

Materiale di supporto per lo studio delle tecniche cromatografiche

Non abbiamo trattato:

- Cromatografia di affinità
- Cromatografia planare (su strato sottile)
- Cromatografia SFC

Non ho eliminato le slides perché avrei reso incomprensibili alcune parti...
un'occhiata potete comunque darla!

Cromatografia

Il termine *cromatografia* indica un insieme di tecniche che hanno lo scopo di separare una miscela nei suoi componenti, per permetterne il riconoscimento qualitativo e quantitativo

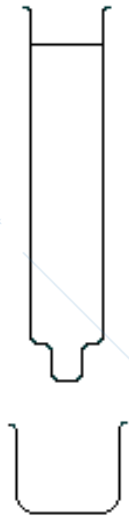
Queste tecniche sono basate sulla distribuzione differenziale dei vari componenti fra due fasi, una chiamata *fase fissa* o *fase stazionaria* e l'altra chiamata *fase mobile* o *eluente*, che fluisce in continuo attraverso la fase fissa

Le tecniche sono molto utilizzate in campo archeometrico, essendo particolarmente utili nell'analisi di miscele complesse come sono la maggior parte dei campioni di natura organica



Nascita della cromatografia

La cromatografia è nata all'inizio del XX secolo come tecnica per la separazione di pigmenti fogliari, inventata dal botanico russo Mikhail Semenovich Tswett. Egli intendeva separare i pigmenti presenti nella clorofilla; fece un estratto di foglie verdi in etere di petrolio, lo depositò in testa ad una colonna di vetro impaccata con carbonato di calcio ed *elui*, (cioè versò in continuo) con solfuro di carbonio: i vari pigmenti si separano in bande colorate, in particolare clorofilla A e B, carotene e xantofilla



Tswett chiamò questa tecnica *cromatografia* dal greco *scrittura del colore* o, visto il significato del suo cognome in russo, *scrittura di Tswett*



Cenni preliminari

Le tecniche cromatografiche sono sempre distruttive (anche se in senso strettamente analitico possono in alcuni casi essere non distruttive), in quanto operano esclusivamente su campioni in soluzione o in fase vapore: i materiali oggetto di analisi vanno quindi disciolti in un opportuno solvente. Non è possibile l'analisi senza prelievo di campione né tanto meno l'analisi *in situ* (tranne con strumenti miniaturizzati)

Nonostante questa premessa scoraggiante, è bene precisare che il consumo di campione è minimo. Sono sufficienti da 1 ml a 1 μ l di soluzione, corrispondenti a pochi mg di campione solido

Basi del procedimento cromatografico

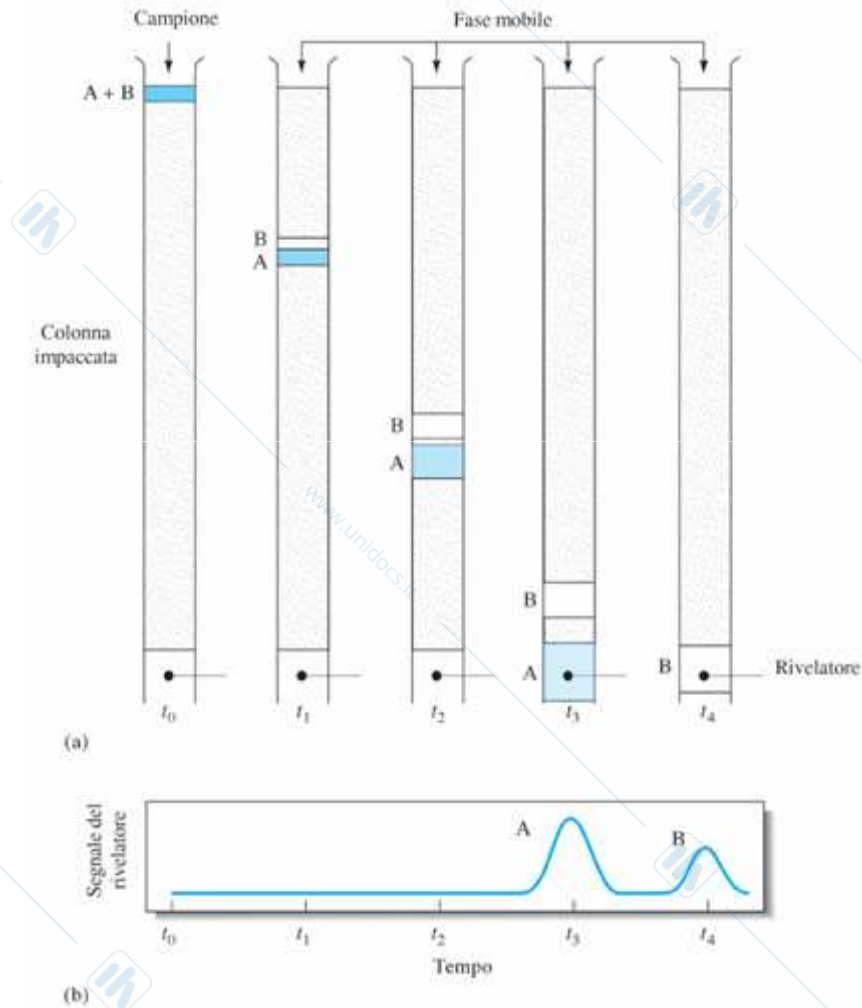
- il campione è introdotto nella fase mobile, che può essere un gas, un liquido o un fluido supercritico
- la fase mobile viene fatta eluire in continuo attraverso la fase stazionaria, che deve essere immiscibile nell'eluente
- la fase stazionaria (liquida o solida) si trova all'interno di una *colonna* oppure è supportata su una *superficie piana*
- la fase mobile e la fase stazionaria sono scelte in modo che i componenti della miscela da separare si distribuiscano tra le due fasi
 - i componenti più affini alla fase stazionaria passeranno più tempo in questa fase, quindi si sposteranno più lentamente attraverso il sistema
 - i componenti più affini alla fase mobile si sposteranno invece più velocemente
- la separazione dei componenti avviene in quanto ogni sostanza ha una distribuzione caratteristica tra le due fasi (costante di ripartizione $K_d = C_s / C_m$)

Visualizzazione della separazione

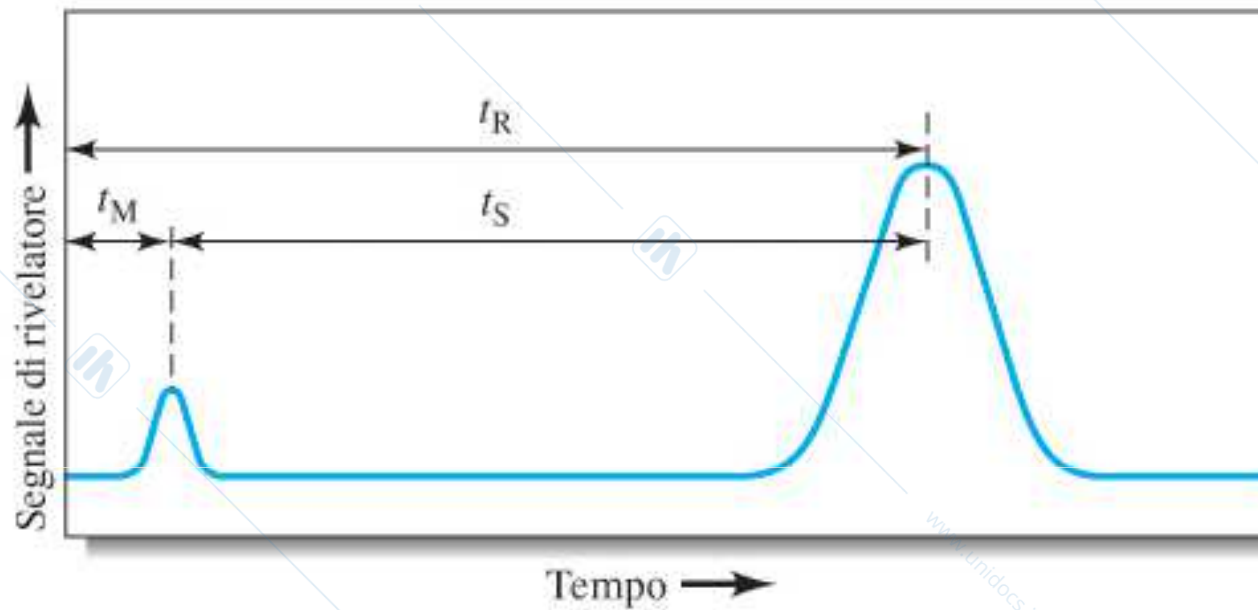
Ponendo all'uscita della colonna un rivelatore che misuri la concentrazione del soluto nell'*eluato* (cioè la fase mobile che esce dalla colonna) e riportando il segnale in funzione del tempo si può ottenere un *cromatogramma*

La posizione dei picchi sull'asse dei tempi, o *tempo di ritenzione*, serve per identificare i componenti del campione

L'area sottesa dai picchi è proporzionale alla quantità di ogni singolo componente e può essere utilizzata a scopo quantitativo



Tempo di ritenzione



Il tempo di ritenzione t_R è il tempo che impiega un componente della miscela iniettata ad uscire dalla colonna o, tecnicamente, ad essere rivelato come picco dal detector. Un tipico *cromatogramma* per una miscela a due componenti ha due situazioni diverse:

- il picco a sinistra rappresenta un soluto che non ha alcuna interazione con la fase stazionaria ed esce al cosiddetto tempo morto, t_M
- il picco a destra rappresenta un soluto che ha, invece, interazione con la fase stazionaria ed esce al tempo $t_R > t_M$

Tempo di ritenzione

Oltre al tempo di ritenzione t_R , è possibile quantificare l'interazione di un soluto con la fase stazionaria in due modi:

- mediante il volume di fase mobile V_R necessario per eluire il soluto, dove $V_R = t_R \times F$ con F = velocità di flusso
- mediante il fattore di capacità K' , espresso come la differenza tra il tempo di ritenzione ed il tempo morto in unità di tempo morto:

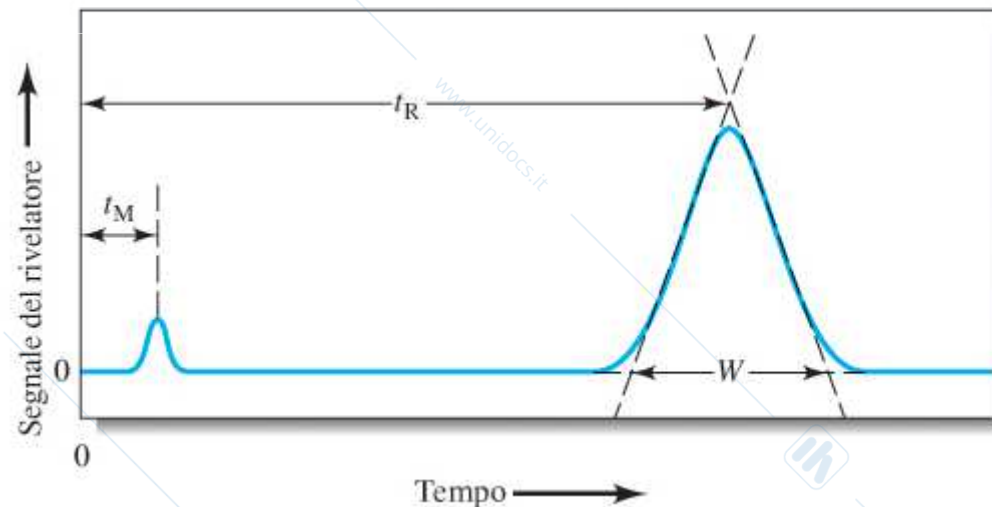
$$K' = \frac{t_R - t_M}{t_M}$$

Piatti teorici

Per descrivere il processo cromatografico è utilizzata una similitudine derivante dalla teoria della distillazione. Il sistema cromatografico è immaginato simile ad una colonna di distillazione, cioè composta da una serie di strati sottili chiamati *piatti teorici*; in ognuno di questi microelementi della colonna si realizza l'equilibrio di distribuzione del soluto tra fase stazionaria e fase mobile. Lo spostamento del soluto lungo la colonna è dovuto all'azione dinamica della fase mobile

