

# ANALISI QUALITATIVA DEI FARMACI II

***-SEZIONE STRUMENTALE-***

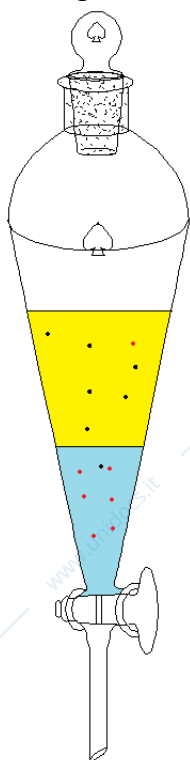
## ESTRAZIONE CON SOLVENTI

Questo tipo di estrazione permette di separare delle sostanze tra loro, basandosi sulle differenti ripartizioni in due solventi non miscibili tra di loro: questa estrazione è tipicamente condotta sfruttando una fase acquosa ed un solvente non miscibile con essa, in realtà sono conducibili con qualunque coppia di solventi non miscibili tra loro (e.g. metanolo ed esano).

Lo scopo dell'estrazione può essere di separare una miscela di prodotti oppure di purificare una sostanza da eventuali impurezze: a prescindere dallo scopo prefissato, la tecnica è basata sulla diversa solubilità della sostanza nei due solventi e sull'utilizzo di un particolare strumento, l'*imbuto separatore* (separating flask, pallone separatore).

Questo strumento è costituito da una porzione conica richiamante la forma dell'imbuto, un tappo smerigliato ed un rubinetto sul fondo per permettere la fuoriuscita del liquido per gravità.

Le sostanze sono mescolate con una fase liquida, ad esempio acquosa, a cui viene successivamente addizionato un liquido non miscibile con la fase preesistente, come ad esempio dell'etere etilico: si osserva come la quasi totalità della sostanza presente nella fase iniziale vada a disciogliersi nel liquido aggiunto.



La separazione non avviene in maniera spontanea ed è necessario agitare energicamente e "sciabordare" il contenuto dell'imbuto per fornire l'energia necessaria a far entrare in contatto tra loro le due fasi e permettere la transizione delle sostanze da una fase all'altra: questo processo è favorito dall'aumento della superficie di scambio e da una rapida instaurazione dell'equilibrio che invece richiederebbe anche settimane.

Dal punto di vista della sicurezza è necessario condurre le operazioni a rubinetto in su, *sfiatando* di tanto in tanto per rimuovere il gas che può andare a svilupparsi e che può fare esplodere il pallone: le operazioni di sfiatatura devono essere condotte fino al cessare della produzione di gas.

Il parametro principale che regola la differente migrazione della sostanza nei solventi è definito *coefficiente di ripartizione*, caratterizzato dalla costante adimensionale  $K$  che indica, all'equilibrio, il rapporto della concentrazione di una data sostanza nella *fase A* e nella *fase B*.

$$K = \frac{[C]_A}{[C]_B}$$

Prendendo ad esempio l'immagine, da un rapido calcolo è possibile appurare che la  $K$  della sostanza rossa è  $K = \frac{6}{1}$  mentre per quella nera risulta  $K = \frac{1}{6}$ : è evidente che la sostanza rossa è preferenzialmente presente nella fase inferiore e quella nera in quella superiore.

Queste differenti  $K$  sono particolarmente favorevoli per la separazione mentre in alcuni casi si hanno  $K$  prossime all'unità, con l'unico risultato ottenibile di avere la sostanza che si scioglie in entrambe le fasi.

Una particolare categoria di coefficienti di ripartizione è data dalla *lipofilia* dove si utilizza un particolare coefficiente di ripartizione,  $P$  o meglio  $\log P$ , utilizzato quando si ha a che fare con la coppia di *n-ottanolo e una fase acquosa*.

È usato il logaritmo del valore al posto del valore stesso per mera convenienza numerica: un  $\log P = 4$  o  $5$  indica una sostanza che sta da  $10^4$  a  $10^5$  volte in *n-ottanolo* rispetto all'acqua, mentre un  $\log P = -3$  è indice di una sostanza che è preferenzialmente reperibile in acqua, con un fattore  $10^3$  volte maggiore rispetto alla fase polare.

Tornando al coefficiente di ripartizione  $K$ , per condurre correttamente un'estrazione è necessario utilizzare una sostanza assolutamente non miscibile, o che lo sia pochissimo, con l'acqua e sono tipicamente utilizzati l'etere etilico o altri solventi clorurati come il cloroformio: la sostanziale differenza è dettata dal fatto che l'etere si pone superiormente alla fase acquosa mentre il cloroformio stratifica in basso.

Sono rari i casi in cui le due fasi risultano divise e presenti con due colorazioni distinte, mentre spesso e volentieri risultano entrambe incolori: la separazione è comunque conducibile perché il menisco tra le due fasi è ben riconoscibile grazie alla differente deviazione ottica.

Un aspetto di cui tenere conto è la scelta del solvente, dato che deve contemporaneamente presentare una corretta  $K$  e una densità sensibilmente differente dall'acqua: la differenza permette una più rapida separazione delle fasi che, altrimenti, genererebbero una emulsione che richiederebbe molto più tempo per rompersi e separarsi.

L'efficienza di una estrazione può essere aumentata in diversi modi, analizzabili prendendo in considerazione un modello di estrazione condotta in fase acquosa e in fase eterica, con la sostanza oggetto di indagine che risulta ripartita tra le due fasi: i parametri da valutare sono il *volume di solvente*, il *coefficiente di ripartizione* ed eventualmente il *numero di estrazioni*.

Immaginando di avere un composto disciolto in acqua e da estrarre con solvente eterico è necessario valutare di quanto diminuisca la quantità di sostanza in fase acquosa in seguito all'estrazione: è definita  $W_1$  la quantità di sostanza rimasta in acqua dopo la prima estrazione,  $V$  il volume della fase acquosa,  $S$  il volume del solvente eterico e  $W_0$  la quantità iniziale di sostanza.

Dopo aver definito questi parametri, è possibile descrivere il *coefficiente di ripartizione*  $K$  in questo modo

$$K = \frac{C \text{ in etere}}{C \text{ in acqua}} = V \frac{\left(W_0 - \frac{W_1}{S}\right)}{W_1}$$

Una volta impostata l'equazione è opportuno valutare di quanto decresce  $W_1$  dopo la prima estrazione e da quali parametri dipenda.

Dividendo tutto per  $\frac{W_1}{V}$  si ottiene:

$$\frac{KW_1}{V} = \frac{W_0 - W_1}{S}$$

E semplificando:

$$KSW_1 = VW_0 - VW_1$$

Esplicitando  $W_1$ :

$$KSW_1 + VW_1 = VW_0$$

$$W_1(KS + V) = VW_0$$

Per cui:

$$W_1 = \frac{W_0V}{KS + V}$$

L'equazione in oggetto descrive come la quantità di composto in acqua vari dopo una singola estrazione con solvente organico.

È possibile fare delle predizioni sul rapporto tra  $W_0$  e  $W_1$ , osservando che il numeratore debba essere sempre positivo per cui

$$0 \leq \frac{V}{KS + V} \leq 1$$

È ovvio che  $W_1$ , la quantità di sostanza rimasta dopo la prima estrazione debba essere necessariamente minore -o al limite uguale- alla quantità iniziale e ciò mi permette di analizzare quali siano i parametri che mi fanno migliorare l'estrazione per avere  $W_1$  molto minore di  $W_0$ : il processo di estrazione presenta l'efficienza massima ogni volta che si riesce a sottrarre la maggior parte del composto dall'acqua.

Per efficientare l'estrazione non è possibile agire sul volume d'acqua, ma è invece possibile agire su:

- **Coefficiente di ripartizione**: usando un solvente appropriato, con un coefficiente di ripartizione favorevole per la sostanza, è possibile ridurre il numero di estrazioni e il volume di solvente necessario. Tuttavia, non esistono molti solventi utilizzabili, per cui non è possibile andare ad inficiare molto sul risultato;
- **Volume di solvente**: è possibile -in teoria all'infinito- aumentare il volume di solvente utilizzato per l'estrazione. Aumentando  $S$  si aumenta il peso del denominatore in maniera considerevole e si migliora l'efficienza del processo, tuttavia occorre minimizzare quanto più possibile l'utilizzo del solvente per ragioni economiche, logistiche e ambientali.

### **Estrazioni multiple**

In seguito alla prima estrazione si procede alla successiva, procedendo come in precedenza ma tenendo conto di quale sia il punto di partenza,  $W_1$  -la quantità di sostanza rimasta in acqua dall'estrazione precedente- al posto di  $W_0$  e  $W_2$  -la quantità di sostanza che rimane in acqua dopo l'estrazione- al posto di  $W_1$ :  $S$  e  $V$  assumono invece gli stessi valori.

Si ottiene quindi

$$W_2 = W_1 \frac{V}{KS + V}$$

Sostituendo  $W_1 = W_0 \frac{V}{KS + V}$  si ottiene

$$W_2 = W_0 \left( \frac{V}{KS + V} \right)^2$$

Così procedendo, alla  $n$ -esima estrazione, si avrà una quantità di sostanza rimanente pari a

$$W_n = W_0 \left( \frac{V}{KS + V} \right)^n$$

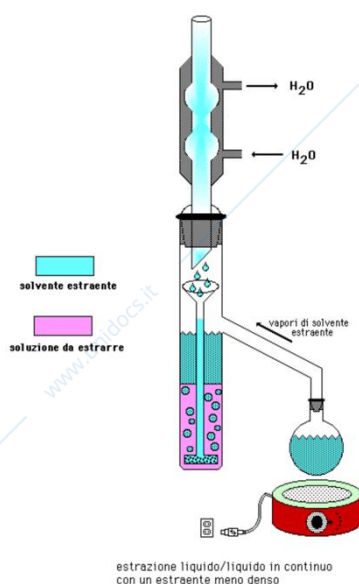
Se si operano le dovute considerazioni si osserva come, a parità di volume di solvente utilizzato, la scelta di effettuare più estrazioni in serie risulta più efficace nel sequestrare quanta più sostanza possibile. Contrariamente, benché meno efficace, l'estrazione in unica soluzione risulta decisamente più rapida.

### **Estrattori in continuo**

La tecnica dell'estrazione multipla permette di rimuovere discrete quantità di sostanza anche in quei casi in cui si ha un *coefficiente di ripartizione sfavorevole*: è necessario tuttavia operare un numero molto elevato di estrazioni.

La soluzione per ovviare al problema è fare ricorso agli *estrattori in continuo*, apparecchiature che permettono di operare vari cicli di estrazione senza l'operatore, basandosi comunque sul principio delle estrazioni multiple.

### ***Estrattori in continuo per solventi meno densi dell'acqua***



Questo tipo di estrattore è basato sulla limitata disponibilità di solvente.

Sul pallone è presente una colonna in vetro provvista di una sorta di "dito" a fondo chiuso e, nella zona evidenziata è presente la soluzione acquosa da estrarre.

Lateralmente è presente una canalizzazione laterale che permette ai vapori provenienti dal solvente di raggiungere la colonna di refrigerazione e condensare, gocciolando verso il basso.

Il solvente è posto a riscaldamento fino al superamento del punto di ebollizione: il vapore -generalmente di etere etilico- sale verso l'alto, condensa e viene convogliato nello strato più basso della soluzione acquosa.

Qui, essendo meno denso dell'acqua, risale verso l'alto e comincia ad accumularsi: raggiunto il quantitativo sufficiente a superare il livello cui è connesso il tubicino laterale, ricade nel pallone arricchito della sostanza estratta dalla soluzione acquosa.

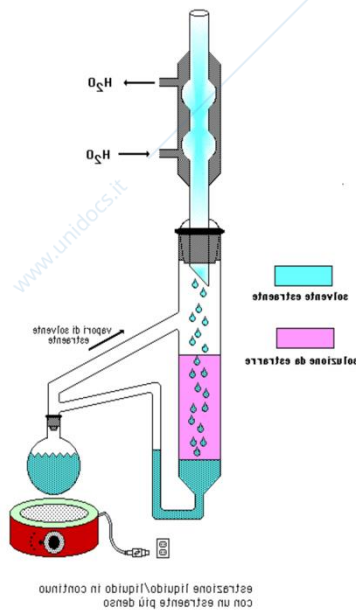
Una volta nuovamente riscaldato, risale il condotto laterale come vapore puro, privo della sostanza estratta: il solvente parte come vapore puro e ritorna al pallone sotto forma di condensato carico della sostanza estratta.

Il ciclo è ripetuto  $n$  volte, permettendo di condurre l'estrazione al massimo dell'efficienza prevista dal principio delle estrazioni multiple.

L'apparecchio è munito di "trappole" costituite da ostacoli fissi che impediscono una risalita agevole del solvente attraverso la soluzione acquosa, aumentando il tempo di permanenza ed efficientando l'estrazione.

In caso il solvente risultasse più denso dell'acqua, è necessario sostituire l'apparecchio di estrazione.

### **Estrattori in continuo per solventi più densi dell'acqua**



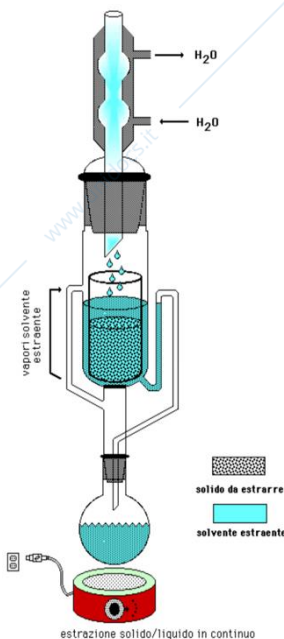
Questo tipo di estrattore è una variante del precedente, completamente inutile nel caso il solvente si stratificasse sul fondo dell'estrattore perché si avrebbe una ricaduta della soluzione acquosa nel pallone di reazione insieme al solvente.

L'estrattore non presenta più delle trappole che rallentano la risalita del solvente, presentando invece delle trappole che ne rallentano la discesa sul fondo dell'estrattore.

Il solvente carico dell'estratto stratifica sul fondo dove, un piccolo tubicino con funzione di sifone, permette di estrarre tutto il solvente una volta raggiunta la quantità di liquido sufficiente e di riprecipitarlo nel pallone di riscaldamento.

A differenza del caso precedente, dove l'estrazione del solvente avveniva in modo continuo, qui si ha un ciclo di riempimento e scarico del sifone.

### **Estrattori SOXHLET**



Un *estrattore solido-liquido* basato sul principio dell'estrattore precedente è definito *estrattore SOXHLET* ed è in grado di estrarre specifiche sostanze a partire da matrici solide.

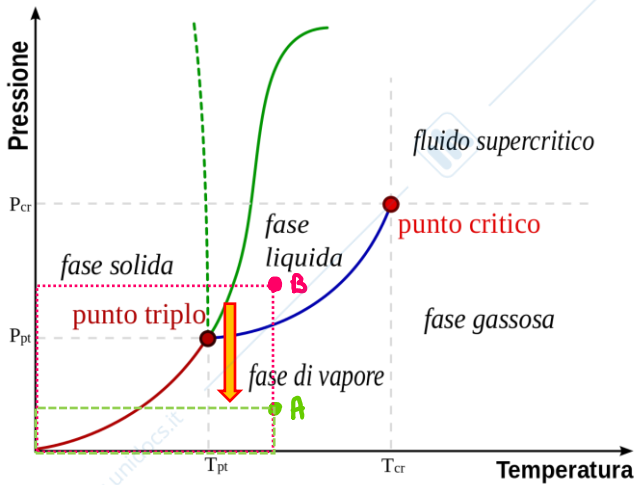
Anche in questo caso è presente una colonna di condensazione, atta a refrigerare i vapori del solvente provenienti dal pallone di riscaldamento, una colonna di estrazione provvista di un tubicino di apporto dei vapori del solvente ed un sifoncino per lo scarico del solvente condensato nel pallone.

All'interno dell'estrattore è presente una sorta di coppetta in cellulosa che agisce da filtro, impedendo la precipitazione del materiale solido nella raccolta dell'estratto.

### **SUBLIMAZIONE**

Si tratta di un processo di purificazione dei solidi consistente nel riscaldare una sostanza solida fino al punto in cui passa direttamente in fase gassosa: il vapore si raffredda a contatto con una superficie fredda, trasformandosi in un solido costituito da cristalli ad elevato grado di purezza.

La sublimazione non è tuttavia applicabile a tutte le sostanze, per valutare quali siano le sostanze idonee a condurre questo processo, occorre far fede al grafico di stato delle sostanze.



Nel grafico di stato è indicato lo stato della sostanza in correlazione a pressione e temperatura applicate.

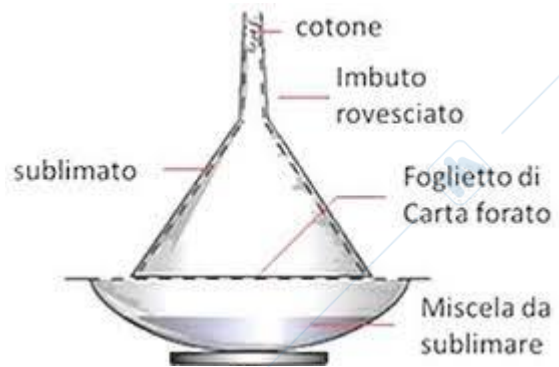
Nel caso la sostanza presenti una  $P_{pt}$  superiore a  $P_{atm}$ , significa che alla pressione atmosferica, riscaldando la sostanza si può passare direttamente alla fase gassosa senza passare dalla fase liquida: questo è il caso del punto A.

In caso il punto triplo presenti una  $P_{pt}$  inferiore a  $P_{atm}$  allora si assiste alla fusione del solido all'aumento della temperatura applicata, come

nel caso del punto B.

Nel caso fortuito in cui  $P_{pt} > P_{atm}$  allora è sufficiente allestire un semplice sublimatore per ottenere dei cristalli solidi ad elevato grado di purezza.

