

CHIMICA ANALITICA II

CON LABORATORIO

(AA 2018-19)

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

GASCROMATOGRAFIA

INTRODUZIONE

I composti da analizzare sono vaporizzati nel sistema di iniezione ed eluiti attraverso una colonna con l'aiuto di un gas come fase mobile.

*La **fase mobile** è usata soltanto come **gas di trasporto (carrier gas)** il che significa che non ci sono interazioni chimiche significative tra analiti e f.m.*

*Le **fasi stazionarie** possono essere **liquide** (partizione liquido/gas (GLC detta anche GC) che viene utilizzata per analisi di composti organici) **o solide** (adsorbimento – GSC- "gas-solid chromatography"; es. analisi dei gas dell'aria)*

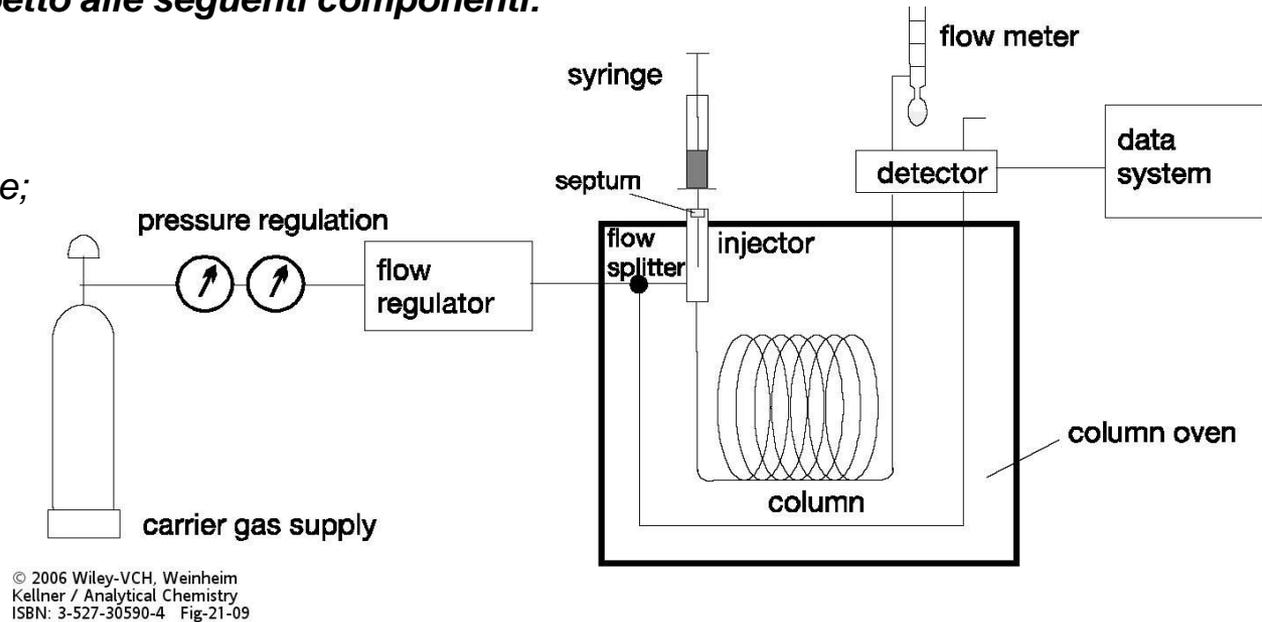
- *nelle **CROMATOGRAFIE DI PARTIZIONE** la fase stazionaria è un film liquido supportato su solido e le sostanze si separano in dipendenza dei loro coefficienti di partizione tra la fase mobile e la fase stazionaria;*
- *nelle **CROMATOGRAFIE PER ADSORBIMENTO** la fase stazionaria è solida e le sostanze si separano a seconda della loro affinità di adsorbimento sulla fase solida.*

*Le analisi gas cromatografiche sono adatte per **analiti volatili, termicamente stabili, non polari, o che possono esser resi tali** da opportune reazioni (→ **DERIVATIZZAZIONE**).*

La strumentazione

La strumentazione può variare rispetto alle seguenti componenti:

- *Tipo di carrier gas usato;*
- *Regolatore del gas;*
- *Sistema di iniezione del campione;*
- *Colonna cromatografica;*
- *Rivelatore*



- ✓ Il flusso e le pressioni del **carrier gas** sono aggiustati con regolatori di flusso e pressione e il gas è diretto attraverso l'iniettore alla colonna cromatografica.
- ✓ Il **campione** è introdotto in uno speciale iniettore o direttamente iniettato in colonna (i campioni liquidi vengono vaporizzati).
- ✓ Gli analiti sono separati nella **colonna** che è mantenuta in un forno a temperatura controllata. Usualmente si impiega un gradiente di temperatura per migliorare la separazione.
- ✓ Sono disponibili diverse tipologie di rivelatori, con selettività e specificità anche elevata.
- ✓ La strumentazione moderna è controllata da computer.

➤ Programmi di temperatura (del forno)

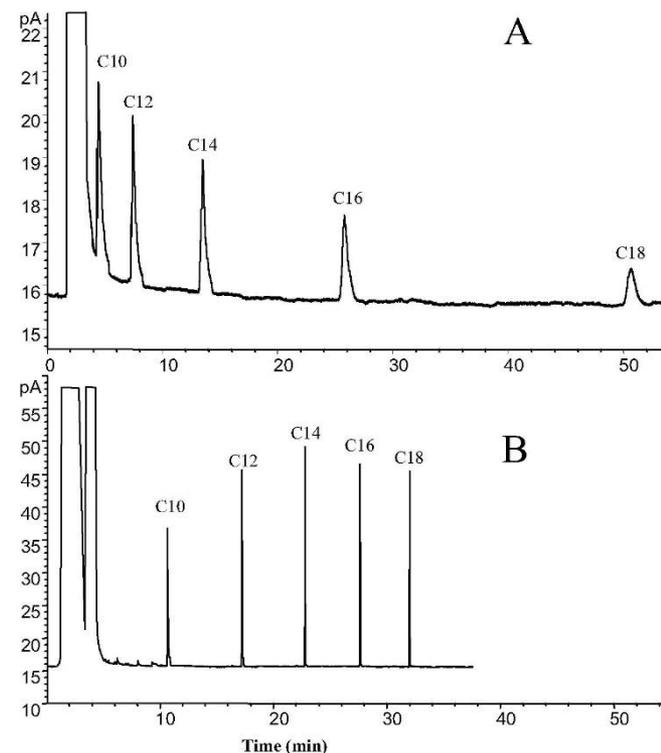
- Il **coefficiente di partizione**, espresso in GLC dalla seguente equazione (già trattata in precedenza) relativa ai volumi

$$V_R' = K V_S$$

è, come tutte le costanti di equilibrio, dipendente dalla **Temperatura**.

