

# Corso di Metodologie Bioanalitiche Ambientali con Lab Mod-A

Orari del corso:

Mcoledì 10:30-12:30

Giovedì 10:30-12:0

Docente

Prof Elena Chianese

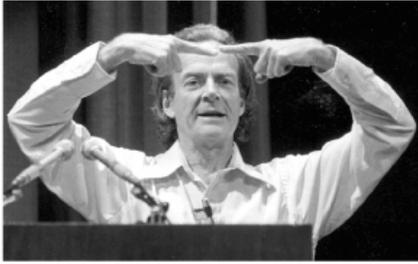
Le interazioni tra radiazione elettromagnetica e materia sono la base dei *metodi spettroscopici*.



Si basano sull'assorbimento oppure l'emissione di radiazione elettromagnetica da parte delle specie molecolari o atomiche di interesse.



Si distinguono sulla base della regione dello spettro elettromagnetico utilizzata: raggi  $\gamma$ , raggi X, ultravioletto, visibile, infrarosso, microonde e radio frequenze.



Per gent. conc. di Archives, California  
Institute of Technology

Richard P. Feynman (1918–1988) è stato uno dei più noti e celebri scienziati del XX secolo. Egli ricevette nel 1965 il Premio Nobel per la Fisica grazie al contributo fornito nello sviluppo dell'elettrodinamica quantistica. Oltre ai suoi numerosi e diversi contributi scientifici, egli fu un bravo insegnante e le sue conferenze e i suoi libri hanno avuto una grande influenza sull'insegnamento della fisica e sulle scienze in generale.



SKOOG e WEST  
Fondamenti di Chimica Analitica - III Ed.  
EdISES

La radiazione è una forma di energia trasmessa nello spazio ad elevata velocità. Per *luce* si intende generalmente la radiazione elettromagnetica nella regione UV-visibile, in alcuni casi si include parte dell'IR



Onda con proprietà quali: lunghezza d'onda, frequenza, velocità, ampiezza. La luce viaggia con velocità pari ad un milione di volte quella del suono.

Particelle, dette fotoni, corrispondenti a pacchetti discreti di energia.



L'energia di un fotone è direttamente proporzionale alla frequenza della radiazione!

Regione	Unità	Definizione
Raggi X	Angstrom, Å	$10^{-10}$ m
UV/visibile	Nanometro, nm	$10^{-9}$ m
IR	Micrometro, μm	$10^{-6}$ m

**Ampiezza:** quantità vettoriale che fornisce una misura della forza del campo elettrico o magnetico ad un massimo dell'onda.

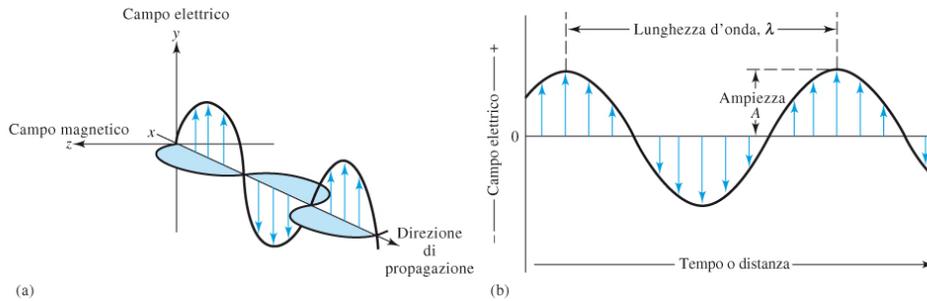
**Periodo (p):** tempo, in secondi, necessario ad un'onda, necessario a due massimi o minimi successivi per passate attraverso un punto dello spazio.

**Frequenza (ν):** numero di oscillazioni che si osservano in un secondo. Sussiste la relazione:  $\nu = 1/p$ . Dipende dalla sorgente emissiva.

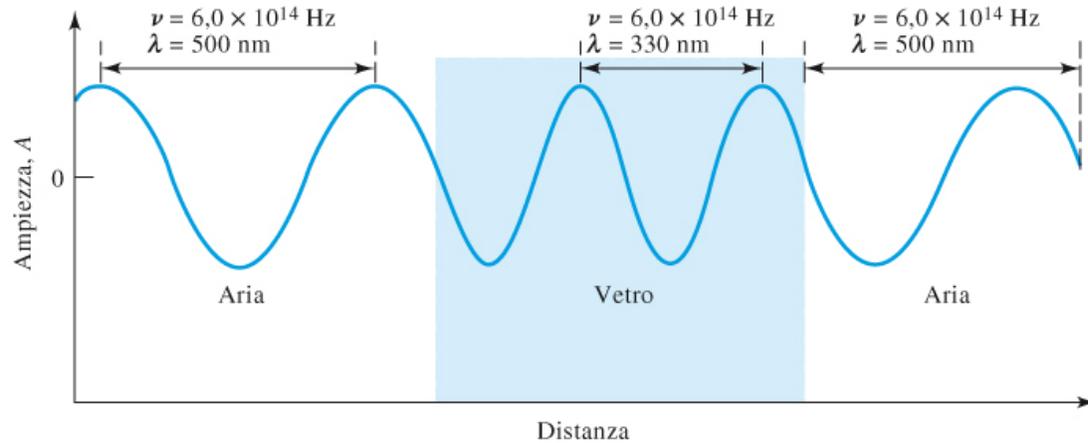
**Velocità dell'onda:** distanza percorsa dall'unità di tempo.

**Lunghezza dell'onda (λ):** distanza lineare tra due massimi o due minimi di un'onda.

$$v = \lambda \nu$$



**Figura 24-1** Natura dell'onda di un fascio di radiazione elettromagnetica a singola frequenza. In (a) viene mostrata l'onda polarizzata in un piano che si propaga lungo l'asse x. Il campo elettrico oscilla in un piano perpendicolare a quello del campo magnetico. Se la radiazione non fosse polarizzata, ci sarebbe una componente del campo elettrico in tutti i piani. In (b) sono mostrate solo le oscillazioni del campo elettrico. L'ampiezza dell'onda è la lunghezza del vettore campo elettrico al massimo dell'onda mentre la lunghezza d'onda è la distanza tra due massimi successivi.



**Figura 24-2** Variazioni nella lunghezza d'onda quando la radiazione passa dall'aria in un vetro denso e di nuovo nell'aria. Si noti come nel passaggio dall'aria al vetro si ha una riduzione della lunghezza d'onda di quasi 200 nm, più del 30%; quando la radiazione rientra nell'aria si ha il fenomeno inverso.

