

Capitolo 1

Solubilità

1.1 Teoria

A differenza dei gas, solidi e liquidi sono caratterizzati da significative forze d'interazione intermolecolari. Nel processo di dissoluzione vengono meno le forze di attrazione intermolecolare esistenti tra le molecole della sostanza che si scioglie, tra le molecole di solvente mentre si instaurano nuove interazioni tra molecole di solvente e soluto. Il bilancio entalpico di questo processo è generalmente negativo (il processo, infatti, è quasi sempre endotermico) ma è favorito termodinamicamente dal parametro entropico: è infatti evidente l'aumento di entropia del solido che passa in soluzione.

Una approfondita conoscenza del processo di dissoluzione è cruciale in ambito farmaceutico per le sue ricadute sull'assorbimento e quindi la biodisponibilità dei farmaci. Risulta quindi chiara l'utilità di poter prevedere "in silico" la solubilità di new chemical entities (*NCE*) durante le prime fasi di ricerca e sviluppo di un farmaco.

Come "rule of thumb" si può dire, in generale, che *il simile scioglie il simile* (es. solventi apolari per sostanze lipofile e polari per composti idrofili), oppure, più propriamente "il simile cerca il simile" definizione che considera anche le molecole anfipatiche come i tensioattivi dove una porzione si comporta in un modo e l'altra in un altro. Questo perché per formare le nuove interazioni solvente-soluto serve che l'entità dei legami tra le molecole del solvente e quelle del soluto siano simili, altrimenti si ha immiscibilità dei componenti. Ad esempio l'olio è immiscibile in acqua a causa della molto maggiore forza che lega tra loro le molecole di acqua (legami idrogeno) rispetto alle deboli interazioni idrofobiche dell'olio, pertanto le molecole di olio saranno "respinte" da quelle di acqua e di conseguenza formeranno una fase distinta.

1.1.1 Forze di Van der Waals

Le forze di interazione intermolecolari nel loro complesso sono spesso impropriamente indicate come *'forze di Van de Waals*, mentre più propriamente possiamo distinguere le seguenti componenti delle forze intermolecolari:

- interazioni dipolo-dipolo, ovvero le forze di *Keesom* tra dipoli permanenti, di natura elettrostatica, possono essere attrattive o repulsive.

- interazioni dipolo-dipolo indotto, forze di *Debye*, tra un dipolo permanente e il dipolo indotto in una molecola adiacente, sono dette di induzione o polarizzabilità.
- interazioni dipolo indotto-dipolo indotto, forze di *London* o dispersive, è un'interazione attrattiva tra molecole o atomi non polari
- interazioni ione-dipolo
- legame ad idrogeno
- interazione idrofobica

Di cui le forze di Van der Waals propriamente dette sono costituite dalle sole prime tre componenti, ovvero le più deboli. Un'interazione di VdW, infatti, è un'interazione attrattiva tra due molecole che dipende dalla distanza internucleare con $1/r^6$.

1.1.2 Interazioni apolari

Le molecole non polari (compresi i gas nobili) si attraggono debolmente tra loro anche se nessuna delle due molecole che interagiscono possiede momenti di dipolo permanenti.

Ci sono molte evidenze dell'esistenza di questo tipo di interazioni, come la formazione di fasi condensate in molecole non polari (es. idrogeno ed elio liquidi) o anche solo il fatto che il benzene a temperatura ambiente sia liquido. L'interazione tra molecole non polari¹ dipende dai dipoli transienti presenti in tutte le molecole, come frutto delle fluttuazioni nelle posizioni istantanee degli elettroni.

Queste interazioni dipolo indotto-dipolo indotto sono chiamate interazioni dispersive o forze di London (dallo scopritore, Fritz London).

L'intensità di questa interazione (è una VdW quindi $\propto 1/r^6$) dipende dalla polarizzabilità della prima sostanza (quella in cui si genera il momento istantaneo di dipolo) in quanto la formazione del dipolo dipende dall'intensità con cui il nucleo esercita controllo sugli elettroni esterni. Dipende anche dalla polarizzabilità del secondo materiale in quanto quest'ultima indica quanto prontamente il dipolo può essere indotto nella molecola.

Un'approssimazione delle forze di London è data da:

$$C = \frac{3}{2} \alpha'_1 \alpha'_2 \frac{I_1 I_2}{I_1 + I_2}$$

dove I_1 ed I_2 sono le energie di ionizzazione della prima e della seconda sostanza ed α' i volumi di polarizzabilità (vedi la nota sulla polarizzabilità a pagina 3).

1.1.3 Interazioni polari

Le interazioni polari s'instaurano quando è presente almeno una sostanza polare, ovvero una sostanza la cui densità elettronica è permanentemente squilibrata a livello molecolare, a causa della composizione elementare della molecola e della

¹Si noti la sottile differenza tra non polare e apolare, dove quest'ultimo è generalmente inteso come "estremamente poco polare"

sue geometria². Ad esempio acqua ed alcool etilico sono sostanze fortemente polari, il toluene è molto debolmente polare mentre gli alcani a catena lunga sono di fatto apolari.

Forze di Keesom

Risulta intuitivo che molecole polari tenderanno disporsi con i poli opposti vicini, in una disposizione “testa-coda”, aumentando l’entità delle forze intermolecolari. Tali interazioni *dipolo-dipolo* sono le *forze di Keesom*.

Forze di Debye

Le forze intermolecolari tra *dipolo e dipolo indotto*, invece, anche note come *forze di Debye*, si instaurano quando una molecola di per sé non polare acquisisce un dipolo in seguito all’avvicinamento di una carica elettrostatica (il dipolo di una molecola polare). L’entità di tali forze dipenderà pertanto dall’intensità del dipolo della molecola polare, dalla polarizzabilità (α) della sostanza apolare. Nel complesso, come per le altre interazioni di VdW, l’intensità è inversamente proporzionale alla sesta potenza della distanza tra le cariche. L’espressione completa delle forze di Debye è riportata nella formula (1.1).

$$C = \frac{\mu_1^2 \alpha'_2}{4\pi\epsilon_0} \quad (1.1)$$

Dove i pedici 1 indicano il dipolo ed i 2 il dipolo indotto, pertanto μ_1 è il momento di dipolo della molecola polare mentre α'_2 è la polarizzabilità della molecola in cui è indotto il dipolo³. La forza di queste interazioni è di $\approx 2 - 10 \text{kJ mol}^{-1}$.

Forze di induzione di Keesom e interazioni di Debye nel complesso sono dette interazioni polari.

1.1.4 Interazioni Ioniche

Le interazioni ioniche si instaurano tra ioni, ovvero tra cariche elettrostatiche. Cariche opposte si attraggono e cariche dello stesso segno si respingono, come si evince dal segno della forza di Coulomb:

$$F = \frac{q_1 \cdot q_2}{\epsilon r^2} \quad (1.2)$$

Un altro parametro importante, però, è la costante dielettrica del mezzo, ϵ .

La costante dielettrica di un mezzo è definita come il rapporto tra la capacità di un condensatore avente tra i piatti il mezzo considerato e quella dello stesso

²Ricorda, ad esempio, come pur presentano legami fortemente polarizzati la CO_2 sia apolare in quanto i momenti di dipolo dei due doppi legami carbonio-ossigeno si annullano essendo uguali in intensità ed opponendosi in verso, a causa della conformazione geometrica del carbonio

³La polarizzabilità (α è la proprietà degli atomi di acquisire momento magnetico quando sono sottoposti a campi elettrici. In particolare α è la costante di proporzionalità tra il dipolo indotto (μ^*) ed il campo (E) applicato: $\mu^* = \alpha \cdot E$. Avendo *alpha* u.d.m “scomode ($\text{C}^2 \text{m}^2 \text{J}^{-1}$) spesso è espressa come “volume di polarizzabilità“ (α' , u.d.m. m^3) definito come $\alpha' = \alpha / (4\pi\epsilon_0)$

Molecole apolari		Molecole polari	
Metano	1,655	Acqua	80,10
Tetraclorometano	2,238	Ammoniaca	16,9
Cicloesano	2,024	Metanolo	33,0
Benzene	2,283	Etanolo	25,3

Tabella 1.1: Costanti dielettriche a 293K, tranne che per metano (-173°C) ed ammoniaca (298K). Fonte: HCP - Handbook of chemistry and physics, CRC Press (2000).

condensatore avente tra i propri piatti il vuoto.

$$\varepsilon = \frac{C_x}{C_0}$$

La costante dielettrica ε (o permittività relativa) può essere vista come la capacità del mezzo di separare due cariche, e pertanto è correlata con la solubilità dei composti ionici.

La tabella mostra i valori di costante dielettrica per alcune sostanze.

1.1.5 Legame ad idrogeno

A differenza delle interazioni polari e delle interazioni dipolo indotto-dipolo indotto, che sono presenti nelle molecole indipendentemente dalla loro struttura, il legame ad idrogeno dipende dalla costituzione molecolare.

Il legame ad idrogeno è un'interazione attrattiva tra due specie, che insorge dal collegamento tra $A - H \cdots B$, dove A e B sono elementi altamente elettronegativi e B possiede almeno un doppietto di non legame⁴.

La forza di un legame ad idrogeno è di $\approx 20\text{kJ mol}^{-1}$.

Non c'è un limite netto per gli atomi che possono o non possono formare legami ad idrogeno ma generalmente si assume che N, O ed F siano i principali.

Nota che, se presente, il legame ad idrogeno è la più importante delle interazioni intermolecolari. Ricorda, infine, che si possono avere anche H-bond intramolecolari, i quali, in quanto tali, diminuiscono l'entità delle interazioni intermolecolari, come ad es. nel caso dell'acido salicilico (fig. 1.1).

1.2 Parametri di solubilità

Poiché la solubilità di una sostanza in un determinato solvente dipende dalle relative forze d'interazione intermolecolari è necessario avere un parametro che misuri l'entità di queste interazioni per poter formulare previsioni di solubilità. Per questo scopo viene spesso utilizzato il calore latente di vaporizzazione, che è il calore associato alla perdita di tutte le interazioni intermolecolari che avviene nel passaggio tra stato liquido (dove le interazioni sono presenti) e gassoso (dove le interazioni intermolecolari sono pressoché nulle).

⁴Nota che il legame ad idrogeno tende a disporsi linearmente. Ciò risulta evidente se si considera che in $[A - H \cdots B]$ A e B sono carichi δ^- ed δ^+ , le due cariche parziali positive, pertanto, tenderanno a disporsi nello spazio il più lontano possibile. Ne segue la minor stabilità (o maggior reattività) degli H-bonds angolari rispetto ai planari.

Tipo interazione	Valore tipico
Forze dispersive di London	0,05 - 40 kJ mol ⁻¹
Forze di Debye (dipolo-dipolo indotto) [1.1.3]	2 - 10 kJ mol ⁻¹
Interazione ione-dipolo indotto	3 - 15 kJ mol ⁻¹
Forze di Keesom (dipolo-dipolo) [1.1.3]	5 - 25 kJ mol ⁻¹
Legame ad idrogeno [1.1.5]	10 - 40 kJ mol ⁻¹
Interazione ione-dipolo [1.1.4]	40 - 600 kJ mol ⁻¹

Tabella 1.2: Riassunto delle interazioni intermolecolari e loro entità.

Si noti che, al fine di avere informazioni sull'entità delle forze intermolecolari, non è importante la temperatura di ebollizione ma il valore dell'entalpia (o calore) di vaporizzazione.

Dal calore di vaporizzazione (ΔH_{vap}) si può ricavare la densità di energia coesiva (c), così definita:

$$c = \left(\frac{\Delta H_{vap} - RT}{V_m} \right) \quad (1.3)$$

Dove R è la costante universale dei gas, T la temperatura in gradi K e V_m il volume molare. $\Delta H_{vap} - RT$ è anche detta "energia latente di vaporizzazione".

c è pertanto un parametro numerico, con grandezza calorie su cm³ o J/cm³. Poiché c riflette l'entità delle forze di VdW, sostanze con c simile saranno miscibili tra loro.

1.2.1 Parametro di solubilità di Hildebrand

Un altro parametro impiegato per valutare l'entità delle forze di VdW è il parametro di solubilità di Hildebrand, definito (nel 1936) come radice quadra di c , ovvero

$$\delta = \sqrt{c} = \left(\frac{\Delta H_{vap} - RT}{V_m} \right)^{\frac{1}{2}} \quad (1.4)$$

Sostanze con valori di δ simili saranno molto probabilmente miscibili.

Dalla tabella 1.3 risulta chiara la scala dei solventi in base alla loro "forza". Nota che l'attendibilità del parametro di Hildebrand è ottima per la descrizione di solvente apolari o debolmente polari ma non da' buoni risultati per solventi polari (momento di dipolo > 2 Debye) o dove sussistano legami ad idrogeno, in quanto non sono contemplati nella sua definizione, e pertanto non vengono considerati (cfr. eq. 1.4).

Tornando a considerare la scala dei solventi della tabella 1.3, se una sostanza è miscibile in un solvente lo sarà probabilmente anche in quelli vicini in ordine di δ , ovvero teoricamente ci sarà un gruppo continuo di solventi, nella scala ordinata per fattore di Hildebrand, capace di solubilizzare la sostanza, a prescindere dalle dimensioni più o meno grandi di tale gruppo.

Un vantaggio del parametro di solubilità di Hildebrand è dato dalla sua linearità, ovvero per miscele di più solventi se ne può calcolare il valore con la media, pesata sulle rispettive quantità relative, dei componenti.

Solvente	δ	Solvente	δ
Cicloesano	16,8	Cloruro di metilene	20,2
Tetracloruro di carbonio	18,0	Piridina	21,7
Xilene	18,2	Dimetilformammide (DMF)	22,1
Acetato di etile	18,2	Alcol n-propilico	24,7
Toluene	18,3	Alcool etilico	24,9
Tetraidrofurano (THF)	18,5	Dimetilsolfossido (DMSO)	26,2
Benzene	18,7	Alcol n-butilico	26,4
Cloroformio	18,7	Alcool metilico	28,7
Tricloroetilene	18,7	Glicole propilenico	29,7
Metilettilchetone	19,3	Glicole etilenico	30,7
Acetone	19,7	Glicerina	34,9
Dicloruro di etilene	20,2	Acqua	36,2

Tabella 1.3: Valori del parametro di solubilità di Hildebrand δ per alcuni solventi.

1.2.2 Parametro di solubilità di Hansen

Come detto la descrizione di Hildebrand presenta dei problemi, non solo perché trascura il legame ad idrogeno ma perché valori identici di δ potrebbero essere ottenuti con forze completamente diverse e pertanto si avrebbero sostanze con lo stesso δ immiscibili.

Una descrizione più accurata è ottenuta scomponendo le componenti che formano il parametro di solubilità di Hildebrand, ovvero dividendo δ in δ_D , δ_P e δ_H . δ_D è la componente che tiene conto delle forze dispersive (D) non polari, δ_P le forze polari (P) mentre δ_H considera il legame ad idrogeno (ed eventuali altre componenti). Nel complesso δ_D , δ_P e δ_H sono dette parametro di solubilità di Hansen (*Hansen solubility parameters, HSP*).

In figura 1.2 sono riportati i valori delle componenti dell'HSP per alcune serie di solventi.

Nota che poiché le componenti dell'HSP sono tre possono essere rappresentate in uno spazio cartesiano tridimensionale. Per ottenere forme più simili a sfere e non dei "dischi" si applica una correzione "estetica" ovvero si moltiplica per 4 il parametro δ_D che è quello, per sua natura, di entità generalmente minore. Poiché questi valori sono sperimentali e servono solo come confronto con altri l'applicazione di un fattore di correzione come questo non provoca problemi.

La distanza tra due sostanze (R_a) in questo genere di rappresentazioni 3D può essere ottenuta estraendo la radice delle differenze delle loro componenti al quadrato. Quella che si ottiene è la lunghezza della linea che congiunge i due punti (cfr. "distanza euclidea in 3 dimensioni" su Wikipedia).

$$R_a = \sqrt{4(\delta_{D1} - \delta_{D2})^2 + (\delta_{P1} - \delta_{P2})^2 + (\delta_{H1} - \delta_{H2})^2} \quad (1.5)$$

Oltre alla distanza tra i punti corrispondenti agli HSP di due sostanze può essere utile il parametro RED, definito come

$$RED = \frac{R_a}{R_o} \quad (1.6)$$

dove R_o , spesso indicato come raggio delle sfera di Hansen, è dato dal più alto valore di R_a per il quale è permessa la solubilità (o l'interazione) delle due sostanze.

Essendo R_o la distanza massima nei grafici HSP 3D entro la quale avviene la solubilità tra solvente e soluto si può immaginare di tracciare una sfera di questo raggio attorno al punto corrispondente ad un solvente ed osservare dove si posiziona il soluto: se è all'interno (ovvero $R_a < R_o$) si *dovrebbe* avere miscibilità totale, nel caso il punto sia nei pressi della superficie della sfera è prevista miscibilità parziale, mentre nel caso il punto rappresentativo del solvente sia fuori dalla sfera non si avrà miscibilità.

Quanto sopra affermato può essere riassunto così⁵:

RED < 1 prevista miscibilità/solubilità totale;

RED \approx 1 prevista miscibilità/solubilità parziale;

RED > 1 prevista immiscibilità/insolubilità;

1.3 Relazioni struttura–solubilità

1.3.1 Solubilità e struttura

Per quanto riguarda le relazioni struttura–solubilità si osserva che la solubilità di una sostanza in un soluto dipende da:

1. peso molecolare della sostanza;
2. isomeria geometrica, ad esempio nel caso di acidi $\alpha - \beta$ insaturi la serie *cis* è generalmente più solubile in acqua;
3. isomeria strutturale, ad esempio a parità di peso molecolare alcoli più ramificati saranno più solubili in acqua di quelli a catena lineare;
4. presenza/formazione di legami ad idrogeno.

1.3.2 Solubilità e pH

Come è ovvio, la solubilità dipende dal pH. Non è il caso di dire altro.

1.3.3 Solubilità e punto di fusione

In alcune serie omologhe di sostanze c'è una relazione tra il punto di fusione della sostanza e la solubilità in acqua, è mostrato in tabella 1.4 l'esempio delle xantine.

⁵Charles M. Hansen, 50 Years with solubility parameters—past and future; Progress in Organic Coatings 51 (2004) 77–84

Composto	p.f. (°C)	Sol. H ₂ O	Sol CHCl ₃
Proxifillina	135	s.s.	m.s.
Etofillina	161	s.	mod.s.
Caffeina	236	mod. s.	m.s.
Teofillina	274	p.s.	p.s.
Teobromina	350	m.p.s.	m.p.s.

Tabella 1.4: Andamento di solubilità e punto di fusione nella xantine.

Regular Solution Theory (RST)

Questo comportamento è previsto dalla Regular Solution Theory (RST), sviluppata nel secondo dopoguerra, la quale, partendo dalla definizione di soluzione reale, quindi ricorrendo alle attività, prevedeva che:

$$-\log(x_2) = \frac{\Delta H_f}{2,303RT_f} \cdot \left(\frac{T_f - T}{T_f} \right) + \log(\gamma_2) \quad (1.7)$$

dove x_2 è la frazione molare di soluto disciolto, ΔH_f è l'entalpia di fusione, T_f la temperatura di fusione del soluto, γ il coefficiente di attività ed il parametro 2,303 è necessario per la conversione da logaritmo naturale a logaritmo decimale.

Ne segue che più bassi sono il punto di fusione del soluto ed il suo calore latente di fusione più alta sarà la sua solubilità alla temperatura T.

Approssimazione con parametro di Hildebrand

Negli anni '70 Hildebrand e Scott hanno stimato l'entità del fattore $\log(\gamma_2)$ ricorrendo al parametro di solubilità di Hildebrand⁶), ottenendo la seguente relazione:

$$\log \gamma_2^{RST} = (\delta_1 - \delta_2)^2 \frac{V_2 \phi_1^2}{2,303RT} \quad (1.8)$$

dove δ sono i parametri di solubilità di Hildebrand, V_2 il volume molare del soluto (calcolato in fase liquida) e ϕ_1^2 la frazione di volume totale occupata dal solvente (≈ 1 per soluzioni diluite).

General Solubility Equation (GSE)

Nel 2000 è stata proposta da Jain e Yalkowsky un'equazione sperimentale, la General Solubility Equation (GSE) che permette di predire con buona accuratezza la solubilità in acqua di solidi organici non elettroliti utilizzando come parametri punto di fusione e coefficiente di ripartizione acqua/ottanolo ($\log P$). Il $\log P$ può essere calcolato con appositi software (cLogP), mentre il punto di fusione costituisce una semplice misura strumentale.

Secondo la GSE:

$$\log S_{acqua}^{solido} = 0,5 - 0,01(P_f - 25) - \log P \quad (1.9)$$

dove P_f è il punto di fusione espresso in gradi centigradi.

⁶Ne segue che tale considerazione è valida solo per le sostanze descritte efficacemente dal parametro di solubilità di Hildebrand ovvero soluti non troppo polari e non elettroliti

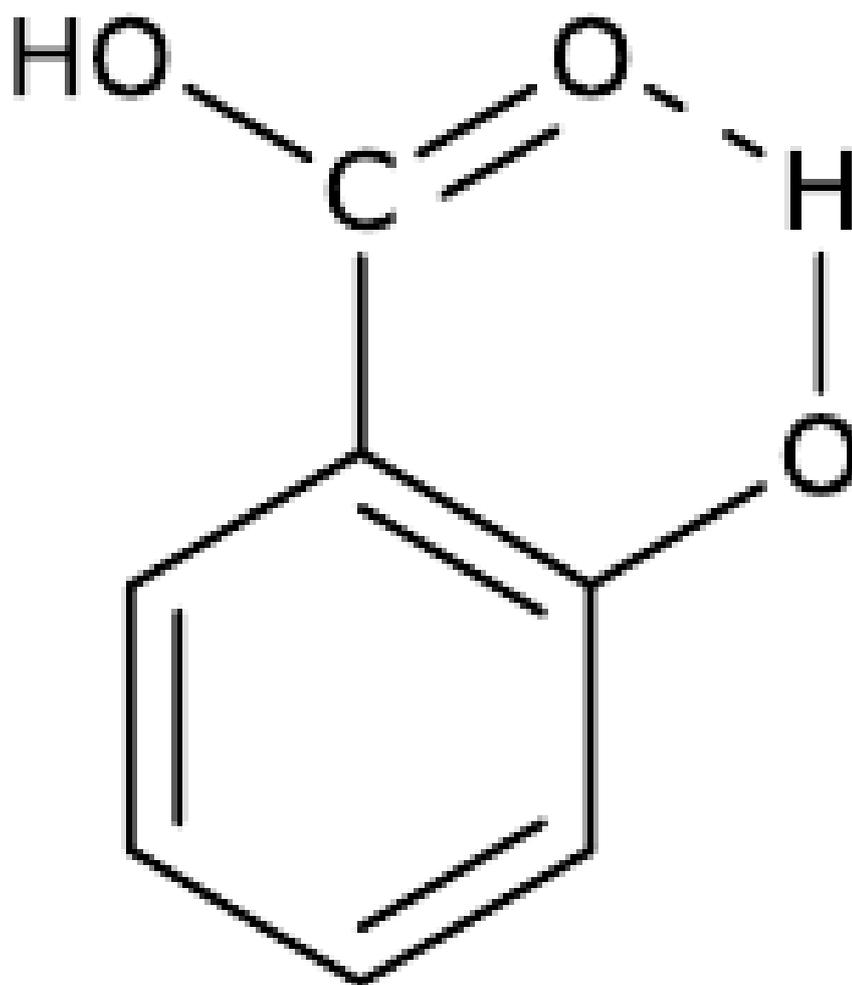


Figura 1.1: Legame idrogeno intramolecolare nell'acido salicilico.

Capitolo 2

Polimorfismo

2.1 Introduzione

“Il polimorfismo è la proprietà di alcuni composti di esistere in più di una forma cristallina.”

Il polimorfismo riveste un ruolo importante in ambito farmaceutico, in quanto diversi polimorfi della stessa sostanza possono mostrare differenze in proprietà fisiche cruciali per la biofarmaceutica, come solubilità e punto di fusione, o per la tecnica farmaceutica, come densità e durezza. Inoltre il polimorfismo può causare variazioni nella stabilità chimica e fisica.

L'esistenza di forme polimorfe viene stabilita con l'analisi cristallografica a raggi X (cfr. sez. 5.9), o con la diffrazione dei raggi X su polveri (sez. 5.9.4. Questo perché strutture cristalline diverse producono spettri di diffrazione diversi.

I polimorfi esistono come prodotto di diverse celle unitarie (packing polymorphism) o per un diverso orientamento spaziale delle molecole (polimorfismo conformazionale).

Il polimorfo più stabile è quello con l'energia libera della forma cristallina più bassa.

I polimorfi possono essere

enantiotropici se due forme polimorfiche possono convertirsi l'una nell'altra al di sotto della loro temperatura di fusione;

monotropici se sono stabili durante tutto il range di temperatura al di sotto del punto di fusione.

Infine polimorfi che tendono a convertirsi in una forma più stabile sono detti metastabili.

Attualmente se sono caratterizzati più polimorfi per la stessa sostanza il brevetto e l'A.I.C. valgono per solo una forma polimorfa, il cambio di polimorfo richiede spesso la riformulazione della forma farmaceutica.

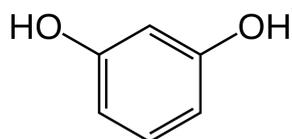


Figura 2.1: Struttura della resorcina.

2.1.1 Polimorfismo di packing

La resorcina

La resorcina (fig. 2.1) costituisce un esempio di “packing polymorphism”, in particolare presenta due (principali) polimorfi¹:

forma α stabile a temperatura ambiente;

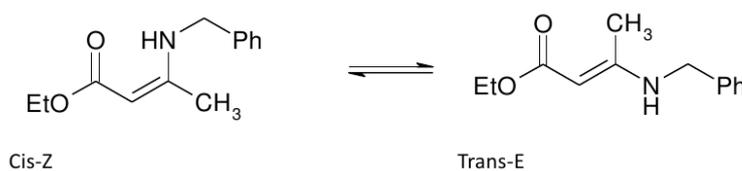
forma β stabile a temperature (o pressioni) superiori.

La forma α , meno densa, si interconverte per riscaldamento nella forma β . Nell'interconversione (che avviene a 71-74°C) non c'è variazione nella simmetria del cristallo (cella sempre ortorombica) ma solo contrazione del volume molare. Questo perché la differenza tra le due è data principalmente dall'estesa rete di legami ad idrogeno che stabilizzano la forma α molto meno presenti (o comunque meno forti) nella forma β .

2.1.2 Polimorfismo configurazionale

L'etil β -benzilaminocrotonato

Un esempio di polimorfismo configurazionale è costituito dall'etil β -benzilaminocrotonato, il quale può assumere due conformazioni diverse: cis o trans (vedi figura 2.2).

Figura 2.2: Conformeri del etil β -benzilaminocrotonato

2.1.3 Polimorfismo dovuto a tautomeri

Anche i diversi tautomeri di una molecola possono dar luogo a forme cristalline diverse, e quindi a polimorfi. Le strutture chimiche che possono dare luogo a polimorfismo causato da tautomeri sono quelle aventi tautomeri stabili, in figura 2.3 è mostrato il caso della ranitidina.

¹Ci sono evidenze di una terza forma polimorfa, γ , che si forma solo a pressioni molto elevate.

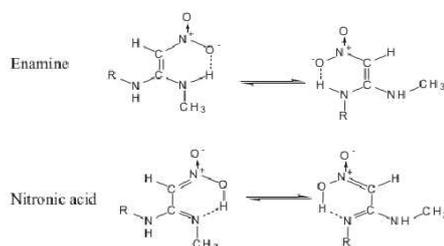


Figura 2.3: La possibilità di tautomeria nella catena laterale della ranitidina da' origine a polimorfi dovuti a tautomeri.

2.1.4 Polimorfismo conformazionale

Il polimorfismo conformazionale è dovuto alle diverse possibili rotazioni attorno a legami semplici che possono dar luogo a celle cristalline diverse. E' il

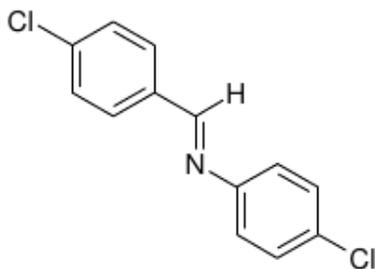


Figura 2.4: Struttura della N-(p-Clorobenzilidene)-p-cloroanilina.

caso delle diverse possibili rotazioni attorno al legame tra carbonio imminico e residuo aromatico nella (N-(p-Clorobenzilidene)-p-cloroanilina dove la conformazione planare da' luogo a cristalli triclini stabili (figura 2.5) mentre la forma non planare da' cristalli ortorombici instabili (figura 2.6).

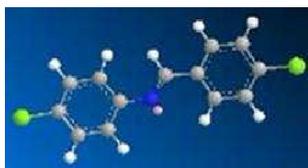


Figura 2.5: Polimorfo stabile (planare).

2.1.5 Solidi amorfi

In alternativa ad un abito cristallino una sostanza può solidificare come amorfo.

“Un solido amorfo è un solido che manca di reticolo cristallino, cioè di ordine a lungo raggio tra le posizioni reciproche degli atomi nello spazio.”

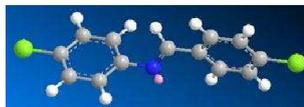


Figura 2.6: Polimorfo instabile (non planare).

I solidi amorfi sono caratterizzati da uno stato rigido, detto vetroso, ed uno più morbido, detto gommoso. La transizione a cui avviene il passaggio da una forma all'altra è detta temperatura di transizione vetrosa (T_g): al di sotto di tale temperatura il composto avrà comportamento vetroso, al di sopra gommoso.

2.1.6 Impatto sull'industria farmaceutica

L'impatto del polimorfismo nell'ambito dell'industria farmaceutica è, come detto, vasto. In particolare transizioni polimorfiche o l'esistenza di diversi polimorfi possono influire su:

- solubilità;
- biodisponibilità;
- proprietà tecnologiche;
- protezione brevettuale.

Esame (28/11/11): *Illustrare l'importanza del polimorfismo nella chimica farmaceutica e le tecniche usate per la caratterizzazione dei solidi polimorfi.*

Dove tutte e quattro questi effetti possono essere d'importanza cruciale. Ad esempio tra i sulfamidici, che sono una famiglia di farmaci caratterizzata da un'alta frequenza del fenomeno del polimorfismo, la sulfametossiazina presenta non meno di 5 diverse forme cristalline, delle quali alcune hanno velocità di dissoluzione più che doppia rispetto ad altre.

Capitolo 3

Punto di fusione

3.1 Punto di fusione

Il punto di fusione è la temperatura alla quale un solido cristallino, alla pressione di una atmosfera, è in equilibrio con la fase liquida. Poiché il passaggio di fase necessita che vengano vinte le forze intermolecolari che tengono le molecole di solido vicine, la temperatura a cui si verifica la fusione dipende dalla struttura delle molecole coinvolte. Pertanto, in linea generale, composti diversi avranno punti di fusione diversi, ed il p.f. può costituire un elemento di identificazione per composti incogniti. Ricorda infine che, a differenza del punto di ebollizione, il punto di fusione varia in modo del tutto trascurabile in funzione della pressione, pertanto è più che giustificato trascurare eventuali correzioni per la pressione.

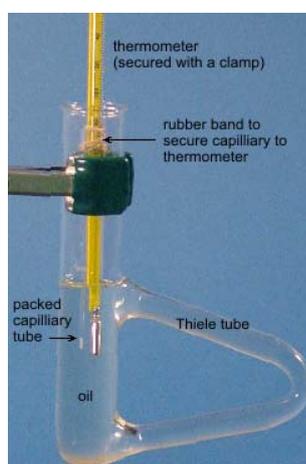


Figura 3.1: Apparecchio Thiele (oggi in disuso) per la determinazione del p.f.

Le sostanze organiche pure, non ioniche cristalline hanno un punto di fusione netto, ovvero il passaggio da fase solida a liquida avviene in un intervallo di temperatura ristretto ($0,5 - 1^{\circ}\text{C}$).

Le sostanze contenenti impurezze hanno un intervallo di fusione più largo, come regola del pollice il p.f. di una sostanza contenente impurezze è più basso

di quello della sostanza pura a causa della formazione di un eutettico (cfr. 4.5.6 a pag. 50). Un intervallo di fusione ampio per una sostanza organica, non ionica e cristallina è pertanto sintomo di scarsa purezza.

L'allargamento dell'intervallo di fusione nel caso di impurezze formanti con il campione una miscela eutettica è evidente in figura 3.2 (cfr. sez. 3.1.3)

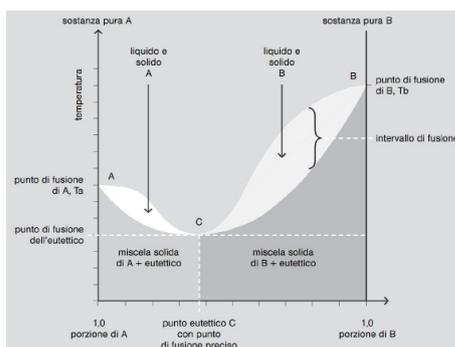


Figura 3.2: Diagramma di una miscela eutettica, sulla destra evidenziato l'intervallo di temperature fusione per una composizione arbitraria.

Nota che l'abbassamento del punto di fusione da parte di miscele eutettiche può essere sfruttato anche per l'identificazione di composti incogniti. Ad es. misurato il punto di fusione di una sostanza incognita pura e trovando più possibili sostanze nello stesso intervallo di temperatura si può provare ad aggiungere piccole aliquote di queste ultime e verificare se si osservi o meno un abbassamento della temperatura di fusione. Se solo per una sostanza testata ciò non dovesse avvenire significa che quella sostanza è la stessa del campione incognito.

3.1.1 Metodi di misura

Metodo del tubo capillare

Per temperatura di fusione col metodo del tubo capillare, si intende la temperatura alla quale l'ultima particella solida di una colonna compatta della sostanza passa alla fase liquida all'interno del tubicino del punto di fusione.

La determinazione avviene quindi attraverso il cosiddetto punto di fusione trasparente, dato che esso costituisce un criterio inequivocabile per la determinazione del punto di fusione.

E' pratica comune, per ottimizzare il tempo, quella di eseguire inizialmente una rapida ed approssimata determinazione del punto di fusione mediante riscaldamento rapido, seguita da almeno due accurate determinazioni (con gradienti minori, circa $2^{\circ}\text{C min}^{-1}$) finché non siano ottenuti due misurazioni coerenti¹.

Il metodo standard del tubo capillare si basa su un bagno di liquido riscaldabile, dotato di un termometro per la misurazione della temperatura. Un tubo capillare in vetro, contenente la sostanza da analizzare, viene introdotto nel liquido in modo tale che la sostanza si trovi vicino al bulbo di mercurio del termometro (cfr. fig. 3.1).

¹La pratica del laboratorio didattico è altra cosa...

Sebbene il metodo del tubo capillare descritto in Ph. Eur. preveda la rilevazione visiva del punto di fusione esistono oggi apparecchi che consentono, oltre alla tradizionale rilevazione visiva anche quella automatica, sfruttando il passaggio di luce attraverso il campione. La luce è riflessa dal solido mentre può attraversare il liquido, azionando dei fotodiodi.

Da: Ph.Eur. ed. 7th §2.2.14

MELTING POINT – CAPILLARY METHOD

The melting point determined by the capillary method is the temperature at which the last solid particle of a compact column of a substance in a tube passes into the liquid phase.

When prescribed in the monograph, the same apparatus and method are used for the determination of other factors, such as meniscus formation or melting range, that characterise the melting behaviour of a substance.

Apparatus *The apparatus consists of:*

- *a suitable glass vessel containing a liquid bath (for example, water, liquid paraffin or silicone oil) and fitted with a suitable means of heating;*
- *a suitable means of stirring, ensuring uniformity of temperature within the bath;*
- *a suitable thermometer with graduation at not more than 0.5°C intervals and provided with an immersion mark. The range of the thermometer is not more than 100°C;*
- *alkali-free hard-glass capillary tubes of internal diameter 0.9mm to 1.1mm with a wall 0.10mm to 0.15mm thick and sealed at one end.*

Method *Unless otherwise prescribed, dry the finely powdered substance in vacuo and over anhydrous silica gel R for 24h. Introduce a sufficient quantity into a capillary tube to give a compact column 4mm to 6mm in height.*

Raise the temperature of the bath to about 10°C below the presumed melting point and then adjust the rate of heating to about 1°C min⁻¹. When the temperature is 5°C below the presumed melting point, correctly introduce the capillary tube into the instrument. For the apparatus described above, immerse the capillary tube so that the closed end is near the the centre of the bulb of the thermometer, the immersion mark of which is at the level of the surface of the liquid. Record the temperature at which the last particle passes into the liquid phase.

Calibration of the apparatus *The apparatus may be calibrated using melting point reference substances such as those of the World Health Organisation or other appropriate substances.*

Metodo del tubo capillare aperto

Il cosiddetto “metodo del tubo capillare aperto” o *punto di fusione ascendente* può essere utilizzato per determinazioni particolari, es. sostanze che fondono rigonfiandosi. Più che un vero e proprio punto di fusione si tratta in questi casi di un punto di rammollimento.

Da: Ph.Eur. ed. 7th §F

or certain substances, the following method is used to determine the melting point (also referred to as slip point and rising melting point when determined by this method).

Use glass capillary tubes open at both ends, about 80mm long, having an external diameter of 1.4mm to 1.5mm and an internal diameter of 1.0mm to 1.2mm. Introduce into each of 5 capillary tubes a sufficient amount of the substance, previously treated as described, to form in each tube a column about 10mm high and allow the tubes to stand for the appropriate time and at the prescribed temperature. Unless otherwise prescribed, substances with a waxy consistency are carefully and completely melted on a water-bath before introduction into the capillary tubes. Allow the tubes to stand at 2 – 8°C for 2h. Attach one of the tubes to a thermometer graduated in 0.5°C so that the substance is close to the bulb of the thermometer. Introduce the thermometer with the attached tube into a beaker so that the distance between the bottom of the beaker and the lower part of the bulb of the thermometer is 1cm. Fill the beaker with water to a depth of 5cm. Increase the temperature of the water gradually at a rate of 1°C min⁻¹. The temperature at which the substance begins to rise in the capillary tube is regarded as the melting point. Repeat the operation with the other 4 capillary tubes and calculate the result as the mean of the 5 readings.

