

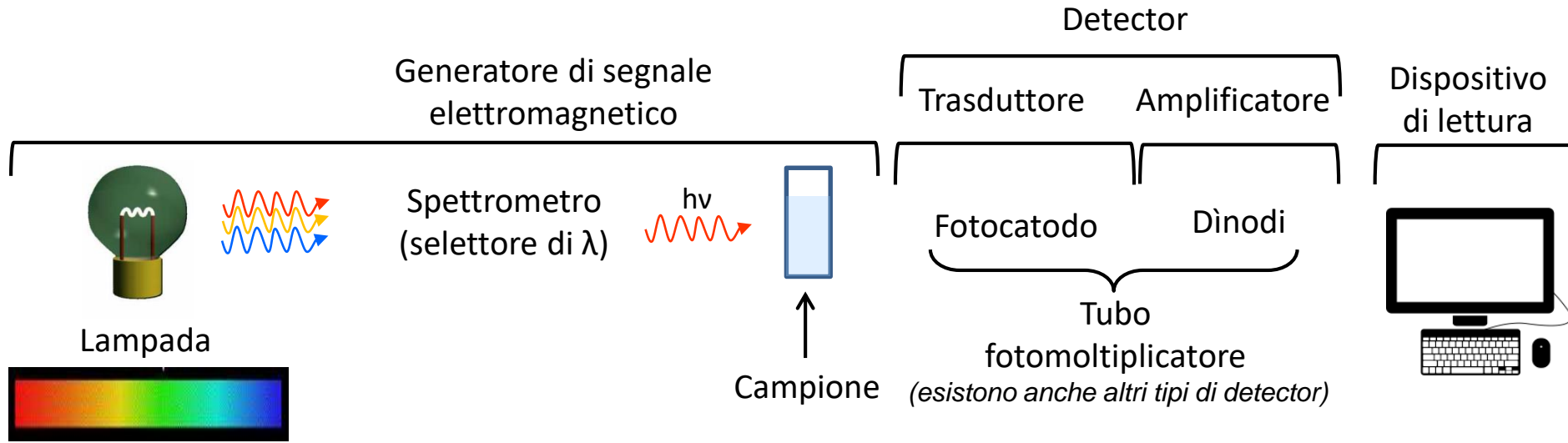
# **CHIMICA ANALITICA II**

**CON LABORATORIO**

**(AA 2018-19)**

**8 C.F.U. - Laurea triennale in Chimica**

# Spettroscopia di assorbimento molecolare UV-Vis: la strumentazione

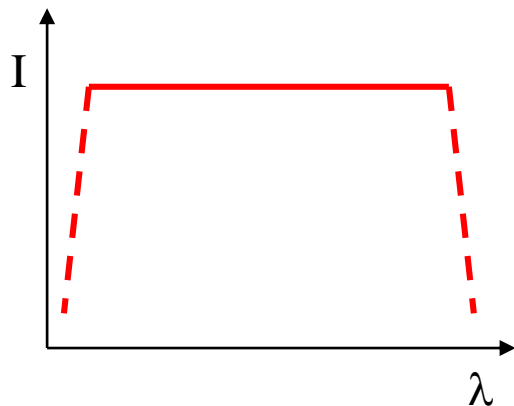


Lo strumento completo è denominato **Spettrofotometro UV-Vis**.

La sorgente di segnale elettromagnetico è una lampada che emette luce continua in un certo intervallo di lunghezze d'onda

Lo strumento è detto ad "ottica diretta" diretta poiché il selettore di  $\lambda$  è posto prima del campione.

# Le sorgenti di radiazione elettromagnetica per UV-Vis



## Sorgente "ideale"

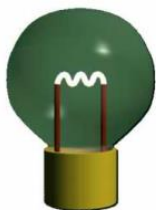
In generale una sorgente deve produrre luce in un ampio intervallo di  $\lambda$  ed avere una intensità di emissione il più possibile uniforme



## Sorgenti per il visibile:

Si utilizza una lampada al tungsteno (comune lampadina) o al tungsteno-alogeno:

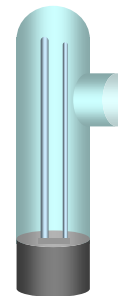
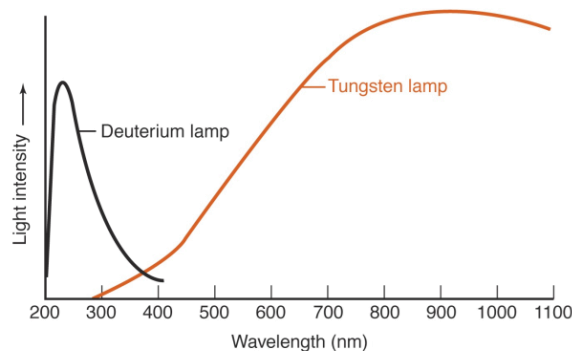
- Intervallo di utilizzazione:  $\lambda=350-2200$  nm



## Sorgenti per l'UV:

Lampada al Deuterio  $D_2$

- $D_2 + \text{energia elettrica} \rightarrow D_2^* \rightarrow D_2 + h\nu$
- Intervallo di utilizzazione:  $\lambda= 160-380$  nm



## Spettrometro (selettore di $\lambda$ )

Gli spettrofotometri sono equipaggiati con uno o più dispositivi (spettrometro per la selezione di  $\lambda$ ) per selezionare una stretta banda, assorbita o emessa dall'analita detta **banda passante**. Una banda passante stretta aumenta la probabilità che lo strumento risponda linearmente alla concentrazione di analita.

**Stringendo la fenditura diminuisce l'ampiezza di banda ma diminuisce anche la potenza radiante.**

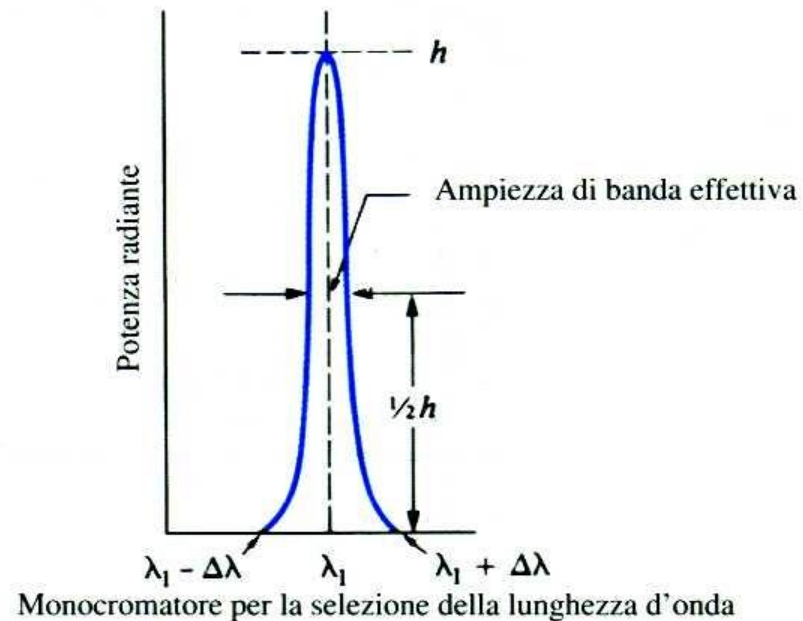
Il ruolo di un selettore di lunghezze d'onda è quello di far sì che solo una  $\lambda$  specifica arrivi al campione e/o al detector.

Questo componente è fondamentale se:

- si è interessati ad una singola lunghezza d'onda;
- si devono esplorare in sequenza diverse  $\lambda$  (scansione), ad esempio per ottenere uno spettro di assorbimento

### Banda passante

(cioè in uscita da una fenditura – vedasi slides successive)



segue →

***I due tipi principali di selettori di lunghezza d'onda sono  
i monocromatori ed i filtri.***

*I monocromatori hanno il vantaggio che la lunghezza d'onda in uscita può essere variata continuamente in un intervallo spettrale considerevole*

*I filtri offrono il vantaggio di semplicità, robustezza e basso costo.*

*I filtri permettono una selezione limitata di  $\lambda$  e forniscono bande passanti generalmente più larghe di quelle dei monocromatori. Essi sono usati nei fotometri (strumenti di bassa qualità).*

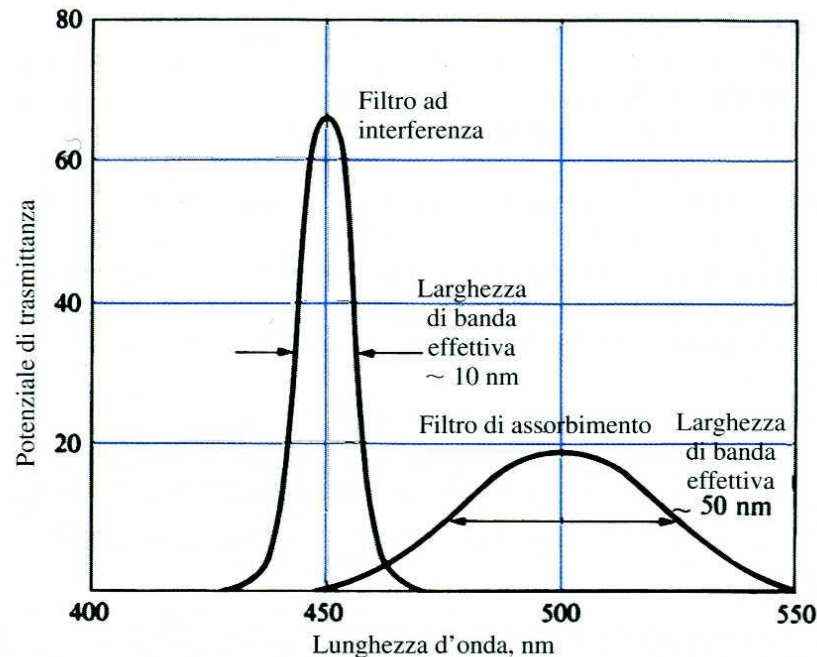
*I monocromatori dei moderni spettrofotometri sono **prismi** e, principalmente, **reticoli**.*