Lunghezza  
d'onda e  
velocità  
dell'onda  
dipendono dal  
mezzo di  
propagazione.

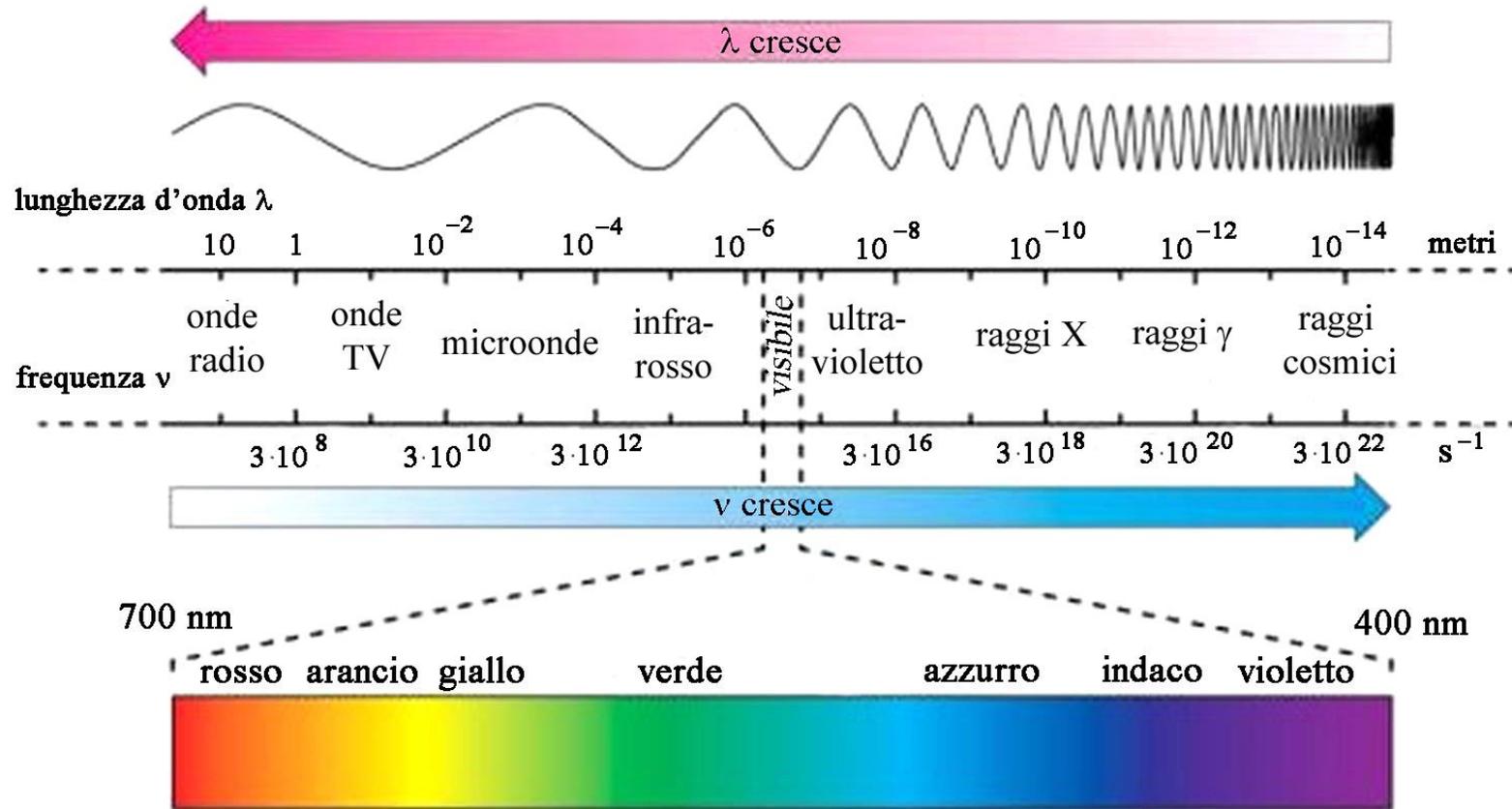


SKOOG e WEST  
Fondamenti di Chimica Analitica - III Ed.  
Edises

Considerando la luce come costituita da fotoni di energia, è possibile correlare tra loro la proprietà osservate, mediante la relazione:

$$E = h\nu = \frac{hc}{\lambda} = hc\bar{\nu}$$

Le interazioni tra luce e materia possono dare origine a fenomeni differenti quali: riflessione, scattering, interferenza etc ma le più interessanti ed in qualche modo specifiche delle sostanze sono quelle che comportano transizioni tra i diversi livelli di energia delle molecole o atomi.



Il tipo di interazione e di effetto dipendono dall'energia della radiazione usata.

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, $\text{cm}^{-1}$ $10^8$
	10 m	100 cm	1 cm	100 $\mu\text{m}$	1000 nm	10 nm	Lunghezza d'onda 100 pm
	$3 \times 10^6$	$3 \times 10^8$	$3 \times 10^{10}$	$3 \times 10^{12}$	$3 \times 10^{14}$	$3 \times 10^{16}$	Frequenza, Hz $3 \times 10^{18}$
	$10^{-3}$	$10^{-1}$	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 $\gamma$

**Figura 24-3** Le regioni dello spettro elettromagnetico. L'interazione tra l'analita e una radiazione elettromagnetica può dare origine ai tipi di cambiamenti mostrati. Si noti che le variazioni della distribuzione elettronica si hanno nella regione UV/visibile. Il numero d'onda, la lunghezza d'onda, la frequenza e l'energia sono caratteristiche che descrivono la radiazione elettromagnetica. (Da C. N. Banwell, *Fundamentals of Molecular Spectroscopy*, 3rd ed., New York; McGraw-Hill, 1983, p. 7.)

