

CHIMICA ANALITICA II

CON LABORATORIO

(AA 2019-20)

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

A horizontal rectangular bar with a rainbow gradient background, transitioning from blue on the left to red on the right.

CROMATOGRAFIA MULTIDIMENSIONALE

Analisi qualitativa in cromatografia

- I metodi cromatografici sono impiegabili per analisi **qualitative**, **quantitative** o **per scopi preparativi**.
- **L'informazione qualitativa:**
 - ✓ nei **cromatogrammi interni** risiede nella posizione della sostanza sulla f.s. (es. in TLC);
 - ✓ nei **cromatogrammi esterni** risiede nel valore del volume o tempo di ritenzione delle diverse sostanze. Sebbene la riproducibilità del tempo o del volume di ritenzione sia minore della precisione delle lunghezze d'onda in spettroscopia, comparando i dati di ritenzione con quelli di sostanze standard, può essere stabilita la presenza o assenza di una sostanza nel campione.
- **Per identificare inequivocabilmente** una sostanza si può accoppiare la separazione cromatografica con un opportuno rivelatore posto alla fine della colonna, (es. UV per HPLC, MS per GC).
- Nelle analisi qualitative di una miscela multicomponente, si deve ricordare che la **“capacità di picchi”** di una colonna è limitata. La capacità di picchi riflette il **numero di picchi che possono essere risolti** in una sequenza di picchi in un intervallo definito.
- Secondo J. Calvin Giddings (Unified Separation Science - Wiley 1991) in cromatografia di eluizione, la capacità di picco n è approssimativamente calcolabile come:

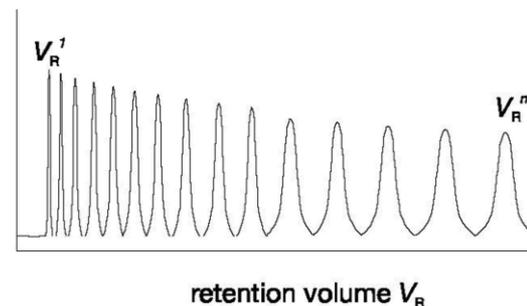
$$n = 1 + \frac{\sqrt{N}}{4} \cdot \ln \frac{V_R^{(n)}}{V_R^{(1)}}$$

$$n = 1 + \frac{\sqrt{N}}{4} \cdot \ln \frac{t_R^{(n)}}{t_R^{(1)}}$$

Capacità di picchi n tipiche per numeri definiti di N, in GC, LC e cromatografia su gel, secondo Giddings

Capacità di picchi n			
Numero di piatti teorici N	Gel	GC	LC
100	3	11	7
400	5	21	13
1000	7	33	20
2500	11	51	31
10000	21	101	61

detector signal

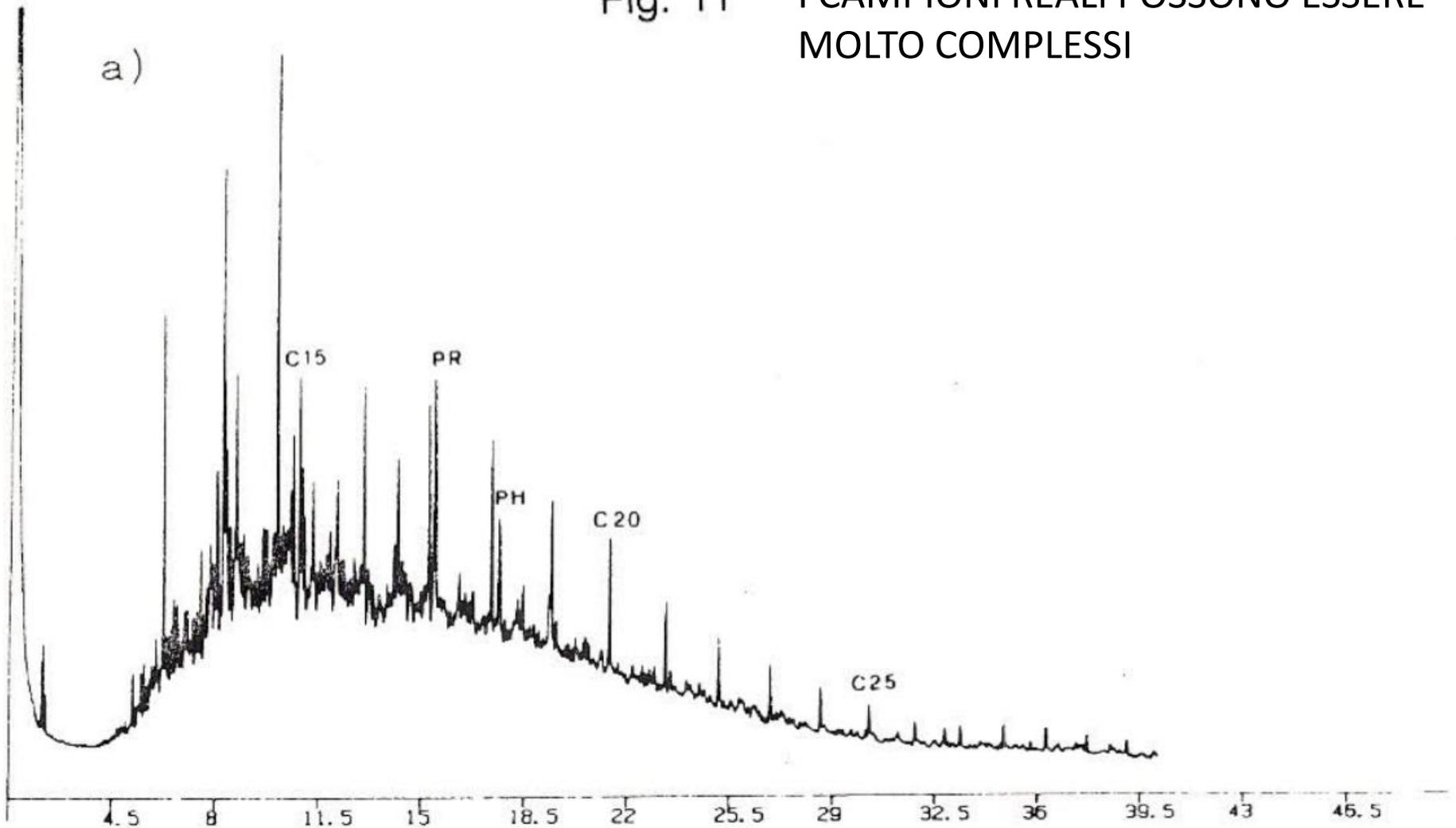


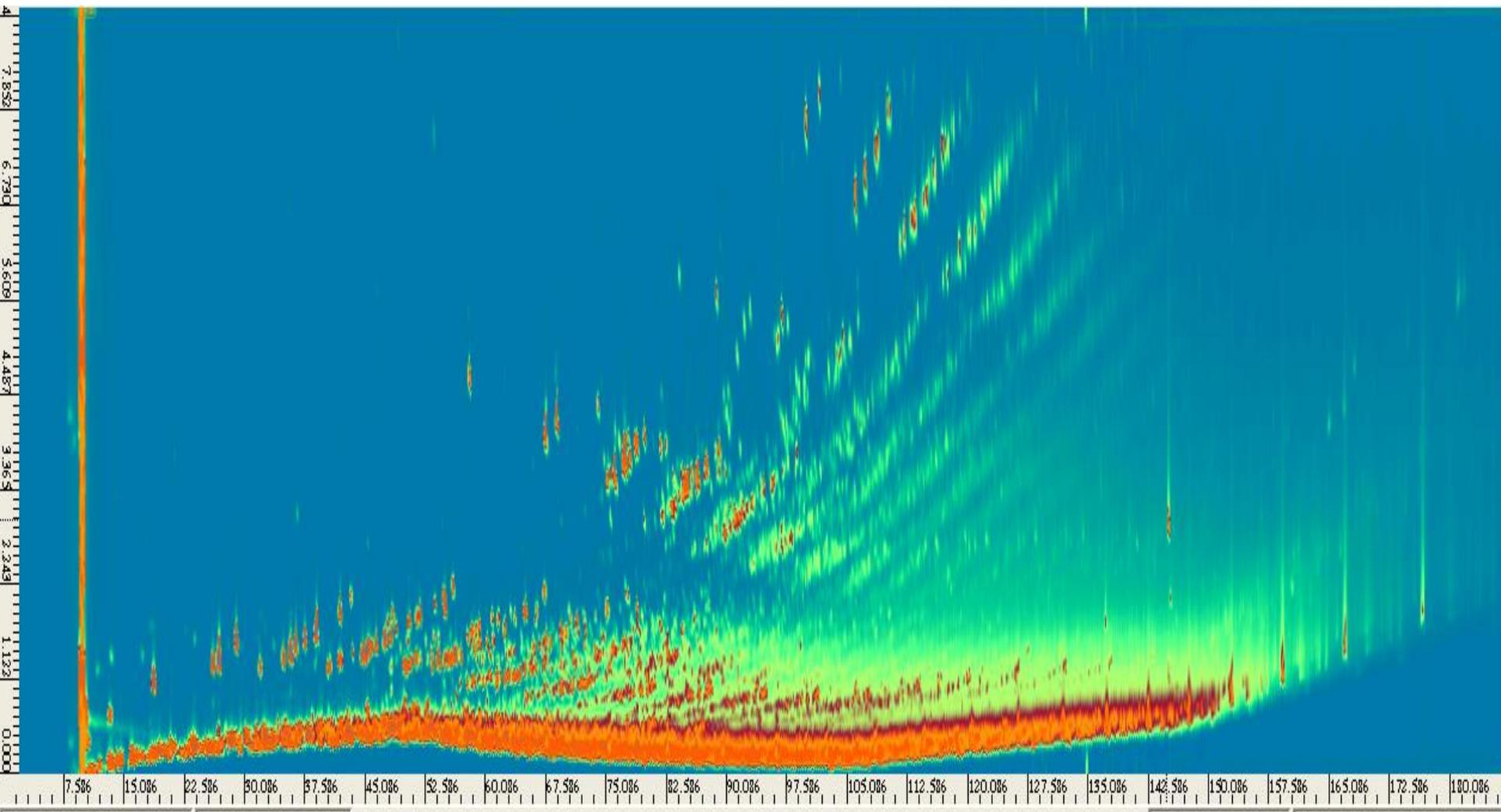
© 2006 Wiley-VCH, Weinheim
Kellner / Analytical Chemistry
ISBN: 3-527-30590-4 Fig.21-08

- Se il numero di costituenti il campione eccede la capacità di picchi, allora si ha sovrapposizione dei picchi sotto i quali due o più costituenti eluiscono insieme.

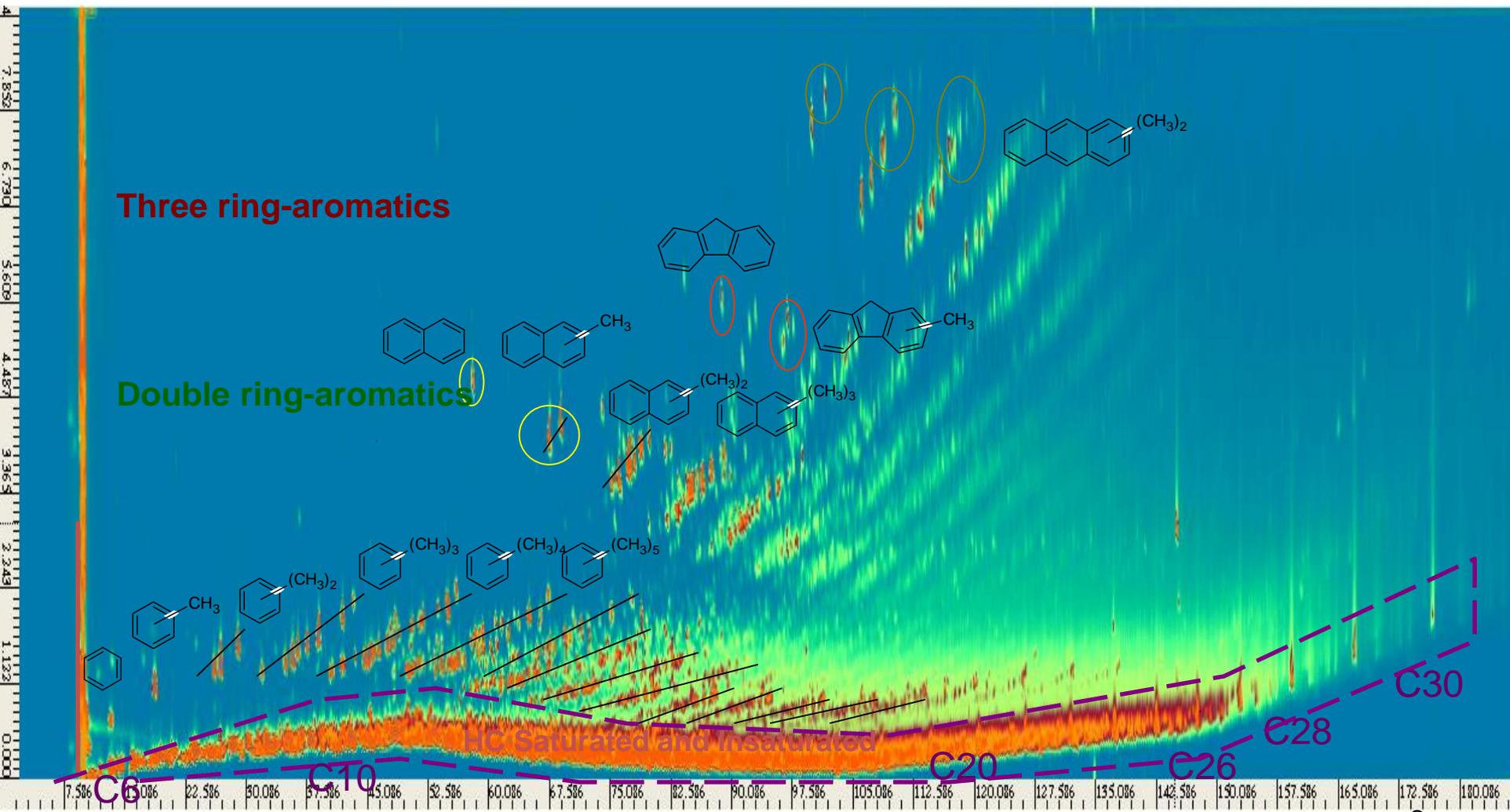
Fig. 11

I CAMPIONI REALI POSSONO ESSERE MOLTO COMPLESSI





Idrocarburi Aromatici in Greggio leggero



Untargeted Comprehensive Two-Dimensional Liquid Chromatography Coupled with High-Resolution Mass Spectrometry Analysis of Rice Metabolome Using Multivariate Curve Resolution

