

SPETTROSCOPIA DI ASSORBIMENTO E LUMINESCENZA

La spettroscopia di assorbimento permette, attraverso lo studio delle radiazioni assorbite e dell'intensità dell'assorbimento delle varie sostanze, di effettuare rapide e precise analisi sia qualitative sia quantitative. Questa spettroscopia si occupa delle transizioni fra diversi stati elettronici della molecola, queste transizioni sono generalmente accompagnate a transizioni sia vibrazionali che rotazionali, per cui gli assorbimenti sono costituiti da moltissime righe molto vicine tra loro, tanto da apparire un continuo, cioè una banda. Le sostanze organiche contengono nella molecola legami prevalentemente di tipo covalente, formati cioè da coppie di elettroni in comune tra i vari atomi.

Esistono due tipi di legame elettronico:

- di tipo **sigma (σ)**, costituiti da una nube elettronica addensata lungo l'asse di unione dei nuclei degli atomi interessati al legame (i legami semplici sono di tipo σ);
- di tipo **pi-greco (π)**, costituiti da coppie di elettroni la cui maggior densità elettronica è situata al di fuori dell'asse di unione dei nuclei (come accade nei legami doppi o tripli).

Gli orbitali π , essendo 'meno legati', risultano più facilmente eccitabili rispetto ai σ , per esempio, per eccitare gli elettroni π dell'etilene occorre una quantità di energia corrispondente ad una radiazione di 180 nm (vicino U.V.), contro i 120 nm (lontano U.V.) della radiazione necessaria per eccitare gli elettroni σ .

Un corpo investito da luce bianca appare colorato perché assorbe alcune radiazioni e ne trasmette o riflette altre, le quali appariranno con un colore che è la risultante delle radiazioni non assorbite. Gli spettri nel visibile sono dovuti agli elettroni di legame π più o meno ampiamente delocalizzati¹.

Analisi qualitativa

Per effettuare un'analisi qualitativa si fa uso di un fascio di radiazioni a spettro continuo, poi separati tramite monocromatori² nelle varie componenti (radiazioni monocromatiche). In pratica le singole componenti monocromatiche, di tale fascio, si fanno passare attraverso la sostanza in esame, la quale assorbirà in modo diverso, cioè con diversa intensità, le diverse radiazioni. Riportando perciò i valori registrati in un grafico lunghezza d'onda-assorbimento, si ottiene lo spettro di assorbimento della sostanza esaminata. Per il fatto che ogni sostanza ha il suo spettro di assorbimento, l'esame di tali spettri permette di identificare una sostanza (per confronto diretto con campioni noti o tramite banche dati di spettri) o di controllarne il grado di purezza. In realtà le tecniche che meglio si prestano alle analisi qualitative (soprattutto organiche) sono la spettroscopia infrarossa, in cui ogni sostanza presenta numerose bande caratteristiche ben separate, e soprattutto la risonanza magnetica nucleare, che fornisce una serie di picchi direttamente collegabili alla struttura della molecola.

¹ In chimica-fisica un elettrone delocalizzato è un elettrone di una molecola che non è associato a uno specifico atomo o a uno specifico legame covalente.

² Un monocromatore è un dispositivo che scompone un singolo fascio di luce policromatica in più fasci di luce monocromatica (che contiene cioè onde di una sola frequenza), permettendo così di analizzare l'intensità in funzione della lunghezza d'onda.

Analisi quantitativa

Per eseguire un'analisi quantitativa si fa uso di raggi monocromatici, cioè costituiti da radiazioni di una sola frequenza. In pratica, date le difficoltà di avere raggi dotati di questa proprietà, si impiegano fasci di radiazioni comprendenti una banda molto ristretta dello spettro, ossia fasci quasi monocromatici. Le determinazioni quantitative sono basate sul fatto che, quando una radiazione attraversa una soluzione, viene assorbita più o meno intensamente a seconda della concentrazione (in pratica l'assorbimento dipende dalla concentrazione). Disponendo quindi di strumenti in grado di misurare l'assorbimento, si risale facilmente alla concentrazione della soluzione. In particolare nella spettroscopia di assorbimento si utilizzano due grandezze (misurate strumentalmente), che sono la trasmittanza e l'assorbanza. Appositi dispositivi, detti rivelatori, sono in grado di misurare l'intensità del flusso luminoso, in particolare vengono misurate:

- **I_0 : intensità del flusso luminoso all'ingresso della cella con il campione**
- **I : intensità del flusso luminoso all'uscita della cella con il campione**

Dalla misura dei flussi I_0 e I gli strumenti forniscono direttamente i valori di trasmittanza e assorbanza, che rappresentano le grandezze caratteristiche della spettroscopia di assorbimento. Il rapporto tra l'intensità del raggio uscente e quella del raggio entrante si chiama trasmittanza:

$$T = I/I_0$$

Questa grandezza esprime quale frazione della luce incidente ha attraversato il campione senza essere assorbita, T può assumere valori compresi tra 0 e 1.

