

Diagramma di fase dell'effetto ouzo mediante spettroscopia UV-Vis a temperatura controllata

Esperimenti simultanei con rampe di temperatura mediante lo strumento UV-Vis Agilent Cary 3500 e la funzionalità Multizone del modulo di campionamento Multicell

Autori

Marc-André Gagnon e Claire
Cislak
Agilent Technologies, Inc.

Introduzione

In chimica un diagramma di fase è un concetto fondamentale. Illustra come lo stato fisico di una sostanza cambia in funzione di due variabili, per esempio temperatura e pressione o temperatura e concentrazione. I diagrammi di fase vengono realizzati tracciando le curve che mostrano le condizioni in cui fasi differenti della materia coesistono in equilibrio. Le linee in un diagramma di fase rappresentano i punti di separazione tra una fase e l'altra, per esempio tra una fase solida e una liquida o tra una fase liquida e una gassosa. Questi limiti indicano le condizioni in cui avvengono le transizioni di fase. Pertanto, modificando la variabile opportuna in un particolare diagramma di fase affinché un valore si sposti da un lato all'altro della linea di separazione si ottengono indicazioni sulle condizioni necessarie per una transizione di fase. Questo processo può essere dispendioso in termini di tempo, in quanto è necessario condurre numerosi esperimenti per ottenere un diagramma di fase esaustivo.

Un diagramma di solubilità, che è in qualche modo correlato a un diagramma di fase, delinea il modo in cui una o più sostanze si combinano con un'altra sostanza. In un diagramma di solubilità sono riportate solubilità (formazione di soluzioni da soluti e solventi in base a concentrazione e temperatura) e miscibilità (miscelazione di sostanze a formare una soluzione omogenea senza formazione di precipitati). I diagrammi si basano su interazioni favorevoli o sfavorevoli tra le sostanze chimiche oggetto dello studio.

Dai diagrammi di solubilità e da quelli di fase si possono ottenere informazioni sulle interazioni fisiche delle sostanze chimiche tra loro e con l'ambiente. Questi studi sono pertanto essenziali per comprendere i principi della chimica.

È stato dimostrato che la spettroscopia UV-Vis si presta alla caratterizzazione di campioni torbidi¹; per tale ragione questa tecnica è stata utilizzata per studiare l'effetto ouzo. L'effetto ouzo descrive un tipo di emulsificazione che si verifica tra l'acqua e i terpeni di bevande alcoliche come l'ouzo greco o il pastis francese. Per esempio, una nota marca di pastis contiene un terpene altamente idrofobico, l'ananeto (Figura 1), che conferisce l'aroma di anice al liquore. Nella sua forma pura, il liquore contiene una concentrazione di etanolo pari al 45% (v/v). A questa gradazione alcolica di etanolo, le molecole di ananeto sono completamente solubili nella miscela acqua/alcol.

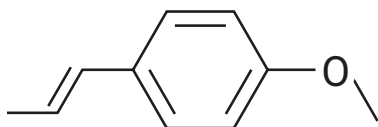


Figura 1. Struttura chimica dell'ananeto, un terpene altamente idrofobico contenuto in alcuni liquori pastis.

Il pastis in genere viene servito con acqua e ghiaccio, cosicché il livello di alcol si riduce per diluizione e la temperatura della miscela si abbassa. Di conseguenza, le molecole di ananeto precipitano nella frazione acquosa, cambiando l'aspetto del liquore da ambrato limpido a giallo torbido (Figura 2). Il meccanismo che porta a questo fenomeno non è interamente compreso, ma il cambiamento pressoché istantaneo affascina allo stesso modo chimici e non.²



Figura 2. Preparazione di una tipica bevanda con il pastis che illustra l'effetto ouzo. Mescolando pastis puro (sinistra), acqua (centro-sinistra) e cubetti di ghiaccio (centro-destra) si ottiene una bevanda giallastra torbida (destra).