Meritxell Navarro-Reig^{†‡}, Joaquim Jaumot[†], Anna Baglai[‡], Gabriel Vivó-Truyols[‡], Peter J. Schoenmakers[‡], and Romà Tauler[†] 

[†] Department of Environmental Chemistry, IDAEA-CSIC, Jordi Girona 18-26, 08034 Barcelona, Spain

[‡] Van't Hoff Institute for Molecular Science, University of Amsterdam, 1090 XH Amsterdam, The Netherlands

Anal. Chem., 2017, 89 (14), pp 7675–7683

DOI: 10.1021/acs.analchem.7b01648

Publication Date (Web): June 23, 2017

Copyright © 2017 American Chemical Society

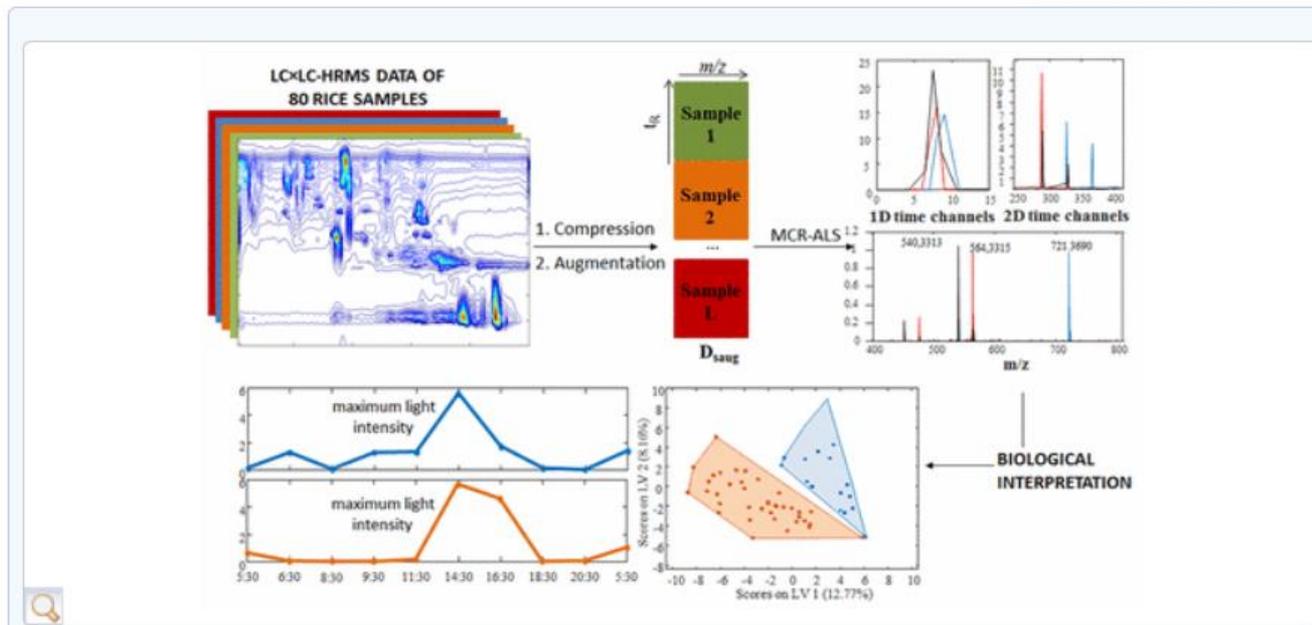
*Phone: +34934006140. E-mail: Roma.Tauler@idaea.csic.es.

 Cite this: *Anal. Chem.* 2017, 89, 14, 7675-7683

 RIS Citation 

Abstract

Jump to a section 



INTRODUZIONE

- I campioni possono essere **tanto complessi** (contenere molti analiti anche chimicamente simili) che una singola separazione cromatografica non ha sufficiente efficienza separativa (capacità di picchi).
- In questo caso si può usare una **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., GCxGC

VANTAGGI:

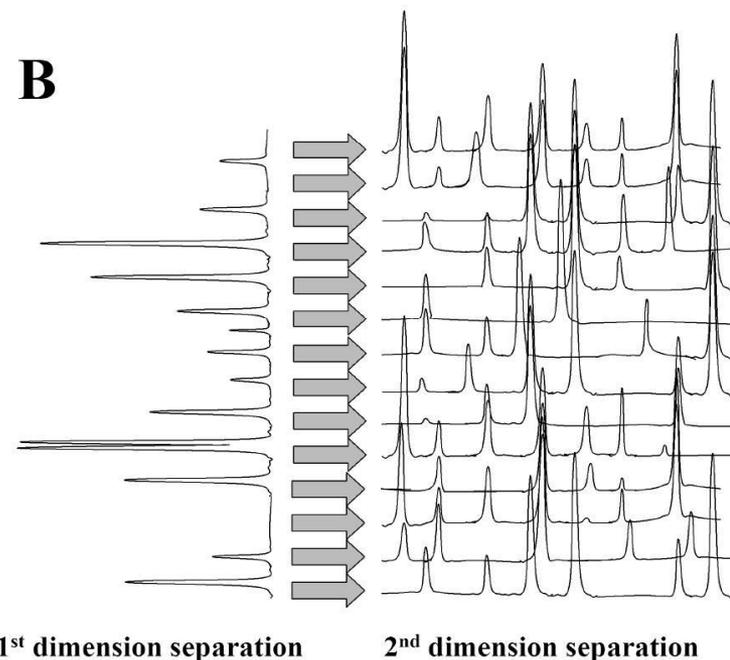
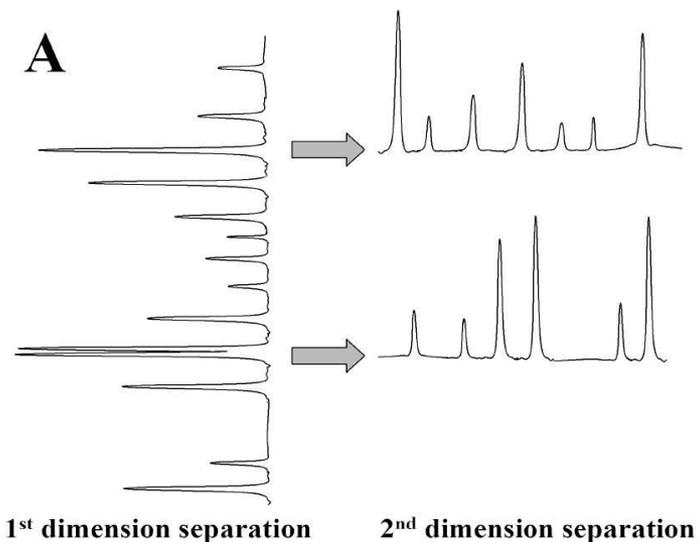
- 1) *Analisi veloce e basso consumo di solvente;*
- 2) *Parte della preparazione del campione viene ricompresa direttamente nell'analisi (lavorando in un sistema chiuso e automatizzato) dove*
- 3) *il rischio di perdita di campione e di contaminazione dello stesso è minimizzato* (ripetibilità e riproducibilità).

➤ **Tipi di tecniche multidimensionali**

Ci sono due possibili approcci all'analisi multidimensionale:

- ✓ **Tecnica “Heartcut”**: in cui 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);

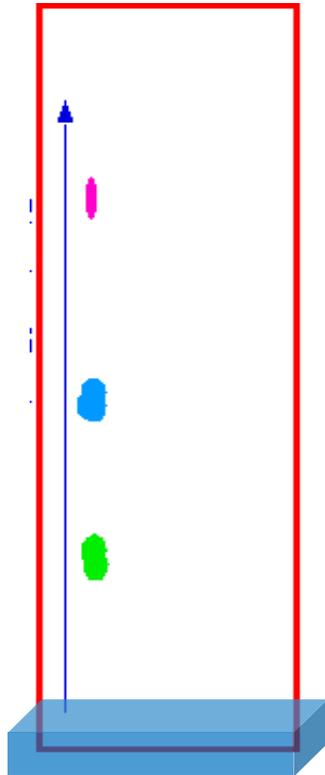
- ✓ **Tecnica “Comprehensive”**: in cui tutto il campione viene separato in tutte le dimensioni. Si usa se è necessario avere una informazione globale sul campione (composizione di un petrolio greggio o di un combustibile).



© 2006 Wiley-VCH, Weinheim
Kellner / Analytical Chemistry
ISBN: 3-527-30590-4 Fig-21-54

➤ **MTLC (TLC multidimensionale)**

Consiste nello sviluppo della TLC lungo due dimensioni perpendicolari utilizzando differenti fasi mobili per ogni fase, è una **Tecnica "Comprehensive"**.



Fase 1:
sviluppo con eluente1



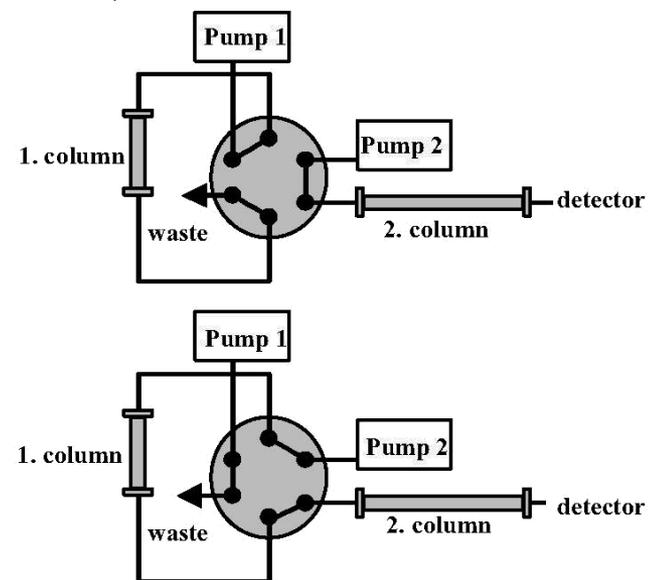
Fase 2:
sviluppo lungo direzione perpendicolare con
eluente2

➤ LC-LC

- E' forse il metodo multidimensionale più usato;
- **Applicazioni:** purificazioni e arricchimento degli analiti, miglioramento dell'efficacia di separazione e sensibilità delle analisi;
- Consiste in un normale sistema per LC in cui si connettono assieme 2 o più colonne con una **valvola multiporta** e il sistema ha due o più pompe indipendenti;
- L'effluente dalla 1^a colonna può essere diretto, commutando la valvola, allo scarico, al rivelatore o alla seconda colonna.
- Nella tecnica di commutazione della colonna, la tecnica è multidimensionale solo se le colonne sono impaccate con diversa fase stazionaria;
- Quindi i meccanismi di ritenzione (materiali delle colonne) devono essere diversi;
- Viene per lo più usato un approccio **"heartcut"**.

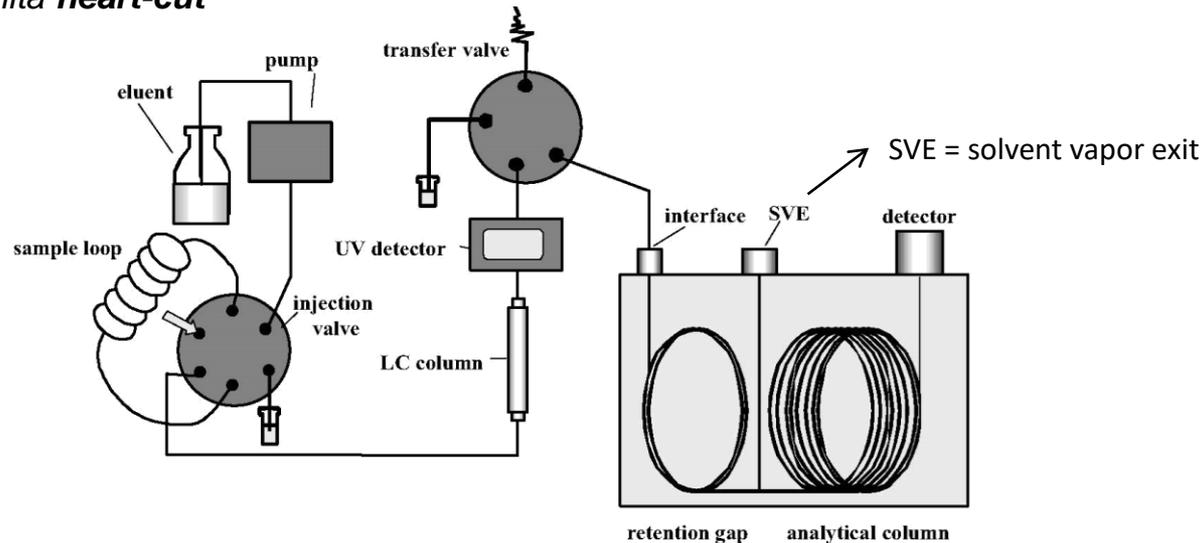
Esempio:

- 1) il campione è iniettato nella 1^a colonna. Gli analiti di interesse vengono trattenuti in colonna sulla f.s. e i composti indesiderati della matrice vengono eliminati (waste).
- 2) Gli analiti vengono trasferiti alla 2^a colonna con altro solvente per ottenere la separazione desiderata.