Metodo della fusione istantanea

Qualora il lento riscaldamento del campione comporti il rischio di decomposizione o di trasformazioni polimorfiche nel campione è opportuno utilizzare il metodo della fusione istantanea.

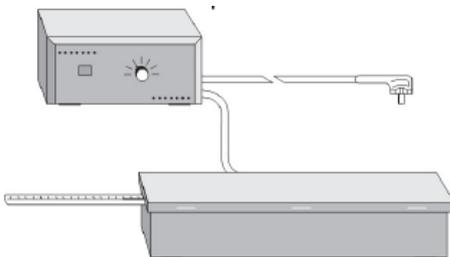


Figura 3.3: Bloc Maquenne per fusione istantanea

Da: Ph.Eur. ed. 7th §2.2.16**MELTING POINT – INSTANTANEOUS METHOD**

The instantaneous melting point is calculated using the expression :

$$P_f = \frac{t_1 + t_2}{2}$$

in which t_1 is the first temperature and t_2 the second temperature read under the conditions stated below.

Apparatus *The apparatus consists of a metal block resistant to the substance to be examined, of good heat-conducting capacity, such as brass, with a carefully polished plane upper surface. The block is uniformly heated throughout its mass by means of a micro-adjustable gas heater or an electric heating device with fine adjustment. The block has a cylindrical cavity, wide enough to accommodate a thermometer, which should be maintained with the mercury column in the same position during the calibration of the apparatus and the determination of the melting point of the substance to be examined. The cylindrical cavity is parallel to the upper polished surface of the block and about 3mm from it. The apparatus is calibrated using appropriate substances of known melting point.*

Method *Heat the block at a suitably rapid rate to a temperature about 10°C below the presumed melting temperature, then adjust the heating rate to about 1°C min⁻¹. At regular intervals drop a few particles of powdered and, where appropriate, dried substance, prepared as for the capillary tube method, onto the block in the vicinity of the thermometer bulb, cleaning the surface after each test. Record the temperature t_1 at which the substance melts instantaneously for the first time in contact with the metal. Stop the heating. During cooling drop a few particles of the substance at regular intervals on the block, cleaning the surface after each test. Record the temperature t_2 at which the substance ceases to melt instantaneously when it comes in contact with the metal*

Calibration of the apparatus *The apparatus may be calibrated using melting point reference substances such as those of the World Health Organisation or other appropriate substances.*

In pratica esistono due apparati per la fusione istantanea:

- il Bloc Maquenne (cfr. figura 3.3);
- il blocco riscaldante Koeffler, adatto per la determinazione in serie di punti di fusione senza particolari esigenze di precisione nella misurazione (cfr. figura 3.4). Nel Koeffler si instaura un gradiente di temperatura per cui la polvere posta sul blocco presenta un fronte in corrispondenza del passaggio da solido a liquido. La temperatura corrispondente nel punto è la temperatura di fusione.

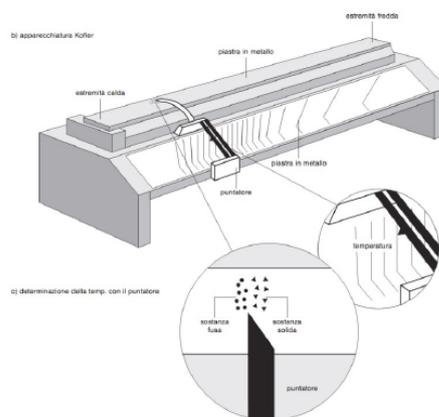


Figura 3.4: Apparato Koeffer per punto di fusione

Velocità di riscaldamento $^{\circ}\text{C min}^{-1}$	Punto di fusione rilevato $^{\circ}\text{C}$ (secondo Ph.Eur.)
0,2	82,5
0,5	82,8
1,0	83,3
2,0	83,6

Tabella 3.1: Effetto della velocità di riscaldamento sul punto di fusione.

3.1.2 Dipendenza del Pf dalla velocità di riscaldamento

Come visto in Ph.Eur. è prescritto un gradiente di $1^{\circ}\text{C min}^{-1}$ in corrispondenza del punto di fusione. Questo, assieme al continuo mescolamento del liquido riscaldante, per garantire che il campione si avvicini il più possibile alla temperatura del bagno. Tuttavia non è in genere possibile evitare che tra campione e bagno riscaldante si instauri una differenza di temperatura, sia pur minima ($\approx 1^{\circ}\text{C}$).²

Nota che, poiché il termometro è immerso nel fluido riscaldante o nel blocco la temperatura letta non è mai quella del campione ma quella dell'agente riscaldante: per questo è necessario minimizzare il più possibile la differenza di temperatura tra campione e liquido/blocco.

E' sperimentalmente dimostrato che il punto di fusione dipende dal gradiente di riscaldamento. In particolare più velocemente aumenta il riscaldamento più si alza il punto di fusione misurato (vedi tabella 3.1).

Ne segue che è possibile confrontare solo valori di p.f. determinati con lo stesso gradiente di riscaldamento.

Il processo di fusione non è immediato, si tratta, per sua natura, di un processo endotermico che richiede del tempo. Si distinguono quindi l'inizio della fusione, quando la prima particella di sostanza diventa liquida ed il punto di

² Questo perchè tanto minore è la differenza di temperatura tra i due tanto meno flusso di calore si instaura dal bagno al campione, cfr. legge di Newton sul raffreddamento eq. (4.5) a pag. 39.

fusione trasparente quando l'ultima particella diventa liquida. Durante l'intervallo tra inizio e fine della fusione il calore fornito è impiegato come ΔH_f . Come detto secondo Ph.Eur. il p.f. è definito come la temperatura del bagno riscaldante in corrispondenza del punto trasparente, in questo modo però non tiene conto dell'intervallo di temperature esistente tra l'inizio della fusione e la fine.

La temperatura di fusione corretta è quindi ottenibile per sottrazione di un fattore di correzione termodinamico della temperatura rilevata. In questo modo si correggono gli effetti della velocità di riscaldamento.

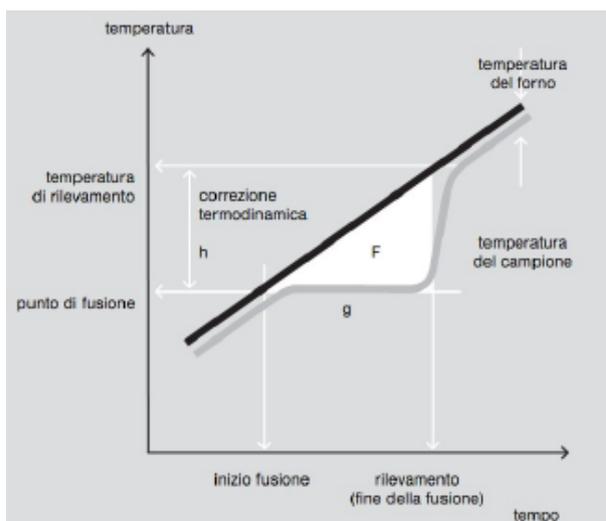


Figura 3.5: Punto di fusione e velocità di riscaldamento. Linea grigia: temperatura del campione, linea nera temperatura forno.

Considerazioni preliminari Si osservi la figura 3.5. Rappresenta l'andamento in funzione del tempo delle temperature di forno e campione durante la fusione. La temperatura del campione a fusione ultimata è vicina a quella del forno in quanto la differenza di temperatura (il triangolo F) che si era instaurata a causa del calore latente fa sì che il flusso di calore sia più intenso. La temperatura misurata al punto trasparente è quindi quella indicata in ascissa come "rilevamento", mentre si cerca una correlazione tra essa e l'inizio della fusione, che dà informazioni più riproducibili in quanto indipendenti dalla velocità di riscaldamento. Bisogna pertanto determinare h , la correzione termodinamica. h dipende essenzialmente dalla pendenza della retta e da F , l'area del triangolo (se maggiore la temperatura rilevata a parità di temperatura iniziale sarà maggiore) e poiché F dipende dal ΔH_f che è una proprietà invariabile³ a parità di forma cristallina/polimorfo. Il fattore di correzione termodinamica (h) calcolato in funzione del gradiente di riscaldamento avrà quindi validità termodinamica nel calcolare la temperatura d'inizio fusione.

Calcolo di h Si vuole ricavare h , l'altezza del triangolo rettangolo, in funzione del gradiente di riscaldamento che è la pendenza dell'ipotenusa (e quindi il

³Trascurabile, come detto, l'effetto della pressione.

Velocità di riscaldamento °C min ⁻¹	Radice quadrata del gradiente	Punto di fusione rilevato °C (secondo Ph.Eur.)	Punto di fusione corretto °C
0,2	0,447	82,5	82,05
0,5	0,707	82,8	82,09
1,0	1,000	83,3	82,30
2,0	1,414	83,6	82,19

Tabella 3.2: Calcolo della correzione termodinamica per i punti di fusione della tabella 3.1

rapporto tra h e ΔT_f) assumendo l'area F costante. (Per semplicità indichiamo g con ΔT_f ed il gradiente con $grad.$)

$$F = \frac{1}{2}(\Delta T_f \cdot h) f(\Delta H_f) = \text{cost.}$$

$$grad. = \frac{h}{\Delta T_f} \text{ (u.d.m. } ^\circ\text{C min}^{-1}\text{)} \longrightarrow \Delta T_f = \frac{h}{grad.}$$

Sostituendo in F:

$$F = \frac{1}{2} \left(\frac{h}{grad.} \cdot h \right) \longrightarrow \frac{1}{2} \left(\frac{h^2}{grad.} \right)$$

Ricavando h:

$$h^2 = 2 \cdot F \cdot grad. \longrightarrow h = \sqrt{2F} \cdot \sqrt{grad.}$$

Pongo $\sqrt{2F}$ uguale a K:

$$h = K \cdot \sqrt{grad.}$$

In realtà K non dipende solo dal ΔH_f ma anche dalla conducibilità termica della sostanza e parametri relativi al campione ed allo strumento come la granulometria del campione, la geometria del forno etc. Da diversi calcoli sperimentali risulta che i valori di 1,0 sono una buona approssimazione di K in diverse circostanze. Per calcolare la temperatura di fusione corretta si dovrà quindi sottrarre alla temperatura rilevata la radice quadrata del gradiente di riscaldamento, moltiplicato per $K \cong 1,0$ (cfr. tabella 3.2).

3.1.3 Teoria del punto di fusione

“Il punto di fusione di un composto è la temperatura alla quale il suo solido cristallino, alla pressione di un'atmosfera, è in equilibrio con il liquido.”

Tale temperatura è caratteristica per le sostanze pure e può costituire un elemento di identificazione.

Effetto della pressione

L'effetto della pressione sulla temperatura di fusione è riassunto nell'equazione di Clapeyron, per cui:

$$\frac{dP}{dT} = \frac{\Delta_{fus}H}{T \Delta_{fus}V} \quad (3.1)$$

dove P è la pressione, T la temperatura in gradi Kelvin V ed H volume ed entalpia molare.

Praticamente tutte le sostanze tranne l'acqua hanno densità del solido maggiore di quella del liquido, pertanto all'aumento della pressione corrisponde un (lieve!) aumento della temperatura di fusione. Come detto per l'acqua vale la considerazione opposta.

Effetto delle impurezze

Tensione di Vapore Il punto di fusione è l'equilibrio tra la fase liquida e la fase solida. Se osserviamo l'andamento della tensione di vapore per un composto notiamo che la curva è ripida per la fase solida e meno pendente nella fase liquida. Il punto in cui le due curve si incontrano (ovvero il punto di discontinuità della derivata prima) è appunto il punto di fusione (F), come illustrato in figura 3.6.

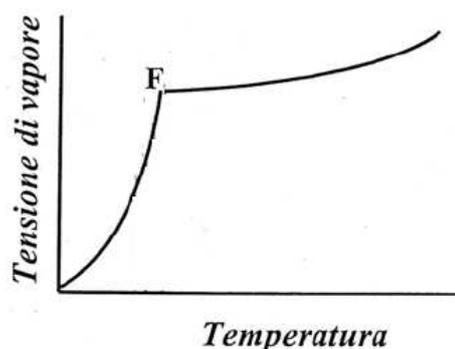


Figura 3.6: Andamento della tensione di vapore in funzione della temperatura. Al punto F corrisponde il passaggio di fase solido-liquido.

Raoult Per una generica impurezza ideale in fase liquida vale la legge di Raoult, per la quale:

$$P_{tot} = P_a X_a + P_b X_b \quad (3.2)$$

Assumendo che a sia la sostanza d'interesse e b un'impurezza presente in bassa quantità, allora la pressione di a sarà ridotta rispetto al valore teorico e sarà pari alla pressione del composto puro per la sua frazione molare (X_a).

Se si sommano le considerazioni sulla dipendenza del punto di fusione dalla tensione di vapore e l'effetto di impurezze in fase liquida sulla tensione di vapore si può giungere alla conclusione efficacemente descritta dal grafico in figura 3.7. Ovvero la presenza di impurezze comporterà un abbassamento del punto di fusione, e tale abbassamento dipende in modo non-lineare (es. una quantità d'impurezza doppia ha un effetto più che doppio⁴) dalla quantità d'impurezza presente.

⁴Questo perché la derivata seconda del tratto di curva del vapor saturo relativa alla fase solida è positiva, ovvero la curva è più pendente per valori più vicini ad F.

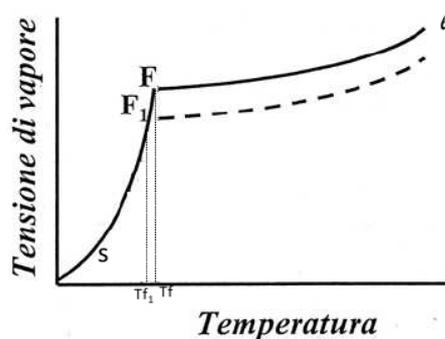


Figura 3.7: Previsione dell'effetto di un'impurezza sul punto di fusione secondo la legge di Raoult.

Eutettico

Qualora poi, ed è cosa frequente, una determinata impurezza formi con la sostanza in esame un composto eutettico l'abbassamento della temperatura di fusione provocato dall'impurezza può essere anche molto marcato.

“Un eutettico, o miscela eutettica, è una miscela di sostanze il cui punto di fusione è più basso di quello delle singole sostanze che la compongono.”

Il diagramma di fase di un generico eutettico AB composto da sostanze pure A e B aventi punto di fusione uguale è rappresentato in figura 3.8. Si tratta di un

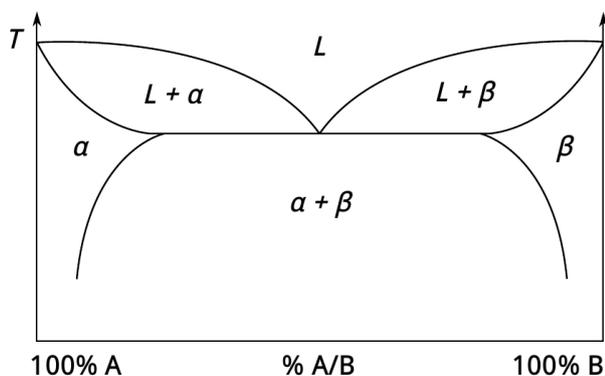


Figura 3.8: Diagramma di stato di una miscela eutettica.

diagramma avente in ordinata la temperatura ed in ascissa la composizione della miscela binaria. In questo caso ideale la composizione dell'eutettico è formata al 50% da A ed al 50% di B. Il punto eutettico in senso stretto è quello di composizione eutettica, caratterizzato nel grafico dall'aver un punto di fusione netto, ovvero dal passaggio diretto da $(\alpha + \beta)$ ad L (ovvero senza i casi $L + \alpha$ o $L + \beta$). α è la fase solida del composto A, β quella del composto B, $\alpha + \beta$ è l'eutettico. L è il liquido (in cui i due composti si suppongono miscibili) mentre

$L + \alpha$ ed $L + \beta$ indicano le fasi con contemporanea presenza del liquido e di una fase solida.

Per capire come leggere un diagramma di fase binario contenente un eutettico consideriamo l'immagine 3.9.

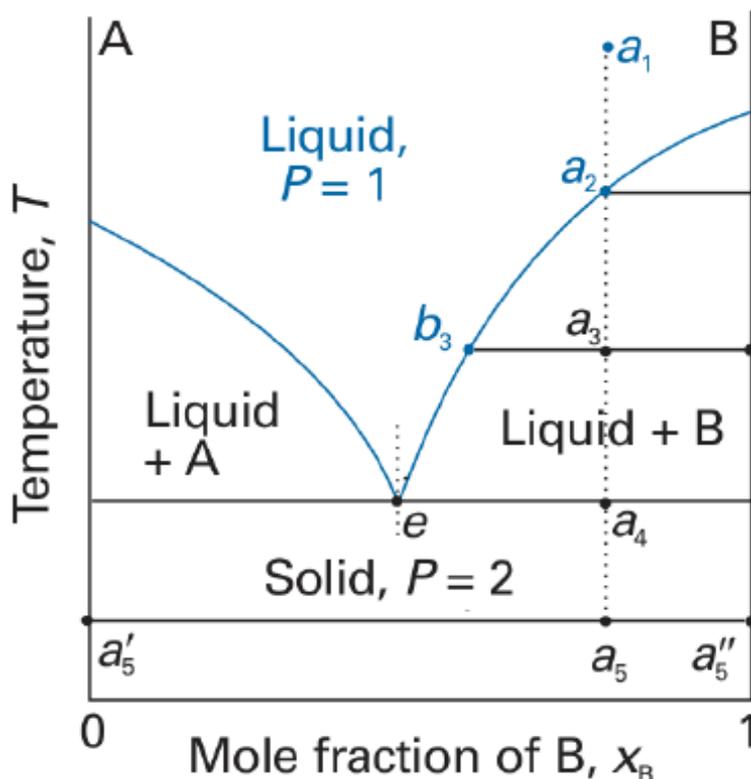


Figura 3.9: Diagramma di fase binario con eutettico.

Ipotizziamo di partire dal punto a_1 . Abbiamo un liquido la cui composizione è data dall'ascissa, approssimativamente sarà formato dallo 80% di B e dal 20%A. Iniziamo a raffreddarlo fino al punto a_2 . Qui incontriamo una che rappresenta un passaggio di stato, e infatti inizia a solidificarsi B puro. Mentre il raffreddamento continua (a_3) continua a precipitare B solido. Ciò altera la composizione del liquido che è ora più povero in B e quindi più ricco in A. In particolare la composizione del liquido sarà pari a b_3 . Con un'ulteriore diminuzione della temperatura (a_4) si ha la fine della solidificazione di B puro e l'inizio della solidificazione dell'eutettico. Questo perché è stata raggiunta la temperatura di fusione dell'eutettico. Non a caso il liquido ha raggiunto la composizione eutettica. L'eutettico si comporta come una sostanza pure ed ha punto di fusione netto, ovvero la temperatura non tornerà a diminuire finché tutto il liquido non si sarà solidificato.

La composizione del sistema nel complesso sarà sempre dell'80% di B e del 20%A, ma ora il 40% sarà sotto forma di eutettico A+B ed il 60% come B puro. Queste frazioni molari possono essere calcolate per via grafica con la regola della leva o algebricamente.

Calcolo algebrico Poniamo che le sostanze X ed Y creino un eutettico XY con composizione eutettica 0,27A e 0,73B, e consideriamo una miscela liquida di composizione 0,50 A e 0,50B. Anche senza osservare il grafico possiamo prevedere che prima di solidificarsi come eutettico si avrà la solidificazione come A puro in quanto la composizione di A nella nostra miscela è maggiore della composizione dell'eutettico. Il fattore limitante la formazione dell'eutettico è quindi B. Possiamo calcolare quanto A si legherà a B nella miscela eutettica per trovare la frazione di A puro nel solido.

$$0,5 : x = 0,73 : 0,27 \quad (3.3)$$

$$x \approx 18,5\% \quad (3.4)$$

$$50 - x = 31,5\% \quad (3.5)$$

Ovvero si avrà il 31,5% di A puro ed il 68,5% di eutettico.

Esame (20/6/11): Definire l'eutettico ed illustrare un diagramma di fase binario contenente un eutettico.

Regola della leva Dal grafico 3.9 si può stabilire la percentuale di eutettico e di B puro per via grafica in ogni punto e nel solido finale. La frazione di B puro solidificato alla temperatura T corrispondente al punto a_3 , ad esempio, è data dalla lunghezza del segmento b_3-a_3 divisa per la lunghezza del segmento che va da b_3 alla linea verticale destra che delimita il grafico. La frazione di eutettico nel solido, invece, è data dalla lunghezza del segmento che va da a_4 alla linea destra del grafico divisa per il segmento che va da e alla linea destra del grafico. Il tutto può essere facilmente dimostrato matematicamente.

Esame (18/1/11): Definire un eutettico ed illustrare un diagramma di fase binario solido-liquido di un conglomerato.

Conglomerati

“I conglomerati sono miscele binarie eutettiche nelle quali i due componenti sono miscibili allo stato liquido ma immiscibili allo stato solido.”

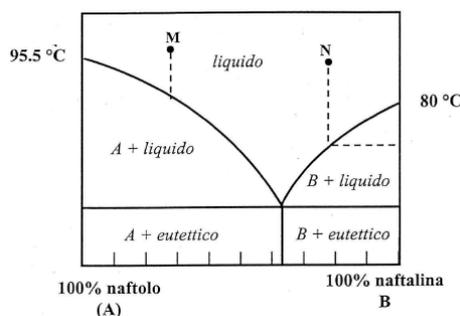


Figura 3.10: Diagramma di stato di un conglomerato tra naftolo e naftalina. Si noti la linea che divide la fase solida.

Composti solidi

In figura 3.11 è rappresentato il diagramma binario di un composto solido.

Si può notare come il composto solido di composizione $A_m B_n$ provochi la formazione di due eutettici, rispettivamente tra il composto stesso ed A e tra

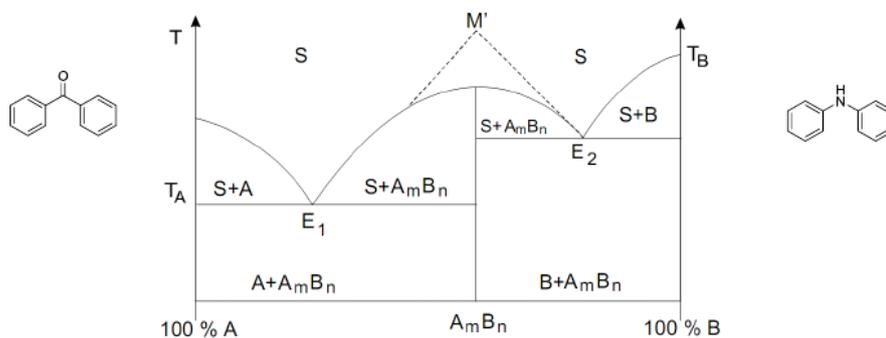


Figura 3.11: Diagramma di un composto solido.

il composto e B. La temperatura di fusione del composto può essere maggiore del p.f. di A e di B, minore di entrambi (fig. 3.11) o compresa tra le due (fig. 3.12). In particolare il punto di fusione del composto è indice della sua stabilità.

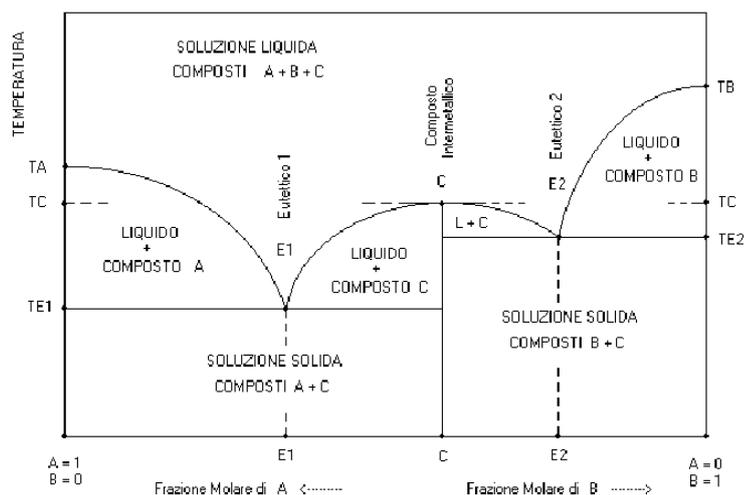


Figura 3.12: Diagramma di stato a pressione costante di un sistema binario dotato di due punti eutettici (PE1, PE2) come conseguenza della formazione del composto solido di composizione C.

Anche miscele racemiche possono dare luogo a composti solidi, più o meno stabili (es. fig. 3.13).

Nota che il composto solido ha proprietà diverse dai singoli enantiomeri, come si può verificare misurando l'indice di rifrazione di un cristallo del composto solido che risulta diverso da quello dei cristalli degli enantiomeri puri.

Soluzioni solide

Le soluzioni solide sono miscele omogenee di un solido nell'altro. Implicano il riordinamento spaziale di un solido nell'altro e per questo sono possibili solo quando le due sostanze hanno strutture cristalline simili, costituzione chimica

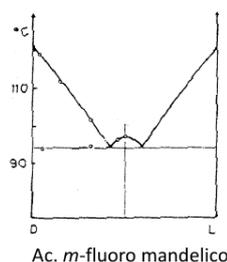


Figura 3.13: Composto solido formato da una miscela racemica di acido *m*-Fluro-mandelico.

analoghe e volumi molecolari quasi uguali.

In altre parole sono estremamente rari.

Il loro diagramma di stato (Fig. 3.14) è simile alle soluzioni liquide.

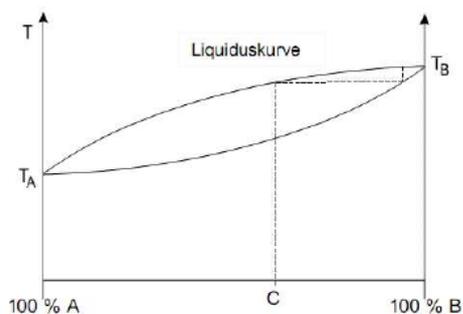


Figura 3.14: Diagramma di fase binario per una soluzione solida.

Diagrammi di fase dei racemati

Un racemato è una miscela binaria di quantità uguali di due enantiomeri, e viene talvolta indicata con (d,l) o (\pm). I racemati cristallini possono presentarsi in diverse forme:

Esame (21/2/11): *Illustrare le differenze tra i diagrammi di fase binari di una miscela racemica e di un composto racemico.*

- Miscele racemiche o conglomerati racemici, sono miscele meccaniche di cristalli delle forme (+) e (-), che possono essere risolte al microscopio. Questo caso si verifica quando ciascun enantiomero ha maggior affinità per le proprie molecole rispetto a quelle dell'altro enantiomero.
- Composti racemici, sono composti molecolari formati da cristalli nei quali sono presenti entrambi gli enantiomeri. Si formano quando le molecole di ciascun enantiomero hanno più affinità per l'altro enantiomero che per sé stesse.
- Pseudoracemati o soluzioni solide racemiche, si hanno quando una coppia di enantiomeri cristallizza insieme per formare un sistema monofasico al cui interno sono presenti in forma disordinata.

Capitolo 4

Analisi Termica

4.1 Introduzione

La definizione correntemente accettata di *Analisi Termica* è la seguente:

A group of techniques in which a physical property of a substance and/or its reaction products is measured as a function of temperature whilst the substance is subjected to a controlled temperature program.¹

L'analisi termica è un ramo della scienza dei materiali che studia le proprietà dei materiali al variare della temperatura, la quale può fungere da variabile dipendente o indipendente a seconda del tipo di analisi condotta. Sono possibili diversi tipi di analisi termiche:

Temperatura come variabile indipendente

TG Termogravimetria (*Thermogravimetry*)

DTG Termogravimetria derivata (*Derivative Thermogravimetry*)

TA Analisi termica (*Thermal Analysis*)

DTA Analisi termica differenziale (*Differential Thermal Analysis*)

DSC Calorimetria differenziale a scansione (*Differential Scanning Calorimetry*)

Temperatura come variabile dipendente

TT Titolazioni termometriche (*Thermometric Titration*)

DIE Entalpiometria ad iniezione diretta (*Direct Injection Enthalpimetry*)

¹ International Confederation for Thermal Analysis (ICTA)

In ambito farmaceutico le analisi termiche sono molto utilizzate, ad esempio nell'identificazione e nel controllo della purezza delle materie prime (*raw materials*), per lo studio dei polimorfi e nella quality assurance.

E' innanzitutto fondamentale chiarire quali fenomeni possono e quali non possono essere studiati con analisi termiche.

Le informazioni ottenute sono relative alla struttura fisica² ed alle proprietà dei materiali³.

Alcuni vantaggi delle analisi termiche nei confronti di altri metodi analitici sono:

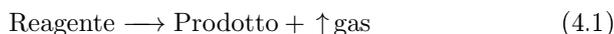
- il campione può essere studiato in un ampio intervallo di temperature;
- le analisi termiche sono estremamente versatili e permettono la caratterizzazione di molteplici tipi diversi di campioni, anche di forme fisiche diverse;
- è sufficiente una piccola quantità di campione da analizzare (0, 1µg -10mg)
- sono tecniche generalmente poco costose ed *operator friendly* e le analisi veloci;
- si può operare in atmosfera inerte o controllata.

4.2 Termogravimetria (TG)

4.2.1 Principio

I termini *termogravimetria* (TG), *termogravimetria differenziale* (DTG) ed *analisi termogravimetrica* (TGA) si riferiscono a metodi sperimentali dove le variazioni di massa del campione sono utilizzate per misurare i processi chimici e, più raramente, fisici che intervengono durante il riscaldamento della sostanza analizzata.

Mediante apposite termobalance si ottiene una misura accurata e continua della massa in funzione della temperatura, saranno pertanto visibili tutte e sole le reazioni che provochino una variazione della massa del campione, aumentandola o diminuendola, schematicamente:



L'intervallo di temperatura nel quale possono essere condotte analisi TG è vasto: da 120 a 2600K, chiaramente con un'accuratezza variabile nell'intervallo.

La temperatura del campione può essere mantenuta costante durante lo studio di un esperimento o variata sistematicamente in funzione del tempo o di altri parametri quali la cinetica di reazione.

Nota che la sola variazione di massa del campione non può essere utilizzata per determinare la stechiometria di reazione ma è buona pratica confermare con

²Possono essere ottenute anche informazioni di carattere chimico come purezza, degradazione, grado di crosslink di un polimero etc.

³In genere sono studiate fusione, cristallizzazione, transizione vetrosa etc non per un interesse *per se* ma perché riflettono la struttura del materiale in particolari condizioni, es. le trasformazioni polimorfiche al punto di fusione.

analisi chimiche l'identità del processo osservato. E' infine opportuno ricordare che non si può evidenziare da un termogramma il passaggio di stato da solido a liquido del campione, che nonostante ciò può essere un fattore importante nei fenomeni osservati.

4.2.2 Applicazioni

La termogravimetria ha trovato varie applicazioni (determinazione delle cinetiche di reazione etc.) ma in ambito farmaceutico il suo utilizzo, per quanto è estensivo, è ancora oggi principalmente concentrato sullo studio degli idrati e del contenuto di acqua^{4 5}.

Altre possibili applicazioni in ambito farmaceutico possono essere:

- stabilità termica, sublimazione e meccanismi di decomposizione;
- caratterizzazione semplice di API ed eccipienti;
- analisi della cinetica di disidratazione;
- analisi di solventi residui.

La TG resta quindi tecnica d'elezione per lo studio dei meccanismi di disidratazione⁶ e può essere applicata, assieme ai dati DSC e XRD, per lo studio dell'interazione tra API ed H₂O oppure tra eccipienti ed acqua.

Sta inoltre diventando cruciale per alcune forme farmaceutiche, quali le microsfere di polilattide (PLA), la rimozione dei solventi organici residui, anche a livelli molto inferiori dei limiti normativi e anche nel caso di solventi con classi di tossicità basse, a causa della loro influenza negativa sulla stabilità della forma farmaceutica stessa⁷. In questi casi la TG può essere molto utile anche nell'ambito dello sviluppo del processo produttivo e nel controllo di qualità.

Anche un impiego più diffuso della TG nello studio della volatilità e/o sublimazione di API ed eccipienti, fenomeni noti ma poco indagati, potrebbe avere ricadute importanti in ambito farmaceutico.

4.2.3 Analisi quantitativa

Oltre a considerazioni di carattere qualitativo derivabili dall'andamento generale del termogravigramma e dalle temperature a cui si verificano le variazioni di massa è possibile applicare la TG per analisi di tipo quantitativo, sia per

⁴Applicazione molto utile ed interessante dal punto di vista tecnologico-formulativo, meno dal punto di vista chimico

⁵Il fatto che la TGA abbia trovato meno applicazione in chimica farmaceutica rispetto alla chimica "di base" è probabilmente dovuto al fatto che in ambito chimico "non-farmaceutico" l'analisi termica è studiata per analizzare meccanismi e prodotti di decomposizione che si formano a temperature molto alte, che non vengono mai raggiunte, ordinariamente, dai preparati farmaceutici. L'unica eccezione degna di nota sono le previsioni di stabilità a lungo termine sulla base di studi di cinetica accelerate termicamente indotte. La validità dei dati estrapolati è però spesso esigua in quanto a temperature diverse possono essere coinvolti meccanismi di degradazione diversi.

⁶E' senz'altro un'analisi più semplice della Karl Fisher! L'unico rischio è finire con l'attribuire all'acqua, anche erroneamente, la causa di ogni perdita di massa tra gli 80 ed i 100°C...

⁷Non a caso queste forme farmaceutiche sono in genere ottenute per spray drying.

l'analisi di prodotti noti sia per la determinazione della composizione di miscele ignote di composti noti.

L'entità della variazione di massa percentuale del campione evidenziabile dal termogravigramma per una data temperatura, infatti, è una misura assoluta della frazione di sostanza persa o guadagnata nel fenomeno chimico o fisico verificatosi a quella temperatura, e come tale dipende unicamente dalla quantità relative di reagenti e dalla stechiometria di reazione.

In altre parole se la massa relativa di una molecola di acqua nel rame(II) solfato pentaidrato è del 7%⁸, ed alla temperatura T_{x1} si verifica la perdita di 4 molecole di acqua la diminuzione percentuale in massa del campione rispetto alla massa iniziale m_i sarà del 28%.

4.2.4 Termobilancia

Nella TG un campione di materiale (1mg –10mg o più) è posto su un braccio di una bilancia (detta *termobilancia*) posta in una fornace. Viene quindi misurata la variazione di massa del campione in funzione dell'aumento della temperatura nella fornace. La bilancia, infatti, è mantenuta in equilibrio da un elettromagnete alimentato da una corrente d'intensità variabile che è incrementata non appena il braccio opposto a quello contenente il campione "scende" a causa della diminuita massa del campione. Lo spostamento del braccio è evidenziato dall'interruzione del passaggio di luce in un laser posto appena sotto la posizione di equilibrio della bilancia e che chiude un circuito elettrico per effetto fotoelettrico.

Questo sistema garantisce l'estrema precisione nella misurazione delle variazioni di massa.

4.2.5 Termogravigramma

Il grafico ottenuto rappresentando le variazioni di massa (in percentuale rispetto alla massa iniziale, $m_i = 100\%$) in funzione della temperatura della fornace è detto termogramma.

Nel termogramma riportato in figura 4.1 sono analizzati 19,03mg di calcio ossalato monoidrato ($\text{CaC}_2\text{O}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 146,12g mol⁻¹) pari a $\approx 0,130$ mmol.

Tra 125°C e 224°C il campione perde 2,28mg, il 12,3% del peso del campione, pari ad un equivalente di H_2O ($0,130$ mmol · 18g mol⁻¹ $\approx 2,3$ mg).

Con calcoli analoghi si può evidenziare la perdita di CO a $\approx 520^\circ\text{C}$ e di CO₂ a $\approx 780^\circ\text{C}$ che lascia il campione ridotto a meno del 40% della massa iniziale: rimane di fatto il solo CaO.

4.2.6 Analisi composizione

In figura 4.2 è mostrato un esempio di applicazione della termogravimetria per determinare la composizione di una sostanza incognita, in questo caso il polimero bianco che costituisce una porta.

⁸Il valore preciso può ovviamente essere calcolato, mediante divisione, a partire dalla masse molecolari dell'acqua e del sale: $18,015\text{g mol}^{-1}/249,68 \approx 7,22\%$

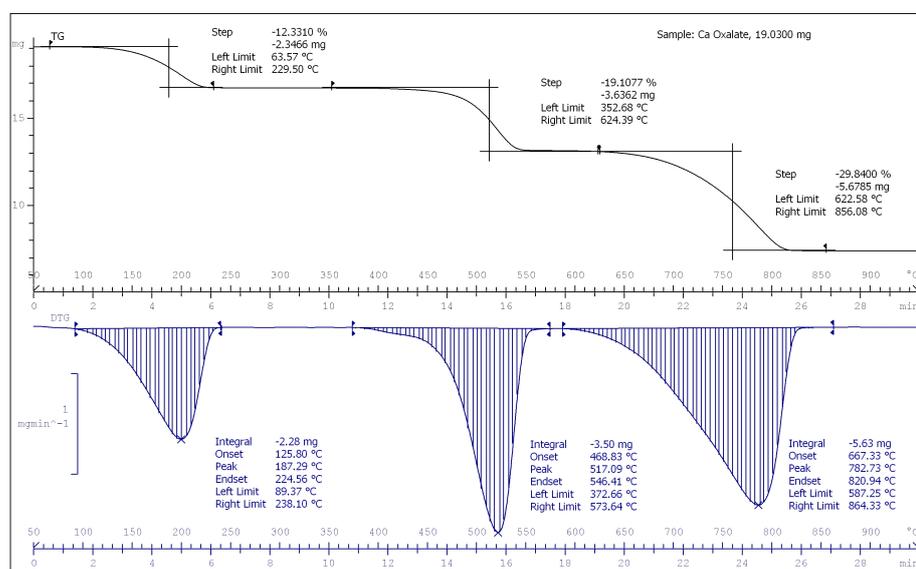


Figura 4.1: Termogramma del Calcio Ossalato

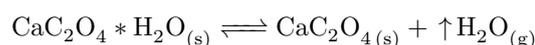
4.2.7 Parametri analisi

Velocità di riscaldamento Un parametro cruciale che influenza il grado di definizione del termogravigramma è la velocità di riscaldamento: tanto maggiore è la velocità con cui la fornace è riscaldata tanto maggiore sarà la differenza di temperatura tra termocoppia e campione, e tanto meno accurata sarà l'analisi. Inoltre gradienti di temperatura troppo aggressivi possono inficiare anche l'uniformità di temperatura all'interno del campione, soprattutto nel caso di campioni di dimensioni troppo grandi, con conseguente perdita nella capacità di risolvere picchi vicini.