Il sublimatore in oggetto è generalmente costituito da un imbuto rovesciato poggiato su di un vetro da orologio contenente il prodotto solido: il tutto è intramezzato da un foglio di carta da filtro o di carta forata per impedire il passaggio diretto di sostanza tramite schizzi o per impedire la ricaduta del solido purificato verso il basso.



Tipicamente non è necessario andare a raffreddare l'imbuto, essendo la superficie vetrosa sufficientemente fredda da garantire la cristallizzazione.

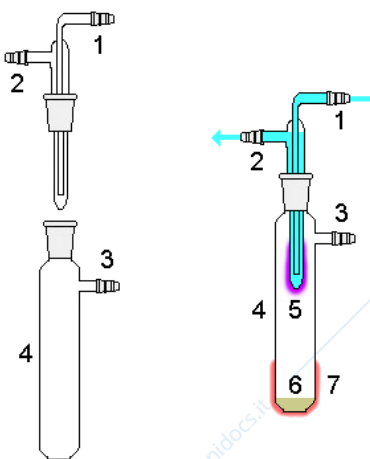
In caso di sostanza che presenti  $P_{pt} < P_{atm}$ , caso che rappresenta la stragrande maggioranza delle possibilità, non è possibile condurre una sublimazione come nel caso precedente.

È però possibile abbassare  $P_{atm}$  tramite una apposita apparecchiatura in grado di creare il vuoto all'interno (vedi freccia sul grafico): questi macchinari sono definiti *sublimatori a pressione ridotta*.

In questa tipologia di macchinari è presente un sistema di raffreddamento ad acqua (mandata 1., ritorno 2.) che permette di raffreddare rapidamente le pareti circostanti e raccogliere il sublimato sul "dito freddo" (5.).

Il contenitore (4.) ed il solido (6.) vengono posti a riscaldare (7.) ed un sistema di vuoto (3.) permette di ridurre la pressione atmosferica e far sublimare la sostanza che altrimenti non

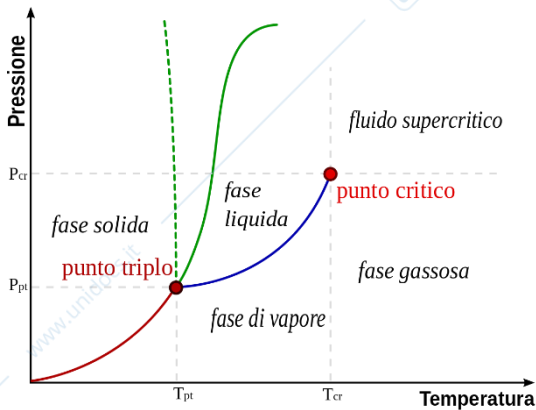
andrebbe incontro a questo destino.



Una volta condotta la sublimazione, si rompe il vuoto e si gratta il sublimato dal dito freddo, ottenendo un solido particolarmente puro.

## **DISTILLAZIONE**

La distillazione è un processo che permette di purificare sostanze liquide, con una procedura identificabile all'interno del grafico di stato.



Un fluido in condizioni di  $P_{atm}$  ed una certa temperatura riesce a trasformarsi in vapore solo perché la tensione di vapore assume un valore identico alla pressione esterna.

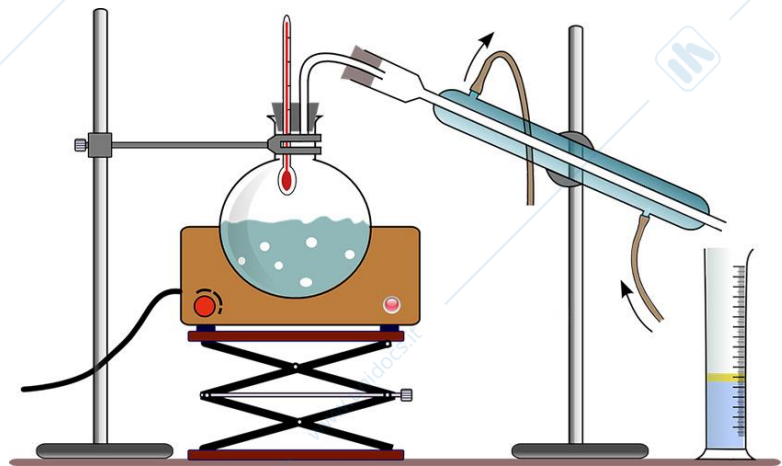
Quando questo avviene, la sostanza inizia a bollire e passare dallo stato liquido a quello gassoso: la temperatura in questo punto è definita  $T_{eb}$ .

La distillazione prevede l'ebollizione del liquido in una sezione dell'apparecchiatura e la sua ricondensazione in un'altra, dove avviene la raccolta del liquido

purificato.

L'apparecchiatura è composta da diverse componenti:

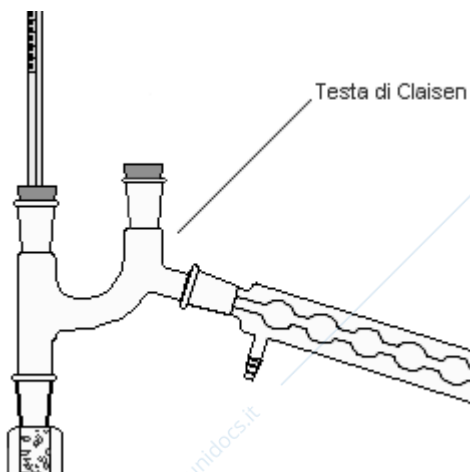
1. Pallone contenente il liquido da distillare;
2. Sistema di riscaldamento;
3. Sistema di connessione tra la condotta di condensazione, il termometro ed il pallone;
4. Termometro;
5. Colonna di raffreddamento;
6. Mandata e uscita dell'acqua;
7. Contenitore per la raccolta.



Il sistema di refrigerazione del vapore deve essere riempito con acqua a partire dalla porzione inferiore per permettere il corretto riempimento della colonna senza che si formino bolle o aree prive di liquido.

Il termometro deve essere immerso completamente nel vapore nella zona di estrazione per rilevare correttamente la temperatura dello stesso.

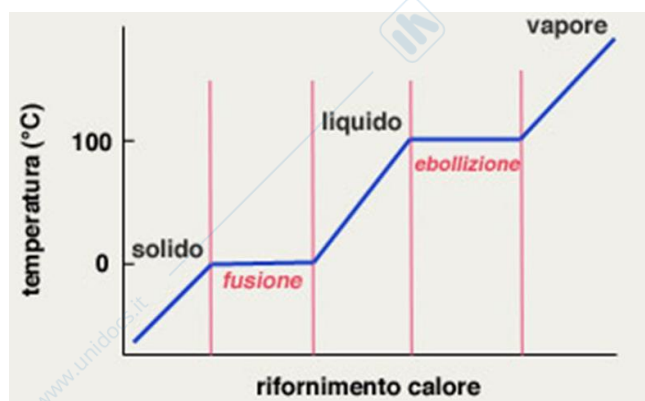
Per evitare di commettere errori di valutazione è possibile inserire una *testa di Claisen*, in grado di garantire il corretto posizionamento del termometro ed evitare interferenze dovute alla condensazione del vapore sul



bulbo dello stesso.

I vapori provenienti dal pallone riscaldato, passando attraverso la colonna refrigerata, trovano una superficie fredda dove condensano in goccioline che si uniscono all'interno del braccio e, per gravità, formano un flusso di liquido che scivola verso il contenitore di raccolta.

La lettura del termometro permette di capire se quella che sta evaporando è il composto puro o meno.



Osservando il grafico si nota come, aumentando il calore somministrato, si ha un aumento della pendenza durante la fase di cambiamento di stato fino a raggiungere una zona di plateau, seguito da un'altra fase di aumento della pendenza.

Il calore somministrato nella zona di plateau tra la fase liquida e la fase vapore è definito *calore latente di evaporazione*, poiché all'aumentare

del calore non si ha un corrispettivo aumento della temperatura, definita *temperatura di ebollizione* ( $T_{eb}$ ).

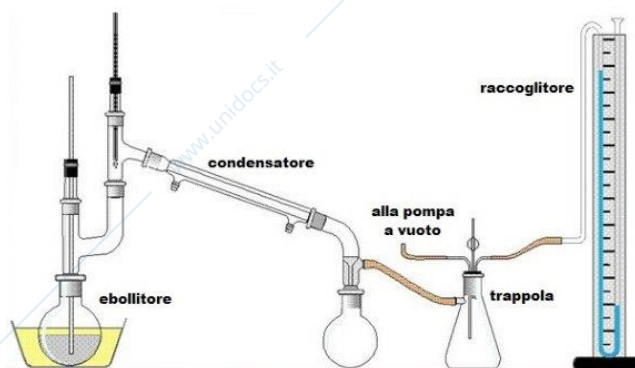
La distillazione effettuata a  $T_{eb}$  contiene il composto puro mentre a temperature inferiori e superiori si hanno impurezze, definite relativamente "testa di distillazione" e "coda di distillazione": esse devono essere scartate.

### **Distillazione a pressione ridotta**

Se la sostanza presenta una  $T_{eb}$  decisamente elevata, sono necessarie apparecchiature complesse per la distillazione con il rischio, sempre presente, di degradare la sostanza irrimediabilmente.

In questi casi è necessario quindi abbassare la temperatura di ebollizione, andando ad agire sulla pressione del sistema: abbassando la pressione rispetto a quella atmosferica, si può sensibilmente abbassare il punto di ebollizione.

Occorre quindi operare con apparecchiature in grado di creare -anche se virtualmente impossibile- il vuoto all'interno del macchinario.



L'apparecchiatura è pressoché identica alla precedente, eccezion fatta per l'aggiunta dell'apparato in grado di praticare il vuoto all'interno del macchinario.

### **DISTILLAZIONE DI MISCELE**

In caso di distillazione di miscele di liquidi, la procedura finale cambia rispetto a quanto trattato in precedenza.

Per semplicità di trattazione, verranno prese in considerazione solo miscele costituite da due liquidi.

Si distinguono quindi due tipi di miscele:

- **Miscela omogenea:** soluzione nella quale i due liquidi sono miscibili tra loro;
- **Miscela eterogenea:** i due liquidi non sono miscibili tra loro.

### Distillazione di miscele omogenee

Immaginando di avere un liquido "A" ed un liquido "B" miscibili tra loro, occorre valutare come il riscaldamento va ad agire sia sulla componente liquida che gassosa.

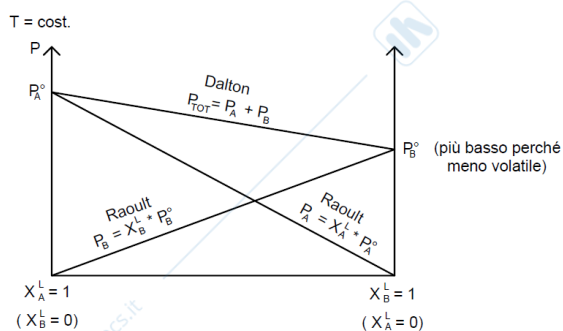
Poiché si forma una miscela gassosa, è possibile applicare la *legge di Dalton*, ottenendo che la pressione totale della miscela è dovuta alla somma delle pressioni della componente "A" e della "B", messe in correlazione stretta con la frazione molare della sostanza:

$$P_{tot} = P_A + P_B$$

$$P_A = \chi_A^{vap} \times P_{tot} \quad e \quad P_B = \chi_B^{vap} \times P_{tot}$$

Trattandosi di soluzioni omogenee, è applicabile anche la *legge di Raoult*, ottenendo che, in una miscela di liquidi miscibili tra loro, la pressione parziale di ciascun componente sia uguale al prodotto della frazione molare per la tensione di vapore del componente che avrebbe se fosse solo.

$$P_A = \chi_A^{liq} \times P_A^0 \quad e \quad P_B = \chi_B^{liq} \times P_B^0$$



Nel grafico si osserva come, aumentando la frazione molare di B, la pressione si avvicini sempre di più alla tensione di vapore di B, stesso discorso per A.

Le due componenti presentano una differente tensione di vapore e, conseguentemente, una differente volatilità: A, presentando  $P^0$  maggiore, risulta essere anche il composto più volatile.

Le due rette, distinte per componente, rappresentano la soluzione ideale della legge di Raoult mentre la legge di Dalton può essere aggiunta sommando punto per punto il valore delle due rette.

Le possibili miscele liquide avranno una tensione di vapore compresa tra un minimo di  $P_B^0$ , dove si ha la presenza solo della componente B, ed un massimo di  $P_A^0$  laddove si abbia la presenza esclusiva della componente A.

Mentre la rappresentazione dell'apporto di Raoult avviene sul grafico riportando le varie frazioni molari della fase liquida, non avviene la stessa cosa per la fase gassosa. Infatti, se nella fase gassosa si ha una certa  $\chi$  per A e per B, la stessa cosa non si ha nel momento del passaggio a vapore: questa teoria viene confermata dalle teorie sia di Dalton che di Raoult, per cui è necessario capire la relazione tra  $\chi_A^{liq}$  e  $\chi_B^{liq}$ .

Considerando contemporaneamente l'apporto di Dalton e di Raoult alla frazione molare

$$\text{Apporto di Dalton: } P_A = \chi_A^{vap} \times P_{tot} \rightarrow \chi_A^{vap} = \frac{P_A}{P_{tot}}$$

$$\text{Apporto di Raoult: } P_A = \chi_A^{liq} \times P_A^0 \rightarrow \chi_A^{liq} = \frac{P_A}{P_A^0}$$

Dividendo tra loro e semplificando  $P_A$  si ottiene:

$$\frac{\chi_A^{vap}}{\chi_A^{liq}} = \frac{P_A}{P_{tot}} \times \frac{P_A^0}{P_A} = \frac{P_A^0}{P_{tot}}$$

Che a sua volta, tramite la legge di Dalton è esprimibile come:

$$\frac{P_A^0}{P_{tot}} = \frac{P_A^0}{P_A + P_B}$$

A sua volta,  $P_A$  e  $P_B$  sono esprimibili secondo la legge di Raoult come

$$\frac{P_A^0}{P_A + P_B} = \frac{P_A^0}{P_A^0 \times \chi_A^{liq} + P_B^0 \times \chi_B^{liq}}$$

Poiché non è ancora comprensibile come vari il rapporto tra le frazioni molari, provando a dividere per  $P_A^0$ , ottenendo:

$$\frac{\chi_A^{vap}}{\chi_A^{liq}} = \frac{1}{\chi_A^{liq} + \left( \chi_B^{liq} \times \frac{P_B^0}{P_A^0} \right)}$$

Si possono operare a questo punto delle valutazioni quantitative poiché, per definizione, in una soluzione la somma delle frazioni molari corrisponde a 1.

$$\chi_A^{liq} + \chi_B^{liq} = 1$$

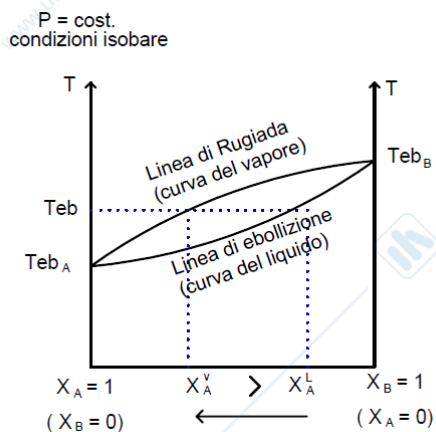
In caso  $P_A^0 = P_B^0$ , allora la composizione del vapore avrebbe la stessa frazione molare della fase liquida ma, dato che questo avviene quando due sostanze presentano la medesima volatilità, questo risulta essere un caso poco probabile.

Se invece si hanno due composti con  $P_A^0 > P_B^0$  allora il discorso cambia, in quanto si ha che la sostanza A è più volatile di B, con un rapporto tra le frazioni molari pari a  $\frac{\chi_A^{vap}}{\chi_A^{liq}} > 1$ : quello che si evince è che A sarà più arricchito nella fase vapore di quanto non lo fosse nella fase liquida

$$\chi_A^{vap} > \chi_A^{liq}$$

Questa esplicitazione numerica dimostra quanto ipotizzato in precedenza e cioè che, in una miscela di liquidi, si avrà una composizione maggiore in vapore della sostanza con volatilità maggiore.

Tutto ciò si riflette in un grafico che contempla l'andamento delle composizioni in funzione della temperatura, a differenza del precedente grafico che era condotto a temperatura costante, pena il veder variare anche le relative  $P_0$ .

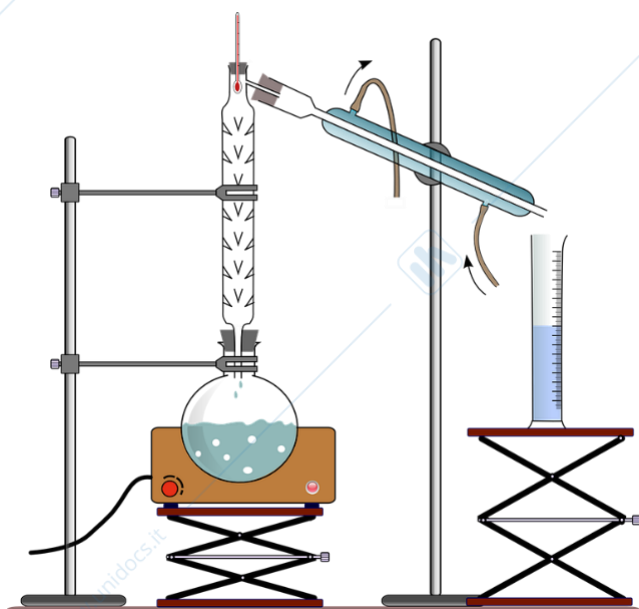


Durante la distillazione non si ha una temperatura costante, ma un aumento generale che porta ad avere un grafico simile a questo dove, partendo dalla temperatura di ebollizione di A puro -inferiore alla temperatura di ebollizione di B che è meno volatile- si ottiene uno sdoppiamento delle curve all'aumentare della temperatura.

