

CROMATOGRAFIA

DOTT. JOANNA IZABELA LACHOWICZ

INTRODUZIONE

LEZIONE 1

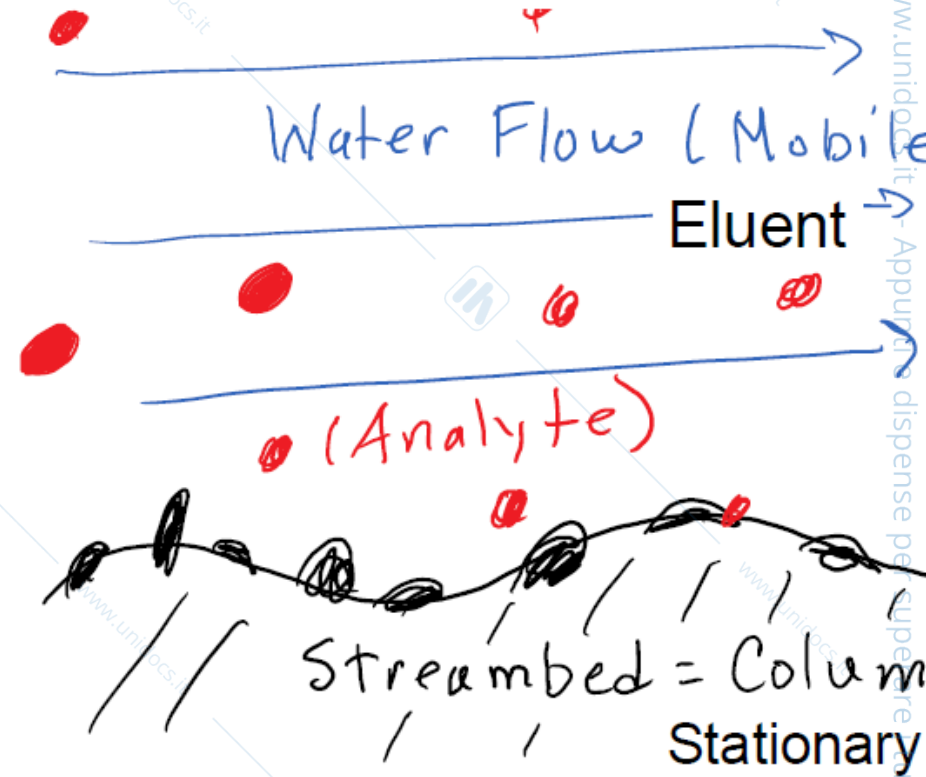
IMPORTANZA DELLA CROMATOGRAFIA

- Tipi di cromatografia
- I principi della cromatografia
- Capire cromatograma

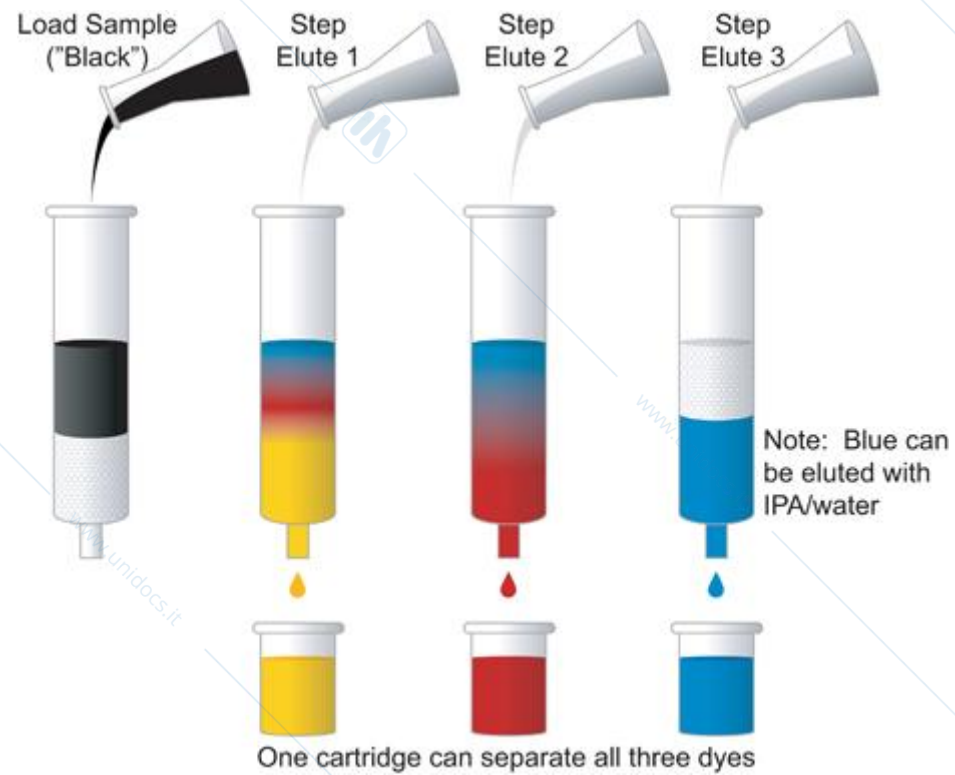
LA CROMATOGRAFIA DAL GRECO ΧΡΩΜΑ, TRASLITTERATO IN KROMA, "COLORE"

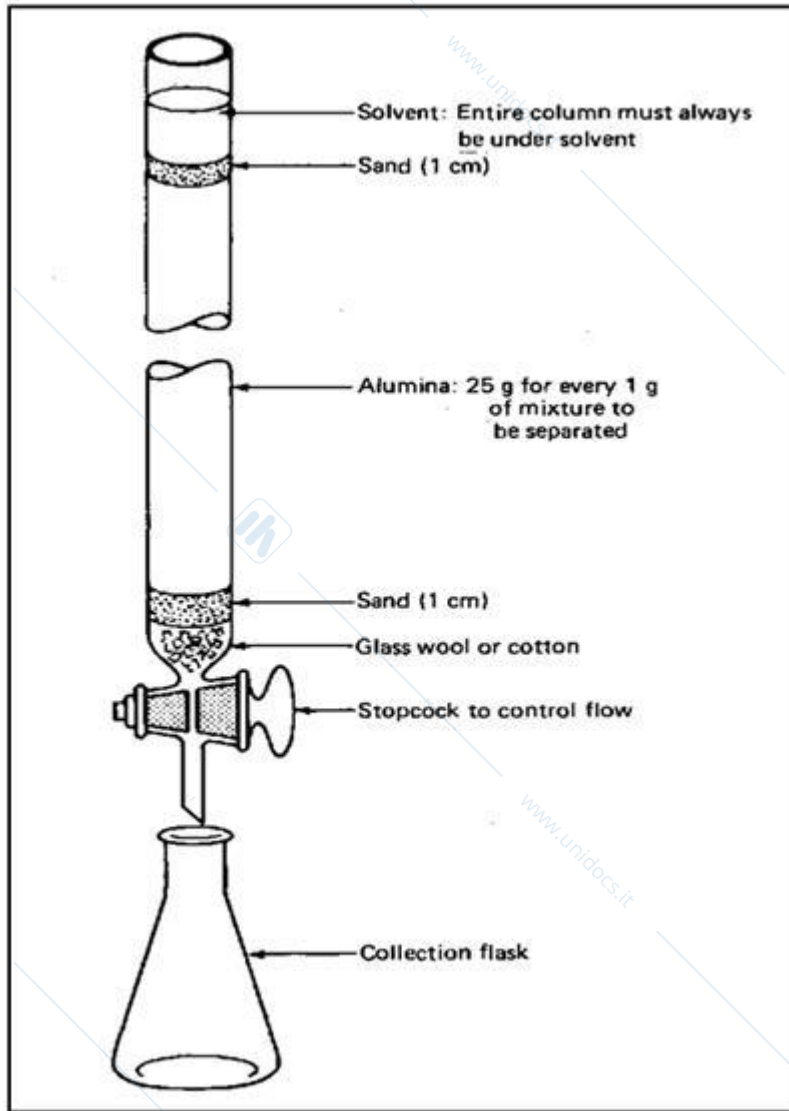
L'invenzione della cromatografia viene attribuita al biochimico **italo**-russo Michail Cvet nel **1906**, quando riuscì, con questa tecnica, a separare la clorofilla da un estratto vegetale. Cvet procedette ponendo una piccola quantità di estratto di foglie verdi alla sommità di una colonna di vetro riempita con particelle di argilla e lavando successivamente il campione. Fece poi colare, attraverso la colonna, dell'etere di petrolio. A mano a mano che l'etere di petrolio fluiva trascinando con sé il campione, questo si separava in bande di diverso colore (da qui il nome "cromatografia"), ciascuna delle quali procedeva verso il fondo della colonna con diversa velocità.



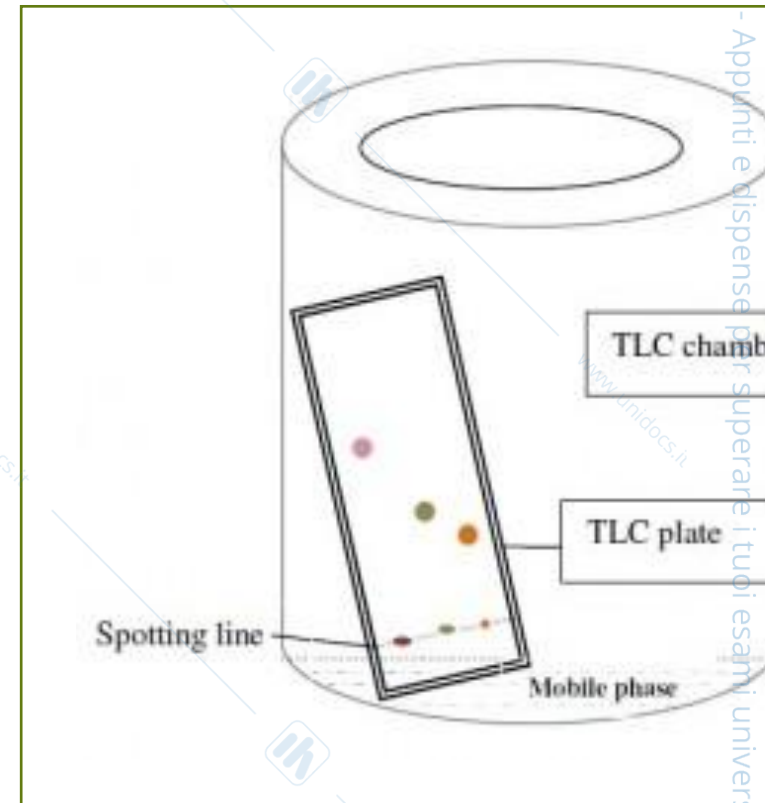


COME FUNZIONA

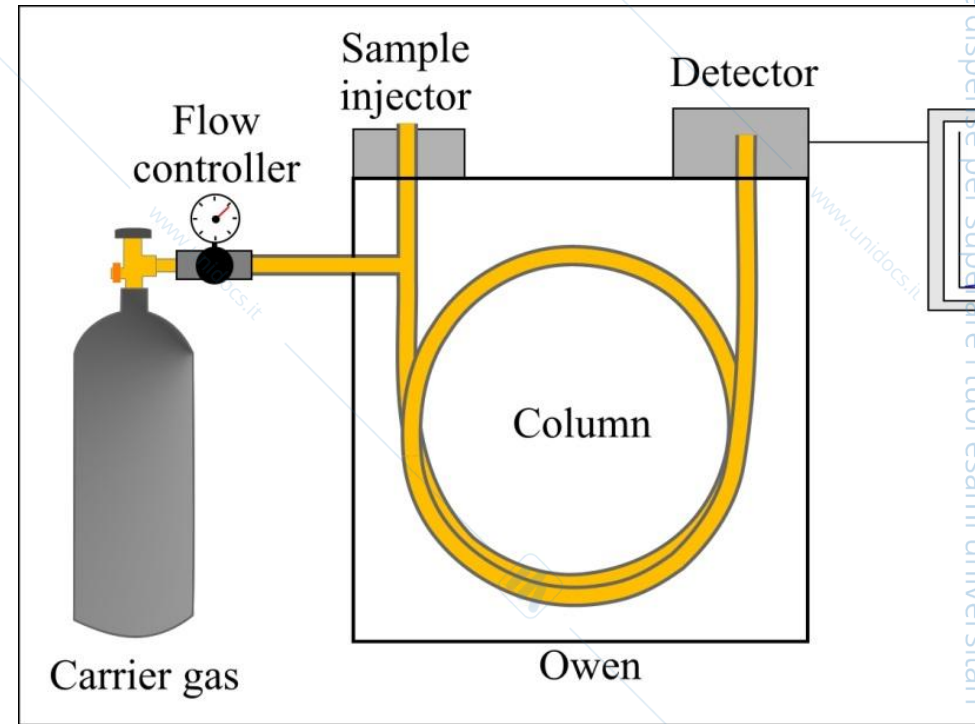
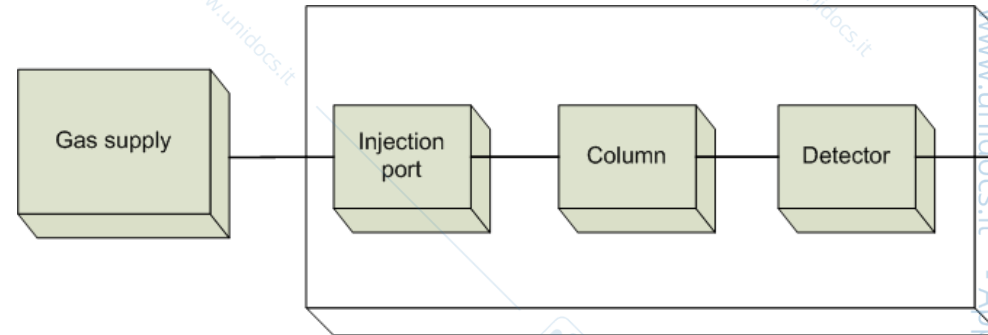
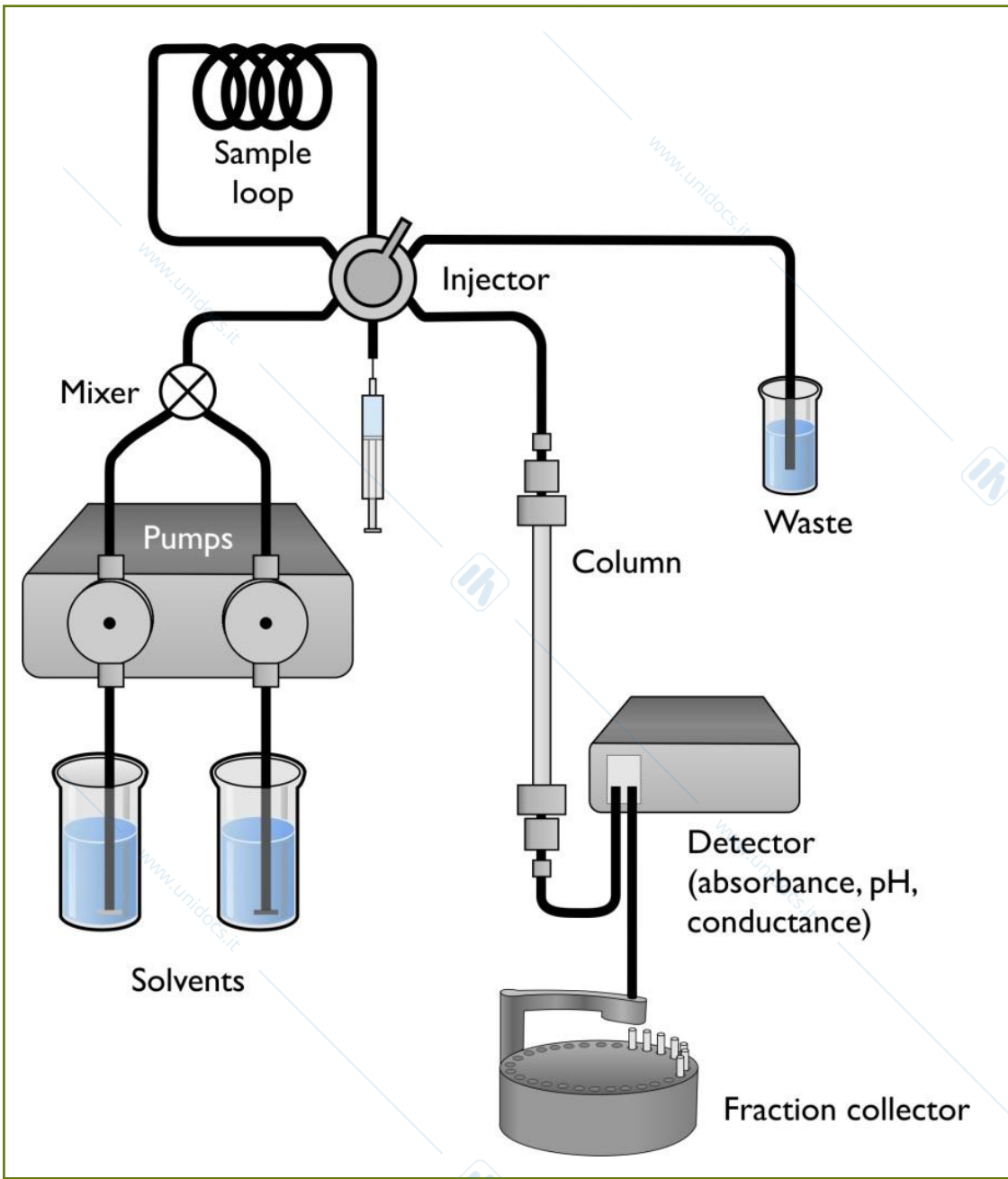




SEMPLICI

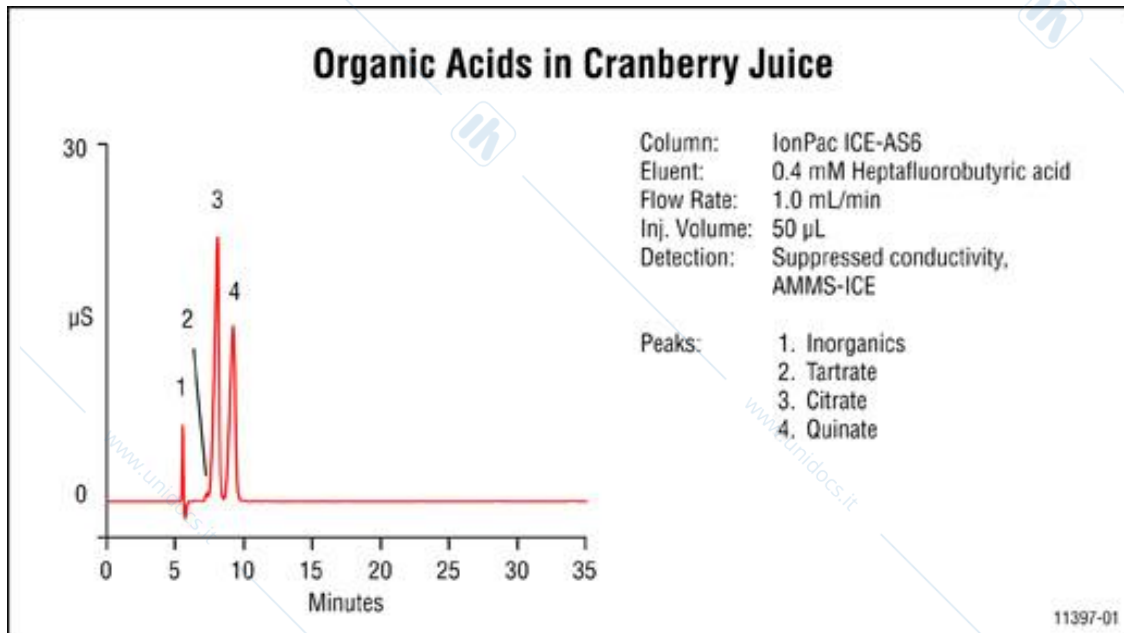


AVANZATE

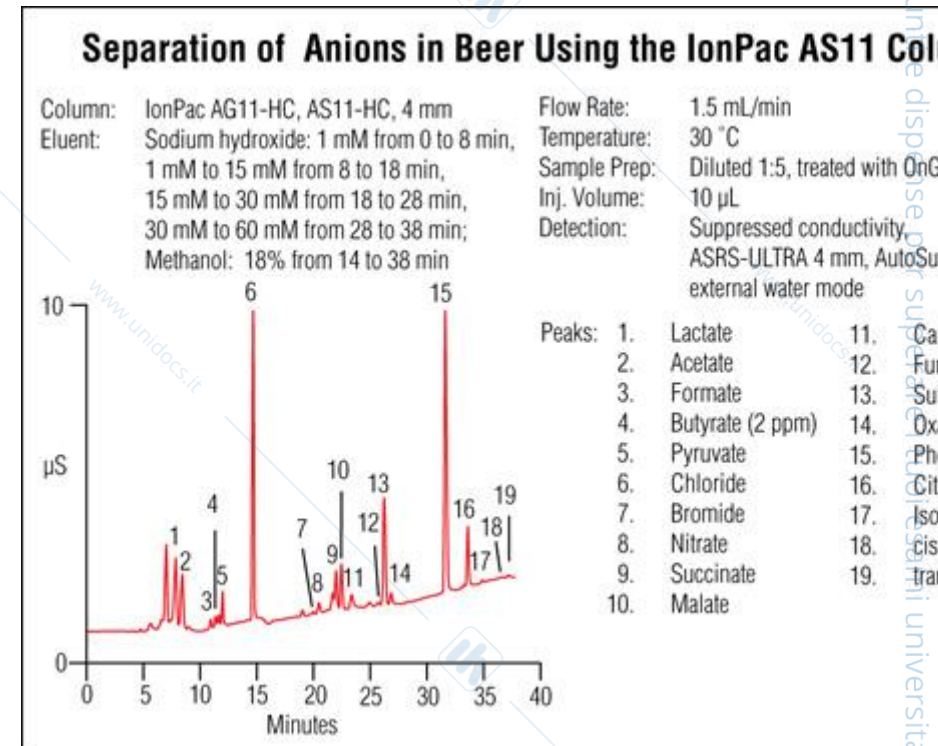


CHROMATOGRAMMA

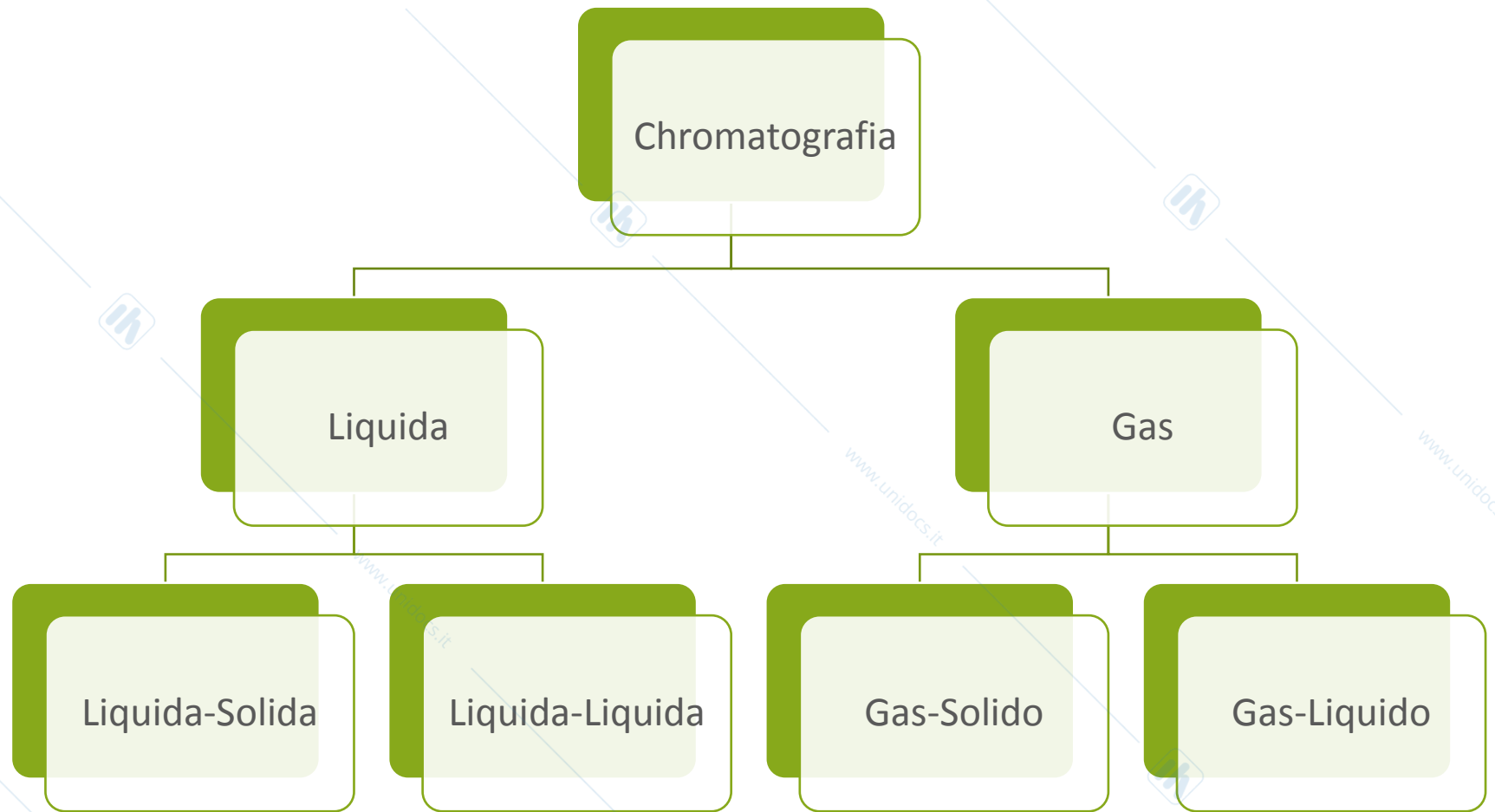
ESEMPIO 1



ESEMPIO 2



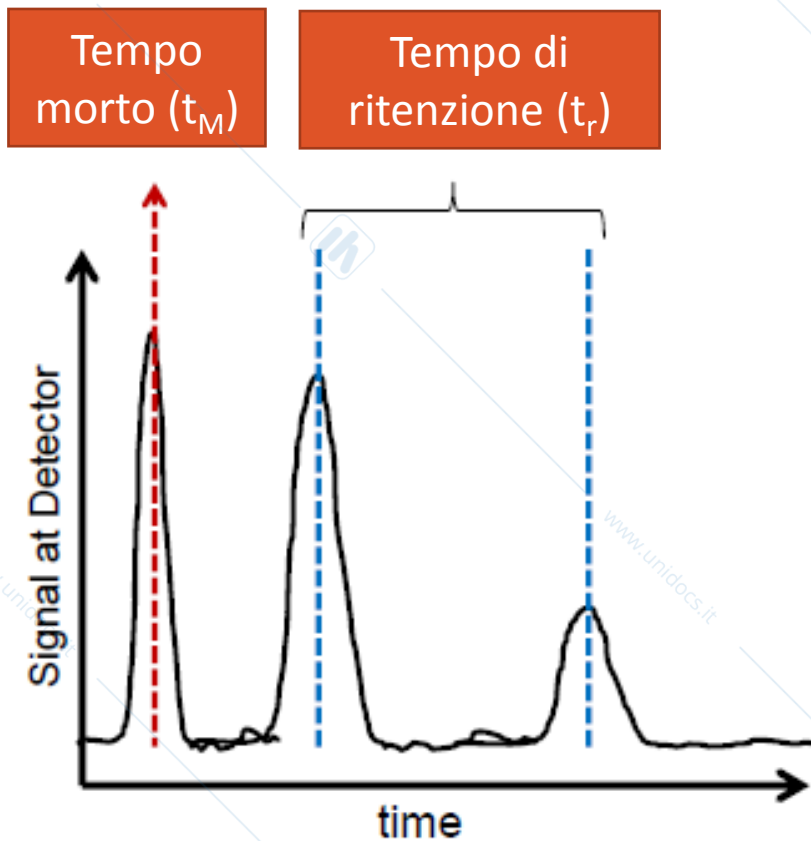
TIPI DI CHROMATOGRAFIA



TEORIA DI CROMATOGRAFIA

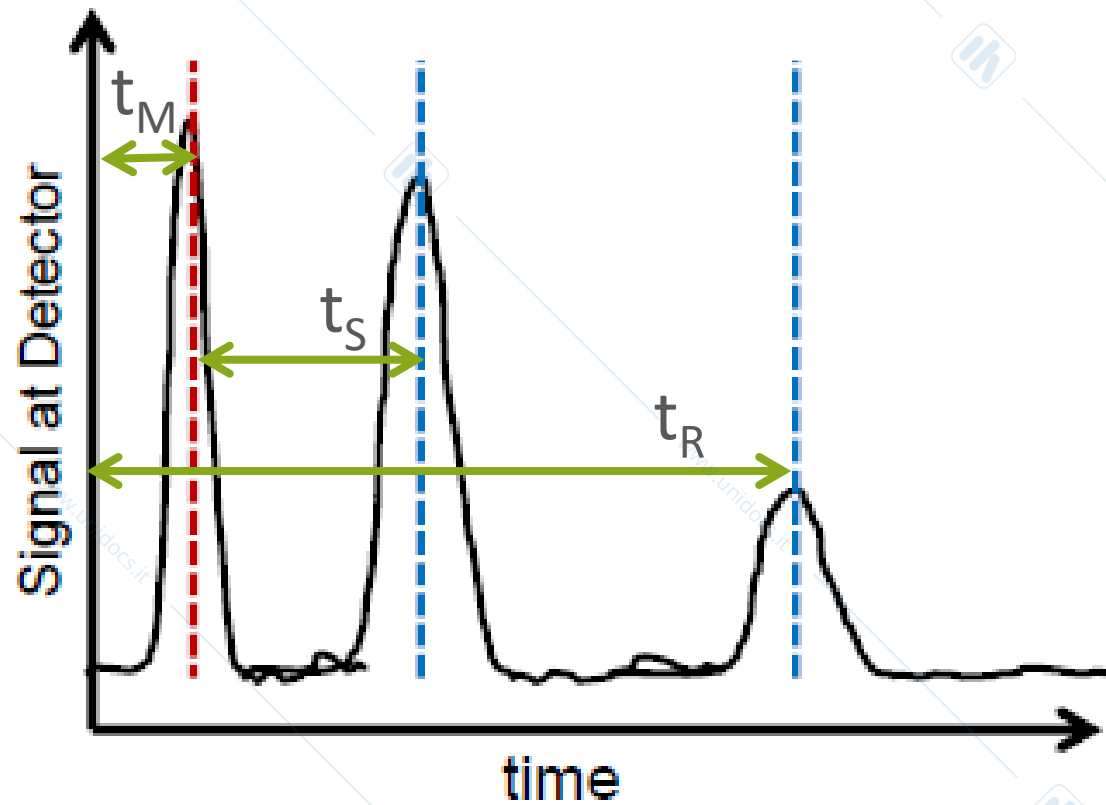
RITENZIONE E RISOLUZIONE

TEMPO DI RITENZIONE (t_R)

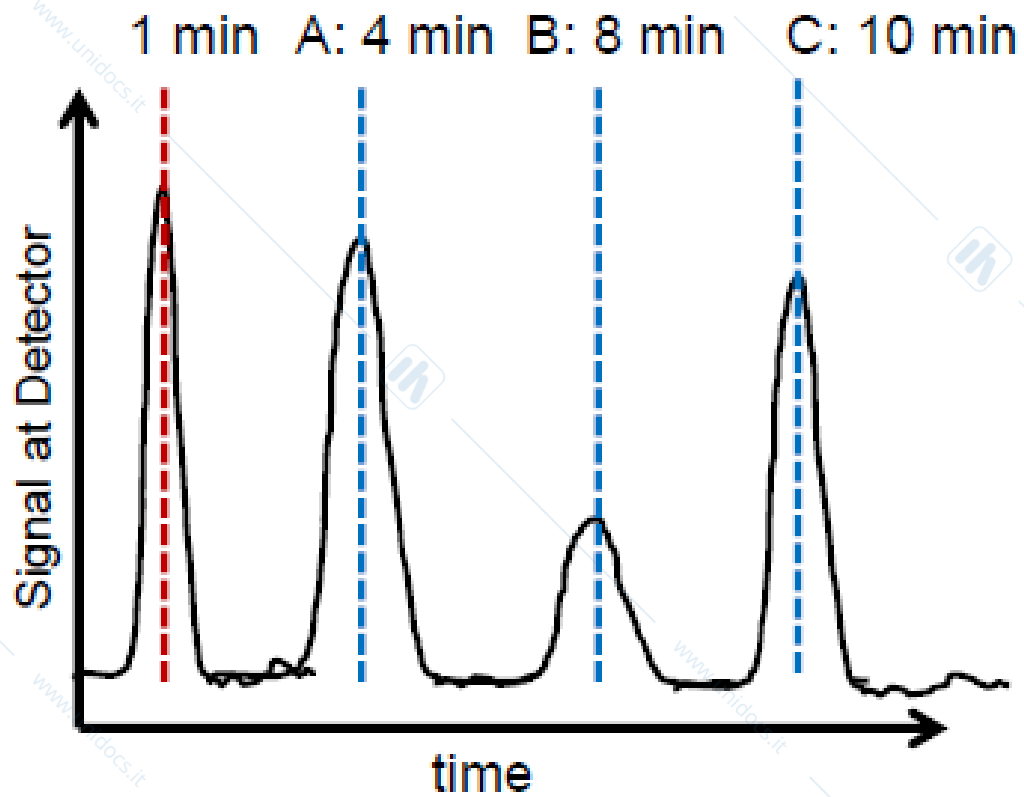


Annalita	Tempo d ritenzione (t_R)
A	2 min
B	4 (min)

TEMPO DI RITENZIONE (t_R)



$$t_{\text{Ritenzione}} = t_{\text{Stazionaria}} + t_{\text{M}} + t_{\text{S}}$$

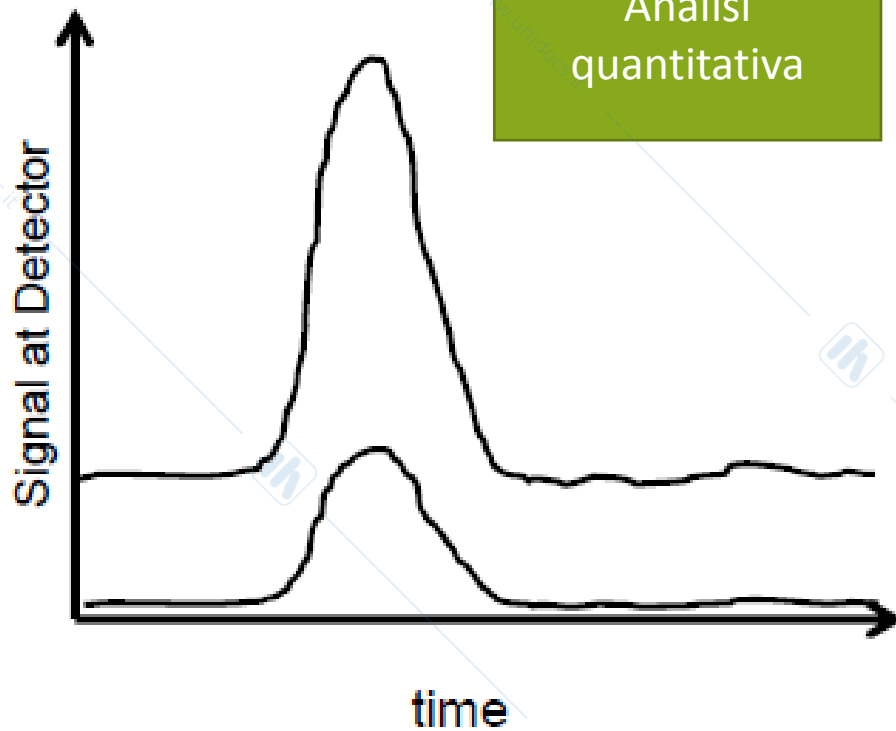


Quale frazione del tempo passa A, B e C nella fase stazionaria?

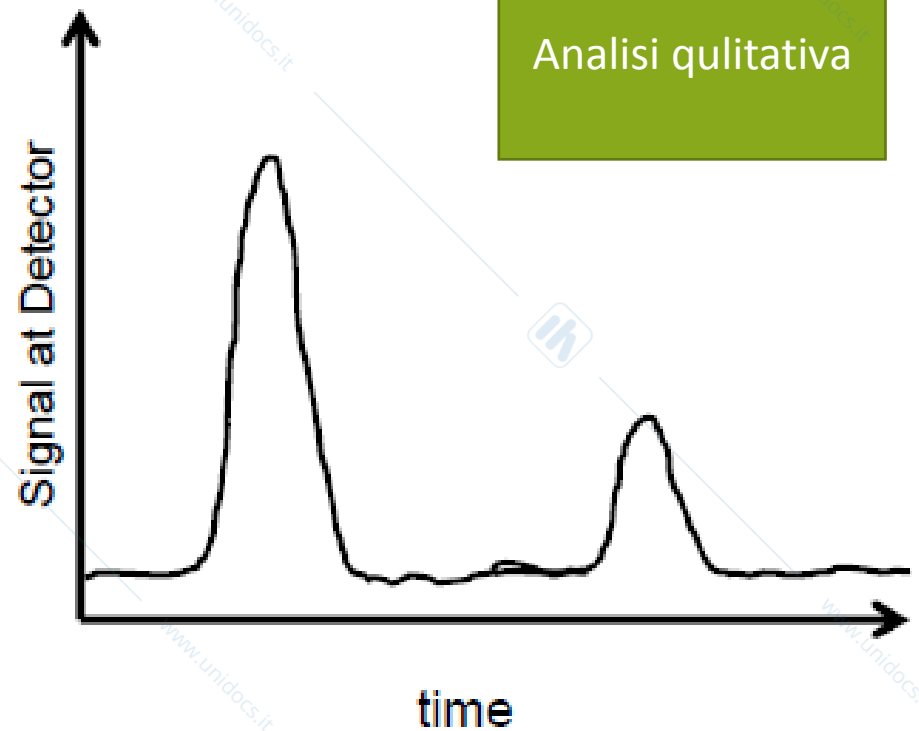
A: $\frac{3}{4}$ oppure 75%

B: $\frac{7}{8}$ oppure 88%

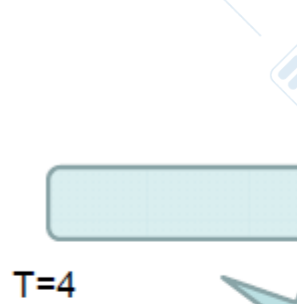
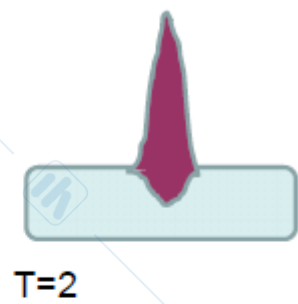
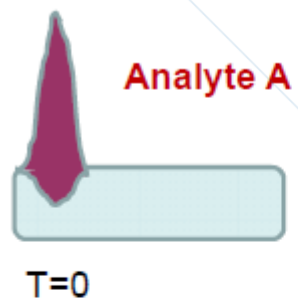
C: $\frac{9}{10}$ oppure 90%



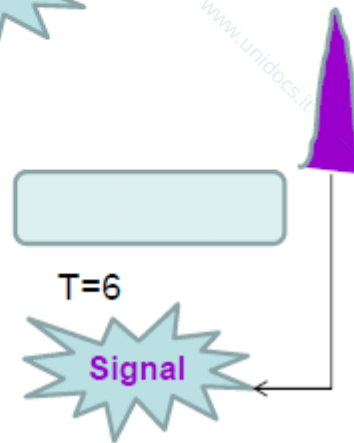
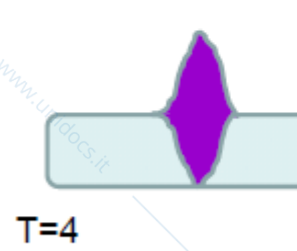
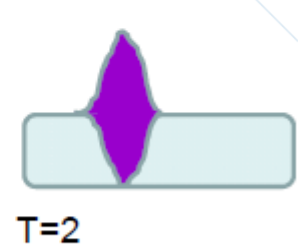
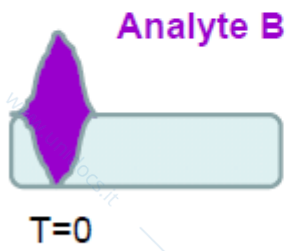
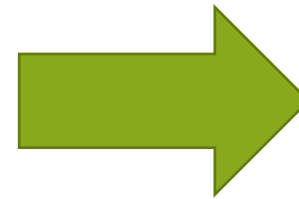
Calibrazione con gli standard
Area sotto la gaussiana



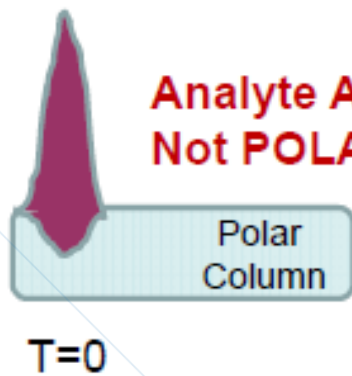
Calibrazione con gli standard
Tempo di ritenzione t_R specifico



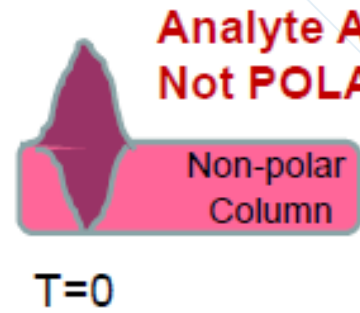
Signal



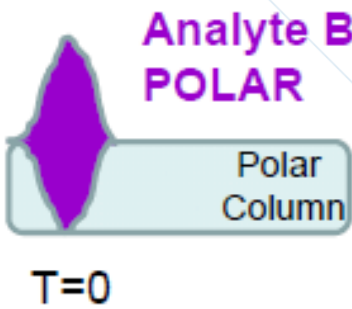
Signal



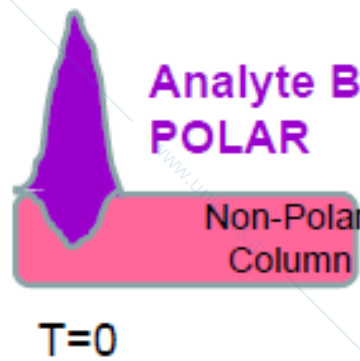
Little 'partition'
into a polar column



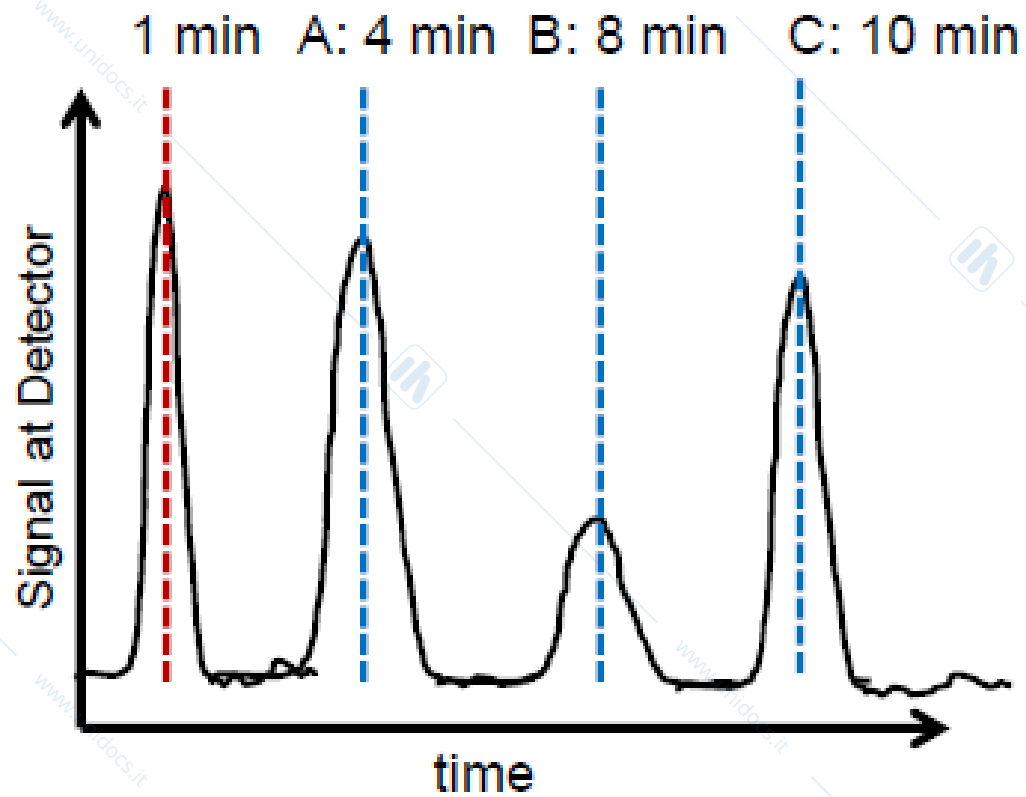
Colonna apolare separa le molecole apolari



Definite partition into a polar column



Colonna apolare separa male le molecole polari

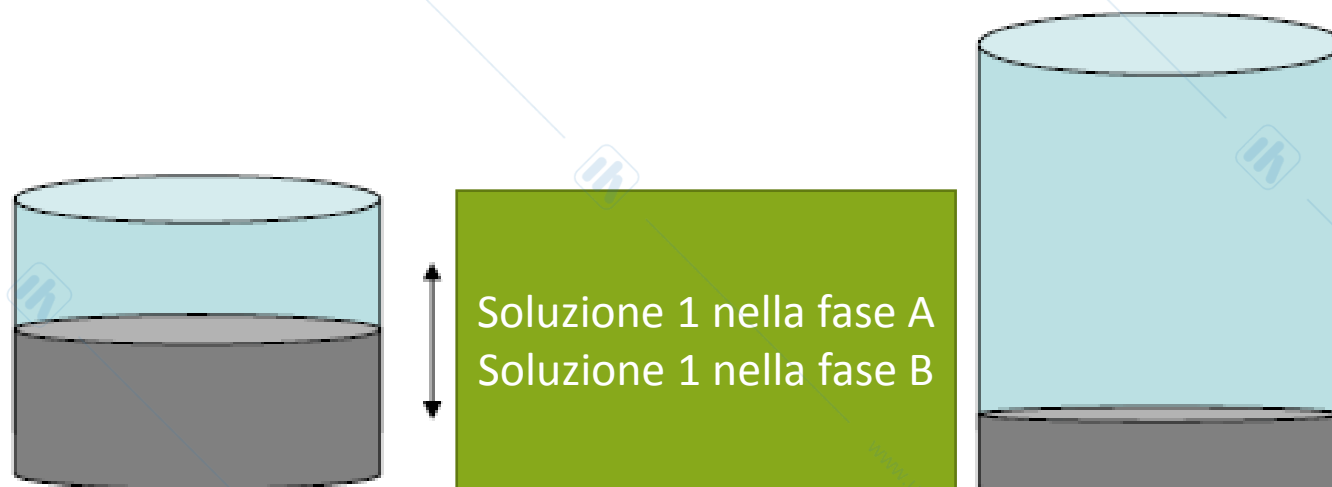


Colonna molto polare

Quale molecola è più polare e quale meno polare?

