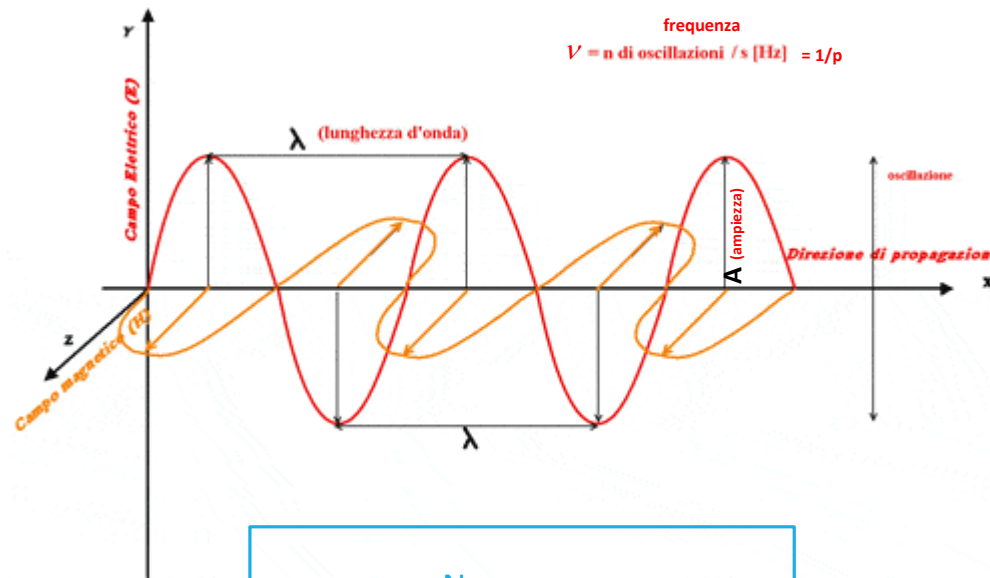


# Metodi spettroscopici:

## Introduzione

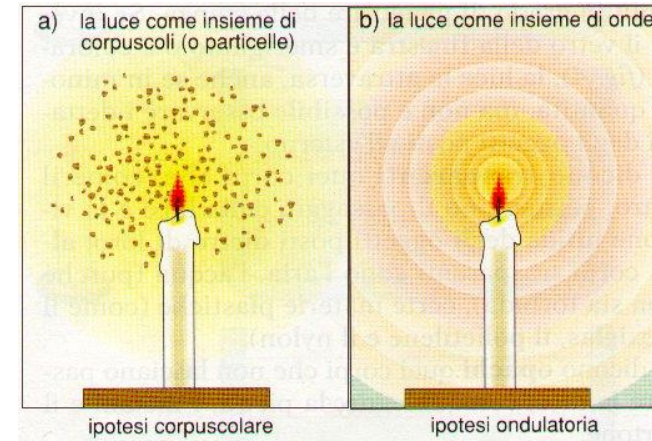
La **SPETTROSCOPIA** è un potentissimo metodo di indagine che studia le interazioni tra radiazione e materia

### Modello ondulatorio



NEL VUOTO  
 $c = \nu\lambda = 3,00 \times 10^{10} \text{ cm/s}$

### Modello corpuscolare



$$E = h\nu$$

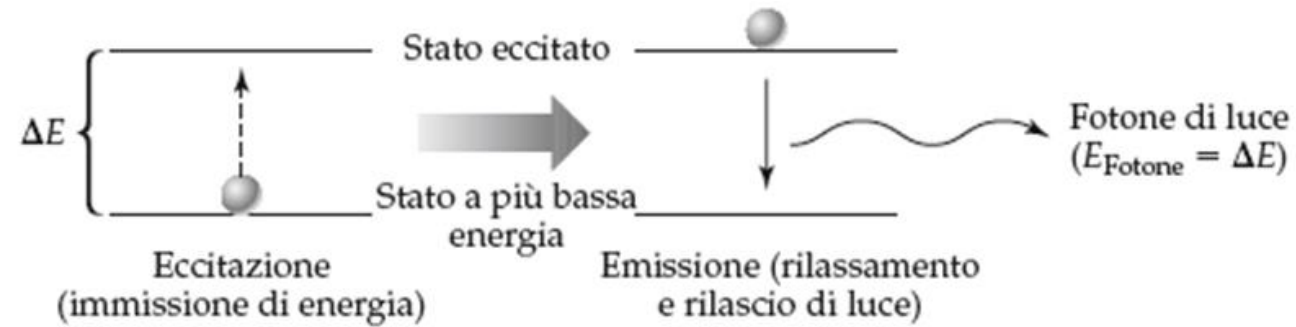
$$\text{nel vuoto } E = h \frac{c}{\lambda}$$

$$h, \text{ costante di Planck} = 6.6254 \times 10^{-34} \text{ J/s}$$

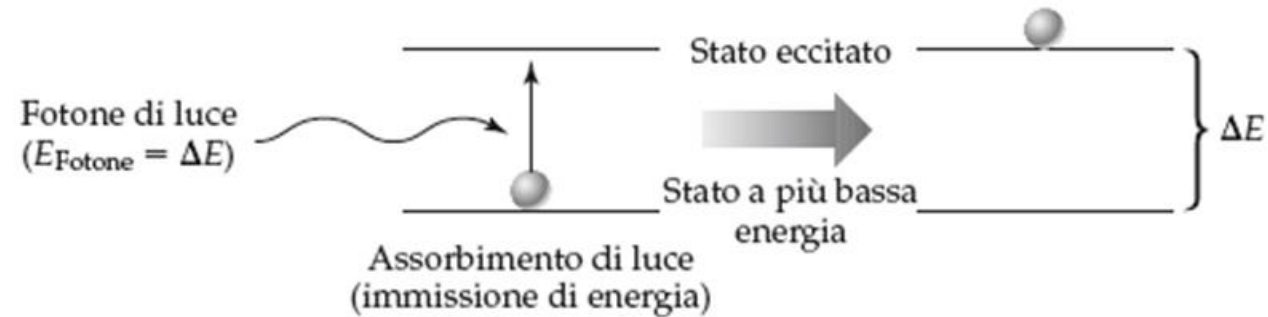
# Metodi spettroscopici:

## Interazioni della radiazione con la materia

### Emissione



### Assorbimento

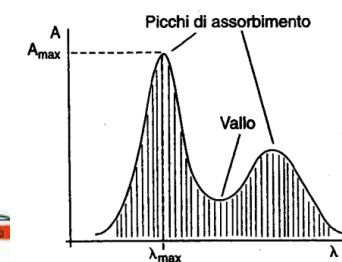
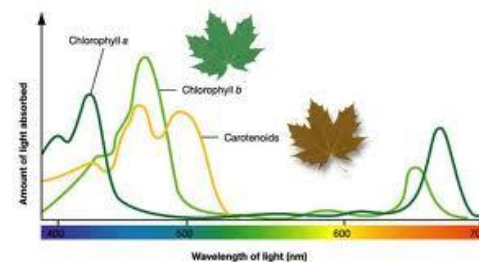
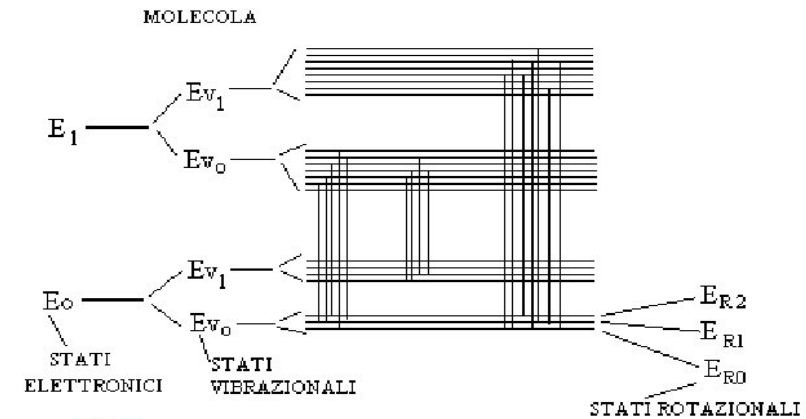
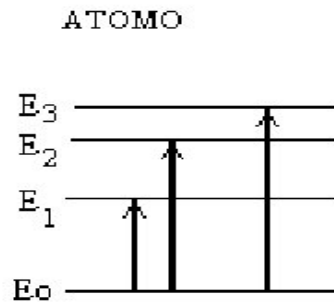
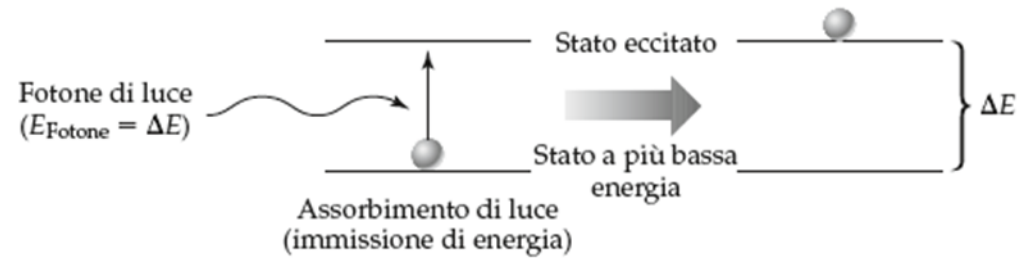


Sono correlabili sia al tipo di molecola considerata che alla sua quantità. Ossia di possono ottenere sia **informazioni qualitative** che **quantitative**.

# Metodi spettroscopici:

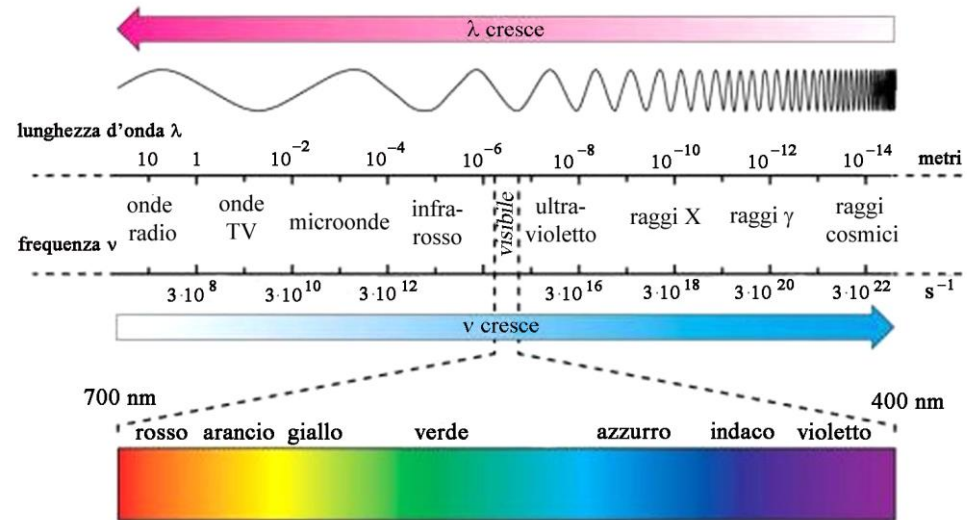
## Interazioni della radiazione con la materia

