

# **CHIMICA ANALITICA II**

**CON LABORATORIO**

**(AA 2018-19)**

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

# **CROMATOGRAFIA LIQUIDA**

## ➤ 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;
- ✓ Oggi giorno 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

**CROMATOGRAFIA IONICA**  
**e**  
**CROMATOGRAFIA AD ESCLUSIONE DIMENSIONALE**

## ➤ **Processo di scambio ionico**

Il processo di scambio ionico può essere espresso dal seguente equilibrio:



con la seguente costante di equilibrio:

$$K_{eq} = \frac{Y^+_R [X]^+}{X^+_R [Y]^+}$$

dove  $X^+_R$  e  $Y^+_R$  sono le frazioni di siti occupati da  $X^+$  e  $Y^+$  rispettivamente.

Nei laboratori usualmente gli scambiatori ionici naturali (argille e zeoliti) sono sostituiti da prodotti organici di sintesi, **resine per scambio ionico**. Le **resine di scambio anionico e cationico sono commercializzate con diverse dimensioni** (numero di mesh) e nomi commerciali (Dowex, Amberlite etc.)

Cosa significa "mesh"?

ad esempio in una zanzariera si possono contare "i buchi" per centimetro. Il numero di buchi per centimetro è il numero di mesh della zanzariera.

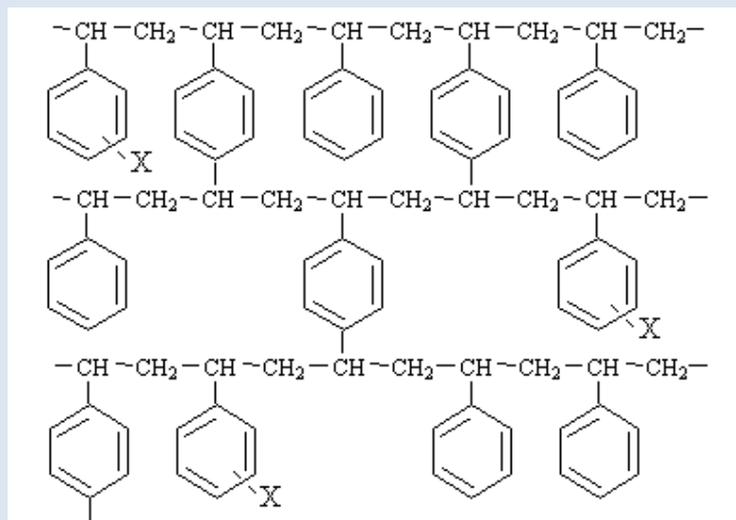
Sieve Mesh #	Inches	Microns	Typical Material
14	.0555	1400	-
28	.028	700	Beach Sand
60	.0098	250	Fine Sand
100	.0059	150	-
200	.0029	74	Portland Cement
325	.0017	44	Silt
400	.0015	37	Plant Pollen
(1200)	.0005	12	Red Blood Cell
(2400)	.0002	6	-
(4800)	.0001	2	Cigarette Smoke

segue →

The mesh numbers in parentheses are too small to exist as actual screen sizes; they are estimates included for reference.

## ➤ Resine a scambio ionico

La matrice è ottenuta in genere per polimerizzazione di stirene e divinil-benzene, formando strutture con gruppi ionici come  $-\text{SO}_3^-$  (gruppi solfonici) o ammine terziarie ( $-\text{CH}_2-\text{NR}_3^+$ , dove R può essere e.g.  $-\text{CH}_3$ ). Se la superficie ha cariche negative si comporta come scambiatore cationico, se positive come scambiatore anionico.



Resina a  
scambio  
cationico

Resina a  
scambio  
anionico

**Applicazioni:** cromatografia di scambio ionico IEC o IE-SPE;  
produzione di acqua deionizzata

# Cromatografia ionica

**Nasce come Cromatografia a Scambio Ionico (IEC – Ion Exchange Chromatography – no HP) :**

- la f.s. è formata da resine porose a scambio ionico basate su copolimeri stirene / divinil-benzene;
- inizialmente veniva impiegata per separare elementi delle terre rare, in forma di cationi; gli ioni raccolti in frazioni venivano poi determinati con titolazioni.

