

I fondamenti della spettrofotometria UV-Vis

Un manuale introduttivo





Contenuti

1	Principi fondamentali delle misure UV-Vis	3
1.1	Lo spettro elettromagnetico	3
1.2	Lunghezza d'onda e frequenza	3
1.3	Spettri UV-visibile	3
1.4	Trasmittanza e assorbanza	4
1.5	Riepilogo	4
2	Come funziona uno spettrofotometro UV-Vis moderno?	5
2.1	Design dell'ottica	7
3	Scelta dei parametri ottimali per le misure UV-Vis	13
3.1	Selezione della cella ottica	13
3.2	Termostatazione dei campioni	16
3.3	Agitazione del campione	16
3.4	Misure a basse temperature	16
3.5	Trasparenza dei solventi	17
3.6	Larghezza di banda spettrale ottimale	18
3.7	Luce diffusa	19
3.8	La linearità di uno strumento UV-Vis	19
3.9	Altre informazioni utili	20
3.10	Lunghezza d'onda o centimetri inversi	20
4	Panoramica delle applicazioni tipiche della tecnologia UV-Vis	21
4.1	Identificazione: spettri e struttura	21
4.2	Conferma dell'identità	22
4.3	Quantificazione di una molecola	22
4.4	Cinetica	24
4.5	Misura del colore	26
4.6	Variazioni strutturali dei composti	28
4.7	Temperatura di fusione di proteine e acidi nucleici	28
4.8	Analisi a multicomponente	30
4.9	Requisiti software	32
5	Glossario	34

1. Principi fondamentali delle misure UV-Vis

1.1 Lo spettro elettromagnetico

La radiazione ultravioletta (UV) e la radiazione visibile costituiscono una piccola parte dello spettro elettromagnetico, che include altre forme di radiazione, come quella radio, infrarossa (IR), cosmica e i raggi X.

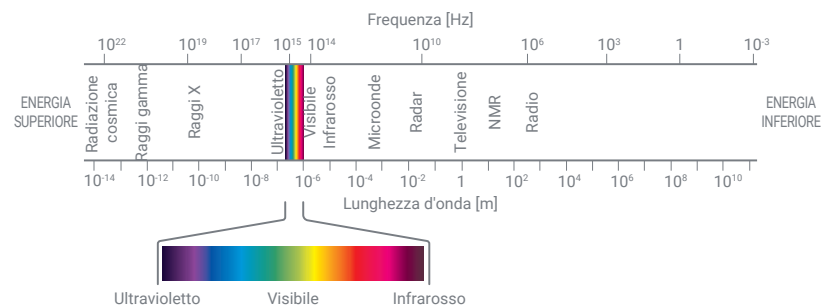


Figura 1. Lo spettro elettromagnetico con la sezione della luce visibile ingrandita.

L'energia associata alla radiazione elettromagnetica è definita come:

$$E = h\nu$$

dove E è l'energia (in joule), h è la costante di Planck ($6,62 \times 10^{-34}$ J) e ν è la frequenza (in secondi).

Grazie alla spettroscopia è possibile studiare come la materia interagisce con o emette radiazioni elettromagnetiche. Esistono diversi tipi di spettroscopia, a seconda dell'intervallo di lunghezze d'onda che viene misurato. La spettroscopia UV-Vis utilizza le regioni UV e visibile dello spettro elettromagnetico. La spettroscopia a infrarossi utilizza la porzione infrarossa dello spettro a energia più bassa.

1.2 Lunghezza d'onda e frequenza

La radiazione elettromagnetica può essere considerata una combinazione di campi elettrici e magnetici che viaggiano nello spazio con moto ondulatorio. Dal momento che si comporta come un'onda, la radiazione può essere classificata in termini di lunghezza d'onda o frequenza, correlate tra loro dalla seguente equazione:

$$\nu = c/\lambda$$

dove ν è la frequenza (in 1/secondi), c è la velocità della luce (3×10^8 ms⁻¹) e λ è la lunghezza d'onda (in metri).

Nella spettroscopia UV-Vis, la lunghezza d'onda di solito viene espressa in nanometri (1 nm = 10^{-9} m). Dalle equazioni si deduce che una radiazione

a lunghezza d'onda più corta possiede un'energia superiore; nel caso della spettroscopia UV-Vis, la luce UV a bassa (corta) lunghezza d'onda possiede la massima energia. A volte, questa energia può essere sufficiente per causare reazioni fotochimiche indesiderate quando si misurano campioni fotosensibili.

1.3 Spettri UV-visibile

Quando la radiazione interagisce con la materia, si possono verificare vari processi, tra cui riflessione, dispersione, assorbanza, fluorescenza/fosforescenza (assorbimento e riemissione) e reazioni fotochimiche (assorbanza e rottura di legami). Tipicamente, quando si analizzano campioni per determinare lo spettro UV-visibile, si misura l'assorbanza.

Essendo la luce una forma di energia, l'assorbimento di luce da parte della materia causa un aumento del contenuto energetico delle molecole (o atomi) della materia stessa. L'energia potenziale totale di una molecola è rappresentata dalla somma di energia elettronica, vibrazionale e rotazionale:

$$E_{\text{totale}} = E_{\text{elettronica}} + E_{\text{vibrazionale}} + E_{\text{rotazionale}}$$

La quantità di energia posseduta da una molecola in ciascuna forma non appartiene a un continuum ma a una serie di livelli o stati discreti. Le differenze in energia tra i differenti stati possono essere descritte da:

$$E_{\text{elettronica}} > E_{\text{vibrazionale}} > E_{\text{rotazionale}}$$

In certe molecole e atomi, i fotoni incidenti UV e di luce visibile possiedono sufficiente energia per causare transizioni tra i vari livelli di energia elettronica. La lunghezza d'onda della luce assorbita possiede l'energia necessaria per spostare un elettrone da un livello energetico inferiore a uno superiore. In Figura 2 è mostrato un esempio di transizioni elettroniche nella formaldeide e le lunghezze d'onda della luce che le causano.

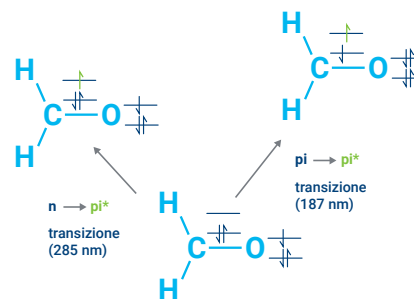


Figura 2. Transizioni elettroniche nella formaldeide. La luce UV a 187 nm causa l'eccitazione di un elettrone nel legame C-O e la luce a lunghezza d'onda di 285 nm causa l'eccitazione e il trasferimento di un elettrone dall'atomo di ossigeno al legame C-O.

Queste transizioni risultano in bande di assorbanza estremamente strette a lunghezze d'onda fortemente caratterizzanti la differenza tra i livelli energetici delle specie assorbenti. Ciò vale anche per gli atomi, come mostrato in Figura 3.

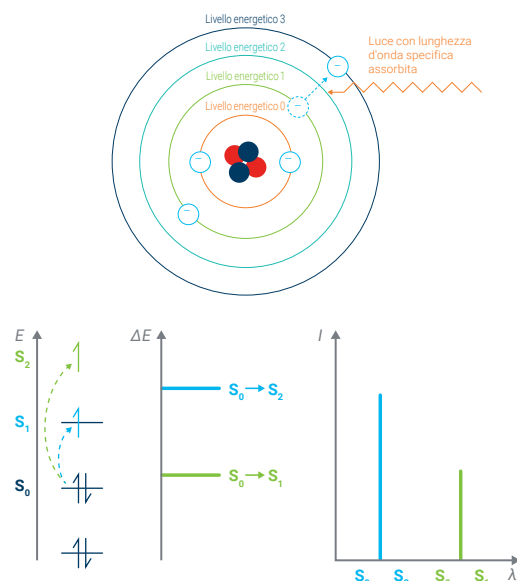


Figura 3. La luce incidente a una specifica lunghezza d'onda causa l'eccitazione degli elettroni in un atomo. Il tipo di atomo o ione (ossia di quale elemento si tratta) e i livelli energetici in cui si muove l'elettrone determinano la lunghezza d'onda della luce che è assorbita. Le transizioni possono avvenire tra più di un livello energetico, con più energia, ovvero a lunghezze d'onda di luce inferiori, per riuscire ad allontanare ulteriormente l'elettrone dal nucleo.

Tuttavia, per le molecole, i livelli di energia vibrazionale e rotazionale sono sovrapposti ai livelli di energia elettronica. Dal momento che possono verificarsi numerose transizioni con energie diverse, le bande risultano più ampie (vedere Figura 4). Nelle soluzioni tale ampliamento è ancora più grande a causa delle interazioni solvente-soluto.

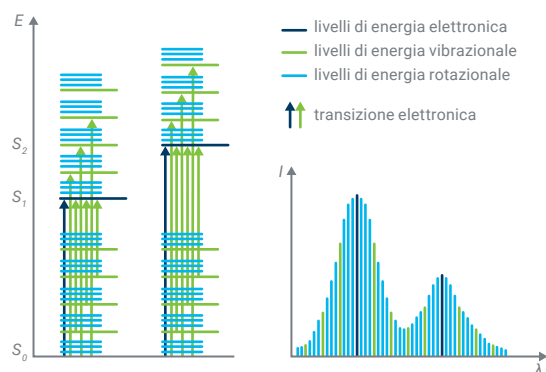


Figura 4. Transizioni elettroniche e spettri UV-visibile nelle molecole (I è l'intensità e λ la lunghezza d'onda).

1.4 Trasmittanza e assorbanza

Quando la luce passa attraverso o viene riflessa da un campione, la quantità di luce assorbita è data dalla differenza tra la radiazione incidente (I_0) e la radiazione trasmessa (I). La quantità di luce assorbita è espressa come assorbanza. La trasmittanza, ossia la luce che passa attraverso un campione, di solito è espressa come frazione di 1 o come percentuale e viene definita:

$$T = I / I_0 \text{ o } \%T = I / I_0 \times 100$$

L'assorbanza è definita:

$$A = -\log T$$

Per la maggior parte delle applicazioni, vengono utilizzati i valori di assorbanza, in quanto la relazione tra assorbanza e concentrazione, così come tra assorbanza e lunghezza del percorso, normalmente è lineare (secondo la Legge di Beer-Lambert, descritta nella sezione 1.9).

1.5 Riepilogo

- UV e luce visibile fanno parte dello spettro elettromagnetico.
- Nella spettroscopia UV-Vis la lunghezza d'onda è espressa in nanometri (nm).
- La luce può venire riflessa, dispersa, trasmessa o assorbita dalla materia e può causare reazioni fotochimiche.
- L'energia della luce incidente causa la transizione di elettroni a livelli energetici differenti. Le transizioni elettroniche avvengono anche tra livelli di energia vibrazionale e rotazionale delle molecole.
- L'assorbanza della luce è usata nella maggior parte delle applicazioni di spettroscopia UV-Vis. È definita come $A = -\log T$, dove T è la trasmittanza.

2. Come funziona uno spettrofotometro UV-Vis moderno?

Gli spettrofotometri ultravioletto-visibile (UV-Vis) utilizzano una sorgente luminosa per illuminare un campione con la luce nell'intervallo di lunghezze d'onda da UV a visibile (tipicamente da 190 a 900 nm). Gli strumenti misurano quindi la luce assorbita, trasmessa o riflessa dal campione a ogni lunghezza d'onda. Alcuni spettrofotometri funzionano a un intervallo di lunghezze d'onda che si estende nella regione del vicino infrarosso (NIR) (da 800 a 3.200 nm).

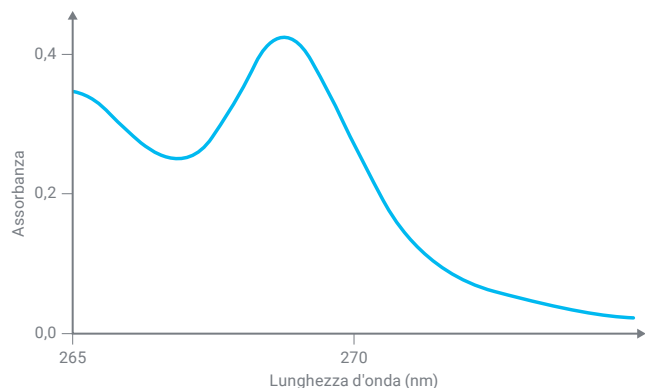


Figura 5. Spettro di assorbanza UV che mostra un picco di assorbanza a circa 269 nm.

Una volta ottenuto lo spettro, simile a quello mostrato in Figura 5, è possibile determinare le proprietà chimiche o fisiche del campione.

In generale, è possibile:

- Identificare le molecole in un campione solido o in soluzione.
- Determinare la concentrazione di una particolare molecola in soluzione.
- Caratterizzare l'assorbanza o la trasmittanza attraverso un liquido o un solido, lungo un intervallo di lunghezze d'onda.
- Caratterizzare le proprietà di riflettanza di una superficie o misurare il colore di un materiale.
- Studiare reazioni chimiche o processi biologici.

È possibile eseguire vari tipi di misure abbinando allo spettrofotometro UV-Vis vari tipi di accessori e supporti per campioni. Esistono accessori differenti per varie funzioni di misura e diversi tipi di campione, per es. solidi piuttosto che liquidi, oltre che per varie condizioni di misura (Figure 6 e 7).



Figura 6. Una sonda a fibra ottica può essere montata come accessorio su uno spettrofotometro UV-Vis per misurare campioni in soluzione in diversi tipi di contenitori.

La spettrofotometria UV-Vis è una tecnica versatile che viene utilizzata da quasi un secolo in una vasta gamma di settori. Gli spettrofotometri UV-Vis sono comunemente usati nelle analisi/ricerca dei materiali, chimica/petrochimica e nei laboratori biotecnologici/farmaceutici.

Figura 7. Un campione solido, come questa cella solare fotovoltaica policristallina, può essere misurato usando uno spettrofotometro UV-Vis.



2.1 Design dell'ottica

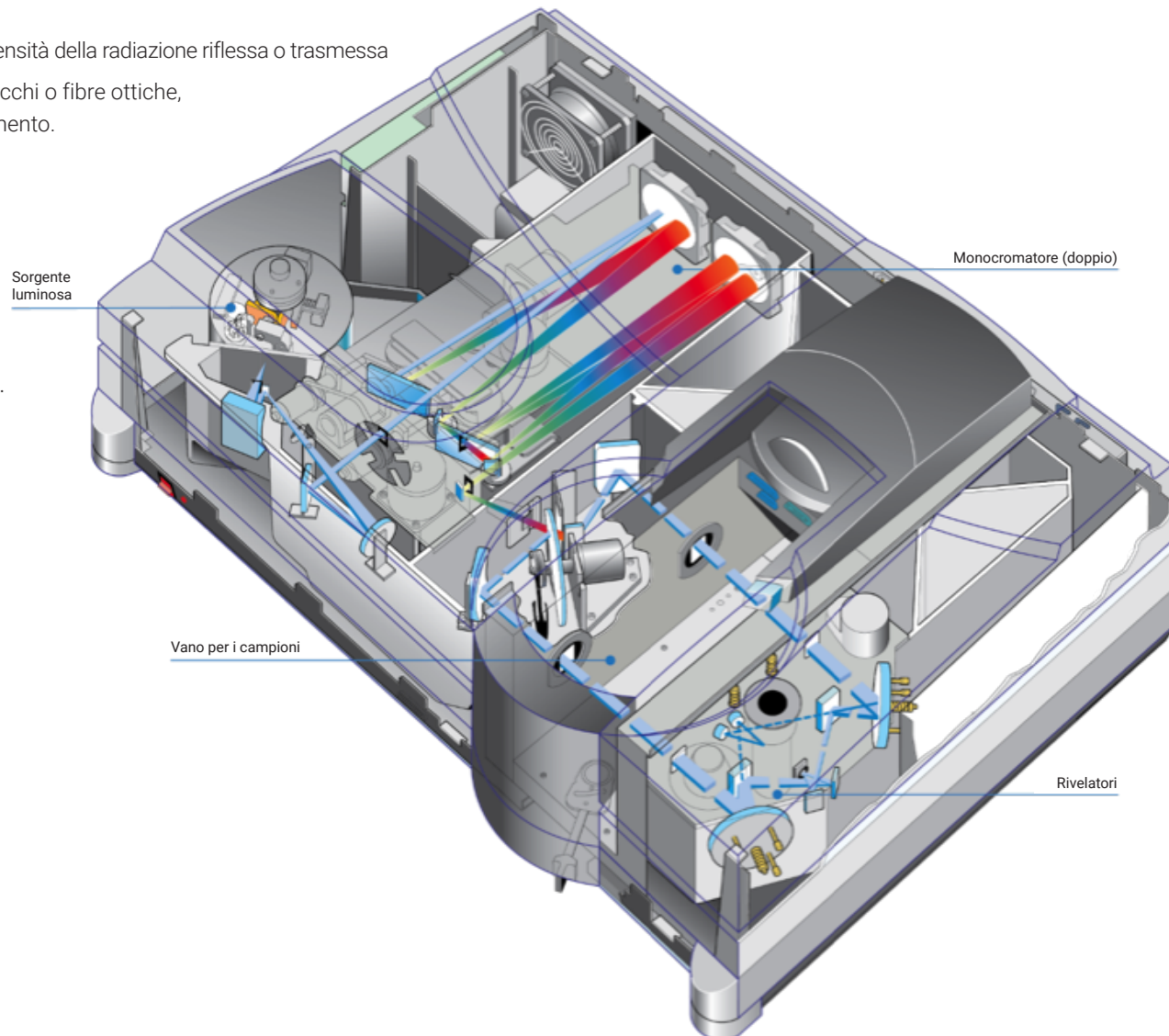
Componenti

I componenti principali di uno spettrofotometro sono:

- Una sorgente luminosa che genera una banda larga di radiazione elettromagnetica sull'intero spettro UV-visibile
- Un dispositivo di dispersione separa la radiazione a banda larga in lunghezze d'onda
- Un'area del campione dove la luce passa attraverso o viene riflessa da un campione
- Uno o più rivelatori per misurare l'intensità della radiazione riflessa o trasmessa

Altri componenti ottici, come lenti, specchi o fibre ottiche, trasmettono la luce attraverso lo strumento.