### Assorbimento



# Metodi spettroscopici:

## SPETTROSCOPIA DI ASSORBIMENTO UV-VIS



$\lambda$  200-800 nm  
 $\lambda$  200-400 nm UV  
 $\lambda$  400-800 nm VIS

Tali radiazioni permettono transizioni degli elettroni più esterni delle molecole dallo stato fondamentale a stati eccitati a più alta energia

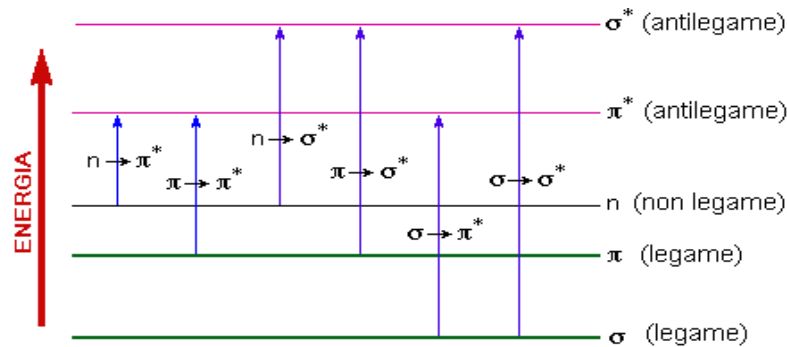
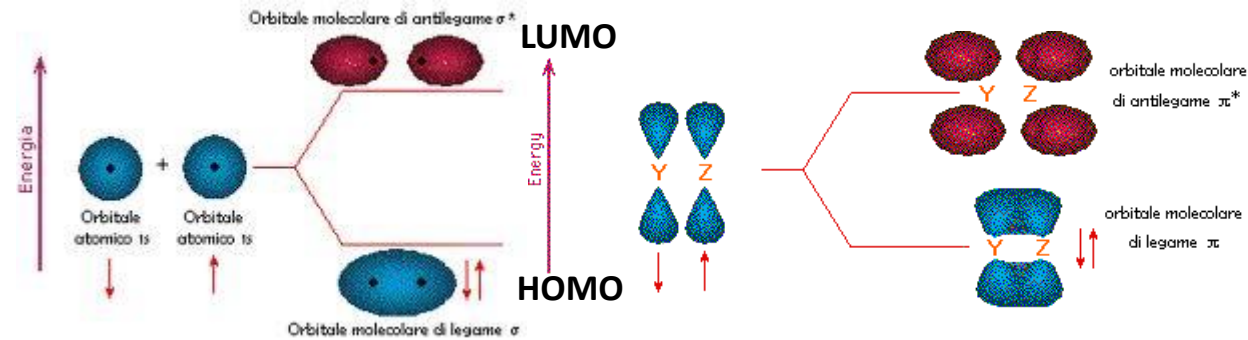
Nelle molecole organiche questi elettroni sono gli elettroni di legame, per cui:

In una molecola organica la radiazione assorbita può essere correlata alla tipologia di legami presenti nella specie

# Metodi spettroscopici:


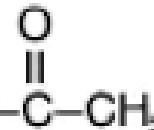
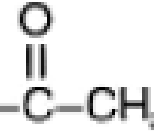
## SPETTROSCOPIA DI ASSORBIMENTO UV-VIS

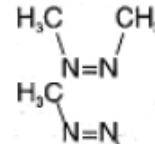
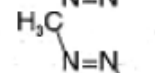
### Orbitali molecolari e transizioni elettroniche



UV lontano	UV vicino	Visibile	$\epsilon$	Intensità della banda
		Trasferimento di carica	$> 10000$	Molto forte (vs = very strong)
		$\pi \rightarrow \pi^*$ di sistemi coniugati	$1000 < \epsilon < 10000$	Forte (s = strong)
$\sigma \rightarrow \sigma^*$	$\pi \rightarrow \pi^*$ E		$100 < \epsilon < 1000$	Debole (w = weak)
	$\pi \rightarrow \sigma^*$ R		$10 < \epsilon < 100$	Molto debole (vw = very weak)
	$\pi \rightarrow \pi^*$ B			
	$\pi \rightarrow \pi^*$ R			

100 200 300 400 500 600 700 780 (nm)

Cromoforo	Transizione	Esempio	$\lambda_{max}$ (nm)	$\epsilon_{max}$	
C-H	$\sigma \rightarrow \sigma^*$	CH <sub>4</sub>	122	intenso	
C-C	$\sigma \rightarrow \sigma^*$	H <sub>3</sub> C-CH <sub>3</sub>	135	intenso	
$\bar{O}$	$n \rightarrow$ $n \rightarrow$ $n \rightarrow$		$n \rightarrow \pi^*$ H <sub>3</sub> C-CH=O	293	12
$\bar{S}$	$n \rightarrow$ $n \rightarrow$ $n \rightarrow$		$\pi \rightarrow \pi^*$ H <sub>3</sub> C-C(=O)-CH <sub>3</sub>	187	950
$\bar{N}$	$n \rightarrow$ $n \rightarrow$ $n \rightarrow$ $n \rightarrow$		$n \rightarrow \pi^*$ H <sub>3</sub> C-C(=O)-CH <sub>3</sub>	273	14
-Alog	$n \rightarrow \sigma^*$	H <sub>3</sub> C-Cl	173	200	
	$n \rightarrow \sigma^*$	H <sub>3</sub> C-Br	204	260	
	$n \rightarrow \sigma^*$	H <sub>3</sub> C-I	258	380	
	$n \rightarrow \sigma^*$	CHI <sub>3</sub>	349	2170	

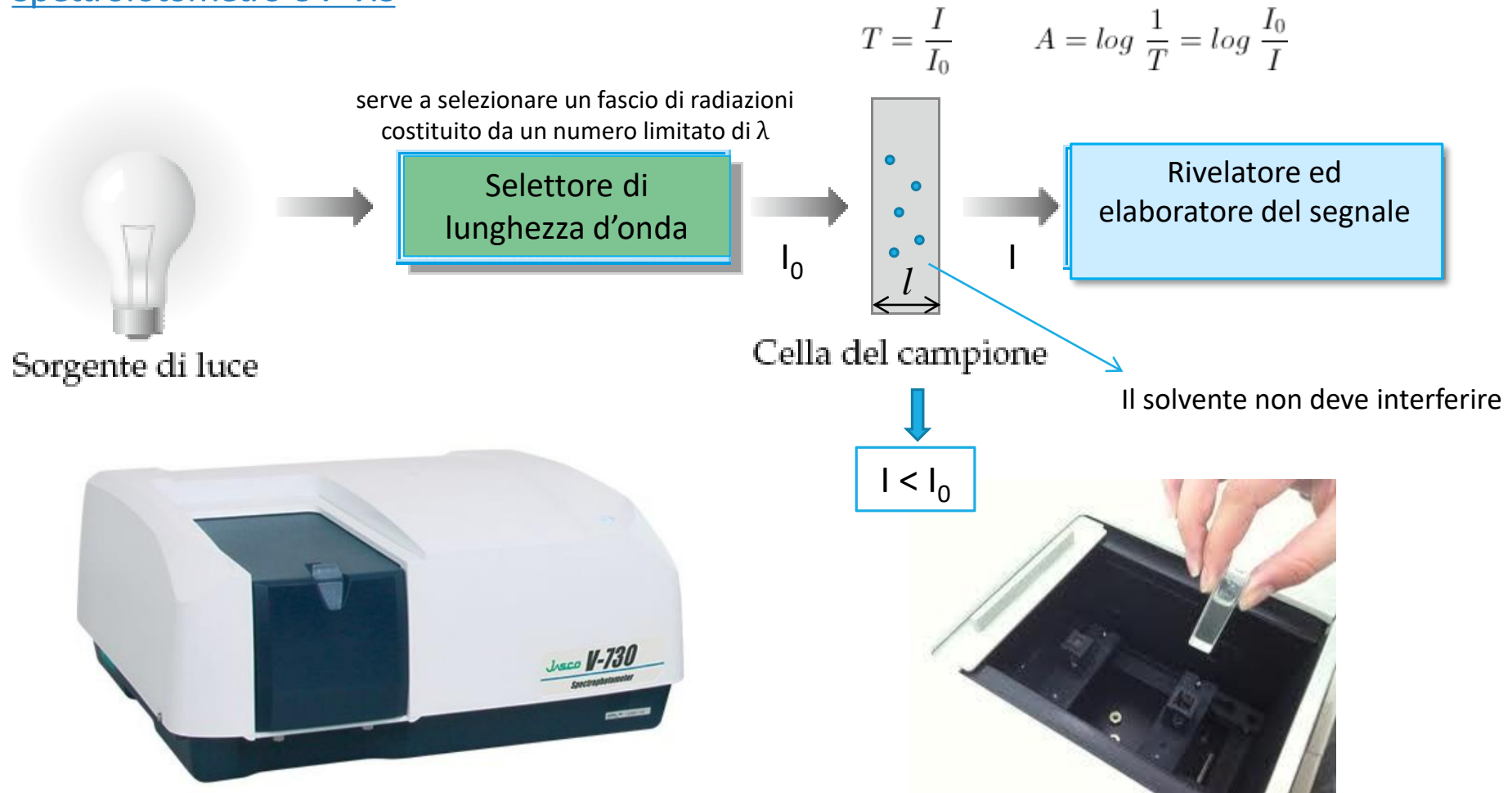
Cromoforo	Transizione	Esempio	$\lambda_{max}$ (nm)	$\epsilon_{max}$
$\text{C}=\text{C}$	$\pi \rightarrow \pi^*$	H <sub>2</sub> C=CH <sub>2</sub>	165	16000
	$\pi \rightarrow \pi^*$	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> -CH=CH-C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	185	7940
-C=C-	$\pi \rightarrow \pi^*$	HC=CH	173	6000
	$n \rightarrow \pi^*$	H <sub>2</sub> C=O	293	2500
	$\pi \rightarrow \pi^*$	H <sub>3</sub> C-C(=O)-CH <sub>3</sub>	187	950
	$n \rightarrow \pi^*$	H <sub>3</sub> C-C(=O)-CH <sub>3</sub>	273	14
$\bar{C}=\bar{N}$	$n \rightarrow \pi^*$	H <sub>3</sub> C-CH=N-OH	279	8000
	$n \rightarrow \pi^*$	H <sub>3</sub> C-CH=N-OH	279	15
$\bar{N}=\bar{N}$	$n \rightarrow \pi^*$		353	240
	$n \rightarrow \pi^*$		343	25
$\bar{N}=\bar{O}$	$n \rightarrow \pi^*$	(H <sub>3</sub> C) <sub>3</sub> C-NO	300	100
	$n \rightarrow \pi^*$	(H <sub>2</sub> C) <sub>2</sub> C-NO	665	20



# Metodi spettroscopici:

## SPETTROSCOPIA DI ASSORBIMENTO UV-VIS

### Spettrofotometro UV-VIS



# Metodi spettroscopici:

## SPETTROSCOPIA DI ASSORBIMENTO UV-VIS

### Spettrofotometro UV-VIS

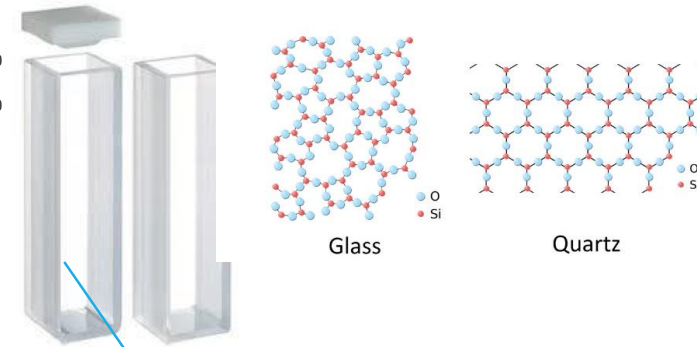
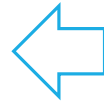
#### CELLA DEL CAMPIONE

