

## Sistemi di rivelazione o detector

Terminologia base:

- Sensibilità
- Selettività
- Range dinamico
- Detector distruttivo e non distruttivo → cioè se durante la rivelazione distrugge il campione o lo preserva.
- Detector universale
- Detector selettivo/specifico

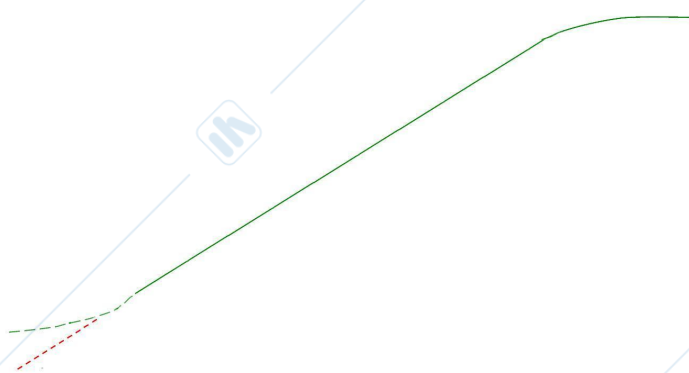
**Sensibilità:**

- Si esprime attraverso il valore del rapporto tra Segnale e Concentrazione o Quantità del composto rivelato, maggiore è il valore del rapporto, maggiore è la sensibilità di rivelazione;
- Questa caratteristica si riflette sulla capacità del detector di fornire grande variazione di segnale per piccole variazioni di concentrazione; generalmente tale rapporto è facilmente identificabile attraverso la pendenza di una retta di taratura;
- Si può esprimere anche attraverso alla minima concentrazione o quantità di composto rivelato che garantisce un segnale 2-3 volte superiore al rumore.

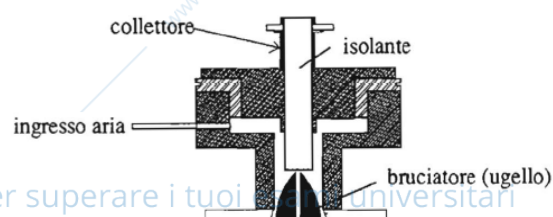
**Selettività:**

- Si riferisce alle caratteristiche strutturali dei composti che possono essere rivelati;
- I detector che riescono a rivelare qualsiasi classe di composti indipendentemente dalle loro caratteristiche si definiscono universali;
- Sono specifici o selettivi i detector che rivelano solo composti con determinate caratteristiche (chimico-fisiche, gruppi funzionali, ecc..);
- Per un detector specifico la selettività si esprime come rapporto di risposta tra il composto rivelato e il suo omologo idrocarburico (es. 1000:1).

**Range dinamico:** Si riferisce al range di concentrazione del composto in cui non varia il rapporto segnale/concentrazione. Range in cui il detector risponde linearmente al variare della concentrazione dell'analita, più è ampio il range dinamico più il detector è robusto nell'analisi quantitativa.



**Flame Ionization Detector o FID:**



Distruttivo → quando rivela il composto che esce dalla colonna cromatografica lo distrugge.

E' selettivo verso i composti organici (CHO) che bruciano nella combustione di una fiamma idrogeno/aria → alimentato da corrente di H (combustibile) che brucia in presenza di ossigeno dell'aria. Durante la combustione si forma fiamma trasparente.

Range dinamico:  $10^6$  (es. tra ng e mg) ciò garantisce la sua affidabilità.

Semplice, robusto, affidabile.

Molto diffuso nell'analisi di composti organici volatili in gas-cromatografia.

La fiamma viene percorsa dalla fase mobile in uscita dalla colonna, trascinando con sé gli analiti separati dalla colonna cromatografica che bruceranno così da formare degli ioni che verranno rivelati da 2 elettrodi che registrano il passaggio di una corrente.

### Thermal Conductivity Detector o TCD:

Non distruttivo e universale → riesce a rivelare qualsiasi sostanza;

Si basa sul principio del *Ponte di Wheatstone*;

La rivelazione si basa su una differente conducibilità termica tra il composto da rivelare e il gas carrier;

Range dinamico:  $10^6$  (es. tra ng e mg);

Semplice, robusto, affidabile;

Molto diffuso nell'analisi di gas naturali in gas-cromatografia.

Ci sono 4 resistenze collegate al Ponte di Wheatstone:

- 2 immerse nel circolo della fase mobile in cui verranno attraversate da gas carrier e dai vari componenti che escono dalla colonna cromatografica in maniera sequenziale;
- L'altro ramo del ponte viene percorso solo da gas carrier.

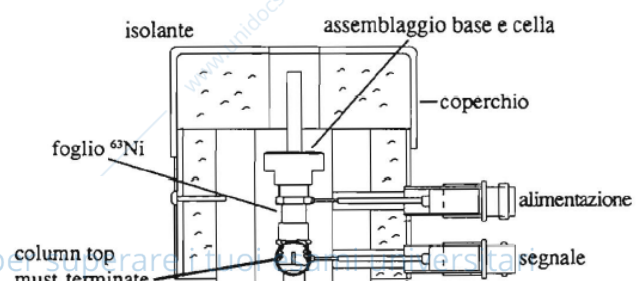
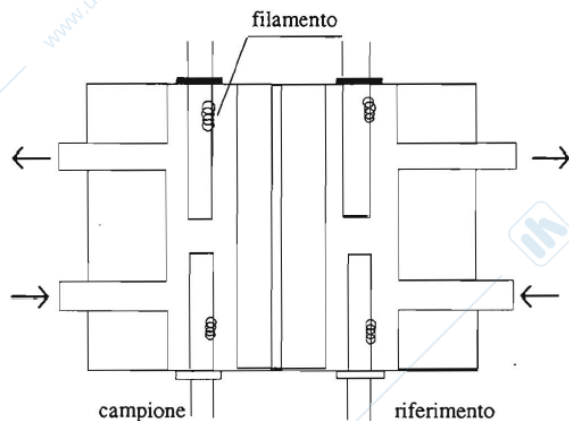
Quando entrambi i rami del ponte sono percorsi da gas carrier non si avrà scompenso, mentre quando uscirà un componente cambierà la sua conducibilità termica quindi il ponte viene scompensato e questo garantisce una rivelazione.