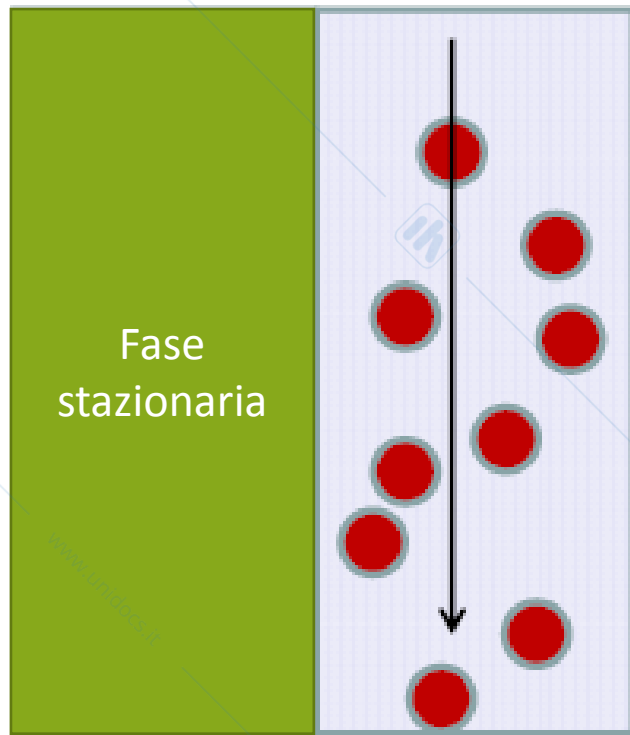
C: più polare
A: meno polare

COSTANTE DI DISTRIBUZIONE



$$K = \frac{[\text{Soluzione}]_a}{[\text{Soluzione}]_b} = \frac{\text{moles in A} / \text{volume}_a}{\text{moles in B} / \text{volume}_b}$$

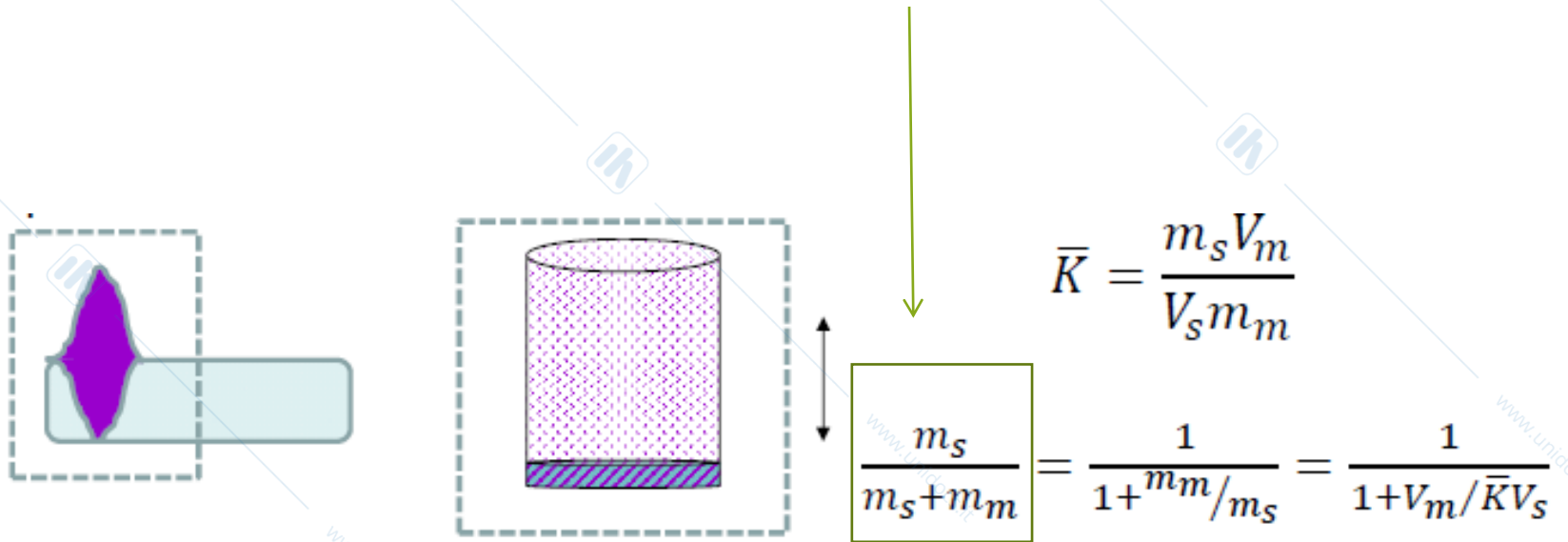
COSTANTE DI DISTRIBUZIONE



$$K = \frac{[\text{Soluzione}]_a}{[\text{Soluzione}]_b} = \frac{\text{moles linA} / \text{volum}}{\text{moles linB} / \text{volum}}$$

$$K = \frac{C_S}{C_M}$$

Costante di distribuzione del esano tra la fase mobile e la fase stazionaria è 3.
Il volume della fase mobile è 100 volte più grande rispetto la fase stazionaria.
Quale frazione delle molecole di esano è presente nella fase stazionaria in ogni momento?



$$\text{Fraction} = 1 / (1 + 100 / 3) = .0291 \text{ or } 2.9 \%$$

Table 1. Data set and their *n*-octanol-water partition coefficients (K_{ow})

No.	References compound	log K_{ow}	Class	No.	Compound name	log K_{ow}	Class
1	2-Butanone	0.3	N	32	3-Chlorobenzoic acid	2.7	A
2	4-Acetylpyridine	0.5	B	33	Toluene	2.7	N
3	Aniline	0.9	B	34	1-Naphthol	2.7	A
4	Acetanilide	1.0	N	35	2,3-Dichloroaniline	2.8	B
5	Benzyl alcohol	1.1	N	36	Chlorobenzene	2.8	N
6	4-Methoxyphenol	1.3	A	37	Allyl phenyl ether	2.9	N
7	Phenoxyacetic acid	1.4	A	38	Bromobenzene	3.0	N
8	Phenol	1.5	A	39	Ethylbenzene	3.2	N
9	2,4-Dinitrophenol	1.5	A	40	Benzophenone	3.2	N
10	Benzonitrile	1.6	N	41	4-Phenylphenol	3.2	A
11	Phenylacetonitrile	1.6	N	42	Thymol	3.3	N
12	4-Methylbenzyl alcohol	1.6	N	43	1,4-Dichlorobenzene	3.4	N
13	Acetophenone	1.7	N	44	Diphenylamine	3.4	B
14	2-Nitrophenol	1.8	A	45	Naphthalene	3.6	N
15	3-Nitrobenzoic acid	1.8	A	46	Phenyl benzoate	3.6	N
16	4-Chloraniline	1.8	B	47	Isopropylbenzene	3.7	N
17	Nitrobenzene	1.9	N	48	2,4,6-Trichlorophenol	3.7	A
18	Cinnamic alcohol	1.9	N	49	Biphenyl	4.0	N
19	Benzoic acid	1.9	A	50	Benzyl benzoate	4.0	N
20	<i>p</i> -Cresol	1.9	A	51	2,4-Nitro-6- <i>sec</i> -butyl phenol	4.1	N
21	<i>cis</i> -Cinnamic acid	2.1	A	52	1,2,4-Trichlorobenzene	4.2	N
22	<i>trans</i> -Cinnamic acid	2.1	A	53	Dodecanoic acid	4.2	A
23	Anisole	2.1	N	54	Diphenyl ether	4.2	N
24	Methyl benzoate	2.1	N	55	Phenanthrene	4.5	N
25	Benzene	2.1	N	56	<i>N</i> -Butylbenzene	4.6	N
26	3-Methylbenzoic acid	2.4	A	57	Fluoranthene	4.7	N
27	4-Chlorophenol	2.4	A	58	Dibenzyl	4.8	N
28	Trichloroethene	2.4	N	59	2,6-Diphenylpyridine	4.9	N
29	Atrazine	2.6	B	60	Triphenylamine	5.7	N
30	Ethyl benzoate	2.6	N	61	DDT	6.2	N
31	2,6-Dichlorobenzonitrile	2.6	N				

A: acidic compounds; B: basic compounds; N: neutral compounds.

SOLO 1 MOLE

DI DDT SU 1 M

SARÀ SCOL

NELL'H₂O

VELOCITÀ DI MIGRAZIONE DEI SOLUTI

TEMPI DI RITENZIONE

$$K_C = \frac{C_S}{C_M}$$

$$t_R = t_S + t_M$$

$$\bar{v} = \frac{L}{t_R} \quad [\text{cm/s}]$$

Velocità media lineare di migrazione del soluto

$$u = \frac{L}{t_M} \quad [\text{cm/s}]$$

Velocità media lineare delle molecole della fase mobile

RELAZIONE TRA VELOCITÀ DI MIGRAZIONE E COSTANTE DI DISTRIBUZIONE

$\bar{v} = u \times$ frazione di tempo che il soluto trascorre nella fase mobile

$$\bar{v} = u \times \frac{\text{Moli di soluto nella fase mobile}}{\text{Moli totali di soluto}}$$

$$\bar{v} = u \times \frac{c_M V_M}{c_M V_M + c_S V_S} = u \times \frac{1}{1 + c_S V_S / c_M V_M}$$

$$\bar{v} = u \times \frac{1}{1 + K_C V_S / V_M}$$

IL FATTORE DI RITENZIONE k

$$k_A = \frac{K_A V_S}{V_M}$$



$$\bar{v} = u \times \frac{1}{1 + K_C V_S / V_m}$$



$$\bar{v} = u \times \frac{1}{1 + k_A}$$



$$k_A = \frac{t_R - t_M}{t_M} = \frac{t_S}{t_M}$$

Un fattore di ritenzione molto inferiore all'unità, significa che il soluto esce dalla colonna ad un tempo quasi uguale a quello del tempo morto.

Quando il fattore di ritenzione è maggiore di valori che vanno da 20 a 30, i tempi di eluzione sono eccessivamente lunghi. Idealmente, k abbiano valori compresi tra 1 e 5

IL FATTORE DI SELETTIVITÀ

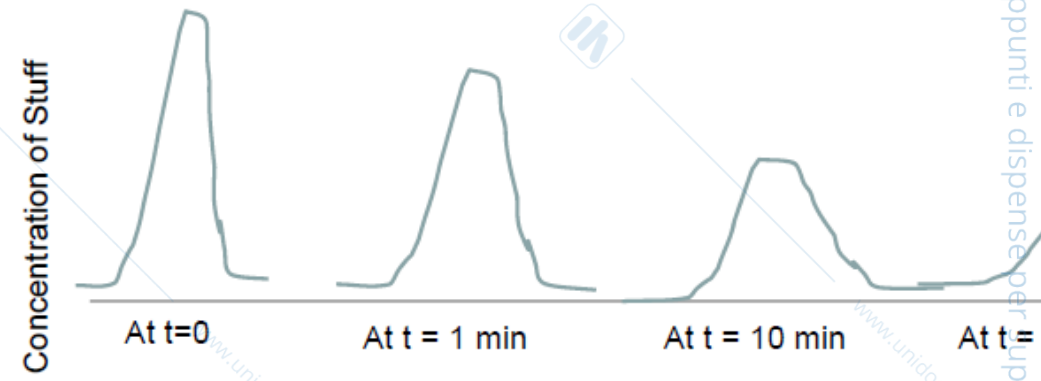
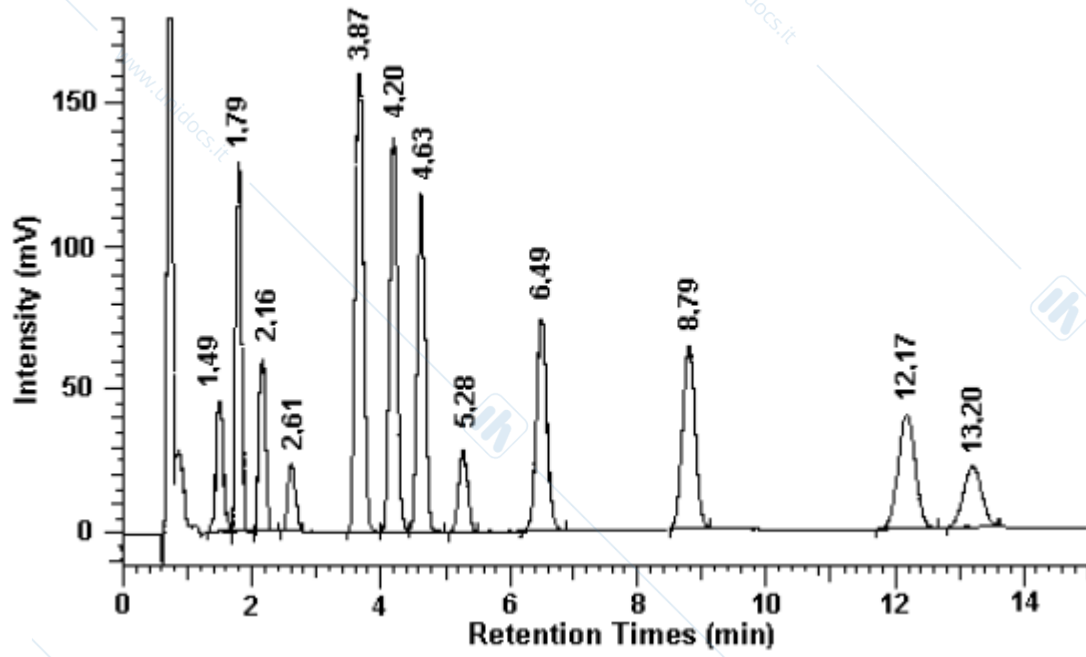
$$\alpha = \frac{K_B}{K_A}$$

K_B costante di distribuzione per la specie B più fortemente trattenuta e K_A è la costante per la specie A meno fortemente trattenuta, e che pertanto eluisce più rapidamente.

$$\alpha = \frac{k_B}{k_A}$$

Relazione tra il fattore di selettività per i due soluti e i loro fattori di ritenzione.

EFFICIENZA DELLA COLONNA



PIÙ GRANDE t_R , PIÙ LARGA LA BANDA

Allargamento della banda dipende dall'efficienza della colonna.
Efficienza della colonna viene descritta da:

Numero dei piatti teorici:

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

Lunghezza dell'impaccamento della colonna

L'altezza del piatto

Il piatto, è il volume della colonna in quale concentrazione della specie nella fase mobile e stazionaria è in Equilibrium.



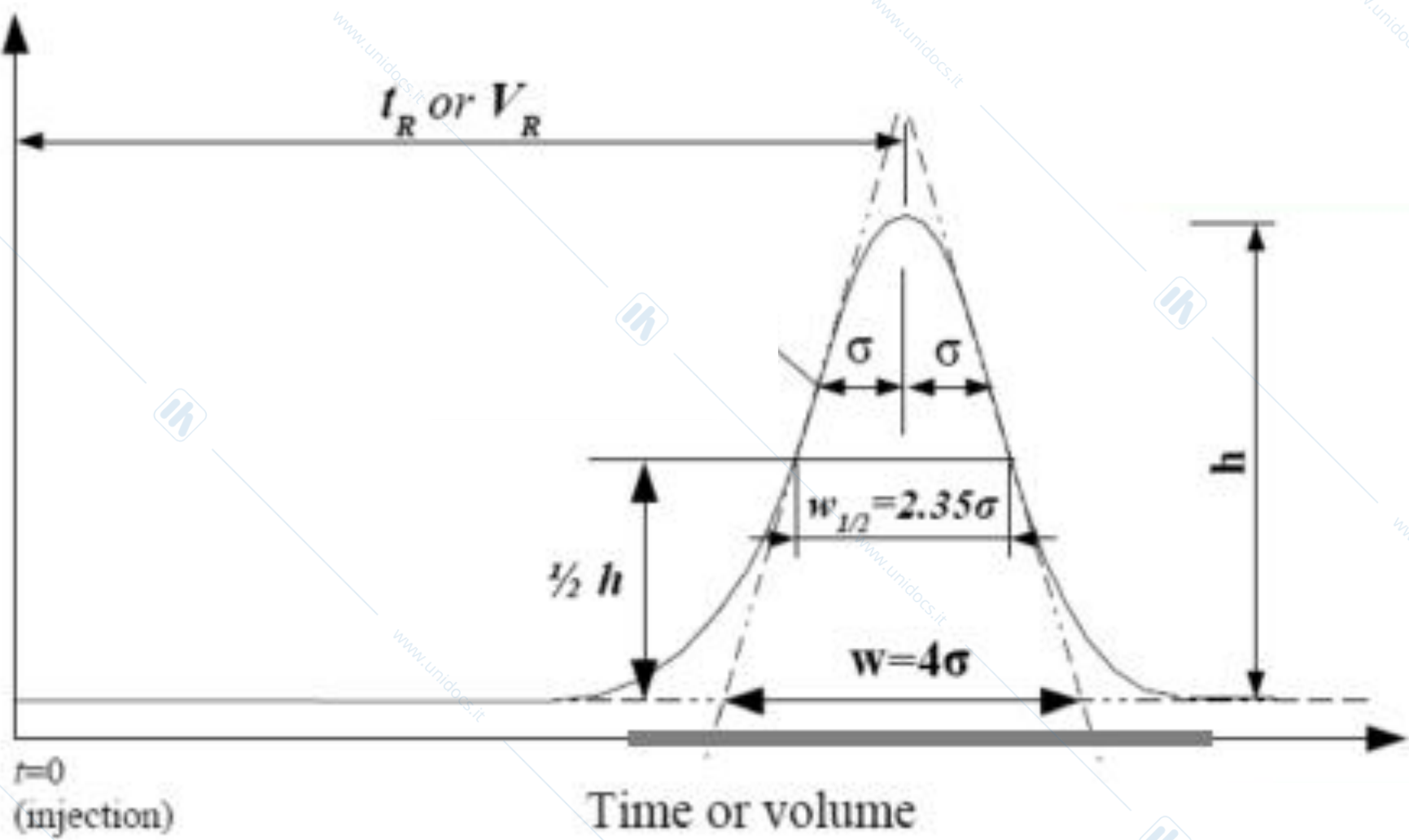
Quando la specie entra sul *primo piatto*, viene divisa tra la fase stazionaria e la fase mobile secondo il suo K

La distribuzione delle concentrazioni della specie, dopo aver passato numero N di piatti viene descritto dalla

$$y = h \times \exp \left[- \frac{(x - m)^2}{2\sigma^2} \right]$$

H - altezza della banda, σ - deviazione standard, m - coefficiente della posizione della banda ($m = t_R$),
 x - qualsiasi tempo di ritenzione

Il grafico di questa funzione è la Gaussiana



COME CALCOLARE NUMERO DI PIATTI TEORICI:

$$N = \left(\frac{t_R}{\sigma} \right)^2$$

$$N = 5,55 \left(\frac{t_R}{W_{1/2}} \right)^2$$

$$N = 16 \left(\frac{t_R}{4\sigma} \right)^2$$

ESEMPIO 1

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

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.

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

$$H = \frac{L}{N} = \frac{25 \text{ cm}}{79,920} \cdot \frac{10 \text{ mm}}{1 \text{ m}} = 0.01$$

DOMANDA

Esempio 1 o 2 parla della Gas Cromatografia?

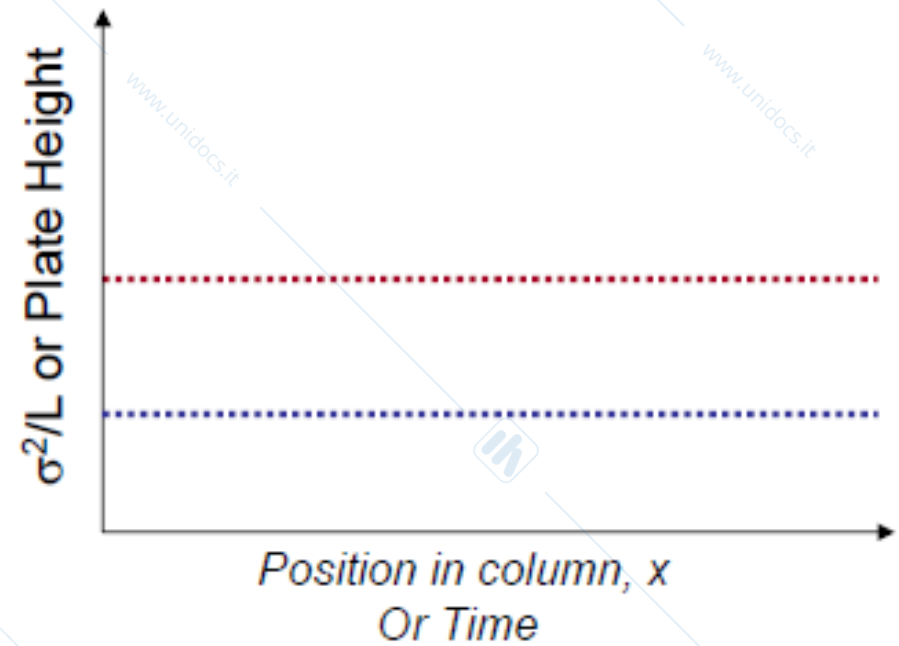
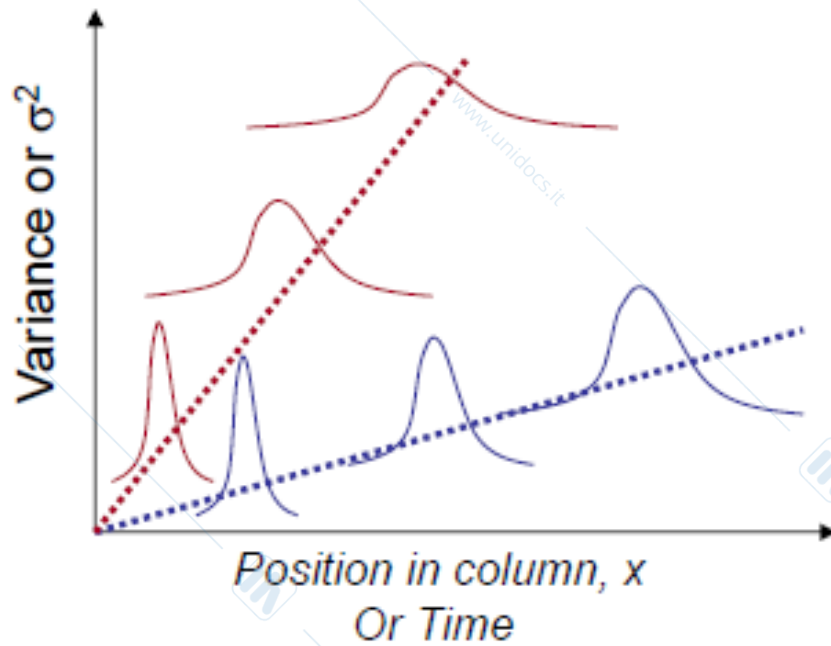
Nota le differenze tra esempio 1 e 2:

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

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

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

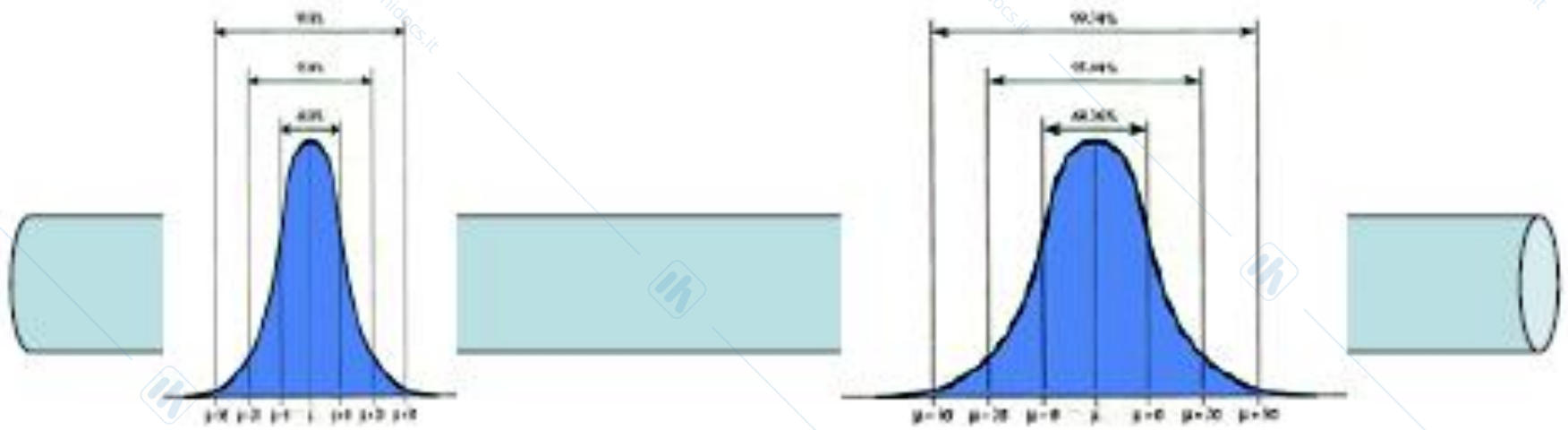
$$H = \frac{L}{N} = \frac{25 \text{ cm} \cdot 10 \text{ mm}}{79,920 \cdot 1 \text{ m}} = .0125$$



H (l'altezza del piatto) descrive la qualità della colonna:

H basso → minore allargamento della banda in funzione del tempo (blue)

H alto → maggiore allargamento della banda in funzione del tempo (rosso)



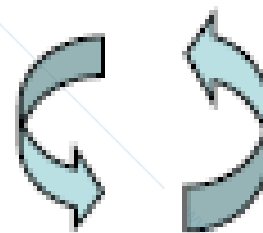
$$H = \sigma^2 / L$$

H basso → Bande strette → migliore la separazione

AVENDO DATI SPERIMENTALI POSSIAMO CALCOLARE

$$H = \frac{\sigma^2}{L} \quad \text{or} \quad H = \frac{\sigma^2}{x}$$

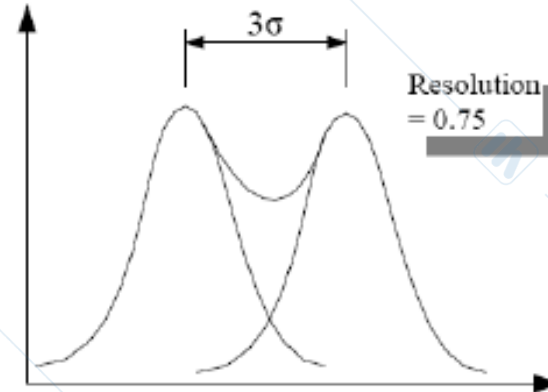
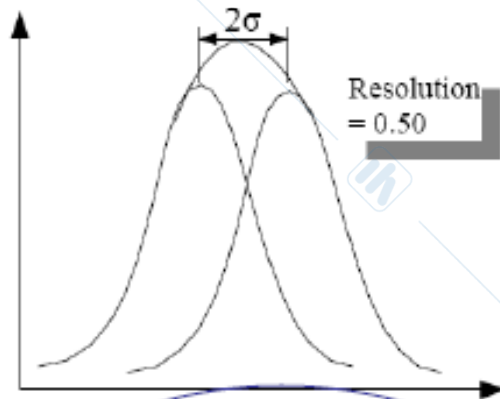
$$N = \frac{L}{H} = \frac{L^2}{\sigma^2}$$



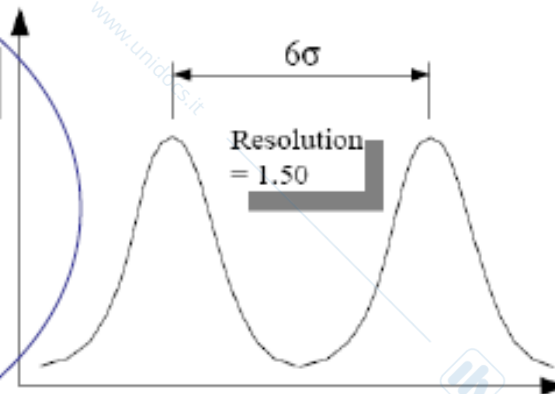
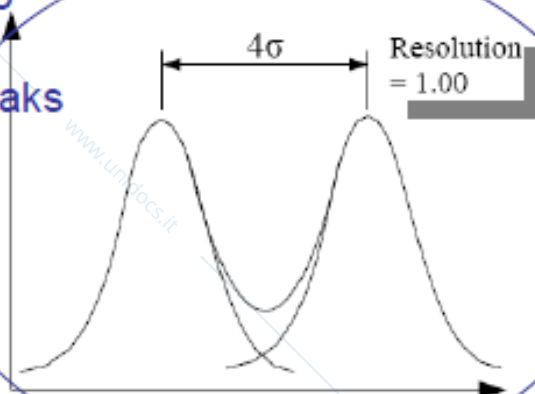
$$\sigma = \sqrt{\frac{L^2}{N}} = \frac{L}{\sqrt{N}}$$

RISOLUZIONE DELLA COLONNA

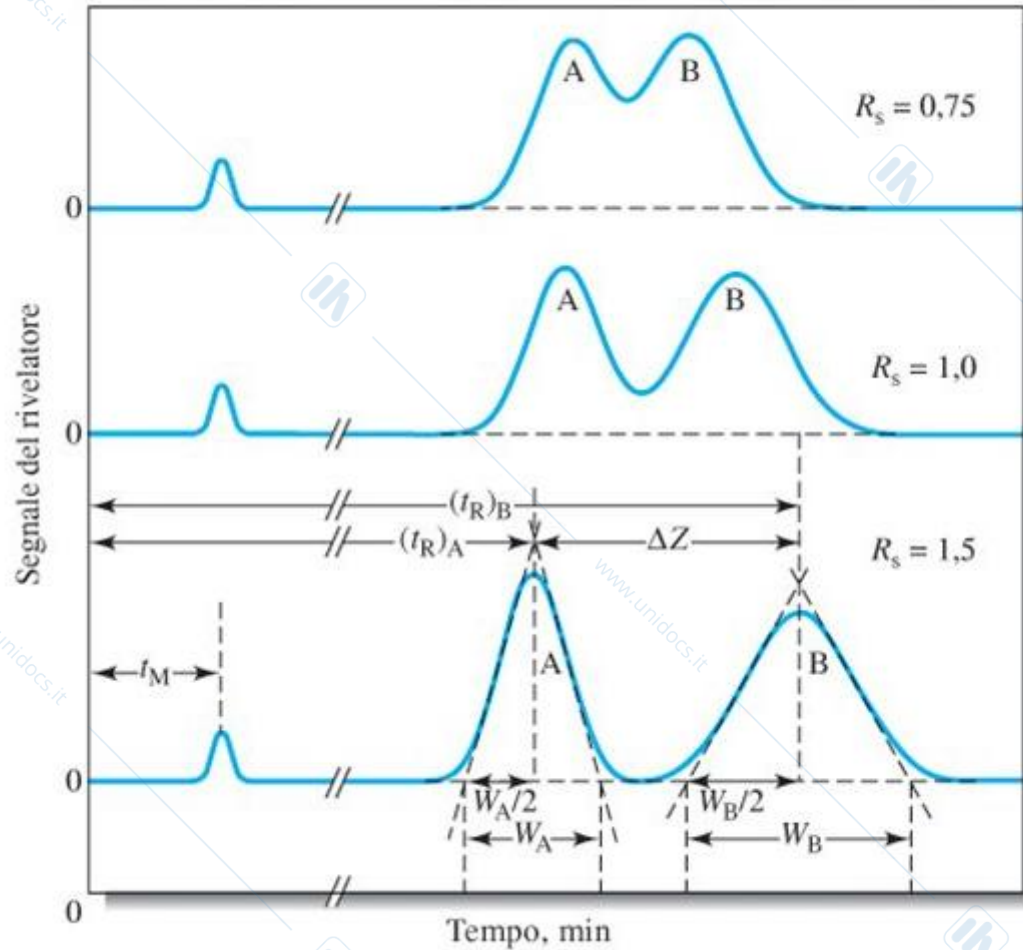
$$\text{risoluzione} = \frac{\Delta t_r}{W_{av}}$$



Name two ways to separate peaks



RISOLUZIONE DELLA COLONNA



$$R = \frac{\Delta Z}{\frac{1}{2}(W_A + W_B)}$$

$$R = \frac{2\Delta Z}{(W_A + W_B)}$$

$$R = \frac{2[(t_R)_B - (t_R)_A]}{(W_A + W_B)}$$

ESEMPIO 1

Tempo di ritenzione della sostanza A è 5 min, mentre larghezza della banda sulla base è 12 secondi.
Tempo di ritenzione della sostanza B è 5,8 min, mentre la larghezza della banda sulla base è 16 secondi.
Calcola la risoluzione tra le due bande.

$$5,8 \text{ min} - 5 \text{ min} = 0,8 \text{ min} = 48 \text{ sec}$$

$$(16 \text{ sec} + 12 \text{ sec}) / 2 = 14 \text{ sec}$$

$$R = (48 \text{ sec} / 14 \text{ sec}) = 3,43$$

ESEMPIO 2

Adesso cambiamo le condizioni durante la separazione:

Tempo di ritenzione della sostanza A è 10 min, mentre larghezza della banda sulla base è 20 secondi.

Tempo di ritenzione della sostanza B è 10,9 min, mentre la larghezza della banda sulla base è 24 secondi.

Calcola la risoluzione tra le due bande.

$$10,9 \text{ min} - 10 \text{ min} = 0,9 \text{ min} = 54 \text{ sec}$$

$$(20 \text{ sec} + 24 \text{ sec}) / 2 = 22 \text{ sec}$$

$$R = (54 \text{ sec} / 22 \text{ sec}) = 2,45$$

RISOLUZIONE E PARAMETRI DELLA SEPARAZIONE

$$R = \frac{\sqrt{N}}{4}(\gamma - 1) = \frac{\sqrt{N}}{4} \left(\frac{t_b}{t_a} - 1 \right)$$

γ - fattore della separazione. Quando $t_a=341$, e $t_b=348 \rightarrow \gamma=348/341=1,0205$ (sempre > 1)

ESEMPIO 1

Quanto deve essere N , per avere risoluzione 2 di due bande?

152290 piatti

RISOLUZIONE E PARAMETRI DELLA SEPARAZIONE

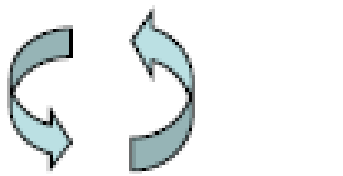
$$R = \frac{\sqrt{N}}{4} \left(\frac{\alpha - 1}{\alpha} \right) \left(\frac{k_B}{1 + k_B} \right)$$

k_B fattore di ritenzione della specie che si muove più lentamente e α il fattore di se


$$N = 16R^2 \left(\frac{\alpha}{\alpha - 1} \right)^2 \left(\frac{1 + k_B}{k_B} \right)^2$$

$$H = \frac{\sigma^2}{L} \text{ or } H = \frac{\sigma^2}{x}$$

$$N = \frac{L}{H} = \frac{L^2}{\sigma^2}$$

$$\sigma = \sqrt{\frac{L^2}{N}} = \frac{L}{\sqrt{N}}$$


$$R = \frac{\Delta t_r}{W_{av}} = \frac{0.589 \cdot \Delta t_r}{W_{1/2}} = \frac{\Delta t_r}{4\sigma_{avg}}$$

$$R = \frac{\sqrt{N}}{4}(\gamma - 1) = \frac{\sqrt{N}}{4} \left(\frac{t_b}{t_a} - 1 \right)$$


EQUAZIONI DA CAPIRE

$$R = \frac{m_s V_m}{V_s m_m}$$

$$k = \frac{(t_r - t_m)}{t_m} \quad k = R V_s / V_m$$

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

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

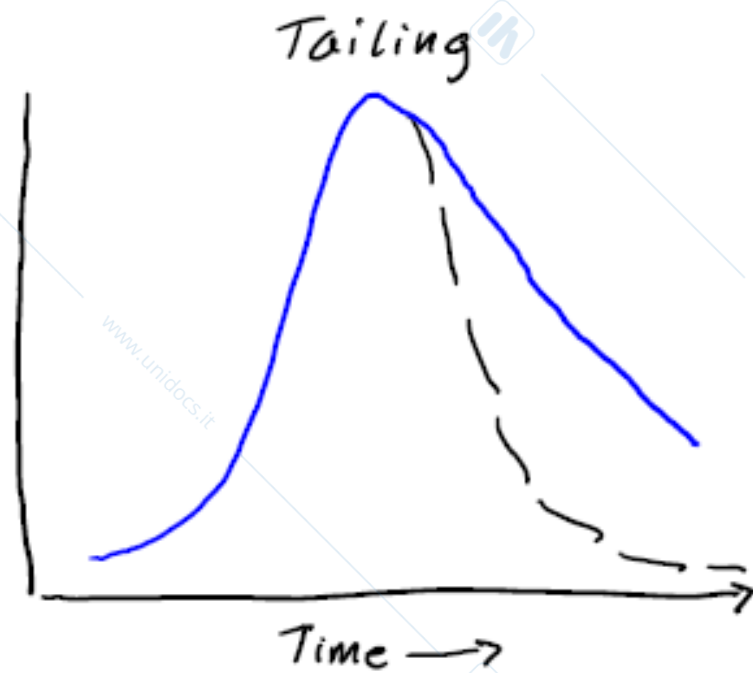
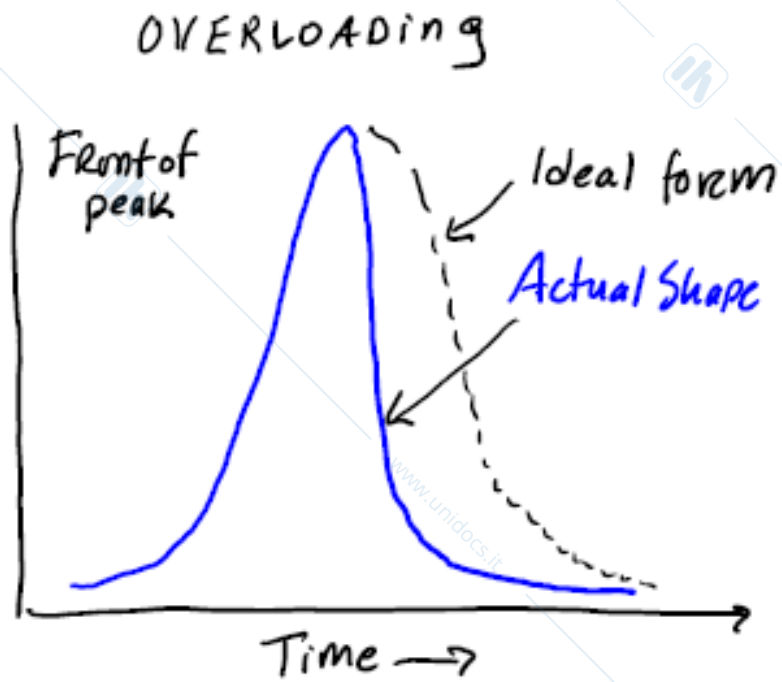
$$N = \frac{16t_r^2}{w^2}$$

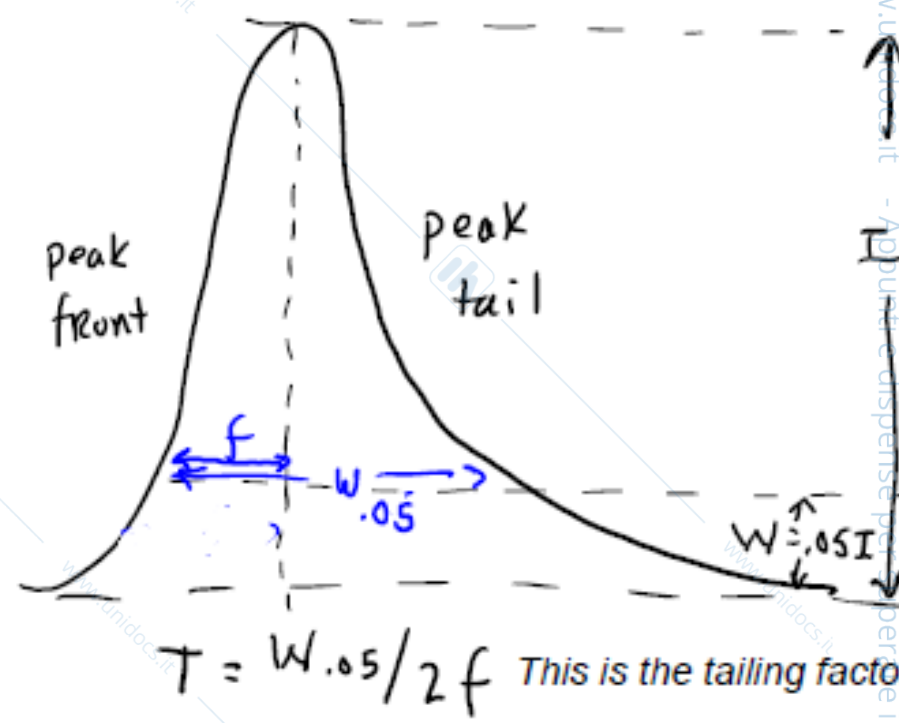
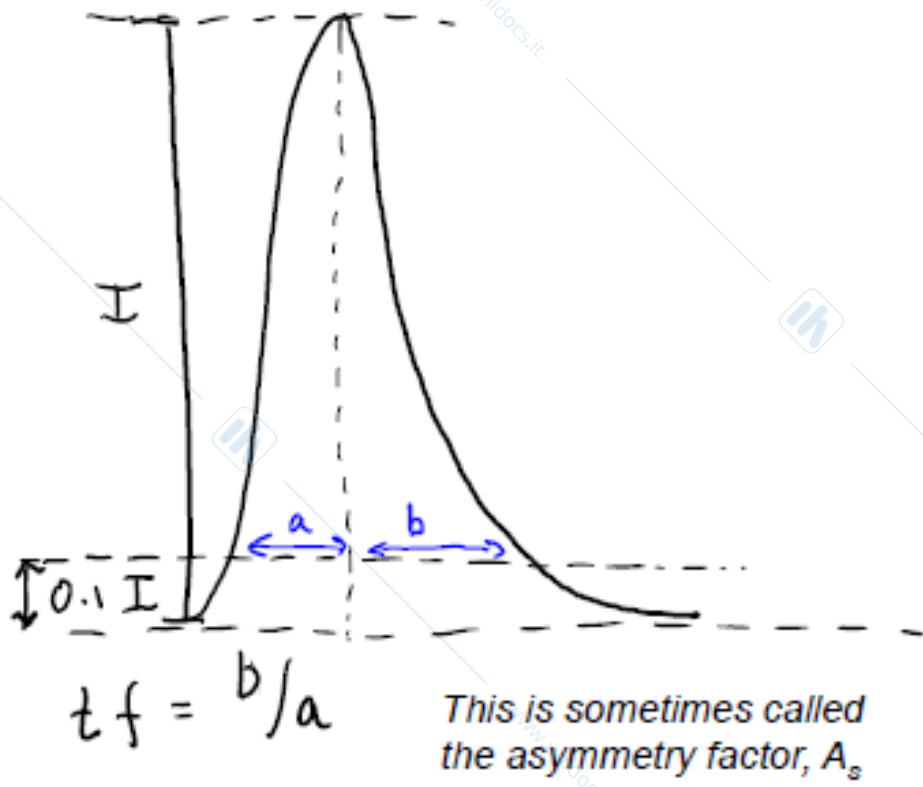
$$N = \frac{5.55t_r^2}{w_{1/2}^2}$$

$$R = \frac{\Delta t_r}{w_{av}} = \frac{0.589 \cdot \Delta t_r}{w_{1/2}} = \frac{\Delta t_r}{4\sigma_{avg}}$$

