

CHIMICA ANALITICA II

CON LABORATORIO

(AA 2021-22)

8 C.F.U. - Laurea triennale in Chimica

ELETTROFORESI

INTRODUZIONE

- ❑ L'elettroforesi è una **alternativa** alle separazioni cromatografiche;
- ❑ Permette di separare **composti ionici** mediante migrazione indotta da un campo elettrico;
- ❑ Tipicamente le biomolecole vengono analizzate mediante **gel elettroforesi**;
- ❑ L'**elettroforesi capillare** invece viene utilizzata per separare ioni inorganici ed organici a MM non elevata.

➤ Meccanismo

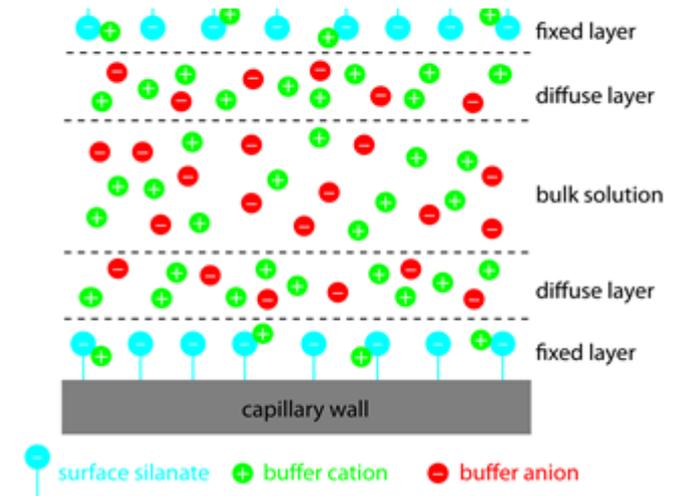
- In un campo elettrico gli ioni migrano in dipendenza delle loro dimensioni e della loro carica;
- I **cationi** vengono attratti dal polo negativo (**catodo**) e gli **anioni** dal polo positivo (**anodo**);
- La migrazione è soggetta ad un equilibrio di due forze: la **forza di accelerazione causata dal campo elettrico** e **una forza ritardante di frizione** (dovuta alla viscosità del mezzo);
- All'equilibrio, quando le due forze si eguagliano, la **velocità costante di migrazione (o velocità elettroforetica)**:

- è direttamente proporzionale al n° di cariche dello ione;
- è direttamente proporzionale all'intensità del campo elettrico applicato;
- è inversamente proporzionale alle dimensioni dello ione;
- è inversamente proporzionale alla viscosità del mezzo

La **mobilità di uno ione** si può definire indipendentemente dal campo elettrico applicato, ed è dir. prop. al n° di cariche dello ione e è inv. prop. e alle dimensioni dello ione e alla viscosità del mezzo.

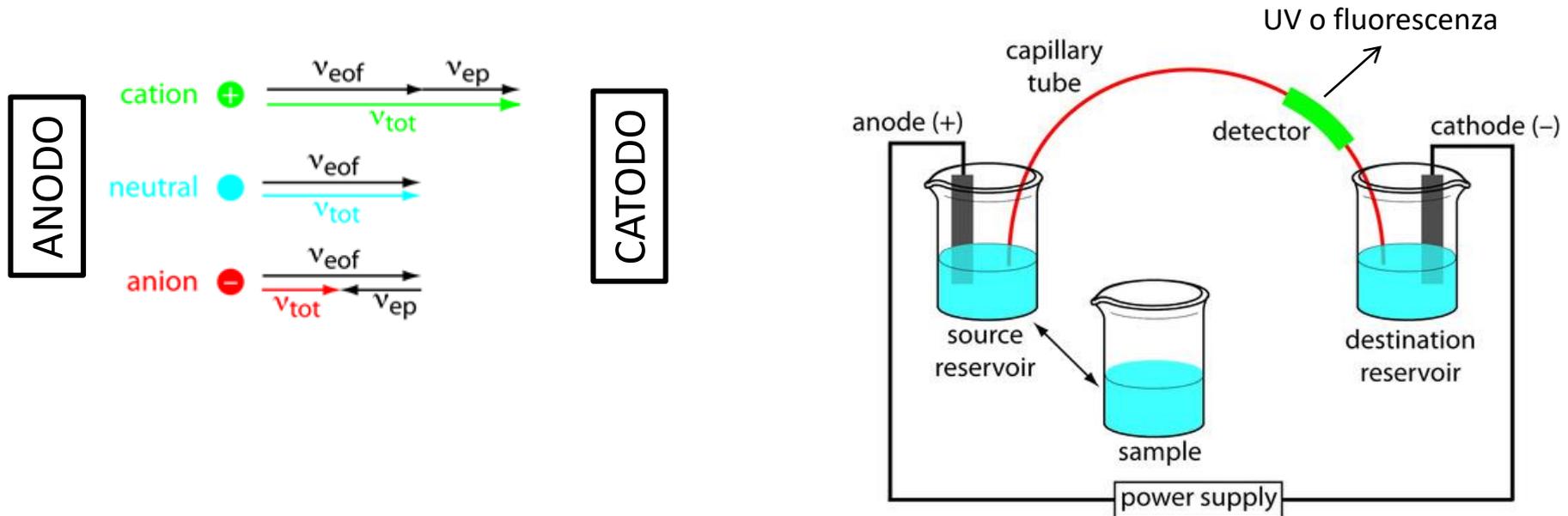
➤ Flusso elettro-osmotico (EOF – Electroosmotic Flow)

- Questo effetto è tipico dell'elettroforesi;
- Dipende dalle interazioni degli elettroliti (presenti nella soluzione tampone che viene utilizzata) con i materiali dell'apparecchiatura, cioè vetro e quarzo principalmente;
- Le superfici in silice contengono un grande numero di gruppi silanolo (-Si-OH);
- A pH superiori a 2-3 i gruppi silanolo vengono deprotonati generando una superficie contenente molte cariche negative;
- I cationi presenti nella soluzione tampone migrano verso le superfici cariche negativamente e "mascherano" una parte delle cariche;
- La rimanente parte delle cariche attrae altri cationi che si "addensano" in uno strato (**diffuse layer**) in prossimità della superficie di silice;
- I cationi contenuti nel "diffuse layer" migrano verso il catodo e "trascinano" con sé tutta la soluzione acquosa poiché sono in essa solvatati (gli anioni migrano verso l'anodo, ma nel "diffuse layer" ce ne sono di meno, quindi si ha un flusso netto verso il catodo);
- Questo fenomeno è detto **flusso elettro-osmotico**



➤ Elettroforesi capillare

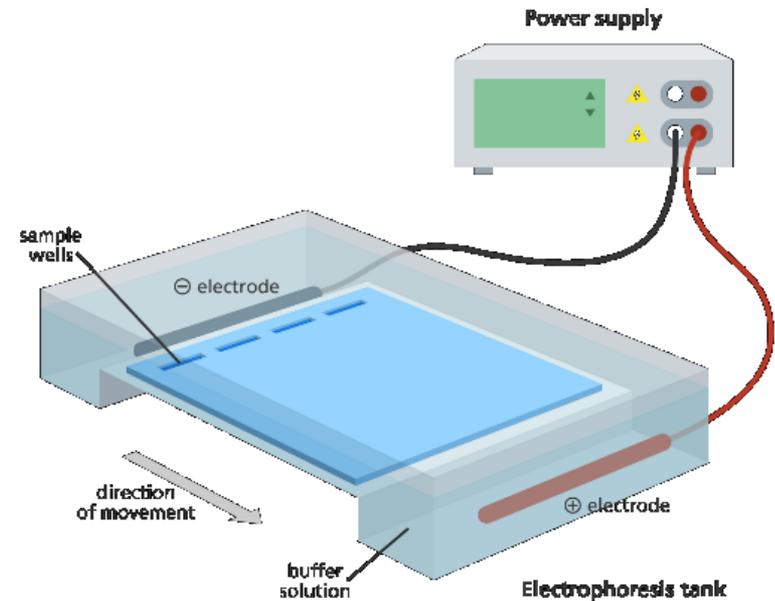
- In elettroforesi capillare grazie al flusso elettro-osmotico è possibile rilevare gli analiti ad una estremità del capillare;
- La velocità totale di un soluto in questa tecnica è dovuta alla velocità di migrazione (o elettroforetica) v_{ep} e alla velocità elettro-osmotica v_{eof} ;
- Queste velocità hanno direzioni diverse a seconda della natura della sostanza, quindi possono sommarsi o sottrarsi come segue:



Esempio di applicazione: separazione di frammenti di DNA

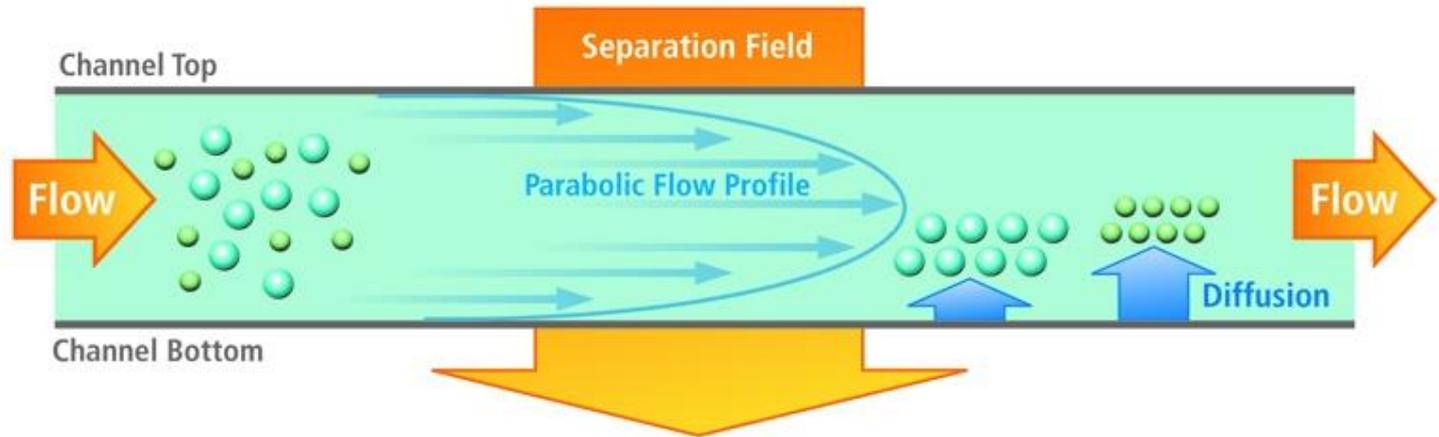
➤ Gel elettroforesi

- *In gel elettroforesi il flusso elettro-osmotico altera il processo di separazione (presenza di aree più diluite, interferenze nel percorso degli anioni) ed è più propriamente definito come elettroendo-osmosi;*
- *In questa tecnica un gel originato dal polisaccaride agarosio o da poliacrilamide sintetica viene versato su una superficie di vetro o di materiale inerte;*
- *Il campione viene alloggiato in una serie di pozzetti (wells) nel gel ad una estremità poi viene applicato un campo elettrico;*
- *Gli analiti separati possono essere rivelati ad es. applicando una soluzione di AgNO_3 (Ag^+ viene ridotto dalle proteine) o degli agenti coloranti che reagiscano selettivamente con gli analiti.*