Il grado di variazione della conducibilità termica dei 2 rami del ponte di Wheatstone comporta il passaggio di corrente che è proporzionale alla quantità di composto che è venuto a contatto con le resistenze, quindi si avrà un segnale proporzionale alla concentrazione o alla quantità di composto uscito dalla colonna.

### Electron Capture Detector o ECD:

Non distruttivo;

E' specifico per tutti quei composti con gruppi elettronegativi come:



- Alogeni;
- Gruppi nitro;
- Composti ossigenati;
- Carbonili coniugati;
- ecc....

La rivelazione si basa sulla diminuzione di una corrente elettrica generata da un flusso di elettroni emessi da una sorgente radioattiva ( $^{63}\text{Ni}$ ) arriva il componente elettronegativo che assorbirà parte degli e-, così la corrente diminuisce e costituisce il segnale di rivelazione.

- Range dinamico:  $10^3$  (es. tra ng e  $\mu\text{g}$ ) → range limitato perché la sua caratteristica di rivelazione si basa sulla diminuzione della corrente di riferimento che può diminuire finché esiste una quantità di e- da catturare.
- Tende ad essere sostituito da altri detector meno inquinanti → perché presenta fonte radioattiva;
- Impiegato nell'analisi di composti alogenati in gas-cromatografia.

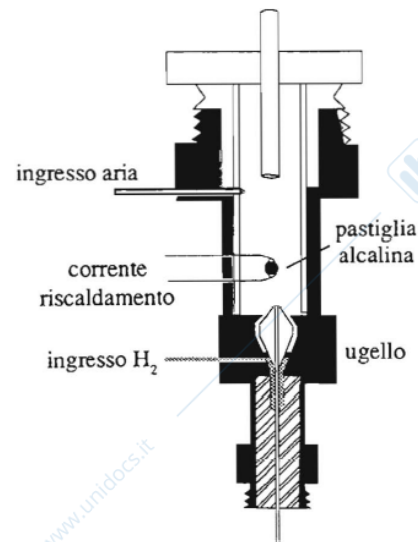
### Nitrogen-Phosphorus Detector o NPD:

Distruttivo;

E' specifico per composti caratterizzati dai legami carbonio-azoto e carbonio-fosforo;

E' un FID modificato, i composti vengono decomposti da una "pastiglia" di sale alcalino (di solito un sale di *Rubidio*) resa incandescente da una resistenza elettrica. Si formano degli ioni, caratterizzati dalla presenza di azoto e/o fosforo, che garantiscono la registrazione di una corrente elettrica;

- Range dinamico:  $10^4$  (es. tra ng e  $10 \mu\text{g}$ ) → range dinamico limitato;
- Diffuso nell'analisi di pesticidi in gas-cromatografia.

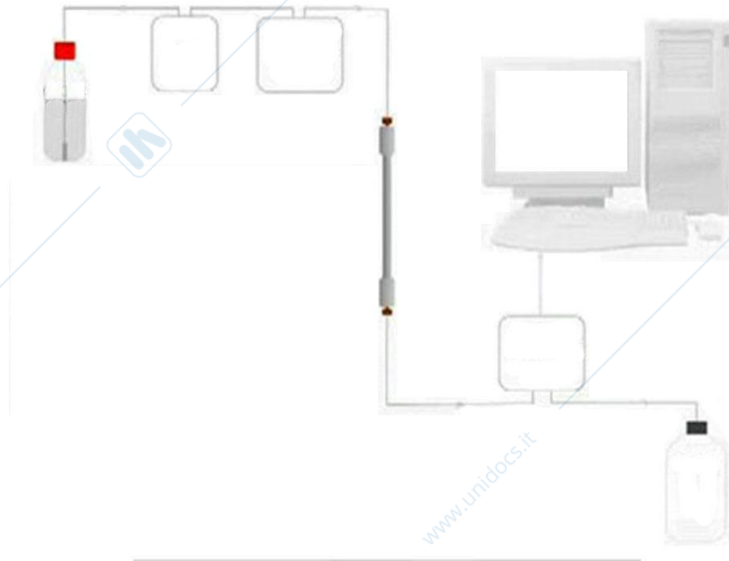


## Sistema cromatografo liquido

Caratterizzato da una fase mobile liquida che sarà garantita in un flusso costante e continuo per l'intero flusso cromatografico.

- Modulo 1 → Esso è caratterizzato da una linea in cui fluirà continuamente la fase mobile dal recipiente del solvente fino al recipiente di scarico, quindi ci sarà un sistema di pompaggio che garantirà questo flusso continuo.
- Modulo 2 → permette di inserire il campione da separare nel sistema di fase mobile fluente e questo sarà il sistema di iniezione.
- Colonna cromatografica → che contiene la fase stazionaria, è in grado di separare le varie componenti della miscela campione attraverso gli equilibri che si stabiliscono tra fase stazionaria e fase mobile.
- Modulo rivelatore → posizionato dopo la colonna, che garantirà la rivelazione delle varie

componenti che escono dalla colonna in modo da trasferirle poi al computer che le processerà ricostruendo il cromatogramma.



La colonna cromatografica di solito viene inserita in un forno colonna che mantiene costante la temperatura.

### Colonne per LC:

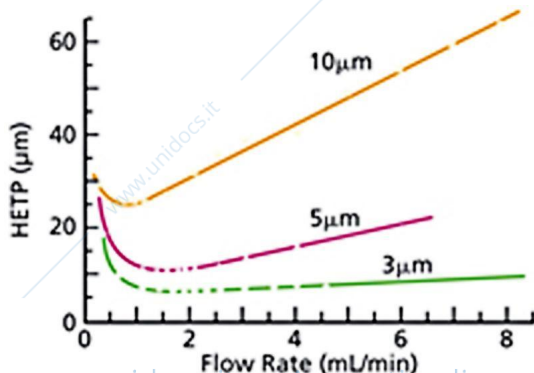
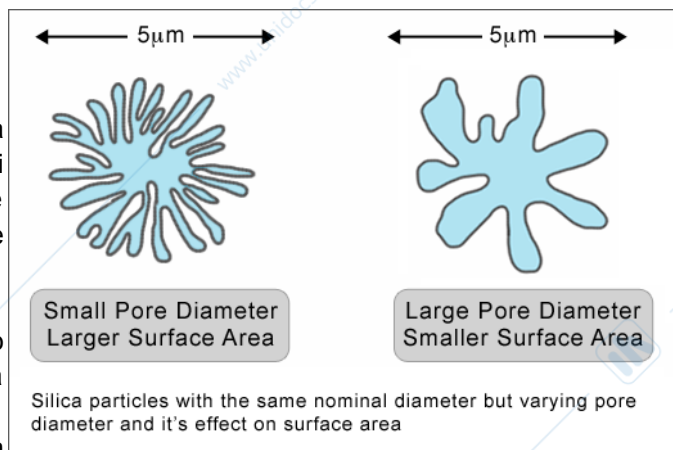