Atmosfera Il controllo dell'atmosfera nella quale è effettuata l'analisi è importante e può essere fondamentale per lo studio di reazioni di ossidazione. Si possono effettuare analisi TG correntemente in atmosfera statica o dinamica, con gas inerti o sotto vuoto.

La curva in figura 4.3 mostra la decomposizione dell'ossalato di calcio monoidrato in atmosfera ossidante (O_2) ed inerte (N_2). Si nota che la diversa atmosfera non ha effetto sulla prima perdita di peso, ed ha effetti opposti tra secondo e terzo picco.

Il primo picco è costituito da una reazione reversibile, la disidratazione:



ed il tipo di atmosfera presente non ha influenza in quanto sia l'azoto che l'ossigeno agiscono con eguale efficacia nell'allontanare le molecole di H_2O in fase gas dall'interfaccia col solido.

Nel secondo picco, invece, si nota una temperatura più bassa della perdita di massa nel caso dell'atmosfera con ossigeno, ciò può essere spiegato chimicamente

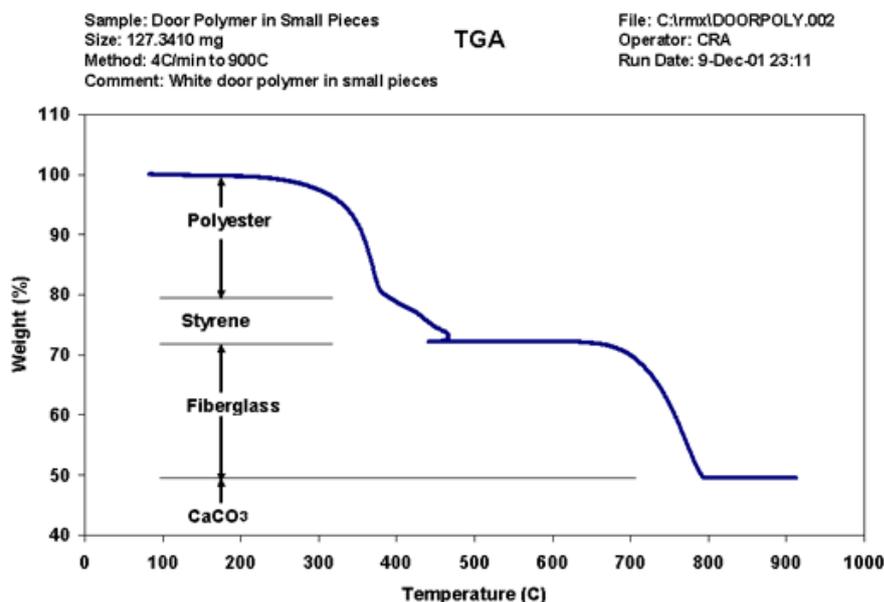
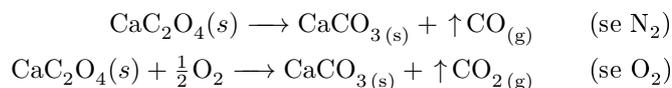


Figura 4.2: Analisi della composizione di un polimero mediante TG

analizzando la reazione, irreversibile, coinvolta in questo step:



Nel terzo picco, infine, si verifica un'altra reazione reversibile, la decomposizione del carbonato di calcio a calcio ossido. Essendo una reazione reversibile (come la prima) non si *dovrebbero* osservare differenze. La distanza sperimentale tra le due linee può essere spiegata con la differente struttura del CaCO_3 formatosi nella seconda reazione.



Come regola generale le reazioni reversibili non sono influenzate dal tipo di atmosfera in cui è condotta l'analisi, con l'ovvia eccezione delle influenze dirette sulla stechiometria di reazione o sulla legge dei gas. In altre parole, anche la reazione reversibile $\text{CaCO}_3(s) \longrightarrow \text{CaO}(s) + \uparrow \text{CO}_2(g)$ può subire importanti effetti relativi all'atmosfera se si esegue l'analisi in un'atmosfera con significativa pressione parziale di CO_2 , che è il prodotto della reazione e quindi sposta l'equilibrio, o se si esegue sotto vuoto (fig. 4.4).

Riscaldamento La fonte di calore può essere diversa, una resistenza, radiazioni IR, microonde o altro. E' in ogni caso importante ottenere un riscaldamento uniforme del campione ed evitare moti convettivi che possono comportare significative perdite in precisione nella misura del peso da parte della termobilancia.

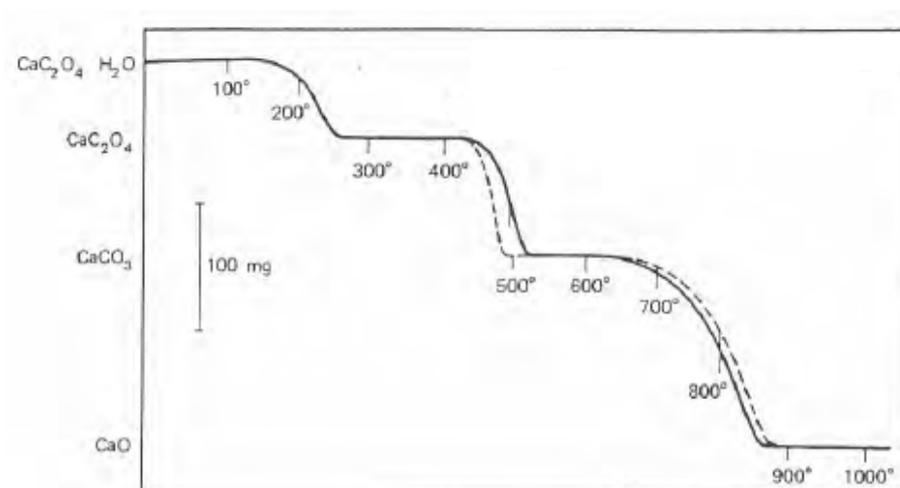


Figura 4.3: Effetto dell'atmosfera sul termogravigramma del $\text{CaC}_2\text{O}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ La linea tratteggiata è un'atmosfera di O_2 quella continua N_2

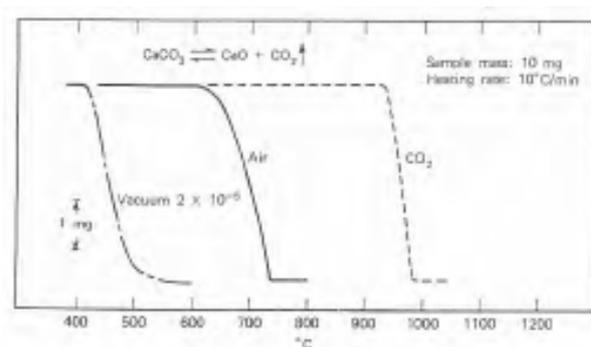


Figura 4.4: L'effetto di diverse atmosfere sul termogravigramma del CaCO_3

Misurazione temperatura Poiché la temperatura gioca un ruolo fondamentale nell'analisi termogravimetrica oltre ad avere misure di massa precise è necessario anche conoscere con precisione la temperatura del campione. Ciò può essere ottenuto mediante termometri a resistenza di platino o con termocoppie.

Quantità campione I risultati migliori si ottengono con quantità minime di campione da analizzare. Questo perché molte reazioni, quali quelle di decomposizione, non coinvolgono tutta la massa del campione contemporaneamente e pertanto è richiesto un tempo maggiore per il completamento della reazione in funzione di una massa di polvere maggiore. Questo tempo maggiore si traduce in una minor precisione nella temperatura associata al fenomeno in quanto il gradiente di temperatura è generalmente costante nel tempo.

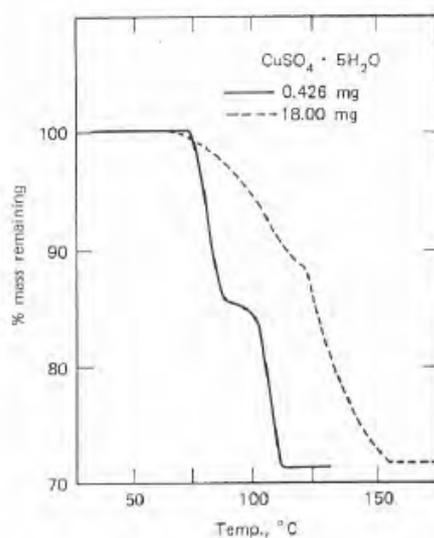


Figura 4.5: Effetto della massa del campione sul termogravigramma

4.3 Termogravimetria Derivata (DTG)

La termogravimetria derivata (DTG) è un'analisi che impiega la stessa tecnica e gli stessi principi della termogravimetria con la sola differenza che è calcolata la derivata prima al termogravigramma.

4.3.1 Perché derivata?

La figura 4.6 illustra, sovrapposte l'una all'altra le curve TG e DTG di un campione. In realtà quella tracciata, come è convenzione, è la derivata cambiata di segno, ma questo non cambia nulla nel suo significato fisico: la derivata, infatti, aiuta semplicemente ad individuare le temperature alle quali avvengono le variazioni di massa.

Dal punto di vista matematico la derivata può essere descritta come la pendenza punto per punto di una curva, e come tale mantiene inalterato il dominio della funzione. In altre parole dove nella TG avevamo una curva dove alla temperatura T_1 si poteva leggere la massa del campione, nella DTG alla stessa temperatura si hanno informazioni su quanto velocemente varia la massa del campione a quella temperatura. In pratica i picchi in DTG corrispondono ai punti di massima pendenza delle curve di TG e sono le temperature alle quali sono massime le variazioni di massa al campione.

La termogravimetria derivata (*Derivative Thermogravimetry - DTG*) misura la variazione di massa rispetto al tempo o alla temperatura in funzione del tempo o della temperatura. Matematicamente:

$$\frac{dm}{dt} = f(T \text{ o } t) \quad (4.3)$$

$$\frac{dm}{dT} = f(T \text{ o } t) \quad (4.4)$$

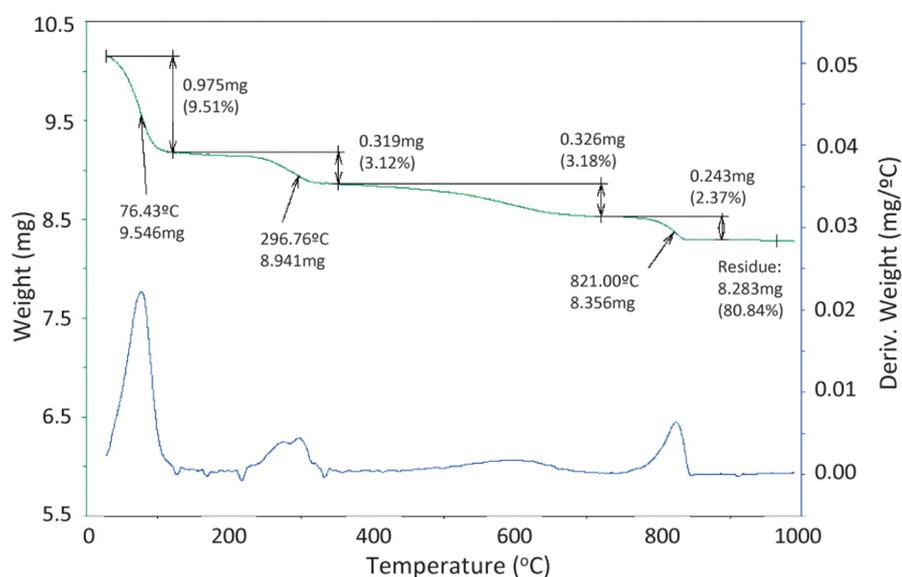


Figura 4.6: Calcolo della derivata (seconda curva) di una TGA

La DTG non è altro che un'elaborazione matematica della TG, pertanto si può dire che

[...] the DTG curve presents information in a form that is more visually accessible, whereas the DTG curve contains no more information than does the TG curve.

4.3.2 Vantaggi

Oltre alla più immediata leggibilità la DTG presenta i seguenti vantaggi rispetto alla TG:

- nella DTG l'area sotto la curva è direttamente proporzionale alla variazione di massa⁹;
- i picchi DTG corrispondono alla temperatura a cui la variazione di massa è massima, per quanto questo valore non abbia un significato fisico maggiore dei T_i e T_f della TG;
- l'altezza del picco DTG può essere correlato direttamente alla cinetica di reazione¹⁰;
- l'analisi DTG permette di identificare e separare reazioni sovrapposte nello schermo TG, si consideri come esempio la figura 4.7;

⁹Ciò risulta evidente se si pensa al calcolo dell'area sotto la curva come operazione di integrazione: l'integrale della derivata riporta alla grandezza originaria dei grafici TG che era la variazione di massa.

¹⁰Arrhenius $-\frac{dm}{dt} = Ae^{(-E/RT)} f(m)$

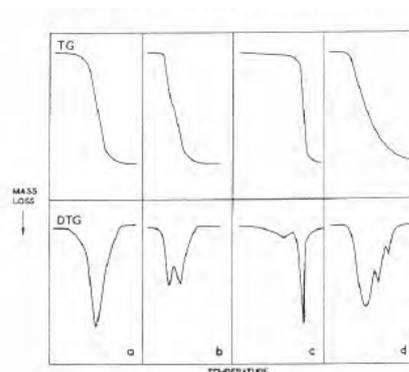


Figura 4.7: Reazioni TG sovrapposte evidenziate in DTG

- grazie alla maggior sensibilità, poi, la DTG è più adatta alla generazione di “fingerprints” di prodotti noti o per confrontare dei campioni con uno standard;
- mediante semplici estrapolazioni, poi, è possibile anche calcolare l’area di picchi sovrapposti, come mostrato in figura 4.8.

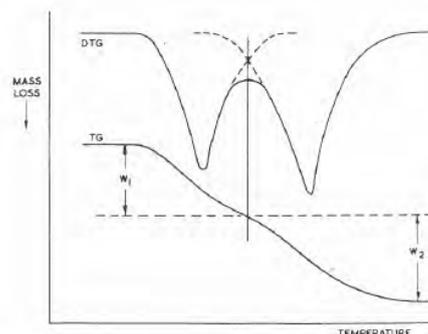


Figura 4.8: Estrapolazione delle variazioni di massa delle due reazioni sovrapposte

4.4 Analisi termica Differenziale (DTA)

L’analisi termica differenziale è una tecnica di analisi termica nella quale la temperatura del campione, confrontata con quella di un materiale termicamente inerte, è registrata in funzione della temperatura del campione, del riferimento o della fornace, mentre il campione è scaldato o raffreddato nell’intervallo di temperature che s’intende studiare.

Le variazioni di temperatura del campione rispetto al riferimento, che vengono registrate mediante un voltmetro che collega le termocoppie poste, rispettivamente, sotto il riferimento e nel portacampione, dipendono da trasformazioni entalpiche endotermiche o esotermiche.

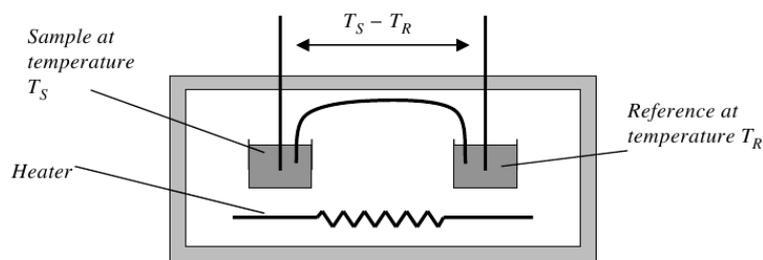


Figura 4.9: Schema di funzionamento di un apparecchio per DTA

Un apparato per DTA è schematizzato in figura 4.9. Una quantità di calore Q costante è fornita dalla fornace al sistema al campione ed al riferimento, i quali, in assenza di fenomeni entalpici, aumentano la loro temperatura linearmente in funzione del calore fornito, dove la costante del rapporto tra calore fornito ed aumento di temperatura è il calore specifico. La sostanza da analizzare potrà avere un calore specifico (C_p) maggiore o minore di quello della sostanza di riferimento (in genere vetro o Al_2O_3), ma poiché le due sostanze sono poste nella medesima fornace le differenze di temperatura tenderanno a compensarsi. Si verificherà un “ritardo” costante di temperatura tra quella con C_p minore, che quindi a parità di calore si scalda di più, e quella con C_p maggiore. Ovvero la curva di temperatura del campione sarà, in assenza di fenomeni entalpici, parallela a quella del riferimento ma a temperature lievemente maggiori o inferiori a seconda del rapporto di C_p tra le due sostanze.

Le differenze di temperatura che si instaura tra riferimento e campione a causa dei diversi p è costante in quanto avendo temperature diverse si crea un flusso di calore dalla sostanza più calda alla più fredda, in accordo con la legge di Newton del raffreddamento, per cui

$$\Phi Q = \frac{dQ}{dt} = K(\Delta T) \quad (4.5)$$

dove K è una costante funzione della conducibilità termica e dell’area di contatto.

Poiché quindi il flusso di calore che si instaura tra la sostanza più calda e la meno calda è proporzionale alla differenza di temperatura e la differenza di temperatura aumenta linearmente al tempo in funzione della differenza dei C_p si giungerà ad una situazione di equilibrio con ΔT costante.

Il grafico delle temperature in funzione del tempo, pertanto, è una retta crescente dove, col passare del tempo aumenta il calore fornito e quindi la temperatura. Tale retta può essere resa lineare per evidenziare le trasformazioni a cui va incontro il campione. Fenomeni endotermici quali fusione disidratazione e sublimazione, infatti, faranno diminuire la temperatura del campione rispetto a quella del riferimento in quanto il calore fornito è impiegato come calore latente della trasformazione e non è più solo correlato all’aumento di temperatura in base al C_p . Analogamente le trasformazioni esotermiche provocheranno variazioni positive di temperatura, come illustrato in figura 4.10.

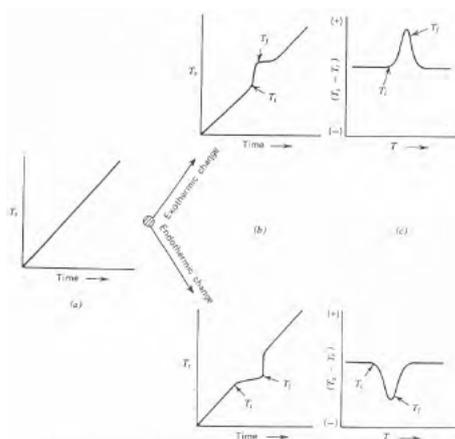


Figura 4.10: Effetto di trasformazioni endo- ed esotermiche sulle curve DTA

4.4.1 Tipi di transizioni

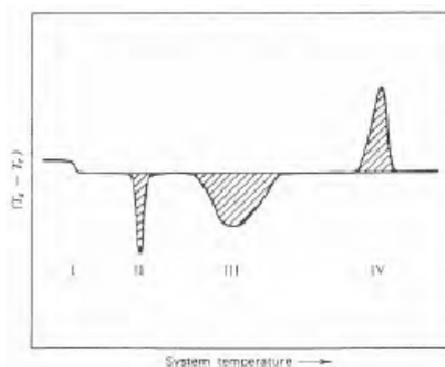


Figura 4.11: Tipi di transizioni possibili in DTA

In figura 4.11 sono mostrati i 4 tipi di trasformazioni osservabili in un grafico DTA:

- I cambio della linea di base (es. transizione vetrosa);
- II picco endotermico (es. fusione);
- III curva endotermica (es. decomposizione);
- IV picco esotermico (es. cambio abito cristallino).

Le transizioni II, III e IV sono dette transizioni di *primo ordine*, e coinvolgono sia calore latente sia un cambiamento di calore specifico, la transizione I è una transizione di *secondo ordine* ovvero contempla solo un cambiamento di calore specifico¹¹.

¹¹Una transizione di secondo ordine, più propriamente, è definita come un processo nel quale la derivata della variazione di energia libera è nulla mentre la derivata seconda non è nulla: $(\delta^2 \Delta G / \delta T^2) = (-\Delta C_p / T) \neq 0$.

Trasformazioni endotermiche

Le trasformazioni endotermiche provocano scostamenti negativi rispetto alla linea base in un grafico DTA, avvengono assorbendo calore e sono:

- fusione (passaggio solido/liquido);
- evaporazione (passaggio liquido/gas);
- sublimazione (passaggio solido/gas);
- disidratazione;
- transizioni polimorfiche.

Trasformazioni esotermiche

Le trasformazioni esotermiche provocano scostamenti positivi rispetto alla linea base in un grafico DTA, avvengono cedendo calore e sono:

- cristallizzazione (passaggio liquido/solido);
- condensazione (passaggio gas/liquido);
- brinazione (passaggio gas/solido);
- adsorbimento;
- ossidazione;
- transizioni polimorfiche.

Transizioni di secondo ordine

Tra le transizioni di secondo ordine si segnala sostanzialmente la sola transizione vetrosa, non perché sia l'unica transizione di secondo ordine esistente ma in quanto l'unica frequentemente presente negli spettri delle analisi termiche e l'unica d'interesse in ambito farmaceutico.

Reazioni chimiche

Non sono transizioni di fase ma sono egualmente visibili in DTA a causa del $\Delta H_{\text{reaz.}}$ le reazioni chimiche. Possono ovviamente essere endotermiche o esotermiche a seconda dell'energia libera di Gibbs ad esse associata.

4.4.2 Teoria

Esistono numerose teorie che tentano di spiegare e predire l'andamento dei grafici DTA. Si può comunque dire che l'area del picco è proporzionale all'energia ceduta (se positivo) o assorbita (se negativo) dal campione durante la trasformazione.

Una non-spiegazione approssimata può considerare il fatto che le ordinate sono proporzionali a $\frac{dQ}{dt}$, ovvero al flusso di calore, che è $\Phi = \frac{dQ}{dt}$ e le ascisse corrispondono alla temperatura del riferimento, ma poiché l'aumento di temperatura nel tempo per il riferimento è costante l'ascissa è proporzionale al

tempo, pertanto l'area di un picco è $\int \frac{dQ}{dt} dt = \Delta Q$ ovvero l'area del picco è proporzionale all'energia ceduta (se positivo) o assorbita (se negativo) durante la trasformazione.

Secondo la teoria più semplice (Speil modificata da Kerr e Kulp) l'area dei picchi è

$$A = \int_{t_1}^{t_2} \Delta T dt = \frac{m \cdot (\Delta H)}{gc} \quad (4.6)$$

dove m è la massa del campione, ΔH l'entalpia di reazione, g una costante dipendente dalla geometria di campione e portacampione, c la conducibilità del campione.

Integrando le costanti g e c in c' si ha: $A = c' \cdot m(\Delta H)$.

Si tratta di un'equazione semplice ed approssimata che trascura il gradiente di temperatura nel campione, i parametri differenziali e che considera l'area del picco indipendente dal C_p del campione.

In pratica, sebbene vi sia una correlazione tra l'integrale alla curva ed il calore coinvolto nella trasformazione, per misura quantitative è meglio ricorrere alla più precisa DSC.

4.4.3 Fattori influenzanti le curve DTA

La DTA, essendo una tecnica a temperatura dinamica, presenta numerosi fattori che ne influenzano le curve sperimentali. I fattori possono essere divisi in due classi:

Fattori strumentali

- atmosfera della fornace;
- geometria del portacampione;
- velocità e risposta dello strumento di registrazione;
- dimensione e forma della fornace;
- cavi e superficie di contatto delle giunzione con la termocoppia;
- posizione della termocoppia rispetto al campione.
- materiale del portacampione;
- gradiente di riscaldamento;

Caratteristiche del campione

- granulometria;
- impaccamento;
- rigonfiamento o restringimento del campione.
- conducibilità termica;
- quantità di campione;
- calore specifico;
- grado di cristallinità;

4.5 Calorimetria a scansione differenziale (DSC)

“La DSC è un'analisi termica nella quale viene misurata, in funzione della temperatura del campione, la differenza tra i flussi termici

nella sostanza ed in un riferimento, mentre entrambi sono sottoposti ad un programma controllato di temperatura.”

Un calorimetro differenziale misura il calore fornito ad un campione relativo ad un riferimento: l'adozione di un riferimento, infatti, consente un significativo incremento di precisione ed accuratezza. In un calorimetro differenziale a scansione, poi, si misura il calore necessario a mantenere un gradiente di temperatura costante.

La DSC è la tecnica termica più utilizzata in ambito farmaceutico, e costituisce un'evoluzione della DTA (che non ha però rimpiazzato completamente¹²).

La DSC è stata introdotta a partire dagli anni '60, per superare le problematiche connesse alla DTA. In comune con la DTA la DSC misura la differenza di temperatura tra il campione ed un riferimento, ma l'innovazione delle prime DSC consisteva appunto nel tentativo di tenere pari o vicina a zero la differenza di temperatura tra i due. In particolare si possono avere due tipi di strumenti per misurazioni DSC;

- a flusso di calore (sez. 4.5.2);
- a compensazione di potenza (sez. 4.5.3).

Mentre il riferimento viene sottoposto ad un aumento lineare di temperatura il sistema di controllo, idealmente, forza il campione a seguire lo stesso gradiente di temperatura. Conseguentemente ogni differenza di potenza tra il piatto di riferimento e quello del campione deve essere correlato alla capacità termica del campione ed alle entalpie associate alle sue transizioni. Per non dover sottrarre il contributo in calore specifico della sostanza di riferimento in genere negli esperimenti DSC il riferimento è costituito dal portacampione vuoto.

4.5.1 La DSC nell'industria farmaceutica

In ambito farmaceutico la DSC è utilizzata diffusamente, con particolare riferimento a tre transizioni:

T_g le transizioni vetrose, ad es. per determinare la presenza di amorfi e la temperatura di conservazione;

C_p il calore specifico per verificare la validità delle procedure di produzione;

T_m il punto di fusione per il calcolo della purezza, nell'ambito del controllo di qualità e per lo studio dei polimorfi che possono avere effetti sulla farmacocinetica.

Virtually all pharmaceutical companies of substantial size will own a DSC, whereas the majority of academic pharmaceutical departments will either own one or have access to it. As far as the pharmaceutical industry is concerned, the breadth and extent of use of this instrument may vary considerably; some will only use it as a

¹²La DTA, ad esempio, continua ad offrire una più precisa misurazione della temperatura iniziale cui si verifica un fenomeno termico, e resta un valido strumento per determinare se si tratta di trasformazioni endotermiche o esotermiche, reversibili o irreversibili e di che ordine, mentre per misurazioni quantitative del fenomeno si ricorre alla DSC.

routine screening for polymorphism whereas others will have researchers dedicated specifically to thermal and related characterization techniques. The level of sophistication with which the technique is used varies accordingly, with some companies using the instrument almost entirely as a screening tool with little or no specific data interpretation, whereas others will use the method for more advanced predictive studies such as characterization of the glass transitions of freeze-dried systems¹³.

4.5.2 DSC a flusso di calore

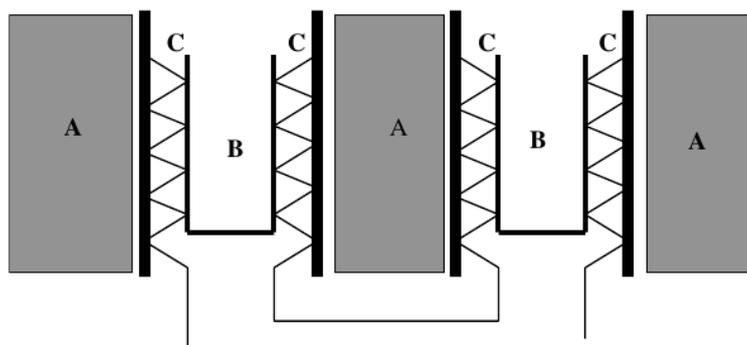


Figura 4.12: Schema di un apparecchio DSC a flusso di calore. A = fornace, B = crogioli campione e riferimento, C = termocoppie

La DSC a flusso di calore è concettualmente il più semplice dei due approcci. Due crogioli, tipicamente l'uno contenente il campione e l'altro vuoto, sono posti simmetricamente in una fornace con una termocoppia a stretto contatto con ciascuno¹⁴. Le termocoppie sono collegate tra loro in modo che la differenza di potenziale misurata sia correlata alla differenza di temperatura tra due crogioli.

La differenza chiave rispetto alla DTA sta nella considerazione seguente: poiché il flusso termico dalla fornace al crogiolo è

$$\frac{dQ}{dt} = \frac{\Delta T}{R}$$

(dove Q = calore, t = tempo, ΔT = differenza di temperatura tra fornace e crogiolo ed R = resistenza termica nel cammino del calore da fornace a crogiolo) ne segue che la differenza di temperatura tra il crogiolo vuoto di riferimento e quello contenente il campione riflette il flusso di calore al campione, in quanto la disposizione simmetrica dei crogioli rispetto alla fornace garantisce l'identità del cammino del calore.

L'utilizzo di un crogiolo vuoto come riferimento interno consente di eliminare per differenza tutte le possibili interferenze come l'assorbimento termico del crogiolo, le perdite di calore per convezione etc. E' necessaria la calibrazione dei segnali di ΔT per garantire che il flusso di calore sia funzione della temperatura,

¹³D. Craig e M. Reading, *Thermal Analysis of Pharmaceuticals*, CRC Press.

¹⁴In realtà per aumentare la sensibilità in genere molte termocoppie sono collegate in serie simmetricamente nella fornace col campione e quella di riferimento, come in figura 4.12

tale calibrazione è effettuata utilizzando come standard dei metalli puri di cui sia nota l'entalpia di fusione e con materiale di capacità termica nota.

Negli strumenti a flusso di calore è generalmente la fornace a subire la programmata di temperatura, mentre le transizioni nel campione provocano distorsioni rispetto al gradiente. Il profilo di temperatura subito dal campione non è quindi noto a priori ma solo in seguito all'esperimento (con l'estrapolazione dei dati) ma in ogni caso queste deviazioni dal gradiente programmato sono minime e non presentano alcuna criticità.

4.5.3 DSC a compensazione di potenza

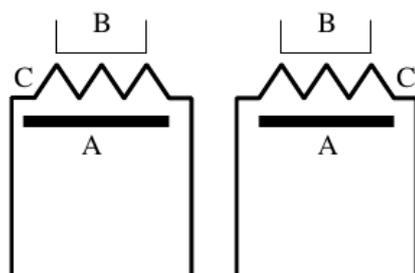


Figura 4.13: Schema di un apparecchio DSC a compensazione di potenza. A = fornaci, B = crogioli campione e riferimento, C = termometri a resistenza in platino

Lo schema di una DSC a compensazione di potenza è riportato in figura 4.13. La prima differenza rispetto all'apparecchio a flusso di calore è che questo approccio utilizza due distinte fornaci: una per il campione, l'altra per il riferimento. Entrambe sono programmate per seguire lo stesso profilo di temperatura, ed è misurata la differenza in energia elettrica fornita alle due fornaci.

L'unica differenza tra le due fornaci dovrebbe essere, quindi, la presenza, in una delle due, del campione. Le stesse considerazioni della DSC a flusso di calore sullo standard interno si applicano qui, mentre teoricamente una misura dell'assorbimento di corrente elettrica potrebbe non richiedere calibrazione, in quanto, nota la quantità di campione, è già linearmente correlato al flusso di calore. In pratica, però, per ottenere risultati più accurati si procede anche in questo caso ad una calibrazione analoga alla precedente.

Contrariamente alla DSC a flusso di calore nella DSC a compensazione di potenza il gradiente di temperatura è impostato rispetto alla temperatura del campione. Pertanto, in teoria, è lecito prevedere una maggior precisione di questo tipo di strumenti. In pratica, comunque, non può essere ottenuto un controllo perfetto a causa del limite di misura della temperatura, che è discreto e non continuo.

In breve, entrambi i modelli sono in commercio da oltre 30 anni e nessuno dei due si è imposto sull'altro in quanto le performance sono molto simili in termini di accuratezza e precisione.

Le fornaci a compensazione di potenza sono generalmente più piccole e permettono quindi riscaldamenti e raffreddamenti più rapidi mentre le DSC a flusso di calore hanno una baseline più stabile grazie al design a singola fornace.

4.5.4 Grafici DSC

Una grafico DSC è costituito da una curva dove la potenza è funzione della temperatura.

In assenza di fenomeni termici la linea di base del grafico è circa parallela all'asse delle temperatura in quanto il C_p varia poco con la temperatura. Assumendo C_p costante in dT si può scrivere:

$$dQ/dt = C_p \cdot dT/dt \quad (4.7)$$

In seguito a calibrazione con lo strumento vuoto e con materiali di riferimento (Al_2O_3), e nota la massa del campione, quindi, si può correlare il valore in flusso di calore nell'unità di tempo con il calore specifico della sostanza.

Transizioni di primo ordine

Le transizioni di primo ordine sono visibili, in DSC come in DTA, come picchi positivi o negativi rispetto alla linea-base (*baseline*).

Si ricorda che (cfr. pag. 41) le principali trasformazioni endotermiche sono fusione, evaporazione e disidratazione mentre tra le esotermiche ricordiamo cristallizzazione, condensazione ed ossidazione.

E' importante osservare che la direzione dell'asse Y, con il flusso di calore, non è costante per tutti i tracciati DSC, bisognerà pertanto prestare attenzione e verificare se, nel grafico d'interesse, i picchi esotermici presentino deviazioni positive o negative.

Per convenzione in DTA le curve endotermiche sono rappresentate come negative, la convenzione DSC invece, è (inutilmente) più complicata. L'orientamento positivo o negativo dei picchi esotermici, infatti, dipende dalla tecnologia impiegata per l'acquisizione dei dati: nelle DSC a compensazione di potenza i picchi endotermici puntano verso l'alto mentre nelle DSC a flusso di calore le endoterme sono negative.

Perché?

Versione Corta La differenza rispetta le direttive dell'ICTAC (International Conference on Thermal Analysis and Calorimetry) e si basa su argomentazioni tecniche.

Nella pratica è bene verificare sempre se sia presente (dovrebbe esserci!) una freccia con l'indicazione della direzione dell'asse ("exo" o "endo", \uparrow o \downarrow).

Versione Lunga Nelle DSC a compensazione di potenza i picchi endotermici, ovvero associati ad eventi che richiedono energia, sono positivi (ovvero puntano verso l'alto) in quanto lo strumento deve fornire più potenza al campione per mantenere le due fornaci (riferimento e campione) alla stessa temperatura. Nelle DSC a flusso di calore, invece, gli stessi eventi che richiedono energia (es. fusione) provocano l'assorbimento di calore da parte del campione che diventa quindi più freddo della fornace (è proprio la differenza di temperatura maggiore a provocare il flusso di calore maggiore che supplirà al calore aggiuntivo richiesto) e pertanto i picchi endotermici puntano verso il basso. In realtà oggi questa regola non è più strettamente seguita ma i due sistemi sono usati indifferentemente, spesso con poca consapevolezza, da parte degli utilizzatori. Si tratta, infatti, di una convenzione stabilita molti anni fa (l'introduzione delle prime DSC risale

agli anni Sessanta) e che, per quanto abbia un razionale tecnico, appare oggi superata in quanto gli strumenti moderni, essendo digitali, permettono di generare il tracciato DSC con la convenzione scelta dall'operatore. Ciò provoca inutile confusione ed arbitrarietà che potrebbe essere superata allargando alla DSC la stessa convenzione applicata alla DTA. Ma per ora non è così...

Transizioni di secondo ordine

Trasformazioni di secondo ordine, come la transizione vetrosa, saranno visibili come alterazioni della linea di base (analogamente a quanto avviene in DTA), ad esempio in figura 4.14 è riportata la transizione vetrosa della vitamina E.

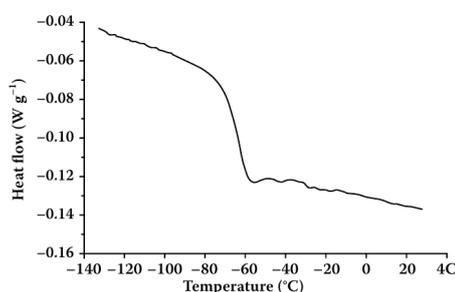


Figura 4.14: Tracciato DSC della transizione vetrosa della vitamina E

Nota che il cambiamento di C_p non avviene “a scalino” ma la trasformazione richiede $\approx 10^\circ\text{C}$ e la temperatura a cui si verifica la transizione vetrosa dipende dal gradiente di riscaldamento o raffreddamento. Ciò indica che si tratta di un fenomeno cinetico oltre che termodinamico, anche per questo la transizione vetrosa non è una trasformazione di secondo ordine ideale. Inoltre nella pratica spesso al cambio di C_p è associata anche una curva esotermica, che può portare ad errate interpretazioni come ad mostrato nella figura 4.15.

Il motivo per cui si verificano “false esoterme” in corrispondenza della temperatura di transizione vetrosa è che gli stress subiti dal materiale in fase vetrosa (stress prodotti da handling, processing or thermal history) sono rilasciati quando il materiale è riscaldato in corrispondenza del punto di transizione vetrosa. Questo in quanto le molecole riacquistano una struttura flessibile al posto di quella rigida della fase vetrosa e come tali possono muoversi per scaricare lo stress subito.

Le false-esoterme associate alla T_g possono essere eliminate se si scalda il campione al di sopra della temperatura di transizione vetrosa (T_g) e lo si raffredda rapidamente. In figura 4.16 è evidenziato come velocità di raffreddamento più elevate diano i migliori risultati in termini di cancellazione dei picchi esotermici nei successivi riscaldamenti prossimi a T_g .

4.5.5 Teoria

Nota che nei grafici DSC l'area sottesa al picco è direttamente proporzionale al calore prodotto o assorbito dalla reazione, inoltre l'altezza della curva è direttamente proporzionale alla velocità di reazione.

