7.7.5 Qualità degli spettri negli spettrofotometri

L'accuratezza e la riproducibilità degli spettri dipendono dai seguenti parametri:

- ampiezza della banda passante e potere risolvente del monocromatore;
- rapporto segnale/disturbo e tempo di risposta del rivelatore;
- velocità di scansione del monocromatore e tempo di risposta del sistema di elaborazione del segnale.

Inoltre, anche la presenza di luce diffusa può pregiudicare la qualità degli spettri.

Ampiezza della banda passante e potere risolvente del monocromatore. Una banda passante stretta assicura che la radiazione in uscita dal monocromatore sia molto monocromatica, ma di modesta intensità, per cui diventa difficile, per il rivelatore, discriminare fra il segnale vero e proprio e la corrente di fondo. Una banda larga, invece, consente l'invio di maggiore energia al rivelatore, ma il fascio di radiazioni è meno monocromatico. Di conseguenza si corre il rischio di registrare uno spettro poco accurato.

Quindi, se lo spettro della sostanza in esame è caratterizzato da picchi molto stretti, si deve usare una banda passante molto stretta per ottenere picchi accurati e ben risolti. Se invece i picchi sono allargati, una banda passante larga non compromette l'accuratezza della misura e la risoluzione.

Il criterio empirico per stabilire il valore ottimale della banda passante per un determinato picco è il seguente: si registra il picco con un valore medio di ampiezza della banda passante (per esempio 1 nm) e si divide per 10 l'ampiezza calcolata a metà altezza.[24]

[24] Ciò permette di apprezzare l'intensità del picco con un errore inferiore allo 0,5%. Se sono presenti più picchi si fa riferimento a quello più stretto.

Nel caso di uno spettrofotometro a serie di diodi la qualità dello spettro dipende dal numero di diodi. Se il DAD possiede 1000 diodi e il campo spettrale va da 200 a 1000 nm, lo spettro registrato avrà un «passo» fisso (ovvero una risoluzione) da 0,8 nm.

Rapporto segnale/disturbo e tempo di risposta del rivelatore. I fotoni non arrivano al rivelatore con un flusso continuo e regolare, ma in modo casuale e disordinato; perciò il segnale elettrico in uscita è fluttuante. Le componenti ad alta frequenza di questa variabilità possono essere filtrate, ovvero attenuate, mediante circuiti di *smoothing* inseriti nel sistema elettrico di rivelazione; quelle a bassa frequenza, invece, non possono essere distinte con sicurezza dal segnale vero e proprio e quindi appaiono come disturbo sul display o al sistema di gestione dei dati.

Il disturbo dipende anche dalla natura quantica della luce e dal tipo di elemento fotosensibile presente nel rivelatore. Se l'intensità della radiazione è bassa, solo pochi fotoni raggiungono il rivelatore e le fluttuazioni sono più ampie. Inoltre, ogni rivelatore ha una regione ottimale di utilizzo, in cui presenta la massima sensibilità; al di fuori di questo intervallo il segnale risulta più instabile.

Nel caso di un fotomoltiplicatore, un metodo per diminuire il **disturbo** (N) è quello di aumentare il **tempo di risposta** (o **costante di tempo**, t) del rivelatore; infatti:

$$N = \sqrt{\frac{1}{t}} \tag{7.6}$$

Quindi, in pratica, si lascia al rivelatore un tempo più lungo per stabilizzare il segnale, prima di comunicarlo al sistema di elaborazione. Tuttavia, se il segnale viene smorzato troppo e la velocità di scansione non viene diminuita di conseguenza, si verifica un eccessivo ritardo fra il sistema di lettura e il sistema di elaborazione (un PC o un semplice

registratore) e quindi si osserva una distorsione dello spettro con perdita di risoluzione, spostamento di picchi e diminuzione dei valori di assorbanza (►fig. 7.16*b*).

Per ottimizzare il rapporto fra questi parametri, gli strumenti sono dotati di:

- un sistema automatico di amplificazione del guadagno del rivelatore;
- un sistema automatico di controllo dell'ampiezza della fenditura (*programmazione delle fenditure*).

Nel primo caso, quando il raggio in arrivo al rivelatore è poco intenso, viene aumentata la tensione ai dinodi del fotomoltiplicatore, per mantenere alto il livello del segnale. In questo modo, però, aumenta il disturbo e ciò limita la possibilità di ridurre a piacere la fenditura. Nel secondo caso, invece, viene allargata la banda passante del monocromatore per aumentare l'energia in arrivo al rivelatore, ma in questo modo si ha perdita di risoluzione.

