UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI TERAMO

Spettroscopia

UV-Vis, infrarosso, fluorescenza ed emissione in fiamma

Chimica Analitica

CdL in Biotecnologie · a.a. 2026/2027

Prof. Federico Fanti

01

Fondamenti

La radiazione elettromagnetica e la sua interazione con la materia

La radiazione elettromagnetica

Che cos'è

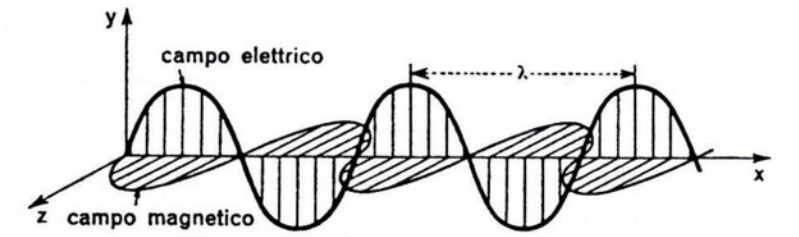
Una forma di energia che si propaga anche nel vuoto, costituita da un campo elettrico e da un campo magnetico che oscillano in fase, su piani perpendicolari tra loro e alla direzione di propagazione.

Duplice natura

Si comporta come un'onda nei fenomeni di diffrazione e interferenza, e come un flusso di fotoni, particelle di energia definita, quando viene assorbita o emessa dalla materia.

I metodi spettroscopici

Misurano l'interazione tra la radiazione e l'analita per ricavarne informazioni qualitative e quantitative.



Campo elettrico e campo magnetico oscillanti su piani perpendicolari.

FONDAMENTI

I parametri dell'onda

$$c = \lambda \nu \quad (\text{nel vuoto } c = 3{,}00 \cdot 10^{8}\ \text{m s}^{-1})$$

Lunghezza d'onda λ

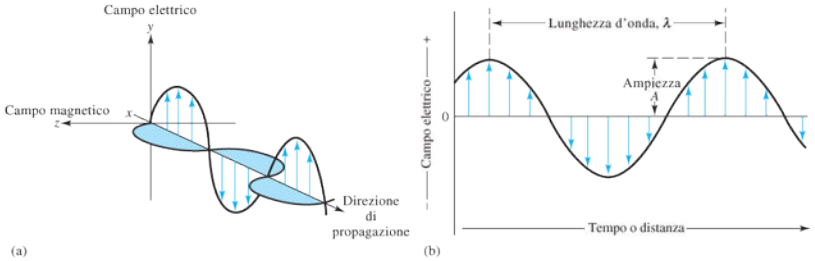
Distanza tra due massimi successivi; si misura in nm per UV e visibile, in µm per l'infrarosso.

Frequenza ν

Numero di oscillazioni al secondo, in hertz. Dipende solo dalla sorgente e non cambia attraversando mezzi diversi.

Ampiezza e potenza

L'ampiezza è il valore massimo del campo elettrico; la potenza radiante P, energia per unità di area e di tempo, è proporzionale al suo quadrato.



Ampiezza, lunghezza d'onda e periodo di un'onda elettromagnetica.

L'energia del fotone

$$E = h\,\nu = h\,c\,/\,\lambda = h\,c\,\tilde{\nu} \qquad h = 6{,}63 \cdot 10^{-34}\ \mathrm{J\,s}$$

Energia e frequenza

L'energia di un fotone è direttamente proporzionale alla frequenza e inversamente proporzionale alla lunghezza d'onda: i raggi X sono molto più energetici delle microonde.

Numero d'onda $\tilde{\nu}$

È il numero di onde per centimetro, $\tilde{\nu} = 1/\lambda$ in $\mathrm{cm^{-1}}$. È proporzionale all'energia ed è l'unità usata in spettroscopia infrarossa.

Un esempio

Un fotone a 500 nm trasporta circa $4{,}0 \cdot 10^{-19}$ J; una mole di fotoni circa 240 kJ, un'energia confrontabile con quella di un legame chimico.

Lo spettro elettromagnetico

Un continuo di energie

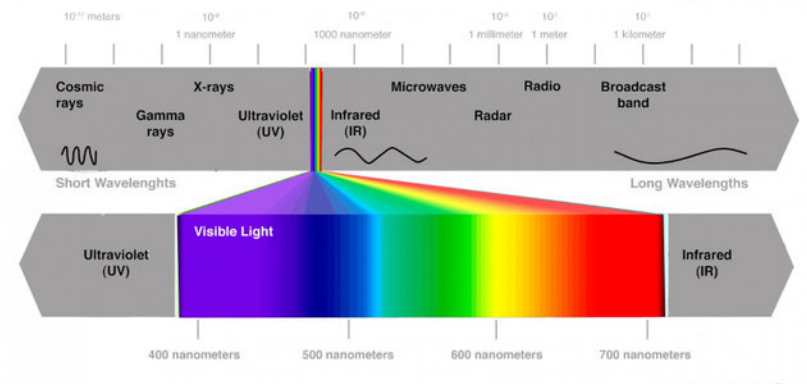
Dai raggi gamma alle onde radio la lunghezza d'onda varia di oltre 15 ordini di grandezza. La parte visibile all'occhio umano va solo da circa 400 a 750 nm.

Regioni di interesse analitico

UV (190-400 nm) e visibile (400-750 nm) per le transizioni elettroniche, infrarosso (2,5-25 µm) per le vibrazioni, radiofrequenze per la risonanza magnetica nucleare.

Una regola

Ogni regione dello spettro sonda un diverso tipo di transizione e quindi una diversa proprietà della molecola.



Regioni dello spettro elettromagnetico e dettaglio della luce visibile.

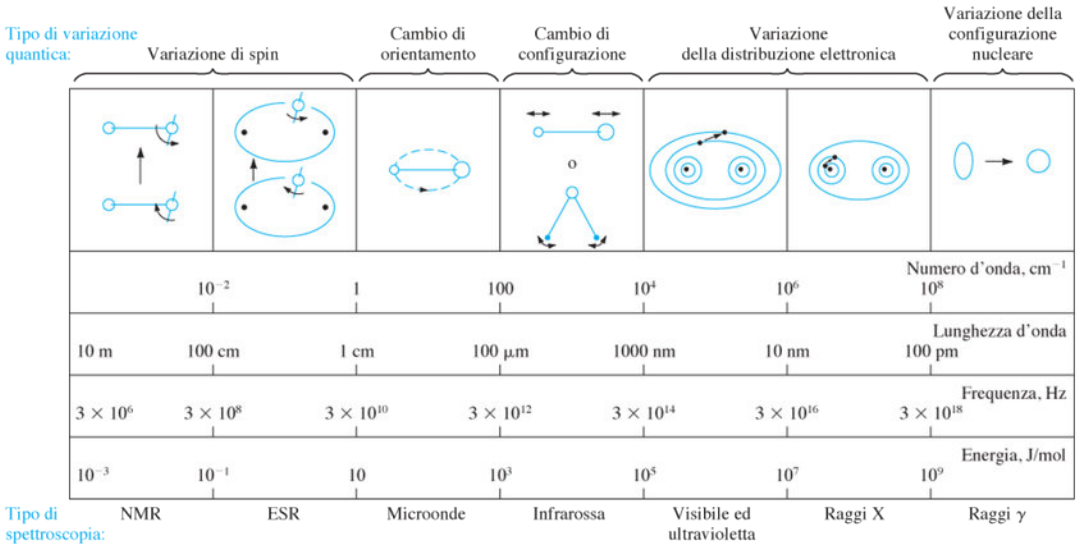
Regioni spettrali e tipi di transizione

Alte energie

Raggi gamma e X interagiscono con i nuclei e con gli elettroni interni; l'UV e il visibile promuovono gli elettroni di valenza e di legame.

Basse energie

L'infrarosso eccita vibrazioni dei legami, le microonde rotazioni molecolari e lo spin elettronico, le radiofrequenze lo spin nucleare (NMR).



Tipo di transizione, lunghezza d'onda, frequenza ed energia per ciascuna regione e tecnica corrispondente.

Livelli energetici: assorbimento ed emissione

Stato fondamentale

Prima della stimolazione l'analita si trova prevalentemente nel livello di energia più basso. Le energie permesse sono quantizzate.

Assorbimento

Un fotone viene assorbito solo se la sua energia corrisponde esattamente alla differenza tra due livelli: la specie passa allo stato eccitato.

Emissione

Tornando allo stato fondamentale, la specie eccitata può cedere l'energia come radiazione. Misurare la radiazione assorbita o emessa fornisce informazioni sull'analita.

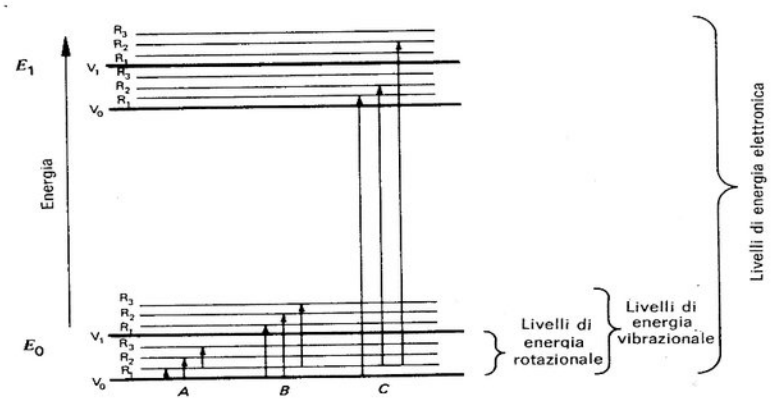


FIGURA 15.3
Diagramma dei livelli energetici illustrante le variazioni di energia associate con l'assorbimento di radiazione elettromagnetica: *A*, variazioni rotazionali pure (infrarosso lontano); *B*, variazioni roto-vibrazionali (vicino infrarosso); *C*, transizioni elettroniche roto-vibrazionali (visibile e ultravioletto). E_0 è lo strato elettronico fondamentale e E_1 è il primo stato elettronico eccitato.

Livelli elettronici, vibrazionali e rotazionali di una molecola.

Classificazione dei metodi spettroscopici

Assorbimento

Si misura l'attenuazione di un fascio di radiazione che attraversa il campione. Esempi: spettrofotometria UV-Vis, spettroscopia IR, assorbimento atomico.

Emissione

Si misura la radiazione emessa da specie eccitate termicamente o elettricamente. Esempi: fotometria di fiamma, ICP-OES.

Fotoluminescenza

L'analita è eccitato per assorbimento di radiazione e si misura la radiazione riemessa a lunghezza d'onda maggiore. Esempi: fluorescenza e fosforescenza.

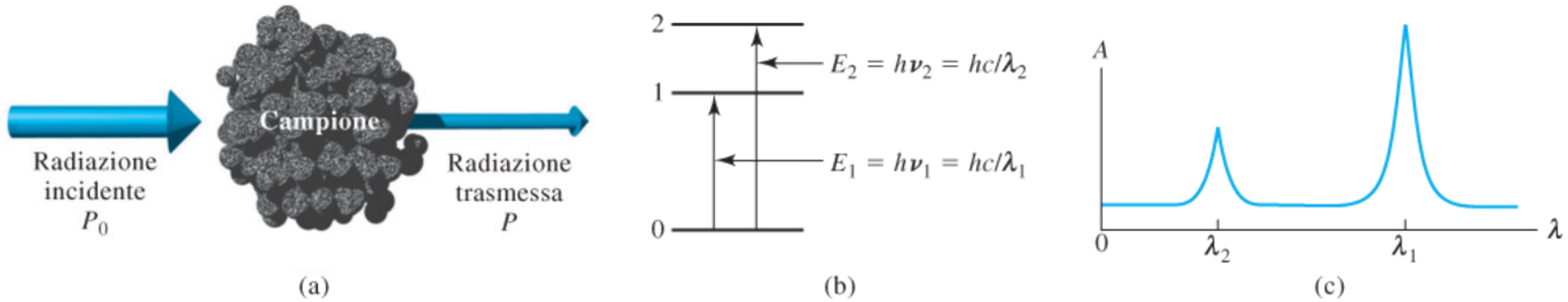
Schema di un esperimento di assorbimento

Il principio

Un fascio di potenza radiante P_0 attraversa il campione; parte della radiazione viene assorbita e la potenza trasmessa P è minore di P_0.