Nel presente studio la transizione di fase in varie miscele di acqua/etanolo è stata valutata misurando l'entità della dispersione della luce creata dalla sospensione di ananeto nella miscela di pastis. Come dimostrato in precedenza, lo spettrofotometro UV-Vis Agilent Cary 3500 è dotato di capacità uniche per la caratterizzazione di campioni torbidi grazie all'esclusivo design ottico.¹

Spettrofotometro UV-Vis Cary 3500

Lo spettrofotometro UV-Vis Cary 3500 è un sistema modulare completamente intercambiabile che utilizza una lampada pulsata allo xeno (Xe) quale sorgente e un doppio monocromatore Littrow fuori piano. La larghezza di banda spettrale (SBW) del monocromatore può variare da 0,1 a 4,0 nm. La tecnologia a fibre ottiche è impiegata per inviare simultaneamente il segnale della sorgente direttamente a tutte le cuvette.

Con l'uso del modulo di campionamento Agilent compatto abbinato al comune motore UV-Vis Cary 3500 l'analista ha accesso a due posizioni delle cuvette, mentre con il modulo di campionamento Agilent multicella può avere accesso a otto cuvette.

Entrambi i moduli di campionamento Peltier compatto e Peltier multicella utilizzano un sistema di controllo della temperatura Peltier raffreddato ad aria che può raggiungere e mantenere una temperatura impostata tra -5 e 110 °C. Il sistema è anche in grado di creare rampe di temperatura a velocità comprese tra 0,1 e 40 °C/min.

L'esclusiva funzionalità Multizone del modulo di campionamento multicella permette l'esecuzione simultanea in zone separate di quattro esperimenti a temperatura controllata (quattro coppie di campione e riferimento). Questa capacità multizona migliora in modo significativo la produttività nella creazione di diagrammi di fase multi-punto.

In questo studio è stato utilizzato il sistema Cary 3500 con modulo di campionamento Peltier multicella per eseguire contemporaneamente esperimenti con rampe di temperatura su quattro differenti miscele alcol/acqua. Per ciascun gruppo di esperimenti, la temperatura è stata modificata in modo ciclico da 55 a -2,5 °C, sotto agitazione costante, utilizzando otto cuvette (quattro cuvette campione e quattro celle di riferimento) nel modulo di campionamento. I risultati mostrano che il sistema UV-Vis Peltier multicella Cary 3500 può essere usato per creare un diagramma di fase della solubilità a otto punti dell'effetto ouzo in modo efficiente in termini di tempo.

Condizioni sperimentali

Preparazione del campione

È stato preparato un totale di otto diluizioni del campione di pastis direttamente nelle cuvette in quarzo standard, con parte superiore aperta da 10 mm, dotate di ancoretta a stella e coperchio. Le concentrazioni dei campioni erano alcol 45,0 (puro), 44,0, 42,5, 40,0, 37,5, 35,0, 32,5 e 30,0% (v/v). Per coerenza, ciascuna cuvetta è stata riempita con un volume totale di soluzione pari a 2,00 mL.

Le celle di riferimento contenenti le corrispondenti diluizioni di etanolo con acqua deionizzata (DI) sono state preparate in cuvette in quarzo con associazione ottica, anch'esse dotate di ancoretta a stella e coperchio. Grazie all'uso di coppie di cuvette con associazione ottica, l'azzeramento e il calcolo della linea di base non sono stati necessari prima dell'avvio delle misurazioni. In tutte le cuvette campione è stata posta una sonda di temperatura a un'altezza tale che la punta fosse completamente immersa nella soluzione (Figura 4).

Strumentazione

Il funzionamento dello spettrofotometro UV-Vis Cary 3500 dotato di un modulo di campionamento Peltier multicella veniva controllato mediante il software Agilent Cary UV Workstation.

