

CHIMICA ANALITICA II

CON LABORATORIO

(AA 2016-17)

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

Cromatografia liquida

Fase mobile liquida

Nella LC classica (Tswett, 1906) colonne di vetro con diametro interno tra 1 e 5 cm, $L = 50 - 500 \text{ cm}$

Per garantire velocità di flusso pratiche (fino a 1 ml/min) le particelle della f.s. si usavano *particelle di 150-200 μm* (per particelle di dim. inferiori le separazioni eran molto lente).

Aumento di velocità con pompe o applicazione di vuoto non migliorava le prestazioni (aumento di velocità lineare implica aumento H).

Bisognava ridurre le dimensioni del materiale della f.s., ma sarebbe servita maggior pressione.

Cromatografia liquida

Alla fine degli anni '60 del secolo scorso: particelle 3-10 μm e nuovi moduli strumentali -> High Performance Liquid Chromatography (HPLC).

Principi di separazione e prestazioni:

- *distribuzione o partizione*
- *adsorbimento*
- *scambio ionico*
- *esclusione dimensionale*

Il meccanismo di **distribuzione o partizione** si basa su forze di dispersione che si hanno tra molecole senza dipoli permanenti o indotti

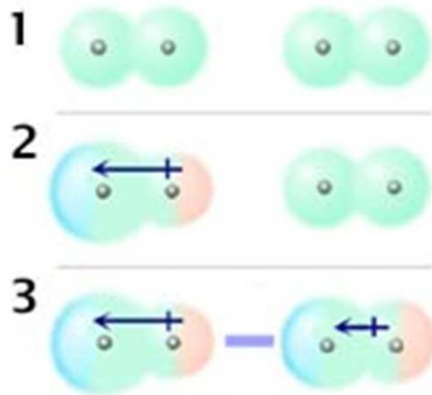
L'**adsorbimento** si basa su interazioni polari che sorgono da forze elettriche tra cariche localizzate, come dipoli permanenti o indotti.

Lo **scambio ionico** coinvolge cariche permanenti positive o negative su una molecola, quindi ioni.

L'**esclusione dimensionale** si basa semplicemente su effetto di setaccio molecolare.

DISPERSION FORCES

Dispersion forces arise from the temporary variations in electron density around atoms and molecules. At any instant the electron distribution around an atom or molecule will likely produce a dipole moment, which can induce a (temporary) dipole moment in any nearby molecules. It is the Polarizability of the molecules, which determines the size of the induced dipole moments and thus the strength of the dispersion forces.



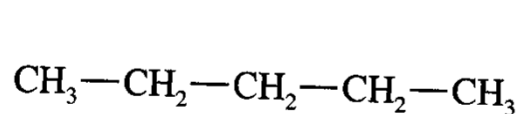
Molecules containing large atoms (e.g. bromine or iodine) have large polarizability and so give rise to large dispersion forces. This explains the increasing melting and boiling points of the halogens going down that group of the periodic table.

DISPERSION FORCES - SUMMARY

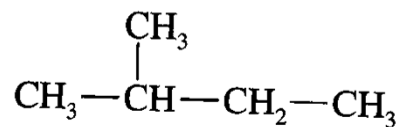
**Polarizability- High Polarizability = High intermolecular attraction
(larger atoms)**

**Molecular Size- Larger Size = More surface area and greater
intermolecular attraction**

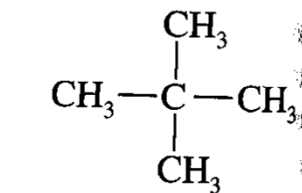
**Molecular Shape - More branching or compact shape has less
surface area and lower intermolecular attraction.**



n-pentane, bp = 36°C

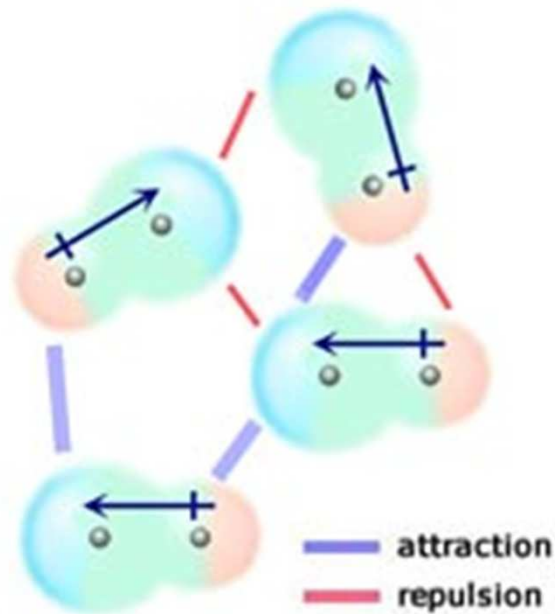


isopentane, bp = 28°C



neopentane, bp = 10°C

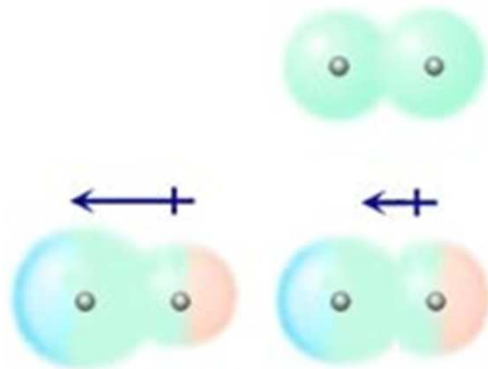
DIPOLE - DIPOLE



If two neutral molecules, each having a permanent dipole moment, come together such that their oppositely charged ends align, they will be attracted to each other.

INDUCED DIPOLE

A polar molecule (lower left) carries with it an electric field and this can induce a dipole moment in a nearby non-polar molecule (lower right). This will cause the attraction between the molecules.



This type of force is responsible for the solubility of oxygen (a non-polar molecule) in water (polar).

“sottoclassi della LC”

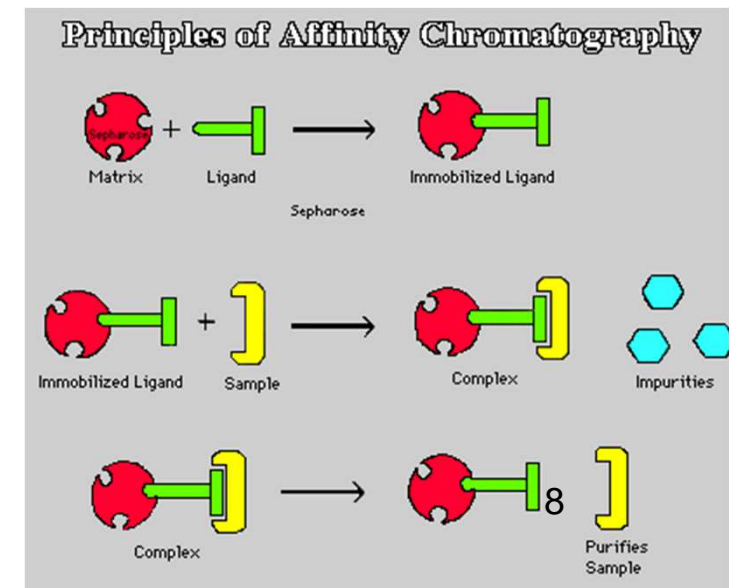
tecnica

cromatografia di adsorbimento
cromatografia in fase normale, NPLC
cromatografia in fase inversa, RPLC
cromatografia di scambio ionico, IEC
cromatografia di esclusione dimensionale, SEC
cromatografia di affinità

meccanismo principale di separazione

adsorbimento
distribuzione/adsorbimento
distribuzione
ionico
esclusione dimensionale
affinità

Cromatografia di affinità: basata tra specifiche interazioni tra molecola presente nella f.m. e molecola attaccata alla f.s. (es. anticorpo legato su f.s. interagisce con specifica proteina nel soluto; recettore e legante; enzima e substrato)



Prima tecnica era basata su adsorbimento, LSC. Solido adsorbente è materiale polare (silice o allumina), l'eluente è un solvente non polare. Serve a separare composti, isomeri o classi di composti non polari (es. idrocarburi alifatici o alcol alifatici).

