

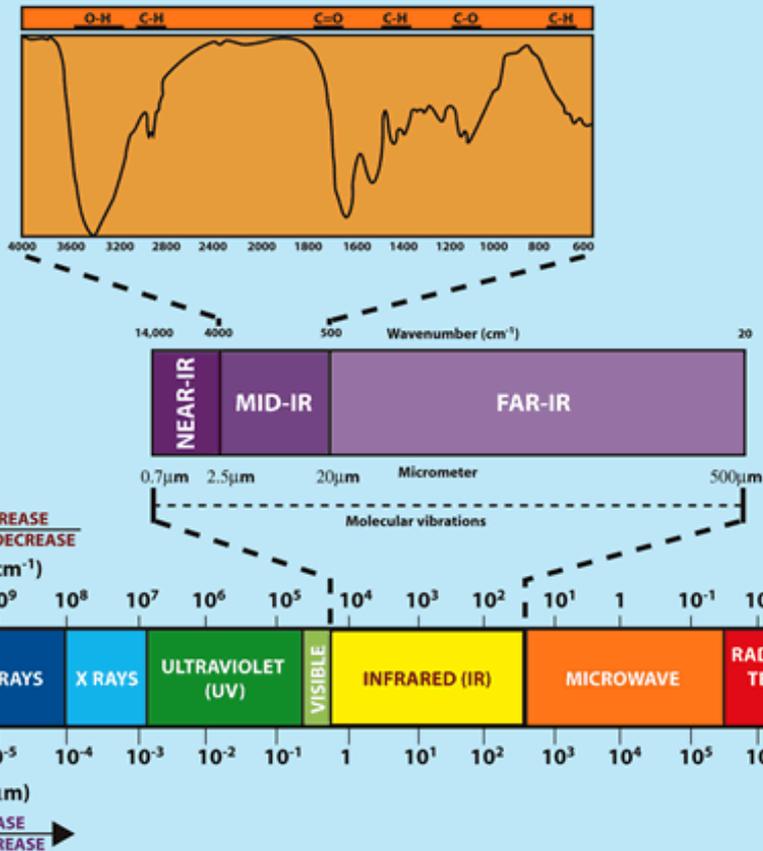
UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI TERAMO

CL in VITICOLTURA ED ENOLOGIA

*Anno Accademico 2020/2021*

METODI SPETTROSCOPICI - 2

# SPETTROSCOPIA IR



La radiazione infrarossa si riferisce a quella parte dello spettro elettromagnetico che si trova tra le regioni del visibile e delle microonde.

Dividiamo questa zona in:

→ IR vicino (NIR) → 13.000–4.000  $\text{cm}^{-1}$

→ IR medio (MIR) → 4.000–200  $\text{cm}^{-1}$

→ IR lontano (FIR) → 200 – 10  $\text{cm}^{-1}$

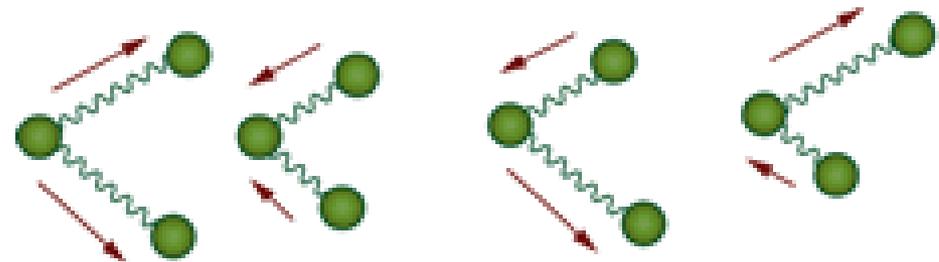
La zona che comunque interessa maggiormente è quella compresa fra 4.000 e 400  $\text{cm}^{-1}$ .

# MOTI VIBRAZIONALI

IR è una **spettroscopia vibrazionale**, infatti quando una molecola viene investita da una radiazione infrarossa la cui frequenza (espressa in termini di numeri d'onda, inversamente proporzionale alla lunghezza d'onda) sia compresa fra 10.000 e 100  $\text{cm}^{-1}$

L'energia ceduta dalla radiazione stessa viene convertita in energia vibrazionale, e sono due i modi fondamentali in cui la molecola può vibrare:

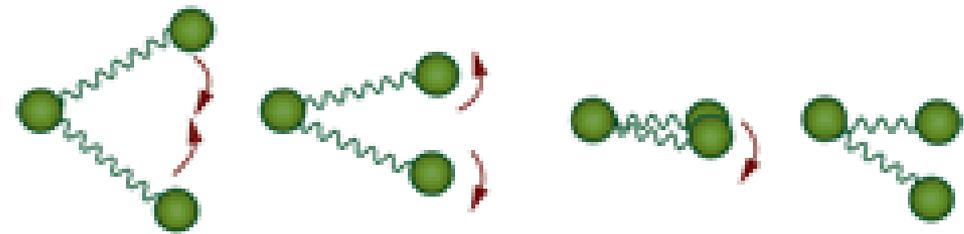
**VIBRAZIONE DI STRETCHING** (stiramento):  
dovuto a stiramento ritmico lungo l'asse di legame



symmetric stretching

asymmetric stretching

**VIBRAZIONE DI BENDING** (piegamento)  
dovuto a variazione dell'angolo di legame



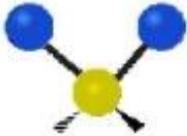
in plane bending

out of plane bending

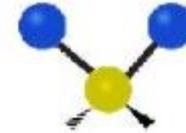
- vibrazioni sul piano → scissoring e rocking
- vibrazioni fuori dal piano → wagging e twisting

# MOTI VIBRAZIONALI

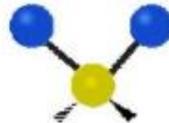
Stretching Asimmetrico (stiramento)



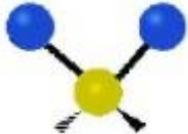
Bending Asimmetrico fuori del piano:  
Twisting (torsione)



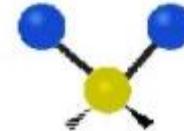
Bending Asimmetrico nel piano: Scissoring (forbice)



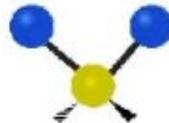
Stretching Simmetrico

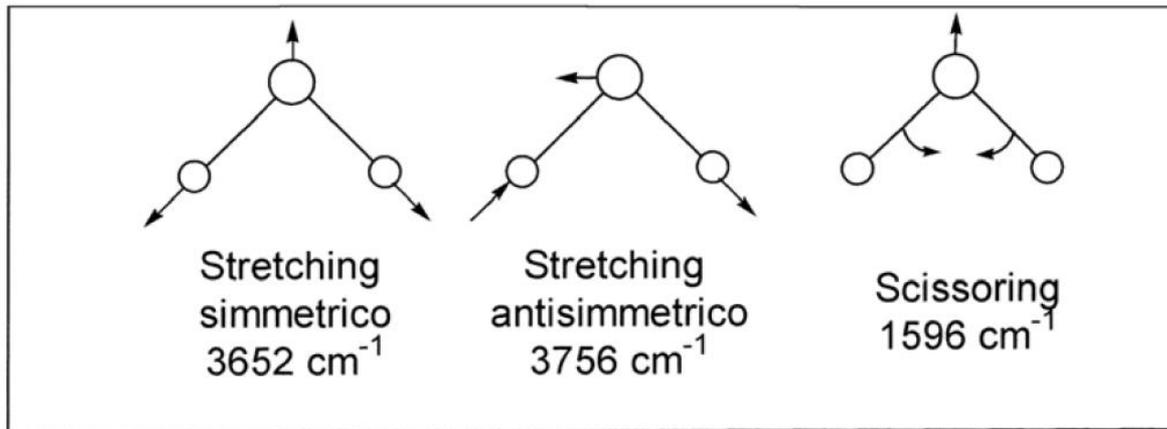


Bending Simmetrico fuori del piano:  
Wagging (agitare)