Esempio di applicazione: separazione di biomacromolecole (es. proteine)

Il frazionamento in campo-flusso, abbreviato **FFF (Field-Flow Fractionation)**, è una tecnica di separazione in cui un campo (*gravitazionale, gradiente termico, elettrico, magnetico* etc,) viene applicato ad una sospensione fluida o soluzione pompata attraverso un canale stretto e lungo, perpendicolare alla direzione di flusso, al fine di provocare la separazione delle particelle presenti nel fluido, dipendente dal loro differenti "mobilità" sotto la forza esercitata dal campo.



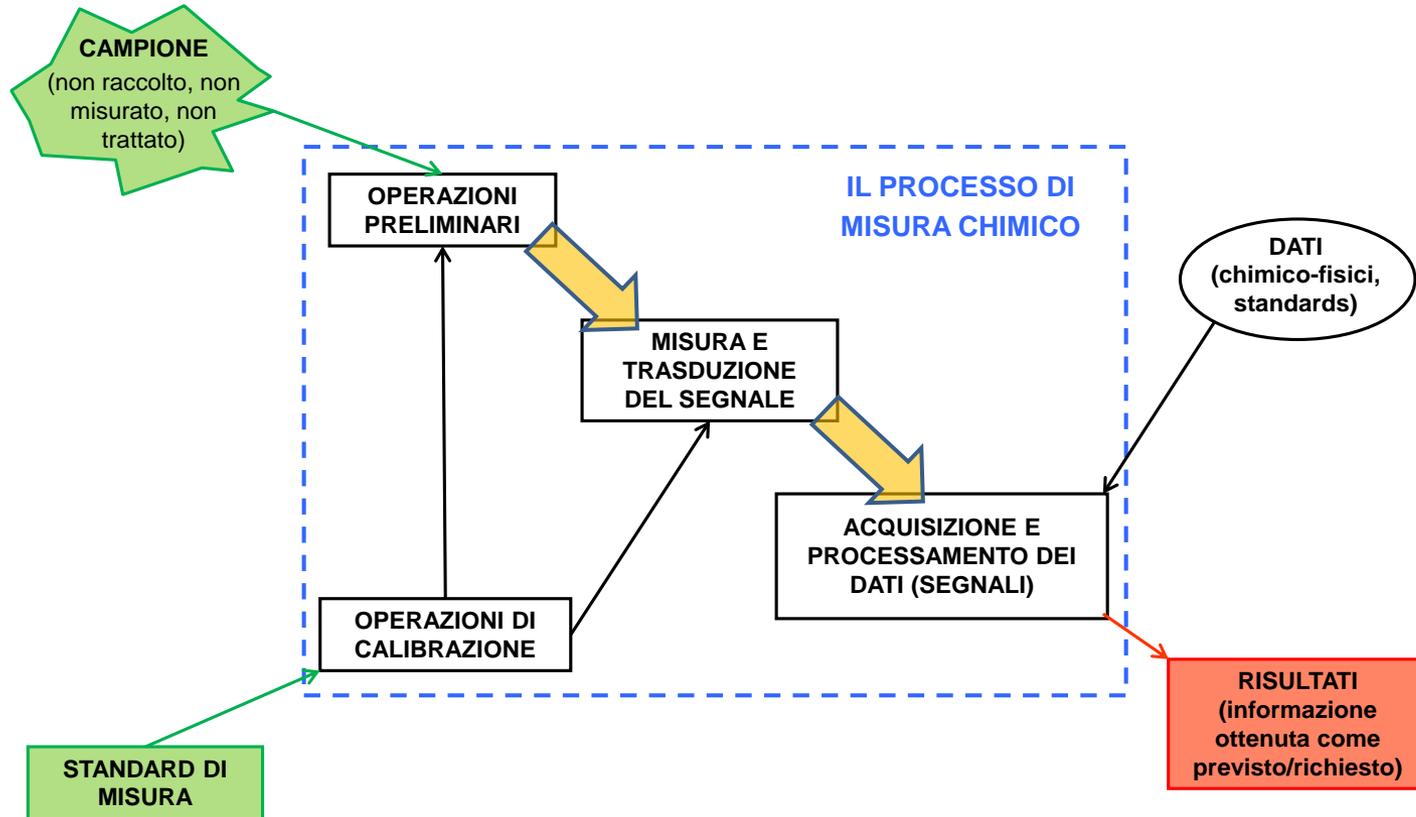
Il meccanismo di separazione nasce da differenze di mobilità per la particella sotto le forze del campo, in equilibrio con le forze di diffusione

<https://www.analytica-world.com/en/video/1000860/field-flow-fractionation-several-applications-for-separation-and-characterization.html>

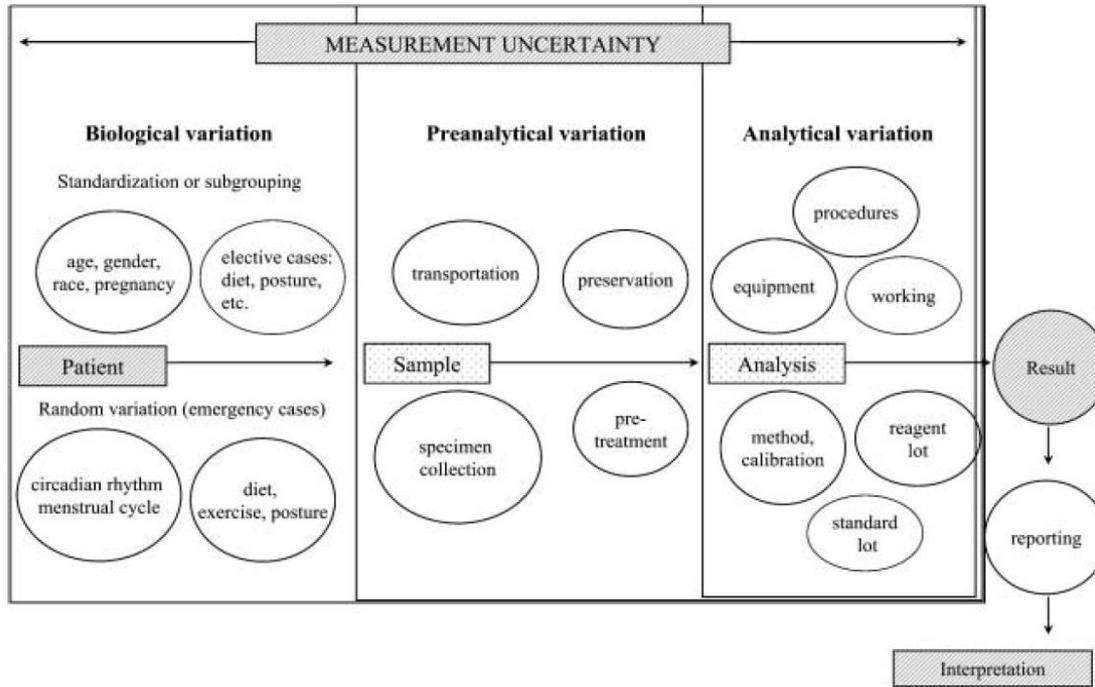
Preparazione del campione

INTRODUZIONE

Torniamo allo schema del processo di misura chimico, o processo analitico:



OPERAZIONI PRELIMINARI: questo stadio può coinvolgere una serie di sottopassaggi il cui scopo complessivo è di rendere il campione adatto alla misurazione. E' denominato anche **preparazione o trattamento del campione**



Clinical application

Scand J Clin Lab Invest 2005; 65: 463–476



ORIGINAL ARTICLE

Pre-analytical factors and measurement uncertainty

T. KOURI¹, M. SILOAHO², S. POHJAVAAARA³, P. KOSKINEN⁴,
O. MALMINIEMI⁵, P. POHJA-NYLANDER⁶ & R. PUUKKA¹

¹Laboratory, Oulu University Hospital, Finland, ²Department of Clinical Chemistry, Kuopio University Hospital and Clinical Research Centre, University of Kuopio, Finland, ³Valkeakoski Health Care Centre, Finland, ⁴TYKSLAB, Hospital District of Southwest Finland, Finland, ⁵Centre for Laboratory Medicine, Pirkanmaa Hospital District, Finland, and ⁶Helsinki University Central Hospital, Finland

Abstract

Pre-analytical factors are an important source of variation or errors in clinical laboratory measurements. Based on the new accreditation standards, medical and laboratory professions now seek to develop tools to deal systematically with these diverse factors. Several obvious pre-analytical uncertainty components were estimated in pragmatic experiments and combined with data on analytical variation and literature knowledge on biological variation, to estimate the measurement uncertainty of most common chemical and haematological examinations in clinical laboratories. The main aim was to assess quality specifications for regional laboratory services. The expanded measurement uncertainties (level of confidence 95%) of serum cholesterol, albumin and potassium remained within 13–16%. The major uncertainty component for cholesterol was biological variation, whereas those for albumin and potassium were sample collection and pretreatment. The measurement uncertainties for serum free thyroxine, thyrotropin and C-reactive protein, 20%, 42% and 125% respectively, were largely due to their biological variation. The measurement uncertainties of basic erythrocyte parameters (erythrocyte count and mean corpuscular volume, blood haemoglobin concentration) were less than 10%. Larger measurement uncertainties were obtained for thrombocyte and leukocyte counts, 24 and 31%, respectively, and for the reticulocyte fraction, 41%.

