

# **CHIMICA ANALITICA II**

**CON LABORATORIO**

**(AA 2019-20)**

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

# **Cromatografie con fase mobile 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**

# 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.

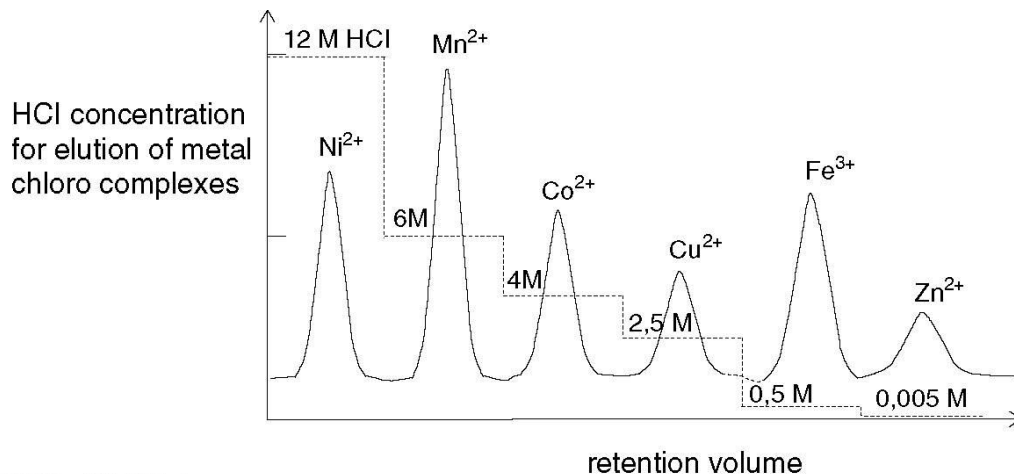
## Esempio:

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

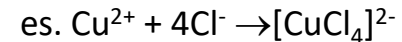
Lo scambiatore è caricato con cloruro da una soluzione 12 M di HCl, e la miscela di ioni metallici è introdotta nella colonna a questa concentrazione di acido cloridrico.

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:



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.

**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

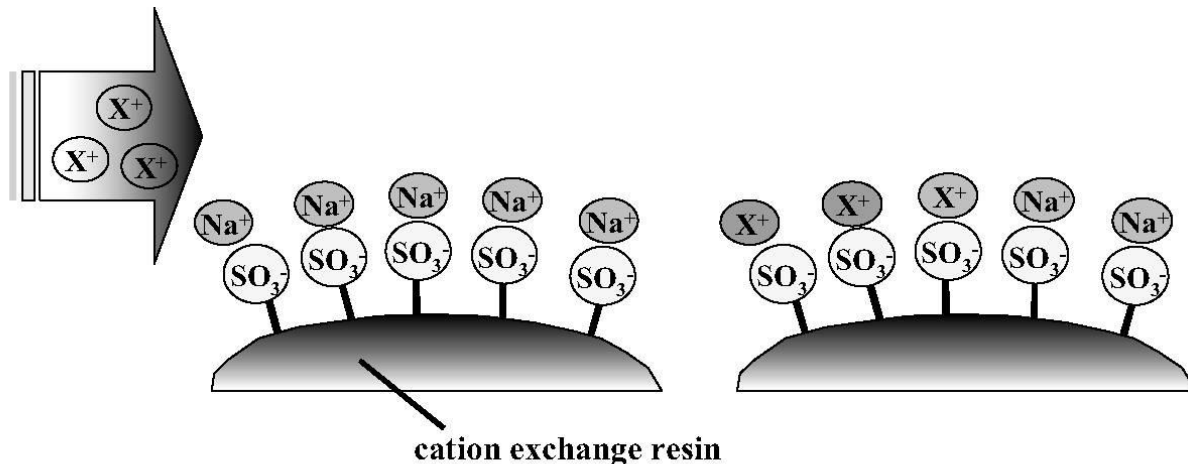
L'innovazione ha portato a processi di diffusione marcatamente migliorati rispetto a scambiatori ionici classici, anche se la capacità della colonna è diminuita.

### **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***

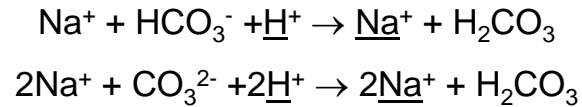
\*) in verità esiste anche la cromatografia anionica senza soppressione, che usa eluenti organici a bassa conducibilità, ma con prestazioni inferiori e minori applicazioni (DOI: [10.1093/chromsci/48.7.525](https://doi.org/10.1093/chromsci/48.7.525) ; <https://www.researchgate.net/publication/46157747> Discovery and Early Development of Non-Suppressed Ion Chromatography)



## ➤ **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:

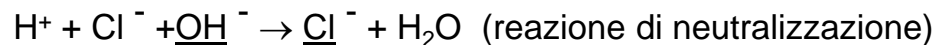
L'eluente può essere  $\text{NaHCO}_3/\text{NaCO}_3$ . Dopo che gli anioni (analiti), es.  $\text{Cl}^-$  e  $\text{NO}_3^-$ , sono stati separati dalla colonna analitica impaccata con scambiatore anionico, l'eluente reagisce nel soppressore:



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.

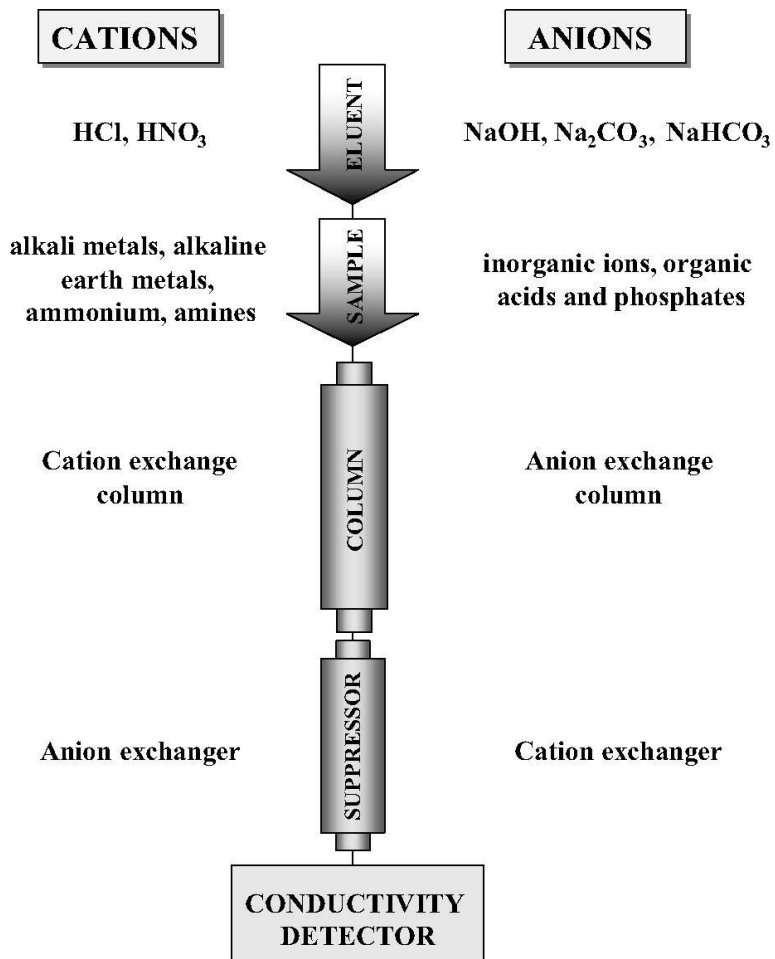
- Per determinare **cationi**, si usa uno scambiatore anionico in forma basica ( $\text{OH}^-$ ) come colonna analitica:

La f.m. adatta può essere l'HCl, e la colonna di soppressione deve contenere un soppressore anionico in forma  $\text{OH}^-$ :

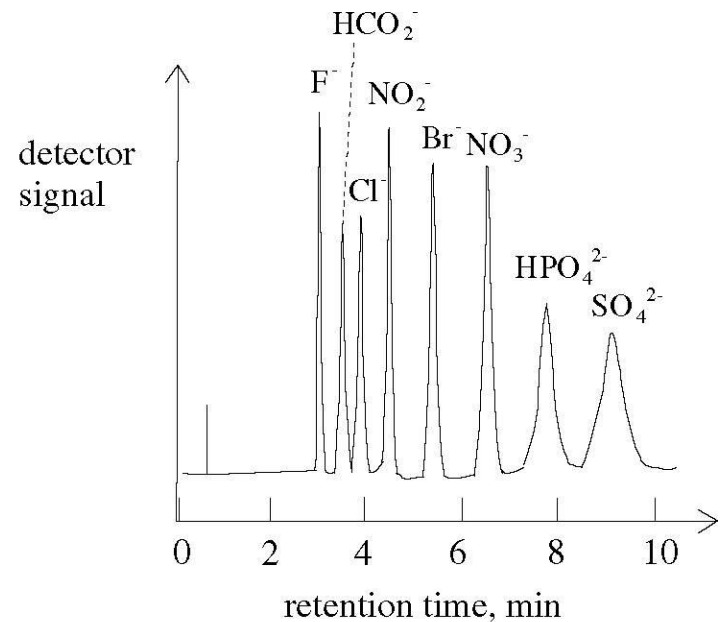


Nuovamente in soluzione rimangono solo gli ioni degli analiti come specie conduttive (es. cationi  $\text{Na}^+$  o  $\text{Mg}^{2+}$ )

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)

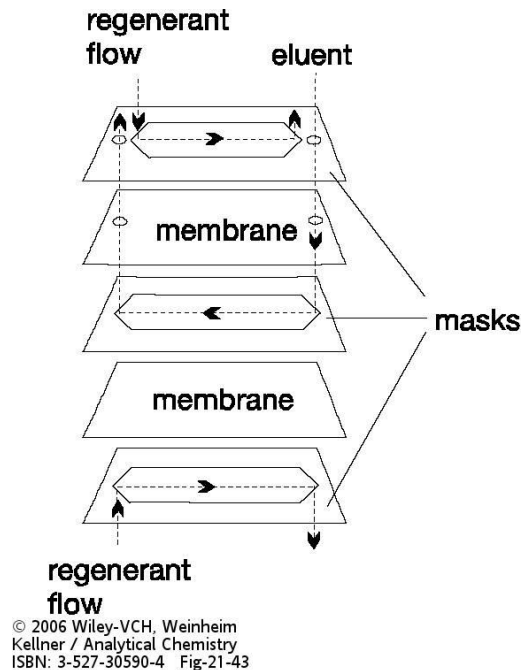


© 2006 Wiley-VCH, Weinheim  
Kellner / Analytical Chemistry  
ISBN: 3-527-30590-4 Fig-21-41

© 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.

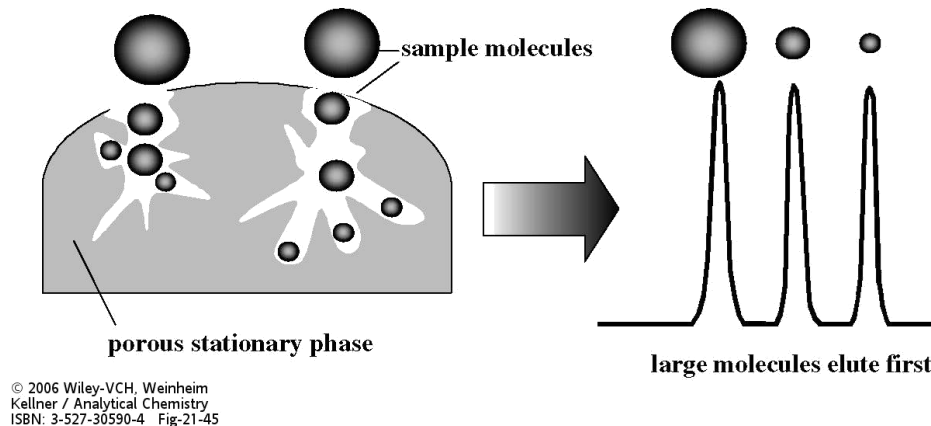


# Cromatografia ad esclusione dimensionale

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 trattenute.



- 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%.



A horizontal rectangular bar with a rainbow color gradient, transitioning from blue on the left to red on the right, with green, yellow, and orange in between.

