

# **CHIMICA ANALITICA II**

## **CON LABORATORIO**

**(AA 2016-17)**

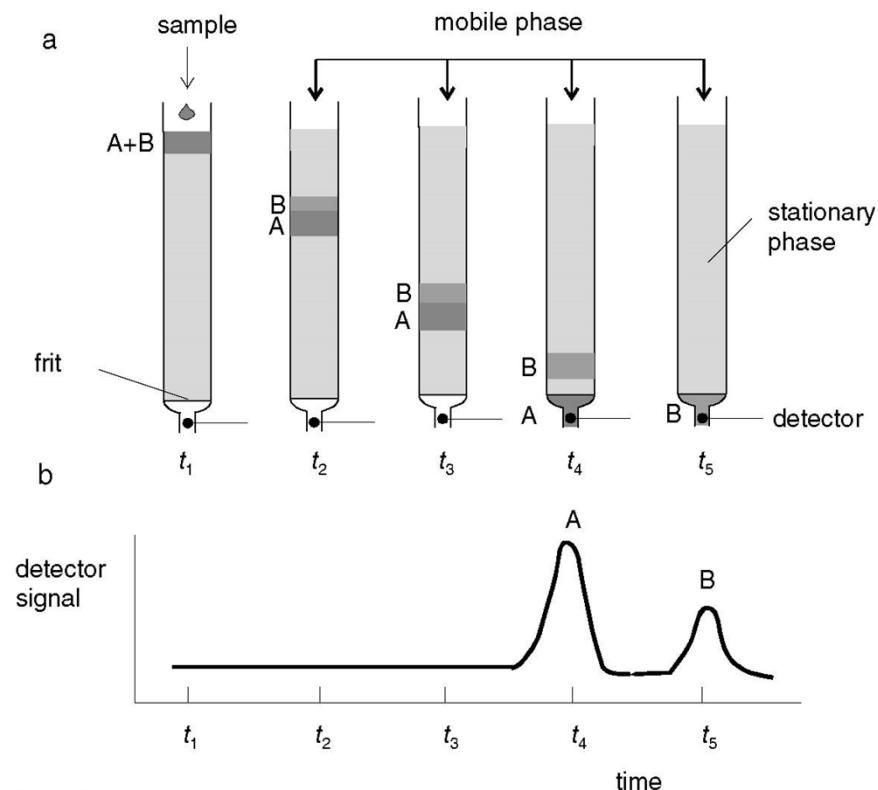
8 C.F.U. - Laurea triennale in Chimica

# Fondamenti teorici / cromatografia su colonna

## Lo sviluppo di un cromatogramma

Tecnica di eluizione  
(eluente è sinonimo  
di fase mobile).

Il campione sciolto nella f.m.  
è posto in testa alla colonna;  
Continuando ad aggiungere f.m.  
si procede all'eluizione finchè  
le sostanze sono separate e  
rilevate alla fine della colonna.



© 2006 Wiley-VCH, Weinheim  
Kellner / Analytical Chemistry  
ISBN: 3-527-30590-4 Fig-21-01

Altro testo

[http://chem.libretexts.org/Textbook\\_Maps/Analytical\\_Chemistry\\_Textbook\\_Maps/Map%3A\\_Analytical\\_Chemistry\\_2.0\\_\(Harvey\)/12\\_Chromatographic\\_and\\_Electrophoretic\\_Methods/12.2%3A\\_General\\_Theory\\_of\\_Column\\_Chromatography](http://chem.libretexts.org/Textbook_Maps/Analytical_Chemistry_Textbook_Maps/Map%3A_Analytical_Chemistry_2.0_(Harvey)/12_Chromatographic_and_Electrophoretic_Methods/12.2%3A_General_Theory_of_Column_Chromatography)

## **Lo sviluppo di un cromatogramma (2)**

Una volta che il campione è iniettato, i costituenti si distribuiscono tra la fase mobile e stazionaria. Se la f.m. è continuamente fornita come eluente, le sostanze si distribuiscono lungo la colonna tra nuova f.m. e la f.s. .

Composti trattenuti in modo più forte impiegano più tempo a essere separati di sostanze che interagiscono poco con la f.s..

Idealmente, le sostanze sono separate dopo un tempo di eluizione e rilevate individualmente alla fine della colonna.

Il segnale registrato come funzione del tempo di eluizione o del volume di eluizione (di f.m.) è chiamato **cromatogramma.**

## Lo sviluppo di un cromatogramma (3)

Se si seguono nel tempo le “zone” in delle sostanze si notano due effetti:

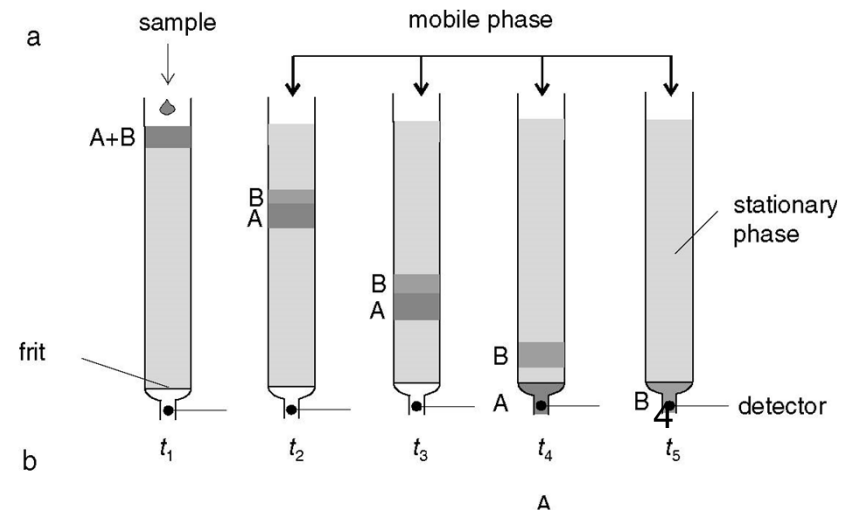
la distanza tra i picchi delle sostanze aumenta

I picchi si allargano, rendendo potenzialmente problematiche alcune separazioni.

Si può migliorare in via di principio una separazione se:

(a) Le velocità di migrazione sono alterate in maniera selettiva

(b) L'allargamento dei picchi è minimizzato



## Valori caratteristici di un cromatogramma

Velocità di migrazioni con cui particelle/molecole viaggiano lungo la colonna. Nel caso più semplice, il passaggio delle sostanze tra le fasi mobile (M) e stazionaria (s) è governato da un equilibrio di partizione. Il coeff. (o rapporto) di partizione K per una sostanza è

$$K = c_s / c_M$$

K non può essere dedotto direttamente dal cromatogramma. Il **tempo di ritenzione totale  $t_R$**  è leggibile direttamente.