Figura 8. Rappresentazione schematica dell'interno di uno spettrofotometro UV-Vis-NIR Agilent Cary 5000 in cui sono mostrati i principali componenti. Si noti che questa è una strumentazione ad alte prestazioni. Gli spettrofotometri UV-Vis per misure di routine presentano un design dell'ottica più semplice.



Sorgenti luminose

La sorgente luminosa ideale dovrebbe produrre un'intensità costante per tutte le lunghezze d'onda con basso rumore e stabilità a lungo termine delle emissioni. Sfortunatamente, tale sorgente non esiste. In passato, negli spettrofotometri UV-visibile si utilizzavano due sorgenti luminose differenti:

- La lampada ad arco al deuterio era usata per fornire intensità buona e continua nella regione UV e intensità utile nella regione visibile
- La lampada alogena produceva intensità buona sull'intero campo visibile e parte dello spettro UV

Più recentemente, si ricorre spesso a una singola lampada pulsata allo xeno. L'uso di una lampada pulsata allo xeno come unica sorgente presenta dei vantaggi notevoli rispetto alle due lampade convenzionali.

Lampada ad arco al deuterio (D_2)

La lampada ad arco al deuterio sfrutta la scarica ad arco del deuterio e produce una buona intensità continua nella regione UV e un'intensità utile nella regione visibile, da 185 a 400 nm (vedere la Figura 9). Nonostante le lampade ad arco al deuterio moderne presentino un rumore del segnale basso, il rumore dovuto alla lampada spesso è il fattore limitante nelle prestazioni complessive dello strumento. Nel tempo, l'intensità della luce di una lampada ad arco al deuterio diminuisce costantemente. Questo tipo di lampada ha un'emivita (il tempo necessario perché l'intensità si riduca a metà del valore iniziale) di circa 1.000 ore. Con un'emivita così breve, la lampada al D_2 deve essere sostituita relativamente di frequente.

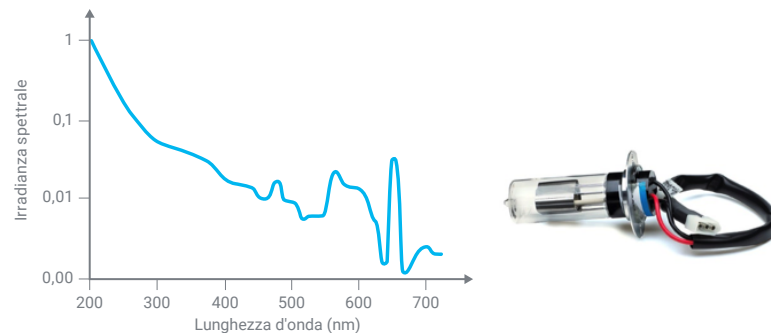


Figura 9. Spettro dell'intensità della lampada ad arco al deuterio.

Lampada alogena

La lampada alogena utilizza un filamento. Quando una corrente viene fatta passare attraverso il filamento, il filamento stesso si scalda ed emette una luce (vedere la Figura 10). La lampada produce una buona intensità su parte dello spettro UV e sull'intero campo visibile e NIR (350 nm-3.000 nm). Questo tipo di lampada presenta un rumore molto basso e una bassa deriva, spesso con una vita funzionale di 10.000 ore.

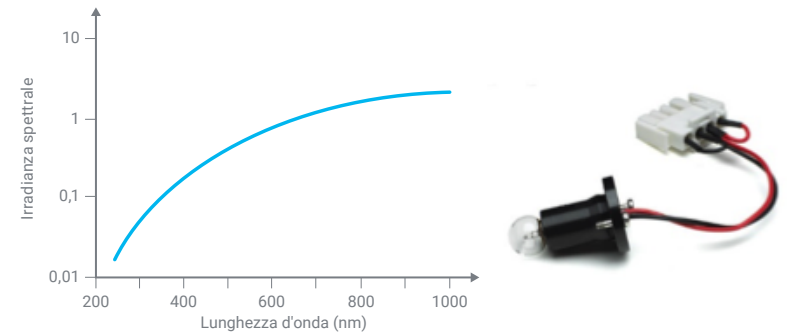


Figura 10. Spettro di intensità della lampada alogena.

Negli spettrofotometri UV-visibile che utilizzano sia una lampada al D_2 che una lampada alogena, un selettore di sorgente viene usato per passare da una lampada all'altra; in alternativa, la luce dalle due sorgenti viene miscelata per produrre una singola sorgente a banda larga.

Lampada pulsata allo xeno

A differenza delle lampade al D_2 o alogene, che forniscono una sorgente luminosa costante, una lampada pulsata allo xeno emette luce per un tempo estremamente breve, a impulsi. Dato che le emissioni sono di breve durata e sono prodotte solo durante la misura del campione, la lampada ha una lunga durata. Il campione viene irradiato con la luce solo nel momento della misura. Grazie a questo breve tempo di illuminazione, la lampada pulsata allo xeno è adatta per misurare campioni che potrebbero essere sensibili al fotodecadimento. Il fotodecadimento può essere osservato su campioni sensibili quando sono esposti a lungo e in modo costante a una sorgente luminosa continua. La lampada pulsata allo xeno emette luce ad alta intensità da 185 a 2500 nm e pertanto non è necessaria una sorgente luminosa secondaria (Figura 11). La lampada pulsata allo xeno può essere usata per molti anni senza bisogno di sostituirla, il che la rende una scelta popolare rispetto a sistemi che usano lampade al D_2 o alogene. Un ulteriore vantaggio è dovuto al fatto che non sono necessari tempi di riscaldamento, a differenza delle lampade al D_2 o alogene.

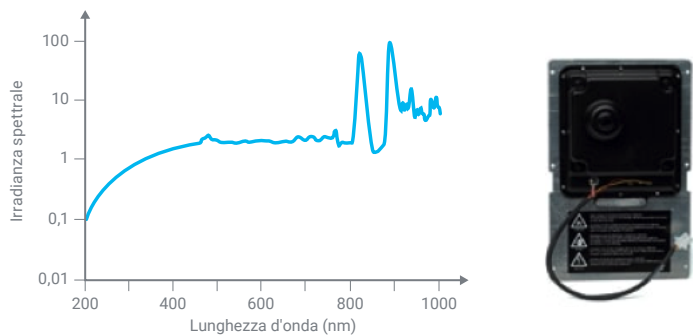


Figura 11. Spettro di intensità della lampada allo xeno.

Il monocromatore

Tutte le sorgenti luminose producono una luce bianca ad ampio spettro. Per restringere la luce a una banda di lunghezza d'onda selezionata, la luce viene fatta passare attraverso un monocromatore. Un monocromatore è composto da:

- una fenditura di ingresso,
- un dispositivo di dispersione per disperdere la luce in lunghezze d'onda differenti (come un arcobaleno) e permettere la selezione di una banda di lunghezze d'onda inserite nel metodo e
- una fenditura di uscita dove la luce delle lunghezze d'onda inserite nel metodo passa attraverso e sul campione.

Un modo semplice per immaginarsi un monocromatore è pensare a una stanza illuminata dal sole attraverso una finestra. La luce del sole colpisce un prisma che separa la luce bianca in un arcobaleno. L'arcobaleno ricade su una finestra sul lato opposto della stanza. Quando il prisma viene fatto ruotare, la luce con colori differenti, ovvero a diverse lunghezze d'onda, esce dalla stanza attraverso la finestra.

Idealmente, l'emissione di un monocromatore è una luce a una singola lunghezza d'onda. In pratica, tuttavia, l'emissione è sempre una banda di lunghezze d'onda.

La maggior parte degli spettrofotometri sul mercato al momento presenta come dispositivo di dispersione dei reticoli olografici. Questi componenti ottici sono realizzati in vetro e sulla loro superficie sono incise in modo preciso delle scanalature estremamente sottili. Le dimensioni delle scanalature sono confrontabili con la lunghezza d'onda della luce da disperdere. Infine, viene applicato un rivestimento in alluminio per creare una superficie riflettente.

Interferenza e diffrazione della luce che cade sul reticolo sono riflesse a diverse angolazioni, a seconda della lunghezza d'onda. I reticoli olografici producono una dispersione angolare lineare rispetto alla lunghezza d'onda e non sono termosensibili. Tuttavia, riflettono la luce in ordini differenti che si sovrappongono (vedere la Figura 12). Di conseguenza, è necessario utilizzare dei filtri per assicurare che a raggiungere il rivelatore sia solo la luce dall'ordine di riflessione desiderato. Un reticolo concavo disperde e contemporaneamente focalizza la luce.

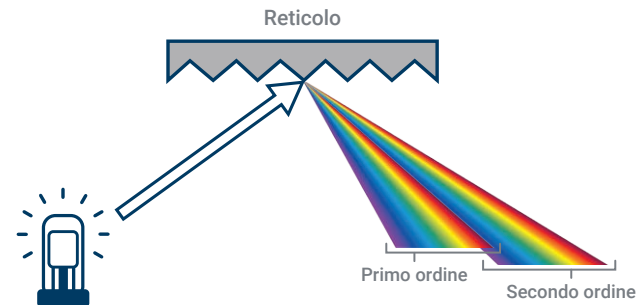


Figura 12. Modalità in cui un reticolo olografico disperde la luce bianca in luce di varie lunghezze d'onda.

Spettrofotometri a singolo monocromatore

Lo spettrofotometro a singolo monocromatore è impiegato nella spettroscopia per uso generico e può essere integrato in un sistema ottico compatto. La Figura 13 mostra un diagramma di un sistema ottico a singolo monocromatore. Uno spettrofotometro a singolo monocromatore non è in grado di selezionare le lunghezze d'onda della luce con la stessa precisione di un sistema a doppio monocromatore, ma tale capacità potrebbe non essere necessaria per numerose applicazioni, per esempio quando si desidera misurare campioni con ampi picchi di assorbimento.

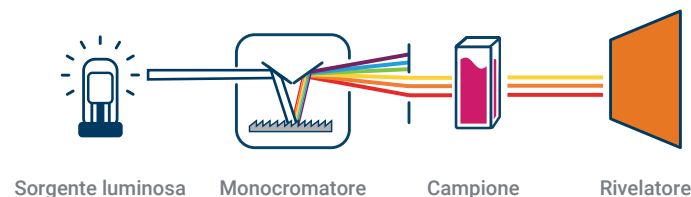


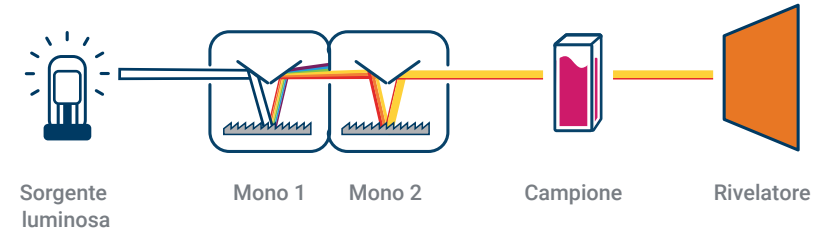
Figura 13. Spettrofotometro a singolo monocromatore.



Spettrofotometri a doppio monocromatore

Gli strumenti ad alte prestazioni sono tipicamente dotati di due monocromatori, disposti in serie. La luce della sorgente viene separata dal primo monocromatore e poi ulteriormente separata dal secondo. La luce diffusa, ovvero la luce che penetra nel sistema, è ridotta e aumenta l'accuratezza spettrale (la capacità di selezionare in modo accurato una particolare lunghezza d'onda). La Figura 14 mostra un diagramma del sistema ottico a doppio monocromatore.

Figura 14. Diagramma di uno spettrofotometro a doppio monocromatore.



Vano per i campioni

Nel vano per i campioni, il campione è collocato in modo da permettere al fascio luminoso proveniente dal monocromatore di attraversare il campione. Per le misure di assorbanza, i campioni in soluzione tipicamente sono contenuti in una cuvetta con una lunghezza del percorso fissa e nota. Le cuvette sono dei contenitori per liquidi rettangolari, come mostrato nella Figura 15. Sono realizzate in vetro, quarzo, plastica o un altro materiale che trasmette luce UV o visibile. Le cuvette standard hanno una lunghezza del percorso di 10 mm e sono realizzate in quarzo per assicurare una buona trasmittanza delle lunghezze d'onda UV. È anche possibile utilizzare cuvette di plastica, che sono meno costose ma di solito non trasmettono la luce UV e sono quindi utili per le misure che prevedono solo la regione a lunghezza d'onda nel visibile. Sono disponibili tantissimi tipi di cuvette per applicazioni specialistiche: da cuvette in grado di contenere piccolissimi volumi di liquidi a cuvette con lunghezze del percorso superiori, da utilizzare con campioni molto diluiti.



Figura 15. Cuvette per la misura di campioni in soluzione. Da sinistra a destra: Cuvetta standard da 3 mL con lunghezza del percorso di 10 mm, cella ultra-micro per la misura di volumi molto piccoli e cuvetta con lunghezza del percorso maggiore per soluzioni diluite.

È possibile mantenere in posizione campioni solidi per semplici misure della trasmissione. Possono anche essere misurati a vari angoli di incidenza. Per misure più complesse, come riflettanza diffusa o trasmissione, è possibile installare altri accessori nel vano per i campioni.

Spettrofotometro a singolo fascio luminoso

Lo spettrofotometro UV-Vis più semplice presenta un sistema ottico a singolo fascio luminoso. In un sistema a singolo fascio luminoso, la luce dal monocromatore passa attraverso il campione e quindi raggiunge il rivelatore. Grazie al semplice design, vengono utilizzati meno componenti ottici, il che permette di ridurre le dimensioni dello strumento e di conseguenza i costi.

Per poter misurare un campione, tuttavia, è prima necessario misurare una linea di base o un bianco. Per le misure di campioni liquidi, la lettura della linea di base serve per tenere conto dell'assorbanza dovuta alla cuvetta e al solvente utilizzati. Con un sistema a singolo fascio luminoso, la linea di base deve essere misurata separatamente dal campione. In tal caso, se c'è una variazione nell'intensità della luce o nelle prestazioni ottiche del sistema, tra la lettura della linea di base e del campione, la misura potrebbe essere meno accurata. Questa inaccuratezza è un problema per misure di campioni che richiedono molto tempo o in cui il bianco può subire dei cambiamenti nel tempo. In pratica, ciò significa che, durante una seduta analitica, è necessario eseguire spesso e regolarmente la misura della linea di base o del bianco, se si utilizza un sistema a singolo fascio luminoso.

Spettrofotometro a doppio raggio

Molti sistemi UV-Vis usano un sistema ottico a doppio raggio. Nei tipi a doppio raggio, la luce emessa dal monocromatore è separata in due fasci luminosi: un fascio luminoso di riferimento e un fascio luminoso del campione. Di solito la luce viene separata mediante un componente ottico che consiste in una rotella girevole dotata di un segmento a specchi o uno specchio semiargentato chiamato beamsplitter. Ogni fascio luminoso entra nella camera del campione attraverso percorsi ottici distinti. Dato che si hanno a disposizione due fasci luminosi alla stessa lunghezza d'onda, il riferimento/bianco e il campione possono essere misurati allo stesso tempo. In questo modo la misura del campione può essere corretta in tempo reale per eventuali fluttuazioni legate allo strumento. Questa correzione in tempo reale garantisce misure molto accurate.

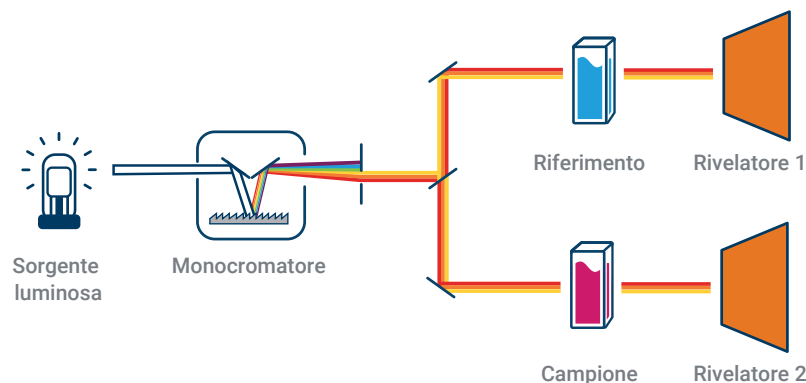


Figura 16. Diagramma di un sistema ottico a doppio raggio, con due rivelatori.