## Selettori di $\lambda$ : i filtri

- Sono il più semplice tipo di selettore di  $\lambda$
- Sono progettati per selezionare (trasmettere) un intervallo di lunghezze d'onda il più stretto possibile
- Se si devono eseguire misure a diverse  $\lambda$  è però necessario utilizzare più filtri
- Inoltre è impossibile eseguire una scansione di lunghezze d'onda

- Sono di due tipi:

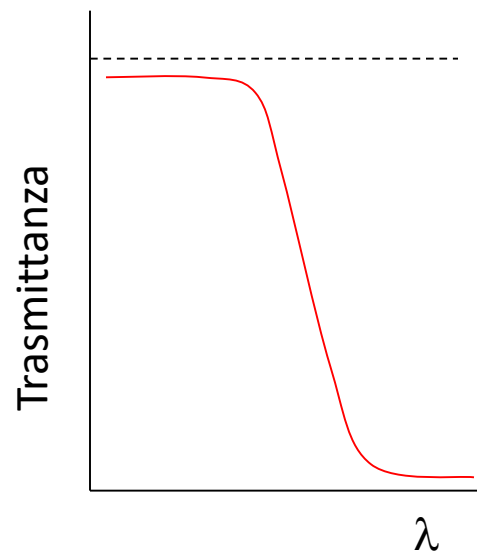
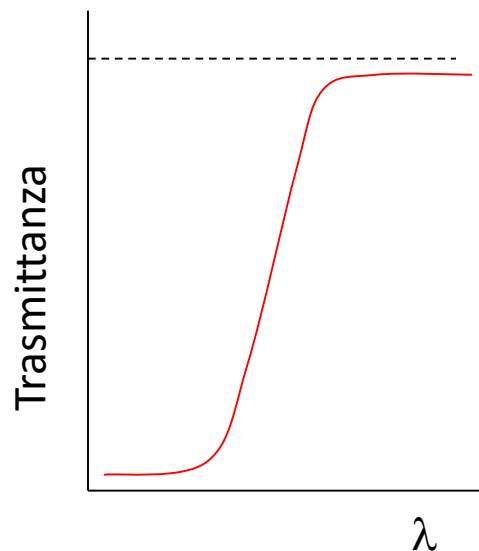
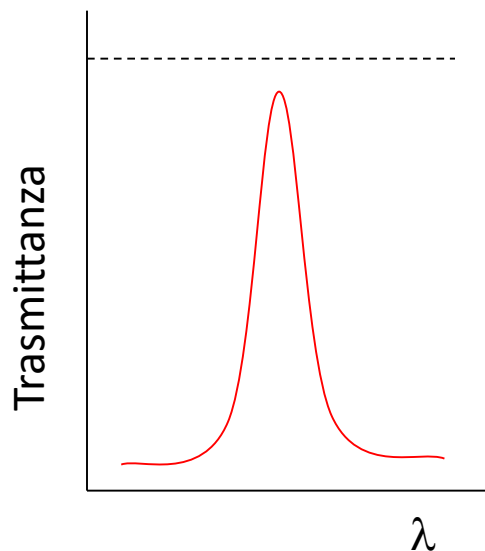
- **filtri ad assorbimento**
- **filtri interferenziali**



segue →

➤ **filtri ad assorbimento**

- Sono costituiti da un materiale che assorbe selettivamente alcune lunghezze d'onda.
- Possono trasmettere un certo intervallo di lunghezze d'onda, oppure tutte le radiazioni con lunghezza d'onda al di sopra o al di sotto di un determinato valore.



Es. commerciali: [https://www.thorlabs.com/navigation.cfm?guide\\_id=2329](https://www.thorlabs.com/navigation.cfm?guide_id=2329)

segue →

Products Home

Rapid Order

Services

The Company

Contact Us

My Thorlabs

- OEM and Customization
- Technical Support
- Returns
- Software Downloads
- Technical Resources
- Terms and Conditions
- Discount Policy
- Quality Systems
- Suppliers

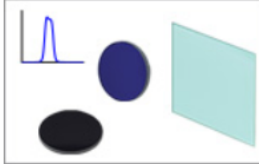
Products Home / Optical Elements / Optical Filters

## Colored Glass Filters

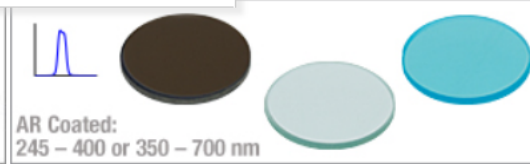
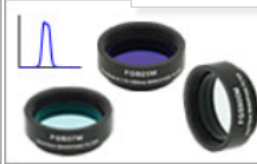
Thorlabs offers unmounted and mounted visible light filters, as well as our temperature-balancing filters. Our AR-coated filters are available in unmounted versions.

Thorlabs offers unmounted and mounted visible light filters, as well as our temperature-balancing filters. Our AR-coated filters are available in unmounted versions.

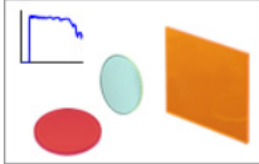
Unmounted Bandpass Colored Glass Filters



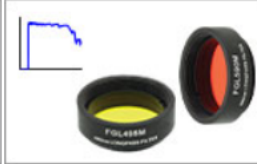
Mounted Bandpass Colored Glass Filters



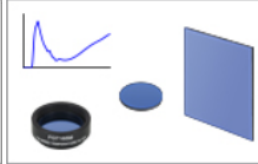
Unmounted Longpass Colored Glass Filters



Mounted Longpass Colored Glass Filters



Color-Balancing Filters



Colored Filter Kits



## Optical Table Workstations



Vibration Isolation Frame Systems

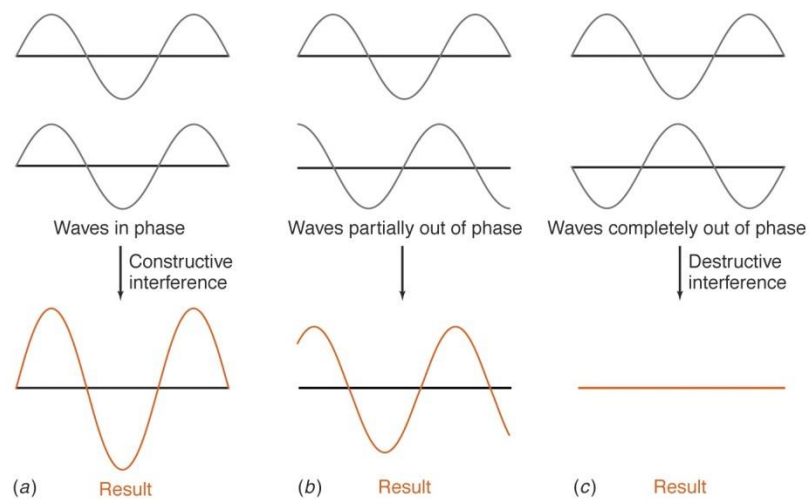
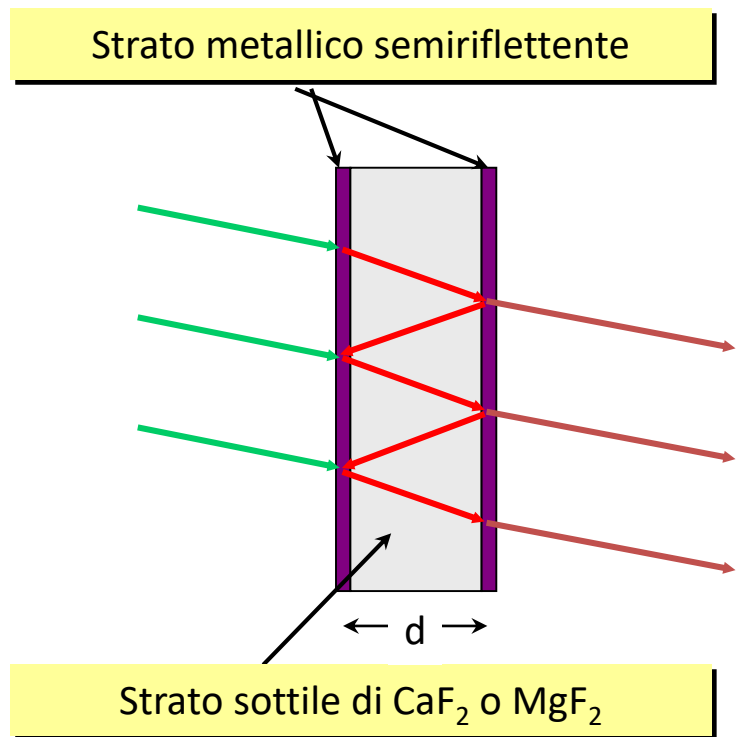


More Info



## ➤ Filtri interferenziali

- La luce passa attraverso la superficie
- Quando arriva sul secondo lato la luce viene riflessa all'indietro
- Si realizza una interferenza tra onde di ciascuna specifica  $\lambda$  della luce incidente, costruttiva o distruttiva, in funzione dello spessore dello strato sottile
- Potrà essere trasmessa solo una  $\lambda$  specifica



Interferenza tra onde adiacenti che sono sfasate di (a)  $0^\circ$ ; (b)  $90^\circ$  e (c)  $180^\circ$

# Selettori di $\lambda$ : i monocromatori

Mediante un monocromatore è possibile:

- Selezionare una qualsiasi lunghezza d'onda all'interno dell'intervallo di utilizzazione del monocromatore
- Effettuare una scansione di lunghezze d'onda

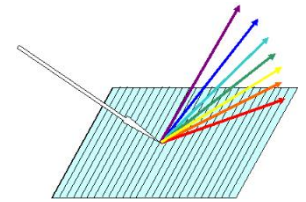
- Sono di due tipi:
  - **Prismi**
  - **Reticoli**

L'ampiezza di **banda effettiva** del monocromatore dipende dalle dimensioni e dalla qualità dell'elemento dispersivo, dalla larghezza della fenditura e dalla lunghezza focale del monocromatore.