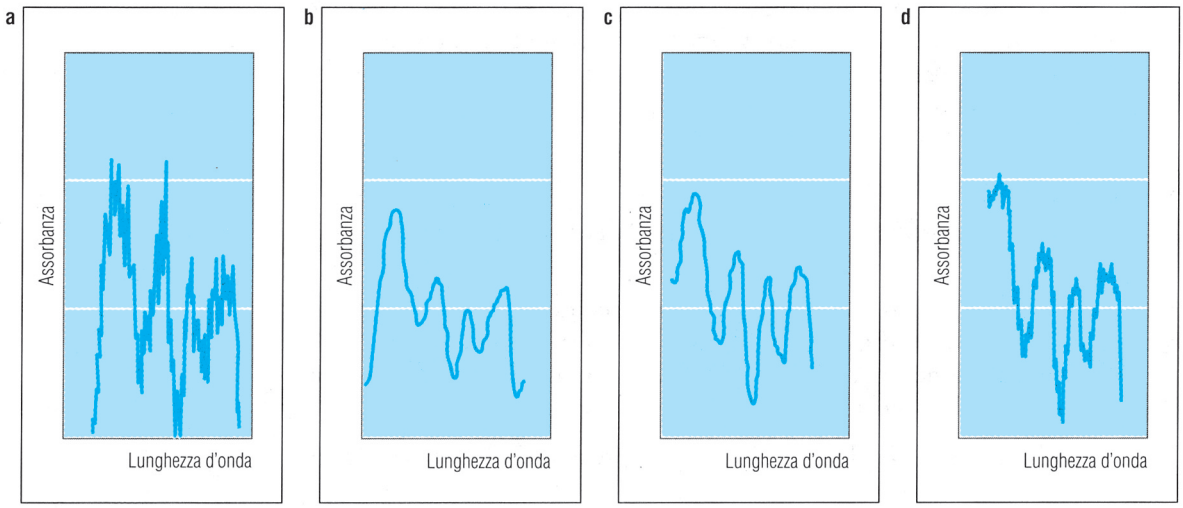

Figura 7.16
Effetto della banda passante e dello smorzamento sulla qualità di uno spettro di assorbimento. Spettro registrato con: (**a**) banda passante stretta e smorzamento basso (il disturbo è elevato); (**b**) banda passante stretta e smorzamento elevato (la risoluzione e l'accuratezza sono scarse); (**c**) banda passante larga e smorzamento basso (la risoluzione è scarsa, ma l'accuratezza accettabile); (**d**) banda passante e smorzamento intermedi (risoluzione e accuratezza sono accettabili).

Luce diffusa. Le imperfezioni e l'usura degli strumenti comportano, per effetto della inevitabile diffusione (*scattering*), il formarsi di radiazioni di lunghezze d'onda diverse da quella di analisi. Anche la piccolissima frazione di luce ambientale (policromatica) che filtra nel comparto celle crea problemi, quando raggiunge il rivelatore.

Inoltre il monocromatore può lasciarsi «sfuggire», insieme alla radiazione nominale, una piccola frazione di onde corrispondenti alle armoniche superiori (cioè multipli della lunghezza d'onda nominale); questo fenomeno è particolarmente accentuato a lunghezze d'onda piccole. La luce diffusa (*stray light*), che si somma a quella in uscita dal monocromatore, può raggiungere intensità non trascurabili agli estremi dell'intervallo spettrale dello strumento (precisamente: sotto 200 nm e sopra 300-400 nm per l'UV e sotto 400 e sopra 800-900 per il visibile).

La presenza di luce diffusa provoca la comparsa di picchi spuri nello spettro, misure di assorbanza poco precise e deviazioni dalla legge di Beer. L'inconveniente è minimizzato utilizzando sistemi a doppio monocromatore, che consentono misure di assorbanza fino a 5 ($T\% = 0{,}001$).

7.7.6 Parametri fondamentali per valutare le prestazioni di uno strumento

Per giudicare e controllare le prestazioni di uno strumento si verificano i seguenti parametri.

Campo spettrale. Ogni strumento è costruito per lavorare in un campo spettrale ben definito, dichiarato dal costruttore. Al di fuori di questo intervallo di lunghezze d'onda si possono commettere errori che possono invalidare l'analisi.

Banda passante. Lo strumento deve consentire di selezionare diverse fenditure, secondo le esigenze analitiche.

Accuratezza e precisione delle lunghezze d'onda. L'accuratezza delle lunghezze d'onda, per definizione, è la differenza (in nm) fra il valore di λ letto sullo strumento e quello *vero*. La precisione, invece, esprime la capacità dello strumento di riprodurre il valore impostato.

Per esempio una *accuratezza* di $\pm 1{,}0$ nm significa che lo strumento può differire al massimo di $\pm 1{,}0$ nm rispetto alla lunghezza d'onda vera; una precisione di $\pm 0{,}3$ nm significa che ogni volta che si seleziona una certa lunghezza d'onda si può verificare uno scostamento da tale valore di $\pm 0{,}3$ nm.

