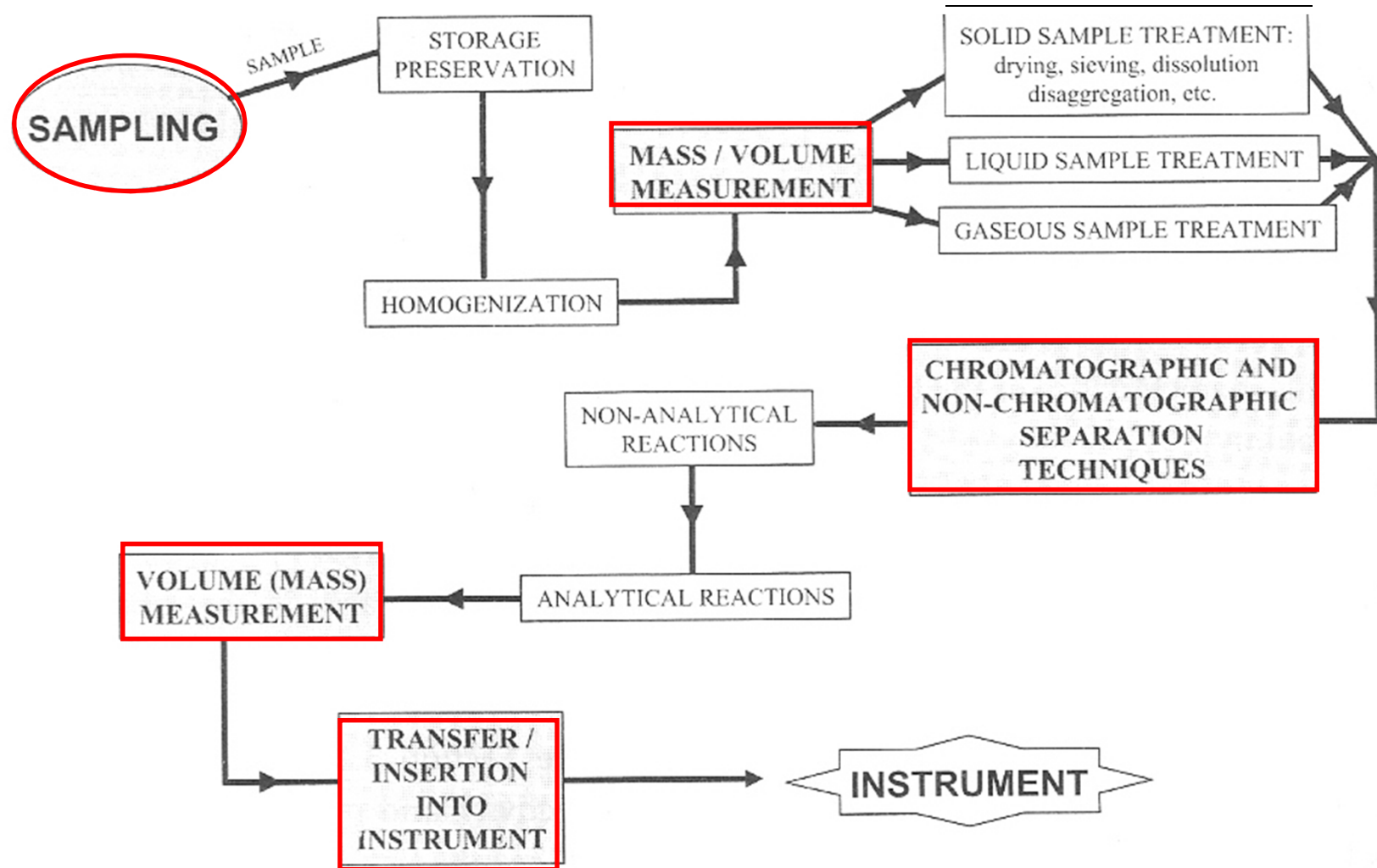


# **CHIMICA ANALITICA II CON LABORATORIO**

**(AA 2016-17)**

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

# POSSIBILI PASSAGGI INTERMEDI NELLE OPERAZIONI PRELIMINARI



Coppia campione/analita; 70-90% del tempo in “step 1”<sup>2</sup>

# INTRODUZIONE AI METODI DI SEPARAZIONE

Kellner, 2004 Parte V, Capitolo 19

Nel curriculum chimico le **separazioni in uno stadio** (es. precipitazioni, estrazioni liquido liquido) sono il primo mezzo per separare ioni inorganici, singoli o in gruppo, da altri costituenti di un campione.