➤ 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 gli 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 (di solito NPLC) e GC;
- Multidimensionalità in modalità **heart-cut**



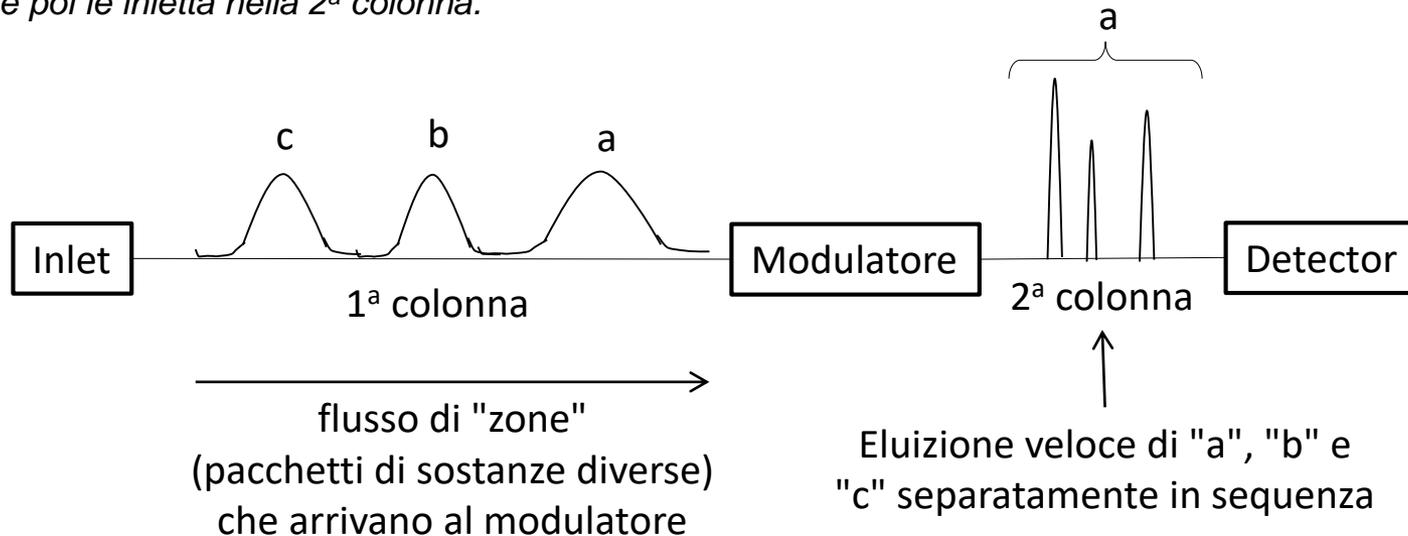
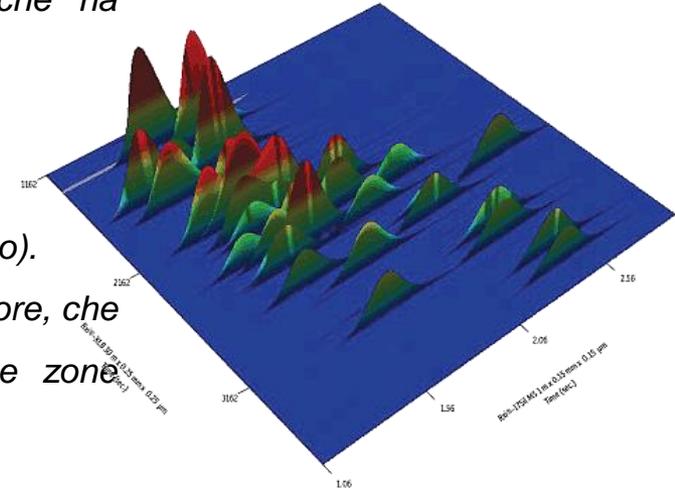
© 2006 Wiley-VCH, Weinheim
Kellner / Analytical Chemistry
ISBN: 3-527-30590-4 Fig-21-56

Interfaccia on column

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

➤ GCxGC

- E' un approccio "**Comprehensive**" (mentre esiste anche GC-GC che ha approccio "heartcut")
- In un unico forno vengono alloggiati 2 colonne capillari;
- La prima colonna è una colonna lunga capillare;
- La seconda colonna è una "narrow bore" (0.2-4 m, 0.05-0.1 diametro interno).
- "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 corsa cromatografica nella seconda colonna è veloce (3-10 secondi).
- Il **modulatore** è tipicamente una trappola fredda a 2 stadi che prima ri-focalizza le "zone" in uscita dalla 1^a colonna e poi le inietta nella 2^a colonna.



SLIDES DI APPROFONDIMENTO SU GC MULTIDIMENSIONALI

Vedi anche

<https://www.researchgate.net/publication/266797043> Advances in Comprehensive Two-dimensional Gas ChromatographyGCxGC

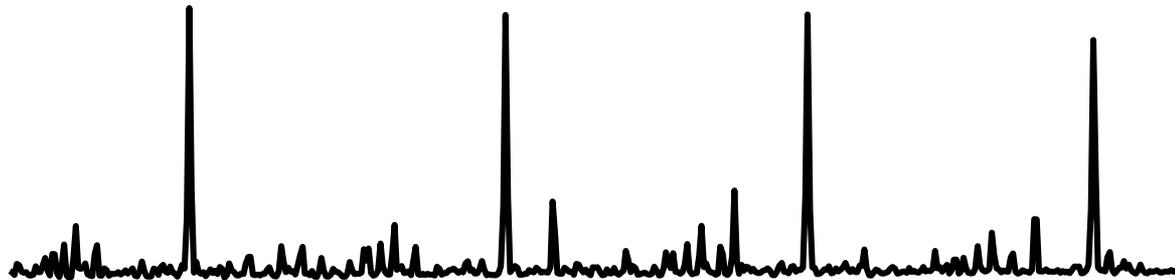
E

<https://www.agilent.com/en/products/gas-chromatography/gc-gc-ms-technologies/capillary-flow-technology/gc-x-gc>

Dalla 1D-GC verso 2D-GC

1D-chromatography

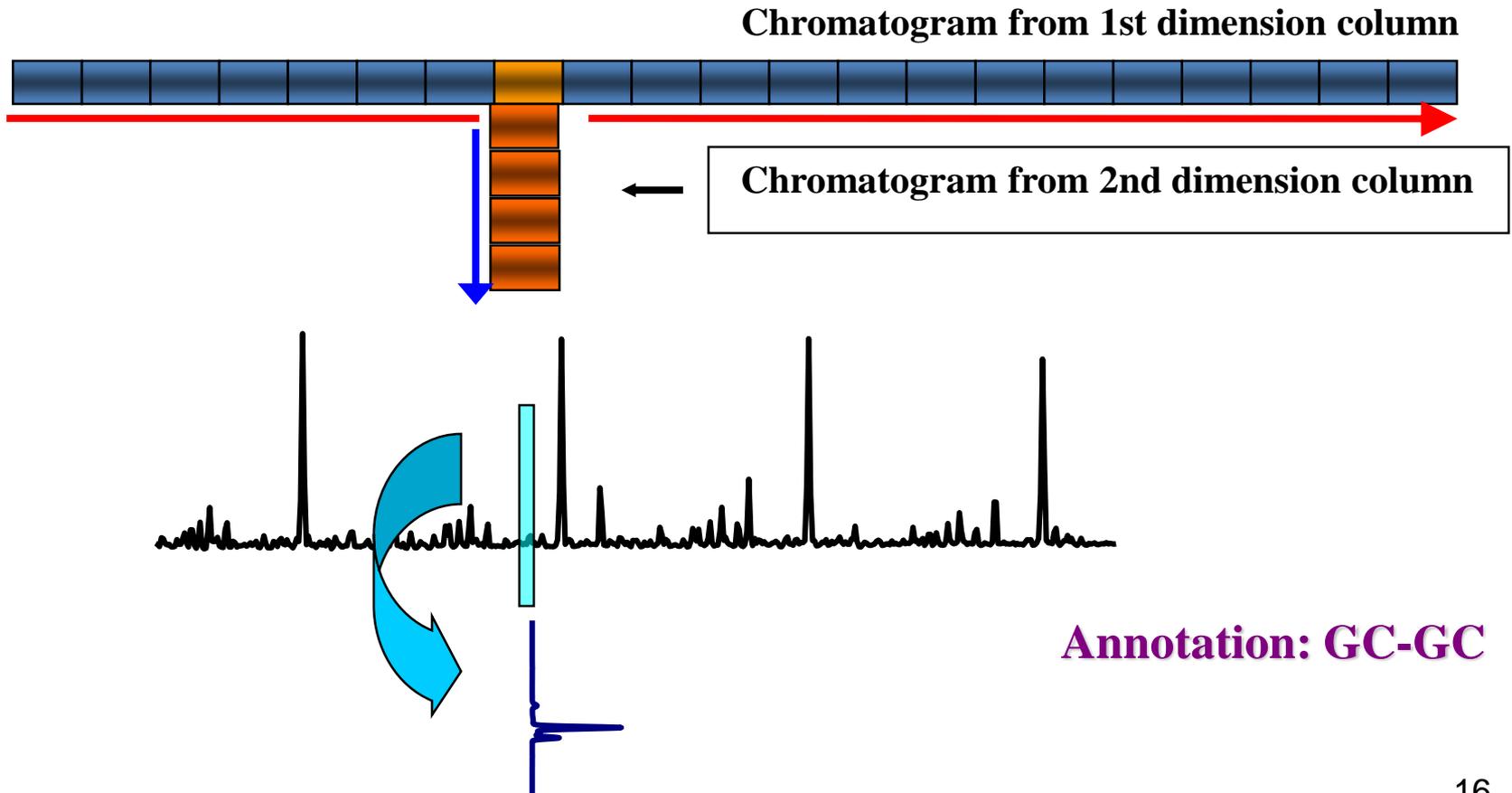
Cromatogramma da una singola dimensione cromatografica

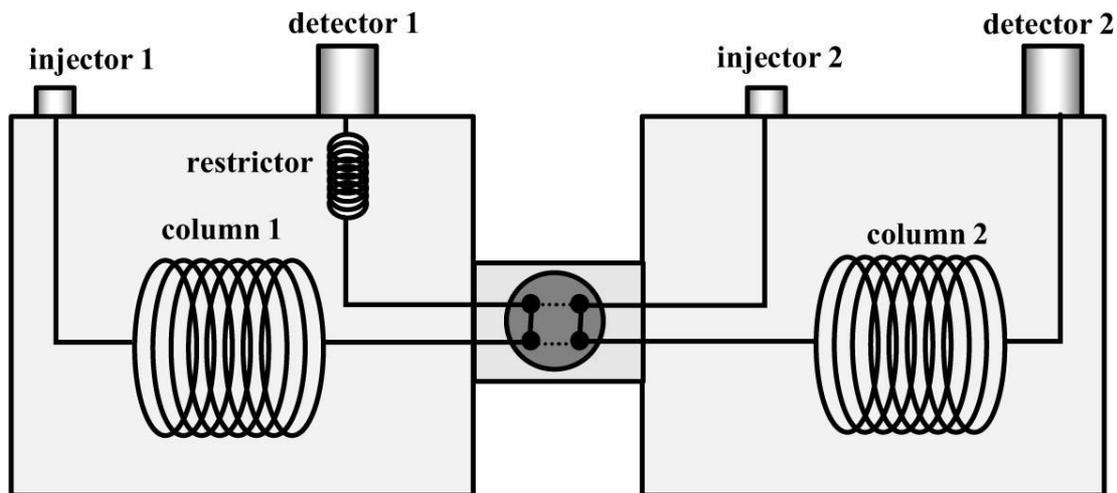


Dimensionalità= "criterio" della selettività

Heart-cut 2D-chromatography

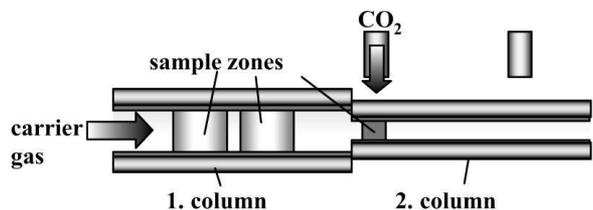
Una o più frazioni della miscela sono soggette a due step consecutivi di separazione



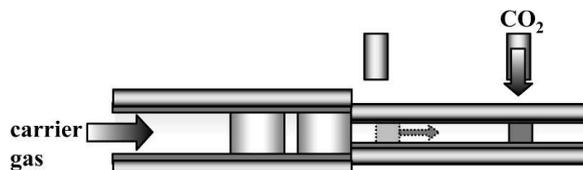


«Heart cut»

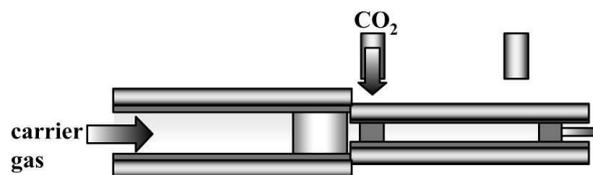
© 2006 Wiley-VCH, Weinheim
Kellner / Analytical Chemistry
ISBN: 3-527-30590-4 Fig-21-58



3-8 s
trapping of sample zone to cold trap 1



1-2 s
release of the sample zone from trap 1, trapping it to trap 2



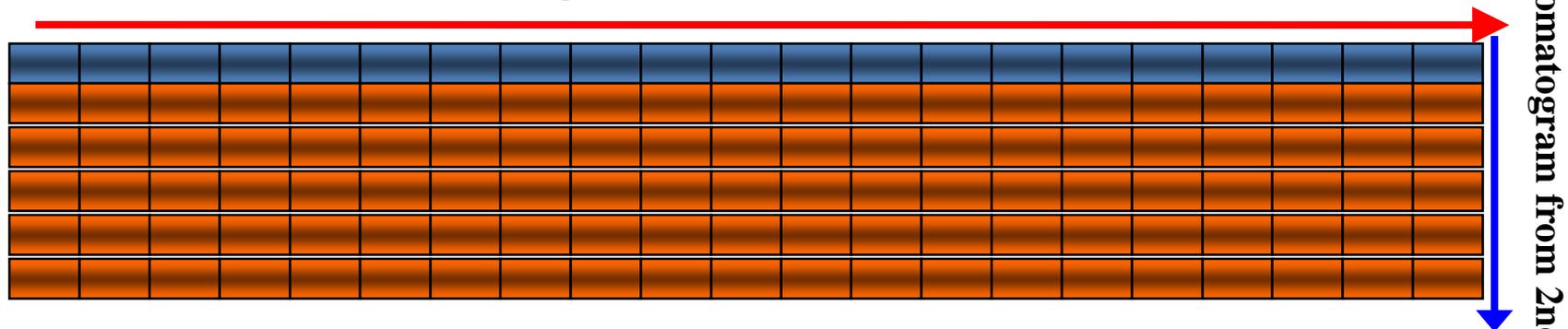
3-8 s
trapping of the next sample zone, release and analysis of the sample zone from trap 2

«2D comprehensive»