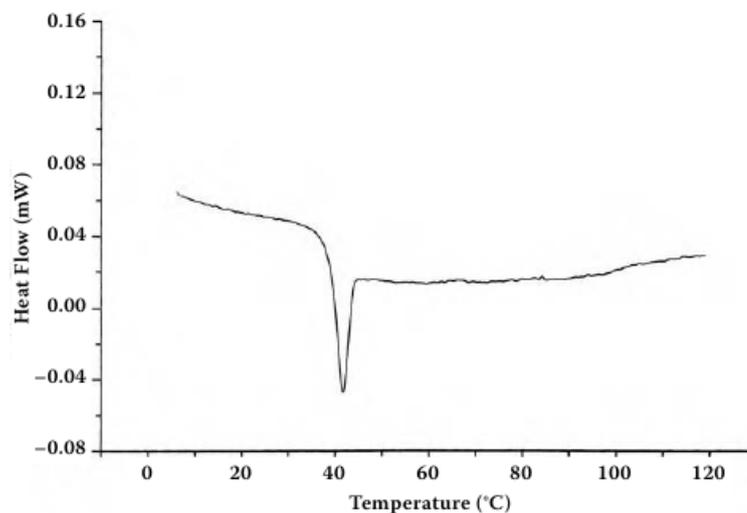


Figura 4.15: Tracciato DSC di microsfele di polylactide con transizione vetrosa associata a un picco esotermico.

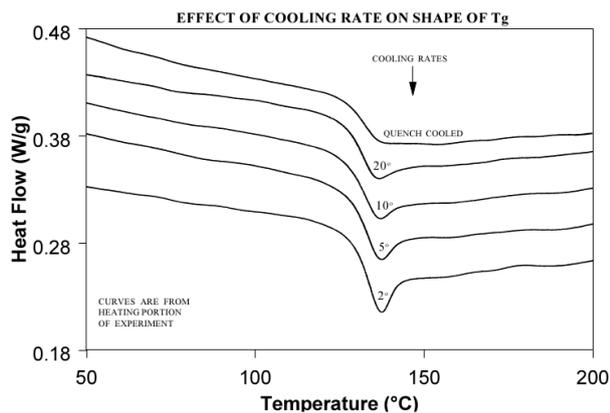


Figura 4.16: Effetto del quench-cooling sulle endoterme accoppiate alla transizione vetrosa.

In particolare viene calcolata la potenza, ovvero il flusso termico nell'unità di tempo, dalla misura dell'intensità di corrente elettrica nella resistenza che produce il calore che alimenta la fornace. Questo perché le misurazioni dell'intensità di corrente elettrica sono semplici, estremamente precise e la conversione analogico-digitale dei valori ottenuti è tecnicamente banale. Il fondamento teorico che mette in relazione l'intensità di corrente elettrica al calore sviluppato è la legge di Ohm

$$V = iR \quad (4.8)$$

sostituendo la differenza di potenziale V nell'equazione della potenza ($P = V \cdot i$)

si ottiene

$$P = i^2 \cdot R = \frac{dQ}{dt} \quad (4.9)$$

dove P è la potenza, i l'intensità di corrente elettrica ed R la resistenza¹⁵.

Viene pertanto misurato l'integrale di dQ/dt in dt . Assumiamo quindi che l'incremento di temperatura dipenda dal solo C_p del campione (ovvero che non si verifichino trasformazioni entalpiche). Trattandosi di una misura "differenziale" si avrà:

$$\Delta \left(\frac{dQ}{dt} \right) = \left(\frac{dQ}{dt} \right)_x - \left(\frac{dQ}{dt} \right)_{rif} \quad (4.10)$$

ma poiché per definizione di DSC campione e riferimento vanno incontro alle stesse variazioni di temperatura nel tempo si ha:

(I pedici "x" si riferiscono al campione mentre i pedici "rif" al riferimento.)

$$\left(\frac{dQ}{dt} \right)_x - \left(\frac{dQ}{dt} \right)_{rif} = \left(\frac{dT}{dt} \right) \cdot \left[\left(\frac{dQ}{dT} \right)_x - \left(\frac{dQ}{dT} \right)_{rif} \right] \quad (4.11)$$

Ricordando che C_p è definito come dQ/dT , ed osservando che dT/dt non è altro che la velocità di scansione della temperatura (β), si ottiene:

$$= \beta x (m_x \cdot C_{p,x} - m_{rif} \cdot C_{p,rif}) \quad (4.12)$$

Dal tracciato ottenuto con la cella portacampione vuota ($m_x = 0$) si ottiene:

$$\left(\frac{dQ}{dt} \right)_r = \beta \cdot m_x C_{p,rif} \quad (4.13)$$

ovvero i valori di $C_{p,rif}$ per ogni temperatura, necessari per trovare il valore assoluto del $C_{p,x}$ e non sono la sua differenza col riferimento.

Sottraendo il tracciato della cella vuota si ottiene il dato "pulito", ovvero riferito al solo campione:

$$\left(\frac{dQ}{dt} \right)_x = \beta \cdot m_x C_{p,x} \quad (4.14)$$

Poiché nei grafici DSC è automaticamente sottratto il parametro riferito al riferimento si ha che la linea di base è descritta dall'equazione:

$$\left(\frac{dQ}{dt} \right)_{baseline} = \beta \cdot m_x C_{p,x} \quad (4.15)$$

Essendo note la massa del campione (m_x) e la velocità di scansione (β) si può ricavare quindi $C_{p,x}$ in funzione di T .

Ricorda che per poter calcolare con precisione i C_p con DSC è necessario effettuare apposite calibrazioni con standard di riferimento! Al di là del significato fisico della linea di base, comunque, la sua importanza è grande anche solo in riferimento al calcolo delle entalpie delle transizioni termiche in quanto

¹⁵Si noti che l'intensità di corrente elettrica è al quadrato, fattore che incrementa ulteriormente la sensibilità dello strumento.

il calcolo dell'area parte appunto dalla linea di base (e non dal valore di flusso = 0!).

Nella definizione delle transizioni di primo ordine era stato sottolineato come esse coinvolgesse sia calore latente sia variazioni del C_p . Ciò è reso evidente dai picchi DSC dove si possono notare significativi scostamenti della linea di base, ovvero del C_p , in corrispondenza di picchi eso/endotermici. Ciò può provocare delle complicazioni nel calcolo dell'entalpia delle trasformazioni in quanto, come detto, quest'ultima è proporzionale all'area compresa tra il picco e la linea di base, e variazioni alla linea di base la rendono meno semplice da calcolare tale area.

4.5.6 Calcolo della purezza

L'utilizzo della DSC nel calcolo della purezza può essere visto come un punto di fusione molto migliorato, non a caso la DSC sta progressivamente soppiantando in molti campi i tradizionali metodi con punto di fusione. Le ragioni del successo risiedono nel fatto che la DSC fornisce più informazioni e più accurate rispetto al semplice p.f.

La determinazione della purezza in DSC si basa sull'assunzione che impurezze eventualmente presenti nella sostanza analizzata ne abbassino il punto di fusione (per Raoult o per formazione di una miscela eutettica).

L'effetto di impurezze eutettiche nell'abbassamento del punto di fusione è descritto dalla equazione di Van't Hoff per la quale, nella sua forma semplificata, si ha:

$$T_f = T_0 - \frac{RT_0^2}{\Delta H_f} x_2 \frac{1}{F} \quad (4.16)$$

dove T_f è la temperatura di fusione (che, durante la fusione, segue la temperatura del liquido formatosi), T_0 è la temperatura di fusione della sostanza pura, R è la costante dei gas, ΔH_f l'entalpia di fusione, x_2 la concentrazione (espressa come frazione molare) dell'impurezza presente ed F la frazione fusa.

Osservando la formula si nota che l'abbassamento nella temperatura di fusione rispetto a quello della sostanza pura T_0 dipende linearmente dalla frazione molare di impurezza presente.

Tutti i valori presenti nell'equazione di Van't Hoff possono essere determinati mediante DSC se è nota la temperatura di fusione della sostanza pura.

$$\frac{1}{F} = \frac{A_{tot} + c}{A_{parz} + c} \quad (4.17)$$

Il reciproco della frazione fusa è correlabile al rapporto tra l'area totale e l'area parziale del picco alla temperatura T_f (variabile dipendente), mentre l'entalpia di fusione è calcolabile dall'area totale del picco.

Chiaramente anche impurezze non eutettiche possono avere effetto sul punto di fusione ed in casi eccezionali (ad es. nel caso di cristalli misti) possono anche causarne un incremento. Impurezze che formano un sistema liquido di due fasi immiscibili (es. vanillina ed ossido di ferro) non hanno effetto sul punto di fusione. Questo tipo di impurezze non può pertanto essere determinato mediante DSC (se non per un minore calore latente di fusione, che però non offre la precisione necessaria a quantificare impurezze presenti in piccole quantità).

Una volta che la o le principali impurezze che contaminano una sostanza sono state individuate (es. mediante HPLC), quindi, il primo passo da compiere per verificare se si può impiegare la DSC in produzione come controllo di qualità per la purezza della sostanza in esame è studiare se l'impurezza forma o meno una miscela eutettica con il campione.

Sono quindi aggiunte aliquote crescenti di impurezza al campione puro (o al massimo grado di purezza disponibile) e si verifica se l'impurezza segue l'andamento previsto dalla regola di Van't Hoff o meno.

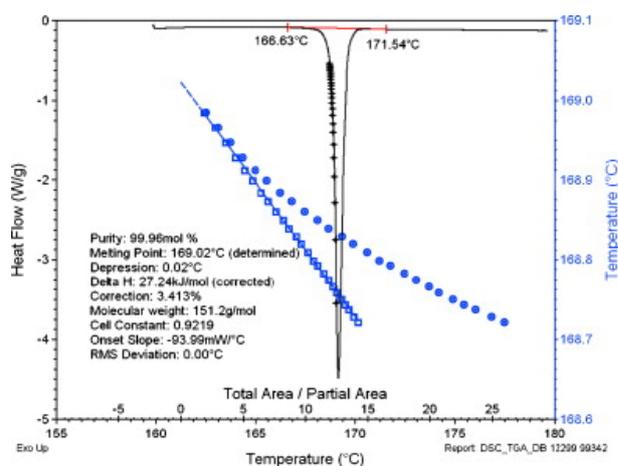


Figura 4.17: DSC scan e analisi della purezza di paracetamolo Reference Standard (2,11mg, gradiente 1°C/min)

In figura 4.17 è mostrato lo studio di purezza condotto sullo standard di riferimento per il paracetamolo, la retta rappresenta l'andamento previsto dall'equazione di Van't Hoff per valori crescenti d'impurezza mentre la curva sovrapposta è l'andamento sperimentale. Si verifica una differenza non significativa per alti valori di purezza, che è la parte più "utile" della curva¹⁶. doi:10.1016/j.jpba.2008.12.030. (Si ricordi che il paracetamolo è "solo" uno standard secondario, mentre purezze del 100% possono essere più facilmente ottenute ad es. con standard primari come il propil parabene.)

Nota poi che con quantità crescenti di impurezza eutettico cresce conseguentemente l'ampiezza del picco di temperatura eutettica, che si trova in genere ad una temperatura più bassa della temperatura di fusione del composto puro di 10-100°C.

Il principale vantaggio dell'impiego della DSC nel controllo della purezza è la rapidità del metodo mentre le limitazioni sono date dalla necessità di campioni molto puri (> 98%), dalla formazione di impurezze eutettiche, dall'influenza della granulometria e dalla presenza di aria nel campione. Questi problemi si sommano a quelli relativi alla DSC in quanto tale, ovvero calibrazione, caricamento del campione, lag termico per gradienti elevati, solventi residui, errori d'interpretazione etc.

Esame (28/3/11): *Calorimetria a scansione differenziale. Illustrare le diverse tecniche utilizzate, il funzionamento della strumentazione e le informazioni che possono essere ottenute.*

¹⁶ However, users should be aware of the fact that previous DSC term results are only reliable for compounds which are highly pure (98% or above), have sharp melting points, and do not have thermal events that interfere with their melting endotherms.

Esame (2/5/11): *Descrivere i fenomeni osservabili mediante DSC ed illustrare le applicazioni nella farmaceutica di questa tecnica.*

4.5.7 Solventi residui

In conclusione l'analisi termica ifenata con tecniche analitiche (FT-IR, MS, GC) permette un'esatta identificazione e quantificazione ($\text{lod} \approx 10\text{ppm}$) con campioni esigui (pochi mg). In ambito farmaceutico la DSC può essere impiegata anche per l'analisi dei solventi residui, in particolare se ifenata ad FT-IR. Per evidenziare lo sviluppo di solventi residui durante un'analisi DSC si possono confrontare le aree dei picchi di fusione tra portacampione chiuso e aperto.

Un solvente può essere incorporato in una forma farmaceutica in diverse forme:

libero il solvente libero è in equilibrio con il suo vapore dove la tensione di vapore saturo dipende dal tipo di solvente e dalla temperatura, è il caso più semplice individuabile anche mediante termogravimetria. La massima perdita di peso si avrà in corrispondenza della temperatura di ebollizione del solvente. Vedi figura 4.18;

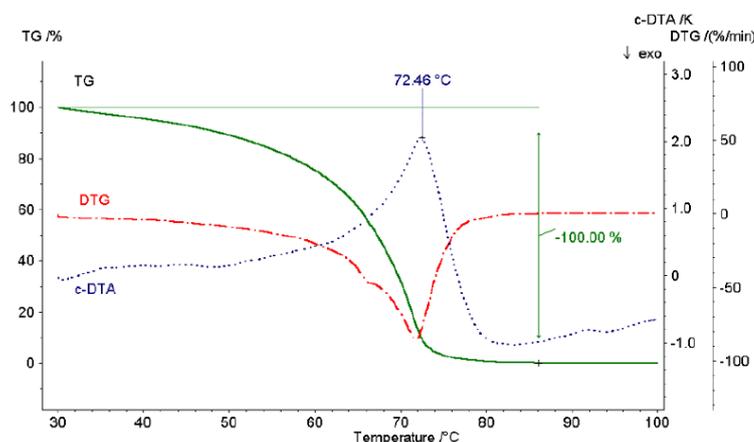


Figura 4.18: Analisi termica dell'etile acetato, curve TG, DTG e DTA

adsorbito il solvente adsorbito è fissato alla superficie o nelle porosità di una matrice solida in un processo reversibile ed esotermico¹⁷;

incluso il solvente è incluso in gocce nell'abito cristallino durante la cristallizzazione, viene pertanto liberato al punto di fusione del cristallo;

intercalato il solvente si intercala tra gli strati di un solido con conservazione della struttura a strati. Non ci sono limiti alla natura dell'agente intercalante né al meccanismo d'intercalazione. Si tratta di un fenomeno diverso rispetto a solvente libero ed adsorbito come è evidenziato dalla diversa tensione di vapore saturo.

¹⁷Quindi lo svolgimento del solvente sarà endotermico

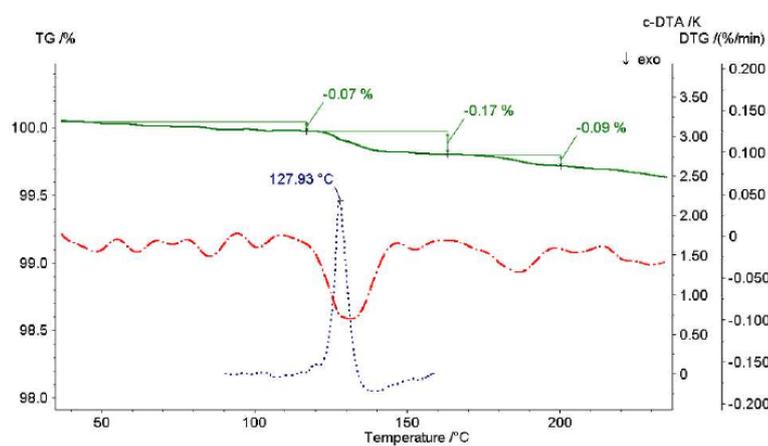


Figura 4.19: Acetato di etile adsorbito dal nftopidil (rilasciato a 127°C)

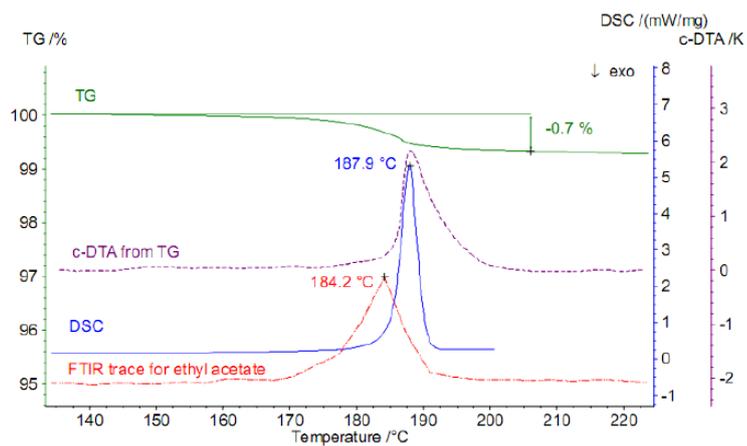


Figura 4.20: Etil acetato residuo intercalato nello Zaleplon, come evidenziato dal tracciato FTIR

Capitolo 5

Interazioni materia – fotoni

5.1 Introduzione

5.1.1 Onde piano polarizzate

Se si considera un'onda elettromagnetica che propaga nello spazio lungo l'asse z essa è formata da un campo elettrico che oscilla nel piano perpendicolare alla direzione di propagazione, ad es. x , e da una componente magnetica data dal prodotto vettoriale tra il vettore di propagazione e quello del campo elettrico¹. Un'onda piano polarizzata è rappresentata in figura 5.1.1 dove si notano i fronti d'onda planari da cui ne deriva il nome.

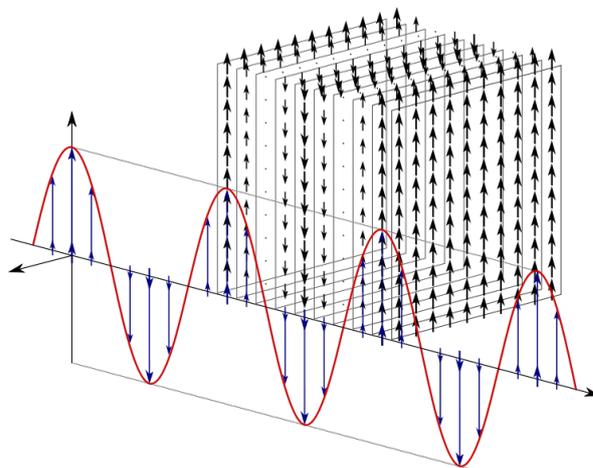


Figura 5.1: Rappresentazione del vettore elettrico di un'onda piano polarizzata

Nota: i video mostrati a lezione sono tratti da qui: [Link](#).

¹Ne segue che essendo i due in questo caso perpendicolari il prodotto tra i moduli moltiplicato per il seno dell'angolo compreso si semplifica qui al solo prodotto dei moduli, essendo il seno di 90° pari ad 1. E' comunque importante sottolineare che si tratta di un prodotto vettoriale in quanto il risultato è un vettore e non uno scalare.

5.1.2 Composizione di onde piano polarizzate

Onde piano polarizzate diverse possono sommarsi con le normali regole di composizione per i vettori. Ad esempio, se si sovrappongono due onde piano polarizzate di eguale lunghezza d'onda, intensità ed in fase tra loro, aventi vettori elettrici tra loro perpendicolari (nell'esempio di cui sopra vettori \vec{E} giacenti lungo gli assi x ed y) si ottiene un'onda piano polarizzata avente campo elettrico di intensità pari a $\sqrt{2}$ rispetto alle precedenti e orientato a 45° .

5.1.3 Onde circolarmente polarizzate

Se, invece, si sovrappongono due onde piano polarizzate uguali ma aventi vettori elettrici tra loro perpendicolari e fuori fase l'uno rispetto all'altro di 90° si possono ottenere onde circolarmente polarizzate a destra o sinistra a seconda del segno della differenza di fase: $+90^\circ$ o -90° ². Un'onda circolarmente polarizzata destrorsa è mostrata in figura 5.1.3.

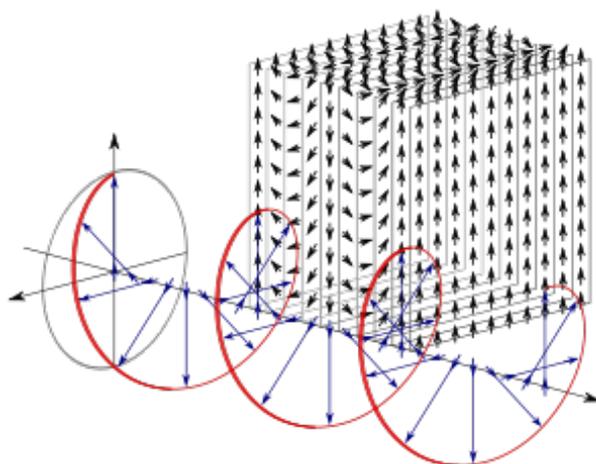


Figura 5.2: Rappresentazione del vettore elettrico di un'onda circolarmente polarizzata

Il fatto che la luce circolarmente polarizzata possa essere vista come composizione di due onde piano polarizzate risulta evidente se se ne scompongono le componenti x, y : esse sono, infatti, due sinusoidi tra loro “sfasate” di 90° .

Se si analizzano le differenze tra componenti x ed y di onde circolarmente polarizzate, infine, si nota che hanno una componente identica e l'altra in anti-fase. Questo perché essendo l'una $+90^\circ$ e l'altra -90° la loro differenza è 180° , ovvero mezzo periodo, il che le rende anti-fase ovvero la loro somma è nulla. Da ciò si evince che la composizione di due onde circolarmente polarizzate identiche se non per il fatto che l'una è destrorsa e l'altra sinistrorsa da' un'onda piano-polarizzata.

²I due casi sono diversi perché i vettori campo elettrico hanno andamento sinusoidale, ed il seno è una funzione periodica di periodo 2π , ovvero 360° nel sistema sessagesimale

5.1.4 Interazioni onde-materia

I principali fenomeni a cui può andare incontro un'onda elettromagnetica attraversando un materiale non riflettente sono assorbimento e rifrazione.

Assorbimento L'assorbimento comporta una diminuzione nell'intensità dell'onda.

Rifrazione La rifrazione è causata dalla minor velocità della luce nel mezzo attraversato rispetto all'aria e provoca quindi un accorciamento della lunghezza d'onda, in quanto la frequenza resta costante e $\lambda/f = \vec{v}$ ovvero il rapporto tra lunghezza d'onda e frequenza è uguale alla velocità di propagazione dell'onda. Se la velocità diminuisce la lunghezza d'onda deve accorciarsi.

5.1.5 Dicroismo Circolare

“Il dicroismo circolare è la proprietà di alcuni materiali di assorbire diversamente la luce circolarmente polarizzata destra rispetto alla sinistra.”

Ciò è visibile anche nella luce piano polarizzata, in quanto questa ultima può essere vista come il prodotto di due onde circolarmente polarizzate di cui una viene più assorbita, il risultato è che l'altra sarà più intensa. Si otterrà pertanto un'onda elettromagnetica ellittica, detta luce ellitticamente polarizzata.

L'asse maggiore dell'ellisse ha l'orientamento dell'onda piano polarizzata originaria, mentre il verso della rotazione è funzione dell'onda meno assorbita.

Nota che è quasi impossibile trovare un materiale che assorba solo una delle due componenti della luce piano polarizzata, più spesso l'assorbimento delle due sarà diverso: maggiore per l'una e minore per l'altra. Se il l'assorbimento è abbastanza alta ed il cammino ottico sufficientemente lungo si può arrivare anche al caso limite in cui una delle due componenti sia assorbita quasi completamente, nel tal caso l'onda uscente sarà quasi-circolare.

5.1.6 Birifrangenza Circolare

“La birifrangenza circolare³ è la proprietà di alcuni materiali di avere indici di rifrazione diversi per la luce circolarmente polarizzata destra rispetto alla sinistra.”

Se un raggio di luce piano polarizzata attraversa un mezzo mostrante birifrangenza circolare ne risulta che una delle due componenti (destra o sinistra) è “rallentata” più dell'altra. Una volta uscite dal mezzo, quindi, le due componenti (circolare destrorsa e sinistrorsa) della luce piano polarizzata torneranno ad avere la stessa velocità ma non saranno più in fase come prima, ovvero saranno ruotate l'una rispetto all'altra rispetto al sistema di riferimento precedente avente per asse il vettore campo elettrico della luce piano polarizzata. Ne segue che anche la loro composizione, che è la luce piano polarizzata, ne risulterà alterata, in particolare si osserverà una rotazione del vettore campo elettrico.

³La birifrangenza circolare è cosa diversa dalla birifrangenza, proprietà di alcuni cristalli.

Anche in questo caso più che di materiali che rifrangono una sola delle due luci circolarmente polarizzate, è più corretto pensare ad un materiale che rifrangano entrambe ma in modo quantitativamente diverso.

5.1.7 Materiali otticamente attivi

Materiali che “ruotino” o “rendano ellittica” la luce piano polarizzata, ovvero che mostrino dicroismo o birifrangenza circolari, sono detti otticamente attivi.

In genere un materiale otticamente attivo mostra sia dicroismo sia birifrangenza circolari. Le molecole chirali sono otticamente attive mentre le molecole achirali⁴ non lo sono. Questo perché la rotazione dell’asse di rotazione della luce è dato dall’interazione con gli elettroni delle molecole e più in particolare con i campi magnetici da essi generati. Se una sostanza è achirale, statisticamente, per ogni molecola con un’orientazione spaziale ne esiste un’altra con l’orientazione opposta, e pertanto i loro effetti sui fotoni si annullano. Nel caso di molecole achirali, invece, non esistendo l’immagine speculare di ogni molecola si possono creare asimmetrie che sono lette come dicroismo e birifrangenza circolari.

5.1.8 Legge di Biot

La *rotazione ottica* è l’entità (in gradi) della rotazione della luce piano polarizzata da parte di molecole chirali. Si tratta, quindi, di una misura di birifrangenza circolare e dipende da diversi parametri riassunti nella legge di Biot per la rotazione specifica⁵:

$$[\alpha]_{\lambda}^T = \frac{\alpha}{l \cdot c} \quad \text{u.d.m.} \frac{[^\circ]}{[dm] \cdot [g/mL]} \quad (5.1)$$

Dove T è la temperatura (generalmente 20 o 25 °C) λ la lunghezza d’onda (di norma la linea D del sodio), α la rotazione ottica misurata, l la lunghezza del cammino ottico (espressa in dm) e c la concentrazione (in g mL⁻¹). La dipendenza della rotazione ottica dalla lunghezza d’onda è anche detta “dispersione ottica rotatoria” (v. oltre a pag. 67).

I valori di $[\alpha]$ a 20,0°C e con λ pari alla linea D del sodio sono talvolta indicati con α^0 .

Potere ottico in Ph.Eur.

Al potere ottico è dedicata una monografia dei metodi d’analisi della Farmacopea Europea.

Da: Ph.Eur. ed. 7th §2.2.7

OPTICAL ROTATION

Optical rotation is the property displayed by chiral substances of rotating the plane of polarisation of polarised light. Optical rotation

⁴Ricorda che chirali non significa “che possiedono carboni asimmetrici” tout court, ma che non siano sovrapponibili alla propria immagine speculare

⁵Nota che i valori di rotazione ottica sono espressi con α mentre la rotazione specifica è $[\alpha]$, con le parentesi quadre ed, eventualmente, apici e pedici per temperatura e lunghezza d’onda.

is considered to be positive (+) for dextrorotatory substances (i.e. those that rotate the plane of polarisation in a clockwise direction) and negative (−) for laevorotatory substances.

The specific optical rotation $[\alpha_m]_{\lambda}^t$ is the rotation, expressed in radians (rad), measured at the temperature t and at the wavelength λ given by a 1m thickness of liquid or a solution containing 1kg m^{-3} of optically active substance. For practical reasons the specific optical rotation $[\alpha_m]_{\lambda}^t$ is normally expressed in milliradians metre squared per kilogram (mradm^2/kg).

The Pharmacopoeia adopts the following conventional definitions.

The angle of optical rotation of a neat liquid is the angle of rotation α , expressed in degrees ($^{\circ}$), of the plane of polarisation at the wavelength of the D-line of sodium ($\lambda = 589.3\text{nm}$) measured at 20°C using a layer of 1dm; for a solution, the method of preparation is prescribed in the monograph.

The specific optical rotation $[\alpha]_D^{20}$ of a liquid is the angle of rotation α , expressed in degrees ($^{\circ}$), of the plane of polarisation at the wavelength of the D-line of sodium ($\lambda = 589.3\text{nm}$) measured at 20°C in the liquid substance to be examined, calculated with reference to a layer of 1 dm and divided by the density expressed in grams per cubic centimetre.

The specific optical rotation of a substance in solution is the angle of rotation α , expressed in degrees ($^{\circ}$), of the plane of polarisation at the wavelength of the D-line of sodium ($\lambda = 589.3\text{nm}$) measured at 20°C in a solution of the substance to be examined and calculated with reference to a layer of 1dm containing 1g mL^{-1} of the substance. The specific optical rotation of a substance in solution is always expressed with reference to a given solvent and concentration.

In the conventional system adopted by the Pharmacopoeia the specific optical rotation is expressed by its value without units; the actual units, degree millilitres per decimetre gram $[(^{\circ}) \cdot \text{mL} \cdot \text{dm}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}]$ are understood.

The conversion factor from the International System to the Pharmacopoeia system is the following :

$$[\alpha_m]_{\lambda}^t = [\alpha]_{\lambda}^t X 0,1745$$

In certain cases specified in the monograph the angle of rotation may be measured at temperatures other than 20°C and at other wavelengths.

The polarimeter must be capable of giving readings to the nearest 0.01° . The scale is usually checked by means of certified quartz plates. The linearity of the scale may be checked by means of sucrose solutions.

Method Determine the zero of the polarimeter and the angle of rotation of polarised light at the wavelength of the D-line of sodium

($\lambda = 589.3\text{nm}$) at $20 \pm 0.5^\circ\text{C}$, unless otherwise prescribed. Measurements may be carried out at other temperatures only where the monograph indicates the temperature correction to be made to the measured optical rotation. Determine the zero of the apparatus with the tube closed; for liquids the zero is determined with the tube empty and for solids filled with the prescribed solvent. Calculate the specific optical rotation using the following formulae.

For neat liquids:

$$[\alpha]_D^{20} = \frac{\alpha}{l \cdot \rho_{20}}$$

For substances in solution:

$$[\alpha]_D^{20} = \frac{1000\alpha}{l \cdot c}$$

where c is the concentration of the solution in grams per litre.

Calculate the content c in grams per litre or the content c' in per cent m/m of a dissolved substance using the following formulae:

$$c = \frac{1000\alpha}{l \cdot [\alpha]_D^{20}}$$

$$c' = \frac{100\alpha}{l \cdot [\alpha]_D^{20} \cdot \rho_{20}}$$

α = angle of rotation in degrees read at $20 \pm 0.5^\circ\text{C}$;

l = length in decimetres of the polarimeter tube;

ρ_{20} = density at 20°C in grams per cubic centimetre.

For the purposes of the Pharmacopoeia, density

is replaced by relative density (2.2.5).

5.1.9 Parametri di purezza enantiomerica

La quantità di un enantiomero rispetto all'altro in una miscela di racemato ed enantiomero puro può essere espressa in vario modo. E' sempre importante indicare quanto sia puro un singolo enantiomero in quanto è estremamente difficile avere purezze assolute; i diversi parametri rispettano le diverse grandezze impiegate per calcolarli.

Purezza Ottica

La purezza ottica ($P.O.\%$) è definita come il rapporto tra la rotazione ottica misurata per il campione in rapporto alla massima rotazione ottica riportata in letteratura ed attribuita a quell'enantiomero puro. Ne segue che la purezza ottica è un indice utilizzato quando la purezza enantiomerica è misurata mediante polarimetria. E' importante ricordare che la rotazione ottica risente di numerosi fattori quali lunghezza d'onda, temperatura etc., e pertanto è necessario, per ottenere valori confrontabili, operare nelle stesse condizioni del valore tabulato.

$$P.O.\% = \frac{[\alpha]_{obs}}{[\alpha]_{max}} \cdot 100 \quad (5.2)$$

Eccesso Enantiomerico

L'eccesso enantiomerico (*ee*), a differenza della purezza ottica, non è legato a un metodo in particolare e può essere determinato in vari modi (HPLC, NMR etc.). Esso è definito come la percentuale di enantiomero puro rispetto al racemato (ovvero alla somma dei due enantiomeri).

$$ee = \frac{|R - S|}{R + S} * 100 = |\%R - \%S| \quad (5.3)$$

5.2 Polarimetria

“La polarimetria è un metodo di analisi non distruttivo che si basa sull’attività ottica di composti chirali.”

Si tratta di una misurazione semplice, pratica e veloce che non richiede apparecchiature costose, parametri che ne spiegano il successo in ambito alimentare (es. per misurare la concentrazione di zuccheri otticamente attivi).

La luce piano polarizzata è ottenuta mediante filtri polarizzanti a partire da una sorgente di luce monocromatica. Si possono avere i seguenti tipi di filtri:

- prisma di Nicol;
- filtri Polaroid.

5.2.1 Polarizzatori

Prisma di Nicol

Il prisma di Nicol fu inventato nel 1828 dall’inglese William Nicol e, per quanto sia piuttosto bizzarro, resta un metodo di generazione di luce polarizzata semplice e preciso.

Il prisma di Nicol è formato da un cristallo di carbonato di calcio tagliato diagonalmente con un lato annerito e saldato con una sostanza con elevato indice di rifrazione (originariamente il balsamo del Canada). Tecnicamente sfrutta la birifrangenza dei cristalli anisotropi.

Birifrangenza La birifrangenza dei mezzi anisotropi *non* deve essere confusa con la birifrangenza circolare. In questo caso si parla della particolare proprietà di alcuni materiali di scomporre la radiazione luminosa che li attraversa in due fasci (i cosiddetti raggi ordinario e straordinario) aventi campi elettrici perpendicolari e di cui il secondo è un fascio di luce piano polarizzata.

Per ottenere un fascio di luce polarizzata mediante un cristallo anisotropo (come il carbonato di calcio) bisogna quindi poter “selezionare” il raggio straordinario dall’ordinario. Ciò è ottenuto con il balsamo del Canada interposto tra le facce diagonali del prisma.

Il motivo è che l'indice di rifrazione del balsamo del Canada è di 1,55, che corrisponde ad un angolo limite⁶ rispetto alla perpendicolare di 69° . I raggi prodotti per birifrazione, come detto, si separano, ovvero sono rifratti con angoli diversi. Nel caso del carbonato di calcio questi angoli sono tali che il raggio ordinario subisca riflessione totale nell'interazione con la faccia diagonale, ovvero torni indietro nel prisma per terminare sull'estremità annerita; al contrario il raggio straordinario è rifratto nel secondo prisma che, essendo identico al primo, provvede a raddrizzarlo. Se ne ottiene un raggio di luce piano polarizzata parallelo al raggio incidente originario.

Filtro Polaroid

Il filtro Polaroid è formato da materiale dielettrico allineato nel processo di produzione mediante un campo magnetico e depositato su di una membrana polimerica trasparente (nitrocellulosa). Il risultato è un disco polarizzatore.

5.2.2 Polarimetro

Il polarimetro, ovvero lo strumento che esegue le misure di polarimetria, è formato da:

- una sorgente di luce monocromatica (in genere una lampada al sodio);
- un primo filtro polarizzatore che generi la luce polarizzata per l'analisi;
- una cella portacampione di lunghezza nota contenente generalmente una soluzione della sostanza da analizzare;
- un secondo filtro polarizzatore ruotabile e per il quale l'entità della rotazione corrisponde al valore di α ;
- un oculare che permetta all'operatore di identificare il punto zero.



Figura 5.3: Schema generale di un polarimetro.

Inizialmente il filtro dell'analizzatore è azzerato, ovvero lo si ruota con il portacampione vuoto in modo che non vi sia luce passante. Ciò avviene quando l'angolo tra i due filtri è di 90° . Se viene immessa nel tubo portacampione una sostanza otticamente non attiva non si avrà rotazione della luce piano polarizzata e l'oculare resterà buio. Al contrario, se una sostanza otticamente attiva

⁶L'angolo limite è l'angolo oltre il quale si verifica la riflessione totale. Vedi anche rifrattometria a pag. 75

è posta nel portacampione, la rotazione indotta sul fascio di luce polarizzata farà sì che l'oculare non sia più buio. L'entità della rotazione ottica è data dai gradi necessari al filtro analizzatore per rendere nuovamente buio l'oculare. Le due direzioni di rotazione sono caratterizzati da segni opposti, + per sostanze destrorgire e - per le levogire.

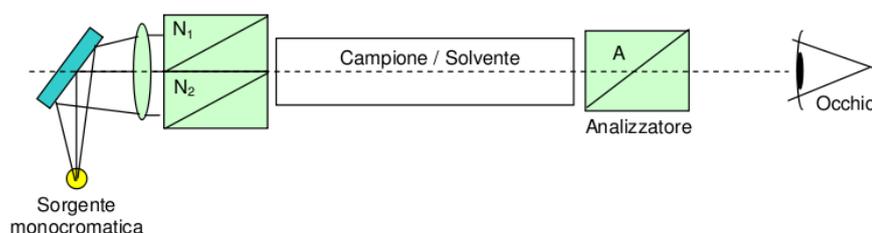


Figura 5.4: Schema di un polarimetro di Lippich

Polarimetro di Lippich

Poiché questo sistema non è molto preciso ne è stato sviluppato un altro analogo ma caratterizzato dall'impiegare per l'analisi due fasci di luce generati da due filtri polaroid con inclinazioni diverse, è il polarimetro di Lippich (fig. 5.4). Il filtro analizzatore resta unico e pertanto l'entità di luce passante per i due fasci sarà diversa. Tale quantità di luce sarà uguale solo quando i due raggi formano con l'analizzatore lo stesso angolo. Questo costituisce il nuovo punto zero, di più facile, rapida e precisa individuazione in quanto l'oculare risulta ora bipartito (vedi figura 5.5) e l'operatore non deve far altro che rendere uguale l'intensità luminosa delle due parti. La procedura d'analisi in seguito all'azzeramento è identica al sistema precedente.