Sollecitazione



Stato fondamentale

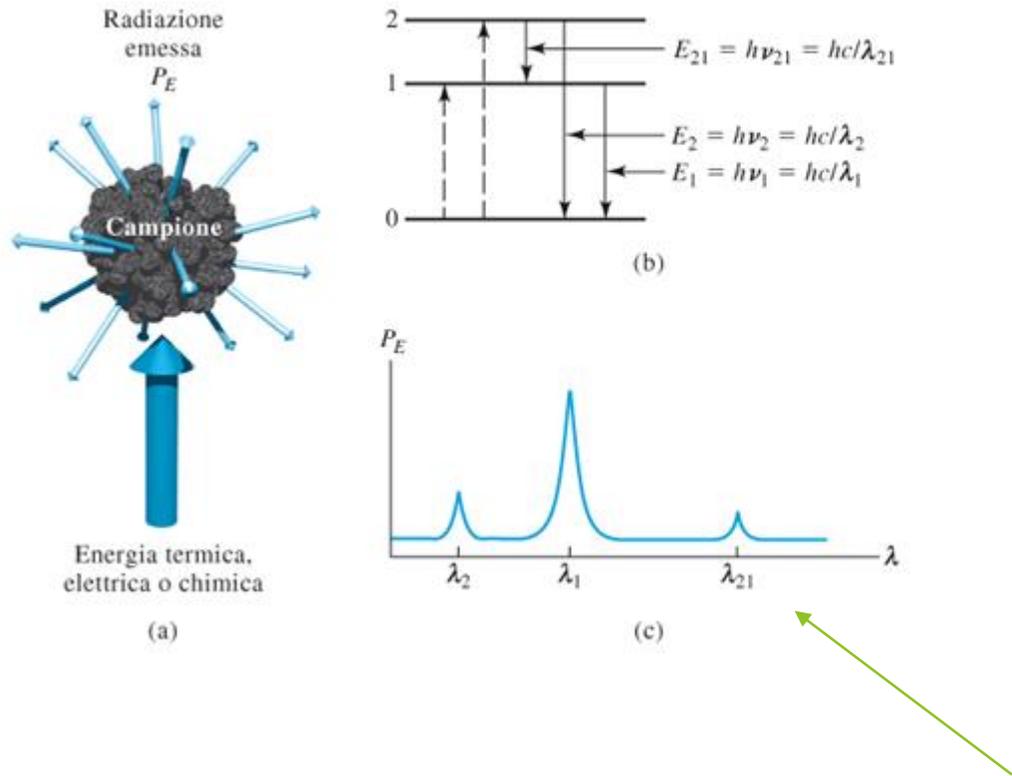


Stato eccitato



L'energia coinvolta in questa fase fornisce informazioni sull'analita

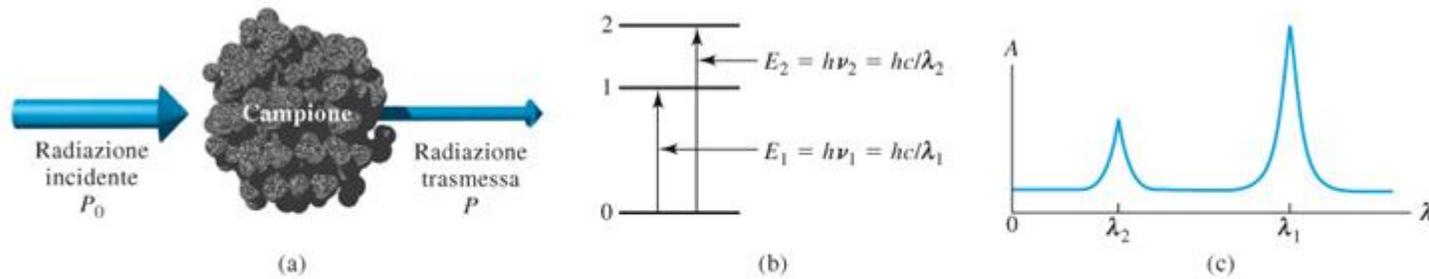
# Spettroscopia di emissione



**Figura 24-4** Processi di emissione o chemiluminescenza. In (a) il campione viene eccitato mediante energia termica, elettrica o chimica. Questi processi non coinvolgono energia radiante e quindi vengono chiamati processi non radiativi. Nel diagramma dei livelli di energia (b), le linee tratteggiate con le frecce rivolte verso l'alto rappresentano questi processi di eccitazione non radiativi, mentre le linee piene con le frecce rivolte verso il basso indicano che l'analita perde la sua energia emettendo un fotone. In (c) è mostrato lo spettro risultante dalla misura della potenza radiante emessa  $P_E$  in funzione della lunghezza d'onda,  $\lambda$ .

Lo spettro riporta la lunghezza d'onda del segnale emesso, che specifica della sostanza che determina il processo, e la sua ampiezza che è proporzionale alla quantità di analita, abbiamo dunque un'informazione qualitativa e quantitativa.

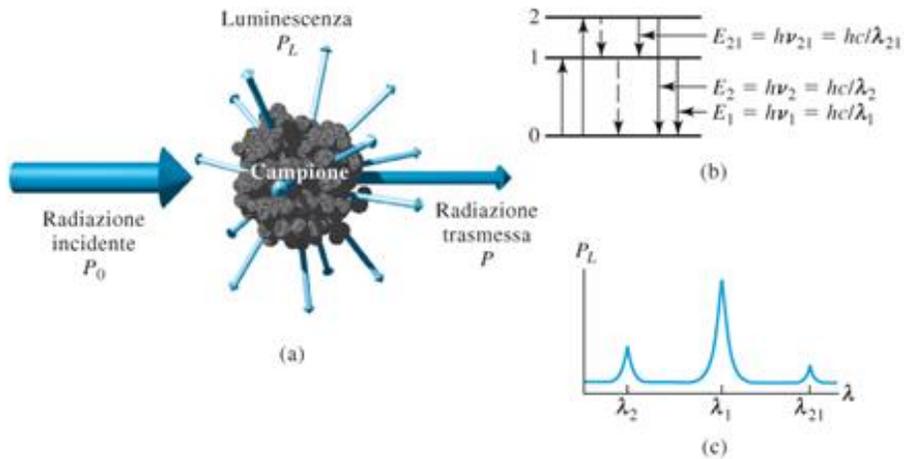
## Spettroscopia di assorbimento



**Figura 24-5** Metodi 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).

Esponendo un campione ad una radiazione, la radiazione stessa può essere diffusa o riflessa; una parte della radiazione però può essere assorbita in modo da eccitare alcune specie. Anche in questo caso l'informazione è sia qualitativa che quantitativa, ma lo spettro che registriamo riporta le lunghezze d'onda e le intensità relative al fenomeno di assorbimento della radiazione.