- Come già visto, i volumi di ritenzione dipendono dalle pressioni di vapore degli analiti ad una data temperatura;
- Un aumento di temperatura aumenta la pressione di vapore e quindi aumenta la velocità di eluizione;
- Secondo la correlazione di Clausius-Clapeyron **il tempo di ritenzione aumenta logicamente in funzione dell'aumento di temperatura**;
- In GC, utilizzando programmi di temperatura si riescono a separare miscele contenenti componenti con un ampio intervallo di punti di ebollizione, infatti le sostanze ad alto punto di ebollizione rimangono in testa alla colonna a corsa cromatografica già iniziata, finché il forno non raggiunge una temperatura adeguata a volatilizzare le sostanze che iniziano a muoversi lungo la colonna.

V_R' = volume di ritenzione corretto,
 V_S = volume della fase stazionaria
 K = coefficiente di partizione



© 2006 Wiley-VCH Weinheim
 Kellner / Analytical Chemistry
 ISBN: 3-527-30590-4 Fig.21-22

- (A) Isoterma a 175 °C
 (B) Temperatura programmata

Eqz. Clapeyron
$$\frac{dp}{dT} = \frac{\lambda}{T(v_B - v_A)}$$

Esempio ANALISI QUALITATIVA DI

COMPOSTI ORGANICI VOLATILI (VOC) DI

MIELI MEDIANTE TECNICA HS-SPME-GC-MS

APPARECCHIATURA:

Materiali correnti da laboratorio, in particolare:

- bilancia analitica;
- vial di vetro da 20 ml capsula dotata di setto PTFE/silicone;
- fibra per SPME della Supelco (1 cm – 50/30 µm DVB/CAR/PDMS);
- gascromatografo Agilent HP 6890 (implementato con un sistema di auto-campionamento Gestel MPS22-Twister), dotato di colonna cromatografica Agilent DB-5ms Ultra Inert cod. 122-5562 UI (30 m × 0,25 mm di diametro interno) ricoperta di Phenyl Arylene [(5%-Phenyl)-methylpolysiloxane] la cui pellicola ha uno spessore di 0,25 µm; gas carrier: elio;
- spettrometro di massa Agilent 5973i.

PROCEDIMENTO:

Si pesano all'interno di una vial 5 g di miele, si aggiungono 5 mL di acqua distillata e 1 g di NaCl (per saturare la soluzione e produrre l'effetto "salting-out") e si chiude ermeticamente la vial con l'apposita capsula. La vial viene riposta nell'apposito piatto dell'auto-campionatore.

L'analisi prevede:

- l'incubazione del campione a 60°C per 2 min con agitazione a 250 rpm;
- l'esposizione della fibra nello spazio di testa per 40 min a 60°C con agitazione a 250 rpm;
- il desorbimento della fibra nell'iniettore del gascromatografo a 265°C per 240 s.

Nel momento in cui inizia il desorbimento della fibra nell'iniettore inizia la registrazione della corsa cromatografica e la ***rampa di temperatura del forno, come segue: 50°C mantenuti per 0.50 min, rampa da 50°C a 120°C alla velocità di 6°C/min, 120°C mantenuti per 0.50 min, rampa da 120°C a 220°C alla velocità di 8°C/min, 220°C mantenuti per 0.37 min, rampa da 220°C a 260°C alla velocità di 15°C/min, 260°C mantenuti per 2.00 min, per un totale di 30 min.*** L'intervallo di acquisizione dello spettrometro di massa è impostato tra 35 m/z e 300 m/z in Total Ion Current (TIC scan time = 0.7 s).

➤ Rivelatori

RIVELATORI	specie rilevate	LOD	area lineare
TCD	non specifico	$10^{-8} \text{ g mL}^{-1}$	10^4
FID	specie contenenti CH	$10^{-13} \text{ g s}^{-1}$	10^7
ECD	gruppi elettroaffini	$10^{-14} \text{ g s}^{-1}$	5×10^4
TID	P	$10^{-15} \text{ g s}^{-1}$	10^5
	N	$10^{-14} \text{ g s}^{-1}$	
FPD	P	$3 \times 10^{-13} \text{ g s}^{-1}$	10^5
	N	$2 \times 10^{-11} \text{ g s}^{-1}$	

➤ *TCD = Thermal Conductivity Detector;*

➤ *FID = Flame Ionization Detector;*

➤ *ECD = Electron Capture Detector;*

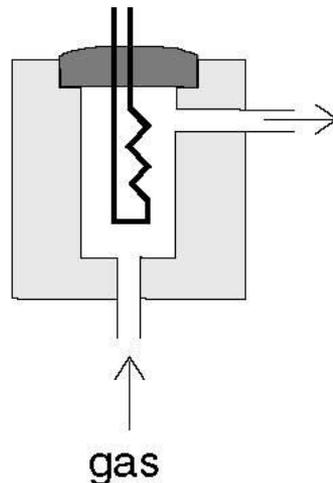
➤ *TID = Thermo-Ionic Detector o NPD = Nitrogen-Phosphorus Detector;*

➤ *FPD = Flame Photometric Detector.*

➤ *MS = Spettrometro di Massa (sempre più impiegato in virtù della possibilità di identificare picchi generati da composti incogniti)*

❖ TCD (Thermal Conductivity Detector)

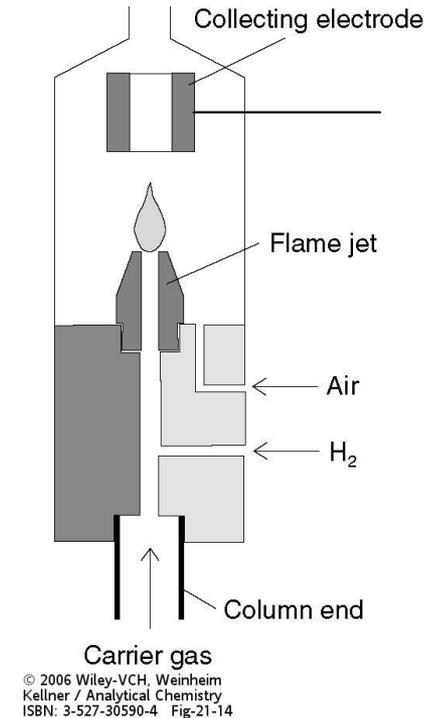
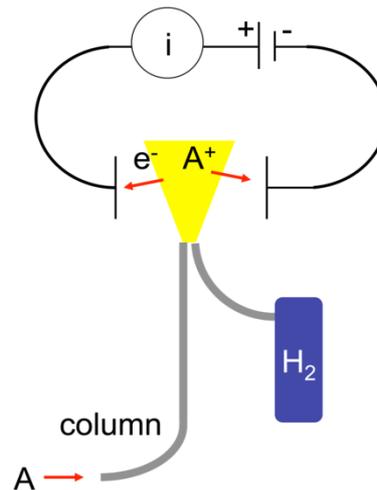
- In presenza dell'analita al rivelatore, si ha riduzione della conducibilità termica del carrier gas (He o H₂). Le conducibilità termiche di He o H₂ sono 6 - 10 volte maggiori di quelle di vapori organici;
- Il filamento cambia resistenza rispetto al filamento non esposto a campione (simile a Ponte di Weathstone);
- Il segnale è proporzionale alla concentrazione.
- E' un detector aspecifico (risponde sia a specie organiche che inorganiche) e poco sensibile, ma è "non distruttivo".



