

# **CHIMICA ANALITICA II**

## **CON LABORATORIO**

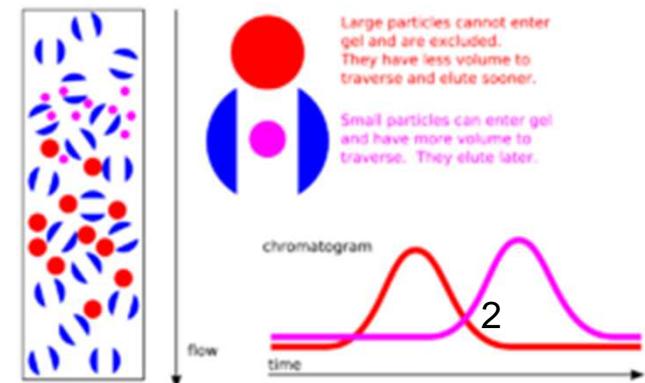
**(AA 2016-17)**

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

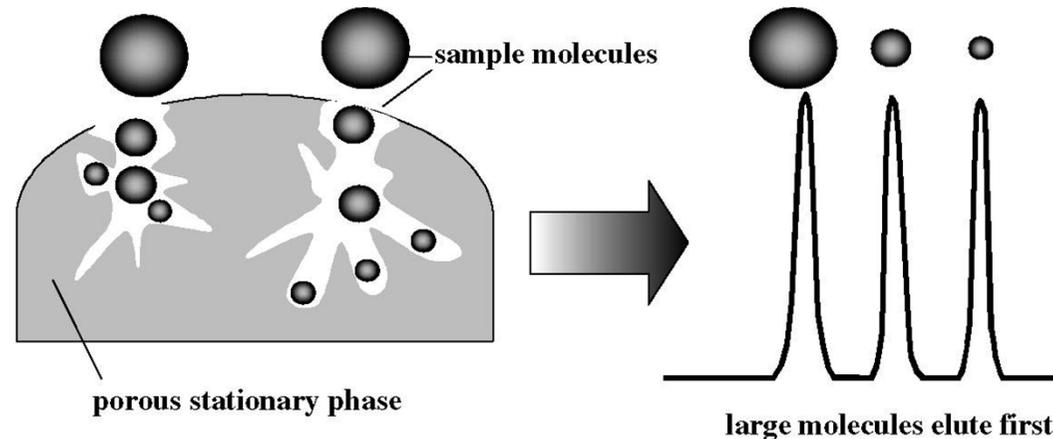
# Cromatografia di esclusione dimensionale

Un'altra cromatografia liquida è la *size exclusion chromatography SEC*, nota anche come *gel chromatography*.

La separazione delle molecole si basa sulle loro diverse dimensioni. Tutte le molecole al di sopra di una particolare dimensione sono escluse dal gel di silice o perline (*beads*) di polimero porosi, con dimensioni di poro definite, mentre molecole con MM inferiore al limite di esclusione del materiale di impaccamento sono trattenute.



# Cromatografia di esclusione dimensionale



© 2006 Wiley-VCH, Weinheim  
Kellner / Analytical Chemistry  
ISBN: 3-527-30590-4 Fig-21-45

Non si basa su nessun tipo di interazione chimica con la F.S..  
La partizione delle molecole tra F.M. e F.S. si basa sulle dimensioni e in parte su forma e polarità delle molecole.  
Gli eluenti possono essere acquosi (si parla allora di *gel filtration*) o solventi organici (*gel permeation*).  
Si impiega per separare molecole di grandi dimensioni e MM, come proteine e polimeri.

# Cromatografia di esclusione dimensionale

## L'esclusione delle molecole

La f.s. ha pori di diverse dimensioni. Si possono differenziare **due estremi** nell'interazione delle molecole con la f.s. porosa.

Quelle molecole che sono *troppo grandi* per diffondere in qualsiasi poro non sono trattenute affatto e quindi sono escluse dalla f.s.. Sono eluite con la f.m. e sono i primi costituenti a uscire (**esclusione totale**).

Gli analiti più piccoli possono diffondere in tutti i pori, e vengono trattenuti di più (**permeazione totale**). Analiti di dimensioni intermedie possono permeare solo in alcuni dei pori, ed hanno comportamento intermedio.

Si usano i **volumi di ritenzione** per descrivere la ritenzione nella SEC (dipende dal tempo di ritenzione, deducibile da cromatogramma, e dal flusso della f.m. ( $V_R = F \times t_R$ )).

# Cromatografia di esclusione dimensionale

## L'esclusione delle molecole (continua)

Il **volume totale** per una colonna impaccata con gel di silice o polimero porosi si può esprimere come:

$$V_{total} = V_0 + V_p + V_{gel}$$

$V_0$  è il volume morto,  $V_p$  è il volume dei pori.

$V_0$  è il volume vuoto corrispondente al volume teorico per il trasporto delle molecole totalmente escluse.

Il volume a disposizione di molecole che si possono muovere liberamente è  $V_0 + V_p$  (volume di ritenzione massimo).

Il volume di eluizione  $V_E$  di una molecola che rimane per un certo tempo nella f.s. dipende da  $V_0$  e da una frazione  $K$  (compresa tra 0 e 1) del volume dei pori:

$$V_E = V_0 + KV_p$$

$K = 0$ , molecole completamente escluse

$K = 1$ , molecole che possono permeare completamente nei pori

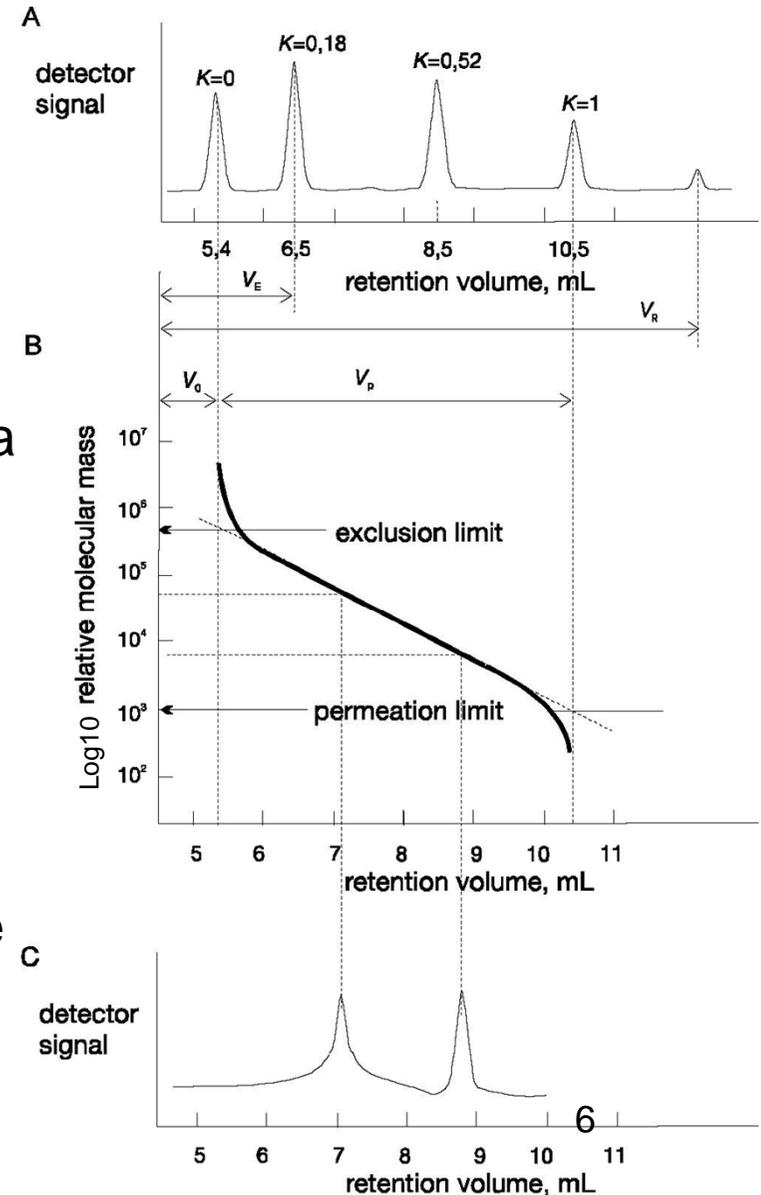
Un'esclusione parziale delle molecole fornisce  $K$  compresi tra 0 e 1

# Cromatografia di esclusione dimensionale

Questo approccio semplice vale solo se non c'è adsorbimento o interazioni tra analiti e superficie del gel. Se ci sono interazioni si possono avere anche  $V_R$  corrispondente a  $K$  maggiori di 1 (picchi anche al di fuori dell'intervallo di esclusione).

Comportamento di ritenzione e calibrazione nella SEC. Nell'esempio grafico:

- (A) Ritenzione di standard nell'intervallo di esclusione molecolare con  $K$  tra 0 e 1 e masse molari tra  $10^6$  e  $10^3$ , il 5° picco corrisponde a un composto che ha avuto interazioni con il materiale dell'impaccamento.
- (B) Relazione logaritmica tra la MM e il volume di eluizione delle sostanze standard in (A)
- (C) Determinazione della MM basata sul cromatogramma di un campione incognito; eluizione abbia stessi  $F$  della calibrazione.



# Cromatografia di esclusione dimensionale

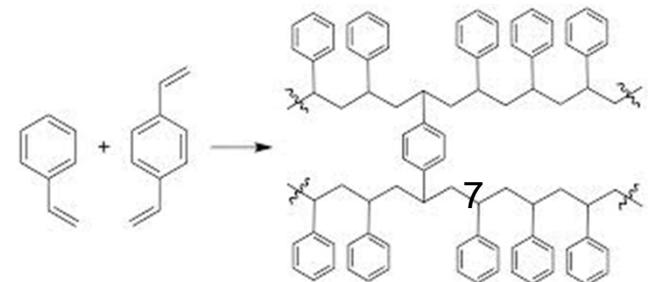
Un riarrangiamento  $V_E = V_0 + KV_p$  porta a scrivere i coeff. di partizione K in modo più usuale

$$K = (V_E - V_0) / V_p = c_s / c_M$$

Si possono così estendere i fondamenti teorici della teoria cromatografica alla SEC.

Il coefficiente di partizione è un parametro essenziale per comparare vari materiali di impaccamento.

Dimensioni medie dei pori (Angstrom)	limite di esclusione in Dalton (MM relativa)
<b>copolimero stirene divinilbenzene</b>	
10 <sup>2</sup>	700
10 <sup>4</sup>	1 x 10 <sup>4</sup> - 2 x 10 <sup>5</sup>
10 <sup>6</sup>	5 x 10 <sup>6</sup> - 1 x 10 <sup>7</sup>
<b>gel di silice</b>	
125	2 x 10 <sup>3</sup> - 5 x 10 <sup>4</sup>
500	5 x 10 <sup>3</sup> - 5 x 10 <sup>5</sup>
1000	5 x 10 <sup>5</sup> - 2 x 10 <sup>6</sup>



# Cromatografia di esclusione dimensionale

## Fasi stazionarie

Devono essere chimicamente inerti e meccanicamente stabili e la distribuzione dei pori dev'essere stretta.

La maggior parte dei materiali assorbenti è costituita da polimeri macromolecolari *cross linked*.

Particelle rigide di vetro o silice possono esser anche impiegate.

Le dimensioni delle particelle sono nell'intervallo 5-10  $\mu\text{m}$ .

Vetri porosi e gel di silice hanno vantaggi: rapido equilibrio in termini di diffusione delle molecole di analita e solvente nei pori, stabilità anche a alte T, facilità di impacamento. Le dimensioni dei pori variano tra i 40 e i 2500 Ångstrom.

Effetti di adsorbimento sono un possibile svantaggio, per cui si disattiva la superficie mediante silanizzazione.

# Cromatografia di esclusione dimensionale

## Fasi stazionarie (continua)

I copolimeri furono i primi materiali usati e le dimensioni dei pori erano governate dal quantitativo di divinilbenzene e quindi di cross-link. Sono materiali idrofobici e quindi possono esser usati solo con solventi non polari.

Oggigiorno sono disponibili anche gel idrofili, costituiti da resine con divinilbenzene solfonato o poliacrilamide.

Dimensioni medie dei pori (Angstrom)	limite di esclusione in Dalton (MM relativa)
<b><i>copolimero stirene divinilbenzene</i></b>	
10 <sup>2</sup>	700
10 <sup>4</sup>	1 x 10 <sup>4</sup> - 2 x 10 <sup>5</sup>
10 <sup>6</sup>	5 x 10 <sup>6</sup> - 1 x 10 <sup>7</sup>
<b><i>gel di silice</i></b>	
125	2 x 10 <sup>3</sup> - 5 x 10 <sup>4</sup>
500	5 x 10 <sup>3</sup> - 5 x 10 <sup>5</sup>
1000	5 x 10 <sup>5</sup> - 2 x 10 <sup>6</sup>

I volumi si riferiscono alla molecola solvatata

# Cromatografia di esclusione dimensionale

## Fasi mobili

La scelta dipende dalla f.s. e dalla solubilità del campione.

Filtrazione su gel: solventi acquosi con pH tamponato

Permeazione su gel: solventi organici non polari: tetraidrofurano, diclorometano, (toluene).

Si usa solo eluizione isocratica. A volte si aggiungono sali inorganici per evitare interazioni ioniche tra gli analiti e la f.s..  
Nell'analisi di proteine si aggiungono modificatori organici (es. glicoli) per evitare interazioni idrofobiche con la f.s.

La capacità delle colonne per SEC è bassa (<2% del volume totale della colonna)

Per una buona risoluzione della colonna servono flussi bassi

# Cromatografia di esclusione dimensionale

## Rivelatori

Devono dare una risposta proporzionale alla concentrazione (rifrattometri differenziali, detectors fotometrici nell'UV o IR)

Un detector dedicato è il viscosimetro a flusso (misura la viscosità dell'eluente).

## Applicazioni

MM > 2000 dalton

Filtrazione su gel si usa per separare sostanze naturali a alto peso molecolare da specie a basso peso molecolare o sali. Es. proteine separate da amminoacidi e peptidi.

Permeazione su gel per separare omologhi e oligomeri (es. acidi grassi tra 100 e 350 dalton, f.s. con limite di esclusione 1000)

Si impiegano per valutare masse molecolari o distribuzioni di MM

$$\log M_r = b_0 + b_1 \log V_E$$

Standard: destrano, PEG, polistirene solfonato (standard idrosolubili), polistirene, poliisoprene (standard non idrosolubili)

Separazioni basate sulle dimensioni molecolari sono efficaci per MM con differenze almeno del 10%

The Essence of Chromatography - [C. Poole \(Elsevier, 2003\)](#)

# Tecniche cromatografiche multidimensionali

Campioni possono essere tanto complessi (contenere molti analiti anche chimicamente simili) che una singola separazione cromatografica non ha sufficiente efficienza separativa.

In questo caso si può usare **integrazione di più di una tecnica di separazione**, cioè si impiega una tecnica multidimensionale.