Ciascuna cella del modulo Peltier multicella è abbinata al proprio rivelatore e ciascuna cuvetta può essere dotata di un agitatore e una sonda di temperatura indipendente. Pertanto, nel presente studio, in tutte quattro le celle campione è stata posta una sonda di temperatura per monitorare, misurare e controllare la temperatura di ciascuna zona (che comprendeva un campione e un riferimento), basandosi sulla lettura della temperatura effettiva della cuvetta campione.

Scansioni delle lunghezze d'onda di miscele/componenti chiave

Prima degli esperimenti a temperatura controllata ai vari livelli di alcol, sono stati raccolti con le impostazioni di Tabella 1 gli spettri UV-Vis di liquore pastis puro, soluzione di pastis diluita costituita con etanolo a una concentrazione di alcol 45% (v/v) e soluzione di pastis diluita a una concentrazione di alcol 30% (v/v). Nella cella di riferimento è stata usata la corrispondente soluzione di etanolo in acqua DI.

Tabella 1. Parametri UV-Vis Agilent 3500 usati per l'acquisizione degli spettri UV-Vis a 25 °C dei campioni di pastis puro e diluito.

Parametro	Impostazione
Intervallo di lunghezze d'onda	Da 200 a 1.100 nm
Intervallo dati	1,00 nm
Tempo per la media	0,02 s
Larghezza di banda spettrale	4,0 nm
Velocità di agitazione	800 rpm
temperatura	25,0 °C

Studio della temperatura di solubilità

I parametri delle rampe di temperatura usati per misurare la temperatura di solubilità per ciascuna miscela di pastis sono riassunti in Tabella 2. Per tutti gli esperimenti è stato selezionato un punto iniziale pari a 25,0 °C. Alcune miscele sono risultate essere già insolubili a temperatura ambiente. Pertanto, nella fase 1 del programma delle rampe di temperatura, la temperatura della cuvetta è stata aumentata a 55 °C per assicurarsi che eventuali particelle rimaste in sospensione venissero completamente solubilizzate. Nella fase 2 sono stati raccolti i dati effettivi da 55 a -5 °C in modalità assorbanza. Per tutte le misurazioni, la sonda di temperatura collocata nella cella campione di ciascuna zona è stata usata per il loop di feedback del sistema di controllo della temperatura. Nella sezione successiva è discussa in maggior dettaglio la selezione di questi parametri.

Tabella 2. Parametri UV-Vis Agilent 3500 per ciascuna fase del programma di temperature.

	Fase 1 (riscaldamento)	Fase 2 (raffreddamento)
Lunghezza d'onda	750,0 nm	750,0 nm
Tempo per la media	1,0 s	1,0 s
Larghezza di banda spettrale	4,0 nm	4,0 nm
Velocità di agitazione	400 rpm	400 rpm
Temperatura iniziale	25,0 °C	55,0 °C
Temperatura finale	55,0 °C	-5,0 °C
Tempo di mantenimento	10,0 min	0 min
Intervallo dati	1,0 °C	1,0 °C
Tasso	5,0 °C/min	1,0 °C/min

Il modulo di campionamento Peltier multicella Cary 3500 è dotato di una linea di spurgo per prevenire la condensa sull'esterno delle pareti della cuvetta quando si eseguono esperimenti a temperature inferiori al punto di rugiada. Dal momento che lo studio del diagramma di fase della solubilità dell'ouzo prevedeva la raccolta di misure di assorbanza a temperature inferiori a 0 °C, il punto di congelamento dell'acqua, si è utilizzato azoto (N₂) come gas di spurgo a un flusso di 10 L/min.

Risultati e discussione

Identificazione dell'intervallo di lunghezze d'onda

Il colore ambrato caratteristico del pastis puro con alcol 45% (v/v) è dovuto ai cromofori associati alla formulazione dello specifico liquore impiegato in questo studio. Pertanto, sono state eseguite alcune scansioni di controllo iniziali per determinare l'intervallo di lunghezze d'onda adatto per le misurazioni delle transizioni di fase.