Figure 3. Sources of measurement uncertainty of clinical laboratory results.

...The major uncertainty component for cholesterol was biological variation, whereas those for albumin and potassium were sample collection and pretreatment...

Environmental application

Estimating the Contribution of Sampling, Sample Pretreatment, and Analysis in the Total Uncertainty Budget of Agricultural Soil pH and Organic Carbon Monitoring

KRISTOF TIREZ,¹ CHRIS VANHOOF,¹
SIEGFRIED HOFMAN,¹ PETRA DEPROOST,²
MARTINE SWERTS,² AND JOOST SALOMEZ²

¹Flemish Institute for Technological Research, Mol, Belgium
²Environment, Nature, and Energy Department, Brussels, Belgium

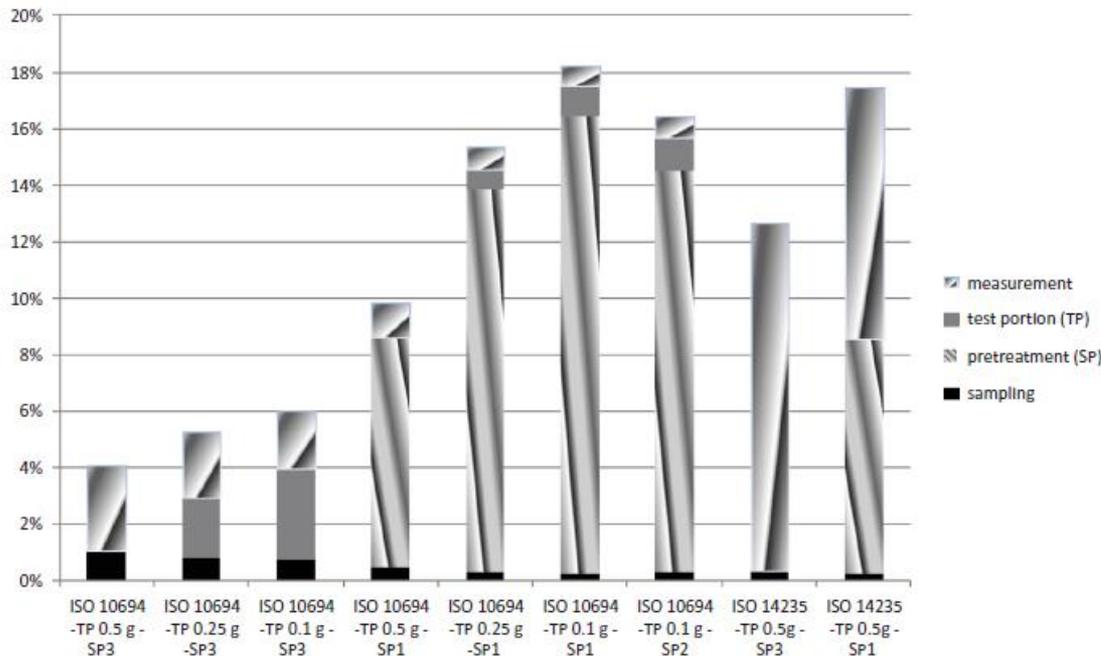


Figure 2. Relative contributions of sampling, sample pretreatment, the amount of test portion, and the measurement to the total expanded monitoring uncertainty, U (%), expressed as 95 % confidence interval.

To study the influence of the sample pretreatment on the determination of SOC, these samples were (i) analyzed as such (SP1), (ii) further manually homogenized with a mortar resulting in a sample for which the 95th percentile of particle size (D_{95}) < 500 μm (SP2), and (iii) homogenized with a planetary ball mill resulting in a D_{95} < 250 μm (SP3).

Monitoring of soil organic carbon (SOC) and pH is needed to manage soil protection and tackle possible degradation in support of, i.e., the upcoming European Soil Framework Directive. Harmonized monitoring procedures and protocols produced under the auspices of the International Organization for Standardization (ISO) and the European Committee for Standardization (CEN) will be recommended. The uncertainty contributions of sampling, sample pretreatment, and analysis in the monitoring of soil pH and organic carbon in agricultural parcels using these harmonized monitoring procedures have been studied.

A within-laboratory comparison between the different analytical methods and sample pretreatments was made on 451 soil samples for SOC and 150 samples for soil acidity. Thereafter, a field study was performed to evaluate the contribution of the sampling method. Finally, an interlaboratory trial (including sampling) was organized to assess the overall monitoring uncertainty.

The results indicate that the influence of different sample pretreatments (e.g., milling) in combination with different analytical methods (elemental combustion versus chemical oxidation) are the main contributions to the observed uncertainty in the monitoring of SOC. For the monitoring of soil acidity, a similar observation was made, showing that differences in the practical implementation of the analytical method (e.g., mechanical shaking) are the main contributions to the monitoring uncertainty. The monitoring uncertainties derived from an interlaboratory trial (including sampling) amounted to $\pm 20\%$ (95% confidence interval, CI) for SOC and ± 0.3 pH units (95% CI).

Sampling Uncertainties for the Detection of Chemical Agents in Complex Food Matrices^{†‡}

THOMAS B. WHITAKER* AND ANDERS S. JOHANSSON

Agricultural Research Service, U.S. Department of Agriculture, Box 7625, North Carolina State University, Raleigh, North Carolina 27695-7625, USA

MS 04-707: Received 27 May 2004/Accepted 17 October 2004

ABSTRACT

Using uncertainty associated with detection of aflatoxin in shelled corn as a model, the uncertainty associated with detecting chemical agents intentionally added to food products was evaluated. Accuracy and precision are two types of uncertainties generally associated with sampling plans. Sources of variability that affect precision were the primary focus of this investigation. Test procedures used to detect chemical agents generally include sampling, sample preparation, and analytical steps. The uncertainty of each step contributes to the total uncertainty of the test procedure. Using variance as a statistical measure of uncertainty, the variance associated with each step of the test procedure used to detect aflatoxin in shelled corn was determined for both low and high levels of contamination. For example, when using a 1-kg sample, Romer mill, 50-g subsample, and high-performance liquid chromatography to test a lot of shelled corn contaminated with aflatoxin at 10 ng/g, the total variance associated with the test procedure was 149.2 (coefficient of variation of 122.1%). The sampling, sample preparation, and analytical steps accounted for 83.0, 15.6, and 1.4% of the total variance, respectively. A variance of 149.2 suggests that repeated test results will vary from 0 to 33.9 ng/g. Using the same test procedure to detect aflatoxin at 10,000 ng/g, the total variance was 264,719 (coefficient of variation of 5.1%). The sampling, sample preparation, and analytical steps accounted for 41, 57, and 2% of the total variance, respectively. A variance of 264,719 suggests that repeated test results will vary from 8,992 to 11,008 ng/g. Foods contaminated at low levels reflect a situation in which a small percentage of particles is contaminated and sampling becomes the largest source of uncertainty. Large samples are required to overcome the “needle-in-the-haystack” problem. Aflatoxin is easier to detect and identify in foods intentionally contaminated at high levels than in foods with low levels of contamination because the relative standard deviation (coefficient of variation) decreases and the percentage of contaminated kernels increases with an increase in concentration.

Food application

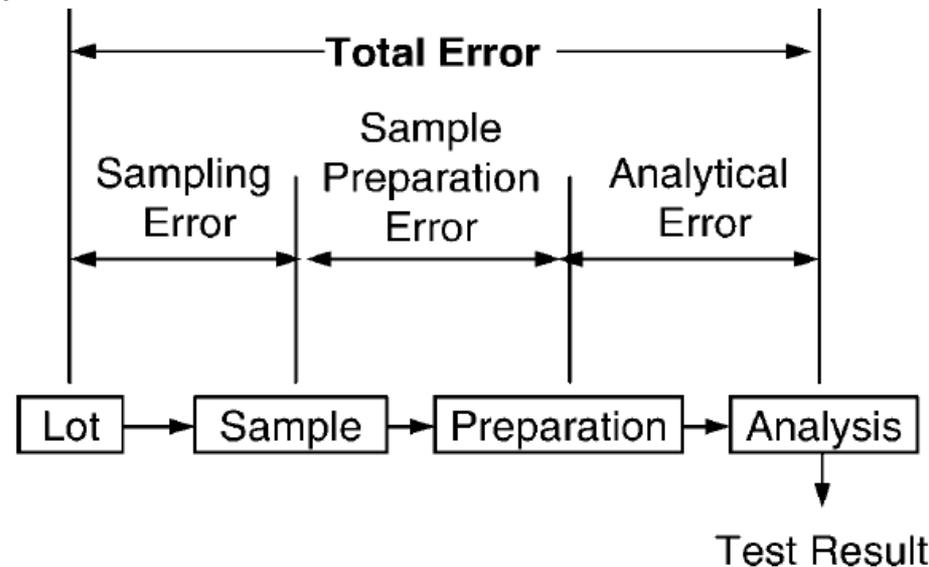
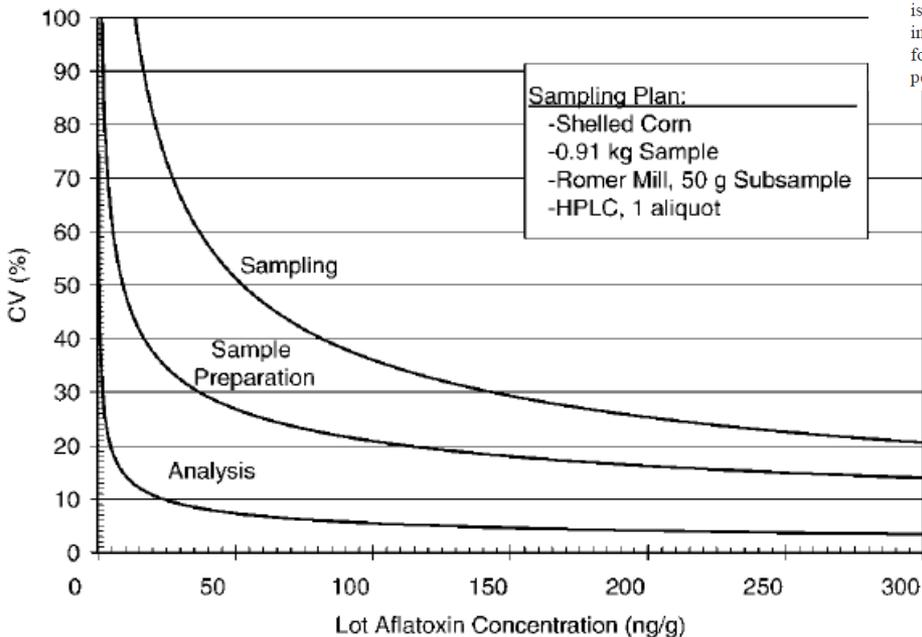


FIGURE 4. Coefficients of variation (CV) for sampling, sample preparation, and analysis when testing shelled corn for aflatoxin.

