

CHIMICA ANALITICA II

CON LABORATORIO

(AA 2020-21)

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

The Essence of Chromatography

Colin F. Poole

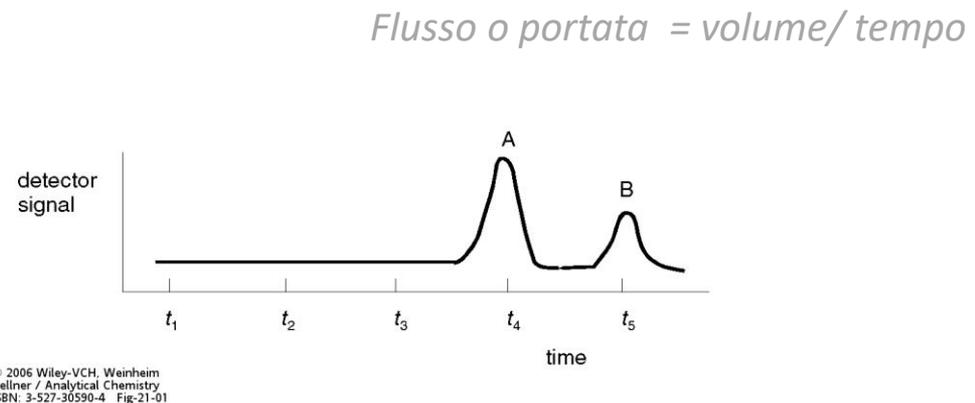
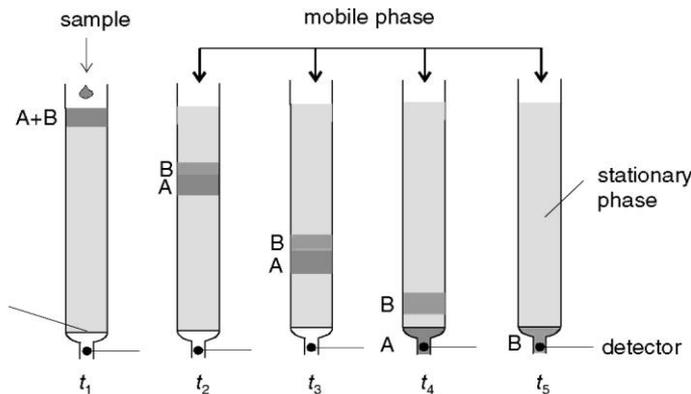
Since chromatography has evolved into a large number of applied methods it is no simple task to provide a meaningful comprehensive definition. Chromatography is essentially a physical method of separation in which the components to be separated are distributed between two phases, one of which is stationary (stationary phase) while the other (the mobile phase) moves in a definite direction [9,10]. This definition suggests that chromatographic separations have three distinct features: (a) they are physical methods of separation; (b) two distinct phases are involved, one of which is stationary while the other is mobile; and (c) separation results from differences in the distribution constants of the individual sample components between the two phases.

Elsevier

Il cromatogramma

Principalmente per le cromatografie su colonna si usa la tecnica dell'**eluizione** (eluente è sinonimo di fase mobile).

- Il campione viene disciolto nella fase mobile (f.m.) e introdotto alla testa alla colonna;
- Una volta che il campione è iniettato, i costituenti si distribuiscono tra la f.m. e la fase stazionaria (f.s.). Se la f.m. è continuamente fornita come eluente, le sostanze si distribuiscono lungo la colonna tra nuova f.m. e la f.s.;
- Continuando ad aggiungere f.m. si procede all'eluizione finché le sostanze sono separate e rilevate alla fine della colonna;
- Composti trattenuti in modo più forte dalla f.s. impiegano più tempo a essere separati di sostanze che interagiscono poco con la f.s..
- Idealmente, le sostanze sono separate dopo un certo tempo di eluizione e rilevate individualmente alla fine della colonna.
- Il segnale viene registrato come funzione del tempo di eluizione o del volume di eluizione (di f.m.), il grafico che si ottiene viene chiamato **cromatogramma**.



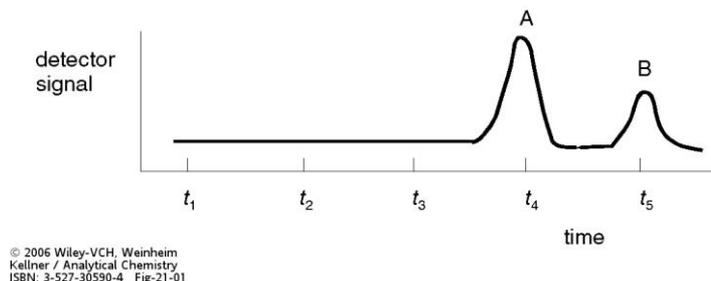
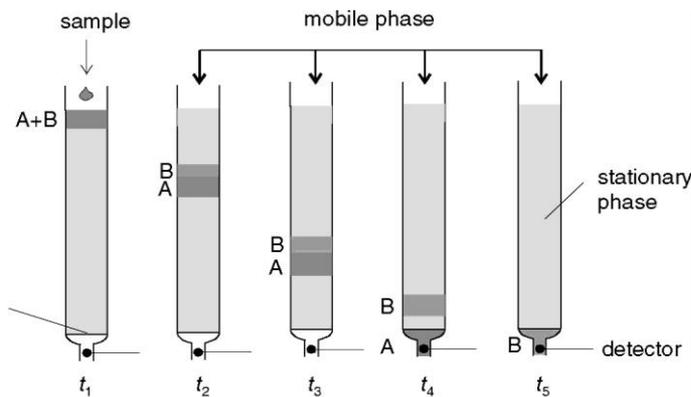
segue →

Se si seguono nel tempo le "zone" (bande) occupate dalle sostanze lungo la colonna si notano **due effetti**:

- la distanza tra le bande delle sostanze aumenta nel tempo (ovvero con il volume di eluente aggiunto), quindi aumenta la separazione temporale del "cammino" delle diverse sostanze;
- allo stesso tempo i picchi rilevati nel cromatogramma si allargano, causando possibili sovrapposizioni tra i picchi, quindi peggiore separazione.

