

SPETTROFOTOMETRIA IN UV-VIS

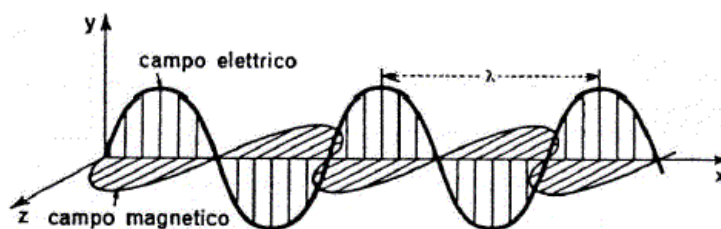
1. Le radiazioni elettromagnetiche

I metodi ottici di analisi sono basati sulla interazione luce-materia, dove con il termine “luce” si intendono le radiazioni elettromagnetiche, non necessariamente quelle visibili all’occhio umano.

Sulla **natura della luce** si sono succedute negli anni diverse teorie:

- quella corpuscolare di Newton ipotizzava che la luce fosse composta da particelle microscopiche dotate di massa; questa teoria spiegava bene i fenomeni dell’ottica geometrica noti ai tempi di Newton (riflessione, ecc.) ma non altri fenomeni scoperti in seguito come la polarizzazione, la diffrazione, l’interferenza, ecc.
- quella ondulatoria di Huygens e Maxwell, che considerava la luce come un’onda priva di massa, che permise di spiegare un gran numero di fenomeni anche se alcuni in seguito scoperti, come l’effetto fotoelettrico e la diffrazione degli elettroni, potevano essere descritti nuovamente solo mediante una ipotesi corpuscolare
- quella della meccanica ondulatoria (1925), legata i nomi di Heisenberg, Schroedinger e De Broglie che, come la meccanica quantistica che si affermava nella fisica di quegli anni, era fondata su concetti probabilistici e la luce veniva descritta come le particelle atomiche, avendo una natura comune: in questa teoria si metteva in rilievo la doppia natura corpuscolare-ondulatoria della luce, che risultava formata da **fotoni**. In certe situazioni i fotoni si comportano come corpuscoli dotati di massa, in altre come onde prive di massa; in definitiva sono due aspetti della stessa realtà che ci appaiono in contrasto a causa della nostra inadeguatezza a comprendere a fondo il fenomeno.

Ancora oggi, tuttavia, ci si riferisce prevalentemente alla **teoria ondulatoria**, in quanto è in grado di spiegare tutti i fenomeni più comuni. In questa teoria una radiazione elettromagnetica è costituita da due campi (grandezze vettoriali), il campo elettrico (asse y) ed il campo magnetico (asse z), oscillanti su piani perpendicolari, che producono due onde sinusoidali sovrapposte ed in fase che si propagano lungo una direzione comune (asse x).



Secondo le equazioni di Maxwell, alla base della teoria ondulatoria, un campo elettrico oscillante induce la formazione di un campo magnetico, viceversa un campo magnetico oscillante induce la formazione di un campo elettrico. Ciò spiega perché la radiazione si possa propagare in assenza di un mezzo: i due campi oscillanti si autotrasportano reciprocamente; i due piani di oscillazione, pur essendo perpendicolari, possono essere qualsiasi. Una radiazione elettromagnetica, per semplicità, viene rappresentata dalla propagazione di una singola onda ed è caratterizzata dai seguenti parametri:

- lunghezza d’onda (λ): è la distanza tra due massimi successivi dell’onda; si misura in μ (10^{-6} m) oppure in $m\mu$ (10^{-9} m) detti anche nm o infine in Angstrom (10^{-10} m)
- frequenza (ν): è il numero di oscillazioni, cioè di cicli completi dell’onda, in 1 secondo; si misura in s^{-1} , detti anche Hertz (con i relativi multipli KHz, MHz, ecc.)
- energia (E): è l’energia trasportata dalla radiazione; si può misurare in qualsiasi unità di misura dell’energia, per es. J, kcal, elettronvolt (eV), ecc.

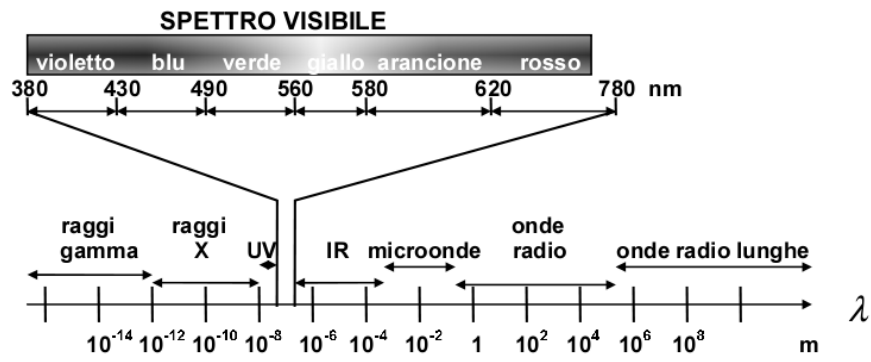
Questi parametri caratteristici delle radiazioni elettromagnetiche sono legati tra loro dalle **equazioni di Plank**:

$$E = h \cdot \nu \quad \nu = \frac{c}{\lambda} \quad E = h \cdot \frac{c}{\lambda}$$

Dalle equazioni di Plank si vede che frequenza ed energia sono direttamente proporzionali mentre energia e lunghezza d’onda e frequenza e lunghezza d’onda sono tra loro inversamente proporzionali. Pertanto le radiazioni con maggiore energia sono caratterizzate da frequenza ν molto grande e lunghezza d’onda λ molto piccola.

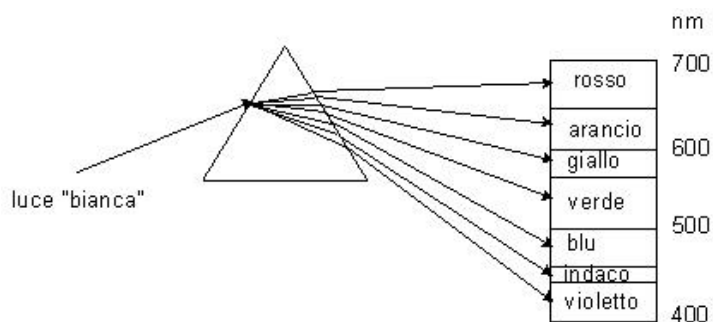
2. Lo spettro elettromagnetico

L’insieme di tutte le radiazioni elettromagnetiche è detto spettro elettromagnetico; si può dividere in varie zone a seconda dei parametri caratteristici della radiazione, cioè E, ν e λ :



Le radiazioni dello **spettro elettromagnetico** sono associabili a diversi fenomeni naturali:

- raggi γ : con i raggi cosmici (protoni accelerati quasi alla velocità della luce, che hanno energia ancora più grande) vengono prodotti da fenomeni galattici e stellari come supernove, buchi neri, ecc. e coinvolgono energie immense
- raggi x: vengono prodotti da transizioni elettroniche tra orbitali atomici interni agli atomi. Trovano applicazioni nella diagnostica medica e nello studio delle strutture cristalline (diffrazione a raggi x) e dei materiali (fluorescenza a raggi x)
- UV: i raggi ultravioletti vengono prodotti dalla eccitazione di molecole allo stato gassoso. Sulla terra arrivano quelli prodotti dal sole (UVA, UVB e UVC) che vengono fortunatamente assorbiti per la maggior parte dallo strato di ozono (ozonofera) in quanto sono mutageni (cioè possono danneggiare il DNA cellulare) e quindi potenzialmente cancerogeni
- VS (o VIS): le radiazioni visibili sono le uniche percepite dall'occhio umano (da circa 400 a circa 750 nm). In questa zona sono presenti 7 radiazioni (rosso, arancio, giallo, verde, blu, indaco, violetto) che l'occhio umano percepisce come "colori", che sommati insieme in egual quantità formano la luce "bianca" cioè la luce solare. Si evidenziano mediante la rifrazione provocata da un prisma di vetro, secondo la classica esperienza di Newton: attraversando il prisma i colori si separano perché hanno un angolo di rifrazione leggermente diverso l'uno dall'altro

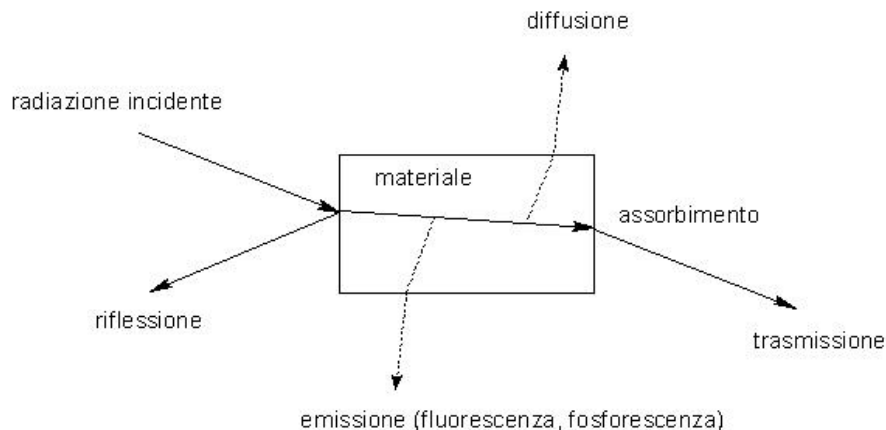


La radiazione rossa è quella deviata di meno, mentre la radiazione violetta è quella deviata maggiormente, come si evidenzia su di uno schermo messo dietro al prisma. Inoltre i colori non sono percepiti con la stessa ampiezza spettrale: il giallo e l'indaco sono hanno un intervallo minore rispetto a rosso o verde

- IR: le radiazioni infrarosse sono emesse dai corpi caldi; sono in pratica le radiazioni termiche. Vengono utilizzate in campo analitico, come le radiazioni del campo VIS-UV
- Microonde: vengono utilizzate nelle tecnologie radar, nella cottura rapida dei cibi (forni a microonde) e nella comunicazione fra i telefoni cellulari
- Onde radio (corte, medie e lunghe): vengono utilizzate nelle trasmissioni radio e TV

3. Interazioni luce-materia

Quando una radiazione elettromagnetica, per semplicità monocromatica cioè formata da una sola lunghezza d'onda, colpisce un materiale (solido, soluzione, gas, ecc.), può interagire con le particelle che costituiscono il materiale in modi diversi, cioè può dare luogo a diversi fenomeni, riassunti nello schema seguente.



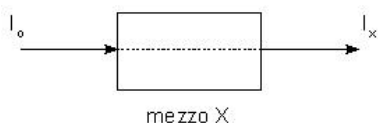
Molti di questi fenomeni possono essere utilizzati in altrettanti metodi analitici specifici:

- luce riflessa: analisi in riflettanza, che produce informazioni sulle caratteristiche della superficie riflettente
- luce assorbita/trasmessa: spettrofotometria in UV-VIS, IR, AA. L'assorbimento è dovuto ad interazioni con le particelle di materia, che cambiano a seconda della zona spettrale considerata
- luce diffusa: diffusione di raggi X, utilizzata nelle analisi cristallografiche
- luce emessa: fluorimetria. L'emissione secondaria di una molecola o un atomo eccitati dalla radiazione incidente può avvenire mediante fluorescenza o fosforescenza

4. Definizioni e leggi sull'assorbimento

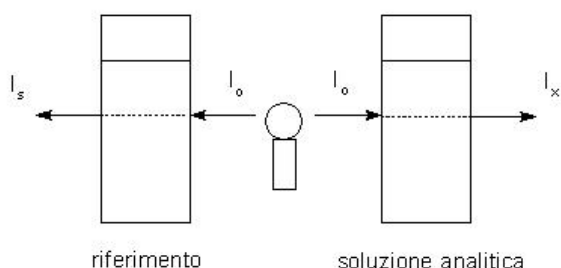
4.1. La trasmittanza

Si consideri un mezzo X attraversato da una radiazione monocromatica incidente:



I_0 è l'intensità della radiazione incidente, mentre I_x è l'intensità della radiazione trasmessa; ovviamente $I_x < I_0$ a causa dell'assorbimento della luce da parte del mezzo X. Il rapporto I_x/I_0 è detto trasmittanza complessiva del mezzo X. Questa grandezza, nel caso di una soluzione, sarebbe dovuta sia all'assorbimento del soluto che all'assorbimento del solvente.