Mentre una curva rappresenta la *composizione della fase liquida* e una la *composizione della fase vapore*, in equilibrio con il liquido.

Per ogni temperatura si ha una fase vapore che avrà una certa composizione e sarà in equilibrio con la fase liquida ed un'altra composizione: la curva del vapore è definita anche *linea di rugiada* mentre la curva del liquido è detta anche *linea di ebollizione*.

### Distillazione frazionata o di rettifica



Il fenomeno di arricchimento vapore della componente più volatile è fondamentale perché permette di usare una tecnica particolare, la *rettifica* o la *distillazione frazionata*.

La distillazione in questo caso è condotta con una specifica apparecchiatura che permette di condurre cicli ripetuti di distillazione e condensazione fino a raggiungere la separazione completa della miscela: l'operazione viene svolta interponendo una *colonna di rettifica* tra il pallone e la testa di Claisen.

La colonna è progettata inserendo dei *piatti di distillazione*, contenenti a loro volta dei caminetti coperti e dei fori in grado di

permettere alla condensa di scendere.

La colonna prevede che i vapori arrivino a toccare dei piatti di vetro, condensare sotto forma di goccioline e scendere per incontrare altro vapore che sta salendo, riscaldarsi ed evaporare per ricondensare per più cicli.

Lo scopo delle ripetizioni di evaporazione e condensazione risiede nello sfruttamento del principio per cui la fase liquida che evapora è in equilibrio con la fase vapore arricchita della componente più volatile.

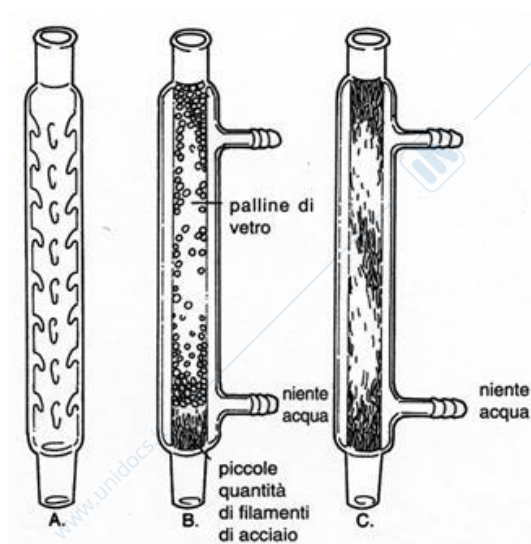


Ponendo ad esempio di partire dalla fase liquida rappresentata in grafico da  $\chi_A^{liq}$ , nel primo piatto si avrà una miscela liquida in equilibrio con la fase vapore che, nel momento in cui si trova a contatto con la superficie più fredda successiva, condensa e risulta avere la composizione della fase vapore.

Il condensato è fatto ribollire dal vapore che sale ma, questo ciclo, è in equilibrio con una fase vapore ancora più arricchita della componente più volatile.

Per ogni piatto di condensazione si ha condensazione ed evaporazione, arrivando ad ottenere un arricchimento completo della componente più volatile: tutto questo a patto di avere un sufficiente numero di piatti di distillazione.

Una volta esaurita la componente A, si inizia a distillare B puro ad una temperatura superiore: questo avviene perché si può raccogliere tutto A e, al momento in cui si ha un rialzo della temperatura, si evince che sta iniziando la distillazione di B.



In realtà è sufficiente che all'interno della colonna di rettifica sia presente un supporto inerte che costituisca la superficie di scambio tra vapore e liquido: spesso le colonne sono riempite di sfere in vetro o di altro materiale, purché inerte.

Affinché il frazionamento avvenga in maniera efficace, gli scambi di calore devono avvenire esclusivamente tra la fase vapore che sale e quella condensata che scende, senza scambi di calore con l'esterno ed agendo in condizioni adiabatiche: si deve isolare la colonna dal punto di vista termico, andando generalmente a creare il vuoto all'interno della camicia che riveste la colonna.

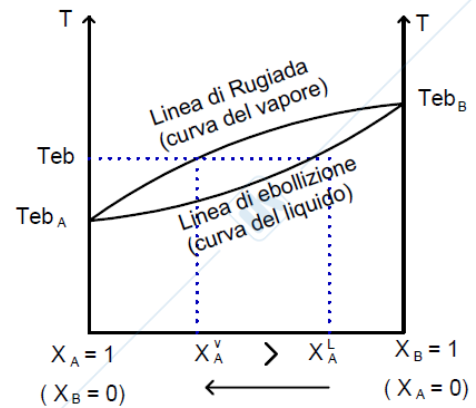
All'interno della colonna, se la separazione avviene completamente, passa prima la componente più volatile con una temperatura interna pari a quella della temperatura di ebollizione della sostanza stessa.

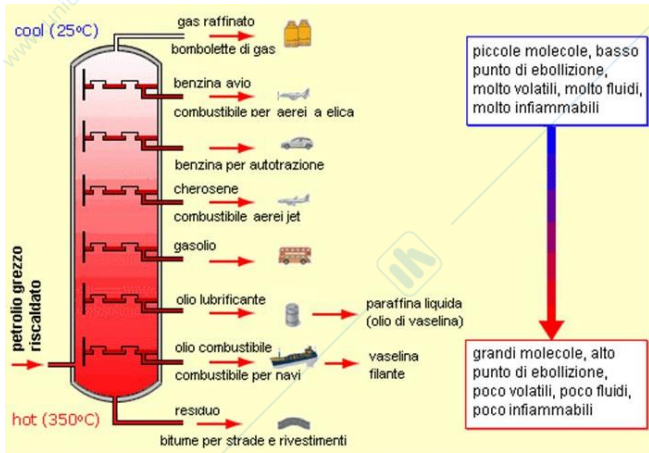
Tuttavia, mentre in alto nella colonna risiedono le porzioni più ricche di A, la componente più volatile, ed in basso le porzioni più ricche di B, componente meno volatile, si assisterà all'instaurazione di un *gradiente di temperatura all'interno della colonna di rettifica*.

A livello industriale, il gradiente di temperatura è sfruttato per la separazione degli idrocarburi: installando dei rubinetti di raccolta a posizioni intermedie lungo la colonna, è possibile raccogliere dei sottoprodotti della distillazione più o meno volatili.

Mentre sulla sommità della colonna sono posti dei bruciatori per eliminare le componenti altamente volatili e non utilizzabili, in alto è possibile raccogliere benzina per automobili,

$P = \text{cost.}$   
condizioni isobare



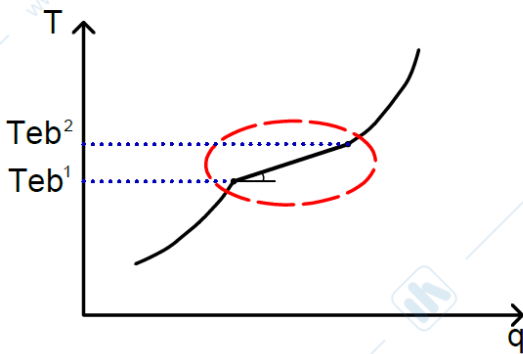


scendendo si passa dal cherosene a composti sempre meno volatili, raggiungendo il catrame sul fondo della colonna stessa.

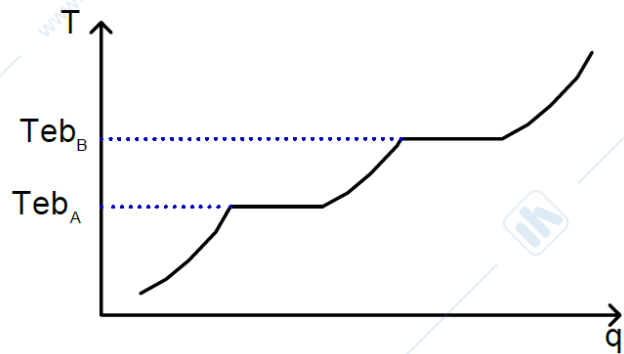
Sebbene condotto a livello industriale, la distillazione degli idrocarburi sfrutta il medesimo principio della colonna di rettifica, cambiando solo il metodo di raccolta.

Senza colonna di rettifica, la distillazione non porterà mai ad un composto puro ma ad una miscela di componenti.

L'andamento del calore latente di distillazione di una miscela non è costante, ma la temperatura di ebollizione si troverà in range differenti.



Senza colonna di rettifica



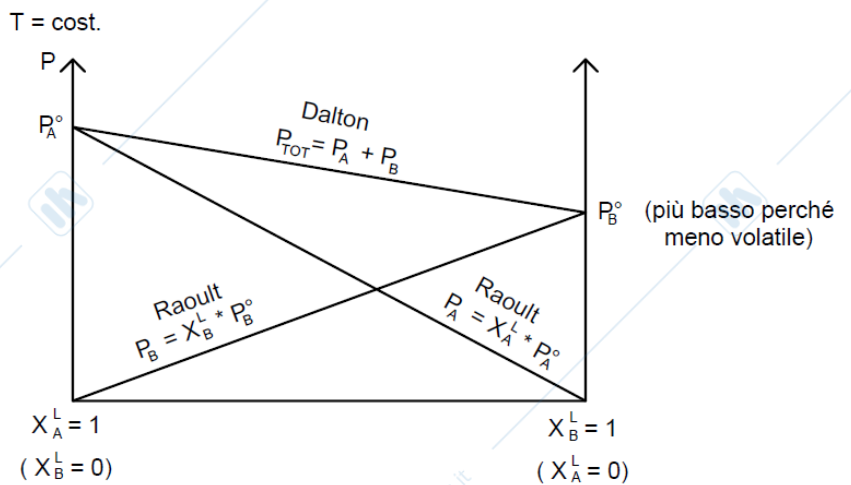
Con colonna di rettifica

**Deviazioni dall'idealità: miscele azeotropiche**

Tutto quanto appena descritto riguarda esclusivamente delle condizioni ideali, in realtà questo non è possibile.

Esistono infatti deviazioni dall'idealità che portano a dare comportamento diversi, dovute principalmente ad interazioni che possono intercorrere tra molecola e molecola, sia in maniera attrattiva che repulsiva a seconda dei gruppi funzionali presenti.

L'aderenza al grafico in oggetto si ha solamente se le due molecole non interagiscono tra loro, caso possibile solamente se si ha a che fare con una diluizione di A con B.



### DEVIAZIONI POSITIVE

Le linee, anziché essere dritte, sono curvate verso l'alto, segno di una *pressione più elevata* all'interno della colonna.

Questa fase è determinata dall'eventualità in cui le molecole stanno di *più nella fase gassosa rispetto al previsto*: questo effetto è derivato da fenomeni di repulsione tra le due sostanze che, altrimenti, starebbero molto di più in fase liquida.

Con fenomeni repulsivi tra i composti della miscela si assiste a deviazioni positive che spostano i grafici leggermente verso l'alto senza presentare comportamenti eclatanti, salvo superarla il livello di tensione massimo.

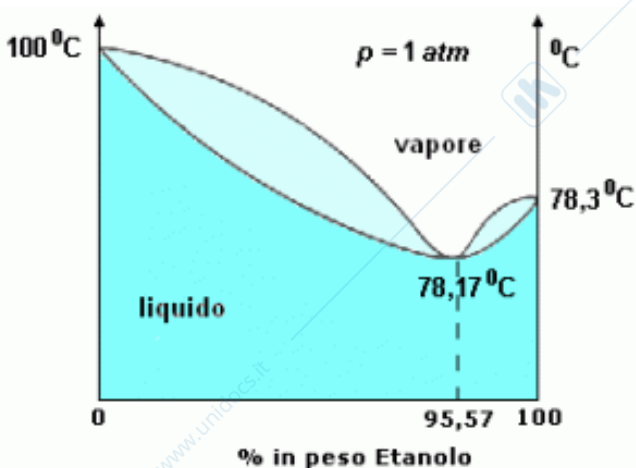
Nel momento in cui si raggiunge il picco massimo di tensione,  $P_{max}$ , si ha un *punto di rottura* che si manifesta con la formazione di una *miscela azeotropica*: la composizione di una miscela che fornisce una tensione di vapore massima in questo tipo di deviazioni genera una miscela azeotropica.

Osservando l'andamento del grafico della distillazione di una miscela azeotropica si realizza come le  $T_{eb}$  di A e B rimangano costanti ma, procedendo con le operazioni di riscaldamento, si raggiunga una fase di rottura del grafico stesso: si è prodotto un azeotropo che ha un punto di ebollizione inferiore alle due sostanze e che si comporta come una sostanza pura.

La miscela, se raggiunge la composizione dell'azeotropo, non è più separabile.

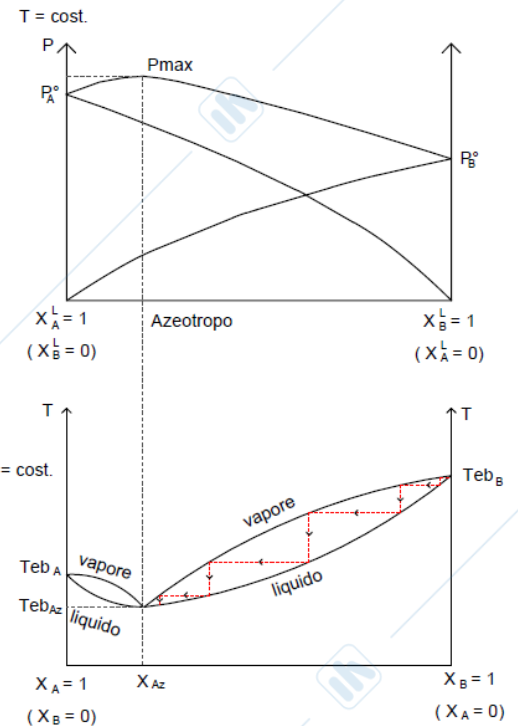
Supponendo di avere una colonna di rettifica contenente etanolo ed acqua: iniziando a scaldare si ottiene un iniziale ciclo di riscaldamento e raffreddamento simile a quello teorico: raggiungendo  $P_{max}$  si ottiene una miscela con un punto di ebollizione proprio ed una composizione tale da non poter essere ulteriormente arricchita.

### Azeotropi di minimo



Un esempio di azeotropo di minimo è dato dalla miscela di etanolo e acqua 95:5 infatti, mentre l'etanolo bolle a 78,3 °C e l'acqua bolle a 100 °C, il loro azeotropo bolle a 78,1 °C.

Questa differenza di temperatura comporta che ogni volta che l'etanolo viene distillato, porta sempre con sé dell'acqua



EtOH (78,3 °C)	H <sub>2</sub> O (100 °C)	Azeotropo
95%	5%	78,1 °C

Un altro azeotropo di minimo è dato dalla miscela di toluene e acqua, spesso utilizzata per permettere la coevaporazione dell'acqua ed essiccare reattivi igroscopici.

Toluene (110 °C)	H <sub>2</sub> O (100 °C)	Azeotropo
80%	20%	84 °C

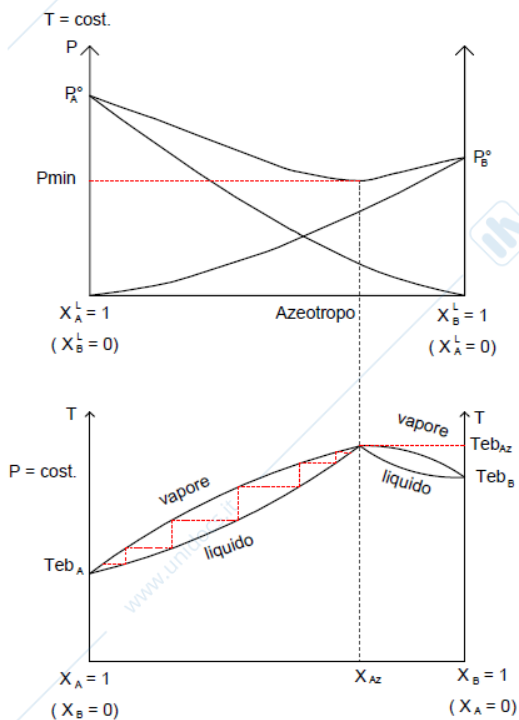
Un ulteriore metodo per rimuovere l'acqua dalle soluzioni prevede di ricorrere all'acetonitrile:

Acetonitrile (82 °C)	H <sub>2</sub> O (100 °C)	Azeotropo
84%	16%	76,5 °C

Riassumendo, quando le deviazioni positive raggiungono il punto di rottura (*massimo di pressione*), generano degli azeotropi di minimo.

Viceversa, quando le deviazioni negative raggiungono il *minimo di pressione* originano *azeotropi di massimo*.

### DEVIAZIONI NEGATIVE



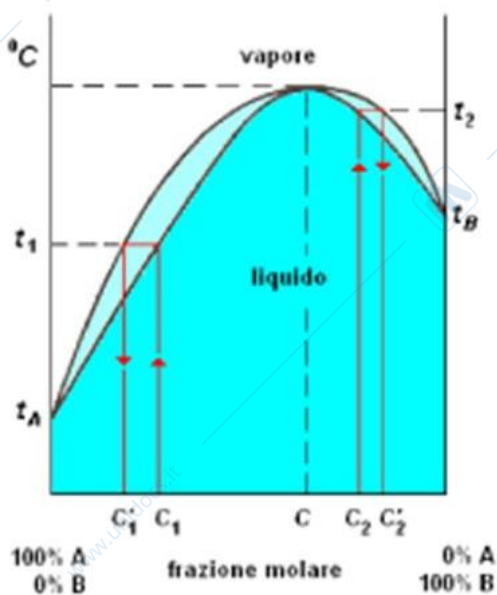
Le pressioni minime corrispondono esattamente all'*azeotropo di massimo*, anch'esso sottostante alle osservazioni fatte per l'azeotropo di minimo.