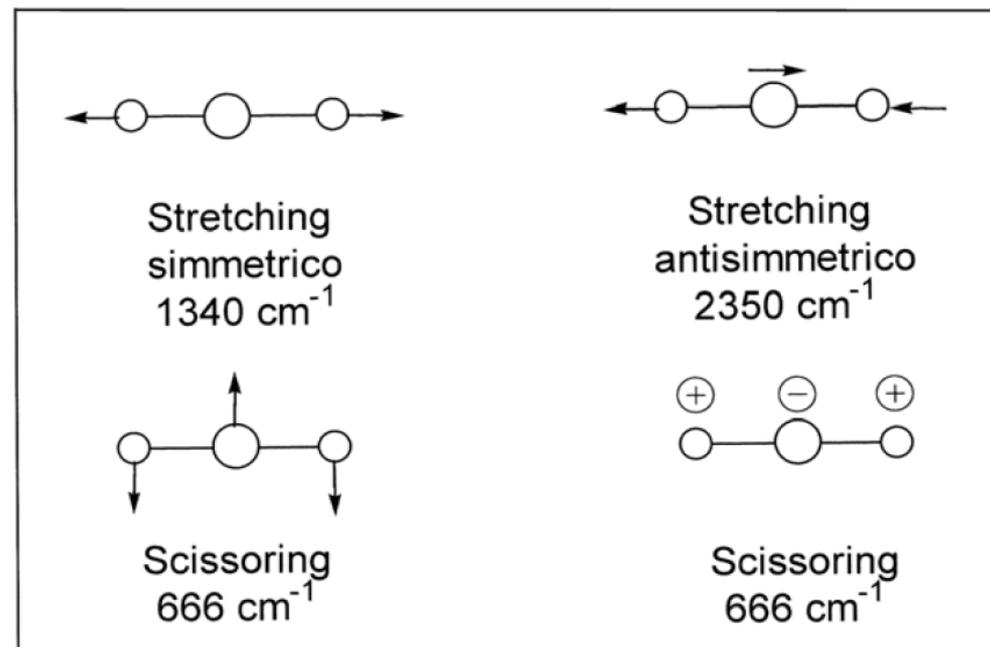


Bending Simmetrico nel piano: Rocking (dondolo)





$\text{H}_2\text{O}$



$\text{CO}_2$

# FATTORI CHE INFLUENZANO LA FREQUENZA DI ASSORBIMENTO

## ASSOCIAZIONE MOLECOLARE

Le molecole all'interno di un campione possono instaurare dei legami fra di loro, in particolare legami idrogeno, sia intermolecolari (come accade nel caso degli acidi carbossilici), sia intramolecolari.

Il legame idrogeno modifica la costante di forza di entrambi i gruppi, perciò vengono alterate le frequenze di vibrazione sia dello stretching che del bending; si osserva un generale spostamento delle frequenze verso valori più bassi.

## EFFETTO INDUTTIVO

La frequenza di assorbimento di un gruppo funzionale dipende soprattutto dall'intorno che si trova da affrontare; la presenza dunque di gruppi elettrondonatori o elettronattrattori la influenza notevolmente!

GRUPPI ELETTRONATTRATTORI → spostano gli assorbimenti dei gruppi vicini a frequenze maggiori

GRUPPI ELETTRONDONATORI → spostano gli assorbimenti a frequenze maggiori

## CONIUGAZIONE

Produce una delocalizzazione degli elettroni  $\pi$ , riducendo il carattere di doppio legame, e quindi spostando le frequenze a valori più bassi di circa  $10 - 15 \text{ cm}^{-1}$

# MOTI VIBRAZIONALI

Quando queste vibrazioni determinano una variazione del momento dipolare della molecola, allora si ha una vibrazione IR attiva.

Quando si ha una tale variazione, infatti, la molecola, vibrando, produce un campo elettrico oscillante: ciò rende possibile lo scambio di energia con le onde elettromagnetiche.

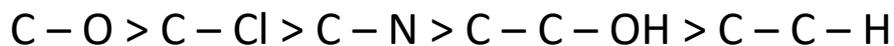
$$\mu = q \cdot d$$

$\mu$  = momento dipolare

$q$  = carica elettrica

$d$  = distanza vettoriale

L'intensità di una banda dipende dal valore del momento dipolare del legame a cui si riferisce:



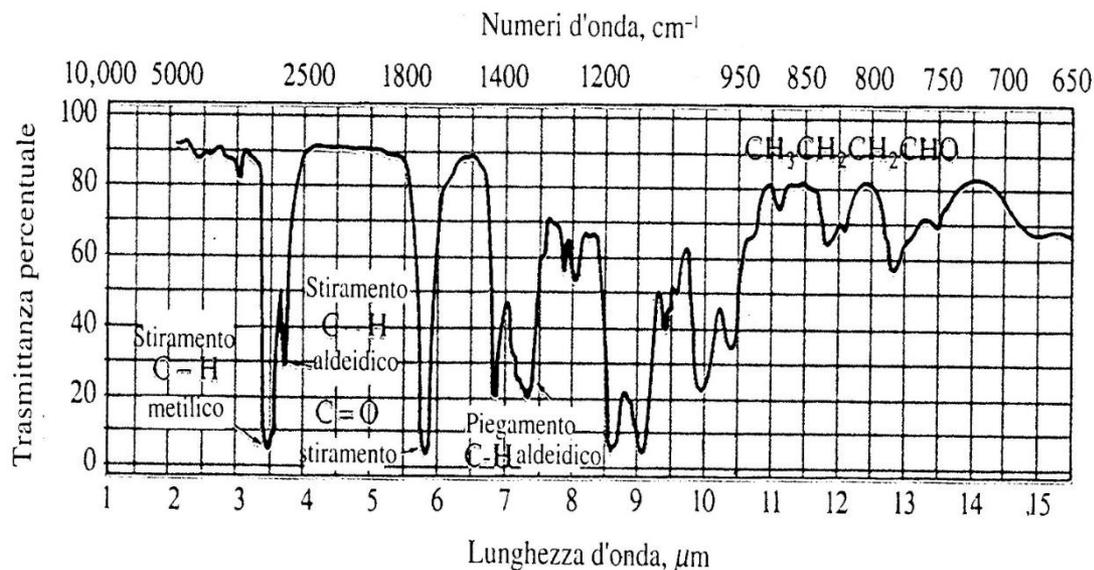
Quindi l'intensità di una banda dipende dall'elettronegatività relativa degli atomi coinvolti nel legame a cui quella banda si riferisce



# SPETTRO IR

Lo spettro IR, che riporta l'intensità dell'assorbimento in funzione della lunghezza d'onda, è caratterizzato da picchi riferibili a gruppi funzionali specifici, che fanno parte della struttura della molecola in esame.

Grazie alla riproducibilità di questi picchi, e soprattutto dei valori caratteristici di assorbimento, siamo in grado di risalire alla struttura della molecola in esame.



Lo spettro è meno risolto a  $\lambda$  maggiori ( $\Delta E$  tra i livelli energetici è minore)

Figura 21-15

Spettro infrarosso per l'*n*-butanale (*n*-butirraldeide). Notare che si riporta in grafico la trasmittanza più che l'assor-

# SPETTRO IR

Lo spettro infrarosso si presenta come una sequenza di bande di assorbimento registrate in funzione della lunghezza d'onda (o del numero d'onda).

Nel caso di composti in fase gassosa le bande appaiono di solito alquanto complesse in quanto prodotte da transizioni vibro-rotazionali delle molecole.

In fase solida e praticamente neanche in liquida le molecole si urtano prima di aver compiuto una rotazione completa (in altre parole il loro cammino libero medio è inferiore al tempo di rotazione), per questo gli spettri si presentano più semplici.

I parametri che caratterizzano una banda di assorbimento IR sono:

## POSIZIONE

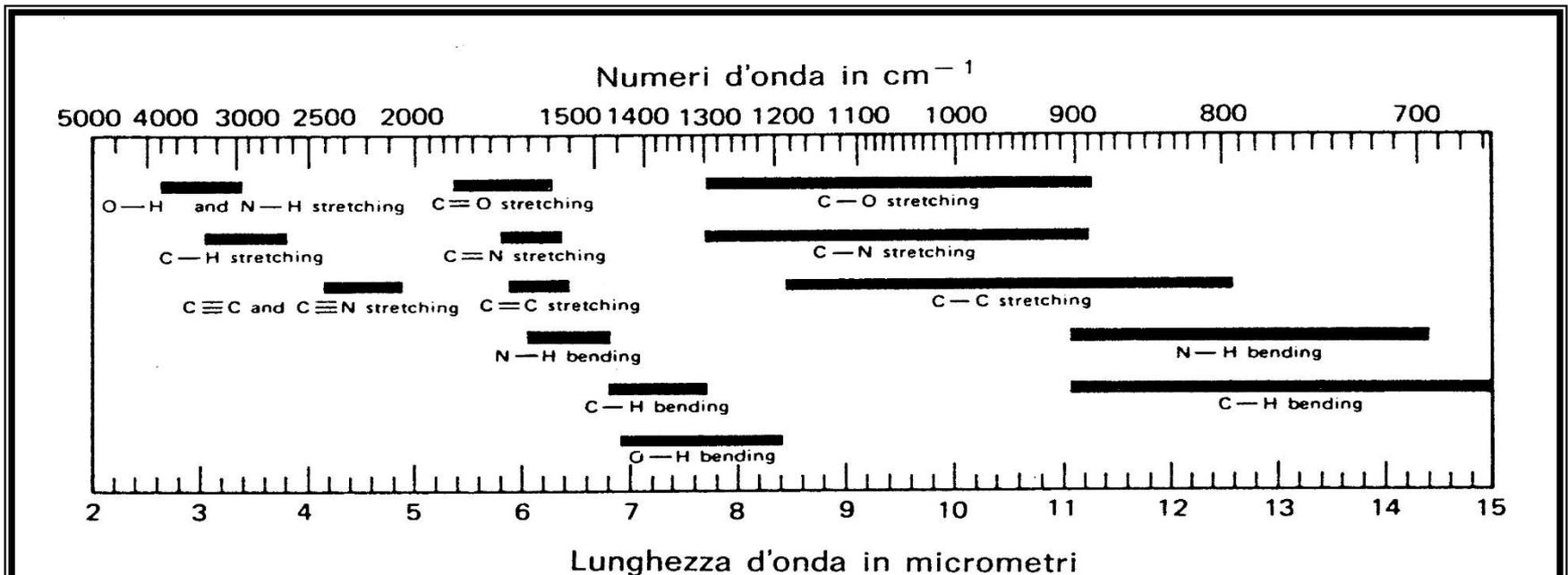
La posizione di una banda viene indicata con la sua  $\lambda_{\max}$  (in micrometri  $\mu\text{m}$ ) o più spesso in numero d'onda  $\nu$  ( $\text{cm}^{-1}$ ), che dipende dalla costante di forza del legame interessato: più rigido è il legame, quanto maggiore è l'energia necessaria per amplificare le vibrazioni.