© 2006 Wiley-VCH, Weinheim
Kellner / Analytical Chemistry
ISBN: 3-527-30590-4 Fig-21-13

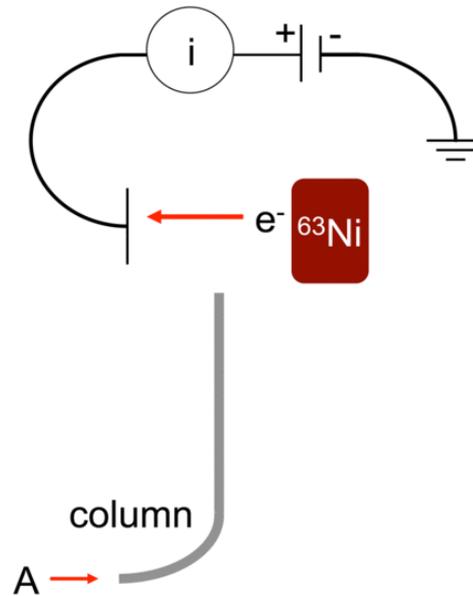
❖ FID (Flame Ionization Detector)

- Consiste nella variazione della conducibilità elettrica in una fiamma alimentata da idrogeno quando questa è alimentata da composti organici, il tutto in presenza di un campo elettrico.
- I composti organici vengono pirolizzati (frammentati) e ossidati generando elettroni:
 $CH\cdot + O \rightarrow CHO^+ + e^-$
- Rivela legami CH e CC, poco legami CO, COH, gruppi amminici o alogeni;
- Il detector risponde al numero di C per unità di tempo;
- Limit Of Detection (LOD) basso;
- Ampio intervallo di linearità (concentrazione vs. segnale);
- E' un detector distruttivo.



❖ ECD (Electron Capture Detector)

- Questo detector usando un emettitore β (Ni o trizio) genera una corrente costante di ioni e elettroni nel carrier gas.;
- In presenza di un analita che contenga gruppi con significativa affinità elettronica (alogeni, perossidi, chinoni, nitro-gruppi), si ha diminuzione rilevabile della corrente;
- ECD è insensibile ad ammine, alcoli e idrocarburi.



❖ **TID (Thermo-Ionic Detector) o NPD (Nitrogen-Phosphorus Detector)**

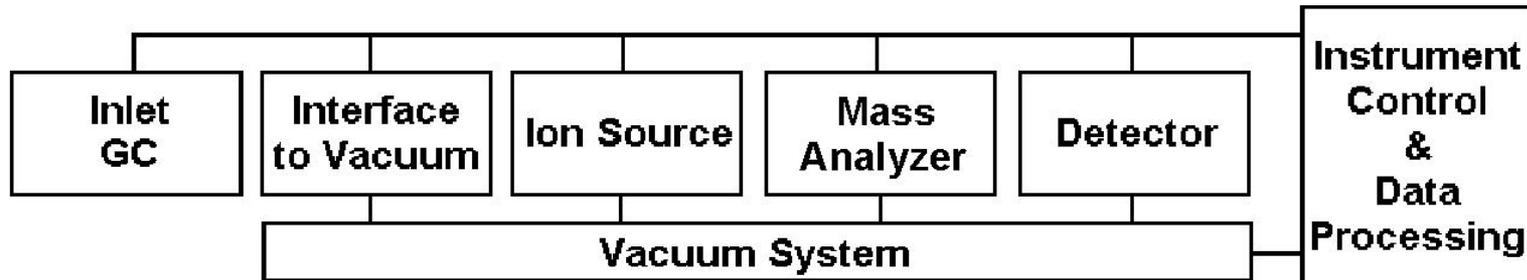
- *Utilizza l'energia termica per ionizzare un analita ;*
- *Con questo metodo, **azoto** e **fosforo** possono essere selettivamente rilevati con una sensibilità che è 10^4 volte maggiore di quella per il carbonio;*
- *Viene utilizzata una concentrazione di gas di idrogeno appena al di sotto del minimo richiesto per l'accensione;*
- *Un bead di rubidio o cesio, è montato sull'ugello, infiamma l'idrogeno (agendo cataliticamente) e forma un plasma freddo;*
- *L'eccitazione dei metalli alcalini produce l'emissione di elettroni, che vengono rilevati come una corrente tra un anodo e catodo nella camera.*
- *All'uscita di azoto o fosforo dalla colonna si ha una variazione della corrente.*

❖ **FPD (Flame Photometric Detector)**

- *Utilizza un tubo fotomoltiplicatore **per rilevare linee spettrali dei composti bruciati in una fiamma.***
- *I composti eluiti dalla colonna vengono portati in una fiamma alimentata da idrogeno che eccita elementi specifici nelle molecole;*
- *Gli elementi eccitati (**P, S, alogeni, alcuni metalli**) emettono luce a lunghezze d'onda caratteristiche;*
- *La luce emessa viene filtrata e rilevata da un tubo fotomoltiplicatore. In particolare, ad es., le emissioni del fosforo sono a circa 510 - 536nm e quelle dello zolfo a 394nm.*

❖ Spettrometro di Massa (MS)

Gli spettrometri di massa accoppiati a sistemi cromatografici sono strumenti costituiti da cinque blocchi:



1. introduzione del campione;
2. ionizzazione degli analiti;
3. analisi della massa;
4. rilevazione;
5. elaborazione dell'informazione

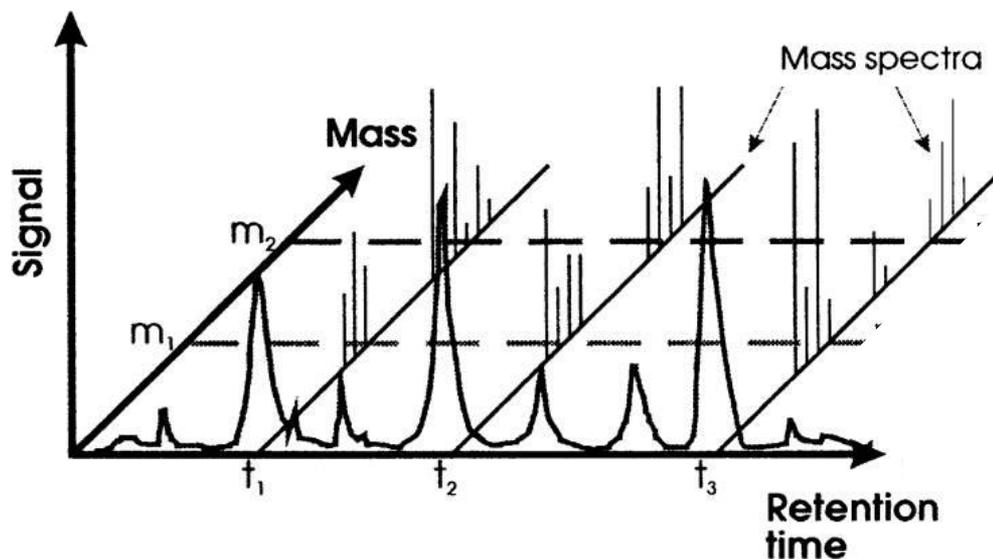
E' necessario un sistema di generazione di alto vuoto ($\sim 10^{-6}$ torr)

L'accoppiamento più comune di un GC è con un MS ad impatto elettronico (EI) quale sorgente di ionizzazione, singolo quadrupolo quale analizzatore di massa e elettromoltiplicatore quale rivelatore.