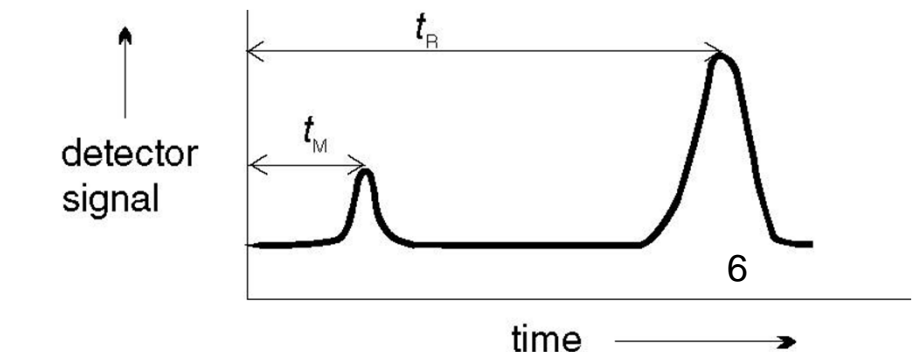
## Valori caratteristici di un cromatogramma (2)

- Il piccolo picco  $t_M$  è generato da un composto per nulla trattenuto; è il tempo che le molecole della fase mobile impiegano per attraversare la colonna (“tempo morto”). Il tempo morto include il tempo dall’effettivo punto di iniezione all’effettivo punto di rivelazione.
- La velocità lineare media per l’analita e per la f.m. è derivabile

$$v = L / t_R$$

$$u = L / t_M$$

L è la lunghezza della colonna



## Come mettere in relazione $t_R$ e coeff. di partizione?

La ritenzione di una sostanza corrisponde al suo tempo di residenza nella fase mobile (l'unica che si muove).

Costituenti non trattenuti stanno per tutto il tempo nella f.m., mentre sostanze che interagiscono con la fase stazionaria rimangono per solo una frazione del tempo nella fase mobile, in paragone alle sostanze non trattenute; questa porzione di tempo può essere descritta usando la relazione tra massa di analita nella f.m. e massa totale dell'analita nella colonna:

$$\begin{aligned}v &= u (c_M V_M) / (c_M V_M + c_S V_S) = u (1 / (1 + c_S V_S / c_M V_M)) \\ &= u (1 / (1 + K (V_S / V_M) ))\end{aligned}$$

$V_S$  e  $V_M$  sono parametri sperimentali misurabili

Si definisce **fattore di ritenzione**  $k$

$$k = K (V_s / V_M) \text{ o } k = K / \beta$$

Dove  $\beta$  è il **rappporto tra fasi**.

La relazione con i tempi di ritenzione è derivabile come:

$$v = u (1 / (1 + k))$$

$$L / t_R = L / t_M (1 / (1 + k))$$

riarrangiando è possibile dimostrare che

$$k = (t_R - t_M) / t_M = t_R' / t_M$$

**Dynamics of  
Chromatography:  
Principles and  
Theory**

Di J. Calvin Giddings

Il fattore di ritenzione può essere dedotto direttamente dal cromatogramma, sulla base dei tempi di ritenzione totali e dell'*hold up time* (tempo morto).

I fattori di ritenzione dovrebbero aver valori tra 1 e 5 ( $k < 1$  eluito troppo velocemente;  $> 20$  tempo di ritenzione intollerabilmente lungo)



**Il fattore di selettività o fattore di separazione** è una misura della separazione di due sostanze ed è indicato con  $\alpha$

$$\begin{aligned}\alpha &= K_B / K_A \\ &= k_B / k_A \\ &= (t_R')_B / (t_R')_A\end{aligned}$$

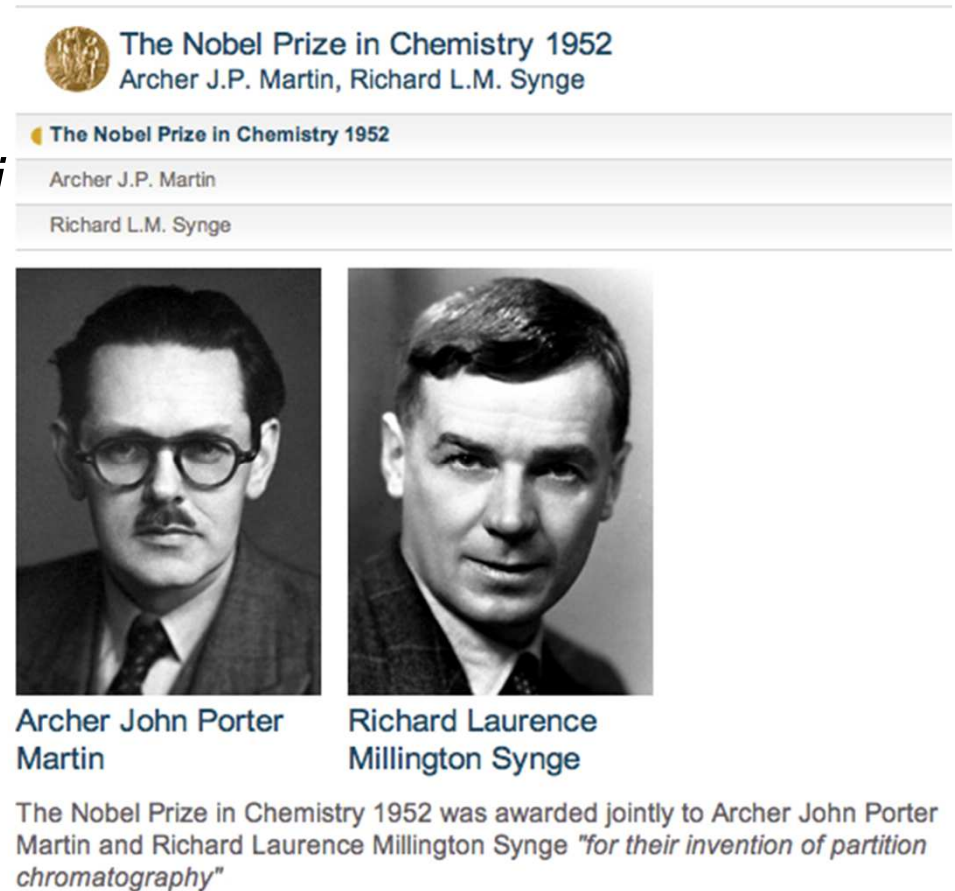
# Teoria della cromatografia

- Esaminiamo l'effetto di allargamento dei picchi lungo la colonna; ***l'ampiezza del picco è direttamente collegata all'efficienza di separazione o efficienza di colonna.***
- E' spiegata dalla "teoria classica" della cromatografia.

