CHIMICA ANALITICA II
CON LABORATORIO

(AA 2016-17)

8 C.F.U. - Laurea triennale in Chimica

17

Spettroscopie atomiche e molecolari

Slides in parte tratte da corso di Chimica Analitica dell'Eurobachelor in chimica e chimica dei materiali della Facoltà di SMFN dell'Università di Bologna

SPETTROFLUORIMETRIA vs. SPETTROFOTOMETRIA

	Spettrofotometria	Spettrofluorimetria
Applicabilità	**Ampia**	**Ristretta** **(relativamente poche sostanze emettono)**
Intervallo di linearità	**Ampio**	**Ristretto**
Sensibilità (oppure limite di rivelazione)	**Media**	**Elevata** **(è possibile utilizzare rivelatori più sensibili o aumentare P_0)**

La strumentazione in SPETTROFOTOMETRIA

- I componenti principali della strumentazione per spettrofotometria UV/Vis e IR sono simili, indipendentemente dalla radiazione che deve essere misurata.

- Ogni strumento comprenderà i seguenti componenti:

  - **sorgente di luce**
  - **cella per il campione**
  - **selettore di lunghezza d'onda**
  - **rivelatore**

- La loro tipologia e disposizione potranno però variare a seconda della radiazione in esame e del metodo di misura utilizzato (assorbimento, emissione…).

MISURE DI ASSORBIMENTO

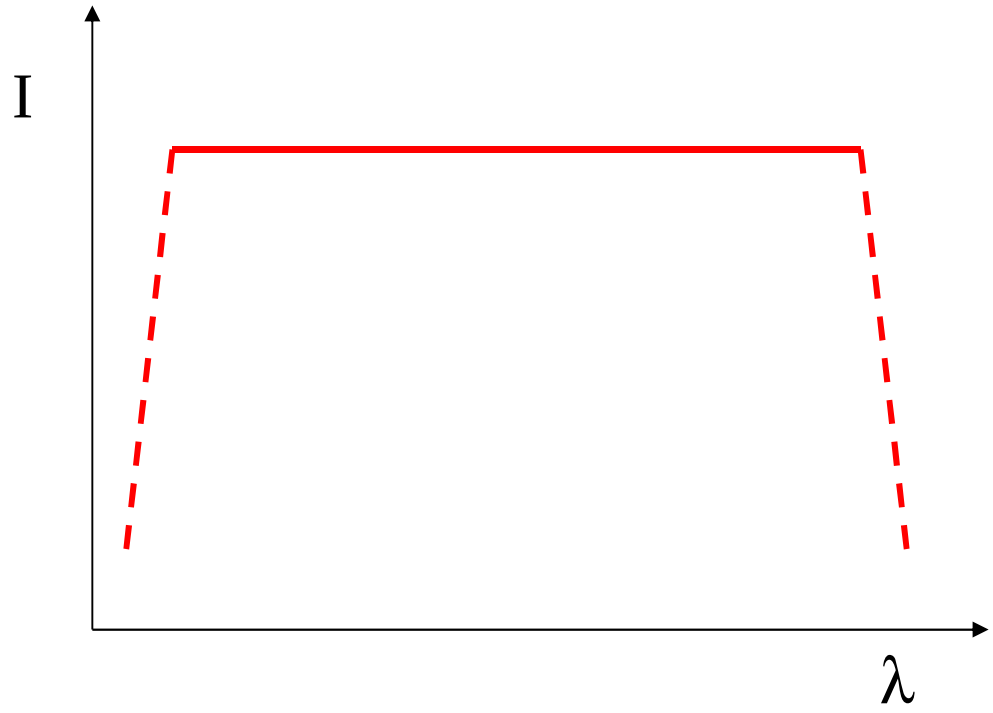
Schema a blocchi di un tipico spettrofotometro UV/ Vis: ottica diretta

Schema a blocchi di un tipico spettrofotometro IR: ottica inversa

SORGENTE

In generale una sorgente deve produrre luce in un ampio ambito di λ ed avere una intensità di emissione il più possibile uniforme

Sorgente “ideale”



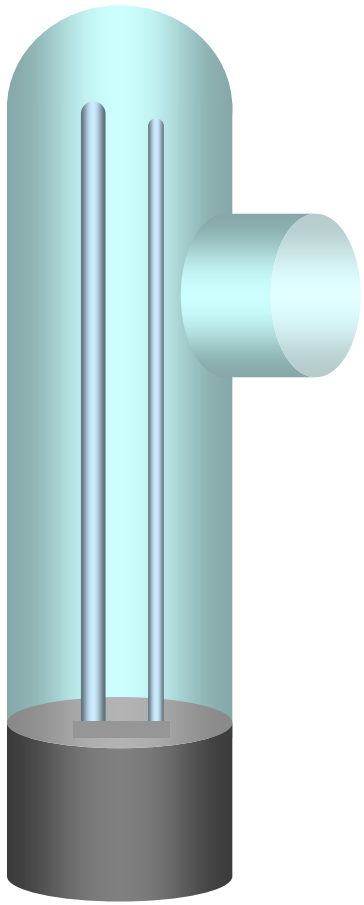
SORGENTI PER IL VISIBILE

- Si utilizza una **lampada al tungsteno** (comune lampadina) o al **tungsteno-alogeno**
- Intervallo di utilizzazione: λ=350-2200 nm
- Utilizzabile per il visibile e il vicino infrarosso

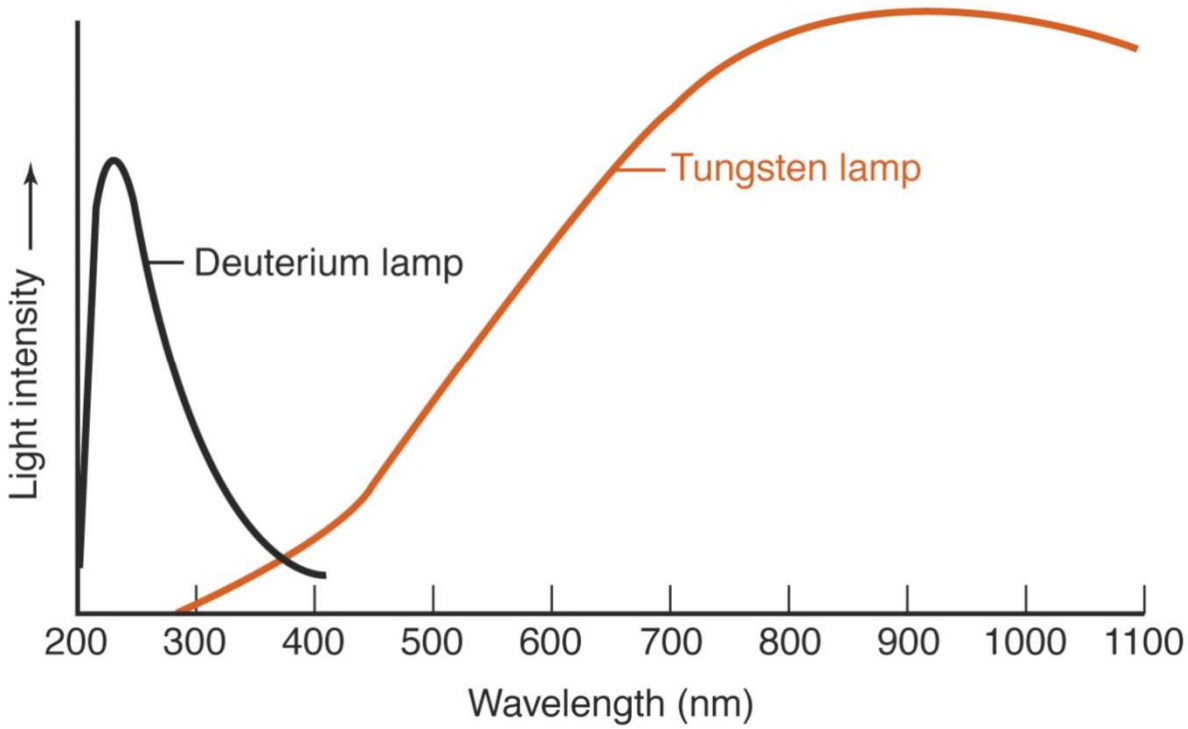
SORGENTI PER UV

Lampada al Deuterio D_2

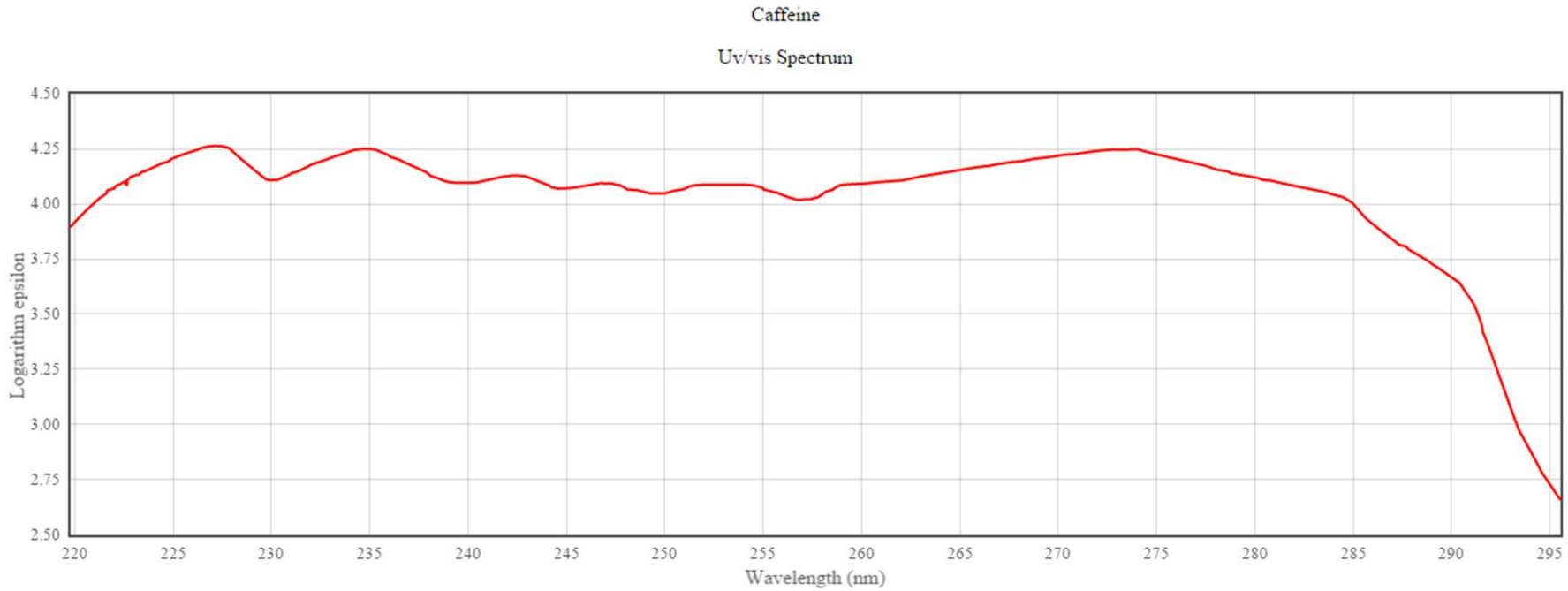
- D_2 + energia elettrica $\longrightarrow D_2^* \longrightarrow D_2 + h\nu$
- Intervallo di utilizzazione: λ= 160-380 nm



SORGENTI PER IL VISIBILE



Es. spettro di assorbimento della caffeina nell'UV



SELETTORE DI LUNGHEZZA D'ONDA

Il ruolo di un selettore di lunghezze d'onda è quello di far sì che solo una λ specifica arrivi al campione e/o al detector.

