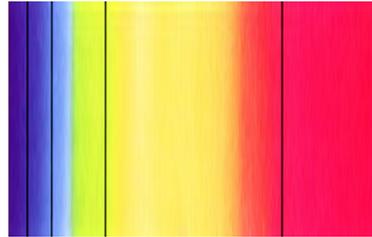




FACOLTÀ DI FARMACIA

# Spettroscopia



C. A. Mattia



## Sviluppo storico della spettroscopia

### L'inizio: il problema del "colore"

Il colore "è contenuto" nella luce o nei corpi?

- \*1660 Newton studia la **rifrazione** e scopre gli **spettri**  
→ il colore è "contenuto" nella luce  
tuttavia ... da dove proviene il "colore" delle fiamme?
- \*1752 Melville scopre gli **spettri a righe** e descrive la **riga gialla della fiamma** che attribuisce al **sodio** → il "colore" è contenuto anche nei corpi?
- \*1800 Herschel scopre l'**infrarosso** nella radiazione solare e Ritter scopre l'**ultravioletto** nelle proprietà fotochimiche di AgCl.

C. A. Mattia

2

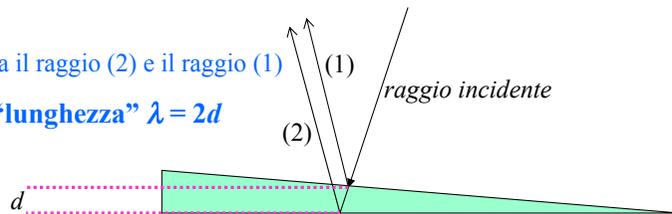


## Dal qualitativo al quantitativo

- \*1801 Young calcola la **lunghezza d'onda** usando dati di Newton di interferenza da lamine sottili

$2d =$  differenza di cammino fra il raggio (2) e il raggio (1)

→ si assegna al colore la "lunghezza"  $\lambda = 2d$



- \*1810 → Fraunhofer sviluppa i diffrattometri e misura ben 700 "righe" fra righe "chiare" (di **emissione**) e righe scure" (di **assorbimento**). Herschel, Brewster, Foucault associano righe e **sostanze** dando vita alla **spettroscopia** come tecnica di analisi chimica.

C. A. Mattia

3



## Sviluppo storico

- \*1859 Le leggi di Kirchoff

- la lunghezza d'onda a cui una sostanza emette **dipende unicamente dalla sostanza**.
- una sostanza **assorbe** alle **stesse lunghezze d'onda** a cui **emette**.
- una sostanza **trasparente** non emette nel visibile.

Inoltre Kirchoff spiega:

- le righe scure nella corona solare;
- il puzzle della "riga D" del sodio;
- predice l'esistenza del rubidio estrapolando le righe di Na e K.

C. A. Mattia

4



# Sviluppo storico

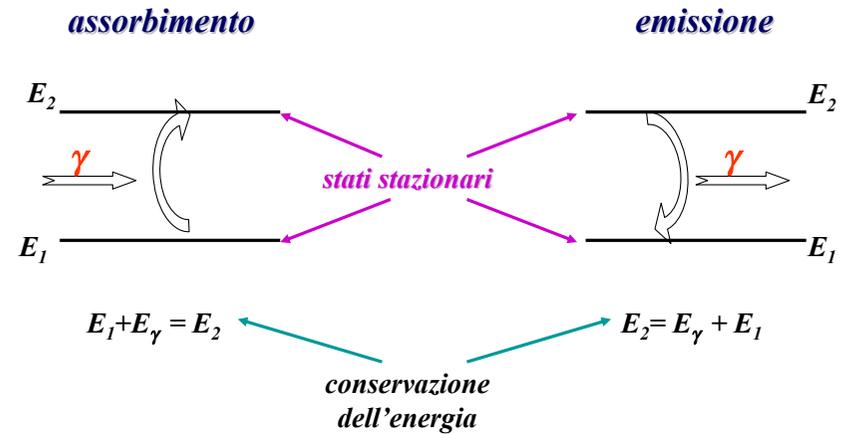
## verso la fisica dei "quanti"

- \* 1885 la serie di Balmer:  $\nu \propto 1/n^2 - 1/m^2$
- \* 1905 Einstein spiega l'effetto fotoelettrico,  $E=h\nu$ .
- \* 1908 Principio di "ricombinazione" di Ritz:  
"termine spettrale" a cui è associata una  
frequenza  $\nu = R Z^2 (1/n^2 - 1/m^2)$  ( $R \approx 3 \cdot 10^{15} \text{s}^{-1}$ ).



# Sviluppo storico spettroscopia

- \* 1913 Ipotesi di Bohr sulle *transizioni fra stati stazionari*.

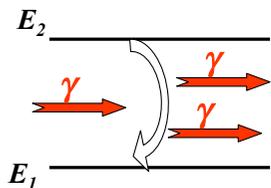


# Sviluppo storico spettroscopia

## La "statistica" della luce

- \* 1918 Einstein ipotizza l'*emissione stimolata* e l'*equilibrio radiazione materia*.

