

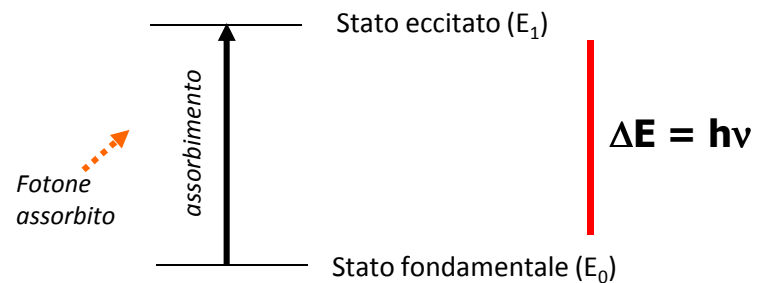
Spettrofotometria di assorbimento molecolare

Origine degli spettri: transizioni elettroniche molecolari. Zone spettrali dell'UV-Visibile.

A causa dell'assorbimento l'intensità misurata a valle di un campione posto davanti ad una sorgente di radiazioni può risultare minore rispetto a quella della radiazione incidente.

zona spettrale intervallo I (nm)

lontano UV	10-200
vicino UV	200-380
visibile	380-780



ANALISI QUALITATIVA

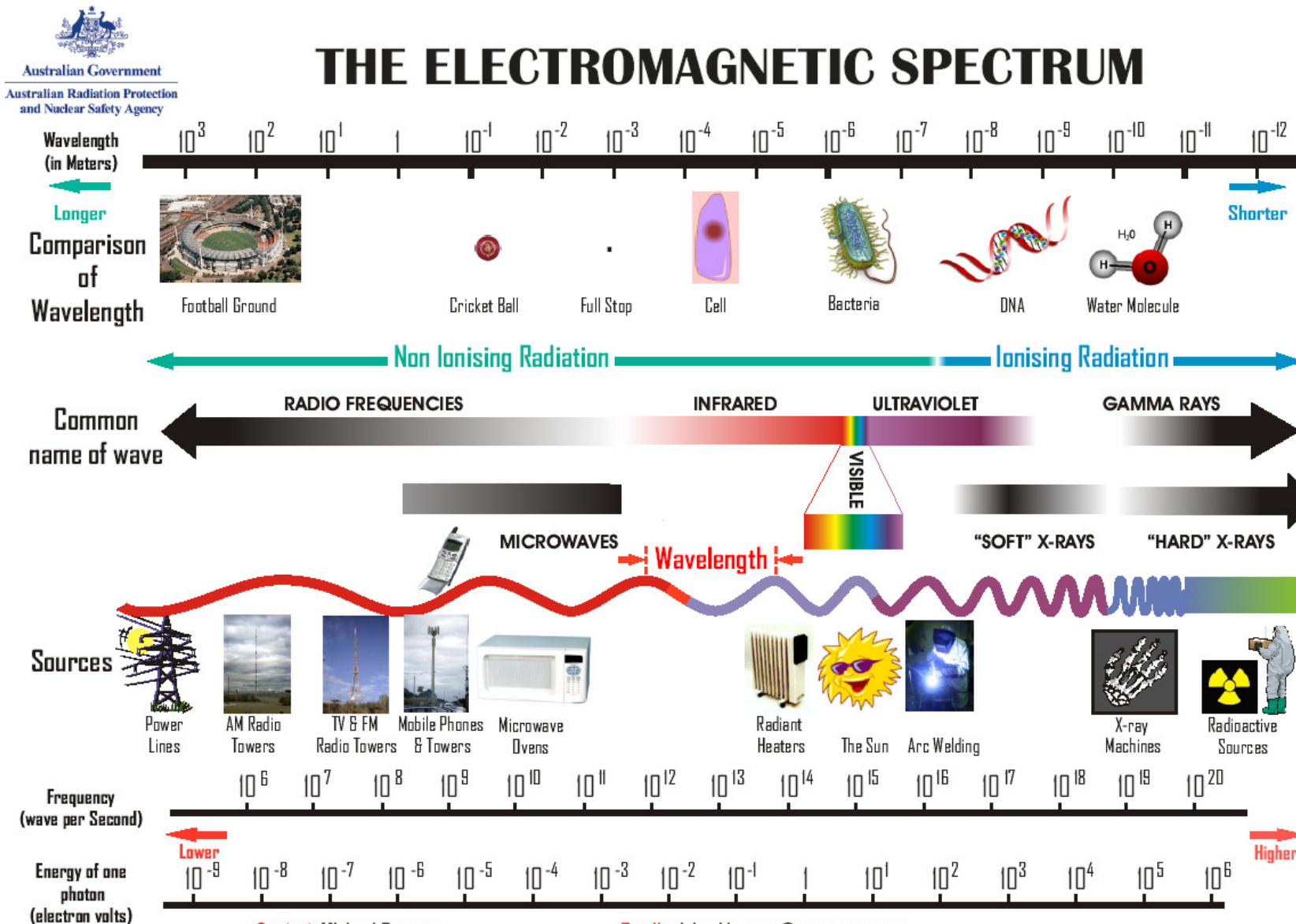
Si confronta l'intensità della radiazione in uscita dal campione con quella in entrata per tutte le lunghezze d'onda di una determinata gamma spettrale. Si ottiene un tracciato che mostra l'assorbimento del campione al variare della lunghezza d'onda detto **spettro di assorbimento caratteristico per ogni sostanza**.

Si registrano spettri di assorbimento in intervalli di λ per identificare gruppi cromofori e molecole.

ANALISI QUANTITATIVA

Si misura l'intensità di una radiazione monocromatica in uscita dal campione confrontandola con quella in entrata. Il risultato ottenuto può essere correlato alla quantità che ha dato luogo all'assorbimento.

L'intensità della radiazione assorbita è proporzionale alla concentrazione della sostanza in esame.



