

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI TERAMO

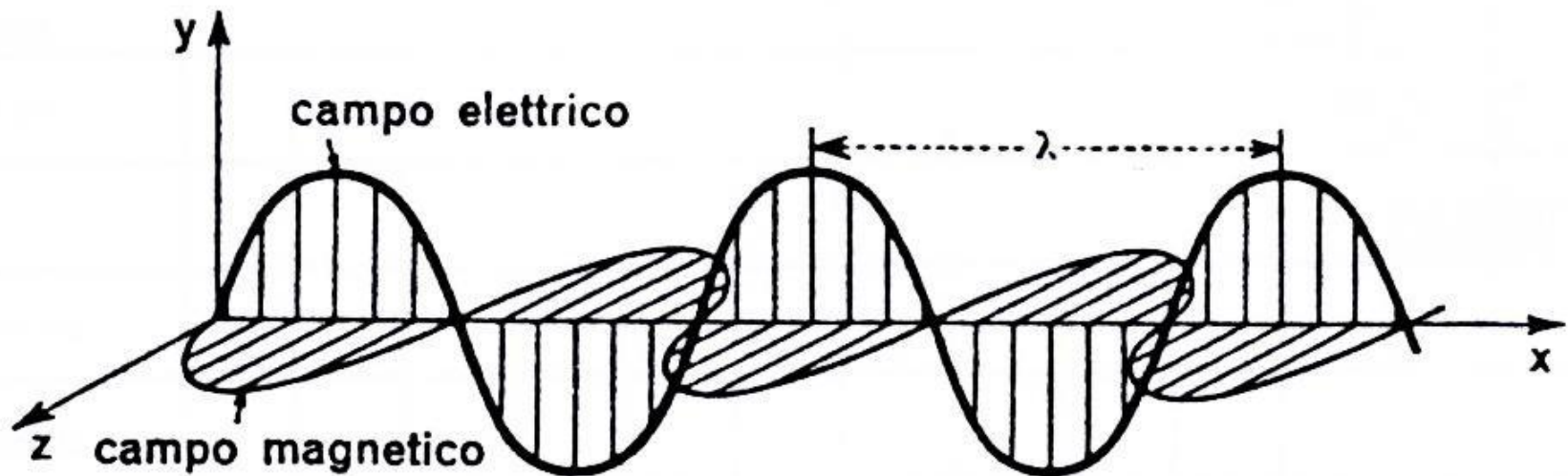
CL in BIOTECNOLOGIE

Anno Accademico 2021/2022

CHIMICA ANALITICA

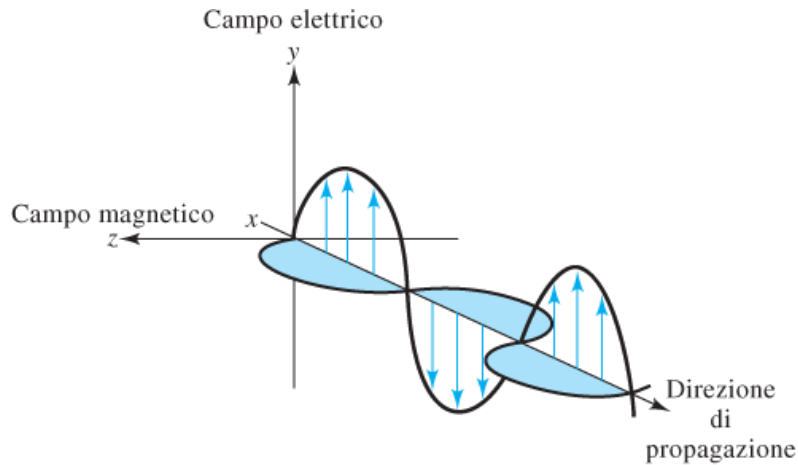
**METODI
SPETTROSCOPICI**

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

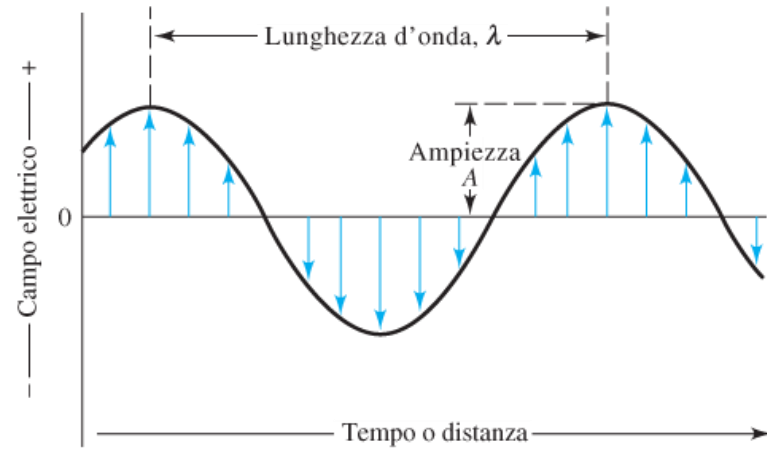


Le radiazioni (o onde) elettromagnetiche consistono in una forma di energia che si propaga, anche nel vuoto: sono la simultanea propagazione nello spazio delle oscillazioni di un campo elettrico e di un campo magnetico.

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



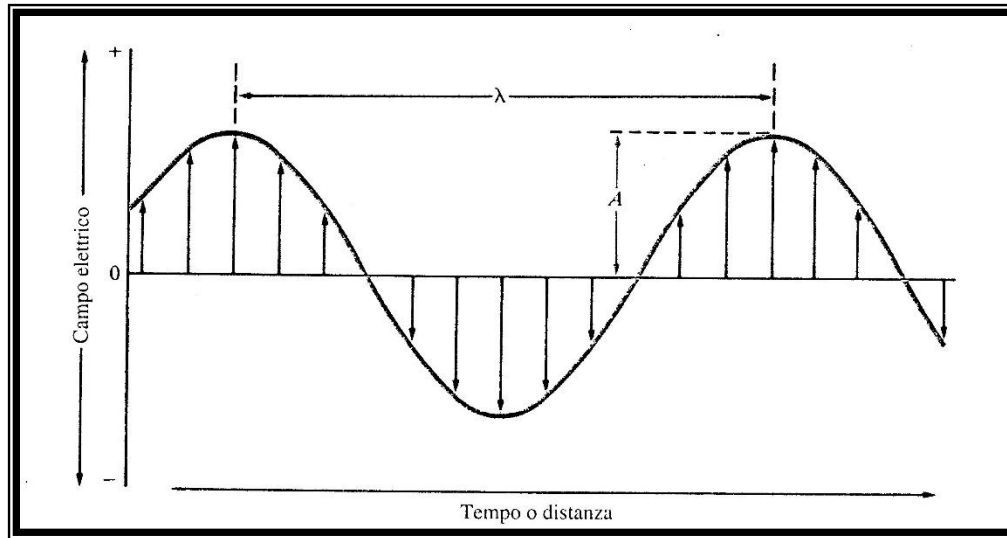
(a)



(b)

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***

$$h = \text{costante di Planck} = 6.63 \times 10^{-34} \text{ Js} \quad \rightarrow \quad E = hc / \lambda$$

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

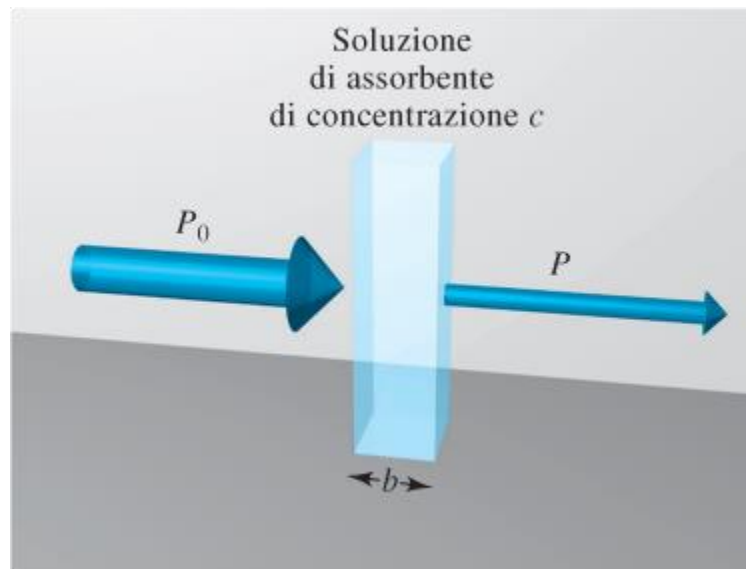
Frequenza (ν) = numero di oscillazioni del campo elettrico al secondo (1 Hz = 1 ciclo al secondo)

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.



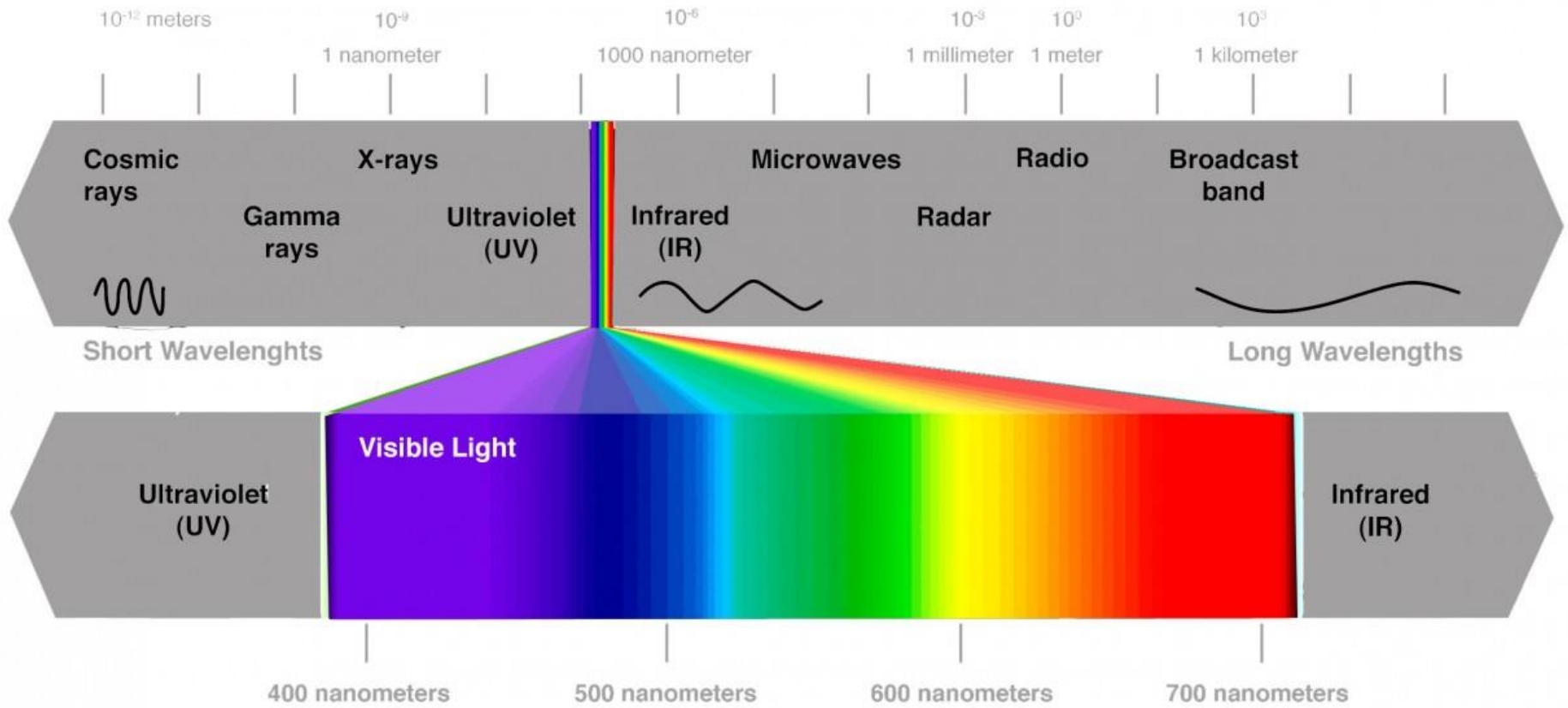
CLASSIFICAZIONE

Si possono dividere generalmente in:

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

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

SPETTRO ELETTROMAGNETICO



Tipi di radiazione

<i>onde radio</i>	<i>micro- onde</i>	<i>raggi IR</i>	<i>luce visibile</i>	<i>raggi UV</i>	<i>raggi X</i>	<i>raggi gamma</i>
-------------------	------------------------	---------------------	--------------------------	---------------------	--------------------	------------------------