### Emissione stimolata

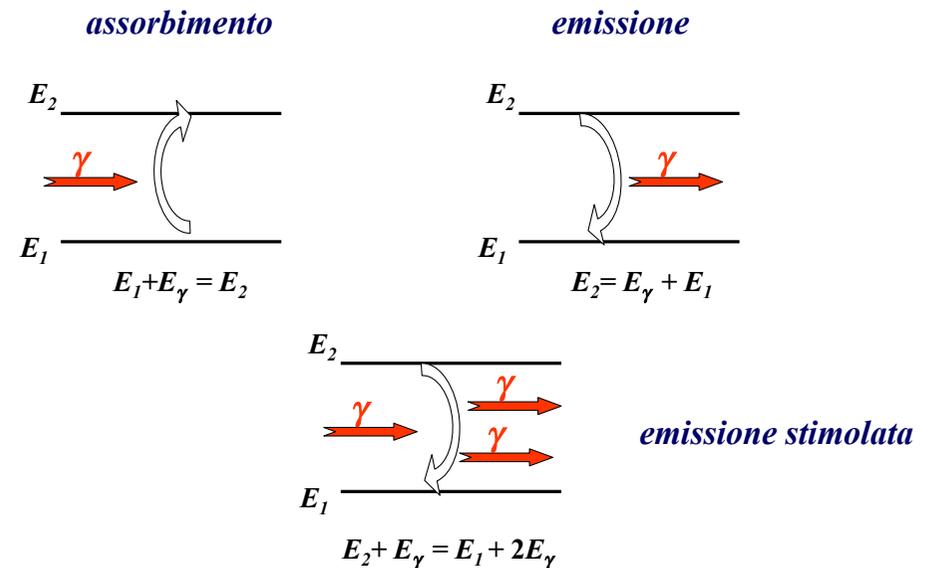


$E_2 + E_\gamma = E_1 + 2E_\gamma$   
i due fotoni uscenti sono  
"identici" al fotone incidente.

- \* 1954 Gordon, Zeiger e Townes realizzano il **MASER** all'ammoniaca.

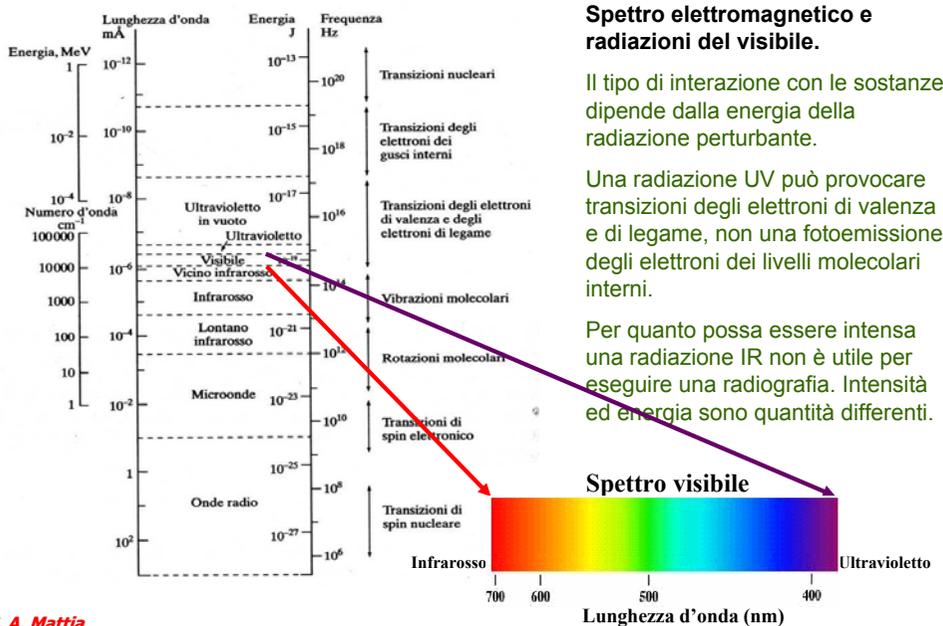


# Interazione radiazione-materia





# Regioni spettro



C. A. Mattia



# Sorgenti

## ■ Lampade

- filamento di Nernst (IR - ceramica con ossidi di terre rare)
- klystron (microonde - Δλ ristretto)
- tungsteno (visibile)
- laser (IR/visibile - monocromatica)
- deuterio (UV)
- sincrotrone (raggi X)

## ■ Elemento disperdente

- prisma
- reticolo
- trasformata di Fourier

C. A. Mattia



# Campioni e rivelatori

## ■ Porta campioni

- forma dipendente dalla tecnica
  - » tubicini
  - » cuvette
  - » .....

## ■ elevata trasparenza alle radiazioni usate

- » bromuro di potassio (IR)
- » cloruro di sodio (IR)
- » nujol (IR - liquido oleoso)
- » vetro o plastica (visibile)
- » quarzo (UV)

## ■ Rivelatori

- diversi tipi di dispositivi sensibili alle radiazioni
  - » semiconduttori (CCD)
  - » pellicole fotografiche
  - » fotomoltiplicatori
  - » .....

C. A. Mattia



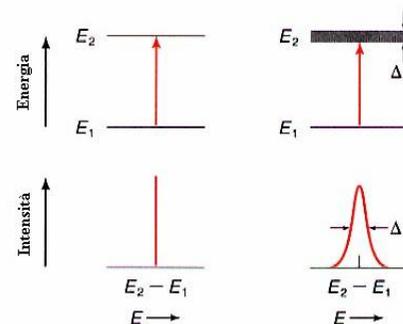
# Ampiezza righe

Ampiezza naturale:  $\Delta E \Delta t \geq h/4\pi$

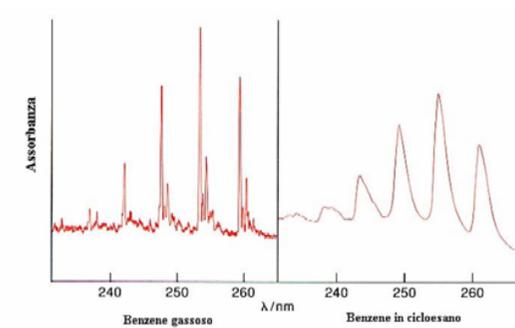
(princ. indetermin.)

$$\Delta \nu = 1/4\pi \Delta t$$

Effetto Doppler  
 $\nu = \nu_0(1 \pm v/c)$



Interazione intermolecolari (pressione)