Esame (31/1/11): Polarimetria: definire il potere ottico rotatorio specifico e descrivere il funzionamento di un polarimetro.



Figura 5.5: Oculare bipartito di un polarimetro

5.3 Cromatografia chirale

Al posto della polarimetria nella determinazione della purezza di composti chirali si possono usare HPLC chirale ed NMR.

L'HPLC chirale può essere seguita con fasi stazionarie chirali, o con additivi chirali nella fase mobile, oppure ancora si possono creare per via chimica diastereoisomeri a partire da enantiomeri e separarli con HPLC classica.

5.3.1 CSP – Chiral Stationary Phase

Oggi in commercio esistono diversi tipi di fasi stazionarie chirali. Per poter avere una separazione chirale sono necessarie almeno tre interazioni. Tali interazioni possono essere anche molto deboli in quanto il processo di separazione è multi-step e pertanto la separazione è comunque raggiunta, non per l'elevata differenza energetica tra i due stati ma per il grande numero di ripetizioni della separazione.

Le CSP possono essere raggruppate in base alla loro struttura chimica:

- Pirkle (o “a pennello”);
- cellulosa;
- ciclodestrine;
- antibiotici macrociclici;
- proteine;
- a scambio di ligando;
- eteri corona.

Brush-type (Pirkle)

Le colonne Pirkle sono basate sull'interazione con residui aromatici, in particolare ce ne sono due tipi: fasi π - π -accettore e π - π -donatore, per anelli elettronricchi ed elettronpoveri. La chiralità della fase stazionaria è data da sostituenti chirali sull'anello, es. fenilglicina.

Cellulosa

Le colonne in cellulosa separano gli enantiomeri grazie ad interazioni attrattive e complessi di inclusione, sono prodotte dalla Daicell e trovano ampia applicazione in ambito farmaceutico. I loro limiti sono dati dall'impossibilità di utilizzare solventi clorurati (per il rischio di danneggiare la fase stazionaria) e la necessità di utilizzare fasi mobili a bassa polarità.

Ciclodestrine

Le ciclodestrine sono oligosaccaridi ciclici contenenti da 6 a 12 unità di glucosio prodotte da un enzima ingegnerizzato per crearne di diverse dimensioni (6, 7 e 8 Glc, rispettivamente α , β e γ).

La ciclodestrina ha ossidrili secondari sul rivestimento della bocca e ossidrili primari sul fondo, mentre l'interno è relativamente idrofobico e può includere porzioni idrofobiche di soluto⁷.

Il problema di questa classe di colonne è la lentezza della cinetica di interazione che comporta il broadening dei picchi che ne limita le applicazioni preparative. Inoltre per l'interazione con la ciclodestrina è necessario che la sostanza da analizzare possa formare legami ad idrogeno.

⁷Si ricordino le applicazioni in tecnica farmaceutica delle ciclodestrine proprio per veicolare sostanze poco polari in ambiente acquoso

Antibiotici macrociclici

Fasi stazionarie più recenti si basano su antibiotici macrociclici immobilizzati su fasi stazionarie in gel di silice

Proteine

Le fasi stazionarie proteiche hanno caratteristiche diverse a seconda della proteina legata, in ogni caso tutte hanno capacità di carico basse e portate piccole il che le rende poco utili a fini preparativi, anche se molto usate per altre applicazioni.

α -glicoproteina umana L' α -glicoproteina (AGP) acida umana è una piccola proteina acida (181 residui amminoacidici e 40 di acido sialico) e molto stabile. Può essere legata covalentemente alle fasi stazionarie in gel di silice.

Albumina serica umana L'HSA (human seric albumin) è una proteina umana con due regioni di binding distinte, quello per il warfarin e quello delle benzodiazepine.

A scambio di ligando

La cromatografia a scambio di ligando chirale separa gli enantiomeri per formazione di complessi metallici diastereoisomerici. Sono utilizzate principalmente per la separazione di amminoacidi e sono formate da un complesso amminoacido-rame legato alla silice o ad un'altra fase stazionaria polimerica. Poiché il rame lega due amminoacidi uno è quello della fase stazionaria e l'altro, presente nella fase stazionaria, è quello che sarà sostituito dall'analita, da cui il nome a "scambio di ligando" (*Ligand exchange*).

Eteri corona

Gli eteri corona sono stati immobilizzati in CSP per la loro capacità di legare le ammine primarie protonate. Il campo di applicazione resta limitato.

5.3.2 CMPA – Chiral Mobile Phase Additives

Gli additivi per fasi mobili chirali consentono di utilizzare colonne non chirali per eseguire HPLC-chirali. L'utilizzo di colonne classiche permette alte capacità di carico ma comportano il problema di dover rimuovere, in un secondo tempo, l'additivo aggiunto come selettore di chiralità, il quale, per altro, spesso non ha un costo tale da renderle economicamente vantaggiose per applicazioni su larga scala.

Esistono diversi tipi di additivi:

- coppie ioniche;
- complessi d'inclusione;
- scambio di ligando;
- additivi proteici.

Coppie ioniche

Possono essere impiegati agenti accoppianti chirali ionici che formino con l'analogita coppie diastereoisomeriche che vengono separate in colonna, ad es. il propanolo è stato separato in coppia ionica con acido tartarico. Il problema è la bassa capacità di carico.

Complessi di inclusione

Complessi di inclusione possono essere ottenuti aggiungendo ciclodestrine a fasi mobili acquose. Le condizioni possono essere ottimizzate su CSP a ciclodestrine, la rimozione è semplice (estrazione acido-base o colonna reverse-phase).

Scambio di ligando

La cromatografia a scambio di ligando può essere eseguita su delle C18 con rame acetato nella fase mobile e con N-alchil-idrossiprolina come selettore chirale adsorbito sulla fase stazionaria.

Additivi proteici

Sia l'albumina serica bovina (BSA) che l'alfa-glicoproteina (AGP) possono essere impiegate, ma la prima dà problemi con i detector UV e la seconda è costosa.

5.3.3 Ottenimento di enantiomeri puri

Sostanze enantiomericamente pure possono essere ottenute per:

- sintesi chirali;
- sintesi achirale seguita da risoluzione indiretta;
- sintesi achirale seguita da cromatografia.

Sintesi chirale

La sintesi chirale richiede un prodotto di partenza chirale (o prochirale e catalizzatori chirali) è complessa e richiede che in nessun passaggio intermedio nelle condizioni di reazione si possa verificare la racemizzazione del composto. Ne segue che la purezza chirale va monitorata durante tutta la sintesi con opportune metodiche analitiche. I vantaggi sono nel lungo termine: dopo il grande investimento iniziale per la progettazione e lo sviluppo di una sintesi chirale, infatti, si risparmia non dovendo smaltire l'enantiomero non desiderato, si possono ottenere quindi rese maggiori a partire dai prodotti di partenza e lo scale-up è immediato non essendoci fasi di purificazione, più difficilmente scalabili.

Sintesi achirale seguita da risoluzione indiretta

La sintesi achirale è più rapida da progettare e generalmente meno costosa della chirale ma pone il problema dello step risolutivo, il quale può essere difficile e dispendioso in termini di tempo. Per la risoluzione si possono utilizzare:

- cristallizzazione;
- risoluzione cinetica con enzimi;
- formazione di sali diastereoisomerici con successiva cristallizzazione.

Il problema maggiore di questo approccio è che la fase purificativa è “single step”, e pertanto è richiesto un alto grado di enantioselettività nel selettore chirale (al contrario nelle colonne HPLC chirali la selettività è bassa ma la separazione è multistep). E' inoltre necessario disporre del selettore di chiralità in elevata purezza per non compromettere resa e/o purezza del prodotto finale.

Sintesi achirale seguita da risoluzione cromatografica

La risoluzione mediante cromatografia può avvenire, a sua volta, in tre modi:

- formazione di un derivato diastereoisomerico separato in HPLC classica;
- HPLC chirale: fase stazionaria chirale (CSP);
- HPLC chirale: additivi di fase mobile chirali (CMPA).

Formazione di derivati diastereoisomerici Questo metodo risente degli stessi limiti della sintesi achirale seguita da risoluzione indiretta per selettività, purezza e problemi connessi all'agente derivatizzante. Si aggiungono poi le problematiche connesse allo sviluppo del metodo cromatografico: l'unico vero vantaggio è dato dall'utilizzo delle colonne tradizionali.

CSP I vantaggi della CSP sono la separazione rapida e multistep senza bisogno di derivatizzare il prodotto, ma questo al prezzo di alti costi, basse capacità di carico e dalla specificità per il singolo processo della colonna usata.

CMPA I vantaggi dei CMPA sono simili alle CSP ma con una maggior versatilità in quanto non sono necessarie colonne dedicate, gli additivi sono in genere meno costosi delle colonne CSP ma è necessario uno step in più per l'allontanamento dell'additivo.

Esame (28/3/11): *Definire la rotazione specifica, la purezza ottica, l'eccesso enantiomerico ed elencare le metodiche HPLC per la determinazione della purezza ottica.*

5.4 Dispersione ottica rotatoria (ORD)

La dispersione ottica rotatoria (*Optical rotatory dispersion – ORD*) è la variazione della rotazione ottica di una sostanza in funzione della lunghezza d'onda della luce piano polarizzata usata nell'analisi.

In particolare sono possibili due andamenti del potere ottico in funzione della λ . Se il composto non presenta assorbimento significativo nell'UV-VIS l'andamento sarà monotono decrescente, ovvero a lunghezze d'onda maggiori corrisponderà una rotazione ottica minore. Se il composto assorbe nell'UV-VIS si può verificare l'effetto Cotton.

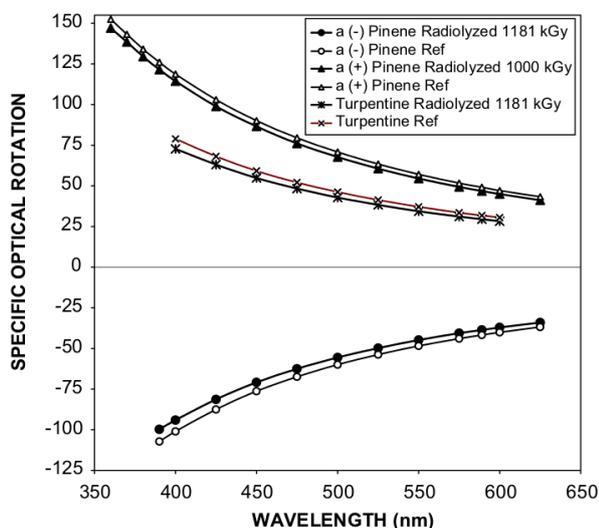


Figura 5.6: Fig.: Andamento ORD monotono per diversi composti (derivati terpenici chirali).

5.4.1 Effetto Cotton

“L’effetto Cotton è quel fenomeno per cui alla lunghezza d’onda alla quale si ha il picco di assorbenza all’UV corrisponde un potere ottico nullo ed un flesso nella curva ORD.”

Nota che l’inversione del segno per un enantiomero è comunque bilanciata dall’andamento speculare dell’altro. Uno spettro ORD con effetto Cotton (in un derivato della canfora) è mostrato in figura 5.7, si noti l’uguaglianza di segno tra ORD e CD.

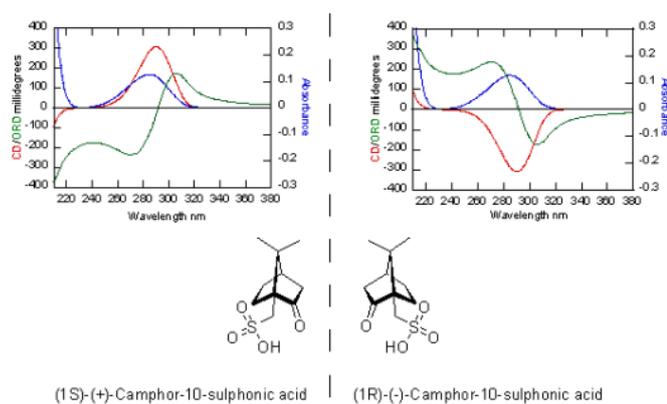


Figura 5.7: Grafici ORD (verde), CD (rosso) ed UV (blu) per i due enantiomeri dell’acido camfor-sulfonico. Si nota l’effetto Cotton.

Nota che la lunghezza d'onda influisce in modo molto significativo sull'entità della rotazione ottica di composti otticamente attivi: si tratta del parametro che influisce di più.

5.5 Dicroismo circolare

Il dicroismo circolare (*Circular Dichroism - CD*) è la differenza dei coefficienti di assorbanza molare di una sostanza chirale per due raggi di luce circolarmente polarizzata, destrorsa e sinistrorsa, in funzione della lunghezza d'onda della luce stessa.

$$A_L - A_R = (\epsilon_L - \epsilon_R) \cdot l \cdot c \quad (5.4)$$

5.5.1 Misurazioni

In pratica in funzione della lunghezza d'onda della luce piano polarizzata usata, cambia l'ellitticità della luce trasmessa. Sperimentalmente, però, non si misura l'ellitticità ma l'assorbanza della luce destra, della sinistra e se ne calcola la differenza.

La differenza nell'assorbanza tra luce polarizzata circolarmente destra e sinistra è generalmente compresa tra lo 0,03% e lo 0,3% dell'assorbimento totale.

Unità di misura

E' pratica comune, per ragioni storiche, esprimere i valori di CD come ellitticità, la quale può essere ricavata con la seguente formula:

$$\theta = 2,303(A_L - A_R) \frac{180}{4\pi} = 32,98 \cdot \Delta A \quad (5.5)$$

Analogamente, l'ellitticità molare è definita come l'ellitticità corretta per la concentrazione:

$$[\theta] = \frac{\theta}{[C]l} = 32,98 \Delta \epsilon \quad (5.6)$$

L'ellitticità non è altro che una diversa unità di misura per la differenza di assorbanza tra le due componenti della luce piano polarizzata, pertanto gli spettri che riportano l'andamento dell'ellitticità in funzione della lunghezza d'onda sono spettri CD.

5.5.2 Applicazioni

Struttura secondaria proteine

Il dicroismo circolare è particolarmente utile nello studio della struttura secondaria delle proteine in quanto, entro certi limiti, permette di individuare e riconoscere il tipo di struttura secondaria assunto in soluzione da una proteina.

Ciò è ottenuto per confronto con reference basis set, ovvero con proteine-eseempio caratterizzate da un'unica struttura secondaria (es. poli-Lys che in funzione di pH e T assume struttura a random coil, α -elica o foglietto β).

Questo è possibile in quanto il legame peptidico presenta due picchi di assorbimento nell'UV a cui corrispondono spettri CD con andamenti caratteristici in funzione delle diverse disposizioni assunte dal gruppo ammidico.

Una volta tabulati gli spettri CD delle strutture secondarie principali (*alpha*-elica, *beta*-foglietto etc.) si può valutare l'entità di ciascuna forma in una proteina in esame mediante deconvoluzione, ovvero stimando mediante calcolo assistito al computer la componente di ciascuna forma nel determinare lo spettro osservato. Ciò è possibile per l'additività delle curve CD dei vari legami peptidici.

Un esempio di una serie di spettri CD di proteine con tenore crescente di alfa elica nella loro struttura secondaria è illustrato in figura 5.8.

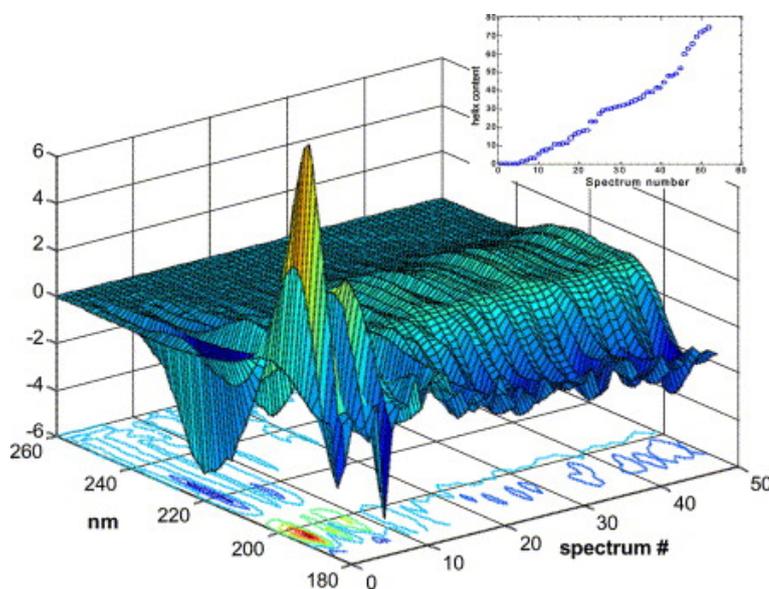


Figura 5.8: Andamento degli spettri CD per una serie (0-50) di proteine con contenuti crescenti di struttura secondaria ad alfa-elica (grafico in alto a destra). Si nota come proteine con alti tassi della stessa struttura secondaria (alfa-elica in questo caso) abbiano spettri CD siano comparabili.

Attendibilità Nota che il risultato ottenuto dalla previsione della struttura secondaria mediante spettri CD non è sempre accurato, ma dipende molto dalle proteine scelte come “modello” per calibrare la deconvoluzione. Il confronto con valori “veri” può essere fatto per proteine delle quali sia nota la struttura ai raggi-X (XRD), tenendo conto che le differenze possono anche derivare dalla diversa conformazione assunta dalla proteina in soluzione rispetto alle condizioni cristalline. Infine, anche se gli spettri CD possono fornire informazioni sulla composizione di strutture secondarie presenti non ci dicono in che punto della sequenza siano localizzate queste strutture.

5.5.3 Folding ed unfolding proteico

Il folding proteico è il ripiegamento dalla forma lineare alla conformazione nativa di una proteina. In vivo, ed in condizioni idonee anche in vitro, è un processo rapido ed efficiente.

Lo studio del folding proteico è importante per la biologia (per prevedere la struttura tridimensionale a partire dalla sequenza amminoacidica), per la tecnica farmaceutica (spesso la formazione di aggregati in farmaci contenenti proteine ricombinanti è un problema grave⁸) ed in clinica (per patologie più o meno direttamente correlate al folding proteico, soprattutto a livello del SNC).

Analisi dell'unfolding proteico

La denaturazione proteica può essere indotta per riscaldamento o mediante l'utilizzo di agenti denaturanti (es. urea).

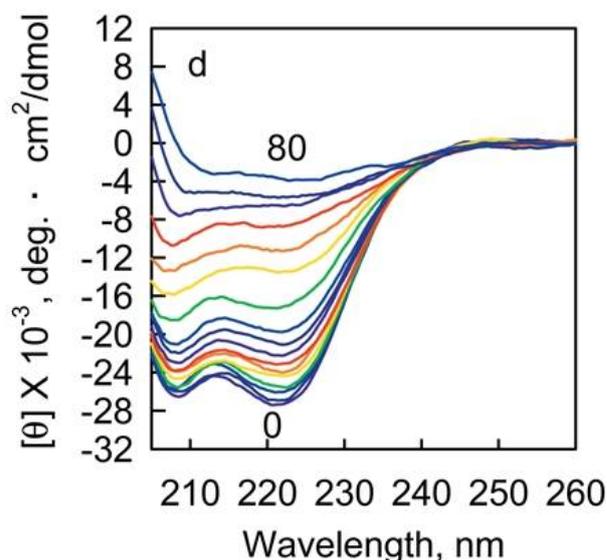


Figura 5.9: Andamento dello spettro CD in funzione della temperatura (0 – 80°C).

La progressiva denaturazione può essere seguita al dicrografo (vedi fig. 5.9), si ottengono così parametri (come la concentrazione di denaturante o la temperatura alla quale il 50% della proteina è denaturato) che permettono di valutare la stabilità della proteina in diverse condizioni operative (solventi, processi produttivi etc.).

5.5.4 Dicrografo

Lo strumento che misura gli spettri di dicroismo circolare è il dicrografo o spettropolarimetro CD.

⁸Tanto più grave se si ricorda come i farmaci formati da proteine non siano assorbiti per os, e pertanto sia necessaria l'iniezione parenterale. La siringabilità della proteina diventa quindi cruciale e la formazione di aggregati la può compromettere.

Esame (28/7/11): *Dicroismo circolare. Definire il dicroismo circolare, illustrare come viene misurato e le informazioni strutturali che fornisce questa tecnica.*

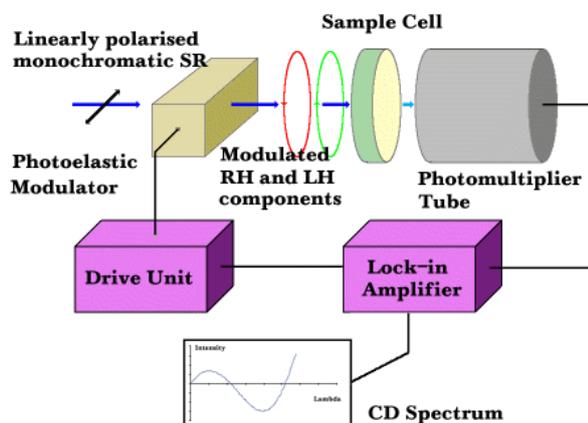


Figura 5.10: Schema di un dicrografo.

Un dicrografo (fig. 5.10) è formato da una sorgente di luce piano polarizzata a lunghezza d'onda regolabile (ovvero una sorgente di luce seguita da un monocromatore a λ variabile ed un polarizzatore) seguito da un modulatore fotoelastico (un apparato che seleziona alternativamente la sola componente circolarmente polarizzata destra o sinistra) una cella contenente il campione, un fotomoltiplicatore che funge da rivelatore e permette di aumentare la sensibilità dello strumento, ed infine un computer che integra le informazioni fornendo lo spettro CD.

5.5.5 CD in Farmacopea

Al dicroismo circolare è dedicata una monografia della Farmacopea Europea, nella sezione 2 dedicata ai metodi analitici.

Da: Ph.Eur. ed. 7th §2.2.41

CIRCULAR DICHROISM

The difference in absorbance of optically active substances within an absorption band for left and right circularly polarised light is referred to as circular dichroism.

Direct measurement gives a mean algebraic value:

$$\Delta A = A_L - A_R$$

ΔA = circular dichroic absorbance,

A_L = absorbance of left circularly polarised light,

A_R = absorbance of right circularly polarised light.

Circular dichroism is calculated using the equation:

$$\Delta\epsilon = \epsilon_L - \epsilon_R = \frac{\Delta A}{c * l}$$

$\Delta\epsilon$ = molar circular dichroism or molar differential dichroic absorptivity
expressed in $\text{l mol}^{-1} \text{ cm}$,

ϵ_L = molar absorptivity (2.2.25) of left circularly polarised light,

ϵ_R = molar absorptivity of right circularly polarised light,

c = concentration of the test solution in mol l^{-1} ,

l = optical path of the cell in centimetres.

The following units may also be used to characterise circular dichroism:

Dissymmetry factor:

$$g = \frac{\Delta\epsilon}{\epsilon}$$

ϵ = molar absorptivity (2.2.25).

Molar ellipticity: Certain types of instruments display directly the value of ellipticity Θ , expressed in degrees. When such instruments are used, the molar ellipticity $[\Theta]$ may be calculated using the following equation:

$$[\Theta] = \frac{\Theta * M}{c * l * 10}$$

$[\Theta]$ = molar ellipticity, expressed in degrees $\cdot \text{cm}^2 \cdot \text{decimole}^{-1}$

Θ = value of ellipticity given by the instrument,

M = relative molecular mass of the substance to be examined,

c = concentration of the solution to be examined in g/ml,

l = optical path of the cell in centimetres.

Molar ellipticity is also related to molar circular dichroism by the following equation:

$$[\Theta] = 2.303\Delta\epsilon \frac{4500}{\pi} \approx 3300\Delta\epsilon$$

Molar ellipticity is often used in the analysis of proteins and nucleic acids. In this case, molar concentration is expressed in terms of monomeric residue, calculated using the expression:

$$\frac{\text{molecular mass}}{\text{number of amino acids}}$$

The mean relative molecular mass of the monomeric residue is 100 to 120 (generally 115) for proteins and about 330 for nucleic acids (as the sodium salt).

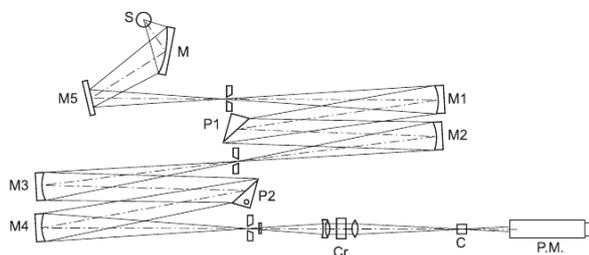


Figura 5.11: Optical scheme of a dichrograph

Apparatus The light source (*S*) is a xenon lamp (Figure 5.11); the light passes through a double monochromator (*M*) equipped with quartz prisms (*P1*, *P2*).

The linear beam from the first monochromator is split into 2 components polarised at right angles in the second monochromator. The exit slit of the monochromator eliminates the extraordinary beam.

The polarised and monochromatic light passes through a birefringent modulator (*Cr*): the result is alternating circularly polarised light.

The beam then passes through the sample to be examined (*C*) and reaches a photomultiplier (*PM*) followed by an amplifier circuit which produces 2 electrical signals: one is a direct current V_c and the other is an alternating current at the modulation frequency V_{ac} characteristic of the sample to be examined. The phase gives the sign of the circular dichroism.

The ratio V_{ac}/V_c is proportional to the differential absorption ΔA which created the signal. The region of wavelengths normally covered by a dichrograph is 170nm to 800nm.

Calibration of the apparatus Accuracy of absorbance scale. Dissolve 10.0mg of isoandrosterone R in dioxan R and dilute to 10.0ml with the same solvent. Record the circular dichroism spectrum of the solution between 280nm and 360nm. Measured at the maximum at 304nm, $\Delta\epsilon$ is +3.3.

The solution of (1S)-(+)-10-camphorsulphonic acid R may also be used.

Linearity of modulation. Dissolve 10.0mg of (1S)-(+)-10-camphorsulphonic acid R in water R and dilute to 10.0ml with the same solvent. Determine the exact concentration of camphorsulphonic acid in the solution by ultraviolet spectrophotometry (2.2.25), taking the specific absorbance to be 1.49 at 285nm.

Record the circular dichroism spectrum between 185nm and 340nm. Measured at the maximum at 290.5nm, $\Delta\epsilon$ is +2.2 to +2.5. Measured at the maximum at 192.5nm, $\Delta\epsilon$ is -4.3 to -5.

(1S)-(+)- or antipodal (1R)-(-)-ammonium 10-camphorsulphonate R can also be used.

5.6 Rifrattometria

5.6.1 Indice di rifrazione

“La rifrattometria è una metodica analitica che utilizza un rifrattometro, ovvero lo strumento capace di misurare l'indice di rifrazione (n) di una sostanza.”

L'indice di rifrazione è per i liquidi l'analogo del punto di fusione per i solidi. Esso può essere definito come il rapporto tra la velocità della luce nel vuoto (c) e la velocità di propagazione della luce nel mezzo, e come tale è un numero adimensionale.

$$n_x = \frac{c}{v_x} \quad (5.7)$$

L'indice di rifrazione dipende dalla temperatura del campione e dalla lunghezza d'onda della luce utilizzata.

La rifrattometria può essere usata per l'identificazione, l'analisi della purezza o della concentrazione di sostanze liquide.

Ogni volta che la luce attraversa il confine tra un mezzo e l'altro e la sua velocità cambia si verifica rifrazione. Se il raggio incidente non è perpendicolare alla superficie di separazione tra i due mezzi il raggio rifratto cambia inclinazione secondo la legge:

$$\frac{v_A}{v_B} = \frac{\sin \theta_A}{\sin \theta_B} = \frac{n_B}{n_A} \quad (5.8)$$

dove i pedici A e B indicano i due mezzi attraverso i quali diffonde il raggio luminoso.

5.6.2 Il rifrattometro di Abbe

Il rifrattometro di Abbe è un rifrattometro, ovvero uno strumento per la misurazione degli indici di rifrazione, costituito da due prismi ad alto indice di rifrazione, il primo illuminante ed il secondo rifrangente, tra i quali è posta la sostanza di cui si vuole misurare l' n .

Esame (31/1/11): Definire l'indice di rifrazione ed illustrare il principio di funzionamento del rifrattometro di Abbe.

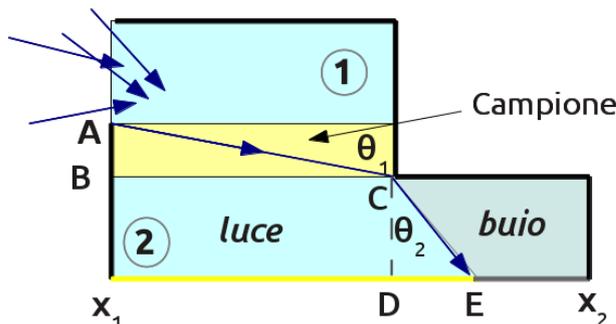


Figura 5.12: Schema di un rifrattometro di Abbe

In figura 5.12 è riportato lo schema di funzionamento di un rifrattometro di Abbe. 1 e 2 sono i due prismi, rispettivamente illuminante e rifrangente.

La luce (frecce blu) entra dall'unica faccia non annerita del prisma illuminante. Risulta chiaro, osservando un po' la figura, che il raggio AC è quello che penetra il prisma 2 con l'angolo maggiore rispetto alla normale (θ_1). Poiché il prisma 2 è di un materiale con alto indice di rifrazione il raggio rifratto avrà formerà un angolo θ_2 con la normale minore⁹. Da quanto detto risulta chiaro che il raggio di luce che andrà "più lontano" lungo l'asse inferiore ($x_1 - x_2$) sarà quello tracciato in blu fino al punto E. Pertanto sarà illuminata solo la porzione $x_1 - E$ mentre la parte $E - x_2$ sarà buia. Dalla posizione di E è poi possibile calcolare l'indice di rifrazione del campione essendo noto quello del prisma inferiore.

Matematicamente:

$$\frac{\sin \theta_1}{\sin \theta_2} = \frac{n_2}{n_{\text{campione}}}$$

$$\theta_2 = \tan^{-1} \left(\frac{DE}{CD} \right)$$

$$\theta_1 = \tan^{-1} \left(\frac{BC}{AB} \right)$$

$$n_{\text{campione}} = \frac{\sin \theta_2 \cdot n_2}{\sin \theta_1}$$

Effetto della lunghezza d'onda

Il problema di tale modello è che è necessario utilizzare luce monocromatica in quanto l'indice di rifrazione dipende significativamente dalla lunghezza d'onda¹⁰ o, in alternativa, si possono aggiungere dei prismi di correzione che annullino l'effetto della lunghezza d'onda e restituiscano valori equivalenti a quelli che si sarebbero trovati utilizzando come sorgente di luce monocromatica la linea D del sodio (589nm), anche in questo caso adottata come standard.

Effetto della temperatura

L'altro parametro che può inficiare le misure di rifrattometria è la temperatura (del campione e, in misura minore, del prisma rifrangente). L'indice di rifrazione, infatti, dipende dalla temperatura ($\approx -0,0005^\circ\text{C}^{-1}$). Ciò non stupisce se si ricorda come il fenomeno della rifrazione dipenda dalla minor velocità della luce nel mezzo: poiché all'aumentare della temperatura la densità dei liquidi abitualmente diminuisce, allo stesso modo diminuisce la velocità della luce nel mezzo, che come è intuitivo dipende dalla densità.

5.6.3 Farmacopea

L'indice di rifrazione è inserito nei metodi d'analisi della Farmacopea Europea.

Da: Ph.Eur. ed. 7th §2.2.6

⁹Un limite del rifrattometro di Abbe, infatti, è la possibilità di misurare solo sostanze con indice di rifrazione inferiore a quello del prisma, che è generalmente di circa 1,7. Si tratta in realtà di un valore molto elevato per gli usi comuni, e non costituisce un problema; molto più importante nella pratica è l'impossibilità di utilizzare liquidi o soluzioni che possano intaccare chimicamente il prisma stesso.

¹⁰Ciò spiega la scomposizione della luce visibile bianca nelle componenti, il cosiddetto arcobaleno, da parte dei prismi di rifrazione. In particolare le lunghezze d'onda minori hanno indici di rifrazione maggiori.

REFRACTIVE INDEX

The refractive index of a medium with reference to air is equal to the ratio of the sine of the angle of incidence of a beam of light in air to the sine of the angle of refraction of the refracted beam in the given medium.

Unless otherwise prescribed, the refractive index is measured at $20 \pm 0.5^\circ\text{C}$, with reference to the wavelength of the D-line of sodium ($\lambda = 589.3\text{nm}$); the symbol is then n_D^{20} .

Refractometers normally determine the critical angle. In such apparatus the essential part is a prism of known refractive index in contact with the liquid to be examined.

Calibrate the apparatus using certified reference materials.

When white light is used, the refractometer is provided with a compensating system. The apparatus gives readings accurate to at least the third decimal place and is provided with a means of operation at the temperature prescribed. The thermometer is graduated at intervals of 0.5°C or less.

5.7 Diffusione luce

I fenomeni diffusivi, o di “scattering”, derivano da un’interazione diversa rispetto a riflessione e rifrazione tra la luce ed una superficie, e sono responsabili della diffusione della luce in tutte le direzioni a partire dal punto di contatto con la superficie.

L’intensità della luce diffusa è proporzionale alla quarta potenza della frequenza, ovvero inversamente proporzionale alla lunghezza d’onda e quindi le lunghezze d’onda minori sono quelle più diffuse. Per questo il cielo è azzurro, perché la luce blu-viola è quella con lunghezza d’onda minore nel visibile ed è quindi quella più diffusa tra le radiazioni percepite dall’occhio umano¹¹. Parallelamente il sole ci appare giallo e non bianco perché privato della componente blu, più diffusa. Quando, come all’alba o al tramonto, la luce solare deve attraversare più strati di atmosfera, viene più diffusa e le uniche lunghezze d’onda che ci arrivano sono quelle rosse-arancio, a maggiore lunghezza d’onda nel visibile.

La diffusione può avvenire a livello molecolare, o a livello particellare, quando le particelle hanno dimensioni minori o uguali alla lunghezza d’onda (λ) della luce incidente, e si trovano in un mezzo con indice di rifrazione n molto diverso dal proprio.

In particolare si possono distinguere i seguenti casi:

se la lunghezza d’onda emessa è uguale a quella incidente

- diffusione di Rayleigh;
- diffusione di Mie (o effetto Tyndall).

se la lunghezza d’onda emessa è diversa da quella incidente

- diffusione Raman.

¹¹In particolare poi il cielo è azzurro e non viola perché l’occhio ha più fotorecettori retinici per il blu che per il viola e perché il sole emana un’intensità maggiore di luce blu rispetto alla viola.



Figura 5.13: Fenomeni diffusivi in un bicchiere di latte (un sistema colloidale). Le lunghezze d'onda minori (blu viola) sono più diffuse (come si nota dal colore blu dell'alone attorno al raggio) il che provoca un viraggio al giallo della luce trasmessa. E' stata usata una sorgente LED bianca con un bicchiere di latte diluito opportunamente.

5.7.1 Diffusione di Rayleigh

La diffusione (o "scattering") di Rayleigh è provocato da particelle di dimensioni minori di $1/20$ rispetto a quelle della lunghezza d'onda incidente per particelle immerse in un mezzo trasparente, sia esso solido, liquido o gassoso.

Dalla legge di Rayleigh, che esprime l'intensità del fenomeno, si ricava la distribuzione angolare nello spazio della luce diffusa (che è bilobata) e si può osservare la dipendenza dalla quarta potenza della frequenza e, soprattutto, la proporzionalità con il numero di particelle responsabili dello scattering. Questo ultimo fattore è cruciale per le applicazioni analitiche che può trovare la diffusione (ovvero nefelometria e turbidimetria).

5.7.2 Diffusione di Mie

La diffusione di Mie (o effetto Tyndall) si verifica quando le particelle disperse hanno dimensioni paragonabili a quelle della lunghezza d'onda incidente. Ciò si osserva di frequente nei colloidali in quanto le particelle colloidali, per definizione, hanno dimensioni comprese tra 10^{-9} e 10^{-6} m, mentre la luce visibile 400 – 700nm. La diffusione di Mie è diversa da quella di Rayleigh per la legge che la regola. In particolare la dipendenza in questo caso è con la seconda potenza della frequenza, e non con la quarta, e la forma della distribuzione angolare della luce diffusa in questo caso è, sempre bilobata, ma asimmetrica, e maggiore nella direzione di propagazione del fascio luminoso che genera diffusione.



Figura 5.14: Diffusione della luce da parte di particelle d'acqua di dimensioni comparabili a quelle della lunghezza d'onda della luce visibile per effetto Tyndall.

5.7.3 Nefelometria e turbidimetria

Nefelometria e turbidimetria sono due tecniche per la misurazione dei fenomeni diffusivi, e come tali possono essere utilizzate per calcolare la quantità di di particelle di determinate dimensioni presenti in un campione ed, eventualmente, anche all'interno di corpi trasparenti o semitrasparenti, previa normalizzazione della luce diffusa dal solo contenitore.

Entrambi gli strumenti (ma in genere lo stesso strumento può effettuare sia misure nefelometriche sia turbidimetriche, a seconda di come viene impostato) sono formati da:

- una sorgente di luce;
- un selettore di lunghezze d'onda per rendere la luce incidente monocromatica¹²;
- il campione da analizzare;
- un detector ed un elaboratore del segnale.

La differenza tecnica tra le due è che mentre la turbidimetria misura la luce diffusa "in avanti", ovvero lungo la direzione della radiazione incidente, la nefelometria misura la luce diffusa a 90° rispetto al raggio incidente.

Nefelometria Per la nefelometria si ha che:

$$I_d = I_0 \cdot k \cdot N \quad (5.9)$$

dove I_d è l'intensità di luce diffusa (il segnale registrato) che dipende dalla luce incidente (I_0) per il numero di particelle che diffondono (N) a meno di una costante (k).

¹²Si ricorda la grande dipendenza della diffusione dalla lunghezza d'onda!

