



Corso di **Chimica Generale** - CHI
083424 - CCS Ingegneria Chimica
A.A. 2015/2016 (I° Semestre)

 POLITECNICO DI MILANO



SPETTROSCOPIA UV-VISIBILE

Prof. Attilio Citterio
Dipartimento di CMIC "Giulio Natta"

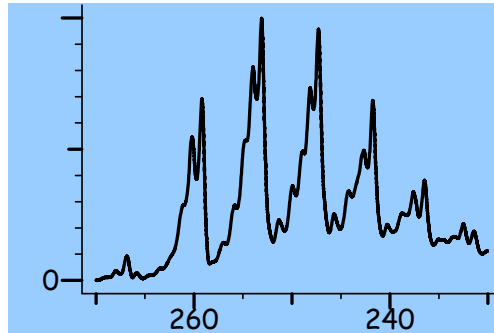


- A insieme di strumenti per misurare le proprietà molecolari.
- La spettroscopia è l'assorbimento o l'emissione di luce.
- L'analisi spettrochimica può essere definita come l'uso dello spettro della radiazione elettromagnetica in analisi qualitative e quantitative.
 - Quando una molecola assorbe luce, la sua energia aumenta
 - Quando una molecola emette luce, la sua energia diminuisce



Fotoni o Quanti di Luce

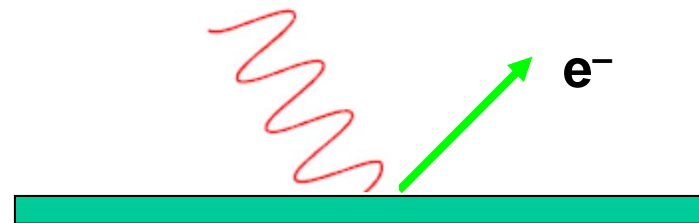
- Atomi e molecole assorbono solo alcune frequenze, ma non altre.



- Ci sono due ragioni per questa osservazione.
 - L'energia assorbita o emessa è proporzionale alla frequenza, ν .

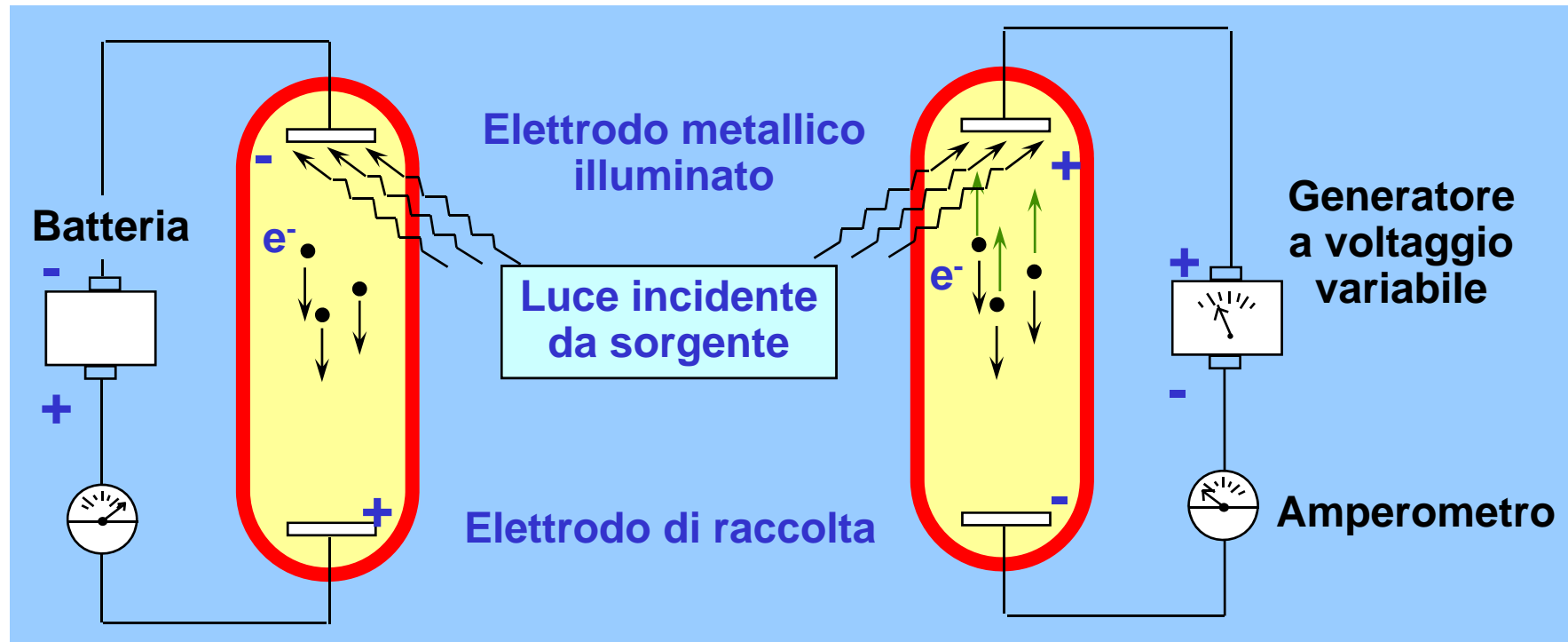
$$\text{Energia di un fotone} = h\nu$$

Costante di Plank





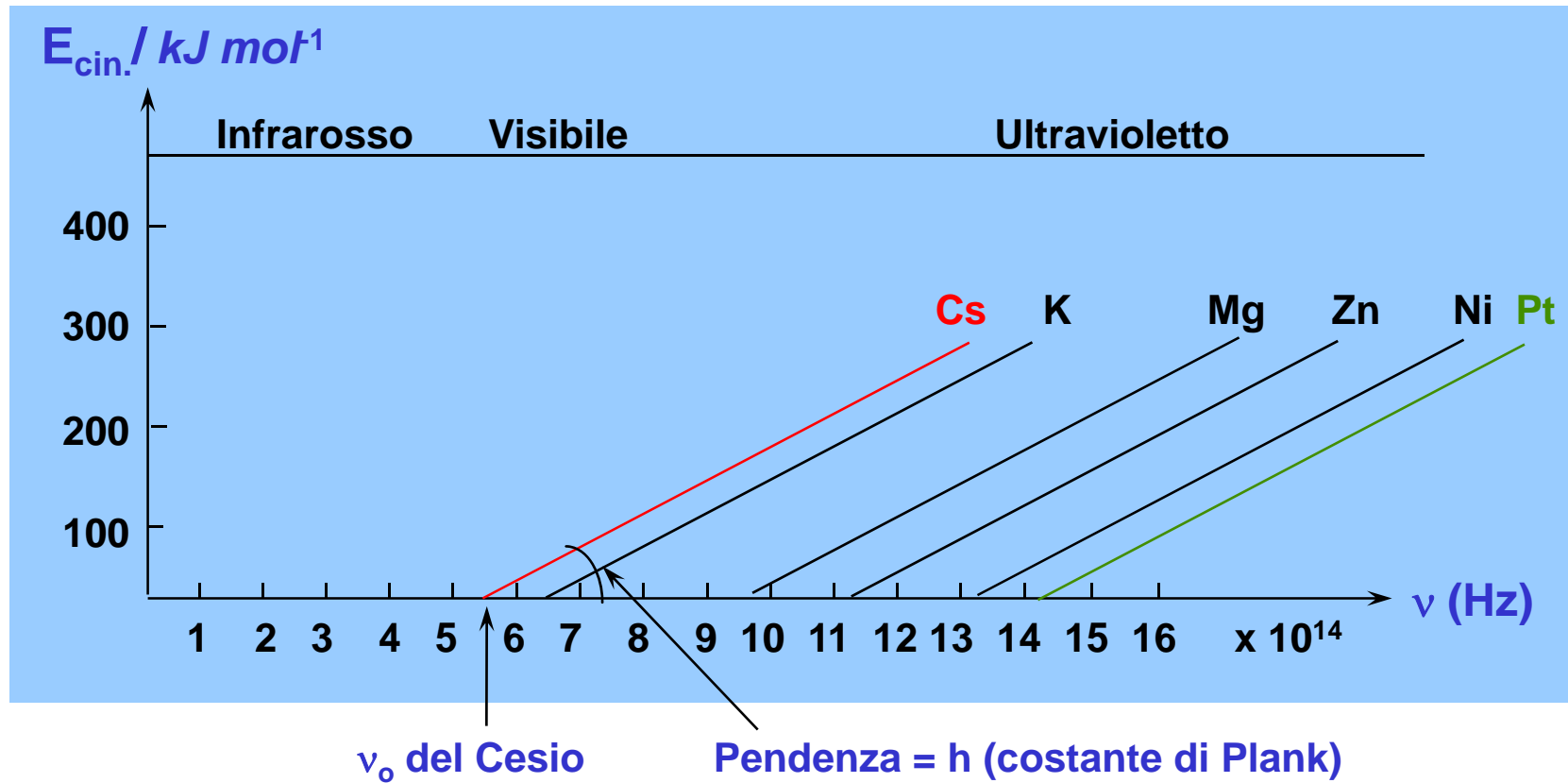
Effetto Fotoelettrico (emissione di elettroni da un metallo solido irraggiato)



Misura dell'energia cinetica degli elettroni emessi (fotoelettroni) = Voltaggio per cui la corrente è zero



Energia dei Fotoelettroni Emessi da Metalli



$$E_{cin.} = E_{fot.} - E_{emis.} = h \nu - \phi$$

$$\phi = h \nu_0$$

$$E_{cin.} = h (\nu - \nu_0)$$



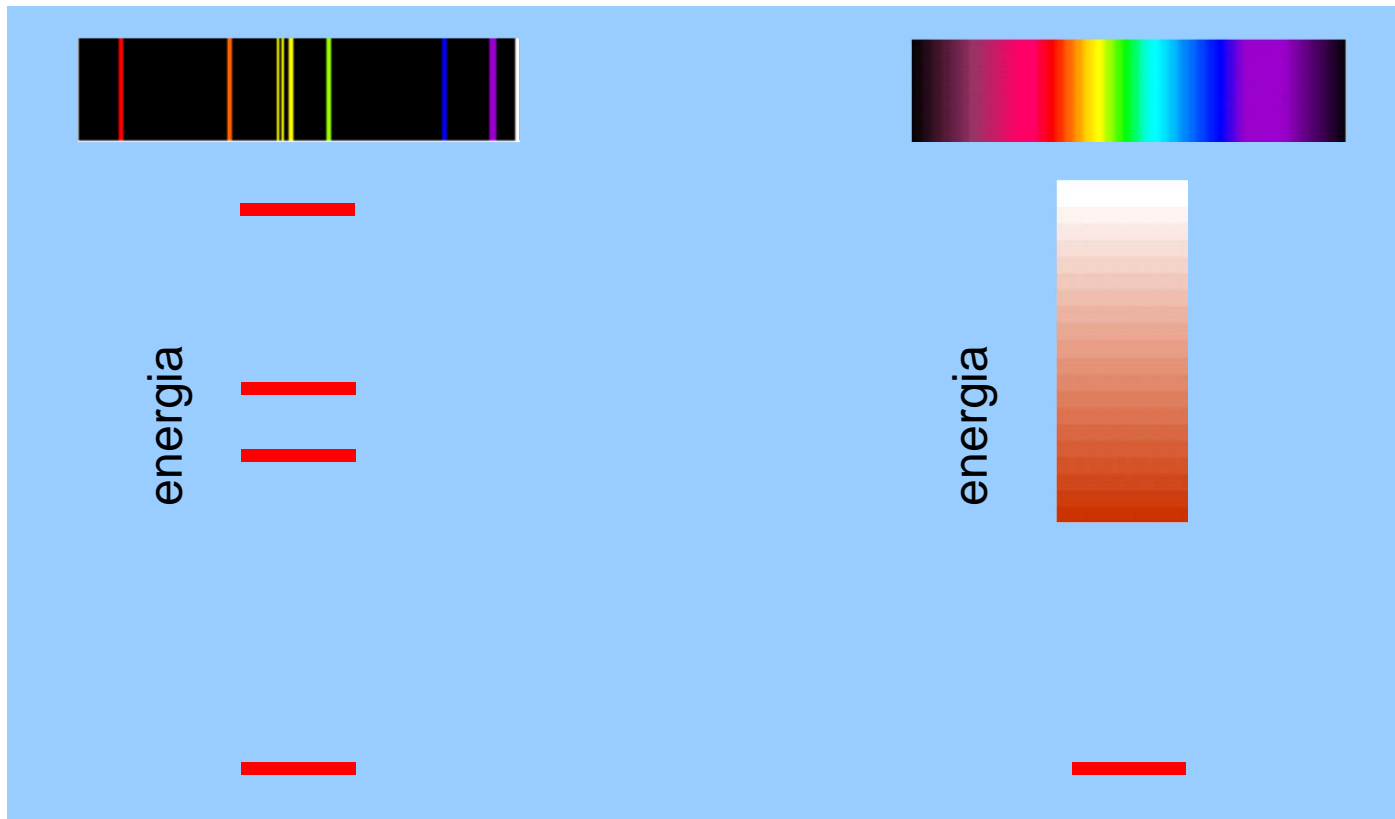
L'emissione fotoelettrica dimostra che l'energia dell'elettrone:

- **Aumenta se si aumenta ν**
- **Non è influenzata aumentando l'intensità**
- **L'intensità influenza il numero di elettroni emessi per secondo**



Le energie molecolari sono quantizzate

Se solo certe frequenze sono assorbite, solo certe energie sono permesse

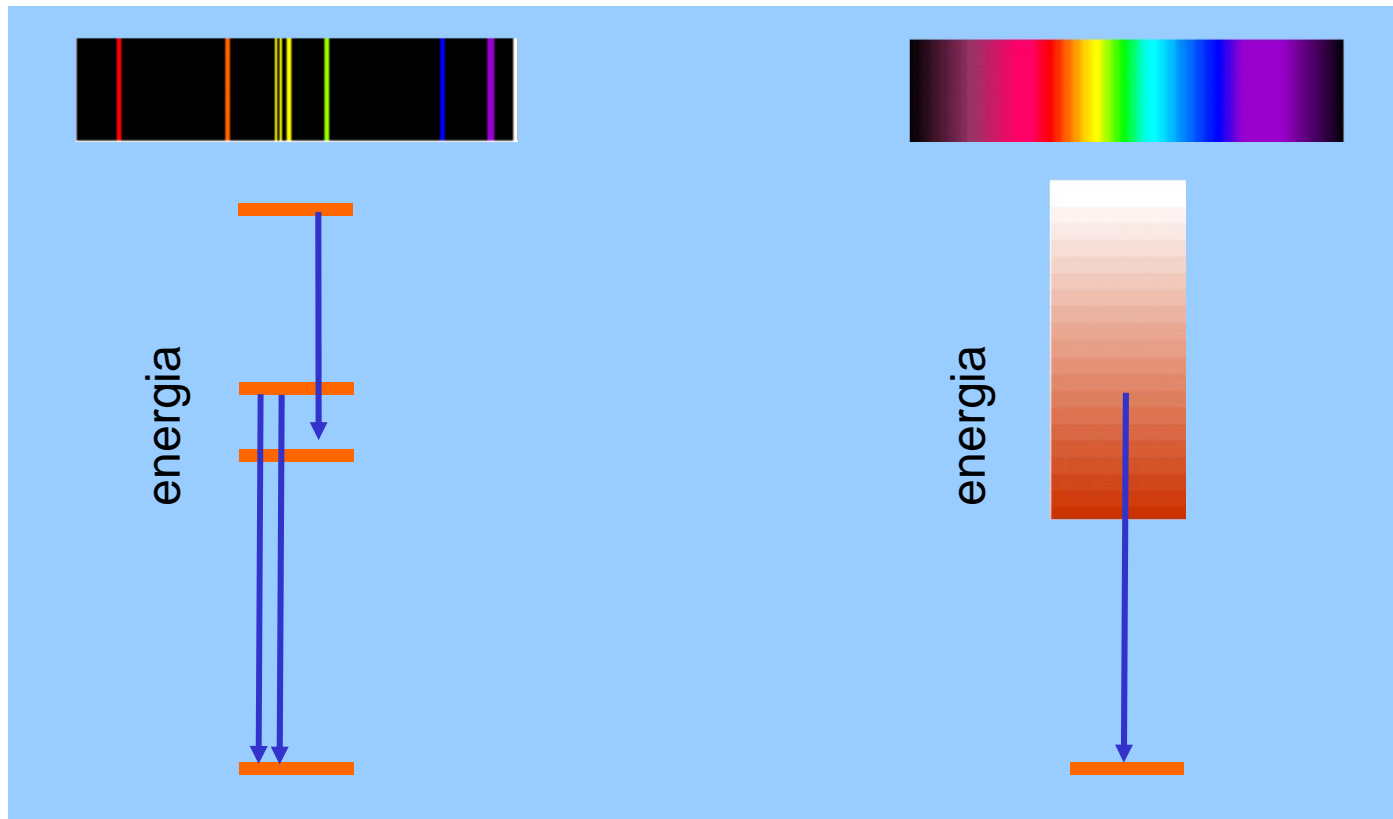




Quantizzazione dell'Energia Molecolare

Le energie molecolari sono quantizzate

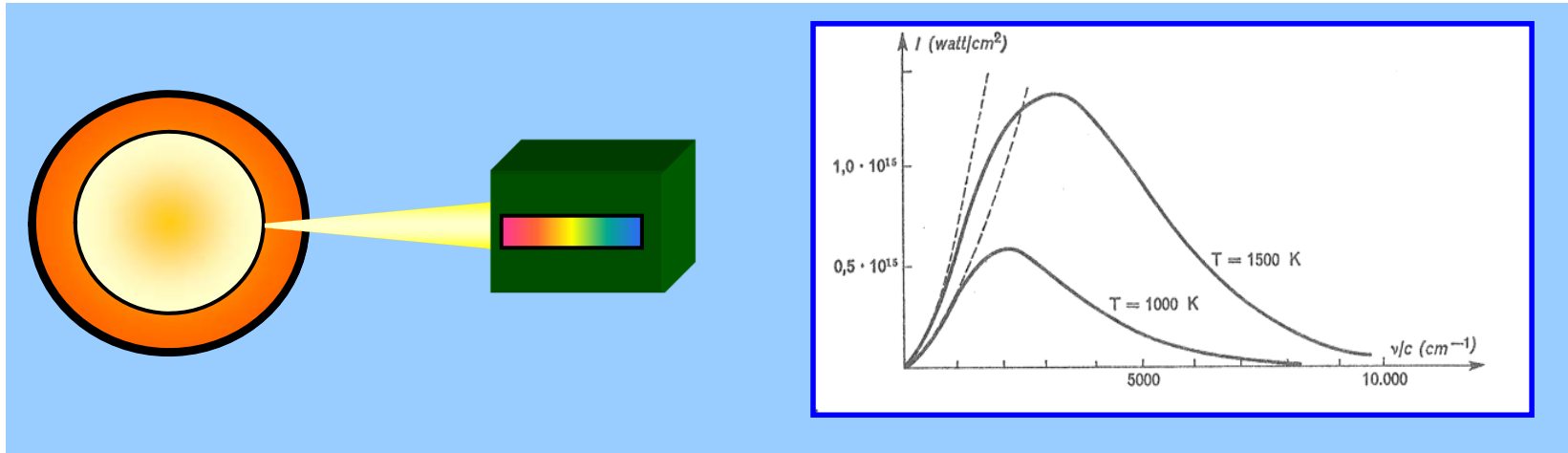
Se solo certe frequenze sono assorbite, solo certe energie sono permesse





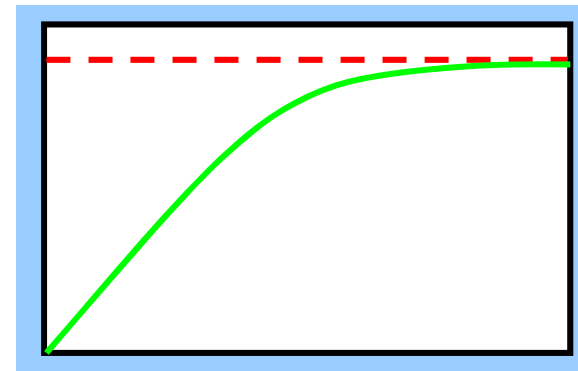
Altre Evidenze della Quantizzazione

- Assorbimento del corpo nero (Panck)



- Capacità termica dei solidi a bassa temperatura

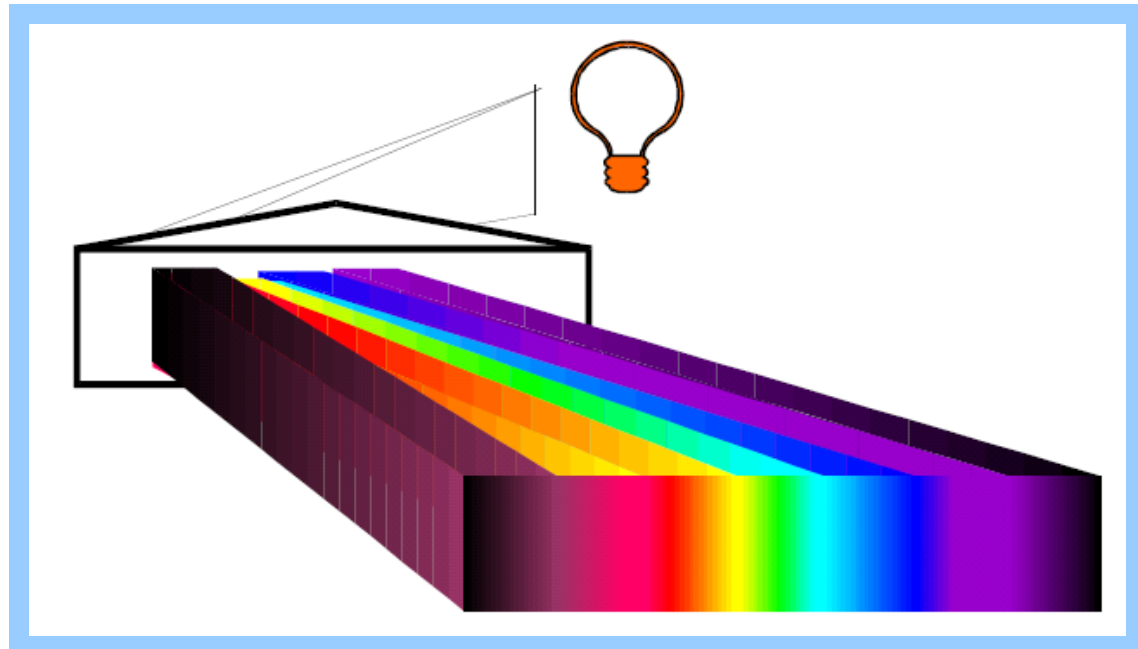
$$\text{quindi } \Delta E = h\nu$$





Spettrometri

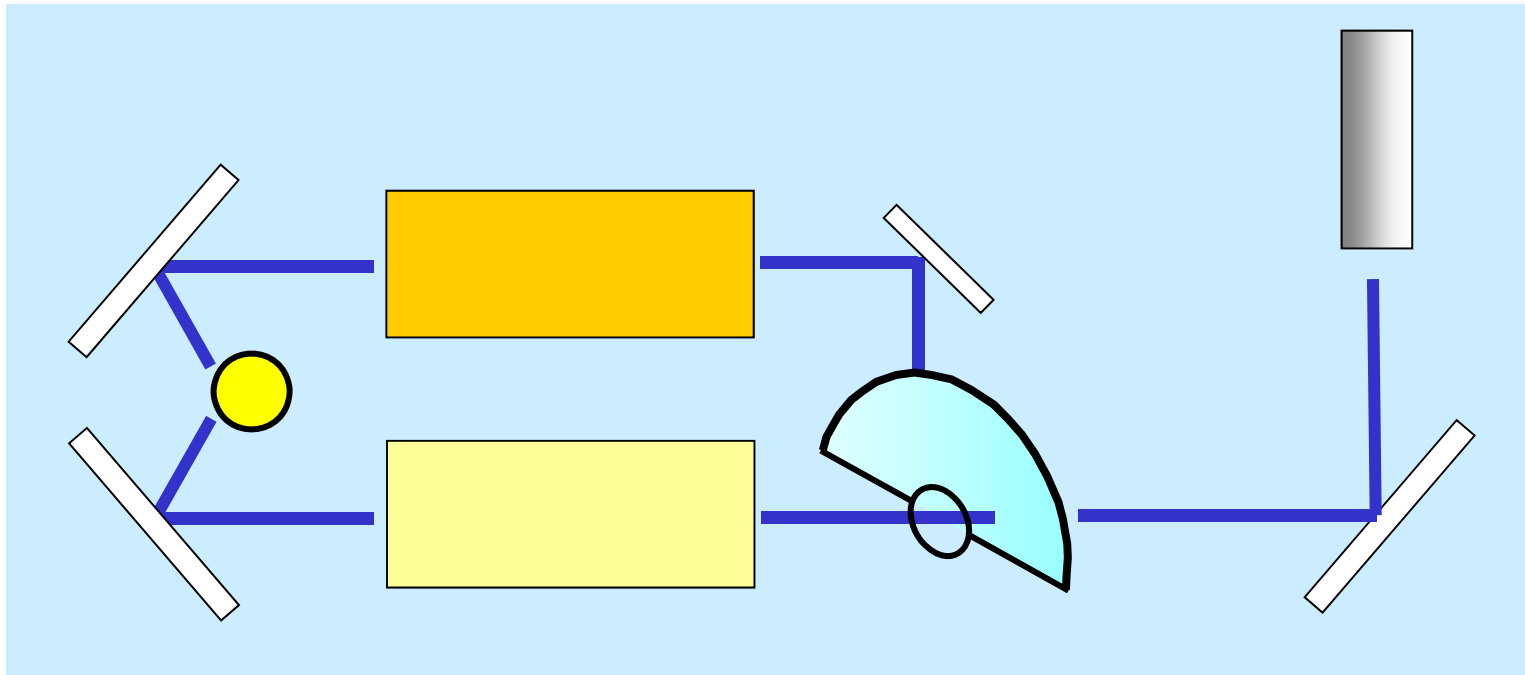
- sorgente
- monocromatore
(selettore di frequenza)
- campione
- rivelatore





Strumenti a Dispersione

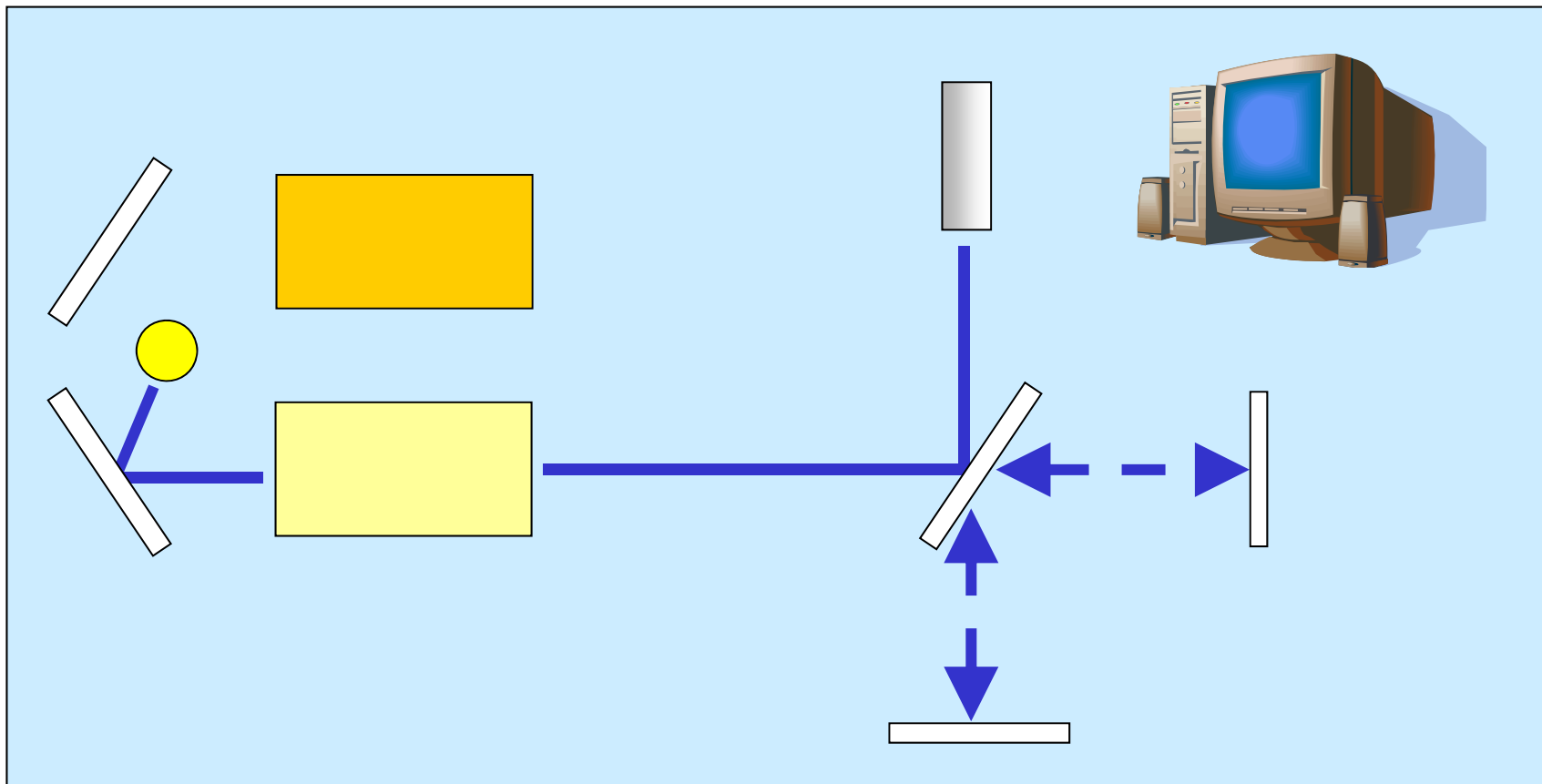
Usati negli spettrometri visibile/ultravioletto e nei vecchi tipi di strumenti infrarosso





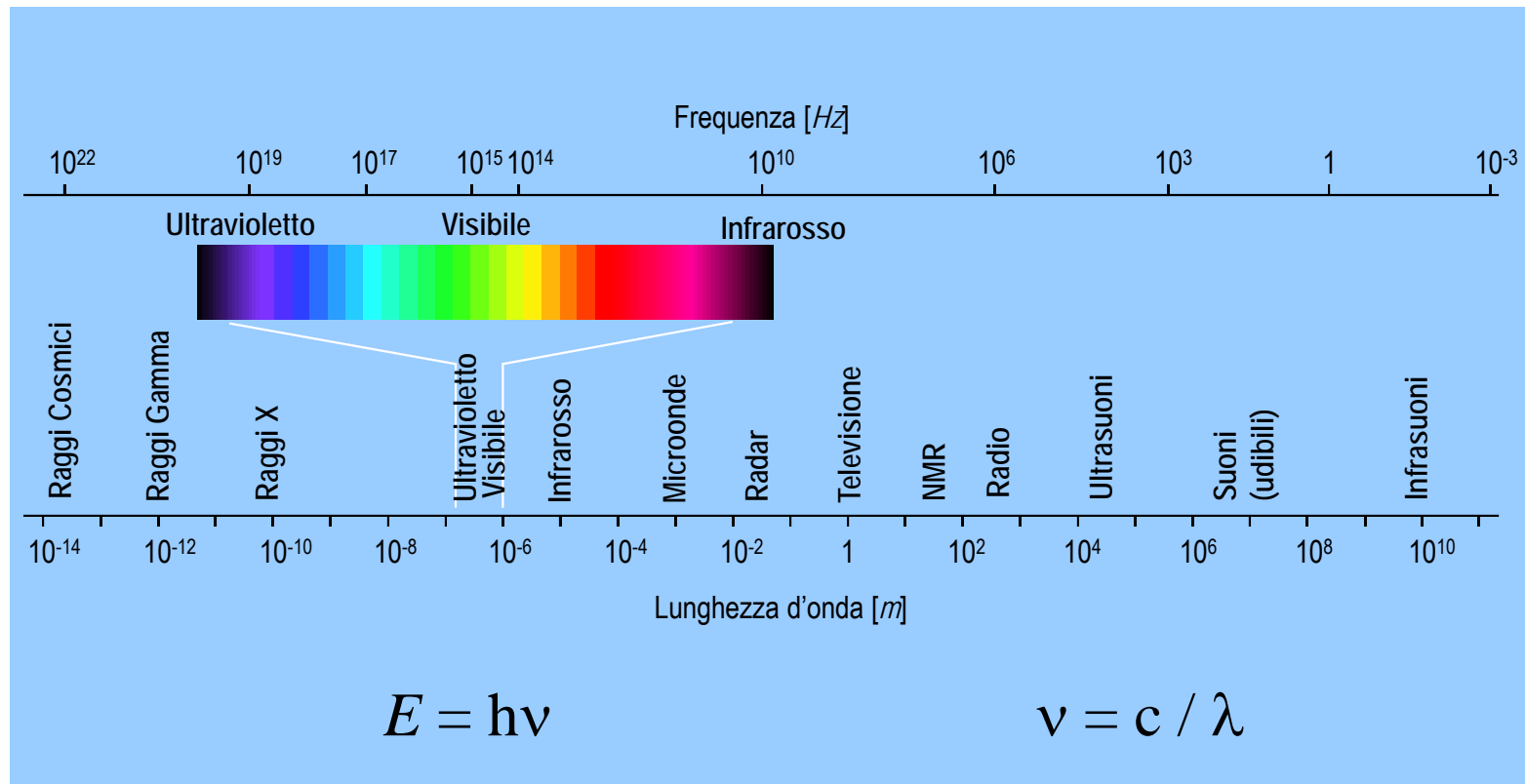
Strumenti a Trasformata di Fourier

Richiedono estesi calcoli per convertire il segnale in uno spettro. Usati nei moderni strumenti.



