

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI TERAMO

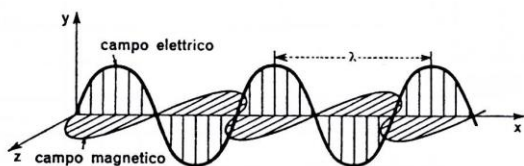
CL. in BIOTECNOLOGIE

Anno Accademico 2021/2022

CHIMICA ANALITICA

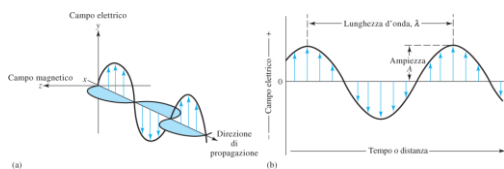
METODI
SPETTROSCOPICI

I metodi spettroscopici si basano sulla interazione e misura della radiazione elettromagnetica con l'analita.



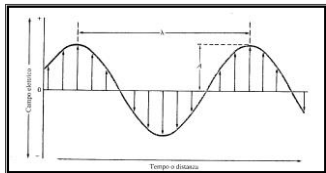
Le radiazioni (o onde) elettromagnetiche consistono in una forma di energia che si propaga, anche nel vuoto; sono la simultanea propagazione nello spazio delle oscillazioni di un campo elettrico e di un campo magnetico.

Il campo elettrico oscilla in un piano perpendicolare a quello del campo magnetico.



L'**ampiezza** di un'onda elettromagnetica è una quantità vettoriale che fornisce una misura della forza del campo elettrico o magnetico ad un massimo dell'onda.

LE ONDE ELETTROMAGNETICHE



Ampiezza (A) = lunghezza del vettore elettrico al massimo dell'onda
 Lunghezza d'onda (λ) = distanza tra i massimi (o i minimi) successivi
 Frequenza (ν) = numero di oscillazioni del campo elettrico al secondo (1 Hz = 1 ciclo al secondo)
 Velocità di propagazione (v) = $v\lambda$ dipende dal mezzo in cui si propaga la radiazione

$$E = h\nu$$

➔ **ENERGIA E FREQUENZA SONO DIRETTAMENTE PROPORZIONALI**

h = costante di Planck = 6.63×10^{-34} Js → $E = hc/\lambda$

Numero d'onda ($\bar{\nu}$) = numero di onde per cm $1/\lambda$

Potenza (P) = energia per unità di area al secondo. Correlata all'ampiezza della radiazione

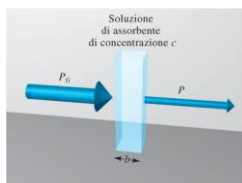
Ampiezza (A) = lunghezza del vettore elettrico al massimo dell'onda
 Lunghezza d'onda (λ) = distanza tra i massimi (o i minimi) successivi
 Frequenza (ν) = numero di oscillazioni del campo elettrico al secondo (1 Hz = 1 ciclo al secondo)

Velocità di propagazione (v) = $v\lambda$ dipende dal mezzo in cui si propaga la radiazione

Le interazioni più utili ed interessanti tra radiazione e materia, cioè in spettroscopia, sono quelle in cui avvengono transizioni tra i diversi livelli di energia delle specie chimiche.

Prima della stimolazione, l'analita si trova prevalentemente nel suo livello di energia più basso o stato fondamentale. L'applicazione dello stimolo fa sì che alcune specie dell'analita passino ad uno stato energetico più alto o stato eccitato.

Possiamo acquisire informazioni sull'analita misurando la radiazione elettromagnetica emessa per ritornare allo stato fondamentale o misurando la quantità di radiazione elettromagnetica assorbita come risultato dell'eccitazione.



