

CHIMICA ANALITICA II

CON LABORATORIO

(AA 2021-22)

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

**CROMATOGRAFIE
CON FASE MOBILE LIQUIDA
(Liquid chromatography – LC)**

INTRODUZIONE

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

➤ **Principi di separazione**

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

tecnica

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

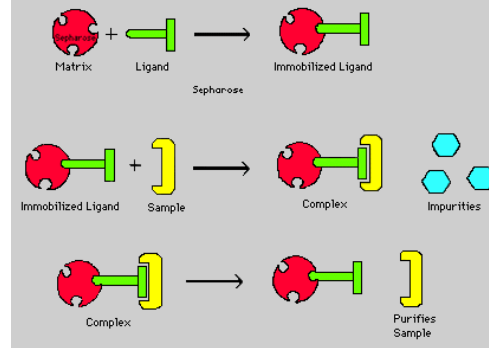
meccanismo principale di separazione

adsorbimento
partizione/adsorbimento
partizione
ionico
esclusione dimensionale
affinità

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

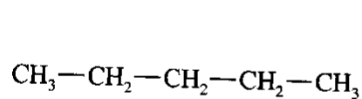
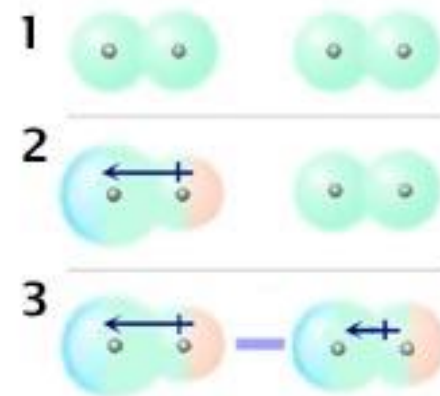
<https://www.sciencedirect.com/topics/biochemistry-genetics-and-molecular-biology/affinity-chromatography>

Principles of Affinity Chromatography

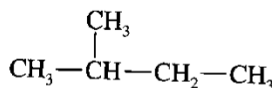


❖ Forze di dispersione

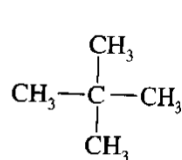
- Le forze di dispersione si generano da momentanee variazioni della densità elettronica attorno agli atomi e alle molecole;
- Ad ogni istante la distribuzione elettronica attorno ad una molecola o ad un atomo può generare un momento di dipolo, che può (temporaneamente) indurre un momento di dipolo nelle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



n-pentane, bp = 36°C



isopentane, bp = 28°C

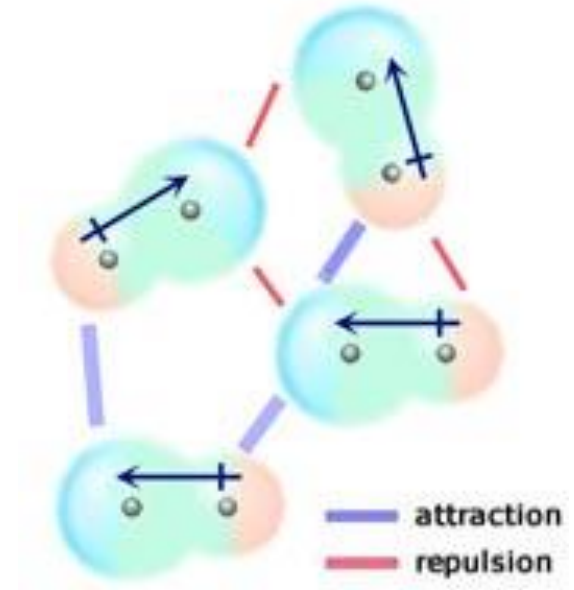


neopentane, bp = 10°C

segue →

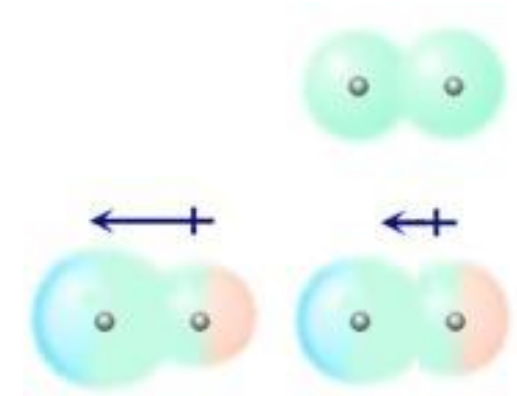
❖ Forze dipolo-dipolo

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



❖ Forze di dipolo indotto

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



➤ Tecniche

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

- ✓ La prima tecnica utilizzata è stata basata sull' adsorbimento, LSC (Liquid Solid Chrom.). La f.s. è un solido adsorbente di materiale polare (silice o allumina), l'eluente (o f.m.) è un solvente non polare. Serve a separare composti, isomeri o classi di composti non polari (es. idrocarburi alifatici o alcol alifatici);
- ✓ In **NPLC** e **RPLC** (che sono LLC – Liquid-Liquid Chrom.) si usano fasi stazionarie chimicamente legate ad un supporto solido e queste cromatografie si chiamano “a fasi legate” (bonded-phase chromatography), i principi della partizione sono importanti per queste tecniche;
- ✓ 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

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

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

$$B = 2 \cdot k_D \cdot D_M \rightarrow \text{poco importante in LC}$$

coefficiente di DIFFUSIONE LONGITUDINALE

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

coefficiente di TRASFERIMENTO DI MASSA

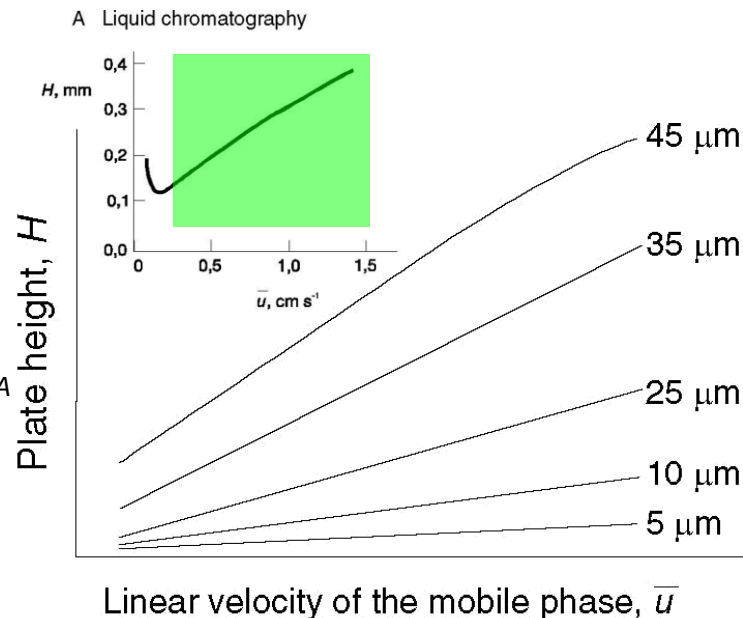
"da e verso" la fase mobile

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

coefficiente di TRASFERIMENTO DI MASSA

"da e verso" la fase stazionaria

se f.s. è liquida se f.s. è solida



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

• Velocità lineare della fase mobile	u
• Coefficiente di diffusione nella f.m.	D_M
• Coefficiente di diffusione nella f.s.	D_S
• Diametro del materiale di impaccamento	d_D
• Spessore del rivestimento liquido della f.s.	d_f
• Tempo di desorbimento dell'analita	t_d
• Diametro della colonna	d_c