Spettrofotometro a due raggi

Un altro, più recente, design dello spettrofotometro utilizza un layout del sistema ottico a due raggi con un rivelatore del campione e un rivelatore di riferimento. Il rivelatore di riferimento serve per correggere le fluttuazioni nella luminosità della lampada per ogni misura, mentre il solvente o il bianco (nel caso di un campione solido) viene misurato nella posizione del campione e successivamente sottratto dallo spettro del campione dopo la raccolta. Grazie a elettronica e software migliorati, il design garantisce un processo di misura semplice e riduce la probabilità di errore dell'utente dovuta a mancata corrispondenza delle cuvette o errato posizionamento del campione. Il design a due raggi offre le stesse prestazioni di uno strumento a doppio raggio di routine, tuttavia il design a doppio raggio è tipicamente riservato a strumenti per uso di ricerca.

Vano per i campioni

Tipicamente, il vano per i campioni di uno spettrofotometro UV-Vis consiste in una scatola colorata di nero chiusa mediante un coperchio. L'interno nero opaco del vano contribuisce ad assorbire la luce diffusa che potrebbe penetrare nel vano.

Nel vano per i campioni, il campione è collocato in modo da permettere al fascio luminoso proveniente dal monocromatore di attraversare il campione. Come discusso in precedenza, cuvette di vetro, plastica o quarzo (Figura 15) sono usate per campioni in soluzione. I campioni solidi sono tenuti in posizione mediante un supporto attaccato sul fondo del vano per i campioni. La luce può anche essere fatta uscire dal vano per i campioni usando delle fibre ottiche. Le fibre ottiche sono utili quando si misurano campioni molto grandi, caldi, freddi, radioattivi o in altro modo pericolosi. Come mostrato nella Figura 6, le fibre ottiche possono estrarre la luce dallo spettrofotometro attraverso una sonda a fibra ottica, per misurare soluzioni al di fuori del vano per i campioni. In alternativa, è anche possibile utilizzare un dispositivo a fibra ottica che permette la misura di riflettanza, fluorescenza o trasmissione della luce attraverso un campione solido.

Il rivelatore

Un rivelatore converte la luce dal campione in un segnale elettrico. Come nel caso della sorgente luminosa, dovrebbe fornire una risposta lineare per un ampio intervallo di lunghezze d'onda, con ridotte emissioni di rumore e sensibilità elevata. Gli spettrofotometri normalmente contengono un rivelatore a tubo fotomoltiplicatore o, in alternativa, un rivelatore a fotodiodi. Altri rivelatori specializzati sono presenti su sistemi ad elevate prestazioni per migliorare la copertura delle lunghezze d'onda o la sensibilità.

La sensibilità e l'intervallo di lunghezze d'onda variano da rivelatore a rivelatore. Nel caso di sistemi con più rivelatori, il sistema passerà al rivelatore che corrisponde all'intervallo di lunghezze d'onda richiesto per la misura.

Tubo fotomoltiplicatore (PMT)

Il tubo fotomoltiplicatore (Figura 17) combina la conversione del segnale a diverse fasi di amplificazione all'interno del corpo del tubo. La natura del materiale del catodo determina la sensibilità spettrale. Un singolo tubo fotomoltiplicatore produce buona sensibilità lungo l'intero intervallo UV-visibile da 200 a 900 nm. Un rivelatore a tubo fotomoltiplicatore fornisce alta sensibilità a bassi livelli di luce. Per campioni diluiti, la maggior parte della luce che colpisce il campione lo attraversa e raggiunge il rivelatore. Per rilevare in modo accurato piccole differenze tra le misure del bianco e del campione, il rivelatore deve presentare un basso rumore del segnale a questi alti livelli di intensità della luce.

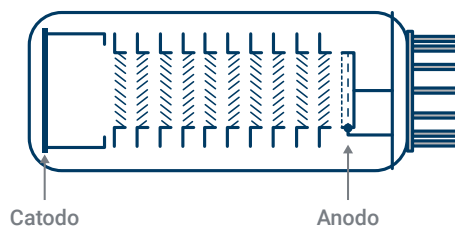
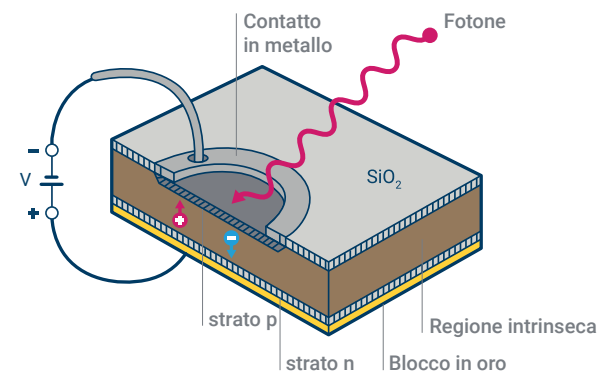


Figura 17. Un rivelatore a tubo fotomoltiplicatore.

Diodo al silicio (Si)

I rivelatori a fotodiodi al silicio (Figura 18) sono largamente utilizzati negli spettrofotometri moderni. I rivelatori a fotodiodi presentano un range dinamico più ampio e sono più robusti dei rivelatori tubo fotomoltiplicatore. In un fotodiodo, la luce che cade sul materiale semiconduttore consente agli elettroni di passarvi attraverso, riducendo la carica in un condensatore connesso al materiale. La carica necessaria per ricaricare il condensatore a intervalli regolari è proporzionale all'intensità della luce. I limiti di rivelabilità per rivelatori al silicio variano approssimativamente tra 170 a 1.100 nm.

Figura 18. Un rivelatore a fotodiodi al silicio.



Fotodiodo all'arseniuro di gallio-indio (InGaAs)

Il rivelatore a InGaAs è un rivelatore specializzato che fornisce prestazioni eccellenti per l'intervallo di lunghezze d'onda del visibile e NIR. I rivelatori a InGaAs sono disponibili nelle opzioni a banda stretta (da 800 a 1.700 nm) e a banda larga (da 800 a 2.500 nm). Questi rivelatori sono utili grazie alla risposta lineare e la sensibilità nella regione del vicino infrarosso.

Rivelatore al solfuro di piombo (PbS)

Il rivelatore al PbS è il rivelatore NIR più comune usato negli spettrofotometri. Questo rivelatore è sensibile tra 1.000 e 3.500 nm. Negli spettrofotometri ad alte prestazioni e ampio intervallo di lunghezze d'onda, il rivelatore al PbS è spesso combinato con un rivelatore a tubo fotomoltiplicatore per ricoprire l'intera regione UV-visibile. Quando è richiesta alta sensibilità alle basse frequenze NIR, un rivelatore al PbS può essere combinato a un rivelatore a InGaAs a banda stretta.

3. Scelta dei parametri ottimali per le misure UV-Vis

Fondamentale per la riuscita delle misure è scegliere il supporto per campioni, il solvente e i parametri dello strumento più adatti.

3.1 Selezione della cella ottica

I campioni in soluzione sono di solito contenuti in una cuvetta (che è un altro nome per cella ottica o semplicemente "cella"). Le cuvette sono disponibili in diversi design a seconda dell'applicazione. Tra queste:

- Una cella ottica standard con lunghezza del percorso di 10 mm (fare riferimento alla Figura 15).
La cella può contenere circa 3,5 mL ed è dotata di due finestre ottiche, parallele tra loro. Tipicamente, gli altri lati sono smerigliati o con scanalature a indicare che questi sono i lati che si possono toccare quando si maneggia la cella. Le finestre ottiche devono essere mantenute il più pulite possibile e non devono essere toccate. Evitare di graffiare le superfici ottiche mentre non sono in uso. Sono inoltre disponibili celle monouso, a uso limitato. Sono realizzate in polistirene o polimetilmetacrilato (PMMA) e non possono essere utilizzate a elevate temperature. Il polistirene non trasmette la luce UV, sono quindi possibili solo misure tra 340 e 800 nm. Le celle in PMMA possono essere usate fino a 300 nm.
- Per piccoli volumi, fino a 0,5 mL, può essere utilizzata una cella semi-micro, di dimensioni esterne simili a quelle di una cella standard, ma con un canale sottile all'interno per ridurre il volume di campione richiesto. Sono inoltre disponibili celle ultra-micro, in grado di contenere appena 0,5 μL . Il nero che maschera entrambi i lati della finestra ottica (come mostrato nella Figura 19 e nella Figura 20) previene la riflessione interna nella cuvetta. Occorre prestare attenzione che le celle siano allineate all'altezza ottica del fascio luminoso nello strumento UV-Vis. Questo parametro è indicato come dimensione Z. La dimensione Z è la misura dalla base della cuvetta al centro della lunghezza del percorso ottico.

Le celle semi- o ultra-micro sono utili quando i volumi dei campioni sono limitati.

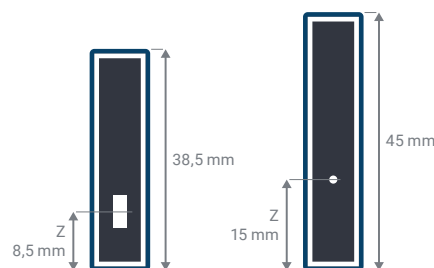


Figura 19. Le cuvette "mascherate" assicurano che il fascio ottico passi attraverso il campione. È molto importante assicurarsi che la dimensione Z della cuvetta sia compatibile con lo spettrofotometro UV-Vis utilizzato.



Figura 20. Cella semi-micro da 1,4 mL, con lunghezza del percorso di 10 mm.

Per misurare più di un campione in soluzione, si può utilizzare una cella di flusso con apertura circolare.

Le celle di flusso con apertura circolare sono disponibili in una varietà di volumi interni della cella e lunghezze del percorso. Di solito le celle sono collegate a una pompa peristaltica che può essere a sua volta collegata a un autocampionatore. La pompa spinge il campione attraverso i tubi collegati alla cella, riempiendo la cella per la misura. Viene quindi fatta passare una soluzione di lavaggio per pulire la cella prima che il campione successivo sia pompato nella cella.



Figura 21. Cella a flusso, con aperture rettangolari di 4 x 11 mm, lunghezza del percorso di 10 mm. Sono anche mostrati i connettori e i tubi.

La maggior parte delle celle ottiche sono dotate di un tappo o coperchio. Il tappo è progettato per ridurre sia le perdite accidentali che l'evaporazione del campione. Si consiglia vivamente di usare un tappo per le misure di campioni volatili o pericolosi.

Lunghezze del percorso delle celle

La lunghezza del percorso è la distanza percorsa dalla luce incidente attraverso un campione. Le cuvette sono disponibili con diverse lunghezze del percorso. La lunghezza del percorso da usare dipende dall'assorbanza del campione:

- Per campioni concentrati con alta assorbanza (>3 A) è necessaria una cuvetta con lunghezza del percorso breve (minore o uguale a 5 mm); in alternativa è possibile diluire i campioni. Le cuvette con lunghezza del percorso breve possono anche essere usate per compensare i solventi con alta assorbanza.
- Per campioni diluiti con bassa assorbanza ($<0,2$ A) è necessaria una cella con lunghezza del percorso estesa (fino a 100 mm) che aumenta la lettura dell'assorbanza. Questo può anche contribuire a ridurre il livello di errore.

La maggior parte dei sistemi di spettrofotometria UV-Vis sono dotati di un supporto per cuvetta adatto a cuvette standard con lunghezza del percorso di 10 mm. Per cuvette con lunghezze del percorso maggiori sarà necessario un appropriato supporto per celle con lunghezze del percorso estese.

Celle con lunghezza del percorso più breve sono disponibili nelle stesse dimensioni delle cuvette standard con lunghezza del percorso di 10 mm e sono adatte per il supporto cella standard fornito con lo strumento. Sono anche disponibili distanziatori per cella per consentire di inserire in modo sicuro una cuvetta con lunghezza del percorso minore nel supporto per cuvetta standard.

Materiale

Le proprietà ottiche del materiale usato per le finestre delle cuvette devono anche essere prese in considerazione. Per l'intervallo di lunghezze d'onda più ampio, è preferibile il vetro di quarzo. Poiché il vetro di quarzo è molto costoso, si può ricorrere al vetro ottico o la plastica (polistirene) quando non sono necessarie misure sotto i 340 nm (polistirene) e i 350 nm (vetro ottico). Le celle in polistirene non sono adatte per l'uso a temperature elevate. È inoltre molto importante assicurarsi che, quando si usano celle in polistirene, i campioni/ solventi non danneggino le celle. Spesso le celle in polistirene sono indicate come monouso o celle in plastica. Possono essere facilmente graffiate e sono progettate per uso singolo. In Tabella 1 è mostrata la trasmissione di materiali comuni nell'intervallo di lunghezze d'onda da UV a NIR.

Tabella 1. Range di trasparenza per materiali comuni per cuvette.

Materiale	Lunghezza d'onda idonea (nm)
Quarzo	170-2.700
Quarzo Infrasil (NIR)	220-3.800
Vetro ottico	334-2.500
Polistirene (monouso)	340-800

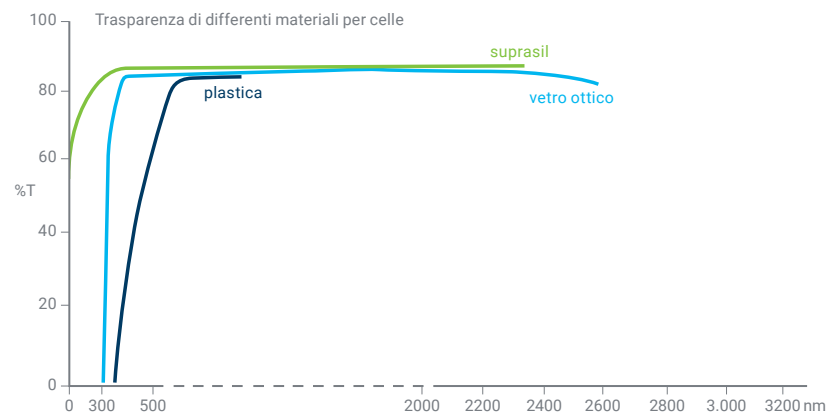


Figura 22. Trasparenza di materiali comuni per celle ottiche.

Abbinamento di cuvette

Certe cuvette sono vendute a coppie abbinata e sono utilizzate per quasi tutte le analisi di routine UV-Vis e UV-Vis-NIR. Le coppie abbinata assicurano che con entrambe le cuvette, vuote o riempite con acqua, si ottengano letture comparabili di assorbanza o trasmissione. Il codice di abbinamento è come un numero di lotto che riflette le caratteristiche di trasmissione del lotto (melt) delle materie prime con cui sono prodotte le cuvette.

Per poter essere abbinata tra loro, due cuvette devono rientrare nella tolleranza di trasmissione accettabile a una particolare lunghezza d'onda. Per esempio, per una coppia la differenza dei valori di trasmissione deve essere di 1,5% a 200 nm. I fabbricanti di cuvette indicano per i materiali forniti le specifiche sulla trasmissione e le corrispondenti tolleranze a lunghezze d'onda misurate.

I codici di abbinamento sono utili solo quando si confrontano nuove celle. Le caratteristiche di trasmissione cambiano durante l'uso a causa della contaminazione o usura delle superfici dovute a processi di pulizia o a manipolazione impropria. Di conseguenza, una cella nuova non sarà necessariamente abbinata a una cella usata con lo stesso codice di abbinamento.

Le moderne tecniche di produzione e fusione hanno migliorato le tolleranze di planarità, parallelismo e costruzione. Insieme a una maggiore attenzione per l'assicurazione qualità delle materie prime, questo ha in pratica eliminato l'esigenza di abbinamento della trasmissione in celle regolari standard in quarzo di qualità superiore.

Purificazione

Gli oli nelle impronte digitali sono degli assorbitori importanti nella regione UV. Le impronte digitali lasciate sulle superfici ottiche possono portare a risultati errati. Prima dell'uso, rimuovere tutte le impronte digitali e contaminanti dalla cella, usando un panno morbido pulito. Assicurarsi che sul panno non ci siano detergenti o lubrificanti. Le salviette per le lenti degli occhiali o per altri usi spesso contengono detergenti o lubrificanti che possono influenzare le misure.

Non usare un pulitore a ultrasuoni per pulire le cuvette in vetro o quarzo. I bagni a ultrasuoni generano onde ultrasoniche a frequenze differenti; se un bagno funziona alla frequenza di risonanza della cella, provocherà la rottura della cella.

Evitare acidi fluorurati come l'acido fluoridrico (HF) a qualsiasi concentrazione, perché attaccano il quarzo e il vetro. Le soluzioni molto basiche (pH 9,0 e superiore) degradano la superficie delle finestre e accorciano la durata di vita della cuvetta.

Dopo aver eseguito una misura del bianco, evitare di pulire le finestre ottiche della cella. Se è necessario pulire, eseguire una nuova misura del bianco prima di continuare le misure.