Comunemente si usa però la trasmittanza percentuale, che assumerà quindi valori compresi tra 0 e 100 :

$$T\% = T \times 100$$

Quando $T\%$ assume il valore 100 significa che il raggio non ha subito alcun indebolimento, cioè non vi è stato alcun assorbimento da parte della sostanza, mentre quando $T\%$ assume il valore 0 significa che il raggio è stato completamente assorbito. Altra grandezza di fondamentale importanza è l'assorbanza, detta anche 'densità ottica' o 'estinzione':

$$A = - \log T$$

L'assorbanza è molto utilizzata nelle analisi quantitative, poiché risulta direttamente proporzionale alla concentrazione. Trasmittanza, trasmittanza percentuale e assorbanza sono adimensionali.

Legge dell'assorbimento (Lambert-Beer)

Se si fa attraversare da un raggio di luce monocromatica una cella contenente una sostanza in soluzione, si può dimostrare che:

$$A = \epsilon \times b \times C$$

(Legge di Lambert-Beer)

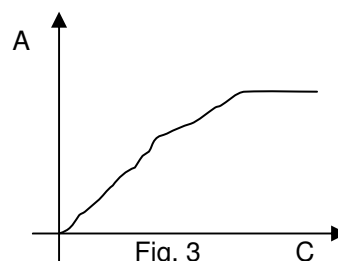
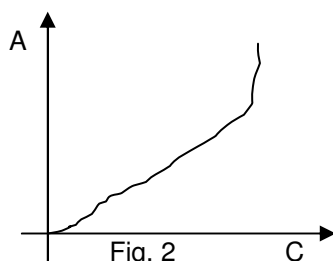
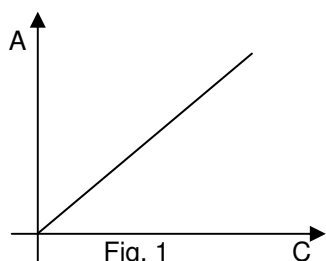
A = assorbanza (non ha unità di misura)

ϵ = coefficiente di assorbimento molare, caratteristico della sostanza ($\text{mol}^{-1} \text{L cm}^{-1}$)

b = cammino ottico (cm), cioè lo spessore della soluzione

C = concentrazione molare della sostanza (mol/L)

La stessa legge in cui però C si esprime in g/L comporterà, al posto di ϵ , un diverso valore k (in $\text{g}^{-1} \text{L cm}^{-1}$) denominato 'assorbività specifica'. La legge di Lambert-Beer descrive i fenomeni di assorbimento di radiazioni elettromagnetiche ed è valida per radiazioni monocromatiche e soluzioni diluite. Come si evince dall'equazione la proporzionalità diretta tra assorbanza e concentrazione permette di effettuare analisi quantitative. L'equazione rappresenta una retta passante per l'origine degli assi e in cui $\epsilon \times b$ è il coefficiente angolare. Tuttavia al crescere della concentrazione del soluto si possono verificare deviazioni notevoli, con conseguente scarsa attendibilità del dato analitico, la causa che tende a provocare queste deviazioni è quella che all'aumentare della concentrazione aumenta il numero di particelle in soluzione e quindi aumenta anche il numero di urti fra le stesse, tale fatto porta le forze interioniche e/o intermolecolari ad aumentare, si possono formarsi molecole o aggregati di particelle più complesse, diverse per struttura da quelle in esame, per cui si potrà avere uno spostamento del massimo di assorbimento. Ad esempio, se una sostanza colorata si trova in soluzione allo stato di parziale dissociazione, e ponendo che tale dissociazione possa divenire completa per forti diluizioni, la legge di Lambert-Beer risulterà valida solo in queste ultime condizioni, e cioè per bassi valori di concentrazione. Per questo motivo, per avere valori accettabili di assorbanza, le condizioni di lavoro usuali prevedono che le soluzioni siano sempre diluite al massimo, compatibilmente con la sensibilità dello strumento. E' da ricordare anche che all'aumentare della concentrazione si ha un aumento dell'indice di rifrazione e quindi una maggior dispersione del raggio nell'attraversare la soluzione stessa. Un'altra condizione di validità della legge di Lambert-Beer è che le radiazioni luminose che devono attraversare la soluzione in esame siano monocromatiche. In realtà le radiazioni impiegate non sono mai rigorosamente monocromatiche a causa, soprattutto, di difficoltà strumentali. E' comunque sufficiente, per ottenere risultati corretti, che la banda continua di radiazioni, centrata attorno ad un valore nominale, sia la più ristretta possibile. In certi casi si osservano, inoltre, deviazioni dovute all'instaurarsi di un equilibrio chimico sensibile al pH.



