

Corso di

Chimica delle Macromolecole I

Prof. R. URBANI

Dipartimento di Scienze Chimiche e Farmaceutiche
a.a. 2021-2022

Caratterizzazione di macromolecole in soluzione:

Osmometria
Cromatografia di Permeazione su Gel (GPC)

PESI MOLECOLARI

- Uno dei problemi che si presenta sempre quando si studiano polimeri è quello della determinazione del peso molecolare.
- I polimeri possono essere monodispersi o polidispersi.
- Monodispersi: tutte le catene hanno lo stesso peso molecolare (es. proteine).
- Polidispersi: le catene hanno una distribuzione di pesi molecolari (es. polimeri di sintesi). In questo caso i valori che si danno sono quelli relativi alle medie.

Caratterizzazione dei polimeri in soluzione

- Definizione delle masse molecolari medie, polidispersità
- Curve di distribuzione delle masse molecolari
- Tecniche per la determinazione delle masse molecolari medie:
 - Osmometria
 - Viscosimetria
 - Diffusione della luce
 - Centrifugazione
 - Analisi dei gruppi terminali
- Frazionamento di polimeri:
 - Esclusione sterica (SEC o GPC) (cromatografia)

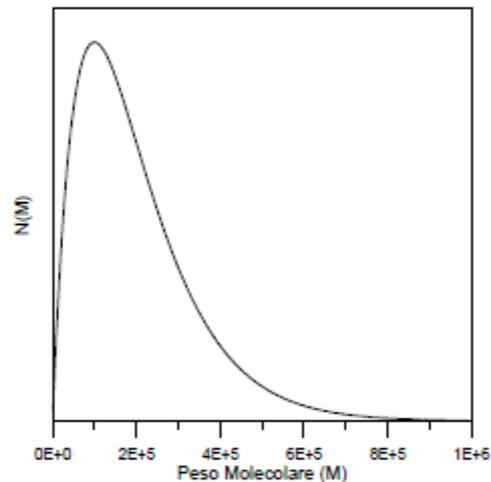
La **distribuzione** del peso molecolare dei polimeri è una **proprietà discreta o discontinua**

Ma è conveniente considerare la distribuzione dei pesi molecolari come una funzione continua normalizzata

Funzione numerica N(M):

Probabilità (Frazione numerica) di avere una catena di massa M

$$\int_0^{\infty} N(M) dM = 1 \quad \left(N(M) \equiv \frac{N_i(M)}{\sum_i N_i(M)} \right)$$



$$\int_{M_1}^{M_2} N(M) dM$$

Frazione (numerica) di macromolecole con peso molecolare compreso tra M1 e M2

Momenti di una distribuzione

$$m_k = \int_0^{\infty} M^k N(M) dM$$

$$m_k = \sum_{i=0}^{\infty} N(M_i) M_i^k$$

$$N_t = \sum_{i=0}^{\infty} N(M_i) = \int_0^{\infty} N(M) dM = m_0$$

$$\bar{M}_n = \frac{\sum_{i=0}^{\infty} N(M_i) M_i}{\sum_{i=0}^{\infty} N(M_i)} = \frac{\sum_{i=0}^{\infty} N(M_i)}{\sum_{i=0}^{\infty} N(M_i)/M_i} = \frac{\int_0^{\infty} MN(M) dM}{\int_0^{\infty} N(M) dM} = m_1/m_0$$

$$\bar{M}_w = \frac{\sum_{i=0}^{\infty} N(M_i) M_i^2}{\sum_{i=0}^{\infty} N(M_i) M_i} = \frac{\int_0^{\infty} M^2 N(M) dM}{\int_0^{\infty} MN(M) dM} = \frac{m_2}{m_1}$$

$$\bar{M}_z = \frac{\sum_{i=0}^{\infty} N(M_i) M_i^3}{\sum_{i=0}^{\infty} N(M_i) M_i^2} = \frac{\int_0^{\infty} M^3 N(M) dM}{\int_0^{\infty} M^2 N(M) dM} = \frac{m_3}{m_2}$$

$$\bar{M}_\gamma = \frac{\sum_{i=0}^{\infty} N(M_i) M_i^{1+a}}{\sum_{i=0}^{\infty} N(M_i) M_i} = \frac{\int_0^{\infty} M^{1+a} N(M) dM}{\int_0^{\infty} MN(M) dM} = \left(\frac{m_{1+a}}{m_1} \right)^{1/a}$$

• **Peso molecolare medio ponderale (Mw)**

$$M_w = \sum_{i=1}^{\infty} w_i M_i \quad \text{con} \quad w_i = \frac{N_i M_i}{\sum_{i=1}^{\infty} N_i M_i}$$

Frazione ponderale delle catene di peso M_i

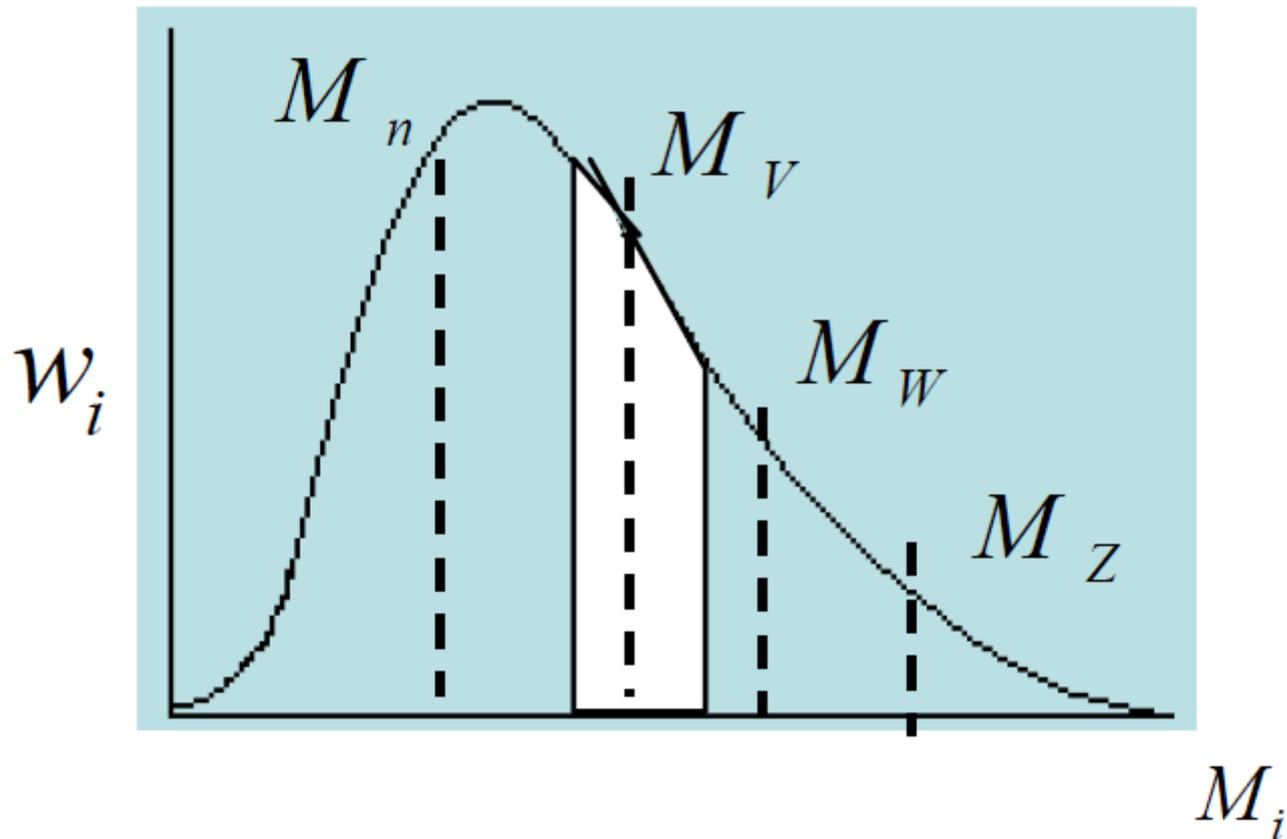
→

$$\overline{M}_w = \frac{\sum_{i=1}^{\infty} N_i M_i^2}{\sum_{i=1}^{\infty} N_i M_i}$$

E possibile generalizzare

$$M_k = \frac{\sum_{i=1}^{\infty} N_i M_i^{k+1}}{\sum_{i=1}^{\infty} N_i M_i^k}$$

Funzione di distribuzione e pesi medi



Si definisce **INDICE DI POLIDISPERSITA** il rapporto:

$$I_d = \frac{\overline{M_w}}{M_n} = 1 + \frac{\sigma_n^2}{M_n^2}$$

Con σ_n^2 la varianza della distribuzione $\sigma_n^2 = \frac{\sum_{i=1}^{\infty} N_i (M_i - \overline{M_n})^2}{\sum_{i=1}^{\infty} N_i}$

I_d fornisce una misura della larghezza della distribuzione dei pesi molecolari

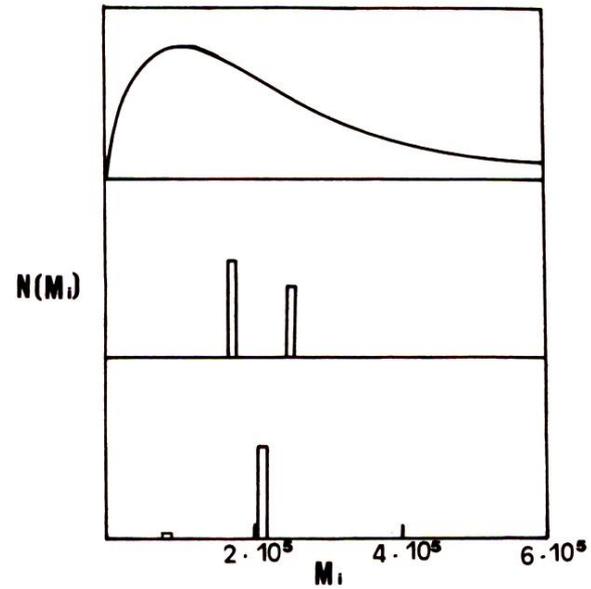
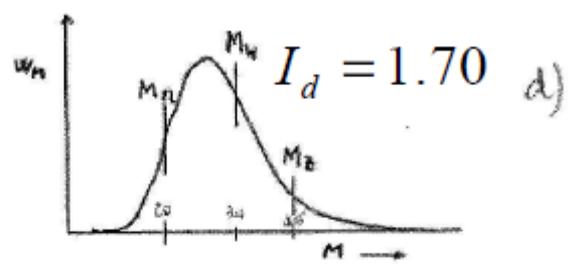
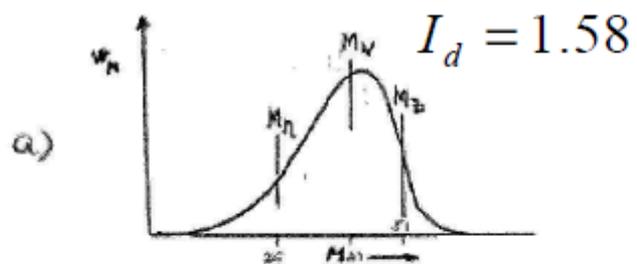
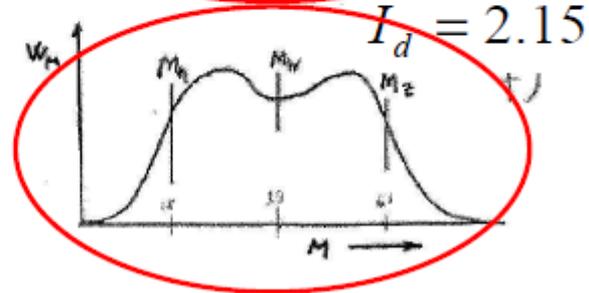
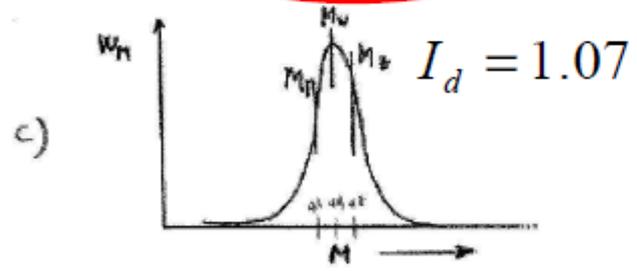
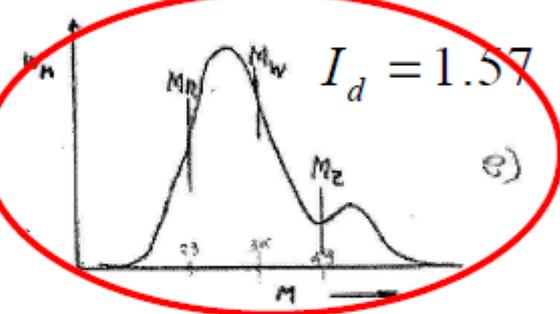
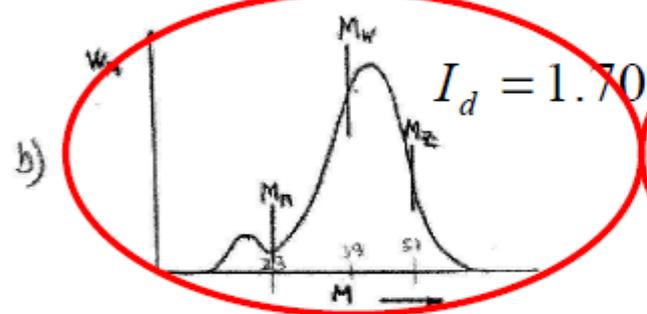


Fig. 2.1.2 - Esempi di distribuzioni di pesi molecolari aventi lo stesso valore di indice di polidispersità.