Queste sono il presupposto per le **separazioni multi-stadio** e **separazioni analitiche**,

# SEPARAZIONE

=

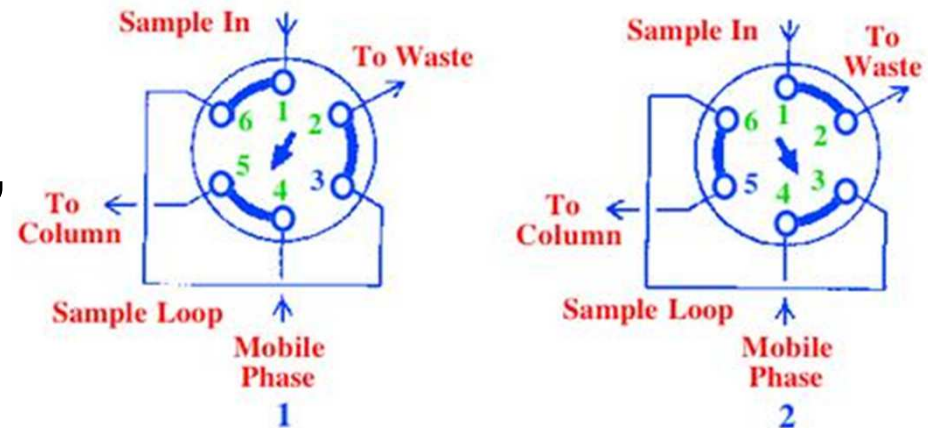
**preparazione del campione+determinazione analitica**

- ***Preparazione del campione*** = *separazione a livelli di prestazione relativamente bassi* , grazie a estrazioni, volatilizzazioni, equilibri di scambio ionico, metodi cromatografici o distillazioni, flottazione, liofilizzazione, dialisi, osmosi, filtrazione e setacciatura (capitolo 20)
- ***Separazioni analitiche si basano su***  
**moduli strumentali** caratterizzati da:
  - Sistema di introduzione del campione
  - Unità di separazione
  - Detector/rivelatore
  - Acquisizione e valutazione dei dati

## Campioni liquidi o gassosi iniettati

manualmente o automaticamente da una siringa - direttamente o tramite una valvola - nell'unità di separazione.

I campioni solidi devono essere trasferiti a un gas, a un liquido o a un fluido supercritico prima dell'iniezione



Es. valvola a 6 vie,  
per iniettare volumi definiti dal  
vol del loop nella u.di sep.

Nell'unità di separazione il campione è soggetto a uno o più principi di separazione della cromatografia, dell'elettroforesi o del frazionamento in campo di flusso

## Metodi di separazione

### **Preparazione del campione**

estrazione liquido-liquido (LLE)  
estrazione in fase solida (SPE)  
tecnica in spazio di testa (HS)  
scambio ionico (IE)

### **Elettroforesi**

elettroforesi su gel (GE)  
elettroforesi capillare (CE)  
cromatografia elettrocinetica micellare (MEKC)  
elettrocromatografia capillare (CEC)

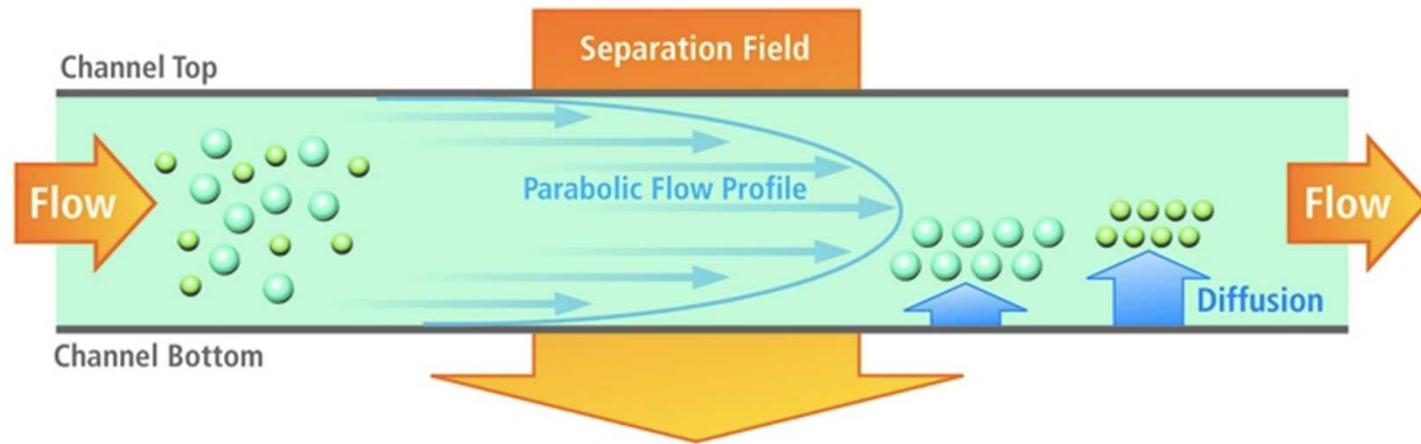
### **Cromatografia**

gas cromatografia (GC)  
GC capillare (CGC)  
cromatografia liquida (LC)  
LC ad alte prestazioni (HPLC)  
cromatografia ionica (IC)  
cromatografia a esclusione dimensionale (SEC)  
cromatografia su strato sottile (TLC)  
cromatografia con fluido supercritico (SFC)

### **Frazionamento in campo-flusso**

FFF termico, di sedimentazione... (ThFFF, SdFFF...)