FIGURE 3. Sources of variability associated with typical test procedures.

Operazioni preliminari

Rendere il campione raccolto adatto alla tecnica analitica che viene applicata per l'identificazione e/o quantificazione del/degli analita/i

Rimuovere interferenti (migliorare rapporto segnale/rumore, proteggere strumentazione, conservare integrità del campione -)

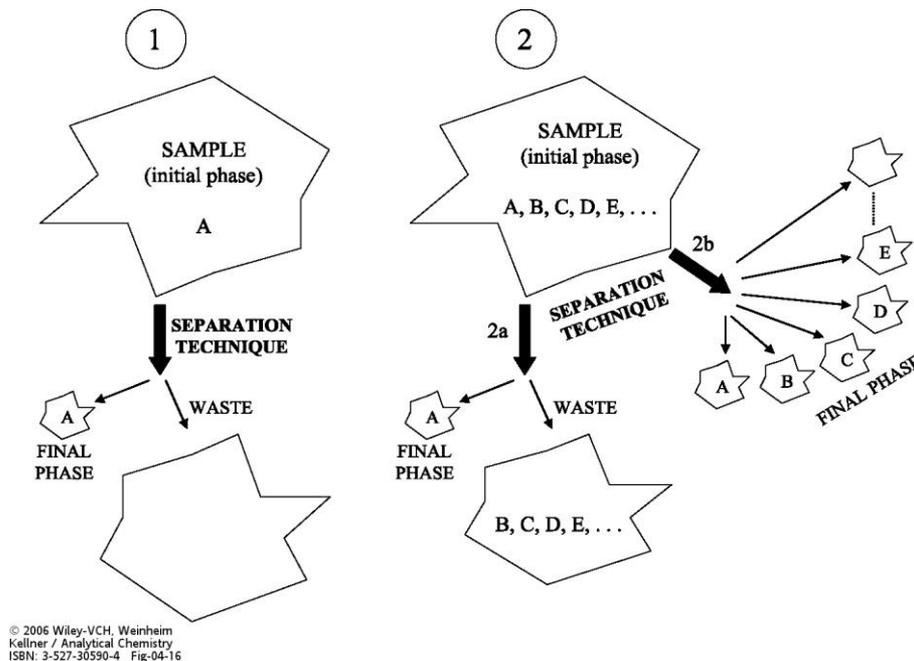
Pre-concentrare

(Derivatizzare - modificare l'analita per renderlo rilevabile)

...

➤ Obiettivi della preparazione del campione

La preparazione del campione **può aumentare la sensibilità** dell'analisi (attraverso la pre-concentrazione del campione – fase 1) e la **selettività** (attraverso la rimozione di interferenti, o clean-up – fase 2), quindi dipende principalmente dal tipo di analisi che si sceglie per qualificare/quantificare gli analiti.



A = analita;
B...E = interferenti

Fase 1 (pre-concentrazione): viene realizzata utilizzando tecniche di separazione non-cromatografiche al fine di trasferire gli analiti da un grande volume di campione iniziale ad un volume molto più piccolo;

Fase 2 (clean-up): viene realizzata utilizzando sia tecniche di separazione non-cromatografica (2a) che cromatografica (2b) al fine di rimuovere sostanze interferenti che possano disturbare la determinazione dell'analita nel metodo strumentale scelto per l'analisi.

➤ **Effetto Matrice**

- La composizione del campione può essere alquanto complessa ed influenzare la risposta strumentale;
- **La *variazione di segnale analitico causata da tutto ciò che è presente nel campione escluso l'analita* viene definita come EFFETTO MATRICE;**
- *Le cause dell'effetto matrice* possono essere di tipo chimico o fisico:
 - complessazione dell'analita;
 - presenza di composti “mascheranti” (segnale di altra specie chimica non discriminabile dal detector rispetto all'analita);
 - variazione dell'attività;
 - alterazione del pH;
 - variazioni delle proprietà fisiche del mezzo.

Alcuni esempi di matrici che possono dare interferenze analitiche significative:

- soluzioni ad alta concentrazione di soluti (scarichi, acque salmastre, salamoie, bibite zuccherine, ...);
- miscele acqua-solvente organico (processi industriali, vini, bibite alcoliche,);
- soluzioni con alto contenuto proteico (fluidi biologici, alimenti,);
- soluzioni ad elevata acidità (scarichi, estrazione di metalli da matrici solide,)

segue →

Come valutare e minimizzare l'effetto matrice?

- Bisogna scegliere un così detto campione "**bianco**", cioè la matrice (NON contenente gli analiti di interesse) deve essere pretrattata e analizzata alle stesse condizioni in cui si opera sul campione al fine di stimare il segnale "zero" del processo analitico scelto;
- In alcuni casi è possibile "ricostruire" artificialmente la matrice, es. miscela di idrocarburi, acqua di mare, suolo artificiale etc...;
- In altri casi è possibile raccogliere un campione sicuramente "incontaminato" e utilizzarlo come bianco;
- Quando non è disponibile un campione "bianco" si può impiegare il metodo delle aggiunte standard;
- Quest'ultimo è un buon metodo per campioni liquidi, meno per solidi (interazioni dell'analita aggiunto sono diverse/più deboli di quelle nel campione solido originale, rimangono nella parte più esterna del campione e vengono quindi estratti più facilmente -> sottostime) o gas (non banale da manipolare quantitativamente, aggiunta di gas a miscela può alterare equilibri del campione).

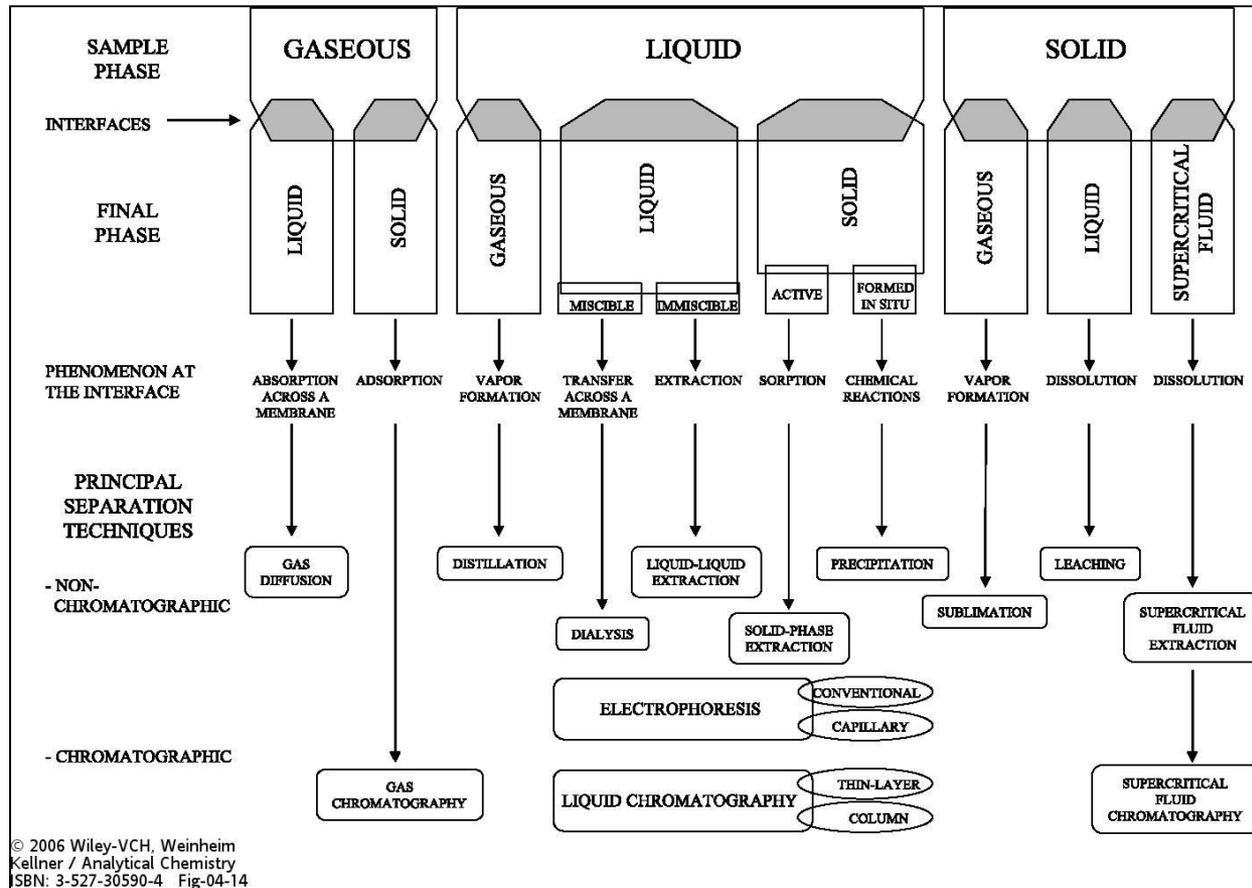
➤ **Recuperi**

- Nei diversi stadi della procedura di pretrattamento del campione possono verificarsi **perdite di analiti**: in generale serve che le procedure siano progettate in modo che il quantitativo di analita(i) nel campione iniziale sia trasferito in modo il più quantitativo possibile nel campione trattato.
- L'efficienza del trasferimento viene definita come recupero dell'analita o resa dell'analita (spesso %):

$$\text{Recupero} = \frac{\text{quantitativo di analita nel campione trattato}}{\text{quantitativo di analita nel campione iniziale}}$$