Se il soluto fosse l'analita da determinare mediante analisi, questa situazione sarebbe inaccettabile, perché la diminuzione dell'intensità luminosa deve essere causata dal solo analita per poterlo dosare. Per tale motivo, in fase di analisi, si deve realizzare un confronto tra 2 soluzioni: una soluzione di riferimento (il cosiddetto bianco, costituito dal solvente e dagli eventuali componenti della matrice) e la soluzione analitica.



Le 2 soluzioni, in cellette identiche, vengono sottoposte ad una identica radiazione di intensità I_0 , prodotta da un'unica sorgente, ottenendo due intensità attenuate I_s e I_x (minore di I_s); il confronto tra queste due radiazioni permette di eliminare l'assorbimento del solvente e gli altri fenomeni parassiti come la riflessione e la rifrazione delle pareti delle cellette

Si definisce quindi **trasmittanza** del soluto la relazione seguente, da utilizzare nelle analisi perché dipende dal solo soluto:

$$T = \frac{I_x}{I_s}$$

La trasmittanza T è adimensionale ed è compresa tra 0 ed 1, oppure in forma percentuale tra 0 e 100; il valore 1 caratterizza i corpi completamente trasparenti oppure le soluzioni a concentrazione nulla (solvente puro); il valore 0 caratterizza i corpi opachi oppure ipotetiche soluzioni a concentrazione infinita.

4.2. L'assorbanza (o estinzione)

L'**assorbanza** è definita come il logaritmo decimale del reciproco della trasmittanza:

$$A = \log \frac{1}{T} = \log \frac{I_s}{I_x}$$

I limiti di variabilità sono: quando $T = 0$ allora $A = \text{infinito}$, quando $T = 1$ allora $A = 0$. Anche questa è una grandezza adimensionale e deve la sua importanza al fatto di essere in relazione lineare con la concentrazione di una soluzione.

4.3. La legge di Lambert-Beer (o di Boguer-Lambert-Beer)

E' la legge fondamentale dell'assorbimento e stabilisce una relazione lineare tra l'assorbanza e la concentrazione di una soluzione; vale per un analita in soluzione quando viene attraversato da una radiazione elettromagnetica rigorosamente monocromatica. La **legge di Lambert-Beer** espressa tramite l'assorbanza è la seguente:

$$A = a \cdot b \cdot C$$

La costante a è detta coefficiente di assorbimento (o di estinzione) ed è l'assorbanza di una soluzione in cui $b = 1$ e $C = 1$ g/l, cioè di spessore e concentrazione unitari. Questa relazione evidenzia una diretta proporzionalità tra assorbanza e concentrazione di una soluzione e quindi pone le basi per la determinazione quantitativa del soluto. Dimensionalmente si ha la seguente relazione, esprimendo lo spessore b in cm e la concentrazione C in g/l, essendo A adimensionale:

$$a = \frac{A}{b \cdot C} = \frac{\text{litro}}{\text{cm} \cdot \text{g}}$$

La legge di Lambert-Beer può essere espressa anche attraverso la trasmittanza:

$$A = \log \frac{1}{T} = a \cdot b \cdot C \quad \log T = -a \cdot b \cdot C \quad T = 10^{-a \cdot b \cdot C}$$

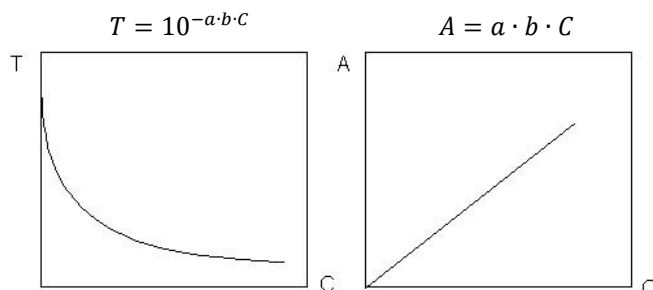
Anche se questa relazione è meno usata della precedente.

A volte la concentrazione viene espressa in mol/l: in questo caso la legge di Lambert-Beer assume le seguenti espressioni:

$$A = \varepsilon \cdot b \cdot C \quad T = 10^{-\varepsilon \cdot b \cdot C} \quad \text{dove } \varepsilon = \text{cm}^{-1} \cdot \text{moli}^{-1}$$

il termine ε è detto coefficiente di assorbimento molare.

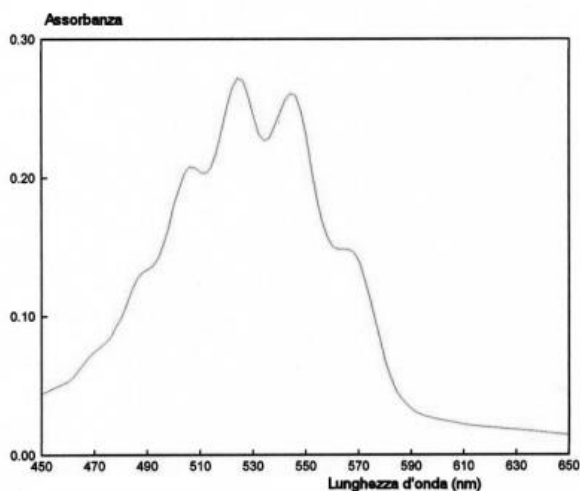
Entrambi i coefficienti di assorbimento dipendono dal tipo di sostanza perché esprimono l'attitudine della stessa ad assorbire la luce; a parità di sostanza dipendono dalla lunghezza d'onda λ incidente, che quindi deve essere **rigorosamente monocromatica** per effettuare delle misure corrette. In altri termini l'assorbanza A o la trasmittanza T devono dipendere solo dalla concentrazione C mentre il coefficiente di assorbimento deve rimanere costante.



Come si vede dai diagrammi, la dipendenza di T da C è di tipo esponenziale, mentre la dipendenza di A da C è lineare: è quindi più facile fare riferimento nelle misure all'assorbanza, in quanto la regressione lineare, che permette di tracciare le rette di calibrazione (di lavoro), ottenute mediante standard di analita puro a concentrazione nota, è più agevole rispetto alla relazione esponenziale. In questo grafico l'assorbanza A è il segnale prodotto dall'apparecchio di misura, correlato alla concentrazione C dell'analita.

5. Spettri di assorbimento

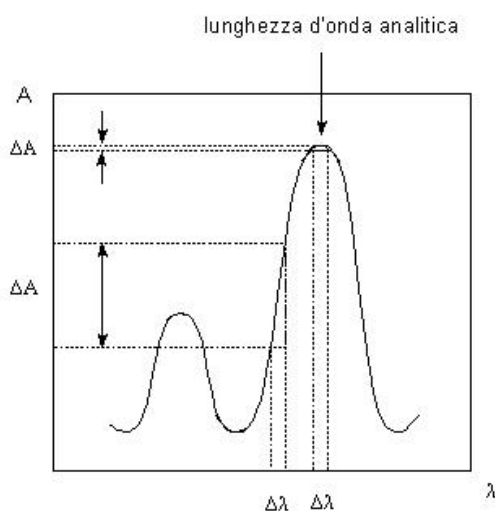
Una sostanza assorbe in modo diverso le varie radiazioni elettromagnetiche, cioè manifesta un diverso coefficiente di assorbimento (a o ϵ), e quindi, a parità di concentrazione, una diversa assorbanza. Mediante opportuni apparecchi (gli spettrofotometri), è possibile registrare come varia l'assorbanza di una sostanza in soluzione in funzione della lunghezza d'onda:



Il diagramma che si ottiene è detto **spettro di assorbimento**; in UV-VIS è uno **spettro a bande** ed è caratterizzato dalla presenza di massimi (picchi di assorbimento); nell'esempio si vede lo spettro nel VIS del KMnO_4 . Si nota la presenza di due massimi di assorbimento caratteristici nel visibile, che non variano la loro posizione al variare della concentrazione della soluzione, ma variano semplicemente la loro altezza: lo spettro di una soluzione più concentrata si troverebbe semplicemente più in alto, quello di una soluzione più diluita si troverebbe più in basso ma la posizione dei massimi rimarrebbe inalterata

Ogni sostanza ha un suo spettro caratteristico: è proprio individuando la posizione dei massimi caratteristici che si realizza l'analisi qualitativa nella spettrofotometria UV-VIS, mediante confronto manuale o computerizzato con una serie di spettri campione.

L'analisi quantitativa in UV-VIS viene fatta costruendo una retta di taratura, secondo la legge di Lambert-Beer, utilizzando luce monocromatica cioè una ben precisa λ , detta **lunghezza d'onda analitica**, scelta in modo che corrisponda di solito al massimo di assorbimento più intenso:



Infatti in tal modo si hanno i seguenti vantaggi:

- aumenta la sensibilità dell'analisi in quanto si lavora in corrispondenza di un valore di a elevato, per cui a parità di C si ottiene un segnale più intenso
- si riducono gli errori di lettura di A a causa di una non perfetta monocromatizzazione della luce incidente. Dal grafico si vede che, a parità di errore sulla monocromatizzazione della luce $\Delta\lambda$, lavorando in corrispondenza di un massimo si rende minimo l'errore di lettura ΔA compiuto su A .

6. Spettri elettronici molecolari

Gli spettri a bande caratteristici dell'assorbimento nell'UV-VIS sono la conseguenza dell'interazione luce-materia. In questo campo spettrale tale interazione si manifesta mediante **transizioni di elettroni di legame tra orbitali molecolari**, provocate dall'assorbimento dell'energia della radiazione che colpisce le molecole di campione.

6.1. Gli orbitali molecolari

E' noto che i legami covalenti sono dovuti alla messa in comune di due elettroni spaiati e possono essere descritti in termini di sovrapposizione di coppie di orbitali atomici: dalla combinazione lineare delle due funzioni d'onda, indicate con Ψ_a e Ψ_b si ottengono due orbitali molecolari, indicati con Ψ (psi), estesi cioè alla coppia di atomi interessata dal legame, secondo il metodo **LCAO** (Linear Combination of Atomic Orbitals). Da 2 orbitali

atomici si ottengono **2 orbitali molecolari**:

- un orbitale legante a minore energia, in cui si ha addensamento di carica tra i due atomi: $\Psi = \Psi_a + \Psi_b$

- un orbitale antilegante a maggiore energia in cui si ha separazione di carica tra i due atomi: $\Psi = \Psi_a - \Psi_b$

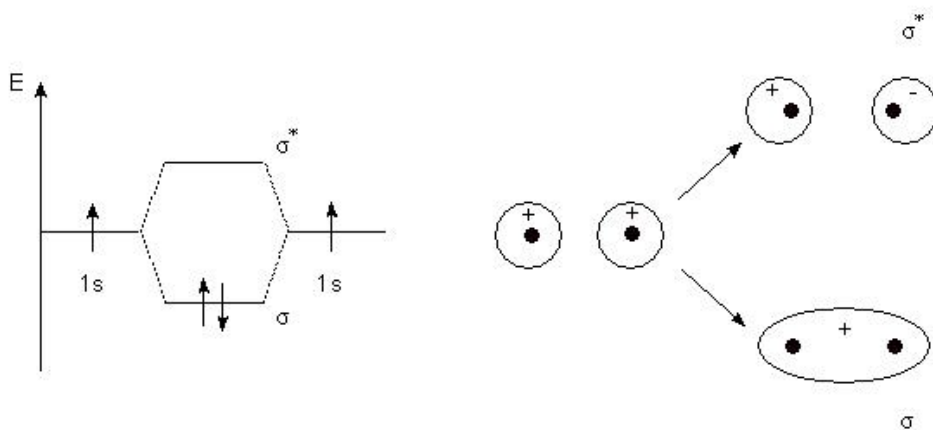
la coppia di elettroni si dispone nell'orbitale legante ed in tal modo si realizza un guadagno energetico che giustifica la formazione del legame covalente. In generale dalla combinazione di $2n$ orbitali atomici si ottengono $2n$ orbitali molecolari: n orbitali leganti ed n antileganti. La **teoria dell'orbitale molecolare (MO)** è quindi in grado di spiegare la natura e le proprietà dei legami covalenti.