Questo componente è fondamentale se:

- Si è interessati ad una singola lunghezza d'onda
- Si devono esplorare in sequenza diverse lunghezze d'onda (scansione), ad esempio per ottenere uno spettro di assorbimento

SELETTORE DI LUNGHEZZA D'ONDA

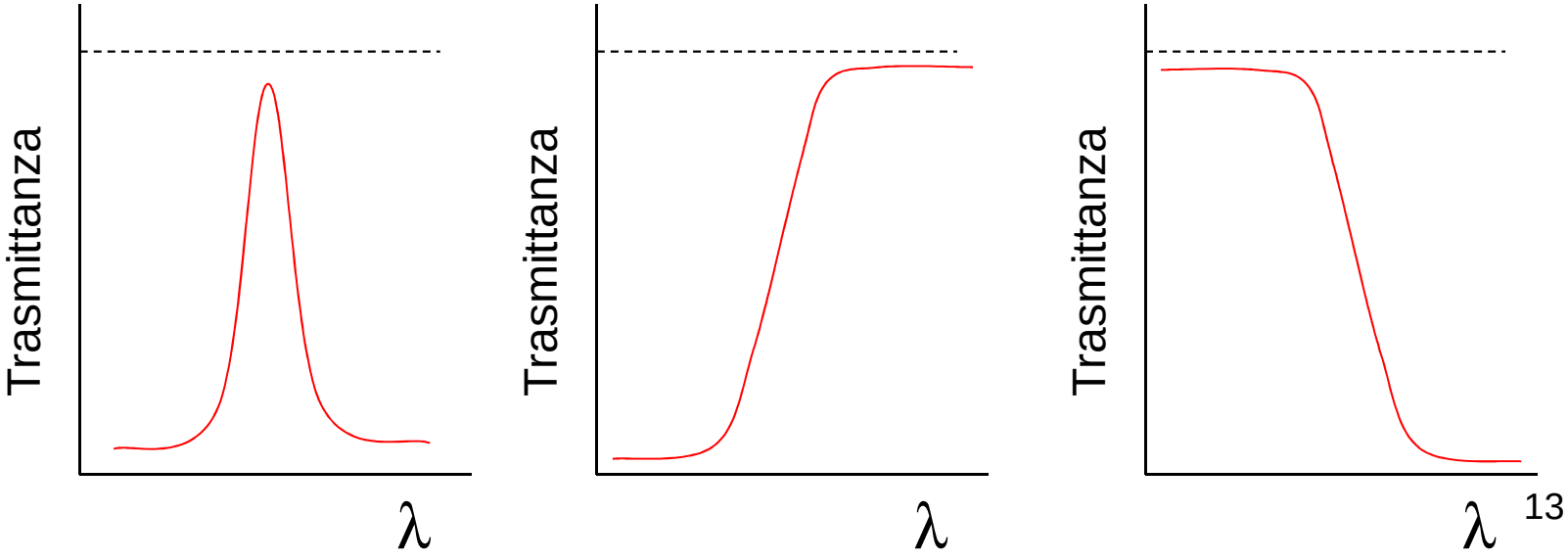
FILTRI

- Sono il più semplice tipo di selettore di λ
- Sono progettati per selezionare (trasmettere) un intervallo di lunghezze d'onda il più stretto possibile
- Sono di due tipi:
  - **filtri ad assorbimento**
  - **filtri interferenziali**

SELETTORE DI LUNGHEZZA D'ONDA

Filtri ad assorbimento

- Sono costituiti da un materiale che assorbe selettivamente alcune lunghezze d'onda.
- Possono trasmettere un certo intervallo di lunghezze d'onda, oppure tutte le radiazioni con lunghezza d'onda al di sopra o al di sotto di un determinato valore.



SELETTORE DI LUNGHEZZA D'ONDA

Filtri interferenziali

- La luce passa attraverso la superficie
- Quando arriva sul secondo lato la luce viene riflessa all'indietro
- Si realizza una interferenza con la luce incidente, costruttiva o distruttiva, in funzione dello spessore dello strato sottile
- Potrà essere trasmessa solo una λ specifica

SELETTORE DI LUNGHEZZA D'ONDA

- I filtri sono sono relativamente economici e utili per ottenere singole bande strette

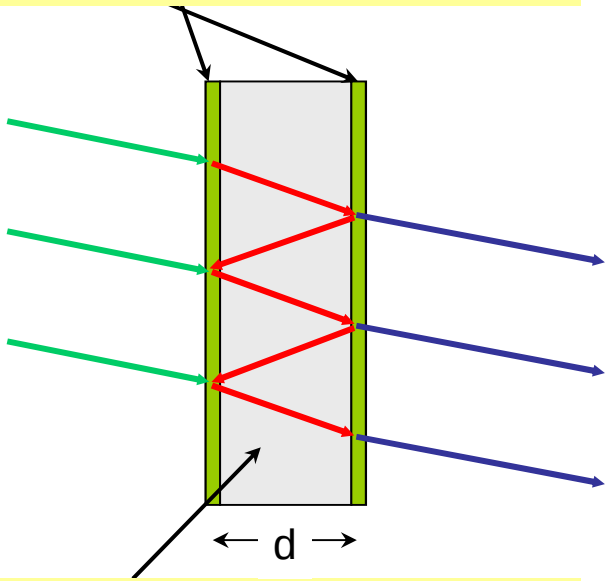
- Se si devono eseguire misure a diverse λ è però necessario utilizzare più filtri

- Inoltre è impossibile eseguire una scansione di lunghezze d'onda

SELETTORE DI LUNGHEZZA D'ONDA

Filtri interferenziali

Strato metallico semiriflettente



Strato sottile di CaF_2 o MgF_2

SELETTORE DI LUNGHEZZA D'ONDA

MONOCROMATORI

Rappresentano una alternativa ai filtri.

Mediante un monocromatore è possibile:

- Selezionare una qualsiasi lunghezza d'onda all'interno dell'intervallo di utilizzazione del monocromatore
- Effettuare una scansione di lunghezze d'onda
- I monocromatori in uso attualmente sono:

  - **Prismi**
  - **Reticoli**

SELETTORE DI LUNGHEZZA D'ONDA

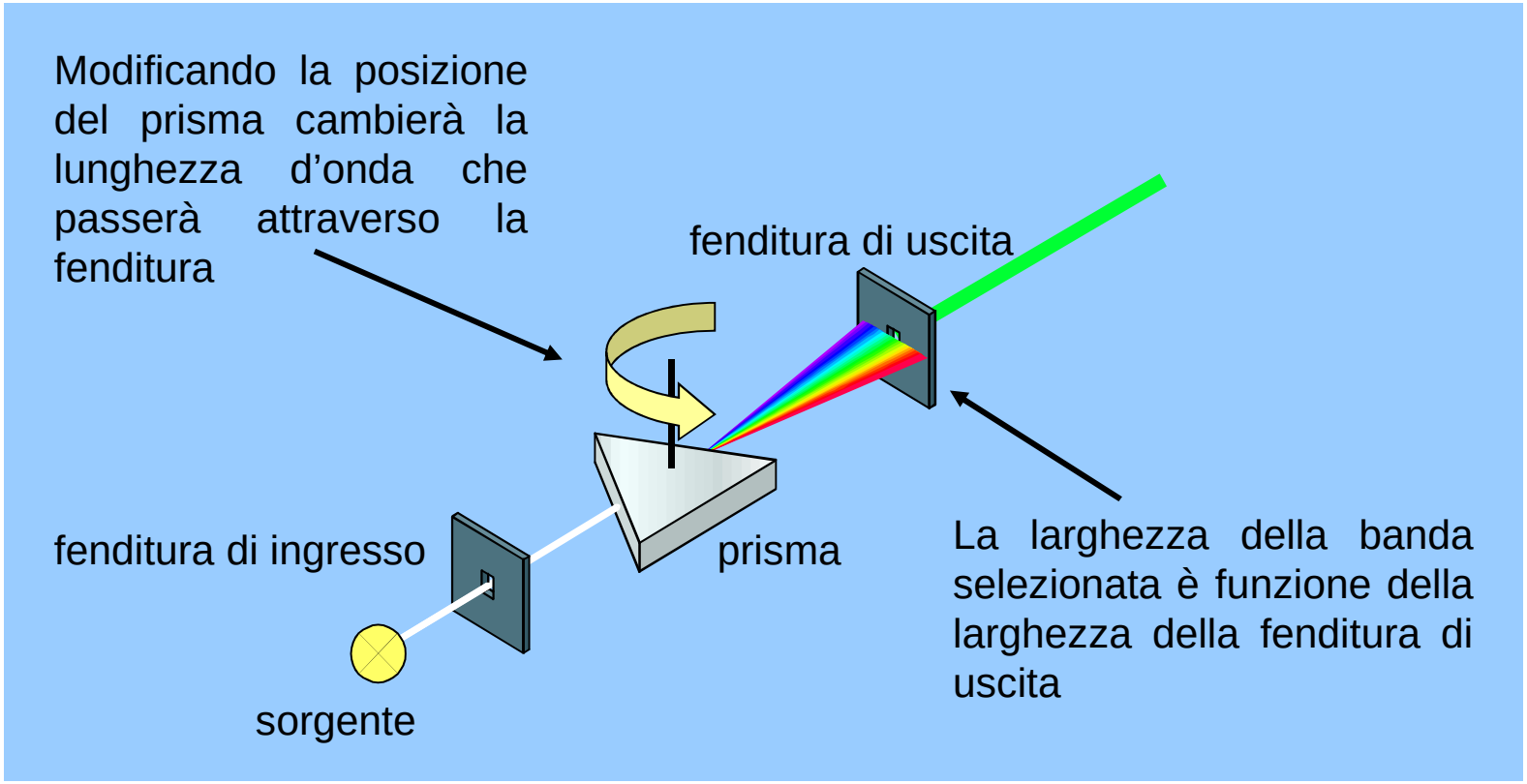
Prismi

- Si basano sul fatto che l'indice di rifrazione di un materiale è funzione della lunghezza d'onda e quindi diverse lunghezze d'onda verranno rifratte con diversi angoli.
- I materiali più usati sono:

Visibile	- quarzo
UV	- N/A
IR	- NaCl, KCl

- Attualmente i prismi sono per lo più stati soppiantati dai reticoli di interferenza

SELETTORE DI LUNGHEZZA D'ONDA



SELETTORE DI LUNGHEZZA D'ONDA

Vantaggi dei prismi

- Permettono di selezionare un ampio ambito di lunghezze d'onda
- Sono relativamente economici

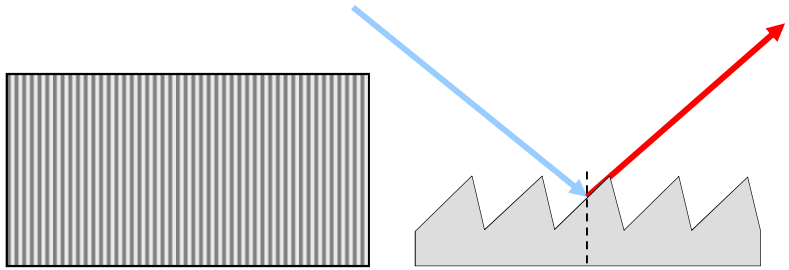
Svantaggi

- **Minore dispersione** a lunghezze d'onda **maggiori**
- La luce deve passare attraverso il materiale del prisma e ciò limita l'intervallo di applicazione del prisma (la radiazione non deve essere assorbita)

SELETTORE DI LUNGHEZZA D'ONDA

Reticoli

- Sono attualmente i monocromatori più utilizzati nella moderna strumentazione analitica
- Consistono di solito in una superfice riflettente contenente una serie di incavi paralleli



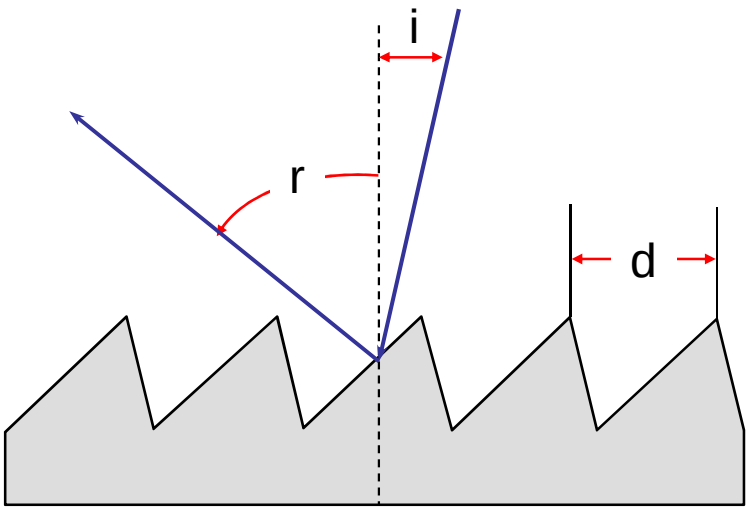
Sono classificati in base al numero di linee/mm, che varia in funzione dell'intervallo di utilizzazione:

- UV/Vis : 300-2000 linee/mm
- IR : 10-200 linee/mm

SELETTORE DI LUNGHEZZA D'ONDA

Il funzionamento dei reticoli è basato sul fenomeno dell'interferenza:

$$n\lambda = d(\sin r - \sin i)$$



i: angolo di incidenza della radiazione

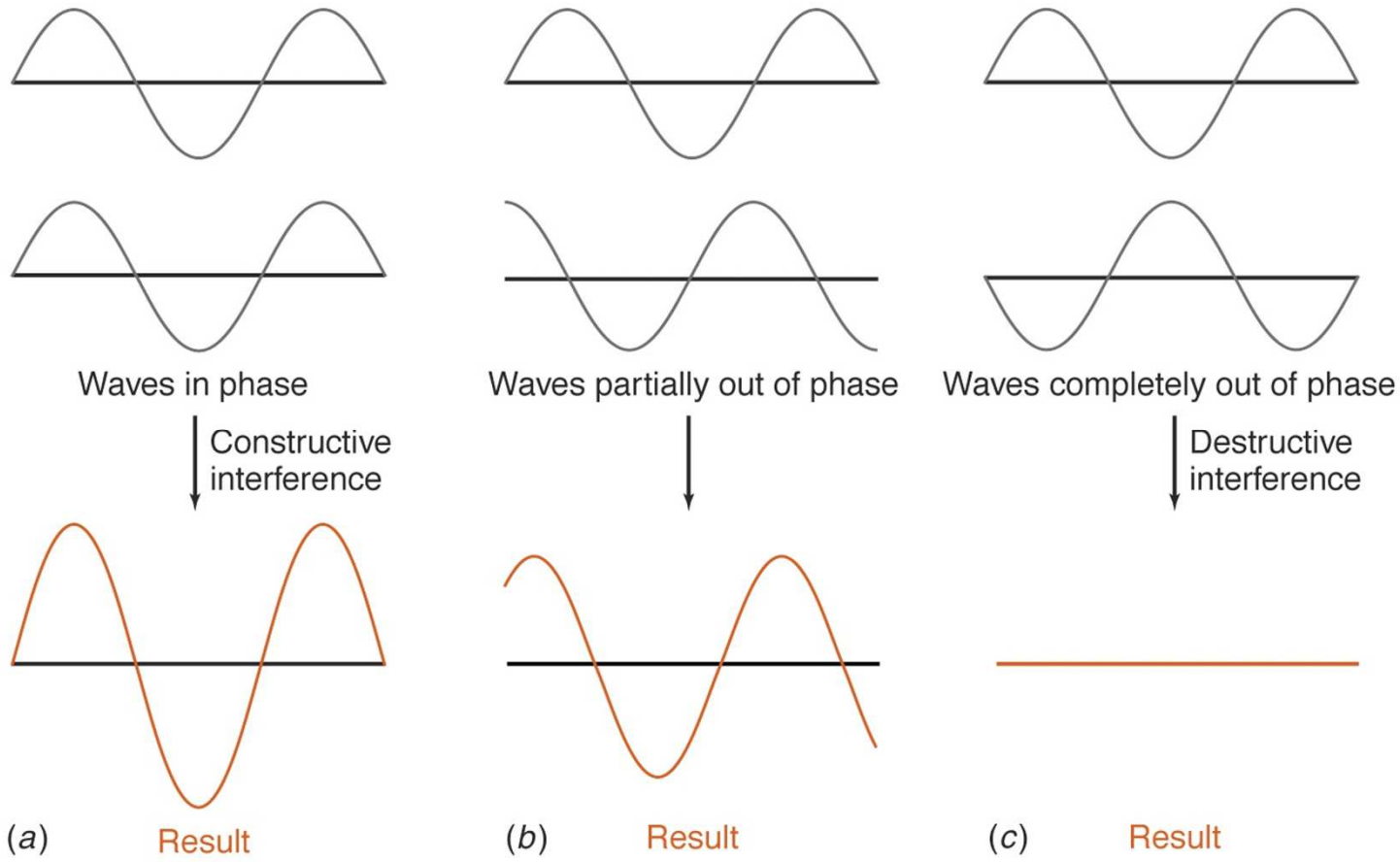
r: angolo di riflessione della radiazione

d: distanza fra le linee

n: ordine di riflessione

λ: lunghezza d'onda

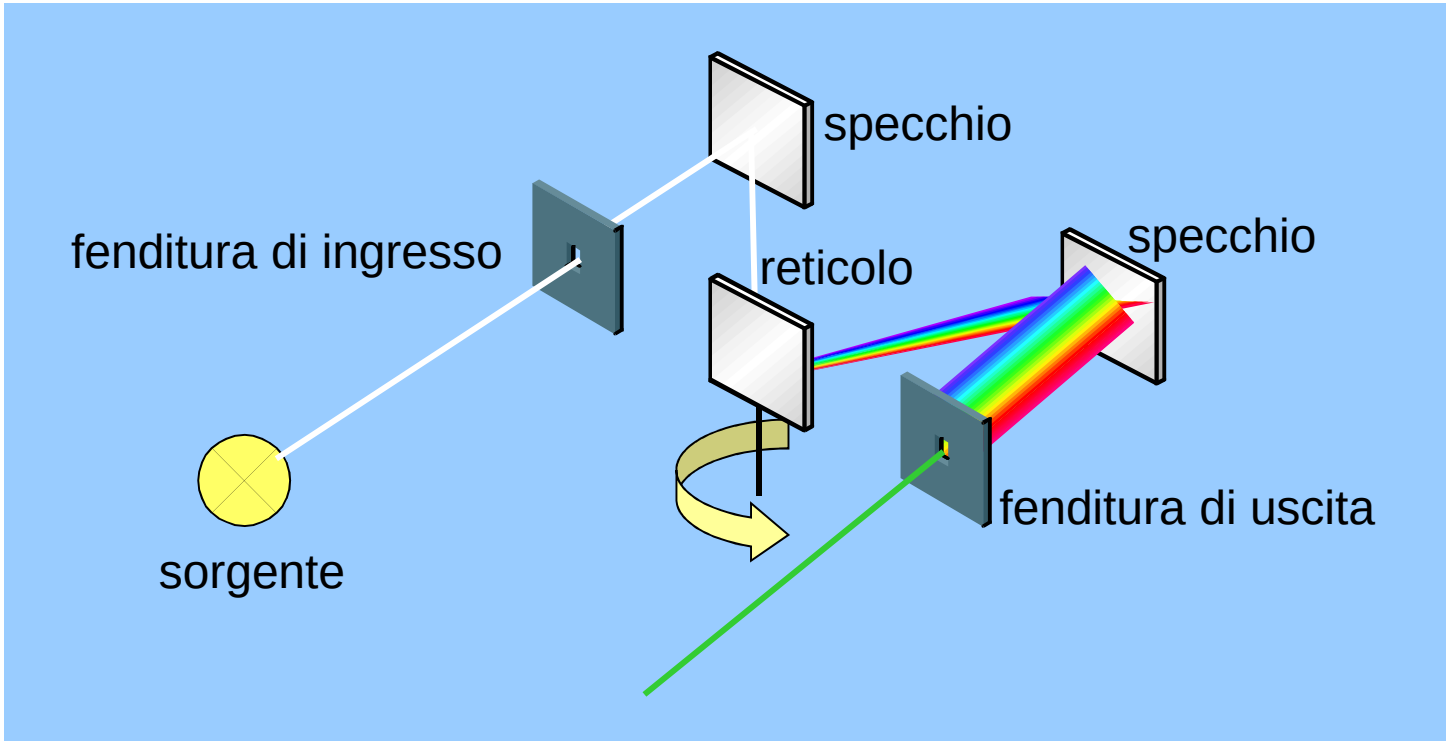
SELETTORE DI LUNGHEZZA D'ONDA



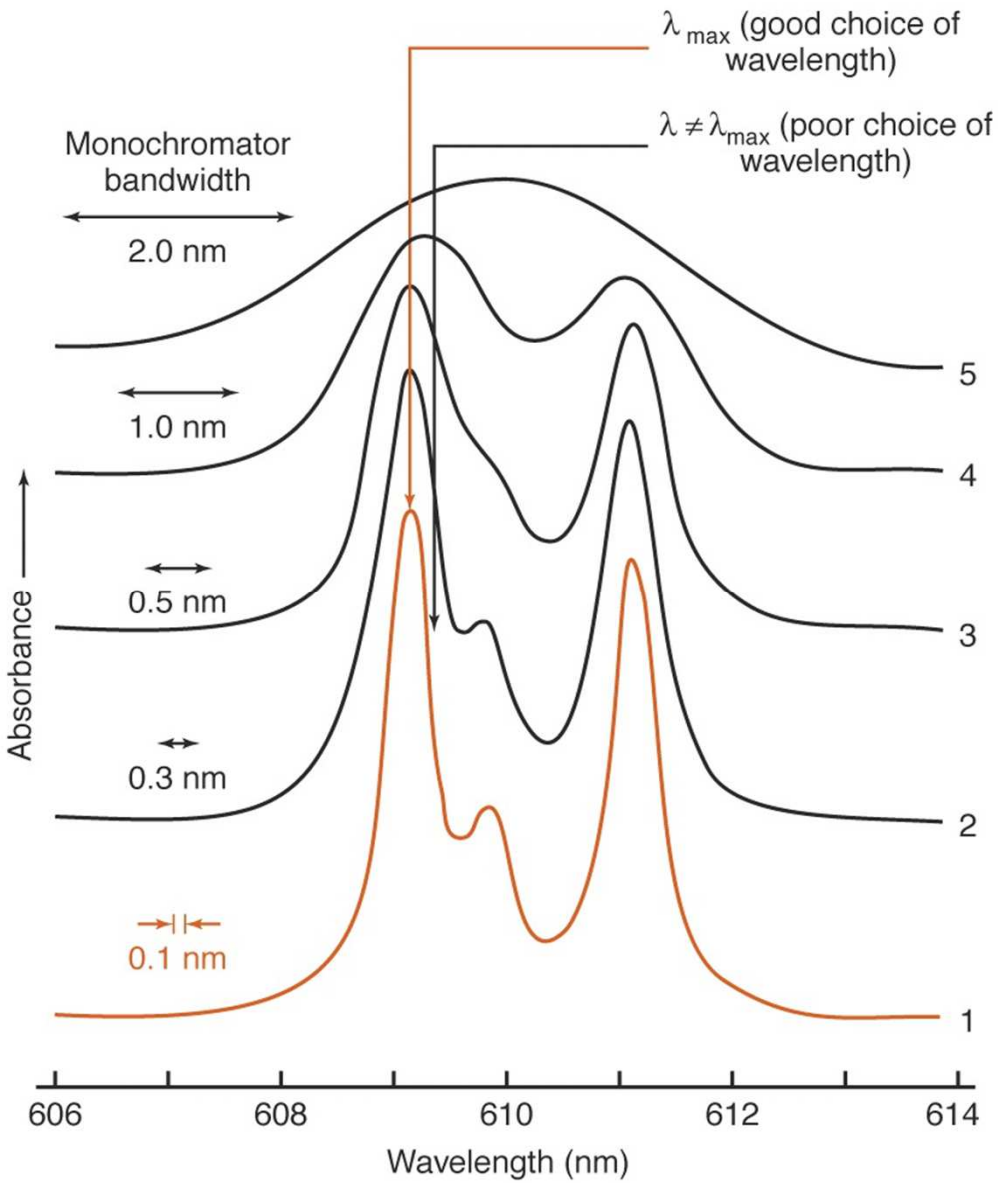
Interferenza tra onde adiacenti che sono sfasate di *(a)* 0° ; *(b)* 90° e *(c)* 180°

SELETTORE DI LUNGHEZZA D'ONDA

Un monocromatore a reticolo contiene comunque anche lenti e fenditure, necessarie al suo corretto funzionamento.



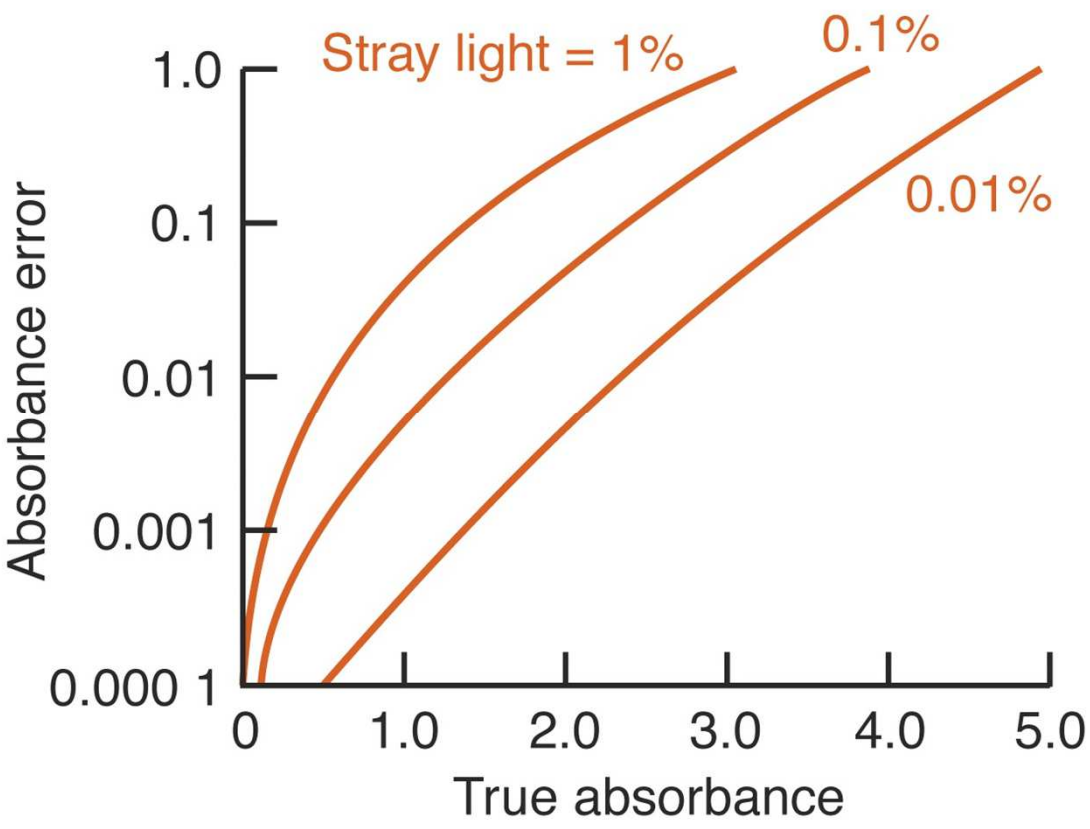
BANDA PASSANTE E SCELTA DELLA LUNGHEZZA D'ONDA



Aumentando la larghezza della banda passante dalla fenditura, le bande di assorbimento si allargano e diminuiscono di intensità.

