

SPETTROSCOPIA UV – VISIBILE

Le tecniche spettroscopiche sono basate sullo scambio di energia che si verifica fra l'energia radiante e la materia.

In particolare, la spettrofotometria di assorbimento è interessata ai fenomeni di assorbimento delle radiazioni luminose della regione dello spettro elettromagnetico appartenenti al campo del visibile (350 – 700 nm) e del vicino ultravioletto (200 – 350 nm).

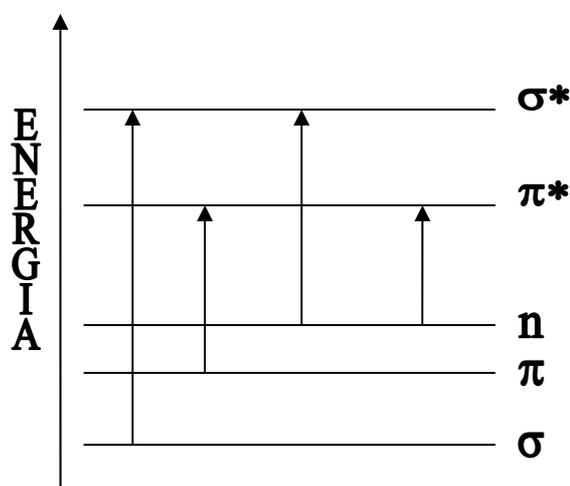
Viene interessato anche l'UV lontano (10 – 200 nm), anche se in questo caso si opera sotto vuoto o in atmosfera di gas inerte, perché l'ossigeno atmosferico copre i segnali delle altre sostanze.

L'assorbimento di questi tipi di radiazioni da parte delle molecole è in grado di produrre delle transizioni energetiche degli elettroni esterni della molecole, sia impegnati che non impegnati in un legame.

Questi elettroni possono essere:

- ◆ di tipo **sigma** (σ), costituiti da una nube elettronica addensata lungo l'asse di unione dei nuclei degli atomi interessati al legame (i legami semplici sono di tipo σ);
- ◆ di tipo **pi-greco** (π), costituiti da coppie di elettroni la cui maggior densità elettronica è situata al di fuori dell'asse di unione dei nuclei (come accade nei legami doppi o tripli).

Gli elettroni π sono 'meno legati' e risultano perciò più facilmente eccitabili rispetto ai σ ; per esempio per eccitare gli elettroni π dell'etilene occorre una quantità di energia corrispondente ad una radiazione di 180nm (vicino U.V.) contro i 120nm (lontano U.V.) della radiazione necessaria per eccitare gli elettroni σ .



TIPO DI TRANSIZIONE	LUNGHEZZA D'ONDA DELLA RADIAZIONE NECESSARIA PER OTTENERE LA TRANSIZIONE	La λ necessaria per la transizione è tanto maggiore quanto minore è il dislivello energetico
$\sigma \rightarrow \sigma^*$	110 – 135 nm	
$\pi \rightarrow \pi^*$	160 – 255 nm	
$n \rightarrow \sigma^*$		
$n \rightarrow \pi^*$	> 285 nm	

Se poi in un molecola sono presenti doppi legami coniugati, si verifica una delocalizzazione elettronica con conseguente diminuzione energetica tra un livello e l'altro: per effettuare transizioni occorreranno quindi radiazioni di minor energia, quali ad esempio quelle nel campo visibile

Di solito, perciò, sono gli elettroni delocalizzati ad entrare in gioco, ad esempio quelli che partecipano al legame π nel doppio legame carbonio – carbonio, e quelli del doppietto libero dell'azoto e dell'ossigeno.

Gli **spettri nel visibile** (che sono spettri a banda, giacché queste transizioni sono generalmente accompagnate a transizioni sia vibrazionali che rotazionali, per cui gli assorbimenti sono costituiti da moltissime righe molto vicine tra loro, tanto da apparire un continuo, cioè una banda) sono quindi dovuti agli elettroni di legame π più o meno ampiamente delocalizzati.

Tale delocalizzazione può essere estesa a tutta la molecola oppure può risultare limitata a raggruppamenti particolari, separati fra di loro nella molecola da un insieme di legami completamente saturi che fungono da isolante e che quindi impediscono la delocalizzazione.

Nel primo caso lo spettro di assorbimento è unico e difficilmente interpretabile secondo regole semplici; nel secondo caso, invece, può essere considerato come la somma di assorbimenti dovuti ai vari gruppi insaturi che vengono chiamati “cromofori”.

Si intende quindi per 'cromoforo' un raggruppamento chimico insaturo responsabile di un assorbimento situato nella regione delle lunghezze d'onda comprese tra 180 e 1000 nm.

I cromofori più semplici sono i gruppi etilenici, acetilenici, carbonilici, carbossilici, azoici, nitrici, nitrosi, ...

APPLICAZIONI DELLA SPETTROSCOPIA UV NELL'ANALISI FARMACEUTICA

Questo è un buon metodo per condurre un'analisi quantitativa; inoltre, da un punto di vista qualitativo, ci permette di:

- ◆ determinare il pKa dei farmaci
- ◆ determinare la loro solubilità
- ◆ determinare la velocità di rilascio di un farmaco da una formulazione (test di dissoluzione)
- ◆ monitoraggio della cinetica di degradazione di un farmaco

Inoltre questo è un metodo di identificazione riconosciuto dalla Farmacopea Ufficiale.

VANTAGGI

- ◆ metodo facile, attendibile ed economico per l'analisi quantitativa
- ◆ metodo di routine usato per la determinazione delle proprietà chimico – fisiche dei farmaci
- ◆ possibilità dell'uso degli spettri in derivata

LIMITI

- ◆ metodo moderatamente selettivo (la selettività dipende dall'estensione del cromoforo)
- ◆ non applicabile all'analisi di miscele

ANALISI QUALITATIVA

Per effettuare analisi qualitative si fa uso di raggi policromatici a spettro continuo, poi separati tramite monocromatori nelle varie componenti (radiazioni monocromatiche).

In pratica le singole radiazioni monocromatiche di tale raggio si fanno passare, una alla volta, attraverso la sostanza in esame, la quale assorbirà in modo diverso, cioè con diversa intensità, le diverse radiazioni.

Riportando perciò i valori registrati in un grafico lunghezza d'onda-assorbimento, si ottiene lo **spettro di assorbimento** della sostanza esaminata.

Per il fatto che *ogni sostanza ha il suo spettro di assorbimento*, l'esame di tali spettri permette di identificare una sostanza (per confronto diretto con campioni noti o tramite banche dati di spettri) o di controllarne il grado di purezza.

N.B. = In realtà le tecniche che meglio si prestano alle analisi qualitative (soprattutto organiche) sono la spettroscopia infrarossa, in cui ogni sostanza presenta numerose bande caratteristiche ben separate, e soprattutto la risonanza magnetica nucleare, che fornisce serie di picchi direttamente collegabili alla struttura della molecola.

ANALISI QUANTITATIVA

Per eseguire analisi quantitative si fa uso di raggi monocromatici, cioè costituiti da radiazioni di una sola frequenza. In pratica, date le difficoltà di avere raggi dotati di questa proprietà, si impiegano fasci di radiazioni comprendenti una banda molto ristretta dello spettro, ossia fasci *quasi* monocromatici.

Le determinazioni quantitative sono basate sul fatto che, quando una radiazione attraversa una soluzione, viene assorbita più o meno intensamente a seconda della concentrazione; in altre parole ***l'assorbimento dipende dalla concentrazione***.

Disponendo quindi di strumenti in grado di misurare l'assorbimento si risale facilmente alla concentrazione della soluzione.

Infatti, se si fa passare attraverso una soluzione a concentrazione incognita una radiazione monocromatica (cioè di una determinata λ) e di intensità I_0 , al di là della soluzione si troverà una radiazione di intensità I , che sarà minore di I_0 se una parte della radiazione è stata assorbita dalla soluzione stessa, o uguale ad I_0 se non si è verificato alcun assorbimento.

Appositi dispositivi (i rivelatori) sono in grado di misurare l'intensità del flusso luminoso; in particolare vengono misurate:

- I_0 : intensità del flusso luminoso all'ingresso della cella con il campione
- I : intensità del flusso luminoso all'uscita della cella con il campione

La frazione di luce trasmessa, rispetto a quella incidente, si definisce **TRASMITTANZA T** , data da:

$$T = \frac{I}{I_0}$$

Questa grandezza ***esprime quale frazione della luce incidente ha attraversato il campione senza essere assorbita***, e può assumere valori compresi tra 0 e 1, e tale rapporto è tanto più piccolo quanto maggiore è stato l'assorbimento.

Comunemente si usa però la **TRASMITTANZA PERCENTUALE**, che assumerà quindi valori compresi tra 0 e 100:

$$\%T = T \cdot 100 = \left(\frac{I}{I_0} \right) \cdot 100$$

- ◆ %T = 100 → significa che il raggio non ha subito alcun indebolimento, cioè non vi è stato alcun assorbimento da parte della sostanza
- ◆ %T = 0 → significa che il raggio è stato completamente assorbito.