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

## Condizioni per separazione efficace possono essere molto diverse:

T: da -60 ° C conservazione campione a 350 ° C per GC

P: da vuoto per essiccare campioni a 35 MPa per HPLC

Voltaggi fino a 30 kV in CE

I mezzi impiegati come fasi mobili possono essere gas inerti, acqua, acidi o basi forti forti, solventi organici (es. acetonitrile), CO<sub>2</sub> supercritica.

Si separano **composti nell'intero intervallo di masse** conosciuto

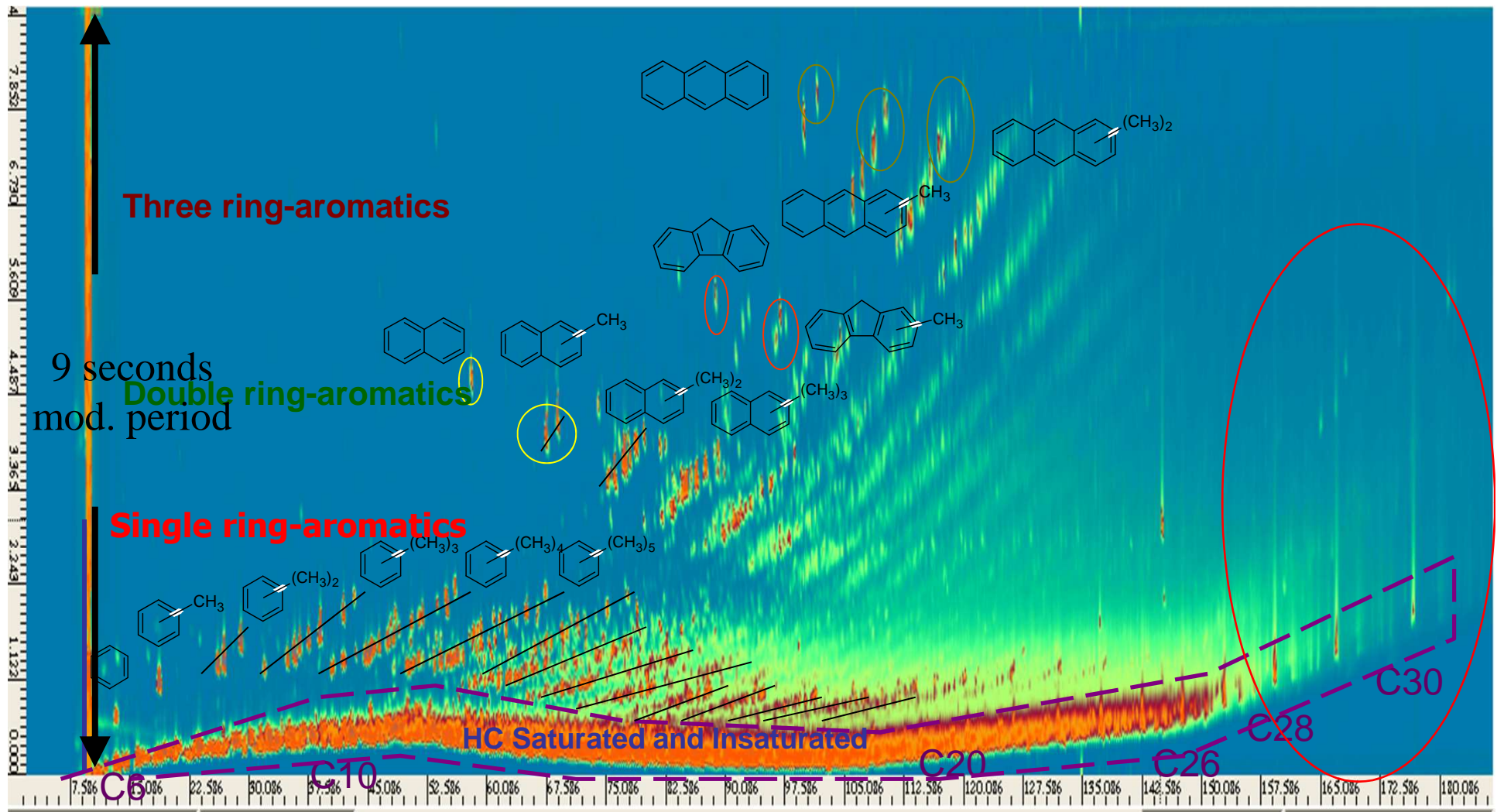
Piccole specie (elemento, composto o ione d'interesse nel campione) inorganiche o organiche (es. ioni cloruro o acetato), molecole organiche neutre o cariche con masse molari relativamente piccole fino a 1000 Da, intermedie fino a 2000 Da, macromolecole come DNA e proteine, cellule intere.