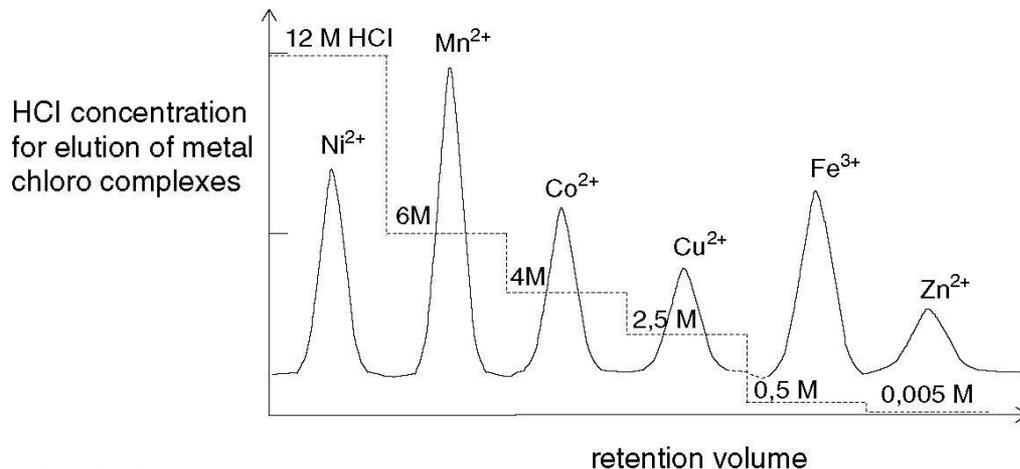
## Esempio:

separazione di ioni metallici come cloro-complessi su uno **scambiatore anionico fortemente alcalino**.

Lo scambiatore è caricato con cloruro da una soluzione 12 M di HCl, e la miscela di ioni metallici è introdotta nella colonna a questa concentrazione di acido cloridrico.

Inizialmente solo ioni Ni scorrono attraverso la colonna, ciò avviene perché non c'è scambio, con generazione di complessi anionici molto deboli del Ni.

Gli altri ioni metallici sono eluiti a stadi successivi (*stepwise*), con concentrazioni minori di HCl.



La sequenza corrisponde alla stabilità dei cloro complessi anionici:



Gradiente a gradini di concentrazione di HCl (in figura).

Ioni metallici raccolti a diversi volumi di ritenzione e diverse concentrazioni di HCl, sono determinabili per titolazione o fotometricamente.

Descrizione di un'esperienza didattica

<http://ww2.chemistry.gatech.edu/class/2115/bottomley/expt6.PDF>

Un brevetto

<https://patents.google.com/patent/US5246591>

Recupero di metalli nobili (Pd, Pt, Au)

<https://cdn.intechopen.com/pdfs/49055.pdf>

**Figure 12.2** Criticality assessment for EU path to the decarbonisation of the energy sector

*Material scarcity , Decarbonization, Urban mining, recupero di metalli*

<http://eplca.jrc.ec.europa.eu/uploads/RawMaterial-scarcity-of-raw-materials.pdf>

<https://phys.org/news/2018-03-scarce-metals-unrecovered-end-of-life-vehicles.html>

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0970389617303294>

Element	Rating
Rare Earths: Dy, Eu, Tb, Y	High
Rare Earths: Pr, Nd	High
Gallium	High
Tellurium	High
Graphite	High-Medium
Rhenium	High-Medium
Indium	High-Medium
Platinum	High-Medium
Rare Earths: La, Ce, Sm, Gd	Medium
Cobalt	Medium
Tantalum	Medium
Niobium	Medium
Vanadium	Medium
Tin	Medium
Chromium	Medium
Selenium	Medium-Low
Lithium	Medium-Low
Hafnium	Medium-Low
Molybdenum	Medium-Low
Silver	Medium-Low
Nickel	Low
Gold	Low
Copper	Low
Cadmium	Low

**La moderna Cromatografia Ionica (IC – Ion Chromatography)** con introduzione di dispositivi HPLC nasce a metà anni '70. Si dovettero risolvere alcuni **problemi**:

- a) necessità sviluppo di resine scambiatrici meno comprimibili, e con miglior diffusione delle molecole attraverso le colonne;
- b) necessità di detector “universale” per la rivelazione di ioni inorganici.