L'entità della radiazione assorbita è detta più comunemente assorbenza (A), ed è pari al logaritmo del reciproco della trasmittanza:

$$A = \log \cdot \frac{1}{T} = \log \cdot \frac{I_0}{I} = \log \cdot \frac{100}{\%T} = 2 - \log \%T$$

La legge di Lambert – Beer

Esiste una legge che ci permette di calcolare la concentrazione di campione dal suo assorbimento; questa è la legge di Lambert – Beer, che assume la forma:

$$A = \varepsilon \cdot c \cdot d$$

dove:

A = assorbenza del campione

ε = coefficiente di estinzione molare, specifico per ogni sostanza

d = cammino ottico (cm)

c = concentrazioni (mol / l)

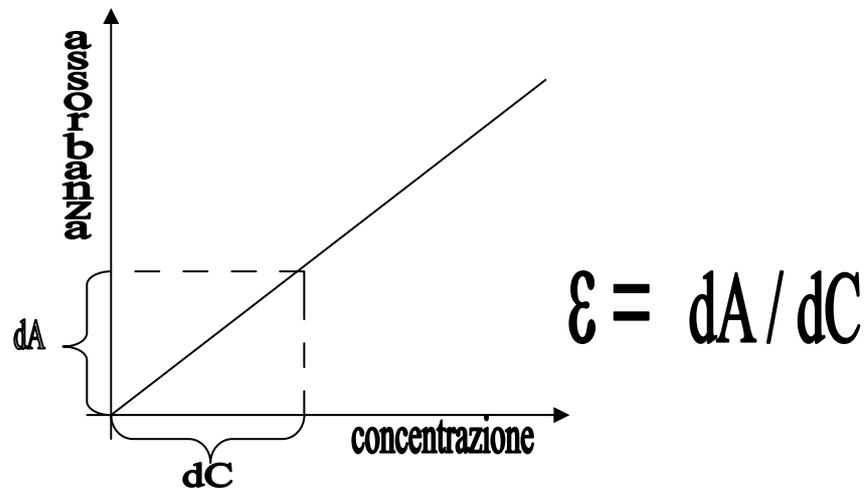
Secondo la legge di Lambert – Beer, dunque, **l'assorbanza A è proporzionale sia alla concentrazione della sostanza assorbente, sia allo spessore dello strato attraversato**, per cui più elevata è la concentrazione delle molecole che passano dallo stato fondamentale a quello eccitato, maggiore sarà l'assorbanza (maggiore sarà la diminuzione dell'intensità del raggio incidente).

Da notare che il **coefficiente di estinzione molare ε** indica il valore di assorbanza del composto in esame quando [d = 1] cm e [c = 1], e il suo valore dipende:

- ◆ dalla lunghezza d'onda della radiazione assorbita
- ◆ dalla natura del solvente
- ◆ dal pH
- ◆ dalla specie chimica che assorbe

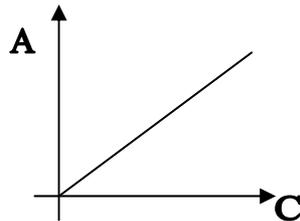
È invece indipendente dalla temperatura!

Ricordiamo infine che l'espressione $A = \varepsilon \cdot c \cdot d$ è l'equazione che descrive una retta passante per l'origine, dove, per un percorso ottico unitario (1 cm), il coefficiente angolare corrisponde proprio al coefficiente di estinzione molare ε !

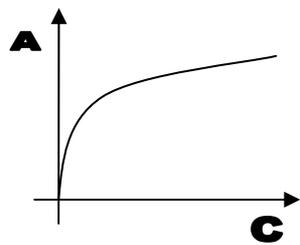


Ricordiamo però una cosa: **LA LEGGE DI LAMBERT – BEER È UN'ASTRAZIONE, ESSENDO VALIDA SOLO PER SOLUZIONI MOLTO DILUITE!**

Se la concentrazione del campione è bassa, infatti, esiste proporzionalità fra A e C:



Se invece la concentrazione è troppo elevata la legge subisce una deviazione e la proporzionalità viene a mancare:



Al crescere della concentrazione del soluto si verificano deviazioni notevoli con conseguente scarsa attendibilità del dato analitico.

Circa le cause che provocano queste deviazioni, l'ipotesi più corretta è quella che all'aumentare della concentrazione aumenta il numero di particelle in soluzione ed aumenta anche il numero di urti fra queste; le forze interioniche e/o intermolecolari aumentano e possono formarsi molecole o aggregati di particelle più complesse, diverse per struttura da quelle in esame, per cui si potrà avere uno spostamento del massimo di assorbimento.

Per questo motivo, le condizioni di lavoro usuali prevedono che le soluzioni siano sempre diluite al

massimo, compatibilmente con la sensibilità dello strumento, per avere di valori accettabili di assorbanza.

E' da ricordare anche che all'aumentare della concentrazione si ha un aumento dell'indice di rifrazione e quindi una maggior dispersione del raggio nell'attraversare la soluzione stessa.

Un'altra condizione di validità della legge di Lambert-Beer è che le radiazioni luminose che devono attraversare la soluzione in esame siano monocromatiche.

In realtà le radiazioni impiegate non sono mai rigorosamente monocromatiche a causa, soprattutto, di difficoltà strumentali. E' comunque sufficiente, per ottenere risultati corretti, che la banda continua di radiazioni, centrata attorno ad un valore nominale, sia la più ristretta possibile.

In certi casi, inoltre, si osservano deviazioni dovute all'instaurarsi di un equilibrio chimico sensibile al pH.

SCelta DELLA LUNGHEZZA D'ONDA

E

FATTORI CHE INFLUENZANO LA POSIZIONE DELLA λ_{max}

Nell'analisi quantitativa spettrofotometrica è fondamentale conoscere come varia l'assorbanza in funzione della lunghezza d'onda. Ciò viene espresso molto chiaramente con il diagramma in cui in ascissa si riportano i valori delle lunghezze d'onda e in ordinata i corrispondenti valori dell'assorbanza.

Si ottengono così delle curve ("spettri") che variano da sostanza a sostanza e presentano dei **massimi caratteristici in corrispondenza di alcune lunghezze d'onda (λ_{max})**.

Poiché le lunghezze d'onda della luce assorbita dipendono dalle transizioni elettroniche che si verificano effettivamente (ed essendo la distribuzione elettronica diversa per i vari atomi), i picchi di assorbimento specifici possono essere correlati a sottostrutture molecolari note, cioè ai cromofori presenti nella struttura della molecola.

Il cromoforo è quindi una parte specifica della molecola che dà origine a parti distinte dello spettro di assorbimento.

Nell'analisi quantitativa lo spettro è essenziale per la scelta della lunghezza d'onda più appropriata da utilizzare, la scelta cade proprio sulla λ_{max} di un cromoforo caratteristico della molecola.

In genere verrà scelta una lunghezza d'onda in modo che:

- ◆ **l'assorbimento sia massimo** → per motivi di sensibilità: se l'assorbimento è alto è possibile rilevare quantità piccolissime di sostanza
- ◆ **sia al centro di un picco 'largo'** → per motivi di precisione, in modo che piccole variazioni di lunghezza d'onda comportino errori minimi sulla misura dell'assorbanza)

Il massimo di assorbimento λ_{max} (e quindi l'energia richiesta per le transizioni elettroniche) di un cromoforo, però, può essere influenzato sia dal resto della molecola che dall'ambiente (solvente) in cui essa si trova!

EFFETTO BATOCROMO (*Red Shift*)

Consiste nello **spostamento a lunghezze d'onda più alte (verso il rosso) della λ_{\max}** .

Tale effetto dipende dalla presenza di gruppi funzionali, detti appunto batocromi, nelle adiacenze del cromoforo, come può essere un doppio legame in α a un carbonile.

Anche il fenomeno dell'iperconiugazione (come nel caso del benzene) determina questo tipo di spostamento, giacché la delocalizzazione elettronica diminuisce l'energia richiesta per la corrispondente transizione!

EFFETTO IPSOCROMO (*Blue Shift*).

Consiste nello **spostamento a lunghezze d'onda più basse (verso il blu) della λ_{\max}** .

Tale effetto dipende dalla presenza di gruppi funzionali, detti appunto ipsocromi, nelle adiacenze del cromoforo, che ne diminuiscono la delocalizzazione elettronica.

Classico è il caso dell'anilina in ambiente acido, dove è presente come ione anilinio (anche se questo è più giusto dirlo effetto pH).

Con l'aumentare dell'acidità della soluzione il doppietto di non legame dell'azoto risulta sempre più impegnato con il protone, e non disturba il sistema π dell'anello aromatico.

EFFETTO AUXOTROMO

Dipende dalla presenza di un gruppo funzionale (auxocromo) saturo, cioè privo di elettroni π , che quando è legato direttamente a un cromoforo determina variazioni sia della λ che della ϵ , in genere aumentandole.

Tipici gruppi auxocromi sono quelli contenenti doppietti di non legame, come $-\text{OH}$, $-\text{NH}_2$, $-\text{Cl}$

EFFETTO SOLVENTE

Il solvente può indurre una significativa variazione dei livelli energetici della molecola.

Un solvente polare, ad esempio, solvatando la molecola, ne abbassa l'energia dello stato eccitato, così, per la transizione $\pi \rightarrow \pi^*$ si ottiene un Red shift (cioè un aumento della λ_{\max}) di 10 – 20 nm passando da esano a etanolo: aumentando la polarità del solvente, questa transizione diventa più facile.

Il fenomeno si spiega in quanto nello stato eccitato la molecola è meno capace di instaurare ponti idrogeno con un solvente polare, e per questo motivo la differenza energetica fra i due stati si amplia.

FATTORI CHE DETERMINANO L'INTENSITÀ DI UNA BANDA

Anche il livello di assorbanza (e quindi il valore del coefficiente di estinzione molare ϵ) di un cromoforo può variare, e questo dipende da quattro fattori.

