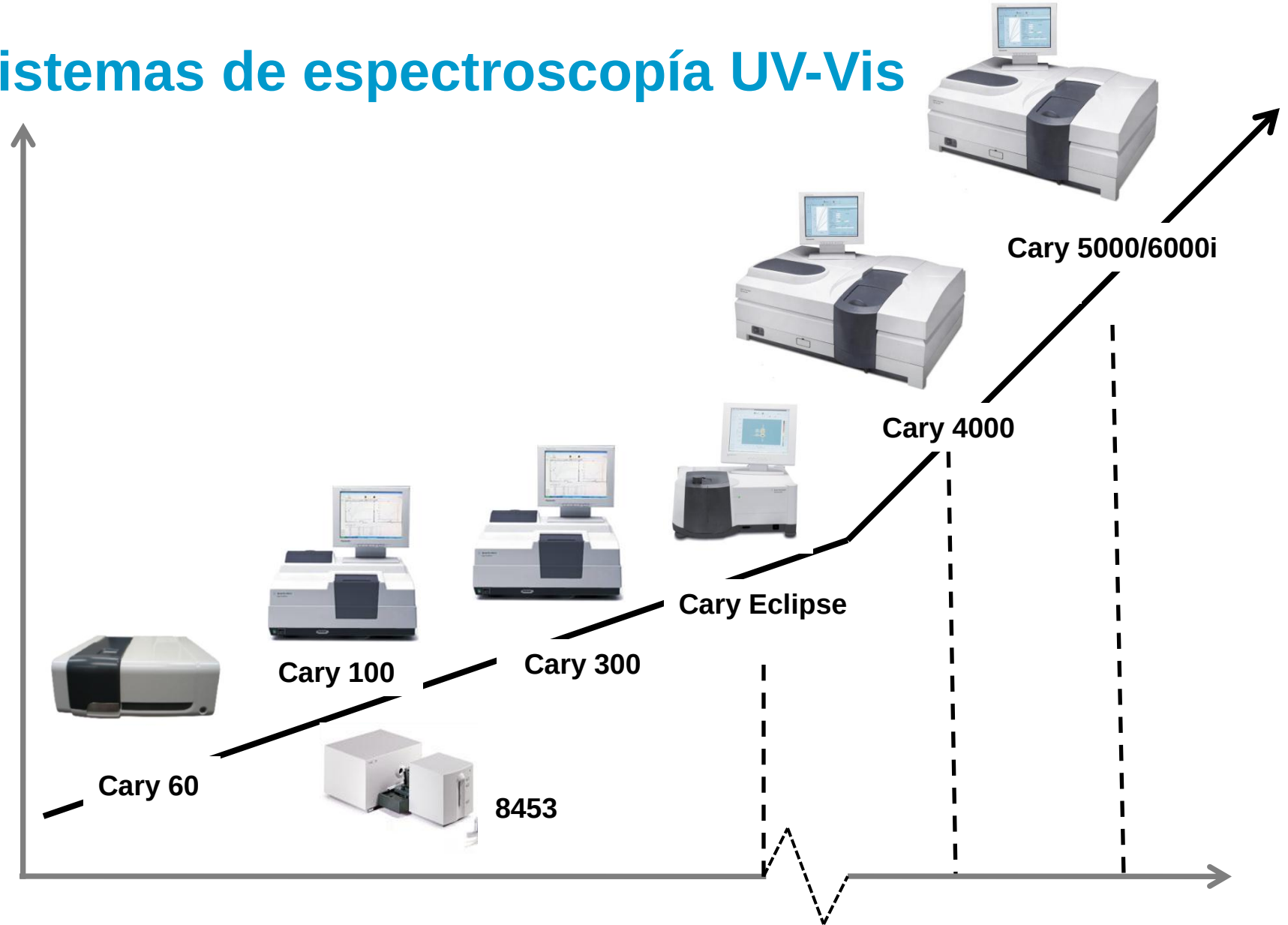
La temperatura puede afectar las intensidades de emisión de diferentes formas

- Si la formación o decaimiento de las especies emisivas depende de una reacción química entonces la fluorescencia quedará afectada
- A temperaturas más bajas el movimiento vibracional se reduce y el camino vía fluorescencia se favorece.
- Restringen la formación de complejos en el estado excitado.
- Permiten calcular las barreras de energía y otras funciones termodinámicas.
- Restringen el movimiento rotacional (ej. Medidas de polarización)

Espectros de absorción, fluorescencia, fosforescencia



Sistemas de espectroscopía UV-Vis

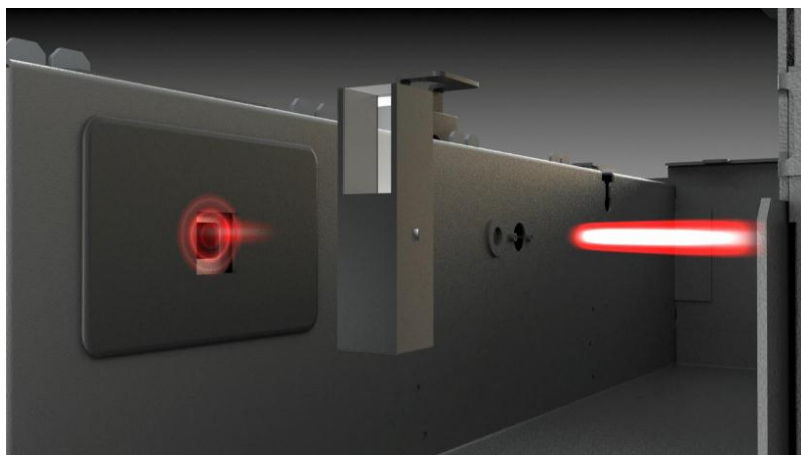


Agilent Technologies

Ventajas de las fuentes de luz pulsantes: alta intensidad y focalización

Haz de luz muy focalizado

Acoplamiento sencillo de microcubetas o fibras ópticas



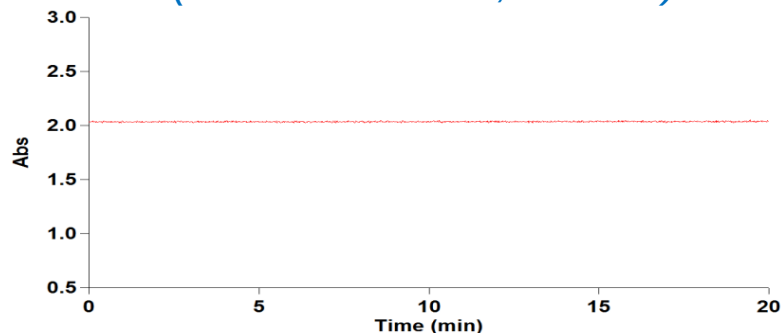
Notas de aplicación disponibles:

5990-7862EN Eliminate photodegradation of aromatic markers used in UV-Vis
5990-7864EN Simple, automated measurements of the photocatalytic properties of colorimetric species
SI-A-1251 Investigation of photochemical reactions
SI-A-1200 Investigation of the photo-kinetics of a platinum organoamine complex

Fuentes pulsantes

Evitan la fotodegradación de muestras lábiles

Ausencia de fotodegradación de los marcadores colorimétricos (azul de metileno, 664 nm)



Accesorios de UV-Vis para análisis de líquidos

Fibras Ópticas

Hace innecesario el uso de cubetas

Mejora la productividad del laboratorio llevando el instrumento a la muestra.

