

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI TERAMO

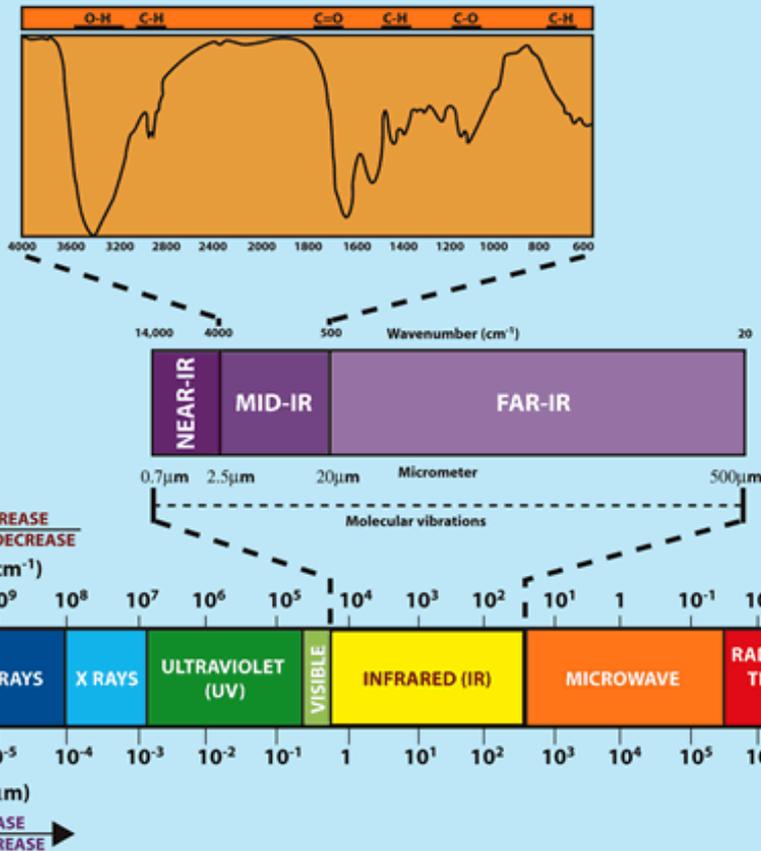
CL in BIOTECNOLOGIE

Anno Accademico 2021/2022

CHIMICA ANALITICA

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 cm^{-1}

→ IR medio (MIR) → 4.000–200 cm^{-1}

→ IR lontano (FIR) → 200 – 10 cm^{-1}

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

MOTI VIBRAZIONALI

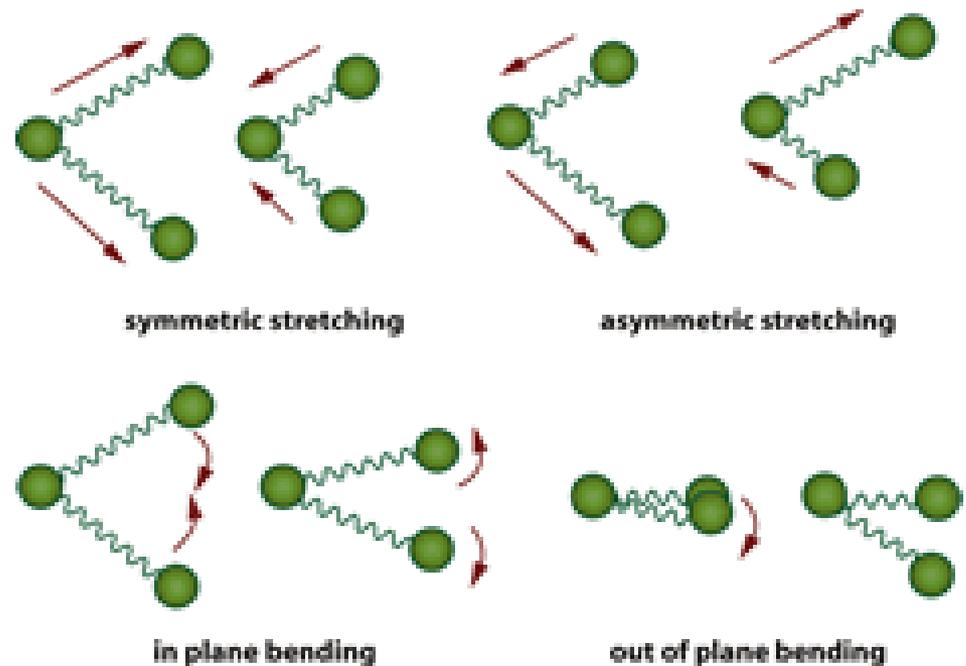
IR è una **spettroscopia vibrazionale**, infatti quando una molecola viene investita da una radiazione infrarossa la cui frequenza (espressa in termini di numeri d'onda, inversamente proporzionale alla lunghezza d'onda) sia compresa fra 10.000 e 100 cm^{-1}