Circa le cause della formazione dell'azeotropo di massimo, essendo generato da deviazioni negative dalle leggi ideali, prevalgono *fenomeni attrattivi tra A e B*, ottenendo una miscela meno volatile del previsto.

Un azeotropo di massimo sottoposto ad una rettifica può comunque portare alla distillazione della componente a volatilità maggiore per ottenerla pura, facendo comunque permanere l'azeotropo nel residuo.

Mentre nell'azeotropo di minimo si osserva che l'azeotropo risiede nel distillato, in questo caso l'azeotropo è localizzato nel residuo.

### Azeotropi di massimo



Questo è il caso rappresentato dagli acidi alogenidrici come *HCl* 37%, *HI* 48% e *HBr* 56%: si tratta di soluzioni costituite da *azeotropi di massimo*, non concentrabili oltre quei valori per non distillare l'azeotropo stesso.

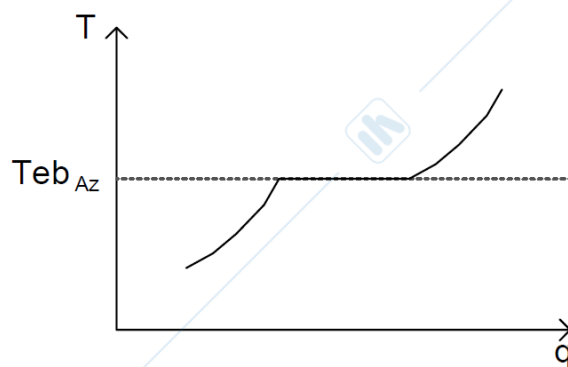
Per quanto concerne, a titolo di esempio, l'azeotropo *HBr* 48% si sa che ha un punto di ebollizione pari a 126 °C, superiore ai 100 °C dell'acqua mentre *HBr* è già un gas, così come *HI* 57% che bolle a 127 °C.

Si tratta di miscele che presentano una temperatura di ebollizione superiore a quella dei singoli componenti e che, se distillate, non porteranno mai all'arricchimento né di uno né dell'altro componente.

Anche negli azeotropi di massimo si osserva una

inseparabilità delle componenti, dato che la miscela azeotropica stessa si comporta come se fosse una sostanza pura, presentando un comportamento ed un grafico tipico, sovrapponibile a quello dei composti puri.

Il calore latente di evaporazione alla temperatura di ebollizione dell'azeotropo sarà esattamente rappresentato da un quadro di temperatura costante come se fosse un composto puro: questo vale sia per l'azeotropo di massimo che per quello di minimo.



### Distillazione di miscele omogenee

È il caso in cui si hanno due liquidi non miscibili tra loro.

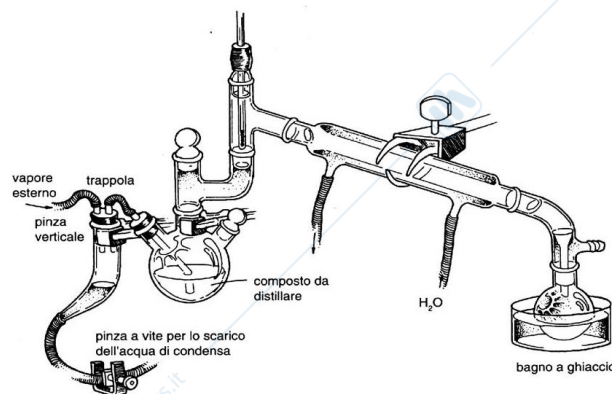
Una situazione abbastanza comune e che prevede una tecnica di distillazione ben precisa come la *distillazione in corrente di vapore*.

### Distillazione in corrente di vapore

Questa tecnica permette la distillazione di miscele eterogenee.

L'apparecchiatura è costituita da un pallone da cui si distilla il composto che viene insufflato, tramite una cannula, di vapore proveniente da una caldaia esterna.

La caldaia contiene acqua sottoposta a riscaldamento fino all'ebollizione, mentre il pallone contiene una certa sostanza liquida da purificare o una miscela complessa: entrambi sono sottoposti a riscaldamento.



I vapori generati dall'acqua si riversano attraverso la cannula nel composto immiscibile con l'acqua stessa, generando una miscela eterogenea di *acqua e sostanza*: l'acqua, in forma di vapore, condensa a contatto con la sostanza generando una miscela.

La miscela stessa permane in equilibrio tra la fase liquida ed il vapore per l'alta temperatura somministrata: ovviamente la sostanza non deve essere miscibile in acqua.

Il riscaldamento fa bollire la miscela che evapora, condensa nel condotto di raffreddamento e viene raccolta in apposito contenitore dove si avrà la separazione tra la fase acquosa e non acquosa.

Il vapore che entra all'interno del pallone può provenire da una fonte esterna, come una caldaia, oppure derivare dall'acqua presente all'interno del pallone stesso: la prima soluzione è adottata in ambito industriale dove sono necessarie grandi quantità di vapore.

Le considerazioni che vengono operate per questo tipo di distillazione sono valide anche per tutte le altre distillazioni di miscele eterogenee: le distillazioni sono da preferire alle estrazioni nei casi in cui si renda necessario ottenere una componente più pura rispetto a quella di partenza.

Se la sostanza inizialmente contiene delle componenti poco volatili o solubili in acqua, esse non saranno trasportate dal vapore e non finiranno nel distillato dato che non si tratta di un'estrazione vera e propria ma di un meccanismo che, sulla base della legge di Dalton, permette di *aumentare la volatilità della sostanza*.

Sono tecniche conducibili laddove la distillazione semplice della sostanza richieda temperature eccessivamente elevate per quel tipo di prodotto e possono condurre alla decomposizione: è sempre possibile condurre una distillazione a pressione ridotta ma servono apparecchiature complesse e costose, con una notevole difficoltà nella conduzione della procedura stessa, soprattutto in caso di elevate quantità di sostanza.

Prendendo in analisi ciò che avviene durante il processo di distillazione di una miscela eterogenea, è evidente come *non sia possibile applicare la legge di Raoult*, applicabile soltanto alle soluzioni: non essendo una soluzione, la tensione di vapore di ogni componente è pari alla tensione della stessa sostanza ma considerata in purezza.

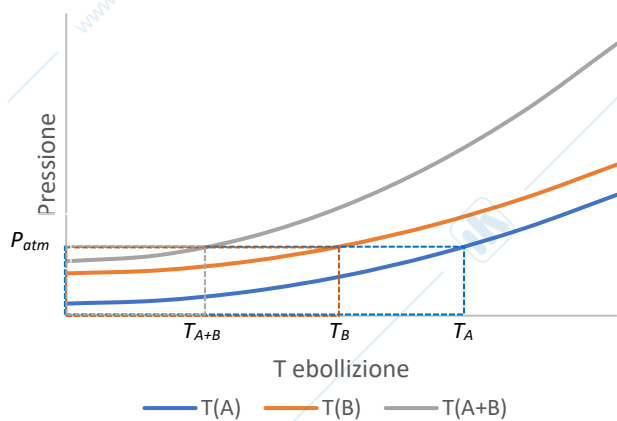
Per cui:

$$P_A = P_A^0 \quad P_B = P_B^0$$

Questo permette altresì di capire che, in questo caso, prendere in considerazione la singola sostanza o una miscela eterogenea delle due non influenza la volatilità delle stesse.

Mentre la legge di Raoult non è applicabile, la *legge di Dalton* trova invece piena applicazione, riferendosi a miscele di gas: la pressione totale sarà uguale alla somma delle due pressioni parziali, equivalenti alle rispettive tensioni di vapore.

$$P_{TOT} = P_A + P_B = P_A^0 + P_B^0$$



L'applicazione della legge di Dalton permette di ottenere un grafico sull'andamento della temperatura di ebollizione delle singole componenti e della miscela stessa.

Applicando punto per punto la legge di Dalton si osserva come, a differenza delle miscele omogenee e degli eventuali azeotropi, in questi casi la temperatura di ebollizione della miscela si trova a livelli inferiori rispetto alle singole componenti.

Questo rappresenta un vantaggio soprattutto nel caso di estrazioni, permettendo di condurle a temperature

piuttosto basse.

Nella distillazione in corrente di vapore, se una delle due componenti è rappresentata dall'acqua, è possibile condurre la procedura a valori di temperatura ben inferiori a 100 °C, riducendo sensibilmente la possibilità che le sostanze estratte possano essere degradate dal calore: nel caso dell'estrazione degli oli essenziali, la procedura viene condotta a circa 80-85 °C.

Il prodotto finale della distillazione è nuovamente una miscela eterogenea delle componenti A e B, stavolta facilmente risolvibile per estrazione con solvente: in questa distillazione viene addizionata una componente aggiuntiva, introdotta dall'operatore, usata solamente come *componente di trasporto*.

Lo scopo della distillazione in corrente di vapore non è tanto estrarre una sostanza, quanto purificarla e concentrarla a partire da qualcosa di poco volatile, agendo in netto contrasto rispetto ad una procedura di distillazione o frazionamento.

Come prodotto finale è possibile avere sia una miscela acqua/fase lipofila che una miscela acqua/solido immiscibile: nel primo caso si opera separando tramite imbuto separatore, nel secondo tramite filtrazione.

### UTILIZZO DELL'ACQUA NELLA DISTILLAZIONE IN CORRENTE DI VAPORE

L'acqua è utilizzata per molteplici motivazioni, una fra tutte il non essere una sostanza lipofila.

Molte delle sostanze estratte con questa tecnica non sono solubili in acqua e possono perciò essere purificate in questo modo: devono essere comunque sostanze con una volatilità sufficiente.

Le sostanze idrofile o poco volatili (oli o solidi molto bassofondenti) non possono essere distillate con acqua.

Inoltre, dato che l'acqua bolle a 100 °C, garantisce una temperatura di estrazione notevolmente inferiore, spesso contenuta nel range degli 80-90 °C, ideali per non degradare le sostanze estratte.

È possibile effettuare anche una previsione quantitativa dell'andamento della resa ponderale della distillazione, analizzando la situazione tramite la legge di Dalton.

Essa sostiene che  $P_{tot} = P_A^0 + P_B^0$  ma anche che, in una miscela omogenea di gas, la pressione finale è costituita dalla pressione esercitata dalla singola componente per la sua frazione molare, ottenendo di fatto:

$$P_A^0 = \chi_A^v \times P_{tot} \quad e \quad P_B^0 = \chi_B^v \times P_{tot}$$

Per cui:

$$\frac{P_A^0}{P_B^0} = \frac{\chi_A^v}{\chi_B^v}$$

Ma poiché:

$$\chi_A = \frac{\eta_A}{\eta_{tot}} \quad e \quad \eta = \frac{g}{PM}$$

Allora:

$$\frac{P_A^0}{P_B^0} = \left( \frac{\chi_A^v}{\chi_B^v} = \frac{\eta_A}{\eta_B} = \frac{g_A}{g_B} \times \frac{PM_B}{PM_A} \right)$$

Omettendo che si sta trattando della fase vapore, è ovvio che la composizione percentuale del condensato sarà identica a quella del vapore che poi si andrà a raffreddare.

Maggiore una sostanza presenta una caratteristica di volatilità e maggiore sarà la sua presenza nel vapore e, conseguentemente, nel condensato e, sostituendo nell'equazione precedente si può osservare come la pressione e la massa di estratto siano in preciso rapporto secondo la legge

$$\frac{g_A}{g_B} = \frac{P_A^0}{P_B^0} \times \frac{PM_A}{PM_B}$$

Questa equazione permette di effettuare delle valutazioni sull'efficienza del processo di distillazione in corrente di vapore, permettendo di prevedere i rapporti ponderali di cosa si ottiene all'interno del distillato.

Dato che le  $P^0$  sono tabulate e che i pesi molecolari delle sostanze da distillare sono noti, si può predire con sufficiente precisione il rapporto tra la sostanza estratta e l'acqua: pur non conoscendo la volatilità delle due componenti, il rapporto tra il peso molecolare dell'acqua e del distillato volge sempre ad un rapporto favorevole tra la massa del distillato e l'acqua stessa.

In sostanza, l'acqua è un ottimo vettore per la distillazione in corrente di vapore per la non miscibilità con altre sostanze organiche, una temperatura di ebollizione della miscela eterogenea che non supera mai i 100 °C ed un rapporto ponderale favorevole dovuto al basso PM dell'acqua stessa.

## **CROMATOGRAFIA**

Non è utilizzata solo per l'analisi quantitativa ma anche per quella qualitativa.

Infatti, come tecnica di purificazione, si basa sul principio dell'estrazione con solventi: pur trattandosi di tecniche profondamente diverse tra loro circa il modo di operare ed i risultati ottenuti, sono basate su principi di funzionamento molto simile.

Nella cromatografia è presente una *fase stazionaria* (solida, liquida o gassosa) ed una *fase mobile* che, in qualche modo, fluisce lungo una certa direzione attraverso la fase stazionaria.

Ciò che accomuna la tecnica cromatografia alle procedure di estrazione è il fatto che la sostanza che costituisce l'*analita*, ciò che è oggetto di analisi, possa ripartirsi con equilibri dinamici e tramite interazioni tra fase stazionaria e fase mobile.

La fase mobile non è solida, bensì liquida o gassosa:

- Se la fase mobile è liquida si ha la *cromatografia liquida (LC)*;
- Se la fase mobile è un gas si ha a che fare con *gascromatografia (GC)*.

Esistono anche varianti della cromatografia liquida, soprattutto strumentali come l'*HPLC (High Pressure Liquid Chromatography)*, una cromatografia che associa l'elevata pressione di esercizio ad una elevata efficienza di estrazione.

La permanenza dell'analita all'interno della fase mobile rispetto alla fase stazionaria comporta un rallentamento del fluire della stessa: maggiore è l'interazione della fase mobile all'interno della stazionaria e maggiore sarà il rallentamento ottenuto.

Le interazioni tra la fase mobile e quella stazionaria influiscono sull'abilità migratoria delle varie sostanze che, dato che mostrano abilità migratorie tutte differenti tra loro: le tecniche di separazione cromatografia sono basate sulla *migrazione differenziale* delle varie sostanze.

Possono esistere delle differenze, sebbene anche solo infinitesimali, nel tempo necessario a due distinte sostanze nel fluire attraverso una colonna e talvolta non sono sufficienti per effettuare una corretta separazione.

Scegliendo l'opportuna fase stazionaria, l'opportuna fase mobile e le opportune condizioni di separazione è possibile sfruttare la differente capacità migratoria per separare due o più sostanze (teoricamente fino a 100) che vengono inserite in un sistema cromatografico.

La cromatografia è utilizzata sia per fini analitici veri e propri sia per scopi preparatori, cioè la separazione fisica delle sostanze.

Le cromatografie sono suddivisibili in due macrocategorie, la *cromatografia su colonna* e la *cromatografia su strato sottile (TLC)*, entrambe utilizzabili sia con fine preparatorio che analitico.

### **Cromatografia su colonna**

Un sistema di questo tipo è schematizzabile come in figura, sia nel caso dei sistemi più semplici che nel caso dei sistemi più avanzati.

Lo schema di una colonna cromatografia prevede innanzitutto la presenza di un *serbatoio di fase mobile* all'inizio dell'apparecchiatura, contenente appunto la fase mobile che verrà poi spinta all'interno del sistema.



Successivamente deve essere presente un'area dell'apparecchiatura dove avviene la *deposizione* o l'*iniezione del campione*: la deposizione avviene generalmente se la colonna è preparativa, l'iniezione se analitica.

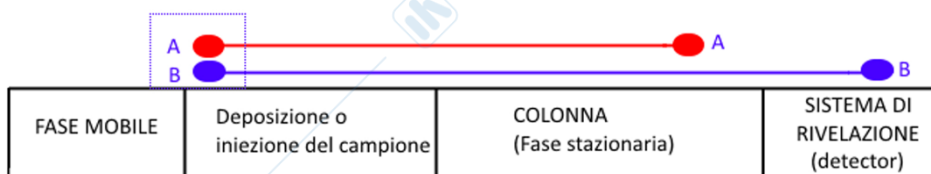
In serie alla sede di deposizione è presente la *colonna* contenente la fase stazionaria e che, tipicamente, occupa gran parte dell'area del sistema operativo.

In coda all'apparecchiatura è presente infine un *sistema di rilevazione* o un *detector*, in grado di determinare quando e quale sostanza sta uscendo dal sistema: il detector può essere accoppiato direttamente alla colonna cromatografica oppure può esserne separata, rendendo necessaria l'azione dell'operatore nell'analizzare le varie frazioni per identificare e segnalare l'uscita della sostanza.

Negli strumenti per scopi analitici, il detector è sempre connesso al macchinario principale e può trattarsi di uno strumento a ultravioletti, a ionizzazione di fiamma oppure, in altri casi, possono essere connessi direttamente a spettrofotometri di massa per verificare direttamente quale sostanza sta uscendo.

Gli *LC-MS (Liquid Chromatography – Mass Spectrometry)* sono attualmente gli strumenti più avanzati e validi per capire quando una sostanza lascia la colonna cromatografica e conoscerne il relativo PM.

Nel caso in cui -come nell'immagine di esempio- si abbiano due sostanze (A e B) che vengono iniettate contemporaneamente in colonna, si otterrà una diversa interazione tra le stesse



sostanze, presenti in fase mobile, e la fase stazionaria: si ottiene quindi un rallentamento di una

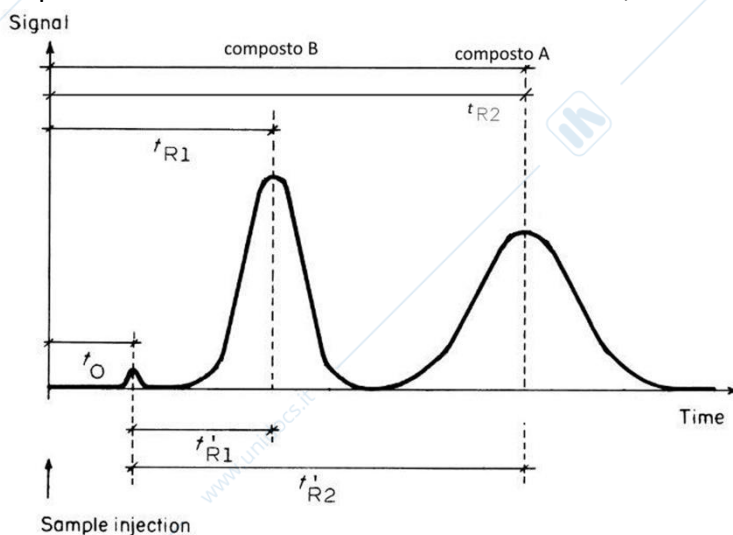
delle due sostanze che uscirà dalla colonna in un momento successivo.