Interazione radiazione materia

Se guardiamo la radiazione elettromagnetica da un punto di vista **microscopico**, tale radiazione consiste in “pacchetti discreti” di energia, chiamati **FOTONI**, la cui energia dipende dalla frequenza, secondo l'equazione già vista:

$$E = h \cdot \nu$$

dove h indica la costante di Planck: $h = 6.63 \cdot 10^{-34} \text{ J} \cdot \text{s}$

Questa relazione indica l'energia associata a ciascun fotone per ogni fascio di frequenza ν ; per cui un fascio di luce è più o meno intenso a seconda che porti più o meno fotoni nell'unità di tempo, ma l'energia di ciascun fotone (il *quanto di energia*) è sempre la stessa per una determinata frequenza della radiazione.

Potenza

Luminosità o densità di flusso radiante



numero di fotoni



quantità di analita

Energia

L'energia del fotone



colore della radiazione (o meglio λ)



specie chimica

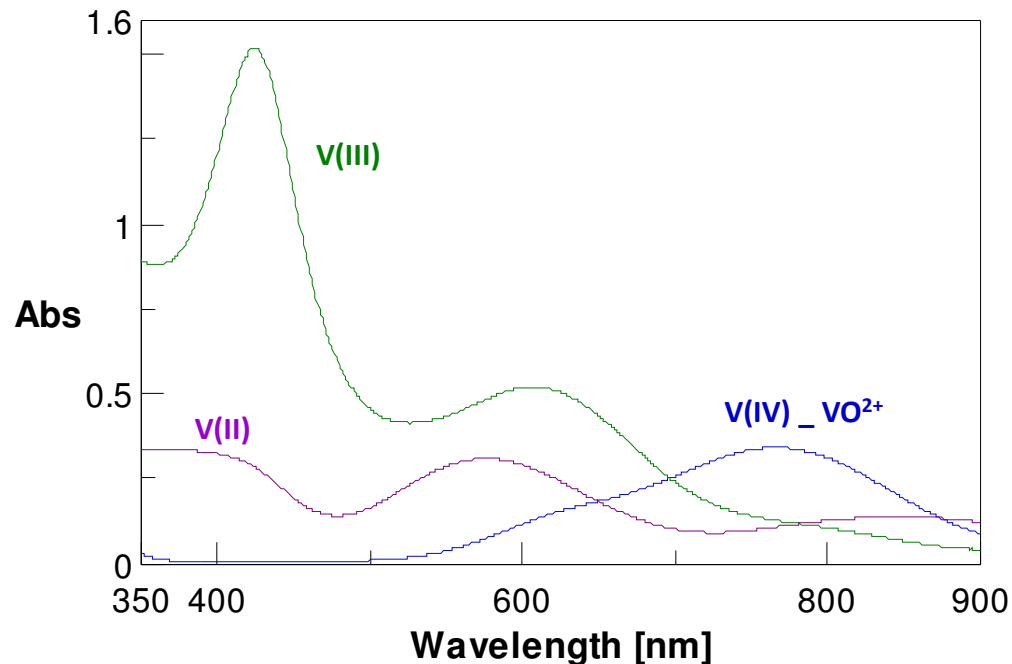
Spettrofotometria di assorbimento molecolare

ANALISI QUALITATIVA

si usano raggi policromatici a spettro continuo, separati, tramite *monocromatori*, nelle varie componenti (radiazioni monocromatiche).

Le singole **radiazioni monocromatiche** si fanno passare, una alla volta, attraverso la sostanza in esame, la quale assorbirà in modo diverso le diverse radiazioni.

Riportando i valori registrati in un grafico lunghezza d'onda - assorbimento, si ottiene lo **spettro di assorbimento** della sostanza esaminata.



Gli spettri, nella regione del visibile e dell'ultravioletto, presentano generalmente un numero limitato di bande di assorbimento larghe.

Dunque forniscono una quantità limitata di informazioni qualitative.

Spettrofotometria di assorbimento molecolare

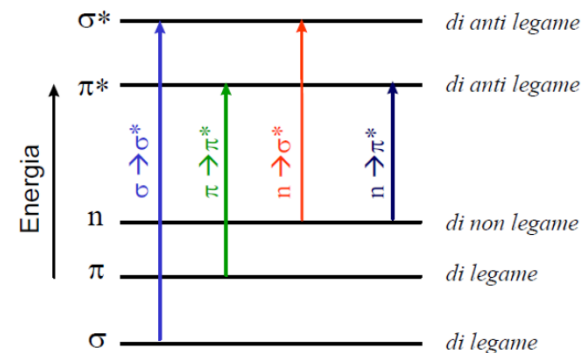
ANALISI QUALITATIVA

Assorbimento nel UV/visibile

L'eccitazione degli elettroni di valenza di una molecola richiede energie tanto più elevate quanto più grande è la separazione fra i livelli elettronici di partenza e di arrivo delle transizioni.

Le più comuni transizioni energetiche e le corrispondenti lunghezze d'onda sono:

- transizioni $\sigma \rightarrow \sigma^*$ (110 - 135 nm circa);
- transizioni $\pi \rightarrow \pi^*$ e $n \rightarrow \sigma^*$ (160 - 255 nm circa);
- transizioni $n \rightarrow \pi^*$ (da 285 nm circa in su).



Queste transizioni sono caratteristiche sia dei composti organici sia dei composti inorganici che possiedono elettroni di valenza di tipo s o p .

Nei composti inorganici e metallorganici che possiedono anche elettroni di tipo d (e f) sono possibili transizioni $d \rightarrow d$ (e $f \rightarrow f$).

L'assorbimento della radiazione di **COMPOSTI ORGANICI** nella zona dello spettro elettromagnetico compresa **fra 185 e 800 nm** è dovuto alla presenza di **legami π** .

