

“ **133FA - ANALISI FARMACEUTICA 1**

**LEZIONE 08 – Caratterizzazione di
costanti chimico fisiche**

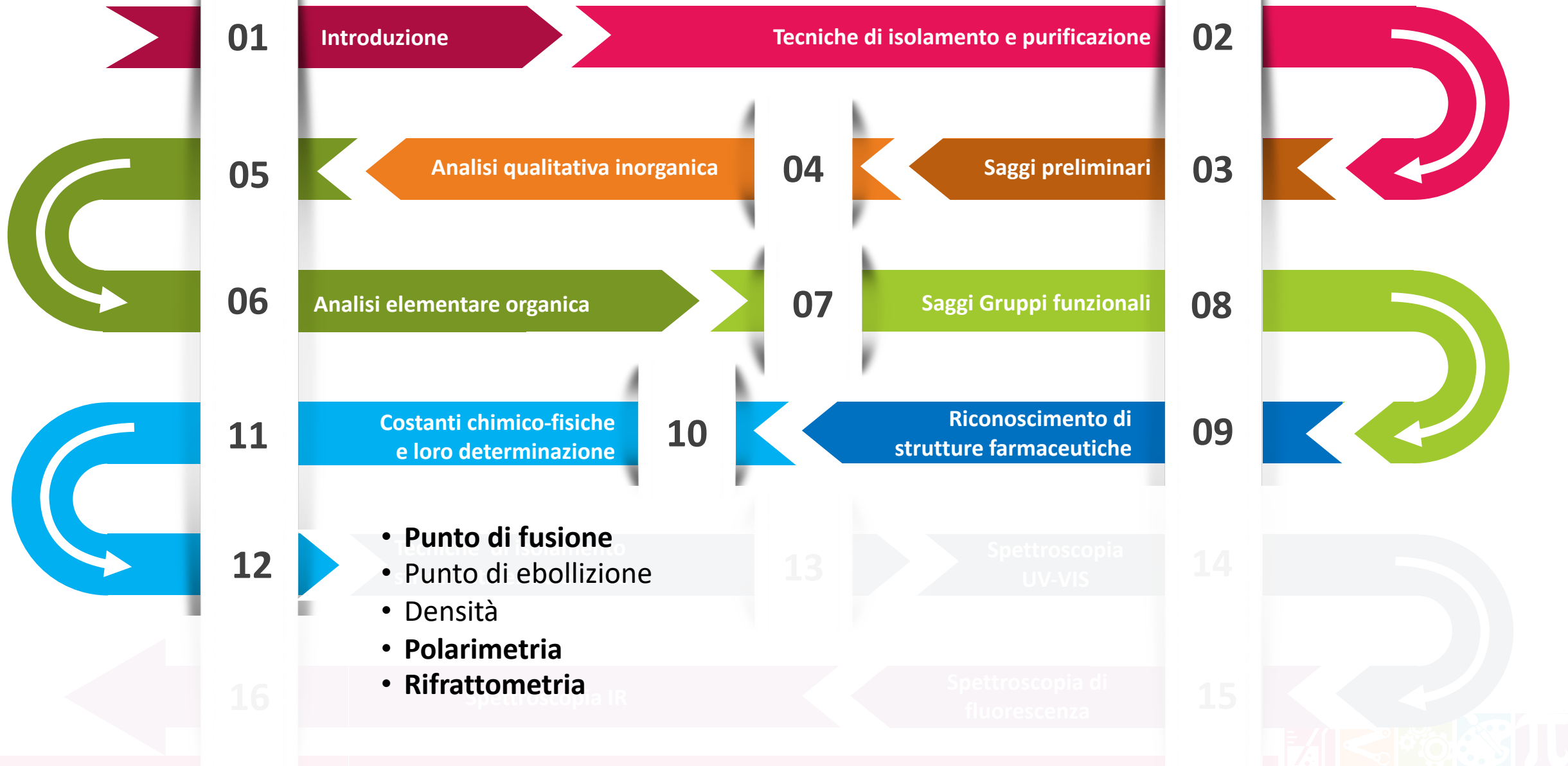
”

Prof. Daniele Zampieri

CdL CTF



Contenuti del Corso (e “Roadmap”)



LE PROPRIETA' CHIMICO-FISICHE DELLE SOSTANZE DI INTERESSE FARMACEUTICO

Lo studio e l'analisi delle proprietà chimico-fisiche, essenziale per il riconoscimento e l'identificazione dei composti organici di interesse farmaceutico, associato a metodi chimici, spettroscopici e cromatografici, contribuisce alla completa caratterizzazione di una sostanza.

Quelle piu' rilevanti sono:

- ☐ **PUNTO DI FUSIONE**
- ☐ **PUNTO DI EBOLLIZIONE**
- ☐ **DENSITA' E PESO SPECIFICO**
- ☐ **POTERE OTTICO ROTATORIO**
- ☐ **INDICE DI RIFRAZIONE**

Punto di fusione

Il **punto di fusione** (p.f.) di una sostanza è definito come la temperatura in cui, a pressione atmosferica, coesistono la fase solida e fase liquida. Per un composto puro, rappresenta un valore netto e si realizza a temperatura costante! Se il liquido viene raffreddato, sempre a questa T° , allora solidificherà; pertanto il p.f. coinciderà con il punto di congelamento!

In genere tutte le sostanze organiche in F.U.. passano dallo stato solido a quello liquido sotto i 300°C : la determinazione del punto di fusione è parte integrante dell'analisi di un composto organico.

Essendo una misura effettuata dall'esterno del sistema, si registrerà un intervallo di fusione di alcuni gradi $^\circ\text{C}$ (goccioline iniziali fino a completa liquefazione) e rappresenterà una caratteristica chimico-fisica di ciascuna molecola essendo, inoltre, indicativo della sua **purezza!**

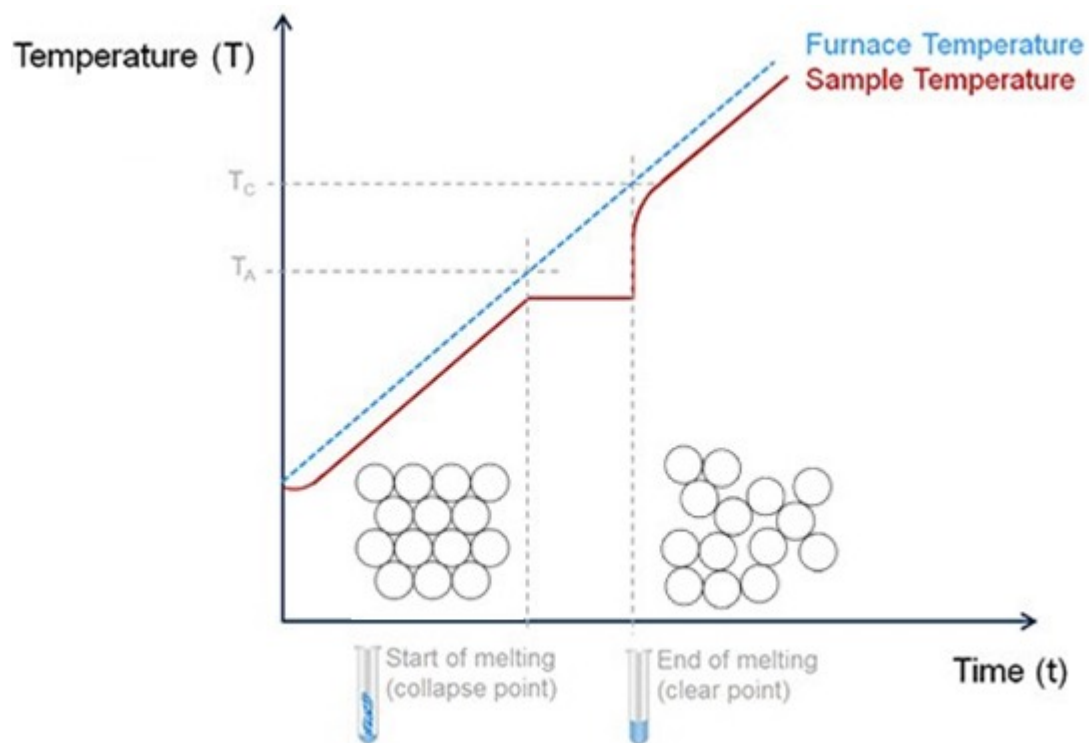
N.B.: NON CONFONDERE FUSIONE CON SOLUBILIZZAZIONE!!

Si utilizzano strumenti dedicati nei quali viene introdotto il campione inserito in un **microcapillare** a fondo chiuso e, generalmente tramite metodo visivo, si determinerà il p.f. caratteristico di ciascuna molecola.

Molte sostanze fondono con decomposizione, che si manifesta con imbrunimenti, colorazioni, evoluzione di fumi, etc.. In questo caso il p.f. sarà indicato con una “(d)” dopo il valore di range di temperatura registrato ; es: Tiamina cloridrato: 245 (d).



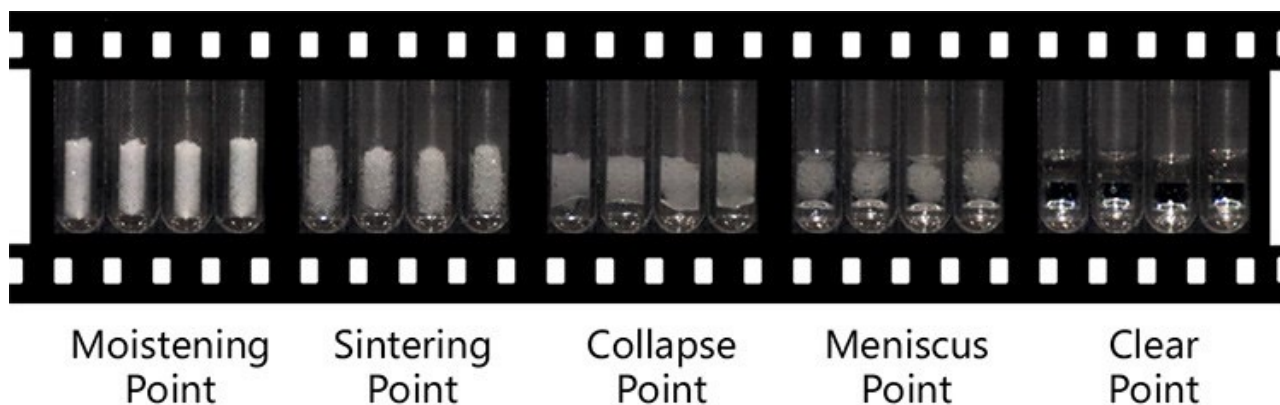
NON determineremo il p.f. di inorganici e metallo-organici in quanto sono necessarie temperature molto alte per la fusione; solitamente $>>300^{\circ}\text{C}$.



✓ NOTE pratiche sulla misura del pf:

Durante il processo di riscaldamento la temperatura del forno è diversa (maggiore) di quella del campione.

Di conseguenza, il punto di fusione valutato dipende fortemente dalla velocità di riscaldamento.



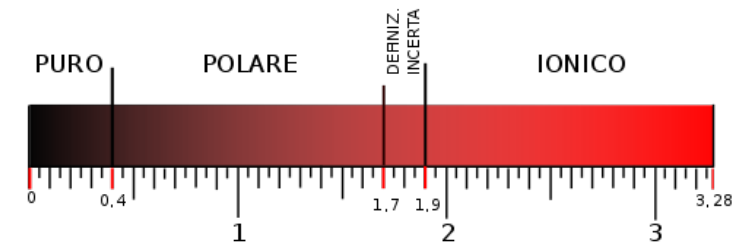
Immagini e testo riadattati dalla documentazione

METTLER-TOLEDO alla pagina:

https://www.mt.com/it/it/home/applications/Application_Browse_Laboratory_Analytics/Thermal_Values/melting-point-determination.html

Fattori che influenzano il punto di fusione:

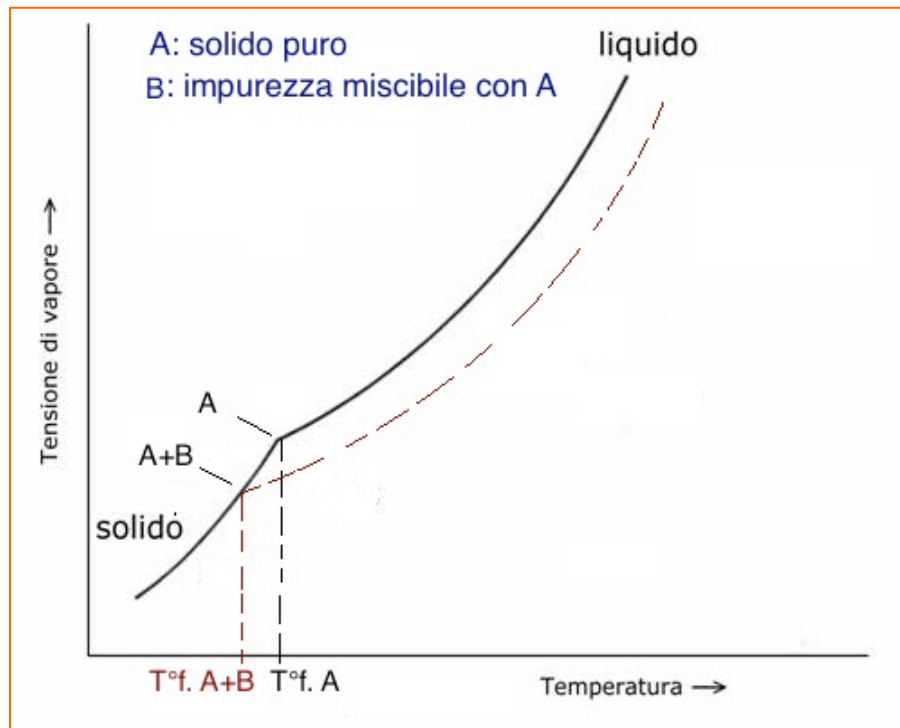
- **Stato solido:** I composti solidi possono essere *amorfi* o *cristallini*. I primi possiedono strutture casuali delle particelle elementari che li costituiscono (come avviene nei liquidi), quindi, più disordinata e con forze intermolecolari più deboli. Lo stato cristallino rappresenta la forma più stabile e ordinata, dove le energie intermolecolari sono maggiori. Ne risulta un punto di fusione più netto per i cristalli e un range più ampio per gli amorfi!
- **Tipo di legami chimici:** In generale, nei composti organici in cui ci sono legami intermolecolari (di coesione) deboli, ad es. il legame-H, si rilevano p.f. piuttosto bassi se raffrontati a quelli dei composti ionici in cui prevalgono intense forze di attrazione elettrostatica (legami ionici).
- **Isomeria strutturale:** Nei composti di una serie omologa, le strutture più simmetriche ed ordinate, come ad es. isomeri strutturali più ramificati, fondono a T° relativamente più elevate degli isomeri a struttura lineare (comportamento inverso per lo stato liquido e il p.eb; gli isomeri lineari possono instaurare più interazioni intermolecolari innalzando così il p.eb. rispetto gli omologhi ramificati).



- **Presenza di impurezze:** In generale le impurezze abbassano il p.f.!

Considerando la **tensione di vapore**, essa è una funzione di stato che dipende dalla temperatura e varia maggiormente per i solidi che per i liquidi.

Se si osserva il diagramma della tensione di vapore della forma solida e liquida si nota come la presenza di un'impurezza (B), fa diminuire la tensione di vapore del solido e quindi la T° di fusione (il p.f.). Al contrario il soluto provocherà un innalzamento della T° di ebollizione nei liquidi.



Legge di Raoult: $P_A = P_A^\circ \chi_A$ e $P_B = P_B^\circ \chi_B \dots$
 ($\chi_A = n_A/n_{tot}$; $\chi_B = n_B/n_{tot}$);

Legge di Dalton: $P_{TOT} = P_A + P_B + \dots$

Se A puro: $\chi=1$, $\chi = \chi_A=1$ e $P_{TOT}=P_A$

Per aggiunta di una quantità B, sarà:

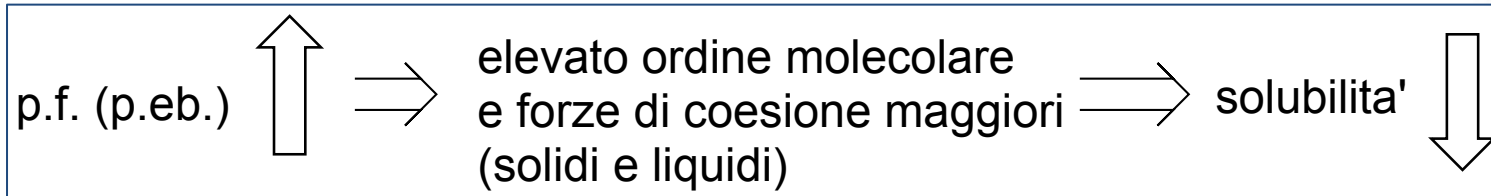
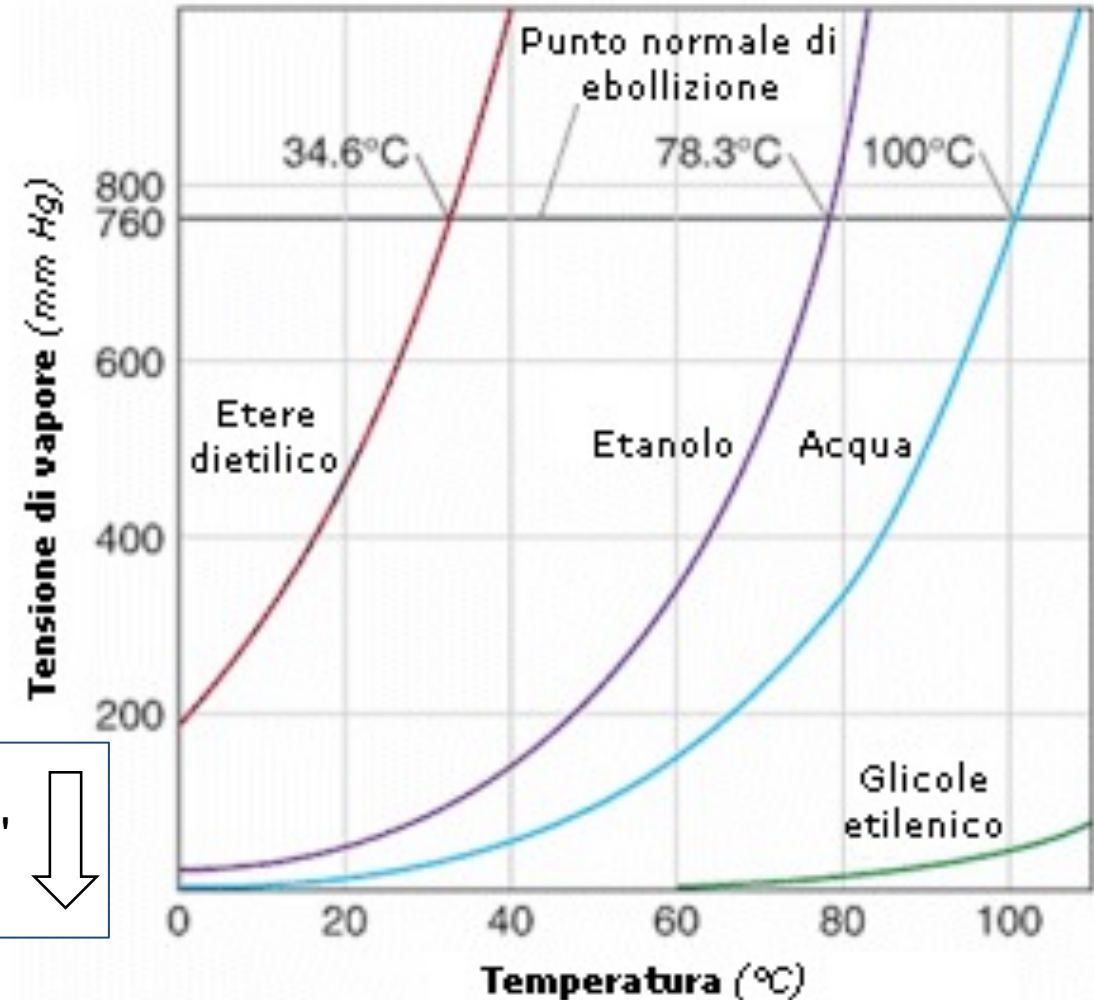
$\chi = \chi_A + \chi_B = 1$ e quindi $\chi_A < 1$

Punto di ebollizione

La temperatura o punto di ebollizione (p.e.) di una sostanza allo stato liquido è la temperatura alla quale la sua tensione di vapore eguaglia la pressione esterna.

La determinazione del punto di ebollizione è poco utilizzata come indicatore della purezza di una sostanza liquida per le difficoltà sperimentali e la scarsa attendibilità del dato ottenuto.

A p.f. elevati appartengono a strutture altamente ordinate, p.eb. alti corrispondono a forze di coesione maggiori.



Densita' e Densita' relativa

Ogni sostanza, a una **data pressione e temperatura**, ha una densità (ρ) caratteristica.

$$\rho = \frac{m}{V}$$

In Ph.Eur. si parla di densità relativa $d_{T_2}^{T_1}$ di una sostanza.

$d_{T_2}^{T_1}$ è il rapporto tra la massa di un certo volume di una sostanza alla temperatura T_1 e la massa di un uguale volume di acqua alla temperatura T_2 .

$$d = \frac{\rho_1}{\rho_2} \xrightarrow{\rho = \frac{m}{V}} d = \frac{m_1}{V_1} \frac{V_2}{m_2} \xrightarrow{V_1 = V_2} d = \frac{m_1}{m_2} \xrightarrow[\text{temperatura diversa}]{\text{se le masse hanno}} d_{T_2}^{T_1} = \frac{m_1^{T_1}}{m_2^{T_2}}$$

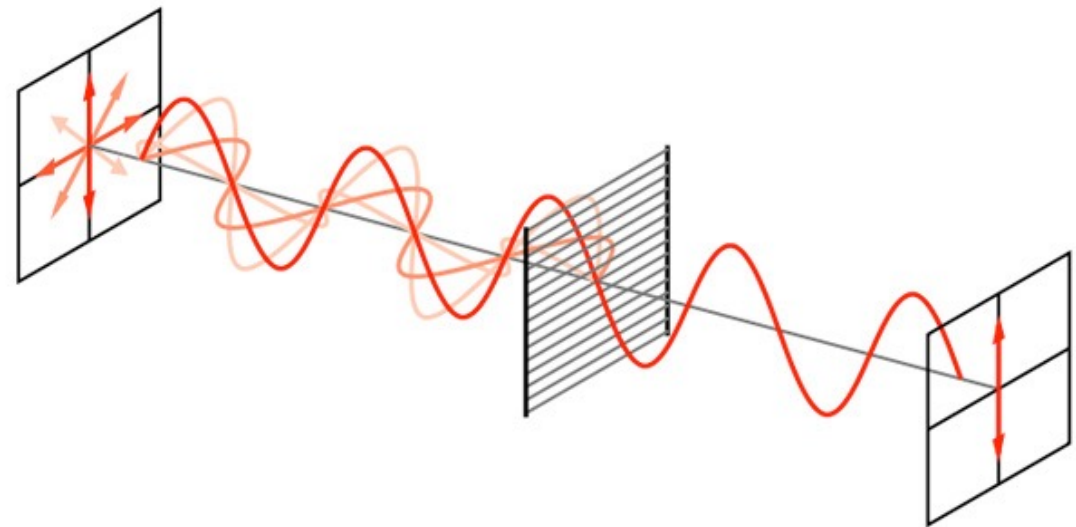
densità relativa

$$d_{T_2}^{T_1} = \frac{m_1^{T_1}}{m_2^{T_2}}$$

POLARIMETRIA

La polarimetria si basa sul concetto di **luce polarizzata**.

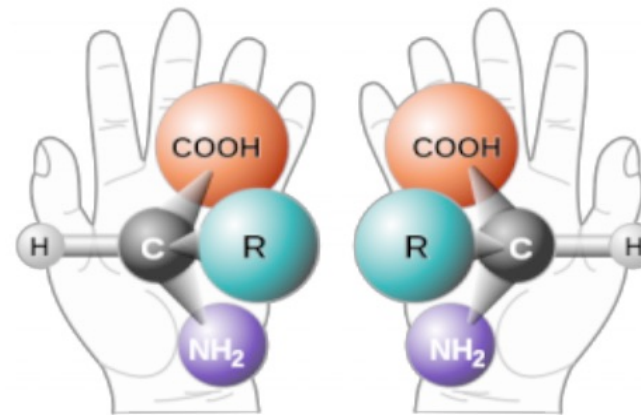
- ❑ La luce “ordinaria” ha infiniti piani di propagazione
- ❑ La luce “polarizzata” ha un unico piano di propagazione (verticale)
- ❑ Il polarizzatore (polarimetro se strumento di misura) rende la luce ordinaria in polarizzata



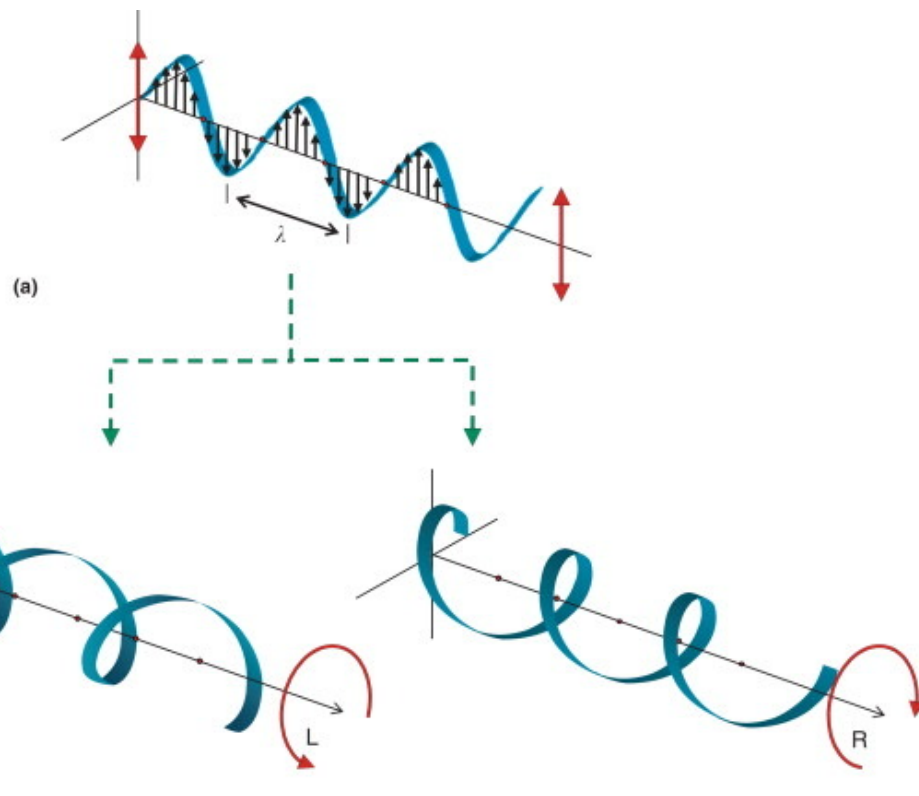
Perchè è utile in laboratorio?!?!?

- ❑ Le molecole “chirali” ruotano il piano della luce polarizzata a causa di una interazione dei campi elettromagnetico della radiazione luminosa e quello degli elettroni della molecola dell'enantiomero;
- ❑ Se la rotazione è in senso orario (l'osservatore che guarda il raggio emergente dalla soluzione), l'enantiomero sarà destrogiro (+), se la rotazione è in senso antiorario, l'enantiomero sarà levogiro (-).

ATTENZIONE: la direzione +/- non è correlata a L/D o S/R!!!



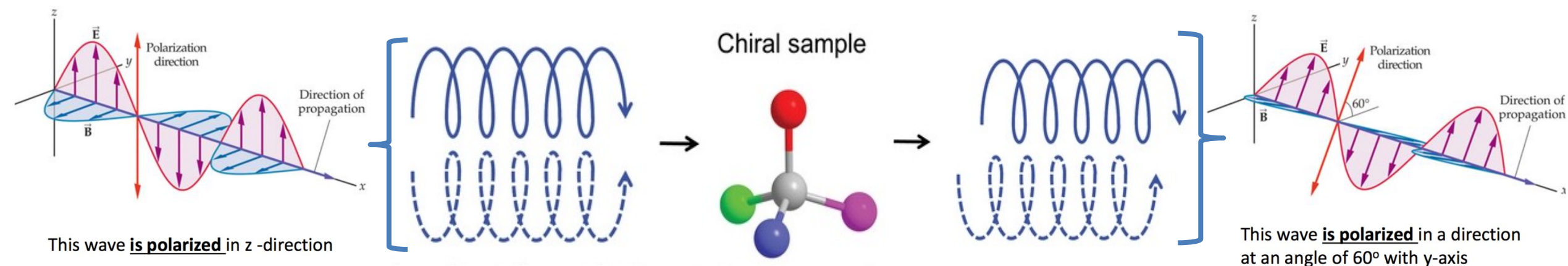
Una molecola si dice **CHIRALE** quando non è sovrapponibile alla sua immagine speculare.

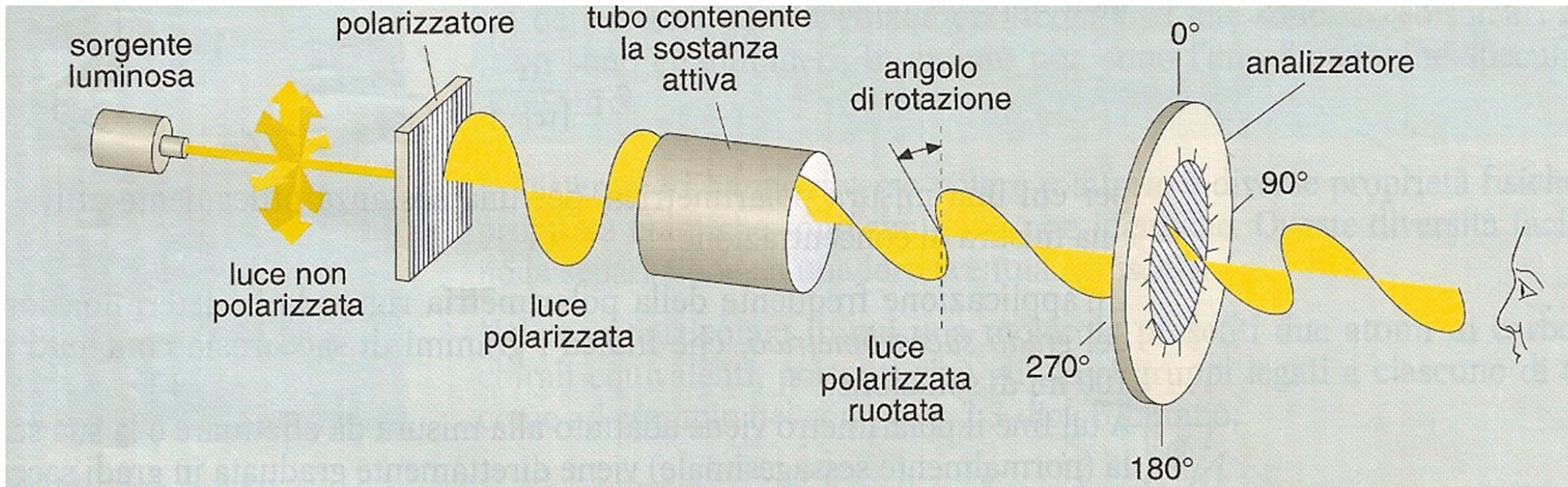


La luce linearmente polarizzata può essere **immaginata** come una sovrapposizione coerente di due onde polarizzate circolarmente (una a sinistra e una a destra) di uguale ampiezza.

Quando queste due componenti incontrano delle molecole chirali, vengono rallentate in maniera differente (diffrazione).

La somma di queste due componenti «rallentate» sarà una nuova onda di luce linearmente polarizzata con il suo piano ruotato rispetto all'onda iniziale!





POLARIZZATORE (o filtro polarizzante)

Il polarizzatore ha la funzione di filtrare la radiazione e.m. ordinaria, in un unico piano (verticale) di oscillazione.

Attualmente i polarizzatori comuni (molto usati in ottica fotografica) sono formati da un filtro costituito da sottilissime lamelle spaziate fra loro dell'ordine della lunghezza d'onda della radiazione e.m. in esame (usualmente la λ del sodio a 589 nm), escludendo tutti gli altri piani non paralleli al loro asse di polarizzazione.

SOSTANZA ATTIVA

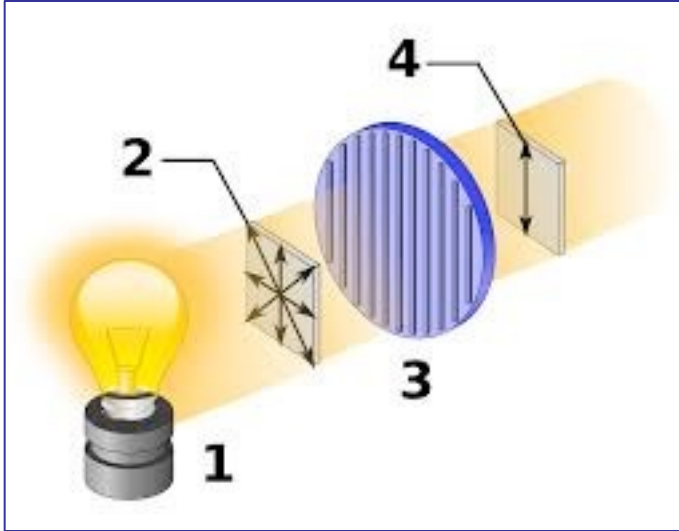
Sostanze con almeno un centro di asimmetria (composti "chirali") sono in grado di ruotare il piano della luce polarizzata e si definiscono "OTTICAMENTE ATTIVE".

Tali molecole sono "stereoisomeri" e vengono definite "enantiomeri", nel senso che ogni enantiomero è l'immagine speculare dell'altro e, perciò, NON SOVRAPPONIBILE ad essa.

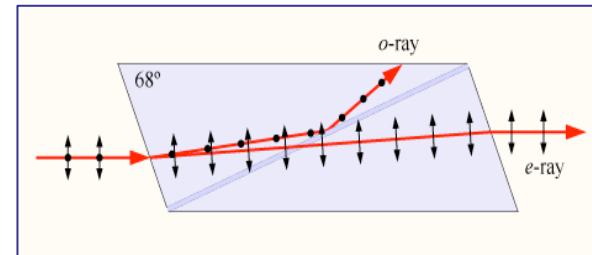
POLARIZZATORE (o filtro polarizzante)

Il polarizzatore ha la funzione di filtrare la radiazione e.m. ordinaria, in un unico piano (verticale) di oscillazione.

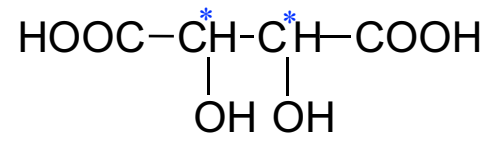
Attualmente i polarizzatori comuni (molto usati in ottica fotografica) sono formati da un filtro costituito da sottilissime lamelle spaziate fra loro dell'ordine della lunghezza d'onda della radiazione e.m. in esame (usualmente la λ del sodio a 589 nm), escludendo tutti gli altri piani non paralleli al loro asse di polarizzazione.



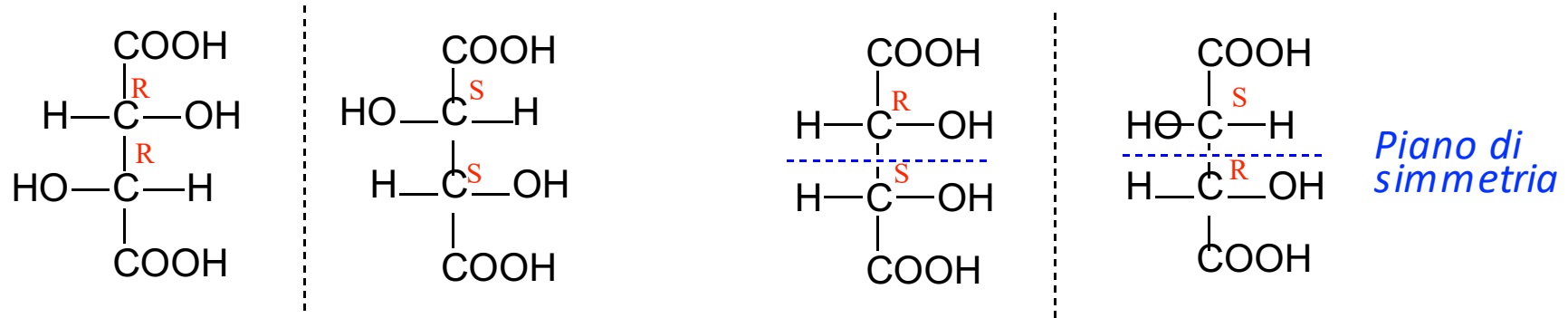
Il polarizzatore “storico” è il filtro di NICOL, costituito da due blocchi di spato d'Islanda (calcite: CaCO_3) tagliati con un angolo di 68° e incollati tra loro con del “balsamo del Canada” (resina). La luce NON polarizzata quando colpisce il cristallo **viene divisa in 2 raggi polarizzati**: uno “ordinario” che viene riflesso totalmente dal balsamo e deviato fuori dal cristallo; uno “straordinario” che attraversa il balsamo ed il secondo cristallo, fuoriuscendo con polarizzazione planare.



ACIDO TARTARICO



N° stereoisomeri: $2^2 = 4$ possibili: R,R-S,S-R,S,S,R



treo

*Enantiomeri
otticamente attivi*

eritro

*Meso:
otticamente inattivi*

3 Stereoisomeri

Diastereoisomeri

POTERE ROTATORIO SPECIFICO

Il POLARIMETRO è lo strumento usato per determinare il grado di rotazione del piano della luce polarizzata da parte di un enantiomero. Tale angolo è proporzionale al numero di molecole incontrate dal raggio, cioè alla concentrazione della soluzione dell'enantiomero e alla lunghezza del percorso (cammino ottico) del raggio all'interno della cella. Così si ha:

Legge di Biot:

$$\alpha = [\alpha]^{T_{\lambda}} \cdot l \cdot c$$

potere rotatorio osservato (in gradi) potere rotatorio specifico cammino ottico (in dm) concentrazione (g/ml)

Il **potere rotatorio specifico** corrisponde al potere rotatorio della sostanza in condizioni di lunghezza e concentrazione unitari, ed è **funzione della temperatura** (si opera a T° fissa) e **della lunghezza d'onda**, λ (si usa la luce gialla del sodio; riga D del sodio). E' una caratteristica come il p.f., la densità, etc. che distingue (l'unica !!!) un enantiomero dall'altro.

Riarrangiando l'equazione precedente si ottiene la **legge di Biot**:

$$[\alpha]^{T^\circ}_\lambda = \frac{\alpha}{l \cdot c}$$

La legge di Biot mi permette di calcolare il potere rotatorio specifico di una sostanza, da una misura sperimentale al polarimetro dell'angolo di rotazione α .

La misura di α dipende dal potere rotatorio specifico $[\alpha]^{T^\circ}_\lambda$ (differente per ogni enantiomero), dal cammino ottico l e dalla concentrazione c dell'analita.

- ❑ **Dipendenza di α dalla lunghezza del cammino ottico l**
se la radiazione percorre un percorso più lungo, essa incontrerà più molecole
- ❑ **Dipendenza di α dalla concentrazione c** la variazione di concentrazione della molecola porta ad una variazione di densità della soluzione e, quindi, di numero di molecole che interagiranno con la radiazione

A sua volta, $[\alpha]^{T^\circ}_\lambda$ dipende esso stesso da una serie di fattori:

- ❖ **Dipendenza di $[\alpha]^{T^\circ}_\lambda$ dalla temperatura**
La T° influenzerà in primis la densità del mezzo e, quindi, le interazioni della molecola con il raggio polarizzato;
- ❖ Vengono alterati anche le interazioni molecola-solvente (es. numero di leg-H);
Alterazioni della conformazione (es. cis-trans)
- ❖ **Dipendenza di $[\alpha]^{T^\circ}_\lambda$ dal solvente**
Interazioni diverse (con solventi diversi) portano a variazioni di α anche dovute a variazioni conformazionali
- ❖ Anche il **pH** sarà importante come nel caso di specie ioniche
- ❖ **Dipendenza di $[\alpha]^{T^\circ}_\lambda$ dalla lunghezza d'onda λ**
E', forse, il fattore più importante: λ differenti interagiranno in modo differente con le molecole presenti (vedi lezione «**Introduzione ai metodi ottici**»
Si opera a λ fissa proprio per assicurare riproducibilità della misura.

FUNZIONAMENTO DEL POLARIMETRO

Poichè la misura di α , necessaria per la determinazione di dipende da molti fattori, è opportuno fissarne alcuni.

Il parametro più semplice da controllare è la lunghezza del cammino ottico.

Si usano “tubi polarimetrici”, cioè vaschette di contenimento della soluzione da analizzare, di lunghezza fissa (10 cm, cioè 1 dm oppure raramente da 20 cm).

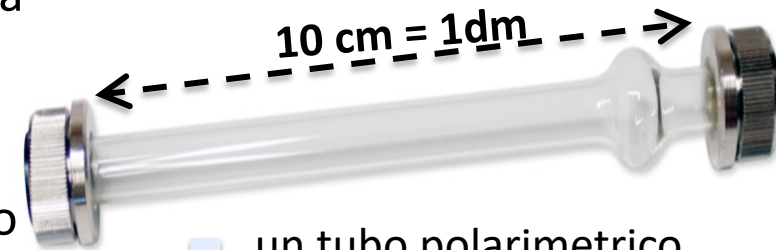
In tal modo si fissa $l = 1$ e l'equazione sopra si semplifica:

il potere rotatorio α (misurato) dipenderà così solamente dal potere rotatorio specifico $[\alpha]_D^{T^\circ}$ (da calcolare) e dalla concentrazione c del mio analita (in g/ml). Dato che la soluzione da analizzare la preparo io, anche questa la posso agevolmente calcolare.

Per effettuare la misura:

- (1) introdurre il campione nel tubo polarimetrico
- (2) accendere la lampada (al sodio)
- (3) attende qualche minuto
- (4) Effettuare la lettura di α (in gradi) dal display dello strumento.

$$[\alpha]_D^{T^\circ} = \frac{\alpha}{l \cdot c}$$



un tubo polarimetrico



APPLICAZIONI DELLA POLARIMETRIA

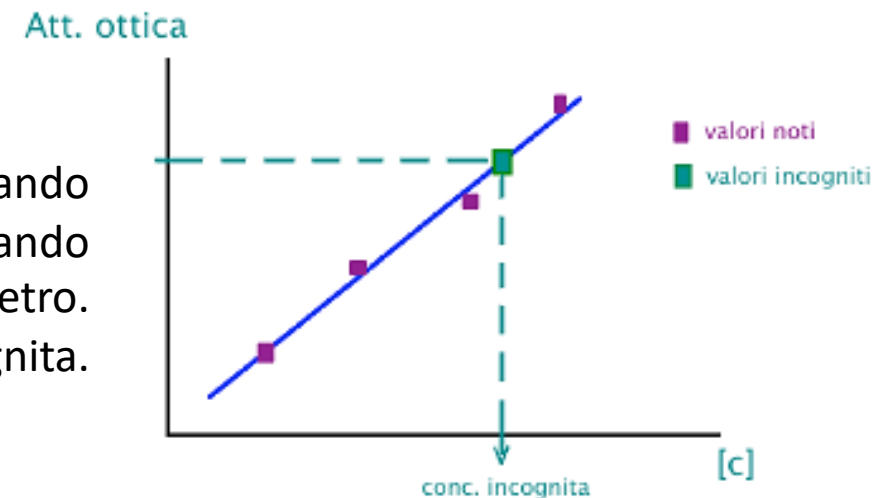
✓ La polarimetria come tecnica qualitativa

L'uso del polarimetro come tecnica qualitativa, può servire a confermare l'identità della sostanza otticamente attiva eseguendo l'esperimento preparando una soluzione di concentrazione 1 g/ml e leggere il valore di α dallo strumento, che corrisponderà all' $[\alpha]_{\lambda}^{T^{\circ}}$ tabellato (alla stessa T°).

✓ La polarimetria come tecnica quantitativa

per sostanze otticamente attive (zuccheri, oli essenziali, amminoacidi, ..)

Dalla relazione tra α e c si ricava la concentrazione di una sostanza (nota!) operando con rette di calibrazione della sostanza. Vengono costruite graficamente riportando concentrazioni note, crescenti, in ascissa e le corrispondenti α lette con il polarimetro. Successivamente si esegue la lettura dell' α dell'analita a concentrazione incognita. Quindi si esegue un'interpolazione del dato dalla retta di taratura.



✓ La misura della PUREZZA OTTICA (P.O.)

La purezza ottica corrisponde all'ECCESSO ENANTIOMERICO (e.e.) che indica le % di eccesso di un isomero rispetto all'altro in miscela:

$$\text{P.O.(\%)} = \frac{\alpha}{[\alpha]_{\lambda}^{T^{\circ}}} \cdot 100$$

purezza ottica (in percentuale)

valore misurato (miscela)

riferito all'enantiomero puro

$$\text{P.O.(\%)} = \text{e.e. (\%)} = \frac{[R] - [S]}{[R] + [S]} \cdot 100$$

eccesso enantiomerico (in percentuale)

Es. 80% di un enantiomero e 20% dell'altro = 60% e.e. (o P.O.%)

VANTAGGI



- ✓ Il valore di α è un dato analitico che accompagna ogni composto chirale e, quindi, permette una comparazione con i dati in letteratura.
- ✓ E' uno standard di riferimento per la sintesi di nuovi composti.
- ✓ Nello studio della variazione di α con la λ (tecnica ORD: Dispersione Ottica Rotatoria) si può risalire alla configurazione assoluta delle molecole.

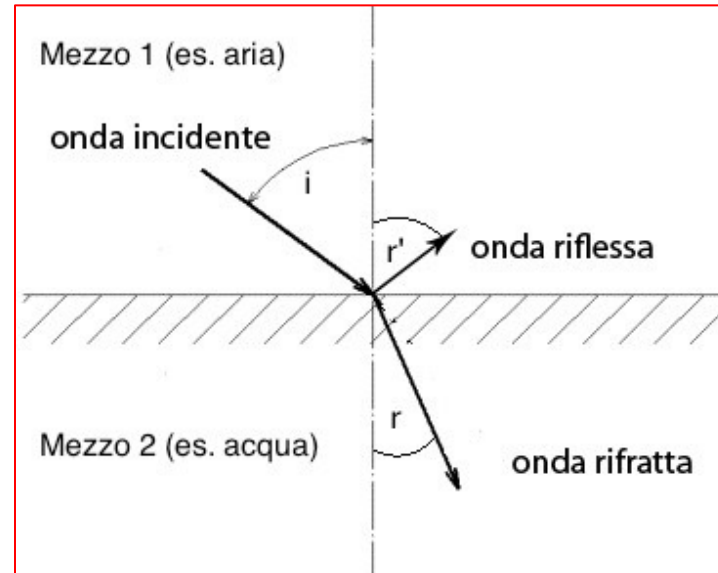
SVANTAGGI



- ✓ Servono quantità elevate di sostanza.
- ✓ Per una valutazione accurata servono valori alti di α
- ✓ Il composto chirale dev'essere puro ed isolato
- ✓ La determinazione di α è influenzata da T° , λ , solvente ed impurezze.

R I F R A T T O M E T R I A

La rifrattometria è una tecnica strumentale che si basa sulla determinazione di un parametro, l'Indice di rifrazione: n associato al fenomeno della rifrazione di sostanze liquide (anche gas e solidi trasparenti), cioè alla **variazione subita dalla radiazione luminosa quando attraversa un mezzo più o meno trasparente.**



L'indice di rifrazione è una misura caratteristica di tutte le sostanze, quindi, può essere utilizzata per una determinazione di tipo qualitativo, ma anche quantitativo. Infatti, oltre ad essere un valore univoco di una sostanza, esso cambia in presenza di un soluto. Cio' permette di identificare sostanze presenti in una soluzione (es. zuccheri in soluzioni acquose).

✓ L'indice di rifrazione n

Passando da un mezzo otticamente isotropo (le cui proprietà ottiche sono uguali in ogni direzione) a un altro mezzo isotropo, la velocità della luce cambia.

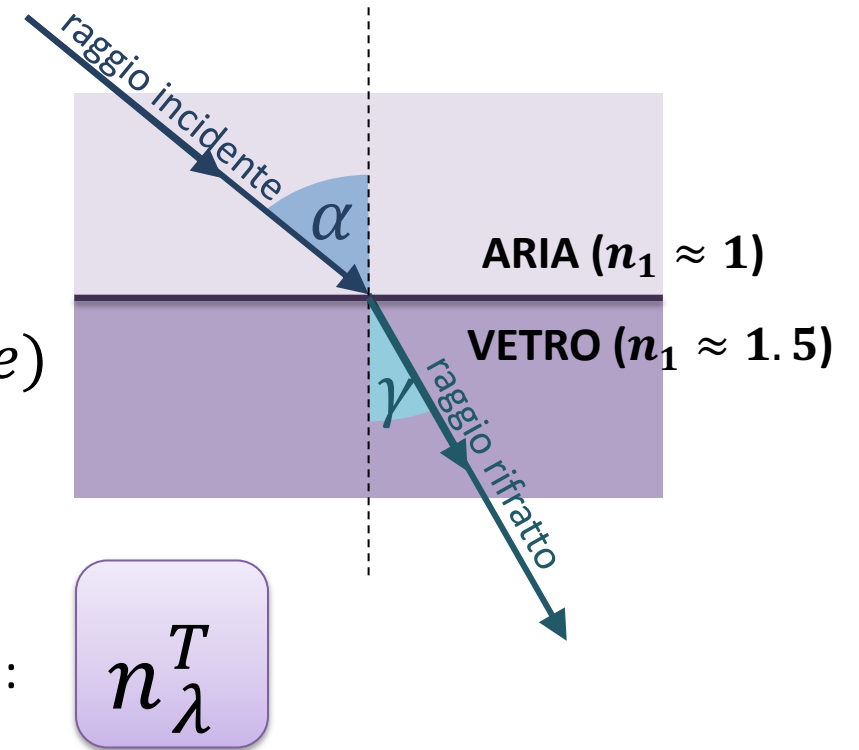
L'indice di rifrazione di un materiale è un **parametro macroscopico**, solitamente indicato col simbolo n , che rappresenta il fattore numerico per cui la velocità di propagazione di una radiazione elettromagnetica viene rallentata, rispetto alla sua velocità nel vuoto (che è **massima**), quando questa attraversa un materiale.

Si definisce indice di rifrazione assoluto di un mezzo n il rapporto tra la velocità di un raggio luminoso nel vuoto (c_v) e la sua velocità nel mezzo considerato (c_m); si tratta dunque di un numero adimensionale:

$$n = \frac{c_v}{c_m} \quad \text{Approssimando:} \quad n \cong \frac{c_a}{c_m} \quad n > 1 \text{ (sempre)}$$

$c_{vuoto} \approx c_{aria}$
 $n_{vuoto} = 1 \rightarrow n_{aria} \approx 1$

In generale, l'indice di rifrazione non è costante, ma **varia in base alla frequenza della radiazione e alla temperatura**, quindi si definisce così:



✓ Definizione geometrica dell'indice di rifrazione (relativo): $n_{\text{mezzo}/\text{aria}}$

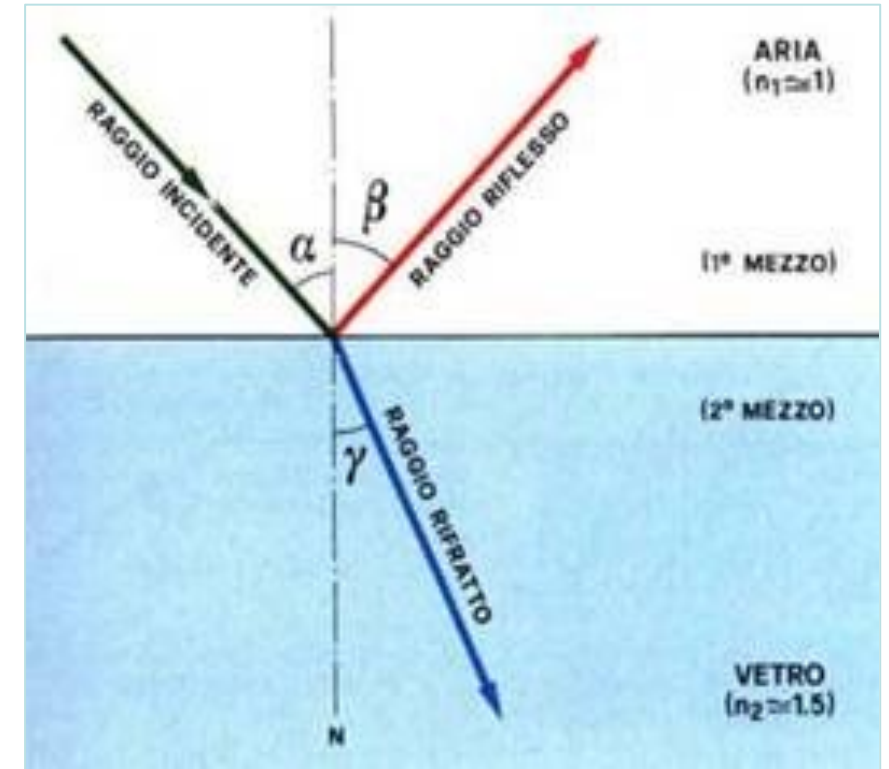
Quando una radiazione attraversa due mezzi a densità differente, il suo percorso viene deviato dal mezzo più denso di un certo angolo che verrà misurato rispetto la normale di incidenza a fornire l' n_{λ}^T . La relazione tra l'angolo del raggio incidente e quello rifratto è governata dalla legge di **SNELL**: $n_1 \sin \alpha = n_2 \sin \gamma$

Riarrangiando:

$$\frac{n_2}{n_1} = \frac{\sin \alpha}{\sin \gamma} \quad \begin{array}{c} \text{Se mezzo 1 = aria} \\ \text{ARIA } (n_1 \approx 1) \end{array} \Rightarrow \boxed{n_2 = \frac{\sin \alpha}{\sin \gamma} = \frac{\sin i}{\sin r}}$$

In generale, l'indice di rifrazione non è costante, ma varia in base alla frequenza della radiazione e alla temperatura, quindi lo scriveremo così:

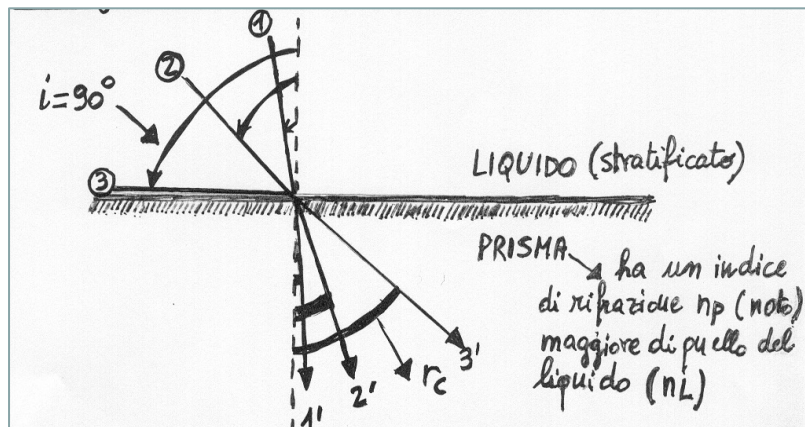
$$n_{\lambda}^T$$



Per la riflessione si avrà: $\alpha = \beta$

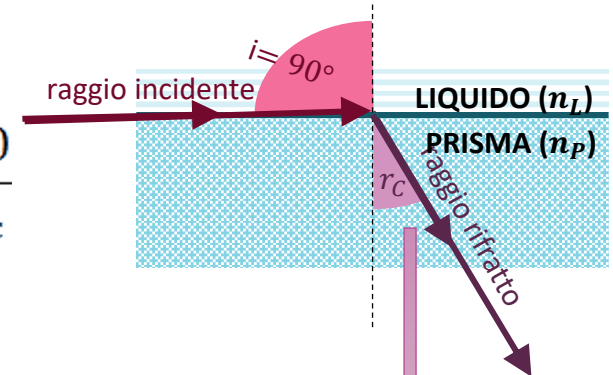
Misura dell'indice di rifrazione

Nella pratica, la determinazione sperimentale dell'indice di rifrazione (di un liquido) si basa sulla ricerca dell'angolo limite di rifrazione r_c corrispondente ad un angolo di incidenza (massimo) radente $i = 90^\circ$. Si sfrutta la rifrazione di un prisma a n noto (e molto maggiore della sostanza da analizzare) chiamato "prisma di Abbe".



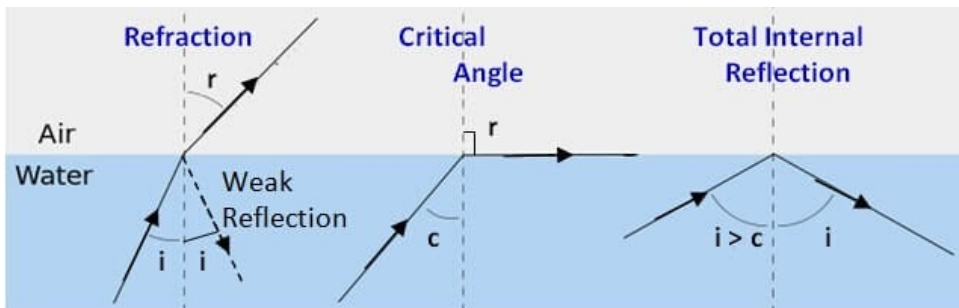
r_c è detto anche angolo critico di riflessione: se un raggio viene indirizzato dall'interno del prisma ad un angolo maggiore di r_c sarà riflesso totalmente all'interno del prisma.

$$\frac{n_2}{n_1} = \frac{\sin i}{\sin r} \quad \Rightarrow \quad \frac{n_p}{n_r} = \frac{\sin 90}{\sin r_c}$$



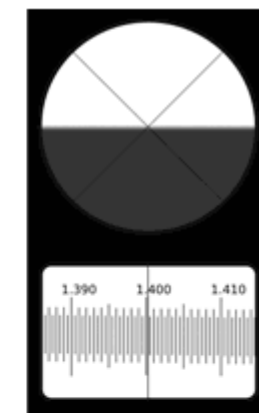
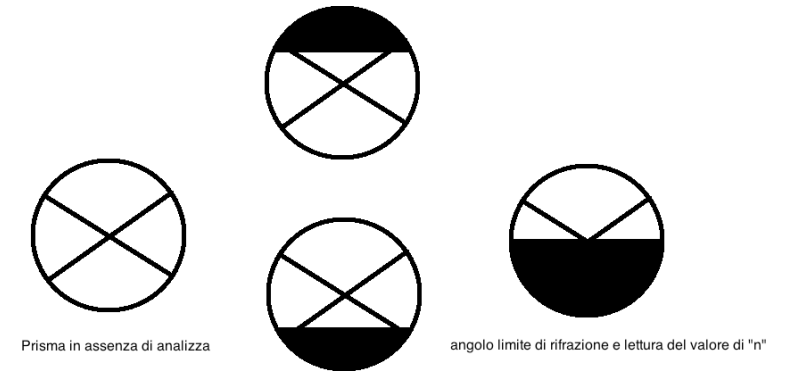
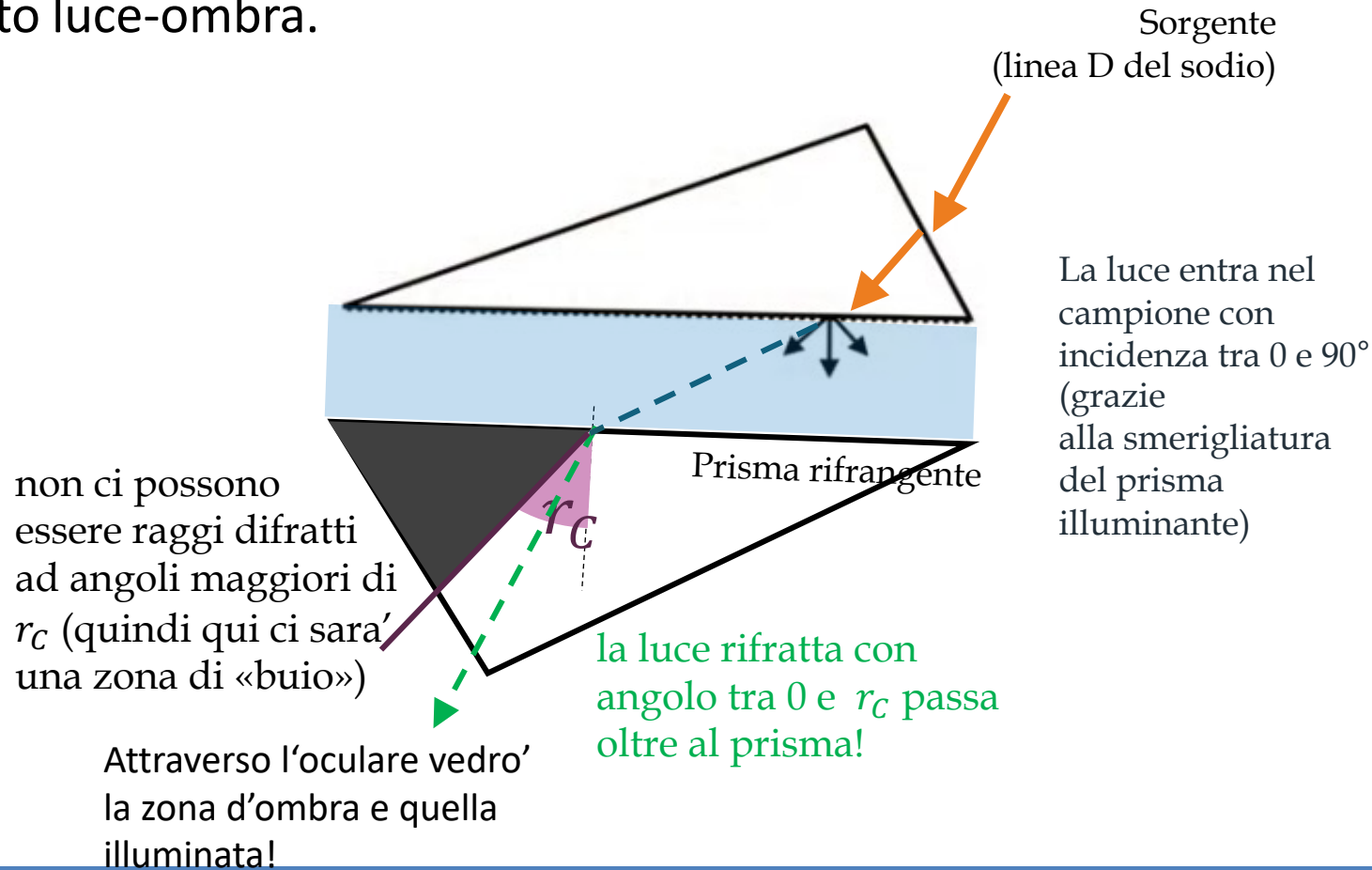
$$n_L = n_p \cdot \sin r_c$$

$$n_p > n_l$$



Ricerca dell'angolo limite:

Essendo la radiazione costituita da una banda luminosa, si avrà all'interno del prisma una zona illuminata e una oscura. La zona scura rappresenta la radiazione che viene riflessa all'interno del prisma e che non giunge alla visuale dell'operatore. Viceversa, la zona illuminata è costituita dai raggi rifratti che giungono all'occhio dell'operatore. La posizione del raggio critico verrà indicata da un passaggio netto luce-ombra.



trovare l'angolo limite

Attraverso l'oculare vedro' la zona d'ombra e quella illuminata!

Centro l'interfaccia tra ombra e luce (agendo su una manopola), e leggo n sulla scala graduata.

Rifrattometro di abbe

Il rifrattometro di Abbe è formato da un sistema di due prismi (di Abbe, appunto), racchiusi in una scatola a cerniera che permette di allontanarli ed avvicinarli, lasciando fra essi una sottile intercapedine di qualche decimo di millimetro, che viene occupata dal liquido in esame. La scatola metallica che contiene i prismi permette la circolazione di acqua, proveniente da un ultratermostato, per mantenere la temperatura costante. Un termometro, situato sull'apparecchio, controlla che la temperatura sia stabile (termostato esterno).

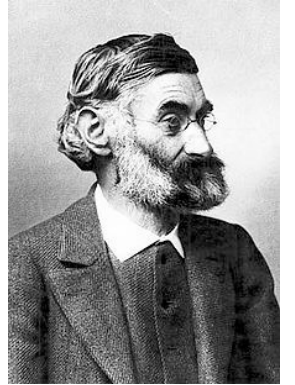
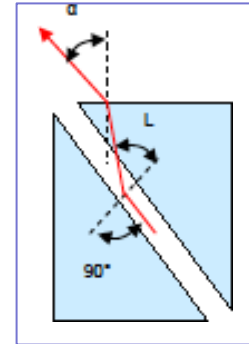
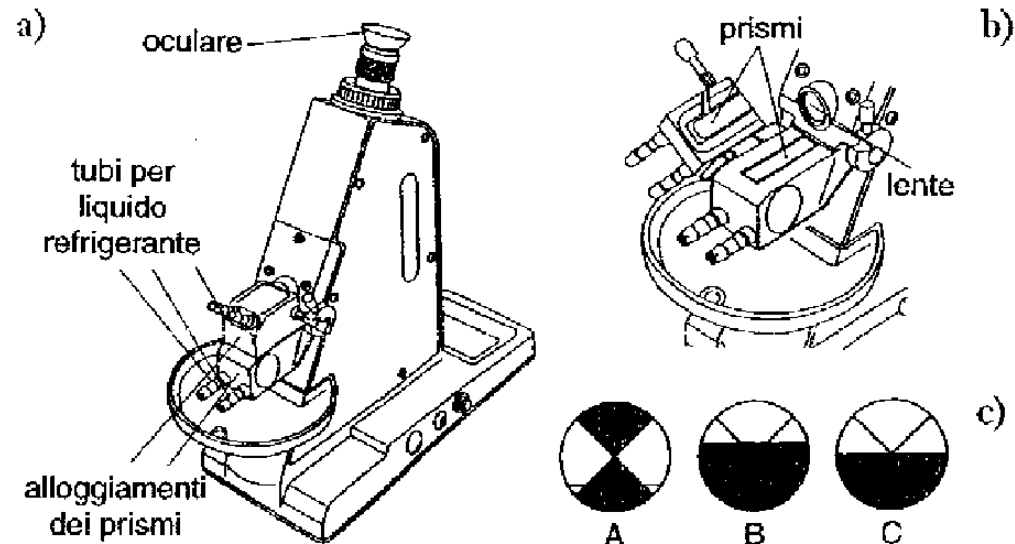


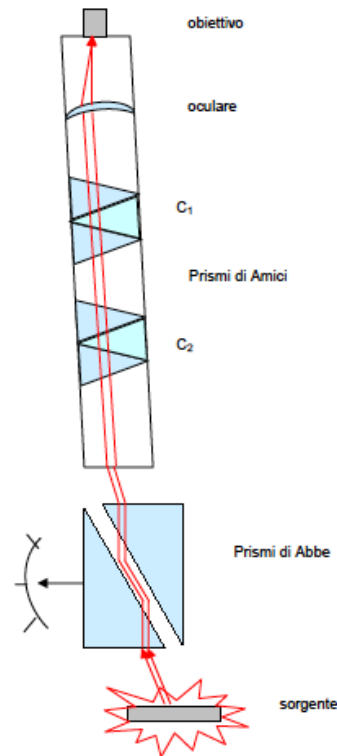
Fig. 2.1-9 - Rifrattometro di Abbe:
a chiuso;
b aperto;
c combinazione dei campi dell'ombra.



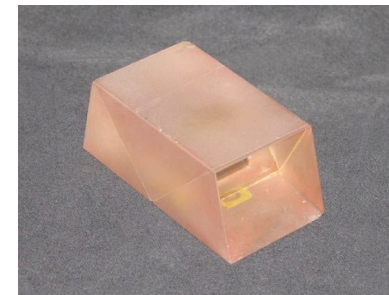
Alla base dei prismi di Abbe si trova una lampada ai vapori di sodio (riga gialla “D” a 589,3 nm) che illumina il campione (film liquido) posto tra i due prismi.

Al di sopra dei due prismi si trova un cannocchiale comprendente: un obiettivo, un oculare e due prismi di Amici (ognuno formato da tre prismi incollati tra di loro), che funzionano da compensatori (meglio: da monocromatori per la radiazione D del sodio in uscita dai prismi di Abbe). Le misure condotte con quest'apparecchio sfruttano il metodo dell'angolo limite.

Al di sopra dei due prismi si trova un cannocchiale comprendente: un obiettivo, un oculare e due prismi di Amici (ognuno formato da tre prismi incollati tra di loro), che funzionano da compensatori (monocromatori per la radiazione D del sodio in uscita dai prismi di Abbe).



Prismi di Amici



Le variabili che influenzano l'indice di rifrazione sono **la temperatura** e la **frequenza della radiazione elettromagnetica incidente**. Di solito le misure vengono fatte a $T = 20\text{ }^{\circ}\text{C}$ e lunghezza d'onda $\lambda = 589,3\text{ nm}$: riga gialla D “doppietto” del sodio (in quanto raggi di lunghezze d’onda diversa subiscono rifrazioni differenti). Poiché ogni sostanza ha indice di rifrazione caratteristico, la misura di questa grandezza rappresenta una valutazione d'identificazione e di purezza.



Si indica con:

$$n_D^{20}$$



Esempi di rifrattometri di Abbe

APPLICAZIONI DELLA RIFRATTOMETRIA

- Determinazione della purezza di liquidi mediante la misura dell'indice di rifrazione ($1.3 < n < 1.7$)
- Misura della concentrazione diretta di zuccheri in una soluzione: gradi Brix (°Bx);

1 grado Brix = 1 g di zucchero in 100 g di soluzione

Es. 25 °Bx di soluzione acquosa zuccherina, significa che 100 g di soluzione contiene 25 g di zucchero e 75 g di acqua.

- Misura del grado alcolico di soluzioni idroalcoliche
- Caratterizzazione di sostanza grasse/oli

“ **133FA - ANALISI FARMACEUTICA 1**
LEZIONE 09 – Introduzione ai metodi
ottici ”

Prof. Daniele Zampieri

CdL CTF

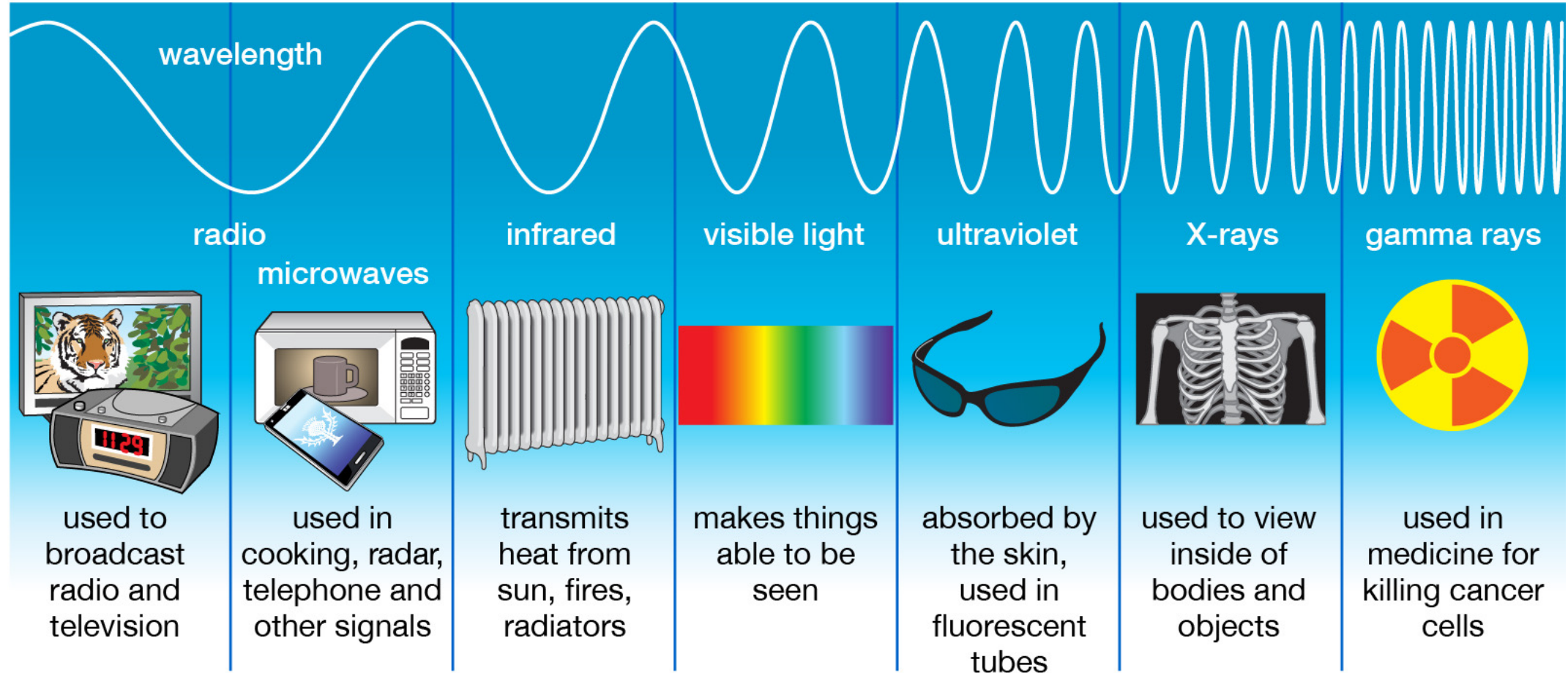


Contenuti del Corso (e “Roadmap”)

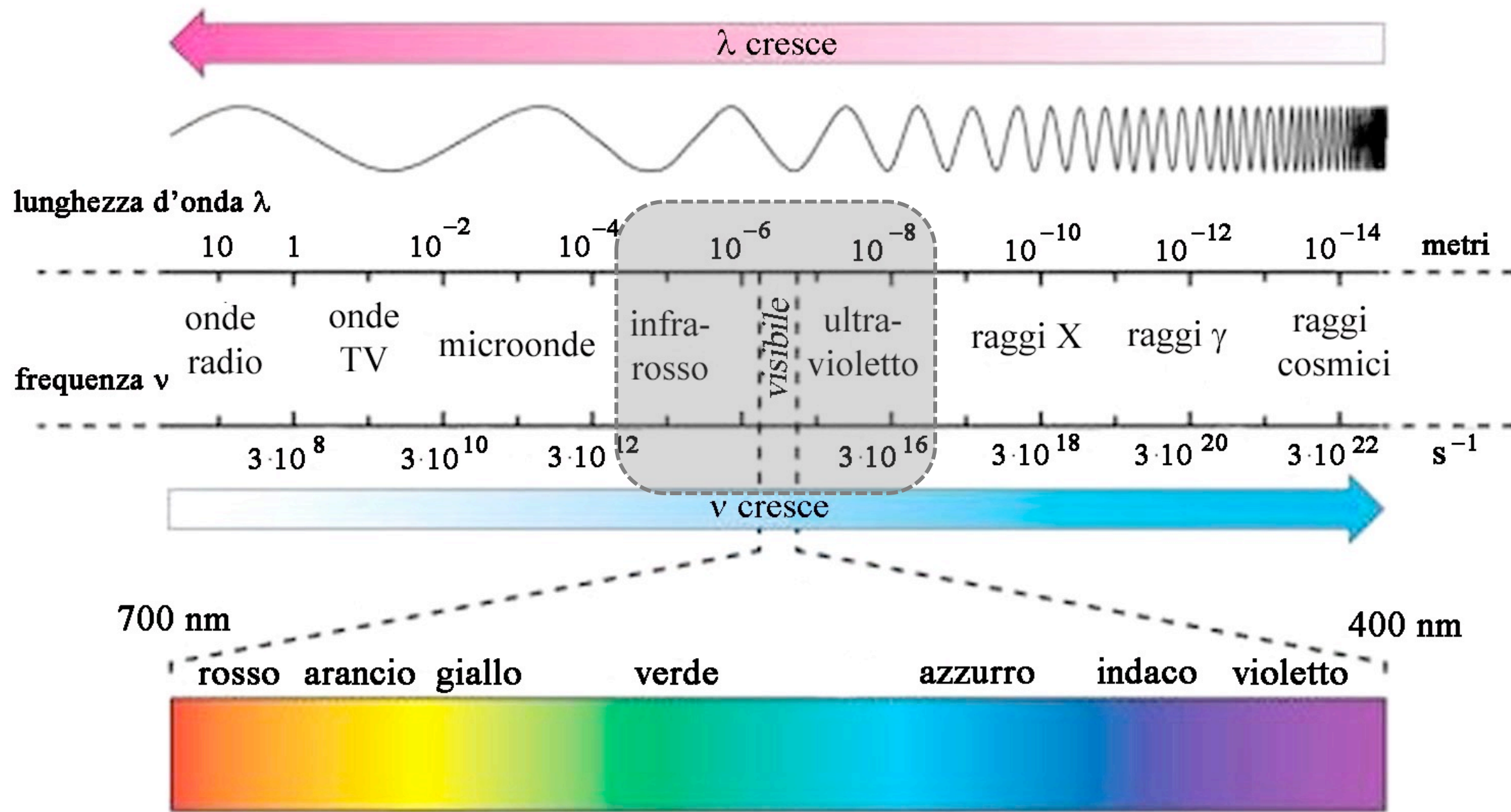


LA RADIAZIONE ELETTROMAGNETICA

Types of Electromagnetic Radiation



© 2013 Encyclopædia Britannica, Inc.

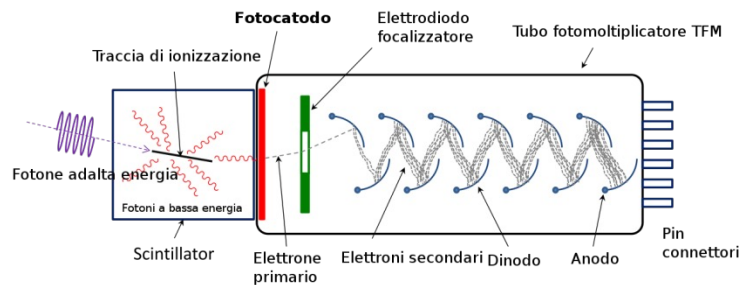


LA DOPPIA NATURA DELLA LUCE

L'aspetto dimostrato dalla luce (particella o onda) dipende dal tipo di strumento utilizzato per la sua rilevazione

Fotomoltiplicatore: particella

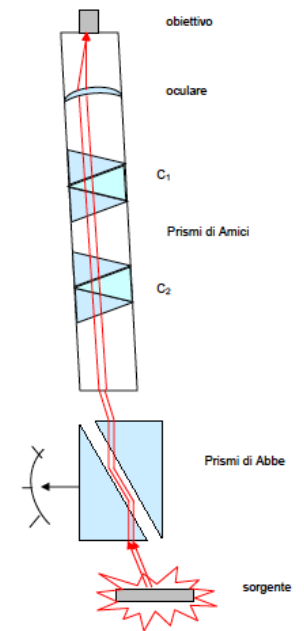
Quando rilevato da un fotomoltiplicatore il fotone agisce come una particella



Strumentazione ottica: onda

Se osservata con strumentazione ottica, essa si comporta come un'onda (fenomeni di riflessione, rifrazione, diffrazione e interferenza)

Es: ottica del rifrattometro di Abbe



LA LUCE come fenomeno ondulatorio

(interpretazione di Huygens)

Consideriamo la luce come un'onda elettromagnetica che si propaga nello spazio.

Quando si parla di «onda elettromagnetica» si intende che questa è causata dalle oscillazioni del campo magnetico e del campo elettrico che la propagano.

Lunghezza d'onda

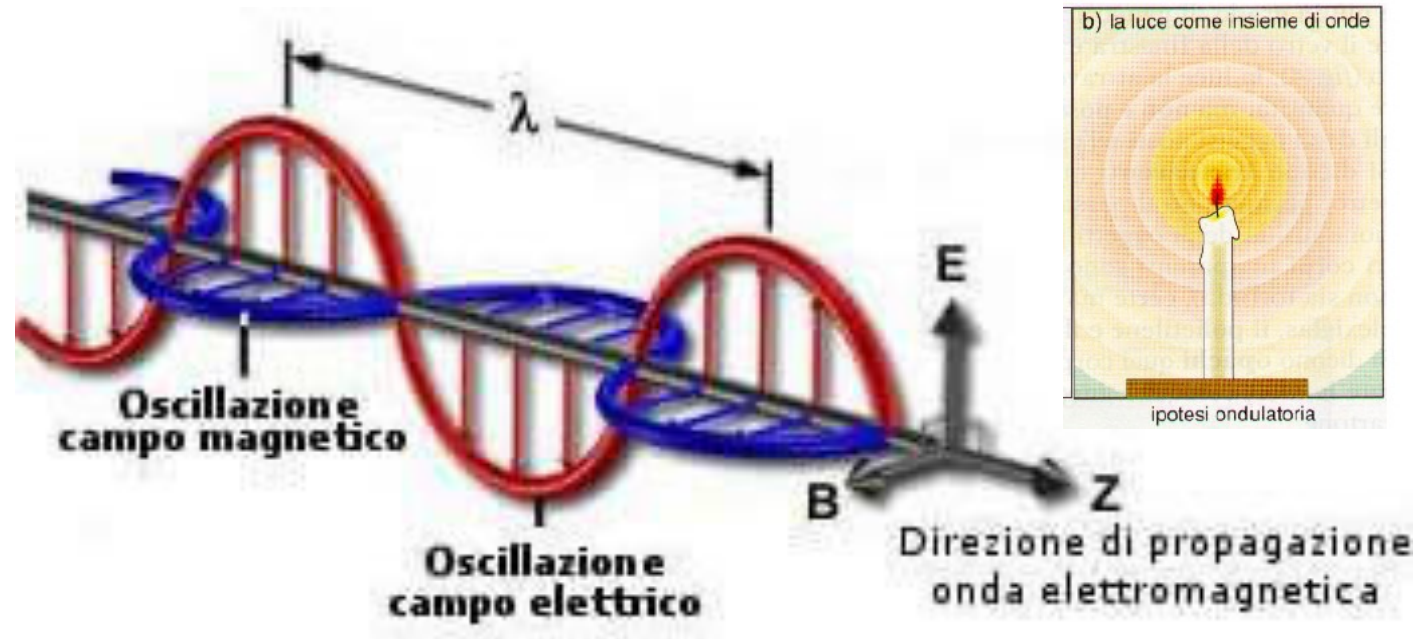
$$\lambda = \frac{c_m}{\nu}$$

frequenza

Le onde (incluse quelle elettromagnetiche) danno una serie di fenomeni caratteristici:

- interferenza
- diffrazione
- rifrazione
- riflessione

**FREQUENZA (ν) =
numero di oscillazioni al
secondo (si misura in
Hertz (Hz))**



Se si considera la radiazione elettromagnetica come un'onda costituita da un campo elettrico ed uno magnetico perpendicolari tra loro ed oscillanti, il suo assorbimento da parte della materia avverrà solamente se essa entrerà in risonanza (stesse frequenze di vibrazione) con quest'ultima.

LA LUCE come fenomeno corpuscolare

(interpretazione di Planck)

La legge di Plank afferma che l'energia associata alla radiazione elettromagnetica è trasmessa in unità discrete o quanti (i fotoni):

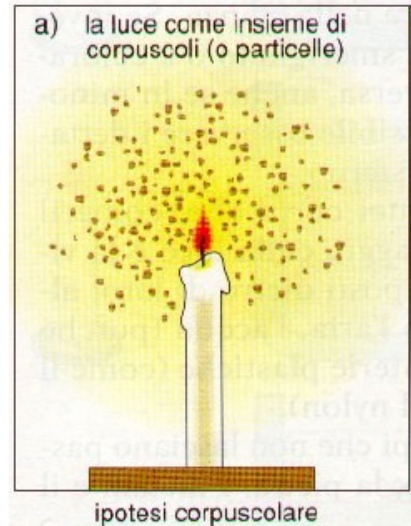
Costante di Plank $\rightarrow$ e' un numero, quindi un valore discreto
(in unita' SI, $h=6.63 \cdot 10^{-34}$ Js)

$$E = h \nu$$

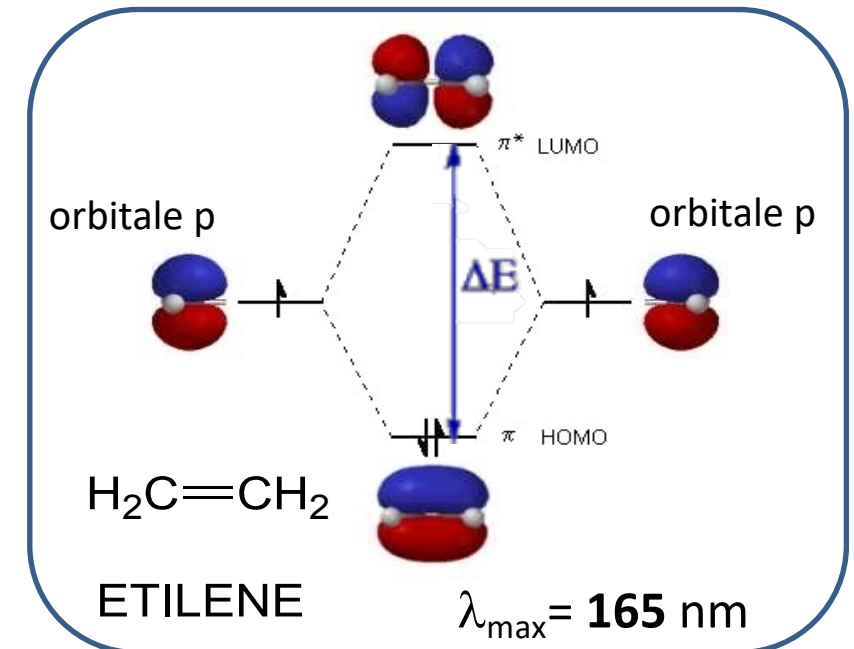
frequenza della radiazione

Energia associata ad un quanto di luce
(= energia del fotone) associato alla
radiazione di lunghezza d'onda

$$\lambda = \frac{c_m}{\nu}$$



Quando forniamo energia a una molecola (o ad un atomo), potremo osservare una transizione elettronica solo se l'energia fornita sara' pari alla differenza di energia ΔE tra i livelli energetici coinvolti. Un esempio lo abbiamo visto nella prima lezione:



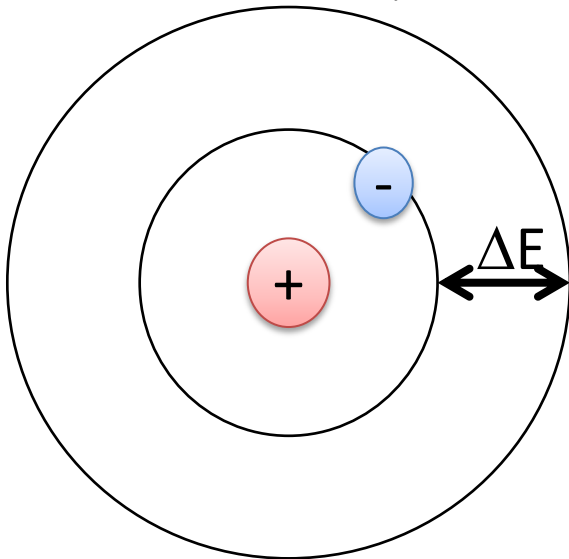
INTERAZIONE LUCE-MATERIA

Visto in precedenza strumenti che si basavano sulla natura ondulatoria della luce in particolare sul fenomeno della rifrazione (rifrattometro e polarimetro).