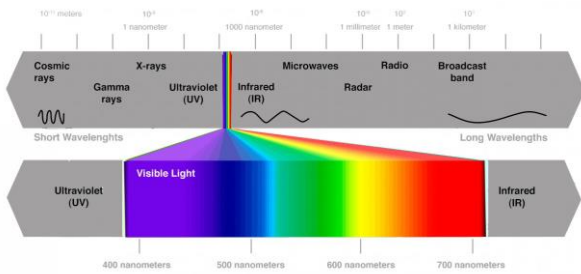
CLASSIFICAZIONE









Si possono dividere generalmente in:

- metodi di **assorbimento** (attenuazione di un fascio di radiazione)
- metodi di **emissione** (radiazione emessa dall'analisita in particolari condizioni sperimentali)

Più in dettaglio vengono classificati in base alla regione dello spettro elettromagnetico coinvolta

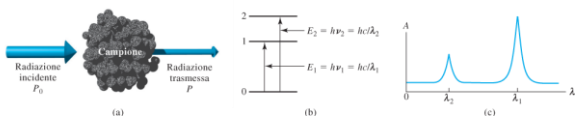
SPETTRO ELETTRMAGNETICO



Tipi di radiazione						
onde radio	micro- onde	raggi IR	luce visibile	raggi UV	raggi X	raggi gamma
10^7	10^{10}	10^{12}	10^{14}	10^{15}	10^{17}	10^{20}
ordini di grandezza (in Hz) delle FREQUENZE						
bassa V bassa E alta λ						alta V alta E bassa λ
ordini di grandezza (in cm) delle LUNGHEZZE D'ONDA						
10^3	1	10^{-3}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-8}	10^{-11}
						

Tipo di variazione quantica	Variazione di spin	Cambio di orientamento	Cambio di configurazione	Variazione della distribuzione elettronica	Variazione della configurazione nucleare
	10^{-2}	1	100	10^6	10^9
	10 m	100 cm	1 cm	100 μ m	1000 nm
	3×10^8	3×10^9	3×10^{10}	3×10^{14}	3×10^{16}
	10^{-3}	10^{-1}	10	10^6	10^9
Tipo di spettroscopia:	NMR	ESR	Microonde	Infrarossa	Visibile ed ultravioletto
					Raggi X
					Raggi γ
					Numero d'onda, cm^{-1}
					Lunghezza d'onda
					Frequenza, Hz
					Energia, J/mol

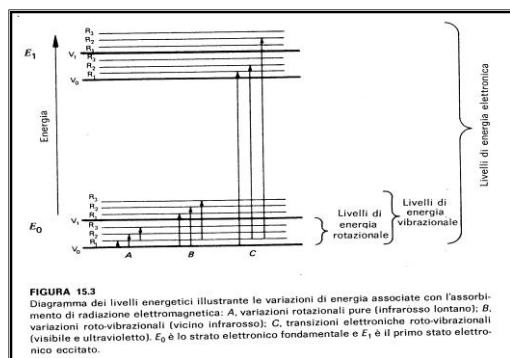
SCHEMA ESPERIMENTO SPETTROSCOPIA DI ASSORBIMENTO



La radiazione di potenza radiante incidente P_0 può essere assorbita dall'analita con il risultato di una diminuzione della potenza radiante P del fascio trasmesso.

Affinché vi sia assorbimento, l'energia del fascio incidente deve essere uguale ad una delle differenze di energia mostrate in (b). Lo spettro di assorbimento risultante è mostrato in (c).

Assorbimento della radiazione



SPETTROFOTOMETRIA UV/visibile

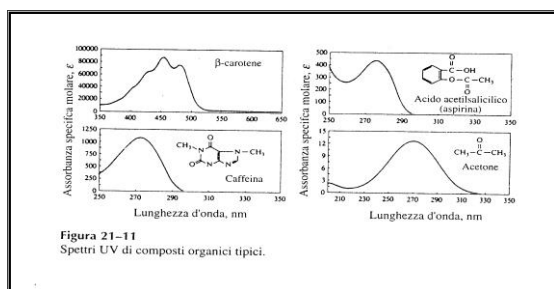
Quali elettroni danno luogo a transizioni misurabili nell'UV/visibile?

Gli elettroni in una molecola possono essere classificati in 4 tipi:

- elettroni non coinvolti in legami (σ) (E di eccitazione alte)
- elettroni di legami singoli covalenti (σ) (E troppo alte per UV/visibile)
- elettroni non leganti (tipo n) (E sufficienti per UV/visibile)
- elettroni in orbitali π (legami doppi e tripli) (E sufficienti per UV/visibile)

Le transizioni avvengono in orbitali *antileganti* di tipo σ^* e π^* , le più comuni sono $n \rightarrow \pi^*$ e $\pi \rightarrow \pi^*$.