Quindi si può migliorare in via di principio una separazione se:

- Le velocità di migrazione delle sostanze viene alterata in maniera selettiva;
- L'allargamento dei picchi viene minimizzato il più possibile (**scelta di f.s., f.m., u**)



➤ **Parametri caratteristici del Cromatogramma**

❖ **Velocità di migrazione**

La velocità di migrazione è la velocità con cui le particelle/molecole viaggiano lungo la colonna.

Nel caso più semplice, il passaggio delle sostanze tra le fasi mobile (M) e stazionaria (s) è governato da un equilibrio di partizione.

Il coefficiente (o rapporto) di partizione K per una sostanza è:

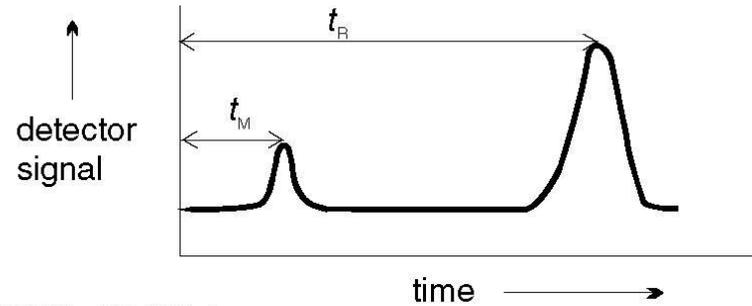
$$K = \frac{c_s}{c_M}$$

K non può esser dedotto direttamente dal cromatogramma.

Tuttavia si può mettere in relazione il parametro t_R **tempo di ritenzione totale** (che è ricavabile direttamente dal cromatogramma) con K .

segue →

❖ **Tempi di ritenzione**



© 2006 Wiley-VCH, Weinheim
Kellner / Analytical Chemistry
ISBN: 3-527-30590-4 Fig-21-02

Il picco t_M è denominato **tempo morto**.

Viene generato da un composto per nulla trattenuto, cioè il tempo che le molecole della fase mobile impiegano per attraversare la colonna. Il tempo morto è l'intervallo di tempo che intercorre tra l'effettivo momento dell'iniezione e l'effettivo momento della rivelazione.

Il picco t_R è denominato **tempo di ritenzione totale** (di una sostanza eluita).

La **velocità lineare media dell'analita** è:
$$v = \frac{L}{t_R}$$

dove L è la lunghezza della colonna

La **velocità lineare media della fase mobile** è:
$$u = \frac{L}{t_M}$$

segue →

❖ Relazione tra t_R e K

Dal momento che la fase mobile è l'unica in movimento, **la ritenzione di una sostanza** corrisponde al suo tempo di residenza nella fase mobile.

Sostanze non trattenute permangono per tutto il tempo nella f.m., mentre sostanze che interagiscono con la fase stazionaria rimangono solo per una frazione del tempo nella fase mobile, in paragone alle sostanze non trattenute.

Questa porzione di tempo può essere descritta usando la relazione tra massa di analita nella f.m. e massa totale dell'analita nella colonna (cioè esprimendo la velocità di migrazione dell'analita come frazione della velocità di migrazione della fase mobile):

$$v = u \cdot \frac{c_M \cdot V_M}{c_M \cdot V_M + c_s \cdot V_s} = u \cdot \frac{I}{I + \frac{c_s \cdot V_s}{c_M \cdot V_M}}$$

n° di moli di analita nella f.m.
K (coefficiente di partizione)

n° di moli totali di analita (f.m. + f.s.)

$$v = u \cdot \frac{I}{I + K \cdot \frac{V_s}{V_M}}$$



V_s e V_M sono parametri sperimentali misurabili

segue →

❖ **Fattore di ritenzione k**

Si definisce **fattore di ritenzione k** :

$$k = K \cdot \frac{V_s}{V_M} \quad \text{oppure} \quad k = \frac{K}{\beta} \quad \text{dove } \beta \text{ è il rapporto tra le fasi}$$

La relazione con i tempi di ritenzione è derivabile come:

$$v = u \cdot \frac{l}{l + k}$$

$$\frac{L}{t_R} = \frac{L}{t_M} \cdot \frac{l}{l + k}$$

Riarrangiando è possibile dimostrare che:

$$k = \frac{t_R - t_M}{t_M} = \frac{t'_R}{t_M}$$

↗ tempo di ritenzione corretto
(adjusted retention time)

Il fattore di ritenzione k può essere dedotto direttamente dal cromatogramma, sulla base dei tempi di ritenzione totali e del tempo morto, ottenendo il tempo di ritenzione corretto.