Ora vediamo fenomeni legati all'onda come «quanto», ovvero legata alle transizioni tra stati.

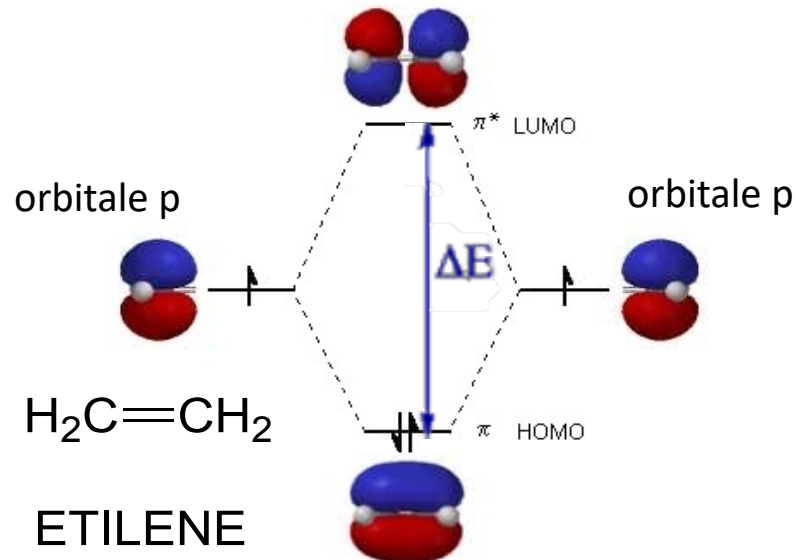
In base all'energia (= lunghezza d'onda) impiegata, si possono osservare fenomeni diversi:

Possiamo vedere le **transizioni tra stati elettronici degli atomi** (l'elettrone «salta» tra diversi orbitali atomici):



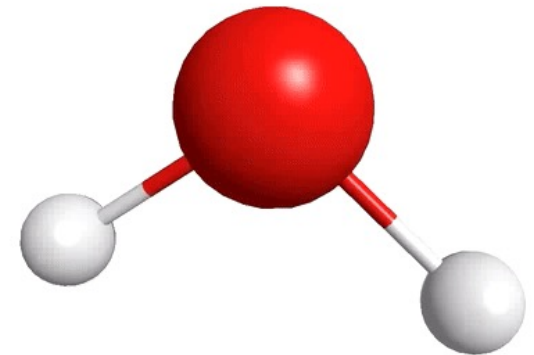
SPETTROSCOPIA ATOMICA
(anche saggi alla fiamma)

Possiamo vedere le **transizioni tra stati elettronici molecolari** (l'elettrone «salta» tra diversi orbitali molecolari):



SPETTROSCOPIA UV-VIS
(ma anche i colori delle sostanze, e fenomeni di fosforescenza e fluorescenza)

Possiamo vedere le **transizioni tra stati vibrazionali molecolari** (qui e' coinvolto anche il movimento dei nuclei):



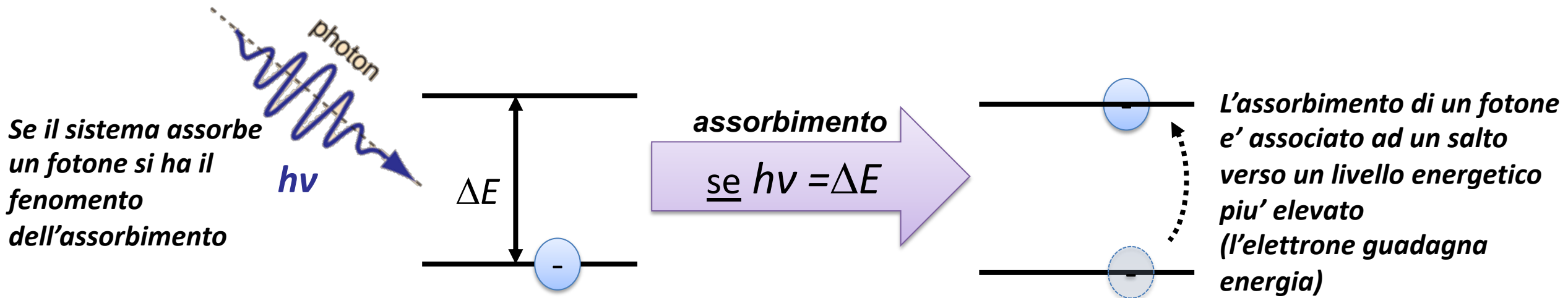
SPETTROSCOPIA IR

Interazione LUCE-MATERIA: transizioni tra stati

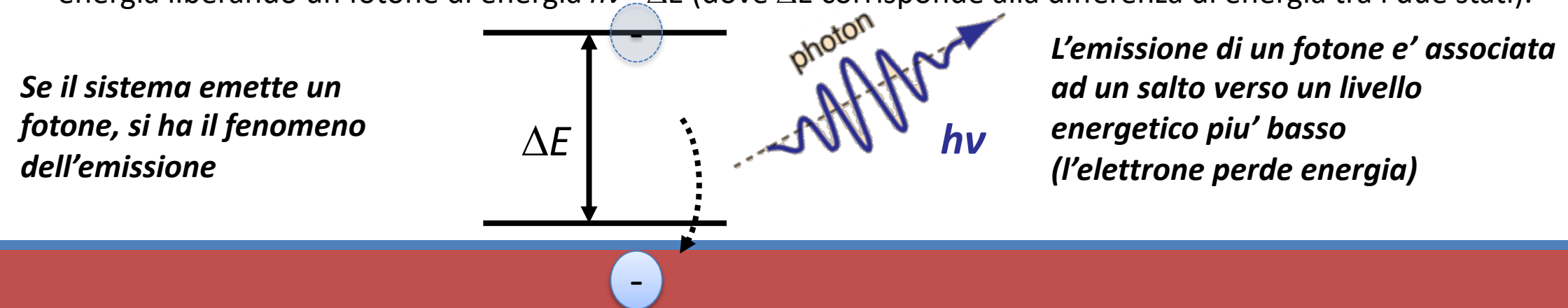
In tutti gli esempi vale la stessa regola generale.

Si considerano due livelli energetici: E_0 ed E_1 (es. stato fondamentale e stato eccitato).

Una transizione tra stati potrà avvenire solo se la quantità di energia fornita ($h\nu$) sarà uguale alla differenza fra i due livelli energetici coinvolti ($\Delta E = E_1 - E_0$).



Nel caso dell'emissione, se un elettrone si trova in uno stato eccitato, questo potrà cadere verso uno stato a più bassa energia liberando un fotone di energia $h\nu = \Delta E$ (dove ΔE corrisponde alla differenza di energia tra i due stati).



SPECIE ATOMICHE

L'assorbimento da parte di atomi (ottenibili allo stato di vapore) dà luogo ad uno spettro costituito da assorbimenti discreti (spettro **a righe**). Per le transizioni dallo stato fondamentale "o" ad uno stato eccitato "i" ($o \rightarrow i$), le frequenze delle radiazioni assorbite sono definite dall'equazione:

$$\nu_i = (E_i - E_o) / h = c / \lambda_i$$

dove:

E_o = energia elettronica dello stato fondamentale

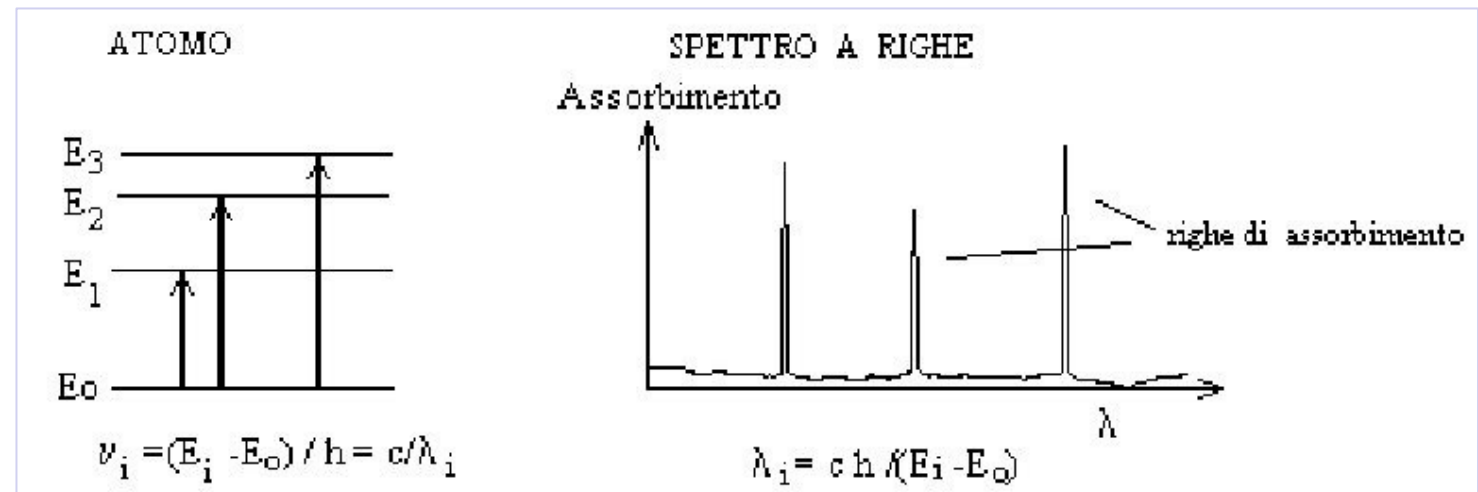
E_i = energia elettronica degli stati eccitati

ν_i = frequenza,

λ_i = lunghezza d'onda,

c = velocità della luce,

h = costante di Planck.

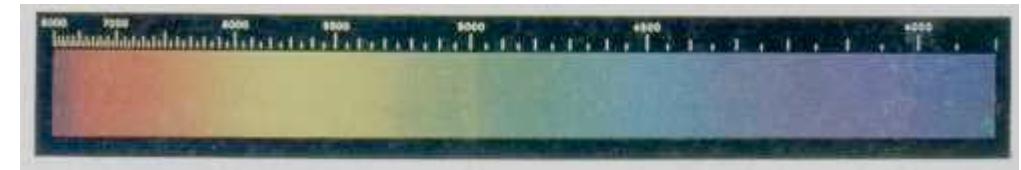


Spettri Atomici

Spettri di emissione continui: sono emessi da una sorgente luminosa; presentano tutti i colori dal rosso al violetto sfumati l'uno nell'altro. Sono emessi da corpi incandescenti, solidi, liquidi o gassosi fortemente compressi; sono esempi lo spettro solare e quello emesso da una lampada ad incandescenza o al neon.

Spettri di emissione a righe (o discreti): presentano righe colorate su sfondo nero; sono emessi da *sostanze gassose o rese gassose a bassa pressione*. Ogni spettro è caratteristico di ogni sostanza.

Spettri di assorbimento: se un gas o una sostanza resa gassosa che si trova a temperatura inferiore a quella di una sorgente di luce bianca, e interposto tra detta sorgente ed uno spettroscopio si ottiene uno spettro di assorbimento; esso è caratterizzato da uno sfondo colorato continuo e dalle righe di assorbimento. Per una stessa sostanza le righe di assorbimento sono sovrapponibili, ovvero hanno la stessa lunghezza d'onda delle righe colorate dello spettro di emissione.



lo spettro della luce visibile



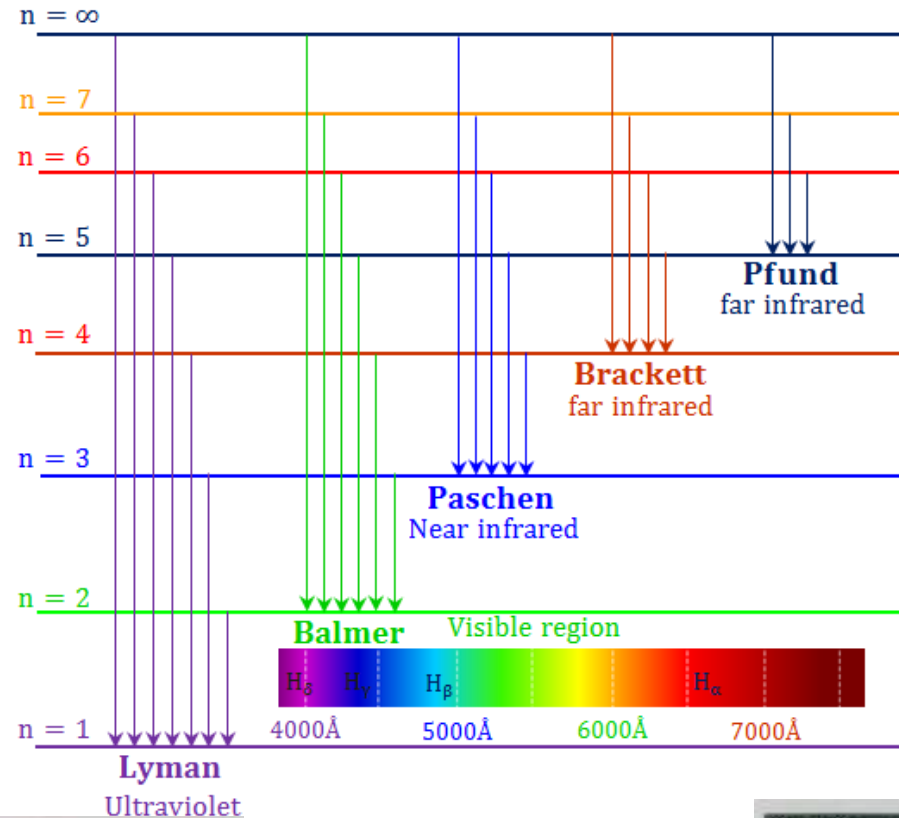
spettro di emissione dell'idrogeno
(eccitato precedentemente da scarica elettrica)



spettro solare di assorbimento discreto
(gli atomi presenti assorbono alcune frequenze caratteristiche – si nota la presenza dell'idrogeno)

Spettri Atomici e Orbitali Atomici

Nel caso in cui tutti gli elettroni vengano portati ad uno stato eccitato, posso osservare il loro decadimento (almeno per quegli elettroni che in qualche momento del loro percorso emettono nel visibile).

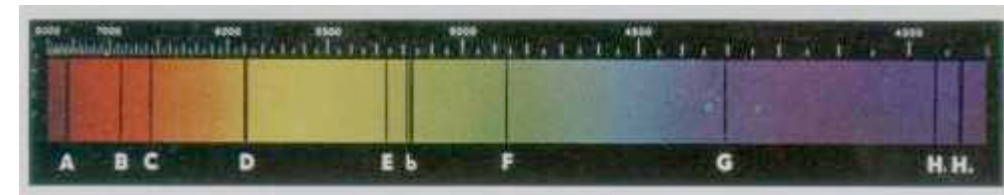


Nel caso in cui tutti gli elettroni partono dallo stato fondamentale (o da stati a bassa energia), possono assorbire le radiazioni corrispondenti ai «salti energetici» che possono fare (e poi decadere seguendo percorsi diversi).

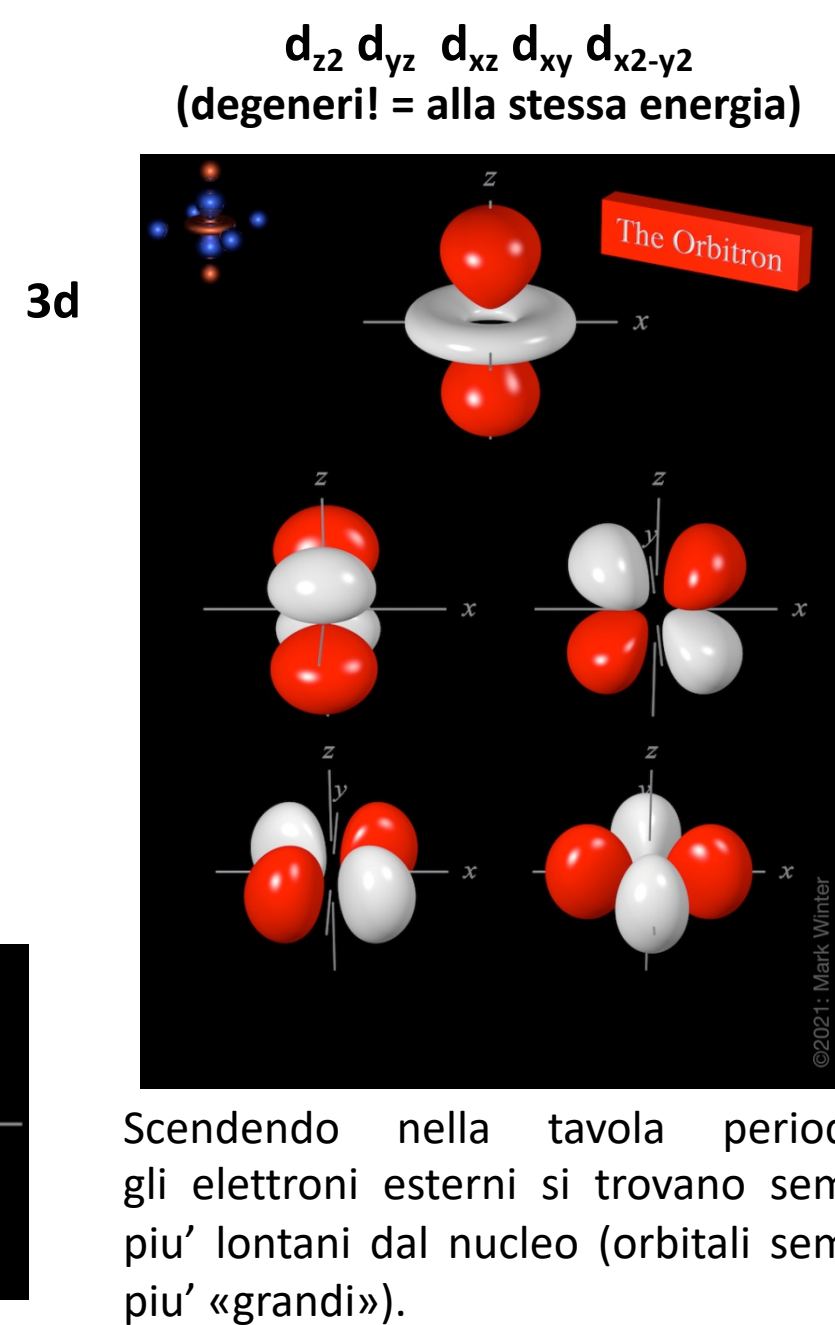
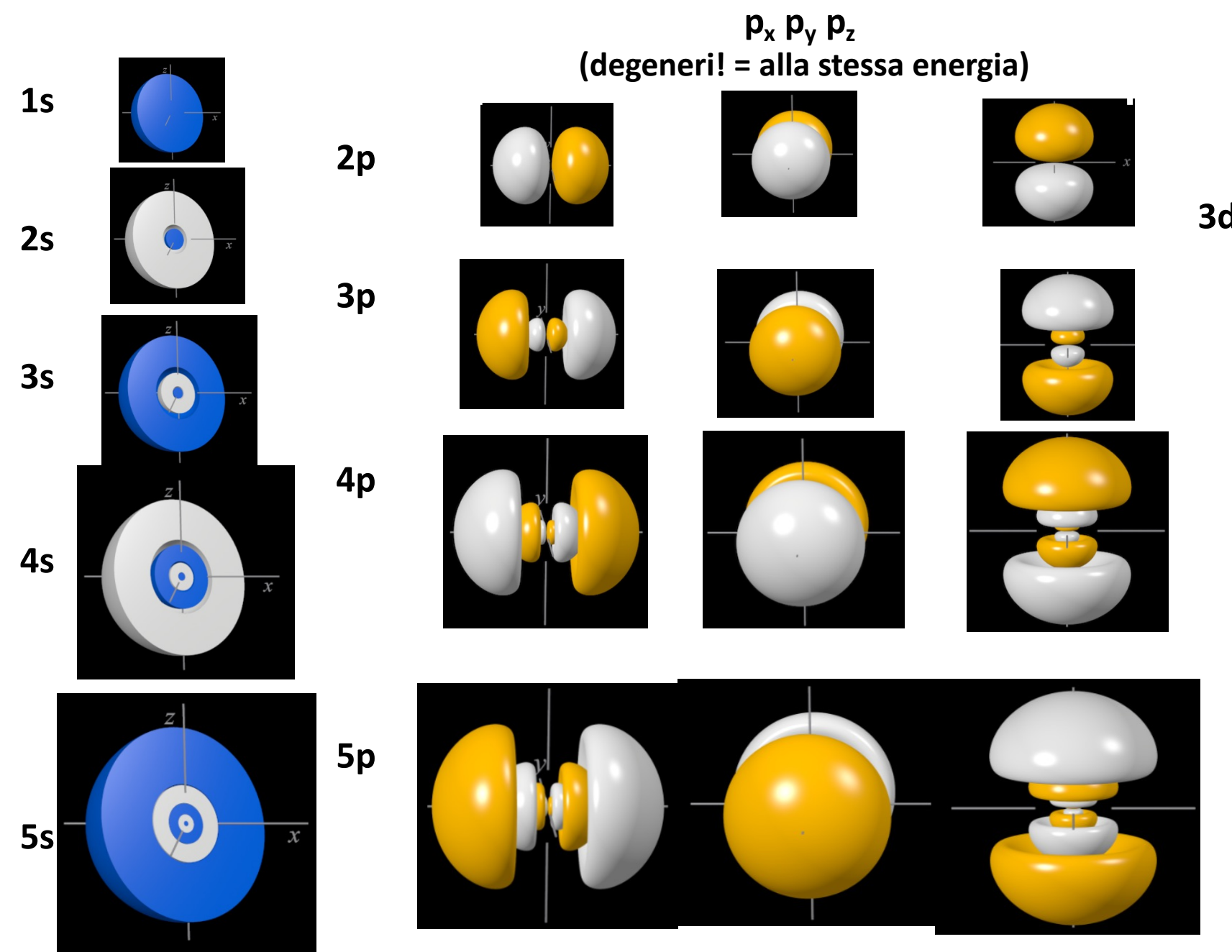


spettro di emissione dell'idrogeno
(eccitato precedentemente da scarica elettrica)

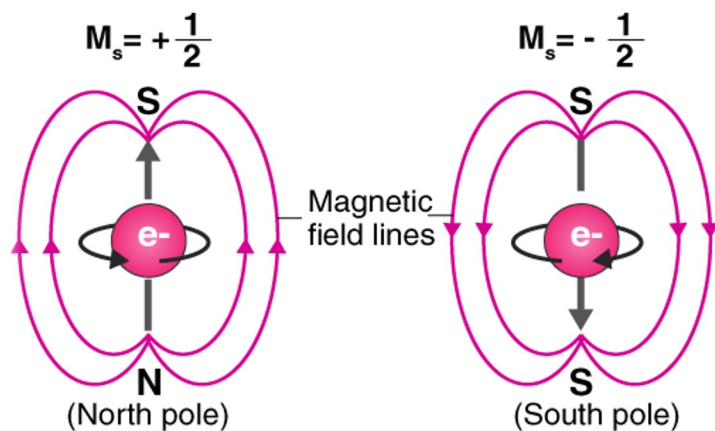
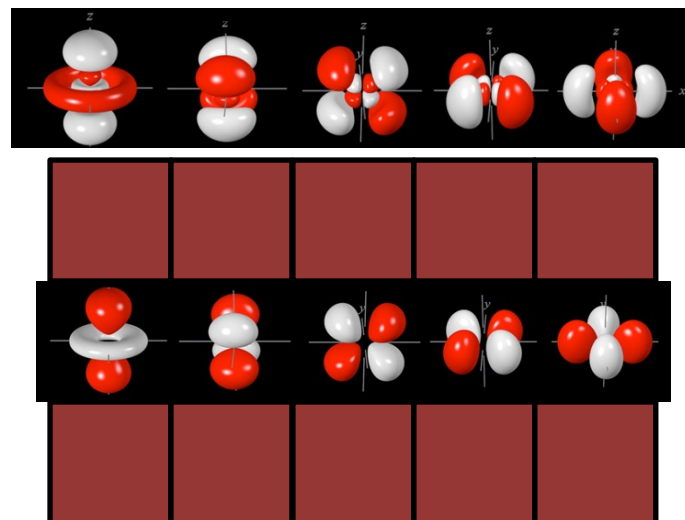
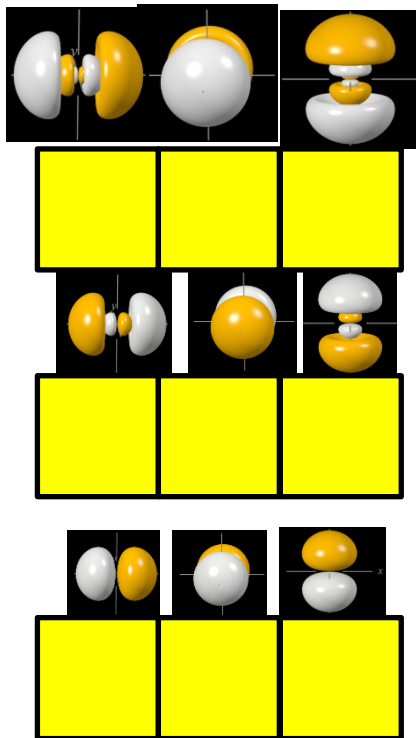
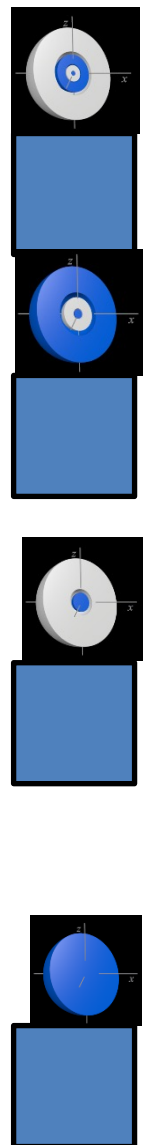
In entrambi i casi qui riportati si può vedere la «serie di Balmer» che riguarda transizioni elettroniche osservabili nel visibile



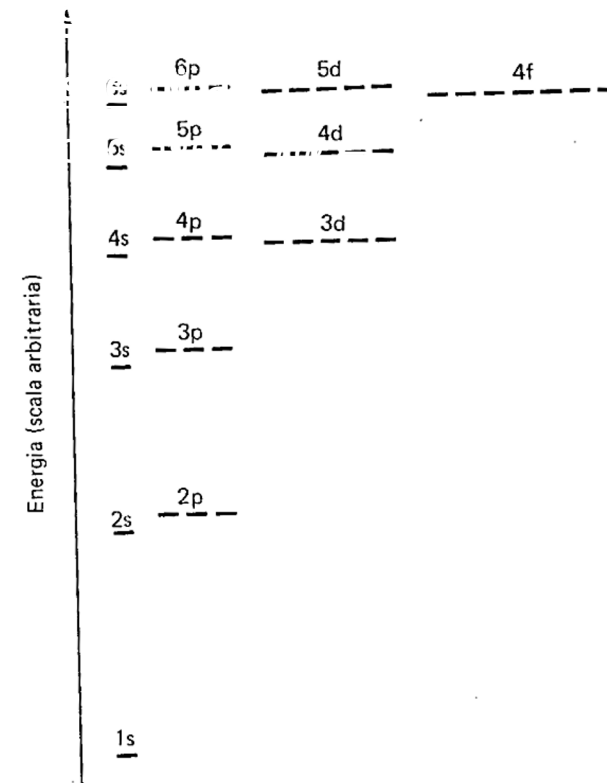
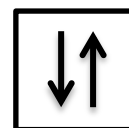
spettro solare di assorbimento discreto

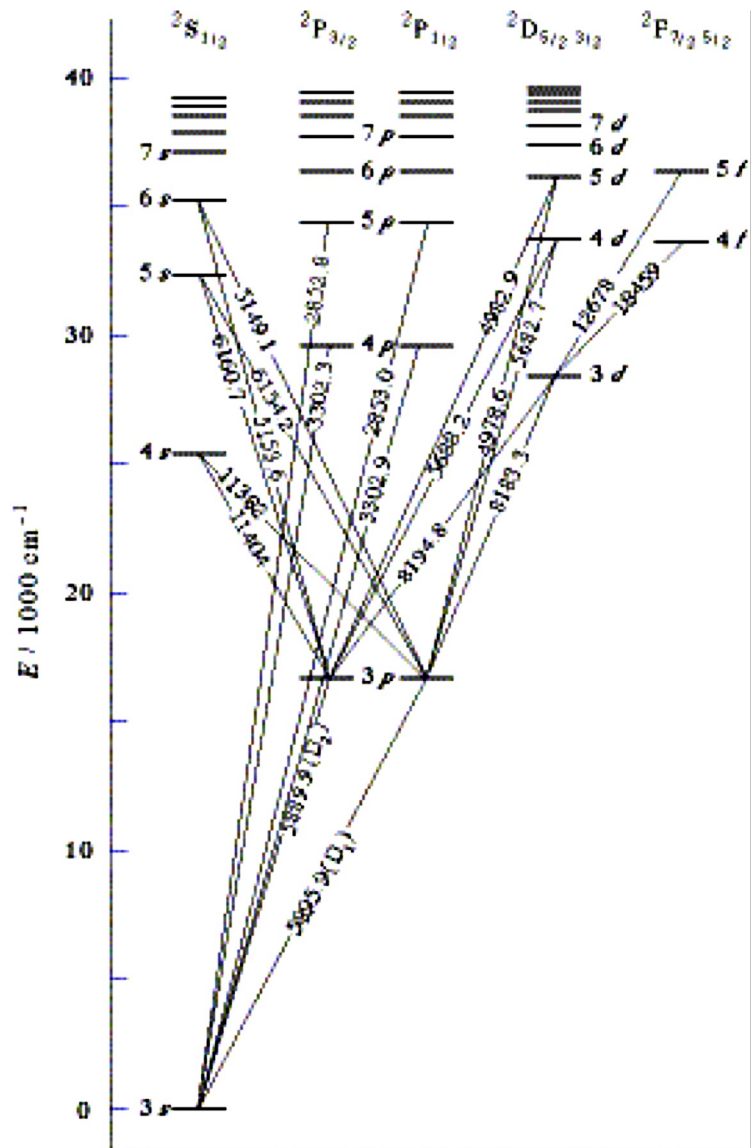


ENERGIA



Ogni orbitale puo' ospitare al massimo due elettroni, i quali pero' dovranno avere spin opposto:





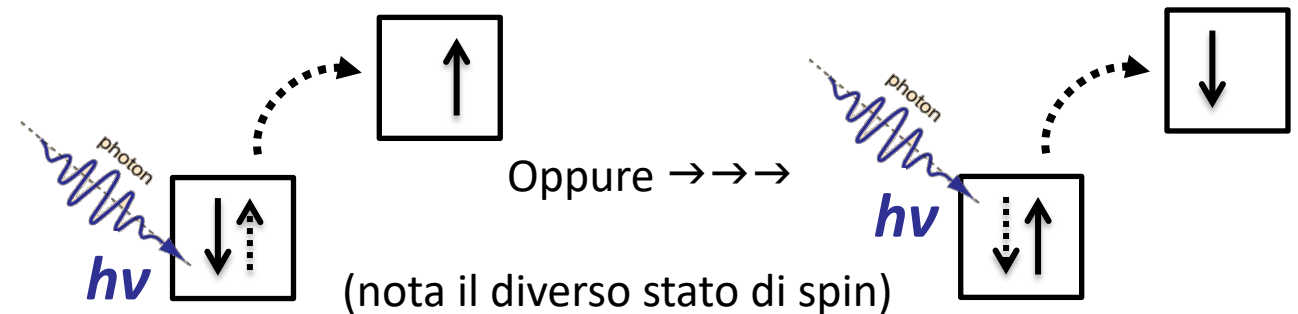
Livelli energetici atomo di Na

Ogni atomo ha un caratteristico spettro di assorbimento, dovuto alla specifica distribuzione energetica degli orbitali.

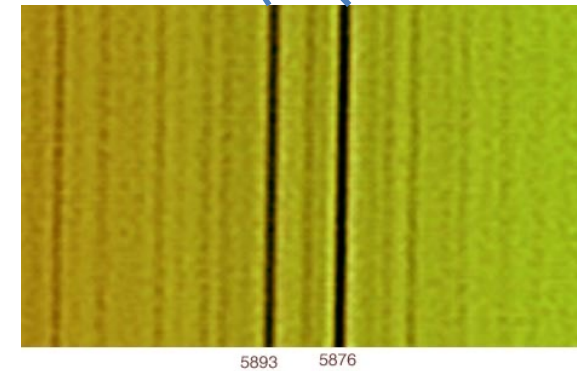
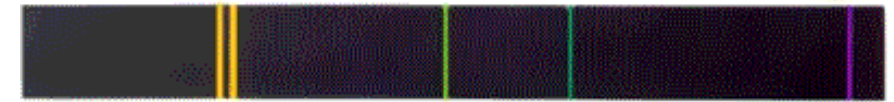
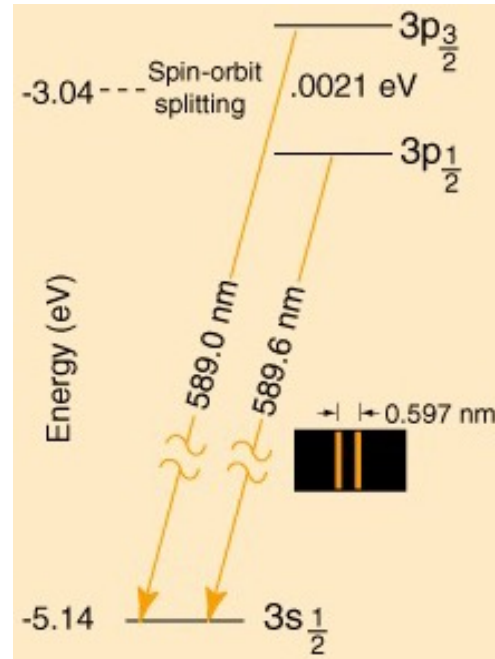
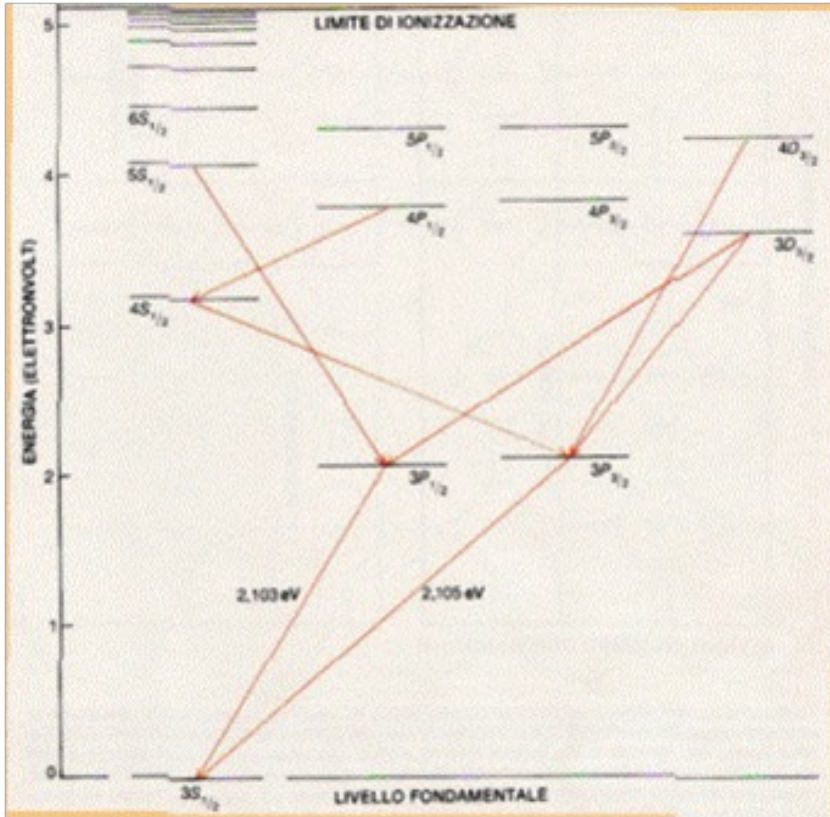
In ogni spettro atomico si distinguono diverse serie di righe, secondo l'orbitale di partenza degli elettroni coinvolti nella transizione.

Questo dipende dallo stato di eccitazione dell'atomo e dalla temperatura.

Tutte le righe dello spettro in realtà sono doppie perchè ogni transizione elettronica può generare due stati eccitati dell'atomo di energia molto simile, caratterizzati da diverso numero quantico di spin.



L'atomo di sodio ($1s^2, 2s^2, 2p_x^2 2p_y^2 2p_z^2, 3s^1$)



Il diagramma a scalini dei livelli di un atomo di sodio definisce uno spettro discreto di lunghezze d'onda, le sole che possono venire emesse o assorbite dall'atomo. Per salire di un livello l'atomo deve assorbire un quanto di radiazione, la cui energia corrisponde esattamente alla differenza fra le energie degli stati iniziale e finale. Ricadendo sul gradino inferiore l'atomo emette un quanto della stessa energia. La maggior parte delle transizioni in discesa passano attraverso i livelli designati $3p_{1/2}$ e $3p_{3/2}$ fino allo stato fondamentale $3s_{1/2}$, esse corrispondono lunghezze d'onda (λ) di 589,0 e 589,6 nm, nella regione gialla dello spettro.

Metodi spettroscopici:

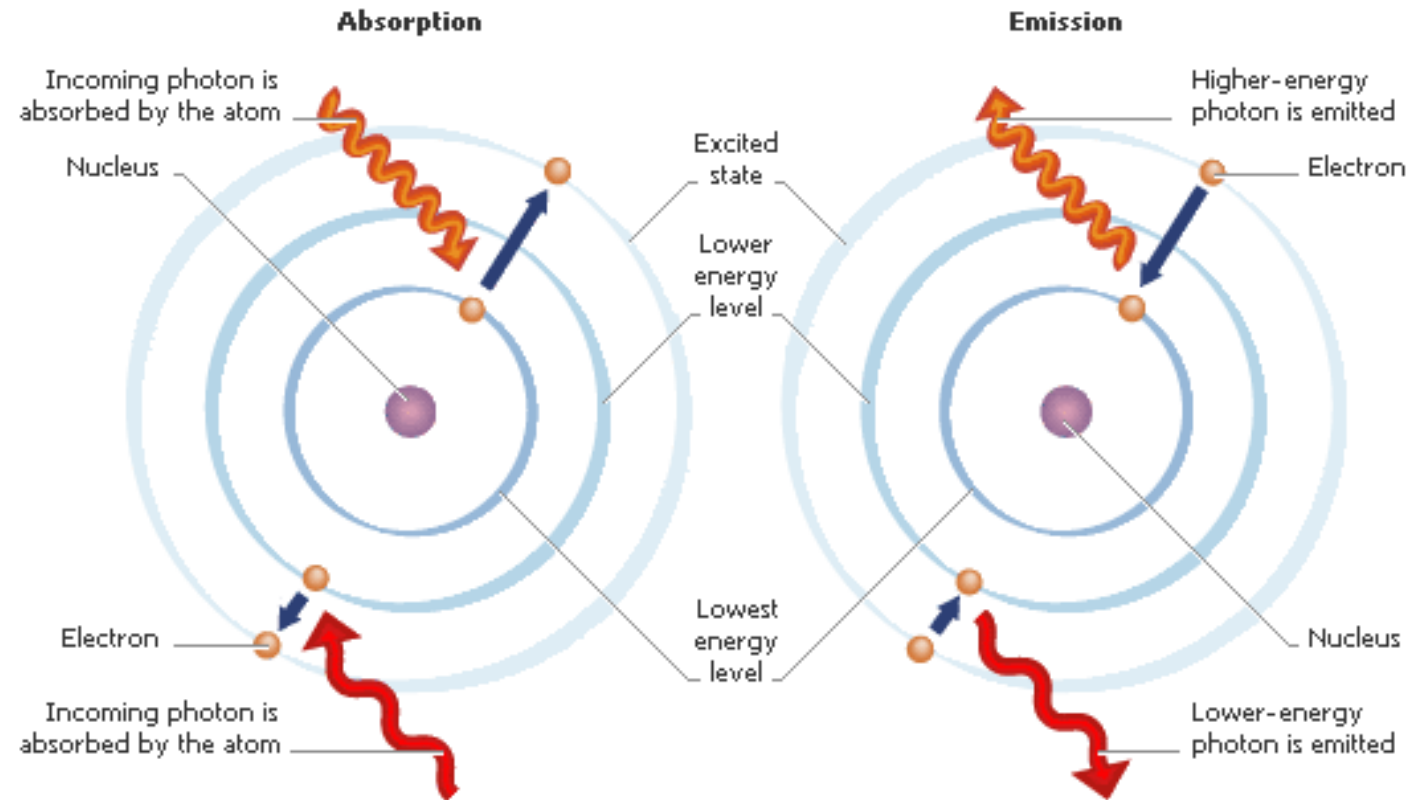
SPETTROSCOPIA DI ASSORBIMENTO ATOMICO (AAS)

La tecnica AAS è basata sull'esame dell'assorbimento di una radiazione elettromagnetica dopo che questa passa in un mezzo in cui il campione sia presente come atomi o ioni monoatomici.

Vale la legge di Lambert-Beer.

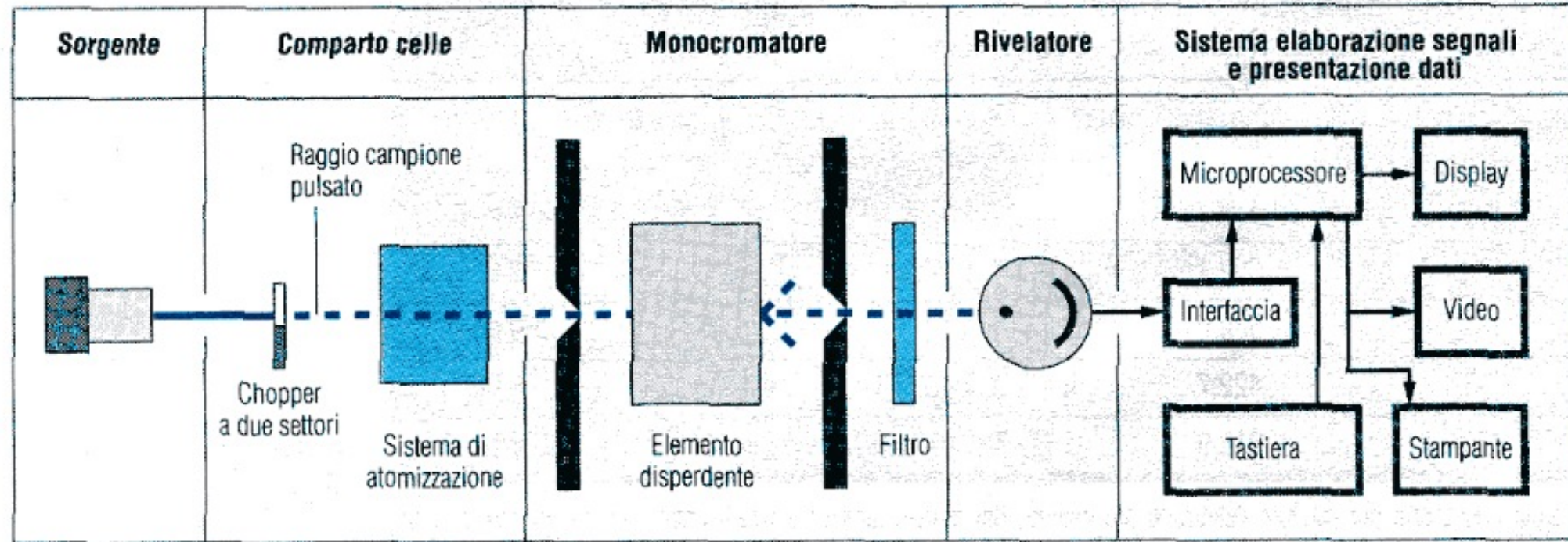
Nella spettrofotometria AAS, l'intervallo utile di lunghezze d'onda dipende dalla sorgente della radiazione, dai componenti del cammino ottico e dal rivelatore.

In pratica il campo spettrale va da 852,1 nm, la lunghezza d'onda più sensibile per il cesio, a 193,7 nm, la lunghezza d'onda più usata per l'arsenico: **lo spettrometro per AAS opera perciò nel campo spettrale degli spettrofotometri UV-vis.**



La Spettroscopia di Assorbimento Atomico (AAS): STRUMENTAZIONE

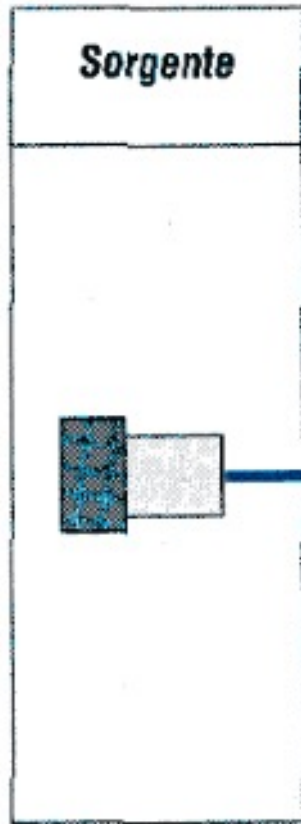
Nello spettrofotometro per AA monoraggio il raggio emesso dalla sorgente attraversa un sistema di atomizzazione (che ha il ruolo di portare il campione allo stato di gas atomico), arriva al monocromatore, e la radiazione monocromatica così «filtrata» passa al rivelatore.



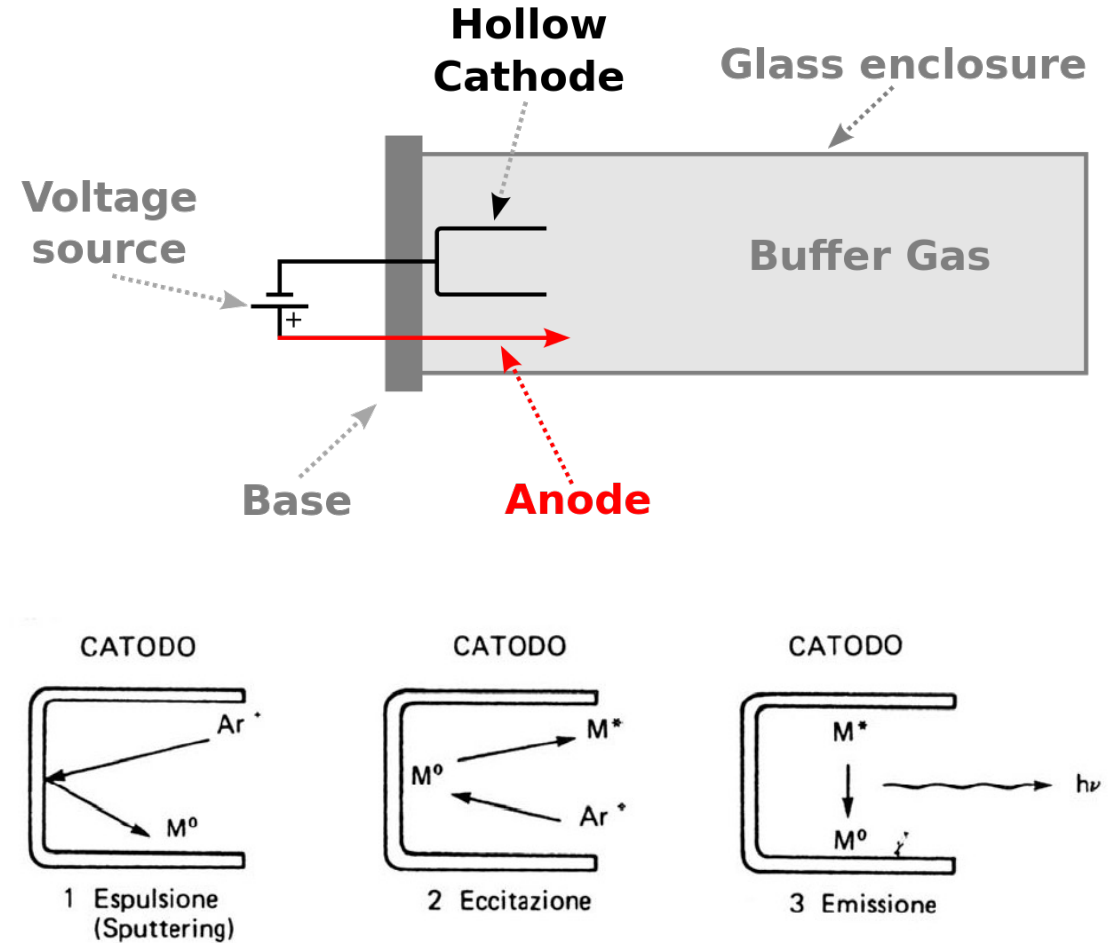
La luce dalla sorgente viene modulata (pulsata) mediante un chopper, in modo da distinguere la luce emessa dalla lampada, dalla luce emessa dall'atomo eccitato.

Lo SPETTROFOTOMETRO per AAS: SORGENTE

La lampada più usata è quella a catodo cavo: è costituita da un bulbo in vetro, con finestra di quarzo in cui al suo interno contiene un catodo e un anodo; l'ambiente interno è riempito di gas (Ar o Ne). Il catodo è costituito da una capsulina, la quale nel fondo contiene l'elemento caratterizzante della lampada.

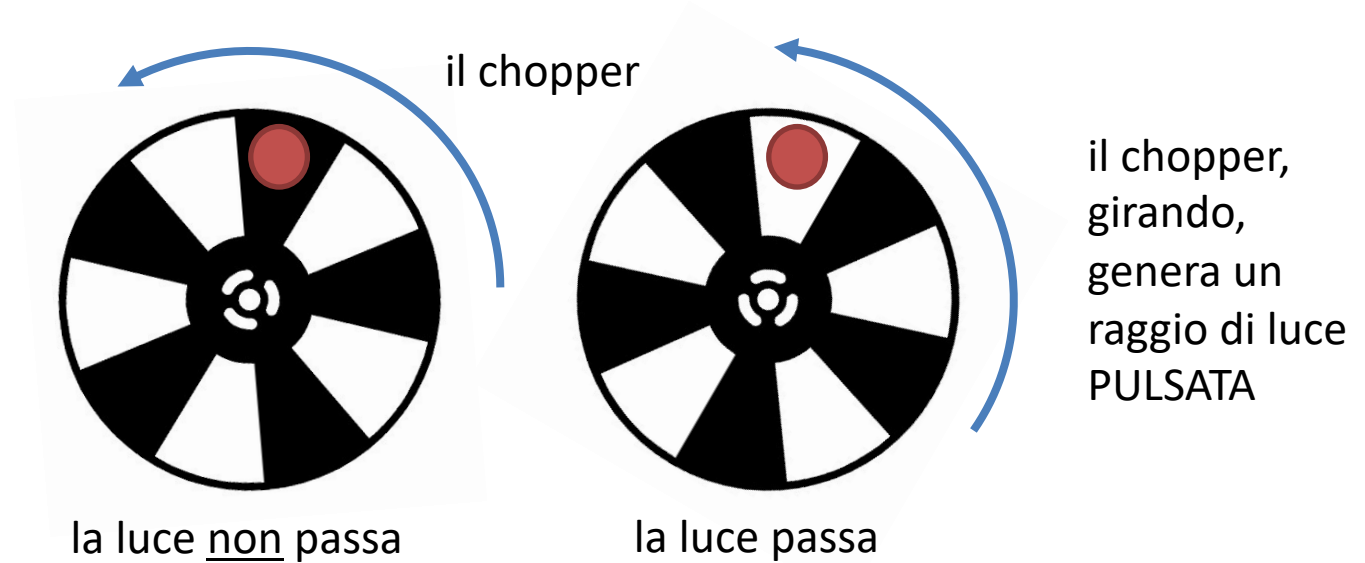
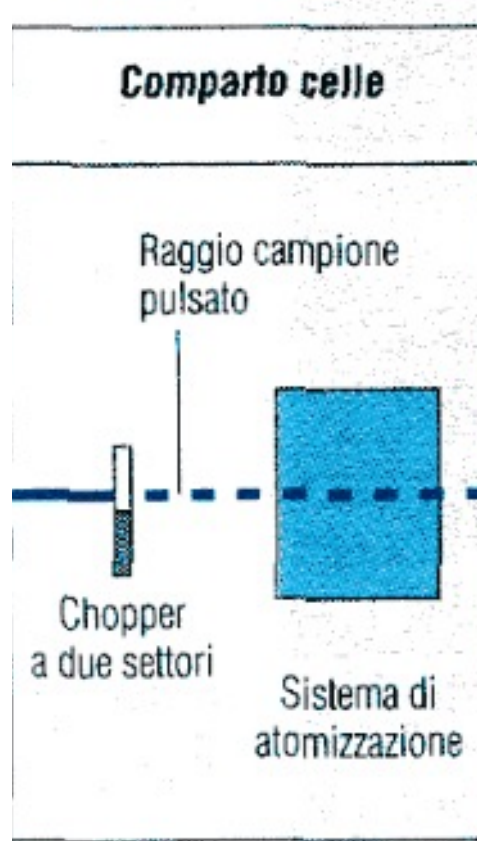


Quando viene applicata una d.d.p. agli elettrodi, il gas di riempimento si ionizza (+); gli ioni positivi urtano il catodo provocando l'espulsione degli atomi superficiali che, dopo essere eccitati dal gas di riempimento con gli urti, ritornano allo stato fondamentale emettendo energia radiante. Queste lampade possono essere: a singolo elemento o multi elemento, meno sensibili di quello a singolo elemento perché possono dare sovrapposizione fra le righe spettrali.



Lo SPETTROFOTOMETRO per AAS: CHOPPER

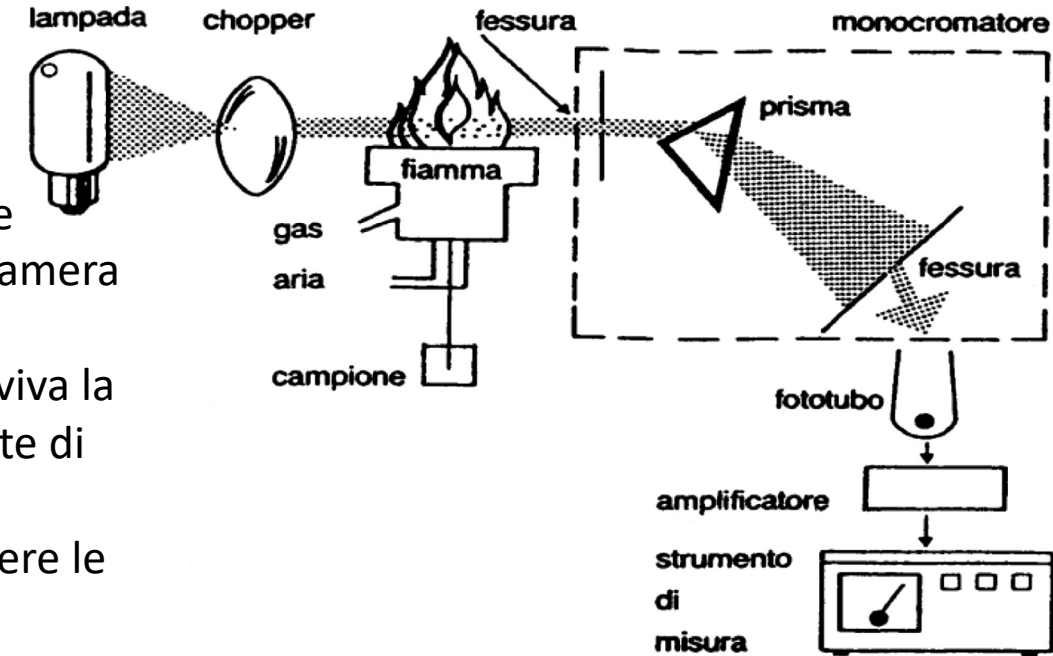
Il raggio emesso dalla sorgente viene pulsato da un chopper (questo permette di distinguere la luce emessa dalla lampada, dalla luce emessa dall'atomo eccitato).



Lo SPETTROFOTOMETRO per AAS: ATOMIZZATORE

Atomizzatore a fiamma

È costituito da un tubo cilindrico diviso in due zone, la camera di nebulizzazione e la camera di premiscelazione; il tutto è collegato ad una testata dove avviene la combustione e l'atomizzazione. Il campione viene aspirato nel nebulizzatore, trasformato in aerosol e immesso nella camera di premiscelazione, dove si mescola con il gas combustibile e con il gas comburente (ossidante, es. aria). Il gas comburente serve per mantenere viva la fiamma, ma funge anche da gas di trasporto nel nebulizzatore; ciò consente di variare il flusso del nebulizzatore senza variare il flusso alla testata. Nella camera di premiscelazione è presente un dispositivo che serve per abbattere le goccioline di soluzione troppo grosse.



Atomizzatore a Fornetto di grafite

Si tratta di un sistema interamente automatizzato, che consente di abbassare notevolmente (1000 volte) i limiti di rivelabilità, inoltre consente di lavorare su aliquote molto piccole di campione.

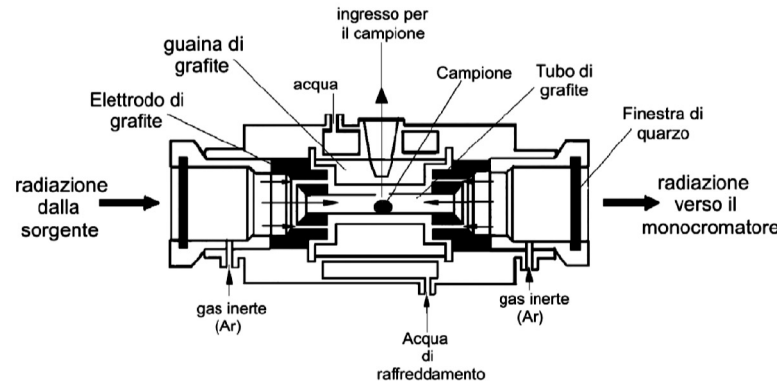
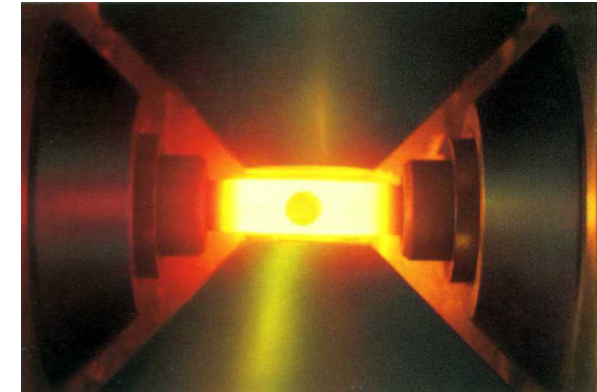


Figura - Schema di uno spettrometro per assorbimento atomico.

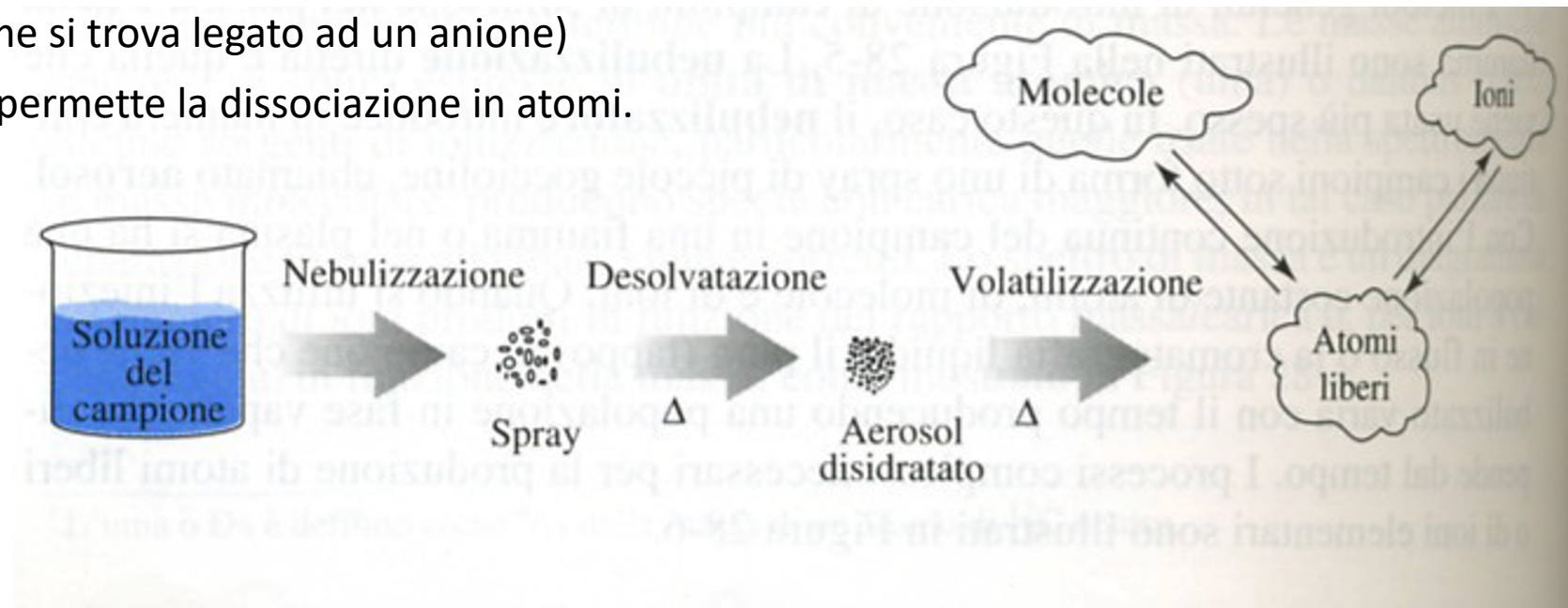


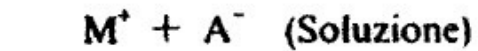
ATOMIZZAZIONE

Affinché si realizzi il processo di AA è necessario che la specie chimica interessata venga trasformata in atomi isolati.

Il campione viene:

- aspirato nel nebulizzatore da una corrente di gas ad alta pressione;
- il campione nebulizzato viene aspirato nel bruciatore dove si miscela con il combustibile e il comburente.
- sulla fiamma il solvente evapora (desolvatazione)
- il sale ivi disciolto fonde, evaporando poi a sua volta (volatizzazione)
(fino a questo punto l'elemento in esame si trova legato ad un anione)
- l'energia della fiamma (o del fornello) permette la dissociazione in atomi.

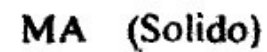




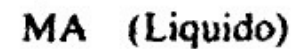
(1) ↓ Nebulizzazione



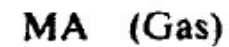
(2) ↓ ΔE · Desolvatazione (evaporazione del solvente)



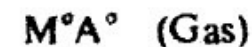
(3) ↓ ΔE · Fusione



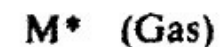
(4) ↓ ΔE · Vaporizzazione



(5) ↓ ΔE · Atomizzazione



(6) ↓ ΔE · Eccitazione



(7) ↓ ΔE · Ionizzazione



INDESIDERATO

INDESIDERATO

✗ Affinché si realizzi il processo di AA è necessario che la specie chimica interessata venga trasformata in atomi isolati.

✗ Il campione nebulizzato viene aspirato nel bruciatore dove si miscela con il combustibile e il comburente. Sulla fiamma il solvente evapora ed il sale disciolto fonde, evaporando poi a sua volta.

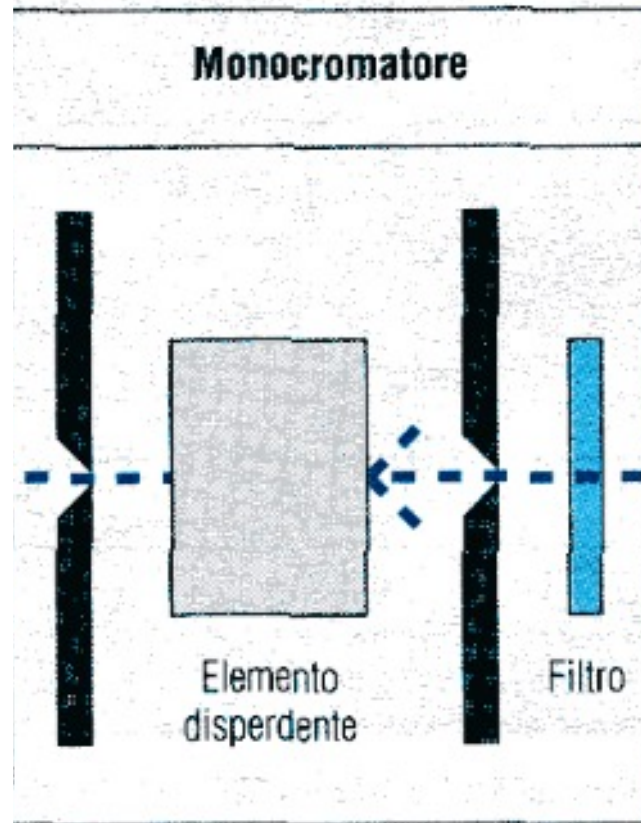
✗ Fino a questo punto l'elemento in esame si trova legato ad un anione. L'energia della fiamma (o del fornello) permette però la dissociazione in atomi, e la successiva (indesiderata) eccitazione.

Lo SPETTROFOTOMETRO per AA: MONOCROMATORE

Il raggio che proviene dalla sorgente e che attraversa il campione viene inviato al monocromatore, che **ha la funzione di isolare la riga di risonanza che interessa** da quelle parassite della fiamma.

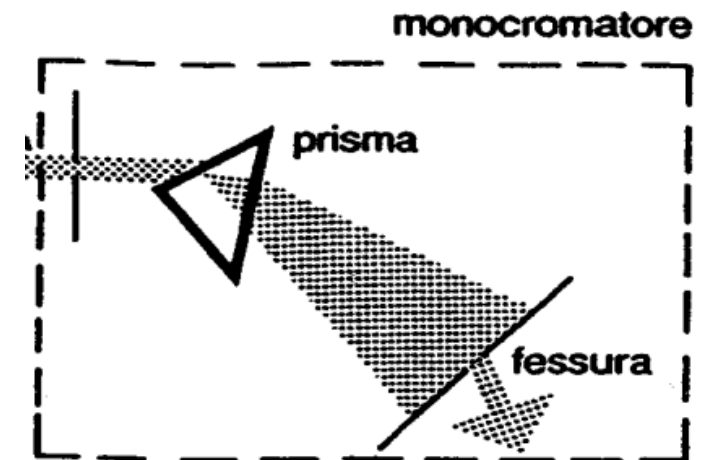
La qualità di un monocromatore
dipende da due fattori:

- dalla banda passante, che è l'intervallo di lunghezze d'onda del fascio che emerge dalla fenditura con una energia superiore al 50% ($I = 0,5I_0$) della radiazione nominale (E_0);
- dal potere risolvete che rappresenta la capacità del monocromatore di separare fra loro due diverse lunghezze d'onda.



Il monocromatore è tipicamente formato da due elementi:

- un elemento disperdente (per esempio un prisma) che diffrange la luce (quindi separa le varie lunghezze d'onda)
- un filtro (anche una semplice fenditura) per isolare la lunghezza d'onda desiderata



Elementi disperdenti: i RETICOLI

Come alternativa al prisma e' possibile usare un reticolo.

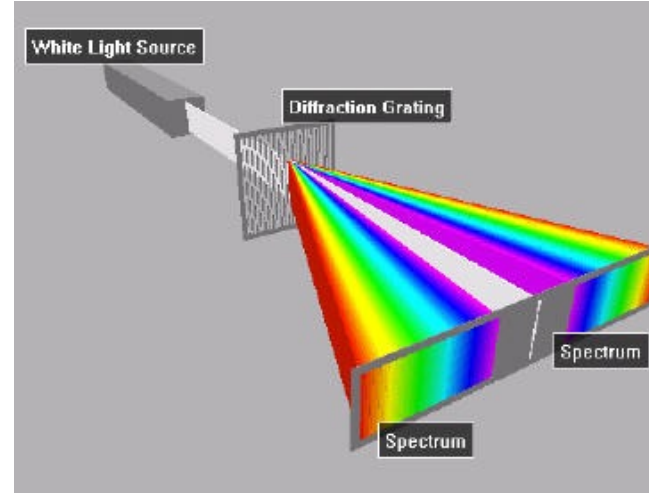
Sia prisma che reticolo permettono di selezionare bande strette e permettono di effettuare una scansione dello spettro in continuo passando da 200 a 800 nm senza interruzione (per spettrofotometri).

I RETICOLI hanno lo stesso principio di funzionamento dei prismi, ma si basano su fenomeni di riflessione o diffrazione.

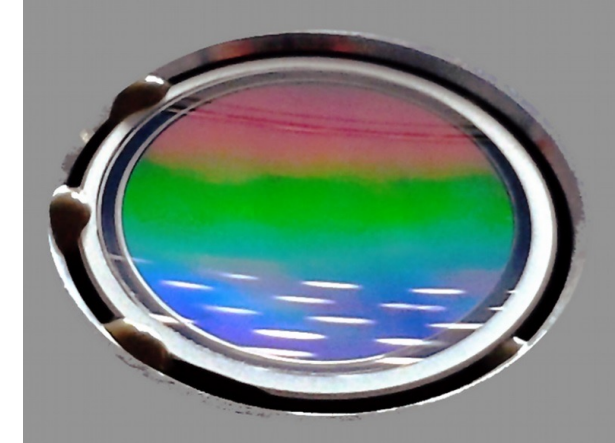
Si dividono in:

Reticoli a trasmissione (o diffrazione): si usano reticoli con fenditure che vanno dalle 600 alle 2000 per ogni millimetro, perche' la fenditura deve avere dimensioni paragonabili alla lunghezza d'onda in modo da avere interferenza costruttiva e quindi uno spettro di diffrazione che si ottiene in uno schermo a valle del reticolo. La dispersione è lineare; la distanza fra le bande è direttamente proporzionale alla $\Delta\lambda$.

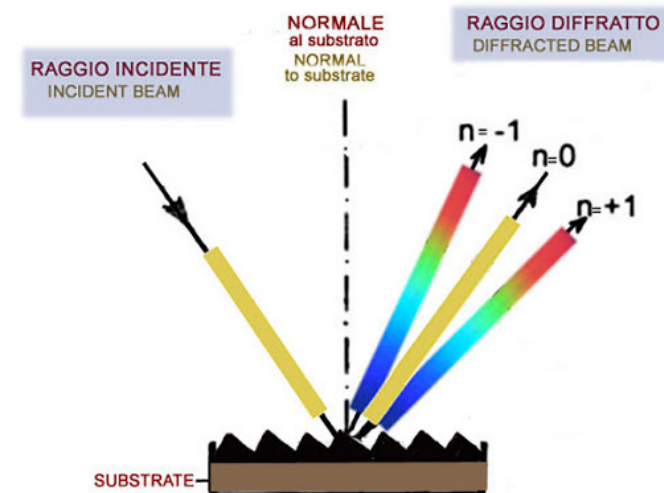
Reticoli a riflessione: sono costituiti da una serie di solchi paralleli tracciati sopra una superficie riflettente. Quando un fascio di radiazioni colpisce il reticolo, i raggi riflessi interferiscono fra loro e danno luogo alle frange di riflessione. Questi reticoli restituiscono quasi interamente la luce incidente (80%).



Il principio di funzionamento del reticolo trasmissione



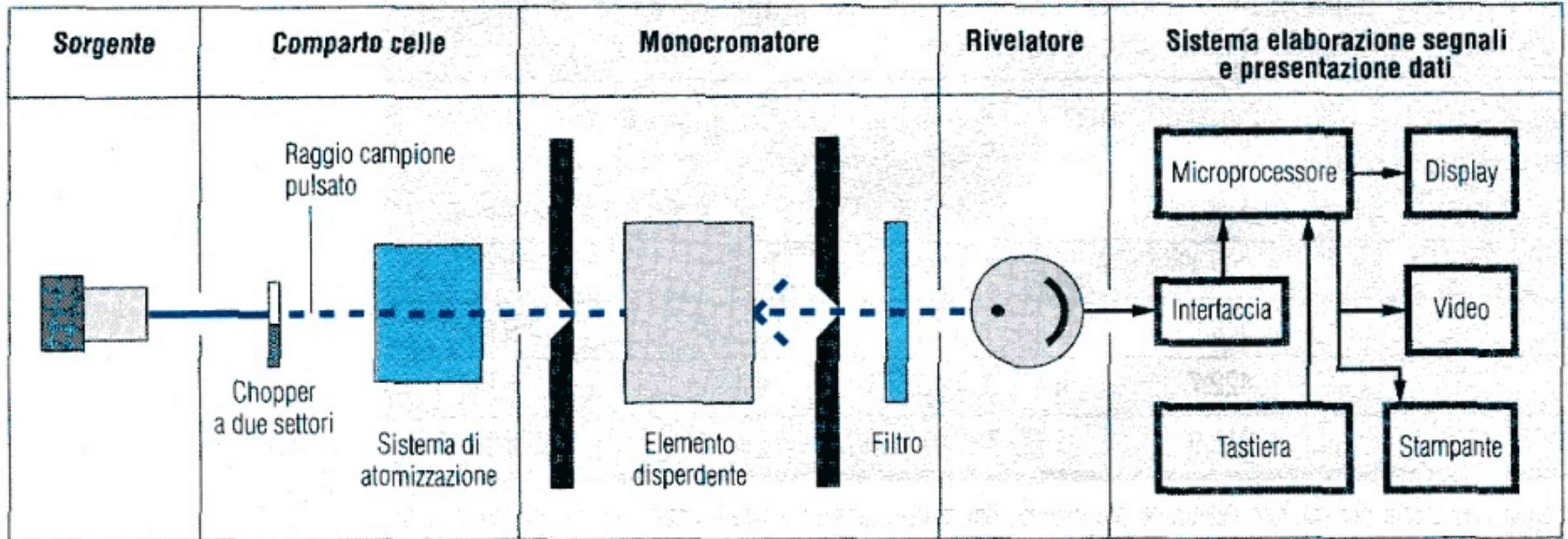
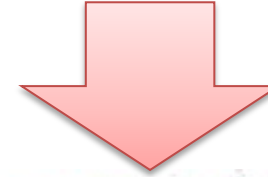
Reticolo di diffrazione riflettente usato come monocromatore in uno spettrofotometro UV-visibile.



Il principio di funzionamento del reticolo a riflessione

Lo SPETTROFOTOMETRO per AAS: RIVELATORE

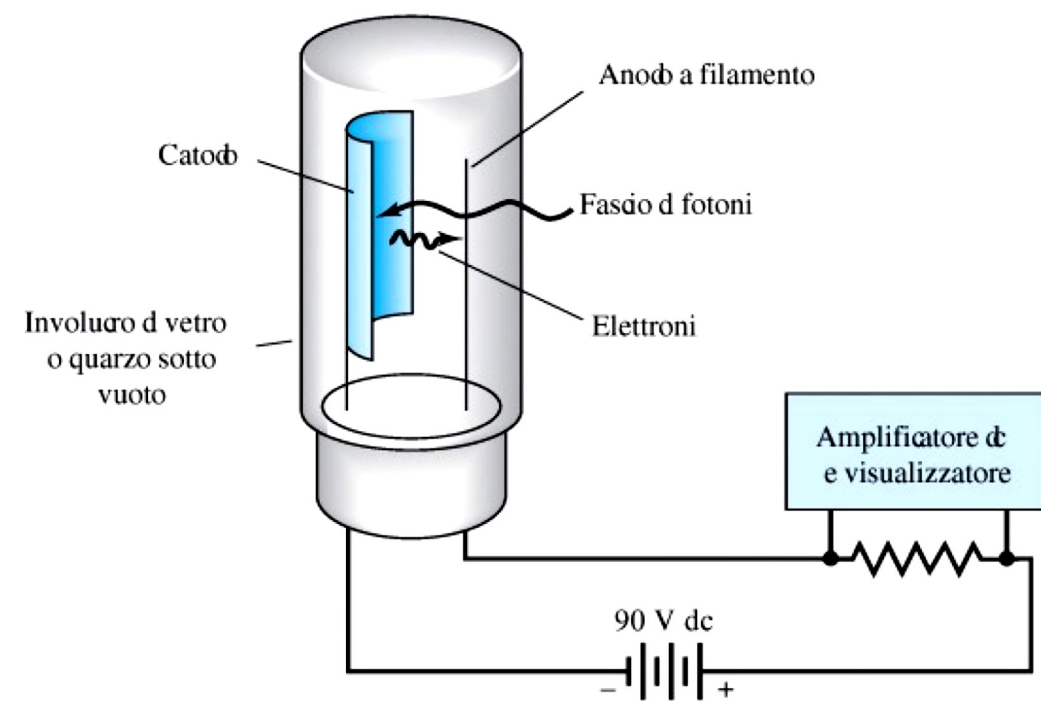
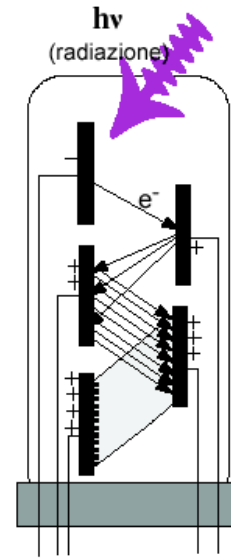
I rivelatori trasformano l'energia radiante in segnale elettrico (che poi possono essere elaborati al computer).



TIPI DI RILEVATORI:

Fototubi. La risposta di un fototubo è basata sull'effetto fotoelettrico (emissioni di elettroni dalla superficie di alcuni materiali cui sia applicata una ddp, qualora colpito da una radiazione luminosa). Un fototubo consiste in un catodo semicilindrico e un anodo a filamento inseriti in un tubo di vetro o quarzo sottovuoto. Il catodo supporta un materiale fotoemissivo (metallo alcalino) che emette elettroni quando irradiato con radiazioni di opportuna energia. I fotoelettroni emessi sono quindi attratti dall'anodo.

Fotomoltiplicatori. Variante dei fototubi, caratterizzati da una sensibilità superiore; gli elettroni emessi dal catodo vengono accelerati da un campo elettrico (quindi acquistano energia). Quando colpiscono una seconda superficie fotoemissiva (dinodo), liberano un numero di elettroni superiore; gli elettroni così liberati colpiscono i dinodi successivi in modo da amplificare il segnale. Il rapporto di amplificazione (guadagno) può arrivare fino a 10^9 elettroni generati per ogni fotone incidente.

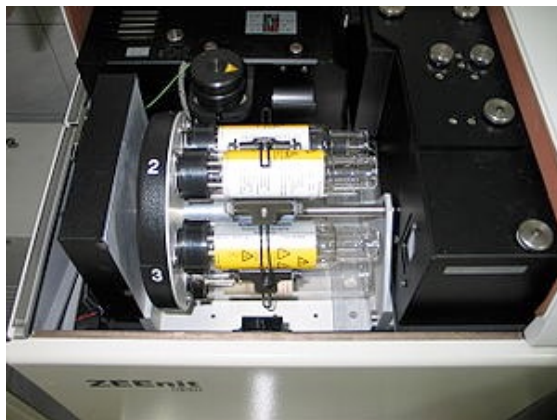


In entrambi i casi il segnale viene poi amplificato ulteriormente da un amplificatore e letto da un voltmetro digitale con scala tarata 0-100% in trasmittanza (T) e la corrente viene così tradotta in numeri che compariranno nel display. Ciò che si misurerà sarà una diminuzione del segnale di trasmittanza dovuto al campione rispetto al bianco. Un sistema logaritmico converte la T in Assorbanza.

Alcune foto (grazie wikipedia)



Lo spettrofotometro può montare più lampade, utilizzabili a turno.



A hollow cathode lamp for Aluminum (Al)



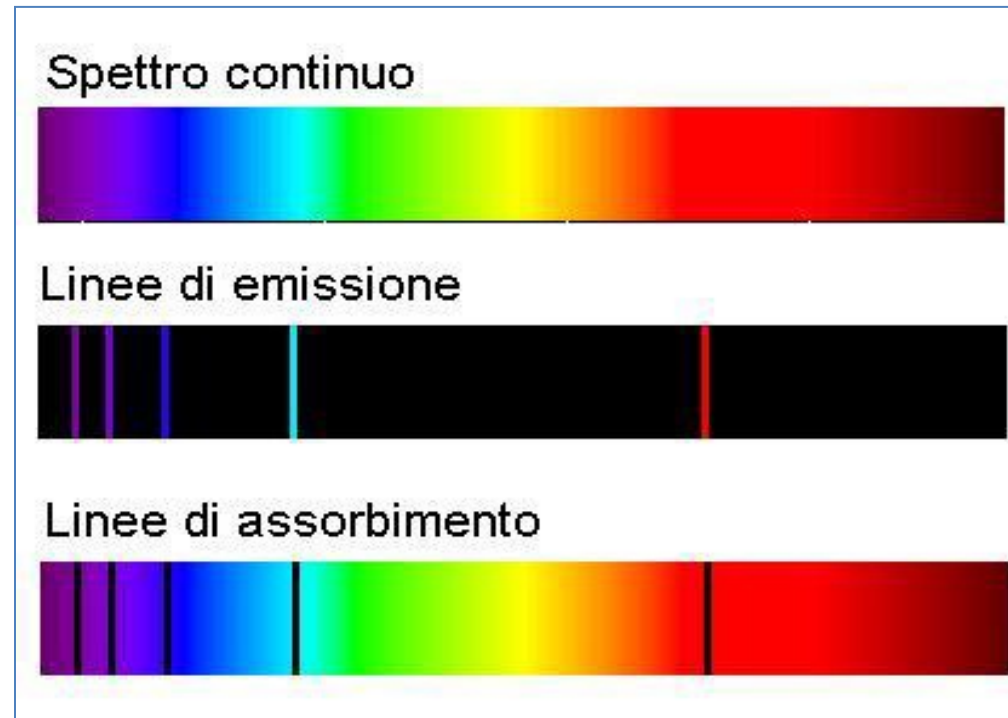
Si può notare al centro il campione in soluzione, a destra il pannello di controllo.

In generale gli strumenti AA sono composti da un portacampioni ed una pompa per prelevare in continuo il campione che si vuole analizzare in soluzione.

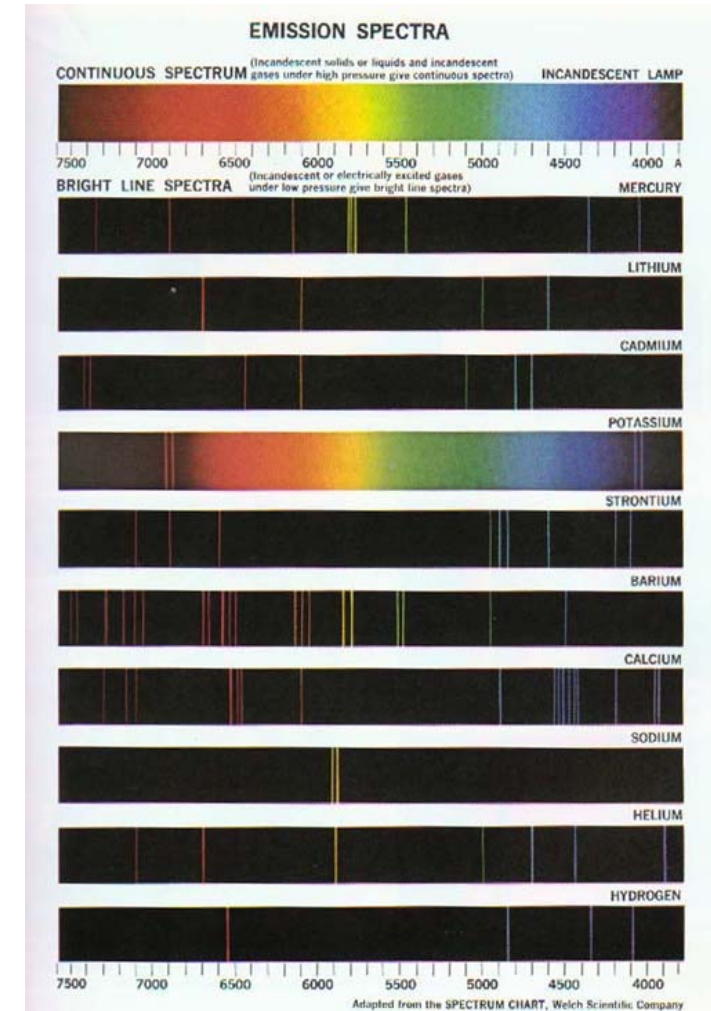
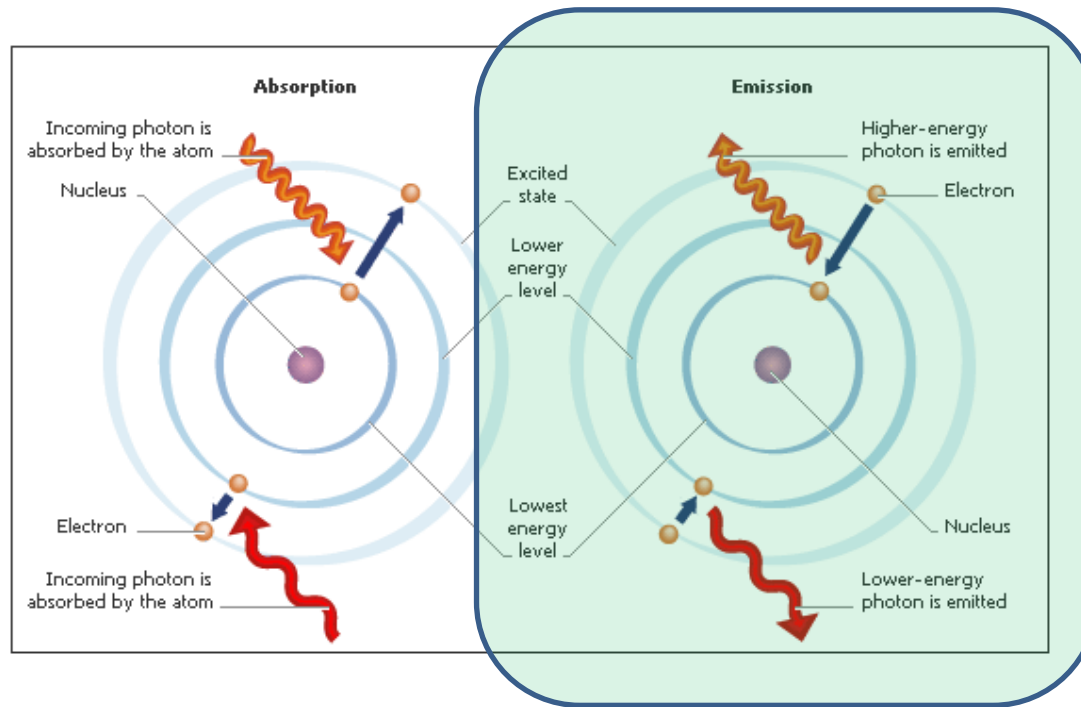
Di seguito la soluzione viene nebulizzata all'interno di una sorgente di calore che può essere a fiamma, un fornello di grafite, oppure una sorgente al plasma (ICP).