Lo spettro

L'assorbimento avviene solo alle energie che corrispondono a differenze tra livelli della specie: il grafico dell'assorbimento in funzione di λ è lo spettro di assorbimento.



(a) Attenuazione del fascio, (b) livelli energetici coinvolti, (c) spettro di assorbimento risultante.

02

Spettrofotometria UV-Vis

Transizioni elettroniche, legge di Lambert-Beer e analisi quantitativa

Transizioni elettroniche

Nell'UV-Vis la radiazione promuove elettroni di valenza da orbitali leganti o non leganti a orbitali antileganti σ* e π*.

σ → σ* e n → σ*

Richiedono energie elevate, sotto i 200 nm: riguardano legami singoli e eteroatomi saturi e non sono utili nelle misure di routine.

π → π*

Doppi e tripli legami, sistemi aromatici e coniugati. Transizioni molto probabili, con ε da 10^3 a oltre 10^4 L mol^{-1} cm^{-1}.

n → π*

Elettroni non leganti di O, N, S adiacenti a un doppio legame, come nel carbonile. Transizioni meno probabili, con ε tipicamente sotto 100.

Cromofori e spostamenti spettrali

Cromofori

Sono i gruppi funzionali responsabili dell'assorbimento, come C=C, C=O, N=N e gli anelli aromatici. La coniugazione sposta l'assorbimento a lunghezze d'onda maggiori e lo intensifica.

Spostamenti di posizione

Batocromico verso λ maggiori (spostamento al rosso), ipsocromico verso λ minori (spostamento al blu).

Spostamenti di intensità

Ipercromico se l'assorbimento aumenta, ipocromico se diminuisce. Solvente, pH e sostituenti possono produrre tutti questi effetti.

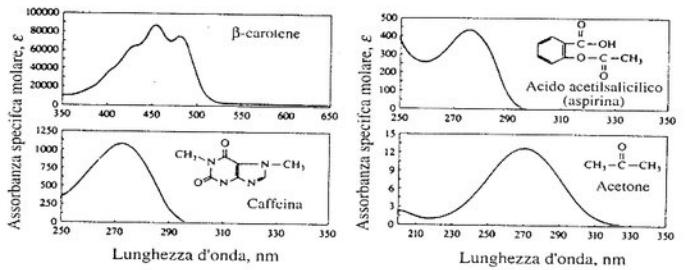


Figura 21–11
Spettri UV di composti organici tipici.

Spettri UV di alcuni composti organici tipici.

Cromofori tipici

Come leggere la tabella

Per ogni cromoforo sono riportati un composto di esempio, il solvente, la lunghezza d'onda del massimo e l'assorbività molare.

Cosa osservare

I sistemi coniugati assorbono a λ maggiori e con ε più alte dei cromofori isolati; i gruppi carbonilici mostrano bande n → π* deboli sopra i 270 nm.

Uso pratico

La tabella guida la scelta della lunghezza d'onda di misura e spiega perché molti composti saturi non sono rivelabili in UV.

Tabella 21–2
Caratteristiche di assorbimento di alcuni tipici cromofori organici

Cromoforo	Esempio	Solvente	λ_{max}, nm	ε_{max}
Alchene	$C_6H_{13}CH{=}CH_2$	*n*–eptano	177	13000
Alchene coniugato	$CH_2{=}CHCH{=}CH_2$	*n*–eptano	217	21000
Alchino	$C_5H_{11}C{\equiv}C{-}CH_3$	*n*–eptano	178	10000
			196	2000
			225	160
Carbonile	$CH_3\overset{\overset{O}{\|}}{C}CH_3$	*n*–esano	186	1000
			280	16
	$CH_3\overset{\overset{O}{\|}}{C}H$	*n*–esano	180	grande
			293	12
Carbossile	$CH_3\overset{\overset{O}{\|}}{C}OH$	etanolo	204	41
Ammide	$CH_3\overset{\overset{O}{\|}}{C}NH_2$	acqua	214	60
Azo	$CH_3N{=}NCH_3$	etanolo	339	5
Nitro	CH_3NO_2	isoottano	280	22
Nitroso	C_4H_9NO	etere etilico	300	100
			665	20
Nitrato	$C_2H_5ONO_2$	diossano	270	12
Aromatico	Benzene	*n*–esano	204	7.900
			256	200

Caratteristiche di assorbimento di alcuni cromofori comuni.

Coniugazione e colore

Composto	Doppi legami coniugati	λ_{max} (nm)	ε_{max} (L mol^{-1} cm^{-1})
Etilene	1	171	15.000
1,3-Butadiene	2	217	21.000
1,3,5-Esatriene	3	258	35.000
Licopene	11	~470	~180.000
β-Carotene	11	~450	~140.000

Ogni doppio legame coniugato aggiunto avvicina HOMO e LUMO: la banda π → π si sposta verso λ maggiori e diventa più intensa. Oltre circa 8 doppi legami coniugati l'assorbimento entra nel visibile e la sostanza appare colorata.*

Auxocromi ed effetto del pH

Gli auxocromi sono gruppi che non assorbono sopra 200 nm ma, legati a un cromoforo, ne spostano l'assorbimento verso λ maggiori e ne aumentano l'intensità.

Gruppi auxocromi

–OH, –OR, $–NH_2$, $–NR_2$, –SH, alogeni: le coppie di elettroni non leganti entrano in coniugazione con il sistema π del cromoforo.

Fenolo e fenato

Il benzene assorbe a 255 nm, il fenolo a 270 nm. In ambiente basico il fenato, con una coppia elettronica in più, si sposta a 287 nm e assorbe più intensamente: effetto batocromico e ipercromico.

Anilina e anilinio

L'anilina assorbe a 280 nm; protonata ad anilinio perde la coppia libera dell'azoto e torna a circa 254 nm, simile al benzene: effetto ipsocromico e ipocromico.

Effetto del solvente

Transizioni π → π*

Lo stato eccitato è più polare dello stato fondamentale e viene stabilizzato maggiormente dai solventi polari: all'aumentare della polarità del solvente la banda si sposta di qualche nanometro verso λ maggiori.

Transizioni n → π*

Nei solventi polari protici gli elettroni non leganti sono stabilizzati da legami a idrogeno nello stato fondamentale: la banda si sposta verso λ minori. Il n → π* dell'acetone passa da 279 nm in esano a 265 nm in acqua.

Conseguenze pratiche

Il solvente va sempre indicato con λ_{max} ed ε; il confronto tra spettri ha senso solo nello stesso solvente. Lo spostamento con il solvente aiuta anche ad assegnare il tipo di transizione.

Cromofori delle biomolecole

Biomolecola	Cromoforo	λ_{max} (nm)	ε (L mol^{-1} cm^{-1})	Uso analitico
Proteine	Legame peptidico	190-220	~7000 per legame	Rivelazione HPLC a 214 nm
Proteine	Triptofano	280	~5600	Dosaggio a 280 nm
Proteine	Tirosina	274	~1400	Dosaggio a 280 nm
Acidi nucleici	Basi puriniche e pirimidiniche	260	~10^4 per base	Quantificazione, purezza
Coenzimi	NADH, NADPH	340	6220	Saggi enzimatici
Flavine	FAD, FMN	450	~11.300	Flavoproteine
Emoproteine	Porfirina (banda di Soret)	~415	> 10^5	Emoglobina, citocromi
Pigmenti	Clorofilla a	430, 662	~10^5	Analisi di vegetali
Pigmenti	Antociani	~520 (pH acido)	~$3 \cdot 10^4$	Metodo del pH differenziale

Colore assorbito e colore osservato

Intervallo assorbito (nm)	Colore assorbito	Colore osservato (complementare)
400-435	Violetto	Giallo-verde
435-480	Blu	Giallo
480-490	Blu-verde	Arancio
490-500	Verde-blu	Rosso
500-560	Verde	Porpora
560-580	Giallo-verde	Violetto
580-595	Giallo	Blu
595-650	Arancio	Blu-verde
650-750	Rosso	Verde-blu

Una soluzione appare del colore complementare a quello che assorbe: il $KMnO_4$, viola, assorbe nel verde intorno a 525 nm.

Assorbimento a trasferimento di carica

Il fenomeno

In alcuni complessi un elettrone passa, per assorbimento di un fotone, da un orbitale del legante a uno del metallo o viceversa.

Perché è utile

Le bande a trasferimento di carica sono molto intense, con ε superiori a 10^4 L mol^{-1} cm^{-1}: garantiscono un'elevata sensibilità.

Esempi

Il complesso Fe(II)-o-fenantrolina per il dosaggio del ferro e il tiocianato di ferro(III), di colore rosso intenso.

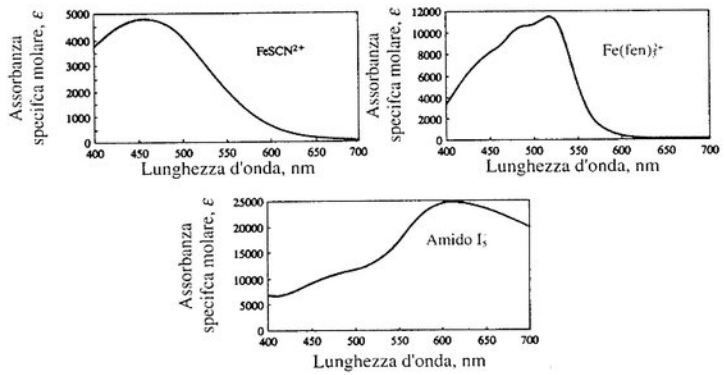


Figura 21–14
Spettri di complessi a trasferimento di carica.

Spettri di complessi a trasferimento di carica.

Trasmittanza e assorbanza

$$T = P / P_0 \qquad A = \log (P_0 / P) = - \log T$$

Trasmittanza

Frazione della radiazione incidente che attraversa il campione; si esprime anche in percentuale, $\%T = 100 \cdot P/P_0$.

Assorbanza

È il logaritmo del rapporto P_0/P. Non ha unità di misura e, a differenza della trasmittanza, è proporzionale alla concentrazione.

Il bianco

P_0 si misura in pratica con una cuvetta contenente solo il solvente, per compensare riflessioni e assorbimento di cuvetta e solvente.

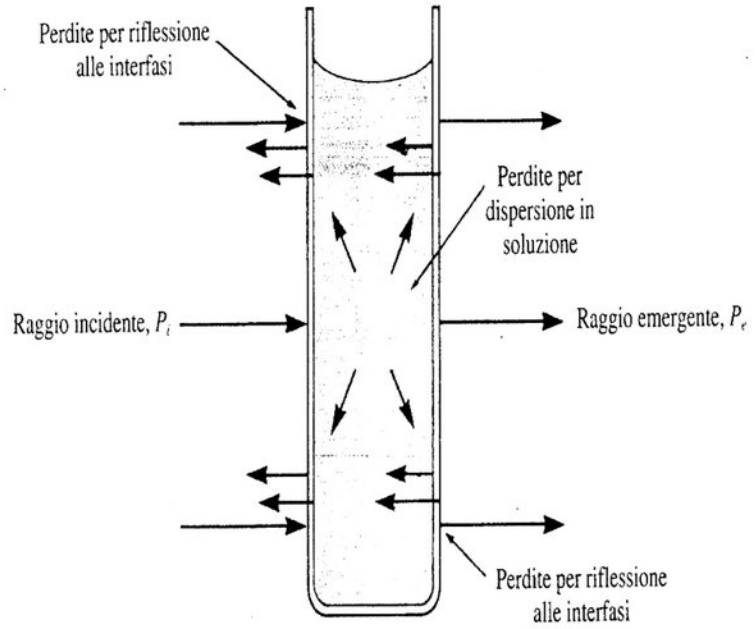


Figura 21-3
Perdite per riflessione e dispersione.