Il pastis in forma pura (curva blu in Figura 3) assorbe fortemente a lunghezze d'onda inferiori a 500 nm fino ai valori massimi del range fotometrico dello strumento Cary 3500 con modulo Peltier multicella, ossia circa 4,5 unità di assorbanza.

Per visualizzare i cromofori associati al liquore pastis, è stata preparata una soluzione di pastis diluita mantenendo la concentrazione di etanolo costante per evitare che l'ananeto precipitasse. La curva gialla in Figura 3 mostra due picchi distinti a 244 e 297 nm, così come uno scodamento fino a 460 nm, probabilmente dovuto al fianco di un picco non risolto. Questa caratteristica di scodamento probabilmente si estende a 600 nm nello spettro del liquore pastis in forma pura (curva blu). Queste misurazioni consentono di concludere che sopra i 600 nm non vi sono cromofori importanti che contribuiscono alla misurazione. La curva verde in Figura 3, associata a una miscela con una percentuale di alcol inferiore (30%), è rappresentativa di una soluzione di pastis torbida a temperatura ambiente.

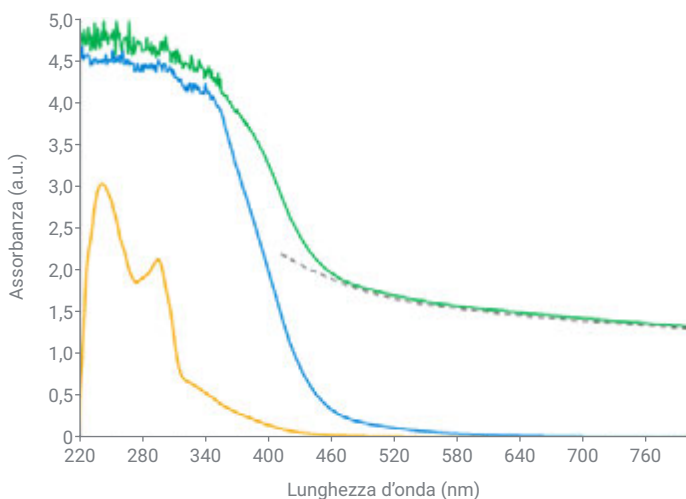


Figura 3. Spettro UV-Vis di pastis non diluito (blu), pastis diluito 10 volte in etanolo 45% (v/v) (giallo) e soluzione di pastis torbida con alcol al 30% (v/v) (verde). Il contributo della dispersione della luce alla curva verde è indicato dalla linea grigia tratteggiata.

In aggiunta alle caratteristiche dei cromofori nel range da 200 a 600 nm, è possibile osservare un ulteriore contributo a >600 nm, come indicato dalla linea grigia tratteggiata in Figura 3. Questo segnale di lento decadimento che compensa il segnale sull'intero intervallo spettrale è associato alla dispersione della luce dovuta alle particelle non disciolte in sospensione.

Per la determinazione delle temperature delle transizioni di fase è stata selezionata una lunghezza d'onda pari a 750,0 nm. Il segnale di assorbanza apparente a 750,0 nm dipende esclusivamente dalla dispersione della luce mentre i cromofori non apportano alcun contributo.

Ottimizzazione delle condizioni di temperatura e della velocità di raffreddamento

Le miscele a percentuale di alcol più bassa in questo studio presentavano temperature di transizione prossime alla temperatura ambiente. In Figura 4 è riportata una curva di solubilità tipica per un campione a bassa percentuale di alcol. Alla temperatura iniziale di 25,0 °C, l'assorbanza apparente a 750 nm è significativa a causa della dispersione della luce causata dall'ananeto non disciolto in sospensione. Il riscaldamento iniziale dei campioni a 55,0 °C (fase 1 in Tabella 2) riduce l'assorbanza apparente a ~ 0 in quanto l'ananeto precipitato si dissolve nuovamente nella frazione di etanolo della soluzione di pastis. In questa fase la velocità di riscaldamento è irrilevante poiché l'obiettivo è dissolvere eventuali particelle che potrebbero indurre la dispersione della luce. I campioni vengono mantenuti per 10 minuti alla temperatura superiore per consentire il completamento degli eventuali processi di dissoluzione lenti.