A seconda del tipo di sovrapposizione si possono avere:

- orbitali σ derivanti dalla sovrapposizione frontale di orbitali atomici, ovvero orbitali molecolari in cui la massima densità di carica, cioè la sovrapposizione degli orbitali atomici, si trova lungo la congiungente i due nuclei atomici

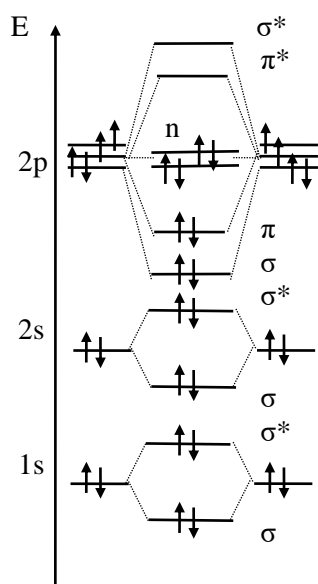
- orbitali π in cui la massima densità di carica non si trova lungo la congiungente i due nuclei.

Nel caso di un **atomo monoelettronico** come l'H ($1s^1$) che forma la molecola H_2 la situazione è semplice:



molecola H_2

I segni che compaiono nel disegno si riferiscono al segno della funzione d'onda Ψ e non hanno niente a che vedere con la carica elettrica, poiché gli orbitali contengono sempre gli elettroni che hanno ovviamente carica negativa. Nella molecola dell'idrogeno H_2 , si formano due orbitali σ , uno legante e l'altro antilegante in seguito alla sovrapposizione frontale dei due orbitali $1s$ degli atomi di idrogeno; come mostrato nel **diagramma di correlazione** gli elettroni di legame si dispongono entrambi nell'orbitale legante σ mentre quello antilegante σ^* , a maggiore energia, rimane disponibile per transizioni elettroniche provocate dall'assorbimento di radiazioni aventi un'energia pari alla differenza di energia dei due orbitali: $\Delta E = h \cdot \nu$. In tal modo si spiega la capacità di H_2 di assorbire radiazioni elettromagnetiche; infatti assorbe in UV a causa della suddetta transizione elettronica tra orbitali molecolari. Quando si legano **atomi poliettronici** la situazione è più complessa, in quanto vi sono non solo orbitali s ma anche orbitali p , che si possono sovrapporre frontalmente o lateralmente ed orbitali contenenti doppietti spaiati, che rimangono tali anche nella molecola; questi sono detti orbitali n (non leganti).



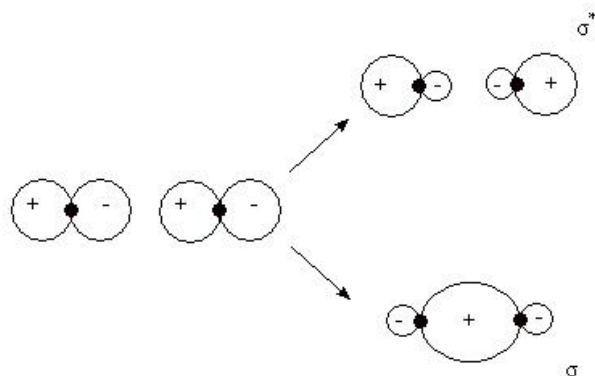
molecola O_2

A fianco è riportato l'esempio della molecola biatomica O_2 (diversa sarebbe la situazione per atomi a diversa elettronegatività, in cui gli orbitali atomici puri non avrebbero avuto la stessa energia).

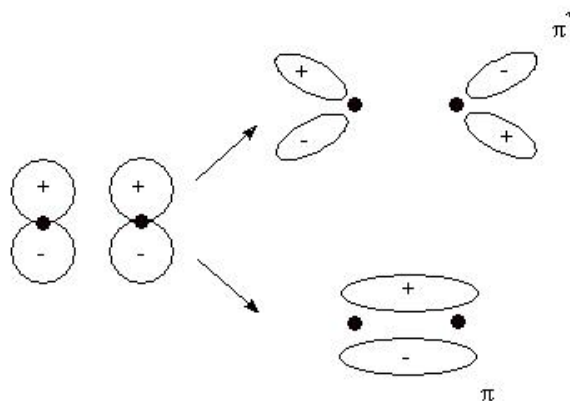
L'O ha numero atomico pari a 8 ed ha la seguente configurazione atomica: $1s^2 2s^2 2p^4$.

Gli 8 elettroni di ciascun atomo di O si accoppiano con quelli dell'altro e si dispongono nei vari orbitali molecolari. Come si vede nel livello di valenza si trovano due doppietti che formano i due legami covalenti e due doppietti spaiati che si trovano in orbitali n non leganti. Anche in questo caso vi sono degli orbitali molecolari non leganti disponibili ad accettare elettroni promossi in quell'orbitale per effetto dell'assorbimento di una radiazione di adatta energia e ciò spiega la capacità di O_2 di assorbire radiazioni elettromagnetiche di adatta energia. L' O_2 può dare più transizioni elettroniche rispetto a H_2 per cui è in grado di assorbire diverse radiazioni.

Nei disegni seguenti sono riportate le possibili sovrapposizioni di orbitali atomici p con formazione dei relativi orbitali molecolari leganti ed antileganti:



Sovrapposizione frontale degli orbitali p

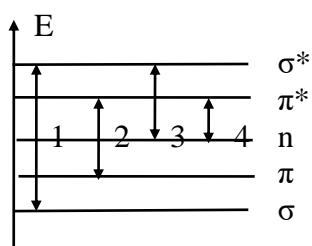


Sovrapposizione laterale degli orbitali p

Dalla combinazione lineare (cioè dalla sovrapposizione) di due orbitali atomici si ottengono sempre due orbitali molecolari, con opportuna simmetria, uno legante e l'altro antilegante. L'insieme degli orbitali molecolari viene quindi riempito con gli elettroni derivanti dai singoli atomi, facendo attenzione alla presenza di eventuali doppietti spaiati che rimangono in orbitali n non leganti, utilizzando le regole di riempimento previste per gli orbitali atomici. In tal modo si costruisce la struttura elettronica dell'intera molecola.

6.2. Transizioni elettroniche e cromofori

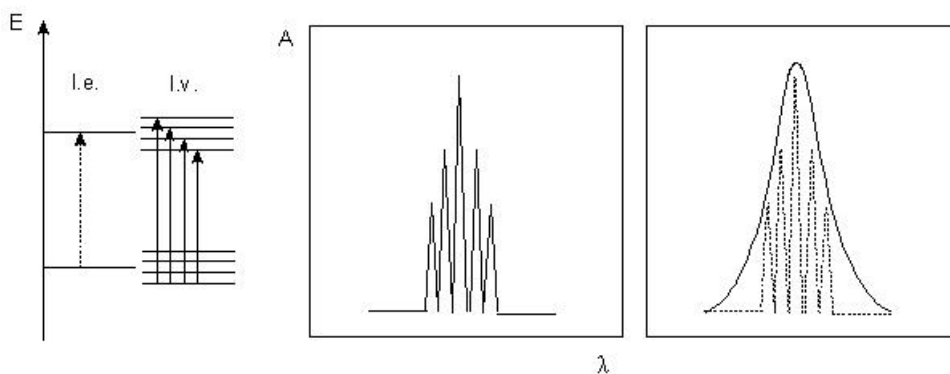
L'assorbimento di una molecola nel campo UV-VIS è dovuto alla transizione di elettroni tra orbitali molecolari, in particolare alla promozione di uno o più elettroni da orbitali leganti a orbitali antileganti o non leganti ad energia superiore. Ciò è possibile solo se la radiazione ha esattamente l'energia corrispondente alla ΔE tra i due orbitali. Sono teoricamente possibili varie transizioni, che sono però limitate in pratica da regole di selezione molto complesse (qui non esaminate) che ne proibiscono alcune, anche se effettivamente vi sono poi eccezioni a queste regole: in generale sono permesse transizioni solo tra orbitali molecolari con simmetria compatibile.



le transizioni permesse dalle regole di selezione sono le seguenti:

- 1) $\sigma \rightarrow \sigma^*$ $\Delta E = 200 \text{ kcal}$ $\lambda = 140 \text{ nm}$ lontano UV
- 2) $\pi \rightarrow \pi^*$ $\Delta E = 150 \text{ kcal}$ $\lambda = 190 \text{ nm}$ UV
- 3) $n \rightarrow \sigma^*$ $\Delta E = 150 \text{ kcal}$ $\lambda = 190 \text{ nm}$ UV
- 4) $n \rightarrow \pi^*$ $\Delta E = 100 \text{ kcal}$ $\lambda = 280 \text{ nm}$ vicino UV

Le regole di selezione sono basate su regole di simmetria: sono proibite transizioni tra orbitali molecolari con simmetria diversa, quindi ad esempio non è consentita la transizione tra un orbitale σ ed un orbitale π . Vi è comunque da rilevare che in pratica possono avvenire anche alcune delle transizioni proibite ma, appunto per tale motivo, sono caratterizzate da coefficienti di assorbimento e quindi da assorbanze molto basse.



Per quanto detto in precedenza, lo spettro di assorbimento di una molecola nel campo UV-VIS dovrebbe essere a righe: ogni riga corrisponde ad una transizione elettronica tra due livelli elettronici (l.e.); in realtà i livelli elettronici contengono al loro interno vari livelli vibrazionali (l.v.) con energie molto simili e quindi lo spettro di assorbimento dovrebbe presentare un insieme di righe molto vicine, che sono effettivamente registrabili solo con particolari strumenti ad alta risoluzione e con campioni in fase vapore; con gli strumenti ordinari e lavorando con soluzioni le righe non sono separabili ma si registra il loro involuppo (cioè il loro contorno) e quindi si ottengono **spettri a bande**, con picchi allargati in cui non sono più visibili i dettagli vibrazionali.

Le transizioni più interessanti e studiate sono quelle $\pi \rightarrow \pi^*$ e $n \rightarrow \pi^*$; sono caratteristiche di sistemi insaturi le prime e di eteroatomi con doppietti liberi le seconde. Sistemi aventi queste caratteristiche sono detti **cromofori** (in origine il nome indicava i sistemi che assorbivano nel VIS, cioè erano colorati, ma oggi si intendono anche sistemi che assorbono in UV non troppo lontano). I principali cromofori saranno quindi gruppi atomici con doppi e tripli legami (elettroni π) e con atomi con doppietti liberi come N, O, S, ecc. (elettroni n):

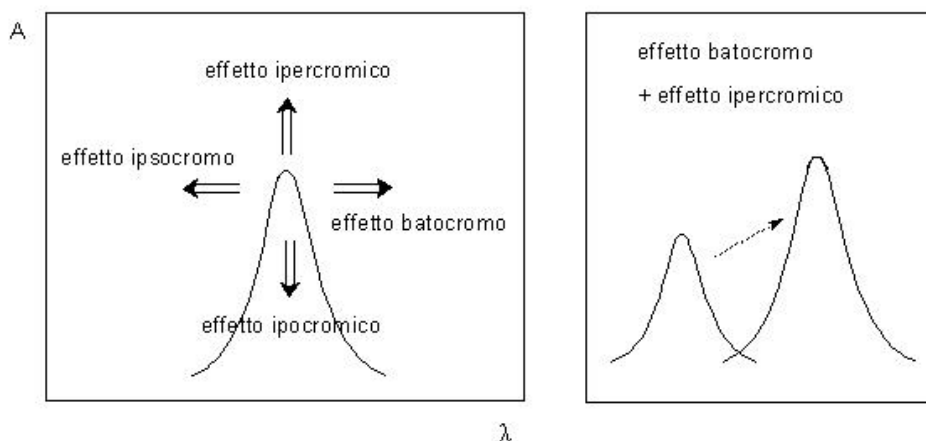
$C=C$ $C\equiv N$ $C=O$ $C=S$ $N=N$ $N=O$ polieni, aromatici, ecc.

6.3. Effetto dei sostituenti

Il comportamento di un cromoforo, che interagisce con la radiazione incidente assorbendola se questa ha una energia adatta, può essere modificato dall'interazione con i sostituenti detti **auxocromi**, cioè con l'intorno del cromoforo: si può modificare sia la λ che il coefficiente molare di assorbimento ϵ .

Gli **effetti dei sostituenti** sono:

- effetto batocromo: diminuisce il ΔE della transizione aumentando la relativa λ assorbita (vedi equazione di Plank); può essere causato da sostituenti che aumentano l'E dell'orbitale legante o diminuisce quella dell'orbitale antilegante o entrambe
- effetto ipsocromo: è opposto al batocromo; aumenta il ΔE della transizione e quindi si riduce la λ richiesta per la transizione elettronica
- effetto ipercromico: si ha quando viene aumentato il coefficiente ϵ sia per un aumento della probabilità della transizione che per un aumento della superficie del cromoforo; aumenta quindi l'assorbanza ma rimane costante λ assorbita
- effetto ipocromico: è opposto all'ipercromico e provoca una diminuzione di ϵ ed una corrispondente diminuzione dell'assorbanza



Sono possibili anche più effetti contemporanei; ad esempio il disegno a destra mostra la contemporanea presenza

di un effetto batocromo e di un effetto ipercromico.