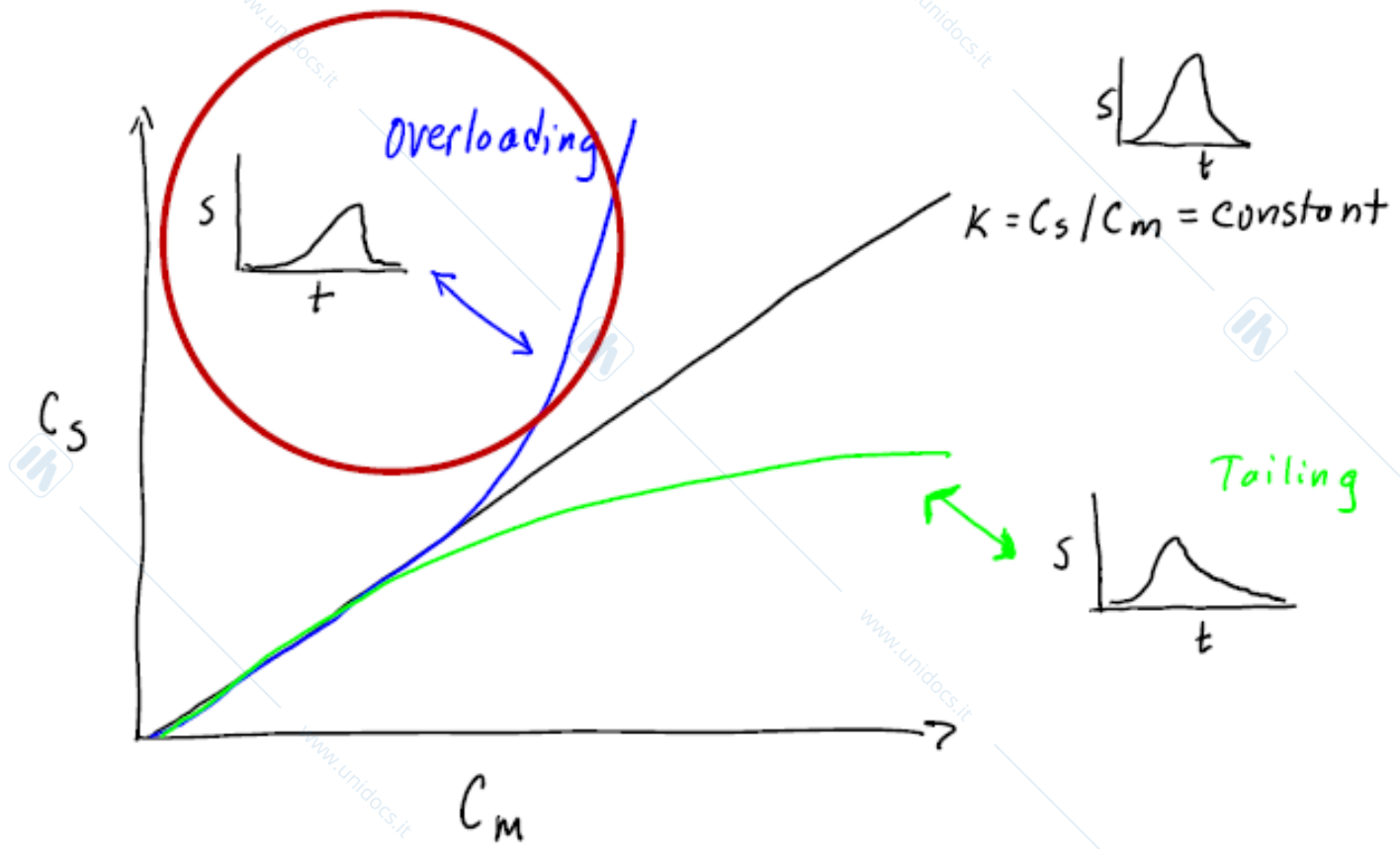
$$R = \frac{\sqrt{N}}{4} (\gamma - 1) = \frac{\sqrt{N}}{4} \left(\frac{t_b}{t_a} - 1 \right)$$

ALLARGAMENTO DI BANDA

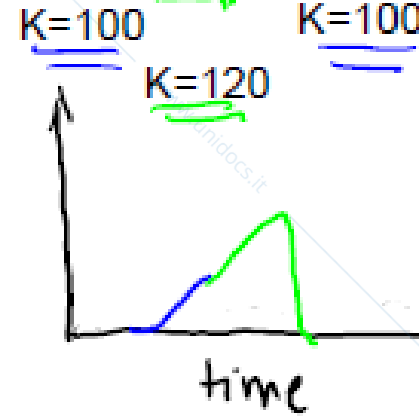
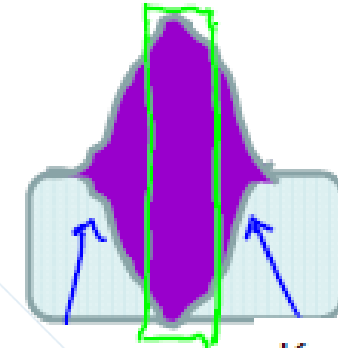
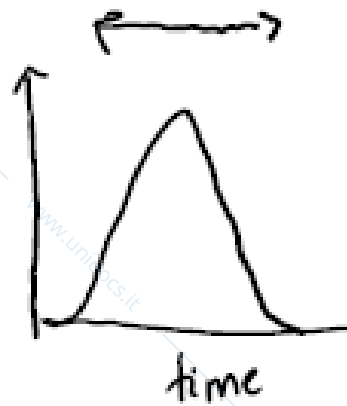




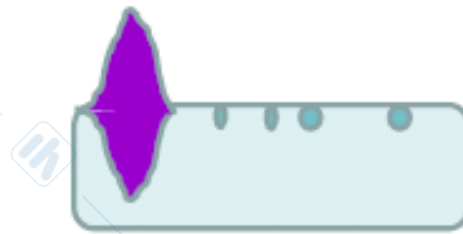
Deve essere al meno < 2



OVERLOADING



TAILING



Dipende da diversi k (fattore di ritenzione)

Alcuni siti/gruppi funzionali della fase stazionaria legano più forte → impurezze della colonna

L'EFFICIENZA DELLA COLONNA

L'allargamento della banda riflette una perdita di efficienza della colonna

Più bassa è la velocità dei processi di trasferimento della massa che siano durante la migrazione di un soluto lungo la colonna



Maggiore sarà allargamento della banda all'uscita dalla colonna.

VAN DEEMTER



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



VAN DEEMTER

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



$$H = \frac{B}{u} + C_S u + A$$

Colonne impaccate ad elevate velocità

DIFFUSIONE LONGITUDINALE



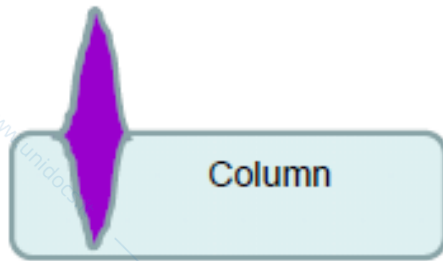
$$H = \frac{B}{u} + C_S u + C_M u$$

$$B = 2 \gamma D_m$$

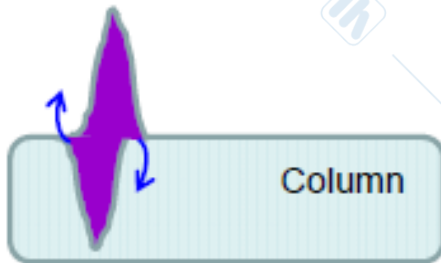
D_m coefficiente di diffusione
 γ dipende dalla superficie delle particelle della fase

Importante nella Gas Cromatografia

TRASFERIMENTO DI MASSA NELLA FASE STAZIONARIA



Lento = buono equilibrio



Veloce = niente equilibrio

$$H = \frac{B}{u} + C_s u + C_M u$$

$$C_s = \frac{d_f^2}{D_s} \frac{k}{(1+k)^2}$$

d_f Spessore del ricoprimento liquido della fase stazionaria
 D_s diffusione nella fase stazionaria
 k fattore di ritenzione

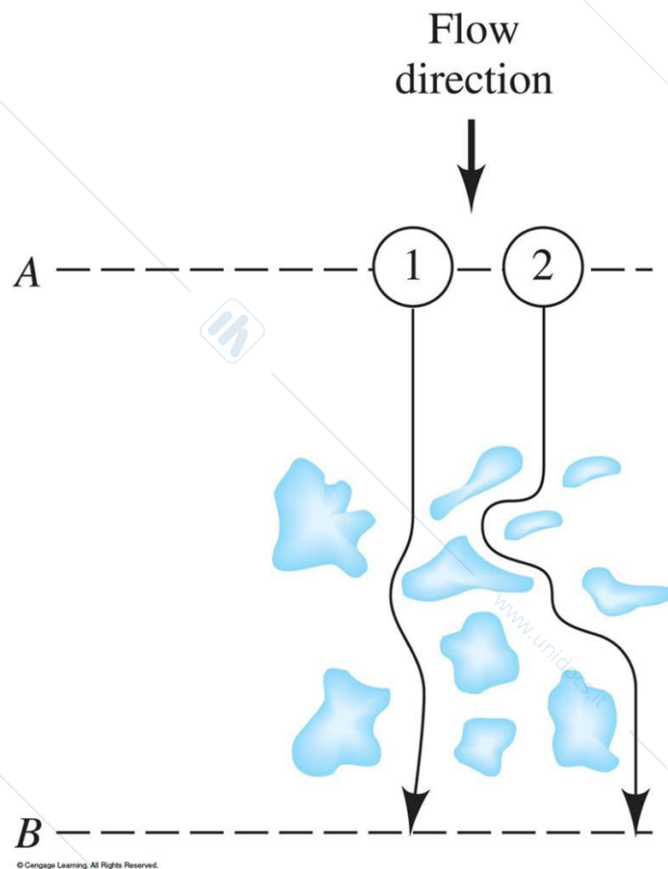
TRASFERIMENTO DI MASSA NELLA FASE MOBILE

$$H = \frac{B}{u} + C_S u + C_M u \longrightarrow A = 2\gamma d_p$$

γ dipende dalla struttura del impaccamento
 d_p diametro degli granuli della fase stazionaria

$$C_m = \frac{\gamma d_p^2}{D_m}$$

γ dipende dalla struttura del impaccamento della
 d_p diametro della particella di impaccamento
 D_m coefficiente della diffusione nella fase mobile

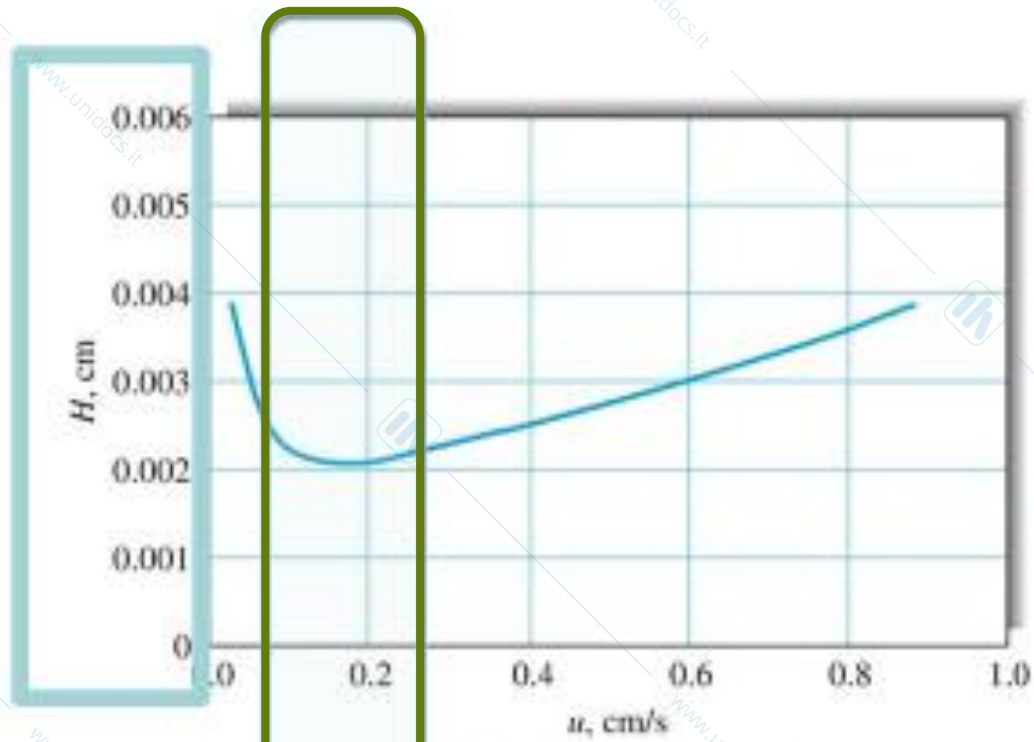


$$A = 2\gamma d_p$$

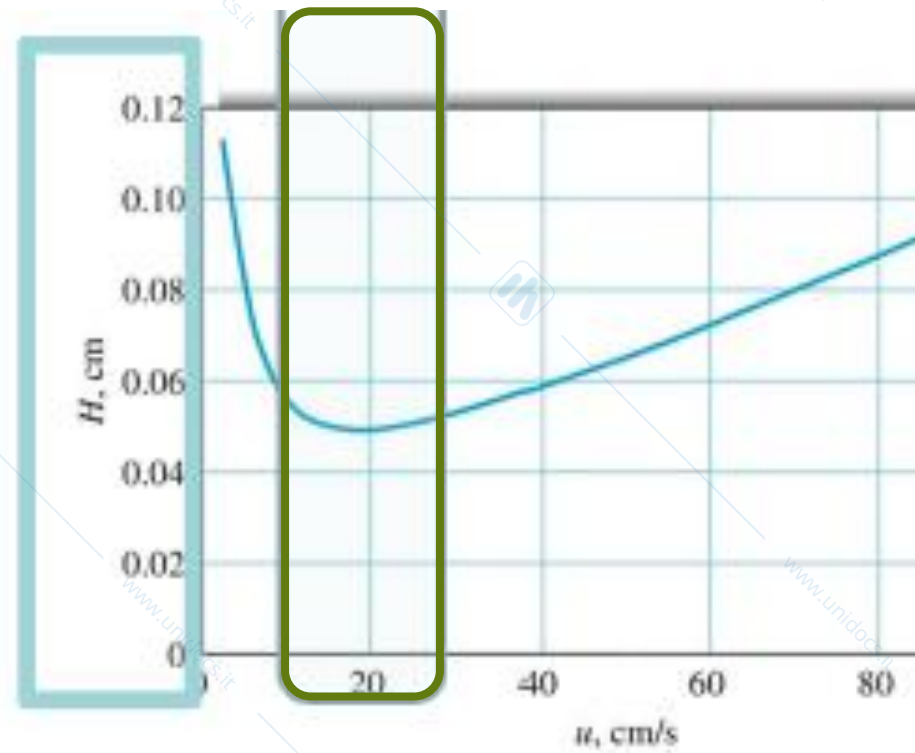
γ dipende dalla struttura del impaccamento
 d_p diametro degli granuli della fase stazionaria

Dipende da:

- Volume della iniezione
- Volume nel rivelatore




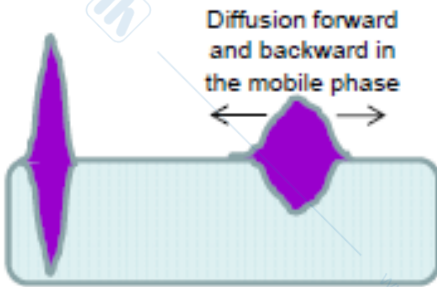
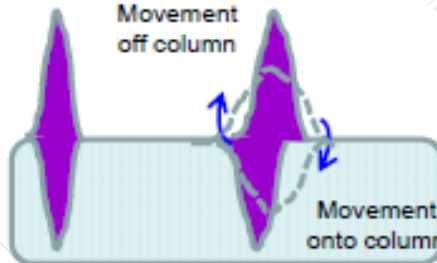
(a) Liquid chromatography



(b) Gas chromatography

COME MIGLIORARE:

$$H = \frac{B}{u} + C_S u + A$$

	<p>Non è un problema nella GC Diametro della particella di impaccamento più piccolo Volumi iniettati nella colonna più piccoli</p> <p style="text-align: right;">A</p>
	<p>Aumentare velocità della fase mobile</p> <p style="text-align: right;">B</p>
	<p>Spessore della fase stazionaria più fine Diminuire velocità della fase mobile</p> <p style="text-align: right;">C</p>

VARIABILI CHE INFLUENZANO L'EFFICIENZA DELLA COLONNA

VARIABILI	SIMBOLO	UNITA' USUALI
Velocità lineare della fase mobile	u	[cm/s]
Coefficiente di diffusione nella fase mobile*	D_M	[cm ² /s]
Coefficiente di diffusione nella fase stazionaria*	D_S	[cm ² /s]
Fattore di ritenzione	k	adimensionale
Diametro della particella di impaccamento	d_p	cm
Spessore del ricoprimento liquido della fase stazionaria	d_f	cm

* Aumenta con l'aumentare della temperatura e al diminuire della viscosità

CROMATOGRAFIA LIQUIDA

- Soltanto 23% delle sostanze possono essere separate nella GC
- Usando liquidi possiamo aumentare uso della cromatografia

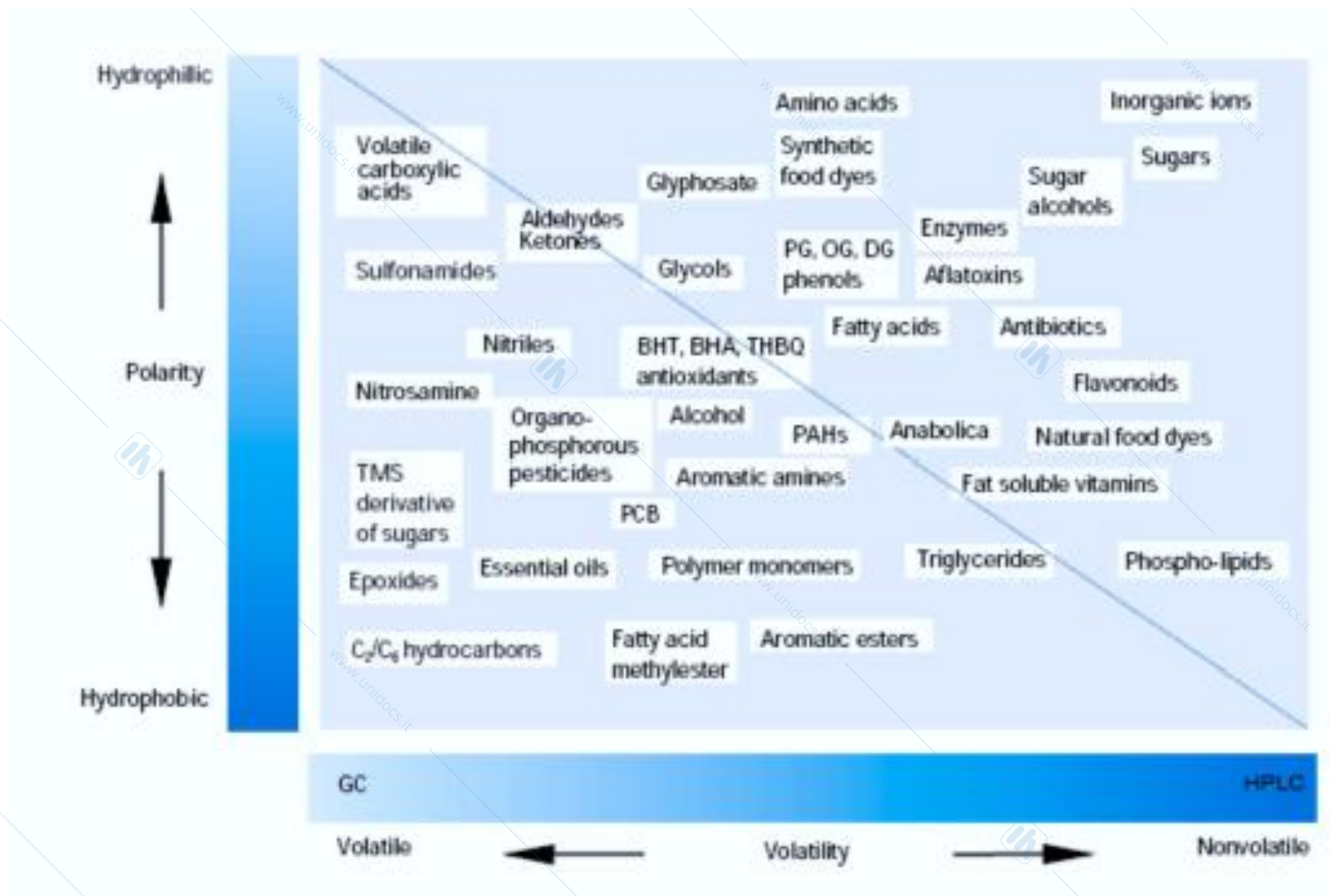


Typical HPLC Column:
15cm x 4.6mm i.d.





**Well, the resolution's too poor.
It won't help much to enhance it.**



TIPI DI CROMATOGRAFIA

RIPARTIZIONE

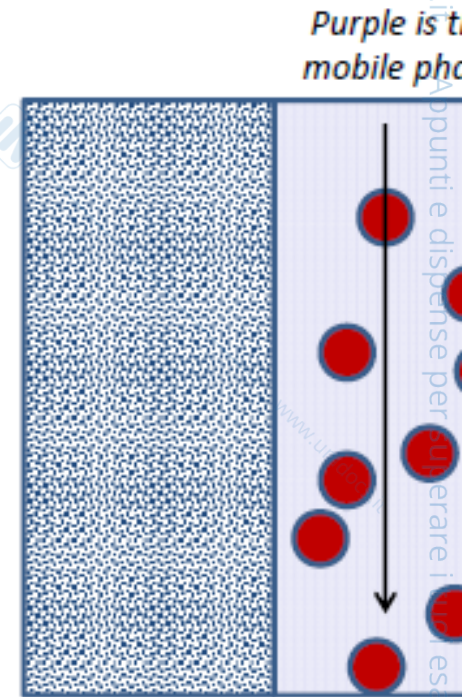
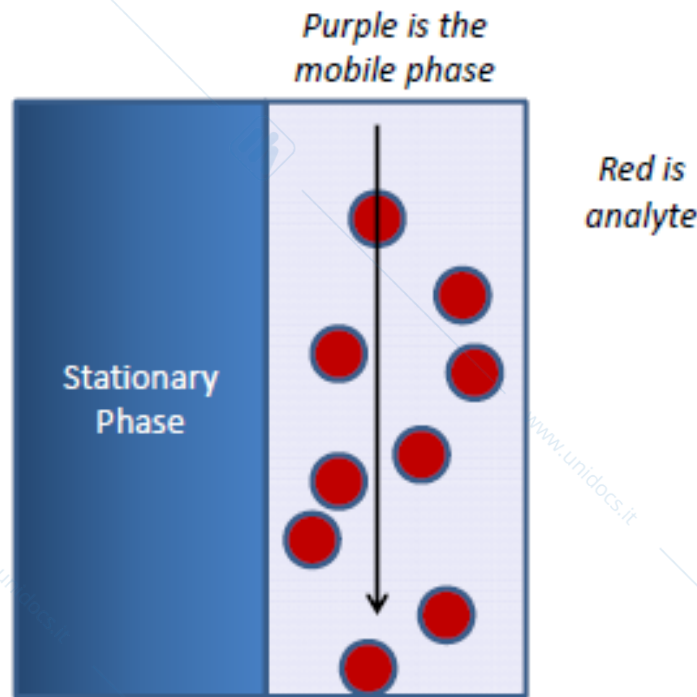
ADSORBIMENTO

SCAMBIO IONICO

ESCLUSIONE DIMENSIONALE

Affinità

CHIRALE



CROMATOGRAFIA DI RIPARTIZIONE

La fase stazionaria è un secondo liquido immiscibile con quello della fase mobile.

Può essere suddivisa in cromatografia:

- Liquido-liquido
- Liquida a fase legata

La differenza tra le due tecniche sta nel metodo con il quale la fase stazionaria è legata sulle particelle di supporto dell'impaccamento

CROMATOGRAFIA DI ADSORBIMENTO

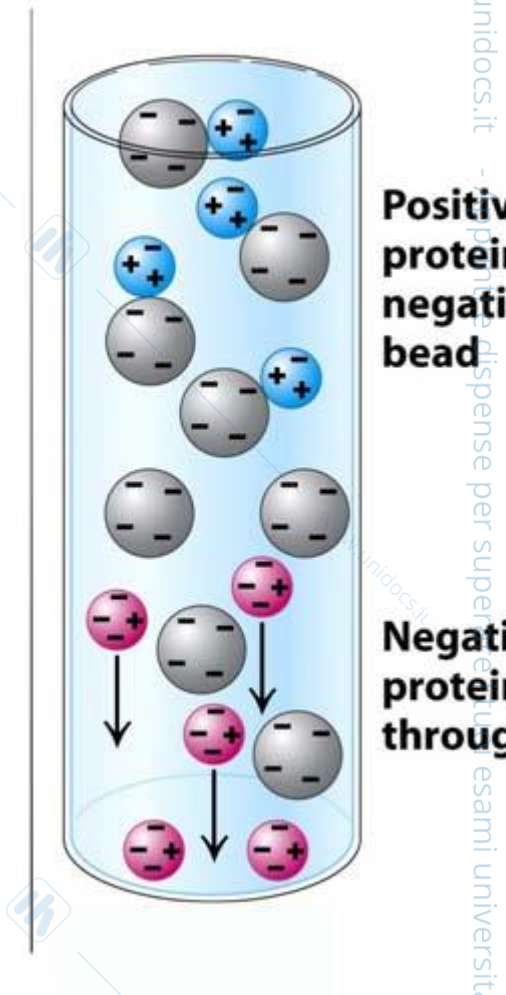
La fase stazionaria è la superficie di un solido polare finemente suddiviso.

L'analita compete con la fase mobile per i siti sulla superficie dell'impaccamento e la risoluzione è il risultato di forze di adsorbimento

CROMATOGRAFIA A SCAMBIO IONICO

Lo scambio ionico è un processo mediante il quale gli ioni presenti su un solido poroso, praticamente insolubile, vengono scambiati con gli ioni presenti in una soluzione che viene posta a contatto con il solido.

Nella cromatografia a scambio ionico a colonna singola, gli analiti ionici sono separati su uno scambiatore ionico a bassa capacità per mezzo di un eluente a bassa forza ionica che non interferisce con la rivelazione conduttometrica degli analiti ionici.

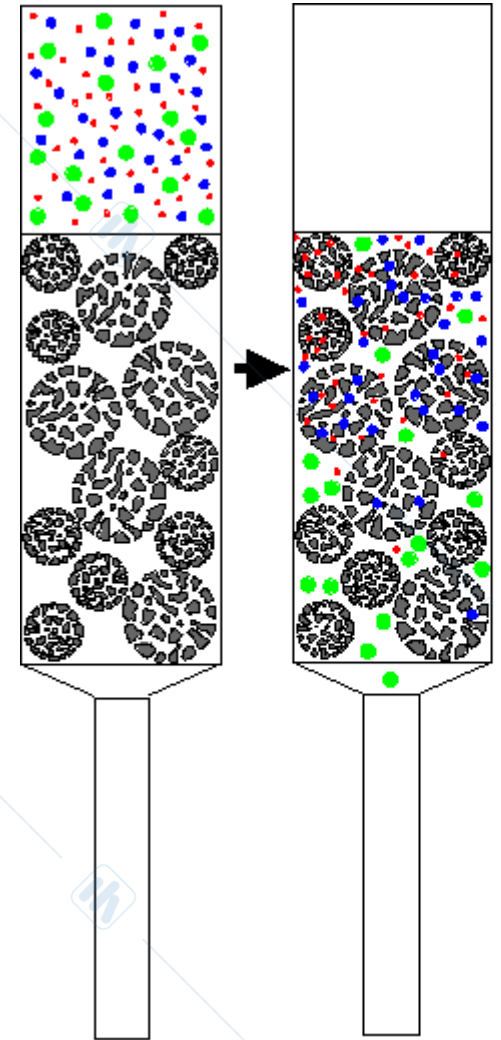


CROMATOGRAFIA AD ESCLUSIONE DIMENSIONALE

La cromatografia ad esclusione dimensionale, o cromatografia di gel, è la procedura più recente in cromatografia liquida.

È una tecnica potente che può essere applicata in modo particolare a specie ad alta massa molecolare.

Nella cromatografia ad esclusione dimensionale, il frazionamento è basato sulla dimensione molecolare.



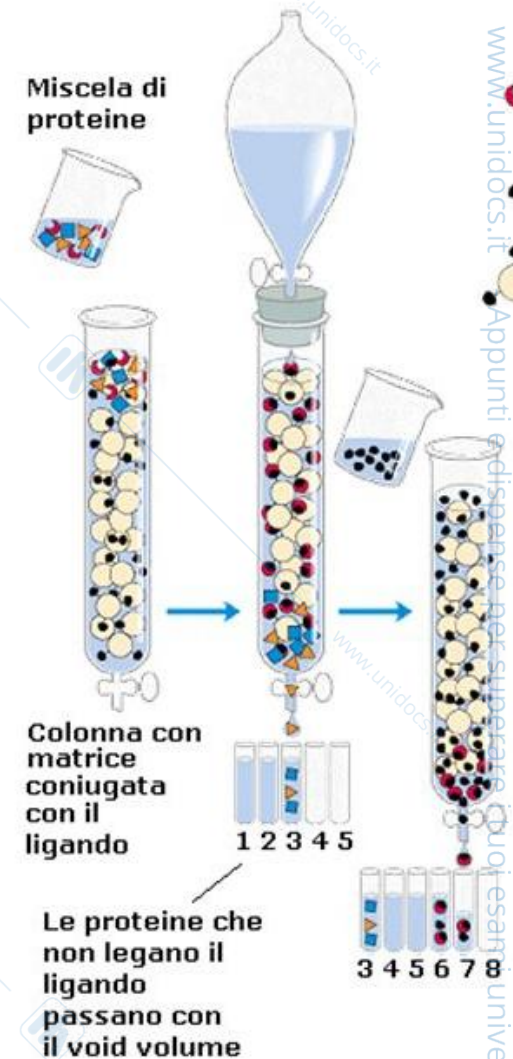
CROMATOGRAFIA DI AFFINITÀ

La cromatografia di affinità coinvolge la formazione di un legame covalente tra
Un reagente, chiamato **legante di affinità**, e un supporto solido.

Tipici leganti di affinità sono gli:

- Anticorpi
- Inibitori di enzimi
- Altre molecole che si legano in maniera selettiva e reversibile

a molecole dell' analita presenti nel campione



CROMATOGRAFIA CHIRALE

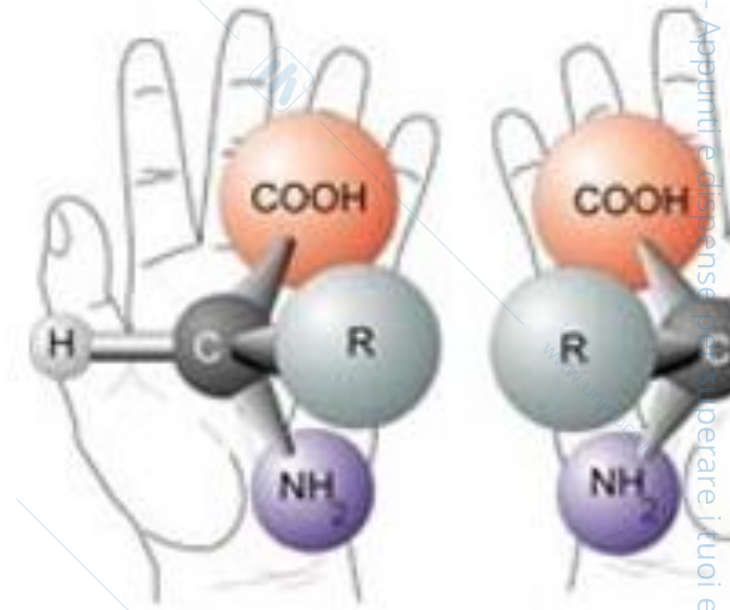
Composti chirali (loro immagini speculari non sono sovrapponibili) = enantiomeri.

Per separare composti chirali si richiedono:

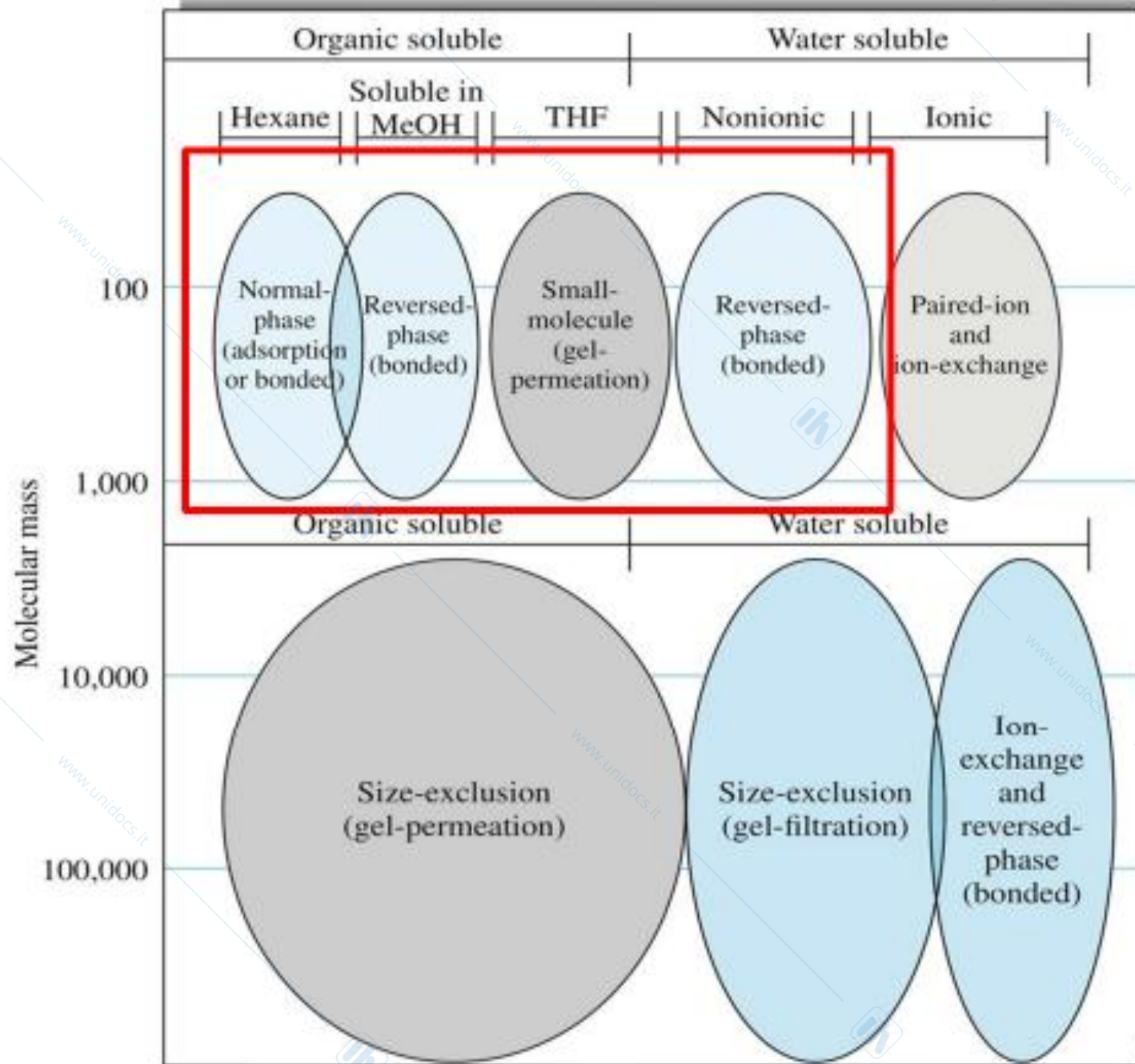
- additivi di fase mobile chirali

Oppure

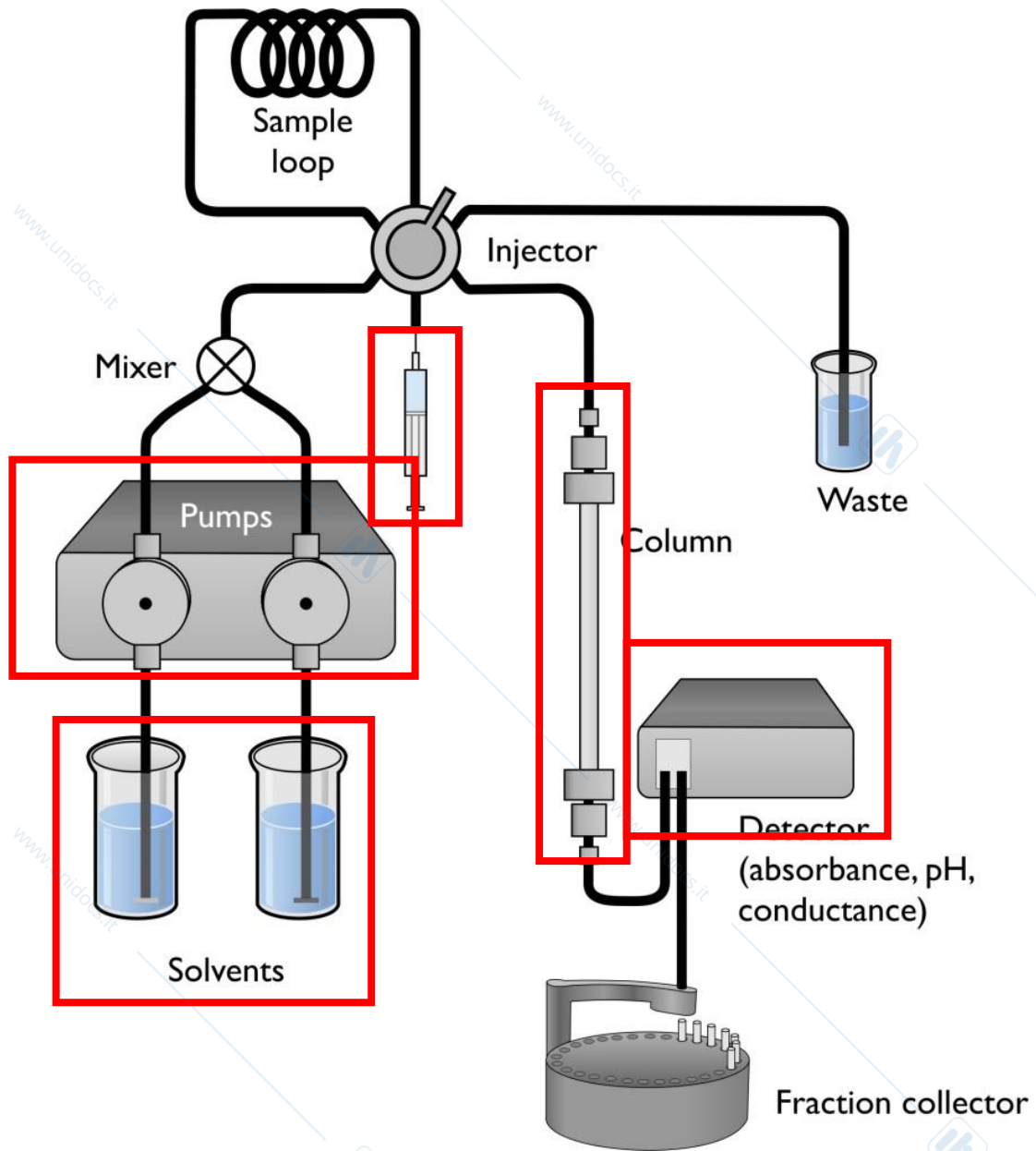
- Fasi stazionarie chirali.



Nella separazione degli enantiomeri si ha la complessazione preferenziale tra l'agente di risoluzione chirale e uno degli isomeri.