Altri tipi di MS sono utilizzabili.

segue →

- ❑ *Lo spettrometro di massa quadrupolare durante l'acquisizione dei dati varia i potenziali dei campi in corrente continua e in corrente alternata secondo un rapporto fisso, in modo da far passare in successione ioni nell'intervallo m/z tra 1.6 e 800 amu fino al detector;*
- ❑ *Una scansione è eseguita in un secondo circa;*
- ❑ *Ciascuna **scansione**, cioè la **registrazione dell'intensità degli ioni come funzione di m/z** , è salvata sul computer per una successiva elaborazione dei dati;*
- ❑ *Si ottiene un **array tridimensionale di dati**, con intensità dello ione, m/z , e tempo o numero di scansione (collegati al tempo di ritenzione) come tre dimensioni.*

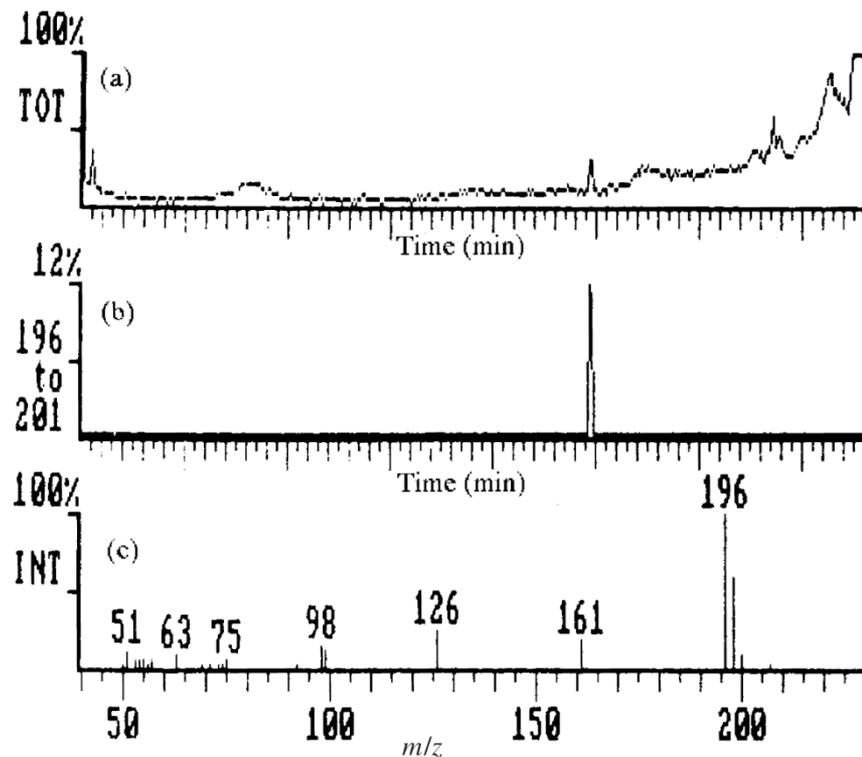


© 2006 Wiley-VCH, Weinheim
Kellner / Analytical Chemistry
ISBN: 3-527-30590-4 Fig-26-04

segue →

La gestione dei dati può essere condotta in modi diversi:

- a) Il **Total Ion Chromatogram (TIC)**: le intensità degli ioni di ciascuna scansione sono sommate indipendentemente da m/z dello ione e le intensità sommate, cioè la corrente ionica totale è riportata come funzione del tempo o del numero di scansione (questo cromatogramma corrisponde a quello ottenuto in GC con un FID).
- b) Il **cromatogramma di massa**: le intensità di uno o più ioni con m/z selezionati possono essere estratte dal TIC e riportate come funzione del tempo o del numero di scansione.
- c) Lo **spettro di massa**: per ciascuna scansione (o in pratica, picco del cromatogramma), l'intensità dei diversi ioni della sostanza rappresentata dal picco vengono riportati in funzione di m/z . Gli spettri di massa possono essere confrontati per via informatica con librerie di spettri di massa (NIST 11 contiene spettri di oltre 200.000 sostanze organiche).

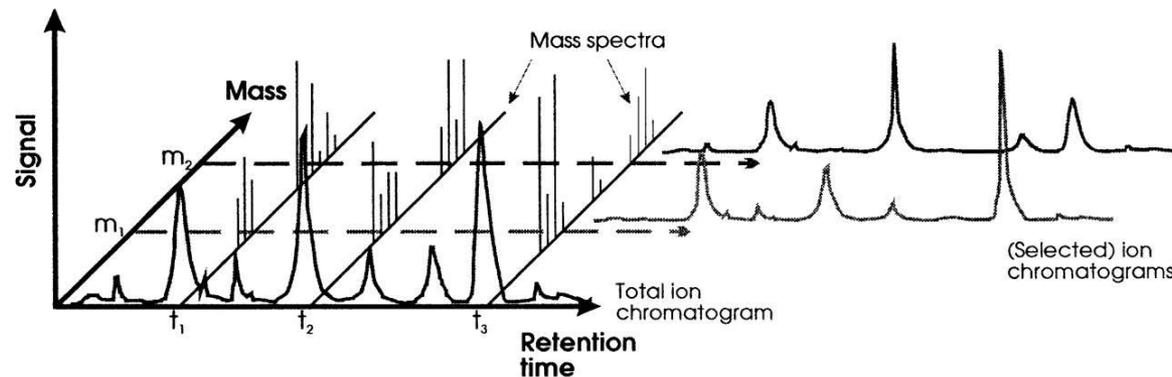


© 2006 Wiley-VCH, Weinheim
Kellner / Analytical Chemistry
ISBN: 3-527-30590-4 Fig-25-04-05

segue →

Monitoraggio di ioni selezionati (Selected Ion Monitoring - SIM)

- Si è assunto finora che lo strumento lavorasse in modalità di scansione (TIC), acquisendo una serie di spettri completi;
- Tale modalità (TIC) viene impiegata in particolare nell'analisi di campioni di composizione incognita e in maniera "non supervisionata";
- Quando lo spettrometro di massa è usato **come rivelatore selettivo e sensibile per l'analisi quantitativa di molecole predefinite**, un numero limitato di ioni è interessante;
- Si impiega conseguentemente la modalità **Selected Ion Monitoring - SIM**, in cui lo strumento seleziona un particolare m/z per un periodo, poi si sposta su un altro m/z per un altro periodo e così via;
- Non si registrano spettri completi, ma i dati possono esser visualizzati come **cromatogramma di massa**;
- Il vantaggio è che il sistema non perde tempo a rilevare ioni irrilevanti, e un maggior tempo di acquisizione a un m/z definito consente di ottenere **migliori rapporti segnale/rumore** e conseguentemente migliori limiti di **rilevabilità/maggiore sensibilità**.