## INTENSITÀ

L'intensità di una banda (cioè l'altezza del picco) esprime la probabilità che avvenga la transizione energetica dallo stato fondamentale a quello eccitato (da parte del gruppo funzionale) che provoca l'assorbimento.

Lo spettro può essere diviso in 4 zone:

- Zona di stretching dell'idrogeno ( $\lambda = 2.7 - 4.0 \mu\text{m}$ )
- Zona di stretching del triplo legame ( $\lambda = 4.0-5.0 \mu\text{m}$ )
- Zona di stretching del doppio legame ( $\lambda = 5.0 - 6.4 \mu\text{m}$ )
- Zona di stretching e bending del legame singolo ( $\lambda = 6.0-15 \mu\text{m}$ )



**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.).

La strumentazione è paragonabile a quella di uno spettrofotometro con l'uso di materiali che non provochino interferenze (p.es. cuvette di KBr). La sorgente è generalmente un solido riscaldato e in alcuni strumenti si usano rivelatori di calore (p.es. termocoppie) soprattutto utili nella regione a lunghezze d'onda elevate.

Alcuni strumenti più moderni (FTIR, spettrometro infrarosso a trasformata di Fourier) sono in grado di misurare contemporaneamente tutto lo spettro IR.

La spettroscopia IR viene utilizzata molto spesso a scopo qualitativo. E' uno strumento molto potente perché lo spettro IR della regione *fingerprint* (impronta digitale) a basse energie è praticamente unico per ogni molecola. Per l'identificazione della molecola si confronta lo spettro ottenuto con quello di molti altri spettri disponibili in banche dati. Lo spettro deve essere registrato in opportune condizioni sperimentali (con la sostanza gassosa, solida o disciolta in un solvente che non interferisce).

## VANTAGGI

- fornisce per ciascun composto esaminato una complessa e caratteristica impronta digitale
- avendo a disposizione uno standard del composto, un controllo computerizzato dello strumento IR permette la perfetta sovrapposizione delle impronte digitali

## LIMITI

- usata raramente nella tecnica quantitativa a causa della difficoltà nella preparazione del campione e della complessità dello spettro
- identifica solo concentrazioni elevate (bassa sensibilità)
- la preparazione del campione richiede un certo grado di abilità (pasticche di KBr)
- la manipolazione del campione può avere effetto sullo spettro e rendere la tecnica non del tutto riproducibile

# STRUMENTAZIONE

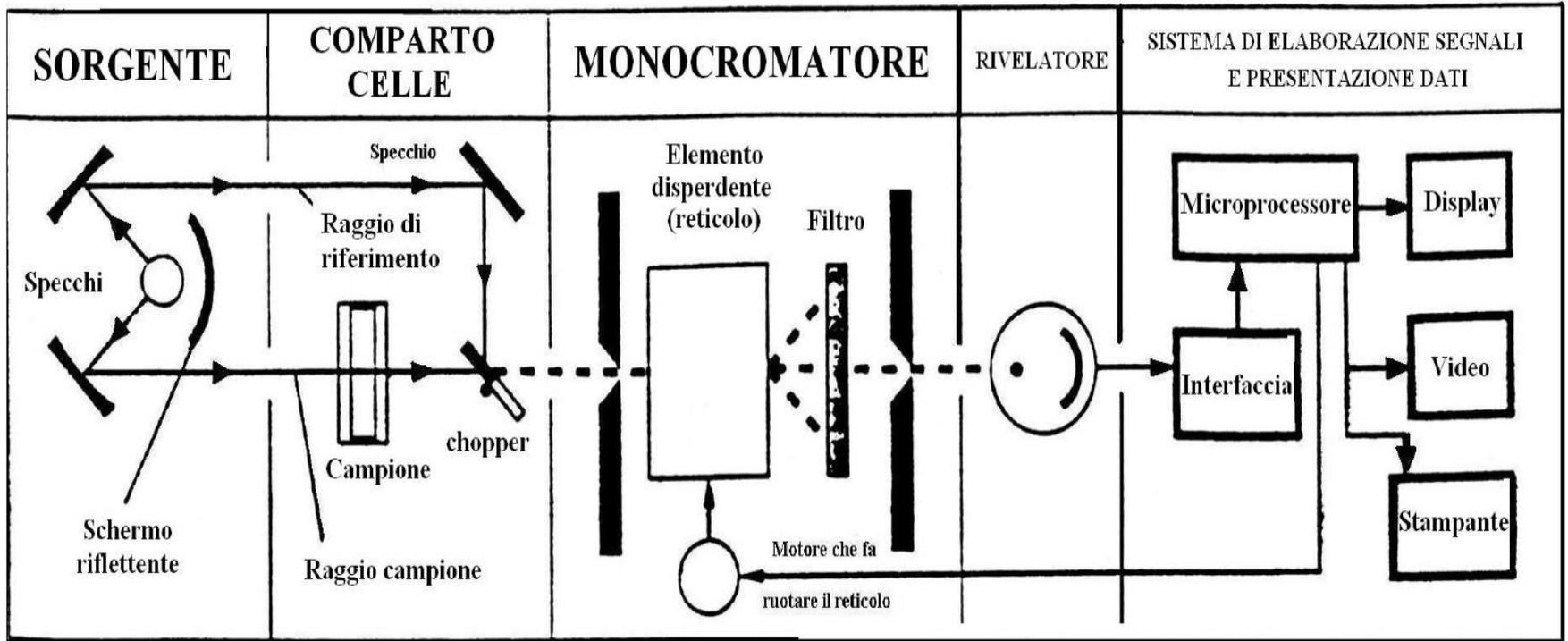
I dispositivi strumentali oggi a nostra disposizione per ottenere spettri nel medio e lontano IR (lo studio e le applicazioni del vicino infrarosso sono relativamente recenti) sono sostanzialmente di due tipi:

- SPETTROFOTOMETRI A DISPERSIONE
- SPETTROFOTOMETRI A INTERFERENZA

I primi sono più diffusi nei moderni laboratori, soprattutto per motivi di costo; i secondi offrono invece prestazioni senz'altro superiori ma i costi sono decisamente più elevati.

L'intervallo di lunghezze d'onda coperto dagli strumento è generalmente compreso tra **4000 e 625  $\text{cm}^{-1}$** , corrispondente al *medio IR*, ma sono anche molto diffusi quelli con intervallo spettrale esteso verso  $\lambda$  più elevate, fino a **400 e 200  $\text{cm}^{-1}$** , che include anche il *lontano IR*.

## SPETTROFOTOMETRIA A DISPERSIONE



# SPETTROFOTOMETRIA IN TRASFORMATATA DI FOURIER (FT-IR)

Questa tecnica strumentale è basata sulla spettroscopia infrarossa classica. Si tratta di una tecnica recente creata grazie alla computerizzazione del laboratorio strumentale.

Il suo principio di base è rappresentato dalla possibilità di cogliere contemporaneamente tutte le frequenze dello spettro IR nel rilevatore, il che rende superflua la scansione della lunghezza d'onda.

Questo è possibile trasformando, per mezzo di un *interferometro*, la radiazione IR policromatica emessa dalla sorgente (istante per istante con la medesima intensità) in un *interferogramma*, dove l'assorbimento non è più funzione della frequenza, ma del tempo (cioè ***si passa da dominio delle frequenze a dominio dei tempi***).