I principi della partizione sono importanti per la NPLC e la RPLC.

Nelle NPLC e RPLC si usano fasi stazionarie chimicamente legate e queste cromatografie si chiamano "a fasi legate".

Oggigiorno la LC più diffusa è la RPLC in cui la fase stazionaria è meno polare del solvente (meccanismo di partizione degli analiti tra f.m. e f.s.)

IEC e IC (HPLC)

Gli eluenti possono essere organici o acquosi

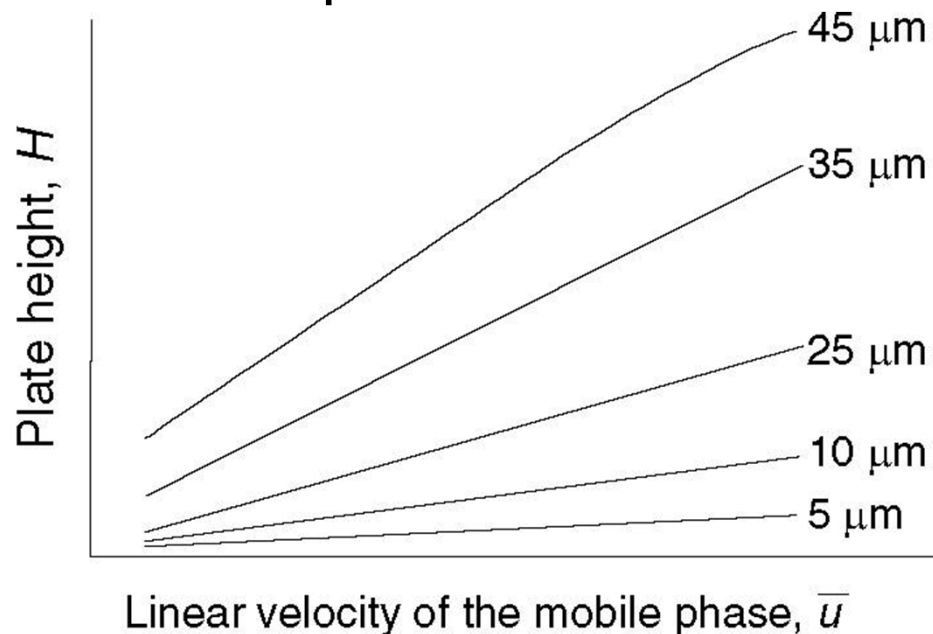
Come regola raramente i meccanismi di separazione agiscono in modo isolato, ma piuttosto simultaneamente, pur con grado diverso.

La scelta della tecnica dipende dalla matrice del campione e dalle componenti da separare:

- per molecole con MM <2000 g/mol, insolubili in acqua, struttura aromatica o alifatica, NPLC o RPLC;
- per molecole idrofile o cariche vanno bene la RP, IEC;
- SEC per molecole MM >2000 g/mol

Dimensioni delle particelle del materiale di supporto

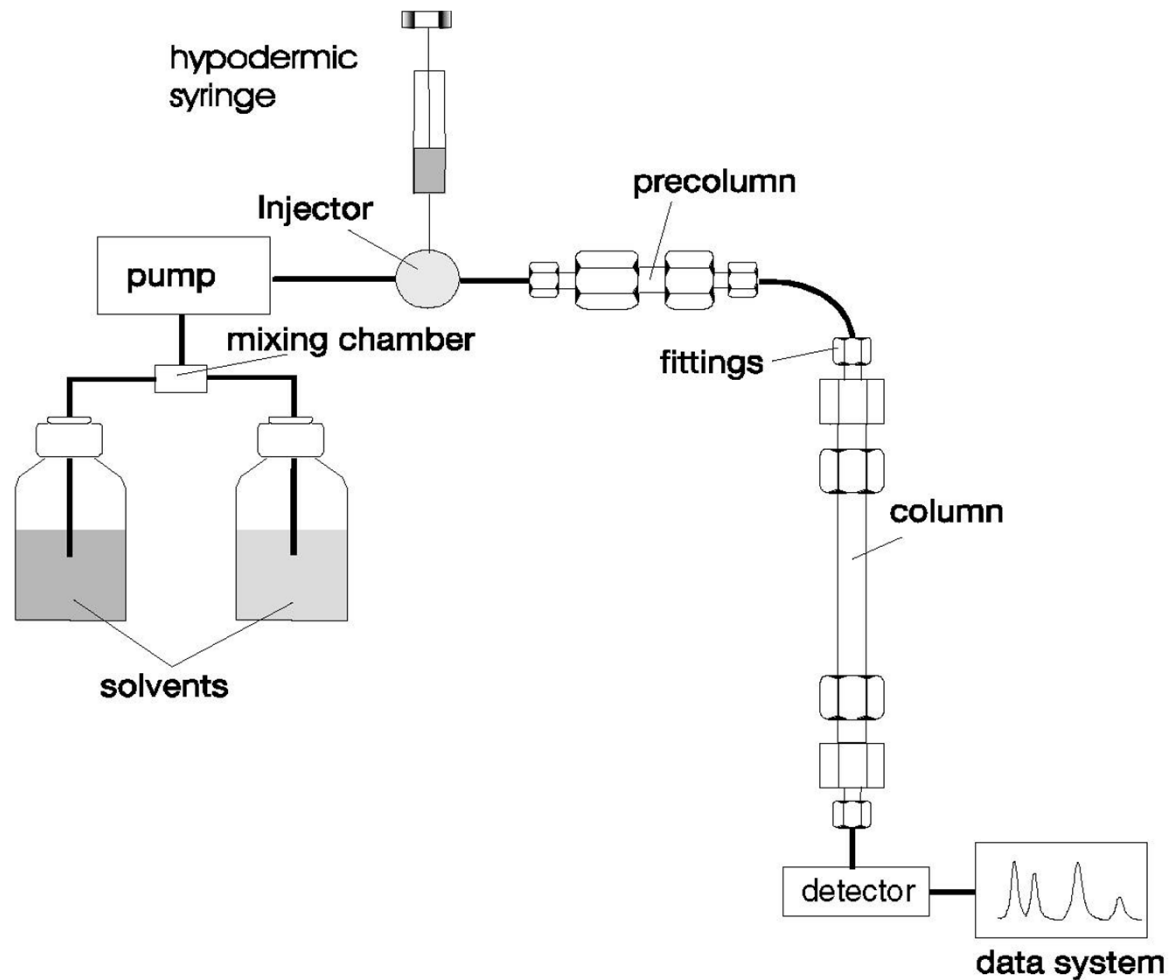
Dalla teoria dinamica (o cinetica) della cromatografia, si deduce che H dipende dalle dimensioni del materiale di supporto attraverso C_M (non c'è reale minimo nella $H=f(u)$, corrisponderebbe a velocità di flusso piccole e impraticabili).



