

# Corso di Analisi Chimico-Farmaceutica e Tossicologica I (M-Z)

*Corso di Laurea in Chimica e Tecnologia Farmaceutiche  
Facoltà di Farmacia e Medicina  
Anno Accademico 2011/2012*

**Dott. Giuseppe La Regina**



**SAPIENZA**  
UNIVERSITÀ DI ROMA

*“Tu, disperato pilota, frangi ora fra gli scogli la mia  
barca già stanca e squassata per tante tempeste!  
A te accanto, mio amore! Oh schietto farmacista!  
Efficace è la tua droga. Con questo bacio io muoio.”  
W. Shakespeare. Giulietta e Romeo, Atto 5, Scena 3.*

# Analisi Spettroscopica

## *Gli spettri di emissione*

- Negli atomi e negli ioni, gli elettroni possono occupare solo determinate posizioni, o meglio, possono trovarsi in determinati livelli energetici.
- Nello stato normale (stato fondamentale) gli elettroni occupano il livello che ha minore energia.
- Per effetto di determinate eccitazioni si può avere nell'atomo un apporto di energia, per cui uno o più elettroni vengono elevati su livelli più lontani dal nucleo.

# Analisi Spettroscopica

## *Gli spettri di emissione*

- Questi elettroni eccitati tendono a ritornare allo stato fondamentale, emettendo la differenza di energia tra lo stato eccitato e lo stato fondamentale.
- Tale energia viene emessa in forma di energia radiante, avente lunghezza d'onda ed intensità caratteristiche.
- Qualsiasi sostanza, opportunamente eccitata, può emettere energia radiante, rivelabile eventualmente con un adeguato strumento.

# Analisi Spettroscopica

## *Gli spettri di emissione*

- Il diagramma che riporta in ascisse le lunghezze d'onda e in ordinate le corrispondenti intensità prende il nome di *spettro di emissione* della sostanza.
- Le sostanze solide e liquide danno in genere spettri continui, cioè costituiti da radiazioni, più o meno intense, di qualsiasi lunghezza d'onda.
- Le sostanze gassose o vaporizzate danno spettri discontinui, cioè costituiti da radiazioni corrispondenti solo a determinate lunghezze d'onda.

# Analisi Spettroscopica

## *Gli spettri di emissione*

- Gli spettri discontinui, a loro volta, possono essere a *bande* o a *righe*.
- Gli *spettri a bande* sono costituiti da varie radiazioni, ciascuna delle quali comprende brevi intervalli di lunghezze d'onda; essi sono dati da sostanze gassose allo stato di molecole.
- Gli *spettri a righe* sono costituiti da radiazioni singole e ben determinate; essi sono dati da sostanze gassose (o vaporizzate) allo stato di atomi o di ioni.

# Analisi Spettroscopica

## *Gli spettri di emissione*

- Gli spettri di emissione variano al variare delle condizioni di eccitazione.
- Tuttavia, una volta fissate le condizioni, diventano caratteristici delle varie sostanze, particolarmente quelli a righe, che perciò sono i più usati per l'analisi chimica.
- Infatti, poiché i livelli di ogni elemento sono definiti e limitati, deve essere definito e limitato anche il numero di righe dello spettro.

# Analisi Spettroscopica

## *Gli spettri di emissione*

- Le diverse righe hanno un'intensità relativa caratteristica che dipende dalla probabilità che il “salto” tra 2 livelli energetici abbia luogo; entro certi limiti, l'intensità è indipendente dall'eccitazione.

# Analisi Spettroscopica

## *Gli spettri di emissione: metodi di eccitazione*

- Il metodo più semplice è il riscaldamento con la fiamma; l'apporto di energia in tal caso è piuttosto limitato, sicché solo poche sostanze (metalli o ioni alcalini e alcalino terrosi, sali di rame e borati) danno i relativi spettri.
- Le radiazioni emesse al disotto di 400 °C sono radiazioni termiche che non vengono percepite dall'occhio umano.
- L'emissione di radiazioni visibili al di sotto di 400 °C deve essere considerata come dovuta a fenomeni di luminescenza.