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

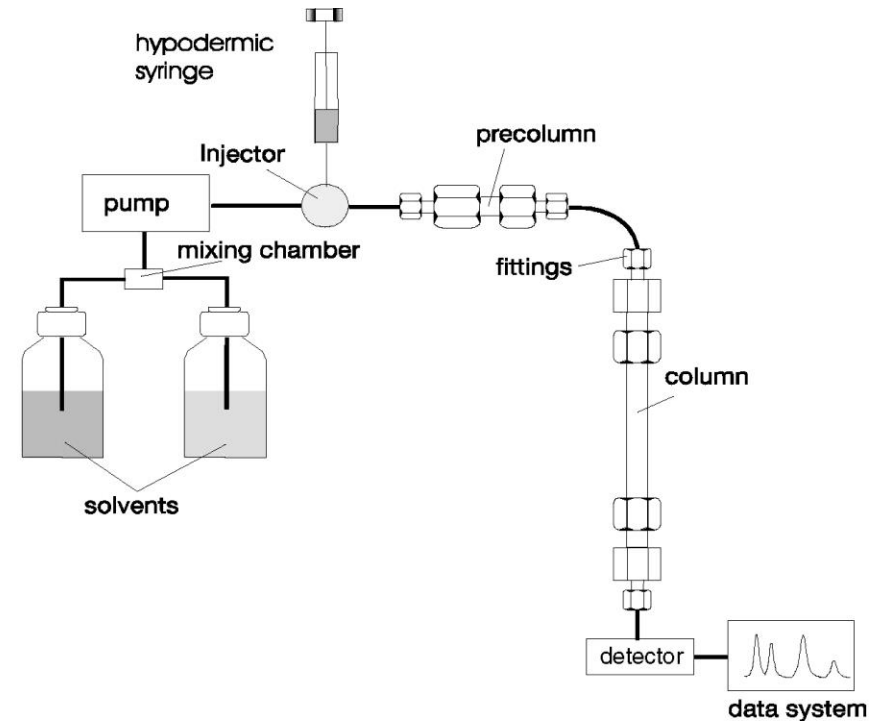
Dalla teoria cinetica della cromatografia, si deduce che H diminuisce al diminuire delle dimensioni del materiale di supporto, aumentando quindi l'efficienza.

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

La strumentazione

La strumentazione consiste nelle seguenti componenti:

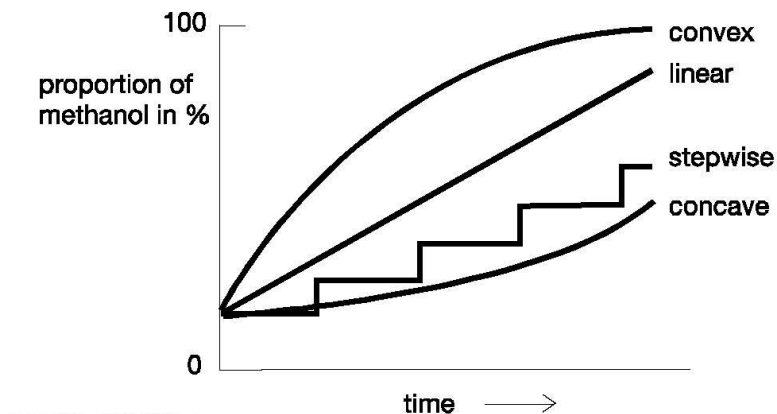
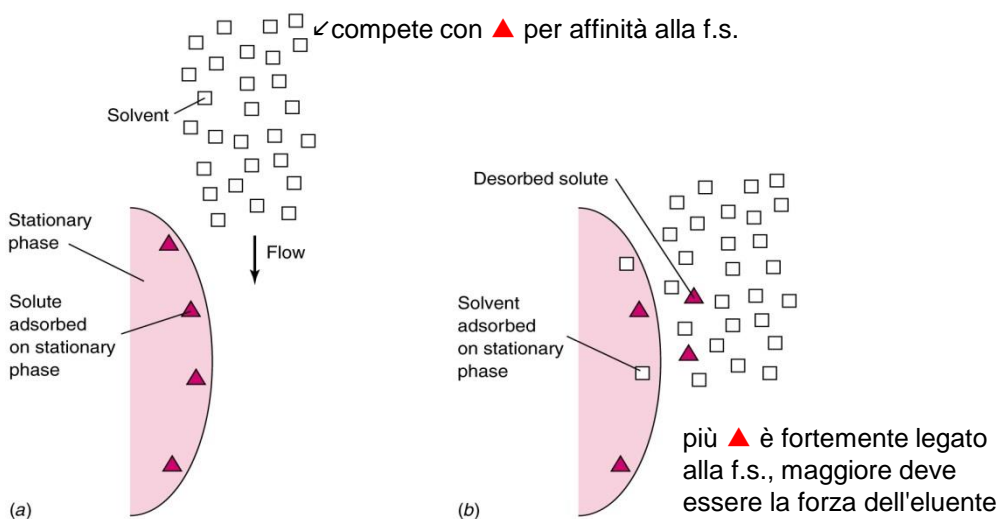
- Sistema di pompaggio;
- Riserve di solvente;
- Sistema di iniezione del campione;
- Colonna cromatografica;
- Rivelatore



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

➤ Solventi (fase mobile)

- La fase mobile viene scelta in base alla tecnica usata;
- I solventi devono essere filtrati per rimuovere particelle sospese che bloccherebbero il flusso di eluente in colonna;
- I gas disciolti devono essere rimossi con gorgogliamento di He o N₂ nel solvente, o con ultrasuoni;
- I solventi per f.m. vengono conservati in recipienti/bottiglie in vetro o acciaio;
- La separazione si può ottenere per eluizione **isocratica** (miscela costante di solventi) o con **gradiente**;
- **Separazioni migliori** in tempi minori si ottengono di solito in **gradiente** di eluizione, in cui la forza dell'eluente è in genere incrementata gradualmente durante l'analisi. Si possono usare 2 o più solventi e il gradiente può essere lineare, a gradini, concavo o convesso;
- La modulazione della composizione e della forza dell'eluente consente di per promuovere l'uscita di soluti (analiti) affini alla fase stazionaria



segue →

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

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

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

▪ Il **parametro** più importante di un solvente è per applicazioni LC la sua **polarità**.