Attenuazione di un fascio che attraversa una soluzione di cammino ottico b.

Legge di Lambert-Beer

$$A = \varepsilon\, b\, c$$

I termini

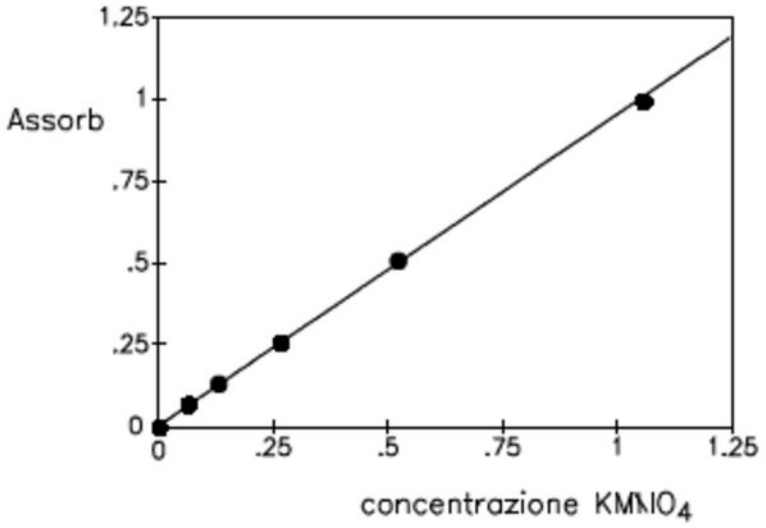
ε è l'assorbività molare in L mol^{-1} cm^{-1}, b il cammino ottico in cm, c la concentrazione in mol/L. Con c in g/L si usa l'assorbività a.

Linearità

A una lunghezza d'onda fissata l'assorbanza è proporzionale alla concentrazione: è la base dell'analisi quantitativa con retta di taratura.

Condizioni

Radiazione monocromatica, soluzioni diluite (indicativamente sotto 0,01 M), specie assorbenti che non interagiscono tra loro.



Retta di taratura: assorbanza in funzione della concentrazione.

Assorbività molare e sensibilità

Una proprietà della specie

L'assorbività molare al massimo di assorbimento è caratteristica di una specie in un dato solvente e a una data lunghezza d'onda.

Valori tipici

Per molti composti organici va da meno di 10 a oltre 10^4 L mol^{-1} cm^{-1}; alcuni complessi dei metalli di transizione arrivano a 10^4-$5 \cdot 10^4$.

Perché conta

ε elevate significano rette più ripide e limiti di rivelabilità più bassi. Per questo si misura al massimo di assorbimento, dove anche piccole variazioni di λ incidono poco.

Spettri a concentrazioni crescenti

Osservazione

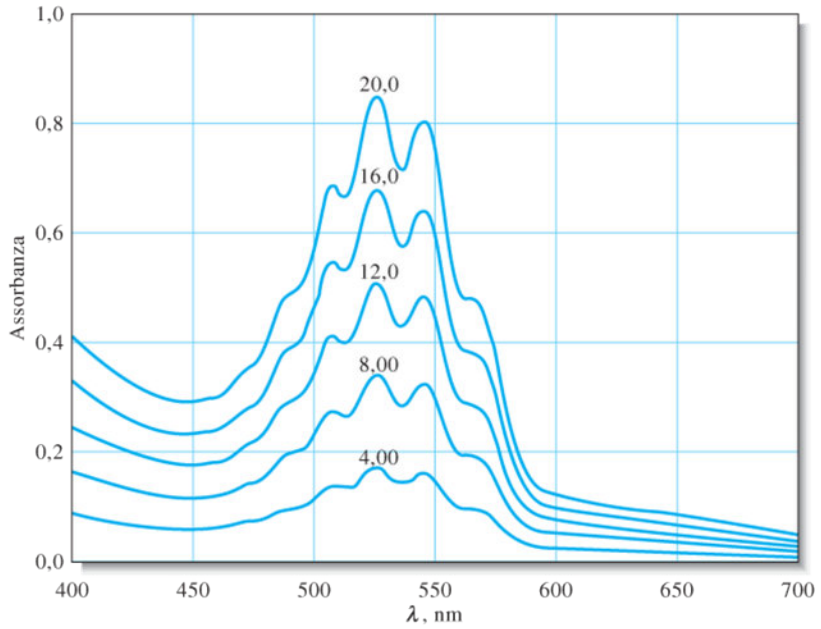
Gli spettri della stessa sostanza registrati a concentrazioni crescenti hanno la stessa forma e lo stesso massimo; cambia solo l'altezza.

Conseguenza

La posizione del massimo identifica la specie, l'intensità ne misura la quantità. A ogni lunghezza d'onda l'assorbanza cresce linearmente con la concentrazione.

Scelta della λ

Si misura al massimo, dove la sensibilità è più alta e la pendenza dello spettro è nulla.



Spettri di assorbimento a concentrazioni crescenti.

Deviazioni dalla legge di Beer

Limiti reali

Ad alte concentrazioni le molecole interagiscono tra loro e cambia l'indice di rifrazione: la retta si incurva.

Deviazioni chimiche

Associazione, dissociazione o reazione con il solvente producono specie con ε diverse, ad esempio un indicatore acido-base in soluzione non tamponata.

Deviazioni strumentali

Radiazione policromatica, soprattutto se si misura su un fianco della banda, e luce diffusa che raggiunge il rivelatore senza attraversare il campione.

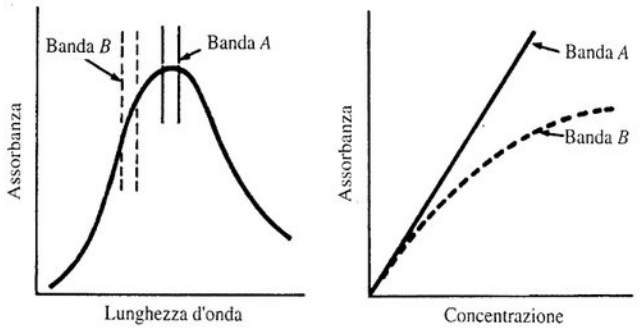


Figura 21–5
L'effetto della radiazione policromatica sulla legge di Beer. La banda A mostra una piccola deviazione poiché ε non cambia molto all'interno della banda. La banda B mostra deviazioni marcate perché ε subisce marcati cambiamenti in questa regione.

Effetto della radiazione policromatica sulla legge di Beer.

Errore spettrofotometrico

Assorbanze basse

P è quasi uguale a P_0: la misura è la piccola differenza tra due grandezze grandi e l'errore relativo sulla concentrazione è elevato.

Assorbanze alte

Al rivelatore arriva pochissima luce, il segnale è vicino al rumore e P è misurato con scarsa accuratezza.

Intervallo ottimale

L'errore relativo è minimo per assorbanze comprese tra circa 0,2 e 0,8. Campioni troppo concentrati si diluiscono, quelli troppo diluiti si misurano con un cammino ottico maggiore.

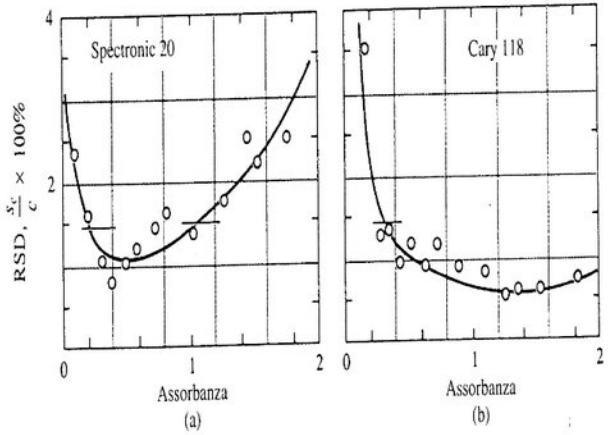


Figura 22-11
Curve sperimentali che correlano le incertezze relative sulla concentrazione all'assorbanza per due spettrofotometri. Dati ottenuti con (a) uno Spectronic 20, uno strumento a basso costo, e (b) un Cary 118, uno strumento per ricerca. (Da W. E. Harris e B. Kratochvil, *An Introduction to Chemical Analysis*, p. 384. Filadelfia: Saunders College Publishing, 1981. Per gent. conc.).

Errore relativo sulla concentrazione in funzione dell'assorbanza.

Additività delle assorbanze

$$A_\lambda = \varepsilon_{x,\lambda}\, b\, c_x + \varepsilon_{y,\lambda}\, b\, c_y$$

Il principio

In una miscela di specie che non interagiscono, l'assorbanza totale a ogni lunghezza d'onda è la somma delle assorbanze dei singoli componenti.

Due componenti

Misurando a due lunghezze d'onda λ_1 e λ_2, con le ε di ciascuna specie note da standard puri, si ottiene un sistema di due equazioni in due incognite c_x e c_y.

Scelta delle λ

Conviene scegliere le lunghezze d'onda dove uno dei due componenti assorbe molto più dell'altro.

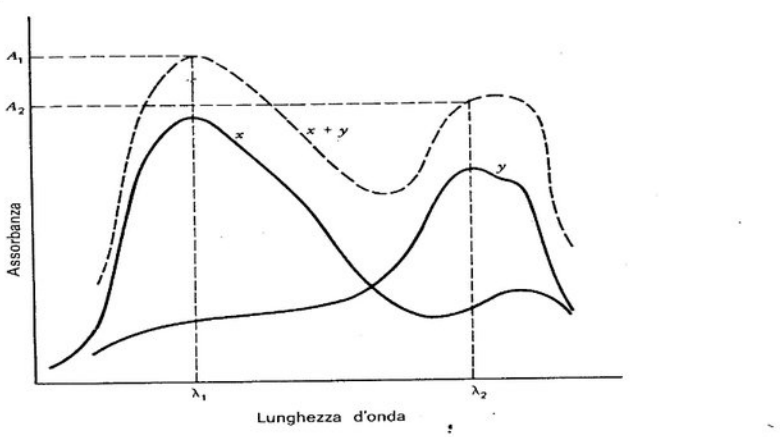


FIGURA 15.10
Spettri di assorbimento di sostanze pure *x* e *y* e di una miscela di *x* e *y* alle stesse concentrazioni.

Spettri di due componenti e della loro miscela.

Esercizio svolto: legge di Lambert-Beer

Dati Una soluzione di NADH misurata a 340 nm in cuvetta da 1,00 cm dà A = 0,415 contro il bianco. Assorbività molare del NADH a 340 nm: $\varepsilon = 6220\ \text{L mol}^{-1}\ \text{cm}^{-1}$.

Formula	$c = A / (\varepsilon\, b)$
Calcolo	$c = 0{,}415 / (6220 \times 1{,}00) = 6{,}67 \cdot 10^{-5}\ \text{mol/L}$
Unità	$c = 66{,}7\ \mu\text{mol/L}$
Verifica	$A = 0{,}415$ cade nell'intervallo ottimale 0,2-0,8: la misura è affidabile

Conclusione La stessa misura a 340 nm è usata nei saggi enzimatici che seguono la formazione o il consumo di NADH nel tempo.