Altri consigli su come manipolare le cuvette

Con alcuni semplici gesti è possibile prolungare la durata delle cuvette:

- Considerare di rimuovere i campioni dalle cuvette immediatamente dopo l'uso, così da evitare che il campione si secchi e si attacchi alla cuvetta. Fare particolare attenzione con proteine e forti coloranti, noti per aderire alle superfici interne della cuvetta. Rimuovere questi tipi di campione dalla cella immediatamente dopo l'analisi e risciacquare accuratamente con il solvente tra campioni successivi.
- Se si misura lo stesso campione per un periodo lungo, conservare il campione chiuso con un tappo e a una temperatura adeguata per ridurre al minimo l'evaporazione. Alcuni campioni potrebbero richiedere un'agitazione continua.
- Pulire accuratamente tutte le cuvette alla fine di ogni giornata e:
 - conservarle in un contenitore adatto una volta asciutte oppure
 - conservare le cuvette bagnate in una soluzione leggermente acida (1% di acido nitrico o acido cloridrico), in un becher resistente agli acidi. Conservare una sola cuvetta per becher per evitare di scheggiare la cuvetta. Risciacquare sempre con acqua abbondante appena prima di riutilizzarla.



Misura degli schermi dei cellulari

Per chi progetta cellulari, tablet, laptop e televisioni è estremamente importante realizzare schermi che siano il più sottili possibile. Riuscire a diminuire lo spessore di appena una decina di micron può fare una enorme differenza nel ridurre le dimensioni complessive di un dispositivo. Questi schermi utilizzano diodi a emissione di luce (LED) e display a cristalli liquidi (LCD) per controllare i colori dello schermo, con un riflettore della retroilluminazione per fornire l'illuminazione. I riflettori della retroilluminazione sono formati da un materiale polimerico trasparente e un film riflettente applicato su una delle superfici e sembrano degli specchi sottili di plastica. La misura della riflettanza e trasmissione del riflettore della retroilluminazione è un aspetto cruciale nello sviluppo di un nuovo design. Rappresenta anche un'importante misura di controllo della qualità durante la produzione. La riflettanza e la trasmissione di un riflettore della retroilluminazione sono misurati con uno spettrofotometro UV-Vis. Il riflettore della retroilluminazione è montato verticalmente nel vano per i campioni e viene fatto ruotare sul proprio asse centrale, consentendo la misura di riflettanza e trasmissione a differenti angoli di incidenza.

[Qui potete trovare i dettagli della misura](#)

3.2 Termostatazione dei campioni

Molti campioni possono essere misurati a temperatura ambiente, ma in alcune circostanze i campioni devono essere riscaldati o raffreddati. Tra queste:

- Raffreddamento di campioni volatili per ridurre l'evaporazione
- Riscaldamento di campioni viscosi per migliorare la gestione del campione o l'omogeneità
- Campioni che sono sensibili a cambiamenti chimici quando sono riscaldati.
- Cambiamenti osservati nei campioni quando vengono riscaldati o raffreddati.

È possibile montare sugli spettrofotometri UV-Vis degli accessori per il controllo della temperatura dei campioni. I sistemi di controllo della temperatura più semplici sono adatti per misure a temperatura fissa. Tipicamente, in questi sistemi viene usato un circolatore d'acqua termostato per fare passare acqua riscaldata attraverso un collettore che sostiene la cuvetta con il campione. Per un controllo più preciso della temperatura, un riscaldatore/refrigeratore Peltier è integrato nel collettore del campione. I dispositivi Peltier consentono un maggiore controllo della temperatura e misure usando rampe di temperatura. Un sistema Peltier di raffreddamento ad aria richiede meno manutenzione di un sistema Peltier di raffreddamento ad acqua o di un sistema di circolazione dell'acqua. I sistemi di circolazione dell'acqua richiedono una manutenzione periodica, come il controllo dei tubi dell'acqua per eventuali perdite e il rabbocco della soluzione refrigerante. Un altro vantaggio del sistema Peltier è il funzionamento silenzioso in quanto non è necessario pompare la soluzione refrigerante.

Quando si utilizza una delle due opzioni di controllo della temperatura, dovrebbe essere possibile monitorare la temperatura mediante il sistema utilizzato. Come requisito minimo, il sistema deve riportare la temperatura del collettore del campione. Questo è particolarmente importante per un sistema a acqua riscaldata esterno. Perdite di calore dalla temperatura impostata sul bagno possono verificarsi tra il circolatore e il collettore del campione. Nel caso dei sistemi controllati a Peltier, la temperatura del collettore del campione è monitorata, fornendo un feedback per mantenere la temperatura stabile.

Nei casi in cui il controllo della temperatura è cruciale, acquisire misure del campione direttamente fornisce una lettura più accurata. Piccole sonde di temperatura sono inserite nel campione, all'interno della cuvetta. Le sonde vengono accuratamente posizionate al di fuori del cammino ottico. Quando la temperatura viene monitorata direttamente nei campioni, il software di controllo UV-Vis dovrebbe consentire di registrare la temperatura di ciascuna cuvetta durante ogni singola misura.

3.3 Agitazione del campione

L'agitazione di un campione termostato è importante per assicurare una costante omogeneità della soluzione e della temperatura. L'agitazione è particolarmente importante per i campioni viscosi o per fare in modo che le soluzioni siano costantemente miscelate quando si studia una reazione chimica all'interno della cuvetta.

L'efficacia dell'agitazione per ottenere omogeneità termica (e chimica) dipende fortemente dal tipo di campione, solvente e dalla viscosità della soluzione. È importante notare che la viscosità cambia con la temperatura e questo potrebbe influenzare l'efficienza di agitazione, e le misure, quando la temperatura viene modificata nel tempo.

Per agitare le soluzioni, un'ancoretta magnetica sferica o a stella viene collocata sul fondo della cuvetta del campione. Sono disponibili delle cuvette appositamente progettate con un'incavatura circolare nella base che contiene l'ancoretta e contribuisce ad aumentare l'efficienza durante l'agitazione.

Quando si sviluppa il metodo analitico, è importante fare attenzione che la velocità di agitazione sia adatta per le soluzioni. Se la velocità di agitazione è troppo bassa, è possibile che il campione non venga miscelato correttamente. Se la velocità è troppo alta, bolle d'aria possono rimanere intrappolate nel campione, causando risultati errati.

Si consiglia di condurre delle prove su tutti i campioni per stabilire la velocità di agitazione ottimale per l'esperimento. Quando si misurano liquidi con viscosità comparabili all'acqua, velocità di agitazione tra 800 e 900 rpm generalmente producono la miglior uniformità di temperatura nelle cuvette standard. Ridurre la velocità di agitazione per campioni con viscosità più alta e aumentare la velocità per campioni con viscosità più bassa.

3.4 Misure a basse temperature

Quando si misurano campioni a temperatura inferiore a quella ambiente, si potrebbe formare della condensa sull'esterno delle cuvette. Questo potrebbe interferire con la misura. È possibile prevenire la formazione di condensa spurgando il vano per i campioni dello spettrofotometro UV-Vis con un gas secco pulito. Alcuni sistemi sono dotati di porte di spurgo apposite per consentire l'entrata del gas nel vano per i campioni senza introdurre luce. Un'alternativa per la misura di campioni freddi è l'uso di una sonda a fibra ottica a introduzione diretta. Un accoppiatore a fibra ottica, inserito nel vano per i campioni, dirige la luce dal sistema mediante un cavo a fibra ottica, attraverso una sonda a introduzione diretta direttamente inserita nel campione (come mostrato in Figura 6). La luce viene quindi diretta indietro al rivelatore mediante un cavo a fibra ottica di ritorno. Per campionamenti ad alta produttività questa tecnica potrebbe essere l'opzione più adatta quando si misurano più campioni a una temperatura fissa.

3.5 Trasparenza dei solventi

Quando si misurano campioni in soluzione o campioni solidi solubili per l'analisi UV, è necessario tener conto della trasparenza del solvente. I solventi vengono selezionati in base a solubilità, stabilità e requisiti di pH del campione, oltre che alla lunghezza d'onda di cut-off UV-visibile. Per composti solubili in acqua, l'acqua è una scelta eccellente in quanto consente di eseguire misure su tutte le lunghezze d'onda UV. L'uso di solventi organici limita l'intervallo di lunghezze d'onda UV efficace utilizzabile. Nella scelta del solvente, considerare sia la solubilità del campione nel solvente che la trasparenza del solvente nell'intervallo di lunghezze d'onda di interesse (come mostrato in Figura 23).

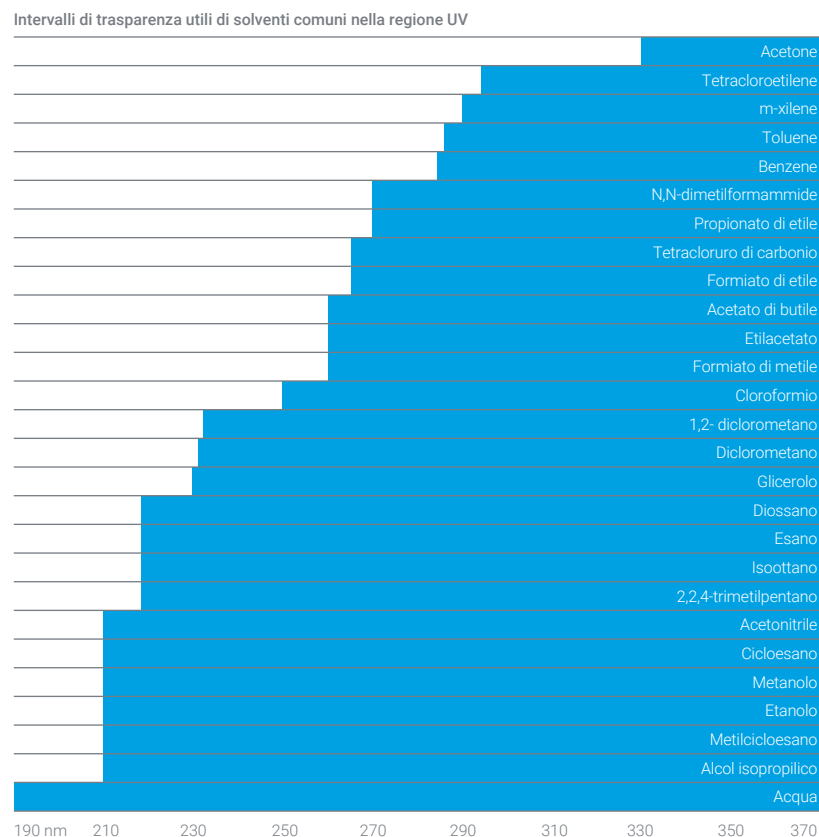


Figura 23. Intervalli di trasparenza di solventi comuni nella regione UV. Nonostante l'acqua sia preferibile per l'analisi UV, un altro solvente potrebbe essere necessario se il campione non è solubile in acqua.



Una molecola con una funzione molto importante

La protoporfirina è una molecola fondamentale per la vita di molte piante e animali. L'organismo stabilizza la molecola inserendo atomi di zinco nella struttura ad anello nei globuli rossi immaturi (reticolociti). Durante il processo di maturazione dei reticolociti, lo zinco viene sostituito dal ferro. I globuli rossi maturi si combinano quindi con la proteina globulare emoglobina, la molecola che trasporta l'ossigeno nel sangue nell'uomo e in molti animali.

Nelle piante, il magnesio è inserito nell'anello della protoporfirina a formare la clorofilla, uno dei composti fondamentali essenziali per la fotosintesi.

La protoporfirina assorbe la luce UV, fatto non sorprendente se si considera la sua importanza nella fotosintesi. La molecola è anche fluorescente. Grazie a queste caratteristiche la protoporfirina è ideale per l'analisi mediante spettroscopia. Costituisce di fatto la base del test di screening primario per l'avvelenamento da piombo nei bambini (1).

1. Clinical and Laboratory Standards Institute, Erythrocyte Protoporphyrin Testing; Approved Guideline, Volume 16, No. 8, 1996

3.6 Larghezza di banda spettrale ottimale

Quando si misura un campione, è bene considerare la risoluzione della misura richiesta. La maggior parte dei campioni solidi o liquidi analizzati mediante spettroscopia UV-Vis presentano per natura ampi picchi, nell'ordine di 20 o più nm da lato a lato. È buona prassi usare uno strumento con impostazioni della larghezza di banda spettrale (SBW) a circa un decimo della larghezza di banda naturale dell'analita. La SBW dello strumento è definita come la larghezza della banda di luce a metà altezza del picco massimo (come mostrato in Figura 24), e a volte è indicata come larghezza totale a metà altezza (FWHM). La SBW dello spettrofotometro UV-Vis è correlata all'ampiezza della fenditura fisica del design del monocromatore.

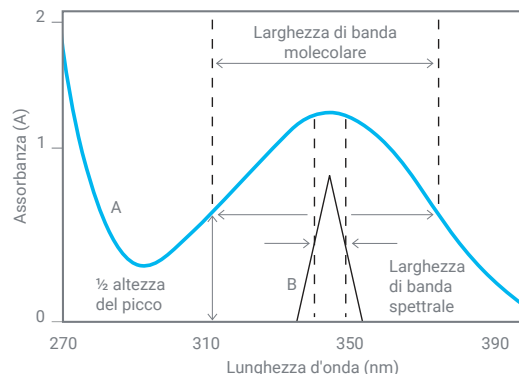


Figura 24. Lo spettro A mostra un massimo del picco vicino a 345 nm. È mostrata la larghezza di banda spettrale. L'ampiezza della fenditura spettrale dello spettrofotometro UV-Vis sarà sempre minore della larghezza della banda spettrale richiesta.

A seconda del design dello spettrofotometro, la fenditura fisica potrà avere una larghezza fissa o variabile. Per la maggior parte degli spettrofotometri UV-Vis di qualità media, comunemente si usa una larghezza di banda spettrale fissa di 1,5 nm, sufficiente per la risoluzione dei picchi di quasi tutti i campioni liquidi e solidi. L'uso di una SBW maggiore permette il passaggio di più luce attraverso il campione e di ottenere dati di qualità migliori con meno rumore, ma non la risoluzione di picchi del campione stretti o ravvicinati. L'uso di una SBW minore garantisce un potere risolutivo maggiore, ma può comportare tempi di raccolta dati più lunghi per ottenere la stessa qualità dei dati, dal momento che meno luce raggiunge il campione.

I sistemi di spettrofotometria ad alte prestazioni o per uso di ricerca sono progettati più frequentemente per consentire all'utente di selezionare l'ampiezza della fenditura e regolare così la risoluzione del sistema. Questo è utile quando si misurano campioni più complicati. L'ampiezza della fenditura può essere impostata ai valori massimi per permettere una maggiore emissione di luce in campioni altamente assorbenti, dove non è richiesta un'alta risoluzione del picco. Un'emissione di luce maggiore al rivelatore consente migliore ripetibilità del metodo, accuratezza e precisione dei risultati. Quando è richiesta alta risoluzione, l'ampiezza della fenditura può essere ridotta (come mostrato nelle Figure 25 e 26).

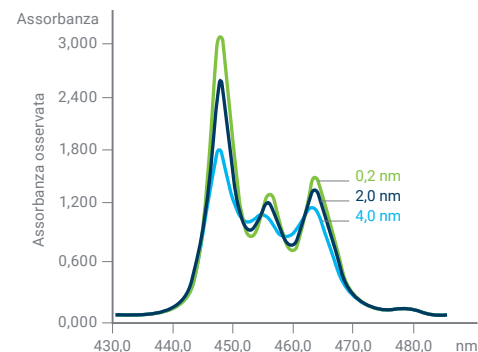


Figura 25. Scan sovrapposti, misurati con una fenditura dello strumento differente per ciascuno scan. Con l'aumentare dell'ampiezza della fenditura, il rapporto segnale-rumore è migliore, tuttavia la risoluzione diminuisce.

Come valore orientativo, la SBW dovrebbe essere impostata a un decimo della larghezza di banda molecolare del campione (esempi in Tabella 2).

Tabella 2. Impostazioni della larghezza di banda spettrale consigliate per comuni tipologie di misure UV-Vis.

Composto rappresentativo	Picco nm	Larghezza di banda nm	Ottimale (SBW) nm
Aminoacidi			
triptofano	279	45	4,5
tirosina	275, 195	40, 10	4,0, 1,0
fenilalanina	258	2,2	0,2
Nucleotidi			
adenosina	260	28	2,8
timina	265	30	3
Proteine			
citocromo C, ossidato	410	25	2,5
rodopsina	500, 278	~90, 25	9, 2,5
ribonucleasi	278	20	2
Pigmenti e coloranti			
β-carotene	480	35	3,5
clorofilla a	660	20	2
Coenzimi			
Nicotinamide adenina dinucleotide	260	35	3,5
NADH	340, 260	50, 25	5, 2,5
Sostanze organiche semplici			
benzene, vapore	253	<<0,1	<<0,01
benzene, soluzione	253	2	0,2
antracene	375	3	0,3

Quando si ottimizza la risoluzione spettrale, è necessario prendere in considerazione anche l'intervallo dei dati raccolti. Come minimo dovrebbero essere raccolti tre punti dati sull'intero picco. Se da un lato un intervallo dei dati minore può fornire una risoluzione migliore, dall'altro un compromesso è necessario tra il tempo impiegato per la raccolta dei dati e l'intervallo dei dati.