Posibilidad de medir muestras frías, calientes o irregulares “in situ”



*Mejora la
productividad
y minimiza la
preparación
de muestra*

*Análisis “in
situ”*



APPLICATION NOTES AVAILABLE:

5990-7863EN Measuring purity of low volumes of DNA at 4 °C with fiber optics microprobe

5990-7945EN Determination of drug tablet concentration in pharmaceutical applications for drug development

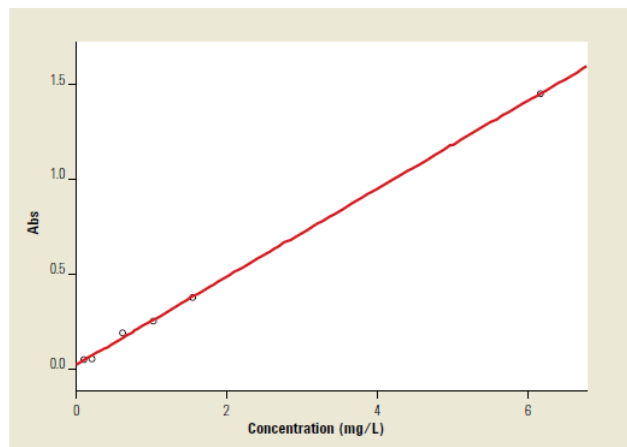
5990-7864EN Simple, automated measurements of the photocatalytic properties of colorimetric species



Agilent Technologies

Aplicaciones con fibras ópticas

Análisis de nitratos con Cary 60



Sample	Conc mg/L	Mean Abs	SD	%RSD	Raw Abs
A	0.145	0.0510	0.0009	1.78	0.0520 0.0504 0.0506
B	0.709	0.1825	0.0025	1.36	0.1797 0.1838 0.1841



Nitrate analysis of water using the quartz fiber optics dip probe on the Cary 50/60 UV-Vis

Análisis de DNA y proteínas en frío



Measuring the purity of low volumes of DNA at 4 °C using the Agilent Cary 60 UV-Vis spectrophotometer with fiber optics microprobe

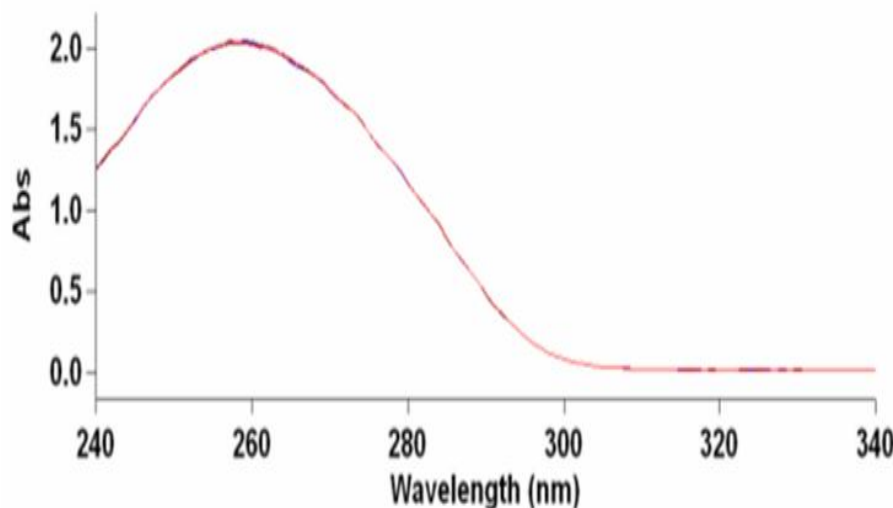


Agilent Technologies

Sistemas de análisis para microvolúmenes

Medida de microvolúmenes de muestras líquidas con mayor precisión y reproducibilidad

Muestras químicas o biológicas valiosas



Barridos múltiples de una muestra de DNA. Demuestra la tremenda reproducibilidad del Cary 60 usando solo 3 μ L de DNA



APPLICATION NOTES AVAILABLE

SI-A-1219 Practical Limits of DNA Quantitation in Microliter samples

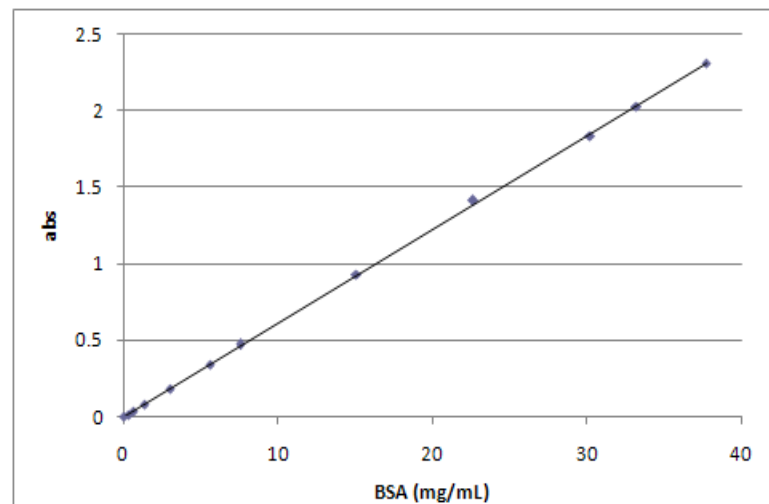
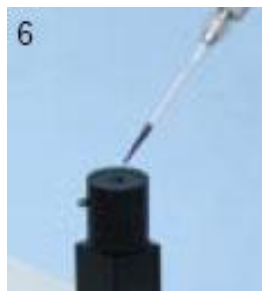
5990-7863EN Measuring the purity of low volumes of DNA at 4 °C with fiber optics microprobe



Agilent Technologies

Análisis directo de muestras líquidas de gran absorbancia

Con Cary 60 y el accesorio Tray Cell se consiguen 2.3 abs de linealidad con un paso óptico de 1 cm.