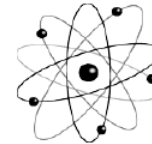
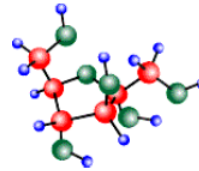
10^7	10^{10}	10^{12}	10^{14}	10^{15}	10^{17}	10^{20}
--------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------

ordini di grandezza (in Hz) delle FREQUENZE



ordini di grandezza (in cm) delle LUNGHEZZE D'ONDA

10^3	1	10^{-3}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-8}	10^{-11}
--------	---	-----------	-----------	-----------	-----------	------------



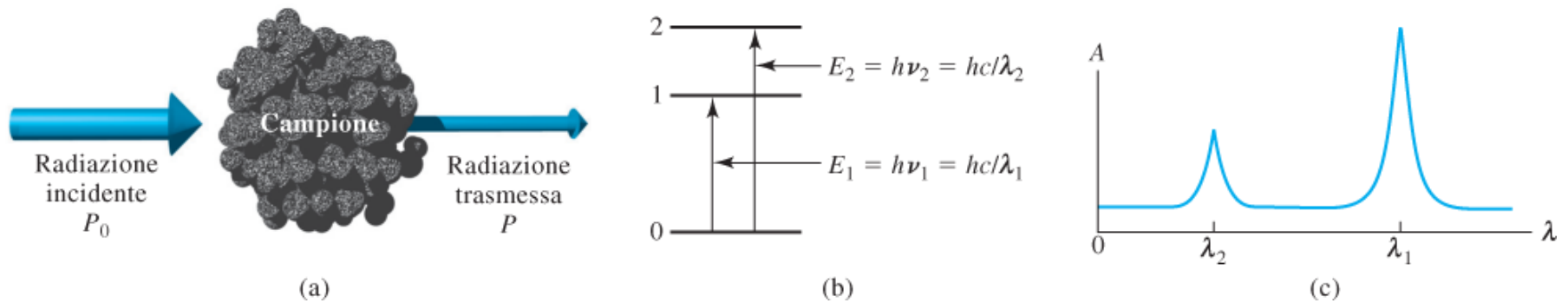
Tipo di variazione
quantica:

	Variazione di spin		Cambio di orientamento	Cambio di configurazione	Variazione della distribuzione elettronica		Variazione della configurazione nucleare
	10^{-2}	1	100	10^4	10^6	Numero d'onda, cm^{-1} 10^8	
	10 m	100 cm	1 cm	100 μm	1000 nm	10 nm	Lunghezza d'onda 100 pm
	3×10^6	3×10^8	3×10^{10}	3×10^{12}	3×10^{14}	3×10^{16}	Frequenza, Hz 3×10^{18}
	10^{-3}	10^{-1}	10	10^3	10^5	10^7	Energia, J/mol 10^9

Tipo di spettroscopia:

NMR ESR Microonde Infrarossa Visibile ed ultravioletta Raggi X Raggi γ

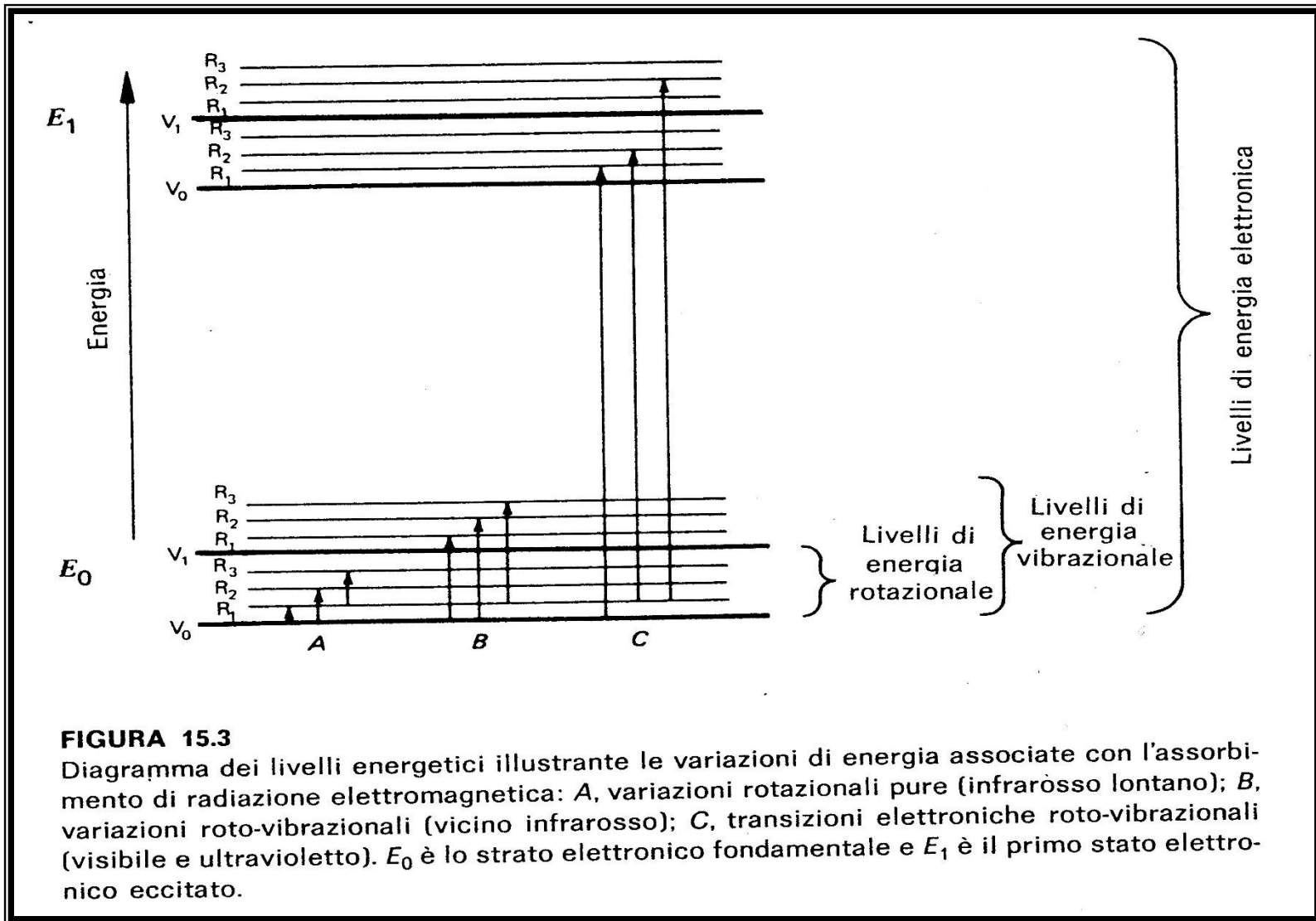
SCHEMA ESPERIMENTO SPETTROSCOPIA DI ASSORBIMENTO



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 (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 *assorbività molar* ϵ che sono una misura della probabilità che la transizione elettronica abbia luogo. La probabilità di transizioni $\pi \rightarrow \pi^*$ è maggiore di transizioni $n \rightarrow \pi^*$

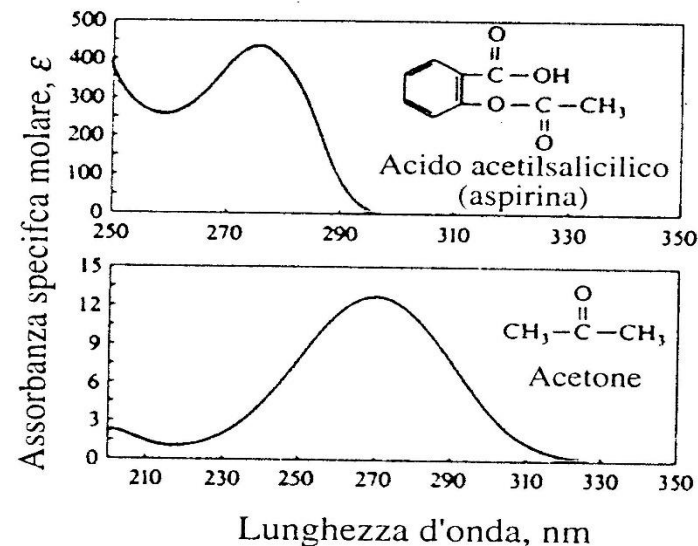
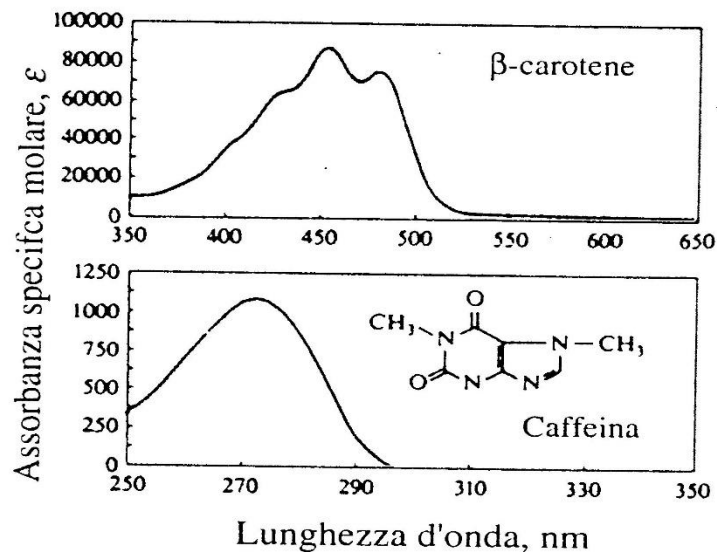


Figura 21-11
Spettri UV di composti organici tipici.

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

Le variazioni spettrali vengono classificate come *batocromiche* (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	$C_6H_{13}CH=CH_2$	<i>n</i> -eptano	177	13000
Alchene coniugato	$CH_2=CHCH=CH_2$	<i>n</i> -eptano	217	21000
Alchino	$C_5H_{11}C\equiv C-CH_3$	<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
	$\begin{array}{c} O \\ \\ CH_3CH \end{array}$	<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
Azo	$CH_3N=NCH_3$	etanolo	339	5
Nitro	CH_3NO_2	isooottano	280	22
Nitroso	C_4H_9NO	etere etilico	300	100
			665	20
Nitrato	$C_2H_5ONO_2$	diossano	270	12
Aromatico	Benzene	<i>n</i> -esano	204	7.900
			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:

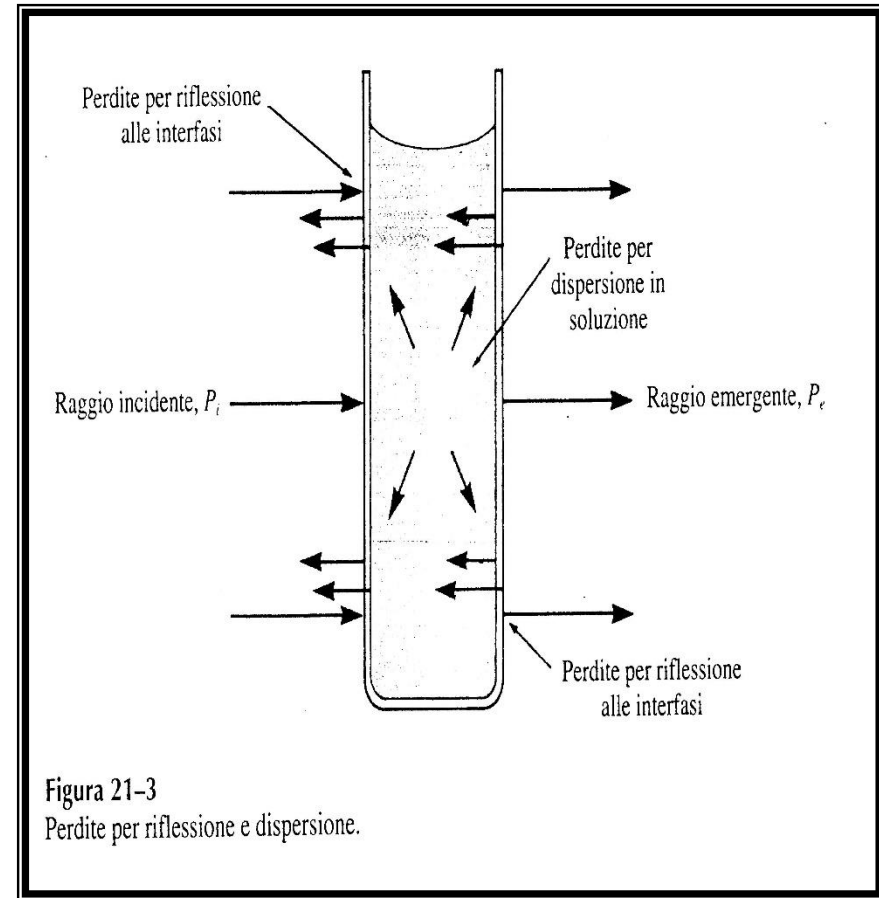
$$A = \epsilon bc$$

ϵ = assorbività (o assorbanza specifica)
molare

b = cammino ottico

c = concentrazione

(vale per soluzioni diluite)