# Analisi Spettroscopica

## *Gli spettri di emissione: metodi di eccitazione*

- Il metodo del riscaldamento con la fiamma oltre che molto semplice ha il vantaggio di dare a causa della bassa energia di attivazione, uno spettro molto semplice, costituito solo da poche righe caratteristiche e facilmente riconoscibili.
- Altri mezzi di eccitazione sono rappresentati dall'*arco voltaico* e dalla *scintilla elettrica*.
- L'*arco voltaico* si ottiene applicando una differenza di potenziale di 100-200 V a 2 elettrodi di grafite, cui si fa aderire la sostanza da analizzare.

# Analisi Spettroscopica

## *Gli spettri di emissione: metodi di eccitazione*

- Si ottengono così spettri (a righe) di atomi neutri, che si confrontano con gli spettri riportati in apposite tabelle.
- L'eccitazione con la scintilla, molto più intensa e controllabile di quella ad arco, si ottiene facendo scoccare, con un apparecchio di induzione, una scintilla di frequenza opportuna, lunga 4-5 cm, direttamente fra 2 elettrodi del metallo da analizzare.
- Si ottengono in tal modo spettri in cui predominano le righe di emissione degli atomi allo stato ionizzato.

# Analisi Spettroscopica

## *Gli spettri di emissione: metodi di eccitazione*

- Altri metodi di eccitazione sono rappresentati dal metodo elettrotermico (fornetto di grafite), plasma ad accoppiamento induttivo e plasma a corrente continua.

# Analisi Spettroscopica

## *Gli spettri di emissione: esame degli spettri*

- L'esame dello spettro costituisce per alcuni elementi il saggio di riconoscimento più sensibile e specifico.
- In alcuni casi, quando cioè l'eccitazione è seguita alla fiamma e la radiazione emessa è monocromatica (Na, K, Li), è sufficiente l'osservazione del colore che assume la fiamma stessa.
- In generale, però, per uno studio più accurato delle righe, specialmente se l'eccitazione è seguita con l'arco elettrico o con una scintilla, è necessario l'uso dello spettroscopio.

# Analisi Spettroscopica

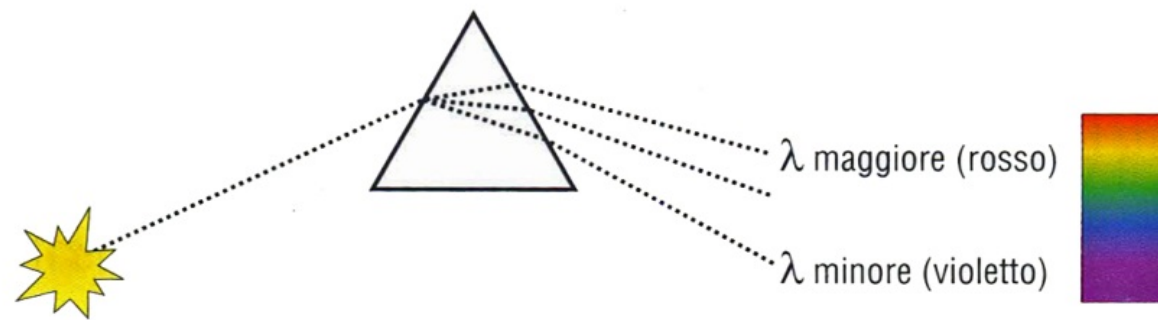
## *Gli spettri di emissione: esame degli spettri*

- Lo spettroscopio è uno strumento che scinde la luce emessa nelle varie righe corrispondenti cioè nelle varie lunghezze d'onda che la costituiscono.
- Lo spettroscopio è fondato sul principio che un raggio di luce policromatica che incida su un prisma di vetro, viene rifratto con diversi indici di rifrazione per le diverse lunghezze d'onda ( $\lambda$ ).
- Più esattamente, le radiazioni a minore lunghezza d'onda risultano più deviate.