- 1) **PROBABILITÀ DELLA TRANSIZIONE ELETTRONICA**
- 2) **VARIAZIONE DEL MOMENTO ELETTRICO AD ESSA ASSOCIATA**
- 3) **NATURA DEL SOLVENTE**
- 4) **TIPO DI SOSTIUMENTI**

Prendiamo ad esempio l'acetone in esano; questo fornisce fornisce:

- ◆ a 279 nm una banda debole, dovuta a una transizione $n \rightarrow \pi^*$
- ◆ a 188 nm una banda intensa, dovuta a una transizione $\pi \rightarrow \pi^*$

- 1) Evidentemente la prima transizione è molto meno probabile della seconda; è infatti proibita dalle regole di selezione
- 2) Per il secondo fattore, bisogna rilevare che per la transizione $n \rightarrow \pi^*$ del carbonile lo stato eccitato riguarda solo l'atomo di ossigeno, mentre per la $\pi \rightarrow \pi^*$ lo stato eccitato corrisponde alla struttura $\overset{(+)}{C} - \overset{(-)}{O}$, in cui i individua un forte momento dipolare.
- 3) L'influenza del solvente su ϵ è limitata
- 4) Se il cromoforo è legato a gruppi che ne influenzano l'assetto elettronico (e quindi incidono sui fattori 1 e 2), si può avere:
 - un **effetto ipercromico**, con aumento di ϵ
 - un **effetto ipocromico**, con diminuzione di ϵ

STRUMENTAZIONE

Generalità sugli spettrofotometri

Gli strumenti usati che sfruttano i principi esposti sono gli *spettrofotometri* e i *colorimetri*.

La differenza essenziale tra questi due tipi di strumenti consiste nel fatto che nei colorimetri si ha una maggiore ampiezza di banda passante.

Un colorimetro, ad esempio, può avere una banda passante di 40nm, il che significa che impostando una lunghezza d'onda di 580nm passano in realtà radiazioni da 560 a 600nm.

Uno spettrofotometro a doppio raggio può arrivare a bande passanti inferiori al nm, usando così una luce assai più monocromatica (condizione importante per il rispetto della legge di Lambert-Beer ed essenziale per registrare spettri utili a fini qualitativi).

Tali differenze di banda passante dipendono dal fatto che vengono utilizzati diversi *monocromatori*:

- ◆ nei colorimetri si utilizzano filtri ottici o interferenziali
- ◆ negli spettrofotometri si usano prismi o reticoli di diffrazione (associati a sistemi di fenditure).

Per quanto riguarda gli spettrofotometri UV-visibile, i tipi più comuni sono il “monoraggio” e il “doppio raggio”: i sistemi monoraggio si utilizzano senza problemi per le analisi quantitative, mentre gli spettrofotometri a doppio raggio sono più complessi e costosi, ma consentono una grande praticità anche nelle analisi quantitative, come si vedrà in seguito.

STRUTTURA GENERALE DI UNO SPETTROFOTOMETRO (UV-VISIBILE O IR)

Dal punto di vista concettuale uno spettrofotometro segue il seguente schema di principio:

- 1) SORGENTE DI RADIAZIONE
- 2) SELEZIONATORE DI LUNGHEZZE D'ONDA O MONOCROMATORE
- 3) CELLA
- 4) RIVELATORE
- 5) LETTORE

SORGENTE

È la parte dell'apparecchio da cui prende origine la radiazione policromatica (*contenenti cioè tutte le lunghezze d'onda del campo richiesto*) che viene diretta sul campione.

Negli strumenti che misurano la luce ultravioletta e visibile sono presenti due diverse lampade, in modo che la sorgente copra l'intervallo da 190 – 800 nm:

- ◆ per la **regione del visibile** si utilizzano **lampade a incandescenza** (a filamento di tungsteno, lampade quarzo-iodio o lampade tungsteno-alogeno)
- ◆ per la **regione UV** si usano **lampade a scarica in un gas** (deuterio o a idrogeno); sono costituite da un'ampolla di quarzo contenente il gas rarefatto (ma non troppo) nella quale viene attivata, tra due elettrodi, una scarica elettrica con la conseguente emissione di radiazioni con spettro continuo.

Gli spettrofotometri UV-visibile avranno quindi al loro interno queste due lampade, che vengono opportunamente intercambiate dal meccanismo interno. Il valore di “cambio – lampada” è in genere intorno a 350 nm.

Dopo la sorgente è posta inoltre la '*fenditura di ingresso*' che serve (associata anche a lenti e/o specchi) a rendere paralleli i raggi ed evitare luce diffusa nello strumento.

MONOCROMATORE

Il monocromatore è il sistema ottico usato per disperdere la luce policromatica in bande monocromatiche, che vengono inviate in successione sul campione.

Esistono due tipi di monocromatori:

- ◆ basati su **FILTRI (ottici o interferenziali)**, che bloccano una parte della luce e lasciano passare solo la parte desiderata
- ◆ basati su un **ELEMENTO DISPERDENTE (prisma o reticolo)**, che separano le varie componenti della radiazione e ne permettono la successiva selezione della banda desiderata

I **filtri ottici** contengono opportune sostanze che **assorbono** gran parte delle radiazioni visibili lasciando solo la banda desiderata, cioè un certo intervallo di lunghezze d'onda, che ha però notevoli ampiezze (250nm).

Anche combinando più filtri, rimangono comunque bande passanti dell'ordine di 50nm e sempre a scapito di un indebolimento del raggio anche per le λ richieste. Si utilizzano solo nei colorimetri.

I **filtri interferenziali** si basano su un fenomeno tipicamente ondulatorio (l'**interferenza**) che causa rafforzamenti o indebolimenti tra due radiazioni che si sommano a seconda che siano o meno in fase tra loro. Sono più efficienti dei filtri basati sull'assorbimento, consentendo bande passanti dell'ampiezza di 20nm (nel visibile); sono tuttavia più costosi e si utilizzano nei colorimetri migliori.

I **monocromatori basati su elementi disperdenti** sono quelli effettivamente usati negli spettrofotometri di qualità.

Sono basati sul far incidere il fascio policromatico su un oggetto (un **prisma** o un **reticolo**) in grado di deviare le diverse radiazioni con diversi angoli: la radiazione uscente sarà quella che passa attraverso la fenditura di uscita.

Il **prisma** è in grado di disperdere le radiazioni con diversa λ grazie al fenomeno della rifrazione: quando un raggio di luce passa da un mezzo ad un altro subisce una deviazione di un angolo inversamente proporzionale alla λ della radiazione (cioè, radiazioni con diversa λ subiscono diversa deviazione).

I **reticoli** svolgono la stessa funzione del prisma, ma il loro funzionamento è basato sulla riflessione. Sono costituiti da serie di solchi o fenditure parallele tracciati su una superficie lucida a distanza ravvicinata: il fenomeno è quello che si osserva guardando obliquamente la superficie di un CD.

Nei moderni spettrofotometri si utilizzano reticoli a riflessione, sia nel campo **UV-visibile** sia nell'**IR**.

CELLA

È la componente destinata a contenere il campione da esaminare; questo, generalmente in soluzione, viene introdotto in questi contenitori che sono chiamati **cuvette**.

Oltre ad essere trasparenti alla radiazione impiegata, devono avere un ben preciso 'cammino ottico' (la lunghezza percorsa dalla radiazione nel campione) che dovrà essere sufficiente ad avere assorbimenti rilevabili dallo strumento.

- ◆ in UV si utilizzano celle in quarzo (SiO_2)
- ◆ nel visibile in vetro o quarzo o alcuni materiali plastici.
- ◆ in IR si rendono necessarie celle in NaCl, KBr, CaF_2

RIVELATORE

Sono dispositivi capaci di produrre un segnale elettrico che dipende dall'energia delle radiazioni che lo investono.

Tale segnale elettrico (proporzionale all'intensità luminosa) viene poi trasferito a un indicatore analogico o elaborato per via elettronica in modo più o meno complesso.

Trattandosi della parte dello strumento che esegue la **misura** vera e propria, è evidente che ne rappresentano una parte molto importante, in particolare per quanto riguarda sia la **sensibilità** sia l'**accuratezza** dello spettrofotometro.

In UV-visibile si possono utilizzare:

- CELLE FOTOVOLTAICHE e CELLE FOTOCONDUTTIVE;
- FOTOTUBI e FOTOMOLTIPLICATORI;
- FOTODIODI

Le **celle fotovoltaiche e fotoconduttive** sono basate su semiconduttori che generano ai loro capi una d.d.p. direttamente proporzionale all'intensità della radiazione incidente.

Sono poco sensibili e non coprono tutto l'UV-visibile, tuttavia sono resistenti e poco costose: per questo motivo vengono utilizzate in colorimetri o semplici fotometri di basso prezzo.

I **fototubi** e i **fotomoltiplicatori** sono basati sull'*effetto fotoelettrico*, che consiste nell'emissione di elettroni da parte di un materiale quando viene colpito da radiazioni luminose: il numero di elettroni emessi (misurabile per via elettrica) è proporzionale all'intensità della radiazione incidente.

I **fotodiodi**, infine, sono microscopici circuiti su chip di silicio (o germanio) che variano la loro d.d.p. se investiti da radiazioni luminose. Hanno sensibilità inferiore ai fotomoltiplicatori, ma presentano il vantaggio di poter essere inseriti in grande numero su un singolo chip di silicio, prestandosi così in modo efficace alla costruzione di *spettrofotometri a serie di diodi* (di cui si parlerà più avanti)

In IR si utilizzano *rivelatori a cristalli piroelettrici*, basati su cristalli che generano tensioni elettriche fra due facce opposte a seconda di quanto vengono 'riscaldati' dalla radiazione infrarossa ricevuta.