# Teoria classica

Trasposizione logica di un numero discreto di stadi di partizione in una colonna.

Martin e Synge hanno introdotto *l'altezza equivalente a un piatto teorico*  $H$  e il *numero dei piatti teorici*  $N$  (parametri di efficienza di una colonna). Secondo questa teoria, la colonna è immaginabile come una successione di piatti immaginari e *su ciascun piatto teorico si verifica un'equilibratura della distribuzione della sostanza tra f.m. e f.s.* Se la sostanza si muove attraverso la colonna, ciò significa un passaggio graduale da uno stadio di separazione al successivo.


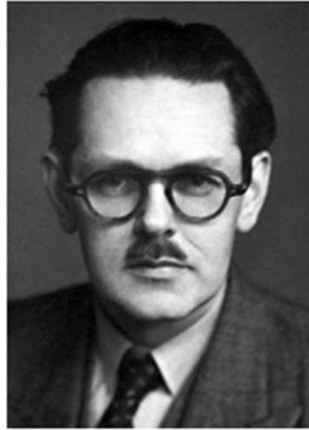


The Nobel Prize in Chemistry 1952  
Archer J.P. Martin, Richard L.M. Synge

The Nobel Prize in Chemistry 1952

Archer J.P. Martin

Richard L.M. Synge

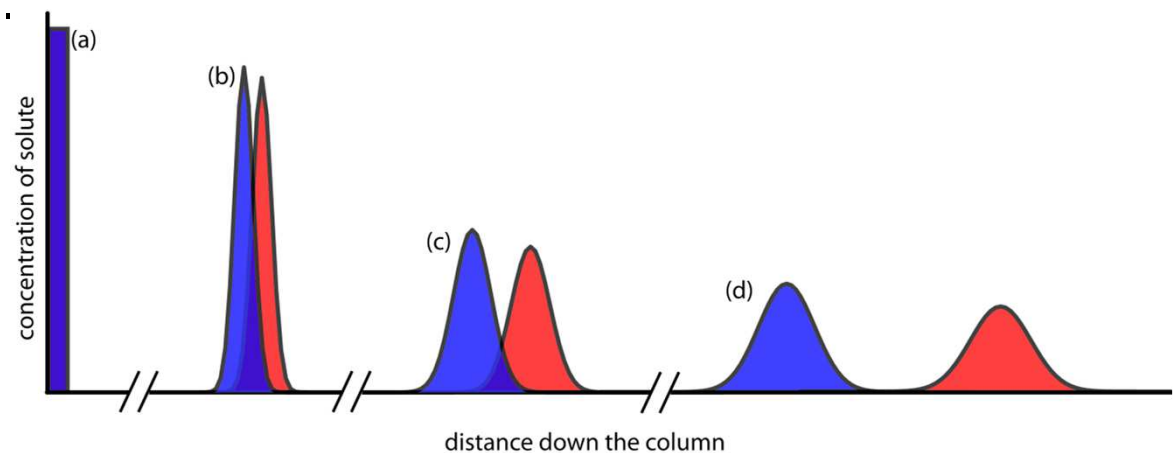


Archer John Porter Martin

Richard Laurence Millington Synge

The Nobel Prize in Chemistry 1952 was awarded jointly to Archer John Porter Martin and Richard Laurence Millington Synge "for their invention of partition chromatography"

**Efficienza della colonna** Supponiamo di iniettare un campione costituito da un unico componente. Al momento dell'iniezione del campione occupa una banda stretta di larghezza finita. Quando il campione passa attraverso la colonna, la larghezza di tale banda aumenta continuamente in un processo che chiamiamo **allargamento di banda**. L'efficienza della colonna fornisce una misura quantitativa dell'entità dell'allargamento di banda. Quando si inietta, il campione ha un profilo uniforme, o rettangolare di concentrazione in funzione della distanza lungo la colonna. Mentre scende nella colonna, la banda si allarga ed assume un profilo di concentrazione gaussiano.



Nel loro modello teorico originale di cromatografia, Martin e Synge divisero la colonna cromatografica in sezioni discrete - che chiamavano **piatti teorici** – in cui vi è una distribuzione di equilibrio del soluto tra la fase stazionaria e fase mobile. Descrissero l'efficienza della colonna in termini di numero di piatti teorici,  $N$ , con  $N = L / H$  in cui  $L$  è la lunghezza della colonna e  $H$  è l'altezza di un piatto teorico. L'efficienza della colonna migliora e picchi cromatografici divengono più stretti, all'aumentare dei piatti teorici.

La distribuzione Normale è definita dall'equazione:

$$f_X(x) = \frac{1}{\sqrt{2\pi\sigma^2}} \exp\left[-\frac{1}{2}\left(\frac{x-\mu}{\sigma}\right)^2\right]$$

con *variabile casuale*

$$x \in ]-\infty ; +\infty [$$

e *parametri*

$$\mu = \text{media} \in ]-\infty ; +\infty [$$

$$\sigma^2 = \text{varianza} \in ]0 ; +\infty [;$$

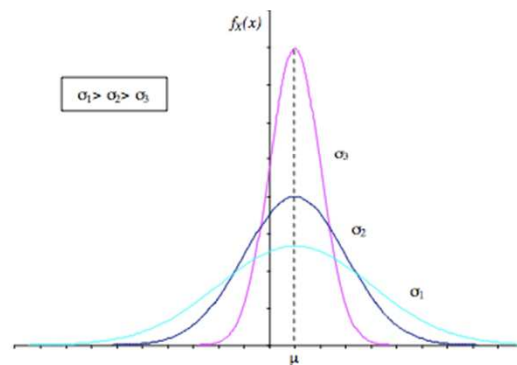


Figura 1 - Distribuzione di una variabile casuale Normale con media fissa e differenti varianze

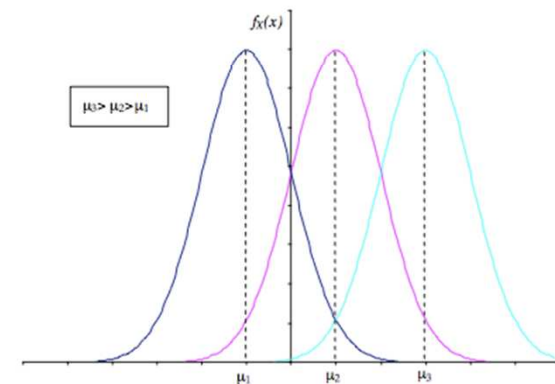


Figura 2 - Distribuzione di una variabile casuale Normale con varianza fissa e differenti medie