Sono tutte costruite con un involucro di acciaio perchè nella cromatografia liquida si è tornati ad una fase stazionaria impaccata ed una fase mobile liquida che deve percorrere tutta la colonna cromatografica per creare gli equilibri tra fase stazionaria e mobile. Nel percorso all'interno della colonna dovrà vincere la resistenza della fase stazionaria al suo fluire.

La fase stazionaria all'interno della colonna cromatografica è costituita da una serie di miparticelle con profondi pori che percorrono quasi tutta la sfera della fase stazionaria.

La quantità e la dimensione dei pori è molto importante nell'efficienza cromatografica della fase stazionaria.

### Equazione di Van Deemter applicata alla LC:



Le curve vengono rappresentate dal diametro medio delle particelle della fase stazionaria.

Minore è il diametro medio maggiore sarà l'efficienza della fase stazionaria.

Diminuendo il raggio medio delle particelle diminuiscono di volume i pori che percorrono la particella, inoltre si ha un migliore impaccamento (fattore A equazione di Van Deemter).

Per ottenere elevata efficienza cromatografica occorre tendere ad avere fasi stazionarie con diametro medio delle particelle più piccolo possibile perchè vanno a diminuire:

- Fattore A (diffusione vorticoso)
- Parametro C (trasferimento di massa)

### Definizioni cromatografia liquida:

I sistemi strumentali che sfruttano la cromatografia liquida sono stati denominati:

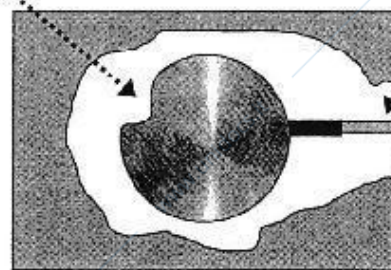
- **HPLC** o High Pressure Liquid Chromatography, dalle pressioni di esercizio che caratterizzano tali sistemi (40-400 atm);
- Siccome la pressione non era più un parametro distintivo si è passati al termine *High Performance Liquid Chromatography* (cromatografia liquida ad elevate prestazioni) mantenendo lo stesso acronimo HPLC;
- Negli ultimi anni questi sistemi si sono evoluti utilizzando particelle di fase stazionaria cosiddette *sub-2 $\mu$ m* (sub 2 micron), con incremento delle pressioni di esercizio fino ad oltre 1000 atm. Tali sistemi prendono il nome di *uPLC* o *uHPLC* (ultra Performance or ultra High Performance liquid chromatography).

### Cromatografia liquida: la pompa

Il cuore di un sistema cromatografico liquido è la pompa che garantisce il flusso di fase mobile. deve essere ingegnerizzata in modo da:

- Poter vincere la resistenza;
- Essere abbastanza robusta;
- Garantire un flusso costante nel tempo di analisi cromatografica.

• **Camma disegnata al computer** che guida lentamente il pistone in avanti durante la fase di spinta del solvente e rapidamente lo ritrae durante la fase di riempimento per ridurre le discontinuità di flusso.



• **Pistone in zaffiro**

• **Testata della pompa** contenente la guarnizione del pistone e le valvole a sfera di ingresso e uscita.

Assemblata camma rotante ad un pistone che si muove in modo alternato all'interno di una camera cilindrica.

In testa alla camera cilindrica ci sono 2 valvole:

- 1 all'ingresso della fase mobile (collega pompa al recipiente di partenza della fase mobile)
- 1 di uscita (manderà fase mobile all'iniettore, la colonna, etc.)

Cosa accade meccanicamente:

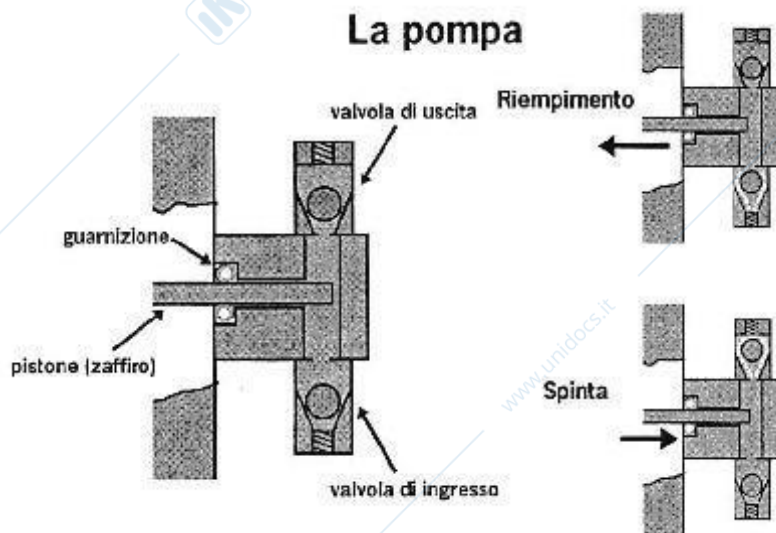
1. Camma rotante aziona il pistone che si muove in modo alternato all'interno del cilindro.
2. Quando il pistone è in aspirazione la valvola di ingresso si apre e fa entrare la fase mobile all'interno del cilindro della pompa.
3. Una volta riempito, la camma spingerà il pistone all'interno del cilindro (creando pressione positiva) che chiuderà valvola di ingresso e aprirà quella di uscita facendo fuoriuscire il liquido fase mobile immettendo nel sistema cromatografico.

Durante il movimento del pistone le valvole sono sempre aperte in modo alternato. Una si apre per

suzione e una per espulsione di fase mobile da parte della pompa del sistema cromatografico.