La scelta migliore è la lunghezza d'onda del massimo di assorbanza

LUCE DIFFUSA ED ERRORI DI LETTURA DELLA ASSORBANZA



La luce diffusa è costituita da radiazione di lunghezza d'onda diversa da quella selezionata.

La luce diffusa è dovuta a fenomeni di diffrazione non intenzionale nel monocromatore, a diffusione ottica, o può giungere dall'esterno.

L'errore e' grave a valori elevati di assorbanza perché la luce diffusa che giunge al rivelatore diventa significativa rispetto a quella trasmessa

RIVELATORI

- Ora è necessario rivelare la luce trasmessa dal campione od emessa dal campione stesso

- Il rivelatore (detector) deve essere in grado di convertire la luce in un segnale misurabile

- I rivelatori si basano su diversi principi fisici, in funzione dellla lunghezza d'onda della radiazione incidente

RIVELATORI

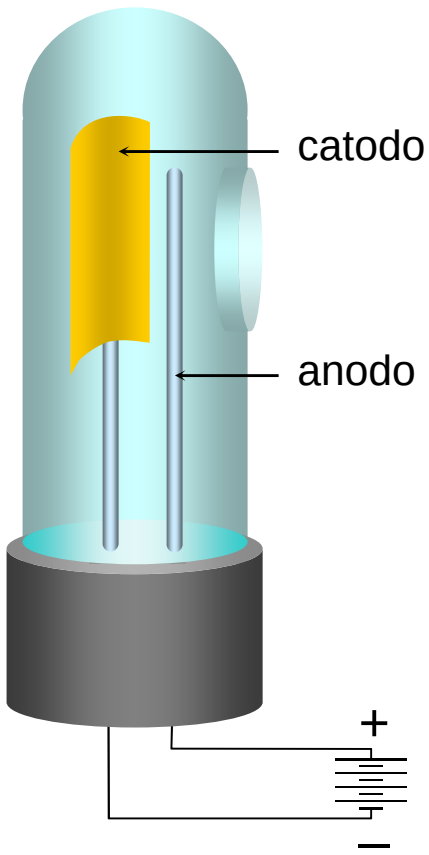
Rivelatori più comuni

Tipo di Rivelatore	intervallo di λ (nm)	proprietà misurata	uso tipico
Fototubo	150-1000	Int. corrente	UV
Fotomoltiplicatore	150-1000	Int. corrente	UV/Vis
Stato Solido	350-3000	varie	varie
Termocoppia	600-20000	Int. corrente	IR
Termistore	600-20000	Int. corrente	IR

RIVELATORI

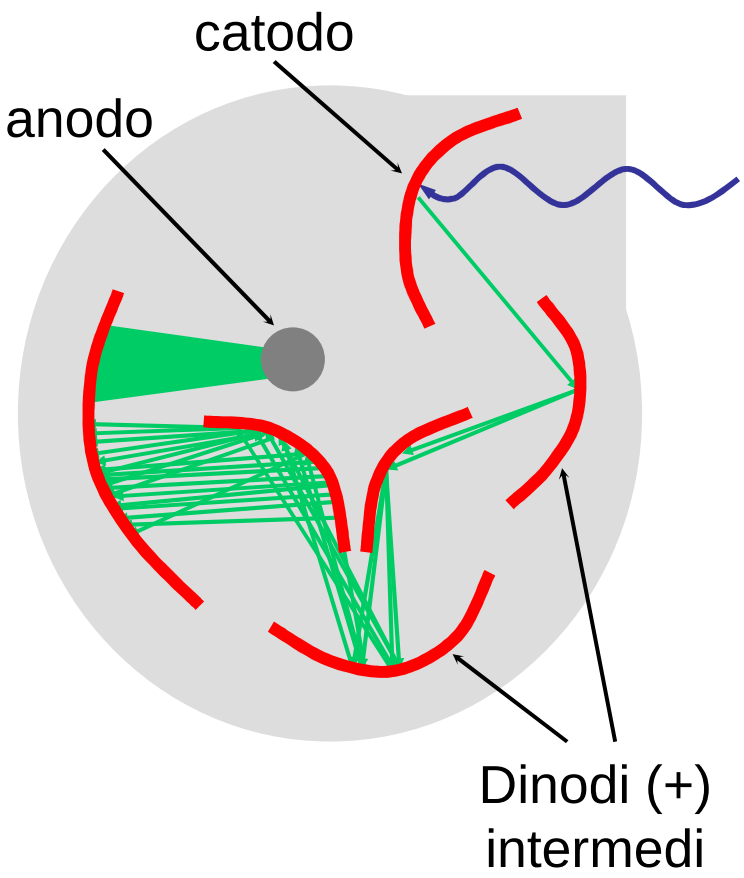
Fototubo

- Si basa sull'effetto fotoelettrico: un fotone incide sul catodo rivestito di un materiale fotosensibile, provocando l'emissione di un elettrone
- Si ottiene una corrente proporzionale alla intensità della radiazione incidente
- I fototubi sono soggetti ad un rumore di fondo (dark current) causato da effetti termici



Fotomoltiplicatori (PM)

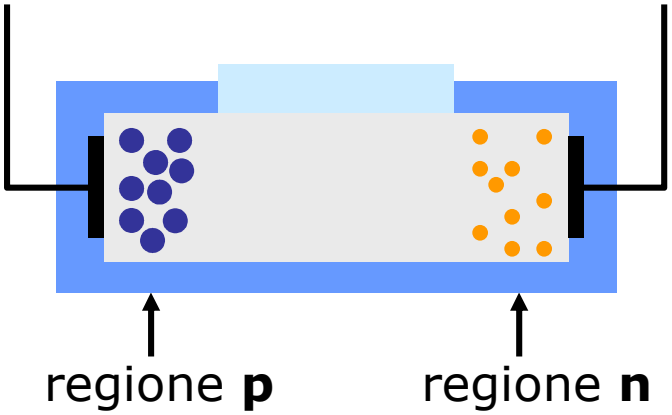
- Questi rivelatori sono simili al fototubo: la radiazione colpisce infatti un catodo iniziale, provocando l'emissione di elettroni
- Gli elettroni prodotti vengono però moltiplicati attraverso la collisione con una serie di dinodi intermedi
- La corrente misurata è così amplificata, rispetto a quella iniziale, di un fattore molto elevato (10^6 – 10^7)



RIVELATORI

Rivelatori a stato solido: fotodiodo

- Quando si applica un opportuno potenziale ad un cristallo di Si drogato si ottengono due aree:
  - **n** - ricche di elettroni
  - **p** - ricche di cariche positive

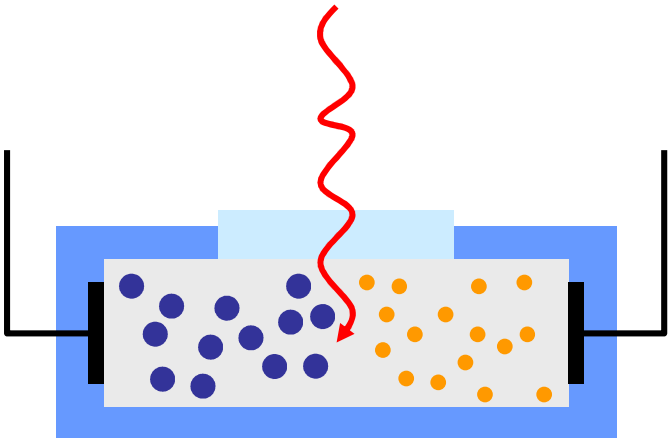


- In condizioni di riposo non si ha passaggio di corrente

RIVELATORI

Rivelatori a stato solido: fotodiodo

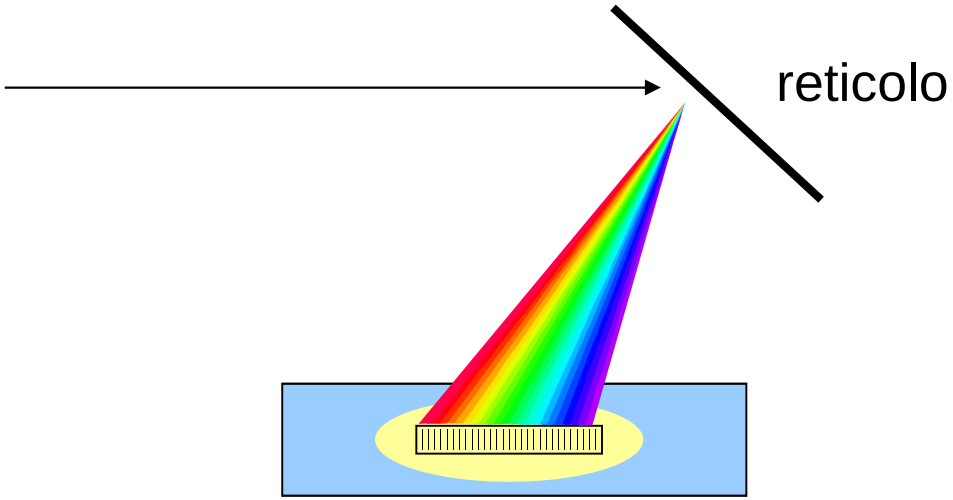
- Quando il fotodiodo viene esposto alla luce, la radiazione incidente produce nuove coppie di cariche positive e negative all'interno del materiale, permettendo il passaggio della corrente.
- L'intensità di corrente è proporzionale alla quantità di luce incidente.
- Un fotodiodo è più sensibile di un fototubo e costa meno di un fotomoltiplicatore.