Sulla  $f_X(x)$  Normale si possono fare alcune considerazioni:

- 1)  $f_X(x) \geq 0 \forall x$ ;
- 2)  $\int_{-\infty}^{+\infty} f_X(x) dx = 1$  ;
- 3)  $f_X(x)$  è tanto più grande quanto più è piccolo l'esponente, e raggiunge il suo massimo per  $x = \mu$  (moda, media e mediana coincidono);
- 4)  $f_X(x)$  possiede due flessi, cioè due punti in cui cambia concavità, in  $\mu - \sigma$  e  $\mu + \sigma$ ;
- 5)  $f_X(x)$  è simmetrica intorno ad  $x = \mu$ , cioè qualsiasi sia  $x$ ,  $f(\mu - x) = f(\mu + x)$ ;

In particolare, come illustrato delle figure 1 e 2 e nell'esempio successivo,

- $\mu$  determina la posizione della curva sull'asse delle ascisse
- $\sigma^2$  determina la maggiore o minore concentrazione della curva intorno a  $\mu$

Se un fenomeno si distribuisce secondo una distribuzione Normale si ha che:

- circa il 68% di tutti i valori cade nell'intervallo di  $+e - 1$  deviazione standard dalla media

$$P[\mu - \sigma \leq x \leq \mu + \sigma] = 0.6826$$

- circa il 95% dei valori cade nell'intervallo di  $+e - 2$  deviazioni standard dalla media

$$P[\mu - 2\sigma \leq x \leq \mu + 2\sigma] = 0.9544$$

- e per 3 sigma ...

$$P[\mu - 3\sigma \leq x \leq \mu + 3\sigma] = 0.9974.$$

<http://www.camilab.unical.it/didattica/statistica/DistrNormale.pdf>

Se assumiamo che un picco cromatografico abbia un profilo gaussiano, allora l'estensione della banda allargamento è in relazione alla varianza o deviazione standard del picco. L'**altezza di un piatto teorico** (anche HETP) si definisce come varianza per unità di lunghezza della colonna

$$H = \sigma^2 / L$$

in cui la deviazione standard,  $\sigma$ , ha unità di lunghezza. Poiché i tempi di ritenzione e larghezze del picco di solito sono misurati in secondi o minuti, è più conveniente per esprimere la deviazione standard in unità di tempo,  $\sigma_t$ , dividendo  $\sigma$  per la velocità lineare media del soluto,  $v$ .

$$\sigma_t = \frac{\sigma}{v} = \frac{\sigma t_r}{L}$$

La velocità lineare media del soluto è la distanza percorsa,  $L$ , divisa per il suo tempo di ritenzione,  $t_r$ . Per una forma di picco gaussiana, la larghezza alla base,  $w$ , è quattro volte la sua deviazione standard,  $\sigma_t$ .

$$w = 4 \sigma_t$$

L'equazione può essere riformulata definendo l'altezza di un piatto teorico in termini di parametri cromatografici facilmente misurabili

$$H = Lw^2 / 16 t_r^2$$

# Teoria classica (4)

$$H = \sigma_t^2 L / t_R^2$$

$$W_b = 4\sigma_t \quad \sigma_t = W_b / 4$$

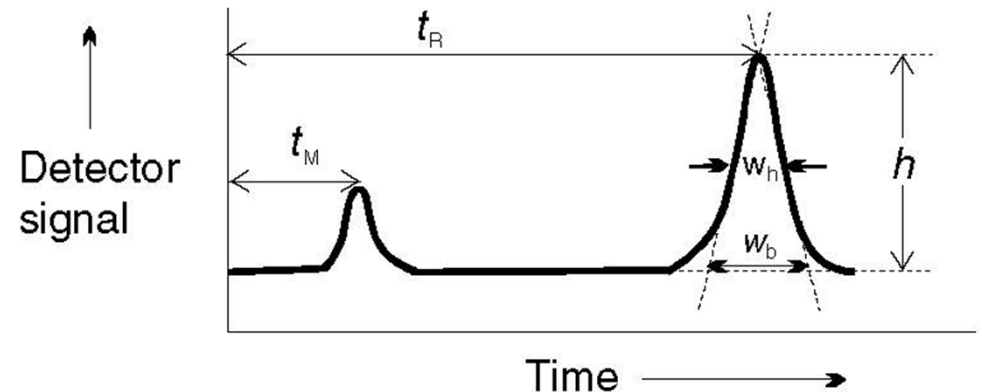
$$H = (W_b^2 / 16) L / t_R^2$$

e quindi:  $N = L / H$

$$N = 16 ( t_R / W_b )^2$$

Quindi il numero di piatti teorici può essere determinato da un cromatogramma, misurando il tempo di ritenzione e l'ampiezza di base di un picco.

Risultati migliori si ottengono impiegando **l'ampiezza al semi-massimo**:  $N = 5.54 ( t_R / W_h )^2$



© 2006 Wiley-VCH, Weinheim  
Kellner / Analytical Chemistry  
ISBN: 3-527-30590-4 Fig-21-03

Queste relazioni si impiegano per valutare le separazioni cromatografiche, ma **la teoria dei piatti è un'approssimazione dei processi che effettivamente avvengono in colonna**: in realtà si verificano difficilmente stadi di equilibrio separati, poiché la f.m. è in movimento. Quando si comparano colonne usando la teoria dei piatti e  $N$ , dobbiamo riferirci sempre ad una stessa sostanza.