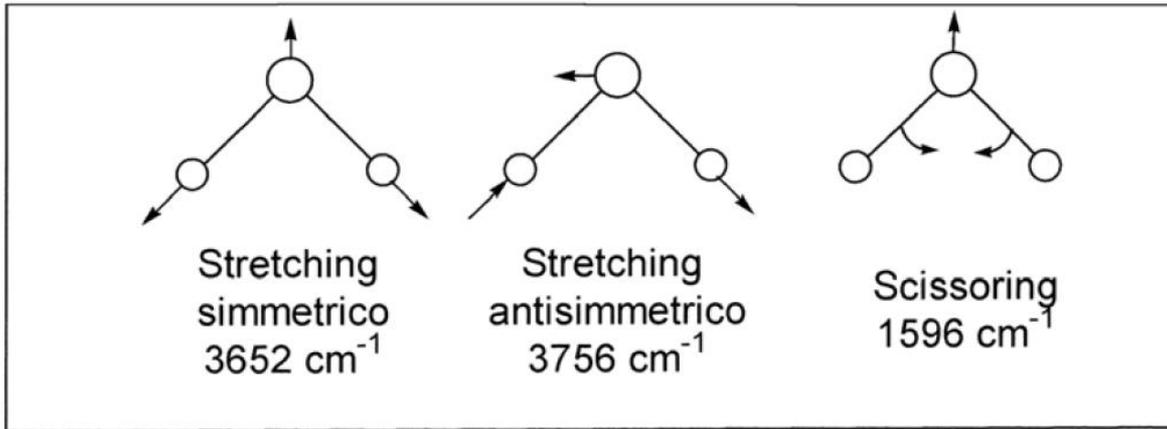
L'energia ceduta dalla radiazione stessa viene convertita in energia vibrazionale, e sono due i modi fondamentali in cui la molecola può vibrare:

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

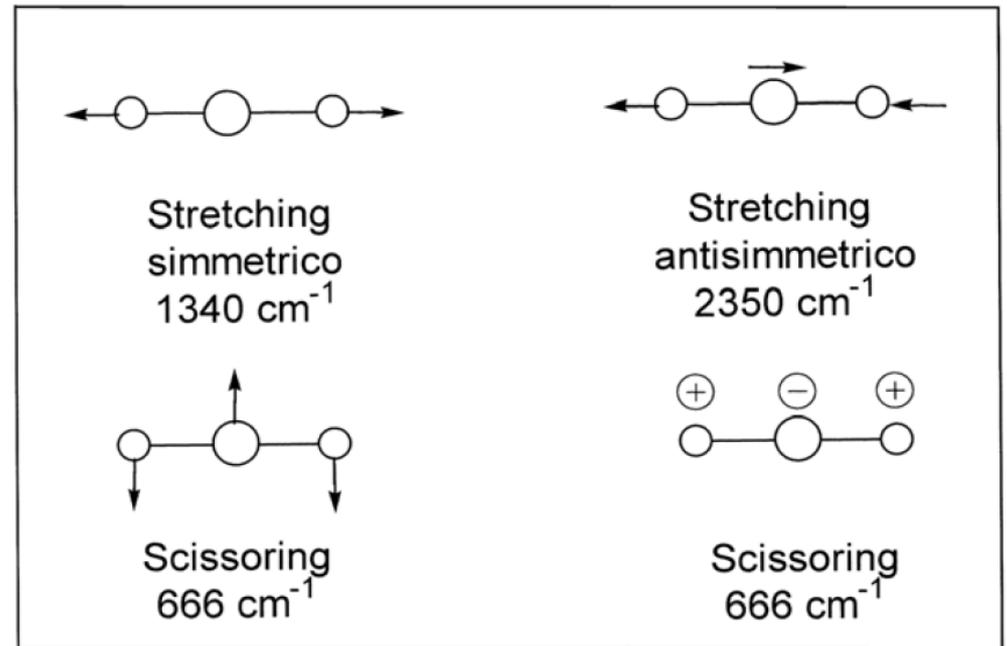
VIBRAZIONE DI BENDING (piegamento)
dovuto a variazione dell'angolo di legame

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





H₂O



CO₂

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 π , 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.