##### CUVETTA

Sezione quadrata

Lunghezza 1 cm

Larghezza 1 cm



Finestra di lettura

Materiale trasparente

Quarzo o silice fusa

per l'UV < 350 nm

ma sono trasparenti anche nel  
VIS e vicino IR

Vetro silicato e

plastica

350-2000 nm

Alloggiamento nel portacuvette, centrato sul  
cammino ottico del raggio

Finestra di lettura perpendicolare al fascio



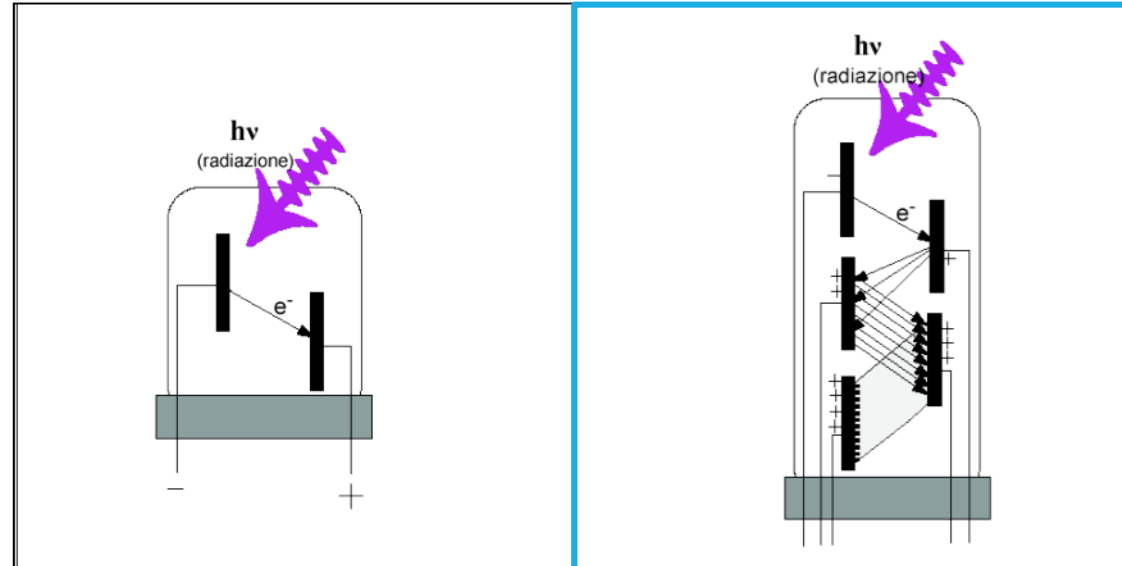
# Metodi spettroscopici:

## SPETTROSCOPIA DI ASSORBIMENTO UV-VIS

### Spettrofotometro UV-VIS

#### RIVELATORE

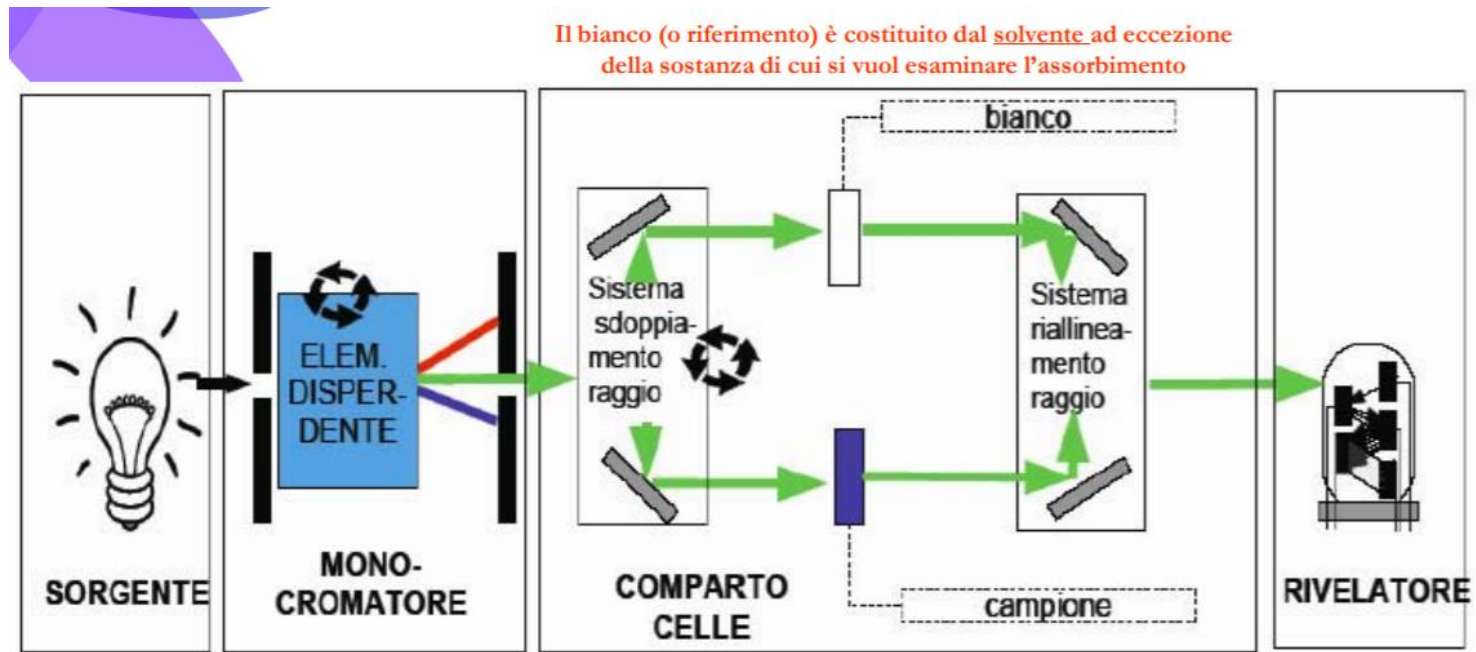
Fotomoltiplicatori: sfruttano l'effetto fotoelettrico, cioè l'emissione di elettroni da una superficie, solitamente metallica, quando questa viene colpita da una radiazione elettromagnetica, ossia da fotoni aventi una certa energia che permette il distacco degli elettroni dagli atomi metallici.



# Metodi spettroscopici:

## SPETTROSCOPIA DI ASSORBIMENTO UV-VIS

### Spettrofotometro UV-VIS



Il bianco (o riferimento) è costituito dal solvente ad eccezione della sostanza di cui si vuol esaminare l'assorbimento

La radiazione proveniente dal **MONOCROMATORE** si divide in due raggi che sono inviati contemporaneamente al campione ed al solvente.

Il secondo raggio passa attraverso il campione e fuoriesce con l'Intensità trasmessa  $I_{\text{campione}}$

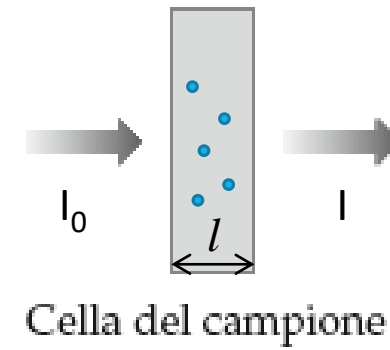
Il computer registra entrambi i raggi in modo alternato e calcola il rapporto.

# Metodi spettroscopici:

## SPETTROSCOPIA DI ASSORBIMENTO UV-VIS

### Analisi quantitativa

La diminuzione di intensità della radiazione dipende da quante molecole incontra la radiazione che non dipende solo dalla concentrazione, ma anche dalla lunghezza del cammino che deve percorrere il raggio ( $l$ ), più lungo è, più molecole incontra.



↓

$$I < I_0$$

$$-dI = K c I dl$$

$$-\frac{dI}{I} = K c dl$$

che come integrale diventa

$$-\int_{I_0}^I \frac{dI}{I} = K c \int_0^l dl$$

ossia

$$-\ln \frac{I}{I_0} = K c l$$



$$\log \frac{I_0}{I} = a c l$$



$$A = a c l$$

A = assorbanza

# Metodi spettroscopici:

## SPETTROSCOPIA DI ASSORBIMENTO UV-VIS

### Analisi quantitativa

$$A = a c l$$

$a = K / 2.303$  = assorbività, assorbanza specifica, coefficiente di estinzione, estinzione specifica

Se  $c$  è espressa in mol/L, si definisce coefficiente di estinzione molare,  $\epsilon$  ( $\text{L mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$ )

$$A = \epsilon c l$$

### Legge di Lambert-Beer

Per cui  $A$  è direttamente proporzionale alla concentrazione senza l'uso di alcun titolante. È applicabile per tutto lo spettro elettromagnetico, ma nell'UV-VIS ci sono le transizioni elettroniche.

# Metodi spettroscopici:

## SPETTROSCOPIA DI ASSORBIMENTO UV-VIS

Procedura di analisi quantitativa: Lambert-Beer

La spettroscopia UV-VIS è un metodo eccezionalmente valido per analisi quantitative sfruttando l'applicazione della legge di Lambert-Beer

$$A = \epsilon lc$$

Esistono delle condizioni in cui è valida la legge di Lambert-Beer al di fuori delle quali non c'è linearità di risposta tra A e c:

Si assume che tutte le specie che assorbono agiscano in modo indipendente l'una dall'altra

valida per soluzioni diluite (< 0.01M)

Ottimale  
 $10^{-3} \div 10^{-6}M$

In soluzioni concentrate si osserva una deviazione negativa:

- Campo elettrico di un analita influenza l'assorbimento da parte di un altro

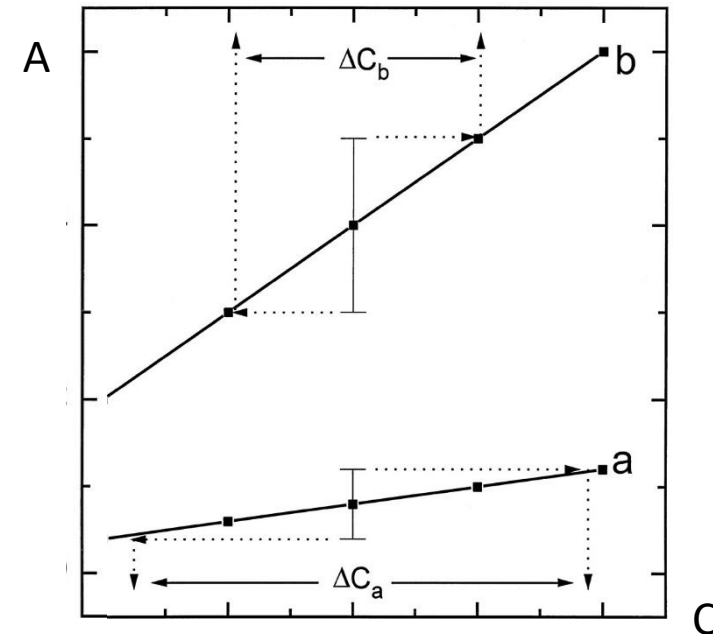
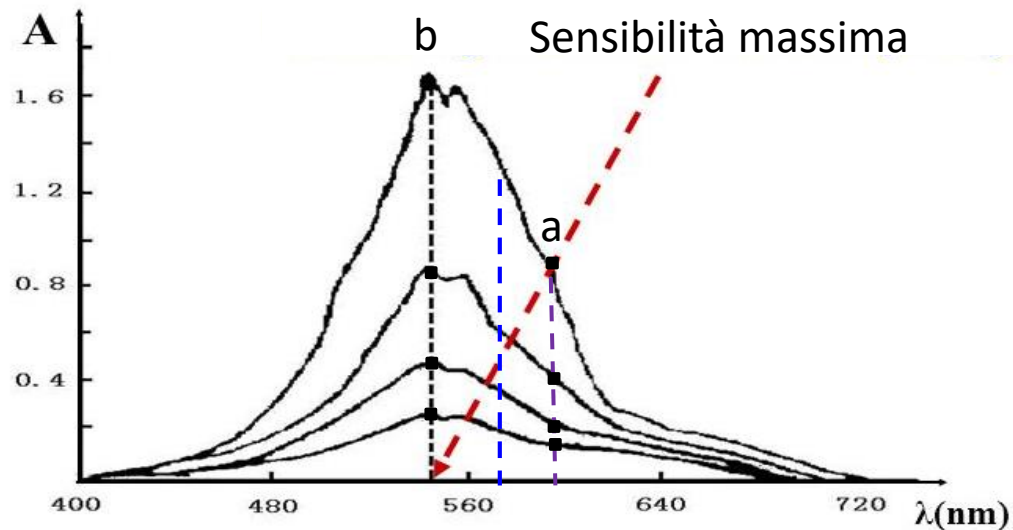
# Metodi spettroscopici:

## SPETTROSCOPIA DI ASSORBIMENTO UV-VIS

Procedura di analisi quantitativa: Lambert-Beer

Misure con elevata sensibilità

Misura di A alla  $\lambda$  del massimo di assorbimento





# Metodi spettroscopici:

## SPETTROSCOPIA DI ASSORBIMENTO UV-VIS

### Procedura di analisi quantitativa: Lambert-Beer

c'è sempre un  $\Delta\lambda$ , un intervallo di lunghezze d'onda, che sarà tanto più piccolo quanto è più preciso lo strumento.



deviazione irrilevante finché la variazione di  $\epsilon$  è minima rispetto all'intervallo di lunghezze d'onda utilizzato.

Si assume che la luce utilizzata sia monocromatica



Misura di A alla  $\lambda$  del massimo di assorbimento

misure di assorbanza normalmente eseguite nei pressi del massimo della banda di assorbimento dove praticamente  $\epsilon$  è costante

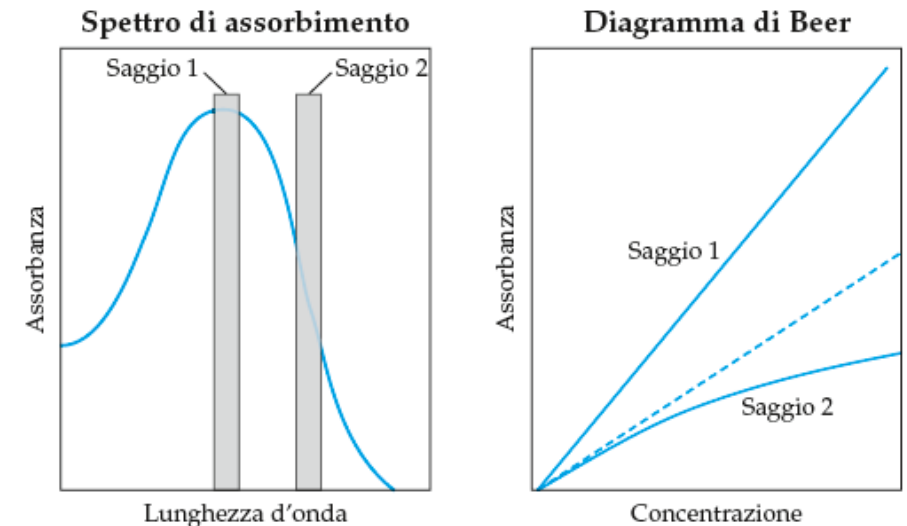


FIGURA 17.20 Effetti della luce policromatica sui grafici ottenuti secondo la legge di Beer.

# Metodi spettroscopici:

## SPETTROSCOPIA DI ASSORBIMENTO UV-VIS

### Procedura di analisi quantitativa: Lambert-Beer

Si assume che tutti i raggi che attraversano il campione percorrano la stessa  
distanza



Cammino ottico costante (porta campione quadrato)

Si assume che la concentrazione della specie assorbente sia uniforme in tutto  
il cammino ottico



Soluzione omogenea

Si assume che la luce non venga diffusa dal campione

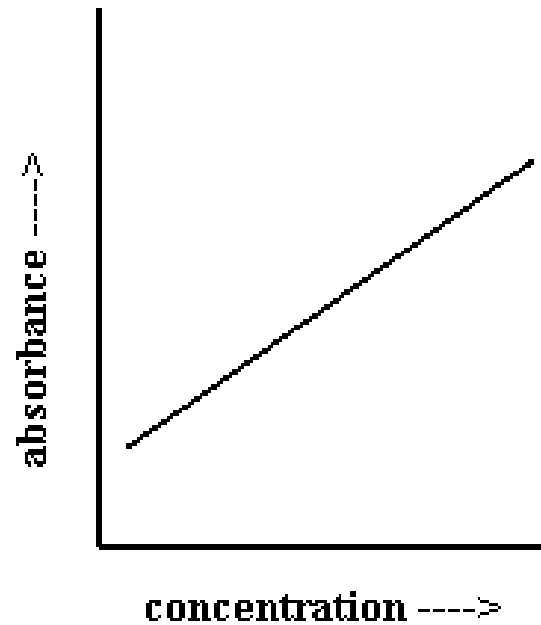
# Metodi spettroscopici:

## SPETTROSCOPIA DI ASSORBIMENTO UV-VIS

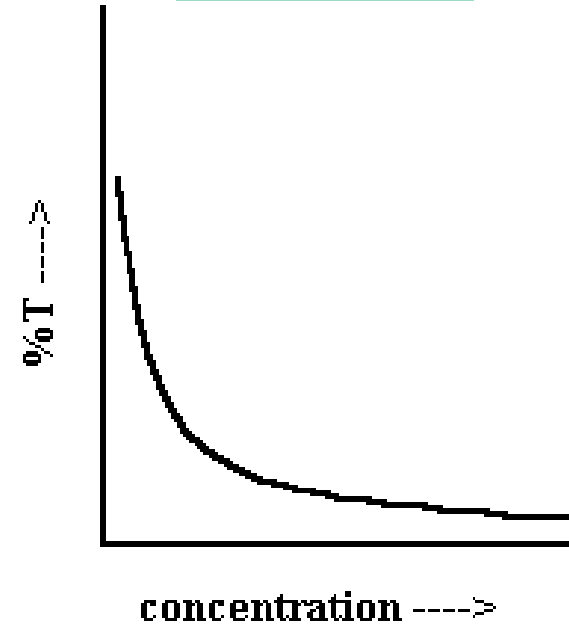
Procedura di analisi quantitativa: Lambert-Beer

$$T = \frac{I}{I_0} \quad A = \log \frac{1}{T} = \log \frac{I_0}{I}$$

$$A = a c l$$



$$\log \frac{1}{T} = a c l$$

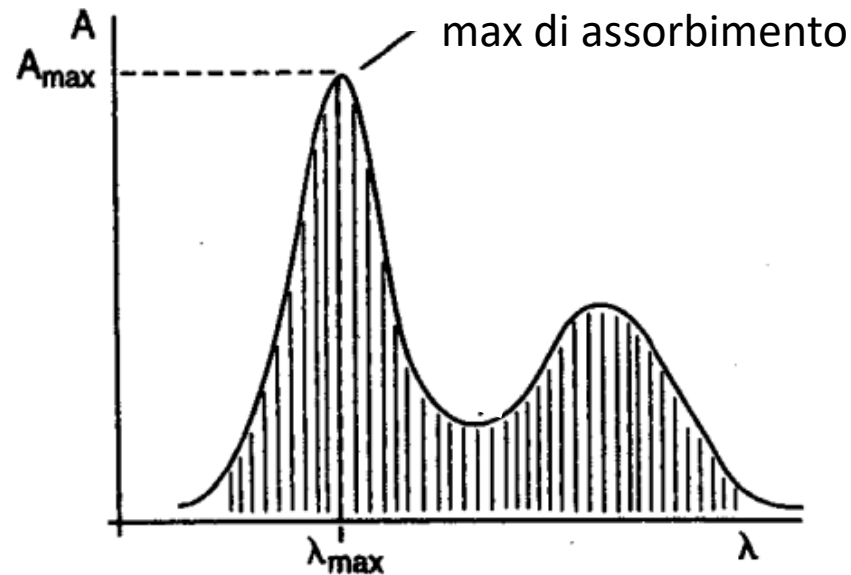


# Metodi spettroscopici:

## SPETTROSCOPIA DI ASSORBIMENTO UV-VIS

Procedura di analisi quantitativa: determinazione della concentrazione di un analita

1. Si registra uno spettro per l'intero range UV-VIS per verificare che l'analita assorba e da questo si seleziona la  $\lambda$  di lavoro che verrà mantenuta costante (legge di LB). Si sceglie il massimo di assorbimento.



# Metodi spettroscopici:

## SPETTROSCOPIA DI ASSORBIMENTO UV-VIS

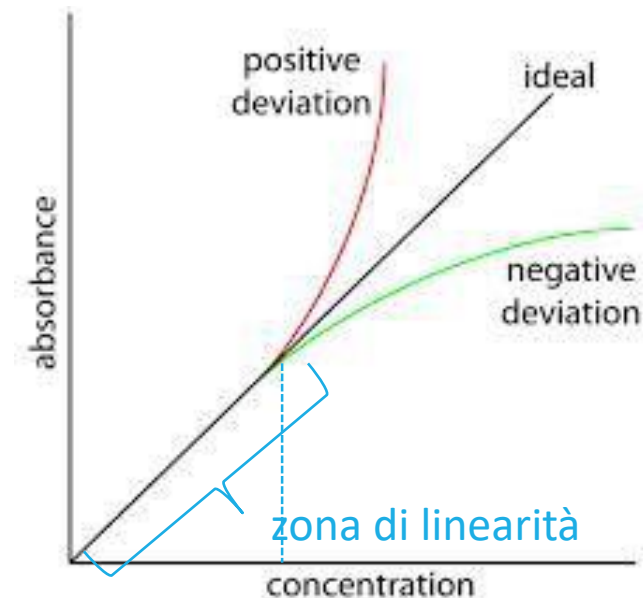
### Procedura di analisi quantitativa: determinazione della concentrazione di un analita

2. Si verifica la legge di Lambert Beer. Si controlla che effettivamente un range di concentrazioni sia rappresentato da una retta che passa per l'origine. Se non passa per l'origine:
- Contenitore sporco
  - Solvente che assorbe a quella  $\lambda$
  - Strumento non allineato

Inoltre non ci devono essere deviazioni che di solito compaiono ad elevate concentrazioni.