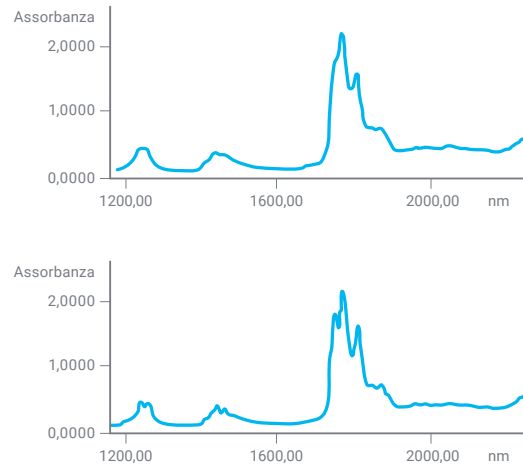


Figura 26. I due scan mostrano l'effetto sulla risoluzione al variare della SBW. A una SBW di 15 nm (grafico in alto), non è possibile osservare molti dettagli nella forma dello spettro. A una SBW di 3 nm (grafico in basso), i picchi sono molto più definiti.

3.7 Luce diffusa

La luce diffusa o energia radiante diffusa (SRE) è definita come la percentuale di radiazione che raggiunge il rivelatore le cui lunghezze d'onda sono al di fuori della banda spettrale selezionata. Questo è dovuto a un design dell'ottica scadente (luce che penetra nello strumento dalle lampade del laboratorio o dalla luce del giorno attraverso le finestre, o la luce non è separata bene dal monocromatore) o a danni allo strumento. Per la maggior parte degli strumenti esistono dei controlli delle prestazioni dello strumento che identificano eventuali problemi legati alla luce diffusa. Tali controlli sono eseguiti usando una soluzione test. Le soluzioni usate per testare i livelli di luce diffusa non causano alcuna trasmittanza alle lunghezze d'onda indicate (mentre trasmettono ad altre lunghezze d'onda): in questo modo la trasmittanza osservata è dovuta solo alla luce diffusa.

La luce diffusa causa letture dell'assorbanza ridotte e modifica la forma dei picchi osservati (come mostrato in Figura 27). Ne risulta una deviazione dalla legge di Beer-Lambert dovuta alla luce diffusa (come mostrato in Figura 28), rendendo le misure delle concentrazioni inaffidabili. Le prestazioni in termini di luce diffusa di uno strumento UV-Vis determinano inoltre l'assorbanza massima misurabile dallo strumento.

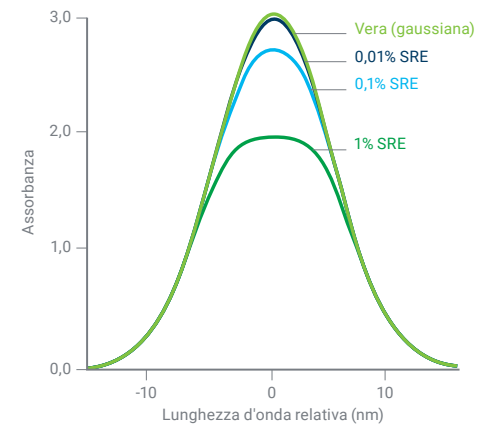


Figura 27. L'assorbanza massima dei picchi sarà minore e la curva si appiattirà con l'aumentare della luce diffusa nello strumento.

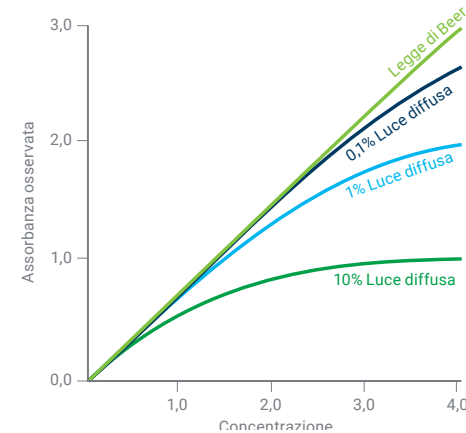


Figura 28. Un sistema UV-Vis con scarse prestazioni in termini di luce diffusa mostrerà deviazioni dalla legge di Beer. Questo rende inaffidabili i calcoli delle concentrazioni.

3.8 La linearità di uno strumento UV-Vis

Il design dell'ottica e i parametri delle misure usati determineranno l'assorbanza massima che uno strumento sarà in grado di misurare a una specifica lunghezza d'onda. A livelli di assorbanza elevati, pochissima luce raggiunge il rivelatore, il che riduce il rapporto segnale-rumore (fare riferimento alla caratteristica "frangia" sullo spettro in Figura 29). Comprendere i limiti del sistema consente di evitare la misura di campioni o di eseguire delle calibrazioni che non rientrano nelle capacità dello strumento. Per i campioni in soluzione, è possibile fare in modo che le misure rientrino nei limiti di linearità dello strumento diluendo il campione. In alternativa, si può ricorrere a una cuvetta con lunghezza del percorso breve.

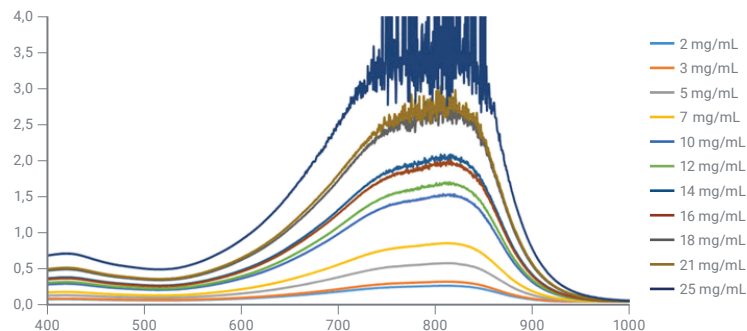


Figura 29. Con l'aumentare progressivo dell'assorbanza del campione, meno luce raggiunge il rivelatore. Questo aumenta il livello di rumore nei risultati e in modalità di scansione si osserva un segnale distinto con numerosi picchi.

3.9 Altre informazioni utili

Nella spettroscopia UV-Vis, l'assorbanza (A) è misurata frequentemente per via della relazione lineare tra concentrazione e assorbanza, come descritto dalla legge di Beer-Lambert. Per altre applicazioni, la percentuale di luce trasmessa o assorbita potrebbe essere un'opzione più adatta. Quando si paragonano le proprietà ottiche di un materiale, per esempio, potrebbe essere più utile comparare la differenza percentuale della trasmissione o assorbanza.

La maggior parte dei sistemi di spettrofotometria UV-Vis permette di convertire i dati raccolti a parametri usati comunemente. La relazione tra questi parametri è mostrata nella Tabella 3.

Tabella 3. La relazione tra trasmissione e assorbanza percentuali può essere difficile da visualizzare. La tabella mostra come un campione con assorbanza di 7 A trasmette solo 0,00001% della luce attraverso i campioni.

%T	T	Assorbanza	%A	LogA
100	1,0	0	0	–
50	0,5	0,3	50	-0,52
10	0,1	1	90	0
1	0,01	2	99	0,3
0,1	0,001	3	99,9	0,48
0,01	0,0001	4	99,99	0,60
0,001	0,00001	5	99,999	0,70
0,0001	0,000001	6	99,9999	0,78
0,00001	0,0000001	7	99,99999	0,85

3.10 Lunghezza d'onda o centimetri inversi

Quasi tutte le misure UV-Vis sono riportate in termini di lunghezze d'onda misurate in nanometri (1×10^{-9} m). Nella vecchia letteratura viene usata la lunghezza reciproca o numero d'onda (cm^{-1}). Il numero d'onda è spesso usato nelle misure di spettroscopia infrarossa (IR). L'uso di una scala basata sul numero d'onda è utile in quanto esprime il cambiamento dei livelli energetici della radiazione incidente. Con una lunghezza d'onda inferiore il numero d'onda è maggiore e l'energia superiore (come mostrato nella Tabella 4).

L'uso del numero d'onda per la spettroscopia a infrarossi consente inoltre di visualizzare più facilmente le differenze spettrali, in quanto la lunghezza d'onda diventa progressivamente più breve.

Per la spettroscopia UV-Vis, generalmente si preferisce optare per la lunghezza d'onda come metodo pratico per visualizzare lo spettro acquisito in un intervallo spettrale.

La maggior parte dei sistemi di spettrofotometria UV-Vis consente di ottenere uno spettro in termini di lunghezza d'onda o di numero d'onda.

Tabella 4. Conversione tra lunghezza d'onda (nm) e numero d'onda (cm^{-1}).

λ nm	cm^{-1}
3.300	3.030
3.000	3.300
2.500	4.000
2.000	5.000
1.500	6.666
1.000	10.000
800	12.500
600	16.667
400	25.000
200	50.000
175	57.143

4. Panoramica delle applicazioni tipiche della tecnologia UV-Vis

4.1 Identificazione: spettri e struttura

Solitamente, gli spettri UV-visibile mostrano solo pochi larghi picchi di assorbanza. Rispetto ad altre tecniche, come la spettroscopia infrarossa, che producono numerosi picchi stretti, la spettroscopia UV-Vis fornisce una quantità limitata di informazioni qualitative. Con solo pochi picchi larghi, è difficile identificare un composto basandosi su uno spettro caratteristico.

La maggior parte dell'assorbimento da parte dei composti organici è il risultato della presenza di legami π (insaturi). Un cromoforo è un gruppo molecolare che generalmente contiene un legame π . Quando viene inserito in un idrocarburo saturo (che non presenta spettri di assorbanza UV-visibile), produce un composto con assorbimento compreso tra 185 e 1.000 nm. Nella Tabella 5 è riportato un elenco di alcuni cromofori e delle lunghezze d'onda dei rispettivi massimi di assorbanza.

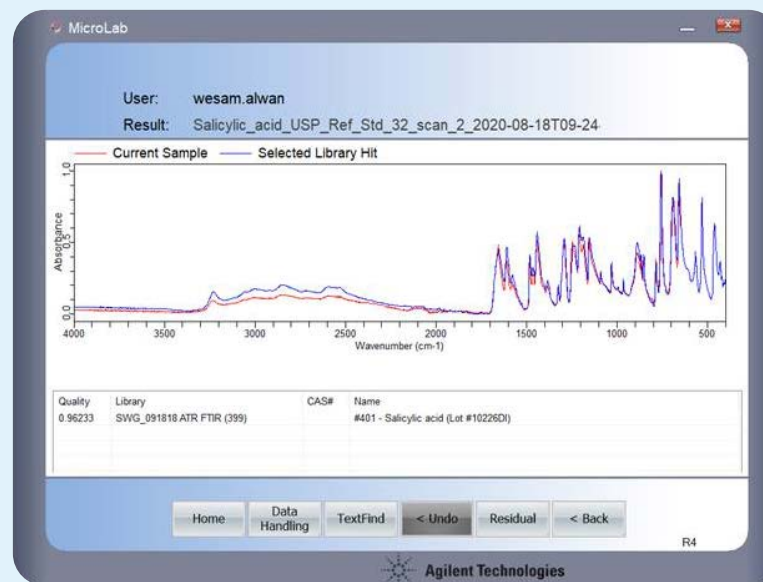
Tabella 5. Cromofori selezionati e lunghezze d'onda dei rispettivi massimi di assorbanza.

Cromoforo	Formula	Esempio	λ_{max} (nm)
Carbonile (chetone)	$\text{RR}'\text{C}=\text{O}$	Acetone	271
Carbonile (aldeide)	$\text{RHC}=\text{O}$	Acetaldeide	293
Carbossile	RCOOH	Acido acetico	204
Ammide	RCONH_2	Acetammide	208
Etilene	$\text{RCH}=\text{CHR}$	Etilene	193
Acetilene	$\text{RC}=\text{CR}$	Acetilene	173
Nitrile	$\text{RC}=\text{N}$	Acetonitrile	<160
Nitrocomposto	RNO_2	Nitrometano	271

La presenza di una banda di assorbanza a una particolare lunghezza d'onda spesso è indice della presenza di un cromoforo. La posizione della lunghezza d'onda del massimo di assorbanza, tuttavia, non è fissa ma dipende in parte dall'ambiente molecolare del cromoforo e dal solvente in cui è disciolto il campione. Anche altri parametri, come pH e temperatura, potrebbero causare dei cambiamenti sia nell'intensità che nella lunghezza d'onda dei massimi di assorbanza.

Gli spettri FTIR possono essere usati per l'identificazione di composti

Gli spettri infrarossi in trasformata di Fourier (FTIR) contengono un numero maggiore di dettagli rispetto agli spettri UV-Vis. Uno spettro come quello mostrato qui (rosso) può essere confrontato con una libreria di spettri FTIR per identificare il composto. In questo caso, un farmaco, l'acido salicilico (il cui spettro nella libreria è mostrato in blu).



La coniugazione del doppio legame con altri doppi legami aumenta sia l'intensità che la lunghezza d'onda della banda di assorbimento. Per alcuni sistemi molecolari, come idrocarburi o carotenoidi coniugati, la relazione tra intensità e lunghezza d'onda è stata investigata sistematicamente. Gli ioni dei metalli di transizione presentano livelli di energia elettronica che causano assorbimento di 400-700 nm nella regione visibile.

4.2 Conferma dell'identità

Nonostante non consentano l'identificazione assoluta di una sostanza incognita, gli spettri UV-visibile sono utilizzati per confermare l'identità di una sostanza, comparando lo spettro misurato con uno spettro di riferimento. Nel caso di spettri estremamente simili, si possono usare gli spettri delle derivate. Come mostrato in Figura 30, il numero delle bande cresce con l'aumentare degli ordini delle derivate. Questi complessi spettri delle derivate possono essere utili nell'analisi qualitativa, sia per la caratterizzazione dei materiali che a scopi di identificazione. Per esempio, lo spettro di assorbanza dello steroide testosterone presenta una singola ampia banda, priva di tratti distintivi, centrata su circa 330 nm, mentre la derivata seconda mostra sei picchi distinti. L'effetto di miglioramento della risoluzione può anche essere utile nell'identificazione di una sostanza incognita. La Figura 30 mostra una simulazione computerizzata. Quando due bande gaussiane con una larghezza di banda spettrale naturale (NBW) di 40 nm, separate da 30 nm, vengono sommate in modalità assorbanza, ne risulta una singola banda con un massimo a metà tra le due bande dei componenti. I due componenti non sono risolti. Usando una derivata quarta dello spettro, le due bande sono chiaramente visibili, con i massimi centrati vicini alla λ_{max} delle bande dei componenti.

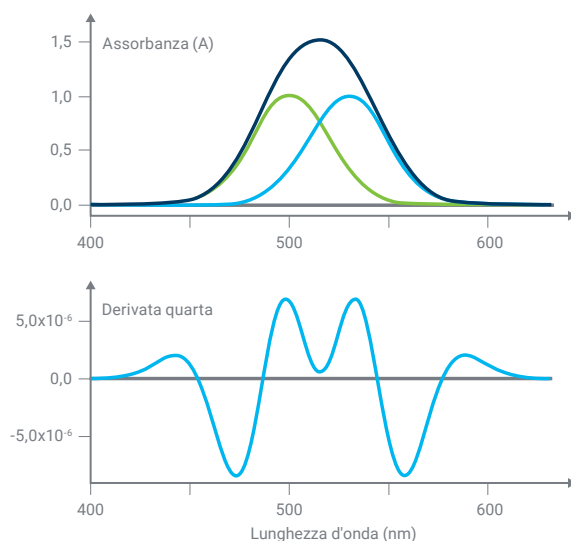


Figura 30. Miglioramento della risoluzione usando l'analisi delle derivate. I picchi originali, sovrapposti tra loro, hanno prodotto un singolo largo picco. Dal calcolo della derivata quarta dello spettro, risulta uno spettro con una risoluzione superiore.

4.3 Quantificazione di una molecola

Legge di Beer

Se 100 fotoni di luce entrano in una cuvetta e solo 50 escono dall'altro lato, la trasmittanza è 0,5 o 50%. Se questi 50 fotoni passano poi attraverso una cuvetta identica, ne usciranno solo 25, e così via. In Figura 31 è mostrato il grafico della trasmittanza in funzione della lunghezza del percorso della cuvetta.

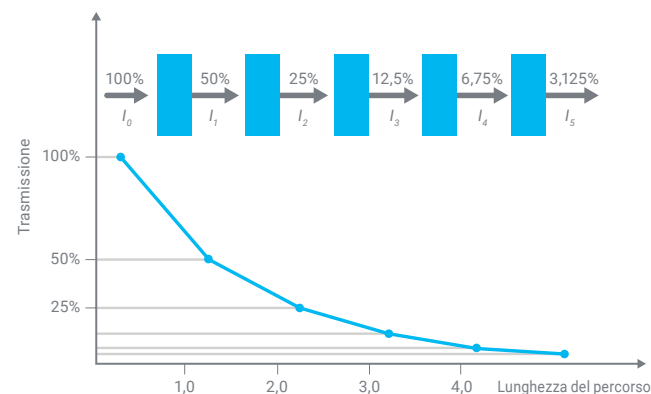


Figura 31. Trasmittanza e lunghezza del percorso: la legge di Bouguer-Lambert.