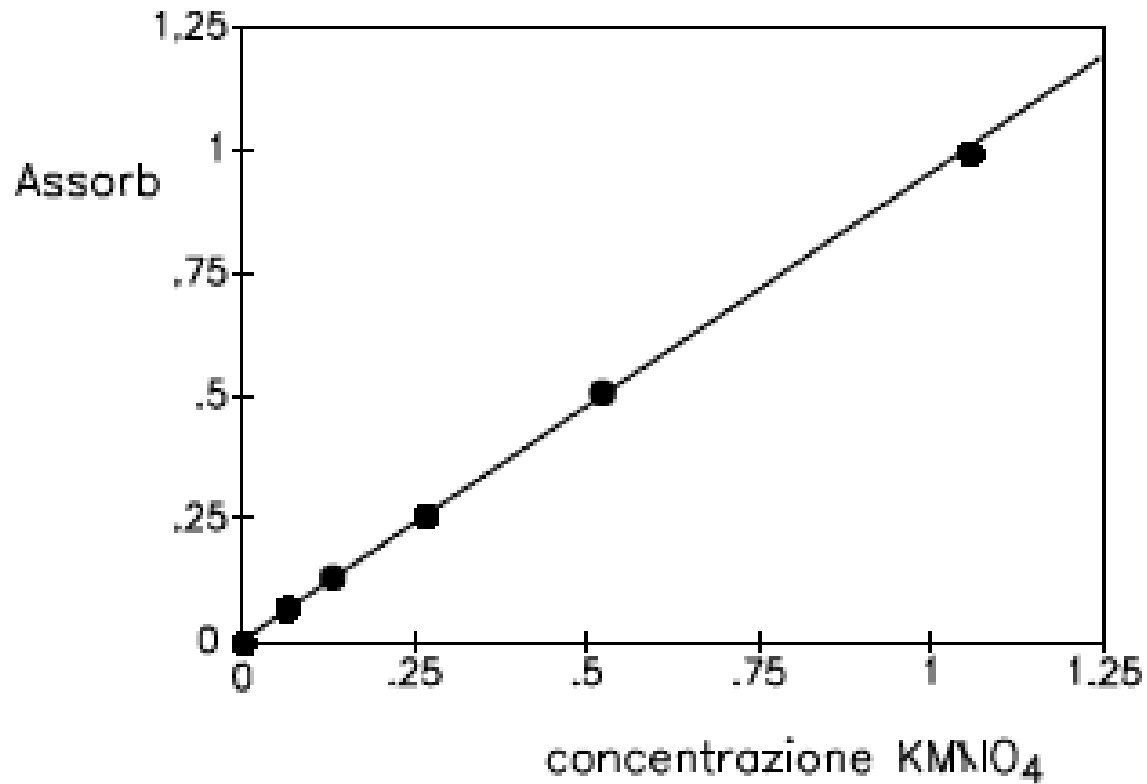
ASSORBIVITÀ MOLARE

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

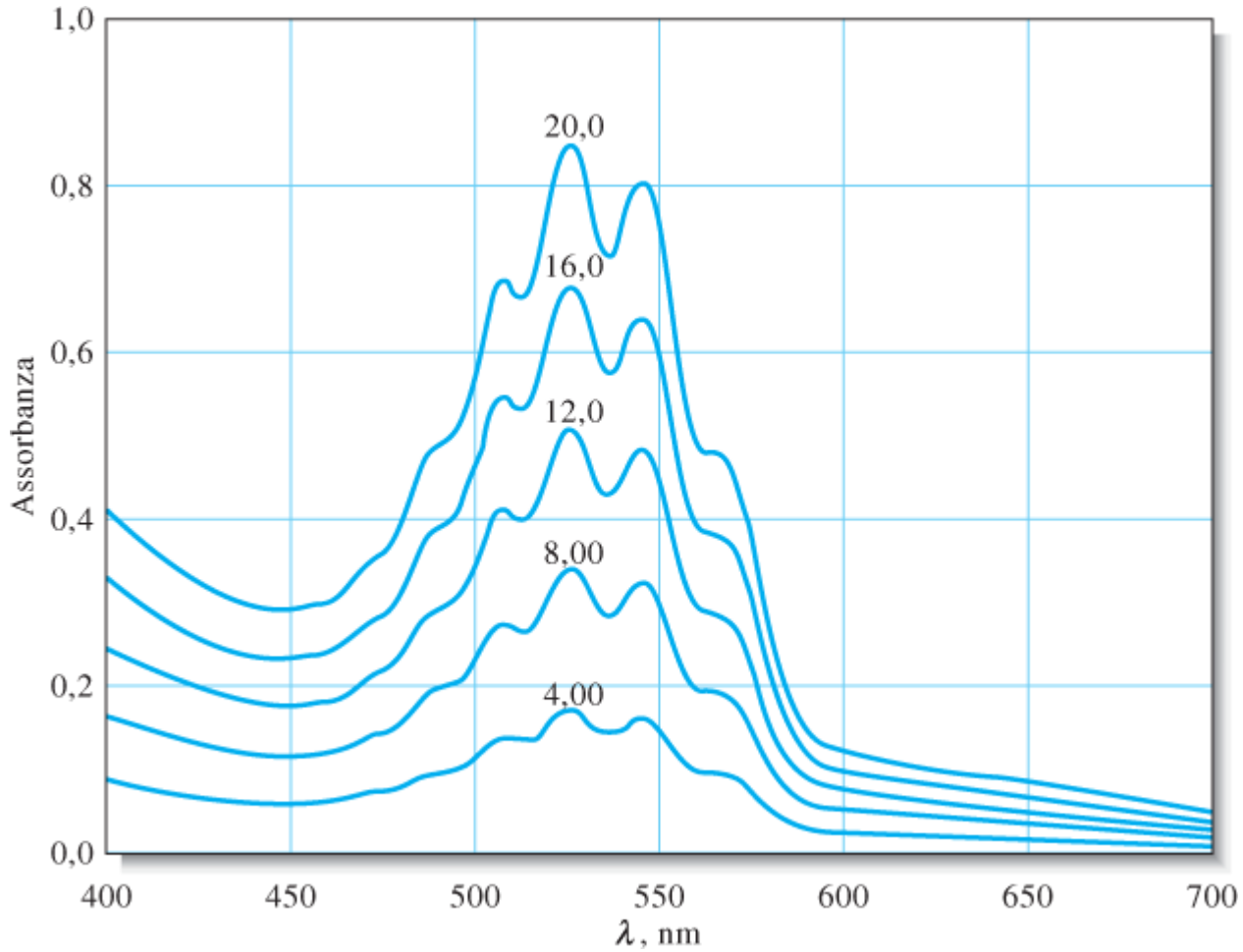
Per molti composti organici l'assorbività molare di picco varia da 10 o meno a 10000 o più. Alcuni complessi dei metalli di transizione hanno assorbività molari che vanno da 10000 a 50000.

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

LEGGE DI LAMBERT-BEER

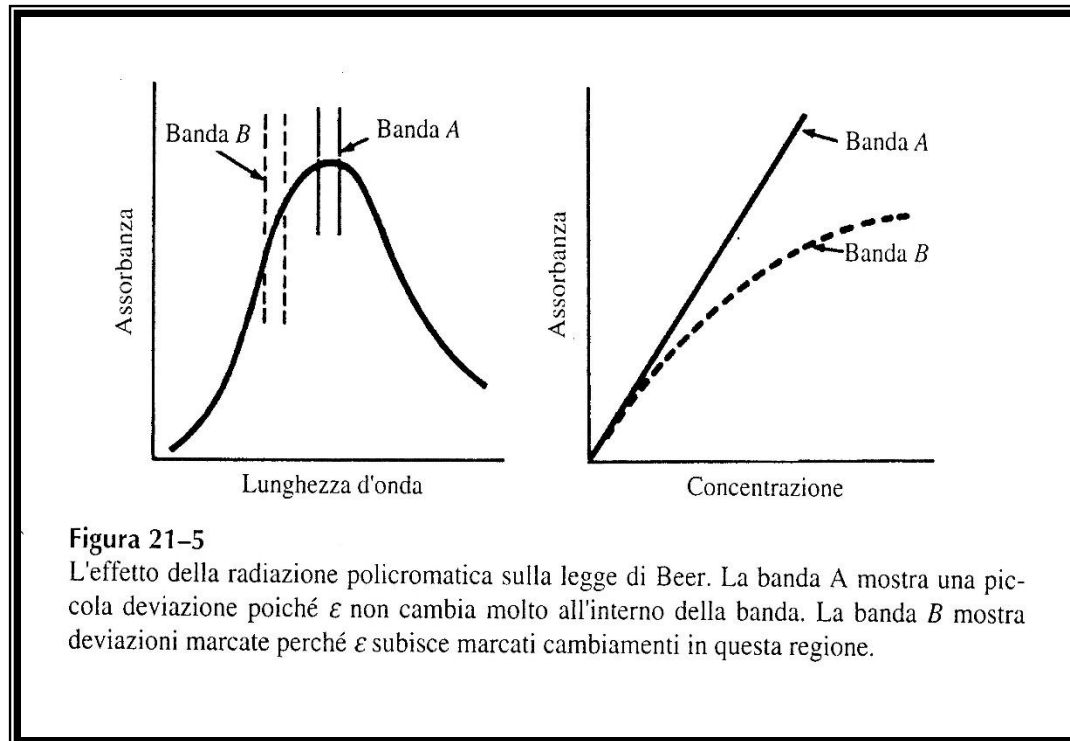


CONCENTRAZIONE VS ASSORBANZA



DEVIAZIONI DALLA LEGGE DI BEER

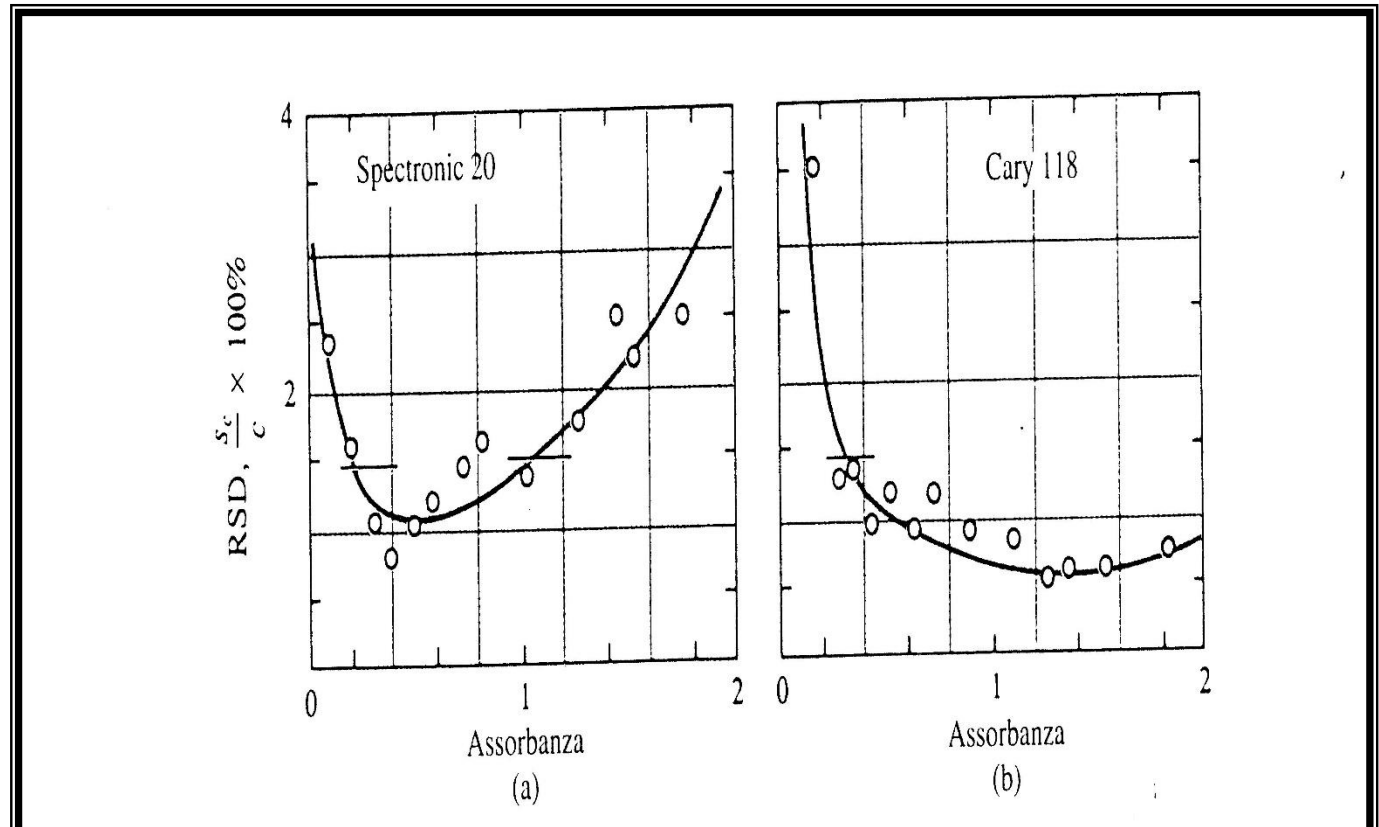
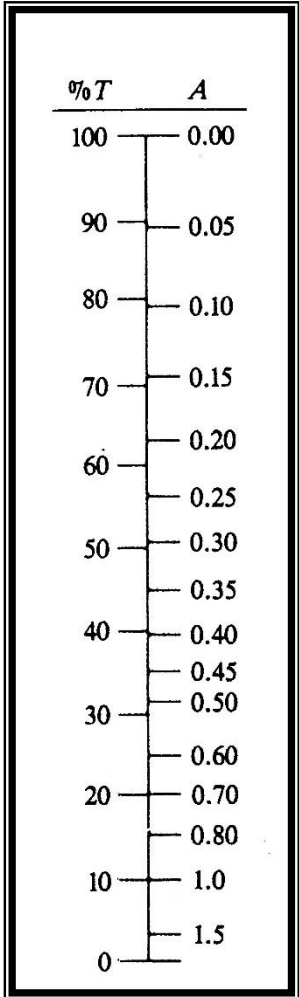
- chimiche → Le specie assorbenti danno reazioni di associazione, dissociazione o reazione con solvente con prodotti che hanno ϵ diversi (p.es. un indicatore acido-base in soluzione non tamponata)
- strumentali → Dovute a radiazioni spurie e al fatto che si usa radiazione policromatica per l'assorbimento.