I fattori di ritenzione dovrebbero aver valori tra 1 e 5 ($k < 1$ eluito troppo velocemente; > 20 tempo di ritenzione intollerabilmente lungo)

segue →

❖ **Fattore di selettività**

Il fattore di selettività o fattore di separazione è una misura della separazione di due sostanze ed è indicato con α .

Utilizzando i coefficienti di partizione per calcolare il fattore di selettività per due sostanze A e B, si ottiene:

$$\alpha = \frac{K_B}{K_A} = \frac{k_B}{k_A} = \frac{(t_R')_B}{(t_R')_A}$$

Quindi il fattore di selettività dipende dai tempi di ritenzione corretti (adjusted retention time) delle due sostanze A e B

Teoria classica

La **teoria classica** della cromatografia **esamina l'effetto di allargamento dei picchi** lungo la colonna e giunge alla conclusione che l'ampiezza del picco è **direttamente collegata all'efficienza di separazione** o efficienza di colonna.

La **teoria classica** della cromatografia considera la **trasposizione in una colonna di un numero discreto di stadi di partizione** (i piatti «teorici»).

Martin e Synge hanno introdotto:

- **l'altezza equivalente a un piatto teorico H** e
- **il numero dei piatti teorici N**

quali parametri di efficienza di una colonna.

Secondo questa teoria, la colonna è immaginabile come una successione di piatti immaginari e su ciascun piatto teorico si verifica un'equilibratura della distribuzione dell'analita tra f.m. e f.s..

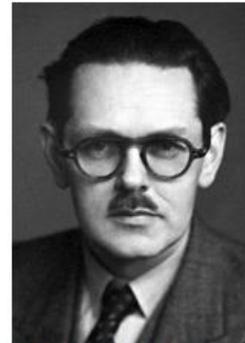
Se la sostanza si muove attraverso la colonna, ciò significa che essa effettua un passaggio graduale da uno stadio di separazione a quello successivo.

 The Nobel Prize in Chemistry 1952
Archer J.P. Martin, Richard L.M. Synge

The Nobel Prize in Chemistry 1952

Archer J.P. Martin

Richard L.M. Synge



Archer John Porter
Martin



Richard Laurence
Millington Synge

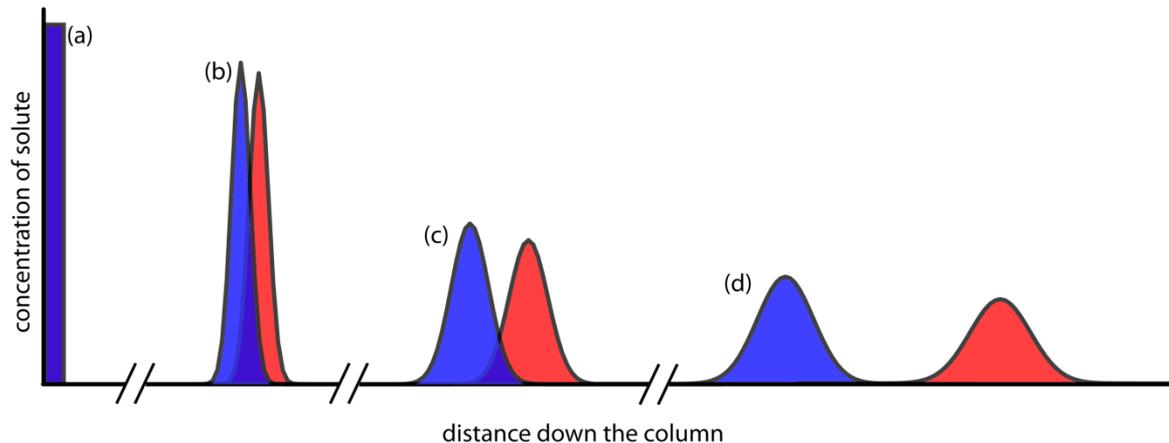
The Nobel Prize in Chemistry 1952 was awarded jointly to Archer John Porter Martin and Richard Laurence Millington Synge "for their invention of partition chromatography"

segue →

➤ **Efficienza della colonna**

Supponiamo di iniettare in colonna un campione costituito da un unico componente:

- Al momento dell'iniezione il campione occupa una banda stretta di larghezza finita.
- Quando il campione percorre la colonna, la larghezza di tale banda aumenta continuamente in un processo che si chiama **allargamento di banda**.
- **L'efficienza della colonna fornisce una misura quantitativa dell'entità dell'allargamento di banda.**
- Quando si inietta il campione la sua banda ha un profilo di concentrazione uniforme, o rettangolare, in funzione della distanza lungo la colonna.
- **Mentre scende nella colonna, la banda si allarga ed assume un profilo di concentrazione gaussiano.**



segue →

❖ Distribuzione gaussiana o normale

La *distribuzione Normale* è definita dall'equazione:

$$f_X(x) = \frac{1}{\sqrt{2\pi\sigma^2}} \exp\left[-\frac{1}{2}\left(\frac{x-\mu}{\sigma}\right)^2\right]$$

con *variabile casuale*

$$x \in]-\infty; +\infty [$$

e *parametri*

$$\mu = \text{media} \in]-\infty; +\infty [$$

$$\sigma^2 = \text{varianza} \in]0; +\infty [;$$

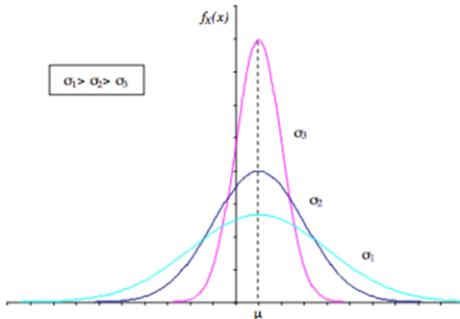


Figura 1 - Distribuzione di una variabile casuale Normale con media fissa e differenti varianze