Esempi di distribuzione



$$I_d = \frac{\overline{M_w}}{M_n}$$



Distribuzione bimodale

Curve b) e e) hanno stesso M_n
 Curve b) e f) hanno stesso M_w

Metodi per la determinazione dei pesi molecolari

Determinazione dei pesi molecolari fatta con soluzioni polimeriche diluite

Determinazione pesi molecolari può essere eseguita con:

- **Metodi assoluti:** basati sulle proprietà delle soluzioni
- **Metodi relativi:** relazione tra proprietà misurata e massa molecolari stabilita attraverso tarature

Metodi assoluti:

Osmometria, diffusione della luce, analisi gruppi terminali, spettrometria di massa

Metodi relativi:

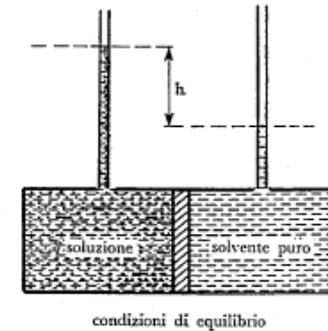
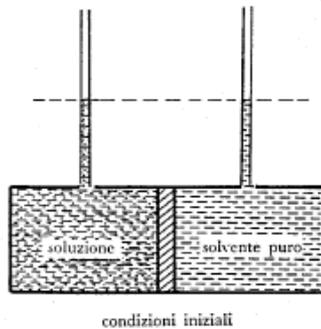
Osmometria a pressione di vapore, viscosimetria, GPC, gel elettroforesi

Il tipo di massa molecolare media ottenuta dipende dal metodo utilizzato

Metodo	Informazioni	Intervallo di applicabilità (g/mol)
Osmometria	Mn	50000-alcuni milioni
Osmometria a tensione di vapore	Mn	<30000
Analisi gruppi terminali	Mn	<15000
Diffusione della luce	Mw	20000-5x10 ⁶
Viscosimetria	M _v	15000-10 ⁶
Ultracentrifuga	Mw, Mz, MWD	2000-10 ⁷
Cromatografia a permeazione di gel (GPC)	MWD	

Osmometria a Membrana

Basata sulla misura della pressione osmotica relativa a due soluzioni con diversi concentrazione separate da una membrana semipermeabile



Potenziale chimico del solvente nella soluzione minore che nel solvente puro



Passaggio molecole di solvente attraverso la membrana

Questo aumento di pressione (pressione osmotica) ha per effetto di innalzare il potenziale chimico del solvente nella soluzione

- Aumento livello di liquido nel capillare sopra la soluzione
- Diminuzione livello di liquido nel capillare sopra il solvente

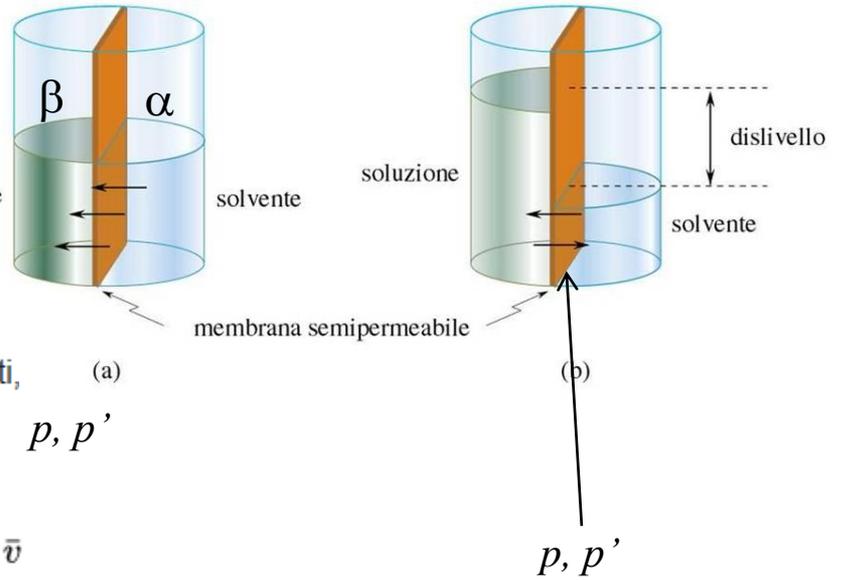
A solvente
B soluzione

$$\mu_A^\alpha = \mu_A^\beta$$

da cui:

$$\mu_A^{*\alpha} = \mu_A^{*\beta} + RT \cdot \ln(x_A)$$

$\mu_A^{*\alpha}$ e $\mu_A^{*\beta}$ si riferiscono a due pressioni differenti,



p, p'

p, p'

$$\left. \begin{aligned} dG &= VdP - SdT \\ d\mu &= \bar{v}dP - \bar{s}dT \end{aligned} \right\} \left(\frac{\partial \mu_i}{\partial p} \right)_T = \bar{v}$$

$$-RT \cdot \ln(x_A) = \int_{p'}^p v_A dP = v_A(p - p')$$

la differenza tra le pressioni p e p' è la pressione osmotica π , quindi:

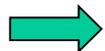
$$-RT \cdot \ln(x_A) = \int_{p'}^p v_A dP = v_A \cdot \pi$$

per soluzioni diluite, le seguenti approssimazioni sono valide:

$$\ln(x_A) = \ln(1 - x_B)$$

$$\ln(1 - x_B) = -x_B - x_B^2/2 - \dots$$

$$x_B \simeq n_B/n_A$$



$$\frac{n_B}{n_A} = \frac{v_A \cdot \pi}{RT}$$

$$\frac{n_B}{n_A} = \frac{v_A \cdot \pi}{RT}$$

$$V = n_A v_A + n_B v_B \approx n_A v_A$$

$$\pi = \frac{n_B}{n_A} \frac{RT}{v_A} = n_B \frac{RT}{V} = \frac{w_B}{M} \frac{RT}{V} = C_B \frac{RT}{M} \quad [C_B] \rightarrow w/V$$

$$\frac{\pi}{RTC} = \frac{1}{M} \quad \text{per } C \rightarrow 0, \text{ soluzione ideale}$$

Per **soluzioni reali (diluite)** la pressione osmotica è data dall'espansione del viriale:

$$\frac{\pi}{RTC} = \frac{1}{M} + A_2 C + A_3 C^2 + A_4 C^3 + \dots$$

c: concentrazione del soluto; M: peso molecolare del soluto

A_2, A_3, \dots : secondo, terzo,, coefficiente del viriale

Pressione osmotica (Π) della soluzione è pari a:

$$\Pi = g\rho h$$

g : accelerazione gravità

ρ : densità della soluzione

(considerata uguale alla densità del
solvente)

Per le soluzioni polimeriche diluite (in osmometria si usano concentrazioni $\leq 10^{-2}$ g/cc)
è possibile trascurare i termini di grado superiori al secondo

In molti casi possibile trascurare anche il termine di secondo grado

L'equazione $\frac{\Pi}{c} = RT\left(\frac{1}{M} + A_2c + A_3c^2 + A_4c^3 + \dots\right)$ è strettamente valida

per soluti monodispersi con peso molecolare M mentre i soluti polimerici hanno una distribuzione dei pesi molecolari

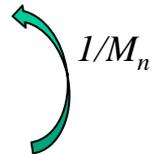
Per le molecole di peso molecolare M_i : $\frac{\Pi_i}{c_i} = \left[\frac{\Pi}{c}\right]_i = \frac{RT}{M_i}$ (al limite di $c_i=0$)

(Π_i): contributo alla pressione osmotica delle specie con M_i alla concentrazione c_i

$$\longrightarrow \Pi = \sum \Pi_i = RT \sum \frac{c_i}{M_i} \qquad C = \sum_i c_i$$

$$\frac{\pi}{C} = RT \frac{\sum_i \frac{c_i}{M_i}}{\sum_i c_i}$$

$$M_n = \frac{\sum_i N_i M_i}{\sum_i N_i} = \frac{\sum_i c_i}{\sum_i \frac{c_i}{M_i}}$$



Per soluzioni «reali» diluite

$$\frac{\pi}{RTC} = \frac{1}{M_n} + A_2C + \dots$$

$$\frac{\pi}{C} = \frac{RT}{M_n} \text{ per } C \rightarrow 0$$

$$\frac{\pi}{RTC} = \frac{1}{M_n}$$



$$\frac{\pi}{RTC} = \frac{1}{M_n} + A_2 C + \dots$$

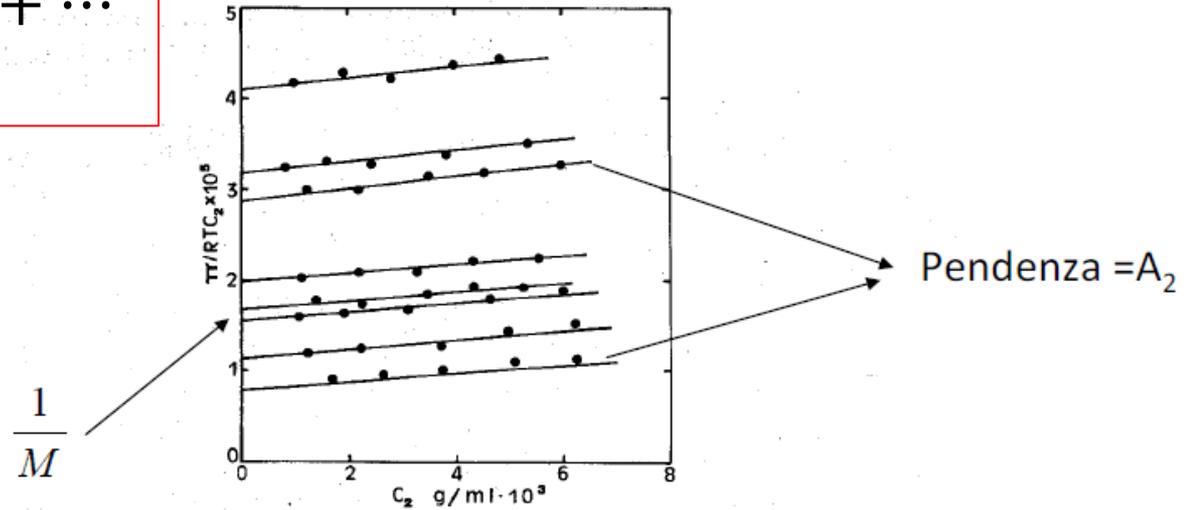
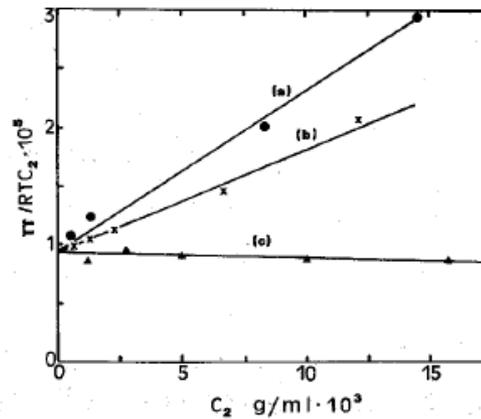


Fig. 2.2.1a - Diagramma di $\pi/RT C_2$ in funzione di C_2 (secondo l'eq. 2.2.4) per frazioni di acetato di cellulosa a diverso peso molecolare in soluzione di acetone.