I termini *numero di piatti teorici* (N) e *altezza del piatto* (HETP, Height Equivalent to Theoric Plate) sono comunemente utilizzati in cromatografia per quantificare le prestazioni dei sistemi cromatografici

$$N = 16 a (t_R/W)^2, \text{ HETP} = \text{lunghezza colonna} / N$$

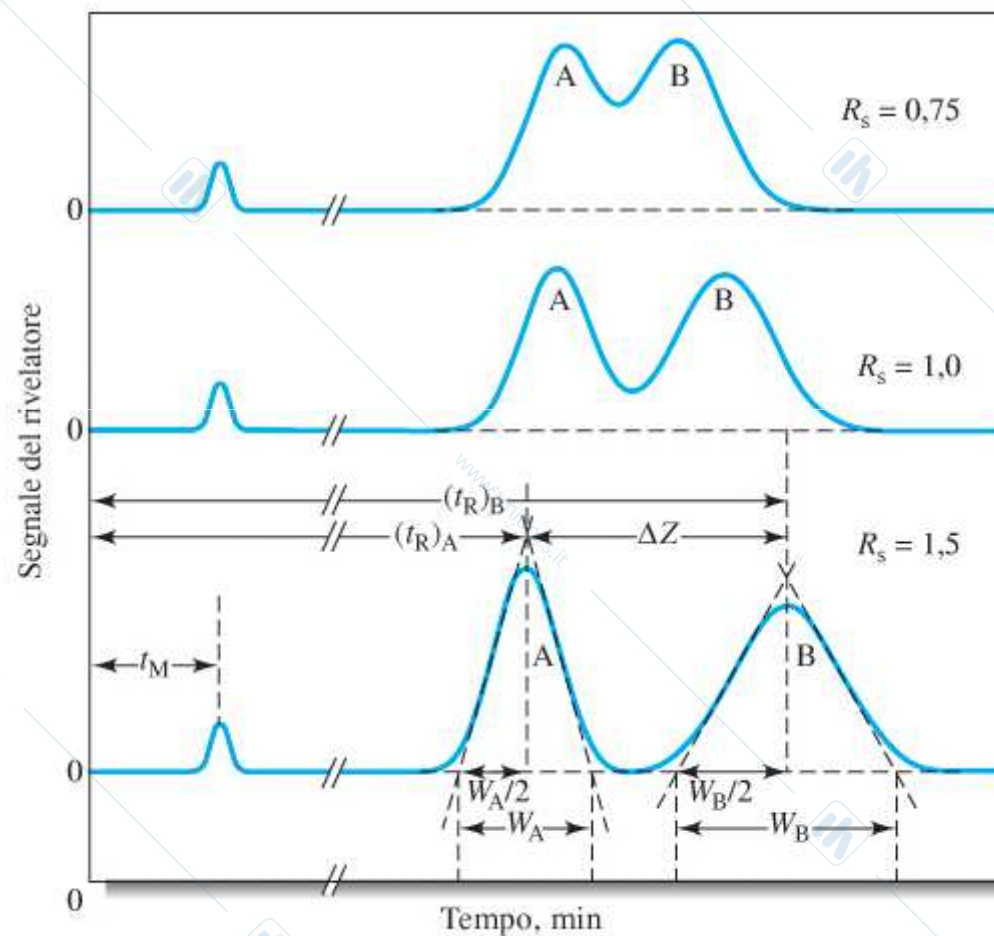


Risoluzione cromatografica

La possibilità di separare due o più sostanze è descritta dal parametro detto *risoluzione*, che misura la capacità di un sistema cromatografico di separare due analiti con caratteristiche simili:

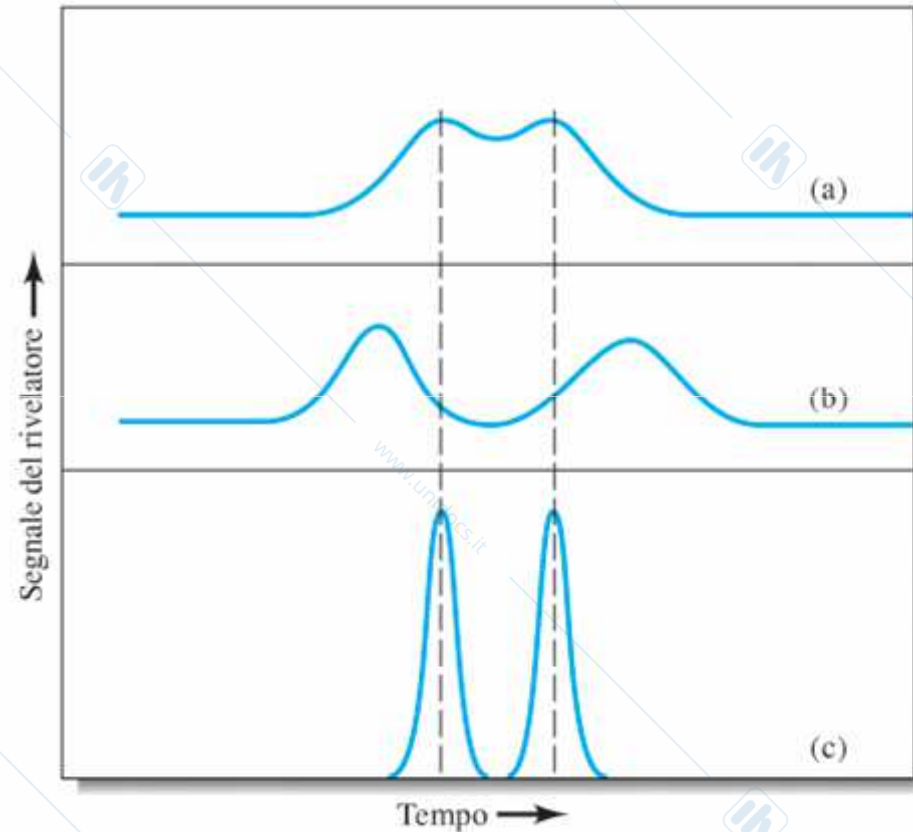
$$R = 2 \cdot \Delta Z / (W_A + W_B)$$

Se la risoluzione non è sufficiente ($R < 1$), i due picchi non possono essere quantificati in maniera corretta



Separazione ottimale

- a) separazione con scarsa risoluzione e basso N
- b) migliora la risoluzione ma è sempre basso N
- c) ottima risoluzione e buono N



Interazione soluto-fasi

Le interazioni che si verificano tra le sostanze da separare e le due fasi (mobile e stazionaria) sono deboli: se così non fosse non ci sarebbe trattenimento sulla fase stazionaria oppure, al contrario, eluizione. Sono sfruttate a scopo separativo le seguenti interazioni:

- legami a idrogeno
- interazioni dipolo-dipolo
- interazioni dipolo-dipolo indotto
- forze di Van der Waals
- formazione di composti di interazione
- attrazione coulombiana
- interazioni steriche

In tutte queste interazioni svolge un ruolo solitamente decisivo la polarità delle due fasi. Spesso possono essere presenti più tipi di interazione nello stesso processo cromatografico

Meccanismi della separazione

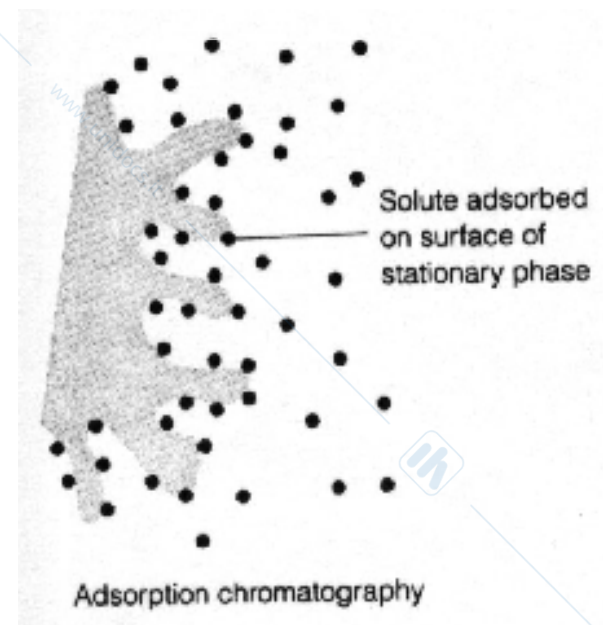
In base ai tipi di interazione prima descritti possiamo suddividere i meccanismi di separazione impiegati in cromatografia in:

- adsorbimento
- ripartizione
- scambio ionico
- esclusione
- affinità

Adsorbimento

La fase stazionaria è un solido in polvere steso su un supporto; sulla superficie dei granuli si trovano siti attivi che possono stabilire legami deboli (reversibili!) con le molecole della miscela da separare. Si parla quindi di *cromatografia di adsorbimento*, che può essere *gas-solido* o *liquido-solido* a seconda della natura della fase mobile

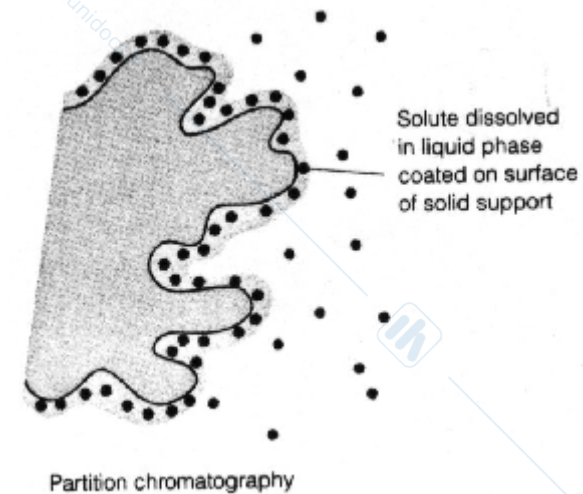
La cromatografia di adsorbimento è utilizzata per separare sostanze neutre polari o non polari, di natura organica o inorganica



Ripartizione

La fase stazionaria è un liquido che impregna un solido granulare inerte o è ad esso chimicamente legato; in questo liquido le molecole da separare sono solubili; la fase stazionaria e la fase mobile devono invece essere immiscibili. Durante l'eluizione le molecole si ripartiscono dinamicamente tra le due fasi secondo la diversa solubilità di ognuna. Si parla quindi di *cromatografia di ripartizione*, che può essere *gas-liquido* o *liquido-liquido* a seconda della natura della fase mobile

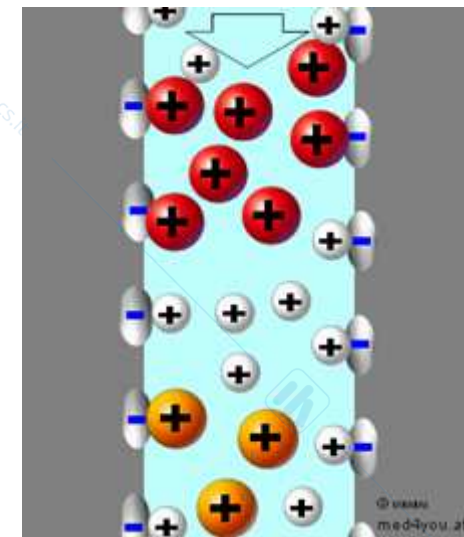
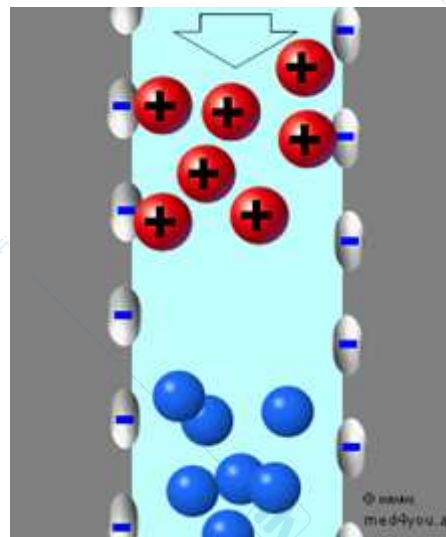
La cromatografia di ripartizione è chiamata in *fase normale* se la fase stazionaria è più polare della fase mobile, mentre è chiamata *fase inversa* se la fase stazionaria è meno polare della fase mobile. Si tratta della tecnica più comunemente impiegata per la separazione di sostanze organiche



Scambio ionico

La fase stazionaria è costituita da un polimero inerte contenente siti attivi ionizzati o ionizzabili, i cui controioni possono essere scambiati con altri ioni aventi carica dello stesso segno. Il meccanismo di separazione è basato sulla competizione per i siti di scambio tra gli ioni presenti nella fase mobile e quelli presenti nel campione. Si parla di *cromatografia di scambio ionico* (IEC)

La cromatografia a scambio ionico è impiegata per la separazione di sostanze ioniche o ionizzabili

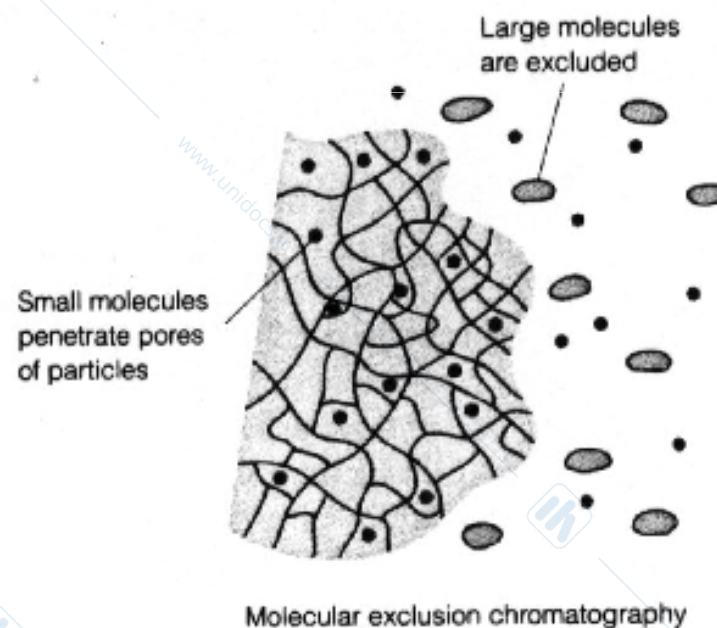


Esclusione dimensionale

La fase stazionaria è un solido poroso o un gel. Le molecole dell'analita, disciolte nella fase mobile, penetrano nei pori se le loro dimensioni sono compatibili e vi rimangono per un certo tempo; le molecole più grandi sono invece escluse dai pori ed escono dalla colonna in tempi brevi