Hellma TrayCell			
	10mm cubeta	1.0mm cap	0.2mm cap
max abs	3.5 abs	2.3 abs	2.3 abs
dilution factor		10x	50x
equiv abs		23 abs	115 abs

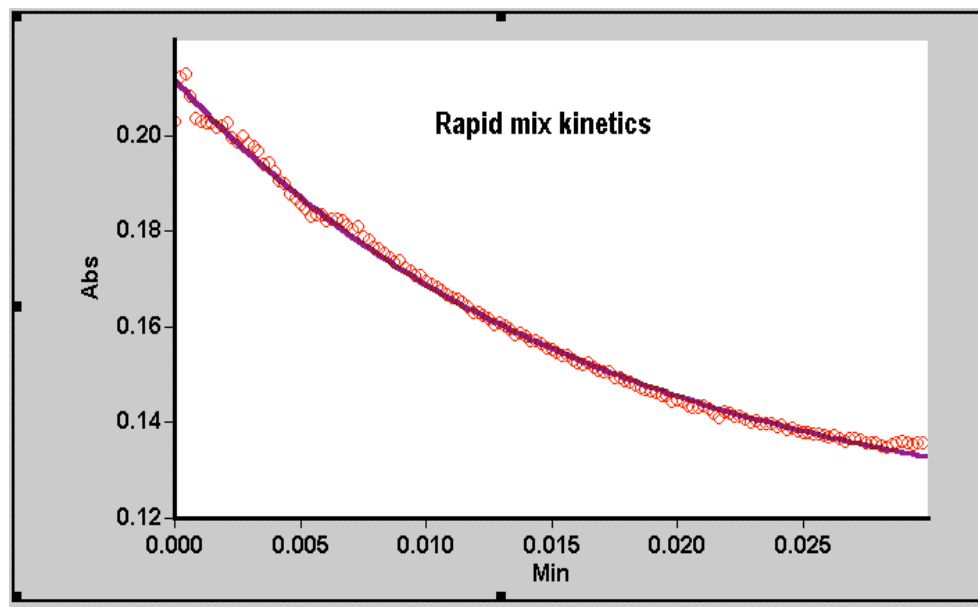
!No es necesario diluir entre 0 y 115 abs!

Análisis de cinéticas químicas o enzimáticas rápidas

La adquisición de datos más rápida (24,000 nm/min; 80 puntos/seg)

Barridos de long de onda o cinéticas puntuales

Posibilidad de estudiar reacciones completas en segundos



Seguimiento del decaimiento rápido de un compuesto verde



APPLICATION NOTE AVAILABLE

SI-A-1177 Monitoring fast reactions using Stopped Flow Kinetics

Análisis colorimétricos en rutina.

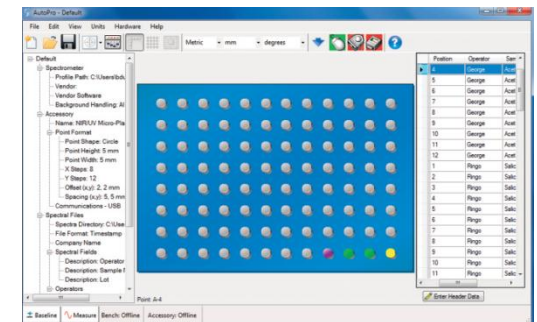
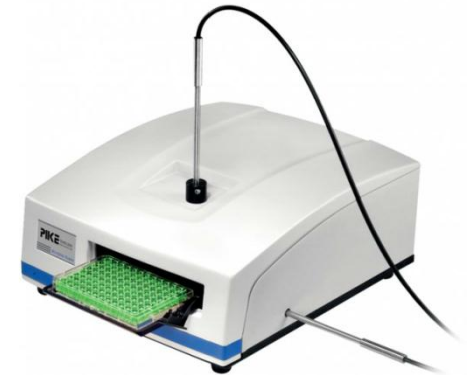
Transportadores automáticos



Sippers con cubetas de flujo

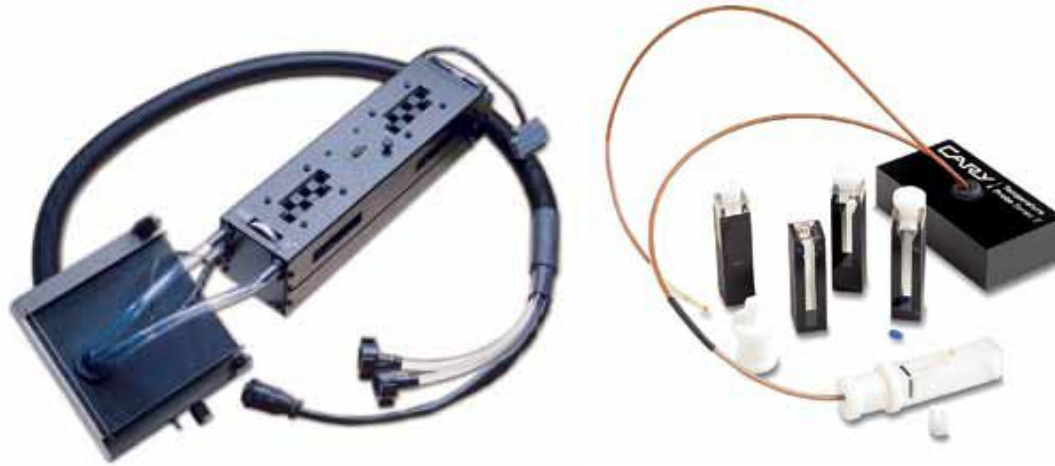


Lectores de placas



Agilent Technologies

Control de temperaturas. Sistemas biomelt



El mejor sistema de control de temperaturas.

Desde -10°C a 100°C
Con un error inferior a 0.05°C en el medio en el que está la muestra.

Collect Temperatures

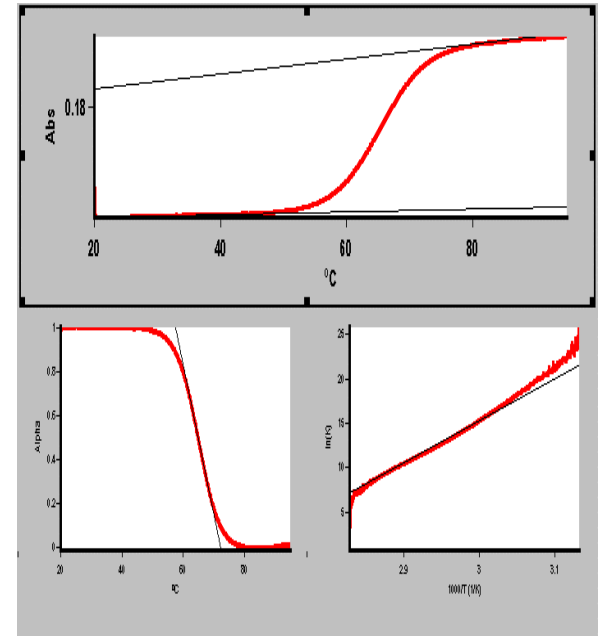
Start $^{\circ}\text{C}$ Temperature Monitor