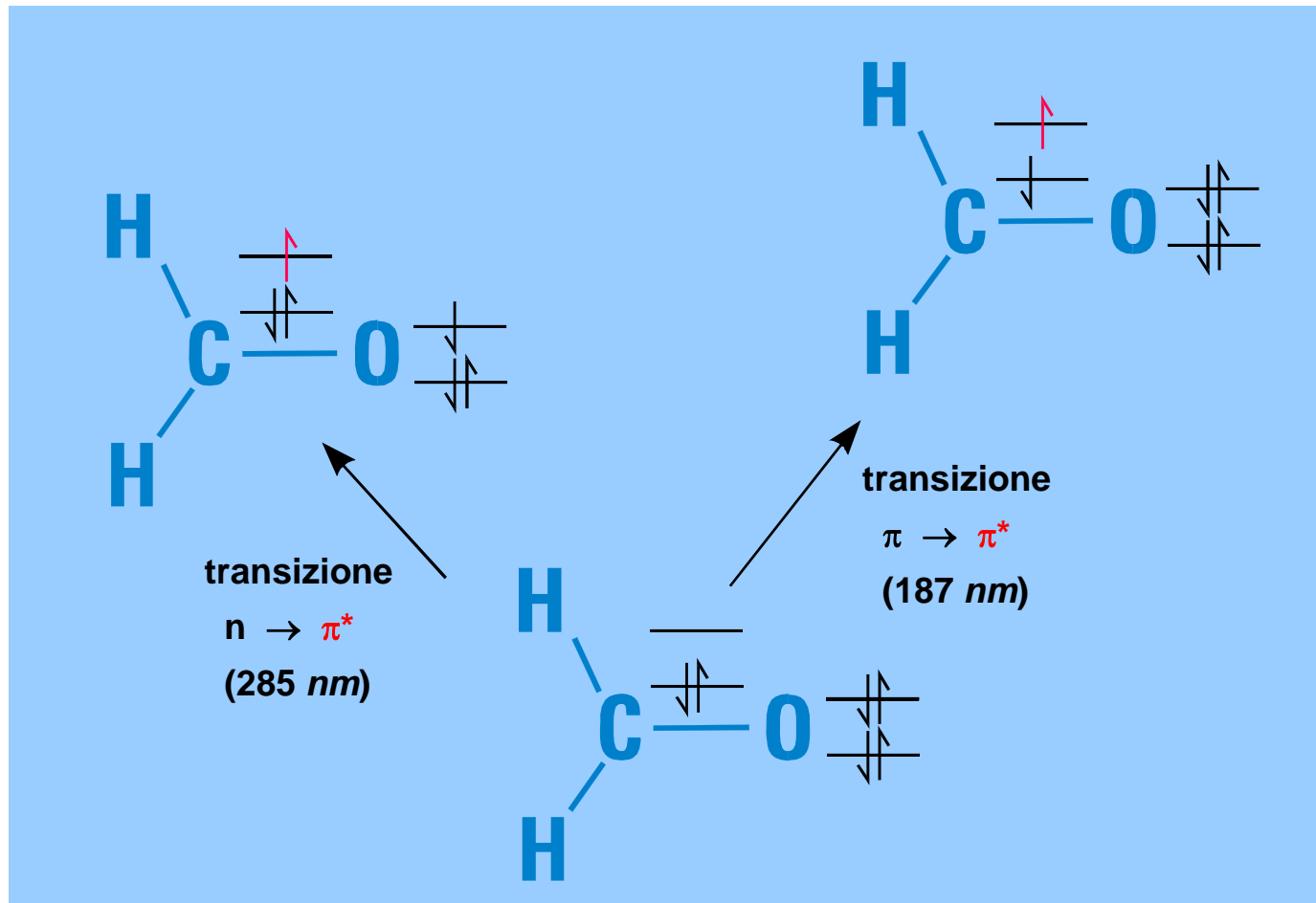


Lo Spettro Elettromagnetico



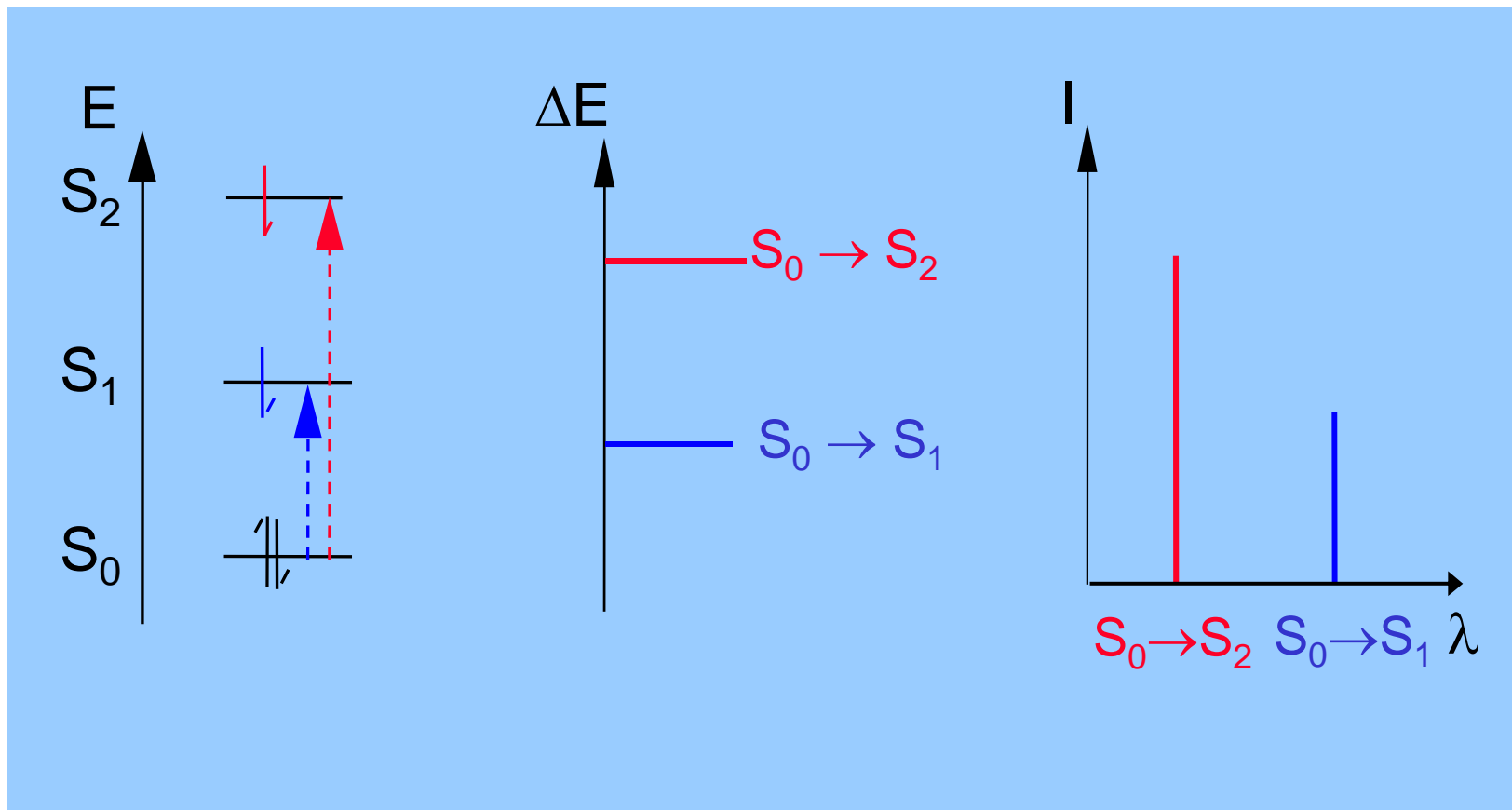


Transizioni Elettroniche nella Formaldeide



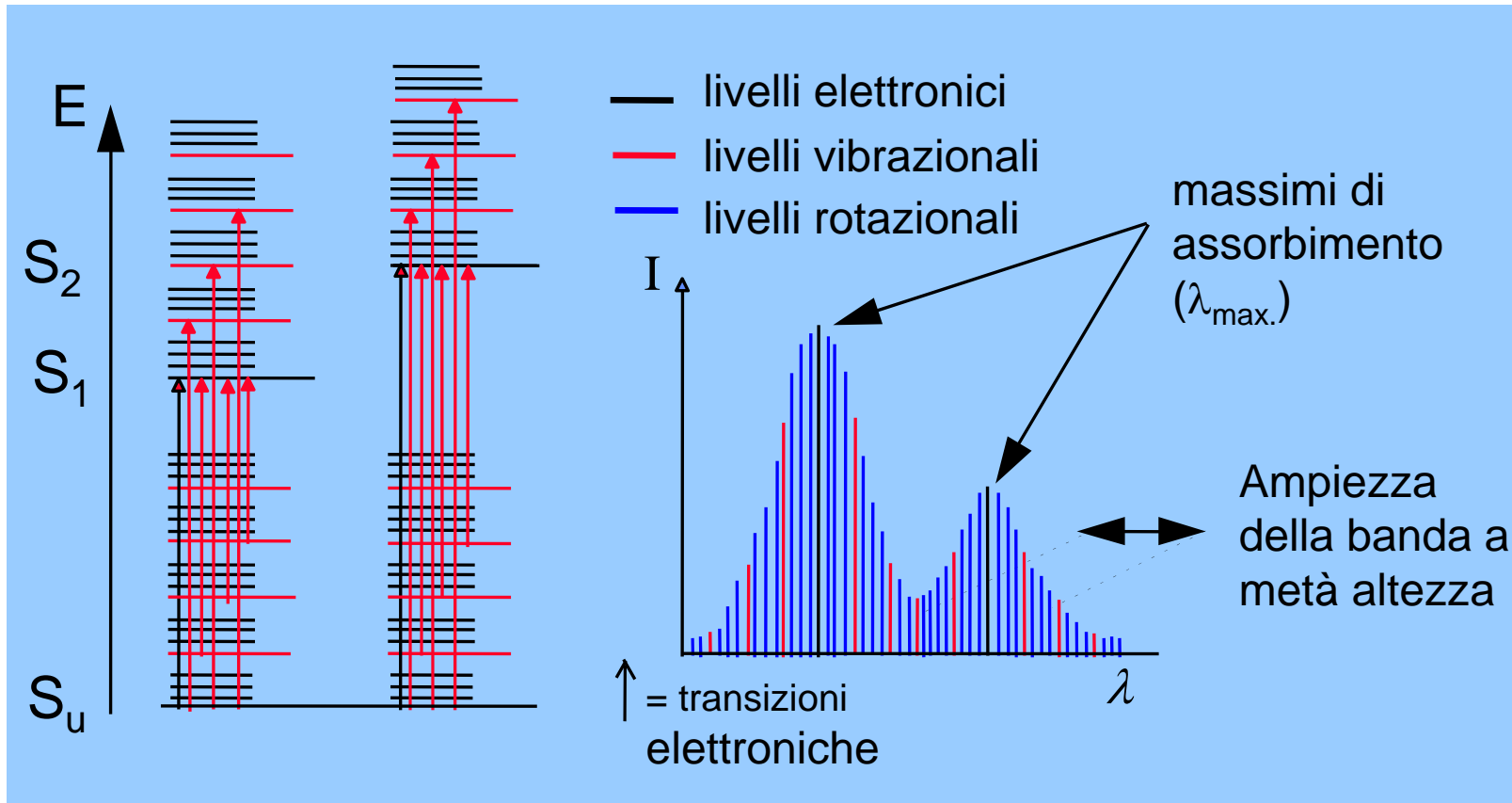


Transizioni Elettroniche e Spettri di Atomi





Transizioni Elettroniche e Spettri UV-visibile in Molecole



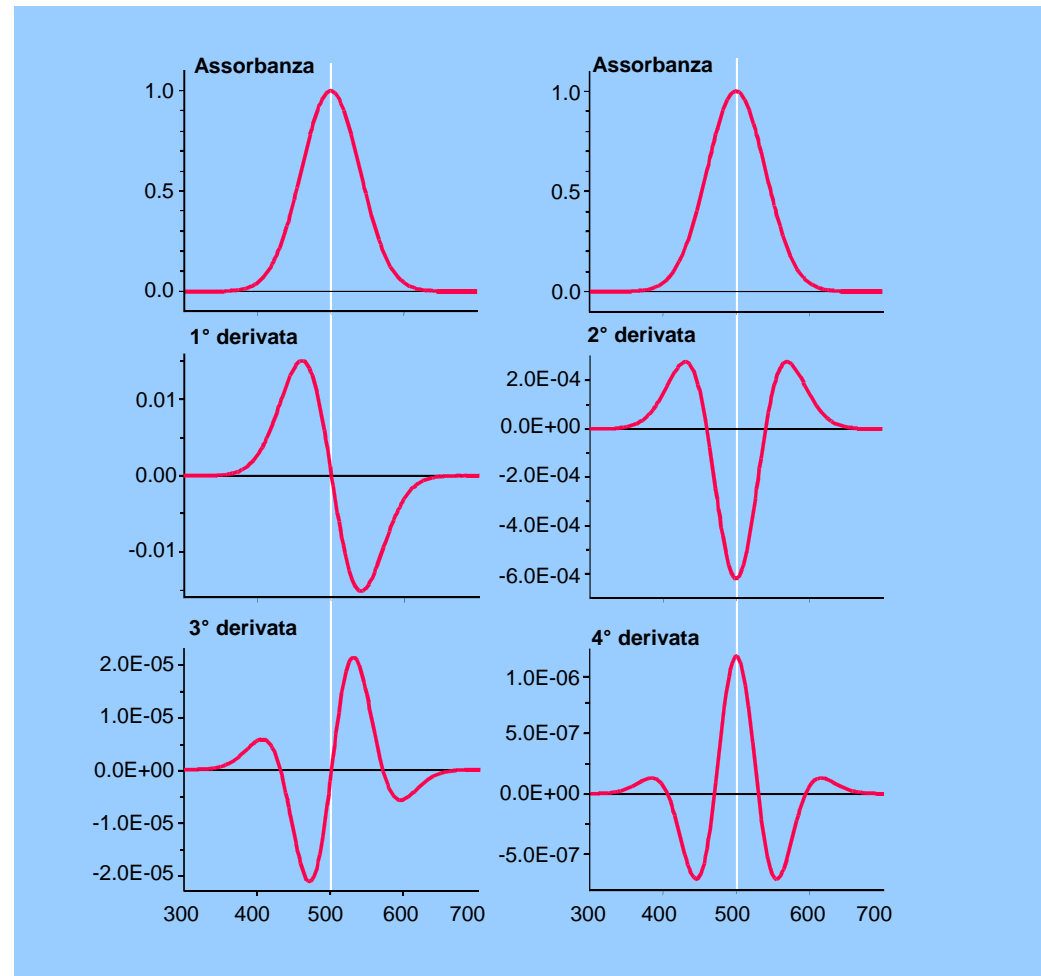


Spettri Derivati di una Banda di Assorbanza Gaussiana

Assorbanza: $A = f(\lambda)$

1^a Derivata: $\frac{dA}{d\lambda} = f'(\lambda)$

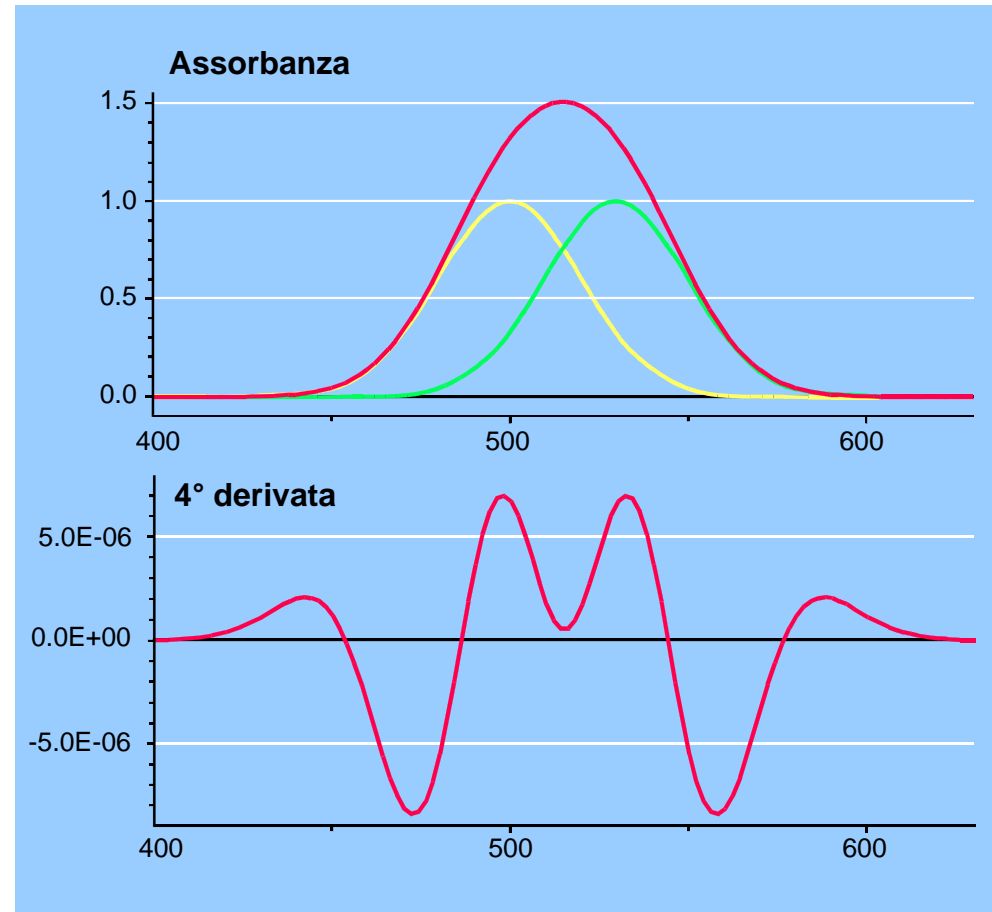
2^a Derivata: $\frac{d^2A}{d\lambda^2} = f''(\lambda)$

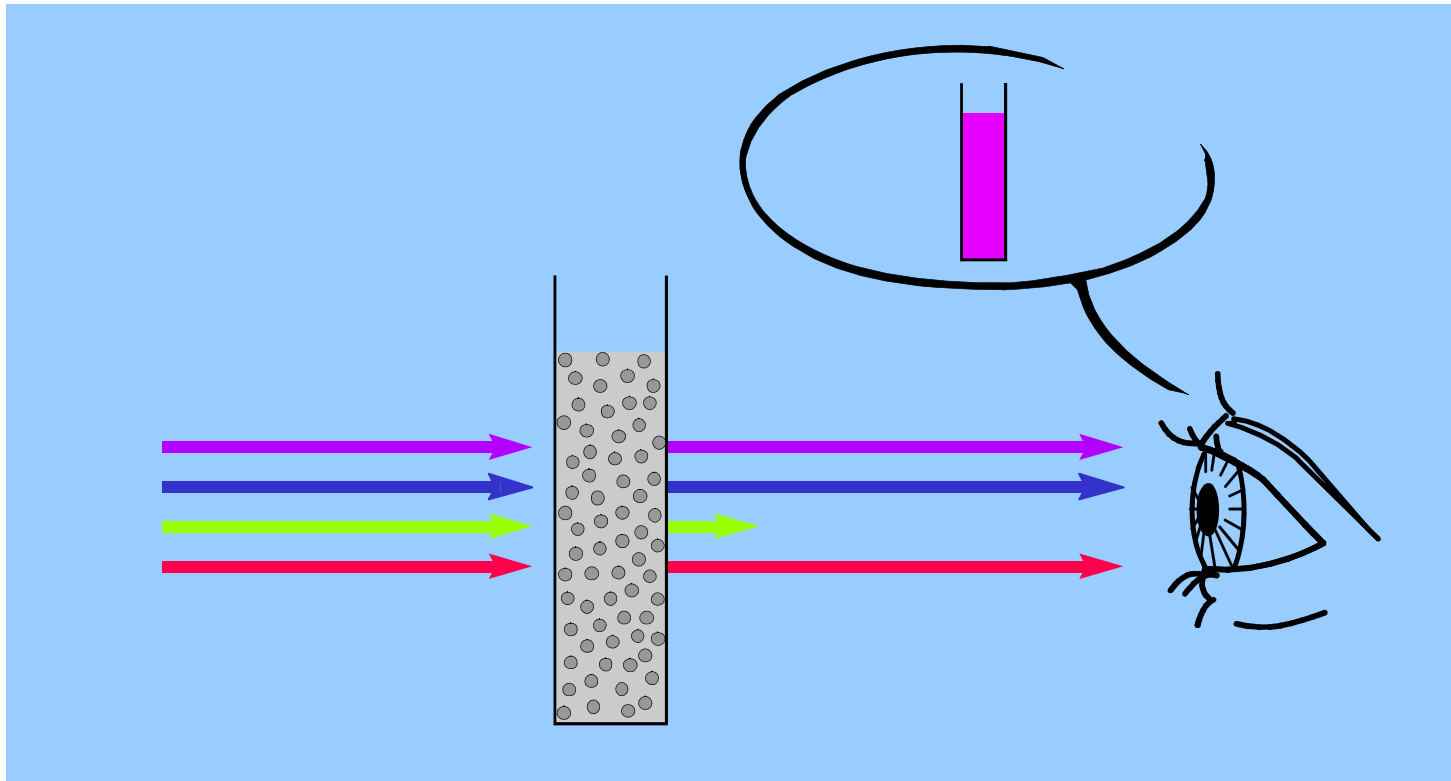




Aumento Risoluzione

- Sovrapposizione di 2 bande Gaussiane con un NBW di 40 *nm* separate da 30 *nm*
- Separate alla 4^a derivata