I gruppi funzionali insaturi capaci di assorbire la radiazione UV/Vis sono detti **CROMOFORI**.

Spettrofotometria di assorbimento molecolare

ANALISI QUALITATIVA

Assorbimento dei composti organici

Consideriamo le principali transizioni energetiche:

Transizioni $\sigma \rightarrow \sigma^*$:

corrispondono alla **rottura di legami** e quindi richiedono energie molto elevate. Gli alcani, le cui molecole contengono solo legami C-C e C-H, danno solo questi assorbimenti che cadono nella regione dell'UV lontano, detta anche **UV sotto vuoto**.

Transizioni $\pi \rightarrow \pi^*$, $n \rightarrow \pi^*$:

sono tipiche dei **composti insaturi** e comprendono:

la transizione di sistemi p isolati, la transizione di anelli benzenici, in questo caso la banda può avere una struttura anche complessa, ma non è molto intensa perché è proibita dalle regole di selezione, e la transizione di sistemi aromatici o coniugati. Tanto più è estesa la delocalizzazione, tanto maggiore è la lunghezza d'onda dell'assorbimento e l'intensità della banda.

Transizioni $n \rightarrow \sigma^*$:

sono transizioni che coinvolgono eteroatomi con doppietti di non legame come l'ossigeno di C=O (gruppo carbonilico) e C-O (alcoli), o l'azoto di C=N, C-N (ammine) e N=N, o lo zolfo di C-S (tioli). Le bande non sono intense perché queste transizioni sono proibite dalle regole di selezione.

Transizioni per trasferimento di carica. Sono dovute a veri e propri spostamenti di elettroni da una parte all'altra della molecola e di solito forniscono le bande più intense dello spettro. I composti aromatici sostituiti presentano bande di questo tipo che cadono nell'intervallo 220-370 nm.

Spettrofotometria di assorbimento molecolare

ANALISI QUALITATIVA

Assorbimento nei composti di coordinazione

Gli spettri dei composti di coordinazione mostrano le bande di assorbimento dei leganti insieme all'assorbimento caratteristico dei metalli di transizione o dei lantanidi e all'assorbimento per trasferimento di carica.

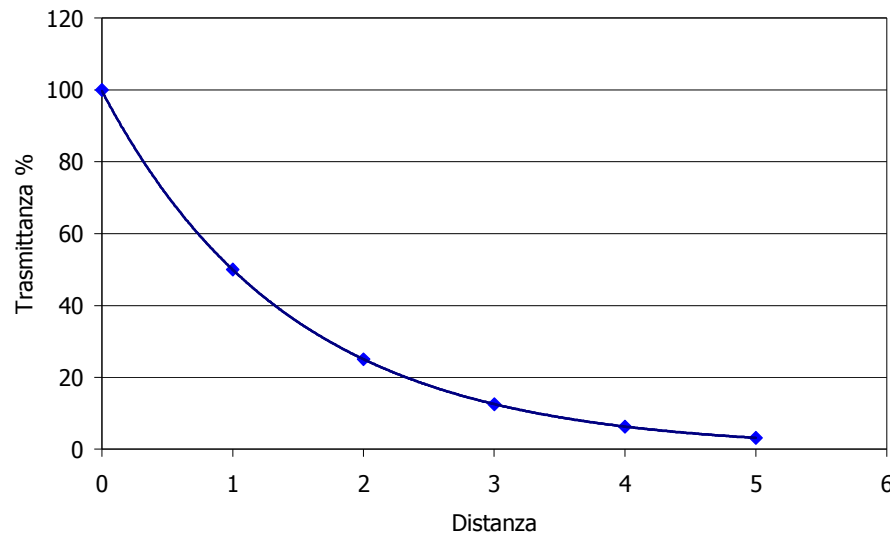
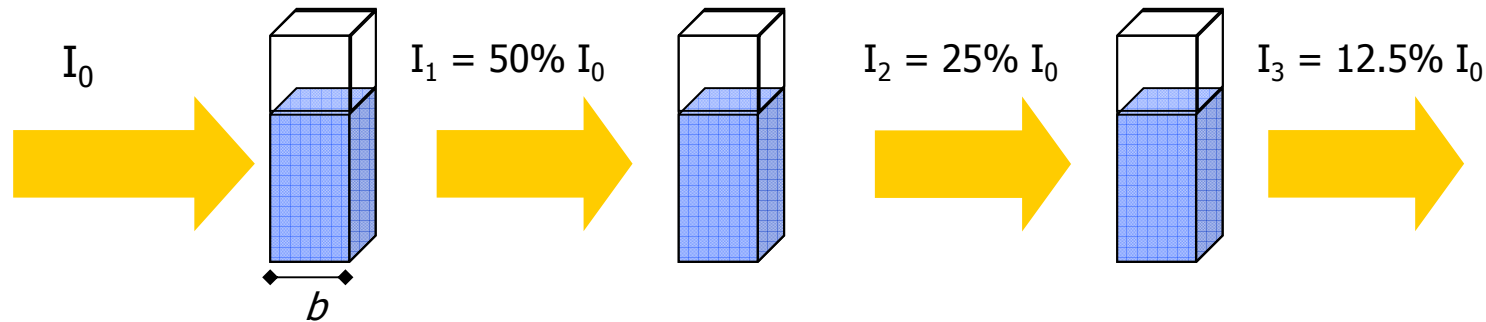
Transizioni $d \rightarrow d$ o $f \rightarrow f$. Nei composti di coordinazione, l'interazione del metallo centrale con i leganti ad esso coordinati provoca una separazione fra i cinque orbitali d (o i sette orbitali f , nel caso dei lantanidi), che in assenza dei leganti hanno tutti la stessa energia. Gli assorbimenti che corrispondono alle transizioni fra orbitali d (o f) cadono nella regione del visibile, perché i dislivelli sono relativamente piccoli; perciò i composti di coordinazione dei metalli di transizione e dei lantanidi appaiono spesso colorati.