Return to $^{\circ}\text{C}$

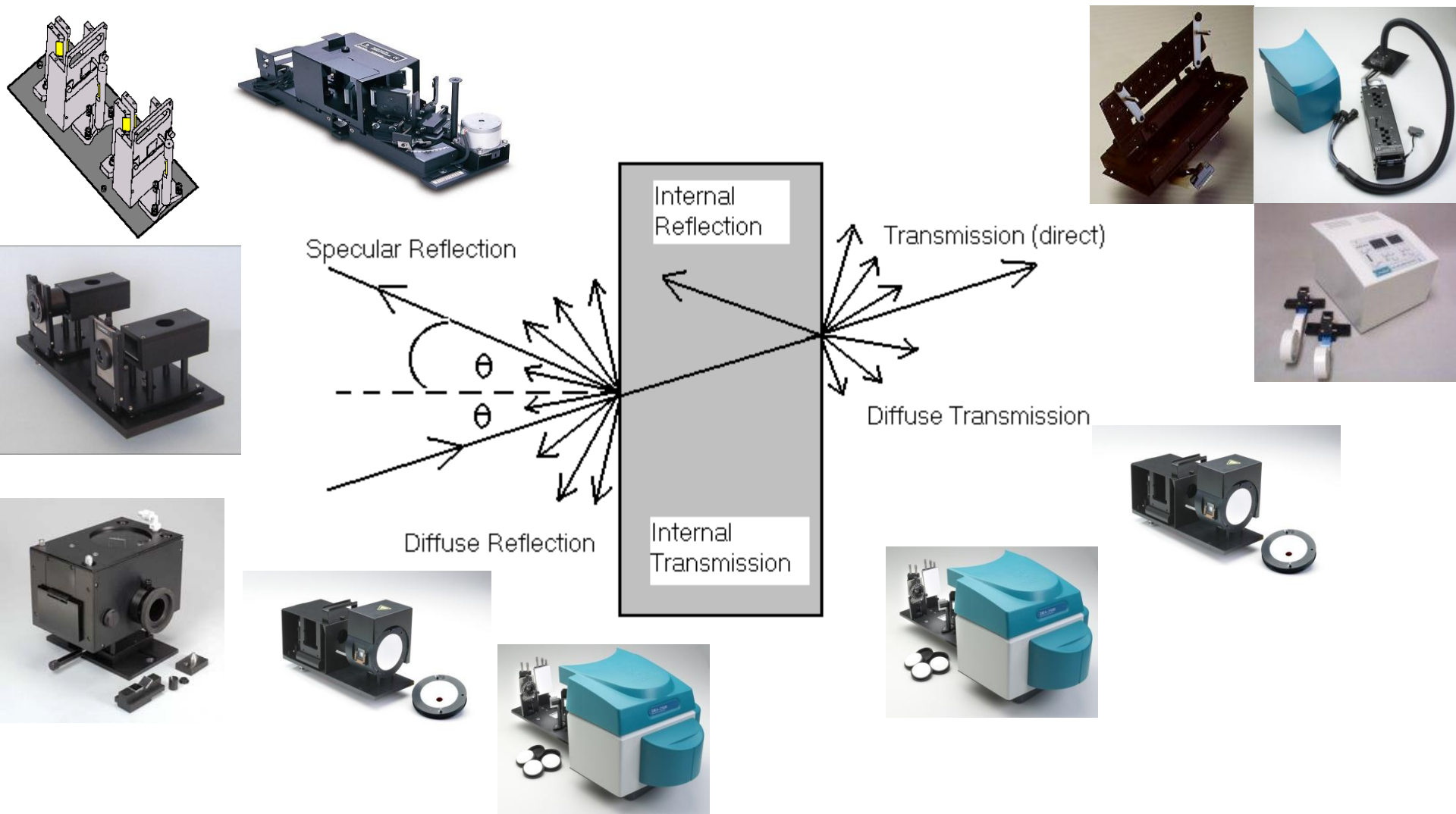
☐ Simple Collect ☒ Advanced collect

Number of Stages

Stage	Collect Data	Data Interval	Rate ($^{\circ}\text{C}/\text{min}$)	End ($^{\circ}\text{C}$)	Hold (min)
1	☐	2.00	2.00	95.00	2.00
2	☐	2.00	2.00	15.00	2.00
3	☒	0.20	0.50	95.00	5.00



UV-Vis-NIR análisis de muestras sólidas



UMS = Sistema universal de medida



Modos de medida del Cary UMS



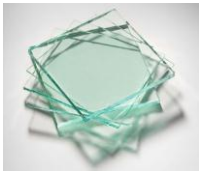
1 *Absolute specular reflection*



2 *Diffuse scattering*



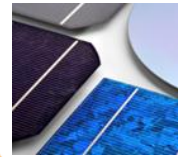
3 *Glossy scattering*



4 *Direct transmission*



5 *Scattered transmission*



6 *Partial scattered transmission*

6
Modos

1
Sistema

Desarrolla todas
las medidas en
el Cary 7000
UMS



Agilent Technologies

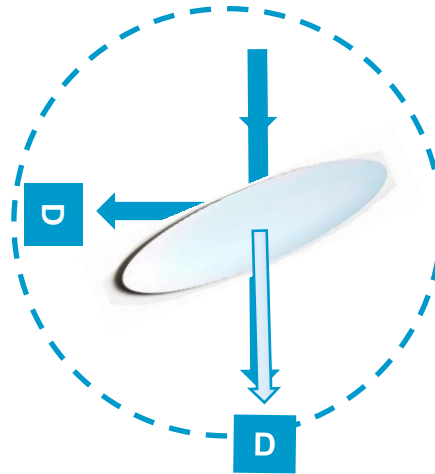
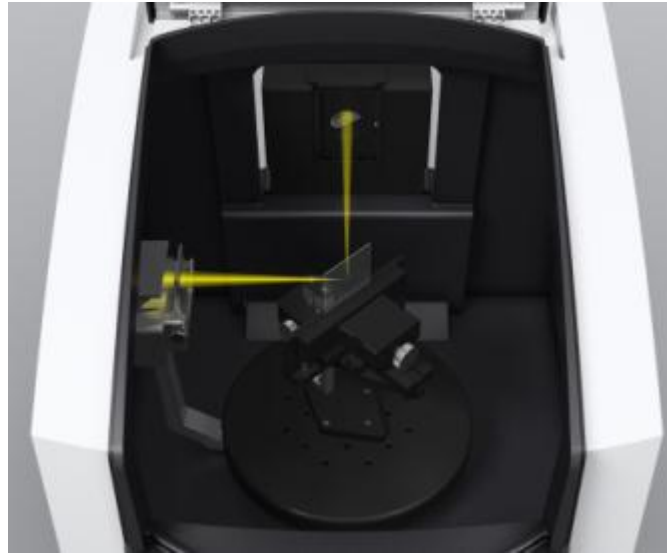
Cary UMS Ventajas

Mayor Productividad

Solo es necesario **una línea base** para todas las medidas de %R y %T, para todos los ángulos a una polarización dada- reduciendo dramáticamente los tiempos de análisis.

Control automatizado independiente de la polarización (s o p) posición del detector (D) position y rotación de la muestra.

Desarrollar **todas las medidas de %R y %T en un solo sistema**, eliminando el intercambio de accesorios y tiempo de reconfiguración.



Mejores Prestaciones

Medida absoluta por definición de la transmisión y la reflexión – La única diferencia entre la línea base y la media es la muestra en si misma.

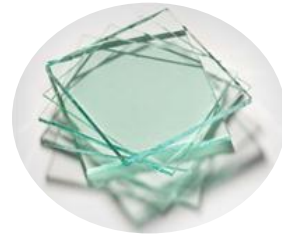
La luz incidente es fija en forma y posición en que incide sobre la muestra asegurando que %T y %R son recogidos **en el mismo punto de la muestra**.

El detector tiene una línea de visión única de la muestra. Esta **Visión Directa** es un rasgo único que provee de la mejor exactitud, reproducibilidad y precisión



Agilent Technologies

Transmisión, Reflexión, Transmisión interna



ISO 9050 (2003): Cristal para edificación:

Transmitancia de luz, transmitancia solar directa, transmitancia total de energía solar, transmitancia UV y otros factores.

EN 410: Cristal para edificación:

Color, Factor solar.