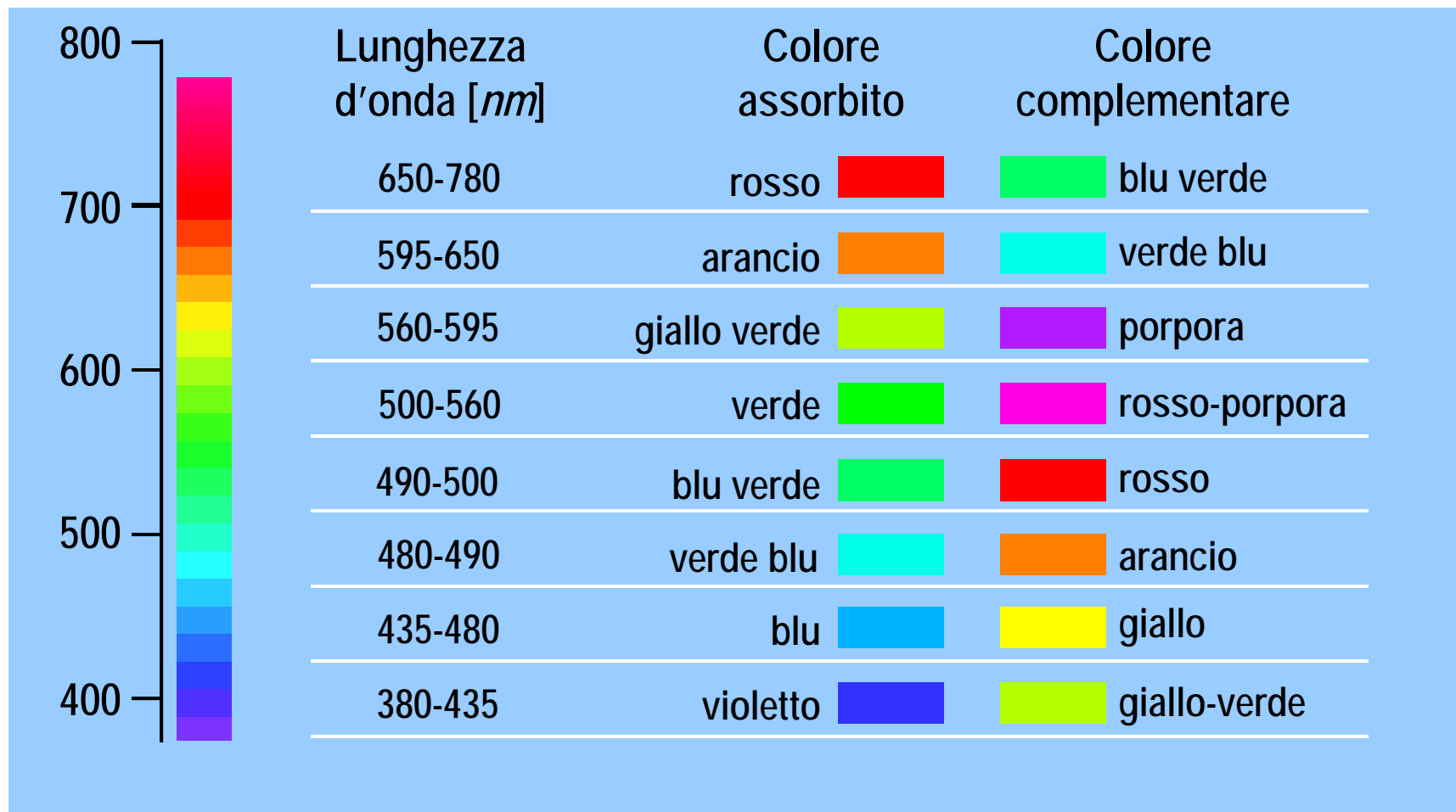




L'occhio umano vede il colore complementare di quello che è assorbito



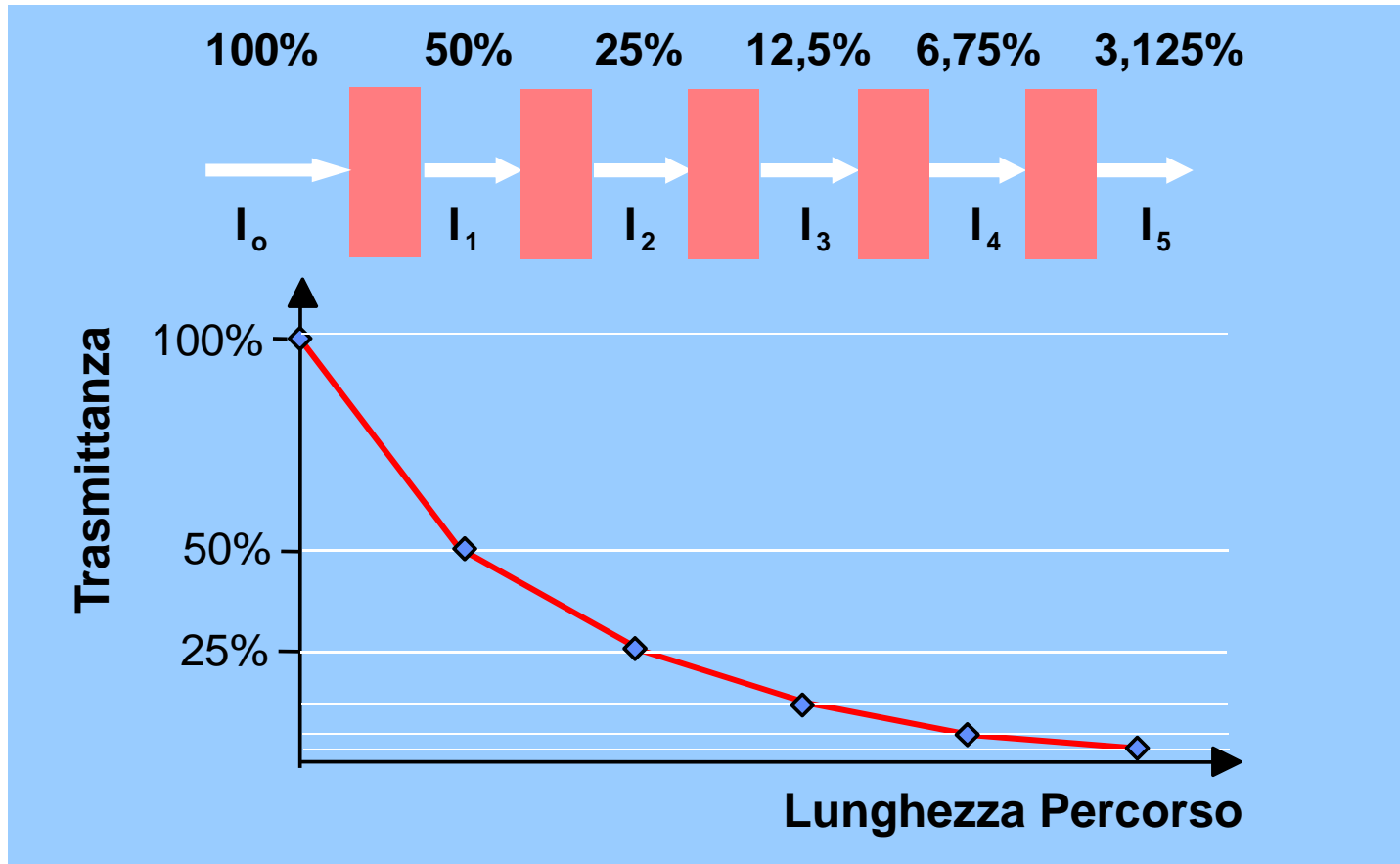
Assorbanza e Colori Complementari





Trasmissione e Concentrazione

La Legge di Lambert-Bouguer

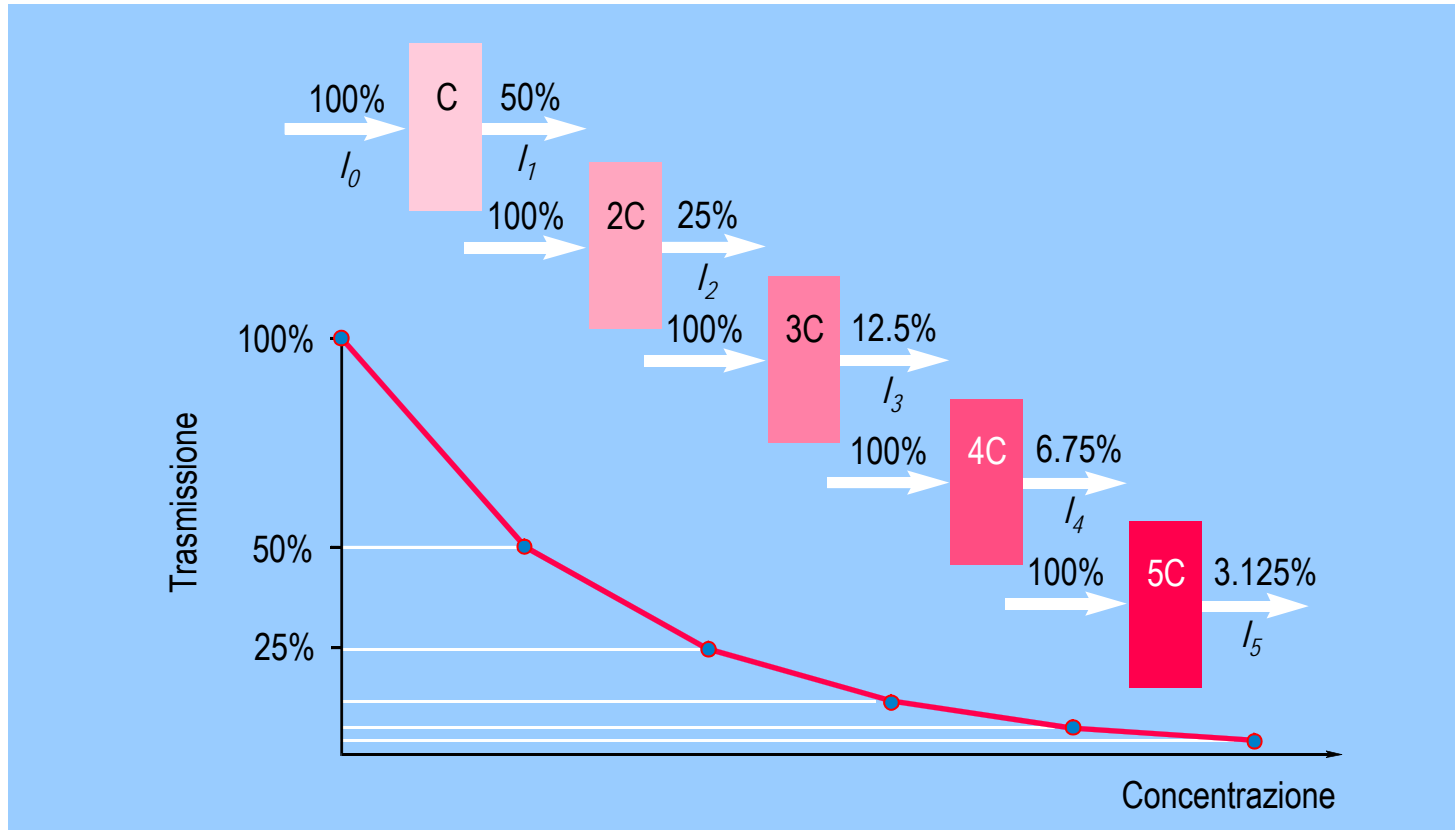


$$T = I / I_0 = e^{-\text{Cammino Cost.}}$$



Trasmittanza e Cammino Ottico

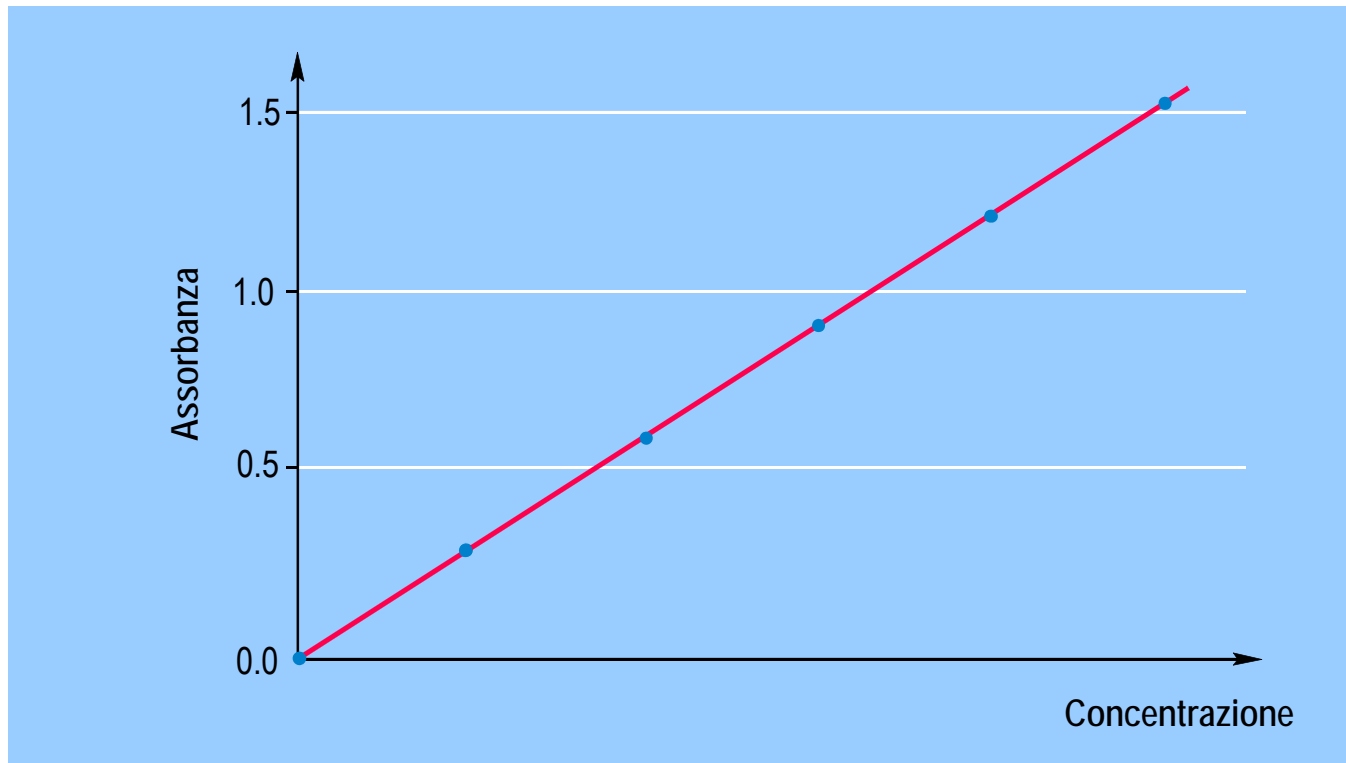
La Legge di Beer



$$T = I / I_0 = e^{-\text{Concentrazione Cost.}}$$



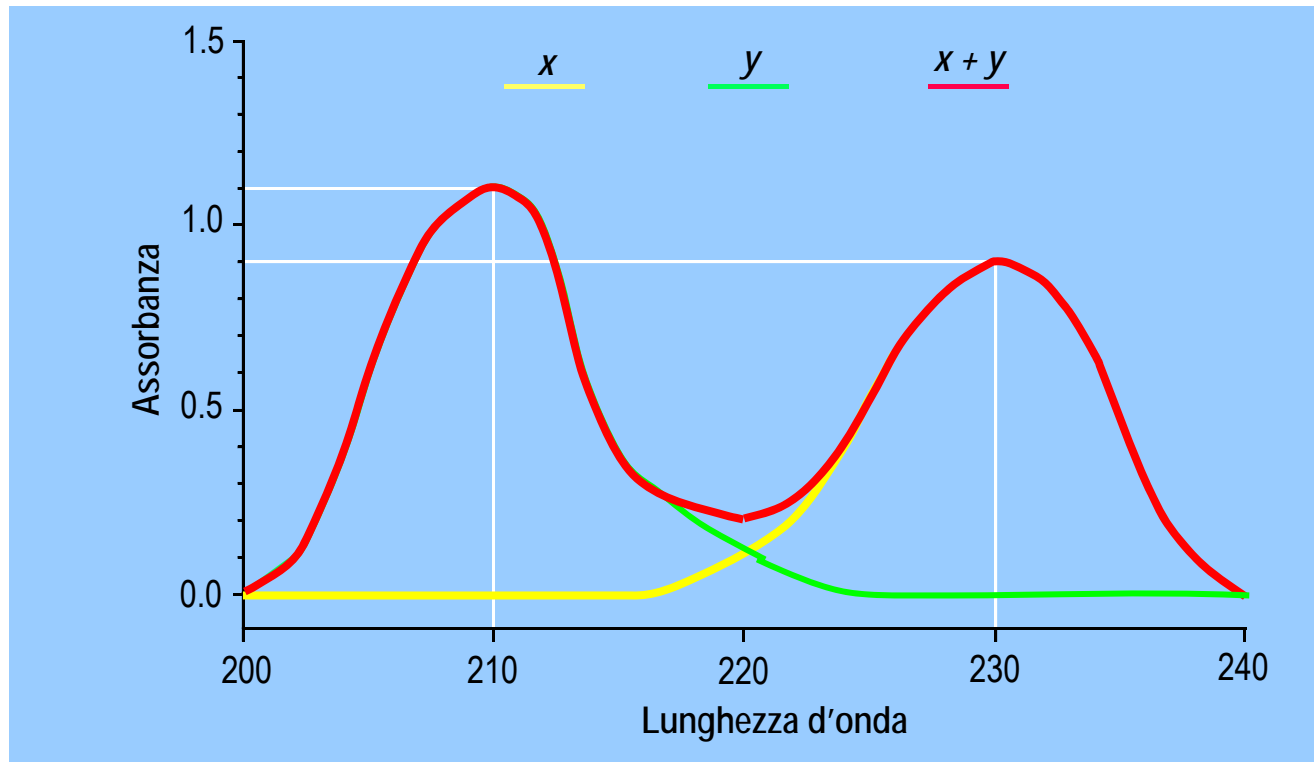
La Legge di Lambert-Bouguer-Beer



$$A = -\log T = -\log(I / I_0) = \log(I_0 / I) = \varepsilon \cdot b \cdot c$$



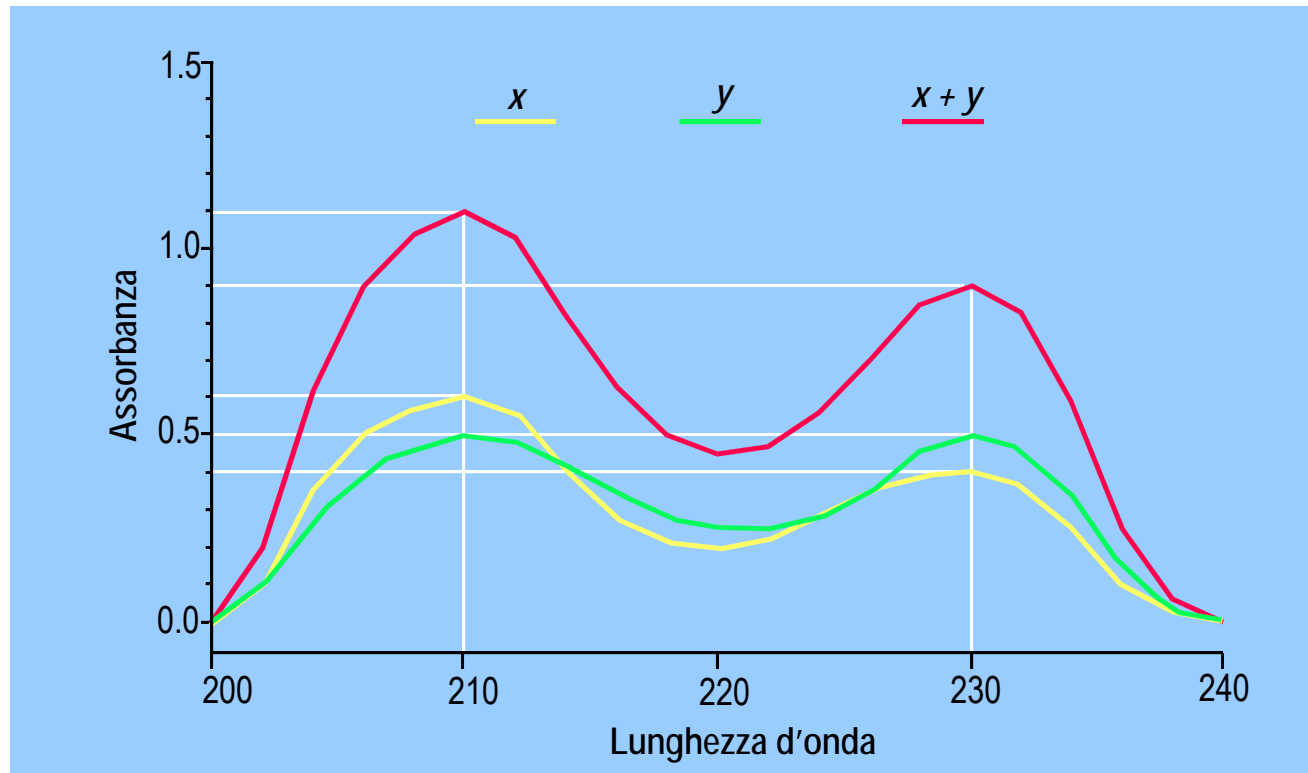
Miscela Bicomponente



Esempio di miscela bi-componente con scarsa sovrapposizione spettrale



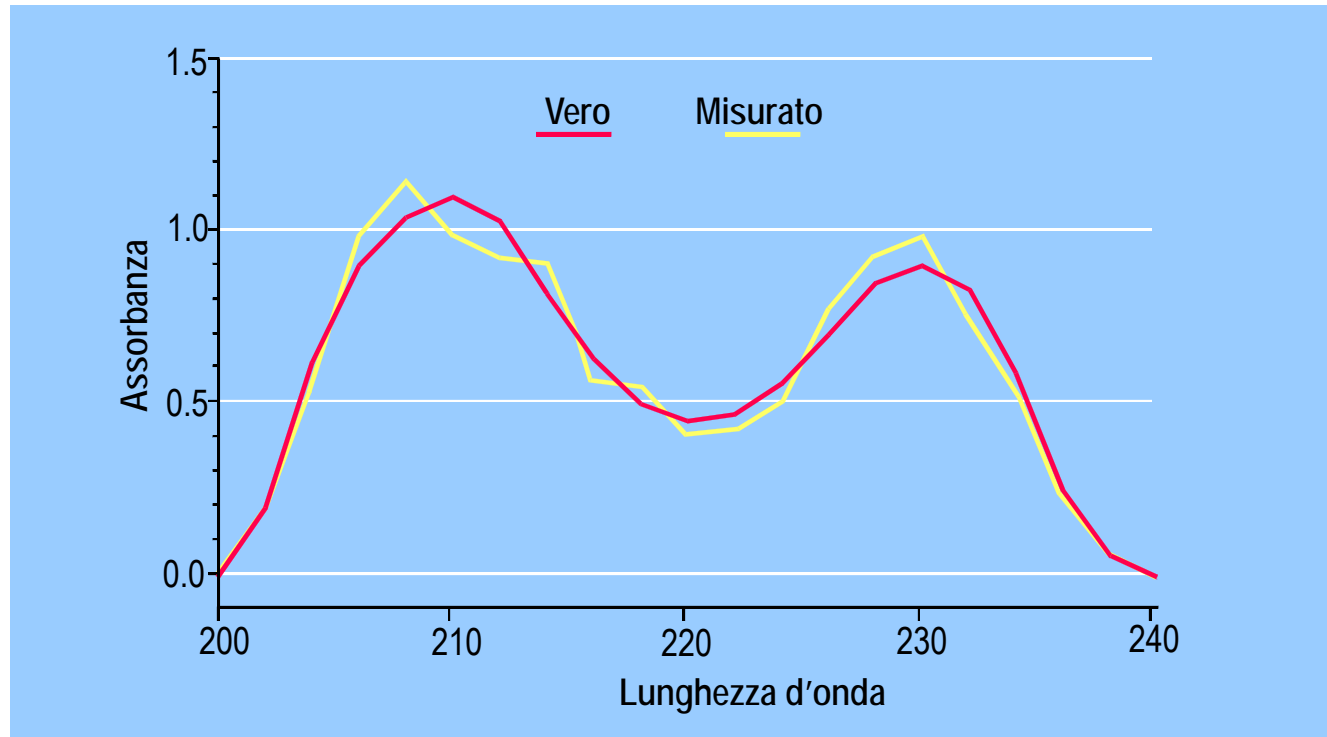
Miscela Bi-componente



Esempio di miscela bi-componente con significativa sovrapposizione spettrale



Influenza di un Errore Casuale del 10%

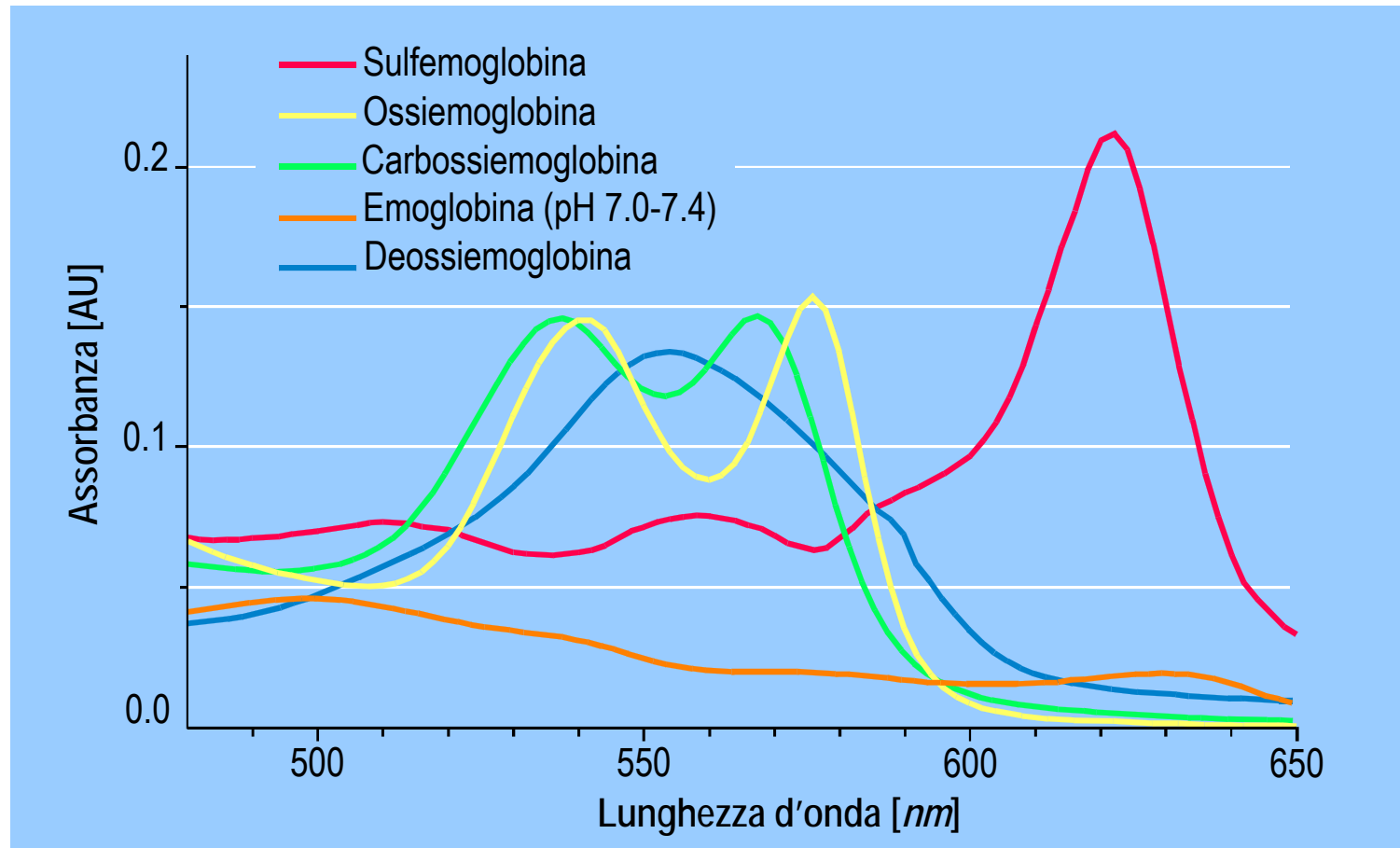


Influenza sulle concentrazioni calcolate

- Scarsa sovrapposizione spettrale: Errore 10%
- Significativa sovrapposizione spettrale: Dipende dalla similarità, può essere molto più alto (p.es. 100%)



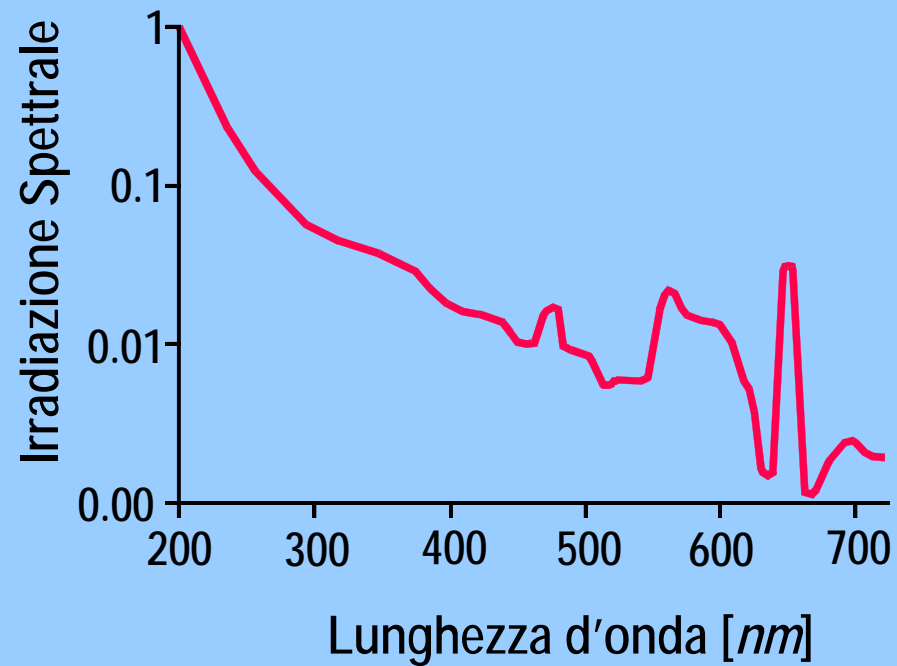
Spettri di Assorbimento di Derivati dell'Emoglobina





Intensità dello Spettro della Lampada ad Arco di Deuterio

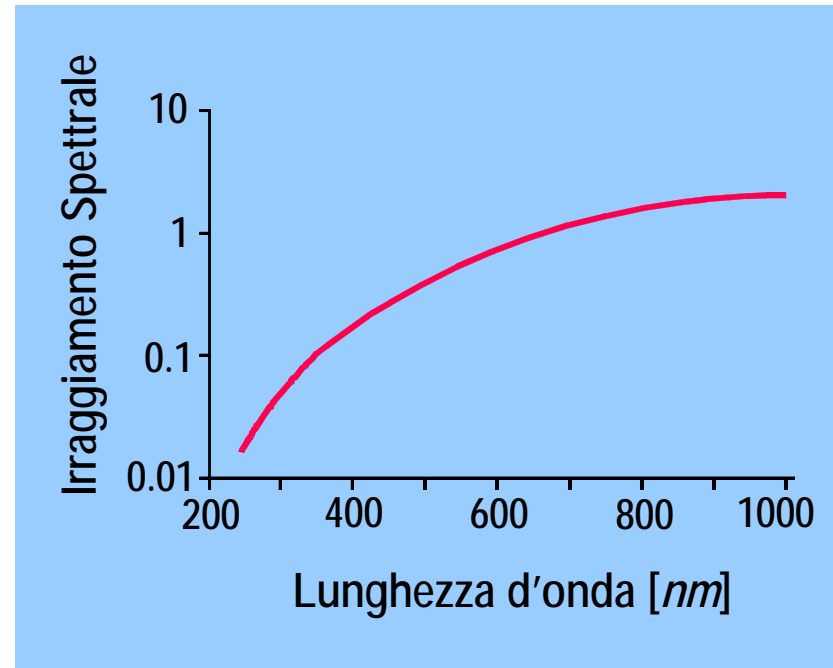
- Buona intensità nell'intervallo UV
- Utile intensità nell'intervallo del visibile
- Basso rumore di fondo
- Intensità calante nel tempo





Intensità dello Spettro della Lampada a Tungsteno-Alogena

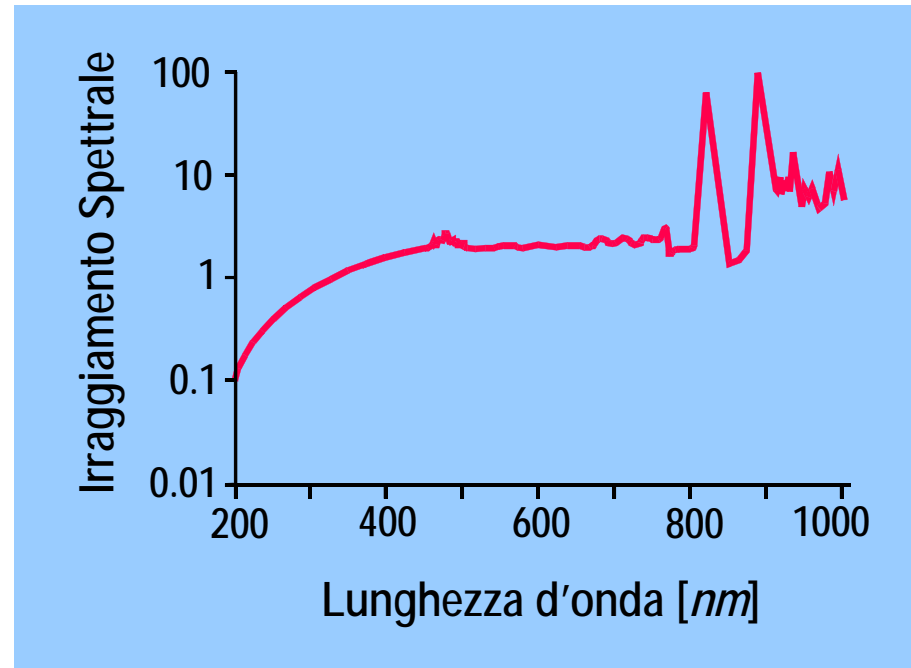
- Bassa intensità nell'intervallo UV
- Buona intensità nell'intervallo visibile
- Rumore di fondo molto basso
- Basso drift





Intensità dello Spettro della Lampada a Xeno

- Alta intensità nell'intervallo UV
- Alta intensità nell'intervallo visibile
- Rumore di fondo medio

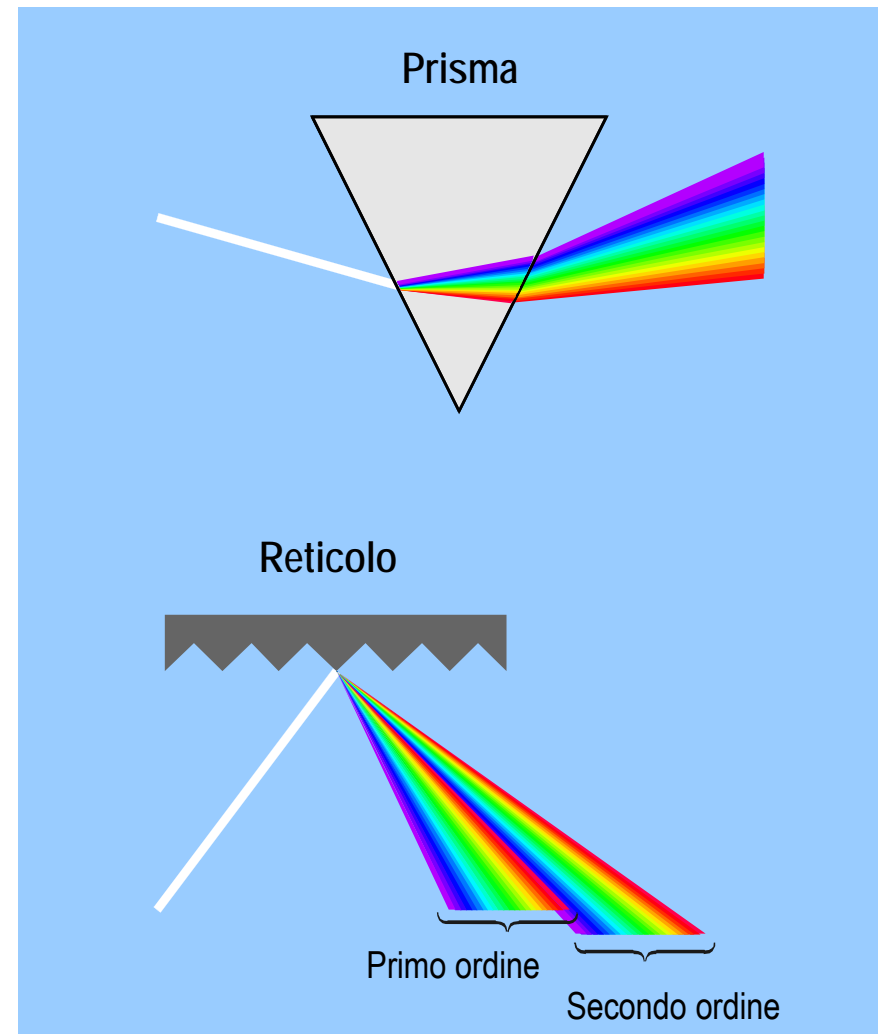




Dispositivi di Dispersione

- Dispersione non-lineare
- Sensibile alla temperatura

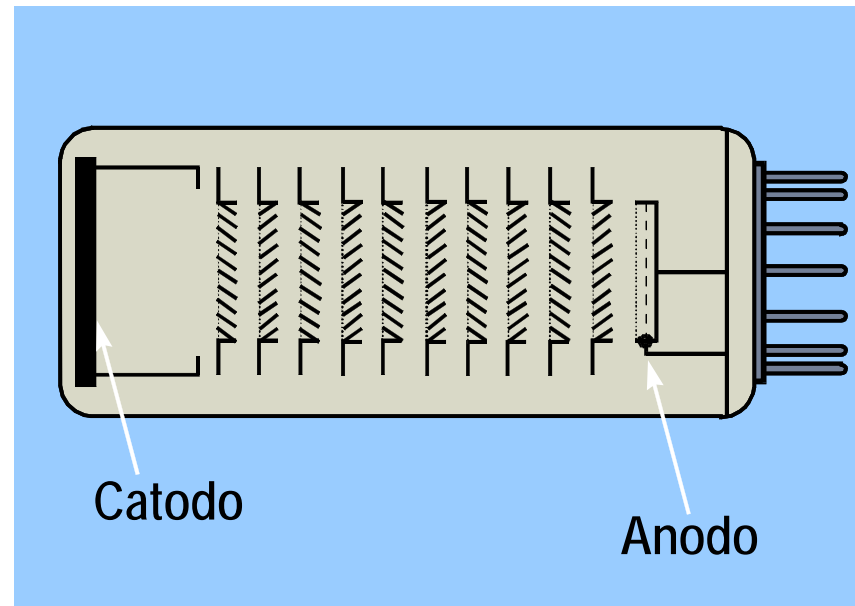
- Dispersione lineare
- Differenti ordini





Dispositivo Fotomoltiplicatore

- Alta sensibilità a bassi livelli di luce
- Il materiale catodico determina sensibilità spettrale
- Buon segnale/rumore di fondo
- Sensibile agli urti





Il Rivelatore a Fotodiodi

- Ampio intervallo dinamico
- Rapporto segnale/rumore molto buono ad alti livelli di luce
- Dispositivo a stato solido

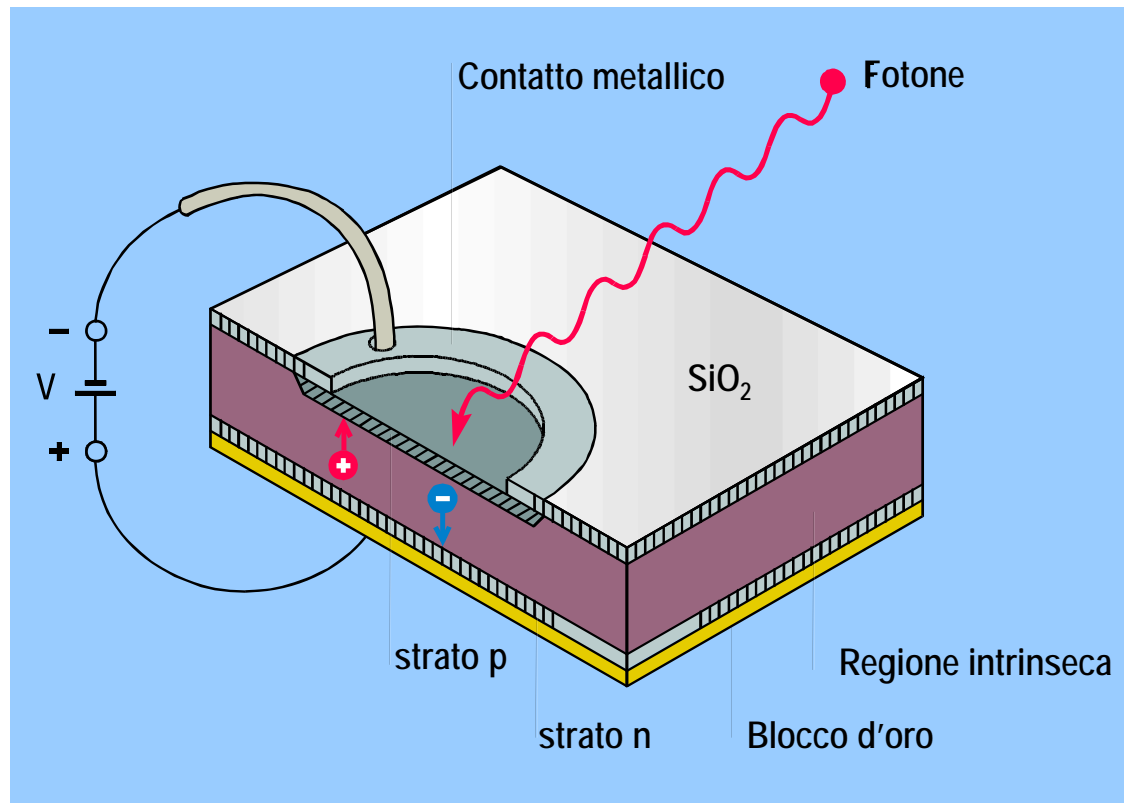
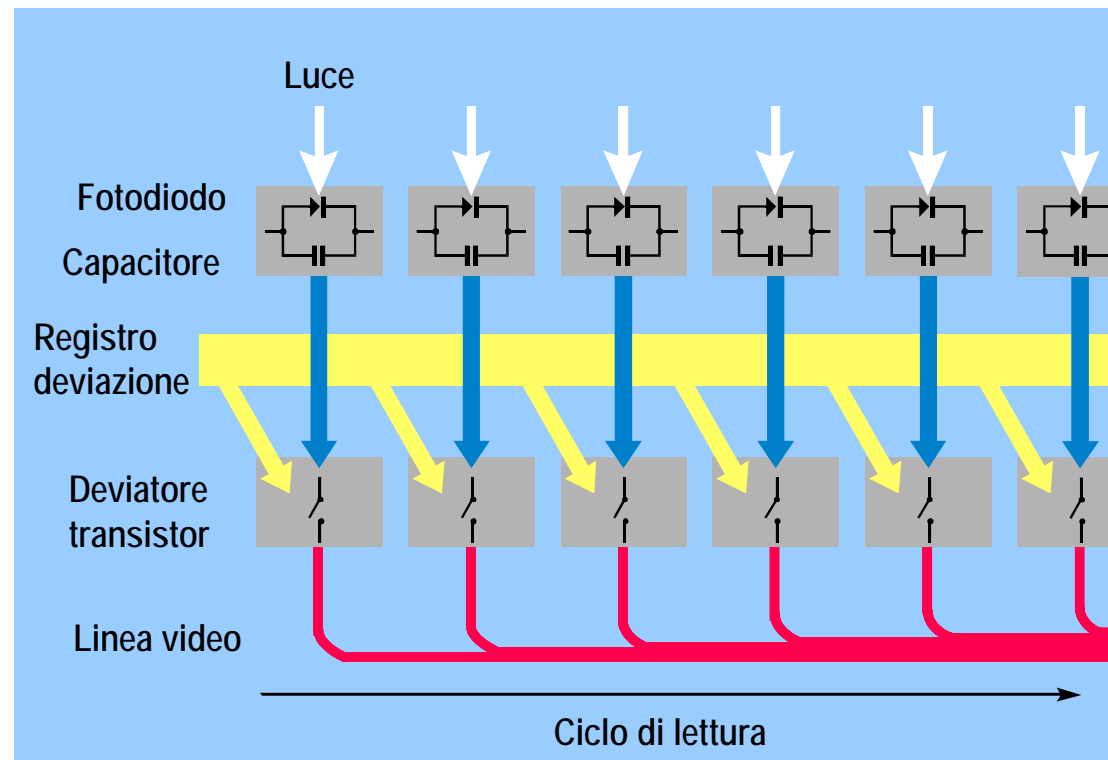