### **Soluzioni del problema (a):**

1. Materiali rivestiti (materiali scambiatori applicati sulla superficie di supporti in vetro o polimero) al posto di resine porose; i materiali scambiatori sono pellicolari (30-40 $\mu$ m di spessore);
2. Gel di silice poroso rivestito con scambiatori ionici liquidi

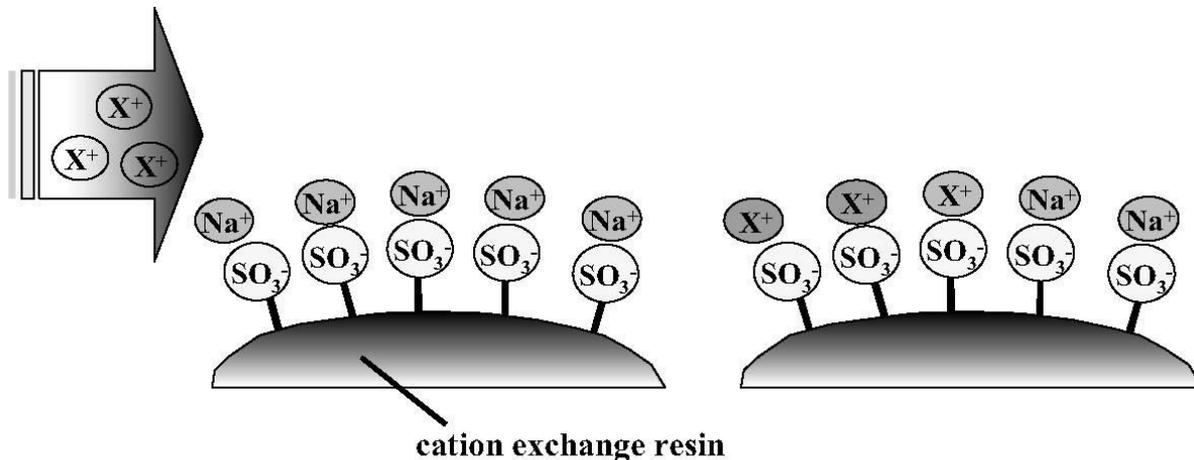
L'innovazione ha portato a processi di diffusione marcatamente migliorati rispetto a scambiatori ionici classici, anche se la capacità della colonna è diminuita.

### **Soluzione del problema (b):**

Misure di conducibilità: in soluzioni acquose gli ioni mostrano una conducibilità proporzionale alla loro concentrazione, ma è necessario sopprimere il segnale dovuto agli ioni presenti nella fase mobile (vedi slides successive).

## ➤ Fase stazionaria e meccanismo di ritenzione

- Le fasi stazionarie hanno gruppi che portano cariche positive o negative legati chimicamente su materiale di supporto (es. copolimeri stirene/divinilbenzene);
- **Per scambio cationico:** resine con  $-\text{SO}_3^-$  (gruppo solfonato) o  $-\text{COO}^-$  (gruppo carbossilato)
- **Per scambio anionico:** resine con  $-\text{NH}_3^+$  (gruppo ammonio) o  $-\text{NR}_3^+$  (gruppo ammonio organico, di solito quaternario);
- Nella separazione, gli ioni dell'analita **competono** con gli ioni dell'eluente per i siti carichi della fase stazionaria;
- La separazione si basa su un processo di assorbimento-desorbimento tra gli analiti e i gruppi ionici della f.s.;
- I **parametri cruciali** per la separazione sono la natura della resina e il pH e la forza ionica dell'eluente (eventuale presenza di solventi organici ha un effetto sulla ritenzione degli analiti).