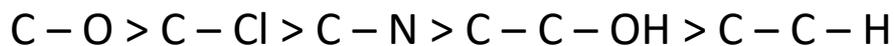
$$\mu = q \cdot d$$

μ = 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:

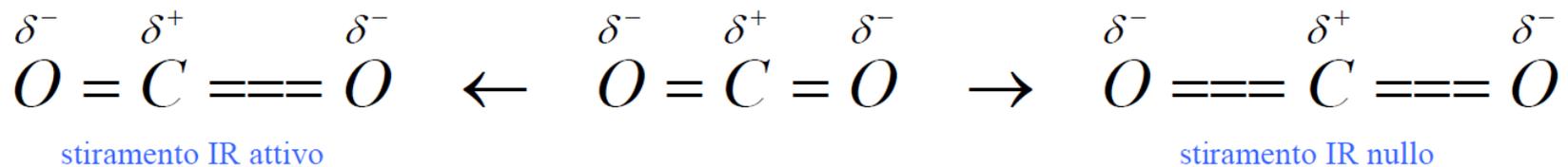


Quindi l'intensità di una banda dipende dall'elettronegatività relativa degli atomi coinvolti nel legame a cui quella banda si riferisce

MOTI VIBRAZIONALI

Nel caso della CO₂, che possiede un momento dipolare nullo, lo stiramento simmetrico dei legami carbonilici non porta ad assorbimento nell'IR perché ogni momento dipolare associato ad un legame C=O è annullato dall'altro (la vibrazione simmetrica non distrugge il centro di simmetria del sistema).

Invece lo stiramento asimmetrico comporta la comparsa di un momento dipolare variabile nel tempo, e cioè assorbimento.

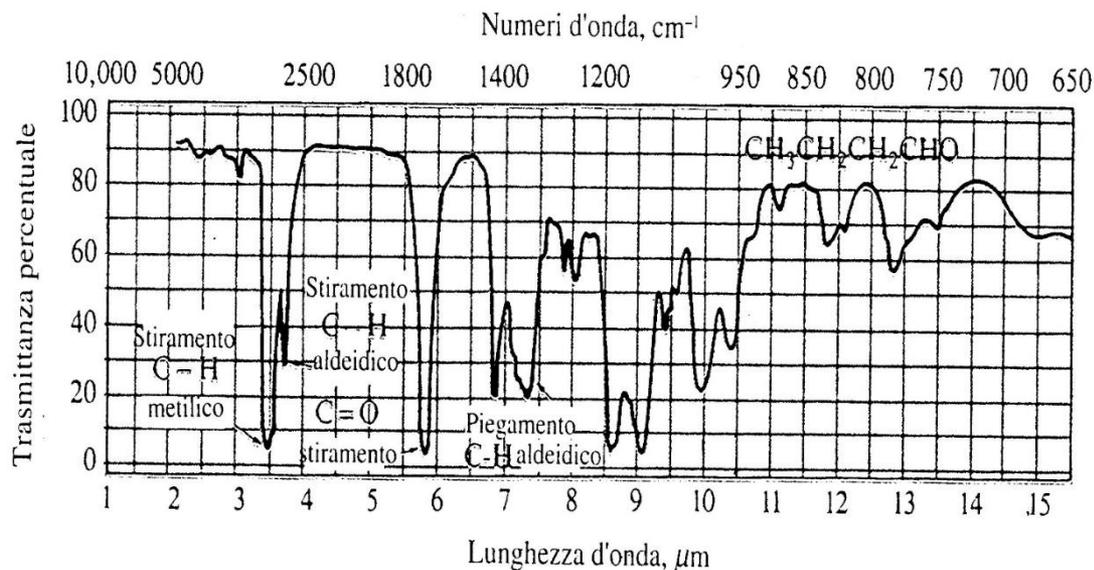


Maggiore è la variazione del momento dipolare, maggiore è l'assorbimento!

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 λ maggiori (ΔE 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'assorbanza.

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 λ_{\max} (in micrometri μm) o più spesso in numero d'onda ν (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 ($\lambda = 6.0-15 \mu\text{m}$)