▪ Si sceglie prima la fase stazionaria che dovrebbe aver polarità simile ai costituenti della miscela che si deve separare, e conseguentemente si sceglie la fase mobile in modo che k_B abbia valori tra 2 e 5;

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

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

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

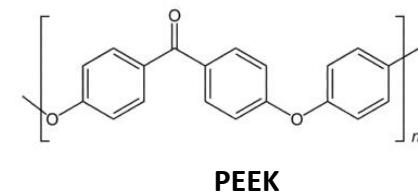
▪ Spesso la soluzione ottimale si trova con un processo per "Trial & error" o con procedure di ottimizzazione multivariata;

▪ Sono state stabilite delle **SERIE ELUOTROPICHE** (es. <http://www.stenutz.eu/chem/solv7.php>) per quantificare la polarità dei solventi (ad esempio Snyder classificò i solventi come fortemente polari, debolmente polari e apolari).

segue →

► Colonne cromatografiche

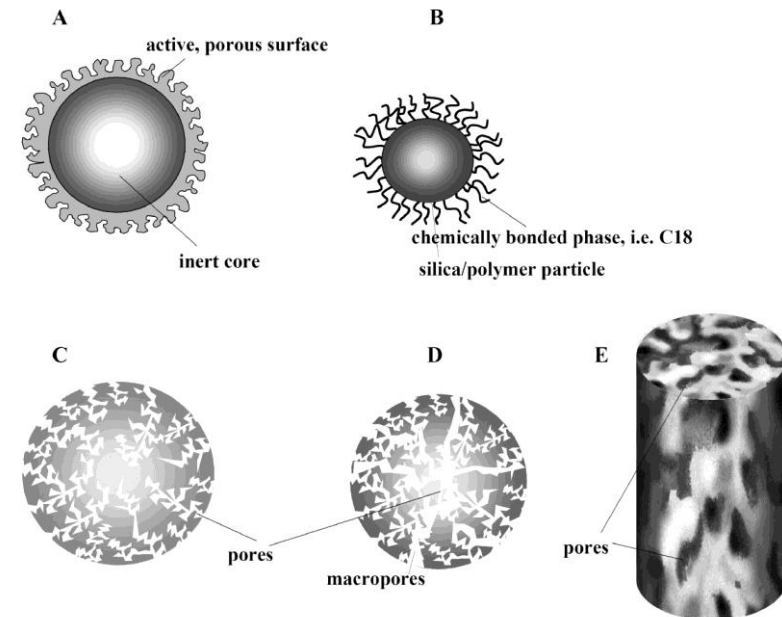
- ❑ Possono essere costituite da diversi materiali: acciaio inossidabile; tubi in vetro spesso contenuti in tubi in metallo; PEEK (polyether ether ketone);
- ❑ La superficie interna non deve essere ruvida poiché diminuisce l'efficienza di separazione;
- ❑ Dimensioni: $L = 1-30$ cm; diametro interno ($ID = 2.1-7.6$ mm) ;
- ❑ In Micro HPLC vengono utilizzate colonne lunghe di tipo capillare ($ID < 1$ mm);
- ❑ Materiale di impaccamento solido con dimensioni di 3-10 μm ;
- ❑ Il materiale d'impaccamento viene trattenuto all'interno della colonna tramite due setti di materiale sinterizzato posti alle estremità;
- ❑ N è approssimativamente 50'000 per metro di lunghezza;
- ❑ Per ridurre l'uso di solventi/f.m. si utilizzano colonne miniaturizzate: $L = 30-75$ mm, ID 1 mm; N fino a 100'000/m per $d_D = 3$ μm (HPLC "microbore").
- ❑ Si impiegano corte "pre-colonne" per proteggere la colonna separativa ($ID=4.5$ mm, $L=30$ mm, impaccamento 10-30 μm , per evitare cadute di pressione significative);
- ❑ Riempire una colonna con particelle di dimensioni < 20 μm è problematico (elevata energia superficiale e cariche superficiali ostacolano il riempimento a secco; se si usa un liquido, vanno evitati i gradienti di dimensioni per le particelle, associati a fenomeni di sedimentazione). Quindi si sospende il materiale dell'impaccamento in un liquido per riempire la colonna; ancor meglio se si usano "sospensioni galleggianti" o slurry; le differenze in densità tra fase solida e liquida possono essere compensate da un agente disperdente opportuno (es. CH_2Br_2).



segue →

❖ **Materiali di impaccamento**

- Più lunga e sottile la colonna e minori le dimensioni dell'impaccamento, migliore è la separazione.
- Purtroppo, la contro-pressione della colonna cresce sensibilmente al diminuire del ID (diametro interno) e del d_D (diametro particelle) e al crescere di L.
- La possibilità di pompare la f.m pone limiti pratici alle dimensioni di colonne e impaccamento;
- Materiale per l'impaccamento si sceglie in base alla tecnica cromatografica;
- **Forma, dimensioni, porosità e distribuzione dimensionale delle particelle** del materiale di supporto sono importanti per le caratteristiche della f.s.
- Il materiale di supporto può essere: non poroso (pellicolare o con fase legata), di particelle porose o perfuse, colonne monolitiche;
- Particelle sferiche si impaccano meglio di particelle irregolari; l'efficienza con distribuzioni uniformi di d_D è alta;
- La distribuzione dimensionale (gaussiana) di d_D deve essere la più stretta possibile - valori di d_D piccoli determinano la permeabilità della colonna, valori più grandi determinano H;
- Le particelle porose possono essere completamente porose, o avere uno strato poroso e una parte intera (nocciolo/core) inerte, ad esempio vetro.
- Le colonne monolitiche consentono elevate velocità della f.m.;
- I materiali monolitici sono completamente porosi.