# ***SPETTROSCOPIA DI EMISSIONE*** **FLUORESCENZA**

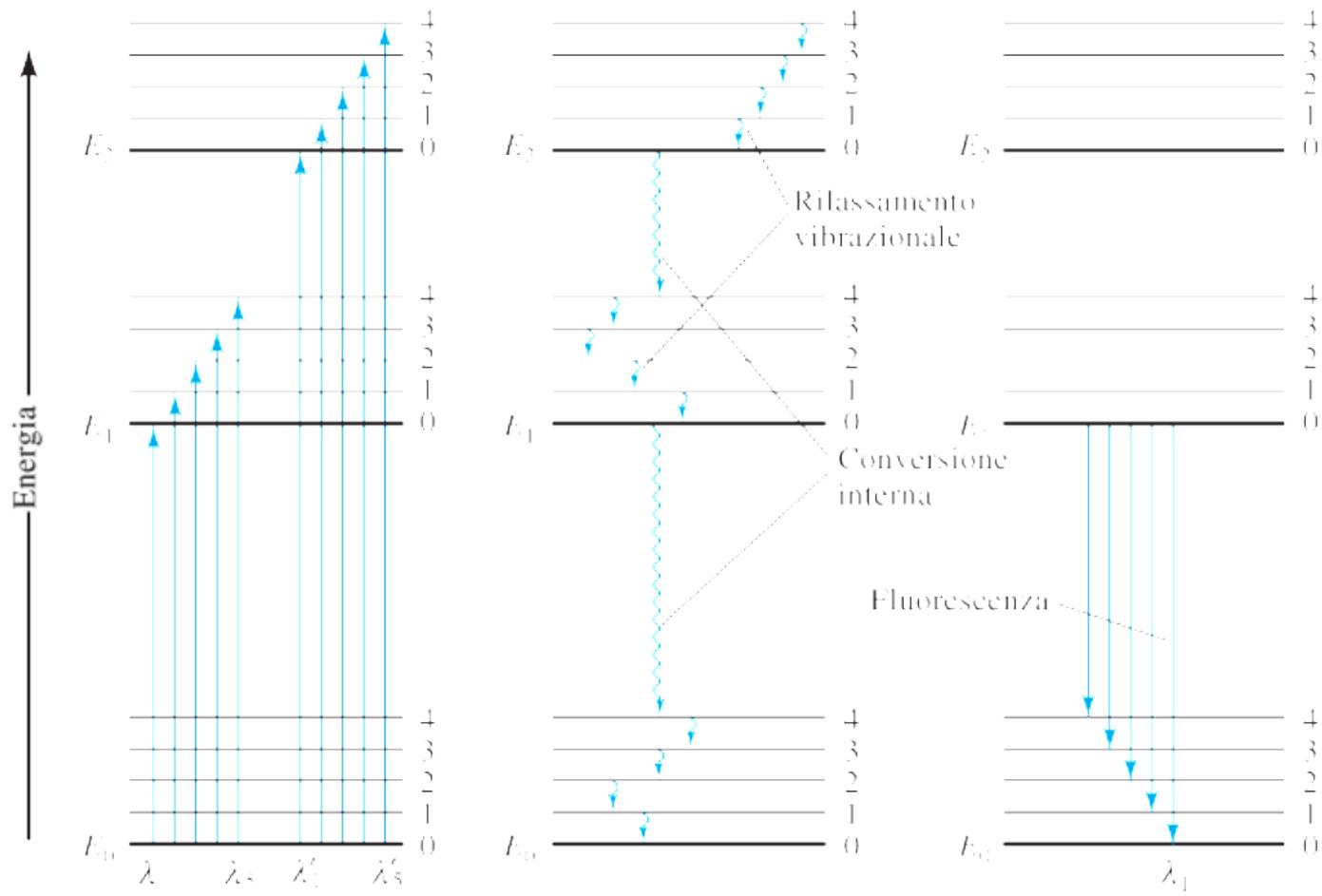
## **LUMINESCENZA**

E' necessario che una sorgente esterna fornisca al sistema una quantità di energia sufficiente ad innescare l'emissione luminosa. Differenti tipi di sorgente energetica definiscono, pertanto, differenti tipi di luminescenza.

Si può così parlare, ad esempio, di elettroluminescenza, radioluminescenza, chemiluminescenza e fotoluminescenza.

In quest'ultima forma di luminescenza l'energia è fornita dall'assorbimento di radiazione elettromagnetica nello spettro compreso fra l'ultravioletto e l'infrarosso; la cosiddetta regione del visibile.

Nella fotoluminescenza vengono, infine, distinti due diversi processi: **fluorescenza e fosforescenza**. La fluorescenza è il risultato di un processo fisico in tre stadi successivi, che avviene in certe molecole (generalmente idrocarburi policiclici o eterociclici), chiamati per questo motivo fluorofori o fluorocromi.



(a) Assorbimento molecolare

(b) Rilassamento non radiativo

(c) Fluorescenza

Diagramma dei livelli energetici che mostra alcuni dei processi che avvengono durante (a) l'assorbimento della radiazione incidente (b) il rilassamento non radiativo, e (c) fluorescenza da parte di una specie molecolare. L'assorbimento avviene di solito in  $10^{-15}$  s, mentre il rilassamento vibrazionale dai  $10^{-11}$  ai  $10^{-10}$  s. Anche la conversione interna tra i diversi stati elettronici è molto rapida ( $10^{-12}$  s), mentre la vita media della fluorescenza varia tipicamente dai  $10^{-10}$  ai  $10^{-5}$  s.



# MECCANISMO FLUORESCENZA

La fluorescenza è uno dei numerosi meccanismi mediante cui una molecola può tornare allo stato fondamentale dopo essere stata eccitata mediante assorbimento di radiazione.

Le molecole potenzialmente possono fluorescere → cammini non radiativi con rilassamento a velocità maggiore dell'emissione fluorescente.

Rendimento quantico → rapporto del numero di molecole che fluoresce rispetto al numero totale di molecole eccitate

Molecole altamente fluorescenti, come la fluoresceina, hanno efficienze quantiche che, in alcune condizioni, si avvicinano all'unità. Le specie non fluorescenti hanno efficienze che sono essenzialmente zero

La fluorescenza è particolarmente favorita in molecole rigide.

La rigidità abbassa la velocità di rilassamento non radiativo al punto in cui il rilassamento per fluorescenza ha tempo sufficiente per avvenire

# CONCENTRAZIONE VS INTENSITÀ FLUORESCENZA

La potenza della radiazione fluorescente  $F$  è proporzionale alla potenza radiante del fascio di eccitazione assorbito dal sistema:

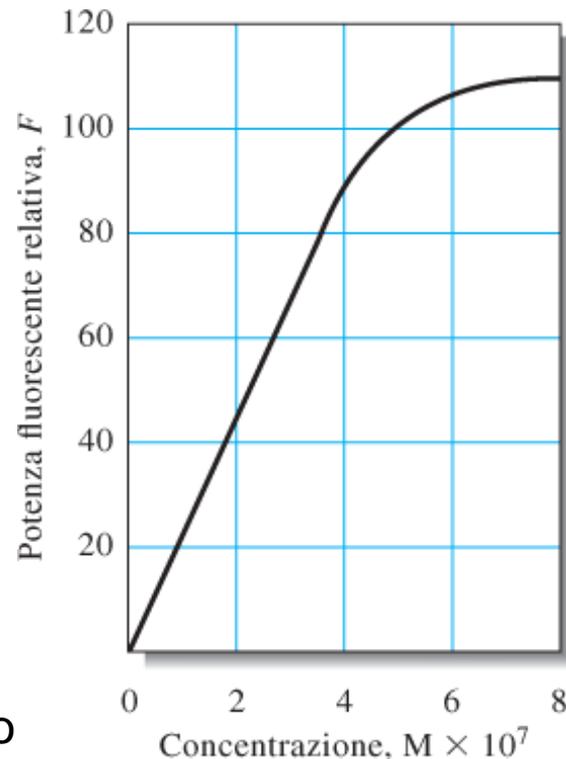
$$F = K'(P_0 - P)$$

Da cui si può scrivere:

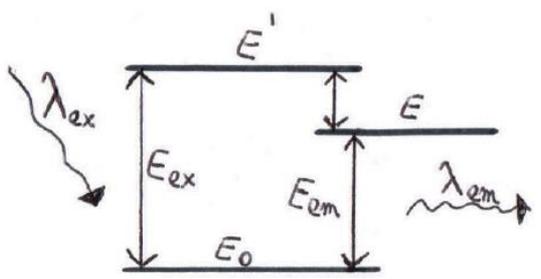
$$F = kc$$

Per  $c$  grande la relazione diventa non lineare per effetto dell' **assorbimento primario** in cui il fascio incidente viene assorbito così fortemente che la fluorescenza non è più proporzionale alla concentrazione.