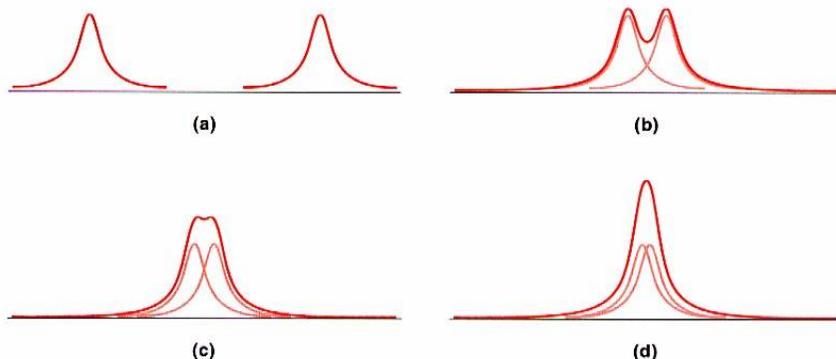
C. A. Mattia



# Risoluzione

Potere di risoluzione

$$R = \lambda/\Delta\lambda \quad (R = v/\Delta v)$$



(a) due righe ben risolte  
da (b) a (d) due righe sempre più sovrapposte



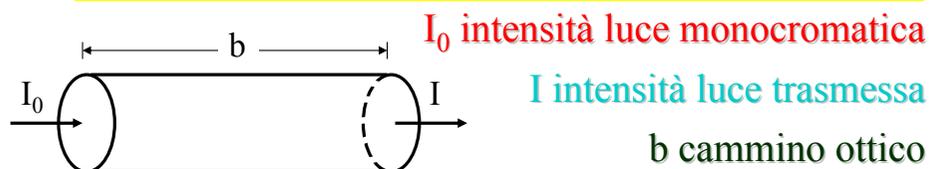
# Intensità

L'intensità di una riga dipende da molti fattori ed è legata al numero di molecole coinvolte nella transizione.

- $N_a/N_b = e^{-hv/kT}$  (legge di distribuzione di Boltzmann)
- Densità di radiazione (dipende dalla frequenza al cubo)
- Coefficiente di Einstein (dipende dall'emissione stimolata)
- Fluttuazioni casuali (rapporto segnale/rumore)
- Regole di selezione:
  - transizioni proibite per lo spin ( $\Delta S = 0$ )
  - transizioni proibite per simmetria



# Legge di Lambert-Beer



$$\ln I = -kb + \ln I_0$$

k costante dipendente dal mezzo assorbente

$$-\ln I/I_0 = kb \quad I/I_0 = T \text{ (trasmittanza)}$$

$$-\log T = A \text{ (assorbanza)}$$

$$A = \epsilon bc \text{ (c concentrazione molare)}$$

$\epsilon$  coefficiente di assorbimento molare

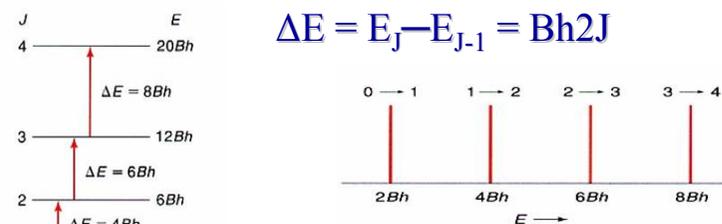
$\epsilon$  coefficiente di estinzione molare



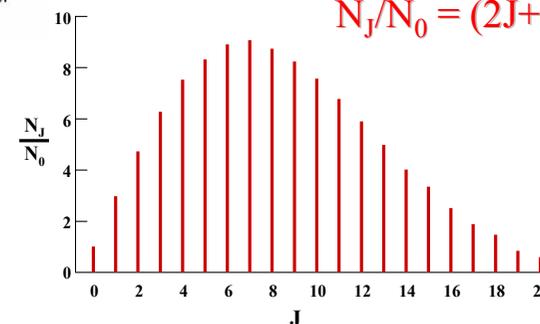
# Spettri rotazionali

$$E_R = J(J+1)h^2/8\pi^2I = BJ(J+1)h$$

$$\Delta E = E_J - E_{J-1} = Bh2J$$



$$N_J/N_0 = (2J+1)e^{-(E_J-E_0)/kT}$$





# Spettri vibrazionali

$$E_v = (v + \frac{1}{2})h\nu \quad (\text{oscillatore armonico})$$

$$E_v = (v + \frac{1}{2})h\nu - x(v + \frac{1}{2})^2 h\nu \quad (\text{oscillatore anarmonico})$$

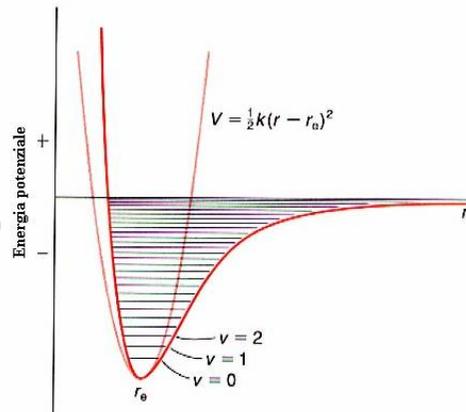
$$\Delta v = \pm 1$$

$v = 0 \rightarrow 1$  (banda fondamentale  $h\nu'$ )

$v = 1 \rightarrow 2$  (banda calda  $h\nu''$ )

$v = 0 \rightarrow 2, 0 \rightarrow 3, \dots$

(armoniche superiori proibite)