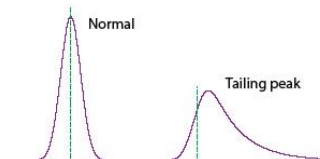


© 2006 Wiley-VCH, Weinheim
Kellner / Analytical Chemistry
ISBN: 3-527-30590-4 Fig-21-29

segue →

❖ Silice

- Le f.s. basate su silice sono al momento il materiale d'impaccamento più popolare in HPLC.
- La silice da sola si impiega nella cromatografia d'adsorbimento, ma più spesso, è usata come materiale di supporto per materiali chimicamente modificati - ai gruppi silanolo (SiOH) - con alta efficienza di colonna e resistenza meccanica e chimica (cromatografia "a fasi legate");
- Le caratteristiche delle particelle in silice (dipendenti dal processo di produzione) sono: forma, dimensione, porosità e dimensione dei pori, area superficiale.
- Ci son vari tipi di gruppi silanolo (liberi, geminali, associati). I silanoli liberi hanno natura molto acida (e possono generare fenomeni di tailing di picchi relativi a analiti basici).
- La purezza della silice è importante, specie per l'analisi di componenti polari: ioni Fe^{3+} , Al^{3+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} contaminanti la silice possono formare complessi con specie chelanti, alterando la forma dei picchi:
- I materiali basati su silice si impiegano a pH di solito compresi tra 2 e 8. A pH maggiori la silice inizia a disciogliersi nell'eluente e a bassi pH si rompono i legami con i gruppi chimicamente legati. Miglioramenti si sono avuti con materiali ibridi silice/gruppi organo-silossani (pH 2-11).

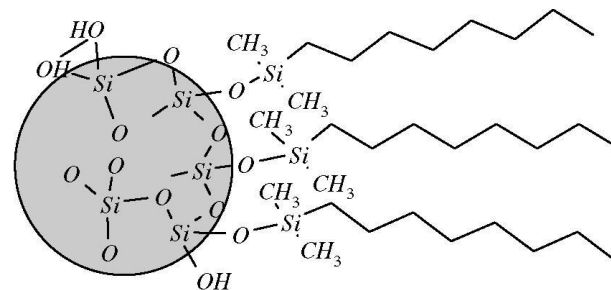


❖ Particelle polimeriche

- I materiali polimerici sono stabili a variazioni di pH, ma l'efficienza di colonna e la resistenza meccanica e solubilizzazione in alcuni solventi è peggiore rispetto alla silice;
- Materiali comuni sono polistirene/divinilbenzene e metacrilato;
- L'impiego di questi materiali è più diffuso in cromatografia ionica.

Cromatografia su fasi legate (NPLC e RPLC)

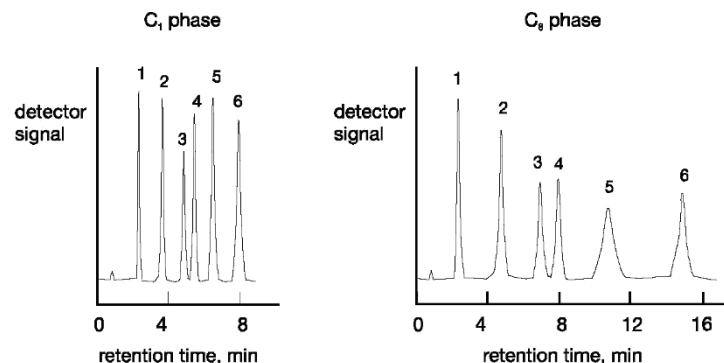
- Sono cromatografie liquido-liquido (LLC);
- In **NPLC** il meccanismo è sia di partizione che di adsorbimento;
- In **RPLC** il meccanismo è puramente di partizione;
- **RPLC** è molto più diffusa (circa il 75% delle applicazioni);
- Il gel di silice è il materiale di supporto più diffuso;
- Grazie alla reattività dei gruppi silanolo è possibile legare agli stessi diversi gruppi, reazioni comuni sono esterificazioni con alcoli e con organo monoclorosilani per legare catene idrofobiche alla silice (es. C8);
- Non tutti i silanoli reagiscono (dipende dall'ingombro sterico), rimane circa il 50% libero che, con ulteriori trattamenti, si riduce di molto, ma non viene azzerato;
- Silanoli rimasti liberi possono legare fortemente gruppi polari di molecole di analita generando fenomeni di tailing nei picchi.
- In **NPLC** i composti polari vengono eluiti per ultimi (trattenuti dalla f.s.);
- In **RPLC** i composti polari vengono eluiti per primi (sono più affini alla f.m.);
- **Effetto della (lunghezza della catena alifatica della)**



© 2006 Wiley-VCH, Weinheim
Kellner / Analytical Chemistry
ISBN: 3-527-30590-4 Fig-21-34

fase stazionaria in RPLC:

- 1 uracile
- 2 fenolo
- 3 acetofenone
- 4 nitrobenzene
- 5 metil benzoato
- 6 toluene



© 2006 Wiley-VCH, Weinheim
Kellner / Analytical Chemistry
ISBN: 3-527-30590-4 Fig-21-35

Es. https://www.shimadzu.com/an/hplc/support/lib/lctalk/silica_gel.html

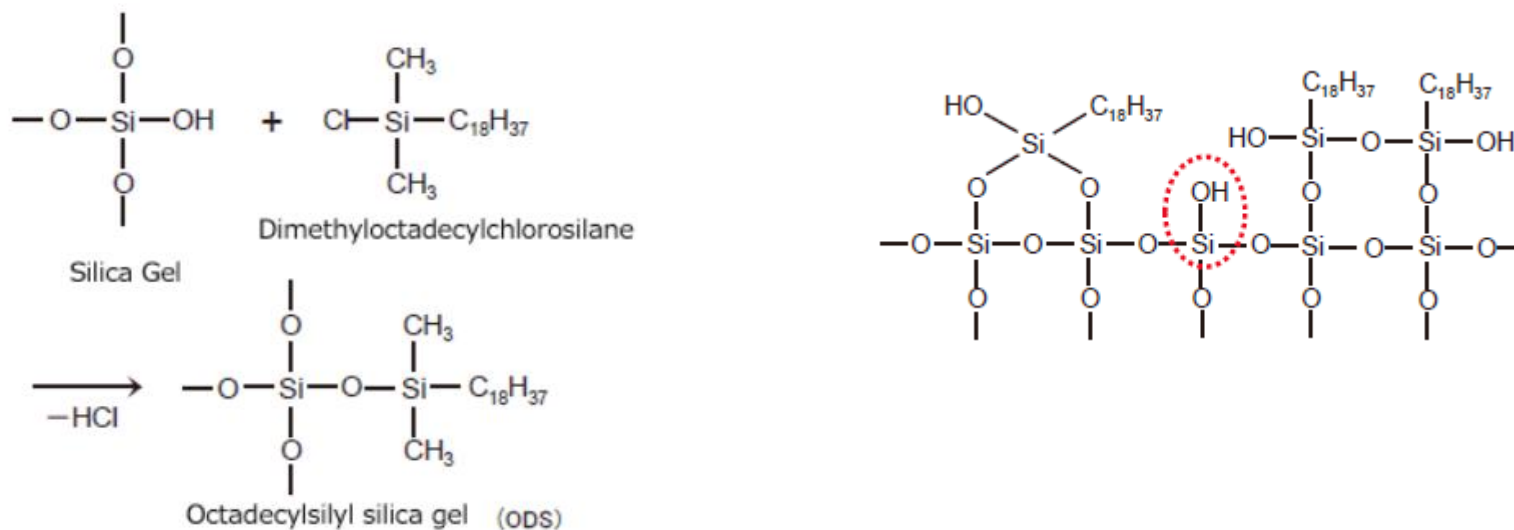
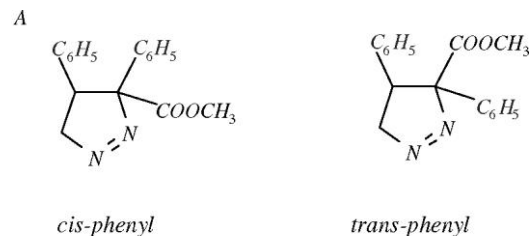