Transizioni per trasferimento di carica. Spesso i composti di coordinazione, ma anche gli ioni di metalli di transizione (come MnO_4^- o CrO_4^{2-}) e i complessi molecolari mostrano una colorazione molto intensa. L'intenso assorbimento nel visibile da parte di queste specie è associato a transizioni elettroniche che producono forti variazioni del momento di polo. In particolare, per ioni e composti di coordinazione si parla di **trasferimento di carica intramolecolare** perché si verifica un vero e proprio trasferimento di un elettrone dall'atomo centrale ai leganti, e viceversa. Il caso più frequente consiste nel trasferimento di un elettrone dal legante al metallo.

Spettrofotometria di assorbimento molecolare

ANALISI QUANTITATIVA

Supponiamo che di 100 fotoni incidenti su una soluzione campione, 50 vengano assorbiti. Possiamo allora dire che la **trasmissione** del campione è $T = 50\%$.



La trasmissione decresce con andamento esponenziale all'aumentare del cammino ottico:

$$T = I/I_0 = e^{-kb}$$

Dove k è una costante e b è il cammino percorso dalla radiazione.

La legge è dovuta a Bouguer (1729) e Lambert (1760).

Spettrofotometria di assorbimento molecolare

ANALISI QUANTITATIVA

Dalla legge di Bougert-Lambert, Beer ricavò la legge che prende il suo nome.
In essa si fa riferimento alla concentrazione della soluzione:

la quantità di luce assorbita è proporzionale al numero delle molecole assorbenti attraversate dalla radiazione

La trasformazione logaritmica, rende la relazione lineare.

$$A = -\log T = -\log(I/I_0) = \log(I_0/I) = \epsilon b C$$

Legge di Lambert-Beer

il logaritmo dell'inverso della trasmittanza, è definito come l'**ASSORBANZA** della soluzione.

L'assorbanza è una funzione lineare sia della concentrazione (C), sia della lunghezza del cammino percorso dalla radiazione incidente (b). Dove ϵ è l'**assorbitività molare** o coefficiente di estinzione molare.

Unità di misura:

Grandezza unità di misura

C	M (=mol/L)
b	cm
ϵ	L mol ⁻¹ cm ⁻¹



L'assorbanza è un rapporto
adimensionale

Spettrofotometria di assorbimento molecolare

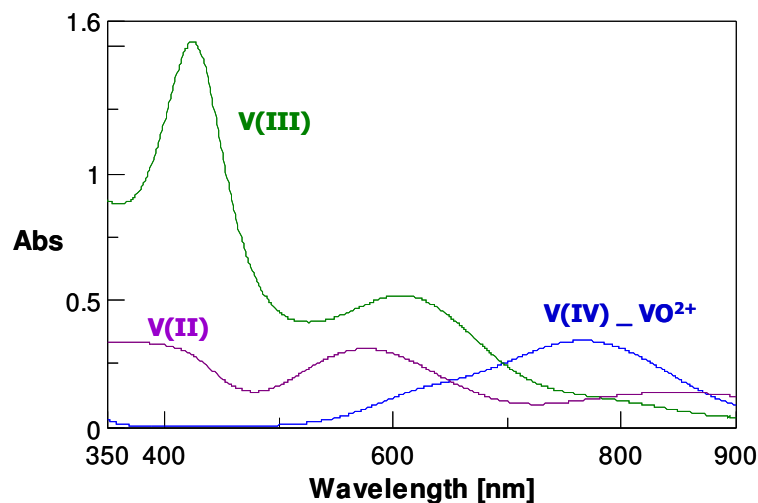
ANALISI QUANTITATIVA

$$A = \varepsilon b C$$

Sarebbe più corretto scriverla in questa forma: $A_{\lambda} = \varepsilon_{\lambda} b C$

Il valore di assorbività molare, caratteristico per ogni specie chimica, è funzione della lunghezza d'onda e di conseguenza è tale anche l'assorbanza.

Questo vuol dire che l'assorbanza di una specie chimica varierà in funzione della lunghezza d'onda della radiazione incidente, motivo per cui è possibile ottenere degli spettri di assorbimento. In questi spettri si registra l'assorbanza di una soluzione in funzione della λ .



L'assorbanza, ad una data lunghezza d'onda, di una soluzione in cui vi sono più specie assorbenti si può calcolare come sommatoria dei contributi di assorbimento dovuti alle singole specie:

$$A = A_1 + A_2 + \dots + A_n = \varepsilon_1 b C_1 + \varepsilon_2 b C_2 + \dots + \varepsilon_n b C_n$$

Spettrofotometria di assorbimento molecolare

Esercizio:

Analisi di una miscela.

Esercizio:

Si considerino i due composti X e Y. Una loro miscela, in una cella da 0.1 cm, ha assorbanza 0.233 a 272 nm e 0.200 a 327 nm. Come posso calcolare la concentrazione dei due componenti della miscela?

$$A_{\lambda} = A_X + A_Y = \varepsilon_X b C_X + \varepsilon_Y b C_Y$$

Quali sono i termini noti di questa equazione?

Quali sono le informazioni che mancano per rispondere al quesito e come posso ottenerle?

Spettrofotometria di assorbimento molecolare

ANALISI QUANTITATIVA

In particolari condizioni si possono osservare delle **deviazioni** alla relazione Lambert-Beer, cioè non è più rispettata la proporzionalità diretta tra assorbanza e concentrazione:

LIMITAZIONI REALI:

La linearità è rispettata solo per soluzioni diluite ($C \leq 0.01 \text{ M}$): quando la distanza media tra le molecole responsabili dell'assorbimento diminuisce ogni specie influenza la distribuzione di carica della specie vicina ed è possibile che questo alteri la capacità della specie di assorbire una radiazione.