# Spettri vibrorotazionali

$$\Delta J = \pm 1$$

regola di selezione

$$\Delta E = (v'+\frac{1}{2})h\nu + BJ'(J'+1)h - (v''+\frac{1}{2})h\nu - BJ''(J''+1)h$$

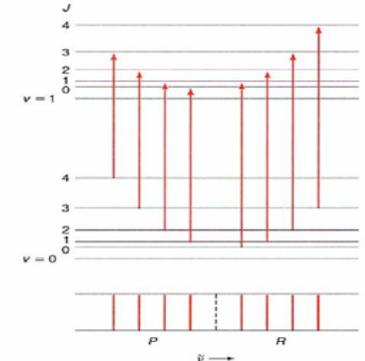
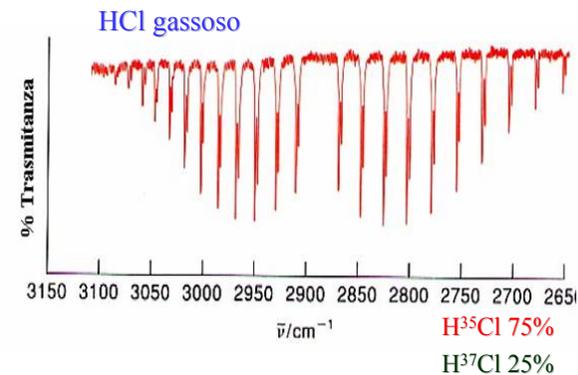
$$v = 0 \rightarrow 1$$

$$(v' - v'' = 1)$$

$$\Delta E = h\nu + Bh[J'(J'+1) - J''(J''+1)]$$

Ramo P ( $J' = J'' - 1$ )

Ramo R ( $J' = J'' + 1$ )

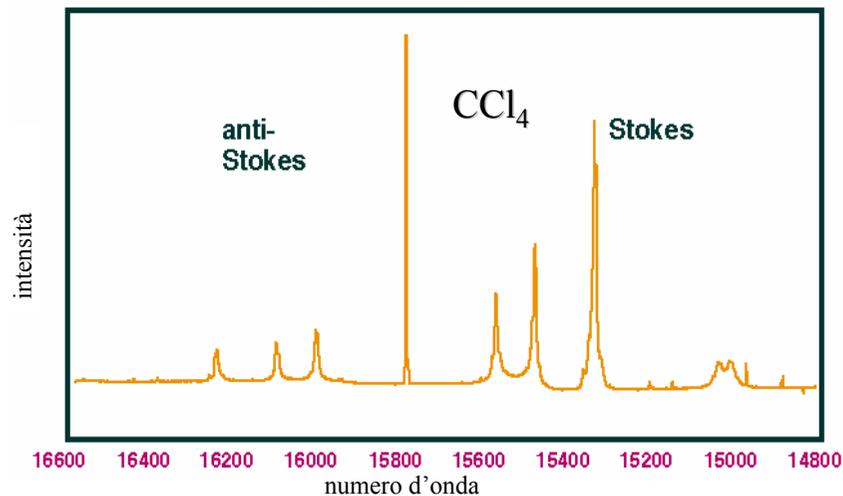


# Spettri Raman

Luce diffusa

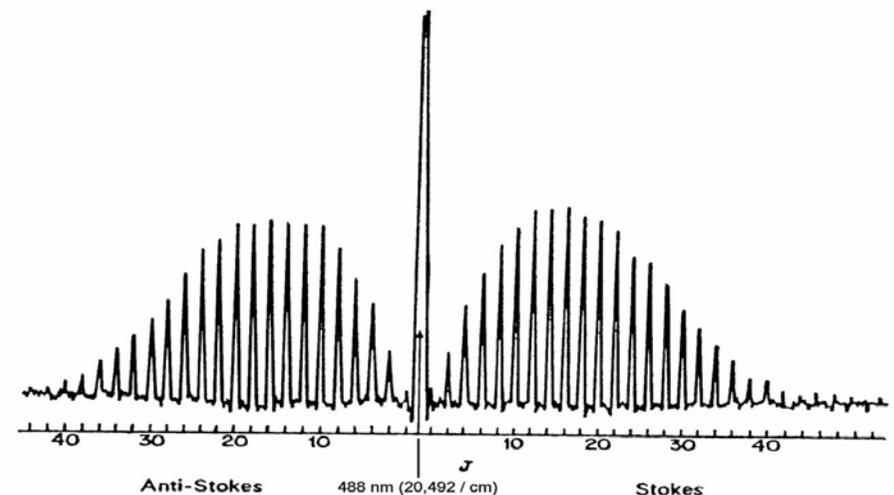
$$\Delta v = \pm 1; \Delta J = \pm 2$$

variazione di frequenza rispetto luce incidente



# Spettri Raman

Spettro rotazionale del biossido di carbonio



sono presenti solo righe con J pari



# Statistica nucleare

Rotazione di 180° CO<sub>2</sub> => scambio nuclei identici di O.

spin nucleari: <sup>1</sup>H = 1/2; <sup>2</sup>H = 1; <sup>19</sup>F = 1/2; <sup>12</sup>C = 0; <sup>13</sup>C = 1/2; <sup>16</sup>O = 0; <sup>33</sup>S = 3/2

Para-idrogeno (J pari)

spin nucleari appaiati

Orto-idrogeno (J dispari)