Acidi nucleici e proteine

Acidi nucleici

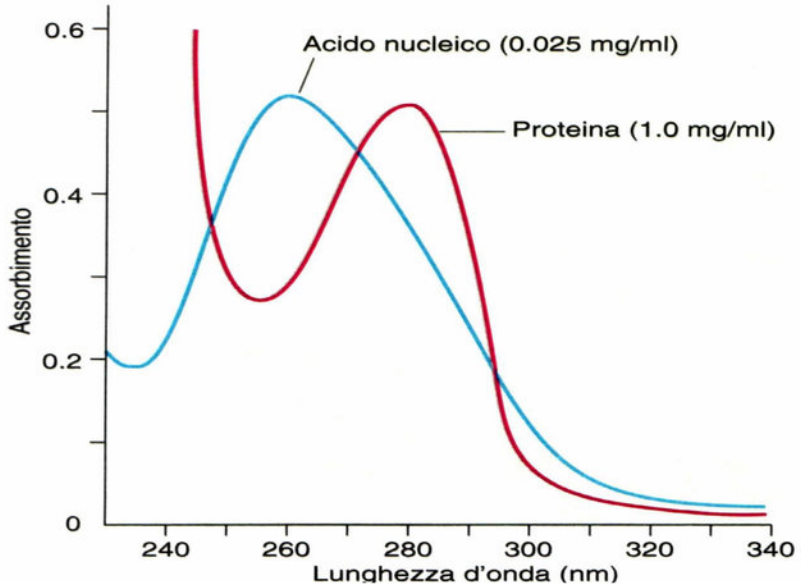
Le basi azotate assorbono con un massimo a 260 nm. Per un cammino di 1 cm, A_{260} = 1 corrisponde a circa 50 µg/mL di DNA a doppio filamento e 40 µg/mL di RNA.

Proteine

Assorbono a 280 nm grazie a triptofano e tirosina; per concentrazioni più basse o miscele si usano saggi colorimetrici come Bradford o BCA.

Purezza

Il rapporto A_{260}/A_{280} vale circa 1,8 per DNA puro e 2,0 per RNA; valori più bassi indicano contaminazione da proteine.



Spettri di un acido nucleico (0,025 mg/mL) e di una proteina (1,0 mg/mL).

Esercizio svolto: concentrazione e purezza del DNA

Dati Un estratto di DNA diluito 1:20 dà, in cuvetta da 1 cm, A_{260} = 0,250 e A_{280} = 0,135.

Diluito	$c = 0{,}250 \times 50\ \mu g/mL = 12{,}5\ \mu g/mL$
Estratto	$c = 12{,}5 \times 20 = 250\ \mu g/mL$
Purezza	$A_{260}/A_{280} = 0{,}250 / 0{,}135 = 1{,}85$

Conclusione Il rapporto vicino a 1,8 indica un DNA privo di contaminazione proteica significativa; l'estratto contiene 250 µg/mL di DNA a doppio filamento.

03

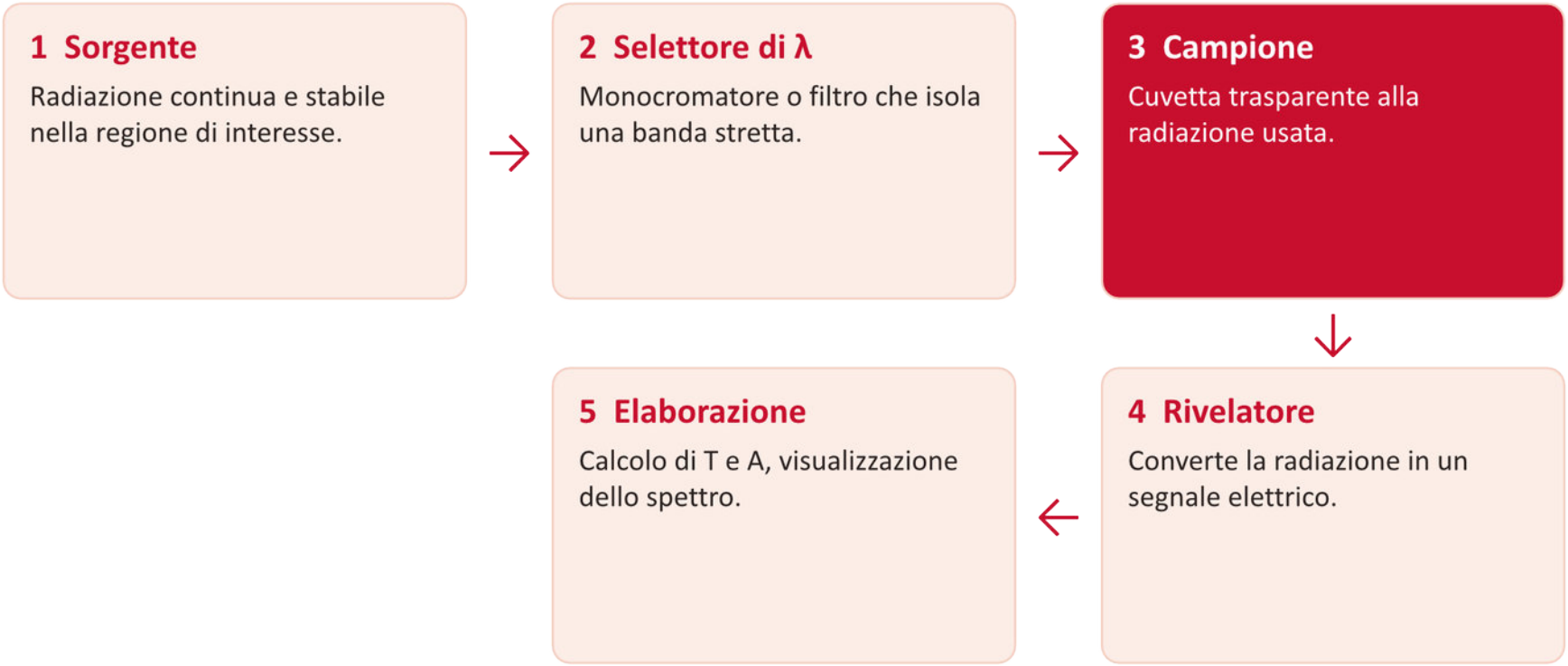
Strumentazione

Sorgenti, selettori di lunghezza d'onda, cuvette e rivelatori

STRUMENTAZIONE

I componenti di uno spettrofotometro

Ogni spettrofotometro di assorbimento combina gli stessi blocchi funzionali; cambiano i materiali a seconda della regione spettrale.



Sorgenti

UV

Lampada a deuterio, con emissione continua tra circa 160 e 380 nm.

Visibile e vicino IR

Lampada a filamento di tungsteno o tungsteno-alogeno, tra 320 e 2500 nm circa. Gli spettrofotometri UV-Vis montano entrambe le lampade.

Altre sorgenti

Lampada allo xeno, intensa su tutto l'UV-Vis e usata in fluorescenza; nell'IR solidi riscaldati come il Globar (carburo di silicio) e il filamento di Nernst; laser e LED per applicazioni specifiche.



Figura 20-6
(a) Lampada a filamento di tungsteno.
(b) Il suo spettro di emissione.

Tabella 20-1
Sorgenti continue per la spettroscopia ottica

Sorgente	Regione di lunghezza d'onda, nm	Tipo di spettroscopia
Lampada a Xeno	250–600	Fluorescenza molecolare
Lampada a H_2 e D_2	160–380	Molecolare di assorbimento UV
Lampada tungsteno/alogena	240–2500	Molecolare di assorbimento UV/vis/vicino IR
Lampada di tungsteno	350–2200	Molecolare di assorbimento vis/vicino IR
Lampada di Nernst	400–20000	Molecolare di assorbimento IR
Filo di nichelcromo	750–20000	Molecolare di assorbimento IR
Globar	1200–40000	Molecolare di assorbimento IR

Lampada a deuterio e tungsteno; tabella delle sorgenti continue per la spettroscopia ottica.

Monocromatore a prisma

Funzione

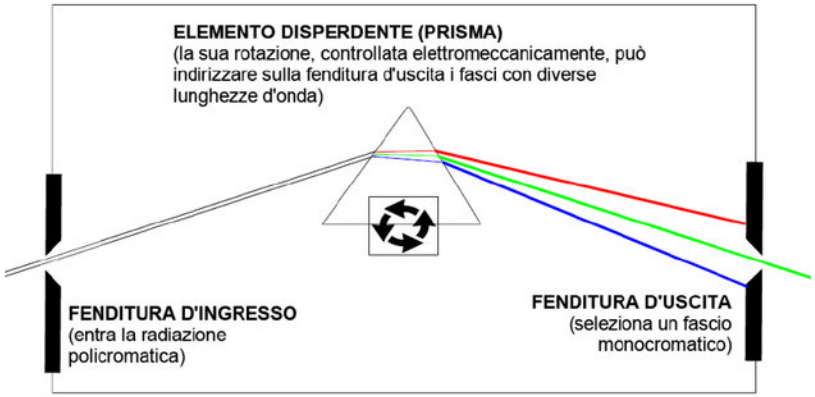
Separa la radiazione policromatica nelle sue componenti e permette di selezionare una banda stretta di lunghezze d'onda.

Principio

L'indice di rifrazione del materiale varia con la lunghezza d'onda: ogni λ viene deviata con un angolo diverso.

Limiti

La dispersione non è lineare ed è minore alle lunghezze d'onda maggiori. Il materiale deve essere trasparente: quarzo per l'UV, vetro per il visibile.



Fenditura d'ingresso, elemento disperdente e fenditura d'uscita.

Il reticolo a riflessione

$$n\,\lambda = d\,(\text{sen}\,i + \text{sen}\,r)$$

Struttura

Una superficie riflettente, di solito alluminio, incisa con un gran numero di solchi paralleli ed equidistanti, da centinaia a migliaia per millimetro.

Principio

La radiazione riflessa dai diversi solchi interferisce costruttivamente solo a certi angoli. n è l'ordine di diffrazione, d la distanza tra i solchi, i e r gli angoli di incidenza e di riflessione.

Vantaggi

Dispersione praticamente lineare. Gli ordini superiori si eliminano con filtri; è il selettore di λ degli strumenti moderni.

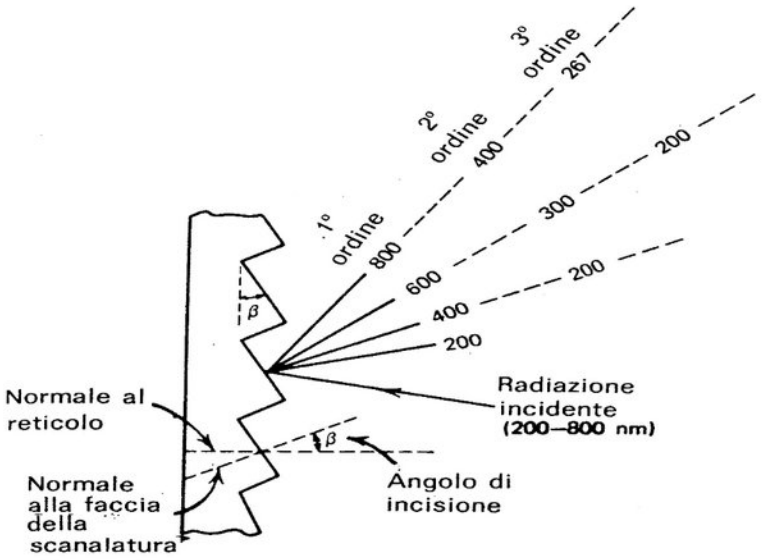


FIGURA 15.15
Diffrazione di radiazioni da parte di un reticolo.

Diffrazione della radiazione da parte di un reticolo a riflessione.