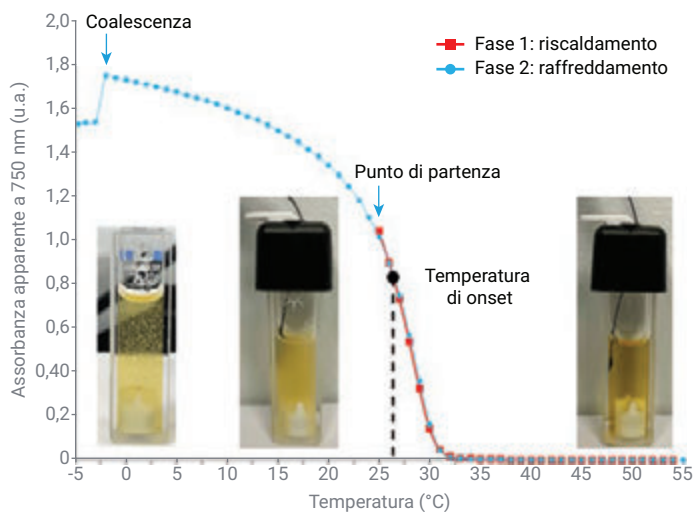


Figura 4. Una tipica curva associata a una transizione di fase di un campione di pastis a una percentuale di alcol del 30% (v/v). Durante la fase 1 (■) i campioni sono stati riscaldati a 55 °C sotto agitazione continua, ottenendo una soluzione limpida come mostrato dalla cuvetta a destra. Durante la fase 2 (●) il campione è stato lentamente raffreddato a -5 °C, ottenendo una soluzione torbida come mostrato dalla cuvetta al centro. Un'ulteriore transizione di fase si è verificata vicino al punto di congelamento dell'acqua, come illustrato dalla cuvetta a sinistra.

Durante la fase di raffreddamento (fase 2 in Tabella 2), la temperatura in ciascuna zona è stata portata lentamente a $-5,0\text{ }^{\circ}\text{C}$ a una velocità di $1,0\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$. Test preliminari a una velocità di raffreddamento maggiore ($>2\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$) hanno mostrato che la transizione di fase dell'inetolo non raggiungeva l'equilibrio nonostante un'agitazione efficiente della soluzione. La cinetica della transizione di fase era troppo lenta alla velocità di raffreddamento maggiore, dando come risultato una curva di isteresi di raffreddamento/riscaldamento (risultati non mostrati).

Risultati riproducibili sono stati ottenuti a una velocità di raffreddamento pari o inferiore a $1,0\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$. Quando le condizioni di temperatura sono soddisfatte, l'assorbanza apparente aumenta rapidamente prima di raggiungere un plateau. Questo punto critico è indicato come temperatura di onset. Più inetolo precipita, più aumenta la dispersione della luce; una certa precipitazione di inetolo avviene persino nella frazione acquosa di campioni di pastis leggermente diluiti.

Per alcune soluzioni, è stata osservata un'improvvisa diminuzione dell'assorbanza apparente a temperature inferiori a $-3\text{ }^{\circ}\text{C}$. Questa diminuzione è mostrata in Figura 4. Alcune soluzioni iniziano a destabilizzarsi e separarsi in fasi al di sotto di $-3\text{ }^{\circ}\text{C}$, come confermato dall'osservazione visiva delle cuvette, nonostante l'ininterrotta e accurata agitazione della soluzione. Questo fenomeno è stato osservato in passato e spiegato in termini di coalescenza (gocce di inetolo si aggregano a formare gocce di maggiori dimensioni), flocculazione (gocce di inetolo si aggregano senza combinarsi tra loro), sedimentazione (separazione dovuta a differenze di densità) e maturazione di Ostwald (aumento nelle dimensioni delle gocce di inetolo).² Ognuno di questi processi causa una diminuzione significativa dell'assorbanza in seguito al collasso della nuvola uniforme di inetolo precipitato. Questa transizione di fase a basse temperature è risultata non essere reversibile, ovvero era possibile osservare un'isteresi quando la soluzione veniva nuovamente riscaldata. A seguito di queste osservazioni, sono state omesse temperature inferiori a $-2,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ per il diagramma di fase della solubilità, in quanto non influivano sull'onset della precipitazione iniziale.