© 2006 Wiley-VCH, Weinheim
Kellner / Analytical Chemistry
ISBN: 3-527-30590-4 Fig-26-04

segue →

Limiti dello spettrometro di massa quadrupolare accoppiato al GC:

Molto usato, strumento versatile e potente, ma:

- Soltanto analiti volatili sono analizzabili in GC-MS, escludendo composti a elevata polarità, ionici e/o macromolecolari;*
- La ionizzazione è limitata a composti con sufficiente tensione di vapore e stabilità;*
- Le reazioni di frammentazione (hard) unimolecolare in EI possono oscurare la presenza dello ione molecolare, specie per i composti meno stabili, impedendo la determinazione della massa molecolare;*
- Si ottengono informazioni solo dalla massa nominale in un intervallo limitato di m/z ;*
- Per superare tali limitazioni si sono sviluppati un numero di approcci diversi per l'introduzione del campione, la ionizzazione dell'analita, l'analisi delle masse, la rivelazione dello ione.*

CROMATOGRAFIA LIQUIDA

INTRODUZIONE

- La fase mobile è LIQUIDA;
- Nella LC classica (Tswett, 1906) venivano utilizzate colonne di vetro con diametro interno tra 1 e 5 cm e $L = 50 - 500$ cm;
- Per garantire velocità di flusso adeguate alla operatività in laboratorio (fino a 1 ml/min) si utilizzavano particelle di dimensione di 150-200 μm (per particelle di dimensioni inferiori le separazioni erano molto lente);
- Aumento di velocità con pompe o applicazione di vuoto non migliorava le prestazioni (aumento di velocità lineare implica aumento H);
- Per aumentare l'efficienza di colonna le particelle della f.s. andavano ridotte, ma al tempo non c'erano dispositivi per applicare alle colonne una pressione sufficiente da garantire una certa velocità di eluizione anche con impaccamento così "denso".
- Alla fine degli anni '60 del secolo scorso si iniziarono ad utilizzare particelle di diametro di 3-10 μm e nuovi moduli strumentali con adeguate pompe per far fluire la fase mobile -> **High Performance Liquid Chromatography (HPLC)**.

➤ **Principi di separazione**

- **distribuzione o partizione** (il meccanismo si basa su **forze di dispersione** che si hanno tra **molecole senza dipoli permanenti o indotti**);
- **adsorbimento** (il meccanismo si basa su **interazioni polari** che sorgono da forze elettriche tra cariche localizzate, come **dipoli permanenti o indotti**);
- **scambio ionico** (il meccanismo coinvolge **cariche permanenti** positive o negative su una molecola, quindi **ioni**);
- **esclusione dimensionale** (il meccanismo si basa su un effetto di **setaccio molecolare**)

tecnica

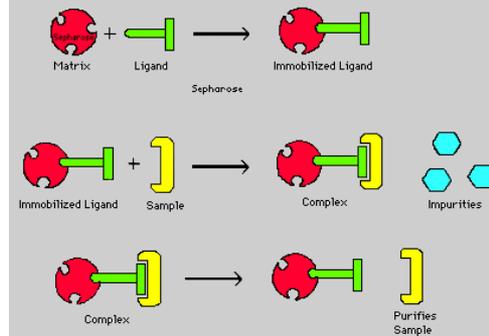
cromatografia di adsorbimento
cromatografia in fase normale, NPLC
cromatografia in fase inversa, RPLC
cromatografia di scambio ionico, IEC
cromatografia di esclusione dimensionale, SEC
cromatografia di affinità

meccanismo principale di separazione

adsorbimento
partizione/adsorbimento
partizione
ionico
esclusione dimensionale
affinità

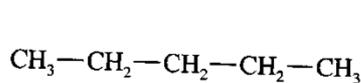
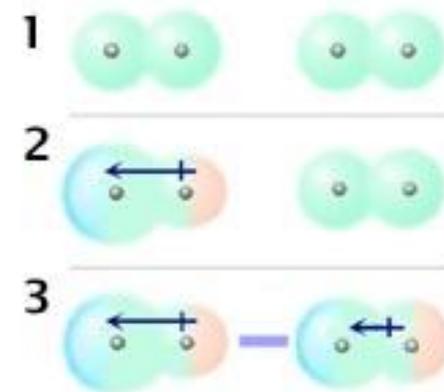
Cromatografia di affinità: basata tra specifiche interazioni tra molecola presente nella f.m. e molecola attaccata alla f.s. (es. anticorpo legato su f.s. interagisce con specifica proteina nel soluto; recettore e legante; enzima e substrato)

Principles of Affinity Chromatography

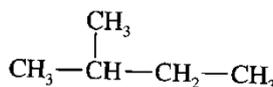


❖ Forze di dispersione

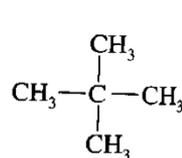
- Le forze di dispersione si generano da momentanee variazioni della densità elettronica attorno agli atomi e alle molecole;
- Ad ogni istante la distribuzione elettronica attorno ad una molecola o ad un atomo può generare un momento di dipolo, che può (temporaneamente) indurre un momento di dipolo nelle molecole che si trovano in prossimità;
- E' la polarizzabilità delle molecole che determina l'entità dei momenti di dipolo indotti e quindi l'intensità delle forze di dispersione;
- Molecole che contengono atomi con raggio grande (es. bromo, iodio) possiedono una polarizzabilità alta e generano intense forze di dispersione (cioè spiega anche l'aumento del punto di fusione ed ebollizione degli alogeni lungo il gruppo della tavola periodica);
- Molecole grandi possiedono una maggiore "superficie" in cui distribuire le cariche, quindi sono maggiormente polarizzabili;
- Molecole "allungate" sono più polarizzabili rispetto a loro isomeri che contengano ramificazioni e/o siano simmetrici (questi ultimi hanno minore "superficie" di distribuzione per le cariche).



n-pentane, bp = 36°C



isopentane, bp = 28°C

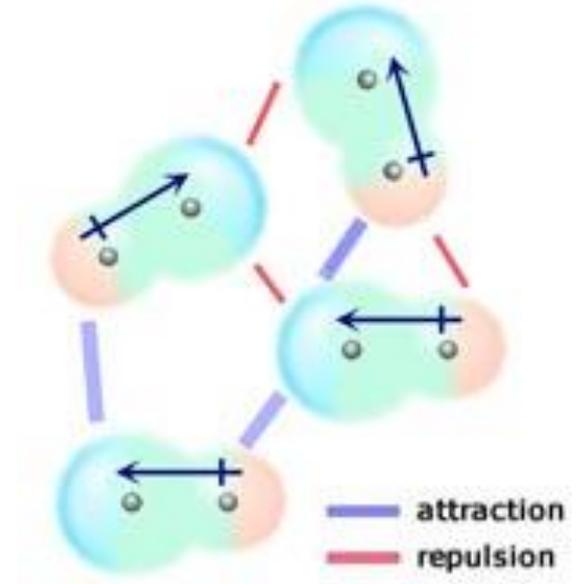


neopentane, bp = 10°C

segue →

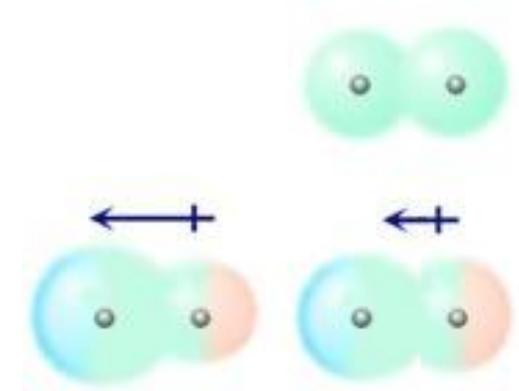
❖ Forze dipolo-dipolo

- Se due molecole neutre, che posseggano entrambe un momento di dipolo permanente, si avvicinano esse si allineeranno in base alle forze di attrazione-repulsione dei loro rispettivi dipoli.