Il monocromatore a reticolo

Componenti

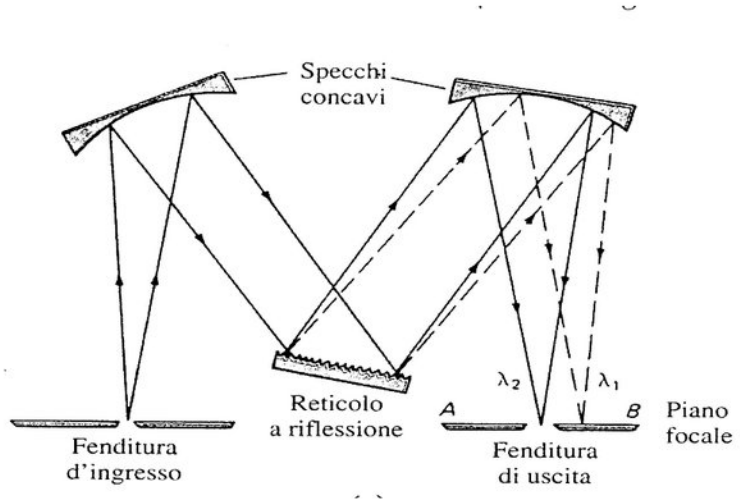
Fenditura d'ingresso, specchio concavo che rende parallelo il fascio, reticolo, secondo specchio che focalizza la radiazione dispersa sulla fenditura d'uscita.

Selezione della λ

Ruotando il reticolo si porta sulla fenditura d'uscita la lunghezza d'onda desiderata.

Schema Czerny-Turner

È la configurazione più comune: i due specchi concavi correggono le aberrazioni e mantengono compatto lo strumento.



Monocromatore a reticolo con specchi concavi.

Ampiezza di banda e fenditure

Ampiezza di banda effettiva

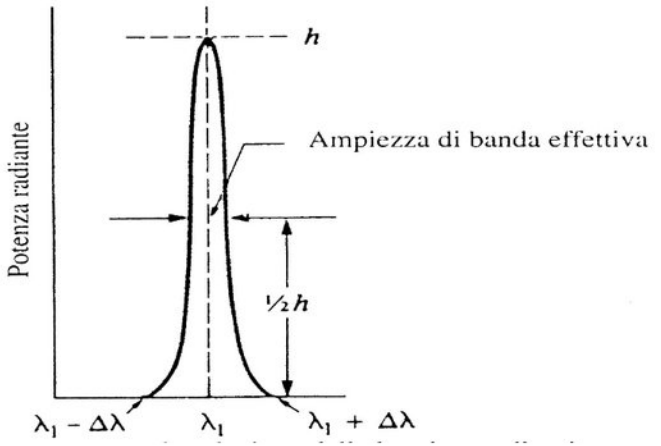
Il monocromatore non isola una sola λ ma una banda, la cui larghezza a metà altezza dipende dalla dispersione del reticolo e dall'apertura della fenditura d'uscita.

Il compromesso

Fenditure strette migliorano la risoluzione e la linearità della legge di Beer, ma riducono la potenza che arriva al rivelatore e aumentano il rumore.

Valori tipici

Negli spettrofotometri da banco l'ampiezza di banda è di 1-2 nm, ampiamente sufficiente per le bande larghe delle molecole in soluzione.



Distribuzione delle lunghezze d'onda in uscita dal monocromatore.

Filtri ad assorbimento e a interferenza

Filtri ad assorbimento

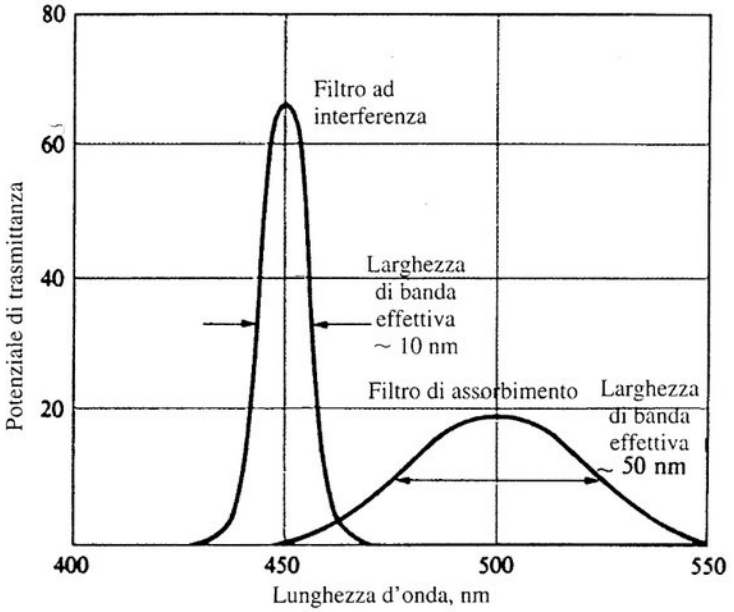
Vetri colorati che trasmettono una banda ampia, di decine di nanometri: economici e robusti.

Filtri a interferenza

Strati sottili dielettrici che sfruttano l'interferenza costruttiva: bande più strette, intorno a 10 nm, e trasmissione più alta, ma costo maggiore.

Dove si usano

Negli strumenti che lavorano a lunghezze d'onda fisse, come fotometri e lettori di micropiastre per saggi immunoenzimatici.



Curve di trasmissione di un filtro ad assorbimento e di uno a interferenza.

Cuvette

Materiale

Deve essere trasparente nella regione di misura: quarzo o silice fusa nell'UV, vetro e plastica solo nel visibile, finestre di NaCl o KBr nell'infrarosso.

Cammino ottico

Lo standard è 1 cm. Cuvette più lunghe aumentano la sensibilità, micro-cuvette e strumenti a microvolume riducono la quantità di campione necessaria.

Buone pratiche

Pareti pulite e senza impronte, cuvette appaiate per bianco e campione, orientamento costante nel portacampioni.

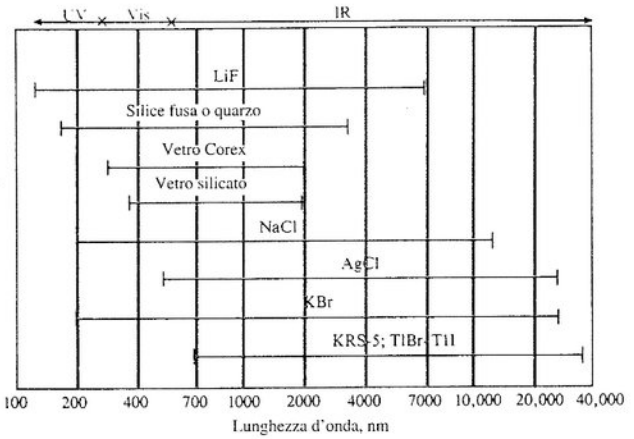


Figura 20–5
Intervallo di trasmittanza per vari materiali ottici.

Intervallo di trasparenza dei materiali usati per cuvette e finestre.

Rivelatori: fototubi e fotodiodi

Rivelatori fotonici

Contengono una superficie che, colpita dai fotoni, emette elettroni (fotoemissione) o diventa conduttrice (fotoconduzione). Funzionano fino a circa 2 µm.

Fototubo

Un catodo fotoemissivo e un anodo in un bulbo sotto vuoto: la corrente prodotta è proporzionale alla potenza radiante.

Fotodiodi al silicio

Rivelatori a semiconduttore compatti, economici e robusti; disposti in serie formano i rivelatori a serie di diodi. Per l'IR si usano rivelatori termici o fotoconduttori specifici.

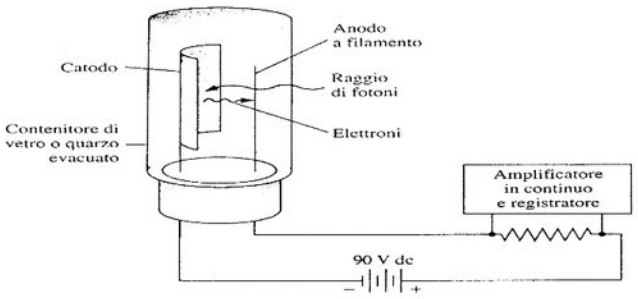


Figura 20–12
Fototubo con circuito accessorio. La fotocorrente indotta dalla radiazione produce una differenza di potenziale lungo il resistore; questo segnale è quindi amplificato per poter essere registrato.

Schema di un fototubo con circuito di amplificazione.

Il fotomoltiplicatore

Struttura

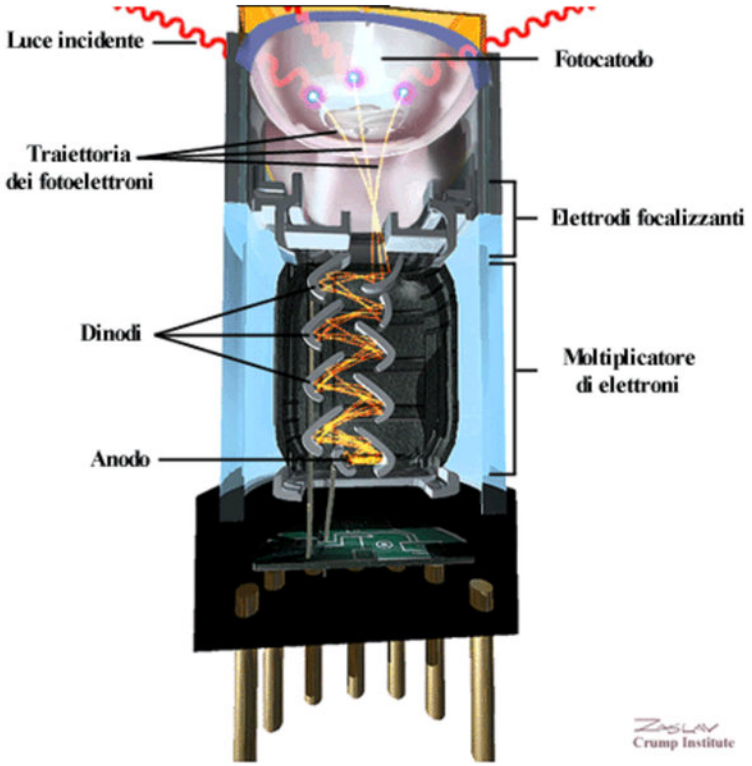
Un fotocatodo, una serie di dinodi a potenziale crescente e un anodo, in un tubo sotto vuoto.

Amplificazione

Ogni elettrone che colpisce un dinodo ne libera diversi: dopo 9-12 dinodi il segnale è amplificato di 10^6-10^7 volte.

Uso

È il rivelatore più sensibile per l'UV-Vis: indispensabile in fluorescenza e per segnali molto deboli. Va protetto da luce intensa, che lo danneggia.



Fotomoltiplicatore: fotocatodo, dinodi e anodo.

Spettrofotometro a raggio singolo

Schema

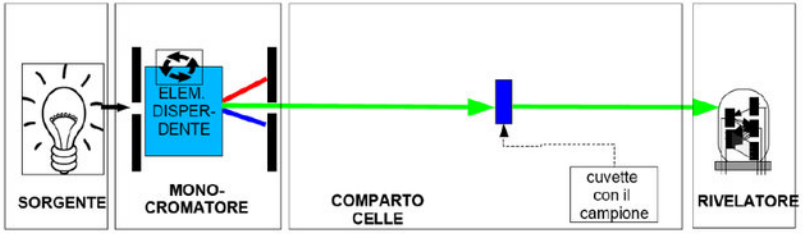
Sorgente, monocromatore, comparto celle e rivelatore sono allineati lungo un unico cammino ottico.

Procedura

Si misura prima il bianco per fissare P_0 ($A = 0$), poi il campione nella stessa posizione.

Pro e contro

Semplice ed economico, ma qualsiasi variazione della sorgente o del rivelatore tra le due misure introduce un errore: richiede strumenti stabili e un bianco ripetuto spesso.



Schema di uno spettrofotometro a raggio singolo.

Spettrofotometro a doppio raggio

Schema

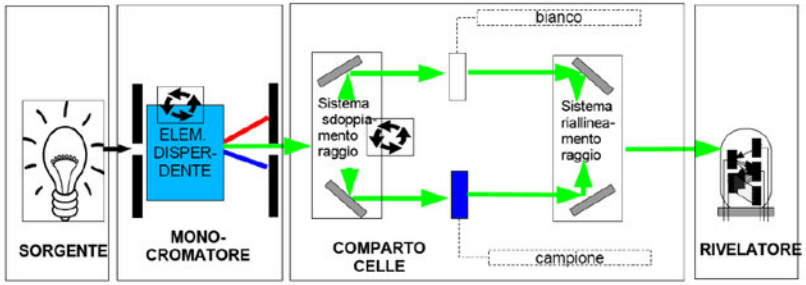
Dopo il monocromatore un sistema di specchi, spesso un chopper rotante, divide il fascio: un raggio attraversa il bianco, l'altro il campione.

