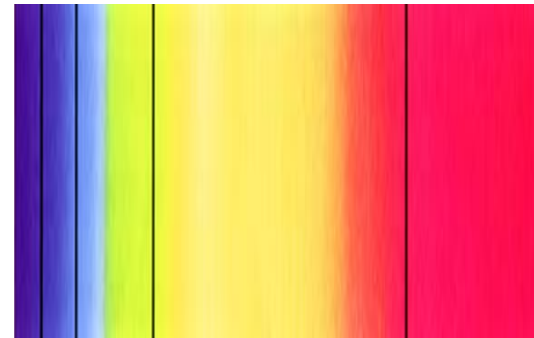




DIPARTIMENTO DI FARMACIA

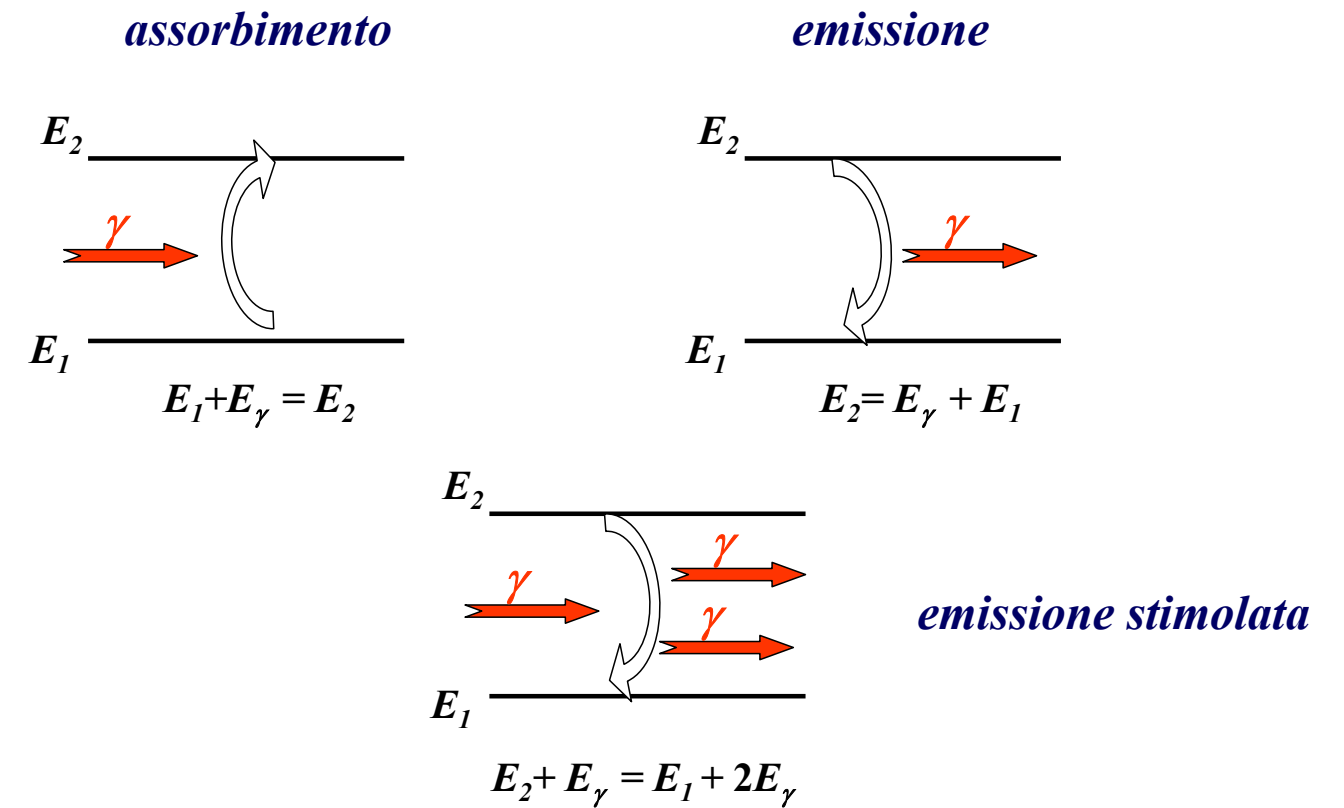
Spettroscopia



C. A. Mattia



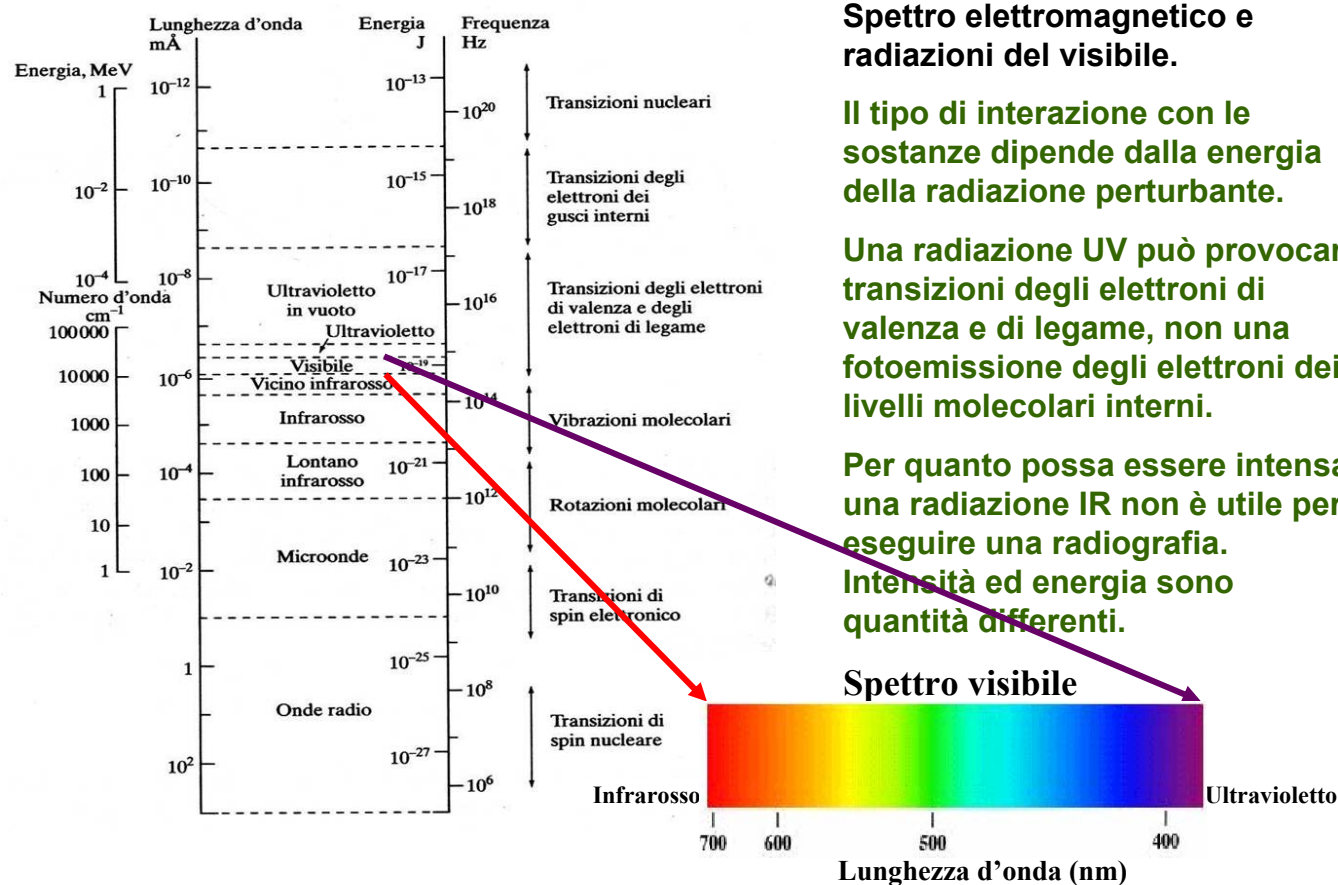
Interazione radiazione-materia



C. A. Mattia



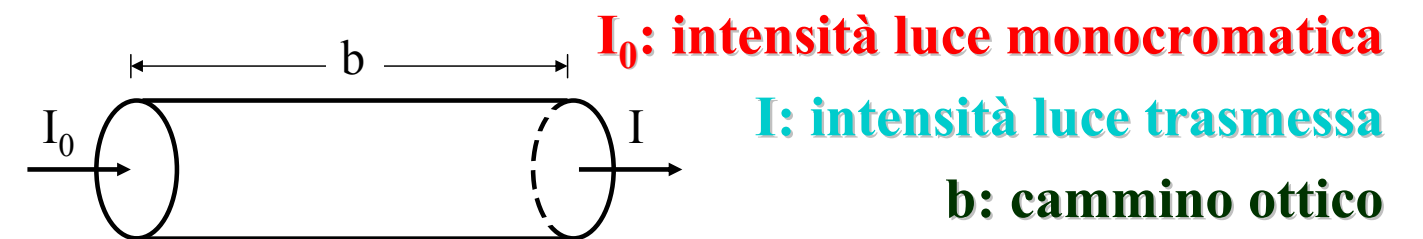
Regioni spettro



C. A. Mattia



Legge di Lambert-Beer



$$\ln I = -kb + \ln I_0$$

k: costante dipendente dal mezzo assorbente

$$-\ln I/I_0 = kb$$

$$I/I_0 = T \text{ (trasmittanza)}$$

$$-\log T = A \text{ (assorbanza)}$$

$$A = \epsilon bc \text{ (c: concentrazione molare)}$$

ϵ : coefficiente di assorbimento molare

ϵ : coefficiente di estinzione molare

C. A. Mattia



Spettroscopia atomica

Il campione è trasformato in atomi con metodi vari di riscaldamento.

Il vapore atomico subisce un'interazione con la luce oppure con un campo magnetico; l'entità di questa interazione fornisce la risposta analitica, qualitativa e quantitativa.