$$H = C_M u + B / u + C_S u$$

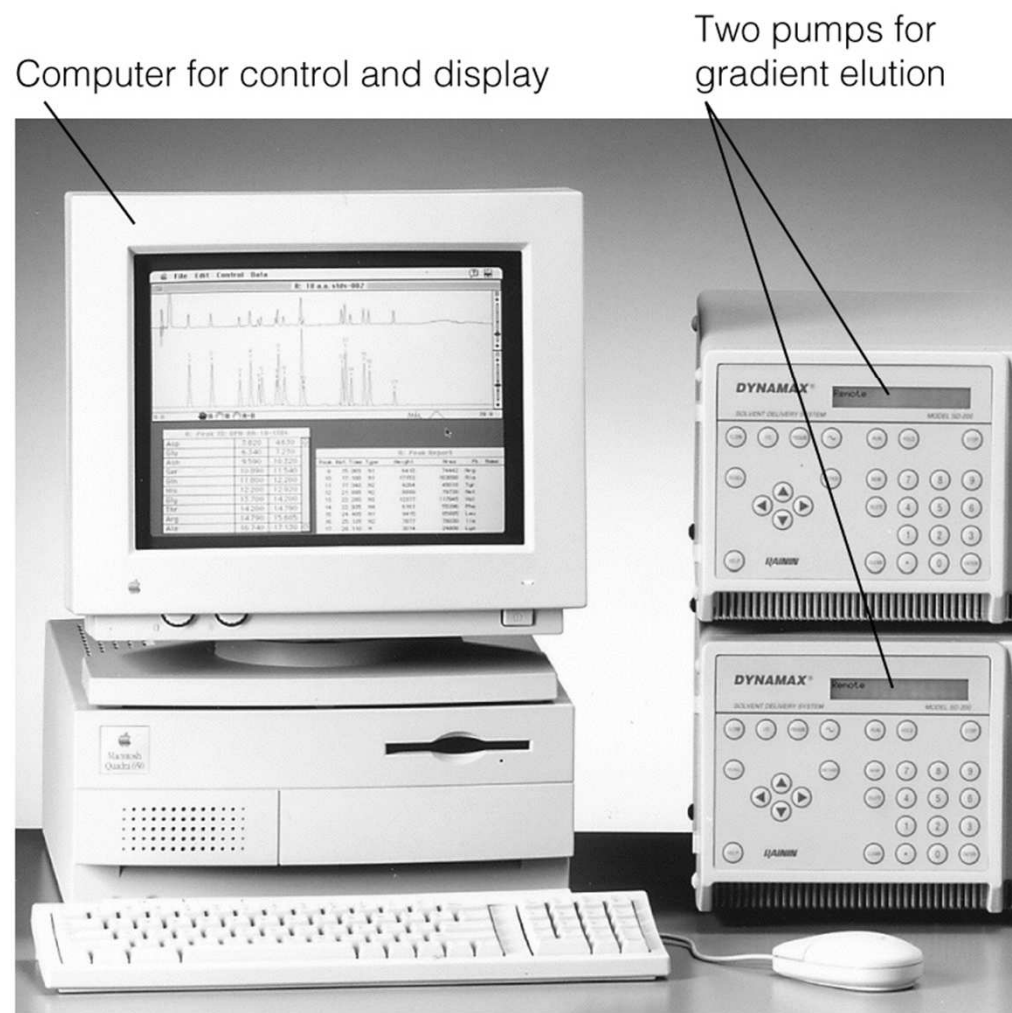
influenza	
Diffusione longitudinale	$B/u = (2k_D D_M) / u$
Trasferimento di massa da e verso la f.s. liquida	$C_S u = q k d_f^2 u / (1+k)^2 D_S$
Trasferimento di massa da e verso la f.s. solida	$C_S u = 2 t_d k u / (1+k)^2 / 10$
Trasferimento di massa nella fase mobile	$C_M u = f(d_c^2, d_p^2) u / D_M$

La strumentazione



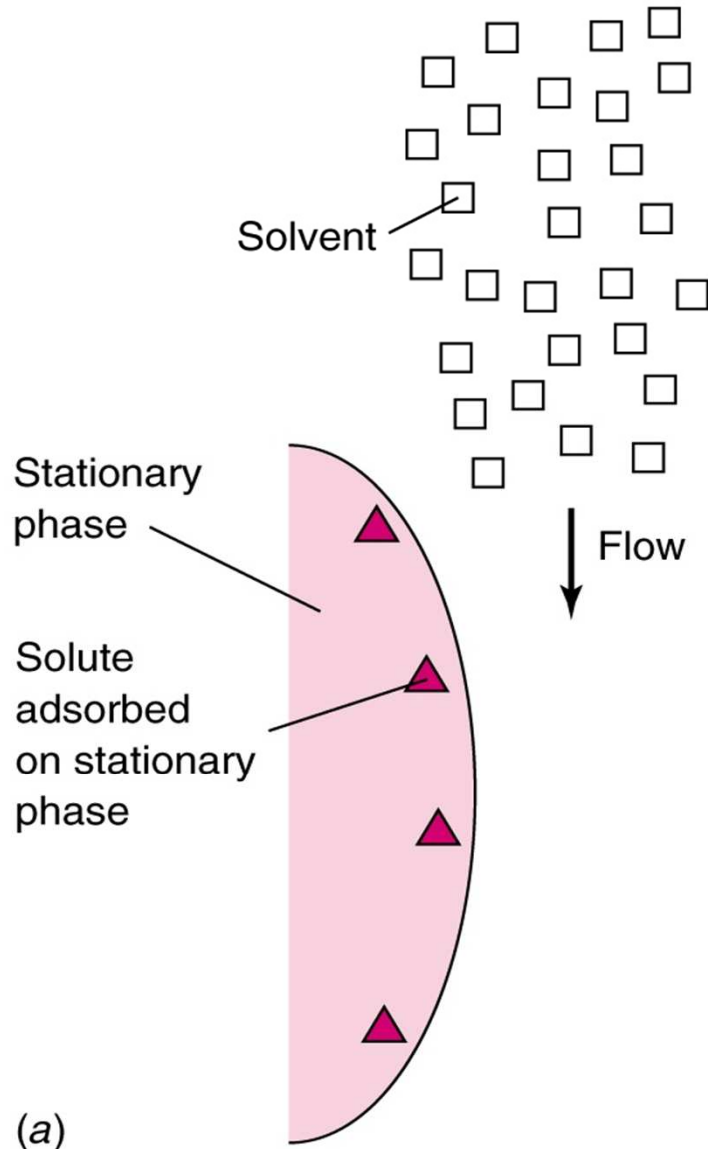
Minimizzare il
volumi morti, specie
nell'iniettore e nel
detector

High-Performance Liquid Chromatography (HPLC)

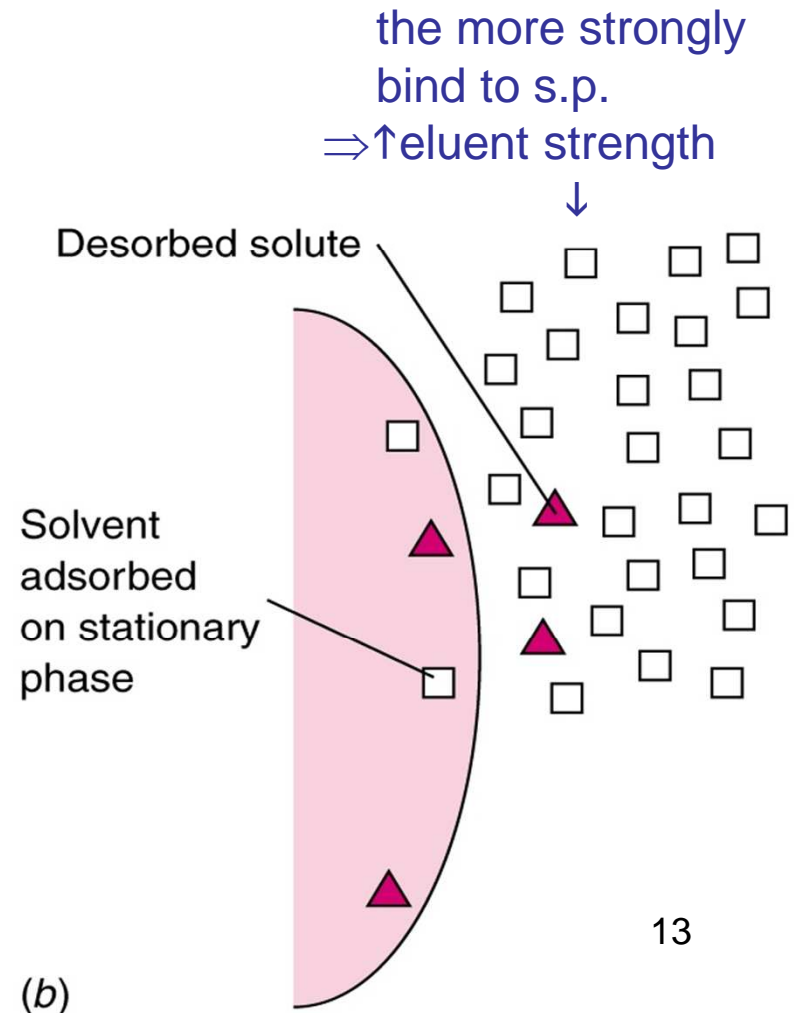


Nella cromatografia liquida è possibile modulare composizione e forza eluente della fase mobile per promuovere l'uscita di soluti affini alla

fase stazionaria



← compete with ▲ for binding on s.p.