Vi sono vari meccanismi di interazione ma tutti sono riconducibili ad una modifica della **disponibilità elettronica del cromoforo**: un aumento di tale disponibilità fa aumentare l'energia dell'orbitale legante riducendo il ΔE con quello antilegante e quindi aumentando la λ richiesta (effetto batocromo); sostituenti che impoveriscono il cromoforo di elettroni provocano l'effetto contrario (effetto ipsocromo). Per es. l'inserimento di vari alchili su un cromoforo etilenico provoca un effetto batocromo ed ipercromico, a causa dell'arricchimento elettronico provocato dagli alchili.

Alcuni **elementi di transizione** (Mn, Cr, ecc.) costituiscono un caso particolare: quando danno legami chimici con anioni, complessi, ecc. anche mediante orbitali d ed f (che hanno energie molto vicine) le transizioni tra i relativi orbitali molecolari richiedono poca energia e quindi molti composti di tali elementi assorbono nel VIS, risultando intensamente colorati (KMnO_4 , $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$, ecc.).

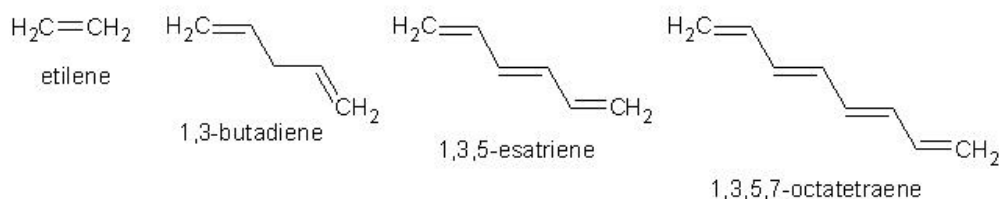
6.4. La coniugazione

Un cromoforo è generalmente un sistema insaturo, eventualmente con eteroatomi dotati di doppietti spaiati; in questo sistema possono facilmente avvenire le transizioni elettroniche responsabili dell'assorbimento in UV-VIS, ovvero $\pi \rightarrow \pi^*$ e $n \rightarrow \pi^*$ nei casi più comuni.

E' importante la **relazione tra assorbimento e coniugazione** che si ha in un cromoforo. Se vi sono 2 o più doppi legami ma sono isolati, si ha una situazione analoga a quella di 1 solo doppio legame: vi è un leggero effetto batocromo a causa della sostituzione di H con alchili ed un leggero aumento del coefficiente molare di assorbimento ϵ (anche se non vi è un vero effetto ipercromico) dovuto all'aumento del numero di cromofori nella stessa molecola.

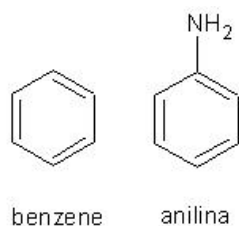
composto	λ (nm)	ϵ ($\text{l}\cdot\text{cm}^{-1}\cdot\text{mol}^{-1}$)
etilene	162	10.000
butadiene	217	20.000
esatriene	258	35.000
octatetraene	289	55.000

Una situazione del tutto diversa si ha quando i 2 o più doppi legami sono coniugati: in questo caso vi è risonanza con varie strutture limite e delocalizzazione degli elettroni π sull'intero cromoforo; ciò comporta una maggior facilità di transizioni perché si può dimostrare (studiando le funzioni d'onda degli orbitali molecolari) che aumenta l'energia dell'orbitale legante



a maggiore energia mentre diminuisce l'energia di quello antilegante a minor energia, cioè si riduce il ΔE della transizione: si ha quindi un marcato effetto batocromo, che in certi casi (per es. nel caso del β -carotene, intensamente colorato in arancio) può portare la lunghezza d'onda assorbita nel VIS e quindi rendere la molecola colorata. Come si vede dalla tabella all'aumentare del numero di doppi legami coniugati si ha una progressiva riduzione del salto energetico tra gli orbitali interessati alla transizione e quindi la presenza dell'effetto batocromo. Parallelamente, l'aumento della coniugazione aumenta anche la superficie del cromoforo stesso e ciò provoca anche un marcato effetto ipercromico.

I sistemi aromatici presentano analoghi effetti in quanto si possono considerare come dei sistemi polienici ciclici; tutti gli aromatici, all'aumentare della coniugazione e quindi del numero di anelli condensati, presentano gli effetti batocromo ed ipercromico.



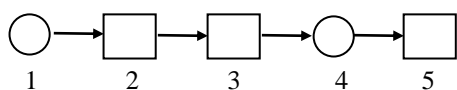
I sostituenti di aromatici presentano ulteriori effetti: quelli elettrondatori, arricchendo l'anello di elettroni π facilitano le transizioni e quindi provocano effetti batocromo ed ipercromico; per esempio: il benzene ($\lambda = 254 \text{ nm}$ $\epsilon = 200$) assorbe in UV e quindi è incolore; l'anilina ($\lambda = 280 \text{ nm}$ $\epsilon = 1430$) assorbe nella regione vicino al violetto e quindi è leggermente colorata in giallo (colore complementare al violetto). Tra benzene ed anilina si manifestano un effetto batocromo ed un effetto ipercromico a causa del doppietto libero dell'atomo di N che viene delocalizzato sull'anello aromatico e quindi lo arricchisce di elettroni.

7. Schema degli apparecchi

Vi sono tre tipi di apparecchi che possono essere utilizzati in 2 diverse metodiche di analisi:

- in colorimetria si usano dei **colorimetri** fotoelettrici; si studia il campo VIS, gli errori commessi non sono mai trascurabili (analisi di routine), non è possibile registrare interi spettri, si usa luce prodotta da monocromatori e banda larga (filtri colorati)
- in spettrofotometria UV-VIS si usano **spettrofotometri a singolo raggio** (che sono analoghi ai colorimetri ma più precisi) o **spettrofotometri a doppio raggio** (gli strumenti più moderni e precisi, che possono anche essere dotati di sistemi per l'elaborazione del segnale). Si analizza il campo UV-VIS (da circa 200 nm fino circa a 900-1000 nm nel vicino IR); è possibile registrare interi spettri perché l'apparecchio effettua la scansione di tutto il campo spettrale; si utilizzano monocromatori a banda stretta (prisma, reticolo) e quindi si commette un errore strumentale molto basso.

In ogni caso i componenti strumentali sono sempre gli stessi: nei paragrafi successivi verranno esaminati i singoli componenti; di seguito vi è uno schema a blocchi di un colorimetro fotoelettrico o di uno spettrofotometro monoraggio; gli apparecchi a doppio raggio verranno illustrati in seguito:



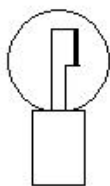
1 = sorgente 2 = monocromatore 3 = celletta (cuvette)
4 = rivelatore 5 = sistema di elaborazione del segnale e presentazione dei dati

La sorgente produce luce policromatica che viene dispersa dal monocromatore; le singole radiazioni monocromatiche, opportunamente selezionate, colpiscono la cella contenente l'analita in grado di assorbirle, vengono attenuate e quindi colpiscono il rivelatore; questo produce una corrente elettrica proporzionale all'intensità di luce incidente che viene misurata da un opportuno strumento di misura dotato di indicatore.

7.1. Sorgenti di energia raggiante

Sono di vario genere, a seconda della zona spettrale interessata:

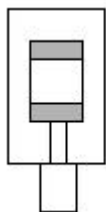
- lampade a filamento di tungsteno: sono utilizzate nel campo VIS sia nei colorimetri che negli spettrofotometri; coprono l'intero campo spettrale da 300 a 930 nm circa. Lavorano a una temperatura di circa 3000 K e richiedono l'uso di stabilizzatori di tensione per emettere energia in modo costante.



Contengono un filamento di W che viene riscaldato ad elevata temperatura mediante il passaggio di corrente elettrica (effetto Joule); il filamento si riscalda fino all'incandescenza ed emette nel VIS.

Migliori prestazioni si ottengono con le lampade W-alogeno, che forniscono energie più elevate nella zona 300-400 nm grazie alle superiori temperature di esercizio. Queste lampade emettono uno spettro continuo solo nel VIS, mentre non sono adatte per l'UV dove producono un'emissione a righe

- lampada a deuterio: si tratta di una lampada ad arco in cui il cui bulbo di quarzo è riempito di deuterio (D_2) a bassa pressione



I due elettrodi contenuti all'interno della lampada vengono sottoposti ad un'elevata differenza di potenziale, fino a che avviene la scarica. L'arco così prodotto ionizza il D_2 e lo eccita, provocando un'intensa emissione quasi continua nella regione UV dello spettro (inferiore a 400 nm).

Oggi vengono prodotte lampade allo Xe in grado di emettere sia nel VIS che nell'UV in modo continuo e quindi i moderni apparecchi sono dotati di un'unica sorgente

7.2. Monocromatori

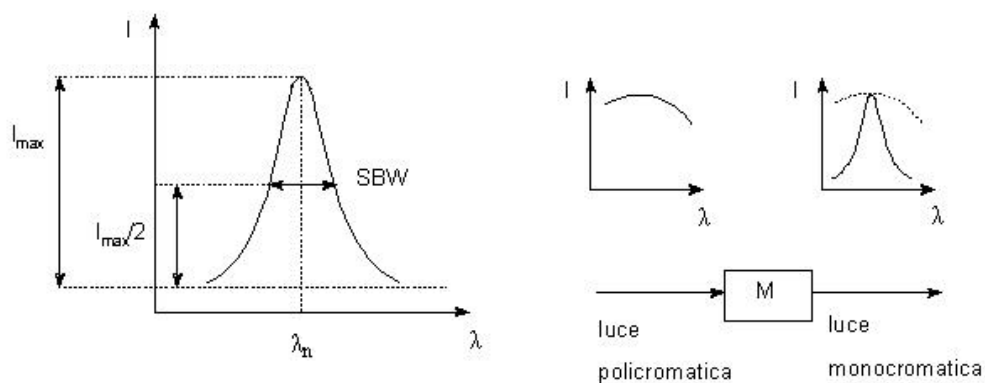
Sono i dispositivi utilizzati per trasformare la luce policromatica prodotta dalla sorgente in luce monocromatica,

che viene in seguito utilizzata per l'analisi spettrofotometrica; infatti la legge di Lambert-Beer vale per luce rigorosamente monocromatica perché il coefficiente di assorbimento a dipende fortemente dalla lunghezza d'onda. Ogni monocromatore è abbinato ad una fenditura, di ampiezza regolabile (dell'ordine di qualche nm), che permette di selezionare l'intervallo di radiazioni desiderato. Si dividono in due categorie:

- filtri, che assorbono una parte delle componenti spettrali della radiazione incidente trasmettendo le altre
- prismi e reticoli, che separano angularmente le diverse radiazioni monocromatiche.