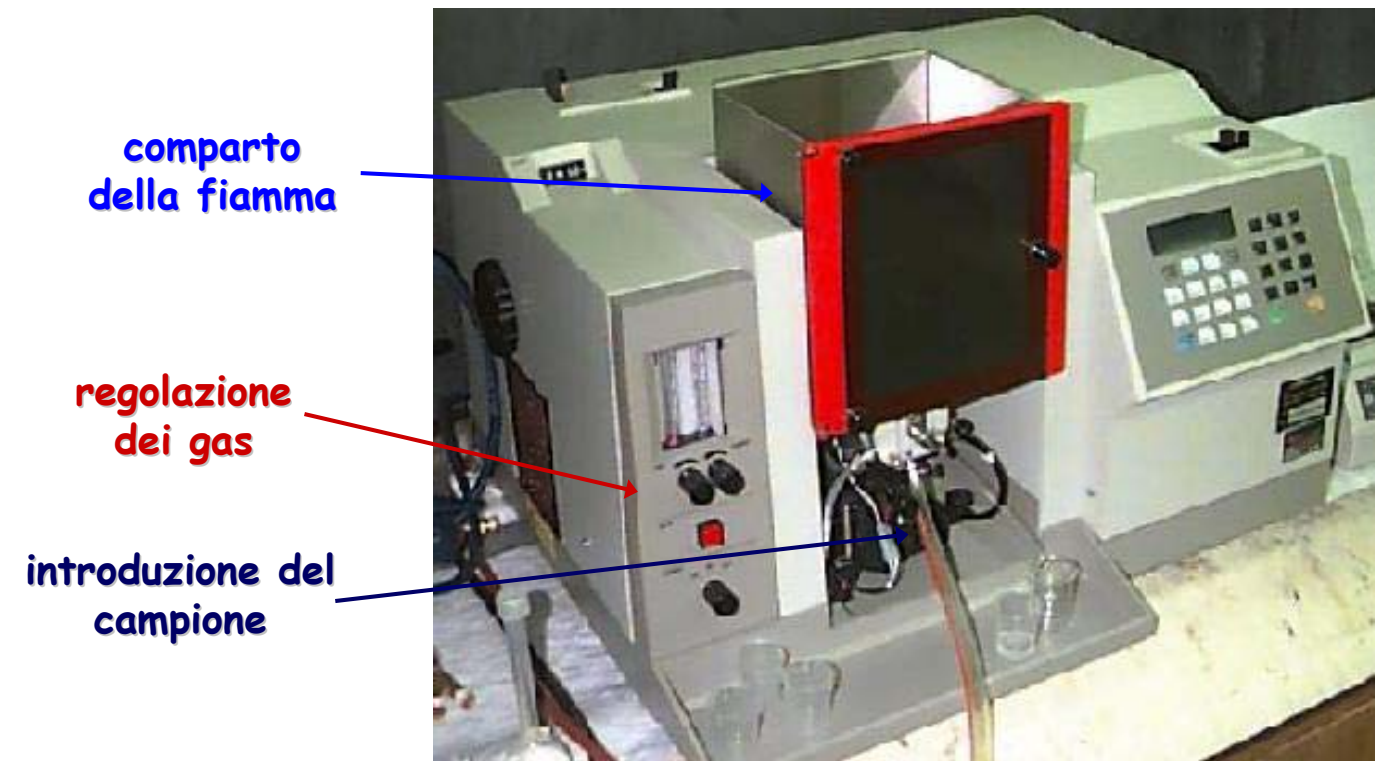
Assorbimento atomico: il vapore è irraggiato con una radiazione monocromatica assorbibile solo dagli atomi di un determinato elemento.

Emissione atomica: il vapore subisce un riscaldamento ulteriore e gli atomi emettono il surplus di energia sotto forma di radiazione luminosa.

Spettrometria di massa: il vapore subisce un riscaldamento ulteriore e gli atomi si trasformano in ioni i quali sono separati e rivelati con uno spettrometro di massa.



Assorbimento atomico a fiamma (FAAS)

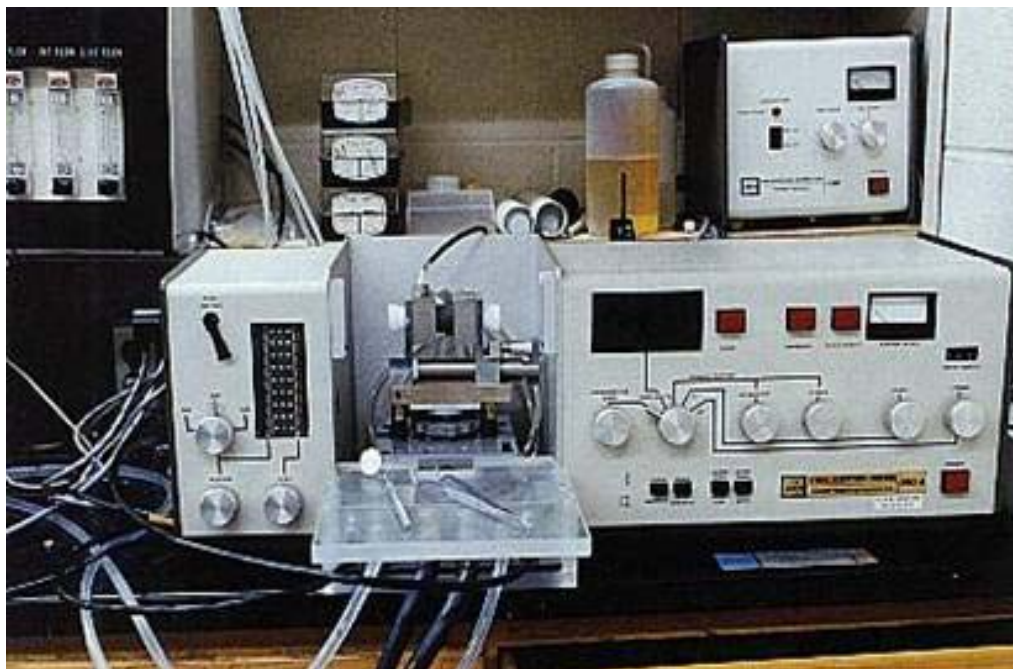


Combustibile (acetilene) + comburente (aria) ⇒ fiamma



Atomizzazione elettrotermica (ETAAS)

Atomizzazione elettrotermica (ET): atomizzazione mediante una corrente elettrica ad alta potenza che crea un riscaldamento per effetto Joule.