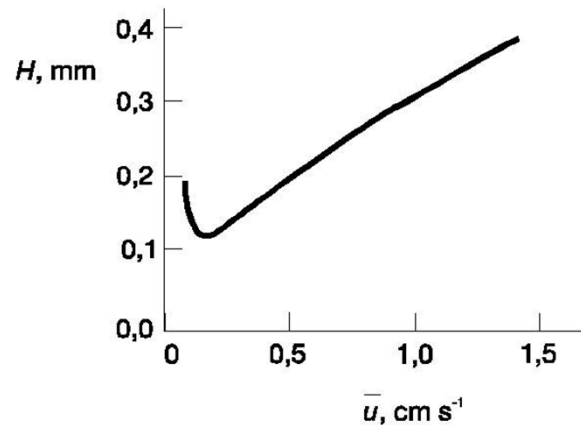


# La teoria cinetica

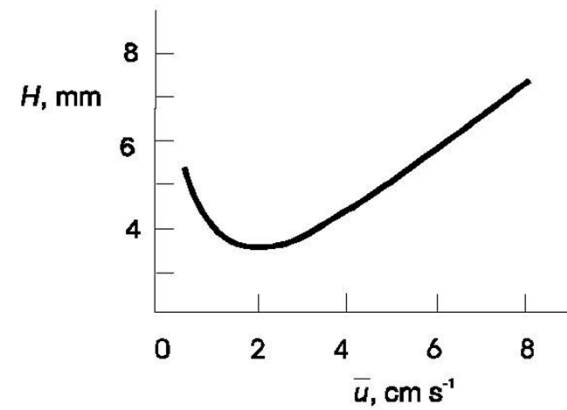
- L'ampliamento dei picchi deriva da un *effetto cinetico che si manifesta a seguito della velocità finita a cui decorre il processo di trasferimento di massa durante la migrazione dell'analita lungo la colonna*. L'entità di questi effetti dipende dalla lunghezza dei possibili passaggi tra f.m. e f.s. ed è direttamente proporzionale alla velocità di flusso della f.m..
- Per descrivere questo effetto bisogna investigare la dipendenza di H dalla velocità (di flusso) lineare ( $\text{cm s}^{-1}$ ).

# La teoria cinetica (2)

A Liquid chromatography



B Gas chromatography



- Variabili importanti per l'efficienza delle colonne sono:

Velocità lineare della fase mobile

$u$

Coefficiente di diffusione nella f.m.

$D_M$

Coefficiente di diffusione nella f.s.

$D_S$

Diametro del materiale di impaccamento

$d_D$

Spessore del rivestimento liquido della f.s.

$d_f$

Velocità di desorbimento dell'analita

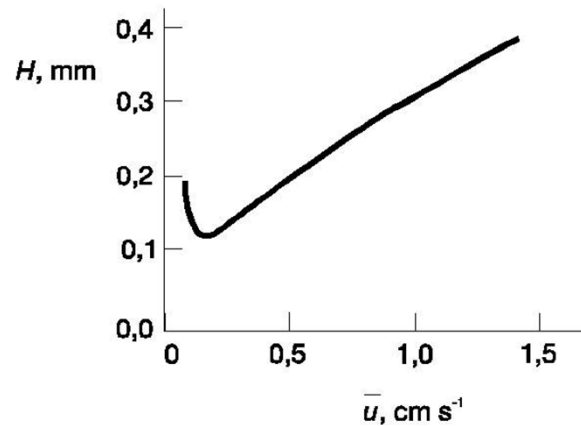
$t_d$

Diametro della colonna

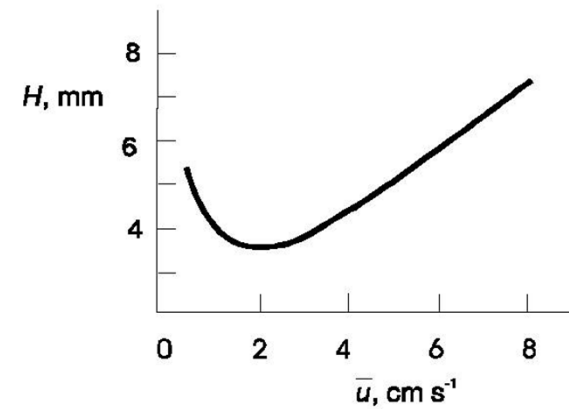
$d_c$

# La teoria cinetica (2)

A Liquid chromatography



B Gas chromatography



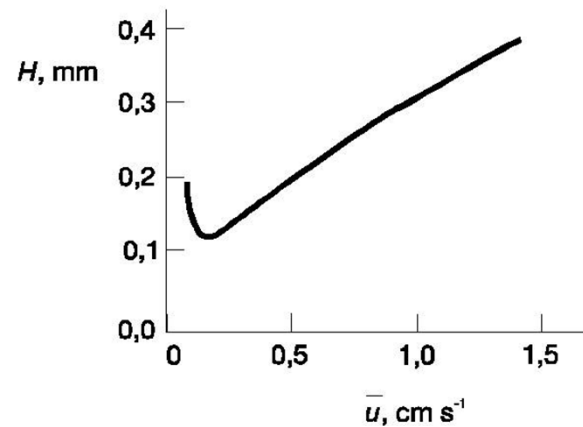
LC min H per basse u

In genere sembra che H per LC sia minore che per GC, ma  $L$  per GC è  $\gg$ .

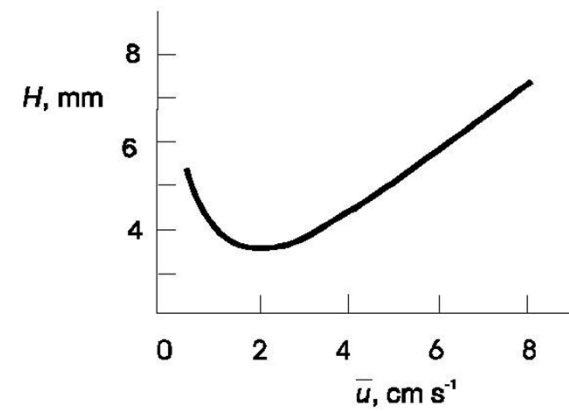
$L$  per LC arriva fino a qualche decina di cm (serve  $P$  elevata per spingere miscela attraverso f.s. impaccata), per GC  $L$  arriva a 100 m