Effetto dell'indice di rifrazione del mezzo: n dipende dall'indice di rifrazione della soluzione e l'aumento della concentrazione può modificare in modo evidente tale indice generando uno scostamento dalla legge di Beer.

DEVIAZIONI CHIMICHE APPARENTI:

Apparenti perché in questo caso la legge rimane valida, ma si ha un'apparente deviazione dalla linearità dovuta al fatto che in soluzione si verificano dei **fenomeni chimici** che cambiano la concentrazione della specie assorbente in modo imprevisto.

Variazioni della forma chimica del composto (ad esempio indicatori chimici)

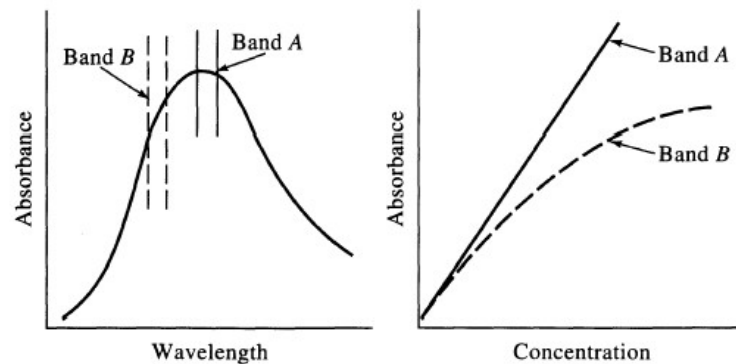
Associazioni di varia natura della specie assorbente in funzione della composizione della soluzione

Spettrofotometria di assorbimento molecolare

ANALISI QUANTITATIVA

DEVIAZIONI STRUMENTALI:

La validità della legge di Beer è tale solo con radiazioni monocromatiche. In realtà i dispositivi di selezione delle lunghezze d'onda isolano una banda più o meno simmetrica di lunghezze d'onda attorno al valore di λ desiderato. L'effetto è minimo nelle zone in cui la ϵ della specie assorbente varia poco al variare di λ (punti di massimo assorbimento).



Presenza di radiazioni parassite dovuta a fenomeni di diffusione e riflessione sulle superfici dello strumento.

Spettrofotometria di assorbimento molecolare

ANALISI QUANTITATIVA

Condizioni per l'analisi quantitativa

la specie da determinare deve assorbire nel campo UV/visibile o poter essere trasformata in una specie assorbente

le specie devono assorbire in modo rilevante nell'intervallo spettrale degli strumenti

la relazione A vs. C deve essere lineare (intervallo ottimale di assorbanza: 0.4-0.9)

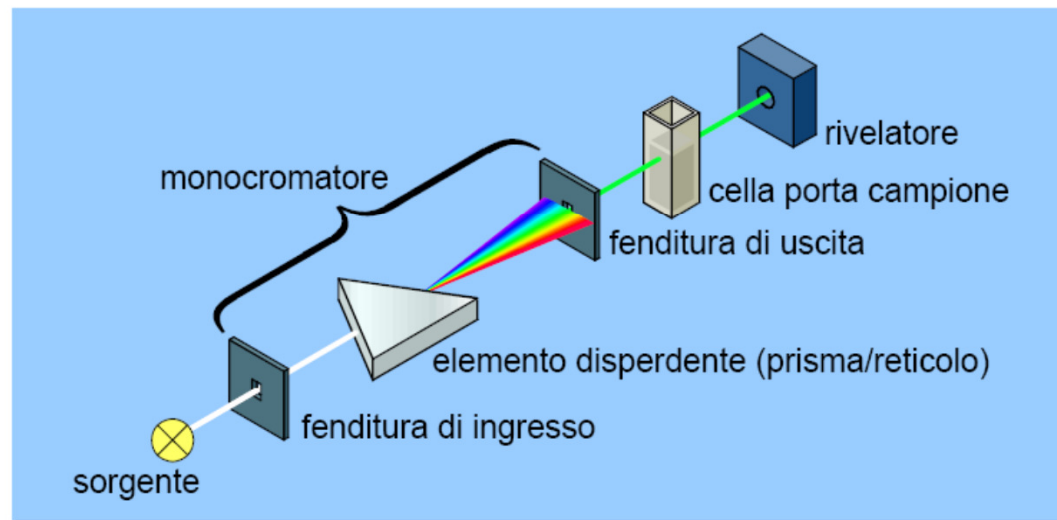
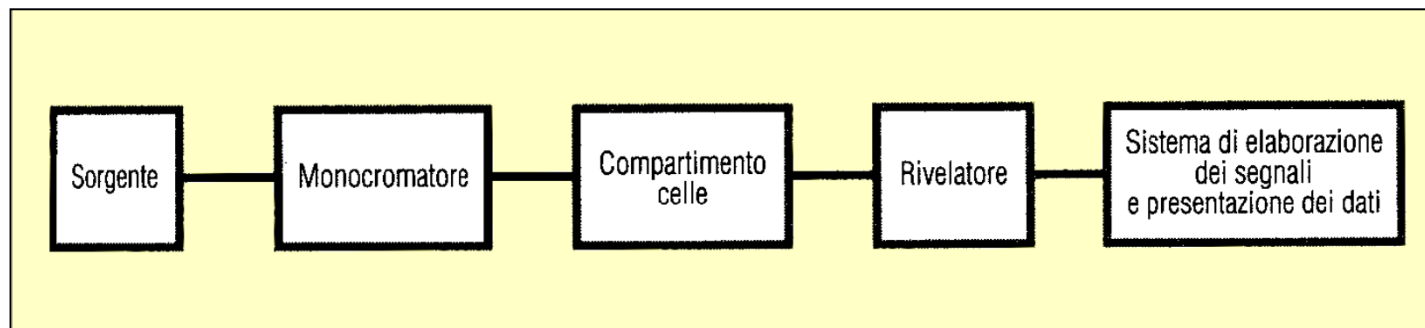
Posso eseguire un'analisi quantitativa basandomi sulla legge di Lambert-Beer o devo eseguire un'indagine di tipo comparativo?