❖ Forze di dipolo indotto

- Una molecola che possiede un momento di dipolo può indurre un momento di dipolo in una molecola adiacente non polare;
- Il risultato è una forza di attrazione tra le due molecole;
- Questo tipo di effetto è per esempio responsabile della solubilità dell'ossigeno (molecola non polare) in acqua (molecola polare).



➤ Tecniche

tecnica	meccanismo principale di separazione	
<i>cromatografia di adsorbimento</i>	adsorbimento	<i>NPLC = Normal Phase LC; RPLC = Reverse Phase LC; IEC = Ion Exchange Chromatography; SEC = Size Exclusion Chromatography</i>
<i>cromatografia in fase normale, NPLC</i>	partizione/adsorbimento	
<i>cromatografia in fase inversa, RPLC</i>	partizione	
<i>cromatografia di scambio ionico, IEC</i>	ionico	
<i>cromatografia di esclusione dimensionale, SEC</i>	esclusione dimensionale	

- ✓ La prima tecnica utilizzata è stata basata sull' adsorbimento, LSC (Liquid Solid Chrom.). La f.s. è un solido adsorbente di materiale polare (silice o allumina), l'eluente (o f.m.) è un solvente non polare. Serve a separare composti, isomeri o classi di composti non polari (es. idrocarburi alifatici o alcol alifatici);
- ✓ In **NPLC** e **RPLC** (che sono LLC – Liquid-Liquid Chrom.) si usano fasi stazionarie chimicamente legate ad un supporto solido e queste cromatografie si chiamano “a fasi legate” (bonded-phase chromatography), i principi della partizione sono importanti per queste tecniche;
- ✓ Oggigiorno la LC più diffusa è la RPLC in cui la fase stazionaria è meno polare del solvente (al contrario di **NPLC**), la separazione dell'analita è basata prevalentemente sulla partizione di esso tra le due fasi;
- ✓ In **IEC** (e anche in cromatografia ionica - IC, che ne è la sua moderna evoluzione ad alte prestazioni) la fase stazionaria è un supporto solido carico (positivamente o negativamente) e l'eluente è di solito una soluzione tampone;
- ✓ In **SEC** la fase stazionaria è un materiale solido poroso, con porosità finemente controllata, che non trattiene molecole grandi, le quali vengono eluite velocemente rispetto a molecole piccole che vengono trattenute negli interstizi del materiale poroso (effetto setaccio molecolare);
- ✓ 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 RPLC e IEC;
 - SEC per molecole MM >2000 g/mol

➤ Influenza delle dimensioni del materiale di supporto (f.s.)

$$H = C_M \cdot u + \frac{B}{u} + C_S \cdot u$$

$$B = 2 \cdot k_D \cdot D_M$$

poco importante in LC

coefficiente di DIFFUSIONE LONGITUDINALE

$$C_M = \frac{f(d_D^2, d_c^2)}{D_M}$$

coefficiente di TRASFERIMENTO DI MASSA

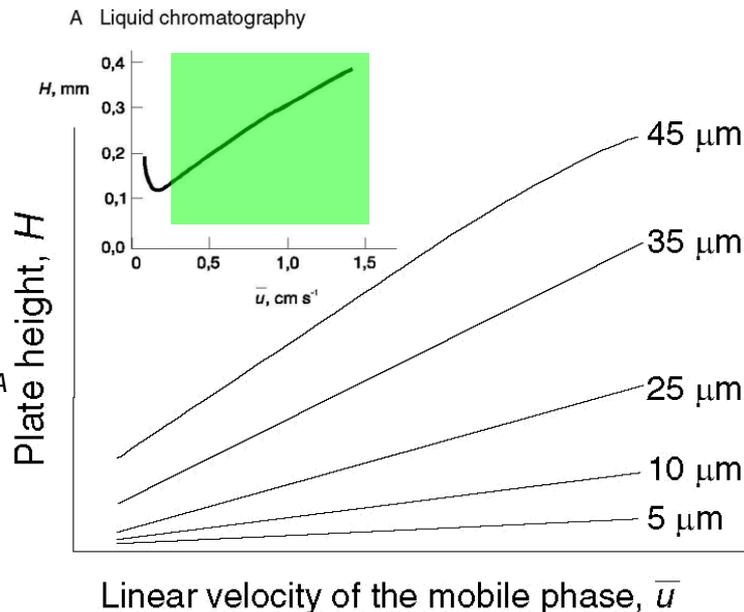
"da e verso" la fase mobile

$$C_S = \frac{q \cdot k \cdot d_f^2}{(1+k)^2 \cdot D_S} = \frac{2 \cdot t_d \cdot k}{(1+k)^2}$$

coefficiente di TRASFERIMENTO DI MASSA

"da e verso" la fase stazionaria

se f.s. è liquida se f.s. è solida



© 2006 Wiley-VCH, Weinheim
Kellner / Analytical Chemistry
ISBN: 3-527-30590-4 Fig-21-24

• 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
• Tempo di desorbimento dell'analita	t_d
• Diametro della colonna	d_c

• Fattore di ritenzione della sostanza	k
• Costanti	k_D, q
• Dipendenza funzionale ("funzione di")	f