L'intensità relativa delle bande di assorbimento è rappresentata dalle *assorbidività molari* ϵ che sono una misura della probabilità che la transizione elettronica abbia luogo. La probabilità di transizioni $\pi \rightarrow \pi^*$ è maggiore di transizioni $n \rightarrow \pi^*$.



I gruppi che assorbono in una molecola sono chiamati **cromofori**.

Le variazioni spettrali vengono classificate come *baticromiche* (massimo spostato verso λ maggiori) e *ipsocromiche* (verso λ minori). Variazioni d'intensità vengono indicate come *ipercromiche* o *ipocromiche*.

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

Cromoforo	Esempio	Solvente	λ_{max} , nm	ϵ_{max}
Alchene	$C_6H_5CH=CH_2$	<i>n</i> -eptano	177	13000
Alchene coniugato	$CH_2=CHCH=CH_2$	<i>n</i> -eptano	217	21000
Alchino	$C_6H_5C \equiv C-CH_3$	<i>n</i> -eptano	178	10000
			196	2000
			225	160
Carbonile	$\begin{array}{c} O \\ \\ CH_3CCH_3 \end{array}$	<i>n</i> -esano	186	1000
			280	16
Carbossile	$\begin{array}{c} O \\ \\ CH_3CH \end{array}$	<i>n</i> -esano	180	grande
			293	12
Carbossile	$\begin{array}{c} O \\ \\ CH_3COH \end{array}$	etanolo	204	41
Ammide	$\begin{array}{c} O \\ \\ CH_3CNH_2 \end{array}$	acqua	214	60
	$\begin{array}{c} O \\ \\ CH_3N=NCH_3 \end{array}$	etanolo	339	5
Azo	CH_3NO_2	isoottano	280	22
Nitro	C_6H_5NO	etere etilico	300	100
Nitroso			665	20
Nitrato	$C_6H_5ONO_2$	diossano	270	12
Aromatico			204	7.900
	Benzene	<i>n</i> -esano	256	200

LEGGE DI LAMBERT-BEER

Trasmittanza (T) = P/P_0

T% = $P/P_0 \times 100$

Assorbanza = $\log P_0/P = -\log T$

Legge di Beer:

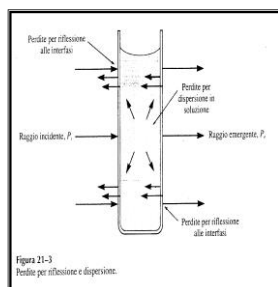
$$A = \epsilon bc$$

ϵ = assorbività (o assorbanza specifica) molare

b = cammino ottico

c = concentrazione

(vale per soluzioni diluite)



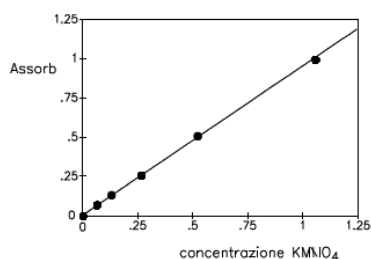
ASSORBIVITÀ MOLARE

L'assorbività molare ϵ di una specie ad un massimo di assorbimento è caratteristica di quella specie.

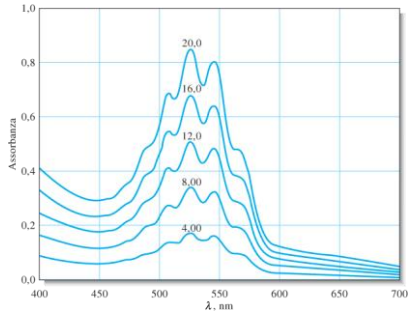
Per molti composti organici l'assorbività molare di picco varia da 10 o meno a 10000 o più. Alcuni complessi dei metalli di transizione hanno assorbività molari che vanno da 10000 a 50000.

Elevati valori dell'assorbività molare sono auspicabili per l'analisi quantitativa poiché essi conducono ad una elevata sensibilità analitica.