Le valvole in testa alla pompa sono formate da delle sfere che vanno ad ostruire il passaggio del liquido e sono di forma opposta:

- Pistone in aspirazione richiama la sfera verso l'altro aprendo la valvola in aspirazione;
- Sfera dell'altra valvola andrà a chiudere la valvola di uscita.

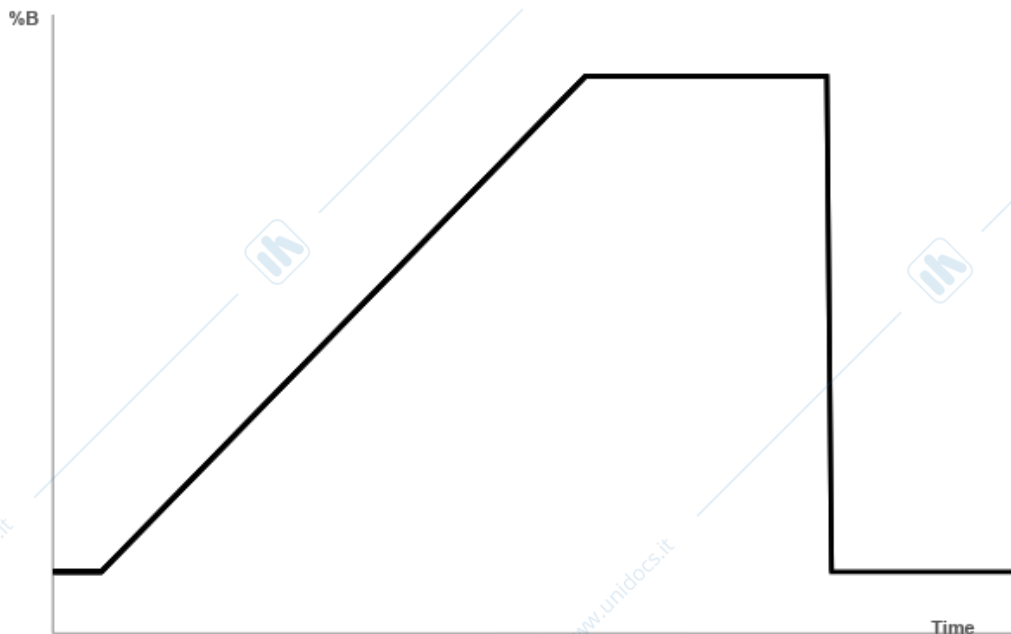


Maggiori saranno le rivoluzioni della camma, maggiore sarà la frequenza apri-chiudi delle valvole e quindi il flusso di fase mobile che uscirà dalla pompa.

### Eluizione cromatografia liquida:

L'eluizione dei componenti di una miscela campione in un sistema di cromatografia liquida ad elevate prestazioni può avvenire:

- Utilizzando una fase mobile costituita da uno o più solvente la cui composizione è costante (*Eluizione Isocratica*);
- Utilizzando una fase mobile costituita da almeno due solventi (A e B) la cui composizione è varia durante l'analisi cromatografica (*Eluizione a Gradiente*);
- L'eluente A permette facilita l'interazione tra l'analita e la fase stazionaria (*potere eluente o elotropo inferiore*).
- L'eluente B rompe l'interazione tra l'analita e la fase stazionaria (*potere eluente o elotropo superiore*).



Nell'asse delle ascisse sono riportati i tempi, mentre nell'asse delle ordinate la composizione % di B che inizialmente sarà bassa per poi gradatamente aumentare fino ad un massimo punto per garantire l'eluizione di tutti i componenti presenti nella miscela complessa, per poi tornare alla composizione iniziale e poi essere ripetuta l'analisi cromatografica.

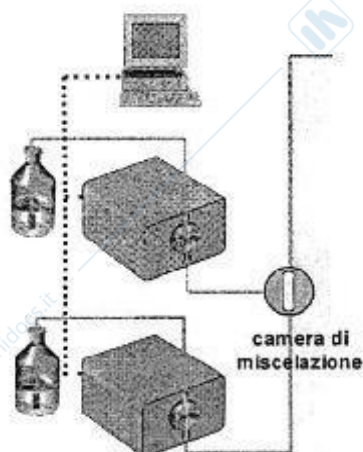
Nella eluizione si riconoscono vari tempi:

- Iniezione → tempo impiegato dal flusso della fase mobile a riempire il volume morto.
- Eluizione a separazione → tempo impiegato a raggiungere la % B.
- Eluizione a lavaggio → tempo impiegato alla % B max per garantire l'eluizione dell'ultimo componente del campione.
- Ricondizionamento → in modo da permettere al sistema di ritrovarsi nelle fasi iniziali della corsa cromatografica per accogliere un nuovo campione per l'analisi.

Generalmente questi tempi sono dettati dal valore del volume morto, si usa:

- Tempo 1 → deve, in base al flusso della fase mobile, garantire almeno il riempimento di 1 volume morto del sistema cromatografico.
- Tempo 3 → deve garantire almeno il riempimento di 3-5 volumi morti in modo da essere confidenti che tutti i componenti siano stati eluiti dalla fase stazionaria.

## Sistema di Pompaggio: Gradiente Alta Pressione



- **Eluizione isocratica** significa mantenere la composizione costante durante la separazione cromatografica
- **Eluizione a gradiente** significa cambiare la composizione costante durante la separazione cromatografica
- **Operatività**. Il computer controlla le velocità di flusso di ciascuna pompa e produce il gradiente variando le velocità di flusso relative delle due pompe mantenendo costante la velocità di flusso complessiva. Durante una corsa cromatografica a gradiente il flusso del solvente debole (A) diminuisce mentre quello del solvente forte (B) aumenta.
- Tipo più comune di sistema a gradiente.
- Usare più di due solventi risulta costoso: occorre aggiungere una pompa per solvente.