SISTEMA DI ELABORAZIONE E PRESENTAZIONE DEI DATI

Il segnale proveniente dal rivelatore viene opportunamente amplificato e un amperometro ne rileva l'intensità.

Il lettore converte quindi il segnale elettrico in un valore numerico proporzionale all'intensità del segnale, e questo valore va da 0 a 100.

Ponendo pari a 100 il valore del segnale in assenza del campione, otteniamo la trasmittanza e da questa l'assorbanza.

TIPI DI SPETTROFOTOMETRO

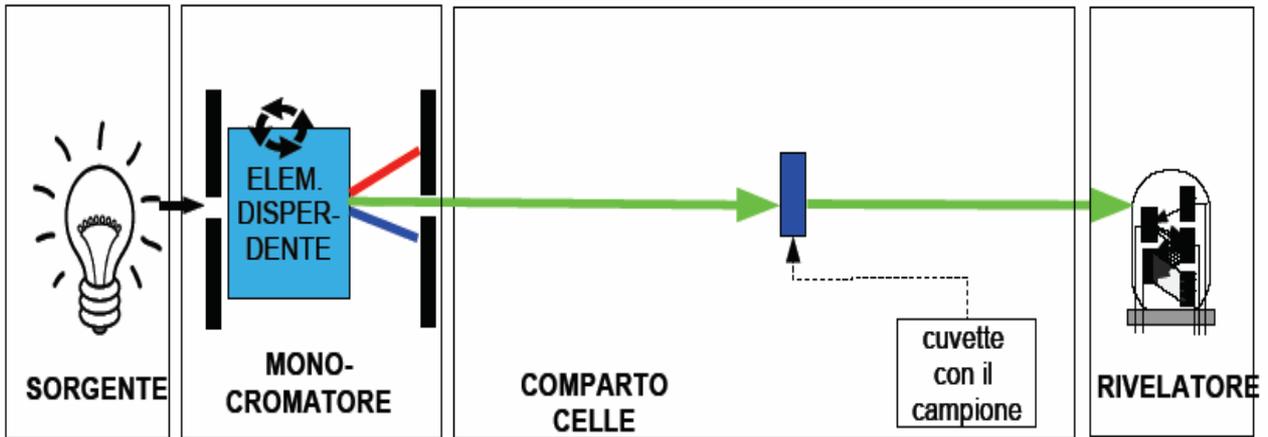
Esistono diversi tipi di spettrofotometro, a seconda di come sono organizzate le varie componenti:

- ♥ SPETTROFOTOMETRI **MONORAGGIO**
- ♥ SPETTROFOTOMETRI A **DOPPIO RAGGIO**
- ♥ SPETTROFOTOMETRI A **SERIE DI DIODI** (solo UV-visibile)
- ♥ STRUMENTI IN **TRASFORMATTA DI FOURIER** (solo IR)

Gli **SPETTROFOTOMETRI MONORAGGIO**, sono usati prevalentemente in analisi quantitativa e non sono comodi per ottenere spettri di assorbimento

La difficoltà sta nel fatto che *per ogni misura, per ogni λ , si deve ripetere l'azzeramento contro il bianco*, oppure registrare prima lo spettro del bianco, poi lo spettro del campione ed infine sottrarre al secondo il primo (procedura che può risultare macchinosa).

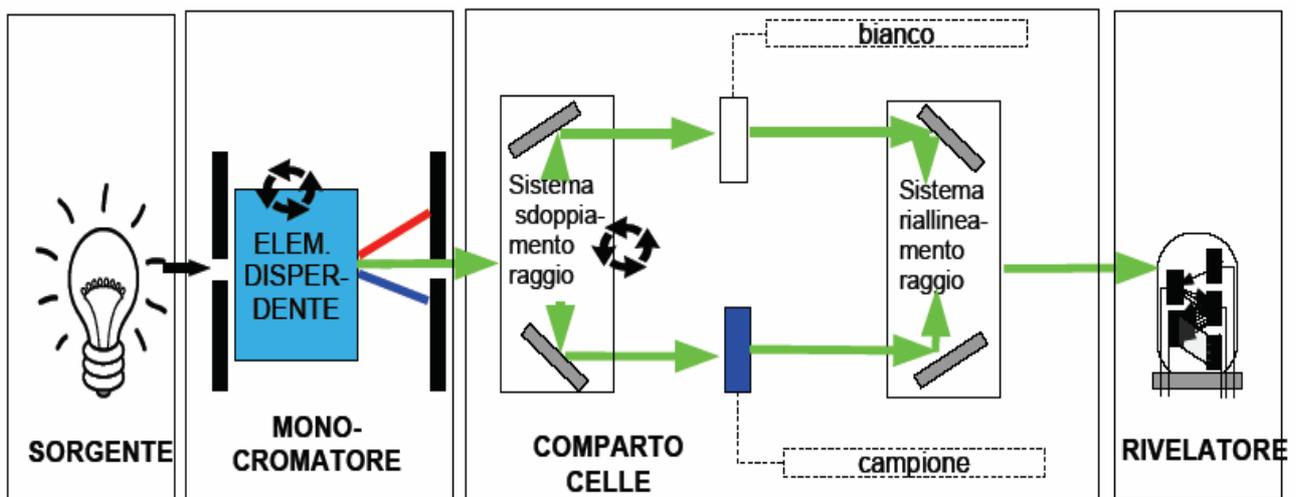
Lo schema corrisponde a quello di un colorimetro:



Negli **SPETTROFOTOMETRI A DOPPIO RAGGIO** si ha invece un sistema che invia due raggi, identici per frequenza e intensità, uno attraverso il campione e l'altro attraverso il bianco, per cui si ha un confronto continuo tra l'assorbanza del campione e quella del bianco.

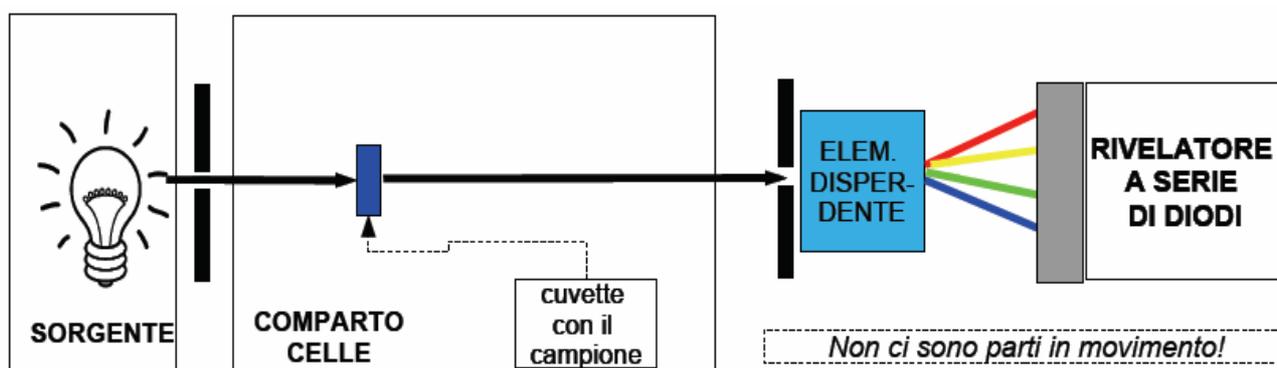
Grazie a queste caratteristiche è possibile effettuare misure direttamente a qualsiasi λ senza ripetere azzeramenti, e soprattutto registrare continuamente lo spettro di assorbimento (fondamentale ai fini qualitativi).

Per questo motivo il doppio raggio è preferito per le applicazioni qualitative sia in UV che in IR (soprattutto).



Esistono poi **strumenti UV-visibile a serie di diodi**, in cui il rivelatore è costituito da un chip con centinaia di fotodiodi allineati, ognuno dei quali misura la particolare banda di radiazione inviatagli dall'elemento disperdente.

Tali strumenti non hanno una risoluzione elevata, ma presentano però una caratteristica notevole: registrano simultaneamente (in 1/10 di secondo) tutto lo spettro (non ci sono parti in movimento che inviano le λ un po' per volta); grazie a questo sono adatti ad essere collegati all'uscita di strumenti di separazione di miscugli (tipo HPLC) in modo da registrare in tempo reale, secondo per secondo, l'intero spettro della miscela in uscita.



Nel campo IR sono ormai ampiamente diffusi gli **strumenti in 'trasformata di Fourier' (FT-IR)**, con notevoli variazioni sull'apparato strumentale, basato in questo caso su un interferometro (dispositivo meccanico) e su un particolare metodo matematico di trattazione dei dati (trasformata di Fourier) ... e NON su un monocromatore!

Tali strumenti misurano lo spettro in modo simultaneo.

ASSORBIMENTO DEI COMPOSTI ORGANICI

L'utilizzo dello spettro UV-Visibile per l'analisi qualitativa non può raggiungere i livelli di approfondimento consentiti da uno spettro IR a causa dello spettro stesso, che non appare quasi mai (specialmente per le soluzioni) sufficientemente dettagliato, tuttavia può essere benissimo impiegato per una prima caratterizzazione della molecola, accontentandosi di ottenere da una simile tecnica solo la possibilità di operare magari una sommaria scelta fra varie alternative.

Vediamo innanzi tutto un quadro relativo alle principali transizioni riguardanti i composti organici.

Transizioni $\sigma \rightarrow \sigma^*$

Queste transizioni sono quelle che richiedono le energie più elevate, dato che corrispondono alla rottura di legami σ .