La prima espressione matematica di questo effetto è generalmente attribuita a Lambert (1760), sebbene ora si ritenga che il primo a formularla sia stato Bouguer nel 1729. L'equazione è:

$$T = I/I_0 = e^{-kb}$$

Dove:

- I_0 è l'intensità incidente
- I è l'intensità trasmessa
- e è la base dei logaritmi naturali
- k è una costante
- b è la lunghezza del percorso (solitamente in centimetri).

La legge di Beer è identica alla legge di Bouguer, ad eccezione del fatto che è espressa in termini di concentrazione. La quantità di luce assorbita è proporzionale al numero di molecole assorbenti attraversate dalla luce. Nella Figura 32 è mostrato un grafico della trasmittanza in funzione della concentrazione.

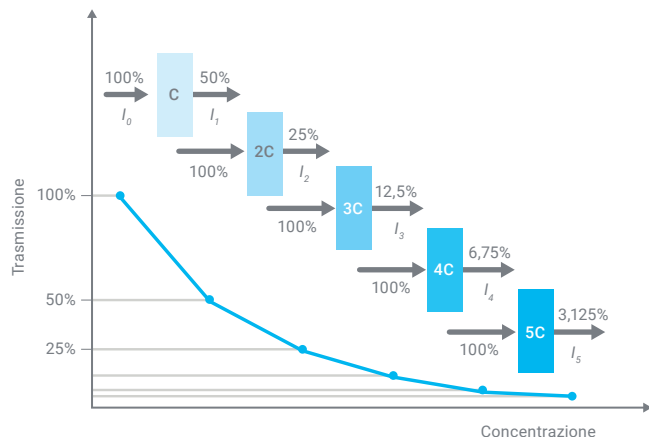


Figura 32. Trasmittanza e concentrazione: legge di Beer

Dalla combinazione delle due leggi origina la legge di Beer-Bouguer-Lambert:

$$T = I/I_0 = e^{-kbc}$$

Dove c è la concentrazione delle specie assorbenti (solitamente espressa in grammi per litro o milligrammi per litro). L'equazione può essere trasformata in un'espressione lineare usando il logaritmo ed è normalmente espressa nella forma decimale:

$$A = -\log T = -\log(I/I_0) = \log(I_0/I) = \sum bc$$

Dove A è l'assorbanza e $\sum$ è l'assorbimento molare o coefficiente di estinzione. Questa espressione è comunemente conosciuta come legge di Beer. Nella Figura 33 è mostrato un grafico dell'assorbanza in funzione della concentrazione.

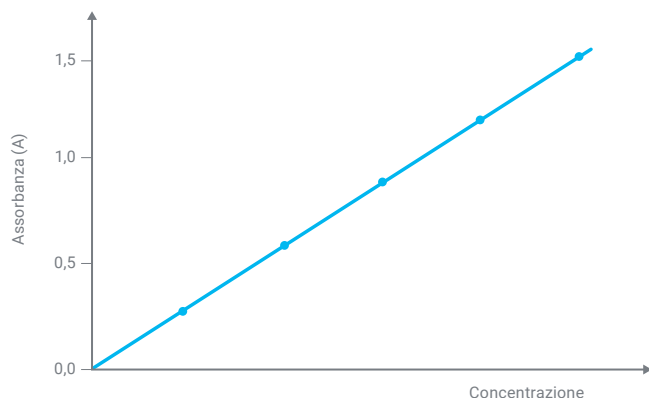


Figura 33. La legge di Beer-Bouguer-Lambert descrive una relazione lineare tra l'assorbanza della luce incidente e la concentrazione della molecola.

Il coefficiente di estinzione (ϵ) è caratteristico di una determinata sostanza in un serie di condizioni ben definite, come lunghezza d'onda, solvente e temperatura. In pratica, il coefficiente di estinzione misurato dipende anche in parte dalle caratteristiche dello strumento utilizzato. Per questi motivi, normalmente i valori predeterminati del coefficiente di estinzione non sono usati per l'analisi quantitativa. Viene invece costruita una curva di calibrazione o di lavoro per la sostanza da analizzare, usando una o più soluzioni standard con concentrazioni note dell'analita.

Per le transizioni elettroniche, la differenza in energia tra lo stato fondamentale e quello eccitato è relativamente ampia. Pertanto, a temperatura ambiente, è molto probabile che tutte le molecole si trovino nello stato elettronico fondamentale. L'assorbimento e il ritorno allo stato fondamentale sono processi rapidi in cui l'equilibrio viene raggiunto molto velocemente. L'assorbimento della luce UV-visibile è quindi quantitativamente molto accurato. La semplice relazione lineare esistente tra assorbanza e concentrazione, nonché la relativa facilità di misura della luce UV-visibile hanno reso la spettroscopia UV-visibile il metodo di analisi quantitativa prediletto da migliaia di persone. Assumendo che la legge di Beer è osservata per lo spettro di ordine zero, una relazione lineare simile esiste tra concentrazione e ampiezza per tutti gli ordini degli spettri delle derivate:

Ordine zero: $A = \epsilon bc$

Derivata prima: $dA/d\lambda = (d\epsilon/d\lambda)bc$

Derivata n-esima: $d^n A/d\lambda^n = (d^n \epsilon/d\lambda^n)bc$

a λ , dove A è l'assorbanza, ϵ è il coefficiente di estinzione, b è la lunghezza del percorso del campione e c è la concentrazione del campione.

Per la quantificazione di componenti singoli, la selezione delle lunghezze d'onda è più difficile con gli spettri delle derivate che con gli spettri di assorbanza, in quanto sono presenti sia picchi negativi che positivi. Le derivate di ordine pari presentano un massimo o un minimo del picco alla stessa λ_{max} degli spettri di assorbanza, ma per le derivate di ordine dispari questa lunghezza d'onda si trova in un punto di passaggio per lo zero. Optando per la differenza tra il massimo più elevato e il minimo più basso si ottiene il miglior rapporto segnale-rumore (S/N), ma può comportare maggiore sensibilità a interferenza da parte di altri componenti.

Per risultati accurati, il campione da analizzare deve contenere solo il componente assorbente per il quale è stata eseguita la calibrazione. Se il campione è una soluzione, un campione puro del solvente deve essere usato come bianco. Potrebbe essere possibile correggere un componente interferente con una seconda lunghezza d'onda.

Misure della concentrazione

Una delle applicazioni più comuni per lo spettrofotometro UV-Vis è la semplice quantificazione della concentrazione. Abbinato a una sonda a introduzione diretta in fibra ottica come accessorio, uno spettrofotometro UV-Vis può essere usato per eseguire misure direttamente nel contenitore del campione, senza dover decantare in una cuvetta.

[Per saperne di più.](#)



4.4 Cinetica

L'analisi della cinetica di reazione è fondamentale per capire come avvengono le reazioni in chimica e biochimica. La spettrofotometria UV-Vis è una tecnica ideale per questa applicazione in quanto il campione non viene distrutto. La si può utilizzare quando variazioni nel reagente o nei prodotti producono nel tempo un cambiamento in assorbanza a una lunghezza d'onda specifica. Con un sistema UV-Vis a scansione rapida, è possibile eseguire molteplici scan durante la reazione in modo da poterla visualizzare e agevolare la scelta di lunghezze d'onda selezionate per il calcolo della velocità.

Cinetica a singolo punto

L'analisi della cinetica a singolo punto costituisce il metodo più semplice per determinare la velocità di una reazione. Viene selezionata una singola lunghezza d'onda, di solito l'assorbanza massima dell'analita di interesse, e, dopo avere avviato la reazione, l'assorbanza è continuamente monitorata a quella lunghezza d'onda. Questo produce un grafico dell'assorbanza in funzione del tempo, come mostrato per quattro campioni in Figura 34. Il monitoraggio del cambiamento dell'assorbanza nel tempo consente di studiare una reazione: quando l'assorbanza cessa di cambiare, normalmente si può concludere che la reazione è completata. Nella Figura 34 sono mostrati quattro campioni differenti su un periodo di 30 minuti.

Il vantaggio della misura a singolo punto risiede nel fatto che, per reazioni veloci, i dati possono essere raccolti in modo quasi continuo, in quanto il sistema non deve passare a un'altra lunghezza d'onda durante la misura. La velocità di raccolta dati dello strumento e il tempo per la media del segnale sono i fattori limitanti per la quantità di dati che possono essere raccolti.

Per le misure della cinetica si possono anche monitorare più lunghezze d'onda. Questo potrebbe fornire informazioni sulla creazione di un prodotto di reazione a una lunghezza d'onda e sul suo esaurimento a un'altra.

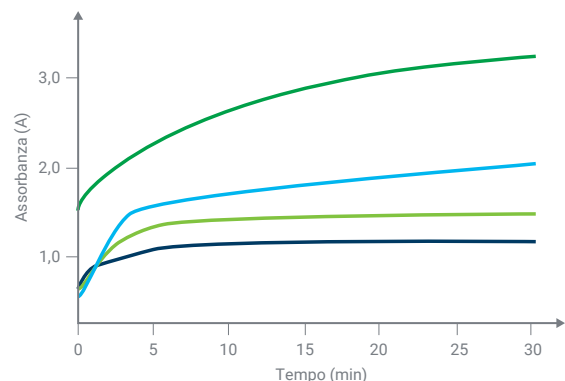


Figura 34. Il monitoraggio del cambiamento dell'assorbanza nel tempo consente di studiare una reazione: quando l'assorbanza cessa di cambiare, normalmente si può concludere che la reazione è completata. Nel grafico sono mostrati quattro campioni differenti su un periodo di 30 minuti.

Cinetica mediante scansione

La scansione di un intervallo di lunghezze d'onda nel tempo può fornire informazioni supplementari durante le misure della cinetica. Al di là di fornire un'impressione visiva della reazione in tempo reale (come mostrato in Figura 34), questa misura offre la flessibilità di poter selezionare tutte le lunghezze d'onda desiderate nell'intervallo di scansione, per eseguire il calcolo della velocità di reazione. Questo potrebbe includere l'analisi del consumo di reagenti o la produzione di prodotti di reazione con il progredire della reazione. Quando si esegue la cinetica mediante scansione, è importante assicurarsi che il sistema UV-Vis sia in grado di scansionare rapidamente l'intervallo di lunghezze d'onda selezionato. Scansioni più lente limiteranno la quantità di dati raccolti a una determinata lunghezza d'onda durante la reazione.

Cinetica mediante miscelazione rapida

Per monitorare la velocità di reazione o due soluzioni che reagiscono rapidamente, potrebbe essere necessario ricorrere a un accessorio specifico per la miscelazione rapida o a flusso interrotto. Questi accessori montati su uno spettrofotometro UV-Vis garantiscono l'erogazione accurata di due o più soluzioni in una cella a flusso nel sistema UV-Vis dove avviene la miscelazione. L'accessorio a flusso interrotto fa in modo che il sistema UV-Vis avvii l'analisi non appena le soluzioni sono miscelate nella cella a flusso. Opzioni includono la capacità di modificare il rapporto di miscelazione delle soluzioni e di termostatare la cella a flusso e i reagenti. Poiché la velocità di raccolta è cruciale, è importante selezionare un sistema UV-Vis con una velocità di raccolta dei dati sufficiente per raccogliere una serie di punti dati nello spazio di tempo della reazione. L'esempio mostrato in Figura 36 mostra una reazione monitorata per tre secondi.

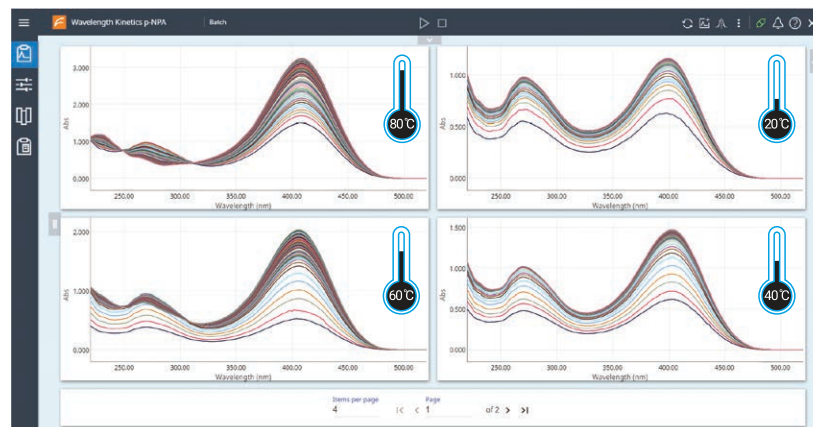


Figura 35. Cinetica mediante scansione: Gli spettrofotometri UV-Vis forniscono informazioni approfondite sulla chimica delle reazioni. L'impatto della temperatura sulle reazioni chimiche può essere osservato velocemente e facilmente con rapide scansioni a diverse temperature. [Qui potete trovare un esperimento di cinetica mediante scansione.](#)

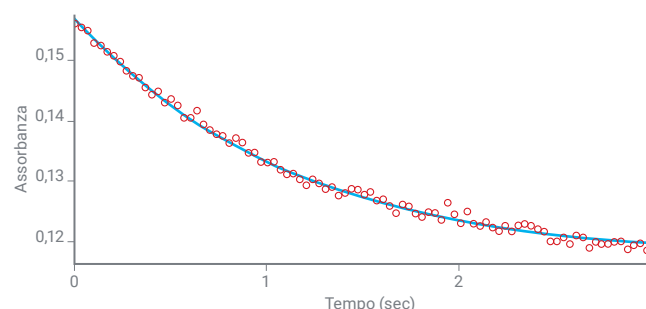


Figura 36. L'uso di uno spettrofotometro UV-Vis moderno e di un accessorio per miscelazione rapida consente la misura di reazioni su un arco di tempo di pochi secondi. [Un esperimento esemplificativo.](#)

Considerazioni sulle misure della cinetica

La velocità di una reazione può essere influenzata dalla temperatura. Per questo motivo, potrebbe essere importante mantenere un campione a una temperatura costante: nel caso di reazioni biologiche, per esempio, solitamente viene scelta la temperatura corporea (37 gradi). A tal scopo, cuvette con sistema di raffreddamento/riscaldamento Peltier o supporti per cuvette termostatati in un bagno ad acqua sono comunemente usati con un sistema UV-Vis. Questi accessori sono in grado di mantenere un campione a una temperatura specifica o modificare la temperatura nel tempo (mediante gradienti).

È necessario considerare con attenzione accuratezza e riproducibilità della temperatura, in quanto lievi variazioni della temperatura o la velocità di cambiamento possono influenzare in modo significativo i risultati. Alcuni sistemi offrono la possibilità di misurare la temperatura dei campioni direttamente nella cuvetta (anziché misurare solo la temperatura del supporto per cuvetta). In combinazione con un feedback al sistema di controllo della temperatura, tipicamente questo garantisce un migliore controllo della temperatura del campione. Le sonde di temperatura nel campione possono anche essere usate per registrare la temperatura del campione insieme ai dati di assorbanza.

L'agitazione uniforme e riproducibile dei campioni è un altro fattore importante. Quando si misurano reazioni a temperatura ambiente, l'agitazione assicura che i reagenti siano miscelati in modo uniforme durante la reazione. Per campioni termostatati, l'agitazione assicura l'assenza di gradiente di temperatura nel campione.

Quando si misurano sistemi complessi, l'uso di una sonda a fibra ottica potrebbe essere l'opzione più adatta. Un cavo a fibra ottica permette alla luce dallo spettrofotometro di essere diretta a un campione fuori dallo spettrofotometro UV-Vis. Questo può essere utile per le misure di un processo di produzione a flusso, dove il campione è a temperatura o pressione estreme, o quando il campione non può essere fisicamente inserito nel vano per i campioni dello spettrofotometro.

Sul sito [agilent.com](https://www.agilent.com) è possibile guardare una [dimostrazione di esperimenti cinetici](#).

4.5 Misura del colore

Il colore è una proprietà fondamentale di un materiale. Il colore della materia è legato alla relativa assorbività o riflettività di specifiche lunghezze d'onda della luce. L'occhio umano vede il colore complementare di quello assorbito, come mostrato in Figura 37 e in Figura 38.

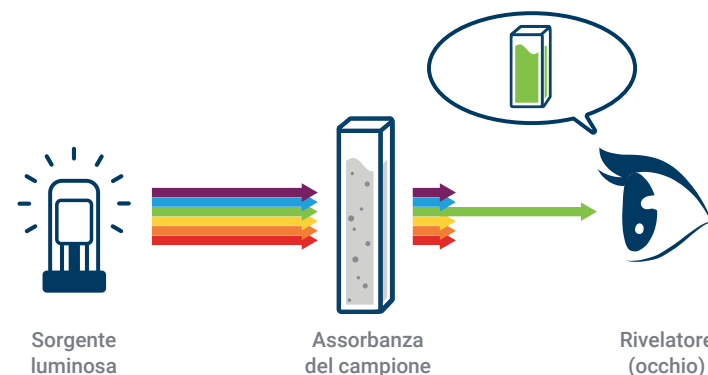


Figura 37. Trasmissione e colore. Molto similmente al rivelatore dello spettrofotometro, il nostro occhio vede la luce trasmessa attraverso o rimbalzata su una superficie. Questa viene percepita come il colore dell'oggetto.