Si parla di *cromatografia di esclusione dimensionale (SEC)* con le varianti *Gel permeazione* per la separazione di sostanze insolubili in acqua e *Gel filtrazione* per la separazione di sostanze solubili in acqua

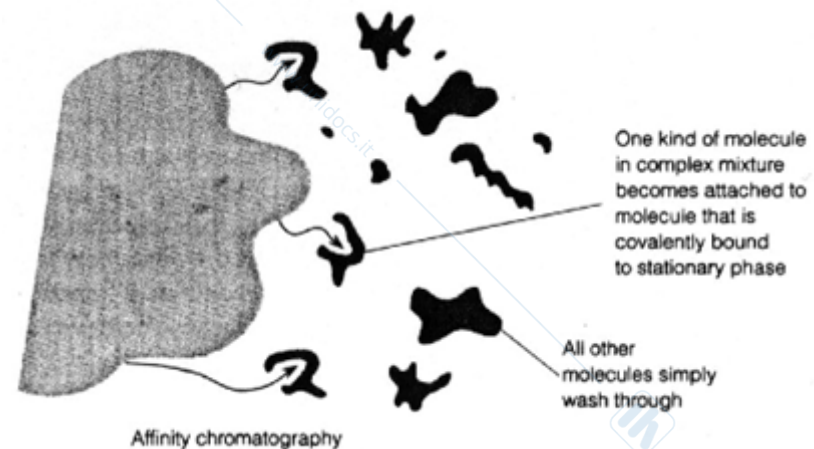
La tecnica è impiegata per la separazione di molecole di grandi dimensioni

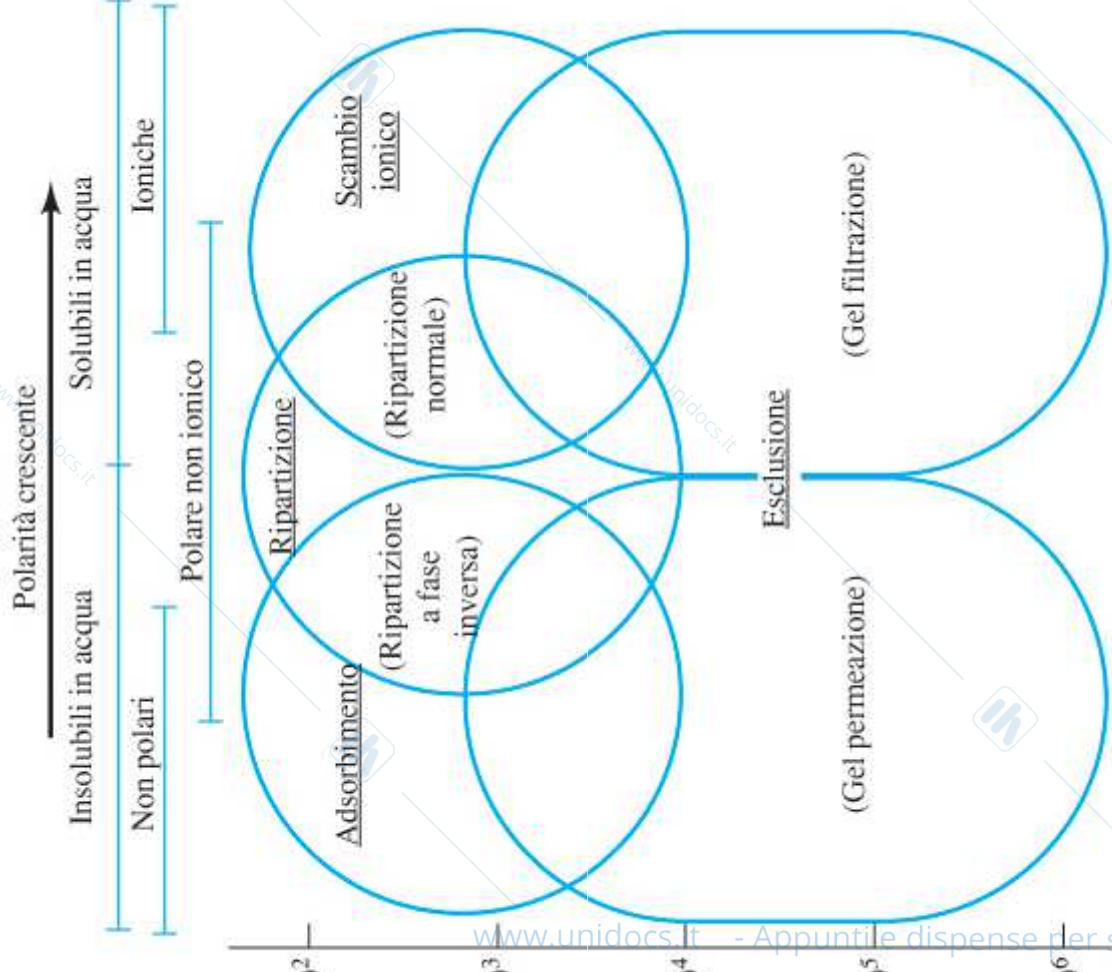


Affinità

In questo caso si utilizzano reazioni di tipo biochimico, reversibili e molto specifiche, in modo che le molecole da separare interagiscano con la fase stazionaria e si ottenga così l'eluizione selettiva di alcuni componenti della miscela. Si parla di *cromatografia di affinità (AFC)*

La cromatografia di affinità è impiegata nella separazione di molecole di interesse prevalentemente biochimico





Stato fisico della fase mobile

In base allo stato fisico della mobile possiamo classificare le tecniche cromatografiche come segue:

- *Cromatografia Liquida (LC)*: la fase mobile è un liquido nel quale siano solubili i componenti della miscela da separare; la fase stazionaria deve essere insolubile nella fase mobile
- *Gas Cromatografia (GC)*: la fase mobile è un gas che funge da carrier per i componenti della miscela
- *Cromatografia fluida supercritica (SFC)*: la fase mobile è un fluido supercritico, con proprietà intermedie tra un liquido e un gas

Forma del letto cromatografico

In base alla forma del letto cromatografico su cui è realizzato il processo separativo, possiamo le seguenti varianti:

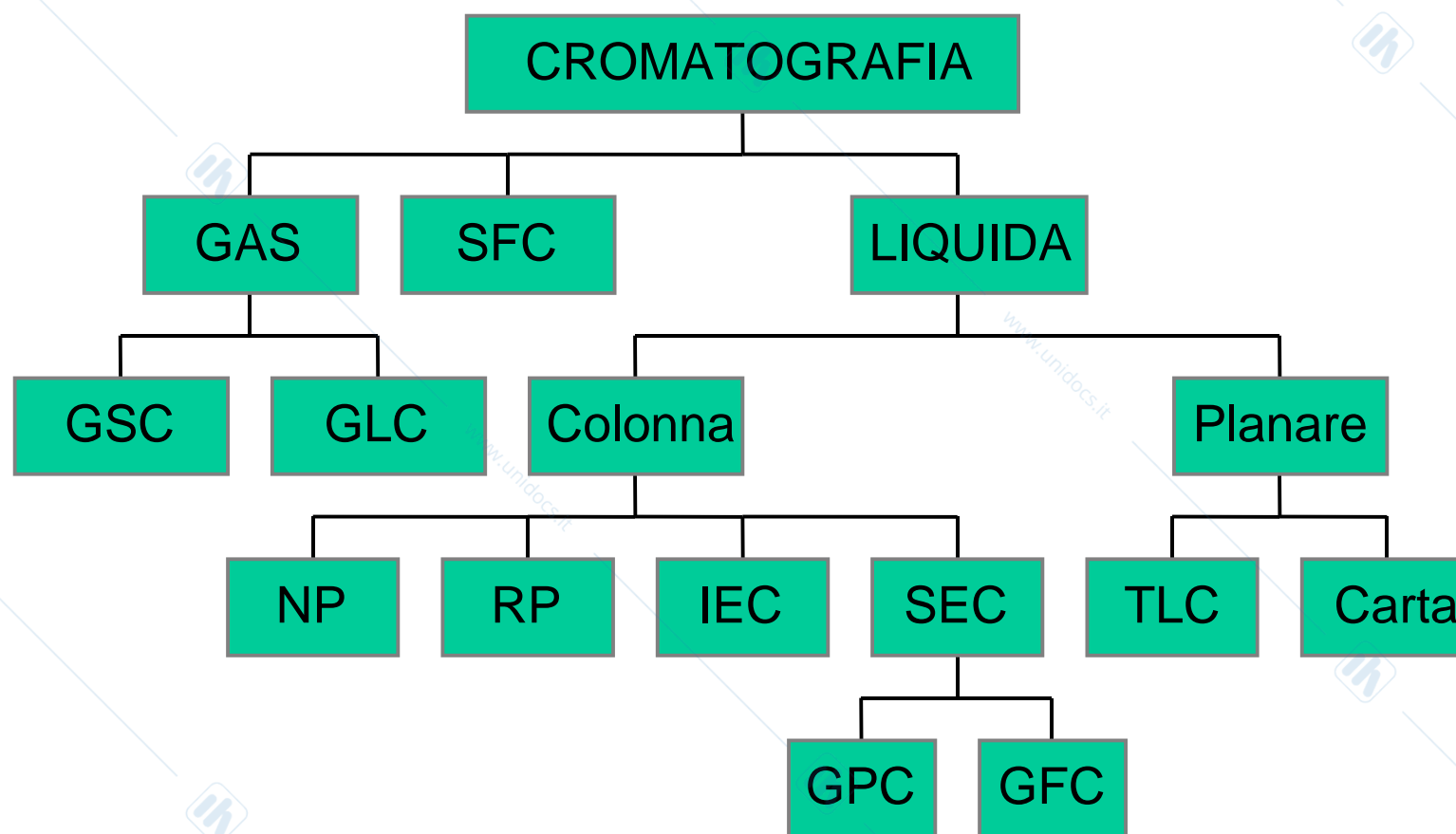
- *Cromatografia su colonna*: la fase stazionaria è contenuta all'interno di una colonna cilindrica, che può riempire completamente (*colonna impaccata*) oppure rivestirne la superficie interna (*colonna tubulare*)
- *Cromatografia planare*: la fase stazionaria è distribuita su una superficie piana, che può essere un supporto cartaceo (*cromatografia su carta, PC*) o una lastrina in vetro o altri materiali (*cromatografia su strato sottile, TLC*)

Tecniche cromatografiche

- In base alla forma del letto cromatografico
 - *Cromatografia su colonna (impaccata, open-tubular)*
 - *Cromatografia planare (su carta, su strato sottile)*
- In base allo stato fisico della fase mobile
 - *Cromatografia Liquida (LC)*
 - *Gascromatografia (GC)*
 - *Cromatografia fluida supercritica (SFC)*
- In base al meccanismo di separazione
 - *Adsorbimento*
 - *Ripartizione*
 - *Scambio ionico*
 - *Esclusione*
 - *Affinità*

Schema delle tecniche

Dalla combinazione dei meccanismi e dei supporti citati, si possono avere numerose varianti di tecniche cromatografiche



Cromatografia liquida

La cromatografia liquida è impiegata per la separazione di sostanze non volatili, neutre o ioniche, e di sostanze termolabili. Si presta facilmente a misure quantitative. Si possono separare sostanze appartenenti a varie classi tra cui, di interesse archeometrico:

- aminoacidi, peptidi e proteine
- idrocarburi
- carboidrati
- terpenoidi
- ioni inorganici