# Spettroscopia di fotoluminescenza



**Figura 24-6** Metodi di fotoluminescenza (fluorescenza e fosforescenza). La fluorescenza e la fosforescenza hanno origine dall'assorbimento della radiazione elettromagnetica e quindi dalla dissipazione dell'energia mediante emissione della radiazione (a). In (b), l'assorbimento può causare l'eccitazione dell'analita allo stato 1 o 2. Una volta eccitato, l'analita può perdere il suo eccesso di energia mediante emissione di un fotone (luminescenza, mostrata dalla linea a tratto pieno) o mediante processi non radiativi (linee tratteggiate). L'emissione avviene in tutti gli angoli e la lunghezza d'onda emessa (c) corrisponde alle differenze di energia tra i livelli. La principale differenza tra la fluorescenza e la fosforescenza risiede nel tempo dell'emissione, nel caso della fluorescenza inizia subito mentre nella fosforescenza è ritardata.

In questo caso viene misurata l'emissione di fotoni a seguito dell'irraggiamento con radiazione elettromagnetica.

Fluorescenza

Fosforescenza

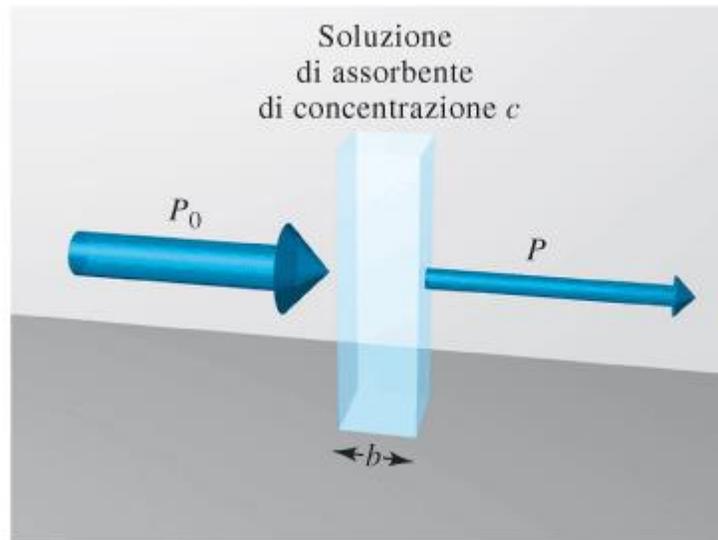
Emissione immediata

Emissione ritardata

## L'assorbimento della radiazione elettromagnetica

La legge che regola l'assorbimento è la legge di Lambert-Beer:

*Ci dice in maniera quantitativa come la quantità di radiazione attenuata dipenda dalla concentrazione della specie che assorbe.*

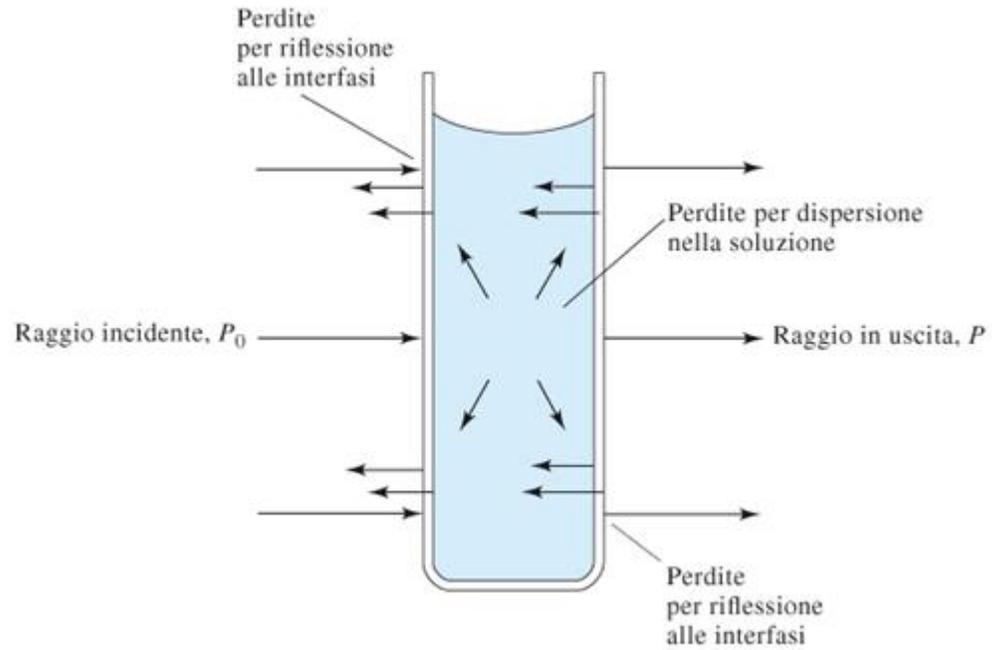


$$T = \frac{P}{P_0}$$
$$A = \log \frac{P_0}{P}$$

Trasmittanza

Assorbanza

$$A = -\log T = -\log \frac{P}{P_0} = \log \frac{P_0}{P}$$



$$A = \log \frac{P_0}{P} \approx \log \frac{P_{\text{solvente}}}{P_{\text{soluzione}}}$$

Facciamo ricorso all'idea di Bianco di solvente! Misuriamo un'assorbanza sperimentale.

La legge di Lambert- Beer si enuncia come segue:

$$A = \log(P_0/P) = abc$$

Concentrazione della  
specie assorbente

Assorbività o coefficiente di  
estinzione, le sue dimensioni  
dipendono da come  
esprimiamo c e b.