ISO 13837: Vehículos rodantes:

Transmitancia solar UV (400), Transmitancia solar directa (1,5),

Transmitancia solar UV (380), Transmitancia solar directa (1,0)

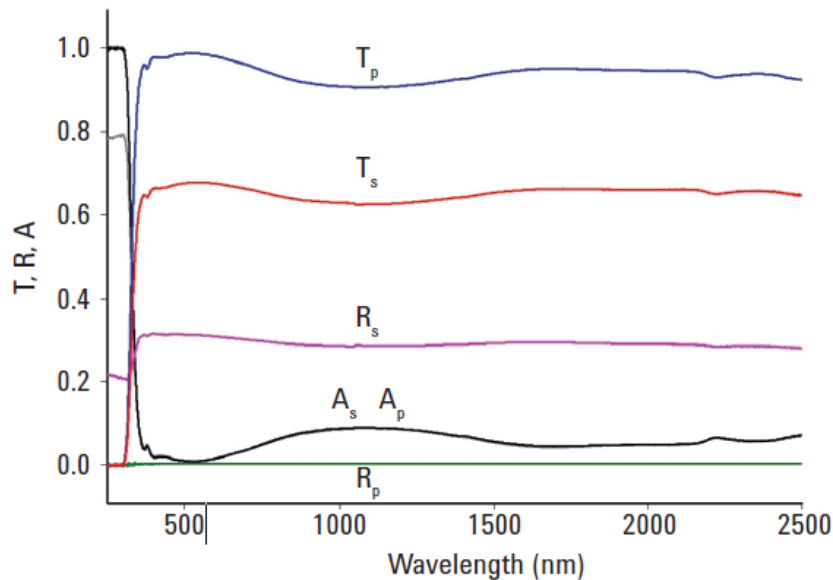


Figure 1b. Transmission, reflection and the associated absorbance spectra ($A=1-T-R$) for an architectural glass sample (2 mm thick). Both s- and p-polarized spectral data were collected at 60° angle of incidence

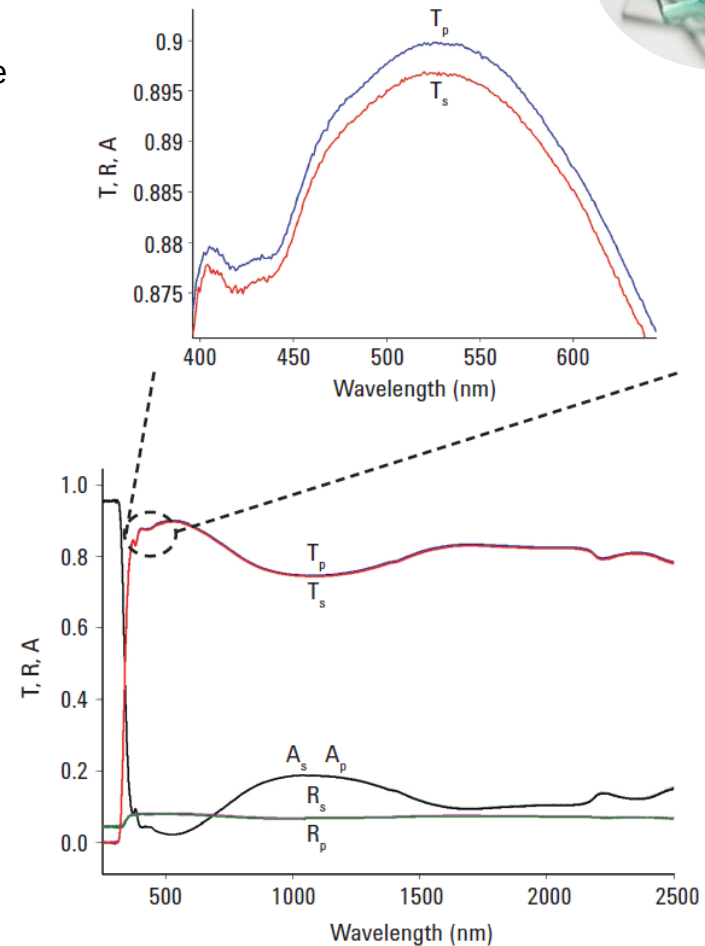
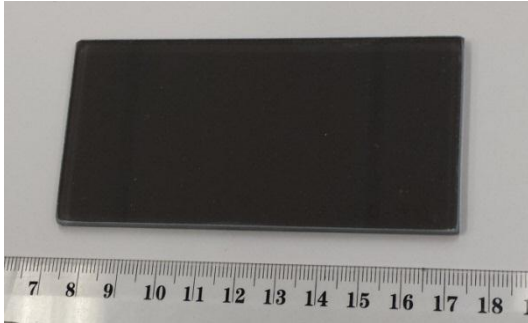


Figure 2b. Transmission, reflection and the associated absorbance spectra ($A=1-T-R$) for an architectural glass sample (2 mm thick). Both s- and p-polarized spectral data were collected at 7° angle of incidence. Inset: A closer look at the T_p and T_s spectra in Figure 2b reveals an expected separation of approximately 0.003 between s- and p-polarized spectra

Cristal – Recubiertos para Control Solar



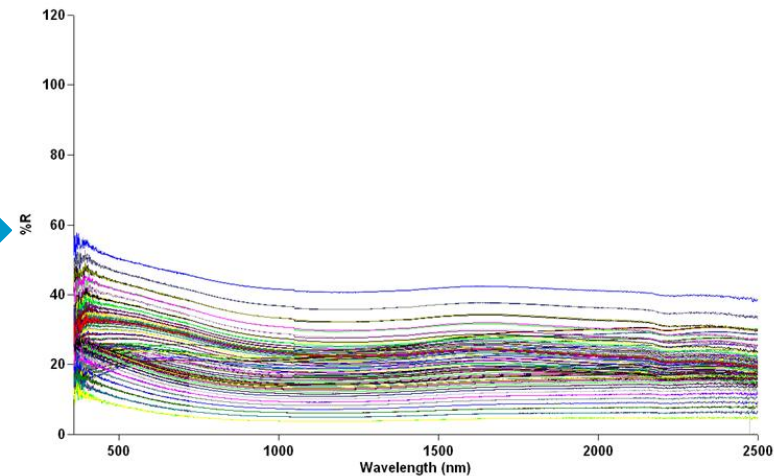
Aplicación/Muestra

Cristal solar recubierto

Vidrio flotado

Estos vidrios se diseñan para aplicaciones donde se necesita una alta transmisión a la luz del día, sin reflejos y con un control de la insolación y control solar para reducir pérdidas de calor. El vidrio de control solar es una solución simple y efectiva para ayudar a las empresas constructoras a cumplir con los requisitos energéticos y consumos térmoelectricos.

Control Solar con recubrimiento al 20 %T a ángulos cercanos a la normal. La recogida de datos desde 7 a 70 grados en pasos de 5° muestran variaciones angulares superiores al 20% de las obtenidas en valores cerca de la normal.