Bada a ***carica, dimensioni, idrofobicità e volatilità.***

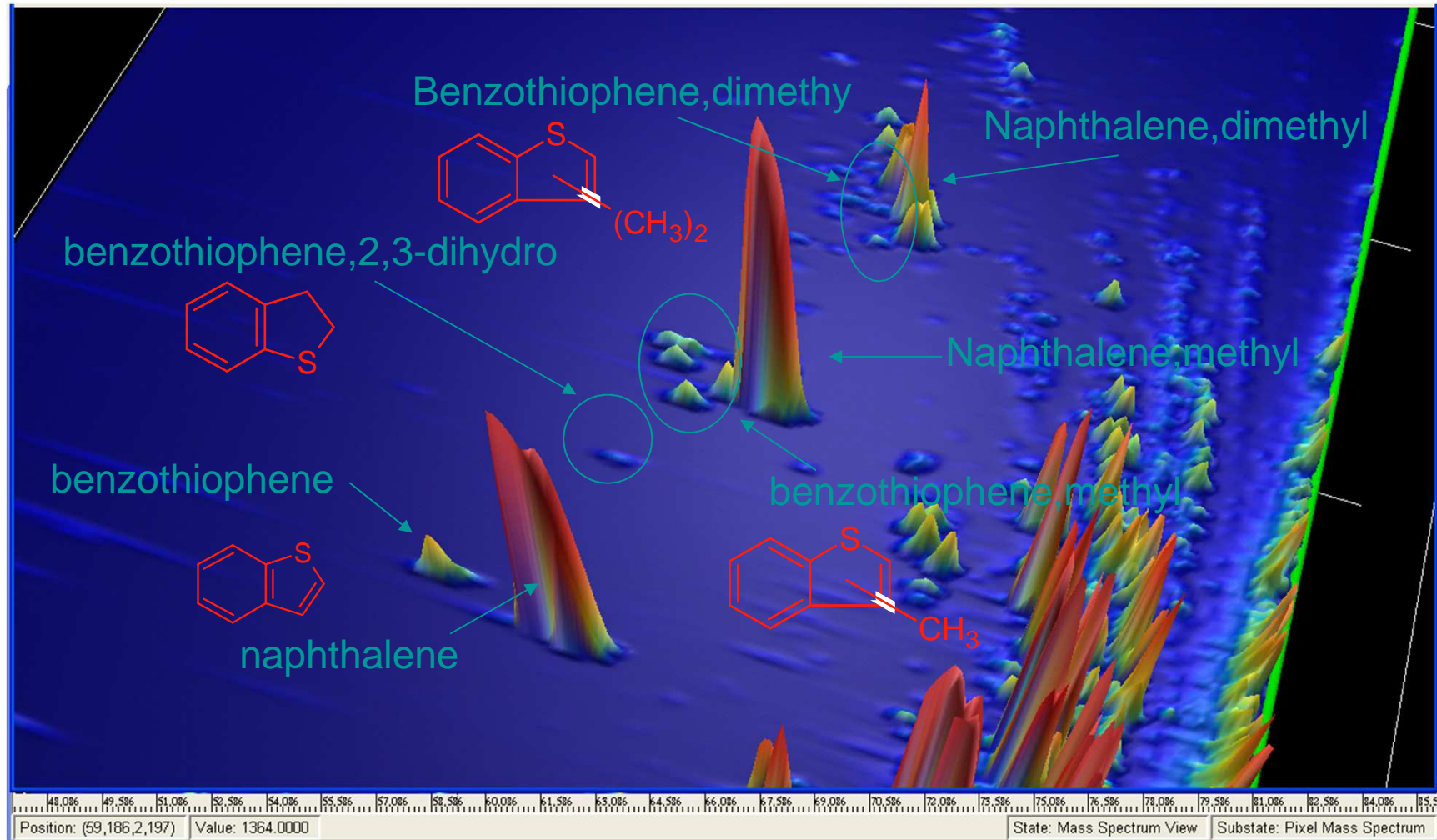


- Da due a migliaia di composti (specie organiche in un suolo contaminato, proteine in una cellula)
- Rilevazione originariamente *off line*, ora *on line*
- Per scopi semplici si impiegano *rilevatori a singolo canale* (FID in GC, UV in HPLC, conduttimetro in IC).
- Si impiegano sempre più spesso *rilevatori multi-canale (hyphenation)*, tipicamente spettrometri di massa e ottici.
- Si impiegano combinazioni di metodi di separazione (es. cromatografie multidimensionali)

# Idrocarburi Aromatici in Greggio leggero



# Vista-3D Benzotiofeni in intermedio di benzina prima della desolforazione Modulatore Termico e Rivelatore di Massa Quadrupolare



**Valutazione dei dati** con uso estensivo di strumenti informatici; algoritmi per la rilevazione del picco, correzione delle linee di base, integrazione dei picchi e per la conservazione dei dati di ritenzione e migrazione specifici per il composto sono intercambiabili per molte tecniche/metodi (cromatografici, elettroforetici etc.).