Effetti del livello percentuale di alcol sulla temperatura di precipitazione

Gli esperimenti sono stati ripetuti usando soluzioni fresche preparate a differenti livelli di percentuale di alcol (da puro a $30,0\%$ v/v). Le curve di raffreddamento per i diversi campioni sono riportate in Figura 5. I risultati mostrano che anche la più piccola aggiunta di acqua al liquore porta a uno spostamento della temperatura di onset a cui l'inetolo precipita. Si osserva una chiara tendenza verso una temperatura di precipitazione più elevata al diminuire della percentuale di etanolo nella soluzione.

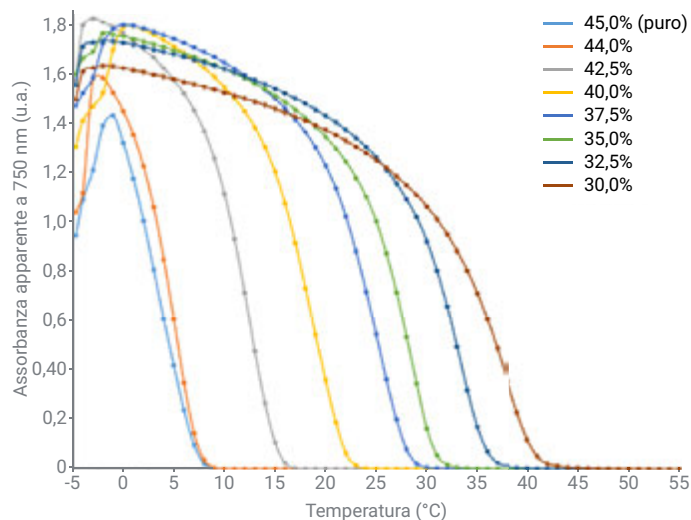


Figura 5. Curve di raffreddamento UV-Vis (fase 2) delle soluzioni di pastis a concentrazioni di alcol pari a 45,0, 44,0, 42,5, 40,0, 37,5, 35,0, 32,5 e 30,0% (v/v).

L'esperimento è stato condotto solo fino al livello di alcol del 30% (v/v), poiché i campioni con concentrazioni di alcol più basse raggiungono temperature prossime al punto di ebollizione di etanolo/acqua per la solubilizzazione iniziale della miscela.

Determinazione delle temperature di fase

Per determinare in maniera accurata la temperatura di fase per ciascuna delle curve mostrate in Figura 5 è stato applicato il metodo della derivata prima. Sono state usate le temperature medie per costruire il diagramma di fase della solubilità dell'inetolo mostrato in Figura 6. Le barre di errore corrispondono alla deviazione standard dai valori di tre replicati.