LEGGE DI LAMBERT-BEER

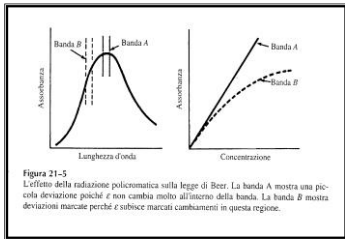


CONCENTRAZIONE VS ASSORBANZA



DEVIAZIONI DALLA LEGGE DI BEER

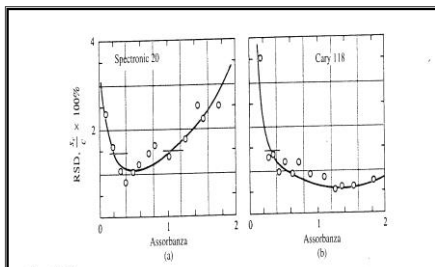
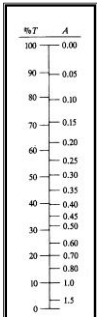
- chimiche → Le specie assorbenti danno reazioni di associazione, dissociazione o reazione con solvente con prodotti che hanno ε diversi (p.es. un indicatore acido-base in soluzione non tamponata)
- strumentali → Dovute a radiazioni spurie e al fatto che si usa radiazione policromatica per l'assorbimento.



ERRORE SPETTROFOMETRICO

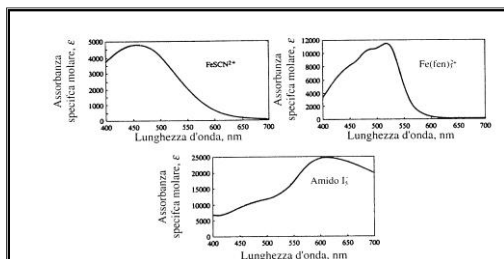
$$A = \epsilon bc = \log P_0/P = \log P_0 - \log P$$

- Per A bassi → Δ piccolo tra N grandi → RSD grande
- Per A alti → P poco accurato → RSD grande

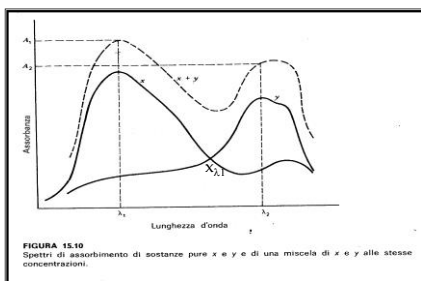


ASSORBIMENTO A TRASFERIMENTO DI CARICA

- Sono coinvolti complessi detti "a trasferimento di carica"
- Possono avere ϵ molto grandi (>10000)
- Viene ceduto un elettrone ad un orbitale del metallo (o vv)



Additività delle assorbanze



$$A_{1x(\lambda,1)} = \epsilon_{x(\lambda,1)} b c_x$$

$$A_{1y(\lambda,1)} = \epsilon_{y(\lambda,1)} b c_y$$

$$A_{2x(\lambda,2)} = \epsilon_{x(\lambda,2)} b c_x$$

$$A_{2y(\lambda,2)} = \epsilon_{y(\lambda,2)} b c_y$$

SORGENTI

(a) Diagram of a tungsten filament lamp.
 (b) Emission spectrum showing intensity vs wavelength (nm) from 500 to 2000 nm.

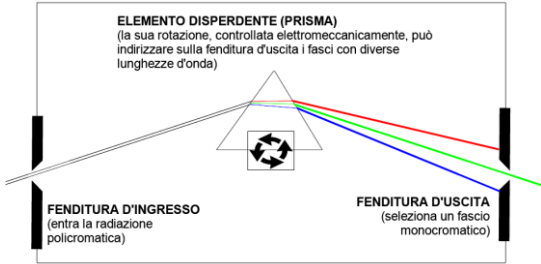
Tabella 20-1
Sorgenti continue per la spettroscopia ottica

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/alogeno	240-2500	Molecolare di assorbimento UV/vis/vicino IR
Lampada di tungsteno	350-2300	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

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

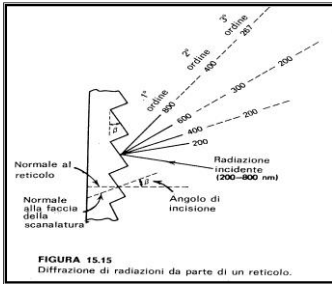
SELEZIONE DELLA LUNGHEZZA D'ONDA MONOCROMATORI: IL PRISMA

Il **prisma** separa le varie componenti della luce perché l'indice di rifrazione è diverso per ciascuna λ . La dispersione non è lineare (minore per λ maggiori).