Solventi

F.m. scelta in base alla tecnica usata

Solventi filtrati per **rimuovere particelle sospese** - bloccherebbero le colonne.

Gas disciolti rimossi con gorgogliamento di elio o azoto o con ultrasuoni.

Solventi per f.m. conservati in un recipienti/bottiglie in vetro o acciaio.

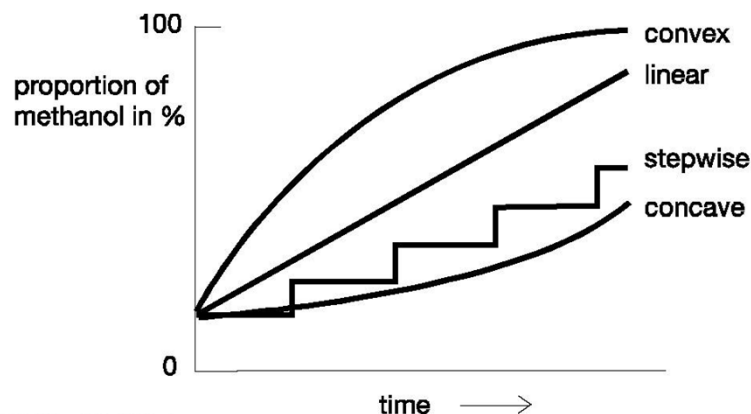
La separazione si può ottenere per **eluizione isocratica o con gradiente**.

Nel metodo isocratico la composizione del solvente è costante durante la separazione.

Separazioni migliori in tempi minori si ottengono di solito in gradiente di eluizione, in cui la forza dell'eluente è in genere incrementata gradualmente durante l'analisi. Si possono usare 2 o più solventi e il gradiente può essere lineare, a gradini, concavo o convesso.

Tipicamente la forza di eluizione di un solvente è aumentata (in RPLC il solvente organico (es. CH_3CN) aumenta a scapito di H_2O)).

Es. $\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$, CH_3OH da 30% a 70% in modi diversi.



in riferimento alla NPLC e a f.s. gel di silice,

Più polare il solvente \Rightarrow \uparrow forza eluente \Rightarrow \downarrow t_r

Eluotropic series and ultraviolet cutoff wavelengths of solvents for adsorption chromatography on silica

Solvent	Eluent strength (ϵ°)	Ultraviolet cutoff (nm)
Pentane	0.00	190
Hexane	0.01	195
Heptane	0.01	200
Trichlorotrifluoroethane	0.02	231
Toluene	0.22	284
Chloroform	0.26	245
Dichloromethane	0.30	233
Diethyl ether	0.43	215
Ethyl acetate	0.48	256
Methyl <i>t</i> -butyl ether	0.48	210
Dioxane	0.51	215
Acetonitrile	0.52	190
Acetone	0.53	330
Tetrahydrofuran	0.53	212
2-Propanol	0.60	205
Methanol	0.70	205

serie eluotropica per solventi LC			
Solvente	Indice di polarità, P'	Forza di Eluizione (SiO2)	Trasmissione UV
fluroalcani	< -2	-0.2	200
cicloesano	0.04	0.03	200
n-esano	0.1	0.01	195
tetracloruro di carbonio	1.6	0.11	265
diisopropil etere	2.4	0.22	220
toluene	2.4	0.22	285
dietil etere	2.8	0.38	215
dicloro metano	3.1	0.34	230
tetraidrofurano	4.0	0.35	210
cloroformio	4.1	0.26	235
etanolo	4.3	0.68	205
acido acetico	4.4	0.38	255
diossano	4.8	0.49	215
metanolo	5.1	0.73	205
acetonitrile	5.8	0.50	190
nitrometano	6.0	0.49	380
acqua	10.2	grande	170

I valori della forza di eluizione su silica gel possono esser impiegati per valutar quelli su allumina, dividendoli per 0.8

The polarity index of a substance is a relative measure of the degree of interaction of the solvent with various and different polar test solutes. A numerical index is proposed that ranks solvents according to their different polarity. It is based entirely on the structure, encoding the relative content of exterjacent electrons in the specific molecule. The index is the first-order valence molecular connectivity index, 1Xv. The index is modified for the number of isolated functional groups in the specific molecule. A comparison with solvent polarity indexes based on several experimental methods reveals a good and strong relationship. The polarity index proposed can be quickly and easily **calculated** and it does not depend on the availability of the actual specific molecule, and it permits prediction of solvent polarity or the polarity of different mixtures.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7310666>

There are several different websites that offer a chart of polarity indexes including the site found at the web address macro.lsu.edu/howto/solvents/Polarity%20index.htm. The **Honeywell Burdick & Jackson company** is a leading manufacturer of solvents. The company pioneered the technology to purify solvents more than 45 years ago. Burdick & Jackson products meet the most demanding requirements for a broad range of applications and industries; including pharmaceutical, chemical, environmental, academic and petrochemical. They indexed their solvents in order of increasing polarity. Burdick & Jackson solvents are arranged in order of increasing polarity index, a relative measure of the degree of interaction of the solvent with various polar test solutes.

Another site that offers a polarity index is available at the web address sci.tech-archive.net/Archive/sci.chem/2005-04/msg00336.html. Knowing the polarity of different chemicals and substances is important in high school as well as college chemistry classes. However, this information is also useful in the professional world as well. It offers scientist the ability to have a quick reference when participating in experiments.

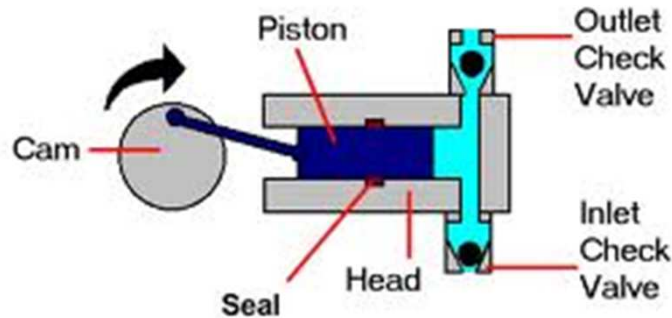
More reference links: macro.lsu.edu/howto/solvents/Polarity%20index.htm sci.tech-archive.net/Archive/sci.chem/2005-04/msg00336.htm