Le deviazioni possono essere **positive** o **negative** e possono essere dovute ad:

- Cause strumentali (luce non monocromatica)
- Cause chimiche
- Variazioni di T (spostamento del  $\lambda_{max}$ )



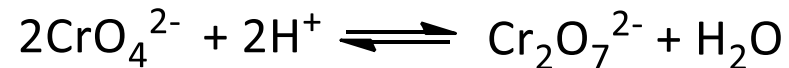
# Metodi spettroscopici:

## SPETTROSCOPIA DI ASSORBIMENTO UV-VIS

Procedura di analisi quantitativa: determinazione della concentrazione di un analita

2. Le cause chimiche possono essere:

- Associazioni ioniche: alcuni composti sono suscettibili a variazioni di pH (cromato e bicromato).



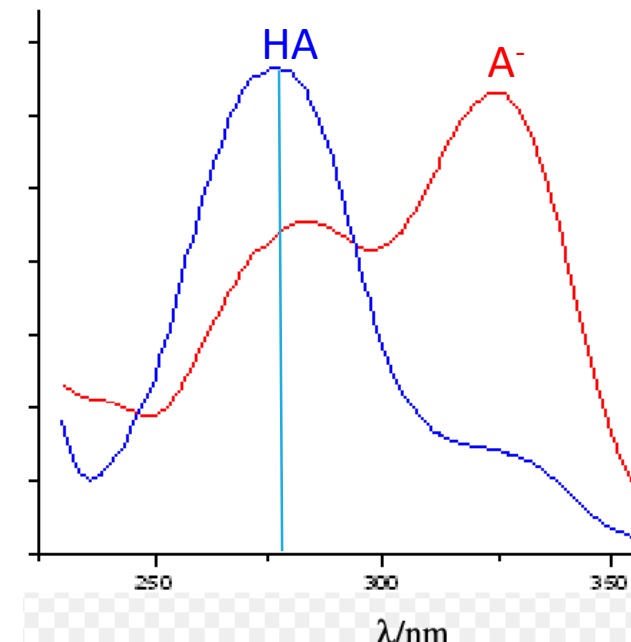
giallo  
375 nm

rosso-arancio  
350-450 nm

- Reazioni acido-base del tipo



All'aumentare della diluizione HA è sempre più dissociato, se HA e A<sup>-</sup> hanno comportamenti diversi si potrebbe avere la situazione in cui ad una certa concentrazione si pensa di determinare solo HA ma invece c'è anche A<sup>-</sup>.





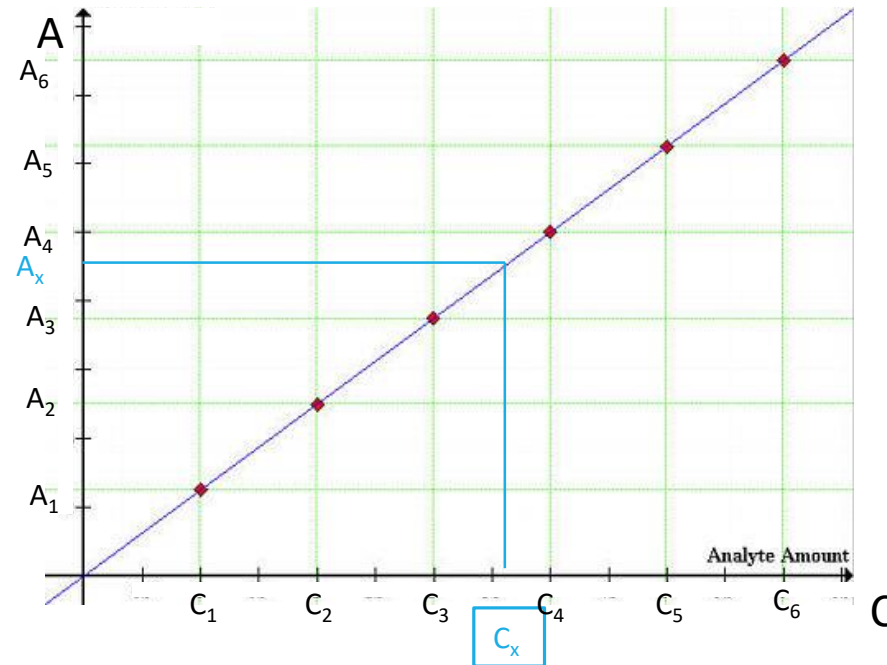
# Metodi spettroscopici:

## SPETTROSCOPIA DI ASSORBIMENTO UV-VIS

### Procedura di analisi quantitativa: determinazione della concentrazione di un analita

2. Per cui per garantire la linearità ad un dato range di concentrazioni si procede con la costruzione della **RETTA DI TARATURA**

C	A
$C_1$	$A_1$
$C_2$	$A_2$
$C_3$	$A_3$
$C_4$	$A_4$
$C_5$	$A_5$
$C_6$	$A_6$



3. La retta di taratura risolve anche il problema della determinazione della soluzione a concentrazione incognita. Si misura l'A e si ricava graficamente  $C_x$ .

# Metodi spettroscopici:

## SPETTROSCOPIA DI ASSORBIMENTO UV-VIS

### Procedura di analisi quantitativa: determinazione della concentrazione di un analita

Con la spettroscopia UV-VIS si analizzano soluzioni  $10^{-4}$ - $10^{-5}$ - $10^{-6}$ , mentre in conduttometria  $10^{-2}$ - $10^{-3}$  e potenziometria  $10^{-1}$ - $10^{-2}$

Spesso la scarsa solubilità era un limite per le tecniche precedenti, anche perché obbligano ad usare l'acqua come solvente

In spettroscopia basta che il solvente non interferisca con l'analita (reazioni secondarie) e che non assorba nell'UV-VIS (metanolo, etanolo non assorbono nell'UV-VIS).

Unico limite: costo della strumentazione

**TABLE 14.3****Lower Transparency Limit of Solvents in the Ultraviolet Region**

<i>Solvent</i>	<i>Cutoff Point, nm<sup>a</sup></i>	<i>Solvent</i>	<i>Cutoff Point, nm<sup>a</sup></i>
Water	200	Dichloromethane	233
Ethanol (95%)	205	Butyl ether	235
Acetonitrile	210	Chloroform	245
Cyclohexane	210	Ethyl propionate	255
Cyclopentane	210	Methyl formate	260
Heptane	210	Carbon tetrachloride	265
Hexane	210	<i>N,N</i> -Dimethylformamide	270
Methanol	210	Benzene	280
Pentane	210	Toluene	285
Isopropyl alcohol	210	<i>m</i> -Xylene	290
Isooctane	215	Pyridine	305
Dioxane	220	Acetone	330
Diethyl ether	220	Bromoform	360
Glycerol	220	Carbon disulfide	380
1,2-Dichloroethane	230	Nitromethane	380

<sup>a</sup>Wavelength at which the absorbance is unity for a 1-cm cell, with water as the reference.

# Metodi spettroscopici:

## SPETTROSCOPIA DI ASSORBIMENTO UV-VIS

### Determinazione di miscele di analiti

Le sostanze (es. A e B) non devono interagire tra di loro



$$C_A = ? \quad C_B = ?$$

Servono due equazioni indipendenti, ossia due Lambert-Beer diverse, ossia usando due  $\lambda$  diverse. L'assorbanza è una proprietà additiva.

$$A_i = \varepsilon_i l c_i$$

$$A_{TOT} = l \sum_i \varepsilon_i c_i$$

per due sostanze

$A = A_A + A_B = l(\varepsilon_A c_A + \varepsilon_B c_B)$  ci sono quattro incognite

lavorando a due  $\lambda$  diverse  $\lambda_1$  e  $\lambda_2$  si ha:

$$\text{per } \lambda_1 \quad A_1 = l(\varepsilon_A^1 c_A^1 + \varepsilon_B^1 c_B^1)$$

$$\text{per } \lambda_2 \quad A_2 = l(\varepsilon_A^2 c_A^2 + \varepsilon_B^2 c_B^2)$$

# Metodi spettroscopici:

## SPETTROSCOPIA DI ASSORBIMENTO UV-VIS

### Determinazione di miscele di analiti

$$\text{per } \lambda_1 \quad A_1 = l(\varepsilon_A^1 c_A + \varepsilon_B^1 c_B)$$

$$\text{per } \lambda_2 \quad A_2 = l(\varepsilon_A^2 c_A + \varepsilon_B^2 c_B)$$

si risolve il sistema e si ottiene:

$$c_A = \frac{A_1 \varepsilon_B^2 - A_2 \varepsilon_B^1}{\varepsilon_B^2 \varepsilon_A^1 - \varepsilon_A^2 \varepsilon_B^1} \frac{1}{l}$$

$$c_B = \frac{A_2 \varepsilon_A^1 - A_1 \varepsilon_A^2}{\varepsilon_B^2 \varepsilon_A^1 - \varepsilon_A^2 \varepsilon_B^1} \frac{1}{l}$$

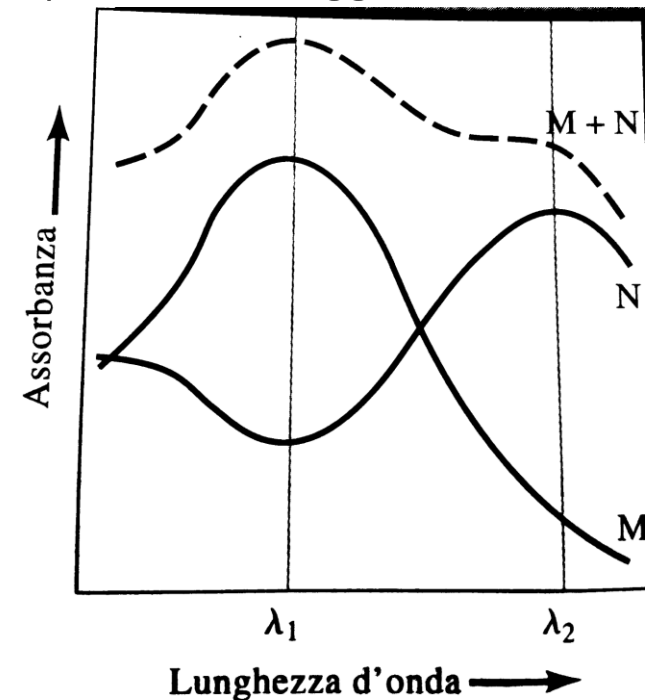
- Pertanto è necessario conoscere  $\varepsilon_A^1$ ,  $\varepsilon_B^1$ ,  $\varepsilon_A^2$ ,  $\varepsilon_B^2$ , che si possono ricavare operando a  $\lambda_1$  e  $\lambda_2$  sui composti puri A e B
- Le due lunghezze d'onda si scelgono dove c'è assorbimento di entrambe le specie