# La teoria cinetica (3)

A Liquid chromatography

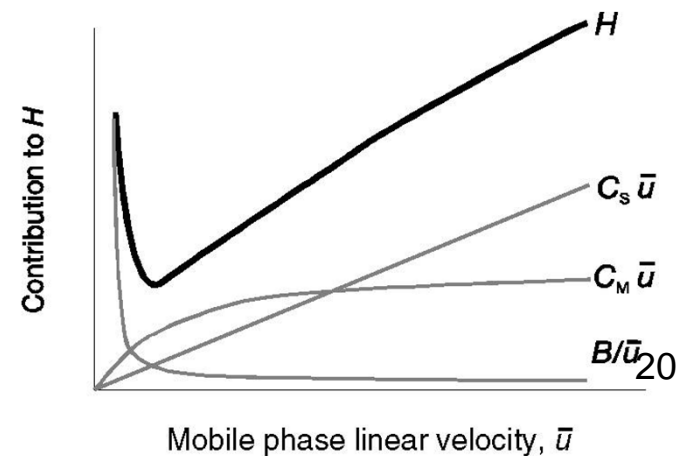


B Gas chromatography



Equazione di Van Deemter

$$H = A + B / u + c u$$

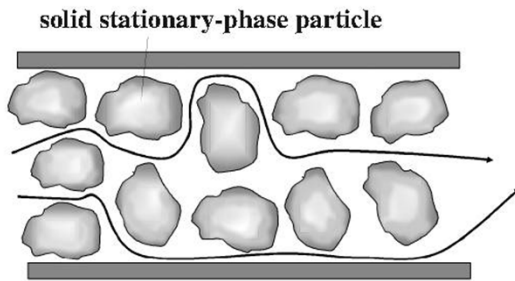


# La teoria cinetica (4)

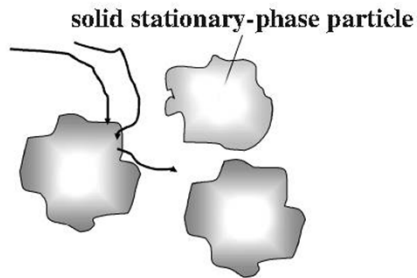
Equazione di Van Deemter

$$H = A + B / u + c u$$

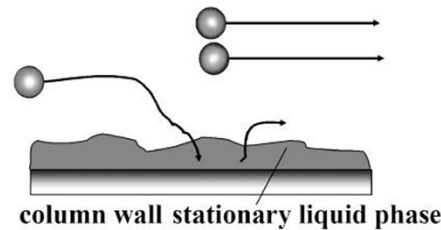
A



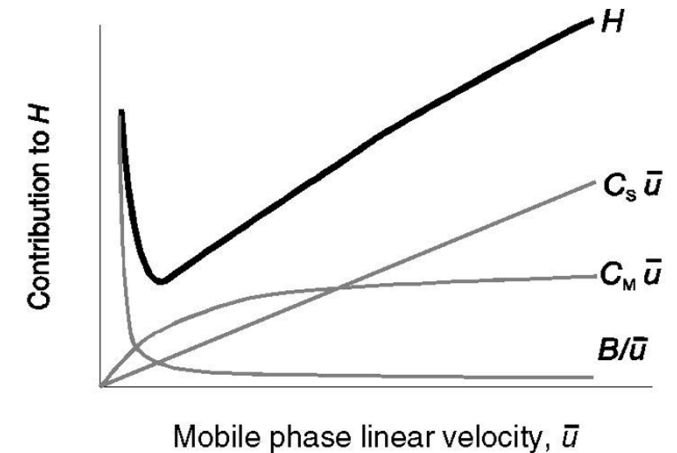
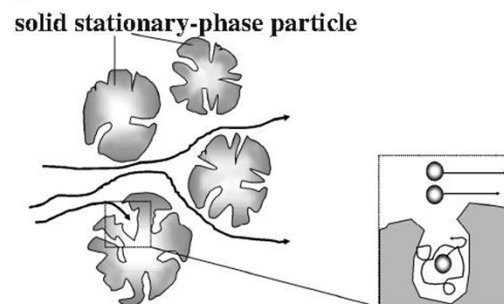
B



C



D



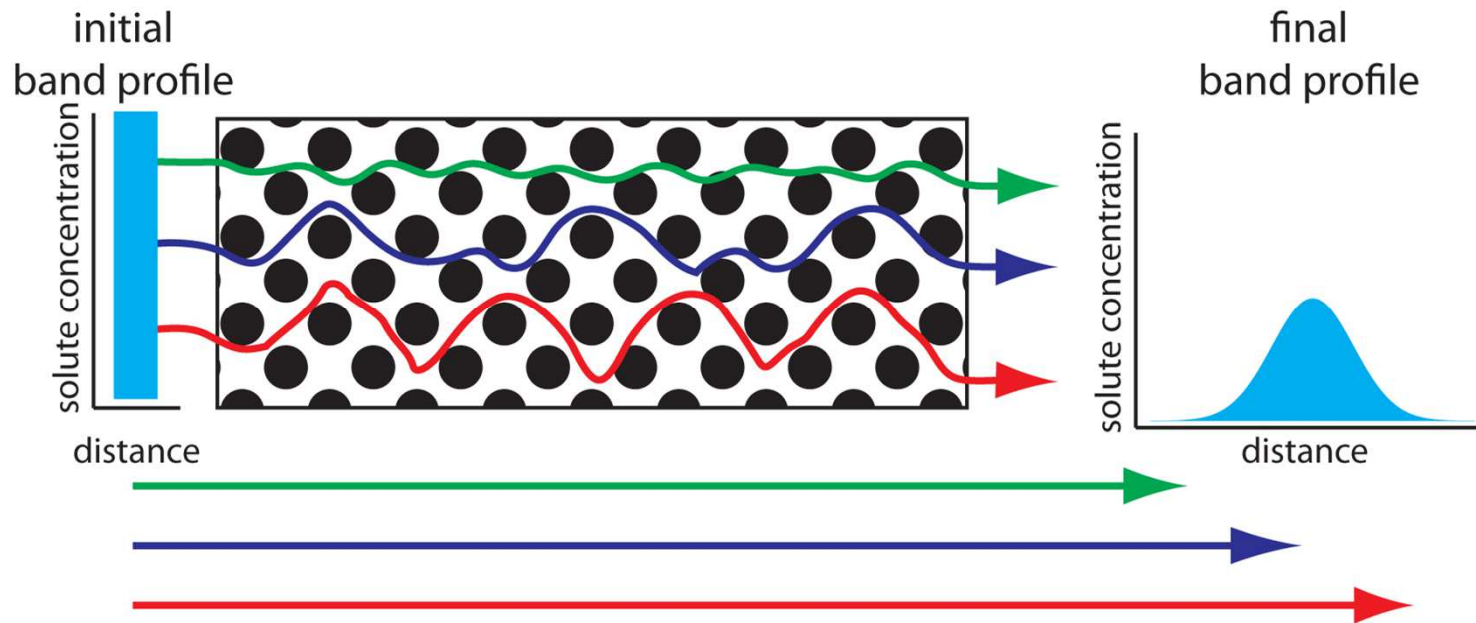
© 2006 Wiley-VCH, Weinheim  
Kellner / Analytical Chemistry  
ISBN: 3-527-30590-4 Fig-21-06