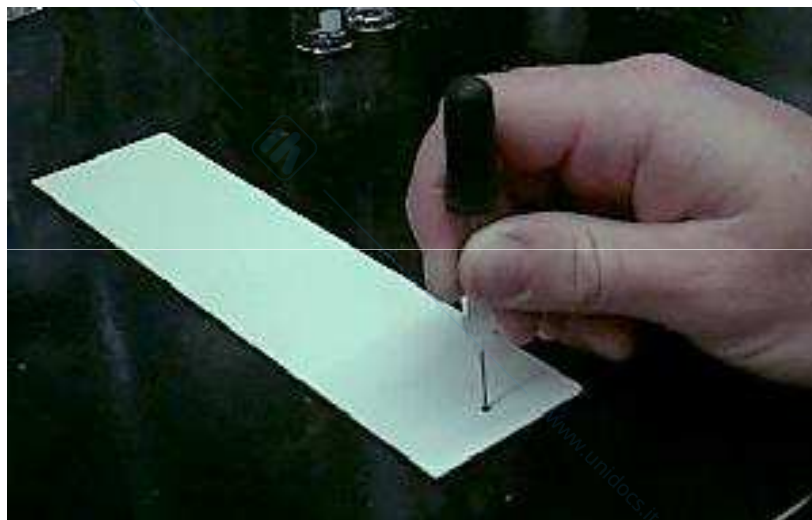
Cromatografia planare

Si tratta di un gruppo di tecniche di cromatografia liquida di semplicissima applicazione, spesso impiegate per avere informazioni preliminari. La fase stazionaria è supportata su lastre di vetro, fogli di alluminio o di plastica nella versione TLC (Thin Layer Chromatography) e su fogli di carta da filtro nella versione PC (Paper Chromatography)

Le fasi stazionarie più usate sono il gel di silice e l'allumina per la cromatografia di adsorbimento, la cellulosa per la ripartizione liquido-liquido (in questo caso la fase stazionaria è l'acqua adsorbita sulle particelle di cellulosa)

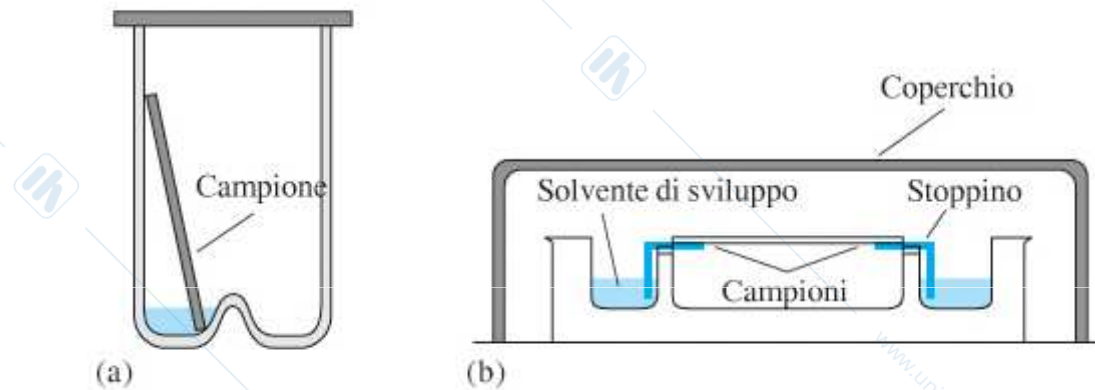
Cromatografia planare

L'esecuzione dell'analisi è molto semplice: la miscela da separare va depositata sulla superficie, posandone con un tubo capillare una goccia su una linea che segna l'inizio del processo di eluizione



Quindi il foglio o la lastrina si pongono in una vaschetta contenente la fase mobile che per gravità (modalità *discendente*), per capillarità (modalità *ascendente*) o per diffusione laterale (modalità *orizzontale*) fluisce sulla fase fissa trascinando gli analiti e separandoli

Cromatografia planare



(a) camera di sviluppo a flusso *ascendente*

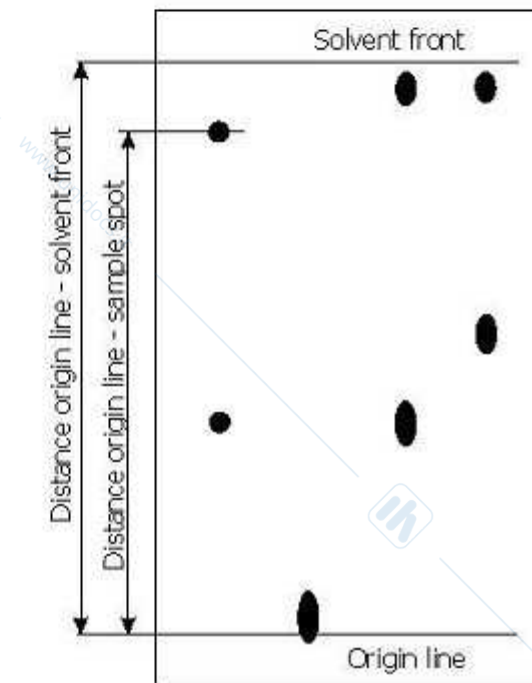
(b) camera di sviluppo a flusso *orizzontale*

Cromatografia planare

Il risultato è (spesso ma non sempre) visualizzabile sotto forma di macchie colorate, ognuna dovuta ad un componente della miscela. Il riconoscimento delle sostanze può avvenire effettuando separazioni su miscele standard; in questo caso il parametro che caratterizza i soluti separati è il cosiddetto R_f o *fattore di ritardo*. Per ogni analita il valore di R_f si ottiene misurando la distanza percorsa dal centro della macchia e confrontandola con la distanza percorsa dal fronte dell'eluente:

$$R_f = d_{\text{analita}} / d_{\text{eluente}}$$

Il valore di R_f degli analiti è quindi sempre compreso tra 0 e 1. I valori ottimali sono compresi tra 0.4 e 0.8



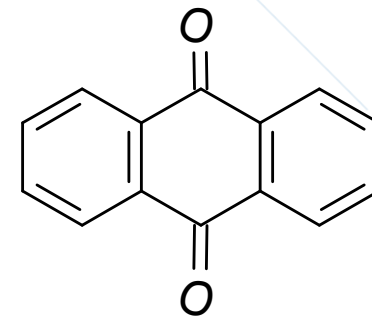
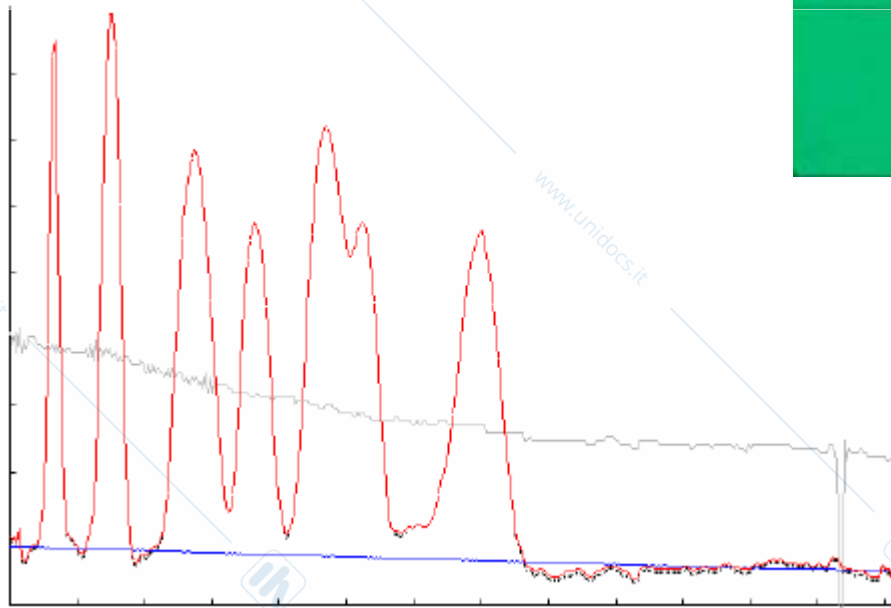
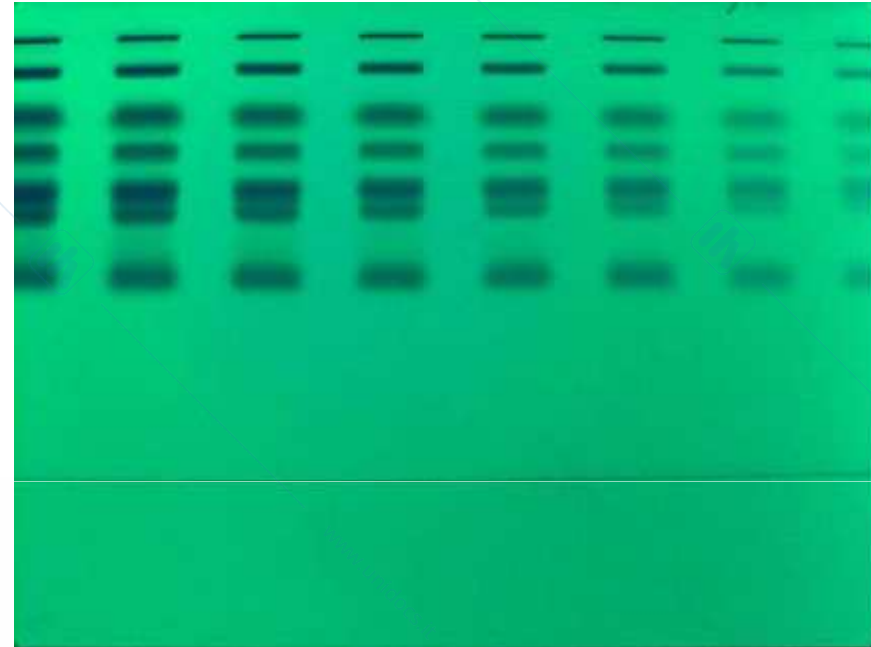
Visualizzazione dei risultati

Nel caso le macchie non siano colorate, è possibile ricorrere a due metodi per visualizzare il risultato della separazione:

- utilizzare una lampada UV per irraggiare la lastrina, se le sostanze separate non assorbono la luce visibile ma assorbono nell'ultravioletto ($\lambda < 400 \text{ nm}$); può essere necessario aggiungere alla fase stazionaria o alla fase mobile un indicatore di fluorescenza che permette di localizzare le macchie
- spruzzare la lastrina con una soluzione contenente sostanze in grado di reagire con i costituenti della miscela separata, generando composti colorati; può essere necessario scaldare leggermente la lastrina per favorire la reazione

Irraggiamento con UV

Separazione di coloranti antrachinonici con TLC e illuminazione con lampada UV a 254 nm (dx); l'intensità delle macchie può essere valutata con un colorimetro (sotto)



Addizione di reagenti cromogeni

Nell'immagine sotto è mostrato un contenitore per l'aspersione di ninidrina su lastrine TLC o PC

Alcuni esempi di reagenti correntemente impiegati per evidenziare le macchie sono riportati nella tabella sottostante

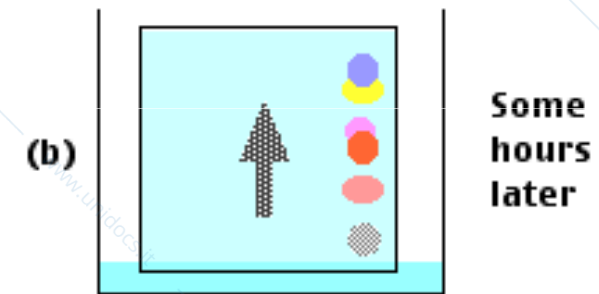
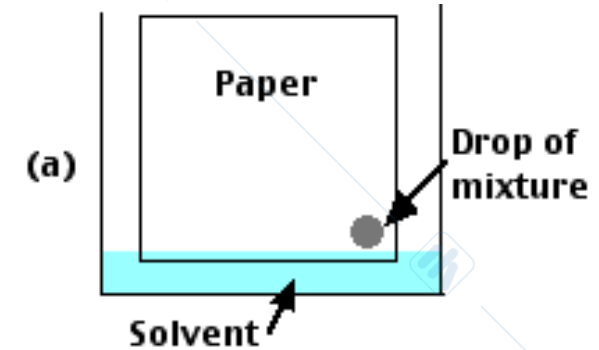
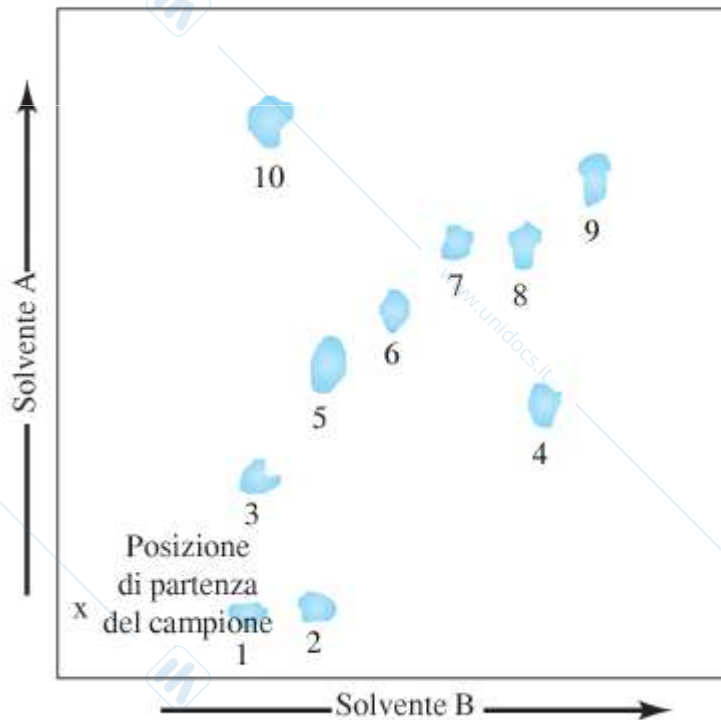