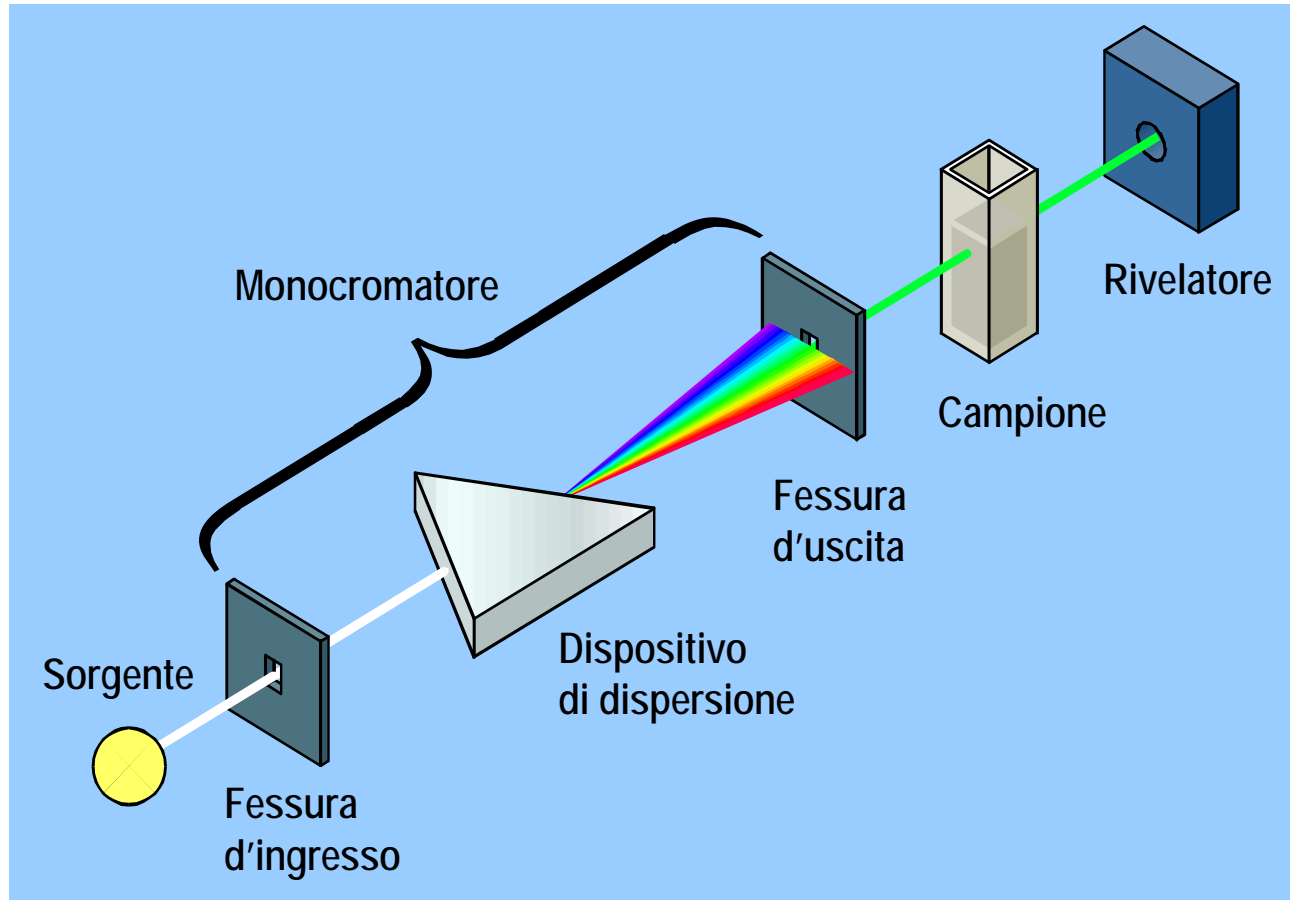
Diagramma Schematico di un Dispositivo a Fotodiodi

- **Stesse caratteristiche dei fotodiodi**
- **Dispositivo a stato solido**
- **Veloci cicli di lettura**



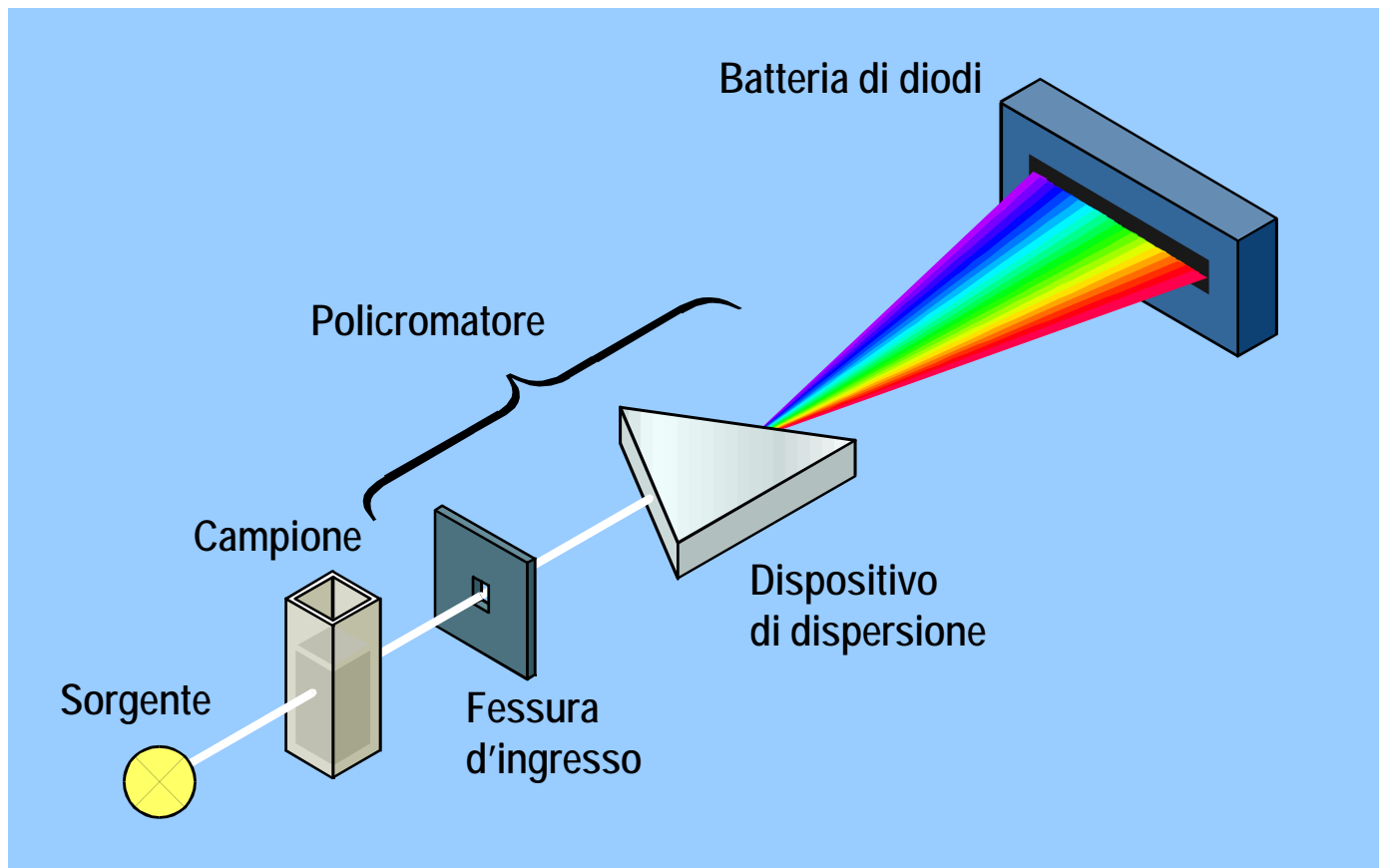


Spettrometro Convenzionale



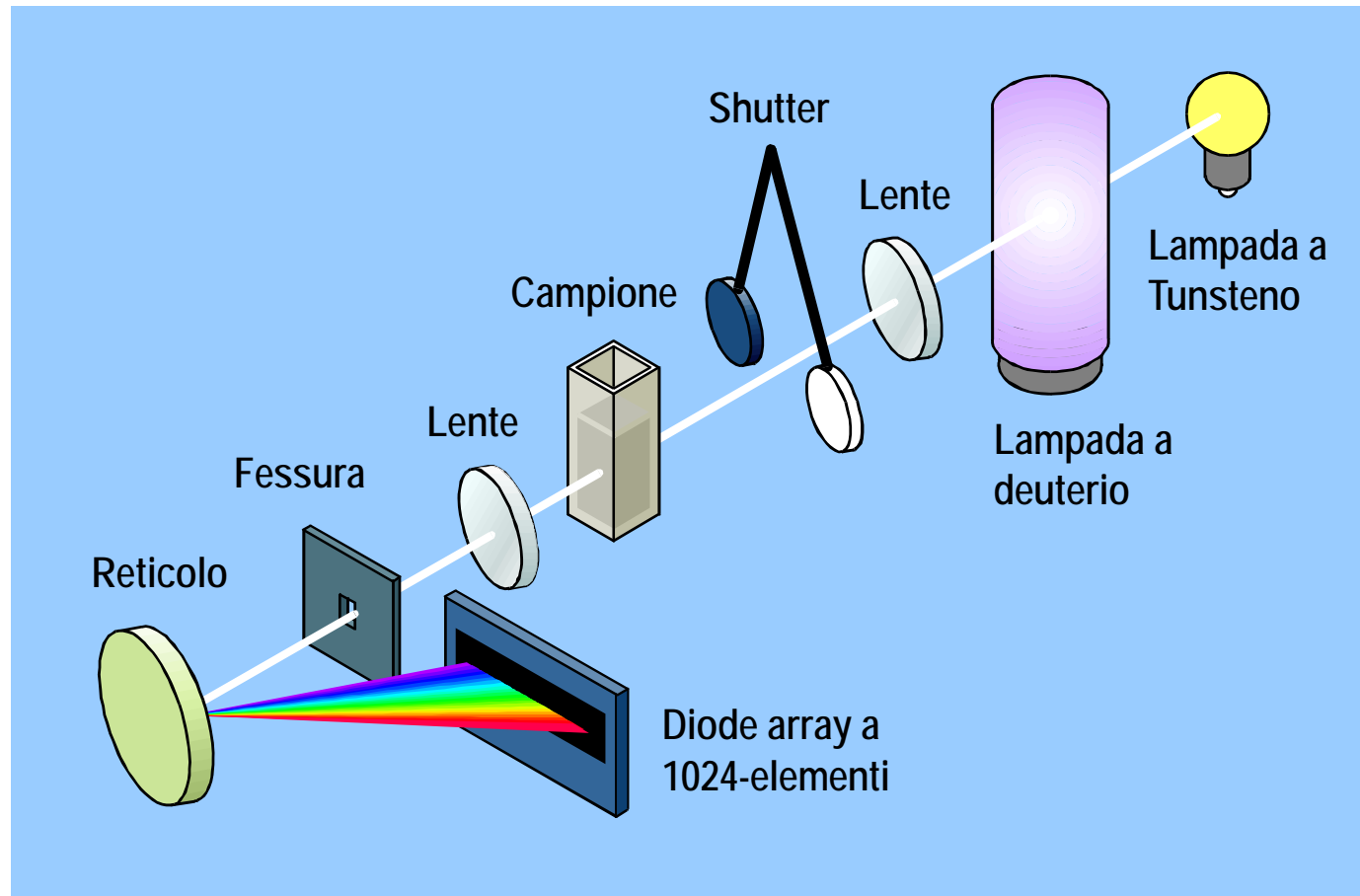


Spettrometro a "Diode Array"





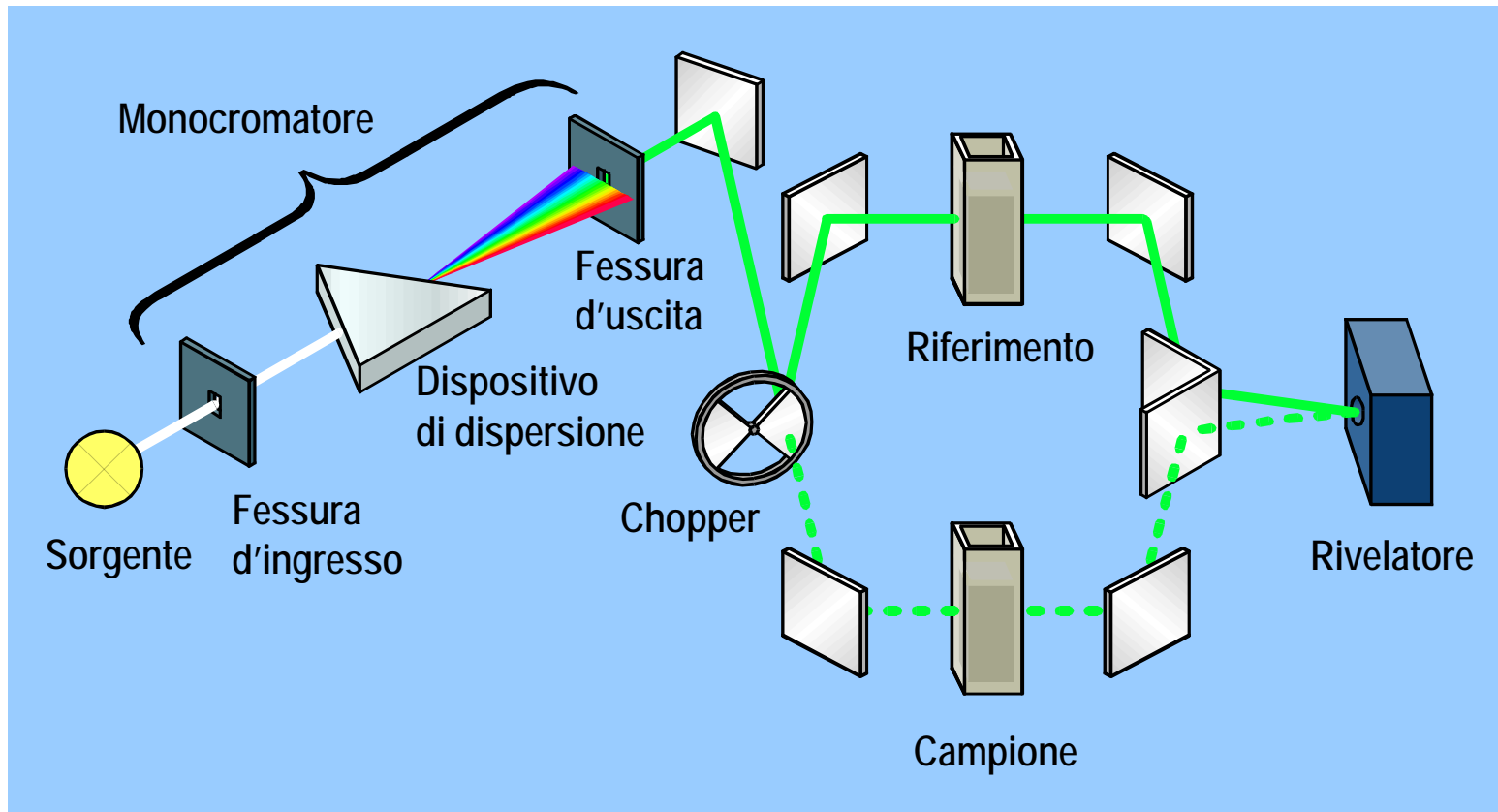
Spettrometro a “Diode Array”



Sistema ottico di uno spettrofotometro HP 8453 a “diode array”



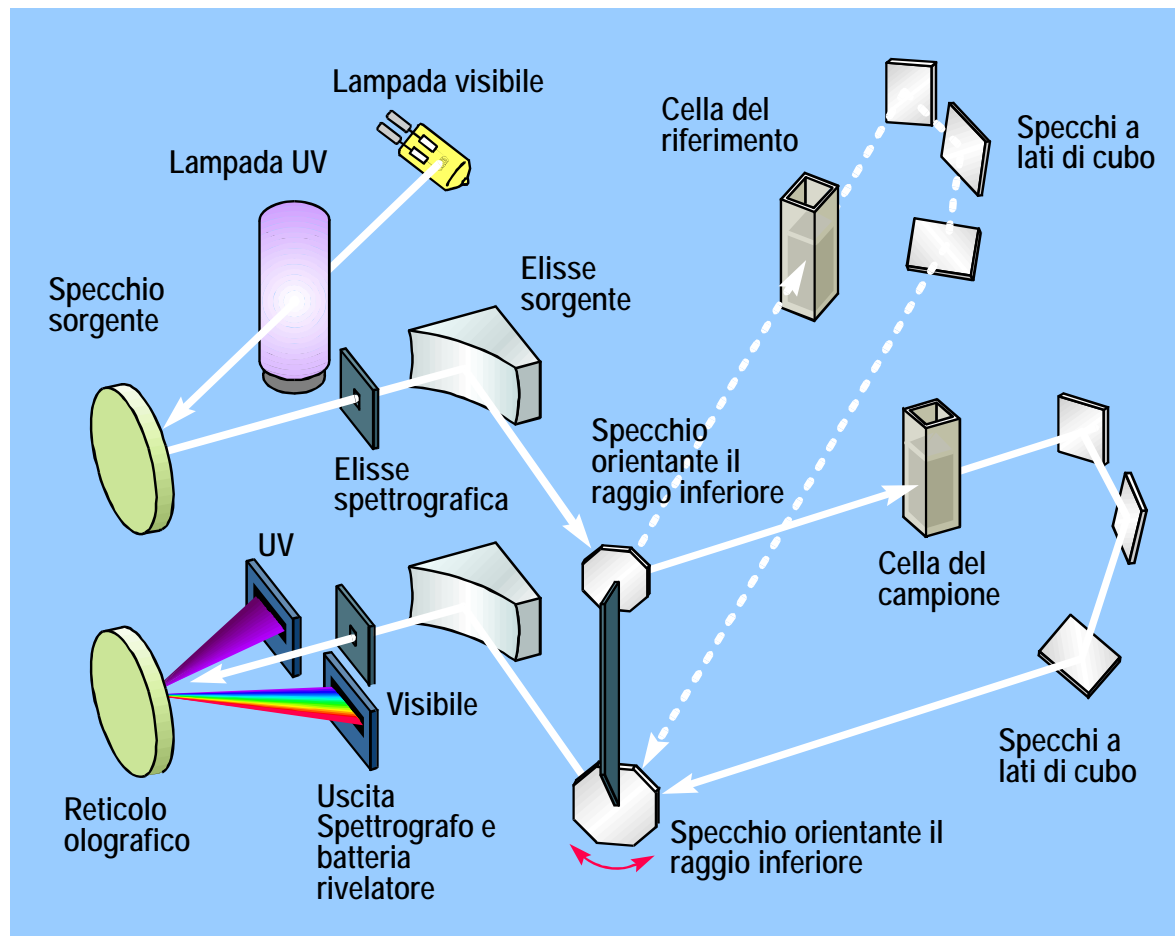
Spettrometro Convenzionale



Sistema ottico di uno spettrofotometro a doppio raggio



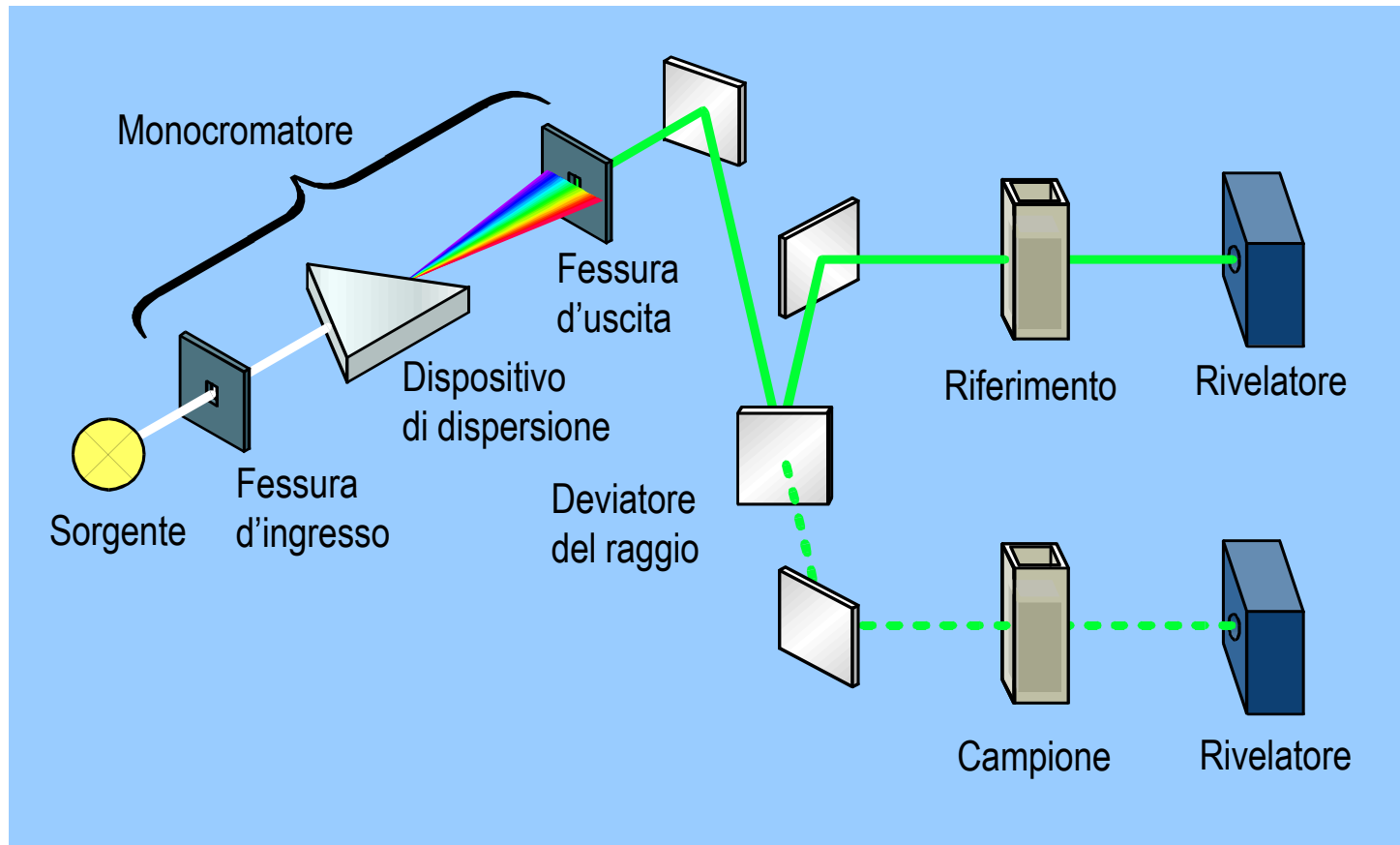
Spettrometro a "Diode Array"



Sistema ottico dello spettrofotometro a diode array HP 8450A



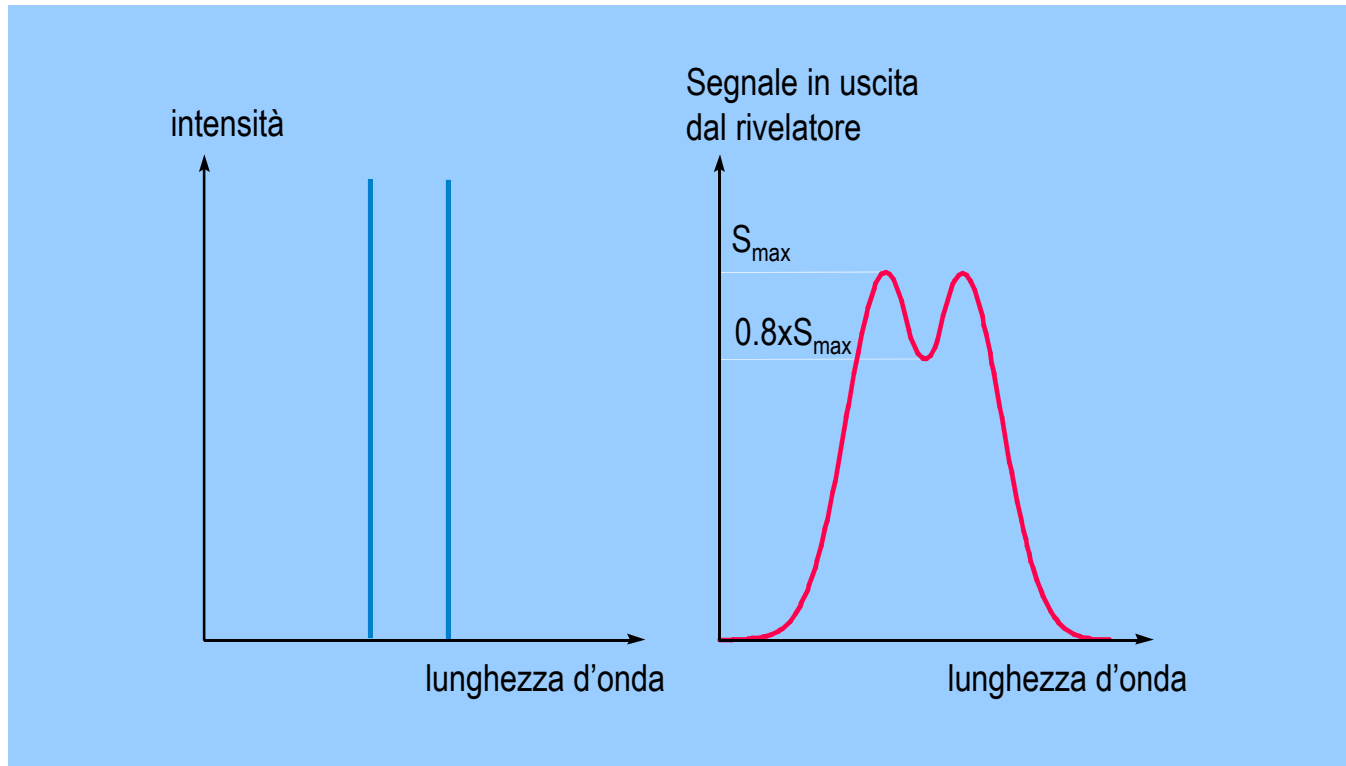
Spettrometro Convenzionale



Sistema ottico di uno spettrofotometro a raggio sdoppiato



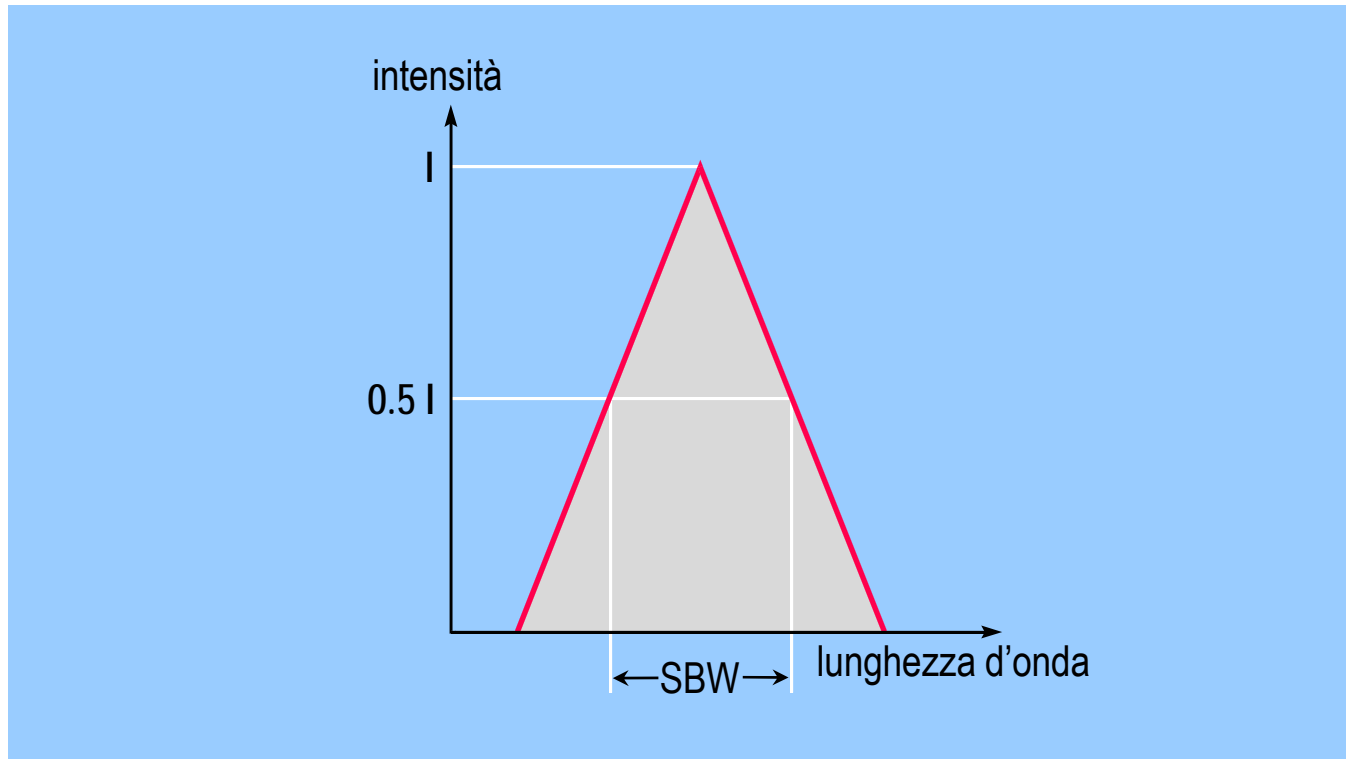
Definizione di Risoluzione



La risoluzione spettrale è una misura della capacità di uno strumento di differenziare tra due lunghezze d'onda adiacenti



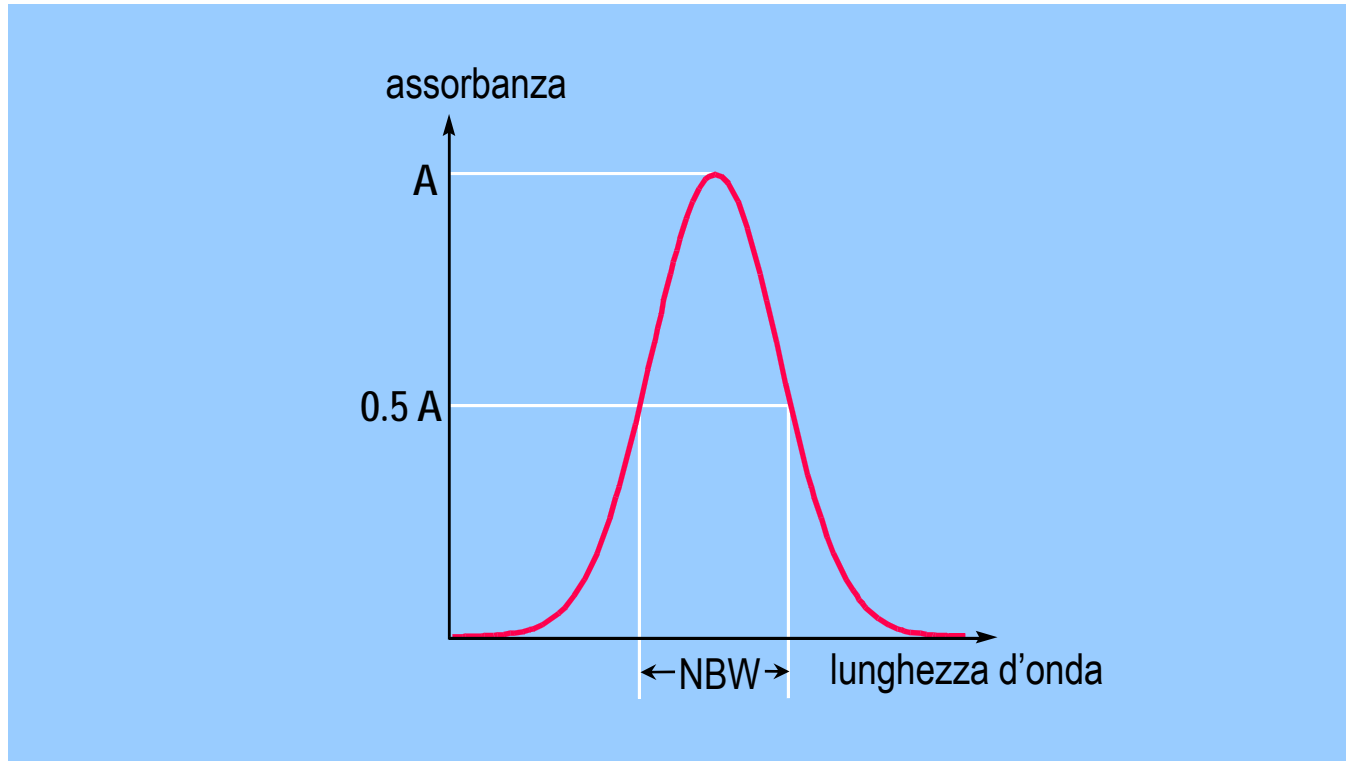
Ampiezza di Banda Spettrale



La SBW è definita come l'ampiezza, a metà dell'intensità massima, della banda di luce uscente dal monocromatore