- Buono se supera il 90%.
- Si misura spesso aggiungendo un quantitativo noto di analita in un campione "bianco" e misurandone la concentrazione nel campione dopo il pretrattamento.
- Oppure si può aggiungere al campione prima del pretrattamento uno **standard interno** (cioè una sostanza il più possibile simile all'analita, ma distinguibile da esso e quantificabile durante l'analisi – es. analogo deuterato dell'analita) che può essere usato per la valutazione/correzione del recupero, sul campione reale.
- Per valutare i recuperi (specie per solidi), ove possibile, si dovrebbero usare materiali di riferimento certificati (CRM) che contengono concentrazioni degli analiti di interesse (immersi in una matrice simile a quella del nostro campione) verificate da laboratori di riferimento. Essi vanno pretrattati ed analizzati alle stesse condizioni in cui si opera sul campione per valutare la perdita di analiti di quel determinato processo analitico. (es <https://www-s.nist.gov/srmors/certificates/2974A.pdf>)

➤ Schema delle principali tecniche di preparazione usate in ambito analitico



La preparazione del campione dipende:

- dalla natura della sua **matrice** (organica, inorganica, biologica);
- dallo stato di **aggregazione** della matrice (solido, liquido, gas);
- dalla natura, il numero e la concentrazione degli **analiti**.

- *Macinazione, omogeneizzazione ed essiccazione;*
- *Dissoluzione e digestione;*
- *Filtrazioni;*
- *Spazio di testa (HS- Head Space);*
- *Estrazioni:*
 - ***LL con solventi immiscibili:*** *vedi slides equilibrio L-L;*
 - ***LS :*** *Soxhlet, ASE, Microonde, Ultrasuoni, Fluido supercritico;*
 - ***Intrappolamento su adsorbenti solidi:*** *SPE, SPME, SBSE*

❖ **Macinazione, omogeneizzazione ed essiccazione del campione per campioni solidi**

- ✓ L'OMOGENEIZZAZIONE ha lo scopo di raggiungere una distribuzione uniforme di tutti i composti nel campione. Inoltre l'estrazione è più efficace quando si diminuisce la dimensione delle particelle di campione;
- ✓ Si utilizzano mortaio e pestello o mulino/“*grinding mill*”;
- ✓ Per **composti termolabili** è necessario raffreddare il campione;
- ✓ I **campioni elastici** devono essere congelati criogenicamente per renderli fragili;
- ✓ I **campioni biologici** spesso vengono omogeneizzati con un *blender* (tipo “*minipimer*”).
- ✓ Prima o dopo la macinazione **può essere necessario setacciare il campione**;

- ✓ Spesso è necessario **rimuovere l'acqua o essiccare** fino a peso costante
 - in **forno a 100-110°C** (se il campione è termicamente stabile e non ci sono sostanze volatili da analizzare);
 - in **essiccatore a vuoto** (per campioni igroscopici o reattivi all'aria);
 - in **liofilizzatore** (per non perdere analiti volatili o per campioni termolabili) --> la liofilizzazione è una procedura di congelamento rapido del campione e rimozione dell'acqua per sublimazione sotto vuoto).

❖ **Dissoluzione e digestione di specie insolubili**

- La dissoluzione di campioni inorganici insolubili (geologici) richiede spesso la degradazione del campione;
- Si usano acidi e basi forti, acidi per analiti cationici, basi per analiti anionici.
- La **digestione** di materiale organico (processo in cui un solido è trattato chimicamente per decomporlo e portare gli analiti in forma adatta all'analisi) può essere per **incenerimento/ashing** a secco oppure
- Nella **digestione umida** per analisi di cationi si usano acidi forti (HNO_3 , HCl , HF , H_3PO_4 , H_2SO_4 , $\text{H}_2\text{S}_2\text{O}_8$ o miscele).
- Per analisi di specie inorganiche in campioni biologici si impiegano digestioni acide coadiuvate da radiazioni a microonde (*Micro-Wave Assisted Digestion* –MWAD).

❖ **Filtrazione e tecniche di pretrattamento del campione basate su membrane**

La filtrazione è un processo in cui **una barriera semipermeabile** (filtro, membrana, mezzo poroso) consente soltanto il passaggio di certe tipologie di molecole.

Questi processi di separazione possono essere classificati sulla base della *driving force* dominante (differenza di concentrazione, di potenziale elettrico, di pressione)

Tecnica

dialisi, elettrodialisi

filtrazione, microfiltrazione, ultrafiltrazione

osmosi inversa

estrazione liquida supportata su membrana

estrazione L-L su membrana microporosa

estrazione su membrana in interfaccia assorbente

Campione

L

L

L

L

L

G,L

segue →

Materiali per le membrane

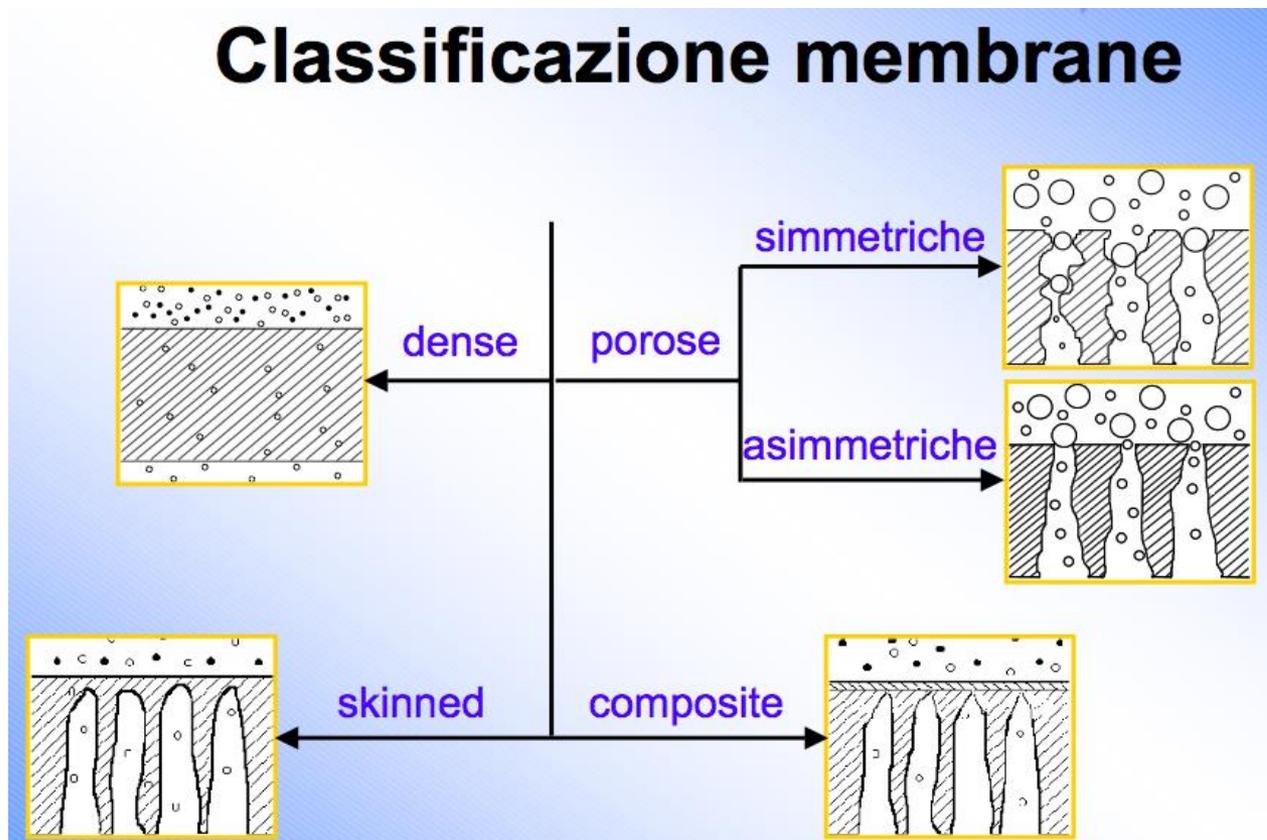
Membrane sintetiche porose (polipropilene, polisolfone, derivati della cellulosa)

Membrane per scambio ionico

Membrane non porose

Dimensioni dei pori

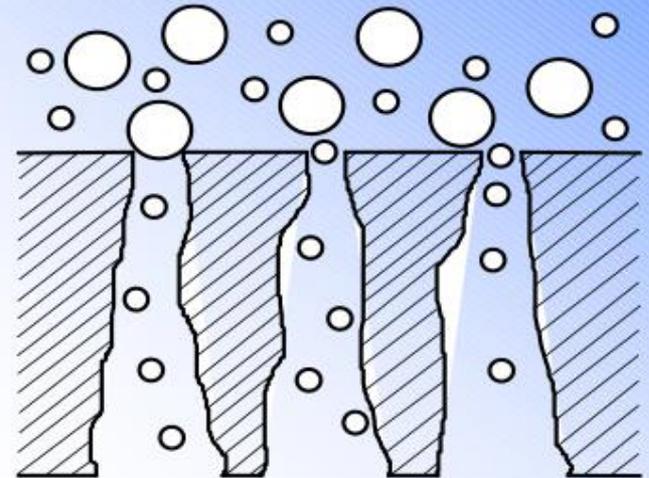
Da pochi a 100 nm, per estrazioni assistite da membrana intervallo da 0,1 a 10 μm



segue →

Meccanismo di separazione

Membrana porose agiscono come un setaccio consentendo solo il passaggio delle particelle con dimensione inferiore a quella dei pori. Sono applicate ad esempio nella MF, UF, D.