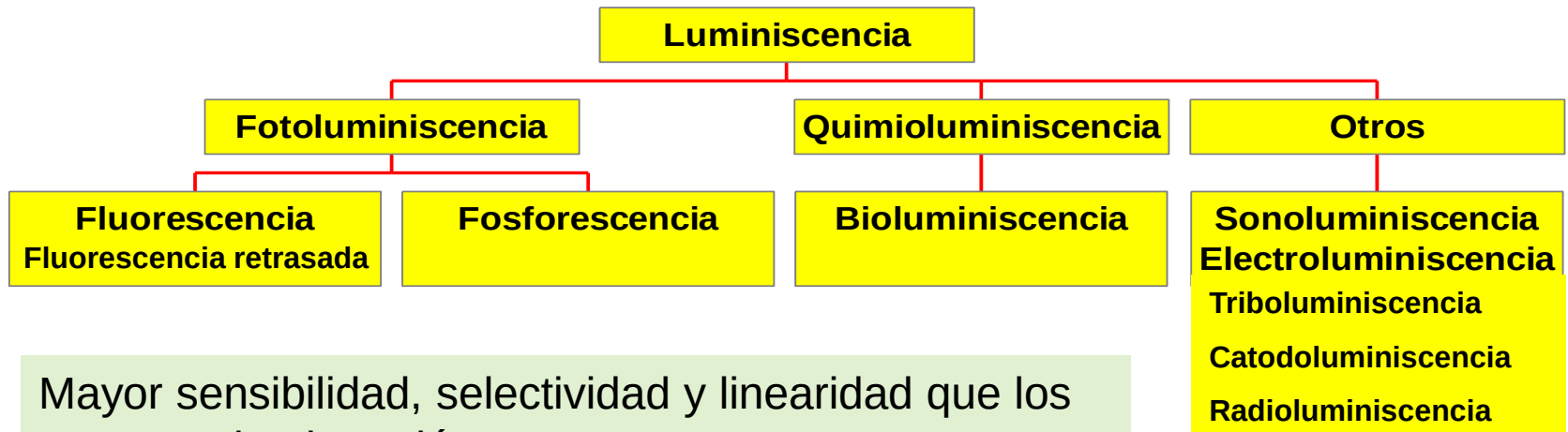
Agilent Technologies

Luminiscencia

‘Una emisión de luz que tiene lugar a temperaturas por debajo de las de los cuerpos incandescentes’.

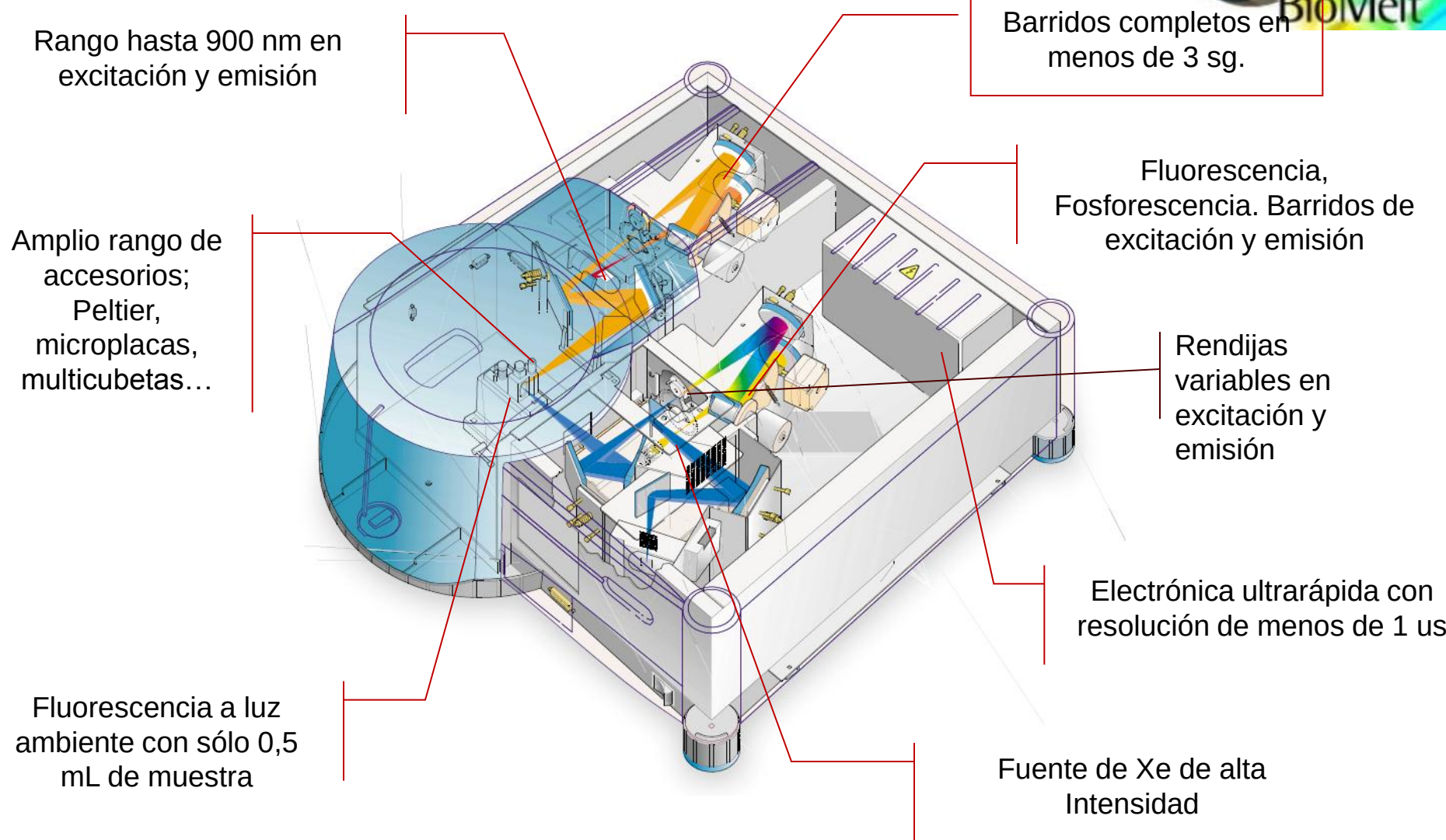
‘La luminiscencia tiene lugar por la capacidad de ciertas sustancias de absorber la luz a frecuencias relativamente altas y re-emitirla instantaneamente en paquetes discretos de frecuencias más bajas ’