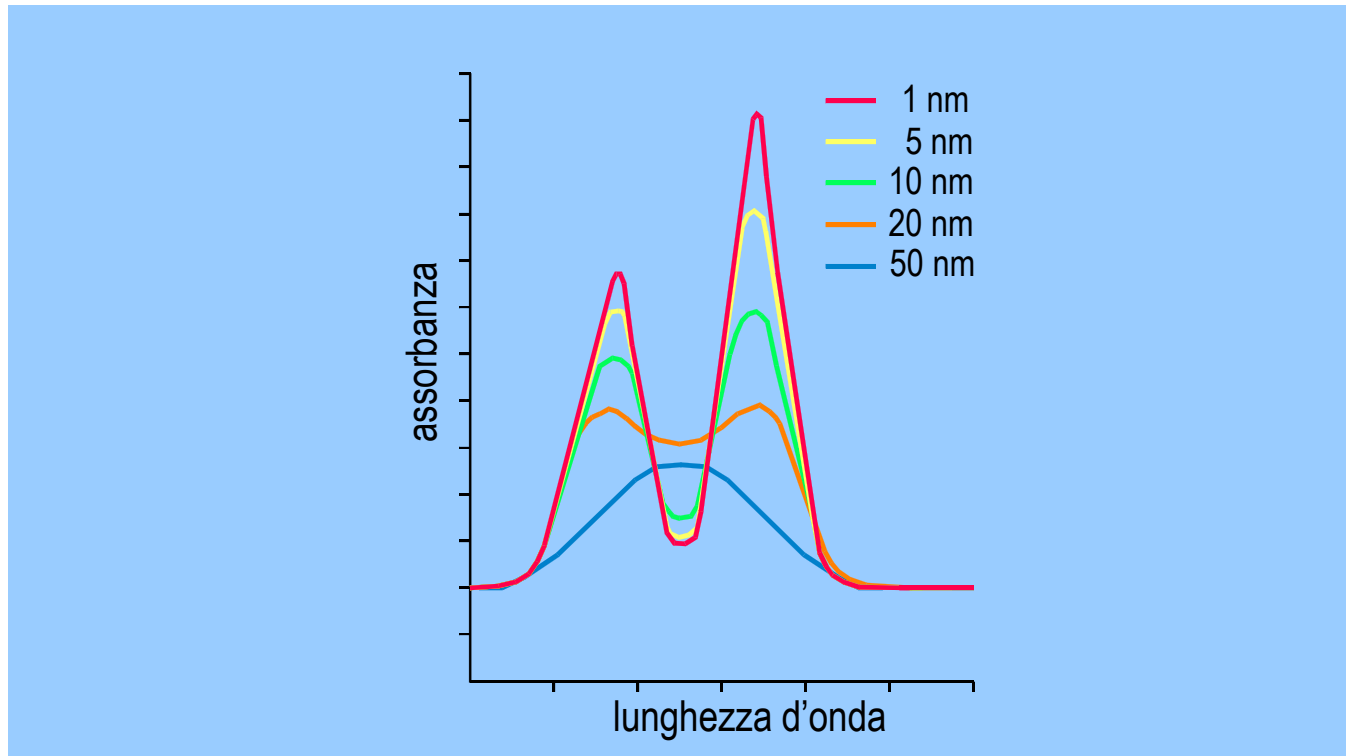
Ampiezza di Banda Spettrale Naturale



La NBW è l'ampiezza della banda di assorbimento del campione a metà del massimo di assorbimento



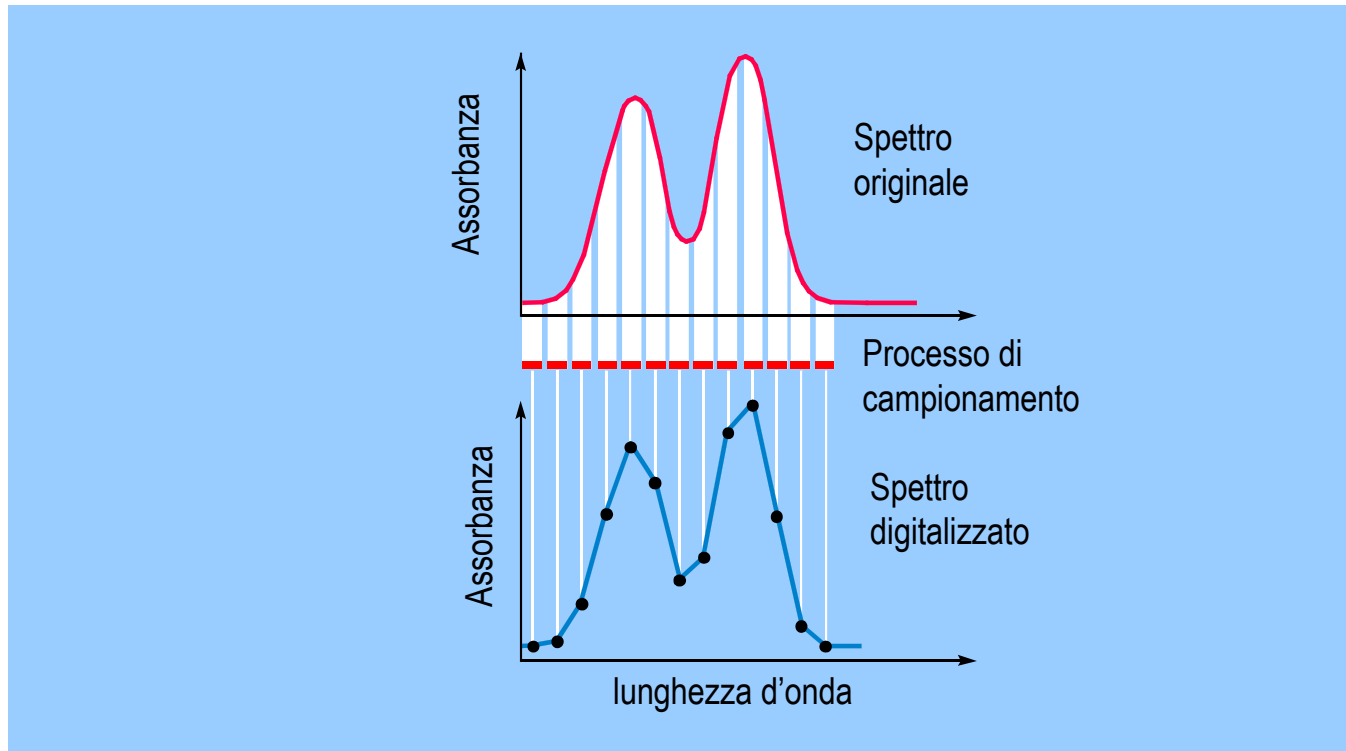
Effetto della SBW sulla Forma della Banda



Il rapporto SBW/NBW deve essere 0.1 o migliore per dare una misura di assorbanza con un'accuratezza del 99.5% o migliore.



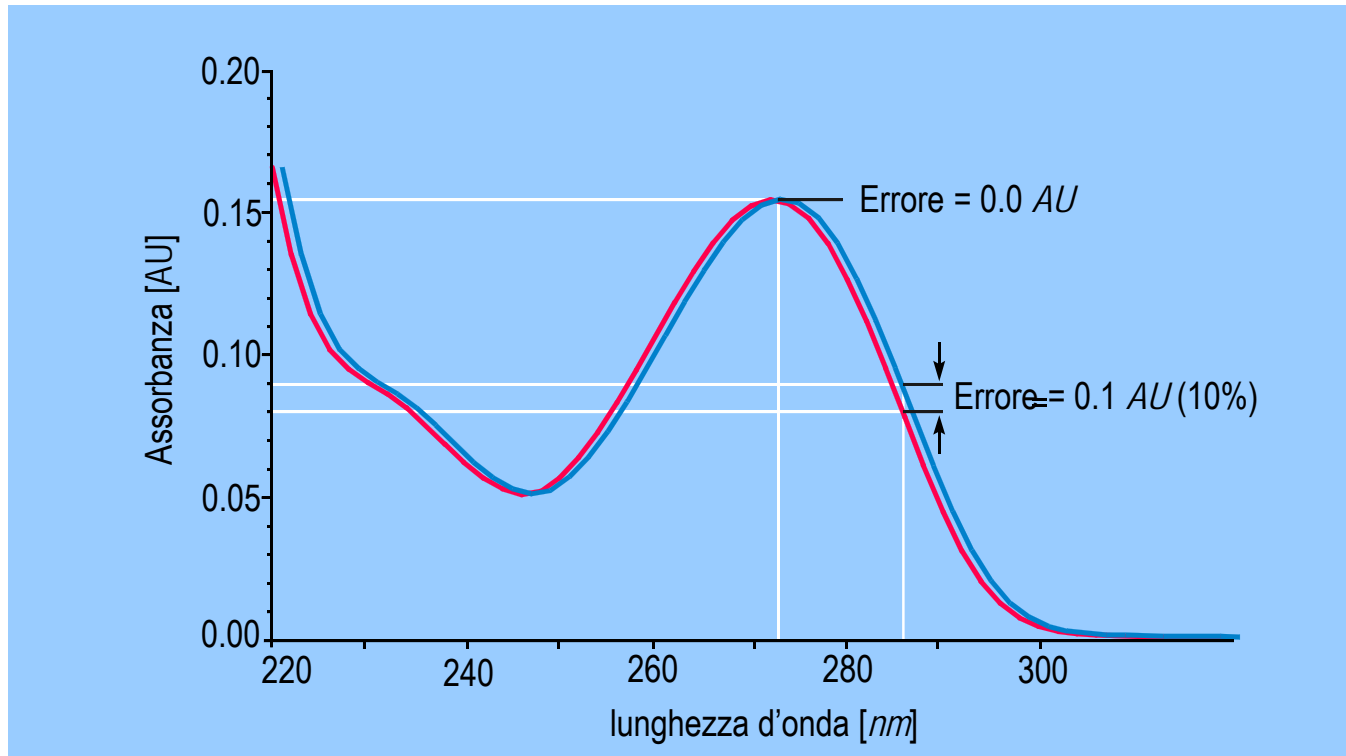
Effetto del Campionamento Digitale



Anche l'intervallo di campionamento usato per digitalizzare lo spettro per la valutazione e lo stoccaggio da parte di un computer influenza la risoluzione



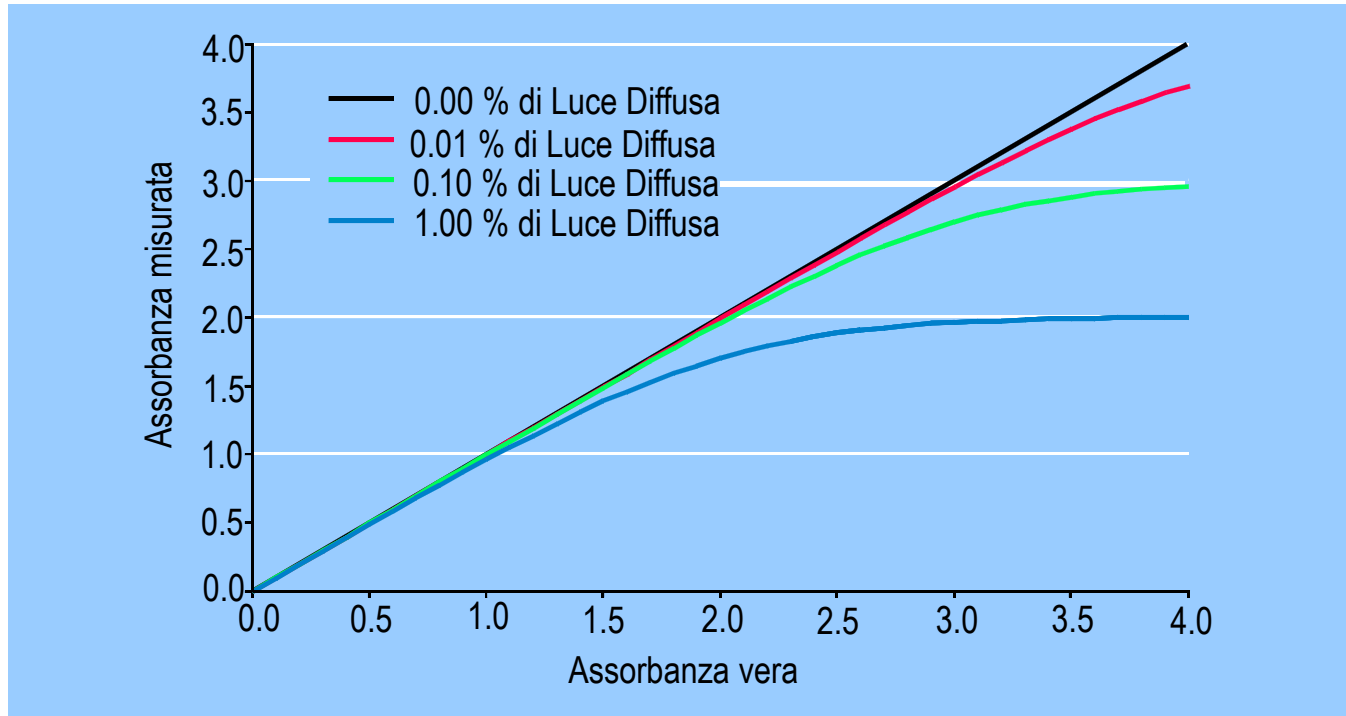
Resettabilità della Lunghezza d'Onda



Influenza della resettabilità della lunghezza d'onda sulle misure al massimo e sulla pendenza della banda di un assorbimento



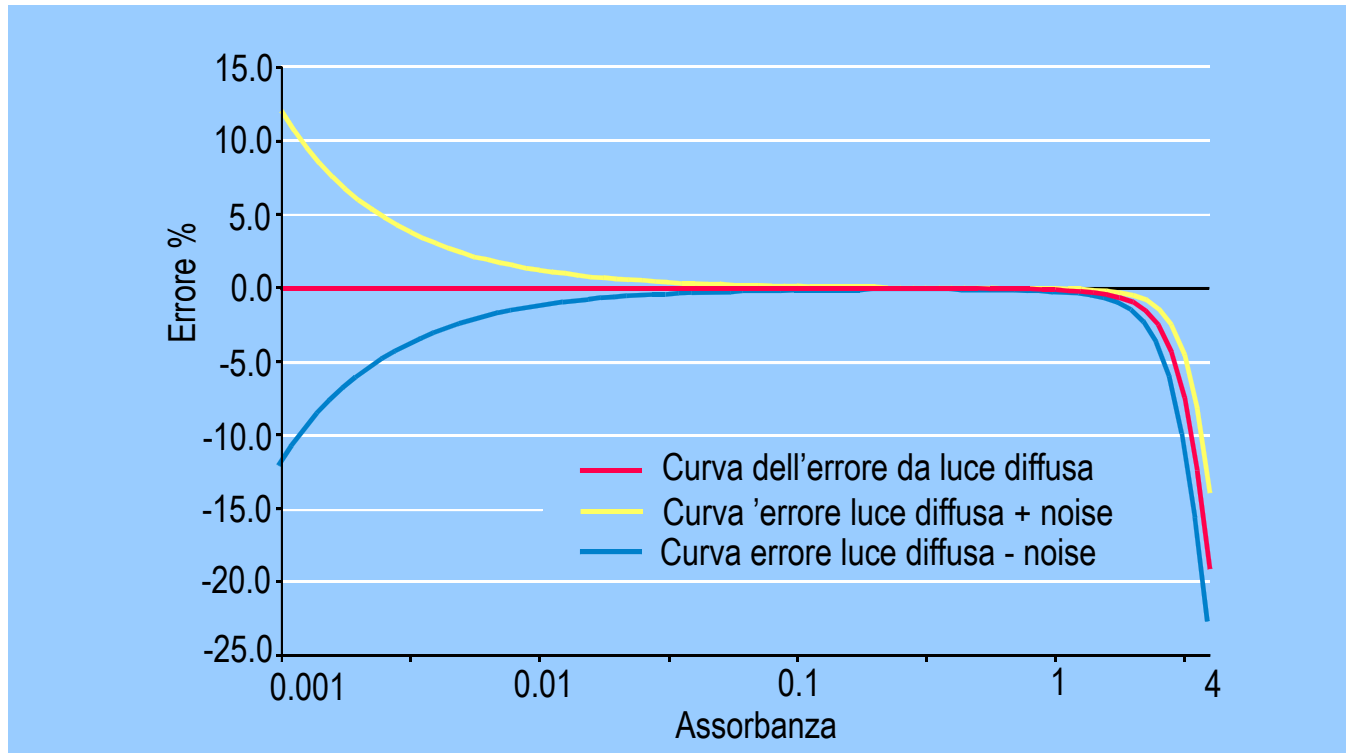
Effetto della Luce Diffusa



Effetto di vari livelli di luce diffusa sulle assorbanze misurate confrontate con le assorbanze reali



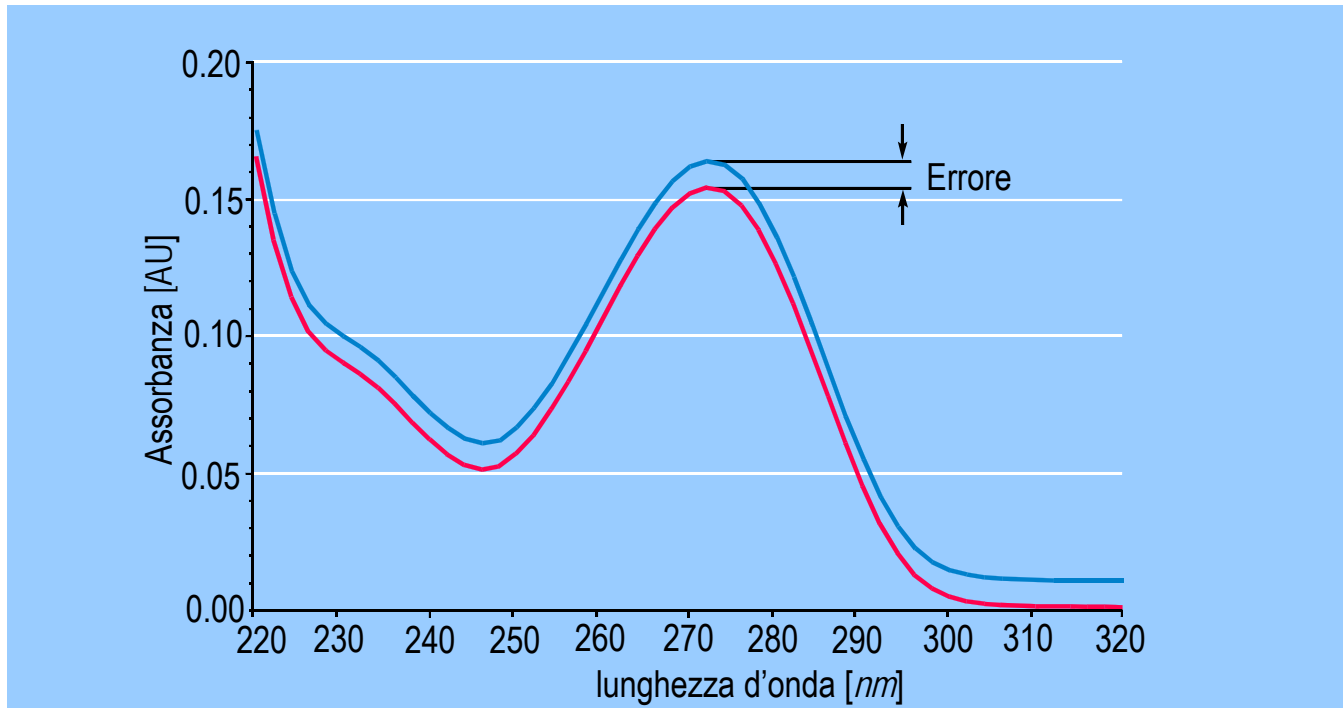
Errore di Assorbanza Teorico



L'errore totale a qualsiasi assorbanza è la somma degli errori dovuti alla luce diffusa e al rumore di fondo (rumore dei fotoni ed elettronico)



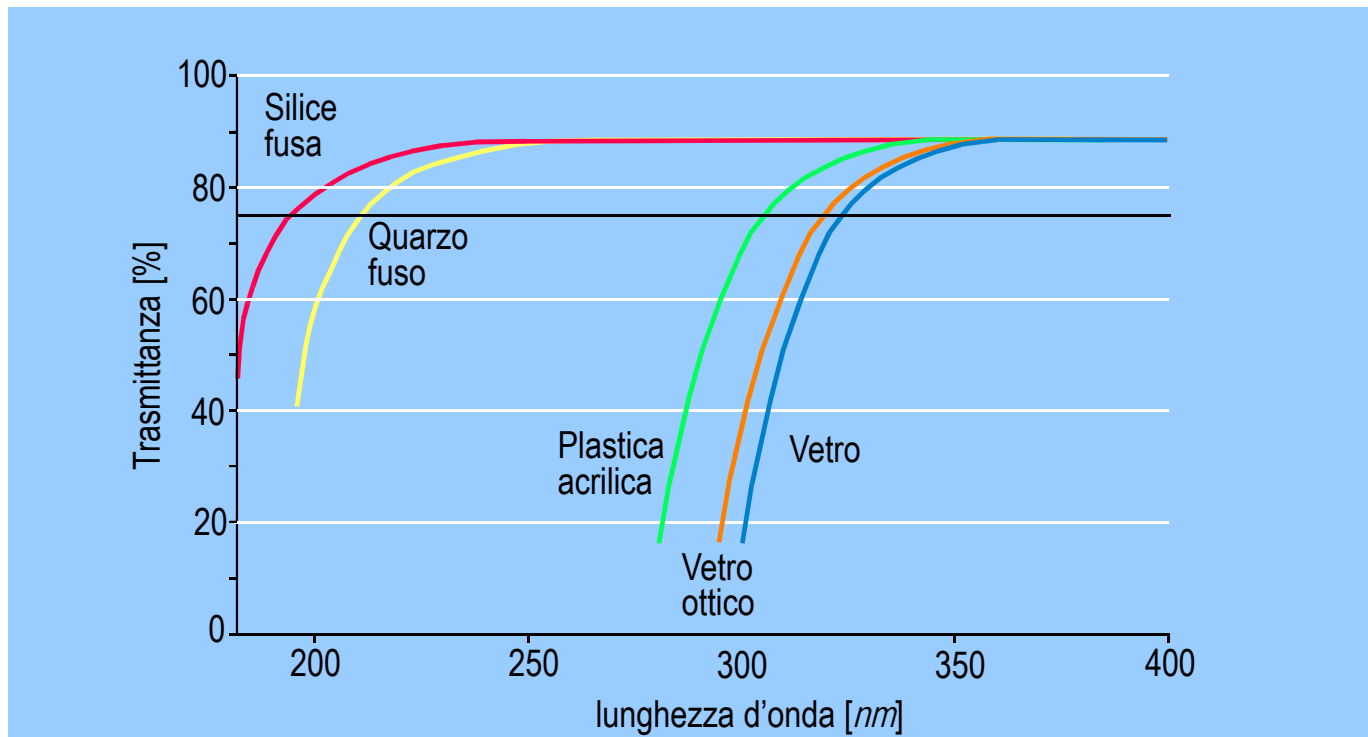
Effetto del Drift



Il drift è una potenziale causa di errore fotometrico e deriva dalle variazioni tra le misure di I_0 e I



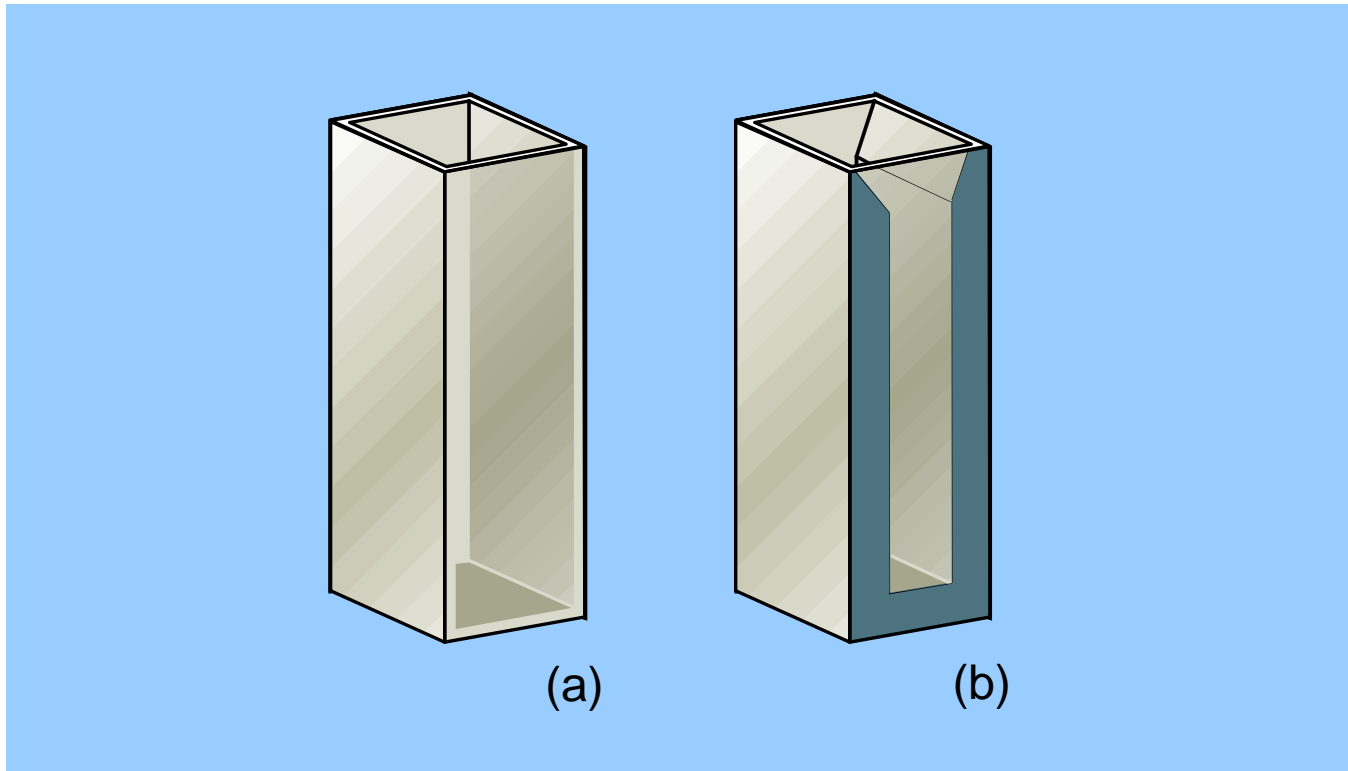
Caratteristiche di Trasmissione dei Materiali di Cella



Notare che tutti i materiali mostrano approssimativamente almeno il 10% di perdita nella trasmittanza a tutte le lunghezze d'onda.



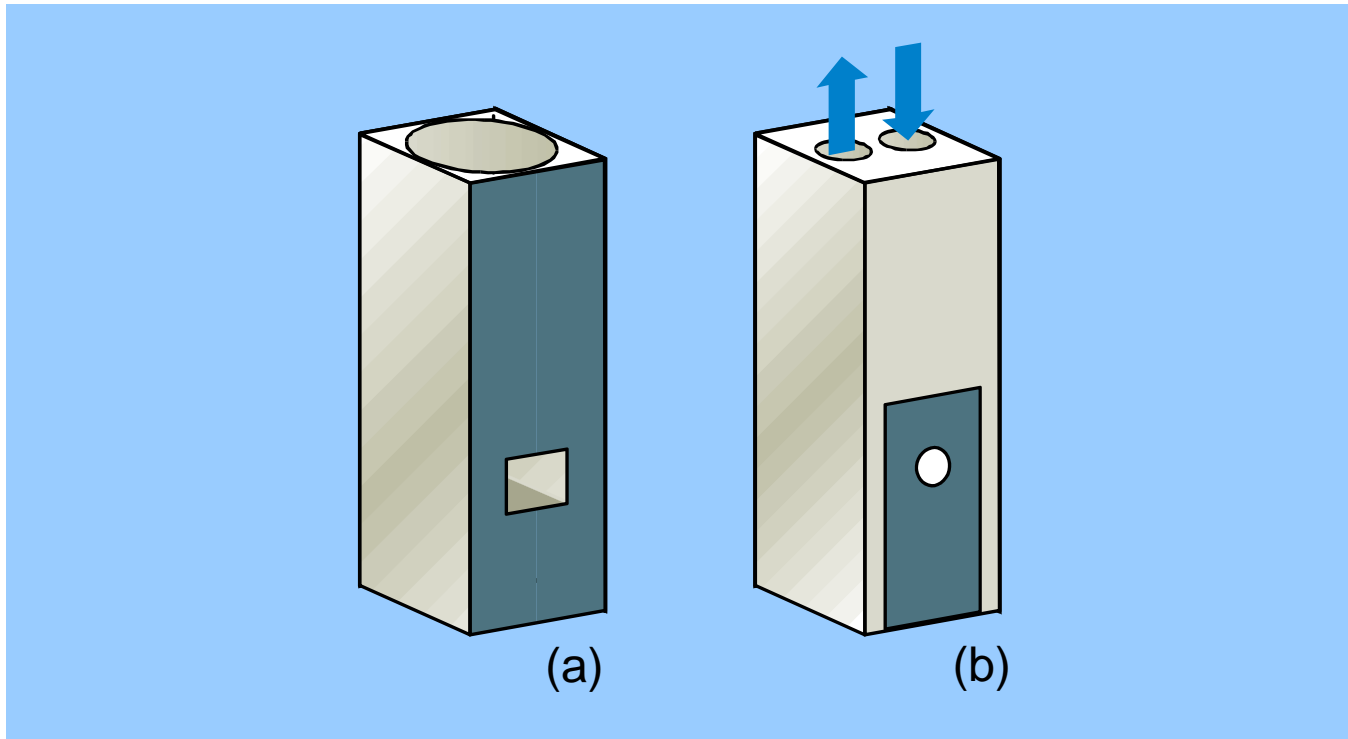
Tipi di Cella 1



Cella Standard rettangolare aperta in testa (a)
e cella con apertura (b) per volumi limitati di campione



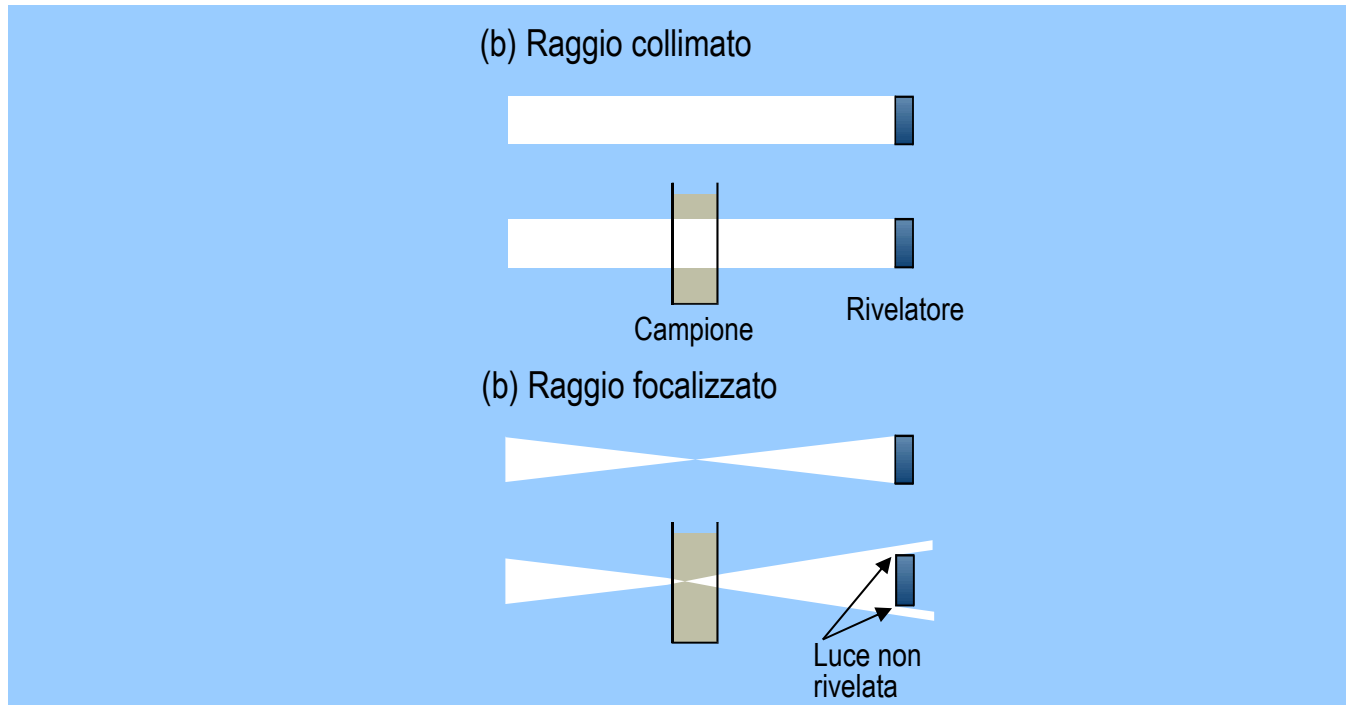
Tipi di Celle (II)



Micro cella (a) per volumi molto piccoli e cella a flusso (b) per applicazioni automatizzate