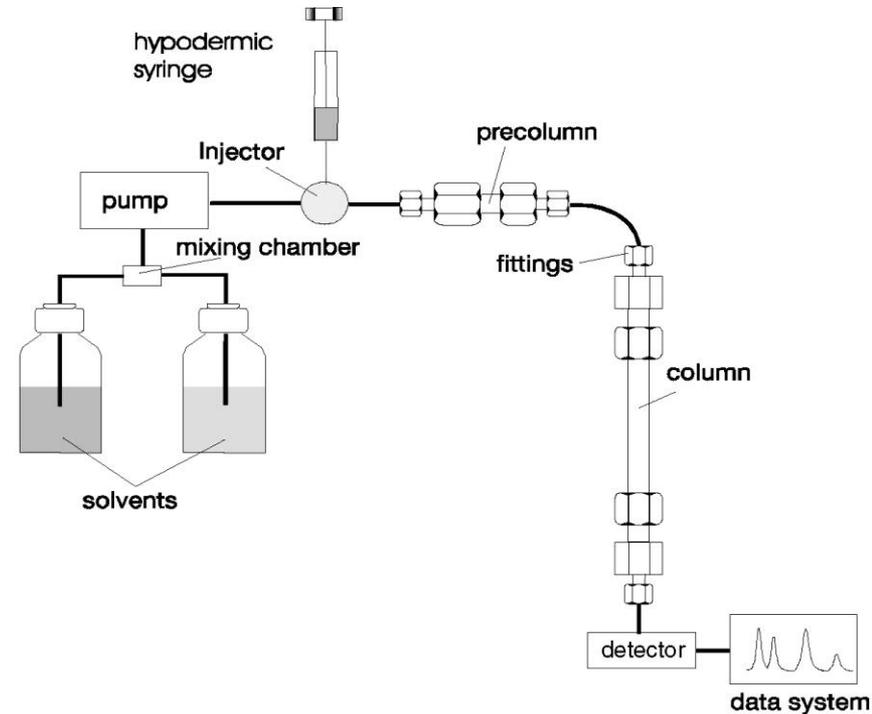
Dalla teoria cinetica della cromatografia, si deduce che H diminuisce al diminuire delle dimensioni del materiale di supporto, aumentando quindi l'efficienza.

In applicazioni reali, per LC, non è praticabile posizionarsi sul minimo della curva $H(u)$, poiché corrisponderebbe a velocità di flusso piccole e non operativamente utilizzabili.

La strumentazione

La strumentazione consiste nelle seguenti componenti:

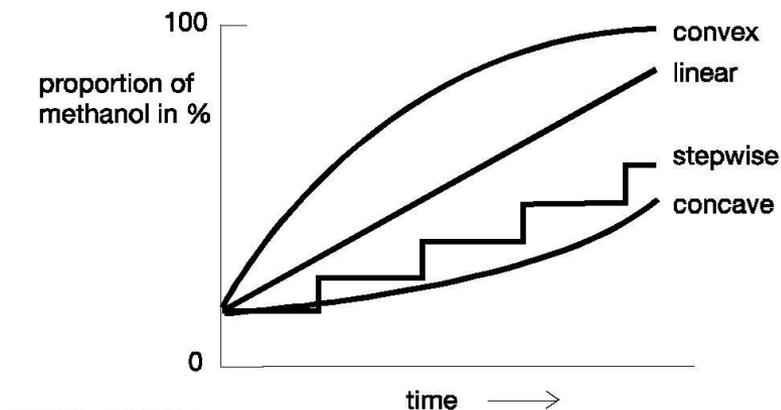
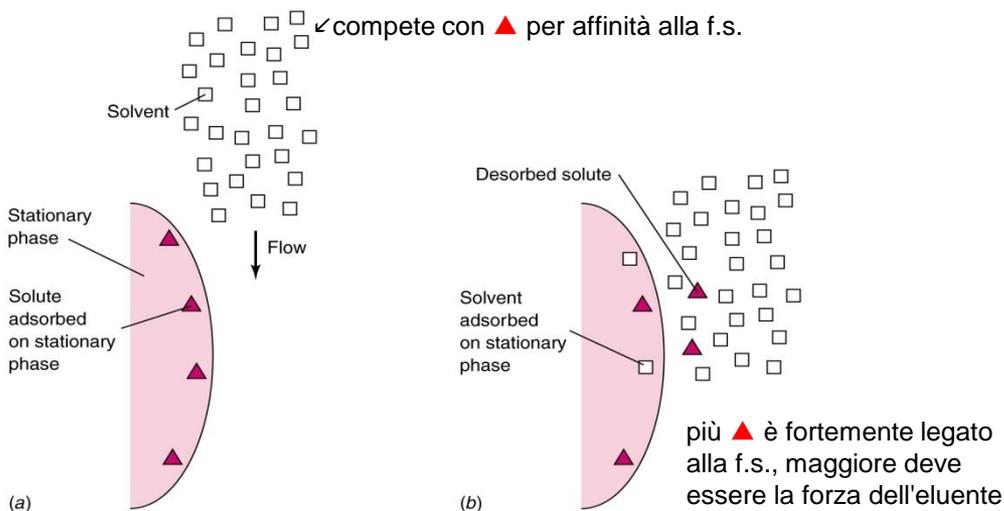
- Sistema di pompaggio;
- Riserve di solvente;
- Sistema di iniezione del campione;
- Colonna cromatografica;
- Rivelatore



- ✓ La pompa flussa l'eluente (solvente o miscela di solventi) attraverso la colonna a una determinata velocità di flusso (eventuale gradiente di polarità di solventi = stesso effetto di gradiente di temperatura in GC);
- ✓ Il **campione** è introdotto in uno speciale iniettore e il solvente passa attraverso l'iniettore trasportando il campione in colonna;
- ✓ Gli analiti sono separati nella **colonna** (che può anche essere termostata);
- ✓ Per minimizzare l'allargamento di picco (*peak broadening*) il volume morto deve essere il minore possibile, specialmente nell'iniettore e nel rivelatore.

➤ Solventi (fase mobile)

- La fase mobile viene scelta in base alla tecnica usata;
- I solventi devono essere filtrati per rimuovere particelle sospese che bloccherebbero il flusso di eluente in colonna;
- I gas disciolti devono essere rimossi con gorgogliamento di He o N₂ nel solvente, o con ultrasuoni;
- I solventi per f.m. vengono conservati in recipienti/bottiglie in vetro o acciaio;
- La separazione si può ottenere per eluizione **isocratica** (miscela costante di solventi) o con **gradiente**;
- **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;
- La modulazione della composizione e della forza dell'eluente consente di per promuovere l'uscita di soluti (analiti) affini alla fase stazionaria



© 2006 Wiley-VCH, Weinheim
Kellner / Analytical Chemistry
ISBN: 3-527-30590-4 Fig-21-26

segue →

In LC ci sono **interazioni significative tra f.m. e analiti** da separare (al contrario di GC in cui la f.m. è il carrier gas inerte). Ricordando:

$$R_S = \frac{\sqrt{N}}{4} \cdot \frac{\alpha-1}{\alpha} \cdot \frac{k_B}{k_B+1}$$

I parametri k_B e α sono modulabili cambiando la composizione dei solventi nella f.m.;

Il **parametro** più importante di un solvente è per applicazioni LC 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_B abbia valori tra 2 e 5;

La fase mobile si può selezionare sulla base del meccanismo atteso di separazione, ma i meccanismi coinvolti possono esser più d'uno;

Se le polarità di f.m. e f.s. sono troppo diverse, il tempo di ritenzione sarà molto piccolo;

Se le polarità di f.m. e f.s. sono molto simili, il tempo di ritenzione sarà molto grande;

Spesso la soluzione ottimale si trova con un processo per "Trial & error" o con procedure di ottimizzazione multivariata;

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).

segue →

❖ Serie Eluotropiche

serie eluotropica per solventi LC			
Solvente	Indice di polarità, P'	Forza di Eluizione (SiO ₂)	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
acetone	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)