Molecole come gli alcani saturi, che contengono solo legami C-C e C-H, danno solo questi assorbimenti, che cadono nella zona dell'UV lontano, detta anche *UV sotto vuoto* (infatti in questa zona assorbe anche l'ossigeno dell'aria, per cui un'eventuale indagine andrebbe condotta eliminando tale interferenza, vale a dire operando sotto vuoto).

Transizioni $\pi \rightarrow \pi^*$

La transizione $\pi \rightarrow \pi^*$ è decisamente più facile della precedente, ed è tipica dei composti insaturi. Ne possiamo individuare tre tipi principali:

- ♥ **transizione E (etilenica)** → banda tipica di sistemi π isolati
- ♥ **transizione B (benzenoide)** → banda tipica del sistema benzenico; può essere anche particolarmente complessa, sebbene non molto intensa, dato che non sarebbe permessa dalle regole di selezione
- ♥ **transizione K (di coniugazione)** → è caratteristica di sistemi aromatici o comunque di doppi o tripli legami coniugati. Maggiore è la delocalizzazione, più alta è la lunghezza d'onda di assorbimento, ed aumenta anche la relativa intensità.

Transizioni $n \rightarrow \sigma^*$ e $n \rightarrow \pi^*$ (bande R o radicaliche)

Queste bande sono del tipo R, cioè radicalico, perché interessano eteroatomi che dispongono di doppietti di non - legame e si trovano inseriti in un sistema π o in un sistema σ .

È il caso di C=O, C=N, N=N, oppure il C-O, C-S, C-N (alcoli, mercaptani, ammine...)

La bassa intensità viene interpretata con il fatto che tali transizioni non sarebbero permesse dalle regole di selezione

Transizioni per trasferimento di carica

Sono di solito le più intense dello spettro, perché sono dovute a veri e propri spostamenti di elettroni da una parte all'altra della molecola e di solito forniscono le bande più intense dello spettro. I composti aromatici sostituiti presentano bande di questo tipo che cadono nell'intervallo 220-370 nm.

Spesso:

- ♥ i composti di coordinazione, ma anche
- ♥ gli ioni di metalli di transizione (come MnO_4^- o CrO_4^{2-}) e
- ♥ i complessi molecolari (come fra I_2 e il benzene)

mostrano una colorazione molta intensa. Perché?

L'intenso assorbimento nel visibile da parte di queste specie è associato a transizioni elettroniche che producono forti variazioni nel momento di dipolo. In particolare, per ioni e composti di coordinazione si parla di **trasferimento di carica intramolecolare** perché si verifica un vero e proprio trasferimento di un elettrone dall'atomo centrale ai leganti, e viceversa.

Il caso più frequente consiste nel trasferimento di un elettrone dal legante al metallo; infatti in una transizione elettronica di questo tipo si verifica una forte variazione del momento di dipolo!

I fattori che facilitano il trasferimento di carica sono l'acidità (il potere ossidante) dello ione centrale e la basicità (il potere riducente) del legante.

Esempio:

- l'**AgI** è giallo mentre l'**AgCl** è bianco, ciò si spiega perché lo ione I^- è più basico (riducente) dello ione Cl^- e quindi tende a cedere un elettrone con più facilità, il trasferimento elettronico da parte di **I** richiede l'assorbimento di un fotone nella regione del blu, al limite del visibile, e perciò AgI appare giallo.
- Il trasferimento di carica è il primo stadio verso l'ossidazione del legante e quindi, la rottura del legame con il metallo, è indice in molti casi, di scarsa stabilità della molecola (o dello ione). Il colore giallo dello ione CrO_4^{2-} deriva dal trasferimento di un elettrone di non legame dall'ossigeno ad un orbitale del cromo.
Lo ione MnO_4^- , che è un ossidante più energetico di CrO_4^{2-} appare di colore violetto, perché il trasferimento elettronico è relativamente più facile (e avviene a lunghezze d'onda maggiori).
- Per i complessi molecolari si parla di **trasferimento di carica intermolecolare**. Nel caso di I_2 in benzene si pensa che l'intensa colorazione marrone scuro sia dovuta al trasferimento di un elettrone π del benzene in un orbitale molecolare vuoto di I_2 . in tetracloruro di carbonio o in un solvente idroalcolico, I_2 dà invece una colorazione viola perché non si formano complessi di questo tipo.

Transizioni $d \rightarrow d$ o $f \rightarrow f$

Nei composti di coordinazione, l'interazione del metallo centrale con i legami ad esso coordinati provoca una separazione tra i cinque orbitali d (o i sette orbitali f , nel caso dei lantanidi), che in assenza dei leganti hanno tutti la stessa energia.

Gli assorbimenti che corrispondono alle transizioni fra orbitali *d* (o *f*) cadono nella regione del visibile, perché i dislivelli sono relativamente piccoli, perciò i composti di coordinazione dei metalli di transizione e dei lantanidi appaiono spesso colorati.

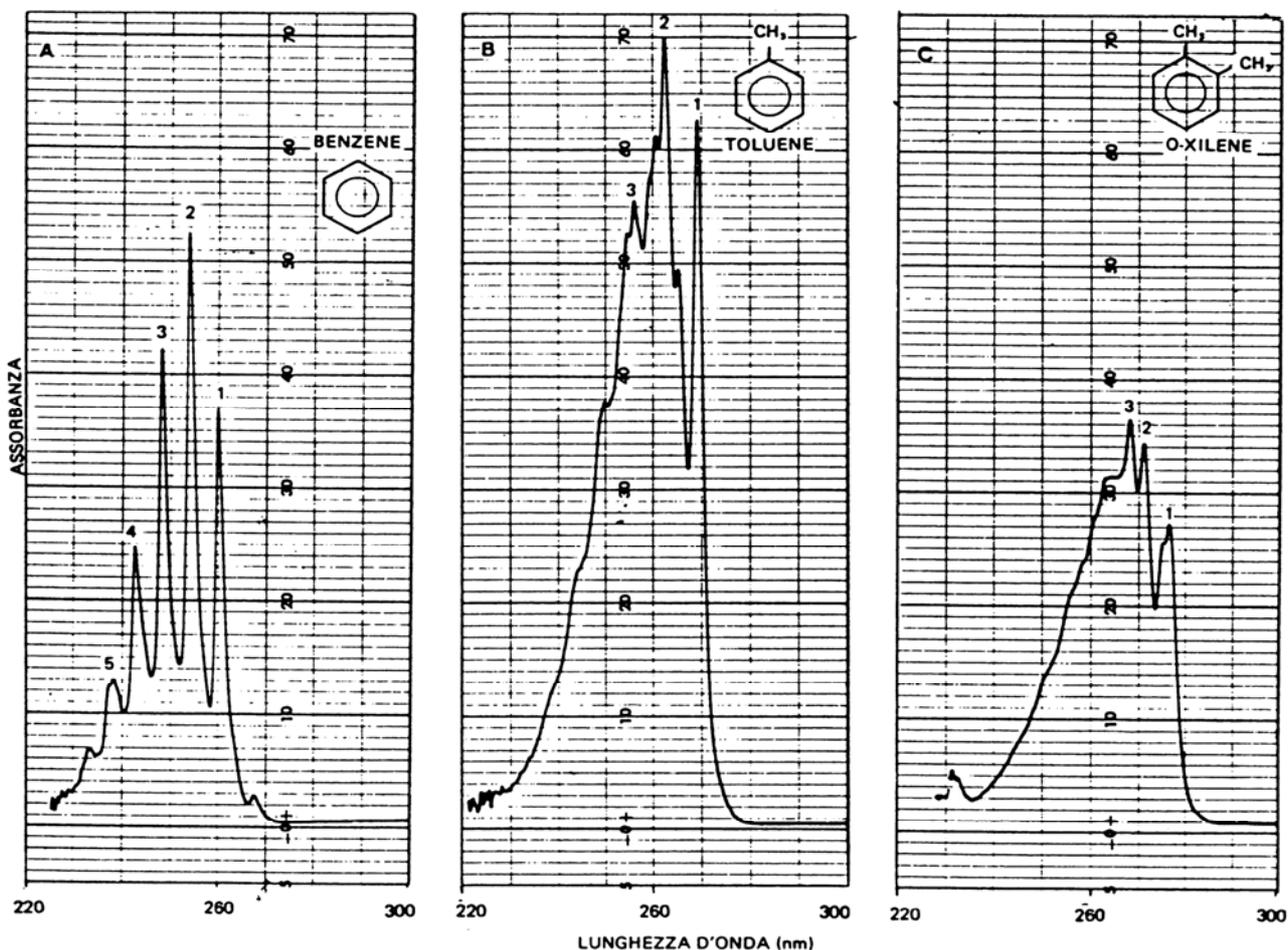
Gli spettri dei composti di coordinazione, dunque, mostrano le bande di assorbimento dei leganti insieme all'assorbimento caratteristico dei metalli di transizione (che hanno orbitali *d*) o dei lantanidi (che hanno orbitali *f*) e l'assorbimento per trasferimento di carica.

EFFETTO DEI SOSTITUENTI SULLA BANDA B DELLO SPETTRO DI ASSORBIMENTO DELL'ANELLO BENZENICO

Nello spettro di assorbimento UV-Vis del benzene possono essere individuate tre bande di interesse particolare:

BANDA	λ	ϵ
E ₁	184	60.000
E ₂	203,5	7.400
B	254	204

Di sicuro, però, quella che maggiormente ci interessa è proprio la banda benzenoide, la cui posizione varia a seconda dei sostituenti portati dall'anello.