SOLVENTI



Acetonitrile LC grade (<99.9%) \$31

Acetonitrile reagent (<95%) \$70

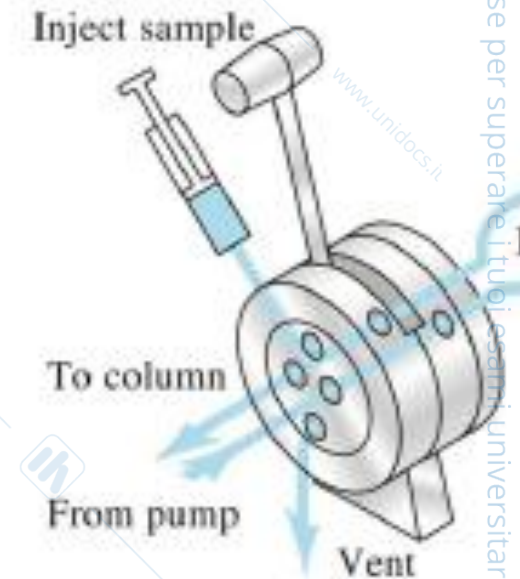
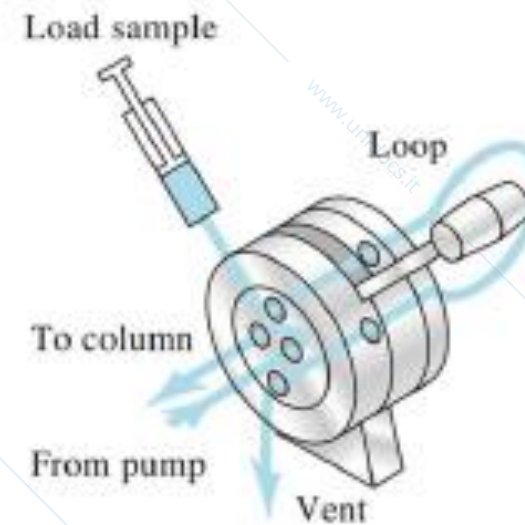
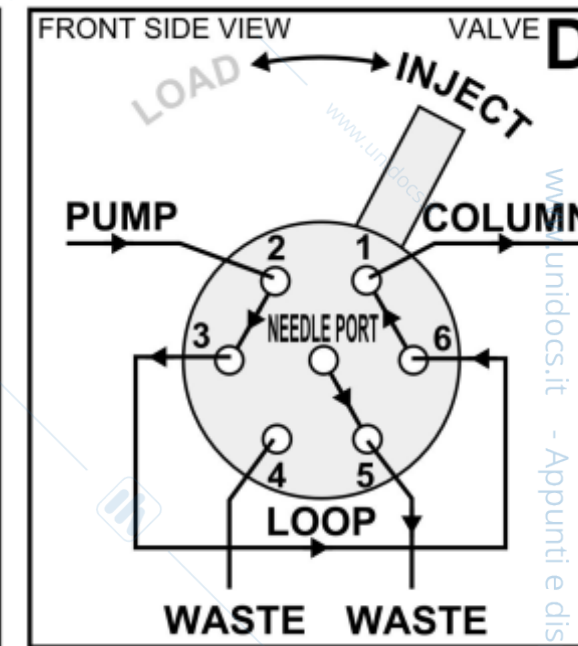
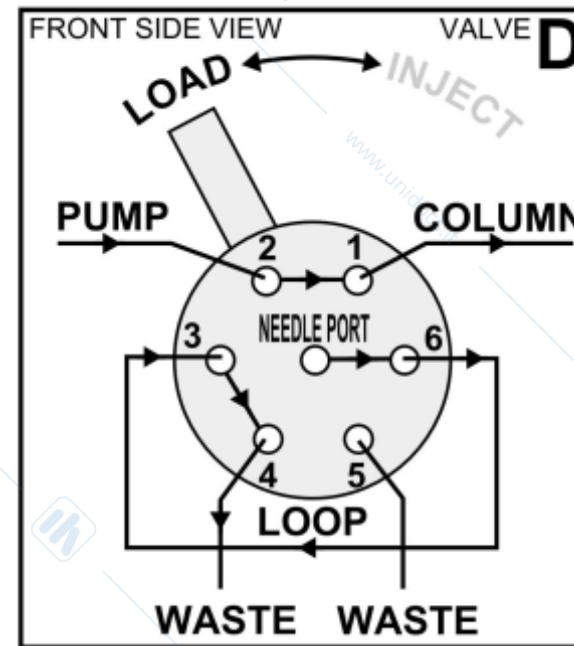
Ultra-Puri

Senza gas → sistema di degassamento (poma da vuoto, distillazione, riscaldare, agitare, gorgoliamenti)

Senza H₂O

Miscela di solventi → eluizione a gradiente

INIEZIONE DEL CAMPIONE



Manuale oppure autocampionatore

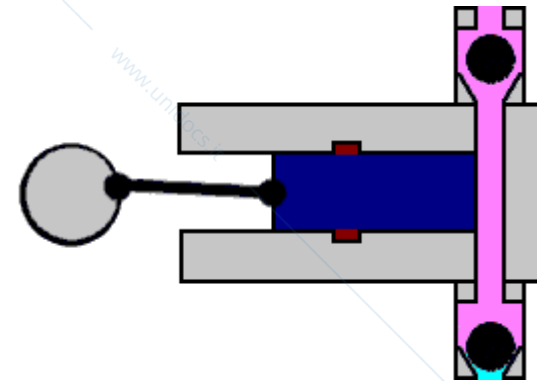
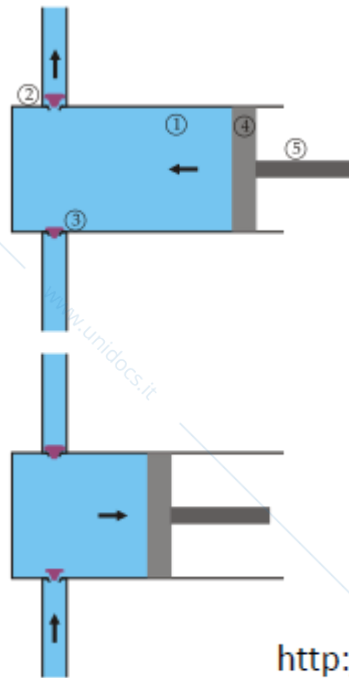
POMPE

- Generare la pressione fino a 6000 psi
- Segnale d'uscita libero da impulsi
- Velocità del flusso che varia. 0,110 ml/min
- Riproducibilità
- Resistenza alla corrosione



Tipi di pompe:

- A. A siringa
- B. Reciprocante
- C. Pneumatica



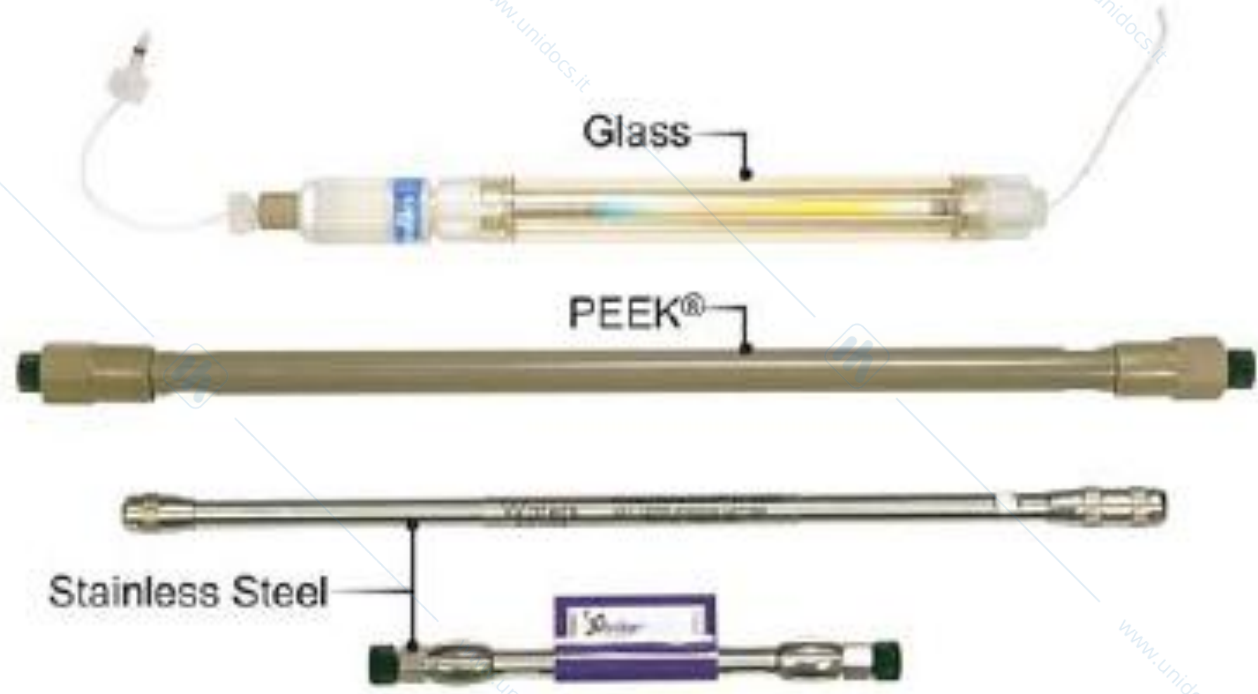
<http://www.lcresources.com/resources/getstart/2b01.htm>

COLONNE

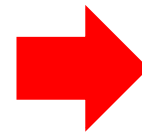
Resistenti ad alta pressione

Non-reattive

Non possono perdere solvente



Lunghezza: 10-30 cm
Diametri interni: 2-5 mm
Impaccamenti di particelle: 3-10 μm



N: 40 000-60 000 piatti teorici per metro

Lunghezza: 3-7,5 cm
Diametri interni: 1-4,6 mm
Impaccamenti di particelle: 3-5 μm



N: fino 100 000 piatti teorici per metro

Lunghezza: 3-7,5 cm
Diametri interni: 1-4,6 mm
Impaccamenti di particelle: 3-5 μm



N: fino 100 000 piatti teorici per metro

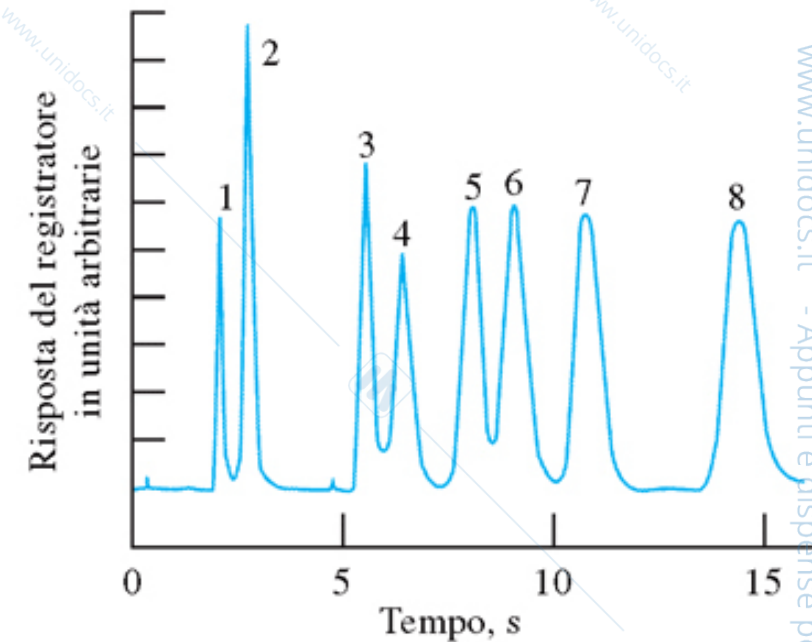


FIGURA 28-7 Separazione isocratica ad alta velocità. Condizioni della colonna: lunghezza cm 4, diametro interno cm 0,25, impaccamento: spherisorb 3- μm ; fase mobile: 4,1% acetone in *n*-esano. Composti: (1) *p*-xilene, (2) anisolo, (3) acetofenone, (4) diacetilbenzile, (5) diottilftalato, (6) dipentilftalato, (7) dibutilftalato, (8) dipropilftalato, (9) dietilftalato. (Da R. P. W. Scott, *Small Bore Liquid Chromatography Columns: Their Properties and Uses*, New York: Wiley, 1984, p. 156. Ristampa autorizzata da John Wiley & Sons, Inc.).

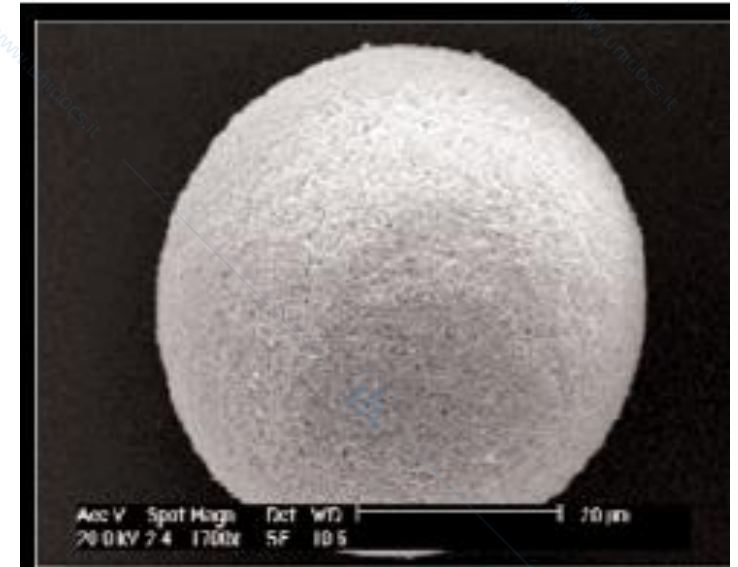
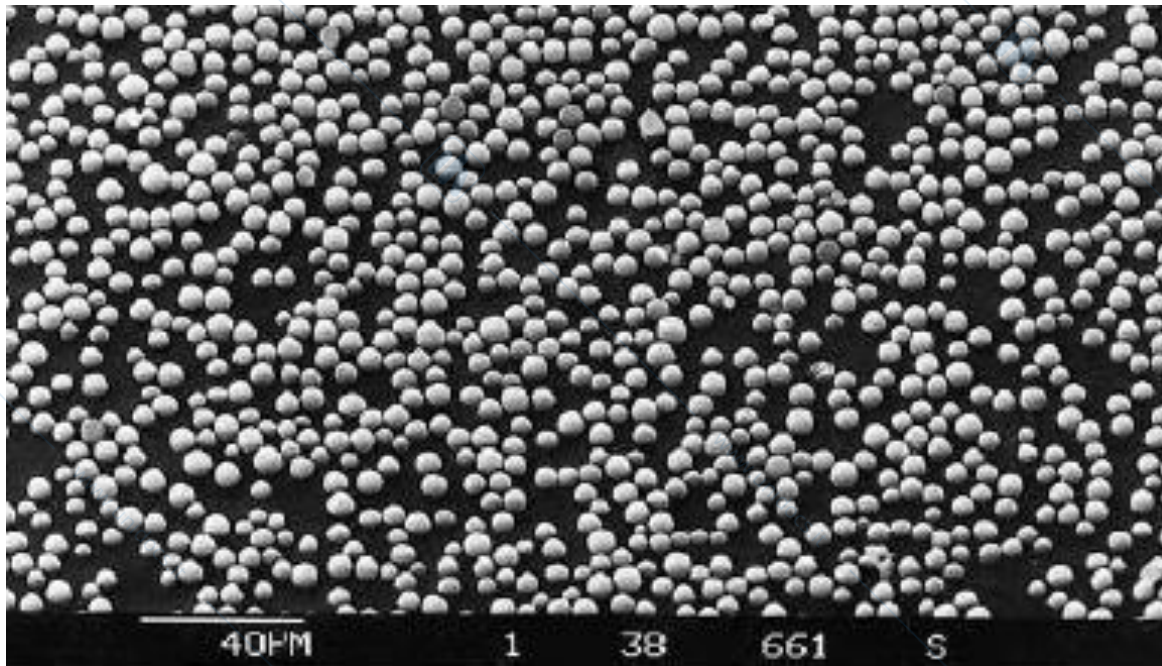
COLONNA DI GUARDIA

Rimozione pre-eliminare di materiale particolato e di impurezze

Saturare la fase mobile con la fase stazionaria, così da rendere minima la possibilità di perdite di fase stazionaria da parte della colonna analitica

TERMOSTATO

COLONNE

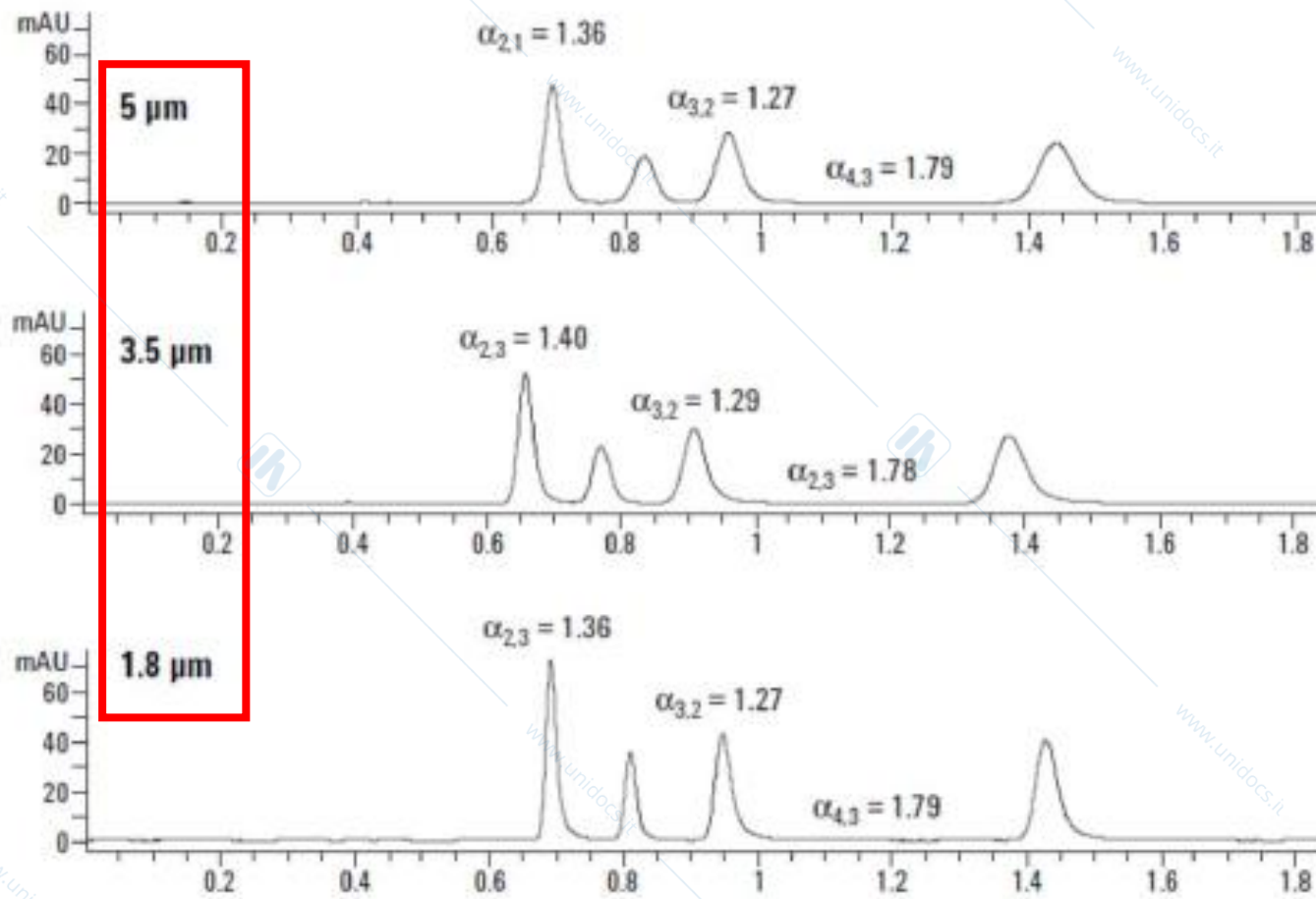


Più piccole → più basso H:

Flusso più omogeneo (A)

Diffusione nella fase stazionaria minore

COLONNE

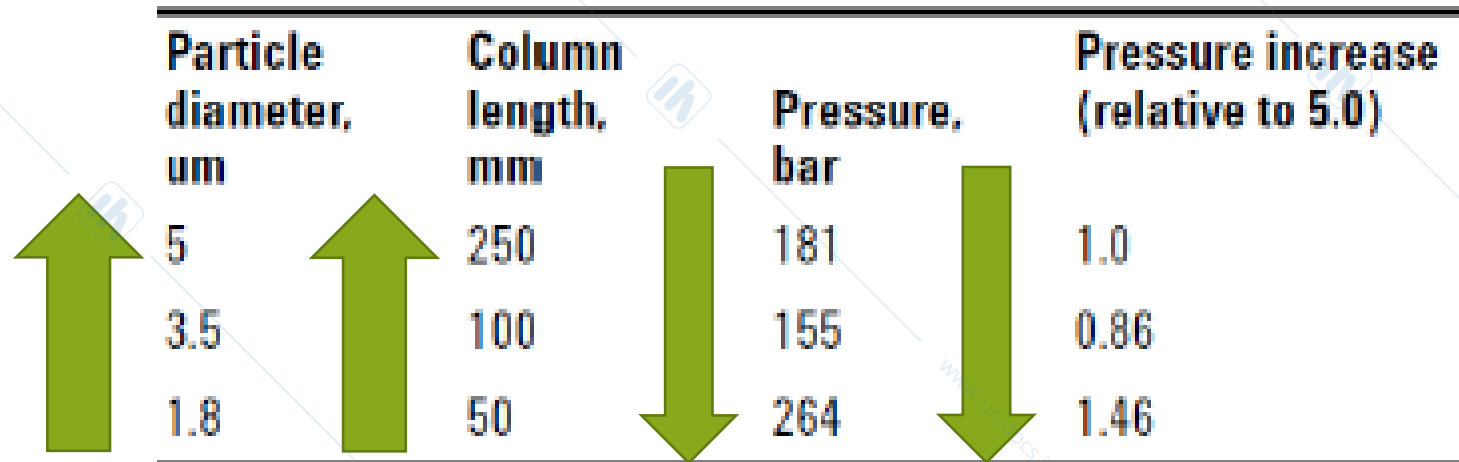


- Solutes:
- 1 1-methylxanthine
 - 2 1,3-dimethyluric acid
 - 3 3,7-dimethylxanthine
 - 4 1,7-dimethylxanthine

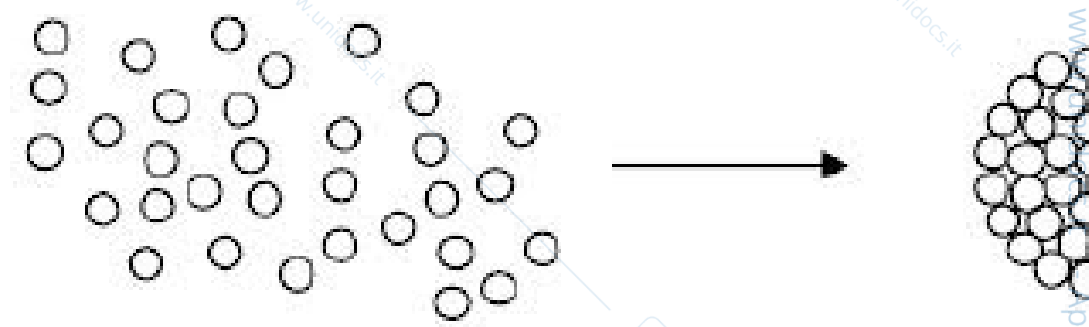
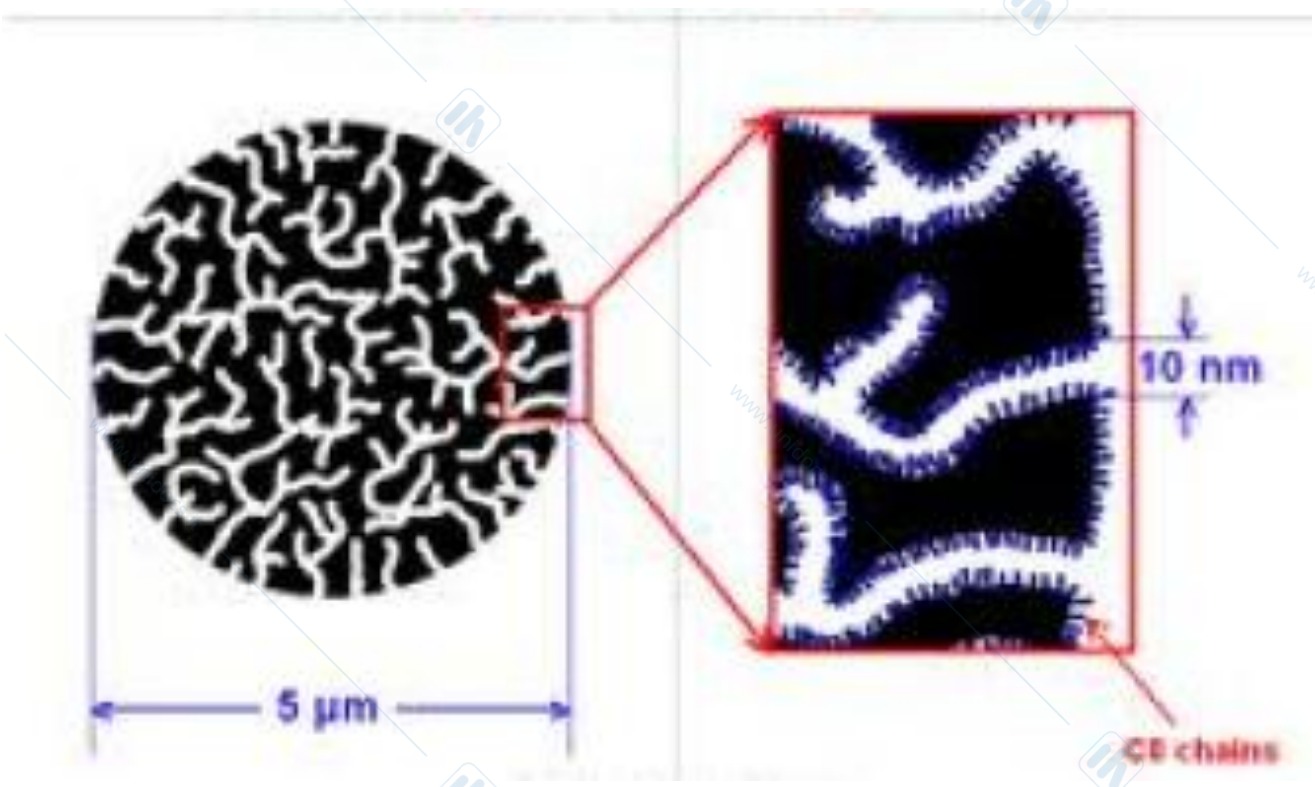
Column: ZORBAX SB-C18
Mobile phase: A = 0.2% FA
B = 0.2% FA in MeCN
Isocratic composition: 98% A 2% B (v/v)
Flow rate: 1.5 mL/min
Injection volume: 2 µL
Flowcell: 2 µL, 3-mm flow path

COLONNE

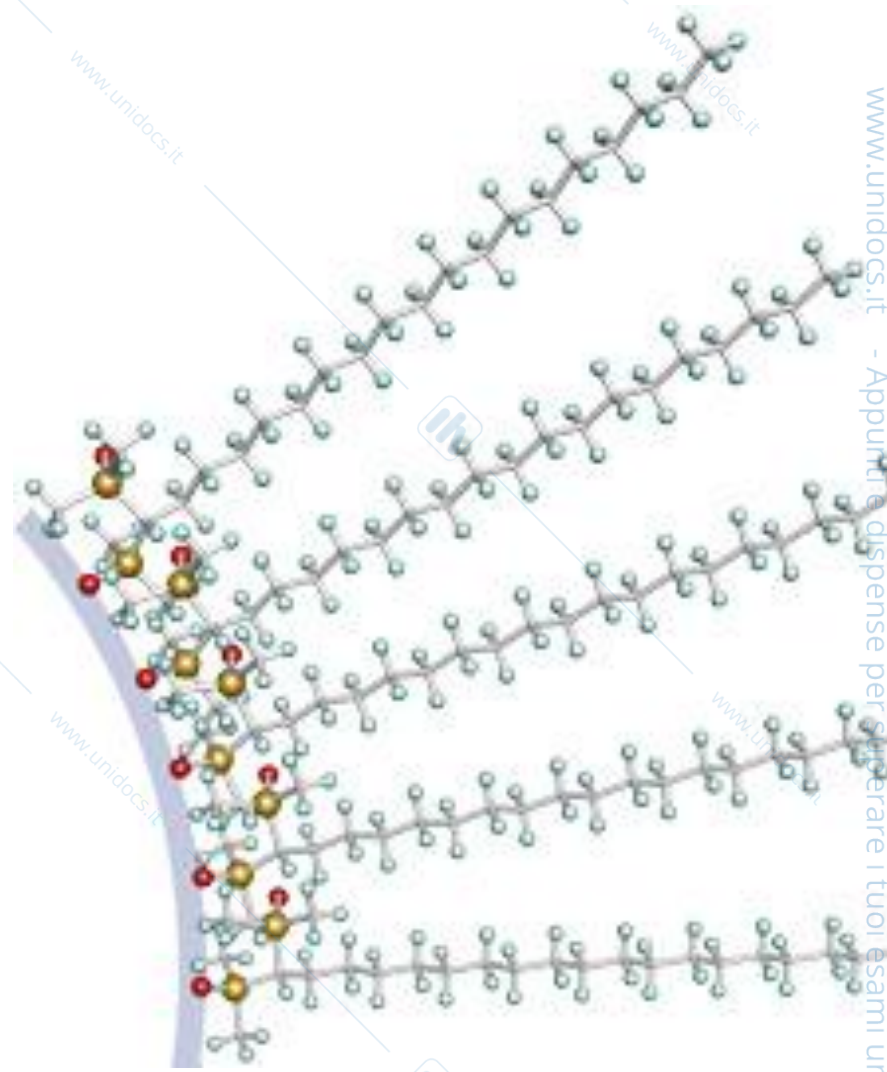
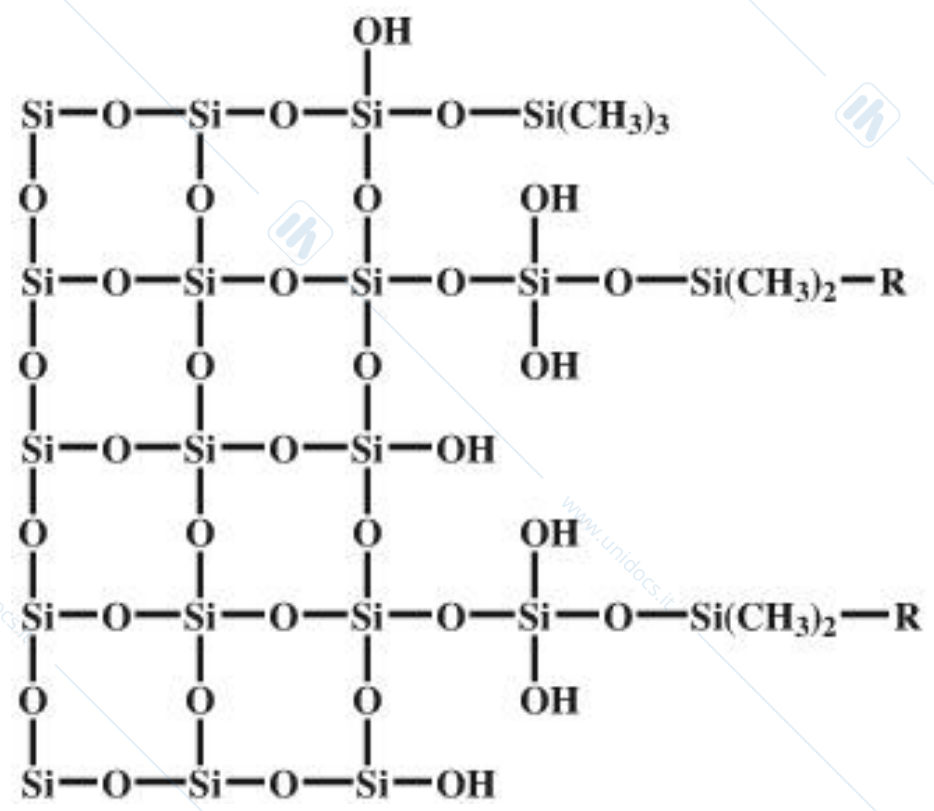
Particle diameter, μm	Column length, mm	Pressure, bar	Pressure increase (relative to 5.0)
5	250	181	1.0
3.5	100	155	0.86
1.8	50	264	1.46



COLONNE



COLONNE

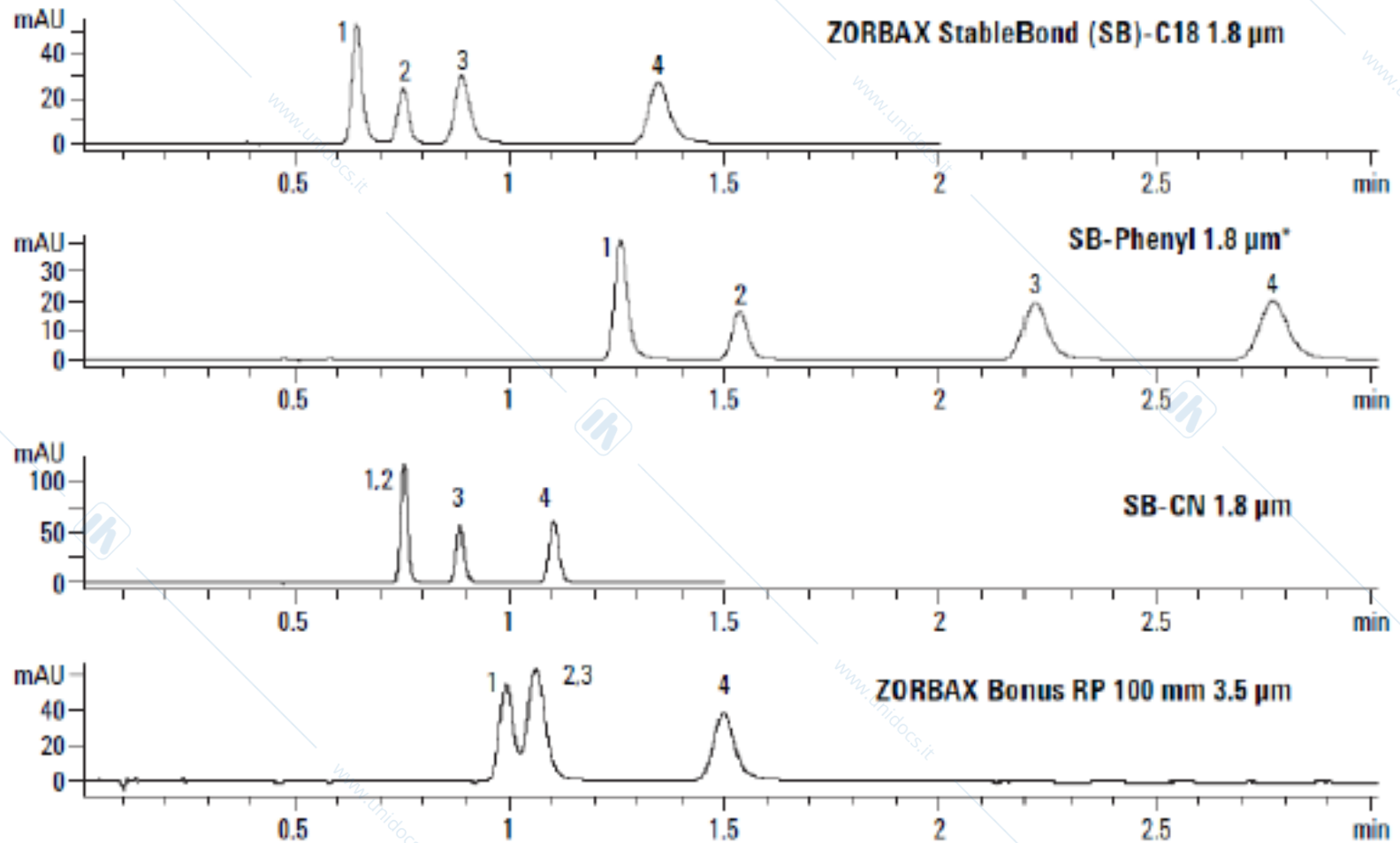


INTERAZIONI

Analita : Fase mobile

Analita : Fase stazionaria

Fase mobile : Fase stazionaria



Compounds:

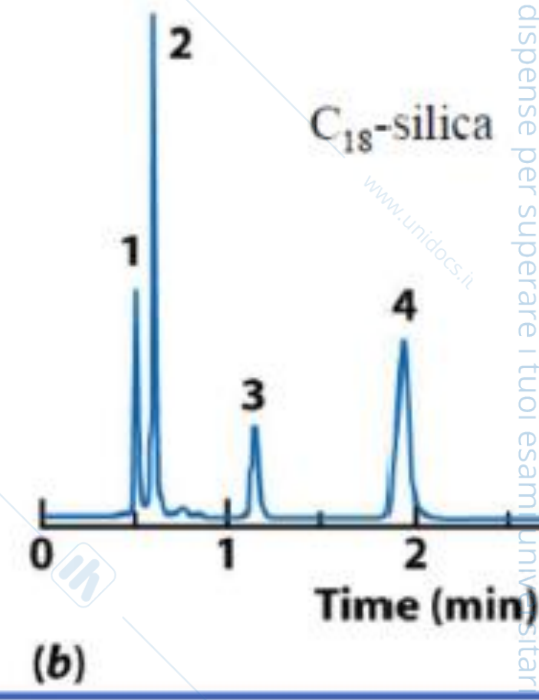
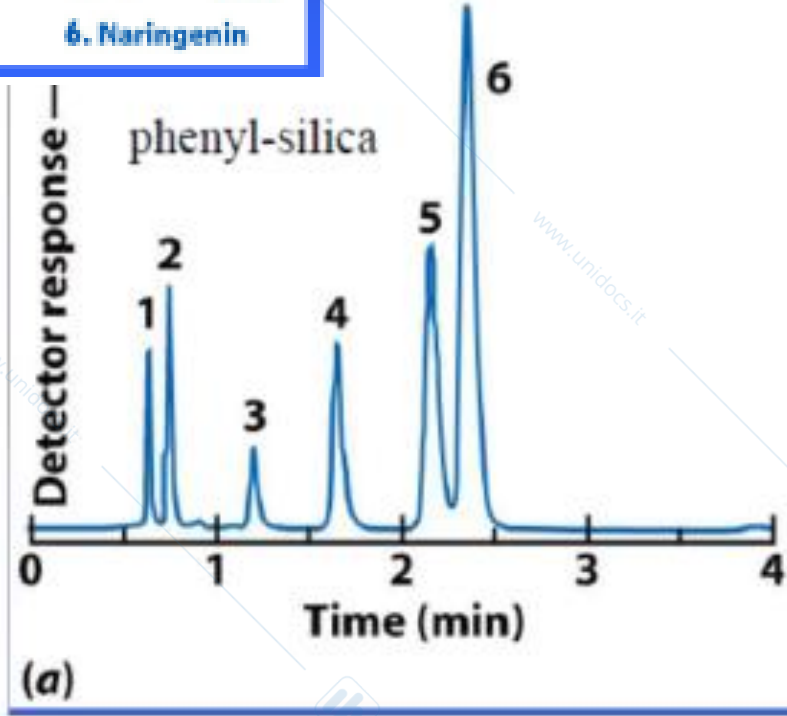
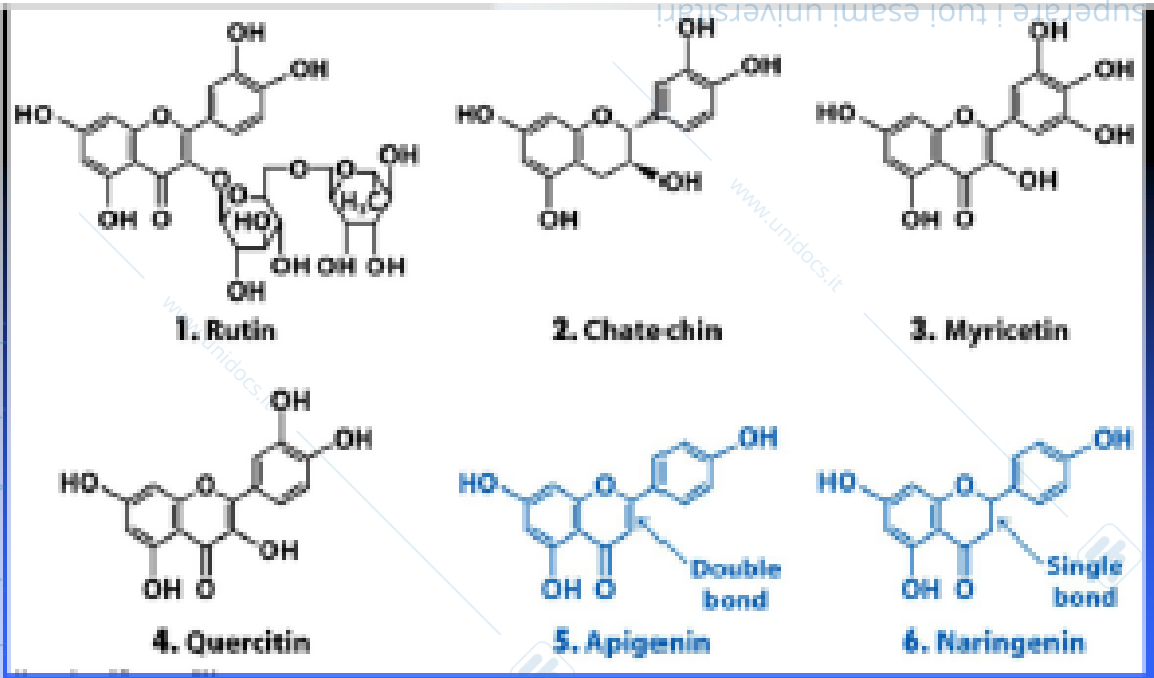
- 1 1-methylxanthine
- 2 1,3-dimethyluric acid
- 3 3,7-dimethylxanthine
- 4 1,7-dimethylxanthine
- * Preproduction batch

Columns:

- SB-C18, 4.6 × 50 mm, 1.8 µm
- SB-phenyl, 4.6 × 50 mm, 1.8 µm
- SB-CN, 4.6 × 50 mm, 1.8 µm
- Bonus-RP, 4.6 × 100 mm, 3.5 µm

Mobile phase:

- A = 0.2% FA
- B = AcCN w 0.2% FA



Eluente forte:
simile a fase stazionaria



Fase mobile compete con analita

Analita interagisce poco con la fase stazionaria

Tempi di ritenzione sono corti

Eluente debole:
diverso dalla fase stazionaria

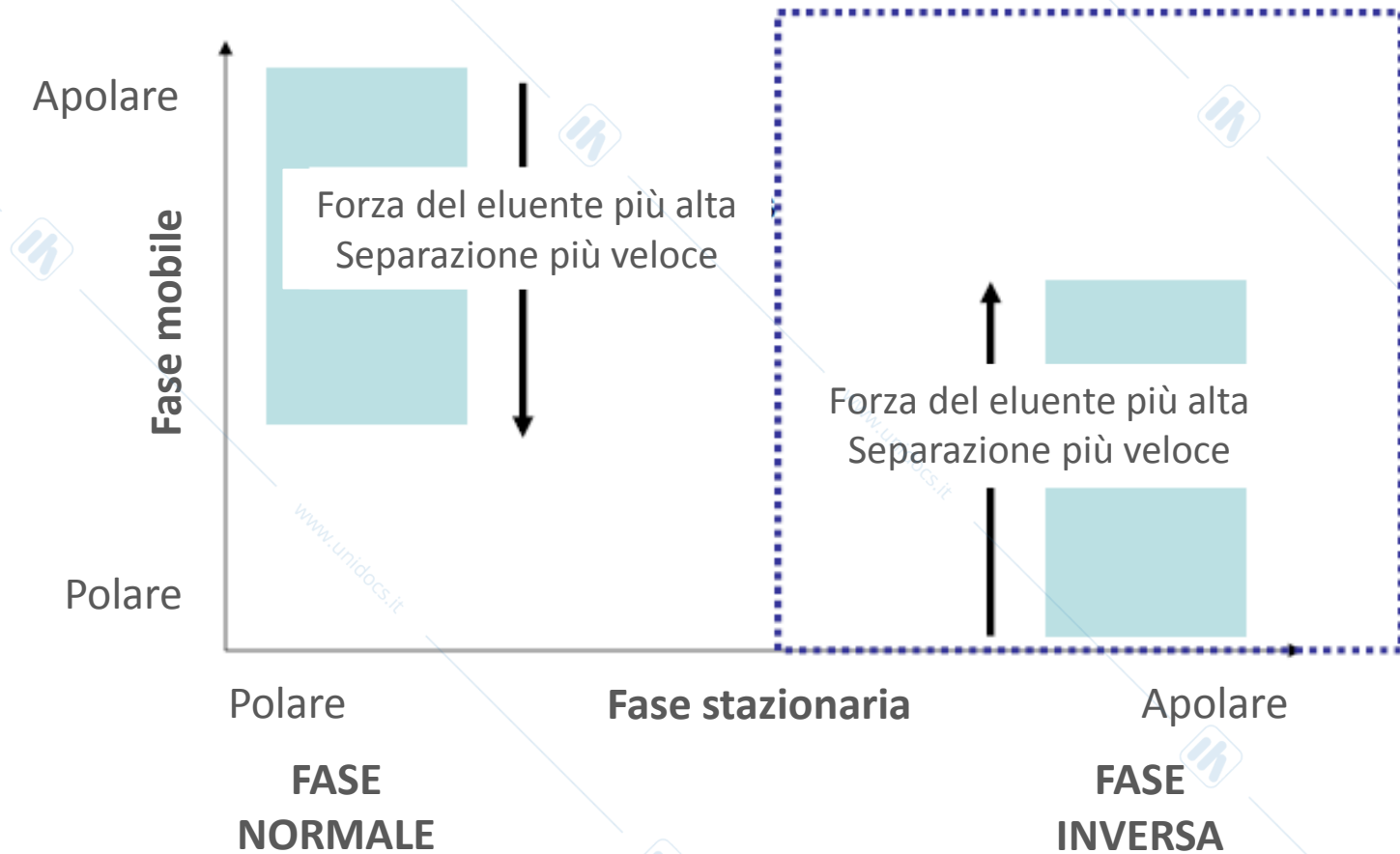


Fase mobile non compete con analita

Analita interagisce molto con la fase stazionaria

Tempi di ritenzione sono lunghi

COME SCEGLIERE FASI

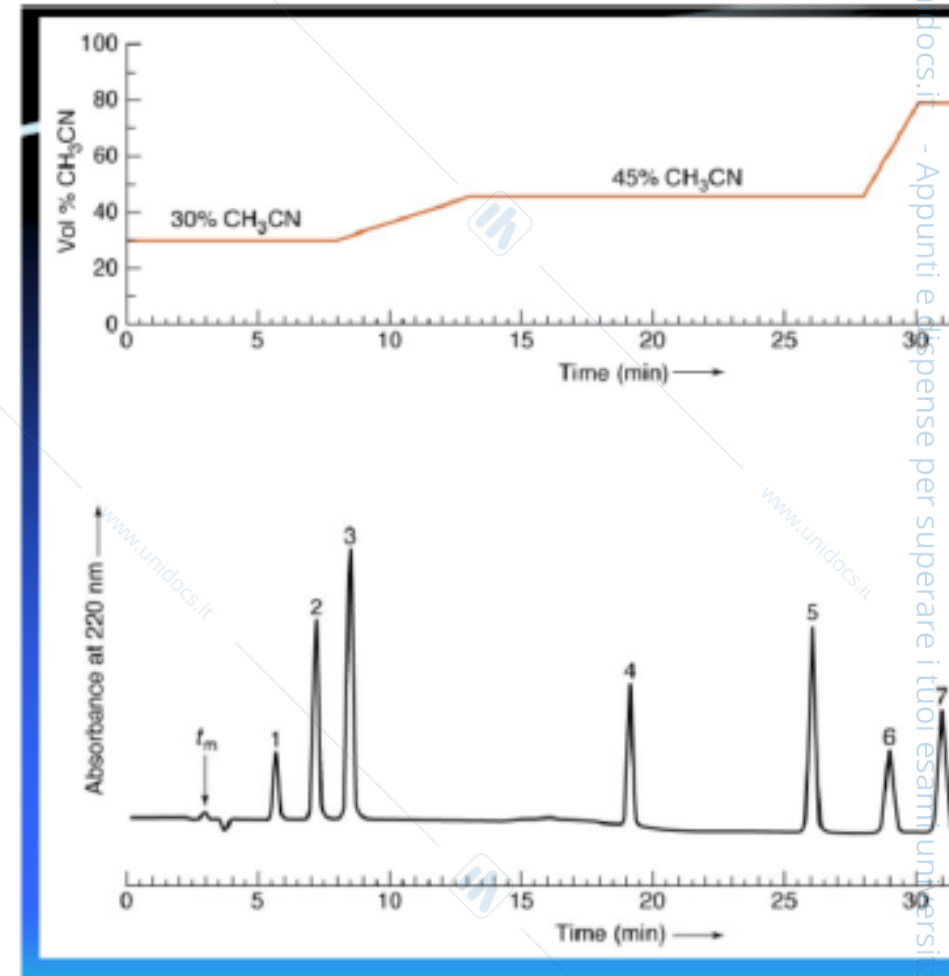


GRADIENTE DI ELUIZIONE

Cromatografia nella fase inversa

Forza del eluente aumenta col tempo

(solvente diventa più apolare col tempo)



RIVELATORI

- Un piccolo volume morto per minimizzare l'allargamento di banda extra-colonna
- Piccolo e compatibile con il flusso liquido
- Dotato di elevata sensibilità

DIPENDERÀ DALLA NATURA DEL CAMPIONE

RIVELATORI

TABELLA 28-1 Caratteristiche dei rivelatori HPLC

Rivelatore HPLC	Disponibilità commerciale	LOD* di massa (tipico)	Intervallo lineare
Assorbanza	Sì	10 pg	3-4
Fluorescenza	Sì	10 fg	5
Elettrochimica	Sì	100 pg	4-5
Indice di rifrazione	Sì	1 ng	3
Conducibilità	Sì	100 pg - 1 ng	5
Spettrometria di massa	Sì	<1 pg	5
FTIR	Sì	1 µg	3
Diffusione luminosa	Sì	1 µg	5
Attività ottica	No	1 ng	4
Selettivo per elementi	No	1 ng	4-5
Fotoionizzazione	No	<1 pg	4

Fonti: Dalla letteratura delle case produttrici; *Handbook of Instrumental Techniques for Analytical Chemistry*, F. Settle, ed., Upper Saddle River, NJ: Prentice-Hall, 1997; E. S. Yeung and R. E. Synovec, *Anal. Chem.*, **1986**, 58, 1237A.