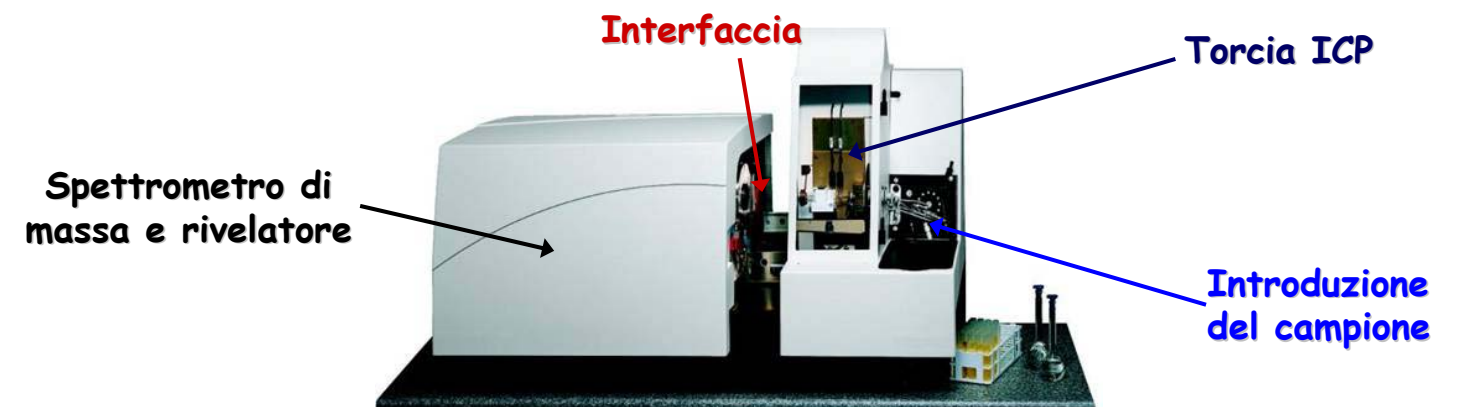


ICP-MS

La spettrometria di massa a plasma accoppiato induttivamente (ICP-MS) è una tecnica analitica basata sull'utilizzo della spettrometria di massa abbinata al plasma accoppiato induttivamente.

La tecnica è molto sensibile e in grado di determinare diverse sostanze inorganiche (metalliche e non) presenti in concentrazioni inferiori a una parte per miliardo.

La torcia ICP è usata per produrre la ionizzazione (il plasma è generato dall'effetto di un campo di radiofrequenza su una corrente di gas) e lo spettrometro di massa per la separazione e rivelazione degli ioni prodotti.





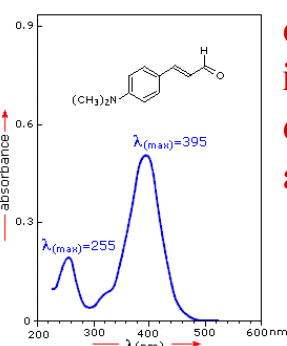
Spettrofotometria UV

Il campione è irraggiato con un intervallo più o meno ampio di λ .

La spettroscopia è basata su transizioni di elettroni tra livelli energetici diversi. La risposta è visibile sotto forma di **spettro di assorbimento**.

Le transizioni elettroniche promosse dalla coinvolgono anche i vari livelli vibrazionali. Per questo motivo lo spettro è del tipo a bande.

Questa caratteristica complica notevolmente il riconoscimento e la quantificazione degli analiti in miscela.



Gli spettrofotometri UV-visibile sono molto diffusi per la loro semplicità di utilizzo e versatilità e per il basso costo; quasi tutte le sostanze organiche presentano assorbimenti nel range strumentale (180-800nm).



Spettrofotometria IR

Il campione è irraggiato con un intervallo più o meno ampio di λ .

Le radiazioni assorbite corrispondono ai gruppi funzionali delle molecole, i quali assorbono l'energia equivalente per vibrare. La risposta è visibile sotto forma di **spettro di assorbimento**.

Gli spettrofotometri IR sono, in genere, strumenti molto compatti.

I campioni liquidi sono analizzati tal quali, mentre per i campioni solidi si prepara una pastiglia di KBr nel quale si disperde il campione polverizzato; è possibile analizzare anche i campioni gassosi.



Attività ottica

Luce non polarizzata

- vettore elettrico oscilla in tutte le direzioni.

Luce piano polarizzata (linearmente polarizzata)

- vettore elettrico oscilla in un piano.

Luce circolarmente polarizzata

- piano di oscillazione ruota durante la propagazione

- rotazione antioraria (sinistra),
- rotazione oraria (destra).