# **CROMATOGRAFIA MULTIDIMENSIONALE**

# Analisi qualitativa in cromatografia

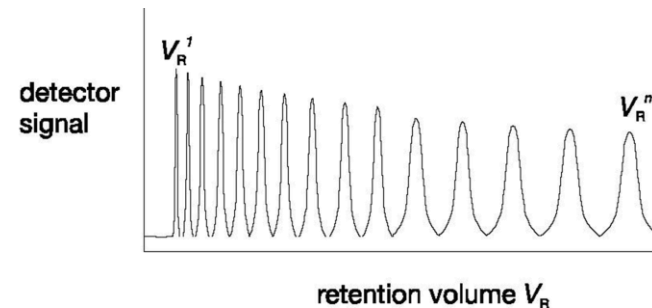
- I metodi cromatografici sono impiegabili per analisi **qualitative**, **quantitative** o **per scopi preparativi**.
- **L'informazione qualitativa:**
  - ✓ nei **cromatogrammi interni** risiede nella posizione della sostanza sulla f.s. (es. in TLC);
  - ✓ nei **cromatogrammi esterni** risiede nel valore 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

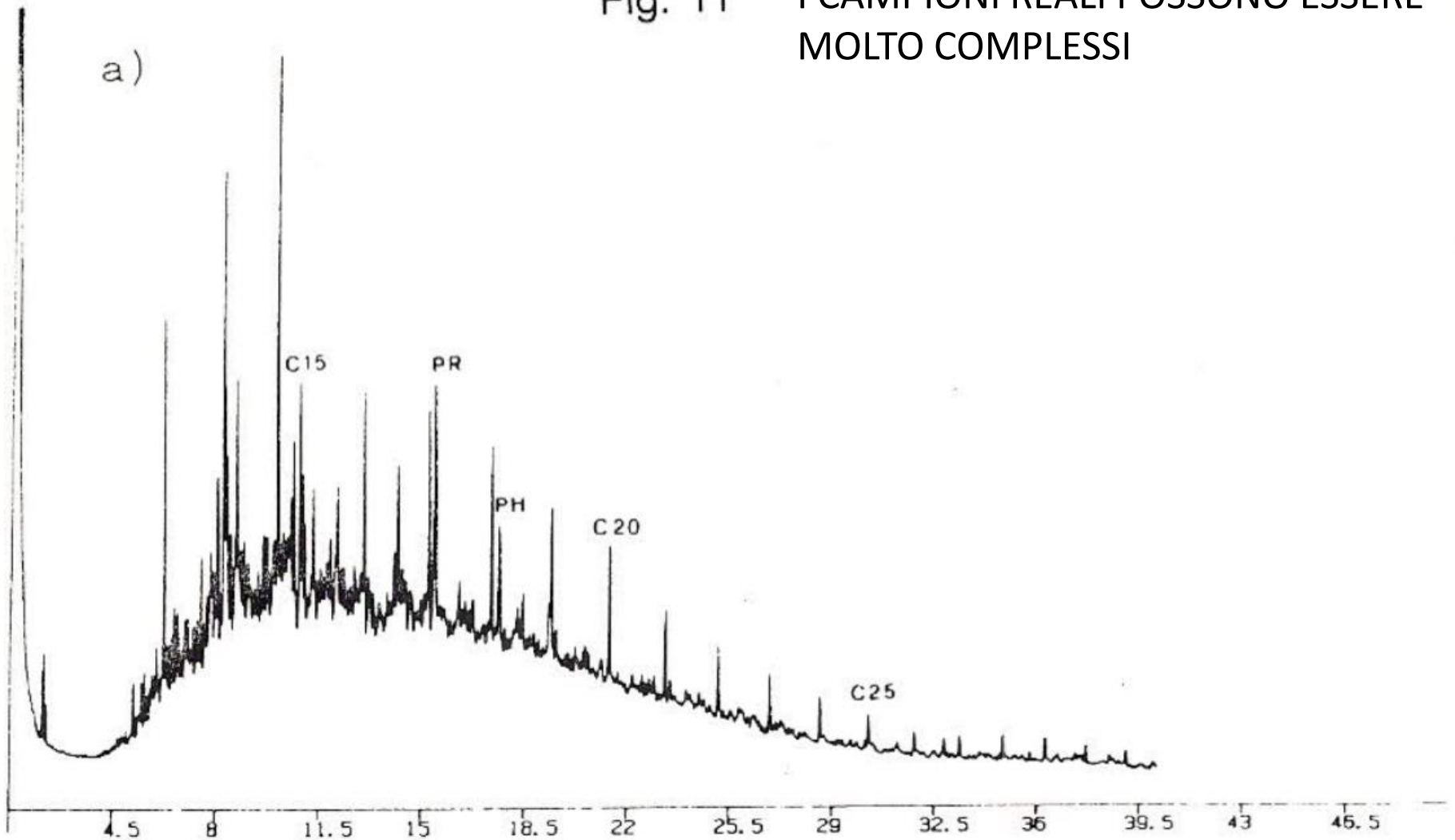


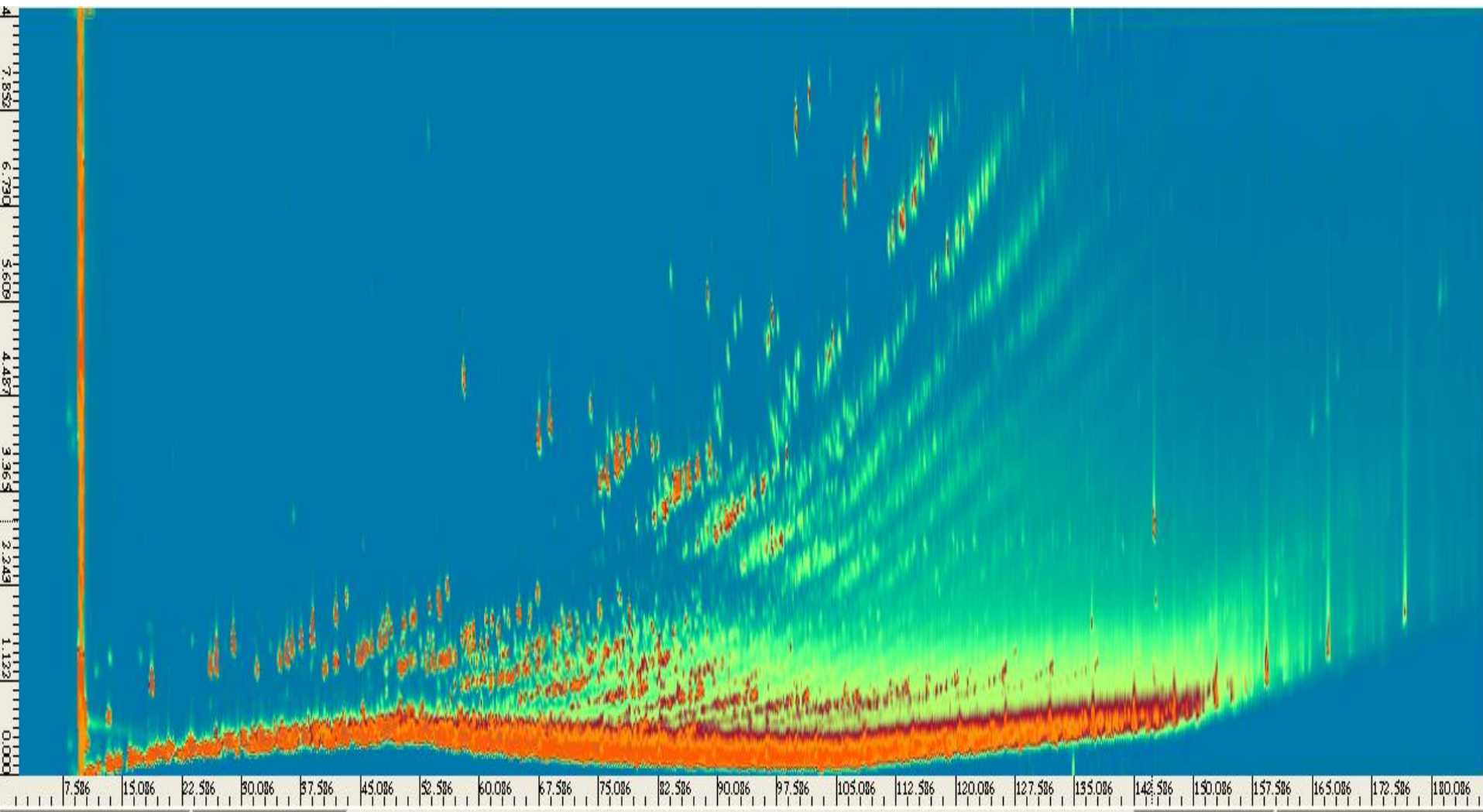
© 2006 Wiley-VCH, Weinheim  
Kellner / Analytical Chemistry  
ISBN: 3-527-30590-4 Fig.21-08

- 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.

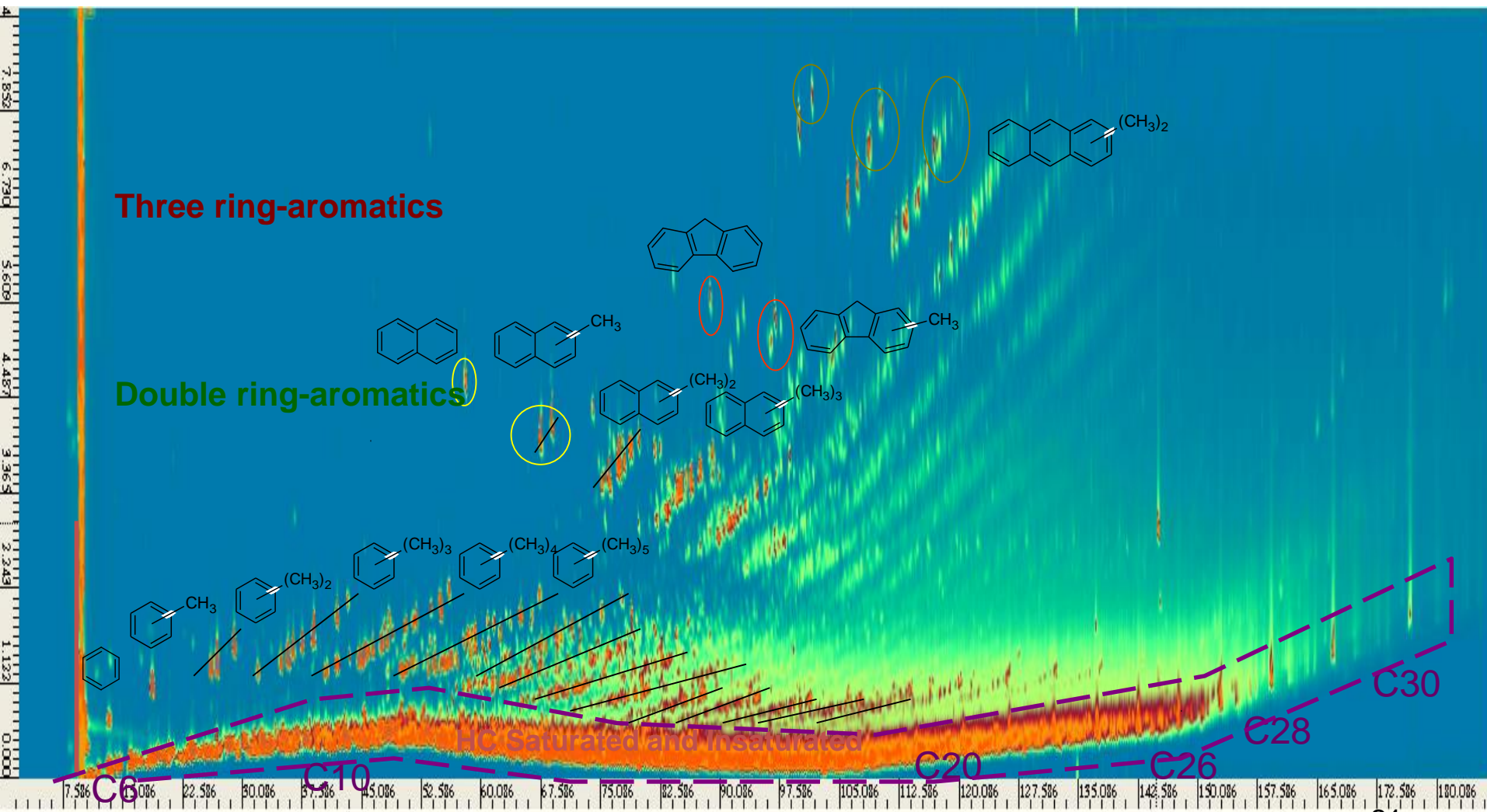
Fig. 11

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<sup>†‡</sup>, Joaquim Jaumot<sup>†</sup>, Anna Baglai<sup>†</sup>, Gabriel Vivó-Truyols<sup>†</sup>, Peter J. Schoenmakers<sup>†</sup>, and Romà Tauler<sup>†</sup> 