* I LOD di massa (limiti di rivelabilità) dipendono dal composto, dallo strumento e dalle condizioni della HPLC, ma quelli dati sono tipici valori di sistemi commerciali, se disponibili.

† Valori tipici riportati dalle fonti precedenti.



Holler, Skoog, Crouch
Chimica Analitica Strumentale, II Ed.
EdiSES

UV-VIS

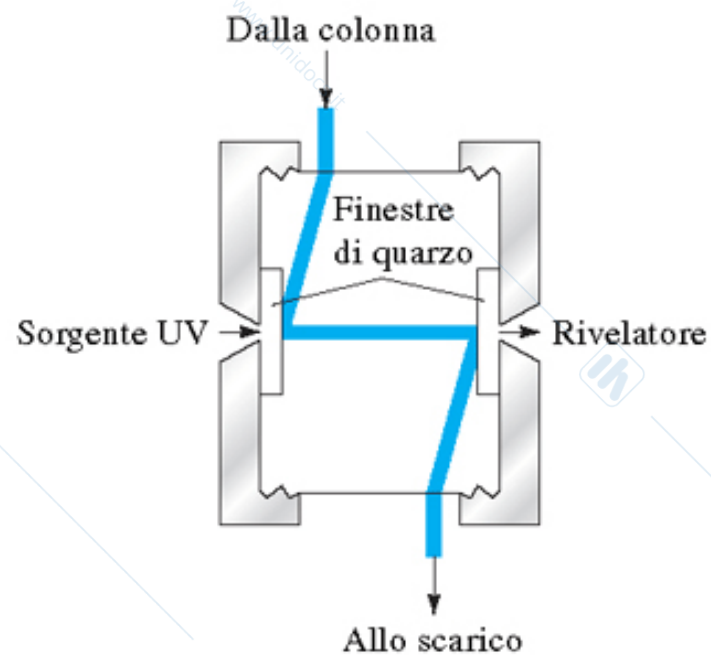


FIGURA 28-8 Cella di assorbimento UV-visibile per HPLC.

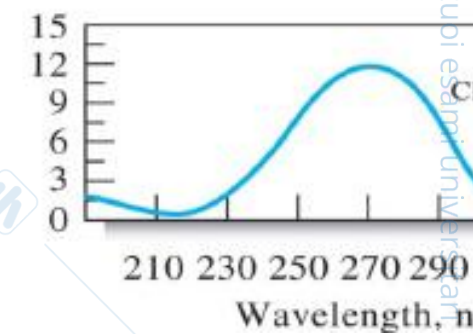
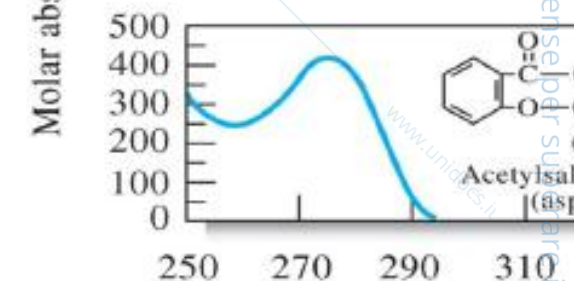
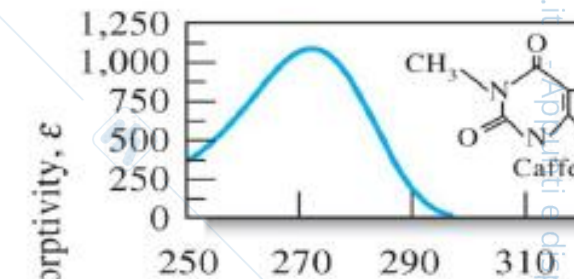
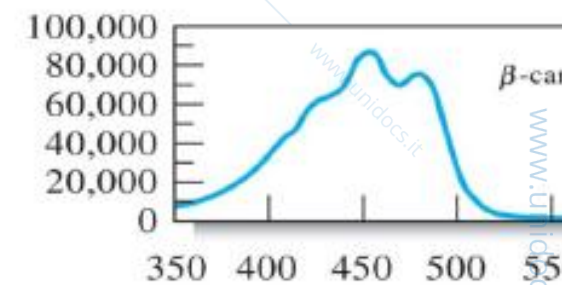


Holler, Skoog, Crouch
Chimica Analitica Strumentale, II Ed.
EdiSES

UV-VIS

Chromophore	Example	Solvent	λ_{max} nm	ϵ_{max}
Alkene	$C_6H_{13}CH=CH_2$	<i>n</i> -Heptane	177	13,000
Conjugated alkene	$CH_2=CHCH=CH_2$	<i>n</i> -Heptane	217	21,000
Alkyne	$C_3H_{11}C\equiv C-CH_3$	<i>n</i> -Heptane	178	10,000
			196	2,000
			225	160
Carbonyl	$CH_3C(=O)CH_3$	<i>n</i> -Hexane	186	1,000
			280	16
	CH_3CHO	<i>n</i> -Hexane	180	Large
			293	12
Carboxyl	CH_3COOH	Ethanol	204	41
Amido	CH_3CNH_2	Water	214	60
Azo	$CH_3N=NCH_3$	Ethanol	339	5
Nitro	CH_3NO_2	Isooctane	280	22
Nitroso	C_4H_9NO	Ethyl ether	300	100
			665	20
Nitrate	$C_2H_5ONO_2$	Dioxane	270	12
Aromatic	Benzene	<i>n</i> -Hexane	204	7,900
			256	200

©Cengage Learning. All Rights Reserved.



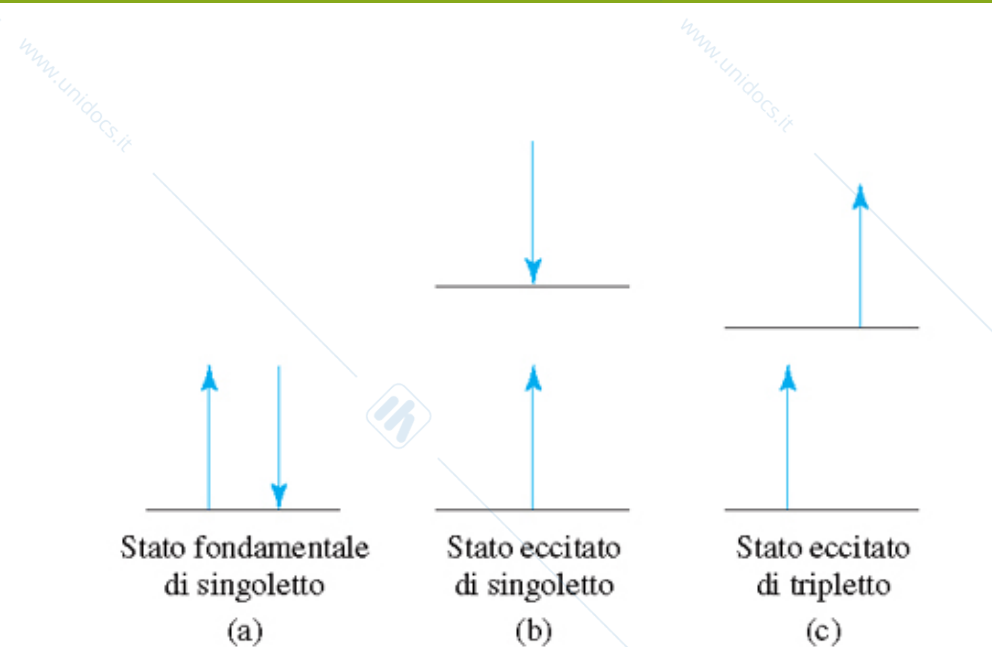


FIGURA 15-1 Stati dello spin elettronico delle molecole. In (a) è mostrato lo stato elettronico fondamentale. Nel più basso livello di energia, o stato fondamentale, gli spin sono sempre appaiati e lo stato è detto stato di singoletto. In (b) e (c) sono mostrati gli stati elettronici eccitati. Se nello stato eccitato gli spin rimangono appaiati, la molecola è in uno stato eccitato di singoletto (b). Se gli spin diventano spaiati, la molecola è in uno stato eccitato di tripletto (c).

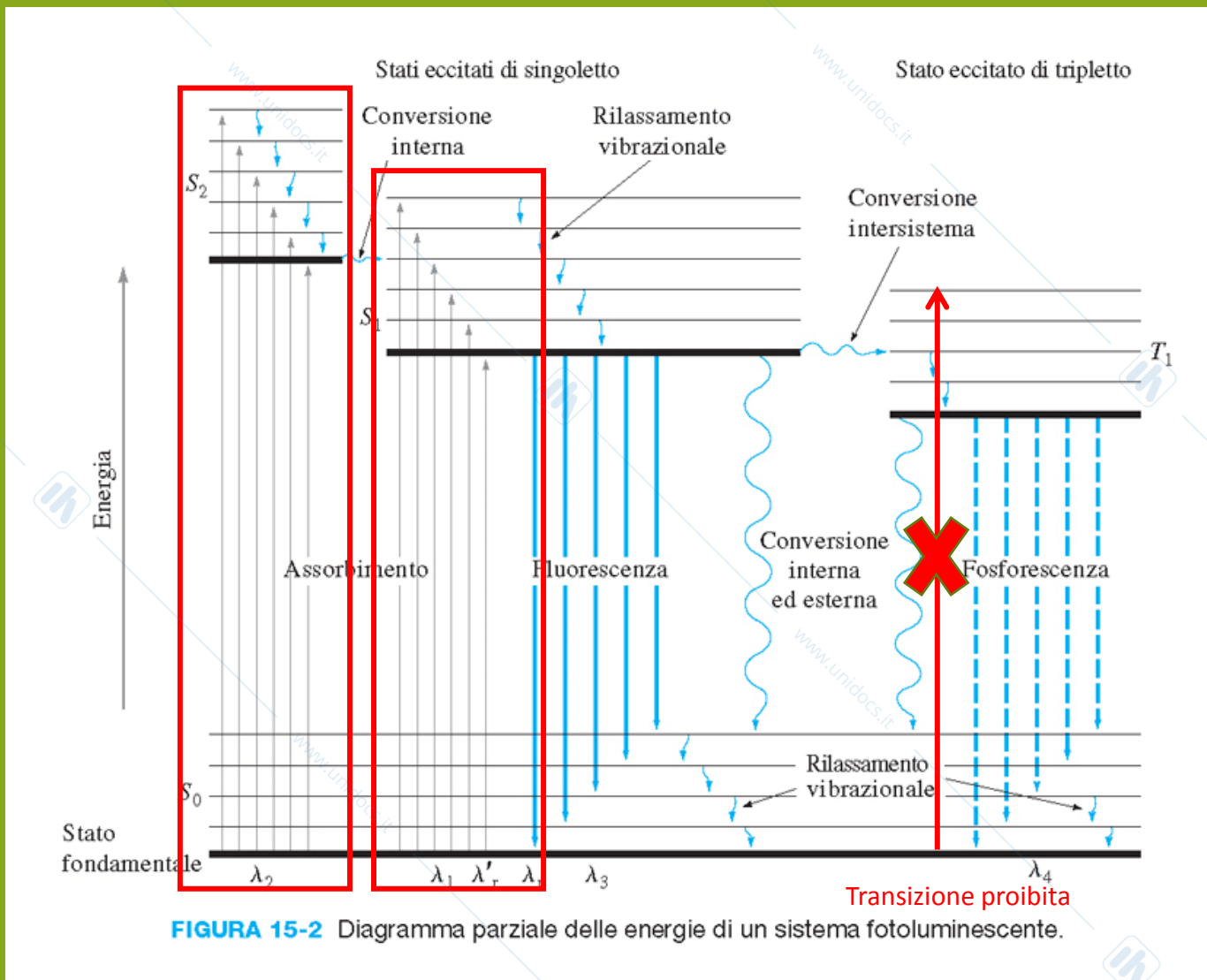


FIGURA 15-2 Diagramma parziale delle energie di un sistema fotoluminescente.

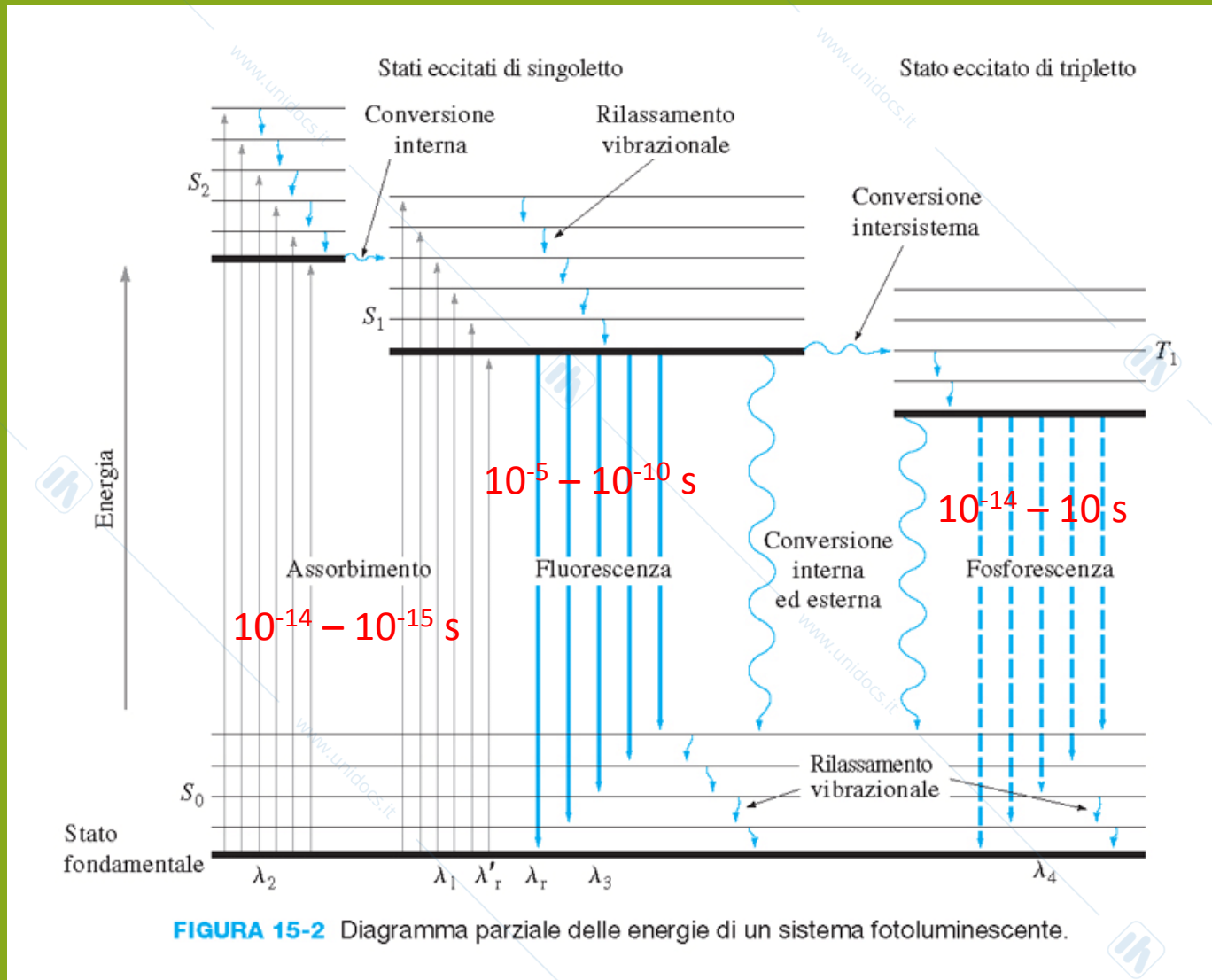
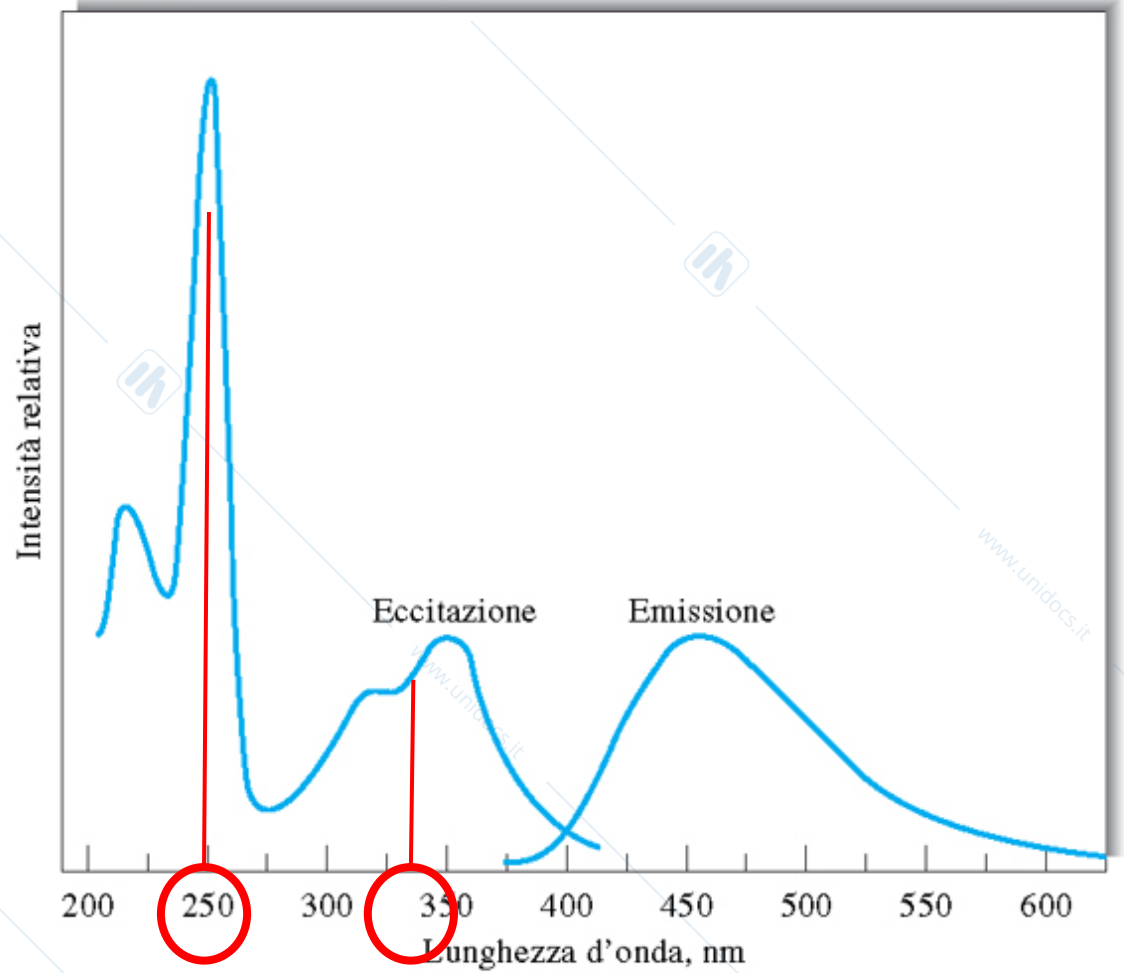


FIGURA 15-2 Diagramma parziale delle energie di un sistema fotoluminescente.



UV-VIS

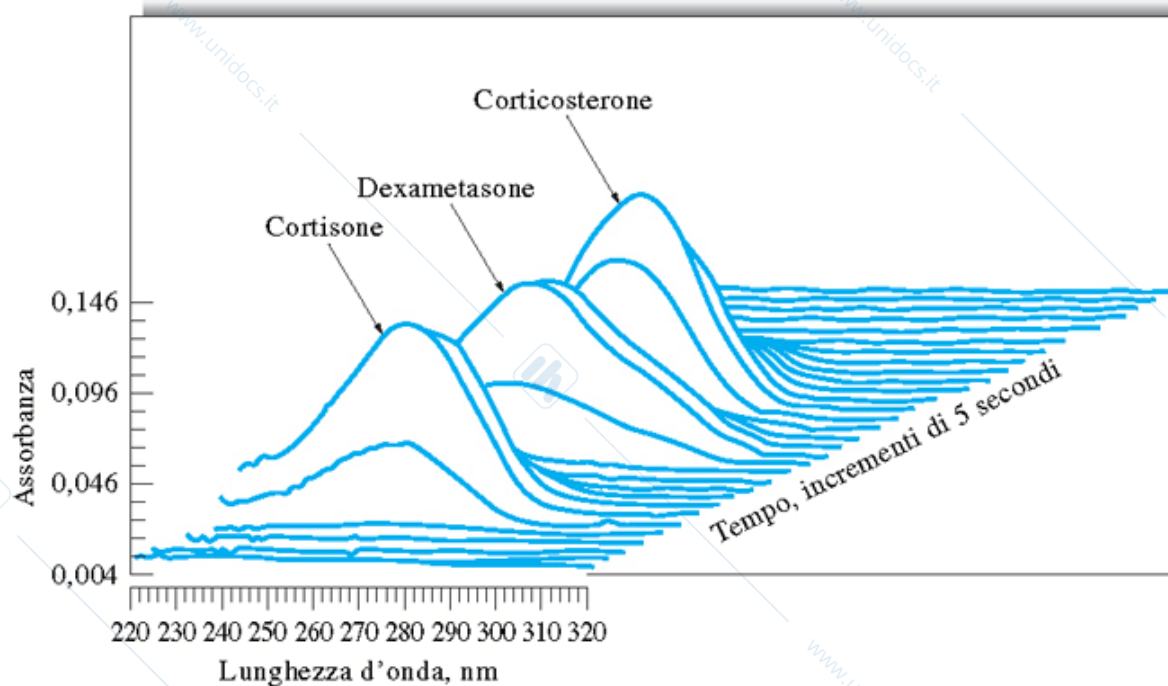


FIGURA 28-9 Spettri di assorbimento dell'eluento da una miscela di tre steroidi presi ad intervalli di 5 secondi. (Per gentile concessione della Hewlett-Packard Co., Palo Alto, CA).



Holler, Skoog, Crouch
Chimica Analitica Strumentale, II Ed.
EdiSES

RIFRAZIONE

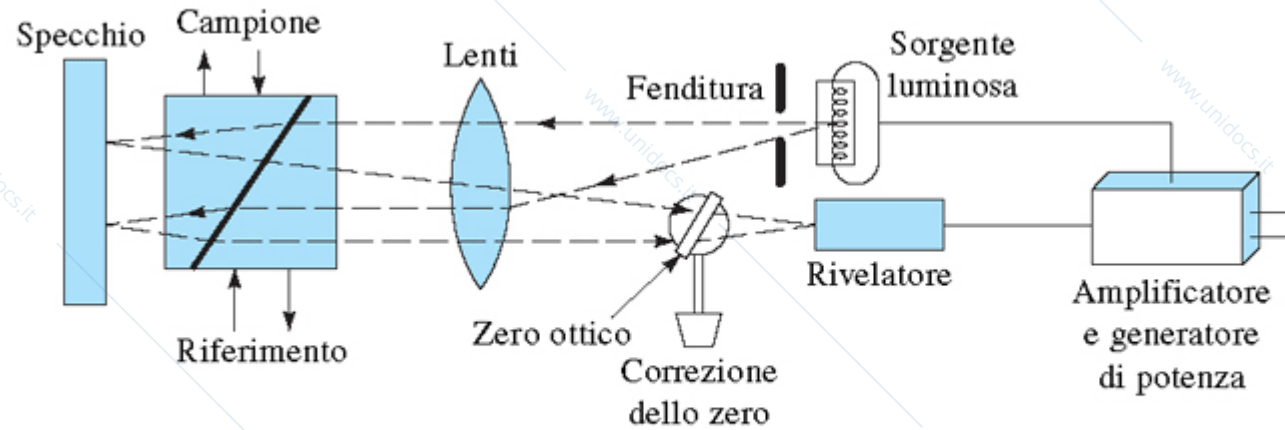


FIGURA 28-10 Diagramma schematico di un rivelatore ad indice di rifrazione differenziale (Per gentile concessione della Waters Associates, Inc., Milford, MA).

La rifrazione è la deviazione subita da un'onda che ha luogo quando questa passa da un mezzo ad un altro nel quale la sua velocità di propagazione cambia. La rifrazione della luce è l'esempio più comunemente osservato, ma ogni tipo di onda può essere rifratta, per esempio quando le onde sonore passano da un mezzo ad un altro o quando le onde dell'acqua si spostano a zone con diversa profondità.

ELETTROCHIMICO

L'amperometria è una particolare misura voltammetrica effettuata a potenziale imposto, in cui la corrente misurata è proporzionale alla concentrazione dell'analita elettroattivo.

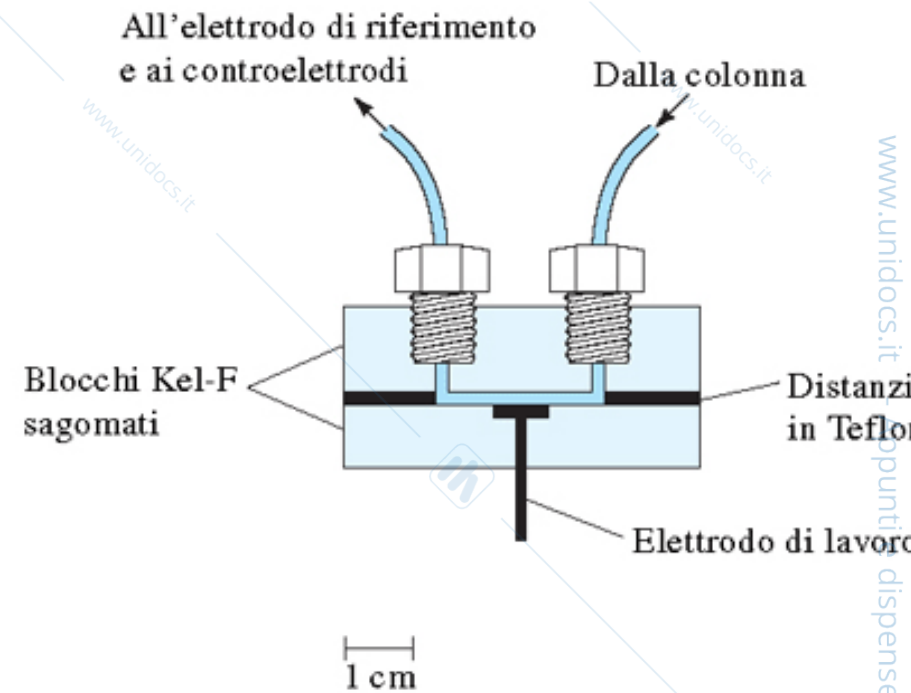


FIGURA 28-12 Cella del rivelatore amperometrico a strato sottile per HPLC.



Holler, Skoog, Crouch
Chimica Analitica Strumentale, II Ed.
EdiSES

ELETTROCHIMICO

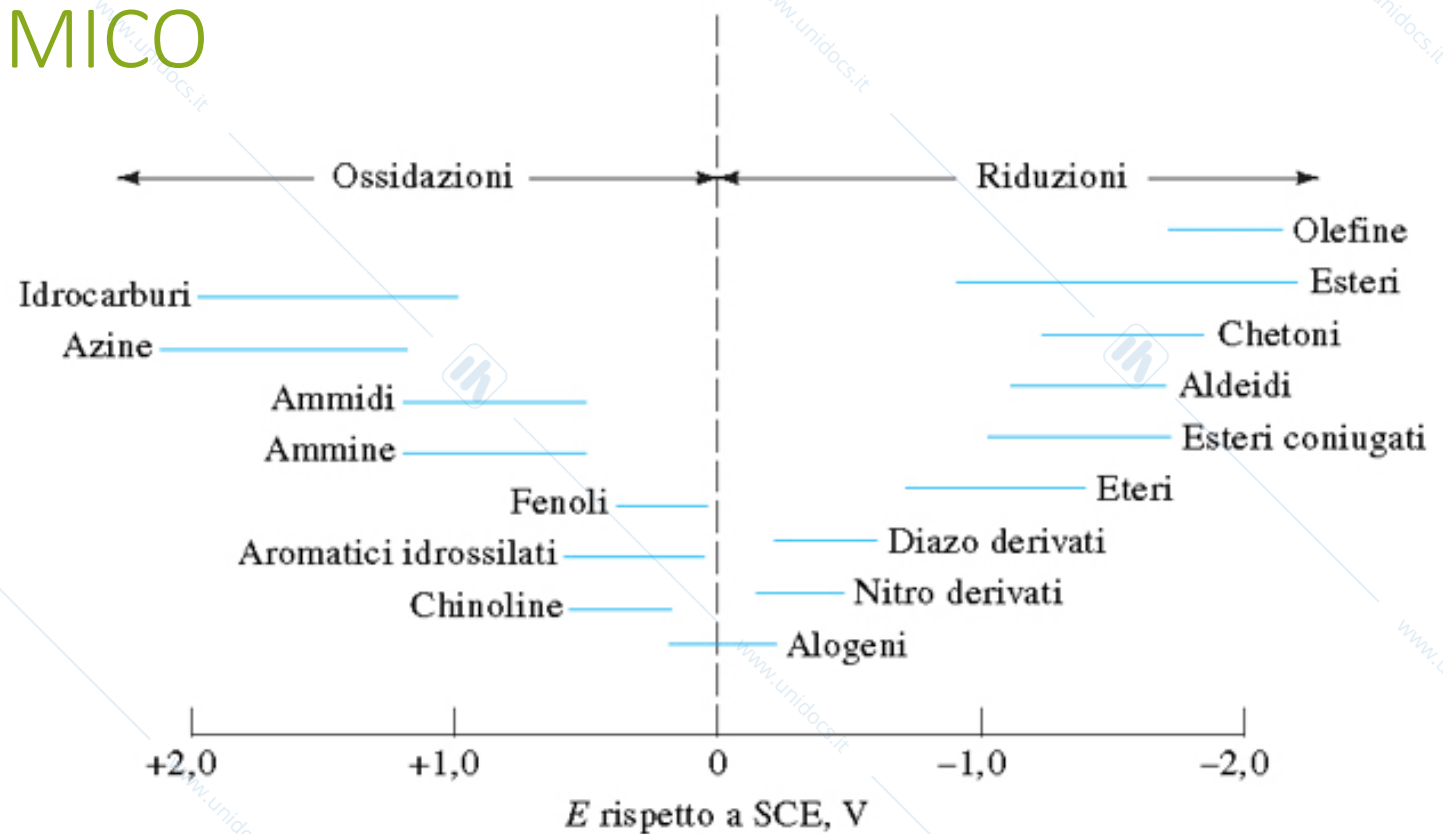


FIGURA 28-11 Rivelazione amperometrica potenziale di gruppi funzionali organici. Le linee orizzontali indicano l'intervallo dei potenziali di ossidazione o riduzione di composti elettroattivi contenenti i gruppi funzionali indicati.

MS

Volume < 1 μ l

Diverse pressioni 1 atm – 10⁻⁷ Tor

Risoluzione delle masse molto alta

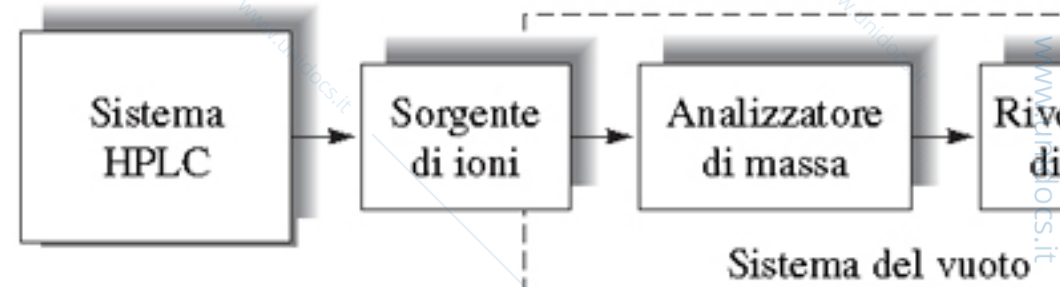
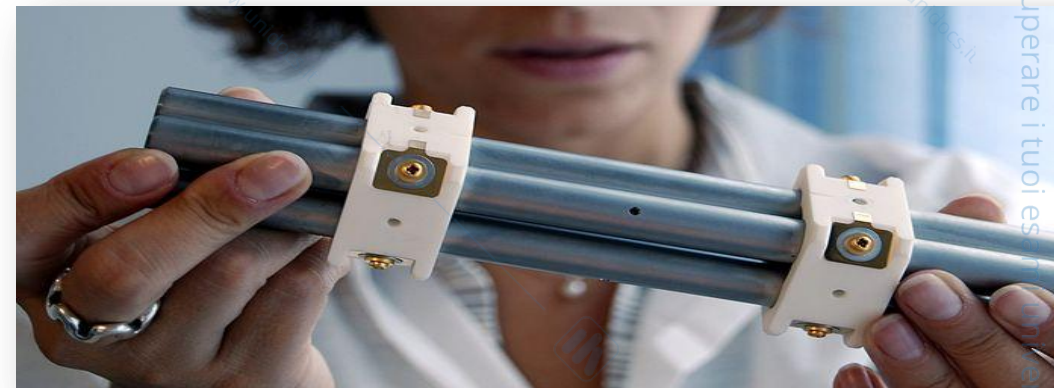


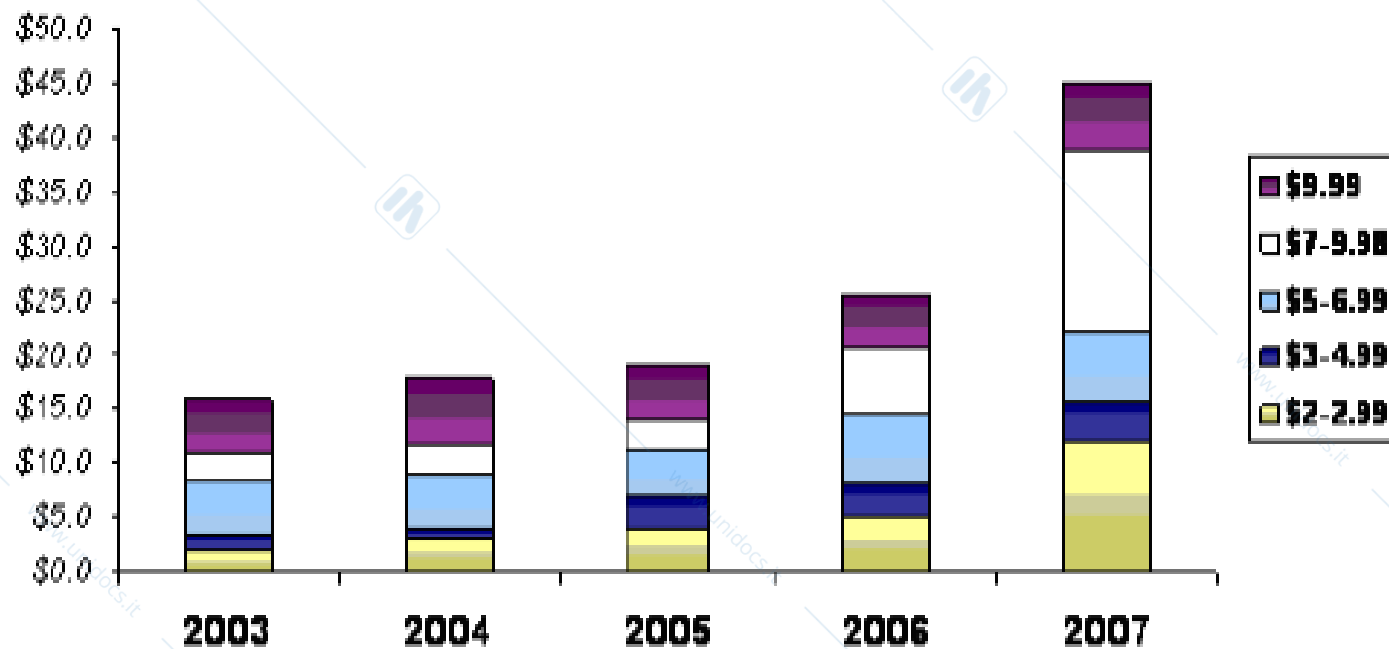
FIGURA 28-13 Diagramma a blocchi di un sistema LC-MS. L'effluente dalla colonna LC viene introdotto in una sorgente di ionizzazione a pressione atmosferica, come un elettrospray o una sorgente di ionizzazione chimica. Gli ioni prodotti vengono selezionati dall'analizzatore di massa e rivelati dal rivelatore di ioni.

Un quadrupolo è composto da quattro barre parallele di metallo. Alle barre viene applicata una tensione continua, le barre opposte diagonalmente hanno la tensione dello stesso segno, a questa viene sovrapposta una tensione alternata con frequenza nell'ordine dei megahertz (radiofrequenza). Il campo elettrico che risulta costringe gli ioni a percorrere una traiettoria oscillante diversa per ogni valore di m/z . Regolando questo campo si può selezionare il valore di m/z degli ioni che attraversano il quadrupolo, gli ioni con m/z superiori o inferiori al valore prescelto saranno costretti a percorrere traiettorie che portano fuori dal campo elettrico e quindi non raggiungeranno il rivelatore. Ciò consente la selezione di un particolare ione, oppure la scansione delle m/z variando con continuità il campo elettrico.



ESEMPI PRATICI

CIOCCOLATO



The total size of chocolate market in China in 2009 approximately 7 billion yuan and expected to grow about 11 percent year through 2010

HOWARD ABE
AT Kearney



By Sanjay Acharya, Creative Commons



1. Racogliere
2. Fermentare
3. Arostire
4. Vendita

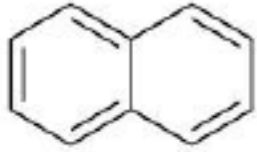
Tre tipi di semi di cacao

Forastero

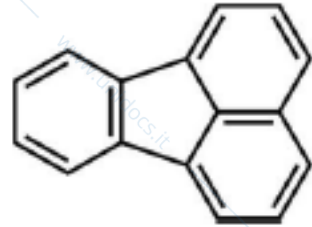
Criollo

Trinitaro

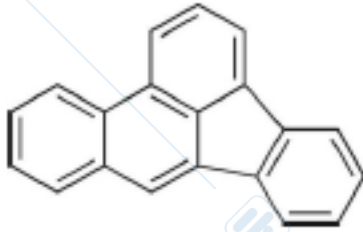
<http://it.wikipedia.org/wiki/Cioccolato>



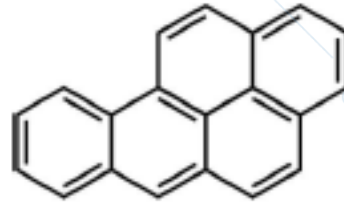
Napthalene



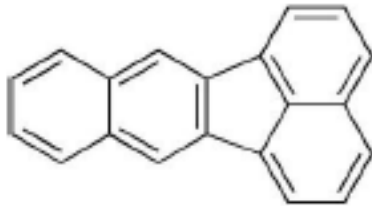
Fluoranthene



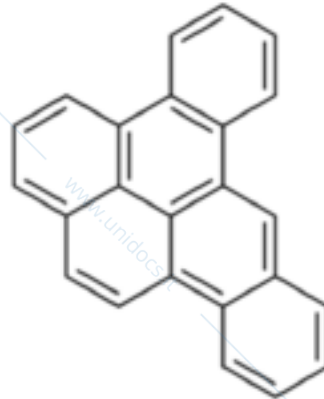
Benzo [b]fluoranthene



Benzo [a] pyrene



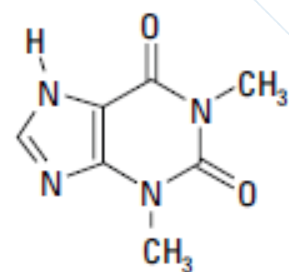
Benzo [k]fluoranthene



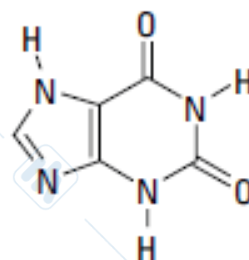
Dibenzo [a,e] pyrene

PAH gruppo di > 10 molecole
Proprietà chimico-biologiche sotto i stu
Prodotti durante il processo di arrostime

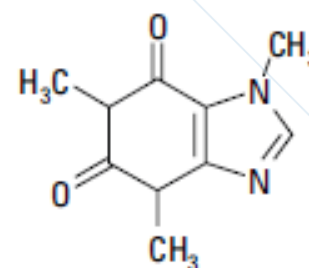
XANTHINES



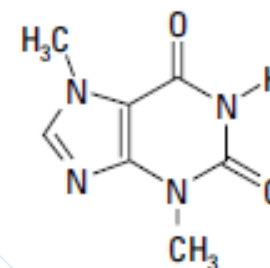
Theophylline
(1,3-dimethylxanthine)



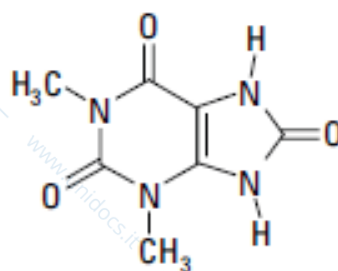
Basic xanthine
structure



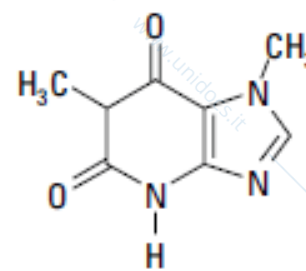
Caffeine
(1,3,7-trimethylxanthine)



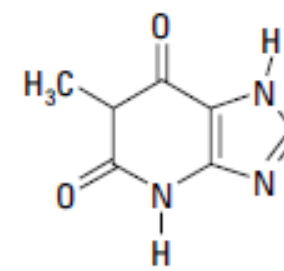
Theobromine
(3,7-dimethylxanthine)



1,3-dimethyluric acid
(theophylline metabolite)



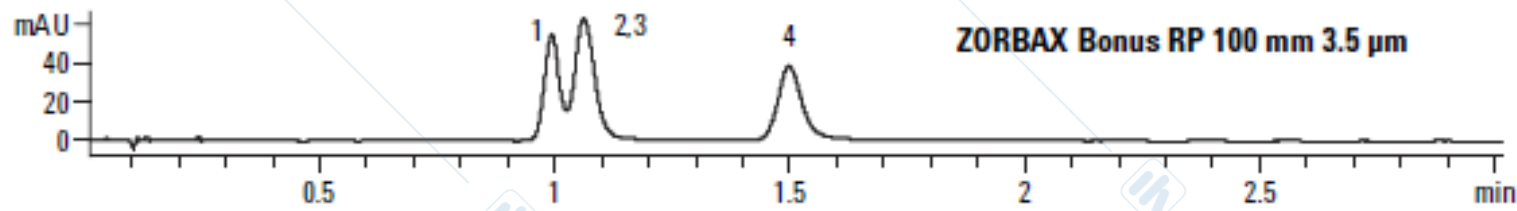
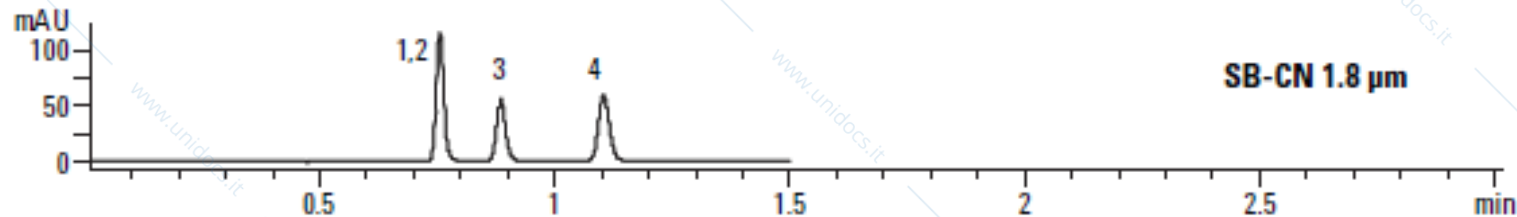
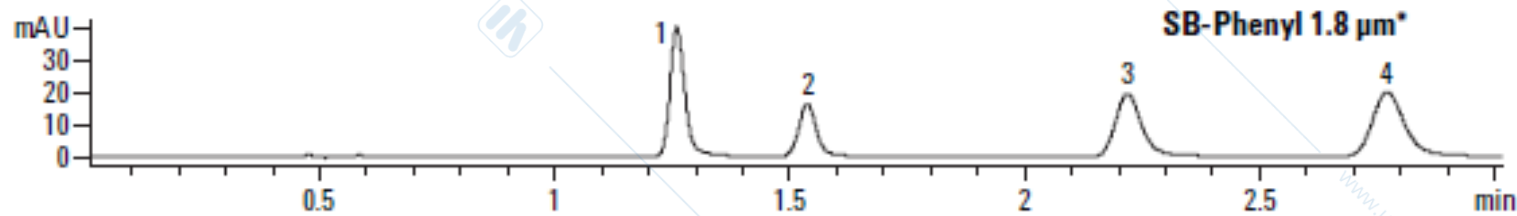
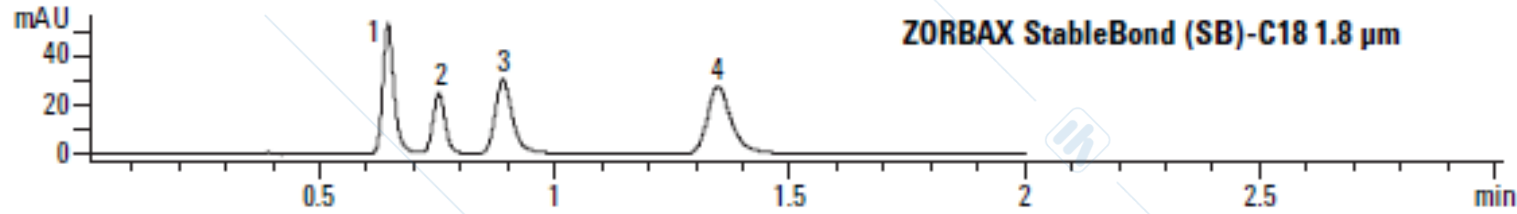
1,7-dimethylxanthine
(caffeine metabolite)



1-methylxanthine
(theophylline metabolite)

Figure 1. Structures of selected xanthines and metabolites used in this study.