Esiste una condizione sperimentale, **condizione Θ** , in cui $A_2=0$, dipendente da **solvente e temperatura**. In questa situazione si ha la compensazione delle forze attrattive e repulsive tra soluto e solvente



Cambiando solvente, la pendenza A_2 cambia ma l'intercetta $\frac{1}{M}$ rimane costante

Fig. 2.2.1b - Diagramma di $\pi/RT C_2$ in funzione di C_2 per una frazione di acetato di cellulosa in diversi solventi: 1) acetone; 2) metanolo; 3) nitrobenzene.

FRAZIONAMENTO

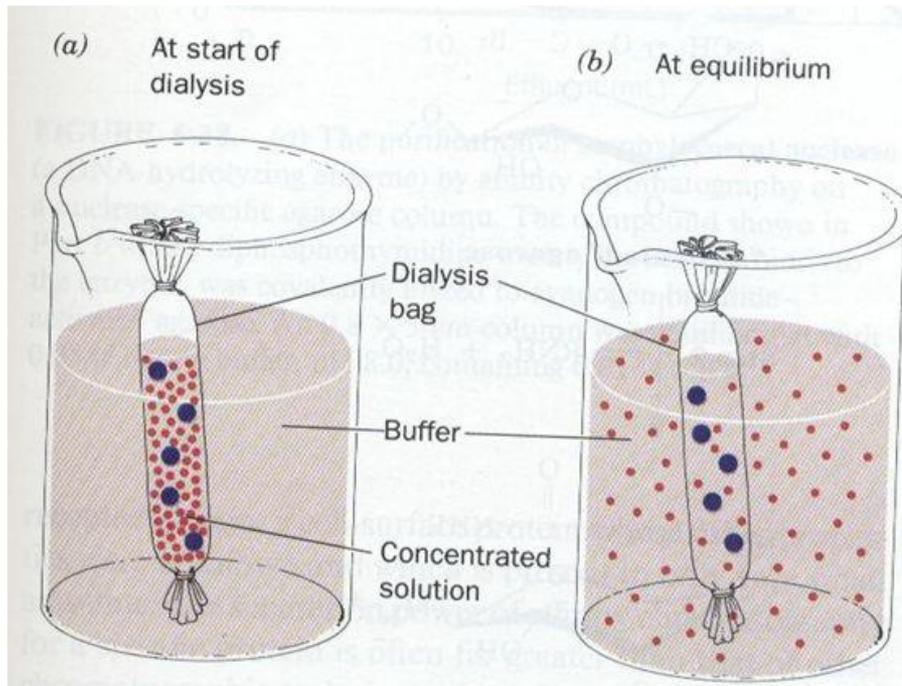
Le distribuzioni di pesi molecolari possono venire **frazionate** anche per:

- SOLUBILITA'** (solventi)
- DIMENSIONE** (ultrafiltrazione e dialisi)
- CARICA ELETTRICA** (elettroforesi, pH,...)
- AFFINITA' PER ALTRE MOLECOLE** (cosoluti)

NB: queste sono anche tecniche di PURIFICAZIONE

DIALISI

È un processo di separazione basato sull'uso di una MEMBRANA SEMIPERMEABILE



CUT-OFF: massa molecolare della più piccola proteina che la membrana è in grado di trattenere

Gel Permeation Chromatography

(GPC o SEC and HPSEC)



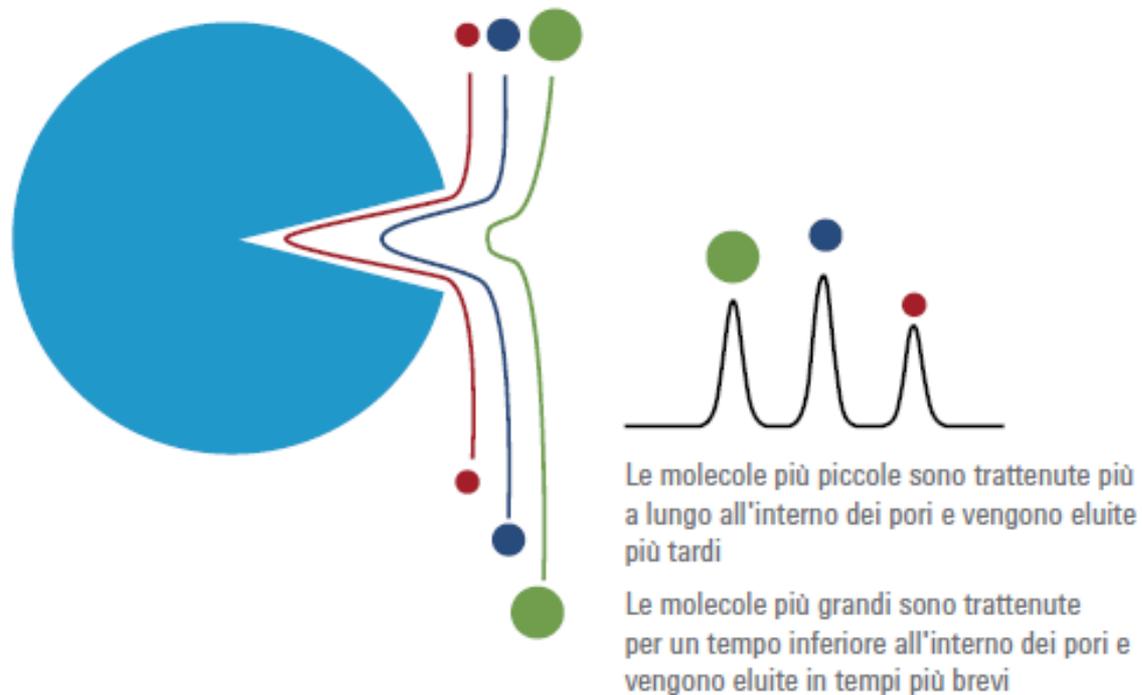
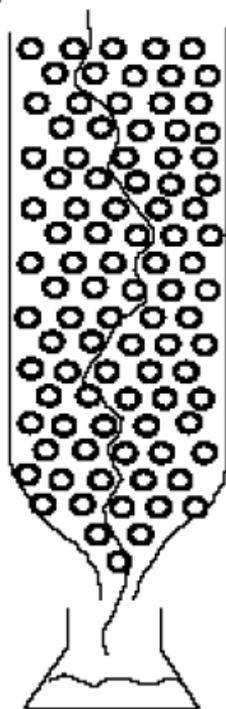


Figura 1: Le molecole penetrano nei pori della fase stazionaria in varia misura a seconda delle loro dimensioni.

La cromatografia di permeazione del gel (GPC) anche chiamata cromatografia di esclusione sterica (SEC) è un metodo di separazione in cui le **molecole sono frazionate in base alle loro dimensioni.**

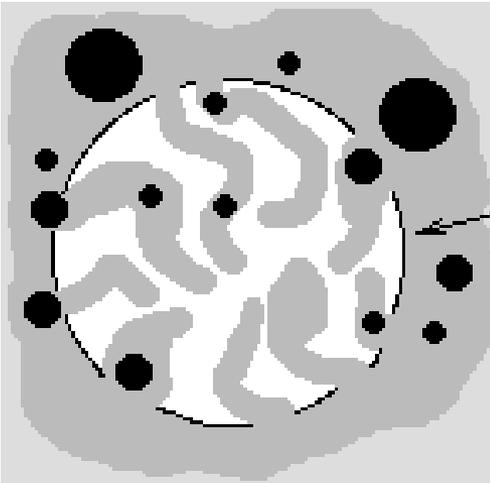
Principio:

Una soluzione polimerica viene eluita attraverso una o più colonne contenenti un impaccettamento poroso (piccole particelle costituite da un polimero con alto grado di reticolazione)

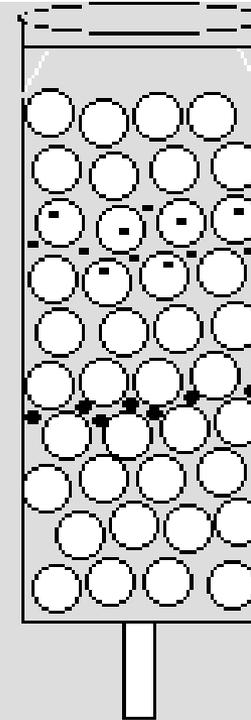
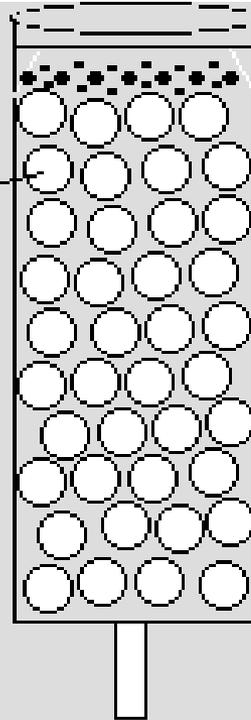


Le particelle i cui volumi idrodinamici sono più grandi delle dimensioni dei pori attraversano la colonna più rapidamente, negli interstizi tra i grani

Più piccole sono le particelle e più tempo spendono nei pori ed il loro passaggio attraverso la colonna è ritardato



Gel beads have pores in them of a defined size range which allows smaller molecules to enter but excludes molecules larger than the pore diameters.



- ← Molecules smaller than gel bead pores
- ← Molecules larger than gel bead pores

PROPRIETÀ E PRESTAZIONI DEI GEL PER SEC

Proprietà dei gel

- Limite di esclusione** Esprime la massa molare della più piccola molecola che viene esclusa dai pori di gel.
- Limite di permeazione** Esprime la massa molare della più grande molecola che può penetrare in tutto il volume interno del gel
- Intervallo di frazionamento** Intervallo delle masse molari delle molecole che vengono frazionate dal gel
- Distribuzione dei pori** Le dimensioni dei pori di un determinato gel non sono tutte uguali, ma si distribuiscono entro un intervallo

Le particelle di gel possono essere di forma irregolare oppure sferica; quella **sferica**, ovviamente, è la forma **ideale**

La qualità della separazione è tanto **migliore** quanto più **ristretto** è l'intervallo in cui si distribuiscono le dimensioni delle particelle

In genere, si usano granulometrie da 100 a 200 mesh, ma anche fino a 400 mesh

Il gel viene preparato miscelando il polimero disidratato con un solvente opportuno; questo comporta una espansione del polimero e quindi un **rigonfiamento** delle particelle. La quantità di solvente assorbita per ogni grammo di gel secco dipende dalla dimensione dei pori.

FASE STAZIONARIA

I gel sono di vari tipi: *morbidi, semirigidi e rigidi.*

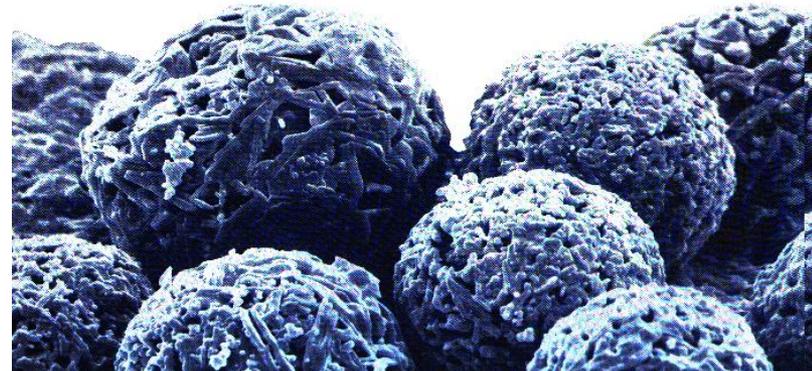
Polimeri a base di **destrano** (Sephadex)

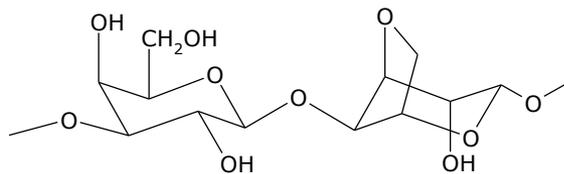
Polimeri a base di **agarosio** (Sepharose, BioGel A)

Polimeri a base di **poliacrilammide** (BioGel P)

Polimeri a base di **destrano copolimerizzato con N.N'-metilenbis-acrilammide** (Sephacryl).