Sistemi di pompaggio

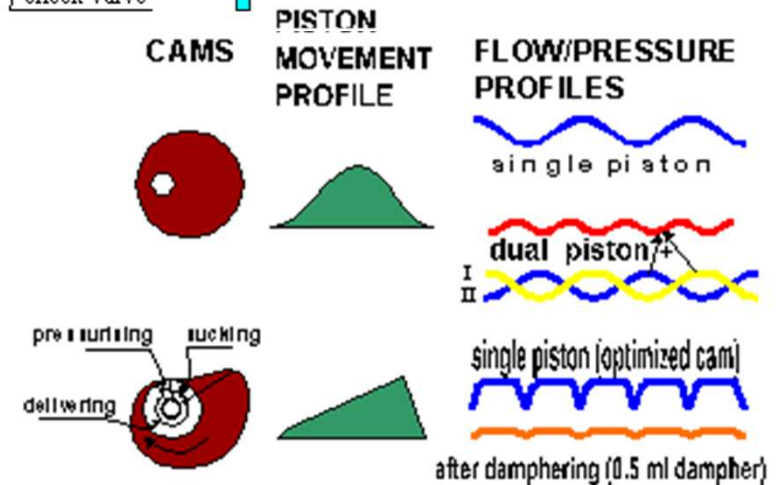
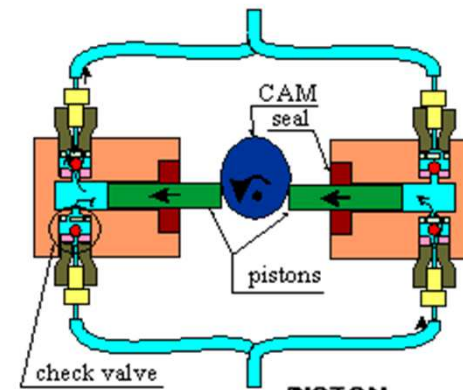
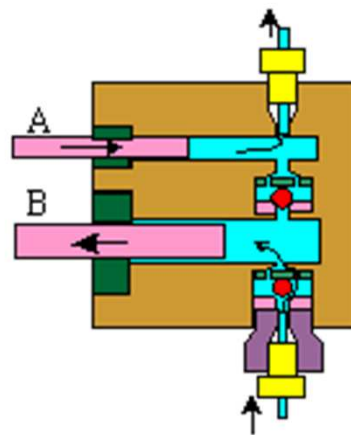
Pressioni fino a varie centinaia di bar (decine di MPa)

Ampio intervallo di velocità di flusso (0,05 - 10 mL/min)

Flusso libero da pulsazioni



Pistoni e sfere
in zaffiro
Le valvole sono la
Parte più delicata
(intasamenti,
contaminazioni)



Sistemi di pompaggio

Volumi interni 40 - 60 μL , pressioni 60 Mpa, flussi costanti, indipendenti da contropressione e viscosità.

Gradiente in bassa pressione (solventi miscelati prima del pompaggio)

Gradienti in alta pressione (minori variazioni di volume nella miscela compressa) richiedono due pompe; un costituente è compresso , seconda pompa aggiunge secondo costituente a flusso pressurizzato.

Miscele ternarie

Campioni filtrati (es. su filtro da 1 μm o migliore)

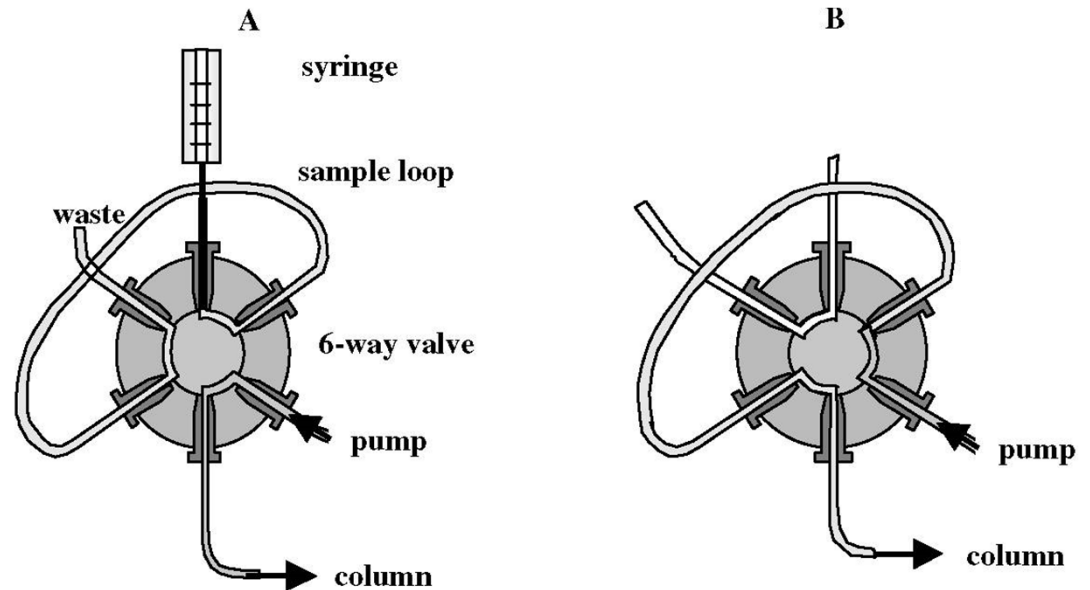
Sistemi di iniezione

1-500 μL

Per micro-HPLC $< 1 \mu\text{L}$

Durante l'iniezione, la pressione dev'esser mantenuta costante

Valvola a 6 vie



Colonne

Materiali:

In acciaio inossidabile

Tubi in vetro spesso contenuti in tubi in metallo

Connessioni in PEEK (polyether ether ketone), materiale inerte

Dimensioni

Superficie interna lucida.

L = 1-30 cm;

ID = 2.1-7.6 mm.

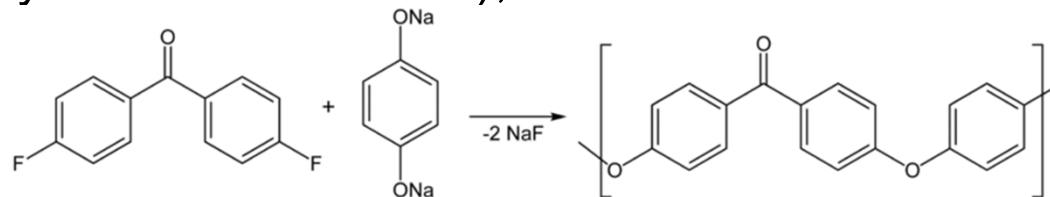
Micro HPLC capillari più lunghi; impaccati con p. ID < 1 mm.

Materiale di impaccamento solido 3-10 µm.

Materiale d'impaccamento contenuto con setti sinterizzati;

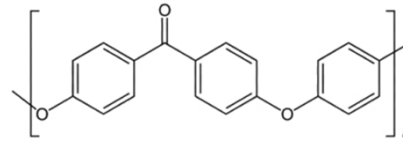
Standard (2004): L=250 mm, ID=4.6 mm, riempita con particelle 5 µm.

N= 50,000 / m



Colonne

In acciaio inossidabile
tubi in vetro spesso contenuti in tubi in metallo
connessioni in
PEEK (polyether ether ketone)



Superficie interna lucida.

L = 1-30 cm;

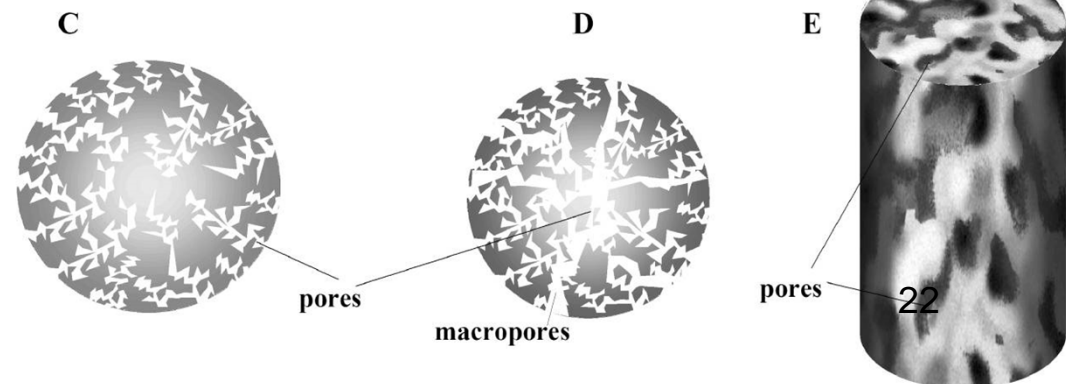
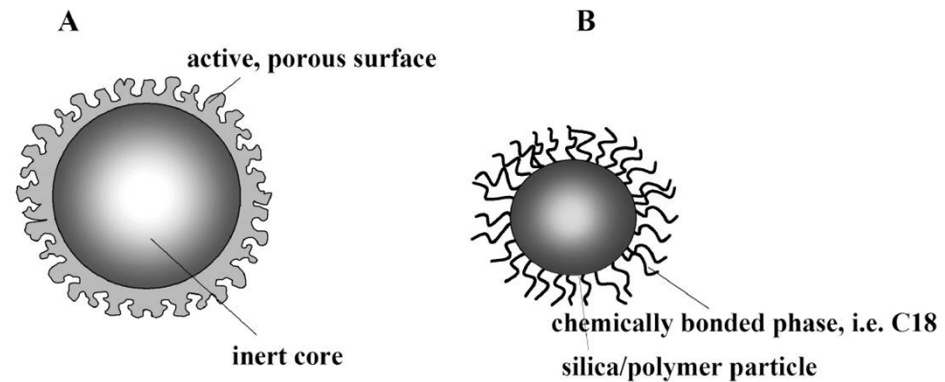
ID = 2.1-7.6 mm.