Ogni monocromatore è caratterizzato da alcuni parametri tipici, tra cui:

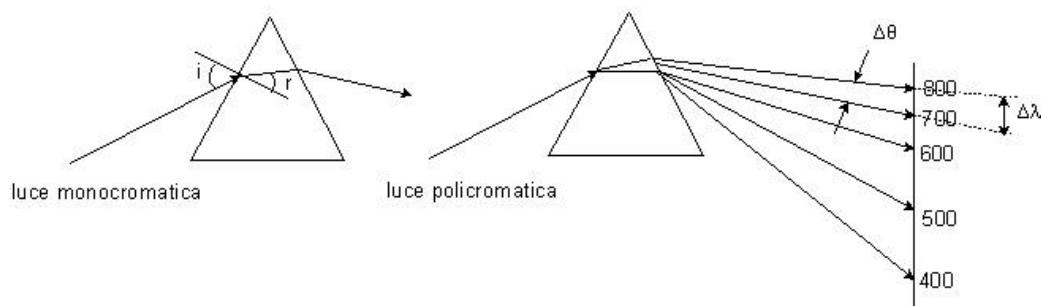
- **lunghezza d'onda nominale** (λ_n): è la λ corrispondente al massimo di intensità di luce trasmessa, cioè in corrispondenza di I_{max} (coincide approssimativamente con il colore del filtro nel caso di filtri colorati per il VIS)
- **ampiezza della banda passante** (SBW = Spectral Band Width), definita come l'intervallo di lunghezze d'onda che emerge dalla fenditura con un'energia superiore al 50% della radiazione nominale; è quindi la larghezza della banda di trasmissione del monocromatore misurata a $I_{max}/2$



Come si vede nel disegno precedente, la luce policromatica attraversa il monocromatore M, la maggior parte delle radiazioni viene bloccata e, idealmente, dovrebbe emergere una sola lunghezza d'onda, ovvero una riga; in realtà lo spettro di emissione di un monocromatore è rappresentato da una curva gaussiana con il massimo corrispondente alla lunghezza d'onda nominale λ_n . Ovviamente i monocromatori più efficienti sono quelli che hanno SBW minore e che permettono misure con minori errori strumentali, perché rendono la luce maggiormente monocromatica

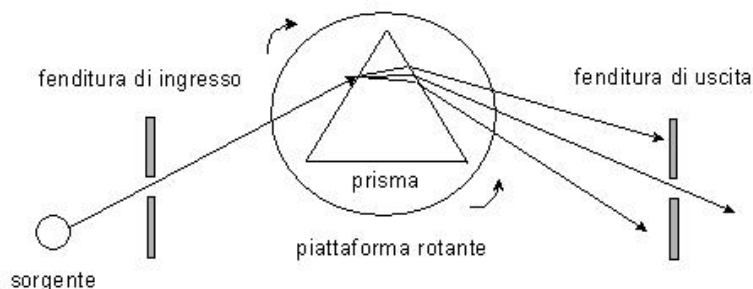
Monocromatori a filtro: sono utilizzati soprattutto nel VIS e sono costituiti da lastre di vetro colorato, oppure gelatina colorata racchiusa tra due lastre di plastica trasparente. Trasmettono la luce corrispondente al colore che li caratterizza: per esempio un filtro verde trasmette appunto luce verde. Filtri di questo genere hanno una SBW di 150-250 nm e quindi sono usati solo in colorimetri impiegati per analisi di routine, in cui non sia richiesta un'elevata precisione. Si possono utilizzare più filtri in serie, riducendo in tal modo l'SBW a 35-60 nm ma con forte attenuazione dell'energia trasmessa e quindi perdita di sensibilità.

Monocromatori a prisma: sfruttano il fenomeno fisico della rifrazione, che permette la separazione angolare delle varie radiazioni che compongono la luce policromatica. Un raggio di luce monocromatica, quando cambia il mezzo di propagazione incidendo sulla superficie di separazione con un angolo i , subisce una rifrazione, cioè una deviazione, a causa della leggera differenza di velocità di propagazione delle luce nei due mezzi; l'angolo di rifrazione viene detto r , è diverso da i e dipende dalla λ incidente.



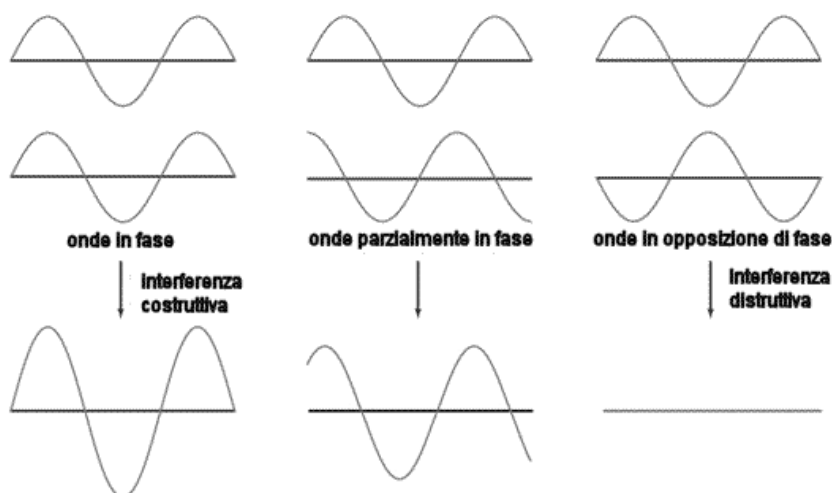
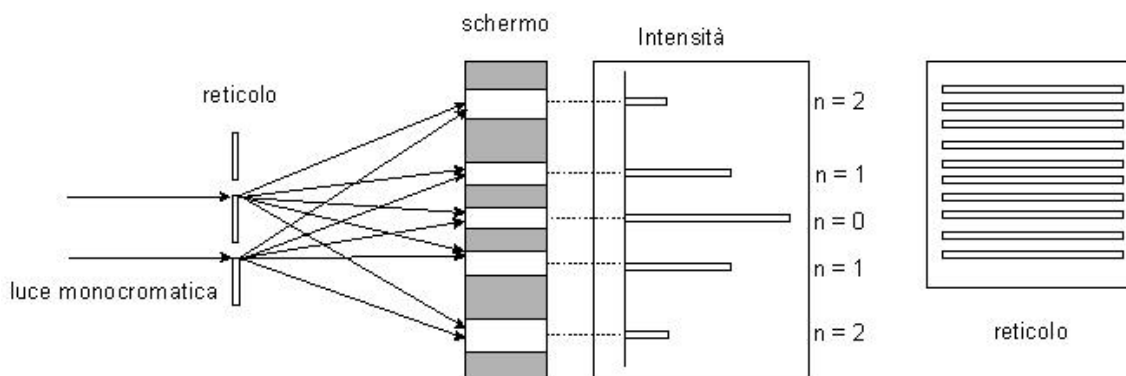
Se sulla superficie del prisma incide un raggio di luce policromatica, ogni radiazione verrà deviata di un angolo diverso e quindi le varie radiazioni subiranno una **separazione angolare**, definita da $\Delta\theta/\Delta\lambda$, detta anche **dispersione del prisma**. La dispersione di un prisma non è costante in funzione di λ , cioè non è lineare ma aumenta progressivamente dal rosso al violetto: le radiazioni rosse vengono cioè separate meno di quelle

violette; ciò costituisce un problema in quanto sarebbe necessario variare l'apertura della fenditura di uscita, restringendola, verso la zona rossa dello spettro VIS, per isolare le radiazioni monocromatiche e mantenere all'incirca costante l'ampiezza di banda passante; ciò comporta però una perdita di energia della radiazione incidente, proprio per le radiazioni di per sé meno energetiche. In seguito a tale inconveniente oggi i prismi non sono più utilizzati. Di seguito è mostrato uno schema ottico tipico di montaggio di un monocromatore a prisma:

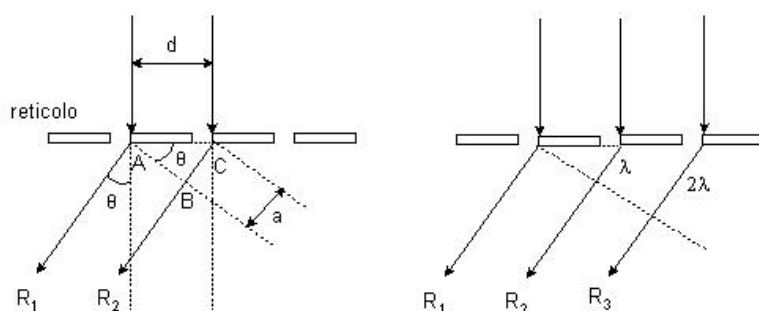


Monocromatori a reticolo: sono oggi i più usati perché producono luce fortemente monocromatica, hanno una dispersione lineare, sono utilizzabili in qualsiasi zona dello spettro. Sfruttano i fenomeni della **diffrazione** e dell'**interferenza**. Poiché il fenomeno è piuttosto complesso, consideriamo prima un caso semplice che non ha applicazioni analitiche.

Reticolo in luce monocromatica: un reticolo di diffrazione è costituito da una lastra con tantissime fenditure sottilissime ed equidistanti tra loro. Sia l'apertura che la distanza delle fenditure sono dello stesso ordine di grandezza della lunghezza d'onda delle radiazioni incidenti. Quando due raggi identici di luce monocromatica colpiscono due fenditure adiacenti producono sullo schermo retrostante delle frange illuminate caratteristiche dette **frange di interferenza** (o frange di Fraunhofer), in cui si alternano righe illuminate a zone scure. Ciò perché le fenditure del reticolo diventano centri di emissione secondaria a causa della diffrazione e producono a loro volta delle radiazioni che si possono rinforzare o elidere a causa dell'interferenza a seconda della loro fase reciproca. La riga luminosa più sottile e intensa è al centro dello schermo (frangia di ordine 0); simmetricamente a questa si formano altre righe sempre più larghe e meno luminose, con intensità decrescente ($n = 1$, ecc.):



Dove i raggi secondari si rinforzano si produce la riga illuminata, dove si elidono si ha la colorazione scura dello schermo retrostante. La condizione di rinforzo costruttivo dei raggi secondari prodotti dalle fenditure del reticolo si ha quando viene soddisfatta la **legge di Bragg**, legata alla geometria del reticolo:



$$a = d \cdot \sin\theta \quad \text{per le proprietà del triangolo rettangolo ABC}$$

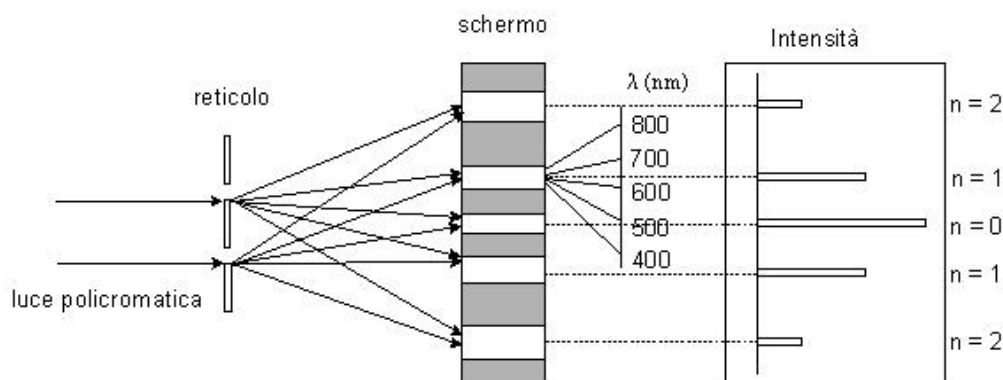
dove a è la differenza di cammino ottico tra due raggi diffratti, d è il passo del reticolo (distanza tra 2 fenditure consecutive) e θ è l'angolo di diffrazione, cioè l'angolo formato da 2 raggi diffratti rispetto alla perpendicolare al reticolo. Se la differenza di cammino ottico è pari ad un numero intero di lunghezze d'onda, allora vi sarà rinforzo, cioè interferenza costruttiva tra i due raggi, che sommeranno le loro intensità luminose; ciò è espresso dalla relazione:

$$d \cdot \sin\theta = n \cdot \lambda \quad \text{legge di Bragg dove } n = 0 \text{ oppure } n > 0 \text{ ed intero}$$

Le radiazioni diffratte che soddisfano questa relazione si rinforzano perché sono in concordanza di fase, le altre si elidono perché non sono in concordanza di fase, cioè hanno una differenza di cammino ottico a che non è pari ad un numero intero di lunghezze d'onda. Come si vede nel disegno precedente, in cui è mostrata una situazione corrispondente ad un angolo di diffrazione che produce rinforzo tra i raggi diffratti, quando R_1 parte dalla fenditura, R_2 ha già percorso un cammino ottico pari a 1λ , R_3 ha già percorso un cammino ottico pari a 2λ , ecc. Tutti questi raggi, corrispondenti ad un determinato angolo di diffrazione θ , si rinforzeranno e produrranno una riga luminosa sullo schermo, cioè una frangia di diffrazione.

Ogni riga luminosa è caratterizzata da una situazione di interferenza positiva che si ha per diversi valori di n (1,2, ecc.), dove n è detto ordine della frangia. Attorno alla frangia principale ($n = 0$) si formano simmetricamente altre frange che hanno progressivamente intensità decrescente e larghezza crescente, cioè sono meno luminose e più larghe; tali frange corrispondono al rinforzo dei raggi diffratti (interferenza costruttiva) nelle direzioni angolari per cui $\sin\theta$ è un multiplo intero di λ . Ogni coppia di frange corrisponde ad un valore diverso di n : la coppia vicina a quella centrale avrà $n = 1$ (frangia di ordine 1), quella successiva avrà $n = 2$ (frangia di ordine 2) e così via. È importante notare che l'energia complessiva della radiazione incidente sul reticolo si ripartisce sulle varie frange, come mostra il diagramma: la massima parte si concentra su quella di ordine 0, mentre decresce progressivamente all'aumentare dell'ordine della frangia.