Reagente	Utilizzo
Iodio in EtOH	per composti azotati
AgNO ₃ in NH ₃	per sostanze riducenti
Alizarina	per cationi
Ninidrina	per amminoacidi e ammine
HS ₂	per cationi e metalli pesanti

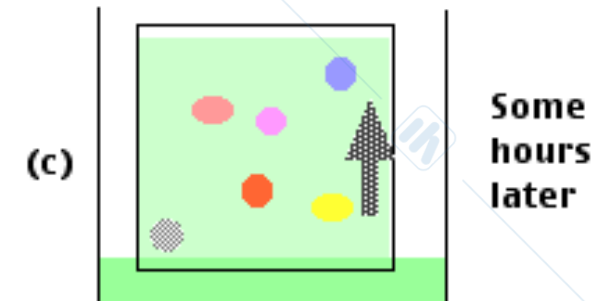
Cromatografia planare bidimensionale

Per aumentare la separazione tra gli analiti e quindi la loro identificazione è possibile effettuare l'eluizione lungo due dimensioni, prima lungo un asse e poi, girando a 90° la lastrina, lungo l'asse ortogonale, eventualmente con una fase mobile differente: in questo modo le macchie sono separate in maniera più efficiente

Sotto: separazione di aminoacidi

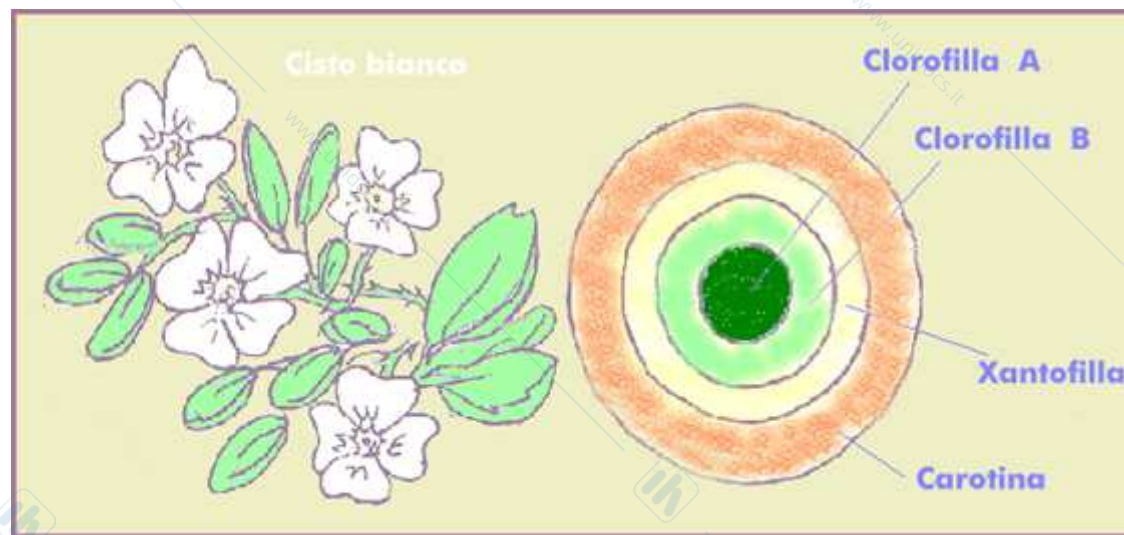


Turn paper 90° clockwise and use a different solvent



Esempio: pigmenti fogliari

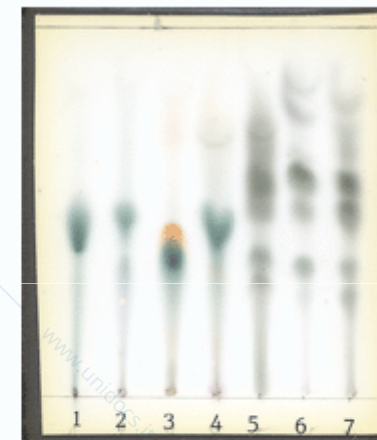
Nella figura è mostrata la separazione per cromatografia su carta orizzontale di pigmenti fogliari da un estratto della pianta *Cisto bianco*; si tratta dei pigmenti che fanno cambiare il colore delle foglie nelle diverse stagioni. La separazione è ottenuta con un disco di carta da filtro come fase fissa e alcol etilico al 95 % come fase mobile. Gli aloni sono attribuiti alle diverse sostanze sulla base del loro comportamento chimico: le sostanze più idrosolubili (e quindi più affini all'acqua adsorbita sulla cellulosa, che costituisce la fase fissa) sono quelle al centro, cioè clorofille A e B; le sostanze meno idrosolubili, xantofilla e carotina, migrano all'esterno in quanto più affini alla fase mobile



Separazione di coloranti tessili

Nella figura è mostrata la separazione per TLC di coloranti rossi di uso tessile, provenienti da insetti

L'identificazione dei vari coloranti è possibile soltanto confrontando gli R_f di standard a composizione nota, ed è essenziale avere informazioni sul maggior numero possibile di sostanze. Infatti i coloranti tessili anticamente erano spesso impiegati in miscela: il colore risultante era ottenuto dal contributo di più sostanze coloranti. Inoltre possono essere presenti sostanze non colorate aventi altre funzioni (es. leganti, conservanti)

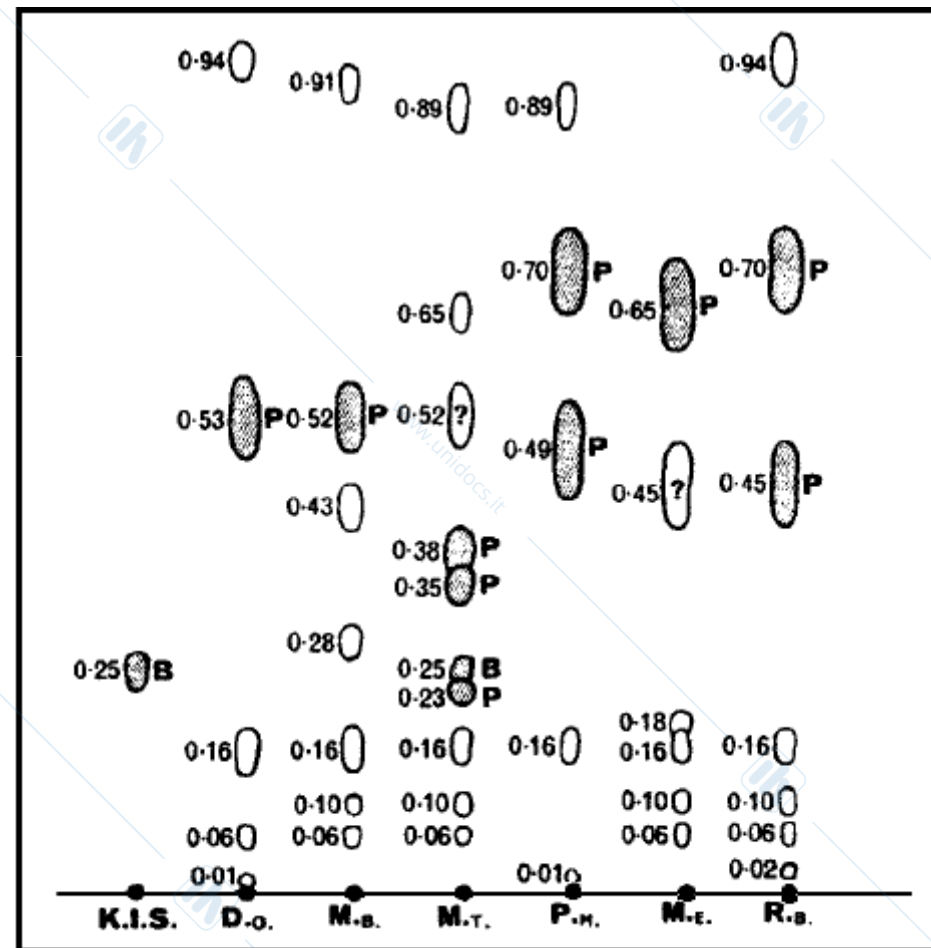


- 1 Dactylopius coccus (Costa, 1835); American Cochineal
- 2 Porphyrophora polonica (L. 1758); Polish Cochineal
- 3 Kermes vernilio (PLANCHON, 1864); Kermes
- 4 Porphyrophora hameli (BRAND, 1833); Armenian Cochineal
- 5 Kerria lacca (KERR, 1782); Lac Dye = Laccaic acids
- 6 Laccaic acid A (Main Dye) and other laccaic acids (Secondary dyes)
- 7 Mixture of laccaic acids made from Lac Dye

Separazione di coloranti porpora

Separazione per PC di estratti in etanolo da molluschi

I molluschi sono delle specie *Dicathais orbita*, *Murex brandaris*, *Murex trunculus*, *Purpura haemastoma*, *Murex erinaceus* e *Rapana bezoar*, tutti impiegati in antichità per ottenere coloranti porpora. I valori di Rf sono confrontati con un composto indigoide, il potassio indossil solfato (K.I.S., a sinistra)



Cromatografia liquida su colonna

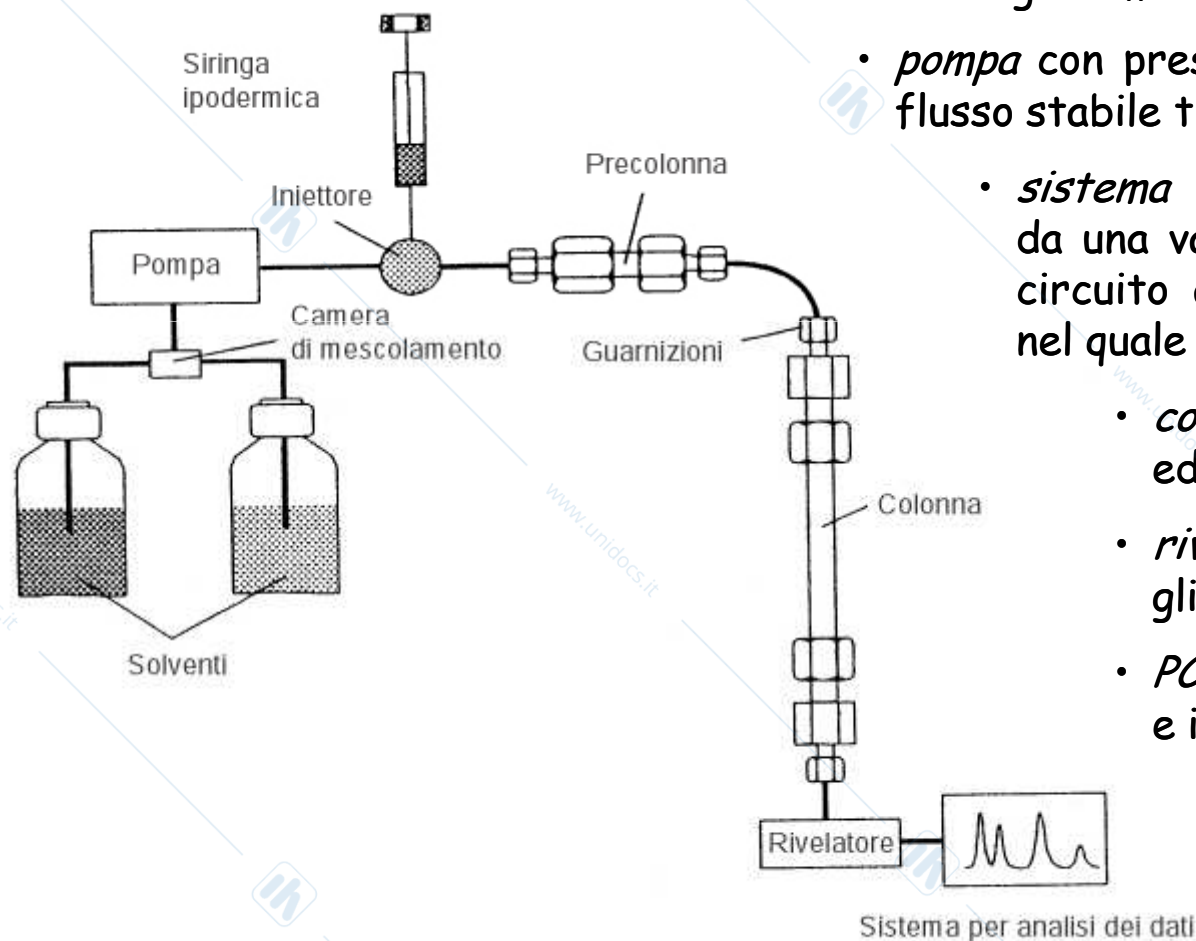
I primi esperimento di cromatografia su colonna utilizzavano colonne di vetro di 1-5 cm di diametro e lunghezza fino a 5 metri. Ciò richiedeva tempi di separazione molto lunghi