Scelta della lunghezza d'onda

Nell'analisi quantitativa spettrofotometrica è fondamentale conoscere come varia l'assorbanza in funzione della lunghezza d'onda. Ciò viene espresso molto chiaramente con il

diagramma in cui in ascissa si riportano i valori delle lunghezze d'onda e in ordinata i corrispondenti valori dell'assorbanza. Si ottengono così delle curve ("spettri") che variano da sostanza a sostanza e presentano dei massimi caratteristici in corrispondenza di alcune lunghezze d'onda, come già visto in precedenza relativamente all'analisi qualitativa. Nell'analisi quantitativa lo spettro è essenziale per la scelta della lunghezza d'onda più appropriata da utilizzare.

In genere verrà scelta una lunghezza d'onda in modo che:

- l'assorbimento sia massimo (per motivi di sensibilità, infatti se l'assorbimento è alto è possibile rilevare quantità piccolissime di sostanza)
- sia al centro di un picco 'largo' (per motivi di precisione, in modo che piccole variazioni di lunghezza d'onda comportino errori minimi sulla misura dell'assorbanza)

Nel caso si abbia una miscela di sostanze, e si voglia determinare una particolare sostanza, la scelta cadrà su una lunghezza d'onda dove le altre sostanze assorbono il meno possibile. Nella colorimetria, che differisce dalla spettrofotometria per la maggior 'banda passante' (cioè si opera con luce assai poco monocromatica), si opera usando un filtro il cui colore è complementare a quello della sostanza da analizzare. Naturalmente i risultati saranno meno accurati rispetto alla spettrofotometria con luce (quasi) monocromatica.

Come si effettua un'analisi quantitativa

Per eseguire un'analisi quantitativa con la spettrofotometria di assorbimento nel campo visibile e ultravioletto, sono necessarie le seguenti fasi:

Preparazione del campione

L'analisi può essere condotta direttamente sulla soluzione della sostanza solo se questa presenta il massimo di assorbimento nell'intervallo delle lunghezze d'onda dello strumento (in colorimetria se è colorata), altrimenti si ricorre ad opportune reazioni chimiche tra la sostanza in esame e opportuni reagenti che portano alla formazione di composti con massimi di assorbimento nell'intervallo di lunghezze d'onda richiesto, tenendo conto dei seguenti requisiti:

- 1.** L'assorbimento ottenuto in seguito all'uso di un reattivo deve essere caratteristico della sostanza oggetto di esame, pertanto dovranno essere assenti altre sostanze in grado di formare, con quel reattivo, composti con assorbimenti analoghi.
- 2.** Il reattivo 'colorante' deve reagire con tutta la sostanza da determinare formando con essa un composto ben definito, in altri termini deve essere nota la stechiometria della reazione.
- 3.** Il reattivo non deve reagire con il solvente o con altre sostanze presenti in soluzione oltre la sostanza da esaminare.
- 4.** Il composto che si forma deve essere stabile, almeno per il tempo necessario per la misura.
- 5.** L'intensità di assorbimento del composto che si forma deve essere la più alta possibile, a beneficio della sensibilità del metodo.
- 6.** Il composto che si forma, e quindi l'assorbimento collegato, non deve risentire di piccole variazioni di pH e di temperatura.

Azzeramento e taratura dello strumento

L'azzeramento e taratura normale di uno strumento si basa sulle definizioni di trasmittanza e assorbanza. Per una 'soluzione con concentrazione infinita' si deve avere trasmittanza nulla e assorbanza infinita, mentre per una soluzione con concentrazione nulla si deve avere trasmittanza pari a 1 e assorbanza nulla. Interponendo sul cammino dei raggi luminosi uno schermo perfettamente opaco (che rappresenta una 'soluzione a concentrazione infinita') lo strumento deve segnare 0 sulla scala delle trasmittanze, per la maggior parte degli strumenti, questa operazione è automatica e quindi non è necessario eseguirla (in caso contrario esisterà un dispositivo atto ad imporre la condizione $T=0$). La taratura a concentrazione nulla (ovvero quando $A=0$) viene invece effettuata con il cosiddetto 'azzeramento contro il bianco'.

Significato dell'azzeramento contro il bianco

Quando il raggio di luce monocromatica investe la celletta contenente il campione, avvengono diversi fenomeni: riflessione, rifrazione, assorbimento da parte delle pareti della celletta, del solvente e di tutti i reattivi aggiunti per formare il composto colorato, e ovviamente della sostanza in esame. L'assorbanza effettivamente misurata risentirebbe quindi di numerosi fattori non legati alla concentrazione della sostanza in esame, portando quindi ad errori nella determinazione della concentrazione di quest'ultima. Per aggirare questo problema, prima di misurare l'assorbanza del campione in esame, si azzerava l'assorbanza introducendo il "bianco", cioè *una celletta identica a quella del campione e che contiene una soluzione il più possibile simile a quella del campione ma in cui è assente la sola sostanza in esame*. Non effettuando l'azzeramento contro il bianco si perderà la proporzionalità diretta tra assorbanza e concentrazione, quindi non si otterrà più una retta passante per l'origine nel grafico C-A.