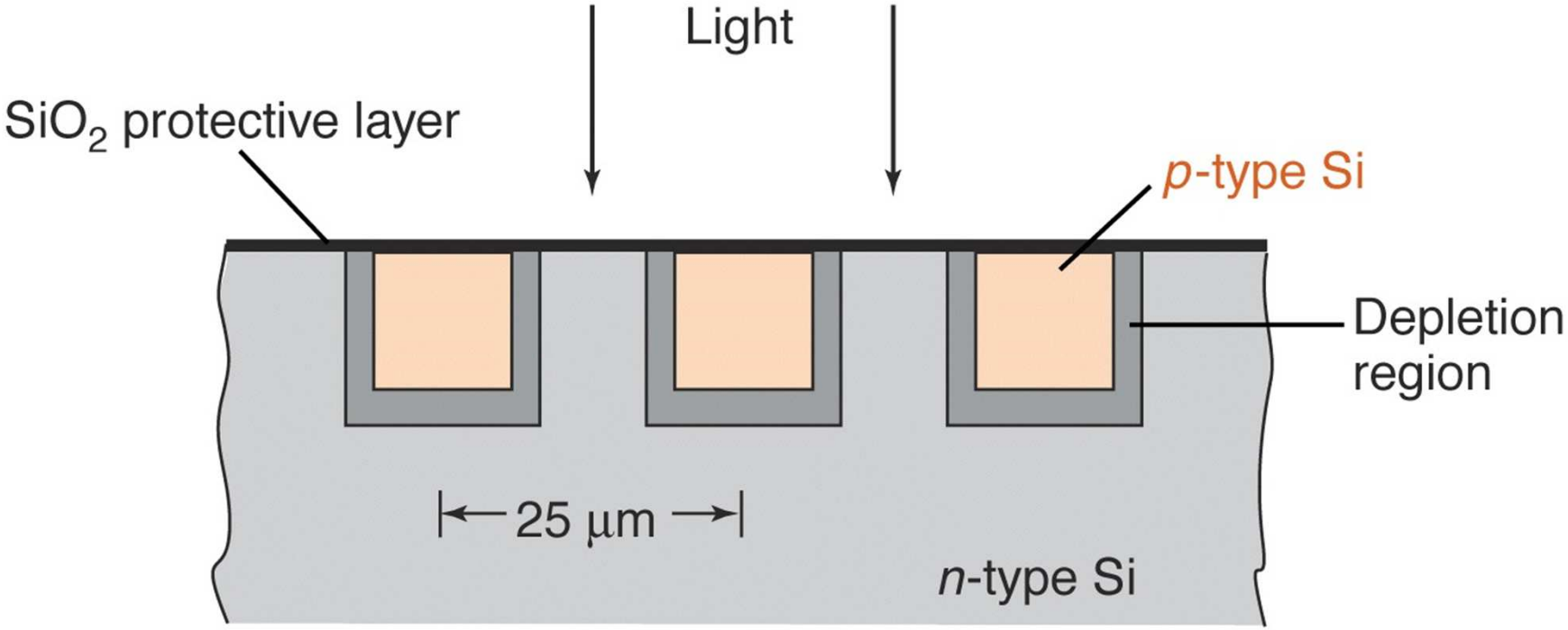
RIVELATORI

Array di fotodiodi

- E' costituito da una serie di fotodiodi, ricavati ad intervalli di spazio regolari su di un microchip
- Inserito in uno strumento con una ottica opportuna, questo tipo di rivelatore permette di misurare simultaneamente radiazioni di diverse lunghezze d'onda

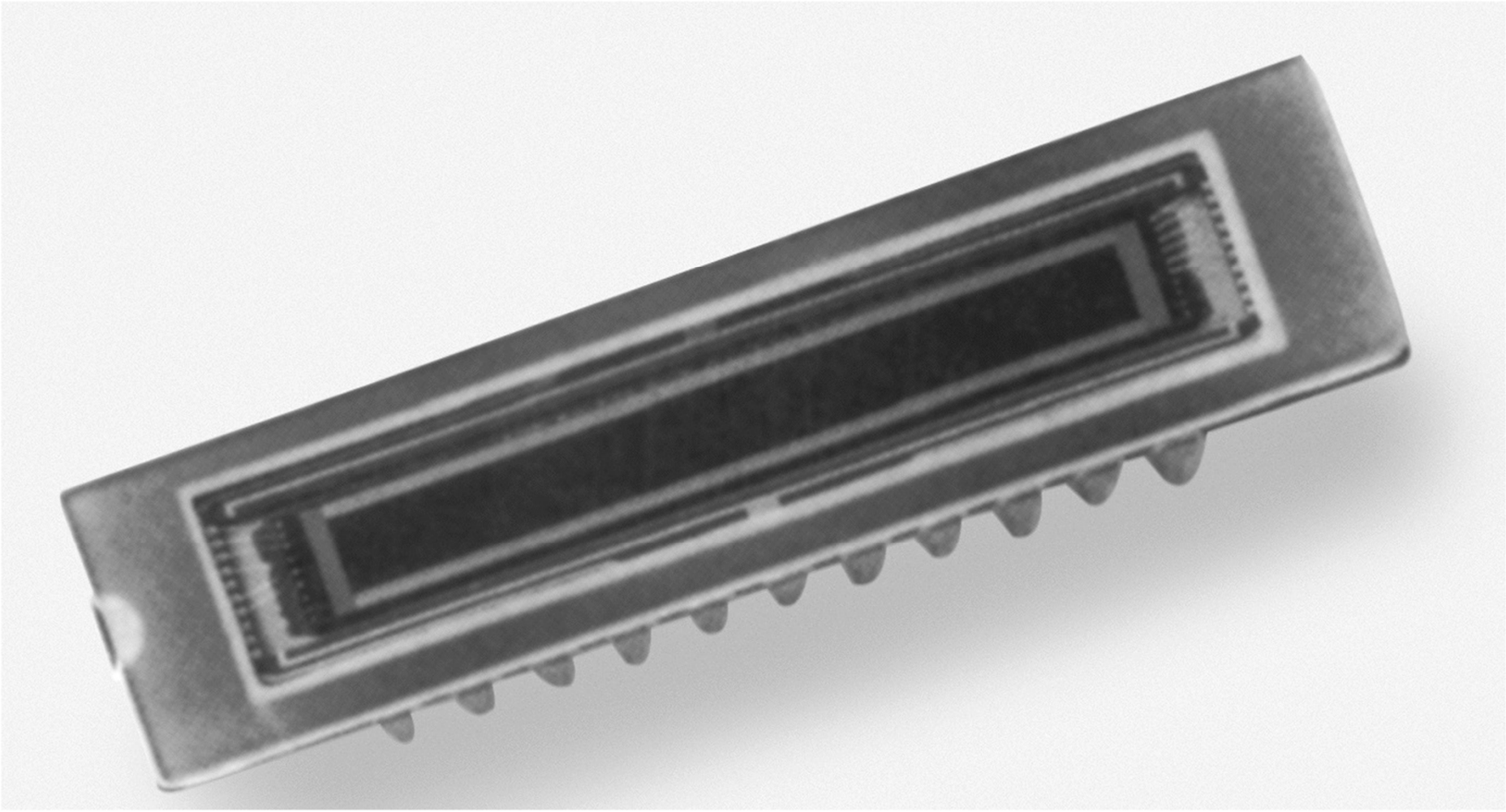


DAD MICROCHIP

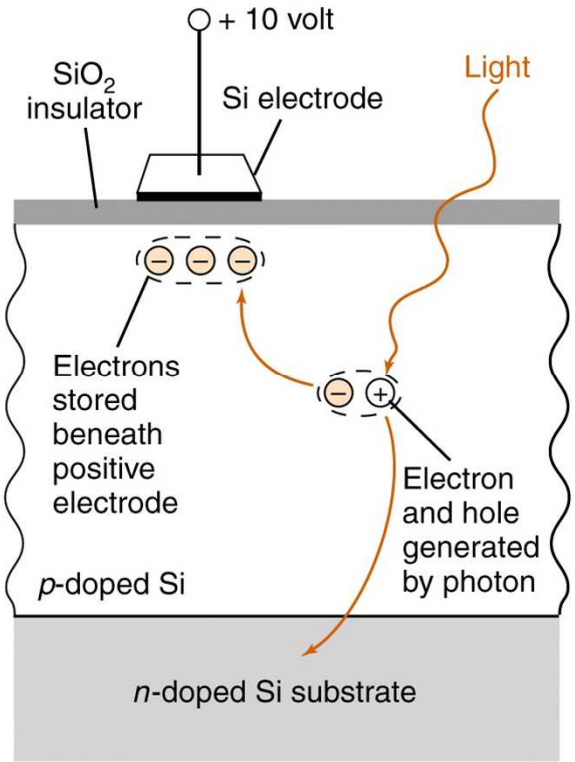


(*a*)

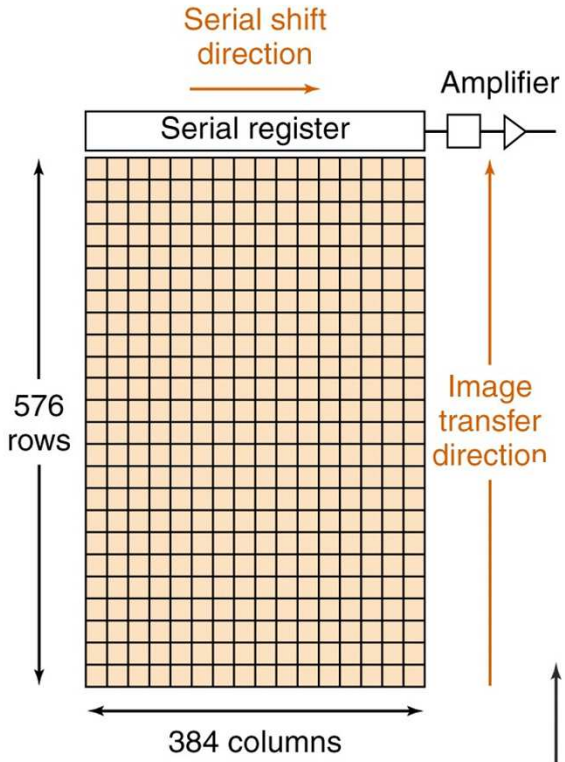
DAD MICROCHIP



RIVELATORI CCD

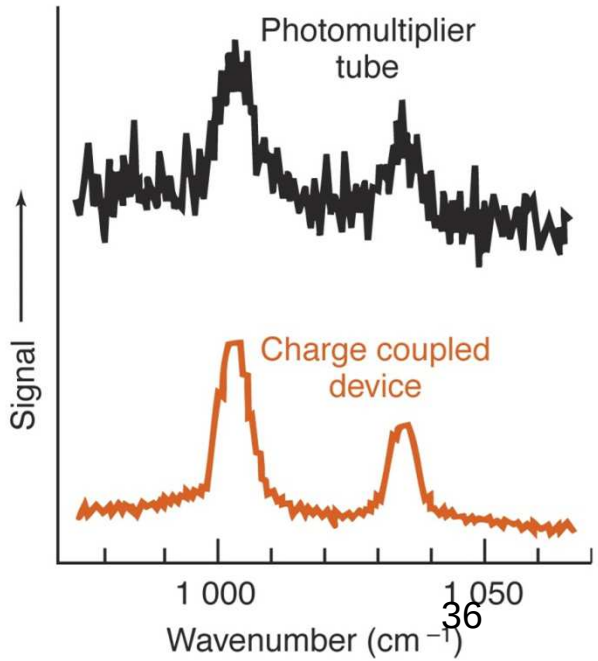


(a)



(b)

I sistemi CCD sono i sistemi usati dalle videocamere.
Sono estremamente sensibili e hanno basso rumore



Confronto tra spettri registrati da un fotomoltiplicatore ed da un dispositivo CCD

ELABORAZIONE DEL SEGNALE E RISPOSTA

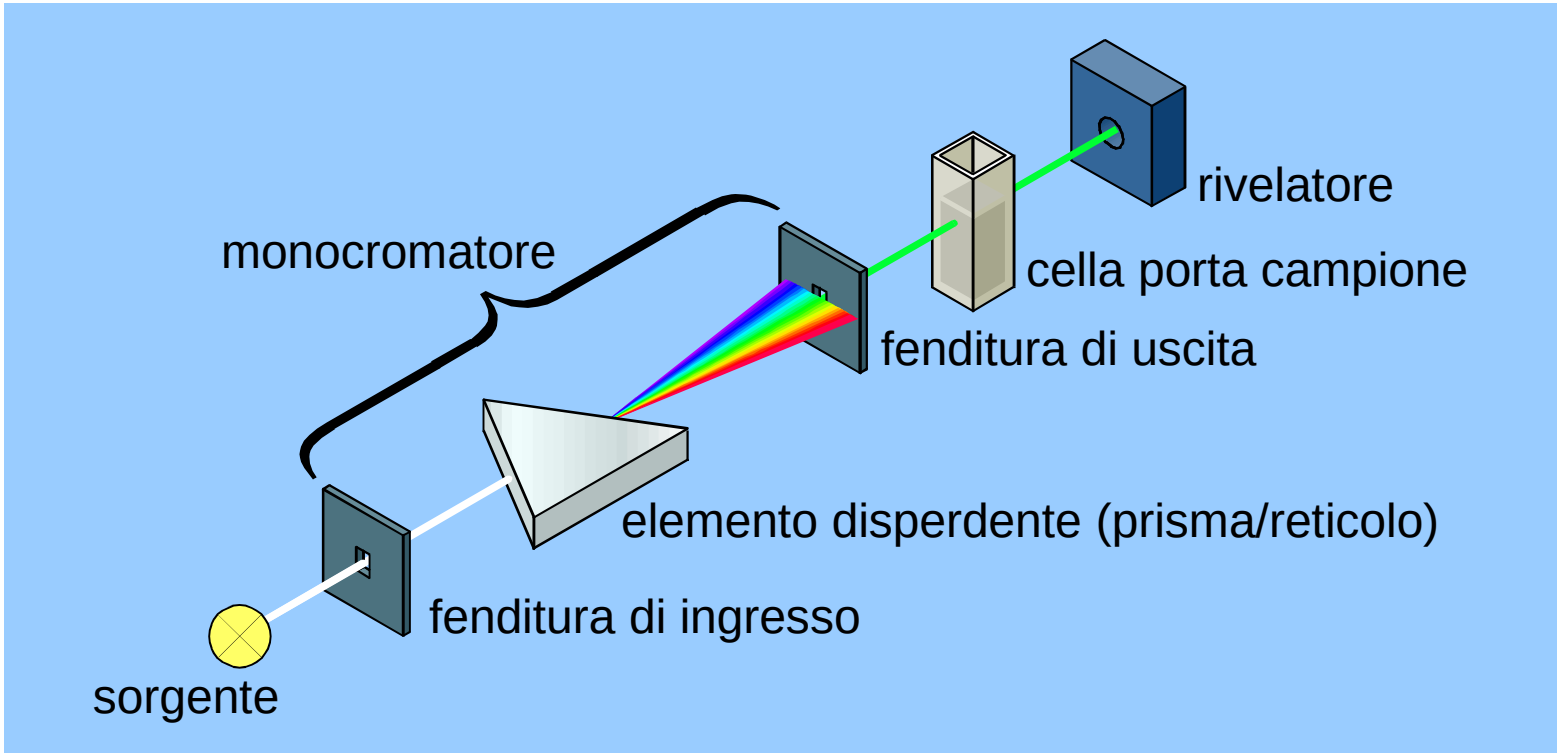
- Il segnale in uscita dal rivelatore viene infine amplificato al fine di produrre un segnale facilmente misurabile.
- La maggior parte degli strumenti attualmente in commercio è in grado di eseguire ulteriori elaborazioni del segnale (medie, uso di filtri per migliorare la qualità del segnale, eliminazione del rumore…) e di presentarlo in una forma adeguata (display, stampati, file dati, …).
- Spesso il sistema è anche in grado di effettuare tutti i calcoli necessari per avere direttamente il risultato dell'analisi.