Attualmente è possibile realizzare microcolonne di pochi cm di lunghezza, in grado di separare in pochi minuti molte sostanze. Queste colonne sono costituite da particelle di 1-5 μm di diametro, che richiedono pressioni molto alte per forzare il passaggio della fase mobile attraverso la colonna. Per sistemi di questo genere il termine utilizzato è cromatografia liquida ad elevate prestazioni o elevate pressioni (*HPLC, High Performance o Pressure Liquid Chromatography*)

Strumentazione per HPLC

Un cromatografo HPLC è costituito dalle seguenti parti:

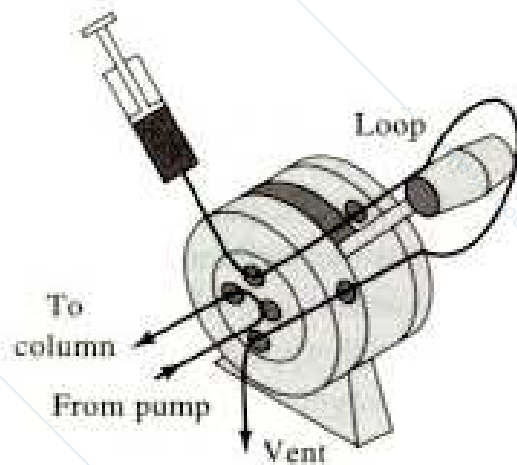
- *riserva di solventi*: uno o più solventi che possono essere utilizzati singolarmente o in miscela
- *pompa* con pressione fino a 400 Atm, flusso stabile tra 0.1 e 10 ml/min
- *sistema di iniezione* costituito da una valvola a più vie e da un circuito a volume fisso, o *loop*, nel quale si mette il campione
 - *colonna cromatografica* ed eventuale *precolonna*
 - *rivelatore* per monitorare gli eluati
 - *PC* per gestire il sistema e i dati



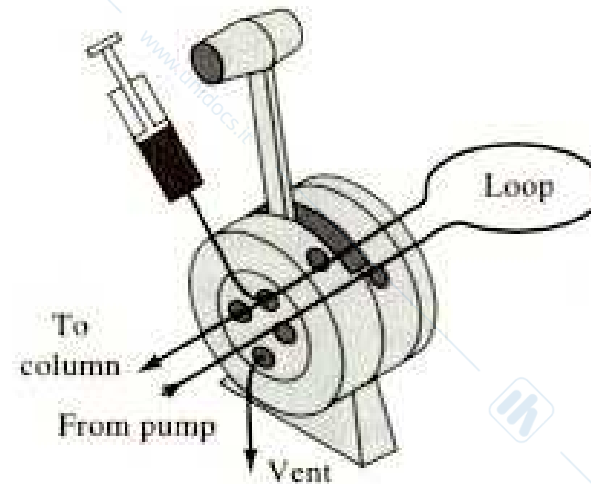
Iniezione del campione

L'introduzione del campione è realizzata attraverso l'iniettore, costituito generalmente da una valvola a due posizioni: una di carico o *load*, in cui il campione può essere introdotto nel loop, e una di introduzione nel circuito dell'eluente, o *inject*

Il volume del loop può variare tra 10 e 250 μl ; ciò comporta un consumo della soluzione di campione di circa 1-2 ml perché è sempre necessario un surplus di soluzione per *avvinare* bene il loop

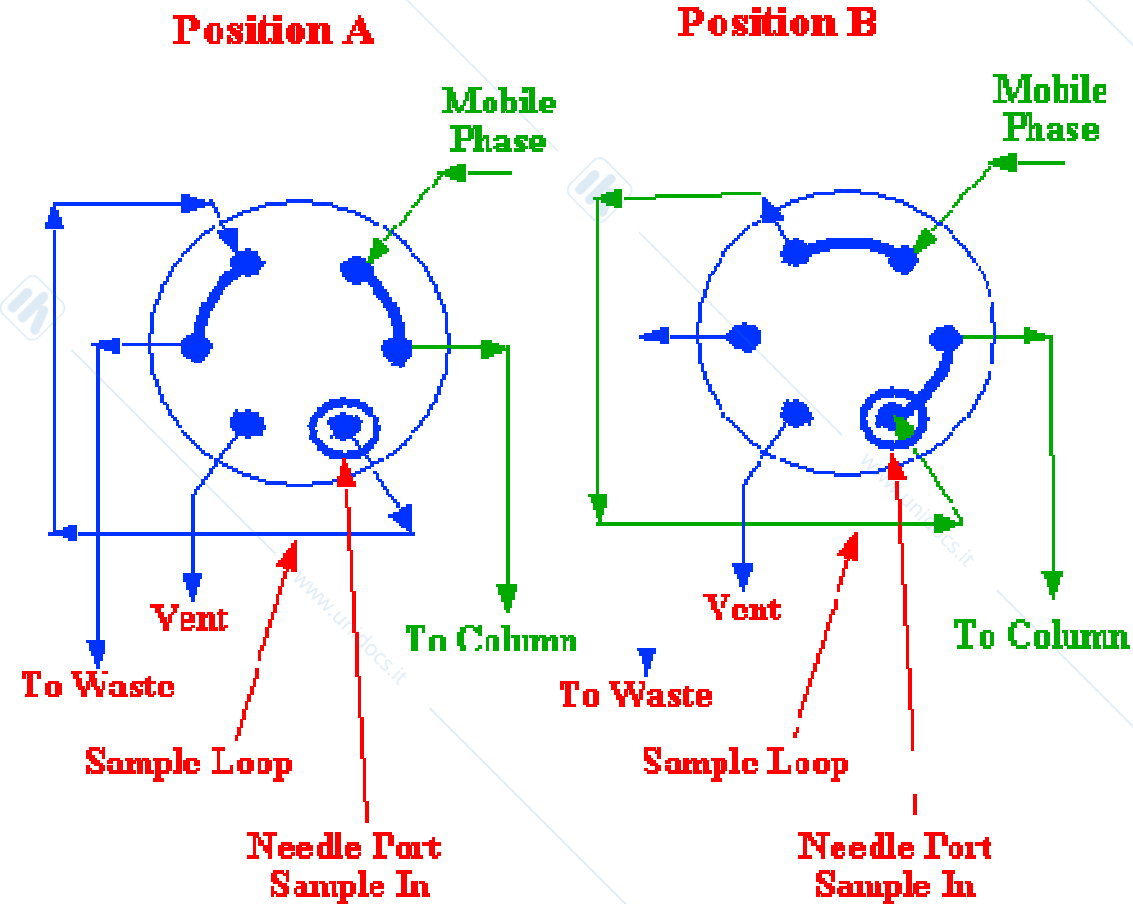


LOAD



INJECT

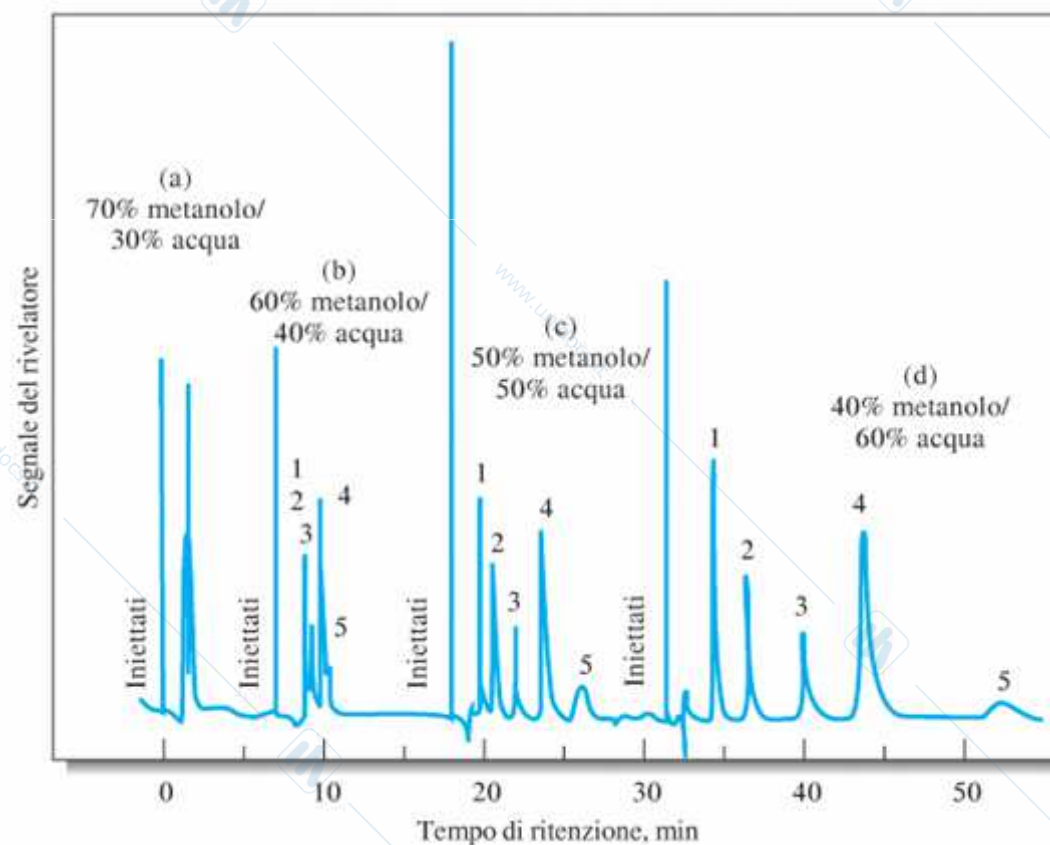
Schema della valvola di iniezione



Ottimizzazione della separazione

Per ottimizzare la separazione cromatografica è necessario trovare le condizioni in cui tutti gli analiti sono sufficientemente separati. Questo si realizza variando alcuni parametri della fase mobile fino ad ottenere la miscela ottimale

Nell'esempio a lato è mostrato come una separazione possa essere ottimizzata variando il rapporto tra solvente organico e acqua, che influenza il potere eluente della fase mobile

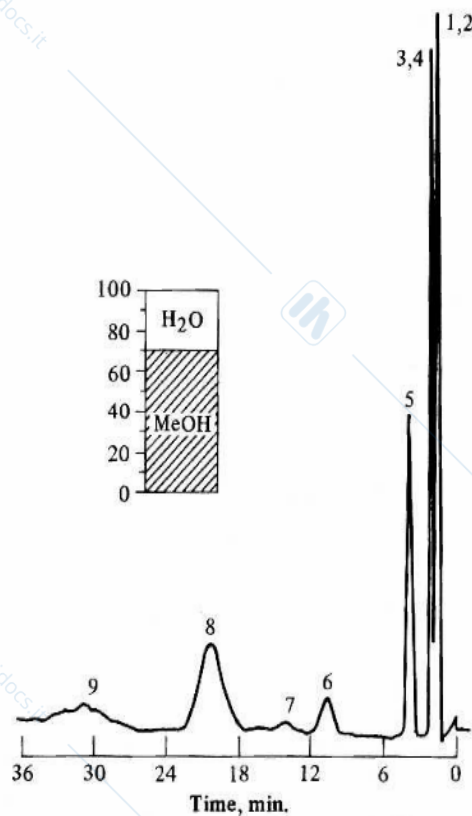


Modalità di eluizione

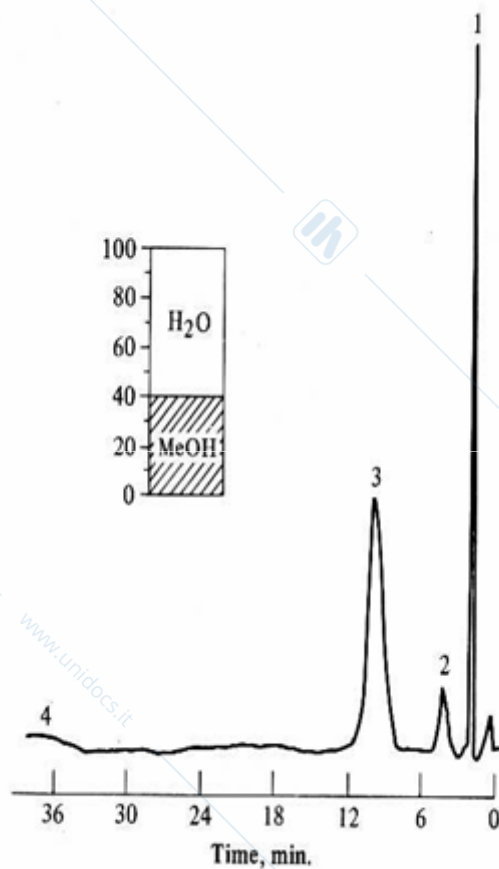
Il processo cromatografico può essere condotto in condizioni *isocratiche*, ovvero mantenendo inalterata la composizione della fase mobile, oppure in *gradiente* se viene modificato uno o più parametri della fase mobile

Il gradiente può essere necessario se le condizioni isocratiche non garantiscono una separazione efficiente per tutti gli analiti da separare, es. se alcuni analiti sono eluiti con tempi di ritenzione troppo alti, oppure se è necessario rallentare l'eluizione per separare due o più analiti