FASE STAZIONARIA



Compounds:

- 1 1-methylxanthine
- 2 1,3-dimethyluric
- 3 3,7-dimethylxant
- 4 1,7-dimethylxant
- * Preproduction ba

Columns:

SB-C18, 4.6 × 150 mm, 5 μm
SB-phenyl, 4.6 × 150 mm, 5 μm
SB-CN, 4.6 × 150 mm, 5 μm
Bonus-RP, 4.6 × 150 mm, 5 μm

Mobile phase:

A = 0.2% FA in water
B = AcCN w/0.1% FA

Isocratic composition:

98% A 2% B (v/v)

Flow rate:

1.5 mL/min

Injection volume:

2, 4, 6 μL, resp.

Detector:

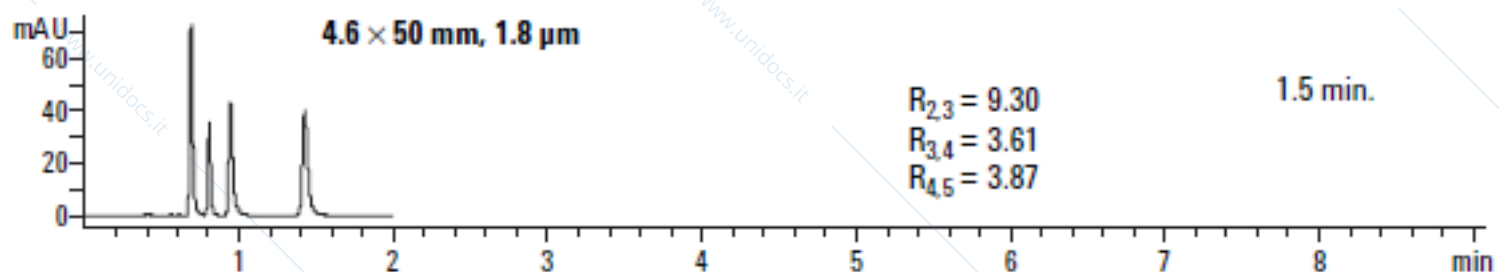
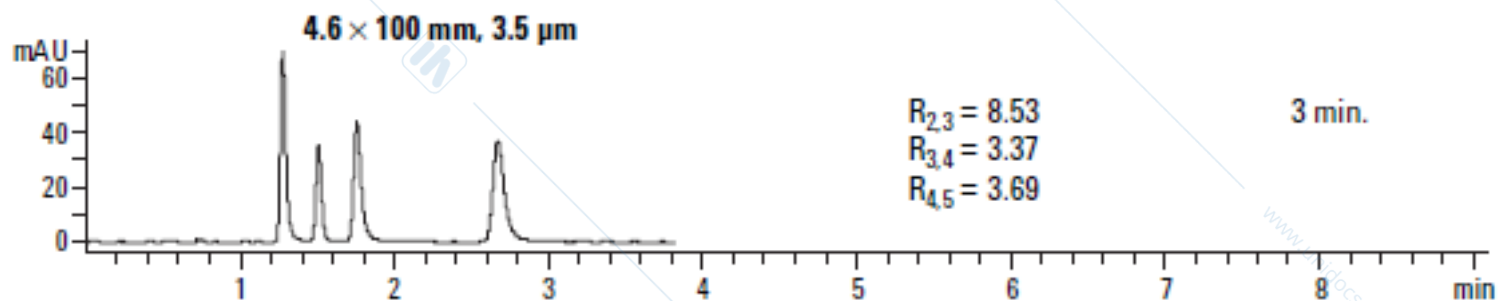
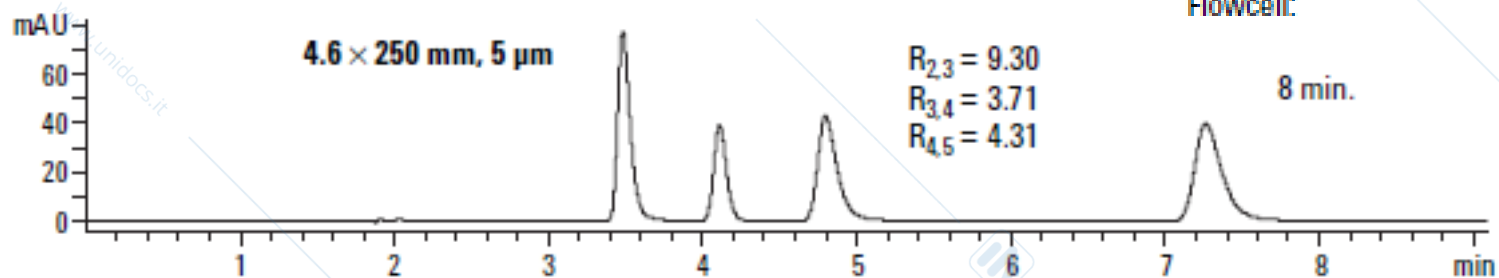
DAD, 254 nm

Flowcell:

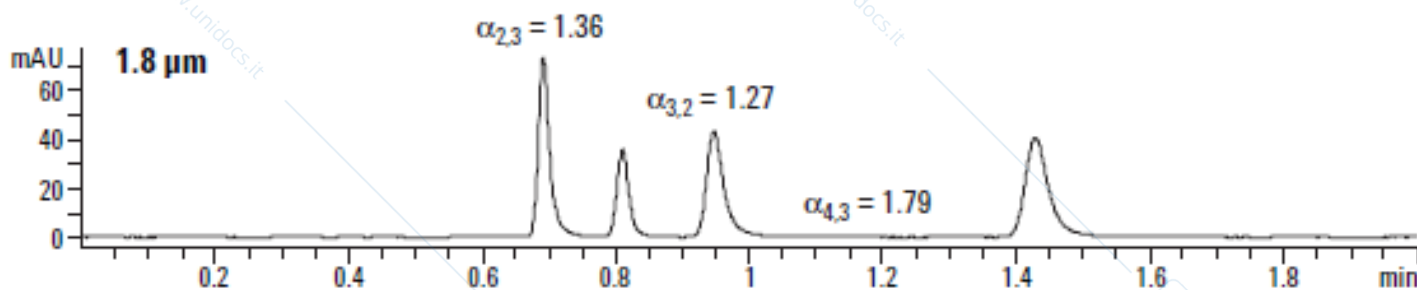
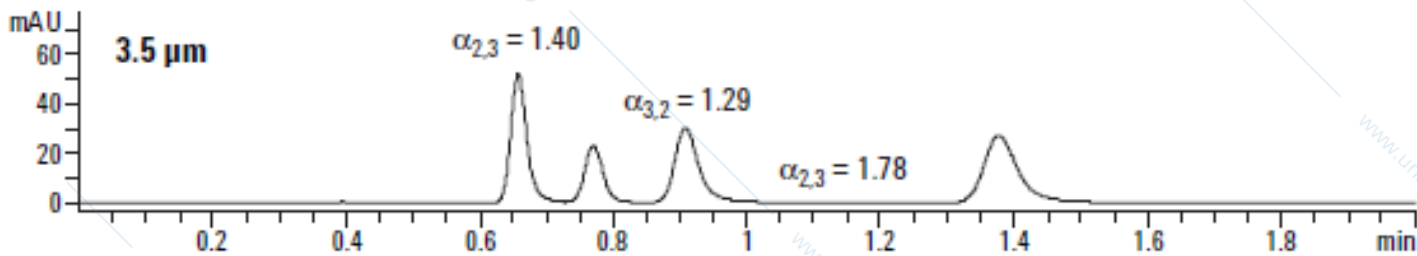
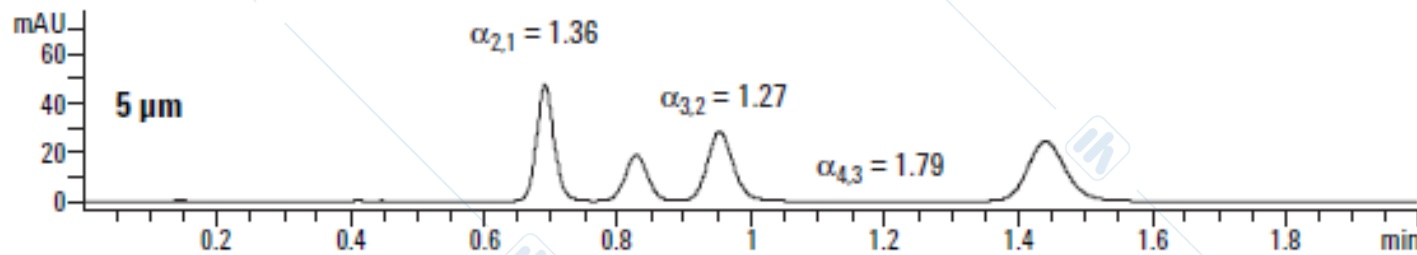
3 μL, 2-mm flow cell

COLONNA

Column: ZORBAX SB-C18 (see chromatogram for dimensions)
Mobile phase: A = 0.2% FA
B = AcCN w 0.2% FA
Isocratic composition: 98% A 2% B (v/v)
Flow rate: 1.5 mL/min
Injection volume: 2, 4, 6 μ L, respectively
Detector: DAD, 254 nm
Flowcell: 3 μ L, 2-mm flow path

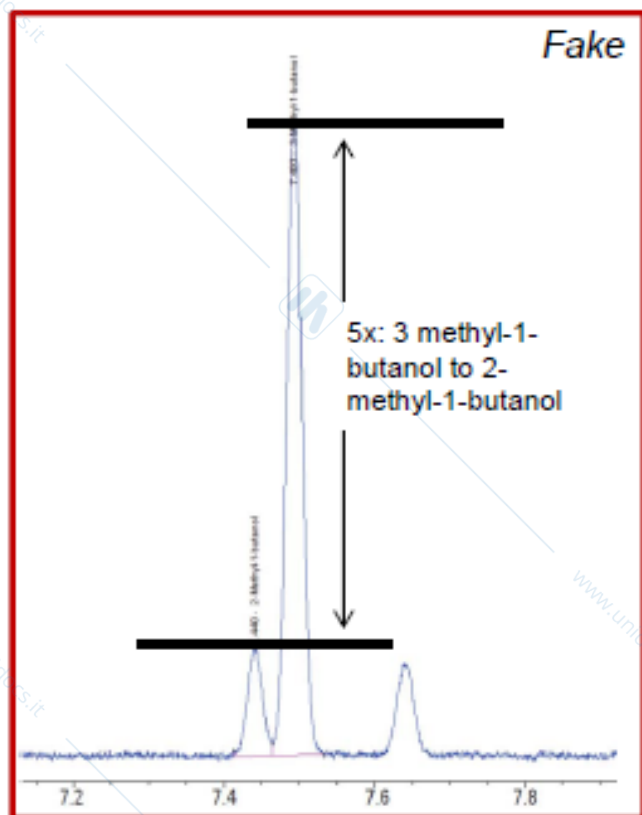


DIMENSIONE DELLE PARTICELLE

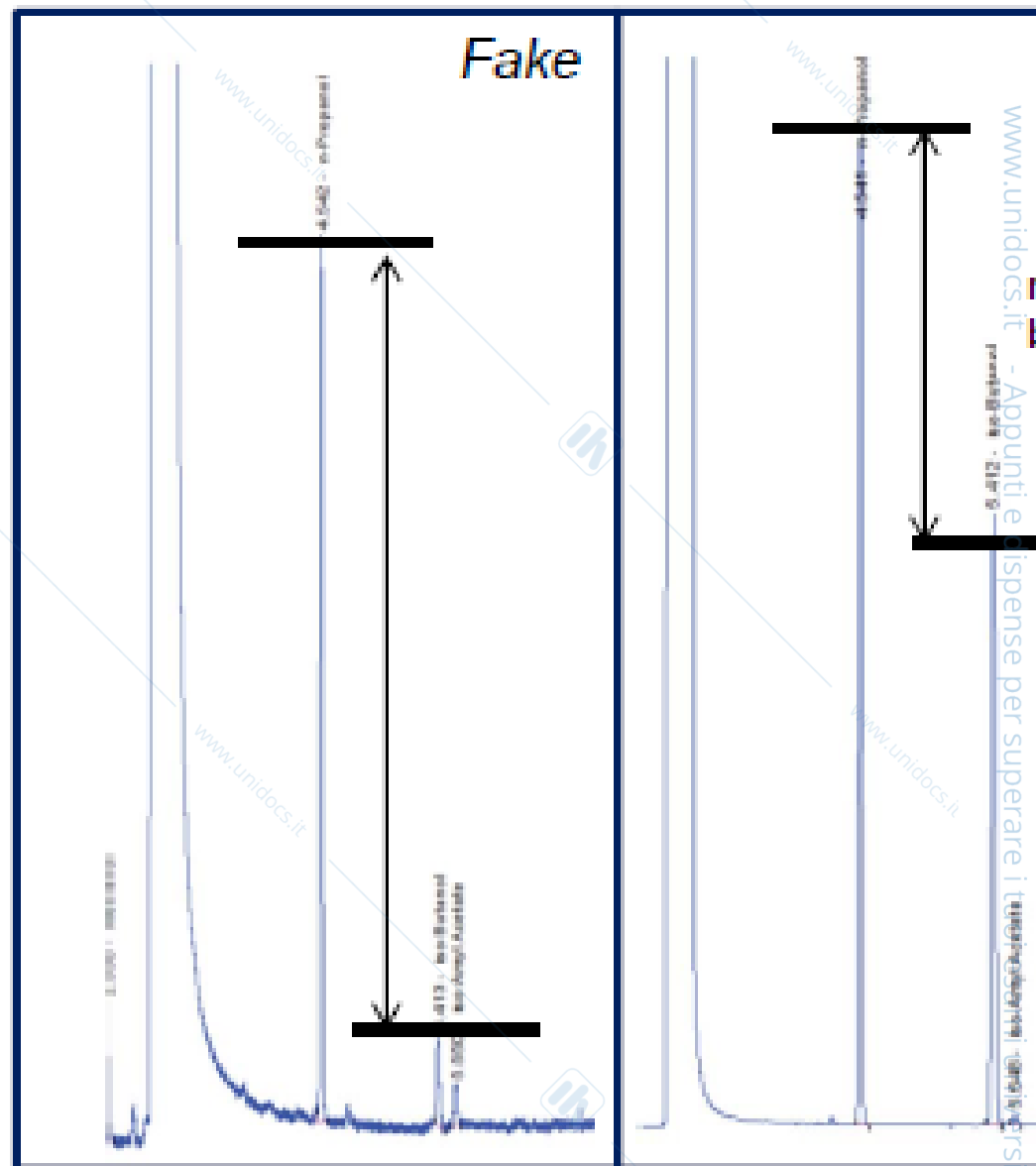


Column: ZORBAX
Mobile phase: A = 0.2% F
B = 0.2% F
Isocratic composition: 98% A 2% B
Flow rate: 1.5 mL/min
Injection volume: 2 μL
Flowcell: 2 μL , 3-mm

WHISKEY

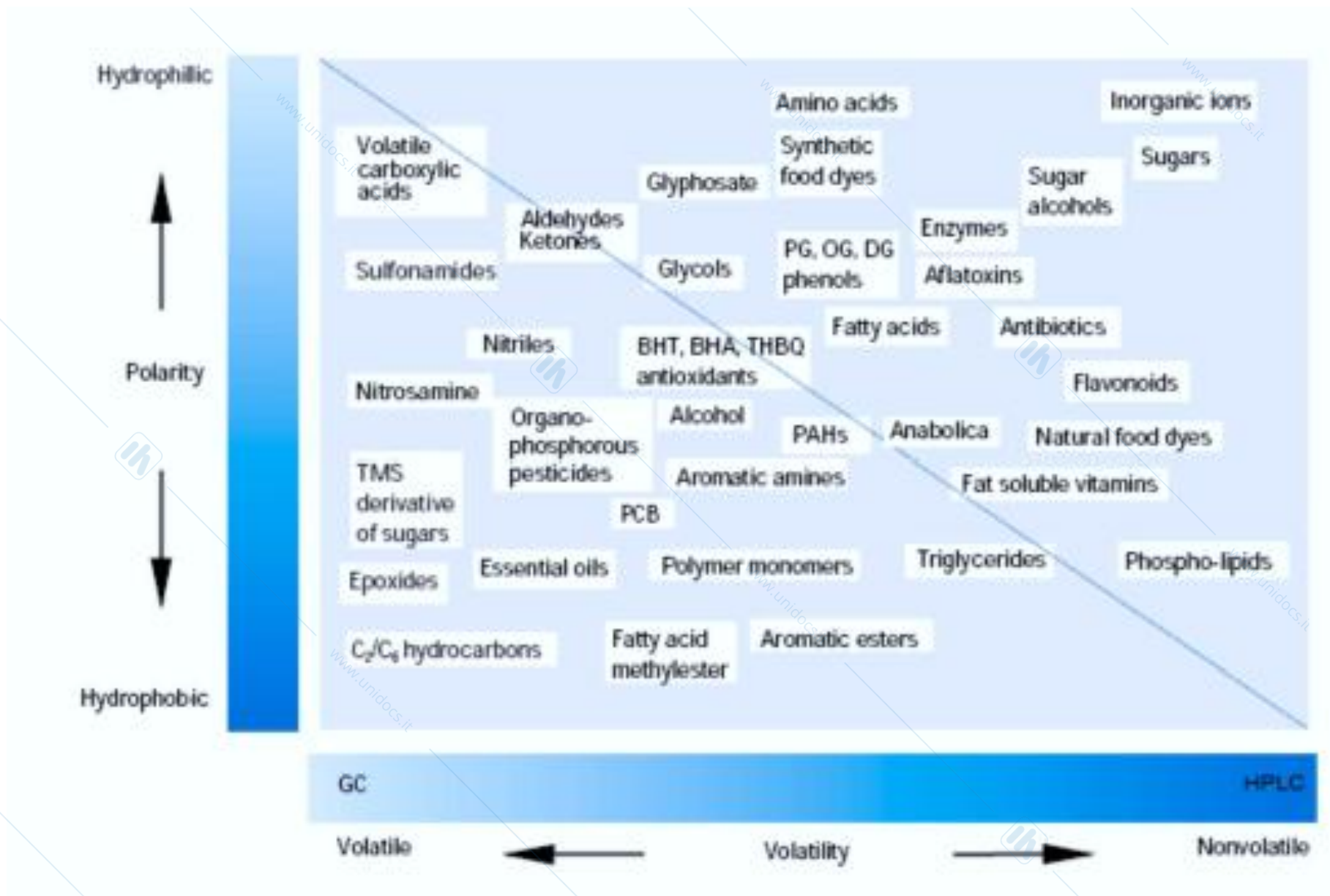


In the 'real' whiskey this ratio is 2!

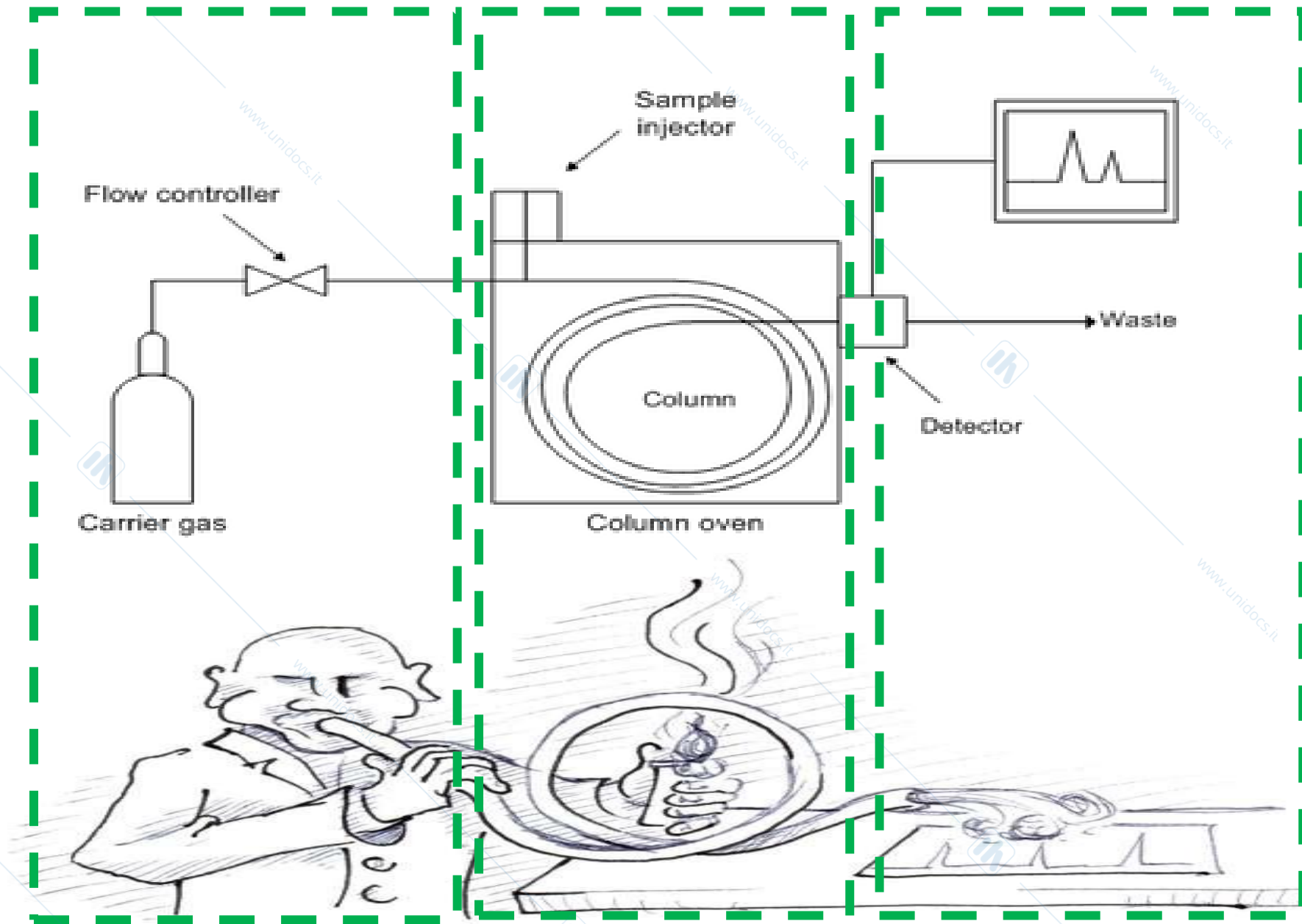


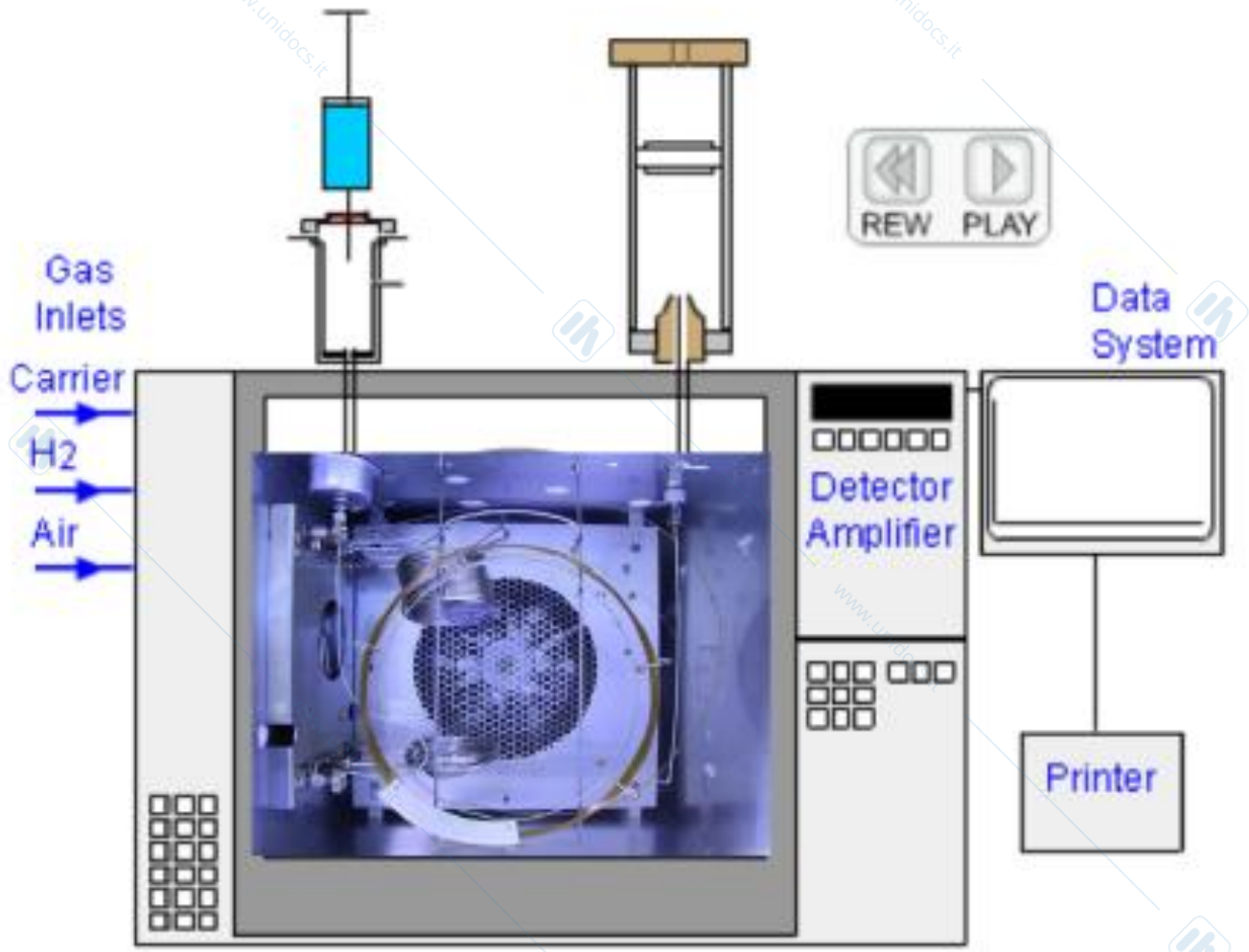
- Soltanto 23% delle sostanze possono essere separate nella GC

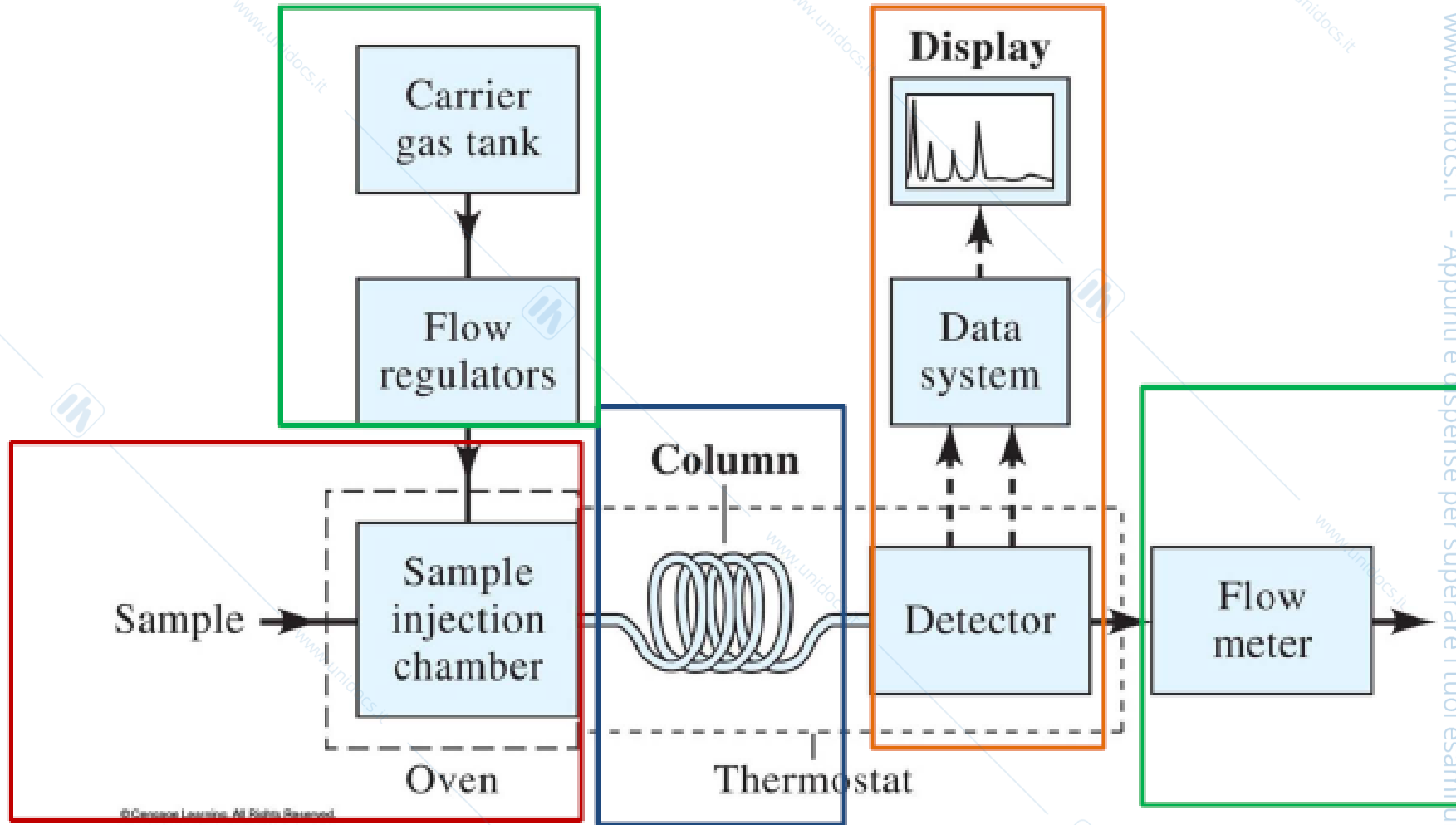












FASE MOBILE

- Pressioni nelle GC colonne: 10-50 psi
- Velocità del flusso: 25-50 ml/min

- 1 psi = 6894 Pascal

- $\text{Pressione} = \text{densità} * \text{velocità}^2$

- Gas ultra-puri:

elio, idrogeno, nitrogeno, argon

99,9999%

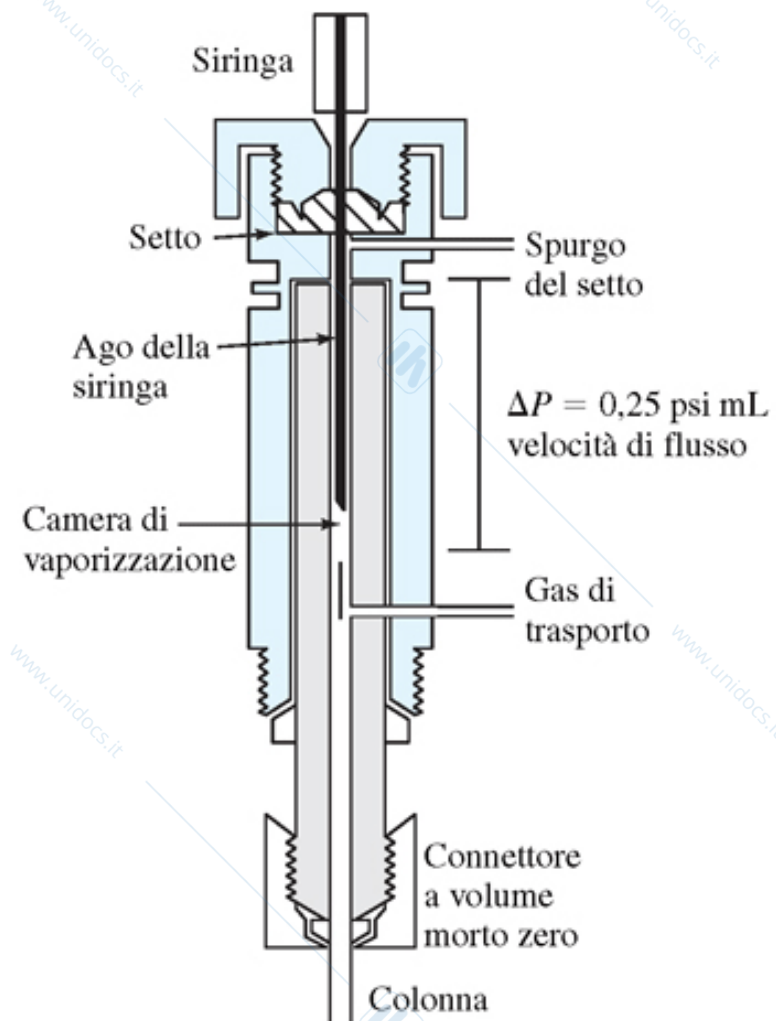


INIEZIONE DEL CAMPIONE



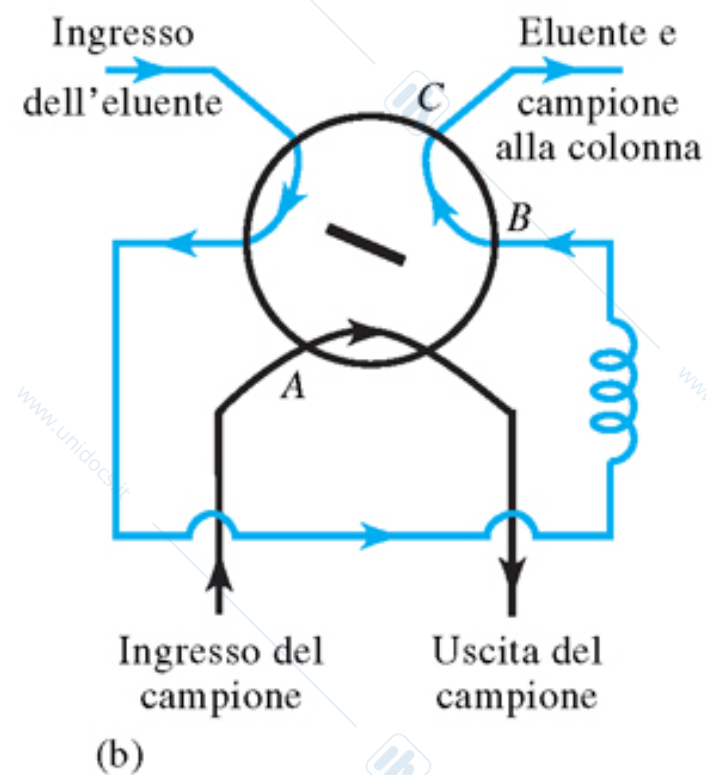
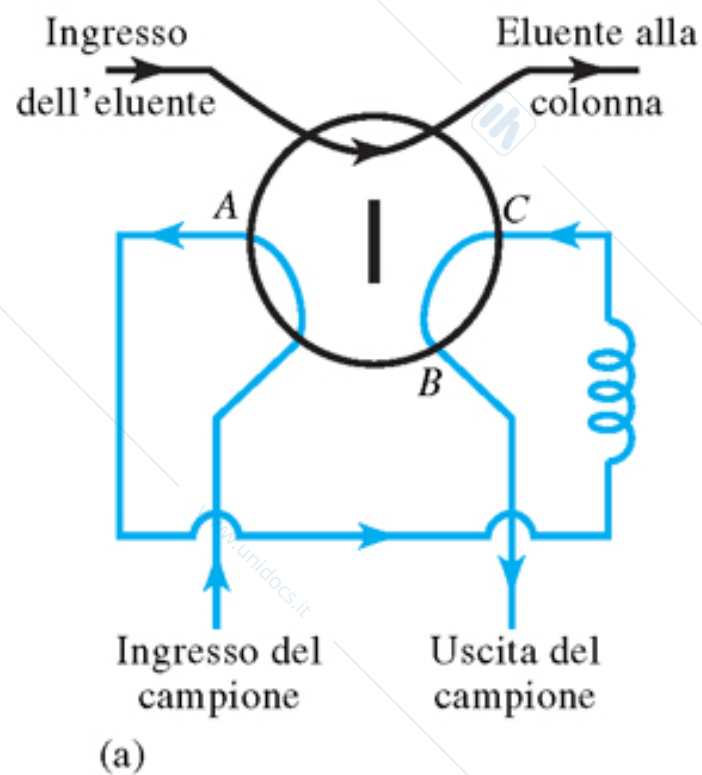
FIGURA 27-3 Un set di microsiringhe per l'iniezione dei campioni. (Per cortesia della Hamilton Company).