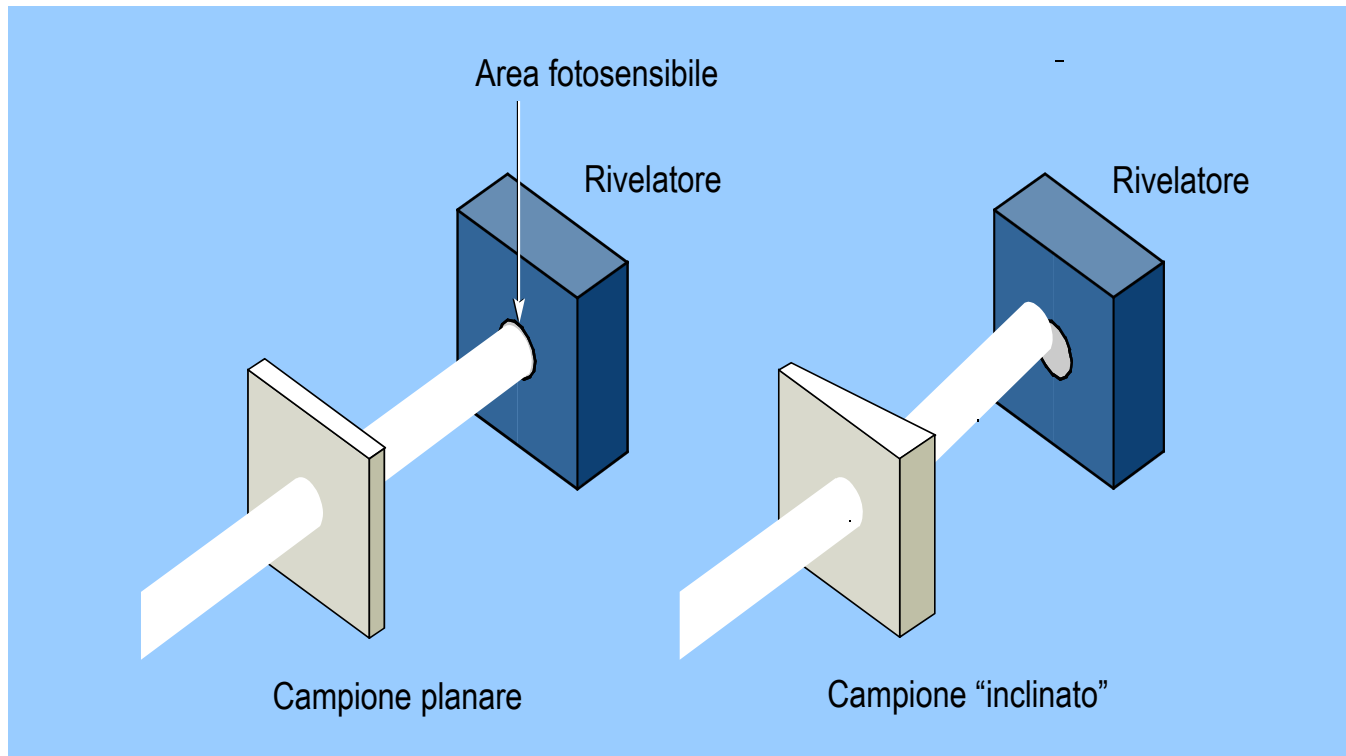
Effetto dell'Indice di Rifrazione



Variazioni nelle misure dell'indice di rifrazione del riferimento e del campione possono causare misure sbagliate di assorbanza



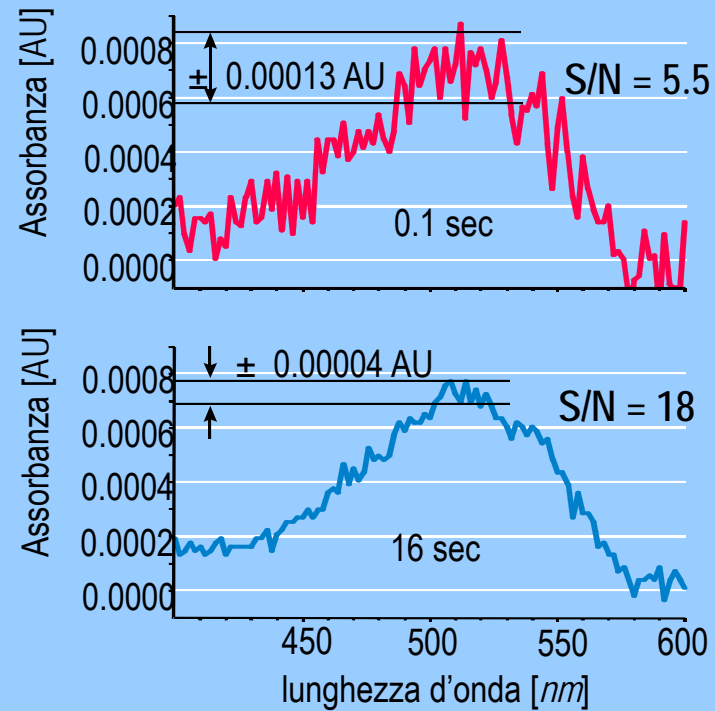
Geometria non Planare del Campione



Alcuni campioni possono agire come componenti ottici attivi nel sistema e deviare o defocalizzare il raggio luminoso



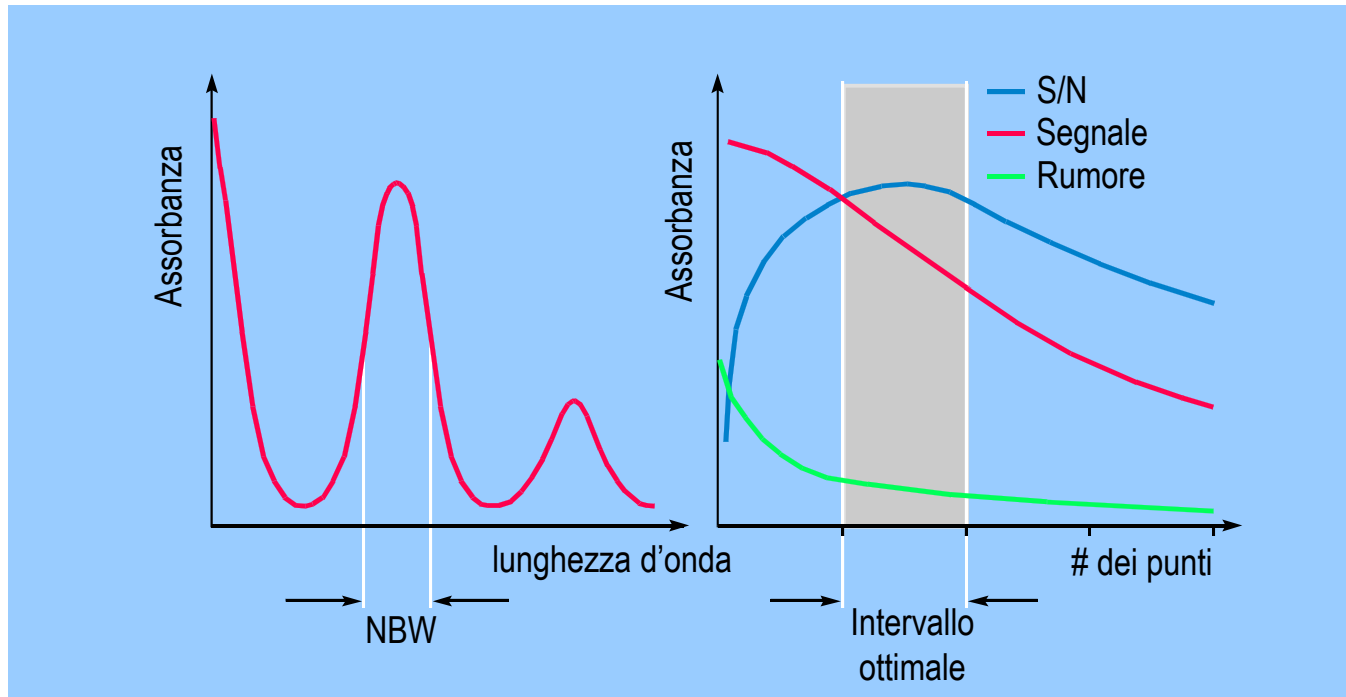
Effetto del Tempo di Integrazione



Mediare i dati raccolti riduce il rumore di fondo della radice quadrata del numero dei punti mediati



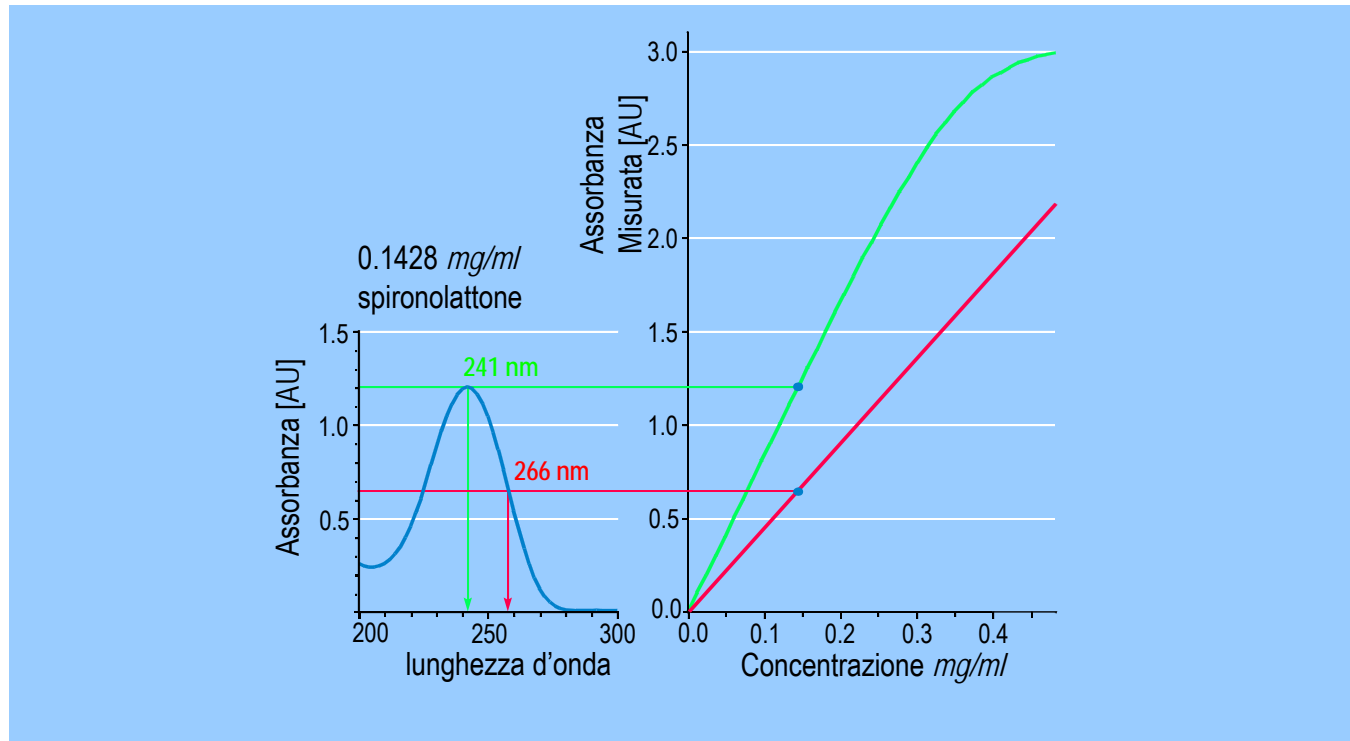
Effetto della Media sulle Lunghezze d'Onda



- Mediare le lunghezze d'onda riduce anche il rumore (della radice quadrata dei punti raccolti)
- L'ampiezza del segnale viene influenzata



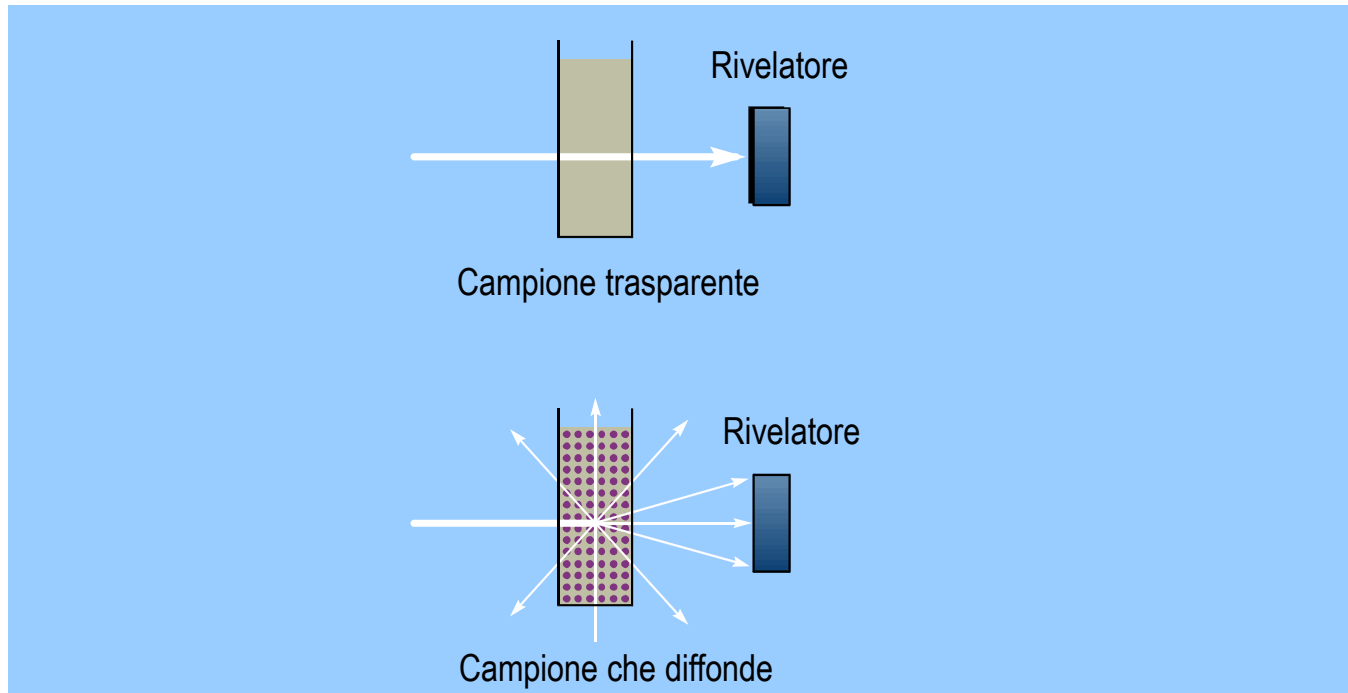
Aumento dell'Intervallo Dinamico



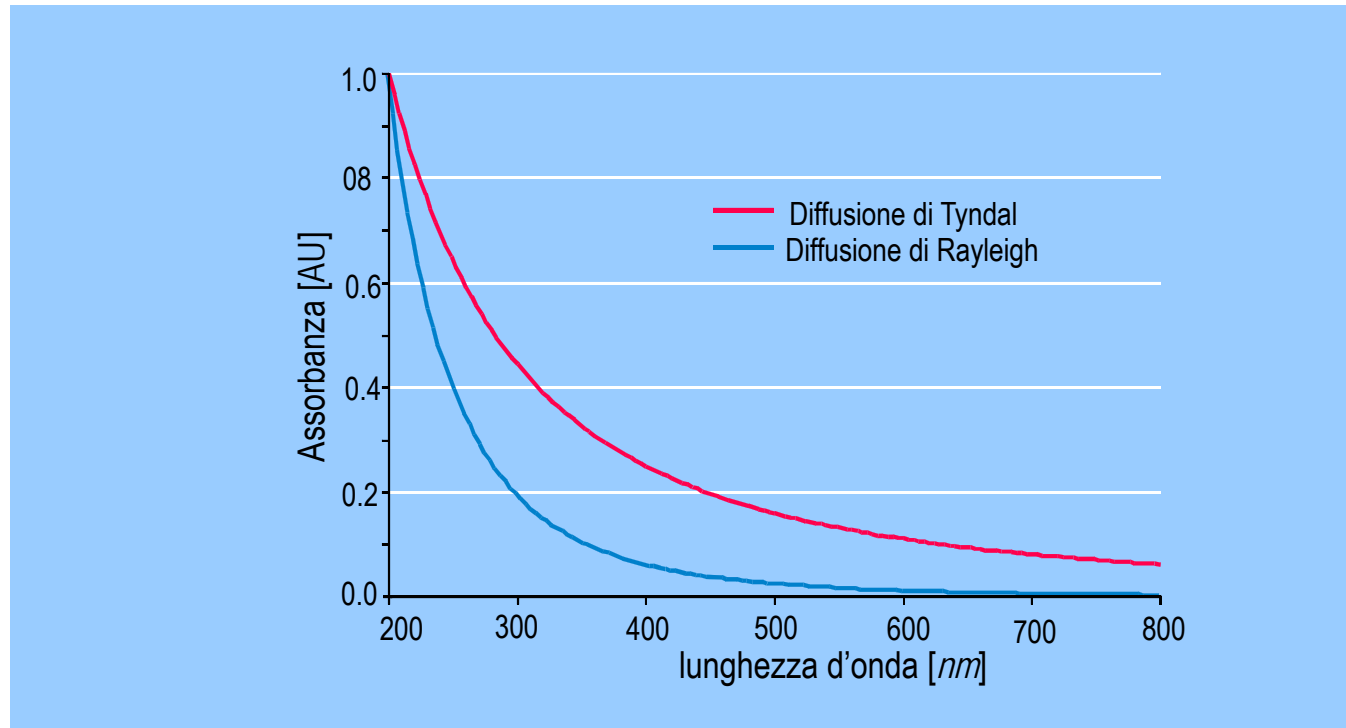
La scelta di una lunghezza d'onda nella pendenza di una banda di assorbimento può aumentare l'intervallo dinamico ed evitare la preparazione del campione come la diluizione



Diffusione



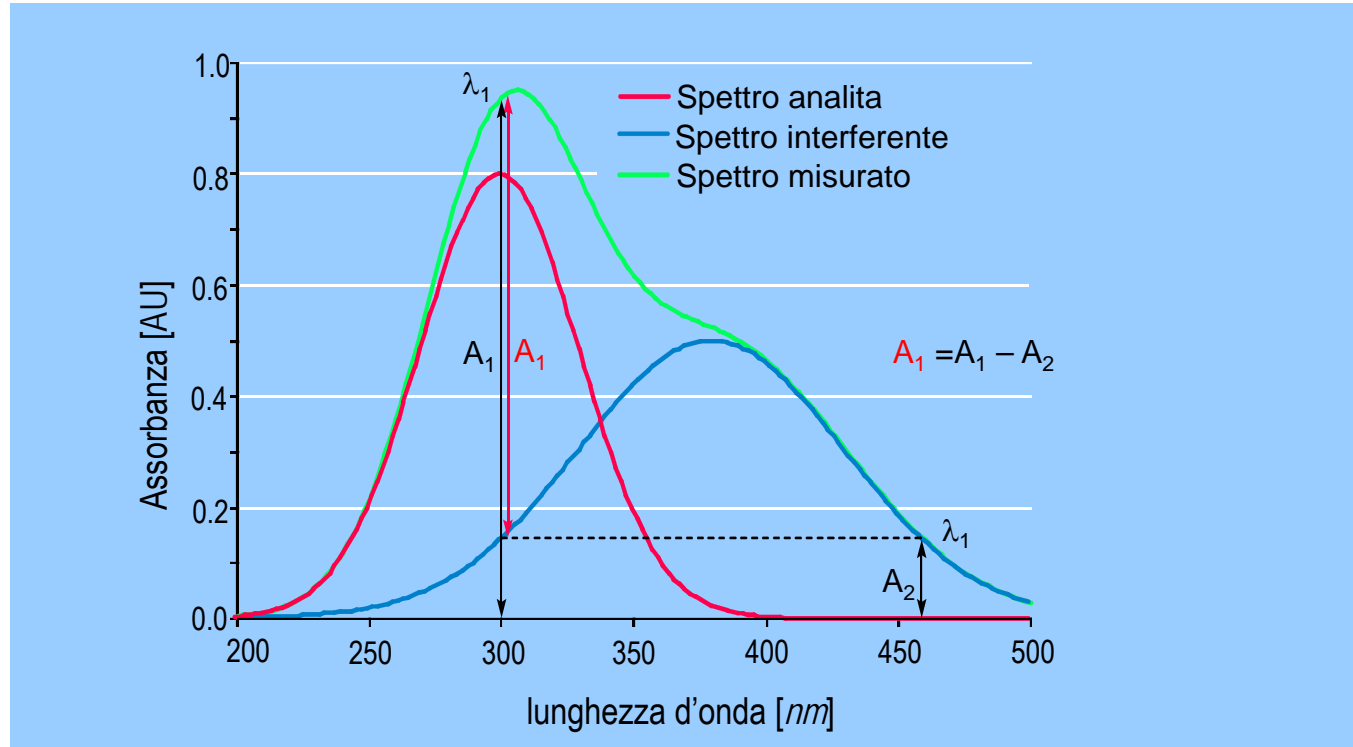
La dispersione causa un assorbanza apparente in quanto meno luce raggiunge il rivelatore



- Diffusione di Rayleigh : Particelle piccole rispetto alla lunghezza d'onda
- Diffusione di Tyndall : Particelle grandi rispetto alla lunghezza d'onda



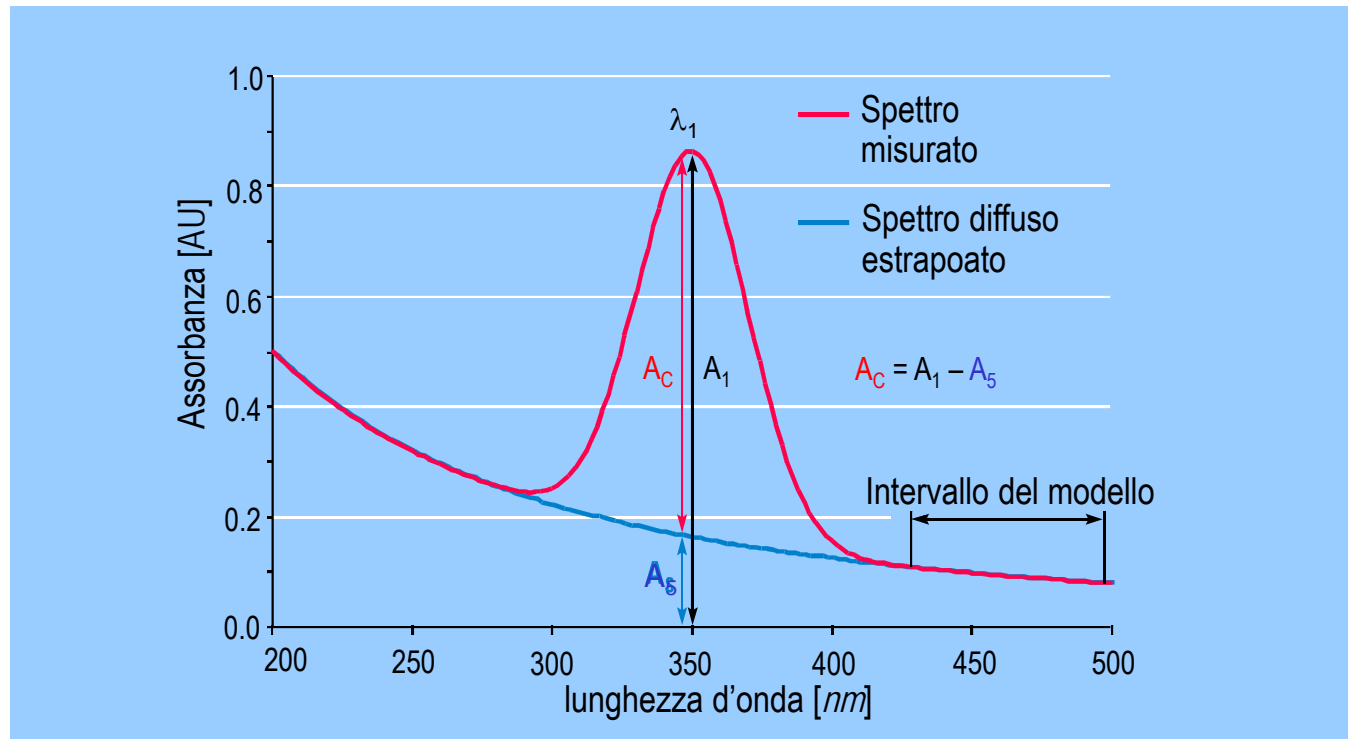
Correzioni per Isoassorbanza



L'assorbanza alla lunghezza d'onda di riferimento deve essere equivalente all'interferenza alla lunghezza d'onda analitica



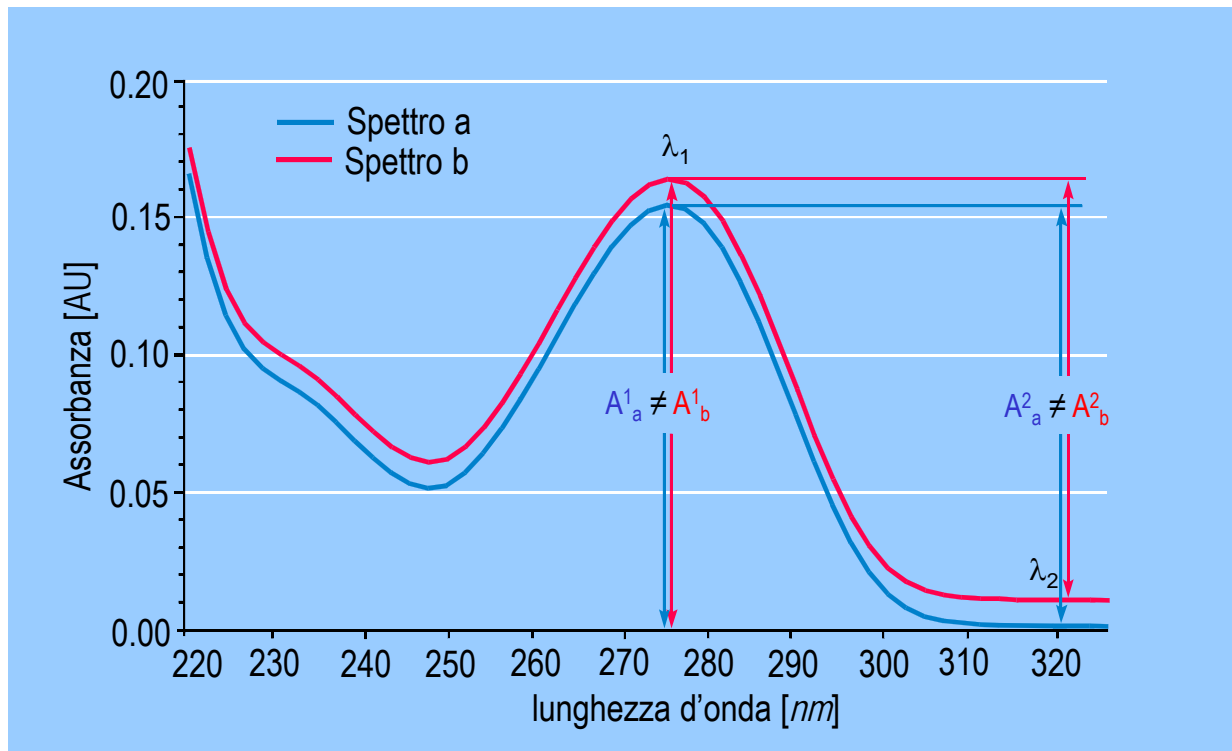
Modellizzazione del Fondo



Si può eseguire la modellizzazione del fondo se l'interferenza è dovuta ad un processo fisico



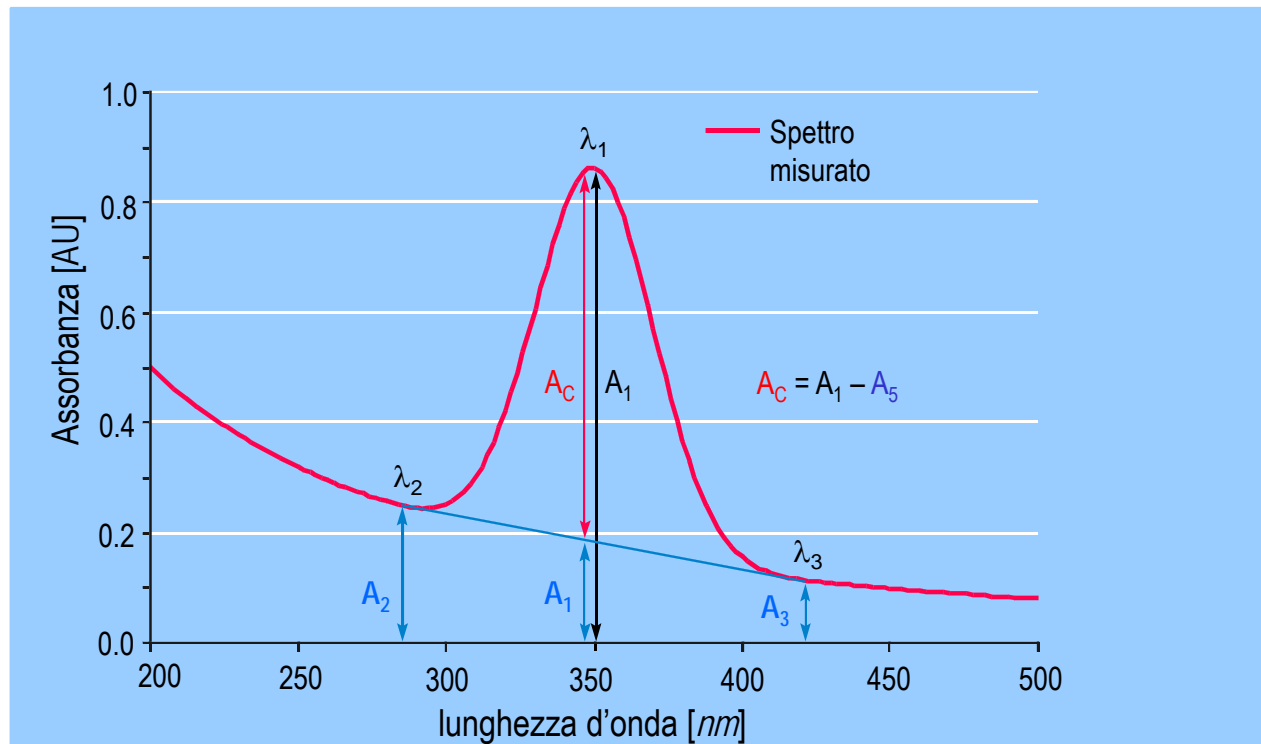
Riferimenti Interni



Corregge per la costante assorbance del fondo su un intervallo



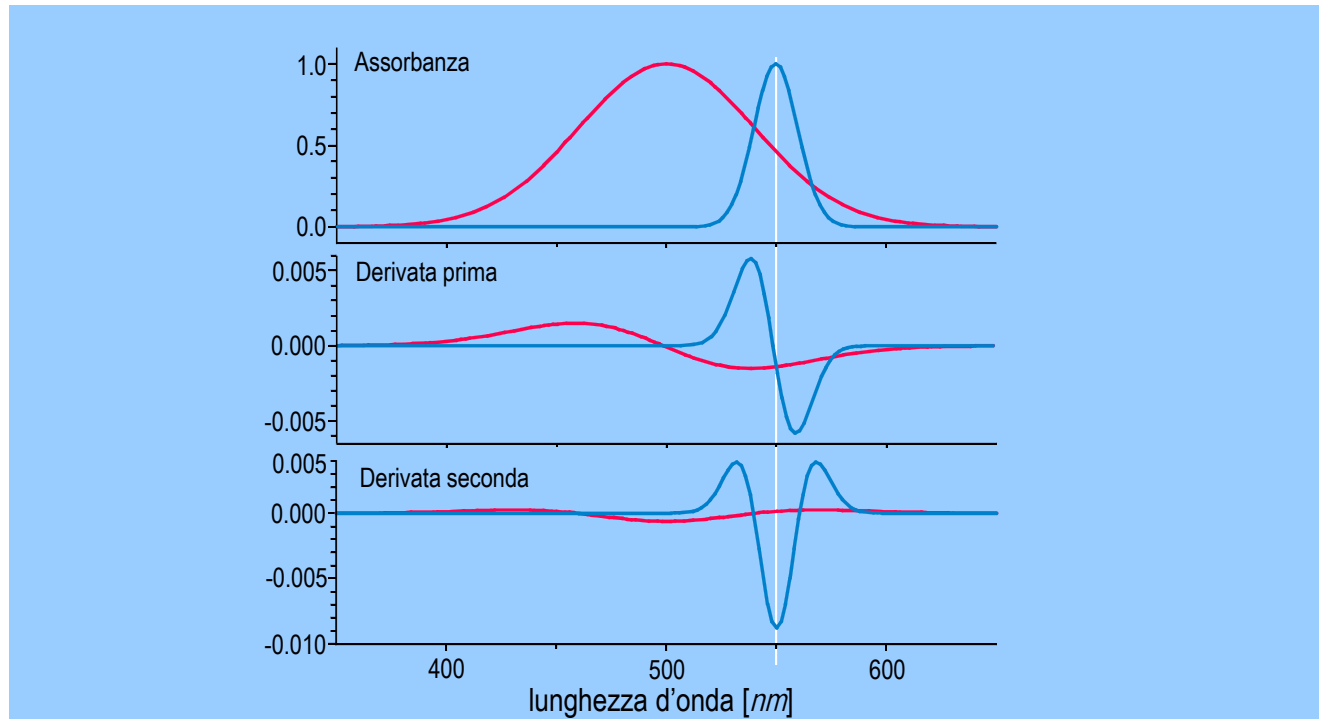
Correzione a Tre Punti



- Uses two reference wavelengths
- Corrects for sloped linear background absorbance