In genere si esegue un'indagine di tipo comparativo.

Spettrofotometria di assorbimento molecolare

STRUMENTO

Schema a blocchi di uno spettrofotometro



Spettrofotometria di assorbimento molecolare

STRUMENTO

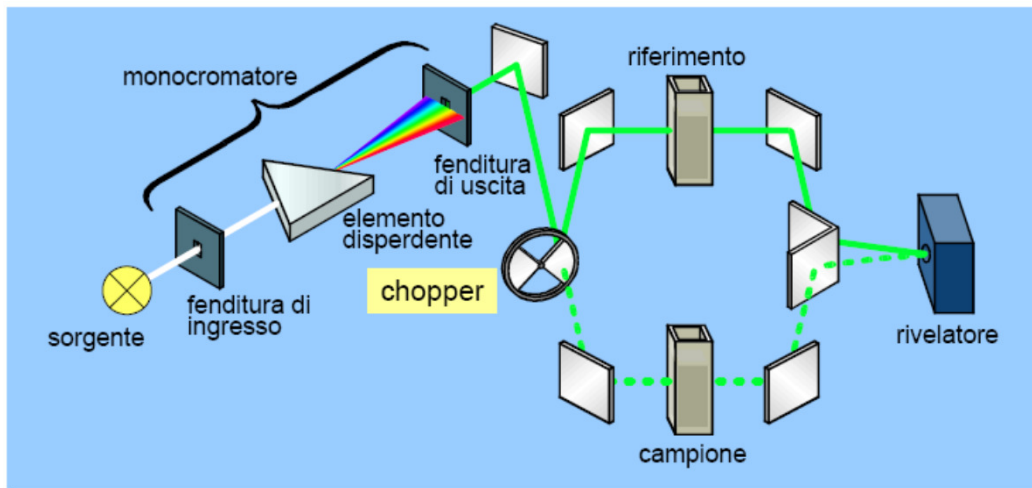
Uno **spettrofotometro a doppio raggio** misura contemporaneamente l'assorbimento della radiazione da parte del campione e del riferimento.

Il rapporto fra queste due grandezze rappresenta l'assorbimento dovuto all'analita, ed è indipendente da tutte le altre variabili legate alla variazione della lunghezza d'onda.

Esistono due tipi di spettrofotometria doppio raggio:

- spettrofotometria doppio raggio nel tempo
- spettrofotometria doppio raggio nello spazio

Spettrofotometro doppio raggio nel tempo



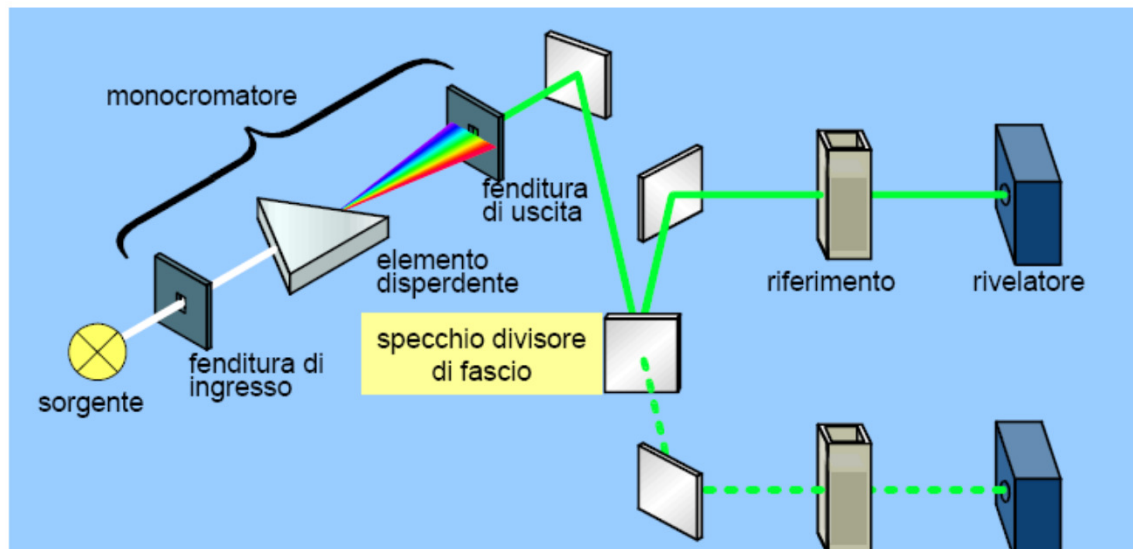
Uno spettrofotometro a doppio raggio nel tempo utilizza un "chopper" (di solito uno specchio rotante a settori) per inviare alternativamente la radiazione attraverso il campione ed attraverso il riferimento.

La radiazione alternativamente trasmessa da campione e riferimento viene poi misurata da un unico rivelatore.

Spettrofotometria di assorbimento molecolare

STRUMENTO

Spettrofotometro doppio raggio nello spazio



Cuvetta portacampione in quarzo con cammino ottico da 1 cm

Spettrofotometro



In questo strumento il fascio di radiazione viene diviso in due parti mediante uno specchio fisso, ed i due fasci vengono inviati rispettivamente sul campione e sul riferimento.

Non esistono parti mobili, ed è possibile studiare anche processi molto veloci.