Figura 38. Lunghezze d'onda della luce associate a colori differenti (sinistra) e colore della luce assorbita e colore complementare associato visto dall'occhio umano (destra).

In pratica, la generazione e la sensazione del colore sono entrambe estremamente complesse e dipendono da molti fattori, tra cui:

- Lo spettro della luce che cade sull'oggetto (si pensi alla differenza nei colori al tramonto e durante il giorno)
- La struttura superficiale di un materiale solido (le scaglie di un pesce o le piume di un uccello sono due esempi in cui la struttura fisica della superficie modifica il colore che si osserva)
- L'angolo visuale (alcune superfici, come le vernici perlacee, cambiano colore a seconda dell'angolo da cui si visualizza la superficie)

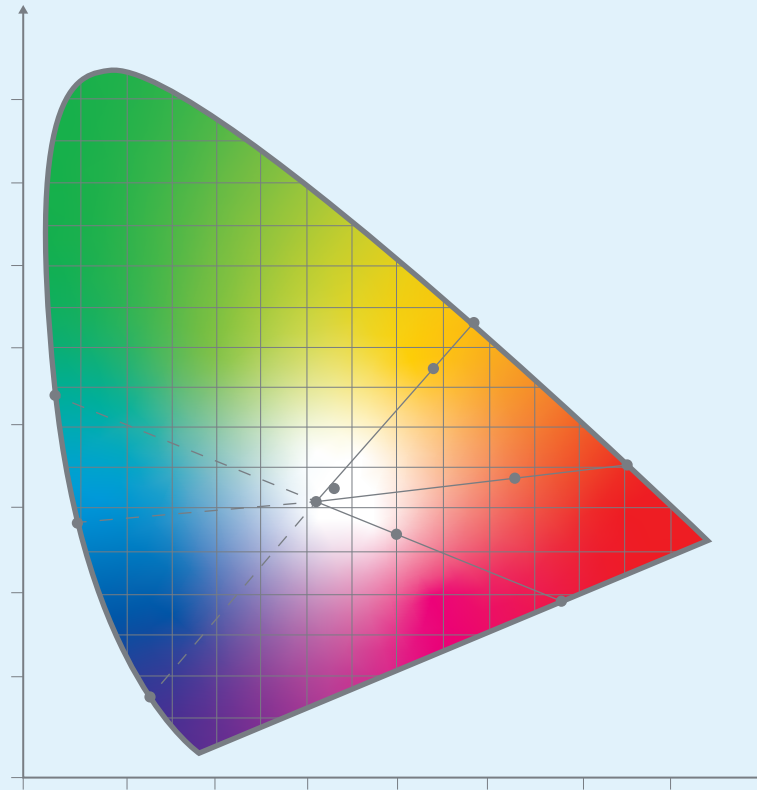
Sono stati sviluppati dei sistemi specifici per la misura del colore, come il CIE L*a*b, e la strumentazione per misurare il colore. La maggior parte degli spettrofotometri, quando sono dotati del software appropriato, possono essere usati per misurare il colore. La percezione del colore è anche influenzata dalla superficie e dalla relativa capacità di produrre riflettanza speculare (simile a uno specchio) o riflettanza diffusa (dispersione). A causa di questi fattori, la misura del colore potrebbe richiedere accessori speciali che consentono di raccogliere la riflettanza speculare e diffusa e osservarla a differenti angoli visuali.

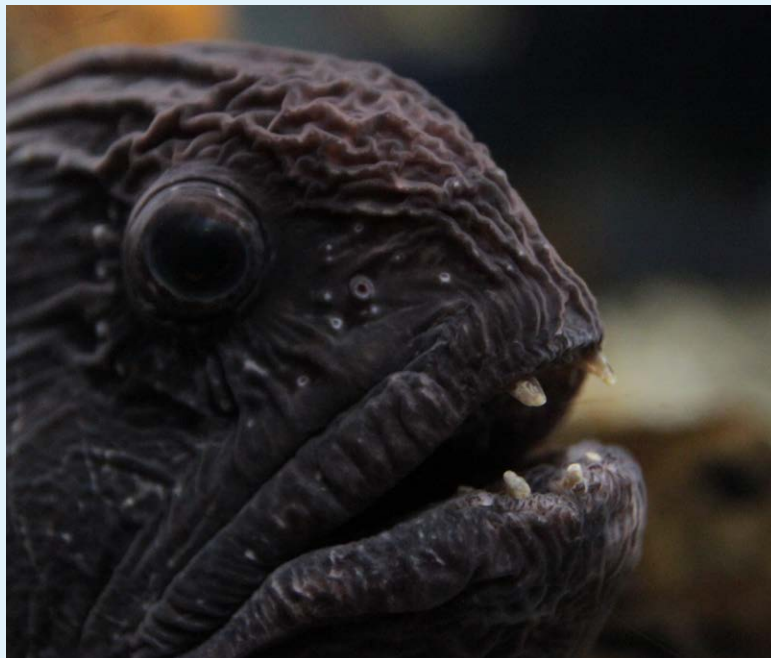
Uno strumento per la misura del colore prenderà lo spettro UV-Vis di un campione e lo convertirà in tre coordinate del colore che localizzano il colore in uno spazio di colori tridimensionale (fare riferimento all'immagine nel riquadro a lato). Le tre coordinate definiscono chiarezza, croma e tinta del campione. La chiarezza è una misura di quanto un colore è chiaro o scuro. La croma è una misura della "purezza del colore", mentre la tinta è il colore spettrale dominante, simile ai colori visibili in un arcobaleno.

Oltre ad essere usato per misure di color matching (per esempio per misurare i colori della vernice su un manufatto), uno spettrofotometro UV-Vis può anche essere usato per misurare un cambiamento di colore in una soluzione. Le misure UV-Vis sono spesso impiegate per questo scopo, per valutare se una reazione è avvenuta o sta avvenendo, senza ricorrere a un'ispezione visiva. Le analisi basate sui colori rappresentano una delle applicazioni più ampiamente usate per la spettrofotometria UV-Vis.

Misura del colore

Gli spettrofotometri UV-Vis sono usati per misurare il colore di liquidi e solidi. Misurando la luce visibile che è trasmessa attraverso una soluzione o un materiale, o la luce riflessa da una superficie, è possibile calcolare il colore del liquido o del materiale. Viene usata una serie di tre numeri per indicare le coordinate del colore misurato in uno "spazio di colori". [Per saperne di più.](#)





Quanto nero è il nero? Chiedetelo a un pesce delle profondità marine

I ricercatori hanno scoperto numerosi pesci nelle profondità marine dalla pelle ultra nera, ovvero che riflette meno dello 0,5% della luce incidente. I pesci usano la pelle ultra nera per non essere notati quando vanno a caccia di prede. Nelle profondità, le scure creature marine spesso sfruttano il bagliore prodotto mediante bioluminescenza per riuscire a vedere le prede o gli aggressori. La pelle ultra nera assorbe la luce di bioluminescenza, evitando al pesce di essere visto.

I ricercatori del Museo nazionale di storia naturale Smithsonian e dell'Università Duke hanno misurato la riflessione della pelle dei pesci, che assorbe il 99,5% di luce. Questo è paragonabile al superbo uccello del paradiso (99,95%) e al materiale più nero mai prodotto, Vantablack che assorbe il 99,96%.

Il meccanismo utilizzato dai pesci per assorbire la luce potrebbe avere applicazione nei pannelli solari, telescopi, macchine fotografiche e sistemi per la mimetizzazione.

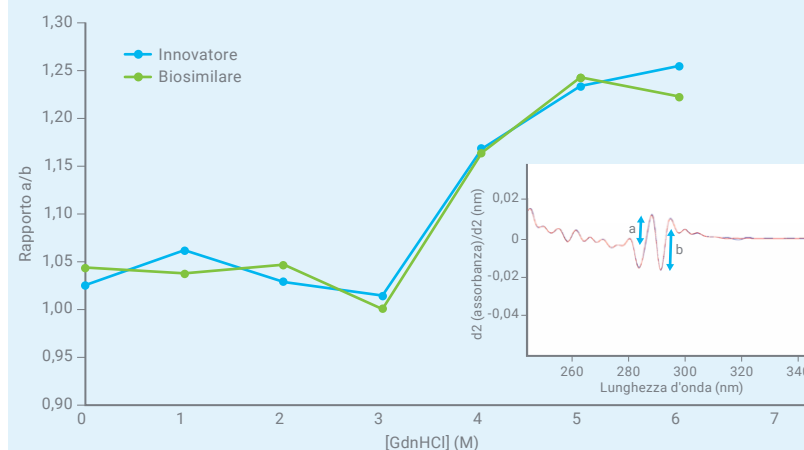
[Leggete i risultati della ricerca](#)

4.6 Variazioni strutturali dei composti

La spettroscopia UV-visibile può essere usata per determinare numerose caratteristiche fisico-chimiche dei composti. Queste misure possono identificare un composto o determinare specifiche proprietà.

Studi conformazionali

La spettroscopia UV-Vis può fornire informazioni sulla struttura delle proteine. La spettrofotometria UV-Vis, inoltre, non è distruttiva, evitando così di dover sacrificare campioni preziosi. UV-Vis è pertanto ideale per l'uso prima dell'analisi mediante tecniche come la cromatografia liquida o la spettrometria di massa. Questo è dimostrato nel confronto tra due anticorpi monoclonali, innovatore e biosimilare. [Per saperne di più.](#)



4.7 Temperatura di fusione di proteine e acidi nucleici

La spettroscopia UV-Vis è comunemente usata nelle bioscienze per l'analisi di biomolecole come proteine e acidi nucleici. Gli spettri di assorbanza delle proteine sono dovuti all'assorbanza degli aminoacidi aromatici triptofano, tirosina e fenilalanina. L'analisi a multicomponente può essere usata per determinare quanti di questi aminoacidi aromatici sono presenti in una proteina intatta.

Una proteina a temperatura ambiente ha una struttura terziaria o conformazione specifica che a sua volta crea uno specifico ambiente elettronico per gli aminoacidi aromatici. Un'altra applicazione di spettroscopia UV-Vis espone le proteine a calore o denaturanti chimici. A una certa temperatura, questo causerà il dispiegamento o la fusione della proteina e conseguente perdita della sua struttura. In questo processo, l'ambiente

elettronico degli aminoacidi aromatici cambia, il che risulta a sua volta in cambiamenti o spostamenti spettrali.

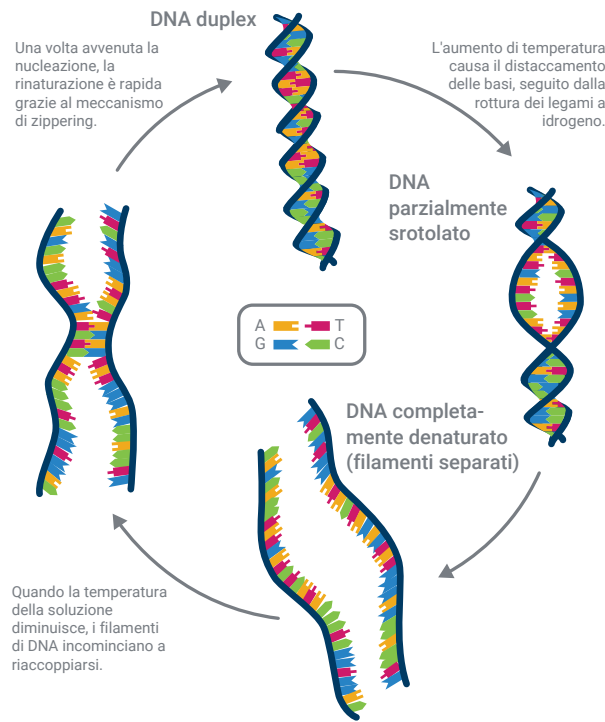


Figura 39. I filamenti della doppia elica del DNA si srotolano quando il DNA è riscaldato. Questo aumenta l'assorbanza di luce UV a 260 nm. Quando il DNA si è raffreddato, i filamenti si riuniscono.

L'acido desossiribonucleico (DNA) nel suo stato nativo è costituito da due filamenti di molecole di desossiribosio avvolte ad elica attorno allo stesso asse. I filamenti sono uniti tra loro da legami a idrogeno tra le basi puriniche e le basi pirimidiniche: adenina è unita alla timina (A-T) e guanina alla citosina (G-C). Queste basi sono le principali responsabili per l'assorbanza UV del DNA e di altri tipi di acidi nucleici, con un picco massimo a 260 nm. Come in ogni sistema a multicomponente, l'assorbimento osservato di una molecola di acido nucleico dovrebbe essere uguale alla somma delle singole assorbanze:

$$A_{DNA} = A_{adenina} + A_{guanina} + A_{citosina} + A_{timina}$$

Tuttavia, l'assorbanza osservata è sempre significativamente inferiore del previsto, perché i legami a idrogeno tra le basi cambiano il loro ambiente elettronico. Quando una molecola è riscaldata, i legami a idrogeno si rompono, la doppia elica si srotola e l'assorbanza aumenta in modo tale da avvicinarsi ai livelli previsti dalla somma di tutte le basi (fare riferimento alla Figura 39). Questo processo di denaturazione è noto come fusione o fusione termica. In un esperimento di fusione termica, la temperatura di una soluzione di acidi nucleici a doppio filamento è aumentata in modo graduale; l'assorbanza a 260 nm a ciascuna temperatura viene misurata e riportata come curva di fusione (come mostrato in figura 40). Il punto medio dell'intervallo di temperatura nel quale avviene la fusione è il valore di T_m . Il valore di T_m di un particolare campione di acidi nucleici dipende principalmente dalla percentuale delle coppie G-C nel campione, ognuna delle quali contiene tre legami a idrogeno (ogni coppia A-T, invece, contiene due legami a idrogeno). Maggiore la percentuale di coppie G-C nel campione, maggiore sarà la T_m osservata.

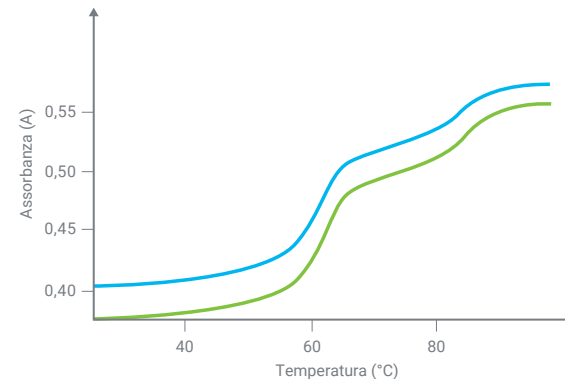


Figura 40. La misura dell'assorbanza a 260 nm, accompagnata da un aumento della temperatura, produce questo grafico caratteristico della "fusione" di una molecola di DNA. Il cambiamento nell'assorbanza è un'indicazione delle molteplici transizioni dovute allo srotolamento dell'elica di DNA.

Per le analisi di fusione di proteine e DNA, lo spettrofotometro UV-Vis deve essere dotato di mezzi che consentono di modificare la temperatura del campione in modo accurato e riproducibile. I recenti progressi nella strumentazione spettrofotometrica consentono riduzioni significative nei tempi impiegati per le misure di fusione termica, nonché una maggiore accuratezza delle temperature mai raggiunta in precedenza. I sistemi UV-Vis per l'analisi di fusione termica sono disponibili con sonde di temperatura integrate nelle cuvette, che possono essere usate per controllare accuratamente la temperatura delle soluzioni durante l'esperimento. L'agitazione all'interno delle cuvette garantisce inoltre il riscaldamento uniforme dei campioni. Quando l'analisi prevede un grande numero di campioni, un supporto multicella è integrato nello strumento o viene fornito insieme allo strumento. La maggior

parte degli accessori per il controllo della temperatura di tipo Peltier prevede un bagnomaria a circolazione per il raffreddamento degli elementi Peltier. Di nuovo, recenti innovazioni hanno permesso l'uso di Peltier raffreddati ad aria nel blocco della cella. L'intervallo di temperatura richiesto tipicamente è compreso tra 0 e 110 °C; insieme al monitoraggio della temperatura e il sistema di agitazione integrati, offre la capacità di modificare mediante gradienti la temperatura del campione il più velocemente possibile, durante l'analisi.

Analisi di fusione termica degli acidi nucleici

Il controllo della temperatura dei campioni è un requisito essenziale del sistema UV-Vis per l'analisi di fusione termica. Il riscaldamento rapido e riproducibile può essere assistito usando una sonda di temperatura incorporata nella cuvetta. [Per saperne di più.](#)



4.8 Analisi a multicomponente

Le analisi a multicomponente che utilizzano gli spettri UV-visibile vengono eseguite da quasi lo stesso tempo delle analisi a componente singolo. Tuttavia, poiché le tecniche utilizzate nell'analisi a multicomponente spesso producevano risultati errati, il loro impiego era limitato. Uno spettrofotometro UV-Vis moderno con un buon design produce dati più precisi. Moderne tecniche di curve-fitting, inoltre, forniscono risultati più accurati e, forse ancora più importante, indicano quando i risultati sono errati.