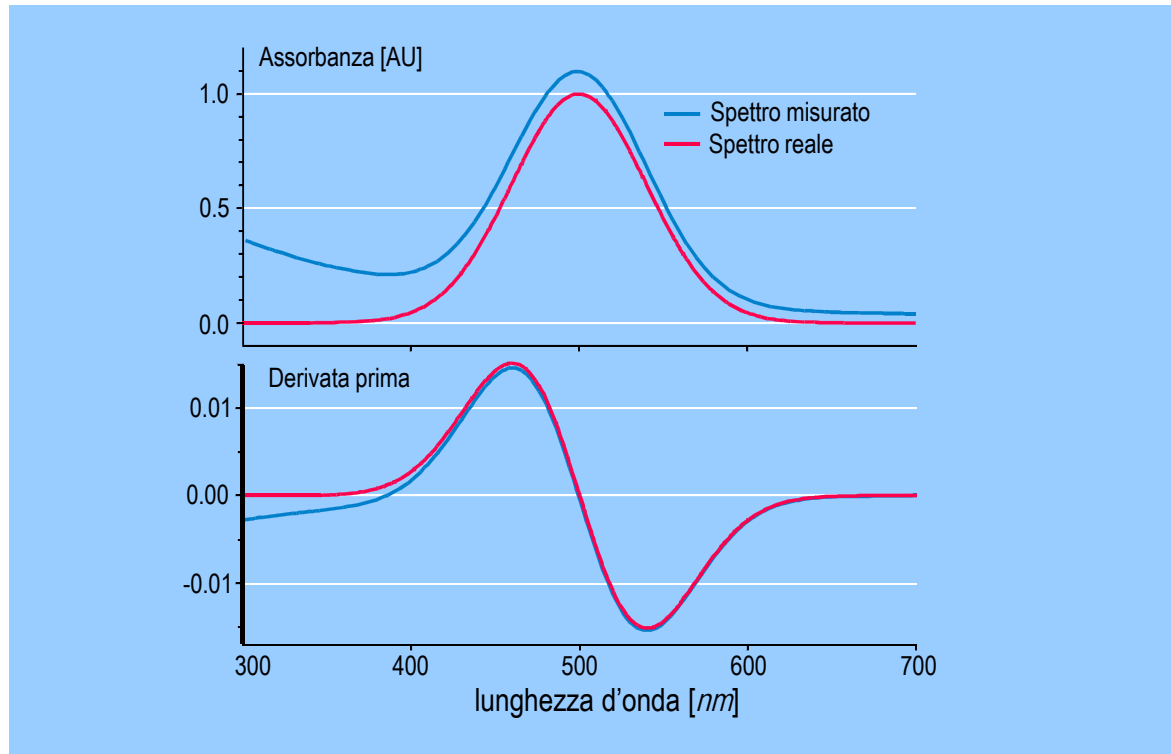
Discriminazione delle Bande Larghe



- Le derivate possono eliminare l'assorbimento di fondo
- Le derivate discriminano rispetto alle ampie bande di assorbimento



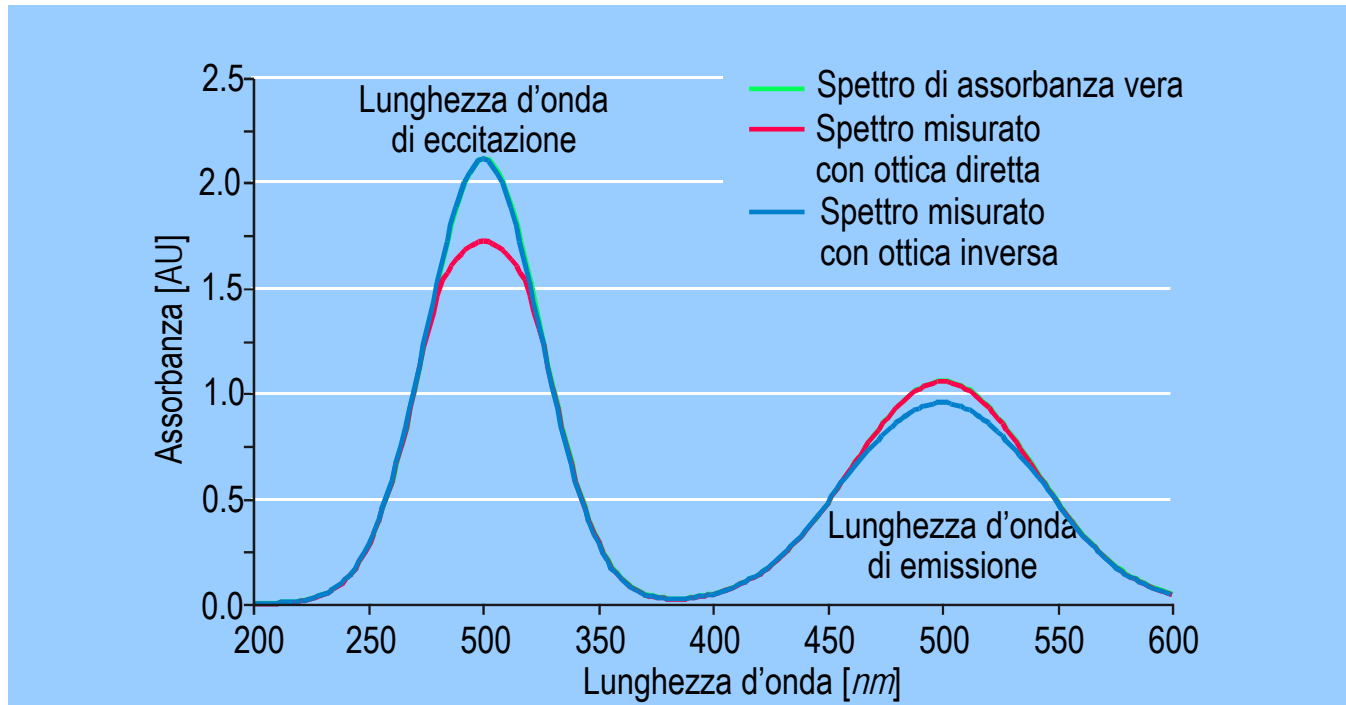
Correzione della Diffusione per Spettroscopia Derivata



La diffusione è discriminata come una banda ampia di assorbanza



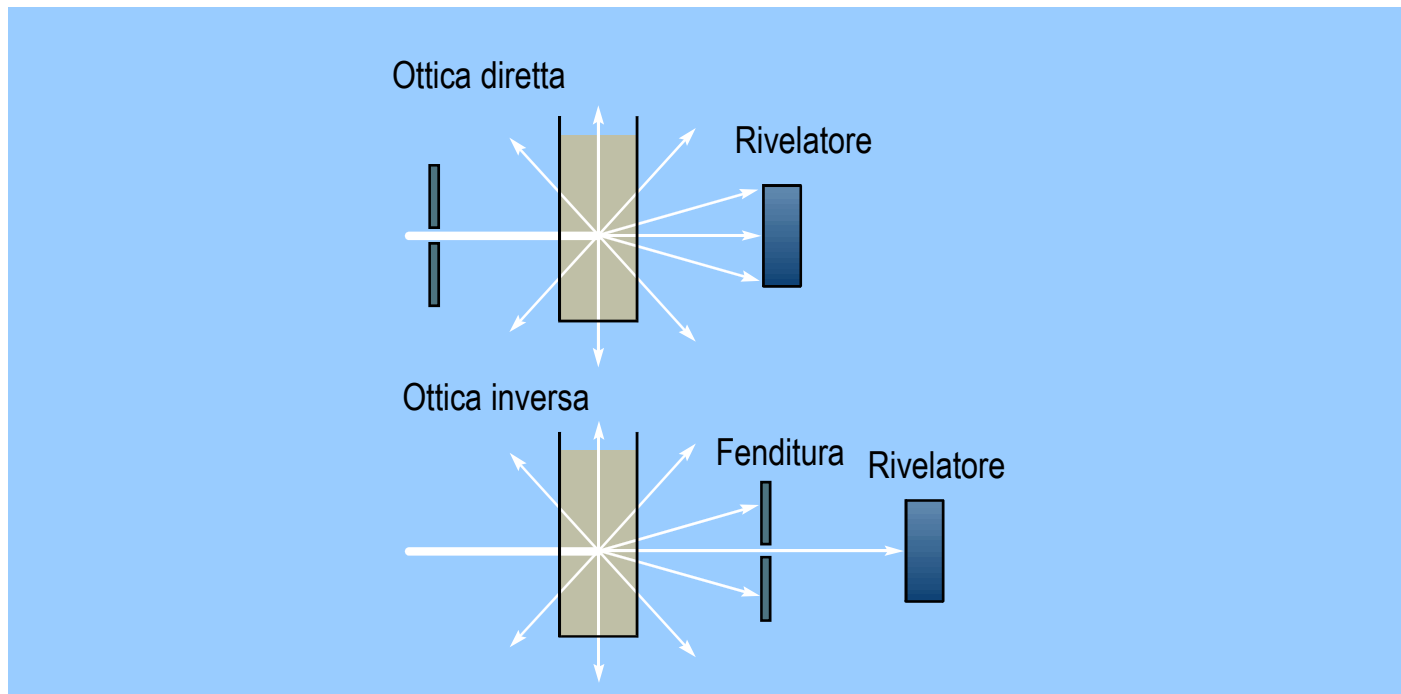
Effetto della Fluorescenza



La luce emessa da un campione fluorescente causa un errore nella misura dell'assorbanza



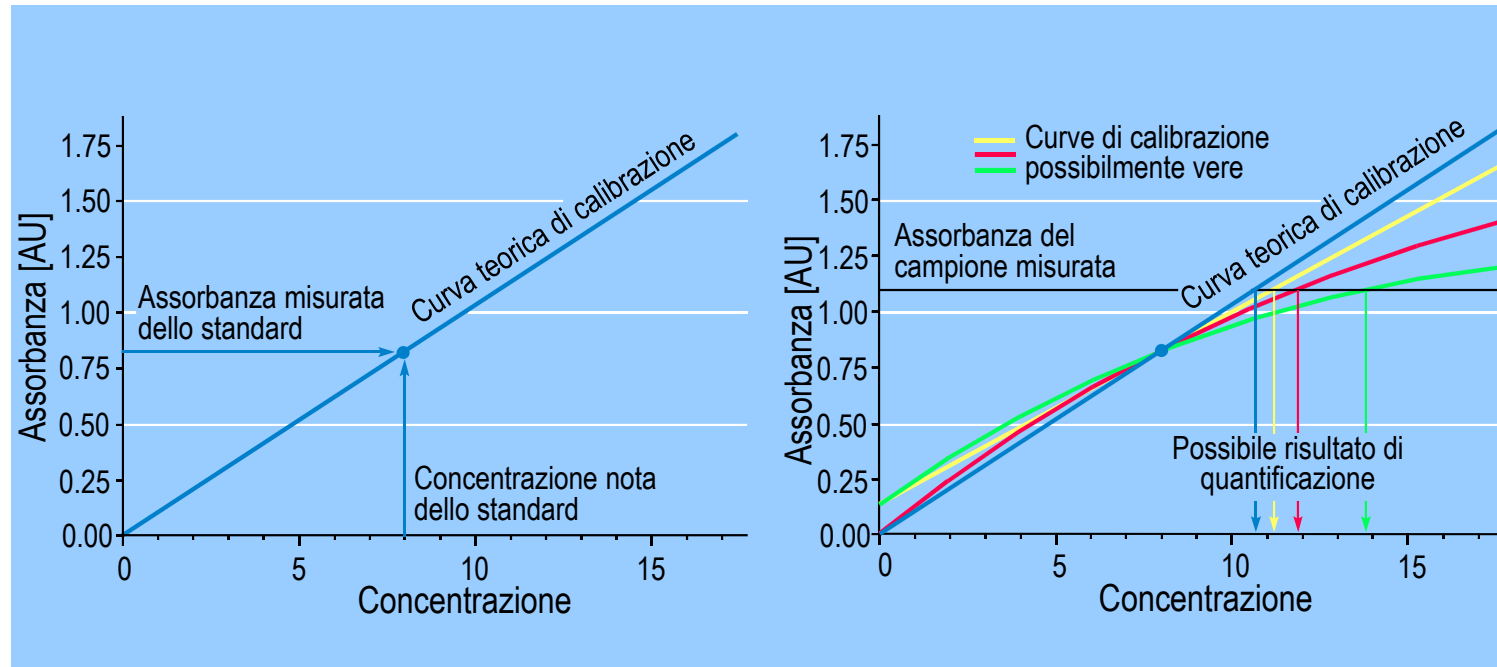
Angoli di Accettazione e Grandezza dell'Errore di Fluorescenza



- Ottica Diretta: Assorbanza alla lunghezze d'onda di eccitazione sono troppo basse
- Ottica inversa: Assorbanza alla lunghezze d'onda di emissione sono troppo basse



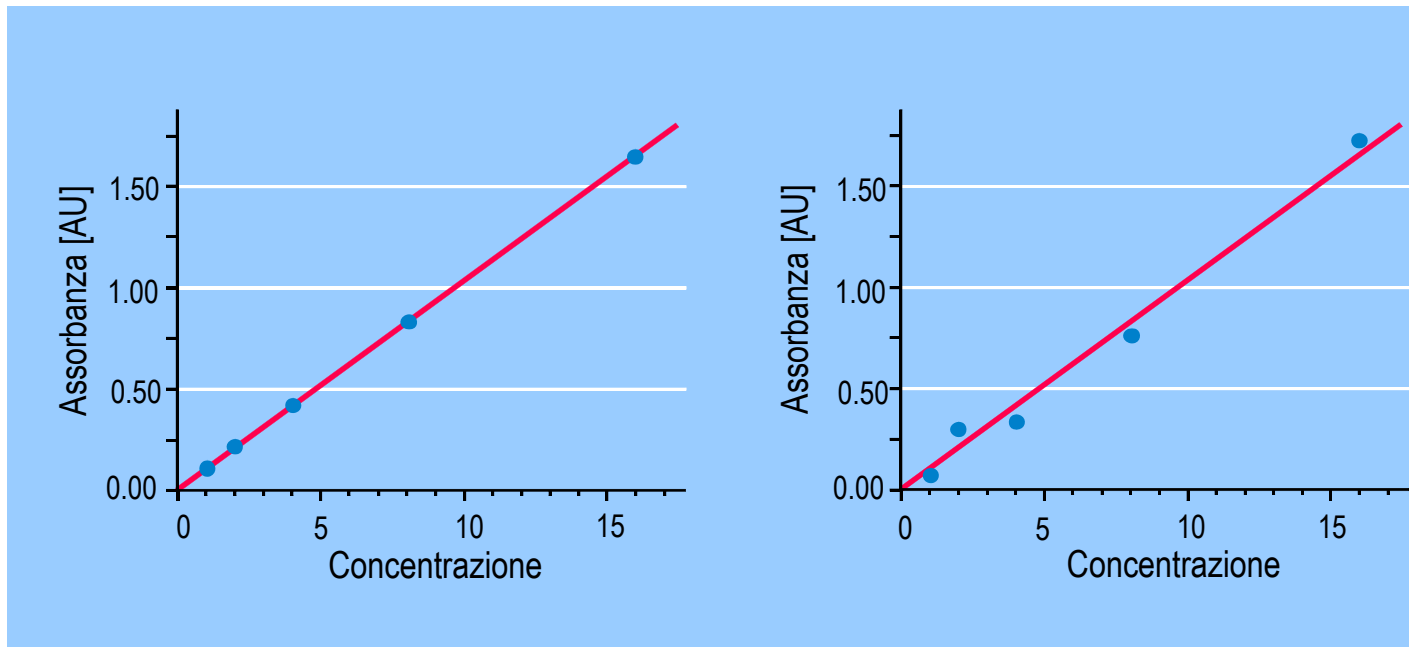
Calibrazione Inadeguata



- Teoricamente si richiede solo uno standard per calibrare
- In pratica, deviazioni dalla legge di Beer possono causare risultare sbagliati



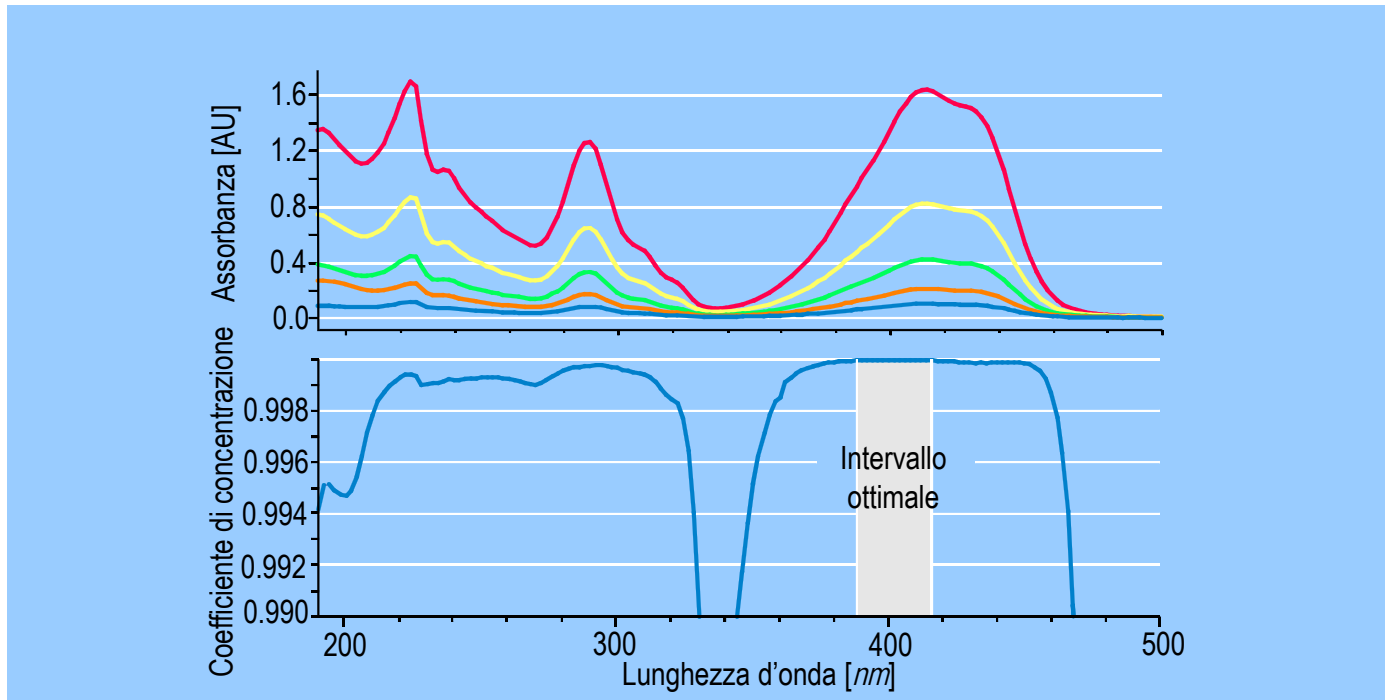
Insieme di Dati di Calibrazione



- Ottica Diretta: Assorbanza alla lunghezze d'onda di eccitazione sono troppo basse
- Ottica inversa: Assorbanza alla lunghezze d'onda di emissione sono troppo basse



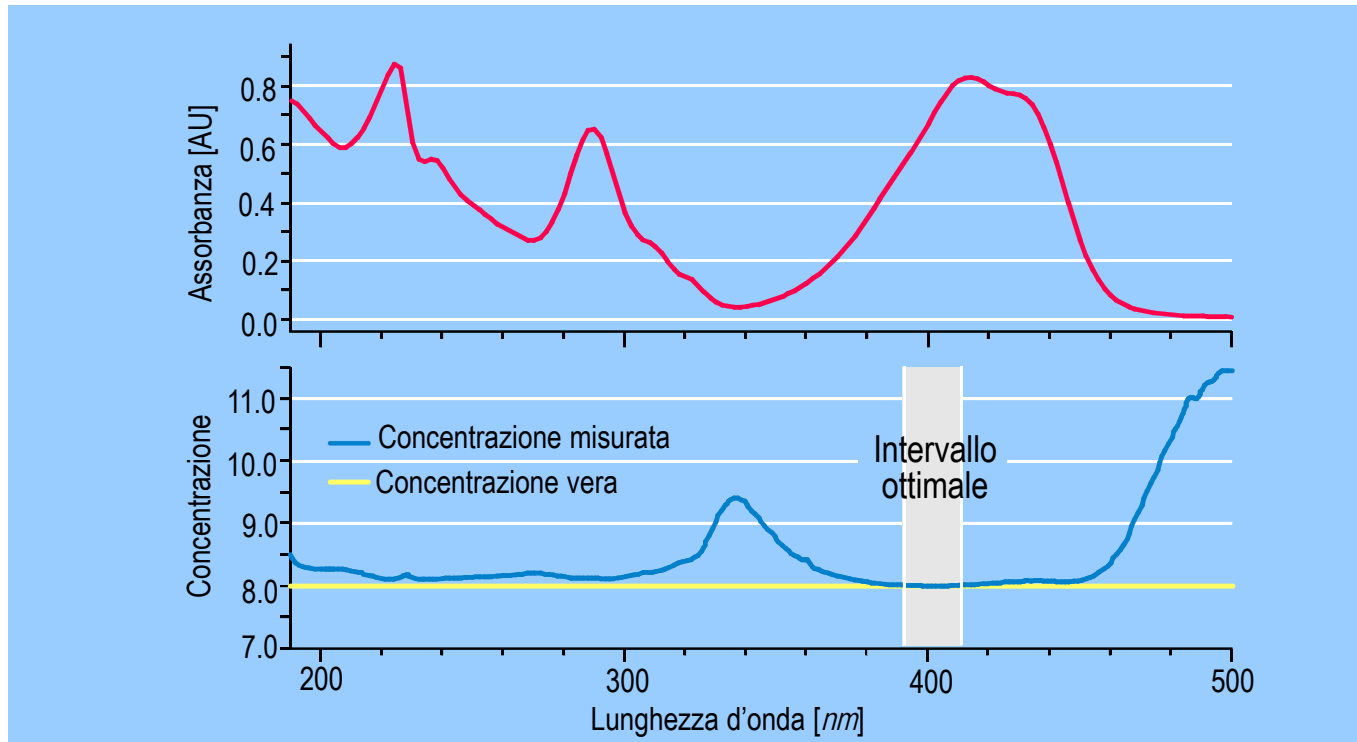
Lunghezza(e) d'Onda per la Migliore Linearità



- Una curva lineare di calibrazione è calcolata ad ogni lunghezza d'onda
- Il coefficiente di correlazione da una stima della linearità



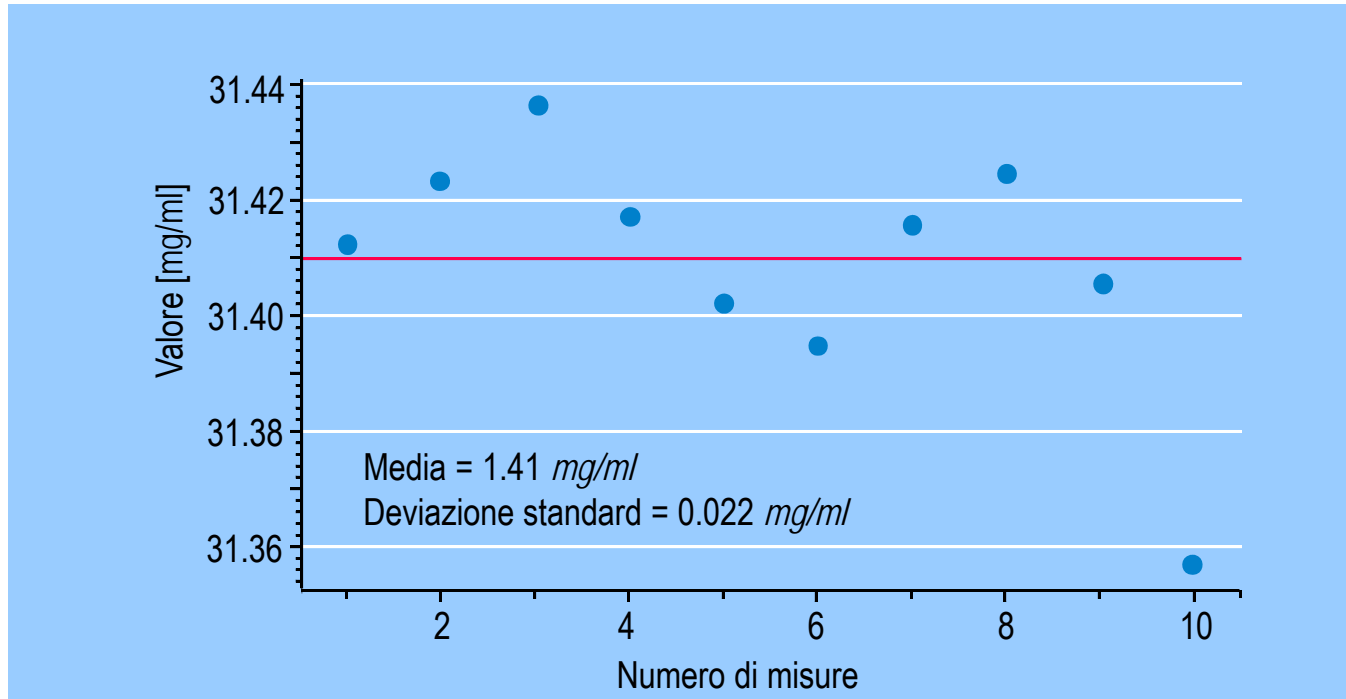
Lunghezza(e) d'Onda per la Migliore Accuratezza



- I risultati di quantificazione sono ora calcolati ad ogni lunghezza d'onda
- Le concentrazioni calcolate danno una stima dell'accuratezza



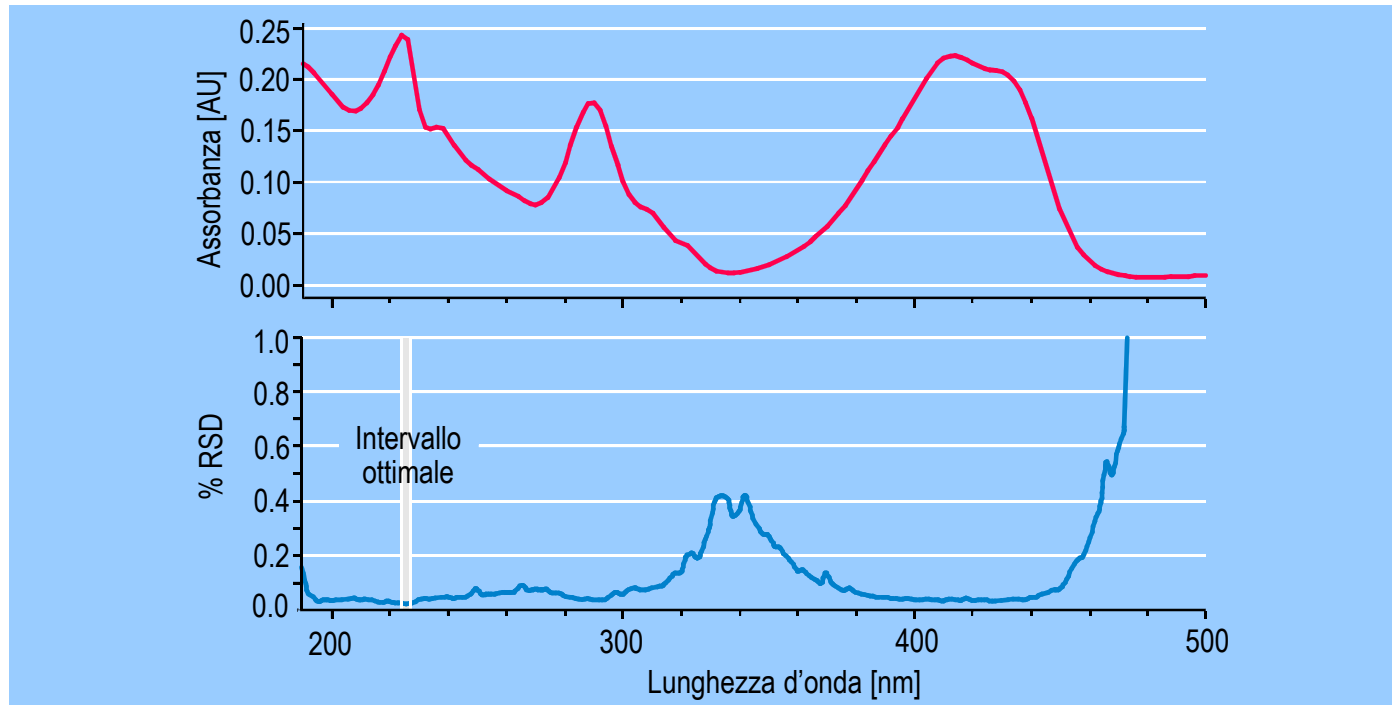
Precisione di una Analisi



La precisione di un metodo è il grado di accordo tra i singoli risultati delle prove quando si applica ripetutamente la procedura a campionamenti multipli



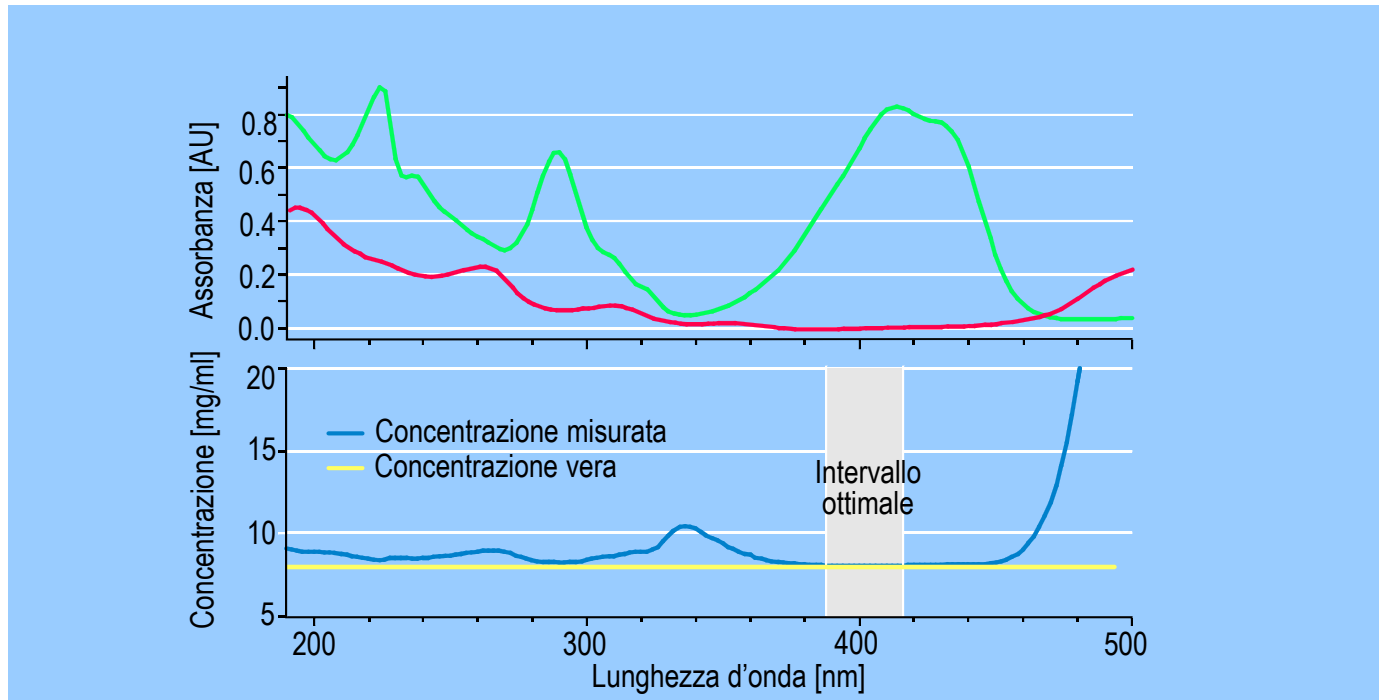
Lunghezza(e) d'Onda per la Migliore Sensibilità



- Il calcolo della deviazione standard relativa dei valori misurati ad ogni lunghezza d'onda
- La lunghezza d'onda con la RSD % inferiore possibilmente fornirà la migliore sensibilità



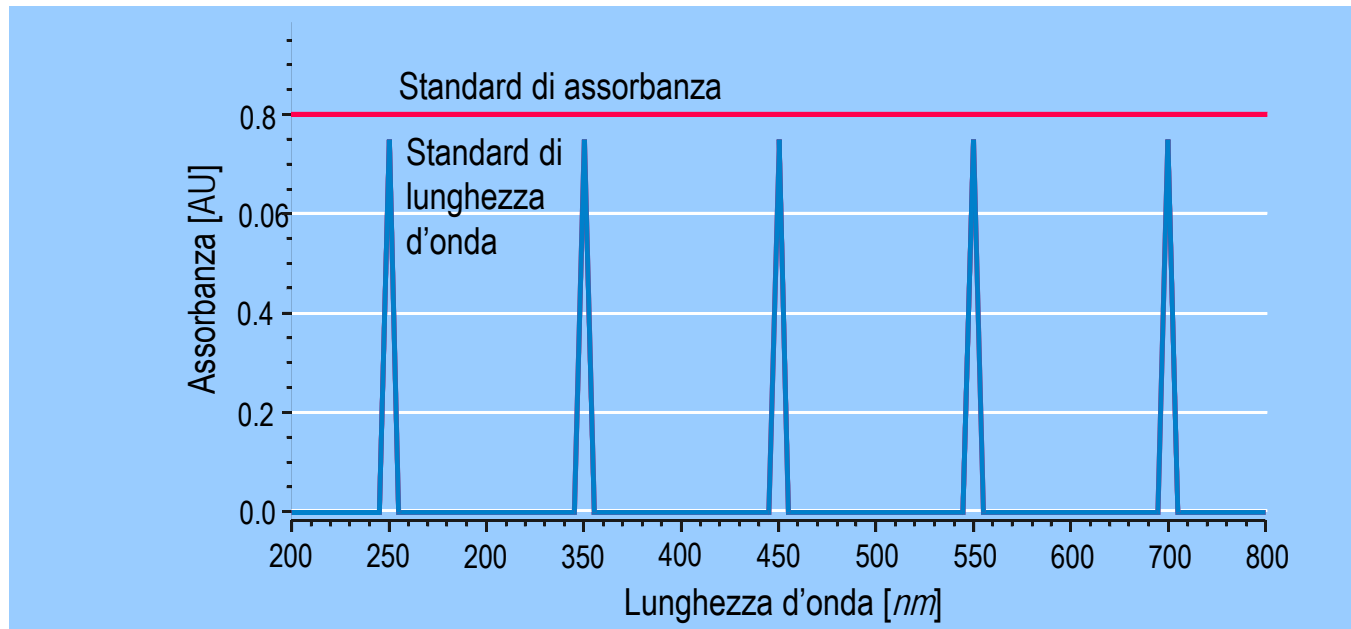
Lunghezza(e) d'Onda per la Migliore Selettività



La selettività è l'abilità di un metodo a quantificare accuratamente e specificamente l'analita o analiti in presenza di altri composti