Poiché le due sostanze presentano una diversa partizione tra la fase mobile e quella stazionaria, il detector può misurare i diversi *tempi di ritenzione*.

Alla fine della colonna si cominciano a raccogliere, in provette diverse, varie frazioni di sostanza: si passa da una iniziale ed esclusiva fase mobile, alla sostanza con minore tempo di ritenzione, ad

altre frazioni di fase mobile fino a raggiungere la componente con tempo di ritenzione maggiore: è quindi fisicamente possibile separare le due sostanze grazie alla diversa propensione a migrare nella fase mobile rispetto alla stazionaria.

In caso di un sistema analitico come *HPLC* si ottiene un *cromatogramma*, un particolare tipo di diagramma che riporta in ascisse il *tempo di uscita del composto* e in ordinate il *livello del segnale*,



derivante da sensori UV, assorbimento nel visibile, segnali di massa, ecc...

A tempi rapidissimi, si ha normalmente un picco molto piccolo che indica il *volume morto* della colonna: il campione viene iniettato con il suo solvente, generalmente differente dalla fase mobile, che tenderà ad uscire per primo dalla colonna senza aver interagito con la fase stazionaria.

Il picco iniziale segnala l'avvenuta fuoriuscita del solvente e una serie di picchi in successione che indicano la fuoriuscita delle varie sostanze, in ordine crescente secondo il relativo tempo di ritenzione: il numero di picchi è pari al numero delle sostanze presenti in miscela.

In aggiunta a ciò, l'analisi dell'AUC del picco del cromatogramma indica la concentrazione della sostanza stessa all'interno della miscela, essendo l'area direttamente proporzionale alla concentrazione della sostanza stessa.

Non è importante l'altezza del picco per la determinazione della concentrazione, quanto l'area sotto il picco stesso: esistono alcune sostanze che mostrano una buona corrispondenza anche delle altezze a è necessario avere picchi molto vicini tra loro e con forme molto simili (picchi molto stretti e ravvicinati tra loro).

Generalmente i primi picchi sono più stretti mentre i successivi sono più larghi per motivazioni collegate a percorsi multipli e altre collegate alla maggiore permanenza in colonna.

Ogni composto presenta spettri tipici con possibilità di preferenza di assorbimento ad una lunghezza d'onda rispetto ad un'altra, rispondendo meglio in una lunghezza d'onda rispetto ad un'altra.

L'area del picco è indicativa solo se confrontata tra eguali sostanze, mentre risulta insignificante se confrontata tra diverse sostanze: se una sostanza presenta, ad esempio un AUC di 100 alla prima iniezione e un AUC di 200 alla seconda, significa che nel secondo caso si ha una concentrazione doppia.

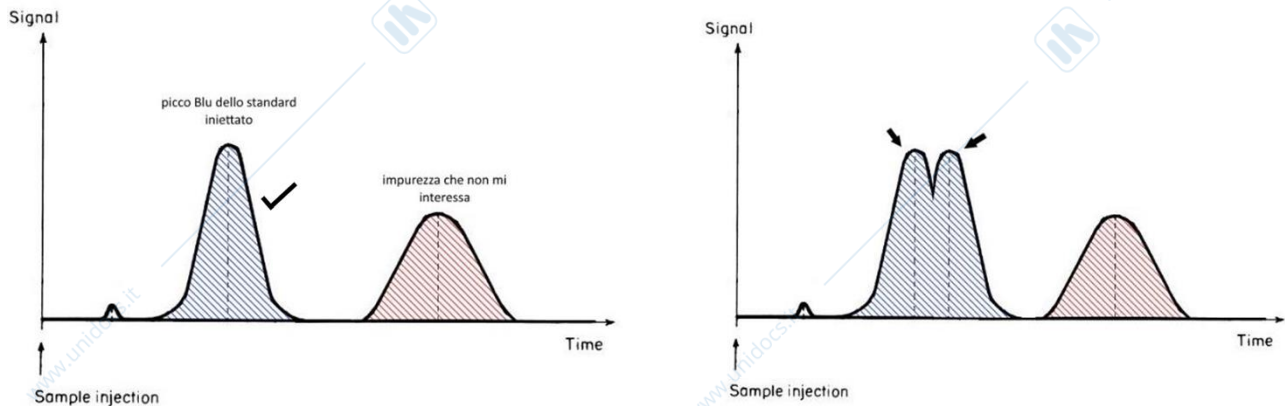
Per eseguire un confronto tra la concentrazione tra due sostanze occorre inserirne un terzo, interno ed esterno, per realizzare uno *standard* e calcolare fattori di correzione che permettano di mettere in correlazione le altre due concentrazioni.

Da un punto di vista prettamente qualitativo, è possibile indagare se un certo campione contiene una data sostanza eseguendone il cromatogramma e confrontandolo con quello di altre sostanze, utilizzate come standard: se un certo picco è presente sia nello standard che nel cromatogramma, è possibile dedurre la presenza di quella data sostanza nel campione analizzato.

In realtà, per verificare se un picco di una certa sostanza è uguale a un altro occorre confrontare il *tempo di ritenzione* ( $t_R$ ), rilevato generalmente proiettando il punto più alto del picco: è scontato che, per confrontare i tempi di ritenzione, le operazioni debbano essere condotte in condizioni standardizzate.

In caso in cui si abbiano dubbi sull'effettiva corrispondenza del tempo di ritenzione, dovuti a  $t_R$  molto simili ma non identici (e.g. 8,62' vs. 8,53') è possibile fugare ogni dubbio eseguendo una *iniezione in miscela*.

Mescolando un'aliquota del campione da analizzare con una parte della soluzione del composto di riferimento e facendo un'iniezione, il cromatogramma risultante potrà fugare ogni dubbio in merito. Infatti, nel caso della presenza di quella specifica sostanza, si osserverà un unico picco a quello specifico tempo di ritenzione, in caso contrario si osserverà un picco anomalo, rassomigliante a due picchi fusi insieme e sinonimo della sostanziale differenza tra le due sostanze.

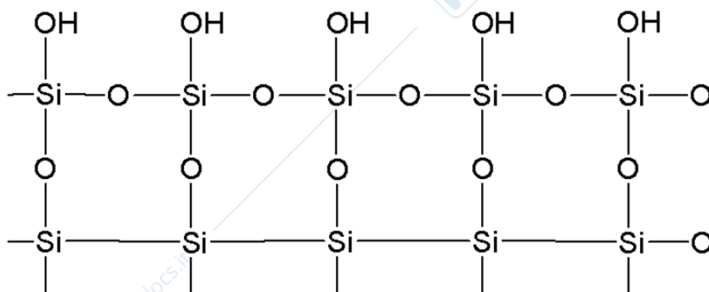


### Scelta della fase stazionaria

Esistono sostanzialmente due tipologie di fase stazionaria, la *fase diretta* e la *fase inversa*.

#### Fase diretta

Si ha a che fare con una *fase stazionaria polare*, tipicamente *silice non funzionalizzata*: questa fase è associata normalmente ad una fase mobile piuttosto lipofila e con vari gradi di lipofilia.



La silice, che si presenta come una sabbia estremamente purificata (è costituita dallo stesso materiale del vetro o della sabbia marina pulita) e presenta una struttura reticolare di atomi di silicio ed ossigeno, intervallati sulla superficie da gruppi -OH: mentre il grosso della struttura è

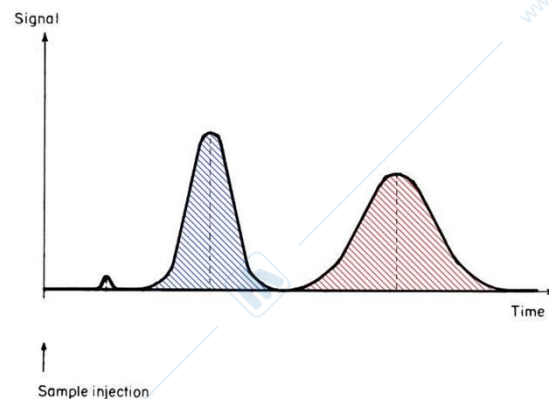
caratterizzata dai numerosi ponti Si-O, la superficie costellata di gruppi -OH rende questa sostanza una fase stazionaria polare.

In questa fase diretta è importante andare ad iniettare una fase mobile lipofila, tipicamente costituita non da un singolo componente ma da una *miscela di solventi a polarità graduale*: un esempio tipico è rappresentato dall'esano, il solvente meno polare, arricchito via via di etilacetato o etere etilico per renderlo più polare.

La necessità di aggiungere etere etilico o etilacetato deriva dal fatto che la fase mobile deve essere sì lipofila, ma non deve esserlo eccessivamente oppure la sostanza da analizzare interagirà in maniera eccessiva con la silice e non sia più rimovibile: all'aumento della polarità della fase mobile corrisponde anche un aumento della capacità di lavaggio, cioè di migrazione delle sostanze stesse.

Analizzando il cromatogramma allegato, è chiaro come la componente blu risulti essere la sostanza più lipofila poiché, interagendo meno con la fase stazionaria, esce per prima mentre la componente rossa, più polare, fuoriesce per seconda, presentando un tempo di ritenzione maggiore: è possibile in questi casi andare a fare una predizione di  $\log P$ .

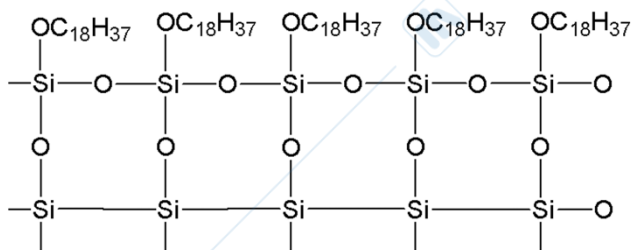
La lipofilia di una sostanza non è sempre determinabile per sciabordatura nell'imbutto separatore con acqua ed etanolo e relativa verifica delle concentrazioni: spesso e volentieri si utilizzano protocolli cromatografici dell'HPLC in grado di fornire, per analisi dei tempi di ritenzione, il calcolo dello specifico  $\log P$ .



Se i tempi di ritenzione risultano troppo lunghi è possibile ridurli aumentando la polarità della fase mobile (aggiungendo etere etilico o etilacetato); in caso di picchi troppo vicini tra loro o che escono troppo in fretta occorre favorire la separazione della fase mobile, riducendo la polarità della fase mobile.

La scelta della polarità della fase mobile è ovviamente dettata dalla competizione tra la stessa e la fase stazionaria nel trattenere la sostanza oggetto di analisi: più la fase mobile è polare, più compete con la fase stazionaria per trattenere la sostanza, minore sarà il tempo di ritenzione.

### Fase inversa



Risulta essere la fase preferita per gli HPLC analitici, mentre per quelli preparativi si preferisce la fase diretta.

La fase inversa è costituita da una *fase stazionaria lipofila*, costituita da gel di silice che, a differenza di quello presente nelle fasi dirette,

è funzionalizzato tramite alchilazione per rimuovere i gruppi polari presenti sulla superficie della sostanza.

Le catene che vanno ad alchilare le porzioni -OH presenti sul gel di silice possono essere di varia lunghezza: le sigle C8, C12, C18 e via dicendo, indicano la lunghezza della catena alchilica legata sui gruppi -OH del gel.

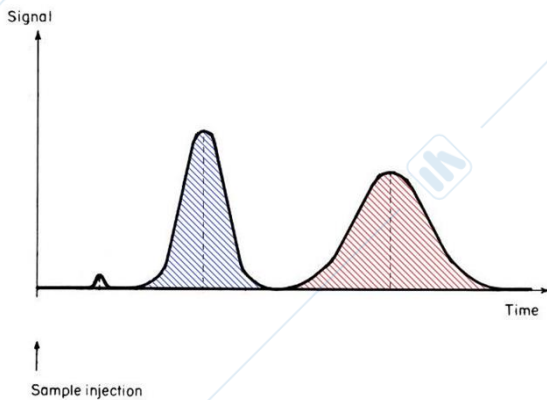
La catena alchilica più utilizzata è generalmente la C18, mentre la C8 rappresenta la catena meno lunga e, conseguentemente, la meno lipofila.

In combinazione con fasi stazionarie lipofile, ovviamente, non è possibile utilizzare contemporaneamente una fase apolare per il rischio di disciogliere la silice funzionalizzata.

Si utilizza generalmente una soluzione di acqua ed alcuni agenti che, sebbene lipofili, sono miscibili con essa: alcuni esempi sono *isopropanolo, metanolo, etanolo o acetonitrile*.

A differenza delle fasi dirette, se si aumenta la lipofilia della fase mobile si ottiene una velocizzazione del processo di uscita delle sostanze dalla colonna cromatografica: ad esempio, aumentando la quantità di acetonitrile in acqua, si ottiene un aumento della velocità della

migrazione delle sostanze e una riduzione dei tempi di ritenzione, casi opposti in caso di aumento della porzione di acqua nella fase mobile.



Prendendo ad esempio il cromatogramma allegato, è evidente che la componente blu risulti quella più polare, in quanto è la prima ad uscire dalla colonna, al contrario della componente rossa che risulta più lipofila e meno polare.

Per scopi analitici, tuttavia, non si utilizzano fasi mobili "statiche", bensì si preferisce avere delle fasi mobili a composizioni variabili nel tempo.

Un esempio può essere fornito dallo schema:

1. Eluizione con fase mobile a composizione "statica" di soluzione di acetonitrile per 5';
2. Gradiente di concentrazione della fase mobile fino a raggiungimento della predominanza dell'acetonitrile come componente principale della fase mobile;
3. Fase di stabilizzazione con acetonitrile al 75%.

Questo dinamismo nella composizione della fase mobile permette di ottenere l'eluizione di una grande quantità di componenti anche molto diversi tra loro e con tempi di ritenzione ragionevoli.

Questa tecnica è molto utile per l'analisi di una miscela contenente sostanze polari e apolari: a titolo di esempio, dopo aver condotto una cromatografia ed aver eluito la componente polare è possibile variare la componente della fase stazionaria per ridurre drasticamente i tempi per l'eluizione anche delle componenti apolari che, contrariamente, impiegherebbero anche settimane per eluire.

### **Cromatografia su strato sottile**

Anche questo tipo di cromatografia è basata su una fase stazionaria a base di silice: in realtà la silice è solo il materiale di partenza perché, a contatto con la fase mobile, ha la tendenza a gelificare e produrre il gel di silice.

In questa tipologia di cromatografia è presente un supporto solido inerte e costituito da vetro o da lastra di alluminio o di plastica dove viene depositato uno strato omogeneo di silice che caratterizza la fase stazionaria.

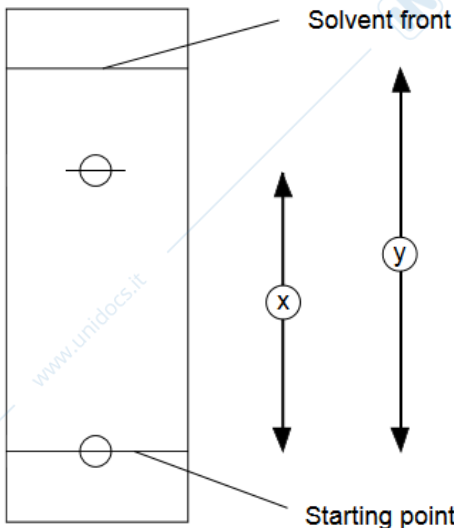
La fase mobile è invece contenuta in un recipiente al cui interno viene posta la lastrina: è necessario che la lastrina per la TLC sia immersa solamente per la parte inferiore nella fase mobile.

A differenza della cromatografia su colonna dove sono utilizzate la gravità o alcune pompe, nella TLC la fase mobile eluisce attraverso la fase stazionaria per *capillarità*: l'analita è depositato sulla lastra ad un'altezza superiore al livello massimo della fase mobile che, altrimenti, verrebbe completamente rimossa dal substrato.

La fase mobile migra lungo la lastra per capillarità, portando con sé l'analita grazie all'equilibrio di ripartizione che si instaura tra la fase stazionaria e quella mobile: maggiore sarà l'affinità dell'analita per la fase stazionaria e minore sarà lo spazio percorso.

Il solvente della fase mobile può risalire tutta la lastra mentre le varie sostanze da analizzare si depositeranno a distanze diverse lungo il percorso: la deposizione può essere evidenziata da lampade UV o opportuni coloranti.

Il parametro utilizzato per valutare il *cammino della sostanza* non può essere  $t_R$ , bensì il *fattore di ritenzione (retention factor o  $R_F$ )*.



Il fattore di ritenzione è calcolato rapportando la distanza percorsa dal fronte del solvente a quello percorso dal soluto, secondo la formula:

$$R_F = \frac{x}{y}$$

Questa formula è applicabile a qualsiasi sistema cromatografico, a prescindere dalle dimensioni e dalle unità di misura, purché concordi tra loro.

Il valore di  $R_F$  oscilla tra un minimo di 0 e un massimo di 1, permettendo di ottenere una distinzione della sostanza ed una certa caratterizzazione di stampo qualitativo.