Un monocromatore di alta qualità avrà un'ampiezza di banda effettiva di pochi decimi di nanometro o meno nelle regioni dell'ultravioletto e del visibile.

L'ampiezza di banda effettiva di un monocromatore, sufficiente **per la maggior parte delle applicazioni quantitative può variare da 1 a 20 nm**.

Molti monocromatori sono equipaggiati con fenditure variabili per permettere un certo controllo della larghezza di banda.



Per **l'analisi qualitativa**, sono richieste fenditure tanto più strette ed ampiezze di banda effettive tanto minori, quanto più rapidamente varia l'assorbività al variare della lunghezza d'onda.

Per **analisi quantitative**, d'altro lato, fenditure più ampie permettono di operare con il sistema di rivelazione ad amplificazione più bassa, che a sua volta fornisce una maggiore riproducibilità della risposta.

segue →

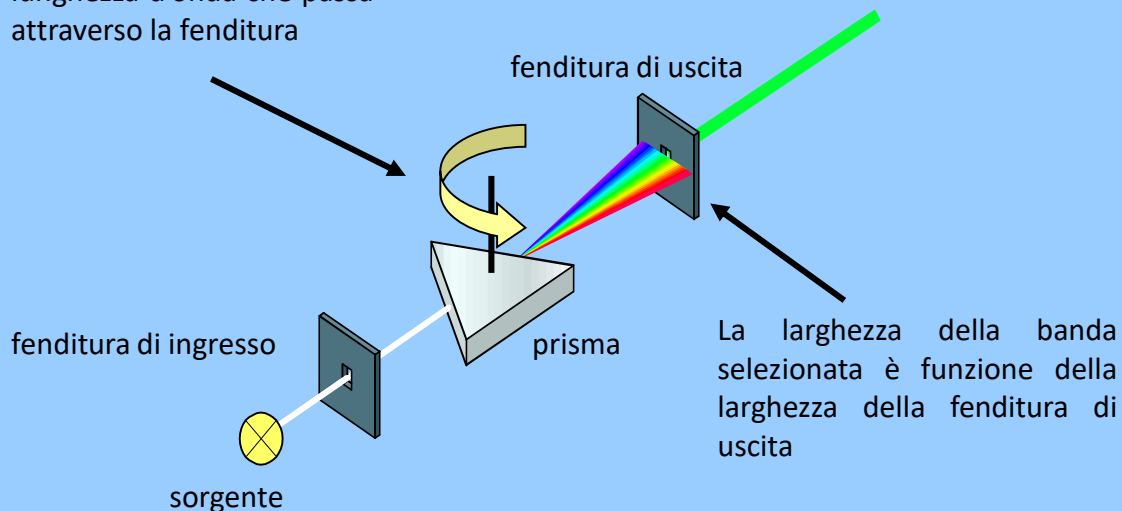
## ➤ *Prismi*

- *Si basano sul fatto che l'indice di rifrazione di un materiale è funzione della lunghezza d'onda e quindi diverse lunghezze d'onda verranno rifratte con diversi angoli.*
- *I materiali più usati sono:*

<i>Visibile</i>	- <i>quarzo</i>
<i>UV</i>	- <i>N/A</i>
<i>IR</i>	- <i>NaCl, KCl</i>
- *Attualmente i prismi sono per lo più stati soppiantati dai reticoli di interferenza*

*l'indice di rifrazione quantifica la diminuzione della velocità di propagazione della radiazione elettromagnetica quando passa da un materiale ad altro. La diminuzione della velocità di propagazione viene accompagnata dalla variazione della sua direzione.*

Modificando la posizione del prisma cambia la lunghezza d'onda che passa attraverso la fenditura



### ***Vantaggi dei prismi***

- *Permettono di selezionare un ampio intervallo di  $\lambda$*
- *Sono relativamente economici*

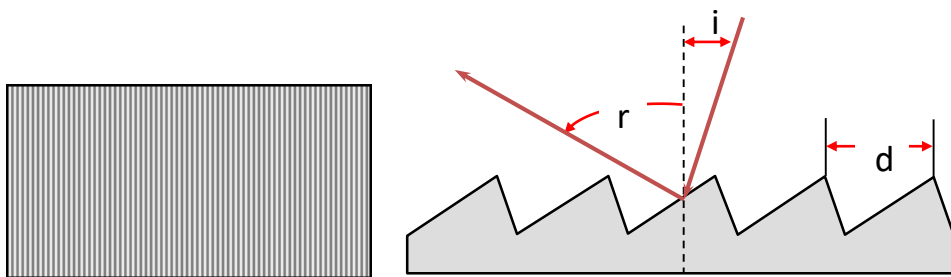
### ***Svantaggi***

- ***Minore dispersione a  $\lambda$  maggiori***
- *La luce deve passare attraverso il materiale del prisma e ciò limita l'intervallo di applicazione del prisma (la radiazione non deve essere assorbita)*

segue →

## ➤ Reticoli

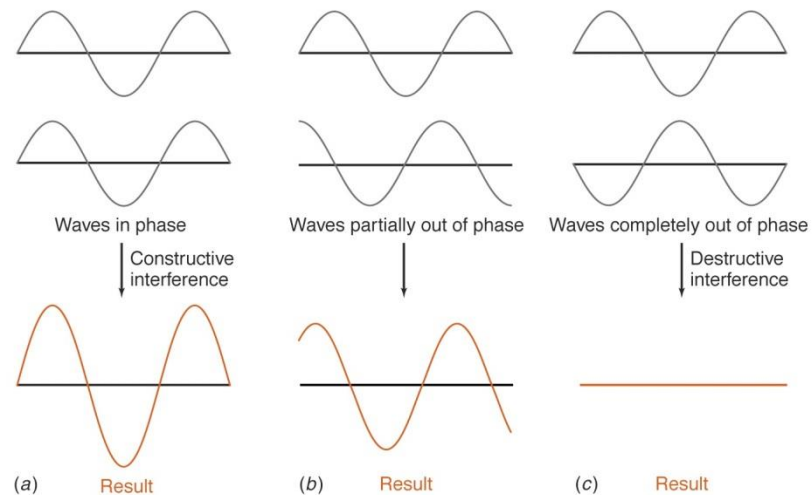
- Sono attualmente i monocromatori più utilizzati nella moderna strumentazione analitica
- Consistono di solito in una superficie riflettente contenente una serie di incavi paralleli



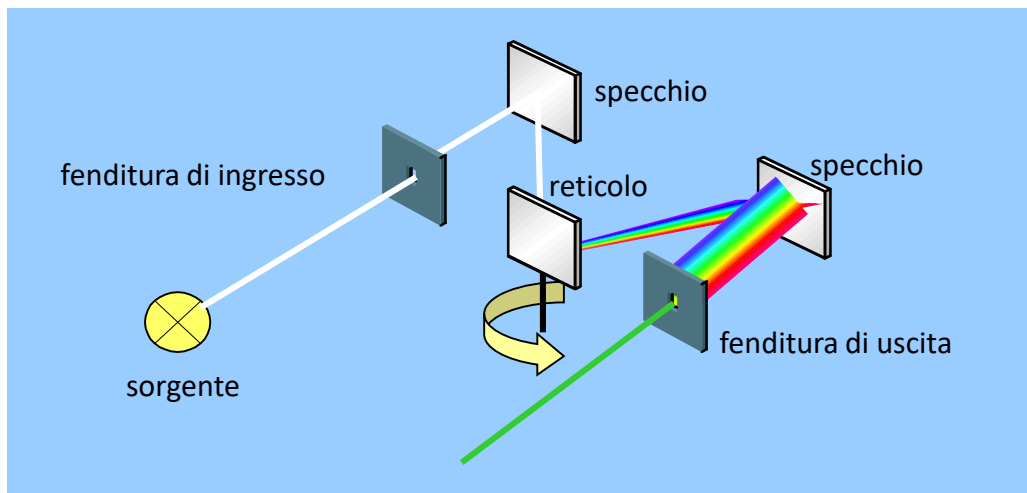
- Il funzionamento dei reticoli è basato sul fenomeno dell'interferenza:

$$n\lambda = d(\sin r - \sin i), \text{ dove:}$$

- $i$ : angolo di incidenza della radiazione
- $r$ : angolo di riflessione della radiazione
- $d$ : distanza fra le linee
- $n$ : ordine di riflessione
- $\lambda$ : lunghezza d'onda

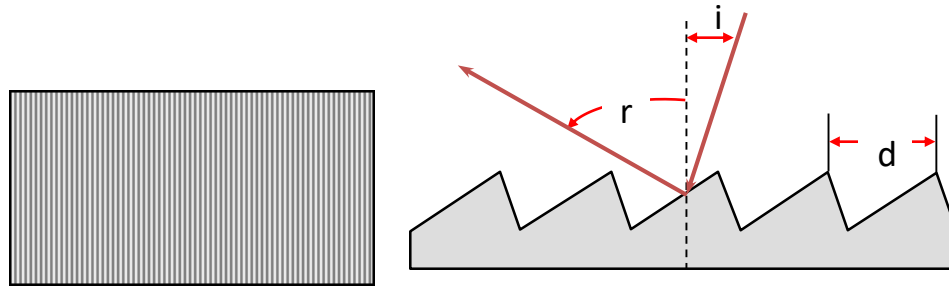


Interferenza tra onde adiacenti che sono sfasate di (a) 0°; (b) 90° e (c) 180°



**!!!** Si ricordi che un monocromatore è l'insieme di un reticolo (o di un prisma) e delle fenditure di ingresso e di uscita. **!!!**

Un fascio luminoso monocromatico che incide su un reticolo dà origine a vari fasci diffratti ad angoli che dipendono dal rapporto fra la distanza tra le righe del reticolo e la lunghezza d'onda della luce.