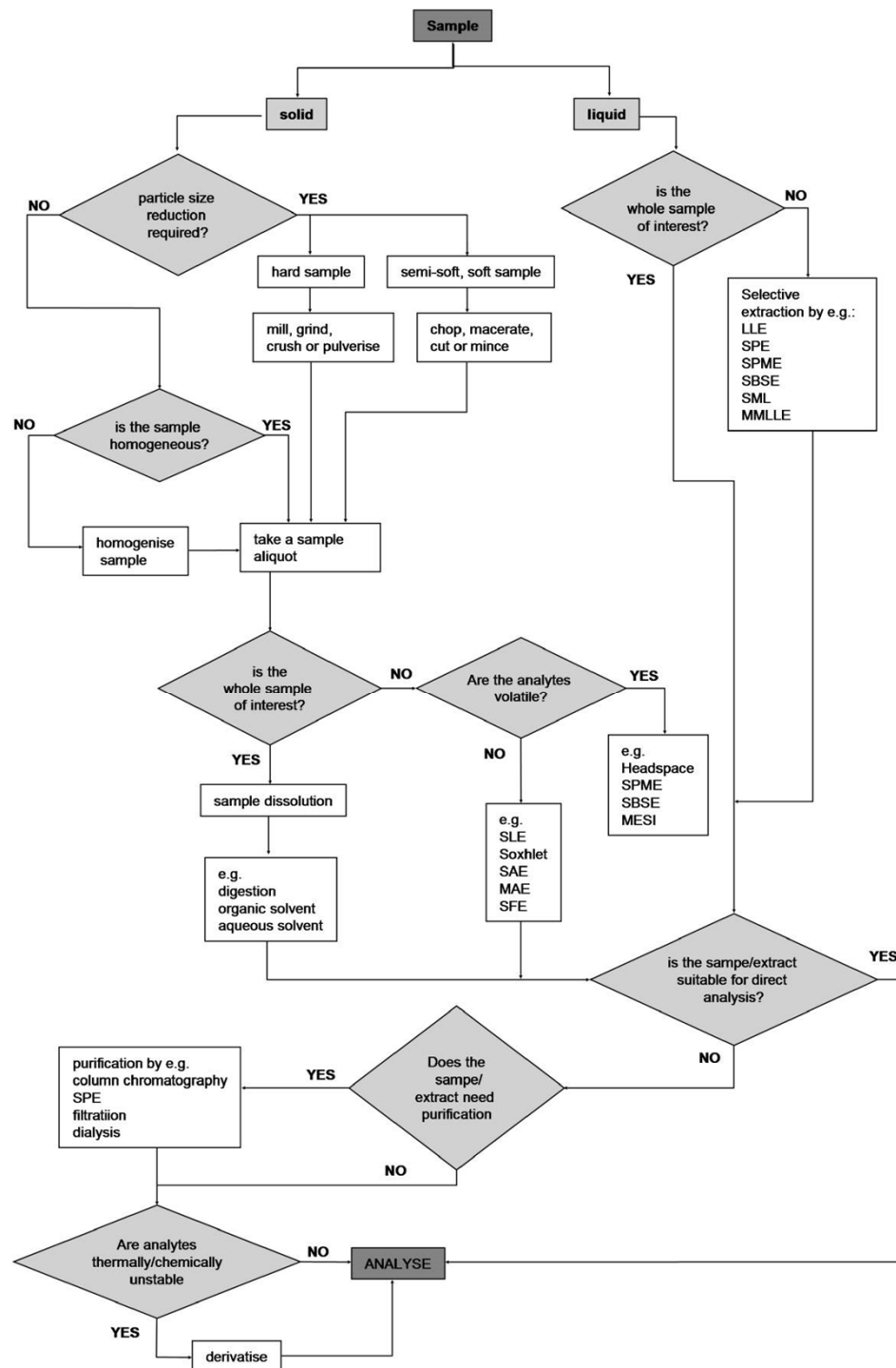
# Preparazione del campione

- Enfasi su mezzi di estrazione (impiegati per isolare, purificare, e preconcentrare)
- Focus su molecole organiche prima di analisi cromatografiche (o elettroforetiche)
- Scopo isolare analiti da matrice e migliorare selettività, rilevabilità, affidabilità, accuratezza, riproducibilità delle analisi
- Preparazione dipende da natura del campione e del metodo analitico. Matrici dei campioni organiche o inorganiche, solide liquide o gassose
- Spesso si inizia con omogeneizzazione e essiccazione