# Metodi spettroscopici:

## SPETTROSCOPIA DI ASSORBIMENTO UV-VIS

### Determinazione di miscele di analiti

- Le due lunghezze d'onda si scelgono dove c'è assorbimento di entrambe le specie ma l'assorbività molare è significativamente diversa
- Ad entrambe le lunghezze d'onda deve essere rispettata la legge di Lambert-Beer
- Le due specie si comportano indipendentemente l'una dall'altra
- In linea di principio si possono analizzare anche più di due specie assorbenti facendo misurazioni usando un numero superiore o uguale al numero di componenti analizzati rispettando le regole precedenti





$$\text{Assorbanza: } A = f(\lambda)$$

# Metodi spettroscopici:

## SPETTROSCOPIA DI ASSORBIMENTO UV-VIS

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

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

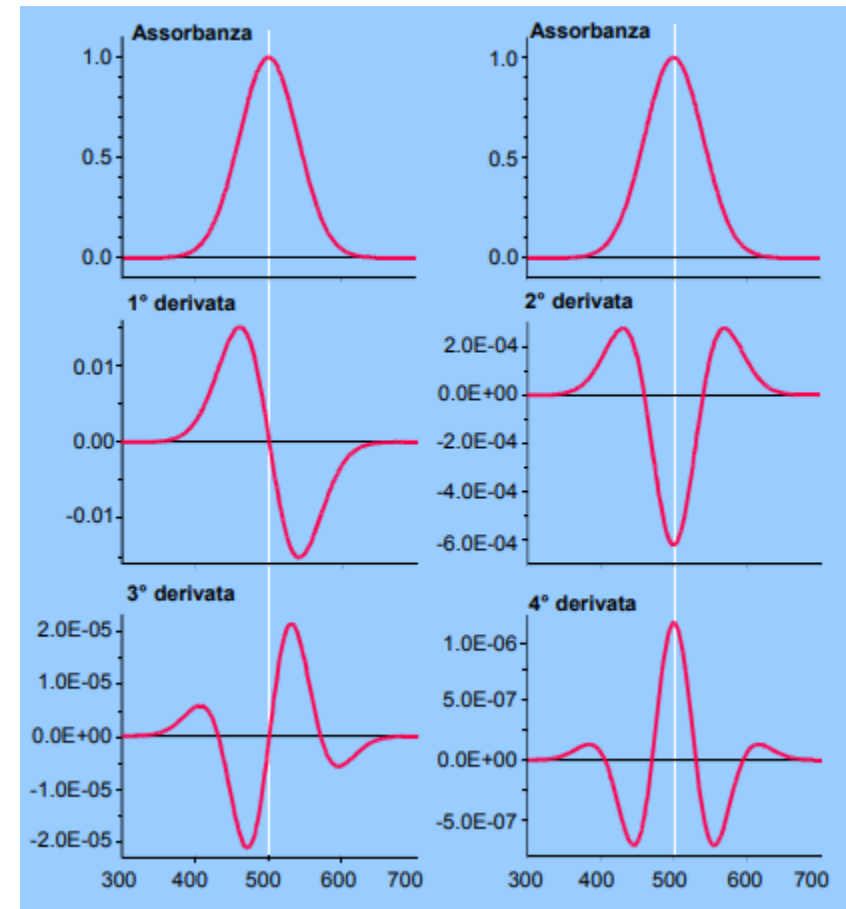
### Determinazione di due una miscela di due analiti con spettro di assorbimento molto simile: METODO DELLE DERIVATE

Spesso le transizioni elettroniche sono le stesse in composti diversi, per cui questi hanno spettri molto simili.

Il metodo delle derivate sfrutta il fatto che la derivata somma è uguale alla somma della derivate.

Tutte le derivate dispari si annullano in corrispondenza della primitiva

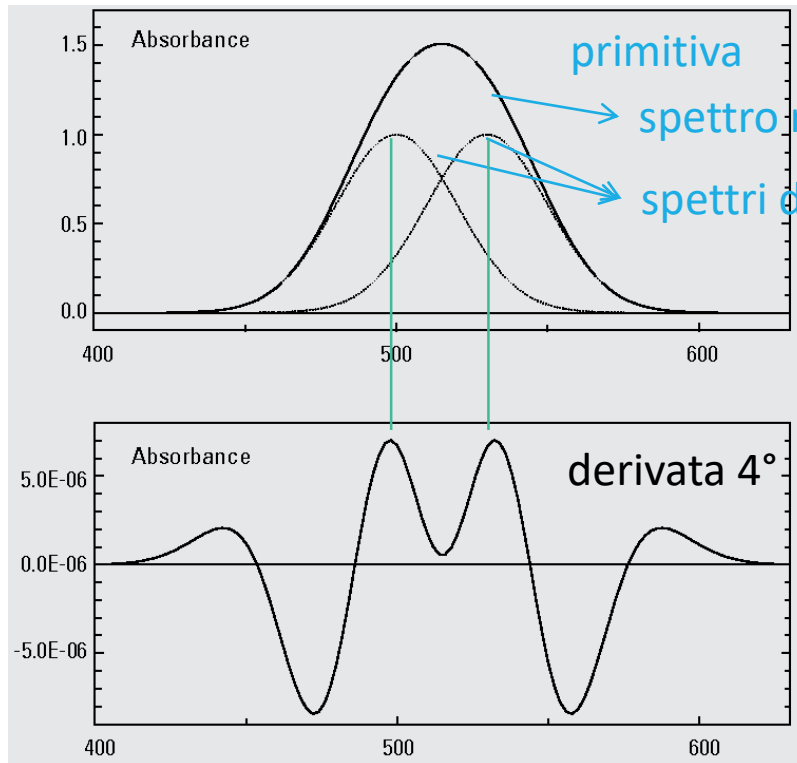
Le derivate pari alternano minimi e massimi in corrispondenza del massimo della primitiva.



# Metodi spettroscopici:

## SPETTROSCOPIA DI ASSORBIMENTO UV-VIS

Determinazione di due una miscela di due analiti con spettro di assorbimento molto simile:  
METODO DELLE DERIVATE



In derivata quarta i due massimi delle bande che formano la primitiva diventano minimi

Via via che aumentano le derivate pari, si riescono ad identificare sempre più picchi.

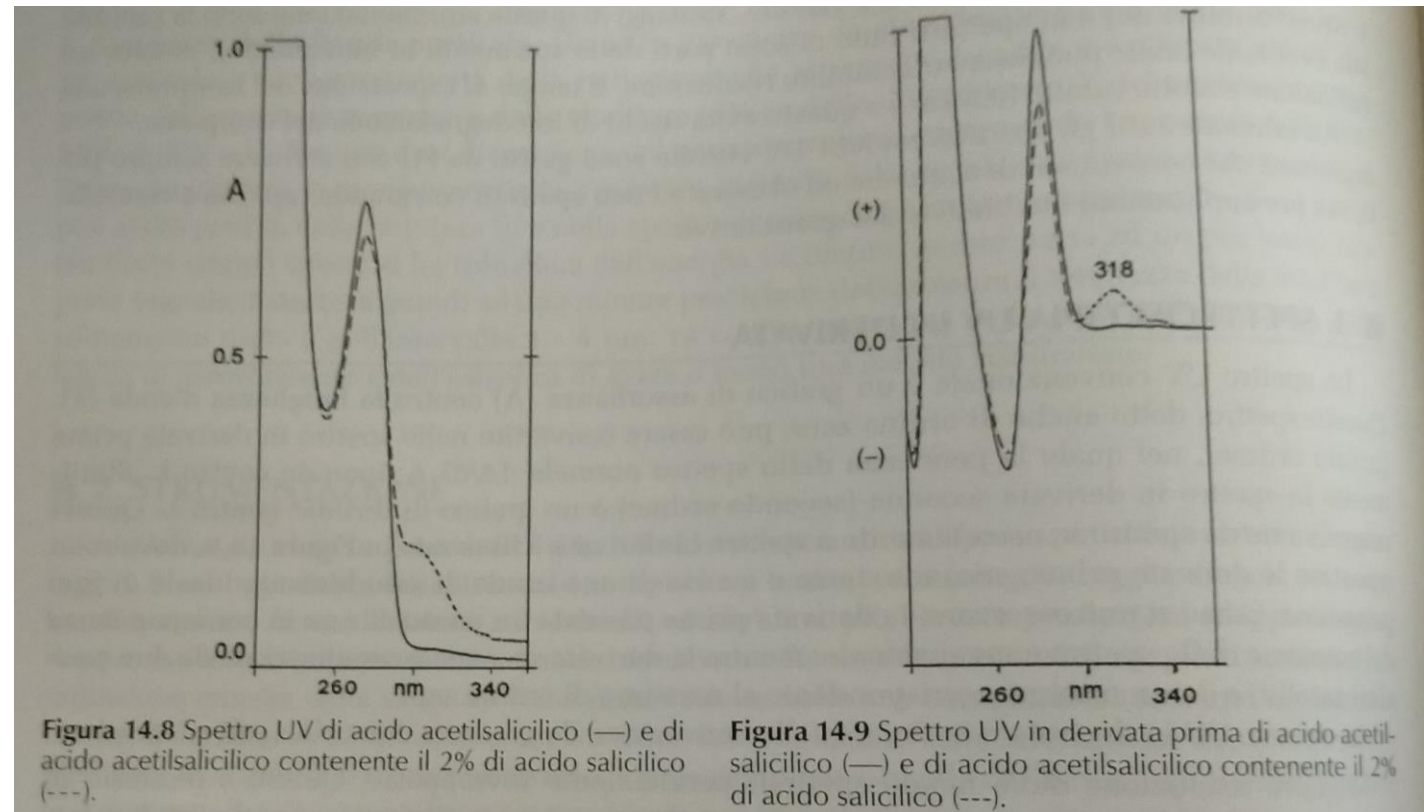
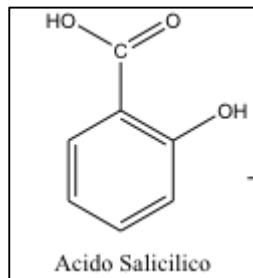
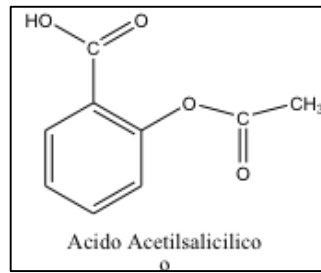
Se i componenti sono tre e in derivata seconda ne vedo due, faccio la derivata quarta.

Attenzione a non esagerare: compaiono le transizioni vibrorotazionali che sono praticamente il rumore di fondo.

# Metodi spettroscopici:

## SPETTROSCOPIA DI ASSORBIMENTO UV-VIS

Determinazione di due una miscela di due analiti con spettro di assorbimento molto simile:  
METODO DELLE DERIVATE



# Metodi spettroscopici:

## SPETTROSCOPIA DI ASSORBIMENTO UV-VIS

### Determinazione di un analita in matrice complessa

Esempi:

- Ricerca delle proteine nel latte
- Ricerca dei barbiturici nelle urine
- Ricerca della vitamina C nel succo d'arancia
- Ricerca della caffeina nel caffè

La matrice complessa assorbe molto perché è complessa, quindi il rumore di fondo è alto.

Per vedere l'analita si può applicare il metodo delle derivate.

# Metodi spettroscopici:

## SPETTROSCOPIA DI ASSORBIMENTO UV-VIS

### Determinazione di un analita in matrice complessa: caffeina in caffè espresso

#### **A) Verifica della legge di Lambert-Beer e costruzione della retta di taratura**

Preparare le soluzioni indicate nella seguente tabella (volume finale 50.0 ml) a partire da una soluzione madre di caffeina pura circa  $5 \cdot 10^{-4}$  M (P. M. della caffeina 194.19; 0.01 g in 100 ml).