Risoluzione (o potere risolvente). Esprime la capacità di uno spettrofotometro di separare due bande affiancate. Dipende dalla banda passante minima selezionabile e può essere calcolata misurando la distanza (in nm) fra i due picchi più vicini nello spettro di un composto adatto. I costruttori, invece, preferiscono definire la risoluzione come la larghezza a metà altezza della banda passante del monocromatore ottenuta con la fenditura al minimo di ampiezza.

Per esempio una risoluzione di $(5 \pm 0{,}5)$ nm significa che la banda passante minima che può essere ottenuta è di $(5 \pm 0{,}5)$ nm.

Linearità fotometrica. Esprime la capacità di uno spettrofotometro di aderire alla legge di Beer.

Accuratezza e precisione fotometrica. L'accuratezza fotometrica è la differenza fra il valore di assorbanza misurato e quello *vero;* questo parametro, dunque, esprime la capacità del fotometro di rilevare correttamente l'energia in arrivo al rivelatore. La precisione esprime la capacità del fotometro di riprodurre una stessa misura.

Per esempio un'accuratezza di $\pm 0{,}005$ *A* (misurata con un filtro NIST 930D di 1,0 *A*) indica che l'errore dello strumento, quando misura un'assorbanza vicino a 1, al massimo è di $\pm 0{,}005$; una precisione di $\pm 0{,}002$ (a 1,0 *A*) indica che misure ripetute di uno standard, con assorbanza di 1,0 *A*, si disperdono entro un intervallo di $\pm 0{,}002$ unità.

Campo dinamico strumentale. Corrisponde alla differenza fra l'assorbanza minima e quella massima che possono essere misurate con l'1% di accuratezza, facendo riferimento a una curva di taratura lineare. Questo intervallo è limitato, all'estremità inferiore, dal rumore di fondo del rivelatore e all'estremità superiore dalla presenza di luce diffusa.

Stabilità della linea di base. La linea di base di uno spettrofotometro indica il grado di bilanciamento fisico (negli strumenti doppio raggio) o elettronico (in quelli monoraggio

con sottrazione elettronica del bianco) dei due raggi, provenienti dal campione e dal riferimento, alle diverse lunghezze d'onda. Se i due raggi sono perfettamente bilanciati, la linea di base è piatta.

Stabilità dello zero. Esprime la deriva, in millesimi di assorbanza, del bilanciamento dei due raggi in un intervallo di tempo ben definito. Per strumenti di elevate prestazioni, la deriva non deve superare ±1% di trasmittanza.

Sensibilità e rapporto segnale/disturbo. La sensibilità esprime la variazione del segnale per unità di concentrazione; perciò è specifica per ciascun analita e dipende dalla pendenza della retta di taratura. Un tempo, per sensibilità si intendeva, impropriamente,[25] il limite inferiore di lettura, espresso come deviazione standard del segnale di fondo.

Il rapporto segnale/disturbo è, in definitiva, il minimo segnale che può essere misurato con significatività e dipende dal rumore di fondo, che a sua volta dipende dall'ampiezza della banda passante, dalla lunghezza d'onda e dalla costante di tempo del rivelatore.

Energia disponibile. Se l'energia che dal monocromatore giunge fino al rivelatore a determinate lunghezze d'onda è troppo bassa, aumenta sia il disturbo sia l'interferenza da parte della luce diffusa. Tanto maggiore è il numero di specchi e lenti montati sullo strumento, quanto più si attenua l'energia disponibile.

Luce diffusa. Viene espressa in termini percentuali rispetto alla luce monocromatica. È presente soprattutto agli estremi del campo spettrale e non supera in genere lo 0,001% negli strumenti a doppio monocromatore o lo 0,1% in quelli con un solo monocromatore.

7.7.7 Scelta del tipo di strumento

La scelta dello spettrofotometro adeguato alle proprie necessità analitiche non è compito facile, anche a causa dell'ampia gamma di prestazioni fornite dagli apparecchi in commercio (►tab. 7.1). In via del tutto indicativa suggeriamo i parametri da prendere in considerazione secondo l'ambito di applicazione: analisi qualitativa, quantitativa o cinetica.

Tabella 7.1 Caratteristiche degli apparecchi in commercio

Analisi quantitativa	Analisi qualitativa	Cinetica di reazione
Mono- o doppio raggio	Doppio raggio	Mono - o (meglio) doppio raggio
Serie di diodi (soprattutto per analisi multicomponente)	Serie di diodi (per alte velocità di acquisizione)	Serie di diodi (per alte velocità di acquisizione)
Linearità fotometrica	Accuratezza delle λ	Stabilità dello 0
Accuratezza e riproducibilità fotometrica	Risoluzione	Sensibilità
Luce diffusa	Stabilità della linea di base	Fedeltà di risposta
Sensibilità		