Micro HPLC capillari più lunghi

Impaccati (ID < 1 mm).

Materiale di impaccamento
solido 1-10 μm .

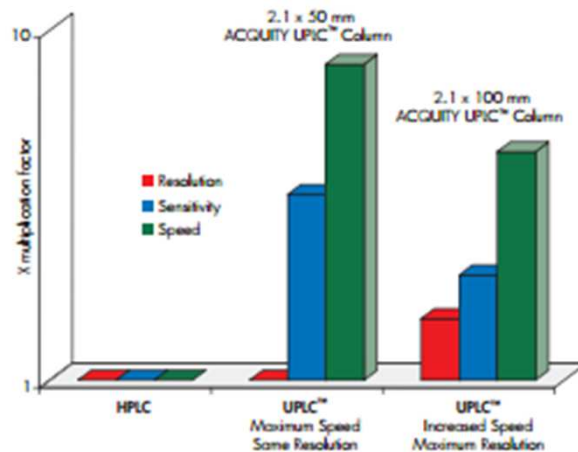
Materiale d'impaccamento
contenuto con setti sinterizzati;
Standard (2004): L=250 mm
ID=4.6 mm, riempita con
particelle 5 μm .



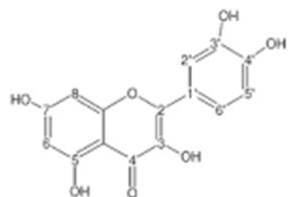
Colonne (continua)

- Per ridurre uso solventi/f.m. (devon esser molto puri) colonne miniaturizzate: $L = 30-75$ mm, ID 1 mm; N fino a 100,000/m per $D_p = 3$ μm (HPLC “*microbore*”).
- Si impiegano corte “pre-colonne” per proteggere la colonna separativa (ID=4.5mm, L=30 mm, impaccamento 10-30 μm , per evitare cadute di pressione significative).
- Riempire una colonna con particelle di dimensioni < 20 μm , è problematico (elevata energia superficiale e cariche superficiali ostacolano il riempimento a secco; se si usa un liquido, vanno evitati i gradienti di dimensioni per le particelle, associati a fenomeni di sedimentazione. Si sospende il materiale dell’impaccamento in un liquido (es. metanolo per RP) per riempir la colonna ; ancor meglio se si usano “sospensioni galleggianti” o *slurry*; le differenze in densità tra fase solida e liquido sono compensate da agente disperdente opportuno (es. CH_2Br_2)

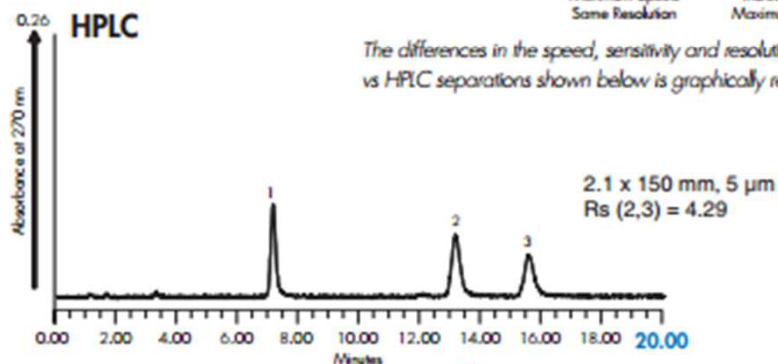
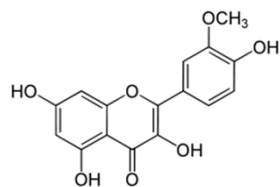
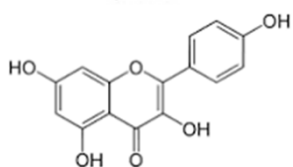
Conditions
 HPLC Column: Xterra^{MS} C₁₈ 2.1 x 150 mm, 5 μm
 UPLCTM Columns: ACQUITY UPLCTM BEH C₁₈ 2.1 x 50 mm, 1.7 μm
 ACQUITY UPLCTM BEH C₁₈ 2.1 x 100 mm, 1.7 μm
Mobile Phase A: 0.1% HCOOH
Mobile Phase B: ACN
Isocratic Mobile Phase Composition: 75% A; 25% B
Flow Rates: HPLC: 0.20 ml/min
 UPLCTM: 0.50 ml/min
Injection Volume: 5 μl
Sample Diluent: 0.1% HCOOH
Sample Concentration: 17 μg/ml
Temperature: 50 °C
Detection: UV @ 270 nm
Instrument: ACQUITY UPLCTM with ACQUITY UPLCTM 2996 PDA



- Compounds**
 1. Quercetin
 2. Kaempferol
 3. Isohammetin

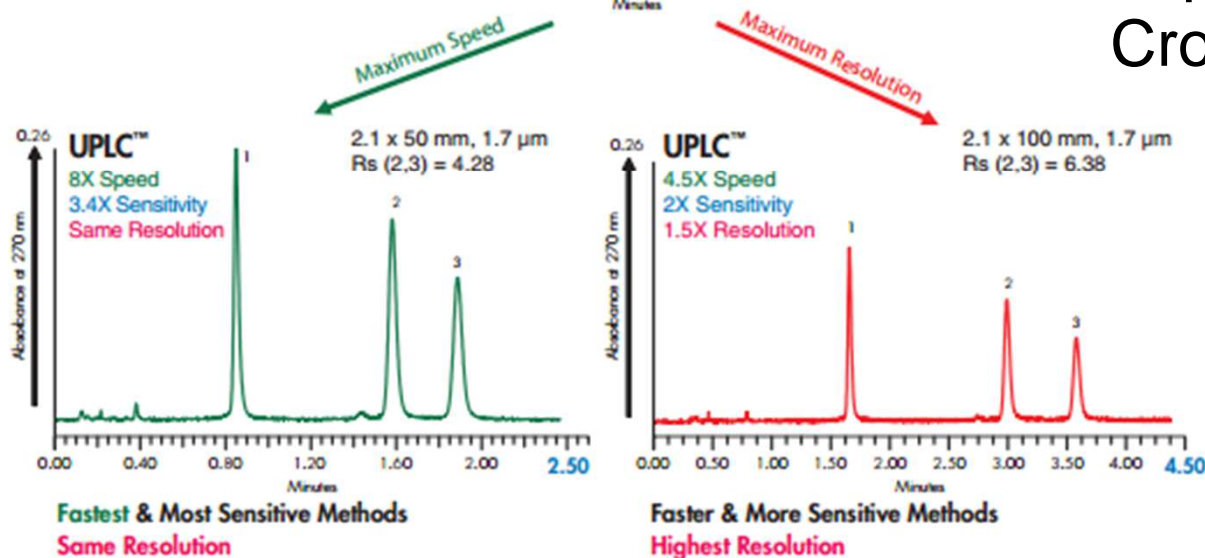


Quercetina



The differences in the speed, sensitivity and resolution of the UPLCTM vs HPLC separations shown below is graphically represented here.