STRUMENTAZIONE COMPLETA

Gli strumenti per spettrofotometria di assorbimento si possono suddividere nelle seguenti categorie:

- **Singolo raggio**
- **Doppio raggio**
- **Multicanale**

SPETTROFOTOMETRO A SINGOLO RAGGIO



SPETTROFOTOMETRO A SINGOLO RAGGIO

- Questo strumento lavora ad una singola lunghezza d'onda selezionata.
- E' utilizzato normalmente per effettuare analisi che prevedono misure ad una sola lunghezza d'onda e per soluzioni con un solo analita.
- Non è adatto a misura da effettuarsi a differenti lunghezze d'onda od alla costruzione di spettri di assorbimento, in quanto non è possibile tenere conto delle variazioni della emissione della sorgente, dell'assorbimento del solvente e della cella e della risposta al detector al variare della lunghezza d'onda.

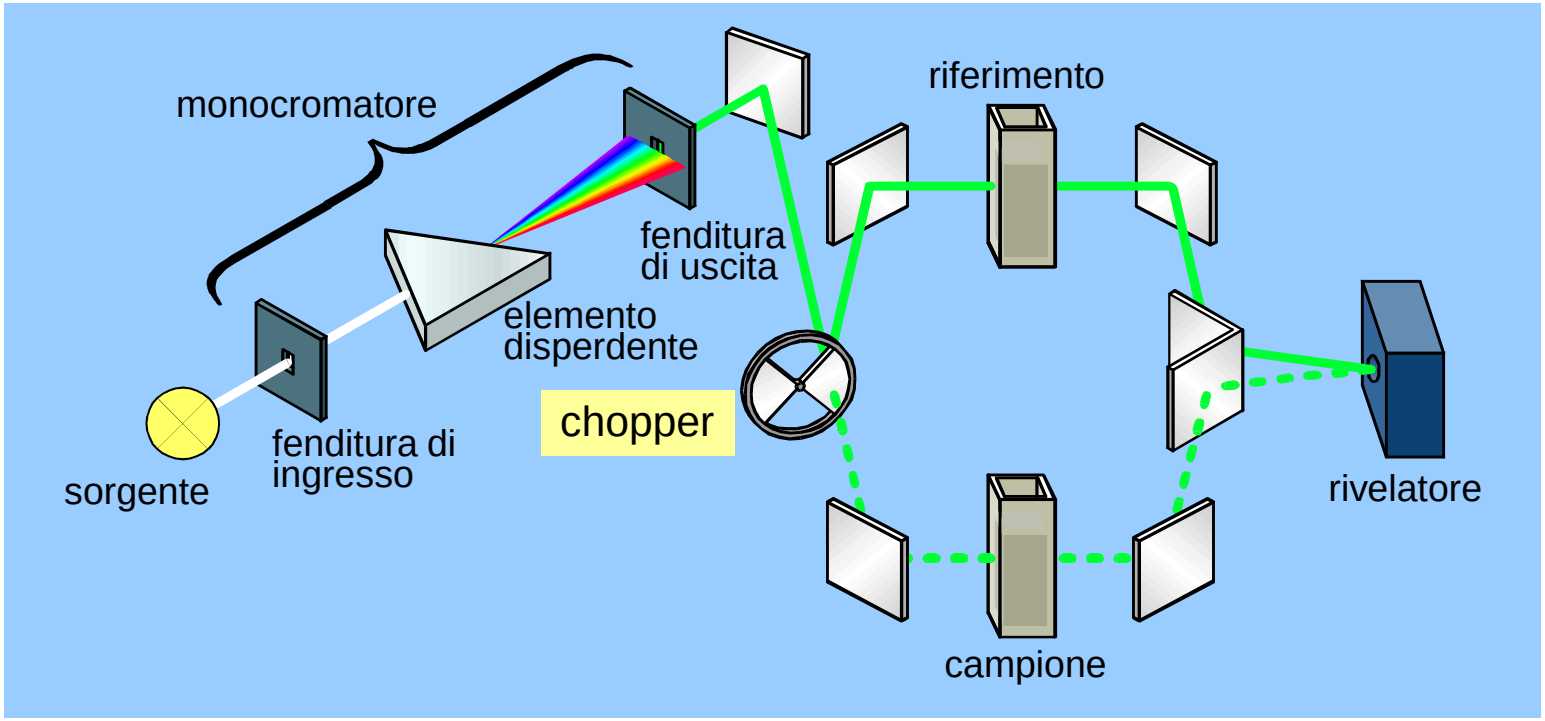
SPETTROFOTOMETRO A DOPPIO RAGGIO

- 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 spettrofotometri a doppio raggio:
  - **spettrofotometri a doppio raggio nel tempo**
  - **spettrofotometri a doppio raggio nello spazio**

SPETTROFOTOMETRO A DOPPIO RAGGIO NEL TEMPO

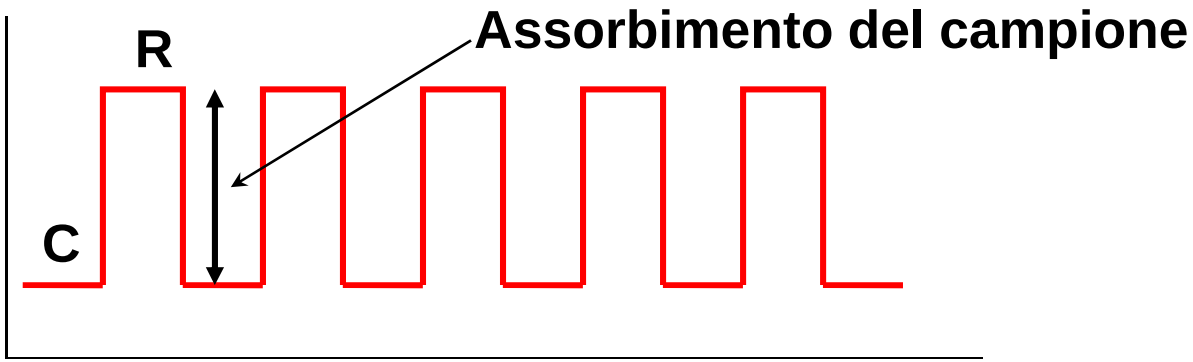
- Uno spettrofotometro a doppio raggio nel tempo utilizza un “chopper” (di solito uno specchio rotante) per inviare alternativamente la radiazione attraverso il campione ed attraverso il riferimento.
- La radiazione alternativamente trasmessa da campione e riferimento viene poi misurata da un unico rivelatore.

SPETTROFOTOMETRO A DOPPIO RAGGIO NEL TEMPO

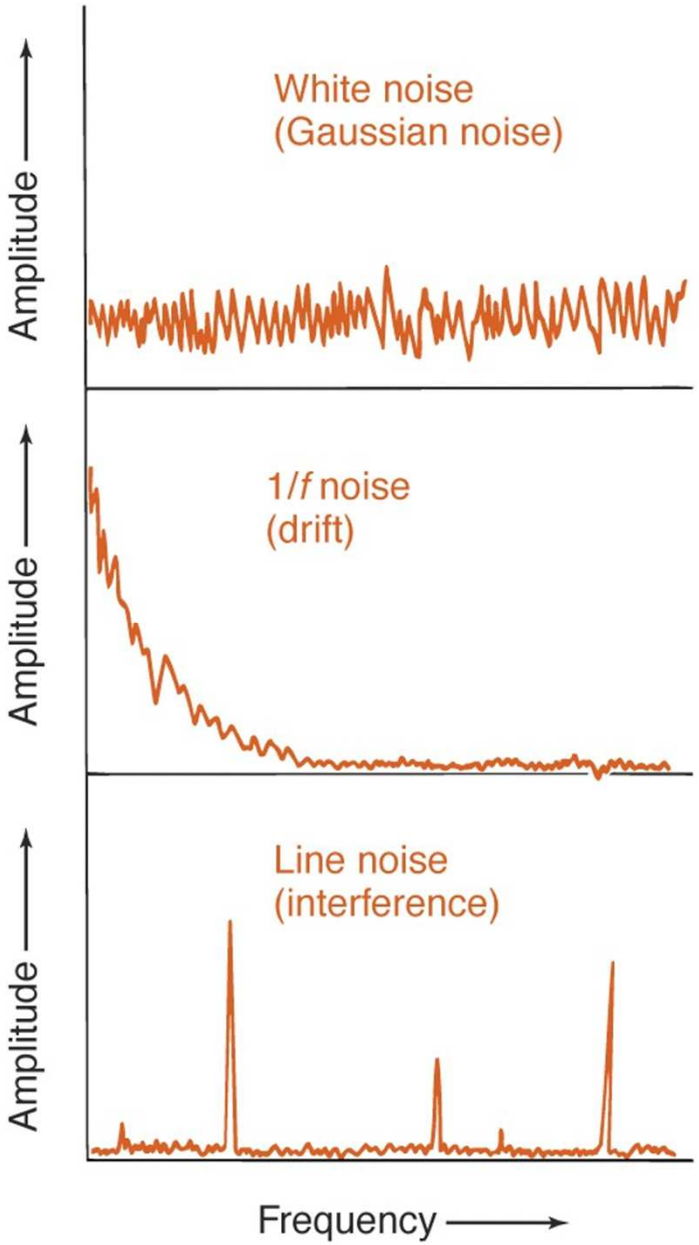


CHOPPING: MODULAZIONE DEL RUMORE

- Questo approccio riduce gli errori legati a variazioni nell'emissione della lampada e nella risposta del rivelatore, poiché l'assorbimento del campione viene misurato relativamente a quello del riferimento.
- Il rumore (noise) viene inoltre ridotto utilizzando un amplificatore "lock-in" che misura solo i segnali con la giusta frequenza, cioè quella con la quale il fascio di radiazione viene alternato fra campione e riferimento.