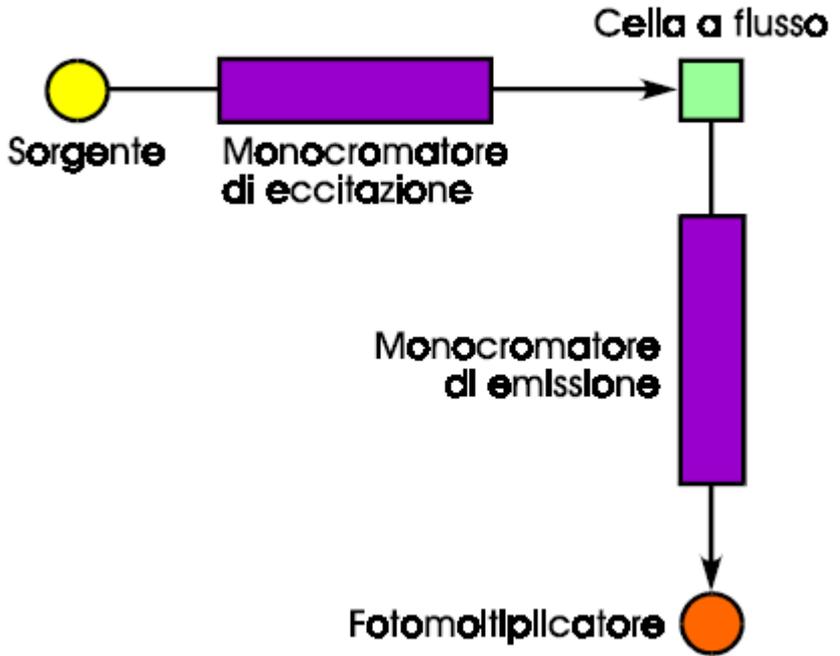
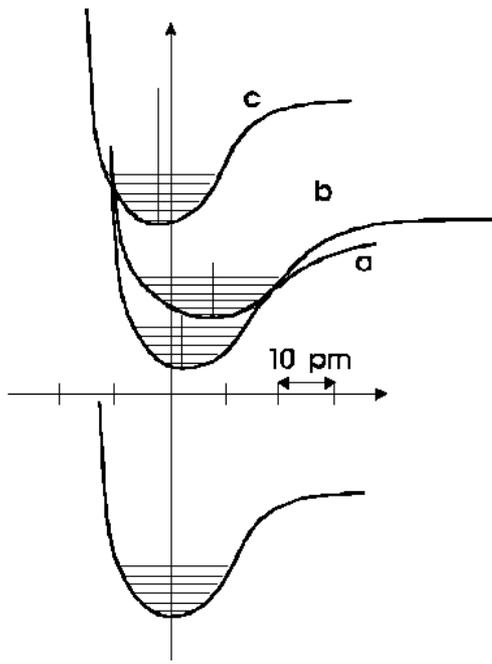
Se  $c$  molto alta,  $F$  inizia a diminuire per **assorbimento secondario** (assorbimento della radiazione emessa da altre molecole)



# SPETTROSCOPIA DI EMISSIONE FLUORESCENZA



$\lambda$  di emissione  $>$   $\lambda$  di eccitazione



# STRUMENTI DI FLUORESCENZA

I metodi di fluorescenza sono generalmente da uno a tre ordini di grandezza più sensibili dei metodi basati sull'assorbimento.

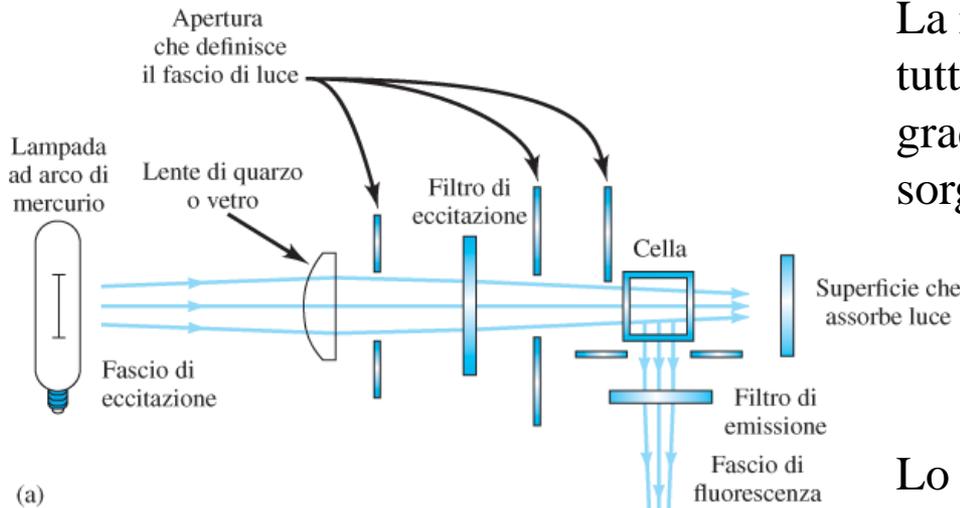
Le sorgenti tipiche della fluorescenza sono le lampade ad arco di mercurio, ad arco di xeno, ad arco di xenomercurio e i laser.

I monocromatori e i trasduttori sono di solito simili a quelli utilizzati negli spettrofotometri ad assorbimento.

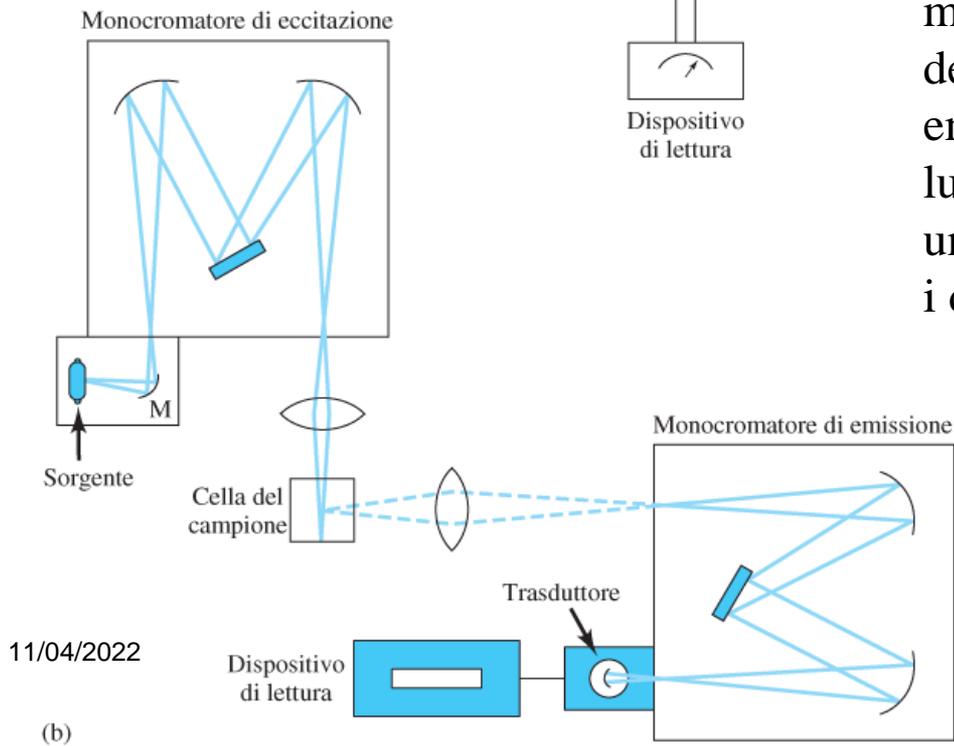
I fotomoltiplicatori vengono ampiamente utilizzati negli spettrofluorimetri ad elevata sensibilità ma i detector a serie di diodi sono diventati molto popolari negli ultimi anni.

I fluorimetri e gli spettrofluorimetri differiscono ampiamente in sofisticazione, prestazioni e costo, così come gli spettrofotometri di assorbimento.

La radiazione fluorescente viene emessa in tutte le direzioni e la configurazione a 90 gradi fa sì che il rivelatore non veda la sorgente.



Lo spettrofluorimetro (b) usa due monocromatori a reticolo ed analizza l'emissione ad angoli retti. I due monocromatori permettono la scansione degli spettri di eccitazione e degli spettri di emissione o entrambi gli spettri (entrambe le lunghezze d'onda vengono scansionate con un determinato offset di lunghezza d'onda tra i due monocromatori).



# Risonanza magnetica nucleare (RMN O NMR)

- ✓ Pauli nel 1924 introdusse l'idea dello **spin nucleare** che è un momento angolare (**J**) intrinseco;
- ✓ **Protoni e neutroni** possiedono un momento angolare di spin con relativo numero quantico di spin **I**
- ✓ il numero quantico di spin può essere **intero, semiintero o nullo**

*L'NMR dipende dall'esistenza dello spin nucleare quindi nuclei con  $I=0$  sono magneticamente inattivi*

# Risonanza Magnetica Nucleare NMR

- Il fenomeno trae origine dal fatto che alcuni nuclei posti in un campo magnetico sono in grado di assorbire radiazioni elettromagnetiche.
- I primi esperimenti NMR furono effettuati nel 1945, mentre utili applicazioni chimiche si ebbero solo nel 1949 dopo la scoperta dello spostamento chimico.