SPETTROSCOPIA DI EMISSIONE ATOMICA (EAS)

- ✗ Quando gli atomi di un elemento vengono eccitati, possono passare in uno stato elettronico di energia maggiore rispetto allo stato fondamentale e, in parte, possono restituire all'ambiente l'energia in più sotto forma di radiazioni elettromagnetiche.
- ✗ In tal caso vengono emesse le stesse frequenze che sono assorbite quando in una nuvola di elemento atomizzato passa un fascio di luce policromatica.



- **Nella tecnica ad emissione atomica**, a differenza dell'AAS, è il metallo stesso che eccitato dalla temperatura emette una radiazione a frequenze caratteristiche degli stati di eccitazione. Il detector in questo caso confronta l'intensità della radiazione emessa con quella dello standard a concentrazione nota.



- ✖ In laboratorio il **saggio alla fiamma** è un metodo semplice, che sfrutta l'emissione atomica, per la determinazione qualitativa di alcuni atomi (presenti come cationi in un sale inorganico/metallo-organico) alcalini e alcalino-terrosi. L'atomizzazione avviene con la fiamma del bunsen.

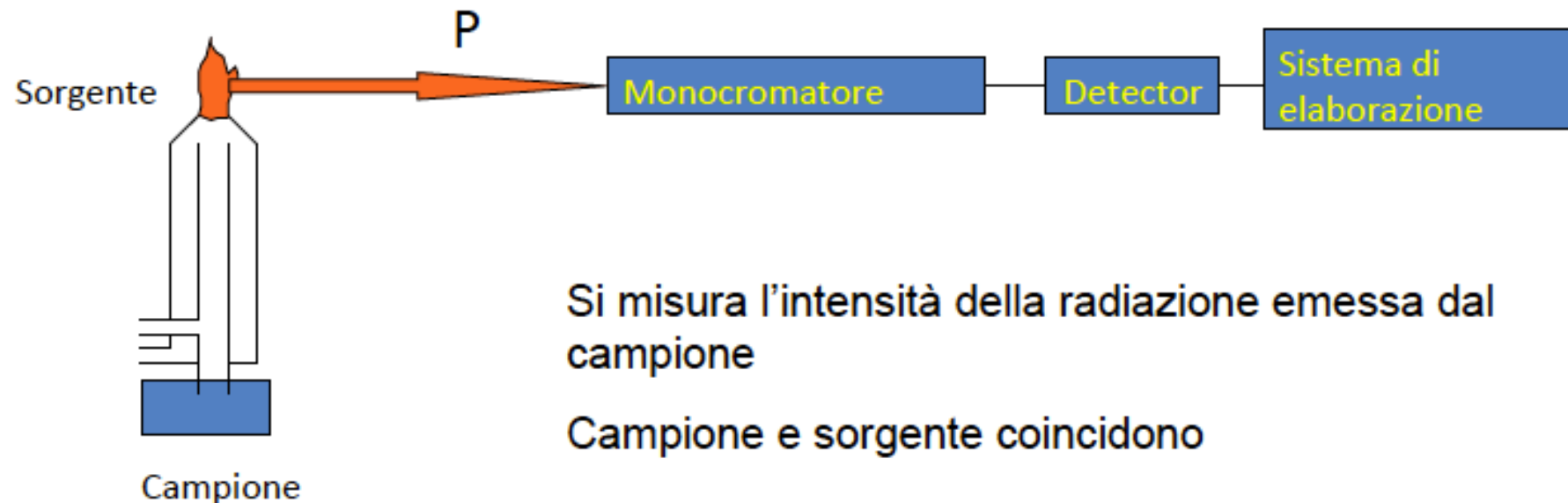
Sale di rame



Sale di sodio

STRUMENTAZIONE:

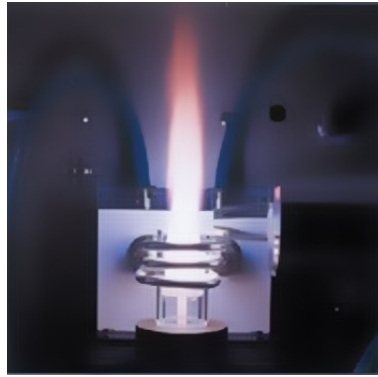
In linea di principio tutti gli spettrofotometri per AA possono lavorare anche in emissione, ma più frequentemente si ricorre a una strumentazione apposita, i cui componenti sono del tutto analoghi a quelli già analizzati per gli strumenti in assorbimento.



La differenza sostanziale dello strumento per AES consiste nella **manca** della **sorgente (lampada)** in quanto non è necessario un “assorbimento” di radiazione da parte della molecola, ma solamente la sua dissipazione energetica (emissione) che viene ottenuta da una fiamma o altro atomizzatore.

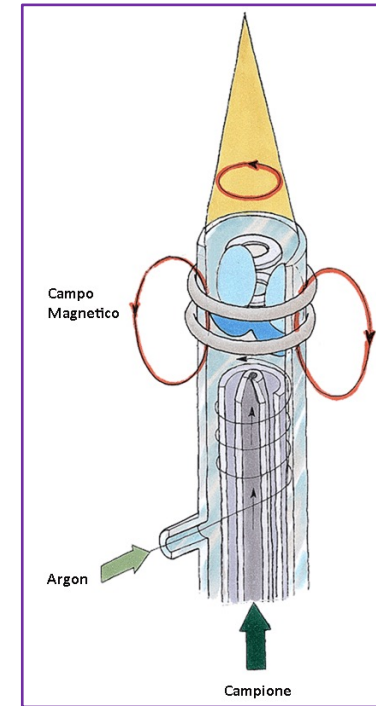
ICP: INDUCTIVELY COUPLED PLASMA

Il sistema che si è rivelato più efficace per eccitare l'analita consiste nel far ricorso al plasma, un gas formato da ioni ed elettroni, eccitato da un campo magnetico oscillante in grado di far arrivare la temperatura fino a $\approx 10000^{\circ}\text{C}$ (il doppio di una fiamma).



Cos'è il Plasma?

Una bobina di metallo alimentata da un generatore di radiofrequenze (RF) raffreddata ad acqua, genera un intenso campo magnetico. Nel centro di questo avvolgimento è posta la torcia che consiste di 3 tubi in quarzo concentrici che contengono 3 flussi separati di gas Ar; **il plasma è indotto dal flusso di Ar**. La ionizzazione del gas viene innescata da una scintilla. Quando la scintilla passa attraverso il gas, alcuni atomi di Ar vengono ionizzati e i risultanti cationi ed elettroni sono accelerati dal campo magnetico delle radiofrequenze. Attraverso una serie di collisioni tra le particelle cariche (Ar^+ e elettroni) e atomi di argon, si genera un plasma stabile (a carica totale nulla) ad altissima temperatura.



APPLICAZIONI DELLA SPETTROSCOPIA AAS ed EAS IN CHIMICA (AMBIENTALE/CLINICA)

□ AAS: sensibilità analitica: *parti per milione*

- Praticamente tutti i cationi di interesse fisio-patologico (Ca, Mg, ecc.). Attenzione al Ca in quanto presente nella polvere e nell'acqua non demineralizzata. Il magnesio è il più sensibile e viene ben dosato nei liquidi biologici.
- Gli elementi oligominerali di interesse biologico (Fe, Co, Zn, Cr, Mn, ecc.)
- Metalli di interesse tossicologico (Pb, Hg, Cd ecc..).

Tabella Elementi d'interesse in campo chimico-clinico determinabili con tecnica di assorbimento atomico.		
Elemento	Riga analitica	Sensibilità µg/ml *
Ca	4.227	0,7
Mg	2.852	0,007
Cu	3.247	0,1
Fe	2.483	0,1
Pb	2.170	0,5
Cd	2.288	0,25
Hg	2.536	10,0
Cr	3.579	0,1
Zn	2.139	0,015
Ni	2.320	0,1
Co	2.407	0,15
Mn	2.795	0,05

* I valori di sensibilità riportati in tabella si riferiscono ai modelli di assorbimento atomico della ditta Perkin-Elmer; tali valori possono comunque dare un'indicazione approssimativa dei limiti generali di sensibilità.

❑ EAS:

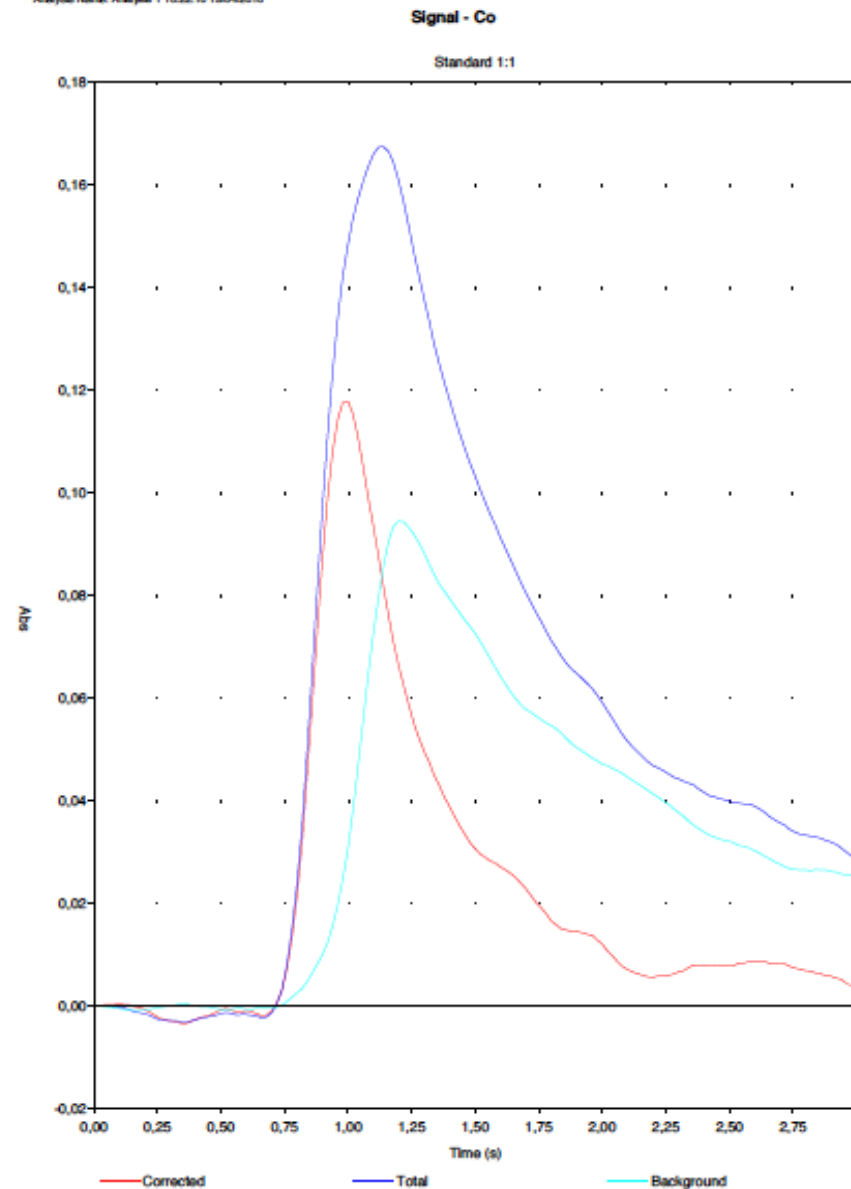
- **Na, Li e K** sono ben dosati con la tecnica in emissione previa diluizione del campione biologico (siero, urina, saliva, ecc.) da 1:50 fino 1:500 per il sodio. Evitare il contatto con le mani e con tappi di gomma e la vetreria dev'essere perfettamente lavata e l'acqua dev'essere deionizzata.

Il litio è importante in quanto utilizzato nella cura delle psicosi maniaco-depressive e deve essere monitorato ad intervalli regolari in quanto concentrazioni ematiche superiori a 2,0 mmol/L risultano tossiche per l'organismo. Si usa la riga analitica del Li a 671 nm.

- Anche **metalli alcalino-terrosi** possono venir dosati (Ca e Mg in particolare) anche se con notevoli limitazioni (fiamme ad alta T° , interferenze da anioni, formazione di ossidi refrattari, ecc...).

❑ La tecnica al plasma (ICP-OES) essendo molto sensibile risulta **ottimale nell'industria siderurgica** nell'analisi di leghe ferrose. Inoltre presenta il vantaggio di un range di concentrazione dinamica molto elevato e consente l'analisi di campioni con elementi presenti a livelli di concentrazione anche molto diversi. Altre applicazioni sono:

- metalli nei liquidi biologici
- metalli nelle rocce
- elementi nelle acque
- elementi in tracce nei solventi o nei reagenti
- metalli nei lubrificanti (usura ingranaggi)



Esempio di come viene rilevato un elemento (Co in questo caso) in EAS.

Assorbanza

Tempo

Sensibilità (S) e Limite di rivelabilità (LdR)

Si definisce **sensibilità** di una determinazione eseguita con A.A. quella concentrazione di elemento nella soluzione che produce nella fiamma un segnale corrispondente all'1% di assorbimento e viene generalmente espressa con mg/ml/1% o anche ppm/1% di assorbimento. In pratica è definita come la variazione del segnale al variare della concentrazione (o quantità) dell'elemento.

$$S = \frac{ds}{dc}$$

Tuttavia per confrontare metodi analitici diversi risulta più utile il concetto di **limite di rivelabilità relativo** definito come la più bassa concentrazione (grammi o ppm) di elemento che può essere rivelata con una probabilità del 95%. Il segnale minimo accettabile è quello che da luogo ad un assorbimento pari al doppio del rumore di fondo (tiene conto anche di altri fattori strumentali oltre alla sensibilità analitica).

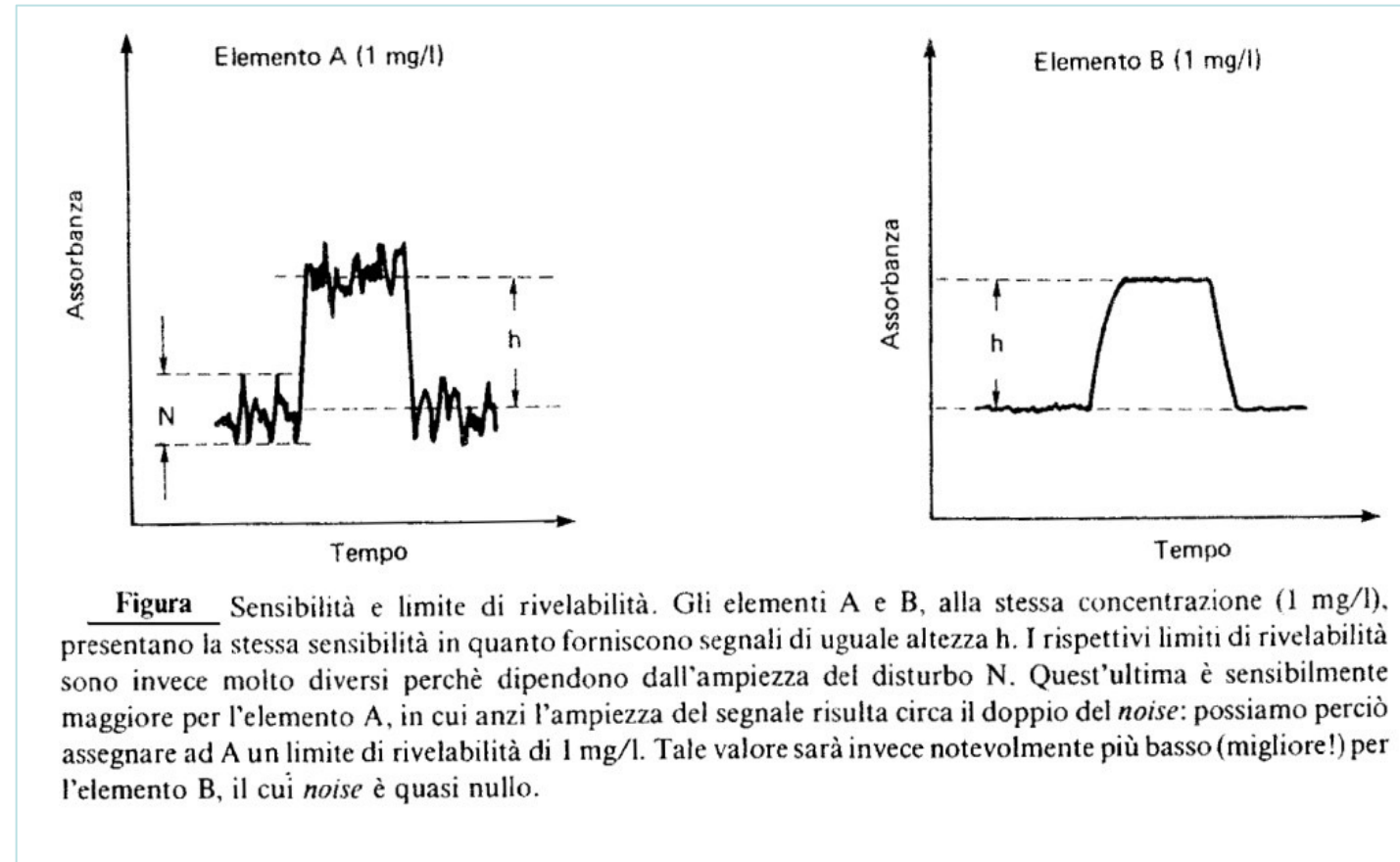
Si definisce **limite di rivelabilità assoluto** la più bassa concentrazione di elemento che da luogo ad un assorbimento di entità tripla del rumore di fondo (noise).

Sensibilità e limite di rivelabilità (LdR) sono grandezze strettamente legate tra di loro.

Mentre la prima ci da informazioni sull'altezza del segnale, la seconda ci da notizie sul rumore di fondo o disturbo.

Quest'ultimo è legato al tipo di strumento che si usa; ad es. un atomizzatore a fiamma produce un noise maggiore di uno a grafite, così come una lampada più usata o monocromatori poco efficienti.

La sensibilità è diversa da elemento a elemento, in quanto dipende dallo spessore dello strato di vapori atomici attraversato dalla sorgente e dalla probabilità che la transizione elettronica si verifichi (che è appunto differente per ciascun elemento).



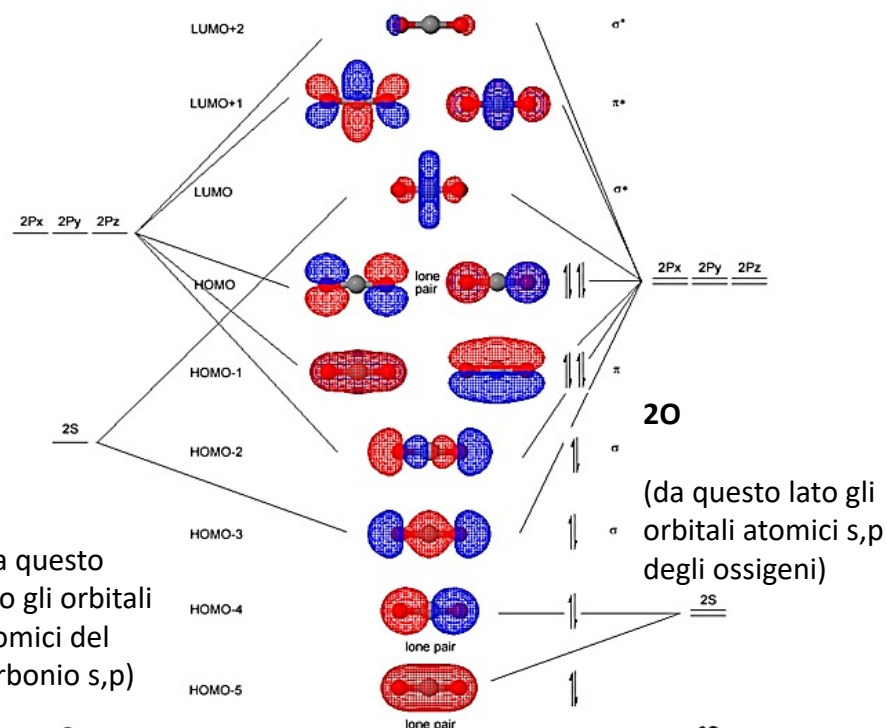
Spettri Molecolari

Nelle molecole, gli orbitali atomici di ogni atomo si combinando per formare orbitali molecolari (σ e π) e le cose si possono complicare un po' ...

E' importante tenere ben presente che le molecole hanno un sacco di «stati accessibili». Molti di piu' rispetto a quelli dei singoli atomi.

La spettroscopia molecolare sfrutta diversi meccanismi di interazione luce/molecola per caratterizzare le proprietà di una molecola:

Orbitali molecolari della CO₂



- **ASSORBIMENTO:**

- ☐ **Spettroscopia UV-Vis** si basa sulla misura dell'assorbimento di radiazioni nell'ultravioletto e nel visibile: dà informazione sul tipo di cromofori (sistema di elettroni π);

- ☐ **Spettroscopia IR** si basa sulla misura dell'assorbimento di radiazioni nell'infrarosso dà informazioni sui gruppi funzionali presenti nella molecola (riguarda i moti vibrazionali).

- **LUMINESCENZA:** proprietà di alcuni materiali di assorbire quantità discrete di energia, successivamente restituita sotto forma di fotoni di energia inferiore.

- ☐ **Spettroscopia di FLUORESCENZA** assorbire radiazioni nell'ultravioletto ed emetterla nel visibile.

- ☐ **FORFORESCENZA**

**Prossima lezione:
Spettroscopia UV-VIS**

“ **133FA - ANALISI FARMACEUTICA 1**
LEZIONE 11 – Spettroscopia Uv-vis

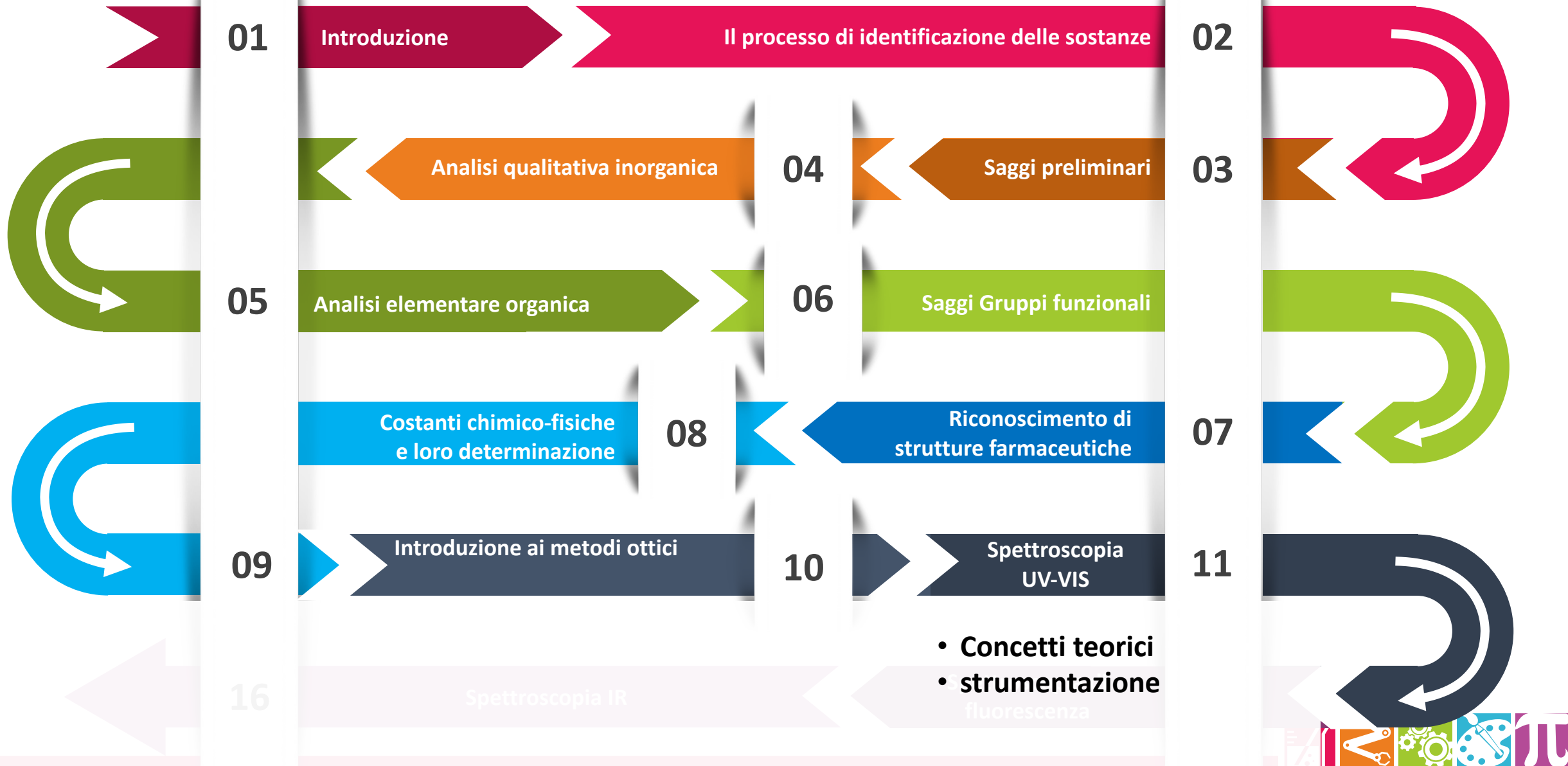
Prof. Daniele Zampieri

CdL CTF

”



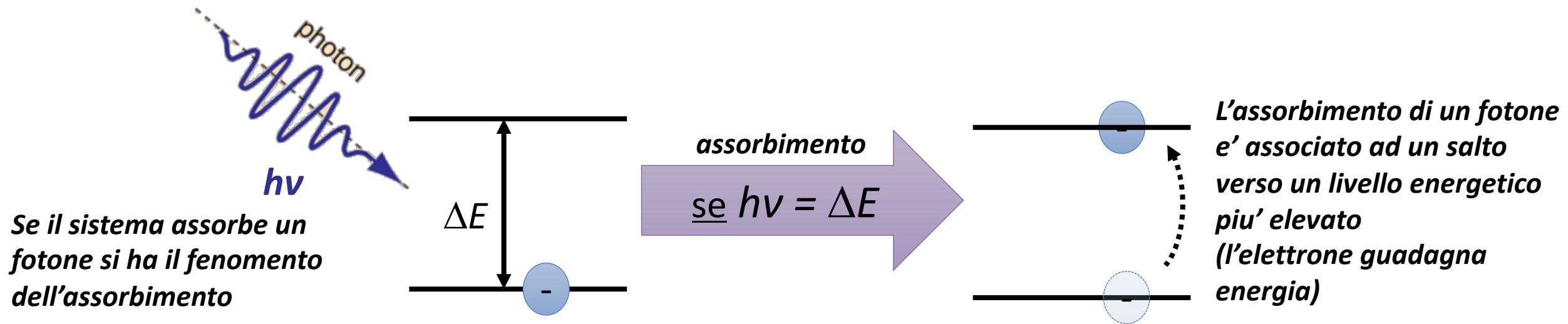
Contenuti del Corso (e “Roadmap”)



Il fenomeno dell'assorbimento

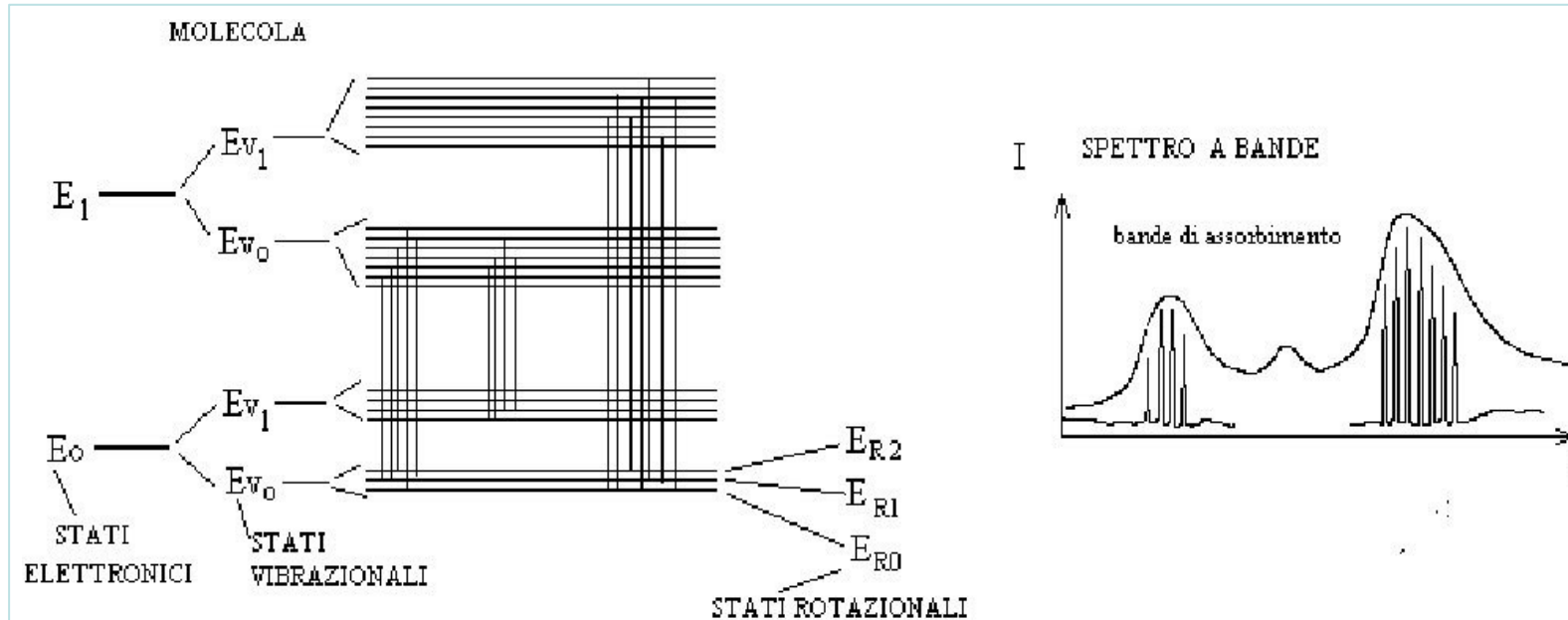
I fenomeni che si verificano quando una radiazione colpisce la materia possono essere molteplici, tra cui la riflessione, la rifrazione, l'assorbimento, l'assorbimento seguito da emissione (fluorescenza, fosforescenza), reazioni fotochimiche, ecc.

Il fenomeno che più interessa i metodi spettroscopici è quello dell'assorbimento, che consiste essenzialmente in un trasferimento di energia “quantizzata” dalla radiazione alla molecola (o atomi) colpita provocandone una “perturbazione” dei livelli quantici.



SPECIE MOLECOLARI

L'assorbimento di radiazioni da parte di molecole da origine ad assorbimenti che coinvolgono stati elettronici, ma anche stati vibrazionali e rotazionali. In tal modo si hanno assorbimenti discreti molto ravvicinati, che costituiscono delle bande (spettro a **bande**).



L'energia totale di una molecola, è data dalla somma delle sue energie elettronica, vibrazionale e rotazionale ($E_{tot.} = E_{el.} + E_{vib.} + E_{rot.}$) e che i livelli elettronici sono quelli a maggior contenuto energetico ($E_{el.} > E_{vib.} > E_{rot.}$).

Risonanza:

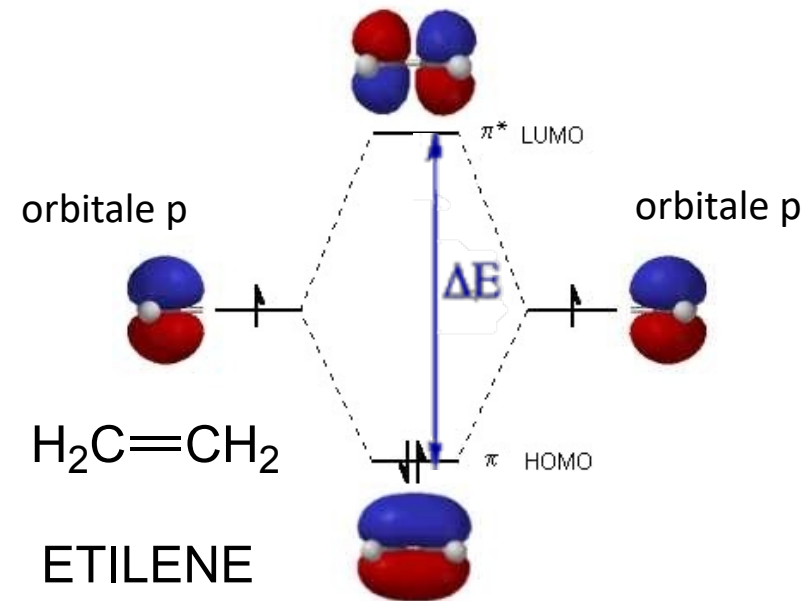
L'assorbimento di energia da parte di una molecola avverrà solamente se la quantità di energia incidente ("quanto") corrisponde alla differenza energetica tra un livello e l'altro, ovvero se la ΔE corrisponde alla differenza tra lo stato "fondamentale" e quello "eccitato".

La spettroscopia UV-Vis riguarda l'assorbimento da parte di MOLECOLE ed in particolare coinvolge gli elettroni presenti sugli orbitali molecolari.

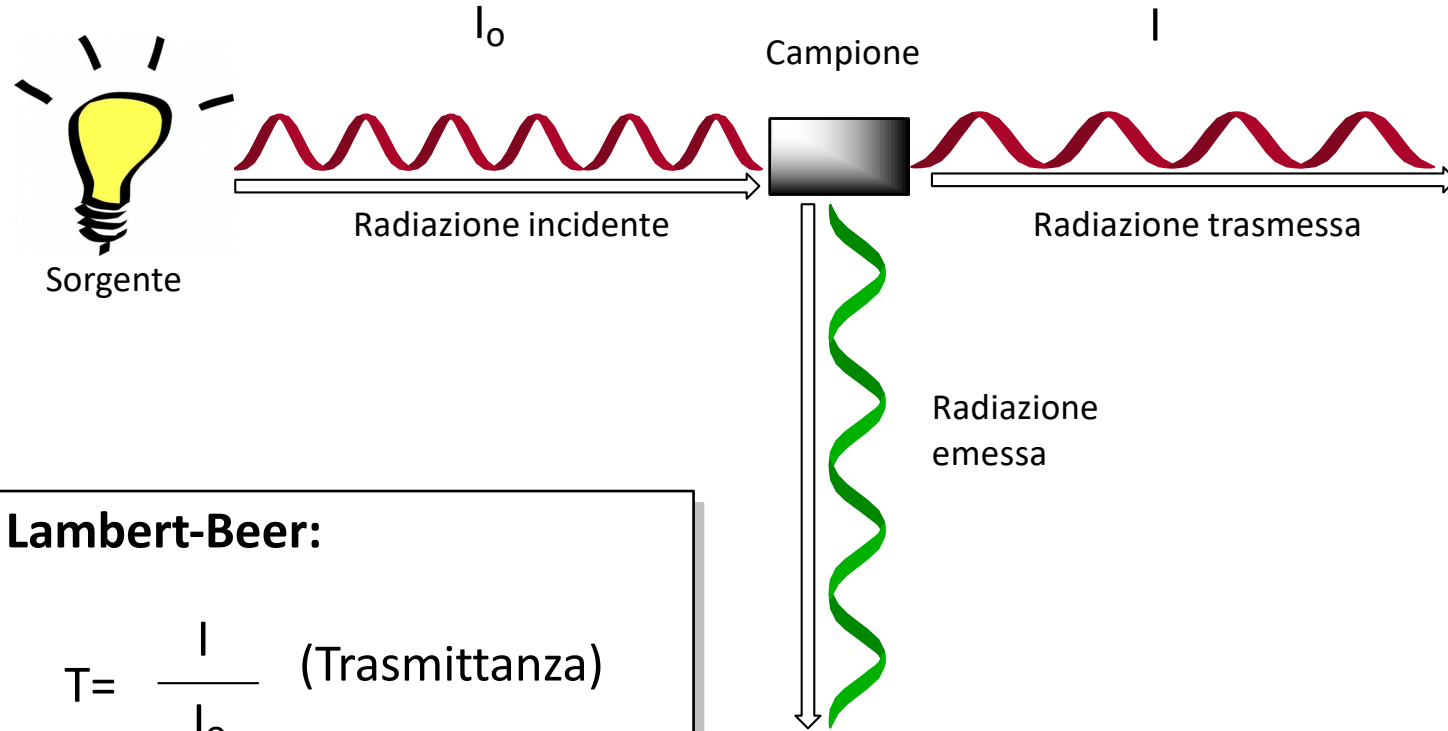
Gli orbitali molecolari tengono assieme gli atomi di una molecola.

L'assorbimento di luce UV-Vis induce transizioni elettroniche degli elettroni più esterni.

Pero' i nuclei non stanno fermi (vibrano!) ...



Schematicamente:



Lambert-Beer:

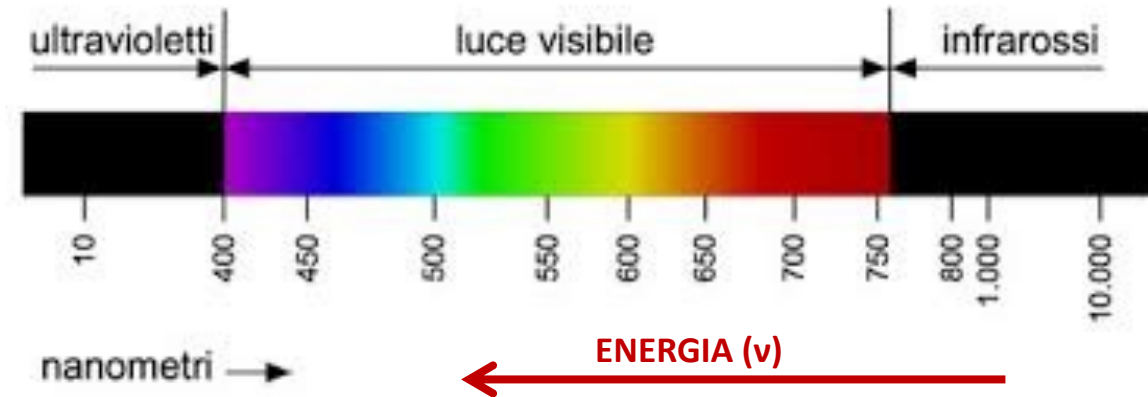
$$T = \frac{I}{I_0} \quad (\text{Trasmittanza})$$

$$\frac{I_0}{I} = \frac{1}{T}$$

$$\text{Log} \frac{I_0}{I} = A \quad (\text{Assorbanza})$$

Metodi spettroscopici:

SPETTROSCOPIA DI ASSORBIMENTO UV-VIS



La spettroscopia (o spettrofotometria) UV-Vis riguarda l'interazione delle molecole con la luce ultravioletta e visibile.

Interessa lunghezze d'onda nel range 10-800 nm.

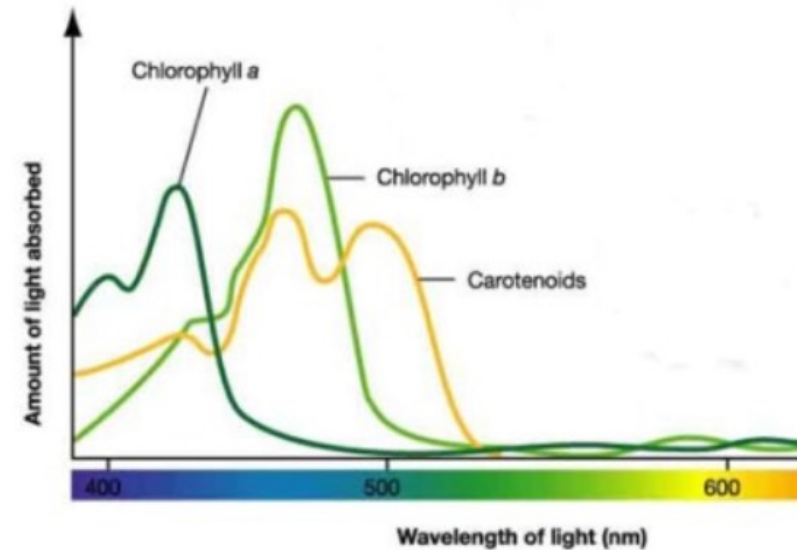
Si parla di

- UV-lontano 10-180 nm
- UV-vicino 180-380 nm
- luce visibile 400-750 nm

↑
ENERGIA (v)

$$E = h \nu$$

L'energia della radiazione è proporzionale alla sua frequenza



La legge di Lambert-Beer

Quando si parla di assorbimento e' utile tenere presente la legge di Lambert-Beer.

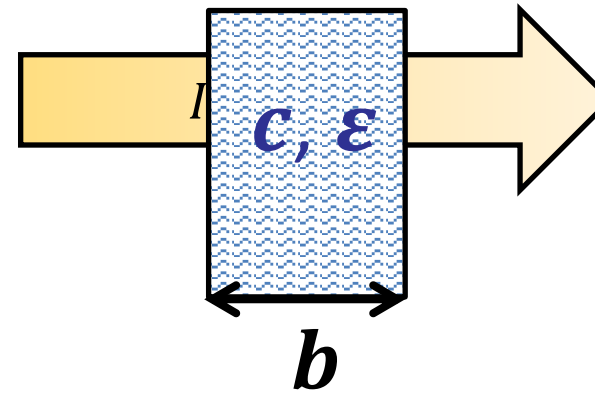
La legge di Lambert-Beer è una relazione empirica che correla la quantità di luce assorbita da un materiale, alla concentrazione (c) e allo spessore (b) del materiale stesso attraversato:

$$\boxed{A} = \boxed{\epsilon} b c$$

ASSORBANZA:
intensità di radiazione
elettromagnetica
assorbita

assorbività
o coefficiente di
estinzione
molare

Nota: ϵ e c
dipendono dal
campione



Il coefficiente ϵ è un valore proprio di ogni sostanza e dipende da:

- natura del solvente;
- dalla I utilizzata
- dal pH
- dalla specie chimica in esame.

E' invece, indipendente dalla temperatura!

L'assorbanza A dipenda dal rapporto tra intensita' di luce assorbita I e intensita' di luce riflessa I_0

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

dove $T = \frac{I}{I_0}$ viene chiamata TRASMITTANZA che e' la quantità di energia che viene "trasmessa" alla materia

Gli spettri UV-VIS

Gli spettri UV si presentano come grosse bande allargate.

Sono **bande di assorbimento**.

Le bande sono caratterizzate da:

- ✓ punti di massimo ($A_{\max}$)
- ✓ la corrispondente lunghezza d'onda ($\lambda_{\max}$)

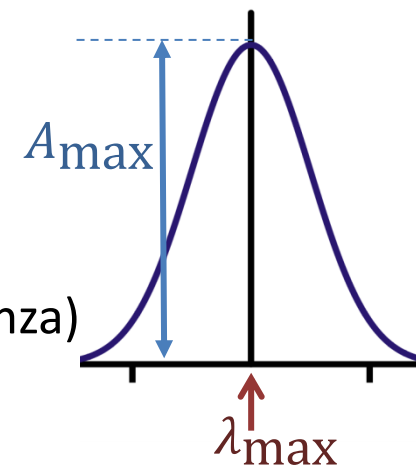
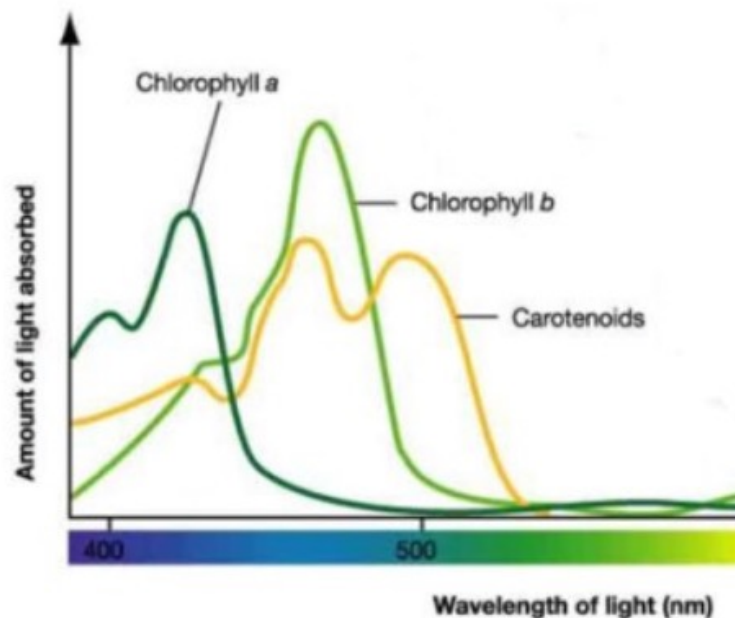
$\lambda_{\max}$ indica la posizione di $A_{\max}$

$A_{\max}$ e' l'assorbanza (massima) che abbiamo gia' visto quando abbiamo parlato della legge di Lambert-Beer

$$A = \epsilon b c$$

dipende da λ

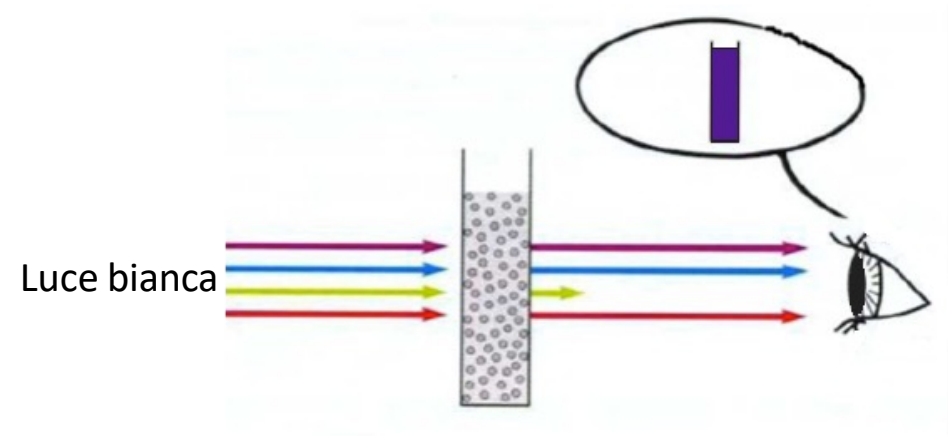
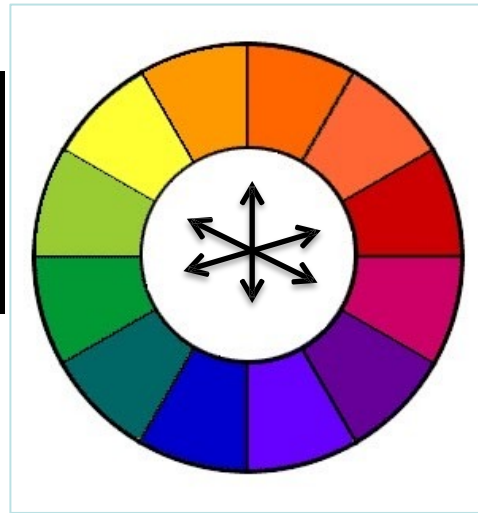
tramite la quale, noto il coefficiente di estinzione molare e' possibile calcolare l'intensita' di assorbimento (assorbanza) a quella lunghezza d'onda.



La maggior parte delle molecole farmaceutiche assorbono nella regione dell'UV (BIANCHE O INCOLORI). Le sostanze **COLORATE** assorbono nel Visibile.

TEORIA DEL COLORE

La luce bianca è costituita da radiazioni comprese tra $\lambda \approx 400$ nm (violetto) e ≈ 800 nm (rosso). Essa è la combinazioni di radiazioni colorate ognuna delle quali ha una certa λ . Si dice che è una **RADIAZIONE POLICROMATICA**. La scomposizione della luce bianca dà origine alle sue componenti **MONOCROMATICHE (COLORI)**.



Quando vediamo un determinato colore è perché è stato assorbito il suo complementare!

Assorbimento di sostanze organiche

La spettroscopia UV-Vis riguarda l'assorbimento da parte di MOLECOLE ed in particolare coinvolge gli elettroni di legame tra gli atomi inducendo transizioni elettroniche degli elettroni più esterni.

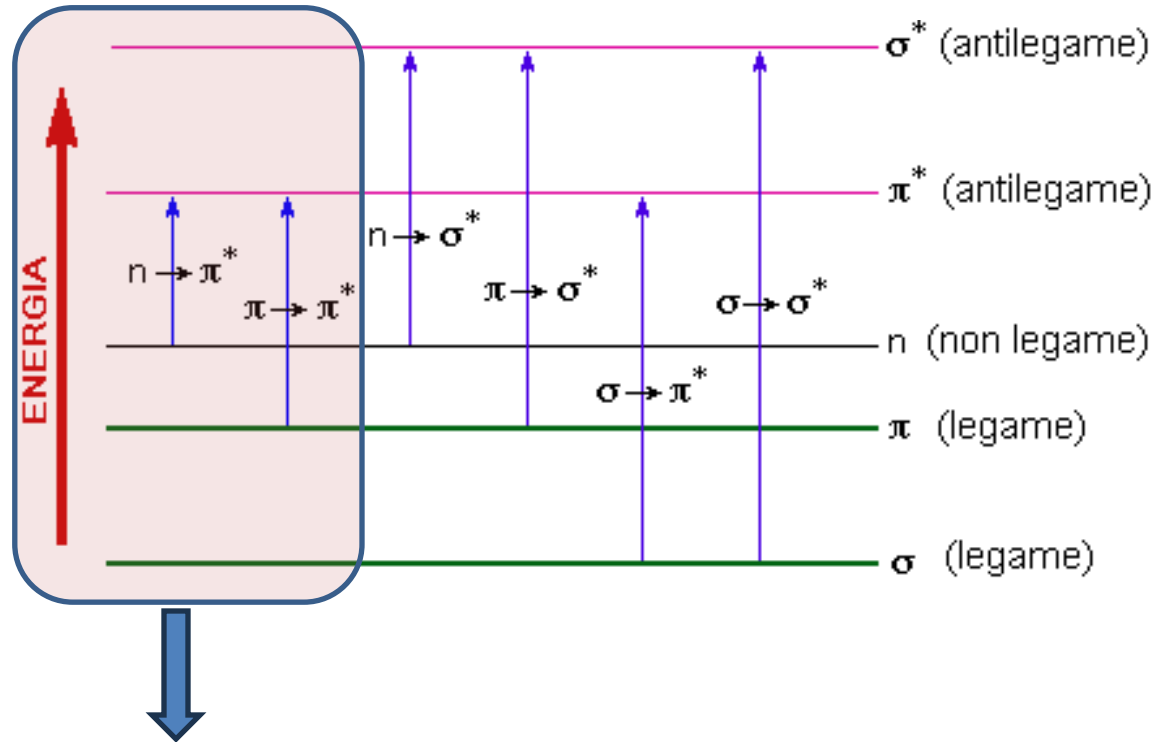
Dalla teoria degli orbitali molecolari sono definiti come orbitali di legame e di antilegame la sovrapposizione di orbitali atomici a contenuto energetico minore (legame) e maggiore (antilegame); il primo a massima densità elettronica e stabilità maggiore rispetto al secondo.

Vi sono poi i livelli indicati con la lettera n , che corrispondono allo stato energetico dei doppietti elettronici non condivisi o di non-legame (es. quelli dell'ossigeno o dell'azoto), situati a livelli intermedi tra gli orbitali di legame e quelli di antilegame.

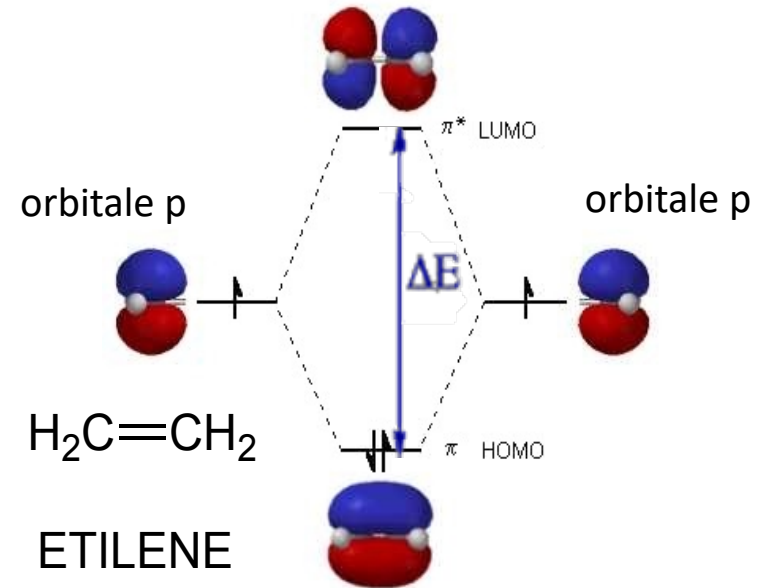
Se gli orbitali atomici sono coassiali si ottengono orbitali molecolari di legame tipo σ , se invece sono paralleli si hanno orbitali tipo π . I corrispondenti orbitali di antilegame sono indicati come σ^* e π^* .

L'assorbimento di radiazione UV-Vis corrisponde all'eccitazione degli elettroni dai livelli σ , π e n ai livelli σ^* π^* .

In realtà si considerano solo le transizioni $\pi \rightarrow \pi^*$ e $n \rightarrow \pi^*$ in quanto gli orbitali σ e σ^* hanno valori energetici tali che richiederebbero valori di energia (ΔE) troppo alta, fuori dal range Uv-Vis.



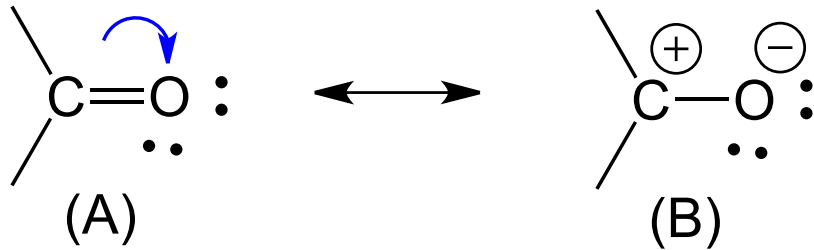
Le uniche transizioni **utili** ai fini analitici



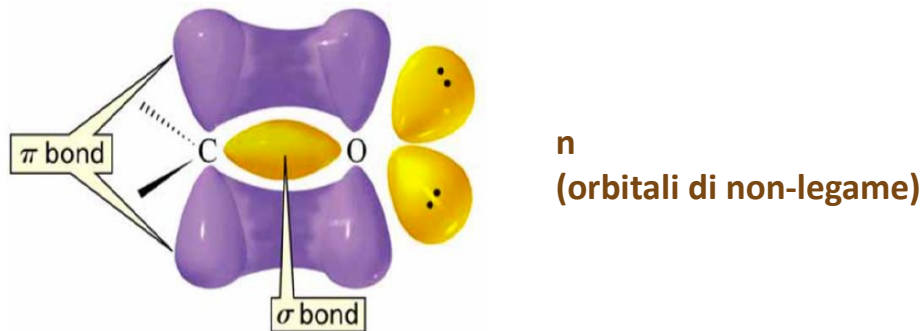
Le transizioni nell' UV-Vis

L'esempio del gruppo carbonilico

Consideriamo un gruppo carbonilico come esempio:

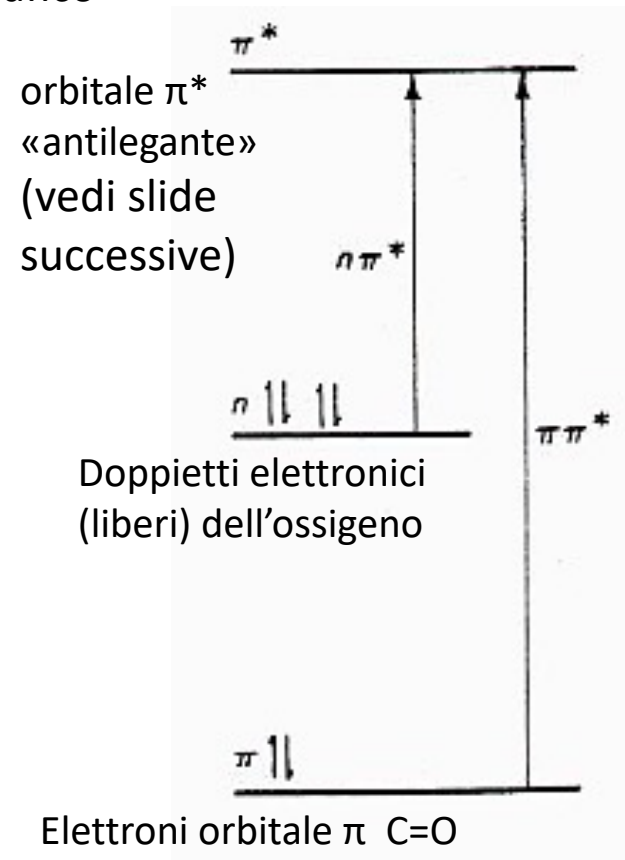


L'atomo di C carbonilico è ibridato sp^2 e forma con l'ossigeno un legame σ ed un legame π :



Gli altri due orbitali sp^2 del C sono impegnati in legami con altri atomi, mentre l'atomo di O (anch'esso ibridato sp^2) ha due doppietti di elettroni liberi. Questi sono orbitali di non legame che chiamiamo n .

Le transizioni osservabili per un gruppo carbonilico $C=O$ sono illustrate schematicamente nel seguente grafico



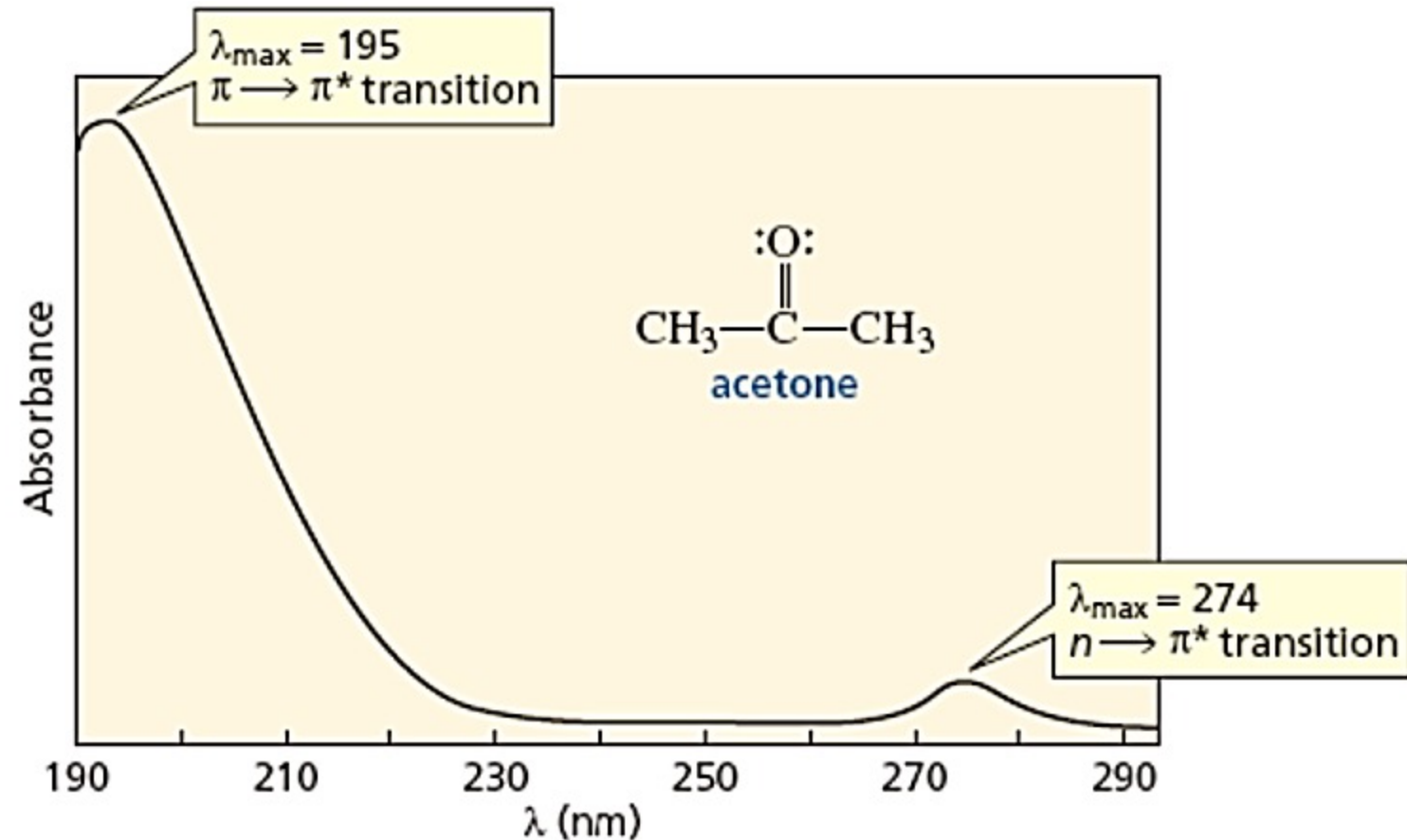
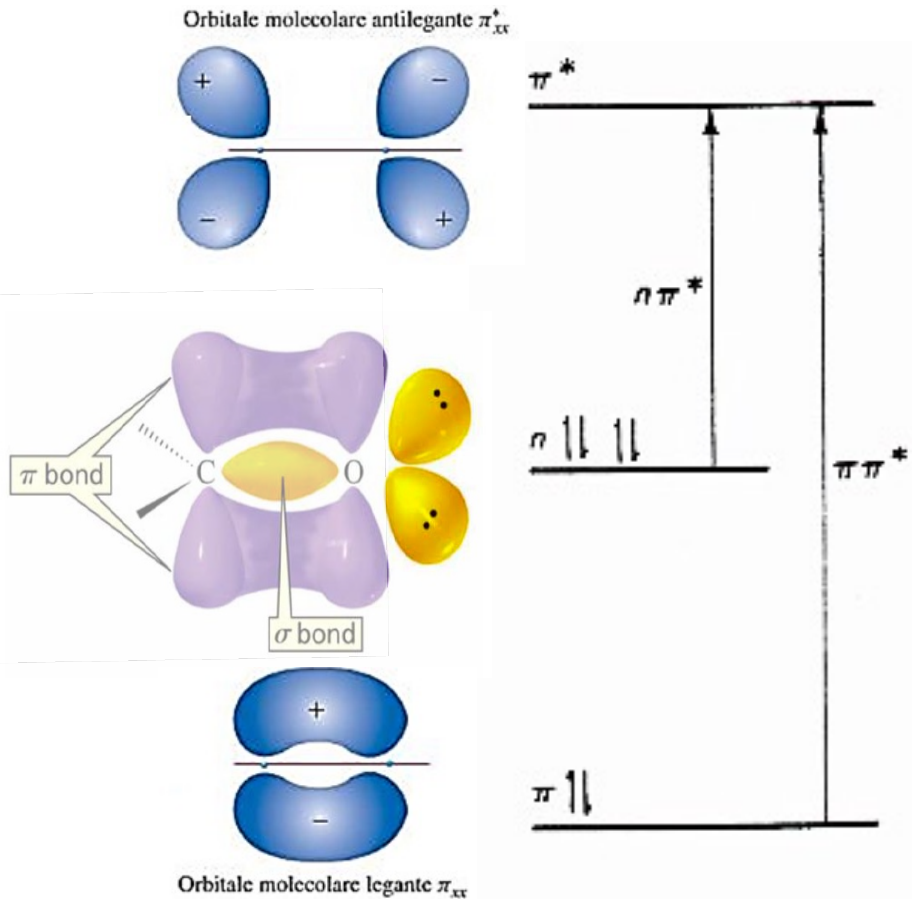
Sono quindi due i tipi di transizione interessanti:

- ☐ $n \rightarrow \pi^*$ (tipiche di atomi con doppietti non condivisi adiacenti a doppi legami)
- ☐ $\pi \rightarrow \pi^*$ (tipiche dei sistemi con doppi legami, anche coniugati)

L'esempio dell'acetone

Lo spettro UV-Vis dell'acetone rispecchia i due tipi di transizione che ci aspettiamo di vedere:

- ❑ $n \rightarrow \pi^*$ (tipiche di atomi con doppietti non condivisi adiacenti a doppi legami)
- ❑ $\pi \rightarrow \pi^*$ (tipiche dei sistemi con doppi legami, anche coniugati)



Metalli di transizione

...e i Sali inorganici

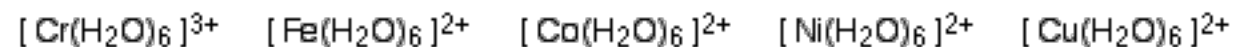
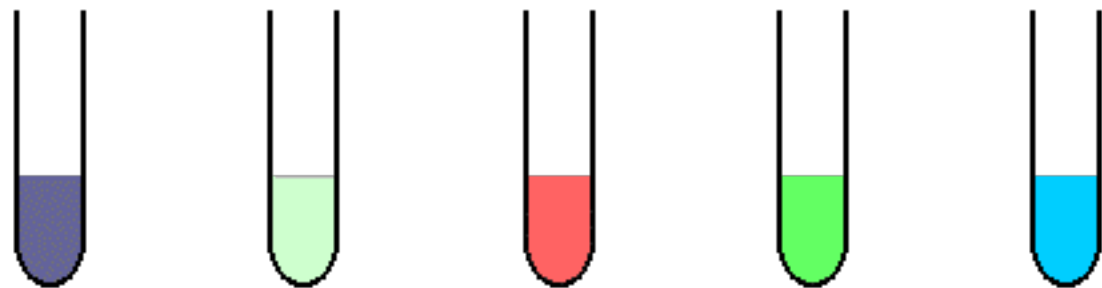
I metalli di transizione hanno orbitali d parzialmente pieni, gli elettroni quindi possono «saltare» da un orbitale d pieno ad uno vuoto.

Nei composti di coordinazione, l'interazione del metallo centrale con i leganti ad esso coordinati provoca una separazione tra i cinque orbitali d, che in assenza dei leganti hanno tutti la stessa energia.

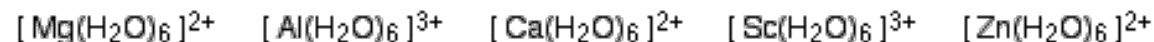
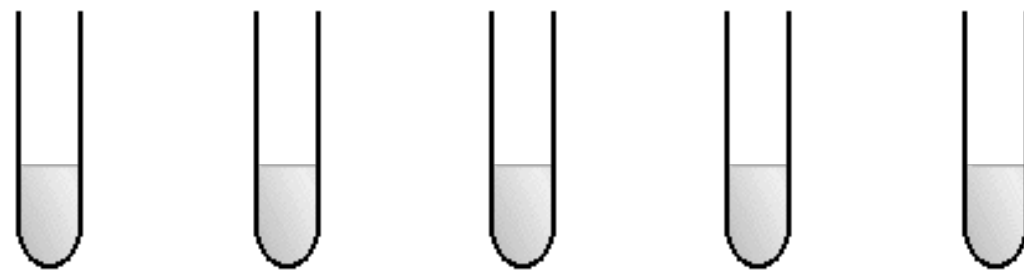
Anche le transizioni $d \rightarrow d^*$ sono osservabili nel visibile!

Lo stesso ragionamento vale per i metalli della serie f. Si parlerà di transizioni $f \rightarrow f^*$).

I complessi dei metalli di transizione sono colorati, poiché possiedono elettroni negli orbitali d. Le transizioni $d \rightarrow d^*$ assorbono luce visibile:



Al contrario, i complessi dei metalli alcalini e alcalino-terrosi sono incolori (non hanno elettroni in orbitali d):



L'esempio dello ione permanganato ...e le transizioni per trasferimento di carica

Lo ione permanganato ha un'intensa colorazione viola.

PROBLEMA: il manganese dello ione permanganato ha numero di ossidazione +7, quindi non ha elettroni d.

DOMANDA: Perché è colorato?!?!

Questa è un esempio di **transizione a trasferimento di carica** dove gli elettroni dell'ossigeno «saltano» in uno degli orbitali d (vuoti) del manganese!!!

Si parla di **trasferimento di carica intramolecolare** in quanto si verifica un vero e proprio trasferimento di elettroni dai leganti all'atomo centrale e viceversa

Le transizioni per trasferimento di carica sono le più intense dello spettro, perché sono dovute a veri e propri spostamenti di elettroni da una parte all'altra della molecola.

Anche i composti aromatici sostituiti presentano bande di questo tipo che cadono nell'intervallo 220-370 nm.

Vengono osservate quando si hanno:

- ✓ Composti di coordinazione
- ✓ Ioni di metalli di transizione (MnO_4^- , CrO_4^{2-})
- ✓ Complessi molecolari (I_2 -Benzene)

Si tratta di sostanze che assorbono nel visibile (colorate !!) in quanto si tratta di transizioni che producono forti variazioni nel momento dipolare della molecola.



**Composti contenenti
elettroni π**

Cromofori singoli
assorbono nel lontano
UV e non nel vicino UV
(solo assorbimento di
bassa intensità)

TABLE 7.3

Absorption Data for Isolated Chromophores						
Chromophoric Group	System	Example	$\lambda_{\max}$ (nm)	$\epsilon_{\max}$	Transition	Solvent
Ethylenic	RCH=CHR	Ethylene	165	15,000	$\pi \rightarrow \pi^*$	Vapor
			193	10,000	$\pi \rightarrow \pi^*$	
Acetylenic	R—C $\equiv$ C—R	Acetylene	173	6,000	$\pi \rightarrow \pi^*$	Vapor
Carbonyl	RR ₁ C=O	Acetone	188	900	$\pi \rightarrow \pi^*$	<i>n</i> -Hexane
			279	15	$n \rightarrow \pi^*$	
Carbonyl	RHC=O	Acetaldehyde	290	16	$n \rightarrow \pi^*$	Heptane
Carboxyl	RCOOH	Acetic acid	204	60	$n \rightarrow \pi^*$	Water
Amido	RCONH ₂	Acetamide	<208		$n \rightarrow \pi^*$	
Azomethine	>C=N—	Acetoxime	190	5,000	$\pi \rightarrow \pi^*$	Water
Nitrile	—C $\equiv$ N	Acetonitrile	<160		$\pi \rightarrow \pi^*$	
Azo	—N=N—	Azomethane	347	4.5	$n \rightarrow \pi^*$	Dioxane
Nitroso	—N=O	Nitrosobutane	300	100		Ether
			665	20		
Nitrate	—ONO ₂	Ethyl nitrate	270	12	$n \rightarrow \pi^*$	Dioxane
Nitro	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ -\text{N} \\ \parallel \\ \text{O} \end{array}$	Nitromethane	271	18.6	$n \rightarrow \pi^*$	Alcohol
Nitrite	—ONO	Amyl nitrite	218.5	1,120	$\pi \rightarrow \pi^*$	Petroleum ether
			346.5 ^a		$n \rightarrow \pi^*$	
Sulfoxide	S=O	Cyclohexyl methyl sulfoxide	210	1,500		Alcohol
Sulfone	$\begin{array}{c} \diagup \quad \diagdown \\ \text{S} \\ \diagdown \quad \diagup \\ \text{O} \end{array}$	Dimethyl sulfone	<180			

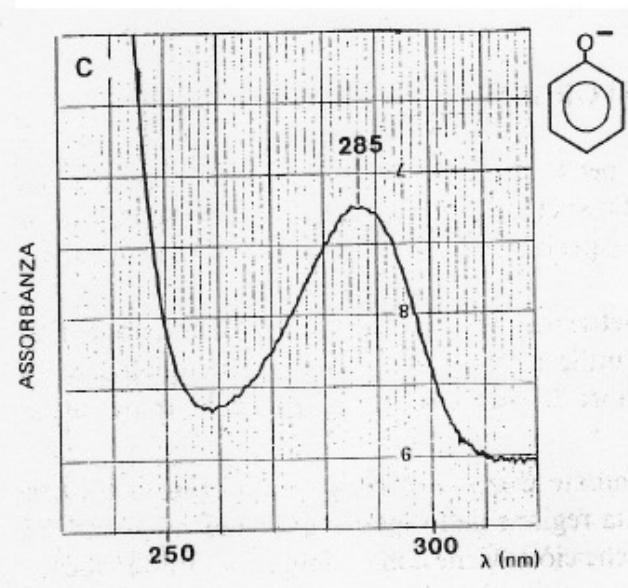
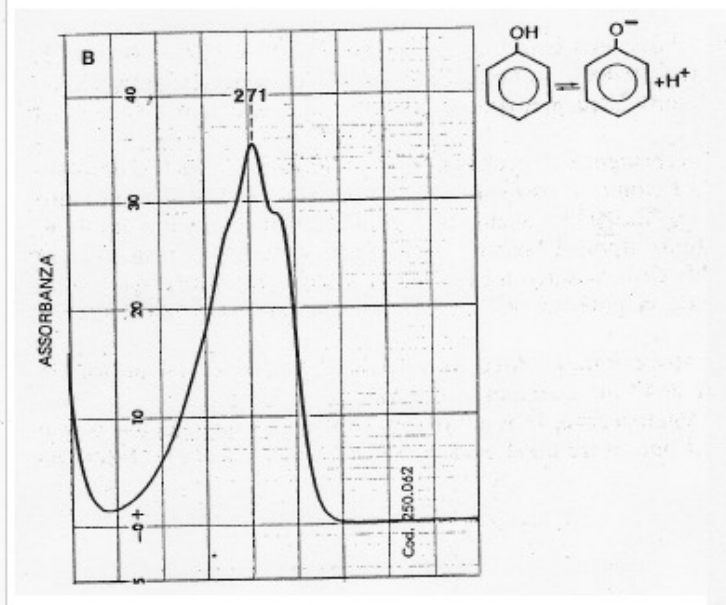
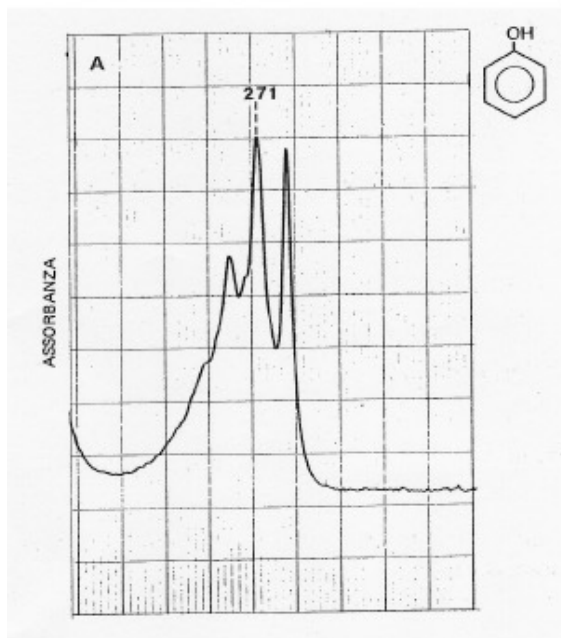
L'effetto del solvente

Ovviamente, poichè vale la legge di Lambert-Beer, **l'intensità delle bande di assorbimento dipenderà dalla concentrazione** e dal cammino ottico (ma la loro posizione resterà la stessa).

$$A = \epsilon b c$$

La posizione e la forma delle bande di assorbimento dipenderà invece da:

- dalla natura chimica del composto
- dal solvente
- dal pH



A) Fenolo in n-pentano
(assenza legami-H;
 $\lambda_{\text{max}} = 271\text{nm}$)

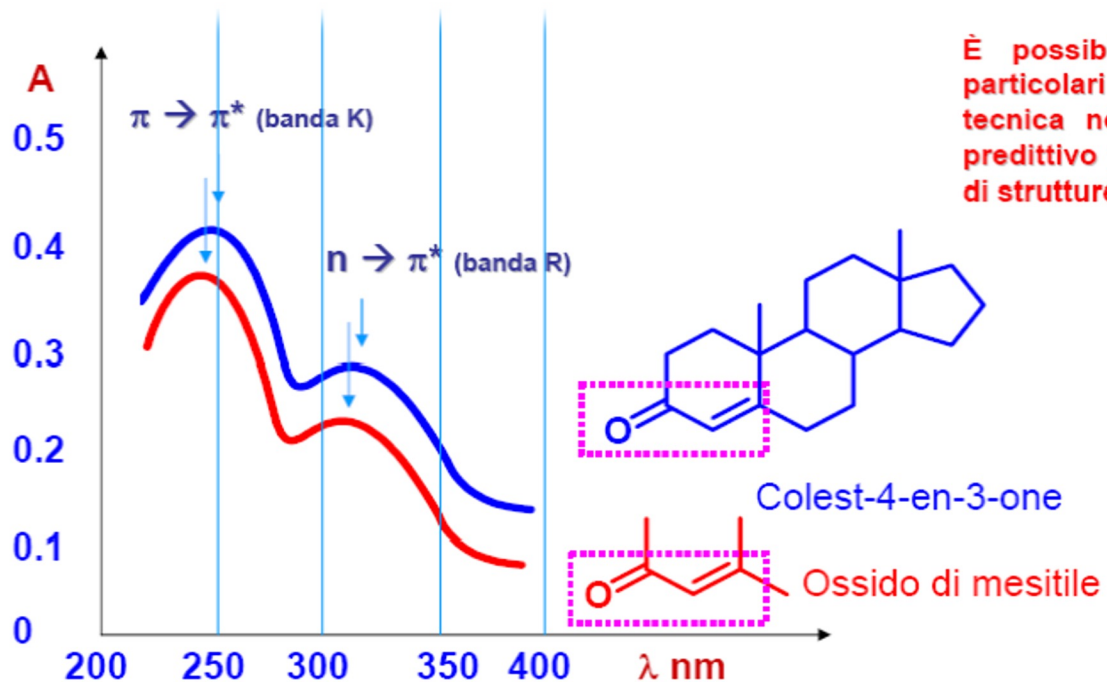
B) Fenolo in H₂O
(presenza di leg-H;
 $\lambda_{\text{max}} = 271\text{nm}$)

C) Fenolo in NaOH
(forma anionica;
 $\lambda_{\text{max}} = 285\text{nm}$)

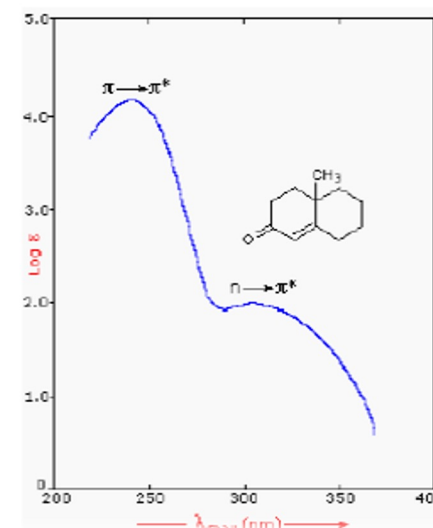
Vantaggi e Svantaggi della tecnica UV-VIS

L'esame degli assorbimenti caratteristici dei vari gruppi funzionali ha dimostrato che non sono numerosi i casi nei quali lo spettro elettronico risulta effettivamente utile.

La tecnica UV-Vis offre però un **aspetto molto vantaggioso**: in generale **la complessità molecolare non influisce sulla complessità spettrale**, pertanto è possibile individuare particolari raggruppamenti in molecole complesse, confrontando gli spettri con quelli di molecole più semplici.

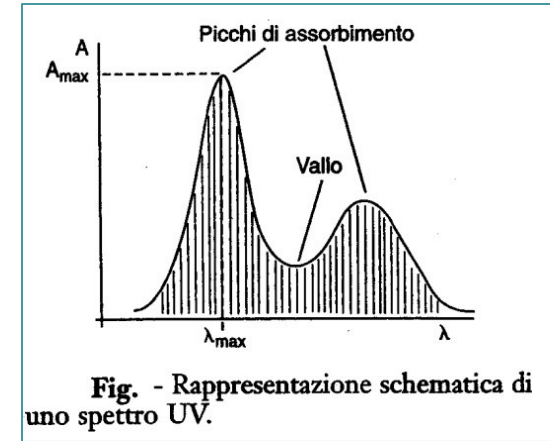


È possibile riconoscere solo particolari gruppi funzionali. La tecnica non ha elevato potere predittivo per la determinazione di strutture incognite.



Lo spettro UV-Visibile

Lo spettro UV-Vis di una molecola ha la forma di una (o più) banda allargata con un picco di massimo di assorbimento ($A_{\max}$) con la corrispondente lunghezza d'onda ($\lambda_{\max}$) e uno di minimo (valli). L'aspetto e l'intensità delle curve sono tipiche per ogni sostanza in quanto dipendono dal tipo di cromofori presenti nella molecola.



Gli spostamenti delle curve (effetti batocromo, ipsocromo, ipercromico e ipocromico) saranno dovuti perlopiù da fattori come:

- **estensione della coniugazione;**
- **solventi** (i solventi polari interagiscono con gli elettroni n abbassandone il livello energetico: es. legame idrogeno);
- **pH:** Le molecole a natura acida o basica sono influenzate dal pH della soluzione (acquosa); se si trovano in forma ionizzata, le bande di assorbimento risulteranno spostate rispetto la forma non ionizzata.

Lo spettrofotometro UV-VIS

Per quanto riguarda la **sorgente**, si tratta di lampade che emettono spettri in continuo (non a righe come nell'AAS) e si dividono in

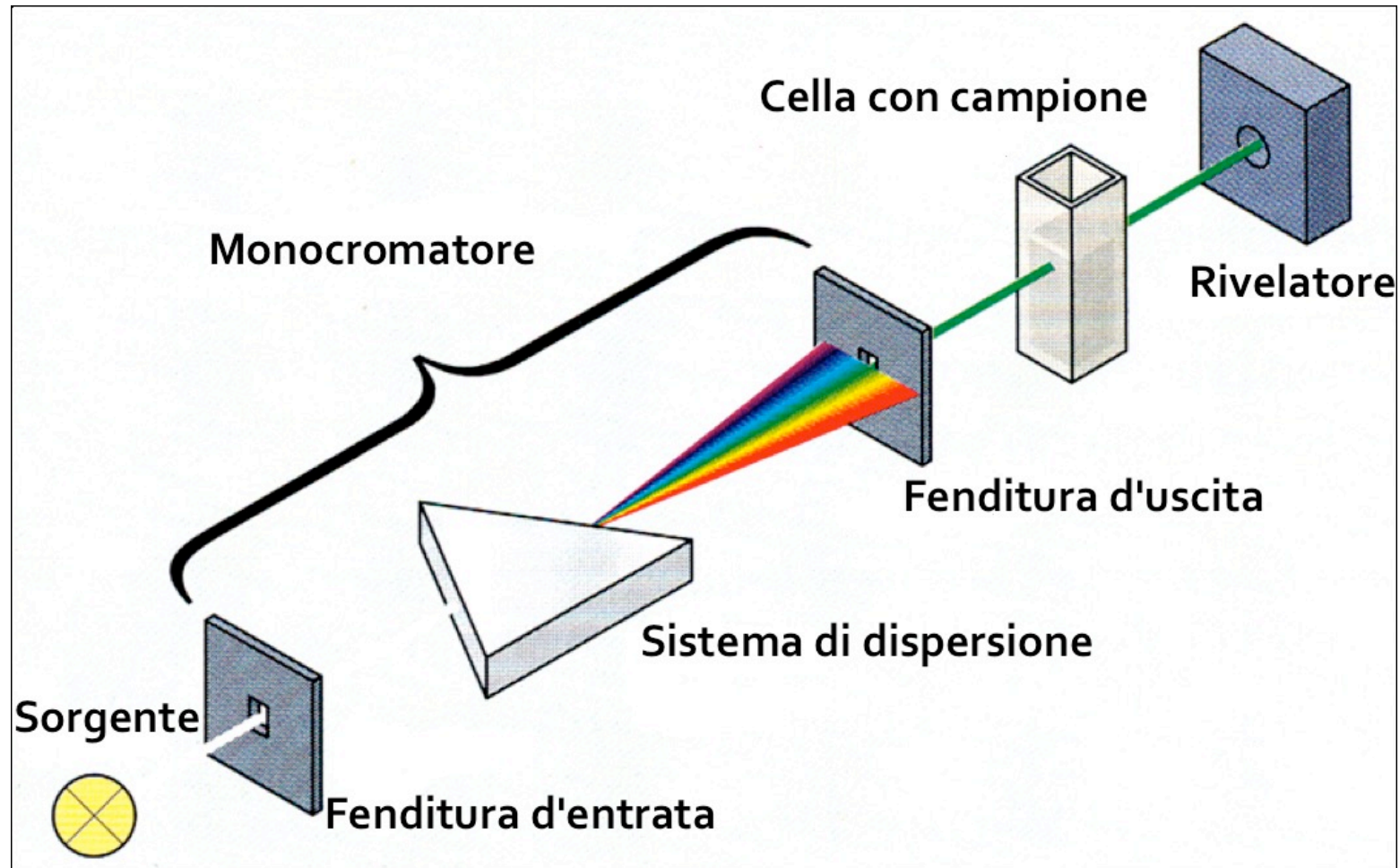
- ❑ lampade al tungsteno-alogeni che coprono la zona del visibile (200-1000 nm),
- ❑ lampade al deuterio per l'UV (160-375 nm).