<sup>†</sup> Department of Environmental Chemistry, IDAEA-CSIC, Jordi Girona 18-26, 08034 Barcelona, Spain

<sup>‡</sup> 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

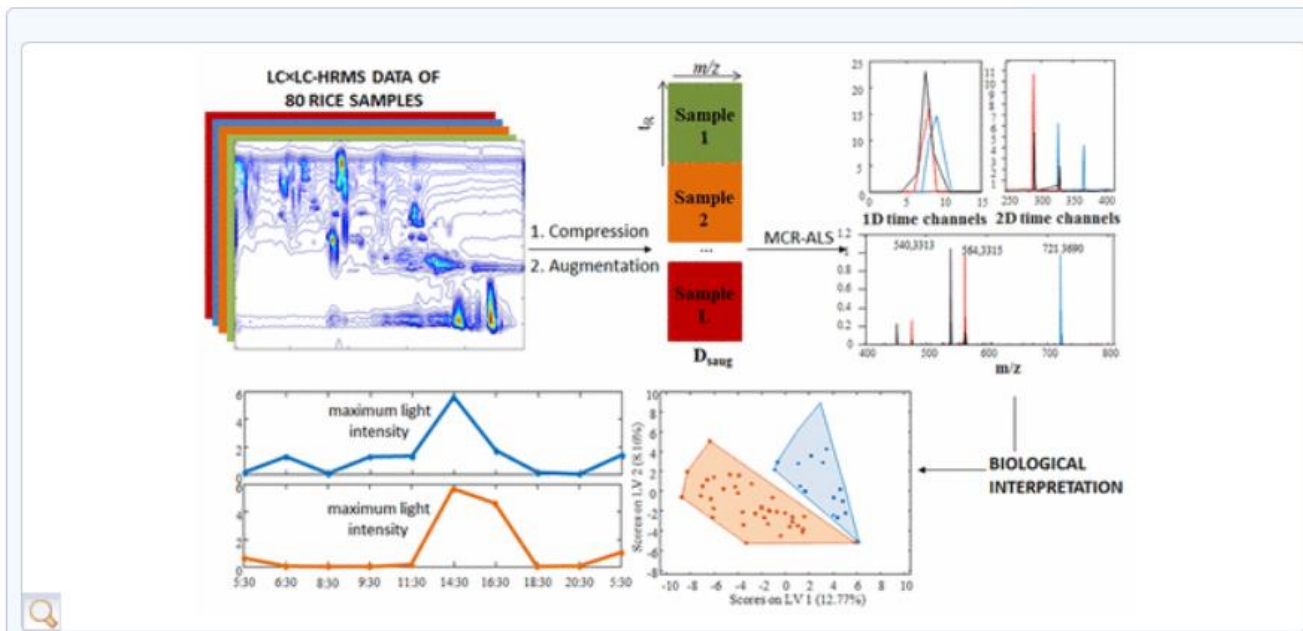
\*Phone: +34934006140. E-mail: Roma.Tauler@idaea.csic.es.

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

 RIS Citation 

## Abstract

Jump to a section 



<https://pubs.acs.org/doi/full/10.1021/acs.analchem.7b01648?src=recsys>

# 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:

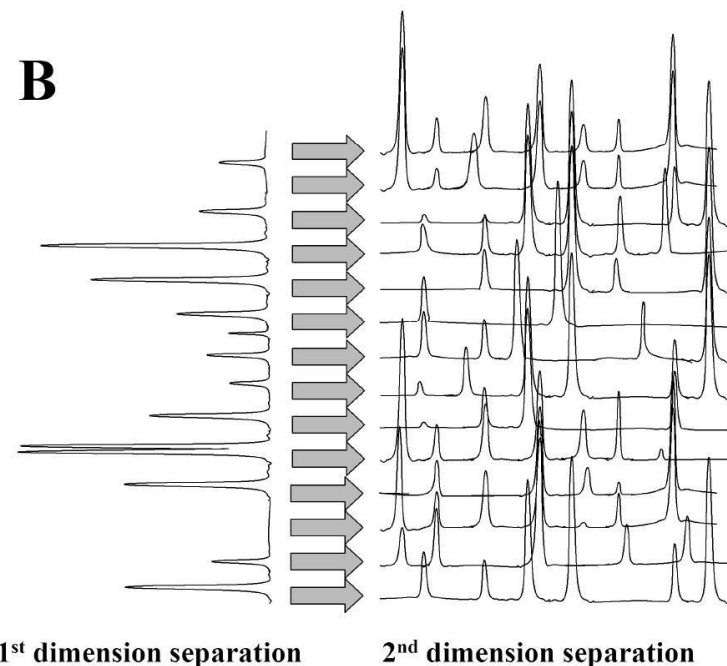
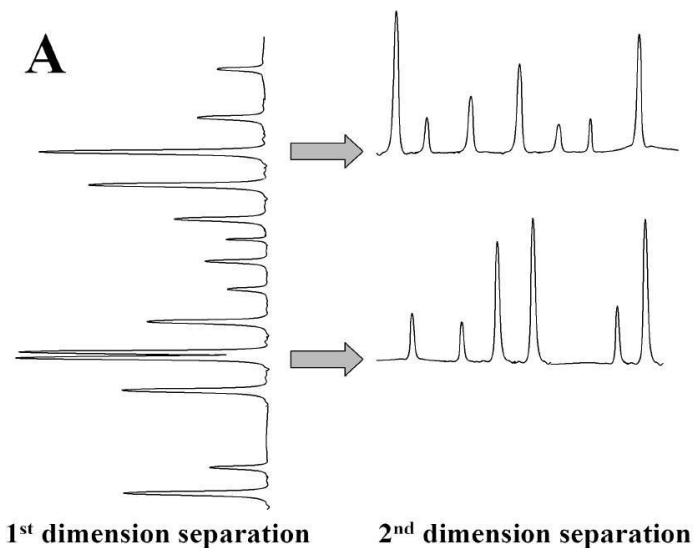
- 1) *Analisi veloce e basso consumo di solvente;*
- 2) *Parte della preparazione del campione viene ricompresa direttamente nell'analisi (lavorando in un sistema chiuso e automatizzato) dove*
- 3) *il rischio di perdita di campione e di contaminazione dello stesso è minimizzato* (ripetibilità e riproducibilità).

## ➤ **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).

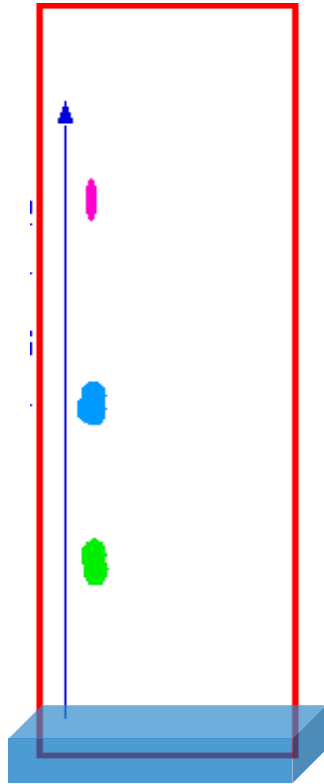


© 2006 Wiley-VCH, Weinheim  
Kellner / Analytical Chemistry  
ISBN: 3-527-30590-4 Fig-21-54

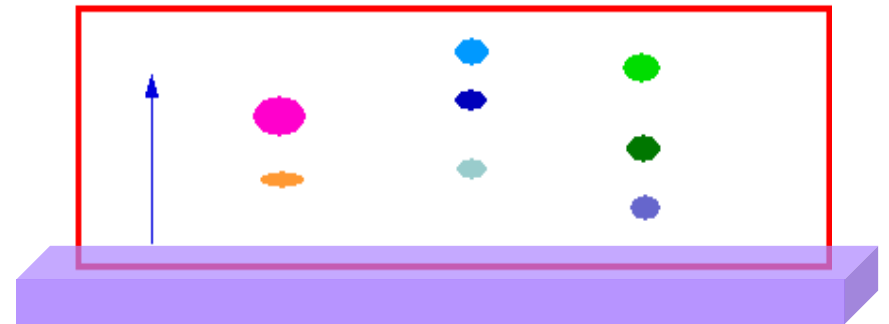


## ➤ **MTLC (TLC multidimensionale)**

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



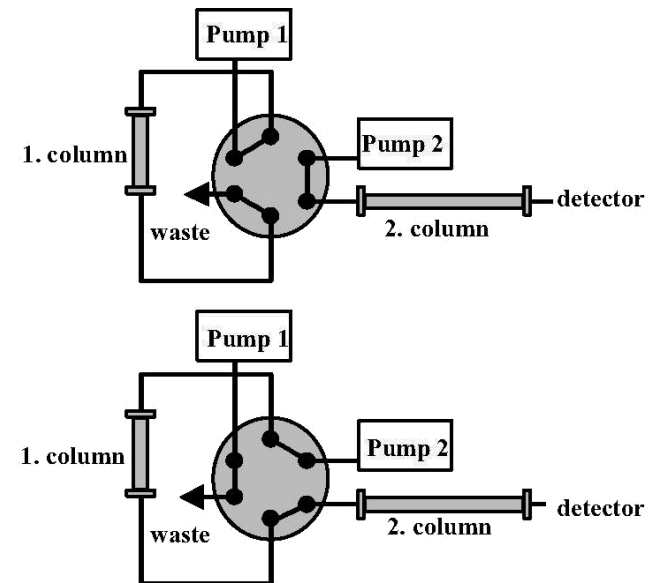
**Fase 2:**  
sviluppo lungo direzione perpendicolare con  
eluente2

## ➤ 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<sup>a</sup> 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".

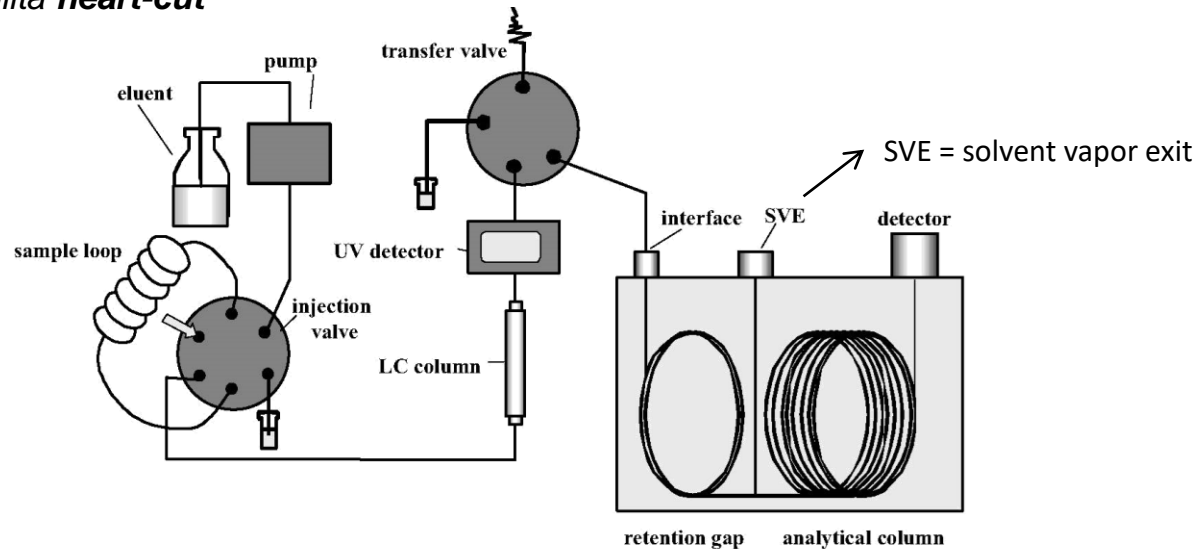
Esempio:

- 1) il campione è iniettato nella 1<sup>a</sup> 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<sup>a</sup> 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**