# *Proprietà dei nuclei*

La materia è fatta di atomi. Gli atomi sono costituiti da elettroni e da nuclei. Ogni nucleo atomico possiede quattro importanti proprietà fisiche:

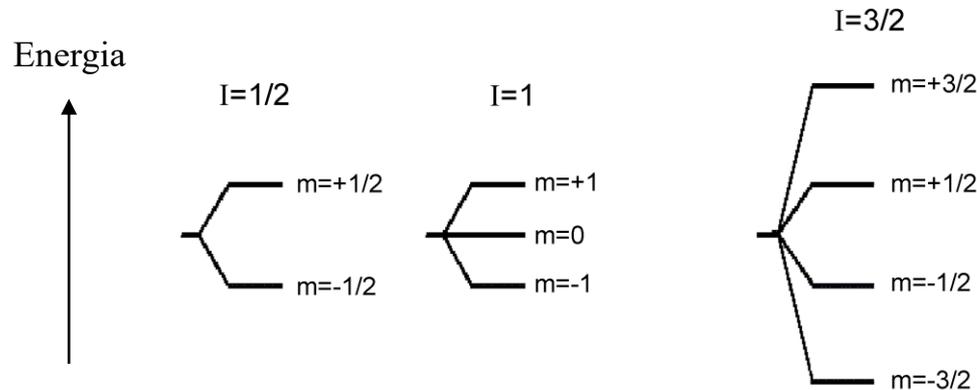
**massa, carica elettrica, magnetismo e spin**

particella	carica	spin
elettrone	- e	1/2
neutrone	0	1/2
protone	+ e	1/2
fotone	0	1

# Energia

- Uno spin nucleare  $I$  ha  $2I+1$  stati energetici in un campo magnetico, con numeri quantici  $m$  da  $-I$  a  $+I$  in step di 1.
- In un campo magnetico  $B_0$ , l'energia dello stato con numero quantico  $m$  è data da:

$$E = -m_I \gamma_I \hbar B_0$$

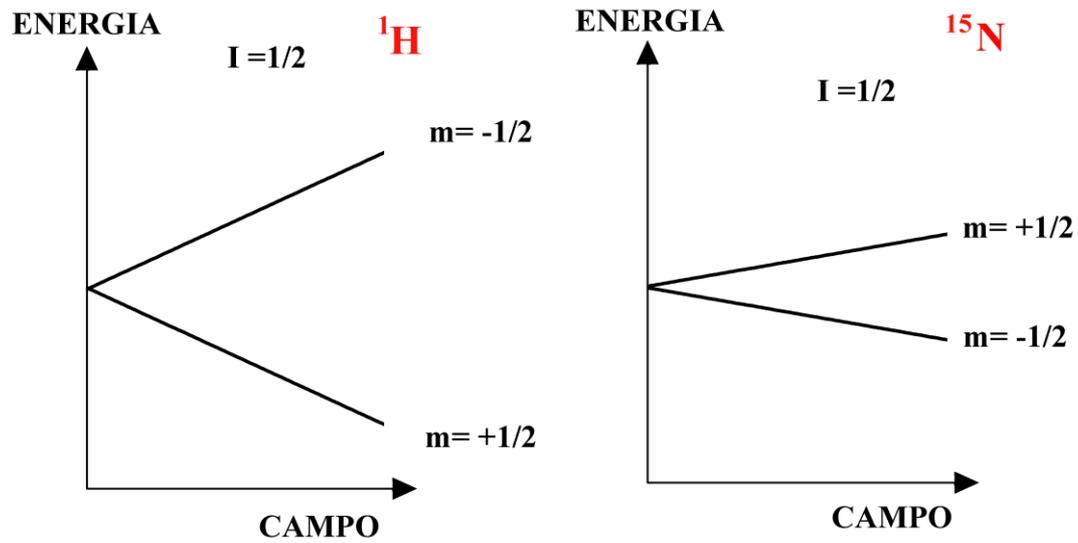


# Differenza di energia tra i livelli

- Se  $E = -m_I \gamma_I \hbar B_0$  allora  $\Delta E = \gamma_I \hbar B_0$
- Quindi per stimolare una transizione da un livello al successivo ( $\Delta m_I = \pm 1$ ) abbiamo bisogno di un quanto di energia  $\Delta E = h\nu$  o di una radiofrequenza  $\nu_0 = \gamma B_0$
- Questa equazione descrive la condizione di risonanza in cui la frequenza della radiazione esattamente corrisponde al salto energetico.  $\nu_0$  è chiamata **frequenza di Larmor**

# Frequenza di Larmor e campo $B_0$

- Il rapporto giromagnetico  $\gamma$  determina la velocità con cui lo Zeeman splitting aumenta allorché aumenta il campo magnetico. 
$$\Delta E = \gamma_I \hbar B_0$$

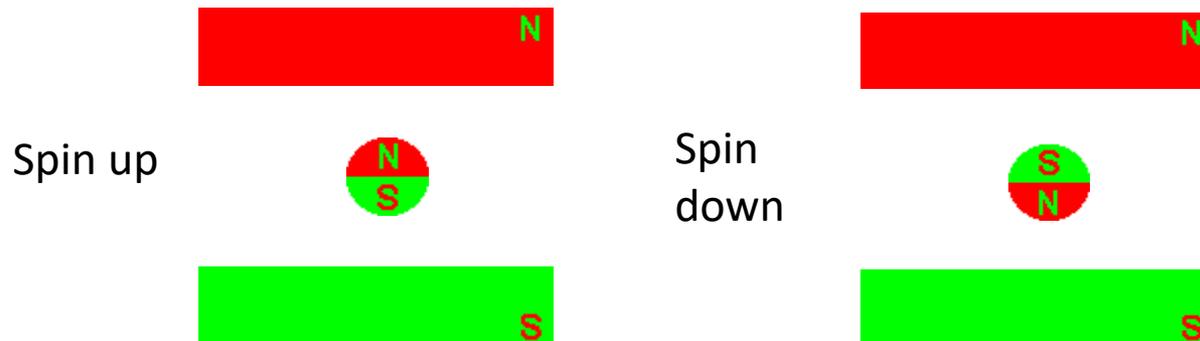


# Condizioni di risonanza

- Una particella con spin non nullo, può essere immaginata come un piccolo magnete

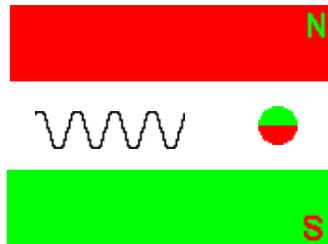


- Mettendo ad esempio una particella con spin  $\frac{1}{2}$  in un campo esterno otteniamo due orientazioni: una a maggiore energia (discorde al campo) ed una ad energia minore (concorde al campo).



# Condizioni di risonanza

- La differenza di energia tra i due stati equivale all'assorbimento di un fotone di energia  $E = h \nu$ .
- $\nu$  corrisponde alla frequenza di Larmor o di risonanza.

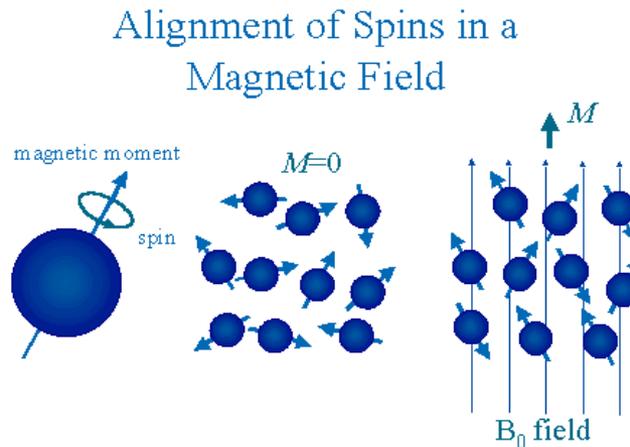


- Una particella con spin non nullo, in un campo magnetico di intensità  $B_0$ , può assorbire un fotone con frequenza  $\nu$ , dove  $\nu$  dipende dal rapporto giromagnetico  $\gamma$  della particella.  $\nu_0 = \gamma B_0$