ERRORE SPETTROFOTOMETRICO

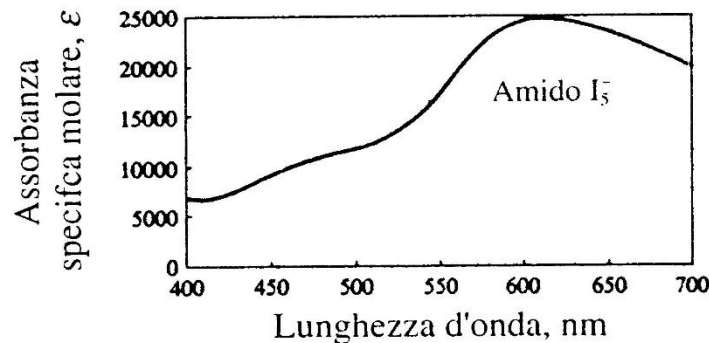
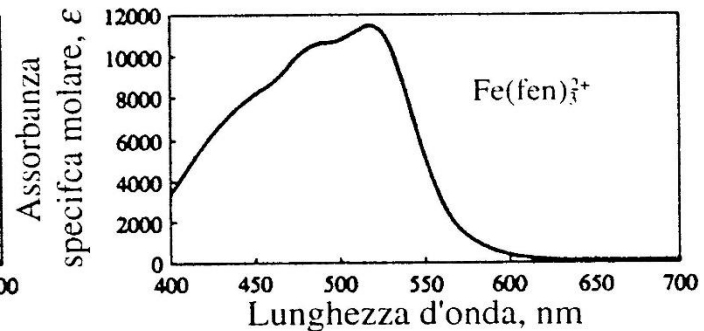
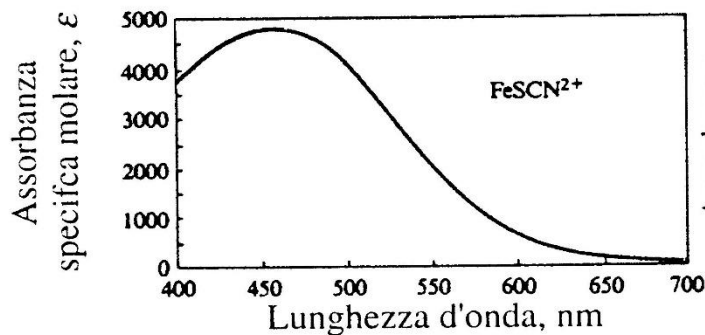
$$A = \epsilon bc = \log P_0/P = \log P_0 - \log P$$

- Per A bassi $\rightarrow \Delta$ piccolo tra N grandi \rightarrow RSD grande
- Per A alti $\rightarrow P$ poco accurato \rightarrow RSD grande

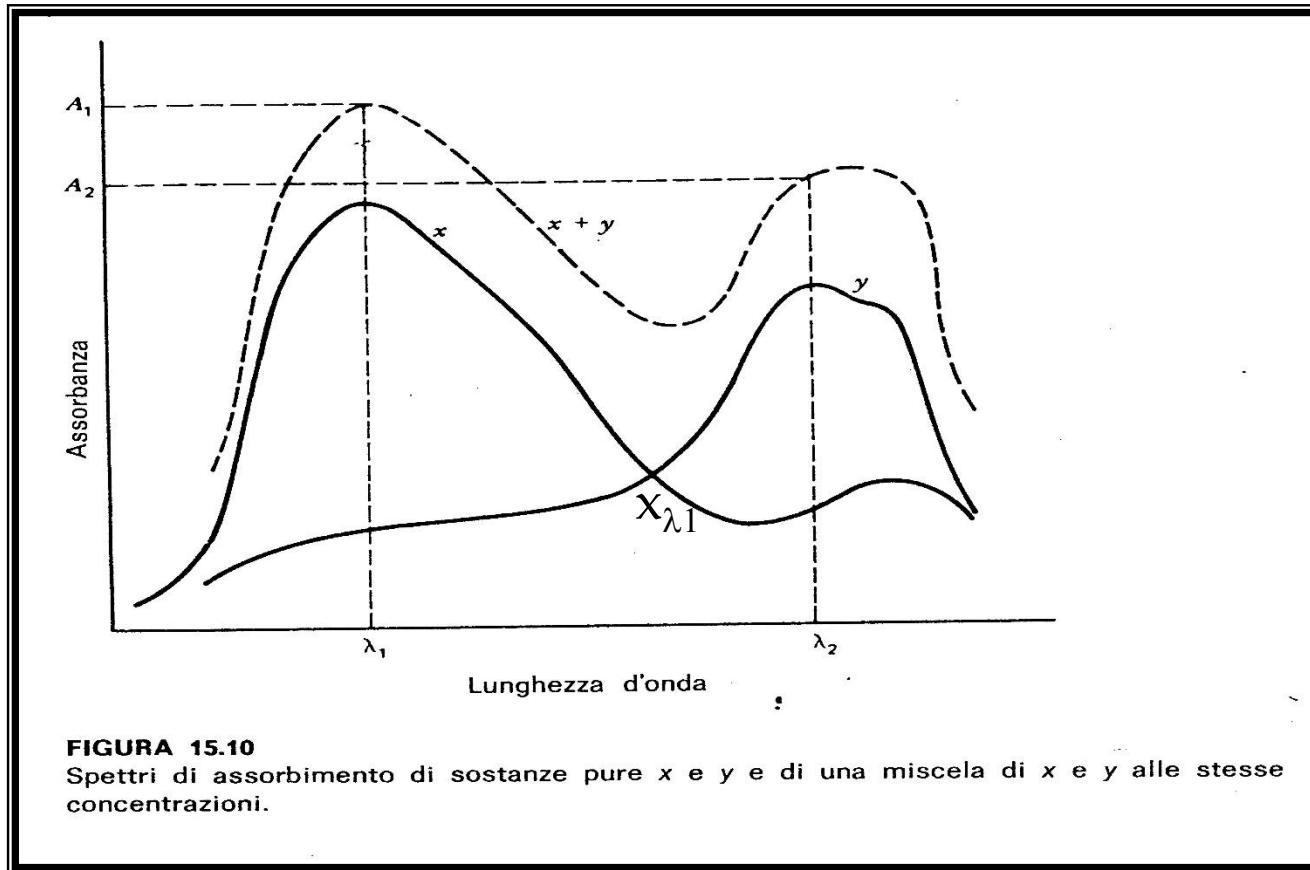


ASSORBIMENTO A TRASFERIMENTO DI CARICA

- 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)



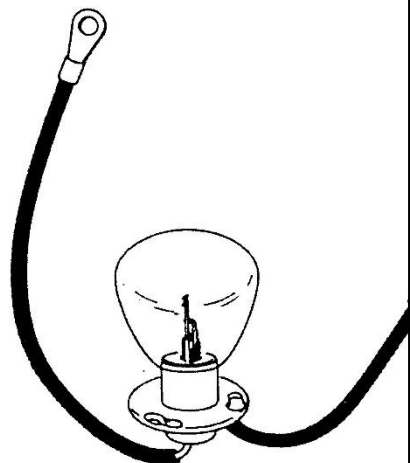
Additività delle assorbanze



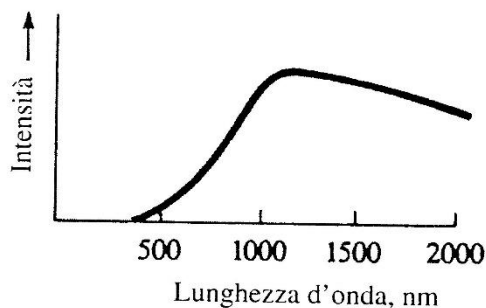
$$A_{1x(\lambda_1)} = \epsilon_{x(\lambda_1)} b c_x$$
$$A_{1y(\lambda_1)} = \epsilon_{y(\lambda_1)} b c_y$$

$$A_{2x(\lambda_2)} = \epsilon_{x(\lambda_2)} b c_x$$
$$A_{2y(\lambda_2)} = \epsilon_{y(\lambda_2)} b c_y$$

SORGENTI



(a)



(b)

Figura 20-6

(a) Lampada a filamento di tungsteno.

(b) Il suo spettro di emissione.

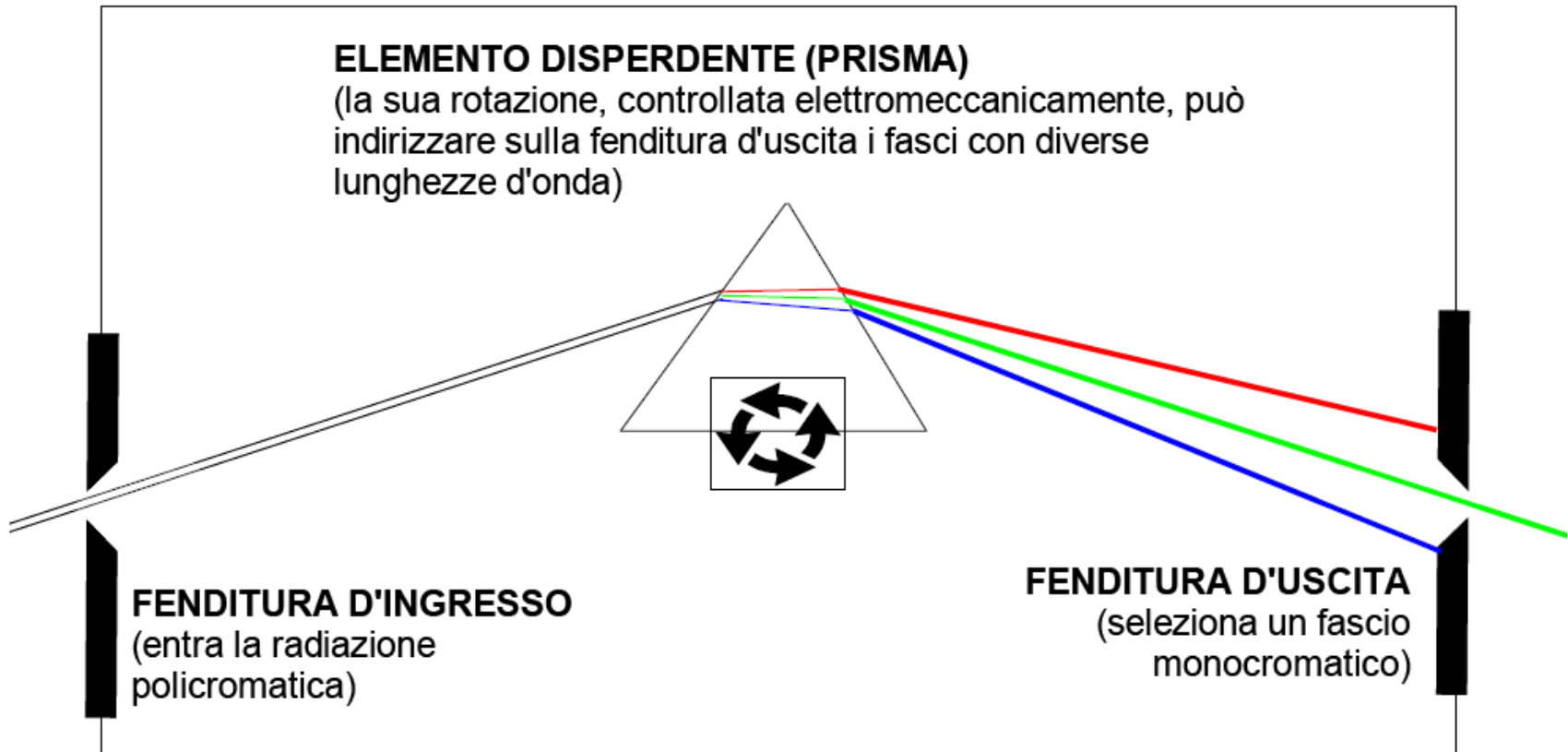
Tabella 20-1

Sorgenti continue per la spettroscopia ottica

Sorgente	Regione di lunghezza d'onda, nm	Tipo di spettroscopia
Lampada a Xenon	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	350–2200	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

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).