Turbidimetria Per la turbidimetria, invece, si ha:

$$T = k \cdot b \cdot C \quad (5.10)$$

dove T , la turbidanza (che è il $\log I_0/I_d$) dipende dalla concentrazione delle particelle che diffondono (C) per b che è la lunghezza del cammino ottico a meno di una costante (k)¹³. Se si integra I_0 in k si ottiene la versione fornita dalle slide:

$$T = \log I_0/I_d = -\log I_d = k \cdot b \cdot C \quad (5.11)$$

5.7.4 Turbidimetria o nefelometria?

La scelta su quale tecnica d'analisi utilizzare dipende dalle condizioni. Nel caso si stia analizzando un campione che diffonde poco la luce, la turbidimetria non sarà adeguata in quanto gran parte della luce sarà riflessa e l'intensità di luce misurata lungo il cammino ottico dal turbidimetro sarà simile all'intensità della luce incidente. La sensibilità dell'analisi turbidimetrica in questo caso risulta molto basse, ma si potranno ottenere buoni risultati con la nefelometria che va a misurare solo la porzione di luce diffusa, ed è sensibile e precisa anche (e soprattutto) a basse concentrazioni. Le due tecniche risultano quindi complementari.

Esame (28/11/11): Nefelometria e Turbidimetria. *Illustrare queste due tecniche, in cosa differiscono e le diverse applicazioni.*

Un altro parametro da considerare nella scelta della tecnica analitica sono le dimensioni delle particelle disperse. Questo fattore è particolarmente importante per la nefelometria in quanto la luce diffusa a 90° è maggiore nel caso dello scattering di Rayleigh rispetto alla Mie, pertanto si otterranno risultati migliori con particelle più piccole.

Nefelometria in immunochimica

Un'interessante applicazione della nefelometria è il dosaggio di complessi antigene-anticorpo o farmaco-proteina in sieri umani. Dopo aver isolato la frazione d'interesse, infatti, la si dosa con lo scattering ed effettuando misure di turbidimetria.

Diffusione in Farmacopea

Nefelometria e turbidimetria sono iscritte in farmacopea (FUI XII) come metodiche strumentali per la misurazione della limpidezza e del grado di opalescenza dei liquidi.

Da: F.U.I. ed. XII §2.2.1

LIMPIDEZZA E GRADO DI OPALESCENZA DEI LIQUIDI

¹³ Si noti l'analogia tra questa espressione e la Lambert-Beer.

Nefelometria *Quando una sospensione viene esaminata perpendicolarmente alla direzione della luce incidente, il sistema appare opalescente a causa della riflessione della luce sulle particelle della sospensione (effetto Tyndall). Una certa parte del raggio di luce che attraversa un liquido torbido viene trasmessa, un'altra parte viene assorbita e la rimanente parte viene diffusa dalle particelle sospese. Se la misurazione viene effettuata a 90° rispetto al raggio di luce, la luce diffusa dalle particelle sospese può essere utilizzata per la determinazione della loro concentrazione, a condizione che il numero e le dimensioni delle particelle che influenzano la diffusione rimangano costanti. Le sospensioni di riferimento devono presentare un grado di torbidità costante e devono essere preparate nelle stesse condizioni del campione da analizzare. L'effetto Tyndall dipende sia dal numero delle particelle che dalle loro dimensioni. Le misurazioni nefelometriche sono più affidabili a valori più bassi di torbidità, dove vi è una relazione lineare tra i valori di torbidità espressi in Unità di Torbidità Nefelometrica (UTN) ed i relativi segnali provenienti dal rivelatore. Con l'aumentare del grado di torbidità, non tutte le particelle sono esposte alla luce incidente e inoltre la radiazione diffusa dalle altre particelle è ostacolata nel tragitto verso il rivelatore. I valori nefelometrici più alti a cui possono essere effettuate misurazioni affidabili sono dell'ordine di 1750-2000 UTN. La linearità deve essere dimostrata costruendo una curva di calibrazione a partire da almeno 4 concentrazioni.*

Turbidimetria *La torbidità esprime la proprietà ottica che fa sì che, a seguito della interazione tra la luce e le particelle in sospensione in un liquido, la luce viene diffusa e assorbita più che trasmessa in linea retta attraverso il campione. La quantità di materiale solido in sospensione può essere determinata mediante la misurazione della luce trasmessa. Si ottiene una relazione lineare tra la torbidità e la concentrazione quando le dimensioni delle particelle nella sospensione sono uniformi ed omogenee. Questo avviene solo nelle sospensioni altamente diluite contenenti particelle di piccole dimensioni. La linearità tra la torbidità e la concentrazione deve essere stabilita costruendo una curva di calibrazione a partire da almeno 4 concentrazioni.*

[Si tratta di una monografia armonizzata presente anche in Ph.Eur. (2.2.1) revisione 01/2008 : 20201.]

Inoltre la nefelometria è citata come strumento analitico a supporto dei metodi di immunoprecipitazione.

Da: F.U.I. ed. XII §2.7.1

DOSAGGI BIOLOGICI - METODI IMMUNOCHEMICI - METODI DI IMMUNOPRECIPITAZIONE

Metodi di immunoprecipitazione *L'immunoprecipitazione può essere valutata visivamente o mediante tecniche di diffusione della luce (dosaggio per nefelometria o turbidimetria). Un aumento di sensibilità può essere ottenuto usando come reattivi particelle rivestite di antigene o di anticorpo (per es. il lattice).*

Infine la turbidimetria viene considerata anche tra i “Metodi alternativi per il controllo della qualità microbiologica” (2-1-1-6).

5.8 Spettroscopia Raman

Come detto nell'introduzione sulla diffusione non sempre la luce viene diffusa con la stessa lunghezza d'onda (e quindi energia) della luce incidente. Una piccola percentuale della luce diffusa, infatti, presenta una lunghezza d'onda diversa.

$$\lambda_{\text{incidente}} \neq \lambda_{\text{diffusa}} \rightarrow E_{\text{incidente}} \neq E_{\text{diffusa}} \quad (5.12)$$

Alla diversa lunghezza d'onda corrisponde una diversa frequenza ($c = \lambda/\nu$) e quindi una diversa energia ($E = h \cdot \nu$).

5.8.1 Basi teoriche

In particolare la diffusione di Rayleigh avviene per un'interazione elastica (non c'è variazione di energia) transiente in cui il fotone è assorbito ed immediatamente riemesso, mentre la diffusione Raman è anelastica e può essere di Stokes o anti-Stokes.

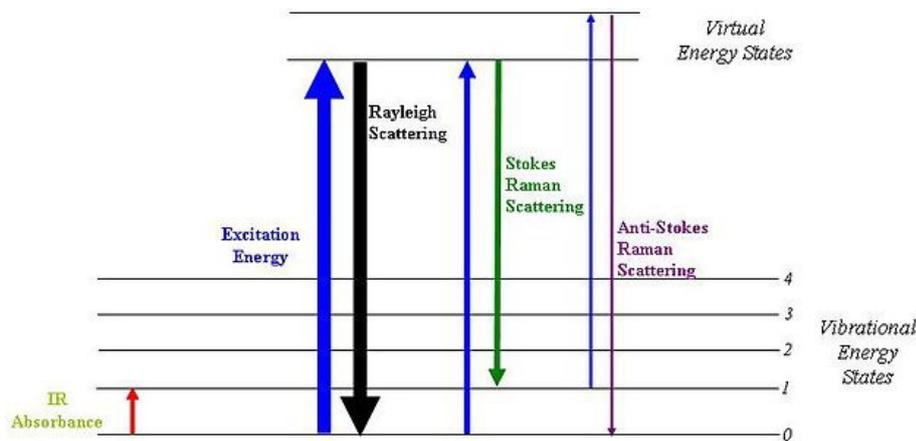


Figura 5.15: Schema dei livelli energetici di una molecola ed interazioni con la luce: effetti Raman e Rayleigh.

Stokes In figura 5.15 è rappresentato lo schema dei livelli energetici di una molecola sottoposta a spettroscopia Raman. A temperatura ambiente la maggior parte delle molecole sarà nello stato di riposo 0, e pertanto la radiazione

luminosa le ecciterà da 0 ad uno stato di energia “virtuale”. Se la molecola si rilassa tornando allo stato fondamentale non c’è effetto Raman, ma Rayleigh, se invece la molecola si rilassa su uno stato di energia eccitato (es. 1) si ha l’effetto Raman-Stokes. Il fotone riemesso avrà in questo caso un’energia (ed una frequenza) minori rispetto a quello incidente.

Anti-Stokes Al contrario se la radiazione colpisce una molecola nello stato eccitato (1), che è percentualmente popolato diversamente in funzione della temperatura secondo l’equazione di Boltzmann, l’energia fornita la eccita ad uno stato di energia virtuale maggiore. Dallo stato ad energia virtuale la molecola può rilassarsi tornando allo stato fondamentale (più probabile) emettendo un fotone in questo caso con energia maggiore di quello incidente, oppure può dare Rayleigh (estremamente poco probabile) tornando allo stato eccitato. In questo caso si ha l’effetto anti-Stokes.

La spettroscopia Raman fornisce spettri complementari rispetto a quelli IR in quanto se all’IR è necessario che vi sia un momento di dipolo nel legame eccitato perché possa essere visibile, e pertanto legami fortemente polarizzati danno segnali più forti (es. il segnale del carbonile a 1700 cm^{-1}), al contrario in Raman sono più visibili i fenomeni che riguardano legami non polari (come il backbone C-C) mentre sostanze estremamente polari, come l’acqua, sono pressoché trasparenti.

Vantaggi Quest’ultimo fatto consente di registrare spettri Raman anche in soluzione, e non dover preparare il campione è un grande vantaggio della Raman sull’IR. Ciò costituisce uno dei vantaggi della spettroscopia Raman, assieme alla capacità di penetrare contenitori in plastica o vetro per poter effettuare analisi sul prodotto finito, oppure è possibile dosare il contenuto in principio attivo in una compressa sottraendo dallo spettro dell’intera forma farmaceutica quello del rivestimento e confrontandolo con quello dell’attivo puro.

Svantaggi Tra gli svantaggi della Raman c’è la sua bassa intensità, che rende necessario l’uso di fonti di luce molto potenti (es. raggi laser) inoltre la presenza di fenomeni di fluorescenza può comportare un disturbo significativo alle analisi¹⁴.

Nota che trattandosi di un fenomeno diffusivo la radiazione riemessa è misurata a 90° rispetto al raggio incidente, come in nefelometria.

5.8.2 Microscopia Raman

Così come si è sviuppata la microscopia IR, che consente di identificare chimicamente le sostanze osservate al microscopio ottico (e che trova applicazioni, ad esempio, nei laboratorio di tecnica farmaceutica per lo studio, tra le altre cose, della distribuzione dei componenti in un semisolido) allo stesso modo si è sviluppato l’imaging Raman.

Esame (28/7/11): *Spettroscopia Raman: illustrare l’effetto Raman e le applicazioni nella chimica farmaceutica.*

¹⁴Un metodo per aumentare il segnale Raman è la surface-enhanced Raman scattering (SERS) dove l’intensità può essere incrementata fino a 10^6 grazie alla concentrazione di locale di densità di carica su superfici opache. Non tutte le superfici, però, sono idonee ad analisi SERS (es. non lo sono le facce di cristalli), si possono però “creare” superfici per sfruttare questo fenomeno adsorbendo l’analita su particelle metalliche di dimensioni colloidali d’oro o argento...

Con la microscopia Raman si possono ottenere immagini in cui un pixel corrisponde ad una cella di $9\mu\text{m}$.

5.9 Spettroscopia a raggi X (XRD)

La spettroscopia XRD (*X-Ray Diffraction*) o Spettroscopia a raggi-X è la tecnica analitica più potente per determinare la struttura tridimensionale di un composto noto o incognito. Il suo limite maggiore è che può essere condotta solo su cristalli, pertanto è necessario riuscire ad ottenere un cristallo della sostanza di cui si vuole studiare la struttura.

5.9.1 Interferenza e diffrazione

Le basi di ottica su cui si basa l'XRD sono sostanzialmente interferenza e diffrazione.

Diffrazione

La diffrazione è un fenomeno che si verifica quando un fascio di luce attraversa una fenditura avente dimensioni simili alla propria lunghezza d'onda. Quando questo avviene la fenditura si comporta da nuova sorgente di irradiazione, ovvero il raggio passante “devia” e si propaga in tutte le direzioni.

Ciò può essere spiegato ricorrendo al principio di indeterminazione di Heisenberg, per il quale esistono coppie di grandezze che non possono essere misurate con precisione contemporaneamente (ad es. posizione e velocità degli elettroni attorno al nucleo). Per il fotone, infatti, non possono essere note contemporaneamente posizione e direzione: tanto più si determina la posizione, mediante fenditure più strette, tante meno informazioni si hanno sulla direzione.

5.9.2 Interferenza

L'interferenza è data dall'interazione tra due onde elettromagnetiche e può essere costruttiva se sono in fase, nel qual caso le loro intensità si sommano, o distruttiva se sono fuori-fase, ed in questo caso si annullano.

Interferenza e diffrazione

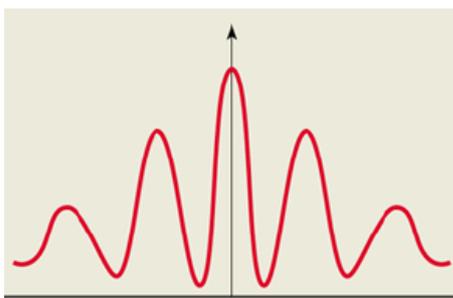


Figura 5.16: Interferogramma prodotto dalla sovrapposizione di due onde.

Una celebre evidenza sperimentale dei fenomeni di interferenza e diffrazione è data dall'esperimento di Young, illustrato in figura 5.17. Un raggio luminoso viene fatto passare attraverso una fenditura di dimensioni tali da provocare diffrazione, quindi è interposto un ulteriore schermo con due fenditure vicine tra loro (sempre nell'ordine di grandezza della λ) ma su un cammino ottico diverso da quello del raggio incidente il primo schermo. Per permettere alla luce il passaggio attraverso queste due fenditure è necessario che si verifichi diffrazione, altrimenti, se la luce proseguisse in linea retta dopo aver oltrepassato la prima fenditura, non si vedrebbe nessun raggio luminoso uscente.

I fasci di luce che oltrepassano le due fenditure vengono quindi fermati da una lastra fotografica posta ad un'adeguata distanza dal secondo schermo. Si leggerà sulla lastra un interferogramma analogo a quello in figura 5.16 ovvero alternanza di linee di luce e linee di buio. Questo perché le due fenditure si comportano come due nuove sorgenti e, a seconda della posizioni le due onde avranno percorso distanze diverse pertanto, essendo in fase all'origine potrebbero non esserlo più. Dove l'interferenza è costruttiva si leggono linee chiare sulla lastra fotografica, dove l'interferenza è distruttiva si trovano le linee scure. E' possibile una trattazione matematica del fenomeno che permette di individuare le condizioni per interferenza distruttiva e costruttiva in funzione della lunghezza d'onda.

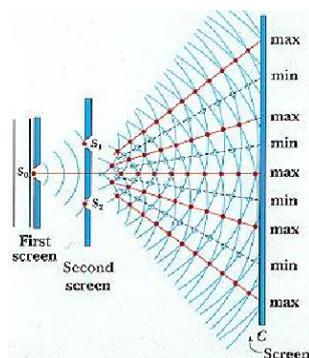


Figura 5.17: Esperimento di Young

5.9.3 Diffrazione di raggi X

Breve storia

I raggi X furono scoperti nel 1895 da Wilhelm Röntgen, e 17 anni più tardi Max von Laue propose che potessero essere diffratti dal passaggio attraverso un cristallo, in quanto la distanza tra piani nel cristallo è proporzionale alla lunghezza d'onda dei raggi X. Ciò fu quasi subito confermato e permise lo sviluppo dell'XRD.

L'interpretazione degli spettri di diffrazione ai raggi X per risalire alla struttura delle molecole, specie se complesse, richiede calcoli matematici estremamente complessi¹⁵. L'avvento dei computer ha modificato profondamente la situa-

¹⁵La tesi di dottorato del prof. Gavezotti, esimio cristallografo della nostra Università, era interamente basata sulla determinazione di una struttura 3D a partire da dati XRD

zione, semplificando enormemente il processo di determinazione delle strutture XRD in seguito all'acquisizione dei dati, tanto che oggi sono note le strutture di oltre 25000 composti organici.

L'applicazione più importante dell'XRD, storicamente, è forse stata permettere l'identificazione della struttura a doppia elica del DNA.

Legge di Bragg

La prima teoria matematica dell'XRD, che ancora oggi è alla base di tale tecnica, è la legge di Bragg, del 1913, che esprime la dipendenza della diffrazione di una radiazione elettromagnetica dalle dimensioni del reticolo cristallino.

Si osservi la figura 5.18. d è la distanza tra i piani del cristallo, ovvero lo spessore della cella cristallina lungo la faccia considerata. Un fascio di raggi X (blu) incidono la faccia del cristallo con angolo α . Poiché la distanza dalla sorgente è molto grande in rapporto alla lunghezza d'onda si possono considerare senza perdite in precisione i fronti d'onda come perpendicolari alla direzione di propagazione, e non archi di una circonferenza avente centro nella sorgente.

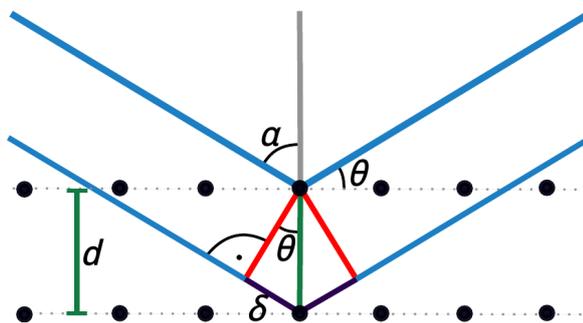


Figura 5.18: Rappresentazione della legge di Bragg. I punti neri costituiscono gli atomi della cella cristallina di spessore d . L'angolo d'incidenza con la faccia del cristallo è α . 2σ , la porzione in nero, è la distanza di cammino tra i due raggi, che deve essere pari a $n\lambda$ per avere interferenza costruttiva. σ è pari a $d \cdot \sin \theta$ per trigonometria.

Ne segue che quando il raggio superiore incontra la molecola il raggio inferiore è nel punto in cui cambia colore da blu a nero. Il raggio inferiore dovrà poi compiere un tragitto maggiore di 2σ prima di raggiungere nuovamente il primo raggio. A questo punto tra i due si verifica interferenza che può essere costruttiva o distruttiva, a seconda del rapporto $2\sigma/n\lambda$.

Poiché σ il complementare di α , al variare dell'angolo di incidenza si può osservare o meno luce diffratta. Dagli angoli a cui si verifica interferenza costruttiva si può ricavare d , essendo note λ ed α quindi θ .

Pertanto:

$$\begin{aligned}
 \sigma &= d \cdot \sin \theta && \text{(perchè triangolo rettangolo)} \\
 n \cdot \lambda &= 2 \cdot \sigma && \text{(condizione per interferenza costruttiva)} \\
 n \cdot \lambda &= 2(d \cdot \sin \theta) \\
 2d &= \frac{n \cdot \lambda}{\sin \theta} \\
 d &= \frac{n \cdot \lambda}{2 \cdot \sin \theta} && (5.13)
 \end{aligned}$$

dove (5.13) è la legge di Bragg. Le relazioni con $n = 2, 3 \dots$ sono dette di secondo-ordine, terzo-ordine e così via. Abitualmente si integra $n = 1$ in d ottenendo un'espressione alternativa della legge di Bragg:

$$\lambda = 2 \cdot \sin \theta \quad (5.14)$$

5.9.4 Tecniche XRD

XRD cristallo singolo

Per determinare la struttura di un singolo cristallo di sostanza si esegue l'XRD a cristallo singolo nella quale una sorgente di raggi X monocromatica è mantenuta fissa mentre il cristallo ruota su 4 diversi assi, finché non si verifichi riflessione. Il tutto è controllato da un PC che analizza gli angoli ai quali si verifica l'interferenza in fase per decidere come ruotare ulteriormente il cristallo ed elabora nel più breve tempo possibile la struttura dettagliata a livello atomico. Questo metodo è quello sviluppato da Bragg (William ed il figlio Lawrence, i quali per questo vinsero il premio Nobel).

XRD di polveri

La powder XRD (o XRPD – *X-Ray Powder Diffraction*) si basa sullo stesso principio dell'XRD a cristallo singolo ma procedimento e dati ottenibili sono diversi.

C'è sempre una sorgente monocromatica di raggi X ma poi si sfrutta il fatto che tra tante particelle di polvere ce ne sarà sempre almeno una che dia riflessione ad ogni angolo, pertanto si ottengono informazioni sol su dimensioni purezza e tipo di cella elementare del cristallo, ma non sulle distanze interatomiche, L'identificazione di composti ignoti dal loro spettro XRD-powder è possibile dal confronto con i pattern di diffrazione conservati in un'ampia banca dati.

Applicazioni farmaceutiche dell'XRPD

Polimorfi Dal punto di vista tecnico-farmaceutico la XRD di polveri è particolarmente importante in quanto ogni forma cristallina è caratterizzata da un diverso pattern di rifrazione, e pertanto è possibile distinguere i polimorfi.

Identificazione di API in formulazioni L'XRPD permette anche di identificare e/o controllare la presenza di principio attivo in una forma farmaceutica confrontando gli spettri dell'API puro con quelli della forma farmaceutica. Ad es. in figura 5.19.

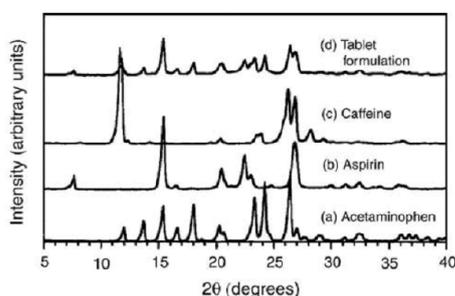


Figura 5.19: Confronto tra spettri XRPD di API puri (a: paracetamolo, b: acido acetilsalicilico, c: caffeina) con una formulazione in compresse che li contiene.

Monitoraggio di transizioni di fase L'XRPD può anche essere applicato in ambito produttivo per il controllo delle transizioni di fase durante il processo di produzione. Una volta registrati gli spettri delle diverse fasi (es. monoidrato, anidro e metastabile) se ne può valutare la presenza percentuale durante un processo (es. essiccamento).

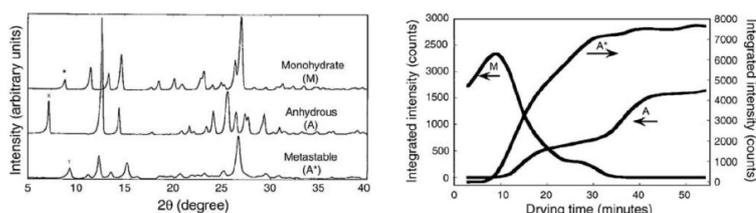


Figura 5.20: Applicazione dell'XRPD al controllo di un processo di essiccamento.

5.10 Spettroscopia Near Infrared (NIR)

5.10.1 Storia

La regione dell'infrarosso comprende le radiazioni elettromagnetiche con lunghezza d'onda compresa tra il visibile ($\lambda \approx 700\text{nm}$) e le microonde ($\lambda \approx 1\text{mm}$).

A sua volta la regione dell'IR può essere così scomposta:

Vicino IR compreso tra 780 e 2500nm, o $13000\text{-}4000\text{cm}^{-1}$ (*Near IR, NIR*);

Medio IR compreso tra 2,5 e 50 μm , o $4000\text{-}200\text{cm}^{-1}$ (*Mid IR, MIR*);

Lontano IR compreso tra 50 e 100 μm , o $200\text{-}10\text{cm}^{-1}$ (*Far IR, FIR*).

Anche se nota da tempo la prima applicazione industriale che sfruttasse la regione del vicino infrarosso (NIR) è solo degli anni Cinquanta, ed accoppiata ad altre tecniche. Solo a partire dagli anni Ottanta si è sviluppata la spettroscopia NIR come tecnica autonoma (*standalone*), ma il vero salto di qualità è avvenuto verso la metà degli anni '80 con l'adozione della fibra ottica come vettore NIR.

L'adozione della NIR spettroscopy nell'industria farmaceutica è relativamente recente, e trova impiego nel controllo qualità di materie prime, intermedi ed eccipienti.

5.10.2 Teoria

Essendo situata a numeri d'onda maggiori di 4000cm^{-1} la NIR si basa su armoniche (*overtone*) molecolari e combinazione di vibrazioni. Si tratta di fenomeni che danno bande larghe e di difficile attribuzione, ma il principale problema della NIR è data dalla debolezza del segnale.

Rispetto alla spettroscopia IR classica il confronto degli spettri a scopo di identificazione è più complesso in quanto necessita di calibrazione con spettri noti. Sostanze incognite sono identificate con pattern recognition da una banca dati di spettri noti più che sulla base di attribuzioni teoriche.

Analisi quantitativa

L'analisi quantitativa ad un a singola lunghezza d'onda non è possibile, (ma sarebbe comunque poco precisa) in quanto essendo gli spettri registrati in riflettanza diffusa più che in trasmittanza non è valida la legge di Lambert-Beer.

E' in ogni caso possibile condurre misurazioni quantitative con elaborazioni software che si basano sull'analisi multivariata con tecniche di regressione lineare multipla a partire da una serie di campioni per calibrare lo strumento.

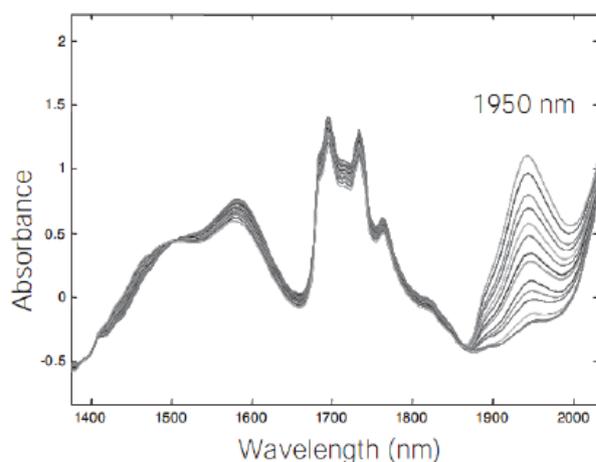


Figura 5.21: Determinazione dell'acqua grazie alla banda a 1950 nm

In figura 5.21 è mostrata una misurazione quantitativa del contenuto di acqua mediante NIR, tecnica ampiamente utilizzata per questa applicazione nell'industria alimentare.

5.10.3 Vantaggi

La NIR penetra il campione iù in profondità di un IR classico e, anche se non particolarmente sensibile permette di sondare materiale sfuso senza preparazione

del campione (semplicemente introducendo la sonda NIR). Inoltre le analisi possono essere condotte anche da personale non qualificato.

Anche se poco sensibile la NIR è però altamente specifica: non è in grado come l'HPLC di identificare sostanze presenti in quantità minime ma consente di distinguere enantiomeri ed isomeri.

5.10.4 Strumentazione e misure

Come sorgente si utilizzano dei diodi emettitori ad infrarossi, più economici rispetto ad una sorgente ad ampio spettro seguita da un monocromatore. Nel telerilevamento possono anche essere impiegate fibre ottiche.

In particolare le principali tecniche di misurazione di spettri NIR sono:

- trasmissione;
- riflettanza totale attenuata (ATR);
- riflettanza secolare;
- riflettanza diffusa (DRIFT).

Misurazioni in trasmittanza

Il prerequisito indispensabile per poter procedere alla misurazione di spettri NIR in trasmittanza è che il campione sia omogeneo, e non vi siano variazioni di concentrazione o composizione che potrebbero alterare il risultato.

Per sostanze chimiche caratterizzate da un forte assorbimento nella regione del NIR, poi, è necessario prepararle in spessori molto sottili (qualche mm), oppure devono essere diluiti.

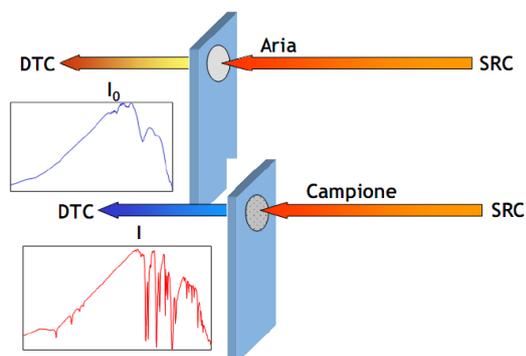


Figura 5.22: Procedura per la misurazione di spettri NIR in trasmittanza. (SRC= source, DTC = detector).

Il campione è depositato su di una finestra con apposito supporto, chimicamente inerte al campione (es. KBr, NaCl). Il cammino ottico è quindi minimo ($\approx 10\mu\text{m}$).

Per informazioni sulla preparazione di pastiglie di KBr cfr. il corso di Metodi fisici in chimica organica.

Misurazioni di riflettanza totale attenuata – (ATR)

La base teorica delle misurazioni in riflettanza totale attenuata è la cosiddetta legge di Snell (5.15) [cfr. la sezione 5.6 “Rifrattometria” a pag. 75]:

$$n_1 \cdot \sin \Theta = n_2 \sin \Phi \quad (5.15)$$

per la quale quando un’onda elettromagnetica passa da un mezzo con indice di rifrazione pari ad n_1 ad uno con indice di rifrazione minore (n_2) si ha una deviazione del raggio secondo l’equazione (5.15) dove Θ e Φ sono gli angoli tra il raggio di luce e la normale, ovvero la perpendicolare all’interfaccia.

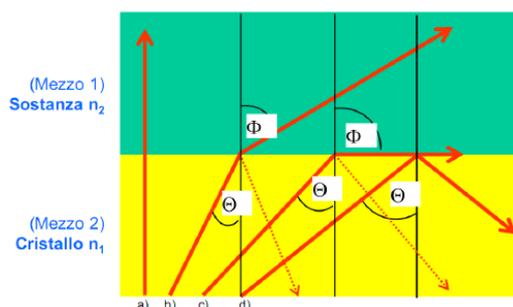


Figura 5.23: Riflessione totale per angoli incidenti maggiori dell’angolo limite (raggio c).

Ne segue che, posto $n_1 > n_2$, esiste un angolo Θ , detto angolo limite (Θ_G) per il quale Φ è pari a 90° ovvero il raggio rifratto è parallelo all’interfaccia e non propaga più nel secondo mezzo. Il valore di tale angolo può essere ricavando ponendo

$$\Phi = 90^\circ$$

..da cui..

$$\begin{aligned} \sin \Phi &= 1 \\ \sin \Theta_G &= \frac{n_2}{n_1} \end{aligned} \quad (5.16)$$

Per angoli maggiori di Θ_G , quindi, si avrà riflessione totale.

Per le misurazioni ATR, quindi, si pone il campione su di un prisma ad alto indice di rifrazione (il cristallo ATR, o elemento di riflessione interna) ed angolo superiore all’angolo limite per far sì che si abbia riflessione totale.

La riflessione totale si ha in seguito all’interazione del raggio con il campione, ovvero parte della radiazione NIR sarà assorbita dal campione secondo le sue caratteristiche, quindi il raggio sarà riflesso. Si forma così un’onda “evanescente” cosiddetta in quanto privata di alcune componenti, che sono quelle assorbite dal campione. In questo caso, infatti, non si tratta di riflessione semplice ma di riflessione totale in seguito alla legge di Snell, ovvero la riflessione dipende dalle caratteristiche del campione (come risulta evidente dal fatto che per un campione con n diverso potrebbe non verificarsi..).

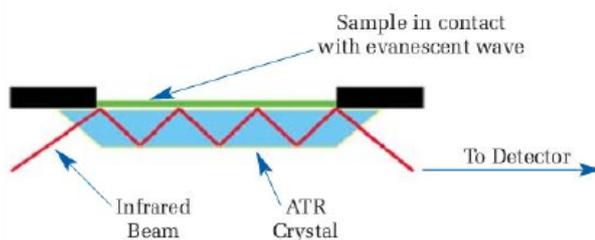


Figura 5.24: Amplificazione (4X) del segnale ATR.

Il problema è che la quantità di radiazione adsorbita dall'interfaccia è minima in quanto il percorso del raggio nel campione è minimo. Il signal-to-noise ratio, però, può essere incrementato moltiplicando questo effetto più volte in serie attraverso un cristallo di forma adeguata, come illustrato in figura 5.24.

Vantaggi La tecnica ATR è molto utilizzata per i liquidi, ma non solo, ed i suoi vantaggi sono dati dal fatto che non necessita di preparazione del campione, è ideale per prodotti altamente assorbenti ed è conservativa.

5.10.5 Misurazioni di riflettanza diffusa – (DRIFT)

Se le misurazioni NIR ATR sono particolarmente adatte ai liquidi, le misurazioni DRIFT lo sono per i solidi.

Tecnicamente si misura la componente diffusa della radiazione IR e si misura la componente adsorbita. In questo caso la parte di radiazione direttamente riflessa è “persa”, e pertanto può essere utile preparare il campione con pastiglie di KBr il cui effetto è diminuire appunto l'entità della riflessione diretta.

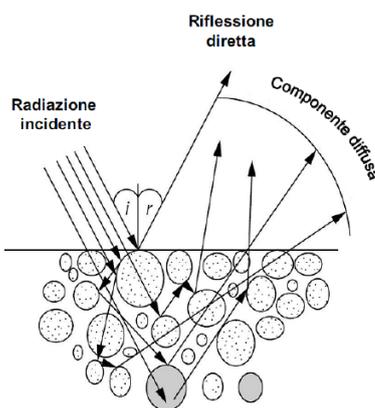


Figura 5.25: Schema della componente di riflessione diffusa sfruttata dalla DRIFT.

Trascurando la componente riflessa dalla superficie del campione (studiata da Fresnel) e concentrandosi sulla componente di riflettanza diffusa non si può derivare una relazione deterministica tra intensità delle bande e concentrazione

dei componenti. Semplificando la trattazione a campioni diluiti in matrici non assorbenti si può ricavare la legge di Kubelka-Munk, per cui:

$$f(R_\infty) = (1 - R_\infty)2/2R_\infty = 2,303\alpha C/s \quad (5.17)$$

dove R_∞ è la riflettanza diffusa da un campione di spessore infinito, α il coefficiente di assorbimento, C la concentrazione ed s un coefficiente di diffusione. Per calcoli quantitativi, quindi, l'unità in ascissa non sarà più l'assorbanza ma "l'unità Kubelka-Munk" (KM) che varia linearmente con la concentrazione di campione.

La riflettanza diffusa è ideale per campioni solidi, e la diluizione con matrici non assorbenti quali KBr permette di ottenere spettri più "puliti", privi delle interferenze riflessive e quindi con una maggior componente diffusiva.

Le misure di riflettanza diffusa possono essere effettuate anche mediante fibre ottiche, dove il decadimento del segno in funzione della distanza è trascurabile fino a 50m e minimo anche per lunghezze superiori (cfr. grafico). A causa della scarsa quantità di energia riflessa dai campioni solitamente non si utilizza una configurazione a singola fibra ma vengono utilizzati "fiber bundle".

5.10.6 Focused Beam Reflectance Measurement (FBRM)

La tecnica "Focused Beam Reflectance Measurement" (FBRM), attualmente sotto brevetto, si basa sulla retro-diffusione della luce da parte di particelle. Un sistema ottico rotante fa sì che la sorgente laser descriva delle circonferenze di raggio prefissato e con messa a fuoco ad una distanza d dall'ottica. Quando alla distanza d in cui la luce laser è focalizzata è presente una particella si ha diffusione e parte della luce torna indietro verso la sorgente dove viene registrata da un detector.

Esame (2/5/11): *Illustrare brevemente la spettroscopia NIR e le applicazioni nella farmaceutica.*

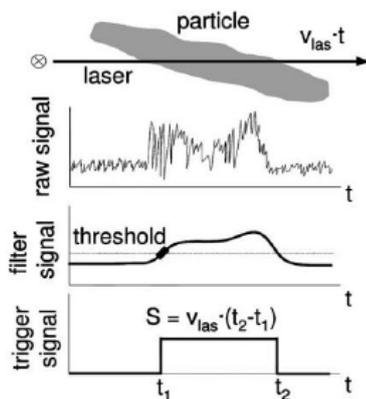


Figura 5.26: Determinazione delle dimensioni particellari e relazione con il superamento della soglia di luce diffusa in funzione del tempo.

Se la luce registrata supera un valore soglia si ritiene che sia presente una particella mentre quando, nel movimento del laser, la particella "finisce" si avrà un'interruzione nella luce riflessa (vedi figura 5.26). Ogni particella è quindi caratterizzata da un intervallo di tempo continuato nel quale si verifica la diffusione. Il prodotto dalla velocità tangenziale connessa alla rotazione del laser per

il tempo continuativo di ogni particella da' informazioni sulle sue dimensioni (in particolare è misurata la distanza della corda).

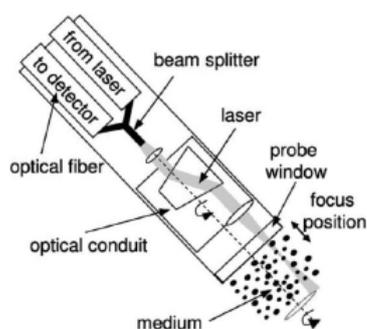


Figura 5.27: Schema di una sonda FBRM

Questo apparato è posto al vertice di una sonda (vedi schema in figura 5.27) alla quale proviene una fibra ottica per il raggio laser e da cui diparte un'altra fibra che va al detector. Si ottengono così informazioni accurate ed in continuo sulla granulometria di un campione. I dati ottenuti sono d'importanza cruciale nel processo di macinazione, nella quale, non a caso, l'FBRM è oggi spesso integrata nella determinazione dell'avanzamento e per impostarne i parametri di processo critici (il cui controllo è cruciale, come ha ricordato l'FDA, per il loro impatto sulla qualità).

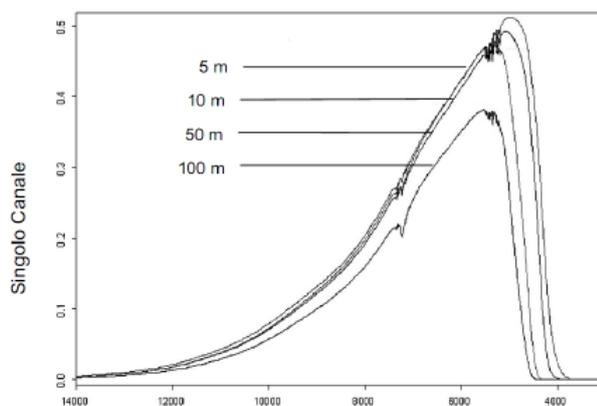


Figura 5.28: Decadimento prestazionale del NIR su fibra ottica.