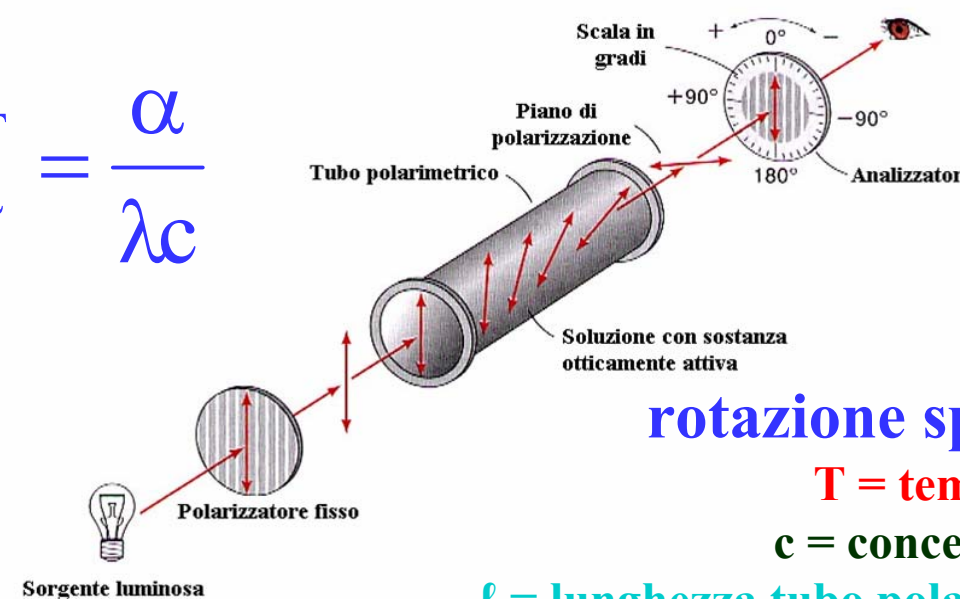
- la luce piano polarizzata è composta da due luci circolarmente polarizzate sinistra e destra con stessa intensità e fase.

Ogni luce ha proprie caratteristiche (indice di rifrazione).



Molecole otticamente attive (chirali)

$$\alpha_{\lambda}^T = \frac{\alpha}{\lambda c}$$



rotazione specifica

T = temperatura

c = concentrazione

l = lunghezza tubo polarimetrico

Destrogiro: mezzo che provoca la rotazione a destra (+)

Levogiro: mezzo che provoca la rotazione a sinistra (-)



Metodi quantitativi

Nella chimica analitica strumentale la quantificazione di un analita viene ottenuta *indirettamente* a partire da un *segnale analitico*.

Vi sono tre fondamentali metodi quantitativi:

- 1) metodo della curva di taratura;
- 2) metodo delle aggiunte standard;
- 3) metodo dello standard interno.

In genere viene misurata una proprietà fisica o chimico-fisica dell'analita in esame, o di un suo derivato, proprietà che possono essere misurate strumentalmente, e che sono utili per l'analisi quantitativa:

- proprietà elettriche;
- interazioni con le radiazioni elettromagnetiche;
- rapporto massa/carica (spettrometria di massa).



Metodo della curva di taratura

Si preparano vari campioni contenenti *quantità note* di analita (*standard*) nella stessa *matrice* del campione incognito o in una *matrice equivalente*.

Si sottopone ciascuno *standard* alla misura strumentale.

In generale si trasformano i dati mediante funzioni che portano a relazioni quasi lineari, spesso la legge è nota (p.e. il potenziale è proporzionale al logaritmo della concentrazione).

Si riportano in grafico i dati (segnale – concentrazione).

Si applica un metodo statistico (*regressione lineare - metodo dei minimi quadrati*) per determinare la curva che meglio si adatta ai punti sperimentali, ovvero si esegue un *fitting*.

Si sottopone il campione incognito alla misura strumentale, rilevandone il segnale.

Si esegue una *interpolazione* sulla curva di taratura per calcolare il valore di concentrazione che corrisponde al valore del segnale.



Metodo della curva di taratura

Si preparano 4 standard di un metallo M^{n+} , a concentrazione C_1, C_2, C_3 e C_4 .

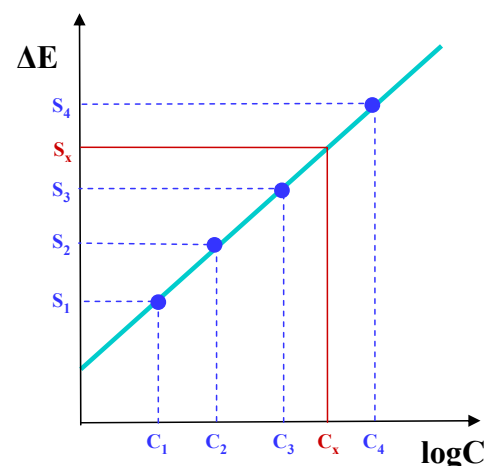
Si misura (potenziometria) il ΔE associato ad ogni standard (S_1, S_2, S_3 e S_4).

Si costruisce il grafico riportando S in funzione di $\log C$, tenendo conto della legge di Nernst.

$$\Delta E = \Delta E^\circ + \frac{0,0592}{n} \log[M^{n+}]$$

Si traccia la miglior retta che passa per i punti sperimentali.

Si misura il ΔE (S_x) per il campione incognito (C_x) e se ne determina la concentrazione come valore dell'ascissa.