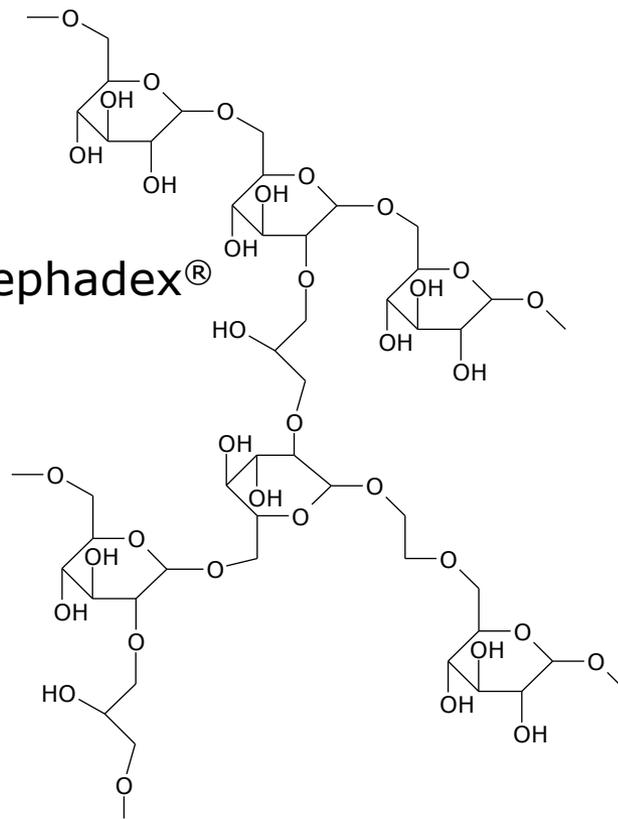
Polimeri a base di **stirene-divinilbenzene** (BioBeads-X)



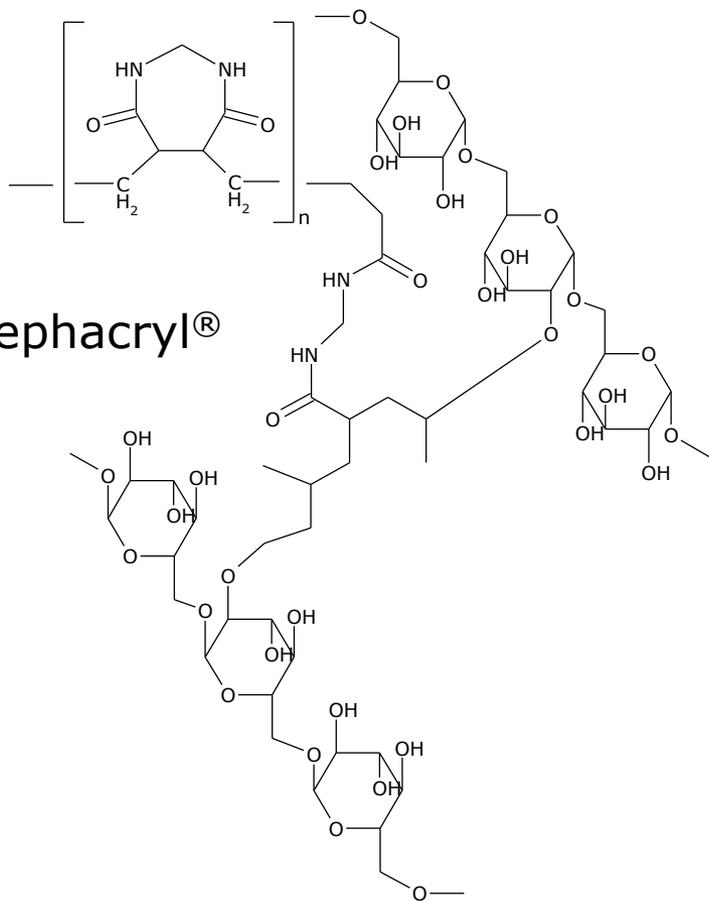


Agarosio

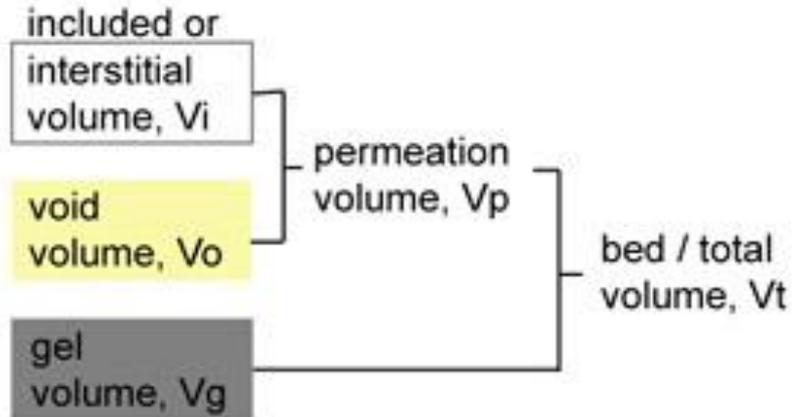
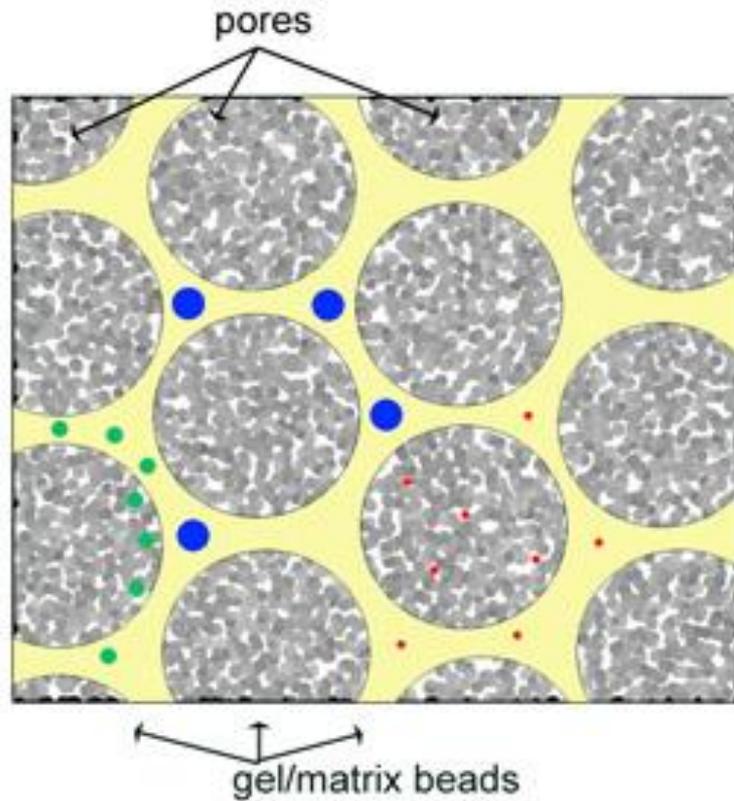
Sephadex®



Sephacryl®



<u>Nome commerciale</u>	<u>Materiale</u>	<u>Campo di frazionamento (kD)</u>
Sephadex G-10	Destrano	0.05 - 0.7
Sephadex G-25	Destrano	1 - 5
Sephadex G-50	Destrano	1 - 30
Sephadex G-100	Destrano	4 - 150
Sephadex G-200	Destrano	5 - 600
Bio-Gel P-2	Poliacrilammide	0.1 - 1.8
Bio-Gel P-6	Poliacrilammide	1 - 6
Bio-Gel P-10	Poliacrilammide	1.5 - 20
Bio-Gel P-30	Poliacrilammide	2.4 - 40
Bio-Gel P-100	Poliacrilammide	5 - 100
Bio-Gel P-300	Poliacrilammide	60 - 400
Sepharose 6B	Agarosio	10 - 4000
Sepharose 4B	Agarosio	60 - 20000
Sepharose 2B	Agarosio	70 - 40000



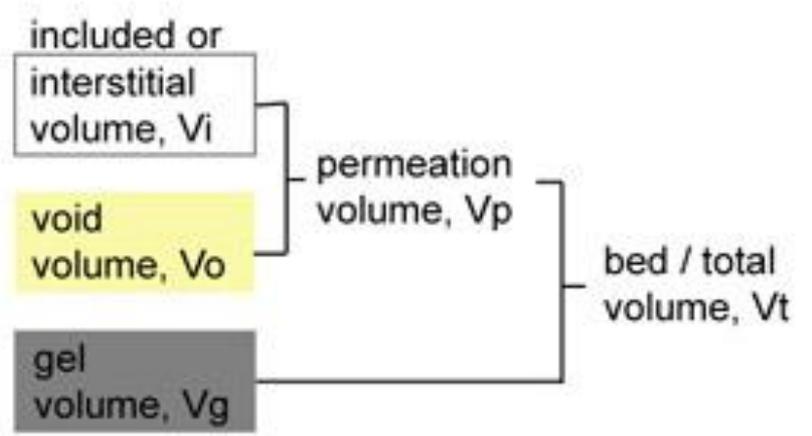
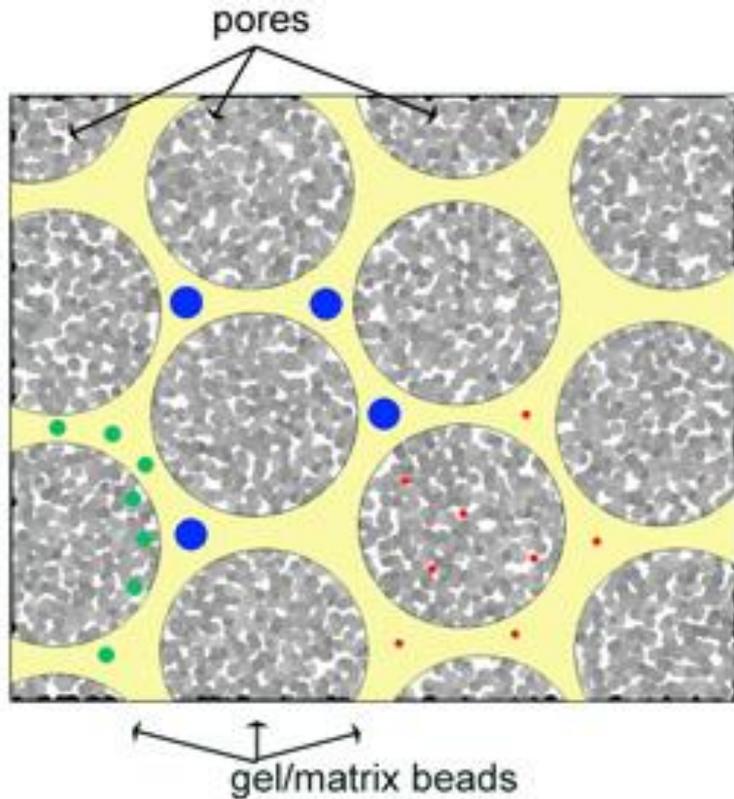
$$V_t = V_i + V_0 + V_g$$

$$V_R = V_0 + V_i K_{SEC}$$

eq. di Martin-Synge

K_{SEC} è il coefficiente di ripartizione del soluto tra la fase mobile (V_p) e la fase stazionaria V_i ($0 < K_{SEC} < 1$):

$$K_{SEC} = V_p / V_i$$



Per le molecole di dimensioni maggiori a tutti i pori, il volume di ritenzione è pari a

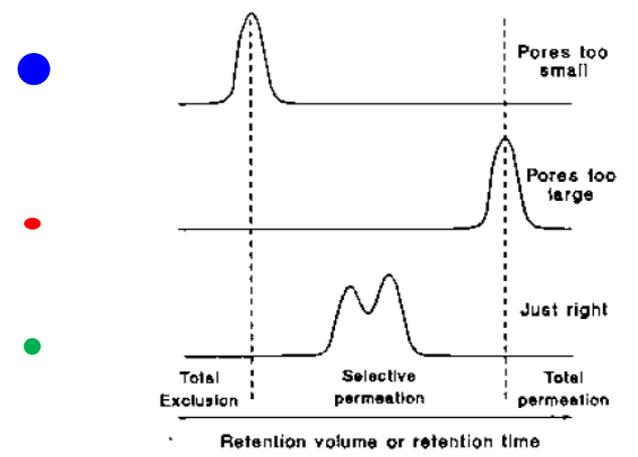
$$V_r = V_0$$

$$(K_{sec}=0)$$

Per le molecole in grado di penetrare in tutti i pori, il volume di ritenzione è pari a

$$V_r = V_0 + V_P$$

$$(K_{sec}=1)$$



Fase Mobile

Si possono usare **soluzioni acquose saline** oppure **solventi organici**.