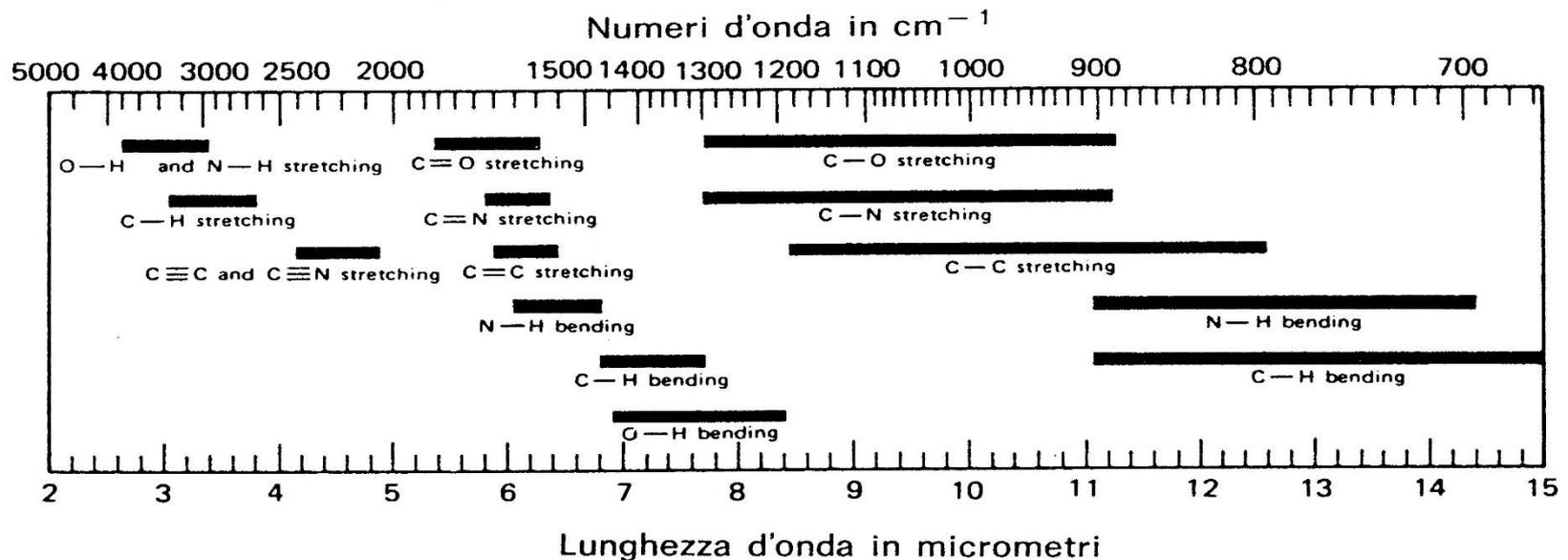


FIGURA 15.8

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. È 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 impurezze grossolane
- 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

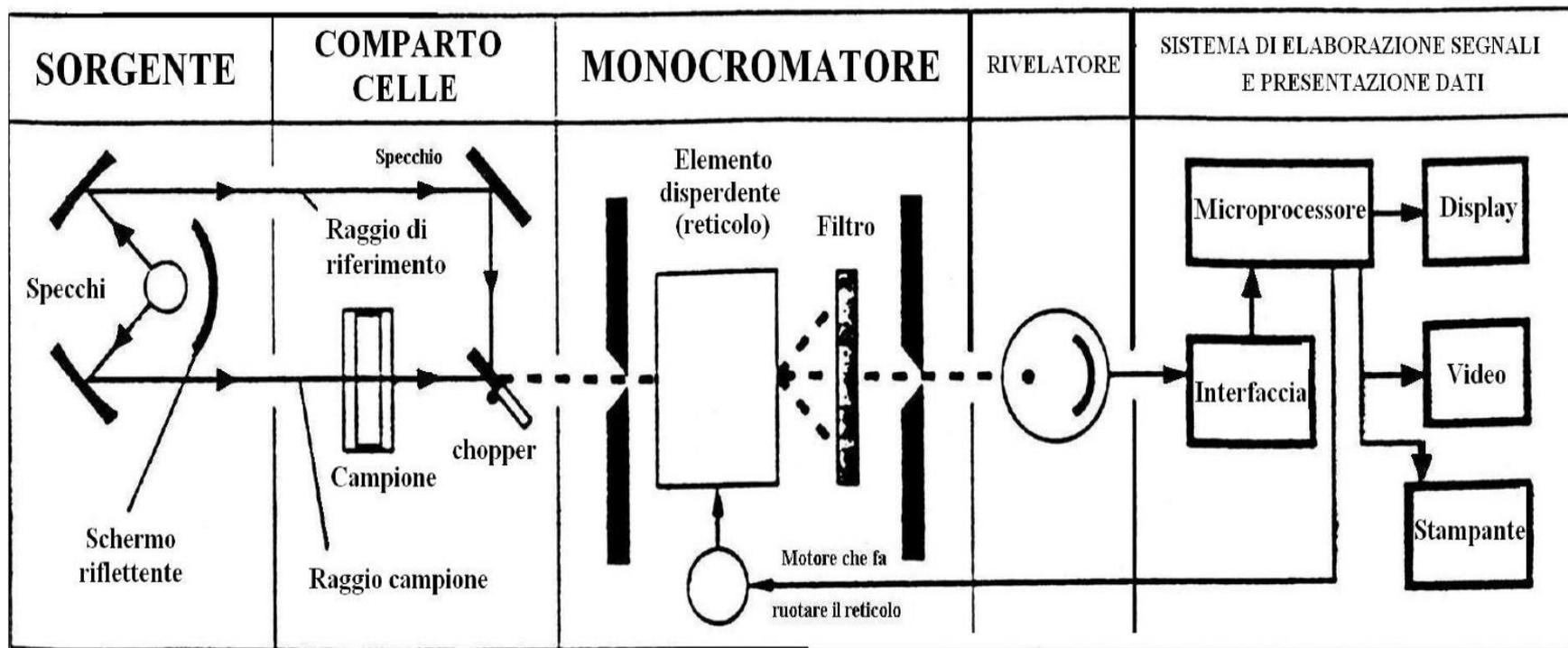
I dispositivi strumentali oggi a nostra disposizione per ottenere spettri nel medio e lontano IR (lo studio e le applicazioni del vicino infrarosso sono relativamente recenti) sono sostanzialmente di due tipi:

- 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 cm^{-1}** , corrispondente al *medio IR*, ma sono anche molto diffusi quelli con intervallo spettrale esteso verso λ più elevate, fino a **400 e 200 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**

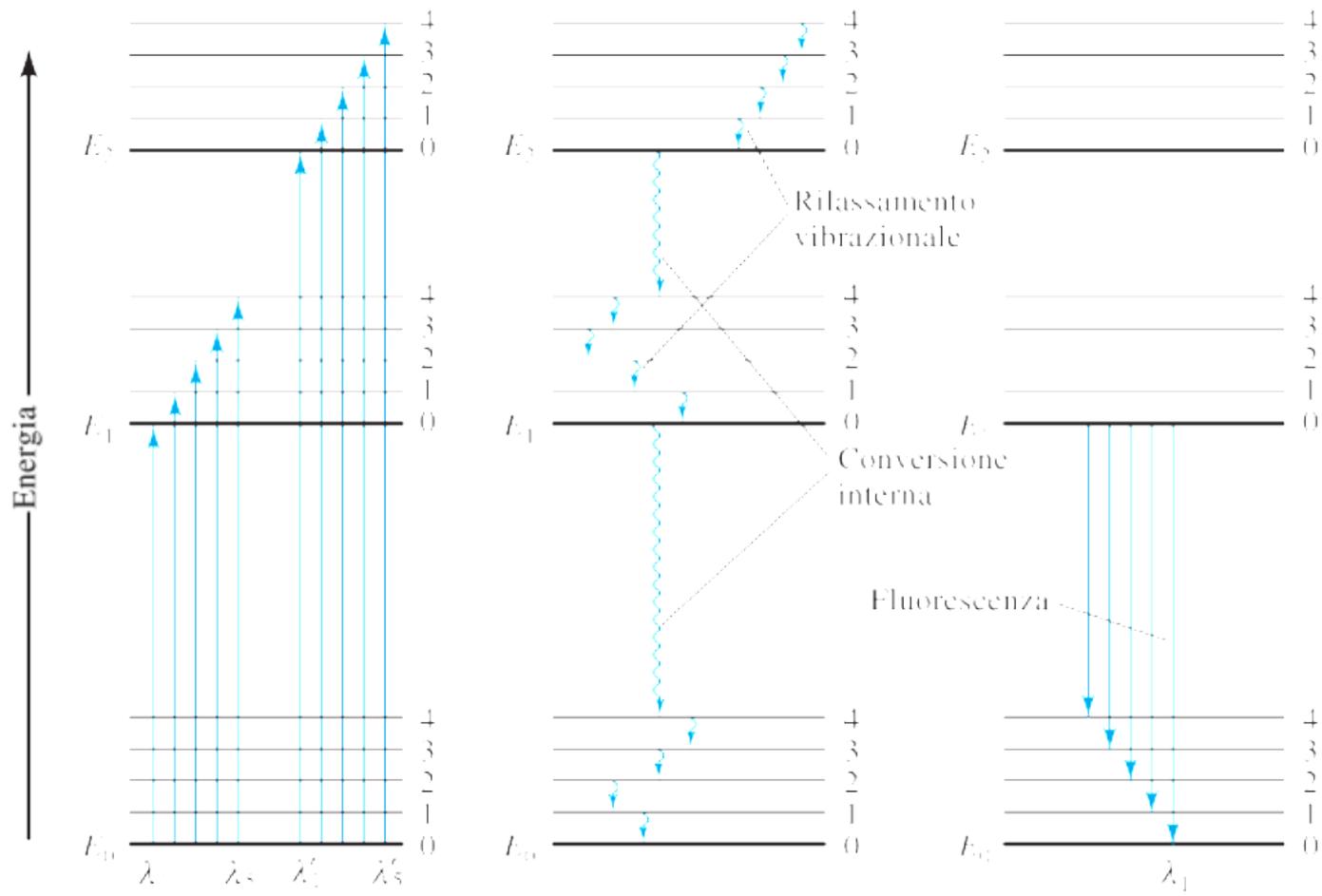
LUMINESCENZA

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:

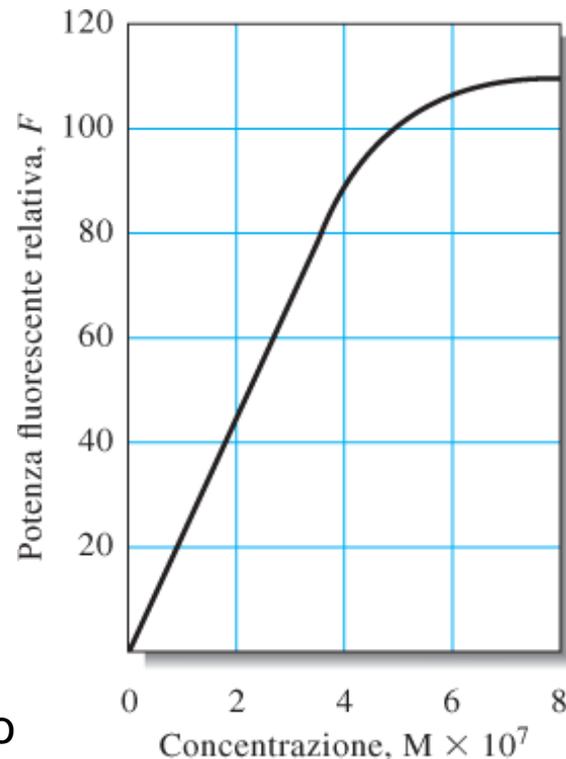
$$F = K'(P_0 - P)$$

Da cui si può scrivere:

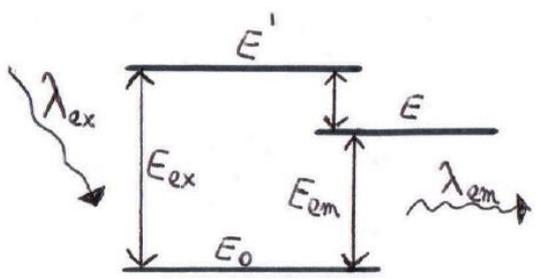
$$F = kc$$

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.

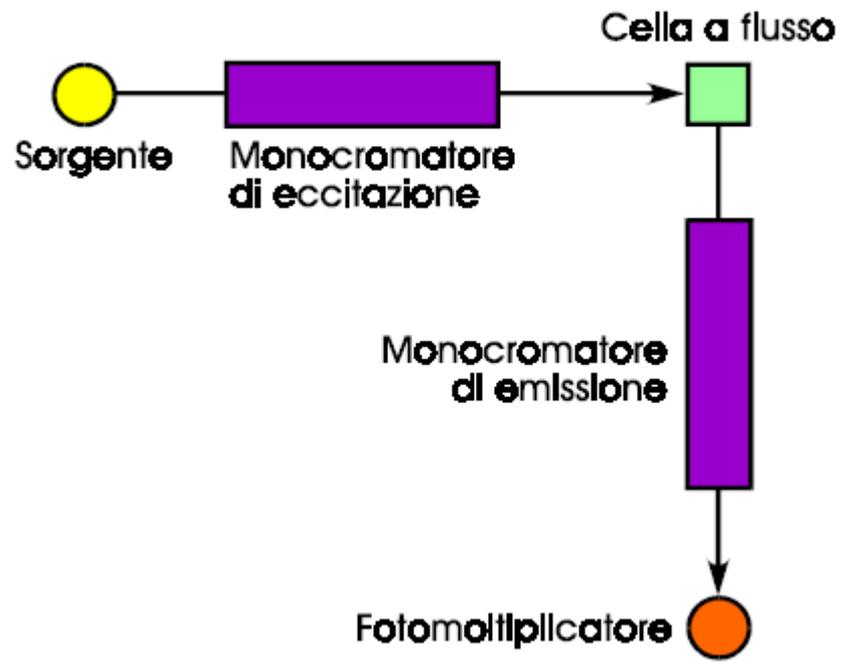
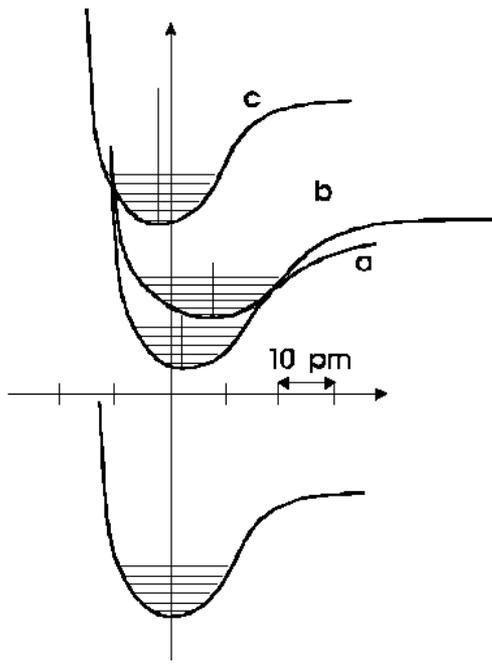
Se c molto alta, F inizia a diminuire per **assorbimento secondario** (assorbimento della radiazione emessa da altre molecole)



SPETTROSCOPIA DI EMISSIONE FLUORESCENZA



λ di emissione $>$ λ 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.