# Analisi Spettroscopica

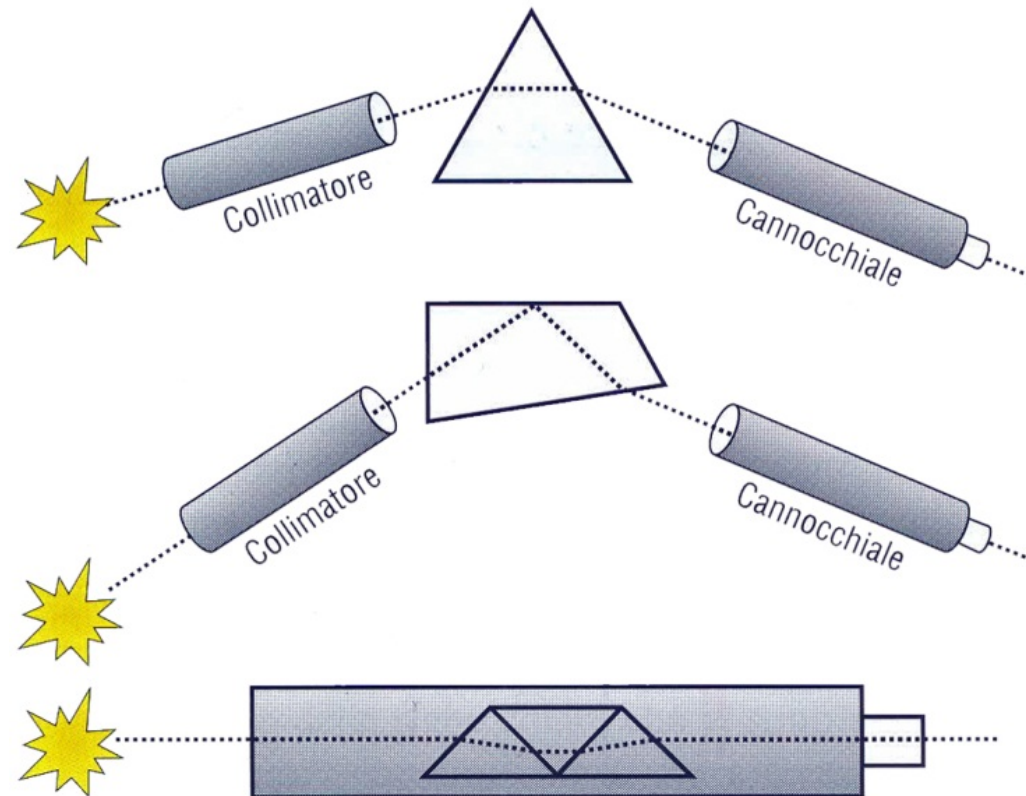
## *Gli spettri di emissione: esame degli spettri*

- Ne risulta una dispersione della luce nelle diverse radiazioni monocromatiche, cioè una scomposizione della luce stessa nei vari colori che la costituiscono.



# Analisi Spettroscopica

## *Gli spettri di emissione: esame degli spettri*



Tipi di spettroscopi

# Analisi Spettroscopica

## *Gli spettri di emissione: esame degli spettri*

- Con i primi 2 tipi di spettroscopio non si ha un esame immediato dell'intero spettro, ma si procede gradualmente all'esame di zone successive.
- Poiché le condizioni ottimali di esame dello spettro si hanno quando l'angolo di incidenza è uguale all'angolo di emergenza, con lo spettroscopio del primo tipo si esamina lo spettro ruotando il cannocchiale ed il prisma in modo da realizzare costantemente le condizioni ottimali.