- Il funzionamento dei reticoli è basato sul fenomeno dell'interferenza:

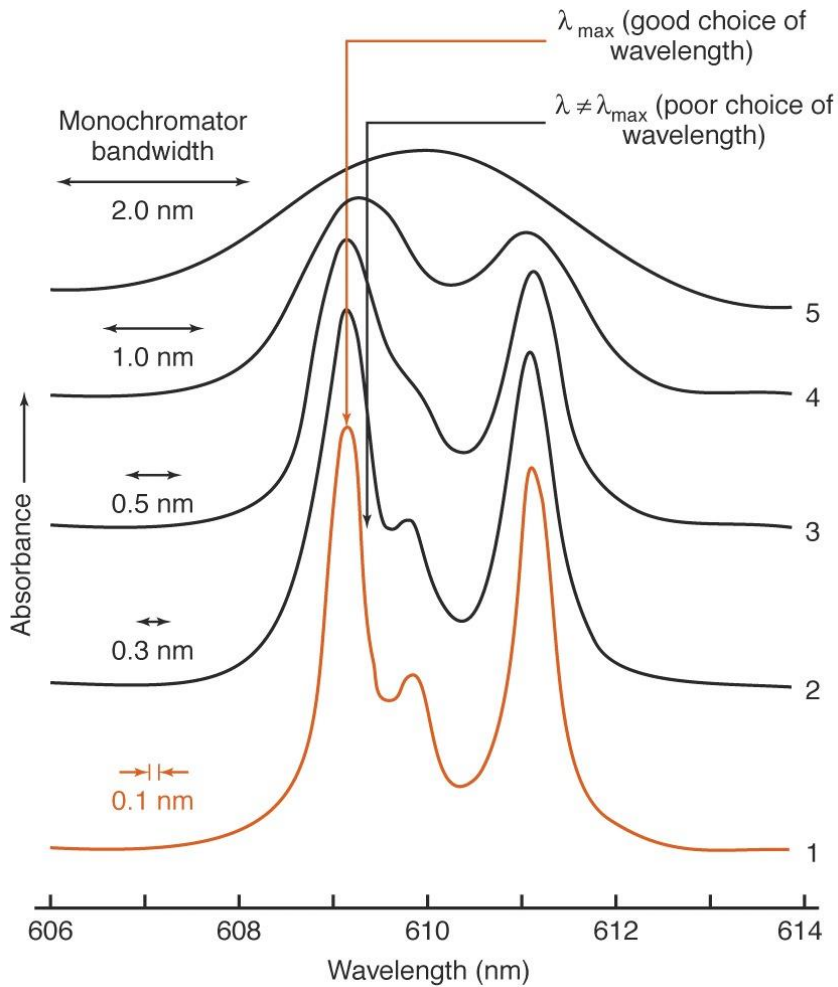
$$n\lambda = d(\sin r - \sin i), \text{ dove:}$$

Legge di Bragg

- $i$ : angolo di incidenza della radiazione
- $r$ : angolo di riflessione della radiazione
- $d$ : distanza fra le linee
- $n$ : ordine di riflessione
- $\lambda$ : lunghezza d'onda

Per una radiazione elettromagnetica policromatica, caratterizzata da più lunghezze d'onda, si ottiene la scomposizione del fascio nelle sue componenti.

## Banda passante e scelta della lunghezza d'onda:

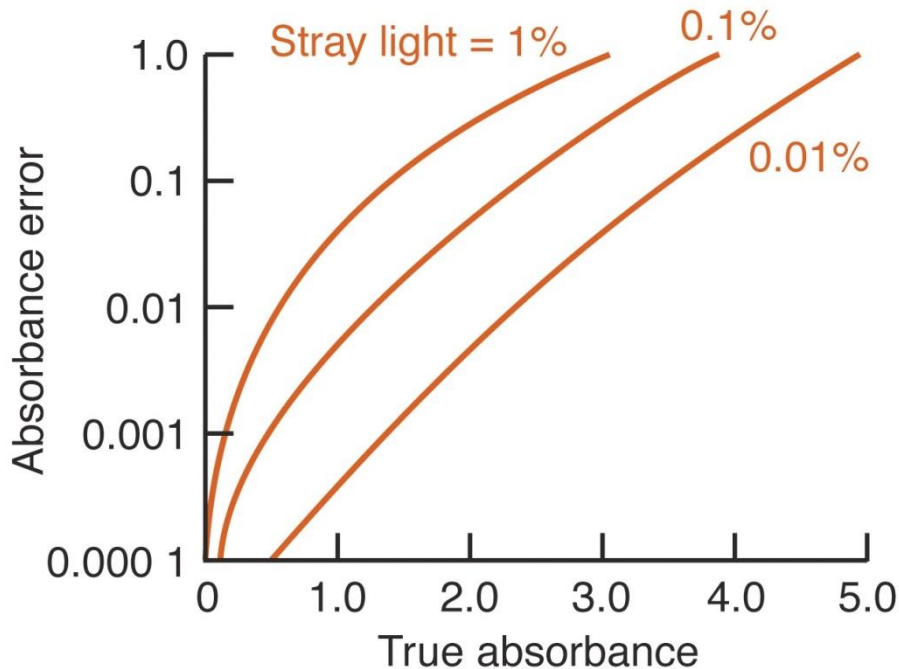


Aumentando la larghezza della banda passante dalla fenditura, le bande di assorbimento si allargano e diminuiscono di intensità.

La scelta migliore è la lunghezza d'onda del massimo di assorbanza

(Segnale relativamente elevato per banda passante stretta centrata su un massimo di assorbanza)

## Luce diffusa ed errori di lettura dell'assorbanza



La **luce diffusa** è costituita da **radiazione di lunghezza d'onda diversa** da quella selezionata.

La luce diffusa è dovuta a **fenomeni di diffrazione non intenzionale** nel monocromatore, a **diffusione ottica**, o può giungere **dall'esterno**.

L'errore è significativo a valori elevati di assorbanza perché la luce diffusa che giunge al rivelatore diventa significativa rispetto a quella trasmessa

## La cella contenente il campione: la cuvetta



*Esistono cuvette di diversi tipi e diversi **materiali** a seconda delle necessità di utilizzo. In particolare può variare sia il **volume** contenuto che il **cammino ottico**.*



## Detector (o rivelatori) per spettrofotometria UV-Vis

E' un dispositivo che *misura la capacità di assorbire una radiazione luminosa nell'UV/Vis (200-700 nm) da parte degli analiti.*

*I **solventi** che impiegati per il campione **non devono assorbire** alle lunghezze d'onda utilizzate per l'analisi.*

*I rivelatori si basano su diversi principi fisici, in funzione della lunghezza d'onda della radiazione incidente*

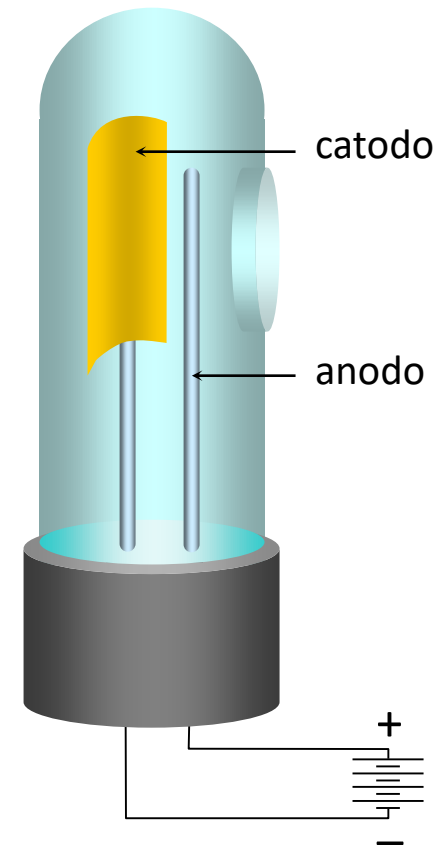
### Rivelatori più comuni

<b>Tipo di Rivelatore</b>	<b>intervallo di <math>\lambda</math> (nm)</b>	<b>proprietà misurata</b>	<b>uso tipico</b>
Fototubo	150-1000	Int. corrente	UV
Fotomoltiplicatore	150-1000	Int. corrente	UV/Vis
Stato Solido	350-3000	varie	vario

segue →

# Fototubo

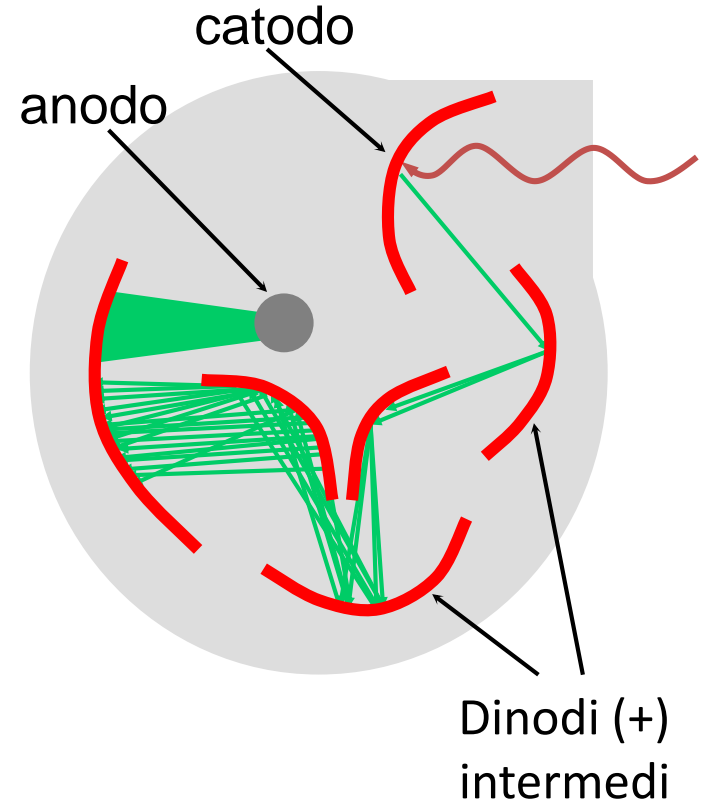
- *Si basa sull'effetto fotoelettrico: un fotone incide sul catodo rivestito di un materiale fotosensibile, provocando l'emissione di un elettrone*
- *Si ottiene una corrente proporzionale alla intensità della radiazione incidente*
- *I fototubi sono soggetti ad un rumore di fondo (dark current) causato da effetti termici*



segue →

## Fotomoltiplicatore

- *Questi rivelatori sono simili al fototubo: la radiazione colpisce infatti un catodo iniziale, provocando l'emissione di elettroni*
- *Gli elettroni prodotti vengono però moltiplicati attraverso la collisione con una serie di dinodi intermedi*
- *La corrente misurata è così amplificata, rispetto a quella iniziale, di un fattore molto elevato ( $10^6 - 10^7$ )*