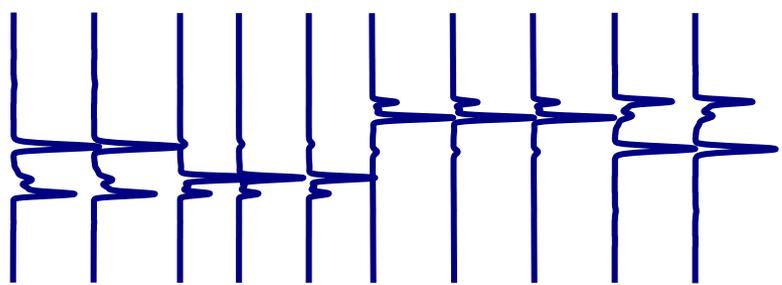
© 2006 Wiley-VCH, Weinheim
Kellner / Analytical Chemistry
ISBN: 3-527-30590-4 Fig-21-59

Comprehensive 2D-gas chromatography

Chromatogram from 1st dimension column



Chromatogram from 2nd dimension column



Annotation: GCXGC

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

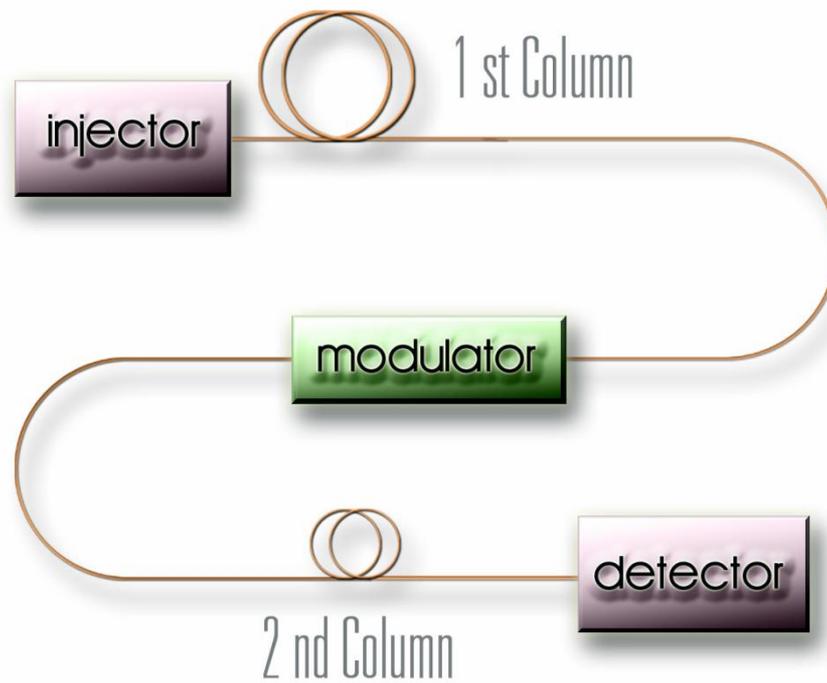


Ortogonalità



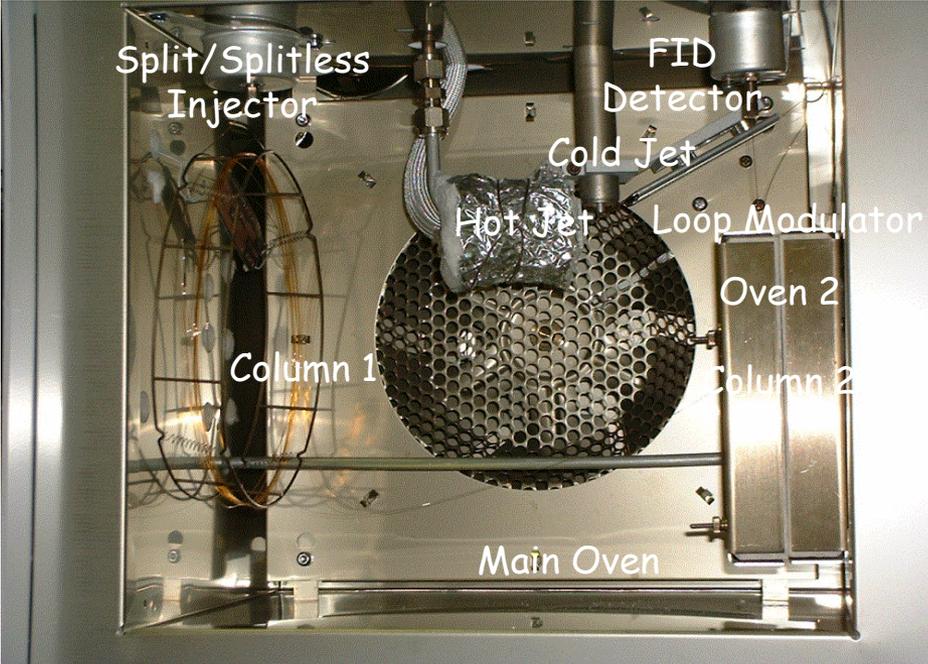
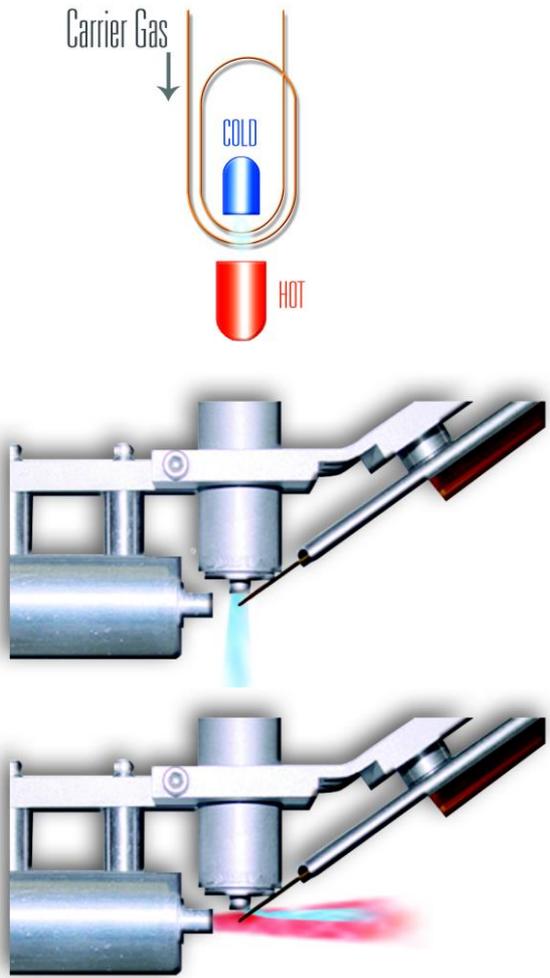
Comprensività

Schema di un Gascromatografo Comprensivo Bidimensionale

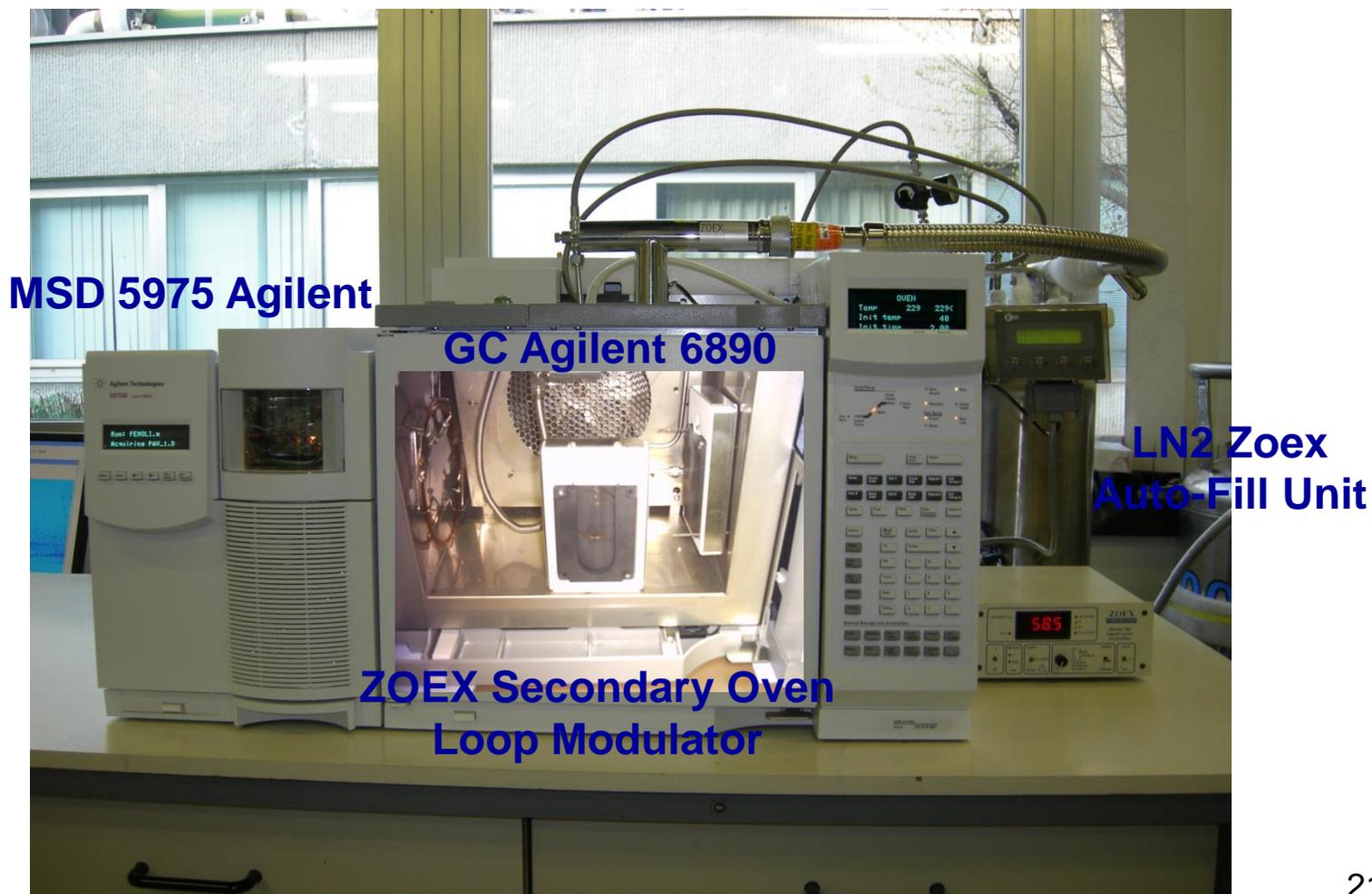


Modulatore Termico

all'interno del forno del
GC Agilent 7890

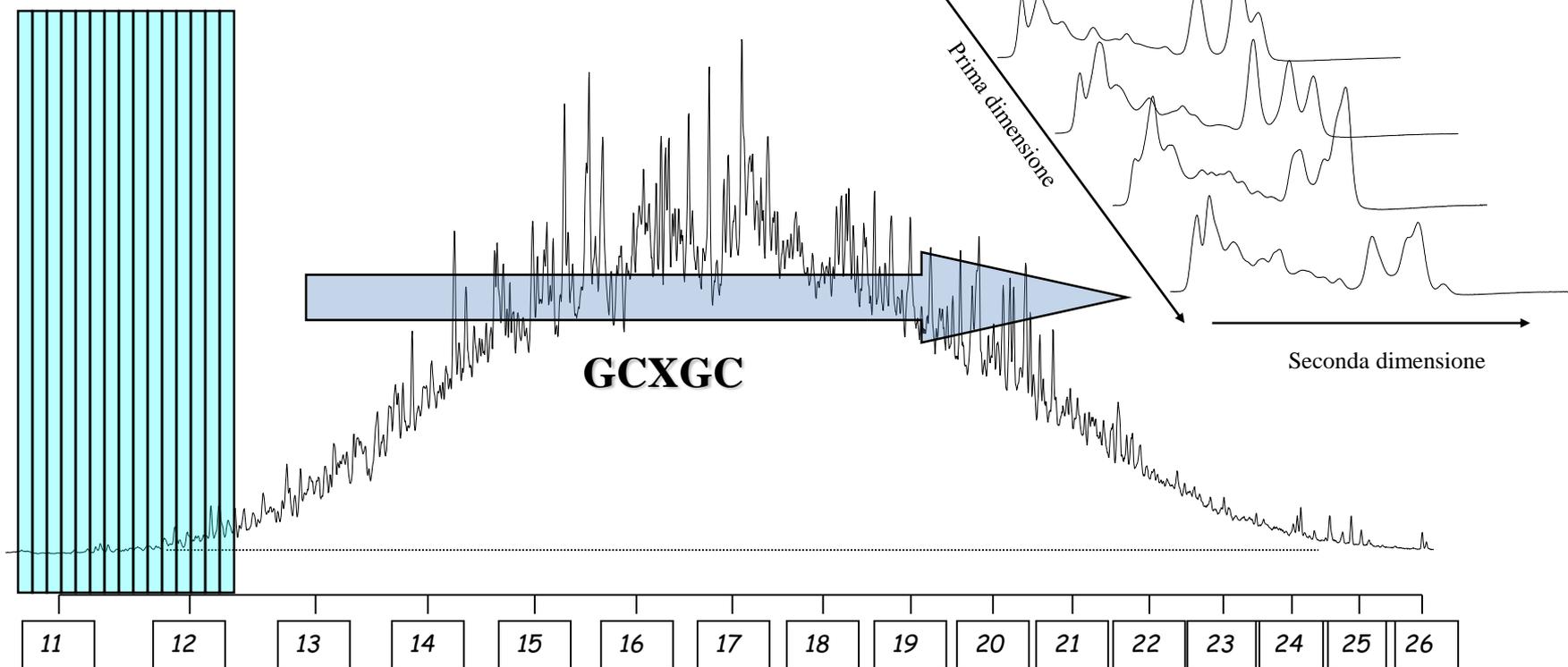


Sistema SRA GCxGC-qMSD installato presso il centro di ricerche ENI di San Donato Milanese