Nella preparazione delle soluzioni saline occorre tenere sotto controllo i seguenti fattori:

In alcuni tipi di gel, soprattutto se la quantità di campione immessa in colonna è piccola, la presenza di ioni inorganici può accentuare la capacità di scambiare ioni da parte dei gruppi funzionali presenti nella matrice del gel. Per questo motivo in genere si preparano soluzioni di cloruro di sodio con forza ionica maggiore di 0,02 (fino a 0,05, in alcuni casi).

Alcune separazioni devono essere eseguite a pH ben determinati. E ogni gel ha un ben preciso campo di applicazione, al di fuori del quale possono verificarsi idrolisi o modificazioni della struttura del polimero.

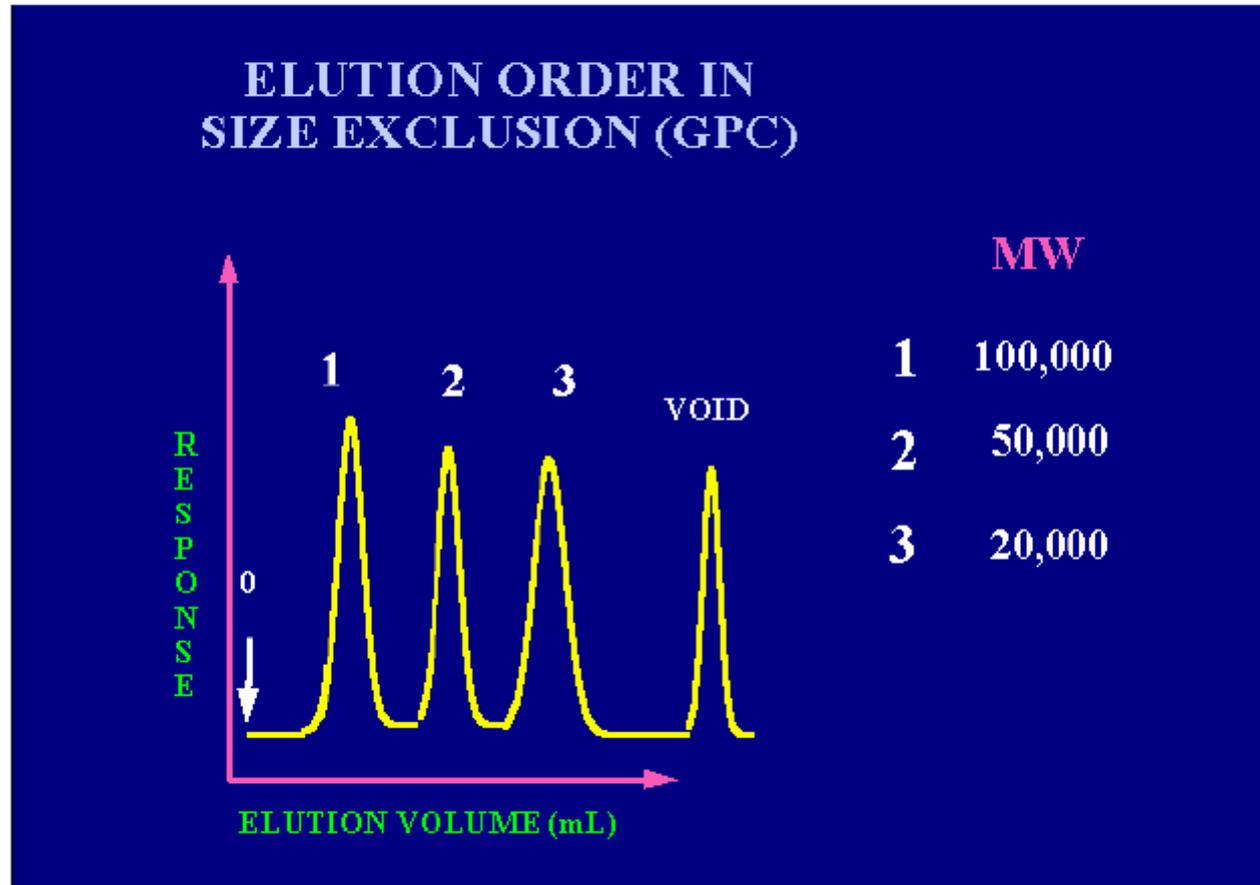
Gli agenti ossidanti devono essere evitati, perché causano modificazioni nella struttura dei polimeri.

Per evitare la formazione di bolle nella colonna, i gas disciolti nell'eluente (soprattutto CO_2) devono essere eliminati.

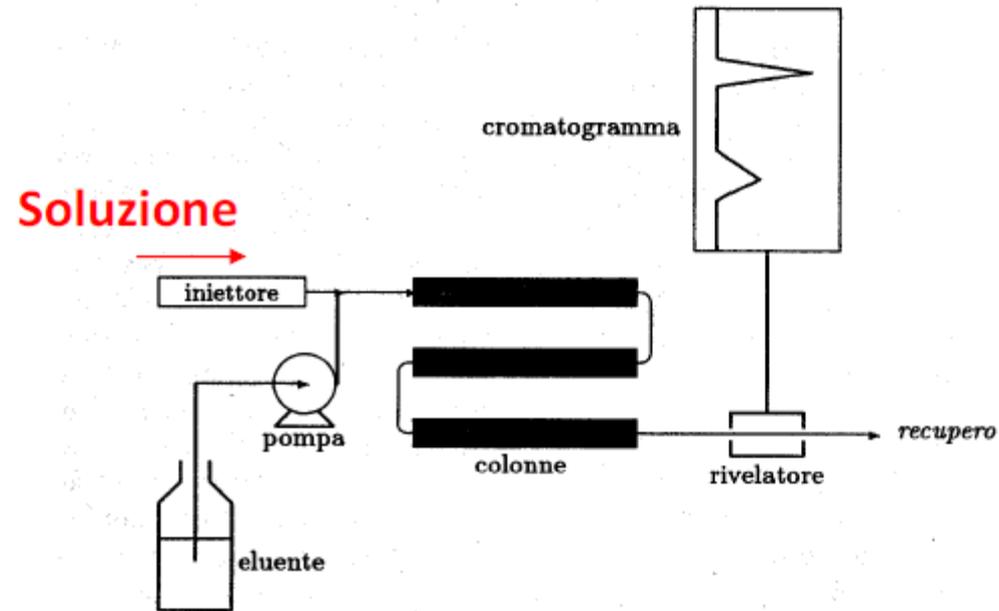
Quando le sostanze ottenute dalla separazione devono essere successivamente liofilizzate o essiccate, si usano eluenti volatili (piridina, acido acetico, acido formico) e sali che danno prodotti volatili nell'equilibrio di solubilizzazione (formiato di ammonio, idrogenocarbonato di ammonio).

I solventi organici non sono compatibili con tutti i tipi di gel.

Sequenza di eluizione nella GPC



Schema della GPC



I componenti principali sono:

- Sistema di iniezione/pompa del solvente
- Colonna di separazione
- Rilevatori

Sistema di iniezione del solvente

Deve essere capace di mantenere costante il flusso del solvente.

La pompa deve generare alte pressioni per eluire il solvente attraverso la colonna ad un flusso costante (tipicamente: $q = 1 \text{ ml/min}$).

In genere si misura il tempo di eluzione (t_r) anziché il volume

Colonna (o colonne)

Consistono in un impaccetamento di sfere rigide o semi-rigide di alta porosità

- **Sistemi acquosi:** Geli reticolati di poliacrilamide o particelle rigide di vetro o silice
- **Sistemi organici non acquosi:** Materiale più utilizzato è il polistirene altamente reticolato con o-divinilbenzene

Intervallo di dimensioni dei pori: $0.5-10^5 \text{ nm}$ che permette una misura dei pesi molecolari nell'intervallo $100-5 \times 10^7 \text{ g/mol}$.

Ogni singola colonna è efficace soltanto in un stretto intervallo di masse molecolari (1.5-2 ordini)



GPC preparativa



GPC analitica

Scelta del solvente

Il solvente deve essere in grado di sciogliere il polimero e non deve indurre “modi di separazione” secondari:

Solventi “**non buoni**” **possono indurre l’adsorbimento del polimero** sulle pareti dei pori della colonna e quindi modificare i valori dei volume di ritenzione



Buoni solventi devono essere preferiti

Rilevatori

Il volume di soluzione iniettata è di c.a. 0.05 cc con una concentrazione tipica di 2 g/L

⇒ c.a. 0.1 mg di polimero è eluito attraverso la colonna



Necessario avere detector molto sensibili

Migliori detector sono quelli UV

MA molti polimeri non assorbono nell'UV



Detector misurando l'assorbimento IR sono più appropriati ma presentano un costo elevato

Inoltre sono specifici in quanto richiedono la presenza di particolari gruppi funzionali che devono anche essere assenti nei solventi

I rivelatori più USATI sono quelli basati sulla misura dell'INDICE DI RIFRAZIONE
che misurano in continuo la differenza d'indice di rifrazione tra l'eluente puro
e la soluzione che eluisce dalla colonna

Rivelatori a diffusione della luce

L'intensità della luce diffusa dalla soluzione viene misurata ad un angolo molto piccolo tra 2° e 6° (**sistemi LALS, Low Angle Laser Scattering**) o a angoli diversi equidistanti (**sistemi MALLS, Multiple Angle Laser Light Scattering**)

Per soluzioni molto diluite a $q \propto \theta \sim 0$:

$$\Delta R_{\theta} = KcM$$

Misurando c mediante un rivelatore di concentrazione e conoscendo la costante ottica K si ottiene direttamente la distribuzione $w(M)$

Indice di rifrazione

Quando un fascio di luce passa da un mezzo a un altro, la velocità e la direzione delle onde cambiano. Il cambio di direzione è noto come rifrazione. La relazione tra angolo di incidenza e angolo di rifrazione è espressa dalla legge di rifrazione di Snell.

$$n = \frac{n_2}{n_1} = \frac{\sin \alpha_1}{\sin \alpha_2}$$

In cui:

- n - indice di rifrazione del mezzo 1 rispetto al mezzo 2
- n_2 - indice di rifrazione del mezzo 2
- n_1 - indice di rifrazione del mezzo 1
- α_1 - angolo della luce incidente nel mezzo 1
- α_2 - angolo di rifrazione nel mezzo 2

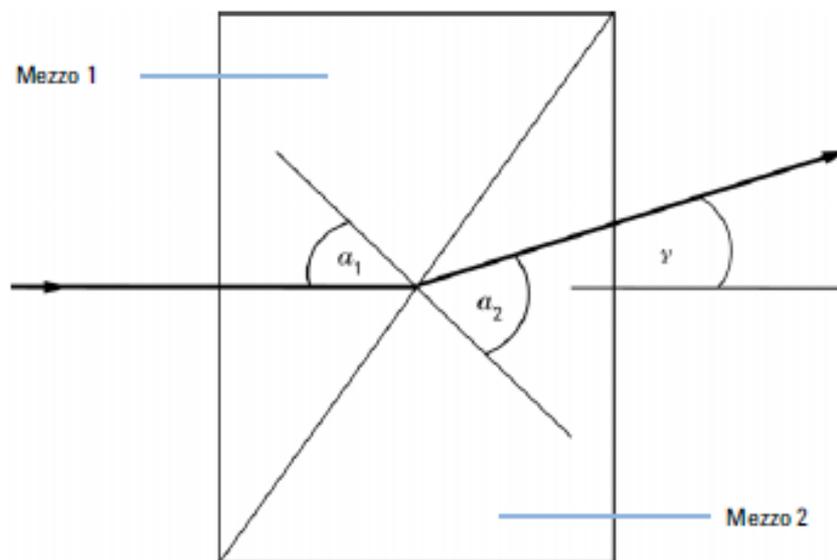


Figura 2 Rifrazione della luce

In base alla formula riportata di seguito, piccoli angoli di deflessione esterna sono proporzionali alla differenza tra gli indici di rifrazione dei mezzi 1 e 2.

$$\tan \gamma = \frac{n_1 - n_2}{n_1}$$

In cui:

- γ - angolo di deflessione esterna
- n_2 - indice di rifrazione del mezzo 2
- n_1 - indice di rifrazione del mezzo 1

Fattori che influiscono sull'indice di rifrazione

L'indice di rifrazione di un mezzo è influenzato da numerosi fattori.