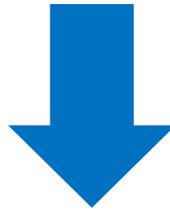


© 2006 Wiley-VCH, Weinheim  
Kellner / Analytical Chemistry  
ISBN: 3-527-30590-4 Fig-21-40

Esempio: gli ioni del campione  $-\text{X}^+$  competono con gli ioni nell'eluente  $\text{Na}^+$  per i siti ionici negativi sulla resina

## ➤ **Eluente e Detector**

- Le **fasì mobili** sono eluenti acquosi (di solito soluzioni tampone) che contengono uno ione che compete con gli analiti che bisogna separare;
- Questi ioni “competitori” spostano gli ioni degli analiti dalla f.s. eluendoli dalla colonna.
  
- La **misura della conduttività** è impiegata come principio universale di rivelazione per ioni inorganici;
- In soluzioni acquose, gli ioni esibiscono una conduttività proporzionale alla loro concentrazione;
- La rilevazione diretta dell’analita negli eluenti non è possibile;
- La concentrazione degli eluenti è troppo elevata per discriminare i segnali degli ioni di analita eluiti dalla elevata conduttività del fondo (background).

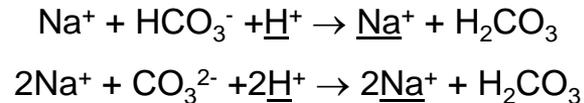


***E' necessario sopprimere il segnale dell'eluente per rivelare il segnale dell'analita***

## ➤ **Colonne di soppressione**

- Il problema della rivelazione fu risolto accoppiando ad una colonna analitica una colonna di soppressione, e scegliendo opportune fasi mobili;
- Per determinare **anioni**, si usa uno scambiatore cationico in forma acida come colonna di soppressione:

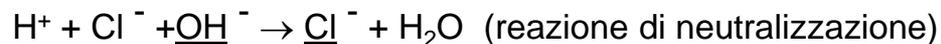
L'eluente è NaHCO<sub>3</sub>/NaCO<sub>3</sub>. Dopo che gli anioni (analiti), es. Cl<sup>-</sup> e NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, sono stati separati dalla colonna analitica impaccata con scambiatore anionico, l'eluente reagisce nel soppressore:



La linea sotto gli ioni indica che sono legati allo scambiatore. Il prodotto della reazione è un acido quasi indissociato, quindi la conducibilità dell'eluente è soppressa.

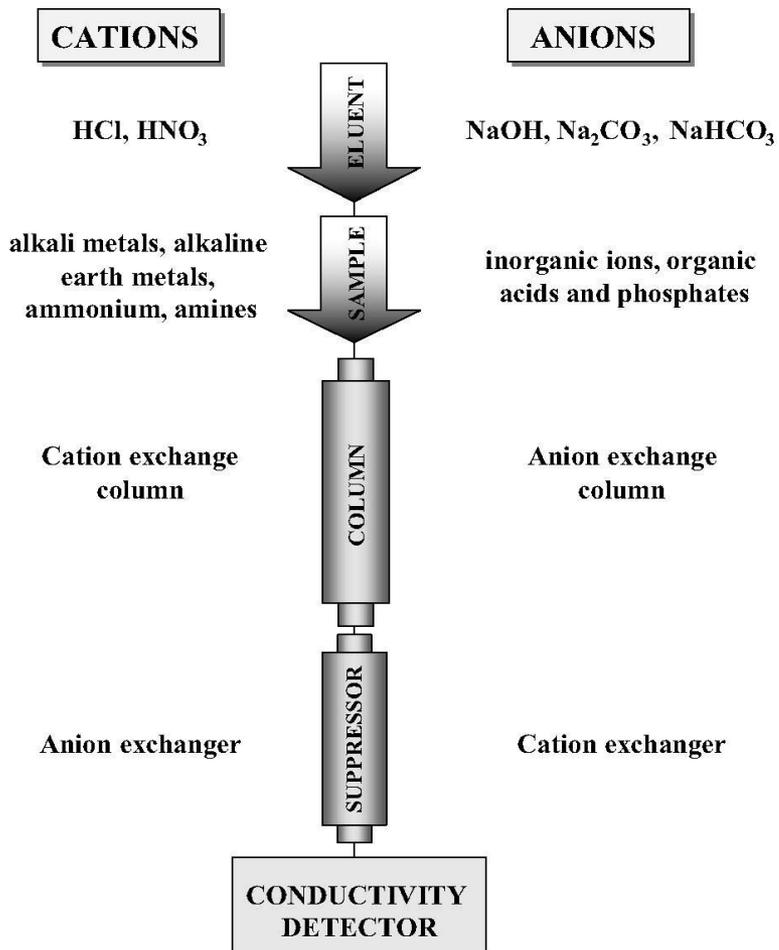
- Per determinare **cationi**, si usa uno scambiatore anionico in forma basica (OH<sup>-</sup>) come colonna analitica:

La f.m. adatta può essere l'HCl, e la colonna di soppressione deve contenere un soppressore anionico in forma OH<sup>-</sup>:

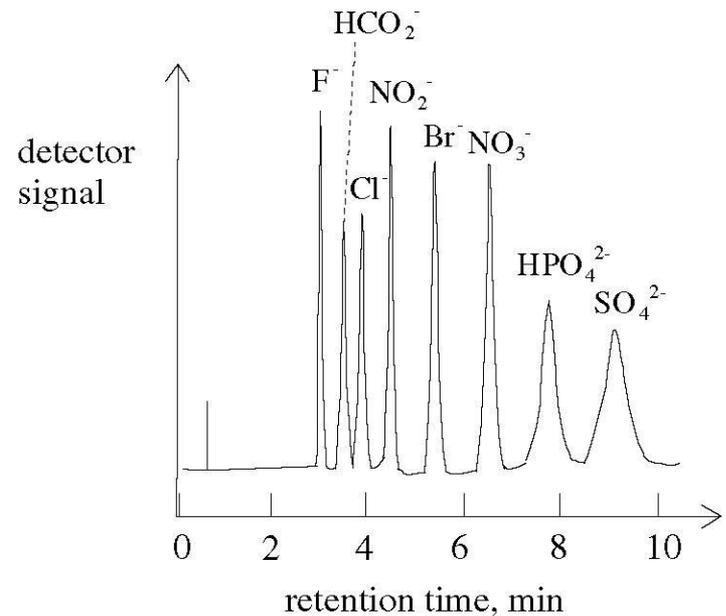


Nuovamente in soluzione rimangono solo gli ioni degli analiti come specie conduttive (es. cationi Na<sup>+</sup> o Mg<sup>2+</sup>)

segue →



**Esempio:** gli ioni da separare Cl<sup>-</sup> e NO<sub>3</sub><sup>-</sup> non reagiscono nel soppressore, e la loro conducibilità può quindi adesso essere rilevata (Eluente NaHCO<sub>3</sub> 2.8mM/NaCO<sub>3</sub> 2.3 mM)

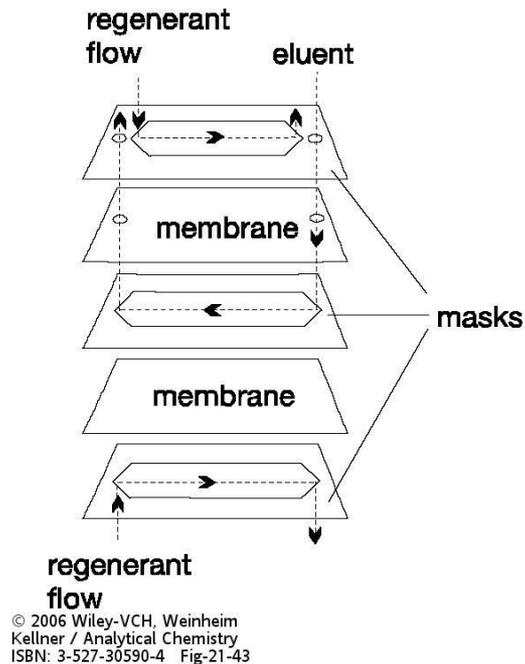


© 2006 Wiley-VCH, Weinheim  
Kellner / Analytical Chemistry  
ISBN: 3-527-30590-4 Fig-21-41

© 2006 Wiley-VCH, Weinheim  
Kellner / Analytical Chemistry  
ISBN: 3-527-30590-4 Fig-21-42

segue →

- Uno **svantaggio** della colonna di soppressione è che deve essere rigenerata dopo un certo tempo (es. 10 ore d'uso);
- Nella **strumentazione moderna** si usa un soppressore a **membrana**:
- il flusso di eluente è circondato da due membrane scambiatrici che forniscono  $H^+$  o  $OH^-$  a seconda del tipo di determinazione analitica;
- le membrane di scambio sono continuamente rinnovate da un acido o base rigenerante, che scorrono controcorrente.