Nelle **tecniche cromatografiche multidimensionali** si accoppiano assieme due o più meccanismi o sistemi di separazione. Un metodo è considerato multidimensionale quando **i meccanismi di separazione nelle diverse dimensioni sono diversi e quando gli analiti che erano separati in una dimensione rimangono separati nelle altre.**

Metodi più comuni: TLC multidimensionale, LC-LC, LC-GC, GC-GC.

**Benefici:** (1) *analisi veloce, consuma meno solvente;*  
(2) *parte della preparazione è effettuata come parte dell'analisi,*  
in un sistema chiuso e automatizzato dove (3) *il rischio di perdita di campione e contaminazione è minimizzato (ripetibilità e riproducibilità).*

Il potere di separazione (es. **capacità di picco**) è in genere molto maggiore di quello di una separazione uni-dimensionale. Quando i meccanismi di separazione nelle diverse dimensioni di separazione non sono correlati, **in teoria la capacità totale di picco è data dal prodotto delle capacità di picco dei sistemi di separazione:**

$$n_{\text{tot}} = n_i \times n_j \times \dots \times n_k$$

k numero di differenti dimensioni, spesso 2

**In pratica  $n_{\text{tot}}$  è minore** (per l'allargamento delle bande nelle dimensioni di separazione). Nel modo heartcut  $n_{\text{tot}}$  è molto minore (somma delle capacità di picco individuali delle colonne).

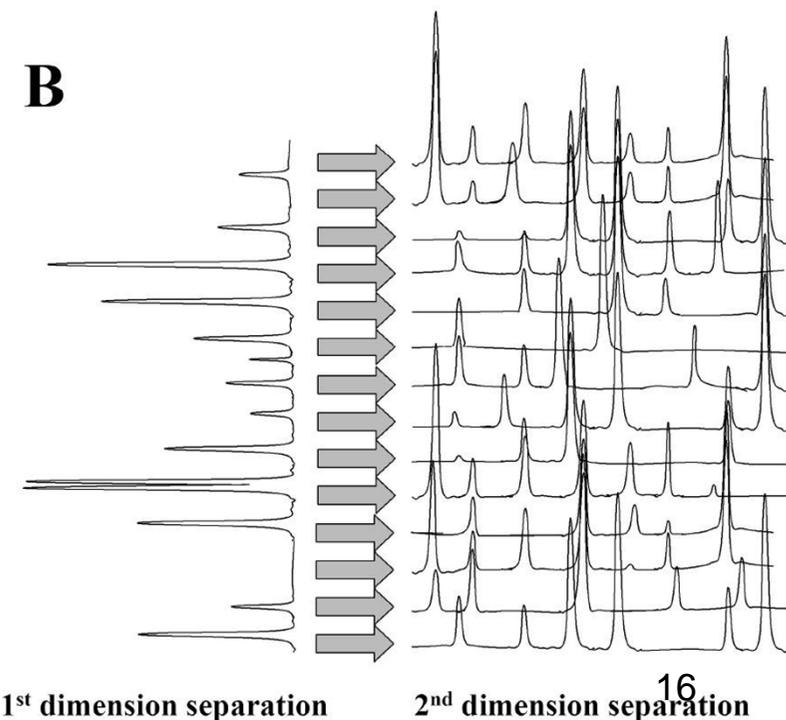
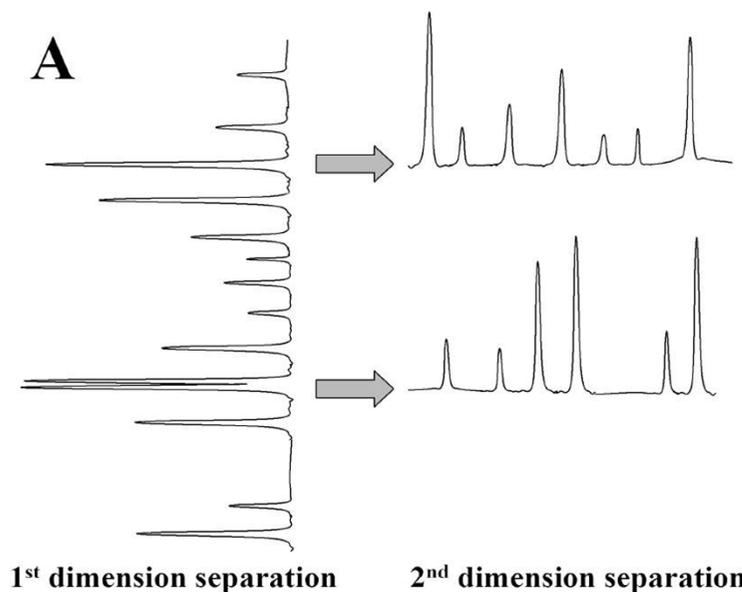
Due categorie di metodi MD: (1) *heartcut* (2) *comprehensive*

*(1) Tecniche "Heartcut"*

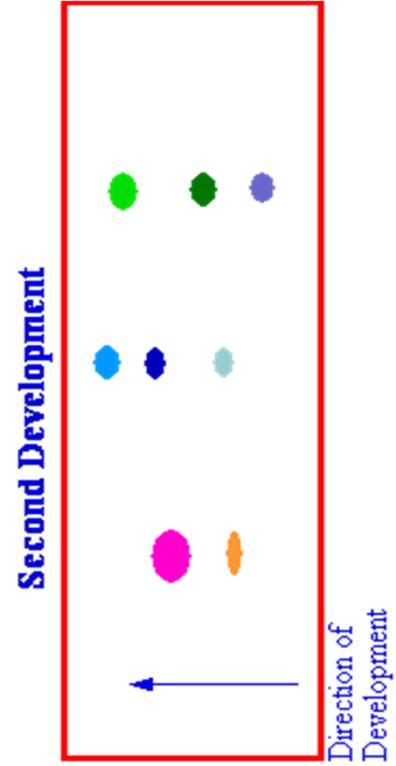
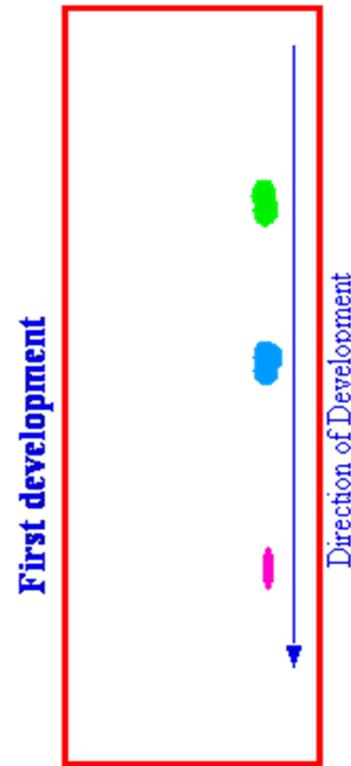
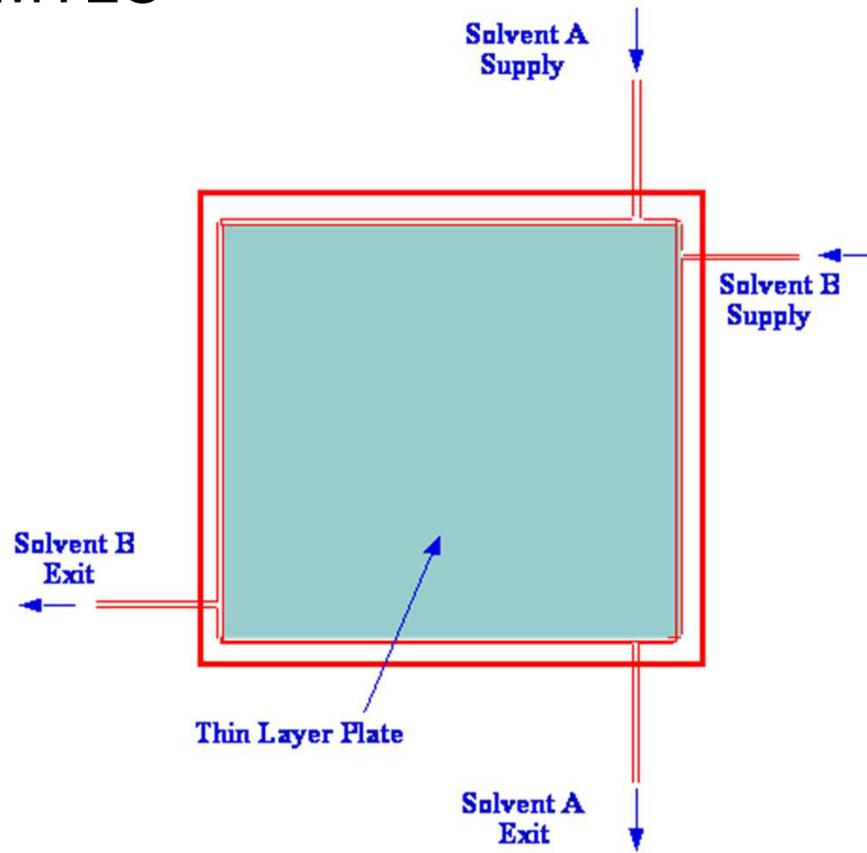
**Solo una o poche frazioni della prima separazione sono raccolte e trasferite alla seconda dimensione di separazione.** Si usa se interessano solo alcune componenti del campione (es. analisi di farmaci/droghe in un campione biologico)

*(2) Tecniche "Comprehensive"*

**Tutto il campione viene separato in tutte le dimensioni.** Si usano se serve informazione globale del campione (composizione di un petrolio greggio o di un combustibile).



# MTLC



- **Cromatografia Liquida Multidimensionale (LC-LC)**

Forse il metodo multidimensionale più usato.

Applicazioni: purificazioni e arricchimento degli analiti, miglioramento dell'efficacia di separazione e sensibilità delle analisi.

Si connettono assieme 2 o più colonne con una valvola multiporta.

L'effluente dalla 1<sup>a</sup> colonna può essere diretto, commutando la valvola, allo scarico, al rivelatore o alla seconda colonna. Nella tecnica di commutazione della colonna, se le colonne sono impaccate con la stessa f.s., la tecnica non è multidimensionale. I meccanismi di ritenzione (**materiali delle colonne**) devono essere diversi.

Per lo più si usa un **approccio "heartcut"**.

- **Restrizioni** nel combinare tecniche LC:
  - Gli *eluenti (f.m.)* devono essere *compatibili con le fasi stazionarie* in tutte le dimensioni della separazione
  - Gli *eluenti nelle diverse dimensioni* devono essere *miscibili*
  - *L'eluente della prima separazione dovrebbe essere preferibilmente un solvente debole nella seconda separazione* per evitare un allargamento dei picchi nel trasferimento.

La forza del solvente è importante.

Poiché i volumi delle frazioni possono essere di alcune centinaia di microlitri, se la frazione sta in un solvente forte nella seconda separazione, gli analiti iniziano a migrare prima che il trasferimento sia completo, causando l'allargamento dei picchi.

## Potenziali problemi:

- immiscibilità degli eluenti,
- precipitazione di sali dei tamponi,
- incompatibilità tra f.m. della prima colonna e f.s. dell'altra (es. rigonfiamento della f.s., acqua che deattiva la silice).

## Compatibilità tra diverse tecniche LC

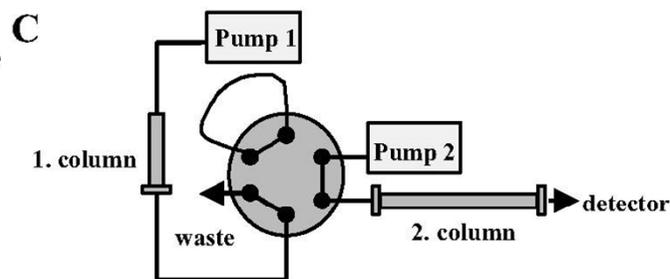
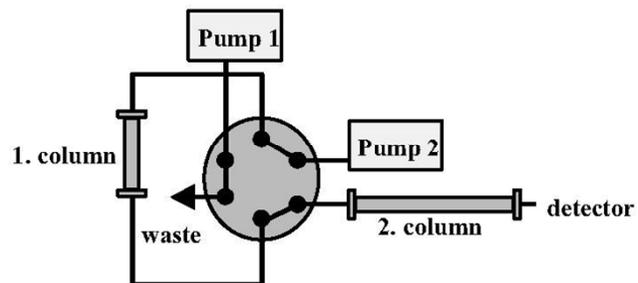
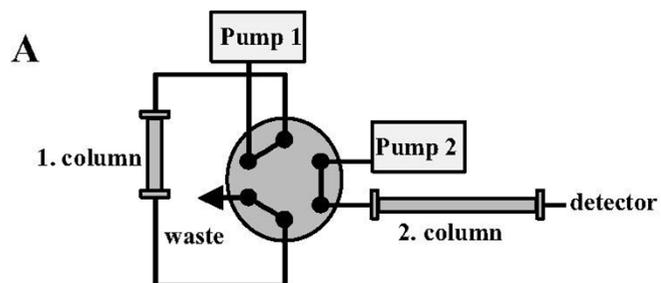
	<b>NPLC</b>	<b>RPLC</b>	<b>IC</b>	<b>SEC, GPC</b>	<b>SEC,GFC</b>
<b>NPLC</b>	<b>X</b>			<b>X</b>	
<b>RPLC</b>		<b>X</b>	<b>X</b>		<b>X</b>
<b>IC</b>		<b>X</b>	<b>X</b>		<b>X</b>
<b>SEC, GPC</b>	<b>X</b>				
<b>SEC,GFC</b>		<b>X</b>	<b>X</b>		<b>X</b>

# Strumentazione

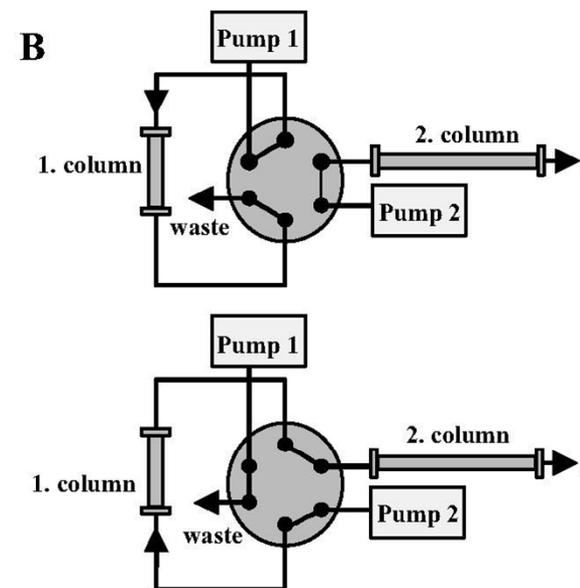
LC normale con una o più pompe, valvola multiporte e due o più colonne.