5.10.7 Le indicazioni della Ph. Eur. sulla spettroscopia NIR

Alla spettrometria NIR è dedicata una monografia della Farmacopea Europea.

Da: Ph.Eur. ed. 7th §2.2.40

NEAR-INFRARED SPECTROPHOTOMETRY

Near-infrared (NIR) spectrophotometry is a technique with wide and varied applications in pharmaceutical analysis. The NIR spectral range extends from about 780nm to about 2500nm (from about 12800-cm⁻¹ to about 4000cm⁻¹). In some cases the most useful information is found in the spectral range from about 1700nm to about 2500nm (from about 6000cm⁻¹ to 4000cm⁻¹). NIR spectra are dominated by C-H, N-H, O-H and S-H overtone resonances and combinations of fundamental vibrational modes; they have a high informative character if the information is extracted by suitable chemometric algorithms. NIR bands are much weaker than the fundamental mid-IR vibrations from which they originate. Because molar absorptivities in the NIR range are low, radiation typically penetrates several millimeters into materials, including solids. Furthermore, many materials such as glass are relatively transparent in this region.

Measurements can be made directly on in situ samples, in addition to standard sampling and testing procedures. Physical as well as chemical information, both qualitative and quantitative, is available from NIR spectra. However, direct comparison of the spectrum obtained with the substance being examined with a reference spectrum of a chemical reference substance, as used in infrared absorption spectrophotometry, is not appropriate. Suitable validated mathematical treatment of the data is required.

NIR spectrophotometry has a wide variety of applications for both chemical and physical analysis, for example : chemical analysis

- *identification of active substances, excipients, dosage forms, manufacturing intermediates, chemical raw materials and packaging materials,*
- *quantification of active substances and excipients, determination of chemical values such as hydroxyl value, iodine value, acid value, determination of water content, determination of degree of hydroxylation, control of solvent content,*
- *process control.*

physical analysis

- *crystalline form and crystallinity, polymorphism, pseudopolymorphism, particle size,*
- *dissolution behaviour, disintegration pattern, hardness,*
- *examination of film properties,*
- *process control, for example monitoring of blending and granulation.*

Measurements in the NIR region are influenced by many chemical and physical factors as described below; reproducibility and relevance of results depend on control of these factors and measurements are usually valid only for a defined calibration model.

APPARATUS

NIR spectrophotometers are used for recording spectra in the region of about 780nm to about 2500nm (about 12800cm⁻¹ to about

4000 cm^{-1}). All NIR measurements are based on passing light through or into a sample and measuring the attenuation of the emerging (transmitted, scattered or reflected) beam. Spectrophotometers for measurement in the NIR region consist of a suitable light source, a monochromator or interferometer. Common monochromators are acousto-optical tuneable filters (AOTF), gratings or prisms. High intensity light sources such as quartz or tungsten lamps or similar are used. The tungsten lamp light source can be highly stabilised. Therefore many NIR instruments have the single-beam design. Silicon, lead sulphide, indium arsenide, indium gallium arsenide, mercury cadmium telluride (MCT) and deuterated triglycine sulphate are commonly used detector materials. Conventional cuvette sample holders, fibre-optic probes, transmission dip cells and spinning or traversing sample holders are a few common sampling devices. The selection is based on the intended application, paying particular attention to the suitability of the sampling system for the type of sample to be analysed. Suitable data processing and evaluation units are usually part of the system.

MEASUREMENT METHODS

Transmission mode Transmittance (T) is a measure of the decrease in radiation intensity at given wavelengths when radiation is passed through the sample. The sample is placed in the optical beam between the source and detector. The arrangement is analogous to that in many conventional spectrophotometers and the result can be presented directly in terms of transmittance (T) or/and absorbance (A).

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

I_0 = intensity of incident radiation,
 I = intensity of transmitted radiation,

$$A = -\log_{10} T = \log \left(\frac{1}{T} \right) = \log \left(\frac{I_0}{I} \right).$$

Diffuse reflection mode The diffuse reflection mode gives a measure of reflectance (R), the ratio of the intensity of light reflected from the sample (I) to that reflected from a background or reference reflective surface (I_r). NIR radiation can penetrate a substantial distance into the sample, where it can be absorbed by vibrational combinations and overtone resonances of the analyte species present in the sample. Non-absorbed radiation is reflected back from the sample to the detector. NIR reflectance spectra are typically obtained by calculating and plotting $\log (1/R)$ versus the wavelength or wavenumbers.

$$R = \frac{I}{I_r}$$

I = intensity of light diffusively reflected from the sample,

I_r = intensity of light reflected from the background or reference reflective surface,

$$A_R = -\log_{10} \left(\frac{1}{R} \right) = \log \left(\frac{I_r}{I} \right).$$

Transflection mode *This mode is a combination of transmittance and reflectance. In the measurement of transfectance (T^*) a mirror or a diffuse reflectance surface is used to reflect the radiation transmitted through the sample a second time and thus doubling the pathlength. Non-absorbed radiation is reflected back from the sample to the detector.*

$$T^* = \frac{I}{I_T}$$

I_T = intensity of transflected radiation, without sample,

I_r = intensity of transmitted and reflected radiation measured with the sample,

$$A^* = -\log_{10} \left(\frac{1}{T^*} \right).$$

SAMPLE PREPARATION/PRESENTATION

Transmission mode *The measurement of transmittance (T) is dependent on a background transmittance spectrum for its calculation. A background reference can be air, an empty cell, and a solvent blank or in special cases a reference sample. The method generally applies to liquids, diluted or undiluted, dispersions, solutions and solids. For transmittance measurements of solids, a suitable sample accessory is to be used. The samples are examined in a cell of suitable pathlength (generally 0.5-4mm), transparent to NIR radiation, or by immersion of a fibre optic probe of a suitable configuration, which yields a spectrum situated in a zone of transmission compatible with the specifications of the apparatus and appropriate for the intended purpose.*

Diffuse reflection mode *This method generally applies to solids. The sample is examined in a suitable device. Care must be taken to make the measuring conditions as reproducible as possible from one sample to another. When immersing a fibre optic probe in the sample, care must be taken in the positioning of the probe to ensure that*

it remains stationary during the acquisition of the spectra and that the measuring conditions are as reproducible as possible from one sample to another. The reflected radiation of a background reference is scanned to obtain the baseline, and then the reflectance of one or more analytical samples is measured. Common reflectance references are ceramic tiles, perfluorinated polymers and gold. Other suitable materials may be used. Only spectra measured against a background possessing the same optical properties can be directly compared with one another. The particle size, water of hydration and state of solvation must be taken into consideration.

Transflection mode *A reflector is placed behind the sample so as to double the pathlength. This configuration can be adopted to share the same instrument geometry with reflectance and fibre optic probe systems where the source and the detector are on the same side of the sample. The sample is examined in a cell with a mirror or a suitable diffusive reflector, made either of metal or of an inert substance (for example titanium dioxide) not absorbing in the NIR region.*

FACTORS AFFECTING SPECTRAL RESPONSE

Sample temperature *This parameter is important for aqueous solutions and many liquids, where a difference of a few degrees can result in substantial spectral changes. Temperature is also an important parameter for solids and powders containing water.*

Moisture and solvent residues *Moisture and solvent residues present in the samples will contribute significant absorption bands in the NIR region.*

Sample thickness *Sample thickness is a known source of spectral variability and must be understood and/or controlled. For example, in a reflection measurement the sample may be “infinitely” thick, or thinner samples of constant thickness must have a stable, diffusively reflecting backing material of constant, and preferably high reflectivity.*

Sample optical properties *In solids, both surface and bulk scattering properties of samples must be taken into account. Spectra of physically, chemically or optically heterogeneous samples may require sample averaging by increasing the beam size or examining multiple samples or spinning the probe. Certain factors such as differing degree of compaction or particle size in powdered materials and surface finish can cause significant spectral differences.*

Polymorphism *The variations in crystalline structure (polymorphism) influence the spectra. Hence different crystalline forms as well as the amorphous form of a solid may be distinguished from one another on the basis of their NIR spectra. Where multiple crystalline forms are present, care must be taken to ensure that the calibration standards have a distribution of forms relevant to the intended application.*

Age of samples *Samples may exhibit changes in their chemical, physical or optical properties over time. Care must be taken to ensure that samples for NIR analysis are representative of those used for calibration. If samples of different age are to be analysed, potential differences in the properties must be accounted for.*

[...]

IDENTIFICATION AND CHARACTERISATION (QUALITATIVE ANALYSIS)

Establishment of a spectral reference library *Record the spectra of a suitable number of batches of the substance which have been fully tested according to established specifications and which exhibit the variation typical for the substance to be analysed (for example, manufacturer, physical form, particle size). The set of spectra represents the information for identification and characterisation that defines the similarity border for that substance and is the entry for that substance in the spectral library used to identify the substance. The number of substances in the library depends on the specific application, but libraries that are too big can cause some difficulties in discriminating between different materials and in validation. All spectra in the library used have the same:*

- *spectral range and number of data points,*
- *technique of measurement,*
- *technique of measurement,*
- *data pre-treatment.*

If sub-groups (libraries) are created, the above criteria are applied independently for each group. The collection of spectra in the library may be represented in different ways defined by the mathematical technique used for identification. These may be:

- *all individual spectra representing the substance,*
- *a mean spectrum of each batch of substance,*
- *if necessary, a description of the variability within the substance spectra.*

Electronic raw data for the preparation of the spectral library must be archived.

Pre-treatment of data *In many cases, and particularly for reflection mode spectra, some form of mathematical pretreatment of the spectrum may be useful before the development of a classification or calibration model. The aim can be, for example, to reduce baseline variations, to reduce the impact of known variations that are interfering in the subsequent mathematical models, or to compress data before use. Typical methods are multiplicative scatter correction (MSC), the Kubelka-Munk transforms, spectral compression techniques that may include windowing and noise reduction and the numerical calculation of the first- or second-order derivative of the spectrum. Higher-order derivatives are not recommended. In some cases spectra may also be normalised, for example against the maximum absorbance, the mean absorbance or the integrated absorbance area under the spectrum.*

Caution must be exercised when performing any mathematical transformation, as artefacts can be introduced or essential information (important with qualification methods) can be lost. An understanding of the algorithm is required and in all cases the rationale for the use of transform must be documented.

Data evaluation *Direct comparison of the spectrum of the substance under investigation is made with the individual or mean reference spectra of all substances in the database on the basis of their mathematical correlation or other suitable algorithms. A set of known reference mean spectra and the variability around this mean can be used with an algorithm for classification. There are different algorithms based on principal component analysis (PCA) combined with cluster analysis, SIMCA (soft independent modelling by class analogy), COMPARE functions using filters or UNEQ (unequal dispersed class) and others used in the software of NIR instruments or supplied as third-party software. The reliability of the algorithm chosen for a particular application has to be validated. For example, correlation coefficient, the sum of squared residuals or the distance using cluster analysis must comply with the acceptance limits defined in the validation procedure.*

Validation of the database *Specificity The selectivity of the classification using database spectra for positive identification of a given material and adequate discrimination against other materials in the database is to be established during the validation procedure. Acceptance thresholds are established. High thresholds achieve a higher discriminatory power, but may cause some errors due to the own variability of materials. Lower thresholds solve these problems, but could produce ambiguous results. Potential challenges must be addressed to the spectral database. These can be materials received on site that are similar to database members in visual appearance, chemical structure or by name. This challenge must fail identification. Independent samples of materials represented in the database,*

but not used to create it (i.e. different batches, blends) must give positive identification when analysed.

Robustness *The robustness of the qualitative procedure must also be challenged to test the effect of minor changes to normal operating conditions on the analysis. There must be no changes to pre-processing and calibration algorithm parameters. Typical challenges are:*

- *effect of differences across operators on variations in environmental conditions (for example, temperature and humidity in the laboratory),*
- *effect of sample temperature, sample positioning on the optical window and probe depth and compression/packing of material,*
- *replacement of instrument parts or sampling presentation devices.*

QUANTITATIVE ANALYSIS

Establishment of a spectral reference library for a calibration model *Calibration is the process of constructing a mathematical model to relate the response from an analytical instrument to the properties of the samples. Any calibration algorithm that can be clearly defined in an exact mathematical expression and gives suitable results can be used. Record spectra of a suitable number of samples with known values of the content throughout the range to be measured (for example, content of water). Wavelengths used in the calibration model can be compared to the known bands of the analyte and those of the matrix to verify that the bands of the analyte of interest are being used by the calibration. Establish the calibration model with about two-thirds of the measured samples. Compare the remaining one-third of the measured samples with the database. All samples must give quantitative results within a precision interval as defined by the intended purpose of the method. Correct quantification must be demonstrated in the presence of variations in the matrix within the specified range. Multiple linear regression (MLR), partial least squares (PLS) and principal component regression (PCR) are commonly used. For PLS or PCR calibrations, the coefficients or the loadings can be plotted and the regions of large coefficients compared with the spectrum of the analyte. Raw data for the preparation of the calibration model must be archived, without data pretreatment.*

Pre-treatment of data *Data pre-treatment can be defined as the mathematical transformation of the NIR spectral data to enhance spectral features and/or remove or reduce unwanted sources of variation prior to the development of the calibration model. Many suitable algorithms for data pre-treatment and calibration exist. The selection is based on the suitability for the intended use. Wavelength selection may enhance the efficiency of calibration models such*

as MLR (for example, in particle-size determination). It is useful to delete certain ranges of the wavelength scale in some cases, for example in the determination of water of hydration. Wavelength compression may be applied to the data.

Validation parameters Analytical performance characteristics to be considered for demonstrating the validation of NIR methods are similar to those required for any analytical procedure. Specific acceptance criteria for each validation parameter must be consistent with the intended use of the method.

Specificity The relative discriminatory power and selectivity for quantitative determination must be similar to those mentioned under Qualitative analysis. The extent of specificity testing is dependent on the application and the risks being controlled. Variations in matrix concentrations within the operating range of the method must not affect the quantitative measurement significantly.

Linearity The validation of linearity involves the correlation of NIR results calculated from NIR responses within the used algorithms to reference method results distributed throughout the defined range of the calibration model. Actual NIR responses that are non-linear may still be valid. Range. The range of analyte reference values defines the range of the NIR method and quantitation limits of the method. Controls must be in place to ensure that results outside the validated range are not accepted.

Accuracy This can be determined by comparison with the validation method or with known samples (samples of blank and added amounts of tested substance). Accuracy can be indicated by the standard error of prediction (SEP) of the NIR method that should be in close agreement with the data of the validated method. The SEP is the standard deviation of the residuals obtained from comparing the NIR results with analytical reference data for the specified samples. It is demonstrated by correlation of NIR results with analytical reference data, by comparison of the SEP to the reference method used for validation. Alternatively statistical comparison methods may be used to compare NIR results with reference values (paired t-test, bias evaluation).

Precision This expresses the closeness of agreement between a series of measurements under the prescribed conditions. It is assessed by a minimum of 6 measurements performed according to the developed analytical method. Precision may be considered at 2 levels, repeatability (replicate measurements of the same sample with or without variation in sample positioning) and intermediate precision (replicate measurements by different analysts, different days of measurements).

Robustness This includes the effects of variations of temperature, humidity, sample handling and the influence of instrument changes for any analytical procedure. Specific acceptance criteria for each validation parameter must be consistent with the intended use of the method.

Outliers Outlier results from NIR measurements of a sample containing an analyte outside the calibration range indicates that further testing is required. If further testing of the sample by an appropriate analytical method gives the analyte content within the specifications, this may be accepted and considered to have met the specifications. Thus an outlier result generated by NIR measurements of the sample may still meet specifications for the analyte of interest.

Capitolo 6

NMR

La risonanza magnetica nucleare (*Nuclear Magnetic Resonance, NMR*) è una tecnica spettroscopica largamente utilizzata in ambito chimico che si basa sull'assorbimento per risonanza di radiazioni nel campo delle radiofrequenze da parte di nuclei di atomi cosiddetti "magnetici".

6.1 Teoria generale

6.1.1 Spin atomico

Numero di spin

Sono detti magnetici, e sono visibili all'NMR, quegli atomi il cui numero di spin sia diverso da zero.

Il numero di spin di un atomo dipende dal bilancio tra i numeri di spin delle particelle subatomiche che lo compongono. In generale per avere spin diverso da zero un atomo deve avere un numero di protoni o neutroni dispari (spin frazionario, es. $1/2$, $3/2$, $5/2$...) oppure sia protoni sia neutroni dispari (spin intero, es. 1, 2, 3...).

Effetto del campo magnetico

Per un atomo magnetico si avranno due popolazioni di atomi, l'una con segno di spin positivo (α) e l'altra con segno negativo (β). In assenza di campi magnetici

Protoni	Elettroni	Spin	Esempi
pari	pari	0	^{12}C , ^{16}O , ^{32}S
dispari	pari	$1/2$	^1H , ^{19}F , ^{31}P
dispari	pari	$3/2$	^{11}B , ^{35}Cl , ^{79}Br
pari	dispari	$1/2$	^{13}C
pari	dispari	$3/2$	^{127}I
pari	dispari	$5/2$	^{17}O
dispari	dispari	1	^2H , ^{14}N

Tabella 6.1: Esempi di alcuni atomi con i rispettivi numeri di spin.

esterni i due livelli energetici (spin alpha e spin beta) sono degeneri, ovvero entrambi hanno la stessa energia.

Applicando un campo magnetico esterno la degenerazione viene meno e lo stato $m_S = +\frac{1}{2}$ incrementa la propria energia rispetto al valore degenero precedente, mentre $m_S = -\frac{1}{2}$ la diminuisce. La differenza di energia tra le due popolazioni di spin è pari a $\Delta E = E_\alpha - E_\beta = \mu B_0$.

Dove E_α ed E_β sono i livelli energetici corrispondenti alle due popolazioni di spin. B_0 è il campo magnetico applicato e μ è il momento magnetico nucleare, il quale dipende dal nucleo considerato.

In breve, pertanto, la differenza tra i livelli energetici dipende dal campo magnetico applicato e dal tipo di atomo considerato.

Rappresentazione grafica

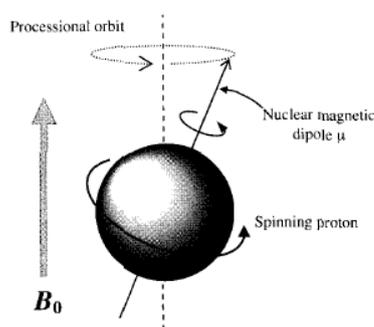


Figura 6.1: Rappresentazione del moto di precessione di un nucleo in un campo magnetico B_0

L'effetto del campo magnetico sul nucleo può essere rappresentato come il moto di precessione del momento di dipolo magnetico del nucleo (che può essere interpretato come il prodotto dalla rotazione degli elettroni attorno all'atomo) attorno all'asse rappresentato dal campo magnetico esterno. Poiché per il principio di Heisenberg non è possibile conoscere le componenti x ed y del momento angolare una descrizione più precisa sarebbe data da un cono ruotante alla frequenza di Larmor ν_L ¹.

6.1.2 Risonanza

Ricordando che l'energia associata ad una radiazione elettromagnetica è $E = h \cdot \nu$, se si irradia una sostanza contenente atomi magnetici immersa in un campo magnetico B_0 con una radiazione frequenza ν tale che:

$$h \cdot \nu = \mu B_0 = \Delta E (E_\alpha - E_\beta)$$

¹Si può dimostrare che la "lunghezza" del vettore di magnetizzazione nucleare μ è data da $\sqrt{I(I+1)}$ dove I è il numero quantico di spin dell'atomo ($\sqrt{3}/2$ per il protone). Per questo atomi con spin nullo non possono essere studiati mediante NMR. La proiezione lungo z, invece, è data da I, che per il protone è $-\frac{1}{2}$. I più attenti avranno capito che l'angolo tra il cono e l'asse z è, per il protone, di circa 55° , dato dall'arcocoseno del rapporto tra spin e "lunghezza" del momento di dipolo. Ovvero $\arccos(1/\sqrt{3})$

si ha che l'energia fornita dalla radiazione, per risonanza, eccita gli atomi del livello energetico inferiore e li promuove al superiore. Successivamente, in seguito all'interruzione dell'irraggiamento, i nuclei eccitati torneranno al livello energetico precedente secondo il FID (free induction decay) emettendo una radiazione analoga a quella con cui sono stati eccitati, ovvero nel campo delle radiofrequenze. E' questa radiazione riemessa che costituisce il segnale negli esperimenti NMR moderni.

6.1.3 Intensità del segnale

L'intensità del segnale NMR dipende da quanta energia è assorbita (e quindi riemessa) nell'intervallo di tempo. Quest'ultima è data da quanti fotoni sono assorbiti nell'unità di tempo per l'energia di ciascun fotone.

L'energia di un fotone assorbito è pari ad $h\nu$ dove ν è la frequenza di Larmor che dipende dal campo magnetico a meno di una costante ($\nu = \gamma/(2\pi) \cdot B_0$).

La quantità di fotoni assorbita dipende dal numero di fotoni nello stato di energia più basso (N_α), meno quelli allo stato eccitato² (N_β)³.

$$\text{Segnale} \propto (N_\alpha - N_\beta) \cdot B_0 \quad (6.1)$$

La differenza tra le due popolazioni di spin, in accordo con l'equazione di Arrhenius, è pari a:

$$\frac{N_\beta}{N_\alpha} = e^{-\Delta E/kT} \quad (6.2)$$

Dove ΔE è $E_\beta - E_\alpha$, generalmente piccolo rispetto a kT , pertanto si può approssimare il fattore esponenziale a $1 - \frac{\Delta E}{kT}$ ⁴:

$$\frac{N_\beta}{N_\alpha} \approx 1 - \frac{\Delta E}{kT} = 1 - \frac{\gamma \cdot B_0}{kT}$$

da cui, con passaggi matematici e approssimazioni, integrando in k tutte le costanti:

$$N_\alpha - N_\beta \approx k' \cdot \frac{\gamma \cdot N \cdot B_0}{T} \quad (6.3)$$

dove γ è la costante giromagnetica dell'atomo considerato, N il numero di molecole dotate di spin, T la temperatura e B_0 il campo magnetico applicato.

Considerando quindi l'equazione (6.1) e sostituendo $N_\alpha - N_\beta$ dalla (6.3) si ottiene che il segnale dipende dal quadrato del campo magnetico applicato, ovvero raddoppiando l'intensità del campo magnetico si avranno spettri 4 volte più definiti.

$$\text{Segnale} \propto (B_0)^2 \quad (6.4)$$

²Così facendo trascuriamo l'autoemissione da parte dello stato eccitato, che è, appunto, trascurabile alle basse frequenze dell'NMR.

³Se ti stai chiedendo come mai ora α indichi lo stato meno energetico è perché si sta considerando il caso dell'NMR- 1^H avente spin = $-\frac{1}{2}$ pertanto, a causa del segno meno, le popolazioni si "invertano".

⁴Lo sviluppo di Taylor per e^x , infatti, sarebbe $1 + x + \frac{1}{2}x^2 \dots$. Per e^x con x piccolo è valida l'approssimazione $e^x \approx (1 - x)$.

6.1.4 Spostamento Chimico

Finora abbiamo considerato tutti gli atomi di un determinato elemento come uguali. Le potenzialità analitiche dell'NMR, però, dipendono proprio dal fatto che questa tecnica consente di determinare la struttura chimica di un composto a partire dal suo spettro. Questo è possibile perché ogni atomo di una molecola (a meno di simmetrie o casuali sovrapposizioni) presenta un segnale distinto.

Campo magnetico locale

Questo accade perché i fotoni della radiofrequenza interagiscono col nucleo ad una frequenza che, come detto, dipende dal campo magnetico. L'intorno chimico di un atomo, però, lo può caratterizzare come più elettronrico o più elettronpovero e la nuvola di elettroni in movimento attorno al nucleo genera un campo magnetico locale addizionale la cui intensità dipende dal campo magnetico principale.

$$\delta B = -\sigma B_0 \quad (6.5)$$

dove σ è detta costante di schermatura. Il campo magnetico locale (*loc*) è quindi pari a:

$$B_{loc} = B_0(1 - \sigma) \quad (6.6)$$

Costante di spostamento chimico (δ)

Poiché σ dipende da B_0 maggiore è l'intensità del campo magnetico principale maggiore sarà lo spostamento chimico dell'atomo. Per rendere confrontabili gli spettri NMR registrati a frequenze diverse, quindi, lo spostamento chimico è stato definito per differenza rispetto ad uno standard: in questo modo diventa un numero adimensionale, indipendente dallo strumento.

$$\delta_x = \frac{\nu_x - \nu^0}{\nu^0} \cdot 10^6 \quad (6.7)$$

dove ν^0 è la frequenza dello standard (per l' ^1H -NMR in genere il tetrametilsilano, abbreviato TMS $(\text{Si}(\text{CH}_3)_4)^5$).

Il fattore 10^6 è arbitrario e rende giustizia della piccola entità degli spostamenti chimici. E' quindi consuetudine indicare i valori di σ aggiungendo l'indicazione *ppm* sebbene ciò non sia necessario.

Nota inoltre che i valori di spostamento chimico dipendono significativamente dall'atomo considerato: ad esempio i valori dell' ^1H -NMR sono generalmente inferiori di un'ordine di grandezza abbondante rispetto a quelli ^{13}C -NMR.

Dall'espressione di δ si nota che al diminuire di σ aumenta δ , ovvero gli atomi con gli spostamenti chimici maggiori sono quelli più "deschermati".

⁵E' stato scelto il TMS in quanto può essere usato sia nell' ^1H che nella C-NMR, è simmetrico, da' un picco NMR intenso e stretto, i suoi protoni sono più schermati di quasi tutti i protoni organici, è volatile (bolle a 27°C), inerte chimicamente e si scioglie prontamente in quasi tutti i liquidi.

6.1.5 Accoppiamento spin-spin

Nuclei che sono soggetti allo stesso intorno chimico sono chimicamente e magneticamente equivalenti, e mostrano lo stesso spostamento chimico. Nuclei non equivalenti tra loro vicini si influenzano con un effetto detto “accoppiamento spin-spin” o J-coupling.

Nel caso più semplice due protoni legati a carboni adiacenti si influenzano l'un l'altro con una 3J , ovvero un accoppiamento lungo 3 legami, anche detto coupling vicinale ($H_1-C_1, C_1-C_2, C_2-H_2$).

Il coupling deriva dalla regola di Pauli per cui i due elettroni di un legame chimico non possono che avere spin antiparallelo (ovvero opposto) tra loro. In un campo magnetico c'è una certa tendenza da parte di un nucleo a seguire lo spin del suo elettrone di legame. In altre parole il livello energetico dello stato con spin alternati ne risulterà abbassato e quello con spin uguale sarà più alto (vedi img. 6.2).

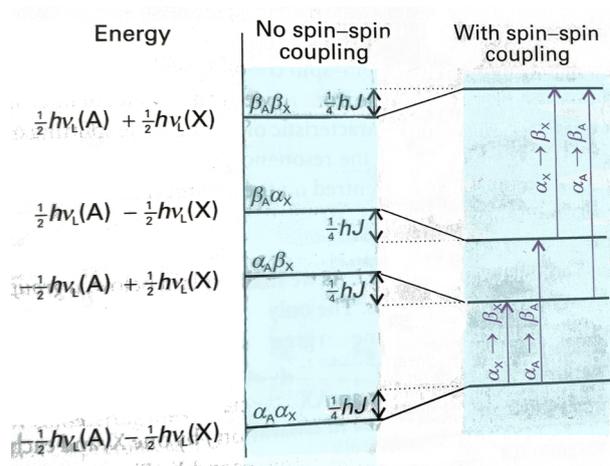


Figura 6.2: Diagramma energetico di un sistema di spin accoppiati AX in H-NMR (α è livello energetico minore).

Questo significa che, considerando un sistema di due protoni accoppiati aventi spostamenti chimici molto diversi (simbolicamente AX), ogni segnale sarà sdoppiato a causa dell'effetto del coupling (ovvero in funzione dello spin dell'atomo con cui accoppia) e la distanza tra i picchi (la J) è proporzionale all'entità del coupling.

Nota che, nel diagramma in figura 6.2 sono permesse solo le transizioni elementari, ovvero quelle che modificano uno spin per volta.

I sistemi accoppiati di ordine superiore seguono lo stesso principio e sistemi di spin di primo ordine possono essere costruiti con la regola del triangolo di Pascal.

6.2 Tecniche di registrazione del segnale

6.2.1 Onda continua (CW)

Gli spettri acquisiti in onda continua (*Current Wave - CW*) sono importanti storicamente, in quanto sono stati i primi esperimenti NMR effettuati, essendo la metodica più semplice, ma risultano oggi superati dagli esperimenti di NMR ad impulsi.

In un esperimento CW il campione è posto in un campo magnetico costante e si varia la frequenza di scansione (più comune), in alternativa si può mantenere la frequenza d'irradiazione costante e variare il campo magnetico. In entrambi i casi è misurato l'assorbimento della radiazione.

Quello che si ottiene è un diagramma bidimensionale con il segnale in funzione della frequenza (nel caso si sia variato il campo magnetico se ne ottiene matematicamente la frequenza corrispondente a campo magnetico fisso). Possono essere così calcolati gli spostamenti chimici σ e le costanti di accoppiamento J .

6.2.2 NMR ad impulsi

In un esperimento ad impulsi, invece, il campione posto in un campo magnetico costante è irradiato da un impulso radio ad alta energia con un intervallo di frequenze tale da coprire tutto il campo d'interesse (durata di pochi μs). Questo impulso porta allo stato eccitato contemporaneamente tutti i nuclei.

Esame (11/1/12): *Illustrare le differenze tra un esperimento NMR ad onda continua ed uno ad impulsi*

In pratica la differenza tra CW ed NMR pulsata è che, volendo trovare la nota di una campana, nel primo caso si emettono una per volta tutte le frequenze fino a trovare quella che la mette in risonanza, nel secondo si colpisce con un martello la campana e si ascolta che suono emette. Inutile dire quale sia il sistema più rapido.

Free Induction Decay (FID)

Non appena viene meno l'impulso i nuclei "tornano dallo stato eccitato al livello energetico fondamentale, emettendo l'energia precedentemente assorbita come un fotone con frequenza nel campo delle onde radio. Il detector misura quindi questi segnali del cosiddetto FID (*Free Induction Decay*).

Il FID, in questo caso, è composto dalla sovrapposizione di tutti i decadimenti in funzione del tempo e può essere convertito ad un diagramma in funzione delle frequenze attraverso la trasformata di Fourier.

Pacchetti di spin

Per una descrizione degli esperimenti di NMR-pulsata risulta utile introdurre il concetto di pacchetto di spin o "spin-packet".

All'interno di un campione si possono definire dei "pacchetti di spin" come gruppi di nuclei con \approx lo stesso interno chimico, quindi lo stesso campo magnetico locale e la stessa frequenza di Larmor. Tali pacchetti avranno due popolazioni, una allo stato di spin eccitato (N_β per il protone) e l'altra nello stato a più bassa energia (N_α).

Posti in un campo magnetico B_0 gli spin si allineano al campo (+ o -) ma è presente una differenza (che dipende dal rapporto giromagnetico) tra le

due popolazioni ($N_\alpha - N_\beta$) tale che la popolazione del pacchetto di spin, nel complesso, può essere rappresentata da un vettore di magnetizzazione globale M_0 , che giace nella direzione del campo magnetico principale.

Vettore di magnetizzazione

L'ottenimento del vettore di magnetizzazione all'equilibrio come somma vettoriale dei momenti magnetici dei singoli nuclei formanti il pacchetto è illustrato in figura 6.3

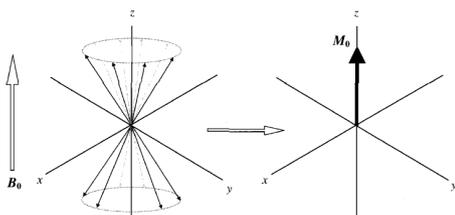


Figura 6.3: Vettore di magnetizzazione netta all'equilibrio come somma vettoriale dei momenti magnetici dei nuclei del sistema di spin.

La lunghezza del vettore M_0 dipenderà dalla differenza tra le popolazioni di spin (che a sua volta dipendeva dalla temperatura e dal campo magnetico secondo Boltzmann).

Riferimento cartesiano xyz

Per permettere una trattazione analitica è necessario introdurre un sistema di riferimento cartesiano xyz . la direzione z è quella del vettore di magnetizzazione e del campo magnetico principale mentre x ed y sono fissi nello spazio fisico (in genere x è l'asse della spira che emette la radiofrequenza e che funge da detector).

Il vettore magnetizzazione \vec{M} può quindi essere scomposto nelle componenti scalari M_x , M_y ed M_z , dove M_x è detta magnetizzazione longitudinale, mentre le componenti sul piano xy sono dette magnetizzazione trasversale.

All'equilibrio M_0 presenta solo magnetizzazione longitudinale.

L'effetto della radiofrequenza

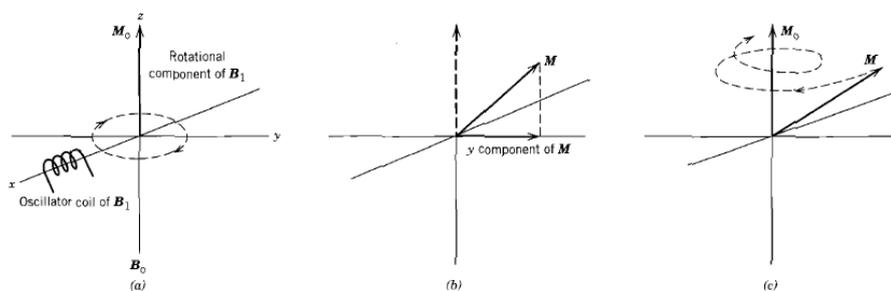


Figura 6.4:

Si consideri l'immagine 6.4. Lungo l'asse x è posta una spira che, quando attraversata dalla corrente elettrica, genera un campo elettrico lungo l'asse x . A quel campo elettrico corrisponde una componente magnetica, B_1 , il cui effetto sull'origine degli assi, ovvero sul campione sottoposto a NMR, può essere descritto come un vettore magnetico rotante nel piano xy .

La frequenza della rotazione dipende dalla lunghezza d'onda dell'onda elettromagnetica generata dalla spira, ed è pari alla frequenza di Larmor per il nucleo⁶. L'effetto di questo campo magnetico è quello di orientare il vettore di magnetizzazione M lungo il piano xy e metterlo in rotazione alla frequenza della radiofrequenza.

Ricordando l'immagine 6.1 ciò è possibile perché i singoli nuclei hanno un moto di precessione attorno all'asse z con frequenza ν_L . Pertanto il vettore di magnetizzazione B_1 appare loro fermo (o quasi-fermo se tenendo conto delle piccole variazioni nelle ν_L). Il loro momento di dipolo (che può essere considerato come una calamita) si orienterà quindi lungo B_1 sul piano xy , ma, al venir meno di B_1 , tornerà a precedere attorno a z per l'effetto di B_0 .

Tempo di rilassamento longitudinale T_1 (spin-lattice)

M_z torna all'equilibrio (M_0) secondo una costante temporale (T_1) detta tempo di rilassamento longitudinale o tempo di rilassamento spin-lattice o spin-reticolo⁷.

$$M_z(t) - M_0 \propto e^{-t/T_1} \quad (6.8)$$

$$M_z = M_0 \cdot (1 - e^{-t/T_1}) \quad (6.9)$$

Tempo di rilassamento trasversale T_2 (spin-spin)

Dopo aver irradiato il campione con un impulso di frequenza ν_L si ha la rotazione dei momenti di dipolo dei protoni con la stessa frequenza attorno all'asse z . Col venir meno dello stimolo in radiofrequenza ogni pacchetto di spin torna a ruotare con la propria frequenza di precessione che, avendo spostamenti chimici diversi, è lievemente diversa. Ciò provoca una progressiva perdita di fase rispetto al ν_L .

Se si considera il vettore di magnetizzazione globale M questa perdita di fase può essere vista come una diminuzione della sua componente xy , ovvero come una minor magnetizzazione trasversale. L'andamento della perdita di magnetizzazione trasversale in funzione del tempo dipende da una costante T_2 detta tempo di rilassamento trasversale o tempo di rilassamento spin-spin.

$$M_{x,y}(t) \propto e^{-t/T_2} \quad (6.10)$$

$$M_{x,y} = M_{x,y}^{orig} \cdot e^{-t/T_2} \quad (6.11)$$

Il valore di T_2 è sempre minore (basse temperature/alta viscosità) o uguale (alta temperatura/bassa viscosità) a T_1 , ed è dell'ordine di grandezza di qualche secondo.

L'immagine 6.5 mostra la relazione tra potere risolutivo teorico dell'NMR e T_2 .

⁶In realtà pacchetti di spin diversi hanno frequenze di Larmor lievemente diverse, ma un segnale intenso e breve ($\mu s!$) funziona lo stesso per quello che è lo scopo dell'impulso, ovvero "spostare" il vettore M sul piano xy e farlo ruotare con frequenza ν_L .

⁷Questo nome deriva dal fatto che durante il processo è ceduta energia al sistema circostante, detto "reticolo" (*lattice*)

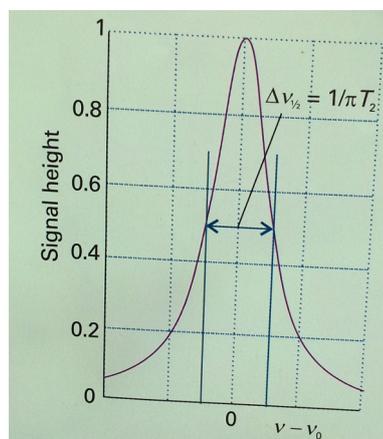


Figura 6.5: Dipendenza della risoluzione dal T_2 .

Disomogeneità di campo

Il T_2 teoricamente dipende solo dalle interazioni molecolari (T_2 puro). In realtà, poiché i magneti impiegati per non sono perfetti ma presentano disomogeneità di campo, il T_2 ne risulta più breve.