Vantaggio

Bianco e campione vengono misurati quasi contemporaneamente: le fluttuazioni della sorgente e del rivelatore si compensano.

Uso

È la configurazione preferita per registrare spettri completi e per misure di precisione su lunghi intervalli di tempo.



Schema di uno spettrofotometro a doppio raggio.

Rivelatore a serie di diodi (DAD)

Ottica inversa

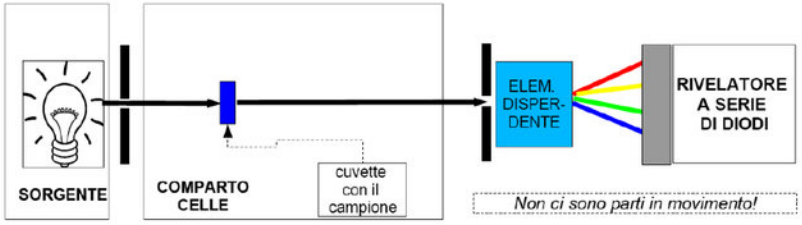
La radiazione policromatica attraversa il campione e solo dopo viene dispersa dal reticolo su una serie di centinaia di fotodiodi.

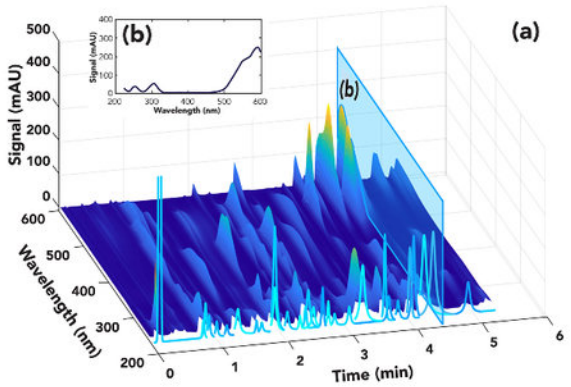
Vantaggi

Registra l'intero spettro in una frazione di secondo, senza parti in movimento. Permette di monitorare più lunghezze d'onda contemporaneamente.

In HPLC

Fornisce cromatogrammi a qualsiasi λ e lo spettro di ogni picco, utile per identificare i composti e verificare la purezza del picco.





Schema di un rivelatore a serie di diodi; cromatogramma tridimensionale assorbanza-tempo-lunghezza d'onda.

Analisi quantitativa: la retta di taratura

Qualitativa e quantitativa

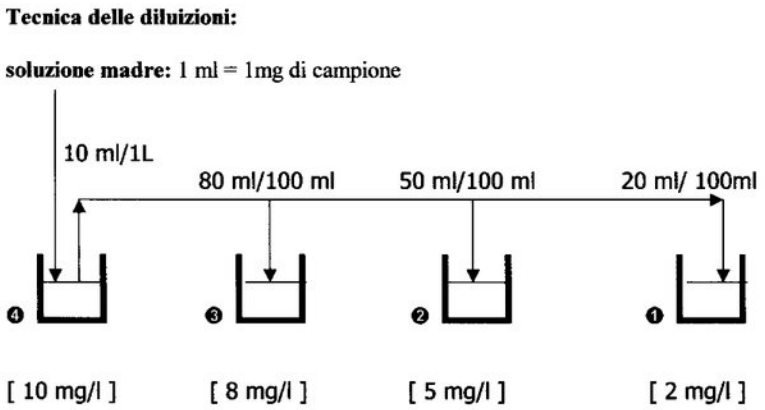
La lunghezza d'onda della radiazione assorbita è caratteristica della sostanza; l'intensità dell'assorbimento dipende dalla sua quantità.

Preparazione degli standard

Da una soluzione madre a concentrazione nota si preparano per diluizione standard a concentrazioni crescenti che coprono l'intervallo atteso nei campioni.

Uso della retta

Si misurano gli standard, si costruisce la retta A contro c e si ricava la concentrazione dei campioni per interpolazione.



Preparazione degli standard di taratura da una soluzione madre.

UV-Vis come rivelatore in HPLC

Cella a flusso

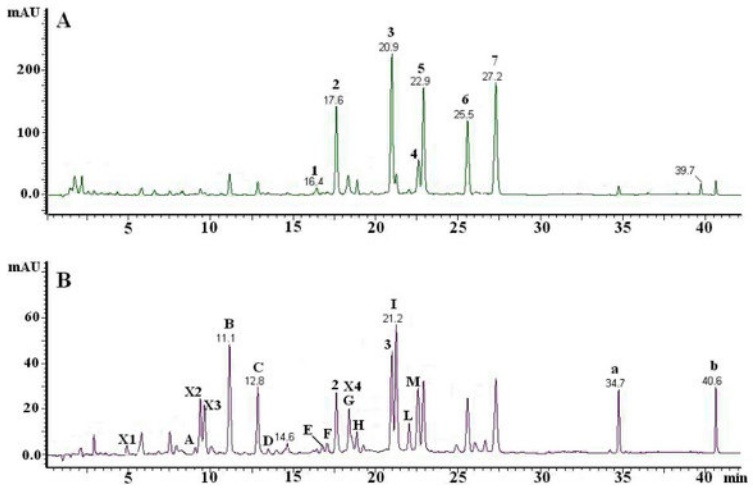
L'eluato attraversa una cella di pochi microlitri; il volume ridotto evita di allargare i picchi separati dalla colonna.

Scelta della λ

Si usa il massimo dell'analita, tenendo conto del cut-off UV dei solventi della fase mobile: l'acetonitrile è trasparente fino a circa 190 nm, il metanolo fino a circa 205 nm.

Selettività

Cambiando lunghezza d'onda si esaltano o si sopprimono alcuni picchi: i due cromatogrammi dello stesso campione appaiono diversi.



Lo stesso campione registrato a due lunghezze d'onda diverse.

04

Spettroscopia infrarossa

Vibrazioni molecolari, spettri IR e FTIR

Le regioni dell'infrarosso

Vicino IR (NIR)

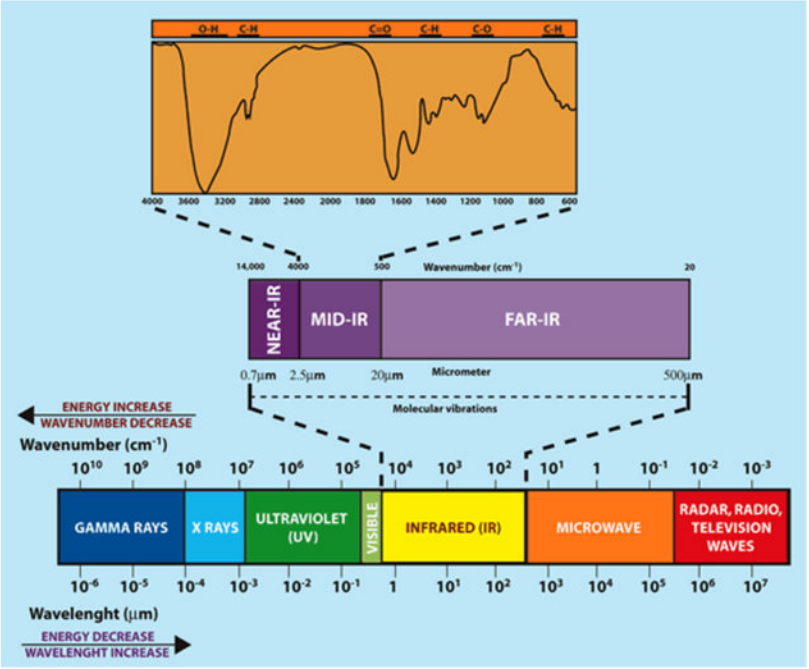
Circa 13.000-4000 cm^{-1}: sovratoni e bande di combinazione, deboli ma utili per analisi quantitative rapide su alimenti e materie prime.

Medio IR (MIR)

4000-400 cm^{-1}: vibrazioni fondamentali dei legami. È la regione usata per l'identificazione strutturale.

Lontano IR (FIR)

400-10 cm^{-1}: vibrazioni di atomi pesanti e del reticolo cristallino, di interesse più specialistico.



Posizione dell'infrarosso nello spettro elettromagnetico.

Moti vibrazionali

Spettroscopia vibrazionale

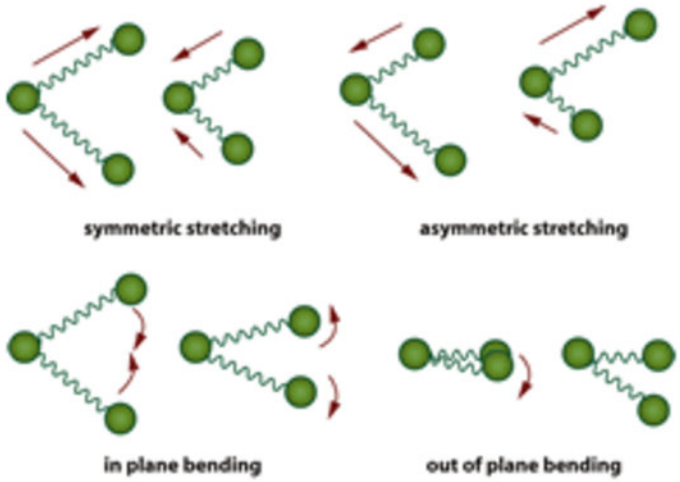
La radiazione IR non è abbastanza energetica per transizioni elettroniche, ma eccita le vibrazioni dei legami.

Stretching

Variazione periodica della lunghezza del legame lungo il suo asse; può essere simmetrico o antisimmetrico.

Bending

Variazione dell'angolo di legame: nel piano (scissoring e rocking) o fuori dal piano (wagging e twisting). Richiede meno energia dello stretching.



Modi di vibrazione di stretching e bending di un gruppo CH_2.

L'oscillatore armonico

$$\tilde{\nu} = (1 / 2\pi c)\sqrt{(k / \mu)} \qquad \mu = m_1 m_2 / (m_1 + m_2)$$

Il modello

Due atomi legati si comportano come due masse unite da una molla. La frequenza di vibrazione dipende dalla costante di forza k del legame e dalla massa ridotta μ.

Legami più forti

k cresce con l'ordine di legame: C≡C assorbe a circa 2200 cm^{-1}, C=C a 1650, C–C sotto 1200.

Atomi più leggeri

Una massa ridotta piccola alza la frequenza: i legami con l'idrogeno (O–H, N–H, C–H) assorbono sopra 2800 cm^{-1}; C–D assorbe a frequenze più basse di C–H.