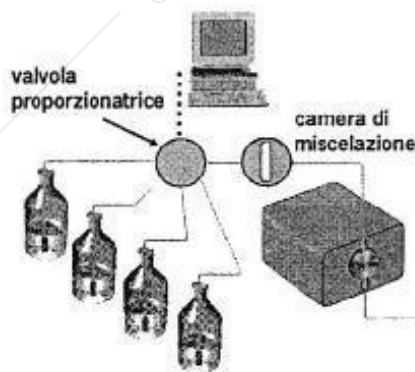
Per variare la composizione della fase mobile esistono 2 sistemi di pompaggio possibili:

1. Gradiente ad alta pressione → in cui ogni pompa è collegata ad un solvente, quindi se facciamo una eluizione binaria con 2 solventi A e B occorrono 2 pompe ed ognuna è collegata al proprio solvente.
2. Il circuito fluidico poi va a unirsi in una camera di miscelazione dove i 2 solventi si miscelano ed entrano nel sistema cromatografico costituito dal sistema di iniezione, colonna e detector.
3. La composizione della fase mobile viene garantita dal flusso di ogni singola pompa per il proprio solvente.

In un sistema di eluizione a gradiente la composizione varierà con i flussi delle singole pompe in modo sincrono. Man mano che si aumenta la % del solvente B, diminuirà il flusso della pompa collegata al solvente A. Analogamente aumenterà il flusso della pompa del solvente B in modo che la somma dei 2 flussi mantenga sempre 1 mL al minuto, ma la sua composizione in fase mobile aumenterà in % del solvente B.

- Vantaggio → Sistema efficiente e garantisce una composizione riproducibile del gradiente di eluizione.
- Svantaggio → Occorre un numero di pompe pari al numero dei solventi utilizzati per la separazione cromatografica, quindi è un sistema costoso. Per ovviare questo svantaggio si è introdotto il gradiente ad alta pressione.

### Sistema di Pompaggio: Gradiente Bassa Pressione



- **Operatività.** Il computer controlla la valvola proporzionatrice e produce il gradiente variando le proporzioni relative dei solventi che dalla valvola passano alla camera di miscelazione. Durante una corsa cromatografica a gradiente il flusso del solvente debole (A) diminuisce mentre quello del solvente forte (B) aumenta.
- È necessaria solo una pompa ad alta pressione.
- Costi inferiori rispetto ai gradienti in alta pressione.
- Può essere usato con al massimo 4 solventi
- Ottimo per sviluppo metodo per usare più solventi.

Questo differisce dal precedente perché con una singola pompa riusciamo ad eseguire un gradiente anche a 4 o più solventi.

- La discriminante sono il numero di *valvole proporzionatrici* (permettono l'ingresso di ogni solvente all'interno dell'HPLC), la loro apertura o chiusura permetterà di variare la composizione della fase mobile.
- Quindi è presente una camera di miscelazione in cui i solventi verranno miscelati, ma si trova in fase di aspirazione della pompa (quindi a bassa pressione).
- Sistema più economico ma la composizione della fase mobile non è così riproducibile perché dipende dai tempi di apertura-chiusura delle valvole proporzionatrici.
- I gradienti a bassa pressione sono caratterizzati da una variazione a gradini.

- Siccome la miscelazione avviene prima della pompa, in luogo a bassa pressione, può accadere che se i solventi sono conservati all'aria essi siano saturi di gas e può accadere che all'interno della camera di miscelazione essi vadano ad occupare un certo volume del sistema e questo va a beneficiare sulla riproducibilità del flusso di fase mobile.

Per ovviare al problema della formazione di bolle di gas all'interno dei tubi del sistema a bassa pressione i solventi impiegati devono subire un *processo di degasaggio*:

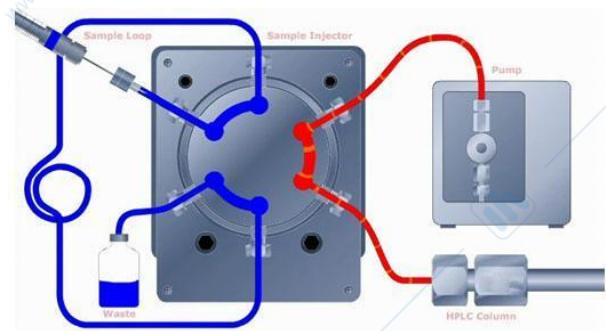
- Per immissione di un gas → il quale deve spostare tutto il gas presente nel liquido.
- Usare sistema in cui il solvente durante la sua aspirazione da parte della pompa, prima di arrivare alla valvola proporzionatrice passa da un degasatore sottovuoto che aspira i residui di gas dal solvente, il quale verrà porzionati all'interno della valvola proporzionatrice a seconda della composizione della fase mobile richiesta.

### Cromatografia liquida: iniettore

Viene introdotta la valvola di iniezione a 6 vie le quali sono collegate a 2 a 2. Ha 2 posizioni possibili che vengono scambiate attraverso la rotazione del rotore:

*Load position* (posizione di caricamento):

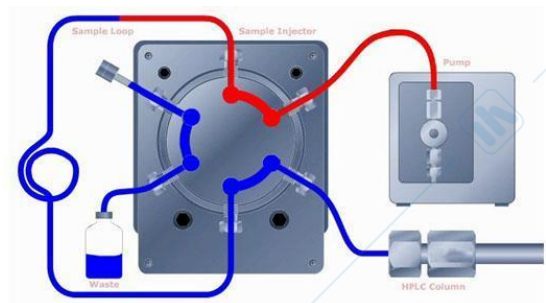
- La pompa cromatografica è collegata attraverso 2 porte alla colonna cromatografica. Questo circuito sarà in alta pressione e sarà indicato di rosso nello schema.
- Mentre le altre 4 porte vengono collegate tra loro attraverso il circuito esterno detto loop, questo circuito ha un volume tarato noto e costante.
- Garantirà l'iniezione di un volume costante di campione, disegnato in blu ed è a bassa pressione (quindi atmosferica e può facilmente interagire con il circuito per esempio iniettando il campione con una siringa che ha accesso da un'altra porta).
- Possiamo prelevare il volume di campione, lo iniettiamo all'interno del circuito di loop, l'eccesso di liquido viene scaricato nella bottiglia dello scarico. Ciò avviene a bassa pressione quindi non c'è rischio di avere una resistenza dovuta al sistema cromatografico.



*Inject position*: Il volume di campione iniettato è scelto in base al volume del circuito di loop.