Ovviamente a noi interessa come e di quanto sia questo spostamento; così abbiamo che:

benzene $\rightarrow \lambda_{\max} = 254$

toluene $\rightarrow \lambda_{\max} = 261$

xilene $\rightarrow \lambda_{\max} = 265$

Si nota quindi un Red Shift, dovuto a una iperconiugazione, in cui gli elettroni σ dei legami C–H alchilici partecipano alla risonanza dell'anello, delocalizzando ulteriormente il sistema aromatico.

Inoltre appare anche a prima vista la progressiva scomparsa della caratteristica struttura fine (a cinque dita) della banda B del benzene, dovuta alla perdita di simmetria da parte dell'anello aromatico.

In generale abbiamo che:

SOSTITUENTI ALCHILICI	Hanno un effetto batocromo, che consiste nello spostamento a lunghezze d'onda più alte (verso il rosso) della λ_{\max}
CONIUGAZIONE CON DOPPI LEGAMI O ALTRI ANELLI AROMATICI	Hanno un effetto batocromi per aumento della delocalizzazione elettronica
SOSTITUENTI CON DOPPIETTI DI NON LEGAME	Hanno un effetto ipercromico, cioè si ha un aumento di ϵ
DOPPIO LEGAME O ETEROATOMO DIRETTAMENTE LEGATO ALL'ANELLO	Danno luogo a bande molto intense nell'intervallo fra 220 – 370 nm, dovute a fenomeni di trasferimento elettronico.

CRITERI DI RICONOSCIMENTO DELLE SOSTANZE ORGANICHE

L'esame degli assorbimenti caratteristici dei vari gruppi funzionali ha dimostrato che non sono numerosi i casi nei quali lo spettro elettronico risulta effettivamente utile, come nel caso di dieni e trieni coniugati, aromatici, carbonili coniugati... In ogni caso è necessario valutare nella stessa misura la λ_{\max} e la ϵ !

Possiamo quindi stilare una serie di linee guida:

- ♥ **Assorbimenti molto forti nell'intervallo 200–300 nm** (ϵ : 10.000–20.000) indicano sistemi di almeno due cromoforo coniugati, uguali o diversi. Se la banda è ancora più spostata verso il visibile, la coniugazione è certamente elevata.
- ♥ **Assorbimenti piuttosto forti nella zona 270–370 nm** (ϵ : 5.000–16.000); indicano sistemi aromatici con sostituenti polari, che danno luogo anche a bande di trasferimento di carica. Le bande si spostano verso il visibile quanto maggiore è la coniugazione, oppure quando sono presenti più sostituenti con elettroni mobili.
- ♥ **Assorbimenti deboli o di media forza nell'intervallo 210 – 300 nm** (ϵ : 200 – 8.000): indicano sistemi aromatici con sostituenti alchilici, ma anche transizioni $n \rightarrow \sigma^*$ di atomi che possiedono doppietti di non legame

- ♥ **Assorbimenti molto deboli nella zona 200 – 300 nm** (ϵ : 10 – 100): indicano transizioni $n \rightarrow \pi^*$ e caratterizzano i gruppi N=O, C=O, N=N, C=S...
- ♥ **Assorbimenti analoghi ai precedenti ma nell'intervallo 400 – 1.500 nm** (ϵ : 20 – 1.000) sono dovute a transizioni interne di tipo $d \rightarrow d$ o $f \rightarrow f$ dei metalli di transizione o dei lantanidi
- ♥ **Assorbimenti molto forti (ϵ : 30.000 – 50.000) verso il visibile** indicano bande di trasferimento di carica intermolecolari o intramolecolari.

In definitiva si può dire che lo spettro UV diventa decisivo quando il dato che fornisce è in negativo, così:

- L'assenza di assorbimento sopra i 180 nm esclude la presenza di sistemi aromatici o comunque coniugati
- L'assenza di assorbimento tra 230 – 280 nm esclude la presenza di anelli benzenici

SCELTA DEL SOLVENTE

Il solvente ideale non esiste, dato che esso non dovrebbe assorbire nell'UV-Vis; tuttavia alcani e alcoli sono buoni solventi.

L'acqua ben distillata e deareata (bollita di fresco) è comunque il solvente principale, ma il suo impiego è limitato dalla ridotta solubilità dei composti organici.

È bene utilizzare sempre solventi puri per spettrofotometria, giacché le impurezze possono interferire con l'analisi.

Tipicamente, esano e cicloesano contengono spesso tracce di benzene che va eliminato tramite passaggio su gel di silice.

ASSORBIMENTI CARATTERISTICI DEI COMPOSTI ORGANICI

ALCANI LINEARI E CICLICI

Nelle molecole degli alcani sono presenti solo i legami C–C e C–H; la sola transizione possibile è quindi $\sigma \rightarrow \sigma^*$.

Questa transizione richiede energie molto alte, tipiche della regione del lontano UV ($\lambda < 200$ nm). Per tale regione, di solito, gli alcani sono utilizzati come ottimi solventi nella spettroscopia UV.

ALCHENI LINEARI E CICLICI

Il doppio legame isolato C=C è responsabile di un intenso assorbimento che quasi sempre cade nella regione dell'UV lontano, dovuto alla transizione $\pi \rightarrow \pi^*$.

L'etilene in fase vapore assorbe a 165 nm, dando una banda molto intensa.

La sostituzione degli idrogeni dell'etilene con gruppi alchilici ha un effetto batocromo, dovuto al loro effetto induttivo, o più probabilmente, al fenomeno dell'iperconiugazione, in seguito alla quale gli elettroni σ del gruppo alchilico vengono parzialmente utilizzati e possono interagire quindi col doppio legame.

COMPOSTO	FORMULA	λ_{MAX}
ETILENE	$CH_2 = CH_2$	165
“ MONOSOSTITUITO	$RCH = CH_2$	177
“ BISOSTITUITO	$RCH = CHR$	182 – 188
“ TRISOSTITUITO	$R RCH = CHR$	188 – 193
“ TETRASOSTITUITO	$R RCH = CHR R$	196 – 200

Data la natura non polare del doppio legame, l'intensità dell'assorbimento degli alcheni risulta essenzialmente indipendente dal solvente

ALCHINI

L'assorbimento dovuto al triplo legame $C\equiv C$ è più complesso di quello dovuto al gruppo etilenico.

L'acetilene in fase vapore mostra una debole banda di assorbimento a 173 nm dovuta alla transizione $\pi \rightarrow \pi^*$.

I derivati alchilici mostrano un debole effetto batocromo.

Gli alchini coniugati danno luogo a spettri di assorbimento caratteristi per la presenza di bande intense separate da intervalli regolari.

COMPOSTI SATURI CON ETEROATOMI

Le molecole sature contenenti atomi che possiedono elettroni n (come O, S, N, P e alogeni), danno il caratteristico assorbimento dovuto alla $n \rightarrow \sigma^*$.

ALCOLI E ETERI	Assorbono intorno ai 180 – 200 nm
TIOLI	Assorbono intorno ai 230 nm
AMMINE	Assorbono intorno ai 220 nm
ALOGENODERIVATI	Danno assorbimenti a λ tanto più elevata quanto più pesante è l'alogeno

COMPOSTI CARBONILICI

Il gruppo carbonilico $C=O$ contiene oltre elettroni σ , anche elettroni π e n. In teoria sono quindi possibili quattro transizioni elettroniche:

- $\sigma \rightarrow \sigma^*$
- $\pi \rightarrow \pi^*$ (banda K)

- $n \rightarrow \sigma^*$
- $n \rightarrow \pi^*$ (banda R)

Le prime tre transizioni danno luogo a bande di assorbimento nella regione del lontano UV (<200nm) e sono quindi scarsamente utilizzabili per un'indagine qualitativa.

La quarta transizione genera una banda di assorbimento (banda R) sempre molto debole nella regione del vicino UV (230 – 300 nm). La debolezza di questa banda si spiega con il fatto che questo tipo di transizione è proibita dalle regole di selezione della meccanica quantistica.

Inoltre questa banda risente fortemente dell'effetto solvente, e al crescere della polarità di quest'ultimo essa subisce uno slittamento verso λ più basse (effetto ipsocromo): questo effetto è la conseguenza dell'instaurarsi del legame a idrogeno che abbassa l'energia dell'orbitale π^* .

Aldeidi e chetoni saturi

In questo tipo di composti le transizioni $\sigma \rightarrow \sigma^*$, $\pi \rightarrow \pi^*$ e $n \rightarrow \sigma^*$ sono di scarsa utilità in quanto le corrispondenti bande si trovano nella regione del lontano UV (<190 nm).

La transizione $n \rightarrow \pi^*$ genera una banda R che si colloca fra 200 e 300 nm, di debole intensità.

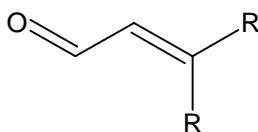
EFFETTO SOLVENTE: → effetto ipsocromo all'aumentare della polarità del solvente

EFFETTO DEI SOSTITUENTI → Gruppi alchilici: effetto batocromo

Gruppi contenenti eteroatomi: effetto ipsocromo, come risultato della combinazione dell'effetto induttivo e di risonanza

Aldeidi e chetoni α,β insaturi

Si indica col termine enoni l'insieme dei composti caratterizzati dalla presenza di un carbonile coniugato con un doppio legame. L'unità caratteristica è:



La coniugazione del carbonile con un doppio legame abbassa la differenza di energia tra l'orbitale di legame e quello di antilegame: il risultato è un **effetto batocromo** sulle bande K e R:

BANDA	λ_{\max}
Banda K	220 – 260 nm
Banda R	310 – 330 nm

EFFETTO SOLVENTE: essendo gli enoni composti polari, le posizioni delle bande di assorbimento risentono della polarità del solvente. In particolare, aumentando la polarità del solvente, la banda K subisce un effetto batocromo

EFFETTO DEI SOSTITUENTI: la posizione della banda K subisce uno spostamento verso il rosso a seconda del tipo e della posizione del sostituente

Acidi carbossilici saturi

Le molecole contenenti il gruppo carbossile COOH presentano il consueto assorbimento dovuto alla transizione $\pi \rightarrow \pi^*$ (banda K) intorno a 180 nm, e la banda dovuta alla transizione $n \rightarrow \pi^*$ (banda R) intorno ai 200 – 210 nm.