INIEZIONE DEL CAMPIONE

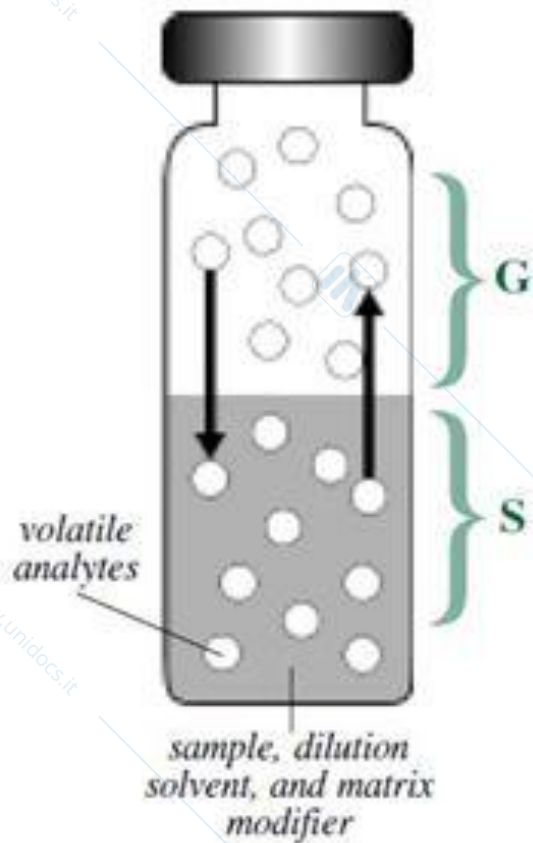


Manuale oppure autocampionatore

INIEZIONE DEL CAMPIONE

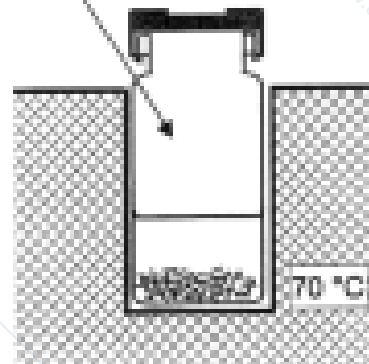


HEADSPACE: BASICA



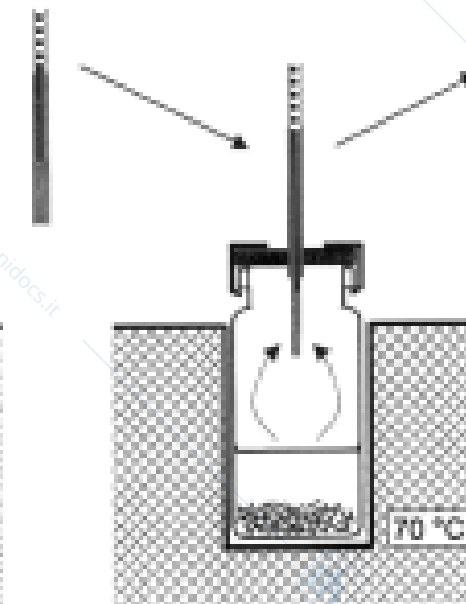
Headspace vial (4 ml)

- 10 mg Hair
- Internal Std.
- 1 ml 4% NaOH
- 0.5 g Na_2SO_4



Hair digestion and preheating (30 min)

SPME-Device



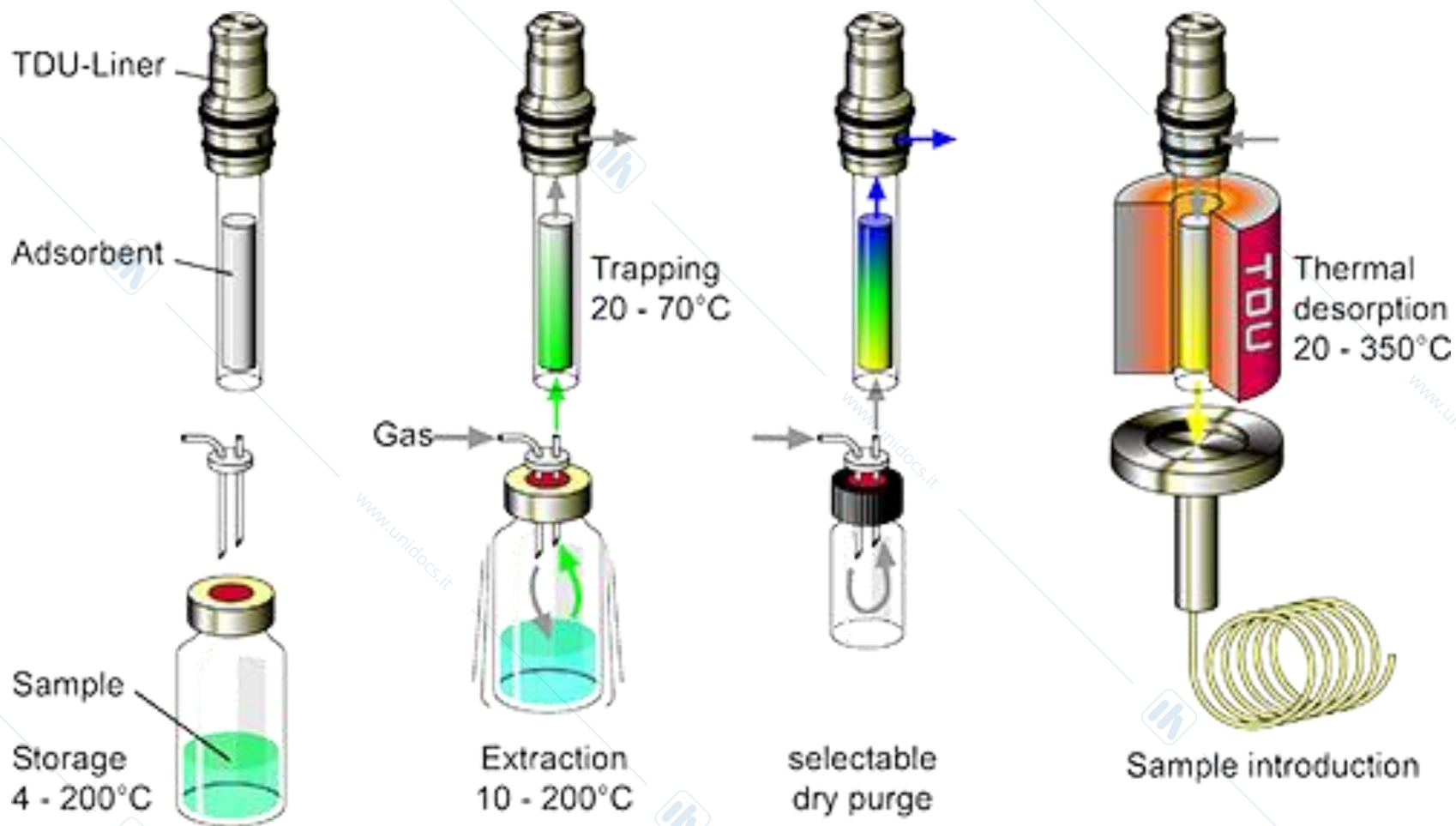
Headspace adsorption (15 min)

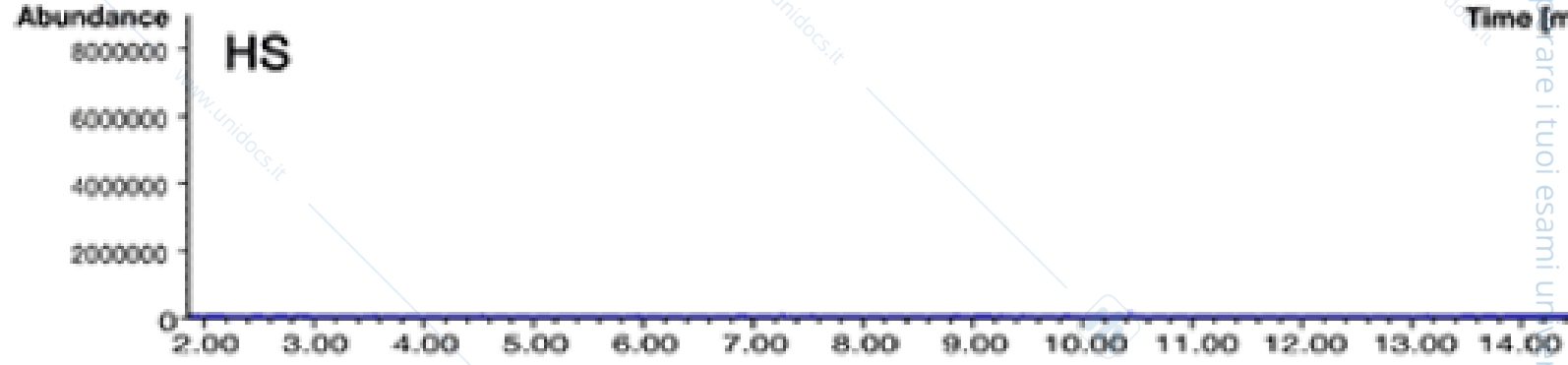
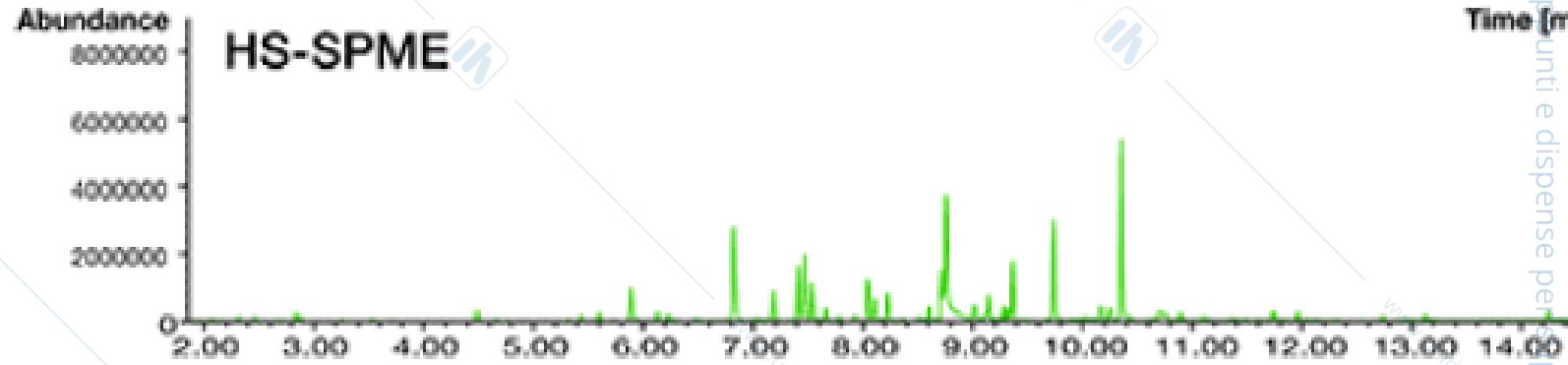
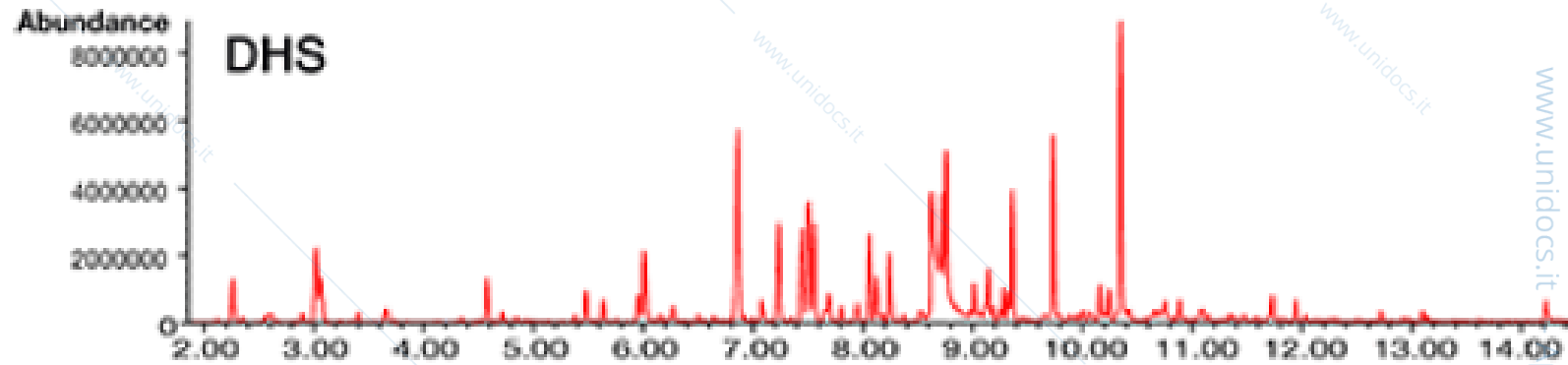
SPME-Dev
Syringe Need
Stainless Steel R
Coated Fused Silica F



Desorption GC-injection

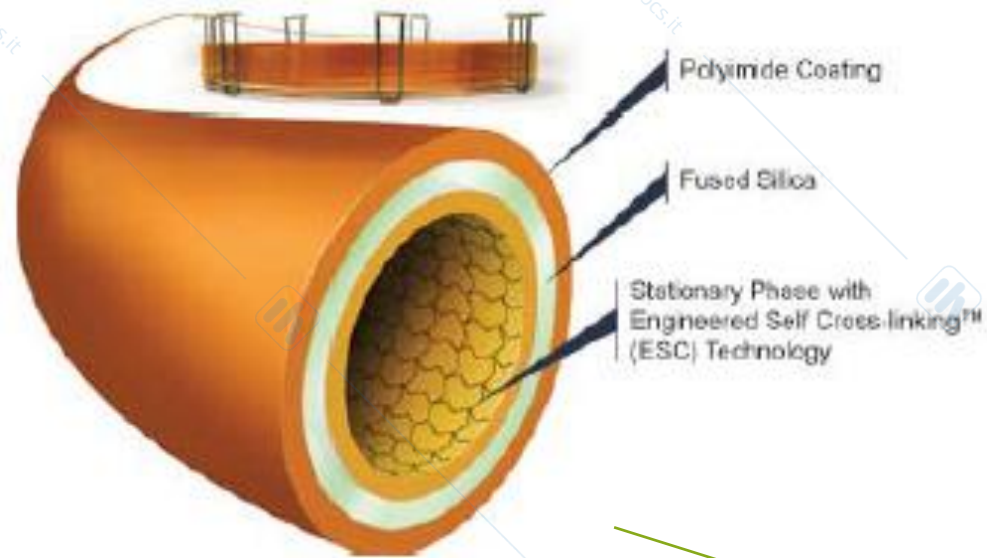
DYNAMIC HEADSPACE





Instant coffee analysis

COLONNE



Colonne capillari danno la risoluzione molto alta

$N \rightarrow 100\ 000$ piatti

Quantità del campione molto bassa

<http://www.phenomenex.com/>

Colonne impaccate

Colonne tubolari aperte

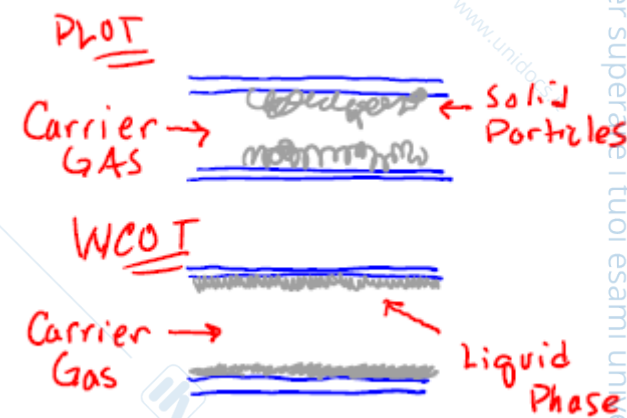
Fase stazionaria liquida

COLONNE TUBOLARI APERTE O CAPILLARI

FSOT : colonne tubolari aperte a silice fusa

WCOT : colonne capillari tubolari aperte a pareti ricoperte

SCOT : colonne capillari tubolari aperte a supporto ricoperto



COLONNE

TABELLA 27-2 Proprietà e caratteristiche delle tipiche colonne GC

	Tipo di colonna			Imp	
	FSWC*	WCOT†	SCOT‡		
Lunghezza, m	10-100	10-100	10-100	1-6	
Diametro interno, mm	0,1-0,3	0,25-0,75	0,5	2-4	
Efficienza, piatti/m	2000-4000	1000-4000	600-1200	500	
Dimensione del campione, ng	10-75	10-1000	10-1000	10-1	
Pressione relativa	Bassa	Bassa	Bassa	Alta	
Velocità relativa	Elevata	Elevata	Elevata	Bassa	
Flessibilità	Sì	No	No	No	
Inerzia chimica	Migliore	→			Peggiora

*Colonna di silice fusa tubolare aperta a pareti rivestite.

†Colonne di metallo, di plastica o di vetro tubolari aperte a pareti rivestite.

‡Colonna tubolare aperta a supporto rivestito (detta anche tubolare aperta a strato poroso, o PLOT).

COLONNE IMPACCCATE

2-3 m di lunghezza

Diametri interni: 2-4 mm

Materiale di impaccamento uniforme e suddiviso o con un supporto solido ricoperto con uno strato sottile ($0,05-0,1 \mu\text{m}$) della fase stazionaria liquida

Supporto solido è costituito da particelle sferiche di piccola dimensione, uniformi, meccanicamente resistenti e con un'area superficiale specifica di almeno $1 \text{ m}^2/\text{g}$.

Materiale inerte e resistente a temperature elevate.

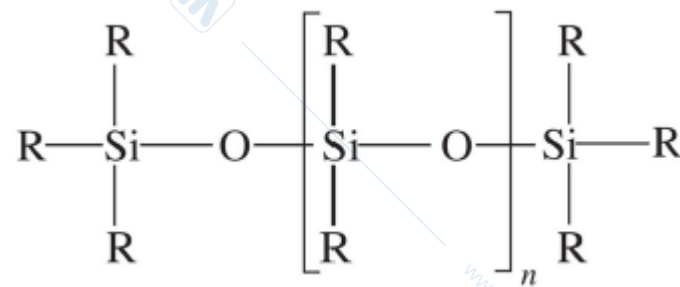
FASE STAZIONARIA LIQUIDA

- Bassa volatilità
- Stabilità termica
- Inerzia chimica
- Caratteristiche di solvente tali, che i valori k e α per soluti che devono essere risolti siano compresi in un adatto intervallo.

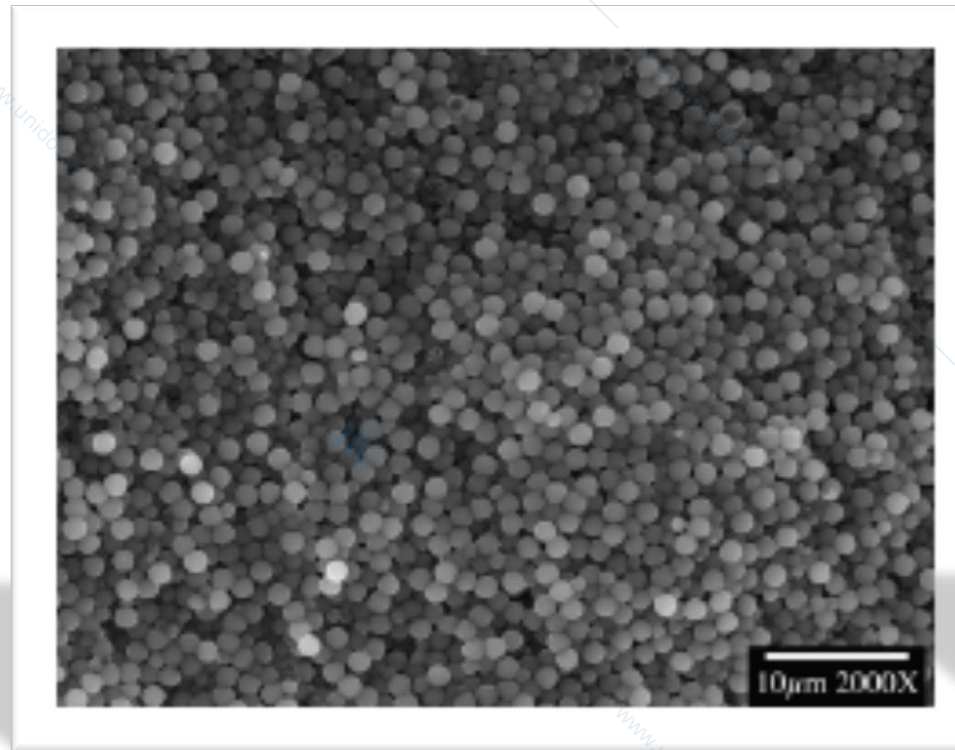
TABELLA 27-3 Alcune comuni fasi stazionari liquide per GLC

Fase stazionaria	Nome commerciale comune	Temperatura max, °C	Applicazioni comuni
Polidimetil silossano	OV-1, SE-30	350	Fase non polare per scopi generali, idrocarburi, aromatici polinucleari, steroidi, PCB
5% Fenil-polidimetil silossano	OV-3, SE-52	350	Esteri metilici di acidi grassi, alcaloidi, farmaci, composti alogenati
50% Fenil-polidimetil silossano	OV-17	250	Farmaci, steroidi, pesticidi, glicoli
50% Trifluoropropil-polidimetil silossano	OV-210	200	Aromatici clorurati, nitroaromatici, alchil benzeni sostituiti
Glicole polietilenico	Carbowax 20M	250	Acidi liberi, alcoli, eteri, oli essenziali, glicoli
50% Cianopropil-polidimetil silossano	OV-275	240	Acidi grassi polinsaturi, acidi di colofonia, acidi liberi, alcoli

COLONNE



COLONNE



Courtesy of Beaver chemicals



Courtesy of Beaver chemicals

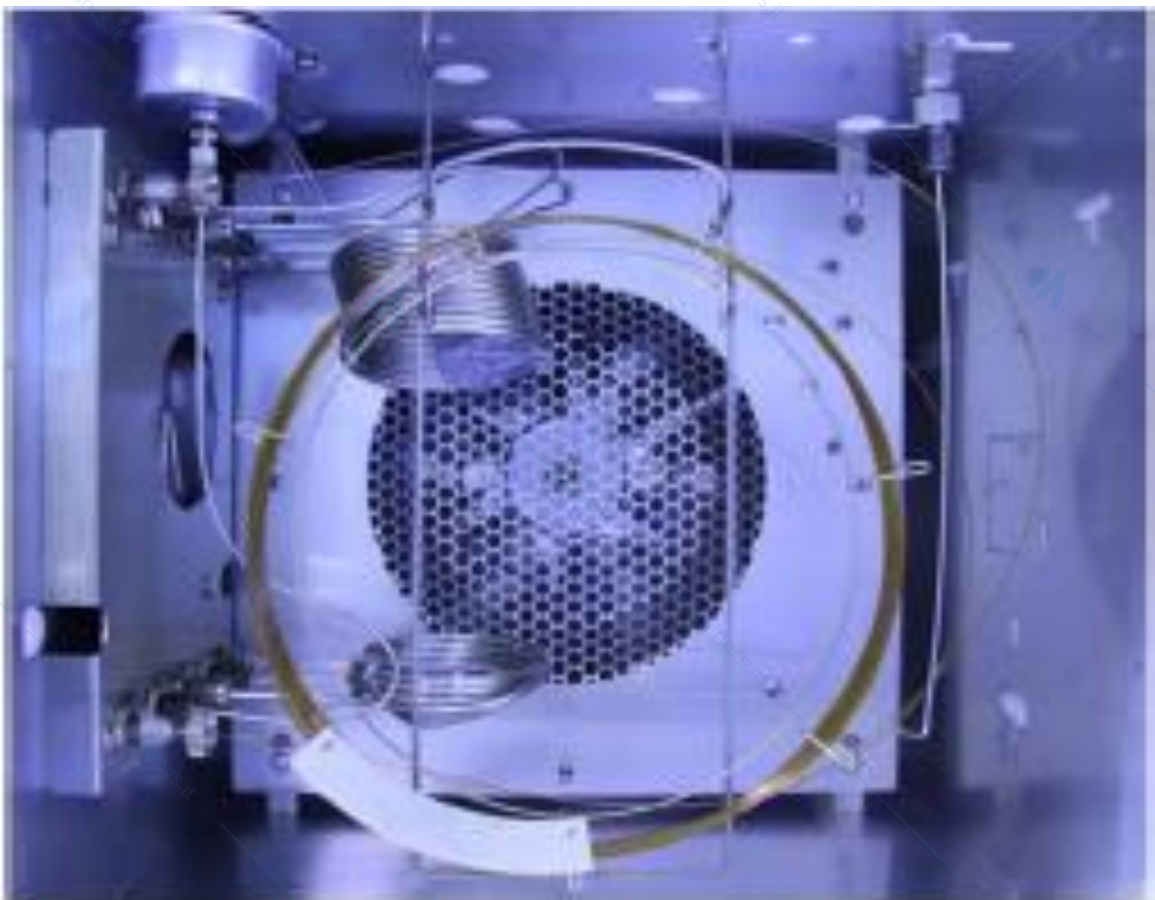
- **Packed bed versus capillary**
 - Diatomaceous earth coated with liquids
 - 10 to 15 meters in length, ID of 2 to 4 mm
- **Bead size effects: smaller beads, lower resolution**

Small bead sizes decrease plate height 2 reasons

More uniform flow, less of term A in the Van Deemter

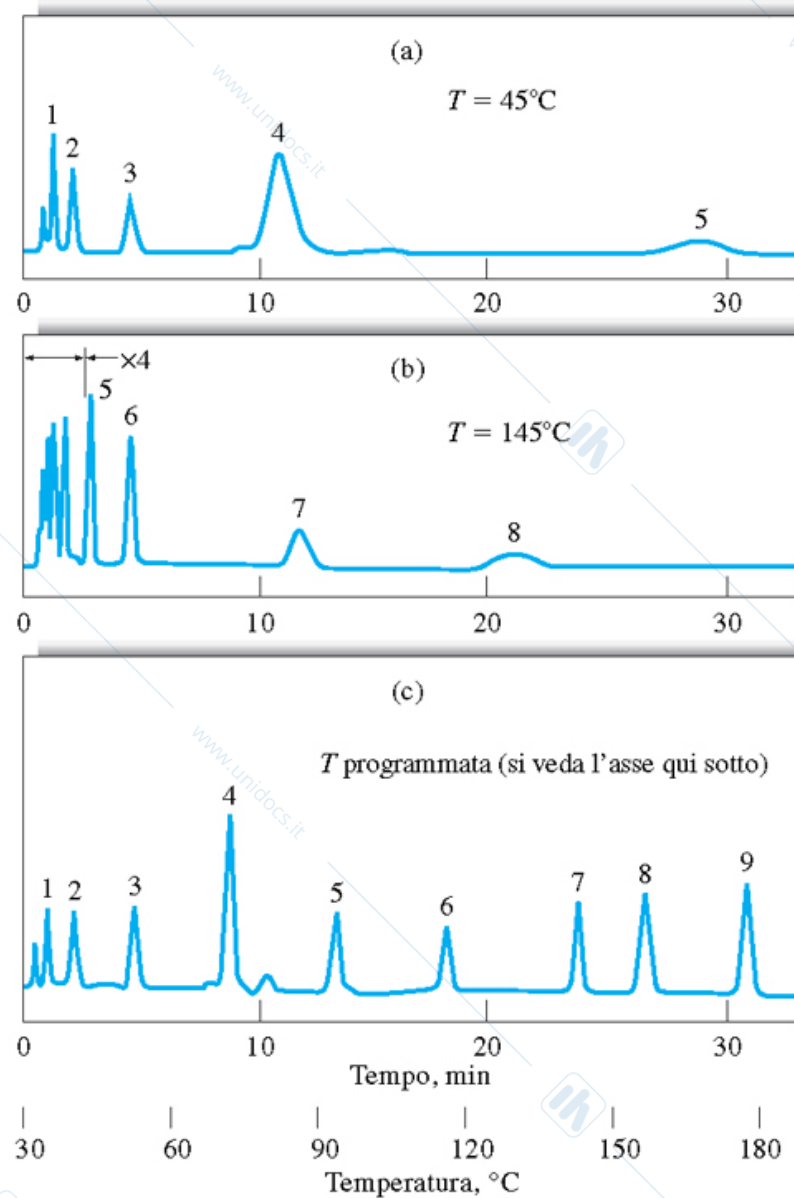
Distance for diffusion to stationary phase is less

FORNO



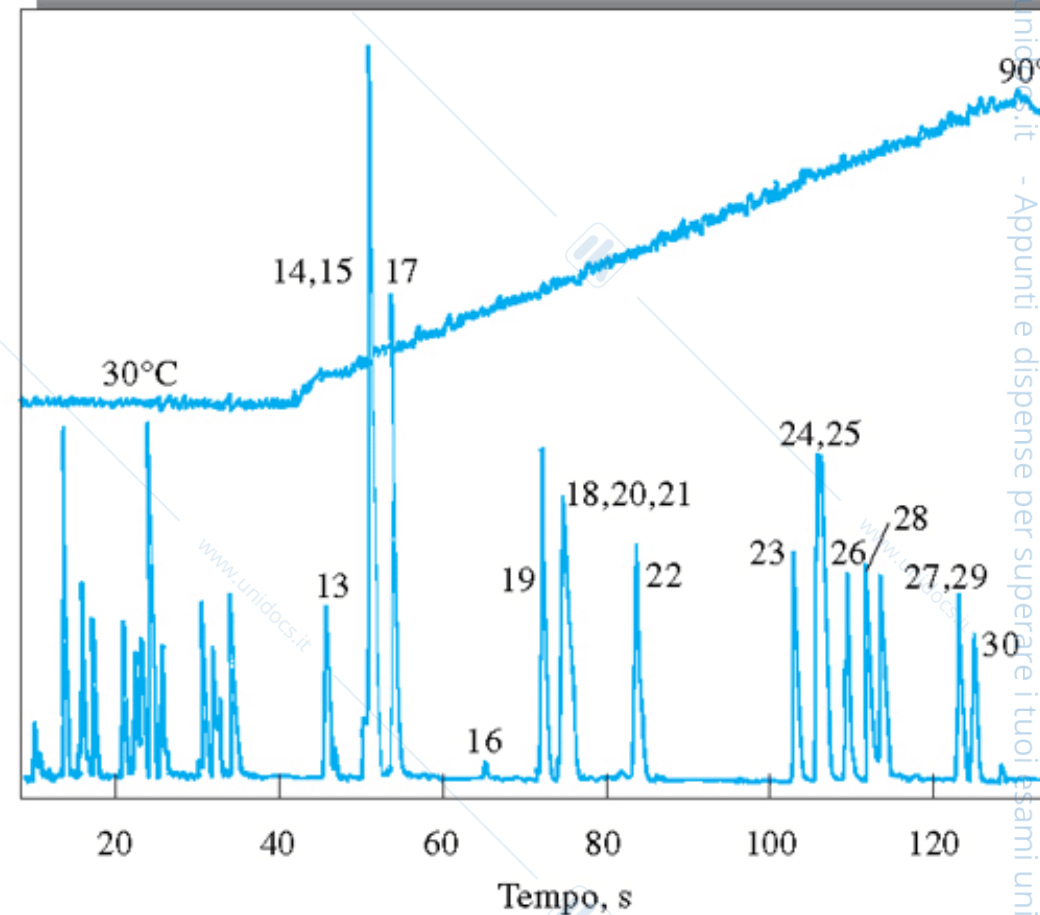
ELUIZIONE ISOTERMICA

FIGURA 27-7 Effetto della temperatura su gascromatogrammi: (a) isotermico a 45°C; (b) isotermico a 145°C; (c) programmato da 30°C fino a 180°C. (Da W. E. Harris and H. W. Habgood, *Programmed Temperature Gas Chromatography*, New York: Wiley, 1966, p. 10. Ristampa autorizzata).



Holler, Skoog, Crouch
Chimica Analitica Strumentale, II Ed.
EdiSES

FIGURA 27-19 Cromatogramma ad alta velocità ottenuto con operatività isoterma (30°C) per 37 s seguita da una rampa di temperatura di $35^{\circ}\text{C}/\text{min}$ fino a 90°C . (Da H. Smith and R. D. Sacks, *Anal. Chem.*, **1998**, *70*, 4960. Copyright 1998 American Chemical Society).



COME SCEGLIERE LA COLONNA

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

A measure of **Efficiency**.
This term is affected by:

- Length
- Inner diameter
- Carrier gas type and linear velocity

A measure of **Retention**.
This term is affected by:

- Inner diameter
- Film thickness
- Temperature

A measure of **Peak Separation**.
This term is affected by:

- Stationary phase composition
- Temperature

$N = L/H$ = Effective theoretical plate number
 L = Column length
 H = HETP = Height equivalent to a theoretical plate

k = Retention factor
 α = Separation factor
 Baseline resolution ($R = 1.5$) is the goal.

SELETTIVITÀ DELLA COLONNA

Indice di Kovats è un valore che identifica i tempi relativi di eluizione dei vari composti in gascromatografia. Il metodo può essere applicato solo a composti organici.

Il metodo si basa sulla relazione tra i valori di I e il numero di carboni della molecola. Solitamente l'indice di Kovats si indica con I .

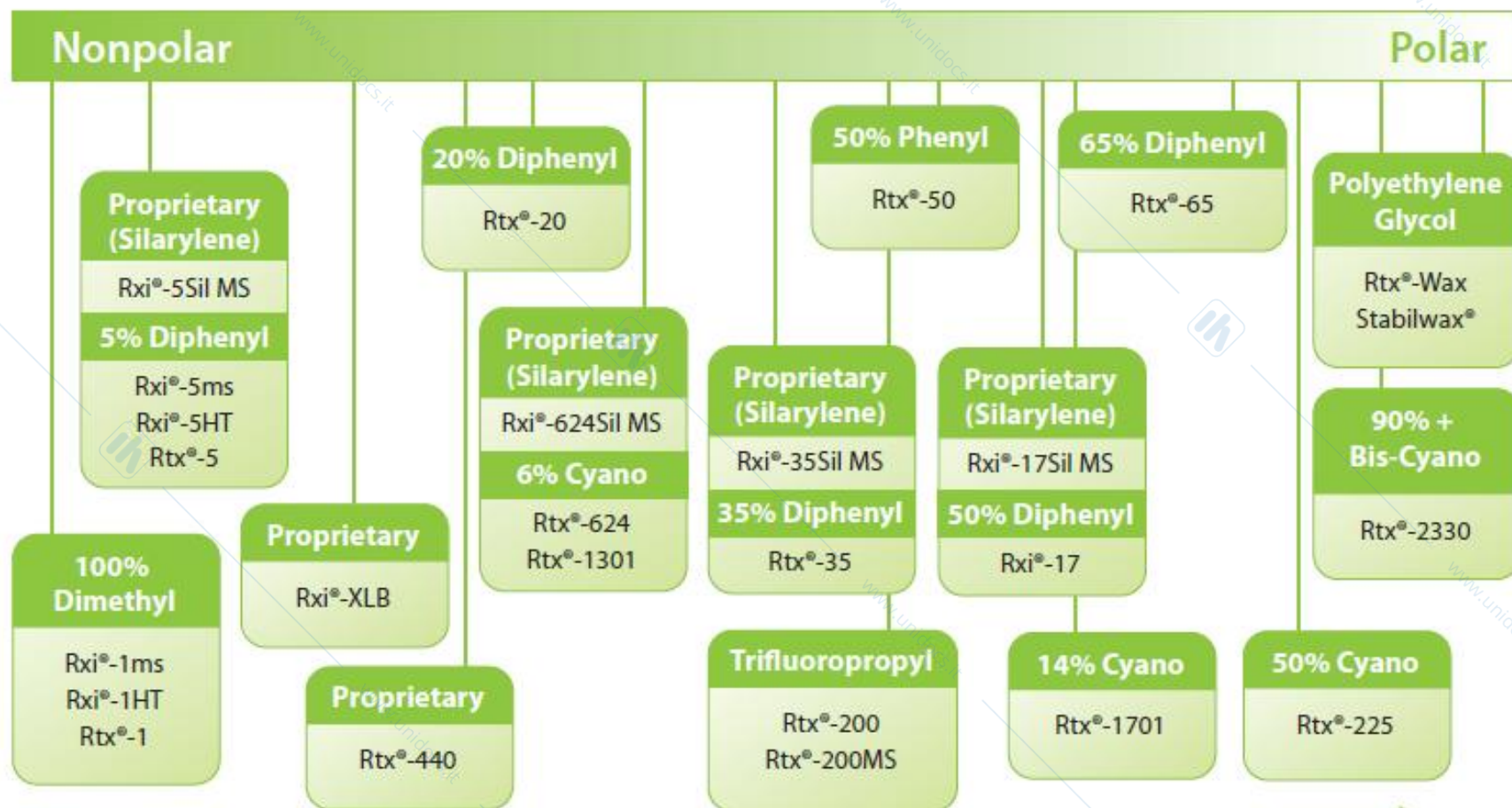
$$I = 100 \times \left[n + (N - n) \frac{\log(t'_{r(\text{incognito})}) - \log(t'_{r(n)})}{\log(t'_{r(N)}) - \log(t'_{r(n)})} \right]$$

I = Indice di ritenzione di Kovats,
 n = numero di carboni nell'alcano più piccolo,
 N = numero di carboni nell'alcano più grande,
 t'_r = tempo di ritenzione registrato.

Table I: Kovat's retention indices for GC phases can be used to approximate selectivity.

Stationary Phase	Benzene	Butanol	Pentanone	Nitropropane
100% Dimethyl polysiloxane	651	651	667	705
5% Diphenyl/95% dimethyl polysiloxane	667	667	689	743
20% Diphenyl/80% dimethyl polysiloxane	711	704	740	820
6% Cyanopropylphenyl/94% dimethyl polysiloxane	689	729	739	816
35% Diphenyl/65% dimethyl polysiloxane	746	733	773	867
Trifluoropropylmethyl polysiloxane	738	758	884	980
Phenyl methyl polysiloxane	778	769	813	921
14% Cyanopropylphenyl/86% dimethyl polysiloxane	721	778	784	881
65% Diphenyl/35% dimethyl polysiloxane	794	779	825	938
50% Cyanopropylmethyl/50% phenylmethyl polysiloxane	847	937	958	958
Polyethylene glycol	963	1,158	998	1,230

COME SCEGLIERE FASE STAZIONARIA



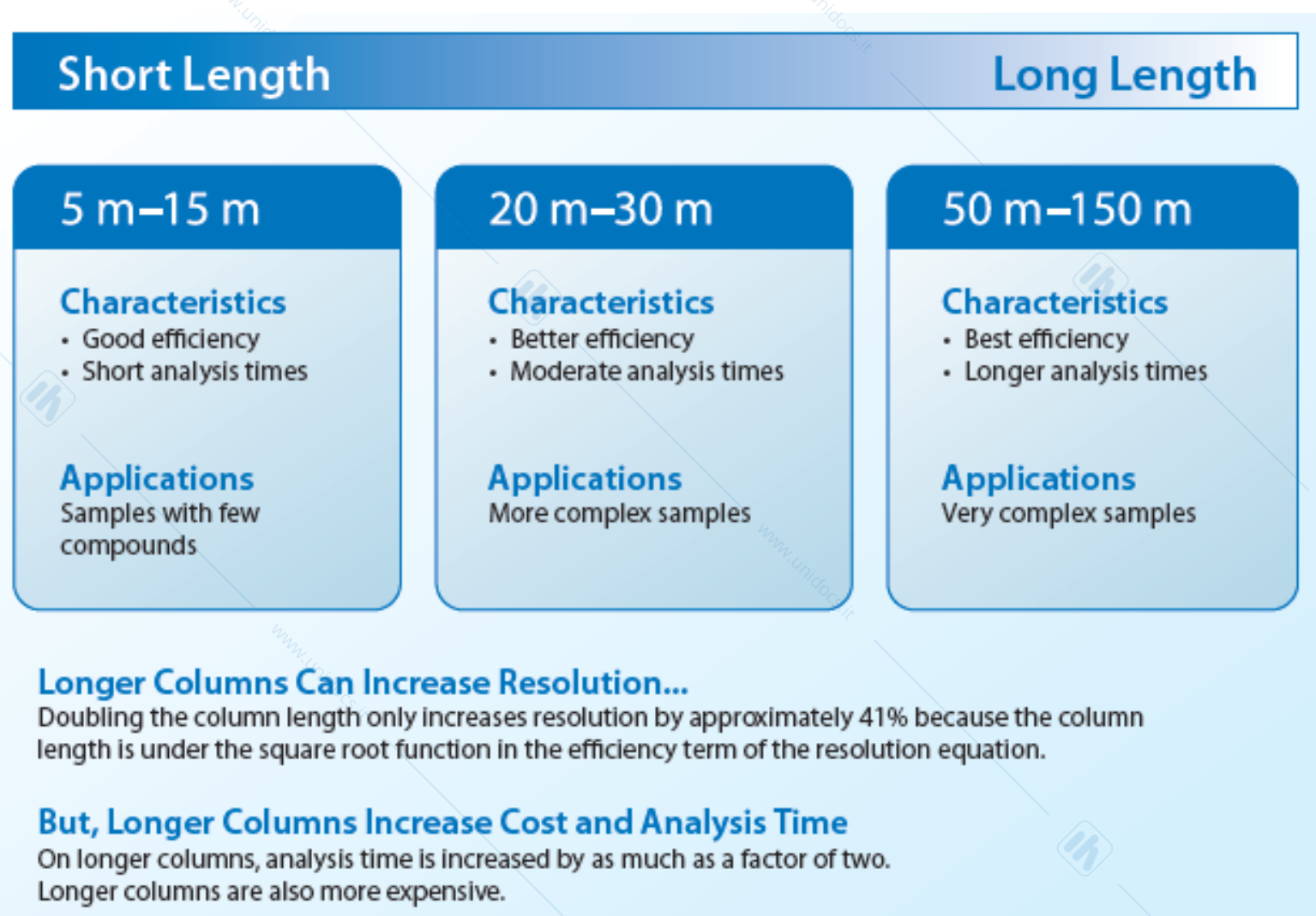
In general, maximum operating temperature decreases as polarity increases.

Note that silarylene columns typically differ in selectivity and have higher temperature limits than their conventional

Table II: Relative polarity and thermal stability are important considerations when selecting a GC stationary

Restek	Phase Composition (USP Nomenclature)	Restek's Max Temps*	Agilent	Phenomenex
Rxi-1HT Rxi-1ms, Rtx-1	100% Dimethyl polysiloxane (G1, G2, G38)	400 °C 350 °C	HP-1/HP-1ms, DB-1/DB-1ms, VF-1ms, CP Sil 5 CB, Ultra 1, DB-1ht, HP-1ms UI, DB-1ms UI	ZB-1, ZB-1MS, ZB-1HT Inferno
Rxi-5HT Rxi-5ms, Rtx-5	5% Diphenyl/95% dimethyl polysiloxane (G27, G36)	400 °C 350 °C	HP-5/HP-5ms, DB-5, Ultra 2, DB-5ht, VF-5ht, CP-Sil 8 CB	ZB-5, ZB-5HT Inferno ZB-5ms
Rxi-5Sil MS	5% (1,4-bis(dimethylsiloxy) phenylene/95% dimethyl polysiloxane	350 °C	DB-5ms UI, DB-5ms, VF-5ms	ZB-5msi
Rxi-XLB	Proprietary Phase	360 °C	DB-XLB, VF-Xms	MR1, ZB-XLB
Rtx-20	20% Diphenyl/80% dimethyl polysiloxane (G28, G32)	320 °C	—	—
Rtx-35	35% Diphenyl/65% dimethyl polysiloxane (G42)	320 °C	HP-35, DB-35	ZB-35
Rxi-35Sil MS	Proprietary Phase	360 °C	DB-35ms, DB-35ms UI, VF-35ms	MR2
Rtx-50	Phenyl methyl polysiloxane (G3)	320 °C	—	—
Rxi-17	50% Diphenyl/50% dimethyl polysiloxane	320 °C	DB-17ms, VF-17ms, CP Sil 24 CB	ZB-50
Rxi-17Sil MS	Proprietary Phase	360 °C	DB-17ms, VF-17ms, CP Sil 24 CB	ZB-50
Rtx-65	65% Diphenyl/35% dimethyl polysiloxane (G17)	300 °C	—	—
Rxi-624Sil MS	Proprietary Phase	320 °C	DB-624 UI, VF-624ms, CP-Select 624 CB	ZB-624
Rtx-1301, Rtx-624	6% Cyanopropylphenyl/94% dimethyl polysiloxane (G43)	280 °C 240 °C	DB-1301, DB-624, CP-1301, VF-1301ms, VF-624ms	ZB-624

COME SCEGLIERE LA LUNGHEZZA DELLA COLONNA



Effects of Column Length			
Column Length (m)	Inlet Pressure (psi)	Peak 1 Retention (min)	Efficiency: Total Plates (N)
15	5.9	8.33	43,875
30	12.0	16.68	87,750
60	24.9	33.37	175,500

Thin Film

0.10 μm –0.50 μm

Characteristics

- Shorter retention times
- Lower bleed
- Higher maximum temperatures
- Lower sample loading capacity
- High resolution for high molecular weight compounds

Applications

Medium and high molecular weight compounds

1.0 μm –10.0 μm

Characteristics

- Longer retention times
- Higher bleed
- Lower maximum temperatures
- Higher sample loading capacity
- High resolution for volatiles and low molecular weight compounds

Applications

- Volatile, low molecular weight compounds
- High concentration samples (e.g., purity testing)

As film thickness increases, retention, sample loading capacity, and column bleed increase; whereas, maximum temperature decreases.

Thick Film

Effect of Film Thickness

	0.10 to .25 μm films	1 to 5 μm films
Benefits	Sharper peaks Better resolution Increased S/N	Increased analyte capacity
Drawbacks	Increased tubing interaction	Increased peak widths Less resolution
Other	Decreased retention Decreased elution temperature	Increased retention May need higher temperatures
Uses	High boiling point analytes Trace analyses	Low boiling point analytes Volatiles, gases High analyte concentrations

DIAMETRO DELLA COLONNA

Small ID

0.15 mm–0.18 mm

Characteristics

- Highest efficiency
- Shorter analysis time
- Lower sample loading capacity

Applications

- Highly complex samples
- Fast GC
- GC-MS
- Split injection

0.25 mm–0.32 mm

Characteristics

- High efficiency
- Good performance for analysis time and sample loading capacity

Applications

- Complex samples
- Wide concentration range
- Split, splitless, direct, headspace, and on-column injection

0.53 mm

Characteristics

- Good efficiency
- Longer analysis time
- Higher sample loading capacity
- May require higher flow rates than MS detectors can tolerate

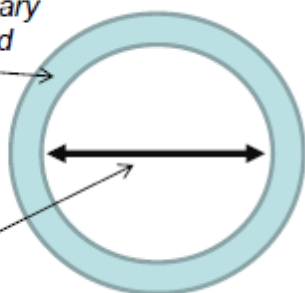
Applications

- Packed column replacement
- Purity analysis
- Split, splitless, direct, headspace, and on-column injection

As inner diameter increases, efficiency decreases, sample loading capacity increases, optimal flow rate increases, and analysis time increases.

This is the stationary phase thickness, d

This is the inner diameter



Diametro più piccolo : migliore la risoluzione

Table V: General column characteristics based on ID.

Characteristic	Column Inner Diameter (mm)					
	0.10	0.15	0.18	0.25	0.32	0.53
Nitrogen flow (mL/min)	0.2	0.3	0.3	0.4	0.6	0.9
Helium flow (mL/min)	0.6	0.8	1.0	1.4	1.8	3.0
Hydrogen flow (mL/min)	0.7	1.1	1.3	1.8	2.3	3.7
Sample loading capacity (ng)	2.5	10	20	50	125	500
Theoretical plates/meter	11,000	7,000	6,000	4,000	3,000	2,000

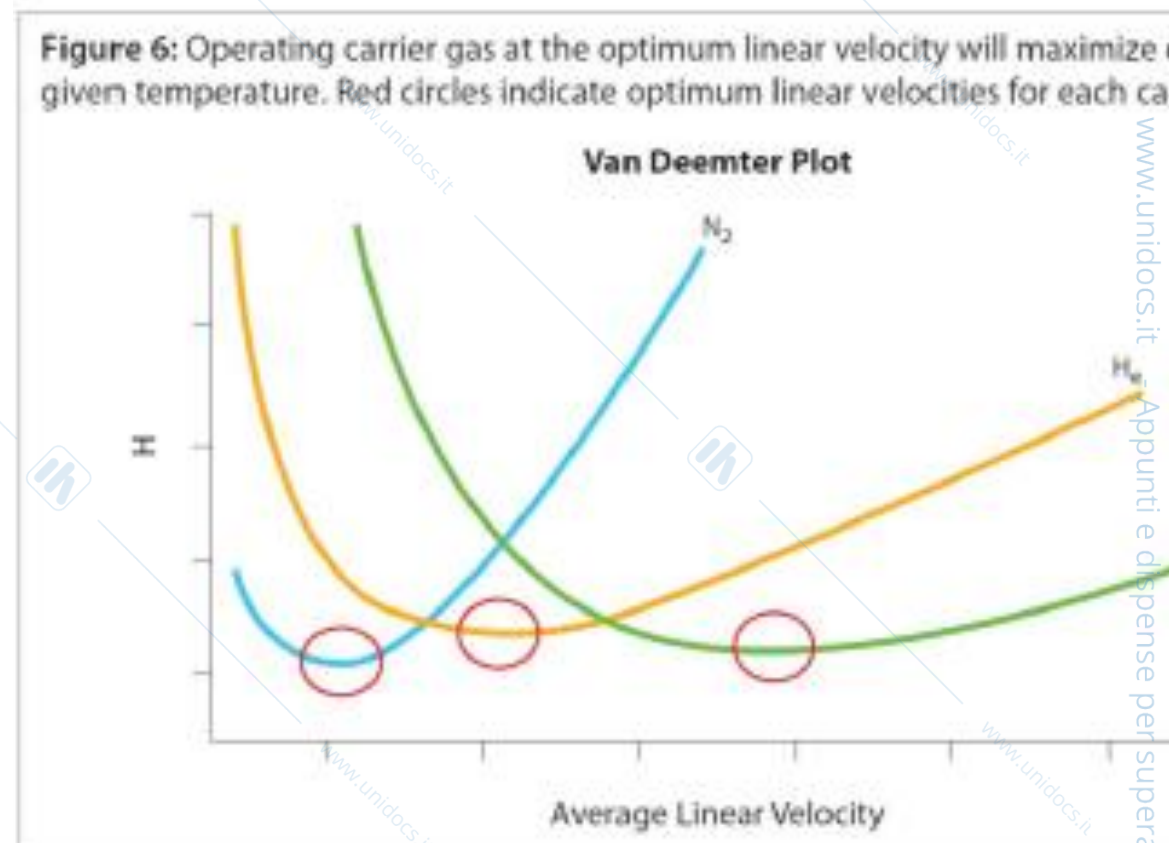
Note: Flows listed are for maximum efficiency. Sample loading capacities are estimates only. Actual sample loading capacity varies with film thickness and a

Table IV: Phase ratio (β)* values for common column dimensions. To maintain similar separations, choose columns with similar phase ratios when changing to a column with different inner diameter or film thickness.