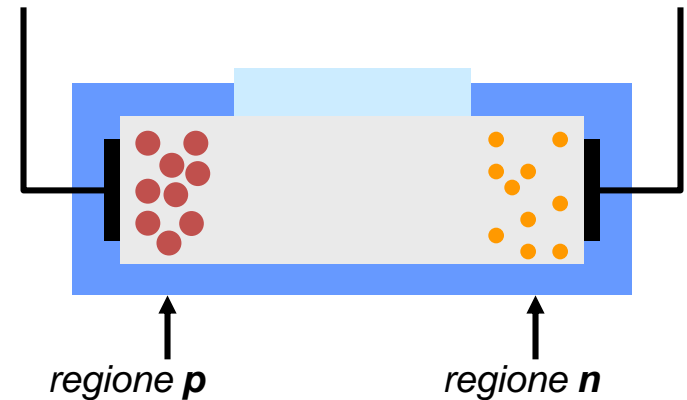
segue →

## Rivelatori a stato solido: fotodiiodo

• Quando si applica un opportuno potenziale ad un cristallo di Si drogato si ottengono due aree:

- **n** - ricche di elettroni
- **p** - ricche di cariche positive

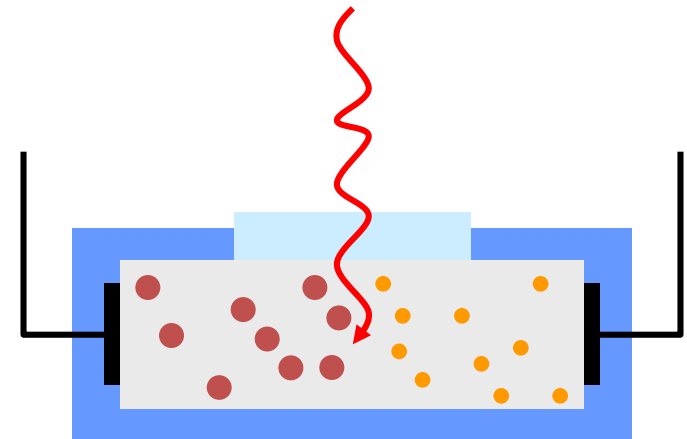
• In condizioni di riposo non si ha passaggio di corrente



• Quando il fotodiiodo viene esposto alla luce, la radiazione incidente produce nuove coppie di cariche positive e negative all'interno del materiale, permettendo il passaggio della corrente.

• L'intensità di corrente è proporzionale alla quantità di luce incidente.

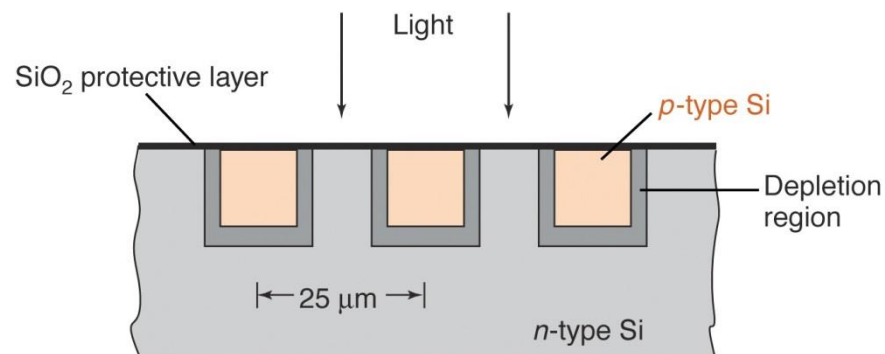
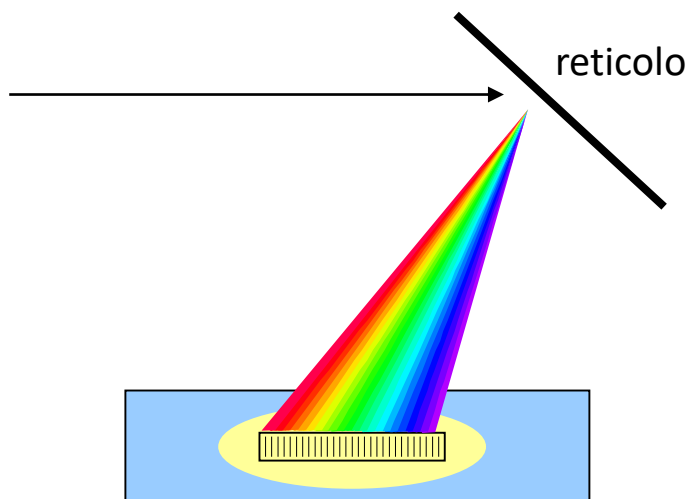
• Un fotodiiodo è più sensibile di un fototubo e costa meno di un fotomoltiplicatore.



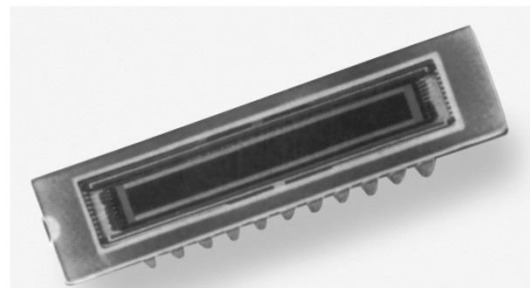
segue →

## Array di fotodiodi

- *E' costituito da una serie di fotodiodi, ricavati ad intervalli di spazio regolari su di un microchip*
- *Inserito in uno strumento con una ottica opportuna, questo tipo di rivelatore permette di misurare simultaneamente radiazioni di diverse lunghezze d'onda*



(a)



## Elaborazione del segnale e risposta

- *Il segnale in uscita dal rivelatore viene infine amplificato al fine di produrre un segnale facilmente misurabile.*
- *La maggior parte degli strumenti attualmente in commercio è in grado di eseguire ulteriori elaborazioni del segnale (medie, uso di filtri per migliorare la qualità del segnale, eliminazione del rumore...) e di presentarlo in una forma adeguata (display, stampati, file dati, ...).*
- *Spesso il sistema è anche in grado di effettuare tutti i calcoli necessari per avere direttamente il risultato dell'analisi.*



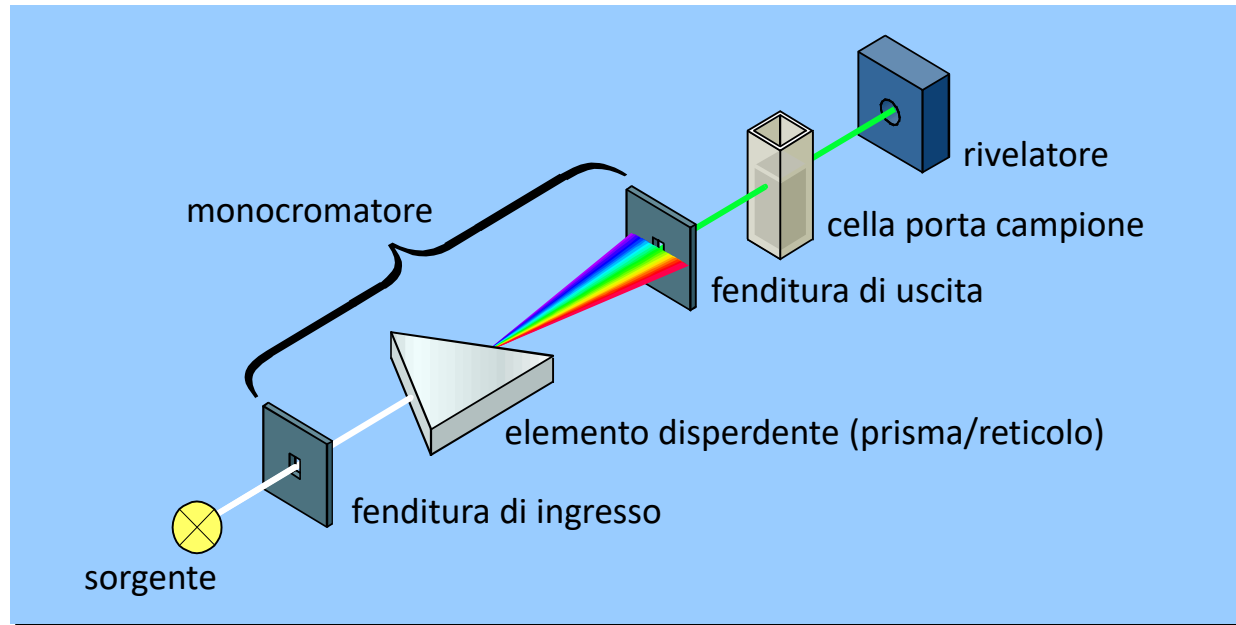
## *Tipi di assetto strumentale*

*Gli strumenti per spettrofotometria di assorbimento si possono suddividere nelle seguenti categorie:*