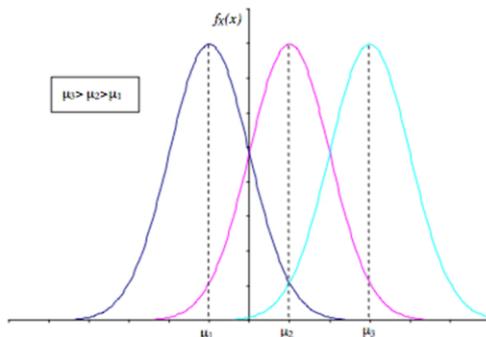


Figura 2 - Distribuzione di una variabile casuale Normale con varianza fissa e differenti medie

Sulla $f_X(x)$ Normale si possono fare alcune considerazioni:

1) $f_X(x) \geq 0 \forall x$;

2) $\int_{-\infty}^{+\infty} f_X(x) dx = 1$;

3) $f_X(x)$ è tanto più grande quanto più è piccolo l'esponente, e raggiunge il suo massimo per $x = \mu$ (moda, media e mediana coincidono);

4) $f_X(x)$ possiede due flessi, cioè due punti in cui cambia concavità, in $\mu - \sigma$ e $\mu + \sigma$;

5) $f_X(x)$ è simmetrica intorno ad $x = \mu$, cioè qualsiasi sia x , $f(\mu - x) = f(\mu + x)$;

In particolare, come illustrato delle figure 1 e 2 e nell'esempio successivo,

- μ determina la posizione della curva sull'asse delle ascisse
- σ^2 determina la maggiore o minore concentrazione della curva intorno a μ

Se un fenomeno si distribuisce secondo una distribuzione Normale si ha che:

- circa il 68% di tutti i valori cade nell'intervallo di $+e - 1$ deviazione standard dalla media

$$P[\mu - \sigma \leq x \leq \mu + \sigma] = 0.6826$$

- circa il 95% dei valori cade nell'intervallo di $+e - 2$ deviazioni standard dalla media

$$P[\mu - 2\sigma \leq x \leq \mu + 2\sigma] = 0.9544$$

- e per 3 sigma ...

$$P[\mu - 3\sigma \leq x \leq \mu + 3\sigma] = 0.9974.$$

segue →

❖ **Dimostrazione teoria classica**

Nel loro modello teorico originale di cromatografia, Martin e Synge interpretarono i fenomeni che avvengono in una colonna cromatografica come uno sviluppo in sezioni discrete - che chiamavano **piatti teorici** – in cui vi è una distribuzione di equilibrio del soluto tra la fase stazionaria e fase mobile.

Descrissero l'efficienza della colonna in termini di **numero di piatti teorici**:

$$N = \frac{L}{H}$$

dove: L è la lunghezza della colonna e H è l'altezza di un piatto teorico.

L'efficienza della colonna migliora e i picchi cromatografici divengono più stretti, all'aumentare dei piatti teorici.

Se assumiamo che un picco cromatografico abbia un profilo gaussiano, allora l'estensione della banda di allargamento è in relazione alla varianza o deviazione standard del picco.

L'altezza di un piatto teorico (anche HETP – Height Equivalent to the Theoretical Plate) si definisce come varianza per unità di lunghezza della colonna:

$$H = \frac{\sigma_L^2}{L}$$

in cui la deviazione standard, σ_L , assume le dimensioni di una lunghezza.

segue →

Poiché i tempi di ritenzione e le larghezze del picco di solito sono misurati in secondi o minuti, è più conveniente esprimere la deviazione standard in unità di tempo, σ_t , dividendo σ_L per la velocità lineare media del soluto, v .

$$\sigma_t = \frac{\sigma_L}{v} = \frac{\sigma_L \cdot t_r}{L}$$

La velocità lineare media del soluto è la distanza percorsa, L , divisa per il suo tempo di ritenzione, t_r .

Per una forma di picco gaussiana, la larghezza alla base, w , si può considerare come quattro volte la sua deviazione standard, σ_t (95 % del picco)

$$w_b = 4 \cdot \sigma_t$$

L'equazione può essere riformulata definendo l'altezza di un piatto teorico in termini di parametri cromatografici facilmente misurabili:

$$\underbrace{\sigma_t = \frac{\sigma_L \cdot t_r}{L} \quad \longrightarrow \quad \sigma_L = \frac{\sigma_t \cdot L}{t_r}}$$

$$H = \frac{\sigma_L^2}{L} = \frac{\sigma_t^2 \cdot L^2}{L \cdot t_r^2} = \frac{L \cdot \sigma_t^2}{t_r^2}$$

$$\sigma_t = \frac{w_b}{4}$$

$$H = \frac{L \cdot w_b^2}{16 \cdot t_r^2}$$

segue →

Si può quindi definire **il numero di piatti teorici** come:

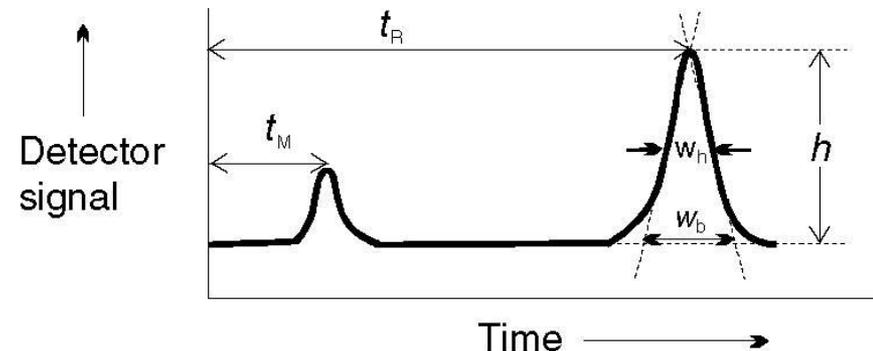
$$N = \frac{L}{H} = \frac{16 \cdot t_r^2}{w_b^2}$$

$$\left(H = \frac{L \cdot w_b^2}{16 \cdot t_r^2} \right)$$

Quindi il numero di piatti teorici può essere determinato da un cromatogramma, misurando il tempo di ritenzione e l'ampiezza di base di un picco.

Risultati migliori si ottengono con una equazione modificata che impiega **l'ampiezza al semi-massimo**:

$$N = 5.54 \cdot \left(\frac{t_r}{w_h} \right)^2$$



© 2006 Wiley-VCH, Weinheim
Kellner / Analytical Chemistry
ISBN: 3-527-30590-4 Fig-21-03

Queste relazioni si impiegano per valutare le separazioni cromatografiche, ma **la teoria dei piatti è un'approssimazione** dei processi che effettivamente avvengono in colonna: in realtà si verificano difficilmente stadi di equilibrio separati, poiché la f.m. è in movimento.

Quando si comparano colonne usando la teoria dei piatti e N , bisogna riferirsi sempre ad una stessa sostanza.

Teoria cinetica

L'ampliamento dei picchi deriva da un effetto cinetico che si manifesta a seguito della velocità finita a cui decorre il processo di trasferimento di massa durante la migrazione dell'analita lungo la colonna.

L'entità di questi effetti dipende dalla lunghezza (del percorso) dei possibili passaggi dell'analita tra f.m. e f.s. ed è direttamente proporzionale alla velocità di flusso della f.m.

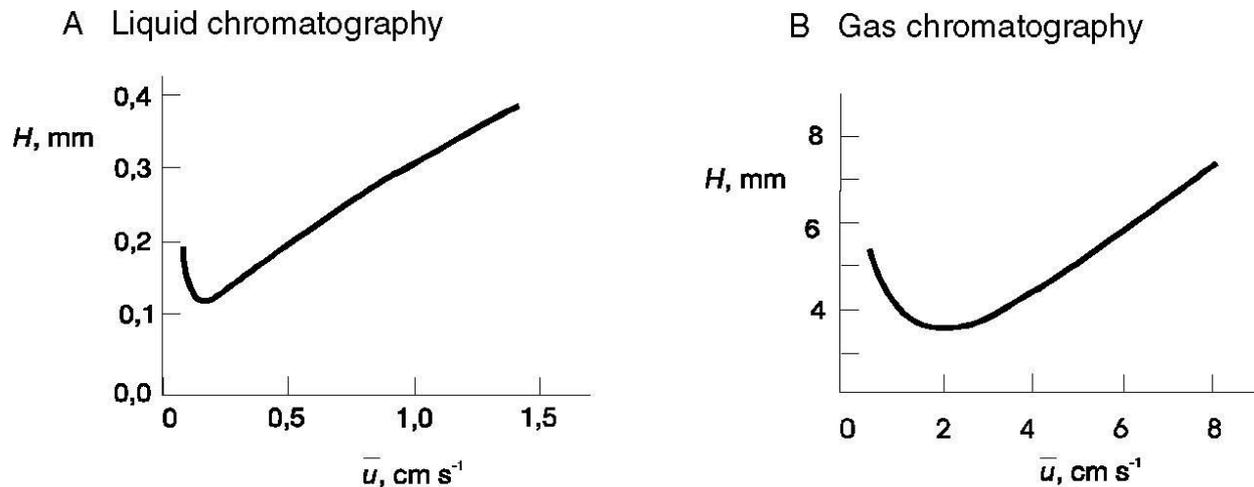
Per descrivere questo effetto bisogna investigare la dipendenza di **H** dalla velocità (di flusso) lineare **u** (cm s^{-1}).