Reticolo in luce policromatica: la situazione è molto più complessa in quanto, a parità di angolo di diffrazione θ , la condizione di rinforzo è funzione di λ , che in questo caso non è più unica come nel caso precedente. In altre parole i massimi luminosi delle frange di interferenza non coincidono per i vari colori dello spettro ma ogni frangia sarà in realtà un insieme di righe colorate, una per ogni lunghezza d'onda presente nella luce policromatica, che verrà quindi scomposta, cioè resa monocromatica proprio dal reticolo di diffrazione.



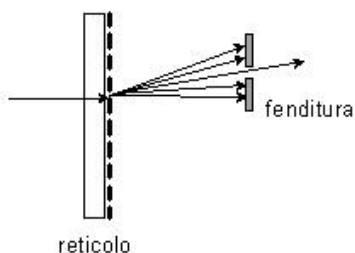
In questo caso, la legge di Bragg viene soddisfatta per angoli di diffrazione θ diversi a seconda della λ , cioè l'angolo di rinforzo è funzione della lunghezza d'onda. Ne consegue che la posizione di rinforzo sullo schermo posto dietro al reticolo non coincide per le varie λ . Ogni banda illuminata è quindi composta da un insieme di righe: è cioè un intero spettro, formato da varie λ . Ciascuna banda illuminata di diffrazione, dovuta all'interferenza costruttiva tra i raggi secondari prodotti dalle fenditure del reticolo, è caratterizzata da un **ordine di spettro**, dove l'ordine di spettro coincide con il coefficiente n intero dell'equazione di Bragg.

La banda centrale non risolta è lo spettro di ordine 0 ($n = 0$) ed è ancora costituita la luce policromatica; a fianco a questa, disposte in modo simmetrico, vi sono gli **spettri** del primo ordine ($n = 1$), del secondo ordine ($n = 2$), ecc. Le righe colorate sono disposte dal violetto (più vicino alla frange centrale) al rosso (più lontano). Da notare che la dispersione $\Delta\theta/\Delta\lambda$ del reticolo è costante per ogni ordine di spettro (al contrario del prisma) e aumenta all'aumentare dell'ordine dello spettro, cioè le singole radiazioni di uno spettro sono sempre più separate al crescere di n .

Tuttavia l'intensità delle radiazioni disperse decresce rapidamente all'aumentare di n cioè all'aumentare dell'ordine dello spettro: è massima per $n = 0$ e quindi diminuisce; quindi in pratica vengono utilizzati negli spettrofotometri gli spettri del 1° e del 2° ordine, perché quelli di ordine superiore si sovrappongono ed hanno poca energia disponibile. La dispersione lineare e costante dei reticoli ha decretato l'abbandono dei prismi nella costruzione degli spettrofotometri.

Tipi di reticolo: dal punto di vista costruttivo, un reticolo può essere realizzato in vari modi, ognuno dei quali comporta un diverso schema ottico di montaggio. I principali tipi di reticolo e le relative caratteristiche sono riportate di seguito:

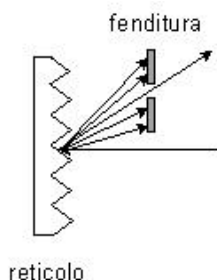
Reticolo piano in trasmissione:



È costituito da una pellicola opaca, depositata su di un supporto rigido trasparente; sulla pellicola vengono tracciate delle incisioni molto sottili e vicine (da 600 a 2000 per mm). La luce policromatica incidente attraversa il sistema in corrispondenza delle incisioni e quindi si producono i fenomeni di diffrazione ed interferenza che sono responsabili della monocromatizzazione della luce emergente dal dispositivo. Una fenditura permette di selezionare una singola lunghezza d'onda.

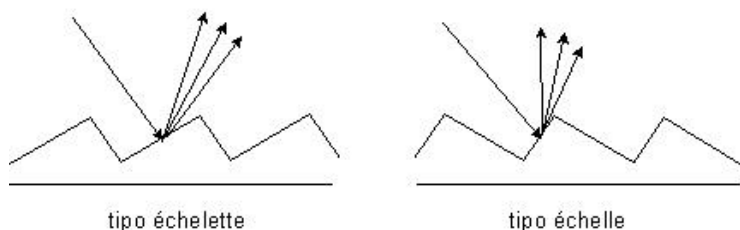
Ruotando il reticolo, è possibile selezionare le diverse lunghezze d'onda in uscita dalla fenditura realizzare la scansione necessaria per la registrazione di uno spettro.

Reticolo piano in riflessione: si ottiene depositando sotto vuoto su di un supporto rigido avente un profilo a dente di sega (per es. vetro) una pellicola opaca di alluminio; in seguito si tracciano una serie di incisioni sulla superficie di alluminio, che perde le sue proprietà riflettenti in corrispondenza delle incisioni, che diventano quindi in grado di provocare il fenomeno della diffrazione.



In questo caso la figura di diffrazione si forma dalla stessa parte della radiazione bianca incidente. La consueta fenditura permette di isolare una singola radiazione. Da notare che a parità di altre condizioni, le dimensioni complessive risultano inferiori. Anche in questo caso, la selezione delle singole lunghezze d'onda può avvenire mediante semplice rotazione del reticolo.

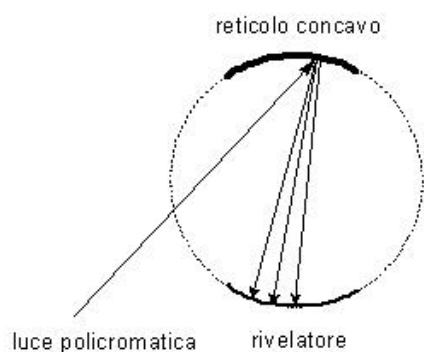
Reticolo a gradinata: è simile al reticolo precedente ma in questo caso il profilo a dente di sega non è simmetrico.



échellette: scaletta, échelle: scala

Vengono ottenuti come quelli piani depositando sotto vuoto una pellicola di alluminio su vetro ed incidendola successivamente. Si può dimostrare che la maggior parte dell'energia raggianti diffratta dal reticolo (circa l'80%) viene concentrata nello spettro di un ordine prestabilito dal costruttore e non sullo spettro di ordine 0, come accade nei normali reticoli. Tuttavia, accanto ad una elevata monocromatizzazione, si ha il problema della sovrapposizione degli spettri, specie scegliendo uno spettro di ordine elevato; accanto al reticolo vi sono quindi dei filtri supplementari che eliminano le radiazioni indesiderate

Reticolo concavo (di Rowland): il reticolo viene tracciato su di una superficie sferica anziché piana; in questo modo il sistema ottenuto abbina le proprietà dispersive dei reticoli a quelle focalizzatrici di una lente e quindi lo schema ottico di montaggio è più semplice.

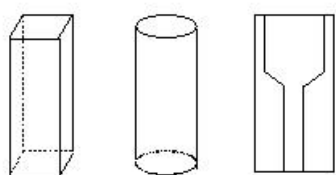


Il cerchio virtuale ha un diametro pari al raggio di curvatura del reticolo, di tipo a riflessione o a gradinata; lo spettro del primo ordine, quello normalmente utilizzato per le applicazioni analitiche, viene focalizzato sul rivelatore.

Questo tipo di montaggio ottico garantisce grande compattezza. Nella zona di focalizzazione si può posizionare una lastra fotografica su cui viene impresso lo spettro (spettrografia), rivelatori di vario genere, oppure il sistema portacampione di uno spettrofotometro.

7.3. Cелlette (cuvette)

Contengono la soluzione in cui è sciolto l'analita ed il "bianco" di riferimento, che serve per eliminare gli assorbimenti della matrice.



Possono avere varie forme (parallelepipedo, cilindro) e vari spessori (normalmente 1 cm, ma anche spessori maggiori, fino a 3-4 cm per soluzioni molto diluite o spessori minori, fino 1-5 mm, per soluzioni molto concentrate).

Per il campo VIS-UV si usano i seguenti materiali: polietilene (celle monouso), vetro (solo per il VIS) e quarzo (anche nell'UV).

Le due celle necessarie in uno spettrofotometro a doppio raggio dovrebbero essere perfettamente identiche; per tale motivo andrebbero sempre usate a coppie: in caso di rottura di una di esse, occorrerebbe sostituire anche l'altra. Per la loro costruzione occorre fare in modo che le due facce interessate dall'attraversamento del raggio analitico siano perfettamente piane, a facce parallele e di identico spessore. E' impossibile realizzare tali condizioni lavorando un unico blocco di vetro o cristallo di quarzo; perciò si producono 5 facce che vengono in seguito assemblate mediante incollatura.

Le celle (di vetro o di quarzo) devono essere sottoposte ad accurata manutenzione: devono essere sempre perfettamente pulite e trasparenti, per cui è bene evitare di toccare le facce non smerigliate con le dita, in quanto si possono lasciare tracce di grasso. Se necessario si immergono una notte in HNO₃ diluito 1:1 oppure in H₂SO₄ diluito con qualche cristallo di K₂Cr₂O₇; usualmente è sufficiente per la loro pulizia acqua distillata, acetone o etanolo.

7.4. Rivelatori

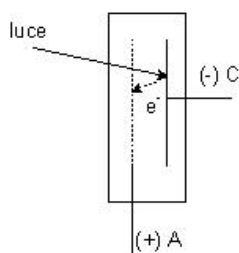
Hanno lo scopo di convertire la radiazione luminosa che proviene dalle celle in un segnale elettrico da inviare all'indicatore o al registratore. Vi sono due tipi di rivelatori:

Fotocella a vuoto (fototubo): sfrutta l'effetto fotoelettrico, consistente nell'emissione di elettroni da parte di superfici metalliche colpite da fotoni, che quindi convertono l'energia luminosa in energia elettrica.

Si utilizzano metalli con bassi potenziali di ionizzazione (energia necessaria per strappare un elettrone). Per i metalli di transizione il potenziale di ionizzazione è elevato e cade nel campo del UV o addirittura dei raggi X; i metalli alcalini e alcune loro leghe, al contrario, hanno un potenziale di ionizzazione che cade nel campo del VIS. Un fototubo è costituito da un tubo a vuoto di vetro (con una finestrina di quarzo per consentire il passaggio sia delle radiazioni VIS sia delle radiazioni UV), contenente un catodo ricoperto di una sostanza fotosensibile (di

solito una lega Cs-Sb) e per tale motivo detto anche **fotocatodo** e da un anodo a griglia, che permette il passaggio delle radiazioni luminose.

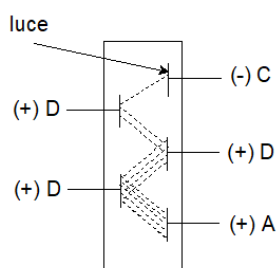
Tra i due elettrodi, una sorgente di corrente continua mantiene un'opportuna d.d.p. (circa 90 V), ma in questa situazione normalmente non passa corrente e quindi il segnale prodotto, in assenza di luce, è nullo.



Quando arriva una radiazione luminosa di adatta energia, ionizza il catodo fotosensibile (fotocatodo) e gli elettroni strappati vengono attirati all'anodo, chiudendo il circuito facendo passare corrente. Ogni fotone di luce strappa un elettrone dal fotocatodo per cui il segnale prodotto è direttamente proporzionale alla quantità di fotoni incidenti.

Il segnale così prodotto viene opportunamente amplificato e quindi inviato all'indicatore o al registratore. Il fototubo ha una buona linearità nelle risposta; tuttavia la sensibilità cromatica non è costante in tutto il campo spettrale ma è massima intorno a 450 nm, cioè nella regione del blu VIS; tuttavia si estende da circa 200 nm a circa 800 nm, coprendo l'intero campo UV vicino-VIS.

Fotomoltiplicatore: sfrutta sempre l'effetto fotoelettrico ma è in grado di amplificare il segnale prodotto, riuscendo quindi ad essere sensibile ad intensità luminose molto più basse rispetto ai comuni fototubi.