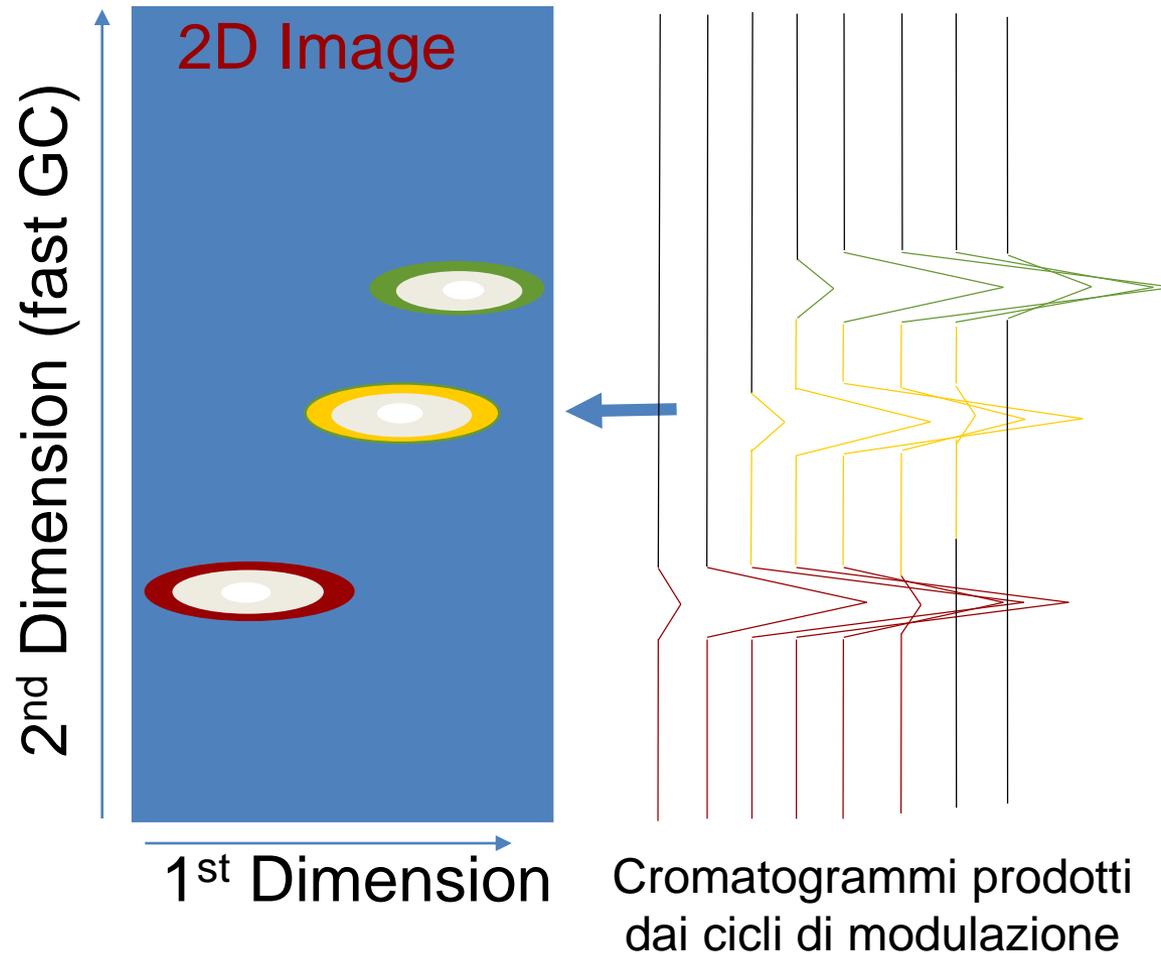
Miscela complessa non risolta

Cromatogramma 1D-GC

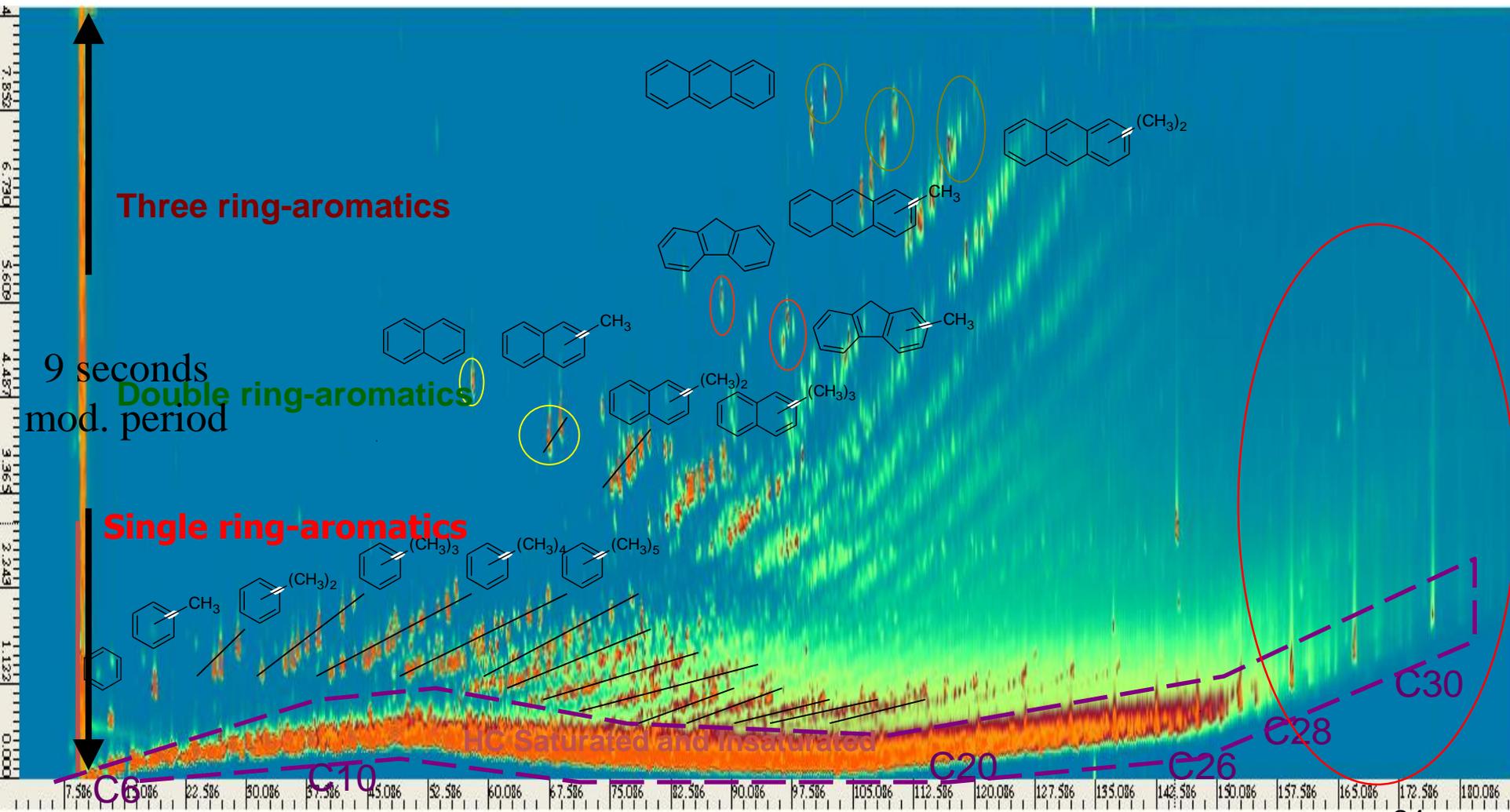


Numero atomi di Carbonio

Costruzione dell'immagine GCXGC

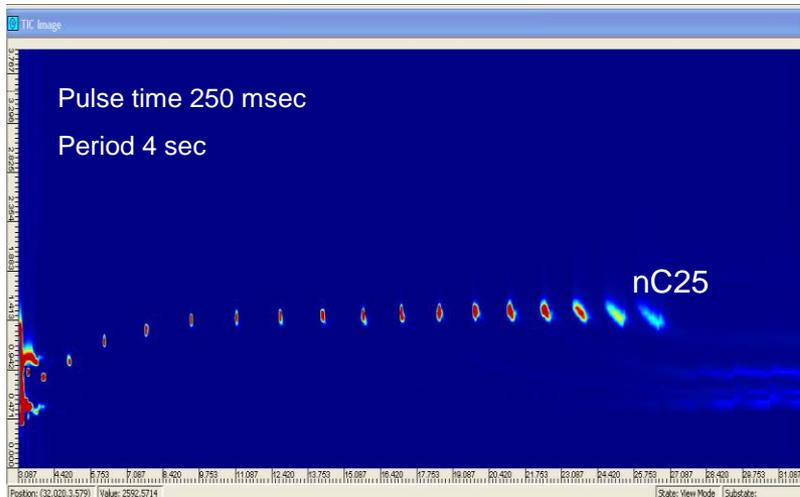
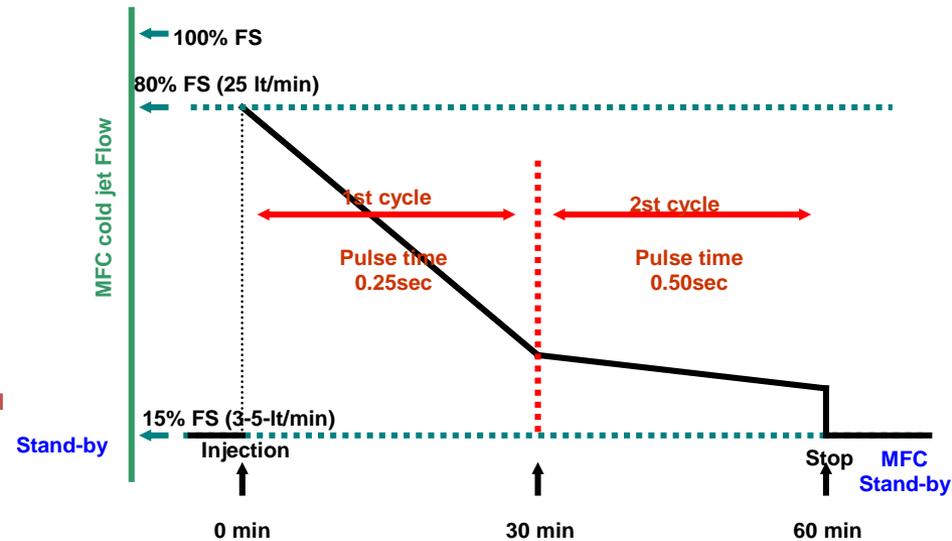


Idrocarburi Aromatici in Greggio leggero

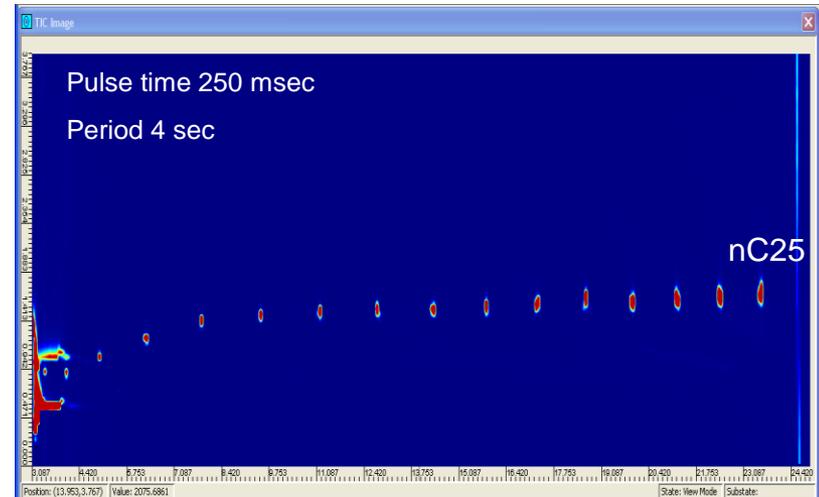


SRA OPTIMODE

- **VANTAGGI**
- CONDIZIONI RIPRODUCIBILI DEL FLUSSO DEL COLD JET
- RIDUZIONE DEI CONSUMI DI AZOTO GAS E LIQUIDO
- PREVIENE BREAKTHROUGHT DEI COMPONENTI PIU' LEGGERI
- CONSENTE UNA VELOCE MOBILIZZAZIONE DEL MATERIALE FOCALIZZATO
- NESSUN CONTRIBUTO DEL MODULATORE AL NUMERO DELLE MODULAZIONI
- IDEALE PER CAMPIONI CON UN AMPIO RANGE DI VOLATILITA'