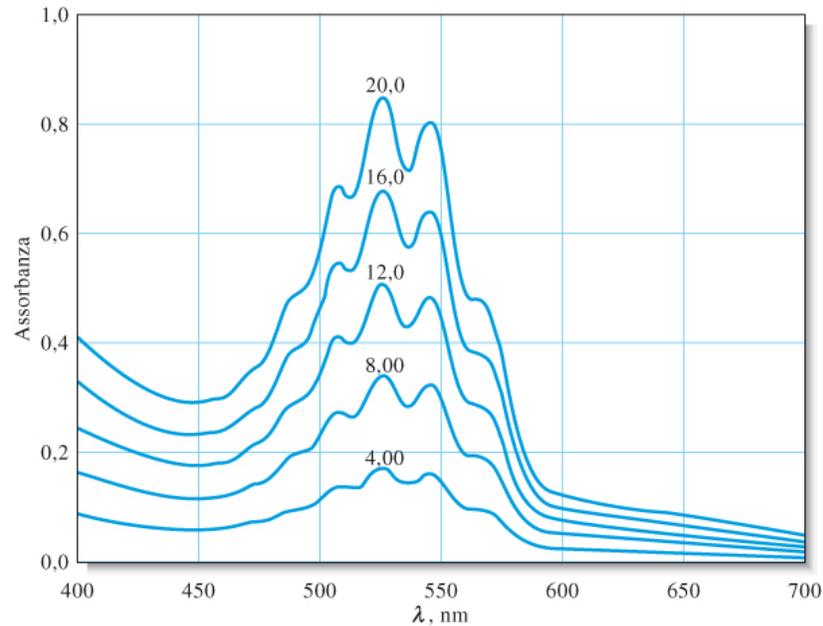
Cammino ottico

Se espressi come mol/L e  
cm, allora parliamo di  
assorbività o coeff. di  
estinzione molare.

$$A = \epsilon bc$$

Possiamo usare questa legge facendo tutte le considerazioni  
esposte in merito alle curve di calibrazione.

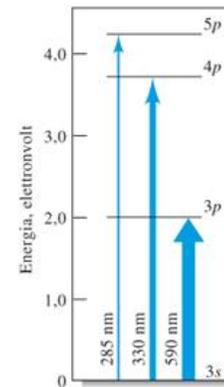
# Spettro di assorbimento



**Figura 24-10** Tipici spettri di assorbimento del permanganato di potassio a cinque diverse concentrazioni. I numeri adiacenti alle curve indicano la concentrazione del manganese in ppm. La specie assorbente è lo ione permanganato,  $\text{MnO}_4^-$ ; il cammino ottico della cella  $b$  è 1,00 cm. Il grafico dell'assorbanza alla lunghezza d'onda del picco a 525 nm in funzione della concentrazione del permanganato è lineare e quindi la specie assorbente obbedisce alla legge di Beer.

## Lo spettro visibile

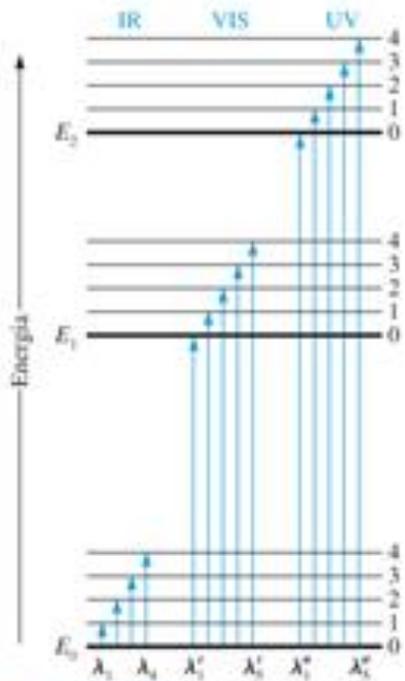
Regione della lunghezza d'onda assorbita, nm	Colore della luce assorbita	Colore complementare trasmesso
400–435	Violetto	Giallo-verde
435–480	Blu	Giallo
480–490	Blu-verde	Arancio
490–500	Verde-blu	Rosso
500–560	Verde	Porpora
560–580	Giallo-verde	Violetto
580–595	Giallo	Blu
595–650	Arancio	Blu-verde
650–750	Rosso	Verde-blu



**Figura 24-11** Diagramma parziale dei livelli energetici per il sodio, che evidenzia le transizioni risultanti dall'assorbimento a 590, 330 e 285 nm.

## Assorbimento atomico

Letture a specifiche lunghezze d'onda, piuttosto che lo spettro



**Figura 2.4-12** Diagramma dei livelli energetici di alcuni dei cambiamenti di energia che hanno luogo durante l'assorbimento della radiazione infrarossa (IR), visibile (VIS) e ultravioletta (UV) da parte di una specie molecolare. Si noti come, in alcune molecole, una transizione da  $E_0$  a  $E_1$  può richiedere una radiazione UV anziché una visibile. In altre molecole, la transizione da  $E_0$  a  $E_2$  può avvenire con una radiazione visibile anziché UV. Vengono mostrati solo alcuni livelli vibrazionali (0-4). I livelli rotazionali associati a ciascun livello vibrazionale non sono mostrati, poiché sono troppo ravvicinati.