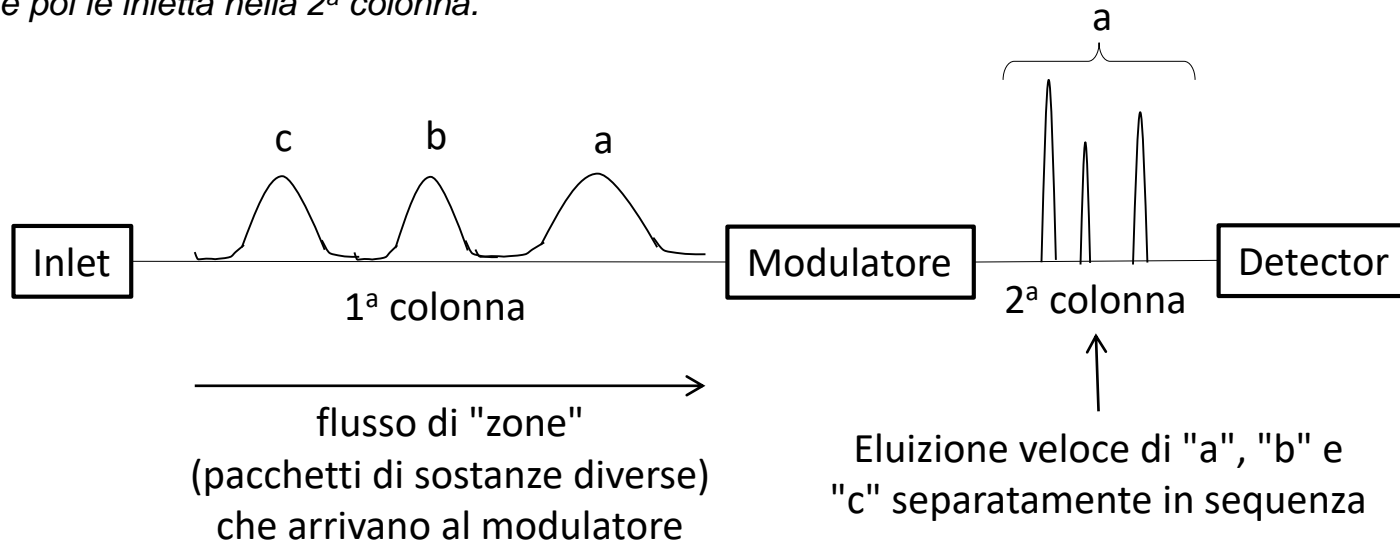
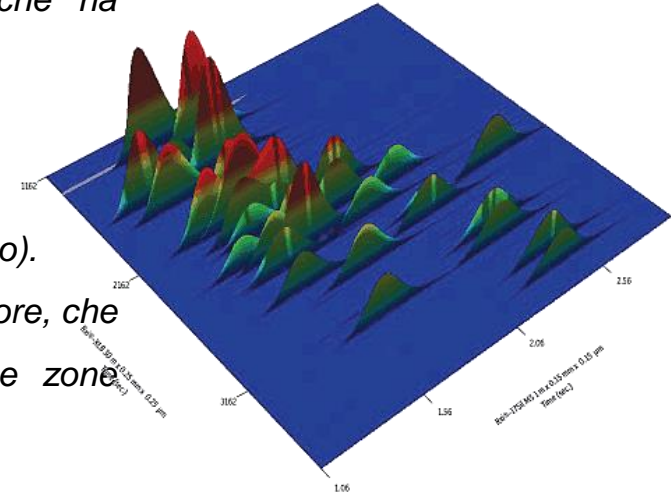
© 2006 Wiley-VCH, Weinheim  
Kellner / Analytical Chemistry  
ISBN: 3-527-30590-4 Fig-21-56

### 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<sup>a</sup> colonna e poi le inietta nella 2<sup>a</sup> colonna.



## SLIDES DI APPROFONDIMENTO SU GC MULTIDIMENSIONALI

Vedi anche

[https://www.researchgate.net/publication/266797043 Advances in Comprehensive Two-dimensional Gas ChromatographyGCxGC](https://www.researchgate.net/publication/266797043_Advances_in_Comprehensive_Two-dimensional_Gas_ChromatographyGCxGC)

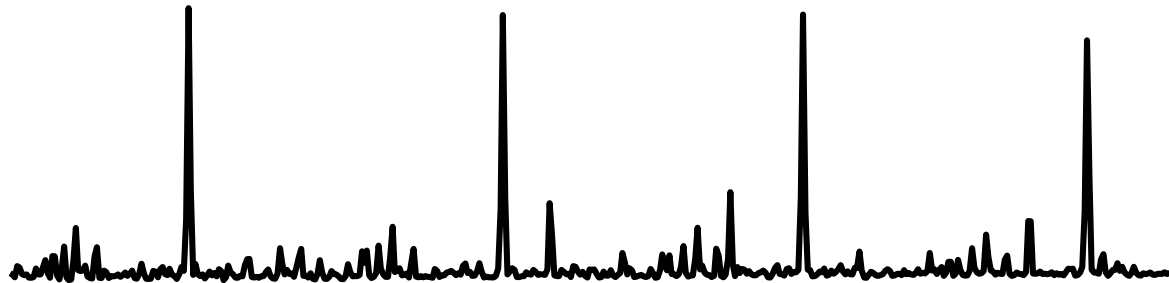
E

<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

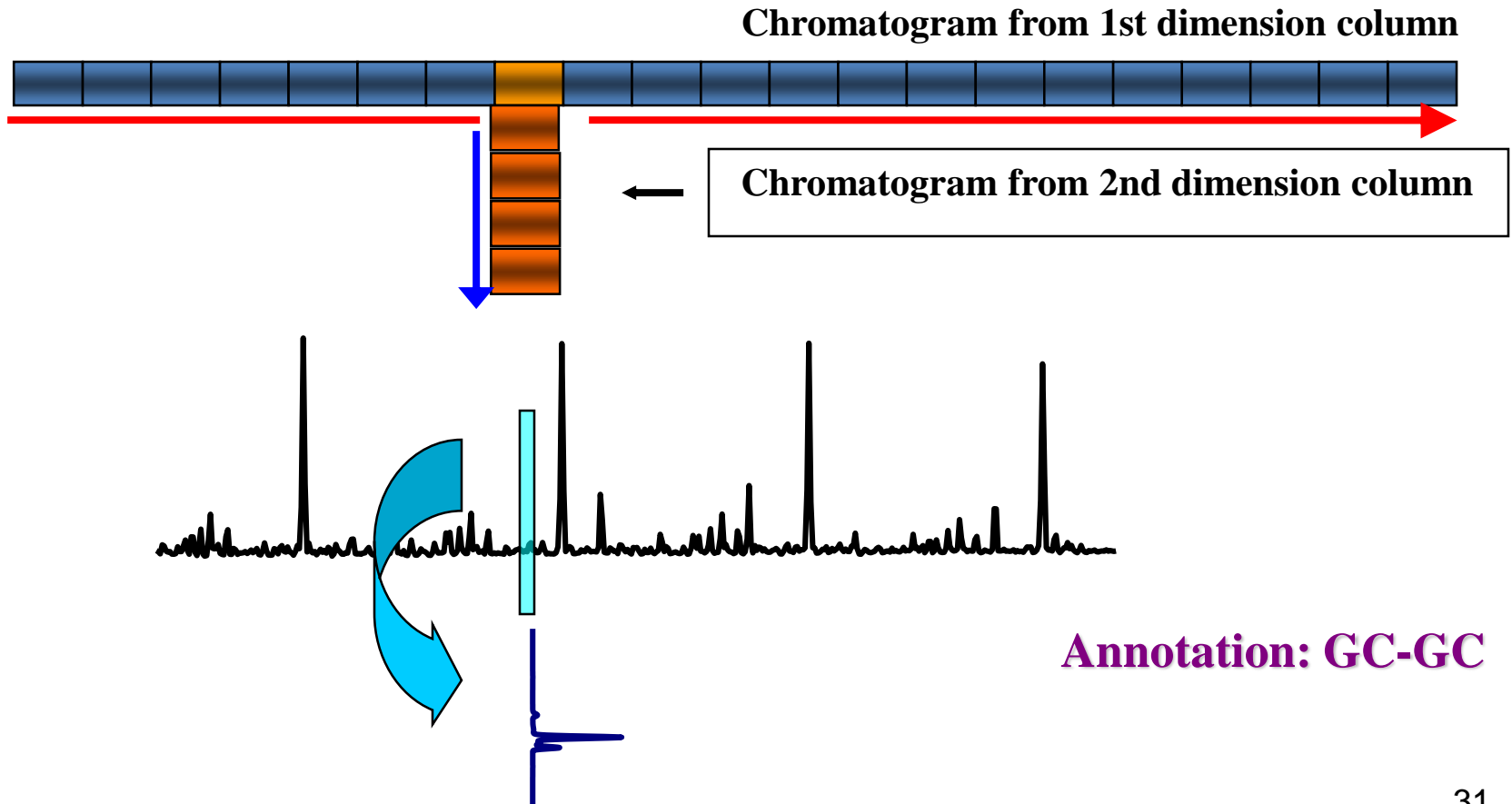
Cromatogramma da una singola dimensione cromatografica

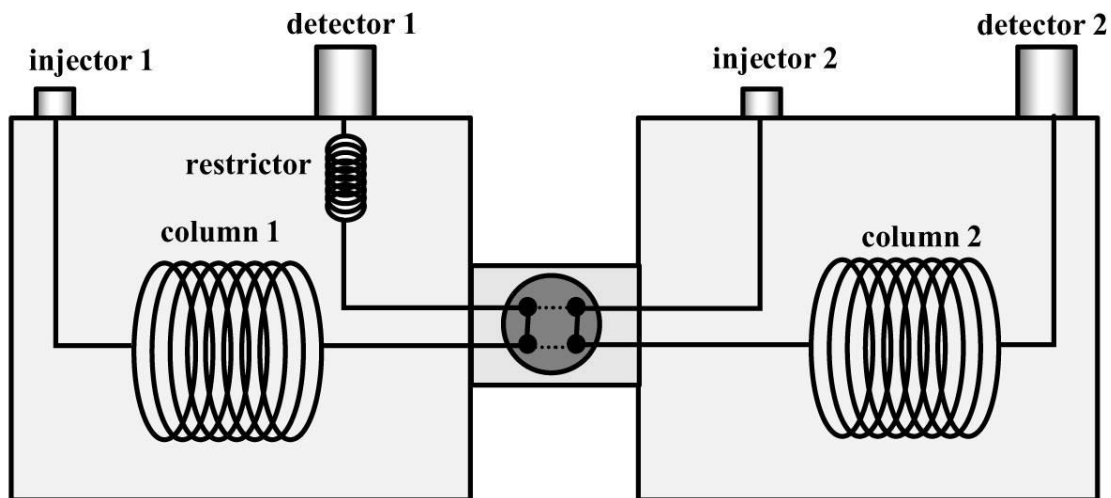


***Dimensionalità = "criterio" della selettività***

# Heart-cut 2D-chromatography

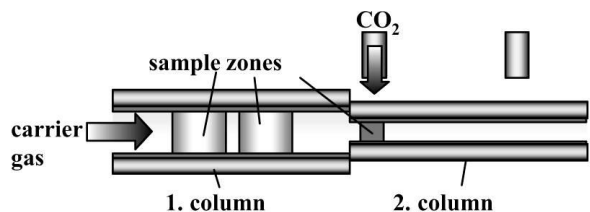
Una o più frazioni della miscela sono soggette a due step consecutivi di separazione



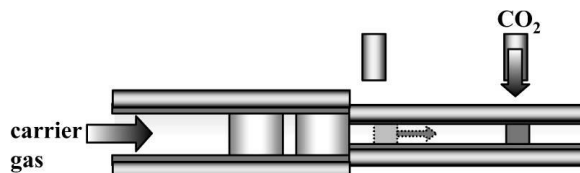


«Heart cut»

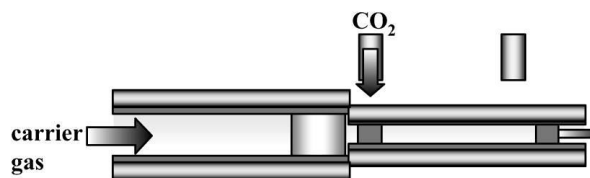
© 2006 Wiley-VCH, Weinheim  
Kellner / Analytical Chemistry  
ISBN: 3-527-30590-4 Fig-21-58