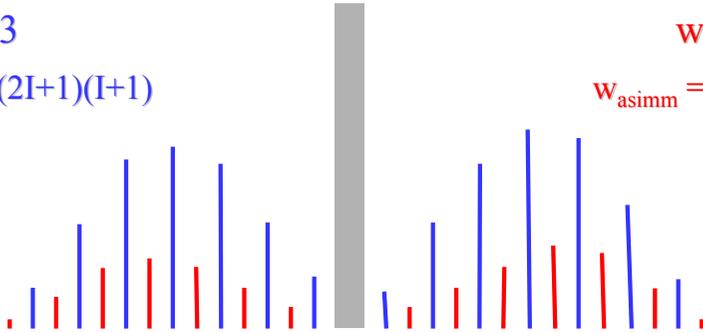
spin nucleari paralleli

$$W_{orto} = 3$$

$$W_{para} = 1$$

$$W_{simm} = (2I+1)(I+1)$$

$$W_{asimm} = (2I+1)I$$



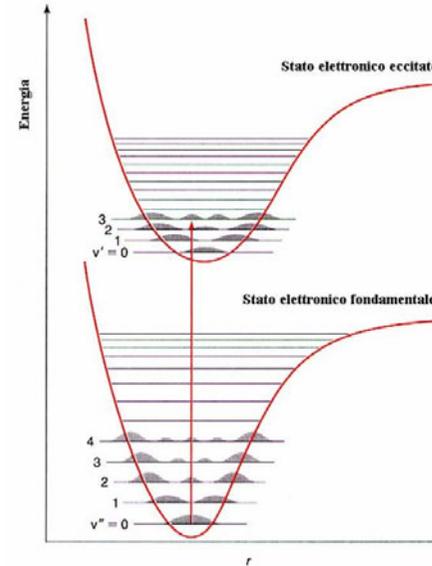
# Spettroscopia elettronica

Principio di Franck-Condon

Tempo necessario per vibrazioni (~10<sup>-12</sup> s) è maggiore rispetto al tempo di una transizione elettronica (~10<sup>-15</sup> s).

Per le transizioni più probabili (intense) le distanze internucleari rimangono inalterate (**transizione verticale**).

Per le molecole poliatomiche elevati momenti d'inerzia danno luogo a spettri a bande.



# Spettri elettronici

Alcani

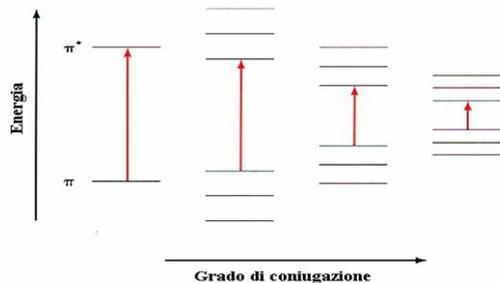
transizioni elettroniche tipo  $\sigma \rightarrow \sigma^*$

C=C (X=Y)

trans. el. tipo  $\pi \rightarrow \pi^*$ ;  $\sigma \rightarrow \pi^*$ ;  $n \rightarrow \pi^*$

$\sigma \rightarrow \pi^*$ ;  $n \rightarrow \pi^*$  deboli (proibite)

Gruppi atomici (cromofori)



Alcuni cromofori comuni e le lunghezze d'onda approssimate di massimo assorbimento

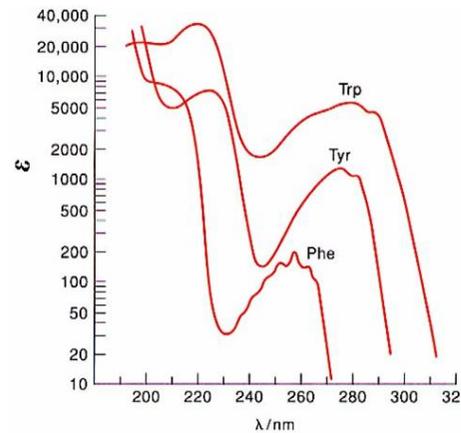
Cromoforo	$\lambda_{max}/nm$
<chem>C=C</chem>	190
<chem>C=C-C=C</chem>	210
<chem>c1ccccc1</chem>	190 260
<chem>C=O</chem>	190 280
<chem>C#N</chem>	160
<chem>COOH</chem>	200
<chem>N=N</chem>	350
<chem>NO2</chem>	270



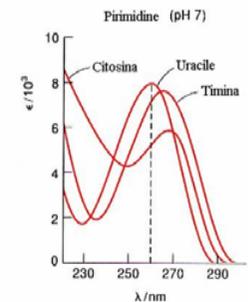
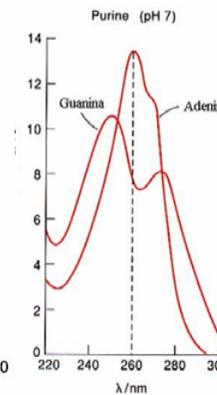
# Spettri UV