In un fototubo, la luce che colpisce il fotocatodo ionizza il materiale del catodo e produce una corrente dell'ordine di 50 μA per lumen mediante emissione primaria; si tratta di un valore molto basso di difficile manipolazione. Nei fotomoltiplicatori, vi sono diverse coppie di elettrodi, dette dinodi D, tutti ricoperti di materiale fotosensibile, sottoposti a tensioni positive progressivamente crescenti: in questo modo ogni elettrone espulso da un dinodo viene accelerato dalla crescente tensione elettrica e produce una emissione secondaria di più elettroni sul dinodo successivo, fino all'anodo A.

Aumentando il numero dei dinodi e sottoponendoli a tensioni sempre crescenti, si ha la produzione di una "cascata" di elettroni secondari, con amplificazione del segnale anche dell'ordine di 10^6 volte. Il guadagno (rapporto di amplificazione) può arrivare a 10^9 elettroni prodotti per 1 fotone incidente: in questo modo il segnale prodotto può arrivare a qualche A per lumen. I fotomoltiplicatori sono costosi e quindi sono riservati ad apparecchi di maggiori prestazioni, in grado di rilevare intensità luminose molto basse.

8. Apparecchi monoraggio

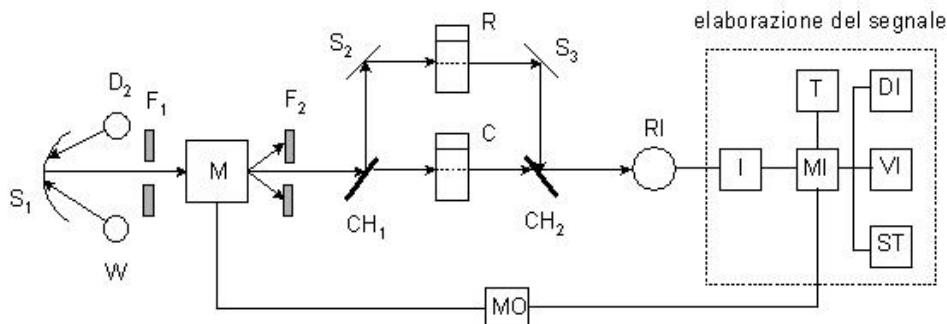
Lo schema ottico di questi apparecchi è già stato presentato in precedenza ed è appunto servito per illustrare i componenti delle apparecchiature che sfruttano il fenomeno dell'assorbimento della luce secondo la legge di Lambert-Beer. All'interno di questa categoria vi sono i colorimetri, che utilizzano esclusivamente filtri colorati in quanto lavorano nel VIS; poiché si tratta di monocromatori a larga banda, la banda passante utilizzata nell'analisi è di 30-60 nm, tale da provocare deviazioni non trascurabili dalla legge di Lambert-Beer. Si utilizzano per analisi quantitativa e la scelta della λ analitica viene fatta manualmente, in quanto non è possibile la scansione di un intero spettro. Di solito non sono molto costosi e non danno prestazioni eccellenti ma sono adatti per analisi di routine e di controllo di processo.

Gli spettrofotometri monoraggio, oggi pressoché abbandonati, utilizzano monocromatori a prisma o a reticolo e lavorano nel campo UV-VIS; anche in questo caso la selezione della λ è manuale ma è comunque possibile registrare un intero spettro per punti, cioè manualmente, misurando per ogni λ l'assorbanza della soluzione analitica, effettuando prima l'azzeramento per ogni punto col bianco, riportando infine in diagramma i valori trovati. Poiché la larghezza della banda passante prodotta da questi apparecchi è sensibilmente più piccola di quella dei colorimetri, le determinazioni effettuate risultano più precise.

9. Apparecchi a doppio raggio

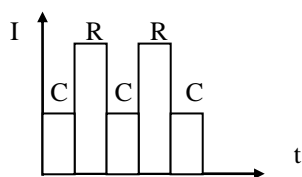
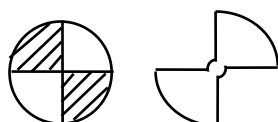
Sono gli apparecchi più diffusi; consentono di confrontare continuamente il segnale prodotto dal campione con quello prodotto dal riferimento (il cosiddetto "bianco", avente la stessa composizione del campione a meno dell'analita), eliminando in tal modo l'effetto delle interferenze dovute alla matrice.

Il sistema più usato è quello a **doppio raggio nel tempo**, schematizzato di seguito:



W: lampada al W	D ₂ : lampada al D ₂	F ₁ : fenditura di ingresso	M: monocromatore
F ₂ : fenditura di uscita	S ₁ : specchio concavo	S ₂ , S ₃ : specchi piani	CH ₁ , CH ₂ : chopper
R: riferimento	C: campione	RI: rivelatore	I: interfaccia
MI: microprocessore	T: tastiera	DI: display	VI: video
ST: stampante	MO: motore		

Le due lampade funzionano alternativamente; la radiazione policromatica prodotta viene inviata tramite lo specchio S₁ al monocromatore M attraverso la fenditura di ingresso F₁; le radiazioni monocromatiche ottenute vengono selezionate dalla fenditura di uscita F₂ ed inviate ad un dispositivo di sdoppiamento del raggio detto chopper;

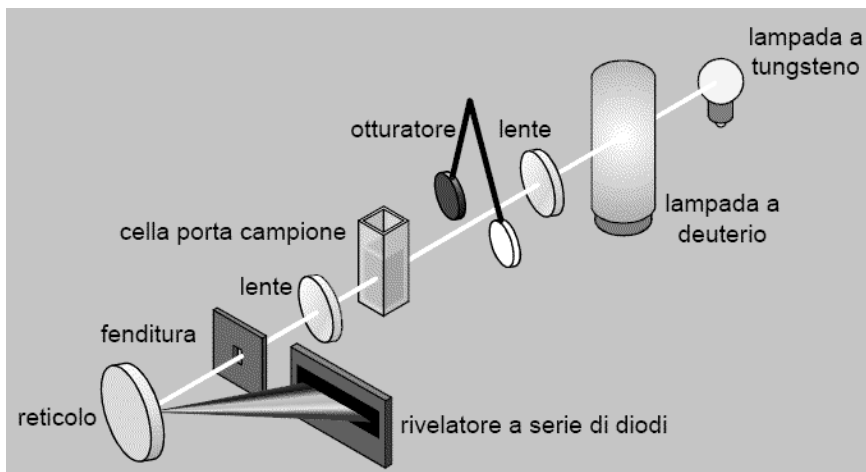


il chopper è costituito da un disco rotante (CH₁) con due quarti riflettenti e due trasmettenti, oppure con due settori pieni e due settori vuoti, come mostrato a fianco. Il chopper ruota a 50-100 giri al secondo e sdoppia il raggio in arrivo dal monocromatore, inviandolo alternativamente al riferimento (R) ed al campione (C); i segnali che emergono dalle due celle vengono ricomposti da un altro chopper (CH₂) e quindi inviati al rivelatore RI. Qui si producono due tipi di impulso alternati: quello ad intensità maggiore proveniente dal riferimento, quello di intensità inferiore proveniente dal campione. I due segnali vengono rapportati istante per istante, facendo una taratura sul riferimento, eliminando quindi l'effetto della matrice del campione.

Il segnale prodotto dal rivelatore viene inviato al sistema di elaborazione del segnale e presentazione dei risultati, composto da un microprocessore (MI), da una tastiera (T) su cui è possibile impostare i valori di lavoro dell'apparecchio, da un display alfanumerico (DI) che visualizza i risultati ed eventualmente da un video (VI), collegato in questo caso ad un vero e proprio computer dedicato. Il microprocessore sottrae istante per istante i due segnali (facendo in pratica una taratura continua sul riferimento), riuscendo così a sottrarre nella misura l'effetto della matrice, contenuta nella cella del riferimento, grazie al confronto campione-riferimento. Ciò consente di registrare un intero spettro di assorbimento nell'UV-VIS (le lampade vengono selezionate automaticamente durante la scansione) in modo automatico, mentre nell'apparecchio monoraggio era necessaria la taratura per ogni λ e quindi lo spettro si poteva rilevare per punti; infatti se nei due scomparti sono presenti entrambe le cellette (contenenti rispettivamente C ed R), la rapida alternanza dei due segnali consente la taratura-misura in tempi brevissimi (circa 6-7 ms) in cui il monocromatore, che si muove grazie ad un particolare motore (MO) non ha ancora avuto il tempo di selezionare un'altra lunghezza d'onda. Inoltre, poiché il chopper ruota a 50-100 giri/secondo, mentre la corrente alternata di alimentazione ha una frequenza di 60 Hz, il segnale modulato prodotto dal rivelatore permette di eliminare anche eventuali disturbi della linea elettrica di alimentazione.

10. Apparecchi a serie di diodi

Recentemente gli apparecchi a doppio raggio tendono ad essere sostituiti da apparecchi con rivelatore a serie (o schiera) di diodi: si tratta di apparecchi monoraggio più compatti e meno costosi, senza parti in movimento, che permettono di registrare in modo pressoché istantaneo (circa 1/10 di secondo) un intero spettro. Il rivelatore a schiera di diodi è detto DAD (Diode Array Detector).



La luce policromatica prodotta dalla sorgente (lampada a W per il VIS, lampada a D₂ per l'UV) dopo aver attraversato il campione incide su di un reticolo fisso in riflessione che disperde la luce; le singole radiazioni monocromatiche vanno su un microchip sul quale sono presenti diverse centinaia di fotodiodi. I **fotodiodi** sono rivelatori allo stato solido microscopici (qualche nm) incisi con tecniche particolari sul microchip: quando i fotoni li colpiscono generano una microcorrente elettrica che, dopo amplificazione, produce un segnale elettrico con il quale si costruisce lo spettro del campione. Poiché ogni singola radiazione monocromatica eccita un singolo fotodiode è possibile registrare istantaneamente lo spettro del campione oppure effettuare singole misure di assorbimento a determinate lunghezze d'onda.

La risoluzione di questi apparecchi è limitata a circa 1-5 nm (più che sufficiente comunque per la maggior parte delle applicazioni) a causa del numero di fotodiodi presenti nel rivelatore ma, in compenso, si hanno apparecchi robusti e di ingombro limitato, anche portatili, di costo molto inferiore ad un tradizionale spettrofotometro, che non richiedono particolare manutenzione.

11. Analisi qualitativa in UV-VIS

L'analisi qualitativa viene fatta confrontando la forma dell'intero spettro con spettri di campioni noti, ovvero individuando la posizione dei massimi di assorbimento caratteristici; questo confronto può essere fatto anche in modo automatico disponendo di un computer dedicato e collegato allo spettrofotometro. Di solito gli spettri UV-VIS non sono molto adatti all'analisi qualitativa perché contengono poche bande e quindi sono scarsi di dettagli (sono molto più usati gli spettri IR). Generalmente questi spettri possono essere utilizzati per escludere la presenza di particolari strutture atomiche, come doppi legami coniugati ed anelli aromatici (caratterizzati da intense bande di assorbimento $\pi \rightarrow \pi^*$); oppure trovano applicazione per lo studio di sostituenti inseriti in particolari cromofori (come il gruppo C=O), in grado di provocare spostamenti caratteristici delle bande di assorbimento.

12. Analisi quantitativa in UV-VIS

L'analisi quantitativa in UV-VIS si basa sulla legge di Lambert-Beer, che esprime una relazione di diretta proporzionalità tra l'assorbimento A e la concentrazione C di un analita in soluzione. L'analisi quantitativa prevede la costruzione preliminare di una retta di lavoro che viene in seguito utilizzata per la determinazione della concentrazione incognita del campione; entrambe le determinazioni vengono effettuate ad una particolare λ , detta λ analitica, scelta in base ad opportuni criteri. Naturalmente l'analita deve assorbire in UV-VIS: deve quindi essere un **cromoforo**, oppure deve poter essere trasformato in un cromoforo; per fare ciò la procedura analitica deve prevedere, generalmente, i seguenti passaggi:

- eliminazione o "schermatura" delle interferenze, mediante complessanti o precipitanti
- aggiunta di tamponi per arrivare a pH ottimali per la stabilità del cromoforo
- se necessario, stabilizzazione dell'analita con opportuni reagenti
- standardizzazione dei tempi di lettura delle assorbimenti in quanto la formazione del cromoforo ha spesso una cinetica lenta e richiede tempi opportuni per completarsi; inoltre il cromoforo decade più o meno velocemente.