Determinazione della concentrazione della sostanza in esame

La maggior parte degli strumenti sono dotati (come i rivelatori) di cellule fotoelettriche che producono un segnale elettrico dipendente dall'intensità luminosa. Il segnale elettrico viene poi trattato in via elettronica, fino ad ottenere una lettura analogica o digitale di A e/o T. Una volta ricavata l'assorbanza (con il solito azzeramento contro il bianco) della soluzione in esame, per risalire alla concentrazione si possono seguire diversi metodi, sempre ricordando che, per concentrazioni non troppo alte, assorbanza e concentrazione sono direttamente proporzionali:

$$\mathbf{A = \epsilon \times b \times C}$$

Si possono seguire essenzialmente due strade: il metodo diretto ed il metodo della curva (o retta) di lavoro.

Metodo diretto

Dalla relazione $\mathbf{A = \epsilon \times b \times C}$, si ricava: $\mathbf{C = A / (\epsilon \times b)}$.

Essendo **b** noto (dimensioni della cella) si deve disporre del valore di ϵ relativo alla sostanza in esame. Se ϵ è noto (da precedenti esperienze o perché tabulato in letteratura) non ci sono problemi, altrimenti è possibile ottenerlo misurando l'assorbanza (A_0) di una soluzione a concentrazione nota (C_0): $\epsilon = A_0 / (b \times C_0)$.

A questo punto è quindi possibile effettuare tutte le analisi che si desiderano su campioni a concentrazione incognita calcolando poi direttamente le concentrazioni. Questo metodo prevede però di essere certi che si sta lavorando in situazione di proporzionalità diretta (retta passante per l'origine) tra assorbanza e concentrazione.

Metodo della curva (o retta) di lavoro

Spesso però non si può essere certi delle condizioni di proporzionalità diretta (linearità) tra A e C, ed è quindi preferibile utilizzare un metodo più sicuro, che consiste nella creazione di un grafico. Si preparano quindi un certo numero di soluzioni contenenti la sostanza in esame a concentrazioni diverse e note e si misura la loro assorbanza. Si avranno quindi una serie di valori di concentrazione (C_1, C_2, C_3, C_4, C_n) associati ai rispettivi valori di assorbanza (A_1, A_2, A_3, A_4, A_n), riportando questi valori in un grafico cartesiano si ottiene la *curva (o retta) di lavoro*. Se la sostanza in esame segue la legge di Lambert-Beer, la curva che si ottiene è una retta. Ottenuta la retta di lavoro, essa viene utilizzata per soluzioni di qualsiasi concentrazione, purché comprese nell'intervallo in cui la curva è stata tracciata. Per calcolare C_x si misura A_x e graficamente si risolve il problema. Naturalmente, la costruzione del grafico con la retta 'più probabile' e l'ottenimento del valore C_x può essere comodamente effettuata con l'utilizzo di un foglio di calcolo. Se il valore di A_x risulta superiore al massimo valore di A dell'intervallo della curva, sarà necessario diluire la soluzione (tenendone poi conto all'atto dei calcoli per il risultato finale) oppure preparare soluzioni a concentrazione nota più elevata per ampliare l'intervallo (prolungando così la retta).

Generalità sugli spettrofotometri

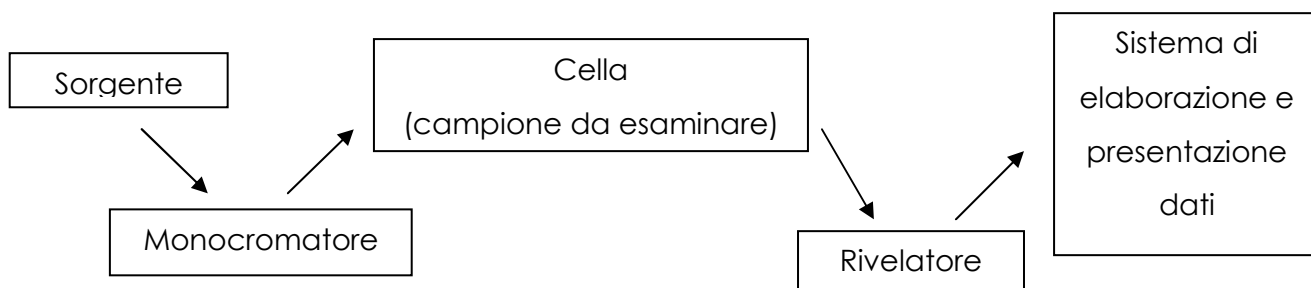
Gli strumenti usati che sfruttano i principi che sono stati citati sono gli **spettrofotometri** e i **colorimetri**. La differenza essenziale tra questi due tipi di strumenti, consiste nel fatto che nei colorimetri si ha una maggiore ampiezza di banda passante. Ad esempio un colorimetro può avere una banda passante di 40 nm, il che significa che impostando una lunghezza d'onda di 580 nm passano in realtà radiazioni da 560 a 600 nm. Uno spettrofotometro a doppio raggio può arrivare a bande passanti inferiori al nm, usando così una luce assai più monocromatica (condizione importante per il rispetto della legge di Lambert-Beer ed essenziale per registrare spettri utili a fini qualitativi). Tali differenze di banda passante, dipendono dal fatto che vengono utilizzati diversi *monocromatori*: nei colorimetri si utilizzano filtri ottici o interferenziali, mentre negli spettrofotometri si usano prismi o reticoli di diffrazione (associati a sistemi di fenditure). Per quanto riguarda gli spettrofotometri UV-visibile, i tipi più comuni sono il "monoraggio" e il "doppio raggio". I sistemi monoraggio si utilizzano senza problemi per le analisi quantitative, mentre gli spettrofotometri a doppio raggio sono più complessi e costosi, e consentono una grande praticità anche nelle analisi qualitative. Naturalmente esistono altri e diversi strumenti di tipo spettrofotometrico, basati sempre sui principi esposti ma con diversi arrangiamenti tecnici. La scelta dello strumento da utilizzare viene effettuata in base ai tipi di