A diffusione  
turbolenta

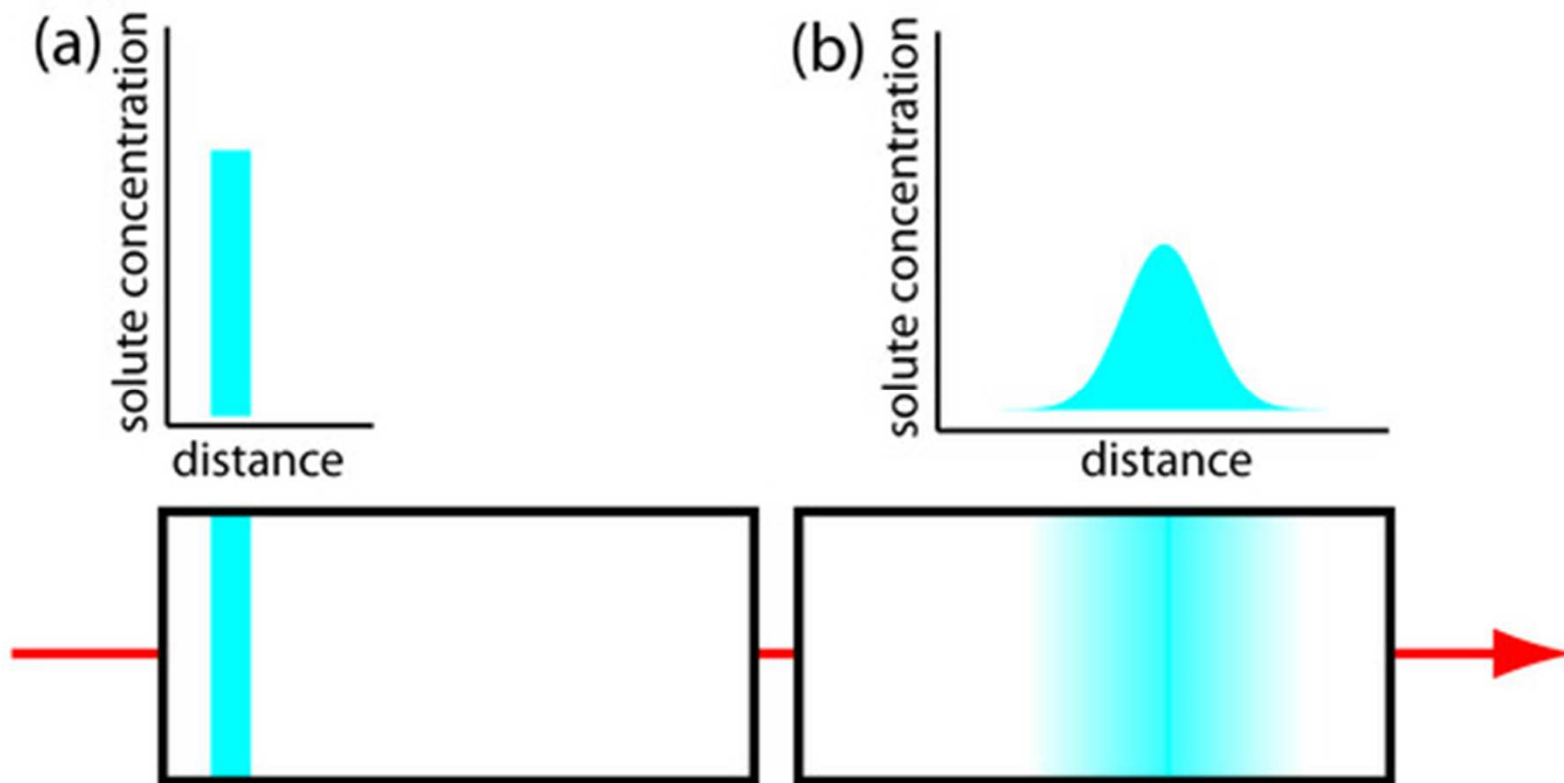
B trasferimento di  
massa nella f.s in LC

C trasferimento di  
massa nella f.s in GC

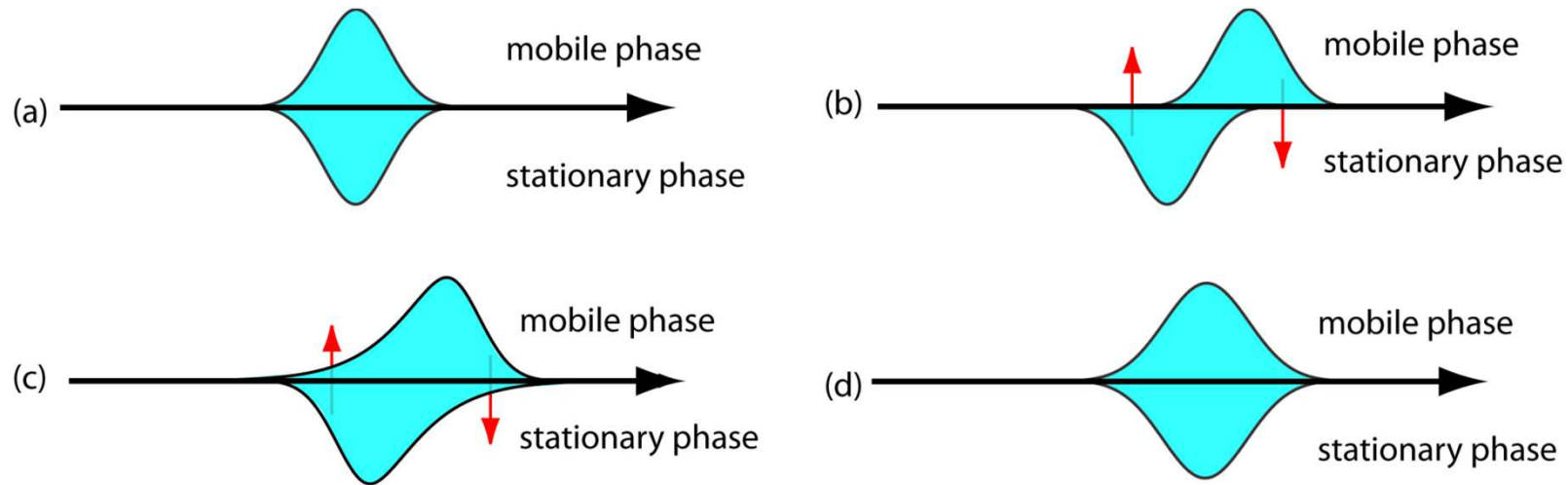
D trasferimento<sub>2</sub> di  
massa nella f.m.



The effect of multiple paths on a solute's band broadening.



The effect of longitudinal diffusion on a solute's band broadening.