Monocromatore prisma o reticolo (come per AAS).

Cella portacampione e' una cuvette di forma rettangolare con lato di 10 mm, assicurando così un cammino ottico $b = 1$ cm (si semplifica Lambert-Beer!).

Le più versatili ma anche più costose sono quelle in quarzo in quanto trasparenti sia nell'UV che nel visibile. Le cuvette di vetro o plastica non sono trasparenti sotto i 300 nm e quindi utilizzabili solo per il visibile.

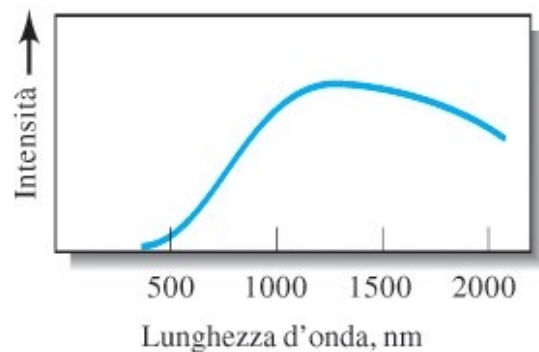
Il **rilevatore** puo' essere ad esempio un fototubo, un fotomoltiplicatore, o un fotodiodo.



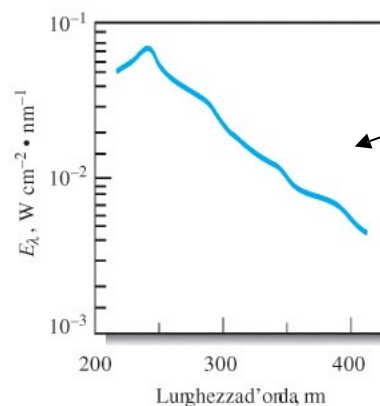
Sorgente

Si tratta di lampade che emettono spettri in continuo (non a righe come nell'AAS) e si dividono in lampade al tungsteno-alogeni che coprono la zona del visibile (200-1000 nm), e quelle al deuterio per l'UV (160-375 nm).

- ❖ regione del **visibile**. Si usano lampade a incandescenza come quelle a filamento di tungsteno. Coprono l'intervallo di lunghezza d'onda da 930 a 330 nm
- ❖ regione dell' **UV**. Si usano lampade a deuterio. Si tratta di lampade ad arco in cui il bulbo di quarzo è riempito di deuterio che, eccitato, emette uno spettro continuo di radiazioni al di sotto di 400nm.



Lampada al tungsteno



Lampada al D2

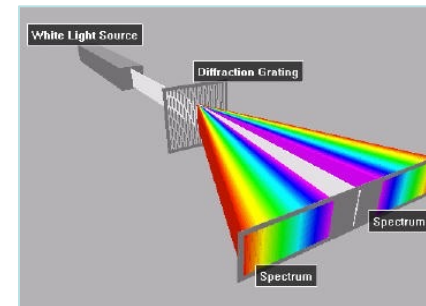
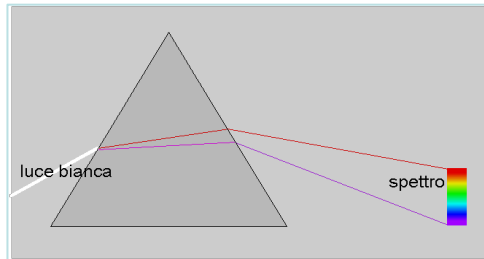
Monocromatore

Si tratta di un sistema che racchiude tra due fenditure il vero e proprio monocromatore che può essere del tipo:

- *a filtri* (ad assorbimento o ad interferenza), che danno bande passanti poco strette (30-250 nm per i primi e 45-100 nm i secondi) e permettono di misurare l'assorbanza ad una lunghezza d'onda alla volta (oppure devono esserci più filtri in serie); gli strumenti che li utilizzano sono detti fotometri o colorimetri (utilizzati per analisi quantitative).

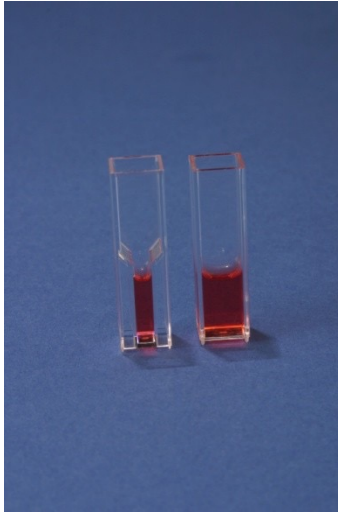


- *prisma o reticolo*, che permettono di selezionare bande strette e permettono di effettuare una scansione dello spettro in continuo passando da 200 a 800 nm senza interruzione (per spettrofotometri).

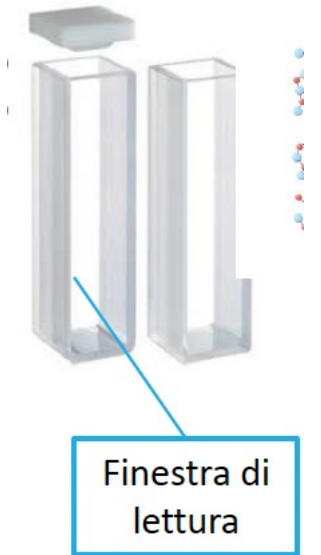


Cella portacampione

Si tratta di *cuvette* di forma rettangolare con lato di 10 mm, assicurando così un cammino ottico (b) = 1 cm. Le più versatili ma anche più costose sono quelle in quarzo in quanto trasparenti sia nell'UV che nel visibile. Le cuvette di vetro o plastica non sono trasparenti sotto i 300 nm e quindi utilizzabili solo per il visibile.



VETRO: 350-1000 nm
METACRILATO: 280-800 nm
POLISTIRENE: 340-800 nm
QUARZO: 160-2500 nm



Versioni per piccoli volumi (70-850 μ L) ma anche maggiori (2,5-4,5 mL)

SISTEMA DI AMPLIFICAZIONE E ELABORAZIONE DEI DATI

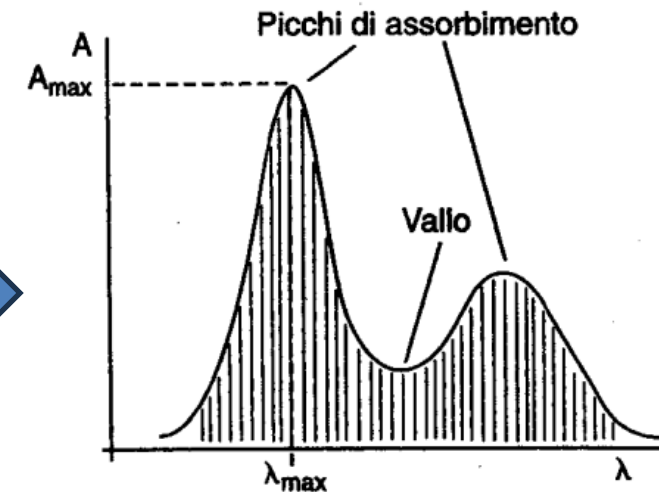
Il segnale proveniente dal rivelatore viene opportunamente amplificato e un amperometro ne rileva l'intensità.

Il lettore converte quindi il segnale elettrico in un valore numerico proporzionale all'intensità del segnale, e questo valore va da 0 a 100.

Ponendo pari a 100 il valore del segnale in assenza del campione, otteniamo la trasmittanza e da questa l'**assorbanza** tramite la nota relazione:

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

L'elaboratore mette in grafico l'assorbanza (A) contro la lunghezza d'onda (λ)

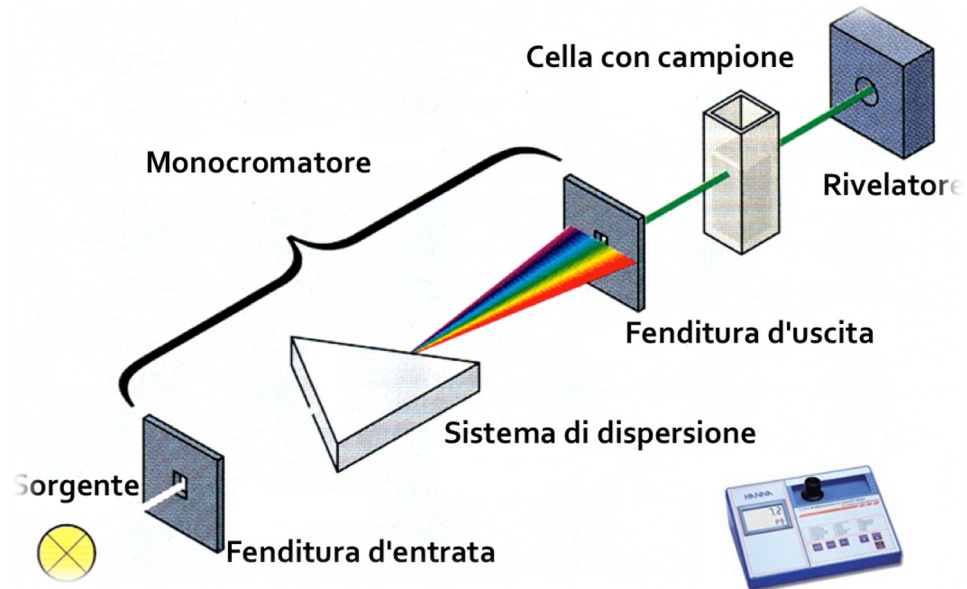


SPETTROFOTOMETRI MONORAGGIO

Usati prevalentemente in analisi quantitativa e non sono comodi per ottenere spettri di assorbimento.

La difficoltà sta nel fatto che per ogni misura, per ogni λ , si deve ripetere l'azzeramento contro il bianco, oppure registrare prima lo spettro del bianco, poi lo spettro del campione ed infine sottrarre al secondo il primo (procedura che può risultare macchinosa).

Sono anche detti COLORIMETRI.

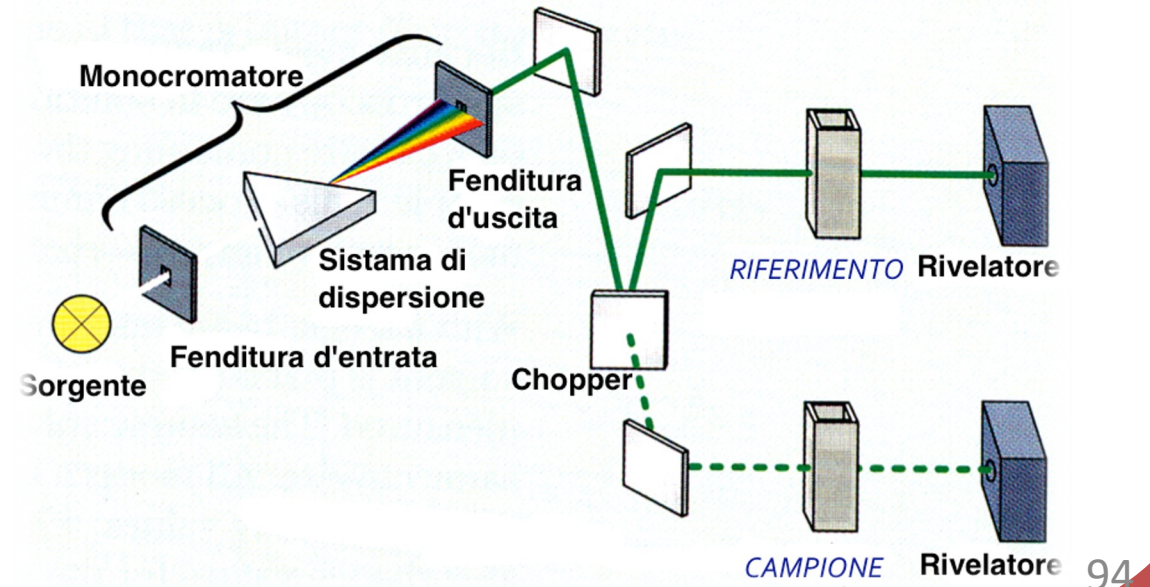


SPETTROFOTOMETRI A DOPPIO RAGGIO

Si ha invece un sistema che invia due raggi, identici per frequenza e intensità, uno attraverso il campione e l'altro attraverso il bianco, per cui si ha un confronto continuo tra l'assorbanza del campione e quella del bianco.

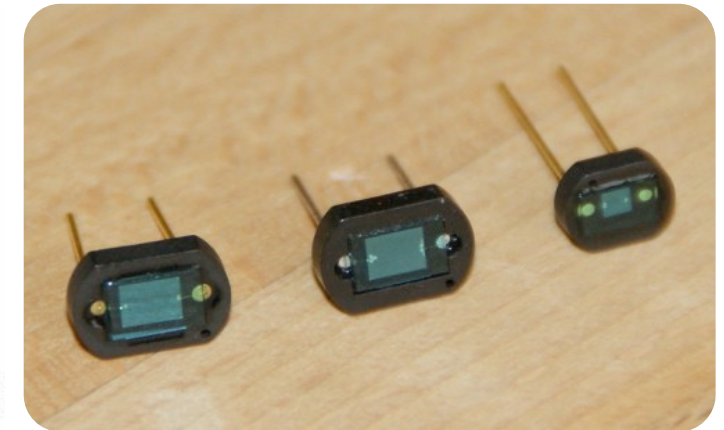
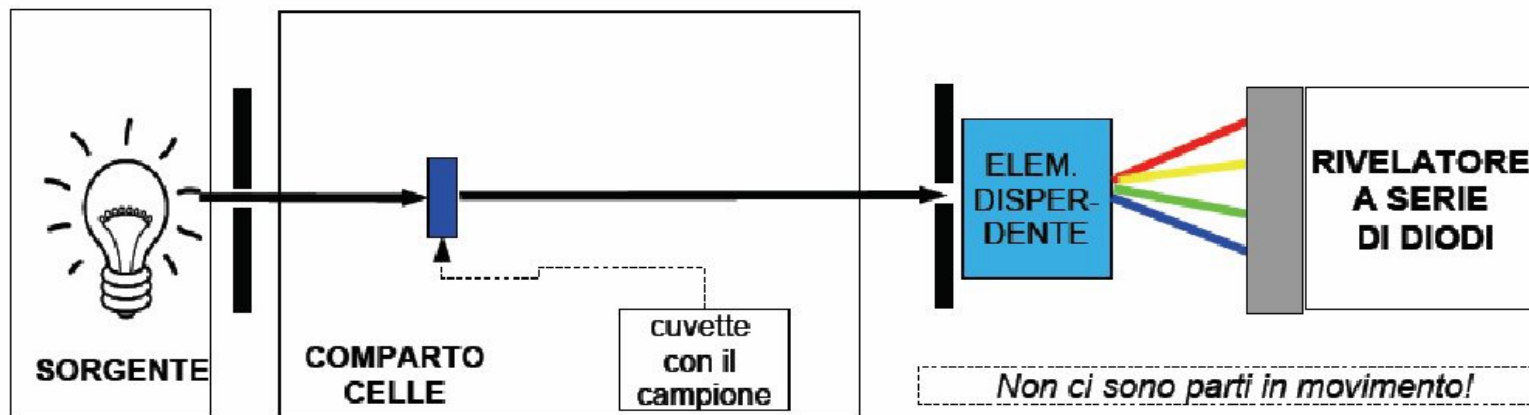
Grazie a queste caratteristiche è possibile effettuare misure a qualsiasi λ senza ripetere azzeramenti, e soprattutto registrare continuamente uno spettro di assorbimento (fondamentale ai fini qualitativi).

Per questo motivo il doppio raggio è preferito per le applicazioni qualitative sia in UV che in IR.



SPETTROFOTOMETRI SPETTROFOTOMETRO A SINGOLO RAGGIO A SERIE DI DIODI

Tali strumenti non hanno una risoluzione elevata, ma presentano però una caratteristica notevole: registrano simultaneamente (in 1/10 di secondo) tutto lo spettro (non ci sono parti in movimento che inviano le λ un po' per volta); grazie a questo sono adatti ad essere collegati all'uscita di strumenti di separazione di miscugli (tipo HPLC) in modo da registrare in tempo reale, secondo per secondo, l'intero spettro della miscela in uscita.

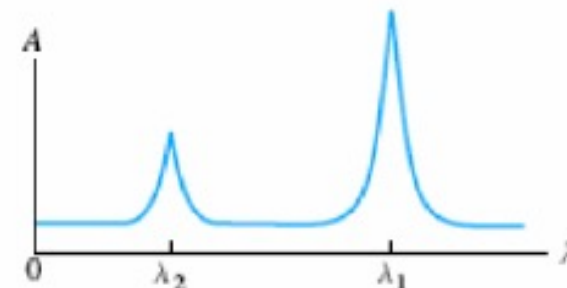
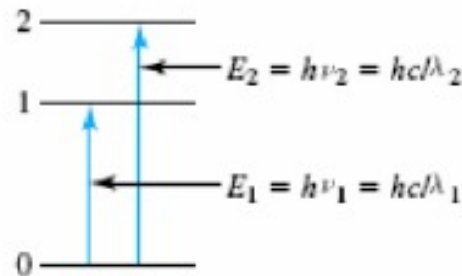
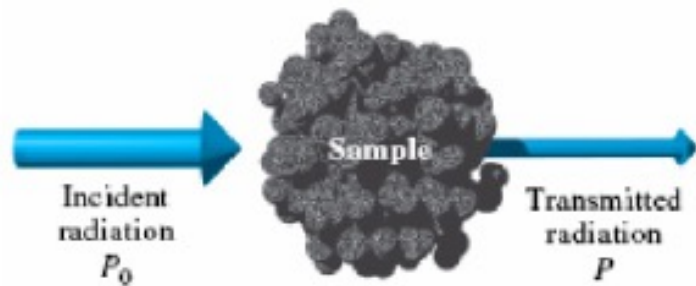


Il rivelatore di uno strumento di questo tipo è costituito da un chip con centinaia di fotodiodi allineati, ognuno dei quali misura la particolare banda di radiazione inviatagli dall'elemento dispersivo.

RIASSUMENDO

Nella spettroscopia UV-VIS il campione viene irraggiato con radiazioni UV e/o visibile .

- ❑ Le molecole che compongono il campione assorbono l'energia irradiata (se sono rispettate determinate condizioni).
- ❑ La risposta del campione viene registrata e, in base ai segnali raccolti, è possibile risalire alla composizione del campione in termini di molecole.
- ❑ Il tipo di interazione fornisce la risposta analitica:
 - ✓ qualitativa: tramite identificazione attraverso le lunghezze d'onda assorbite ($\lambda_{\max}$)
 - ✓ quantitativa : tramite retta di calibrazione e interpolazione (legge di Lambert-Beer $A = \epsilon bc$)



Metodi spettroscopici:

SPETTROSCOPIA DI ASSORBIMENTO UV-VIS

Analisi quantitativa: legge di Lambert Beer

La diminuzione di intensità della radiazione (I_0) dipende da quante molecole incontra la radiazione che non dipende solo dalla concentrazione (c) ma anche dalla lunghezza del cammino che deve percorrere il raggio (l), più lungo è, più molecole incontra.

$$-\frac{dI}{dl} = K c I_0$$

$$-dI = K c I_0 dl$$

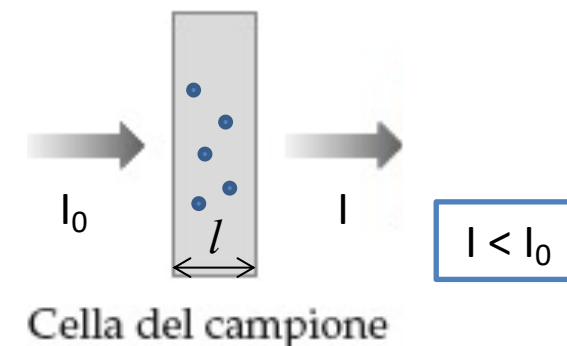
$$-\frac{dI}{I_0} = K c dl$$

che come integrale diventa

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

Ossia: $-\ln \frac{I}{I_0} = K c l \longrightarrow \log \frac{I_0}{I} = a c l \longrightarrow \log \frac{1}{T} = a c l$

Dove: $\frac{I}{I_0} = T$ (Trasmittanza)



$$A = a c l$$

A = assorbanza

Analisi quantitativa: legge di Lambert Beer

$$A = a c l$$

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

Se c è espressa in mol/L, a si definisce come **assorbività molare**
(coeff. di estinzione molare, ϵ in $\text{cm}^{-1}\text{M}^{-1}$)

$$A = \epsilon c l$$

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.

Assorbività molare, ϵ (cm⁻¹M⁻¹)

$$A = \epsilon c l$$

riflette la capacità di una molecola di assorbire la radiazione, ovvero la probabilità che l'interazione tra i fotoni di opportuna lunghezza d'onda e la molecola dia luogo ad assorbimento

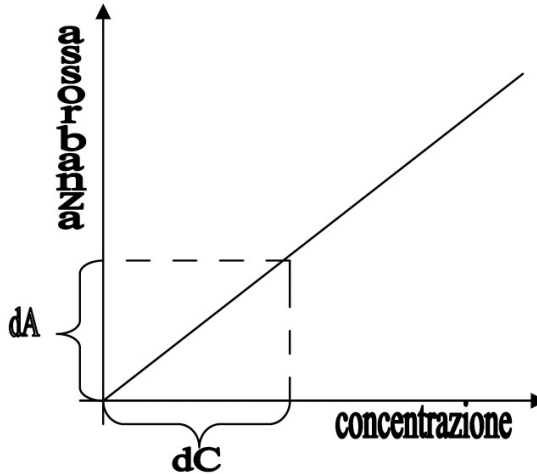
Dipende da:

- specie chimica che dà l'assorbimento
- lunghezza d'onda utilizzata $A_{\lambda} = \epsilon^{\lambda} c l$
- solvente
- indice di rifrazione
- pH

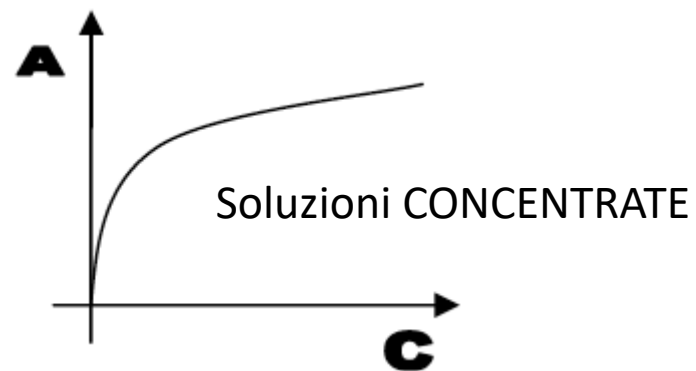
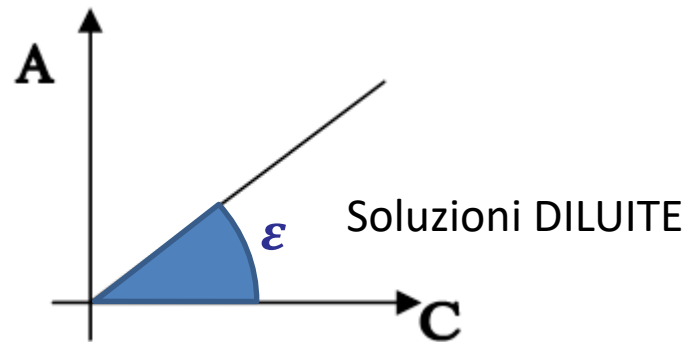
Ricordiamo infine che l'espressione $A = \varepsilon c l$ è l'equazione che descrive una retta passante per l'origine, dove, per un percorso ottico unitario ($l = 1$ cm), il coefficiente angolare corrisponde proprio al coefficiente di estinzione molare ε .

In caso di linearità ε può essere
calcolato come pendenza della
retta **assorbanza** vs.
concentrazione

$$\varepsilon = \frac{\Delta A}{\Delta c}$$



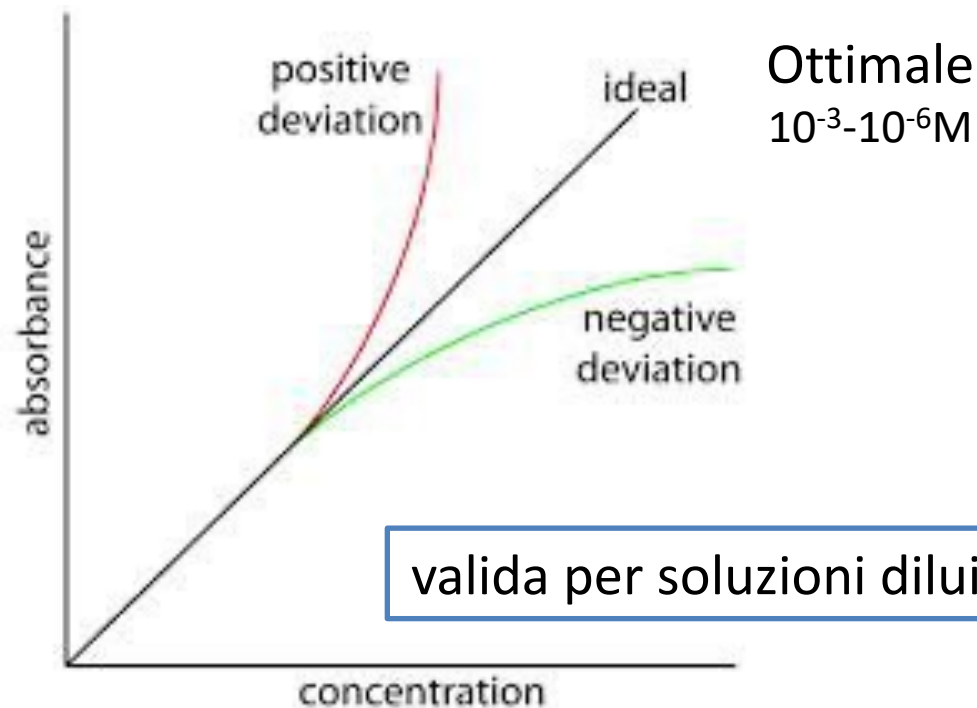
$$\varepsilon = dA / dC$$



La legge di Lambert-Beer è lineare (ovvero ha l'andamento di una retta) fino a certi valori di concentrazione, oltre i quali l'andamento devia dalla linearità.

Il discostamento dalla linearita' può essere dovuto a fattori strumentali, e a fattori chimici quali:

- ☐ Modificazioni della sostanza a causa di fenomeni come polimerizzazioni o dissociazioni in soluzione.
- ☐ Alterazione del pH e quindi della forma di associazione della sostanza (in particolare per acidi/basi).
- ☐ Luce non perfettamente monocromatica.
- ☐ Presenza di sostanze assorbenti o fluorescenti.
- ☐ Variazioni dell'indice di rifrazione con la concentrazione (= maggior dispersione).

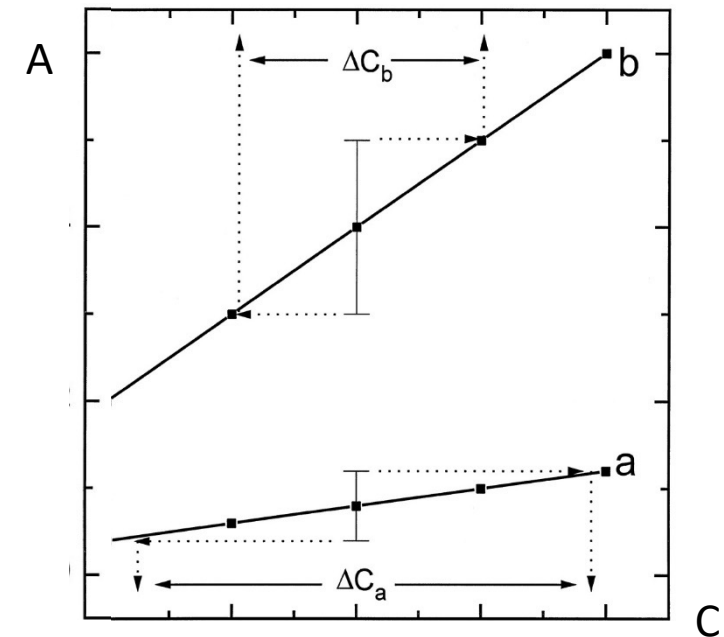
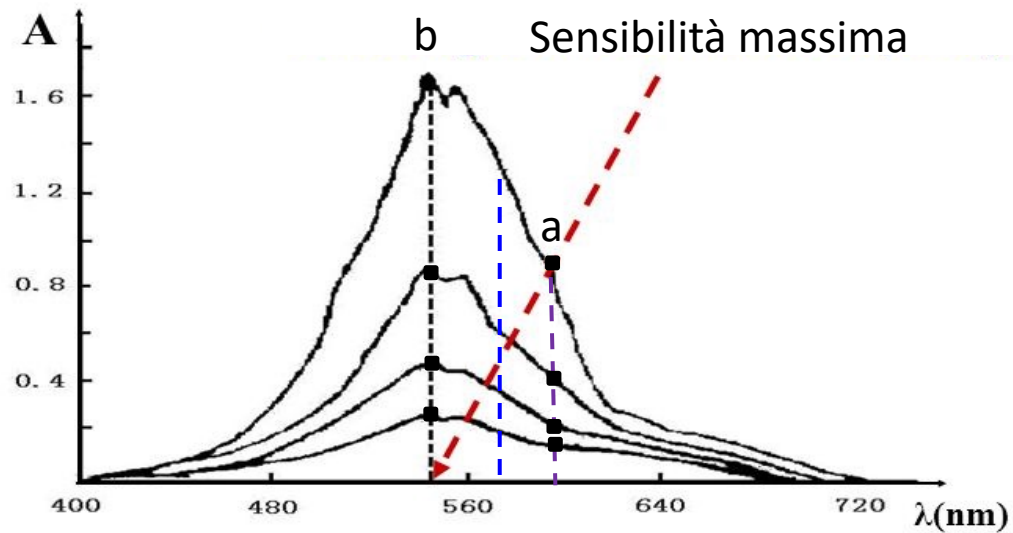


In laboratorio tipicamente si lavora utilizzando solventi non assorbenti, luce il più monocromatica possibile e alte diluizioni.

- Scelta della lunghezza d'onda λ

Misure con elevata sensibilità

Misura di A alla λ del massimo di assorbimento



- **Scelta della radiazione monocromatica**

Si assume che la luce utilizzata sia monocromatica
(mai vero, comunque più ristretta possibile)

Misura di A alla λ del massimo di assorbimento

$$A = \epsilon c l$$

La deviazione della legge di Beer è irrilevante fino a quando la variazione di ϵ è minima rispetto all'intervallo di lunghezze d'onda utilizzato. Anche per questo si misura al massimo del picco di assorbimento dove praticamente ϵ è costante.

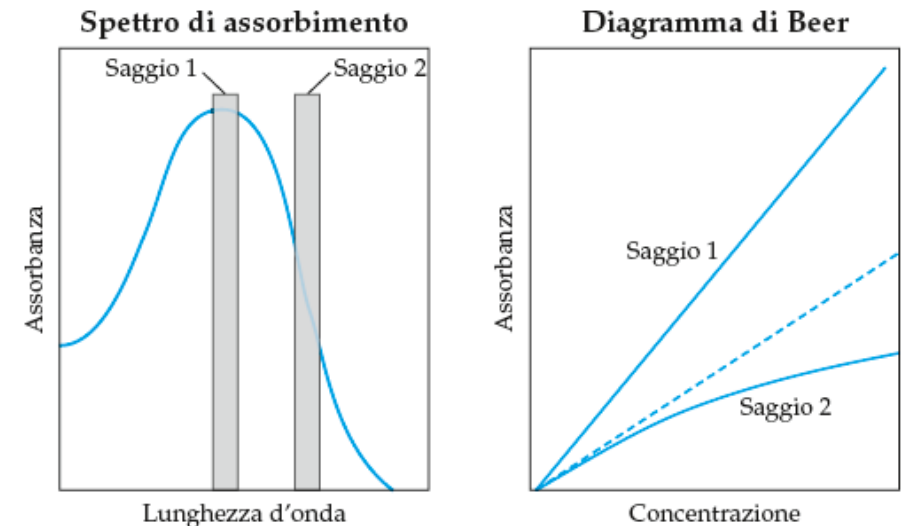


FIGURA 17.20 Effetti della luce policromatica sui grafici ottenuti secondo la legge di Beer.

- Scelta del cammino ottico

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



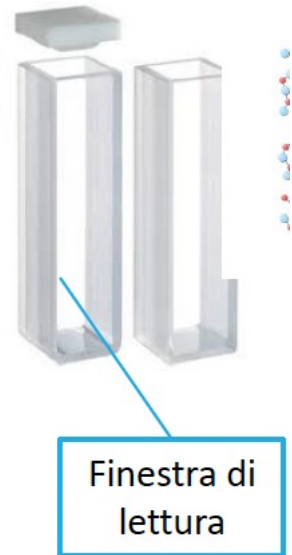
Cammino ottico costante (porta campione quadrato)

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



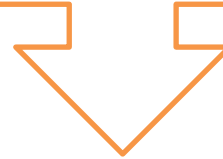
Soluzione omogenea

Si assume che la luce non venga diffusa dal campione



- **Scelta del solvente**

Quando la soluzione contiene più specie assorbenti, l'assorbimento sarà la **somma** dei contributi delle varie specie (proprietà additiva)



L'assorbimento di altre specie o del solvente devono essere trascurabili alla lunghezza d'onda utilizzata

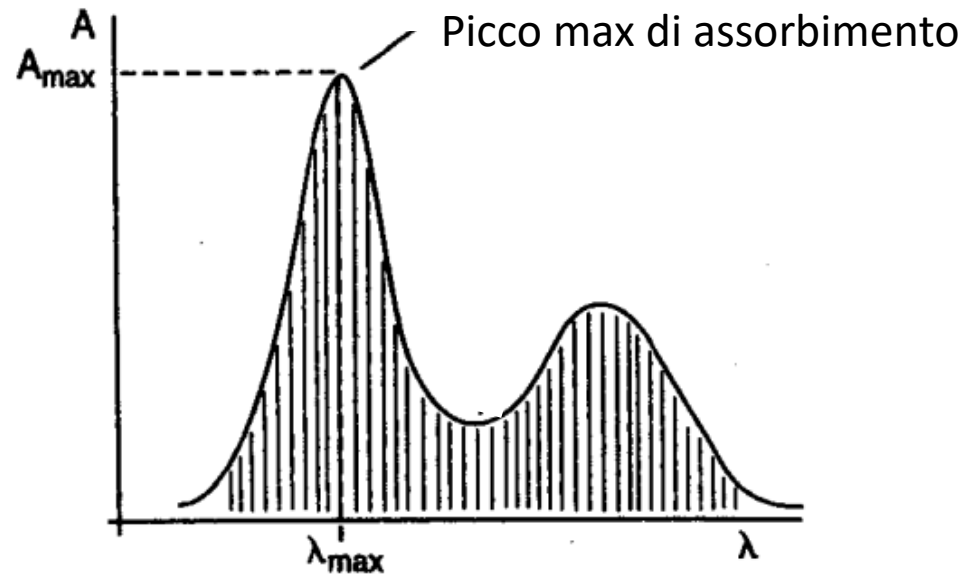
Assorbimento di solventi nel range UV

	UV Cutoff (nm)
Acetonitrile UV	190
Pentane	190
Water	190
Hexane UV	195
Cyclopentane	198
Cyclohexane	200
Heptane	200
Isopropyl Alcohol	205
Methanol	205
Ethyl Alcohol	210
2-Methoxyethanol	210
Methyl <i>t</i> -Butyl Ether	210
<i>n</i> -Propyl Alcohol	210
Trifluoroacetic Acid	210
Tetrahydrofuran UV	212
<i>n</i> -Butyl Alcohol	215
1,4-Dioxane	215
Ethyl Ether	215
Iso-Octane	215
<i>n</i> -Butyl Chloride	220
Glyme	220
Isobutyl Alcohol	220
Propylene Carbonate	220
Ethylene Dichloride	228
1,1,2-Trichlorotrifluoroethane	231

Dichloromethane	233
Chloroform	245
<i>n</i> -Butyl Acetate	254
Ethyl Acetate	256
Dimethyl Acetamide	268
<i>N,N</i> -Dimethylformamide	268
Dimethyl Sulfoxide	268
Toluene	284
<i>N</i> -Methylpyrrolidone	285
Chlorobenzene	287
<i>o</i> -Xylene	288
<i>o</i> -Dichlorobenzene	295
1,2,4-Trichlorobenzene	308
Methyl Ethyl Ketone	329
Acetone	330
Methyl Isoamyl Ketone	330
Methyl <i>n</i> -Propyl Ketone	331
Methyl Isobutyl Ketone	334

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 λ di lavoro che verrà mantenuta costante (legge di L-B). Si sceglie il massimo di assorbimento.



Procedura di analisi quantitativa: determinazione della concentrazione di un analita

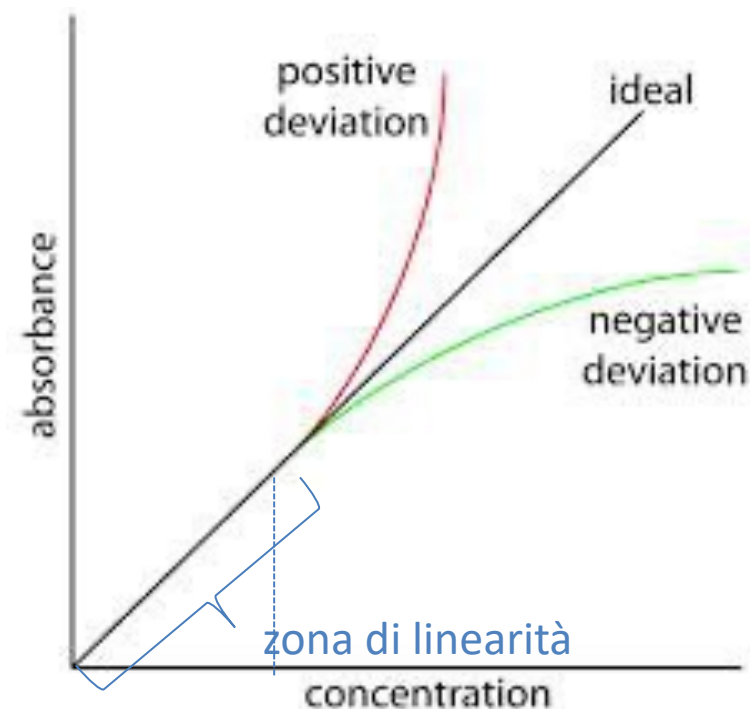
2. Si verifica la legge di Lambert Beer. Si controlla che effettivamente un range di concentrazioni sia rappresentato da una retta che passa per l'origine. Se non passa per l'origine:

- Contenitore sporco
- Solvente che assorbe a quella λ
- Strumento non allineato

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

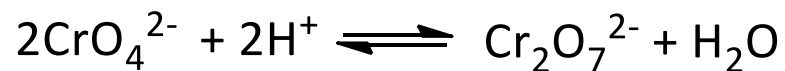
Le deviazioni possono essere **positive** o **negative** e possono essere dovute ad:

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



Procedura di analisi quantitativa: determinazione della concentrazione di un analita

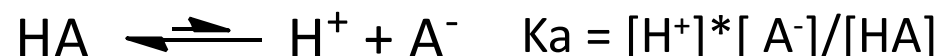
- Le **cause chimiche** possono essere:
 - Associazioni ioniche: alcuni composti sono suscettibili a variazioni di pH (cromato e bicromato).



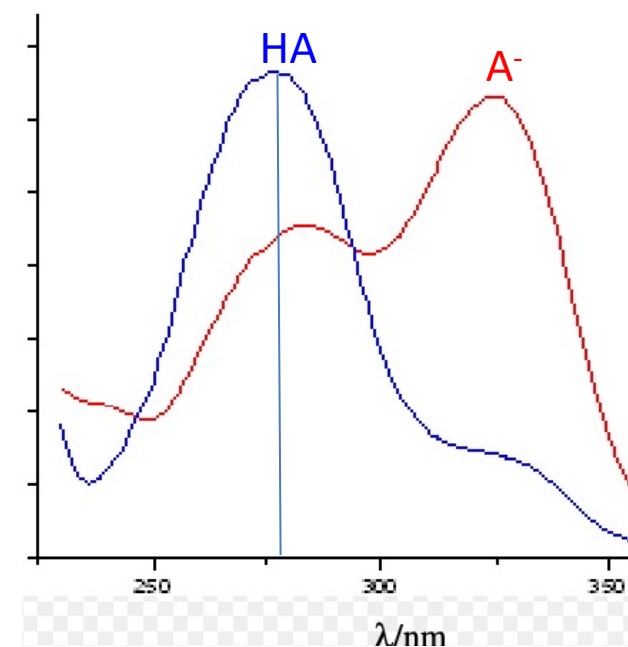
giallo
375 nm

rosso-arancio
350-450 nm

- Reazioni acido-base del tipo



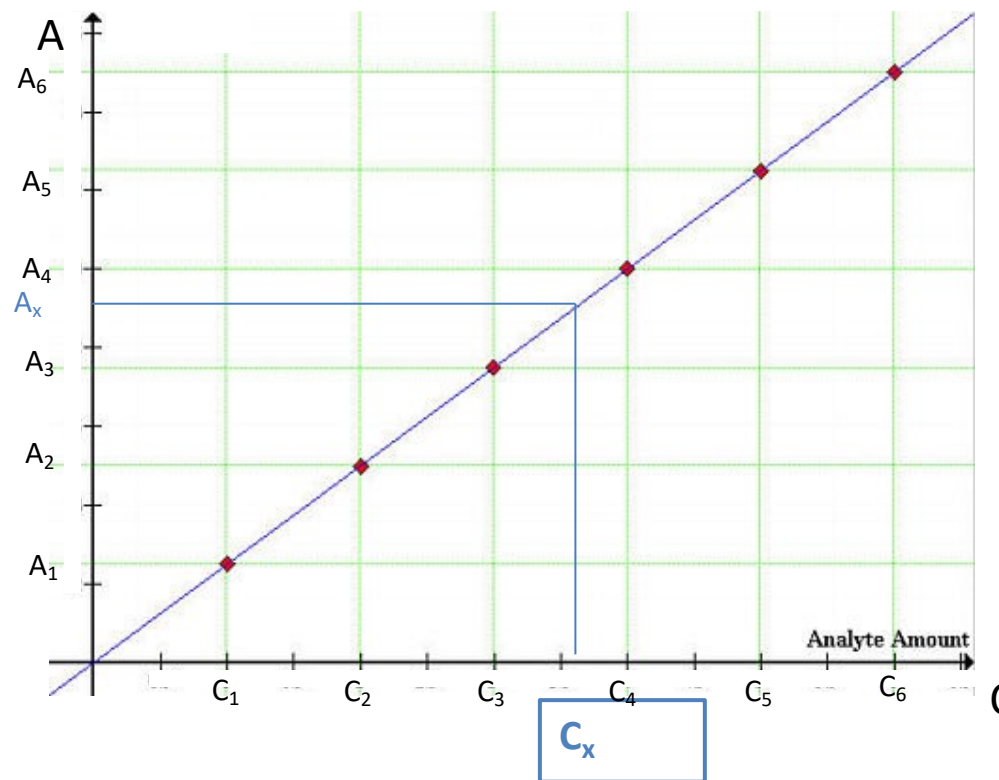
All'aumentare della diluizione HA è sempre più dissociato, se HA e A⁻ hanno comportamenti diversi si potrebbe avere la situazione in cui ad una certa concentrazione si pensa di determinare solo HA ma invece c'è anche A⁻.



Procedura di analisi quantitativa: determinazione della concentrazione di un analita

3. 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



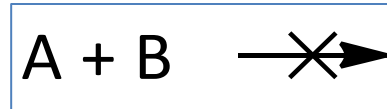
4. La retta di taratura risolve anche il problema della determinazione della soluzione a concentrazione incognita. Si misura l'A e si ricava graficamente C_x .

Procedura di analisi quantitativa: riassumendo

- Con la spettroscopia UV-VIS si analizzano soluzioni 10^{-4} - 10^{-5} - 10^{-6}
- Spesso la scarsa solubilità è un limite per altre tecniche strumentali, anche perché obbligano ad usare l'acqua come solvente. In UV si usano comunque soluzioni molto diluite
- 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

❖ Determinazione di miscele di analiti che NON interagiscono tra di loro

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



Quali saranno le concentrazioni rispettivamente $C_A = ?$ e $C_B = ?$

Servono due equazioni indipendenti, cioè due Lambert-Beer diverse, ossia usando due λ 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 e B, avremo quindi:

$A = A_A + A_B = l(\varepsilon_A c_A + \varepsilon_B c_B)$ ci sono quattro incognite lavorando a due λ diverse λ_1 e λ_2 si ha:

$$\begin{array}{ll} \text{per } \lambda_1 & A_1 = l(\varepsilon_A^1 c_A^1 + \varepsilon_B^1 c_B^1) \\ \text{per } \lambda_2 & A_2 = l(\varepsilon_A^2 c_A^2 + \varepsilon_B^2 c_B^2) \end{array}$$

per λ_1 sarà $A_1 = l(\varepsilon_A^1 c_A + \varepsilon_B^1 c_B)$

per λ_2 sarà $A_2 = l(\varepsilon_A^2 c_A + \varepsilon_B^2 c_B)$

si risolve il sistema e si ottiene:

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

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

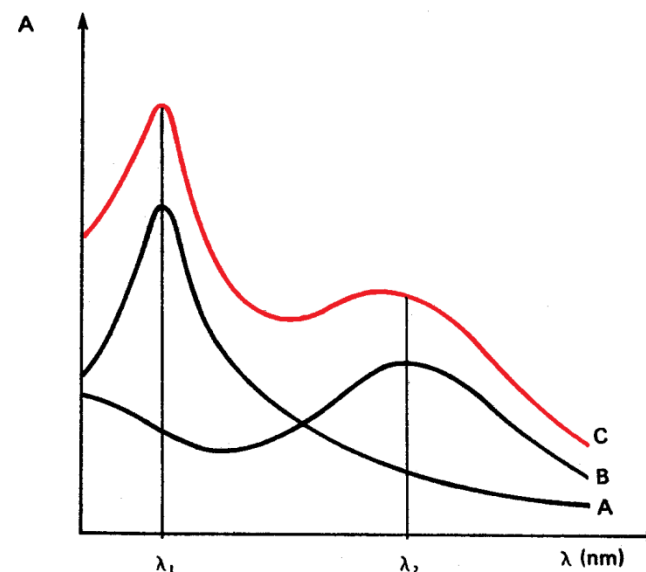


Figura Lo spettro di assorbimento C di una miscela di due composti risulta essere la somma degli spettri dei singoli composti (A e B).

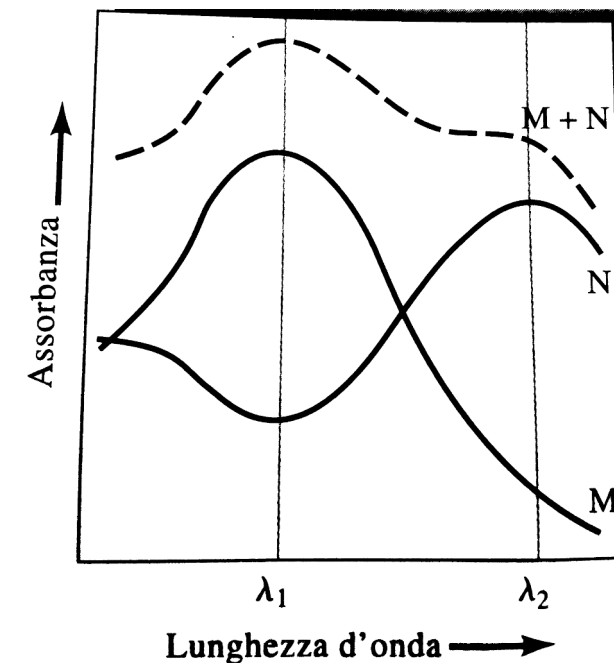
- Pertanto è necessario conoscere $\varepsilon_A^1 \varepsilon_B^1 \varepsilon_A^2 \varepsilon_B^2$, questi si possono ricavare operando a λ_1 e λ_2 sui composti puri A e B
- Le due lunghezze d'onda si scelgono dove c'è assorbimento di entrambe le specie

- 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

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

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

- Le due specie si comportano indipendentemente l'una dall'altra (NON INTERAZIONI)
- 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



❖ Determinazione di miscele di analiti che INTERAGISCONO tra di loro



$$K_{eq} = [AB]/[A][B]$$

Si determinano le concentrazioni all'equilibrio, ma bisogna conoscere K_{eq}

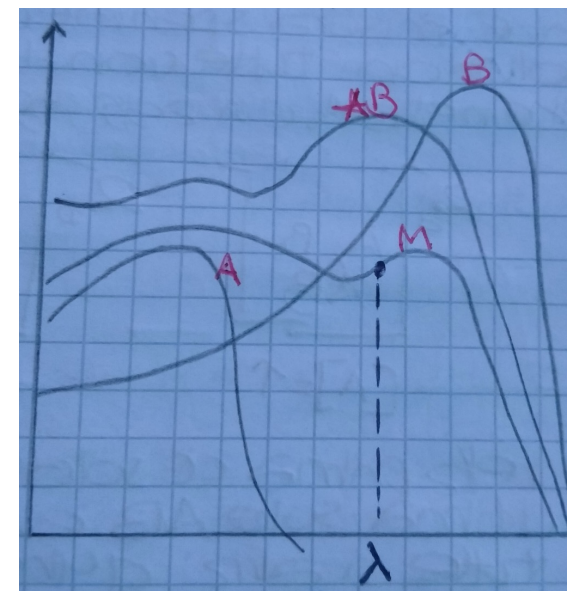
M = miscela di A, B e AB all'equilibrio

Come si vede non è la somma punto per punto delle tre curve delle specie pure.

Per risolvere il sistema si sceglie una λ dove una delle specie non assorbe (perché ϵ è zero)

Quindi alla λ prescelta si avrà:

$$A_{TOT} = A_A + A_B + A_{AB} = I(\cancel{\epsilon_A[A]} + \epsilon_B[B] + \epsilon_{AB}[AB]) = I(\epsilon_B[B] + \epsilon_{AB}[AB])$$



$$A_{\text{TOT}} = A_A + A_B + A_{AB} = l(\varepsilon_A[A] + \varepsilon_B[B] + \varepsilon_{AB}[AB]) = l(\varepsilon_B[B] + \varepsilon_{AB}[AB])$$

$$C_A = [A] + [AB]$$

$$C_B = [B] + [AB]$$

A_{TOT} può essere espressa con una Lambert-Beer che però ha una ε finta, è una proprietà specifica di una specie, non di una miscela:

$A_{\text{TOT}} = l\varepsilon C_B$ C_B infatti comprende sia B che AB

$$l(\varepsilon_B[B] + \varepsilon_{AB}[AB]) = l\varepsilon C_B$$

$(\varepsilon_B[B] + \varepsilon_{AB}[AB]) = \varepsilon C_B$ in cui $[B] = C_B - [AB]$ e $[AB] = C_B - [B]$ e sostituendo si ha:

$$\varepsilon C_B = \varepsilon_B[B] + \varepsilon_{AB}C_B - \varepsilon_{AB}[B] \text{ per cui } [B] = \frac{\varepsilon C_B - \varepsilon_{AB}C_B}{\varepsilon_B - \varepsilon_{AB}}$$

$$\varepsilon C_B = \varepsilon_B C_B - \varepsilon_B[AB] + \varepsilon_{AB}[AB] \text{ per cui } [AB] = \frac{\varepsilon C_B - \varepsilon_B C_B}{\varepsilon_{AB} - \varepsilon_B}$$

Concettualmente



$$K_{eq} = [AB]/[A][B]$$

$$[B] = \frac{\epsilon C_B - \epsilon_{AB} C_B}{\epsilon_B - \epsilon_{AB}}$$

$$[AB] = \frac{\epsilon C_B - \epsilon_B C_B}{\epsilon_{AB} - \epsilon_B}$$

sostituendo in K_{eq}

$$K_{eq} = \frac{1}{[A]} \frac{\cancel{C_B}(\epsilon - \epsilon_B)}{\epsilon_{AB} - \epsilon_B} \frac{-(\epsilon_{AB} - \epsilon_B)}{\cancel{-C_B}(\epsilon - \epsilon_{AB})}$$

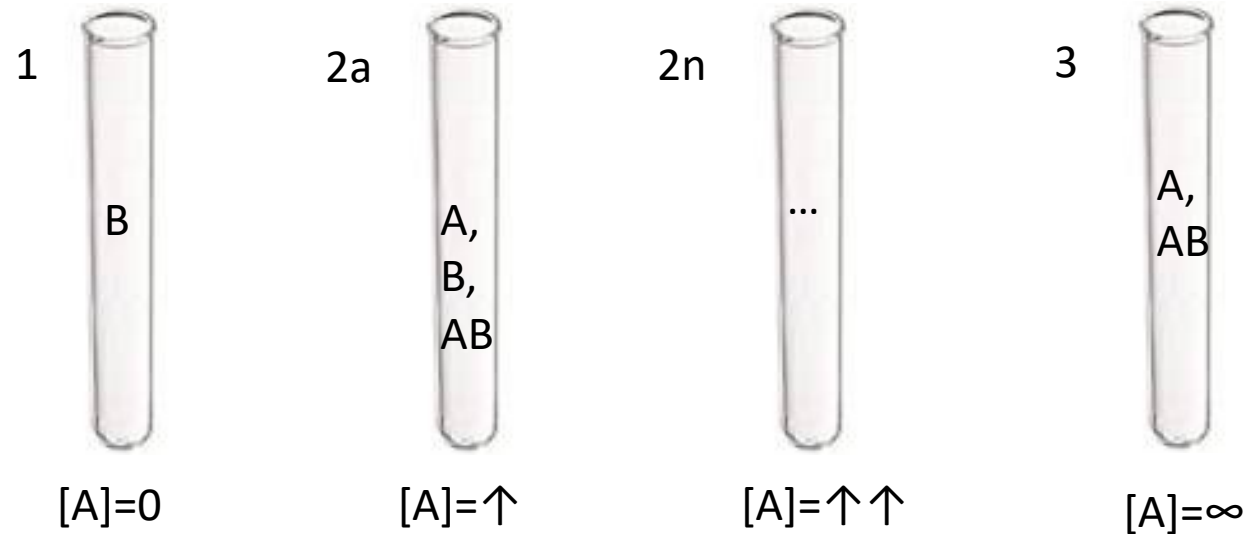
$$K_{eq} = \frac{1}{[A]} \frac{\epsilon - \epsilon_B}{\epsilon_{AB} - \epsilon}$$

In questo modo si è riusciti ad esprimere la K_{eq} in funzione di $[A]$, ma gli altri tre coefficienti non sono misurabili sperimentalmente.

Sono però riconducibili a delle Lambert-Beer in cui rappresentano la pendenza, per cui si ricavano da misure di A sperimentali.

Sperimentalmente

Si preparano delle soluzioni con la stessa C_B nota e poi nella prima non si mette A, che invece viene aggiunto in quantità crescenti nelle altre. Nell'ultima provetta (3) B avrà reagito tutto per dare AB per cui non sarà presente.



Misurando l'assorbanza in tutte si avrà:

$A_A = 0$ alla λ esaminata A non assorbe

$$1. A_B = l \varepsilon_B C_B$$

$$\varepsilon_B = \frac{A_B}{l C_B}$$

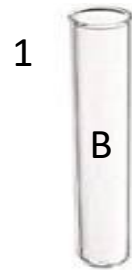
$$2. A_{TOT} = \cancel{A_A} + A_B + A_{AB} = l \varepsilon C_B$$

$$\varepsilon = \frac{A_{TOT}}{l C_B}$$

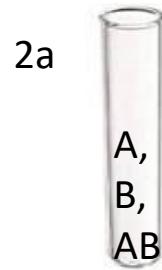
$$3. A_{TOT} = \cancel{A_A} + A_{AB} = l \varepsilon_{AB} C_B$$

$$A_{AB} = l \varepsilon_{AB} C_{AB}$$

$$\varepsilon_{AB} = \frac{A_{AB}}{l C_B}$$



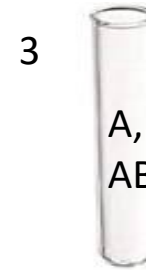
[A]=0



[A]=↑



[A]=↑↑



[A]=∞

Essendo:

$$K_{eq} = \frac{1}{[A]} \frac{\varepsilon - \varepsilon_B}{\varepsilon_{AB} - \varepsilon}$$

diventa

$$K_{eq} = \frac{1}{[A]} \frac{\frac{A_{TOT}}{l C_B} - \frac{A_B}{l C_B}}{\frac{A_{AB}}{l C_B} - \frac{A_{TOT}}{l C_B}} = \frac{1}{[A]} \frac{A_{TOT} - A_B}{A_{AB} - A_{TOT}}$$

L'eq è spostato tutto a dx

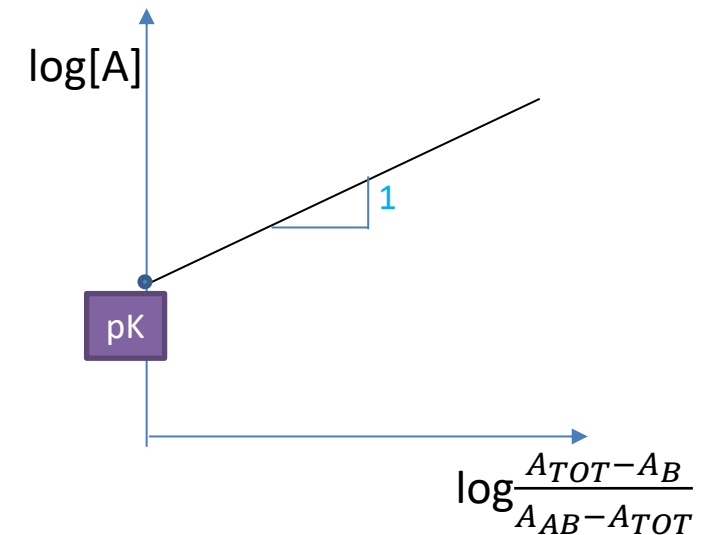
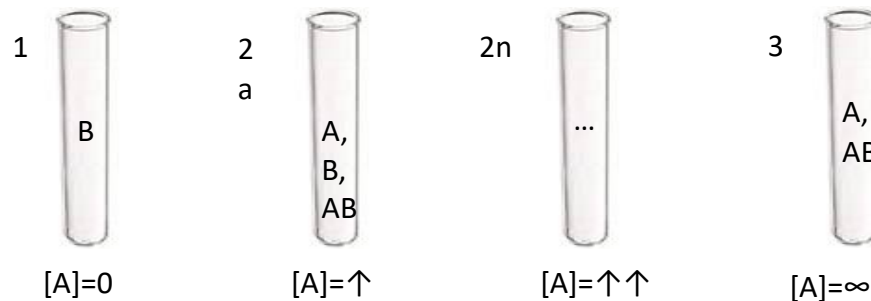


$$K_{eq} = \frac{1}{[A]} \frac{A_{TOT} - A_B}{A_{AB} - A_{TOT}}$$

Quindi, in termini logaritmici: $\log K_{eq} = -\log[A] + \log \frac{A_{TOT} - A_B}{A_{AB} - A_{TOT}}$

$\log[A] = -\log K_{eq} + \log \frac{A_{TOT} - A_B}{A_{AB} - A_{TOT}}$ questa è una retta con intercetta $-\log K_{eq}$ (pK)

Pertanto basta misurare l'assorbanza al punto 1 (A_B) qualche punto 2 (A_{TOT}) e poi al punto 3 (A_{AB}) per costruire una retta



Caso di un indicatore acido-base



allora K_{eq} è $1/K_a = [HA]/[H^+][A^-]$

Quindi dall'equazione precedente:

$$\log[H^+] = -\log \frac{1}{K_a} + \log \frac{A - A_{A^-}}{A_{HA} - A} \quad \text{ossia invertendo i segni:}$$

$$pH = pK_a + \log \frac{A_{HA} - A}{A - A_{A^-}}$$

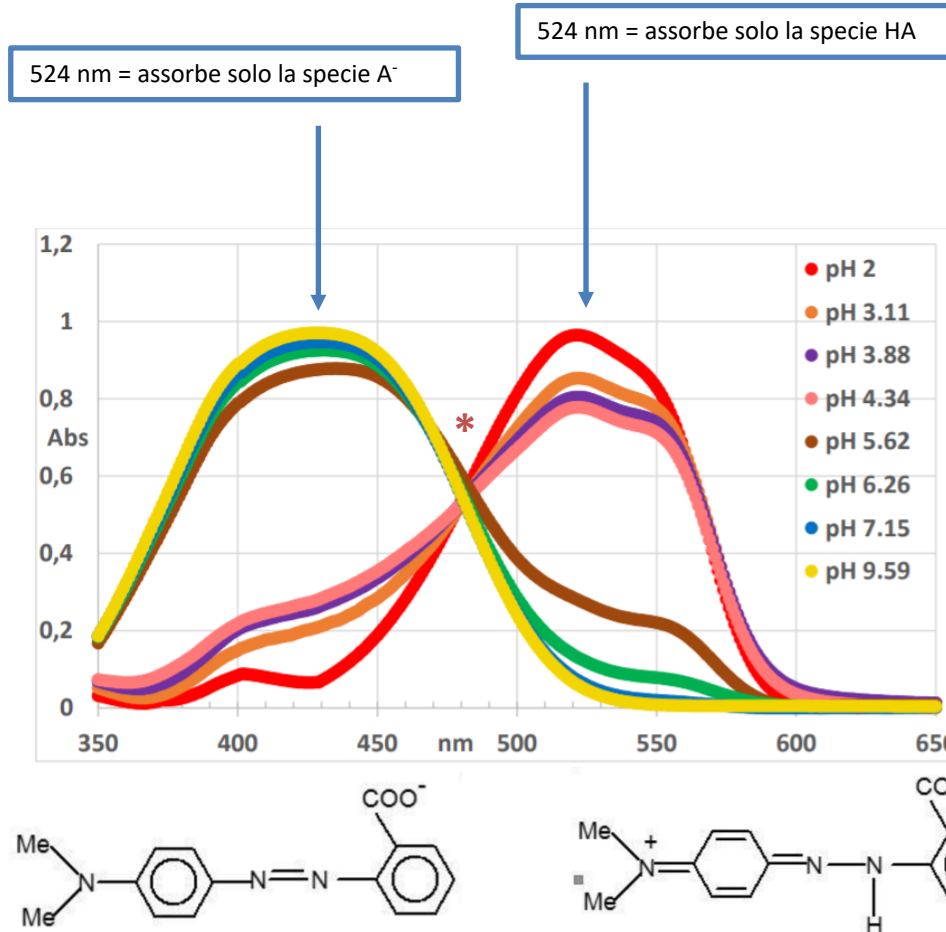
Infatti $A = H^+$ che non assorbe mai nell'UV-VIS

Operativamente quindi si prepara la prima soluzione a pH basico, l'ultima è tutto sale e H^+ e delle soluzioni tampone intermedie

Determinazione quantitativa del pka del Rosso di Metile



Soluzione	pH
1° provetta	2
2° provetta	3,11
3° provetta	3,88
4° provetta	4,34
5° provetta	5,6
6° provetta	6,26
7° provetta	7,15
8° provetta	9,59



Tutte le curve a qualsiasi pH passano per lo stesso punto: **PUNTO ISOBESTICO (*)** dove l'A_{totale} non cambia ed è quindi indipendente dal rapporto tra le concentrazioni delle due specie.

Le due specie sono indistinguibili: al punto isobestico hanno lo stesso coefficiente di estinzione molare.

19 Determinazione del pK del rosso metile

Preparare le soluzioni indicate nella seguente tabella a partire da una soluzione di indicatore (circa 7.4×10^{-5} M) mantenendo la concentrazione finale di indicatore **rigorosamente costante** (volume finale = 50.0 ml).

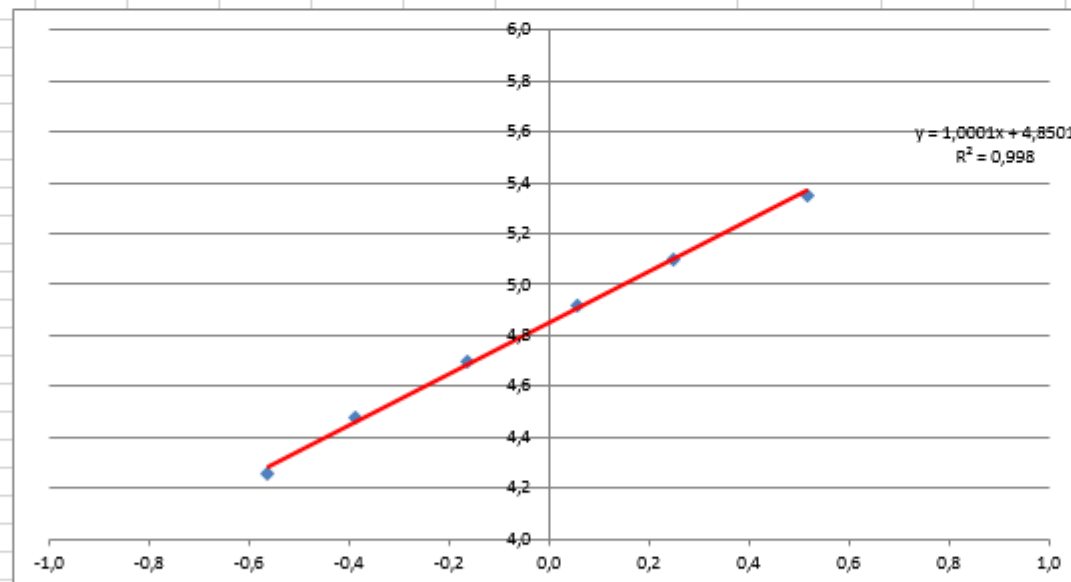
Soluzione	Indicatore	CH_3COONa 0.0800 M	CH_3COOH 0.0200 M
1	10.0	----	35.0
2	10.0	5	35 !!!!!
3	10.0	5	23.0
4	10.0	5	14.5
5	10.0	5	9.0
6	10.0	5	6.0
7	10.0	5	3.5
8	10.0	5	----

Soluz.	pH (Y)	A	$[\text{In}^-]$	$[\text{HIn}]$	$[\text{In}^-]/[\text{HIn}]$	$\log [\text{In}^-]/[\text{HIn}]$ (X)
1	acido	$A_{(\text{HIn})} =$	----	----	----	----
2						
3						
4						
5						
6						
7						
8	basico	$A_{(\text{In}^-)} =$	----	----	----	----

$$\log[H^+] = -\log \frac{1}{K_a} + \log \frac{A - A_{A-}}{A_{HA} - A} \quad \text{ossia}$$

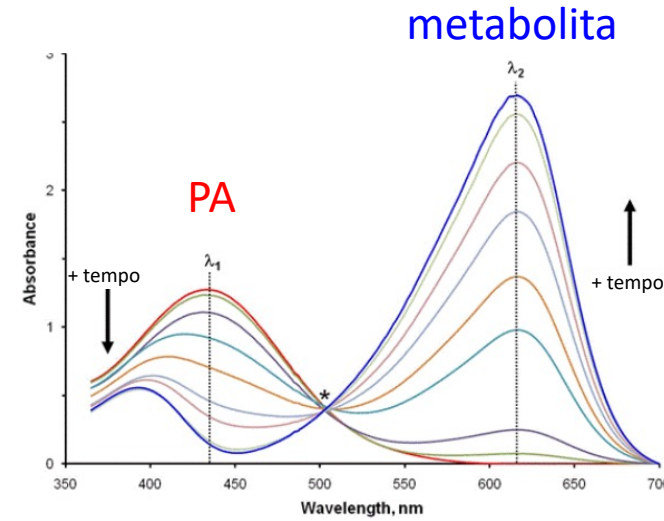
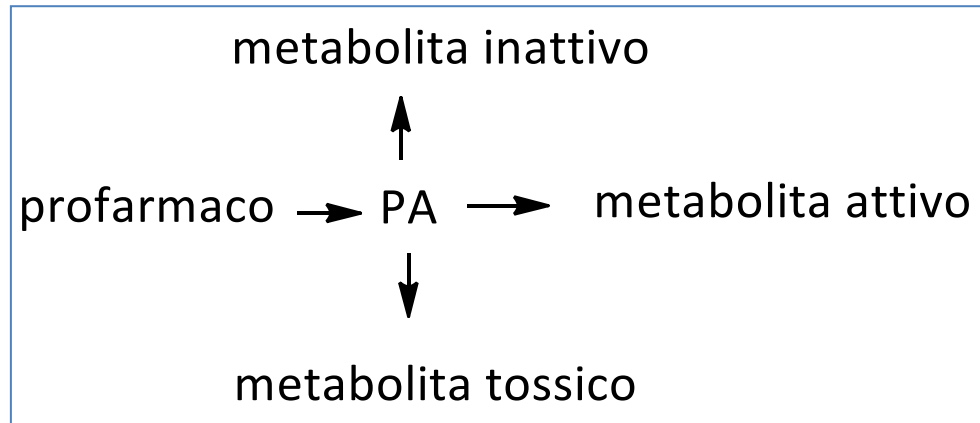
$$\text{pH} = \text{pK}_a + \log \frac{A_{HA} - A}{A - A_{A-}}$$

A	[In-]	[Hin]	log([In-]/[Hin])	pH sperimentale	A([In-])	A([Hin])	intercetta	pendenza	pK
0,652	0,162	0,592	-0,563	4,26	0,06	0,814			
0,594	0,220	0,534	-0,385	4,48					
0,507	0,307	0,447	-0,163	4,70					
0,413	0,401	0,353	0,055	4,92					
0,332	0,482	0,272	0,248	5,10					
0,236	0,578	0,176	0,516	5,35					



Applicazione

Questo concetto è applicabile a molte reazioni:



Per esempio si prende un PA ad una certa concentrazione e si registra lo spettro UV al tempo 0 e poi a tempi diversi (2h, 12h, 24h, ...). Se si trova un punto isosbastico, allora PA si è trasformato in un'altra specie (in un'unica altra specie), la concentrazione è costante perché dipende da PA messo inizialmente, non viene aggiunto nulla.

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

Assorbanza: $A = f(\lambda)$

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

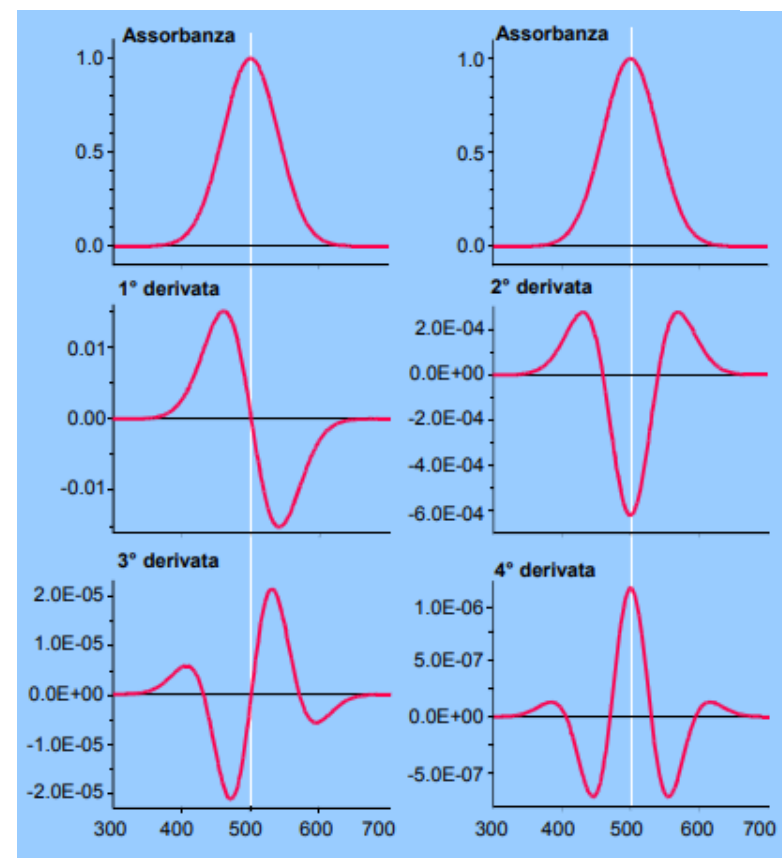
2ª Derivata: $\frac{d^2 A}{d\lambda^2} = f''(\lambda)$

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

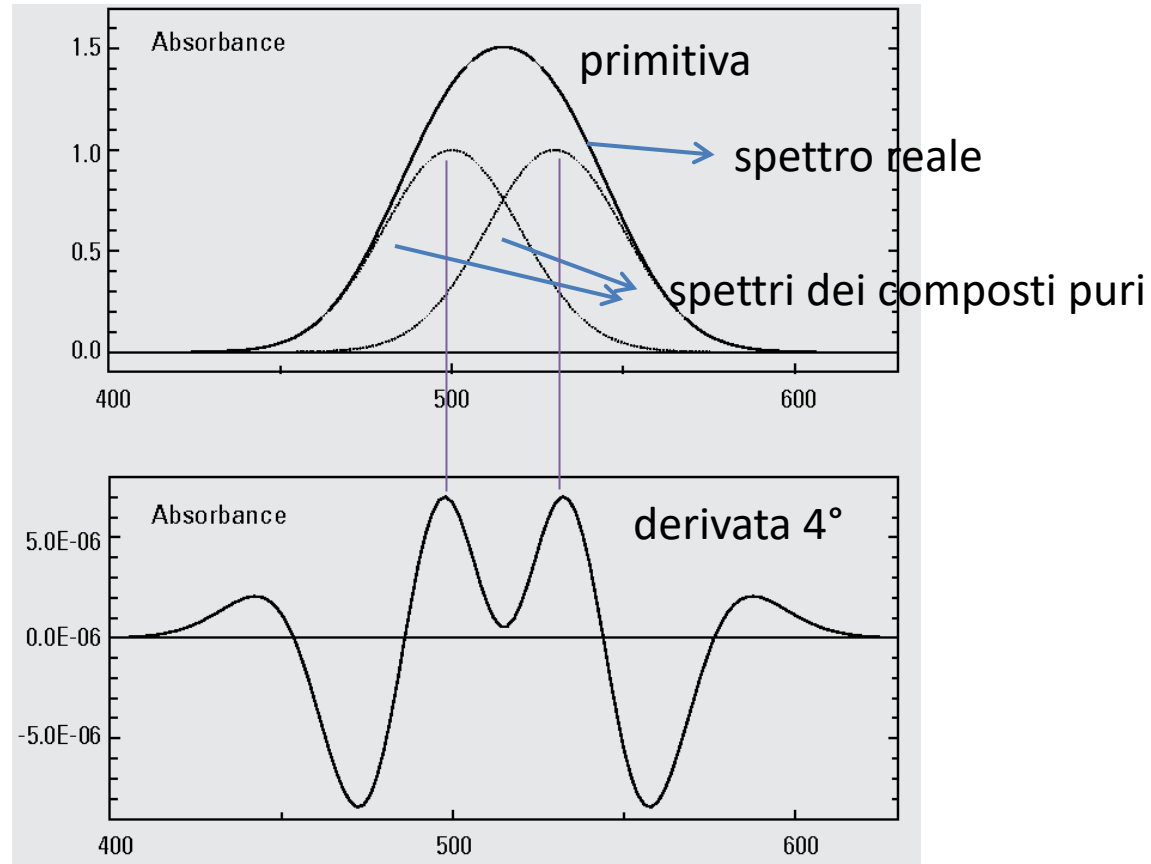
Il metodo delle derivate sfrutta il fatto che la derivata somma è uguale alla somma della derivate.

Tutte le derivate dispari si annullano in corrispondenza della primitiva

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



Concettualmente



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. Generalmente è sufficiente fare la derivata seconda!

Determinazione di un analita in matrice complessa

Esempi:

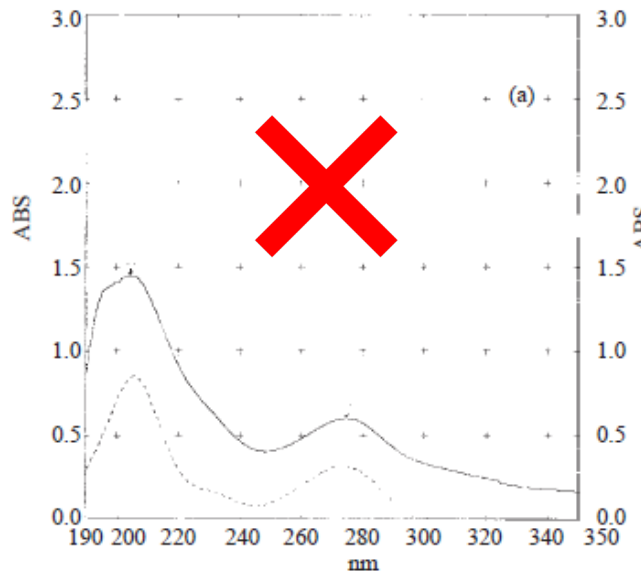
- Ricerca delle proteine nel latte
- Ricerca dei barbiturici nelle urine
- Ricerca della vitamina C nel succo d'arancia
- **Ricerca della caffeina nel caffè**

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

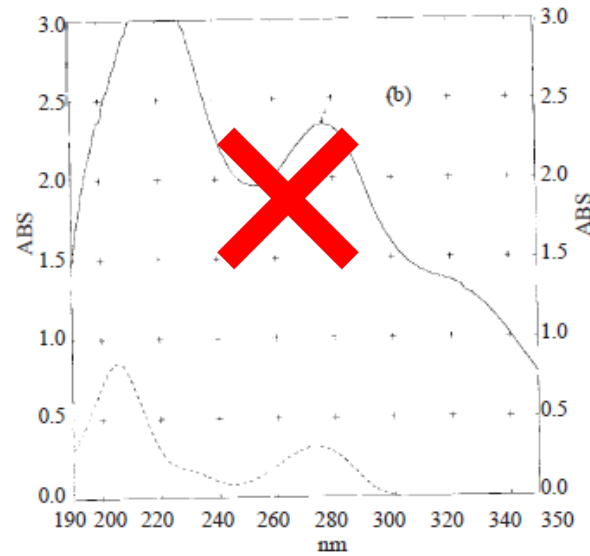
Per vedere l'analita si può applicare il metodo delle derivate.

Esempio di spettri UV della caffeina in varie preparazioni

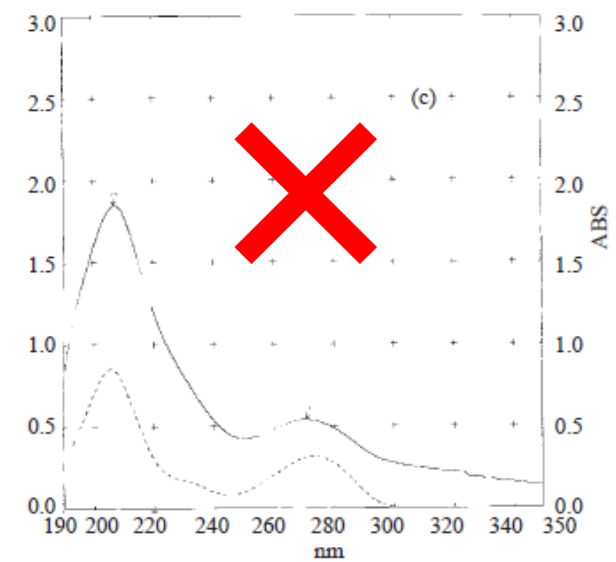
- Spettri in assorbanza (primitive)



— cola
--- caffeina

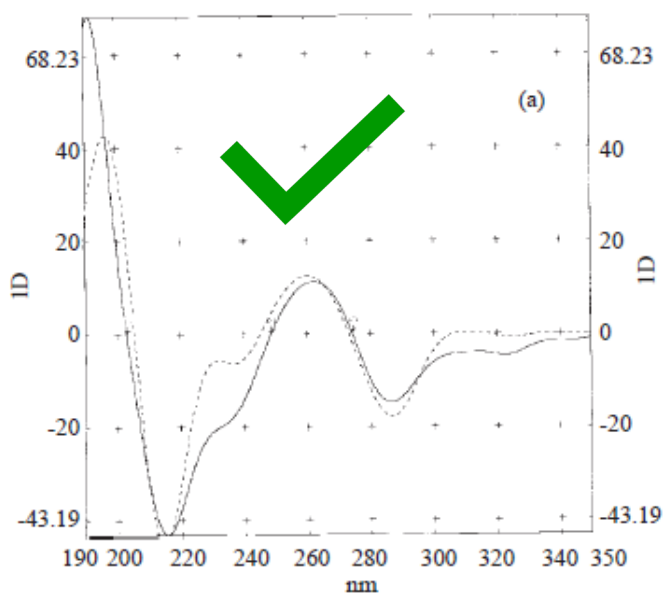


— tè
--- caffeina

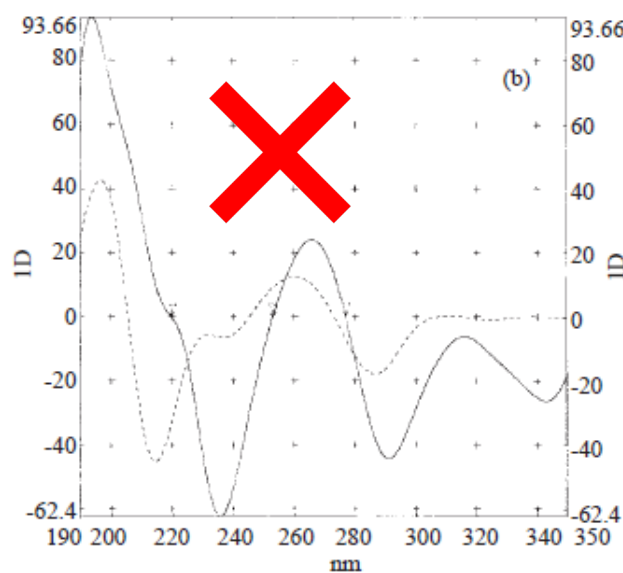


— caffè
--- caffeina

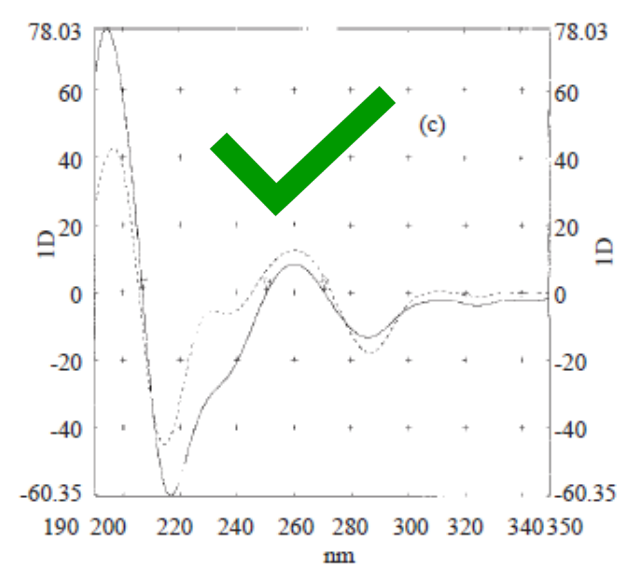
- Spettri in derivata prima



— cola
 --- caffeina

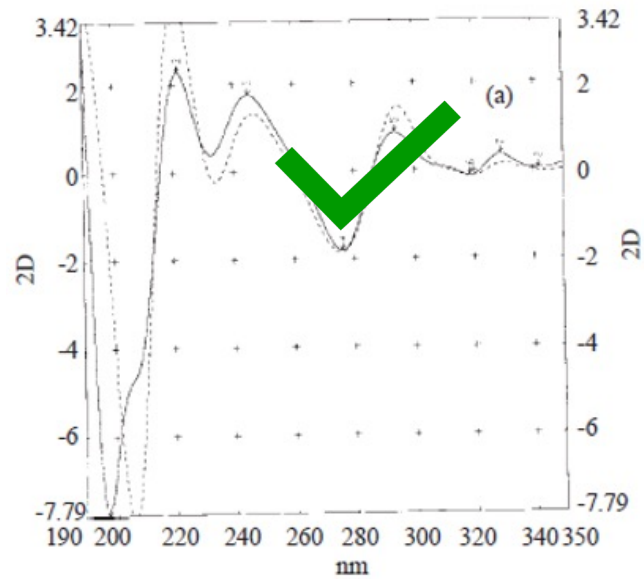


— tè
 --- caffeina

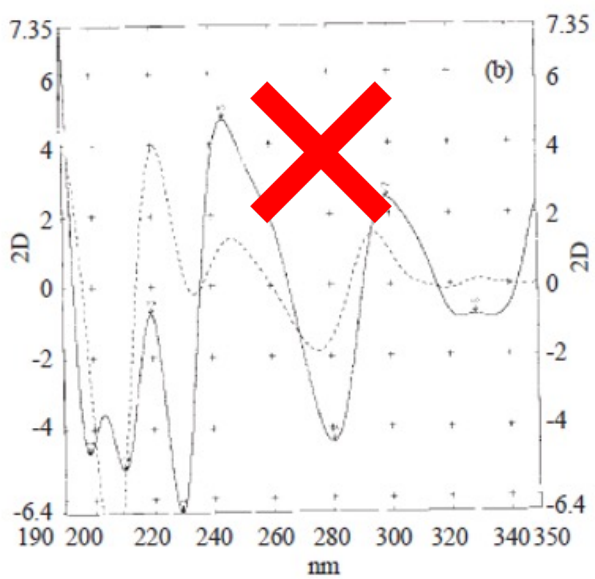


— caffè
 --- caffeina

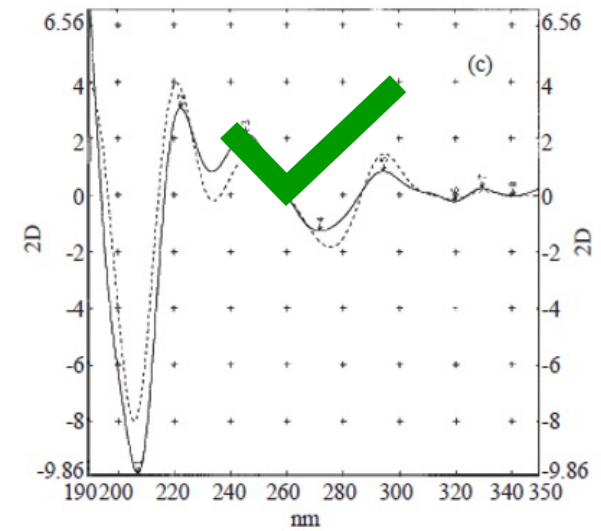
- Spettri in derivata seconda



— cola
--- caffeina



— tè
--- caffeina

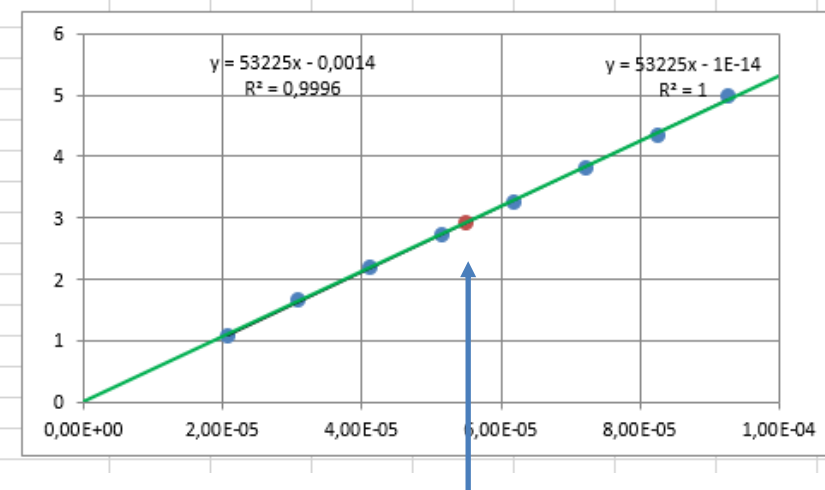
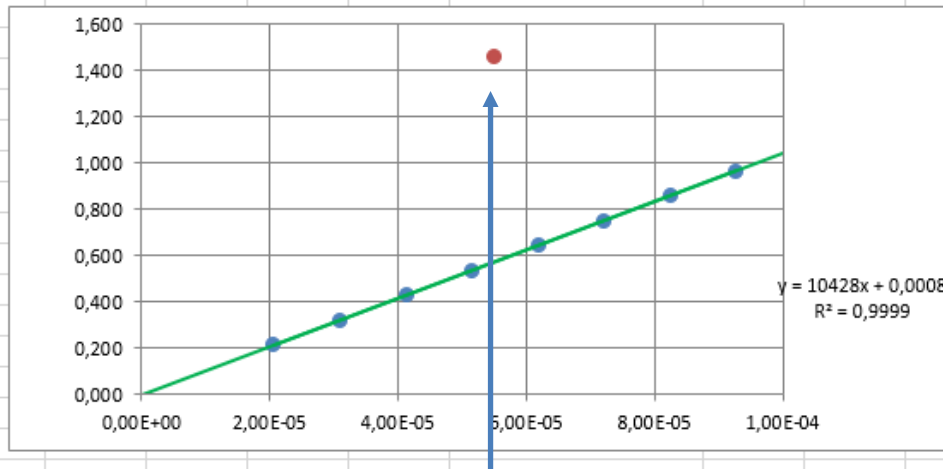


— caffè
--- caffeina

Foglio di calcolo della C_{caffeina} nel caffè

soluzione	ml	molarità	derivata	A	D (calc)				
		1,00E-04		1,0436	5,323				
1	9,0	9,27E-05	4,98	0,965	4,934	pendenza	53225	M sperimentale	5,49E-04
2	8,0	8,24E-05	4,36	0,861	4,386			M(caff)	0,00686
3	7,0	7,21E-05	3,81	0,751	3,838	intercetta	0,00000	caff (g/L)	1,332
4	6,0	6,18E-05	3,27	0,650	3,289	correlazione	0,9996	mg/tazzina	133
5	5,0	5,15E-05	2,73	0,538	2,741				
6	4,0	4,12E-05	2,2	0,430	2,193				
7	3,0	3,09E-05	1,67	0,323	1,645				
8	2,0	2,06E-05	1,09	0,214	1,096				
		0		0,000	0,000				
campione		5,49E-05	2,92	1,465	2,920				

pesata	0,0100
molarità	5,15E-04
PM	194,19
perlievo	0,80
Vfinale	50



❖ Studio del TITOLO DI UN FARMACO

E' possibile sfruttare la legge di L-B anche per risalire al titolo di un farmaco ad es. in una compressa. Un esempio può essere il titolo di paracetamolo in compresse da 500 mg di Tachipirina (o analogo equivalente). Infatti dalla L-B:

$$A = \varepsilon c l \longrightarrow c = A / \varepsilon l \quad (\varepsilon \text{ paracetamolo} = 715, 1\%, 1\text{cm}; l = 1 \text{ cm})$$

Per cui sapendo che una soluzione di 250 mL contenente effettivi 0.1875 g di paracetamolo rientra nella linearità della L-B, posso ricavare la quantità sperimentale di paracetamolo effettivo nella mia *cp*.