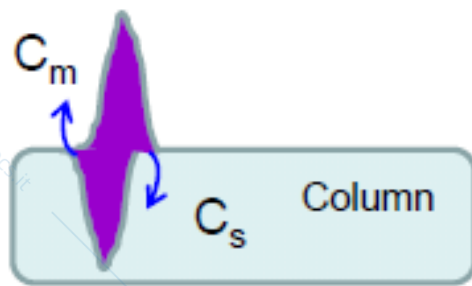
Column ID	Film Thickness (d_f)						
	0.10 μm	0.25 μm	0.50 μm	1.0 μm	1.5 μm	3.0 μm	5.0 μm
0.18 mm	450	180	90	45	30	15	9
0.25 mm	625	250	125	63	42	21	13
0.32 mm	800	320	160	80	53	27	16
0.53 mm	1,325	530	265	128	88	43	27

*Phase ratio (β) = radius/ $2d_f$ (Note: Convert variables to the same units prior to calculation.)

FASE MOBILE



- Optimal flow rate increases $N_2 < He < H_2$
- Fastest separations with H_2 ,
- H_2 can break down analytes and cannot be used with mass spec (reacts with pump) and can be flammable
- H_2 and He are better because solutes diffuse more rapidly through mobile phase so mass transfer minimized



Both diffusion in mobile and stationary phase can matter!

d : thickness of stationary phase
 D_s : Diffusion into stationary phase
 D_m : Diffusion into mobile phase
 r : column radius
 k : capacity factor
 u_x : flow rate

$$H = A + \frac{B}{u_x} + Cu_x$$

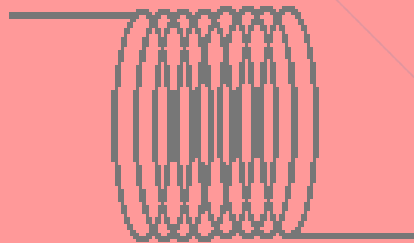
$$H_{\text{mass transfer}} = Cu_x = (C_s + C_m)u_x$$

For an open tubular column

$$C_s \approx \frac{k \cdot d^2}{3(k+1)^2 \cdot D_s}$$

$$C_m \sim \frac{r^2}{D_m}$$

Gas Chromatography



RIVELATORI

Non-selettivo → vede tutti i composti tranne gas della fase mobile

Selettivo → vede solo alcuni composti

Specifico → vede solo un tipo di composto

RIVELATORE A IONIZZAZIONE DI FIAMMA (FID)

- è uno strumento di misurazione utilizzato per il rilevamento gascromatografico degli idrocarburi (come il butano o l'esano). Ha un range di rilevamento lineare di 6 - 7 ordini di grandezza (10⁶-10⁷), con un limite inferiore di rilevamento pari a meno di un picogrammo. Il FID è lo strumento gascromatografico che ha avuto maggior successo per il rilevamento dei composti organici.

Lo strumento permette di rilevare solo i composti che bruciano, altri componenti possono essere ionizzati al passaggio lungo la fiamma, ma non possono produrre un segnale sufficientemente intenso, tale da essere rilevato dallo strumento. Non sempre questo fatto costituisce uno svantaggio, in certi casi, come per l'analisi dei gas, lo strumento può rilevare degli idrocarburi incombustibili come l'azoto (così come altri gas permanenti, come l'anidride carbonica).

Per le molecole che contengono solo carbonio ed idrogeno lo strumento risponde in modo corretto, ma la presenza di altri atomi nelle molecole, come l'ossigeno, riduce l'efficienza dello strumento.

Ad esempio la sensibilità verso il metano (CH₄) è alta, ma quella relativa alla formaldeide (CH₂O) è più bassa.

Essendo il FID un rivelatore distruttivo, deve essere collegato a fondo alla catena di rilevazione strumentale.

Come il nome lascia intuire, lo strumento sfrutta la presenza di ioni nella fiamma. La sorgente degli ioni è data dall'idrogeno introdotto nella fiamma. Spesso viene introdotto anche dell'ossigeno al fine di aumentare la sensibilità dello strumento. La fiamma risultante dalla combustione di idrogeno in aria (eventualmente l'aria può essere sostituita con ossigeno puro) pirolizza i composti organici producendo atomi caricati positivamente (cationi) ed elettroni.

Al fine di determinare tali ioni due elettrodi sono disposti lungo il percorso della fiamma, il primo, **caricato positivamente**, è posto all'uscita del bruciatore (il quale è una sorta di becco di bunsen), l'altro, **caricato negativamente**, è posizionato lungo la fiamma (questo elettrodo è normalmente un cilindro cavo od un pezzo angolare di platino). I cationi prodotti dall'elevato calore della fiamma vengono attratti dall'elettrodo negativo ricco di elettroni. Nel momento dell'incontro del catione con l'elettrodo negativo, questi gli cede gli elettroni mancanti generando una debole corrente tra i due elettrodi. La corrente viene rilevata tramite un sensibile amperometro e quindi visualizzata su di un display.

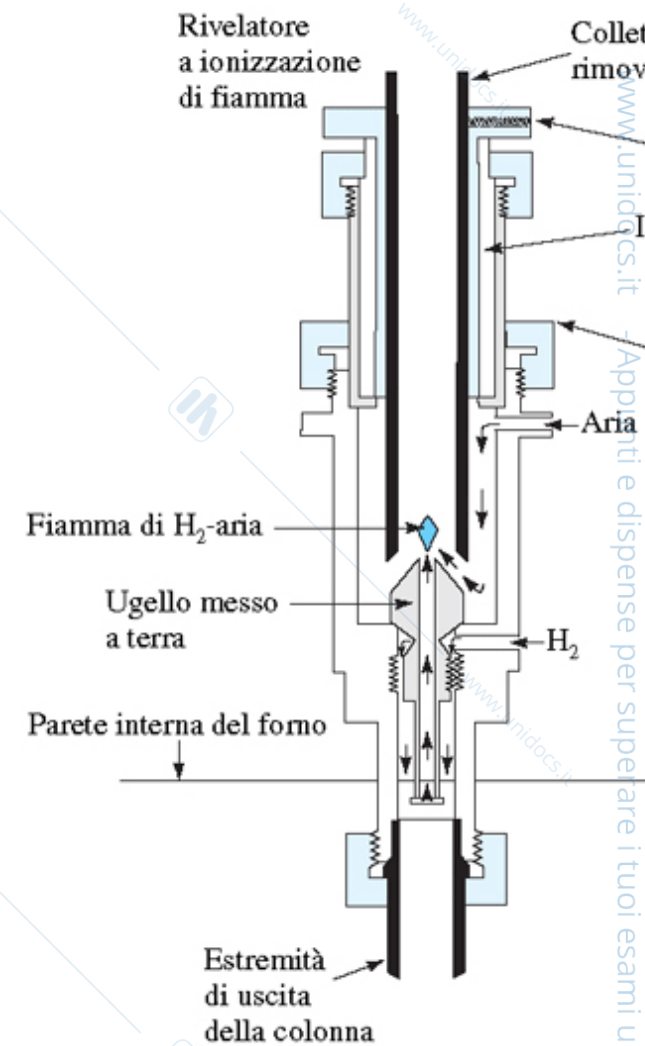
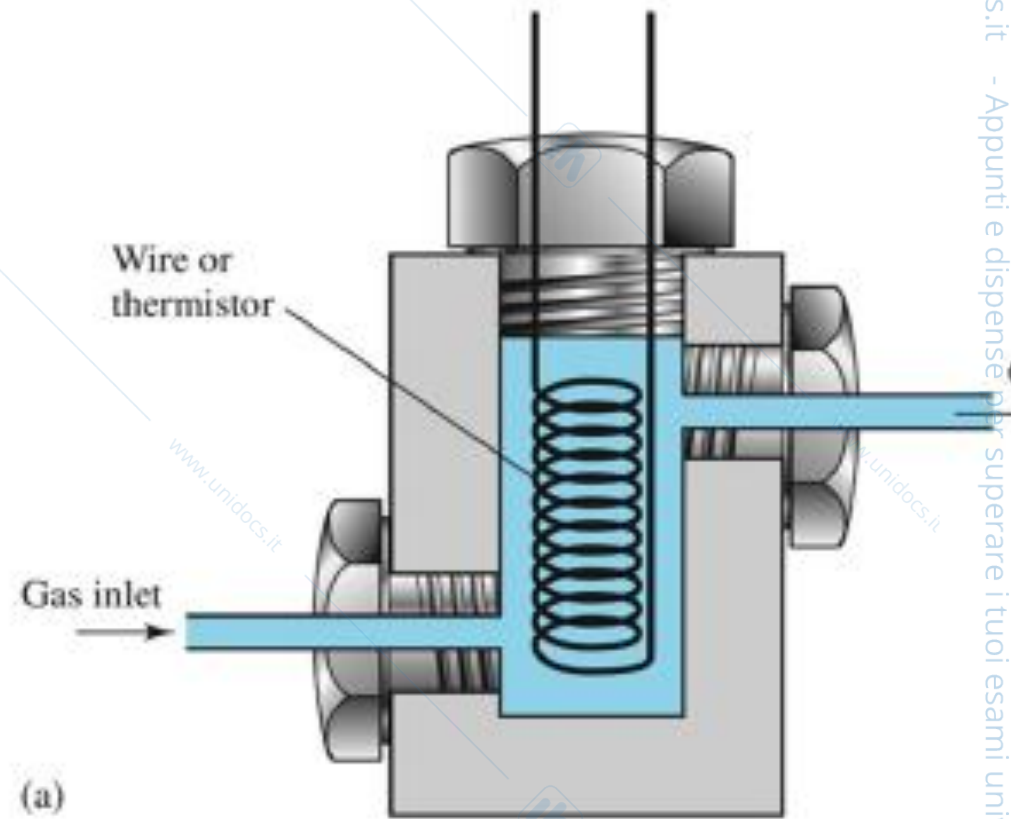


FIGURA 27-8 Tipico rivelatore a ionizzazione di fiamma. (Per cortesia di Agilent Technologies).

RILEVATORI A CONDUCEBILITÀ TERMICA

Un rivelatore a conducibilità termica (**TCD**, Thermal Conductivity Detector) è costituito da due filamenti riscaldati elettricamente e mantenuti a temperatura costante. Su uno scorre il gas di trasporto puro, sull'altro scorre il gas in uscita dalla colonna. Quando una sostanza viene eluita, il secondo filamento subirà un raffreddamento o un riscaldamento rispetto al primo per via del calore più o meno facilmente asportato dal gas contenente la sostanza eluita. Tale variazione di temperatura si riflette in una variazione di resistenza, che viene amplificata e rappresenta il segnale del rivelatore.



ALTRI

In un rivelatore a cattura di elettroni (**ECD**, Electron Capture Detector), un radioisotopo, in genere ^{63}Ni viene utilizzato come sorgente (raggi beta). Composti contenenti atomi elettronegativi, fortemente assorbenti il flusso di elettroni tra la sorgente ed un rivelatore di elettroni, possono venire visualizzati via via che eluiscono dalla colonna gascromatografica. In genere queste molecole sarebbero scarsamente visibili con altri rilevatori: ad esempio molti composti alogenati oltre a non bruciare sono addirittura estinguenti la fiamma, e porrebbero dei problemi ad un FID.

In un rivelatore a fotoionizzazione (**PID**, Photo Ionization Detector), fotoni ad alta tipicamente ultravioletti provenienti da una lampada ad idrogeno di 10,2 eV o ad argon di 12,8 eV ionizzano positivamente le molecole dei composti eluiti. Tali sorgenti ionizzano le specie che hanno un potenziale di ionizzazione al di sotto dell'energia della lampada. I composti con un potenziale superiore all'energia della lampada assorbono l'energia e perciò non vengono ionizzati. Dopodiché la corrente elettrica prodotta viene raccolta da un paio di elettrodi polarizzati, amplificata e misurata: maggiore è la concentrazione di una componente, più ioni vengono prodotti, maggiore è la corrente rivelabile. Il rivelatore è più sensibile in confronti degli idrocarburi e degli organoclorurati aromatici o verso i composti organofosforici che non sono facilmente fotoionizzati. L'intervallo lineare è di diversi ordini di grandezza.

ALTRI

I rivelatori a fiamma fotometrica (**FPD**, Flame Photometric Detector) e i rivelatori termoionici (**TS**, Thermionic Specific Detector) sono dei dispositivi dotati di elevata specificità per elementi quali l'azoto, il fosforo e lo zolfo. Il rivelatore a fiamma fotometrica sfrutta l'emissione di una radiazione di chemiluminescenza prodotta dalla combustione in fiamma di idrogeno di composti contenenti zolfo e fosforo. Il rivelatore termoionico sfrutta una parziale pirolisi attuata sempre tramite bruciatore a fiamma idrogeno/aria ma in questo caso viene misurata la corrente prodotta dai radicali CN e PO, derivanti da composti contenenti azoto e fosforo, che formano ioni CN⁻ e PO⁻ acquisendo elettroni da una sferetta di metallo alcalino (come il rubidio) che costituisce un catodo posto superiormente alla fiamma stessa.

RIVELATORI

Detector	Type	Support gases	Selectivity	Approx detection limit
Flame ionization (FID)	Mass flow	Hydrogen and air	Most organic cpds.	2pg/sec
Thermal conductivity (TCD)	Concentration	Reference	Universal	400 pg/ml
Electron capture (ECD)	Concentration	Nitrogen or 5%meth/Ar	Halides, nitrates, nitriles, peroxides, anhydrides, organometallics	5fg/sec
Nitrogen-phosphorus	Mass flow	Hydrogen and air	Nitrogen, phosphorus	100fg/sec
Flame photometric (FPD)	Mass flow	Hydrogen and air possibly oxygen	Sulphur, phosphorus, tin, boron, arsenic, germanium, selenium, chromium	<1 pg/s (P)
Photo-ionization (PID)	Concentration	Make-up	Unsaturated aliphatics, aromatics, ketones, esters, aldehydes, amines, heterocyclics, organosulphurs, some organometallics	25 – 50 pg

http://www.chemcas.com/tutorial/Gas_chromatography/gc_guide.html#Simulation

SPETTROMETRIA DI MASSA

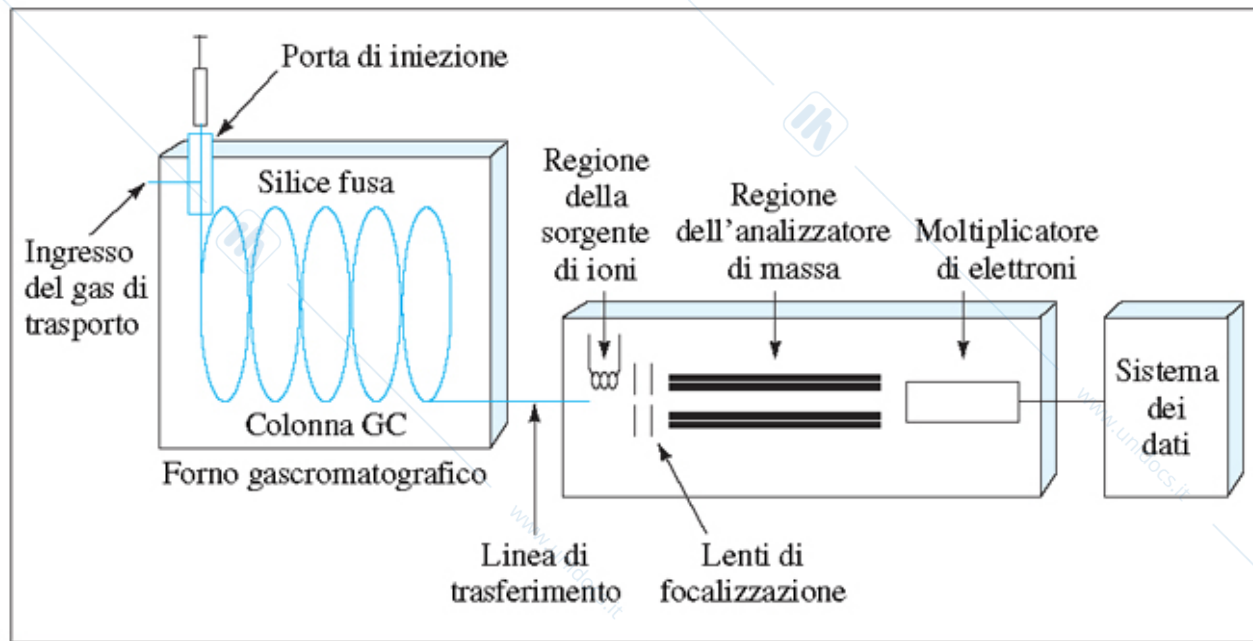
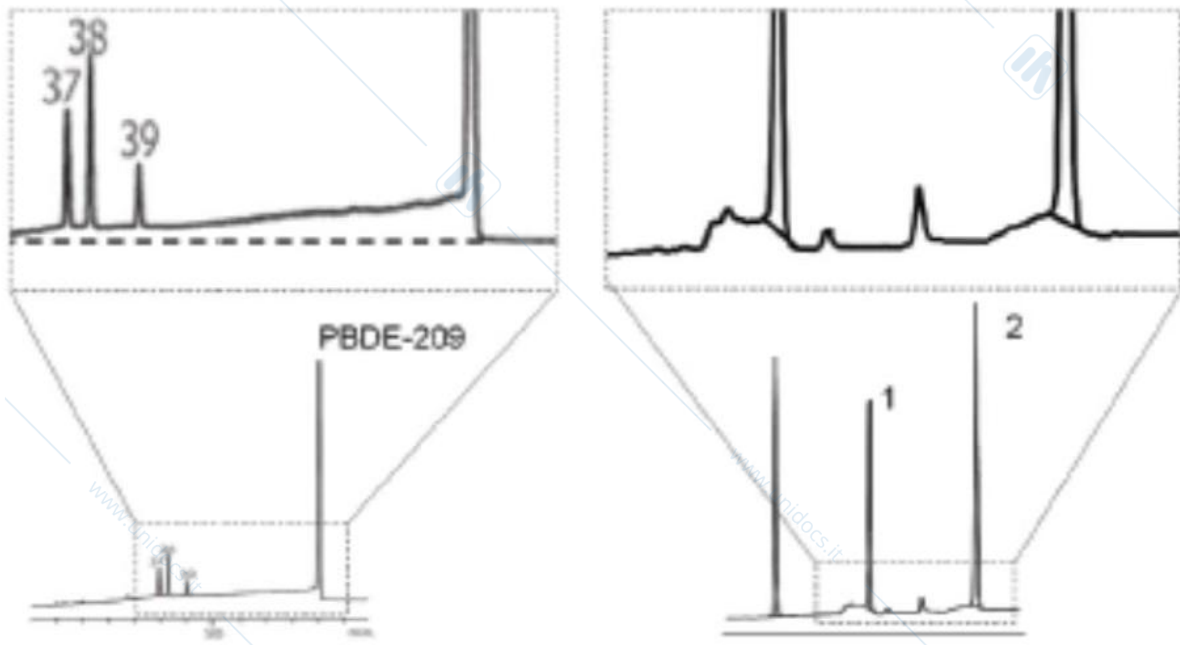


FIGURA 27-14 Rappresentazione schematica di un tipico sistema capillare GC/MS. L'effluente da GC viene fatto passare nell'entrata dello spettrometro di massa, dove le molecole del gas vengono frammentate, ionizzate, analizzate e rivelate.

ON-COLUMN DEGRADATION

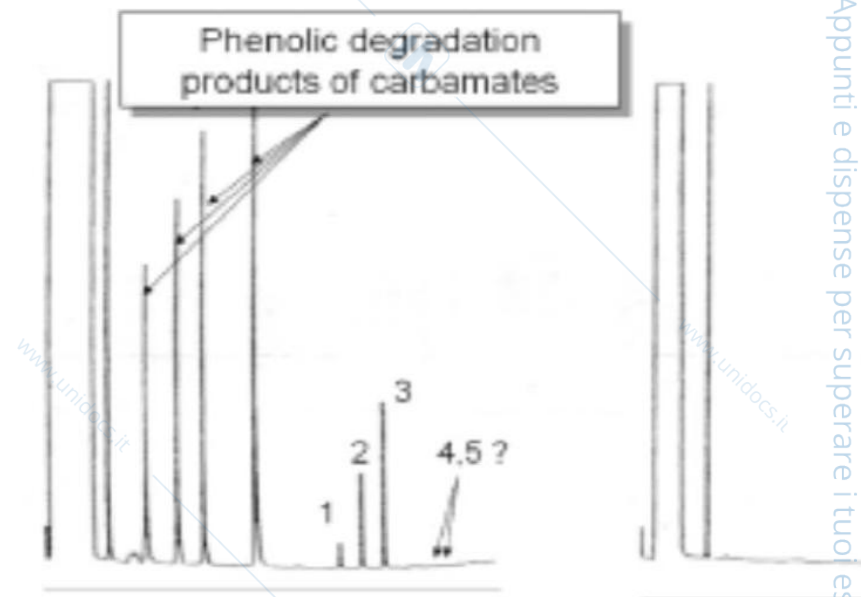
A decomposition at injection



Poly brominated diphenylethers

Pesticides

1 p,p'-DDT; 2 methoxychlor;



A Hot Splitless Injection

B Cold On-column Injection

ANALISI QUALITATIVA

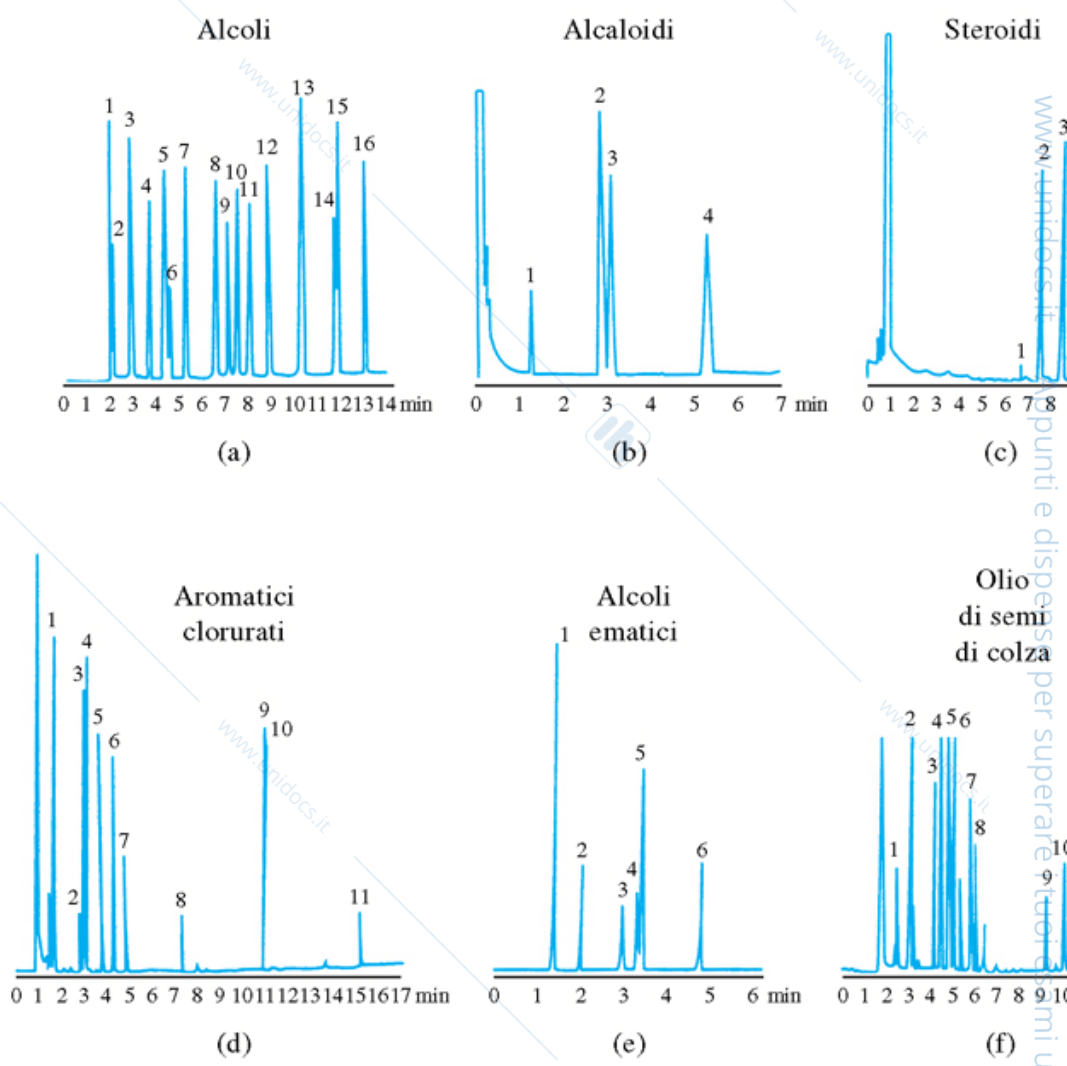


FIGURA 27-17 Tipici cromatogrammi ricavati da colonne tubolari aperte rivestite con: (a) polidimetil silossano; (b) 5% (fenil metildimetil) silossano; (c) 50% (fenil metil) silossano; (d) 50% poli(trifluoropropil-dimetil)silossano; (e) glicole polietilenico; (f) poli(cianopropil-dimetil) silossano. (Per cortesia di J&W Scientific).

ANALISI QUANTITATIVA

- Calibrazione con standard
- Metodo dello standard interno

TROUBLESHOOTING

Check the Obvious:

- Power supply
- Electrical connections
- Signal connections
- Gas purity
- Gas flows
- Temperature settings
- Syringe condition
- Sample preparation
- Analytical conditions

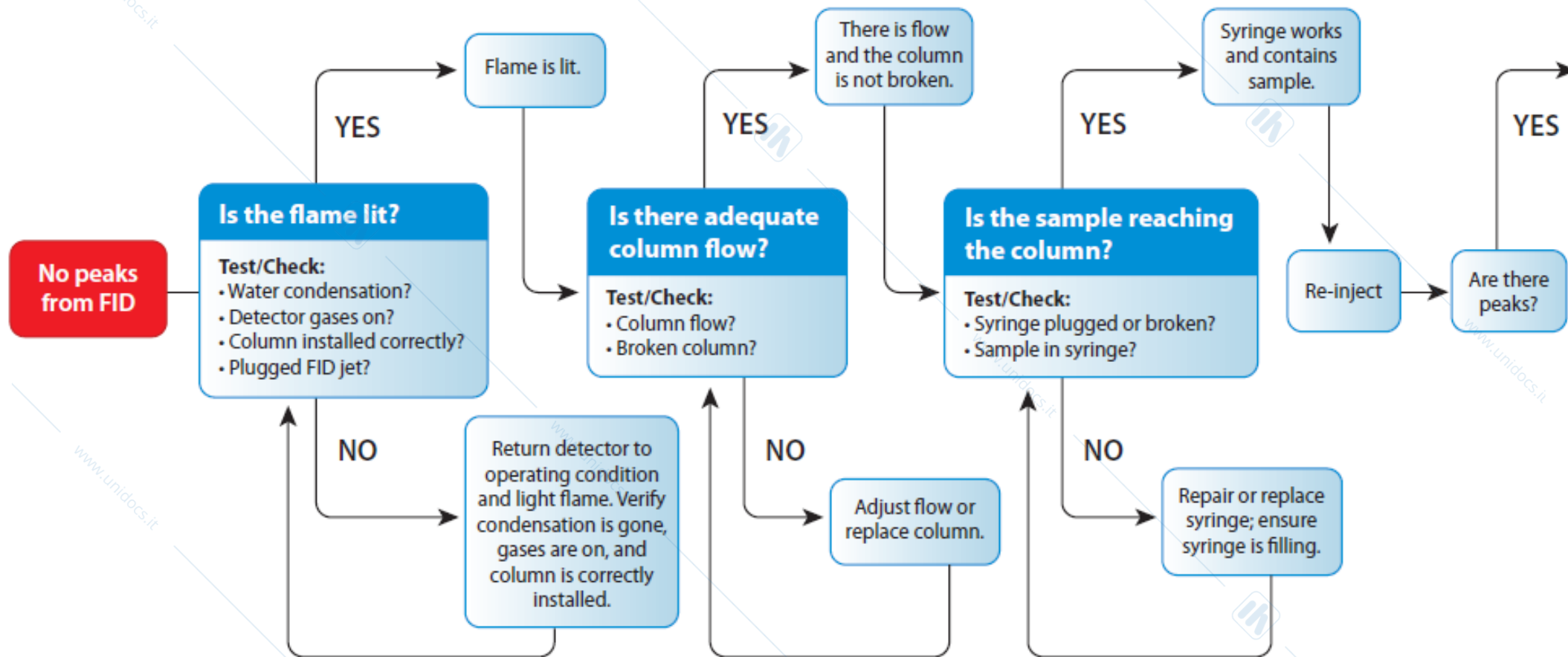
Identify the Cause:

- Define the problem clearly; for example, “Over the last 4 days, only the phenols in my sample have been tailing.”
- Review sample and maintenance records to identify trends in the data or problem indicators, such as area counts decreasing over time or injector maintenance not being performed as scheduled.
- Use a logical sequence of steps to isolate possible causes.

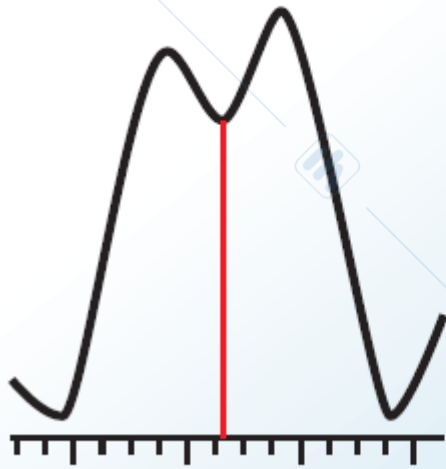
Document Work and Verify System Performance:

- Document all troubleshooting steps and results; this may help you identify and solve the next problem faster.
- Always inject a test mix and compare to previous data to ensure restored performance.

ESEMPIO DELLA SEQUENZA DI «TROUBLESHOOTING»



Poor Resolution



Causes

Non-selective stationary phase

Poor efficiency

Sample overload

Incorrect analytical conditions used

Solutions

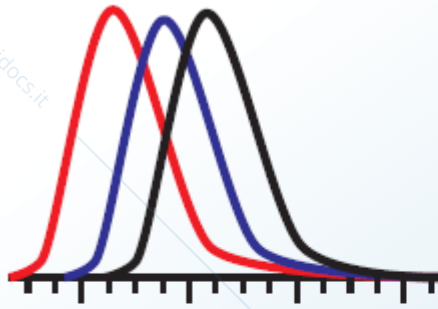
- Choose appropriate stationary phase and column dimensions.

- Optimize carrier gas linear velocity and GC oven temperature program.

- Adjust sample concentration or amount on column.

- Verify temperature program, flow rates, and column parameters.

Poor Retention Time Reproducibility



Causes

Leaks

Analyte adsorption

Resolution/integration issues

Incorrect column/oven temperature program

Incorrect or variable carrier gas flow rate/linear velocity

Poor control of oven temperature programming

Incorrect oven equilibration time

If manual injection, delay between pushing start and actual injection

Solutions

- Leak check injector and press-fit connections.
- Replace critical seals (i.e., septa, O-rings, inlet disc, etc.)

- Maintain inlet liner and GC column.
- Use properly deactivated liners, seals, and columns.

- Avoid sample overload.

- Verify column temperature and oven temperature program.

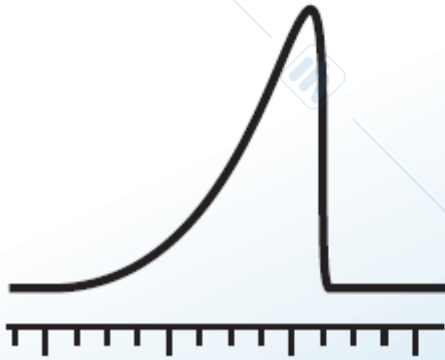
- Verify the carrier gas flow and linear velocity.
Repair or replace parts if necessary.

- Confirm GC oven program falls within instrument manufacturer's recommendation.

- Extend GC oven equilibration time.

- Use autosampler or standardize manual injection procedure.

Fronting Peaks



Causes

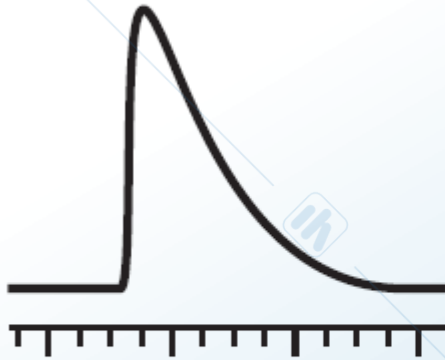
Incompatible stationary phase

Column overloading

Solutions

- Choose appropriate stationary phase.
- Reduce amount injected, dilute sample.
- Increase column inner diameter and/or film thickness.

Tailing Peaks



Causes

Adsorption due to surface activity or contamination

Adsorption due to chemical composition of compound

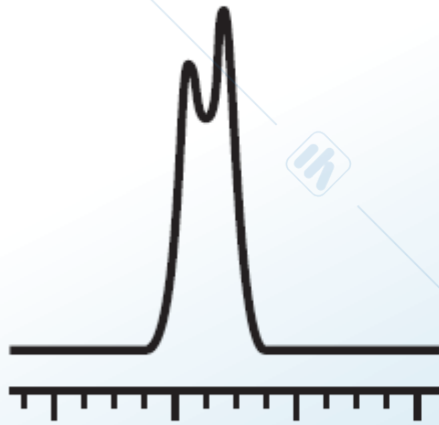
Leak in system

Installation issues

Solutions

- Use properly cleaned and deactivated liner, seal, and column.
- Trim inlet end of column.
- Replace column if damaged.
- Derivatize compound.
- Check for leaks at all connections, replace critical seals if needed.
- Minimize dead volume.
- Verify that the column is cut properly (square).
- Verify correct installation distances.

Split Peaks



Causes

Mismatched solvent/stationary phase polarity

Incomplete vaporization

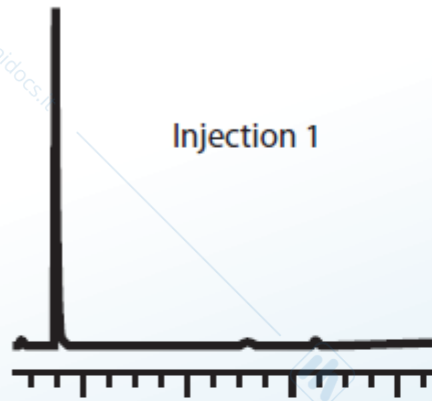
Sample loading capacity exceeded

Fast autosampler injection into open liner

Solutions

- Adjust solvent or stationary phase to allow wetting.
- Add surface area, such as wool, to the inlet liner to enhance vaporization.
- Use proper injector temperature.
- Inject less sample (dilute, use split injection, reduce injection volume).
- Use wool or slow injection speed.

Carryover/Ghost Peaks

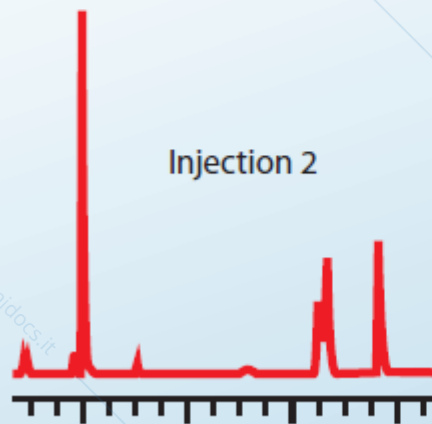


Causes

Contaminated syringe or rinse solvent

Solutions

- Replace rinse solvent.
- Rinse or replace syringe.



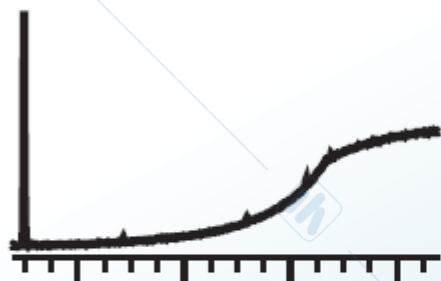
Backflash (sample volume exceeds liner volume)

- Inject a smaller amount.
- Use a liner with a large internal diameter.
- Increase head pressure (i.e., flowrate) to contain the vapor cloud.
- Use slower injection rate.
- Lower inlet temperature.
- Increase split flow.
- Use liner with packing.
- Use pressure-pulse injection.

Last analysis ended too soon

- Extend analysis time to allow all components and/or matrix interferences to elute.

High Bleed



Causes

Improper column conditioning

Contamination

Leak in system and oxidation of stationary phase

Solutions

- Increase conditioning time and/or temperature.

- Trim column and/or heat to maximum temperature to remove contaminants.

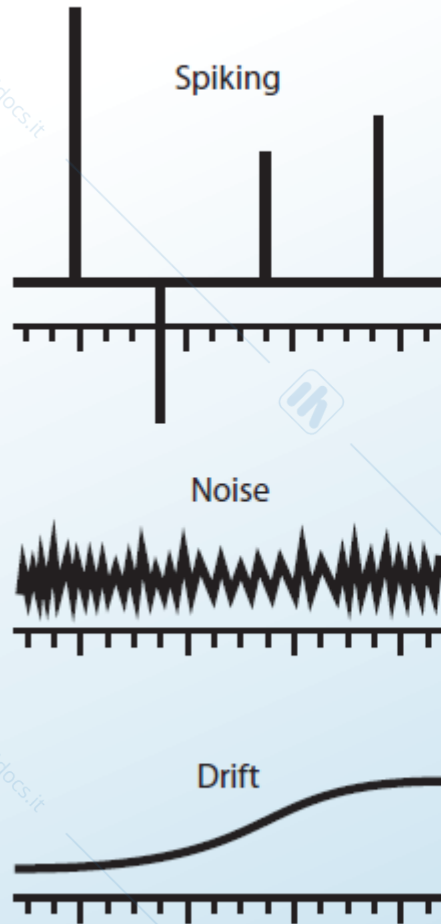
- Replace carrier gas and/or detector gas filters.

- Clean injector and detector.

- Check for oxygen leaks across the entire system and replace seals and/or filters.

- Replace column.

Unstable Baseline (Spiking, Noise, Drift)



Causes

Carrier gas leak or contamination

Injector or detector contamination

Column contamination
or stationary phase bleed

Septum coring/bleed

Loose cable or circuit board
connections

Variable carrier gas or
detector gas flows

Detector not ready

Solutions

- Leak check connections and replace seals if needed.
- Replace carrier gas and/or detector gas filters.

- Clean system and perform regular maintenance.

- Condition, trim, and rinse column.

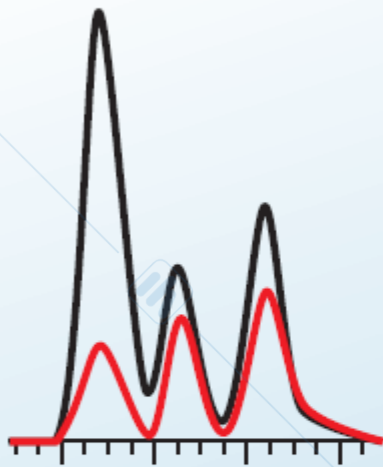
- Replace septum.
- Inspect inlet liner for septa particles and replace liner if needed.

- Clean and repair electrical connections.

- Verify flow rates are steady and reproducible; may need to replace or repair flow controller.
- Leak check system.

- Allow enough time for detector temperatures and flows to equilibrate.

Response Variation



Causes

Solutions

Sample issues

- Check sample concentration.
- Check sample preparation procedure.
- Check sample decomposition/shelf life.

Syringe problems

- Replace syringe.
- Check autosampler operation.

Electronics

- Verify signal settings and adjust if needed.
- Repair or replace cables or boards.

Dirty or damaged detector

- Perform detector maintenance or replace parts.

Flow/temperature settings wrong or variable

- Verify steady flow rates and temperatures, then adjust settings and/or replace parts if needed.

Adsorption/reactivity

- Remove contamination and use properly deactivated liner, seal, and column.

Leaks

- Check for leaks at all connections and repair connections as needed.

Change in sample introduction/Injection method

- Verify injection technique and change back to original technique.
- Check that split ratio is correct.
- Verify that the splitless hold time is correct.

No Peaks

Causes



Injection problems

Broken column

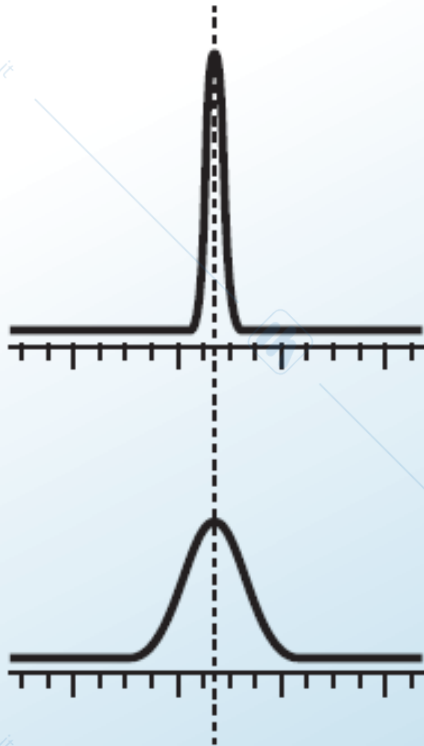
Column installed into wrong injector or detector

Detector problems

Solutions

- Plugged syringe; clean or replace syringe.
- Verify there is sample in the syringe.
- Injecting into wrong inlet; reset autosampler.
- Verify carrier gas is flowing.
- Replace column.
- Re-install column.
- Signal not recorded; check detector cables and verify that detector is turned on.
- Detector gas turned off or wrong flow rates used; turn detector on and/or adjust flow rates.

Broad Peaks



Causes

High dead volume

Low flow rates

Slow GC oven program

Poor analyte/solvent focusing

Column film is too thick

Sample carryover

Solutions

- Minimize dead volume in the GC system; verify proper column installation, proper connectors, proper liners, etc.

- Verify injector and detector flow rates and adjust if needed.
- Verify make-up gas flow and adjust if needed.

- Increase GC oven programming rate.

- Lower GC oven start temperature.

- Reduce retention of compounds by decreasing film thickness and length.

- See Carryover/Ghost Peaks solutions.

http://www.chem.agilent.com/en-US/Solutions/Pages/default.aspx

The screenshot shows the Agilent Solutions website homepage. At the top, there is a navigation bar with the Agilent Technologies logo, a search bar, and utility links for 'All in Convert', 'Convert Files', 'Measurement Converter', 'Translate', and 'Facebook'. The main navigation menu includes 'Products & Services', 'Solutions', 'Technical Support', 'Library', 'Training & Events', and 'Buy'. The 'Solutions' section is active, displaying the heading 'Agilent Solutions' and a paragraph describing the company's offerings. Below this, there are four featured solution categories: 'Energy & Chemicals', 'Integrated Biology', 'Semiconductor Analysis', and 'Genomics', each with a representative image and a plus sign indicating further content.

risoluzione picchi cromat x Agilent Solutions | Agilent x

www.chem.agilent.com/en-US/Solutions/Pages/default.aspx

Search All in Convert Convert Files Measurement Converter Translate Facebook 57°F White Plains, NY

Agilent Technologies Global Sites Contact Us Login Cart (0) Quick Order

Products & Services Solutions Technical Support Library Training & Events Buy

Home > Solutions

Agilent Solutions

Agilent Technologies offers you a comprehensive portfolio of innovative solutions – from improving lab productivity for chemical analysis, to vacuum systems, to workflow solutions developed to facilitate unlocking the complexities of living systems. Our experts possess in-depth understanding of issues across a broad spectrum of applications. Agilent's latest technologies are developed for your leading edge research programs. We help you stay current with emerging applications and approved methods, while our integrated workflow solutions deliver accurate, comprehensive data helping you make informed decisions accelerating your time to results. Learn more about the latest solutions and applications for your industry below.

Connect with Agilent

- Energy & Chemicals +
- Integrated Biology +
- Semiconductor Analysis +
- Genomics +