Per l'idrogeno,  $\gamma = 42,58 \text{ MHz / T}$

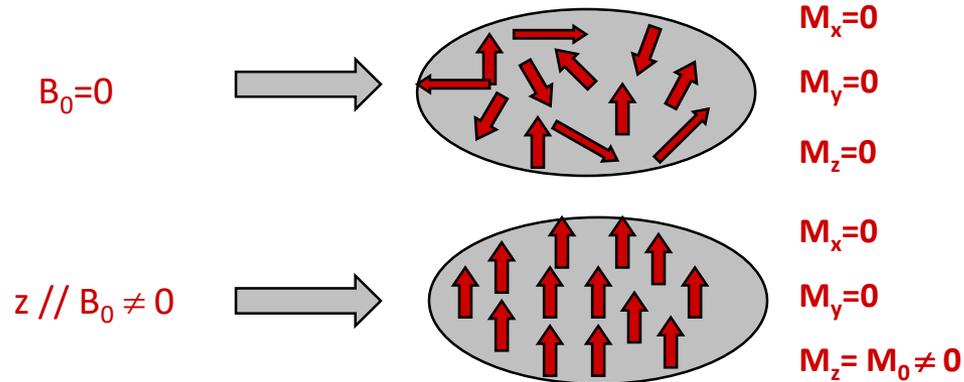
# Cosa accade ai singoli nuclei

I nuclei in condizioni “normali” si muovono caoticamente per effetto del moto termico. Non appena introduco un campo esterno  $B_0$  i nuclei si orientano disponendosi secondo l’asse del campo  $B_0$



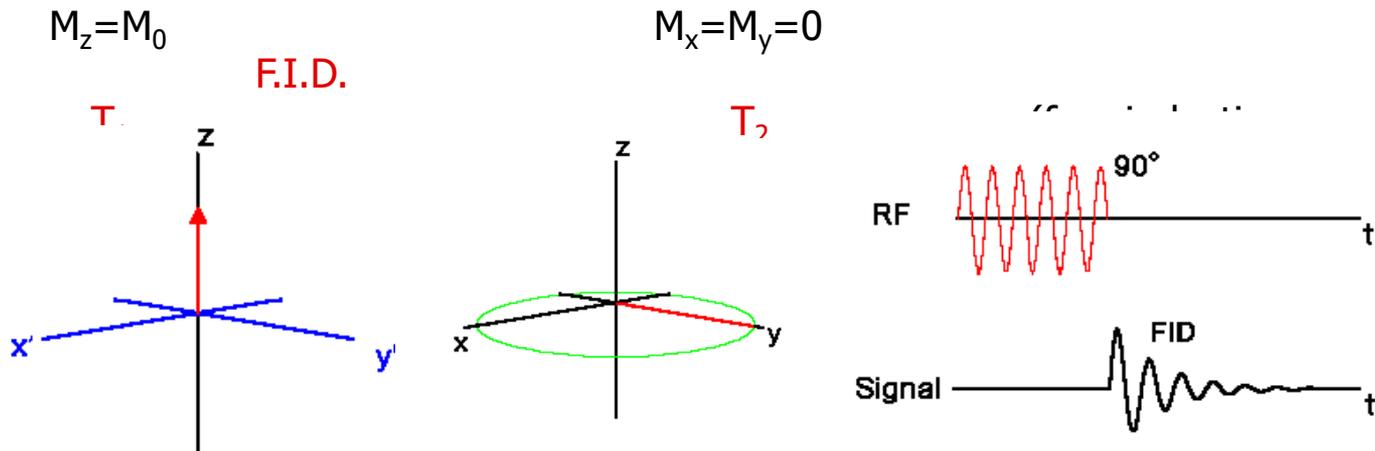
# Magnetizzazione

In un campione macroscopico quello che osserviamo è una media dei moti dei singoli nuclei, chiamiamo questa quantità: vettore **magnetizzazione  $M_0$** , orientato lungo  $B_0$ .



## Dopo l'impulso

Finito il periodo di “eccitazione” generato dal campo  $B_1$  tutti i nuclei tendono a “rilassarsi”, ovvero a tornare nelle condizioni iniziali di equilibrio termico ognuno con la sua  $\omega_L$ .

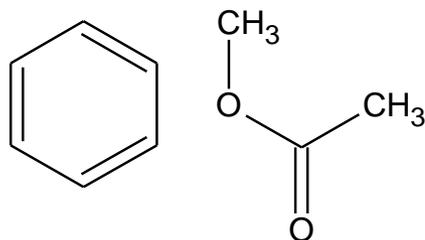


## Dal FID allo spettro: FT

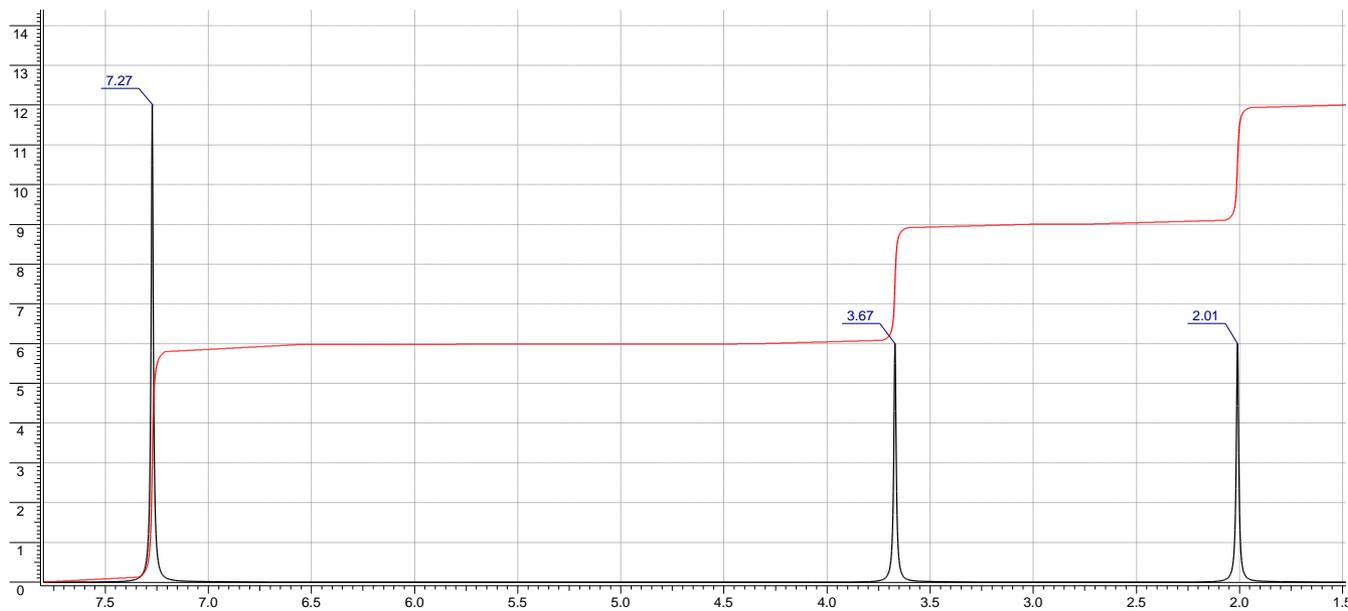
Il F.I.D. rappresenta il segnale NMR nel dominio del tempo. Ogni nucleo genera un segnale rappresentabile tramite una sinusoide smorzata.

Attraverso la trasformata di Fourier in quadratura del segnale nel dominio del tempo otteniamo il segnale nel dominio delle frequenze (spettro).