Trasferimento tra colonne effettuato in modi diversi

tipicamente, il campione è iniettato in una colonna corta con eluente debole. Analiti di interesse trattenuti in colonna e resto della matrice eliminato. Analiti trasferiti alla 2<sup>a</sup> colonna con altro solvente (A) o con lo stesso (C)



© 2006 Wiley-VCH, Weinheim  
Kellner / Analytical Chemistry  
ISBN: 3-527-30590-4 Fig.21-55



Frazione di interesse trasferita anche in flusso inverso (B) se gli analiti sono fortemente trattenuti sulla f.s. della prima colonna.

Si può fermare il flusso nella prima colonna finchè l'analisi nella seconda non è terminata

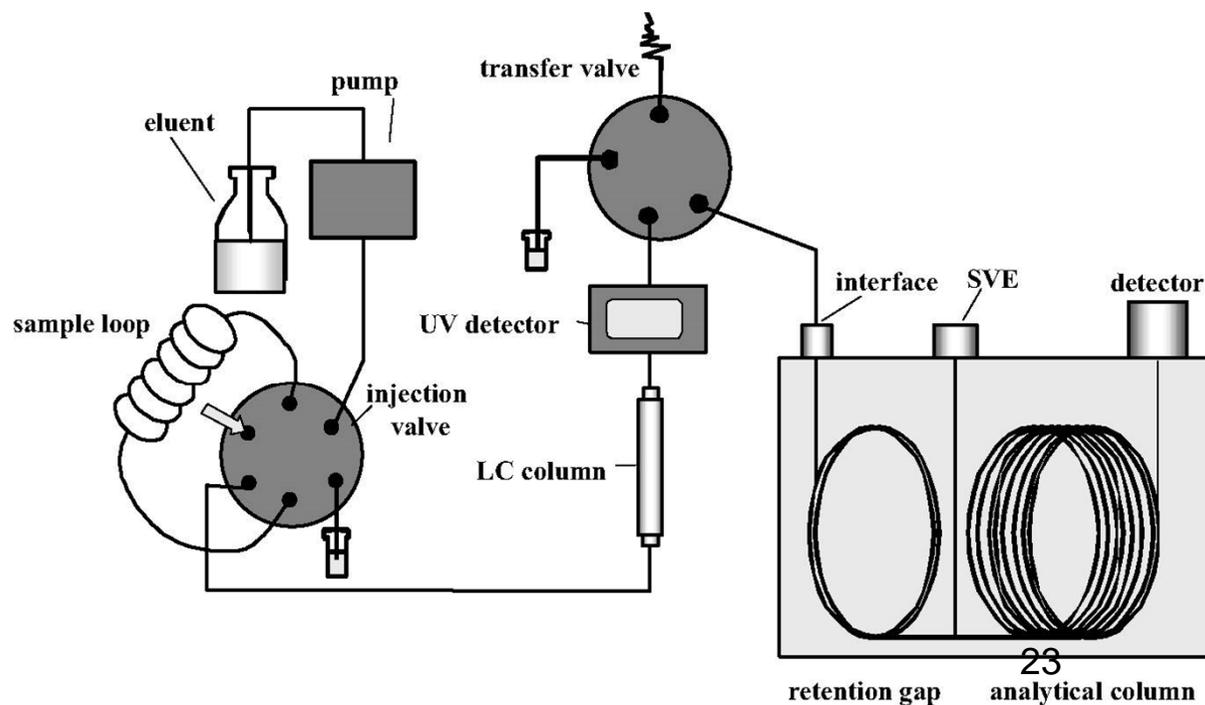
# Accoppiamento on line LC-GC

- LC: capacità e ampio spettro di meccanismi di separazione
- GC: elevata efficienza di separazione e disponibilità di metodi di rilevazione.
- Punto di forza del LC-GC: l'intera frazione contenente le sostanze d'interesse/analiti è trasferita al GC; LC può essere un buono stadio di *clean up* (**trasferisco alla fase analitica GC l'intero quantitativo di analita purificato in LC**, avendo eliminato resto della matrice -> sensibilità alta!)
- Si trasferiscono frazioni di centinaia di microlitri; **l'eluente dev'essere adatto a LC e GC; di solito NPLC**
- In pratica LC preparativa, e multidimensionalità in **modalità heart-cut**

# Strumentazione LC-GC (1)

**Interfaccia *on column*** basata sull' *on column injector*.

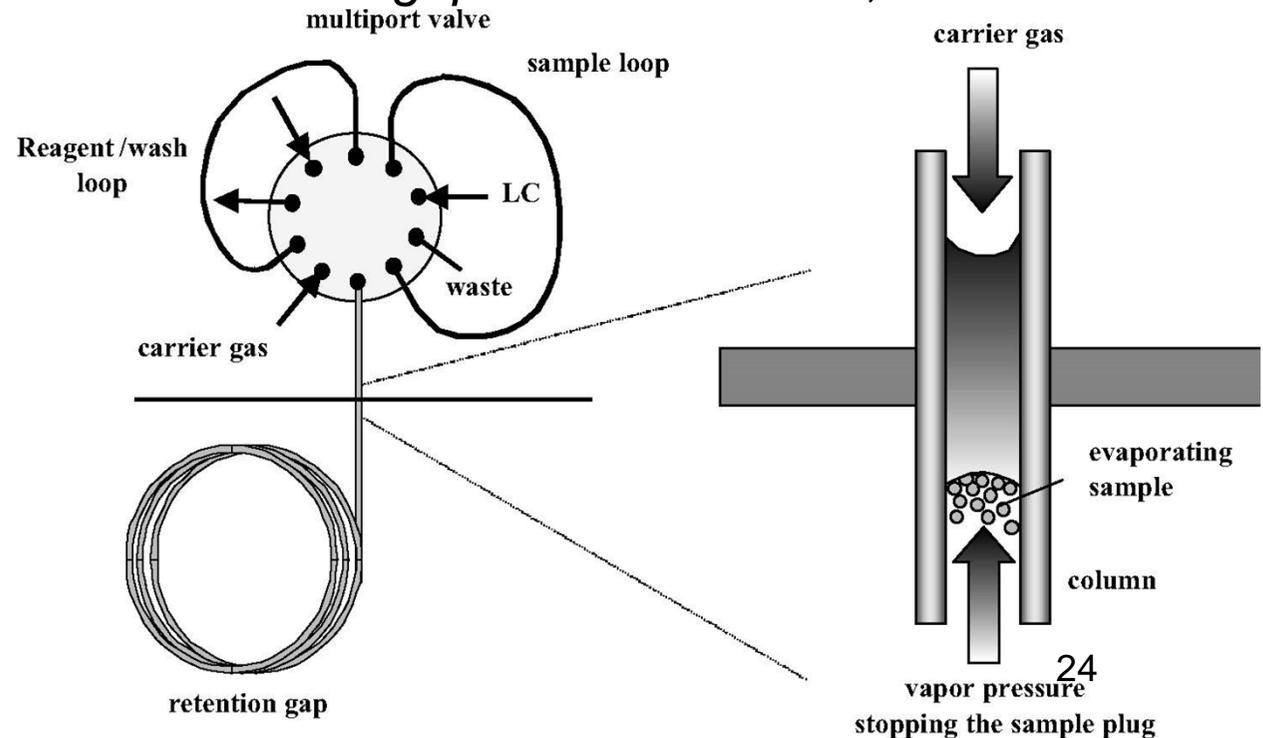
Frazione di campione è spinta in una **sezione di precolonna GC di deposito temporaneo** (“*retention gap*”), dove il solvente evapora lascia un film liquido, da cui poi vengono rilasciati gli analiti volatili, che eluiscono nella colonna analitica GC



SVE solvent vapour exit

## • Strumentazione LC-GC (2)

L'interfaccia dotata di *loop* è stata progettata per l'accoppiamento tra LC e GC. La frazione di campione è raccolta in un loop di una valvola a molte vie, dalla quale il gas di trasporto la spinge in una colonna GC non rivestita (il *retention gap*): l'interfaccia è usata per la tecnica di evaporazione del solvente completa (*Fully Concurrent Solvent Evaporation*), in cui il solvente viene evaporato durante il trasferimento. La  $T$  del forno è  $>$  della  $T_{eb}$  del solvente. La pressione del vapore del solvente supera quella dell'ingresso, evitando un ulteriore ingresso di liquido nel *retention gap*. Se si usa SVE, le componenti più volatili possono esser perdute.



- **Strumentazione LC-GC (3)**

Per ovviare alla perdita di componenti volatili, si può impiegare anche **un'interfaccia di vaporizzazione** (*Programmable Temperature Vaporizer- PTV*); la camera di vaporizzazione è impaccata con materiale opportuno (lana di vetro, Carbofrit, Tenax). Esistono diverse modalità di iniezione/trasferimento:

*PTV solvent split (semplice, senza SVE)*

*PTV large volume splitless transfer*

*PTV vapor overflow transfer*

Nel *PTV solvent split*, la temperatura dell'iniettore è mantenuta inizialmente al di sotto della  $T_{eb}$  del solvente durante l'introduzione del campione, e la valvola di split rimane aperta, permettendo l'allontanamento successivo *programmato* del solvente (più volatile). Gli analiti sono intrappolati nell'iniettore freddo, e una volta eliminato il solvente, c'è un riscaldamento rapido dell'iniettore, che trasferisce gli analiti nella colonna.



# On-line Coupled LC–GC: Theory and Applications

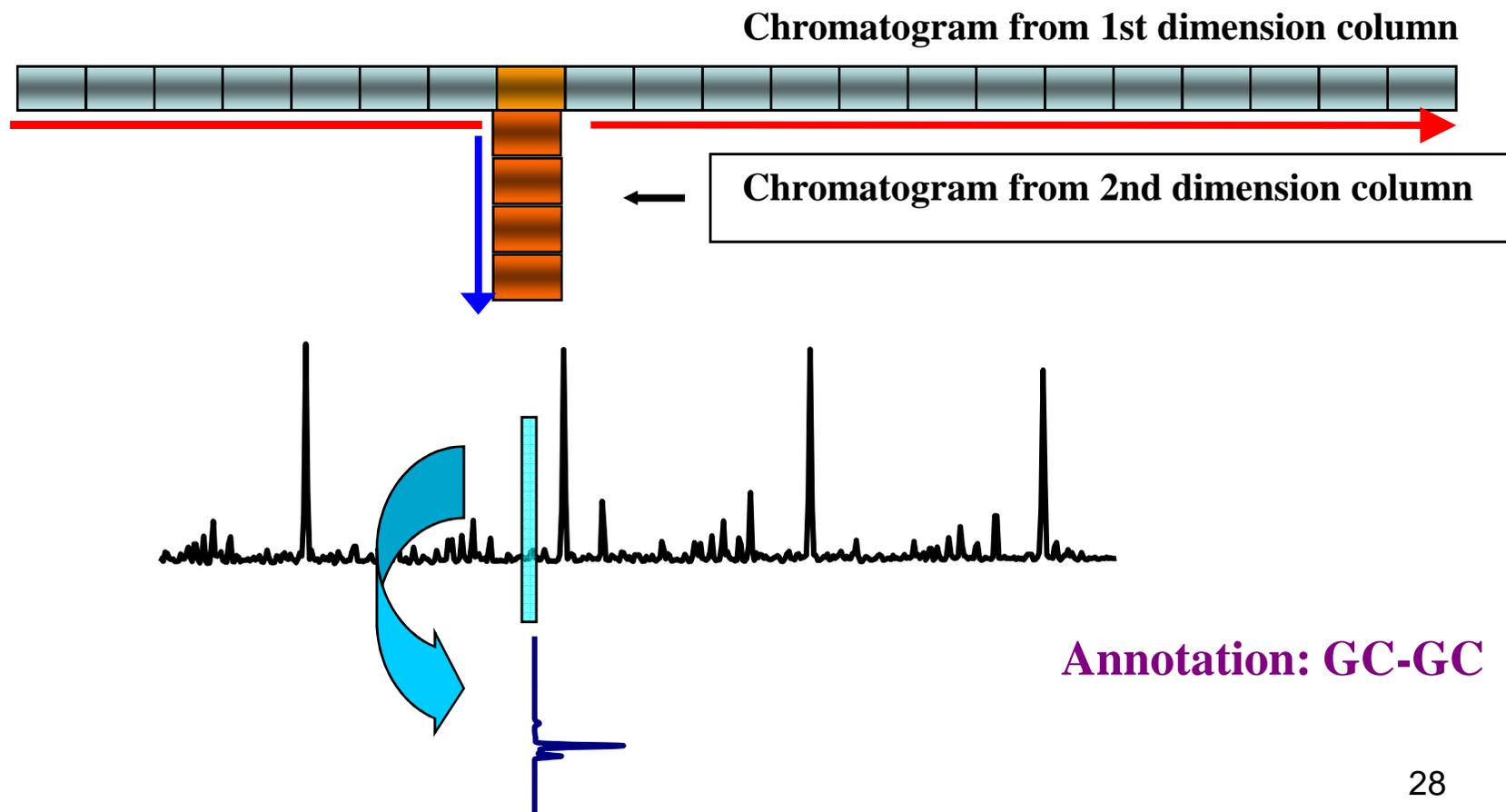
Paola Dugo, Giovanni Dugo and Luigi Mondello, University of Messina, Italy

- <http://chromatographyonline.findanalytic.com/lcgc/data/articlestandard//lcgc-europe/482003/77606/article.pdf>