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

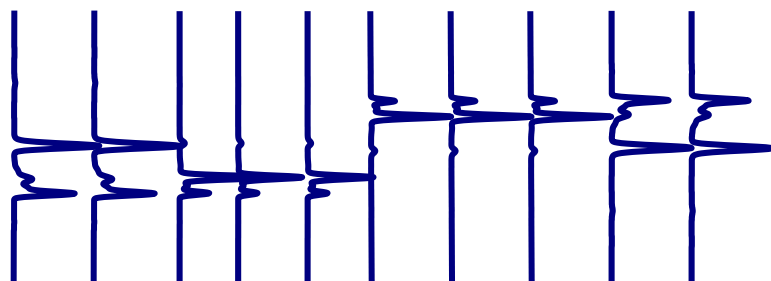
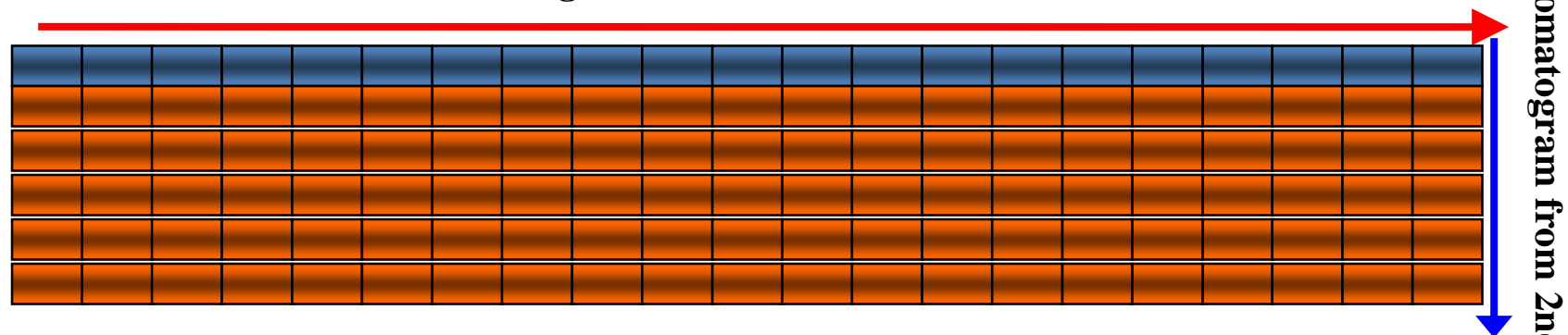
«2D comprehensive»

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



# Comprehensive 2D-gas chromatography

Chromatogram from 1st dimension column



Annotation: GCXGC

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

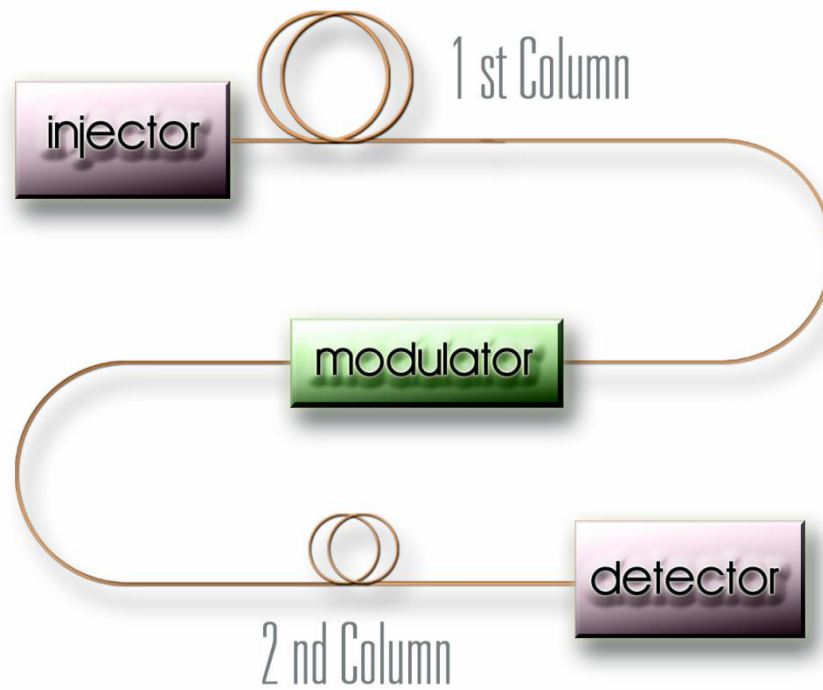


*Ortogonalità*



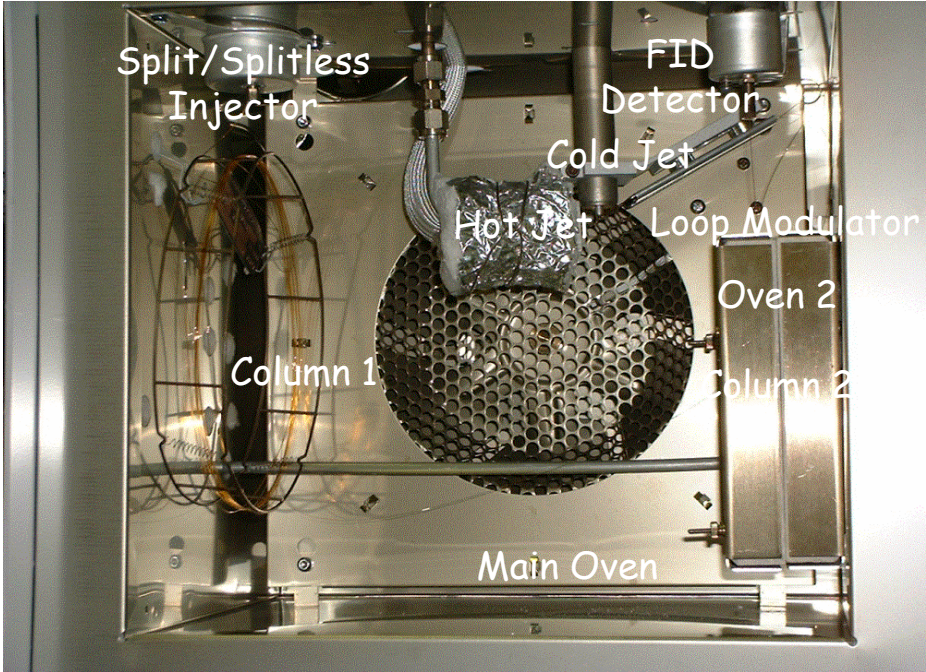
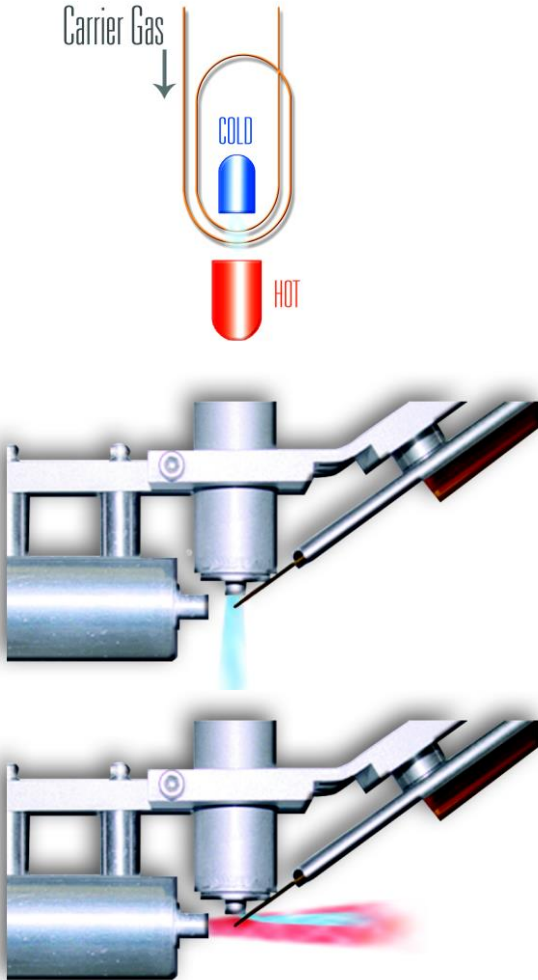
*Comprensività*