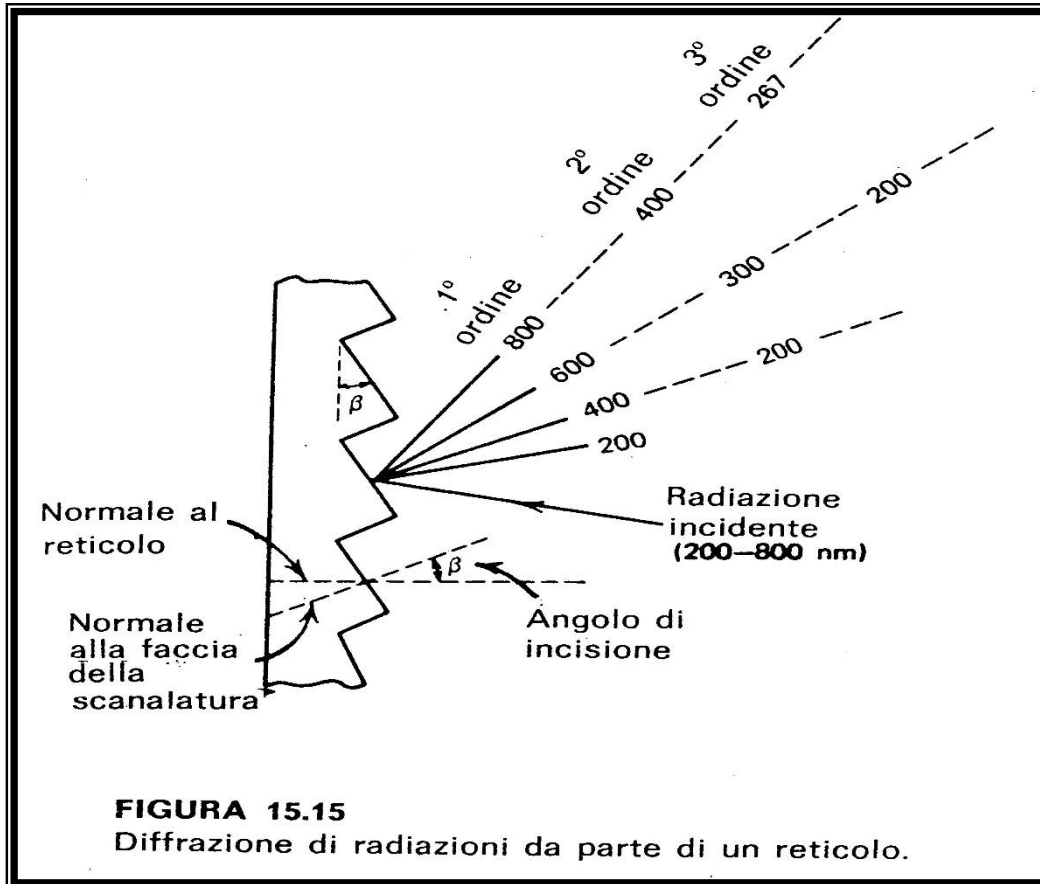


SELEZIONE DELLA LUNGHEZZA D'ONDA

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).

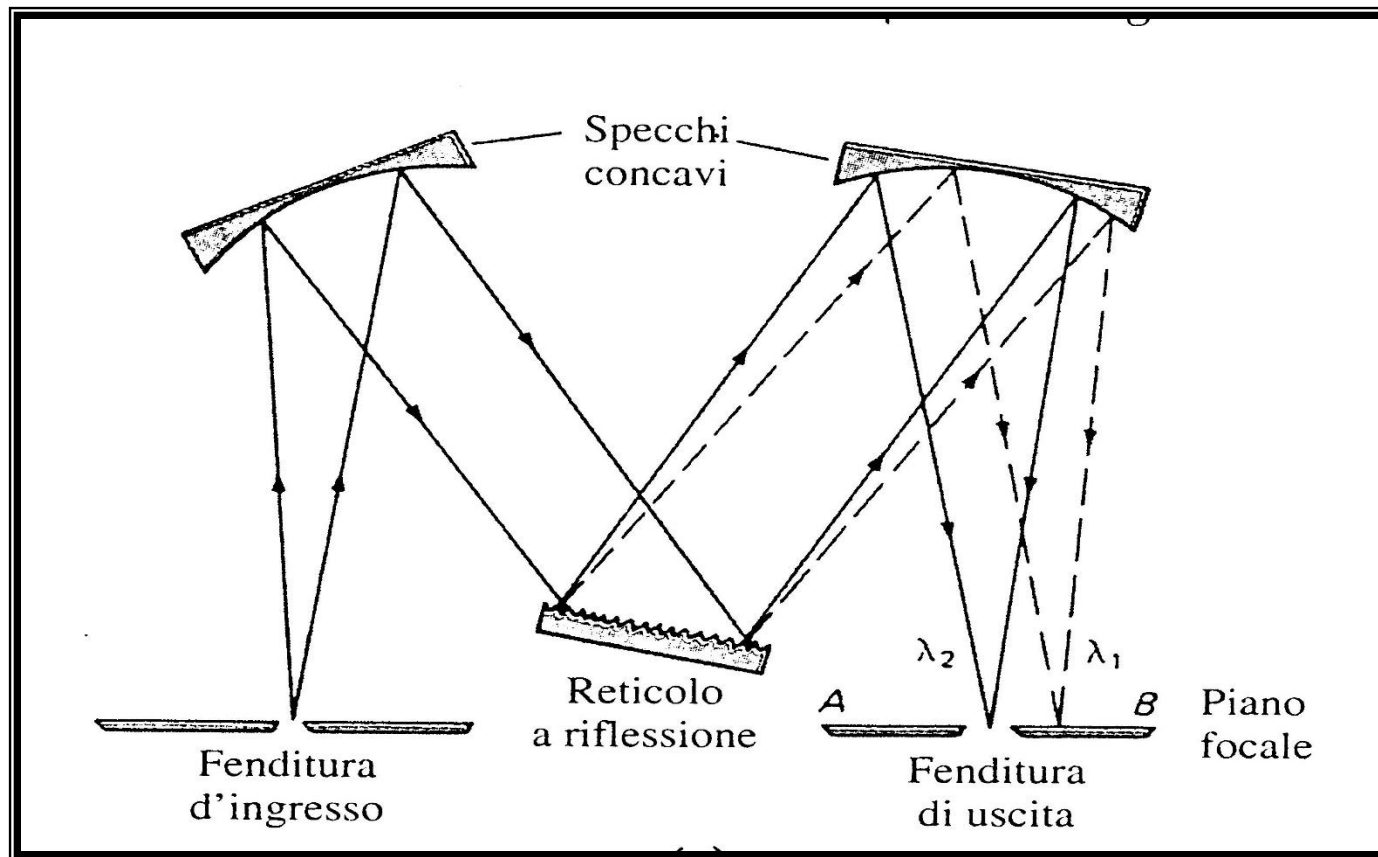
$$n\lambda = d (\text{sen } i + \text{sen } r)$$

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

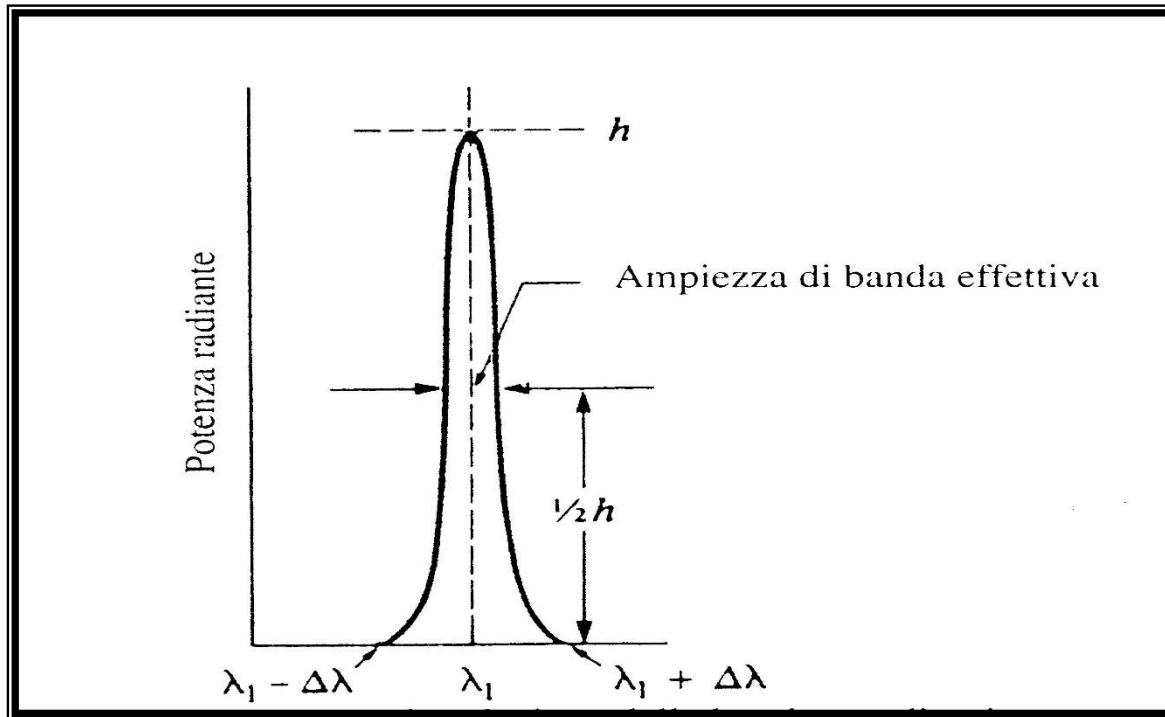
Servono a selezionare la lunghezza d'onda desiderata, consistono di *fenditure d'ingresso* e *d'uscita* per eliminare le radiazioni indesiderate, *un sistema di specchi* per focalizzare la radiazione e un *separator* di lunghezze d'onda (prisma o reticolo)



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.