# Analisi Spettroscopica

## *Gli spettri di emissione: esame degli spettri*

- Con lo spettroscopio del secondo tipo, le condizioni ottimali vengono realizzate ruotando solo il prisma, mentre il collimatore ed il cannocchiale restano fermi (*spettroscopio a deviazione costante*).
- Lo spettroscopio del terzo tipo, costruito anche in formato tascabile, consente la visione diretta di tutto lo spettro visibile.
- In tutti i casi un adeguato dispositivo permette di leggere su un'apposita scala graduata le lunghezze d'onda corrispondenti alle varie righe dello spettro della sostanza in esame.

# Analisi Spettroscopica

## *Gli spettri di emissione: esame degli spettri*

- Il riconoscimento qualitativo degli elementi si può fare paragonando lo spettro della sostanza con quello degli elementi puri che si suppongono possano essere presenti in essa.
- Altrimenti, si possono misurare le lunghezze d'onda delle righe della sostanza e confrontandole con quelle dei vari elementi ricavate da apposite tabelle.
- Fra tutte le righe di un elemento alcune sono caratteristiche, in quanto, essendo le più intense, sono le ultime a scomparire quando l'elemento viene a trovarsi in quantità infinitesime.

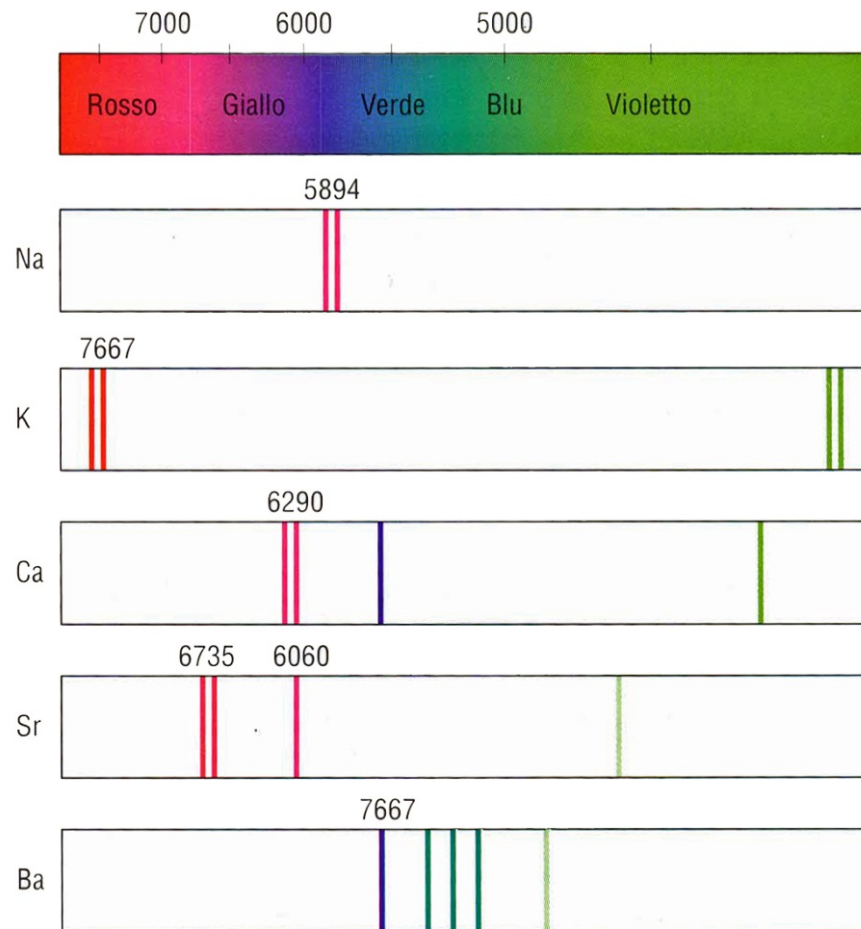
# Analisi Spettroscopica

## *Gli spettri di emissione: esame degli spettri*

- Tali righe, note come *ultime*, sono le più utili per il riconoscimento di tracce o di impurezze, anche se queste sono presenti in quantità di  $\sim 10^{-8}$  g.