Per es. se la *cp* pesa esattamente 0.5432 g (contenete 0.5000 g di paracetamolo), avrò:

$$0.5000 : 0.1875 = 0.5432 : x$$

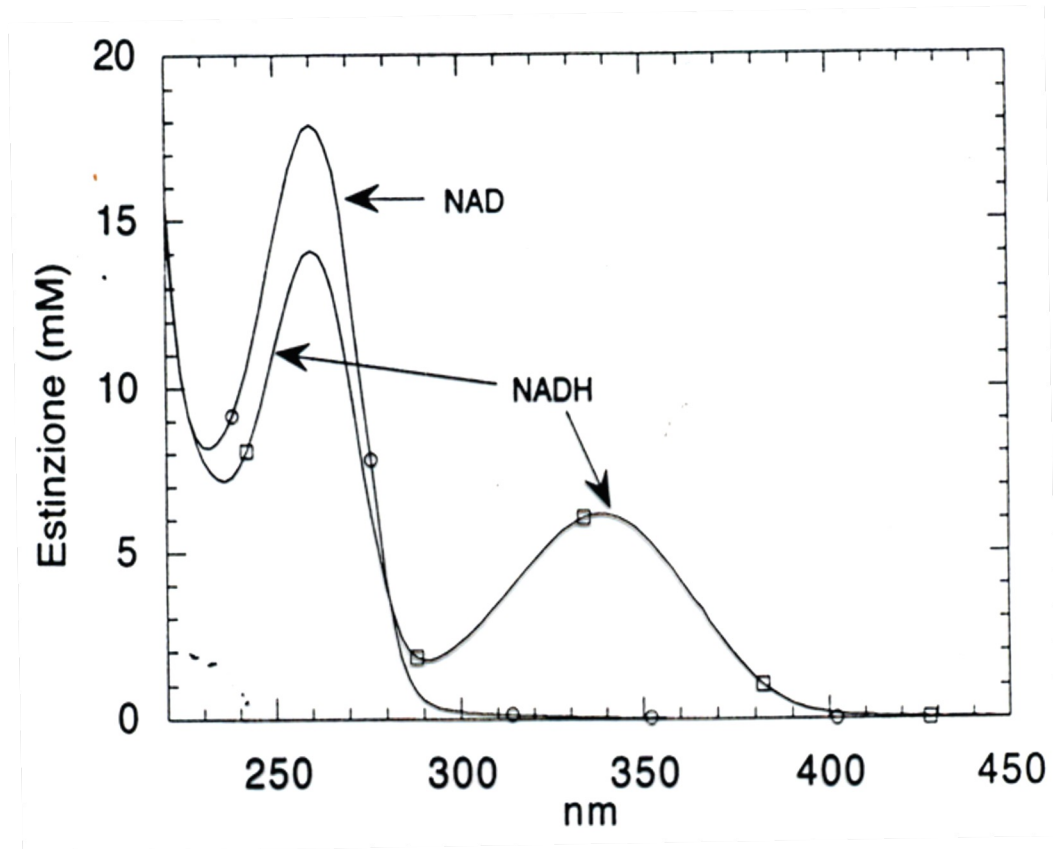
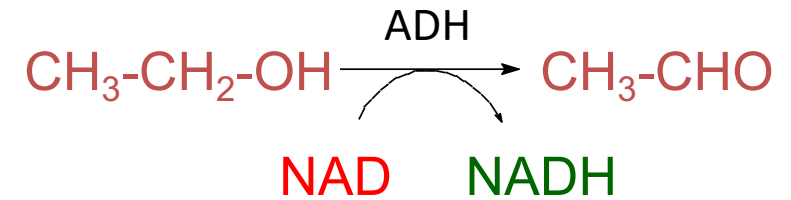
$X = 0.2037 \text{ g } cp$ che conterranno 0.1875 g di paracetamolo effettivi ($\rightarrow$ g dichiarati)

A questo punto peserò una quantità vicina ai g dichiarati (farò almeno 3 pesate per l'errore standard) ed eseguirò lo spettro UV. Dal valore di A_{max} (noto ε del paracetamolo che è = 715 e $l = 1 \text{ cm}$), mi ricaverò la concentrazione c (che sarà in g/100 ml e dovrò rapportare alla diluizione utilizzata) $\rightarrow$ g trovati

Ora, rapportando in termini % i g trovati/g dichiarati, avrò il mio titolo % di paracetamolo che dovrà rientrare nel range 95 – 105 % della quantità dichiarata di paracetamolo.

❖ Studio della CINETICA DI REAZIONE

Esempio ox. dell'etanolo ad acetaldeide a livello metabolico



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} – 10^{-6} M
- Selettività da moderata ad ampia, ampliabile mediante spettroscopia in derivata per più analiti
- 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

“ 133FA - ANALISI FARMACEUTICA 1

LEZIONE 12 – Spettroscopia di
fluorescenza

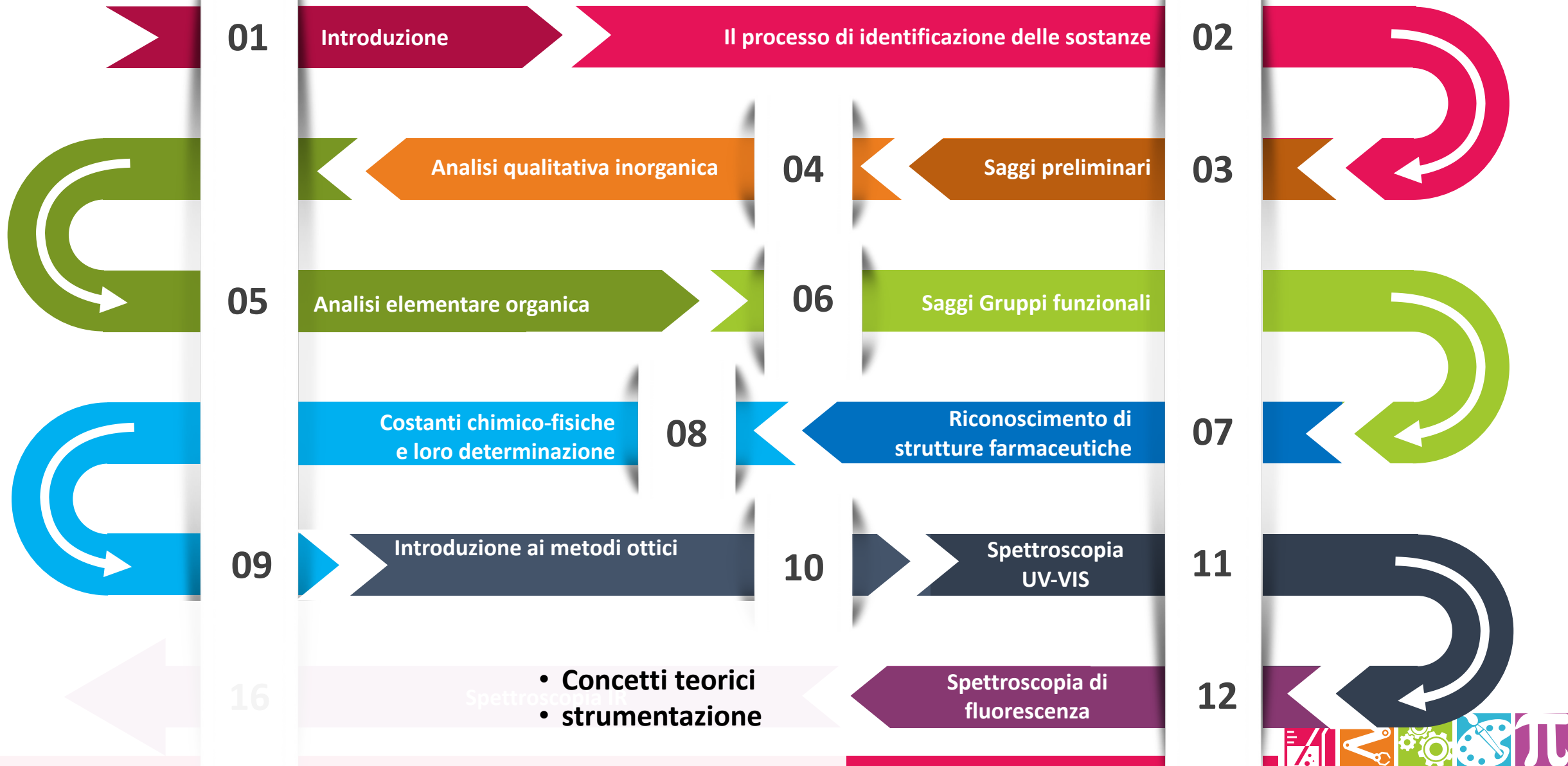
”

Prof. Daniele Zampieri

CdL CTF



Contenuti del Corso (e “Roadmap”)



La Fotoluminescenza

E' un'altro fenomeno osservabile in UV-Vis.

La fotoluminescenza riguarda alcuni materiali (e composti) che hanno la proprieta' di assorbire quantità discrete di energia, successivamente restituita sotto forma di fotoni di energia inferiore.



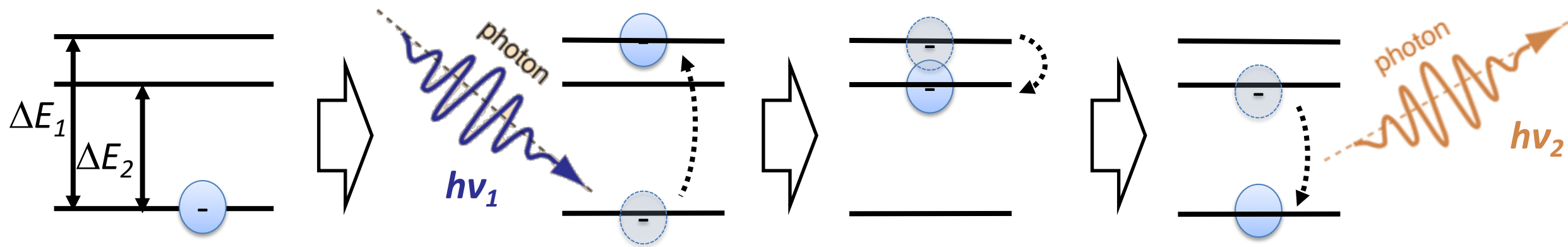
Fosforescenza del Solfuro di Zinco

CURIOSITA': «I glow-sticks» sfruttano una reazione chimica chiamata chemiluminescenza in grado di generare luce. I componenti chimici principali di un *lightstick* sono acqua ossigenata, difenil ossalato (un estere dell'acido ossalico) e un pigmento fluorescente da cui dipende il colore: giallo, blu, verde, viola, rosso, arancione o bianco.»

<https://it.wikipedia.org/wiki/Lightstick>

La LUMINESCENZA: il meccanismo

Alcuni materiali hanno la proprietà di assorbire quantità discrete di energia, successivamente restituita sotto forma di fotoni di energia inferiore.



immaginiamo 3 livelli energetici
(per esempio corrispondenti
all'energia di tre orbitali
molecolari, di cui solo quello più
basso contenente un elettrone)

il sistema assorbe un fotone
passando dallo stato
fondamentale ad uno degli stati
eccitati facendo un salto di
energia compatibile a quella del
fotone assorbito ($\Delta E_1 = h\nu_1$)

in alcuni casi, ci può essere
«decadimento non radiativo» (per
esempio un cambio conformazionale):
l'elettrone decade ad uno stato
inferiore di energia senza emettere
radiazione in altri l'energia in eccesso
può essere persa sotto forma di
calore

l'elettrone infine torna al suo
stato fondamentale liberando
un fotone di energia inferiore
a quella del fotone assorbito e
pari a
 $h\nu_2 = \Delta E_2 < \Delta E_1$

In base al tipo di energia assorbita, si parla di

CHEMILUMINESCENZA quando una reazione chimica porta a un prodotto di reazione in stato eccitato che poi decade,

BIOLUMINESCENZA quando l'energia chimica viene convertita in energia luminosa per reazione enzimatica in sistemi biologici vivi (es. lucciole),

ELETTROLUMINESCENZA quando l'energia viene fornita da un campo elettrico (es. reazione elettrica con gas ionizzato, LED),

FOTOLUMINESCENZA (Fluorescenza-Fosforescenza) quando l'energia assorbita è luce UV-Vis,

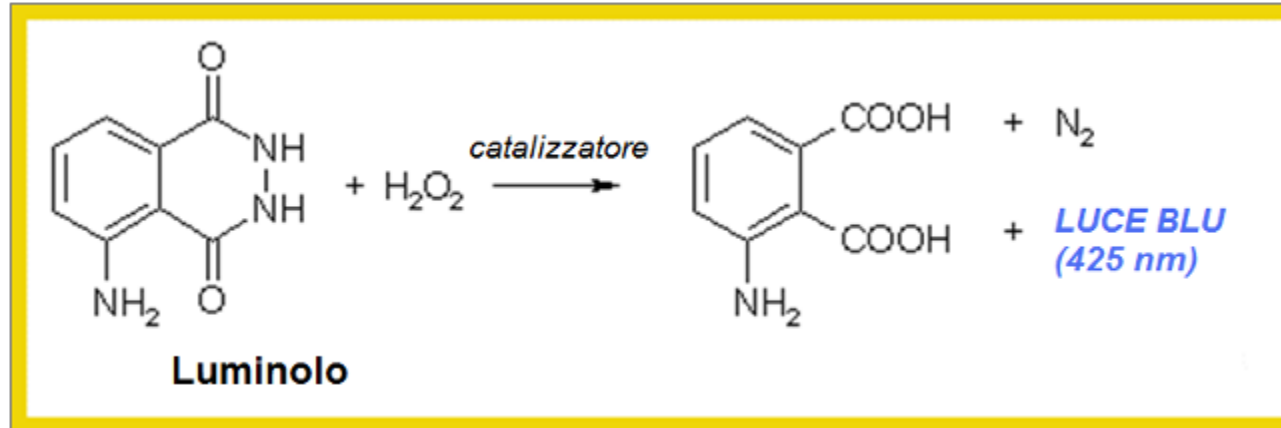
....

CHEMILUMINESCENZA e BIOLUMINESCENZA: esempi

Alcune molecole hanno la proprietà di convertirsi (spesso per ossidazione) in molecole che, successivamente, restituiscono parte dell'energia acquisita per la reazione, sotto forma di fotoni di energia.



Interessante, dal punto di vista forense, è l'utilizzo della chemiluminescenza del luminolo nella rivelazione di emoglobina in tracce in svariati casi di criminologia. Si sfrutta, infatti, l'azione catalitica degli ioni ferro (3+) dell'Hb per la reazione del luminolo e $\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow$ ac. 3-amminoftalico.

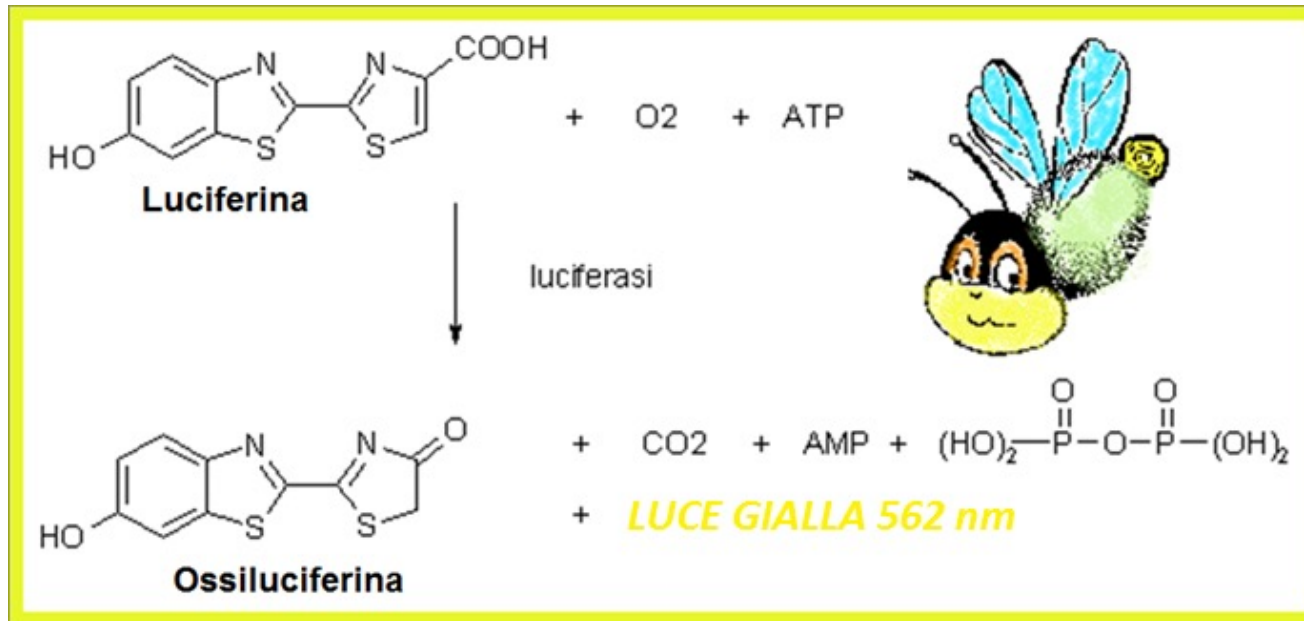


Le sostanze chemiluminescenti (CL) come il *luminolo*, *isoluminolo* e la *licigenina* possono anche venir utilizzate nella preparazione di coniugati da impiegare come **traccianti** nelle reazioni di competizione proteica (alternativa ai traccianti radioattivi) o nei dosaggi immunologici (LIA: Luminescent Immuno Assay).

La bioluminescenza nel regno animale e vegetale è un fenomeno abbastanza diffuso; per esempio la luminescenza delle lucciole, la luciferina è la sostanza BL che viene ossidata dall' ossigeno dell'aria a ossiluciferina (schema).

Sono necessari sia il trifosfato di adenosina (ATP) che l'enzima luciferasi per attivare la luciferina.

La resa quantica della bioluminescenza delle lucciole è estremamente alta ($\Phi = 0.88$), circa 10 volte maggiore di quella dei sistemi sintetici luminescenti.

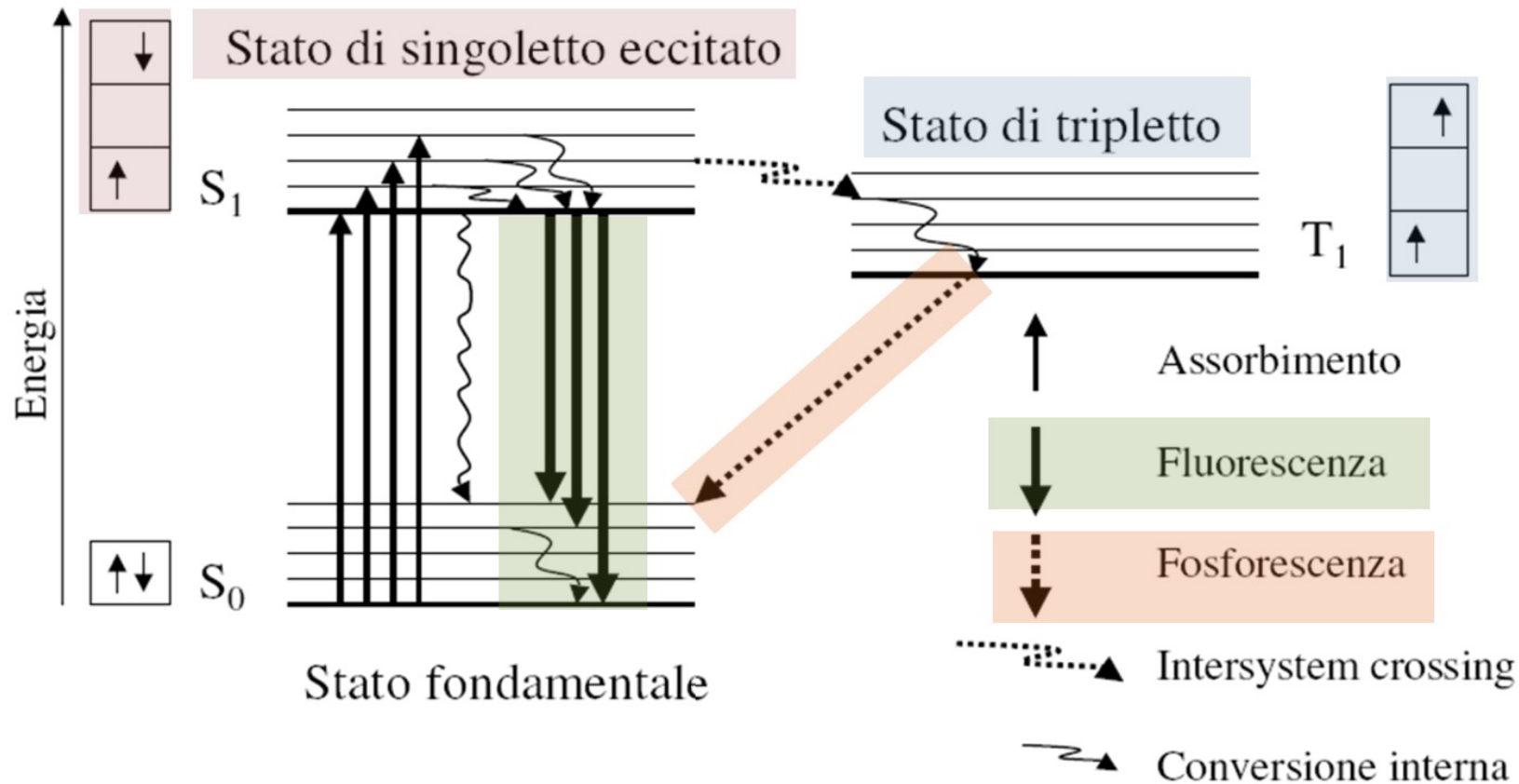


La reazione luminosa prodotta dal sistema luciferina-luciferasi può essere utilizzata per misurare il contenuto, la produzione o il consumo di ATP in un campione biologico. Ogni enzima o metabolita legato alla degradazione o alla formazione di ATP può essere determinato mediante questo sistema. Tramite la bioluminescenza sarà così possibile dosare ATP e tutte le attività enzimatiche ATP-dipendenti (ATP-asi, esochinasi, piruvatochinasi, ecc.) nonché dei substrati corrispondenti (ADP, glucosio, fosfoenolpiruvato, ecc.). Particolare importanza assume la determinazione della carica batterica nei liquidi (quindi della sterilità), essendo questi ultimi produttori di ATP sotto azione enzimatica della luciferina-luciferasi.

FLUORESCENZA e FORFORESCENZA: le transizioni elettroniche coinvolte Nella realtà le molecole presentano una serie di stati energetici molto ravvicinati, e la situazione risulta un po' più complessa, in quanto transizioni multiple avvengono contemporaneamente!

Immaginiamo una molecola già eccitata che ha due elettroni nel suo orbitale molecolare a più alta energia.

Lo stato di singoletto è situazione in cui i due elettroni se ne stanno in due orbitali degeneri con spin opposto



Lo stato di tripletto è situazione in cui i due elettroni se ne stanno in due orbitali degeneri con lo stesso spin

PRINCIPIO

Il fenomeno della fluorescenza (diagramma di Jablonsky) è spiegato come una emissione di energia assorbita sotto forma radiante mantenendo lo stesso stato di spin (stessa molteplicità); cioè da uno stato di singoletto eccitato (S_2) si passa ad uno intermedio (S_1) e poi al ritorno allo stato fondamentale conservando lo spin (S_0).

La radiazione emessa possiederà un'energia minore (λ maggiore di quella assorbita).

Se invece la molecola (o l'atomo) dissipa una parte dell'energia acquisita in calore ma con cambiamento di molteplicità di spin (stato di tripletto; T_1), allora l'energia emessa sarà di fosforescenza, con tempi di emivita più lunghi (da 10^{-3} sec. a qualche minuto) e λ di emissione maggiori rispetto alla fluorescenza, a causa di un minore probabilità di interconversione dello spin rispetto al meccanismo di conservazione (conversione interna); l'emissione perdurerà anche a termine dell'eccitazione.

In generale, la (foto)luminescenza, può avvenire per (foto)eccitazioni dovute ad assorbimento di una delle seguenti forme di energia radiante:

- ☐ Luce solare
- ☐ Radiazione visibile (inclusa luce ambientale)
- ☐ Radiazione UV
- ☐ Raggi X

A differenza dell'AAS, in cui si determina sempre un rapporto fra due intensità luminose (I/I_0), la fluorimetria costituisce un metodo diretto per la misura della quantità di energia assorbita (o emessa).

La relazione fondamentale che definisce l'intensità della fluorescenza emessa da soluzioni diluite, paragonabile alla Lambert-Beer dell'assorbimento, è la seguente:

$$F = I_0 \cdot \varepsilon \cdot c \cdot b \cdot \Phi$$

F = n° tot. Fotoni; cioè intensità di fluorescenza emessa in tutte le direzioni (quanti/sec);

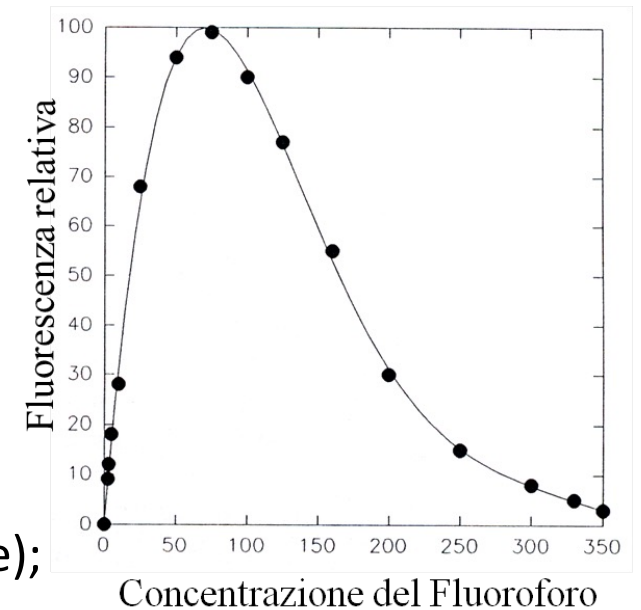
I_0 = intensità della luce eccitante (quanti/sec);

ε = coeff. di assorbimento molare (ricavato da altre misure spettrofotometriche);

c = concentrazione sostanza fluorescente;

b = cammino ottico;

Φ = efficienza quantica; rapporto tra i quanti assorbiti e quelli emessi. E' compresa tra 0 e 1 (intervengono altri processi non-radiativi che abbassano la resa quantica, come ad es. la Temperatura che aumenta la conversione interna e fa diminuire Φ).

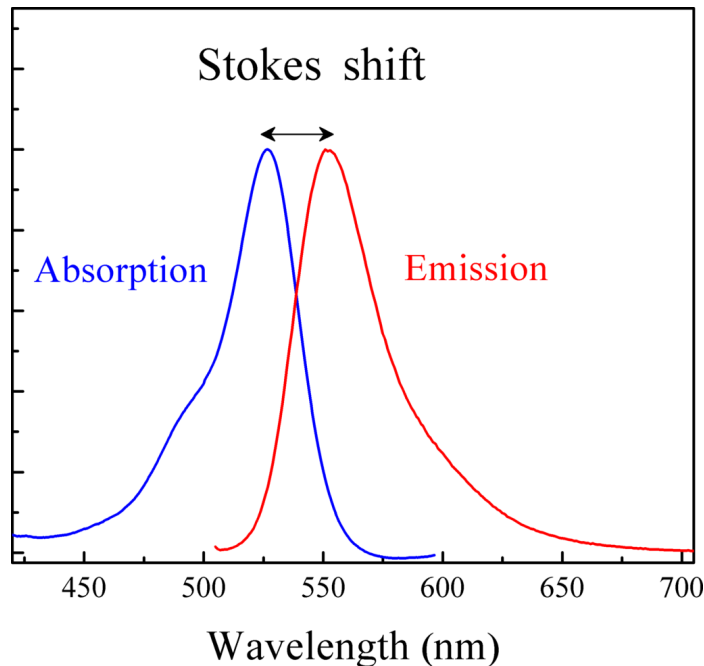


Metodi spettroscopici:

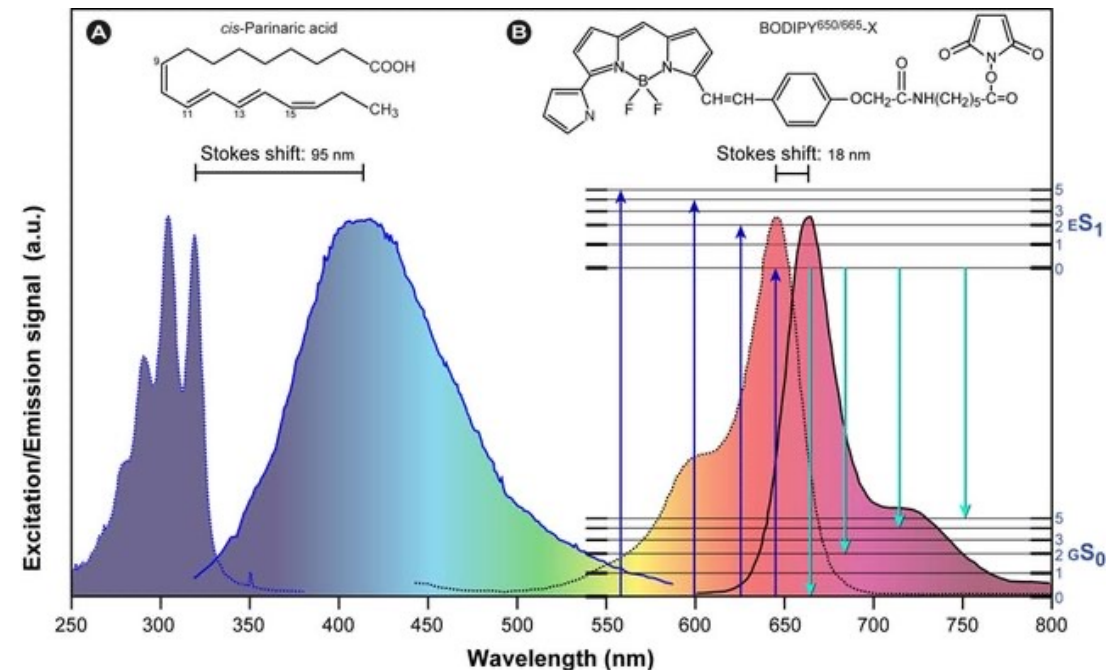
SPETTROSCOPIA DI FLUORESCENZA

A differenza del UV-Vis, la tecnica spettrofluorimetrica implica la registrazione sia di uno spettro di eccitazione (assorbimento) che di uno di emissione e gli strumenti sono chiamati spettrofluorimetri (spettrofosforimetri per fosforescenza). La differenza di energia tra l'eccitazione e l'emissione è chiamata Stokes' shift.

Schematicamente:



Un esempio dalla letteratura:



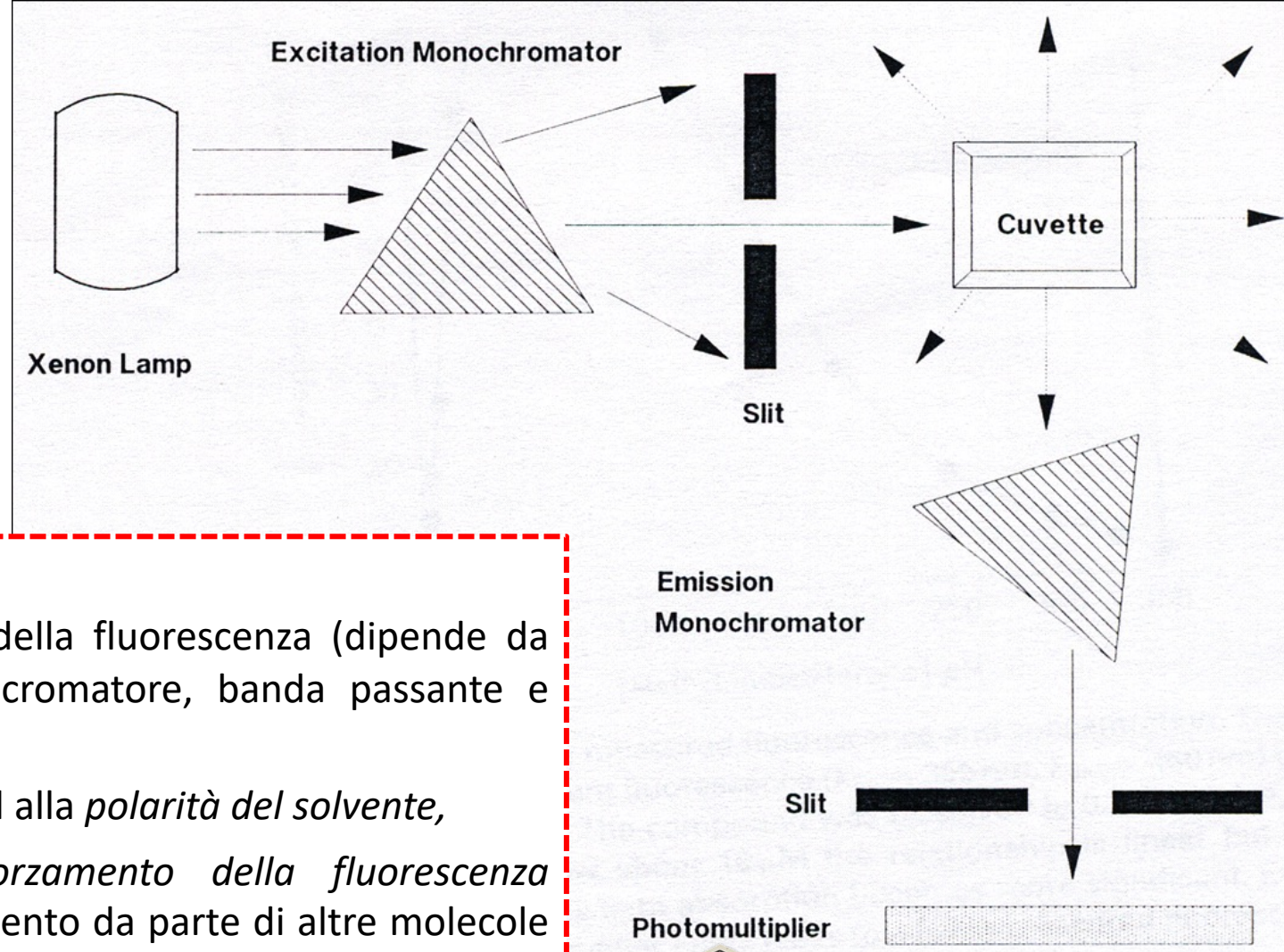
STRUMENTAZIONE

1. Sorgente
2. Monocromatore di
3. Eccitazione (filtro o reticolo)
4. Cella portacampione (o «cuvette»)
5. Monocromatore di emissione
6. Fotomoltiplicatore o fototubo
7. Registratore



La tecnica della ha delle limitazioni:

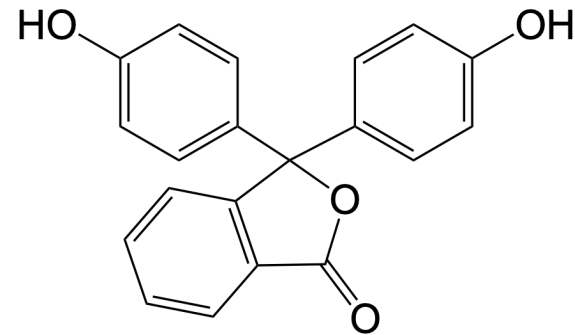
- consente solo una *misura relativa* della fluorescenza (dipende da intensità lampada, efficienza monocromatore, banda passante e sensibilità fotomoltiplicatore),
- e' *sensibile* al *pH*, alla *temperatura* ed alla *polarità del solvente*,
- risente del fenomeno dello *smorzamento della fluorescenza* (quenching) per effetto dell'assorbimento da parte di altre molecole (O₂, metalli) della soluzione,
- ha la maggiore sensibilità ed accuratezza a *basse concentrazioni* per cui adatta al dosaggio di sostanze presenti in tracce nei campioni!!



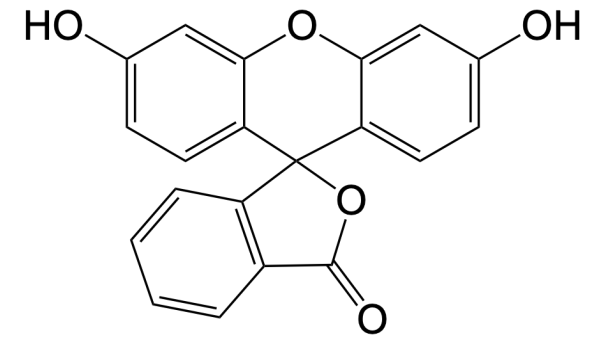
Una cuvette (deve essere di materiale trasparente alla radiazione utilizzata)

Caratteristiche di una sostanza fluorescente

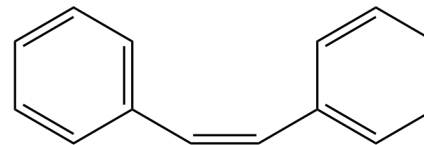
- Avere un elevato grado di coniugazione
- Presenza di molti eteroatomi ricchi di elettroni n
- Sistema di base «rigido» spesso con anelli condensati



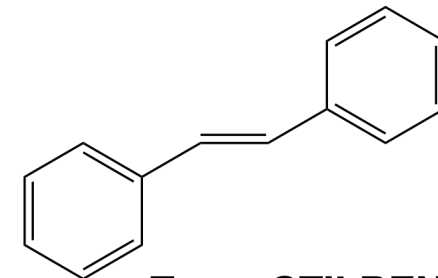
FENOLFTALEINA
incolore



FLUORESCEINA
Fluorescenza
VERDE



Cis-STILBENE
incolore



Trans-STILBENE
Fluorescenza
VERDE

“ **133FA - ANALISI FARMACEUTICA 1**

**LEZIONE 13 – Spettroscopia Infrarosso
(IR)**

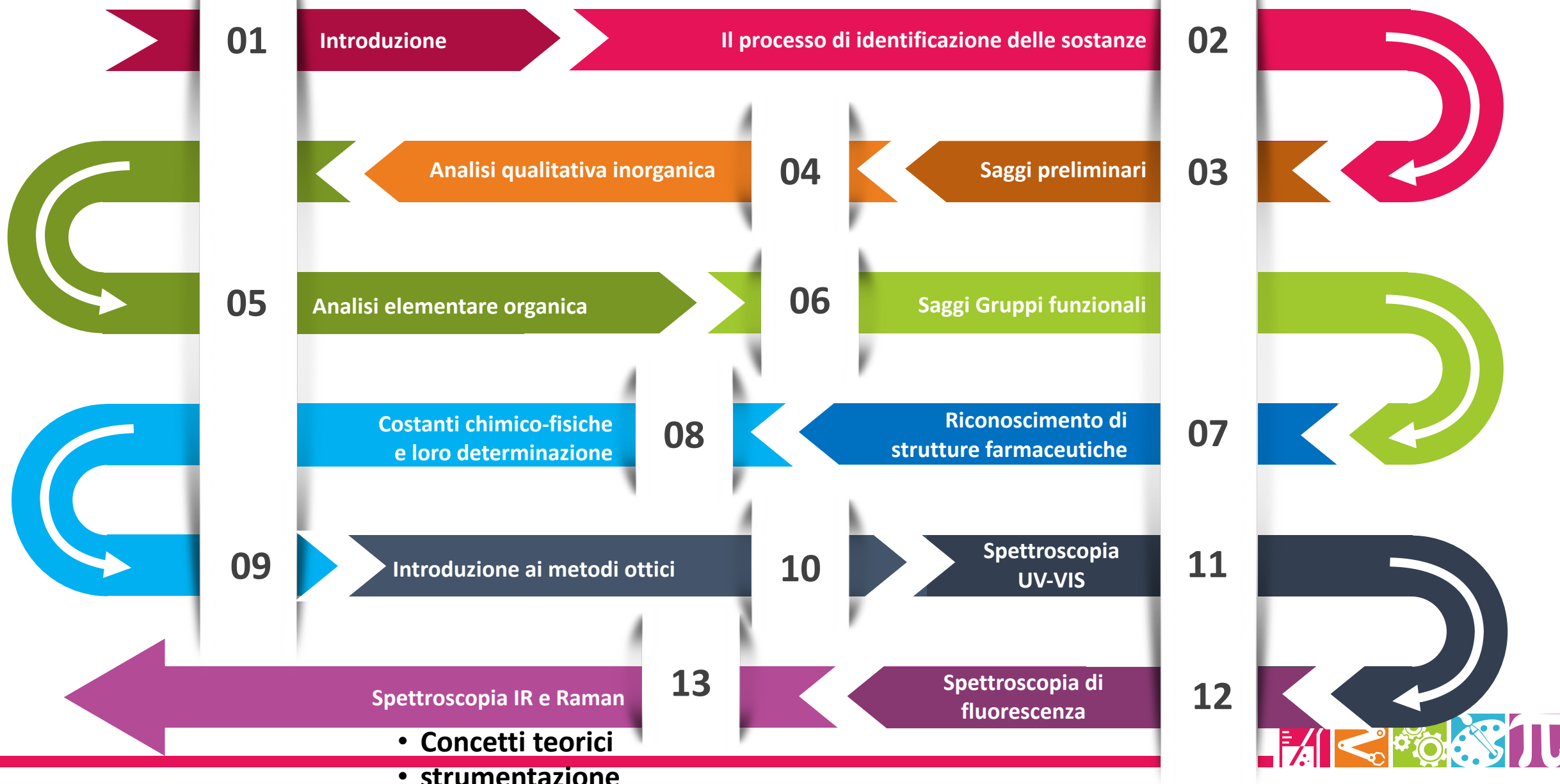
”

Prof. Daniele Zampieri

CdL CTF



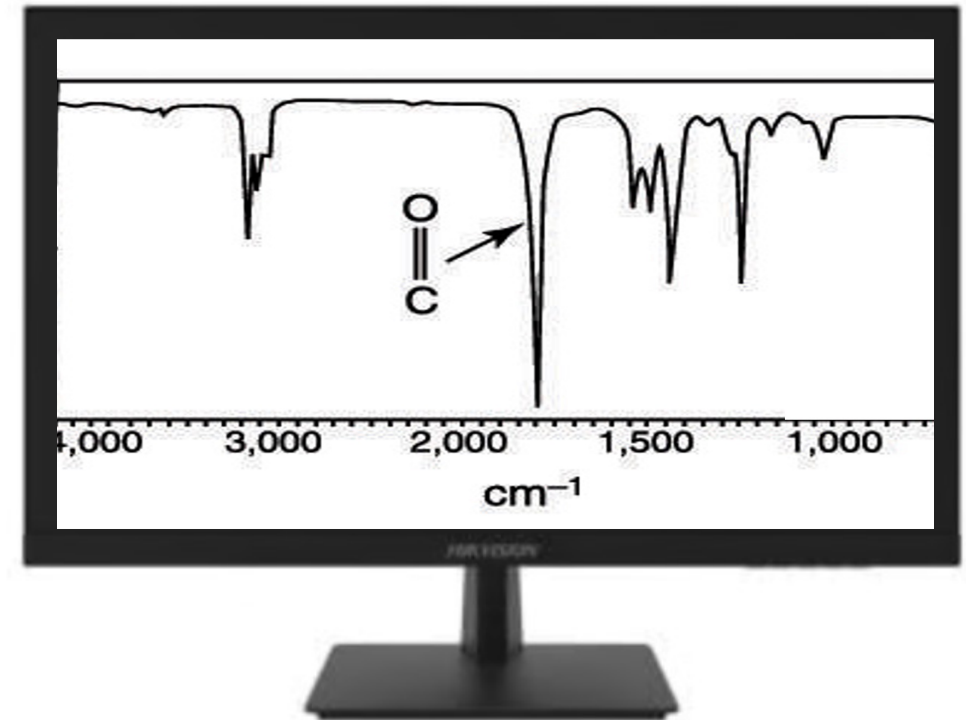
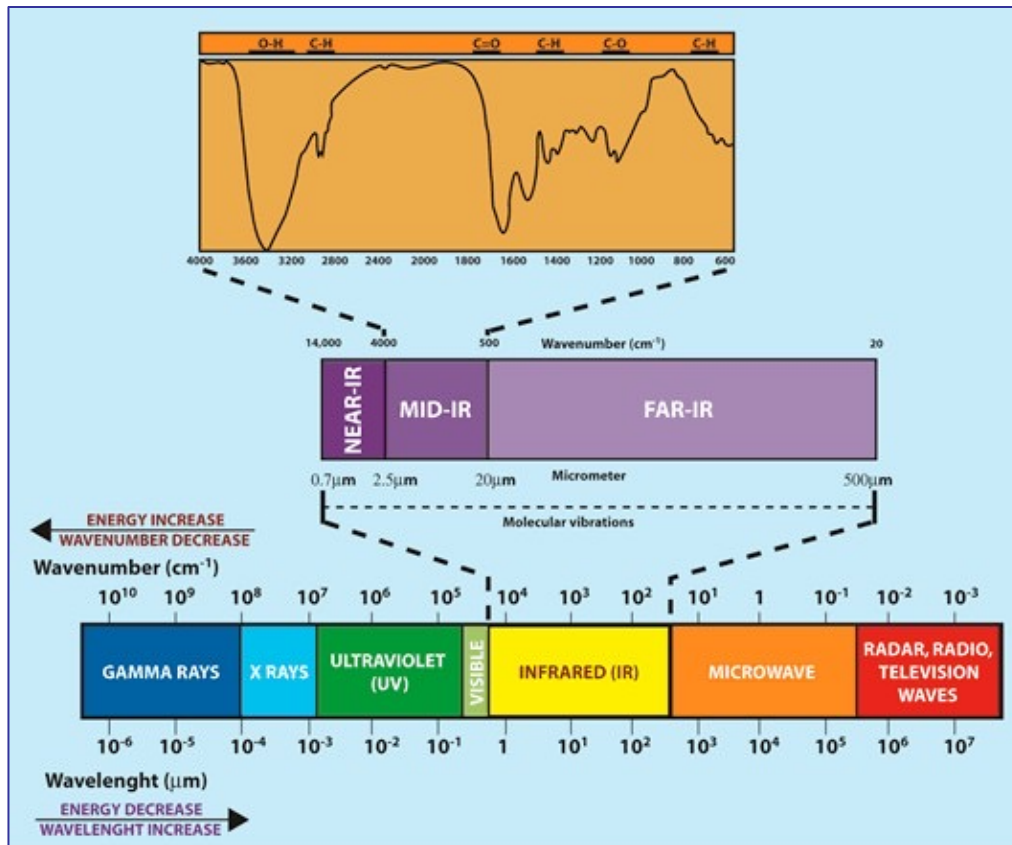
Contenuti del Corso (e “Roadmap”)



Metodi spettroscopici:

SPETTROSCOPIA DI ASSORBIMENTO IR

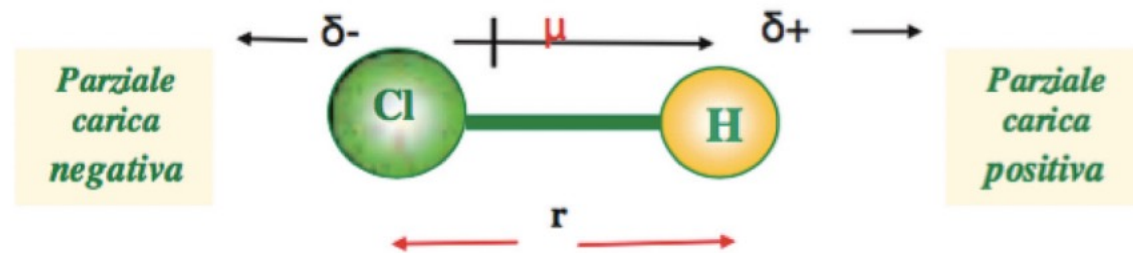
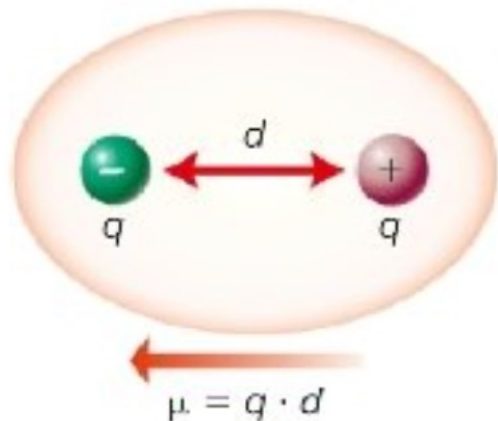
La spettroscopia (o spettrofotometria) IR riguarda lunghezze d'onda nel range **400 – 4000 nm** (vicino-medio infrarosso).



La spettroscopia IR è una tecnica analitica che permette la delucidazione della struttura molecolare determinando la presenza di legami e gruppi funzionali caratteristici.

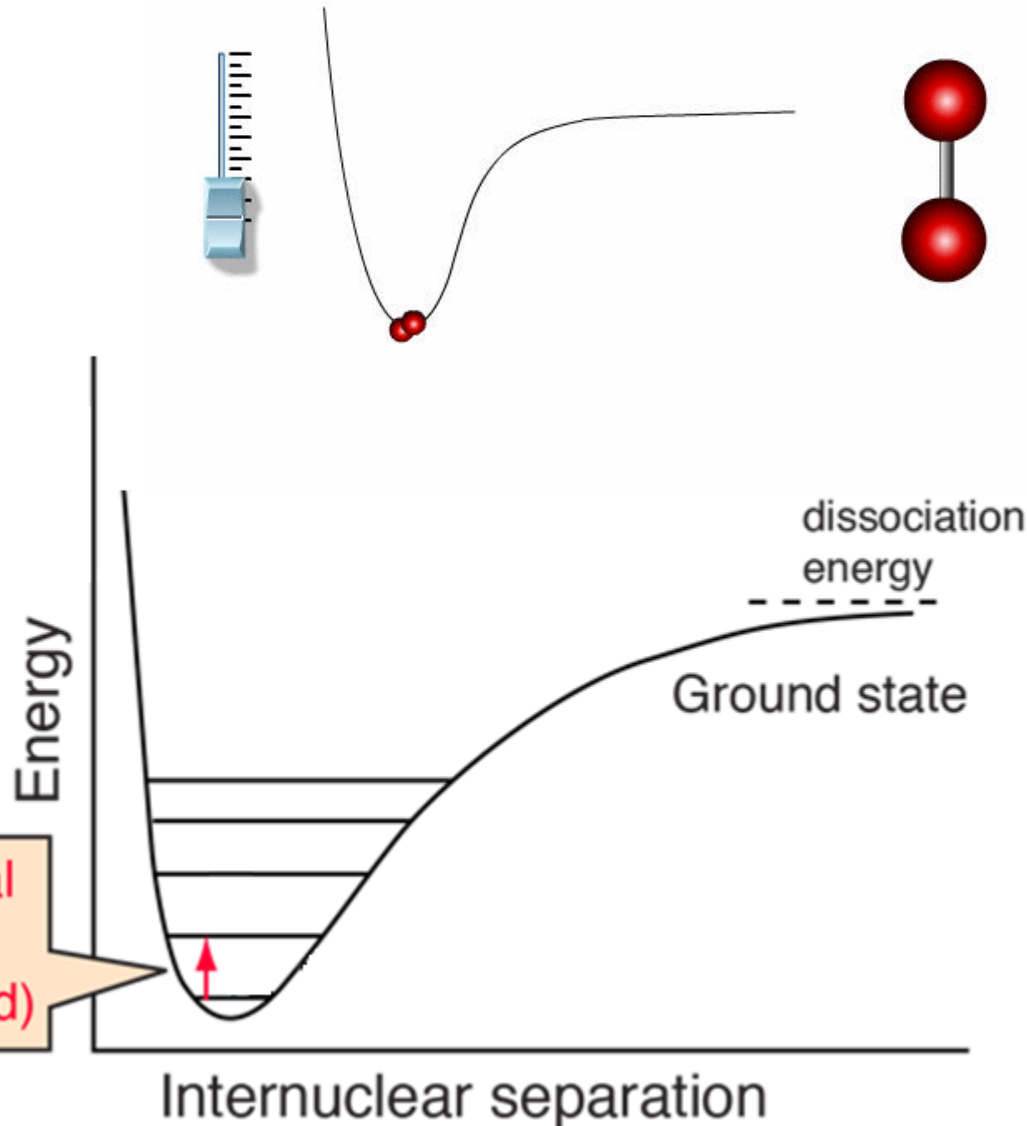
A differenza della spettroscopia UV-Vis, l'IR è **quasi esclusivamente un metodo analitico qualitativo e non quantitativo** che sfrutta radiazioni più deboli in grado di indurre variazioni di **tipo vibro-rotazionale** nella molecola.

La condizione essenziale perciò che una molecola assorba una radiazione IR è che ci sia una variazione del momento dipolare $\mu = q \times d$. Ovvero che **il legame che unisce i due atomi deve essere polare!!** Si genera così un campo elettrico stazionario che interagirà con quello fornito dalla sorgente dello strumento (molecole come O_2 o N_2 **non assorbono raggi IR** in quanto simmetriche $\rightarrow \mu = 0$).



SPETTROSCOPIA INFRAROSSA (IR)

La spettroscopia IR è una tecnica analitica che permette la delucidazione della struttura molecolare determinando la presenza di legami e gruppi funzionali caratteristici.



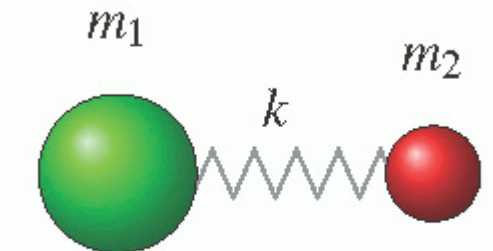
Le molecole, a differenza degli atomi, contengono sottostrutture rotazionali o vibrazionali.

Ad esempio, per una molecola diatomica si ha il grafico qui a sinistra.

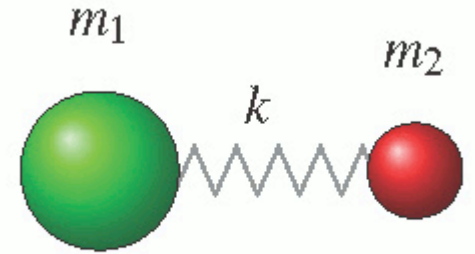
Il grafico riporta uno stato fondamentale (ground state, possiamo immaginarlo come un orbitale molecolare).

Poiché le molecole vibrano, nel loro movimento deformeranno la nuvola elettronica attorno ai nuclei in movimento. Questa deformazione viene rappresentata dalle linee orizzontali all'interno della curva, che mi rappresentano gli stati vibrazionali della molecola (possiamo anche immaginarli come vibrazioni più o meno ampie).

Fortunatamente, in questa lezione basterà immaginare le molecole come ad un insieme di molle (oscillatori armonici).



L'oscillatore armonico



© F. Aguiló-Rueda 2020

Immaginiamo un legame chimico come costituito da due masse (atomi) unite da una molla di massa trascurabile.

Vale quindi la legge di Hooke:

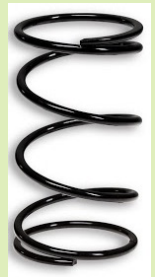
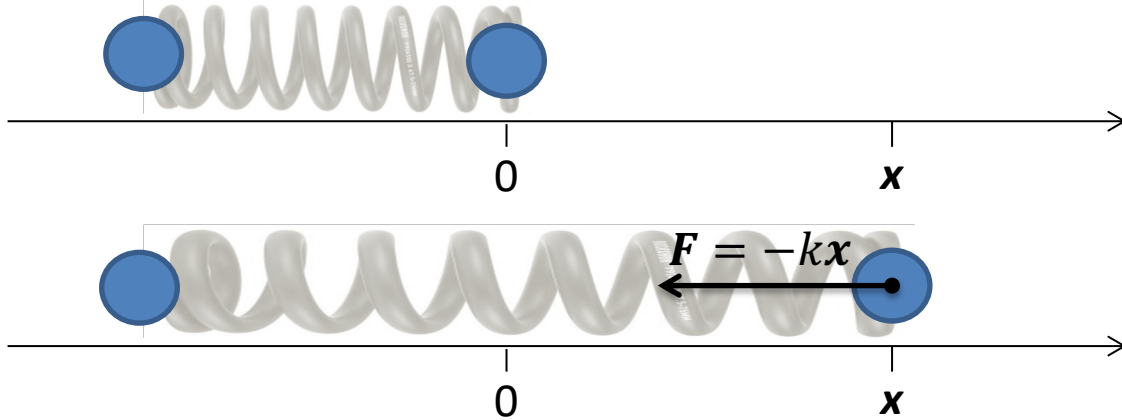
$$F = -kx$$

(la forza di richiamo agisce in senso opposto all'elongazione e, quindi, ha valore numerico negativo)

All'oscillazione armonica è associata una frequenza ν che dipenderà dalle masse degli atomi coinvolti e dalla costante di forza k :

$$\nu = \frac{1}{2\pi} \sqrt{k/\mu} \rightarrow \mu = \frac{m_1 m_2}{m_1 + m_2}$$

massa ridotta



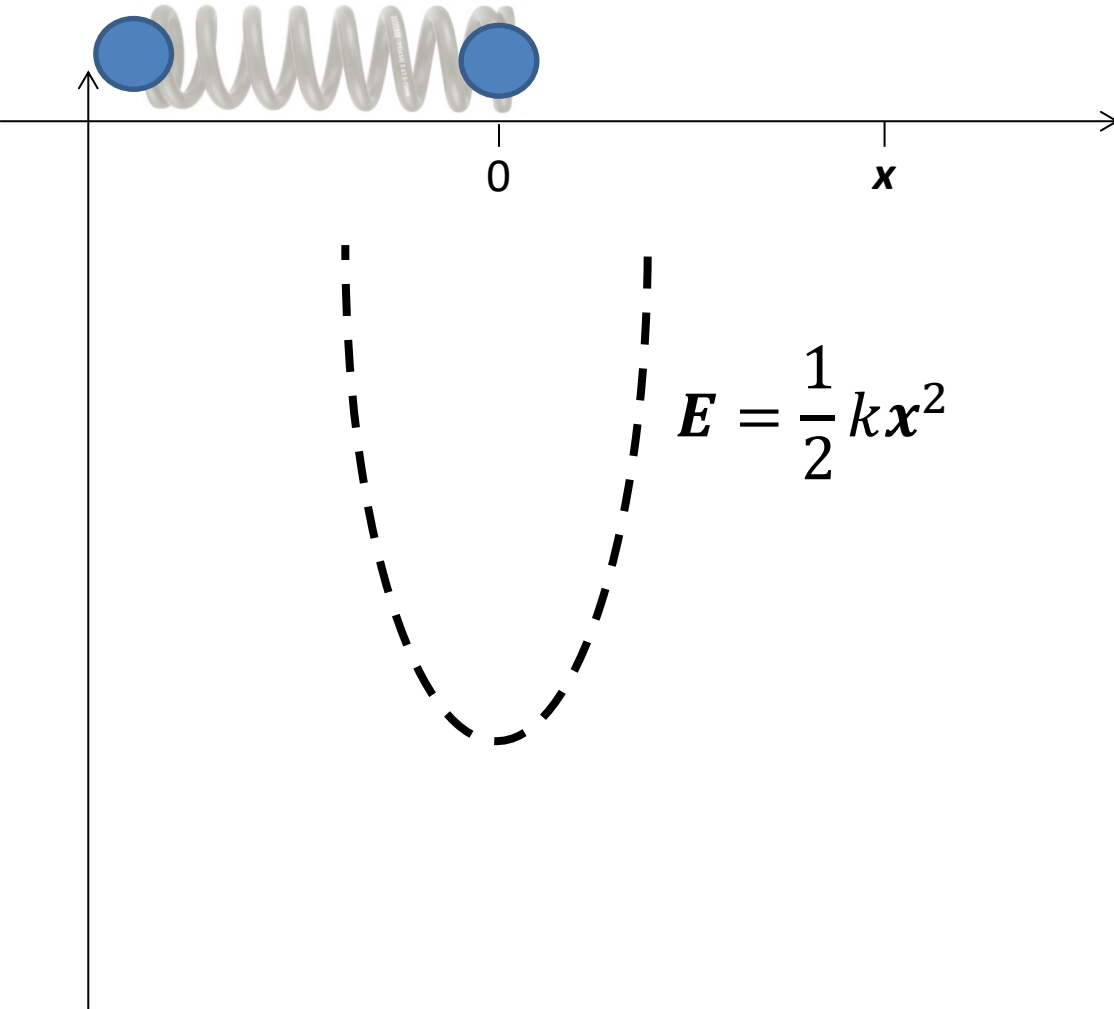
k



k

k dipende dalla rigidità della molla (o del legame chimico).

Mi dice quanto rigida è la molla, quindi quanto forte è la forza di richiamo.

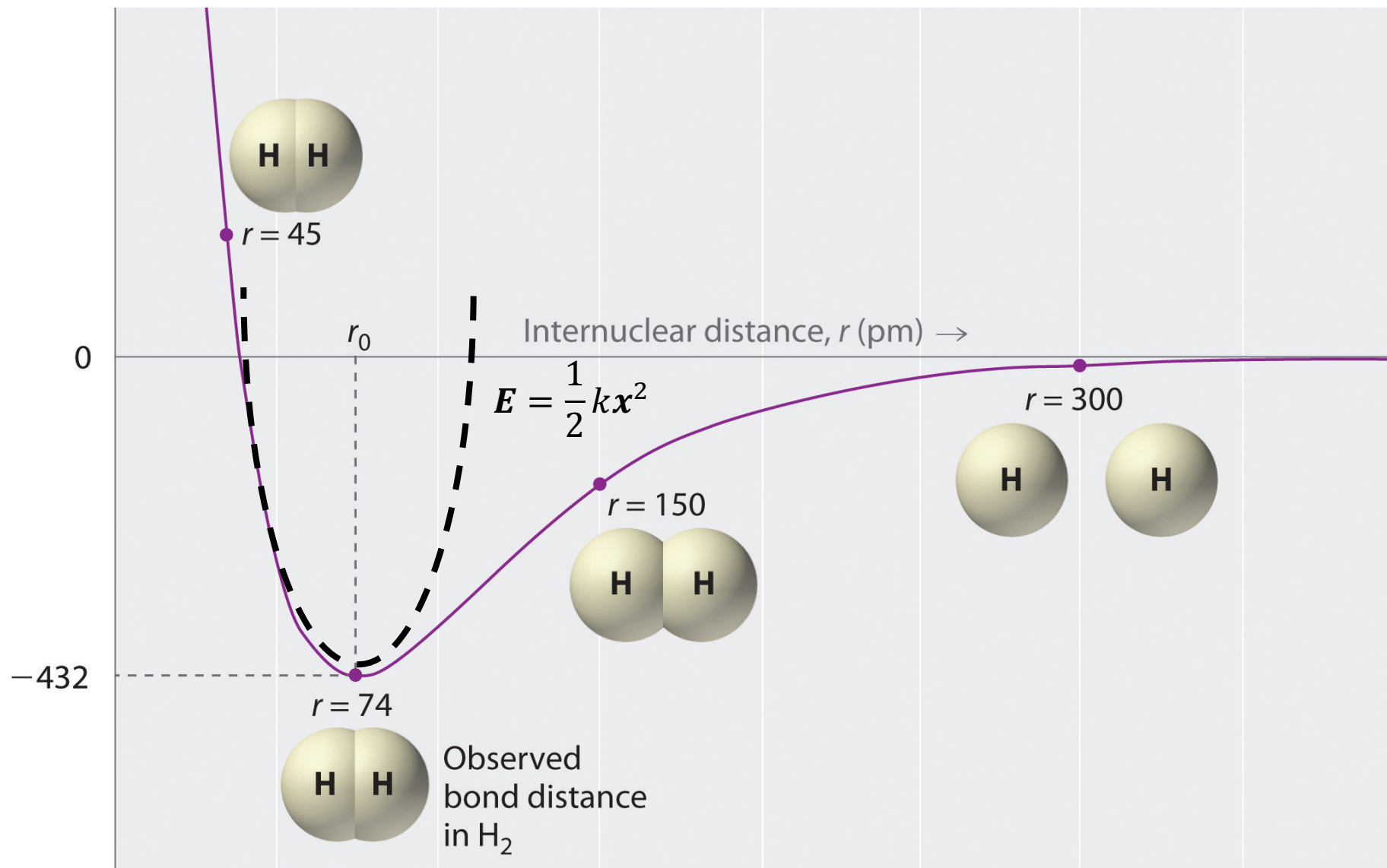


L'energia potenziale, associata ad un sistema di due atomi (sfere) che oscillano con moto semplicemente armonico, è data da:

$$E = \frac{1}{2} k x^2$$

Graficamente, l'equazione dell'En. Potenziale corrisponde a una parabola il cui punto di minimo corrisponde alla posizione di equilibrio, mentre per qualunque variazione (compressione o allungamento) si ha variazione di en. potenziale corrispondente.

Potential energy (kJ/mol)



Il modello classico(- - -) descrive sufficientemente bene la realtà' (—), entro certe distanze internucleari, oltre le quali NON si avrà più un moto elastico ma separazione di carica.

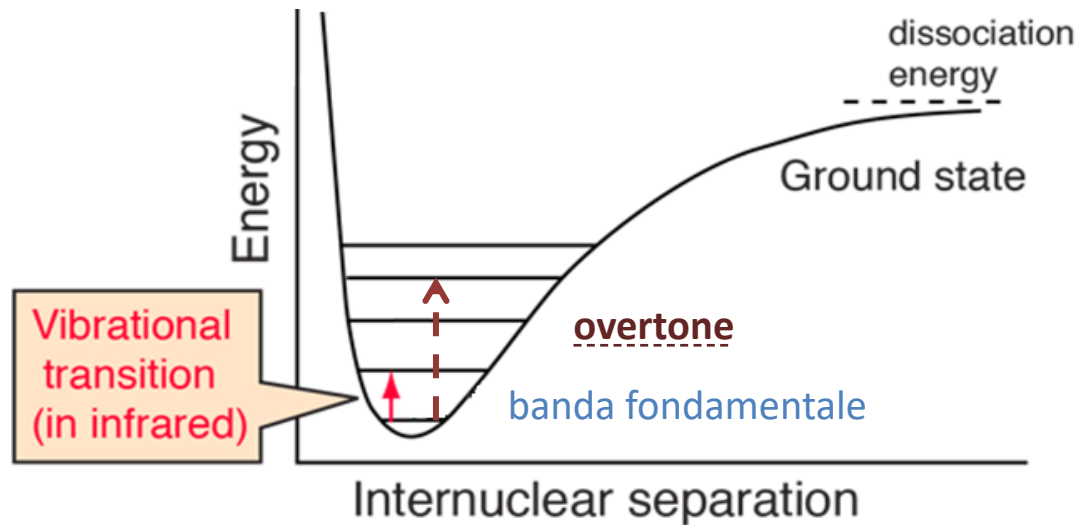
RISONANZA e OVERTONES

Quando una radiazione del range IR colpisce una molecola, questa entrerà in “risonanza”, cioè le energie coinvolte coincideranno e si avrà ASSORBIMENTO di energia con conseguente ampiezza di oscillazione del sistema!

L'energia di risonanza, cioè la frequenza ν di oscillazione, aumenterà all'aumentare della costante di forza k (quindi alla forza di legame tra gli atomi), e al diminuire di μ (ovvero atomi di masse piccole).

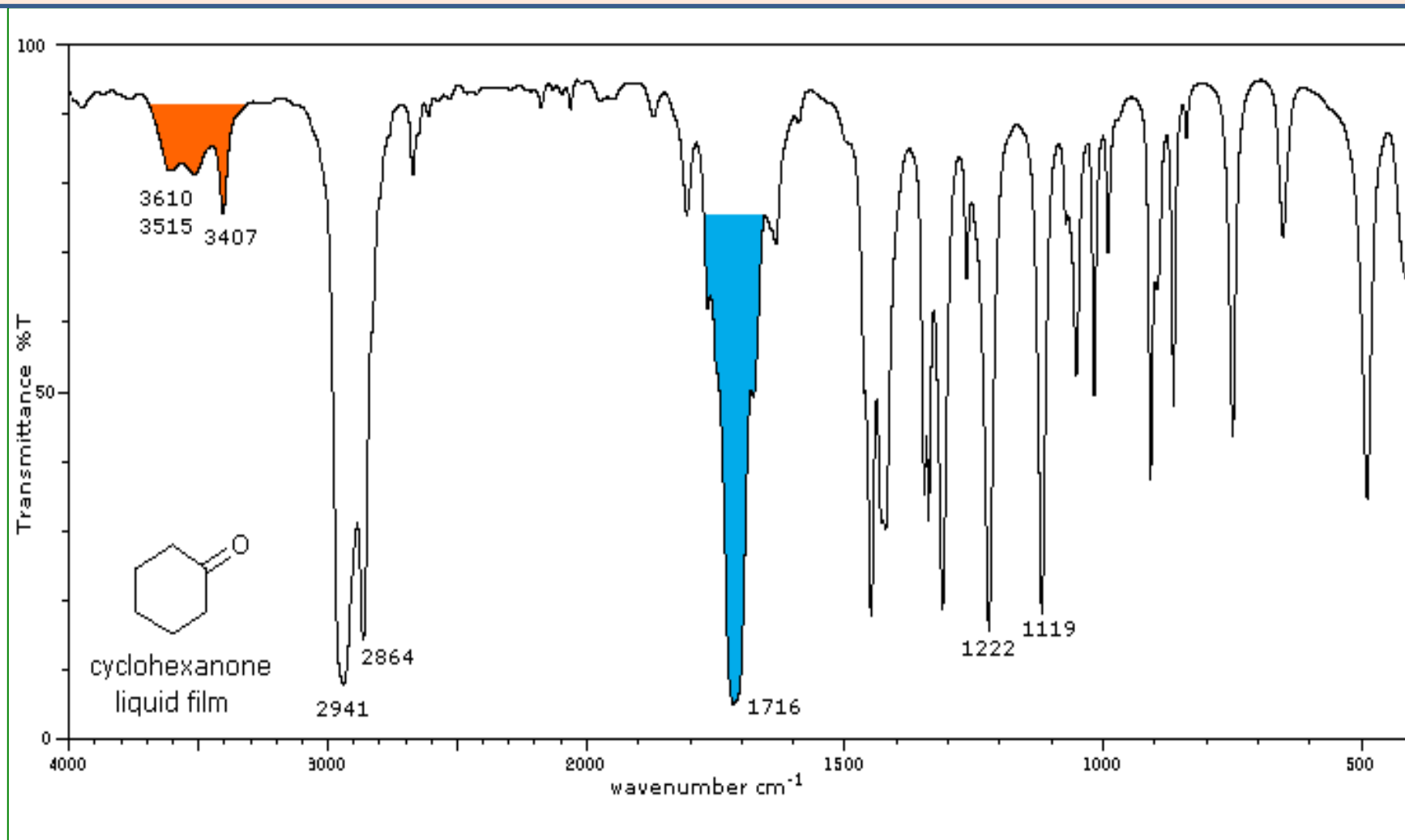
Es. $\nu_{\text{str.}} \text{ C=C , C=O } (\uparrow k) > \nu_{\text{str.}} \text{ C-C , C-O } (\downarrow k)$
 $\nu_{\text{str.}} \text{ C-H , O-H } (\downarrow \mu) > \nu_{\text{str.}} \text{ C-C , O-C } (\uparrow \mu)$

$$\nu = \frac{1}{2\pi} \sqrt{k/\mu}$$



In uno spettro IR è la transizione dallo stato fondamentale ($v=0$) al primo livello vibrazionale ($v=1$) che dà origine alla **banda fondamentale** di assorbimento per quella data coppia di atomi, le altre transizioni a livelli vibrazionale maggiori ($v=1, 2, 3..$) sono molto più rare (anche se possibili) e, tali bande sono dette di **overtones** (sopraton) che, naturalmente, cadono ad una frequenza multipla della banda fondamentale e sono poco intense.

Un es. è dato dall'overitone del gruppo carbonilico C=O chetonico o aldeidico (≈ 1720 cm^{-1}) che si evince a ≈ 3400 cm^{-1} come debole banda sempre nel range dell'IR.

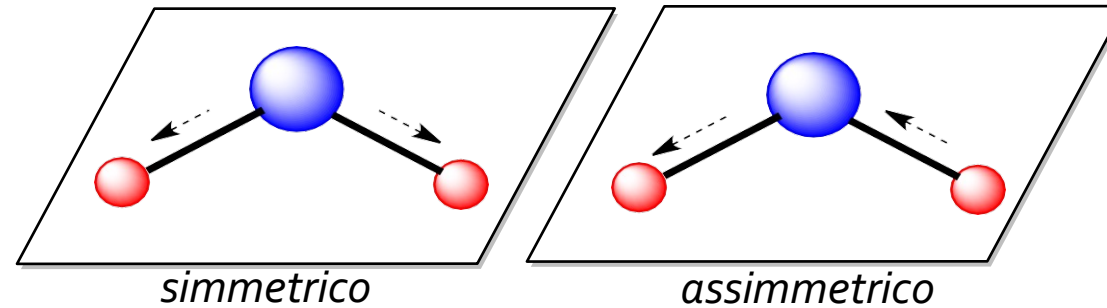


MODI DI VIBRAZIONE DEI LEGAMI

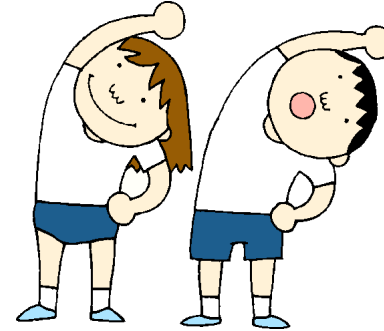
Abbiamo già visto che ci dev'essere un MOMENTO DIPOLARE NON NULO perciò che avvenga risonanza, → assorbimento, → vibrazione molecolare.

Vediamo i vari tipi di VIBRAZIONI MOLECOLARI, ad es., di una molecola di H₂O suddivisi in:

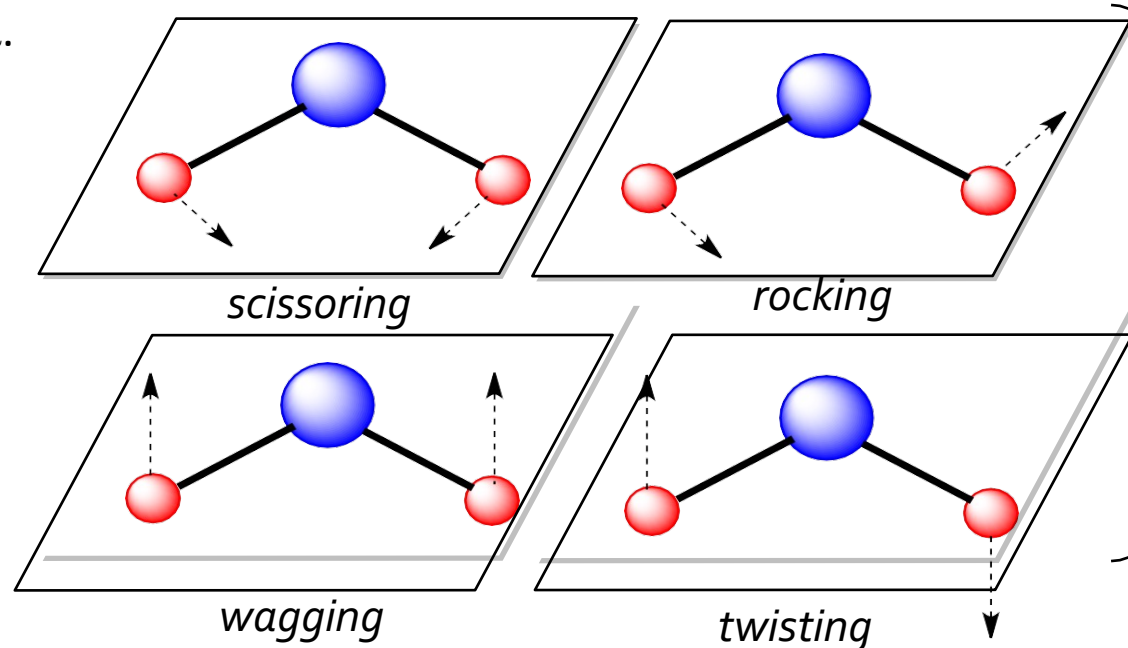
STRETCHING (ν ; stiramento: simmetrico o asimmetrico): comportano un allungamento dei legami chimici di una molecola inducendo variazioni nel loro momento dipolare μ .



*stiramenti
(nel piano: ν)*



BENDING (δ e γ ; piegamento nel piano o fuori dal piano): comportano una modificazione nell'assetto lineare dei legami con variazione degli angoli di legame coinvolti.



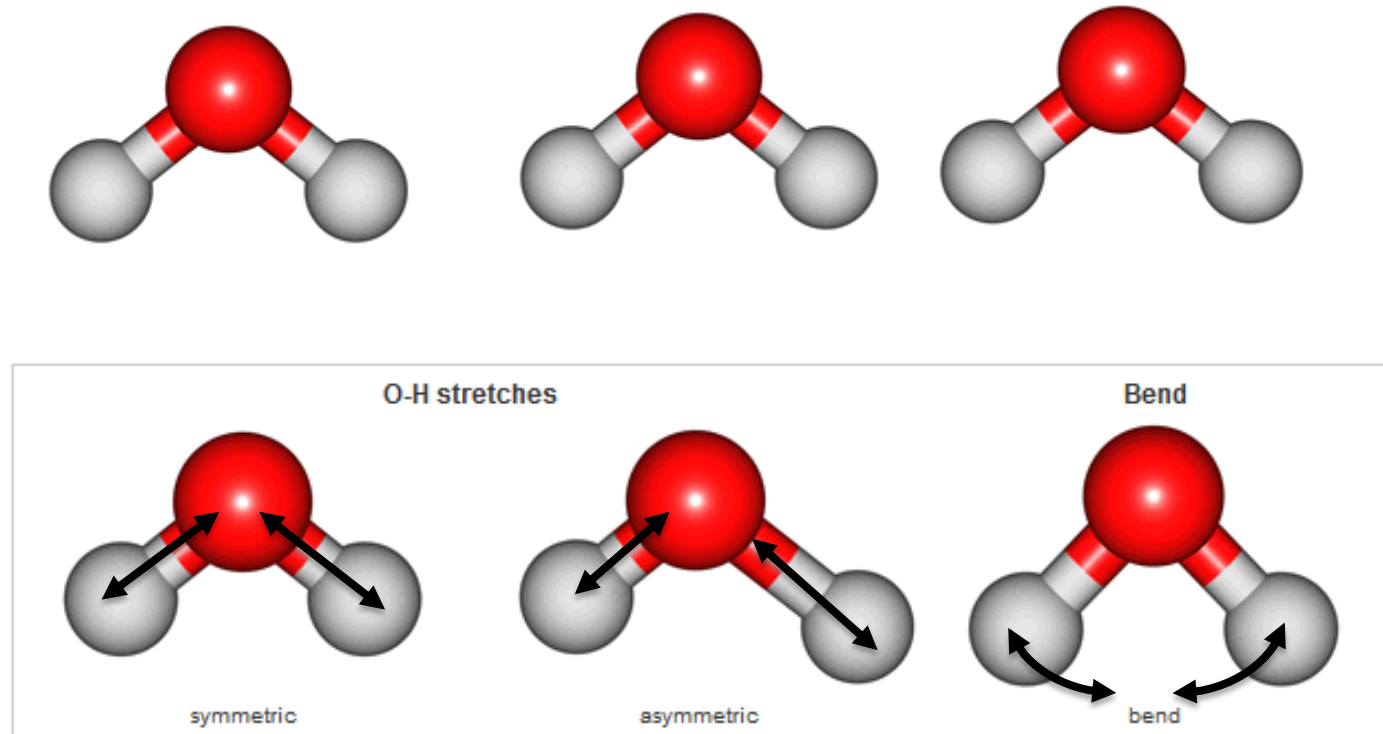
*piegamenti
(deformazioni nel piano: δ)*

*piegamenti
(deformazioni
fuori dal piano: γ)*

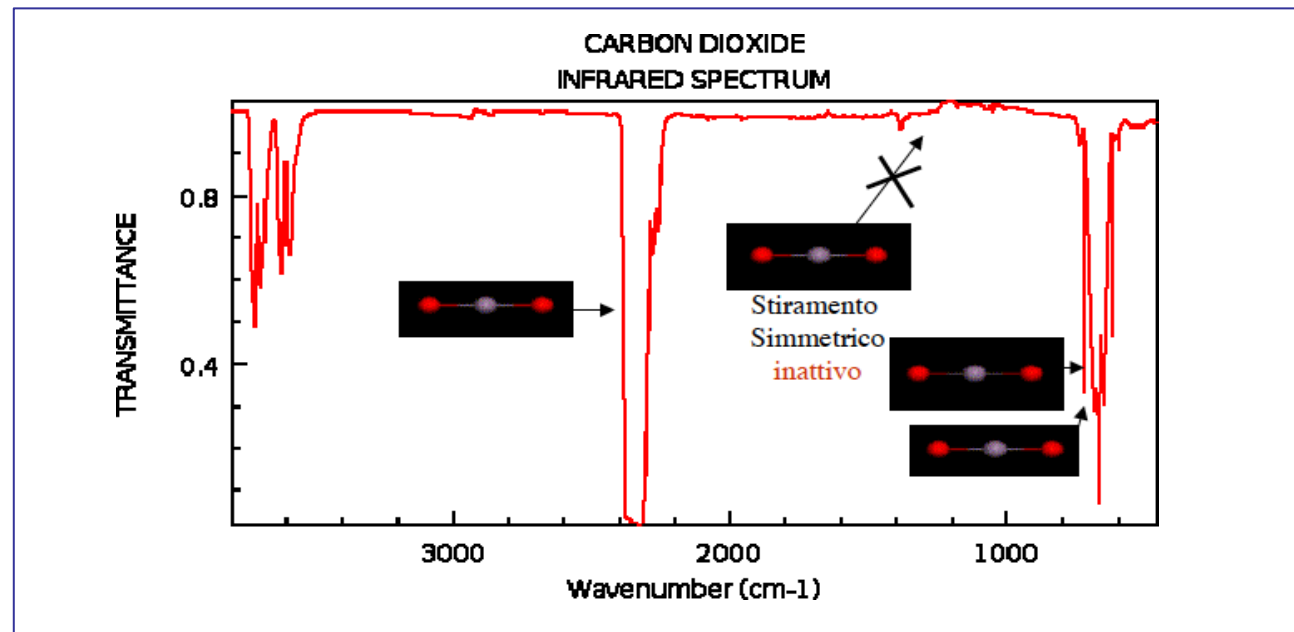
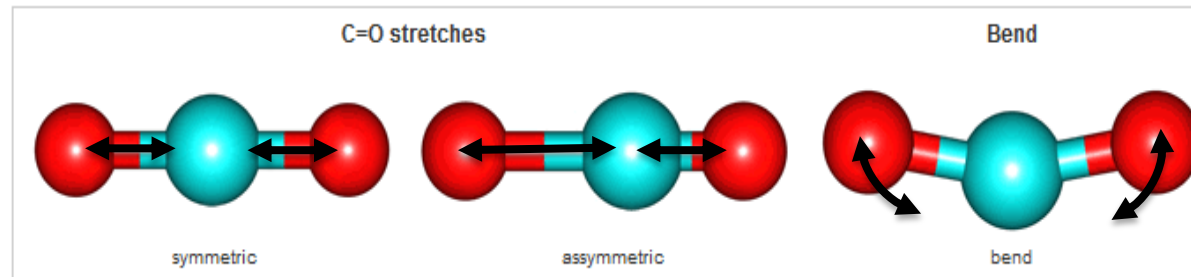


In generale, maggiore è la polarità del legame, maggiore è il suo assorbimento IR. Si genera un campo elettrico stazionario che interagirà con quello fornito dalla sorgente dello strumento (molecole come O_2 o N_2 non assorbono raggi IR in quanto simmetriche).