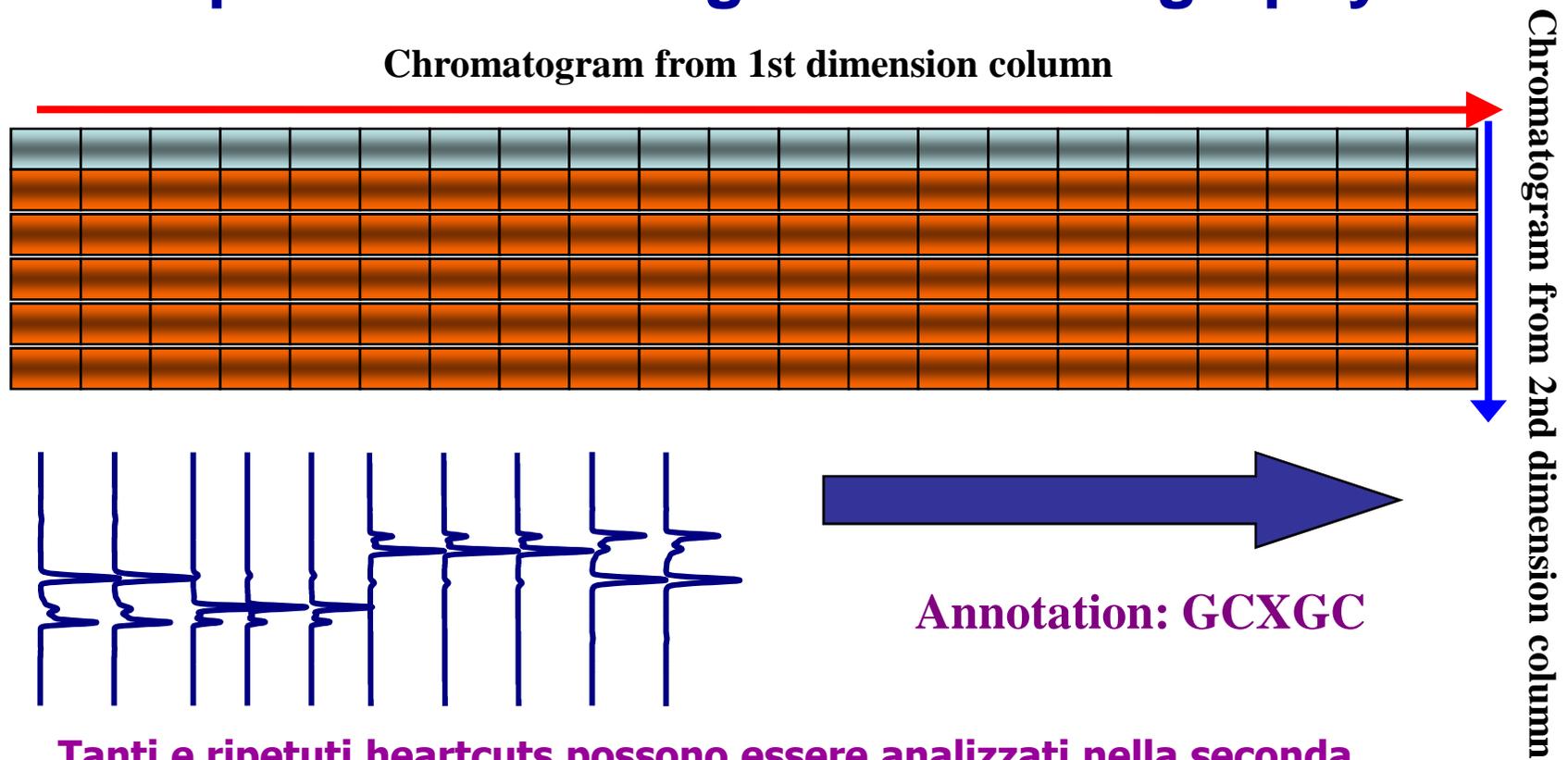
# **Gas cromatografia multidimensionale**

# Heart-cut 2D-chromatography

Una o più frazioni della miscela sono soggette a due step consecutivi di separazione



# Comprehensive 2D-gas chromatography



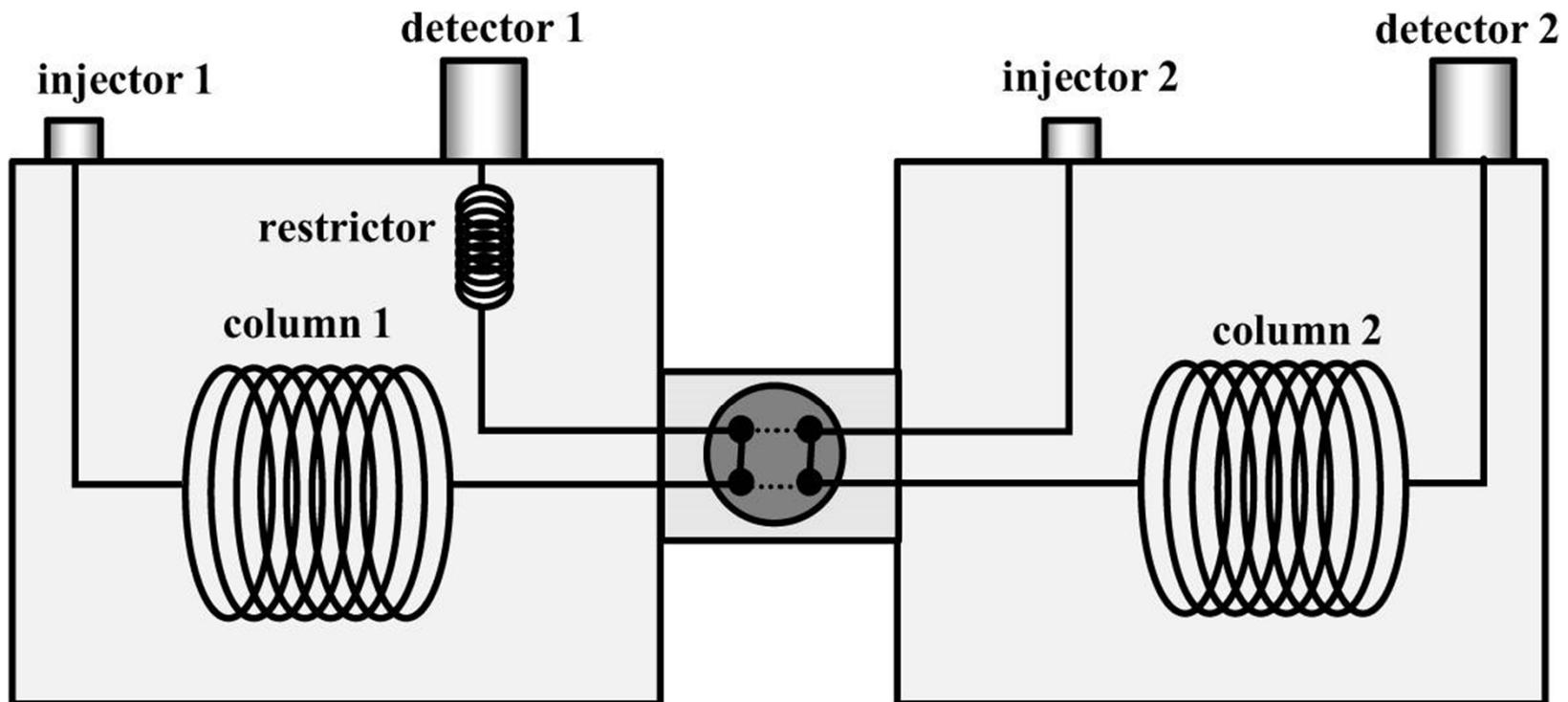
Tanti e ripetuti heartcuts possono essere analizzati nella seconda colonna. Ogni componente della miscela è soggetta a tutte le fasi della separazione



*Ortogonalità*



*Comprensività*



© 2006 Wiley-VCH, Weinheim  
Kellner / Analytical Chemistry  
ISBN: 3-527-30590-4 Fig-21-58

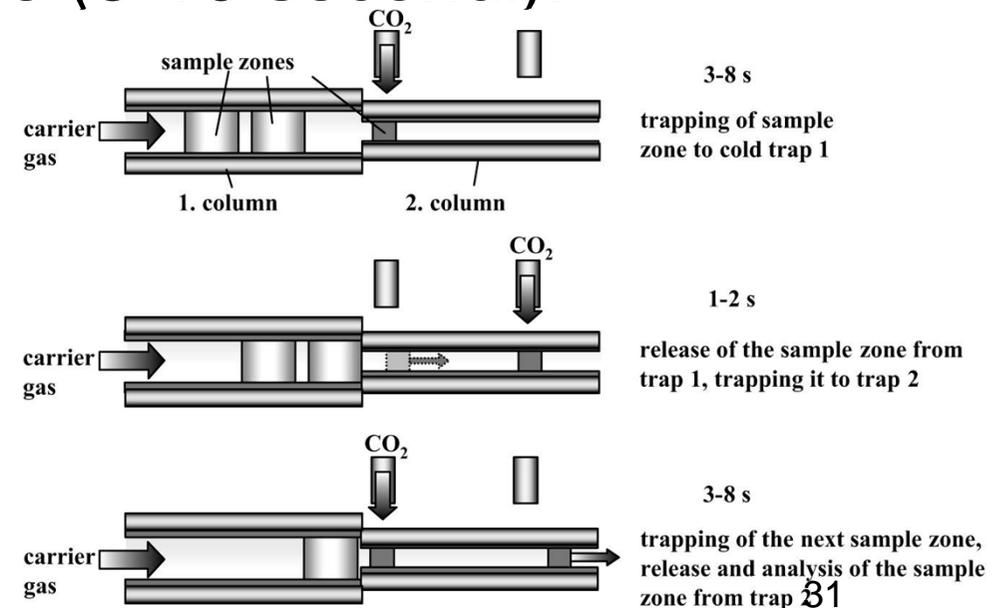
“Comprehensive”

Un forno

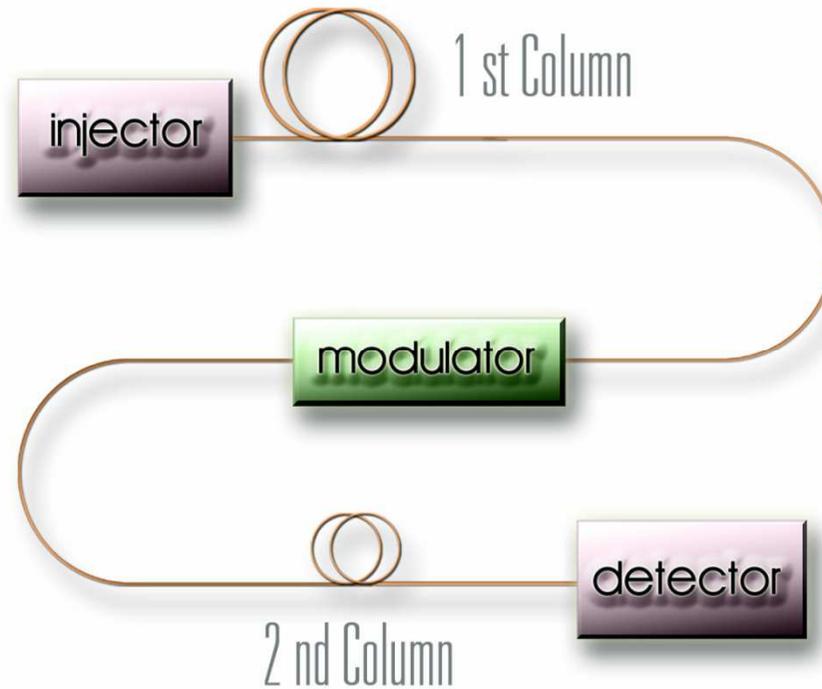
# GCxGC

Una colonna lunga capillare (es. non polare), seconda colonna “narrow bore” (0.2-4 m, 0.05-0.1 id, es polare). “Zone” di campione che escono dalla prima colonna entrano in un **modulatore**, che raccoglie porzioni piccole e separate dell’eluato e le introduce come zone compatte nella seconda colonna. La seconda colonna è veloce (3-10 secondi).

Es.: modulatore criogenico stadi. Flusso di CO<sub>2</sub> liquida in 2 posizioni



## Schema di un Gascromatografo Comprensivo Bidimensionale

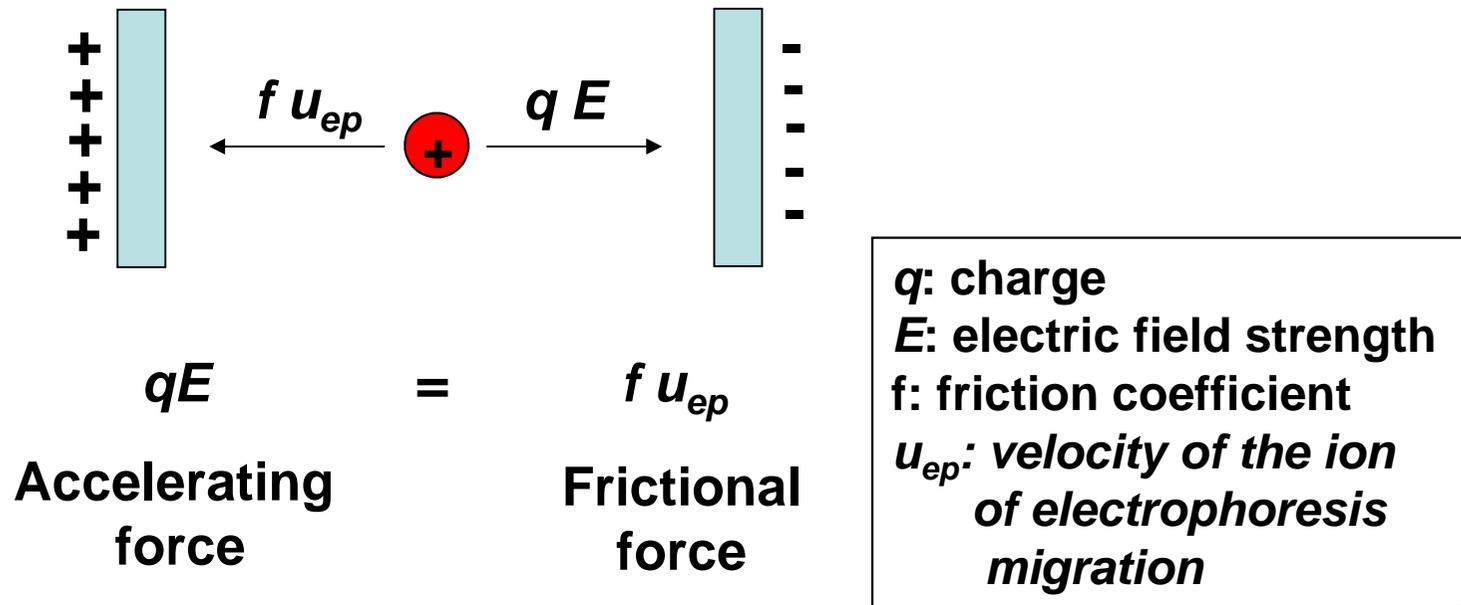




# Capillary Electrophoresis

## 1. Introduction

a. *electrophoresis*: the migration of ions in solution under the influence of an electric field.