L'allungamento della catena alchilica comporta un leggero effetto batocromo, in particolare sulla seconda banda.

Acidi carbossilici α,β insaturi

Qui il discorso corrisponde a quello dei carbonili α,β insaturi. La coniugazione ha sempre un effetto batocromo, così come la presenza di sostituenti alchilici.

Esteri → non manifestano differenze sostanziali dagli acidi

Ammidi → la transizione $n \rightarrow \pi^*$ (banda R) cade al di sotto dei 200 nm

Cloruri acilici → l'assorbimento dovuto alla transizione $n \rightarrow \pi^*$ (banda R) subisce un forte effetto batocromo

Spettri in derivata

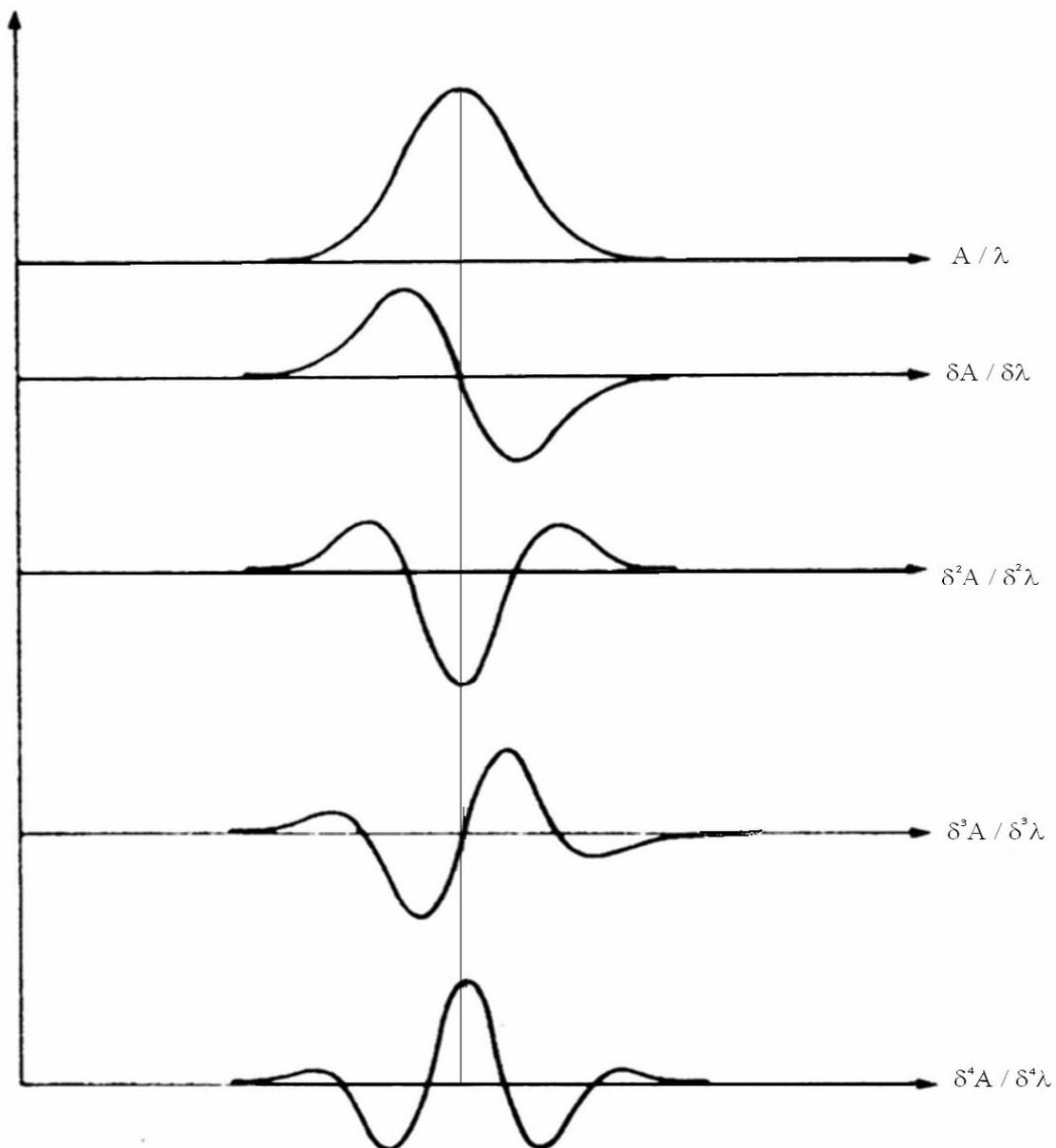
In linea di massima lo spettro elettronico non risulta abbastanza selettivo per caratterizzare una molecola. Tuttavia quando si tratta di distinguere fra sostanze molto simili, è possibile utilizzare proficuamente lo spettro UV-Vis mediante la registrazione del così detto spettro in derivata.

Quando le bande di assorbimento, che in UV-Vis sono solitamente larghe, non hanno una struttura sufficientemente risolta, gli spettri di sostanze simili appaiono praticamente uguali.

In questi casi, se il rumore di fondo, cioè il segnale dovuto al disturbo, è sufficientemente basso è possibile tracciare anche la derivata della funzione

$$f = \frac{A}{\lambda}$$

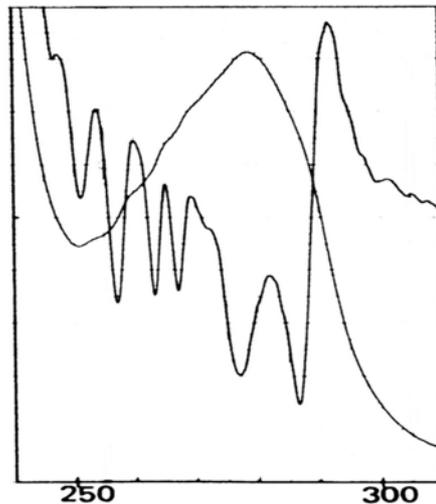
Lo spettro in derivata solitamente si registra ricorrendo all'impiego di sistemi a base di amplificatori operazionali; tali circuiti consentono di registrare vari ordini di derivazione.



derivata prima → pendenza uguale a zero al massimo del picco, e pendenza massima a metà del picco

derivata seconda → pendenza minima al massimo del picco

In generale è sufficiente registrare la derivata seconda per caratterizzare in modo univoco un composto. Se necessario si ricorre a derivate di ordine superiore, che consentono maggiori dettagli anche se presentano un disturbo più evidenziato.



Questo è lo spettro normale e in derivata seconda di albumina umana. Da notare le vistose differenze nella zona fra 260 e 290 nm

I vantaggi delle derivate sono:

- ♥ **MAGGIORE RISOLUZIONE** → la derivata esalta le caratteristiche delle bande sovrapposte che vengono registrate dal normale spettro A/λ . La struttura che ne risulta rende lo spettro adatto a rilevare piccole differenze altrimenti non distinguibili

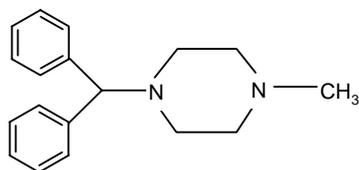
- ♥ **DISCRIMINAZIONE VERSO LE BANDE PIÙ STRETTE** → le bande derivate risultano tanto più pronunciate quanto più strette sono le bande dello spettro di assorbimento. Viene quindi esaltata la differenza fra bande larghe e bande strette

Da un punto di vista pratico le condizioni migliori per la registrazione della derivata vanno stabilite di volta in volta; i parametri significativi sono:

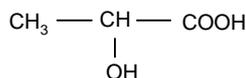
- il rapporto S/N (segnale/disturbo)
- l'ordine (n) della derivata ($dA/d\lambda$)
- l'intervallo spettrale ($d\lambda$)

ESEMPI DI ANALISI QUANTITATIVA

DETERMINAZIONE DELLA CICLIZINA LATTATO IN UNA PREPARAZIONE INIETTABILE



Ciclizina



Acido Lattico

- 1) Diluire 5 ml di soluzione presente nella fiala a 100 ml con H₂SO₄ 1M
- 2) Aggiungere 2 g di NaCl a 20 ml della soluzione
- 3) Estrarre con 2 porzioni da 50 ml di etere etilico
- 4) Aggiungere 20 ml di NaOH 5M
- 5) Estrarre con tre porzioni da 50 ml di etere etilico
- 6) Riunire gli estratti eteri e lavare con due porzioni da 10 ml di una soluzione satura di NaCl
- 7) Estrarre la fase eterea con 2 porzioni da 25 ml di H₂SO₄ 0,05 M, e poi con due porzioni da 10 ml di H₂O
- 8) Riunire gli estratti acidi e acquosi neutri e diluire con H₂O a 100 ml
- 9) Prelevare 5 ml di questa soluzione e diluirli a 200 ml con H₂SO₄ 0,05 M
- 10) Misurare l'Assorbanza della soluzione acida risultante a 225 nm