# Analisi Spettroscopica

## *Gli spettri di emissione: esame degli spettri*



Righe spettroscopiche di alcuni elementi

# Analisi Spettroscopica

## *Gli spettri di assorbimento*

- Tutti i corpi hanno la capacità di assorbire in maniera diversa alcune radiazioni.
- In generale, quando una radiazione di una determinata lunghezza d'onda colpisce un corpo, una parte di essa viene riflessa, una parte viene assorbita ed una parte attraversa il corpo.
- Il rapporto tra la parte assorbita e quella riflessa varia in genere secondo la lunghezza d'onda.
- Per questa ragione molti corpi risultano colorati se colpiti da luce bianca.

# Analisi Spettroscopica

## *Gli spettri di assorbimento*

- Nella maggior parte dei casi la radiazione assorbita viene trasformata in calore.
- Solo in alcuni casi viene trasformata in energia chimica (reazioni fotochimiche).
- In altri casi viene riemessa come radiazione luminosa a lunghezza d'onda diversa (luminescenza, fluorescenza).
- Analogamente all'emissione, l'assorbimento dei solidi e dei liquidi differisce da quello dei gas e dei vapori.

# **Analisi Spettroscopica**

## ***Gli spettri di assorbimento***

- I solidi e i liquidi hanno spettri di assorbimento in genere a bande, la cui ampiezza e posizione può variare a seconda delle condizioni e particolarmente della concentrazione e dello spessore dello strato esaminato.
- Sostanze che presentano certe bande di assorbimento nello spettro visibile possono, per altra concentrazione o per altro spessore dello strato, presentare un assorbimento (e quindi un colore) completamente diverso.

# Analisi Spettroscopica

## *Gli spettri di assorbimento*

- Mentre lo spettro di assorbimento di una sostanza solida, liquida o in soluzione non ha in genere alcuna relazione con lo spettro di emissione della medesima sostanza, ben diversamente si comportano le sostanze gassose.
- Gli spettri di assorbimento dei gas sono costituiti da bande o da righe, e, come nel caso degli spettri di emissione, quelli a bande sono dovute alle molecole, mentre quelli a righe agli atomi.
- I gas, inoltre, assorbono le medesime radiazioni che essi emettono.



# Analisi Spettroscopica

## *Gli spettri di assorbimento*

- Ad esempio, lo spettro della luce solare presenta delle righe scure, la cui posizione coincide con la posizione delle righe chiare che vi sono negli spettri di emissione delle sostanze presenti negli strati più esterni del Sole.
- Il medesimo fenomeno si ha osservando attraverso una fiamma colorata una sorgente luminosa più intensa.
- Come gli spettri di emissione, anche di spettri di assorbimento vengono rilevati ed esaminati, per uno studio esatto delle righe ai fini dell'analisi chimica, mediante lo spettroscopio.

# Analisi Cromatografica

## *Cromatografia su carta*

- La cromatografia è una tecnica analitica relativamente recente, che si usa per separare i costituenti di una miscela in soluzione, distribuendoli tra 2 fasi immiscibili, di cui una è in movimento rispetto all'altra.
- La *fase stazionaria* può essere solida o liquida; la *fase mobile* può essere una sostanza liquida o gassosa (in quest'ultimo caso si parla di gas cromatografia).

# Analisi Cromatografica

## *Cromatografia su carta*

- Si distinguono varie tecniche cromatografiche:
  - la *cromatografia su colonna* si esegue in colonne di vetro riempite di un'opportuna sostanza insolubile;
  - la *cromatografia su strato sottile* si esegue su un sottile strato di sostanza di adsorbente, per esempio su uno strato di gel di silice, che rappresenta la fase stazionaria, disposta su una lastra di vetro, alluminio, ecc.;
  - la *cromatografia su carta* si esegue su strisce di carta speciale, dove la soluzione si muove per capillarità.