- ***Singolo raggio***
- ***Doppio raggio***
- ***Multicanale***

segue →

- **Singolo raggio**

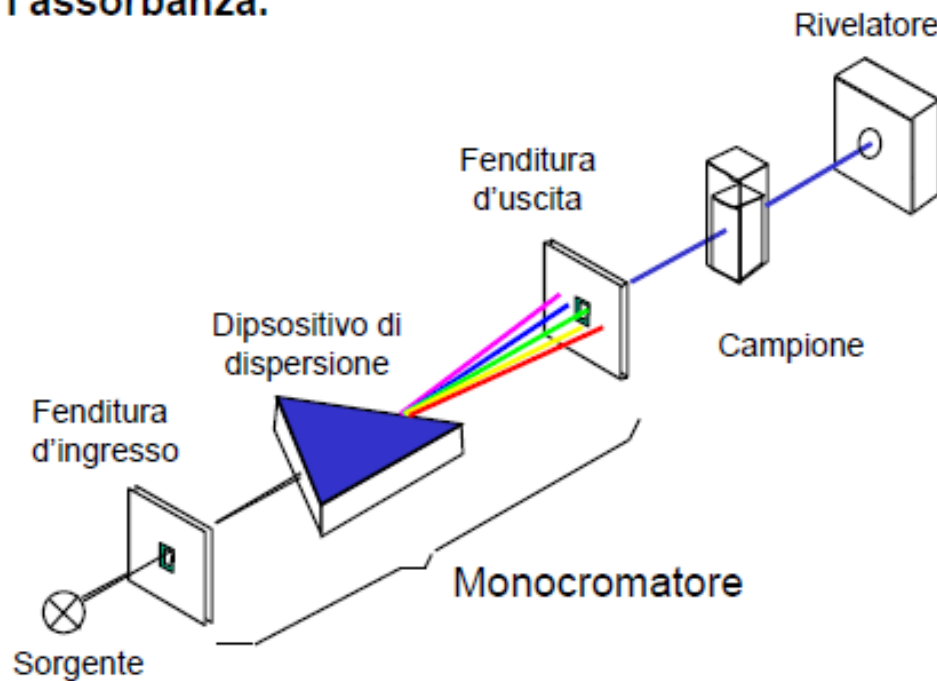


- Questo strumento lavora ad una singola lunghezza d'onda selezionata.
- E' utilizzato normalmente per effettuare analisi che prevedono misure ad una sola lunghezza d'onda e per soluzioni con un solo analita.
- Non è adatto a misura da effettuarsi a differenti lunghezze d'onda od alla costruzione di spettri di assorbimento, in quanto non è possibile tenere conto delle variazioni della emissione della sorgente, dell'assorbimento del solvente e della cella e della risposta al detector al variare della lunghezza d'onda.

segue →

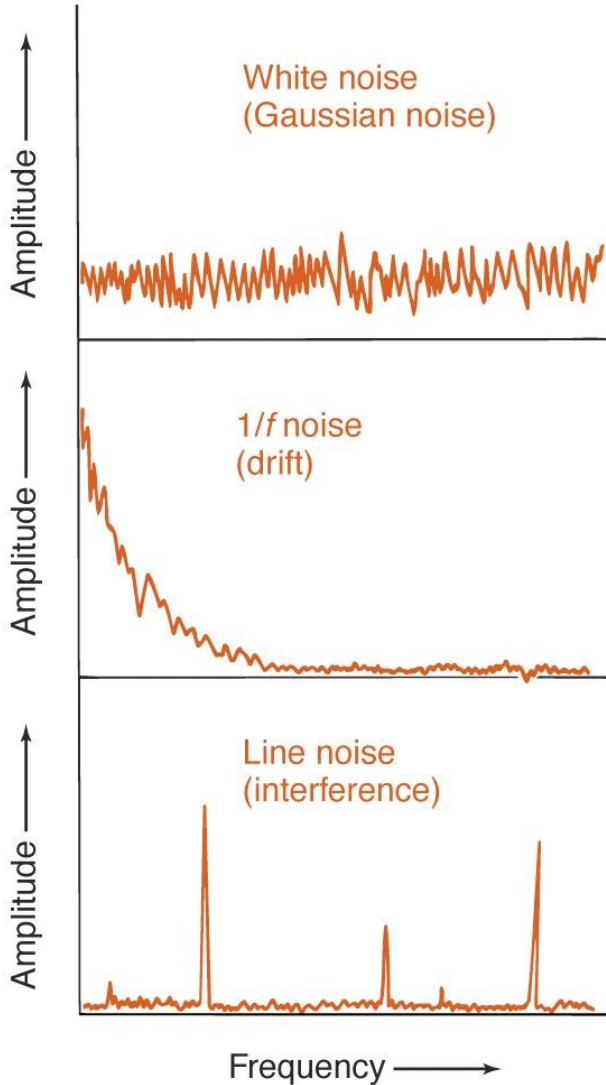


La geometria più semplice si trova negli strumenti a singolo raggio. Per effettuare la misura, si introduce prima il bianco e se ne misura la  $I_0$ . Quindi si introduce il campione (utilizzando la stessa cuvetta) e se ne misura la  $I$ , e lo strumento ne calcola a scelta la trasmittanza o l'assorbanza.



**Gli strumenti a raggio singolo sono poco costosi, hanno alta resa luminosa, e perciò alta sensibilità, a causa della semplicità del sistema. Lo svantaggio sta nel tempo che deve intercorrere tra le due misure e nell'aumento dei problemi di deriva.**

# Tipi di rumore



Il *rumore bianco* (gaussiano) è dovuto al moto casuale degli elettroni di un circuito elettrico

Il *rumore 1/f* (deriva) è a bassa frequenza ed è generato da variazioni di voltaggio nella alimentazione dello strumento o da variazioni della risposta di componenti strumentali

Il *rumore di linea* (interferenza) si presenta a frequenze precise, come ad esempio alla frequenza della rete elettrica (50 Hz in Europa)

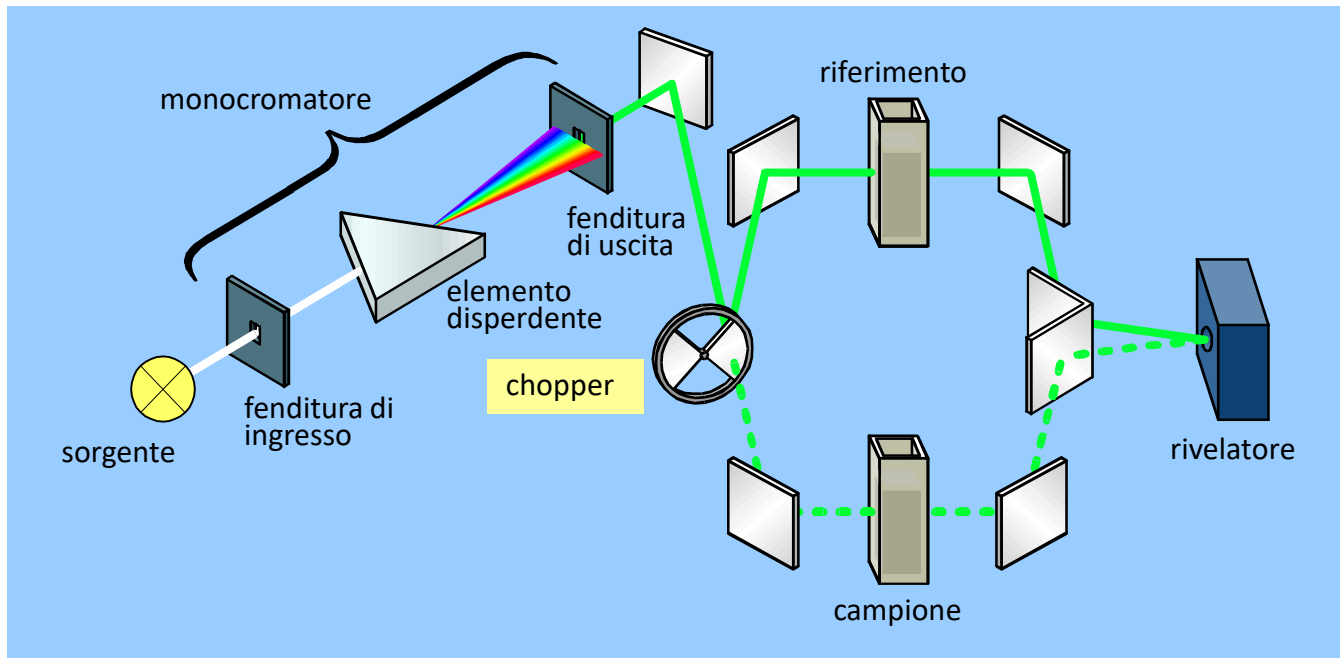
segue →

- **Doppio raggio**

- *Uno spettrofotometro a doppio raggio misura contemporaneamente l'assorbimento della radiazione da parte del campione e del riferimento.*
- *Il rapporto fra queste due grandezze rappresenta l'assorbimento dovuto all'analita, ed è indipendente da tutte le altre variabili legate alla variazione della lunghezza d'onda.*
- *Esistono due tipi di spettrofotometri a doppio raggio:*
  - **spettrofotometri a doppio raggio nel tempo**
  - **spettrofotometri a doppio raggio nello spazio**

segue →

## ➤ spettrofotometri a doppio raggio nel tempo

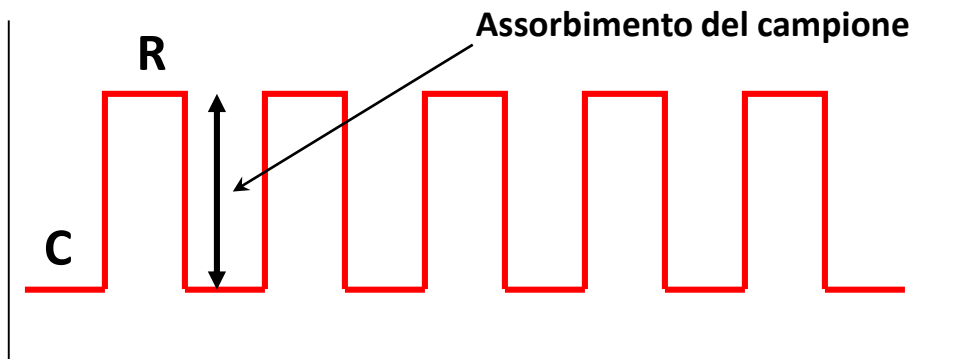


- *Uno spettrofotometro a doppio raggio nel tempo utilizza un “**chopper**” (di solito uno specchio rotante) per inviare alternativamente la radiazione attraverso il campione ed attraverso il riferimento.*
- *La radiazione alternativamente trasmessa da campione e riferimento viene poi misurata da un unico rivelatore.*

segue →

## Chopping: modulazione del rumore

- Questo approccio riduce gli errori legati a variazioni nell'emissione della lampada e nella risposta del rivelatore, poiché l'assorbimento del campione viene misurato relativamente a quello del riferimento.
- Il **rumore (noise)** viene inoltre ridotto utilizzando un amplificatore "lock-in" che misura solo i segnali con la giusta frequenza, cioè quella con la quale il fascio di radiazione viene alternato fra campione e riferimento.