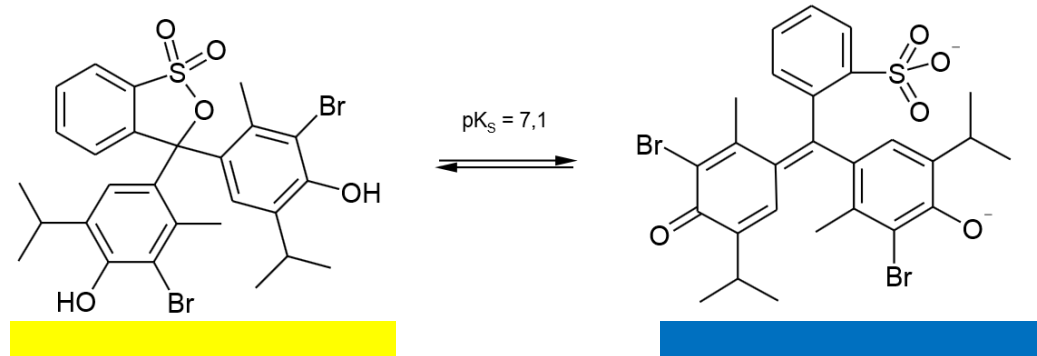
Sono però necessari due rivelatori distinti, che devono possedere caratteristiche simili

Spettrofotometria di assorbimento molecolare

Esperimento:

Quantificazione di un colorante

Quantificazione di blu bromotimolo.



- Si preparano soluzioni del colorante a concentrazione crescente e se ne registra lo spettro di assorbimento.
- Si individuano le lunghezze d'onda di massimo assorbimento.
- Si registra l'assorbanza ai massimi di assorbimento.
- Si costruisce il grafico C vs. Abs per ognuno dei massimi di assorbimento.
- Si misura il pH delle soluzioni in esame.

Questioni:

- La legge di Lambert-Beer è rispettata per tutte le lunghezze d'onda prese in esame?
- Il fatto che la molecola sia soggetta a equilibrio acido-base e che il suo colore dipenda dalla forma chimica in cui si trova può influire sull'analisi?
- In quali condizioni operative conviene eseguire l'analisi per garantire l'affidabilità del risultato?
- In quali condizioni di misura ho maggiore sensibilità?

Spettrofotometria di assorbimento molecolare

Esperimento:

Risoluzione del caso!

Domande da porre

L'andamento dell'assorbanza in funzione della concentrazione è quello previsto?

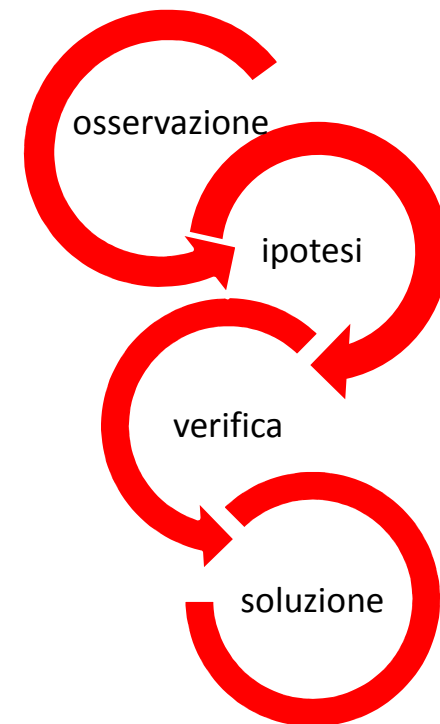
Se no, perché?

Come posso fare per verificare l'ipotesi proposta?

Come posso quantificare il blu bromotimolo per via spettrofotometrica?

Esperienza che consente allo studente di:

- *Eseguire un'analisi di tipo comparativo*
- *Sperimentare la legge di Lambert-Beer*
- *Verificare un effetto degli equilibri chimici sulla misura analitica*
- *Ragionare su un caso per la sua comprensione e soluzione*



Spettrofotometria di assorbimento molecolare

Esperimento su campioni reali:

DETERMINAZIONE DELL'AZOTO NITROSO

Le acque possono contenere nitriti (NO_2^-). La loro presenza può essere dovuta ad una incompleta ossidazione dell'azoto proveniente dalla decomposizione di sostanze organiche (ed è quindi indice di possibili forme di inquinamento).

A causa di ciò e della loro tossicità, le acque destinate all'alimentazione umana è bene contengano nitriti in quantità inferiore a 0,1 mg/L di NO_2^- (corrispondente a circa 0,03 mg/L di N-nitroso), mentre per l'uso igienico i nitriti possono arrivare a 0,5 mg/L di NO_2^- (corrispondente a circa 0,15 mg/L di N-nitroso); le acque di scarico non devono invece contenere nitriti in concentrazione superiore a 0,6 mg/L di NO_2^- (corrispondente a circa 0,2 mg/L di N-nitroso).

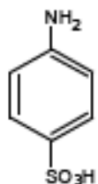
Il metodo descritto di seguito è la determinazione spettrofotometrica con reattivo di Griess.

Principio del metodo

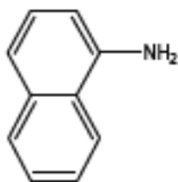
Il reattivo di Griess (contenente 1-naftilammina, acido solfanilico e acido acetico) forma con i nitriti un colorante azoico, intensamente colorato in rosa, con un massimo di assorbimento a 540 nm.

Reazioni chimiche coinvolte nella determinazione dell' azoto nitroso:

Il reattivo di Griess è composto da:



acido solfanilico
(ac. 4-amminobenzenesolfonico)

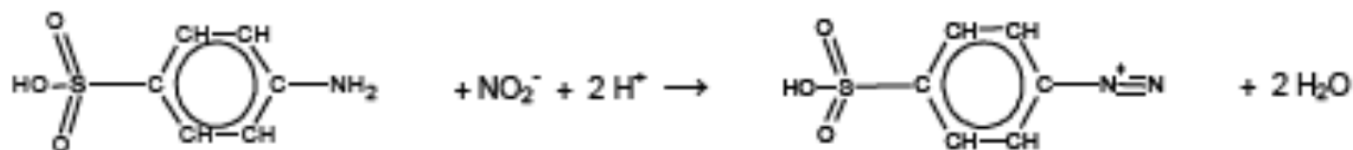


α-naftilammina
(1-naftilammina)



acido acetico

L'acido solfanilico viene diazotato dai nitriti presenti nelle acque formando un diazocomposto ...