## Assorbimento molecolare

Transizioni elettroniche



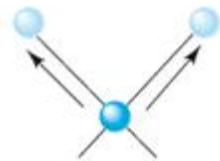
Transizioni vibrazionali



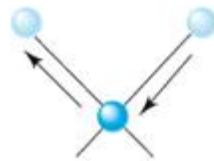
Transizioni rotazionali

$$E = E \text{ elettronica} + E \text{ vibrazionale} + E \text{ rotazionale}$$

## Transizioni vibrazionali.

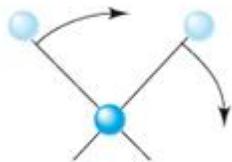


Simmetrico

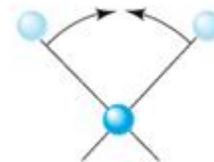


Asimmetrico

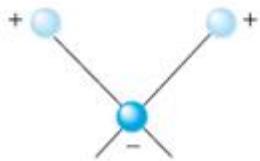
(a) Vibrazioni di stiramento



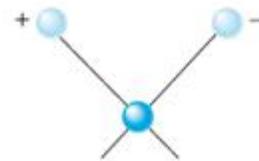
“Rocking” nel piano



“Scissoring” nel piano



“Wagging” fuori dal piano

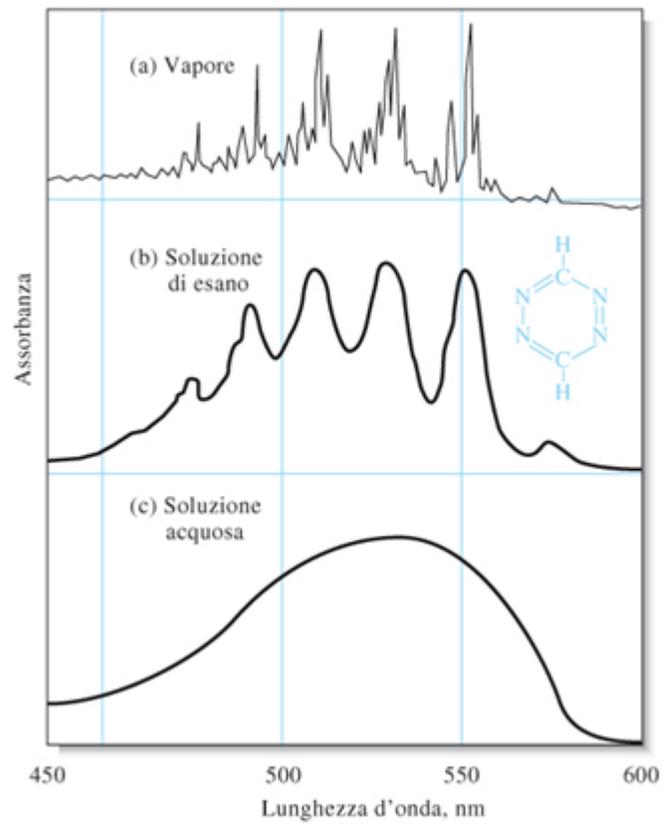


“Twisting” fuori dal piano

(b) Vibrazioni di piegamento

Le energie associate ai moti vibrazionali non variano con continuità ma assumono valori discreti detti livelli energetici vibrazionali.

Le molecole hanno un loro centro di gravità; le rotazioni rispetto a questo centro di gravità determina le *energie rotazionali*.



Il sistema condiziona la risposta della molecola.  
Spettro della 1,2,4,5- tetrazina

## *Limitazioni alla legge di Lambert-Beer*

Deviazioni reali → Rappresentano limitazioni reali alla legge

Deviazioni strumentali → Legate al metodo strumentale usato per la lettura dell'assorbanza

Deviazioni chimiche → Risultano da cambiamenti chimici associati a cambiamenti di concentrazione

## Limitazioni reali

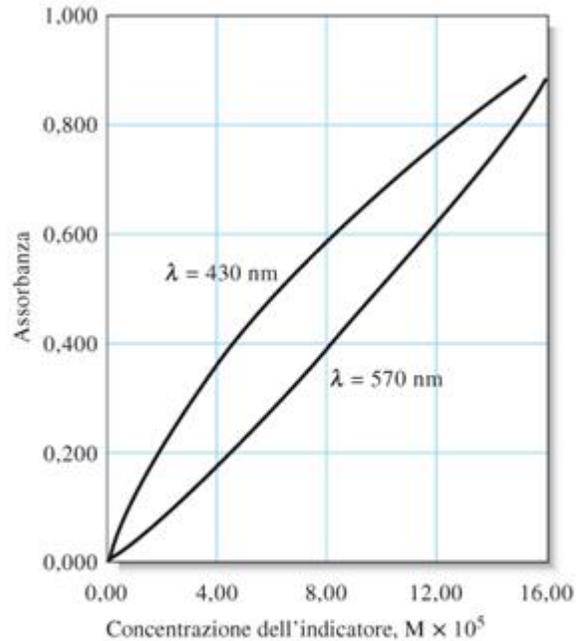
Le legge di Lambert Beer è valida solo per soluzioni diluite, è dunque una legge *limite*. Oltre 0,01M la numerosità delle molecole è tale per cui molte sono le interazioni tra le molecole stesse.

Quando ciò accade, le molecole si influenzano reciprocamente, alterando le energie coinvolte nelle diverse transizioni, determinando uno scostamento dalla linearità.

Ciò accade anche quando l'analita che vogliamo determinare è presente a bassa concentrazione ma è in una soluzione con altri analiti concentrati, soprattutto se specie elettrolitiche; in questo caso gli ioni sono molto vicini tra di loro e l'assorbività molare dell'analita ne risulta modificata.

## Deviazioni chimiche

Si osservano deviazioni dalla legge di L. B. quando l'analita si dissocia, si associa o reagisce con il solvente, dando prodotti con diverso assorbimento della radiazione.



**Figura 24-15** Deviazioni chimiche dalla legge di Beer per soluzioni non tamponate dell'indicatore HIn. I valori di assorbanza sono stati calcolati a diverse concentrazioni dell'indicatore, come mostrato nell'Esempio 24-5. Si noti che ci sono deviazioni positive a 430 nm e negative a 570 nm. A 430 nm, l'assorbanza è principalmente dovuta alla forma ionizzata  $\text{In}^-$  dell'indicatore ed infatti è proporzionale alla frazione ionizzata. La frazione ionizzata varia in maniera non lineare con la concentrazione totale. A bassi valori della concentrazione totale ( $[\text{HIn}] + [\text{In}^-]$ ), la frazione ionizzata è più alta di quella che si ha per elevati valori per cui si ha un errore positivo. A 570 nm, l'assorbanza è dovuta principalmente all'acido indissociato HIn. Tale frazione aumenta in maniera non lineare con la concentrazione totale dando origine, come mostrato, ad una crescente deviazione negativa.

## Deviazioni strumentali: radiazione policromatica

La validità della legge di LB è legata all'uso di una radiazione strettamente monocromatica.

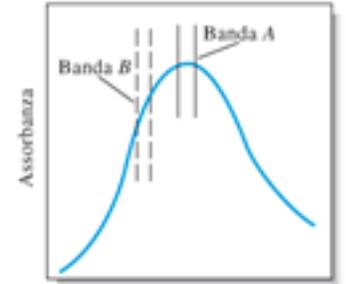
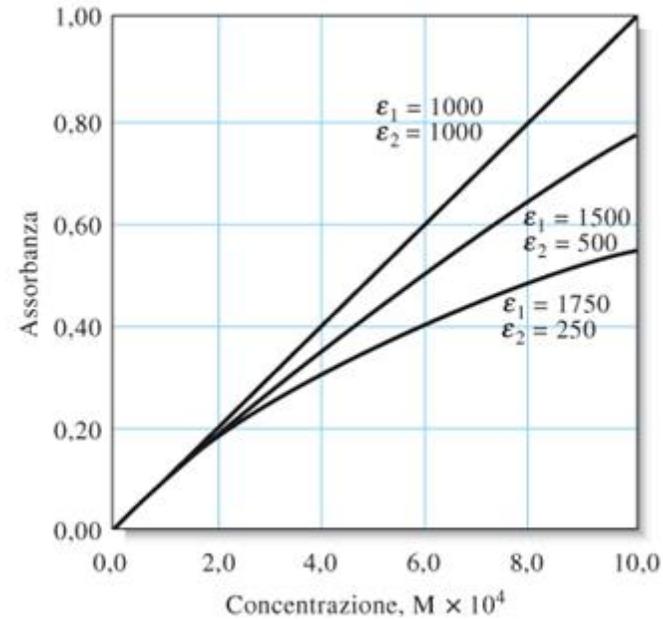
$\lambda'$