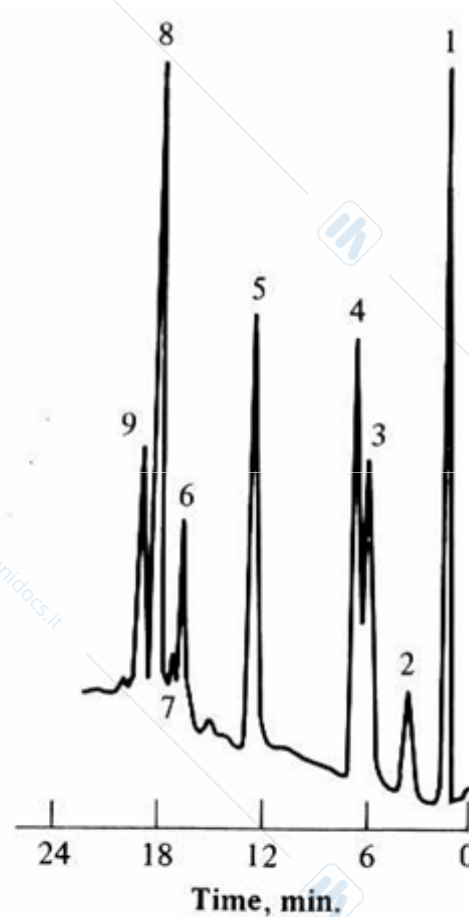
Isocratica o gradiente?



isocratica
(più forte)



isocratica
(meno forte)



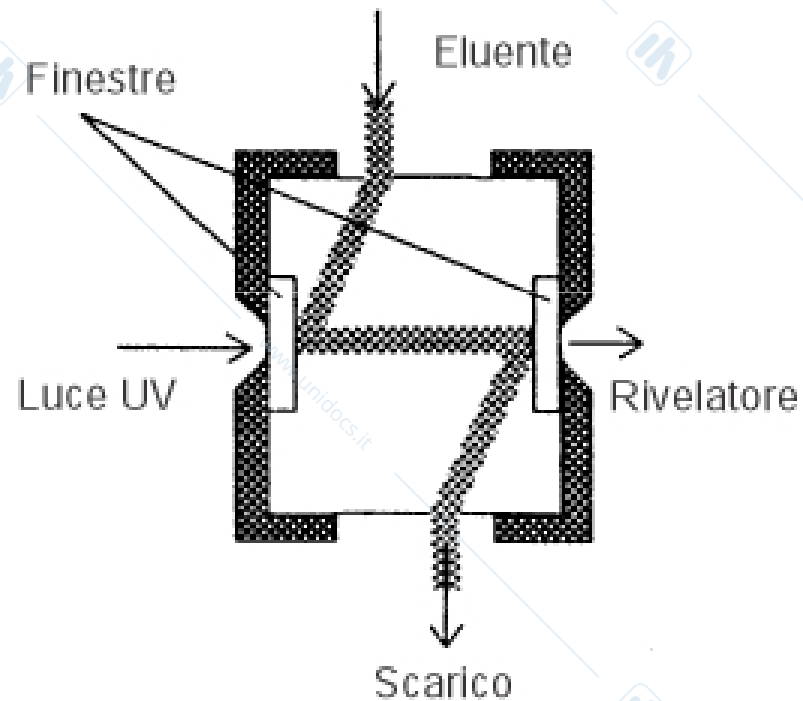
gradiente

Rivelatori per HPLC

- *Bulk properties*: si misura una caratteristica della fase mobile che indirettamente rivela gli analiti
- *Solute properties*: si misura una caratteristica del soluto
- *Spettrofotometrico UV-visibile*: il più comune (quasi tutte le sostanze assorbono nell'UV-vis), misura l'assorbanza dell'eluato a λ fissa
- *Spettrofotometrico UV-visibile con Diode-array*: misura l'assorbanza dell'eluato in un range di λ , restituendo in ogni istante lo spettro UV-vis
- *Spettrofotometrico IR*: poco diffuso
- *Spettrofluorimetrico*: solo per sostanze che fluorescono (anche con derivatizzazione), molto più sensibile dell'UV-vis
- *a Indice di rifrazione*: utilizzato per zuccheri o sostanze non attive nell'UV-vis
- *Elettrochimico*: misura la corrente generata ad un elettrodo sul quale avviene una reazione redox che coinvolge l'analita: adatto per sostanze elettroattive, sensibilità eccellente
- *Conducimetrico*: misura la corrente trasportata da ioni presenti nell'eluato, utile per sostanze ioniche o ionizzabili
- *Spettrometria di massa*: la nuova frontiera, fornisce in ogni istante lo spettro di massa dell'eluato

Rivelatore spettrofotometrico UV-visibile

- il rivelatore più diffuso (copre più del 70% dei metodi di rivelazione)
- basato sull'assorbimento di luce nel range UV-visibile-NIR
- sensibile a moltissime sostanze organiche ed inorganiche (es. 254 nm)
- sensibilità tipica: 0.1 ppb
- è un sistema non distruttivo (in senso analitico)

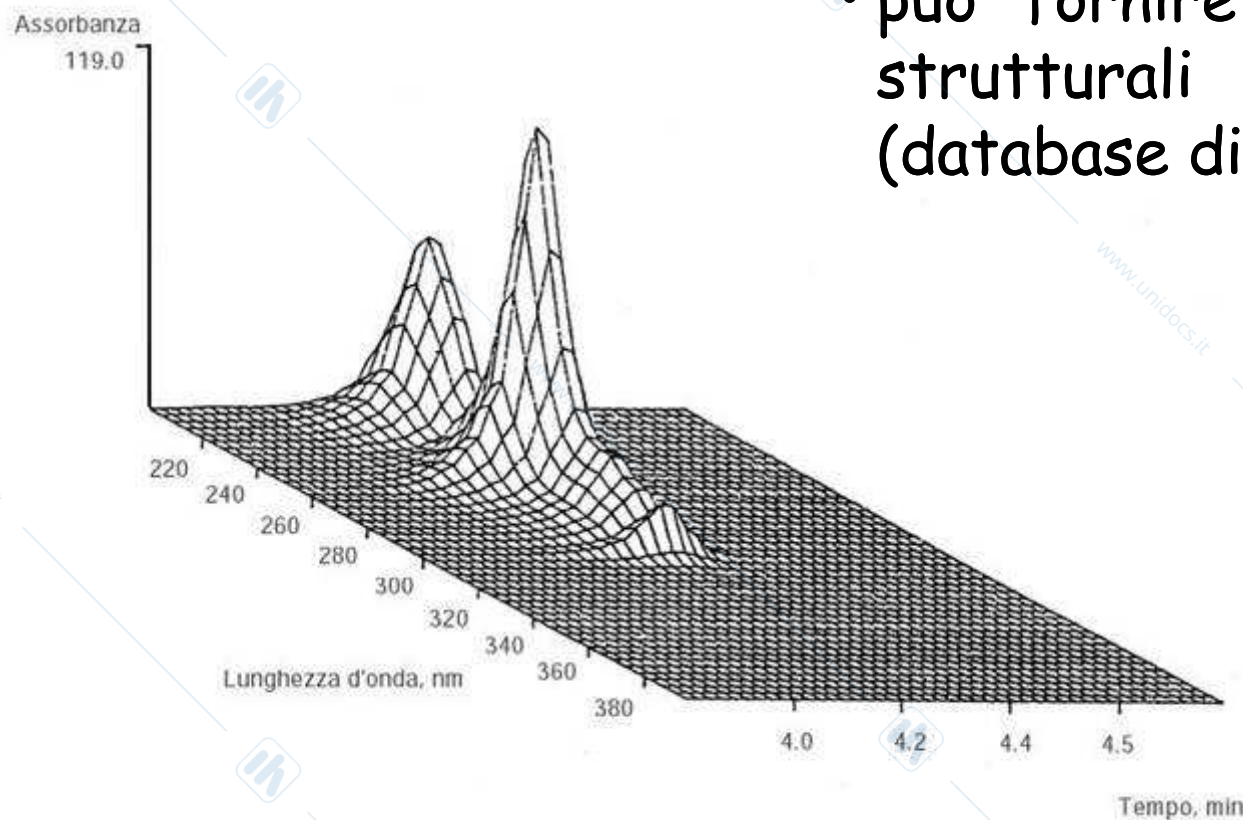


Gruppi cromofori

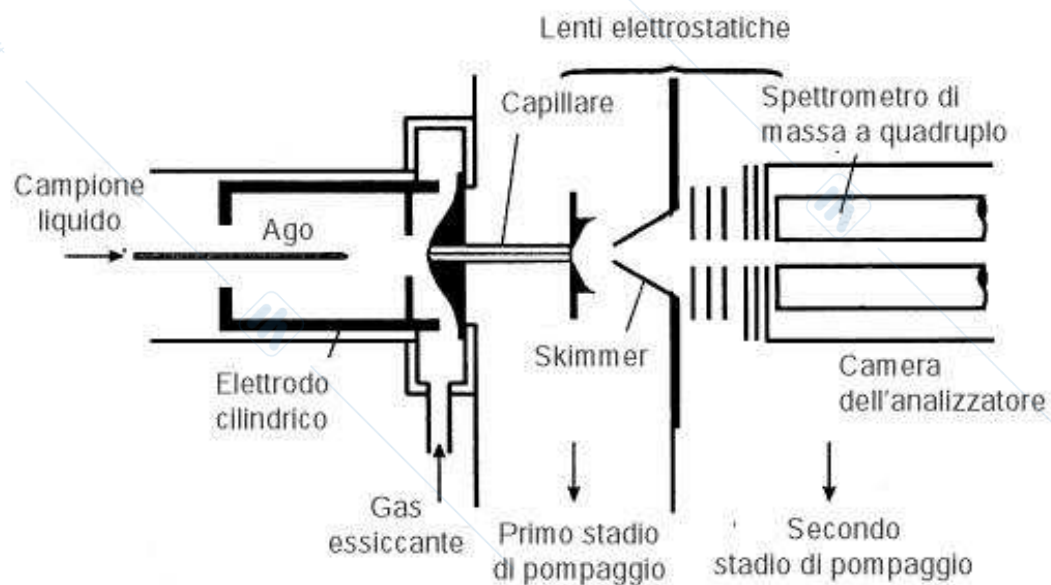
Cromoforo	Formula	λ_{\max} (nm)	ϵ
aldeide	-CHO	210	1.500
amino	-NH ₂	195	2.800
azo	-N=N-	285-400	3-25
bromuro	-Br	208	300
carbossile	-COOH	200-210	50-70
chetone	-C=O	195	1.000
disolfuro	-S-S-	194	5.500
estere	-COOR	205	50
etere	-O-	185	1.000
etilene	-C=C-	190	6.000
fenile	-C ₆ H ₅	202, 255	
naftile	-C ₁₂ H ₁₁	220, 275	
nitrato	-ONO ₂	270	12
nitrito	-ONO	220-230	1.000-2.000
nitrile	-C=N	160	-
nitro	-NO ₂	210	forte

Rivelatore Diode-array (DAD)

- misura in ogni istante lo spettro UV-visibile dell'eluato nell'intervallo desiderato
- può fornire informazioni strutturali sugli analiti (database di spettri)



Rivelatore a spettrometria di massa



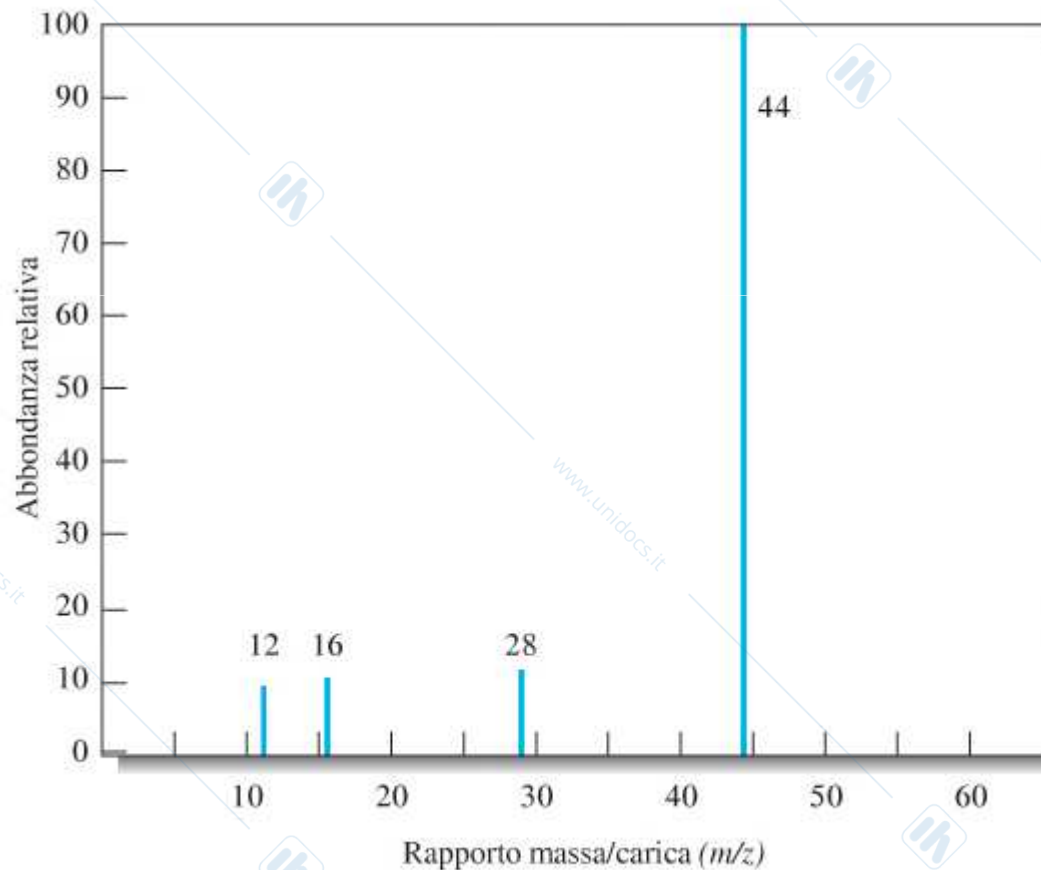
- sensibilità tipica: 0.1 ppb
- limitato dall'interfaccia e dalla necessità di rimuovere il solvente dal campione
- gli analiti devono essere ionizzabili