Esercizio

Un elettrodo ionoselettivo al calcio fornisce le seguenti letture di potenziale:

C (M)	$3,16 \cdot 10^{-5}$	$3,16 \cdot 10^{-4}$	$3,16 \cdot 10^{-3}$	$3,16 \cdot 10^{-2}$	$3,16 \cdot 10^{-1}$
E (mV)	-75,0	-45,0	-20,0	10,0	40,0.

Calcolare la concentrazione in una soluzione incognita con $E = -5.0\text{mV}$

Si costruisce il grafico riportando E in funzione di $\log C$ (legge di Nernst).

I valori di $\log C$ sono rispettivamente -4,50, -3,50, -2,50, -1,50 e -0,50.

Si traccia graficamente la miglior retta passante per i punti sperimentali.

Si traccia il segmento orizzontale (a ordinata -5,0) fino alla retta.

Si legge l'ascissa del punto di intersezione tra il segmento e la retta ($x_{-0,5} = -2,04$).

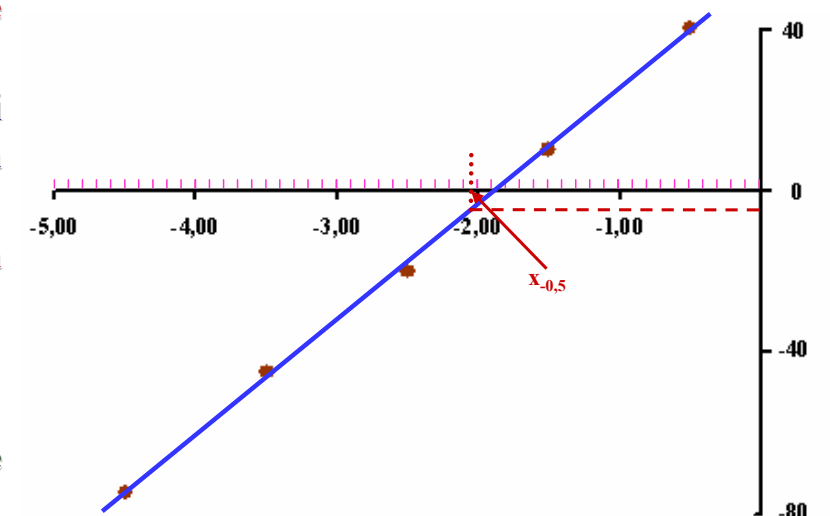
Si calcola la concentrazione dalla relazione $x = \log C$.

$$C = 10^{-2,04}$$

$$C = 9,12 \cdot 10^{-3}\text{M}$$

Con i minimi quadrati si ottiene

$$x_{-0,5} = -2,044 \text{ e } C = 9,04 \cdot 10^{-3}\text{M}.$$





Metodo delle aggiunte standard

Si preparano n aliquote uguali dello stesso campione incognito.

Alle aliquote dalla 2 alla n si aggiungono quantità note (diverse) di analita puro, mentre non si fa alcuna aggiunta all'aliquota 1.

Si portano tutte le aliquote allo stesso volume, che può essere uguale a quello iniziale se le aggiunte sono state tali da non modificare significativamente il volume delle aliquote.

Si sottopone ciascuna soluzione alla misura strumentale.

Si riportano in grafico i punti sperimentali.

Si applica un metodo statistico (*regressione lineare – metodo dei minimi quadrati*) per determinare la retta che meglio si adatta ai punti sperimentali.

Si esegue una *estrapolazione* della retta in modo da determinare l'ascissa all'origine, che corrisponde all'opposto valore incognito.

C. A. Mattia

17



Metodo delle aggiunte standard

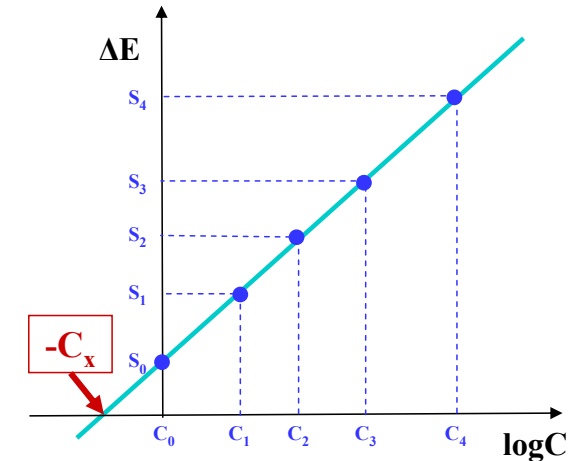
Si preparano 4 standard di un metallo M^{n+} , a concentrazione C_1, C_2, C_3 e C_4 , e 5 soluzioni del campione incognito.

Si aggiungono a 4 soluzioni incognite i 4 standard.

Si misura (potenziometria) il ΔE associato ad ogni soluzione ottenuta (S_0, S_1, S_2, S_3 e S_4) e si costruisce il grafico riportando S in funzione di $\log C$, tenendo conto della legge di Nernst.

Si traccia la miglior retta che passa per i punti sperimentali.

Si misura l'intercetta della retta con l'asse delle ascisse, che corrisponde, a meno del segno, al valore della concentrazione incognita.