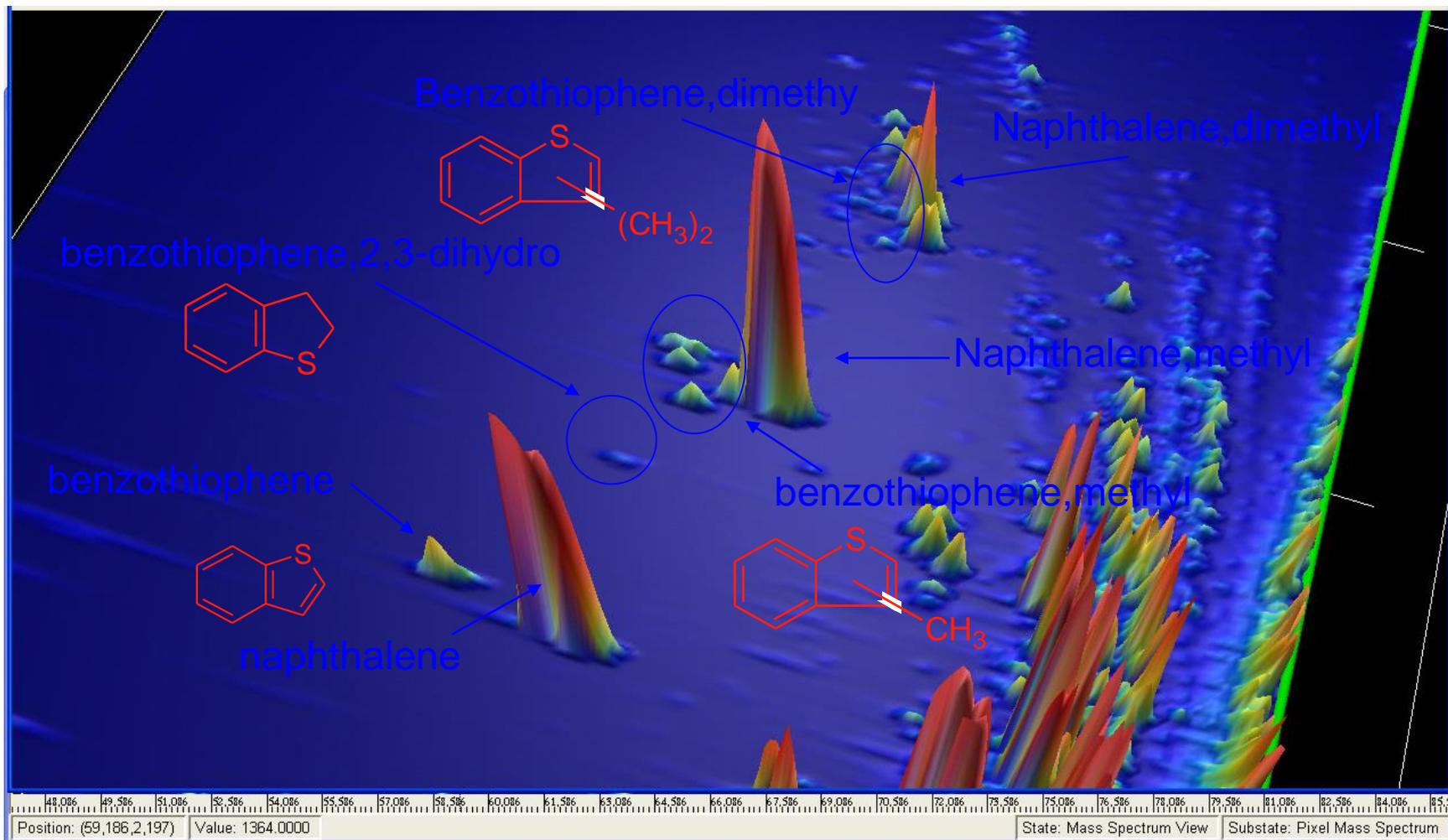


Standard Cold Flow 20 lt/min

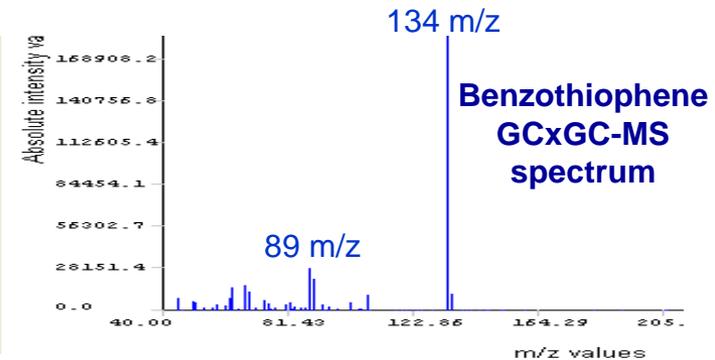
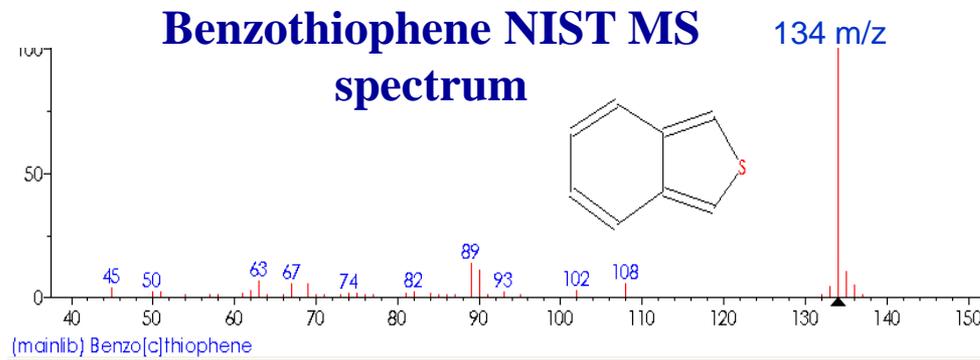
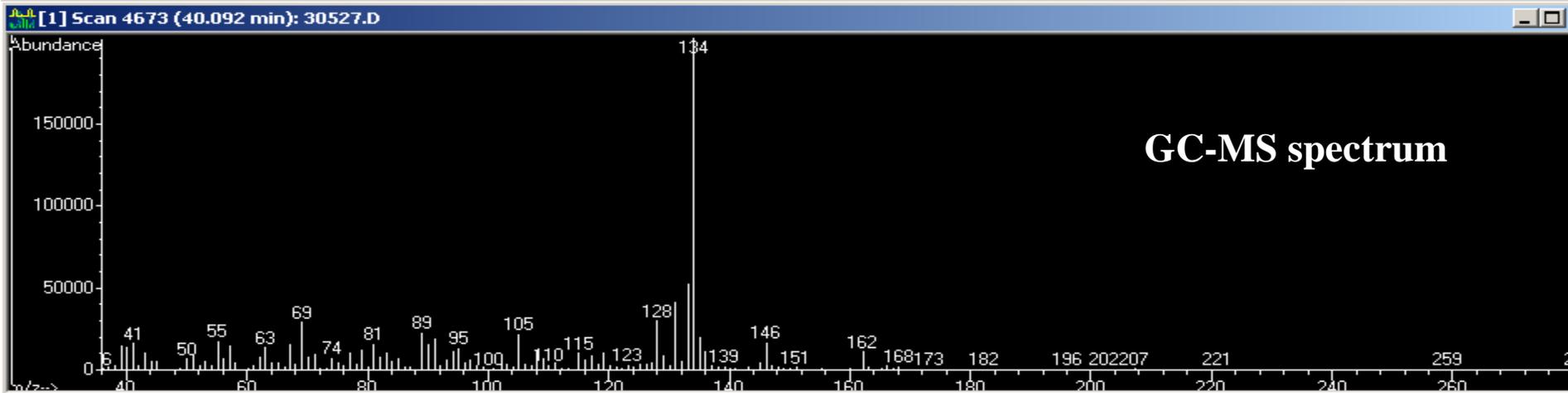


Optimode Cold Flow da 20 lt/min a 3 lt/min

Vista-3D Benzotiofeni in intermedio di benzina prima della desolforazione Modulatore Termico e Rivelatore di Massa Quadrupolare

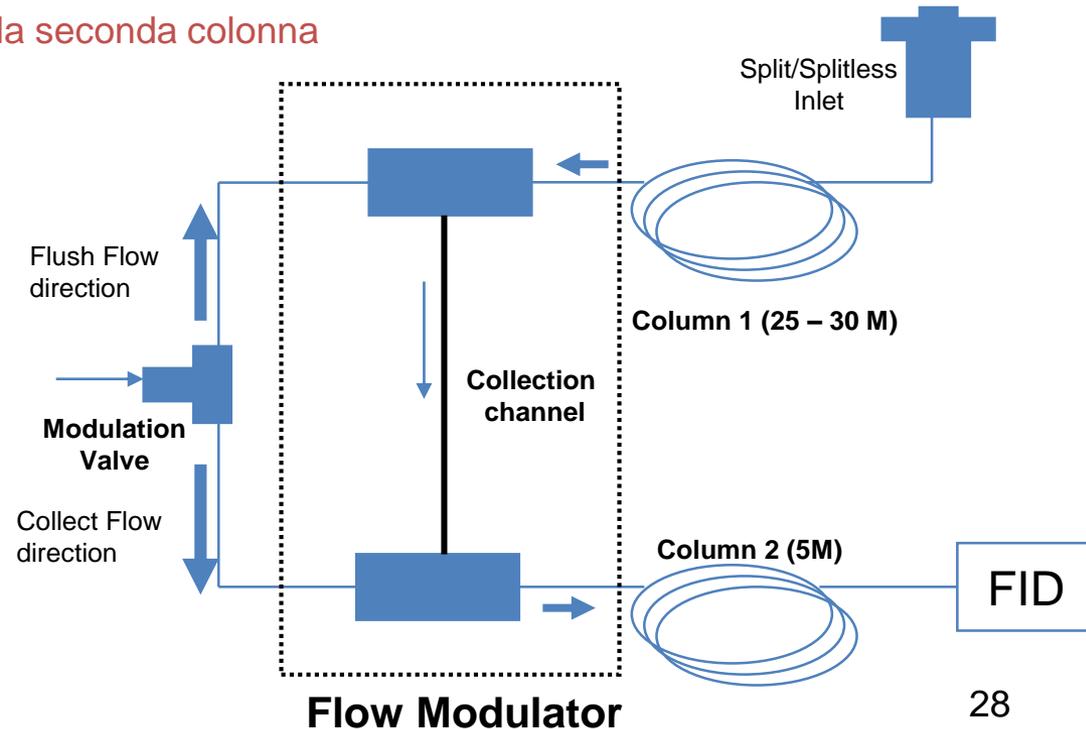
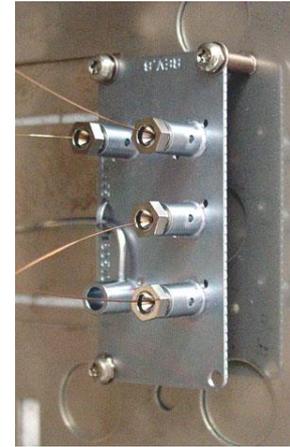


Benzothiophene GC-MS

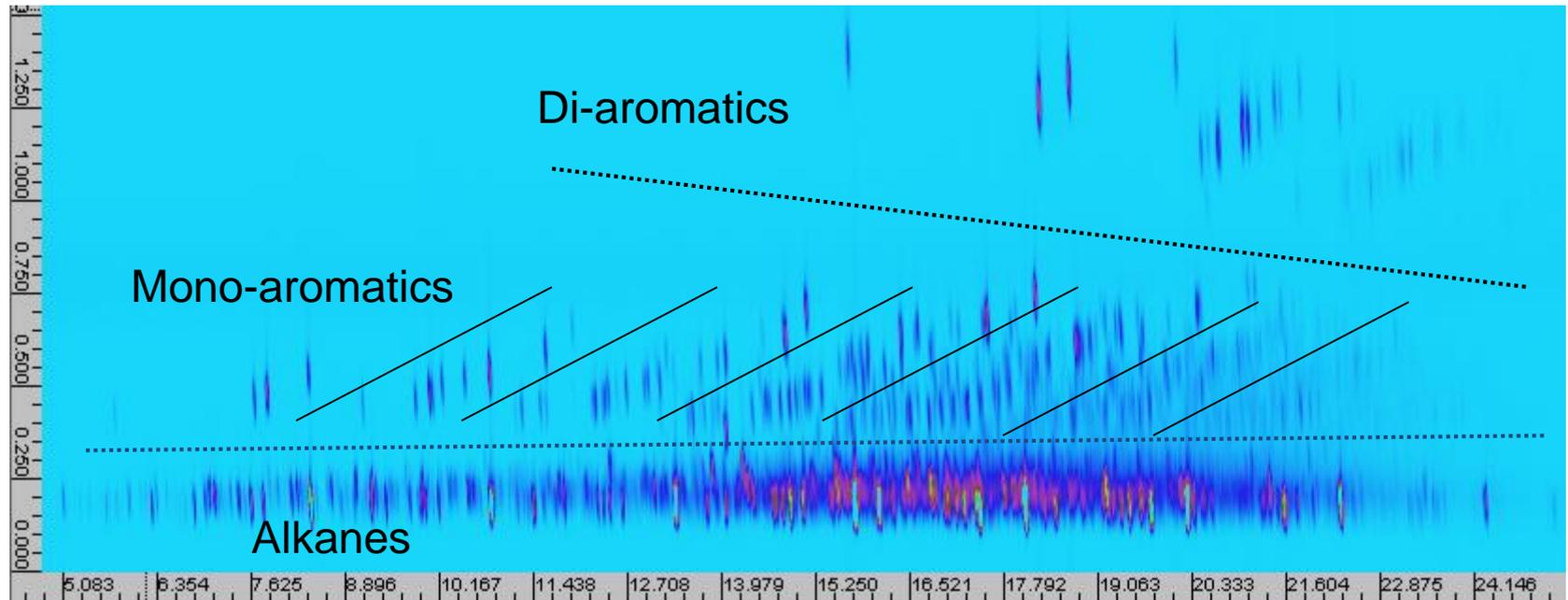


Agilent GCXGC Flow Modulator

- Il modulatore a flusso differenziale è costruito con Capillary Flow Technology
- Il GC 7890 consente il controllo accurato delle pressioni e degli eventi a tempo
- Non usa fluidi criogenici, adatto per gas e bassobollenti
- Necessita di un elevato flusso nella seconda colonna