SELEZIONE DELLA LUNGHEZZA D'ONDA MONOCROMATORI: IL RETICOLO A RIFLESSIONE

I reticoli presentano una superficie riflettente piana di alluminio che presenta un numero grande di solchi paralleli. La separazione dipende dalla distanza tra i solchi.



I reticoli producono anche multipli della radiazione incidente (ordini superiori).

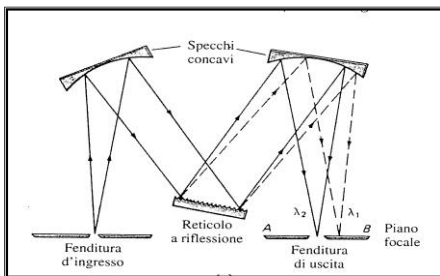
$$n\lambda = d (\sin i + \sin r)$$

d = distanza tra le superfici, n ordine di diffrazione, i e r = radiazione incidente e riflettente

La dispersione è lineare, vengono usati diversi tipi per l'UV/visibile e l'IR

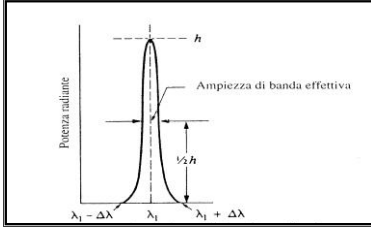
MONOCROMATORI: il reticolo a riflessione

Servono a selezionare la lunghezza d'onda desiderata, consistono di fenditure d'ingresso e d'uscita per eliminare le radiazioni indesiderate, un sistema di specchi per focalizzare la radiazione e un separatore di lunghezze d'onda (prisma o reticolo)



SELEZIONE DELLA LUNGHEZZA D'ONDA Monocromatori

L'ampiezza di banda effettiva del monocromatore dipende oltre che dalle caratteristiche del reticolo anche dalla *fenditura d'uscita*. Generalmente varia tra 1 e 20nm per applicazioni quantitative.

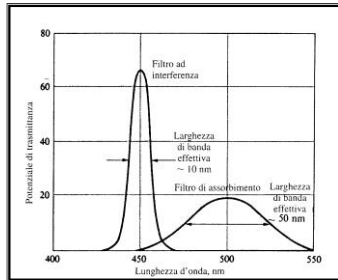


Molti monocromatori hanno fenditure variabili che permettono di lavorare con rivelatori di diversa sensibilità

SELEZIONE DELLA LUNGHEZZA D'ONDA Filtri di assorbimento e ad interferenza

I *filtri* sono caratterizzati da una λ alla quale si ha la massima trasmissione e da una ampiezza di banda. Quelli ad interferenza sono più selettivi (e più costosi). Quelli ad assorbimento sono costituiti da vetro colorato.

Vengono utilizzati nel sistema ottico sia in presenza che in assenza di monocromatore (p.es. alcuni lettori per dosaggi immunochimici).



Contenitori per il campione (cuvette)

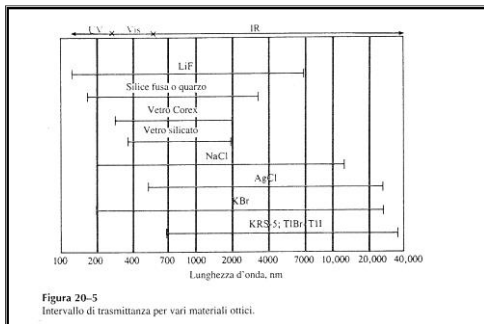


Figura 20-5 Intervallo di trasmittanza per vari materiali ottici.