Variabili importanti per descrivere l'efficienza delle colonne sono:

• 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

segue →

❖ **Dipendenza di H (altezza piatto teorico) da u (velocità lineare della f.m.) in LC e GC**



© 2006 Wiley-VCH, Weinheim
Kellner / Analytical Chemistry
ISBN: 3-527-30590-4 Fig-21-04

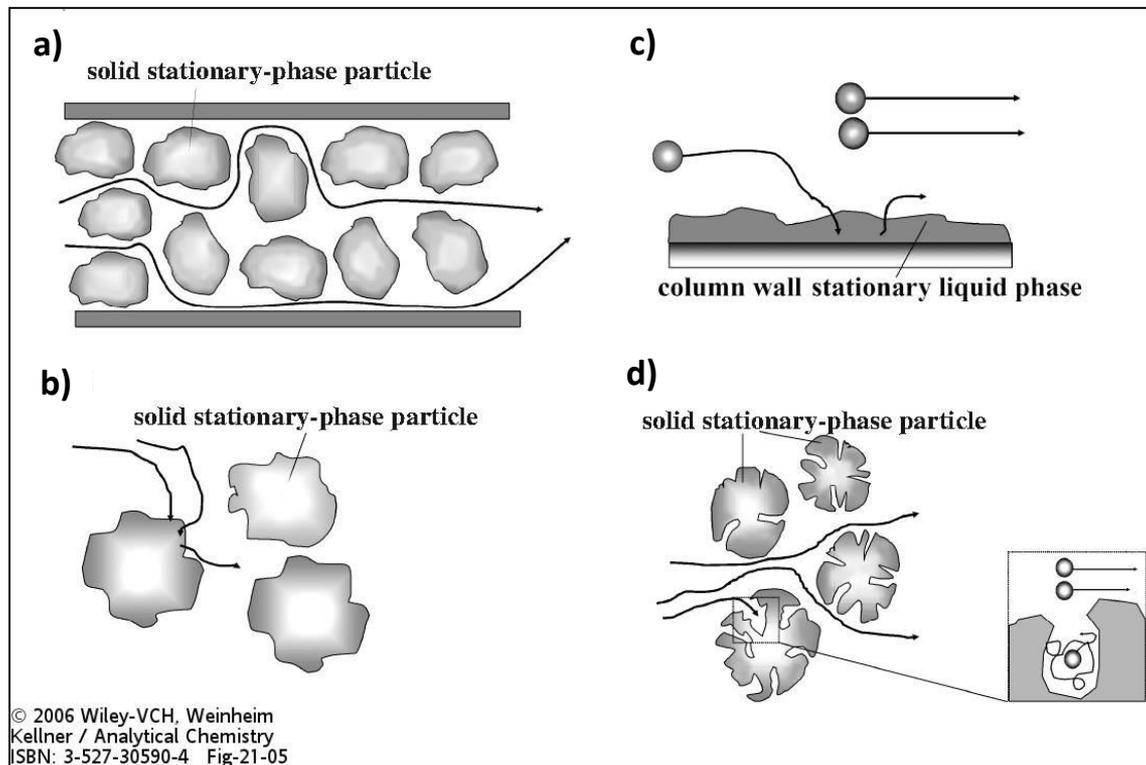
- ✓ *In **LC** si ottiene la minima altezza di H per velocità della f.m. (u) più basse rispetto a **GC**;*
- ✓ *Osservando i grafici risulta che è possibile, in linea di principio, ottenere H minori in **LC** rispetto a **GC**;*
- ✓ *Quindi, a parità di lunghezza, colonne **LC** contengono un numero più alto di piatti teorici (N) di quelle **GC**, pertanto sono più efficienti;*
- ✓ *Tuttavia in **LC** si utilizzano colonne lunghe tra i 25 cm e i 50 cm al massimo, poiché pressioni per mantenere il flusso attraverso colonne più lunghe non sono raggiungibili senza danni alla strumentazione;*
- ✓ *Le colonne **GC** sono mediamente lunghe tra i 30 m e i 60 m, ma possono essere lunghe anche 100 m (mantenere su lunghe colonne la pressione della f.m., che è un gas, non comporta problemi alla strumentazione).*

segue →

➤ **Equazione di Van Deemter**

$$H = A + \frac{B}{u} + C \cdot u$$

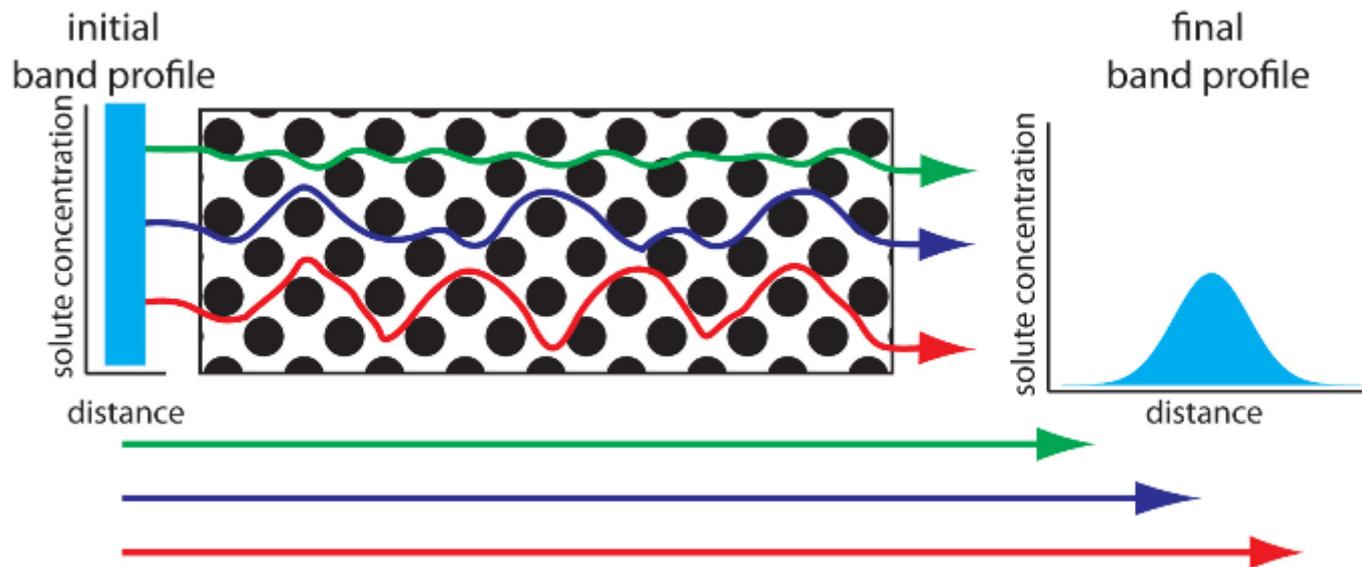
← *coefficiente di DIFFUSIONE TURBOLENTA* *coefficiente di DIFFUSIONE LONGITUDINALE*
(u = velocità della f.m.)
coefficiente di TRASFERIMENTO DI MASSA (f.m. ↔ f.s.)