Esempio: H_2O . Ci sono 3 tipi di vibrazioni: due stiramenti (STRETCHING) e 1 piegamento (BENDING). Sono possibili 2 allungamenti poiché i 2 legami O-H possono vibrare in sincronia (movimento "simmetrico") o fuori sincronia ("asimmetrico"). Tutte e 3 le vibrazioni richiedono diverse quantità di energia, quindi la molecola d'acqua assorbe la radiazione IR a 3 diverse lunghezze d'onda.



Esempio: CO₂. Durante lo stretching e il bending asimmetrici, la simmetria viene persa e viene creato momentaneamente un dipolo. È possibile eccitare queste 2 vibrazioni con la radiazione IR. Durante lo stretching simmetrico, tuttavia, non viene creato alcun momento di dipolo e quindi la radiazione IR non è in grado di eccitare questa vibrazione. La CO₂ quindi assorbe solo a 2 lunghezze d'onda nell'IR.



FREQUENZA VIBRAZIONALE

Dalla legge di Hooke si ricava un'altra equazione che correla la forza elastica, con l'energia coinvolta. All'oscillazione armonica è associata una frequenza, ν , che dipenderà dalle masse degli atomi coinvolti e dalla costante di forza K .

$$\nu = \frac{1}{2\pi} \cdot \sqrt{\frac{K}{\mu}}$$

Ovvero un'energia E :

$$\mu = \frac{m_A \cdot m_B}{m_A + m_B}$$

Massa ridotta

$E = h\nu$

$E \propto \nu$

REGOLE GENERALI:

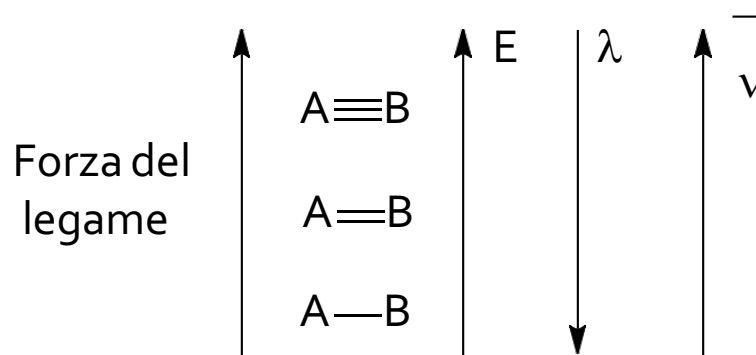
- i. L'energia per indurre stiramenti e piegamenti è inversamente proporzionale alle masse degli atomi coinvolti nella vibrazione; per cui atomi con massa atomica grande, vibreranno più facilmente (a numeri d'onda inferiori, cioè a energie minori):

Es. O-H $\mu = 16 \times 1 / 17 = 0.94$
 C-O $\mu = 12 \times 16 / 28 = 6.86$

$$\mu = \frac{m_A m_B}{m_A + m_B}$$

Infatti: stretching O-H a $3000-3500 \text{ cm}^{-1}$ (energia alta) stretching C-O a $1000-1700 \text{ cm}^{-1}$ (energia bassa)

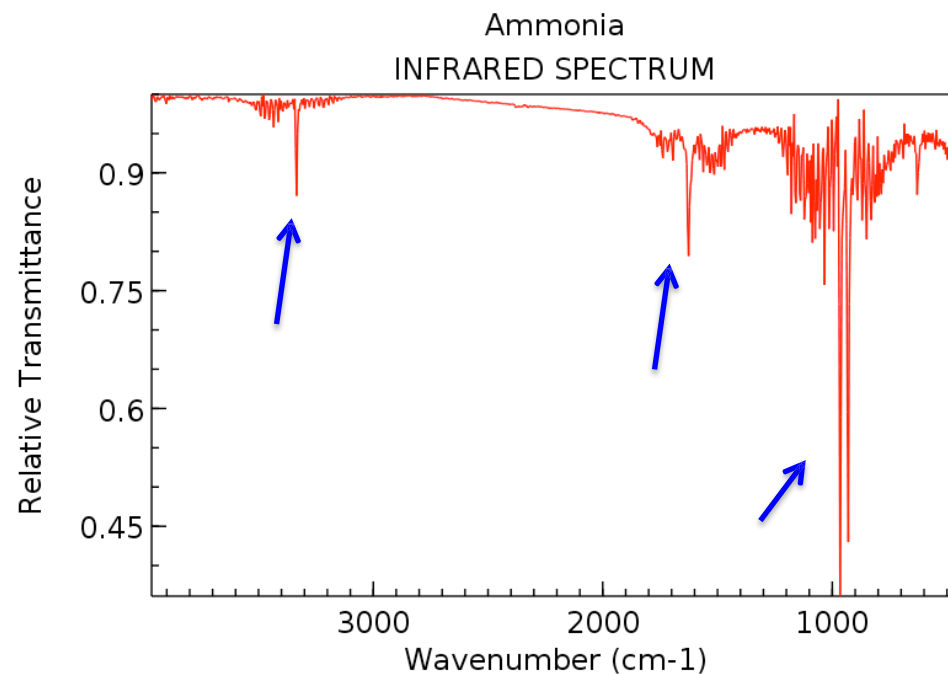
- ii. L'energia vibrazionale è direttamente proporzionale all'ordine di legame, cioè alla forza di legame (costante di forza K).



iii. L'energia vibrazionale richiesta per il bending (δ e γ) è minore rispetto a quella per lo stretching (ν), di conseguenza le deformazioni di bending si troveranno a numeri d'onda minori. Inoltre le bande di bending sono meno "discriminanti" rispetto a quelle di stiramento nella caratterizzazione di una molecola in quanto si trovano in una zona ricca di picchi (fingerprint).

Es. NH_3 : γ N-H: 2 bande a 750-900 cm^{-1} (s/m) e
 δ N-H: 1600 cm^{-1} (m)

ν N-H: 3100-3500 cm^{-1} (m/w)



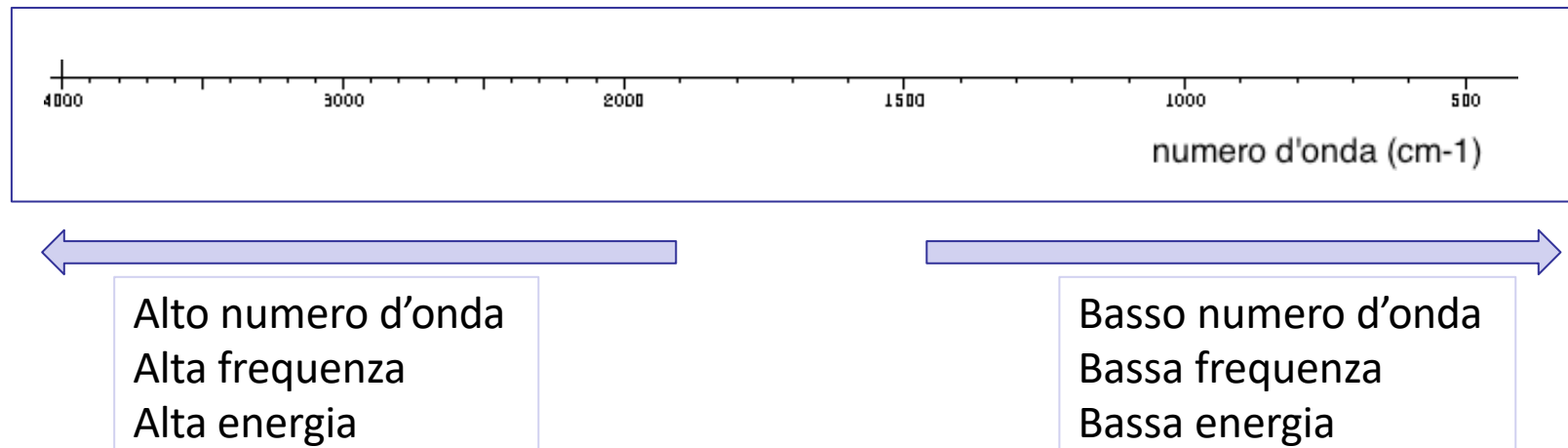
NIST Chemistry WebBook (<http://webbook.nist.gov/chemistry>)

COSA CI DICE UNA “BANDA” NELLO SPETTRO I.R.:

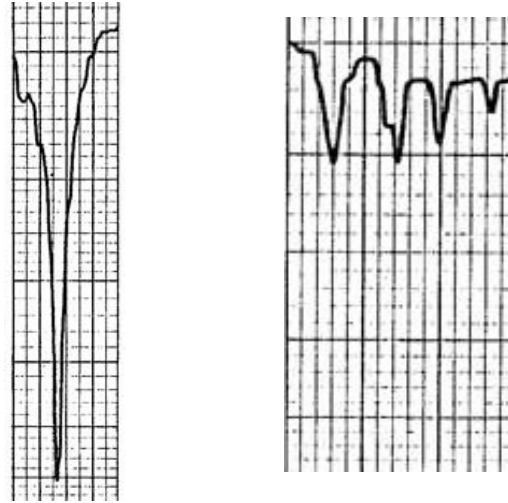
Parametri da osservare:

- Posizione (numero d'onda: $\bar{\nu}$)
- Intensità (T%)
- Forma

- Posizione: è legata all'energia della vibrazione ($h\nu=E$) per cui alla forza di legame degli atomi coinvolti.



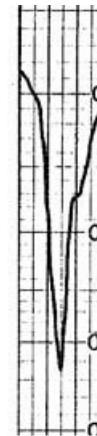
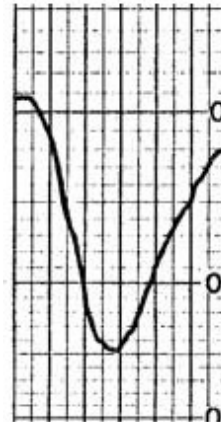
- Intensità: è legata all'efficienza nel trasferimento di energia.



Classificazione intensità bande

- vs: molto forti
- s: forti
- m: medie
- w: deboli
- vw: molto deboli

- Forma: dipende dall'interazione del gruppo funzionale con l'intorno:
 - banda larga: gruppo con forti interazioni (es. O-H per legame H)
 - banda stretta: gruppo isolato (es. C=O)



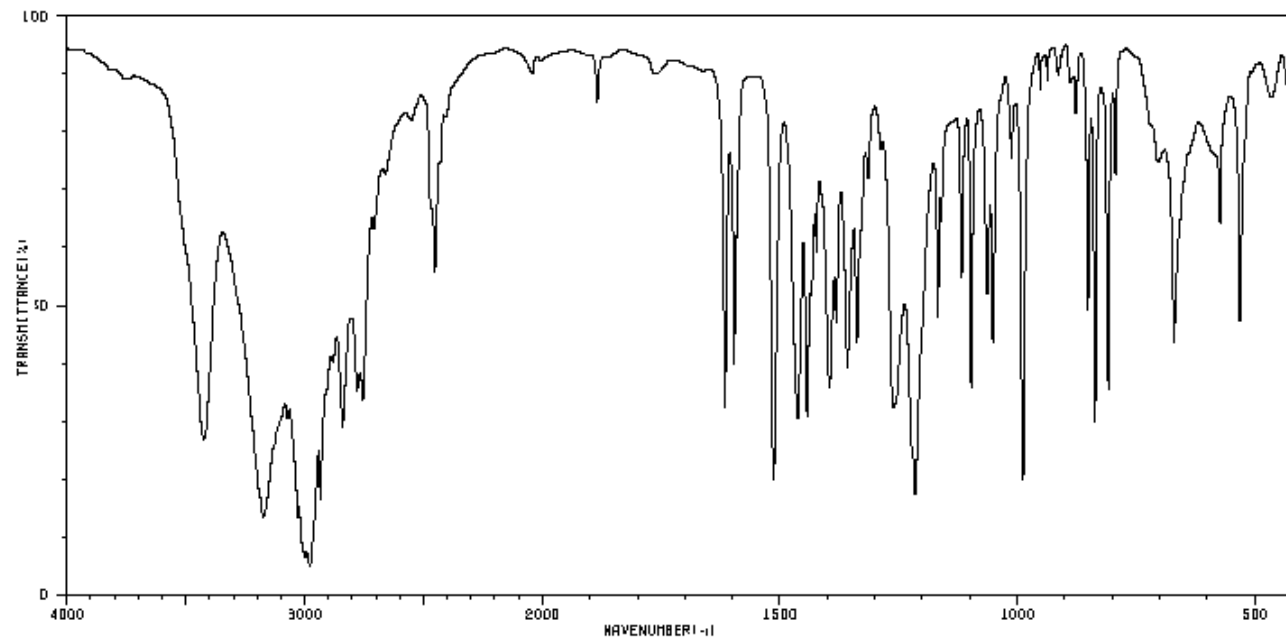
Fonte: R. Cozzi, P. Protti, T. Ruaro -Analisi chimica moderni metodi strumentali- (Zanichelli)

COME INTERPRETIAMO LO SPETTRO I.R.:

Ciò che vediamo, nella pratica, sarà uno spettro “a bande” riportato su un grafico con la Trasmittanza percentuale ($T\% = I/I_0 \cdot 100$) in ordinata contro il numero d'onda ($\bar{\nu} = 1/\lambda$ in cm^{-1}) in ascissa.

Notiamo tutta una serie di bande verso il basso (lacune di trasmittanza) dovute proprio agli assorbimenti (più o meno intensi) relativi dei vari gruppi funzionali della molecola:

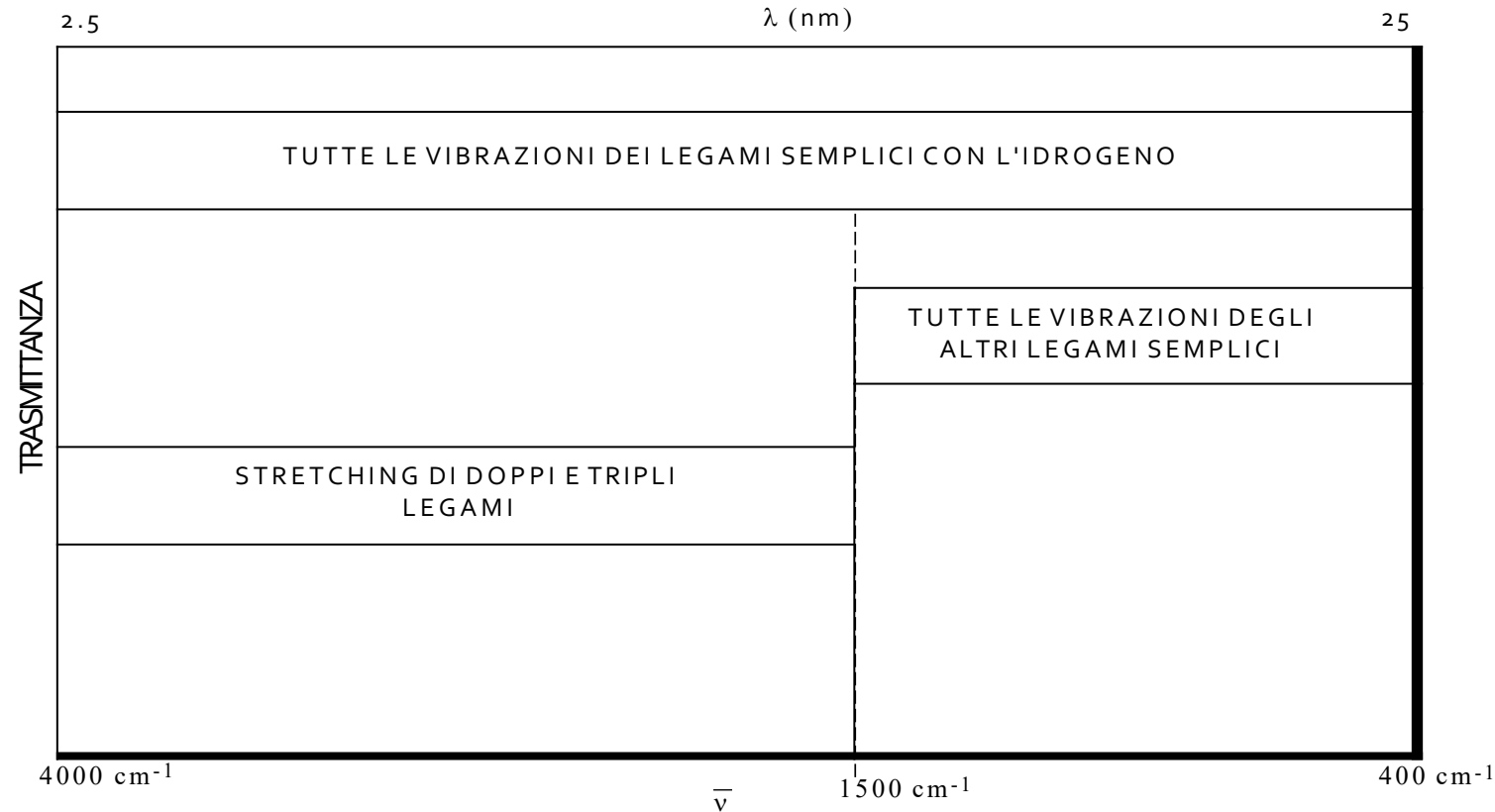
Es. spettro I.R. dell'efedrina cloridrato:



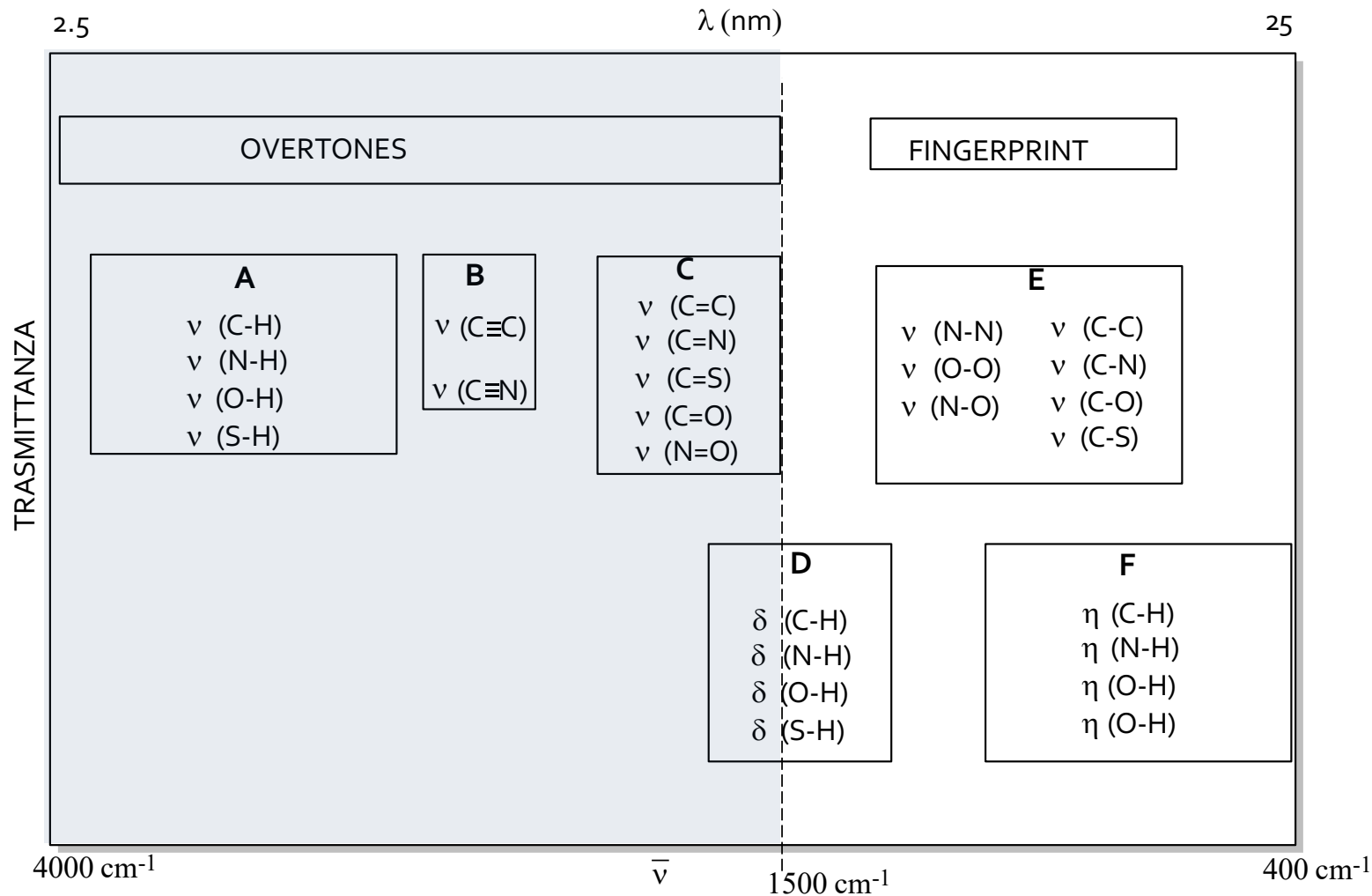
3426	26	2881	38	1613	19	1338	42	1061	42
3174	13	2850	34	1463	29	1261	31	988	19
3072	29	2840	27	1443	29	1216	16	852	47
3026	12	2779	34	1434	49	1168	48	836	28
2996	6	2755	32	1396	34	1117	52	809	34
2978	4	1618	31	1381	44	1097	34	671	42
2936	16	1596	38	1358	37	1063	50	632	46

CN(C)C(C)C(O)c1ccc(O)cc1 ·HCl

LE “ZONE” DELLO SPETTRO I.R.:



Genericamente nello spettro IR a sinistra di 1500 cm⁻¹ si collocano le vibrazioni di stretching dei gruppi funzionali, cioè di doppi e tripli legami tra eteroatomi (C; N, O). A destra di 1500 cm⁻¹, cioè a λ minori, avvengono vibrazioni di tutti i tipi (stretching e bending dentro e fuori dal piano) per i legami singoli, ad eccezione dei legami dell'idrogeno con eteroatomo (C, N, O) che cadono ad energia molto maggiore.



Zona degli Overtones: 4000-1500 cm^{-1}

- Sono $\sim 1/10$ meno intense delle vibrazioni fondamentali e cadono a $\approx$ il doppio del valore di numero d'onda della vibrazione fondamentale. Sono proprie di legami che assorbono in modo intenso (es. C=O)

Zona A: 3650-2500 cm⁻¹

Vibrazione di stiramento (ν) tra idrogeno ed un eteroatomo (Y-H). Essendo legame con alto momento dipolare (μ) hanno costanti di forza elevate ($\uparrow K$) e quindi necessitano di elevate energie di risonanza ($h\nu$). Si tratta di bande, in genere, medio-forti ed intense. Lo stiramento C-H è quello che cade a $\bar{\nu}$ minori (≈ 3000 cm⁻¹) in quanto, pur se la massa ridotta diminuisce (passando da O-H a N-H a C-H) e, quindi, ci si aspetterebbe un legame “più forte”, diminuisce la differenza di elettronegatività (ovvero diminuisce il μ) che prevale e causa un indebolimento del legame più marcato che non per O-H (3000–3500 cm⁻¹) ed N-H (3300–3600 cm⁻¹). Se lo spettro viene eseguito in *nujol* (olio di paraffina: miscela complessa di alcani), tale banda di stretching C-H risulta “mascherata” dallo stesso nujol (numerosi legami C-H).

Zona B 2300-2100 cm⁻¹

Stretching (ν) dei tripli legami $C\equiv X$

Zona C 1800-1500 cm⁻¹

Stretching (ν) dei doppi legami. Cadono anche gli assorbimenti dei doppi legami aromatici, anche se a energie minori data la parziale natura di legame singolo posseduto da questi sistemi.

Zona D 1650-1300 cm⁻¹

Bending nel piano (δ) dei legami singoli dell'idrogeno con un eteroatomo (H-Y).

Zona E 1300-700 cm⁻¹

Stretching dei legami semplici fra atomi diversi dall'idrogeno (C, N, O,). Si nota come passando da legami tripli a doppi ed a legami semplici, la richiesta di energia è sempre minore (numeri d'onda minori).

Zona F 1650-1300 cm⁻¹

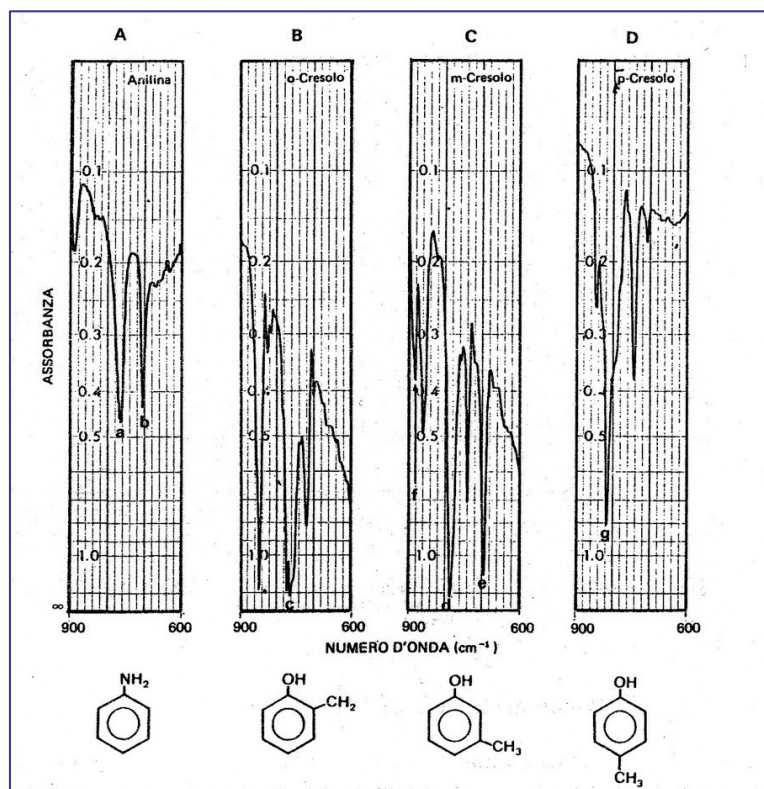
Bending fuori piano (γ) dei legami singoli dell'idrogeno con un eteroatomo (H-Y). La richiesta energetica per la deformazione fuori dal piano è inferiore rispetto a quella nel piano a causa di una minor interazione con l'*intorno* della molecola.

Zona del Fingerprint

Questa zona, che coincide con la zona E, non corrisponde ad una specifica vibrazione di legame, ma a più deformazioni di legame propri della molecola, dando luogo ad una serie di bande numerose e di non facile interpretazione, ma che sono caratteristiche della sostanza in esame, cioè la sua "impronta digitale". Ad es. due molecole che contengono gli stessi gruppi funzionali (che, magari cadono a numeri d'onda pressochè uguali), ma caratteristiche strutturali anche leggermente diverse (es. un gruppo -CH₂- di differenza su una catena alchilica...), danno luogo a spettri IR che risultano differenti proprio nella regione del fingerprint (e quindi discriminabili).

Idrocarburi aromatici

Oltre alle bande medie di stretching C=C aromatico a $1450-1650\text{ cm}^{-1}$, stretching C-H a $\approx 3000\text{ cm}^{-1}$, ed overtones deboli dei C-H a $1660-2000\text{ cm}^{-1}$ molto importante è la zona dei γ $600-900\text{ cm}^{-1}$, corrispondente al bending (γ) fuori del piano dei legami C-H di anelli aromatici variamente sostituiti. Dà informazioni sulla sostituzione dell'anello e si presentano bande in genere intense ed affilate.



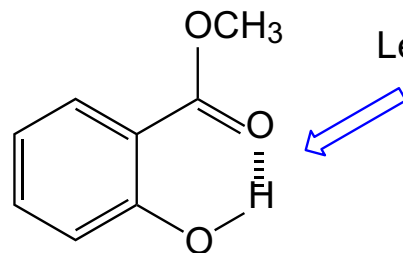
- A) 5H adiacenti: 2 bande medie $700-770\text{ cm}^{-1}$
- B) 4H adiacenti: 1 banda molto intensa
- C) 3H adiacenti: 2 bande intense più 1 debole dovuta al γ del C-H isolato
- D) 2H adiacenti: 1 banda intensa verso 850 cm^{-1}

Fonte: R. Cozzi, P. Protti, T. Ruaro -Analisi chimica moderni metodi strumentali- (Zanichelli)

Alcoli e fenoli

Importante lo stretching dell'O-H nella zona ad alte energie (3000-3600 cm^{-1}). In particolare tre frequenze di assorbimento:

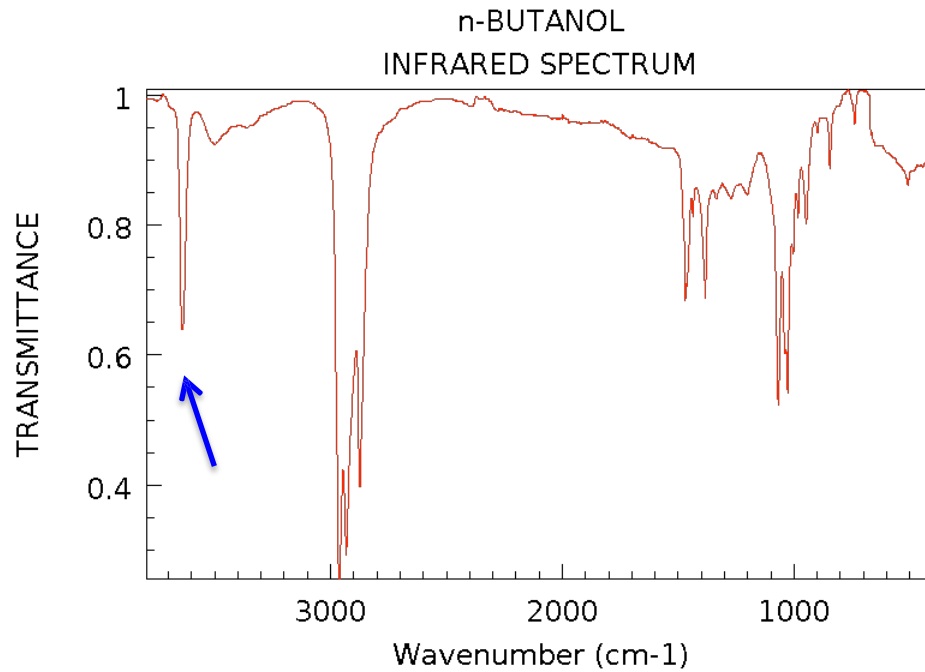
1. O-H libero: ν 3580-3650 cm^{-1} (banda affilata: zona A). E' dovuta a soluzioni diluite o in fase vapore, dove mancano interazioni intermolecolari.
2. O-H associato intermolecolare: $\bar{\nu}$ 3200-3550 cm^{-1} (banda allargata caratteristica: zona A). E' tipica dell'O-H in cui c'è possibilità di legami H tra le stesse molecole (soluzioni concentrate, mancanza di impedimenti sterici nella molecola). Il leg-H indebolisce la costante di forza ($\downarrow K$) del legame O-H e quindi è richiesta una minor energia ($\downarrow \nu$).
3. O-H associato intramolecolare: $\bar{\nu}$ 3050-3550 cm^{-1} (banda allargata: zona A). A differenza del caso sopra, la diluizione non ha effetto, ma più forte è il leg.-H, minore è l'energia richiesta e, quindi $\downarrow \nu$.



Salicilato di metile

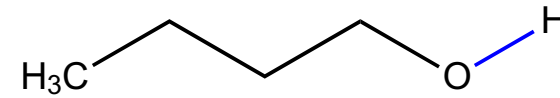
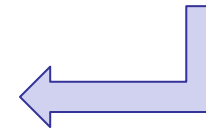
Legame -H intramolecolare

4. Inoltre stretching (ν) C-O 1200-1260 cm^{-1} (bande forti) e bending (δ) O-H fingerprint (deboli, poco importanti)



NIST Chemistry WebBook (<http://webbook.nist.gov/chemistry>)

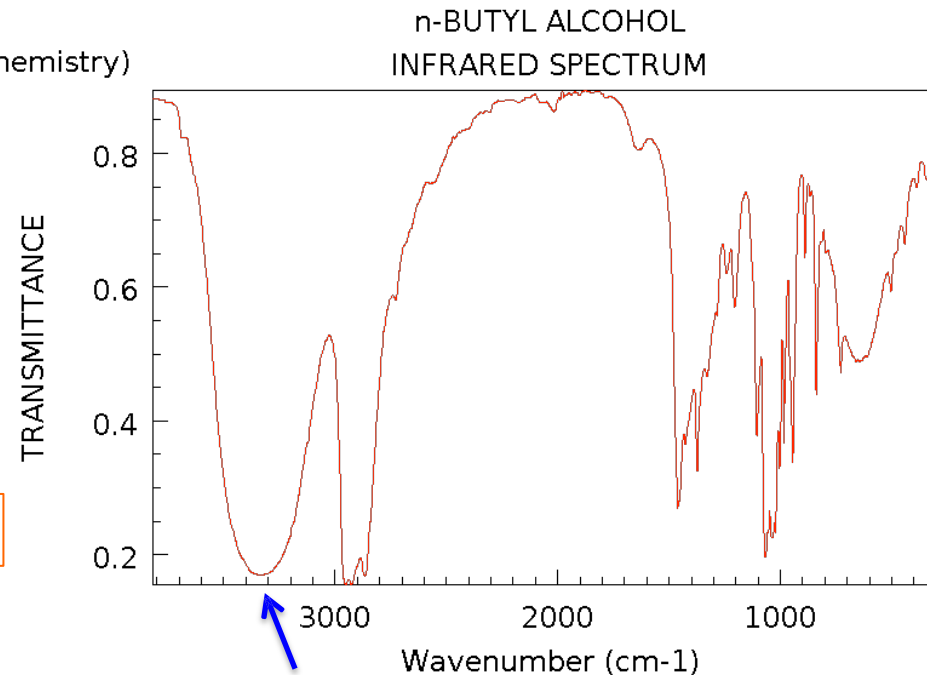
Spettro eseguito allo 0.5% in CCl₄
(sostanza diluita)



Spettro eseguito su film
liquido (sostanza pura)

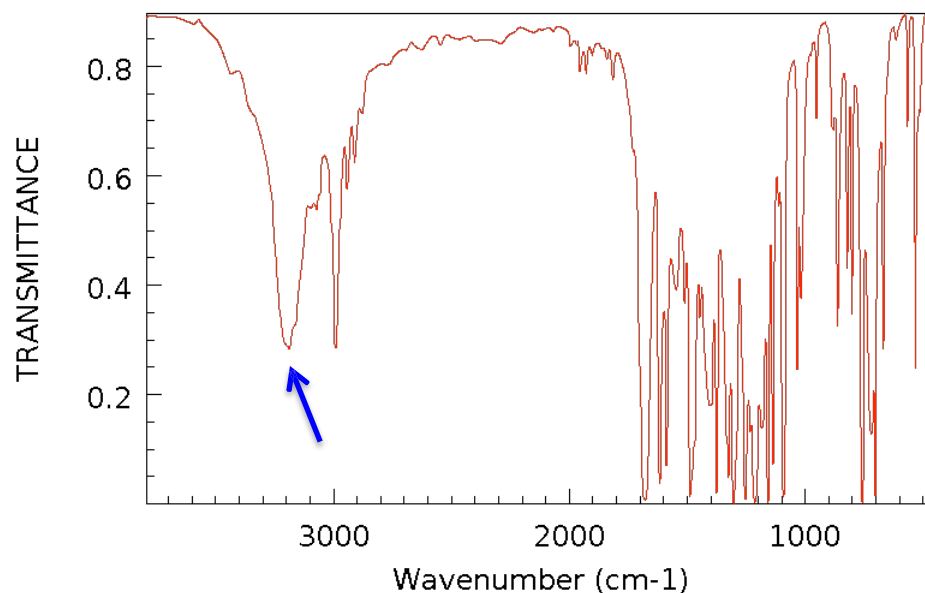


Legame H intermolecolare



NIST Chemistry WebBook (<http://webbook.nist.gov/chemistry>)

SALICYLIC ACID, ETHYL ESTER
INFRARED SPECTRUM



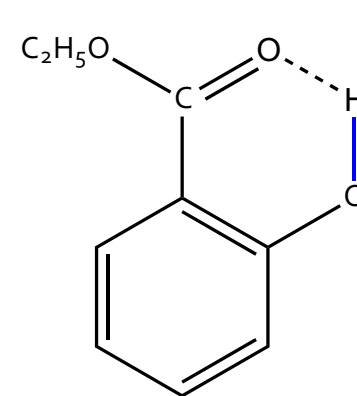
NIST Chemistry WebBook (<http://webbook.nist.gov/chemistry>)

IR in fase gassosa (bande quasi identiche: la diluizione non cambia la forma)

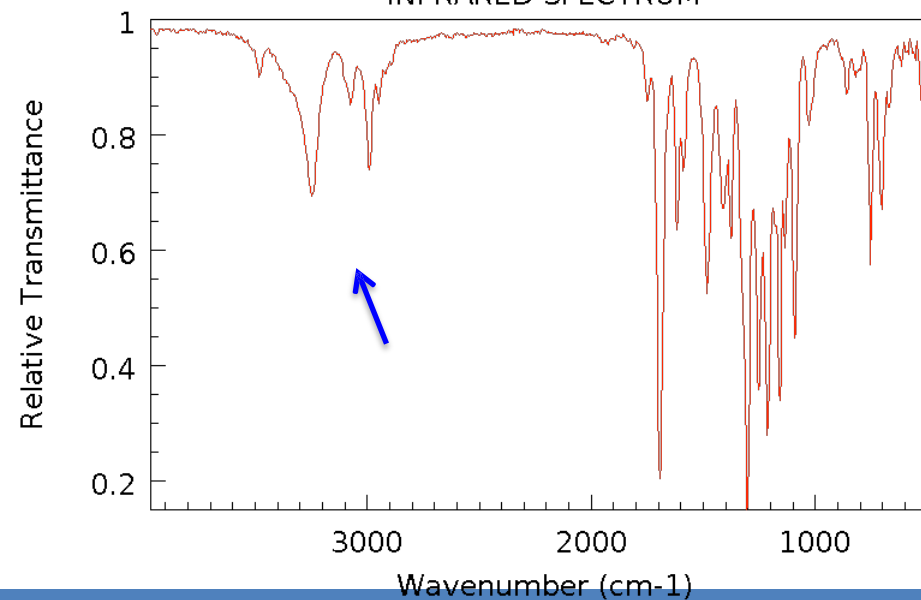


Legame H intramolecolare

Soluzione 10% CCl₄

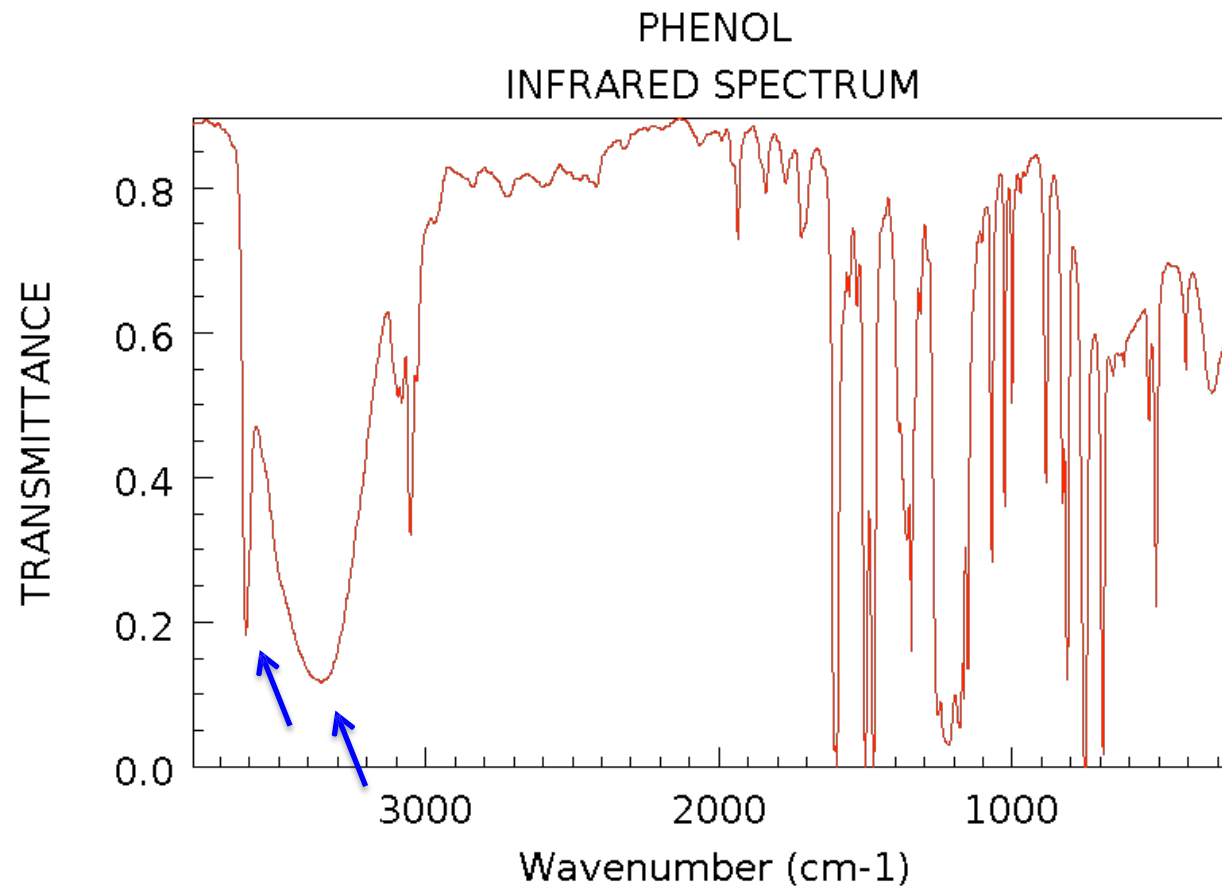


Benzoic acid, 2-hydroxy-, ethyl ester
INFRARED SPECTRUM

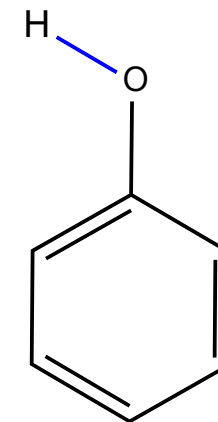


NIST Chemistry WebBook (<http://webbook.nist.gov/chemistry>)

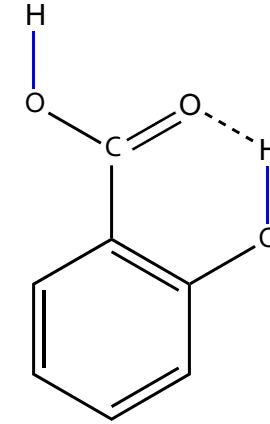
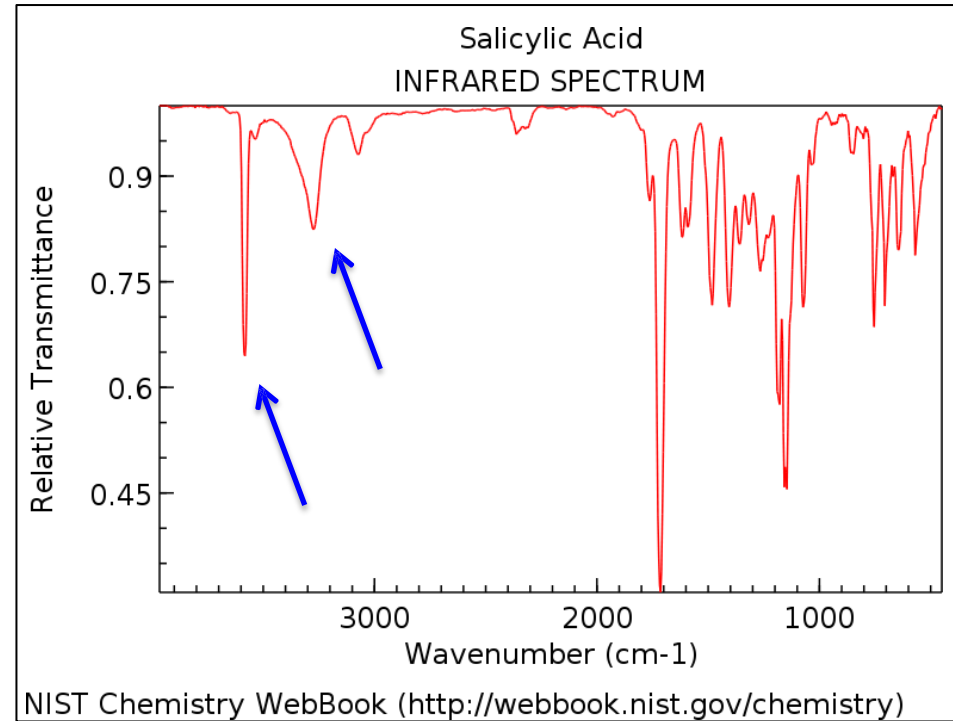
Spesso si possono riscontrare sia la banda dell'OH libero, che di quello associato con legame idrogeno. Un es. lo spettro del fenolo (leg.H intermolecolare):



NIST Chemistry WebBook (<http://webbook.nist.gov/chemistry>)



L'acido salicilico presenta due gruppi ossidrilici che daranno due bande distinte di stretching O-H ben visibili dovuti ad entrambi gli ossidrili della molecola.



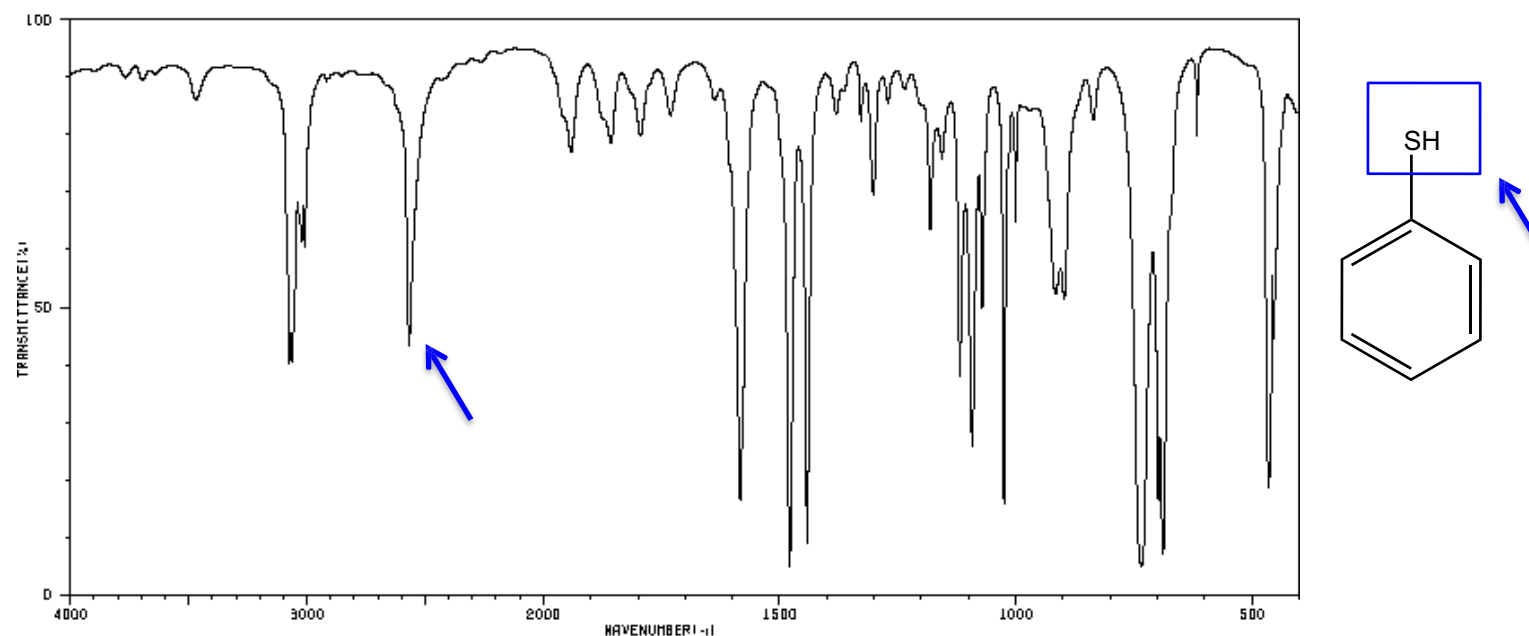
Si può notare la differenza tra i due segnali dovuta al legame idrogeno intramolecolare del protone ossidrilico legato all'anello benzenico a frequenze minori ($\downarrow \nu$, $\downarrow \bar{\nu}$) e di forma “allargata” rispetto al segnale dello stretching O-H dell'ossidrile carbossilico, che risulta “stretto” (assenza di leg.H) e a frequenze maggiori ($\uparrow \nu$, $\uparrow \bar{\nu}$).

Gruppo tiolico: S-H

Al pari del gruppo ossidrilico (OH), la banda più importante riguarda lo stretching nella zona A e, a seguire, i bending nella zona D ed F.

Le frequenze sono minori perché minore è la costante di forza (K) del legame S-H essendo lo zolfo più “pesante” (P.A.= 32.066) di altri eteroatomi.

Stretching (ν) S-H: $\approx 2600 \text{ cm}^{-1}$



Ammine

In particolare stretching e bending N-H:

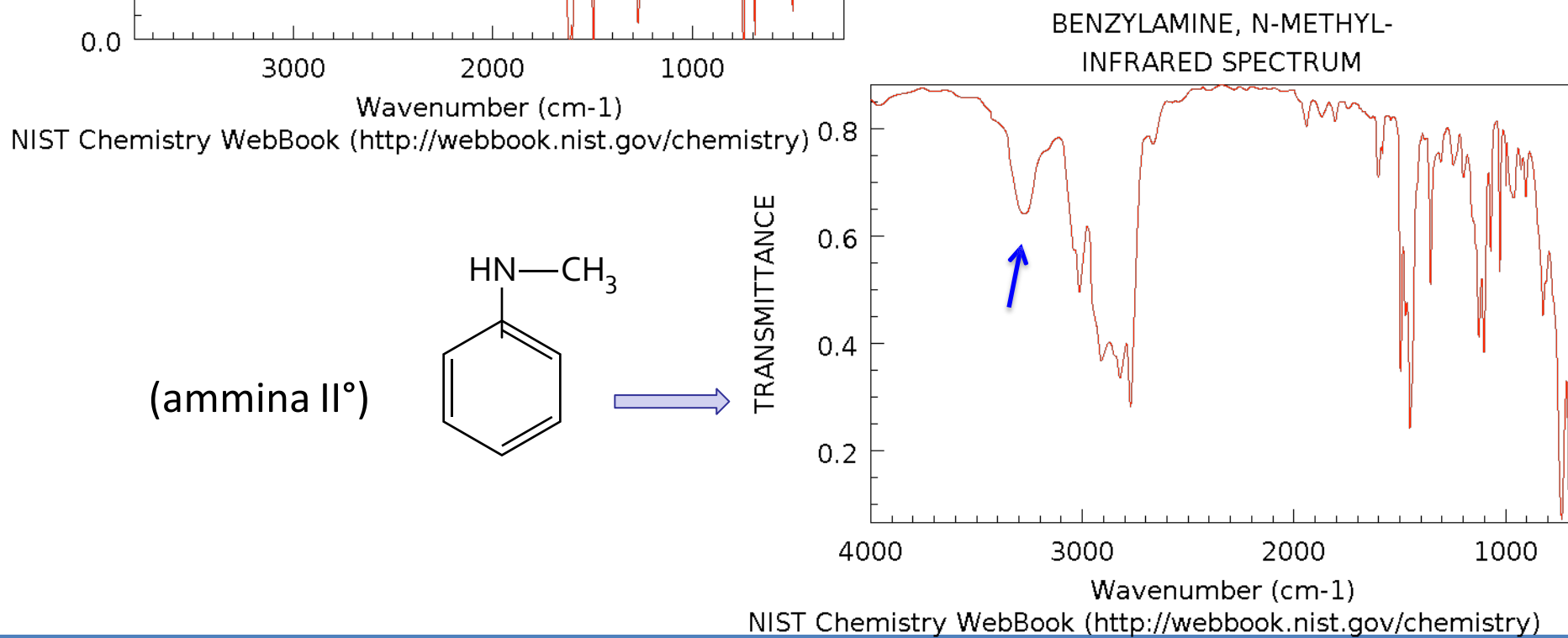
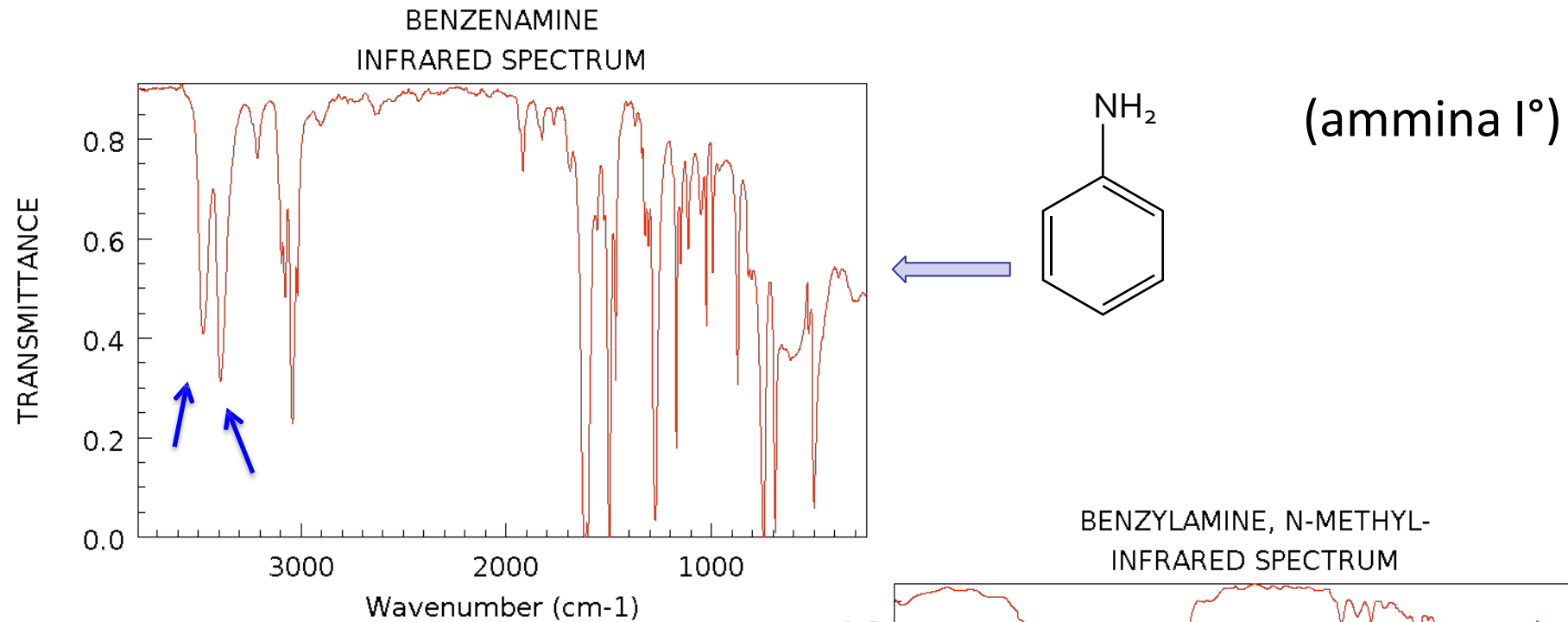
1. Stretching (ν) N-H:

- Ammine I°: 2 bande ≈ 3300 e 3400 cm^{-1} (deboli: zona A) di $\nu_{\text{sim.}}$ e $\nu_{\text{assim.}}$
- Ammine II°: 1 banda $\approx 3310\text{-}3350 \text{ cm}^{-1}$ (debole: zona A) di $\nu_{\text{sim.}}$
- Ammine III°: NON assorbono (nessun legame N-H)

2. Bending N-H:

- Ammine I°: 2 bande di bending;
 - $1580\text{-}1650 \text{ cm}^{-1}$ (media: zona D) di δ
 - $750\text{-}900 \text{ cm}^{-1}$ (forte e larga: zona F) di γ
- Ammine II°
 - $700\text{-}800 \text{ cm}^{-1}$: (forte e larga: zona F) di γ

Inoltre stretching (ν) C-N: $1020\text{-}1250 \text{ cm}^{-1}$ (media-debole: zona E); scarsa importanza.



Gruppo carbonilico

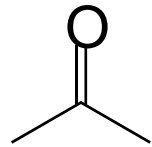
Stretching (ν) C=O: 1550-1880 cm^{-1}

E' la banda di assorbimento più "interessante" e la più studiata in spettroscopia IR. Il valore della frequenza è strettamente correlato al tipo di sostituyente legato al C carbonilico.

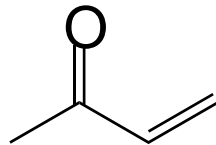


Il sostituyente va ad influenzare la costante di forza, K , del legame C=O e, di conseguenza, la frequenza di assorbimento, ν (ovvero il numero d'onda, $\bar{\nu}$).

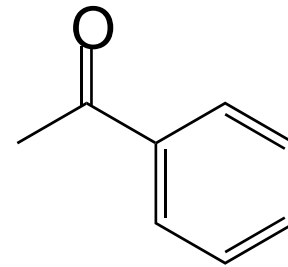
Es.



1720 cm^{-1}

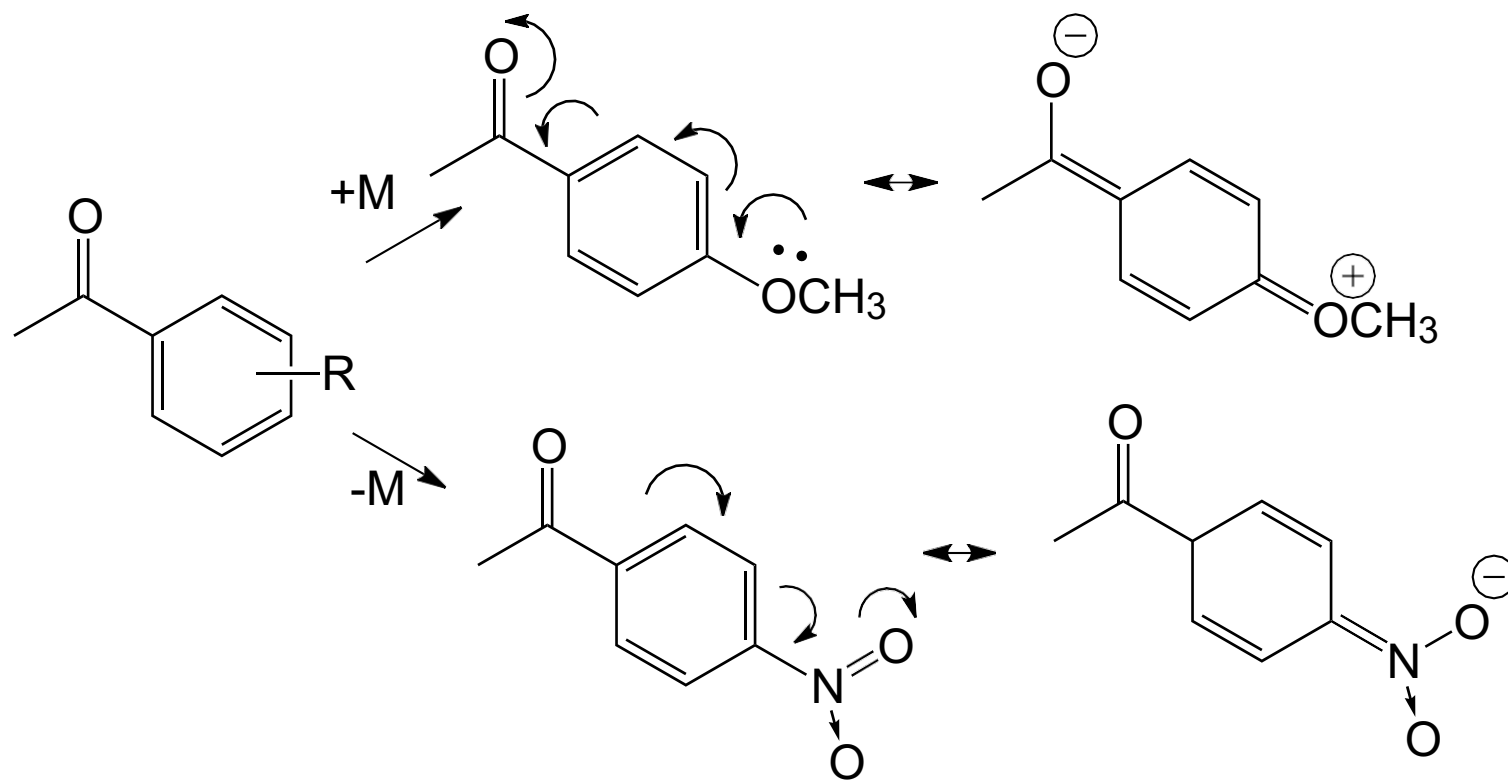


~1700 cm^{-1}

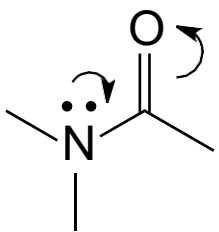
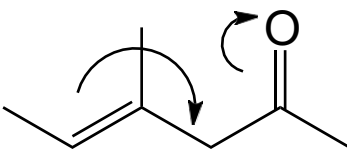
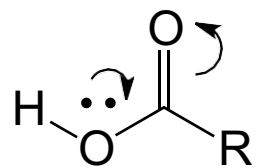
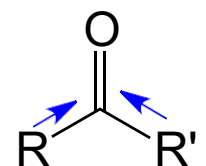
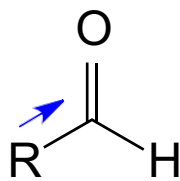
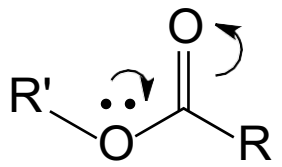
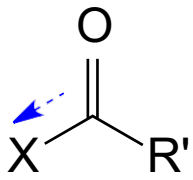
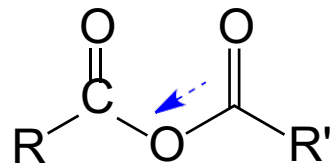


~1700 cm^{-1}

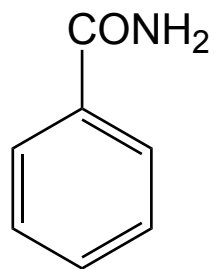
Se presenti sostituenti sull'anello, essi influenzeranno la forza del π legame tra C ed O, a seconda della loro natura. Infatti sostituenti elettron-repulsori (es. $-\text{OCH}_3$, $-\text{CH}_3$, ecc.), delocalizzeranno maggiormente la carica negativa indebolendo così il π legame, quindi $\downarrow K$ e $\downarrow \bar{\nu}$; viceversa nel caso di sostituenti elettron-attrattori (es. NO_2): $\uparrow K$ e $\uparrow \bar{\nu}$.



Il discorso appena fatto vale in generale, per cui si avrà un andamento del tipo:

Ammidi (+M)	Coniugati (+M)	Ac. carbossilici (+M)	Chetoni (+I)
 $<1700\text{ cm}^{-1}$	 $<1700\text{ cm}^{-1}$	 $\sim 1715\text{ cm}^{-1}$	 1720 cm^{-1}
Aldeidi (+I)	Esteri (+M)	Alogenuri acilici (-I)	Anidridi (-I)
 $\sim 1740\text{ cm}^{-1}$	 $\sim 1740\text{ cm}^{-1}$	 $\sim 1800\text{ cm}^{-1}$	 $\sim 1850\text{ e } \sim 1750\text{ cm}^{-1}$

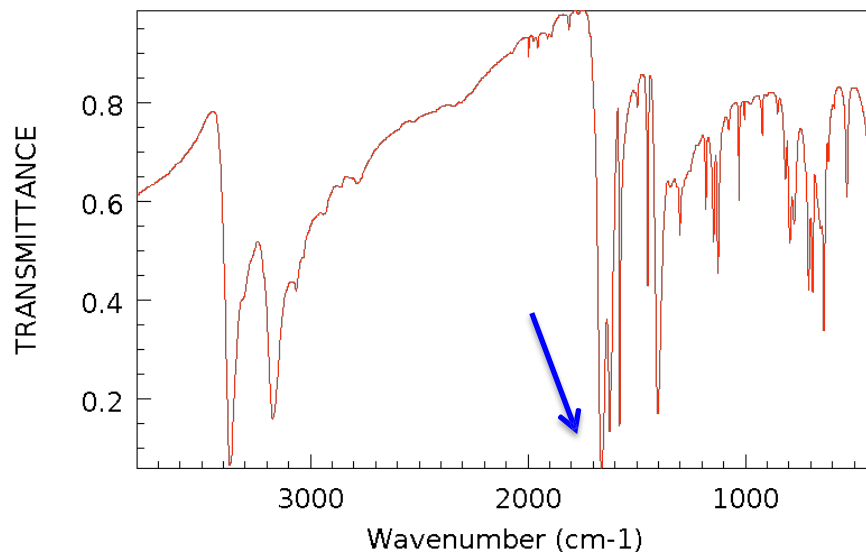
$\bar{\nu}$ Aumenterà con la stabilizzazione del doppio legame C=O.



Benzamide

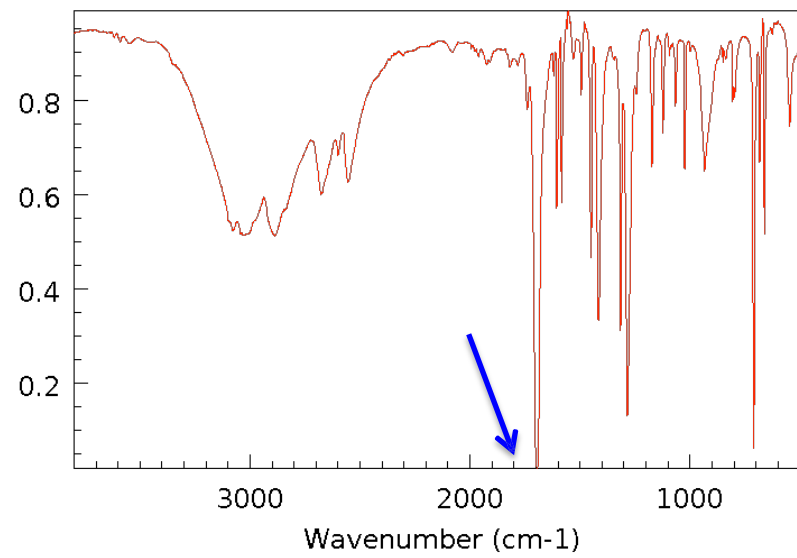
Str. = 1661 cm⁻¹

BENZAMIDE
INFRARED SPECTRUM

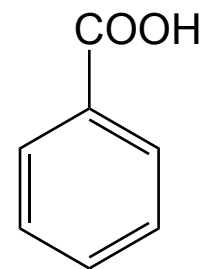


NIST Chemistry WebBook (<http://webbook.nist.gov/chemistry>)

Benzoic acid
INFRARED SPECTRUM



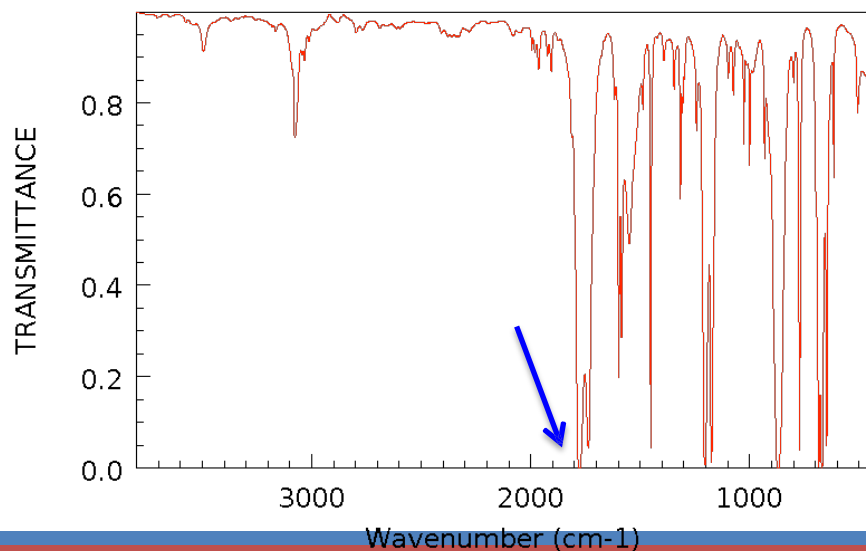
NIST Chemistry WebBook (<http://webbook.nist.gov/chemistry>)



Acido Benzoico

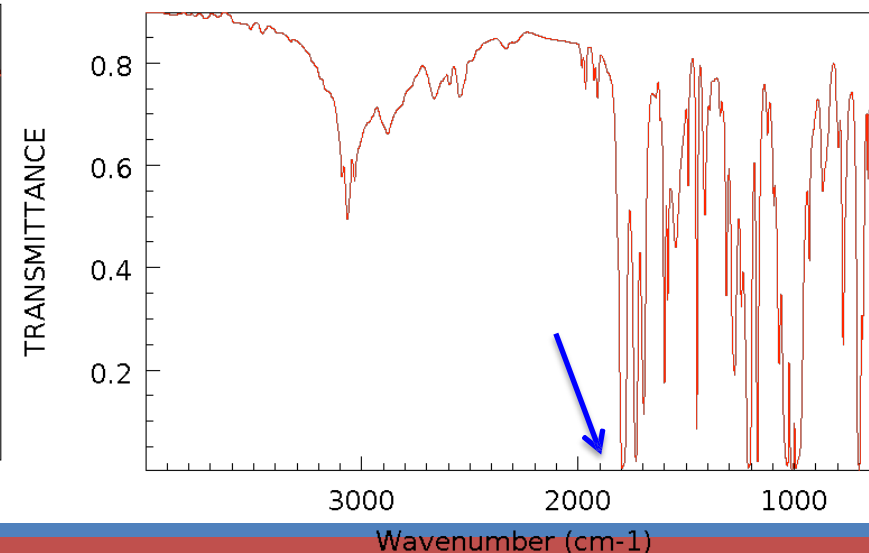
Str. = 1689 cm⁻¹

BENZOYL CHLORIDE
INFRARED SPECTRUM

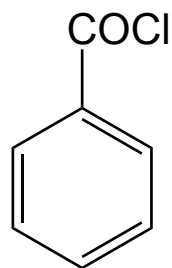


NIST Chemistry WebBook (<http://webbook.nist.gov/chemistry>)

BENZOIC ANHYDRIDE
INFRARED SPECTRUM

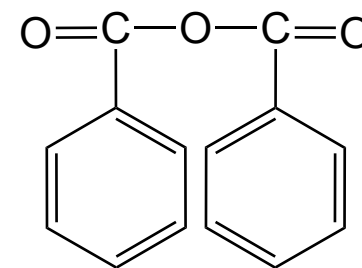


NIST Chemistry WebBook (<http://webbook.nist.gov/chemistry>)



Benzil cloruro

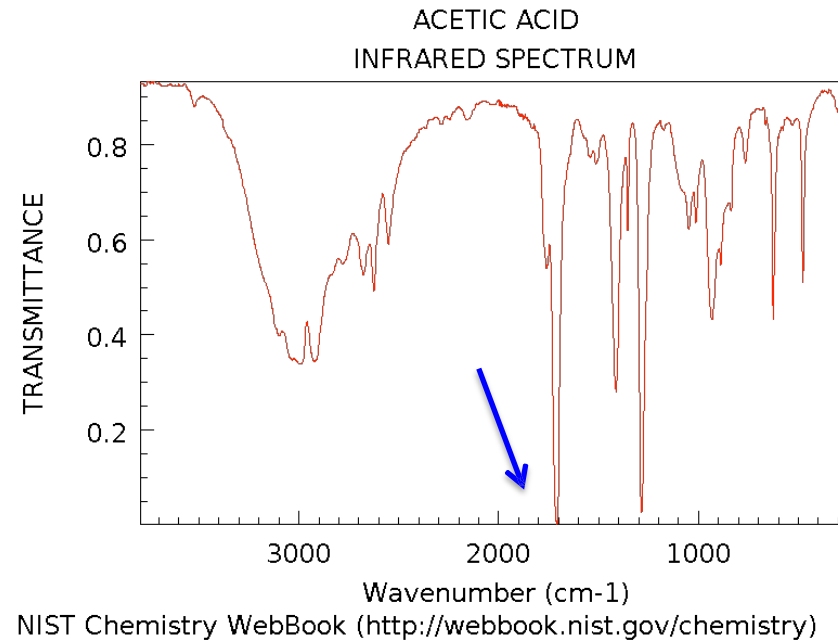
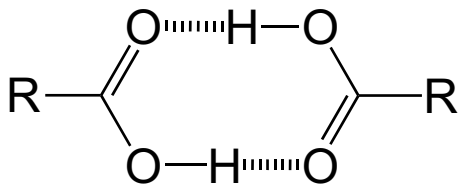
Str. = 1775 cm⁻¹



Anidride Benzoica

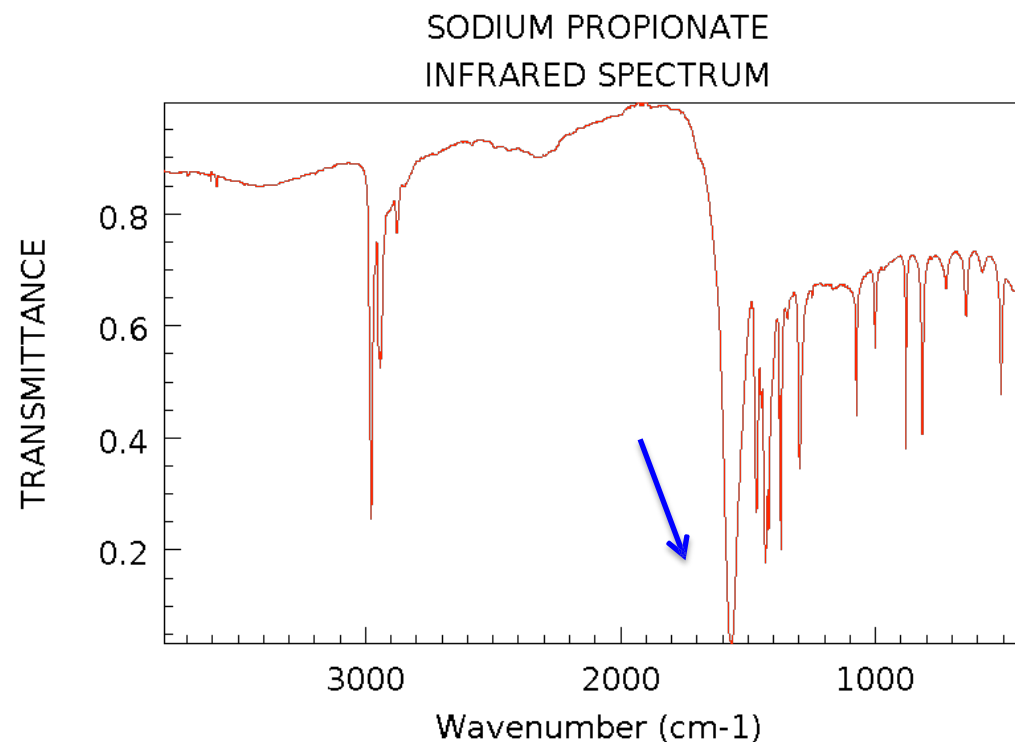
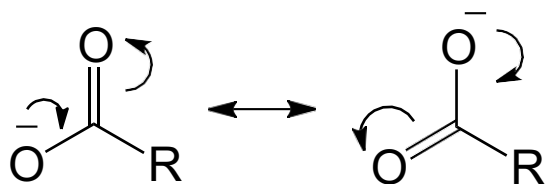
Str. = 1788 cm⁻¹

Infine bisogna ricordare che gli acidi carbossilici daranno anche una banda relativa allo stretching O-H allargata verso i 3000 cm^{-1} e, inoltre, formeranno dei dimeri che indeboliranno (per leg-H) il legame C=O che cadrà a frequenze minori ($\downarrow \nu, \downarrow \bar{\nu}$):



- $\bar{\nu}$ O-H: $\approx 3000 \text{ cm}^{-1}$ banda larga con più massimi a causa del leg.-H
- $\bar{\nu}$ C=O: $\approx 1710 \text{ cm}^{-1}$ banda intensa monomero (raramente singola) più frequente
 $< 1700 \text{ cm}^{-1}$ banda intensa dimero (diminuisce la K per il leg.H)
- $\bar{\nu}$ C-O: $\approx 1300 \text{ cm}^{-1}$ banda intensa

Lo ione carbossilato, non avendo il carattere “puro” di doppio legame, ma un ordine di legame 1,5 a causa delle 2 forme di risonanza, presenta lo stretching del legame C=O a frequenze minori di tutti, ovvero anche < 1600 (banda forte, ν ass.).



NIST Chemistry WebBook (<http://webbook.nist.gov/chemistry>)

Gruppo nitroso (N=O) e nitro (NO₂)

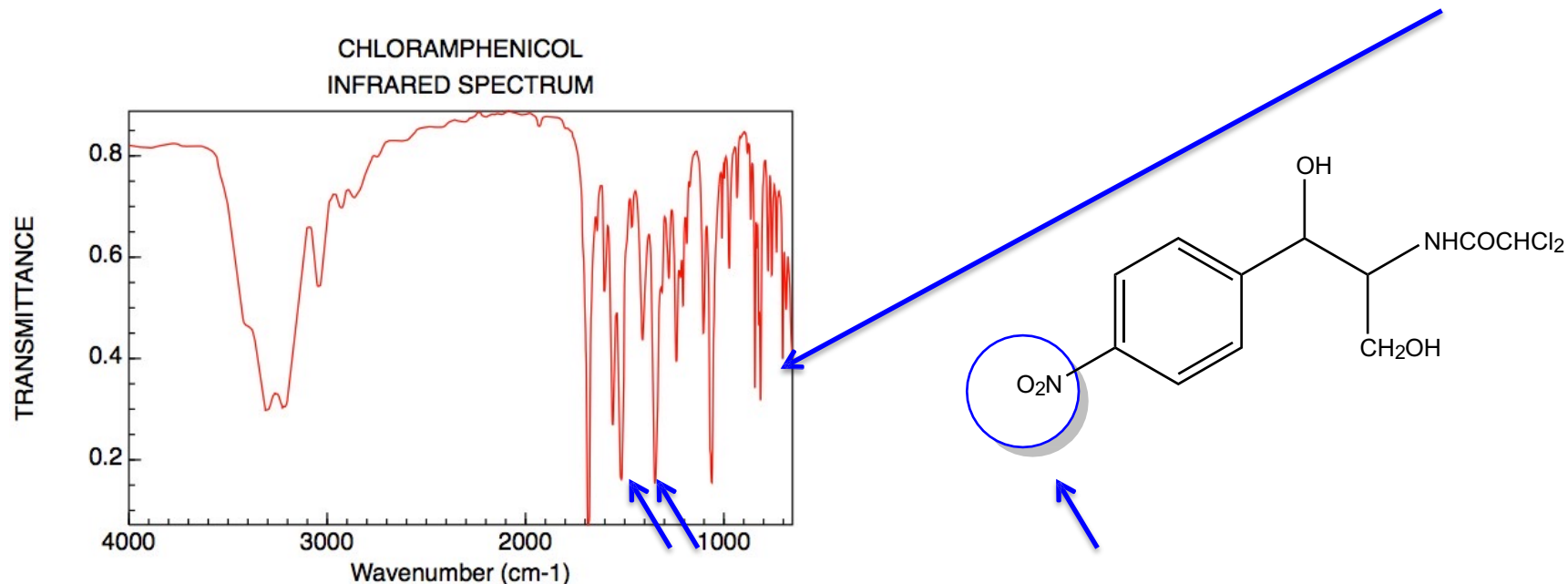
Sono vibrazioni paragonabili al gruppo carbonilico, ma con K minore e frequenze minori. Stretching dei doppi legami nella zona B, più lo stiramento dei rispettivi legami semplici.