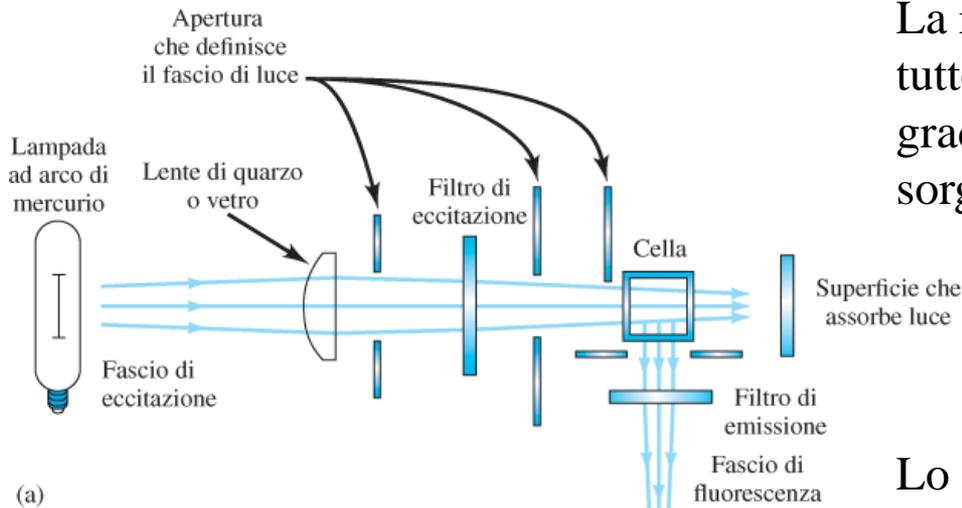
Le sorgenti tipiche della fluorescenza sono le lampade ad arco di mercurio, ad arco di xeno, ad arco di xenomercurio e i laser.

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

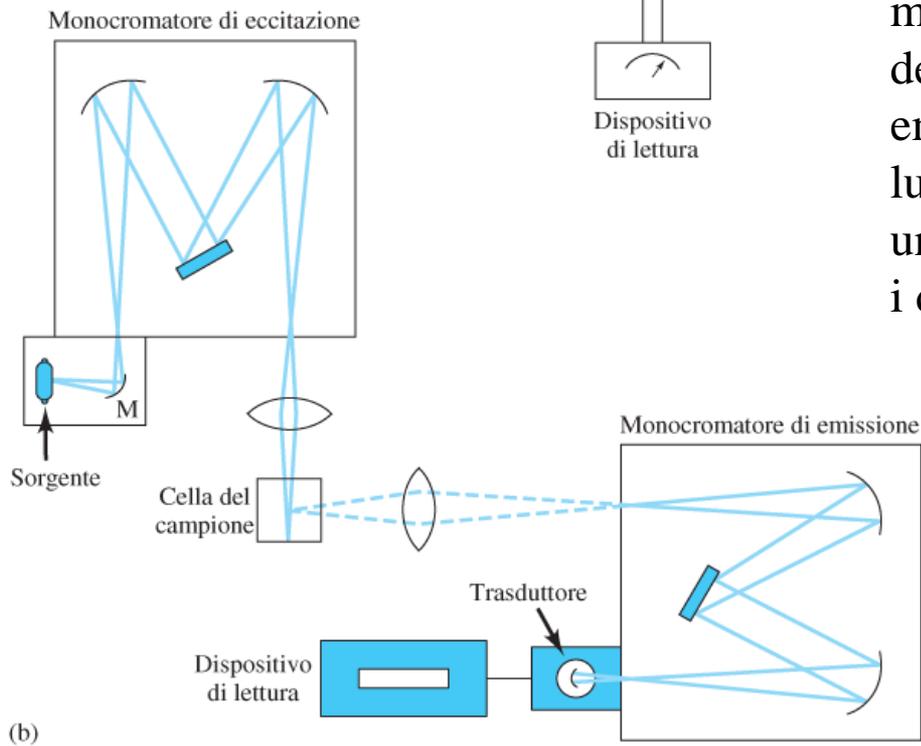
I fotomoltiplicatori vengono ampiamente utilizzati negli spettrofluorimetri ad elevata sensibilità ma i CCD ed i detector a serie di diodi sono diventati molto popolari negli ultimi anni.

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).



APPLICAZIONI FLUORIMETRIA

Il numero di applicazioni dei metodi fluorimetrici a problemi organici e biochimici è impressionante.

Tra i tipi di composti che possono essere determinati per fluorescenza vi sono gli amminoacidi, le proteine, i coenzimi, le vitamine, gli acidi nucleici, gli alcaloidi, le porfirine, gli steroidi, i flavonoidi e molti metaboliti.

Grazie alla sua sensibilità, la fluorescenza è ampiamente utilizzata come tecnica di rilevamento per i metodi di cromatografia liquida, per i metodi di analisi in flusso e per l'elettroforesi.

Diverse applicazioni della fluorimetria nell'analisi dei cibi, dei prodotti farmaceutici, dei campioni clinici e dei prodotti naturali. La sensibilità e la selettività del metodo ne fanno uno strumento particolarmente valido in questi settori.