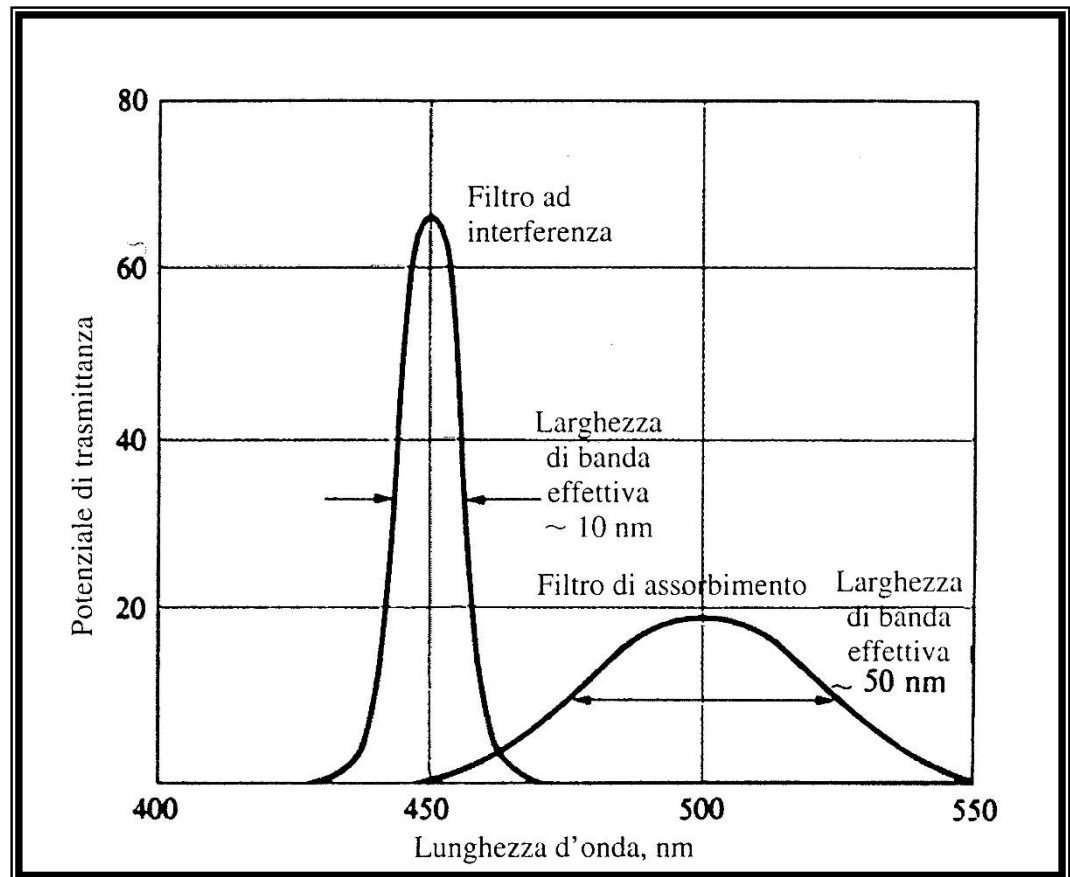
Molti monocromatori hanno fenditure variabili che permettono di lavorare con rivelatori di diversa sensibilità

SELEZIONE DELLA LUNGHEZZA D'ONDA

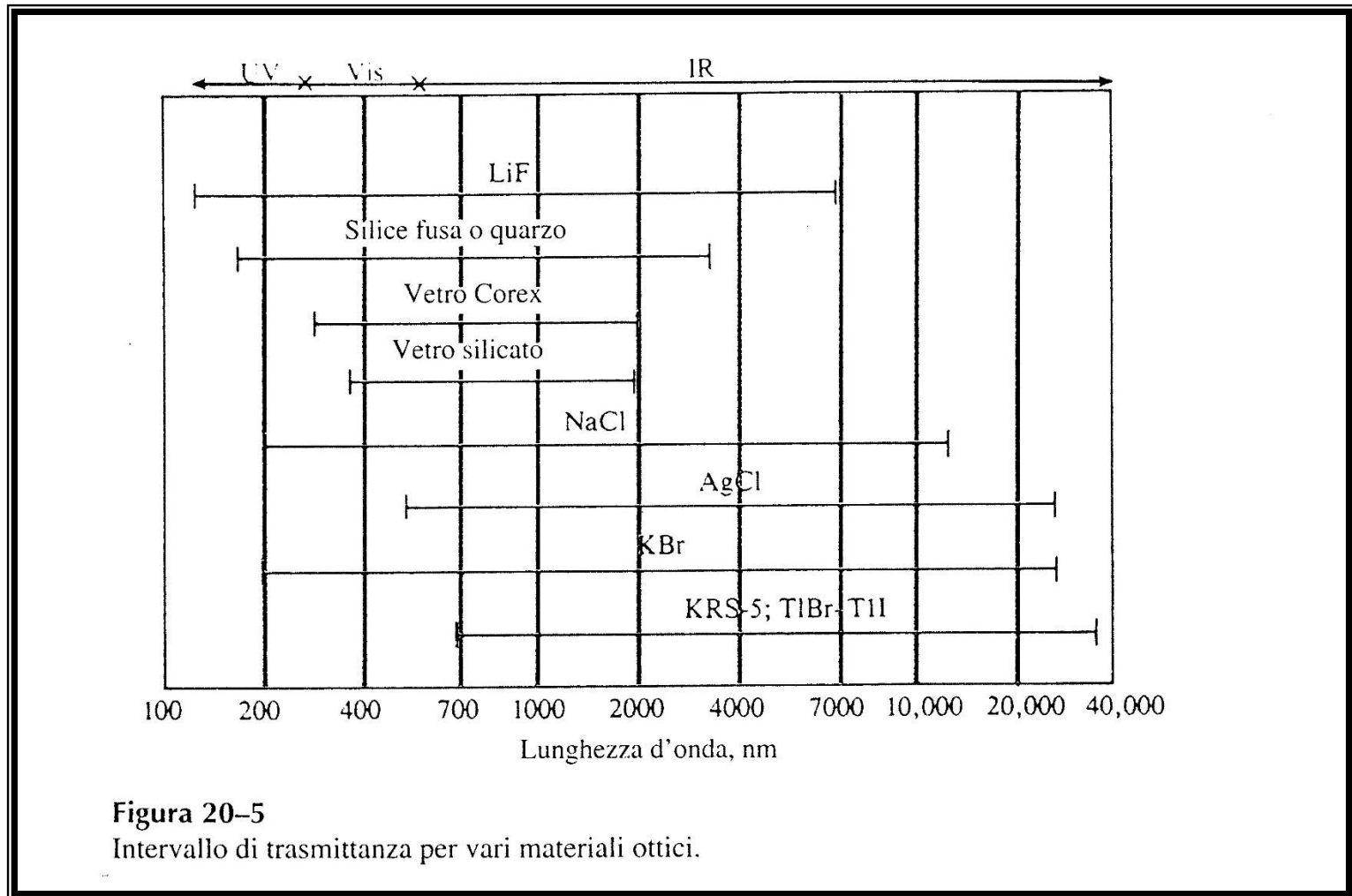
Filtri di assorbimento e ad interferenza

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)



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)

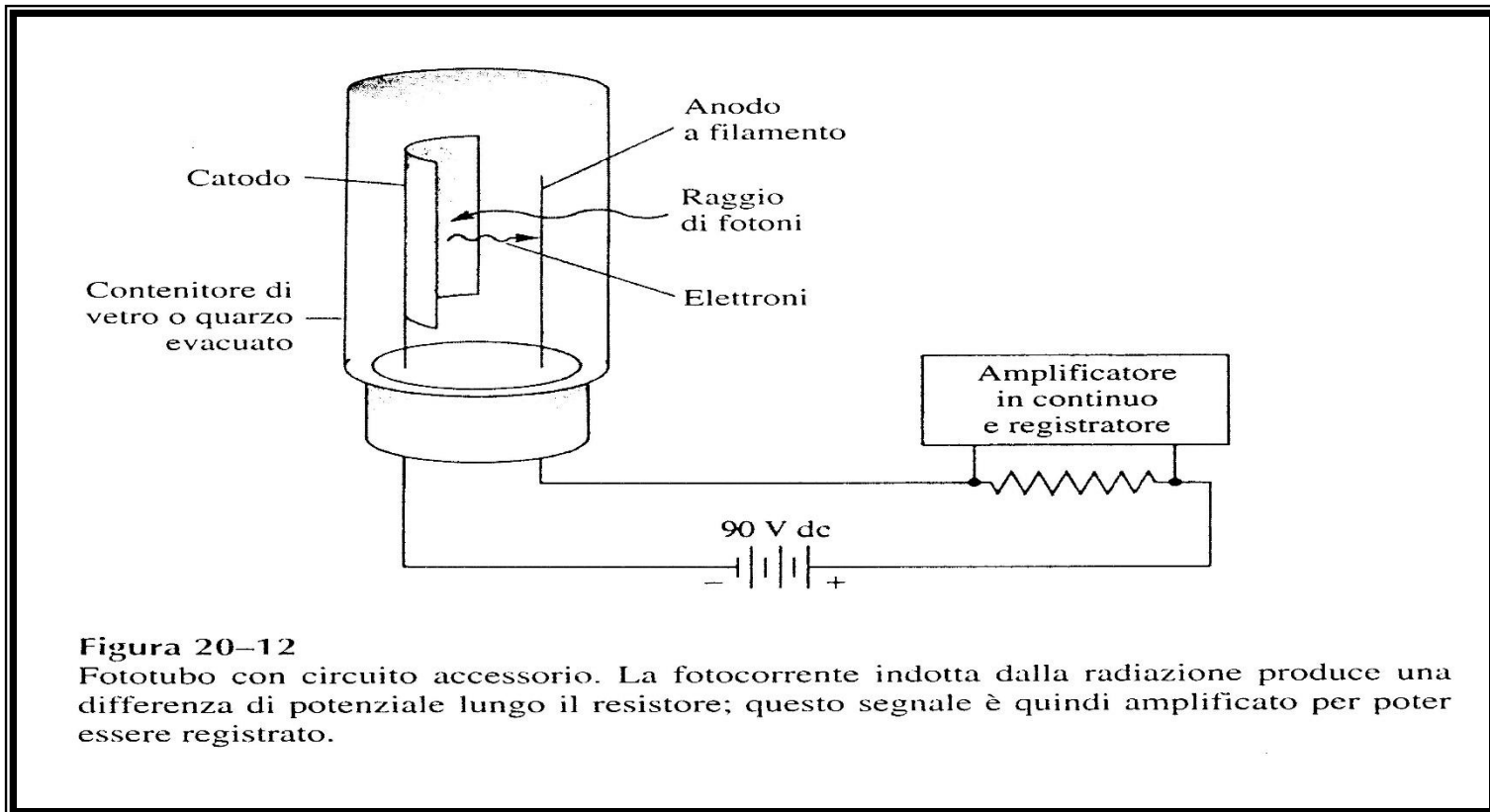
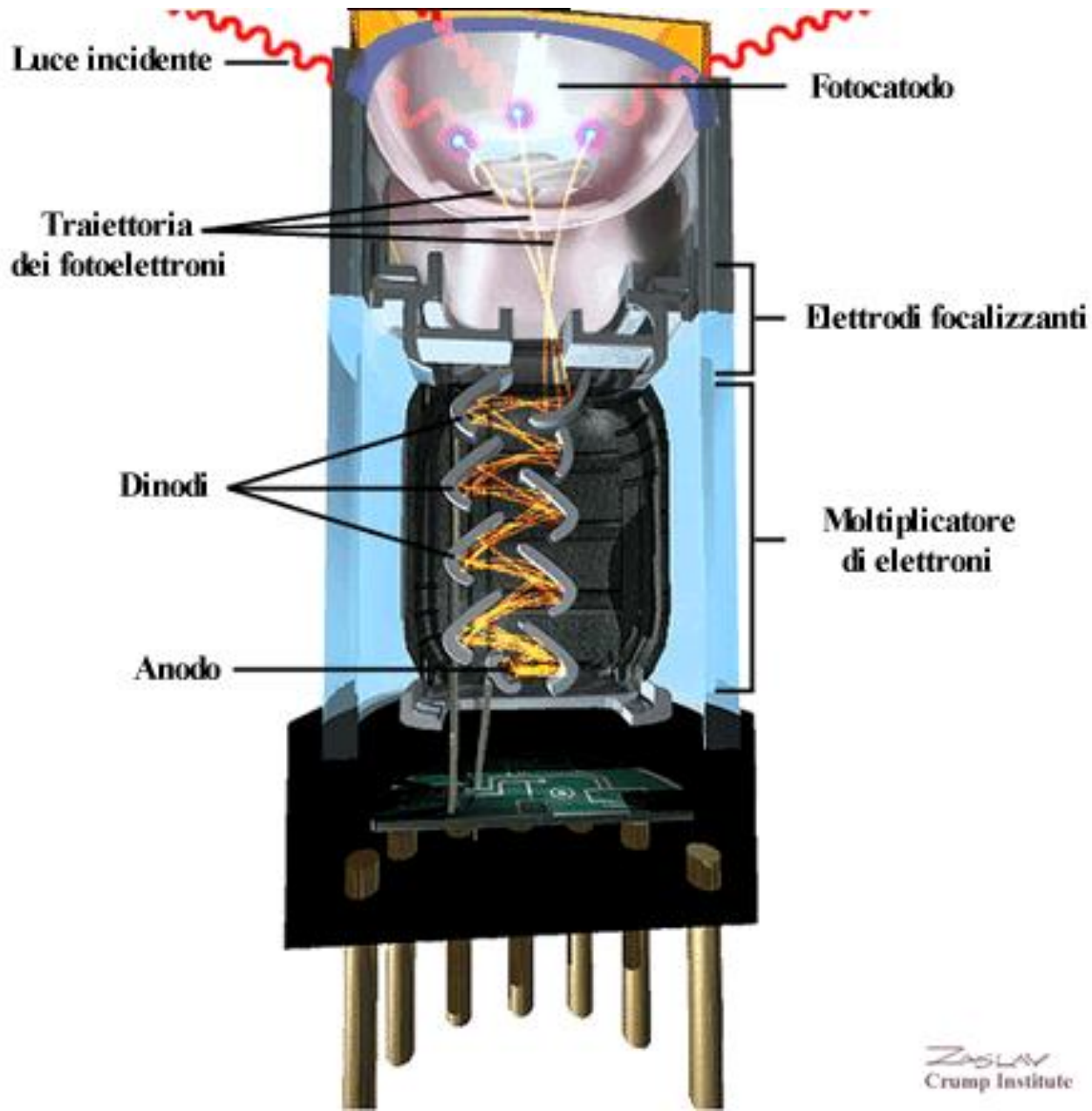