Nitroso:

Stretching (ν) N=O: 1550-1600 cm⁻¹ (s) e stretching (ν) C-N: $\approx$ 1100 cm⁻¹ (s)

Nitro:

Stretching NO₂: (ν_{sim}) $\approx$ 1550 cm⁻¹(s) e (ν_{asim}) $\approx$ 1370 cm⁻¹(s); stretching (ν) C-N: $\approx$ 900 cm⁻¹ (w)

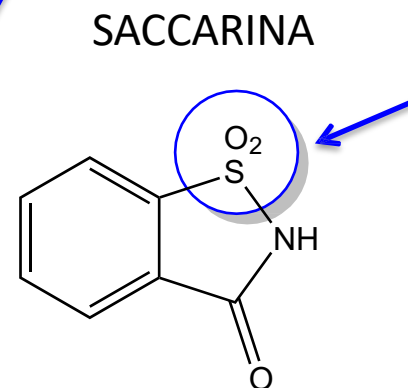
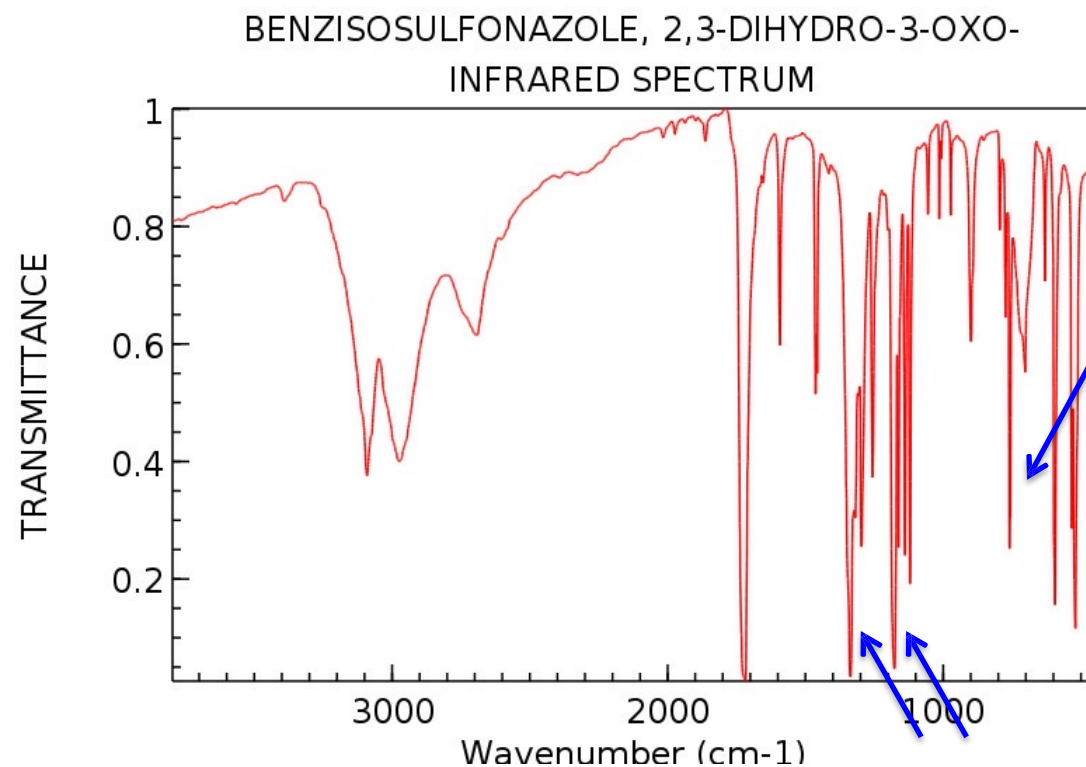


Gruppo solfo (S=O) e fosfo (P=O)

Solfo e fosfo:

Stretching (ν) P=O e S=O: $1000\text{--}1480\text{ cm}^{-1}$ (2 bande: ν_{sim} e ν_{asim})

Anche: Stretching (ν) P-O: $1000\text{--}1250\text{ cm}^{-1}$ e S-O e C-S: da 1000 cm^{-1} in giù



Ioni inorganici

Ione ammonio: 3030 - 3300 cm^{-1} (Zona A: stretching N-H)

Cianuro, tiocianato, cianato: 2000 – 2200 cm^{-1} (Zona B: stretching tripli legami $\text{C}\equiv\text{N}$)

Carbonato: 1410 – 1450 cm^{-1}

Solfato: 1008 – 1130 cm^{-1}

Nitrato: 1350 – 1380 cm^{-1}

Nitrito: 1230 – 1250 cm^{-1}

Fosfato: 1000 – 1100 cm^{-1}



Zona E: stretching legami singoli $\neq \text{H}$

Sito web per spettri sostanze organiche

<https://webbook.nist.gov/chemistry/>

NIST National Institute of Standards and Technology
U.S. Department of Commerce

NIST Chemistry WebBook, SRD 69

Home Search NIST Data About

Species Data by Chemical Name

Search for species by chemical name

Please enter the chemical name or formula to conduct your search ([Help](#)):

1. Enter the chemical name or pattern: (e.g., methane, *2-hexene)

2. Select the type(s) of data for thermodynamic data:

3. Select the desired type(s) of data:

Thermodynamic Data	Other Data
☐ Gas phase	☒ IR spectrum
☐ Condensed phase	☐ THz IR spectrum
☐ Phase change	☐ Mass spectrum
☐ Reaction	☐ UV/Vis spectrum
☐ Ion energetics	☐ Gas Chromatography
☐ Ion cluster	☐ Vibrational & electronic energy levels
	☐ Constants of diatomic molecules
	☐ Henry's Law

4. Press here to search:

permette di cercare una molecola
tramite il suo nome oppure la sua
formula

E di trovarne per esempio lo spettro IR
(e le frequenze vibrazionali), oppure lo
spettro UV/Vis

Benzoic acid

webbook.nist.gov/cgi/cbook.cgi?ID=C65850&Units=SI&Type=IR-SPEC&Index=4#IR-SPEC

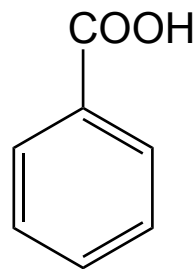
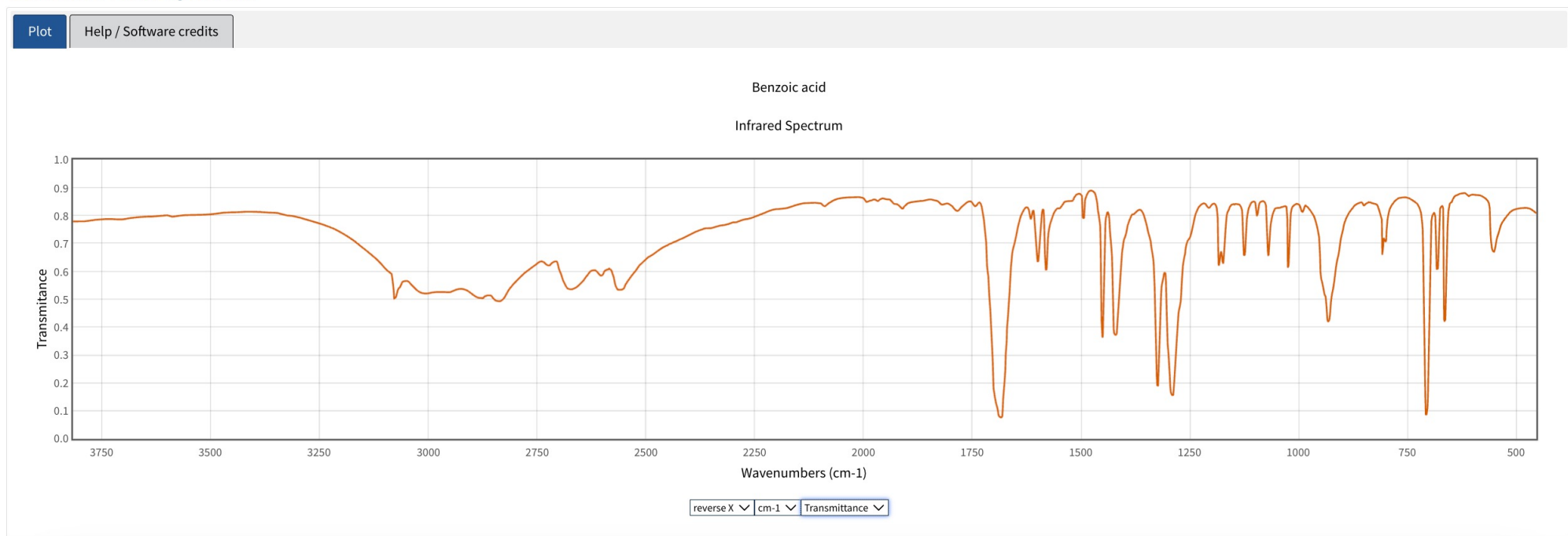
Importati da Firefox Journals Posta - ZAMPIERI... UniCredit Banca:... Dipartimento di Sc... Area Docente, Uni... Università degli st... Tutti i preferiti

Go To: [Top](#), [References](#), [Notes](#)

Data compilation [copyright](#) by the U.S. Secretary of Commerce on behalf of the U.S.A. All rights reserved.

Data compiled by: [Coblentz Society, Inc.](#)

Condensed Phase Spectrum



Acido Benzoico

Altro sito web per spettri sostanze organiche

https://sdb.db.aist.go.jp/sdb/cgi-bin/direct_frame_top.cgi

AIST:Spectral Database for Organic Compounds SDBS

sdbs.db.aist.go.jp/SearchInformation.aspx

Japanese Introduction Disclaimer HELP Contact What's New FAQ Link

SDBS Compounds and Spectral Search

Compound Name: benzoic acid match partial	Atoms: C(Carbon) to H(Hydrogen) to N(Nitrogen) to O(Oxygen) to F(Fluorine) to Cl(Chlorine) to Br(Bromine) to I(Iodine) to S(Sulfur) to P(Phosphorus) to	Spectrum : Check the spectra of your interest ☐ MS ☐ IR ☐ ¹³ C NMR ☐ Raman ☐ ¹ H NMR ☐ ES IR Peaks(cm⁻¹): ", " or space is the separator for multiple peaks Use "-", to set a range: eg. 550-1000 Transmittance < 80 ¹³C NMR Shift(ppm): ", " is the separator for multiple peaks
Molecular Formula : C, H, then the other elements are alphabetical order, "%", "*" for the wild card		
Molecular Weight: to Numbers between left and right columns Up to the first place of a decimal point		
CAS Registry No.: "%", "*" for the wild card		

Spectral Database for Organic Compounds SDBS

[Japanese](#)
[Introduction](#)
[Disclaimer](#)
[HELP](#)
[Contact](#)
[What's New](#)
[FAQ](#)
[Link](#)

SDBS Information

SDBS No.:673

Compound Name:

benzoic acid

Molecular Formula: C₇H₆O₂

Molecular Weight: 122.1

CAS Registry No.:

65-85-0

Spectral Code:

[Mass :](#)

[13C NMR : in CDCl₃](#)

[1H NMR : 90 MHz in CDCl₃](#)

[IR : KBr disc](#)

[IR : nujol mull](#)

[IR : CCl₄ solution](#)

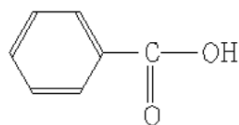
[Raman : 4880 A,200 M,powder](#)

[Chemical Information:](#)

[Return to Search:](#)

[Return to Result:](#)

SDBS No.: 673 **CAS Registry No.:** 65-85-0
DOI:
Molecular Formula: C₇H₆O₂ **Molecular Weight:** 122.1
 SDBS-NO= 673
 BENZOIC ACID



Compound Name:

benzoic acid

InChI:

InChI=1S/C7H6O2/c8-7(9)6-4-2-1-3-5-6/h1-5H,(H,8,9)

InChIKey:

WPYMKLBDIGXBTP-UHFFFAOYSA-N

Publisher:

National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST)

Rights:

AIST all rights reserved

Date of Publication:

1999-03-31

Update History:

AIST:Spectral Database for Organic Compounds

sdb.db.aist.go.jp/lrSpectralView.aspx?fname=NIDA63340&sdbno=673

Importati da Firefox Journals Posta - ZAMPIERI... UniCredit Banca... Dipartimento di Sc... Area Docente, Uni... Università degli st... Tutti i pref

Spectral Database for Organic Compounds SDBS

Japanese Introduction Disclaimer HELP Contact What's New FAQ Link

SDBS Information

SDBS No.: 673

Compound Name: benzoic acid

Molecular Formula: C₇H₆O₂

Molecular Weight: 122.1

CAS Registry No.: 65-85-0

Spectral Code:

[Mass :](#)
[¹³C NMR : in CDCl₃](#)
[¹H NMR : 90 MHz in CDCl₃](#)
[IR : KBr disc](#)
[IR : nujol mull](#)
[IR : CCl₄ solution](#)
[Raman : 4880 Å, 200 M, powder](#)

[Chemical Information:](#)

[Return to Search:](#)
[Return to Result:](#)

HIT-NO=1081	SCORE= ()	SDBS-NO=673	IR-NIDA-63340 : KBr DISC
BENZOIC ACID			
C ₇ H ₆ O ₂			

3073 49	2678 57	1426 35	1112 77	936 42
3012 53	2607 62	1327 17	1107 77	812 62
2998 53	2554 57	1294 14	1102 74	805 70
2986 53	1689 5	1187 58	1074 62	708 4
2886 52	1603 58	1180 60	1029 53	685 55
2838 52	1585 53	1129 84	1001 72	667 52
2726 86	1464 28	1118 77	943 60	654 68

Spettroscopia IR

Source Method Substance
LAB ATR STD

Data from file (.dx) or database

Database

Select the molecule of your main spectra

ACIDOBENZOICO (LAB/STD/ATR/2022-03-30)

☐ Add reference

☐ Interpretation

Students collected LAB data in the years '22, '23 and '24

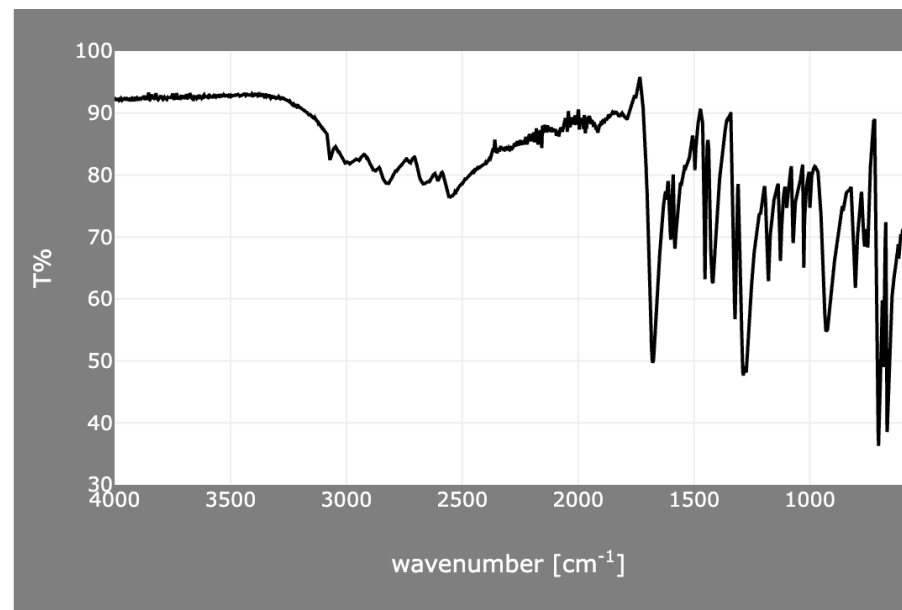
Developed by E.Carosati

Select colour for background

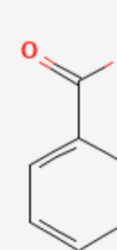
white

Select colour for the main line

black



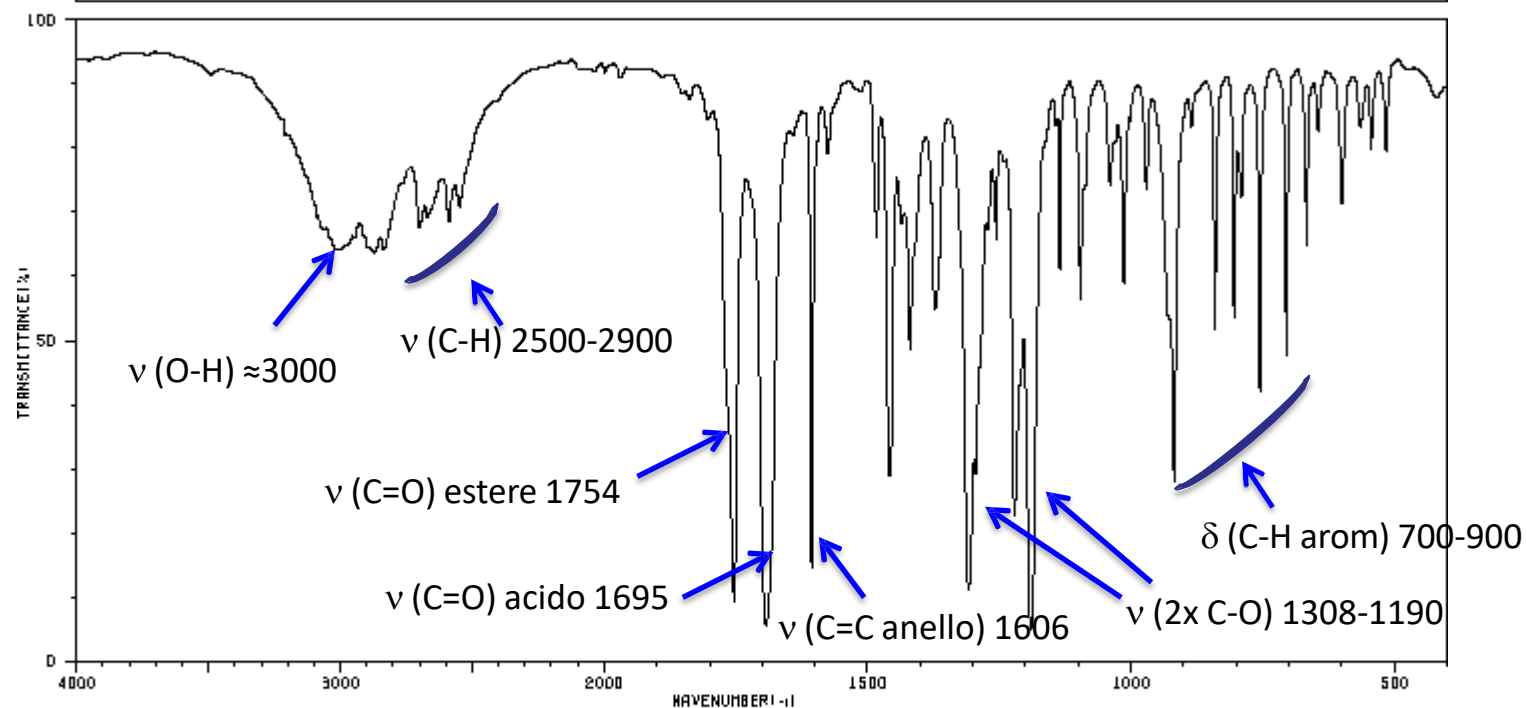
ACIDOBENZOICO



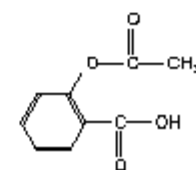
https://unitsfarmaceutica.shinyapps.io/app_IR_2024/

ACIDO ACETILSALICILICO

HIT-NO=1022	SCORE= ()	SDBS-NO=532	IR-NIDA-63853 : KBR DISC
O-ACETOXYBENZOIC ACID			
$C_9H_8O_4$			

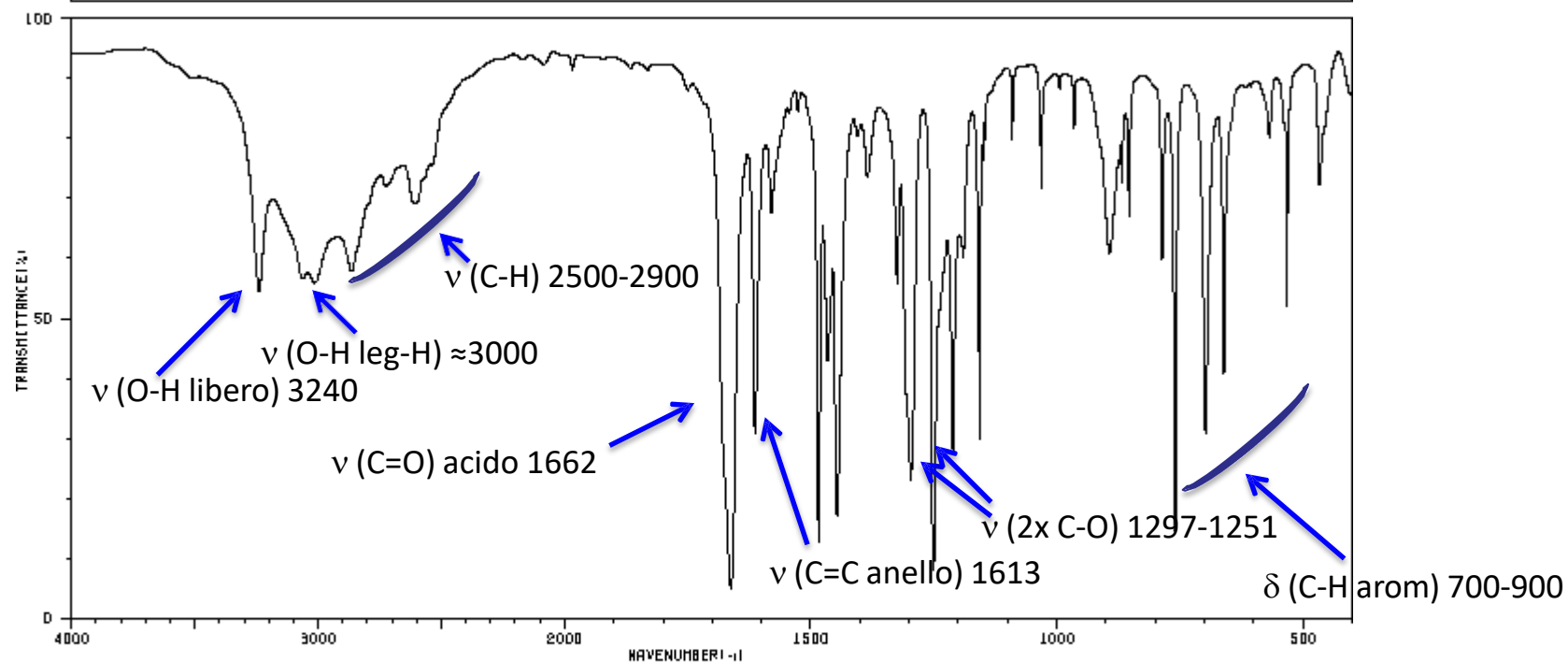


3006	62	2589	66	1436	66	1222	21	918	26
2983	62	2548	68	1420	47	1190	4	841	50
2891	62	1754	9	1372	53	1136	58	805	52
2872	62	1693	6	1308	10	1096	66	766	41
2834	62	1606	14	1295	28	1014	57	706	46
2701	66	1483	64	1272	84	971	70	667	62
2670	66	1459	27	1257	64	928	62	600	68

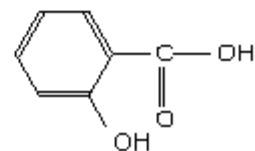


ACIDO SALICILICO

HIT-NO=1330	SCORE= ()	SDBS-NO=1149	IR-NIDA-08453 : KBR DISC
SALICYLIC ACID			
$C_7H_6O_3$			

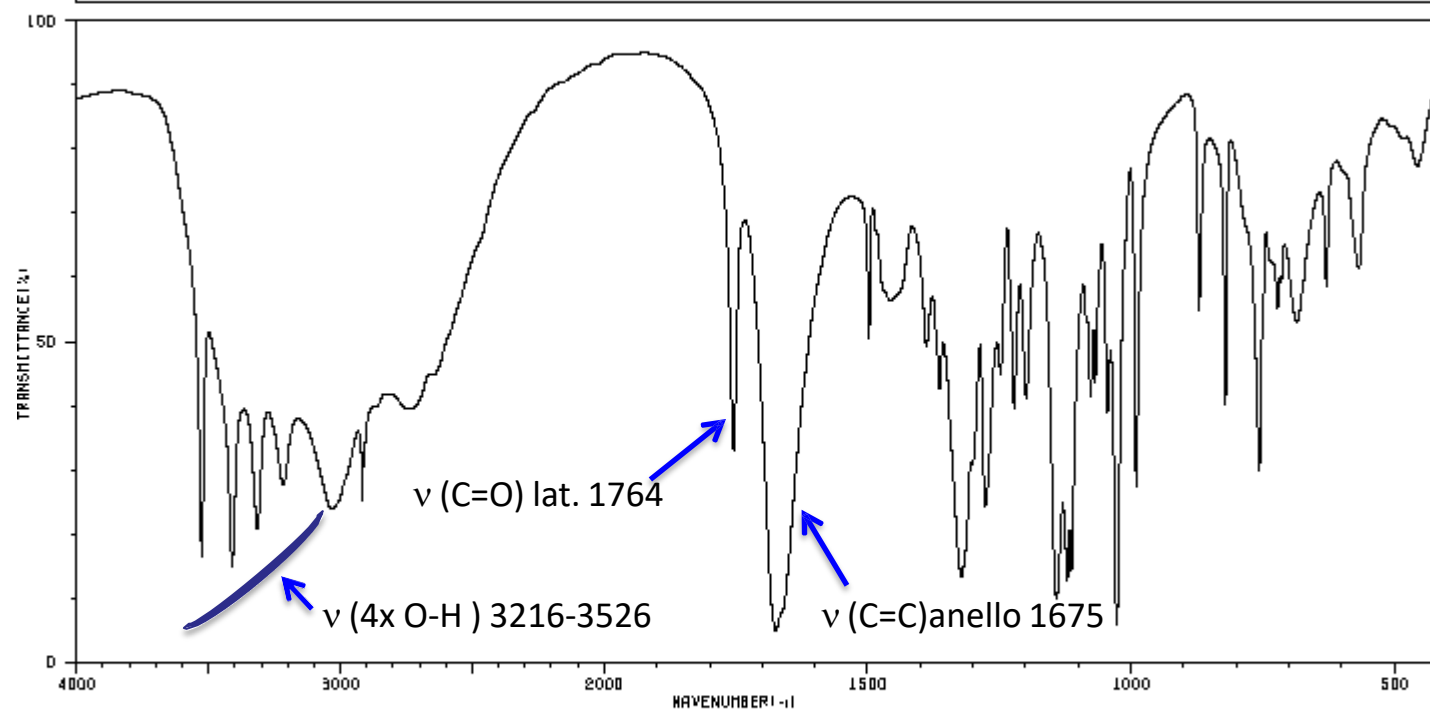


3240	62	1680	64	1326	63	1161	72	786	67
3013	53	1527	81	1297	21	1091	77	760	13
2864	55	1484	12	1251	7	1032	68	699	29
2724	70	1467	41	1239	49	966	79	661	38
2605	66	1447	16	1212	26	893	58	589	77
1662	4	1405	77	1190	58	868	70	533	50
1613	29	1386	70	1167	28	863	64	467	70

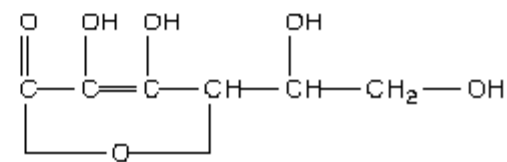


ACIDO ASCORBICO

HIT-NO=1567	SCORE= ()	SDBS-NO=1605	IR-NIDA-04374 : KBR DISC
L-ASCORBIC ACID			
$C_6H_8O_6$			

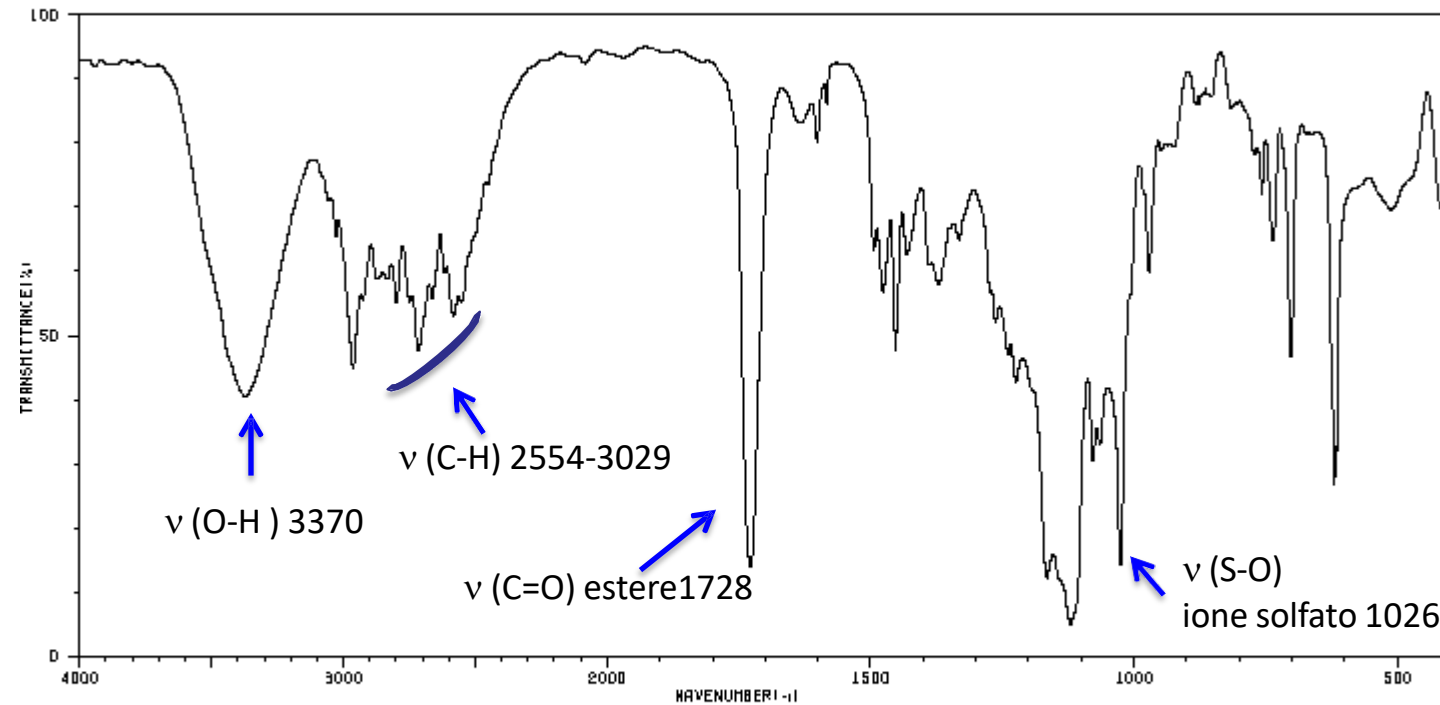


3526	16	2760	37	1463	66	1189	39	1027	6
3410	14	2739	37	1389	47	1142	9	990	26
3316	20	2729	36	1364	41	1121	12	871	52
3216	26	1764	32	1322	12	1113	13	821	38
3030	23	1675	4	1277	23	1077	39	757	28
2917	23	1497	49	1246	43	1066	42	722	53
2907	33	1468	63	1222	38	1046	37	686	60

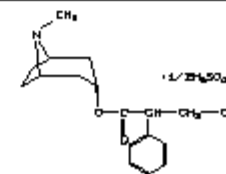


ATROPINA Solfato

HIT-N0=4873	SCORE= ()	SDBS-N0=7818	IR-NIDA-30192 : KBR DISC
ATROPINE SULFATE			
$C_{17}H_{23}NO_3 \cdot K_2H_2O_4 \cdot 8K_2H_2O$			

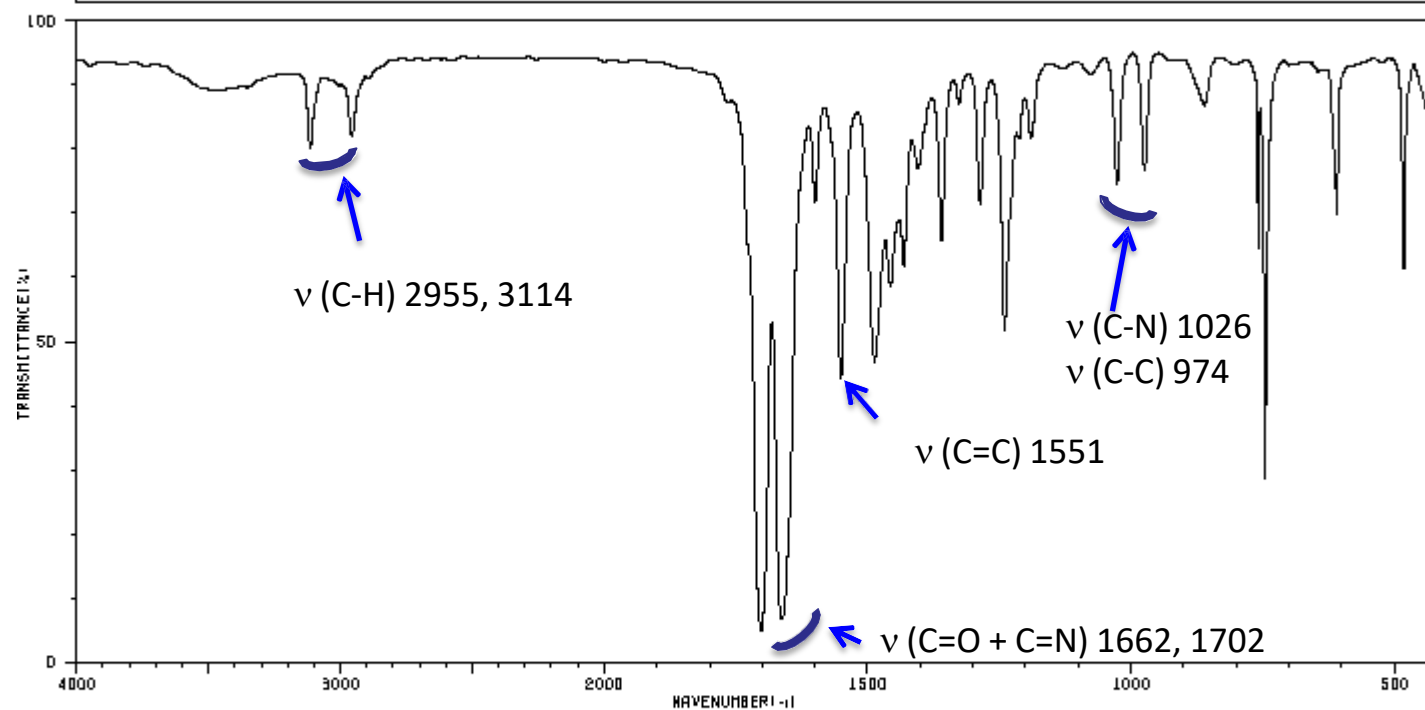


3370	39	2716	46	1477	66	1226	41	772	74
3029	62	2663	53	1453	46	1166	12	758	70
2963	43	2617	57	1432	80	1121	4	737	62
2869	67	2583	62	1371	66	1078	29	703	44
2852	57	2554	53	1332	62	1065	32	620	26
2833	57	1728	19	1263	50	1026	19	611	57
2798	63	1494	60	1240	44	972	67	612	66

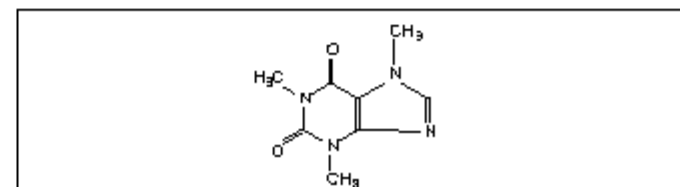


CAFFEINA

HIT-NO=1705	SCORE= ()	SDBS-NO=1898	IR-NIDA-62055 : KBR DISC
CAFFEINE			
$C_8H_{10}N_4O_2$			

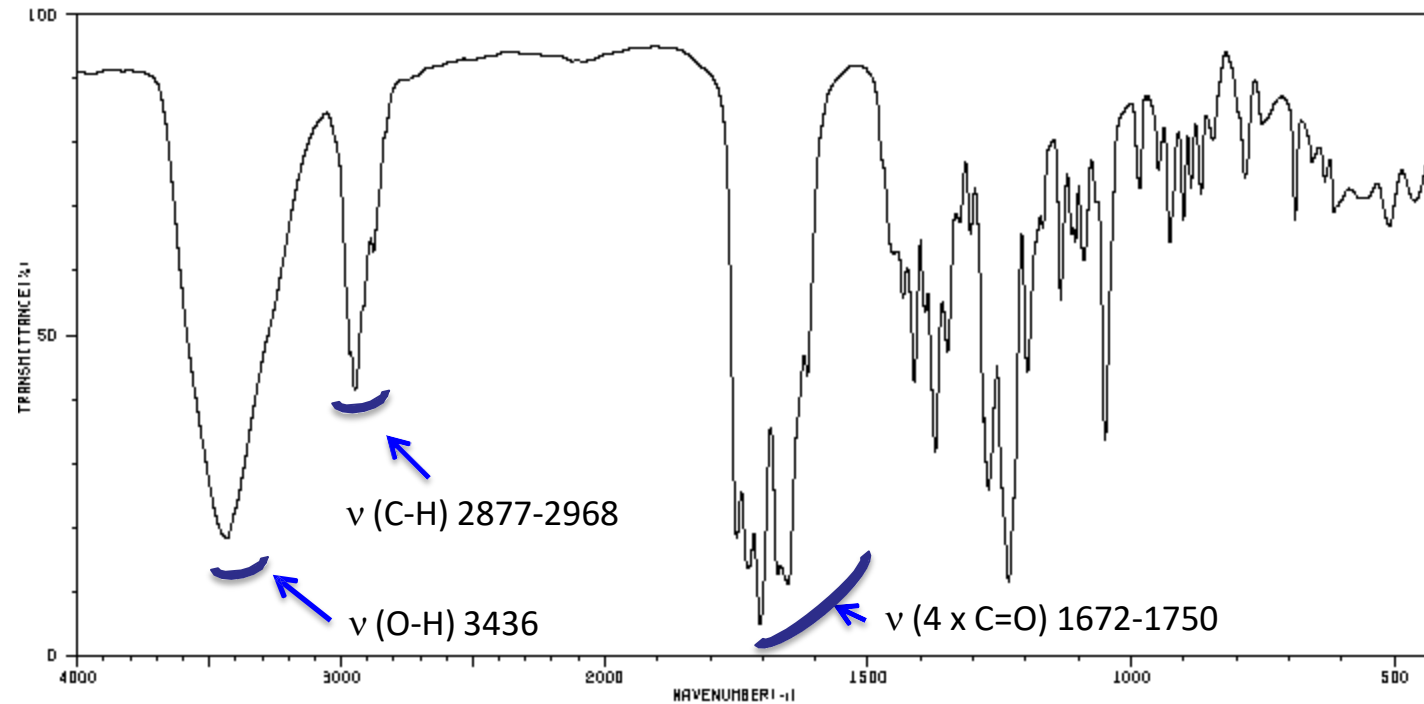


3114	77	1456	57	1213	79	610	66
2955	79	1431	58	1190	79	482	58
1702	4	1405	74	1026	72		
1662	6	1360	64	974	74		
1600	68	1327	84	861	84		
1551	42	1287	68	759	82		
1487	44	1241	50	746	27		



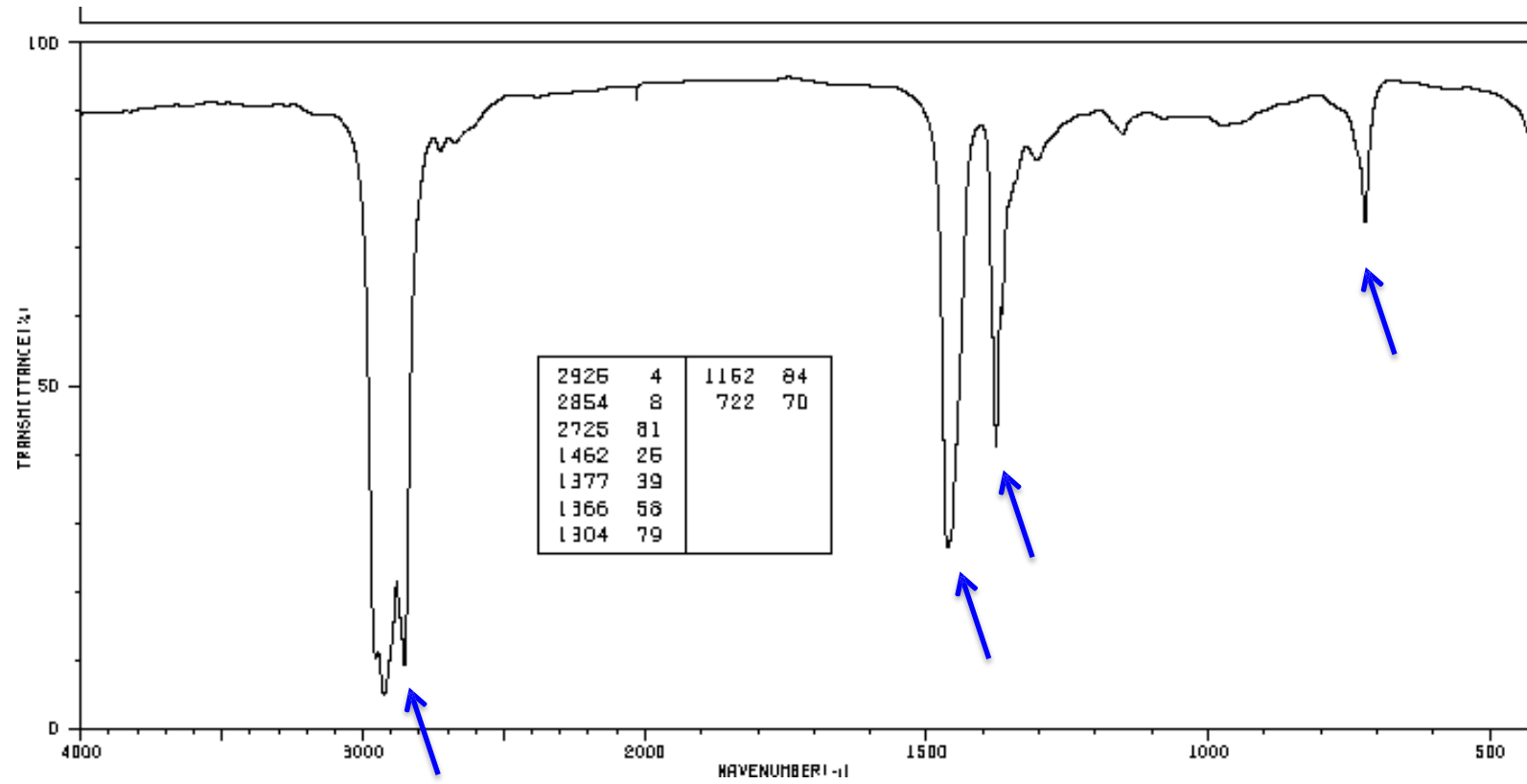
CORTISONE Acetato

HIT-NO=5880	SCORE= ()	SDBS-NO=11048	IR-NIDA-05284 : KBR DISC
21-ACETOXY-17ALPHA-HYDROXY-4-PREGNENE-3,11,20-TRIONE			
$C_{23}H_{30}O_6$			



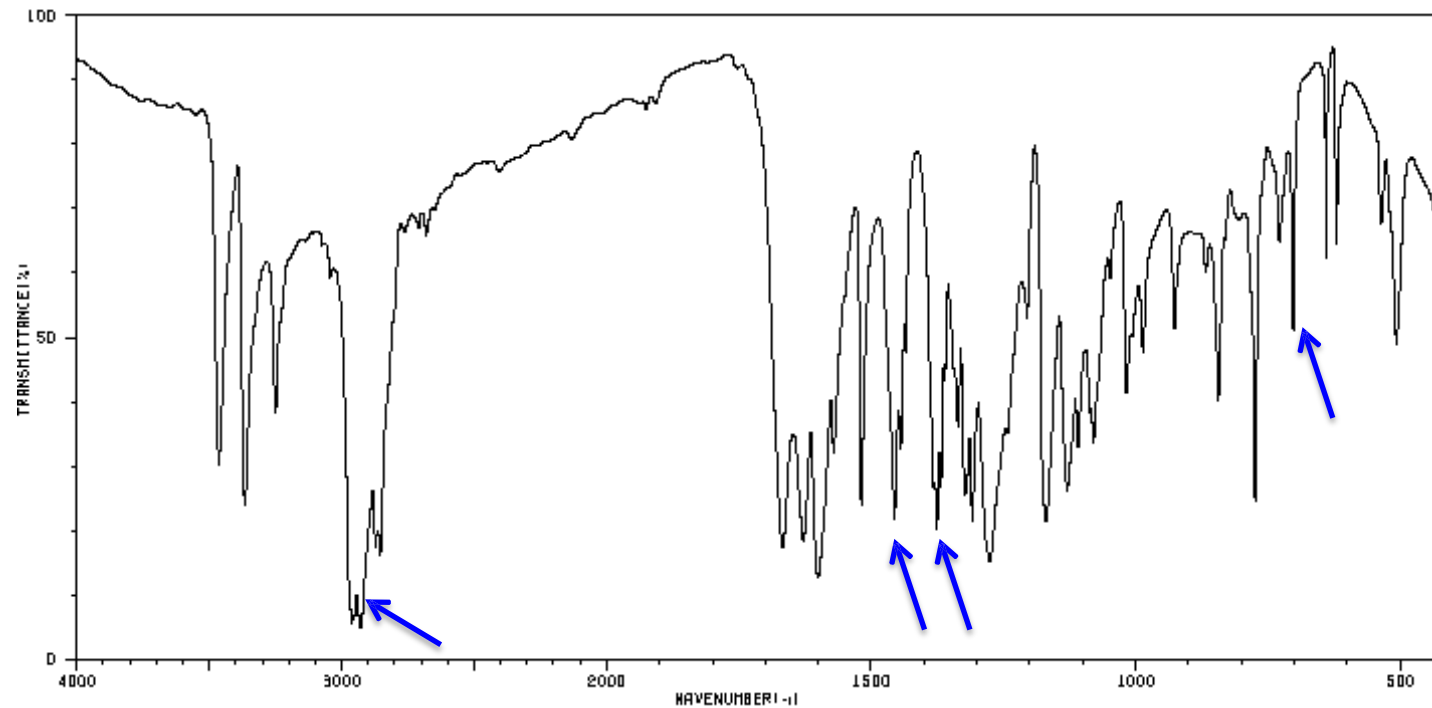
3436	17	1672	12	1349	46	1169	64	901	66
2968	44	1652	10	1326	64	1134	53	689	66
2947	39	1615	42	1306	82	1114	62	615	66
2877	60	1434	69	1281	35	1106	62	601	68
1750	17	1412	41	1271	25	1090	58	563	68
1727	13	1391	52	1233	11	1050	32	557	68
1706	4	1372	30	1198	42	927	62	609	64

Nujol (olio di paraffina)

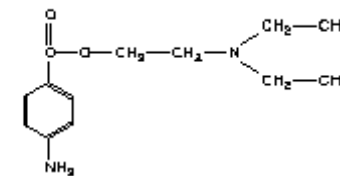


PROCAINA (in *nujol*)

HIT-NO=7969	SCORE= ()	SDBS-NO=21551	IR-NIDA-28777 : NUJOL MULL
2-(DIETHYLAMINO)ETHYL P-AMINOBENZOATE			
$C_{13}H_{20}N_2O_2$			

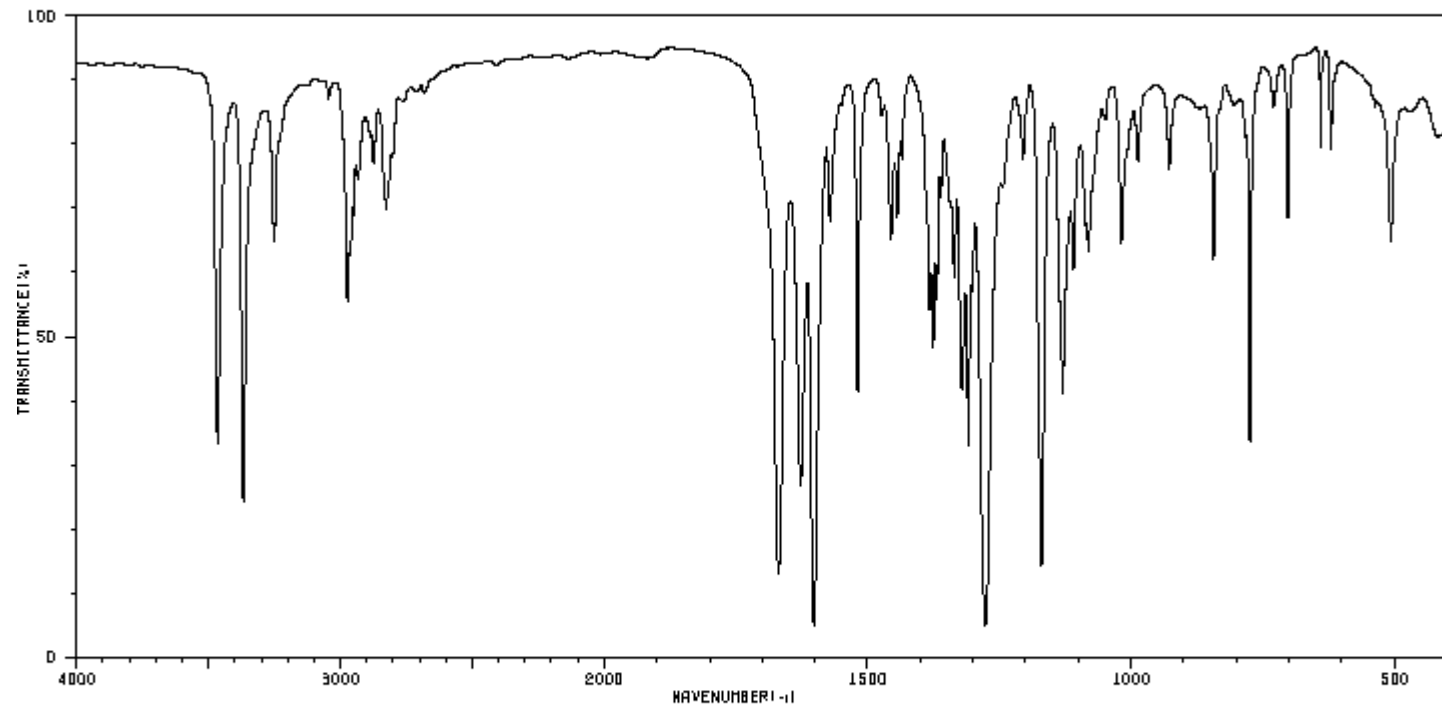


3464	29	1668	16	1436	46	1309	20	1080	32
3367	23	1628	17	1382	25	1277	14	1018	39
3250	36	1601	12	1376	19	1170	20	1007	47
2961	6	1571	30	1369	26	1130	26	987	46
2929	4	1519	23	1361	42	1119	33	844	38
2872	16	1458	20	1336	34	1109	31	775	23
2854	16	1444	31	1322	24	1087	37	608	47

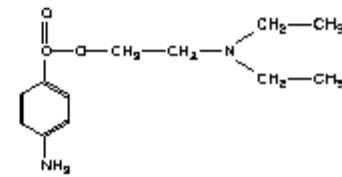


PROCAINA (in KBr)

HIT-NO=9228	SCORE= ()	SDBS-NO=21551	IR-NIDA-27866 : KBR DISC
2-((DIETHYLAMINO)ETHYL P-AMINOBENZOATE			
$C_{15}H_{20}N_2O_2$			

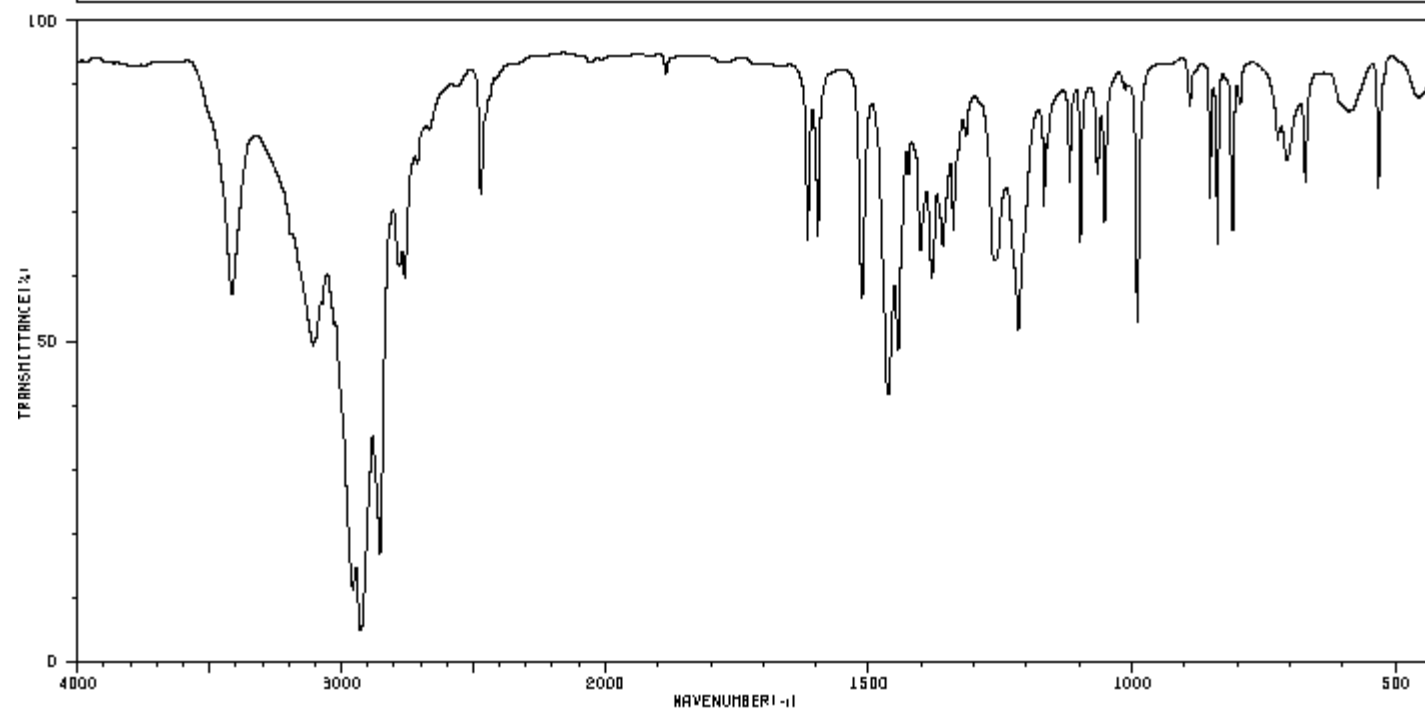


3466	32	2874	74	1456	62	1321	38	1061	60
3455	57	2827	68	1444	66	1309	32	1019	62
3368	23	1659	12	1382	52	1277	4	928	72
3251	62	1627	26	1376	46	1170	19	844	60
2973	53	1602	4	1369	53	1130	39	775	32
2961	80	1572	66	1361	86	1109	58	703	66
2934	72	1519	38	1336	67	1087	64	607	62

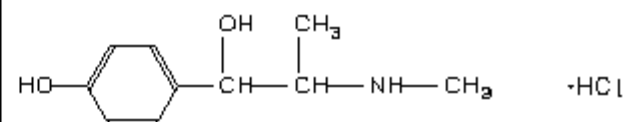


EFEDRINA cloridrato

HIT-NO=8877	SCORE= ()	SDBS-NO=23505	IR-NIDA-42897 : NUJOL MULL
(+-)-4-HYDROXY-ALPHA-(1-METHYLAMINO)ETHYL) BENZYL ALCOHOL HYDROCHLORIDE			
$C_{10}H_{15}NO_2 \cdot HCl$			

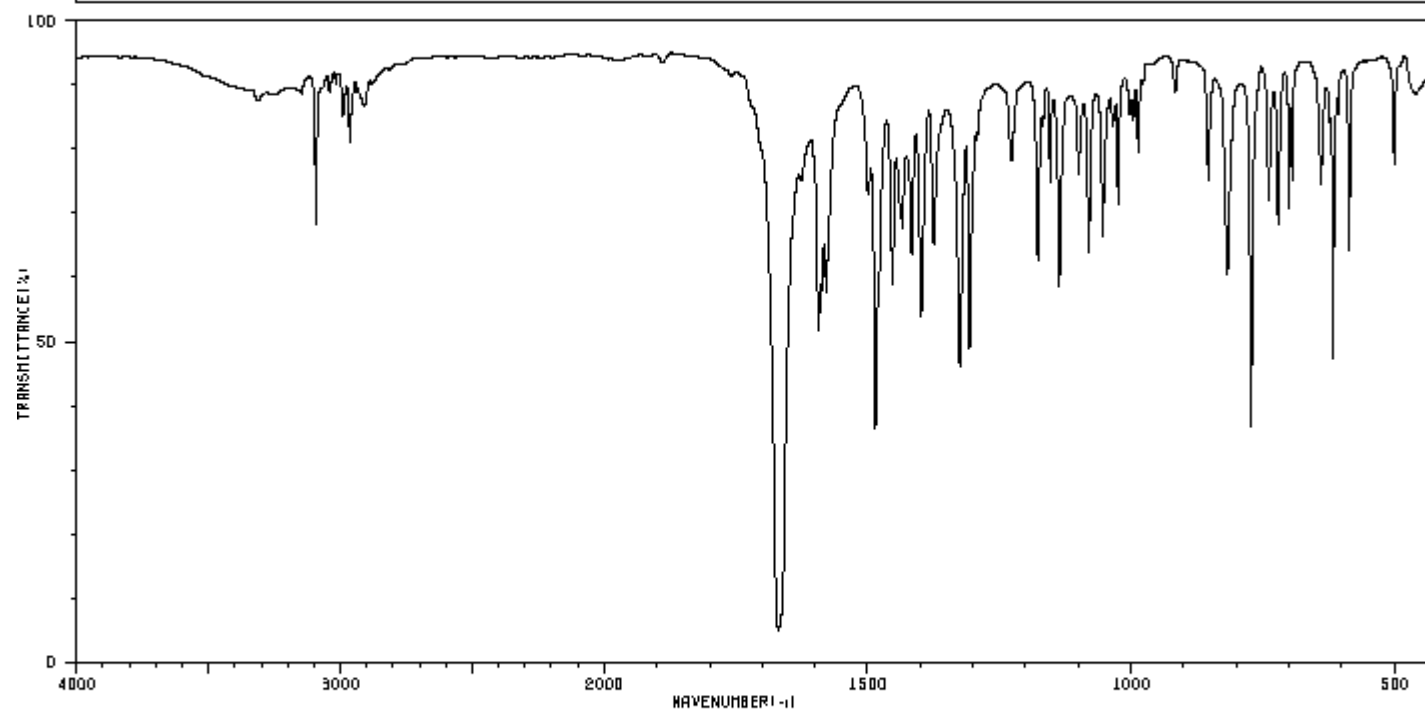


3416	66	2711	74	1426	72	1167	68	852	70
3108	47	2471	70	1402	62	1161	77	838	62
2956	10	1618	62	1381	57	1118	72	810	64
2927	4	1596	64	1369	62	1098	62	724	79
2854	16	1513	55	1340	64	1066	72	706	74
2781	56	1462	38	1262	80	1052	66	672	72
2760	67	1444	46	1216	49	990	60	633	70

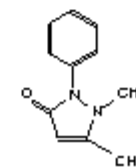


FENAZONE

HIT-NO=9486	SCORE= ()	SDBS-NO=22106	IR-NIDA-52381 : KBR DISC
2,3-DIMETHYL-1-PHENYL-3-PYRAZOLIN-5-ONE			
$C_{11}H_{12}N_2O$			

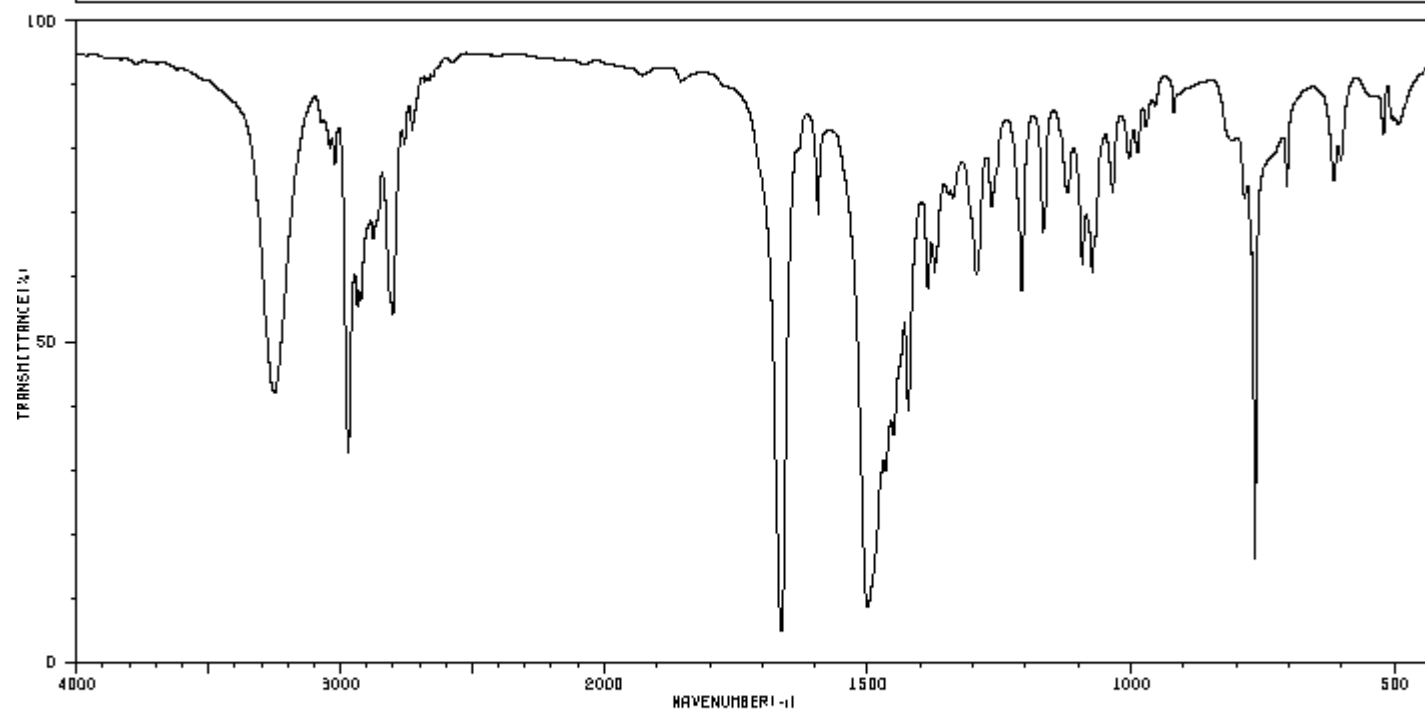


3093	66	1454	57	1307	47	1063	64	721	56
1669	4	1440	68	1227	74	1025	68	701	68
1593	50	1435	65	1177	80	987	77	695	72
1587	65	1417	60	1164	72	863	72	640	72
1579	55	1399	52	1137	57	818	58	617	46
1499	70	1375	62	1099	72	772	35	586	52
1486	35	1326	44	1080	62	739	70	501	74

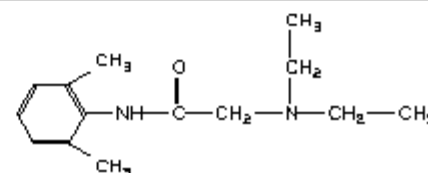


LIDOCAINE

HIT-NO=13315	SCORE= ()	SDBS-NO=27423	IR-NIDA-38059 : KBR DISC
2-DIETHYLAMINO-N-(2,6-XYLYL)ACETAMIDE			
$C_{14}H_{22}N_2O$			

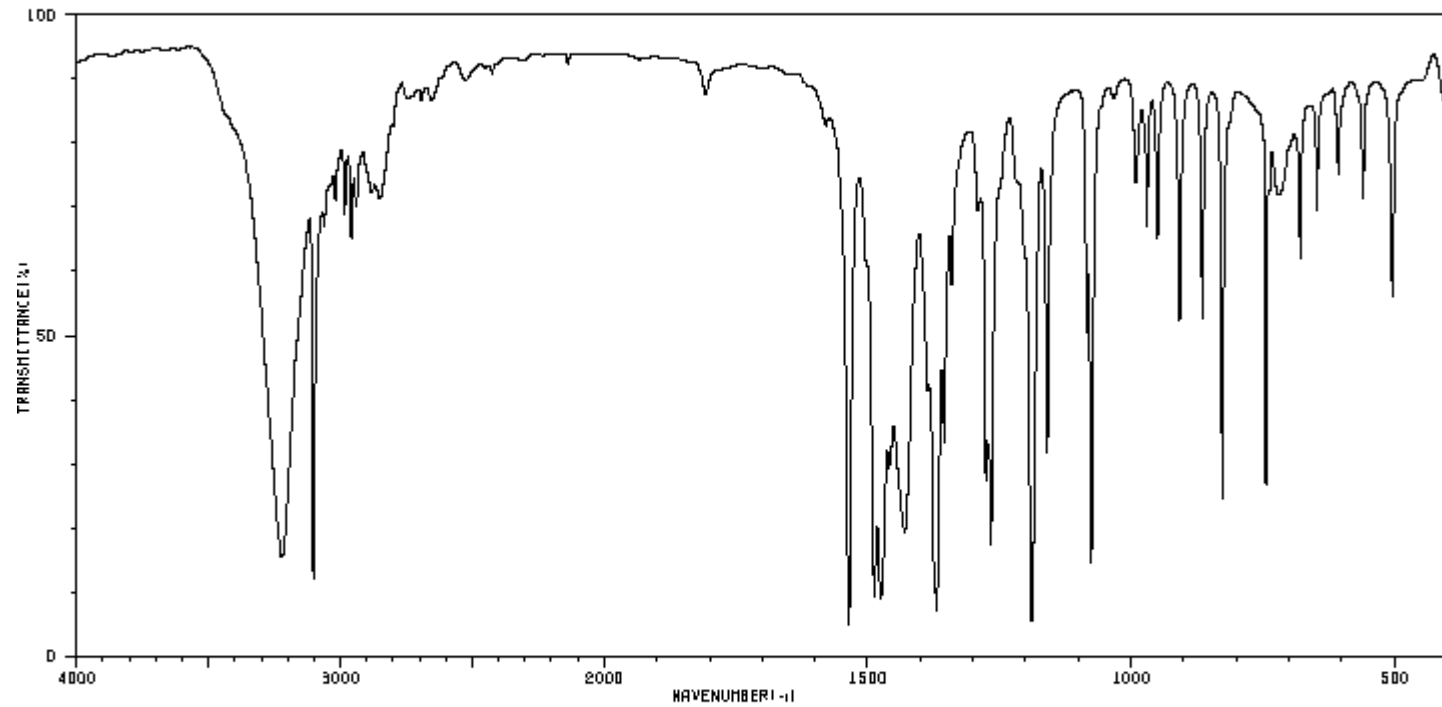


3260	41	2801	52	1423	37	1208	55	1004	74
3039	77	2757	77	1386	57	1167	64	784	70
3022	74	1664	4	1373	58	1120	70	772	60
2970	31	1694	68	1338	70	1093	60	766	16
2936	53	1500	8	1293	58	1074	58	704	70
2923	55	1467	28	1265	66	1058	64	616	72
2874	64	1451	34	1255	74	1036	70	602	74

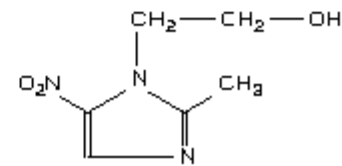


METRONIDAZOLO

HIT-NO=8228	SCORE= ()	SDBS-NO=18702	IR-NIDA-61394 : KBR DISC
2-(2-METHYL-5-NITRO-1-IMIDAZOLYL)ETHANOL			
$C_6H_9N_3O_3$			

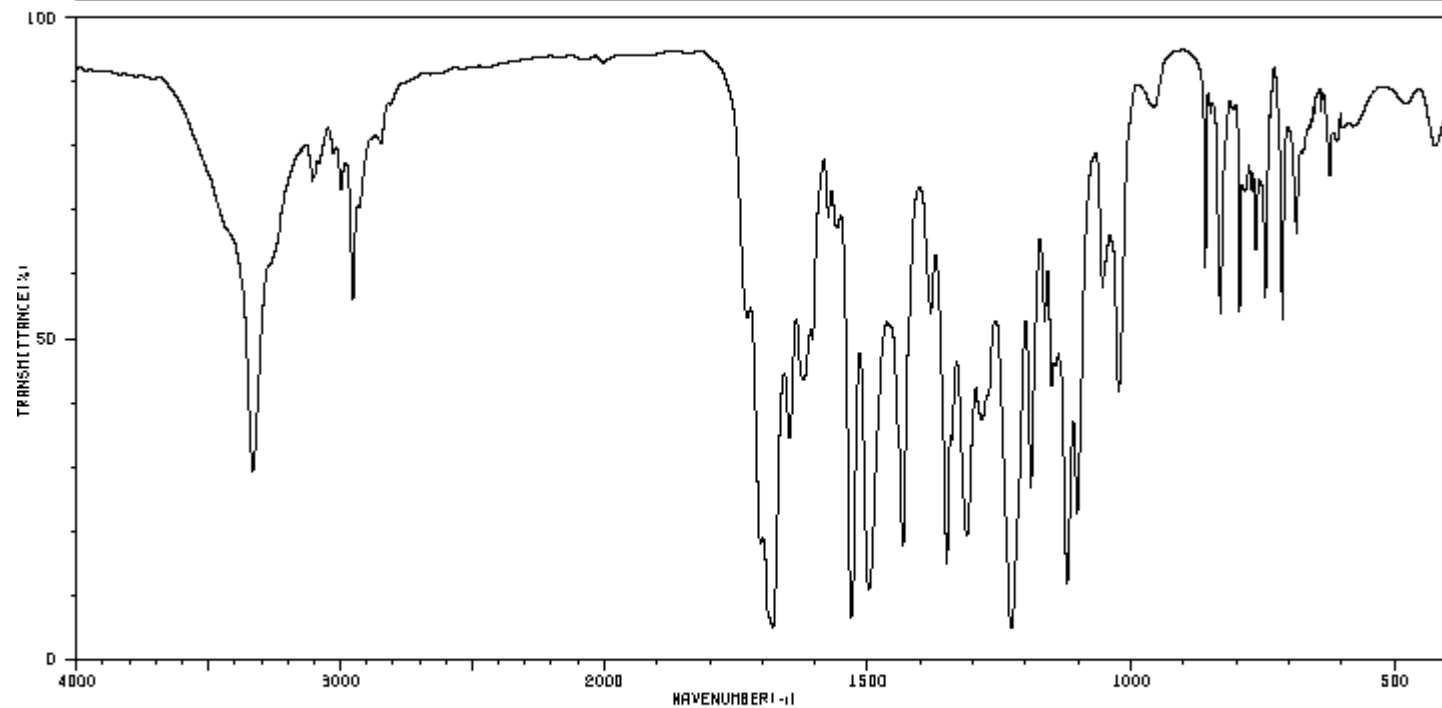


3221	14	2880	70	1386	39	1189	6	866	60
3102	11	2851	68	1370	7	1160	30	827	23
3061	84	1538	4	1355	32	1084	49	745	26
3019	68	1488	9	1341	66	1076	14	679	60
2983	66	1475	8	1291	66	970	64	647	66
2956	62	1460	28	1276	26	950	62	560	68
2940	68	1430	18	1266	16	908	60	506	63

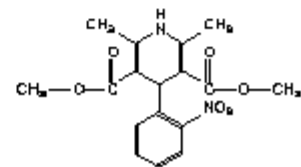


NIFEDIPINA

HIT-NO=5127	SCORE= ()	SDBS-NO=9750	IR-NIDA-48654 : KBR DISC
DIMETHYL 2,6-DIMETHYL-4-(O-NITROPHENYL)-1,4-DIHYDRO-3,5-PYRIDINEDICARBOXYLATE			
$C_{17}H_{16}N_2O_6$			

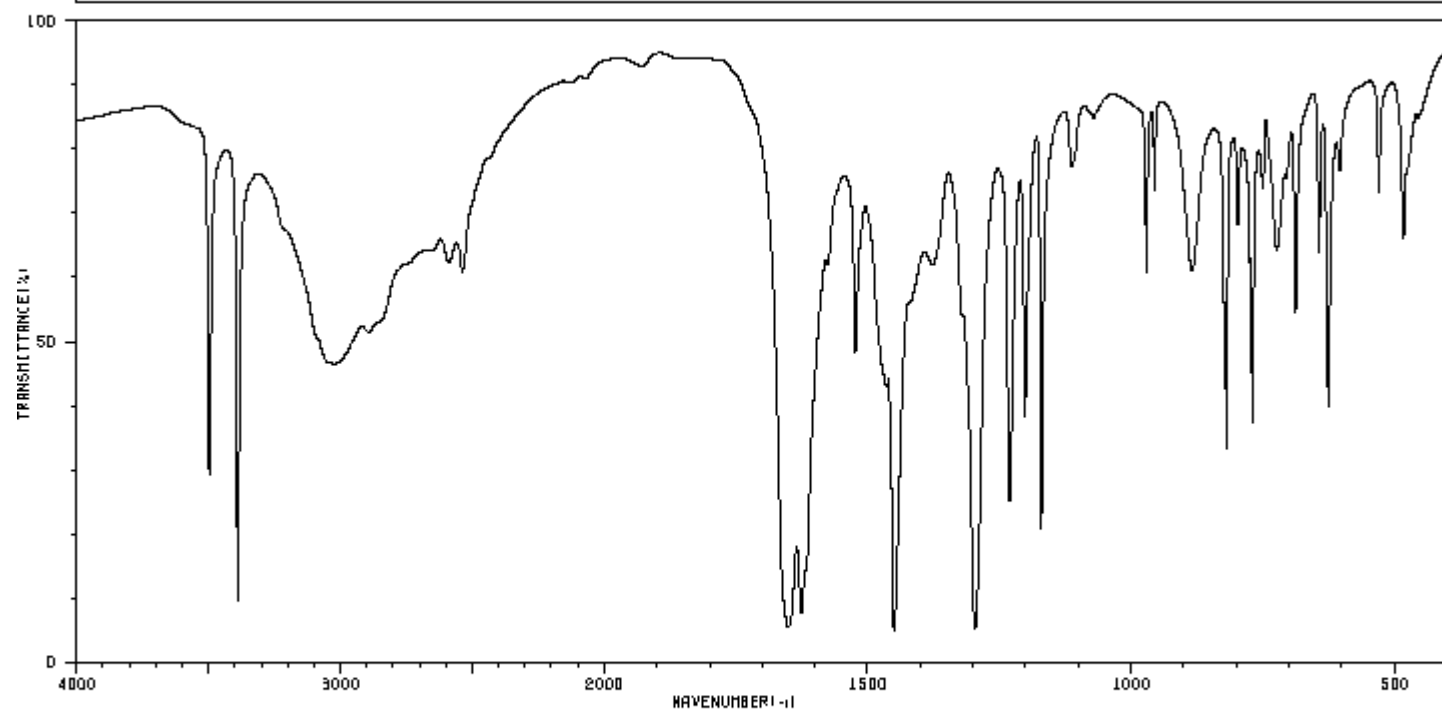


3333	26	1622	42	1380	62	1166	60	869	68
2952	53	1604	49	1350	14	1152	41	830	52
2929	88	1574	66	1341	33	1146	44	795	52
1729	62	1558	64	1312	18	1121	11	764	62
1687	6	1531	6	1283	36	1102	21	746	53
1660	4	1498	10	1227	4	1054	55	713	50
1649	33	1433	17	1190	26	1023	38	687	64

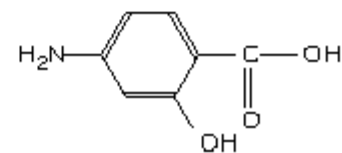


ACIDO *p*-AMINOSALICILICO

HIT-NO=1428	SCORE= ()	SDBS-NO=1380	IR-NIDA-04163 : KBR DISC
4-AMINOSALICYLIC ACID			
C ₇ H ₇ NO ₃			

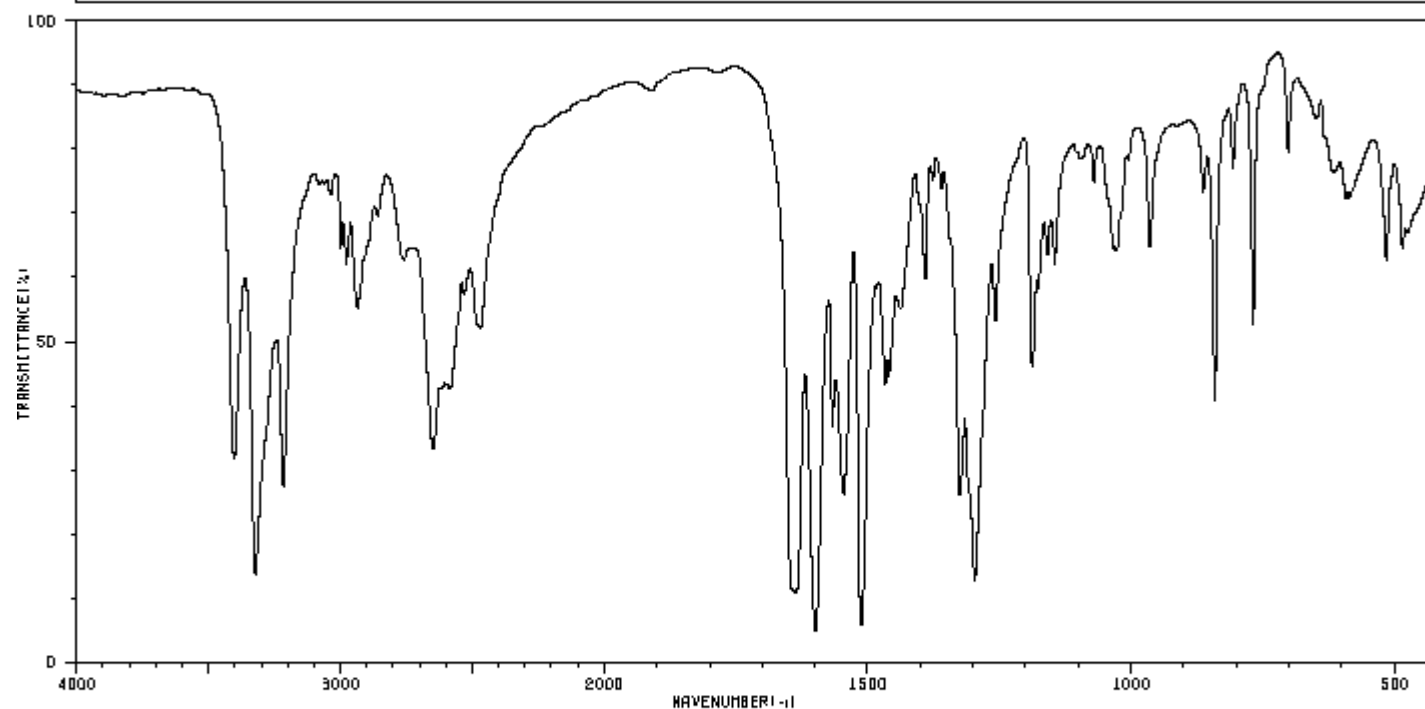


3497	26	1626	7	1202	37	819	32	644	62
3389	9	1617	13	1171	20	797	66	626	38
3027	44	1523	46	1113	74	775	60	604	74
3017	44	1460	4	1071	81	770	36	630	70
2588	60	1377	58	971	58	750	70	483	64
2537	56	1297	5	956	70	724	62		
1650	6	1231	23	884	68	688	62		



PROCAINAMIDE Cloridrato

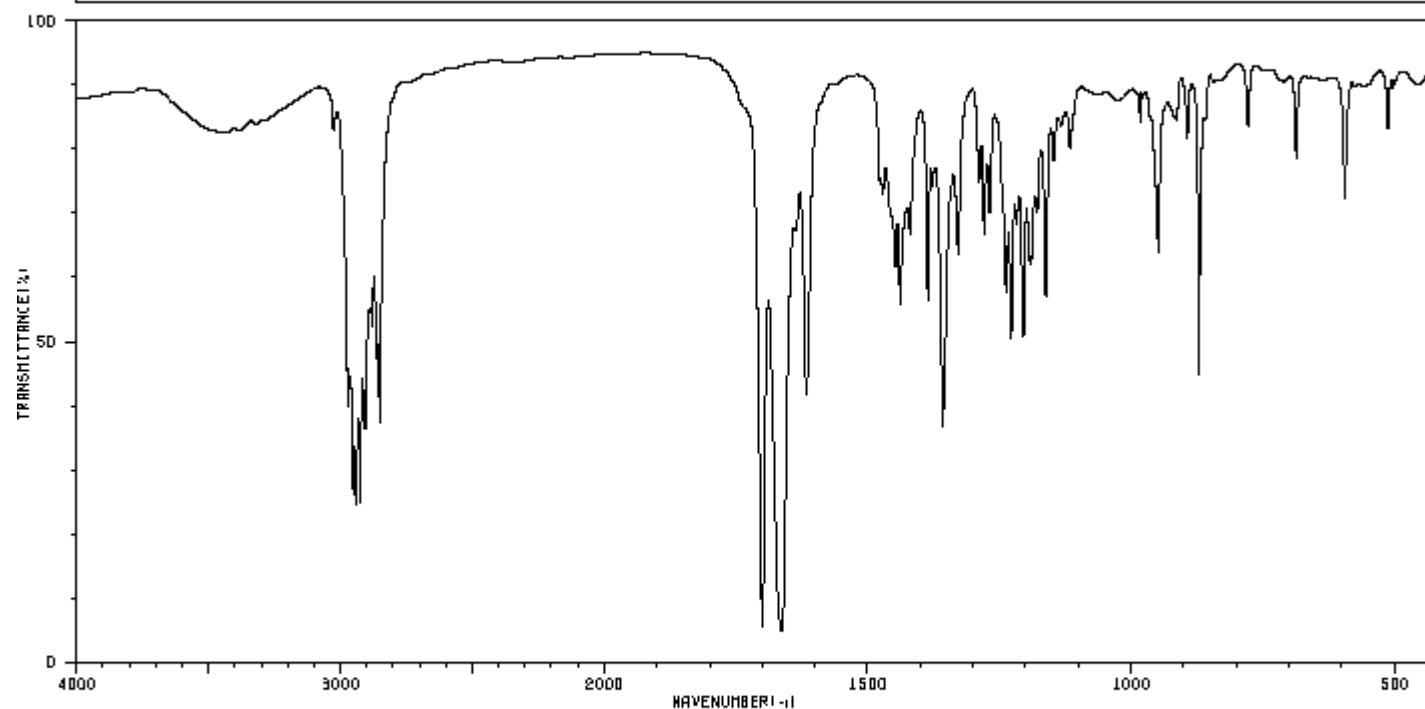
HIT-NO=9158	SCORE= ()	SDBS-NO=21422	IR-NIDA-26545 : KBR DISC
P-AMINO-N-(2-(DIETHYLAMINO)ETHYL)BENZAMIDE HYDROCHLORIDE			
$C_{15}H_{21}N_3O \cdot HCl$			



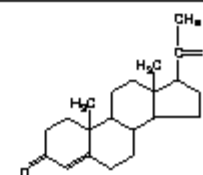
3403	30	2648	32	1636	10	1438	53	1160	60
3323	13	2619	41	1599	4	1390	57	1145	60
3216	26	2583	41	1567	35	1326	25	1034	62
2998	62	2531	66	1546	26	1297	12	964	62
2978	60	2481	50	1512	5	1258	52	841	38
2936	53	2468	50	1467	42	1188	44	768	50
2760	60	1643	10	1460	43	1177	57	616	60

PROGESTERONE

HIT-NO=5851	SCORE= ()	SDBS-NO=11019	IR-NIDA-05241 : KBR DISC
PROGESTERONE			
$C_{21}H_{30}O_2$			

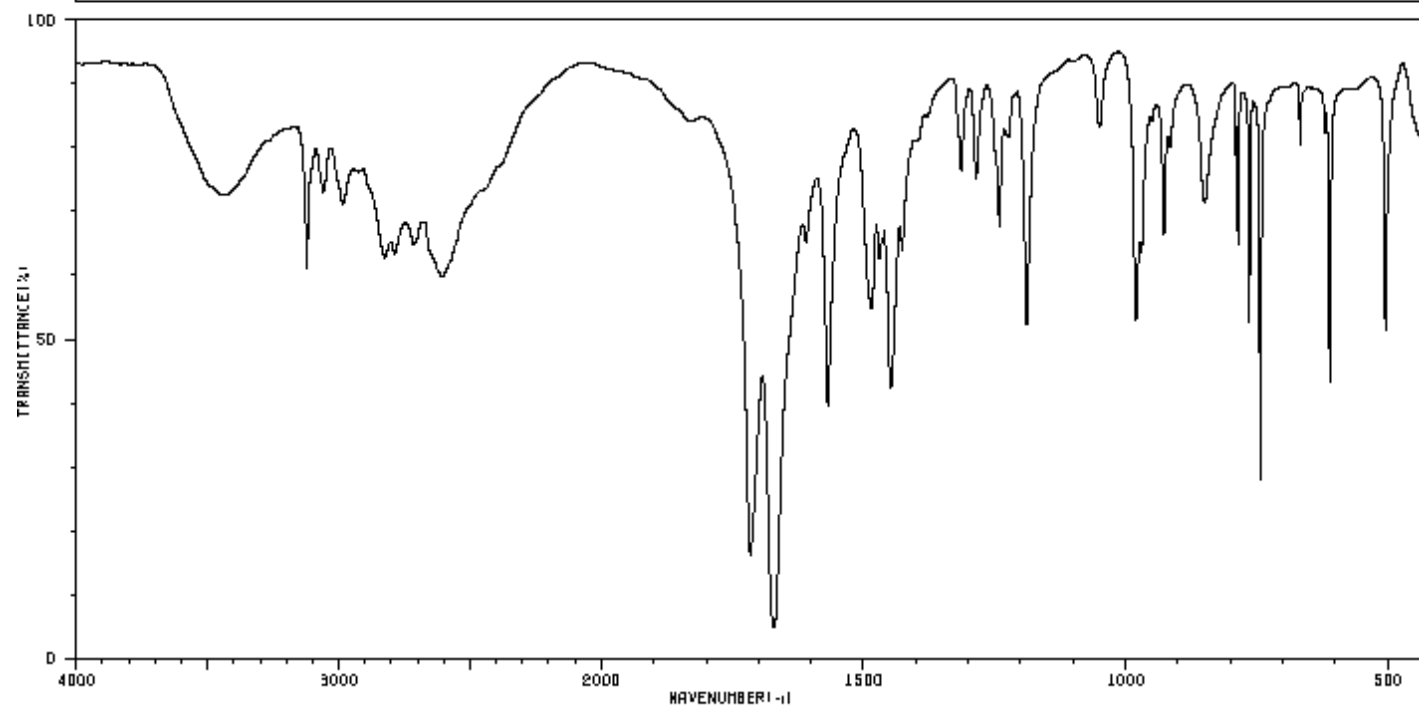


2969	36	2860	36	1439	63	1279	64	1179	68
2952	26	1699	5	1420	64	1269	68	1162	55
2942	23	1663	4	1386	53	1238	55	1147	74
2926	23	1616	39	1377	72	1228	49	964	72
2906	35	1478	72	1358	35	1218	66	949	62
2880	50	1471	70	1328	80	1204	49	871	43
2863	46	1447	68	1289	72	1190	68	696	70

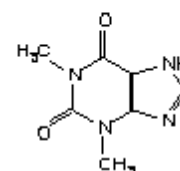


TEOFILLINA

HIT-NO=1873	SCORE= ()	SDBS-NO=2224	IR-NIDA-24759 : KBR DISC
THEOPHYLLINE			
$C_7H_8N_4O_2$			



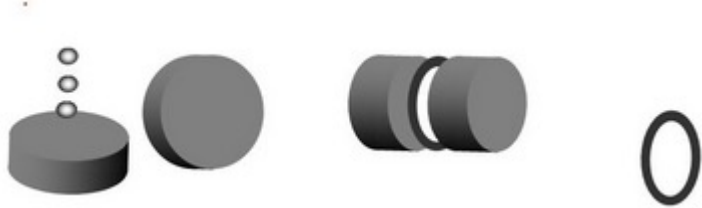
3441	70	2824	60	1668	38	1241	65	786	62
3431	70	2787	60	1484	53	1189	50	764	50
3133	72	2712	62	1471	80	980	52	743	26
3122	68	2606	57	1447	41	970	60	667	77
3060	70	1716	15	1427	62	927	64	821	79
3047	72	1671	4	1314	74	915	77	611	42
2981	68	1610	62	1286	72	849	68	606	50



PREPARAZIONE DEL CAMPIONE

Il campione può essere utilizzato in vari modi per l'analisi IR:

- Fase gassosa: si usano celle di 10 cm di cammino ottico precedentemente trattate facendo il vuoto; tecnica complessa che non trattiamo!
- Film liquido: se sostanza è liquida, essa può venir utilizzata come tale disponendo una gc. tra due pastiglie di NaCl trasparenti alla radiazione I.R.
- In soluzione più o meno diluita, in genere di solventi alogenati (CCl_4 , CHCl_3) sempre con l'ausilio delle pastiglie di NaCl.
- Spesso si fanno dispersioni solide con KBr anidro (10-100 vv tanto in peso) in polvere e si procede alla formazione di una "compressa" che verrà messa nel proprio alloggiamento (diverso da quello delle pastiglie in NaCl).
- Nel caso di solidi questi possono venir "sospesi" in una matrice oleosa quale la paraffina liquida (nujol) o altre sostanze (ostaflon C). Una goccia della sospensione viene posta tra le due pastiglie di NaCl.



Il campione viene posto tra due pastiglie di NaCl
(il campione quindi forma un film, ovvero uno strato sottile).



Le dispersioni solide si preparano al mortaio.