- a)** *diffusione turbolenta*
- b)** *trasferimento di massa nella f.s in LC*
- c)** *trasferimento di massa nella f.s in GC*
- d)** *trasferimento di massa nella f.m.*

segue →

❖ **Effetto della diffusione turbolenta sull'ampiezza di picco**



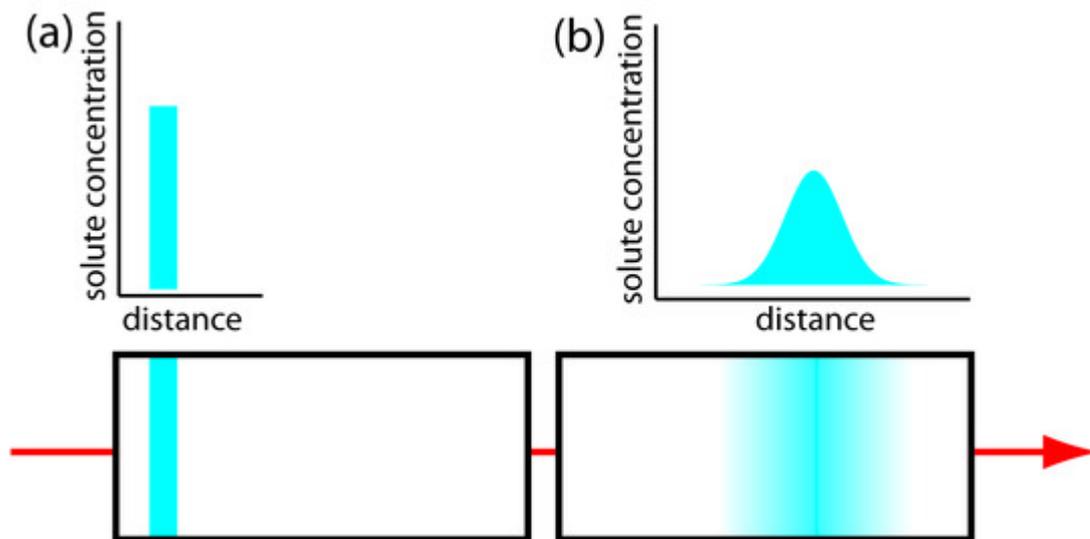
La differenza di cammino di molecole dello stesso analita nel passaggio attraverso la f.s. in cromatografia liquida (LC) provoca un arrivo di molecole al detector in tempi diversi e quindi la registrazione di un picco allargato.

Il fenomeno della diffusione turbolenta non riguarda GC in cui la fase stazionaria è liquida e non solida.

Regolarità dell'impaccamento (piccola distribuzione dimensionale delle particelle di f.s.) minimizza la diffusione turbolenta. Parametro indipendente da u .

segue →

❖ Effetto della diffusione longitudinale sull'ampiezza di picco

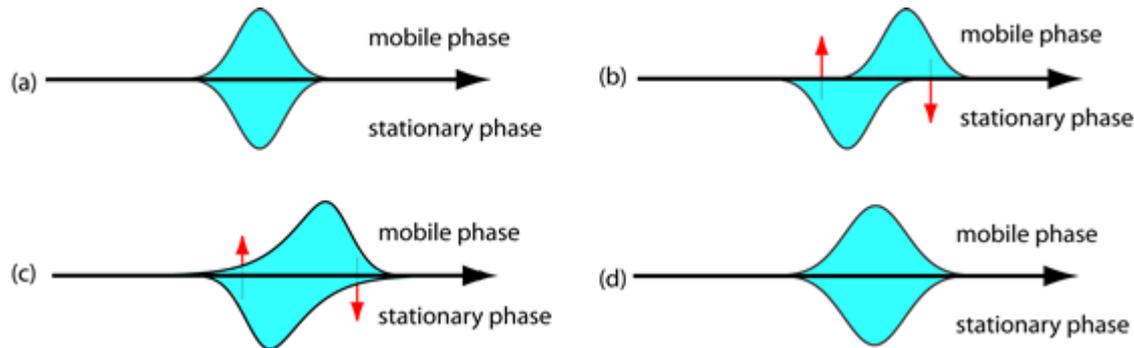


- ✓ Le molecole di analita sono in continuo movimento. Diffondono da regioni a più alta concentrazione di analita verso quelle a più bassa concentrazione.
- ✓ Questi fenomeni di diffusione comportano un allargamento del picco.
- ✓ Alte velocità di flusso della f.m. riducono il tempo per i processi di diffusione longitudinale, così da ottenere picchi più stretti.
- ✓ Poiché il coefficiente di diffusione delle sostanze è più alto nella fase gas che nella fase liquida, la diffusione longitudinale contribuisce di più agli allargamenti di picco in GC che in LC.