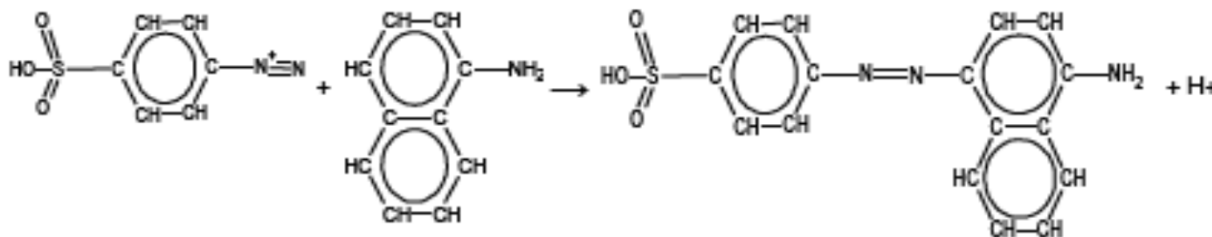


acido solfanilico

nitrito

diazocomposto (ione)

il diazocomposto così ottenuto, copulandosi con l'α-naftilammina, produce un colorante azoico rosa



diazocomposto (ione) *α-naftilammina*

colorante azoico

PROCEDURA ANALITICA

Ottenimento della retta di lavoro:

Si prepara una soluzione standard primaria di NaNO_2 avente concentrazione 100 mg/L di N-nitroso.

Al momento dell'uso, a partire dalla soluzione standard primaria, si prepara una soluzione standard secondaria avente concentrazione 2,0 mg/L di N-nitroso.

Dalla soluzione standard secondaria si effettuano 4 prelievi ai quali verrà aggiunto reattivo di Griess e portati a volume in modo da avere soluzioni che corrispondono a concentrazioni di: 0.10, 0.20, 0.30, 0.40 mg/L di N-nitroso. Si misura quindi l'assorbanza (contro il bianco) a 540 nm costruendo così la retta di lavoro.

Analisi del campione in esame:

Si preleva una certa quantità dell'acqua da esaminare e si procede alla preparazione della soluzione colorata come per la retta di lavoro e alla successiva misura di assorbanza a 540 nm.

Tramite la retta di lavoro si ricava la concentrazione di N-nitroso corrispondente alla soluzione sottoposta a misura.

Tenendo conto poi della quantità di campione prelevata, si determina la concentrazione di N-nitroso dell'acqua in esame.



Spettrofotometria di assorbimento molecolare

Un esempio applicativo:

Titolazione spettrofotometrica.

Misure spettrofotometriche sono utili per evidenziare il punto equivalente di titolazioni in cui partecipino di specie assorbenti (analita, titolante o indicatore).

Le curve di titolazione riportano il valore di assorbanza ad una data lunghezza d'onda in funzione del volume di titolante aggiunto.

A seconda che della natura della specie assorbente si possono avere curve di titolazione con andamenti diversi:

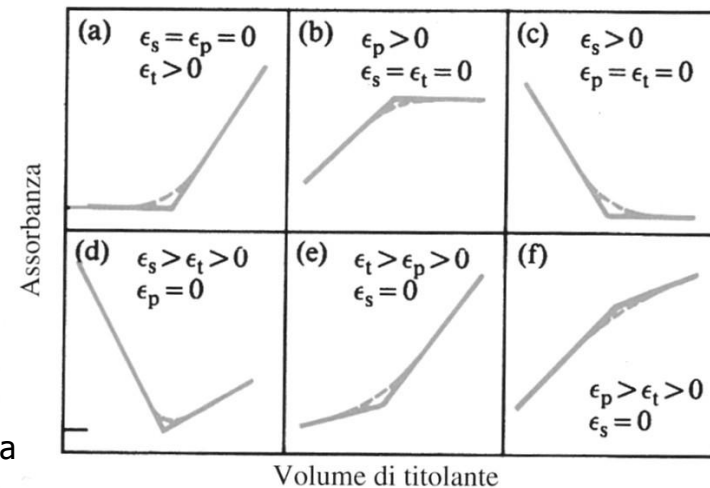
ϵ_s = assorbività molare dell'analita

ϵ_p = assorbività molare del prodotto di reazione

ϵ_t = assorbività molare del titolante

I valori di assorbività molare sono riferiti alla lunghezza d'onda λ ,
in genere corrispondente al punto di massimo assorbimento di
una delle specie

Valori di assorbanza, alla
lunghezza d'onda λ ,
registrati durante la titolazione.



Spettrofotometria di assorbimento molecolare

Titolazione spettrofotometrica.

Le curve di titolazione presentano due tratti rettilinei con differenti pendenze. Il punto equivalente corrisponde al valore dell'ascissa del punto di intersezione tra le due rette che interpolano i dati sperimentali.

Da qui si deduce che il punto finale è valutato da dati sperimentali lontani dal punto equivalente, dunque si ottengono valori attendibili anche con equilibri in cui le costanti sono meno favorevoli rispetto alle condizioni necessarie per l'individuazione visuale. Inoltre, si può lavorare su soluzioni più diluite.

Perché sia possibile eseguire titolazione spettrofotometriche il recipiente di titolazione deve essere posto sul cammino ottico della radiazione incidente o la soluzione da titolare deve poter essere trasportata nella cuvetta di misura o, ancora, si può eseguire la lettura in un recipiente di titolazione esterno se lo spettrofotometro è corredato da fibre ottiche per il trasporto del segnale luminoso.