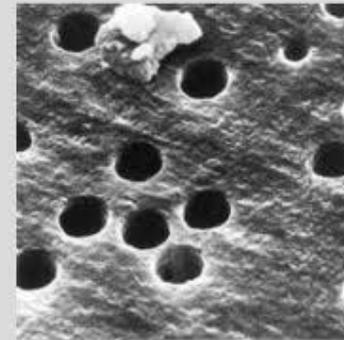
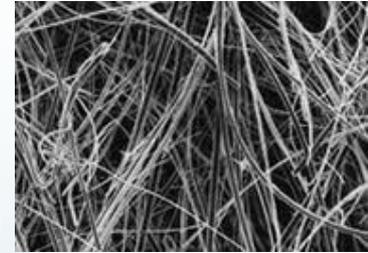


Membrane dense (non porose) separano le specie in base alla loro differente solubilità e diffusione attraverso lo strato denso della membrana. Sono applicate ad esempio nella OI e NF.

segue →

Matrici filtranti

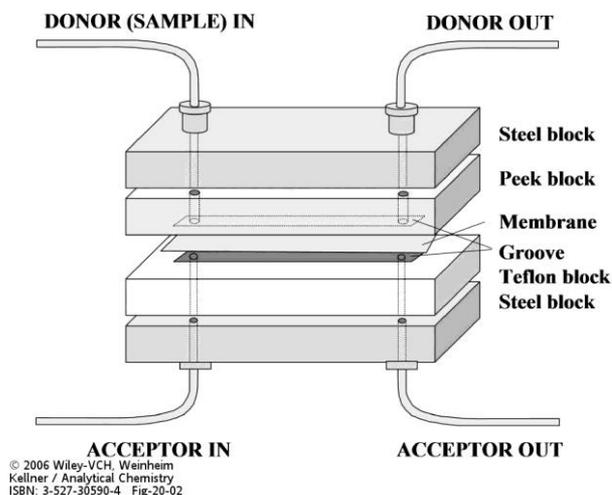
Tipo di filtro	Esempio di materiale	Vantaggi	Svantaggi
A profondità	Fibra di vetro Fibra di quarzo	<ul style="list-style-type: none">• Grande capacità di ritenzione• Quarzo: unico resistente alle alte temperature (circa 1000°C) => è l'unico utilizzabile per analisi del carbonio mediante evoluzione termica	<ul style="list-style-type: none">• Rilascio di materiale filtrante dovuto alla struttura fibrosa discontinua• Tendenza ad adsorbire composti organici volatili
A membrana (schermo)	Esteri di cellulosa, PTFE, policarbonato	<ul style="list-style-type: none">• Nessun rilascio di materiale filtrante grazie alla struttura continua del filtro• Bassi livelli di bianco, più adatti per analisi della composizione elementale	<ul style="list-style-type: none">• Bassa capacità di ritenzione e limitata alla superficie del filtro• Intasamento molto rapido in presenza di elevate quantità di particelle



segue →

Dialisi

- Tutte le molecole di dimensioni appropriate possono passare attraverso una membrana da un canale donatore a un canale ricevente.
- Gli analiti diffondono attraverso la membrana come risultato di un gradiente di concentrazione tra le fasi donatrice ed accettrice
- Nell'elettrodialisi si aggiunge una differenza di potenziale elettrico utile al trasporto di specie cariche.



❖ **Tecniche di spazio di testa (HS-head space)** – (vedi anche slides GC)

Lo spazio di testa è lo spazio gassoso in una provetta per campione (*vial*) sopra il campione solido o liquido.

L'estrazione dello spazio di testa è quindi l'estrazione delle componenti presenti in quel gas. Analisi si effettua in genere tramite GC.

Spazio di testa statico

Il più semplice, prelievo dello spazio di testa con siringa a tenuta. La quantità di analita nel volume prelevato è funzione di T e P. Quantificazione è problematica (difficile usare standard interno)

L'alternativa è l'utilizzo di un materiale adsorbente (es. Fiala Tenax o fibra SPME)

Spazio di testa dinamico

Un gas inerte è impiegato per rimuovere gli analiti dallo spazio di testa del campione.

Poiché si immette gas “fresco” in continuazione, il quantitativo rimosso non si limita alle concentrazioni all'equilibrio nelle 2 fasi secondo il coefficiente di partizione, ma si riescono a prelevare quantità maggiori di campione.

Dopo la rimozione dalla *vial* del campione, gli analiti vengono intrappolati in una trappola (con solvente o una trappola raffreddata con liquidi criogenici o con un adsorbente adatto). e infine desorbiti dalla trappola per effettuare l'analisi (di solito GC).

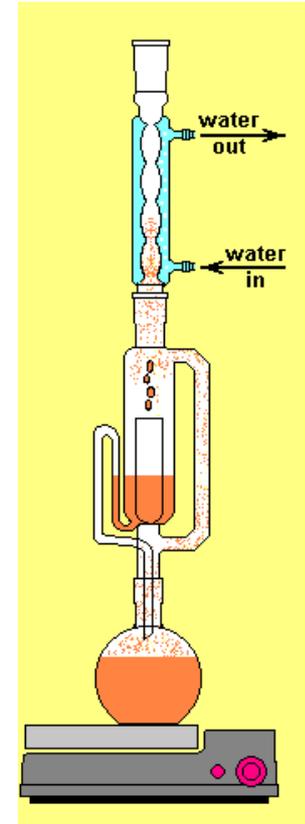
❖ Estrazioni L-S

Tecniche di estrazione L-S:

- Estrazione Soxhlet;
- ASE (*Accelerated Solvent Extraction*);
- MWAE (*Micro-Wave Assisted Extraction*);
- SAE (*Sonication Assisted Extraction*);
- SFE (*Supercritical Fluid Extraction*).

❖ Estrazione Soxhlet

- Viene utilizzata per estrarre analiti da matrici solide e semi-solide;
- L'apparecchiatura è formata da:
 - un sistema di **riscaldamento** (isomantello, bagno ad acqua o silicone termostato);
 - un pallone contenente il **solvente/i** per l'estrazione;
 - una **camera centrale** con sifone in cui viene alloggiato il campione (contenuto in un ditale, cioè un contenitore costituito da un materiale filtrante);
 - un **refrigerante** a bolle.
- Il solvente, per distillazione e condensazione ricade sul campione che è posto nel ditale alloggiato nella camera centrale dell'apparecchio;
- Quando la camera che contiene il ditale è piena di solvente, esso, tramite il sifone ricade nel pallone contenente il solvente posto nella parte inferiore del sistema;
- Grazie al processo di distillazione e ricondensazione **il campione viene continuamente estratto con solvente puro** (non contenente analita) aumentandone la capacità estrattiva;
- Dopo vari cicli il solvente posto nel pallone inferiore si "arricchisce" in contenuto di analiti;
- Dopo diversi cicli si raggiunge un'estrazione completa;
- Di solito si estraggono 1-20 g di campione con 100-500 mL di solvente/i per 16-24 h



segue →

Limiti dell'estrazione con Soxhlet:

- utilizzo di **elevate quantità di solventi organici**, spesso anche tossici (considerando che il sistema, prima dell'estrazione del campione viene "pulito" con un ciclo con solo solvente che poi deve essere gettato o, se possibile, ridistillato per riutilizzo);
- procedura **lunga** (16-24 h);
- possibilità di **perdita o contaminazioni** durante la manipolazione del campione;
- **difficoltà di automazione**



segue →

Estrazione con Microsoxhlet

Strumento automatizzato che consente un' estrazione in continuo



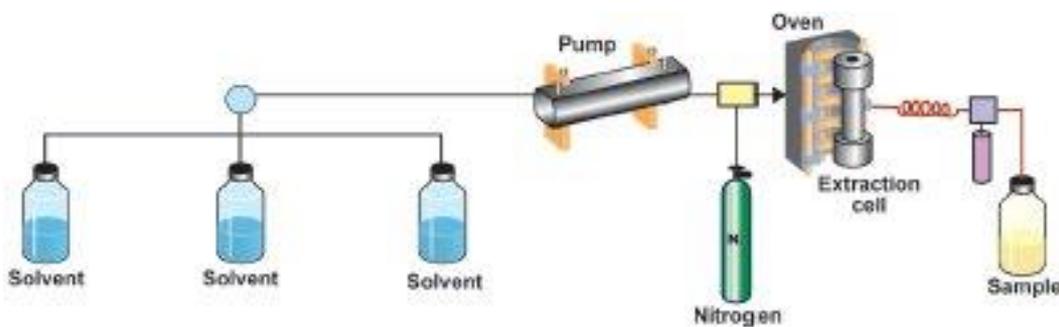
Microsoxhlet

Vantaggi:

- Risparmio di tempo
- Risparmio di solvente

❖ Estrazione accelerata con solvente (ASE)

- Viene utilizzata per estrarre analiti da matrici solide e semi-solide;
- Viene definita anche PLE: *Pressurized Liquid Extraction*;
- Lo scopo di questa tecnica è aumentare il potere estraente utilizzando **temperatura e pressione**;
- Tipicamente l'estrazione viene effettuata ad una temperatura superiore a quella del punto di ebollizione del solvente (quindi la pressione serve a mantenere il solvente in fase liquida);
- La **solubilità** e la **diffusività** degli analiti aumenta con la temperatura, quindi queste estrazioni sono rapide ed efficienti;
- La quantità di solvente utilizzata è in genere minore rispetto ad es. ad estrazione Soxhlet;
- Un sistema ASE è costituito da: un forno, una cella di estrazione (di solito in acciaio), una pompa e un sistema di pressurizzazione, una serie di valvole e un contenitore per raccogliere l'estratto;
- Il sistema è automatizzabile con un autocampionatore.