1 Lunghezza d'onda

L'indice di rifrazione varia al variare della lunghezza d'onda del fascio di luce incidente.

2 Densità

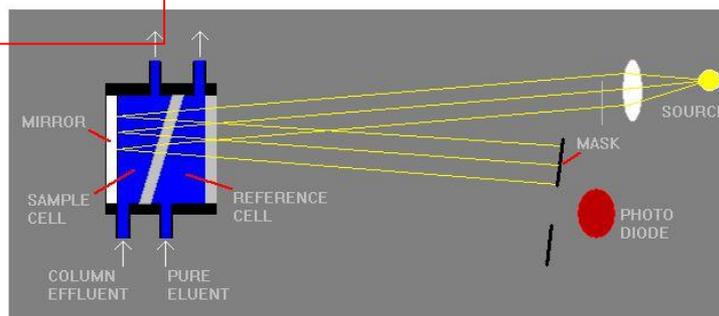
Al variare della densità del mezzo varia anche l'indice di rifrazione. Se la lunghezza d'onda della luce incidente è fissa, le variazioni dell'indice di rifrazione sono in genere lineari rispetto alle variazioni di densità del mezzo.

La densità di un mezzo è influenzata dai seguenti fattori:

- Composizione (se non si tratta di una sostanza pura)
- Temperatura
- Pressione



Rivelatore a indice di rifrazione

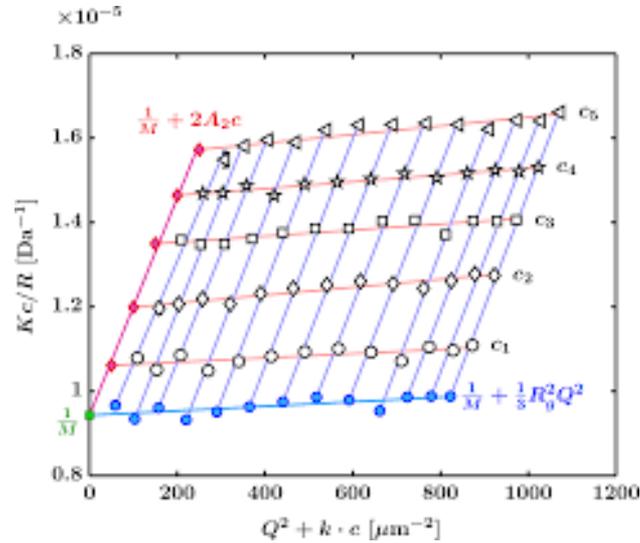


Il rivelatore a indice di rifrazione misura la differenza nell'indice di rifrazione tra la cella del campione e una cella di riferimento che generalmente contiene soltanto l'eluente. Si utilizza un fascio di luce collimato e filtrato per rimuovere la luce IR che riscalderebbe il campione. Quando l'eluente contenente l'analita entra nella cella del campione, il raggio viene deflesso e inviato al fotodiode producendo un segnale in uscita differente rispetto a quello prodotto dal solo eluente.

LALS

Low Angle Laser Light Scattering

$$\frac{Kc}{\Delta R(\theta, c)} = \frac{1}{M_w} \left(1 + \frac{q^2 R_g^2}{3} + O(q^4) \right) + 2A_2c + O(c^2)$$



con $K = 4\pi^2 n_0^2 (dn/dc)^2 / N_A \lambda^4$

$$\Delta R(\theta, c) = R_A(\theta) - R_0(\theta)$$

$$R(\theta) = \frac{I_A(\theta)n_0^2}{I_T(\theta)n_T^2} \frac{R_T}{N(\theta)}$$

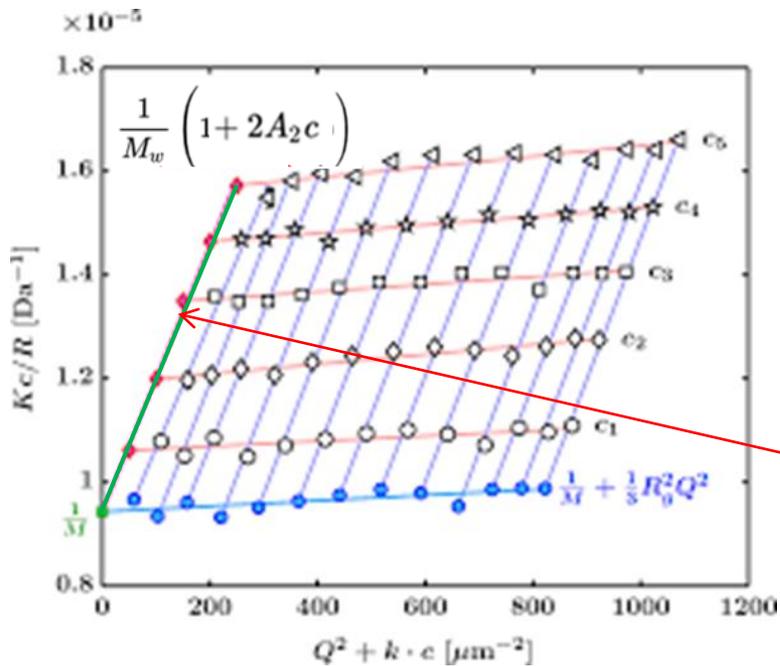
$$q = 4\pi n_0 \sin(\theta/2) / \lambda$$

$$\frac{Kc}{\Delta R(\theta, c)} = \frac{1}{M_w} \left(1 + \frac{q^2 R_g^2}{3} \right) + 2A_2c$$

LALS

Low Angle Laser Light Scattering

$$q \rightarrow 0 \quad \frac{Kc}{\Delta R(\theta, c)} = \frac{1}{M_w} (1 + 2A_2c)$$



Rivelatore LALS
 $\theta=3-6^\circ$

Rivelatori viscosimetrici

Funzionamento basato sulla relazione tra la viscosità che fluisce in un capillare e la pressione esercita sulle par

La determinazione del **rapporto tra la pressione esercita durante il passaggio della soluzione e durante il passaggio del solvente** permette di ottenere la viscosità relativa dalla quale la viscosità specifica può essere calcolata.

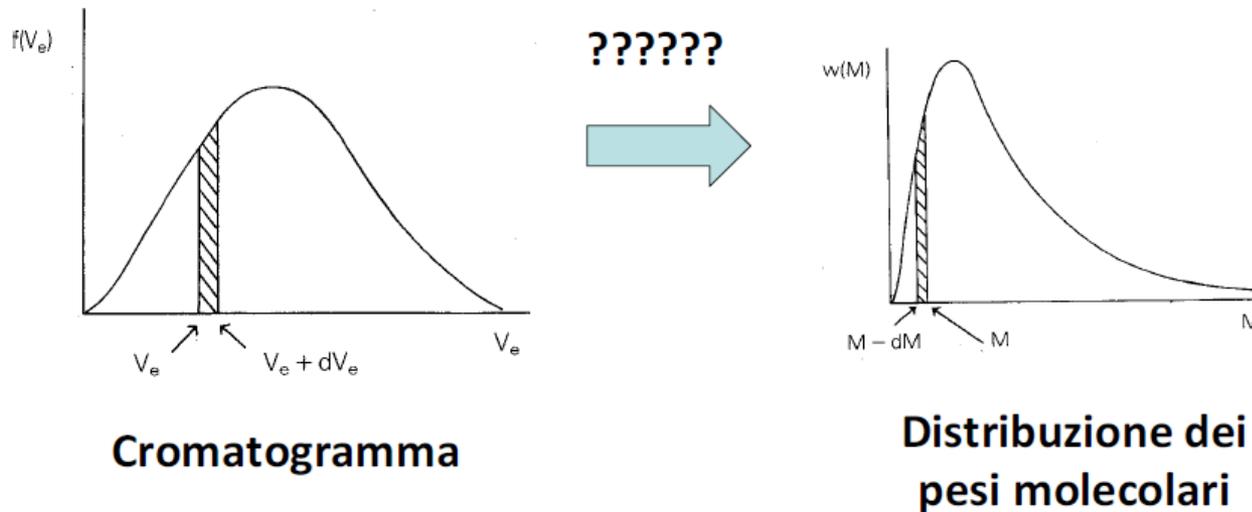
Per una soluzione molto diluita:

$$\eta_{sp} = c[\eta] \quad \curvearrowright \quad [\eta] = KM_v^a$$

La determinazione di c mediante un rivelatore di concentrazione e la conoscenza delle costanti di Mark-Houwink permettono di determinare la distribuzione w(M)

Rivelatori viscosimetrici e di diffusione della luce combinati a detector di indice di rifrazione permettono di evitare il ricorso alla calibrazione

Il rivelatore permette di costruire il cromatogramma ossia la variazione della concentrazione in funzione del volume o tempo di ritenzione

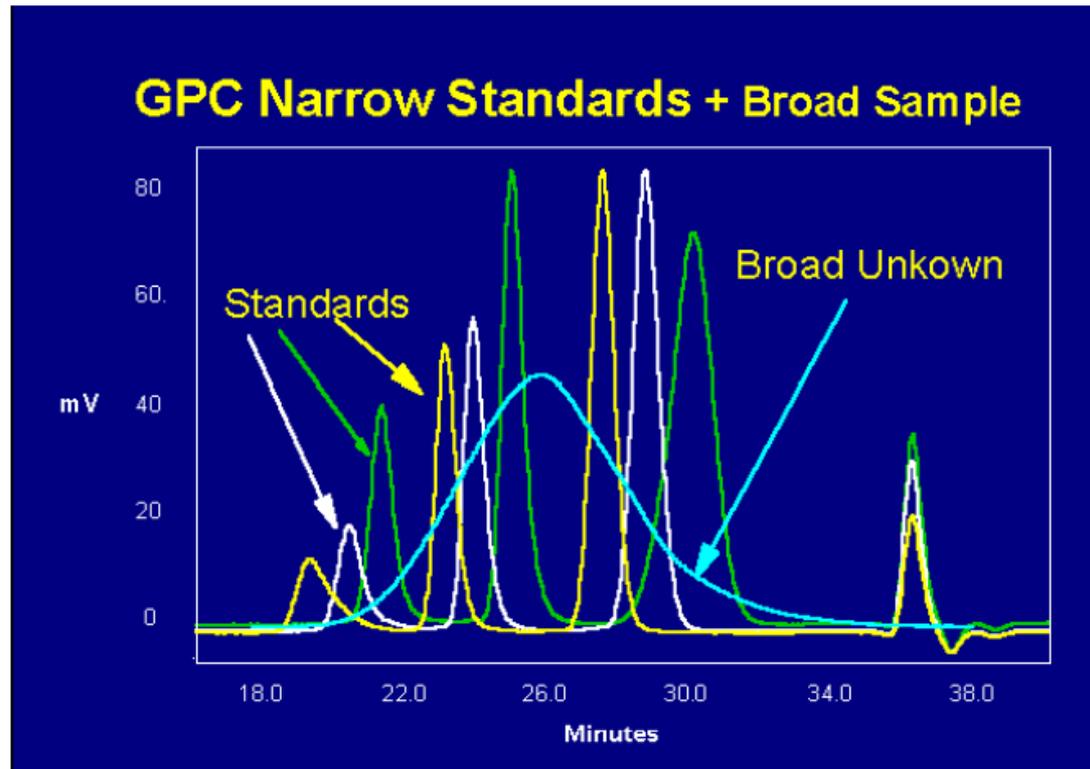


Per poter trasformare il cromatogramma in una distribuzione dei pesi molecolari occorre stabilire la relazione tra volume di ritenzione e peso molecolare