analisi da svolgere, non esiste infatti uno strumento 'migliore di tutti', bensì esiste lo strumento migliore *per quel tipo di analisi*. Facendo una sintesi sui metodi spettrometrici più importanti, si può dire che:

- uno spettrofotometro UV-visibile a doppio raggio rappresenta una valida soluzione per molte analisi quantitative (e alcuni problemi qualitativi e cinetici);
- uno spettrofotometro IR permette di effettuare numerose indagini qualitative (e quantitative) in campo organico;
- uno spettrometro NMR³ consente numerose indagini sulle strutture molecolari organiche, con potenzialità notevolissime nell'ambito della ricerca (ma presenta costi elevati di acquisto e funzionamento);
- rivestono infine notevole interesse sistemi strumentali di separazione di miscugli direttamente accoppiati a spettrometri.

Passando ad altre parti dello spettro elettromagnetico (come l'infrarosso), le componenti della strumentazione subiranno modifiche più o meno profonde, pur rimanendo invariato il principio: ad esempio una sorgente per l'UV non sarà idonea per l'IR, ma una sorgente dovrà pur sempre esserci. Tuttavia, nel campo della spettroscopia nelle radiofrequenze (NMR) le differenze si fanno notevoli e, il fenomeno diventa più complesso e si rende necessaria una trattazione quantistica.

Dal punto di vista concettuale uno spettrofotometro segue il seguente schema di principio:



Nota sui materiali

I materiali da utilizzare negli apparati ottici di uno spettrofotometro hanno un ben preciso requisito, devono essere **trasparenti** alle radiazioni impiegate. Ad esempio, il vetro è trasparente alla luce visibile ma non agli infrarossi, per tale motivo una cella per infrarossi non sarà di vetro o quarzo, bensì di un sale (ad esempio cloruro di sodio, con gli evidenti problemi connessi, ovvero riguardanti la possibile reattività del sale con il campione da analizzare). Il vetro inoltre comincia ad assorbire nell'UV (sotto i 350 nm), per questo motivo negli spettrometri UV viene usato il quarzo, anziché il vetro, come materiale trasparente. Anche i solventi devono essere scelti in modo che non assorbano significativamente nelle zone di Interesse, in UV-visibile l'acqua non dà problemi (che emergono invece quando è necessario usare solventi organici). Anche l'aria costituisce un limite, ad esempio il campo di studio UV è limitato ai 200nm in quanto l'ossigeno assorbe parecchio le lunghezze d'onda inferiori.

³ Risonanza Magnetica Nucleare.

Sorgente

La sorgente deve emettere radiazioni policromatiche, contenenti cioè tutte le lunghezze d'onda del campo richiesto. Per la **regione del visibile** si utilizzano **lampade a incandescenza** (a filamento di tungsteno, lampade quarzo-iodio o lampade tungsteno-alogeno). Per la **regione UV** si usano **lampade a scarica in un gas** (a deuterio o a idrogeno), queste sono costituite da un'ampolla di quarzo contenente il gas rarefatto (ma non troppo) nella quale viene attivata, tra due elettrodi, una scarica elettrica con la conseguente emissione di radiazioni con spettro continuo. Gli spettrofotometri UV-visibile avranno quindi al loro interno due diverse lampade, che vengono opportunamente intercambiate dal meccanismo interno. Per la **regione IR** si usano barrette di vari materiali, sempre riscaldate elettricamente a temperatura adeguata.