## b. Electrophoretic mobility

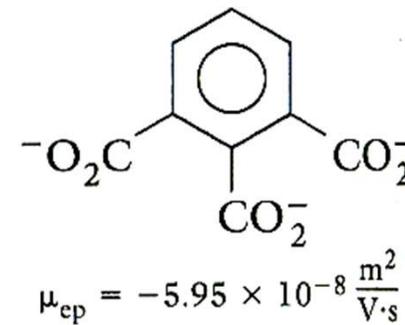
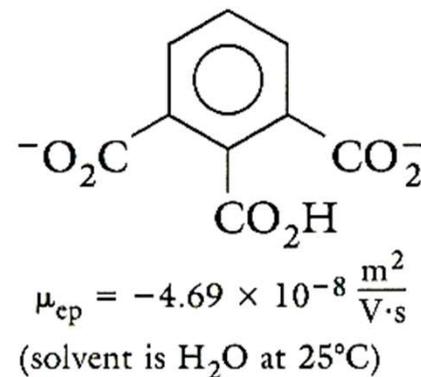
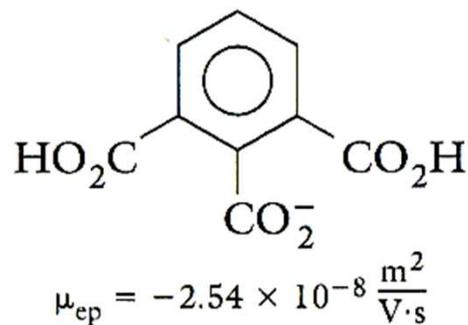
$$u_{ep} = \frac{q}{f} E \equiv \mu_{ep} E$$

↑  
**Electrophoretic mobility**

$$\mu_{ep} = \frac{q}{f} = \frac{u_{ep}}{E}$$

Electrophoretic mobility ( $\mu_{ep}$ ) is a constant and an intrinsic property of an ion. It is dependant on the charge and 3-D structure of the ion.

i. Molecules of similar size, the magnitude of the mobility ( $\mu_{ep}$ ) increases with charge



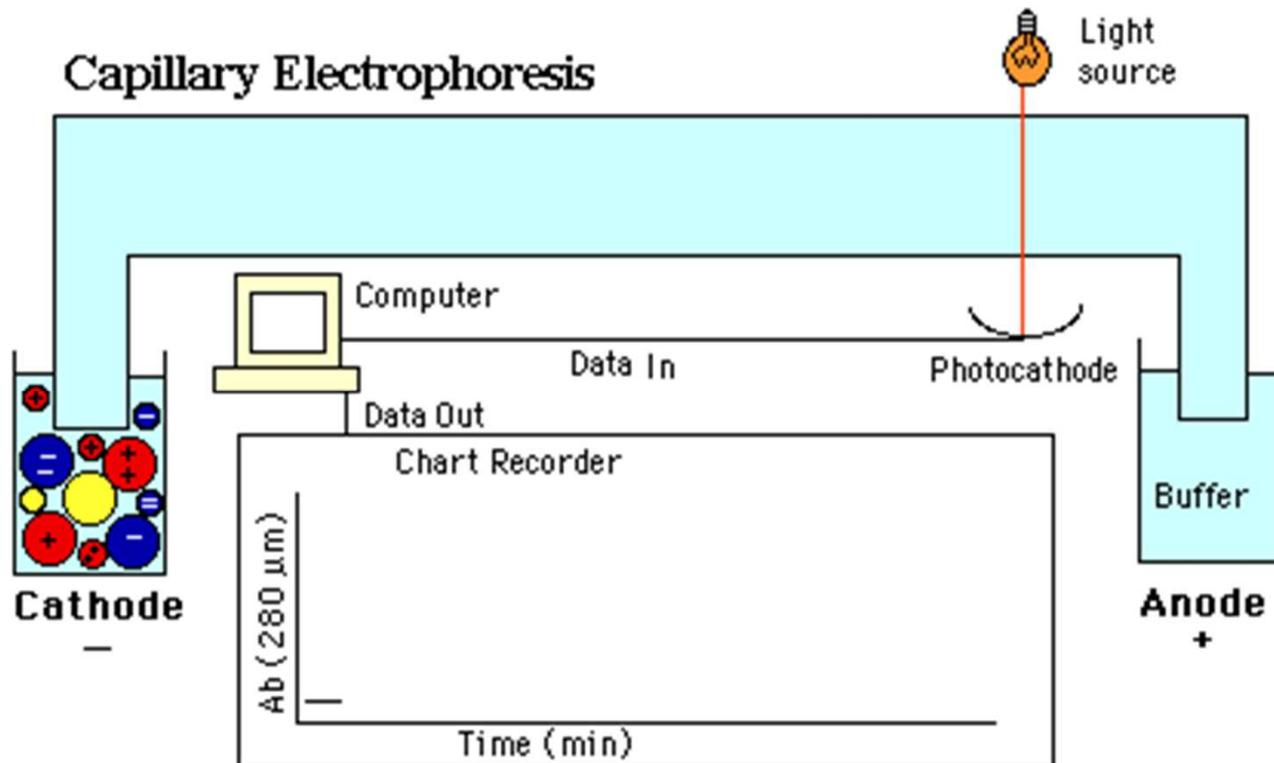
ii. For a spherical particle of radius  $r$  moving through a fluid of viscosity  $\eta$ , the friction coefficient  $f$  is

Stokes equation:  $f = 6\pi\eta r$

$$\mu_{ep} = \frac{q}{6\pi\eta r}$$

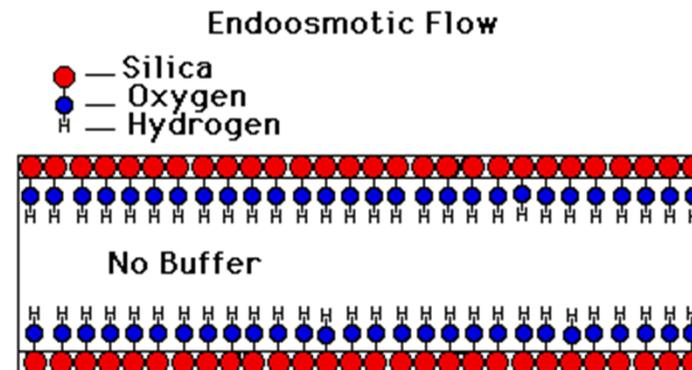
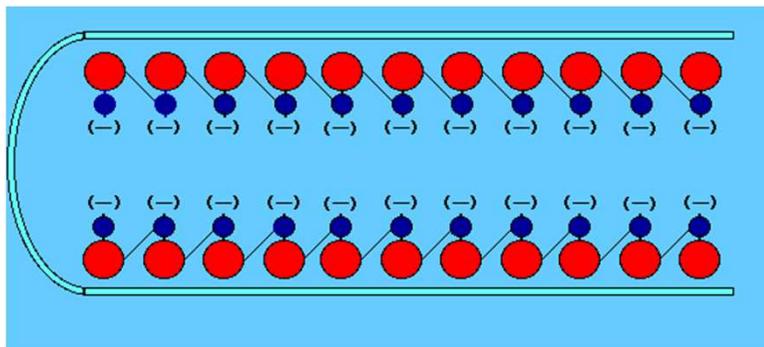
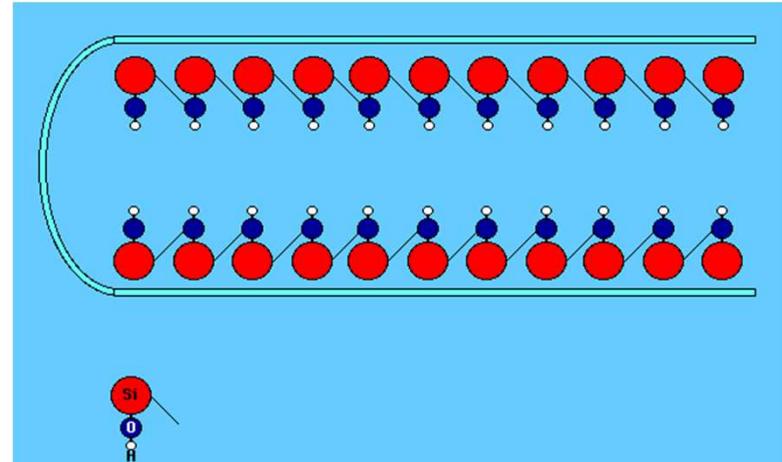
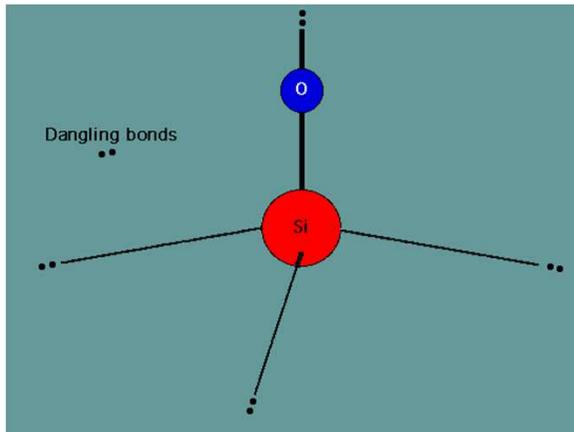
## C. Capillary electrophoresis

Capillary electrophoresis is formed in fused  $\text{SiO}_2$  capillary tube long  $\sim 0.5$  m, inner diameter:  $25\text{-}75\ \mu\text{m}$ .



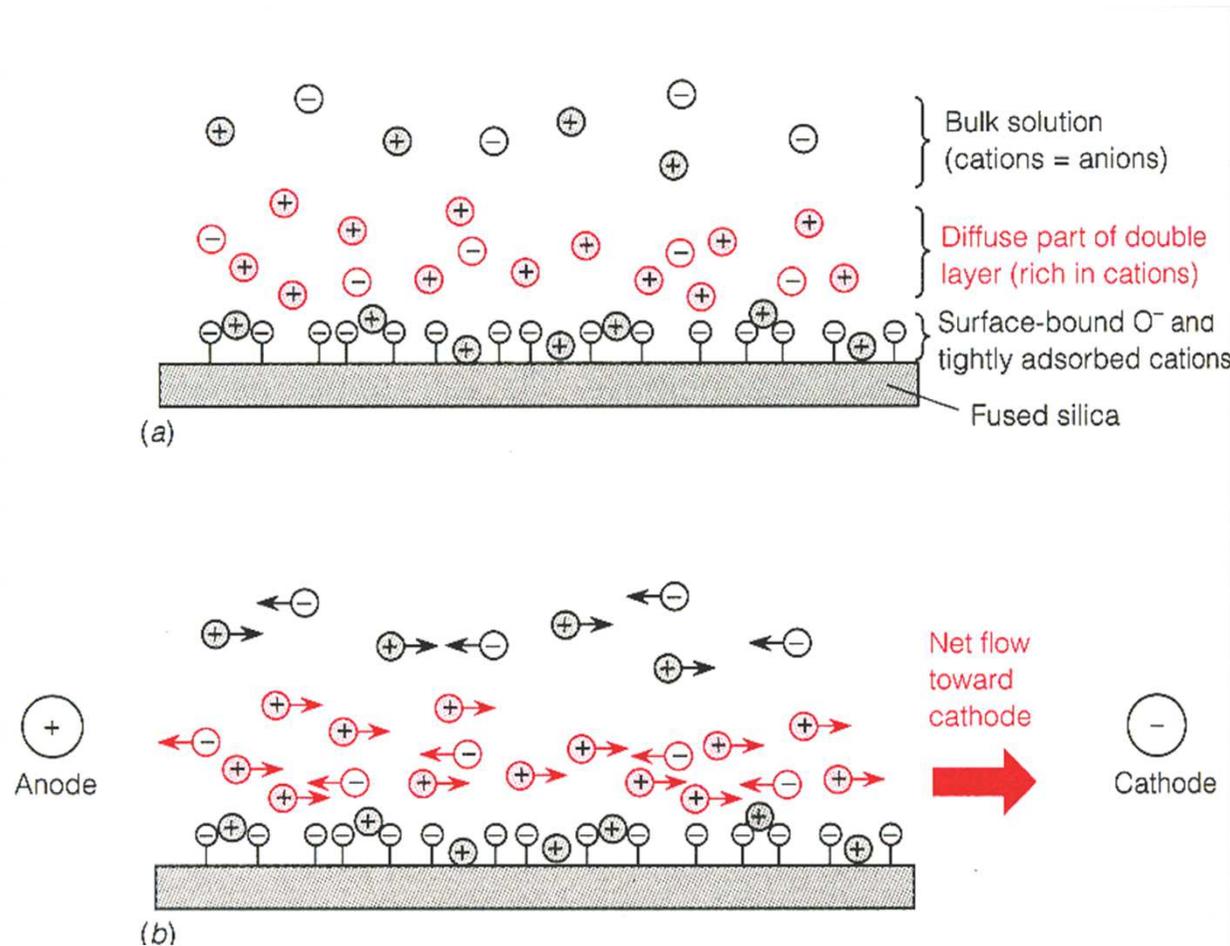
# Fused SiO<sub>2</sub> Capillary Tube?

Fused silica capillary has exposed silanol groups which have a pKa ~ 2 which means that at pH's above this there is a negative surface charge (-SiO<sup>-</sup>)



## Electroosmosis

# Electroosmosis

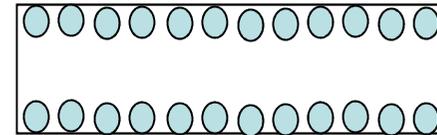


When DC voltage is applied, the excess positive charge ions (cations) migrate toward cathode. This migration is called electroosmosis. The resulted flow of bulk solvents is called electroosmotic flow (EOF) <sup>38</sup>

# Electroosmotic flow (EOF)

Electroosmotic mobility is the constant of proportionality between electroosmotic velocity ( $u_{eo}$ ) and applied field  $E$

$$u_{eo} = \mu_{eo} E$$



Electroosmotic mobility (is proportional to surface charge density on the silica)