Agilent Flow Modulator : Analisa GCXGC di Kerosene



Modulation

1.40 second collect

0.11 second inject

Column 1: HP-5MS 30m x 0.25mm x 0.25um

Column 2: INNOWAX 5m x 0.25mm x 0.15um

Oven rate: 8 °C/min

BPX5 5% Phenyl Polysilphenylene-siloxane

High temperature

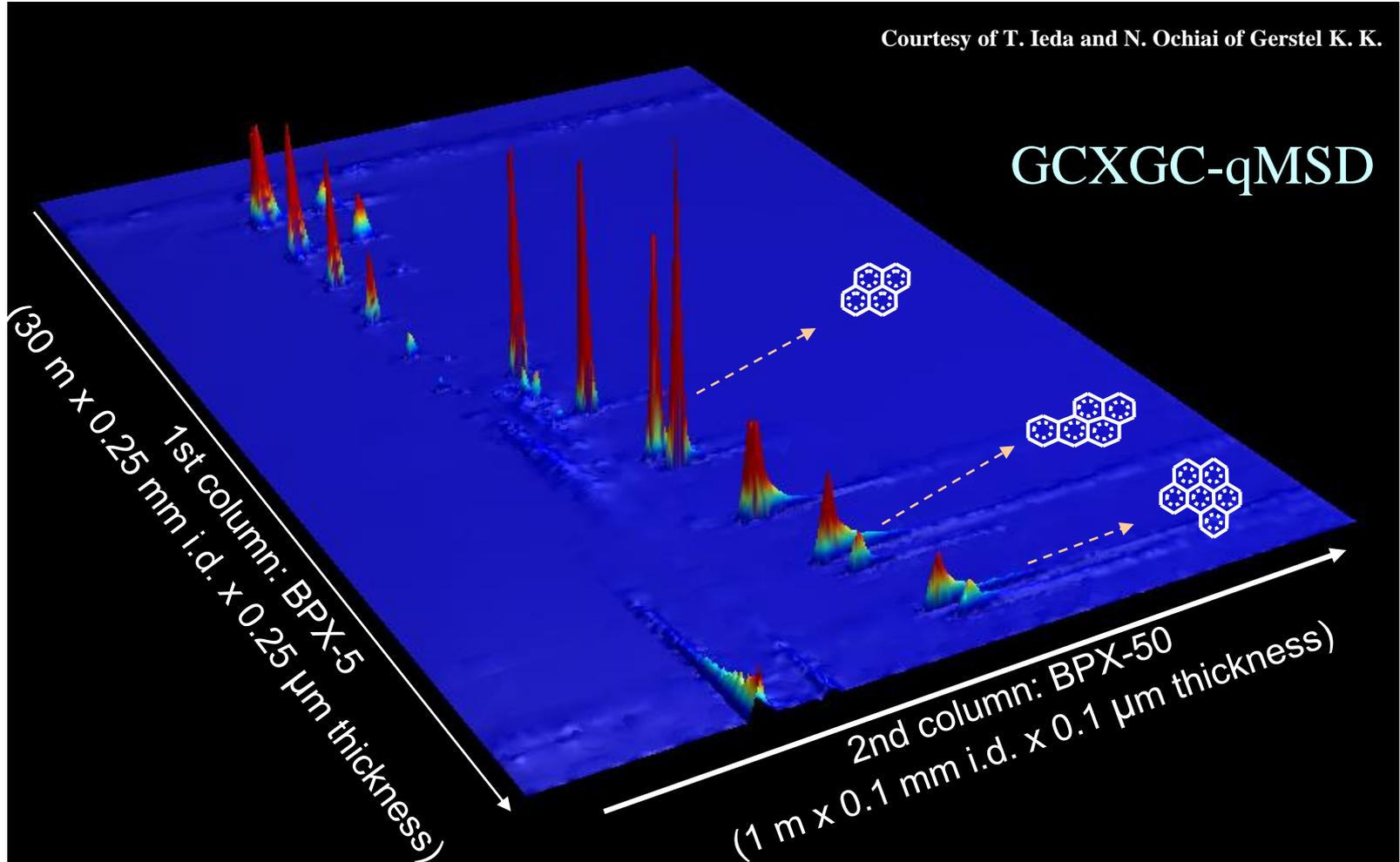
General Purpose GC column - suitable for over 80% of all routine analyses performed by gas chromatography

Very Low Bleed - ideal for trace analysis

Non-Polar

Extremely inert **Modulatore Termico GC x GC – Qms of PAHs STD (100 pg each) in 3D plot**

2nd column: BPX-50 (1.0 m x 0.1 mm i.d. x 0.1 μm thickness)



1st column: BPX-5 (30 m x 0.25 mm i.d. x 0.25 μm thickness)

BPX50

You are here:

[GC Columns](#) > [BPX50](#)

50% Phenyl Polysilphenylene-siloxane

- Mid polarity
- Inert
- Low bleed
- High temperature
- Ideal for a range of EPA methods and pharmaceutical applications

Application Areas: EPA methods 604, 608, 8060, 8081, triazines/herbicides, drug screening, steroids and a variety of pharmaceutical applications

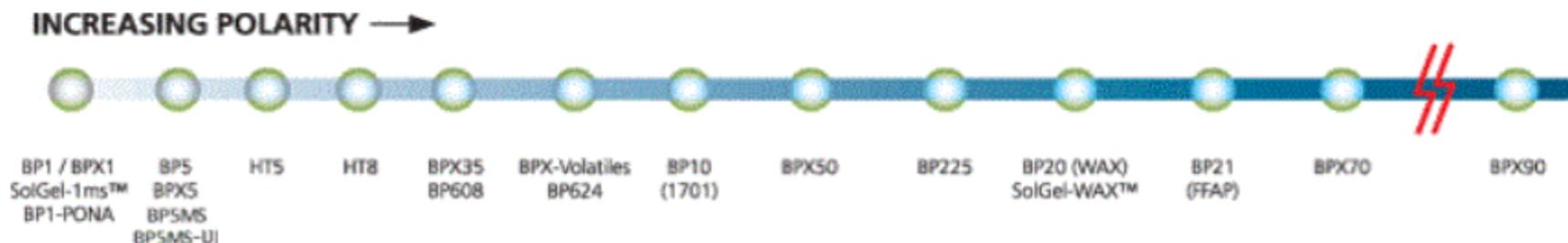
Operating Temperature:

0.1-1 μ m film thickness

80°C to 330/350°C

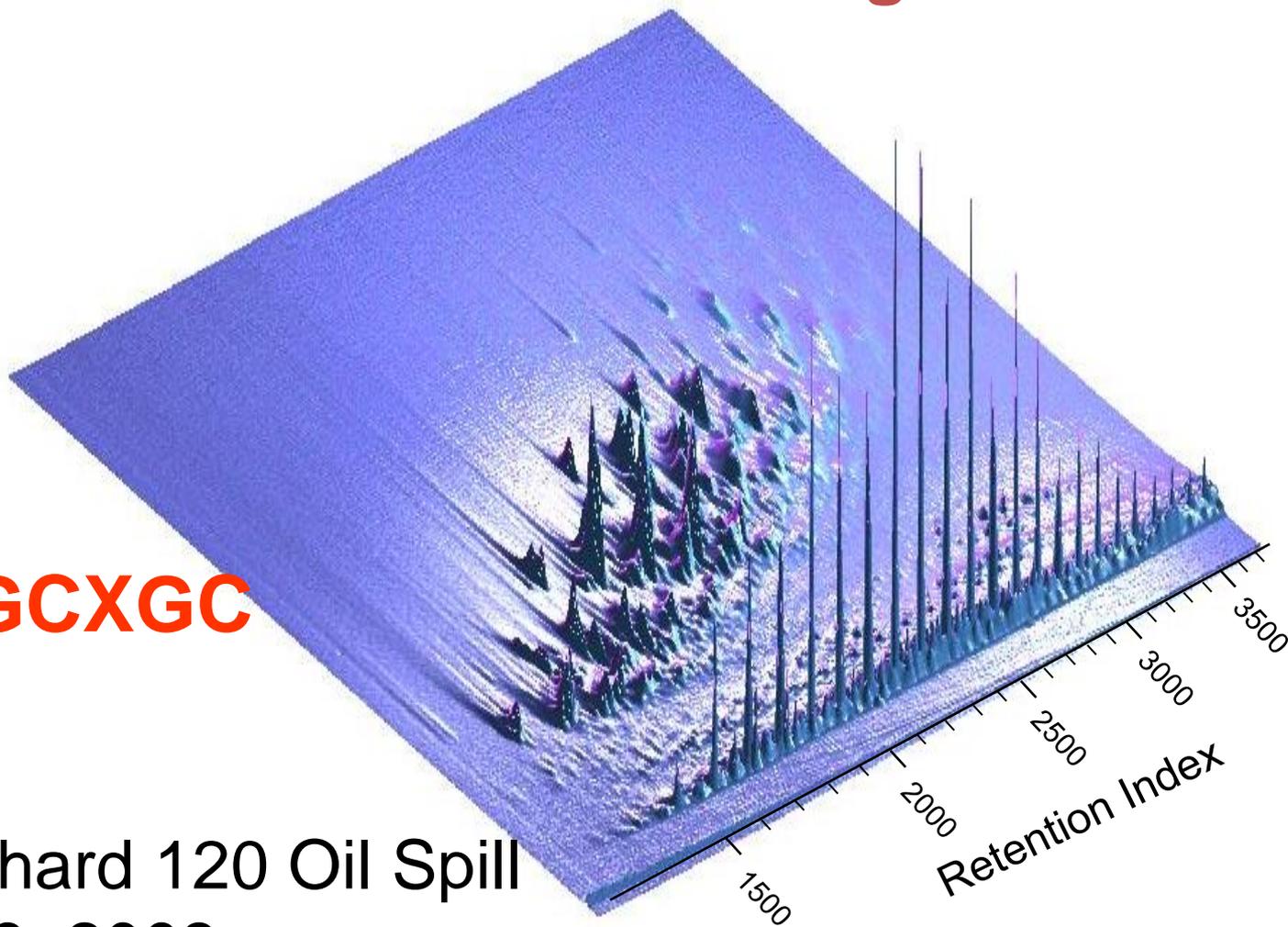
Suitable Replacement for: OV-17, SP-2250, DB-17, DB-17ms, DB-17ht, Rtx-50, SPB-50, HP-50+, HP-17

To search for peer reviewed literature featuring BPX50 columns, [click here](#).



Applicazione di GCxGC ad indagini ambientali

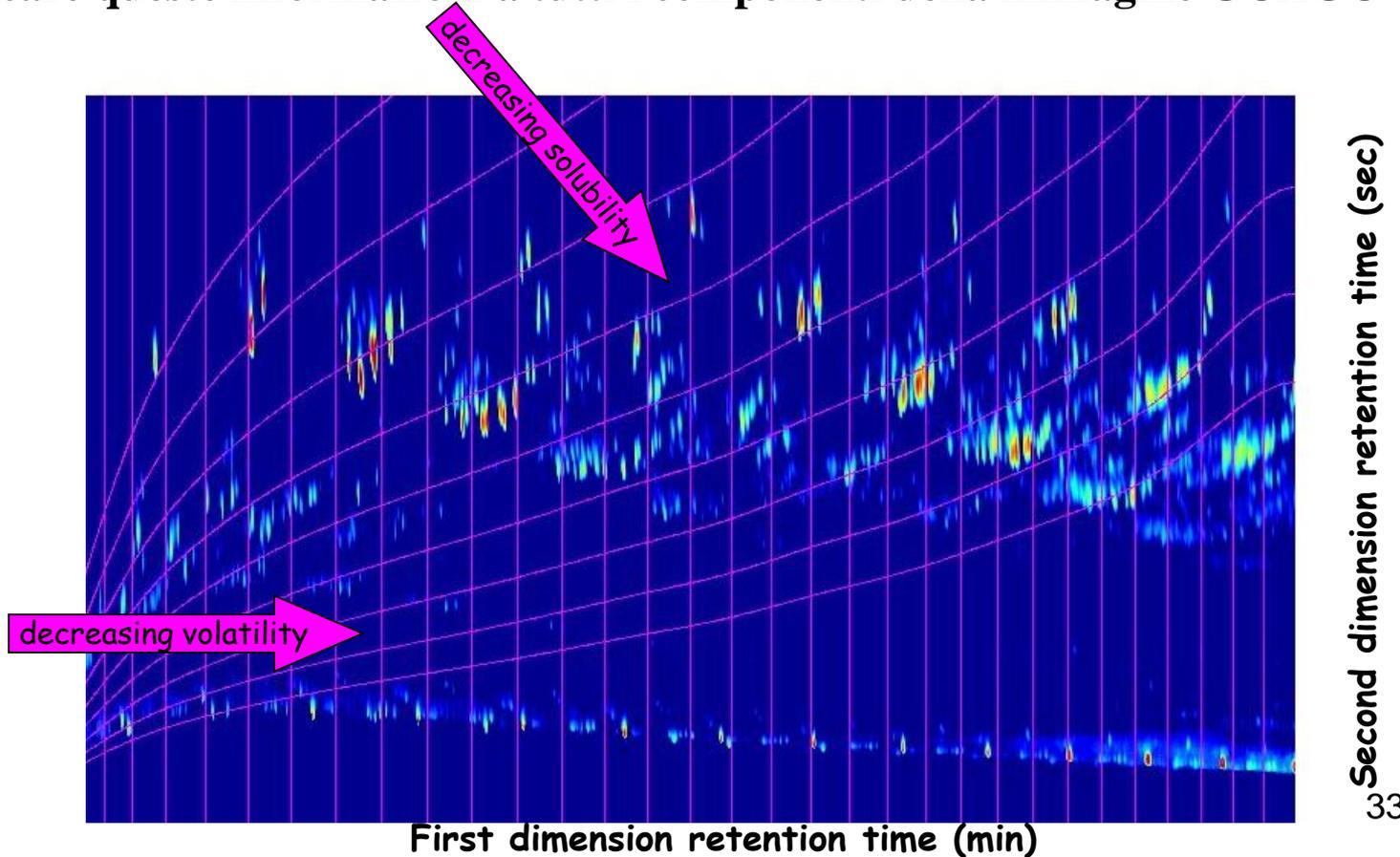
3D-GCXGC



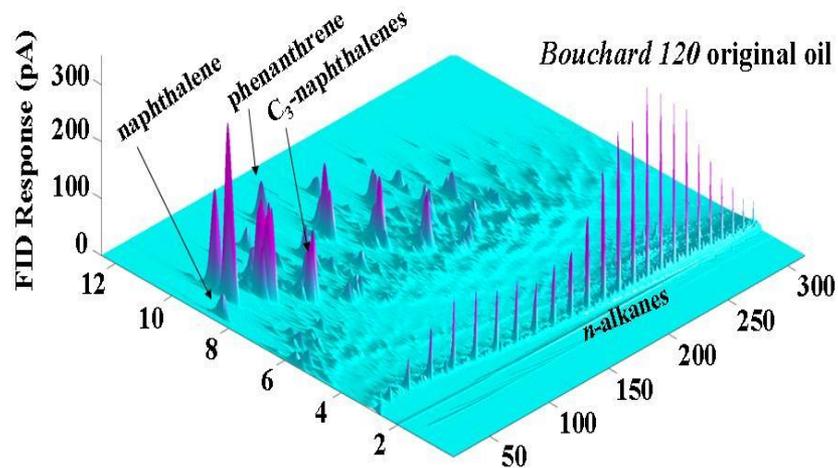
Bouchard 120 Oil Spill
May 9, 2003

Proprietà fisiche da un cromatogramma GCXGC

Usare i tempi della prima e della seconda dimensione per stimare la pressione di vapore (volatilità degli idrocarburi) e la solubilità in acqua
Applicare queste informazioni a tutti i componenti della immagine GCXGC