TIPI DI RUMORE

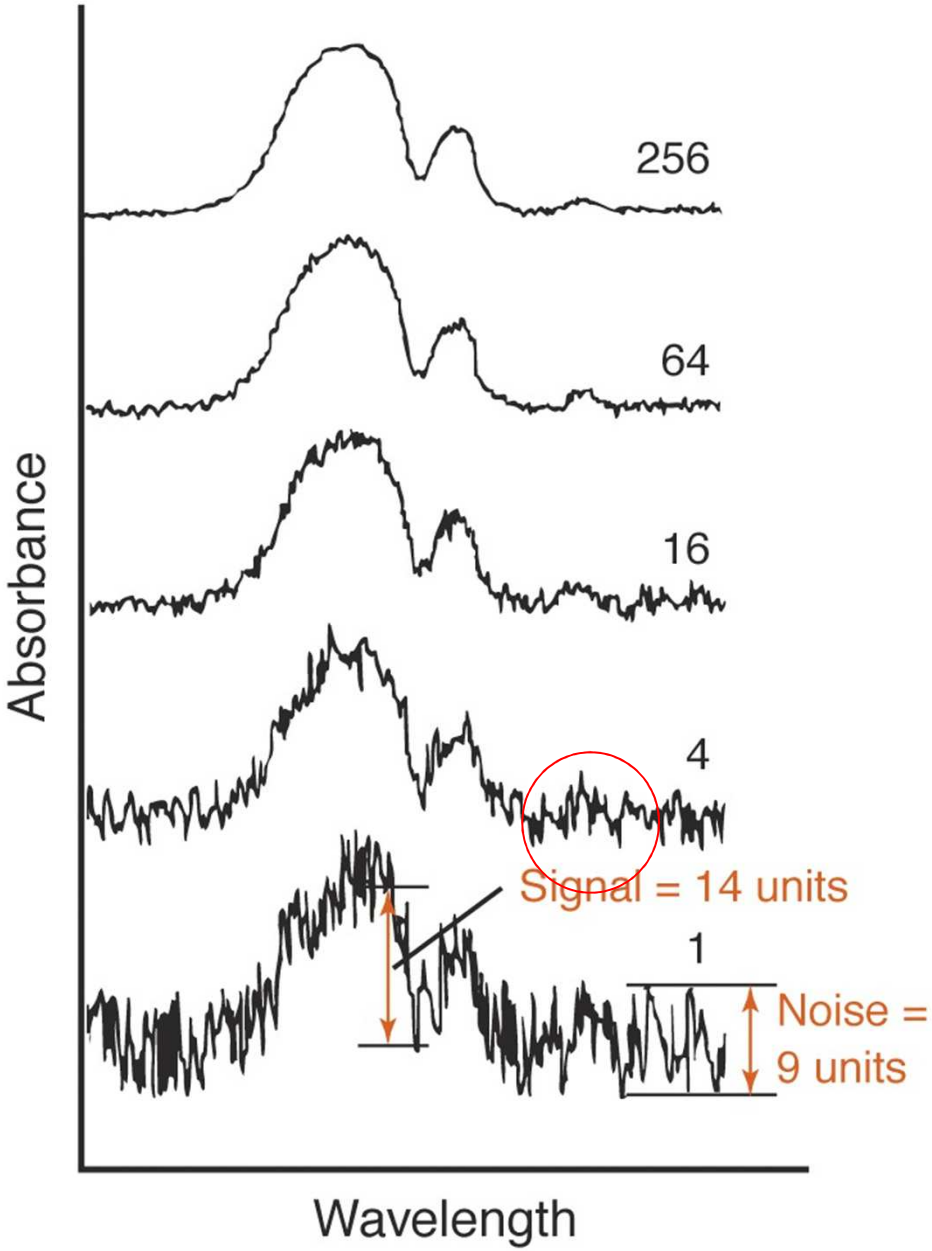


Il *rumore bianco* (gaussiano) è dovuto al moto casuale degli elettroni di un circuito elettrico

Il *rumore 1/f* (deriva) è a bassa frequenza ed è generato da variazioni di voltaggio nella alimentazione dello strumento o da variazioni della risposta di componenti strumentali

Il *rumore di linea* (interferenza) si presenta a frequenze precise, come ad esempio alla frequenza della rete elettrica (50 Hz in Europa)

RIDUZIONE DEL RUMORE MEDIANTE MEDIA



Effetto della media del segnale sul rumore di uno spettro

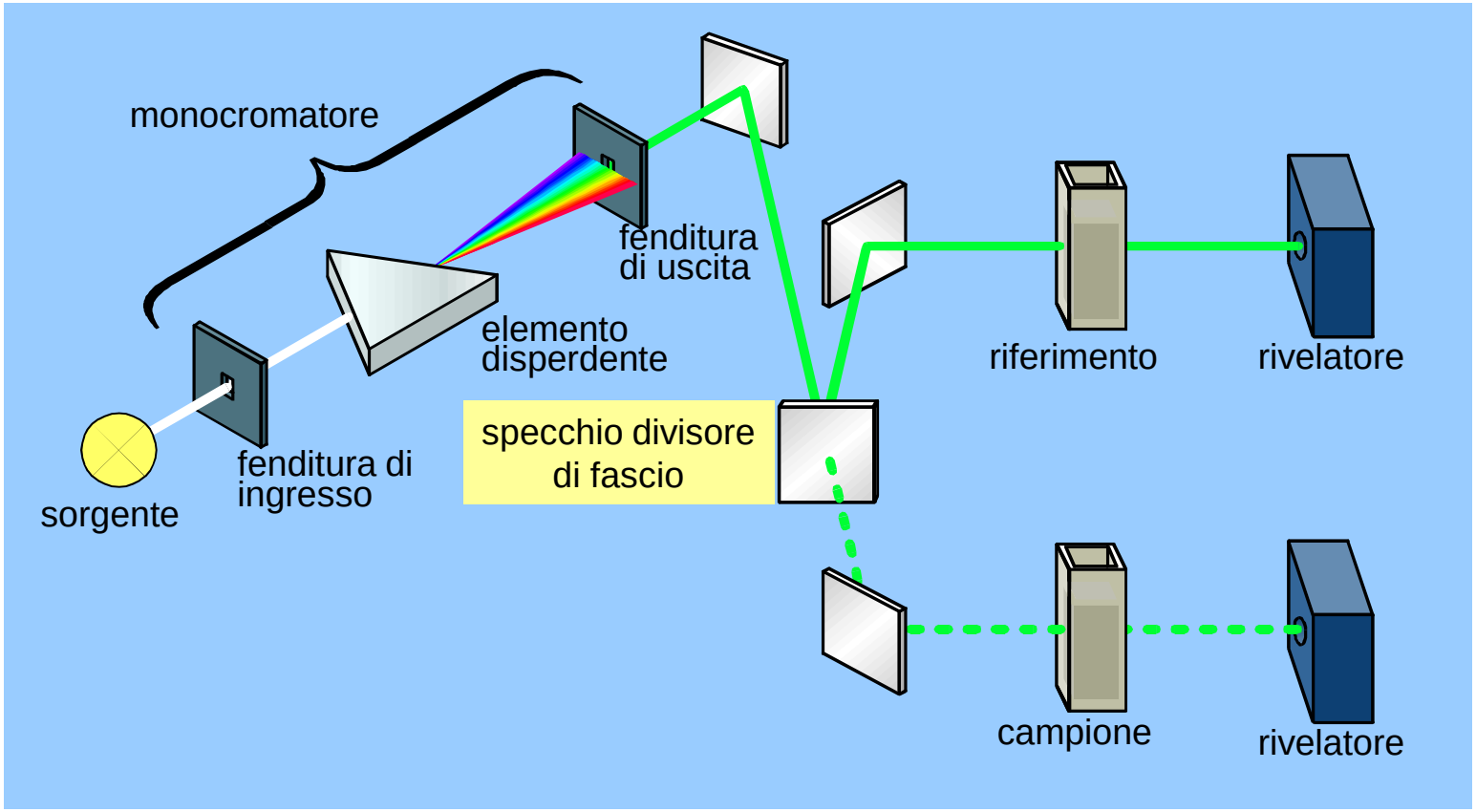
SPETTROFOTOMETRO A DOPPIO RAGGIO NEL TEMPO

- Con uno spettrofotometro a doppio raggio nel tempo si possono ottenere facilmente spettri, ed il rumore di fondo viene notevolmente ridotto.
- Esistono però alcune limitazioni: ad esempio, non è possibile misurare correttamente variazioni di assorbanza che avvengono a velocità confrontabili o maggiori di quella di rotazione del chopper. Non è quindi possibile effettuare studi cinetici che coinvolgono reazioni veloci.

SPETTROFOTOMETRO A DOPPIO RAGGIO NELLO SPAZIO

- 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

SPETTROFOTOMETRO A DOPPIO RAGGIO NELLO SPAZIO



RIVELATORE UV/Vis

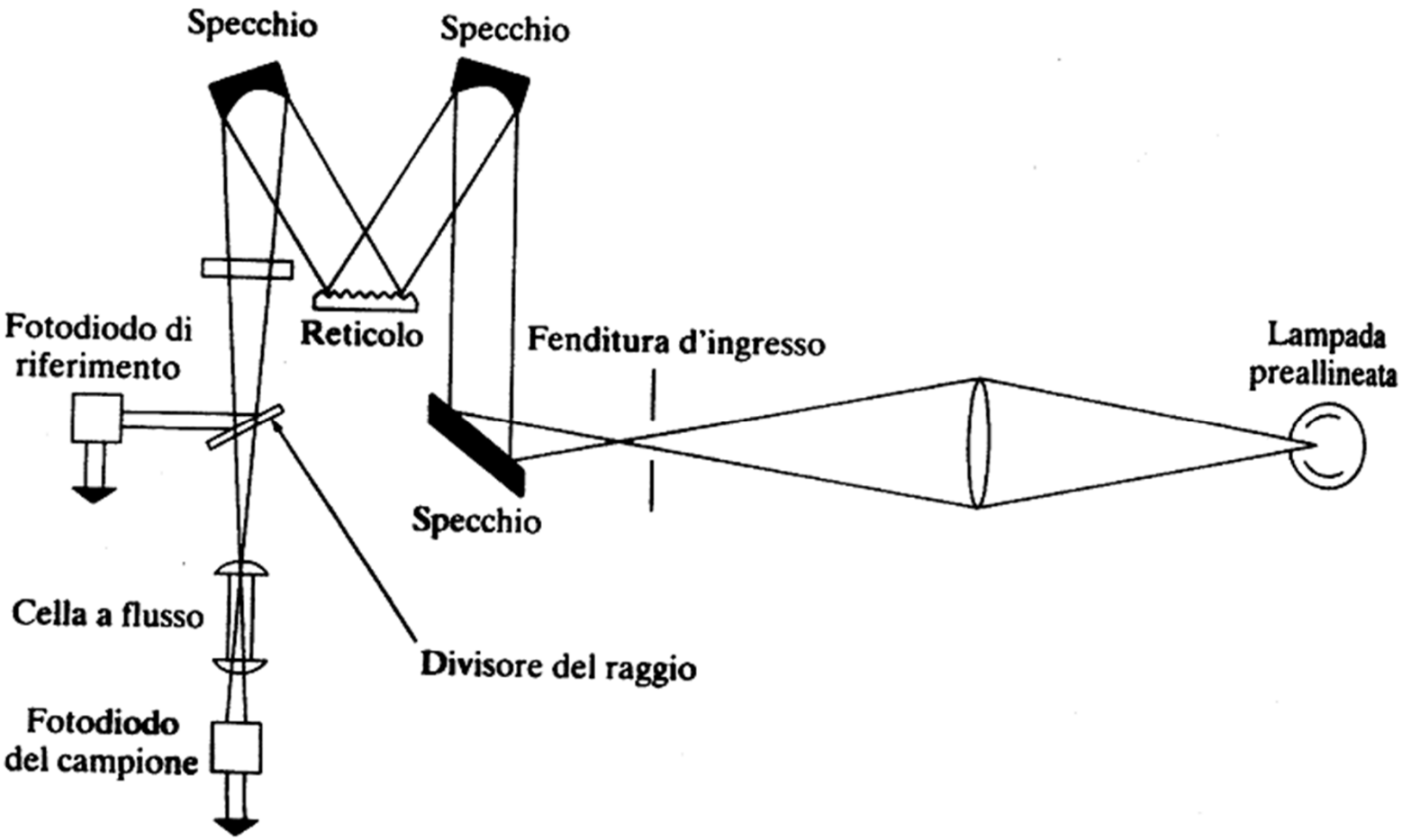
E' un rivelatore che misura la capacità di assorbire una radiazione luminosa nell'UV/Vis (200-700 nm) da parte degli analiti.

I solventi che compongono la fase mobile non devono assorbire alle lunghezze d'onda utilizzate per l'analisi.

I rivelatori UV/Vis si distinguono in:

- rivelatori a lunghezza d'onda singola
- rivelatori a lunghezza d'onda variabile
- rivelatori a matrice di fotodiodi (photodiode array)

SCHEMA DI RIVELATORE UV/Vis

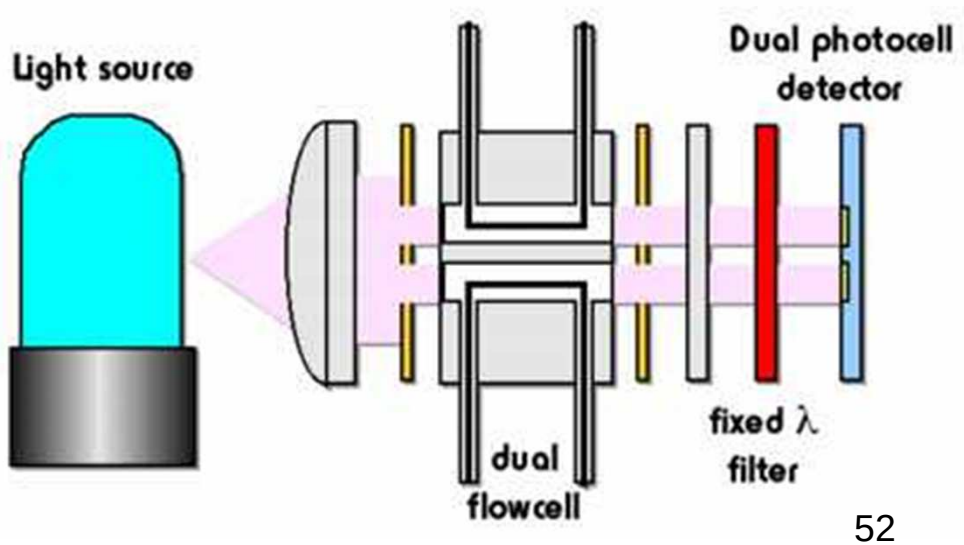


RIVELATORE UV/Vis A FILTRO E A MONOCROMATORE

Questa figura riporta un rivelatore UV/Vis a filtro (in rosso), che permette di leggere l'assorbanza ad una sola lunghezza d'onda (quella selezionata dal filtro).