# **Analisi Cromatografica**

## ***Cromatografia su carta***

- Nell'analisi qualitativa inorganica la cromatografia è particolarmente adatta per eseguire separazioni altrimenti difficili.
- Ad esempio, è adatta per separare il platino dai platinoidi, il berillio dall'alluminio, lo scandio dalle altre terre rare, l'afnio dallo zirconio, ecc.
- Inoltre, essa può essere usata non solo per il riconoscimento qualitativo dei vari costituenti ma anche per la loro determinazione quantitativa.

# Analisi Cromatografica

## *Cromatografia su carta: il coefficiente $R_f$*

- Nella cromatografia su carta si pone una piccola quantità della sostanza da analizzare (es., la soluzione acquosa di vari ioni) ad un'estremità di una striscia di carta da filtro.
- Si dispone, quindi, in adatte condizioni un solvente opportuno in modo che dall'estremità della striscia esso diffonda per capillarità lungo la striscia stessa.
- Entro un certo tempo (di solito entro alcune ore) la miscela migra dal punto in cui era stata applicata e si separa, in maggiore o minore misura, nei suoi costituenti.

# Analisi Cromatografica

## ***Cromatografia su carta: il coefficiente $R_f$***

- I costituenti della miscela si localizzano in zone separate formando un cromatogramma.
- Le diverse zone, se non sono visibili di per sé, possono essere individuate e rese visibili sotto forma di macchie o bande trattando il cromatogramma con appropriati reattivi chimici (sviluppo del cromatogramma).
- La posizione raggiunta da una determinata sostanza o ione sul cromatogramma viene definita mediante il cosiddetto *rapporti dei fronti o coefficiente  $R_f$* .

# Analisi Cromatografica

## *Cromatografia su carta: il coefficiente $R_f$*

$R_f$  = spostamento della sostanza/spostamento del solvente

cioè il coefficiente  $R_f$  di una sostanza è il rapporto tra la distanza media percorsa dalla sostanza e la distanza media raggiunta dal fronte del solvente, misurate a partire dal punto di applicazione della miscela.

- Più esattamente, queste distanze sono misurate a partire da una «linea di partenza», segnata precedentemente sulla carta.

# Analisi Cromatografica

## ***Cromatografia su carta: il coefficiente $R_f$***

- E' stato sperimentato che, fissate le condizioni di operazione, i valori di  $R_f$  sono caratteristici per ogni sostanza.
- La separazione per cromatografia su carta è possibile, di solito, quando i valori di  $R_f$  differiscono di almeno 0,1.
- La posizione della linea di partenza si può fissare tracciando sulla carta una linea con una matita e ponendo in corrispondenza di questa linea una goccia della soluzione in esame, mediante una micropipetta o una microsiringa.



# Analisi Cromatografica

## *Cromatografia su carta: il coefficiente $R_f$*

- La lunghezza del tratto percorso dalla sostanza o dallo ione viene considerata uguale alla distanza fra la linea di partenza ed il centro della banda.
- Ovviamente possono sorgere incertezze se la banda presenta bordi molto sfumati.
- I valori di  $R_f$  risultano abbastanza riproducibili, sicchè si possono ritenere costanti anche nel caso che si voglia identificare una banda su una striscia prendendo come riferimento la posizione di una banda nota.

# Analisi Cromatografica

## *Cromatografia su carta: il coefficiente $R_f$*

- Pertanto, in analisi qualitativa, per riconoscere i vari ioni è sempre necessario conoscere con esattezza il valore di  $R_f$ .
- Inoltre, si è trovato che, fissate le condizioni di lavoro (temperatura, carta, solvente, ecc.), i valori di  $R_f$  possono essere influenzati da vari fattori tra cui:
  - 1) la presenza di ioni estranei e la loro concentrazione (es., cloruri in separazioni effettuate con soluzione nitrica);
  - 2) acidità della soluzione (es, la presenza di acidi è necessaria per evitare l'idrolisi dei sali);