Dopo la sorgente è posta una **'fenditura di ingresso'** che serve (associata anche a lenti e/o specchi) a rendere paralleli i raggi ed ad evitare la luce diffusa nello strumento.

Monocromatore

Come si intuisce, il monocromatore è una delle componenti critiche che caratterizzano lo strumento, in quanto da esso dipende la qualità e la precisione della misura, ne esistono due tipi:

- basati su **filtri (ottici o interferenziali)**, che bloccano una parte della luce e lasciano passare solo la parte desiderata;
- basati su un **elemento disperdente (prisma o reticolo)**, in grado di separare le varie componenti della radiazione e di permettere la successiva selezione della banda desiderata.

I **filtri ottici** contengono opportune sostanze che **assorbono** gran parte delle radiazioni visibili lasciando solo la banda desiderata, cioè un certo intervallo di lunghezze d'onda, che ha però notevoli ampiezze (250 nm). Anche combinando più filtri, rimangono comunque bande passanti dell'ordine di 50 nm e sempre a scapito di un indebolimento del raggio anche per le λ richieste, per tale motivo questo tipo di filtri si utilizzano solo nei colorimetri. I **filtri interferenziali** si basano su un fenomeno tipicamente ondulatorio (l'**interferenza**), che causa rafforzamenti o indebolimenti tra due radiazioni che si sommano, a seconda che siano o meno in fase tra loro. Sono più efficienti dei filtri basati sull'assorbimento, consentendo bande passanti dell'ampiezza di 20 nm (nel visibile), sono tuttavia più costosi e si utilizzano nei colorimetri migliori. I **monocromatori basati su elementi disperdenti** sono quelli effettivamente usati negli spettrofotometri di qualità. Sono basati sul far incidere il fascio policromatico su un oggetto (un **prisma** o un **reticolo**) in grado di deviare le diverse radiazioni con diversi angoli, la radiazione uscente sarà quella che passa attraverso la fenditura di uscita. Il **prisma** è in grado di disperdere le radiazioni con diversa λ , tramite il fenomeno della **rifrazione**, quando un raggio di luce passa da un mezzo ad un altro subisce una deviazione che dipende però dalla λ della radiazione (cioè, radiazioni con diversa λ subiscono diversa deviazione). Tale fenomeno diventa evidente quando un raggio attraversa un corpo con facce non parallele, come ad esempio un prisma. I **reticoli** svolgono la stessa funzione del prisma, ma il loro funzionamento è basato sull'interferenza. Sono costituiti da serie di solchi o fenditure parallele tracciati su una superficie a distanza ravvicinata (ad esempio 1000 solchi a mm), il fenomeno

è quello che si osserva guardando obliquamente la superficie di un CD. Nei moderni spettrofotometri si utilizzano reticoli a riflessione, sia nel campo **UV-visibile** sia nell'**IR**.

Cella

È la componente destinata a contenere il campione da esaminare. Oltre ad essere trasparenti alla radiazione impiegata, devono avere un ben preciso 'cammino ottico' (la lunghezza percorsa dalla radiazione nel campione) che dovrà essere sufficiente ad avere assorbimenti rilevabili dallo strumento. In UV si utilizzano celle in quarzo (SiO_2), nel visibile in vetro o quarzo o alcuni materiali plastici, mentre in IR si rendono necessarie celle in NaCl, KBr, CaF_2 . Più recentemente, con l'avvento di apparecchi particolarmente sensibili, si è reso possibile non usare celle e far invece viaggiare la luce in sottili fibre ottiche che escono dallo strumento, andando così ad analizzare porzioni piccolissime di materiali (ad esempio parti di cellule).

Rivelatore

È un dispositivo capace di produrre un segnale elettrico che dipende dall'energia delle radiazioni che lo investono. Tale segnale elettrico (proporzionale all'intensità luminosa) viene poi trasferito a un indicatore analogico o elaborato per via elettronica in modo più o meno complesso. Il rivelatore è la parte dello strumento che esegue la **misura** vera e propria, per questo rappresenta una parte molto importante, in particolare per quanto riguarda sia la **sensibilità** sia l'**accuratezza** dello spettrofotometro.

In UV-visibile si possono utilizzare:

- celle fotovoltaiche e celle fotoconduttive;
- fototubi e fotomoltiplicatori;
- fotodiodi.

Le **celle fotovoltaiche e fotoconduttive** sono basate su semiconduttori che generano ai loro capi una differenza di potenziale (d.d.p.) direttamente proporzionale all'intensità della radiazione incidente. Sono poco sensibili e non coprono tutto l'UV-visibile, tuttavia sono resistenti e poco costose: per questo motivo vengono utilizzate in colorimetri o semplici fotometri di basso prezzo. I **fototubi** e i **fotomoltiplicatori** sono basati sull'effetto fotoelettrico, che consiste nell'emissione di elettroni, da parte di un materiale, quando viene colpito da radiazioni luminose, il numero di elettroni emessi (misurabile per via elettrica) è proporzionale all'intensità della radiazione incidente.