Sostituendo il filtro con un monocromatore, si ottiene un rivelatore a lunghezza d'onda variabile, che permette di rivelare in una sola analisi composti con spettri di assorbimento molto diversi tra loro.

La cella a flusso di lettura qui rappresentata è doppia: in una delle due celle passa l'eluato della colonna, nell'altra passa la fase mobile. Questo permette di migliorare la linea di base per sottrazione del segnale del solvente



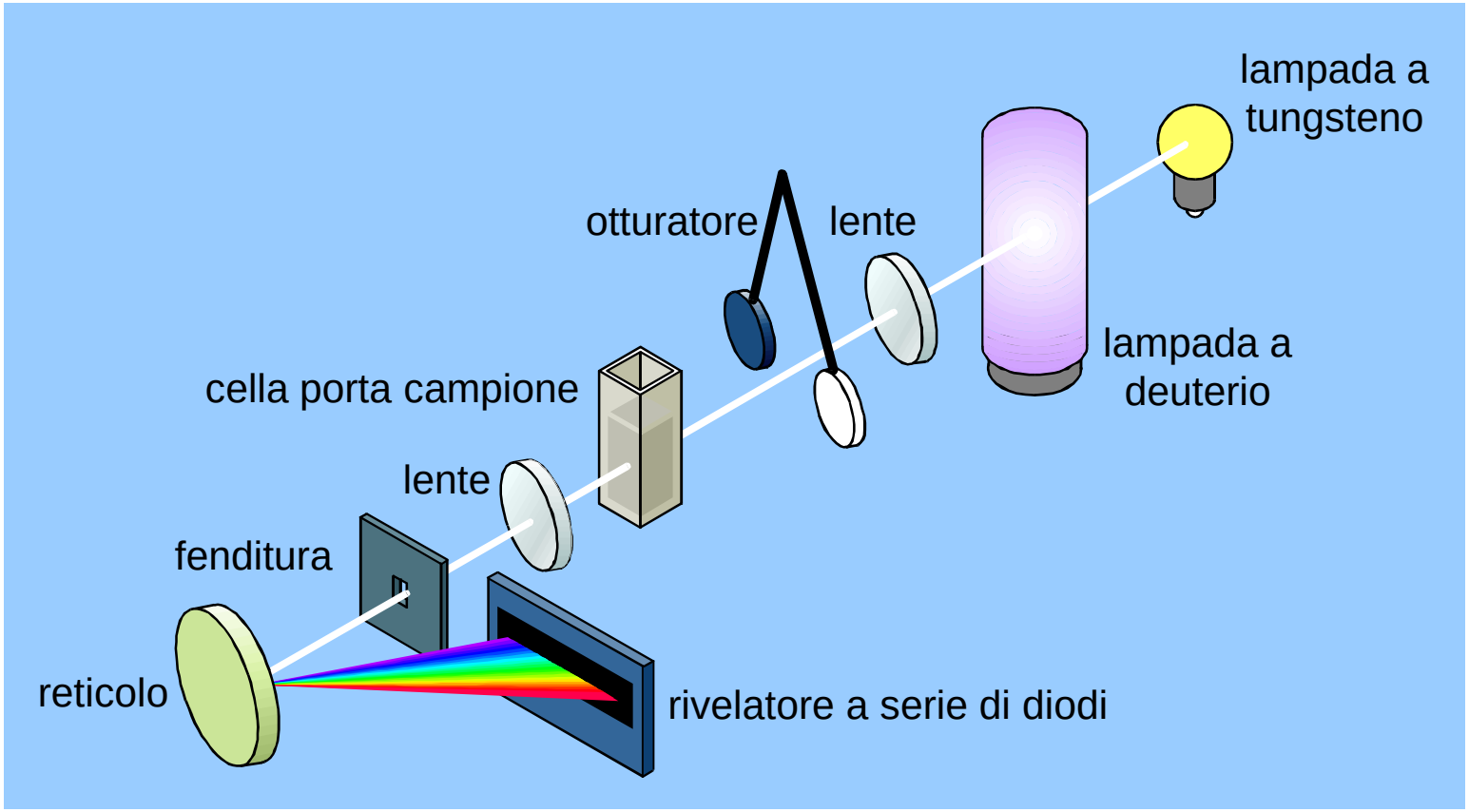
SPETTROFOTOMETRO A SINGOLO RAGGIO A SERIE DI DIODI

- Sono attualmente disponibili molti strumenti basati su una tecnologia a singolo raggio ed in grado di permettere la misura di spettri di assorbimento.
- Prima della misura si deve effettuare l'acquisizione dello spettro di assorbimento del riferimento, che viene memorizzato e sottratto allo spettro di assorbimento misurato per ogni campione.
- La maggior parte di questi strumenti usa rivelatori a serie di diodi, in modo da acquisire simultaneamente l'intero spettro.

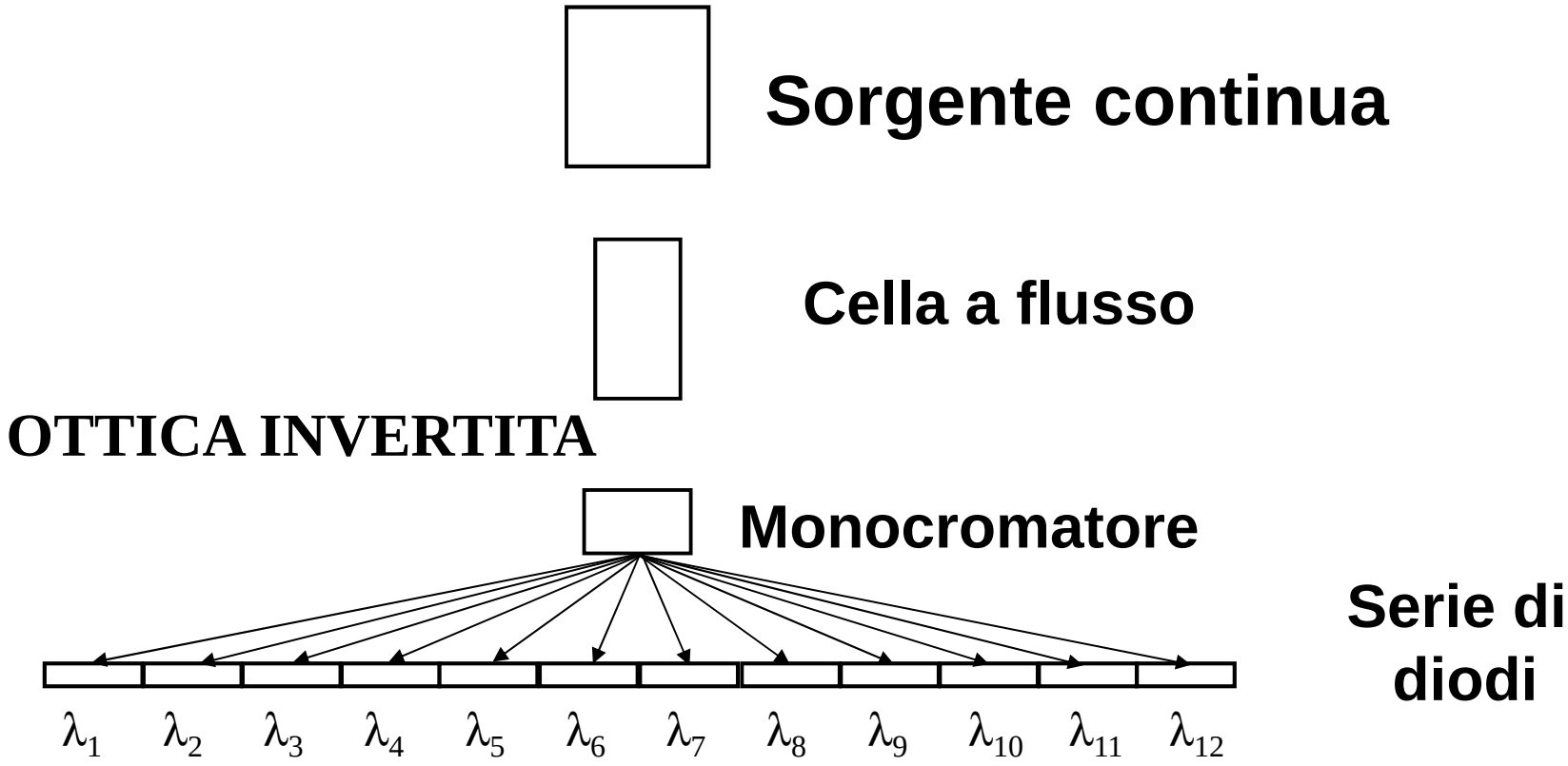
SPETTROFOTOMETRO A SINGOLO RAGGIO A SERIE DI DIODI

- Questi strumenti sono in grado di effettuare la misura in un tempo brevissimo (anche meno di un secondo), permettendo quindi di studiare anche variazioni spettrali che avvengono in tempi molto brevi.
- Possiedono però certe limitazioni: ad esempio, la risoluzione è limitata dal numero degli elementi del rivelatore a serie di fotodiodi, e di solito non è minore di 0,5-1 nm.

SPETTROFOTOMETRO A SINGOLO RAGGIO A SERIE DI DIODI



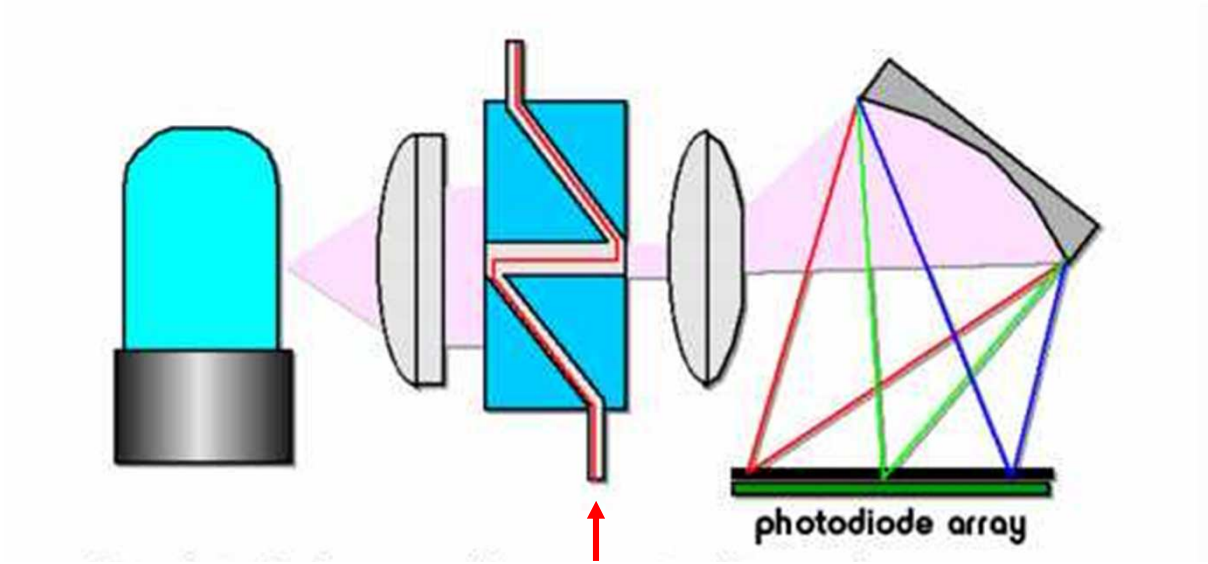
Diode-array detector (DAD)



Istante per istante, lo strumento registra lo SPETTRO dell'analita che in quell'istante attraversa la cella. Il riferimento è lo spettro del fluido di trasporto

RIVELATORE UV/Vis A MATRICE DI FOTODIODI

Il rivelatore a matrice o serie di fotodiodi (photodiode array) permette di misurare contemporaneamente un intervallo di lunghezze d'onda, per ottenere lo spettro completo degli analiti eluenti.



Percorso della fase mobile all'interno di una cella di misura del tipo a "Z"