Amminoacidi

Basi DNA



Proteine: assorbanza 280 nm

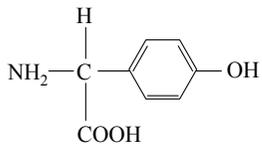


Acidi nucleici: assorbanza 260 nm

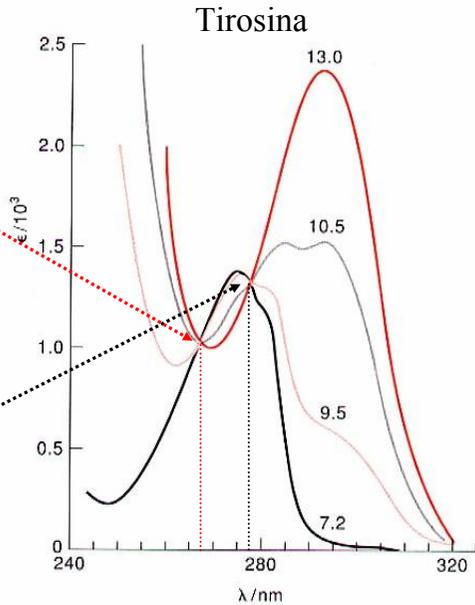


# Spettri e pH

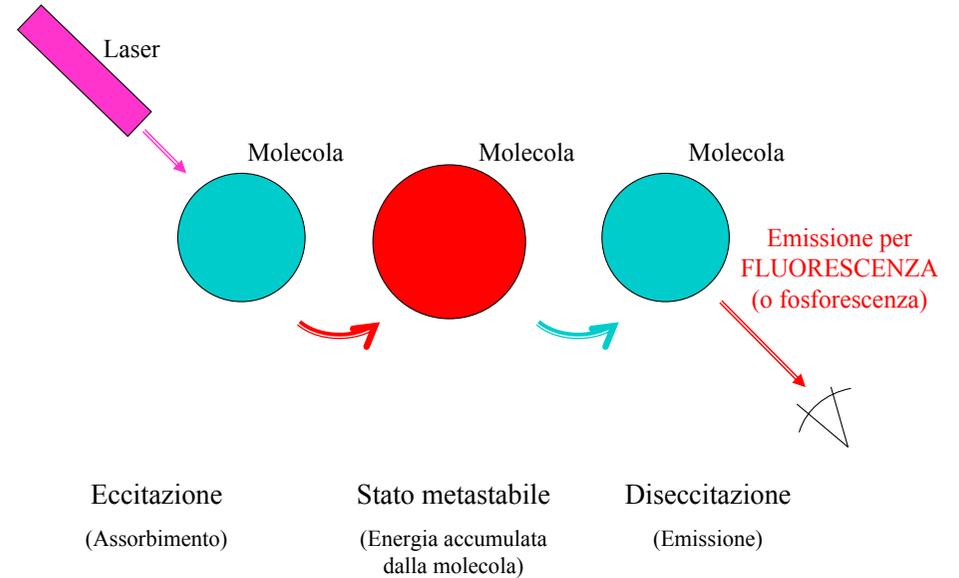
Punto isobestico  
a 267 nm



Punto isobestico  
a 277,5 nm



# Fluorescenza e fosforescenza



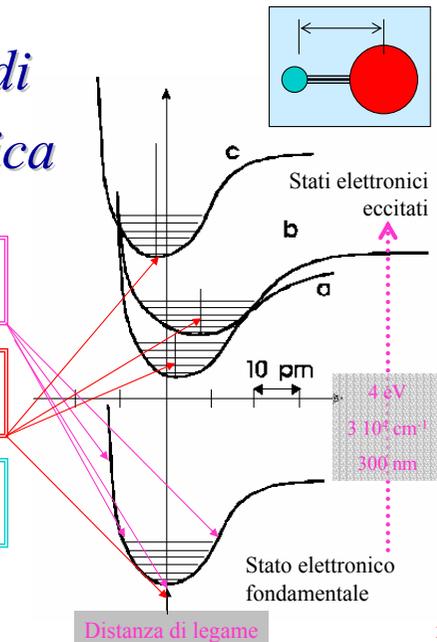
## Struttura elettronica e roto-vibrazionale

### Struttura elettronica di una molecola biatomica

Il potenziale di interazione dipende dalla distanza fra gli atomi

Gli stati elettronici hanno distanza di equilibrio propria

Stati di singoletto e di tripletto  $\uparrow\downarrow$   $\uparrow\uparrow$



## Struttura elettronica e roto-vibrazionale

### Struttura vibrazionale di una molecola biatomica

Deformazione della molecola per allungamento

Livelli energetici quantizzati

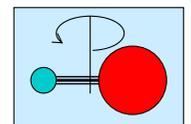
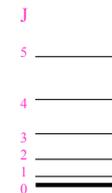
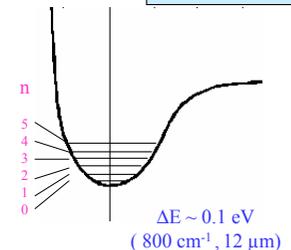
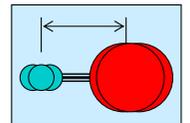
$$E_n = (n+1/2) h\nu$$

### Struttura rotazionale di una molecola biatomica

Rotazione della molecola intorno agli assi

Livelli energetici quantizzati

$$E_j = B J(J+1)$$



$B \sim 0.01$  eV  
(80 cm⁻¹, 120 μm)



# Principio di Franck-Condon

Assorbimento di un fotone  $\Delta E = h\nu_{in}$

=> Transizione elettronica indotta

Dal livello fondamentale

ad un livello elettronico eccitato

in uno stato roto-vibrazionale eccitato

**Regole di selezione**

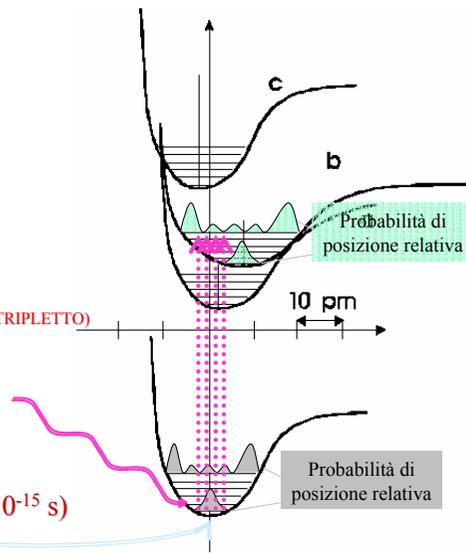
$\Delta L = \pm 1$

$\Delta S = 0$  (nessuna transizione fra stati di SINGOLETTO e stati di TRIPLETTO)

$\Delta J = 0, \pm 1$  tranne per  $J=0$

**Transizione verticale**

Nuclei immobili durante la transizione ( $10^{-15}$  s)