C. A. Mattia

18



Esercizio

10,0ml di un campione di cromo in acqua vengono posti in 5 matracci da 50,0ml, e dopo aver aggiunto volumi diversi di uno standard 13,5ppm di cromo, le soluzioni sono portate al volume. Determinare la concentrazione del cromo nel campione dalle assorbanze (A) delle soluzioni.

Volumi standard (ml)	0,0	8,0	16,0	24,0	32,0
Assorbanze	0,22	0,37	0,49	0,62	0,77

La concentrazione di cromo standard in ogni soluzione è $C_i = 13,5 \cdot V_i / V_f$:

$C_0 = 0,00\text{ppm}$, $C_1 = 2,16\text{ppm}$, $C_2 = 4,32\text{ppm}$, $C_3 = 6,48\text{ppm}$, $C_4 = 8,64\text{ppm}$.

Legge di Lambert–Beer: $A = k \cdot C$; si riporta A in funzione di C.

Si traccia la miglior retta che passa per i punti sperimentali (excel).

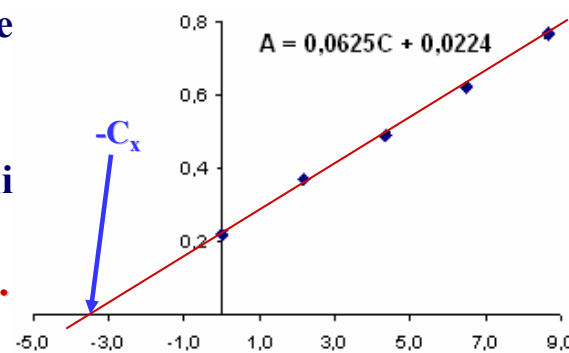
Si ricava l'intercetta della retta con l'asse delle ascisse dall'equazione della retta $y = ax + b$.

$y = 0 \Rightarrow x = -b/a = -0,0224/0,0625 = -3,58$.

La concentrazione incognita (C_x) in ogni soluzione sarà $-(-3,58) = 3,58\text{ppm}$.

$C_{\text{campione}} = C_x \cdot V_{\text{soluzione}} / V_{\text{campione}} = 3,58 \cdot 50,0 / 10,0$.

$C_{\text{campione}} = 17,9\text{ppm}$



C. A. Mattia

19



Metodo dello standard interno

Con il metodo dello standard interno si misura la concentrazione dell'analita riducendo le perdite dovute al trattamento per la preparazione del campione in una forma adatta alla misura.

Uno standard interno è un elemento o composto, di solito diverso dall'analita, ma con comportamento analogo, che viene aggiunto in quantità nota al campione (matrice) da analizzare.

Per l'analisi del contenuto di pesticidi nella frutta, il campione deve essere omogenato e sottoposto a estrazione con apposito solvente, causando delle perdite, anche marcate, dell'analita.

Addizionando, all'inizio dell'analisi uno standard al campione, le eventuali perdite, nelle operazioni successive, sono equivalenti e il rapporto tra standard ed analita rimane costante.

C. A. Mattia

20



Controllo di qualità

Il controllo di qualità descrive le misure da adottate per verificare la validità dei risultati ottenuti in un laboratorio.

Il suo scopo è assicurare che il sistema analitico funzioni correttamente.

Se la stessa misura è ripetuta più volte non si otterrà sempre lo stesso risultato, ma ci sarà una leggera variazione nelle risposte dovuta a lievi variazioni statistiche.

Il controllo di qualità è usato per controllare che queste fluttuazioni siano accettabili e non dovute a errori sistematici.

Il controllo di qualità può essere interno al laboratorio o esterno.

Il controllo di qualità interno si suddivide in due categorie:

- controllo di qualità del dato analitico, da effettuarsi per ogni gruppo di misure;**
- controllo di qualità del laboratorio, da effettuarsi periodicamente.**



Controllo di qualità del dato analitico

Il controllo di qualità del dato analitico è composto di sette elementi, che dovrebbero regolarmente far parte di ogni protocollo di analisi: calibrazione e sua verifica periodica, valutazione del recupero, analisi di bianchi, analisi di standard, analisi replicate, carte di controllo, campioni “ciechi”. In casi particolari si può ricorrere ad un ulteriore controllo consistente nell’analisi con due metodi diversi.

1 - La calibrazione con standard.

2 - Il recupero di quantità note di analita.

3 - L’analisi di bianchi.

4 - L’analisi di standard.

5 - Analisi replicate.

6 - Le carte di controllo.

7 - I campioni “ciechi”.



La calibrazione con standard

Occorre misurare almeno tre differenti diluizioni dello standard (i metodi EPA prescrivono la calibrazione da tre soluzioni standard a cinque soluzioni standard).

La curva di calibrazione va verificata periodicamente (anche giornalmente), a seconda della stabilità dello strumento di misura, analizzando uno o più standard.

Non ha senso riportare valori al di sopra dello standard più alto a meno che non si sia dimostrato che l’intervallo lineare è più ampio, e che il valore è inferiore almeno 1,5 volte lo standard più alto.

Il più basso valore che si può riportare è il limite di rivelabilità (MDL), se lo standard di calibrazione più basso ha concentrazione non superiore di 10 volte il limite stesso.

Tuttavia quando è possibile è meglio evitare estrapolazioni e fare misure solo nell’intervallo di concentrazione tra lo standard inferiore e superiore.