Principio di additività

Secondo la legge di Beer, l'assorbanza è proporzionale al numero di molecole che assorbono la radiazione alla specifica lunghezza d'onda. Questo principio è vero se sono presenti più di una specie assorbente. Tutti i metodi quantitativi a multicomponente si basano sul principio che l'assorbanza di una miscela a una lunghezza d'onda è uguale alla somma dell'assorbanza di ciascun componente nella miscela a quella lunghezza d'onda.

Il semplice approccio all'analisi a multicomponente è basato su misure a un numero di lunghezze d'onda, equivalente al numero di componenti presenti nella miscela. Le lunghezze d'onda che vengono scelte sono solitamente quelle del massimo di assorbanza di ciascun componente. Per la calibrazione, viene misurata l'assorbanza di standard di concentrazioni note di componenti

puri, per determinare il coefficiente di estinzione per ciascun componente a ogni lunghezza d'onda selezionata. L'assorbanza della miscela a ciascuna lunghezza d'onda è la somma delle assorbanze di ciascun componente a quella lunghezza d'onda, che a sua volta dipende dal coefficiente di estinzione e dalla concentrazione di ciascun componente. Così, per due componenti, le equazioni sono:

$$A'_{(x+y)} = A'_x + A'_y = e'_x bc_x + e'_y bc_y$$

e

$$A''_{(x+y)} = A''_x + A''_y = e''_x bc_x + e''_y bc_y$$

Dove:

- A' è l'assorbanza alla lunghezza d'onda'
- A'' è l'assorbanza alla lunghezza d'onda''
- e' è l'assorbività molare alla lunghezza d'onda'
- e'' è l'assorbività molare alla lunghezza d'onda''
- c è la concentrazione
- b è la lunghezza del percorso.

La risoluzione di queste facili equazioni permette di determinare la concentrazione di ciascun componente. Se le misure fossero sempre perfette, sarebbe possibile ottenere risultati accurati persino per miscele complesse di componenti con spettri molto simili. In pratica, tuttavia, si verificano sempre degli errori di misura, che possono influenzare in modo significativo l'accuratezza dei risultati in presenza di un'importante sovrapposizione spettrale. Nella Figura 41 è mostrata la simulazione di una miscela a due componenti che non presenta sovrapposizioni degli spettri ai massimi di assorbanza.

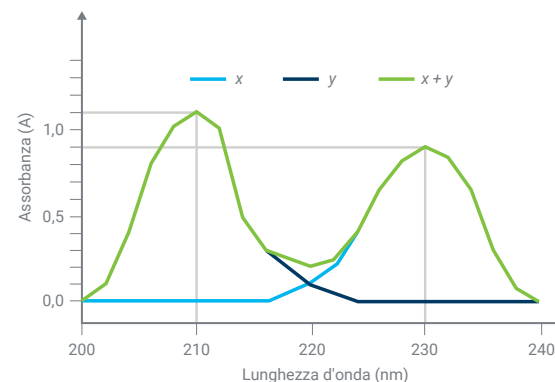


Figura 41. Una miscela a due componenti con minima sovrapposizione spettrale.

Al contrario, nella Figura 42 è mostrata la simulazione di una miscela a due componenti che presenta significative sovrapposizioni degli spettri ai massimi di assorbanza.

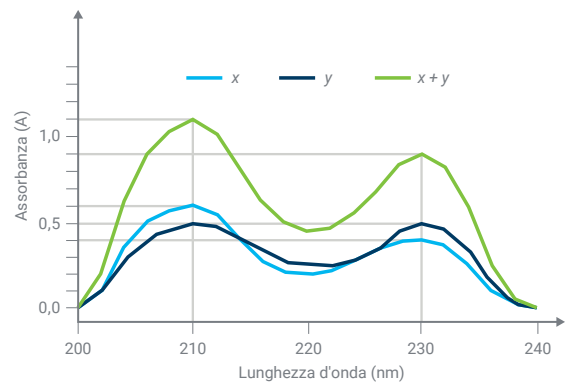


Figura 42. Una miscela a due componenti con significativa sovrapposizione spettrale.

Con minima sovrapposizione spettrale			Con sostanziale sovrapposizione spettrale		
$A'(x+y) = 1,1 + 0,0 = 1,1$			$A'(x+y) = 0,6 + 0,5 = 1,1$		
$A''(x+y) = 0,0 + 0,9 = 0,9$			$A''(x+y) = 0,4 + 0,5 = 0,9$		

Per una miscela di x e y dove $c_x = c_y = 1$, le assorbanze misurate dovrebbero essere:

Se si verifica un errore del 10% nella misuradi $A'_{(x+y)}$ e $A''_{(x+y)}$, ovvero, $A'_{(x+y)} = 0,99$ (-10%) e $A''_{(x+y)} = 0,99$ (+10%), il calcolo quantitativo produce i risultati mostrati nella Tabella 6:

Tabella 6. Confronto di risultati di analisi a multicomponente per esempi con minima e sostanziale sovrapposizione spettrale.

Componente	Concentrazione nominale	Concentrazione calcolata	Minima sovrapposizione spettrale	Sostanziale sovrapposizione spettrale	
			errore %	Concentrazione calcolata	errore %
x	1	0,9	-10%	0,0	-100%
y	1	1,1	+10%	1,98	+98%

Metodo dei minimi quadrati

L'effetto del rumore casuale può essere ridotto usando ulteriori informazioni spettrali, ovvero anziché solo due punti dati, è possibile usare per la quantificazione una serie di punti dati. In questo cosiddetto sistema sovradeterminato, l'approssimazione dello spettro del campione misurato rispetto alla retta dei minimi quadrati degli spettri standard produce risultati quantitativi (1,2). Nella Figura 43 è mostrato uno spettro per la miscela a due componenti mostrata in Figura 42, con errore casuale del 10% a ogni punto di misura.

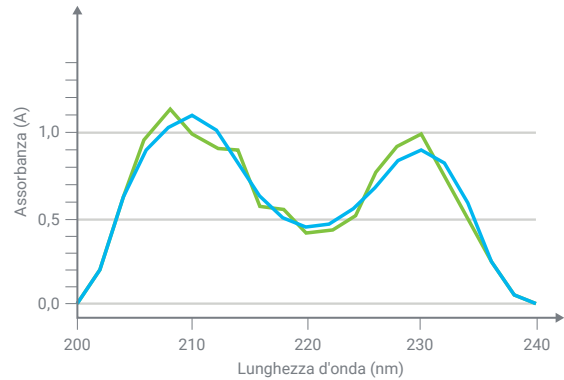


Figura 43. Spettro della miscela con errore casuale del 10% a ciascuna lunghezza d'onda.

Con 21 punti dati (intervalli di 2 nm da 200 a 240 nm), i risultati quantitativi ottenuti con il metodo dei minimi quadrati presentano un errore inferiore a 1% rispetto a un errore di circa 100% dalle misure usuali a due lunghezze d'onda, come mostrato nella Tabella 7.

Tabella 7. Confronto di risultati di analisi a multicomponente da semplici equazioni simultanee e metodo dei minimi quadrati.

Componente	Concentrazione nominale	Concentrazione calcolata	Usando solo 210 e 230 nm	Usando 200-240 nm	
			errore %	Concentrazione calcolata	errore %
x	1	0,0	-100%	1,003	+0,3%
y	1	1,98	+98%	0,995	-0,5%

Questo metodo consente l'analisi di miscele più complesse e di miscele semplici di componenti con spettri simili. Il residuo dal calcolo con i minimi quadrati è un buon indicatore della qualità dell'approssimazione degli spettri standard agli spettri del campione e pertanto è un buon indicatore della probabile accuratezza dei risultati.

La quantificazione di cinque emoglobine nel sangue con minima preparazione del campione è un esempio di analisi a multicomponente (3). Nella Figura 44 sono mostrati gli spettri di assorbimento di derivati dell'emoglobina. Quest'analisi è stata condotta precedentemente usando varie tecniche analitiche, tra cui spettroscopia e titolazioni.

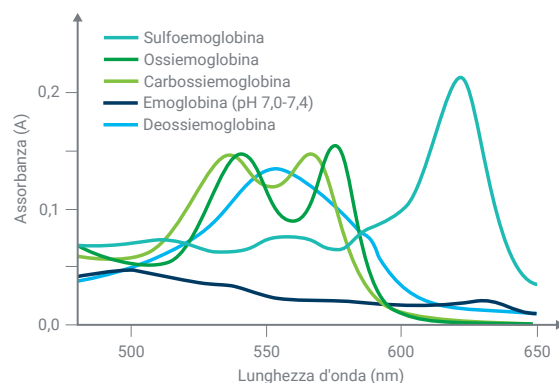


Figura 44. Spettri di assorbimento di derivati dell'emoglobina.

Altri metodi

Altri approcci statistici all'analisi a multicomponente includono i metodi dei minimi quadrati parziali (PLS), della regressione del componente principale (PCR) e dei minimi quadrati multipli (MLS). In teoria, questi metodi offrono alcuni vantaggi rispetto a quelli descritti sopra, tuttavia il processo di calibrazione può essere molto più complesso.

Requisiti dei campioni

Le semplici equazioni simultanee e i metodi dei minimi quadrati producono risultati accurati solo se la calibrazione è eseguita usando standard puri o miscele di standard per ciascun componente nel campione che contribuisce allo spettro UV-visibile. Il campione incognito non deve presentare nessun'altra capacità di assorbimento.

Requisiti dello strumento

La quantificazione a singolo componente normalmente è eseguita misurando con lo stesso strumento uno standard o serie di standard seguiti da una sostanza incognita. Questo processo di calibrazione dovrebbe eliminare l'errore strumentale così da rendere l'accuratezza della lunghezza d'onda assoluta e l'accuratezza fotometrica assoluta relativamente trascurabili. La riproducibilità fotometrica, d'altro canto, è essenziale per risultati precisi. Se le misure sono condotte solo al massimo di assorbimento, anche la riproducibilità della lunghezza d'onda è trascurabile, perché la velocità di cambiamento dell'assorbanza con la lunghezza d'onda è ridotta. Tuttavia, se si usa una lunghezza d'onda su uno dei lati della banda, la riproducibilità della lunghezza d'onda diventa particolarmente importante. Infine, la linearità strumentale è cruciale, in quanto il processo di calibrazione si basa su una relazione lineare. Analisi a multicomponente accurate richiedono prestazioni segnale-rumore eccellenti, specialmente se si utilizza il semplice metodo delle equazioni simultanee. Nel metodo dei minimi quadrati, i dati ottenuti dai lati delle bande di assorbimento sono incorporati nel calcolo, pertanto la riproducibilità della lunghezza d'onda diventa essenziale anche in questo caso. In aggiunta, poiché sono richiesti più dati, per la produttività saranno necessarie scansioni rapide.

4.9 Requisiti software

Software specifici per l'analisi a multicomponente sono disponibili per assistere nella creazione di modelli di dati per analizzare i dati raccolti. Questi pacchetti software possono essere incorporati nel controllo software e nel software per la refertazione dello strumento; in alternativa possono anche essere pacchetti indipendenti. La maggior parte dei sistemi UV-Vis disponibili possono esportare dati in un formato standard che può essere importato in un pacchetto software per l'analisi a multicomponente per l'elaborazione.

Bibliografia:

1. Kisner, H.; Brown, W.; Kavarnos, G. "Multiple analytical frequencies and standards for the least-squares analysis of serum lipids. **Anal. Chem.** **1983**, *55*, 1703.
2. Maris M.; Brown, C.; Lavery, D. Nonlinear multicomponent analysis by infrared spectrophotometry. **Anal. Chem.** **1983**, *55*, 1694.
3. Zwart, A.; van Kampen, E.; Zijlstra, W. Multicomponent analysis of hemoglobin derivatives with a reversed-optics instrument. **Clin. Chem.**, **1984**, *30*, 373.



5. Glossario

assorbanza: 1. proprietà di una sostanza in grado di assorbire la luce 2. unità per l'assorbanza della luce, rappresentata come A.

Ad arco (lampada): crea luce da un arco elettrico o voltaico attraverso un gas inerte.

bianco: il solvente o substrato del campione, senza le specie assorbenti. Quando si misurano campioni in soluzione, questo sarà il solvente (spesso acqua) in una cuvetta. L'assorbanza del bianco può così essere sottratta da quella del campione per determinare l'assorbanza dovuta al solo campione.

carotenoidi: cromoforo associato alla fotosintesi in certe piante, alghe e batteri.

cromoforo: parte di una molecola che assorbe la luce

cuvetta: comunemente indicata come cella, la cuvetta è il contenitore in cui si trovano campioni in soluzione. Le cuvette sono disponibili in volumi differenti e con diverse lunghezze del percorso. Il materiale delle cuvette determina la trasparenza ottica.

dispersione: nel design ottico si riferisce alla capacità del dispositivo ottico di separare la luce nelle sue lunghezze d'onda costituenti. Per esempio, la luce bianca attraverso un prisma crea un effetto arcobaleno mediante dispersione.

dispersione: effetto della luce che rimbalza da una superficie a qualsiasi angolo.

farmacopea: documento normativo che elenca dettagli riguardanti prodotti farmaceutici e procedure di test richiesti o raccomandati per le aziende farmaceutiche.

fluorescenza: una forma di luminescenza e proprietà di alcune molecole in grado di assorbire la luce a una frequenza e di emettere luce di breve durata a un'altra lunghezza d'onda.

fosforescenza: una forma di luminescenza legata alla fluorescenza, proprietà di alcune molecole di assorbire la luce a una frequenza e di emettere una luce ritardata a un'altra lunghezza d'onda.

fotochimica (reazioni): reazione chimica causata dall'assorbimento della luce.

fotosensibilità: sensibilità di una sostanza a reagire quando esposta alla luce.

GMP: abbreviazione. Buone pratiche di fabbricazione. Adottate comunemente in aziende farmaceutiche e altre industrie manifatturiere regolamentate.

linea di base: una misura raccolta con gli stessi parametri per le misure del campione, ma in assenza del campione. Per la misura della linea di base, solitamente viene usato un bianco, in quanto permette di sottrarre dalla misura finale del campione i contributi dello strumento, solvente, cuvetta ecc.

MRC: abbreviazione. Materiale di riferimento certificato. In riferimento a standard forniti che sono stati certificati a uno standard primario per confronto.

olografiche (ottiche): ottiche olografiche sono create mediante incisione di un pattern di interferenza su una superficie ottica. Possono essere usate al posto di lenti, specchi e altri dispositivi ottici. Grazie al design sono piccole e leggere, facili da riprodurre in modo accurato.

ossidi di terre rare: ossidi di olmio, didimio e samario, il cui uso in misure di validità della lunghezza d'onda è indicato da organizzazioni normative e dalla farmacopea.

Peltier: Peltier è un dispositivo di riscaldamento/raffreddamento azionato da un accoppiamento termoelettrico. Il dispositivo trasferisce calore da un lato del dispositivo all'altro. È in grado di garantire il controllo accurato della temperatura di un campione.

QA/QC: abbreviazione. Controllo qualità o assicurazione qualità

qualitativa (misura): Fornisce una misura che definisce o descrive la stessa. Per es. identificazione di una molecola in soluzione.

quantitativa (misura): misura che si traduce in un valore numerico, per es. concentrazione.

rumore: in termini di spettrofotometria, rumore si riferisce al segnale elettrico di fondo dovuto allo strumento stesso. Se troppo grande, può coprire il segnale misurato, rendendo difficile riuscire a distinguere tra i due segnali. Un modo semplice per immaginarsi il rumore è considerare quando si guardano le stelle da un luogo in città, paragonato a un luogo isolato. La luce di fondo ("rumore") dovuta alle illuminazioni della città rende difficile vedere le stelle. In un luogo isolato, c'è poca luce di fondo e in questo modo la luce delle stelle può essere vista facilmente.

riflessione: descrive il percorso della luce in un campione che è deflessa all'angolo di incidenza.

SOP: abbreviazione. Procedura operativa standard. Documento scritto per assicurare che la misura può essere eseguita in modo sicuro e riproducibile.

spettro: plurale spettri. Intervallo di lunghezze d'onda. Lo spettro elettromagnetico. Si riferisce anche a un output di solito grafico della lunghezza d'onda rispetto all'intensità (o assorbanza, se misurata da uno spettrofotometro).

SST: abbreviazione. Test di idoneità del sistema. Test per determinare l'adeguatezza allo scopo del sistema.

trasmittanza: percentuale di luce incidente che è trasmessa attraverso un campione.

zero: è l'equivalente della funzione "Tara" di una bilancia. Imposta la lettura dello strumento a 0 A.

Maggiori informazioni:

www.agilent.com/chem/cary3500uv-vis

Acquista online:

www.agilent.com/chem/store

Ottieni risposte alle tue domande di natura tecnica e accedi
alle risorse nell'Agilent Community:

community.agilent.com

Italia

numero verde 800 012 575

customercare_italy@agilent.com

Europa

info_agilent@agilent.com

Asia Pacifico

inquiry_lsca@agilent.com

DE-008895

Le informazioni fornite possono variare senza preavviso.

© Agilent Technologies, Inc. 2025
Pubblicato negli Stati Uniti, il 19 agosto 2025
5980-1397ITE