Fig. 2 Example Method of Preparing ODS

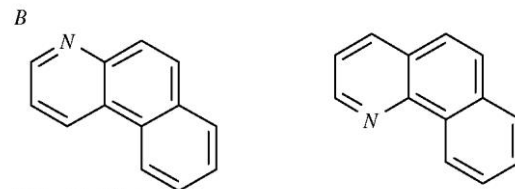
Cromatografia di adsorbimento

- Sono cromatografie liquido-solido (LSC);
- La fase stazionaria è silice o allumina;
- La ritenzione si basa su processi di adsorbimento differenziati sull'adsorbente solido, quando le molecole della f.m. competono con quelle degli analiti;
- L'adsorbimento è localizzato nei centri attivi liberi della f.s.;
- Molecole fortemente polari possono deattivare la superficie della f.s. (es. H_2O);
- La forza di eluizione è una misura dell'energia di adsorbimento del solvente per unità di area superficiale;
- Tempi di ritenzione: alcheni < idrocarburi aromatici < composti alogenati e solfuri < eteri < nitrocomposti < esteri < alcoli < ammine < solfoni < solfossidi < amidi < acidi carbossilici.
- LSC è adatta a separare sostanze non polari difficilmente solubili in H_2O ;
- Utilizzata per separare isomeri posizionali e stereoisomeri.

Cis- e trans- pirazoline



Isomeri posizionali di aza-derivati del fenantrene



306 Wiley-VCH, Weinheim
Kellner / Analytical Chemistry
ISBN: 3-527-30590-4 Fig-21-38

WIKI Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC) is a variant of normal phase liquid chromatography that partly overlaps with other chromatographic applications such as ion chromatography and reversed phase liquid chromatography. HILIC uses *hydrophilic stationary phases with reversed-phase type eluents*. The name was suggested by Dr. Andrew Alpert in his 1990 paper on the subject. He described the chromatographic mechanism for it as liquid-liquid partition chromatography where analytes elute in order of increasing polarity.

REVIEW

Anal Bioanal Chem (2012) 402:231–247 DOI 10.1007/s00216-011-5308-5

Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC)—a powerful separation technique

Bogusław Buszewski & Sylwia Noga

https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3249561/pdf/216_2011_Article_5308.pdf

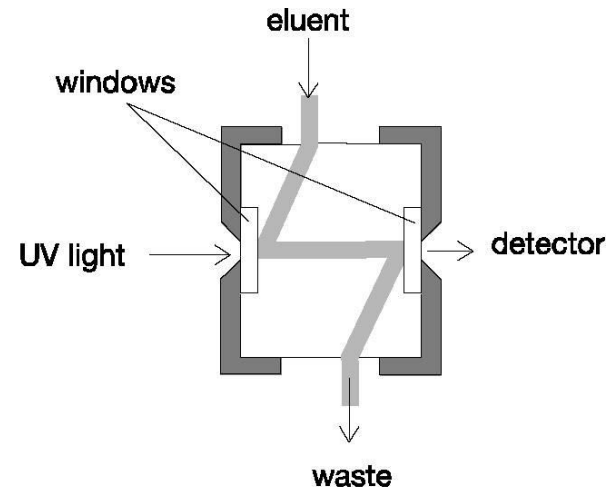
➤ **Rivelatori**

I rivelatori per LC si basano su due principi:

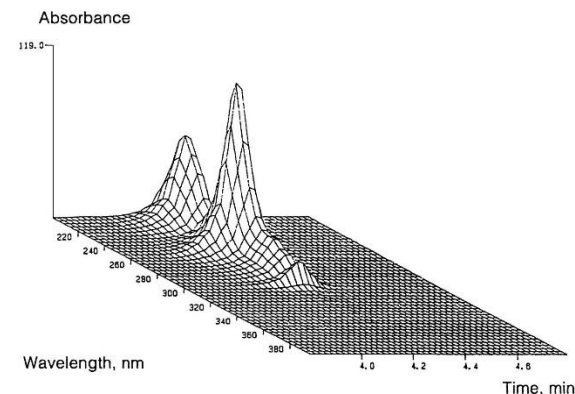
- **Rivelazione di una caratteristica della fase mobile (bulk property):** l'analita provoca un cambiamento in un segnale "fisso" generato dalla fase mobile;
 - **Rivelazione di una caratteristica dell'analita (solute property):** l'analita genera un segnale quando arriva al rivelatore.
-
- **Es. bulk property:** indice di rifrazione, conducibilità.
 - **Es. solute property:** UV, fluorescenza, corrente di diffusione ad un elettrodo, **spettro di massa**

❖ Rivelatori di assorbanza (UV)

- Sono i più diffusi (per più del 70% delle applicazioni);
- Sono costituiti da un cella di flusso liquido per misurare l'assorbimento di radiazione luminosa in uscita dalla colonna;
- La cella di flusso ha forma di Z;
- Per evitare l'allargamento di picco, volume è di 1-10 μL e il cammino ottico è di 2-10 mm;
- La cella è in quarzo per misurare nel range UV;
- Le misure vengono effettuate a lunghezza d'onda singola.
- Si possono impiegare anche spettrometri a schiera di fotodiodi (DAD- diode array detectors). Informazione è fornita ad esempio come rappresentazione 3D (assorbanza, tempo di ritenzione, lunghezza d'onda).
- In questo modo si possono facilmente identificare le λ migliori per la quantificazione dei diversi analiti.
- Bisogna operare in intervalli di λ in cui i solventi non assorbono.