C. A. Mattia

29



# Decadimento non-radiativo

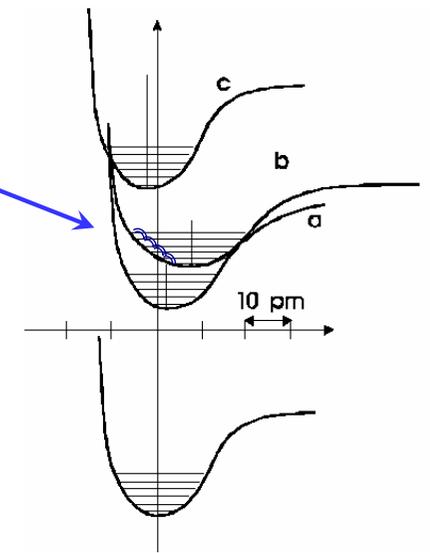
**Urti con altre molecole**

Livelli roto-vibrazionali: dallo stato eccitato allo stato fondamentale (nel livello elettronico eccitato)

Energia ceduta per aumentare la temperatura del sistema

**Tempi di diseccitazione ( $10^{-9}$  s)**

Dipendenti da temperatura e ambiente molecolare



C. A. Mattia

30



# FLUORESCENZA

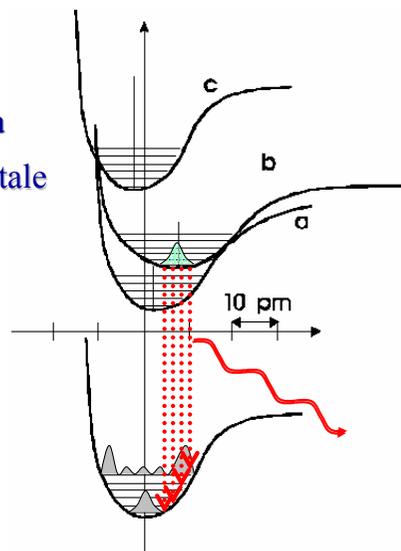
Emissione di un fotone  $\Delta E = h\nu_{fl}$

=> Transizione elettronica spontanea

Dal livello roto-vibrazionale fondamentale del livello elettronico eccitato

a livelli roto-vibrazionali eccitati del livello elettronico fondamentale.

Tempi tipici  $10^{-15}$  s.



C. A. Mattia

31



# FLUORESCENZA

**Caratteristiche dell'emissione di fluorescenza**

Energia del fotone emesso  $\leq$  Energia fotone assorbito

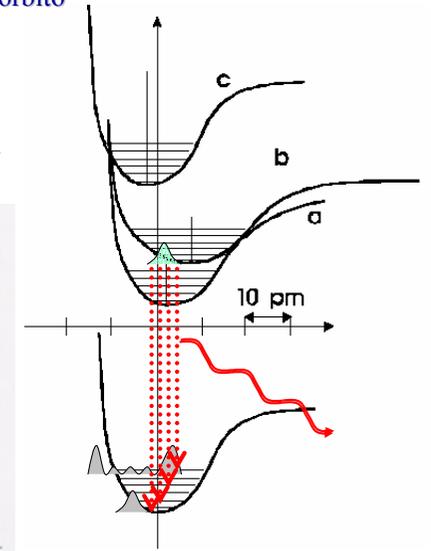
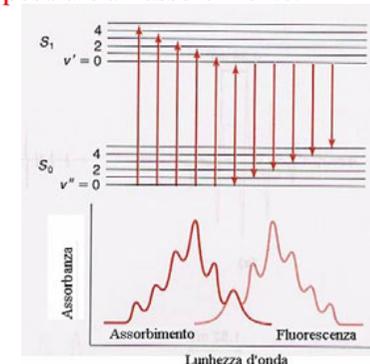
$$h\nu_{fl} \leq h\nu_{in}$$

**Emissione non monocromatica**

Transizione verso stati roto-vibrazionali eccitati

Spettro quasi speculare all'assorbimento.

**Tempo totale di durata del fenomeno**  
 $10^{-9} - 10^{-8}$  s



C. A. Mattia

32



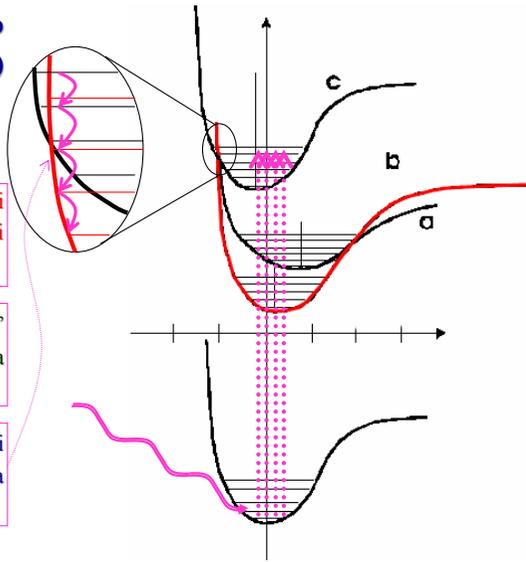
# Eccitazione di stati di tripletto

Transizione elettronica in uno stato di **tripletto** (spin allineati) proibita dalle regole di selezione.

Un forte accoppiamento spin-orbita (atomi pesanti) rende meno rigida la regola di selezione.

In particolare la transizione è "possibile" all'intersezione delle le curve di energia potenziale.

Possibilità di transire fra uno stato eccitato di **singoletto** ed uno di **tripletto** durante la termalizzazione.