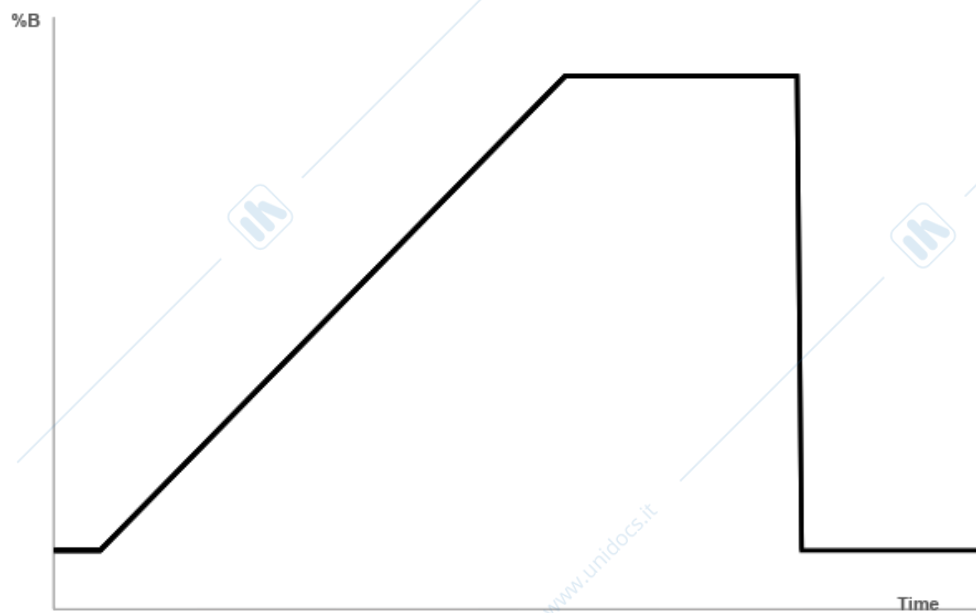
- Volumi inferiori → riempire parzialmente il circuito in loop;
- Volumi maggiori → cambiare il circuito di loop con circuiti tarati.

Le porte, ruotando in senso orario, mettono in comunicazione le varie porte che prima erano scollegate con il sistema ad alta pressione.



La pompa è direttamente collegata con il circuito di loop che entra nel sistema ad alta pressione, fase mobile sposterà il campione dal circuito di loop in testa alla colonna. Le porte per iniettare e quella di scarico rimangono sempre a bassa pressione per permettere l'accessibilità da parte dell'utente.

## Eluizione in cromatografia liquida:



La corsa inizia con una percentuale dell'eluente meno eluotropo per consentire l'instaurazione delle varie interazioni degli analiti con la fase stazionaria, per poi crescere la composizione in % del componente più eluotropo per poi arrivare al massimo della sua concentrazione (90% circa).

- Posizione inject → campione entra in colonna. Inizia con l'inizio del gradiente che può mantenere la composizione iniziale in fase isocratica per garantire il riempimento del volume morto.
- Crescente aumento dell'eluente B (fase di separazione cromatografica) poi un'isocratica finale per garantire una totale pulizia della colonna cromatografica dal campione che è stato iniettato, quindi il ricondizionamento.
- Posizione di load → si ha alla fine del ricondizionamento. Quando il sistema cromatografico è pronto per inserire un nuovo campione e iniziare di nuovo il ciclo di analisi.

## Rivelatori: Assorbanza



- **Funzionamento.** La luce ad una precisa lunghezza d'onda passa attraverso la cella di rivelazione e viene misurata l'assorbanza. I primi rivelatori ad assorbanza usavano lampade al mercurio che emettono principalmente a 254 nm e secondariamente a 280 nm.
- Rivelatore selettivo per molecole contenenti cromofori. Poiché la maggior parte dei composti organici ha un qualche assorbimento tra 200 e 300 nm, l'assorbanza è quasi universale ma non del tutto.
- Relativamente insensibile a cambiamenti del solvente durante il gradiente
- Molto sensibile, sull'ordine dei  $10^{-9}$  grammi.

Il più usato in cromatografia liquida.

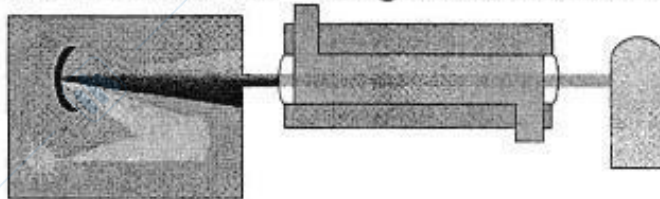
- Detector con cella di flusso (segmento del circuito HPLC) fissa collegata con uscita della colonna cromatografica.
- Lampada a deuterio che garantisce l'emissione di lunghezze d'onda nell'ultravioletto, si ha la scelta della lunghezza d'onda attraverso una fenditura la quale va a investire la cella di flusso che percorre la fase mobile.
- Quando passerà un analita registrerà un assorbimento.
- Durante separazione cromatografica arriverà un componente e arriverà la trasduzione del segnale chimico in una corrente elettrica che sarà registrata ed amplificata dal data system.

Il funzionamento dei rivelatori si basa sull'assorbimento di un'onda elettromagnetica ad energia fissa, sarà caratteristica di una determinata struttura che andremo ad analizzare. L'analita deve avere un cromoforo che riesce ad assorbire quella determinata lunghezza d'onda.

Questo è un detector specifico per sostanze che posseggono nella loro struttura un gruppo funzionale cromoforo (contengono elettroni pigreco, doppi legami meglio se auxocromizzati per permettere più transizioni).

Metodo relativamente sensibile (nanogrammo), adatto alle eluizioni in gradiente e non è distruttivo.

### Rivelatori: Assorbanza - Lunghezza d'onda Variabile



- **Funzionamento.** La luce ad una precisa lunghezza d'onda passa attraverso la cella di rivelazione e viene misurata l'assorbanza. Il rivelatore a lunghezza d'onda variabile impiega un piccolo monocromatore per scegliere una qualsiasi lunghezza d'onda da ~200 nm in su.
- Rivelatore selettivo per molecole contenenti cromofori. Poiché la maggior parte dei composti organici ha un qualche assorbimento tra 200 e 300 nm, l'assorbanza è quasi universale ma non del tutto.
- Relativamente insensibile a cambiamenti del solvente durante il gradiente.
- Molto sensibile, sull'ordine dei  $10^9$  grammi.
- Il rivelatore UV a lunghezza d'onda variabile è il più comune in HPLC.
- Si può ottimizzare la rivelazione selezionando la lunghezza d'onda che coincide con la massima assorbanza degli analiti.