Questo T_2 , detto tempo di rilassamento trasversale effettivo ed indicato con T_2^* , provoca un maggiore allargamento delle bande del segnale (cfr. fig. 6.5). In particolare:

$$T_2^* = \frac{1}{\pi \Delta\nu_{1/2}} \quad (6.12)$$

dove $\nu_{1/2}$ è l'allargamento previsto dal T_2 puro, pertanto:

$$T_2^* = \frac{1}{T_{2puro}} + \frac{1}{T_{2disomog.}} \quad (6.13)$$

Risulta, pertanto, cruciale diminuire il più possibile le disomogeneità del campo magnetico.

L'effetto del T_2 sulla risoluzione può anche essere spiegato in riferimento alla trasformata di Fourier: essa trasforma il dominio del tempo in quello delle frequenze: se ha a disposizione più punti nel tempo (e quindi se il rilassamento spin-spin è più breve) darà risultati migliori nello spettro (cfr. fig.).

6.2.3 Omogeneità del campo magnetico

Per produrre spettri ad alta risoluzione è necessario che il campo magnetico sia omogeneo nello spazio e costante nel tempo. Poiché l'NMR è uno strumento molto sensibile, ed i campi magnetici coinvolti sono particolarmente intensi è facile che il movimento di oggetti metallici o altri fenomeni incontrollabili alterino il campo magnetico. Questo problema viene superato con il Field-Frequency Lock.

Field Frequency Lock

Il *field frequency lock*, o, semplicemente, "lock" può essere considerato come uno spettrometro NMR sperato dallo strumento principale ma accoppiato a quest'ul-

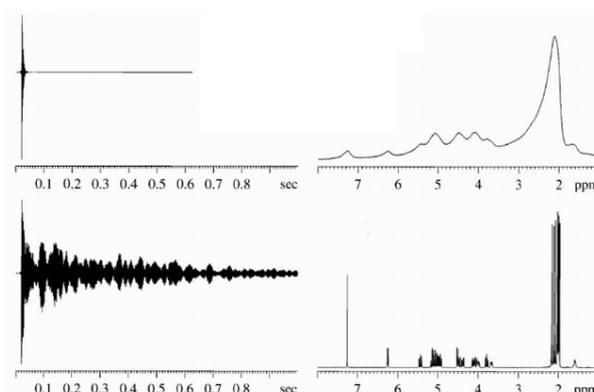


Figura 6.6: Miglioramento della risoluzione corrispondente all'allungamento del T_2

timo per diminuirne le disomogeneità di campo. Esso è generalmente sintonizzato sulla frequenza di risonanza del deuterio, che misura in continuo operando minime variazioni in real-time su B_0 per mantenere costante la frequenza di risonanza.

Il deuterio dà sempre un segnale forte in quanto viene impiegato al posto dei protoni nei solventi NMR (es. CDCl_3) per evitare l'effetto del solvente nello spettro del protone.

Shim colis

Per annullare anche le disomogeneità locali nel campo magnetico principale, quelle quindi che non possono essere annullate variandone l'intensità tout-court come fa il lock, si utilizzando delle spire secondarie progettate per creare campi magnetici che si oppongono alle disomogeneità locali, annullandole.

Queste spire secondarie sono dette "shim coil" e la corrente che le attraversa può essere regolata in funzione dello spettro ottenuto al fine di avere il risultato migliore.

Poiché gli shim coil correggono le disomogeneità di campo vanno a diminuire il $T_{2disomog.}$ allungando quindi il T_2^* e la qualità del segnale prodotto dopo FT.

Rotazione campione

Un altro metodo per tentare di diminuire le disomogeneità è quello di ruotare il campione durante l'analisi in modo che gli effetti di disomogeneità vengano mediati e si ottengono spettri più definiti.

6.2.4 Sistemi di riferimento rotanti

Per semplificare la trattazione delle varie sequenze-NMR risulta estremamente utile introdurre un sistema di riferimento rotante $x'y'z'$ avente $z' = z$ del riferimento xyz precedente, ovvero asse zeta longitudinale al campo magnetico principale, ma con il piano $x'y'$ ruotante alla frequenza di Larmor ν_L .

In questo modo il vettore di magnetizzazione B_1 risulta stazionario nel nuovo sistema di riferimento, mentre vettori più lenti di ν_L ruoteranno in senso antiorario e vettori più veloci in senso orario. In questo modo la trattazione del T_2 ne risulta estremamente semplificata come illustrato in figura 6.7.

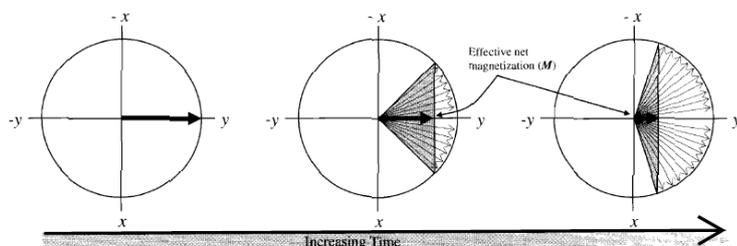


Figura 6.7: Rappresentazione del tempo di rilassamento spin-spin nel sistema di riferimento rotante.

6.2.5 Sequenza 90-FID

La sequenza illustrata nella sezione 6.2.2 per spiegare T_1 e T_2 è la cosiddetta 90-FID in quanto genera un FID di durata T_2^* .

Le fasi per l'acquisizione di uno spettro con sequenza 90-FID sono illustrate in figura 6.8. Il passaggio (a) è l'applicazione dell'impulso a 90° ($\pi/2$ in radianti),

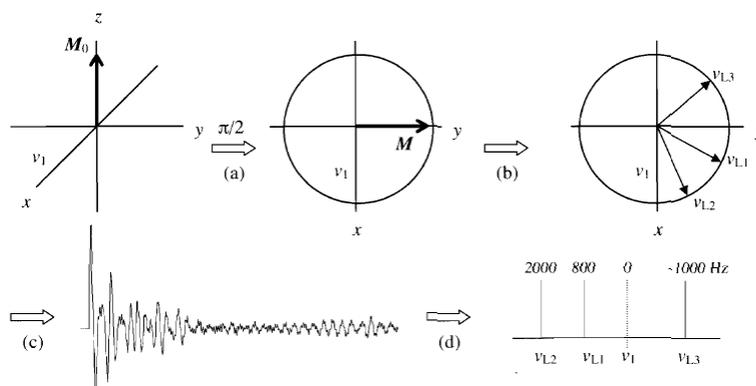


Figura 6.8: Procedimento per l'ottenimento di uno spettro NMR con sequenza 90-FID.

lo step (b) rappresenta il FID nel sistema $x'y'z'$ con 3 sistemi di spin (L1, L2 ed L3) (c) è il segnale in funzione del tempo trasformante mediante trasformata di Fourier (d) nello spettro in funzione delle frequenze.

Rapporto segnale/rumore

Per migliorare il rapporto segnale-rumore è possibile ripetere la sequenza numerose volte e sommare i FID ottenuti per poi effettuare la FT sui risultati di più scansioni.

Prima di applicare il secondo impulso 90-FID, però, è necessario aspettare che tutti i nuclei (o quasi) siano tornati allo stato di equilibrio. L'ampiezza del segnale (S), infatti, dipende dal rapporto tra il tempo che intercorre tra le ripetizioni (T_R) ed il tempo di rilassamento spin-lattice (T_1).

$$S = k\rho(1 - e^{-T_R/T_1}) \quad (6.14)$$

dove ρ è la densità degli spin del campione e k una costante.

In breve un campione con un T_1 più lungo richiederà un tempo più lungo tra impulsi successivi.

6.2.6 NMR bidimensionale

Nota Bene: in questa sezione si fa sempre riferimento ai sistemi di riferimento ruotanti, anche quando non indicati con apici.

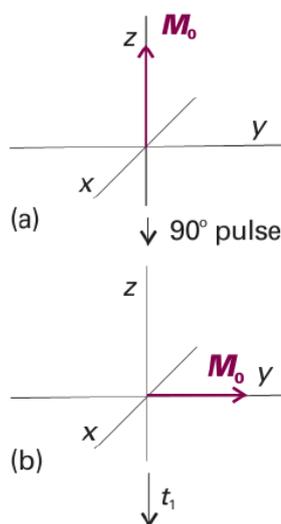


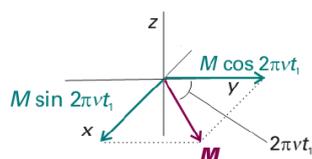
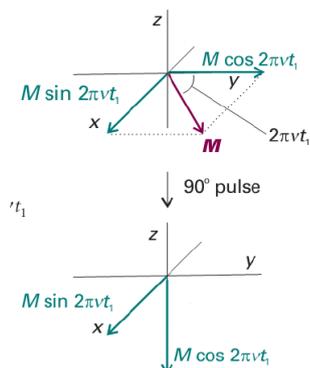
Figura 6.9: Effetto del primo impulso a 90°.

Nell'NMR bidimensionale viene sfruttata una doppia sequenza 90-FID: il campione, infatti, viene prima irraggiato con un canonico impulso a 90°, e poi, ad una distanza di tempo t_1 variabile, e comunque durante il decadimento conseguente al primo impulso riceve un'ulteriore sequenza a 90°.

Il primo impulso a 90° ha l'effetto di spostare il vettore di magnetizzazione netta nel piano xy dove ruoterà alla frequenza di Larmor mentre avvengono i rilassamenti spin-spin e spin-lattice.

A questo punto, mentre l'intensità della magnetizzazione trasversale diminuisce in funzione del tempo secondo l'equazione (6.11), i pacchetti di spin perdono progressivamente fase rispetto alla frequenza di Larmor. Dopo un tempo arbitrario t_1 , detto periodo di evoluzione, si avrà una situazione simile a quella rappresentata in figura 6.10. A questo punto viene inviato un altro impulso, sempre a 90° che ruota nuovamente le componenti del vettore di magnetizzazione.

L'effetto di questo secondo impulso è rappresentato in figura 6.11. La componente x dei vettori è mantenuta sul piano x, y mentre la componente

Figura 6.10: Situazione al tempo t_1 .Figura 6.11: Effetto del secondo impulso a 90° .

y viene ruotata sull'asse z (dove non viene registrata). Si misura quindi il FID prodotto da questo secondo impulso.

Il t_1 è come il tempo in un FID classico, e al variare del t_1 la proiezione sull'asse y di ogni sistema di spin varia con un andamento sinusoidale d'intensità decrescente e che impiega per ogni rotazione il reciproco della propria frequenza, e non più della frequenza di Larmor in quanto è venuta meno la radiofrequenza. È proprio questo che causa il tempo di rilassamento T_2 . Si può notare, da questa osservazione, che il valore d'intensità variabile della proiezione y di un picco al variare del tempo t_1 in un esperimento COSY fornisce un'ulteriore FID. Dalla trasformata di Fourier di questo FID avente per dominio non direttamente il tempo ma la successione di spettri a tempi diversi deriva la seconda dimensione dell'NMR-2D.

Possiamo applicare la considerazione di cui sopra ad ogni punto del FID "classico" trovato dopo t_2 per realizzare un grafico che può essere tridimensionale (6.13) o bidimensionale con linee di contorno della proiezione di z (6.14) a seconda del proprio gusto estetico.

6.2.7 Trasferimento della magnetizzazione

Il trasferimento della magnetizzazione è il fenomeno più utile a fini diagnostici e più sfruttato dagli esperimenti di NMR bidimensionale attuali. Mediante opportune sequenze d'impulsi, infatti, è possibile spostare la magnetizzazione da un nucleo ad un altro. Esistono due possibili modi in cui può essere trasferita la magnetizzazione:

- l'effetto di Nuclear Overhauser (NOE);
- INEPT.

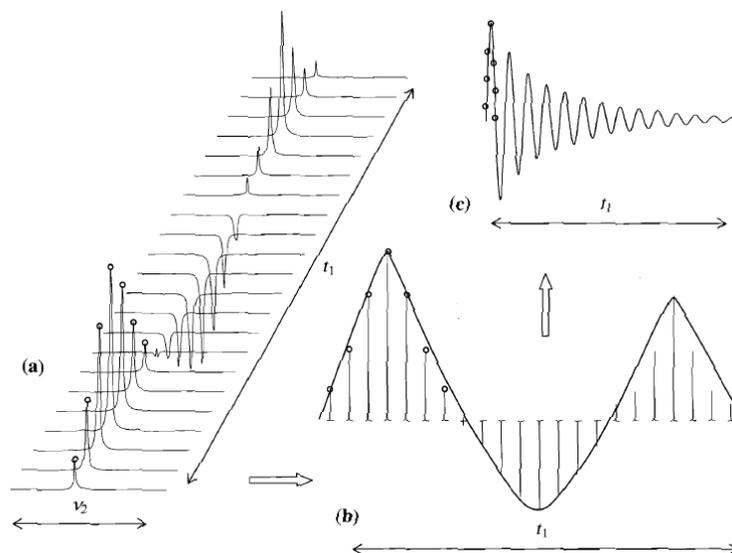


Figura 6.12: Processi per la creazione di uno spettro bidimensionale a partire da 22 spettri di acetone con t_1 crescente.

Nuclear Overhauser Effect (NOE)

L'effetto NOE è un trasferimento di magnetizzazione che avviene nello spazio. Poiché decade con l'inverso della sesta potenza della distanza permette di individuare protoni distanti fino a 0,5 nm. L'effetto NOE è molto utile per determinare la conformazione spaziale assunta da molecole complesse, es. proteine, in quanto permette di rilevare come vicini anche atomi che appartengono a sistemi di spin diversi.

Per fare ciò si irradia, come negli esperimenti di doppia risonanza, la frequenza corrispondente ad un protone. Generalmente si fa questo per "cancellare" il protone ed i suoi accoppiamenti in uno spettro monodimensionale, per semplificarlo. Nel caso di un esperimento ^1H - ^1H -NOE (esperimento molto raro in

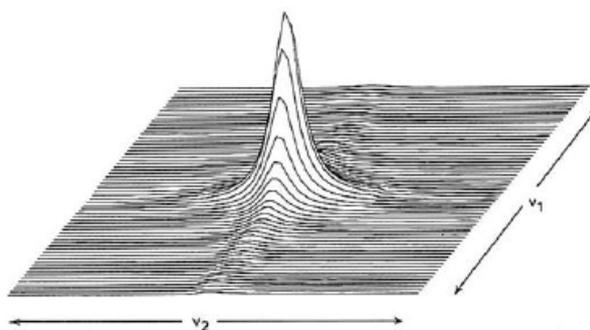


Figura 6.13: Grafico tridimensionale rappresentante uno spettro COSY di un composto con un singolo protone, o con protoni magneticamente equivalenti.

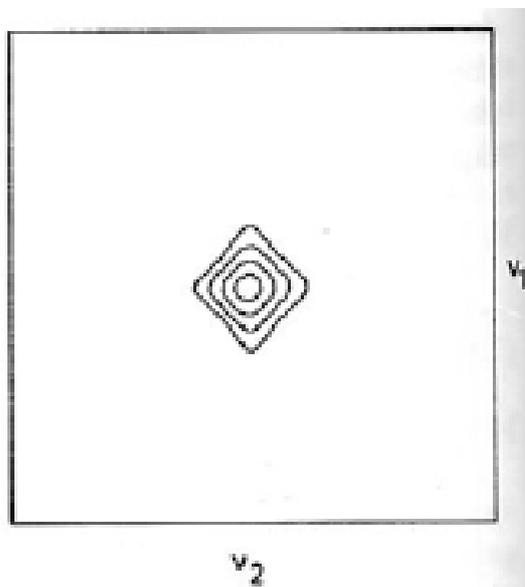


Figura 6.14: Rappresentazione bidimensionale dello spettro COSY di figura 6.13.

verità, ma utile per questa spiegazione teorica) si procede allo stesso modo, ovvero si irradia un protone ma con intensità molto minore rispetto a quella usata per il decoupling. I protoni vicini nello spazio rispetto a quello irradiato subiranno l'effetto NOE, sia che siano accoppiati col protone irradiato, sia che non lo siano.

La polarizzazione del nucleo irradiato (che è la variazione di popolazione nei livelli energetici) risulta, nello spazio, in un'accresciuta popolazione dei livelli energetici superiori dei nuclei (non irradiati!) vicini nello spazio. Questo eccesso di popolazione N_β ha un rilassamento spin-lattice maggiore (l' M_z dei pacchetti di spin che hanno subito il NOE va "più in basso"). È per questo che l'effetto NOE è anche detto "trasferimento della magnetizzazione z". Questa variazione al vettore di magnetizzazione longitudinale incrementa il segnale dei protoni vicini nello spazio rispetto all'irradiato per effetto NOE. La differenza d'intensità è minima, generalmente minore al 20%, ma se si osserva lo spettro per sottrazione di uno spettro classico si ottengono tutte e sole le informazioni di NOE. Un esempio di spettro ^1H -NOE è mostrato in figura 6.15.

Trasferimento della coerenza (INEPT)

Il trasferimento INEPT avviene attraverso i gli accoppiamenti J, ovvero tra nuclei separati da 2,3 o pochi più legami. Così come il NOE l'INEPT si applica sia ai nuclei di carbonio sia ai protoni, e come il NOE può essere sia 1D (DEPT) sia 2D (COSY, HETCOR, HSQC, HMBC etc).

Si consideri un doppietto, es. in un sistema A_2B B sarà un doppietto con segnali a $\nu + \frac{J}{2}$ e $\nu - \frac{J}{2}$ (cfr. fig. 6.16).

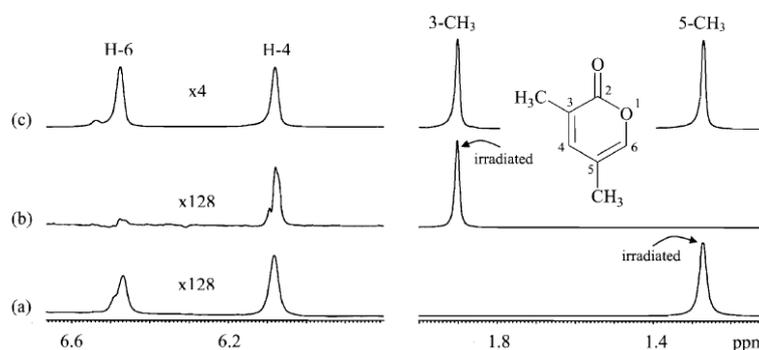


Figura 6.15: In figura sono riportati tre spettri per il composto raffigurato. Il primo (c) è uno spettro classico dove i picchi dei protoni singoli sono stati aumentati di 4 volte per avere altezza simile a quella dei CH_3 terminali. Nel secondo (b) è irradiato il metile in 3 e si nota l'effetto NOE (segnale incrementato di 128 volte) sul protone in 4. Nel terzo spettro (c) è irradiato il metile in 5 e si vede la vicinanza spaziale con i protoni in 4 e 6.

Antifase Dopo un impulso 90-FID i due sistemi di spin avranno rilassamento spin-spin diverso, in base alla loro frequenza. In particolare dopo un tempo $1/(2 \cdot J)$ avranno fase opposta.

Ricorda infatti che le J si esprimono in Hz che sono secondi alla meno uno (s^{-1}) e che un nucleo avente frequenza ν_1 significa che ruota attorno all'asse zeta con quella frequenza, ovvero compie una rotazione in $1/\nu_1$ secondi. Allo stesso modo due frequenze ν_1 e ν_2 diverse di J che siano in fase al tempo $t = 0$ (ovvero alla sequenza 90-FID) saranno nuovamente in fase tra loro dopo $1/J$ secondi e saranno in antifase a $1/2 \cdot 1/J$.

Quando due momenti magnetici che accoppiano (ovvero tra i quali esista un J-coupling lungo i legami chimici, cfr. sez. 6.1.5) sono in antifase il secondo impulso 90-FID fa sì che la magnetizzazione si trasferisca da un atomo all'altro, mantenendo la fase tra i due picchi.

Si consideri l'immagine 6.17 riferita ad un sistema di spin AX dove i grafici della prima riga si riferiscono ad A e quelli della seconda riga ad X. Entrambi i sistemi di spin sono costituiti da un doppietto.

Quando il primo sistema di spin è in antifase l'impulso 90FID ne trasferisce la magnetizzazione al secondo sistema di spin.

Crosspeaks Quando invece i due momenti sono in fase (ai tempi multipli di $1/J$) non c'è trasferimento di magnetizzazione. Poiché possiamo rappresentare l'andamento del rapporto di fase tra i picchi di un multipletto nel tempo un con andamento sinusoidale ($0^\circ \rightarrow$ in fase, 180° antifase etc.) si ha che al variare del tempo t_1 si avrà un trasferimento di magnetizzazione variabile.

Questa intensità variabile genera un FID che alla frequenza sistema di spin del nucleo X sarà di frequenza pari al sistema di spin del nucleo A e viceversa. In altre parole si creano i caratteristici crosspeaks di correlazione bidimensionale COSY.

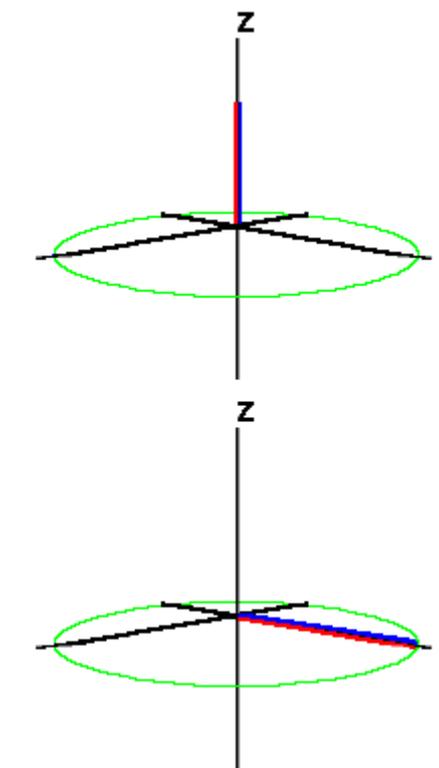


Figura 6.16: Diagramma di un nucleo con J-coupling. Si hanno due sistemi di spin distinti che avranno rilassamento spin-spin diverso.

6.2.8 Sequenze di correlazione

CORrelation SpettroscopY (COSY)

La spettroscopia di correlazione (COSY) è una tecnica bidimensionale che sfrutta l'INEPT, ovvero il trasferimento di magnetizzazione mediante J-coupling, per creare spettri bidimensionali in cui sono evidenziate le correlazioni tra sistemi di spin che accoppiano.

Alla famiglia delle COSY appartengono diverse sequenze (COSY classica, è il doppio 90-FID della sezione 6.2.6, DQF-COSY, o COSY Double Quantum Filtered che pulisce il segnale rimuovendo le correlazioni con i singoletti, es i metili, COSY-b, COSY-90 etc.).

Tutte le tecniche COSY però si basano sulla correlazione di protoni accoppiati tra 2,3 (o, eventualmente, più) legami secondo lo schema di figura 6.18.

Dove (1.) è la radiazione $h\nu_L$ che mette in risonanza il primo protone, cui segue (2.) un periodo di evoluzione t_1 dopo il quale il secondo impulso provoca il trasferimento di magnetizzazione (3.) verso il secondo protone che viene quindi registrato come crosspeak dal FID al t_2 (4.).

Esame (21/2/11): *Illustrare il processo di trasferimento della magnetizzazione e la sua applicazione all'esperimento COSY*

Esame (2/5/11): *NMR-2D: Illustrare la sequenza $90^\circ-t_1-90^\circ-t_2$. Descrivere lo spettro 2D-COSY del cloroetano.*

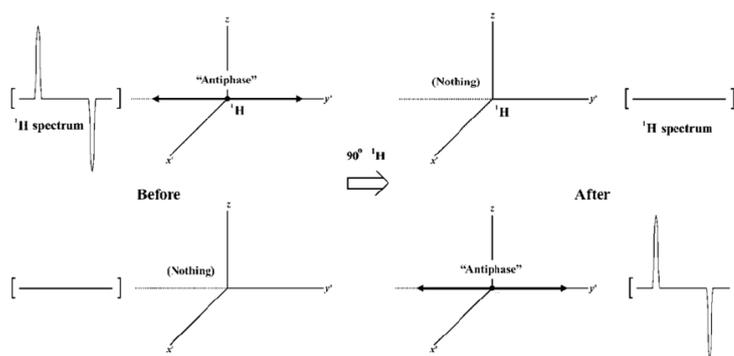


Figura 6.17: Trasferimento di fase in un sistema accoppiato AX.

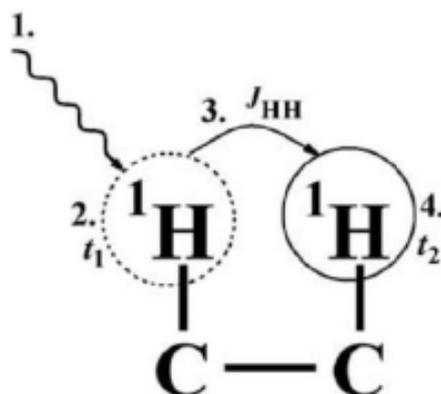


Figura 6.18: Schema del trasferimento di magnetizzazione in un esperimento COSY.

HETeronuclear chemical shift CORrelation (HETCOR)

L'HETCOR è un esempio di NMR di correlazione eteronucleare, ovvero tra nuclei "diversi", in questo caso, tipicamente, idrogeno e carbonio sfruttando la $^1J_{CH}$.

In questo caso essendo i domini delle frequenze ν_1 e ν_2 diversi (perché si tratta di nuclei diversi) non si ha alcun appaiamento sulla diagonale.

La sequenza HETCOR è riportata in figura 6.19

2D TOveral Correlation SpettroscopY (TOCSY)

La TOCSY è una sequenza analoga alla COSY in cui al posto del secondo impulso 90° -FID è inserito un "mixing period" formato da numerosi impulsi e durante il quale la magnetizzazione viene trasferita più volte. In questo modo è possibile osservare anche accoppiamenti a lunga distanza (4^J , 5^J etc). La dipendenza della quantità di accoppiamenti visibili in funzione del mixing time è evidente in figura 6.20 con lo spettro del β -lattosio. 400ms è il massimo tempo impostabile per il mixing period e permettono in questo caso di individuare tutti i protoni di un'unità saccaridica.

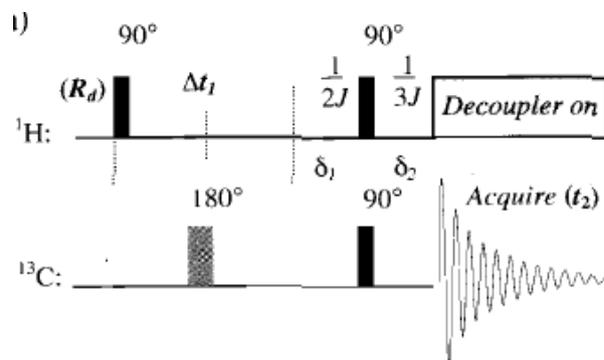


Figura 6.19: Sequenza di un esperimento HETCOR.

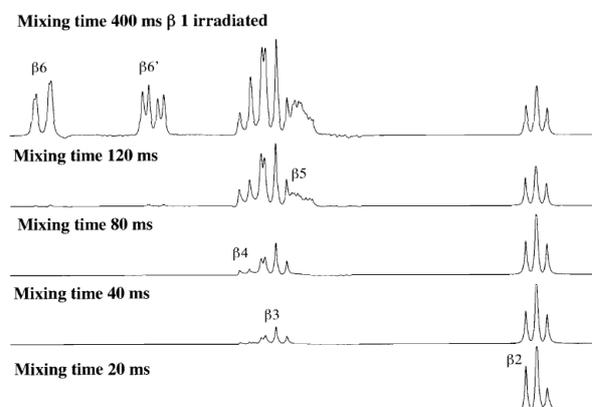


Figura 6.20: Dipendenza del numero di coupling visibili in funzione del mixing period.

6.2.9 Heteronuclear Multiple Bond Coherence

L'HMBC è una sequenza eteronucleare al pari della HETCOR ma se la HETCOR misurava il FID sui carboni la HMBC, all'opposto, lo registra sui protoni. Per ragioni di intensità del segnale derivanti da abbondanza naturale e costante giroscopica risulta evidente il vantaggio di tale tecnica sulla più datata HETCOR.

La maggiore risoluzione dell'HMBC sull'HETCOR è evidente se si confrontano gli spettri HETCOR ed HMBC per l'iposenolo nel quinto capitolo del Silverstein.

6.2.10 Rotating-frame Overhauser Effect SpettroscopY

La ROESY è una sequenza NMR di correlazione bidimensionale omonucleare (protoni-protoni) che sfrutta il trasferimento della magnetizzazione secondo l'effetto NOE. Rispetto alla NOESY presenta il vantaggio di essere applicabile anche a piccole molecole.

Rispetto alle COSY la ROESY presenta tutti gli stessi picchi, e talvolta anche alcuni picchi TOCSY, cui si aggiungono però gli accoppiamenti per NOE. In

figura 6.21 sono riportati gli spettri COSY, TOCSY e ROESY per il tetrapeptide VGSE. Sono evidenziati i segnali presenti solo nel ROESY che indicano la vicinanza spaziale tra il protone ammidico della serina ed i protoni G2 della glicina, la relazione tra il protone ammidico del glutammato ed i protoni in 2 e 3 della serina ed infine l'interazione tra il protone ammidico della glicina ed il protone in 2 alla valina.

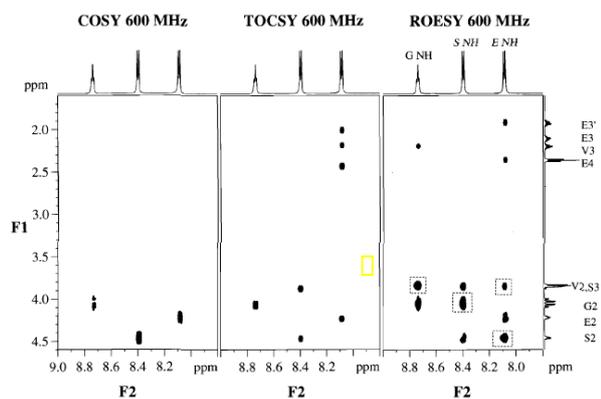


FIGURE 5.35 A comparison of the DQF COSY, 2-D TOCSY, and ROESY spectra showing the interactions of the amide protons.

Figura 6.21: Confronto COSY, TOCSY e ROESY sul tetrapeptide.

Indice

Solubilità	1
1 Solubilità	1
1.1 Teoria	1
1.1.1 Forze di Van der Waals	1
1.1.2 Interazioni apolari	2
1.1.3 Interazioni polari	2
Forze di Keesom	3
Forze di Debye	3
1.1.4 Interazioni Ioniche	3
1.1.5 Legame ad idrogeno	4
1.2 Parametri di solubilità	4
1.2.1 Parametro di solubilità di Hildebrand	5
1.2.2 Parametro di solubilità di Hansen	6
1.3 Relazioni struttura–solubilità	7
1.3.1 Solubilità e struttura	7
1.3.2 Solubilità e pH	7
1.3.3 Solubilità e punto di fusione	7
Regular Solution Theory (RST)	8
Approssimazione con parametro di Hildebrand	8
General Solubility Equation (GSE)	8
Stato solido	8
2 Polimorfismo	11
2.1 Introduzione	11
2.1.1 Polimorfismo di packing	12
La resorcina	12
2.1.2 Polimorfismo configurazionale	12
L’etil β -benzilaminocrotonato	12
2.1.3 Polimorfismo dovuto a tautomeri	12
2.1.4 Polimorfismo conformazionale	13
2.1.5 Solidi amorfi	13
2.1.6 Impatto sull’industria farmaceutica	14

3	Punto di fusione	15
3.1	Punto di fusione	15
3.1.1	Metodi di misura	16
	Metodo del tubo capillare	16
	Metodo del tubo capillare aperto	18
	Metodo della fusione istantanea	18
3.1.2	Dipendenza del Pf dalla velocità di riscaldamento	20
3.1.3	Teoria	22
	Effetto della pressione	22
	Effetto delle impurezze	23
	Eutettico	24
	Conglomerati	26
	Composti solidi	26
	Soluzioni solide	27
	Diagrammi di fase dei racemati	28
4	Analisi Termica	29
4.1	Introduzione	29
4.2	Termogravimetria (TG)	30
4.2.1	Principio	30
4.2.2	Applicazioni	31
4.2.3	Analisi quantitativa	31
4.2.4	Termobilancia	32
4.2.5	Termogravigramma	32
4.2.6	Analisi composizione	32
4.2.7	Parametri analisi	33
4.3	Termogravimetria Derivata (DTG)	36
4.3.1	Perchè derivata?	36
4.3.2	Vantaggi	37
4.4	Analisi termica Differenziale (DTA)	38
4.4.1	Tipi di transizioni	40
	Trasformazioni endotermiche	41
	Trasformazioni esotermiche	41
	Transizioni di secondo ordine	41
	Reazioni chimiche	41
4.4.2	Teoria	41
4.4.3	Fattori influenzanti le curve DTA	42
4.5	Calorimetria a scansione differenziale (DSC)	42
4.5.1	La DSC nell'industria farmaceutica	43
4.5.2	DSC a flusso di calore	44
4.5.3	DSC a compensazione di potenza	45
4.5.4	Grafici DSC	46
	Transizioni di primo ordine	46
	Transizioni di secondo ordine	47
4.5.5	Teoria	47
4.5.6	Calcolo della purezza	50
4.5.7	Solventi residui	52

Interazione della materia con le onde elettromagnetiche 52

5	Interazioni materia – fotoni	55
5.1	Introduzione	55
5.1.1	Onde piano polarizzate	55
5.1.2	Composizione di onde piano polarizzate	56
5.1.3	Onde circolarmente polarizzate	56
5.1.4	Interazioni onde-materia	57
5.1.5	Dicroismo Circolare	57
5.1.6	Birifrangenza Circolare	57
5.1.7	Materiali otticamente attivi	58
5.1.8	Legge di Biot	58
	Potere ottico in Ph.Eur.	58
5.1.9	Parametri di purezza enantiomerica	60
	Purezza Ottica	60
	Eccesso Enantiomerico	61
5.2	Polarimetria	61
5.2.1	Polarizzatori	61
	Prisma di Nicol	61
	Filtro Polaroid	62
5.2.2	Polarimetro	62
	Polarimetro di Lippich	63
5.3	Cromatografia chirale	63
5.3.1	CSP – Chiral Stationary Phase	64
	Brush-type (Pirkle)	64
	Cellulosa	64
	Ciclodestrine	64
	Antibiotici macrociclici	65
	Proteine	65
	A scambio di ligando	65
	Eteri corona	65
5.3.2	CMPA – Chiral Mobile Phase Additives	65
	Coppie ioniche	66
	Complessi di inclusione	66
	Scambio di ligando	66
	Additivi proteici	66
5.3.3	Ottenimento di enantiomeri puri	66
	Sintesi chirale	66
	Sintesi achirale seguita da risoluzione indiretta	66
	Sintesi achirale seguita da risoluzione cromatografica	67
5.4	Dispersione ottica rotatoria (ORD)	67
5.4.1	Effetto Cotton	68
5.5	Dicroismo circolare	69
5.5.1	Misurazioni	69
	Unità di misura	69
5.5.2	Applicazioni	69
	Struttura secondaria proteine	69
5.5.3	Folding ed unfolding proteico	71
	Analisi dell'unfolding proteico	71
5.5.4	Dicrografo	71

5.5.5	CD in Farmacopea	72
5.6	Rifrattometria	75
5.6.1	Indice di rifrazione	75
5.6.2	Il rifrattometro di Abbe	75
	Effetto della lunghezza d'onda	76
	Effetto della temperatura	76
5.6.3	Farmacopea	76
5.7	Diffusione luce	77
5.7.1	Diffusione di Rayleigh	78
5.7.2	Diffusione di Mie	78
5.7.3	Nefelometria e turbidimetria	79
5.7.4	Turbidimetria o nefelometria?	80
	Nefelometria in immunochimica	80
	Diffusione in Farmacopea	80
5.8	Spettroscopia Raman	82
5.8.1	Basi teoriche	82
5.8.2	Microscopia Raman	83
5.9	Spettroscopia XRD	84
5.9.1	Interferenza e diffrazione	84
	Diffrazione	84
5.9.2	Interferenza	84
	Interferenza e diffrazione	84
5.9.3	Diffrazione di raggi X	85
	Breve storia	85
	Legge di Bragg	86
5.9.4	Tecniche XRD	87
	XRD cristallo singolo	87
	XRD di polveri	87
	Applicazioni farmaceutiche dell'XRPD	87
5.10	Spettroscopia NIR	88
5.10.1	Storia	88
5.10.2	Teoria	89
	Analisi quantitativa	89
5.10.3	Vantaggi	89
5.10.4	Strumentazione e misure	90
	Trasmittanza	90
	Riflettanza totale attenuata	91
5.10.5	Riflettanza diffusa	92
5.10.6	Focused Beam Reflectance Measurement (FBRM)	93
5.10.7	NIR in Ph. Eur.	94

Tecniche spettroscopiche

103

6	NMR	105
6.1	Teoria generale	105
6.1.1	Spin atomico	105
	Numero di spin	105
	Effetto del campo magnetico	105
	Rappresentazione grafica	106

6.1.2	Risonanza	106
6.1.3	Intensità del segnale	107
6.1.4	Spostamento Chimico	108
	Campo magnetico locale	108
	Costante di spostamento chimico (δ)	108
6.1.5	Accoppiamento spin-spin	109
6.2	Tecniche NMR	110
6.2.1	Onda continua (CW)	110
6.2.2	NMR ad impulsi	110
	Free Induction Decay (FID)	110
	Pacchetti di spin	110
	Vettore di magnetizzazione	111
	Riferimento cartesiano xyz	111
	L'effetto della radiofrequenza	111
	Rilassamento T1	112
	Rilassamento T2	112
	Disomogeneità di campo	113
6.2.3	Omogeneità del campo magnetico	113
	Field Frequency Lock	113
	Shim colis	114
	Rotazione campione	114
6.2.4	Sistemi di riferimento rotanti	114
6.2.5	90-FID	115
	Rapporto segnale/rumore	115
6.2.6	NMR bidimensionale	116
6.2.7	Trasferimento della magnetizzazione	117
	NOE	118
	INEPT	119
6.2.8	Sequenze di correlazione	121
	COSY	121
	HETCOR	122
	2D-TOCSY	122
6.2.9	HMBC	123
6.2.10	ROESY	123