$A', P_0', P', \varepsilon'$

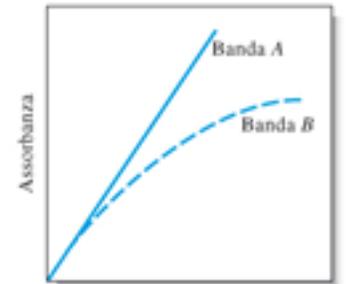
$\lambda''$

$A'', P_0'', P'', \varepsilon''$

$$\begin{aligned} A_m &= \log(P_0' + P_0'') - \log[(P_0' + P_0'')(10^{-\varepsilon'bc})] \\ &= \log(P_0' + P_0'') - \log(P_0' + P_0'') - \log(10^{-\varepsilon'bc}) \\ &= \varepsilon'bc = \varepsilon''bc \end{aligned}$$



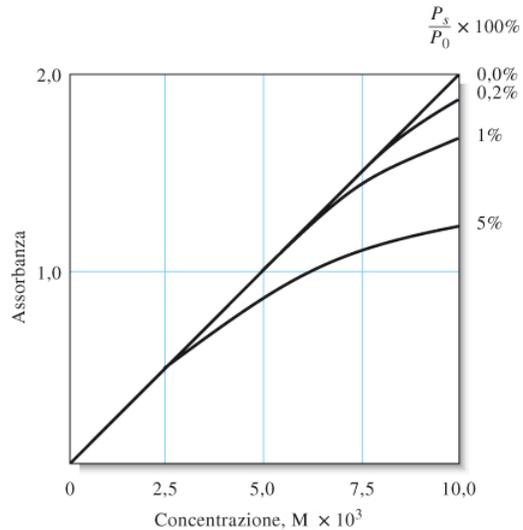
Lunghezza d'onda



Concentrazione

**Figura 24-17** L'effetto della radiazione policromatica sulla legge di Beer. Nello spettro di assorbimento in alto, la Banda A mostra una piccola deviazione poiché l'assorbività dell'analita non cambia molto all'interno della banda A. Si noti come usando la Banda A si abbia un grafico lineare della legge di Beer, riportato in basso. La Banda B dello spettro coincide con una regione nella quale l'assorbività dell'analita subisce delle variazioni. Si noti la marcata deviazione dalla legge di Beer osservabile nel grafico in basso.

## Deviazioni strumentali: radiazione spuria



SKOOG e WEST  
Fondamenti di Chimica Analitica - III Ed.  
EdiSES  
EdiSES

**Figura 24-18** Deviazione dalla legge di Beer causata da diversi livelli di luce spuria. Si noti come ad alti livelli della luce spuria lo scostamento dalla legge di Beer inizi a concentrazioni più basse. La luce spuria limita sempre il massimo di assorbimento ottenibile poiché quando l'assorbanza è alta, la potenza radiante trasmessa dal campione può essere confrontabile o addirittura più bassa della radiazione spuria.

$$A' = \log \frac{(P_0 + P_s)}{(P + P_s)}$$

## Deviazioni strumentali: Disuguaglianza tra le cellette

Se le cellette contenenti la soluzione dell'analita e la soluzione del bianco non sono uguali per cammino e caratteristiche, nella curva di calibrazione sarà presente un'intercetta e la relazione sarà del tipo:

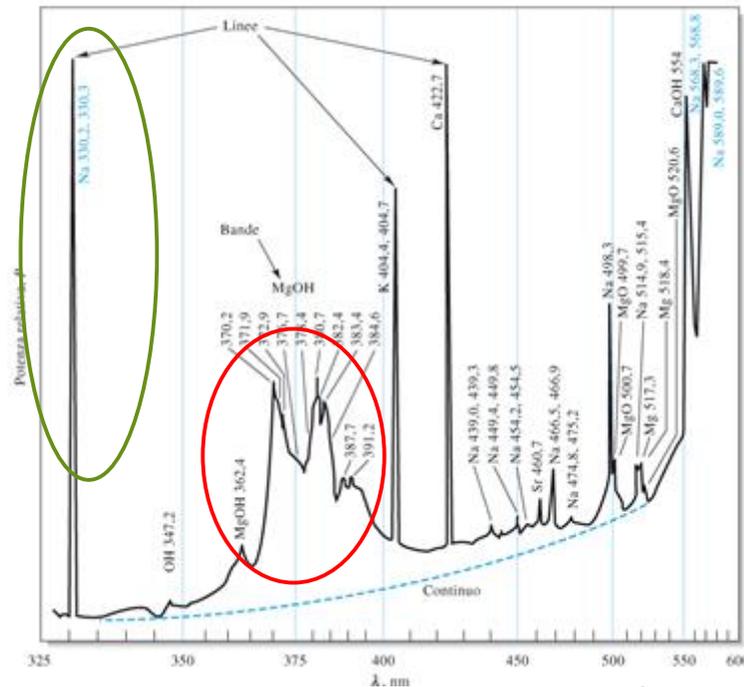
$$A = \epsilon bc + k$$

## L'emissione di radiazione elettromagnetica

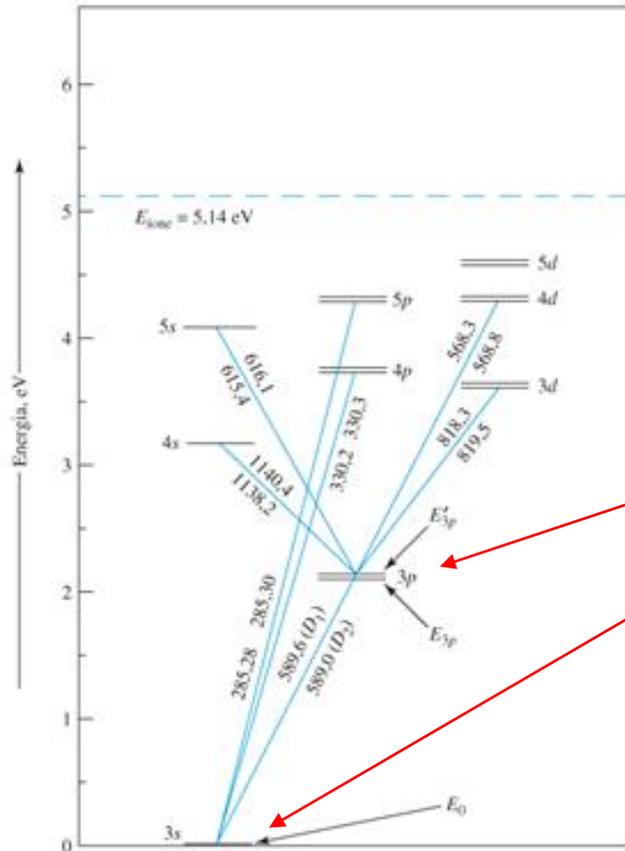
Gli atomi, gli ioni e le molecole possono essere portati a livelli energetici superiori mediante processi vari, quali bombardamento con elettroni, esposizione al plasma ad alte temperature, fiamma, etc

La vita media di una specie che ha assorbito energia in questo modo è di  $10^{-9}$ - $10^{-6}$  secondi circa; ciò vuol dire che dopo questo tempo avviene il rilassamento ed il ritorno allo stato energetico fondamentale, con rilascio di energia in forma di calore, radiazione elettromagnetica o entrambi.

L'emissione prodotta da una sorgente è caratterizzata mediante uno «spettro», ossia l'insieme di segnali di intensità di radiazione in funzione della lunghezza d'onda



## Spettri a righe



Na

Gli spettri a righe si registrano quando le specie che emettono la radiazione sono particelle atomiche o ioni ben separati ed individuabili.

Le righe dello spettro sono dovute alla emissione della radiazione associata al ritorno allo stato fondamentale, la cui lunghezza d'onda è data dalla relazione:

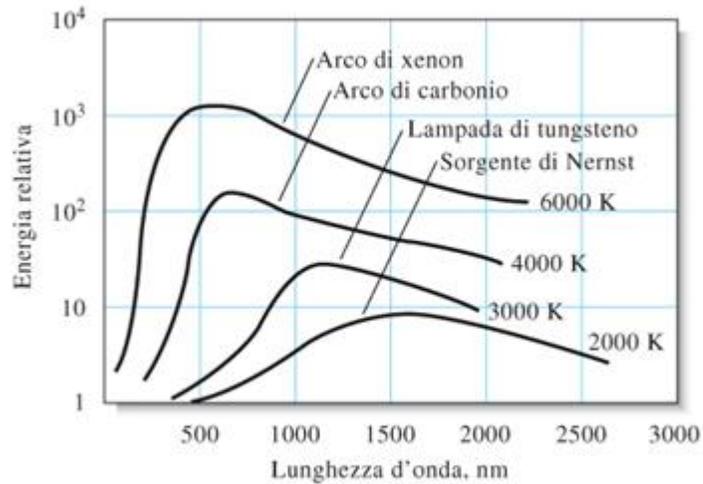
$$\lambda_1 = \frac{hc}{(E_{3p} - E_0)} = 589,6 \text{ nm}$$

Si formano dei doppietti quando ci sono transizioni che generano segnali molto vicini tra loro.

Sia per gli spettri a righe che per quelli a bande, la potenza della radiazione emessa dipende dal numero di eventi che ha luogo, dunque dalla concentrazione delle specie presenti.

$$P=kc$$

## Spettri continui

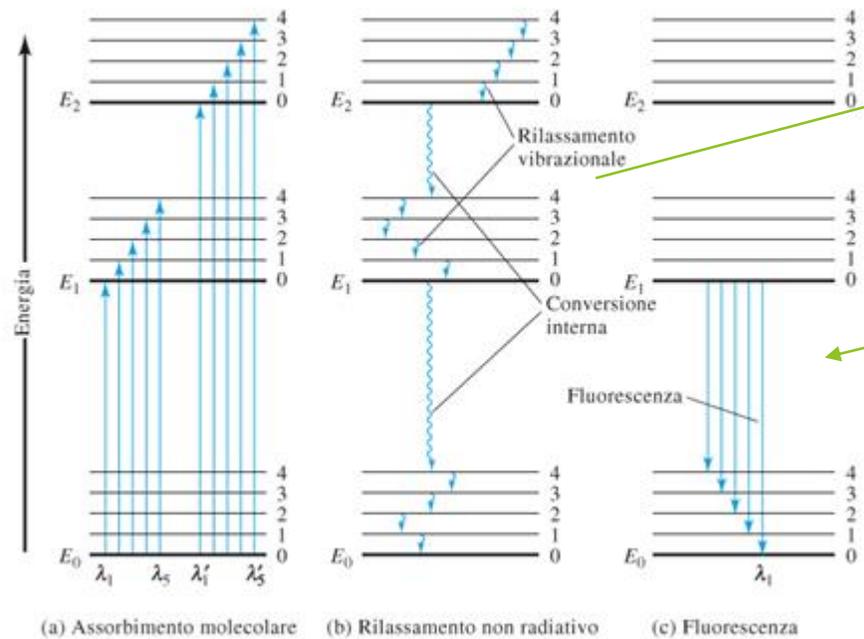


Uno spettro continuo si ottiene quando un corpo solido viene riscaldato ad alta temperatura. La lunghezza d'onda massimamente emessa dipende dalla temperatura raggiunta dall' oggetto.

## Emissioni in fluorescenza e fosforescenza

Fluorescenza molecolare: si osserva quando sono irradiate molecole e non atomi. Il rilassamento può avvenire mediante processi radiativi, e quindi parliamo di fluorescenza, e non radiativi.

Fluorescenza atomica: si osserva quando atomi gassosi vengono irradiati con una radiazione specifica, corrispondente ad un salto energetico da un livello fondamentale ad uno eccitato. Se nella riemissione viene emessa una radiazione di lunghezza d'onda uguale a quella incidente, si parla di fluorescenza di risonanza.



Nel rilassamento vibrazionale, le molecole cedono l'energia in eccesso mediante collisione con le molecole di solvente.

Affinchè il rilassamento sia un processo radiativo, è necessario che la molecola riesca a dare il fenomeno radiativo più velocemente di quello non radiativo.

La radiazione emessa ha minore energia e dunque maggiore lunghezza d'onda della radiazione incidente, si parla dunque di spostamento o shift di Stokes.