Il campione da analizzare può avere più analiti con diverse strutture e quindi diverse lunghezze d'onda da impostare per essere rivelate al rivelatore spettrofotometrico. Ciò si fa con dei programmi a tempo così da rivelare tutti i componenti presenti.

Variando nel tempo la lunghezza d'onda che attraversa la cella del flusso possiamo garantire la rivelazione di tutti i composti presenti nel campione. Ma può essere che il campione contenga gli analiti in concentrazioni diverse quindi la sensibilità può risentirne.

Beer's Law

$$A = \epsilon b c$$

$\epsilon$  molar absorption coefficient,  
 $b$  path length,  
 $c$  concentration

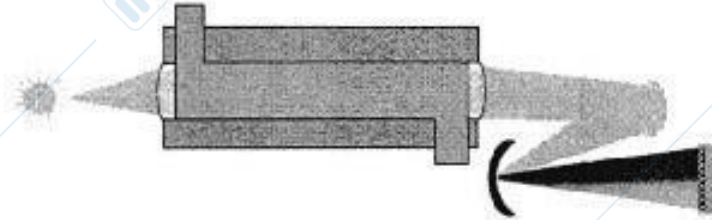
La legge di Lambert-Beer dove:

$b$  è la lunghezza del cammino ottico. Se allungo il cammino ottico il segnale aumenta con la conseguente sensibilità, nota che aumenta anche la quantità di fase mobile analizzata.

Se durante l'analisi un composto incognito viene eluito durante l'incidenza nella cella di flusso di lunghezza d'onda non sensibile alla sua struttura questo componente non viene rivelato.

Per ovviare a questo inconveniente si è evoluto il sistema di rivelatori UV-visibili passando ai rivelatori a schiera di Fotodiodi.

## Rivelatori: Assorbanza con Schiera di Fotodiodi



**Funzionamento.** La luce passa attraverso la cella di rivelazione. La luce emergente dalla cella viene poi riflessa su specchi e scomposta su una griglia nelle lunghezze d'onda componenti e lo spettro è focalizzato su una schiera di fotodiodi.

Rivelatore selettivo per molecole contenenti cromofori. Poiché la maggior parte dei composti organici ha un qualche assorbimento tra 200 e 300 nm, l'assorbanza è quasi universale ma non del tutto.

Relativamente insensibile a cambiamenti del solvente durante il gradiente

Molto sensibile, sull'ordine dei  $10^9$  grammi.

Fornisce spettri di assorbimento "al volo"

Più costoso di un rivelatore UV a lunghezza d'onda variabile

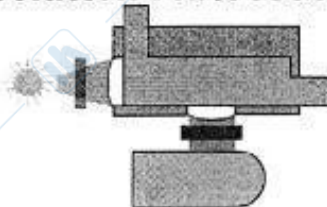
In questo caso il monocromatore viene posto dopo la cella di flusso. La cella di flusso viene investita dalla luce bianca, tutte le lunghezze d'onda vanno ad investire il campione nella cella di flusso, quindi interagiranno tutte le lunghezze d'onda.

Una volta uscite dalla cella di flusso le lunghezze d'onda vengono separate dal monocromatore e poi rivelate ognuna da un fotodiode. In questo caso tutte le lunghezze d'onda subiranno l'assorbimento specifico del campione quindi la rivelazione è l'intero spettro di assorbimento UV-vis che può essere registrato.

### ➤ Differenza principale tra detector UV-vis e detector a schiera di diodi quale è?

Il monocromatore nel primo sarà posto prima della cella di flusso in modo da investirla con una radiazione monocromatica, invece nel detector a diodi il monocromatore è posto dopo la cella di flusso quando la luce che ha investito la cella di flusso ha già subito un assorbimento.

## Rivelatori: Fluorescenza



- **Funzionamento.** Un filtro seleziona la lunghezza d'onda di eccitazione dalla luce sorgente e lo passa nella cella di rivelazione. Quando soluti adatti attraversano la cella e hanno una reazione di fluorescenza, la luce emessa viene raccolta da una posizione ortogonale rispetto al raggio di eccitazione e selezionata da un filtro di emissione è focalizzata in un tubo fotometrico.
- Rivelatore altamente selettivo, non-universale. Rileva soluti naturalmente fluorescenti o derivatizzati allo scopo.
- Estremamente sensibile - 1000 volte più sensibile di un rivelatore ad assorbanza, nell'ordine dei  $10^{-12}$
- Insensibile a cambiamenti nel solvente e a molti contaminanti del campione

- Fluorescenza → fenomeno per cui una specie assorbe una certa lunghezza d'onda eccitatoria, passa da un livello fondamentale ad eccitato. Disperde parte dell'energia attraverso gli urti (calore) passando a un livello eccitato minore e quindi riemette un'altra lunghezza d'onda che è inferiore rispetto a quella assorbita (lunghezza d'onda di emissione).

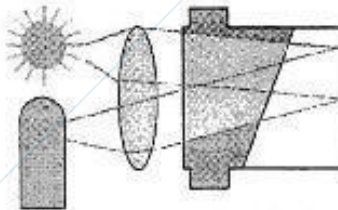
Campione investito da una radiazione luminosa monocromatica (radiazione eccitatrice) e si va a rivelare una radiazione emessa dal campione stesso, la quale avrà un'altra lunghezza d'onda.

Per evitare interferenze tra le 2 lunghezze d'onda la disposizione del detector è 90 gradi rispetto alla direzione della radiazione eccitatoria. Andrà a rivelare solo la radiazione emessa dal campione dopo il fenomeno della fluorescenza.

Il detector di questo tipo è molto selettivo: andrà a rilevare solo le sostanze che consentono questo fenomeno. esso è circa 1000 volte più sensibile rispetto al rivelatore di assorbanza.

Purtroppo sono pochi gli analiti che hanno le caratteristiche fluorescenti e quindi può essere usato solo per le sostanze che garantiscono fluorescenza. Non è distruttivo.