- **Fototubo:** è realizzato inserendo due elettrodi in una ampolla sotto vuoto, con una finestra (in quarzo) per il passaggio della radiazione luminosa. Il catodo (elettrodo negativo) è rivestito di un materiale fotosensibile che libera facilmente elettroni (come il cesio), e tra anodo e catodo viene applicata una d.d.p.. Ha prestazioni superiori alle celle fotovoltaiche e fotoconduttive.
- **Fotomoltiplicatore:** è una variante del fototubo, ma con un accorgimento per aumentarne notevolmente la sensibilità. Vi sono infatti una serie di elettrodi (detti dinodi) contrapposti, in opportuno materiale, ai quali vengono applicati potenziali

crescenti. In questa maniera gli elettroni vengono accelerati da un dinodo all'altro e ad ogni urto liberano più elettroni, moltiplicando così gli effetti finali (con amplificazioni dell'ordine $10^6 - 10^9$). Sono quindi molto sensibili (e costosi).

- **Fotodiodi:** sono microscopici circuiti su chip di silicio (o germanio) che variano la loro d.d.p. se investiti da radiazioni luminose. Hanno sensibilità inferiore ai fotomoltiplicatori, ma presentano il vantaggio di poter essere inseriti in grande numero su un singolo chip di silicio, prestandosi così in modo efficace alla costruzione di *spettrofotometri a serie di diodi* (di cui si parlerà più avanti).

In IR si utilizzano *rivelatori a cristalli piroelettrici*, basati su cristalli che generano tensioni elettriche fra due facce opposte a seconda di quanto vengono 'riscaldati' dalla radiazione infrarossa ricevuta.

Sistemi di elaborazione e presentazione dati

Il segnale proveniente dal rivelatore viene opportunamente amplificato e trasmesso a:

- indicatore (digitale o analogico) di A e/o T;
- eventuale registratore su carta;
- eventuale sistema computerizzato di elaborazione dati.

L'elettronica di uno spettrofotometro deve inoltre controllare i movimenti dell'apparato monocromatore e, per gli strumenti a doppio raggio, del sistema di sdoppiamento del raggio incidente. Ovviamente, l'avvento dell'informatica ha fortemente ampliato le possibilità di gestione automatica dei dati raccolti, fino ad arrivare a veri e propri computer interfacciati con lo strumento che ne permettono sia il controllo delle impostazioni sia l'elaborazione e memorizzazione dei risultati, nonché il confronto degli spettri ottenuti con basi di dati su supporto digitale.

Tipi di spettrofotometro

Esistono diversi tipi di spettrofotometro, a seconda di come sono organizzate le varie componenti:

- spettrofotometri **monoraggio**
- spettrofotometri a **doppio raggio**
- spettrofotometri a **serie di diodi** (solo UV-visibile)
- strumenti in **trasformata di Fourier** (solo IR)

Gli **spettrofotometri monoraggio**, sono usati prevalentemente in analisi quantitative e non sono comodi per ottenere spettri di assorbimento. Lo schema corrisponde a quello di un colorimetro. La difficoltà nell'ottenere uno spettro sta nel fatto che **per ogni misura ad 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). Negli **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 direttamente a qualsiasi λ senza ripetere azzeramenti, e soprattutto registrare continuamente lo 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 (soprattutto). Esistono poi **strumenti UV-visibile a serie di diodi**, in cui il rivelatore è costituito da un chip con centinaia di fotodiodi allineati, ognuno dei quali misura la particolare banda di radiazione inviatagli dall'elemento disperdente. 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 HPLC⁴) in modo da registrare in tempo reale, secondo per secondo, l'intero spettro della miscela in uscita. Nel campo IR sono ormai ampiamente diffusi gli **strumenti in 'trasformata di Fourier' (FT-IR)**, con notevoli variazioni sull'apparato strumentale, basato in questo caso su un interferometro (dispositivo meccanico) e su un particolare metodo matematico di trattazione dei dati (trasformata di Fourier) e non su un monocromatore. Tali strumenti misurano lo spettro in modo simultaneo.

Spettroscopia di emissione atomica

Fin qui sono stati considerati gli spettrofotometri di assorbimento, ora viene fornita una breve descrizione di spettrofotometri di emissione. Come spiegato in precedenza, quando gli atomi vengono eccitati (fornendogli energia, ad esempio, con una fiamma), passano ad uno stato elettronico di maggiore energia, mentre quando ritornano allo stato fondamentale restituiscono l'energia sotto forma di radiazioni elettromagnetiche:

- misurando la **lunghezza d'onda** delle varie radiazioni emesse è possibile identificare gli atomi presenti (analisi **qualitativa**);
- misurando l'**intensità** delle varie radiazioni emesse è possibile determinare la concentrazione (analisi **quantitativa**).