## Schema di un Gascromatografo Comprensivo Bidimensionale



# Modulatore Termico

all'interno del forno del  
GC Agilent 7890

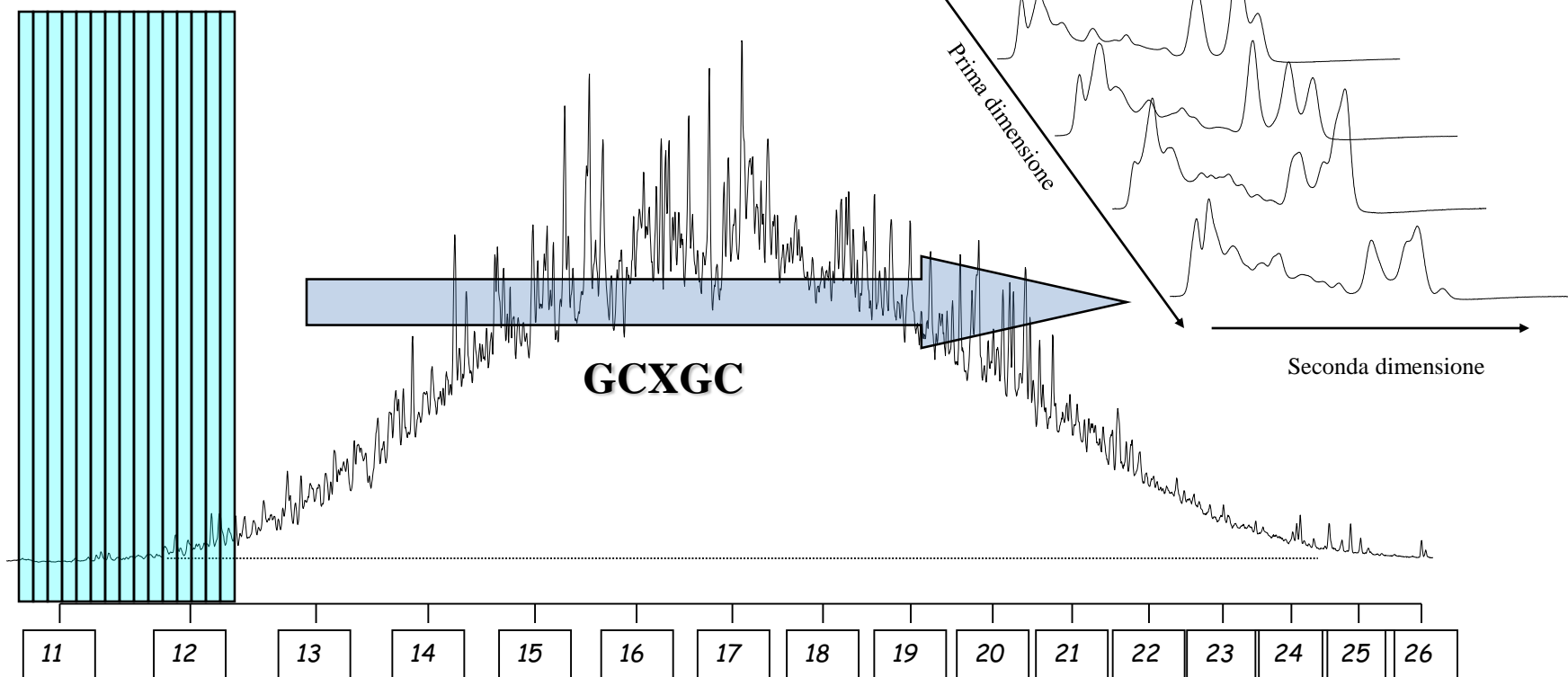


# Sistema SRA GCxGC-qMSD installato presso il centro di ricerche ENI di San Donato Milanese



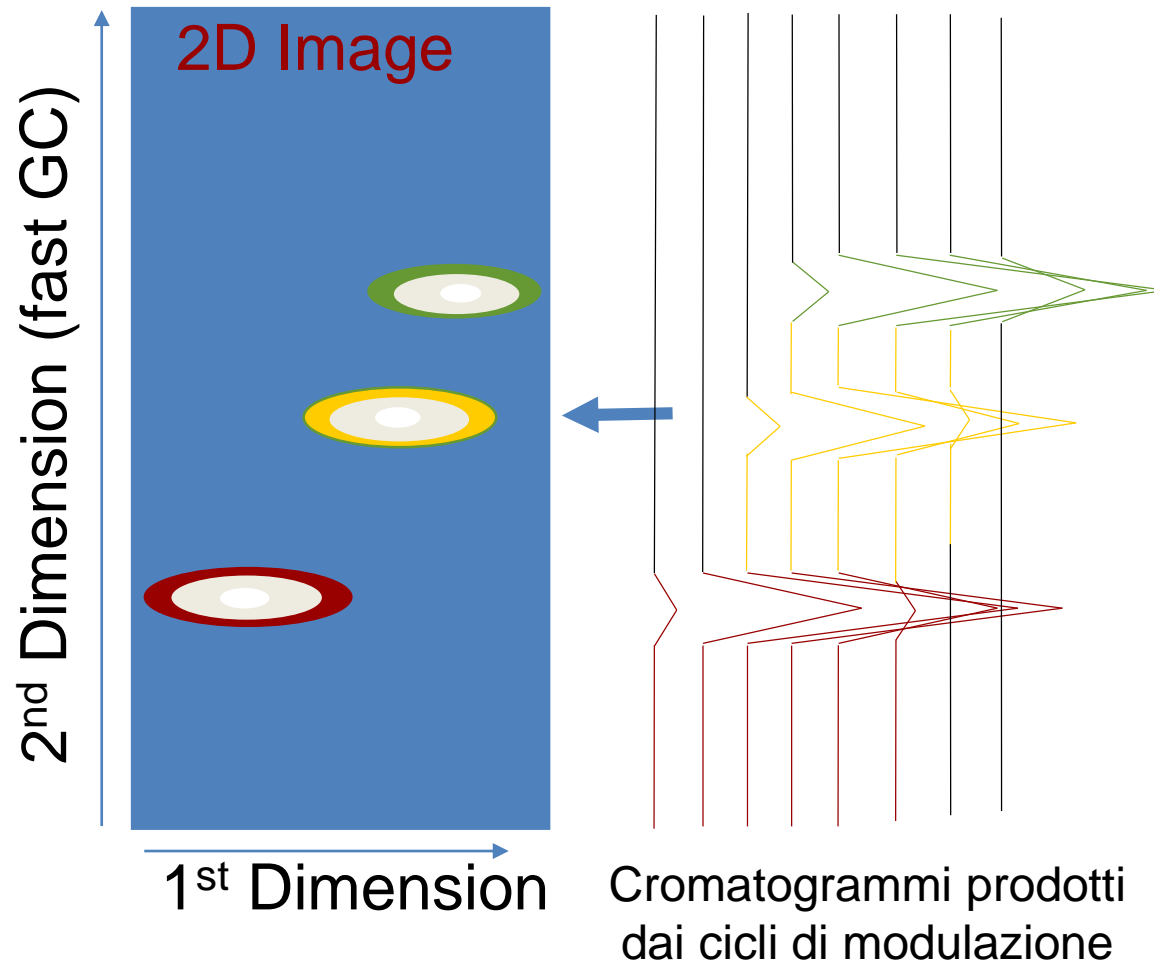
# Miscela complessa non risolta

## Cromatogramma 1D-GC

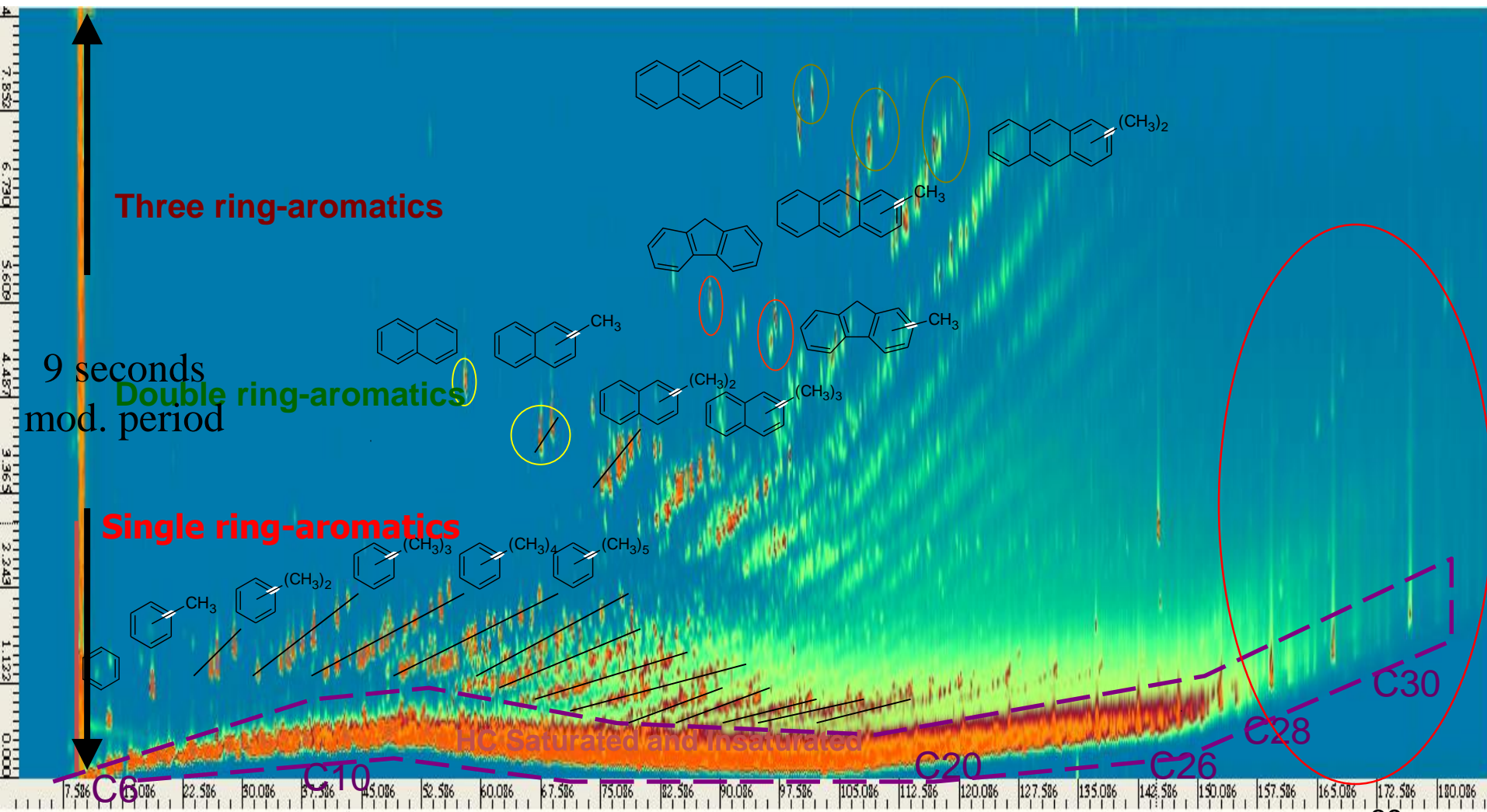


Numero atomi di Carbonio

# Costruzione dell'immagine GCXGC



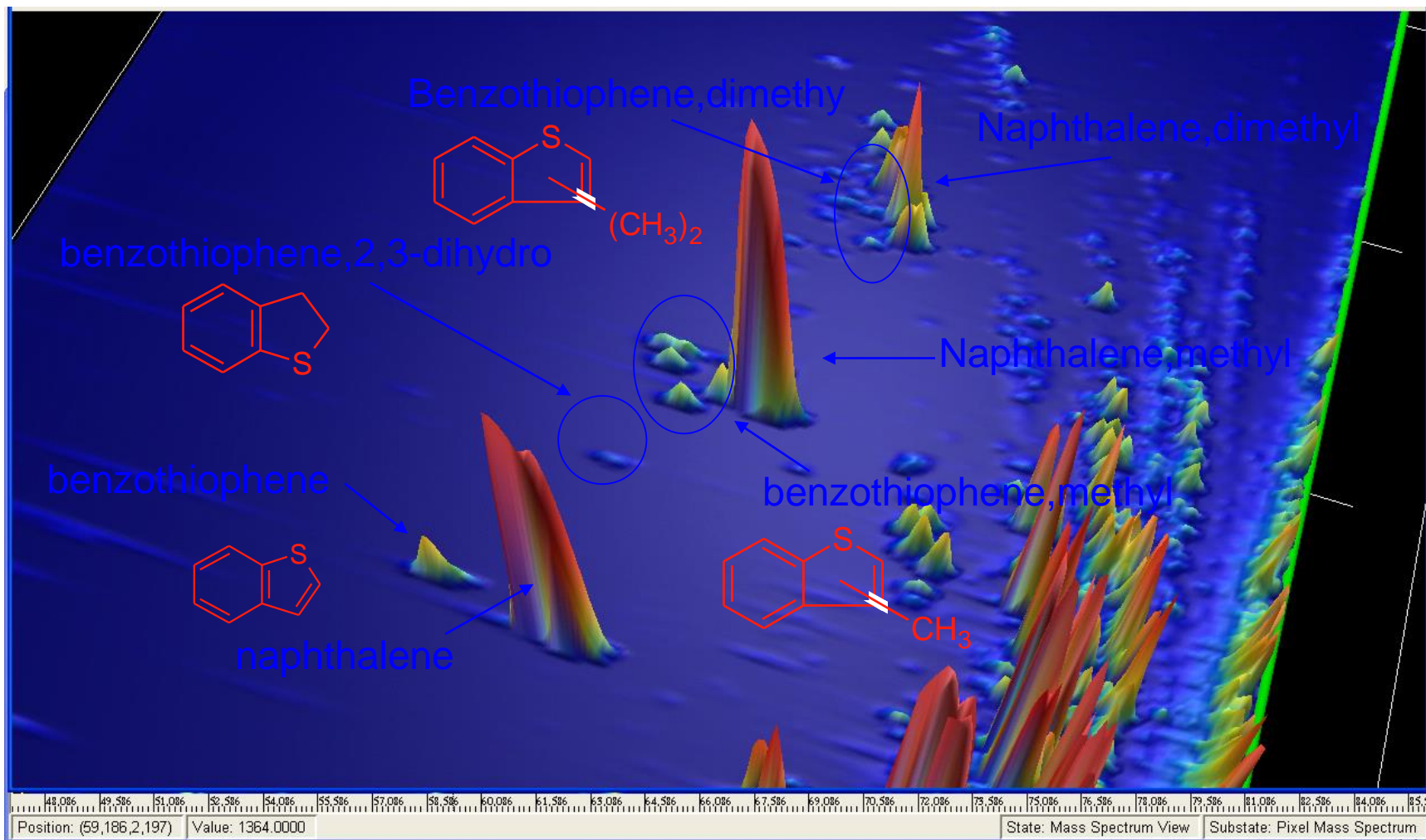
# Idrocarburi Aromatici in Greggio leggero