Immaginando di avere un campione incognito che mostra un certo tipo di cammino all'interno di una TLC, la sua caratterizzazione è possibile andando a confrontare la migrazione del campione incognito con altri standard e valutando la somiglianza con altri  $R_F$ .

Nel caso allegato, il campione evidenziato dalla macchia nera presenta un percorso -e quindi un  $R_F$ - molto simile a quello operato dalla sostanza blu, facendo presupporre una certa corrispondenza.

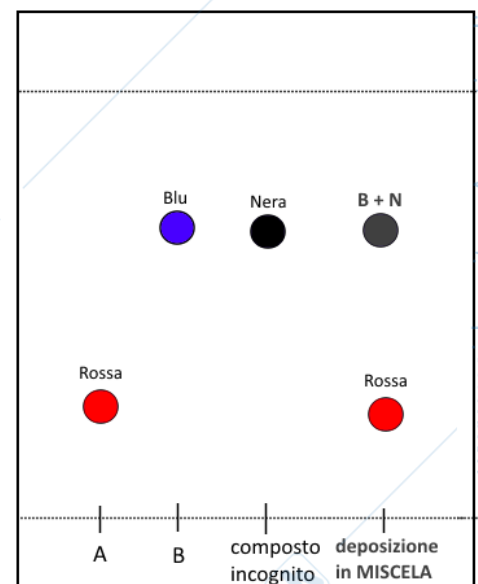
Tuttavia, dato che si tratta di una tipologia di analisi sufficientemente grossolana, non si ha la certezza matematica della corrispondenza delle sostanze.

In linea teorica, è opportuno non tanto eseguire una deposizione delle sostanze in maniera distinta e in tre punti, quanto una singola *deposizione in miscela*: le sostanze partirebbero contemporaneamente e si può valutare la corrispondenza delle varie componenti per l'effettiva sovrapposizione delle macchie.

La deposizione in miscela permette di validare l'effettiva e corretta conduzione della TLC poiché si può effettivamente capire se la cromatografia fornisce un dato realistico o meno.

In questo caso, la sostanza rossa potrebbe essere stata penalizzata nell'eluizione dalla scelta del solvente della fase mobile ma se, come in questo caso, si osserva un percorso sovrapponibile anche in miscela, la TLC eseguita risulta valida.

Ovviamente, la scelta della fase diretta o inversa influisce sul percorso effettuato dai campioni: in una fase diretta la sostanza rossa risulta più polare di quella blu, in una fase inversa si assisterebbe ad una valutazione completamente opposta.



### Efficienza di una separazione cromatografica

Per valutare l'efficienza di una separazione cromatografica è possibile prendere in considerazione alcuni parametri come *capacità*, *selettività* e *larghezza dei picchi*.

#### CAPACITÀ

Questo parametro è indicato come  $K'$  ed equivale ad una elaborazione del rapporto tra *tempo di ritenzione* di un certo composto ( $t_R$ ) e il tempo necessario al solvente per attraversare la colonna ( $t_0$ ) secondo la formula

$$K' = \frac{t_R - t_0}{t_0}$$

Il *fattore di capacità* ( $K'$ ) permette di valutare quanto il sistema sia in grado di trattenere una certa sostanza: maggiore è la capacità e maggiore è la tendenza del sistema a trattenere la sostanza al suo interno.

Questa valutazione è valida tanto per i sistemi cromatografici strumentali che per le colonne preparative: mentre nelle colonne analitiche si misura il tempo di ritenzione attraverso il cromatogramma, in quelle preparative occorre valutare i diversi *volumi di eluizione*, raccolti durante l'analisi.

Nel caso di una colonna preparativa, dove fattori come gravità e pressione incidono drasticamente sulla misurazione dei tempi, la corretta formula per il calcolo di  $K'$  è data da

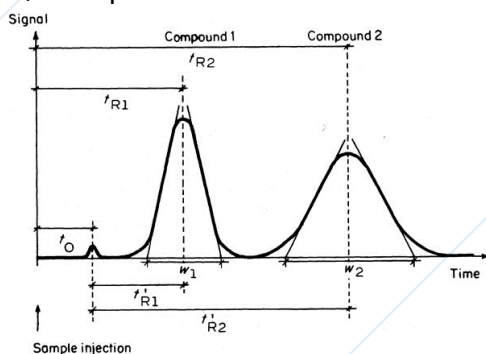
$$K' = \frac{V_r - V_0}{V_0}$$

In entrambi i casi, comunque,  $K'$  esprime la tendenza del sistema a trattenere le sostanze oggetto di analisi.

La capacità non è indice dell'efficienza del sistema cromatografico, parametro valutabile attraverso la selettività.

#### SELETTIVITÀ

Questo parametro contiene al suo interno anche il fattore di capacità.



Due sostanze iniettate in una colonna cromatografica presentano due differenti  $t_R$ , definiti ognuno dal proprio picco di segnale: l'introduzione del parametro numerico della *selettività* permette di valutare l'effettiva identità del sistema cromatografico.

La selettività è definita dal rapporto tra la capacità di una sostanza rispetto ad un'altra secondo la formula:

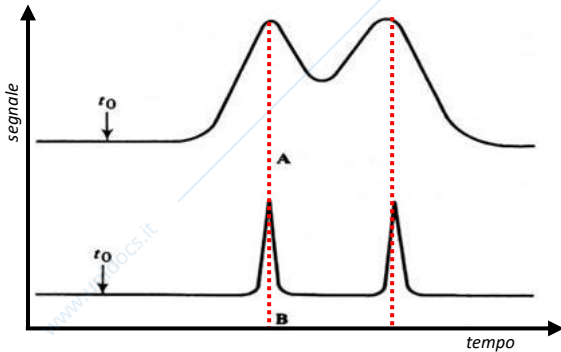
$$S = \frac{K'_B}{K'_A}$$

Dove  $K'_B$  indica la capacità della sostanza a ritenzione maggiore e  $K'_A$  quella della sostanza a ritenzione minore.

Sostituendo i valori di  $K'$  nell'equazione si ottiene:

$$S = \frac{K'_B}{K'_A} = \frac{t_B - t_0}{t_A - t_0} \quad \text{per} \quad \begin{cases} K'_A = \frac{t_A - t_0}{t_0} \\ K'_B = \frac{t_B - t_0}{t_0} \end{cases}$$

Maggiore è la selettività e maggiori saranno i tempi di ritenzione delle varie sostanze.



La selettività è importante per definire l'efficienza di un sistema cromatografico ma non è il solo parametro da tenere in considerazione.

Nell'esempio riportato a fianco si osservano le medesime sostanze eluite con il medesimo sistema cromatografico: mentre la selettività risulta costante perché non variano i tempi di ritenzione, occorre osservare invece la forma del picco.

Nel secondo caso si osserva come i picchi risultino evidentemente *separati alla linea di base* mentre nel primo caso questo non avviene: la prima sostanza ad eluire presenta uno slargamento del picco che va a fondersi con il secondo, generando la forma anomala.

L'anomalia non è legata al tempo di ritenzione dei vari prodotti quanto all'*allargamento delle bande o dei picchi*, uno dei problemi principali della cromatografia, da evitare il più possibile perché picchi stretti e ben separati sono sinonimo di una cromatografia condotta con efficienza.

In questo caso, mentre la selettività del sistema è costante, l'efficienza è maggiore nel caso B rispetto al caso A.

### LARGHEZZA DEI PICCHI

La misura della larghezza del picco può essere misurata in due punti distinti dello stesso:

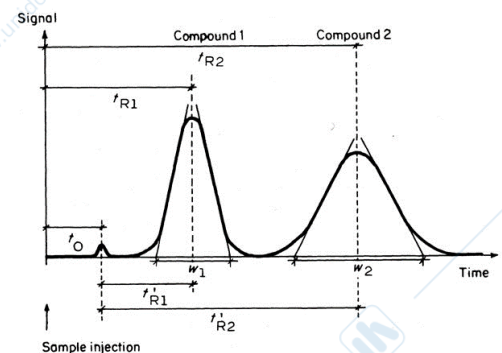
- **Larghezza alla base del picco:** occorre tenere conto del fatto che un picco non rappresenta un triangolo perfetto, mostrando sfumature all'inizio e alla fine dello stesso che non permettono una misurazione agevole della larghezza. Una prima soluzione al problema è stata trovata andando a proiettare idealmente il picco sulla linea di base e misurandone la proiezione, determinata come  $W_b$ .

Il parametro in questione, sebbene teoricamente semplice da misurare, in realtà non lo è perché applicabile solo a *picchi stretti, simmetrici e abbastanza regolari*, una combinazione di caratteristiche non sempre presente;

- **Larghezza a metà altezza del picco:** normalmente la sezione più facilmente misurabile di un picco è la parte centrale.

Per effettuare tale operazione è sufficiente misurare metà dell'altezza del picco ( $h_{1/2}$ ) e misurarne la larghezza in tale punto ( $W_{1/2}$ ).

Questo parametro risulta essere quello più facilmente riproducibile e più utilizzato per valutare



l'effettivo allargamento del picco, tuttavia non rappresenta l'unico parametro da tenere in considerazione.

Così come nella colonna di frazionamento si ottiene una maggiore efficienza all'aumentare dei piatti di distillazione, così nelle colonne cromatografiche si ha una maggiore efficienza all'aumentare dei piatti, ovviamente teorici perché non presenti all'interno della colonna.

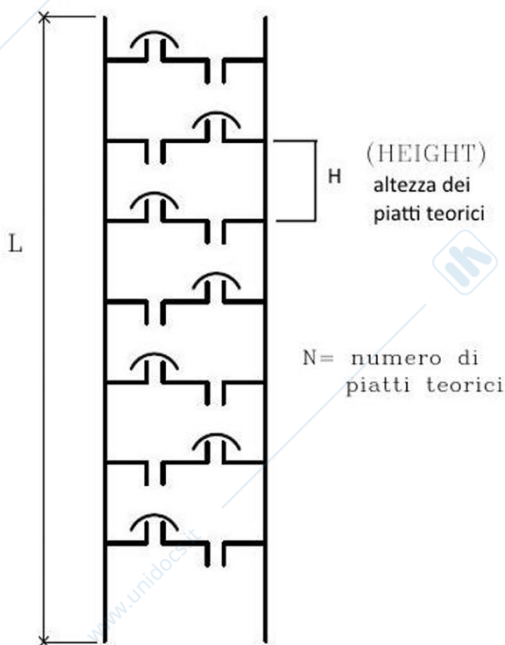
Per una colonna cromatografica il *numero di piatti teorici* è:

$$N = 16 \left( \frac{t_R}{W_b} \right)^2$$

Questo parametro tiene conto del tempo di ritenzione in senso positivo e della larghezza del picco in senso negativo ed entrambi i fattori devono essere correttamente bilanciati per far sì che il numero di piatti teorici sia il più alto possibile: l'efficienza del picco quindi non può essere attribuibile al solo slargamento del picco ma anche al tempo di ritenzione, che deve essere il più breve possibile.

Prendendo in considerazione il parametro  $W_{1/2}$ , è possibile esprimere il numero di piatti teorici con la formula:

$$N = 8 \ln(2) \left( \frac{t_R}{W_{1/2}} \right)^2$$



Il numero di piatti teorici è un parametro piuttosto importante ma anch'esso, preso singolarmente, descrive fino ad un certo punto l'efficienza della colonna, in quanto  $N$  potrebbe derivare anche dalla lunghezza della colonna stessa ( $L$ ): maggiore è la lunghezza e maggiore sarà il numero dei piatti teorici.

Il parametro universale utilizzato indipendentemente dalla lunghezza della colonna è l'*altezza del piatto teorico* ( $H$ ), descritto dalla formula:

$$H = \frac{L}{N}$$

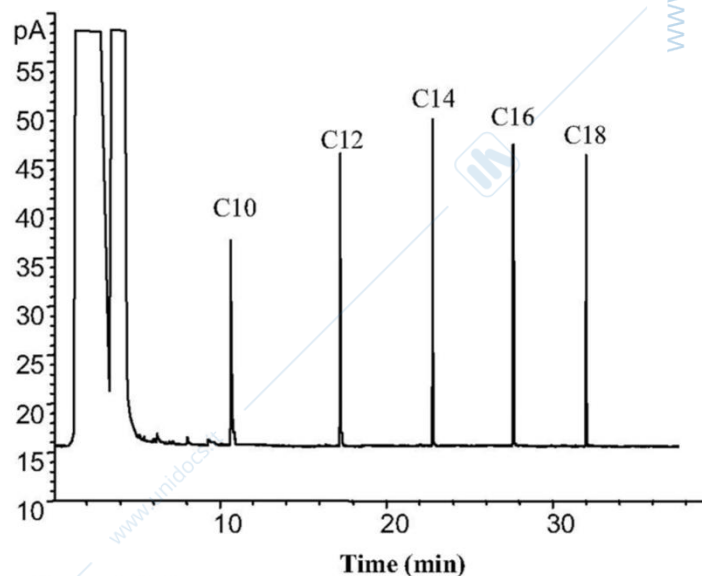
Affinché l'efficienza della colonna sia alta, l'altezza del piatto teorico ( $H$ ) deve essere bassa.

### PROBLEMI NELLO SLARGAMENTO DELLE BANDE

Per ottimizzare  $H$  in modo tale da avere valori minimi, occorre analizzare tutti i fattori che slargano le bande.

Un cromatogramma ideale dovrebbe presentarsi come quello in figura, cioè con picchi non a campana e con le molecole dello stesso tipo che escono tutte insieme.

Tuttavia, sussistono alcuni problemi legati all'inizio della corsa cromatografica perché, al pari di una gara podistica molto affollata, dove le partenze non sono tutte uguali, è impensabile che ciò avvenga anche nella colonna di riferimento.



Le problematiche inerenti allo slargamento delle bande sono essenzialmente quattro: *deposizione dei campioni*, *percorsi multipli*, *diffusione longitudinale* e *resistenza al trasferimento di massa*.

### Deposizione dei campioni

Per deporre un campione all'interno di uno strumento cromatografico, è necessario iniettare una soluzione di campione di un certo volume all'interno del macchinario: così facendo ci sarà una porzione di campione dove alcune molecole saranno messe prima e altre dopo, per cui all'aumentare della diluizione del campione si assiste ad un aumento della banda di partenza.

Per ridurre questa problematica occorre cercare di utilizzare un *volume di eluizione minore*, usando soluzioni più concentrate possibile: ovviamente non è possibile ridurre eccessivamente il volume del solvente, pena la mancata dissoluzione dello stesso.

### Percorsi multipli

Un'ulteriore problematica che può sfociare nello slargamento delle bande è dovuta alla presenza di *percorsi multipli*.

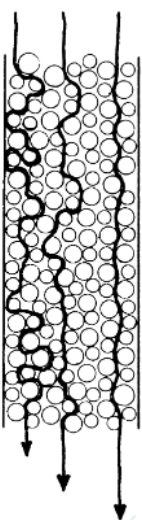
Due molecole della stessa sostanza che attraversano la fase stazionaria, possono essere soggette a percorsi diversi in funzione della presenza di granuli di forme e dimensioni scostanti.

Maggiore è la differenza di percorso effettuato dalle due molecole e maggiore risulterà essere lo slargamento della banda in uscita.

Il problema si intensifica laddove si fa più marcata la differenza tra le dimensioni delle particelle di fase stazionaria: le particelle più piccole tendono ad addensarsi creando percorsi più tortuosi, le grandi generano percorsi più lineari.

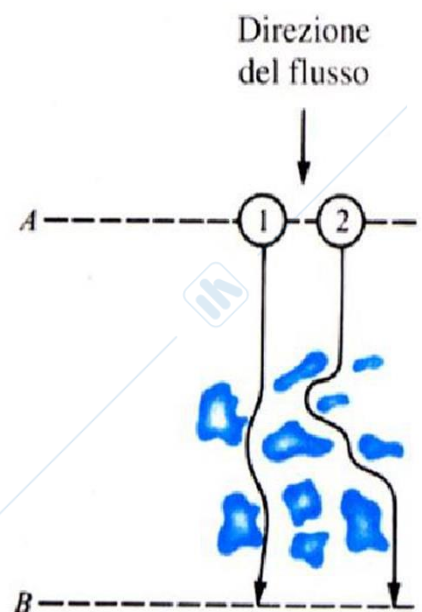
Per far fronte a questa problematica è opportuno utilizzare fasi stazionarie quanto più omogenee possibile: questa soluzione non eradica il problema ma può sicuramente ridurre sensibilmente gli effetti.

### Diffusione longitudinale



Un'ulteriore problema dello slargamento delle bande è dovuto alla *diffusione longitudinale*, derivata dal fatto che in laboratorio si opera ad una media di 20 °C per cui le molecole sono soggette a *moti browniani casuali* che si sviluppano in tutte le dimensioni dello spazio.

Le molecole della colonna non sono sottoposte solamente al trascinamento della fase mobile, oscillando un po' a causa della temperatura: il problema non si pone per le oscillazioni trasversali alla fase quanto per le oscillazioni che sono ad essa parallele, portando ad uno spostamento avanti e indietro delle particelle nella colonna stessa.



Per cercare di ridurre questa problematica è possibile *ridurre la temperatura del sistema*, ponendo la colonna dentro ad una camicia di raffreddamento: questa soluzione permette di ridurre i moti browniani e, conseguentemente, lo slargamento dei picchi.

Tuttavia, non si tratta di una procedura comune e, per quanto riguarda le colonne preparative, è quasi impossibile da condurre.

A differenza di un HPLC, condotto normalmente a temperatura ambiente o fredda, una gascromatografia è conducibile esclusivamente a caldo.

Ad ogni modo, sebbene la gascromatografia soffra della diffusione longitudinale, i picchi sono sempre più stretti per l'assenza di percorsi multipli, presenti invece nella cromatografia liquida.