STRUMENTAZIONE

Per quanto riguarda i vecchi tradizionali strumenti “a dispersione”, ovvero a “scansione di λ ”, abbiamo già visto la strumentazione “generica” per la spettroscopia molecolare (UV-Vis). Per l’IR valgono gli stessi componenti, ma con la dotazione di una sorgente (lampada) che emette radiazioni nell’infrarosso. Può essere di vari tipi:

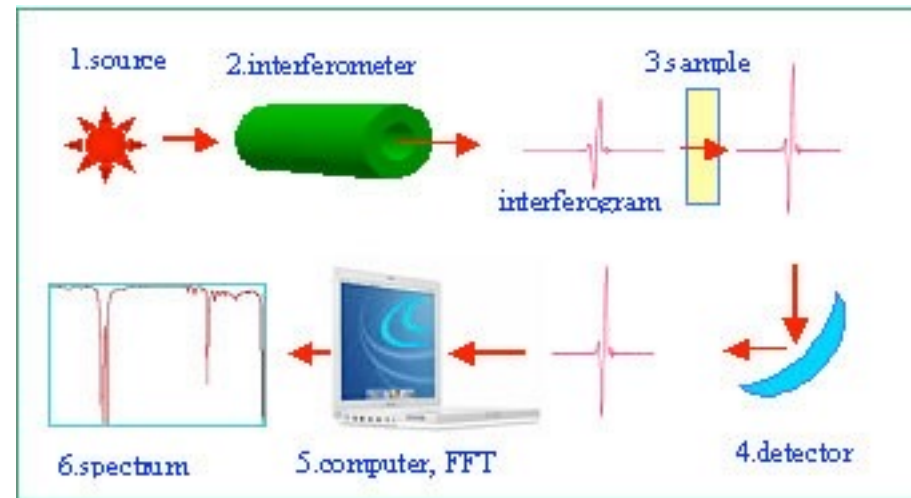
- Filamento al Carburo di silicio (Globar: richiede elevata potenza);
- Filamento di Nernst: mix di ossidi fusi (fragile);
- Filamento di Ni-Cr: il più usato ed economico;
- Filamento di Wolframio per il vicino infrarosso (NIR).
- **Laser I.R.**

Ci sono, poi, il sistema fotometrico di specchi comprendente il chopper, il monocromatore (reticolo a riflessione) e il rivelatore (fotomoltiplicatore).

Attualmente gli spettrofotometri utilizzati sono quelli che lavorano in Trasformata di Fourier (FT) e sono costituiti da INTERFEROMETRI.

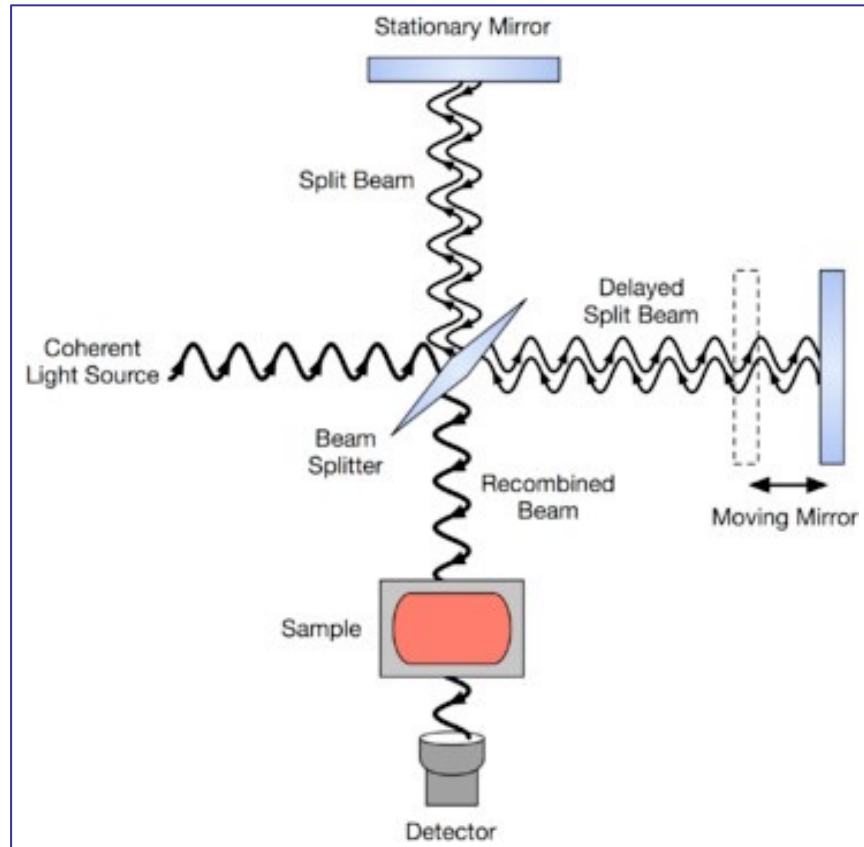
FT-IR (Fourier Transform Infrared Spectroscopy)

Questi strumenti, a differenza dei classici strumenti a scansione di λ tramite monocromatori (come gli UV-Vis), sono dotati di un interferometro (di Michelson), ovvero di un dispositivo che raccoglie contemporaneamente tutte le frequenze provenienti dalla sorgente policromatica dell'IR, che attraversa il campione, e le invia al rivelatore in maniera tempo-dipendente (**cioè l'assorbimento della radiazione è in funzione del tempo e non della frequenza**).

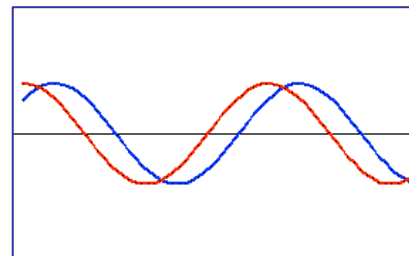
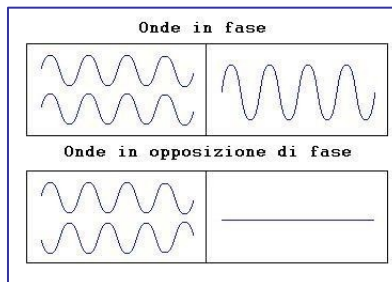


Successivamente un computer esegue la Trasformata di Fourier in modo da passare dal dominio del tempo a quello delle frequenze e trasformare così l'interferogramma in uno spettro a bande di frequenza.

Schema di uno strumento FT-IR



<https://www.youtube.com/watch?v=2TCwLENX310>



Onde “sfasate”, ma di stessa frequenza
(solo ritardate nel tempo!)

Lo spostamento dello specchio mobile (Δx) corrisponderà alla differenza di tempi di arrivo al rivelatore (ritardo) tra l'onda riflessa dallo specchio fisso rispetto a quella riflessa dallo specchio mobile.

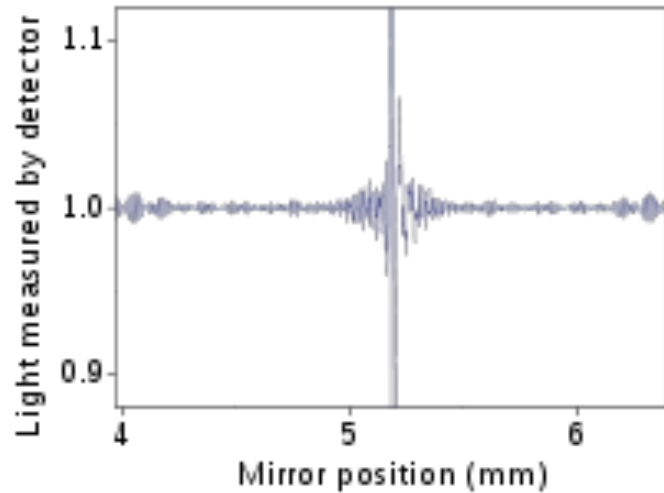


Un computer opera la FT in modo da trasformare tale ritardo in variazioni di frequenza!!

FUNZIONAMENTO:

Il raggio policromatico IR (filamento Ni-Cr o altro) viene indirizzato su uno specchio semiriflettente (beamsplitter, cristallo di KBr rivestito di Germanio) che lo suddivide in 50% ad uno specchio fisso e 50% ad uno mobile. I raggi riflessi da questi specchi vengono inviati nuovamente al beamsplitter che li ricongiunge e li invia al detector dopo aver attraversato il campione. Il cammino ottico (inteso come tempo trascorso dai raggi) sarà differente per i due percorsi anche se giungono al rivelatore congiunti e, a seconda della differenza di cammino ottico, si creano delle interferenze costruttive o distruttive che creano un segnale proporzionale alla differenza di cammino ottico dei due raggi, cioè alla posizione dello specchio mobile in quell'istante. Il segnale complessivo è un interferogramma che contiene tutte le informazioni inerenti l'intensità e la frequenza della radiazione emessa. Il campione, interposto tra il beamsplitter e il detector, attenuerà tale interferogramma a causa dell'assorbimento di parte di radiazione dei propri gruppi funzionali e, quindi, si genererà una risultante che verrà decodificata da un computer tramite la trasformata di Fourier (algoritmo). Si otterrà lo spettro IR di Assorbanza (meglio la Trasmittanza %) in funzione della frequenza (meglio il numero d'onda) che sarà unico per ciascuna sostanza.

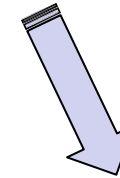
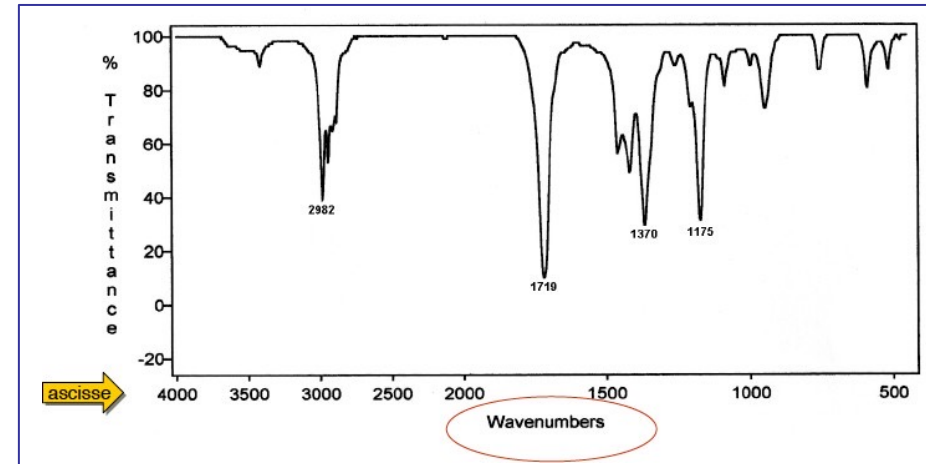
Interferogramma



F.T.



Spettro IR di frequenze (o $\bar{\nu}$)



Il punto centrale rappresenta il “ritardo ZERO” e corrisponde all’assenza del campione (tutta la radiazione attraversa l’interferometro e giunge al detector)



ASSORBIMENTO-TEMPO

ASSORBIMENTO-FREQUENZA

$$X(f) = \int_{-\infty}^{+\infty} x(t) \cdot e^{-j 2\pi f t} dt$$

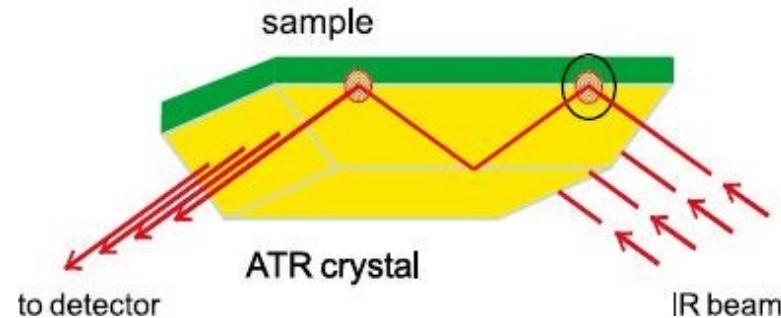
$$x(t) = \int_{-\infty}^{+\infty} X(f) \cdot e^{+j 2\pi f t} df$$

Lavorando in **FT** si hanno notevoli vantaggi:

- Risparmio di tempo: misure in pochi secondi rispetto a qualche minuto del spettrofotometro a scansione;
- Miglior potenza della sorgente luminosa, in quanto vengono a mancare fenditure e, quindi, non si ha dispersione di segnale e di conseguenza anche:
- Miglior rapporto segnale/rumore;
- Nessun effetto termico sul campione (sorgente “lontana” ad esso)
- Assenza di luce diffusa nonostante sorgente di luce policromatica.
- Sono a monoraggio!

In tutti i casi si eseguirà prima uno spettro del “BACKGROUND”, cioè del supporto in assenza del campione che originerà lo spettro «dell’aria» e successivamente si eseguirà l’analisi dell’analita. Lo strumento provvederà automaticamente alla sottrazione dello spettro del background dal totale registrato!

FTIR-ATR (Attenuated Total Reflection)



La tecnica ATR, a differenza di quella vista finora, si basa sulla riflessione da parte di un cristallo (diamante, Ge, ZnSe,...) ad elevato indice di rifrazione entro il quale viaggia la radiazione IR riflessa che, quando presente un campione solido o liquido sulla sua superficie, sarà per qualche frazione di micron, capace di attenuare l'intensità del raggio a causa dell'assorbimento e sufficiente ad essere rilevato dallo spettrofotometro dando origine ad uno spettro FTIR-ATR pressochè «pulito» e di facile preparazione.

SPETTROSCOPIA RAMAN

La spettroscopia Raman è una tecnica spettroscopica, qualitativa, basata sull'effetto Raman: è una tecnica di spettroscopia molecolare che, come la spettroscopia infrarossa a trasformata di Fourier (FTIR), sfrutta l'interazione della luce con la materia per ottenere informazioni sulla struttura o sulle caratteristiche di un materiale.

La spettroscopia Raman e la spettroscopia FTIR forniscono entrambe uno spettro caratteristico delle specifiche vibrazioni di una sostanza e sono utili per identificarla.

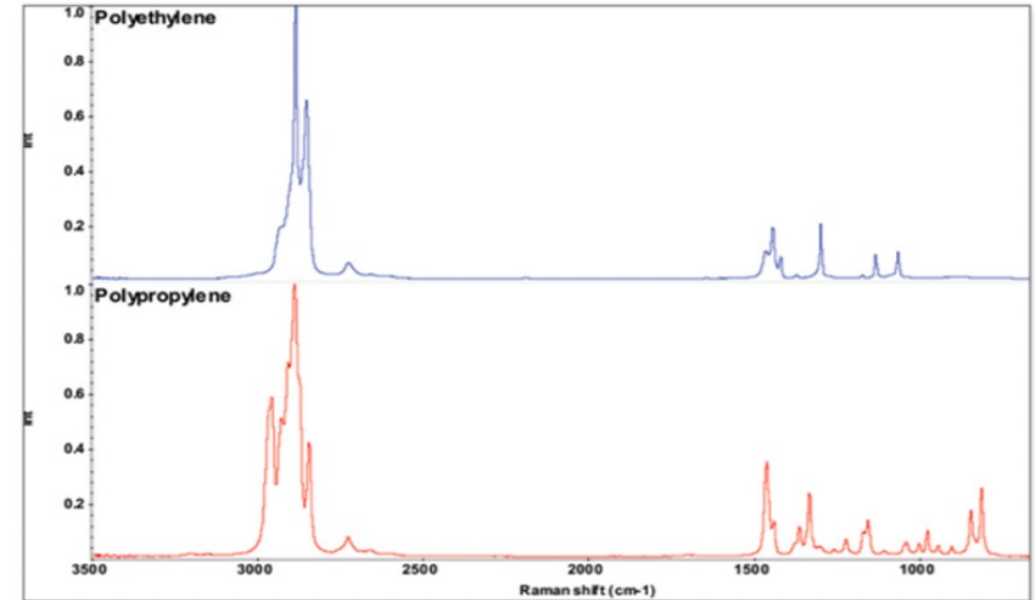
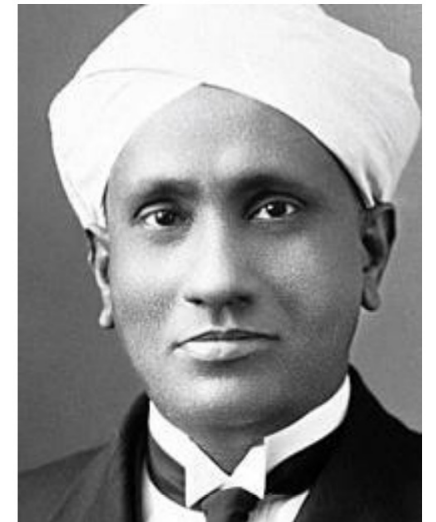
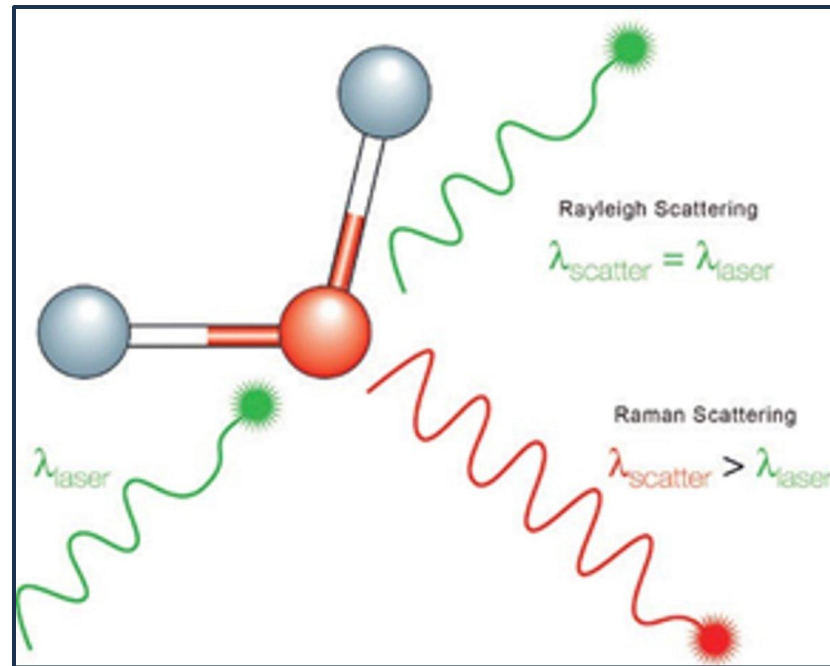


Figure 2: Raman spectra of polyethylene and polypropylene.

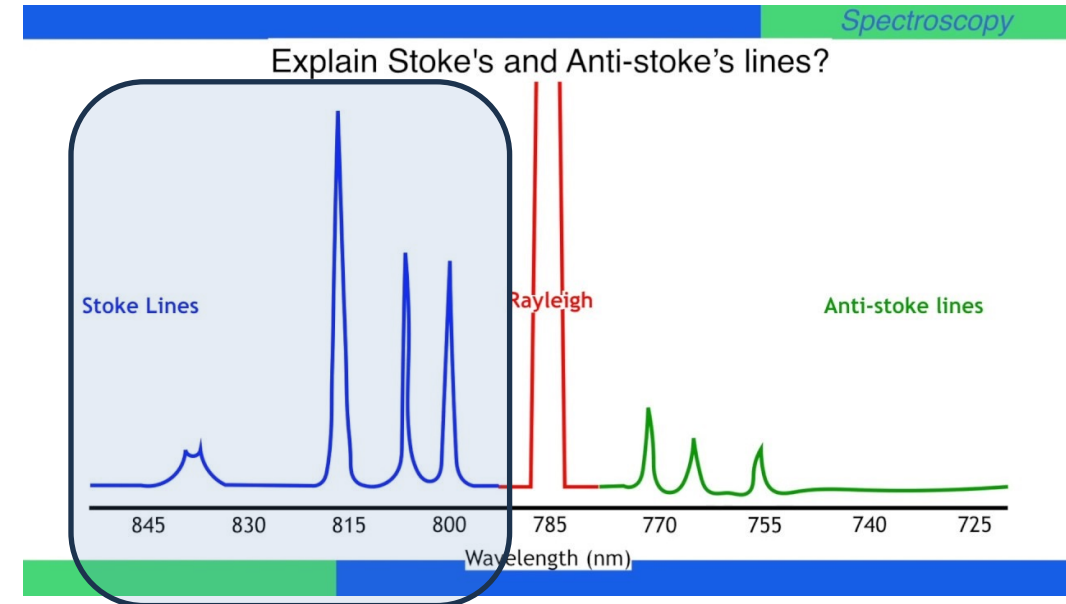
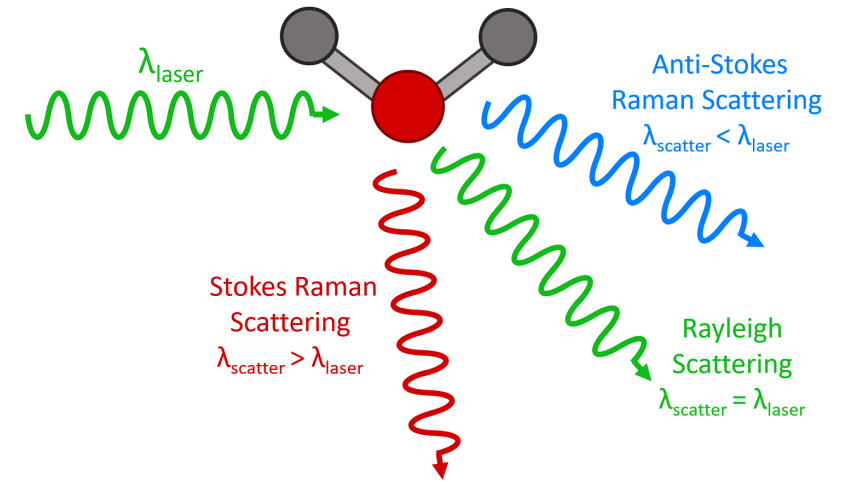
Quando la luce interagisce con le molecole di un gas, di un liquido o di un solido, la maggior parte dei fotoni viene dispersa o diffusa **mantenendo la stessa energia dei fotoni incidenti**. Questo fenomeno è denominato diffusione elastica o diffusione di Rayleigh. Una quantità molto piccola di questi fotoni, circa 1 fotone su 10 milioni, dopo la diffusione ha **una frequenza diversa** da quella del fotone incidente. Questo processo è denominato diffusione anelastica, oppure effetto Raman, in onore di Sir Chandrasekhara Venkata Raman che lo scoprì e per il suo lavoro ricevette nel 1930 il premio Nobel per la fisica.



(C.W. Raman per il suo lavoro ricevette nel 1930 il premio Nobel per la fisica.)

In genere un fascio di luce che incide su un campione lo attraversa senza subire modifiche o viene assorbito a seconda della lunghezza d'onda della radiazione e della natura del materiale in questione.

Vi sono poi i fenomeni di diffusione, lo "sparpagliamento" che un fascio di onde elettromagnetiche o di particelle subisce nell'attraversare un mezzo in virtù delle interazioni con le particelle di quest'ultimo. Una piccola parte del fascio incidente viene diffusa elasticamente, ossia con la medesima frequenza: questo è **l'effetto Rayleigh**, ossia l'effetto che fa apparire il cielo blu, i prati verdi, il sole giallo... Una percentuale minore di luce subisce una diffusione anelastica e questo è **l'effetto Raman**: il fascio è diffuso con una frequenza più alta o più bassa di quella originaria. Se il livello energetico del fotone diffuso è maggiore del fotone irraggiato (cede energia alla molecola → vibrazione molecolare) si ha il **fenomeno di Raman-Stokes**, se è minore prende nome di **Raman Anti-Stokes** (acquista energia dalla molecola).

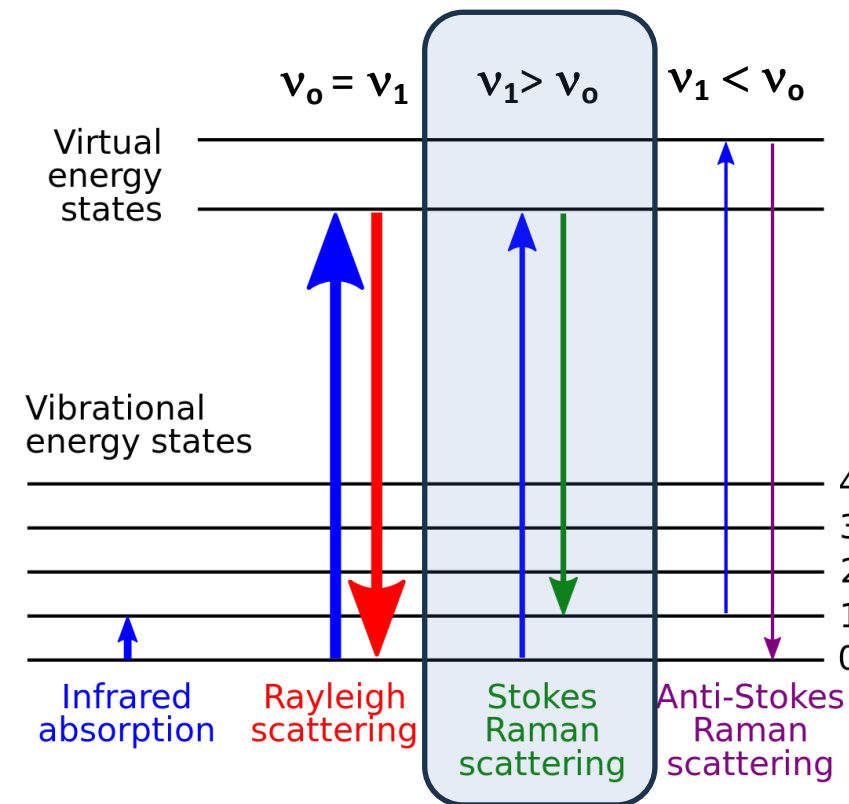
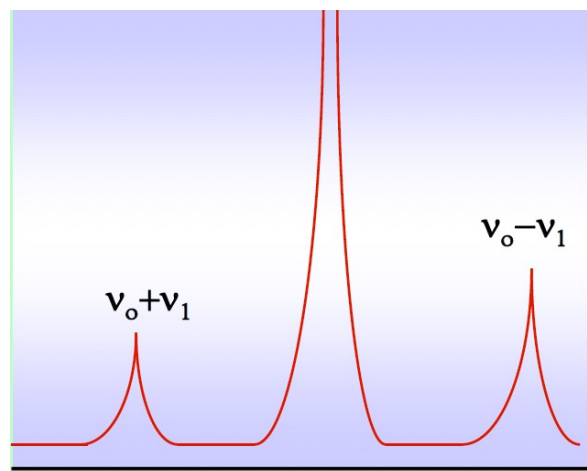


La diffusione è quindi dovuta per la creazione di dipoli istantanei (polarizzabilità) per l'interazione tra il campo elettrico e le molecole della sostanza.

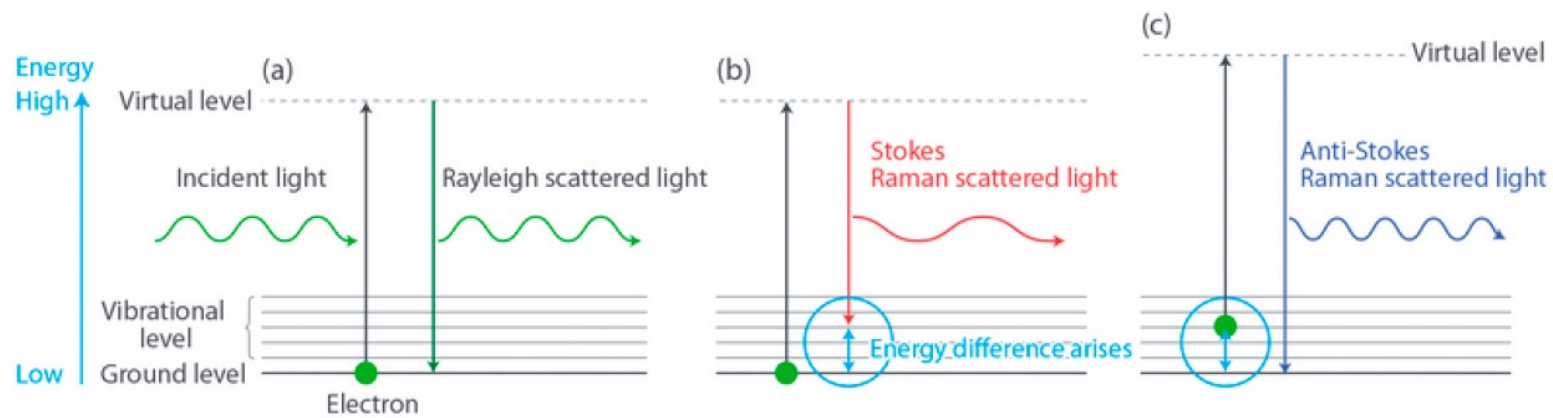
La molecola passa da uno stato vibrazionale fondamentale ν_0 ad uno stato eccitato $\nu_0 + \Delta E$. Ricadendo allo stato fondamentale si avrà l'effetto Rayleigh ($\nu_1 = \nu_0$) se, invece, ricade in uno stato vibrazionale a energia maggiore ($\nu_1 > \nu_0$) cederà minor energia ($< \Delta E$) con effetto Raman a frequenza minore, viceversa se ricade in uno stato con $\nu_1 < \nu_0$.

A livello quantomeccanico si parla di transizione ad uno **stato vibrazionale virtuale** (transitorio) con ritorno ed uno stato vibrazionale diverso:

$$\Delta \nu = \pm 1$$



A livello spettrale si considera solamente l'effetto Stokes a frequenze minori (λ maggiori, cm^{-1} positivi, più intenso: $\Delta \nu = +1$), ovvero quando la molecola acquista energia per vibrare.



(a) An electron is excited from the ground level and falls to the original ground level. (b) An electron is excited from the ground level and falls to a vibrational level. (c) An electron is excited from a vibrational level and falls to the ground level.

Raman spectrum

Figure 3. Raman spectrum of ethanol obtained by 532 nm excitation wavelength

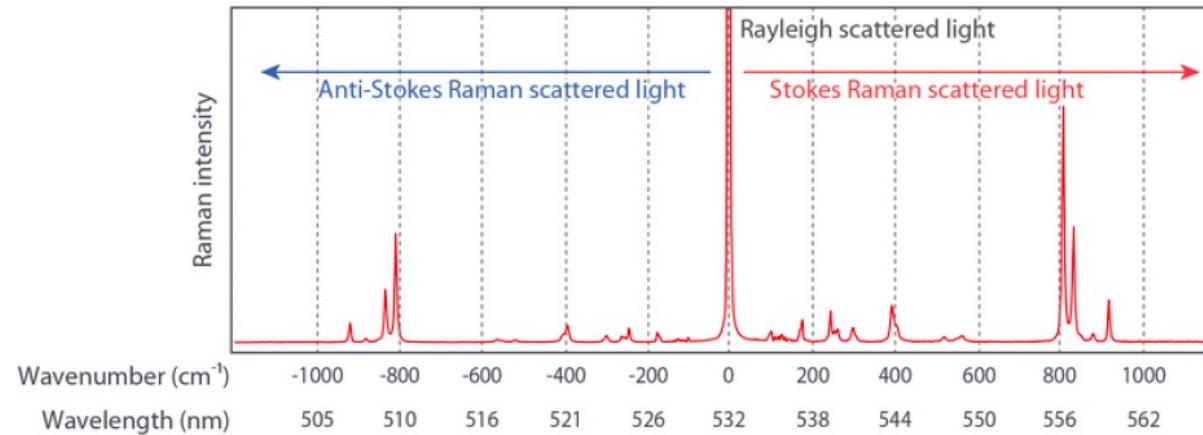
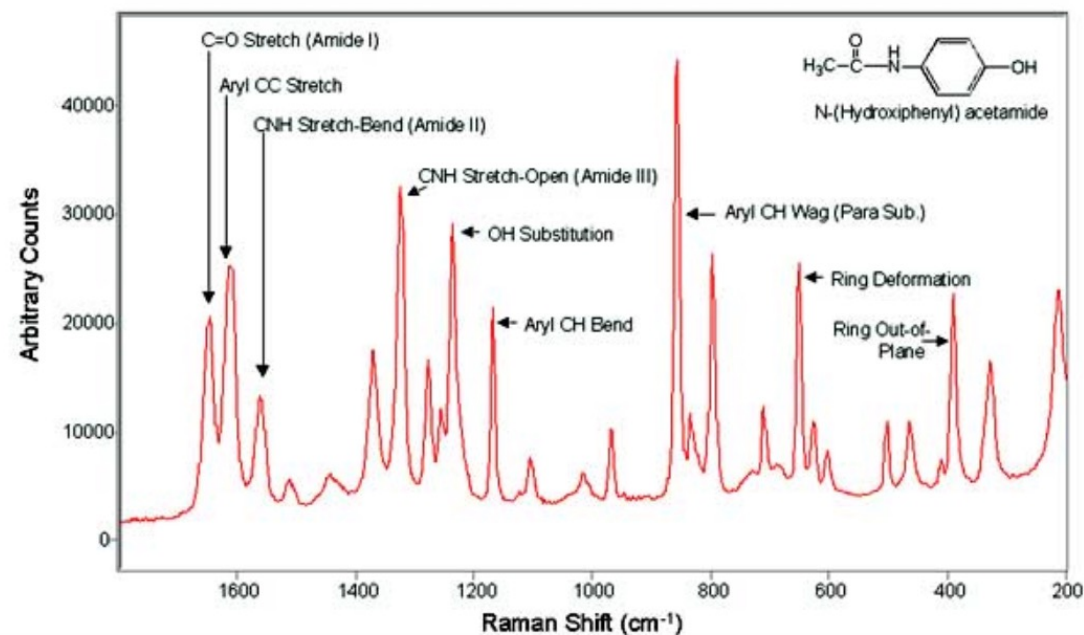


Figure 3 shows a Raman spectrum of ethanol. The Raman spectrum is expressed in a form of intensity of scattered light versus wavenumber (the reciprocal of wavelength, called Raman shift). For example, the Raman peak at 547.14 nm obtained by a 532 nm excitation wavelength can be converted into a wavenumber as below;

La radiazione prodotta dalla diffusione Raman è registrata e di seguito viene elaborato un grafico di lunghezze d'onda (numero d'onda, cm^{-1}) in funzione dell'intensità. Questo spettro è associabile a un'unica molecola e costituisce una vera e propria impronta digitale.



Le applicazioni:

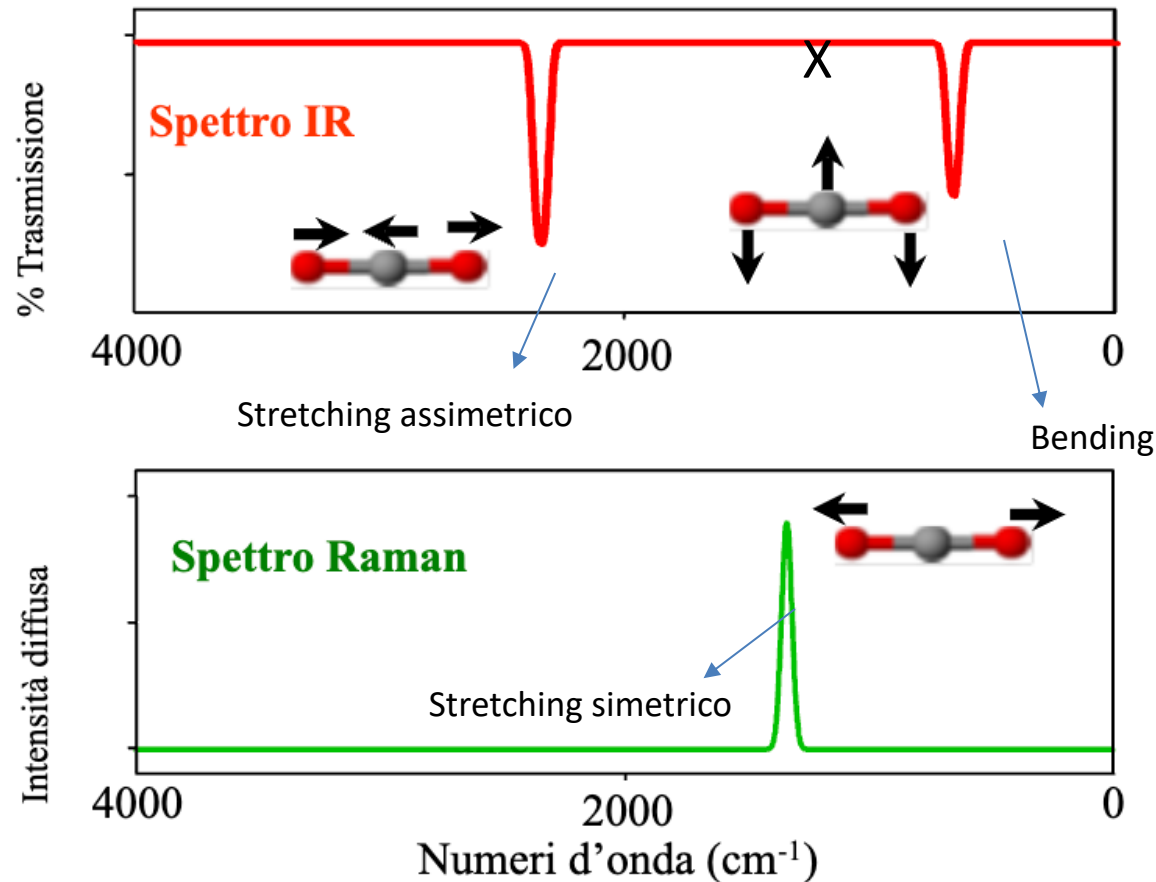
- caratterizzazione di pigmenti, coloranti e leganti;
- caratterizzazione di superfici ceramiche, materiali lapidei, sostanze organiche e inorganiche di varia natura;
- identificazione di prodotti di degrado su superfici pittoriche, vetri, ceramiche, metalli e rocce.

DIFFERENZE TRA FTIR E RAMAN

1. Nella *spettroscopia FTIR* si utilizza tipicamente una luce laser nel campo dell'*infrarosso*.
2. Le informazioni fornite dalla *spettroscopia FTIR* è basata sull'assorbimento della luce.
3. La spettroscopia FTIR fornisce informazioni in particolare sulle vibrazioni intramolecolari.
4. Nella spettroscopia FTIR molecole con dipolo nullo non assorbono (es. N_2 o v_{sim} molecole lineari)

1. Nella *spettroscopia Raman* si utilizza tipicamente una luce laser nel campo visibile, nel *vicino infrarosso* e nel *vicino ultravioletto*.
2. Le informazioni fornite dalla spettroscopia Raman si ottengono mediante un processo di diffusione (scattering) della luce.
3. La spettroscopia Raman fornisce informazioni sulle vibrazioni intra- e intermolecolari e può consentire di comprendere meglio una reazione.
4. Nella spettroscopia Raman molecole con dipolo nullo vengono rilevate

Esempio di spettro IR e Raman della CO₂



Nella tecnica IR lo stretching simmetrico (ν_{sim}) di molecole lineari come la CO₂ non viene registrato per mancanza di un momento dipolare «attivo», mentre nella tecnica Raman si considera la «polarizzabilità» (possibilità di distorsione della nuvola elettronica) dovuta all'interazione con la radiazione delle molecole, per cui tali vibrazioni sono rivelate.



Stiramento simmetrico

Raman Attivo



Stiramento asimmetrico

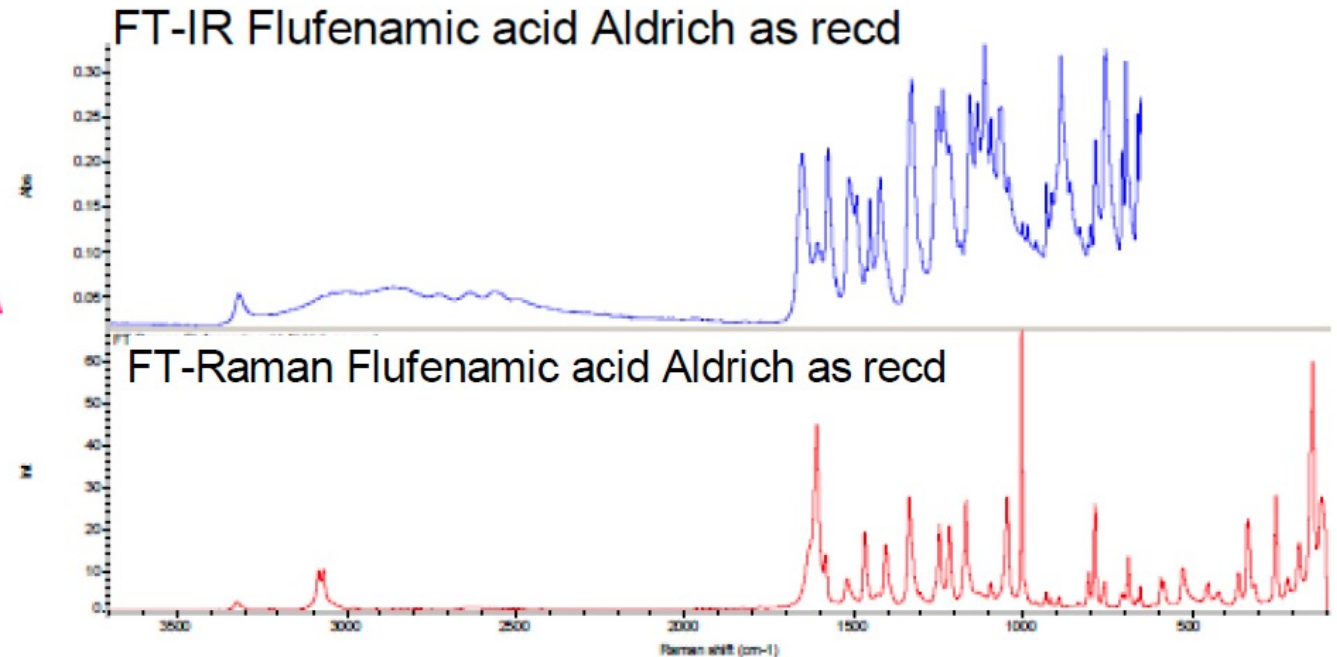
IR Attivo

Il range spettrale in Raman è maggiore e si riescono a rilevare più molecole (es. complessi metallo-legante che cadono nel range 100-700 cm⁻¹). Sono comunque due tecniche «complementari» piuttosto che competitive.

Esempio di spettro IR e Raman dell'acido flufenamico

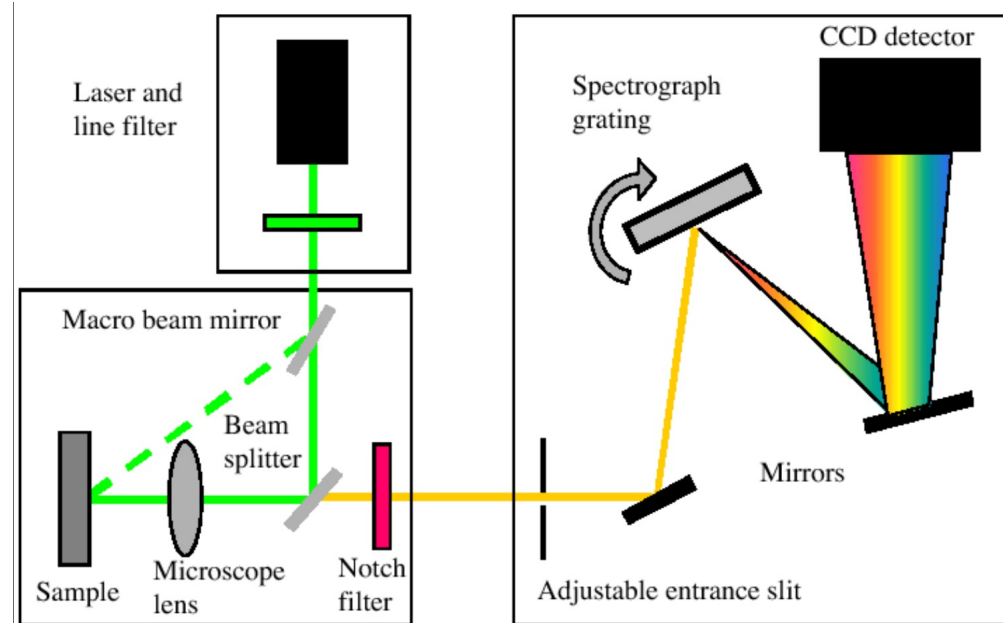
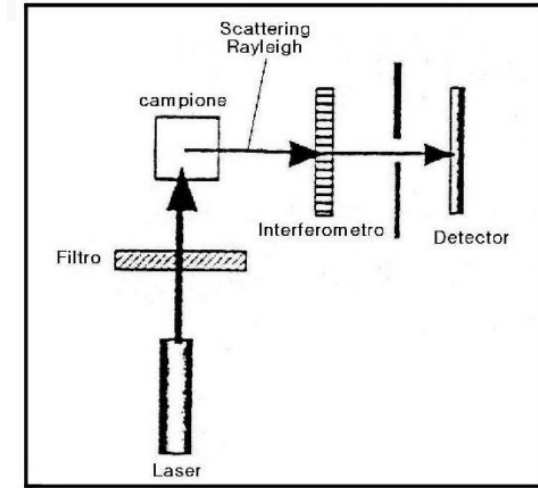
Posizione e intensità delle bande sono legate ai gruppi funzionali e al loro modi di vibrazione in maniera analoga alla spettroscopia FT-IR. Lo spettro Raman, però, risulta più dettagliato di quello IR.

**GRANDI DIFFERENZE TRA
LE VIBRAZIONI ATTIVE
ALL'IR E AL RAMAN**



STRUMENTAZIONE

1. Sorgente laser ad alta intensità (stato solido o gas) → Vis-medio IR (NIR)
2. Focalizzatore (microscopio confocale)
3. Chopper (beam splitter)
4. Portacampione
5. Interferometro oppure monocromatore e CCD detector (charge-coupled detector → semiconduttori)
6. Registratore



“ **133FA - ANALISI FARMACEUTICA 1**
LEZIONE 14 – Spettrometria NMR

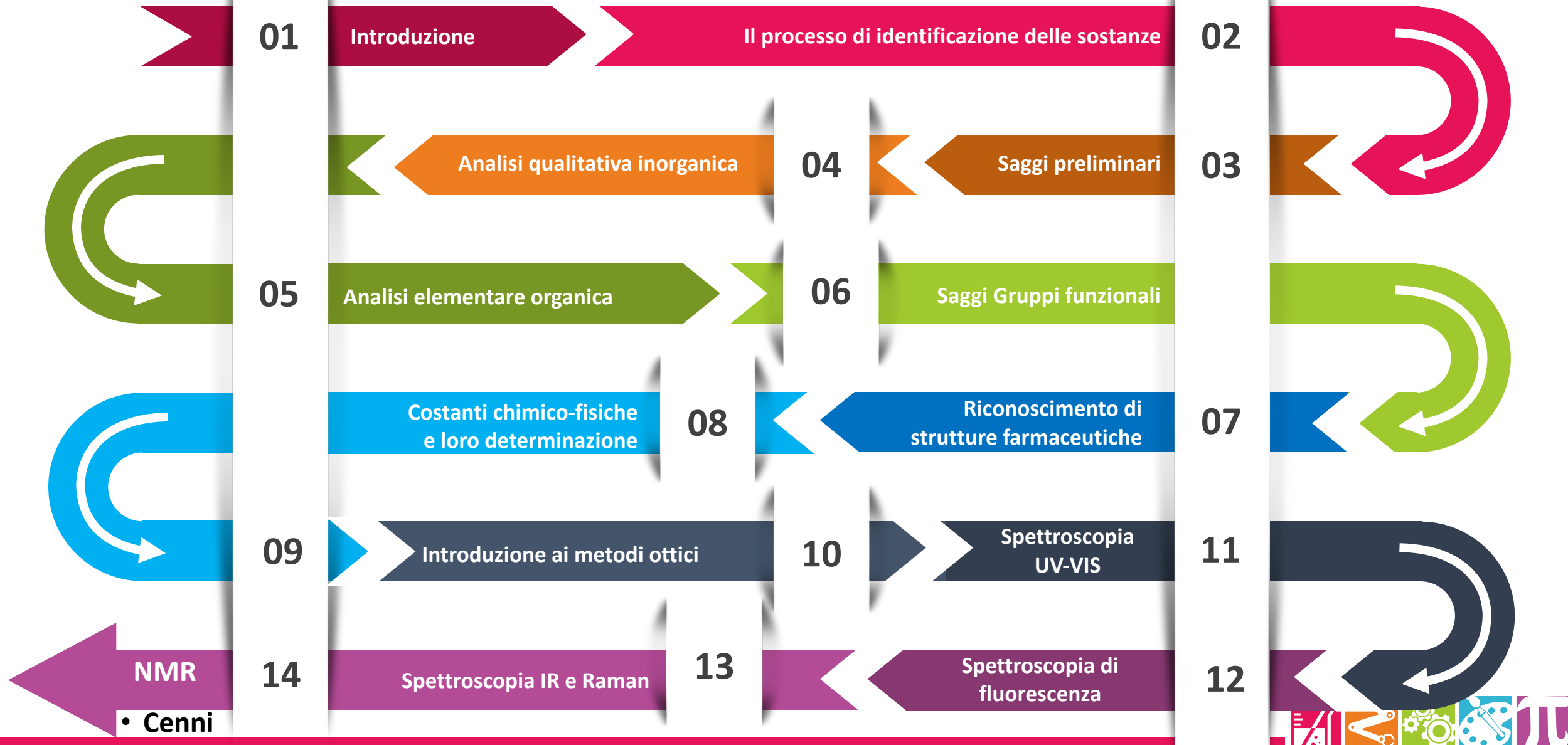
Prof. Daniele Zampieri

CdL CTF

”



Contenuti del Corso (e “Roadmap”)



Metodi spettrometrici:

RISONANZA MAGNETICA NUCLEARE

La spettroscopia di risonanza magnetica nucleare (NMR) è la tecnica che fornisce la maggior quantità di informazioni strutturali rispetto alle altre tecniche (IR, UV, MS) nell'identificazione di un composto organico.

Dallo spettro NMR di un composto ricaviamo infatti la natura degli atomi, il loro intorno chimico e il loro rapporto quantitativo. E' possibile inoltre, conducendo esperimenti più sofisticati, risalire alla conformazione anche di molecole molto complesse.

- ✓ Pauli negli anni 1924-1927 introdusse il concetto di «spin»
- ✓ Elettroni, protoni e neutroni possiedono un momento angolare intrinseco di spin con relativo numero quantico di spin (m_s) $\pm 1/2$.
- ✓ In nuclei diversi da quello di ^1H (= protone) il numero quantico di spin può essere intero o semiintero:
 $m_s = 0, 1/2, 1, 3/2, 2, \dots (2s+1)$
- ✓ Ogni particella carica in moto produce un momento di dipolo magnetico μ
- ✓ Ogni nucleo con un momento angolare L possiede un momento magnetico μ proporzionale:

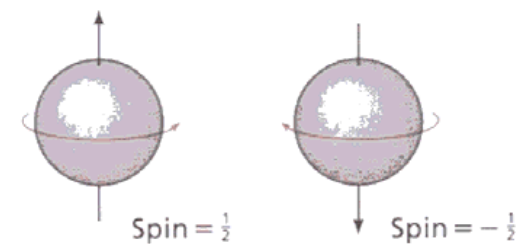
$$\mu \propto L$$

Per fare NMR ci vuole uno spin nucleare $L \neq 0$

$\Rightarrow$ nuclei con $L = 0$ sono magneticamente inattivi (per es. ^{12}C).

Alcuni esempi di specie con numero di spin nullo o non nullo

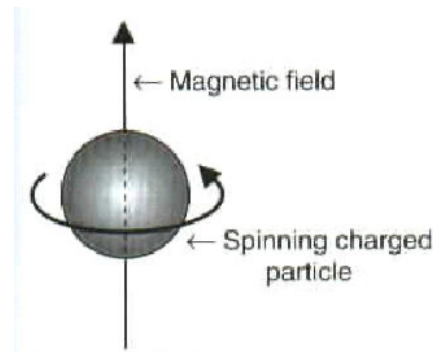
Numero di protoni (Z)	Numero di neutroni (N)	Numero di Spin (m_s)	Esempi
pari	pari	0	^{12}C , ^{16}O , ^{32}S
dispari	pari	$1/2$	^1H , ^{19}F , ^{31}P
dispari	pari	$3/2$	^{11}B , ^{35}Cl , ^{79}Br
pari	dispari	$1/2$	^{13}C
pari	dispari	$3/2$	^{127}I
pari	dispari	$5/2$	^{17}O
dispari	dispari	1	^2H , ^{14}N



Il principio

Nel nucleo è concentrata tutta la carica positiva dell'atomo, la rotazione (quindi il movimento) di una carica genera un campo magnetico. Si dice quindi che al momento angolare L è associato un momento magnetico μ . Entrambi i momenti sono grandezze vettoriali e sono direttamente proporzionali sulla base di un fattore di proporzionalità γ detto *rapporto giromagnetico*.

$$\vec{\mu} = \gamma \cdot \vec{L}$$

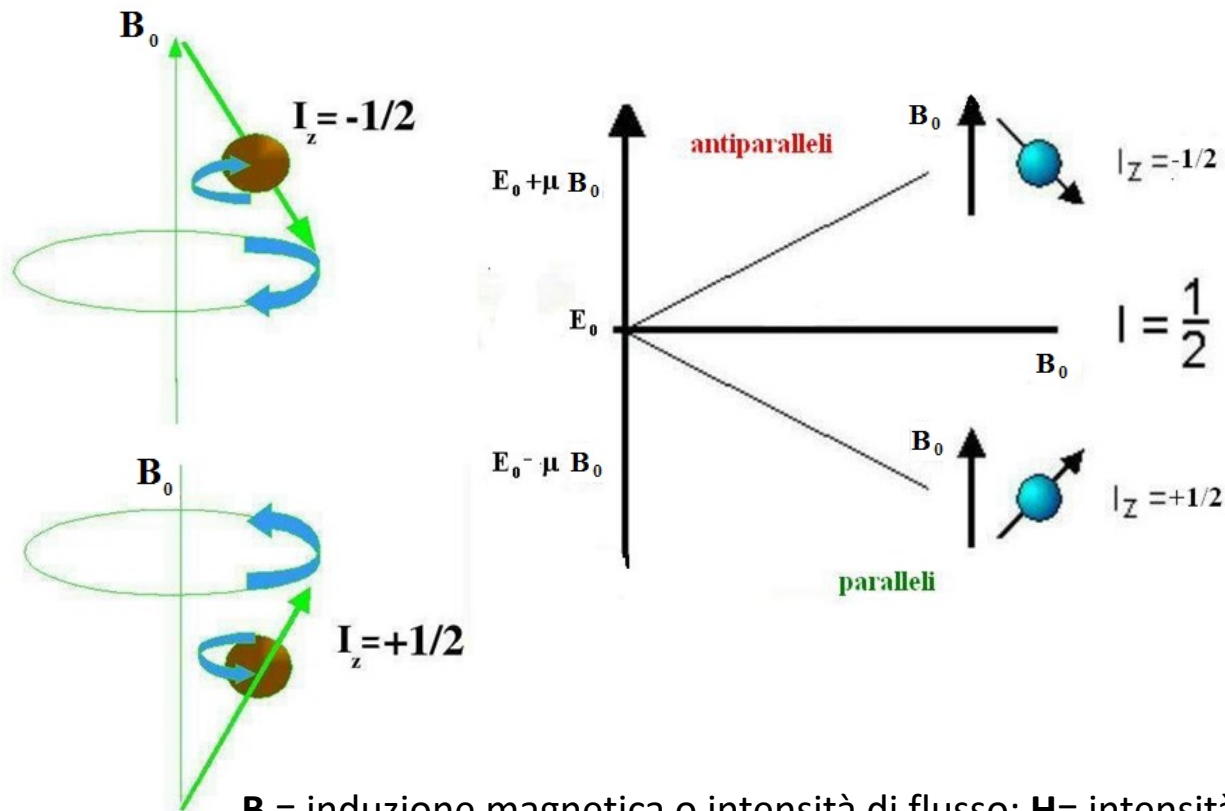


una corrente circolante in una spira produce un **momento magnetico (μ)**.

Il più semplice tra gli elementi aventi momento magnetico nucleare, ed il più importante a fini pratici, è l'**idrogeno**. Si può grossolanamente visualizzare l'unico protone di cui è composto l'atomo di idrogeno come una palla in rotazione su sé stessa e uniformemente carica: le porzioni infinitesime di carica generano un campo magnetico in funzione della loro distanza dall'asse di rotazione (γ differenti per nuclei differenti).

Quando un nucleo con numero di spin non nullo è posto in un campo magnetico (B_0), lo spin nucleare può allinearsi alla direzione del campo oppure alla direzione opposta ($2I+1$).

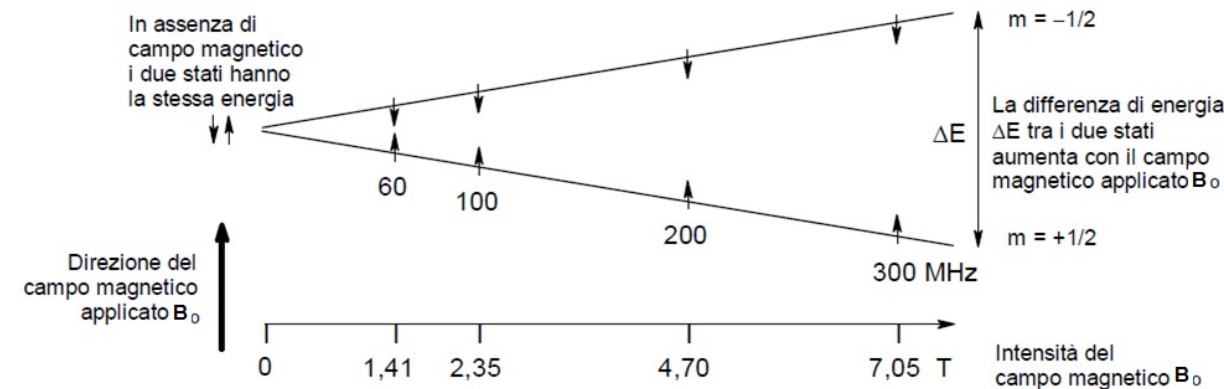
A questi due allineamenti sono associate energie differenti: in particolare, lo stato con spin opposto è più energetico (ma meno popolato!!).



B = induzione magnetica o intensità di flusso; H = intensità magnetica
Come unità di misura per B si utilizza il tesla (T) = 104 G (Gauss)

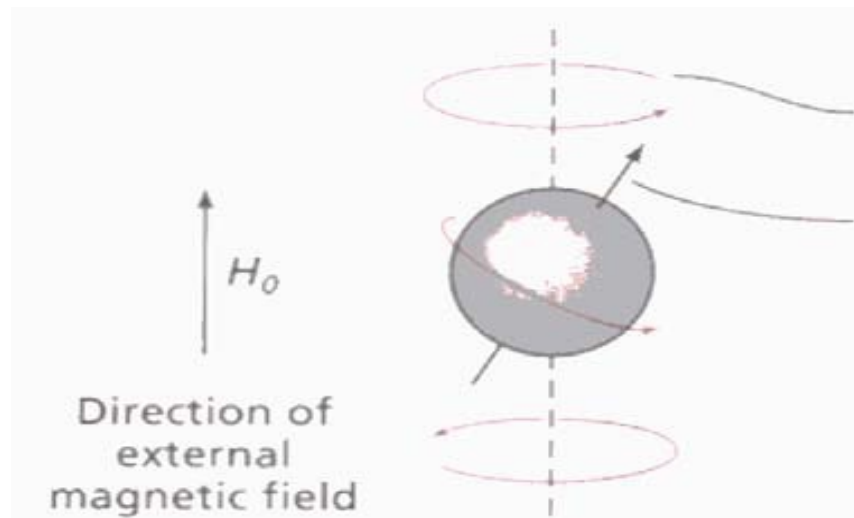
Lo spinning del nucleo genera un campo magnetico con momento magnetico μ proporzionale allo spin.

In presenza di un campo magnetico esterno (B_0), si generano due stati energetici con spin $+1/2$ (meno energetico) e $-1/2$ (più energetico).



Precessione degli spin

In presenza di un campo magnetico B_0 gli spin, in realtà, continuano ad oscillare attorno a un'asse di rotazione parallelo alla direzione del campo magnetico compiendo un moto di precessione simile a quello di una trottola.



Orbita di precessione, ω frequenza

Dipolo magnetico generato dalla rotazione dell'atomo

$$\Delta E = \frac{h\gamma}{2\pi} B_0$$

rapporto giromagnetico γ

	$\gamma/10^7 \text{T}^{-1} \text{s}^{-1}$	ν/MHz	abbondanza naturale, %
^1H	26.75	400.0	99.985
^2H	4.11	61.4	0.015
^{13}C	6.73	100.6	1.108
^{14}N	1.93	28.9	99.63
^{15}N	-2.71	40.5	0.37
^{17}O	-3.63	54.3	0.037
^{19}F	25.18	376.5	100.0

Il moto di precessione avviene con una frequenza proporzionale all'intensità di campo (B_0) e cioè alla differenza di energia tra i due livelli ($\Delta E = \gamma \hbar B_0$):

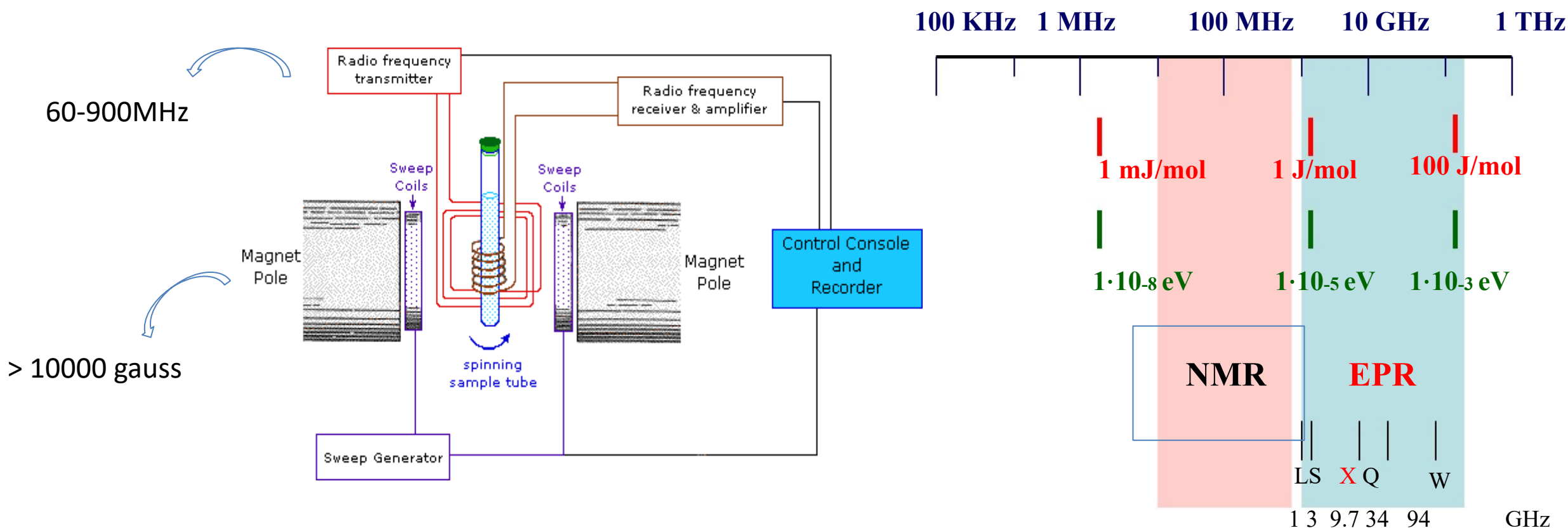
Equazione di Larmor

$$\omega_0 = \gamma B_0$$

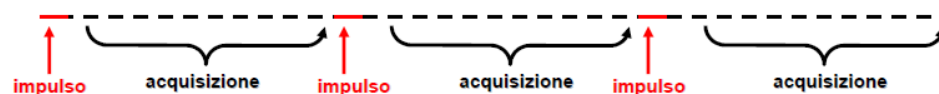
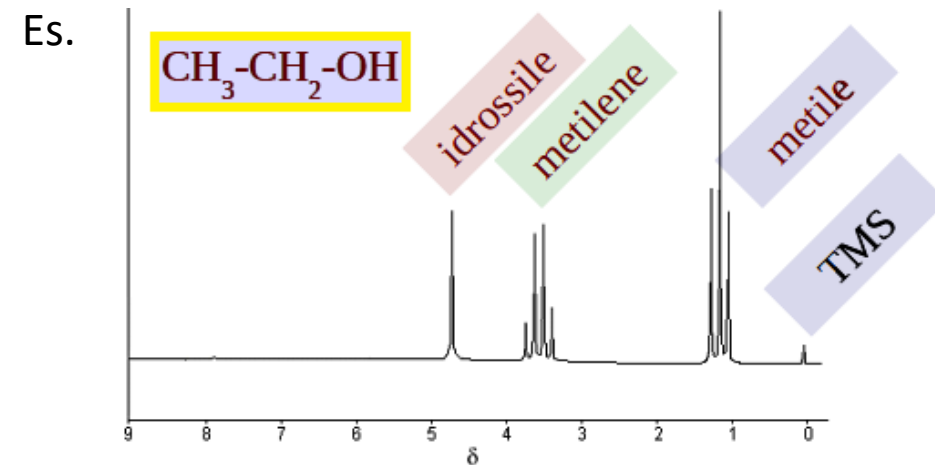
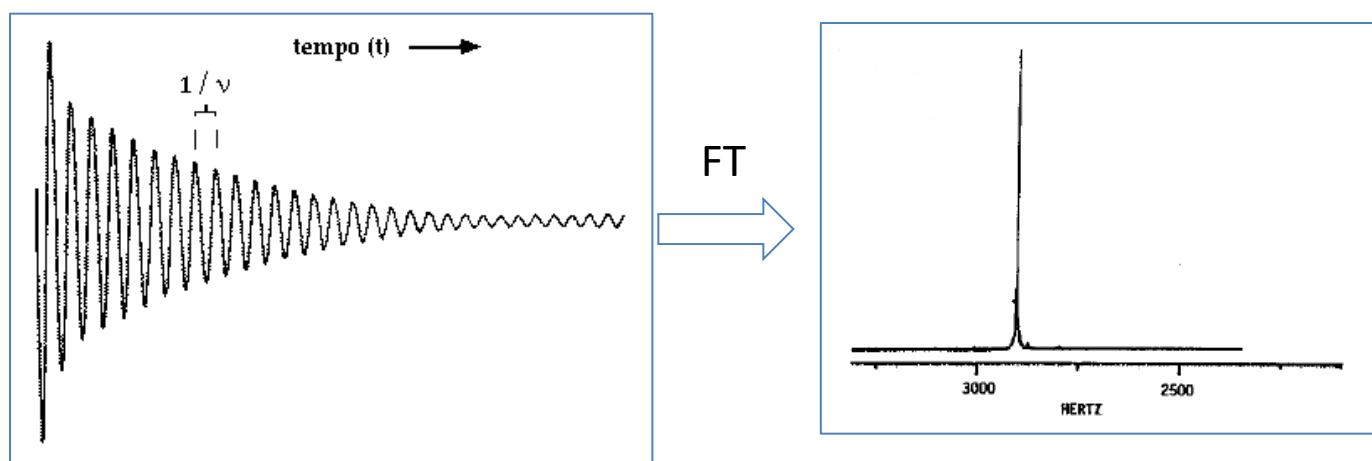
Rapporto giromagnetico: è caratteristico di ciascun nucleo!

Schema di uno spettrometro NMR

Sulla base di quanto si è visto fino ad ora uno strumento NMR deve essere costituito: a) da un magnete per la realizzazione del campo magnetico B_0 ; b) da un emettitore di radiofrequenze (continua o pulsante), in grado di emettere la frequenza ω .

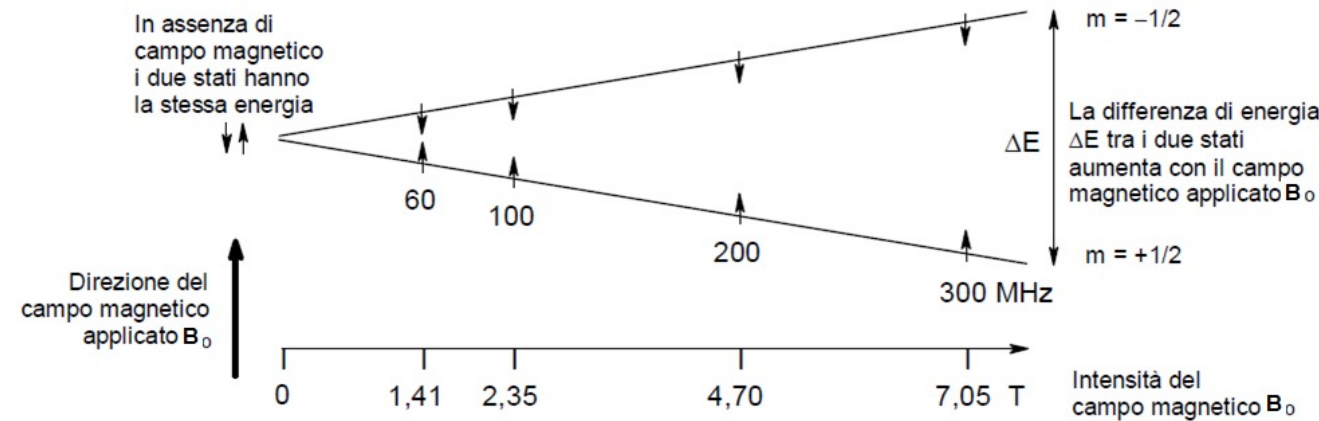
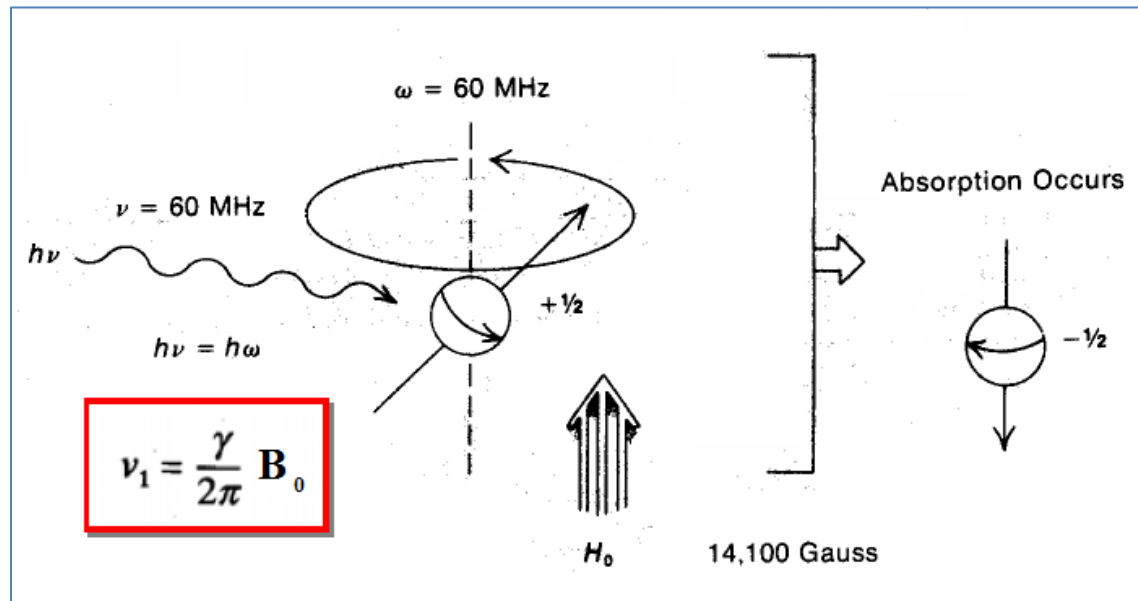


Nello strumento più utilizzato, quello che opera in **Trasformata di Fourier**, ciò che si va a misurare sperimentalmente è l'energia emessa dal decadimento del nucleo dallo stato eccitato a quello fondamentale, in funzione del tempo. Tale decadimento segue una forma oscillante scodata che prende il nome di FID (Free Induction Decay; decadimento libero dell'induzione), nella quale le oscillazioni hanno la frequenza di Larmor del nucleo in esame.



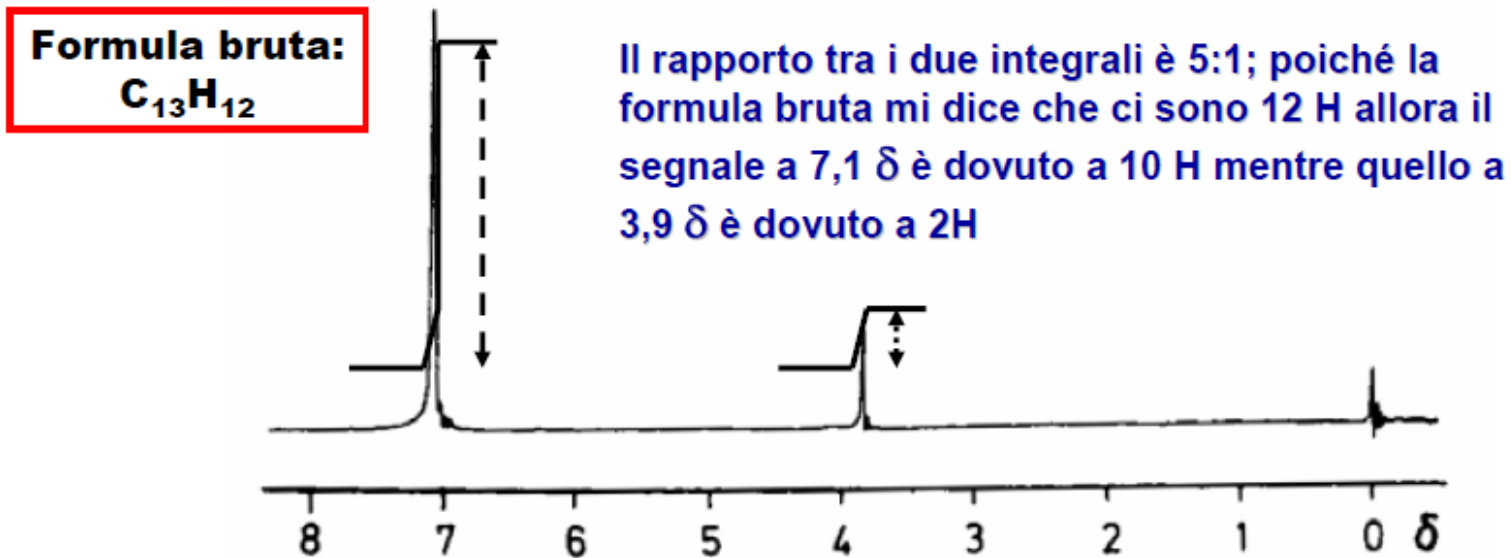
Il segnale periodico viene convertito in un insieme discreto di valori tramite la “Trasformata di Fourier (FT)” ottenendo così un “picco” caratteristico del nucleo in questione.

L'esperimento di risonanza magnetica nucleare consiste nell'irradiare un nucleo con una frequenza elettromagnetica uguale ad ω , la frequenza di Larmor di precessione del momento magnetico del nucleo attorno a B_0 .



Da uno spettro NMR possiamo ricavare due importanti informazioni:

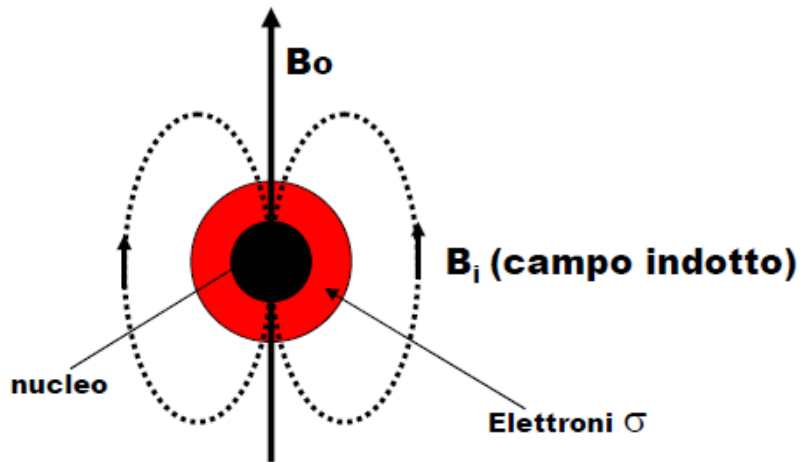
1. Il tipo diverso di protoni (più in generale di nuclei) presenti in una molecola organica in base alla posizione dei segnali (δ)
2. Il numero di protoni di un certo tipo che sono responsabili di quel segnale (area del segnale o integrale)



L'integrale di uno spettro NMR non ci dice il valore assoluto di protoni responsabili di un segnale ma solo il numero relativo

Lo schermo elettronico

In una molecola, la presenza di elettroni ed altri nuclei vicini, attorno ad un determinato nucleo tende a formare un campo magnetico che si oppone come uno *schermo* al campo applicato esternamente, influenzando così l'esatta energia di transizione di spin in quanto il campo esterno deve essere leggermente incrementato per permettere la transizione.



Idrogeni (ma anche atomi di carbonio ecc.) diversi di una molecola “sentono” campi magnetici diversi (anche se di poco) e quindi hanno frequenze di risonanza diverse!

$$B_{\text{eff}} = B_0 - B_i$$

Il campo effettivamente “sentito” dal nucleo è ridotto dal controcampo indotto dovuto alla presenza degli elettroni.

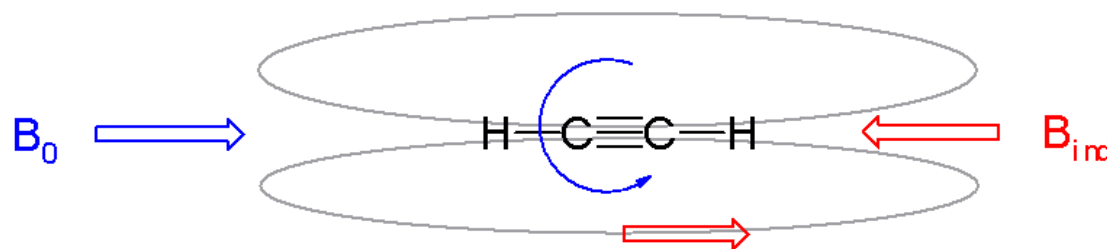
—————→ ω sarà minore

La conseguenza di ciò è che:

-gruppi elettron-attrattori (-I) diminuendo la densità di e^- attorno al nucleo ne aumentano la frequenza di risonanza (diminuisce la schermatura!); ES: alogenuri di metile (CH_3X): il chemical shift aumenta con $\text{X} \Rightarrow \text{I} \Rightarrow \text{Br} \Rightarrow \text{Cl} \Rightarrow \text{F}$ da 2.16 ppm a 4.26 ppm

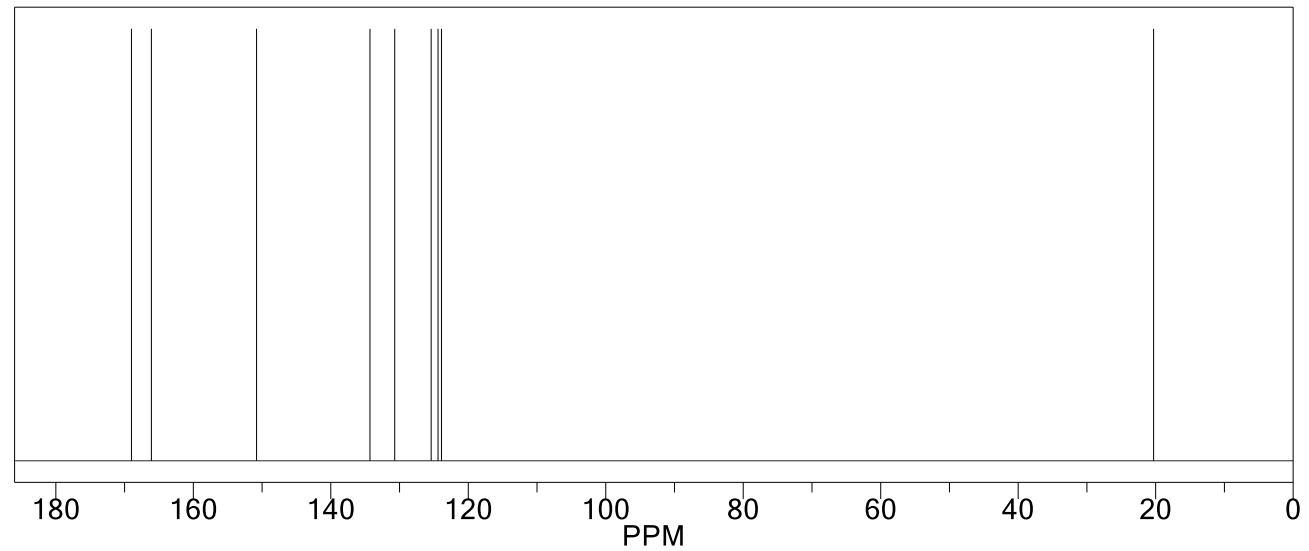
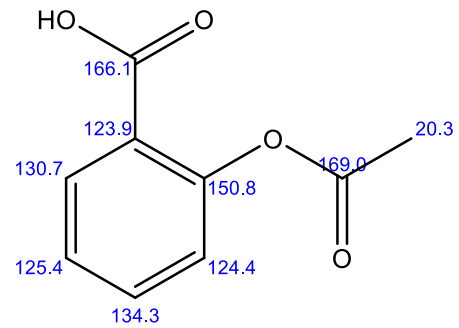
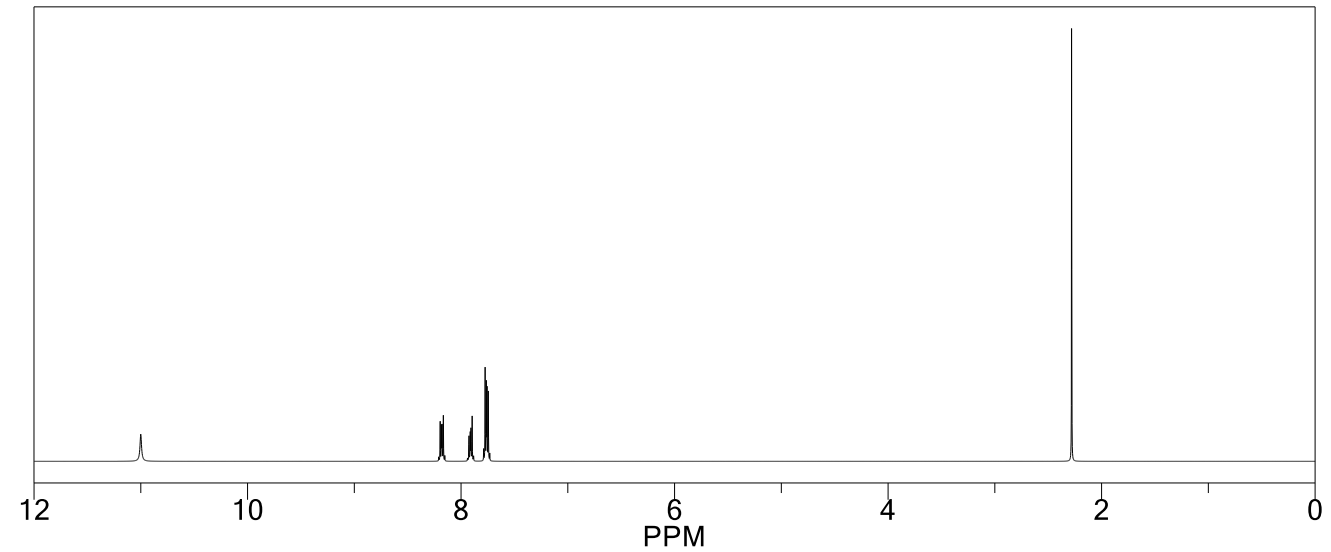
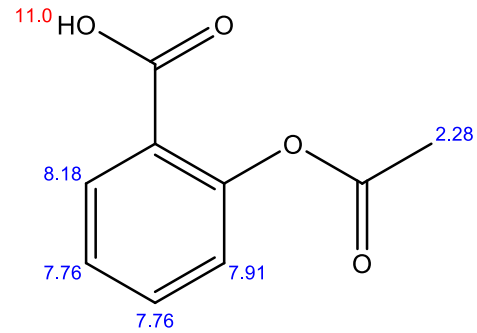
-gruppi elettrondonatori (+I) agiscono al contrario diminuendo la frequenza di risonanza e quindi aumenta la schermatura.

-Orbitali estesi come i legami doppi $\text{C}=\text{C}$ o tripli $\text{C}\equiv\text{C}$ e ancora più gli anelli aromatici (benzene) schermano fortemente (grandi $\delta \approx 6$), in maniera anisotropa, aumentando il campo ($\delta > 0$) o riducendolo ($\delta < 0$) a seconda della posizione relativa dei protoni.



In conseguenza di ciò, nuclei posti in situazione elettroniche diverse daranno segnali di assorbimento NMR diversi, permettendo quindi di determinare la struttura elettronica del composto in cui si trovano.

ESEMPIO: Spettro ^1H -NMR e ^{13}C -NMR della Aspirina (ac. Acetilsalicilico)



The screenshot shows a web browser window with the address bar displaying `mestrelab.com/main-product/mnova`. The browser's address bar also shows a search icon, Google Lens, and a star icon. The browser's tab bar shows a single tab titled "Mnova Software Suite - Mestrelab". The browser's bookmark bar shows several bookmarks, including "Importati da Firefox", "Journals", "Posta - ZAMPIERI...", "UniCredit Banca...", "Dipartimento di Sc...", "Area Docente, Uni...", "Università degli st...", and "Tutti i preferiti".

The website's header is dark red. On the left, there is a white "M" logo and the text "Mestrelab Research". On the right, there is a white button that says "Download Mnova Free trial", a search icon, and the "SciY" logo. Below the header, there is a navigation menu with the following items: "Products & Solutions", "Applications", "About us", "News/Events", "Resources", "Downloads", "Learn & Support", "Store", and "Contact".

The main content area has a dark red background. On the left, there is a large white "M" logo inside a hexagon, followed by the word "NOVA" in large white capital letters. To the right of the logo, the text "Top-Class Software Suite for Comprehensive Analytical Chemistry Data Processing" is displayed in white. Below this, a paragraph describes the software: "Mnova is a powerful, multi-vendor software suite designed to seamlessly process and analyze data from NMR, LC/GC-MS, and Electronic & Vibrational Spectroscopic techniques. Our platform is built to work with a wide range of instruments, offering unmatched versatility and precision for your analytical needs!". In the bottom right corner, there is a white button that says "Contact us".

<https://mestrelab.com/main-product/mnova>