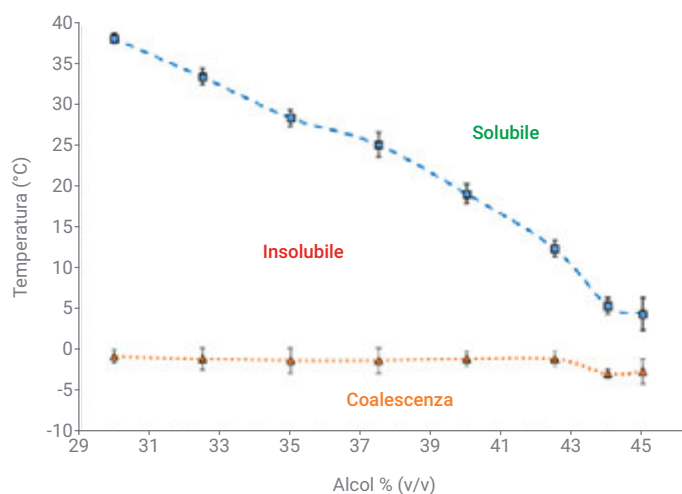


Figura 6. Diagramma di fase della solubilità dell'inetolo nel liquore pastis. Ciascun punto dati corrisponde al valore medio della temperatura e le barre di errore sono correlate alla deviazione standard di tre replicati.

La spettroscopia UV-Vis potrebbe non essere lo strumento più ovvio o adatto per studiare la separazione di fase che si verifica in prossimità del punto di congelamento dell'acqua. Tuttavia è possibile stimare la temperatura a cui tale fenomeno avviene anche impiegando il metodo della derivata prima. Questa transizione di fase aggiuntiva sembra essere indipendente dal livello di alcol nella soluzione, come indicato dalla linea arancione tratteggiata in Figura 6. Poiché la transizione avviene a una temperatura molto vicina a 0 °C, si potrebbe ipotizzare un'associazione con domini di acqua pura all'interno dell'emulsione.

Conclusione

Lo spettrofotometro UV-Vis Agilent Cary 3500 dotato di un modulo di campionamento Peltier multicella Agilent è stato utilizzato per costruire un diagramma di fase a otto punti dell'anetolo nel liquore pastis.

La funzionalità Multizone della multicella di Peltier a temperatura controllata ha reso possibile l'esecuzione in parallelo di quattro esperimenti con rampe di temperatura, in cui sono state utilizzate cuvette contenenti coppie di campione e riferimento. Grazie a questa capacità, è stato possibile ottenere un esaustivo diagramma di fase della solubilità per il pastis in due analisi di 73 minuti con lo strumento UV-Vis Cary 3500, ossia in tempi molto più brevi rispetto a quelli necessari per costruire un diagramma di fase ricorrendo ad altre tecniche.

Allo scopo di prevenire la sedimentazione durante le misurazioni, ciascuna delle otto cuvette nella multicella è stata dotata di un agitatore indipendente. L'agitazione continua ha inoltre garantito una temperatura uniforme in tutte le cuvette, un fattore critico per gli esperimenti con rampe di temperatura. Il sistema Peltier con raffreddamento ad aria, abbinato all'uso dell'azoto come gas di spurgo, ha consentito di raggiungere set point di temperatura significativamente sopra la temperatura ambiente e inferiori al punto di congelamento dell'acqua senza formazione di condensa.

Lo studio ha dimostrato l'idoneità e l'efficienza del sistema UV-Vis Cary 3500, facile da usare, per determinare i diagrammi di fase di campioni complessi e ottenere informazioni sull'effetto ouzo.

Bibliografia

1. United States Pharmacopeia (2024). General Chapter, {855} Nephelometry and Turbidimetry. USP-NF. Rockville, MD: United States Pharmacopeia. DOI: https://doi.org/10.31003/USPNF_M9373_03_01
2. Sitnikova, N. L.; Sprik, R.; Wegdam, G.; Eiser, E. Spontaneously Formed *trans*-Anethol/Water/Alcohol Emulsions: Mechanism of Formation and Stability. *Langmuir* **2005**, 21, 16, 7083-7089.

Ulteriori informazioni

- Spettrofotometro UV-Vis Multicell Cary 3500
- Spettrofotometro UV-Vis Compact Cary 3500
- Software Cary UV Workstation
- Domande frequenti sugli spettrofotometri e sulla spettroscopia UV-Vis

www.agilent.com/chem/cary3500uv-vis

DE-000868

Le informazioni fornite possono essere soggette a modifica senza preavviso.

© Agilent Technologies, Inc. 2024
Stampato negli Stati Uniti, 12 settembre 2024
5994-77671TE