**Effect of mass transfer on band broadening:** (a) Ideal equilibrium Gaussian profiles for the solute in the mobile phase and in the stationary phase. (b, c) If we allow the solute's band to move a small distance down the column, an equilibrium between the two phases no longer exists. The red arrows show the movement of solute—what we call the mass transfer of solute—from the stationary phase to the mobile phase, and from the mobile phase to the stationary phase. (d) Once equilibrium is reestablished, the solute's band is now broader.



# Modello cinetico $H = C_M u + C_S u + B / u$

Influenze cinetiche sull'allargamento dei picchi

influenza	
Diffusione longitudinale	$B/u = (2k_D D_M) / u$
Trasferimento di massa da e verso la f.s. liquida	$C_S u = q k d_f^2 u / (1+k)^2 D_S$
Trasferimento di massa da e verso la f.s. solida	$C_S u = 2 t_d k u / (1+k)^2$
Trasferimento di massa nella fase mobile	$C_M u = f(d_c^2, d_p^2) u / D_M$

$k_D, q$  – costanti ;  $f$  indica una dipendenza funzionale

- Variabili importanti per l'efficienza delle colonne sono:

Velocità lineare della fase mobile	$u$
Coefficiente di diffusione nella f.m.	$D_M$
Coefficiente di diffusione nella f.s.	$D_S$
Diametro del materiale di impaccamento	$d_D$
Spessore del rivestimento liquido della f.s.	$d_f$
Velocità di desorbimento dell'analita	$t_d$
Diametro della colonna	$d_c$

Durante la migrazione nella colonna, le molecole di campione si trasferiscono continuamente e in modo reversibile dalla f.m. alla f.s.;

Le molecole devono raggiungere l'interfase e poi dare luogo al trasferimento. Devono attraversare la f.m. fino all'interfase ed il tempo richiesto dipende dalla loro posizione. Questa componente della dispersione dei tempi di ritenzione di una molecola è descritta come **“trasferimento di massa nella f.m.,  $C_M u$ ”**. In limitate condizioni corrisponde alla diffusione turbolenta dell'eqz. di van Deemter. Questo termine è inversamente proporzionale al coeff. di diffusione *(Nel fenomeno fisico della diffusione molecolare il coefficiente di diffusione ( $D$ ) è una grandezza proporzionale alla velocità con cui una molecola diffonde può muoversi nel mezzo di diffusione. Sarà quindi: (1) direttamente proporzionale alla energia cinetica della particella; (2) inversamente proporzionale all'ingombro della particella (e quindi al suo raggio); (3) inversamente proporzionale alla viscosità del mezzo)* e direttamente dipendente dalle diametro delle particelle del materiale di impaccamento e dal diametro della colonna (maggiore volume di F.M. nella colonna).

In LC la presenza di sacche di stagnazione di f.m. intrappolate nei pori e canali della f.s. aumenta l'allargamento della banda (le molecole si muovono per diffusione dentro e fuori da questi pori)

**Il termine  $C_s u$  descrive il trasferimento di massa verso e dalla f.s., e si devono distinguere il caso della f.s. liquida o solida.**

Per la f.s. liquida domina l'equilibrio di distribuzione; quando una molecola di analita è trattenuta nella f.s., il movimento di quella molecola attraverso la colonna è rallentato, mentre le altre si muovono avanti con la f.m. L'effetto aumenta all'aumentare dello spessore della f.s. liquida e con il diminuire del coefficiente di diffusione dell'analita nella f.s. .

Per la f.s. solida  $C_s$  dipende dalle velocità dei processi di adsorbimento e desorbimento.

# Modello cinetico $H = C_M u + B / u + C_S u$

Influenze cinetiche sull'allargamento dei picchi

influenza	
Diffusione longitudinale	$B/u = (2k_D D_M) / u$
Trasferimento di massa da e verso la f.s. liquida	$C_S u = q k d_f^2 u / (1+k)^2 D_S$
Trasferimento di massa da e verso la f.s. solida	$C_S u = 2 t_d k u / (1+k)^2$
Trasferimento di massa nella fase mobile	$C_M u = f(d_c^2, d_p^2) u / D_M$

- Variabili importanti per l'efficienza delle colonne sono:

Velocità lineare della fase mobile

$u$

Coefficiente di diffusione nella f.m.

$D_M$

Coefficiente di diffusione nella f.s.

$D_S$

Diametro del materiale di impaccamento

$d_D$

Spessore del rivestimento liquido della f.s.

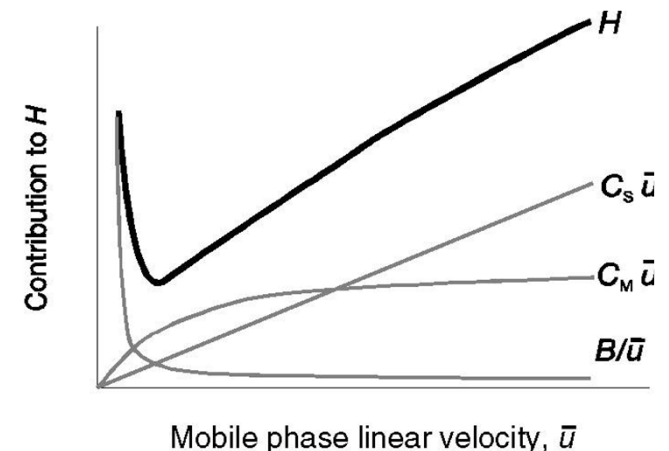
$d_f$

Velocità di desorbimento dell'analita

$t_d$

Diametro della colonna

$d_c$



L'obiettivo nelle cromatografie è quello di **raggiungere separazioni efficaci in un breve tempo di analisi**; ciò significa che si persegue una bassa altezza del piatto  $H$ , e che la funzione  $H(u)$  dovrebbe svilupparsi con piccole variazioni, così che si possano avere alte velocità di separazione senza perdere efficienza.ù

Basse  $H_{\min}$  e curve  $H(u)$  con piccole variazioni si possono ottenere:

- 1) *Con f.s. solida con piccole particelle o con rivestimento sottile di liquido immobilizzato*
- 2) *Con un impaccamento omogeneo di f.s. usando materiale con una distribuzione dimensionale stretta*
- 3) *Con colonna dal piccolo diametro (colonne sempre più strette)*
- 4) *con coefficienti di diffusione elevati nella fase stazionaria e bassi nella f.m. (in GC i coeff. nella f.m. si abbassano significativamente abbassando  $T$ )*

Poiché i coeff. di diffusione dipendono dalle dimensioni molecolari, l'allargamento di un picco dipende dalla massa molare relativa (piccole molecole, buona efficienza).