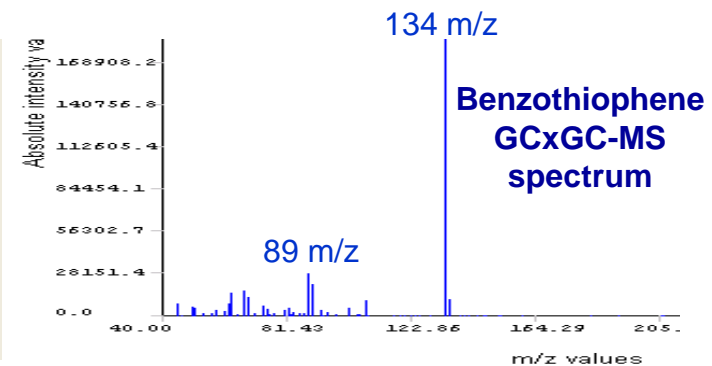
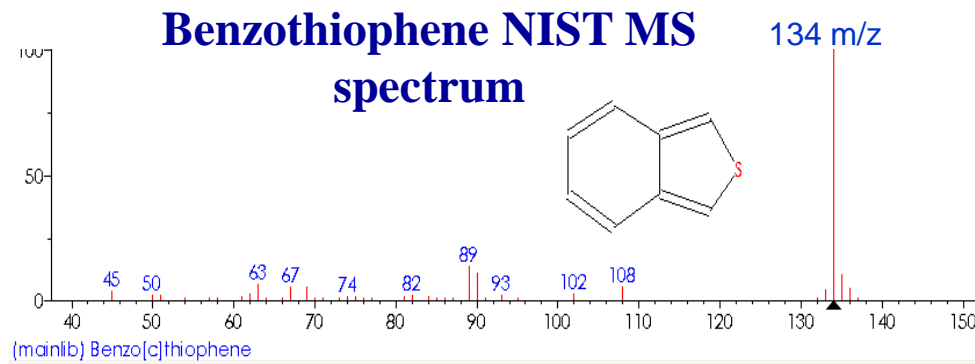
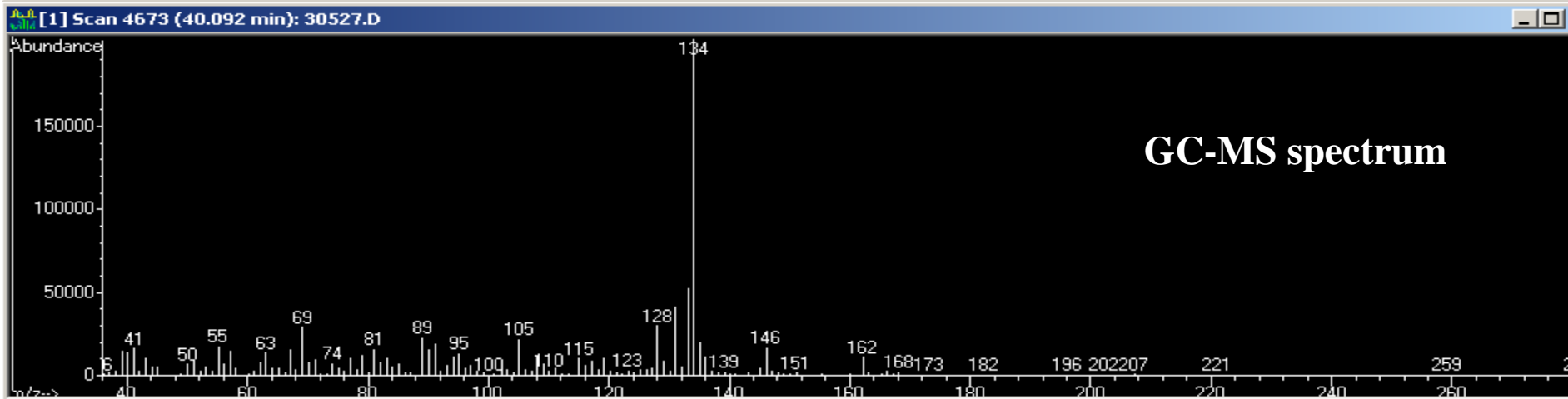




# Vista-3D Benzotiofeni in intermedio di benzina prima della desolforazione Modulatore Termico e Rivelatore di Massa Quadrupolare

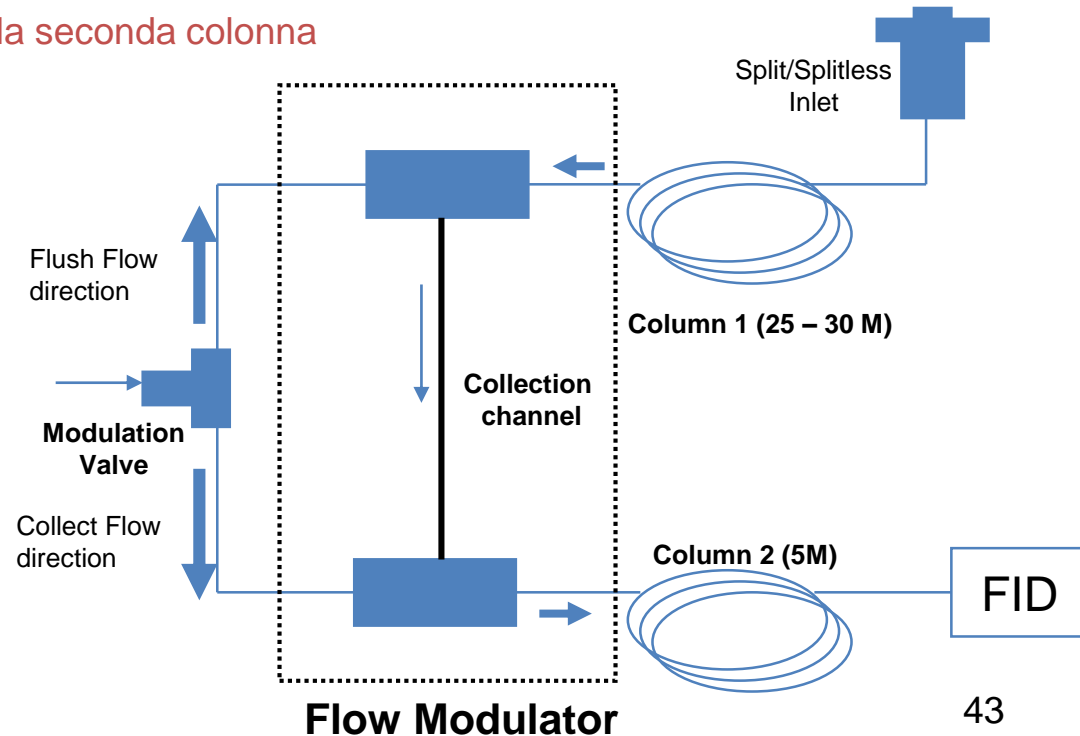
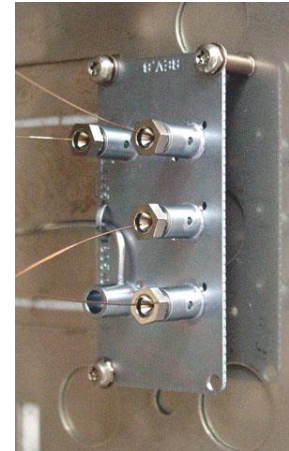


# Benzothiophene GC-MS

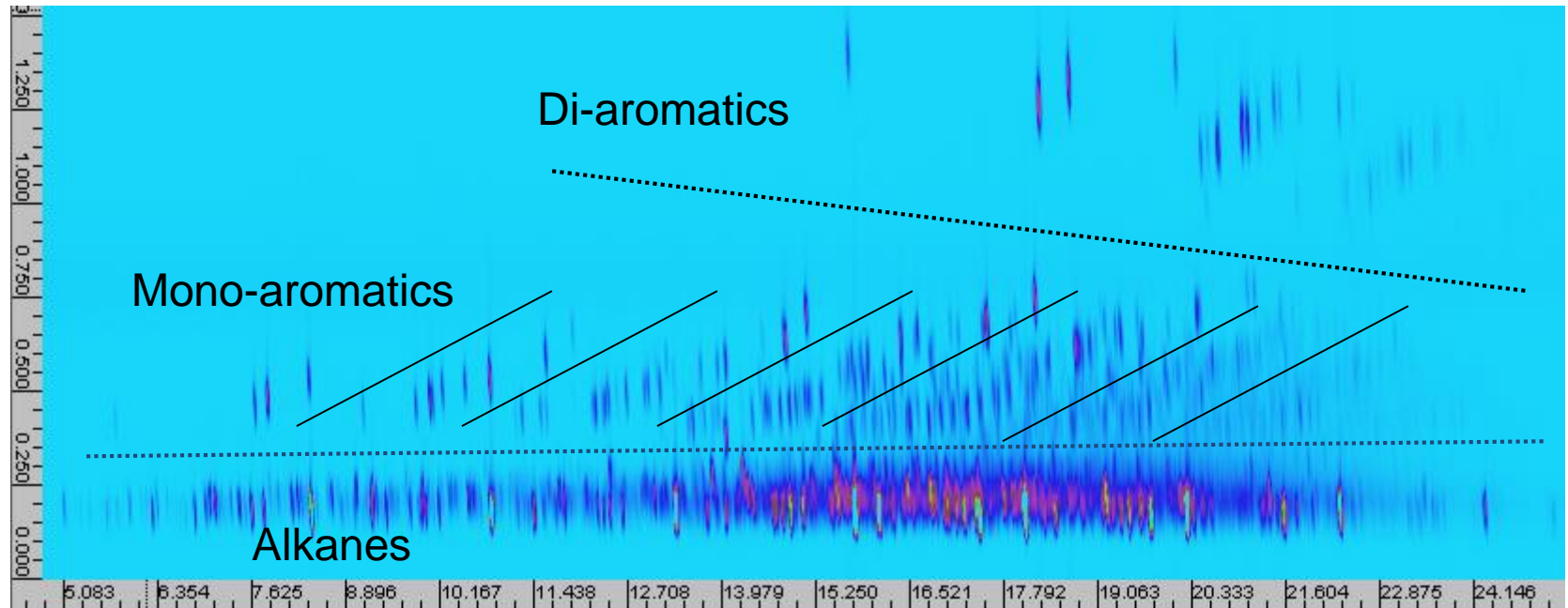


# Agilent GCXGC Flow Modulator

- 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

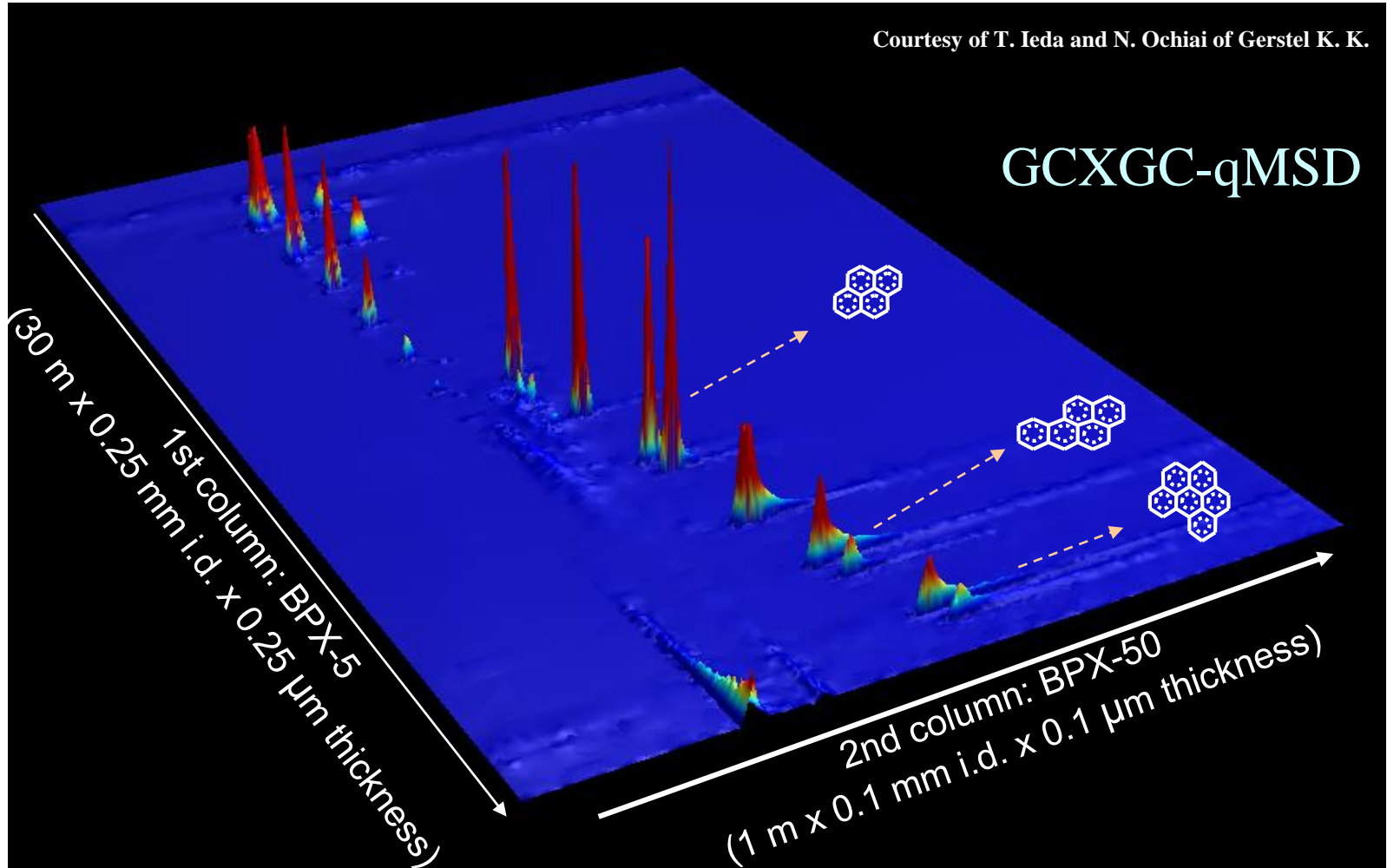
General Purpose GC column - suitable for over 80% of all routine analyses performed by gas chromatography