Registrare gli spettri delle soluzioni **in assorbanza** ed **in derivata seconda** e costruire la retta di taratura.

#### **B) Preparazione della soluzione incognita**

Trasferire quantitativamente un caffè espresso in un pallone tarato da 100 ml. Portare esattamente a volume con H<sub>2</sub>O distillata e mescolare accuratamente.

Prelevare esattamente 0.80 ml di questa soluzione in un pallone tarato da 100 ml, portare a volume con H<sub>2</sub>O distillata e mescolare accuratamente.

Registrare gli spettri della soluzione in assorbanza e in derivata seconda e calcolare dalla retta di taratura la Molarità sperimentale della caffeina.

Esprimere il risultato in termini di **mg di caffeina** presenti nel caffè espresso.

# Metodi spettroscopici:

## SPETTROSCOPIA DI ASSORBIMENTO UV-VIS

Determinazione di un analita in matrice complessa: caffeina in caffè espresso

**Elaborazione dati:**

274nm  $\nearrow$  *quanta luce assorbe la soluzione*  $\rightarrow$  276

Soluz	ml sol madre	Molarità	Assorbanza	Derivata
1	9.0	$9.361965086 \cdot 10^{-5}$	0.9000	-4.8007
2	8.0	$8.321746743 \cdot 10^{-5}$	0.8043	-4.3000
3	7.0	$7.2815284 \cdot 10^{-5}$	0.7055	-3.7499
4	6.0	$6.241310057 \cdot 10^{-5}$	0.6033	-3.2283
5	5.0	$5.201091714 \cdot 10^{-5}$	0.5009	-2.6760
6	4.0	$4.161944988 \cdot 10^{-5}$	0.3953	-2.1420
7	3.0	$3.120655029 \cdot 10^{-5}$	0.3091	-1.6174
8	2.0	$2.080436686 \cdot 10^{-5}$	0.1975	-1.0834
caffè	====	???	1.4999	-2.4228

$$\text{Molarità}_{\text{caffè}} = \frac{\text{Molarità}_{\text{sperim}} \times V_{\text{finale}} (= 100.0\text{ml})}{V_{\text{iniziale}} (= 0.80\text{ml})}$$

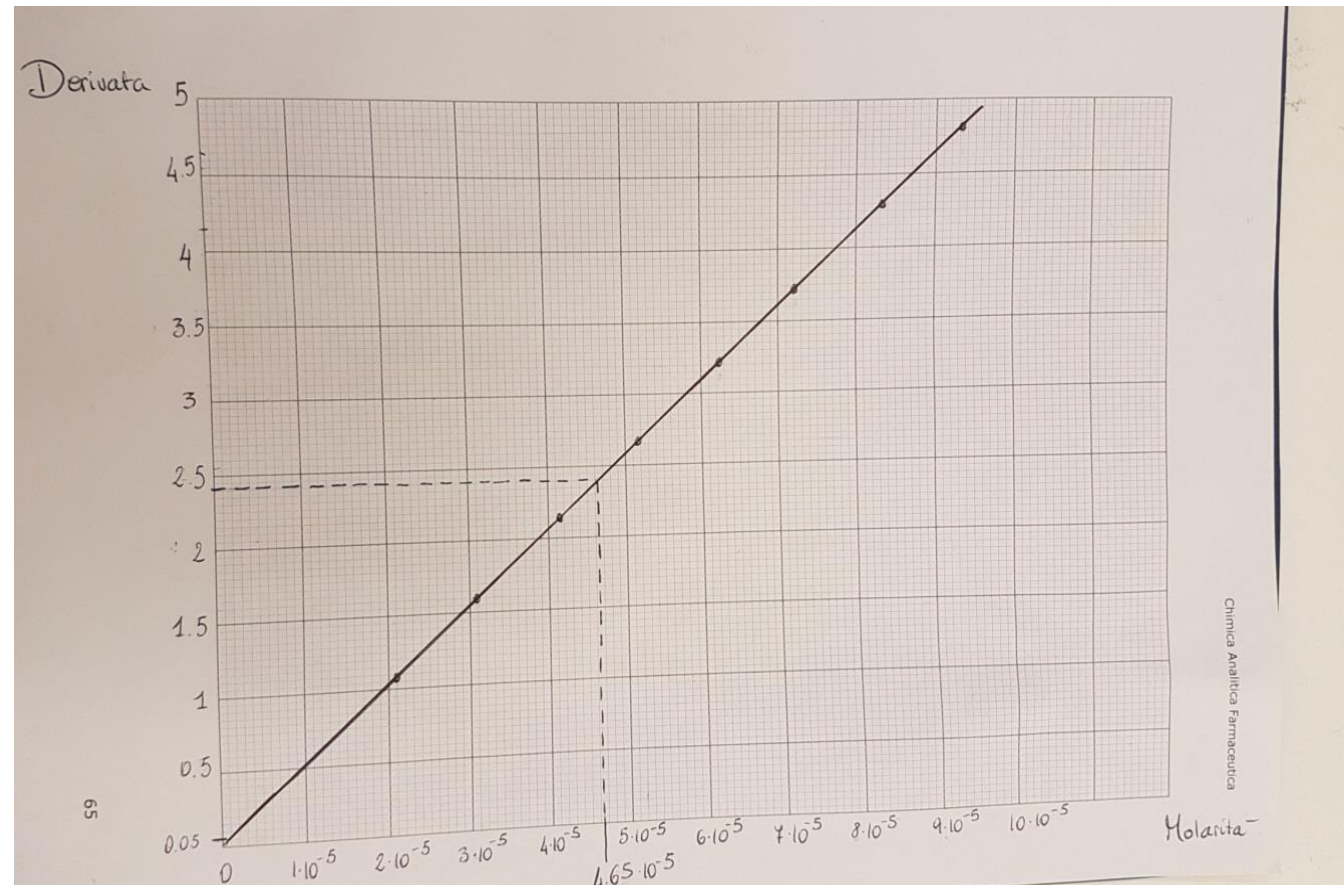
$$\text{Molarità} \cdot (\text{soluzioni} \cdot 1 \div 8) = \dots \frac{\text{Molarità}_{\text{iniziale}} \times \text{Volume}_{\text{iniziale}}}{\text{Volume}_{\text{finale}} (= 50.0\text{ml})}$$



# Metodi spettroscopici:

## SPETTROSCOPIA DI ASSORBIMENTO UV-VIS

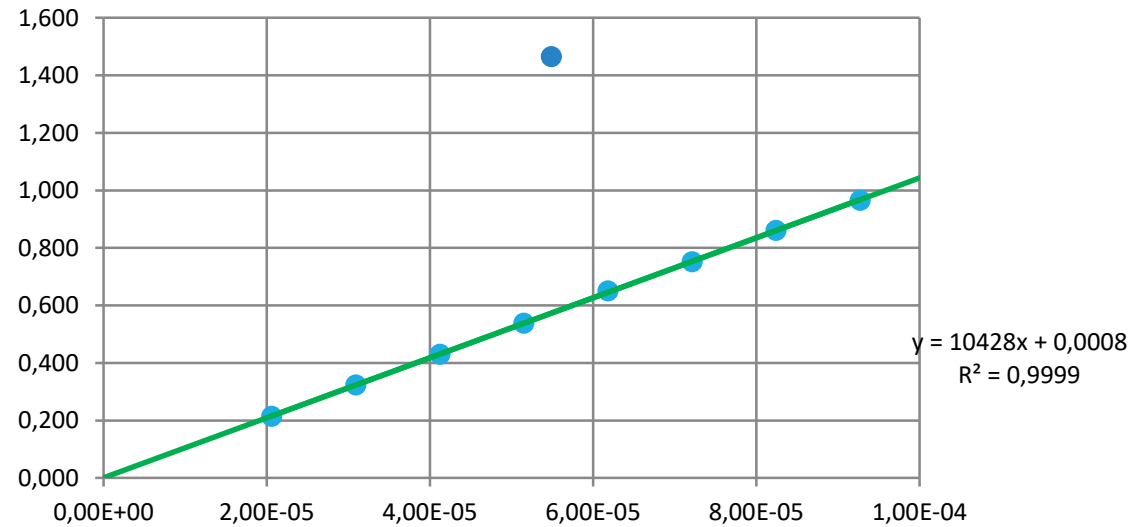
Determinazione di un analita in matrice complessa: caffeina in caffè espresso



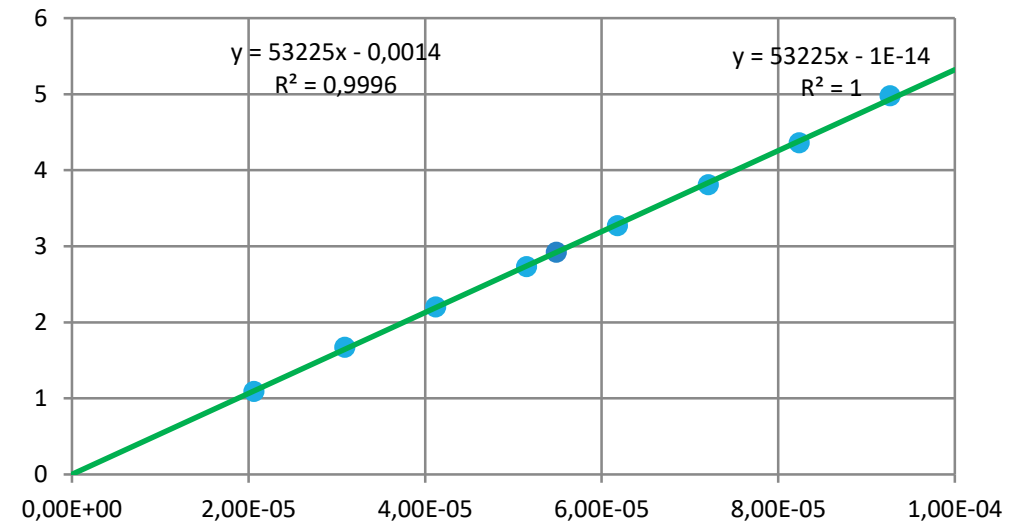
# Metodi spettroscopici:

## SPETTROSCOPIA DI ASSORBIMENTO UV-VIS

Determinazione di un analita in matrice complessa: caffeina in caffè espresso



Assorbanza



Derivata seconda

# Metodi spettroscopici:

## SPETTROSCOPIA DI ASSORBIMENTO UV-VIS

Determinazione di un analita in matrice complessa: caffeina in caffè espresso

$$\text{Molarità}_{\text{caffè}} = \frac{\text{Molarità}_{\text{sperim}} \times V_{\text{finale}} (= 100.0\text{ml})}{V_{\text{iniziale}} (= 0.80\text{ml})}$$

$$\text{Molarità}_{\text{caffè}} \times \text{P.M.} = \text{grammi}_{\text{caffeina}} / \text{litro}$$

$$\text{grammi}_{\text{caffeina}} / \text{litro} \times 100 = \text{mg}_{\text{caffeina}} / \text{caffè}$$

Esprimere il risultato in termini di **mg di caffeina** presenti nel caffè espresso.