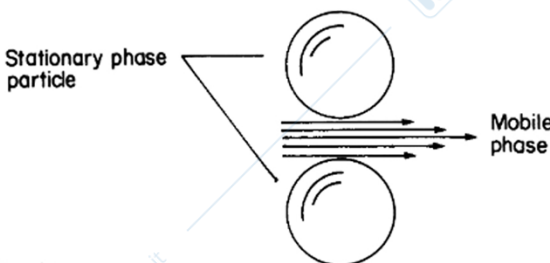
### Resistenza di trasferimento di massa

Questo tipo di resistenza può essere suddivisa in tre grandi categorie:

- a. *Fase mobile;*
- b. *Fase stagnante;*
- c. *Fase stazionaria.*

Mentre gli apporti dati dalla fase stazionaria e da quella stagnante sono simili, l'apporto della fase mobile risulta essere differente

L'apporto della *fase mobile* è determinato dal passaggio del flusso laminare della fase stessa attraverso le particelle della fase stazionaria, riportate idealmente in figura come sfere.

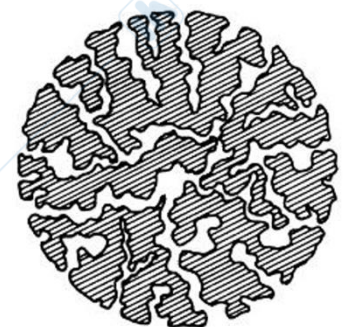


Mentre il flusso della fase mobile, spinto dalla gravità o da una pompa, attraversa la fase stazionaria, si osserva che il flusso che attraversa le strettoie tra le particelle della fase stazionaria si muove con velocità maggiore rispetto alle molecole rallentate dall'ingombro delle particelle stesse.

Le particelle che saranno meno influenzate dall'ingombro dato dalla presenza della fase stazionaria saranno quelle che usciranno prima dalla colonna, mentre le altre usciranno dopo: questo rallentamento porta allo slargamento della banda.

Quanto alla *fase stagnante* e alla *fase stazionaria*, occorre fare riferimento alla natura delle particelle che compongono la fase stazionaria: poiché non sono realmente delle sfere perfette, ma grumi di forma irregolare circondati dalla fase mobile in movimento.

La sostanza può interagire o meno con la fase stazionaria andando a formare delle zone stagnanti di fase mobile (*zone di ristagno*): se le sostanze permangono in queste zone si forma resistenza al movimento e un rallentamento nel trasferimento di massa che, di conseguenza, impiegherà più tempo ad eluire dalla colonna.



Un parametro utilizzabile soprattutto in HPLC è la *velocità della fase mobile* che permette di ottimizzare situazioni di questo tipo: una attenta razionalizzazione di questo parametro permette di limitare i danni dovuti al comportamento di queste sostanze.

La *velocità ottimale della fase mobile* è rappresentata da un compromesso tra l'aumento e la riduzione della velocità iniziale: in alcuni casi l'aumento della velocità può causare il restringimento dei picchi, in altri casi uno slargamento per diversi fenomeni.

La velocità di flusso non influisce sull'efficienza dovuta alla deposizione del campione e sui percorsi multipli, andando invece ad influire sulla diffusione longitudinale, attenuando il fenomeno dell'oscillazione.

Una volta che una colonna cromatografica, sia essa analitica o preparativa, viene iniziata deve essere terminata: eventuali interruzioni e tempi di riposo nella colonna portano alla diffusione dei moti browniani lungo tutta la colonna rendendo di fatto impossibile la separazione delle sostanze.

Per ridurre la diffusione longitudinale è necessario aumentare la velocità di flusso mentre è invece opportuno ridurre la velocità per affievolire il fenomeno della resistenza al trasporto di massa: all'aumento della velocità si assiste anche ad un aumento della differenza tra la velocità di percorrenza della fase mobile rispetto a quelle che rimangono bloccate nella fase stagnante.

### EQUAZIONE DI VAN DEEMTER

Ponendo in relazione l'altezza dei piatti teorici ( $H$ ) con la velocità è possibile scrivere un'equazione del tipo:

$$H = A + \frac{B}{u} + cu$$

L'efficienza è da una parte direttamente proporzionale alla velocità di flusso, da un'altra ne è inversamente proporzionale e da un'altra ancora è dipendente da un ulteriore fattore:  $A$  è determinato dalla *deposizione del campione* e dai *percorsi multipli*.

Il fattore  $B$  rappresenta infatti la *diffusione longitudinale* che risulta attenuata in caso di aumento della velocità di flusso ( $u$ ): una sua riduzione porta all'aumento dell'efficienza del sistema.

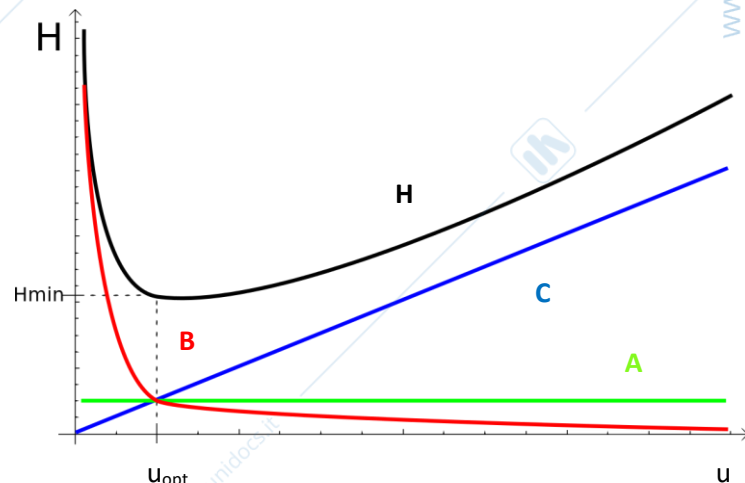
Al contrario, l'aumento della velocità di flusso influisce negativamente sulla *resistenza al trasferimento di massa* ( $c$ ), aumentandola: andando ad incrementare questo parametro si va a perdere efficienza.

La rappresentazione grafica dell'equazione di van Deemter pone sulle ordinate il valore di  $H$  e sulle ascisse il valore della velocità di flusso.

Trovano rappresentazione i fattori  $A$ ,  $B$  e  $C$  citati in precedenza oltre alla curva di van Deemter: essa è la somma punto per punto di tutte le equazioni.

La curva presenta un massimo per velocità di flusso pari a 0, raggiungendo il minimo ad una certa velocità di flusso e ricominciando a crescere per valori di  $u$  maggiori.

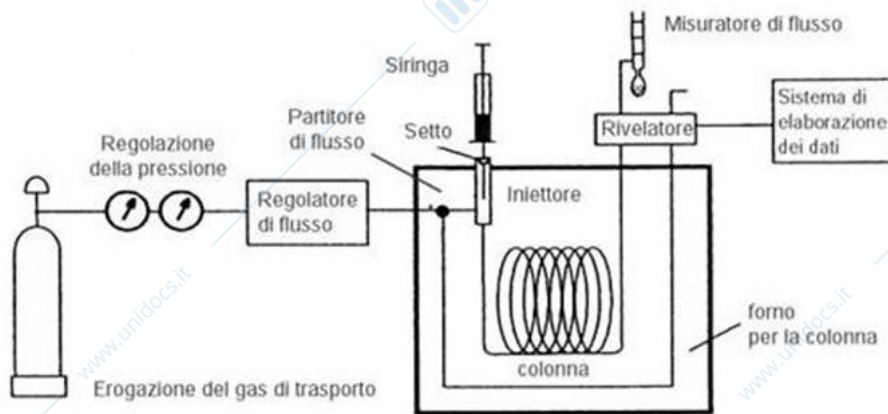
L'equazione permette all'operatore di essere nelle condizioni il più possibile vicine al punto minimo di  $H$ , il punto di massima efficienza del sistema.



La velocità ideale viene quindi ricavata dal grafico di van Deemter ed è quella che permette di ottenere il valore più basso di H.

### Esempi di schemi di strumentazione

#### GASCROMATOGRAFIA



La gascromatografia è eseguita in uno strumento molto simile ad un forno domestico.

Il campione deve essere iniettato tramite un'apposita siringa, sviluppata per iniettare solo microvolumi: a questo punto il campione entra nelle *colonne capillari*, dotate di un diametro estremamente ridotto.

All'interno delle colonne fluisce un gas inerte di trasporto riscaldato e la sostanza viene così condotta lungo la colonna: caratteristica importante delle sostanze iniettate è che siano sufficientemente volatili e che non siano carboidrati (caramellizzerebbero, ostruendo irrimediabilmente il condotto).

Il forno è riscaldato a temperature comprese tra 100-240 °C, permettendo anche l'analisi di sostanze solide, a patto che siano sufficientemente volatili.

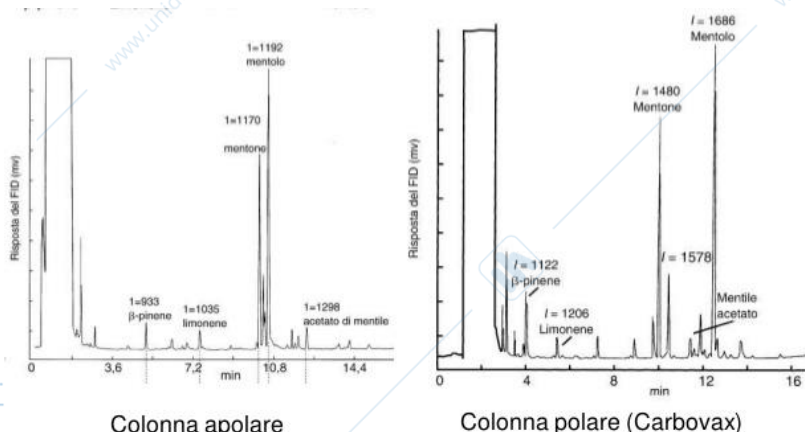
In serie all'apparecchiatura è possibile ottenere anche un cromatogramma grazie alla presenza di un integratore e all'interfaccia di un opportuno *elaboratore informatico*.

Esistono vari tipi di rivelatori ma il più comune risulta essere quello a *ionizzazione di fiamma* dove è presente una fiamma a idrogeno/aria che brucia la sostanza al suo passaggio, producendo ioni che vengono rilevati da detector elettronici, indicando la natura della sostanza che sta passando: esistono specifici detector anche per il riconoscimento di azoto e fosforo.

Il detector migliore -ma anche il più costoso- è rappresentato dallo *spettrometro di massa* che, a mano a mano che escono i picchi, misura in automatico il PM della sostanza e i picchi dei frammenti della stessa: è importante non solo sapere quanto è il peso molecolare di una sostanza ma anche quanto pesano i suoi frammenti, separati a seconda dei gruppi funzionali presenti.

Poiché ogni gruppo funzionale presenta una sua massa frammentaria, queste informazioni unite al singolo PM permettono di delineare la struttura completa della sostanza in esame.

Osservando alcuni cromatogrammi è possibile valutare l'azione separatrice delle colonne gascromatografiche, così come la loro risoluzione.



In questo caso è stata operata una GC dell'olio essenziale di menta.

È evidente come sia possibile vedere le singole componenti dell'olio che vengono via via separate all'interno della colonna.

L'odore associato alla percezione della menta non deriva infatti da una singola componente chimica, bensì da una miscela di esse.

Colonna apolare

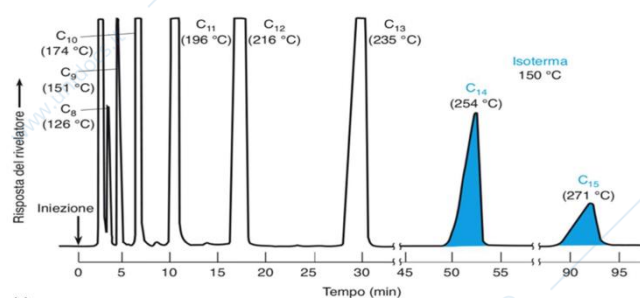
Colonna polare (Carbox)

In questo specifico esempio sono riportati i cromatogrammi derivati dall'operazione con colonna polare o apolare: sono evidenti i diversi  $t_R$  e il diverso ordine di uscita delle sostanze dalla colonna.

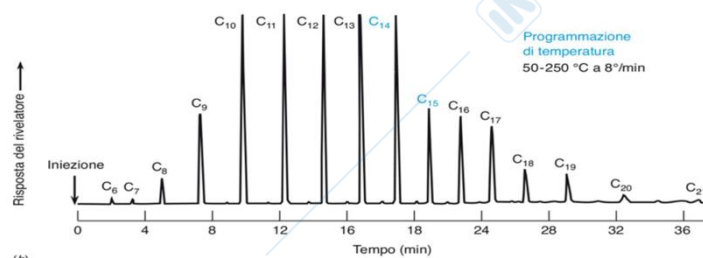
In questo caso invece si osserva la capacità di risoluzione di un sistema gascromatografico nel distinguere le singole componenti di una miscela di alcani lineari.

La precisione dell'apparecchiatura permette di distinguere le varie sostanze per differenze di un singolo  $-CH_2-$ : le molecole sono praticamente identiche ma lo strumento ha una risoluzione sufficiente a riconoscerne le differenze.

È possibile anche osservare le due modalità operative, l'una in condizioni di isoterma e l'altra in condizioni di gradiente di temperatura programmata e controllata.

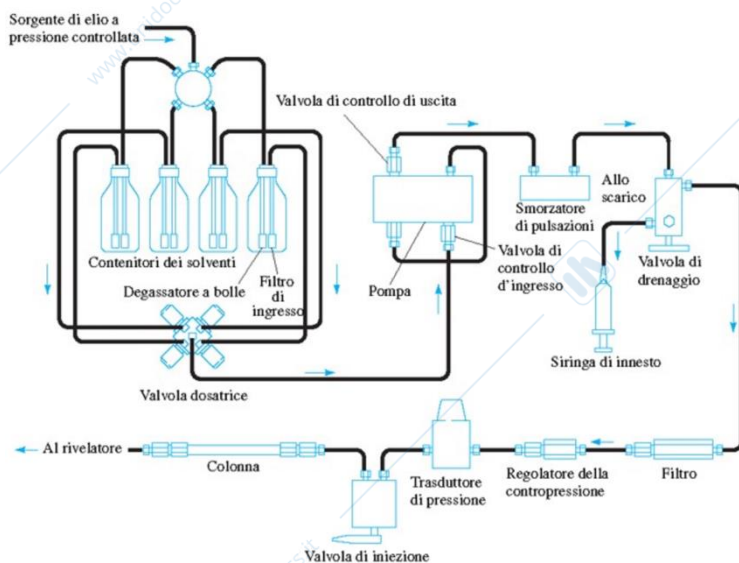


(a)



(b)

### HPLC (HIGH-PRESSURE LIQUID CHROMATOGRAPHY)



selezionabili dall'utente.

Questa apparecchiatura permette di condurre una cromatografia in fase liquida.

È presente una colonna cromatografica dove avviene la separazione ed un sistema di controllo posto a monte di essa, sviluppato per miscelare solventi e preparare l'intero sistema ad una separazione ottimale.

Il blocco preparatorio consta di un miscelatore in grado di miscelare - comunemente - fino a quattro solventi con gradienti di concentrazione

In realtà sono quasi sempre utilizzati dai due ai tre solventi contemporaneamente, mentre il quarto è utilizzato solo per il lavaggio della colonna in preparazione all'iniezione: il miscelatore è in grado di produrre la composizione inserita dall'utente oppure programmare una variazione nel tempo di questa composizione.

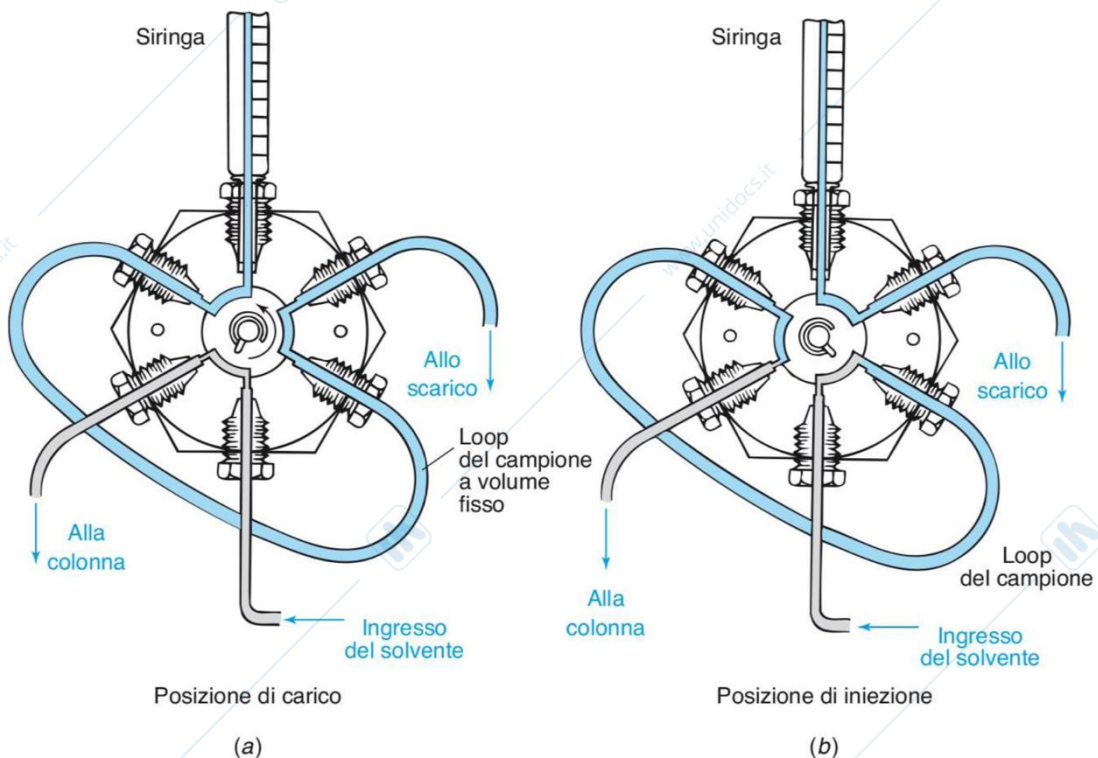
In serie al sistema di preparazione del solvente è presente una pompa, fondamentale per iniettare la fase in alta pressione all'interno del sistema: è presente un particolare sistema di iniezione che, all'inserimento della siringa, esclude quella porzione di impianto dal circuito sotto pressione e favorisce l'immissione del campione nell'apparecchiatura.