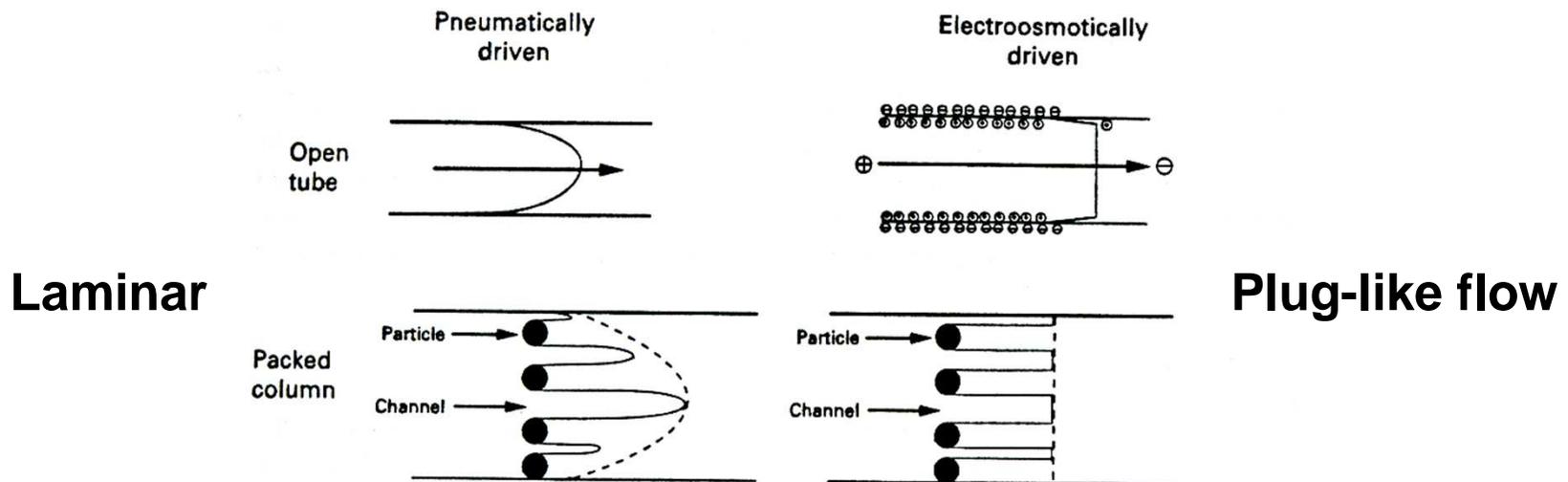
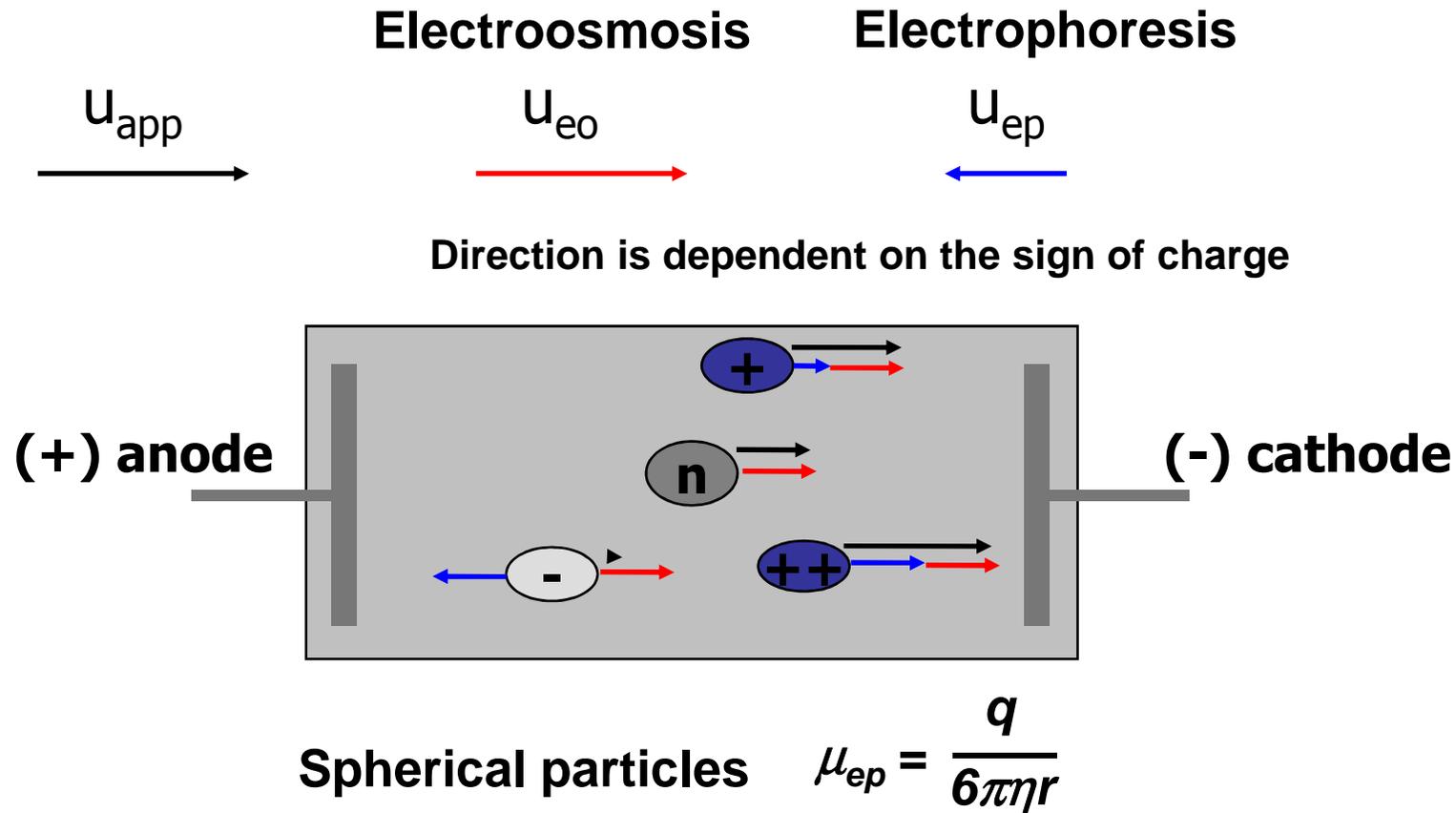


Figure 1.5. Mobile phase flow profile for an open tube and a packed column with pressure-driven and electroosmotic flow.

This is one reason why capillary electrophoresis has better separation efficiency.

# Capillary Electrophoresis

## Apparent Mobility



The electroosmotic force is not necessary always stronger than the electrophoretic force.

**Anion: negative charged ion (-)**

**Cation: positive charged ion (+)**

**Anode: is an electrode through which electric current flows *into* a polarized electrical device.**

**Positive charged electrode in electrophoresis (+)**

**Cathode: cathode is an electrode through which electric current flows *out of* a polarized electrical device:**

**negative charged electrode in electrophoresis (-)**

# Apparent Mobility of An Ion

## Apparent Mobility ( $\mu_{app}$ )

$$\mu_{app} = \mu_{ep} + \mu_{eo}$$

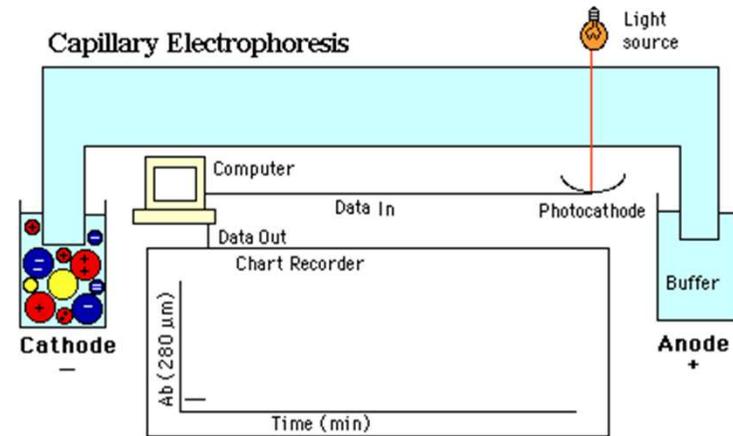
$$\mu_{app} = \frac{u_{net}}{E} = \frac{L_d/t}{V/L_t}$$

$L_d$  is the length from the injector to the detector

$L_t$  is the length from one end to another

$V$  the voltage applied

$t$  is the time required for solute to migrate from the injector to the detector



## Measurement of Electroosmotic mobility

$$\mu_{eo} = \frac{u_{neutral}}{E} = \frac{L_d/t_{neutral}}{V/L_t}$$

# Capillary Electrophoresis

## Separation Efficiency

Recall 
$$H = A + \frac{B}{u_x} + C u_x$$

No particles  $\Rightarrow$  no multiple paths term ( $A = 0$ )

No stationary phase  $\Rightarrow$  no resistance to mass transfer term ( $C = 0$ )

$$H = \cancel{A} + \frac{B}{u_x} + \cancel{C u_x} = \frac{B}{u_x}$$

Increase velocity by increasing applied voltage, but due to solution resistance this generates heat and increases longitudinal diffusion (B)

# Capillary Electrophoresis

$$H = \frac{B}{u_x} = \frac{2D}{u_x} = \frac{2D}{\mu_{app}E} = \frac{2DL}{\mu_{app}V}$$

where  $D$  = diffusion coefficient (m<sup>2</sup>/s)

Number of Plates: 
$$N = \frac{L}{H} = \frac{\mu_{app}V}{2D}$$

- i. Plate number is independent of capillary length at constant !
- ii. The higher the voltage, the greater the number of plates.
- iii. The smaller the diffusion coefficient, the greater the number of plates.

**How many theoretical plates might we hope to attain?**

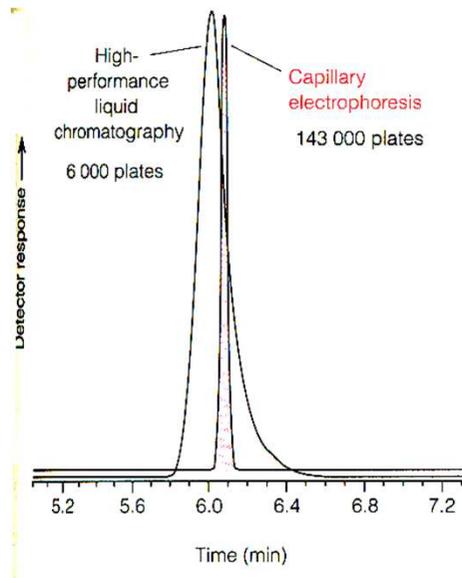
**Using typical values  $\mu_{app} = 2 \times 10^{-8} \text{ m}^2/\text{V}\cdot\text{s}$  which corresponds to a 10 minute migration time in a 55 cm long capillary with 25 kV (Serum albumin (a protein) with  $D = 0.059 \times 10^{-9} \text{ m}^2/\text{s}$ , and  $\text{K}^+$  with  $D = 2 \times 10^{-9} \text{ m}^2/\text{s}$ ).**

$$N = \frac{\mu_{app} V}{2D}$$

**For  $\text{K}^+$ :  $N = 125,000$  plates,  $H = L/N = 4.4 \mu\text{m}$**

**For serum albumin:  $N = 4.2 \times 10^6$  plates  
 $H = L/N = 0.13 \mu\text{m}$**

**A greater plate number means a sharper peak!**



**Figure 24-13** Comparison of peak widths for benzyl alcohol ( $C_6H_5CH_2OH$ ) in capillary electrophoresis and HPLC. [From S. Fazio, R. Vivilecchia, L. Lesueur, and J. Sheridan, *Am. Biotech. Lab.* January 1990, p. 10.] Separations with  $\sim 3$  million plates have been demonstrated [R. D. Smith, J. O. Olivares, N. T. Nguyen, and H. R. Udseth, *Anal. Chem.* 1988, 60, 436].

## Other on-column band-broadening

### i. Joule heating , ii. Mixing due to unstable density gradients

**a. Joule heating** is an uneven heating thermal effect caused by electric field ( $I^2Rt$ ). This effect occurs throughout the packed bed or open tube and results in solvent at different point in the system having different temperature. There thermal gradients are produced because solution at the edges of the system can give off heat more easily than that near the center.

**TABLE 24-6** Heat generation in capillary electrophoresis<sup>a</sup>

Buffer	Current density (A/cm <sup>2</sup> )	Temperature difference (K) (capillary center to capillary wall)
100 mM sodium phosphate, pH 7.0	4.0	0.30
50 mM sodium citrate, pH 2.5	0.90	0.066
20 mM 3-(cyclohexylamino)propane sulfonate (CAPS), pH 11.0	0.31	0.024

a. Fused silica capillary with 50- $\mu$ m diameter and electric field of  $2.5 \times 10^4$  V/m.

SOURCE: Data from P. D. Grossman and J. C. Colburn, *Capillary Electrophoresis: Theory and Practice* (San Diego: Academic Press, 1992), Chapter 1.

**b. The result of these thermal gradients is that solute and solvent molecules at different points in the system mix unevenly. This gives rise to band-broadening.**

**c. Ways of decreasing band-broadening due to Joule heating**

**(1) low current (optimizing).**

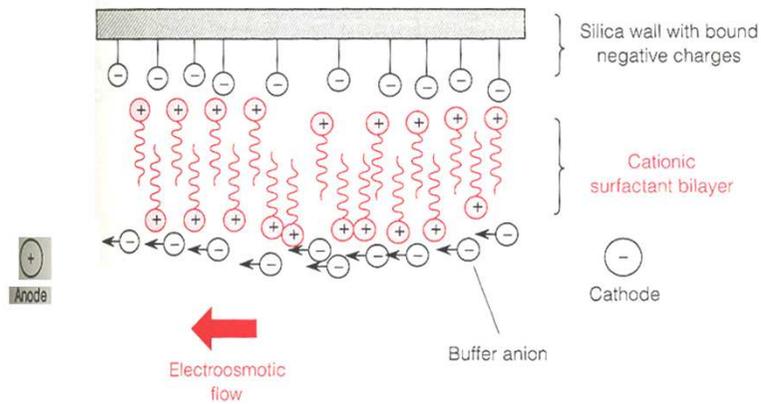
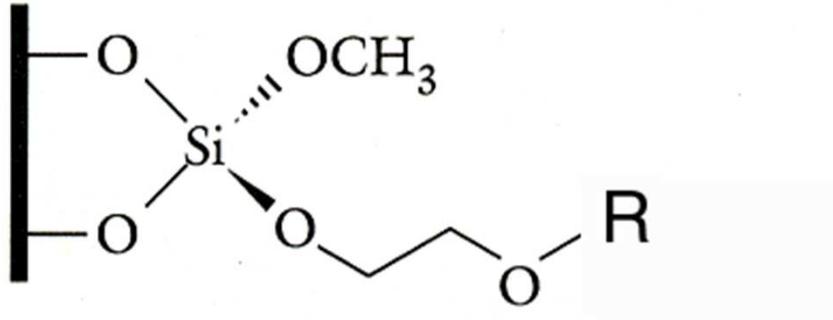
**Although plate number is independent of capillary length at constant. Increasing length allows applying a higher voltage!**

**(2) the use of packed-bed system prevents mixing of solvent from different regions of the system.**

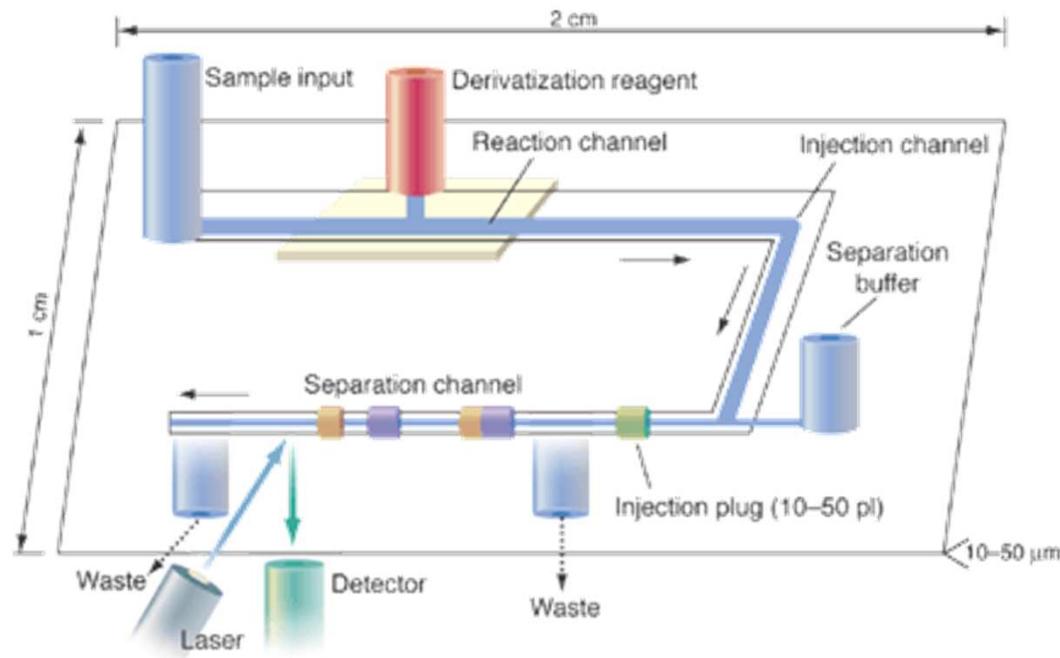
**(3) the use of more efficient cooling prevents the formation of the thermal gradients.**

# Column modification

Example of covalent wall coating:



# Instrumentation

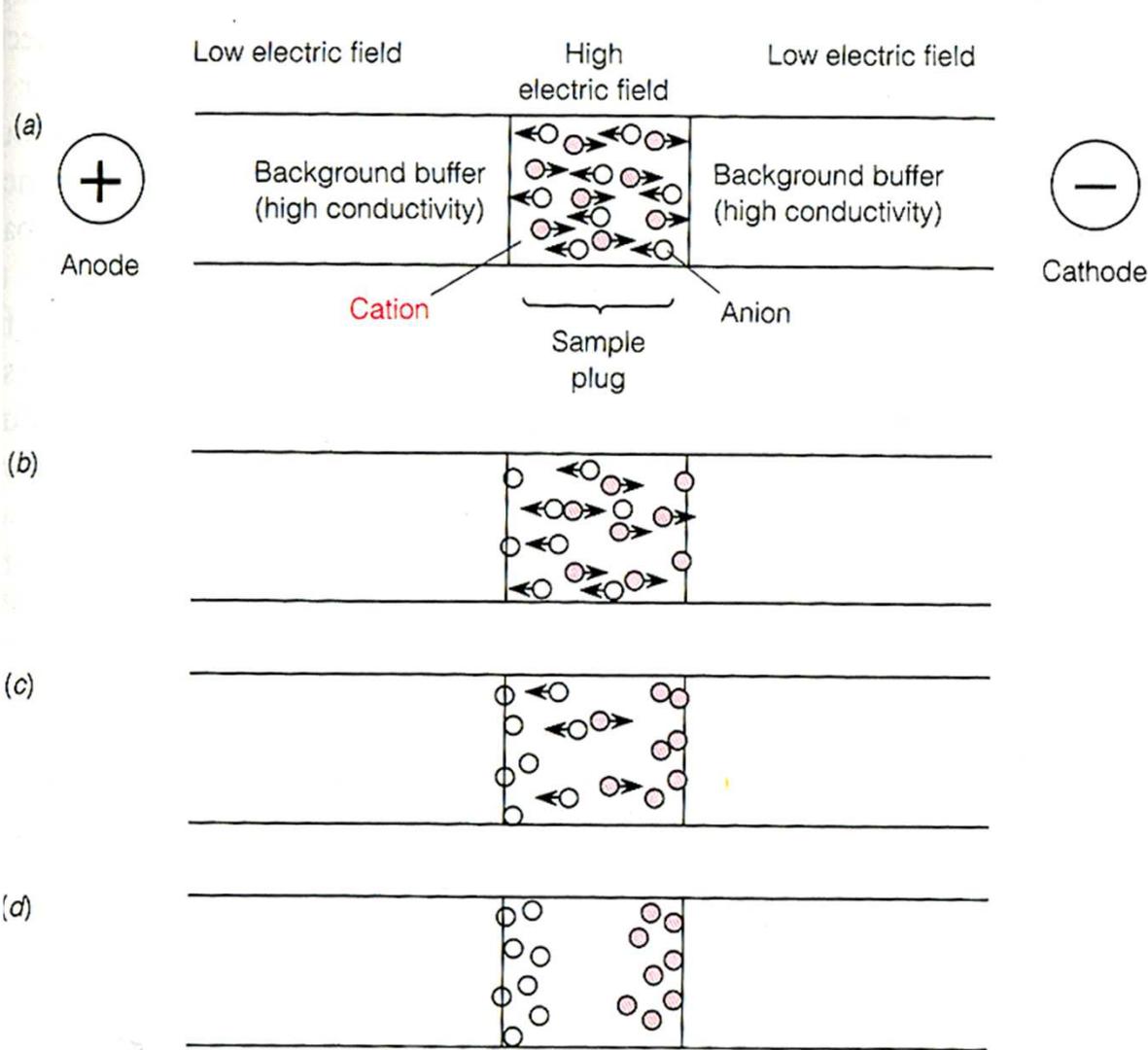


## 1. Injection (Sample volumes are typically in the nL range) :

a. Hydrodynamic injection-use of a pressure differential between the ends of the capillary

b. Electrokinetic-injection based on the  $m_{app}$  which means that different analytes have different mobilities and the injected sample has different composition than the original sample. It allowing pre-separation sample focusing.

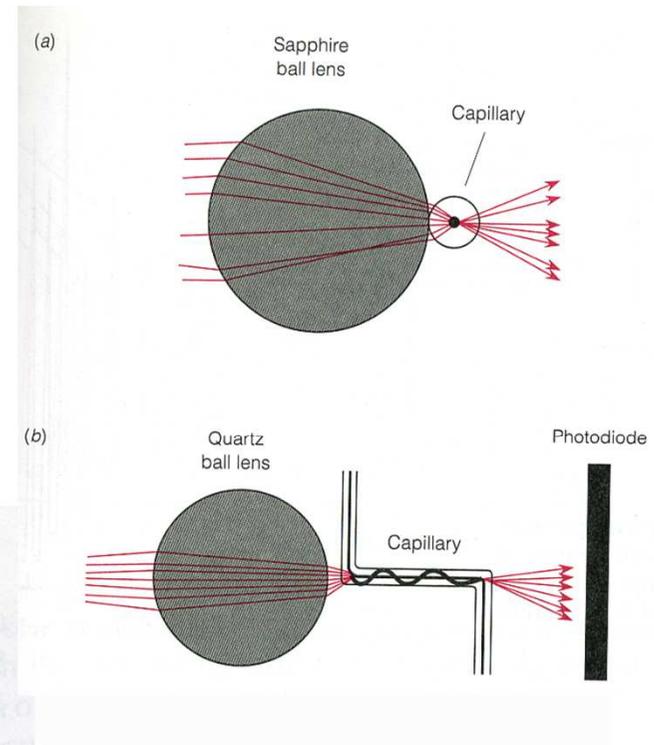
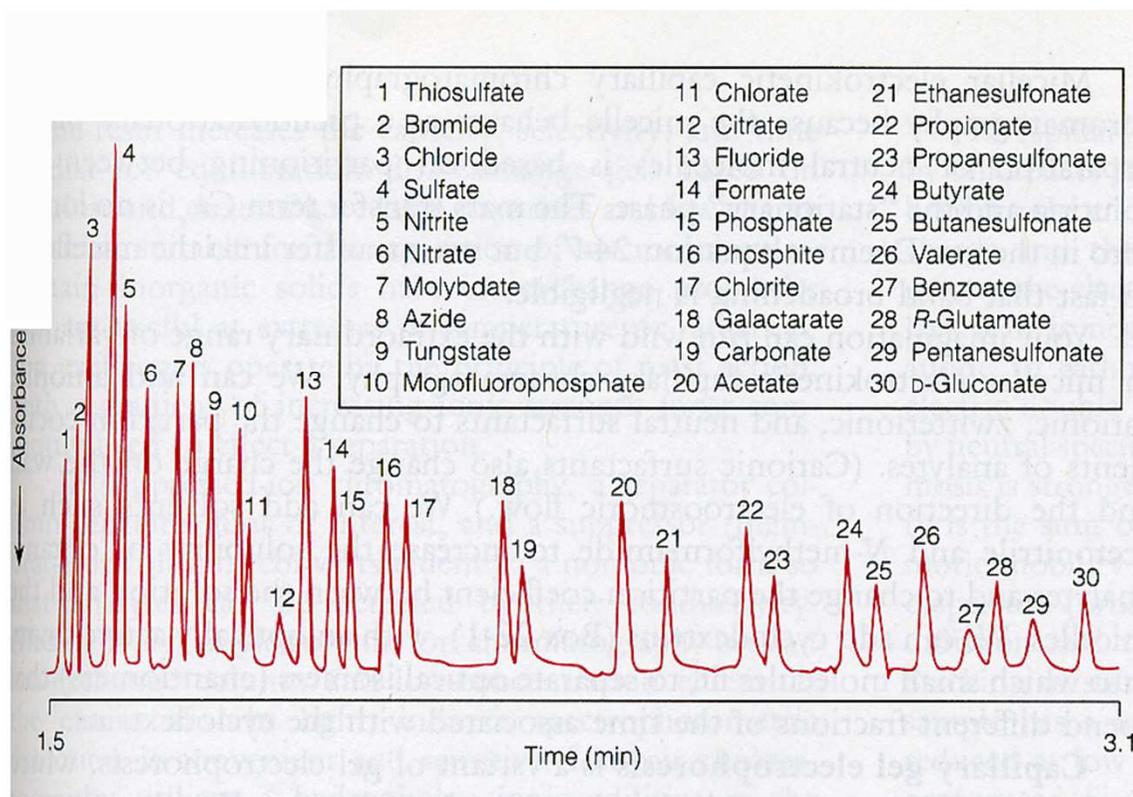
# pre-separation sample focusing



# Detection:

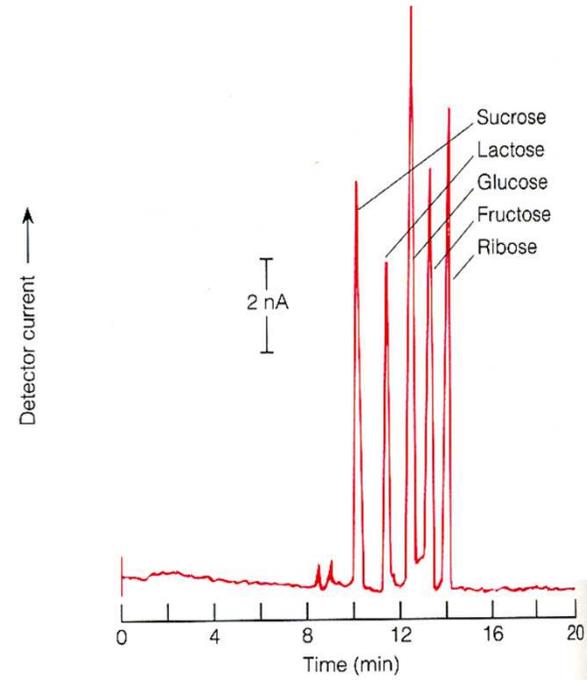
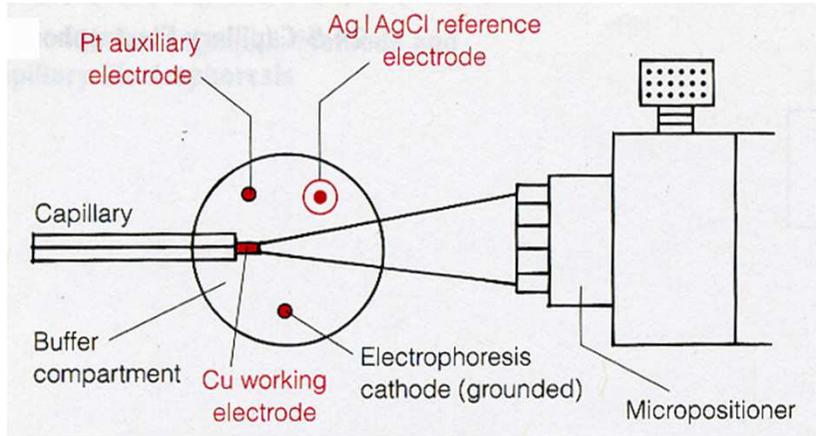
## 1. Absorption:

## 2. Fluorescence:

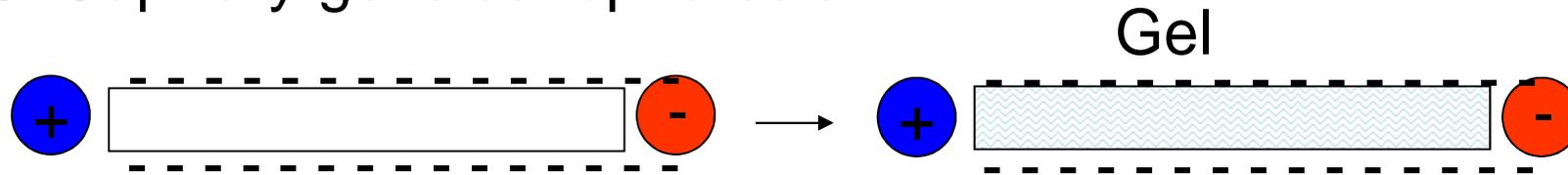


**Figure 24-24** Anion separation with indirect ultraviolet absorbance detection (254 nm) of  $\text{CrO}_4^{2-}$  in the background electrolyte. Thirty anions were separated in 3 min on a 50- $\mu\text{m}$ -diameter  $\times$  60-cm-long capillary at 30 kV. [From W. R. Jones, P. Jandik, and R. Pfeifer, *Am. Lab.* May 1991, p. 40.]

### 3. Conductivity



## 5. Capillary gel electrophoresis

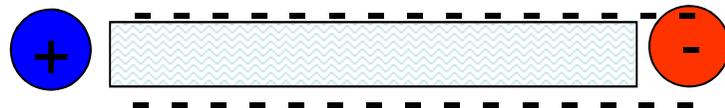


- a. Blocking the solute diffusion caused by Joule heating
- b. Size of the channels in the gel gives further selection (entropy  $\epsilon$ )

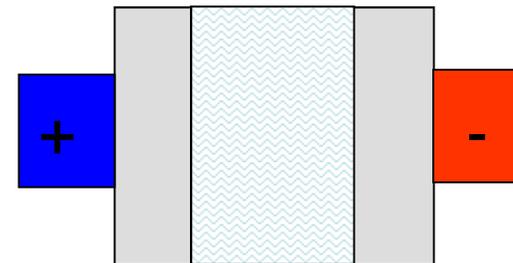
## B. Electrophoresis for Bio-Applications

Separation of DNA, RNA, and protein

Capillary gel electrophoresis



Gel electrophoresis



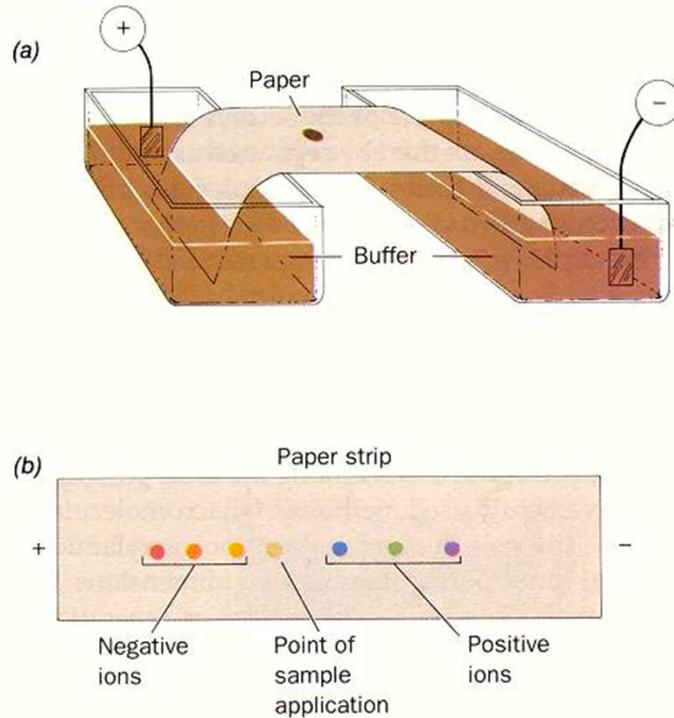
Electroosmosis can play a significant role in capillary gel electrophoretic separation, but not in gel electrophoretic separation. Both techniques separate solutes by their electrophoretic mobility.