Nome e Cognome:

---

Risultato finale dell'analisi: 113 mg caffeina/caffè

# Metodi spettroscopici:

## SPETTROSCOPIA DI ASSORBIMENTO UV-VIS

### Riassumendo

È una delle tecniche analitiche più utili:

- Ampia applicabilità (specie inorganiche organiche, biochimiche per analisi diretta). Molte specie possono poi essere determinate dopo conversione chimica a specie assorbenti.
- Alta sensibilità  $10^{-4} \div 10^{-6}$  M
- Selettività da moderata ad ampia, ampliabile mediante spettroscopia in derivata
- Buona accuratezza, errori di concentrazione <5%. Riducibili fino a 0.1-0.2% applicando per esempio la retta di taratura
- Facilità e convenienza, ottima manualità, ottima possibilità di automazione, costi accessibili

# Metodi spettroscopici:

## LUMINESCENZA

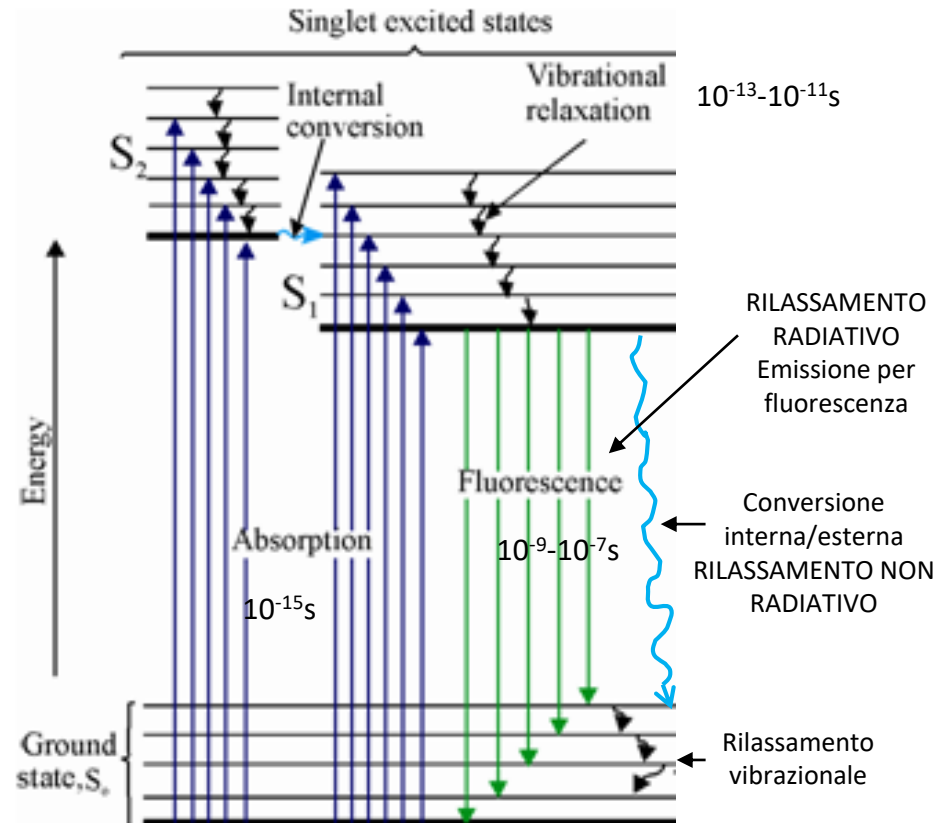
Fenomeno fisico che consiste nell'emissione di fotoni di luce da parte di materiali eccitati da cause diverse della temperatura.

A seconda della causa si distinguono:

- Bioluminescenza
- Chemiluminescenza
- Elettroluminescenza
- Fotoluminescenza
  - Fosforescenza
  - **Fluorescenza**
- Radioluminescenza
- Sonoluminescenza
- Termoluminescenza

# Metodi spettroscopici:

## Spettroscopia di fluorescenza



La fluorescenza è la proprietà di alcune sostanze di riemettere le radiazioni elettromagnetiche ricevute.

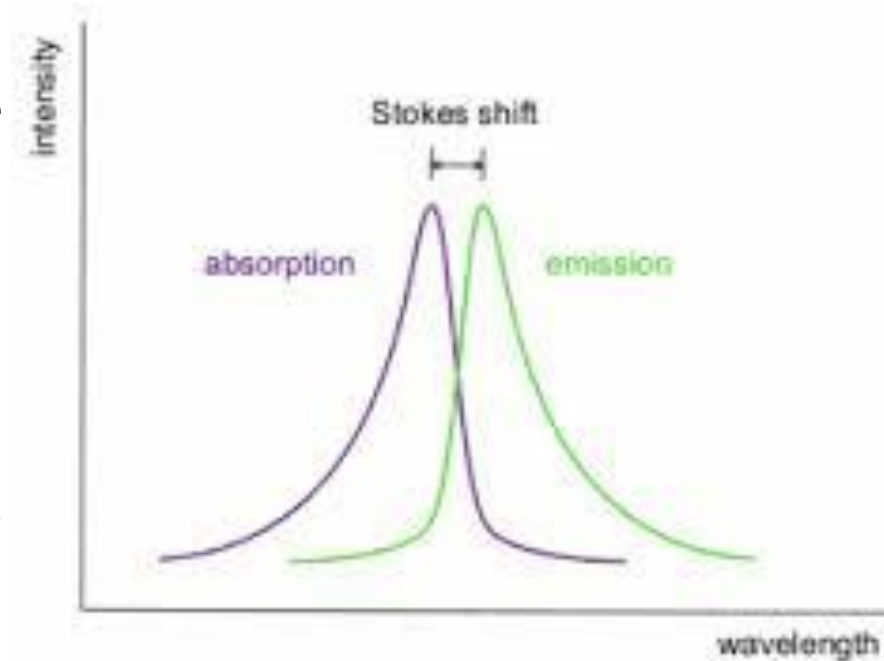
# Metodi spettroscopici:

## Spettroscopia di fluorescenza

Nella fluorescenza, essendo che parte dell'energia assorbita viene persa per rilassamento vibrazionale, l'energia della radiazione emessa avrà minore energia, cioè maggiore  $\lambda$ : [legge di Stokes](#)

La differenza di  $\lambda$  è detta [Stokes shift](#)

[Resa quantica di fluorescenza](#) è la frazione di molecole eccitate che emettono radiazioni (quindi va da 0 a 1),  $\phi$



# Metodi spettroscopici:

## Spettroscopia di fluorescenza

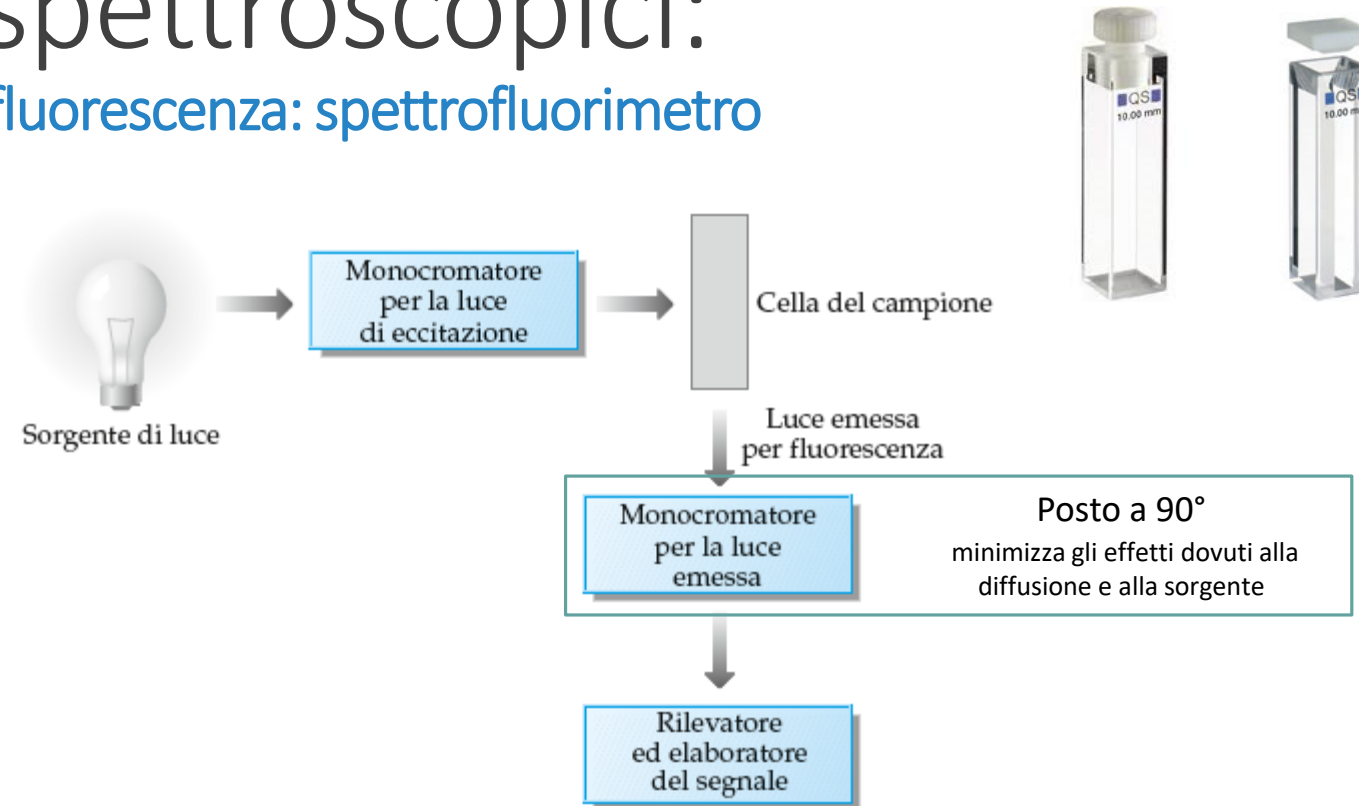
- $\lambda_{\text{ex}} < 250 \text{ nm}$  non danno fluorescenza
- Si osserva fluorescenza per transizioni
  - $\pi^* \rightarrow \pi$  e  $\pi^* \rightarrow n$ 
    - Gruppi aromatici
    - Gruppi carbonilici alifatici e aliciclici
    - Strutture con doppi legami ad elevata coniugazione
- $\phi$  maggiore per  $\pi^* \rightarrow \pi$
- Intensità di fluorescenza direttamente proporzionale a concentrazione dell'analita e  $\phi$





# Metodi spettroscopici:

## Spettroscopia di fluorescenza: spettrofluorimetro



**FIGURA 18.21** Schema generale di uno spettrofluorimetro. In questo strumento sono presenti due monocromatori. Il primo seleziona la lunghezza d'onda della luce proveniente dalla sorgente utilizzata per l'eccitazione del campione. Il secondo seleziona le lunghezze d'onda della luce emessa dal campione per fluorescenza prima della misurazione. Se si varia la lunghezza d'onda al primo monocromatore mentre si mantiene costante quella al secondo, il grafico risultante che descrive l'intensità della fluorescenza in funzione della lunghezza d'onda prende il nome di "spettro di eccitazione". Al contrario se si mantiene costante la lunghezza d'onda al primo monocromatore variando invece quella al secondo, il grafico risultante intensità della fluorescenza/lunghezza d'onda viene detto "spettro di emissione" (o "spettro di fluorescenza".)