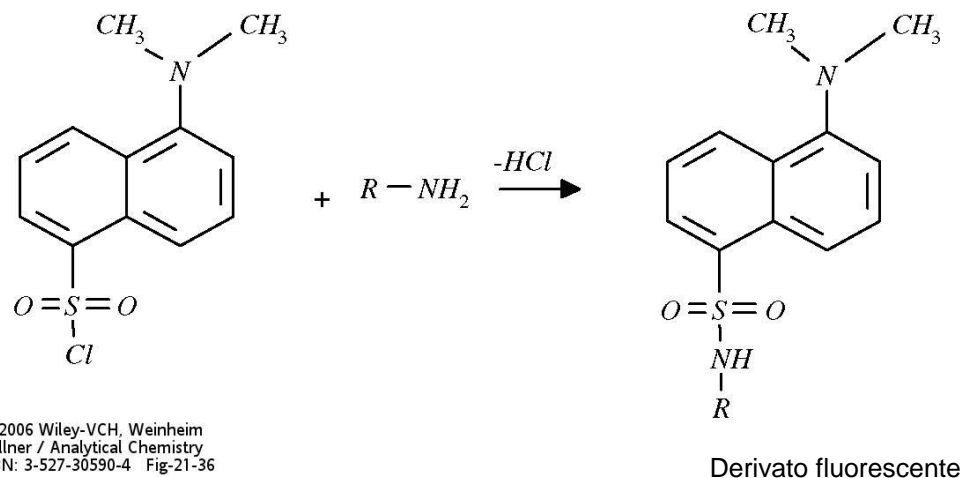
© 2006 Wiley-VCH, Weinheim
Kellner / Analytical Chemistry
ISBN: 3-527-30590-4 Fig-21-30



© 2006 Wiley-VCH, Weinheim
Kellner / Analytical Chemistry
ISBN: 3-527-30590-4 Fig-21-31

❖ Rivelatori a fluorescenza

- Hanno sensibilità 1000 volte superiore ai detector UV;
- L'eccitazione avviene con una lampada a vapori di mercurio (o a Xenon ad elevate pressioni);
- Le lunghezze d'onda di eccitazione ed emissione sono selezionate da monocromatori, o si usa uno spettrometro di fluorescenza.
- Alcune sostanze farmaceutiche, di interesse clinico o naturali sono fluorescenti.
- Per l'analisi di composti non fluorescenti questi possono essere derivatizzati legando chimicamente ad essi un gruppo fluorescente.

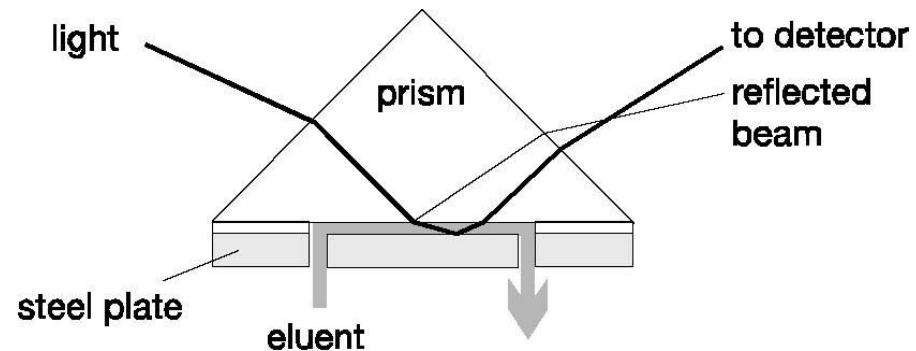


Dansil cloruro

5-(dimetilamino)naphthalene-1-
sulfonyl chloride

❖ **Rifrattometro (RI detector)**

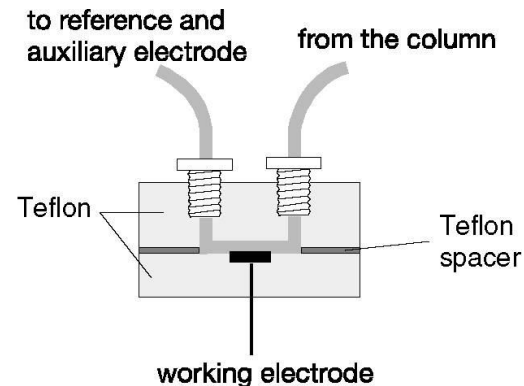
- *E' un detector universale, non specifico;*
- *Si basa sulla differenza di indice di rifrazione tra eluente puro e eluente che contiene costituenti del campione.*
- *Si può valutare la luce riflessa attraverso un prisma (o deflessa da un deflettore);*
- *La luce è rilevata dopo esser passata attraverso l'eluente ed esser stata riflessa da una lamina in acciaio (che funge anche da termostato);*
- *Si impiegano una cella di misura e una cella di riferimento (rifrattometro differenziale);*
- *E' meno sensibile di UV detector, richiede termostatazione;*
- *Non è utilizzabile per eluizioni in gradiente, poiché l'indice di rifrazione che rappresenta lo "zero" cambia al variare della miscela di solventi.*



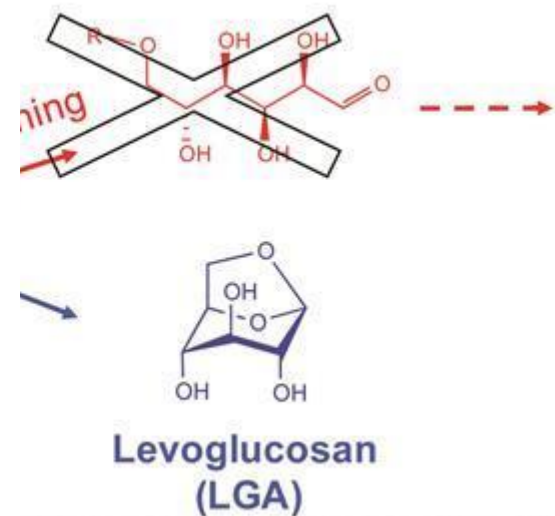
© 2006 Wiley-VCH, Weinheim
Kellner / Analytical Chemistry
ISBN: 3-527-30590-4 Fig-21-32

❖ Rivelatori elettrochimici

- Voltammetria, amperometria, coulombometria e conduttimetria possono essere utilizzate per rivelatori elettrochimici;
- Il **detector conduttimetrico** è usato usualmente in cromatografia ionica;
- Il detector coulombometrico e voltammetrico sono raramente usati;
- Nel **detector amperometrico** si applica un potenziale costante a un elettrodo di lavoro (es. in oro, grafite o platino), e si misura una corrente limite di diffusione a un determinato potenziale, relativamente a un elettrodo di riferimento.
- Si usa per sostanze che possono essere ridotte o ossidate nell'intervallo di potenziale dell'elettrodo di lavoro impiegato;
- Viene impiegato per rilevare sostanze biochimiche;
- Un problema è la possibilità di avvelenamento (cioè contaminazione non reversibile) delle superfici dell'elettrodo



© 2006 Wiley-VCH, Weinheim
Kellner / Analytical Chemistry
ISBN: 3-527-30590-4 Fig-21-33