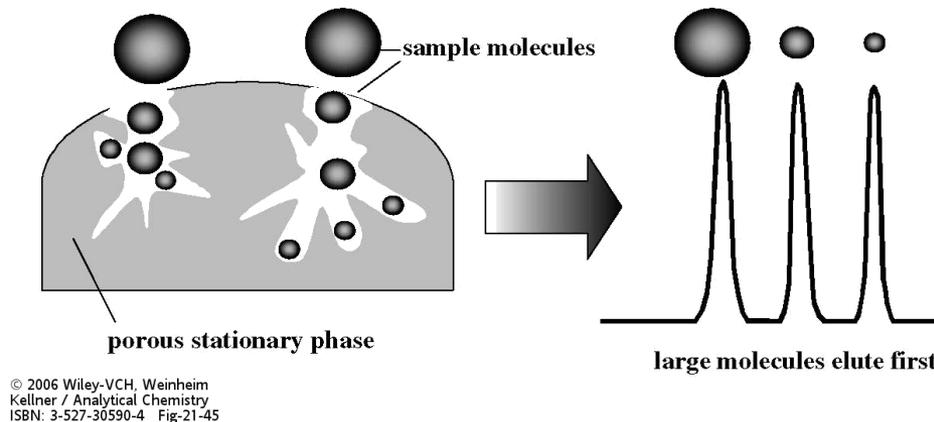


# Cromatografia ad esclusione dimensionale

Nella **Cromatografia ad Esclusione Dimensionale** (SEC – *Size Exclusion 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.

Molecole con MM inferiore al limite di esclusione del materiale di impaccamento sono trattentate.



- Non ci deve essere alcun tipo di interazione chimica degli analiti 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.

## ➤ **Meccanismo**

- ✓ La f.s. ha pori di diverse dimensioni.
- ✓ Si possono differenziare **due estremi** nell'interazione delle molecole con la f.s. porosa:
  - a) 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**).
  - b) 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. ( $V_R = F \times t_R$ )).

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

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

$V_0$  = il volume morto

$V_p$  = il volume dei pori.

In gel-cromatografia il volume vuoto ( $V_0$ ) corrisponde 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).

segue →

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

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  $V_R$  corrispondenti a  $K$  maggiori di 1 (perchè le molecole che entrano nei pori vengono trattenute anche da "forze" chimiche).

Un riarrangiamento  $V_E = V_0 + KV_p$  porta a scrivere il coefficiente di partizione  $K$  in modo più usuale

$$K = \frac{V_E - V_0}{V_p} = \frac{c_S}{c_M}$$

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.

## ➤ **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  $\mu\text{m}$ ;
- ✓ 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 in caso di utilizzo di silice o vetro.

## ➤ **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**.

## ➤ *Rivelatori*

- Devono dare una risposta proporzionale alla concentrazione es. rifrattometri differenziali, detectors fotometrici nell'UV o IR;
- Un detector dedicato è il **viscosimetro a flusso** (misura la viscosità dell'eluente).

## ➤ *Applicazioni*

- Molecole con MM > 2000 dalton;
- La **filtrazione su gel** si usa per separare sostanze naturali ad alto peso molecolare da specie a basso peso molecolare o sali. Es. proteine separate da amminoacidi e peptidi;
- La **permeazione su gel** per separare omologhi e oligomeri (es. acidi grassi tra 100 e 350 dalton, f.s. con limite di esclusione 1000);
- Si possono impiegare per valutare masse molecolari o distribuzioni di masse molecolari (es. di polimeri sintetici);
- Le separazioni basate sulle dimensioni molecolari sono efficaci per MM con differenze di almeno il 10%.