Gli **spettrografi**, ad esempio, sono strumenti che misurano le radiazioni emesse da un campione (opportunitamente eccitato) in funzione della lunghezza d'onda. Lo spettrogramma risultante sarà costituito dalle righe di emissione caratteristiche degli atomi presenti, confrontandolo con campioni noti, è quindi possibile stabilire quali elementi sono presenti nel campione.

Gli **spettrometri di emissione a fiamma** ricordano il principio dell'analisi alla fiamma, la soluzione in esame viene nebulizzata all'interno di una fiamma e vengono misurate le intensità delle radiazioni emesse, caratteristiche delle specie chimiche in esame, allo scopo di ottenere analisi quantitative.

Gli **spettrometri di emissione al plasma** sono concettualmente analoghi a quelli a fiamma, ma in questo caso la fiamma è sostituita dal plasma (gas altamente ionizzato, ottenuto attraverso

⁴ Cromatografia liquida ad alta prestazione (*High Performance Liquid Chromatography*).

irraggiamento o scariche elettriche), in quanto quest'ultimo è più stabile e permette di raggiungere temperature più elevate, dell'ordine di 5000-6000 K. E' pertanto possibile determinare accuratamente numerosi elementi, presenti anche in bassissime concentrazioni (fino ai $\mu\text{g/L}$).

- **La spettroscopia di emissione a fiamma:** questo tipo di spettroscopia si presta essenzialmente a determinazioni quantitative, ad esempio i più comuni strumenti sono dedicati all'analisi quantitativa dei metalli alcalini e alcalino terrosi (Li, Na, K, Ca, Mg) in soluzione. L'analisi quantitativa si basa sul fatto che l'intensità della radiazione emessa e la concentrazione sono direttamente proporzionali ($I_E = K \times C$). Anche in questo caso si procede alla costruzione della curva di lavoro (o retta di taratura). Trattandosi di uno strumento in emissione, la sorgente è costituita dalla fiamma stessa, all'interno della quale viene nebulizzata la soluzione da esaminare. La fiamma (che non supera mai i 3000 K) riesce ad eccitare facilmente gli atomi di Li, Na, K, Ca e Mg, i quali emettono poi le loro radiazioni caratteristiche nell'ambito del visibile. Un opportuno sistema di specchi convoglierà la luce al monocromatore. Un monocromatore, generalmente basato su filtri, farà sì che giunga al rivelatore solo la radiazione utile all'analisi di un singolo elemento. Il rivelatore determina la sensibilità dello strumento, con un fototubo si può arrivare al massimo a concentrazioni dell'ordine dei ppm (mg/L), mentre con fotomoltiplicatori si può arrivare fino a 0,01 ppm (10 $\mu\text{g/L}$).

Luminescenza, chemiluminescenza e bioluminescenza

La luminescenza è un termine utilizzato per indicare generalmente diverse tipologie di emissione di luce. Questo avviene quando un atomo si trova in uno stato elettronico eccitato, gli elettroni non potendo mantenerlo, decadono naturalmente allo stato fondamentale liberando energia sotto forma di fotoni, e quindi di luce. Il colore della luce che si differenzia secondo la frequenza della radiazione luminosa, dipende dall'energia somministrata, più si fornisce energia, più il colore si avvicina al violetto, vale a dire la radiazione con la frequenza più alta. Una particolare tipologia di fenomeni luminescenti sono quelli chemiluminescenti, essi avvengono quando uno dei prodotti si trova in uno stato elettronico eccitato a seguito di una reazione chimica, che deve essere obbligatoriamente esotermica. L'energia liberata dalla reazione deve essere molto consistente, essendo necessari 200.000 J per ogni mole all'emissione di fotoni. In particolare le reazioni coinvolte sono quelle di ossidoriduzione, ed implicano ossigeno, perossidi o altri forti ossidanti. Nel caso in cui un fenomeno chemiluminescente avviene all'interno di un organismo vivente allora si parla di bioluminescenza. Queste particolari reazioni devono avvenire in soluzione acquosa (di cui gli organismi sono costituiti in gran parte) nella quale molte reazioni chemiluminescenti non possono svolgersi, e sono catalizzate da un enzima, la luciferasi, che pur non reagendo con le altre sostanze, tra cui la luciferina, diminuisce l'energia necessaria affinché la reazione possa completarsi. Luciferasi e luciferina sono due termini conati da Dubois nel 1880. Le specie che usufruiscono della bioluminescenza a scopo della sopravvivenza sono numerose e comprendono batteri, funghi, crostacei, molluschi, insetti e pesci. Ma i meccanismi di emissione di luce dei viventi sono vari e a volte molto differenti tra loro. È plausibile dunque che la bioluminescenza sia una caratteristica analoga ma non omologa di molte specie (seguendo percorsi evolutivi diversi si è giunti alla medesima conclusione).