Ultra Performance Liquid Chromatography



Whether your objective is maximum speed (with the same resolution) or maximum resolution (in less time), UPLCTM allows you to achieve both – in addition to increased sensitivity – without compromising chromatographic fidelity.

Dimensioni delle colonne e delle particelle

Più lunga e sottile la colonna, e minori le dimensioni dell'impaccamento, migliore la separazione.

Purtroppo, la contro-pressione della colonna cresce sensibilmente al diminuire del ID e del d_p e al crescere di L. La possibilità di pompare la f.m pone limiti pratici alle dimensioni di colonne e impaccamento.

Materiale per l'impaccamento

Si sceglie in base alla tecnica cromatografica.

Forma dimensioni porosità e distribuzione dimensionale delle particelle del materiale di supporto sono importanti per le caratteristiche della f.s.

Supporto:

- non poroso,
- pellicolare,
- particelle porose o perfuse,
- colonne monolitiche

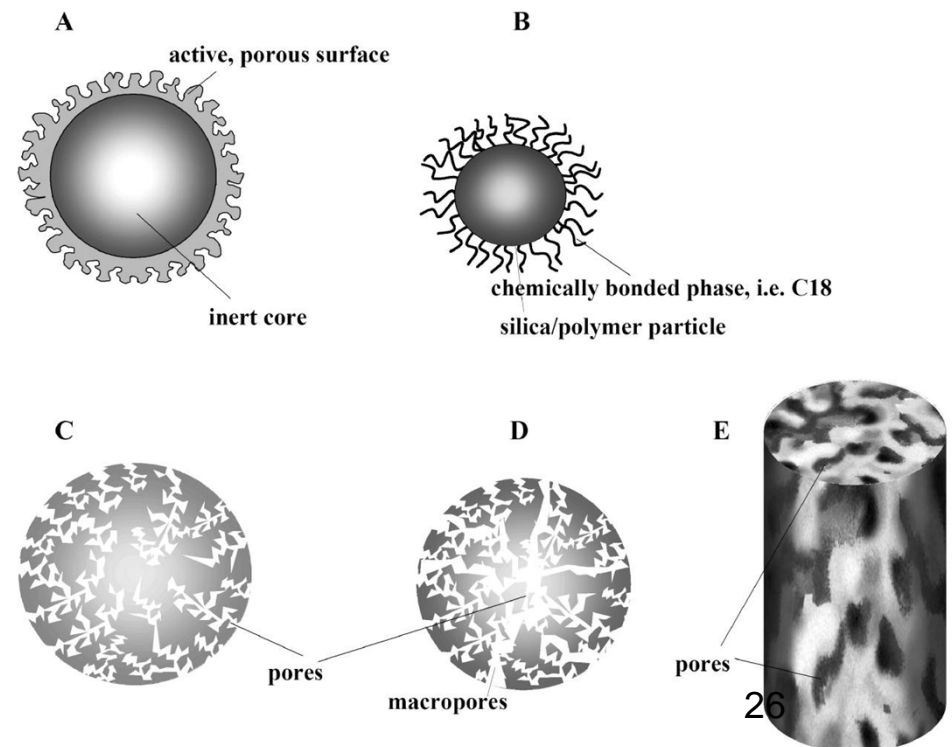
Supporto: non poroso, pellicolare, particelle porose o perfuse, colonne monolitiche.

- Particelle sferiche si impaccano meglio di particelle irregolari; efficienza con distribuzioni uniformi di d_p è alta. Distribuzione di d_p dev'esser la più stretta possibile; d_p per le più piccole determina la permeabilità per la colonna, per le più grandi determina H.

- Monoliti consentono elevate velocità della f.m..

Le particelle porose possono essere completamente porose, o avere uno strato poroso e una parte intera (nocciolo/core) inerte, ad esempio vetro.

I materiali monolitici sono completamente porosi.

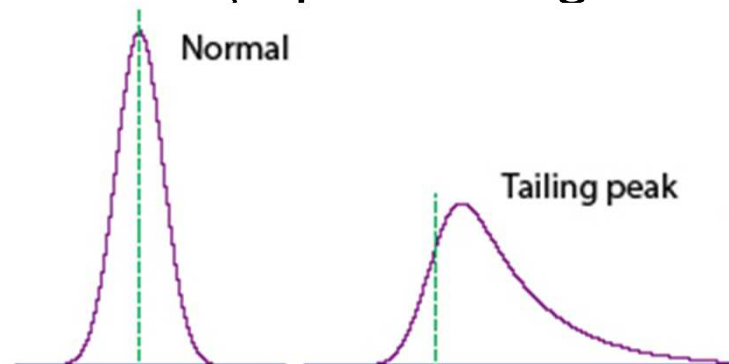


Silice

Le f.s. basate su silice sono al momento il materiale d'impaccamento più popolare in HPLC. La silice da sola si impiega nella cromatografia d'assorbimento, ma più spesso, è usata come materiale di supporto per materiali chimicamente modificati - ai gruppi silanolo (SiOH) - con alta efficienza di colonna e resistenza meccanica e chimica.

Caratteristiche delle particelle in silice (dipendenti dal processo di produzione): forma, dimensione, porosità e dimensione dei pori, area superficiale.

Ci son vari tipi di gruppi silanolo (liberi, geminali, associati). I silanoli liberi han natura molto acida (e possono generare *tailing* di analiti basici).



La purezza della silice è importante, specie per l'analisi di componenti polari: ioni Fe^{3+} , Al^{3+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} contaminanti la silice possono formare complessi con specie chelanti, alterando la forma dei picchi.

I materiali basati su silice si impiegano a pH di solito compresi tra 2 e 8. A pH maggiori la silice inizia a disciogliersi nell'eluente e a bassi pH si rompono i legami con i gruppi chimicamente legati. Miglioramenti si sono avuti con materiali ibridi silice/gruppi organosilossani (pH 2-11).

Particelle polimeriche

materiali polimerici stabili a variazioni di pH, ma efficienza di colonna e resistenza meccanica e solubilizzazione in alcuni solventi peggiore della silice.

Materiali comuni polistirene/divinilbenzene e metacrilato.

Impiego diffuso in cromatografia ionica.

Cromatografia su fasi legate

RPLC: meccanismo di separazione è principalmente la partizione

NPLC: gioca un ruolo anche l'adsorbimento

FASI STAZIONARIE

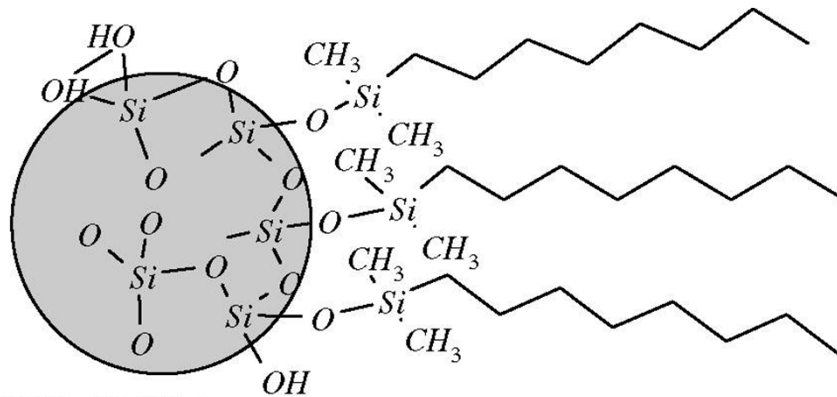
RP circa 75% delle applicazioni

Il gel di silice è il materiale di supporto più diffuso

Legame covalente di vari gruppi su gruppi silanolo. Per impedimento sterico solo una parte dei gruppi SiOH superficiali è legato (<50%), i SiOH liberi posson generare adsorbimento dei composti polari e tailing.