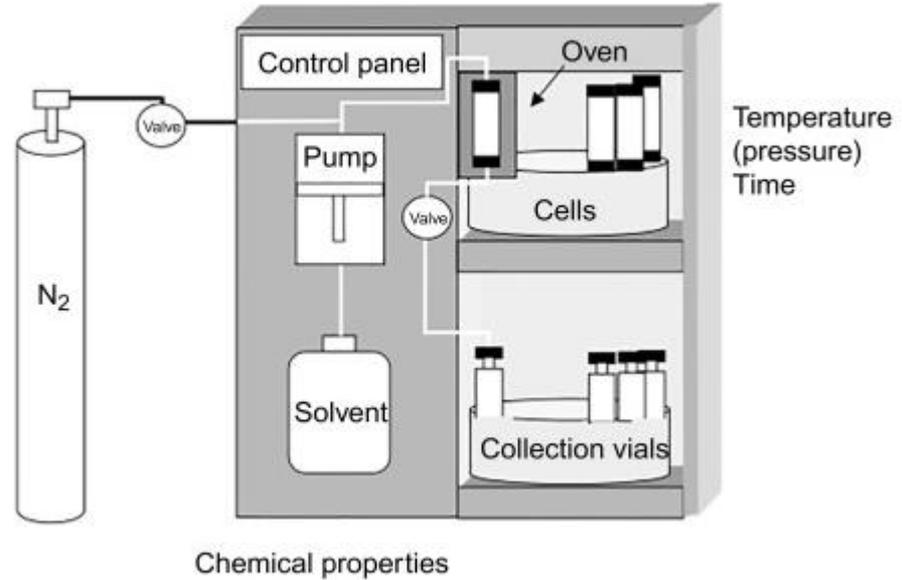
cella



- Estrazioni con 20-50 ml di solvente e durata 10-40 min.

Update 2020

<https://www.sciencedirect.com/topics/chemistry/pressurized-liquid-extraction>



<https://www.epa.gov/sites/production/files/2015-12/documents/3545a.pdf>

❖ Estrazione con solvente assistita dalle microonde (MWAE)

- Le microonde sono onde elettromagnetiche ad alta frequenza;
- In questo tipo di tecnica le microonde sono utilizzate per scaldare il solvente e conseguentemente anche il campione;
- L'energia delle microonde agisce sulle molecole attraverso due effetti: la **conducibilità ionica** e la **rotazione di dipolo**

Conducibilità ionica: Fenomeno per cui un elettrone o uno ione si muove in un mezzo a causa della mobilità ionica piuttosto che elettronica.

In MWAE il campo elettrico genera mobilità ionica poiché le molecole cercano di orientarsi rispetto al campo elettrico, causando quindi l'aumento di temperatura

Rotazione di dipolo: è una interazione in cui le molecole polari cercano di allinearsi con il campo elettrico applicato.

In MWAE il campo elettrico viene continuamente variato e il tentativo della molecola di allinearsi porta ad un trasferimento di energia. L'effetto dipende dalla polarità della molecola.

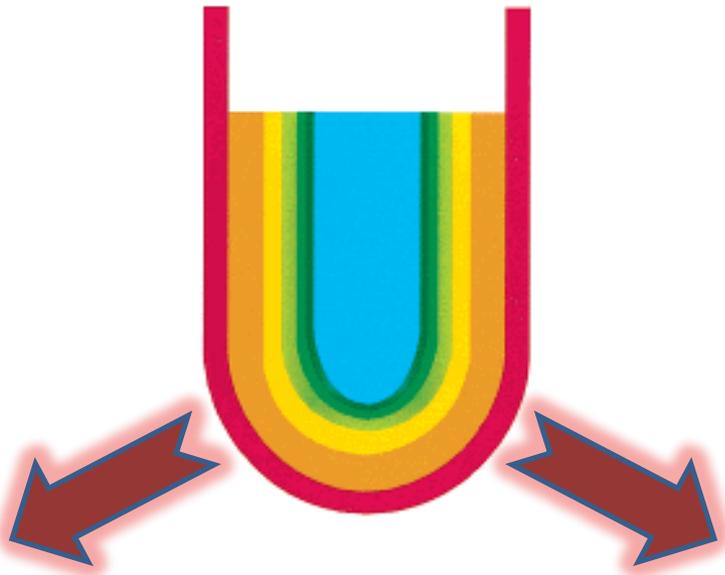
- La MWAE funziona bene se il solvente utilizzato è in grado di assorbire l'energia delle microonde e trasferirla al campione sotto forma di calore;
- Ottimi solventi sono molecole con grande momento di dipolo, come: acqua, metanolo e acetone;
- L'estrazione viene effettuata in un **contenitore chiuso (vessel)** di materiale inerte e resistente alla pressione interna che viene generata, poiché i solventi possono riscaldarsi anche al di sopra del loro punto di ebollizione;
- L'estrazione di solito richiede 20-50 ml di solvente e dura circa 20-40 minuti.

segue →

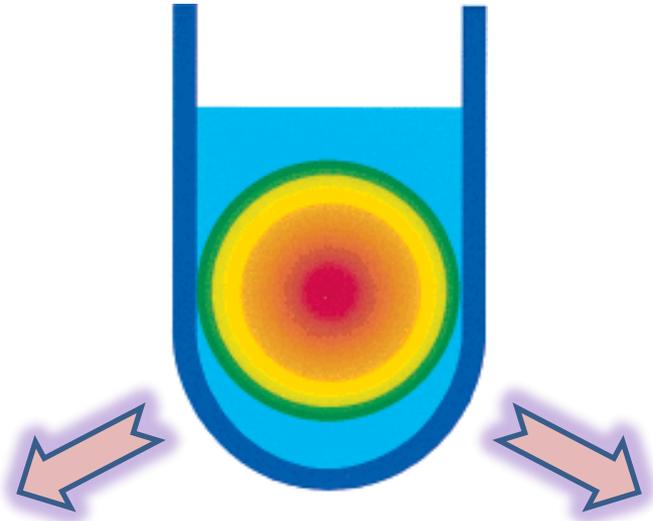
Vantaggi:

- riscaldamento diretto
- riduzione dei tempi di trasmissione del calore
- riduzione delle dispersioni di calore (80%, Diehlmann, 2002)
- precisione dell'azione di controllo termico

Riscaldamento con meccanismi di scambio termico



Riscaldamento con microonde



Esempio: digestione acida assistita dalle microonde per effettuare analisi di metalli in ICP-AES

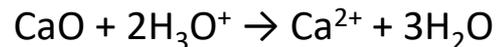
Si sceglie la miscela di acidi a seconda del tipo di matrice del campione:

- (a) per campioni abbastanza “puliti” e facilmente ossidabili si usa HNO_3
- (b) per matrici organiche facilmente ossidabili si usano $\text{HNO}_3\text{-HCl}$ or $\text{HNO}_3\text{-H}_2\text{SO}_4$
- (c) per matrici organiche refrattarie all’ossidazione si usano $\text{HNO}_3\text{-HClO}_4$
- (d) per dissoluzione totale di materiali contenenti silicati si usano HNO_3 (+HCl)-HF

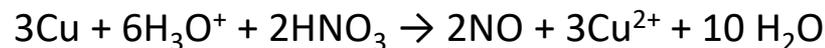
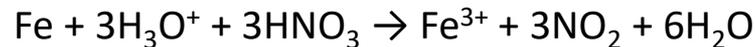
A volte si utilizza anche H_2O_2 combinata con miscele di acidi.

Perché HNO_3 è la scelta d’elezione per questa tecnica? perché HNO_3 agisce sia come acido che come agente ossidante.

Come acido dissolve gli ossidi inorganici:



Come agente ossidante, può ossidare metalli e non metalli a valenza zero, trasformandoli in ioni:



Inoltre HNO_3 , al contrario di H_2SO_4 ed HCl, non forma alcun composto insolubile con metalli o non-metalli.

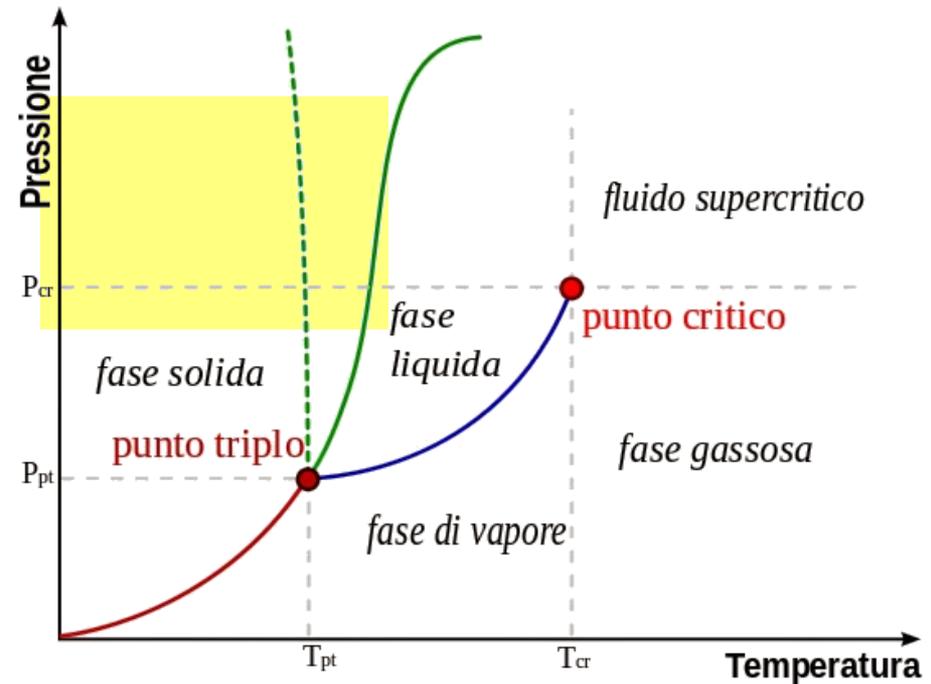
❖ Estrazione con ultrasuoni (SAE)

- In questa tecnica si utilizzano gli ultrasuoni, cioè le vibrazioni acustiche con frequenza superiore a 20 kHz;
 - Quando le vibrazioni vengono trasmesse attraverso il liquido e si propagano uniformemente formando onde di compressione e decompressione che danno origine alla formazione di microbolle (fenomeno della **cavitazione**) le quali implodono raggiungendo pressioni locali anche fino a 1000 bar;
 - Le sostanze e le particelle vengono rimosse meccanicamente dalla superficie della matrice e dai suoi siti adsorbenti a causa dello shock meccanico dovuto allo scoppio delle microbolle;
 - Inoltre, l'implosione delle cavità della matrice genera dei micro-ambienti in cui la temperatura e la pressione sono alte, così da accelerare il processo di estrazione;
-
- Questa tecnica può essere utilizzata sia con campioni solidi che liquidi e sia per l'estrazione di composti organici che inorganici;
 - Tipicamente il campione viene immerso in un solvente dentro ad una apposita fiala/provetta, la quale viene immersa nel bagno ad ultrasuoni che di solito contiene acqua deionizzata;
 - Si utilizzano 20-200 ml di solvente con tempi di estrazione di 2-20 minuti.