<b>Metodo</b>	<b>Matrice</b>	<b>Metodo</b>	<b>Matrice</b>
pesata	L/S	cambio di solvente	L
essiccazione	G/L/S	estrazione Soxhlet	S
filtrazione	L	estrazione liquido liquido	L
aggiustamento di pH	L	estrazione liquido solido	S
omogeneizzazione	S	estrazione in fase solida	L/G
macinazione	S	estrazione con fluido supercritico	S
precipitazione	BIO	tecniche in spazio di testa	G/L/S
mescolamento	G/L/S	estrazione assistita da microonde	L/S
digestione	S(BIO)	estrazione assistita da sonicazione	L/S
disgregazione cellulare	S/L(BIO)	dispersione della matrice in fase solida	L/S
dialisi	L	estrazione liquida pressurizzata	L/S
ultrafiltrazione	L	estrazione in corrente di vapore	L/S
miscelazione	S	micro-estrazione in fase solida	L/G
liofilizzazione	S/BIO	estrazioni con membrana	L/G
sonicazione	L/S	estrazione per assorbimento su barra agitatrice	L/G
arricchimento delle tracce	ALL	derivatizzazione	L/S
centrifugazione	L	concentrazione	ALL
diluizione	L	cromatografia su colonna	L(estratti)
		aggiunta di standard interno	ALL

Difficile dare linee guida generali per il pretrattamento. Un esempio di schema per campioni solidi e liquidi →

- Qualche acronimo
- Microporous Membrane Liquid-Liquid Extraction (MMLE)
- Membrane Extraction with a Sorbent Interface (MESI)
- Supported Liquid membrane (SLM) extraction
- Sulfolane Aromatics Extraction (SAE)



- GC può aver problemi con matrici complesse e per presenza di composti non volatili

*“pretrattamento”*

- HPLC e TLC in generale

*“meno esigenti, meno pretrattamento”*



**Perdite di analiti** possono verificarsi nei diversi stadi di procedure di pretrattamento del campione: in generale serve che le p.di p. 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 %):

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" ("*blank*" è un campione che non contiene l'analita di interesse) e misurandone la concentrazione nel campione dopo il pretrattamento.
- In aggiunta, *uno standard interno*, che è aggiunto al campione prima del pretrattamento del campione, può essere usato per la *correzione del recupero, sul campione reale*.

# 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.*

*Cause dell'effetto matrice* possono essere di tipo chimico o fisico:

- complessazione dell'analita
- formazioni di composti “mascheranti”
- variazione dell'attività
- alterazione del pH.....
- variazioni delle proprietà fisiche del mezzo .....

*Alcune esempi di matrici:*

- 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, ....)

- Quando **non** è disponibile un campione “blank” (matrice complessa non facile da trovare “incontaminata” o da “ricostruire” artificialmente) si può impiegare il **metodo delle aggiunte standard**.
- E' un metodo in cui si rileva prima il segnale analitico per il campione reale a concentrazione incognita; si aggiunge poi un quantitativo noto di sostanza standard, e si misura l'aumento del segnale. Si ripete l'aggiunta a concentrazioni diverse dello standard ed è poi possibile calcolare la quantità dell'analita nel campione incognito.
- E' un buon metodo per campioni liquidi, meno per solidi (interazioni dell'analita aggiunto son 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).
- Per valutare i recuperi (specie per solidi) ove possibile si dovrebbero usare **materiali di riferimento certificati** (CRM) che contengono concentrazioni degli analiti di interesse verificate da laboratori di riferimento.

L'aggiunta dello standard che è lo stesso analita è anche **chiamata, in inglese "spicking"**.

Nel metodo dell'**aggiunta standard**, si aggiunge una quantità nota di **analita standard** al campione incognito.

L'aumento dell'intensità del segnale rivela in che quantità l'analita era presente prima dell'aggiunta standard.

**Segnale del campione:** 

**Segnale totale (analita + standard):** 

**Segnale dello standard = Segnale totale - Segnale del campione** =  -  = 

$$Se_{std} : Conc_{std} = Se_{camp} : Conc_{camp}$$

$$Conc_{camp} = \frac{Conc_{std} \times Se_{camp}}{Se_{std}}$$

Vedremo in laboratorio anche il metodo delle aggiunte multiple

## Macinazione, omogeneizzazione ed essiccazione del campione per campioni solidi

- Omogeneizzazione ha lo scopo di raggiungere una distribuzione uniforme di tutti i composti nel campione. Inoltre l'estrazione è più efficace quando quando si diminuisce la dimensione delle particelle di campione.
- Mortaio e pestello o mulino/“*grinding mill*”.
- Per **composti termolabili** necessario raffreddare il campione.
- **Campioni elastici** devono essere congelati criogenicamente per renderli fragili.
- **Campioni biologici** spesso omogeneizzati con un *blender* (tipo “*minipimer*”)
- **Setacciature prima della macinazione**
- Rimozione dell'acqua o **essiccazione** fino a peso costante (se c. termicamente stabile e non ci sono volatili forno a 100-110° C; per campioni igroscopici (assorbono acqua dall'atmosfera) o reattivi, essiccatore a vuoto; per non perdere analiti volatili o per campioni non riscaldabili si usa liofilizzazione (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.