segue →

❖ Effetto del trasferimento di massa sull'ampiezza di picco

Quando il soluto passa attraverso la colonna si muove tra la f.m. e la f.s., questo movimento tra le due fasi è detto trasferimento di massa.



a) Equilibrio ideale con profili Gaussiani del soluto nella f.m. e nella f.s.

b-c) Se la banda del soluto (nella f.m.) si sposta per una breve distanza lungo la colonna non c'è più equilibrio del soluto tra f.m. e f.s.. Le frecce mostrano il movimento del soluto (cioè il trasferimento di massa) tra f.s. e f.m. e viceversa.

d) Una volta che l'equilibrio tra le due fasi è ristabilito la banda del soluto (nella f.m.) risulta più allargata che in precedenza.

Quindi, se il movimento del soluto attraverso la f.m. o la f.s. non avviene a velocità comparabili per mantenere l'equilibrio di partizione tra le due fasi, il picco si allarga.

Mediamente le molecole si muovono più velocemente nella f.m. che nella f.s., quindi per ridurre l'effetto di allargamento di picco dovuto al trasferimento di massa bisogna ridurre la velocità della f.m. per consentire il mantenimento dell'equilibrio di partizione tra le due fasi.

segue →

➤ **Equazione di Van Deemter modificata (modello più dettagliato)**

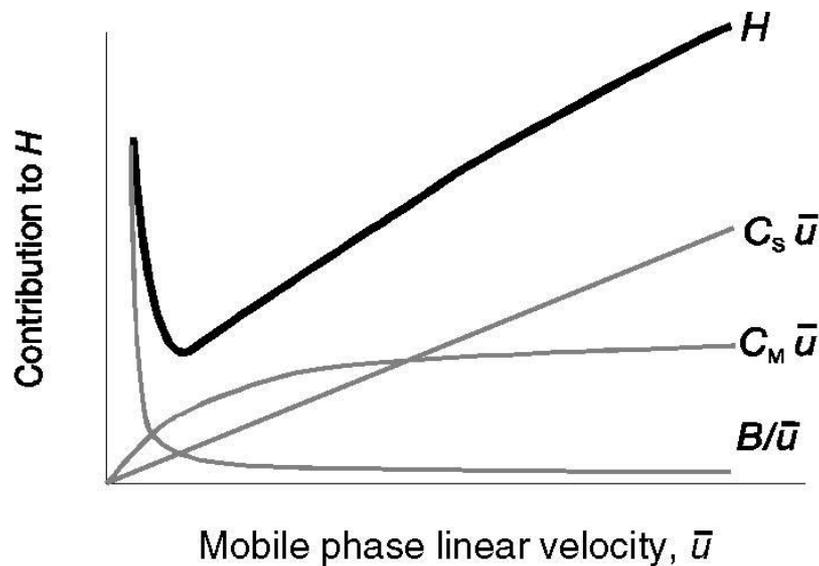
$$H = C_M \cdot u + \frac{B}{u} + C_S \cdot u$$

(u = velocità della f.m.)

coefficiente di TRASFERIMENTO DI MASSA
"da e verso" la fase mobile

coefficiente di DIFFUSIONE LONGITUDINALE

coefficiente di TRASFERIMENTO DI MASSA
"da e verso" la fase stazionaria



© 2006 Wiley-VCH, Weinheim
Kellner / Analytical Chemistry
ISBN: 3-527-30590-4 Fig-21-06

segue →

➤ **Contributo dei termini individuali rispetto ai parametri di efficienza di colonna**

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

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

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

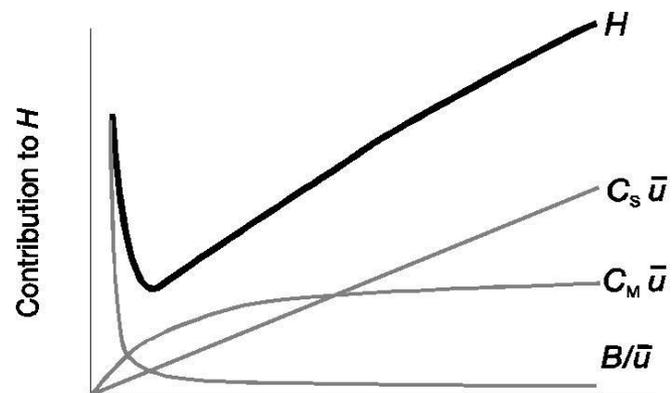
$$C_S = \frac{q \cdot k \cdot d_f^2}{(1+k)^2 \cdot D_S} = \frac{2 \cdot t_d \cdot k}{(1+k)^2}$$

coefficiente di TRASFERIMENTO DI MASSA

"da e verso" la fase stazionaria

• 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



© 2006 Wiley-VCH, Weinheim
Kellner / Analytical Chemistry
ISBN: 3-527-30590-4 Fig-21-06

segue →