Attività IR: il momento dipolare

La regola

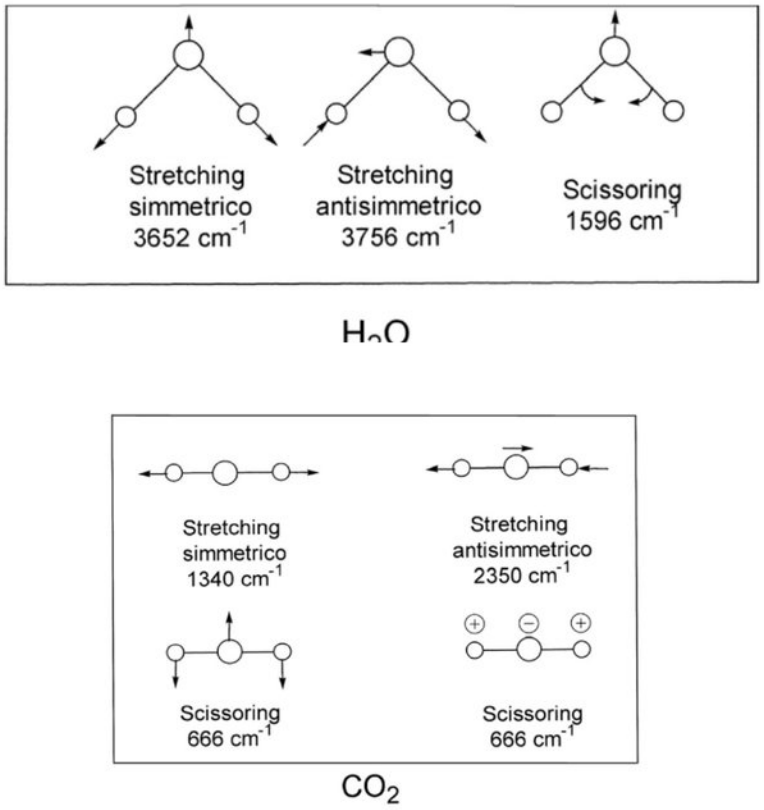
Una vibrazione assorbe nell'IR solo se produce una variazione del momento dipolare della molecola: la molecola che vibra genera un campo elettrico oscillante che scambia energia con la radiazione.

H_2O

Tutti e tre i modi sono IR attivi: stretching simmetrico (3652 cm^{-1}), antisimmetrico (3756 cm^{-1}) e scissoring (1596 cm^{-1}).

CO_2

Lo stretching simmetrico (1340 cm^{-1}) non modifica il momento dipolare ed è IR inattivo; sono attivi lo stretching antisimmetrico (2350 cm^{-1}) e il bending (666 cm^{-1}).



Modi normali di vibrazione di H_2O e CO_2.

Fattori che influenzano la frequenza

Legame a idrogeno

Indebolisce il legame X–H e sposta lo stretching a frequenze più basse, allargando molto la banda: l'O–H libero è stretto intorno a 3600 cm^{-1}, quello associato degli acidi carbossilici è larghissimo tra 3300 e 2500.

Effetto induttivo e di risonanza

Gruppi elettronattrattori legati al carbonile ne alzano la frequenza (cloruri acilici ~1800 cm^{-1}); gruppi elettrondonatori per risonanza la abbassano (ammidi ~1650 cm^{-1}).

Coniugazione

Delocalizza gli elettroni π e riduce il carattere di doppio legame: un carbonile coniugato assorbe circa 20-40 cm^{-1} più in basso (1715 → 1685 cm^{-1}).

Le zone dello spettro IR

4000-2500 cm^{-1}

Stretching dei legami con l'idrogeno: O–H, N–H, C–H.

2500-2000 cm^{-1}

Stretching dei tripli legami e dei cumuleni: C≡C, C≡N, O=C=O.

2000-1500 cm^{-1}

Stretching dei doppi legami: C=O intorno a 1700, C=C e C=N, anelli aromatici.

1500-400 cm^{-1}

Regione dell'impronta digitale: stretching dei legami singoli e bending, caratteristica di ogni molecola.

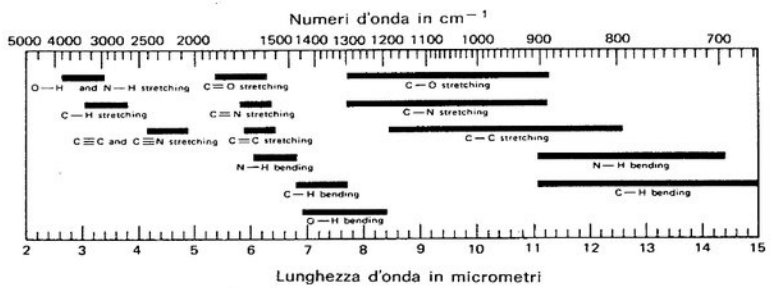


FIGURA 15.8
Semplici correlazioni tra vibrazioni di gruppi e regioni di assorbimento infrarosso. Da R. T. Conley, *Infrared Spectroscopy*, 2nd Ed. Boston: Allyn and Bacon, Inc., 1972. (Reproduced by permission of Allyn and Bacon, Inc.).

Carta di correlazione delle principali bande di assorbimento IR.

Leggere uno spettro IR

Il grafico

Trasmittanza (o assorbanza) in funzione del numero d'onda, per convenzione decrescente da sinistra a destra. Le bande di assorbimento appaiono come picchi rivolti verso il basso.

Posizione e intensità

La posizione dipende dalla costante di forza del legame; l'intensità dalla variazione del momento dipolare. Si descrivono come forti, medie o deboli e larghe o strette.

Fase del campione

Nei gas si osservano bande vibro-rotazionali complesse; in fase liquida e solida le collisioni impediscono la rotazione libera e le bande sono più semplici.

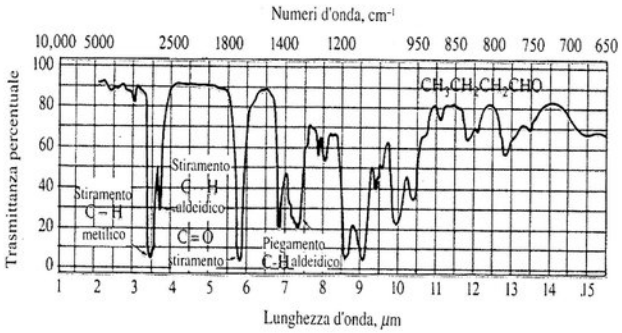


Figura 21–15
Spettro infrarosso per l'*n*–butanale (*n*–butirraldeide). Notare che si riporta in grafico la trasmittanza più che l'assorbanza.

Spettro IR di un composto organico con le bande principali.

Lo spettrofotometro IR a dispersione

Schema

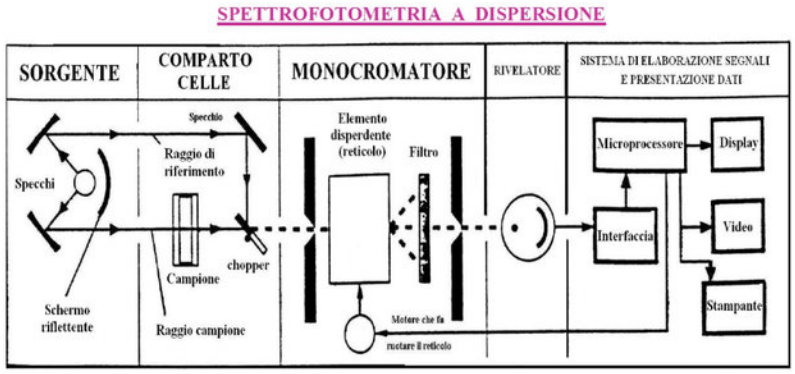
Sorgente (Globar o filamento di Nernst), sistema a doppio raggio con chopper, monocromatore a reticolo e rivelatore termico.

Particolarità

Ottiche a specchi e finestre in sali alogenuri, perché vetro e quarzo assorbono nell'IR. Il campione è posto prima del monocromatore.

Oggi

Gli strumenti dispersivi sono stati quasi completamente sostituiti dagli FTIR, più rapidi, sensibili e accurati.



Schema a blocchi di uno spettrofotometro IR a dispersione.

FTIR: lo spettrofotometro a trasformata di Fourier

L'interferometro

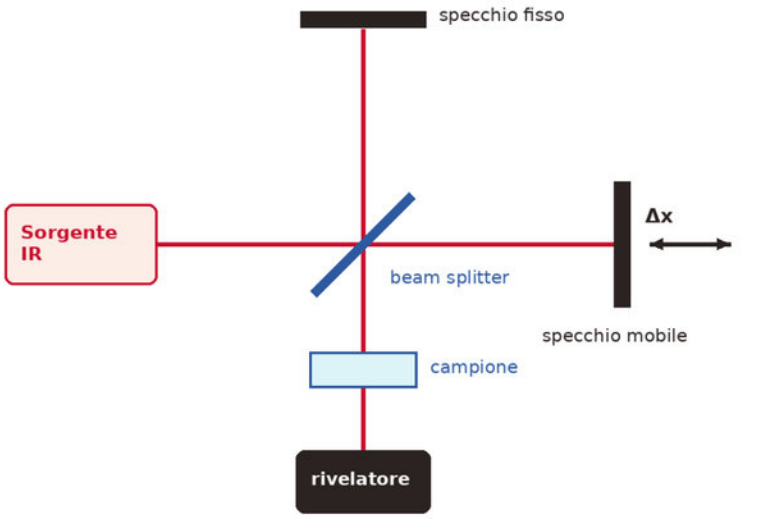
Un beam splitter divide il fascio verso uno specchio fisso e uno mobile; i due fasci ricombinati interferiscono in modo diverso a seconda dello spostamento dello specchio.

Interferogramma e spettro

Il rivelatore registra tutte le frequenze insieme, in funzione della posizione dello specchio; la trasformata di Fourier converte questo interferogramma nello spettro.

Vantaggi

Multiplex (tutte le frequenze in ogni misura), maggiore potenza al rivelatore per l'assenza di fenditure, numero d'onda calibrato con un laser. Uno spettro si acquisisce in pochi secondi.



Interferometro di Michelson: il segnale registrato in funzione di Δx è l'interferogramma.

Interferometro di Michelson, cuore dello spettrofotometro FTIR.

Preparazione del campione

Pasticche di KBr

Il solido viene macinato con KBr anidro e pressato in un disco trasparente. Richiede manualità ed è sensibile all'umidità, che aggiunge bande O–H.

Film e celle

I liquidi si analizzano come film tra due finestre di NaCl o KBr; le soluzioni in celle con solventi che assorbono poco nella regione di interesse.

ATR (riflettanza totale attenuata)

Il campione si appoggia su un cristallo di diamante o ZnSe e la radiazione penetra solo pochi micrometri: solidi, liquidi e paste si analizzano senza preparazione. È oggi la tecnica più usata.

Applicazioni e limiti

Identificazione

Lo spettro nella regione dell'impronta digitale è praticamente unico per ogni molecola: il confronto con le banche dati permette di identificare composti puri e di verificare materie prime.

Analisi quantitativa

La legge di Beer vale anche nell'IR. NIR e MIR, combinati con la chemiometria, sono usati per determinare umidità, proteine, grassi e zuccheri negli alimenti in pochi secondi.

Limiti

Le miscele complesse danno spettri sovrapposti; l'acqua assorbe fortemente e disturba i campioni acquosi; la sensibilità è inferiore a UV-Vis e fluorescenza.

05

Spettroscopia di emissione

Fluorescenza, fosforescenza ed emissione in fiamma

EMISSIONE

La luminescenza

La luminescenza è l'emissione di radiazione da parte di una specie eccitata. Il tipo dipende dalla sorgente dell'energia di eccitazione.

Fotoluminescenza

L'eccitazione avviene per assorbimento di radiazione UV-Vis. Comprende fluorescenza e fosforescenza.

Chemiluminescenza

L'energia proviene da una reazione chimica, come nell'ossidazione del luminolo; se la reazione è enzimatica si parla di bioluminescenza, come per la luciferasi.

Altre forme

Elettroluminescenza, radioluminescenza, termoluminescenza. Le molecole fluorescenti sono di solito aromatiche o eterocicliche, dette fluorofori.