Tipos de fenómenos luminiscentes



Mayor sensibilidad, selectividad y linealidad que los ensayos de absorción

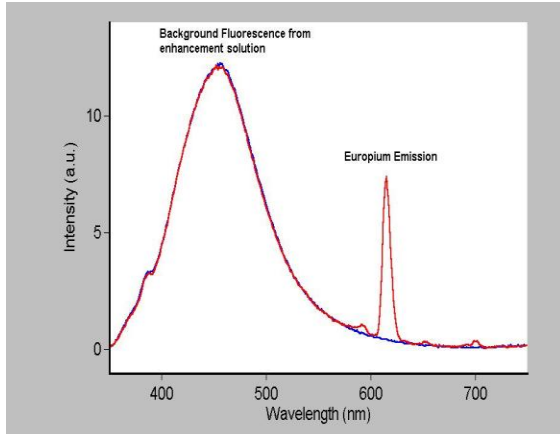
Fluorescencia ECLIPSE



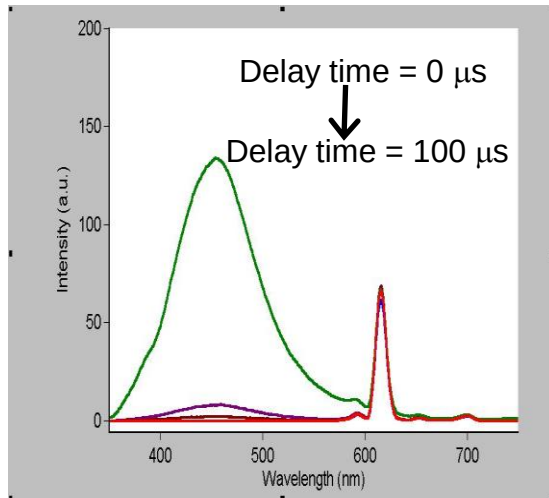
Agilent Technologies

Espectro de fluorescencia de Europio en disolución potenciadora DELFIA™

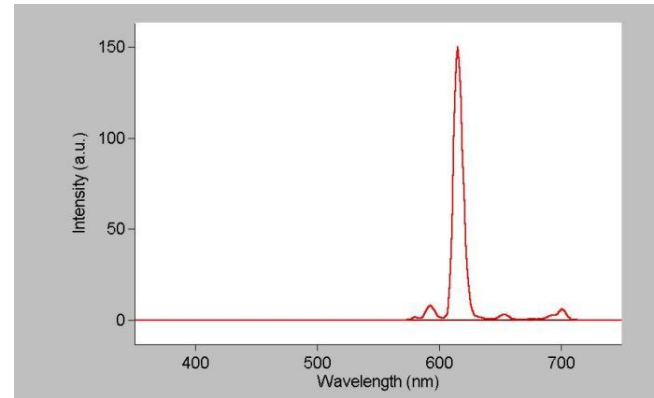
Pico desestructurado a 450 nm atribuido a la emisión de fondo de la solución potenciadora



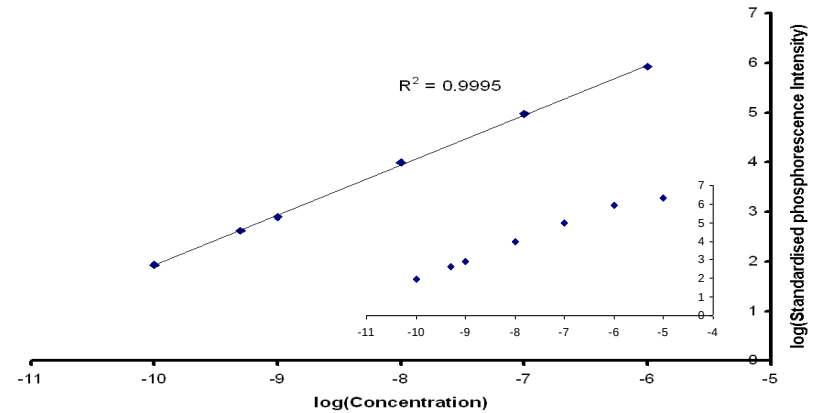
Modo Fluorescencia



Optimización del delay time



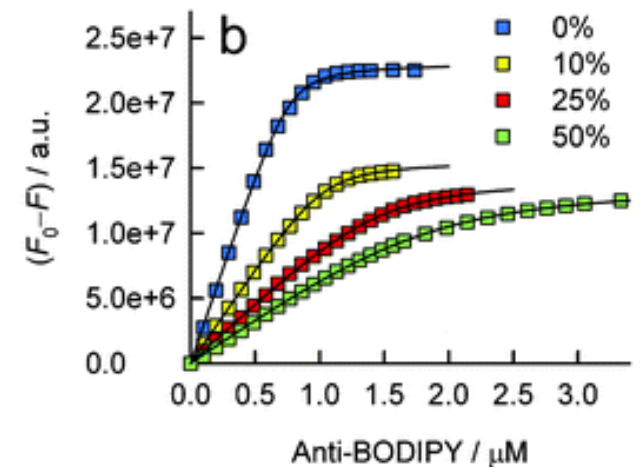
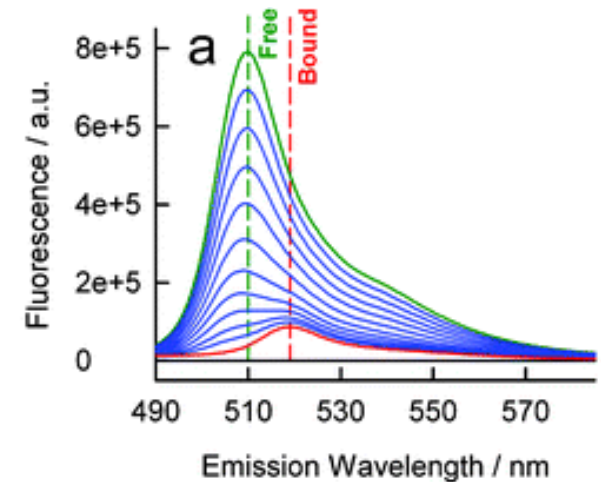
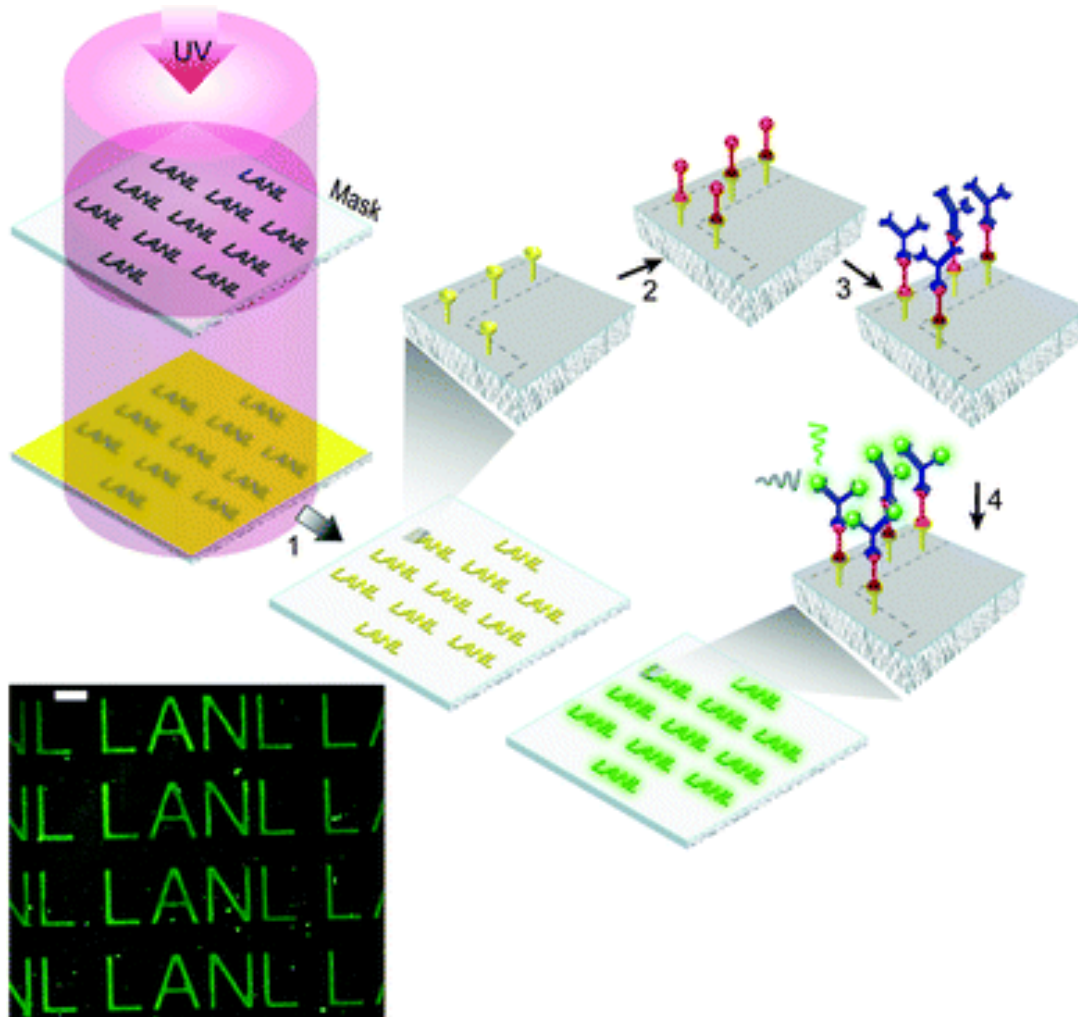
Modo Fosforescencia (TRF) mode