Il recupero di quantità note di analita

Aggiungendo al campione quantità note di analita e valutandone il recupero si evidenzia l’eventuale presenza di perdite durante i vari stadi dell’analisi e la presenza di effetti matrice.

Il recupero della frazione di analita aggiunto è un argomento a favore della qualità del dato analitico, ma non esclude del tutto la presenza di effetti matrice (non sempre l’analita già presente nel campione, e magari fortemente legato alla sua struttura, si comporta esattamente come la frazione aggiunta dall’esterno).

Si raccomanda di aggiungere l’analita alla matrice e lasciarlo in contatto almeno 12 ore prima delle successive operazioni, in modo che possa avvenire un’interazione tra matrice e analita stesso.

Per valutare l’efficienza di estrazione dei composti organici da una matrice si aggiungono inoltre al campione uno o più composti con caratteristiche chimiche simili agli analiti di interesse (“surrogati”) presumibilmente assenti nel campione originario.



L'analisi di bianchi

Almeno il 5% dei campioni analizzati dovrebbe essere costituito da bianchi.

In questo modo si verifica la purezza dei reagenti e il bianco totale della procedura.

Il bianco della procedura è determinato seguendo il procedimento in ogni suo stadio ed usando le stesse quantità di reagenti impiegate per i campioni.

È necessario inoltre analizzare un bianco dopo la misura di ogni campione con concentrazione maggiore dello standard più alto o comunque quando c'è il pericolo di effetti memoria.



L'analisi di standard

Periodicamente si devono analizzare standard diversi da quelli usati per la calibrazione.

Si possono seguire due procedure:

- analisi di soluzioni a concentrazione nota di analita preparate in laboratorio, in genere a concentrazione tra 5 e 50 volte il limite di rivelabilità del metodo;

- analisi di materiali di riferimento certificati. Questa seconda opzione è da preferirsi ogni qual volta siano disponibili materiali certificati per l'analita cercato. Ad esempio ci sono materiali dell'istituto statunitense National Institute of Standard and Technology (NIST), del National Research Council canadese, e del BCR europeo. Se si utilizzano materiali di riferimento interni al laboratorio, essi vanno preparati indipendentemente dai campioni usati per la calibrazione.



Analisi replicate

L'analisi ripetuta dello stesso campione deve essere fatta per il 5% o più dei campioni per stabilire la precisione dell'analisi.

Analizzando più volte la stessa soluzione di campione dopo il pretrattamento si valuta la ripetibilità del sistema di misura.

Sottoponendo più aliquote di campione all'intero procedimento di analisi si valuta la ripetibilità di tutto il metodo e l'omogeneità del campione stesso.



Le carte di controllo

Una carta di controllo è semplicemente un diagramma in cui i valori di una grandezza sono riportati in funzione del tempo. Un esempio sono i valori ottenuti dalla misura di soluzioni standard. Si ottiene un grafico in cui sono visibili le fluttuazioni naturali del valore misurato in funzione del tempo.

Per decidere i limiti di accettabilità, lo standard viene misurato più volte e i risultati vengono utilizzati per calcolare la media e la deviazione standard.

Alcuni andamenti del grafico indicano la presenza di problemi e richiedono che l'analista prenda provvedimenti (ad esempio controllare il funzionamento dello strumento e ricalibrarlo).

Un'altra funzione della carta di controllo è mostrare un miglioramento nella precisione del metodo. Se le misure raramente o mai superano i limiti di allarme, ricalcolare i limiti usando i venti dati più recenti.



I campioni “ciechi”

I campioni “ciechi” sono repliche di campioni o soluzioni a concentrazione nota, aventi una concentrazione tra 5 e 50 volte maggiore del limite di rivelabilità del metodo, che vengono inseriti nel blocco di campioni da analizzare all’insaputa dell’analista: l’analista può essere informato della presenza di campioni “ciechi”, ma non deve sapere quali sono.

La competenza dell’operatore viene valutata dalla precisione e accuratezza dell’analisi di tali campioni.

Essi possono essere inviati dal cliente oppure dal responsabile del laboratorio.



Il controllo di qualità esterno

I laboratori dovrebbero cercare una valutazione indipendente della propria competenza. Ci sono più possibilità, con diversi gradi di difficoltà e impegno richiesto:

- partecipazione a studi interlaboratorio;
- richiesta di un parere di un consulente esterno;
- richiesta di accreditamento del laboratorio da parte dell’ente preposto.



Validazione metodo analitico

Nonostante esistano metodi ufficiali di analisi sviluppati da numerose organizzazioni riconosciute a livello nazionale o internazionale, ci possono essere situazioni in cui tali metodi non sono utilizzati, oppure è possibile che non esistano ancora metodiche standard per un particolare composto.

Può essere quindi necessario sviluppare un metodo di analisi e validarlo.

La validazione è necessaria anche quando si apportano modifiche ad un metodo esistente per soddisfare particolari esigenze.



La procedura di validazione

Per validare un metodo di analisi si procede in tre stadi:

- valutazione del limite di rivelabilità del metodo e della accuratezza e ripetibilità (da parte di un singolo operatore);
- **analisi di campioni incogniti;**
- valutazione della robustezza del metodo (è particolarmente importante determinare questa caratteristica se il metodo verrà proposto come metodo standard, inoltre vanno individuati gli stadi del metodo in cui è importante operare rigorosamente e quelli in cui è possibile una minore attenzione).