Necessario una taratura o calibrazione della colonna

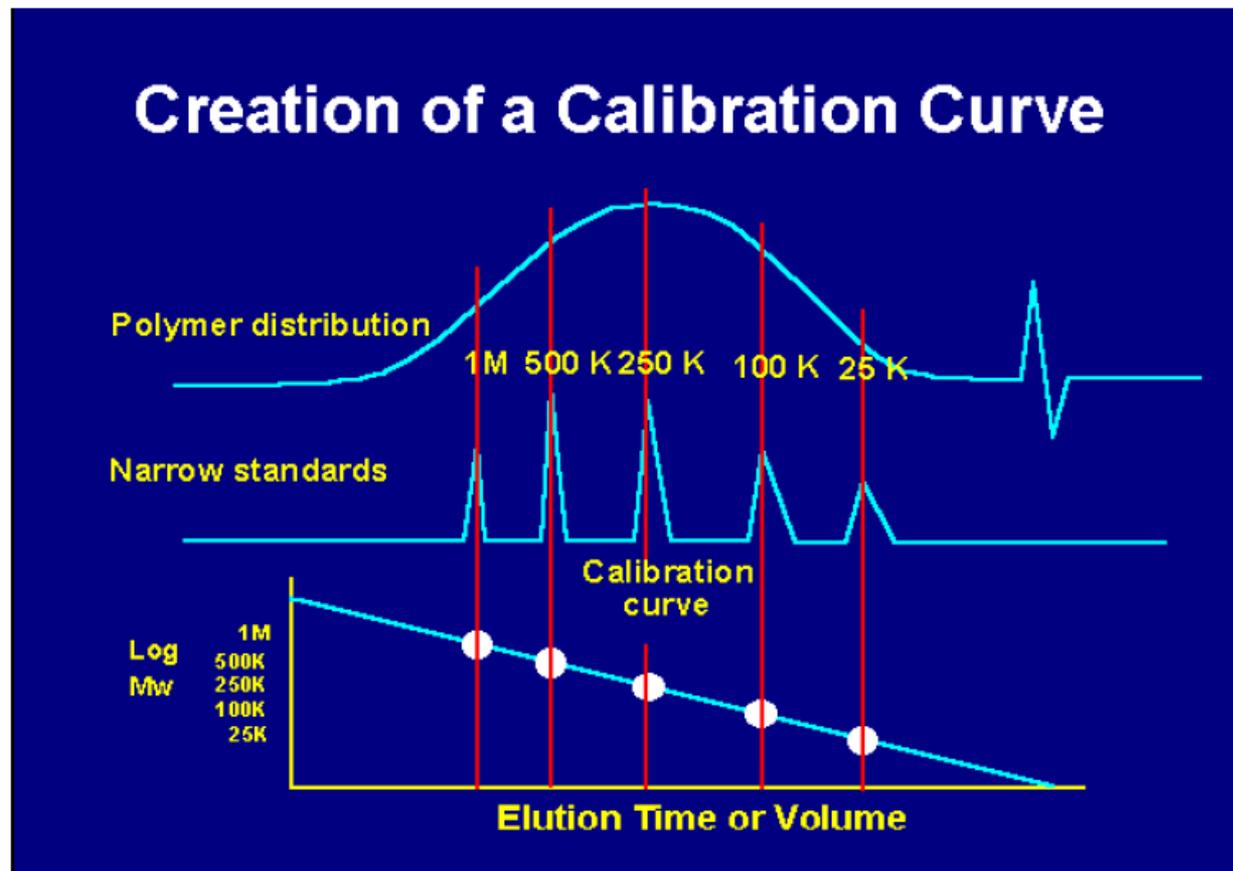
Calibrazione GPC

Realizzata con campioni standard di **massa molecolare nota e stretta**



Campioni standard (commerciali) sono di solito a base di polistirene con MW da 2.9 milioni a 3000 u.m.a.

Preparazione di una curva di calibrazione (considerazioni generali)



N.B.

Problema della calibrazione

La calibrazione non è solo caratteristica della colonna/GPC ma anche del tipo di polimero usato per costruirla.

Calibrazione può essere utilizzata soltanto per lo stesso sistema polimero/solvente/colonna

Inoltre ad eccezione dei polimeri comuni, polimeri standards utilizzabili per la calibrazione non sono disponibili per molti polimeri

Gli standard dovrebbero essere disciolti nella fase mobile e ci si dovrebbe assicurare che il campione sia completamente disciolto. Se la soluzione appare torbida sarà necessario prendere ulteriori provvedimenti. Per rimuovere materiali insolubili prima dell'iniezione si dovrebbe procedere alla centrifugazione o alla filtrazione

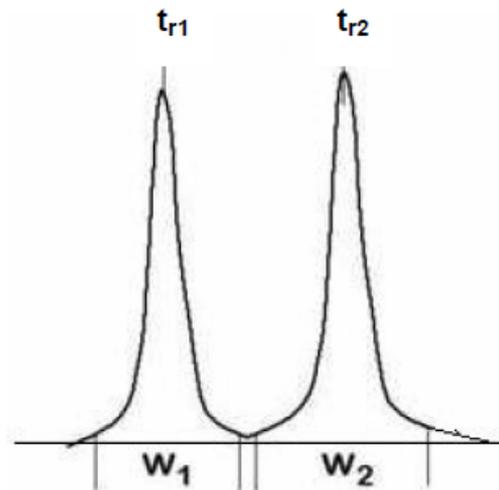
del campione. Tuttavia, potrebbe essere necessario prendere in considerazione condizioni alternative della fase mobile che migliorino la solubilità del campione, poiché i processi fisici potrebbero alterare la valutazione del peso molecolare.

Parametri per valutare la qualità delle separazioni

1. Risoluzione, R

E' una grandezza che viene calcolata dal cromatogramma, e permette di caratterizzare la separazione di due picchi cromatografici. Questo è importante per poter identificare e quantificare esattamente due sostanze.

$$R = \frac{t_{r2} - t_{r1}}{\frac{W_1 + W_2}{2}} = \frac{2\Delta t}{W_1 + W_2}$$



t_{r1} e t_{r2} = tempi di ritenzione per le specie 1 e 2

W_1 e W_2 = larghezze dei picchi 1 e 2 misurate al punto di intersezione delle tangenti coi flessi del picco con la linea di base

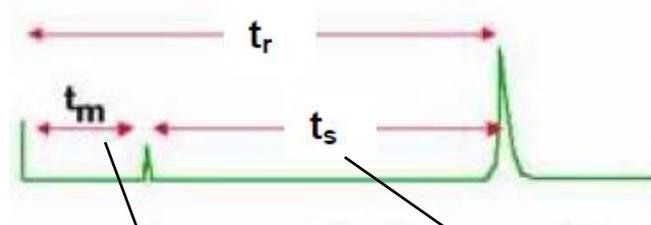


una completa separazione dei picchi è ottenuta per $R > 1.5$.

2. Selettività, α

$$\alpha = \frac{t_{r2} - t_m}{t_{r1} - t_m}$$

misura la separazione relativa di due picchi



tempo richiesto da un composto che non interagisce (non trattenuto) con la fase stazionaria per essere eluito

tempo che il soluto trascorre nella fase stazionaria prima di essere eluito

3. Fattore di capacità, k'

$$k' = \frac{M_s}{M_m} = \frac{c_s V_s}{c_m V_m} = \frac{V_s}{V_m} K_D$$

$$k' = \frac{t_R - t_M}{t_M}$$

⇒ Piccoli valori di k' implicano che i composti eluiscono in prossimità del volume morto e di conseguenza la separazione è scarsa.

⇒ Elevati valori di k' indicano una buona separazione, ma anche tempi di analisi lunghi cui si associa una riduzione di sensibilità e un allargamento del picco.

Valori ottimali di k' : $0 > k' < 15$.

Il piatto teorico

Sebbene la cromatografia sia un processo in continuo, si può immaginare che la colonna sia divisa in N sezioni, in ciascuna delle quali viene raggiunto l'equilibrio tra fase stazionaria e fase mobile. Ognuna di queste sezioni è un **piatto teorico**. Se la lunghezza totale della colonna è L , l'**altezza equivalente a un piatto teorico (HETP)** è:

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

- Per convenzione l'efficienza di una colonna è espressa in N piatti teorici.
- Tanto maggiore è il numero di piatti teorici, tanto maggiore è l'efficienza della colonna.
- L'efficienza di una colonna dipende dal fatto che i picchi siano più o meno allargati, picchi stretti danno una buona separazione.
- Essendo l'altezza del piatto equivalente correlata ad N , maggiore è N , minore è $HETP$, e maggiore è l'efficienza della colonna.

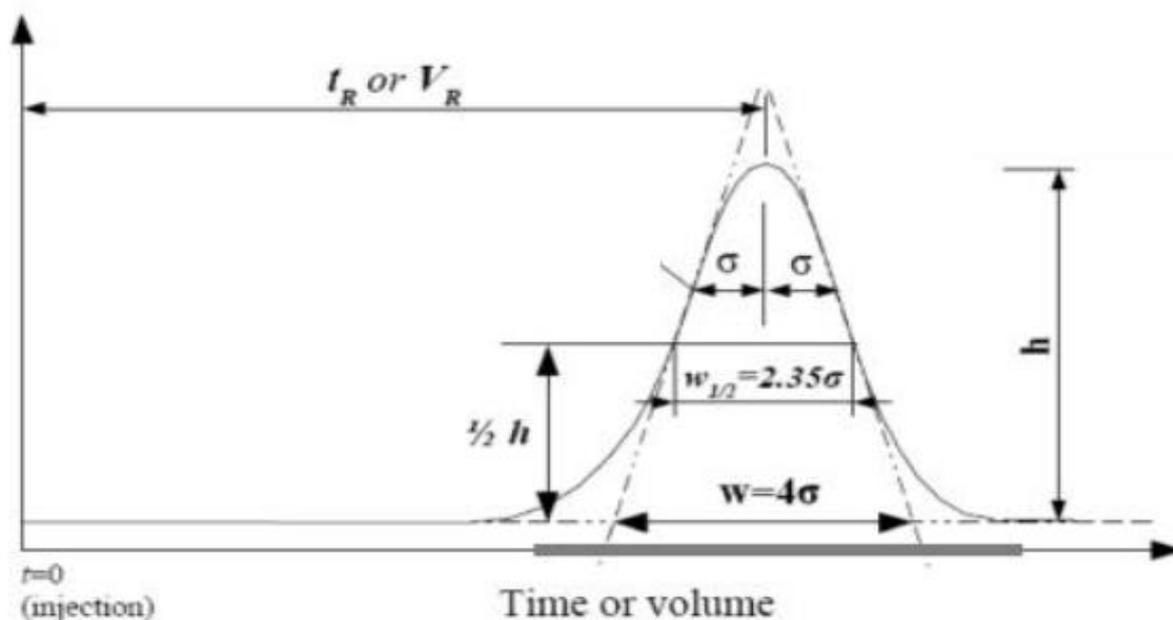
Non è raro che una colonna cromatografica possieda diverse migliaia di piatti teorici.

Es.

Se una colonna di 1m possiede 10^4 piatti teorici, $HETP = 1 \text{ m} / 10^4 = 10^{-4} \text{ m}$

Proprietà dei picchi gaussiani

L'andamento delle bande d'eluizione o picchi cromatografici è generalmente di tipo gaussiano:



L'ampiezza di una banda gaussiana è proporzionale alla deviazione standard della banda.

L'ampiezza di banda alla linea di base, W , è definita come 4σ , dove σ è la deviazione standard.

Misurando il tempo di ritenzione e la larghezza di banda (in unità di tempo) si ricava il numero dei piatti teorici:

$$N = \frac{t_r^2}{\sigma^2} = 16 \frac{t_r^2}{W^2} = 5.54 \left(\frac{t}{W_{1/2}} \right)^2 \quad N = (V_{Ri} / \sigma_i)^2$$

ESEMPIO 1

Lunghezza della colonna è 30 m (L), la specie viene eluita dalla colonna dopo 10 min, con la banda larga $w_{1/2} = 5$ s.

Calcola numero di piatti teorici e altezza del piatto.

$$N = \frac{5.55t_r^2}{w_{1/2}^2} = \frac{5.55(10 \text{ min})^2}{\left(5 \text{ sec} \cdot \frac{1 \text{ min}}{60 \text{ sec}}\right)^2} = 79,920 \text{ plates}$$

$$H = \frac{L}{N} = \frac{30 \text{ meters} \cdot 1000 \text{ mm}}{79,920 \cdot 1 \text{ m}} = .375 \text{ mm}$$

ESEMPIO 2

Lunghezza della colonna è 25 cm. La specie viene eluita dalla colonna dopo 10 min con $w_{1/2}$ 5 secondi.