POTENZIALI APPLICAZIONI

L'USO DI SONDE FLUORESCENTI IN NEUROBIOLOGIA: SONDARE IL CERVELLO ILLUMINATO

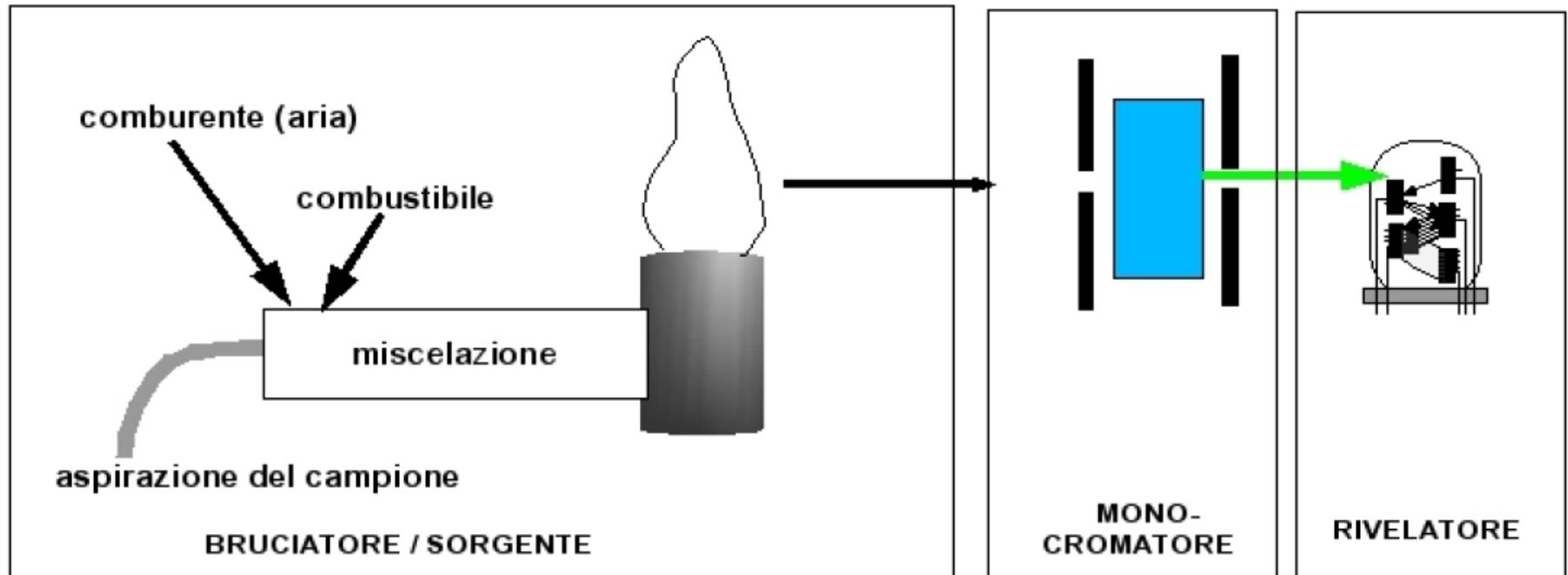
Gli indicatori fluorescenti sono ampiamente usati per indagare ciò che avviene nelle singole cellule.

Una sonda particolarmente interessante è quella chiamata sonda ionica, che varia il suo spettro di eccitazione o di emissione quando si lega a ioni specifici come Ca^{2+} o Na^+ . Questi indicatori possono essere usati per registrare ciò che accade nelle diverse parti dei singoli neuroni o per monitorare simultaneamente l'attività di un gruppo di neuroni.

In neurobiologia, per esempio, il colorante Fura-2 è stato usato per monitorare la concentrazione del calcio libero intracellulare dopo l'applicazione di alcuni stimoli farmacologici o elettrici. Seguendo nel tempo le variazioni di fluorescenza di siti specifici nel neurone, i ricercatori possono determinare quando e dove ha luogo un evento elettrico che coinvolge il calcio.

SPETTROSCOPIA DI EMISSIONE A FIAMMA

La spettroscopia ad emissione di fiamma si presta essenzialmente a determinazioni quantitative; ad esempio i più comuni strumenti sono dedicati all'analisi quantitativa dei metalli alcalini e alcalino terrosi (Li, Na, K, Ca, Mg) in soluzione.



SPETTROSCOPIA DI EMISSIONE A FIAMMA

L'analisi quantitativa si basa sul fatto che intensità della radiazione emessa e concentrazione sono direttamente proporzionali ($IE=K.C$).

Anche in questo caso si procede alla costruzione della curva di lavoro (o retta di taratura).

La fiamma (che non supera mai i 3000K) riesce ad eccitare facilmente gli atomi di Li, Na, K, Ca e Mg, i quali emettono poi le loro radiazioni caratteristiche nell'ambito del visibile.