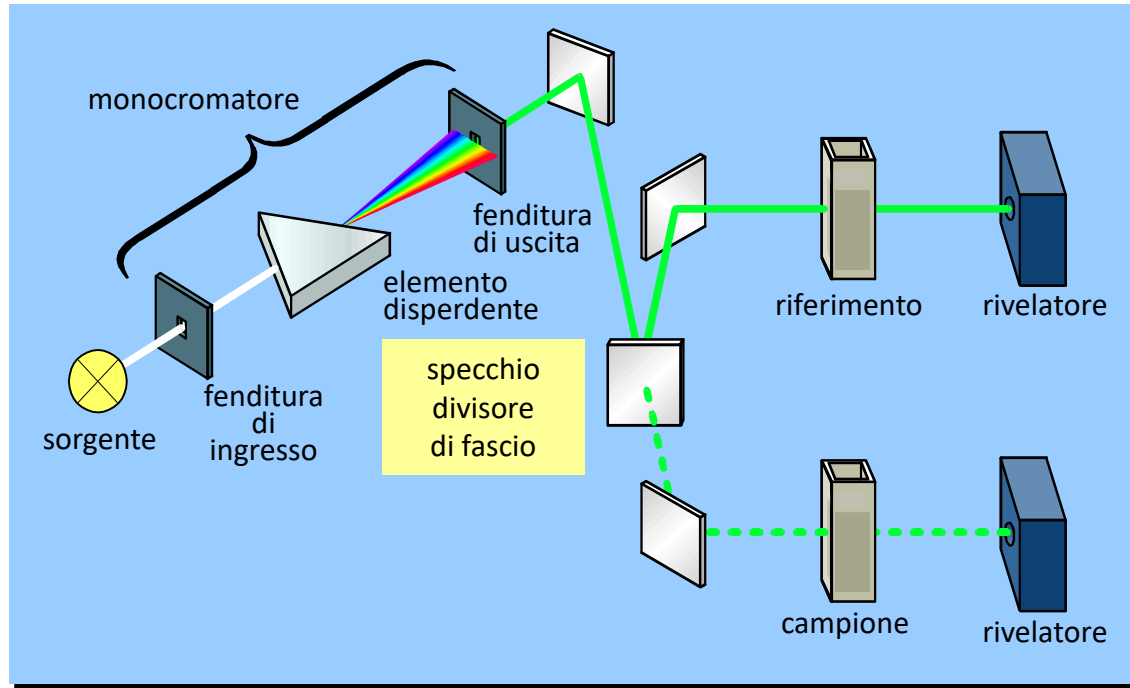


C = campione, R = riferimento

- Con uno spettrofotometro a doppio raggio nel tempo si possono ottenere facilmente spettri, ed il rumore di fondo viene notevolmente ridotto.
- Esistono però alcune limitazioni: ad esempio, non è possibile misurare correttamente variazioni di assorbanza che avvengono a velocità confrontabili o maggiori di quella di rotazione del chopper. Non è quindi possibile effettuare studi cinetici che coinvolgono reazioni veloci.

segue →

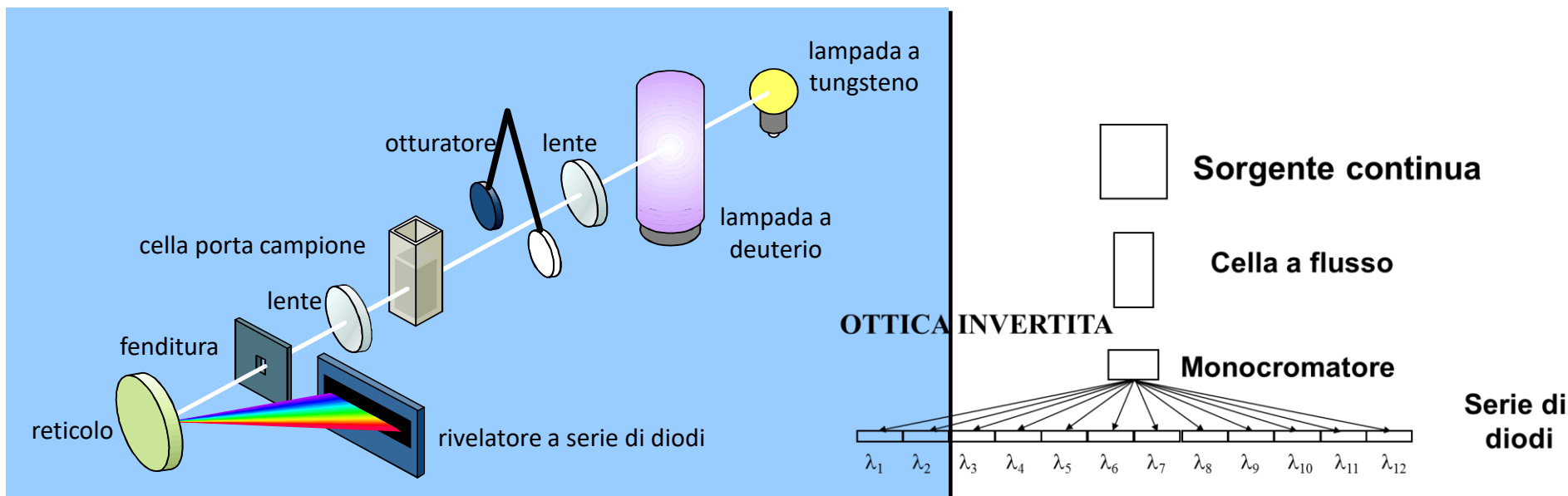
## ➤ spettrofotometri a doppio raggio nello spazio



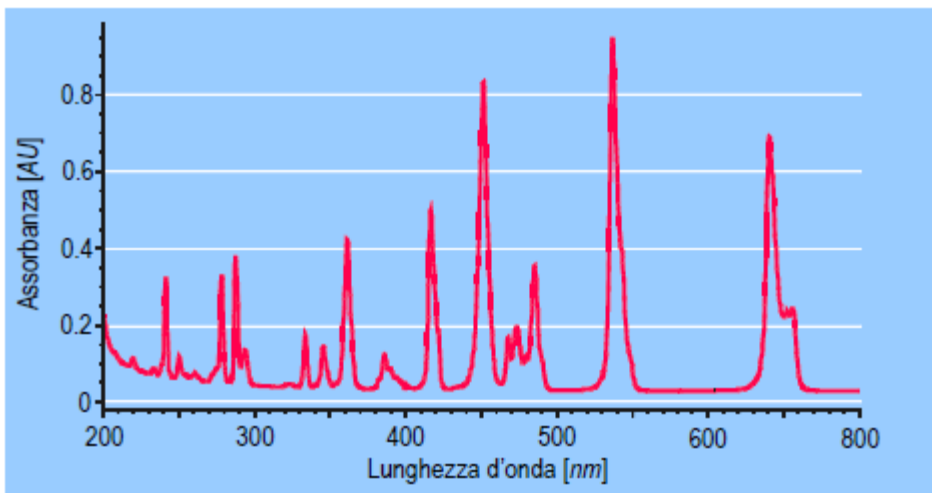
- *In questo strumento il fascio di radiazione viene diviso in due parti mediante uno specchio fisso, ed i due fasci vengono inviati rispettivamente sul campione e sul riferimento.*
- *Non esistono parti mobili, ed è possibile studiare anche processi molto veloci.*
- *Sono però necessari due rivelatori distinti, che devono possedere caratteristiche simili (virtualmente identiche)*

segue →

## • Singolo raggio a serie di diodi

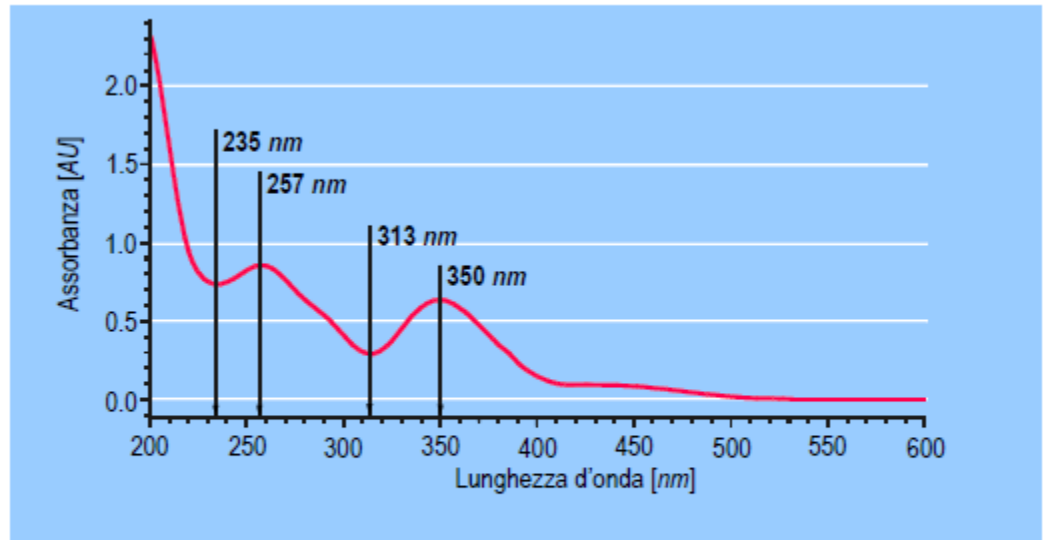


- Sono attualmente disponibili molti strumenti basati su una tecnologia a **singolo raggio** ed in grado di permettere la misura di spettri di assorbimento.
- Prima della misura si deve effettuare l'acquisizione dello spettro di assorbimento del riferimento, che viene memorizzato e sottratto allo spettro di assorbimento misurato per ogni campione.
- Questi strumenti sono in grado di effettuare la misura in un tempo brevissimo (anche meno di un secondo), permettendo quindi di studiare anche variazioni spettrali che avvengono in tempi molto brevi.
- Possiedono però certe limitazioni: ad esempio, la risoluzione è limitata dal numero degli elementi del rivelatore a serie di fotodiodi, e di solito non è minore di 0,5-1 nm.