Gráfica logarítmica de la intensidad de la fosforescencia vs. Concentración.
Linealidad en el intervalo entre 0.1 – 1000 nM (inserto 0.1 – 10000 nM)

Aplicaciones: Inmunoensayos con sondas fluorescentes

Esquema de un Fluoroinmunoensayo



Aplicaciones: Ensayos de actividad antioxidante en suero

El método está basado en los cambios conformacionales que sufre la proteína R-Phycoeritrina (R-PR) en presencia de radicales libres que conlleva un quenching de la fluorescencia en modo tiempo-dependiente.

Requiere de tres medidas cinéticas a temperatura controlada (37°):

- 1- Curva de decaimiento de la R-PE con AAPH (un generador de radicales libres) S_{blanco}
- 2- Curva de decaimiento de la R-PE con AAPH y TROLOX (un antioxidante standard) S_{Trolox}
- 3- Curva de decaimiento de la R-PE en suero de un voluntario sano S_{muestra}

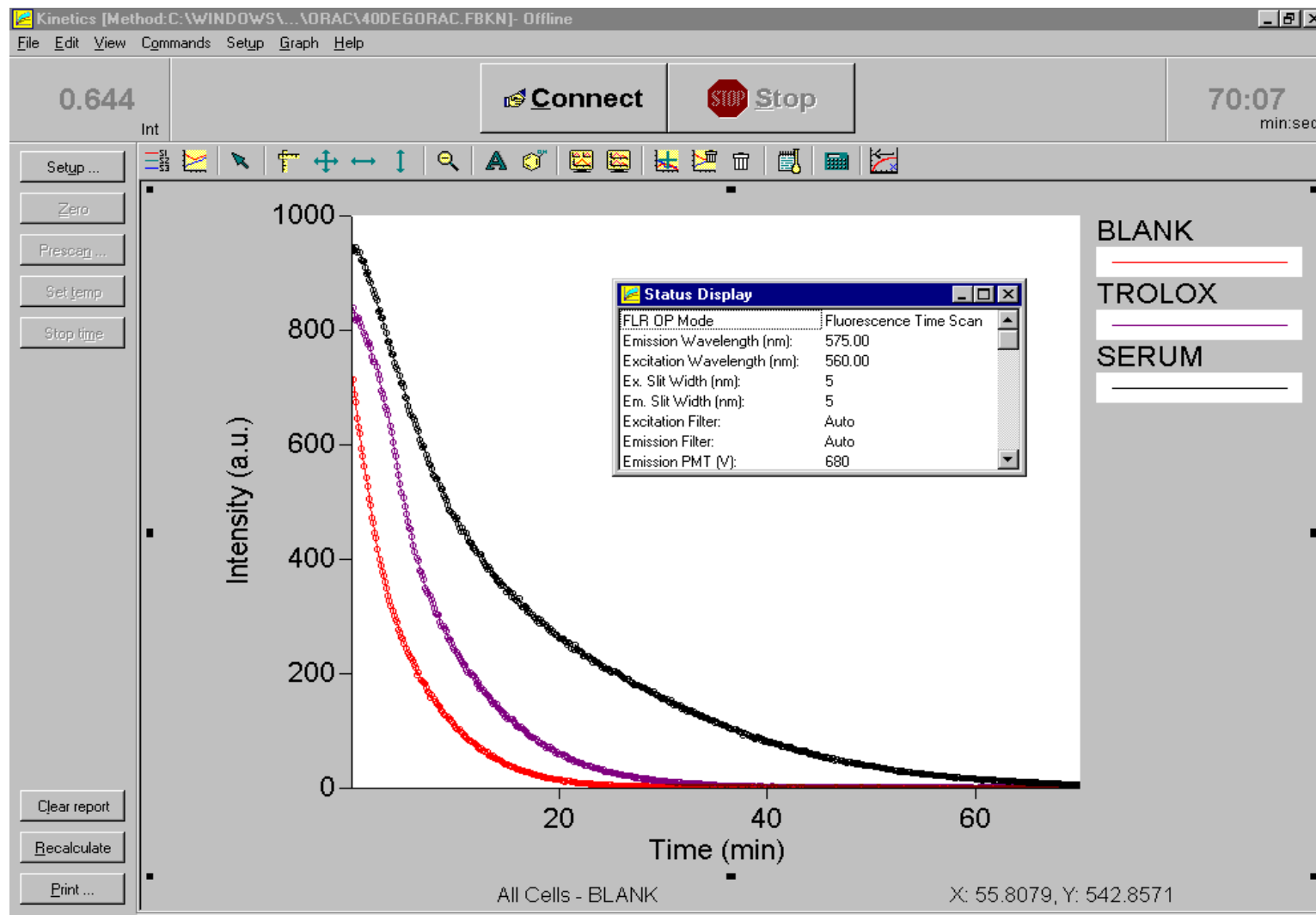
Luego se integra el área bajo la curva de decaimiento y se calcula el valor de ORAC

$$\text{Resultado ORAC value} = 20k (S_{\text{muestra}} - S_{\text{blanco}}) / (S_{\text{Trolox}} - S_{\text{blanco}})$$

Donde k es el factor de dilución



Ensayo ORAC – Determinación del valor de ORAC



El significado de tener un Cary

- Más de 60 años de excelencia en el diseño óptico
- Liderazgo tecnológico
- Innovaciones y numerosos premios

La filosofía Cary:

“Para investigadores que en ocasiones deben llevar sus espectrofotómetros a los límites de sus prestaciones y capacidades para obtener la información que necesitan y aún así disponer de un instrumento adaptable a muy distintas aplicaciones”

~ Howard Cary



Howard Cary – La persona detrás de los primeros instrumentos Cary.