Calcolare la % P/V di Ciclizina Lattato nella preparazione iniettabile, tenendo conto dei seguenti dati:

- ♥ A (1%, 1 cm) a 225 nm → 331
- ♥ Volume saggiato → 5 ml
- ♥ A misurata → 0,413
- ♥ Cuvetta da 1 cm

1° diluizione ----- 5 → 100 ml (diluito 20 volte)

2° diluizione ----- 20 → 100 ml (diluito 5 volte)

3° diluizione ----- 5 → 200 ml (diluito 40 volte)

Diluizioni totali (*fattore di diluizione*) ----- 20 x 5 x 40 = 4000

CONCENTRAZIONE DELLA PREPARAZIONE INIETTABILE DILUITA

$$Conc = \frac{A}{A_{(1\%, 1cm)}} = \frac{0,413}{331} = 0,00124 \text{ g / 100ml}$$

CONCENTRAZIONE DELLA SOLUZIONE ORIGINALE

$$Conc = 0,001248 \cdot 4000 = 4,992 \text{ g / 100 ml}$$

DETERMINAZIONE DELLA FURASEMIDE IN FIALA DI LASIX

- 1) Il contenuto di una fiala di furosemide, contenente 20 g di farmaco, si trasferisce in un matraccio tarato da 100 ml
- 2) Si aggiunge una soluzione di NaOH 0,1 m preparata di fresco
- 3) Si agita bene per portare la sostanza in soluzione e si porta a volume
- 4) Si preleva una porzione dell'estratto pari a 5 ml, si trasferisce in un altro matraccio e si porta al volume di 50 ml con NaOH 0,1 M
- 5) Si misura l'assorbanza dell'estratto diluito alla lunghezza d'onda di 271 nm

Il valore di A (1%, 1 cm) in soluzione di NaOH 0,1 M è 580.

Diluizione ----- 5 → 50 ml (diluito 10 volte)

$A_{\text{misurata}} \rightarrow 1,21$

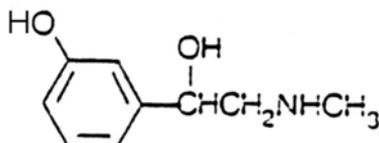
$$Conc = \frac{A}{A_{(1\%, 1cm)}} \cdot f_{\text{diluizione}} = \frac{1,21}{580} \cdot 10 = 0,0208 \text{ g / 100ml}$$

Determino quindi la % di Furosemide a partire dagli iniziali 20 mg (0,02 g):

$$\frac{0,0208 \text{ g}}{0,02 \text{ g}} \cdot 100 = 104\%$$

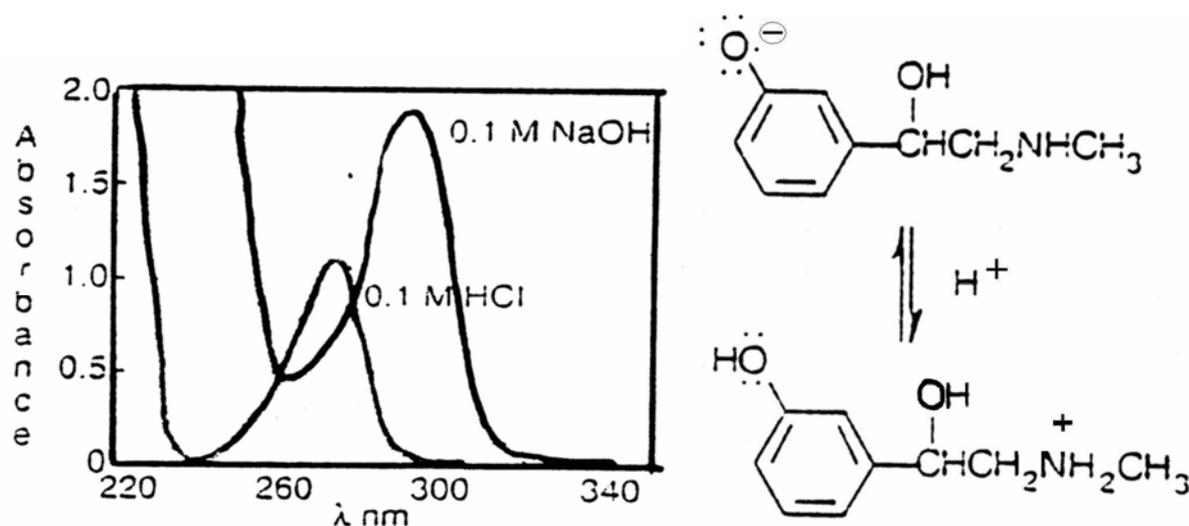
DETERMINAZIONE DEL pKa DI UN GRUPPO IONIZZABILE

Prendiamo in considerazione la FENILEFRINA



Il grado di ionizzazione influenza l'assorbimento di questa molecola, che contiene gruppi ionizzabili, quali i gruppi OH e NH.

In questo caso, in ambiente alcalino prevale la forma non ionizzata, la cui $\lambda_{\max} = 292$ ($\epsilon = 182$)
In ambiente acido prevale invece la forma cationica⁽⁺⁾, la cui $\lambda_{\max} = 273$ ($\epsilon = 110$)



A questo punto si devono determinare:

- 1) l'assorbanza della specie completamente ionizzata (A_i)
- 2) l'assorbanza della specie non ionizzata (A_{ni})
- 3) l'assorbanza di un tampone a pH noto (A_{tampone})

Conoscendo questi dati posso determinare il pKa della molecola dalla formula:

$$pKa = pH + \log \frac{A_i - A_{\text{tampone}}}{A_{\text{tampone}} - A_{ni}}$$

La lunghezza d'onda alla quale viene effettuata la determinazione viene accuratamente scelta, e in particolare si sceglie la lunghezza d'onda alla quale ($A_i - A_{ni}$) è massima.

Il pH del tampone, invece, viene scelto conoscendo più o meno l'ordine di grandezza del pKa. Più precisamente il pH viene scelto in modo che sia ± 1 unità rispetto al valore del pKa

Determinazioni accurate si fanno ripetendo le letture a valori di pH vicini.

Nel caso della fenilefrina:

$\lambda = 292 \text{ nm}$ → è la lunghezza d'onda alla quale l'assorbanza della forma non ionizzata è trascurabile

$$A_i (\text{NaOH } 0,1 \text{ N}) = 1,224$$

$$A_{ni} (\text{HCl } 0,1 \text{ N}) = 0,02$$

$$A_{\text{tampone (pH } 8,5)} = 0,349$$

$$pKa = 8,5 + \log \frac{1,224 - 0,349}{0,349 - 0,02} = 8,5 + 0,42 = 8,92$$

DETERMINAZIONE DEL COEFFICIENTE DI RIPARTIZIONE DI UN FARMACO

Proprietà fondamentale, il coefficiente di ripartizione indica la distribuzione di farmaco tra due liquidi immiscibili tra loro e permette perciò di valutare l'assorbimento e la distribuzione del farmaco nell'organismo.

Dipende dalla temperatura e viene espresso come:

$$P = \frac{C_{\text{farmaco nella fase oleosa}}}{C_{\text{farmaco nella fase acquosa}}}$$

Tuttavia in genere l'equazione per la definizione del coefficiente di ripartizione P può essere espressa anche in forma logaritmica, questo per poter confrontare facilmente anche valori di P molto diversi:

$$\log P = \log C_{\text{fase oleosa}} - \log C_{\text{fase acquosa}}$$

Se > 1 il farmaco è lipofilo e diffonde facilmente

Se < 1 il farmaco è idrofilo e non diffonde facilmente

Ad esempio, se $P = 10^{-4}$ parliamo di una sostanza poco lipofila.

Se $P = 10^2$ parliamo invece di una sostanza molto lipofila

La misurazione del coefficiente di ripartizione si basa sull'impiego di separatori che possono essere attivati manualmente o meccanicamente; in questo caso è però importante:

- ♥ la termostatazione del sistema (visto che P dipende dalla temperatura)
- ♥ l'equilibratura preventiva delle due fasi (nel caso i due liquidi siano parzialmente miscibili)
- ♥ la messa a punto di un metodo analitico per il dosaggio del farmaco

Su quest'ultimo punto diciamo che la determinazione del farmaco nelle due fasi può essere effettuata per via spettroscopica, giacché sappiamo che l'Assorbanza di una soluzione è proporzionale alla concentrazione dell'analita in essa disciolto.

Praticamente si procede aggiungendo il farmaco alle due fasi e agitando; quindi si effettua la separazione delle fasi e si dosa il farmaco.

Dai valori ottenuti ricavo P e $\log P$.

Per quanto riguarda la scelta delle due fasi, questa va considerata alla luce del fine che si vuole raggiungere misurando il coefficiente di ripartizione.

Lo scopo è quello di correlare un parametro chimico fisico con l'assorbimento e la ripartizione del farmaco nell'organismo, per cui la scelta della coppia di solventi deve essere tale da simulare le condizioni in cui si trova il farmaco all'interno dell'organismo (compartimento che in genere ha una componente lipofila e una idrofila)

Una delle due fasi sarà perciò lipidica (solventi organici o oli), mentre l'altra sarà acquosa (acqua o soluzione tampone); la coppia più usata è n-ottanolo/acqua.

In definitiva l'entità dell'assorbimento di un farmaco dipende dal suo pK_a , dalla sua lipofilia e dal pH del mezzo.