Il campione viene caricato nella valvola per riempire l'ansa (o *loop*) di 10, 20, 50 o 100  $\mu\text{L}$ : minore è il loop e minore è il volume di deposizione che comunque non deve risultare eccessivamente piccolo, pena il mancato inserimento del campione.

La *valvola di iniezione* di un HPLC è un particolare sistema che permette di iniettare la sostanza in un'area di relativa bassa pressione del circuito, immettendola in un secondo momento all'interno dell'anello del sistema in alta pressione.



Questo tipo di valvola - comunemente detta "*a sei vie*" - possiede due posizioni operative, la *posizione di iniezione* e *posizione di caricamento*: nella prima posizione si inietta il campione all'interno del loop a capacità variabile, nella posizione alternativa l'anello viene collegato al resto del circuito.



## TECNICHE DI CRISTALLIZZAZIONE

Lo scopo della cristallizzazione è quello di purificare quanto più possibile una sostanza solida.

La cristallizzazione avviene solitamente dopo un'accurata scelta del solvente più opportuno, tentando di dissolvere la sostanza di interesse a caldo e cercando di riprecipitarla a freddo: non si ha a che fare con una banale riprecipitazione, bensì della formazione lenta di un solido necessaria a costruire il reticolo cristallino.

All'aumentare della lentezza del processo di cristallizzazione è associato un sensibile aumento della dimensione e della purezza del cristallo che va a formarsi, diversamente dalla polvere amorfa che non genera alcun tipo di cristallizzazione.

La cristallizzazione viene generalmente condotta all'interno di una beuta, vetro di elezione per la presenza di un fondo piatto che ben si presta al riscaldamento su piastra e alla simultanea presenza di un collo stretto che riduce la superficie di evaporazione: il collo ristretto della beuta permette inoltre una condensazione dei vapori prodotti che vanno a finire all'interno del contenitore stesso, potendo riscaldare la beuta senza portarla a secco.

In seguito al riscaldamento e alla dissoluzione, è fondamentale allontanare eventuali solidi indisciolti che rappresentano un'impurezza all'interno del cristallo desiderato: si utilizza un *filtro a pieghe* per eseguire una rapida filtrazione che consenta di trasferire in un secondo recipiente il liquido ancora caldo, pena il raffreddamento e la cristallizzazione all'interno del filtro e non del contenitore.

Una volta effettuata la filtrazione, la beuta contenente il liquido filtrato deve essere lasciata più ferma possibile per migliorare il processo di cristallizzazione.

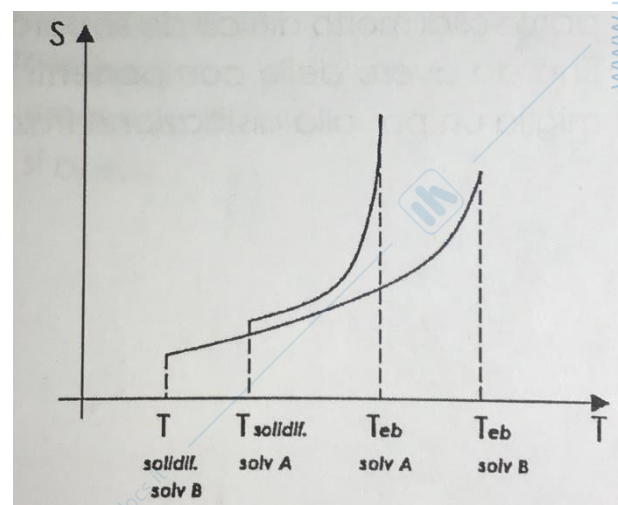
Si ottengono quindi cristalli di grande dimensione di forma generalmente *cubica o aghiforme* a seconda della sostanza in esame: la soluzione può essere filtrata e i cristalli raccolti.

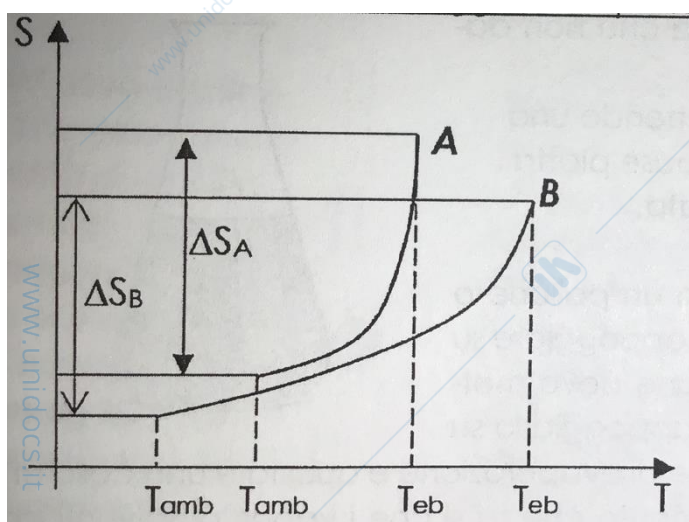
Un problema che è opportuno considerare nel processo di cristallizzazione è dovuto alla *scelta corretta del solvente*.

Osservando un grafico che esprime la solubilità di una sostanza in base alla temperatura è facile capire come, all'aumentare della temperatura, si assista normalmente ad un aumento della massima solubilità della sostanza stessa.

Ponendo in grafico la solubilità della soluzione in funzione della sua temperatura è possibile osservare come, a seconda della temperatura si possa ottenere una soluzione più o meno concentrata e, conseguentemente, un cristallo più o meno ricco.

Per scegliere correttamente il solvente da utilizzare occorre anche valutare che tipo di curve possa ottenere dal solvente in analisi.





Osservando il comportamento del solvente A e del solvente B, nel medesimo range di temperatura si ottengono due distinti  $\Delta S$ : la differenza concentrazione osservata con il solvente B è maggiore rispetto a quella osservata in A.

Ciò detto, a parità di temperatura, con il solvente B sarebbe possibile recuperare più sostanza di quella ottenibile tramite il solvente A.

Ovviamente la massima temperatura raggiungibile sarà quella di ebollizione, oltre a quella non ha più senso scaldare.

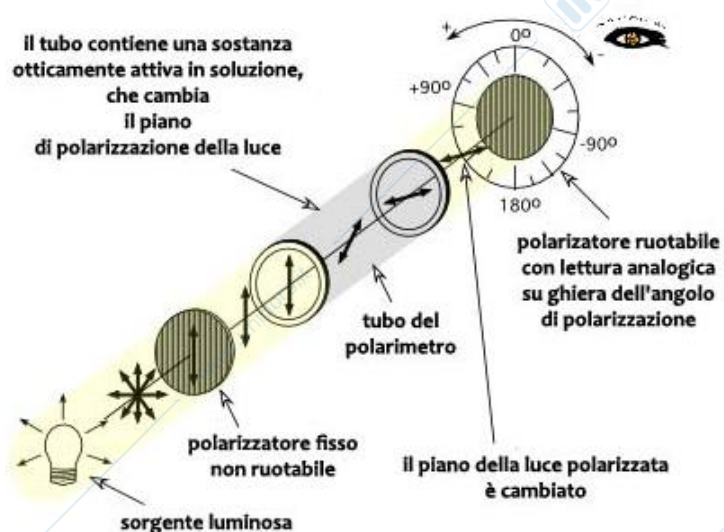
La minima temperatura ottenibile è invece rappresentata dalla temperatura di fusione del solvente stesso.

Esistono procedure di cristallizzazione frazionata che permettono, in vari step, di ottenere composti sempre più puri tramite separazioni successive via via più efficaci: un procedimento simile alla distillazione frazionata.

### **TECNICHE POLARIMETRICHE**

Per effettuare questo tipo di misurazione è necessario allestire delle soluzioni molto precise e a concentrazione nota di un certo composto in un certo solvente.

Per fare ciò si utilizza un *matraccio* o un *pallone volumetrico*, dotati di una singola tacca sul collo del contenitore e in grado di misurare con assoluta precisione un singolo volume: la pesata esatta della sostanza di interesse è inserita nel matraccio e portata a volume, avendo cura di far coincidere la parte inferiore del menisco della soluzione acquosa con la linea di demarcazione del matraccio.



Il *polarimetro* è uno strumento caratterizzato dalla presenza di una lampada al sodio, emettente luce nel giallo alla specifica lunghezza d'onda  $\lambda = 589 \text{ nm}$  detta anche *riga D del sodio*: lo strumento permette inoltre di filtrare anche le possibili interferenze.

Il primo filtro è in grado di selezionare la lunghezza d'onda ed è chiamato *monocromatore*, permettendo l'uscita della sola luce con lunghezza d'onda prestabilita (in questo caso la riga D del sodio): questa luce non è orientata lungo un solo piano, bensì lungo tutte le direzioni.

Un *polarizzatore* permette quindi, tramite appositi filtri, di selezionare e far passare le sole radiazioni che presentino un piano di vibrazione parallelo a quello di interesse: a questo punto si ha il passaggio di luce monocromatica e ad un determinato orientamento nello spazio.

Se la luce è fatta attraversare un campione di un certo tipo di soluzioni, è possibile assistere alla rotazione del piano della luce polarizzata: questo evento si presenta solo nel caso in cui la sostanza presenti caratteristiche chirali.

Lo strumento è in grado di misurare con estrema precisione  $\alpha$ , angolo di inclinazione della luce polarizzata linearmente.

L'angolo di rotazione dipende da diversi fattori come:

- *Lunghezza d'onda della luce emessa;*
- *Temperatura di esercizio;*
- *Lunghezza del cammino ottico.*

Il cammino ottico è il percorso effettuato dalla luce attraverso il campione, da quando viene emessa a quando viene registrata.

Il *potere ottico rotatorio specifico*, comunemente indicato con  $[\alpha]$  viene definito specificando la temperatura e la lunghezza d'onda alla quale è misurato, secondo la formula:

$$[\alpha]_D^T = 100 \left( \frac{\alpha}{lC} \right)$$

Andando a riportare il valore di  $[\alpha]$ , si indica in apice la temperatura a cui si opera e in pedice la lunghezza d'onda: in questo caso "D" rappresenta la lunghezza d'onda del sodio, la più comune.

Nell'equazione  $l$  rappresenta il cammino ottico (espresso in  $dm$ ),  $C$  la concentrazione (indicata in  $g/100$  mL di soluzione) e  $\alpha$  l'angolo di inclinazione della luce: poiché è quasi impossibile preparare soluzioni da 100 mL, è possibile utilizzare anche volumi inferiori a patto di mantenere la stessa concentrazione richiesta dall'analisi.

Una ulteriore semplificazione deriva dal fatto che le celle comunemente utilizzate in polarimetria sono di 10 cm (1 dm).

A questo punto, dato che il valore di  $[\alpha]$  è riportato in letteratura, è possibile determinare con quale sostanza si ha a che fare.

Occorre tenere a mente che i valori di  $[\alpha]$  non sono necessariamente positivi, ma possono anche essere negativi: composti *levogiri* presentano un potere ottico rotatorio specifico negativo, i composti *destrogiri* lo presentano invece positivo.

### **AGENTI ESSICCANTI**

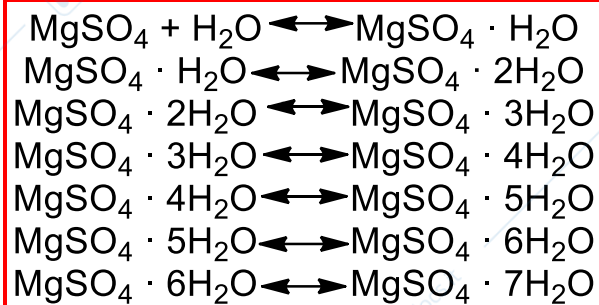
In laboratorio è possibile utilizzare una serie di agenti essiccanti, classificabili in *agenti reversibili* e in *agenti irreversibili*: la distinzione è dettata dal fatto che quelli reversibili interagiscono con l'acqua e permettendo di cederla nuovamente al sistema, quelli irreversibili no.

Non tutte le sostanze sono compatibili con gli agenti irreversibili data la loro natura ad interagire con molti composti: per le sostanze organiche è buona norma utilizzare agenti reversibili a causa della tendenza all'interazione con l'altra tipologia di reagenti.

**Agenti reversibili**

Il *solfato di sodio anidro*, se posto in sospensione in un solvente o in una soluzione, tende ad adsorbire molecole d'acqua.

Il *solfato di magnesio anidro* è anch'esso utilizzato per rimuovere acqua dalle soluzioni o dai solventi, con un processo di essiccamento basato sull'equilibrio delle forme idrate:



Gli equilibri qui citati sono equilibri di solvatazione, trattandosi sempre di solidi idrati, non di soluzioni: il punto di equilibrio ottenuto è definito dalla quantità di acqua esterna o dall'umidità presente in atmosfera.

I valori tabulati per il *solfato di magnesio* sono i seguenti:

- Fino a 1 mmHg H<sub>2</sub>O: forma monoidrata;
- Fino a 2 mmHg H<sub>2</sub>O: forma diidrata;
- Fino a 5 mmHg H<sub>2</sub>O: forma tetraidrata;
- Fino a 9 mmHg H<sub>2</sub>O: forma pentaidrata;
- Fino a 10 mmHg H<sub>2</sub>O: forma esaidrata;
- Fino a 11,5 mmHg H<sub>2</sub>O: forma eptaidrata.

A mano a mano che aumenta l'umidità esterna, aumenta il numero di molecole di acqua che partecipano all'equilibrio: più agente essiccante viene aggiunto e più si abbassa la quantità di acqua esterna.

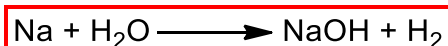
In laboratorio si osserva che queste sostanze, aggiunte alle soluzioni di interesse, rimangono in sospensione e, se si agita la soluzione, esse "spolverano", indicando la presenza di forme idrate a livelli più bassi.

Forme idrate a livelli superiori tendono a spolverare di meno per cui l'essiccamento deve procedere fino a che non si osserva più alcun fenomeno di spolveramento.

Quanto al solfato di sodio, il ragionamento effettuato rimane il medesimo, sebbene i valori di mmHg H<sub>2</sub>O di riferimento siano leggermente diversi.

**Agenti irreversibili**

Il *sodio metallico*, laddove si trovi in presenza di quantità minime di acqua, genera effervescenza per produzione di NaOH e H<sub>2</sub> secondo la reazione



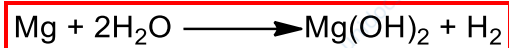
La reazione è irreversibile perché l'idrogeno, come gas, fuoriesce dalla reazione e rimane NaOH, liberando la soluzione dall'acqua presente.

Il sodio, tuttavia, reagisce anche con la maggior parte dei gruppi funzionali per cui è utilizzato quasi esclusivamente per l'essiccazione di solventi e non di soluzioni di composti: a titolo di esempio, è utilizzabile per essiccare l'etere.

In questo caso vengono aggiunti alcuni cubetti di sodio alla miscela, si riscalda e si distilla l'etere anidro, raccolto in un recipiente: è opportuno non mandare mai a secco il sodio.

A differenza degli agenti reversibili che agiscono a temperatura ambiente, qui non ci sono problemi in caso di riscaldamento.

È utilizzabile anche il *magnesio metallico*, usato spesso per essiccare alcoli come etanolo e metanolo. Anche in questo caso si formano l'idrogeno gassoso e l'idrossido:



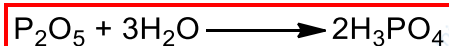
A differenza del sodio, il magnesio metallico risulta meno reattivo.

Questa tipologia di agenti essiccanti è utilizzata molto bene in caso di solventi come etere etilico, esano, toluene, ecc...: in pratica agisce molto bene in caso di idrocarburi saturi o aromatici.

Questi essiccanti non sono utilizzabili in caso di solventi clorurati perché i reattivi clorurati generano specie reattive chiamate *carbeni*, in questo caso *clorocarbeni*.

Le basi forti reagiscono con l'idrogeno dei reattivi a formare specie anioniche intermedie che perdono i cloruri e formano *diclorocarbeni*, agenti fortemente reattivi.

Un ulteriore essiccante irreversibile è costituito da  $\text{P}_2\text{O}_5$ , un agente in grado di formare irreversibilmente acido fosforico in presenza di acqua secondo la reazione:



Questo tipo di agente è utilizzato per essiccare solventi clorurati come cloroformio e diclorometano, incorporando acqua nella struttura senza rilasciare  $\text{H}^+$ : come nel caso del sodio, anche con questo agente è possibile effettuare il riscaldamento della miscela.

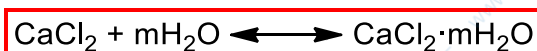
### **Cloruro di calcio**

Il cloruro di calcio merita una opportuna e mirata considerazione, prevedendo due distinti meccanismi di essiccamento, comportandosi da agente reversibile o da agente irreversibile.

È un agente utilizzato, ad esempio, durante il saggio degli acidi idrossammici, utilizzato per intrappolare l'umidità proveniente dall'ambiente: rappresenta un ottimo agente essiccante, utilizzato anche all'interno delle apparecchiature.

Ha una forma granulata che permette il passaggio di aria e l'intrappolamento dell'umidità all'interno della struttura.

L'*interazione reversibile* è definita dalla reazione:



L'interazione irreversibile viene invece descritta dalla reazione:



Quest'ultima reazione è più lenta della precedente ma può comunque avvenire, producendo HCl in forma gassosa e rilasciandolo in ambiente.

Il comportamento reversibile è comunemente quello prevalente ma, in caso di flussi d'aria massicci, è possibile assistere anche al comportamento irreversibile.