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 o a umido.

Spesso per analisi di cationi si usano acidi forti ( $\text{HNO}_3$ ,  $\text{HCl}$ ,  $\text{HF}$ ,  $\text{H}_3\text{PO}_4$ ,  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{H}_2\text{S}_2\text{O}_8$  o miscele). Per analisi di specie inorganiche in campioni biologici si impiegano digestioni acide e MWAD.

# Filtrazione e tecniche di pretrattamento del campione basate su membrane

Filtrazione è 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

## ***Materiali per le membrane***

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

Membrane per scambio ionico

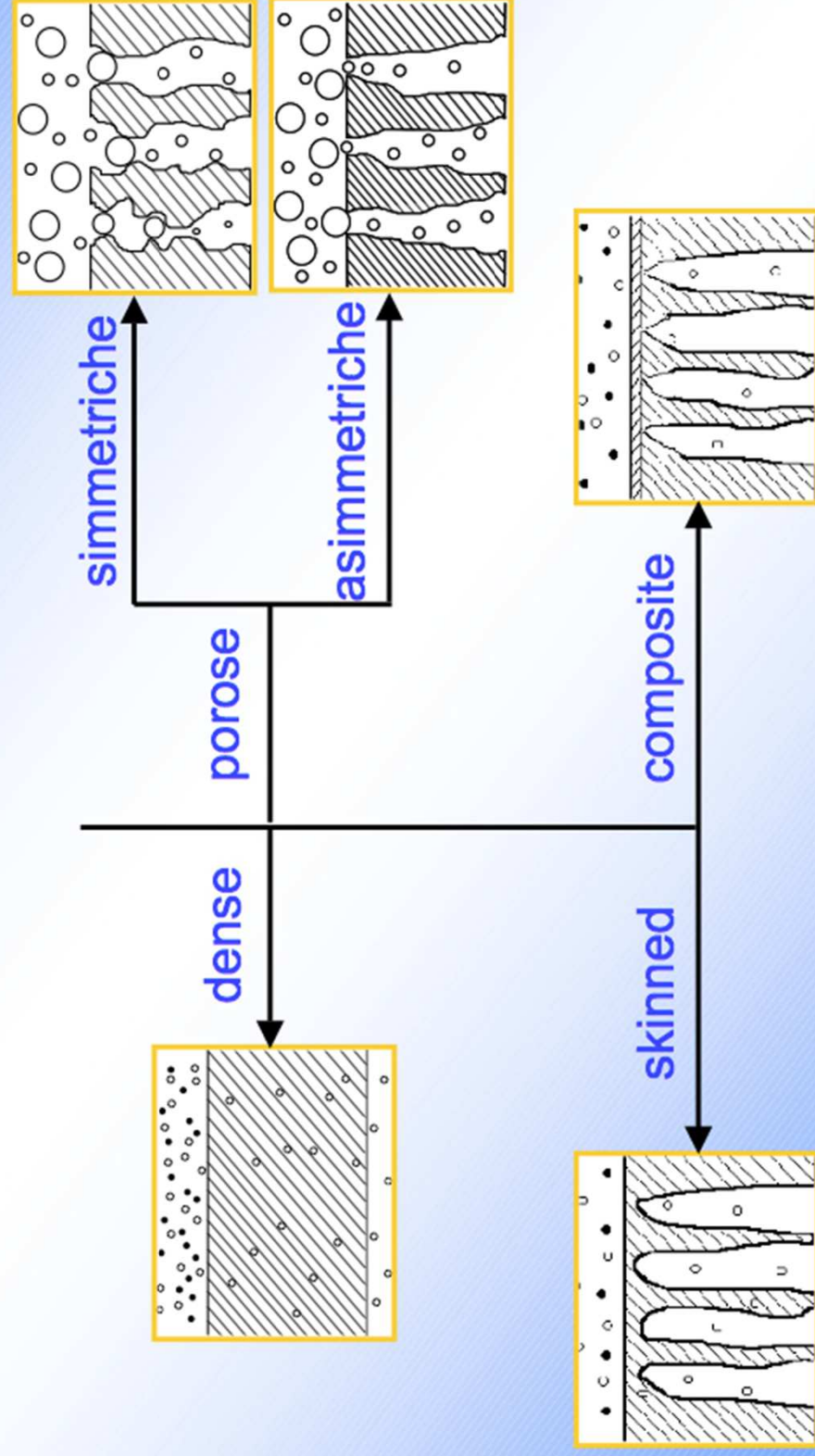
Membrane non porose

Dimensioni

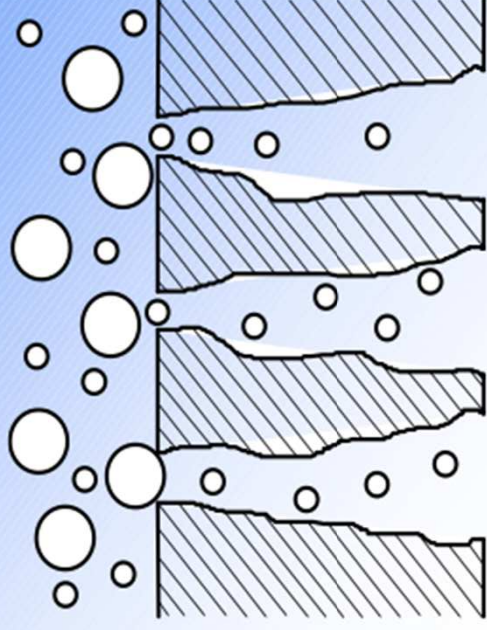
Da pochi a 100 nm, per estrazioni assistite da membrana intervallo da 0,1 a 10  $\mu\text{m}$



# Classificazione membrane

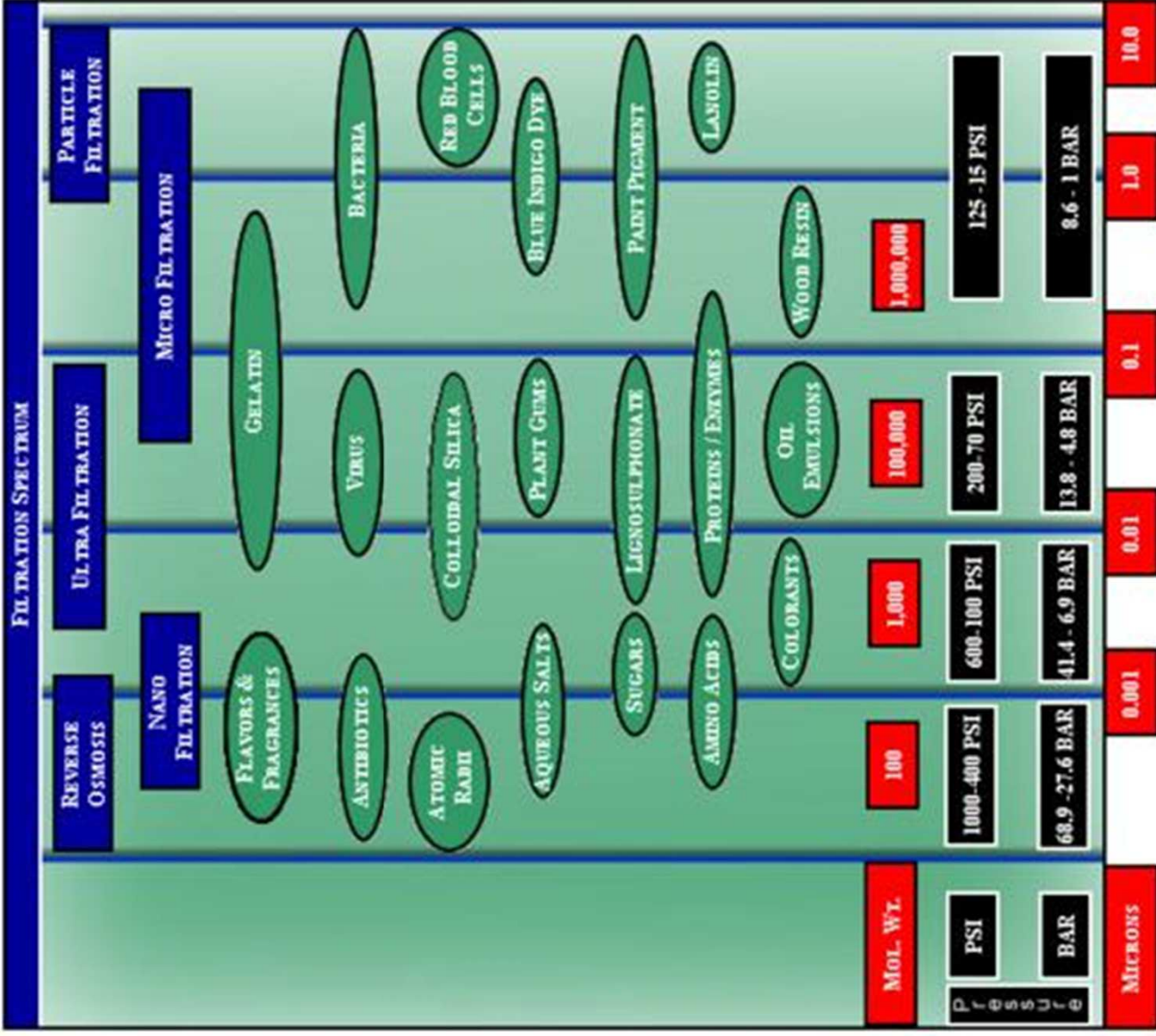


# Meccanismo di separazione



**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.





# Matrici filtranti

Es. per APM

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