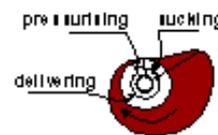
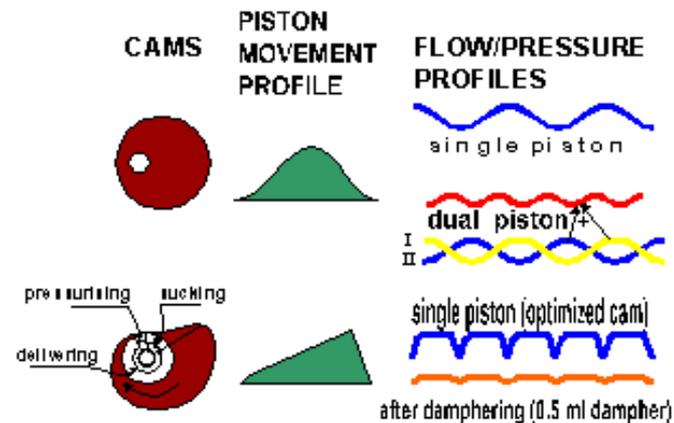
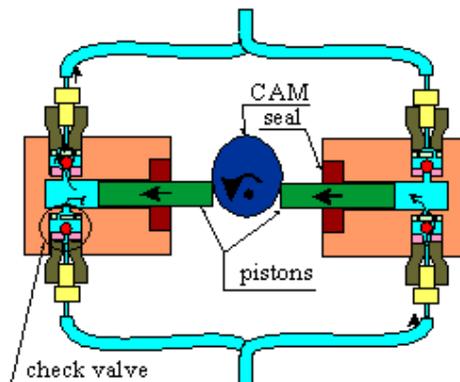
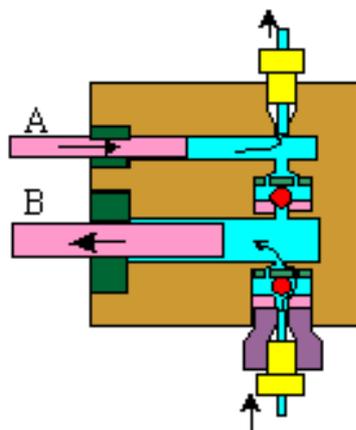
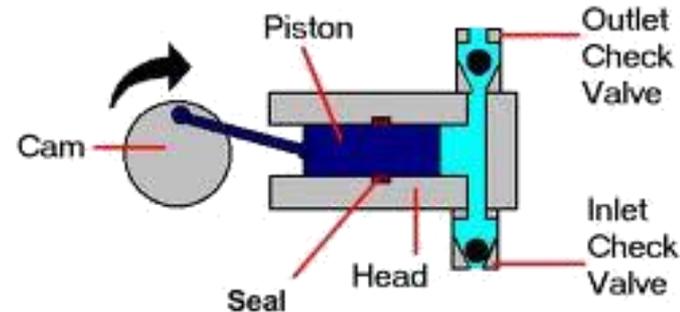
$$P_{\text{metanolo/acqua}} = 0.3 P_{\text{metanolo}} + 0.7 P_{\text{acqua}} = 1.53 + 7.14 = 8.67$$

- ✓ L'indice di polarità (P') è **INDIPENDENTE** dalla fase stazionaria utilizzata;
- ✓ La forza di eluizione **DIPENDE** dalla f.s. (ad es. la forza di eluizione relativa alla f.s. "allumina" si ottiene dividendo per 0.8 quella relativa alla silice (SiO₂));
- ✓ Se la fase stazionaria è APOLARE la serie eluotropica è inversa rispetto a quanto riportato in tabella.

segue →

➤ Sistema di pompaggio

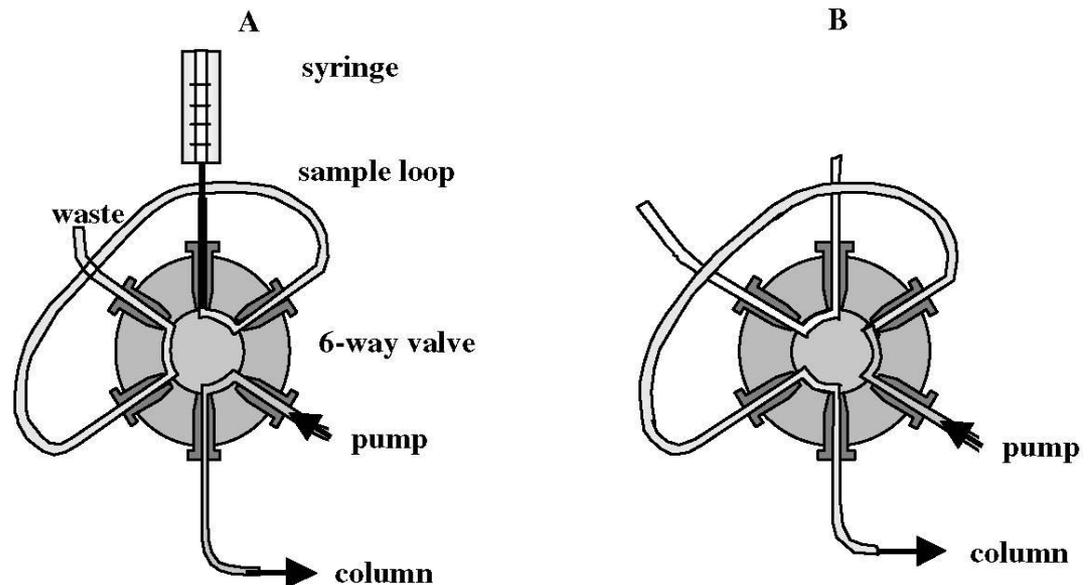
- Pressioni fino a varie centinaia di bar (decine di MPa);
- Ampio intervallo di velocità di flusso (0,05 - 10 mL/min);
- Flusso libero da pulsazioni;
- Volumi interni 40 - 60 μL , pressioni 60 Mpa, flussi costanti, indipendenti da contropressione e viscosità;
- **Gradiente in bassa pressione** (solventi miscelati prima del pompaggio);
- **Gradienti in alta pressione** (minori variazioni di volume nella miscela compressa) richiedono due pompe; un costituente è compresso, la seconda pompa aggiunge secondo costituente a flusso pressurizzato;
- E' possibile utilizzare miscele ternarie di solventi.



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

➤ Sistemi di iniezione del campione

- ✓ Consente di iniettare volumi di 1-500 μL (in micro-HPLC si possono iniettare volumi $< 1 \mu\text{L}$);
- ✓ Durante l'iniezione, la pressione deve essere mantenuta costante;
- ✓ Il sistema di iniezione più comune è una **valvola a 6 vie** equipaggiata con un **loop**;
- ✓ Il campione viene iniettato nel loop tramite microsiringa, mentre l'eluente fluisce direttamente in colonna (escluso dal loop);
- ✓ Girando la valvola (ad iniezione completata) il flusso di eluente viene diretto al loop e quindi trasporta il campione in testa alla colonna.



© 2006 Wiley-VCH, Weinheim
Kellner / Analytical Chemistry
ISBN: 3-527-30590-4 Fig-21-28