## Rivelatori: Indice di Rifrazione



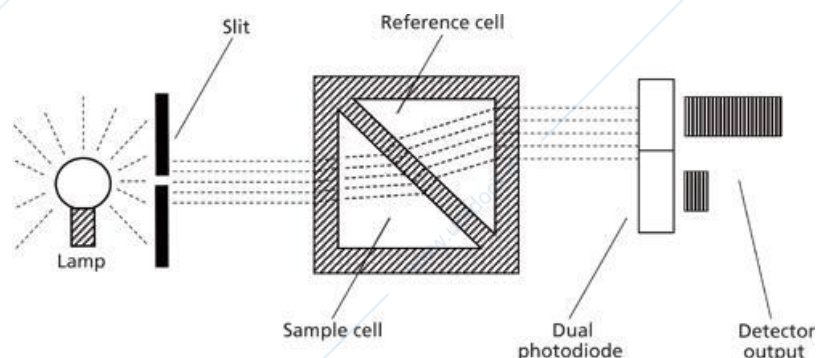
- **Funzionamento.** La luce è focalizzata sulla cella di rivelazione e successivamente fatta passare attraverso la cella di riferimento. La luce rifratta è poi focalizzata su un tubo fotometrico. Quando bande con indice di rifrazione diverso da quello della fase mobile attraversano la cella il fuoco della luce si sposta provocando un cambiamento nel segnale del fotometro.
- Rivelatore universale. Si basa sulla differenza fra l'indice di rifrazione del soluto e quello della fase mobile.
- Non può essere utilizzato in gradiente.
- 1000 volte meno sensibile di un rivelatore ad assorbanza (sensibilità sull'ordine dei  $10^6$  grammi).

Primo rivelatore universale della serie fin qui affrontata. Il principio di funzionamento si basa sul divergente raggio di propagazione di un raggio luminoso focalizzato quando attraversa 2 fluidi di differenti densità.

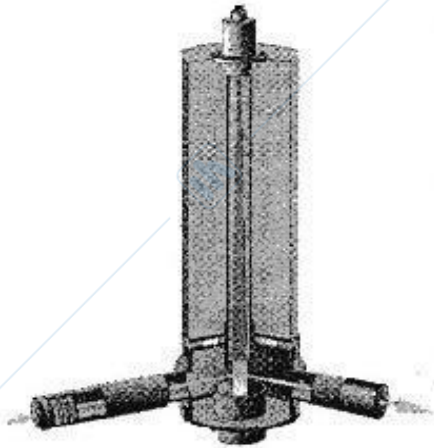
L'analita andrà a modificare la fase mobile, quindi l'angolo di propagazione del raggio focalizzato. Rivelatore circa 1000 volte meno sensibile di un rivelatore UV-vis.

Molto usato per le analisi che non contengono cromofori. Ha un range dinamico molto ampio e non è distruttivo. Questo detector deve lavorare in eluizione isocratica.

Luce focalizzata si propaga tra mezzi di diversa densità, varierà il suo angolo di propagazione e verrà rivelato o meno dal fotodiode.



## Rivelatori: Evaporative Light Scattering

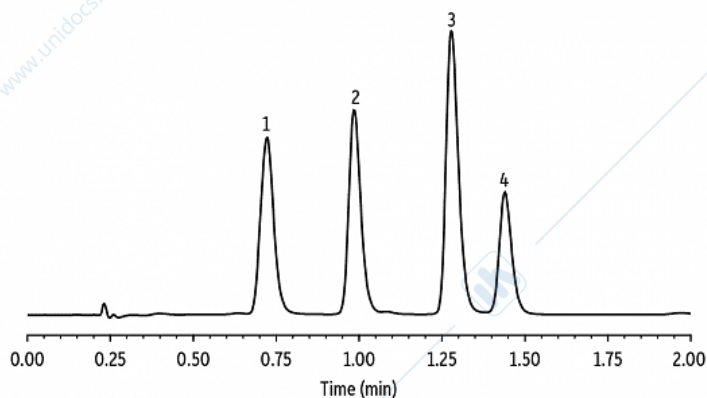


- **Funzionamento.** L'eluente HPLC è nebulizzato da un gas (aria o azoto) in un tubo di evaporazione riscaldato. Durante il passaggio nel tubo il solvente viene evaporato e le particelle di soluto desolvatate sono rivelate attraverso la diffusione di luce laser.
- Rivelatore veramente universale. Può rivelare acidi grassi e altri composti completamente privi di cromofori
- Adatto per l'uso con gradiente.
- Indipendente dalla temperatura.
- Meno sensibile di un rivelatore ad assorbanza - (sull'ordine dei  $10^{-7}$  grammi) - comunque molto più sensibile di un RI.

Rivelatore universale, molto sensibile (circa 10 volte di più del rivelatore a indice di rifrazione). Può lavorare anche con eluizioni in gradiente. Rispetto al precedente è distruttivo, quindi nella rivelazione si va a distruggere il campione, l'eluato non può essere riutilizzato.

- Campione entra da un dado, viene nebulizzato con l'aiuto di un gas inerte (disperde l'eluato in tante goccioline). Poi c'è un secondo gas che servirà per porzionare la parte che andrà ad essere rivelata da quella che verrà scartata.
- La parte che verrà rivelata viene condotta fino a raggiungere un altro sistema ma prima di raggiungerlo viene evaporata (2° gas inerte è caldo e garantisce l'evaporazione di ogni gocciolina di spray formatasi nella prima sezione).
- L'evaporazione completa fa sì che i soluti siano presenti come particelle aerosospese nel gas inerte, queste raggiungono la parte ottica del detector la quale è percorsa da un raggio di luce focalizzato il quale, quando viene percorso dal particolato aerodisperso, andrà a scatterizzarsi. Cioè andrà a diminuire di intensità la quantità di questo raggio.

### Collettore di frazioni cromatografiche:



Cromatografia liquida usata anche per separare una miscela complessa e raccogliere le varie frazioni. Dopo che il composto è stato rivelato possiamo raccoglierlo e separarlo dagli altri.

Quando esce il picco seleziono la modalità di raccolta, quando supera una certa assorbanza il braccetto del raccogliatore andrà a porzionare l'eluato verso una provetta. Valvola andrà a chiudersi quando assorbanza arriva ad un certo livello. Ciò si ripeterà per tutte le frazioni.