Calcola numero di piatti teorici e altezza del piatto.

$$N = \frac{5.55t_r^2}{w_{1/2}^2} = \frac{5.55(10 \text{ min})^2}{\left(5 \text{ sec} \cdot \frac{1 \text{ min}}{60 \text{ sec}}\right)^2} = 79,920 \text{ plates}$$

$$H = \frac{L}{N} = \frac{25 \text{ cm} \cdot 10 \text{ mm}}{79,920 \cdot 1 \text{ m}} = .0125 \text{ mm}$$

In base a questa relazione la risoluzione può essere calcolata dai parametri di selettività (α), capacità (k') e numero dei piatti teorici (N):

$$R = \frac{\Delta t_r}{W}$$

$$k' = \frac{V_r - V_m}{V_m} = \frac{t_r - t_m}{t_m}$$

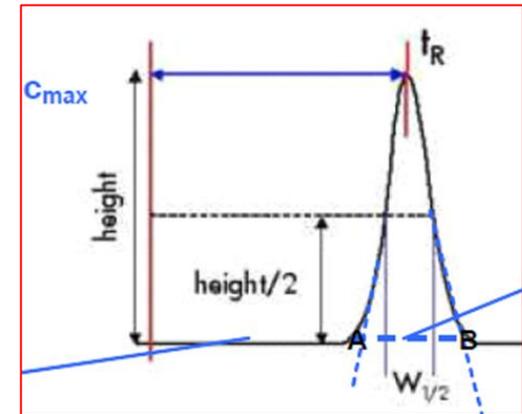


$$t_r = t_m(k' + 1)$$

$$N = \frac{t_r^2}{\sigma^2} = 16 \frac{t_r^2}{W^2} = 5.54 \left(\frac{t}{W_{1/2}} \right)^2$$



$$W = 4 \frac{t_r}{\sqrt{N}}$$



$$\alpha = \frac{t_{r2} - t_m}{t_{r1} - t_m}$$

$$R = \frac{1}{4} \sqrt{N} \left(\frac{\alpha - 1}{\alpha} \right) \left(\frac{k'}{k' + 1} \right)$$

Efficienza della
colonna

Selettività

Capacità

R si può migliorare aumentando N , cioè cercando di diminuire la larghezza del picco cromatografico:

- diminuendo le dimensioni delle particelle
- diminuendo la viscosità dell'eluente
- aumentando la temperatura (aumenta la velocità del trasferimento di massa)



Non si deve aumentare troppo la lunghezza della colonna (tempi di separazione troppo lunghi)

Allargamento delle bande cromatografiche

È misurato dal numero di piatti teorici nel processo cromatografico considerato, ed è dovuto al fatto che le molecole di analita, pur uguali fra di loro, e quindi con uguale K_D , possono trascorrere tempi differenti all'interno della colonna, per varie ragioni.

Un modo conveniente per riassumere tali ragioni è presentato dall'**equazione di van Deemter**, secondo cui l'altezza equivalente del piatto teorico in funzione della velocità lineare u della fase mobile è data:

$$HETP = A + \frac{B}{u} + Cu \rightarrow \text{Resistenza al trasferimento di massa}$$

Diffusione longitudinale

u = velocità lineare della fase mobile

Diffusione vorticosa

I tre termini dell'equazione di van Deemter corrispondono alle diverse cause di allargamento del picco cromatografico:

Tutti i fattori elencati contribuiscono a migliorare il processo cromatografico, se diminuiscono, in quanto fanno diminuire l'altezza del piatto teorico, e quindi il numero dei piatti teorici.

$$A = 2d_p \lambda$$

d_p = diametro delle particelle impaccate
 λ = misura dell'irregolarità dell'impaccamento

$$B = 2\gamma D_m \frac{1}{u}$$

D_m = coefficiente di diffusione del soluto nella fase mobile
 γ = fattore di ostruzione o tortuosità

$$C = C_f + C_p$$

- termine dovuto al trasferimento di massa nelle due fasi, che è spesso il fattore dominante nella deformazione del picco

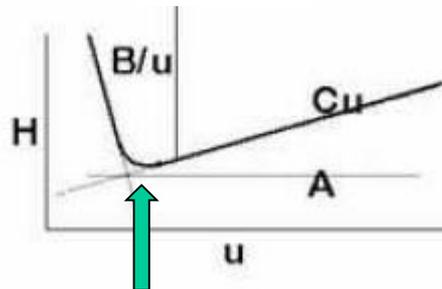
$$C_f = \frac{fp(1-p)d_f^2}{D_f} u$$

C_f = diffusione nel film

$$C_p = \frac{\omega d_p^2}{D_m} u$$

C_p = diffusione all'interno della particella

Riportando in grafico l'equazione di Van Deemter ($HETP$ vs u) si ottiene una funzione iperbolica:



- a velocità estremamente basse, il termine B/u dà il maggior contributo all' $HETP$
- a velocità elevate diventa importante il termine Cu
- l'impiego di particelle di piccole dimensioni diminuisce anche il termine A

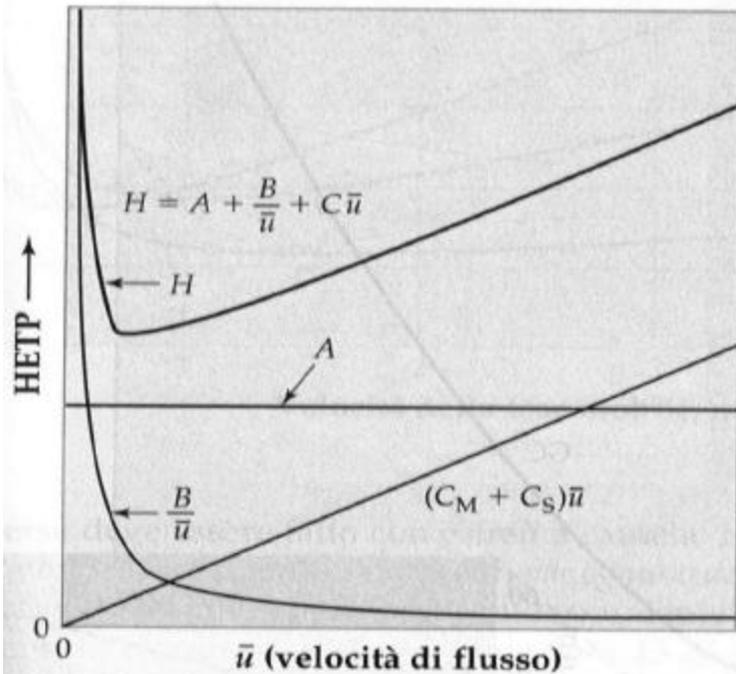
La velocità di flusso ottimale è quella che corrisponde al minimo della curva.

L'equazione di van Deemter permette quindi di ottimizzare il processo in funzione della velocità di flusso, ma non è in grado di predire né l'ampiezza della dispersione né l'effetto della modifica di alcune variabili, quali la velocità di flusso o la dimensione delle particelle.

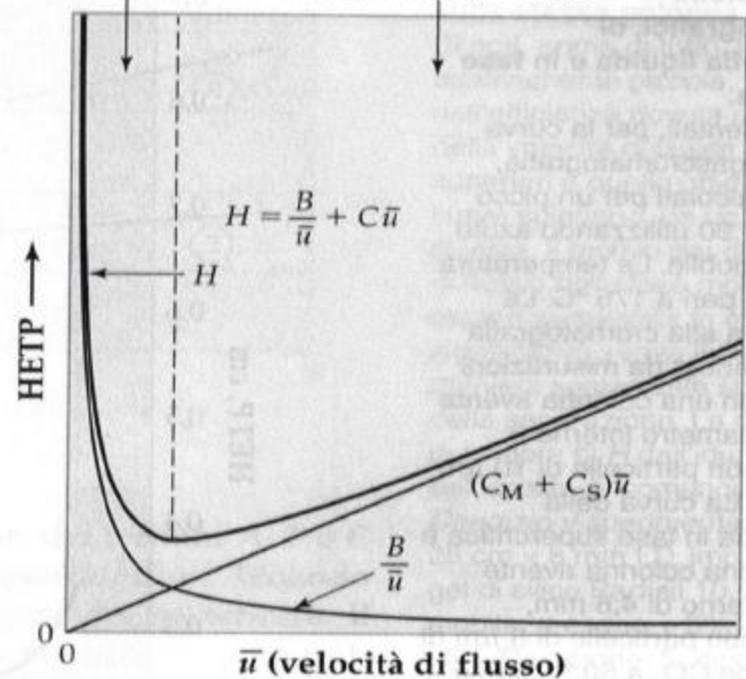
TEORIA DEI PIATTI TEORICI

Allargamento di banda: Equazione di van Deemter

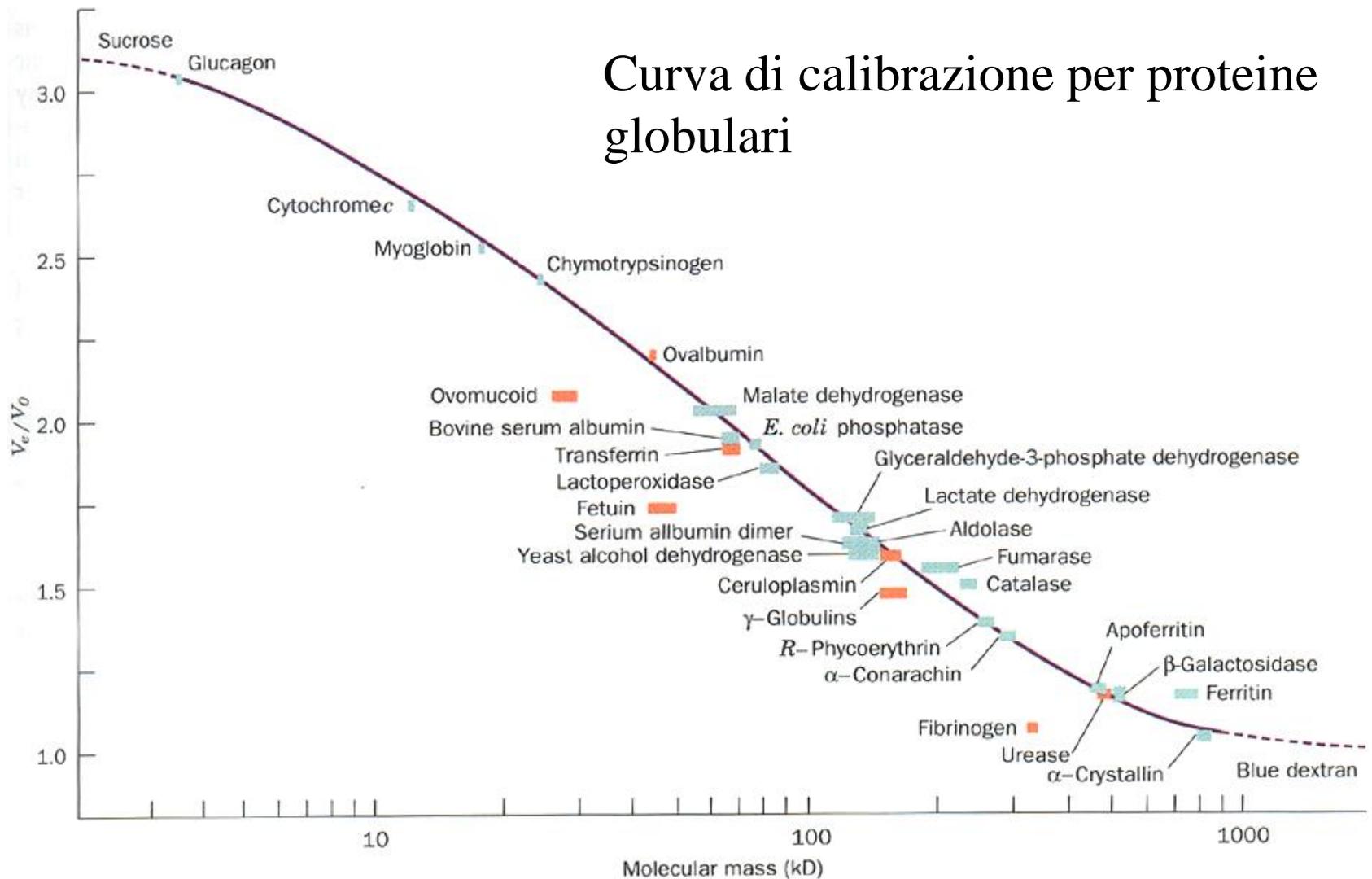
In HPLC



(b) Allargamento di banda dovuto soprattutto alla diffusione Allargamento di banda dovuto soprattutto al trasferimento di massa **In GC**



Curva di calibrazione per proteine globulari



Cromatografia su Sephadex G-200. Volume di eluzione relativo verso il logaritmo della massa molecolare. Le proteine arancioni sono glicoproteine.