C. A. Mattia

33



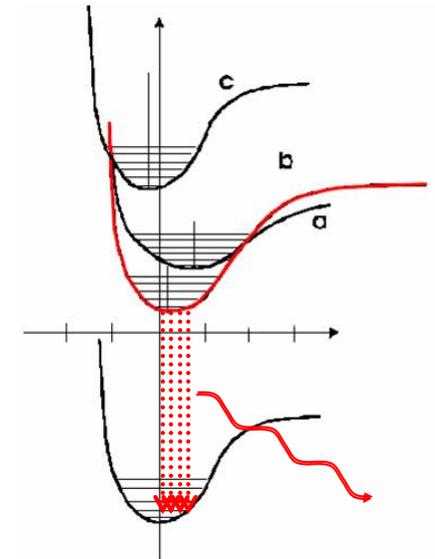
# FOSFORESCENZA

La transizione spontanea ha **probabilità bassa**.

=> **Tempi di diseccitazione lunghi (secondi)**.

Energia intrappolata in uno stato **metastabile**.

Energia del fotone emesso **sempre minore dell'energia del fotone incidente**.



C. A. Mattia

34



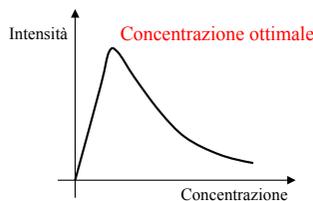
# Influenza dell'intorno molecolare

## Attenuazione dell'intensità di FLUORESCENZA

Fenomeni dissipativi non radiativi:

- Urti con molecole,
- Urti con pareti metalliche

Intensità di fluorescenza in una soluzione



Transizioni in stati di tripletto (*Intersystem crossing*)

Diminuzione della probabilità di fluorescenza

Quenching

Urti con molecole (O<sub>2</sub> e I<sup>-</sup>) capaci di assorbire l'energia in eccesso

Foto-dissociazione e foto-chimica (*bleaching*)

L'energia in eccesso è utilizzata da altre molecole per dissociarsi o per attivare reazioni chimiche

C. A. Mattia

35

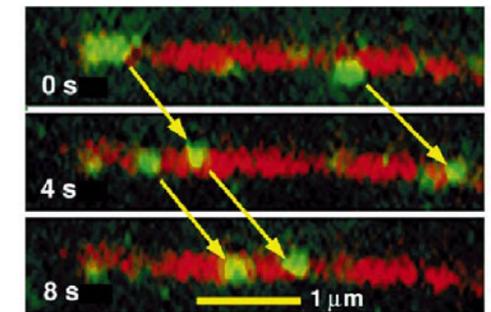


# Fluorescenza

Uso di marcatori fluorescenti per molecole di interesse biologico

=> **Possibilità di seguire i fenomeni in-situ in tempo reale**

ESEMPIO: Lo studio dell'evoluzione di proteine in ambiente acquoso è reso possibile dalla fusione con una proteina fluorescente verde (GFP) estratta da una medusa (*Aequorea victoria*). Da Nature 338 (1997)



Il moto della molecola S65T kinesin-GFP lungo un canale (microtubule) in presenza di 1 mM di adenosinatrifosfato (ATP) è rivelato grazie ad un microscopio a fluorescenza.

Howard Hughes Medical Institute  
and Department of Pharmacology,  
University of California, San Francisco,  
California 94143-0450, USA

C. A. Mattia

36



# Fluorescenza

## Applicazioni in campo biomedico:

Dermatologia (diagnosi dei difetti della cute e delle infezioni: tinea, vitiligine, ...).

Immunologia (rivelazione di batteri in coltura con marcanti fluorescenti).

Immunoreumatologia (presenza di microcristalli nei liquidi sinoviali).

Oncologia (fluorescenza risolta in tempo per la diagnosi).

Medicina del lavoro (analisi di tracce di metalli pesanti - fino alle atto-moli). atto 10<sup>-18</sup>



# Spettroscopia fotoelettronica

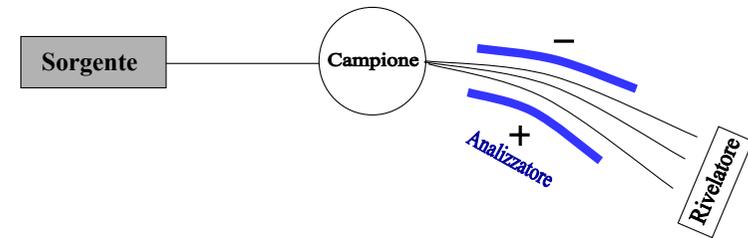
Espulsione di elettroni da orbitali diversi.

L'energia del fotone incidente è uguale all'energia di ionizzazione più quella dell'elettrone espulso:

$$h\nu = 1/2m_e v^2 + I$$

Lo spettrometro è costituito da una sorgente, un analizzatore elettrostatico e da un rivelatore di elettroni.

Gli elettroni sono deviati in funzione della loro velocità.



# UPS

## Spettroscopia fotoelettronica nell'ultravioletto

Lampada a He ~ 58 nm (più usata)

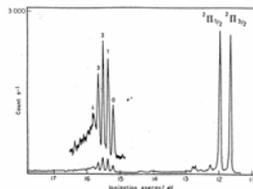
Elettroni di valenza.

Struttura fine:

- tipo ionizzazione;
- stati vibrazionali.

Esempio: spettro fotoelettronico di HBr è caratterizzato dalla presenza di due bande:

- ionizzazione coppia solitaria Br;
- ionizzazione elettrone di legame ( $\sigma$ ).



# XPS (raggi X)

Energia così elevata da espellere gli elettroni del nocciolo interno dei singoli atomi.

Spettroscopia elettronica per analisi chimica (ESCA).

Strati superficiali.

Può differenziare atomi con "carica diversa".

Ione azitidrato  $N=N=N^-$

Carica positiva sull'azoto centrale.

Cariche negative sugli azoti esterni.



Rapporto intensità 2:1

UPS-XPS (luce di sincrotrone)