Il diagramma di Jablonski

Assorbimento e rilassamento

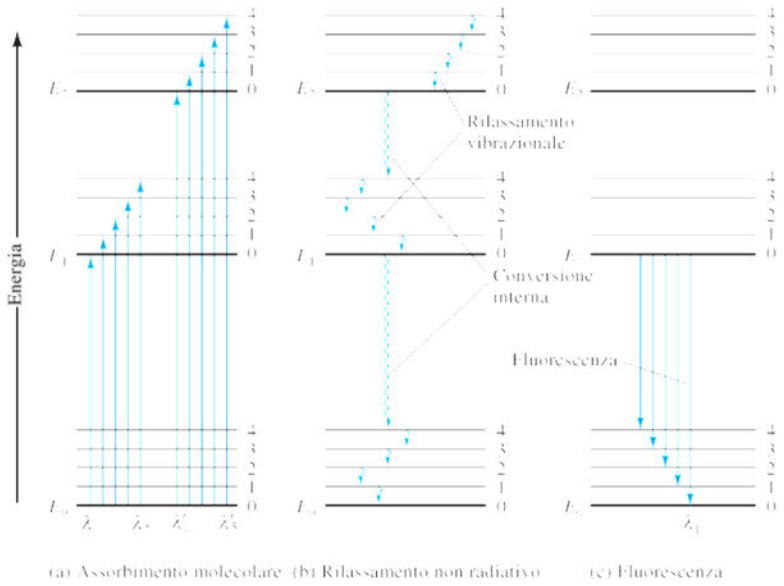
Dopo l'assorbimento la molecola raggiunge un livello vibrazionale eccitato e perde rapidamente energia per rilassamento vibrazionale e conversione interna, fino al livello più basso di S_1.

Fluorescenza

Emissione da S_1 a S_0, tra stati con lo stesso spin; avviene in 10^{-9}-10^{-7} s.

Fosforescenza

Dopo un incrocio intersistema verso lo stato di tripletto T_1, l'emissione verso S_0 è proibita dallo spin e quindi lenta, da millisecondi a secondi.



(a) Assorbimento, (b) rilassamento non radiativo, (c) fluorescenza.

Rendimento quantico e struttura

$$\Phi = \text{molecole che emettono / molecole eccitate}$$

Competizione tra processi

La fluorescenza compete con il rilassamento non radiativo. Molte molecole che potrebbero fluorescere non lo fanno perché la disattivazione non radiativa è più rapida dell'emissione.

Valori

Fluorofori molto efficienti come la fluoresceina hanno Φ vicino a 1 in condizioni opportune; le specie non fluorescenti hanno Φ praticamente nullo.

Rigidità strutturale

Le molecole rigide e planari fluorescono di più: la rigidità riduce i moti che disperdono l'energia come calore. Anche la complessazione con un metallo può rendere fluorescente un legante.

Spettri di eccitazione ed emissione

Spostamento di Stokes

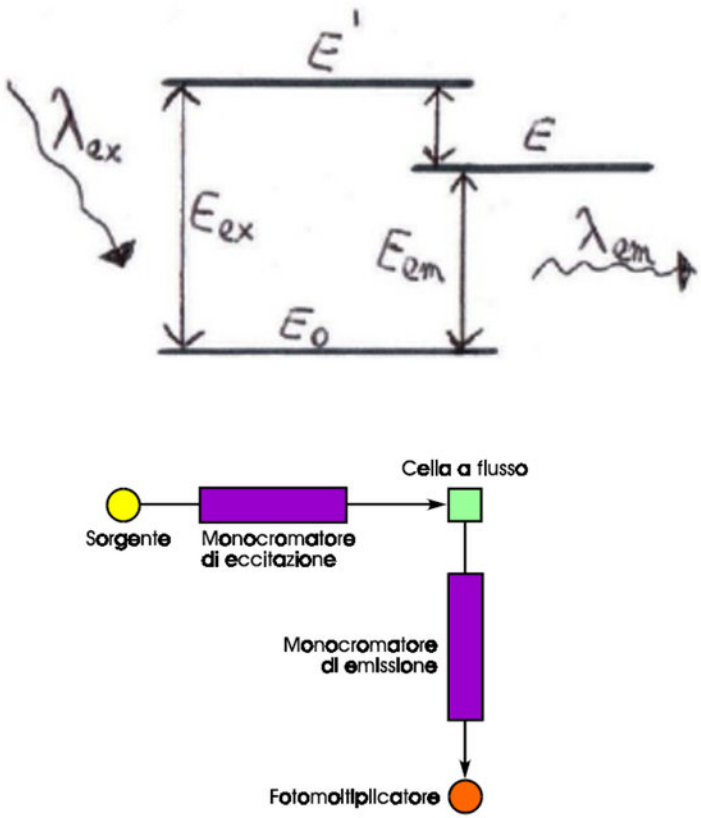
La radiazione emessa ha energia minore e quindi lunghezza d'onda maggiore di quella assorbita, perché parte dell'energia si perde per rilassamento vibrazionale.

Due spettri

Lo spettro di eccitazione si registra variando λ_{ex} a emissione fissa e somiglia allo spettro di assorbimento; lo spettro di emissione si registra variando λ_{em} a eccitazione fissa.

Selettività

Scegliendo sia λ_{ex} sia λ_{em} si ottiene una selettività superiore all'assorbimento: pochi composti condividono entrambe.



Origine dello spostamento di Stokes e spettri di eccitazione ed emissione.

Intensità di fluorescenza e concentrazione

$$F = K'(P_0 - P) \approx 2{,}303\, K'\, \varepsilon\, b\, c\, P_0 = k\, c$$

Linearità

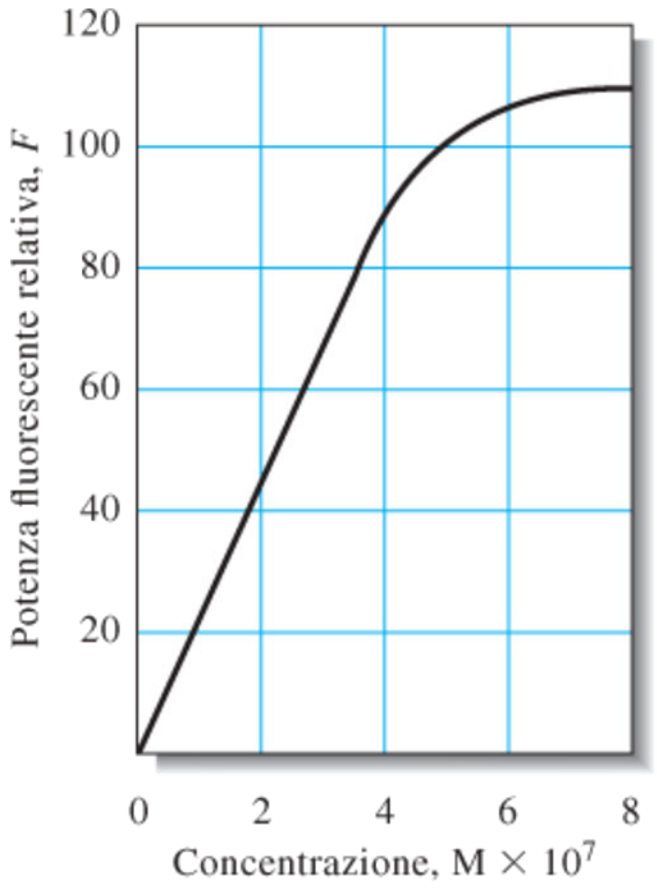
La potenza di fluorescenza è proporzionale alla radiazione assorbita. Per assorbanze basse, sotto circa 0,05, F è proporzionale alla concentrazione e alla potenza della sorgente.

Effetto filtro interno

Ad alte concentrazioni il fascio di eccitazione viene assorbito prima di raggiungere il centro della cella (filtro primario) e la luce emessa viene riassorbita (filtro secondario): la curva si incurva e poi scende.

Quenching

Ossigeno, ioni alogenuro e altre specie disattivano lo stato eccitato e riducono l'intensità.



Intensità di fluorescenza in funzione della concentrazione.

Fluorimetri e spettrofluorimetri

Geometria a 90°

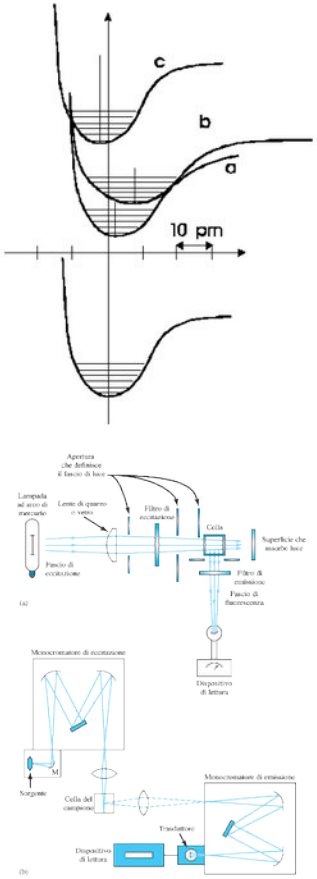
La fluorescenza è emessa in tutte le direzioni: il rivelatore si pone a 90° rispetto al fascio di eccitazione, così non vede la sorgente.

Fluorimetro

Usa filtri per selezionare eccitazione ed emissione: semplice, economico e adatto ad analisi quantitative di routine.

Spettrofluorimetro

Ha due monocromatori a reticolo e registra spettri di eccitazione e di emissione. Sorgente allo xeno, rivelatore a fotomoltiplicatore.



Schema di uno spettrofluorimetro; fluorimetro a filtri e spettrofluorimetro a due monocromatori.

La fluorescenza in biotecnologie

Analitica

Amminoacidi, proteine, coenzimi, vitamine, acidi nucleici, porfirine e molti metaboliti si determinano per fluorescenza, direttamente o dopo derivatizzazione; il rivelatore a fluorescenza è molto usato in HPLC ed elettroforesi.

Sonde ioniche

Indicatori come Fura-2 cambiano spettro quando legano Ca^{2+}: permettono di seguire nel tempo la concentrazione del calcio libero nei singoli neuroni.

Biologia molecolare

Proteine fluorescenti come la GFP, PCR quantitativa in tempo reale, citometria a flusso e microscopia a fluorescenza si basano sugli stessi principi.

Spettroscopia di emissione in fiamma

$$I_E = K \cdot c$$

Principio

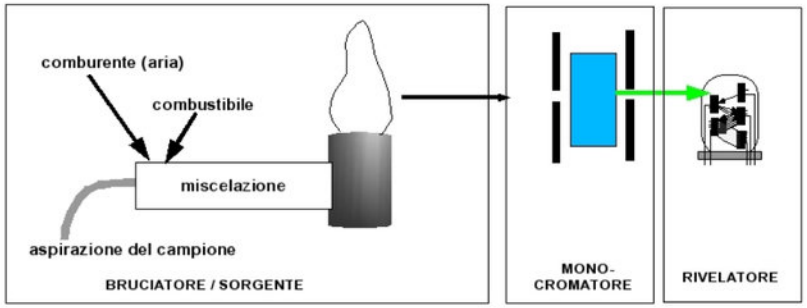
La soluzione viene nebulizzata in una fiamma; gli atomi eccitati termicamente emettono a lunghezze d'onda caratteristiche, a righe strette.

Applicazioni

Determinazione quantitativa dei metalli alcalini e alcalino-terrosi (Li, Na, K, Ca), facilmente eccitabili alle temperature di una fiamma aria-propano o aria-acetilene (circa 2000-2500 K).

Quantificazione

L'intensità di emissione è proporzionale alla concentrazione nell'intervallo di lavoro: si costruisce una retta di taratura con standard.



Fotometro a fiamma: nebulizzatore e bruciatore, monocromatore, rivelatore.

SINTESI

Le tecniche a confronto

	UV-Vis	IR	Fluorescenza	Emissione in fiamma
Transizione	Elettronica	Vibrazionale	Elettronica (emissione da S_1)	Elettronica atomica
Uso principale	Quantitativo	Identificazione	Quantitativo in tracce	Metalli alcalini
Sensibilità	Media	Bassa	Molto alta	Alta per Na, K
Selettività	Bassa-media	Molto alta	Alta	Alta (righe)
Esempio biotech	DNA a 260 nm	Verifica di materie prime	Sonde e qPCR	Na e K nei fluidi

La scelta della tecnica dipende dall'informazione richiesta: identità, quantità, livello di concentrazione e natura della matrice.