La frequenza di risonanza dipende dall'intorno chimico



Group	nH	Shift
2,3,4,5	6	7.27
8	3	3.67
11	3	2.01

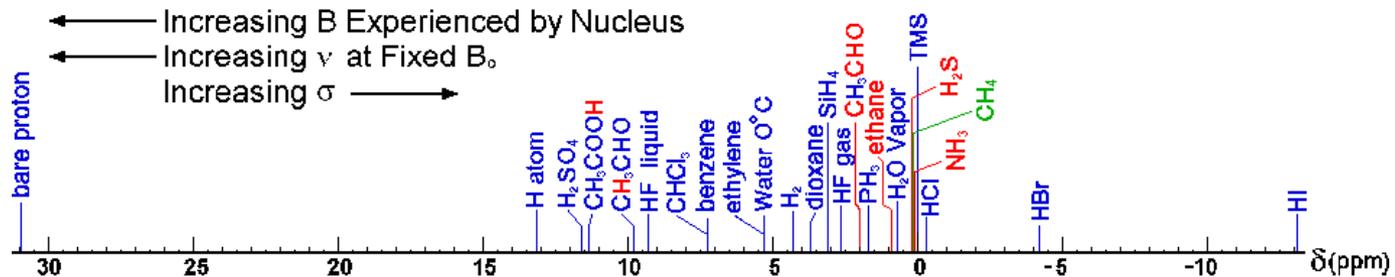


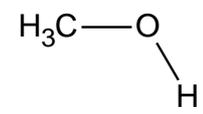
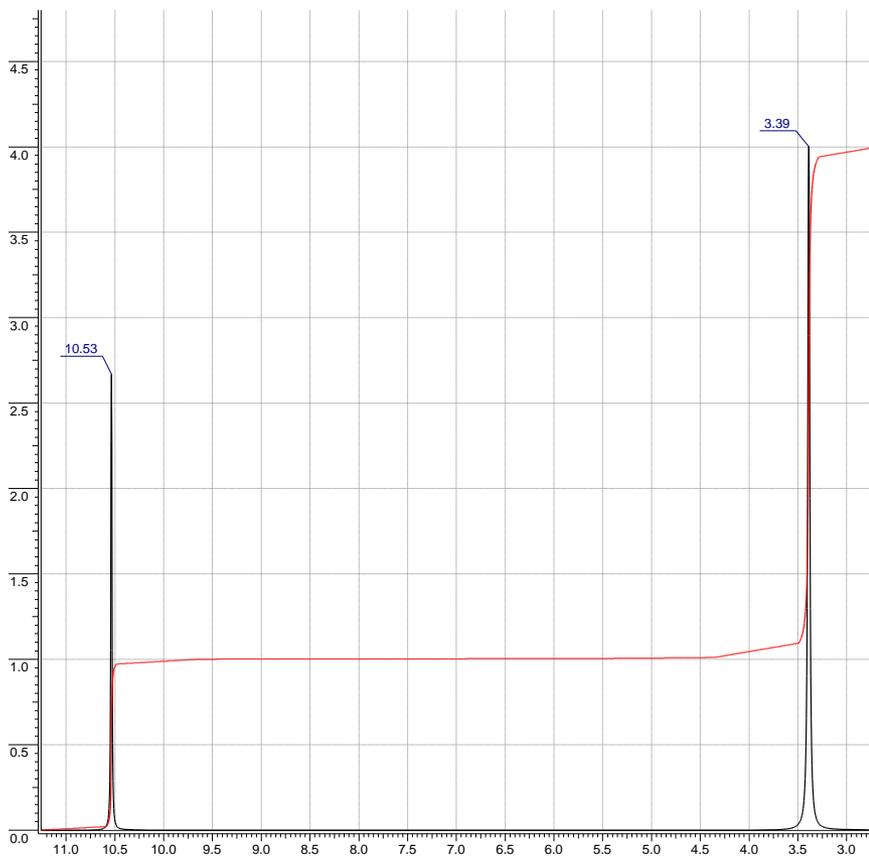
# Costante di schermo

- Nel caso delle molecole la situazione è più complessa, la distorsione della distribuzione elettronica sferica causata dalla presenza di altri nuclei riduce l'effetto diamagnetico.

$$\sigma = \sigma_{\text{dia}} + \sigma_{\text{para}} + \sigma'$$

- Per i protoni sono importanti solo due termini





$$\sigma_{\text{C-H}} > \sigma_{\text{O-H}}$$

$$B_{\text{C-H}} = B_0(1 - \sigma_{\text{C-H}})$$

$$B_{\text{O-H}} = B_0(1 - \sigma_{\text{O-H}})$$

$$B_{\text{C-H}} < B_{\text{O-H}}$$

# Chemical shift

- Grazie al chemical shift, l'NMR fornisce importanti dati per la determinazione di composti sconosciuti.
- Per il chemical shift e le costanti di schermo possiamo fare le seguenti generalizzazioni:

Per legami C-H alifatici la costante di schermo decresce nella serie



Per legami C-H olefinici  $4 < \delta < 6.5$

Per legami C-H aromatici  $7 < \delta < 9$

## Dati di spostamento chimico per protoni (scala $\delta$ )

**Protoni alifatici** (ciclici o aciclici, esclusi i derivati del ciclopropano)

**Metile** (solo con H o sostituenti alchilici su entrambi i carboni  $\alpha$  e  $\beta$ ): **0,9**

**Metilene** (solo con H o sostituenti alchilici su entrambi i carboni  $\alpha$  e  $\beta$ ): **1,25**

**Metino** (solo con H o sostituenti alchilici su entrambi i carboni  $\alpha$  e  $\beta$ ): **1,6**

La presenza sul C-  $\alpha$  di sostituenti capaci di sottrarre elettroni (per es., X, OH, OR, R-COO, NH<sub>2</sub>, NO<sub>2</sub>) sposta il protone di 2 - 4 ppm verso campi bassi.

I gruppi C=O, C=C, e gli anelli aromatici hanno un effetto simile, ma meno pronunciato. lo spostamento verso campi bassi è generalmente di circa 0,5 - 1,5 ppm.

**Protoni benzilici**: 2 - 3 (*toluene* 2,34).

**Protoni acetilenici**: 2 - 3.

**Protoni olefinici**: 5 - 7, con una variazione regolare con la sostituzione (*etilene* 5,30).

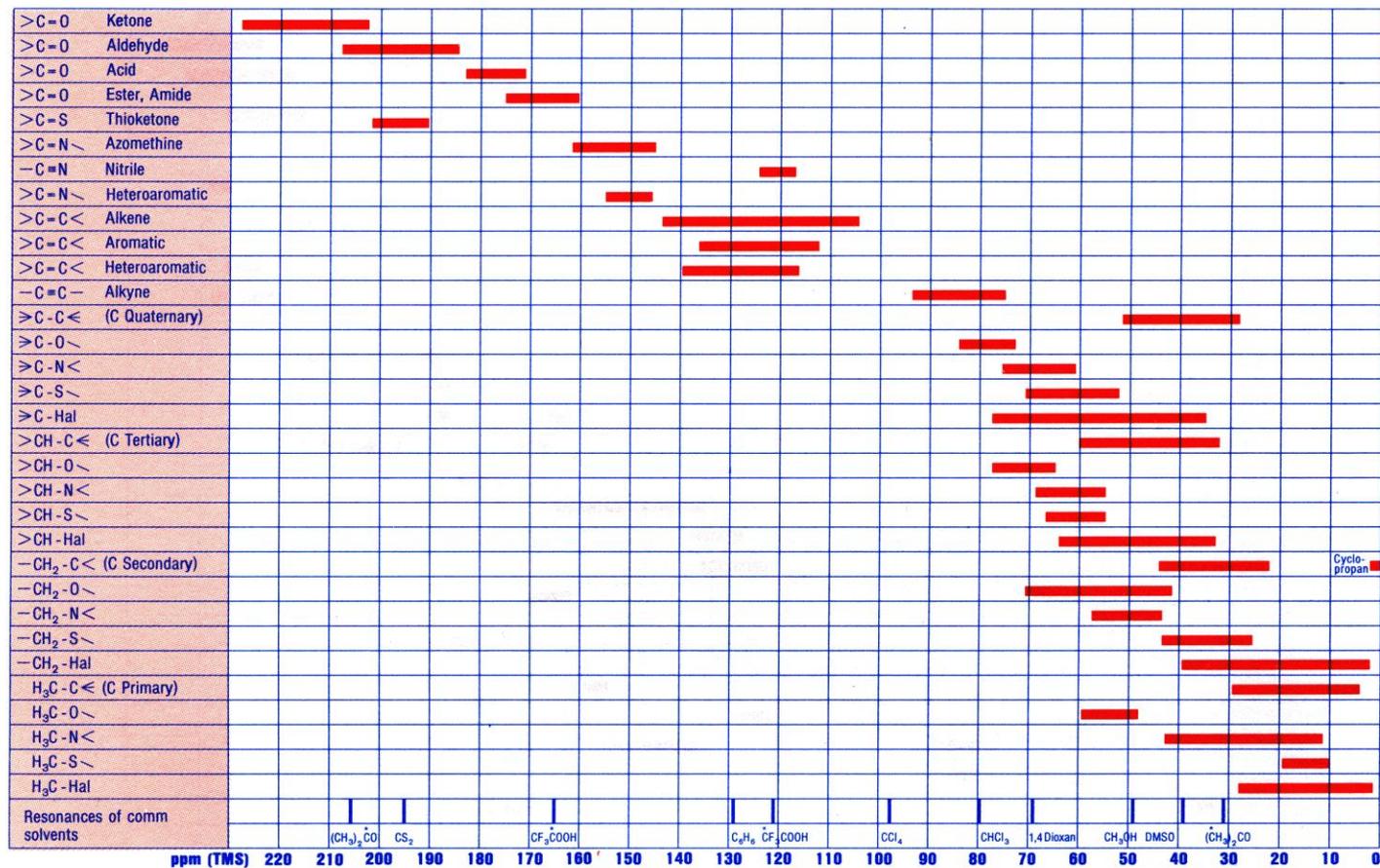
**Protoni aromatici ed eteroaromatici**: 6 - 10 (*benzene* 7,27).

**Protoni aldeidici**: 9 - 10.

**Protoni idrossilici ed amminici**: Tra 1 e 16 ppm, a seconda del tipo di legami idrogeno (un legame idrogeno forte è deschermente). I segnali dovuti a questi protoni possono essere facilmente riconosciuti dagli spostamenti con la temperatura, che altera il grado dei legami idrogeno, e per la facilità con la quale vengono scambiati con D<sub>2</sub>O.

Quest'ultimo procedimento può essere eseguito nel tubo del campione NMR e i segnali dovuti a OH, NH<sub>2</sub>, ecc., scompaiono.

## <sup>13</sup>C Chemical Shifts in Organic Compounds\*



\*Relative to internal tetramethylsilane.