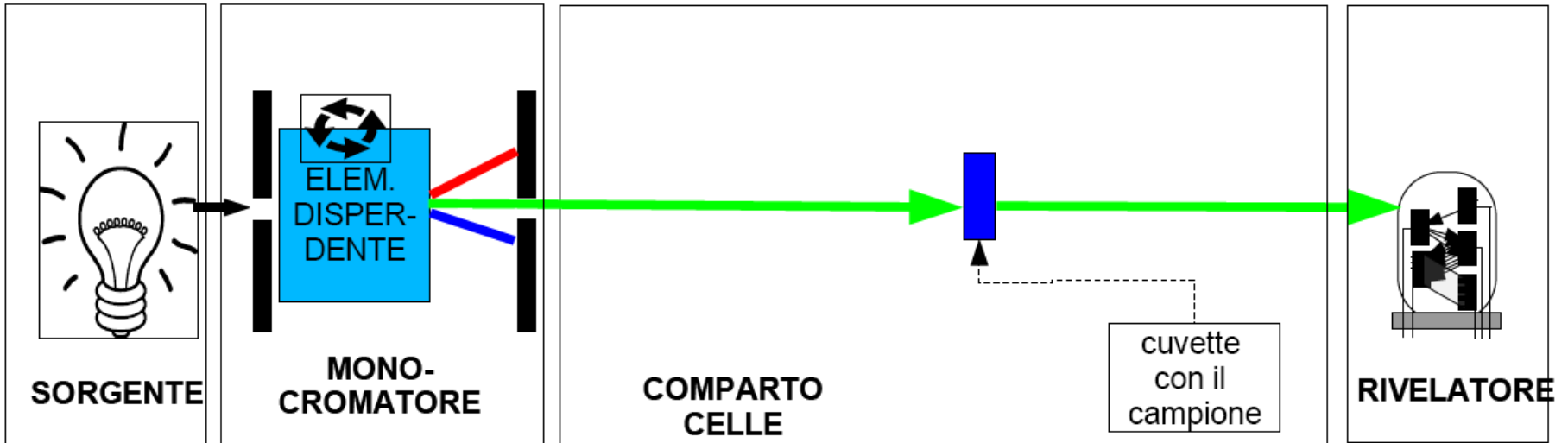
Figura 20-12

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.

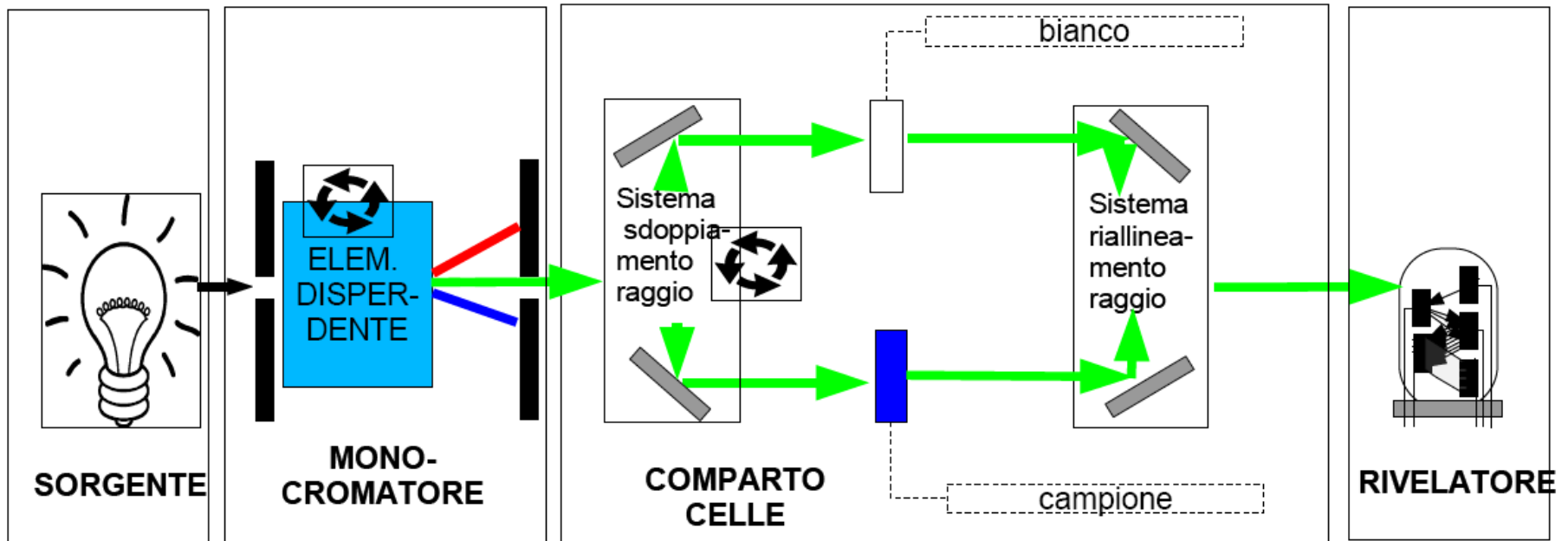
FOTOMOLTIPLICATORE



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:

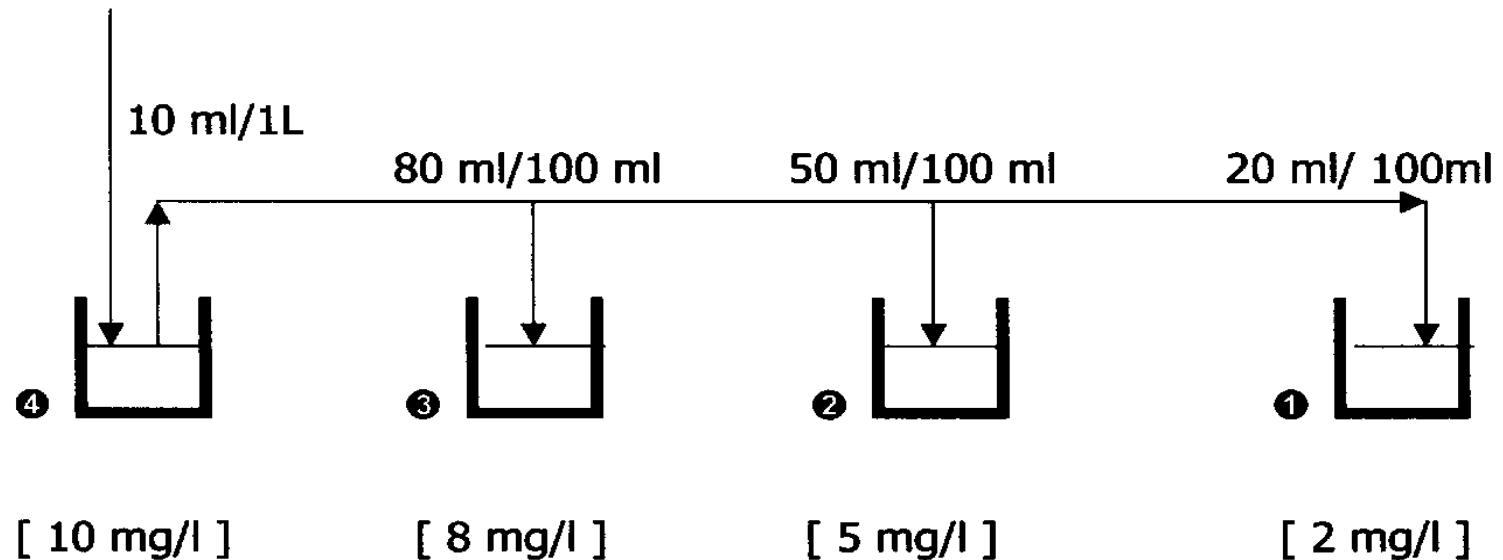
analisi **QUANTITATIVA**

ANALISI QUANTITATIVA

RETTA DI CALIBRAZIONE (TARATURA)

Tecnica delle diluizioni:

soluzione madre: 1 ml = 1mg di campione



DATA :08/02/01
ID :Acetone

TEMPO :11:03:41
OPERATORE:espraf

No SERIE :060506

L. D' ONDA:263.0nm
CAMBIO LAMP:325nm

B. PASSANTE:2.0nm
No.STANDARDS:4
RIPETIZION:1

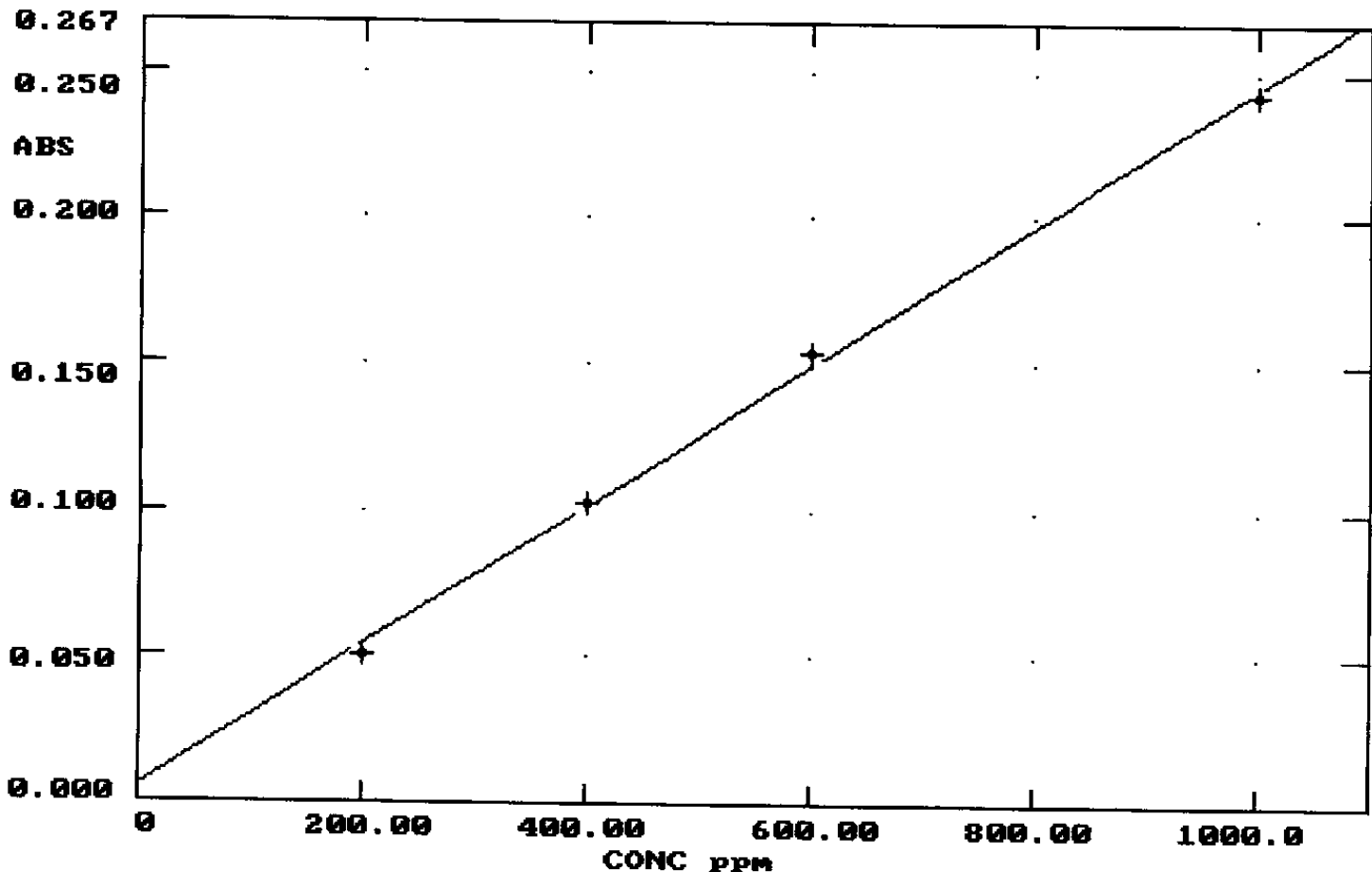
INTEGRAZ:1s
UNITA' ppm
TIPO CURVA:LINEARE