UV Region	Visible Region	Visible Region
241.0	333.5	451.1
249.9	345.6	467.8
278.2	361.4	485.2
287.1	385.4	536.5
	416.1	640.6

Il più comune standard per l'accuratezza della lunghezza d'onda è il perclorato di olmio



Lo standard di accuratezza fotometrica richiesto da molte farmacopee è una soluzione di bicromato di potassio



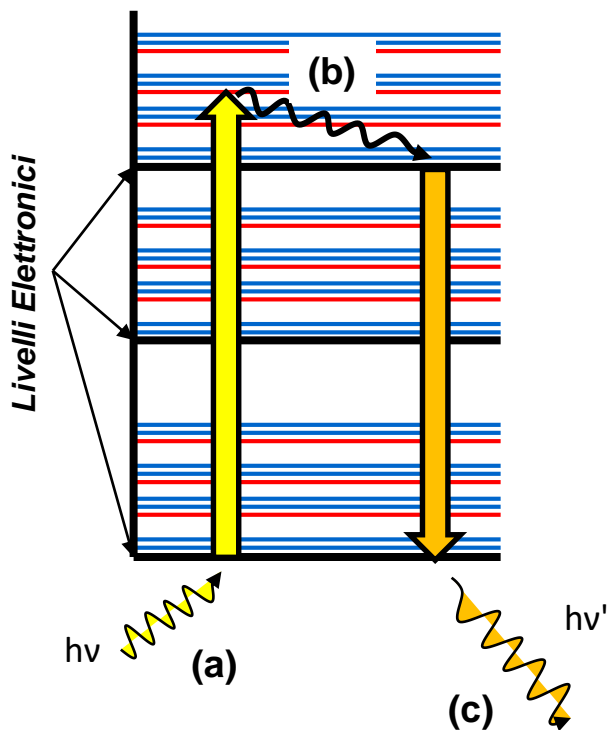


# Le Spettroscopie di Fluorescenza molecolare

Il fenomeno della fluorescenza molecolare avviene quando una molecola dopo aver assorbito un fotone ad energia  $h\nu$  emette un fotone ad energia  $h\nu'$  con  $\nu' < \nu$  (cioè  $\lambda' > \lambda$ )

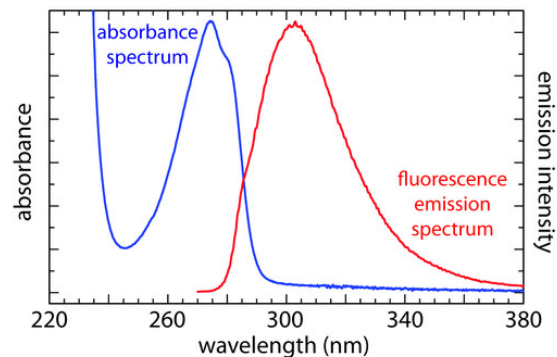


!!! E' una  
spettroscopia di  
emissione !!!



Con l'assorbimento del fotone la molecola:

- raggiunge un livello energetico vibrazionale appartenente ad un certo livello elettronico superiore a quello fondamentale (a),
- poi decade per rilassamento vibrazionale fino al livello elettronico eccitato (b)
- ed infine emette un fotone per rilassamento radiativo ritornando allo stato fondamentale (c), quindi  $\Delta E' < \Delta E$



# L'analisi quantitativa in spettroscopia di fluorescenza molecolare

Le misure di emissione non sono misure assolute: le intensità di emissione ottenute su diversi strumenti non sono in genere confrontabili fra di loro

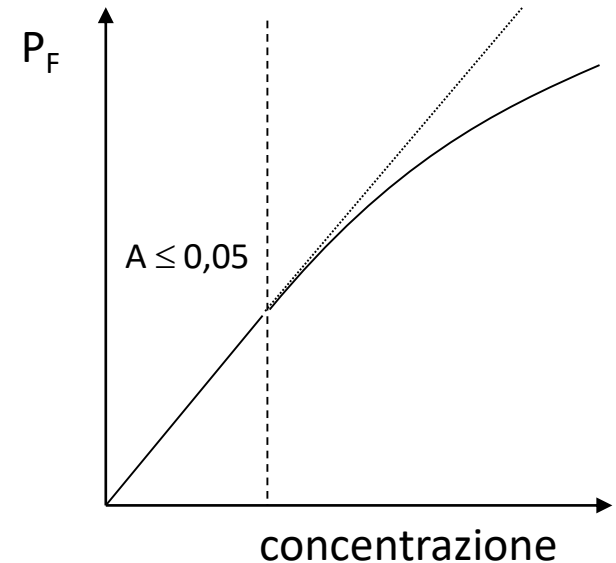
Per effettuare misure quantitative è quindi indispensabile utilizzare una curva di taratura.

E' possibile dimostrare che, quando l'assorbanza della soluzione è sufficientemente bassa ( $A \leq 0,05$ ) esiste una proporzionalità diretta fra l'intensità dell'emissione  $P_F$  e la concentrazione:

$$P_F = kP_0c$$

dove  $P_0$  è la potenza della radiazione incidente e  $k$  è una costante che contiene, fra l'altro, il valore della resa quantica di emissione dell'analita (la resa quantica  $\Phi$  è il rapporto tra il numero di fotoni emessi e il numero fotoni assorbiti):

Inoltre è possibile aumentare l'intensità del segnale di emissione aumentando la potenza della radiazione di eccitazione.

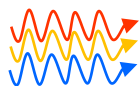


# Spettroscopia di fluorescenza molecolare: la strumentazione

Generatore di segnale  
elettromagnetico

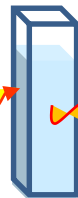


Lampada ad arco  
(Xe)



Monocromatore1

$h\nu$



Campione

$h\nu'$

Monocromatore2

Detector

Dispositivo  
di lettura



E' necessario che il secondo monocromatore sia posto a 90° rispetto alla radiazione incidente in modo che al detector arrivi solo la radiazione emessa ( $h\nu'$ ) senza che essa si sommi alla radiazione trasmessa  $h\nu$ .

Lo strumento completo è denominato **Spettrofluorimetro**.

- La sorgente di segnale elettromagnetico è una lampada che emette luce continua nell'intervallo di lunghezze d'onda (spettro UV-Vis) necessario per utilizzare la tecnica.
- Quali selettori di  $\lambda$  vengono utilizzati due monocromatori a reticolo;
- Le celle che contengono il campione devono avere tutte le quattro facce trasparenti (nella spettroscopia UV-Vis è sufficiente che due facce opposte siano trasparenti)
- La lampada ad arco contenente Xe (ad alta pressione) è una lampada ad alto potere radiante ( $P_0$ ) che produce radiazione elettromagnetica in un intervallo  $\Delta\lambda = 200 - 900 \text{ nm}$

Es. di attività in corso : Analisi di prodotti fluorescenti di degradazione enzimatica  
Per quantificare un enzima diagnostico di patologie polmonari.

Marked elevation of plasma chitotriosidase  
activity. A novel hallmark of Gaucher disease.

C E Hollak, ... , M H van Oers, J M Aerts

J Clin Invest. 1994;93(3):1288-1292. <https://doi.org/10.1172/JCI117084>.

Chitotriosidase activity was measured by incubating 5  $\mu$ l of EDTA plasma with 100  $\mu$ l of 0.022 mM 4-methylumbelliferyl- $\beta$ -D-N,N',N''-triacetylchitotriose (4 MU-chitotrioside; Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) as substrate in citrate/phosphate buffer (0.1/0.2 M), pH 5.2, at 37°C. In GD patients, samples were diluted 50 $\times$  in demineralized water before incubation. After 15 min the reaction was stopped with 2 ml of 0.3 M glycine/NaOH buffer, pH 10.6. Fluorescent 4-methylumbelliferone was measured with a fluorimeter (Perkin-Elmer Corp., Norwalk, CT) at 445 nm. Chitotriosidase activity in the supernatant of cultured cells was measured by incubating 10  $\mu$ l of the supernatant with 100  $\mu$ l of substrate mixture for 30 min. The enzyme activities were linear with time of incubation and amount of enzyme (data not shown).

# Confronto tra Spettroscopia di assorbimento e di fluorescenza molecolare

## Spettrofotometria

## Spettrofluorimetria

**Applicabilità**

**Ampia**

**Ristretta**

(relativamente poche sostanze emettono)

**Intervallo di linearità**

**Ampio**

**Ristretto**

**Sensibilità (oppure  
limite di rivelazione)**

**Media**

**Elevata**

(è possibile utilizzare rivelatori più  
sensibili o aumentare  $P_0$ )