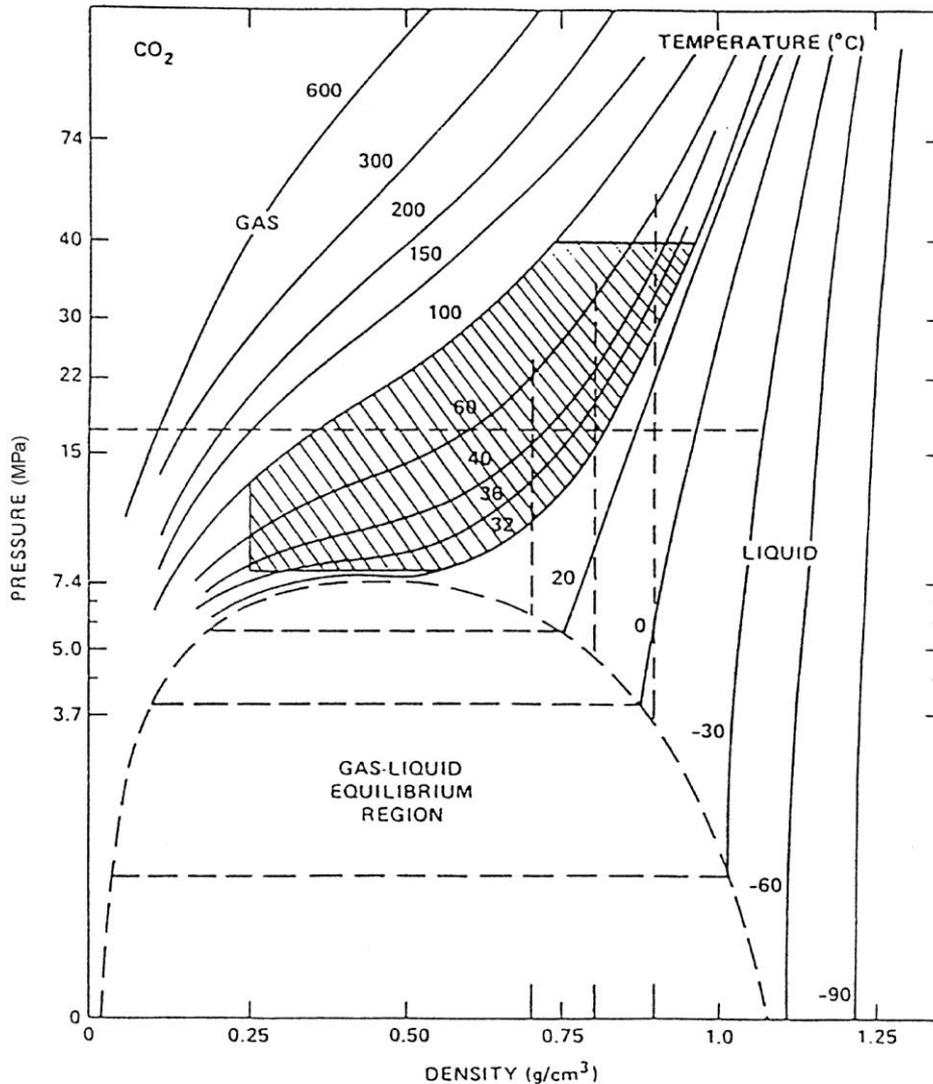


❖ Estrazione con fluido supercritico (SFE)

- Un fluido supercritico è una sostanza che si trova ad una temperatura superiore alla sua temperatura critica e viene mantenuto ad una pressione superiore alla sua pressione critica;
- Il fluido supercritico esiste in un'asingola fase (né gas né liquida) e non può essere liquefatto alzando la pressione o la temperatura;
- Quindi esso presenta proprietà intermedie tra quelle di un gas e quelle di un liquido, in particolare l'alta densità e il potere dissolvente di un liquido, assieme alla bassa viscosità, bassa tensione superficiale e alta velocità di diffusione di un gas;
- La densità può essere variata variando la temperatura;
- Quindi il fluido supercritico è un ottimo mezzo di estrazione;
- La sostanza più utilizzata è la **CO₂** supercritica, poiché ha basse temperatura e pressione critica, non è tossica, non è infiammabile ed è poco costosa.



segue →



© 2006 Wiley-VCH, Weinheim
 Kellner / Analytical Chemistry
 ISBN: 3-527-30590-4 Fig-15-02

CO₂ supercritica

For CO₂, T_c=31°C, P_c=1100 psi

Diagramma di fase della CO₂ nella zona supercritica

Sono possibili grandi cambiamenti di densità per valori di P e T "raggiungibili"

Conversione psi --> atm:

1100	=	74,85056
Libbra-forza per pollice quadrato ↕		Atmosfera

segue →

- Questa tecnica viene effettuata tramite apparecchiature dedicate che siano in grado di sia di generare il fluido supercritico, sia di controllare la pressione, la temperatura e il suo flusso;
- L'estratto viene raccolto sia tramite un apposito solvente che tramite trappola adsorbente;
- L'estrazione di solito richiede 10-20 ml di solvente (per l'intrappolamento o l'eluizione) e tempi di circa 20-60 minuti;
- Questa tecnica è utile in caso di analiti termolabili che non possono essere estratti con tecniche che utilizzano calore/alte temperature.

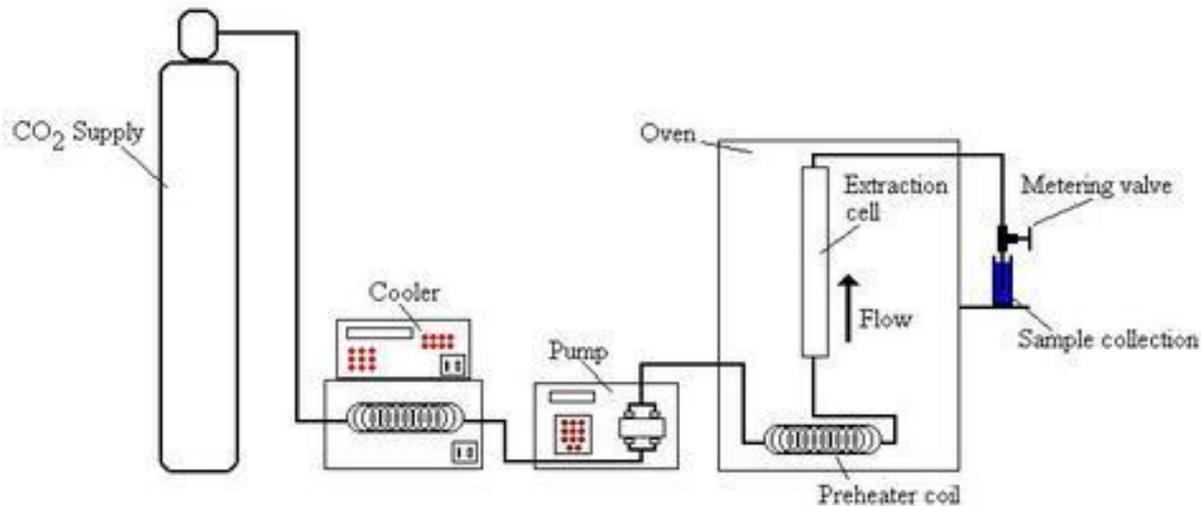


Table 1. Main characteristics, advantages and disadvantages of novel and conventional extraction technologies [3,5].

Characteristic	Novel Extraction Technology				Conventional Methods	
	Ultrasound-Assisted	Microwave-Assisted	Supercritical Fluids	Accelerated by Solvents	Mechanical Agitation	Soxhlet
Driving force	Acoustic cavitation	Microwave power	Pressure in conjunction with supercritical fluid	Heat in conjunction with the solvent under pressure	Solvent contact	Heat
Extraction time	10–60 min	3–30 min	10–60 min	10–20 min	Several hours	6–24 h
Sample size	1–30 g	1–10 g	1–5 g	1–30 g	1–30 g	1–30 g
Solvent amount	50–200 mL	10–40 mL	30–60 mL	15–60 mL	Large volume	150–500 mL
Power Amount	Moderate	High	Moderate	Moderate	High	High
Advantage	Easy to handle, safe (atmospheric pressure and ambient temperature), moderate use of solvent, reproducible	Fast, easy to handle, moderate use of solvent	Fast, safe, no filtering required, high selectivity	Fast, safe, no filtering required	Not use o sophisticated equipment	Not use of sophisticated equipment
Disadvantages	Required filtration step, possible degradation of compounds at high frequencies	Risk of explosion (solvent must absorb microwave power), expensive, required filtration step	Many parameters to optimize	Possible degradation of thermo-labiles compounds	Risk of spills and exposure to organic vapors, degradation of thermos-labiles compounds, required filtration step	Exposure risk to organic vapors, degradation of thermos-labiles compounds