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**

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



1<sup>st</sup> 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

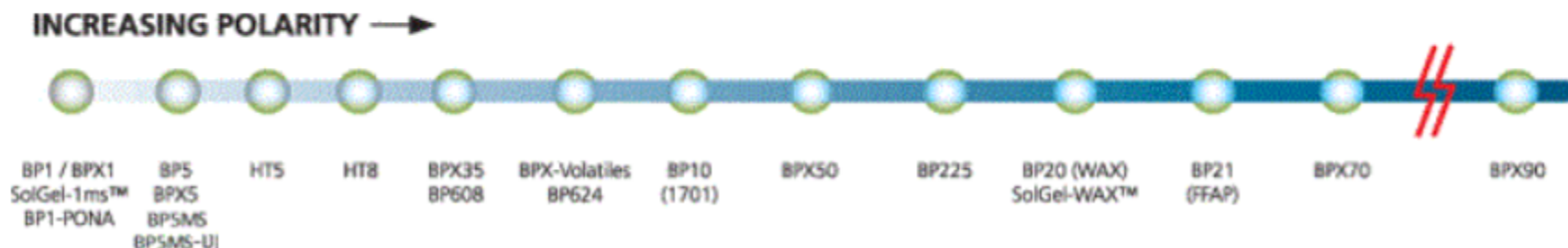
**Operating Temperature:**

0.1-1 $\mu$ m film thickness

80°C to 330/350°C

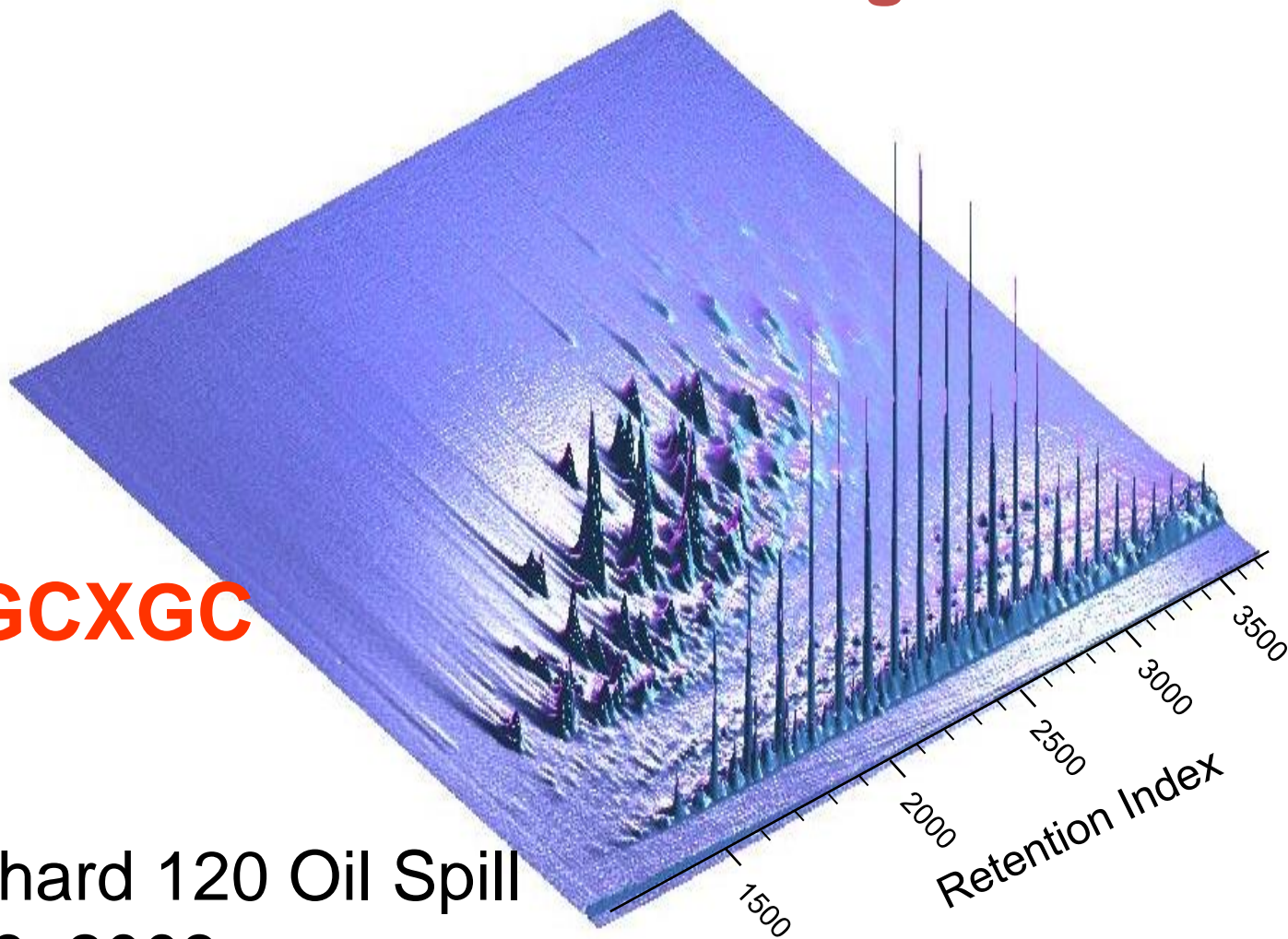
**Suitable Replacement for:** OV-17, SP-2250, DB-17, DB-17ms, DB-17ht, Rtx-50, SPB-50, HP-50+, HP-17

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



# Applicazione di GCxGC ad indagini ambientali

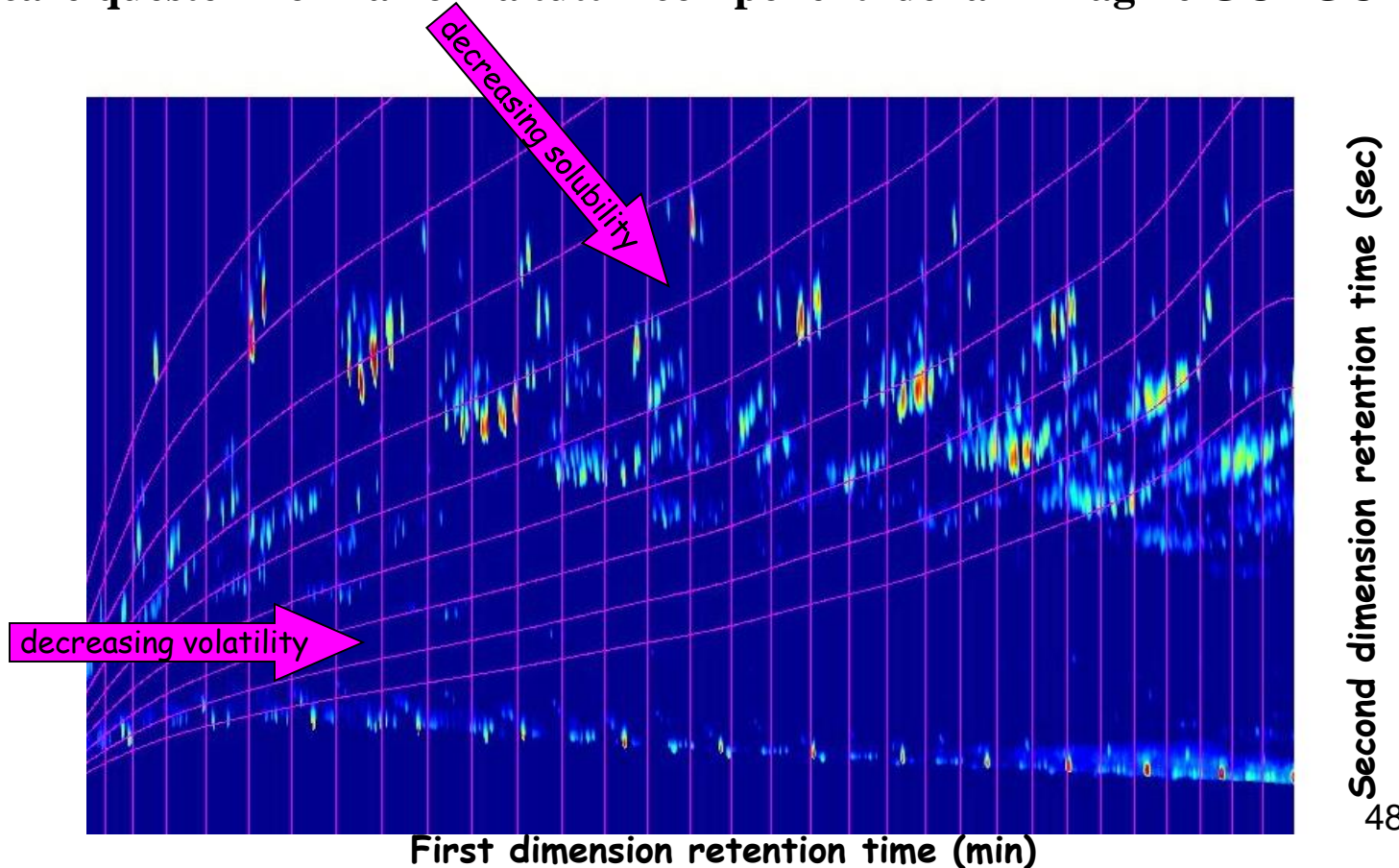
**3D-GCXGC**



Bouchard 120 Oil Spill  
May 9, 2003

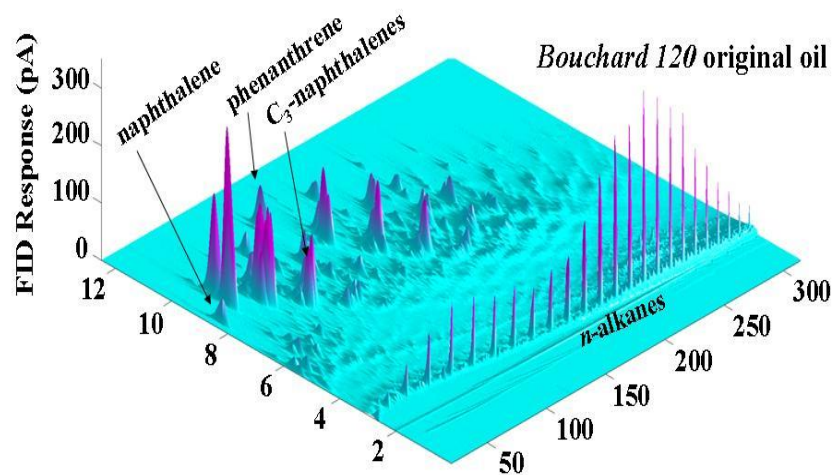
# Proprietà fisiche da un cromatogramma GCXGC

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

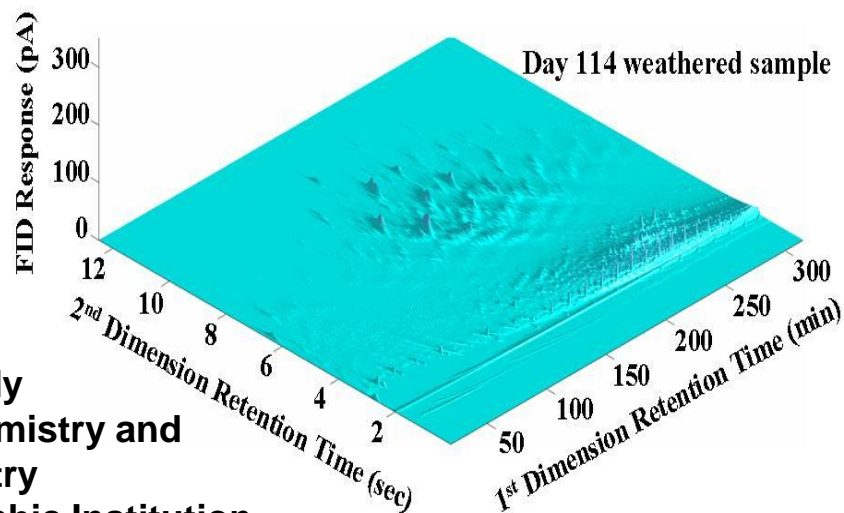
51% in aria 49% in acqua

## Fenantrene

31% in aria – 69% in H<sub>2</sub>O

## 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 + H<sub>2</sub>O + other products