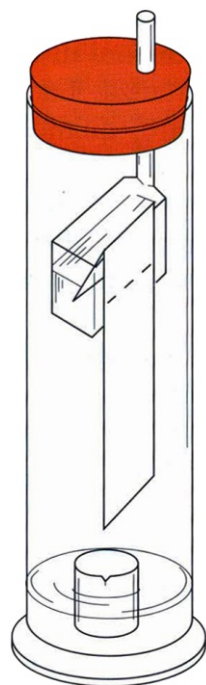
# Analisi Cromatografica

## ***Cromatografia su carta: il coefficiente $R_f$***

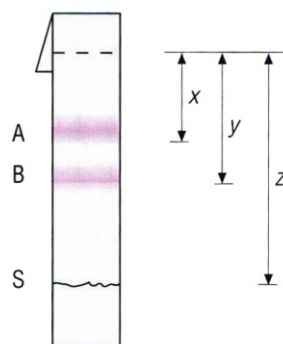
- 3) il tempo impiegato per l'adsorbimento (es., i valori di  $R_f$  possono aumentare con il tempo di adsorbimento).
- Si deve aggiungere che un fattore molto importante nella cromatografia su carta è la ripartizione dei composti inorganici tra l'acqua ed un determinato solvente organico.
  - La ripartizione può variare, tra l'altro, per la formazione di complessi fra i cationi ed i solventi organici.

# Analisi Cromatografica

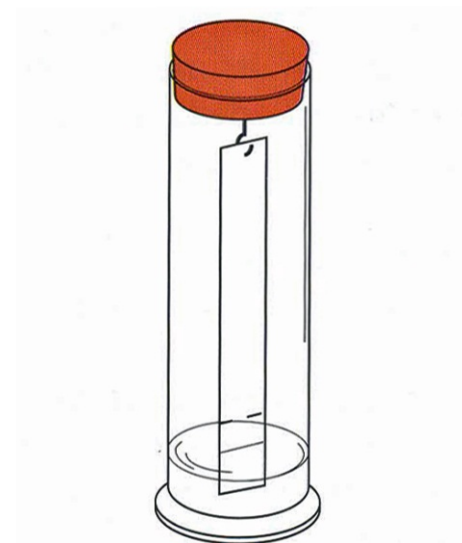
## *Cromatografia su carta: attrezzatura e procedimento*



a)



b)



**Cromatografia ascendente**

**a)** Camera cromatografica con una striscia di carta immersa nella navicella. Sulla striscia è segnata la linea di partenza (tratteggiata) e su questa linea si vede la macchia formata dalla goccia di soluzione in esame, all'inizio dell'esperimento.

**b)** Cromatogramma sviluppato; su di esso si vedono le posizioni di due bande, A e B, e il fronte del solvente S.

Per la sostanza A, si ha  $Rf = \frac{x}{z}$ . Per la sostanza B, si ha  $Rf = \frac{y}{z}$ .

# Analisi Cromatografica

## *Cromatografia su carta: applicazioni*

- Mediante cromatografia su carta è possibile separare cloruri, bromuri e ioduri.
- Gli alogenuri debbono essere presenti come sali sodici in soluzione acquosa neutra.
- Il solvente adatto è la piridina contenente il 10% di acqua (v/v) oppure l'acetone contenente il 20% di H<sub>2</sub>O (v/v).
- La fase discendente della cromatografia dura circa 2 ore; dopo l'evaporazione del solvente dalla striscia, questa viene irrorata con AgNO<sub>3</sub> 0,1N e con fluoresceina 0,1% in alcol 50%.

# Analisi Cromatografica

## *Cromatografia su carta: applicazioni*

- Dopo l'essiccamento, gli alogenuri sono chiaramente visibili come bande caratteristiche che, osservate alla luce ultravioletta, appaiono come macchie scure su uno sfondo fluorescente.

Ione	Piridina 10% H <sub>2</sub> O	Acetone 20% H <sub>2</sub> O
Cloruro	Rf = 0,25	Rf = 0,50
Bromuro	Rf = 0,47	Rf = 0,60
Ioduro	Rf = 0,70	Rf = 0,77