Indagine Ambientale: riversamento in mare di crude oil



Naftalene

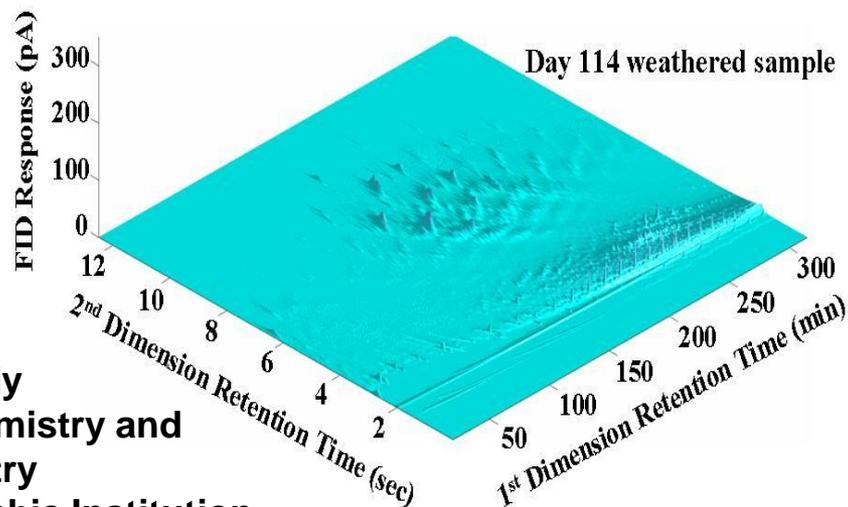
51% in aria 49% in acqua

Fenantrene

31% in aria – 69% in H₂O

C3-Naftaleni

80% in aria - 20% in acqua

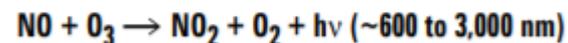
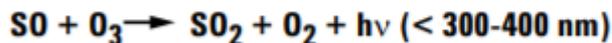


Chris Reddy
Dept. of Marine Chemistry and
Geochemistry
Woods Hole Oceanographic Institution,
Woods Hole, MA

GC X GC: conclusioni

- **Alta Risoluzione, Elevata “peak capacity”**
- **Analisi per fingerprint, per gruppi o per componenti target**
- **Semplice interpretazione (i picchi sono organizzati con logica)**
- **Sensibilità (guadagno nel rapporto segnale/rumore)**
- **Identificazione affidabile con Fast-qMSD e spettri “puliti”**
- **Grande flessibilità, numerose applicazioni**
- **Rivelatori FID, SCD, NCD (chemiluminescenza del S e del N), AED, qMSD Fast Scan**
- **Modulatori Termici – usa fluidi criogenici – tutti i rivelatori fast citati**
- **Modulatori a Flusso Differenziale - più economici**

Sulfur compound (analyte) → SO + H₂O + other products



ELETTROFORESI

INTRODUZIONE

- ❑ L'elettroforesi è una **alternativa** alle separazioni cromatografiche;
- ❑ Permette di separare **composti ionici** mediante migrazione indotta da un campo elettrico;
- ❑ Tipicamente le biomolecole vengono analizzate mediante **gel elettroforesi**;
- ❑ L'**elettroforesi capillare** invece viene utilizzata per separare ioni inorganici ed organici a MM non elevata.

➤ Meccanismo

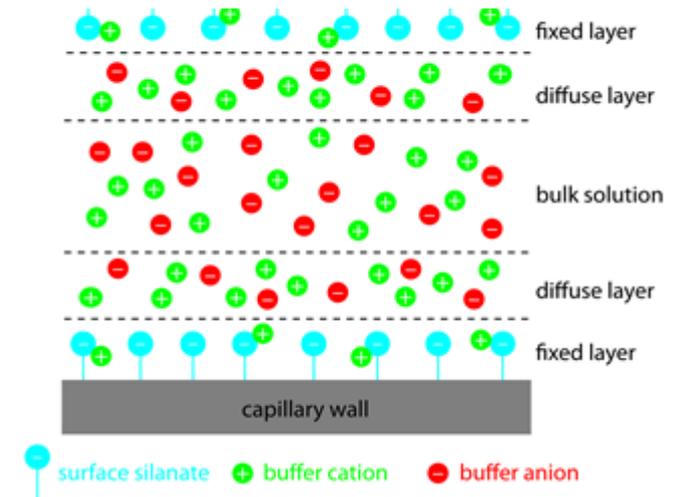
- In un campo elettrico gli ioni migrano in dipendenza delle loro dimensioni e della loro carica;
- I **cationi** vengono attratti dal polo negativo (**catodo**) e gli **anioni** dal polo positivo (**anodo**);
- La migrazione è soggetta ad un equilibrio di due forze: la **forza di accelerazione causata dal campo elettrico** e **una forza ritardante di frizione** (dovuta alla viscosità del mezzo);
- All'equilibrio, quando le due forze si eguagliano, la **velocità costante di migrazione (o velocità elettroforetica)**:

- è direttamente proporzionale al n° di cariche dello ione;
- è direttamente proporzionale all'intensità del campo elettrico applicato;
- è inversamente proporzionale alle dimensioni dello ione;
- è inversamente proporzionale alla viscosità del mezzo

La **mobilità di uno ione** si può definire indipendentemente dal campo elettrico applicato, ed è dir. prop. al n° di cariche dello ione e è inv. prop. e alle dimensioni dello ione e alla viscosità del mezzo.

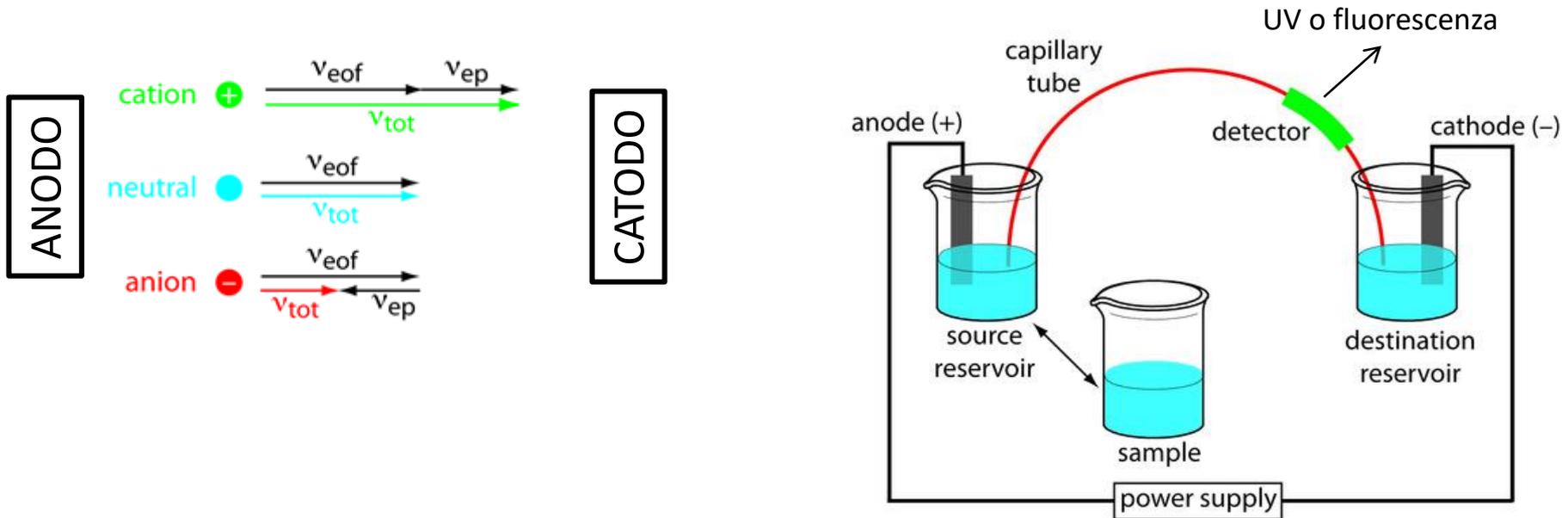
➤ Flusso elettro-osmotico (EOF – Electroosmotic Flow)

- Questo effetto è tipico dell'elettroforesi;
- Dipende dalle interazioni degli elettroliti (presenti nella soluzione tampone che viene utilizzata) con i materiali dell'apparecchiatura, cioè vetro e quarzo principalmente;
- Le superfici in silice contengono un grande numero di gruppi silanolo (-Si-OH);
- A pH superiori a 2-3 i gruppi silanolo vengono deprotonati generando una superficie contenente molte cariche negative;
- I cationi presenti nella soluzione tampone migrano verso le superfici cariche negativamente e "mascherano" una parte delle cariche;
- La rimanente parte delle cariche attrae altri cationi che si "addensano" in uno strato (**diffuse layer**) in prossimità della superficie di silice;
- I cationi contenuti nel "diffuse layer" migrano verso il catodo e "trascinano" con sé tutta la soluzione acquosa poiché sono in essa solvatati (gli anioni migrano verso l'anodo, ma nel "diffuse layer" ce ne sono di meno, quindi si ha un flusso netto verso il catodo);
- Questo fenomeno è detto **flusso elettro-osmotico**



➤ Elettroforesi capillare

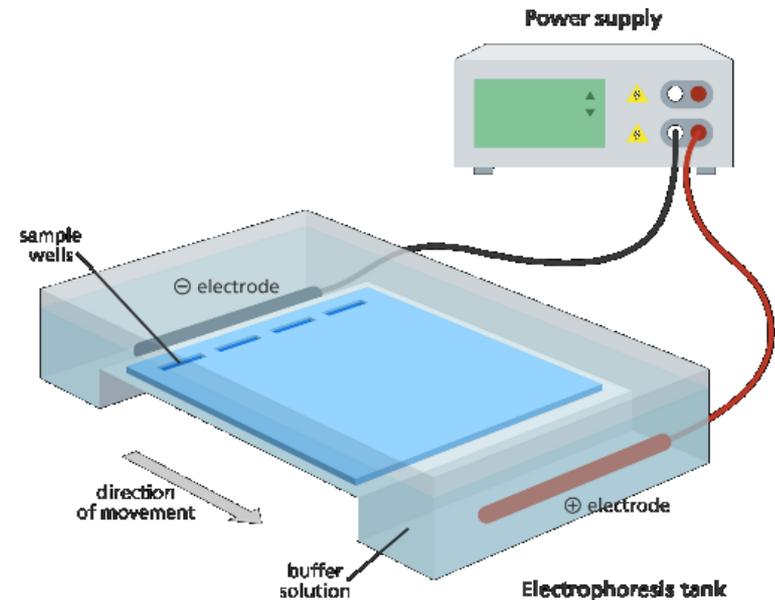
- In elettroforesi capillare grazie al flusso elettro-osmotico è possibile rilevare gli analiti ad una estremità del capillare;
- La velocità totale di un soluto in questa tecnica è dovuta alla velocità di migrazione (o elettroforetica) v_{ep} e alla velocità elettro-osmotica v_{eof} ;
- Queste velocità hanno direzioni diverse a seconda della natura della sostanza, quindi possono sommarsi o sottrarsi come segue:



Esempio di applicazione: separazione di frammenti di DNA

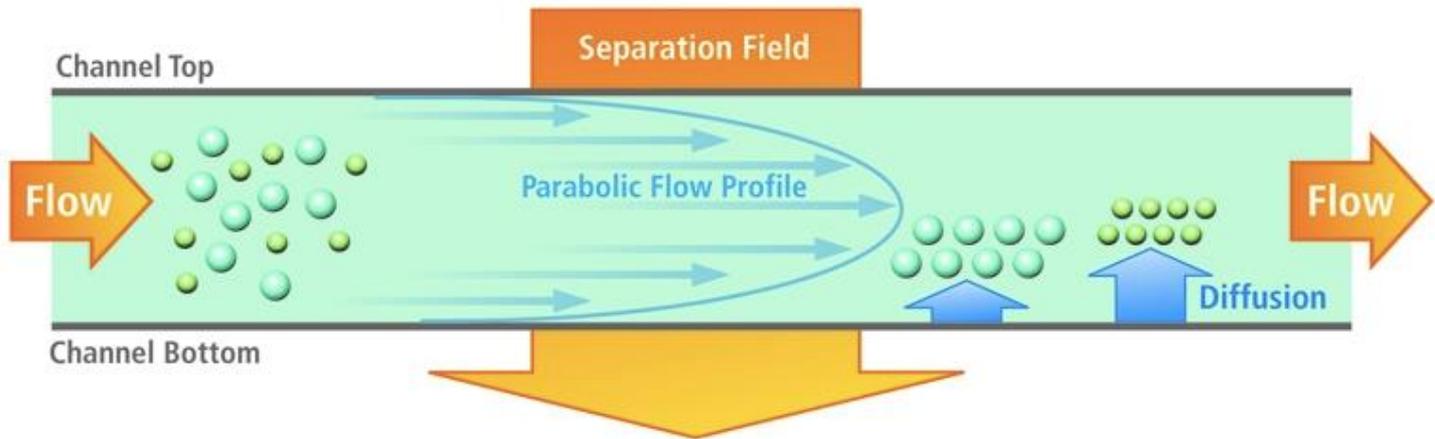
➤ Gel elettroforesi

- *In gel elettroforesi il flusso elettro-osmotico altera il processo di separazione (presenza di aree più diluite, interferenze nel percorso degli anioni) ed è più propriamente definito come elettroendo-osmosi;*
- *In questa tecnica un gel originato dal polisaccaride agarosio o dal poliacrilamide sintetica viene versato su una superficie di vetro o di materiale inerte;*
- *In questa tecnica un gel originato dal polisaccaride agarosio o dal poliacrilamide sintetica viene versato su una superficie di vetro o di materiale inerte;*
- *Il campione viene alloggiato in una serie di pozzetti (wells) nel gel ad una estremità poi viene applicato un campo elettrico;*
- *Gli analiti separati possono essere rivelati ad es. applicando una soluzione di AgNO_3 (Ag^+ viene ridotto dalle proteine) o degli agenti coloranti che reagiscono selettivamente con gli analiti.*



Esempio di applicazione: separazione di biomacromolecole (es. proteine)

Il frazionamento in campo-flusso, abbreviato **FFF (Field-Flow Fractionation)**, è una tecnica di separazione in cui un campo (gravitazionale, gradiente termico, elettrico, magnetico etc,) viene applicato ad una sospensione fluida o soluzione pompata attraverso un canale stretto e lungo, perpendicolare alla direzione di flusso, al fine di provocare la separazione delle particelle presenti nel fluido, dipendente dal loro differenti "mobilità" sotto la forza esercitata dal campo.



Il meccanismo di separazione nasce da differenze di mobilità per la particella sotto le forze del campo, in equilibrio con le forze di diffusione