A simplified method for levoglucosan quantification in wintertime atmospheric particulate matter by high performance anion-exchange chromatography coupled with pulsed amperometric detection

Andrea Piazzalunga^{ad*}, Paola Fermo^a, Vera Bernardoni^b, Roberta Vecchi^b,
Gianluigi Valli^b and Maria Antonietta De Gregorio^c

^aDepartment of Inorganic, Metallorganic and Analytical Chemistry, University of Milan, Via Venezian 21, 20133, Milan, Italy; ^bDepartment of Physics, University of Milan and INFN-Milan, Via Celoria 16, 20133 Milan, Italy; ^cEnvironmental Protection Agency of Lombardy Region, Department of Milan, Via Juvara 22, 20133 Milan, Italy; ^dDepartment of Environmental Science, University of Milan-Bicocca, Piazza della Scienza 1, 20126 Milan, Italy

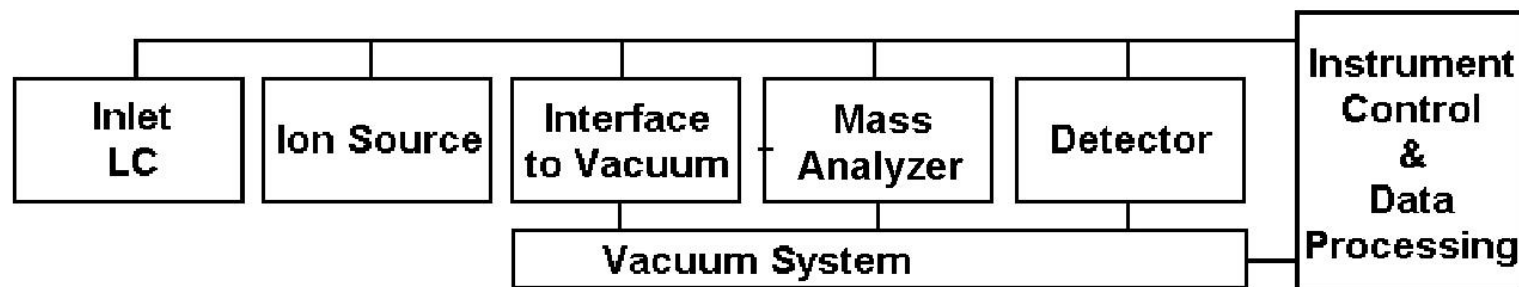
(Received 21 January 2009; final version received 6 May 2009)

Levoglucosan, a tracer for the assessment of the biomass burning contribution to atmospheric particulate matter (PM) concentrations, was determined by means of high-performance anion-exchange chromatography (HPAEC) with pulsed amperometric detection (PAD). In this work we propose a modification in the instrumental set-up aiming at an improvement in the detector response by adding NaOH after chromatographic separation to increase the pH. The comparison between this technique and the gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS) method commonly used showed good agreement. Repeatability is 4.8% RSD, limits of detection for levoglucosan, mannosan and galactosan are in the range 0.001–0.002 $\mu\text{g mL}^{-1}$ in solution, corresponding to 3–4 ng m^{-3} for 24 m^3 of air sampled. PM₁₀ samples were characterised for levoglucosan and for organic and elemental carbon contents. The preliminary results reported here for five sites in the Lombardy region (Northern Italy) are, as far as we know, the first data on levoglucosan contribution to OC in Italy. The levoglucosan concentrations observed in Lombardy vary in the range 173–963 ng m^{-3} with an average levoglucosan-C to OC ratio ranging from 1.5% to 2.5%.

Keywords: atmospheric aerosol; levoglucosan; HPAEC-PAD; anhydrosugars;

❖ Spettrometro di Massa (MS)

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



© 2006 Wiley-VCH, Weinheim
Kellner / Analytical Chemistry
ISBN: 3-527-30590-4 Fig-25-04-01

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

Per LC è necessaria una camera di rimozione del solvente (Interface to vacuum) prima di entrare nel sistema ad alto vuoto (~ 10⁻⁶ torr)

L'accoppiamento più comune di un LC è con un MS a ionizzazione elettronica spray (ESI) quale sorgente di ionizzazione, singolo quadrupolo quale analizzatore di massa e elettromoltiplicatore quale rivelatore. Altri tipi di MS sono utilizzabili.

CROMATOGRAFIA IONICA

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.

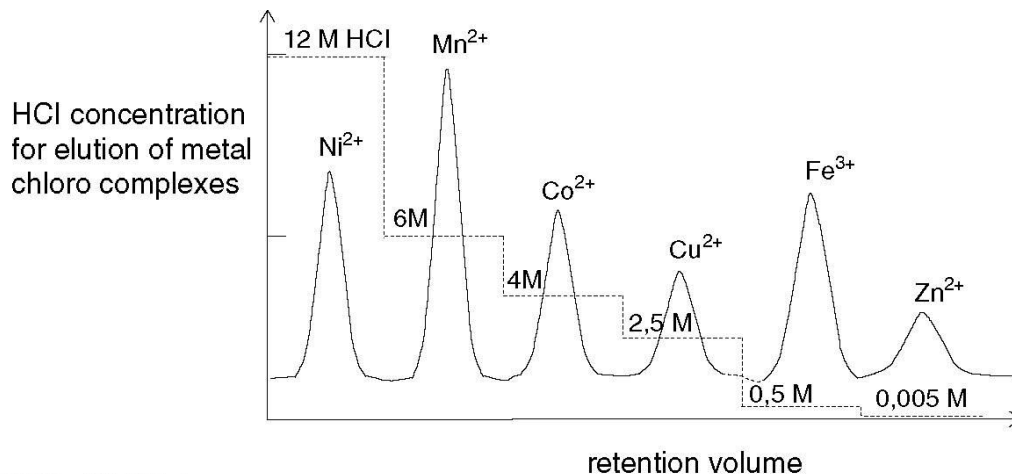
Esempio:

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

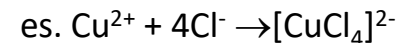
Lo scambiatore è caricato con cloruro da una soluzione 12 M di HCl, e la miscela di ioni metallici è introdotta nella colonna a questa concentrazione di acido cloridrico.