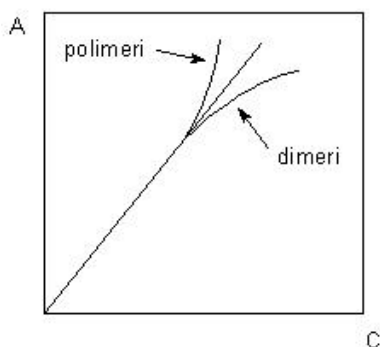
Tutte le metodiche analitiche in UV-VIS richiedono solitamente questi passaggi in modo più o meno completo: le analisi spettrofotometriche devono quindi essere rigorosamente standardizzate per fornire risultati soddisfacenti.

12.1. Deviazioni dalla legge di Lambert-Beer

La legge di Lambert-Beer è riferita ad una radiazione rigorosamente monocromatica e può presentare vari tipi di deviazione dall'idealità. I fattori di deviazione possono essere:

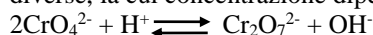
- fattori fisici e chimici:

- *indice di rifrazione della soluzione*: varia a seconda della concentrazione della soluzione analizzata; se questa è molto concentrata varia il coefficiente a (o ϵ) anche per lo stesso analita alla stessa λ analitica, per cui durante la costruzione della retta di lavoro si commette un errore, che produce una deviazione della stessa retta. Pertanto si lavora con soluzioni diluite (10^{-2} - 10^{-7} mol/l)



- *associazioni molecolari*: alcune molecole, specie a concentrazioni elevate, possono formare dimeri o polimeri, o anche aggregati col solvente; di conseguenza si osservano deviazioni positive (dimeri) o negative (polimeri) dalla legge di Lambert-Beer, in quanto questi aggregati hanno dei coefficienti di assorbimento a diversi dall'analita puro e quindi provocano deviazioni dall'andamento ideale.

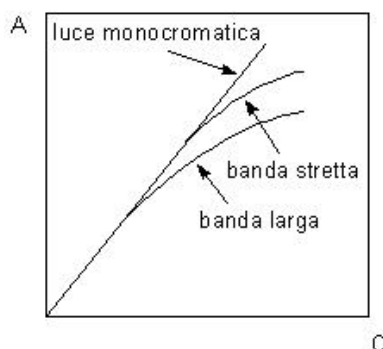
- *equilibri influenzati dal pH*: si manifestano quando l'analita può essere presente in soluzione con due forme diverse, la cui concentrazione dipende dal pH. Tipico esempio è il seguente equilibrio chimico:



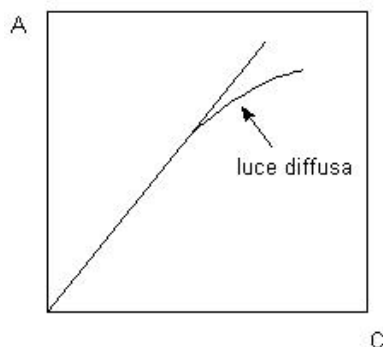
La forma CrO_4^{2-} è gialla ed assorbe intorno a 375 nm mentre la forma $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$ è rosso-arancio ed assorbe intorno a 350 nm e 450 nm; supponiamo di misurare l'assorbimento della soluzione a pH = 1, a cui prevale nettamente il bicromato e quindi di diluire la soluzione 1 : 10 ripetendo la misura; anche l'assorbimento dovrebbe essersi ridotto ad 1/10 ma la diluizione ha aumentato il pH ed ha quindi spostato l'equilibrio verso la forma CrO_4^{2-} : di conseguenza l'assorbimento sarà diminuito maggiormente in quanto una parte di bicromato si sarà trasformata in cromato, che assorbe ad una diversa λ e di conseguenza si avrà una deviazione negativa dall'idealità. In questo caso, nella preparazione degli standard che si ottengono di solito per diluizione di una soluzione concentrata, occorre aggiungere un tampone che mantenga costante il pH

- *fattori fisici vari*, come la temperatura, la polarità del solvente, fenomeni indotti di fluorescenza da parte delle radiazioni UV, ecc.

- fattori strumentali:



- *ampiezza della banda passante (SBW)*: nessun monocromatore produce una luce perfettamente monocromatica, ma si ha sempre un intervallo di λ , molto ampio nel caso di un colorimetro a filtro (50-60 nm), molto stretto in uno spettrofotometro (di solito 1 nm). Generalmente conviene operare con una SBW minima, in quanto di solito si sceglie come λ analitica quella corrispondente al massimo di assorbimento più intenso: un aumento della SBW provoca una diminuzione del coefficiente a complessivo (e quindi della sensibilità) perché il valore totale viene mediato su tutto l'intervallo delle λ e se il picco è stretto, il valore di a diminuisce nettamente appena ci si allontana dalla λ analitica.



- *diffusione della luce*: è dovuta alle particelle di polvere che si depositano sulle parti ottiche dello strumento; la luce diffusa da queste particelle può incidere in modo non trascurabile sul risultato dell'analisi perché si somma alla luce monocromatica uscente dalla fenditura del monocromatore, attraversa il campione e ne altera il valore di assorbimento, soprattutto se è molto concentrato. La diffusione della luce può influenzare in modo significativo l'analisi solo alle estremità dello spettro accessibile allo spettrofotometro, dove i monocromatori hanno potere risolvente più basso.

- **fattori operativi**: sono legati all'abilità dell'operatore ed alle condizioni di lavoro; si possono citare:

- errore nelle pesate e nella preparazione delle soluzioni
- perdita di sensibilità degli strumenti di misura
- pulizia inadeguata delle cellette
- errore nella scelta della λ analitica
- presenza di sostanze interferenti nel campione.

12.2. Retta di lavoro

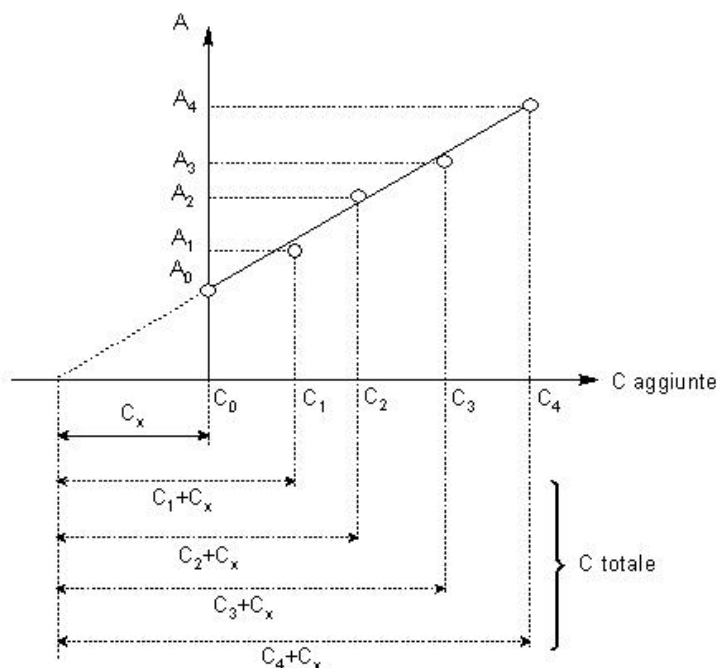
In assenza di interferenze o potendo riprodurre esattamente la matrice del campione, il metodo più semplice per l'analisi quantitativa è quello della retta di lavoro (o di calibrazione o di taratura). Tale retta, poiché si lavora in un intervallo di concentrazione dove è seguita la legge di Lambert-Beer, viene costruita mediante standard a concentrazione nota, ottenuti sciogliendo e portando a volume quantità conosciute di analita puro, usando come bianco di riferimento il solvente e tutte quelle sostanze che sono servite a produrre la forma assorbente dell'analita, assicurandosi che la matrice degli standard sia molto simile a quella del campione. Ogni retta ha un suo limite di linearità, cioè la concentrazione massima da non superare per non avere deviazioni dalla legge di Lambert-Beer. La retta viene poi ottimizzata mediante regressione lineare, per es. col metodo dei minimi quadrati. Questo metodo è anche detto metodo dello **standard esterno SE**.

In presenza di interferenze, cioè di sostanze che assorbono alla stessa λ analitica utilizzata nella determinazione quantitativa dell'analita, si può egualmente utilizzare il metodo della retta di lavoro a condizione di disporre di campioni a concentrazione nota dell'analita. Per esempio volendo determinare il contenuto di Mn in un acciaio, mediante analisi nel VIS del KMnO_4 prodotto per ossidazione del Mn, si possono preparare gli standard partendo da acciai a titolo noto di Mn: la matrice presente è sempre la stessa e quindi potrà essere eliminata per confronto con un bianco prodotto sempre dallo stesso acciaio ma senza l'ossidazione del Mn a permanganato, seguendo cioè il metodo precedentemente descritto della compensazione delle interferenze.

Il metodo delle retta di lavoro ha validità generale; ha il vantaggio di essere relativamente semplice e quello di produrre una retta che mantiene la sua validità per molti giorni (anche se periodicamente bisogna controllarla a causa di variazioni di risposta dello strumento).

12.3. Metodo delle aggiunte multiple

Quando vi sono molte interferenze e non è possibile eliminare l'effetto della matrice riproducendola negli standard, si può ricorrere al metodo delle aggiunte multiple.



Si produce la soluzione analitica, a concentrazione incognita, mediante trattamento opportuno del campione. Si produce una soluzione standard a concentrazione nota, che deve essere 10-100 volte più concentrata della soluzione analitica, partendo dall'analita puro più semplice acqua distillata. Quindi in altrettanti matracci si aggiungono quantità note e crescenti di soluzione standard concentrata portando infine a volume con la stessa

soluzione analitica a concentrazione incognita (e non con acqua!). In questo modo nei matracci vi sarà un'aliquota di soluzione a concentrazione nota (C_1 , C_2 , ecc.) ed una a concentrazione incognita (C_x) uguale in tutti; la concentrazione totale per ognuno sarà: (C_1+C_x) , (C_2+C_x) , ecc.

In questo modo si ha la certezza di avere la stessa matrice sia negli standard che nella soluzione analitica poiché si è portato a volume con la soluzione analitica ed il volume aggiunto di soluzione standard, essendo molto più concentrata, è trascurabile e quindi tale da non alterare la matrice iniziale, ma sufficiente da aumentare il segnale prodotto dallo spettrofotometro.

Per ogni campione così prodotto e per la soluzione analitica iniziale (che ha $C_0 = 0$ cioè non è stata fatta nessuna aggiunta) si misura l'assorbanza allo spettrofotometro, riportando i dati ottenuti nel diagramma seguente (assorbanza, C aggiunte), dove l'origine dell'asse è riferita alla concentrazione C_0 , tracciando quindi la retta di taratura col metodo dei minimi quadrati.

Ovviamente, la retta non partirà dall'origine, in quanto la concentrazione $C_0 = 0$ (si tratta della concentrazione aggiunta e non quella effettiva) corrisponde in realtà alla soluzione analitica priva di aggiunte e quindi con concentrazione C_x .

Estrapolando la retta di taratura ottenuta fino all'intersezione con l'asse orizzontale si potrà facilmente individuare la concentrazione incognita, come mostrato nel diagramma precedente. Come si vede dal diagramma, il tratto posto tra l'origine degli assi e l'intersezione con la retta estrapolata corrisponde alla concentrazione incognita C_x . Utilizzando questa tecnica è possibile analizzare campioni complessi con una matrice difficilmente riproducibile negli standard, che produrrebbero risultati imprecisi utilizzando il metodo della retta di lavoro.

13. Applicazioni spettrofotometriche in UV-VIS

Vengono riassunte alcune importanti applicazioni spettrofotometriche nel campo dell'UV-VIS.

Le acque: determinazione dei seguenti elementi presenti nell'acqua:

- Fe col metodo all'o-fenantrolina
- NH_3 col metodo di Nessler
- NO_3^- col metodo al salicilato sodico
- NO_2^- col metodo di Gries
- PO_4^{3-} col metodo al blu di molibdeno
- Mn col metodo al persolfato

I fertilizzanti: determinazione del P come titolo in P_2O_5 col metodo al blu di molibdeno

Gli alimenti: determinazione dei seguenti elementi:

- Ni nei grassi idrogenati col metodo alla dimetilglossima
- Fe nel cioccolato (e nei farmaci) col metodo all'o-fenantrolina
- analisi spettrofotometrica in UV degli oli alimentari

Gli acciai: determinazione dei seguenti elementi:

- Mo col metodo al blu di molibdeno
- Cr e Mn col metodo dell'analisi multicomponenti