RIVELATORI PER SPETTROFOMETRI

Sono di tipo fotonico (fino a $\lambda = 2 \mu\text{m}$); sono forniti di una superficie reattiva che in presenza di fotoni emette elettroni (fotoemissione) o li eccita in modo che possano condurre elettricità (fotoconduzione). I più comuni sono i *fototubi*, i *fotomoltiplicatori* e i rivelatori basati sulla tecnologia dei semiconduttori (a silicio)

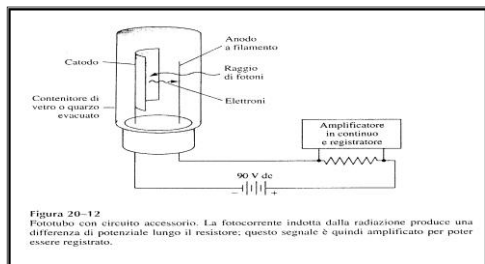
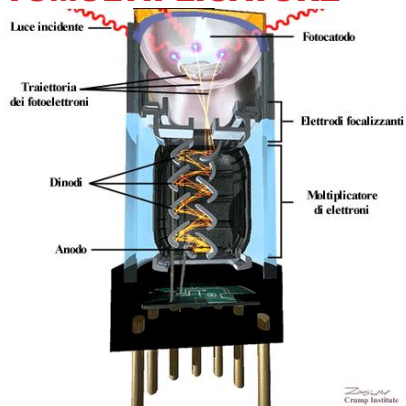
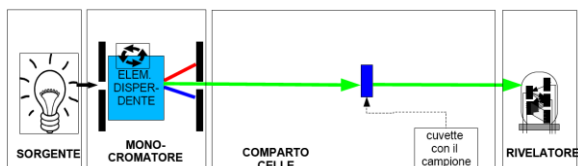


Figura 20-12
Fototubo con circuito accessorio. La fotocorrente indotta dalla radiazione produce una differenza di potenziale lungo il resistore; questo segnale è quindi amplificato per poter essere registrato.

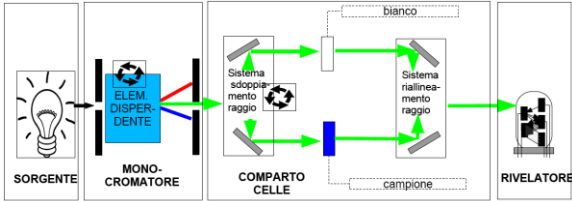
FOTOMOLTIPLICATORE



SCHEMA DI UNO SPETTROFOTOMETRO (MONORAGGIO)



SCHEMA DI UNO SPETTROFOTOMETRO (DOPPIO RAGGIO)



ANALISI QUALITATIVA E QUANTITATIVA

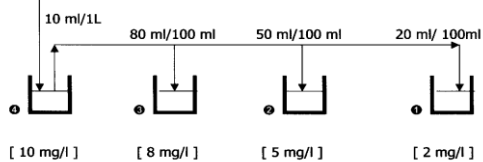
•La **lunghezza d'onda** delle radiazioni emesse o assorbite sono caratteristiche delle varie sostanze:
analisi **QUALITATIVA**

•L'**intensità** delle radiazioni emesse o assorbite dipendono dalla quantità di sostanza:
analisi **QUANTITATIVA**

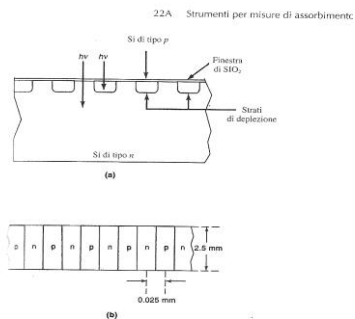
ANALISI QUANTITATIVA RETTA DI CALIBRAZIONE (TARATURA)

Tecnica delle diluizioni:

soluzione madre: 1 ml = 1mg di campione

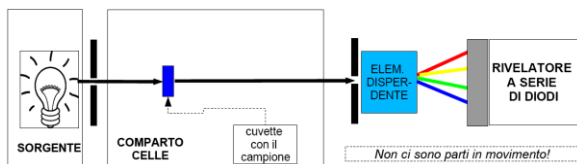


RIVELATORE A SERIE DI DIODI (DAD)



RIVELATORE A SERIE DI DIODI (DAD)

E' possibile monitorare simultaneamente diverse λ



Vengono utilizzati prevalentemente come rivelatori HPLC