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 μ m di spessore);
2. Gel di silice poroso rivestito con scambiatori ionici liquidi

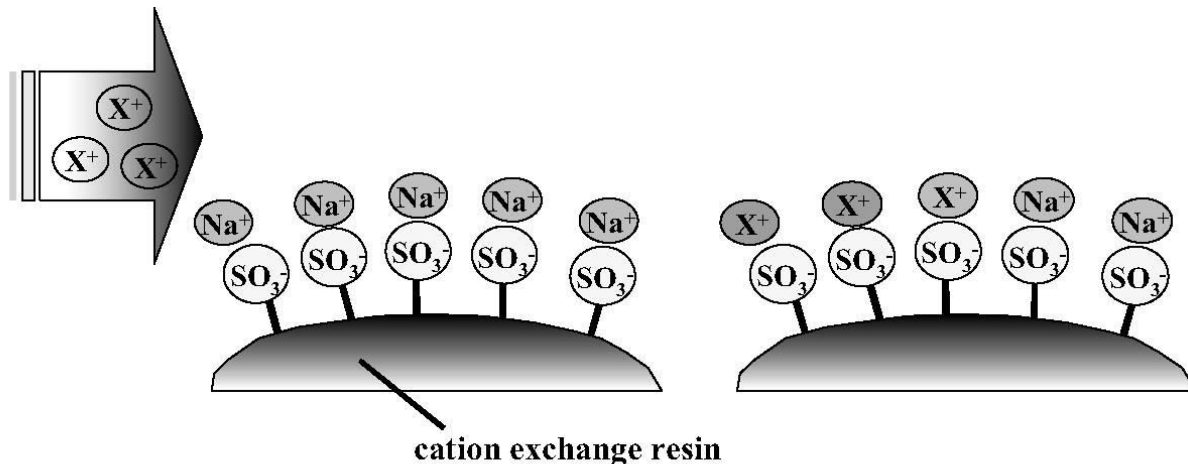
L'innovazione ha portato a processi di diffusione marcatamente migliorati rispetto a scambiatori ionici classici, anche se la capacità della colonna è diminuita.

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 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).

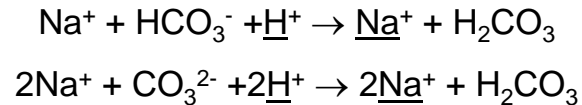


E' necessario sopprimere il segnale dell'eluente per rivelare il segnale dell'analita

➤ **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:

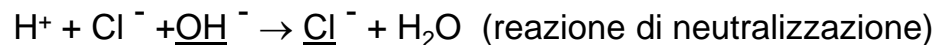
L'eluente è $\text{NaHCO}_3/\text{NaCO}_3$. Dopo che gli anioni (analiti), es. Cl^- e NO_3^- , sono stati separati dalla colonna analitica impaccata con scambiatore anionico, l'eluente reagisce nel soppressore:



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.

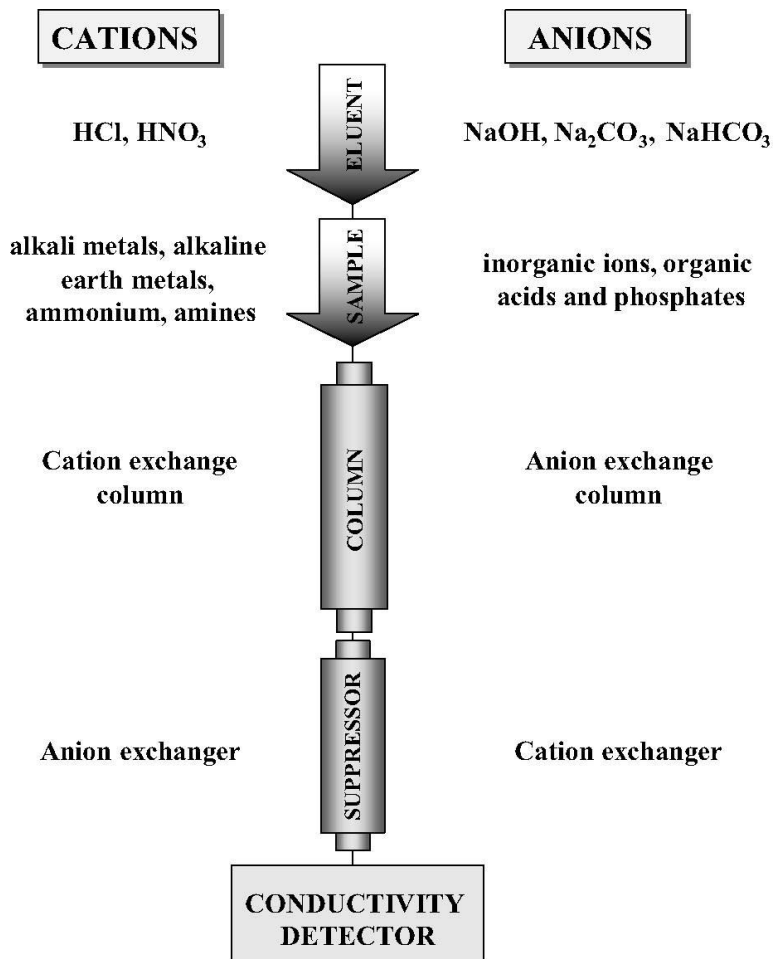
- Per determinare **cationi**, si usa uno scambiatore anionico in forma basica (OH^-) come colonna analitica:

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

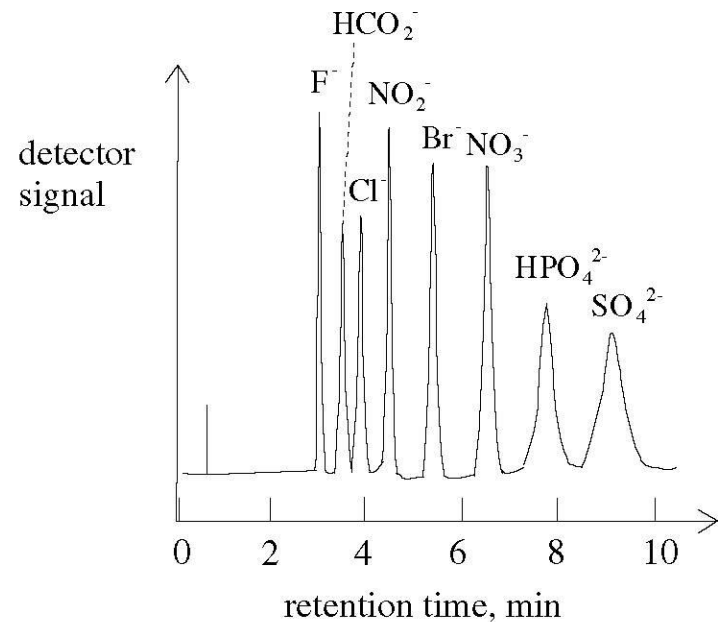


Nuovamente in soluzione rimangono solo gli ioni degli analiti come specie conduttive (es. cationi Na^+ o Mg^{2+})

segue →



Esempio: gli ioni da separare Cl⁻ e NO₃⁻ non reagiscono nel soppressore, e la loro conducibilità può quindi adesso essere rilevata (Eluente NaHCO₃ 2.8mM/NaCO₃ 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.