# Materiali di supporto

- Storicamente carta
- Acetato di cellulosa
- Agarosio
- Poliacrilammide

# ELETTROFORESI SU SUPPORTO

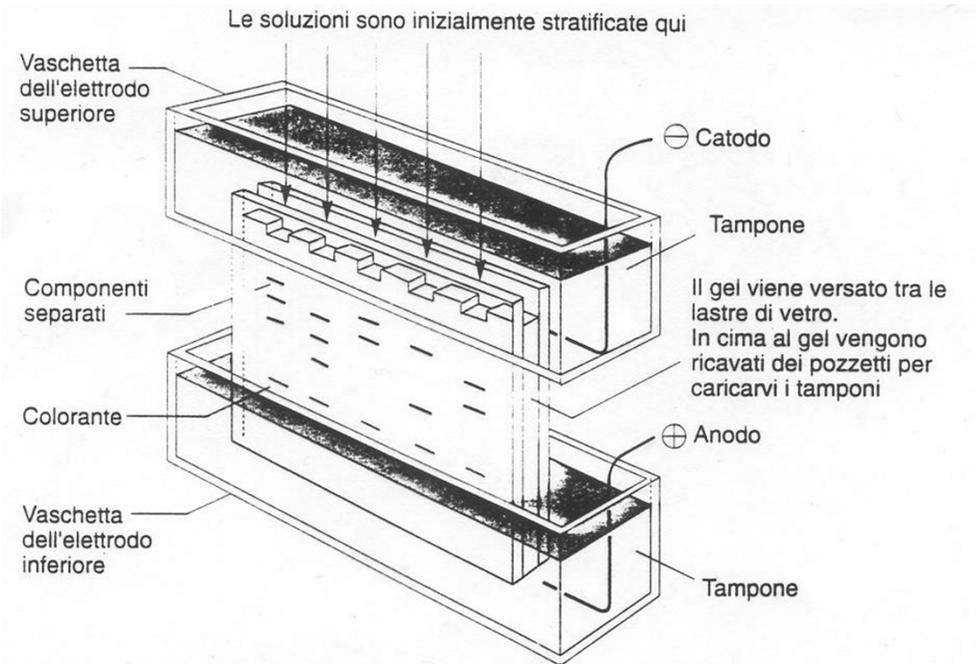
## su carta



**Figure 5-20**

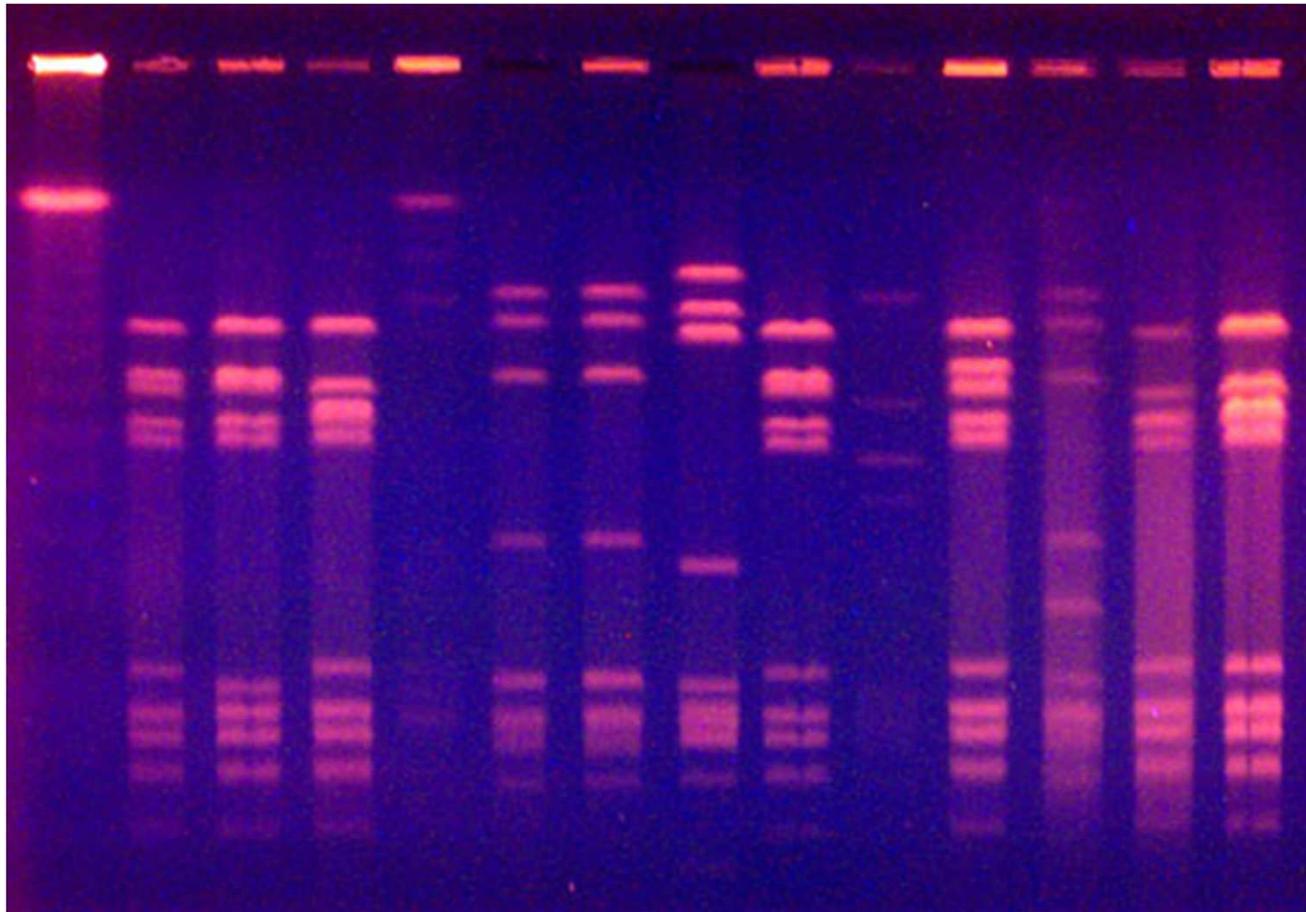
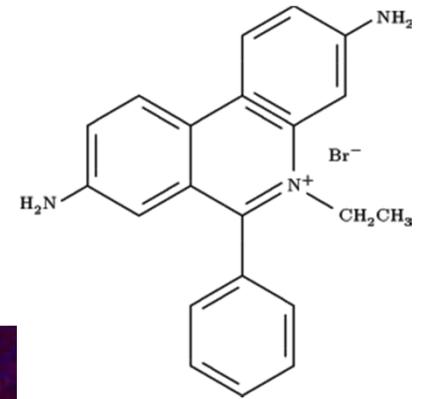
Paper electrophoresis. (a) A schematic diagram of the apparatus used. The sample is applied to a point on the buffer-moistened paper. The ends of the paper are dipped into reservoirs of buffer in which the electrodes are immersed and an electric field is applied. (b) A schematic representation of a completed paper electrophoretogram. Note that positive ions (cations) have migrated towards the cathode and negative ions (anions) have migrated towards the anode. Uncharged molecules remain at the point of sample application.

## su gel

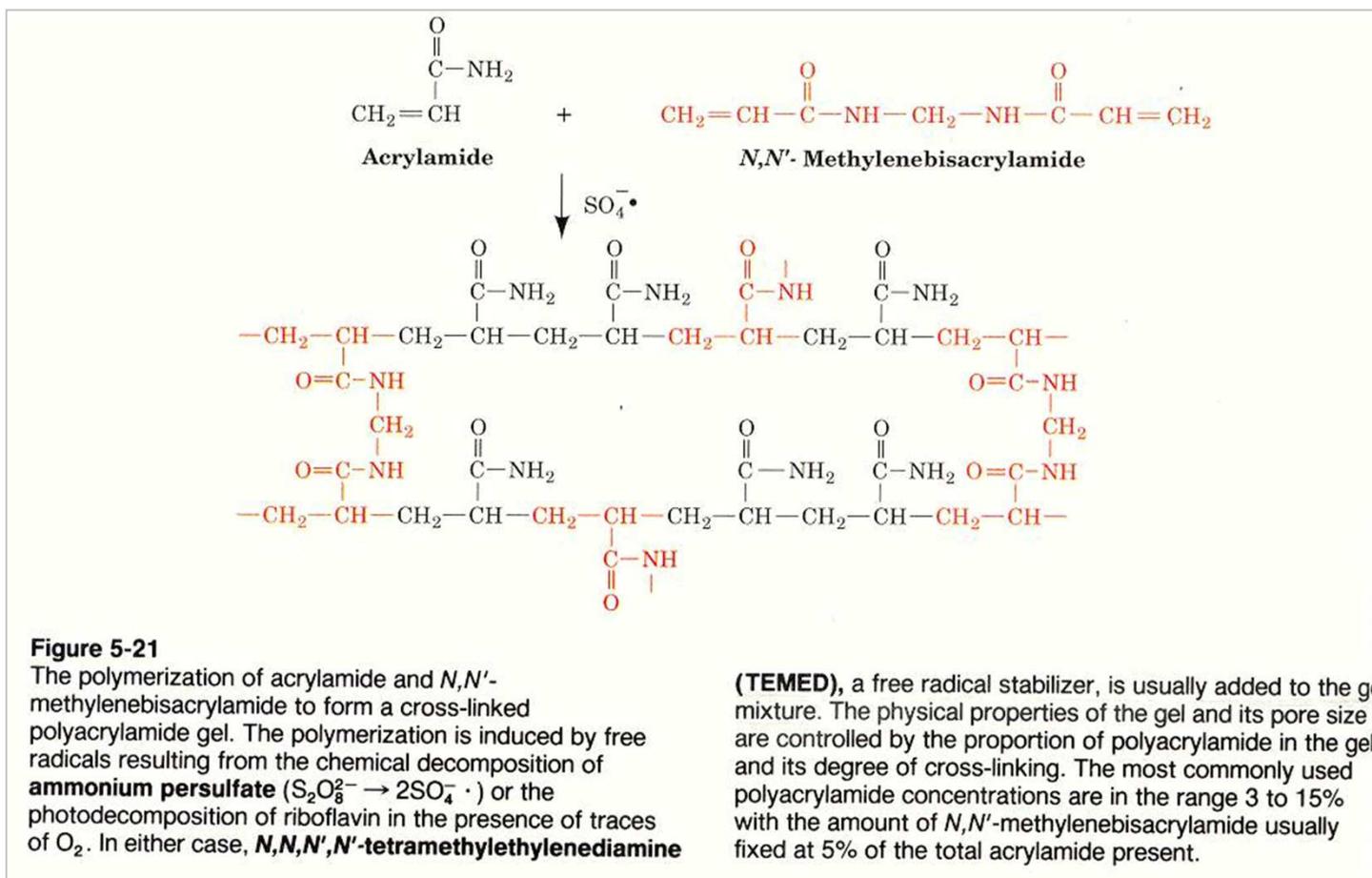


# Gel di agarosio – Elettroforesi orizzontale



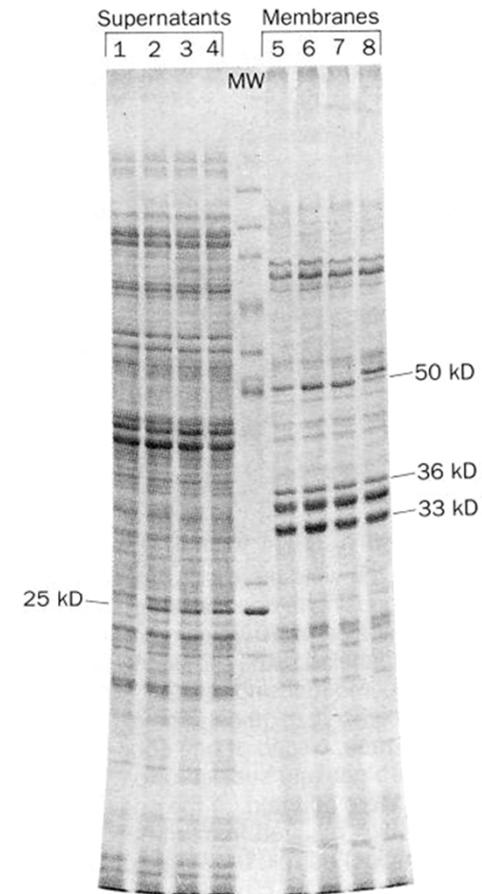
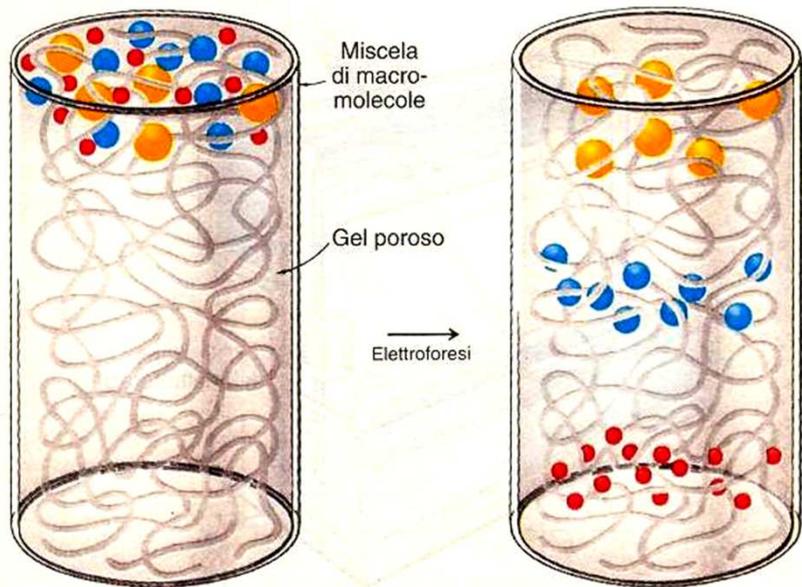


## Formazione di un gel di poliacrilammide



- Acrilamide, bisacrilamide → monomeri
- Ione perossodisolfato → iniziatore
- TEMED → catalizzatore
  
- L'ossigeno è un radicale, quindi interferisce con la polimerizzazione

## Effetto “setaccio” in un gel uniforme



**Figure 5-26**

The SDS-polyacrylamide disc electrophoresis pattern of the supernatant (*left*) and membrane fractions (*right*) of various strains of the bacterium *Salmonella typhimurium*. Samples of 200- $\mu$ g of protein each were run in parallel lanes on a 35-cm long  $\times$  0.8-mm thick slab gel containing 10% polyacrylamide. The sample marked MW contains molecular weight standards. [Courtesy of Giovanna F. Ames, University of California, Berkeley.]