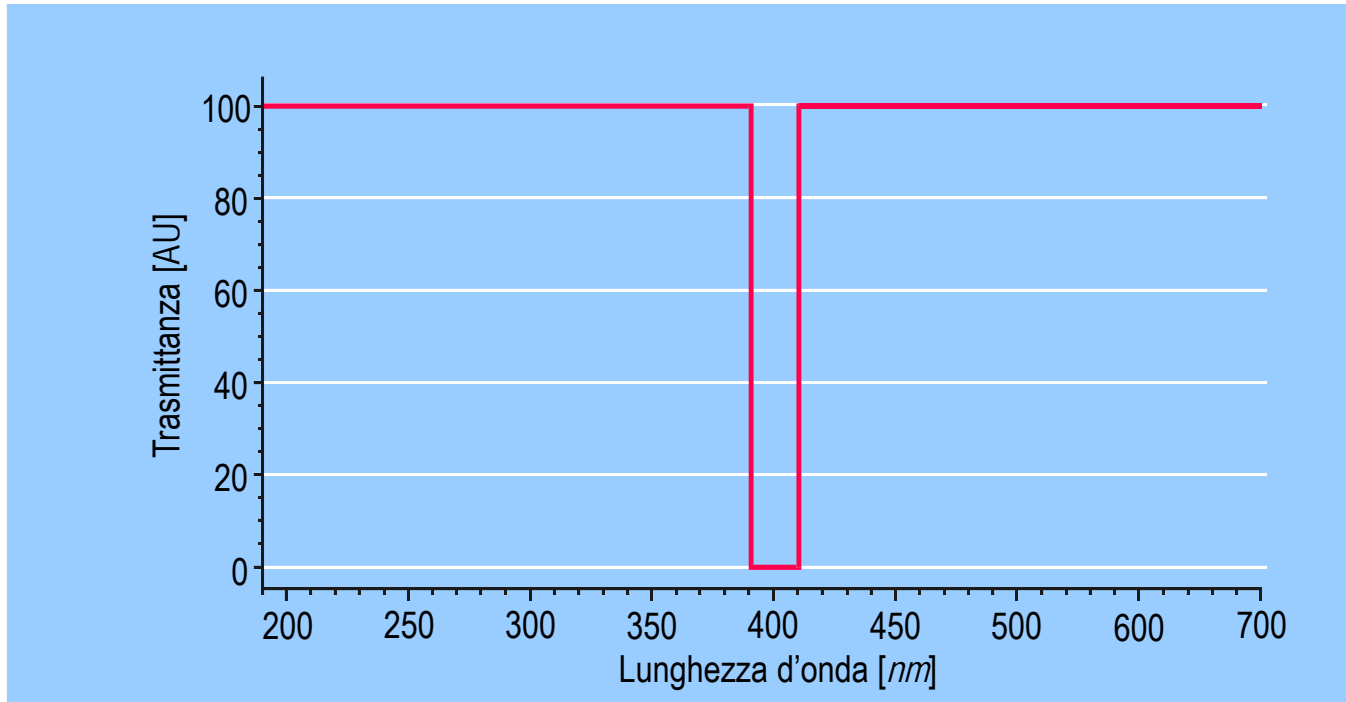
Assorbanza Ideale e Standard di Lunghezza d'Onda



- Uno standard ideale di assorbanza dovrebbe avere una assorbanza costante a tutte le lunghezze d'onda
- Uno standard ideale di lunghezza d'onda dovrebbe avere picchi molto stretti e ben-definiti



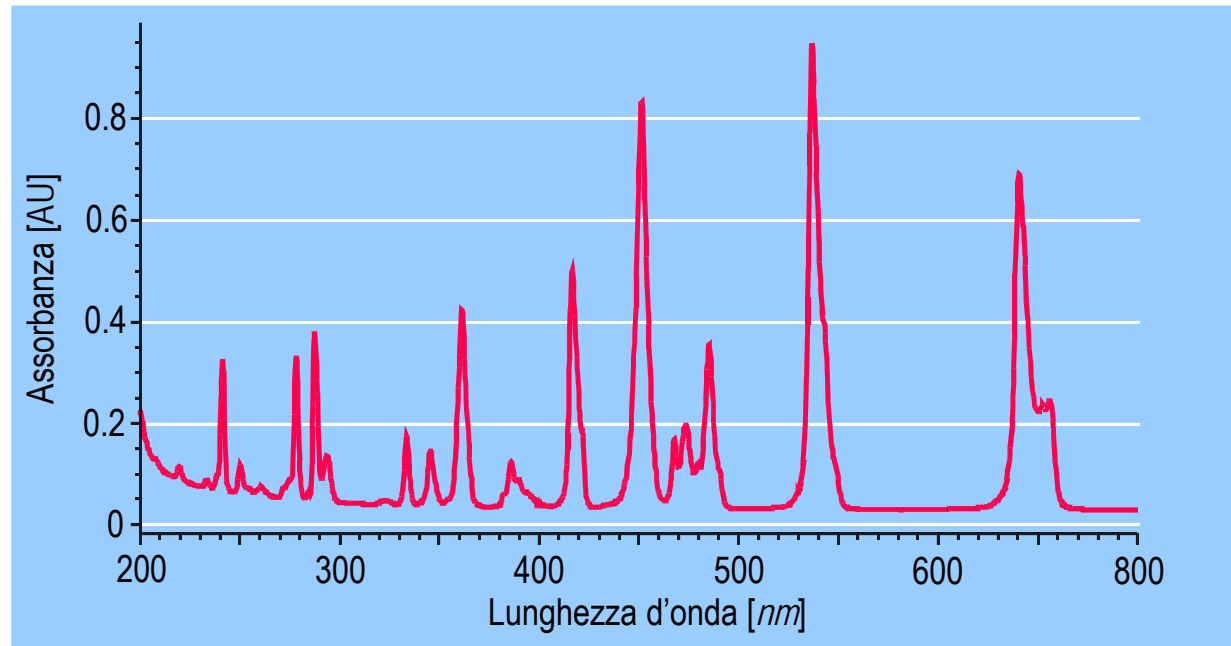
Filtro Ideale per Luce Diffusa



Un filtro ideale di luce diffusa dovrebbe trasmettere tutte le lunghezze d'onda eccetto quelle usate per misurare la luce diffusa



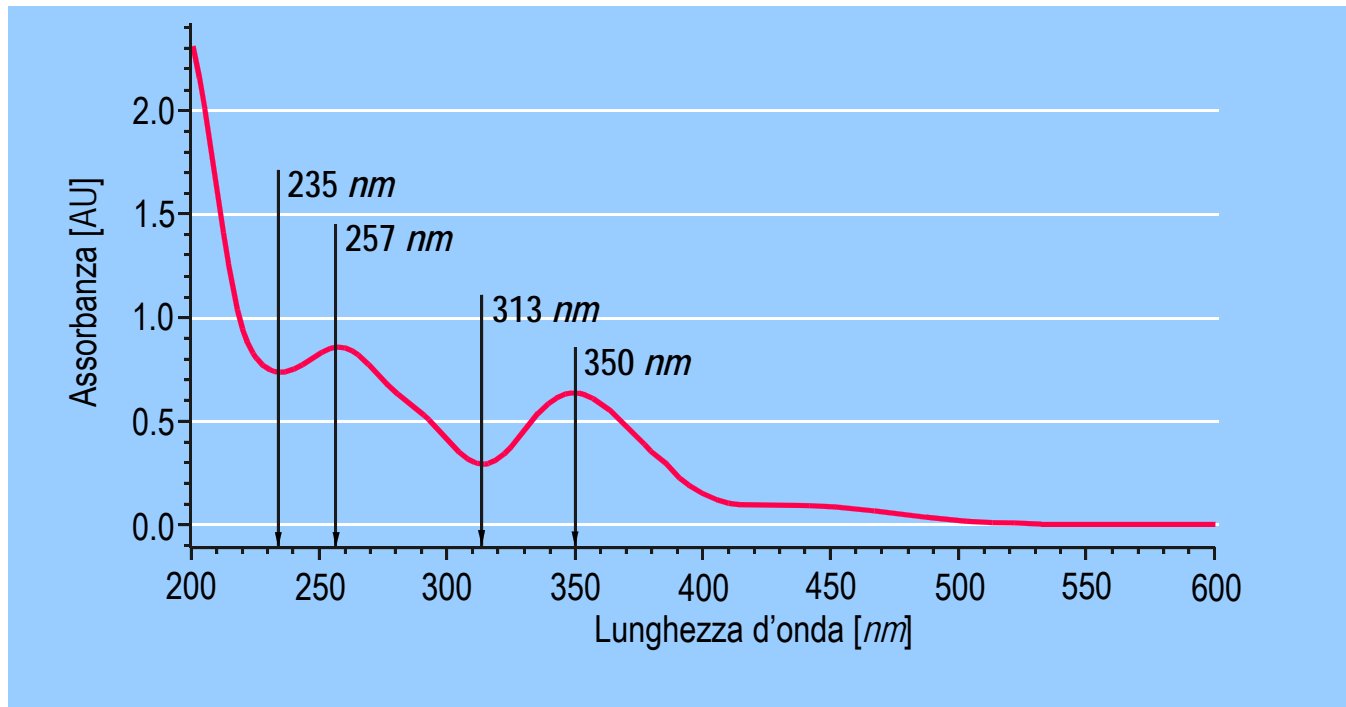
Soluzione di Perclorato di Olmio



Il più comune standard per l'accuratezza della lunghezza d'onda è il perclorato di olmio



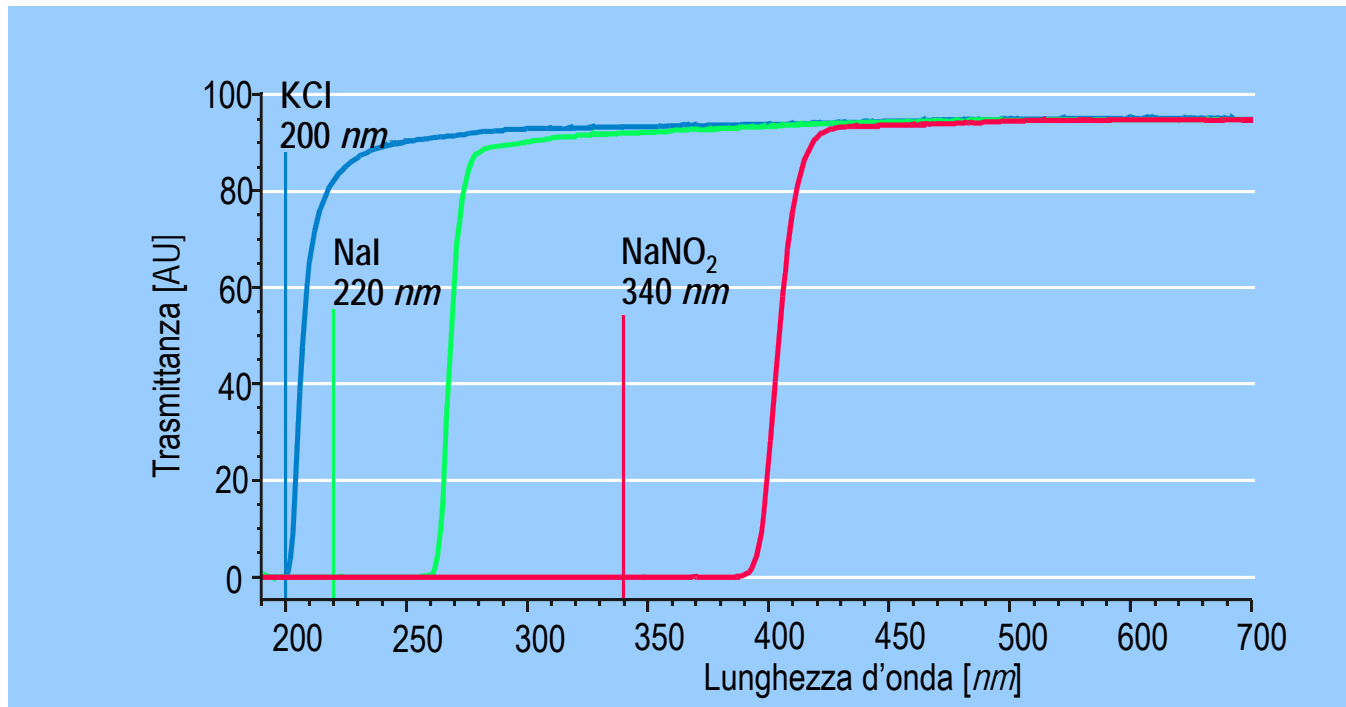
Soluzione di Dicromato di Potassio



Lo standard di accuratezza fotometrica richiesto da molte farmacopee è una soluzione di bicromato di potassio



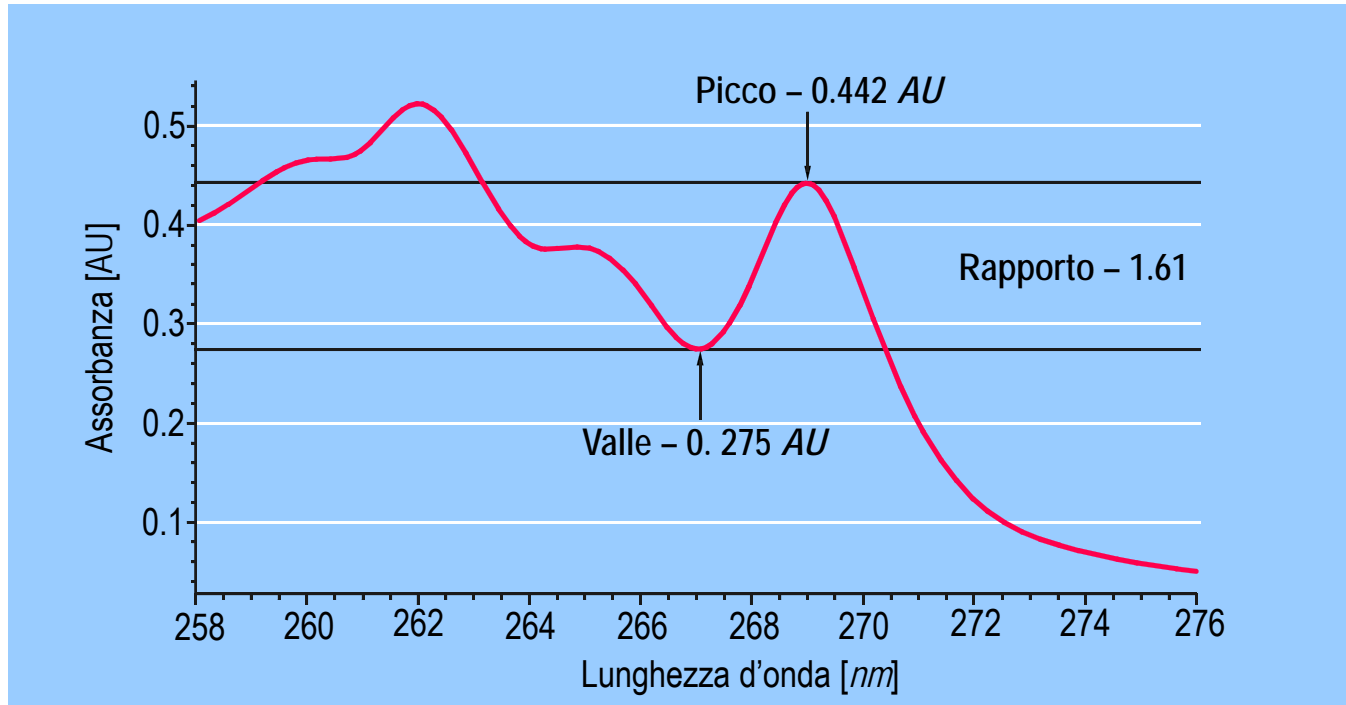
Soluzioni Standard per Luce Diffusa



I più comuni standard per luce diffusa e le rispettive lunghezze d'onda usate



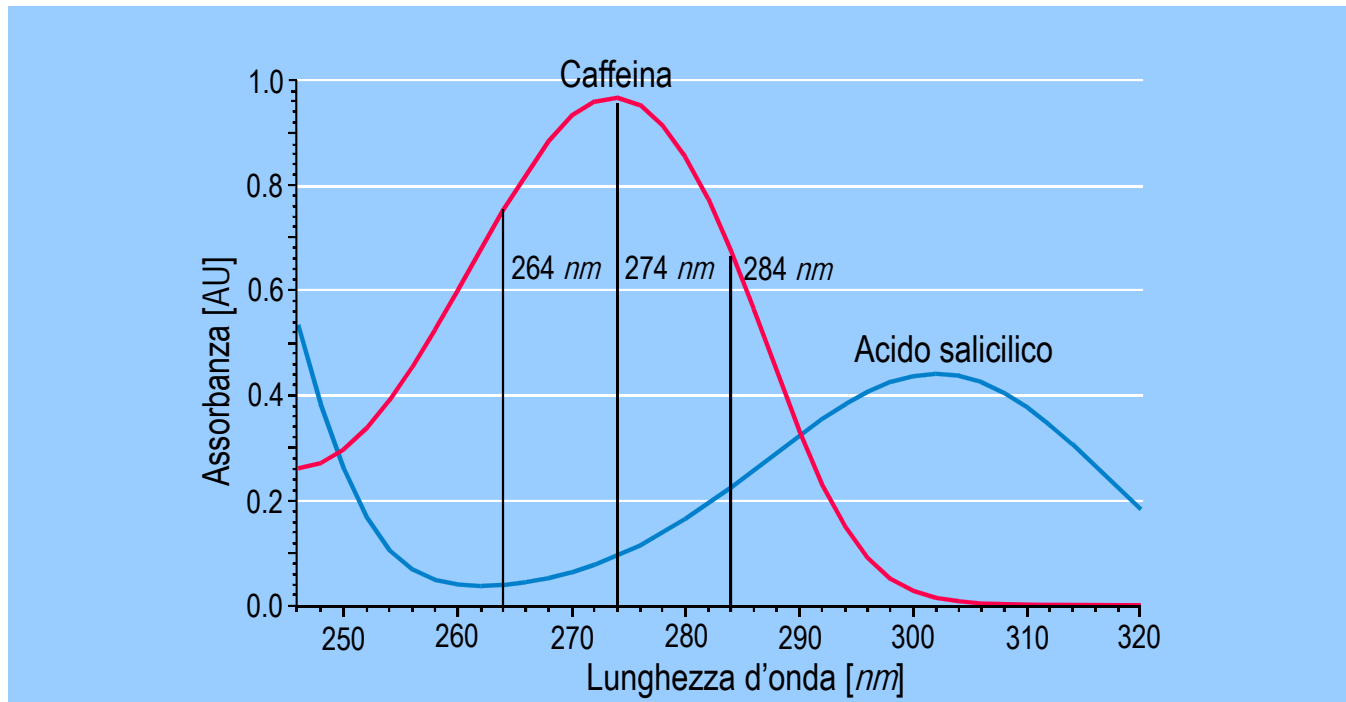
Toluene in Esano (0.02% v/v)



La risoluzione è stimata prendendo il rapporto dell'assorbanza del massimo vicino a 269 *nm* e il minimo vicino a 266 *nm*.



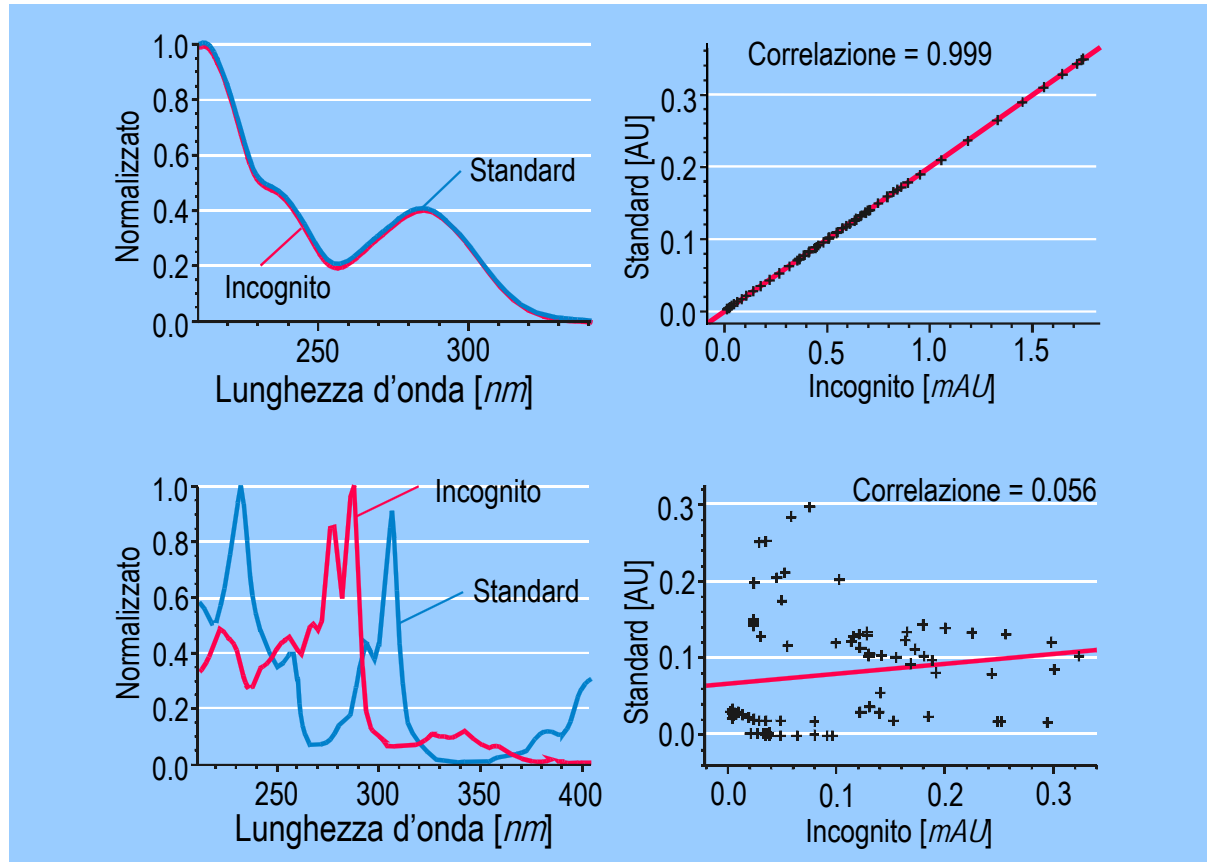
Analisi di Conferma



Nell'analisi di conferma, si usa l'assorbanza ad una o più ulteriori lunghezze d'onda per quantificare un campione



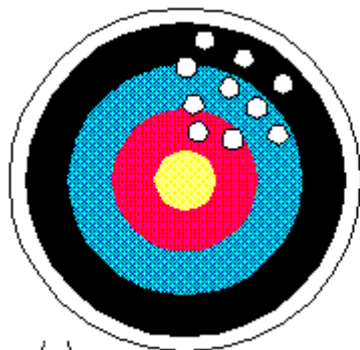
Similarità Spettrale



Grafici comparativi di spettri simili e dissimili

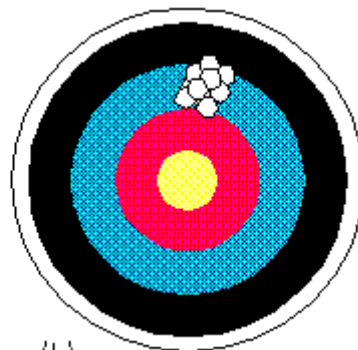


Precisione e Accuratezza



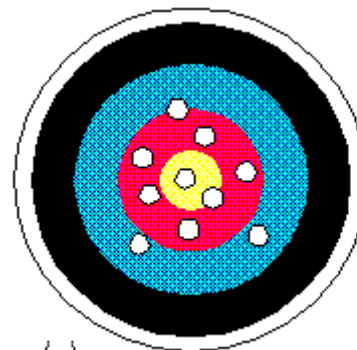
(a)

Precisione —
Accuratezza —



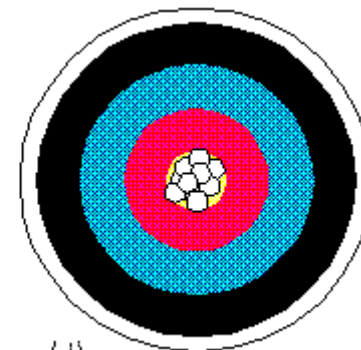
(b)

Precisione +
Accuratezza —



(c)

Precisione —
Accuratezza +



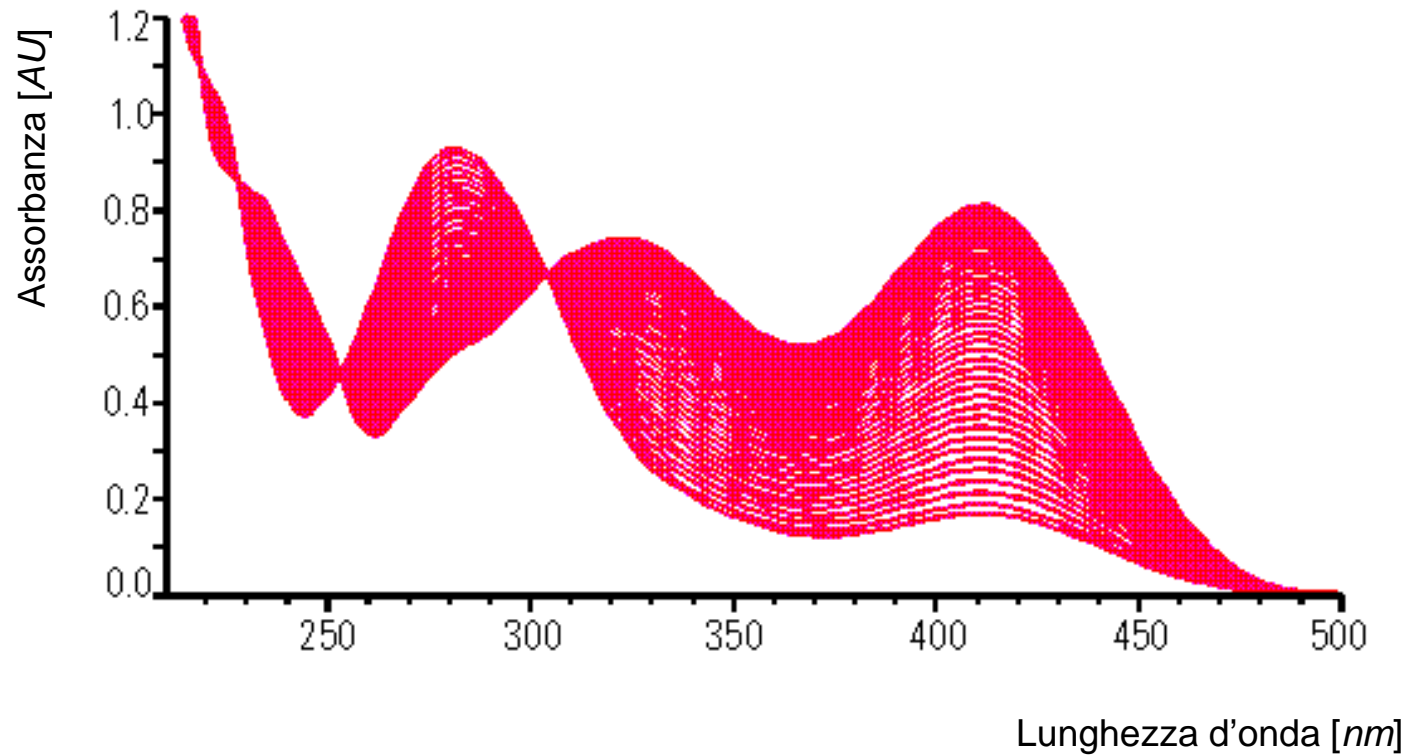
(d)

Precisione +
Accuratezza +



Usò dell'UV

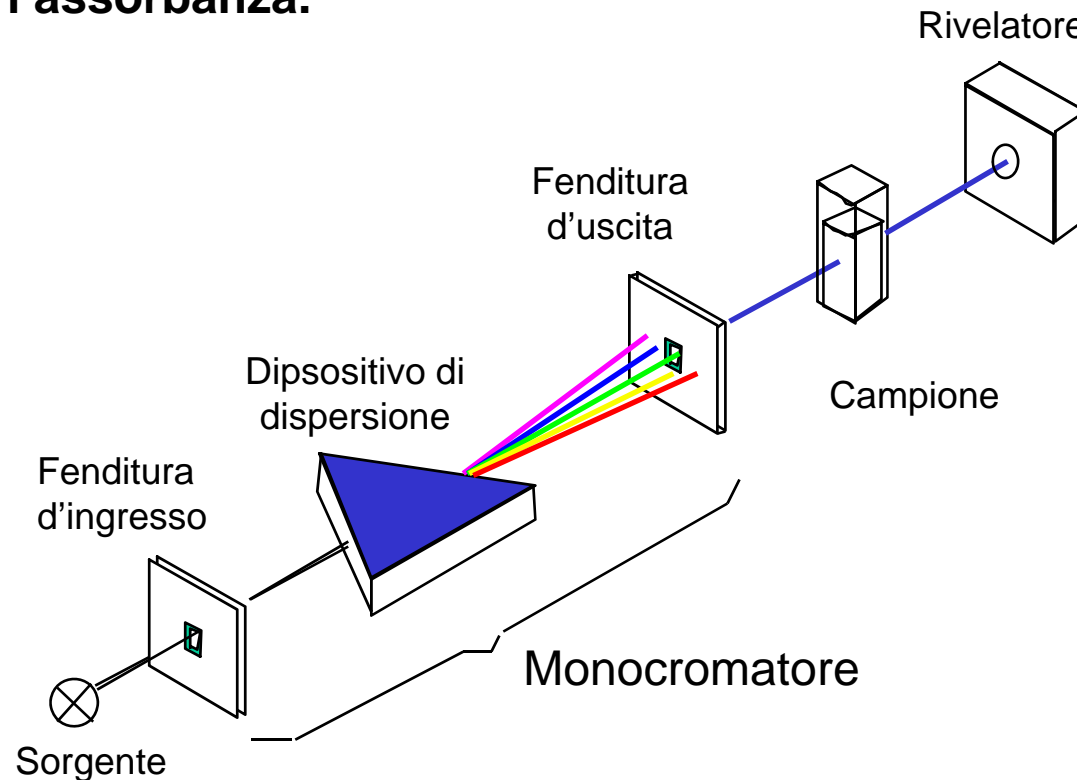
Cinetica dell'Idrolisi del Sultone





Spettrometro Convenzionale

La geometria più semplice si trova negli strumenti a singolo raggio. Per effettuare la misura, si introduce prima il bianco e se ne misura la I_0 . Quindi si introduce il campione (utilizzando la stessa cuvetta) e se ne misura la I , e lo strumento ne calcola a scelta la trasmittanza o l'assorbanza.

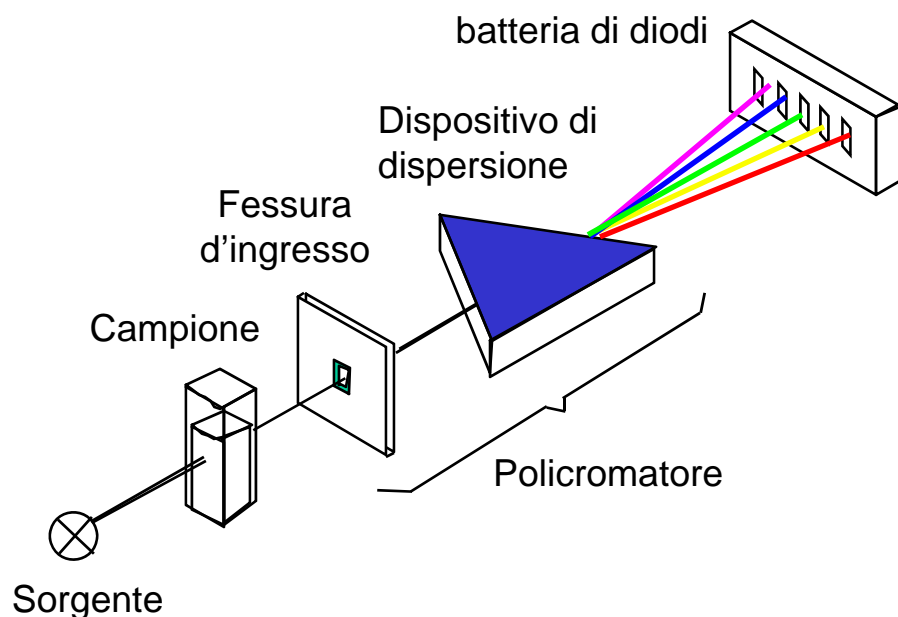


Gli strumenti a raggio singolo sono poco costosi, hanno alta resa luminosa, e perciò alta sensibilità, a causa della semplicità del sistema. Lo svantaggio sta nel tempo che deve intercorrere tra le due misure e nell'aumento dei problemi di deriva.



Rivelazione Spettrofotometrica a “diode array”

Un rivelatore spettrofotometrico a “diode-array” usa una batteria di rivelatori e una configurazione ottica “inversa”, con il dispositivo di dispersione collocato dopo il campione. Si ha il vantaggio che solo la luce passante sull’asse dalla sorgente alla fenditura prima del dispositivo di dispersione raggiunge il rivelatore; la luce avente altri angoli viene scartata. Così la luce ambiente non interferisce e si può lasciare aperta la zona del campione, rendendo il sistema più facile da utilizzare e versatile.



La luce di tutte le lunghezze d’onda colpiscono il “diode-array” e sono misurate simultaneamente. Lo spettro si recupera per scansione elettronica della batteria. In principio, gli spettrofotometri a “diode-array” possono avere una geometria a raggio singolo o doppio ma, in pratica, i vantaggi dei primi si combina bene con il rivelatore a “diode-array”.