COEFFIC: 0.9988

EQUAZ:
 $0 \times 2 + 0.0002392x + 0.005906$

PROGR.CUVETTE2
RIF. MODO:ON

CICLI PROG CELLE1
MODO PROG CUVETTE:AUTO



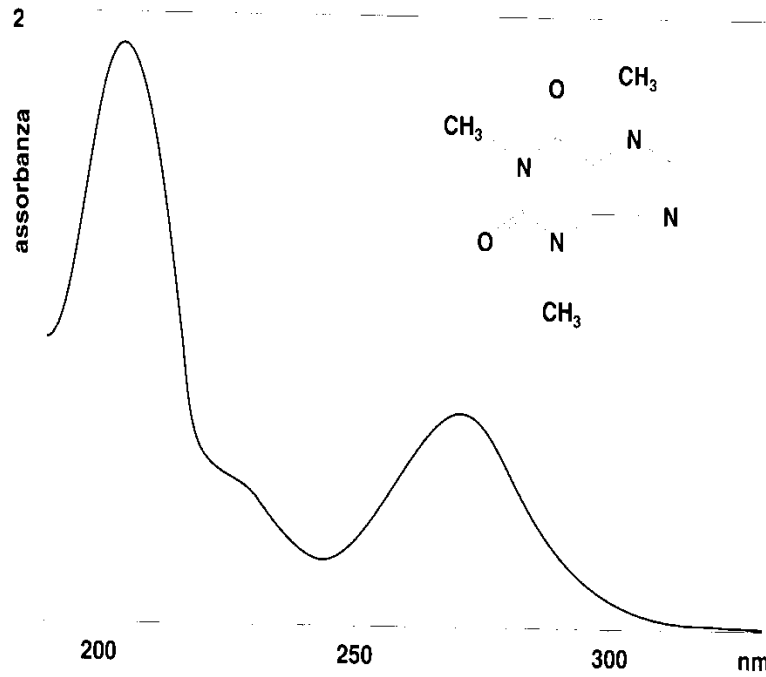


Fig. 1.9 Spettro di assorbimento della caffeina.

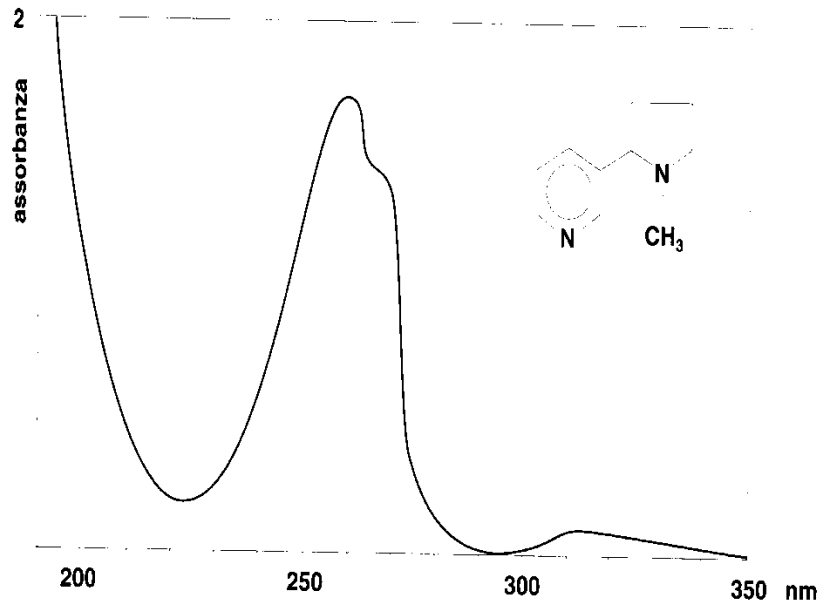


Fig. 1.10 Spettro di assorbimento della nicotina.

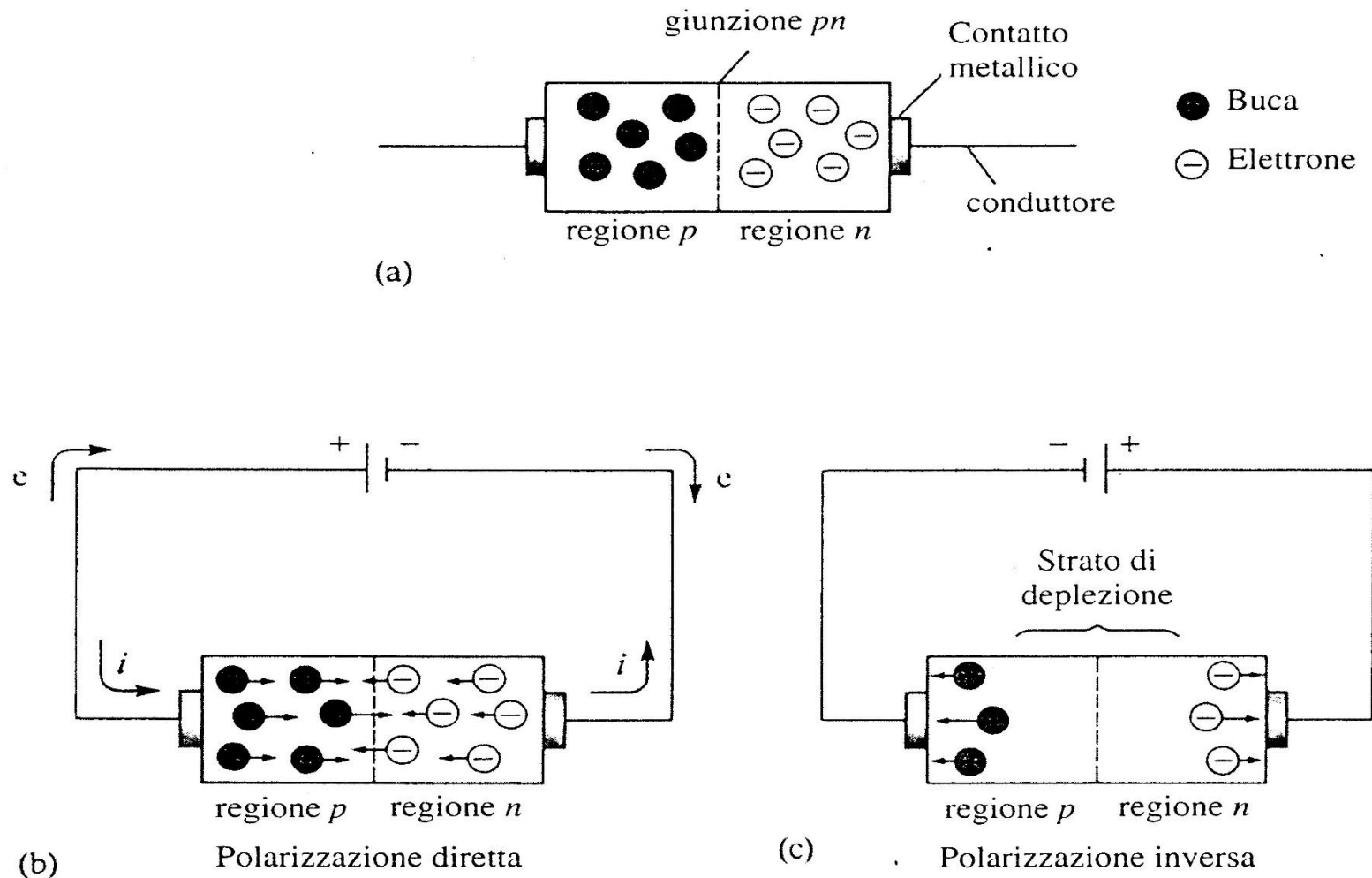
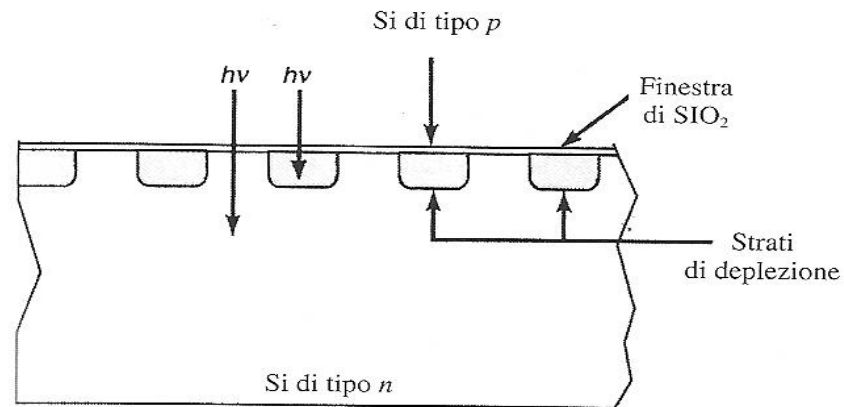


Figura 20-16

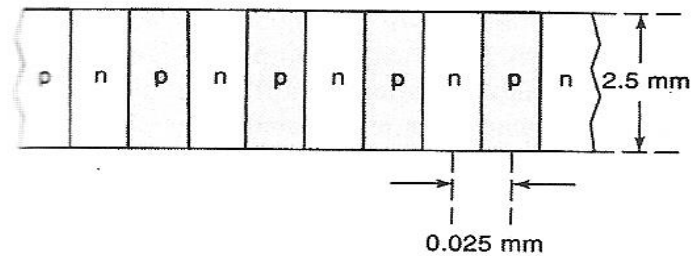
(a) Schema di un diodo al silicio. (b) Flusso di elettricità in condizioni di polarizzazione diretta. (c) Formazione dello strato di deplezione, che impedisce il flusso di elettricità, in condizioni di polarizzazione inversa.

RIVELATORE A SERIE DI DIODI (DAD)

22A Strumenti per misure di assorbimento



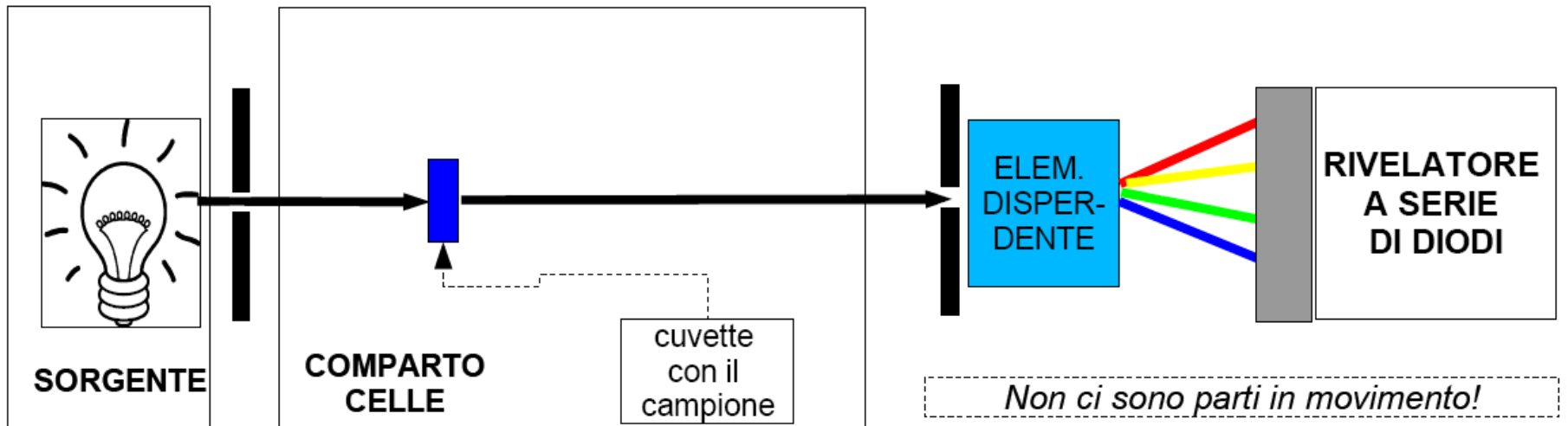
(a)



(b)

RIVELATORE A SERIE DI DIODI (DAD)

E' possibile monitorare simultaneamente diverse λ



Vengono utilizzati prevalentemente come rivelatori HPLC