“End capping” con clorosilani a catena corta, per far reagire SiOH rimanenti.

Es. C8



Fasi mobili

In LC ci sono interazioni significative tra f.m. e analiti da separare. Ricordando

$$R_s = \sqrt{N/4} \cdot ((\alpha - 1) / \alpha) \cdot (k_B / (1 + k_B))$$

I parametri k_B e α sono modulabili cambiando la composizione dei solventi nella f.m.. Il parametro più importante di un solvente è qui la sua polarità.

Si sceglie prima la fase stazionaria che dovrebbe aver polarità simile ai costituenti della miscela che si deve separare, e conseguentemente si sceglie la fase mobile in modo che k abbia valori tra 2 e 5.

La fase mobile si può selezionare sulla base del meccanismo atteso di separazione, ma i meccanismi coinvolti possono essere più d'uno; spesso la soluzione ottimale si trova con un processo per "*Trial & errors*" o con procedure di ottimizzazione multivariata.

Serie eluotropiche

Sono state stabilite delle serie eluotropiche per quantificare la polarità dei solventi (ad esempio Snyder classificò i solventi come fortemente polari, debolmente polari e apolari).

serie eluotropica per solventi LC			
Solvente	Indice di polarità, P'	Forza di Eluizione (SiO₂)	Trasmissione UV
fluroalcani	< -2	-0.2	200
cicloesano	0.04	0.03	200
n-esano	0.1	0.01	195
tetracloruro di carbonio	1.6	0.11	265
diisopropil etere	2.4	0.22	220
toluene	2.4	0.22	285
dietil etere	2.8	0.38	215
dicloro metano	3.1	0.34	230
tetraidrofurano	4.0	0.35	210
cloroformio	4.1	0.26	235
etanolo	4.3	0.68	205
acido acetico	4.4	0.38	255
diossano	4.8	0.49	215
metanolo	5.1	0.73	205
acetonitrile	5.8	0.50	190
nitrometano	6.0	0.49	380
acqua	10.2	grande	170

- Per valutare la polarità di una miscela di solventi si mediano le polarità dei solventi componenti
- Es. 30:70 metanolo/acqua (v/v)

$$\begin{aligned}
 P_{\text{metanolo/acqua}} &= 0.3 P_{\text{metanolo}} + 0.7 P_{\text{acqua}} = \\
 &= 1.53 + 7.14 = 8.67
 \end{aligned}$$

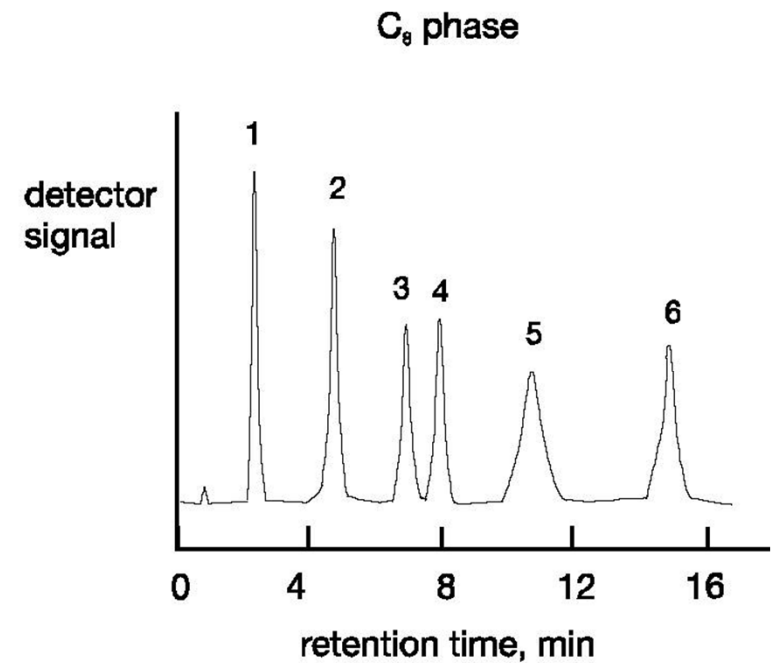
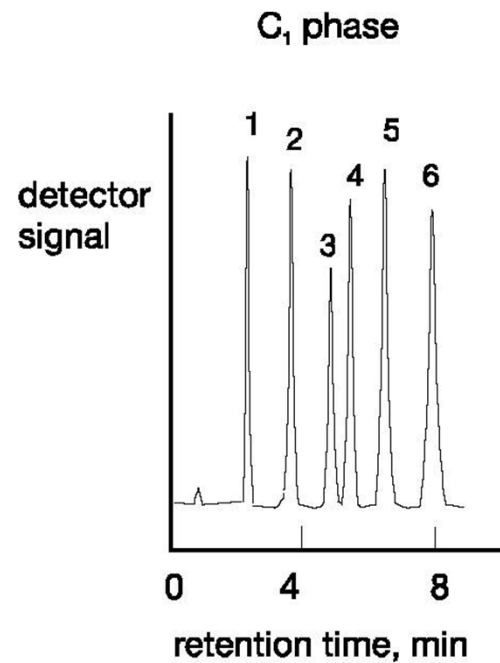
Forza di eluizione

Si riporta come forza di eluizione ϵ_0 rispetto a f.s. in gel di silice (dividendo per 0.8 si ha la forza di eluizione su allumina)

Su NPLC vengono eluiti prima composti polari o apolari? E com'è la dipendenza da polarità di fase mobile?

- Es. RPLC

Effetto della fase stazionaria
f.m. 50:50 metanolo/acqua



- 1 uracile
- 2 fenolo
- 3 acetofenone
- 4 nitrobenzene
- 5 metil benzoato
- 6 toluene

© 2006 Wiley-VCH, Weinheim
Kellner / Analytical Chemistry
ISBN: 3-527-30590-4 Fig-21-35

Cromatografia di adsorbimento

LSC

Silice e allumina

Ritenzione si basa su processi di adsorbimento differenziati sul adsorbente solido, quando le molecole della f.m. competono con quelle degli analiti.

Isoterme di adsorbimento lineari in piccolo intervallo di concentrazioni (f (centri attivi liberi))

Molecole fortemente polari possono deattivare la superficie (es. H₂O)

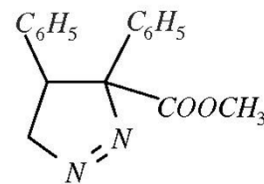
La forza di eluizione è una misura dell'energia di adsorbimento del solvente per unità di area superficiale.

Tempi di ritenzione: alcheni < idrocarburi aromatici < composti alogenati e solfuri < eteri < nitrocomposti < esteri alcoli ammine < solfoni < solfossidi < amidi < acidi carbossilici

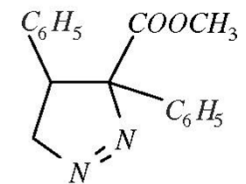
- LSC è adatta a separare sostanze non polari difficilmente solubili in H₂O
- Isomeri posizionali e stereoisomeri

Cis e trans pirazoline
 Isomeri posizionali di
 Aza- derivati del fenantrene

A

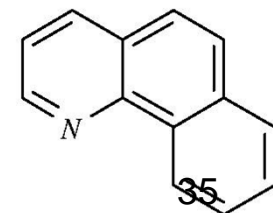
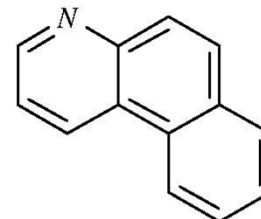


cis-phenyl



trans-phenyl

B



Rivelatori

Due principi:

Rivelazione di una caratteristica della fase mobile (es. indice di rifrazione, conducibilità); l'analita è indicato da un cambio nelle caratteristiche della f.m.. (*Bulk property*).

Rivelazione di una caratteristica del soluto (es. assorbimento UV, fluorescenza, corrente di diffusione a un elettrodo). (*Solute property*).

Rivelatori UV sono i più comuni (stima 70% delle applicazioni).