- il detector finale: sensibile, selettivo e universale, può permettere la caratterizzazione chimica del campione
- possibilità di discriminare analiti coeluiti in modalità SIM

Esempio di spettro MS

Spettro di massa della CO_2 . Lo ione molecolare compare a $m/z =$

44 ($C = 12, O = 16$);
gli ioni frammento
compaiono a $m/z =$
28 (CO^+), 16 (O^+) e
12 (C^+)



Oltre a questi
segnali devono
comparire i picchi
delle specie
isotopiche (es. i
frammenti che
contengono ^{13}C
anziché ^{12}C)

Cromatogramma con rivelatore MS

L'informazione che si ottiene dal rivelatore a spettrometria di massa può essere gestita in modi diversi:

- nella modalità TIC (Total Ion Current) si misura, in ogni istante della corsa cromatografica, la *corrente ionica totale* generata dai vari ioni che si formano dal soluto in quell'istante
- nella modalità SIM (Single Ion Monitoring) si misura il segnale a m/z fissa; il cromatogramma che si ottiene indica la presenza soltanto dei soluti dai quali si genera un frammento avente quel valore di m/z
- in ogni istante del cromatogramma è inoltre possibile avere lo spettro di massa di ciò che sta passando in quel momento nello spettrometro di massa

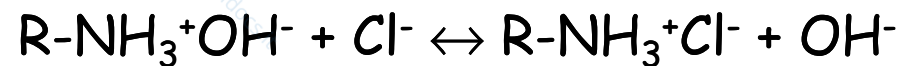
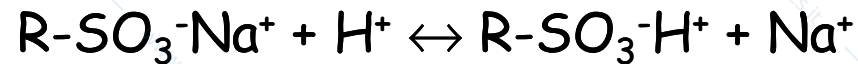
Applicazioni LC-MS

Le applicazioni della tecnica LC-MS in campo archeometrico risalgono agli ultimi due-tre anni e dimostrano quanto la tecnica sia promettente. Mediante essa è possibile affrontare problemi coinvolgenti miscele complesse, e risulta quindi di particolare aiuto nella caratterizzazione di campioni di natura organica, quali residui alimentari, umani o animali, leganti e vernici, sostanze naturali, ecc.

Oltre al potere diagnostico, la spettrometria di massa garantisce una sensibilità elevatissima, che permette di minimizzare il consumo di campione richiesto per l'analisi

Cromatografia ionica

Sebbene la maggior parte delle tecniche cromatografiche sia rivolta alla determinazione di sostanze organiche neutre, esiste una tecnica che è utilizzata specificamente per la separazione e identificazione di sostanze ioniche o ionizzabili: la cromatografia ionica (IC, Ion Chromatography). Questa tecnica è basata su equilibri di scambio che si realizzano tra ioni presenti in soluzione e ioni fissati su un supporto solido, secondo le reazioni



La prima reazione è uno *scambio cationico*, la seconda è uno *scambio anionico*

Cromatografia ionica

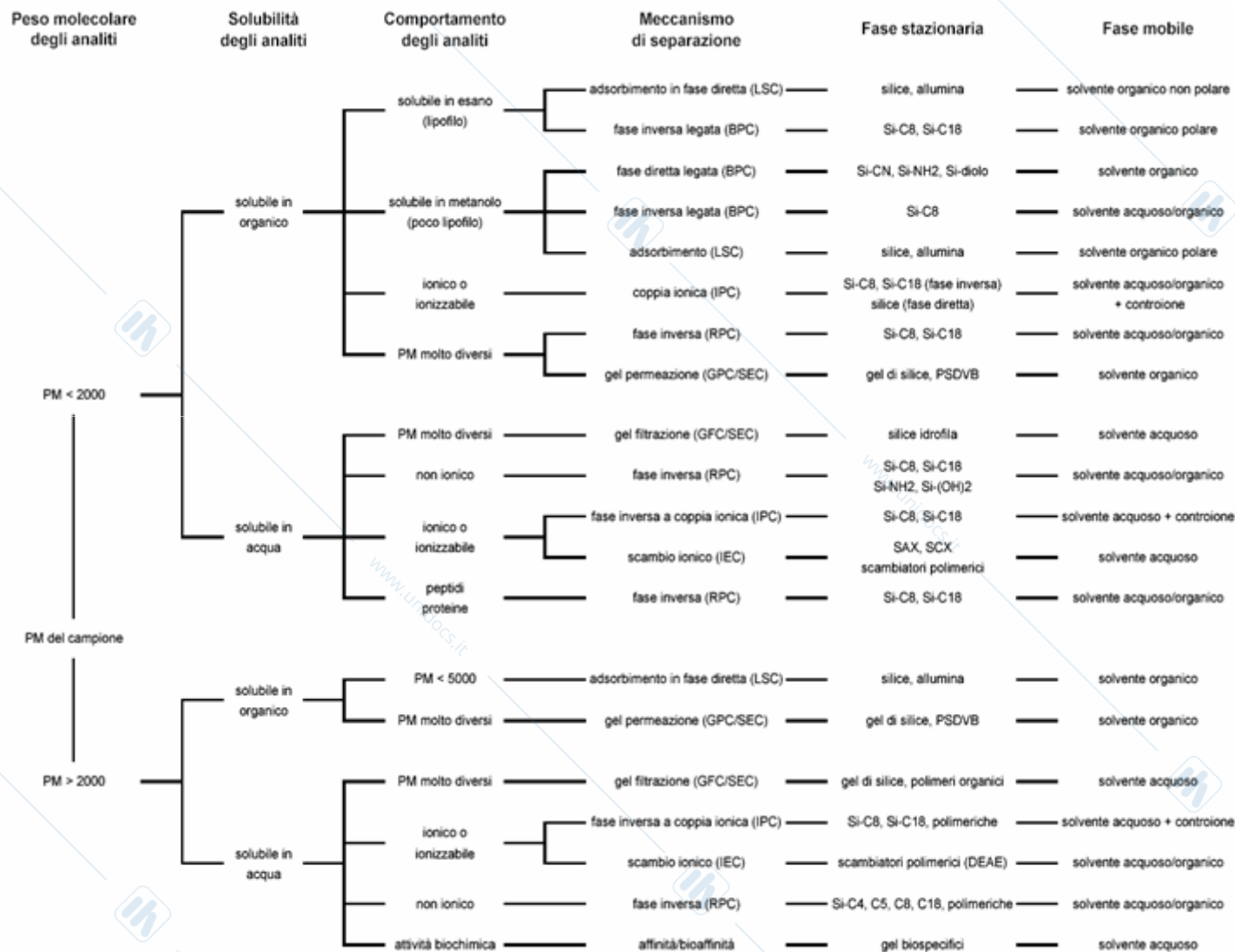
Nella cromatografia ionica la fase stazionaria è un solido contenente gruppi ionizzati (es. $-\text{SO}_3^-$, $-\text{NH}_3^+$) con i rispettivi controioni, mentre la fase mobile è una soluzione contenente ioni che sono in grado di competere con gli ioni presenti nel campione per i siti carichi della fase stazionaria

Mentre l'interazione tra soluti e fase stazionaria è basata sull'attrazione coulombiana tra cariche di segno opposto, la separazione è garantita dalla competizione tra soluti e fase mobile

Attraverso la scelta opportuna del sistema fase mobile - fase stazionaria è possibile separare sostanze ioniche o ionizzabili, sia inorganiche che organiche

I rivelatori impiegati nella cromatografia ionica possono essere quelli convenzionali per cromatografia liquida, ma normalmente si impiega il rivelatore a conducibilità, specifico per sostanze ioniche

Selezione della tecnica HPLC



Gas Cromatografia

La gas cromatografia è impiegata per la separazione di sostanze volatili. Si presta meno facilmente a misure quantitative rispetto alla LC, in compenso ha maggiori potenzialità dal punto di vista diagnostico. Si possono separare sostanze appartenenti a varie classi tra cui, di interesse archeometrico:

- aromi (terpeni, esteri)
- idrocarburi a catena corta
- acidi carbossilici
- composti di interesse biochimico

Gas Cromatografia

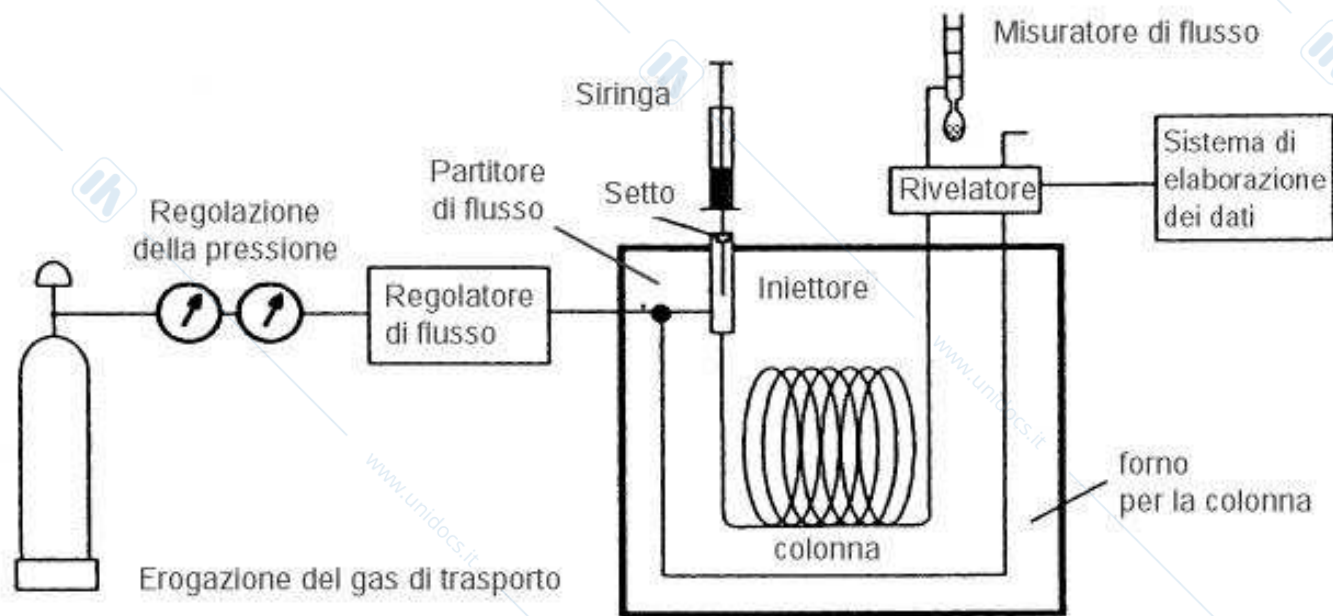
Nella gas cromatografia il campione è vaporizzato e poi iniettato in colonna; un gas costituisce la fase mobile ma in questo caso non ha alcuna interazione con i soluti in quanto agisce soltanto da *carrier*, cioè trasporta i soluti lungo la colonna

I composti iniettabili in un sistema GC devono avere $T_{eb} < 300^{\circ}\text{C}$ e non devono essere *termolabili*, ovvero non devono degradarsi per effetto della temperatura, pena l'impossibilità di riconoscerli nel campione

Gas Cromatografia

- **Gas-liquido**
 - supporto inerte solido
 - liquido non volatile, legato covalentemente
 - meccanismo di ripartizione
 - moltissime applicazioni
- **Gas-solido**
 - fasi stazionarie di silice, allumina o carbone
 - meccanismo di adsorbimento
 - adatta per la separazione di gas permanenti (H_2 , He, Ar, O_2 , N_2 , CO) o idrocarburi a basso punto di ebollizione

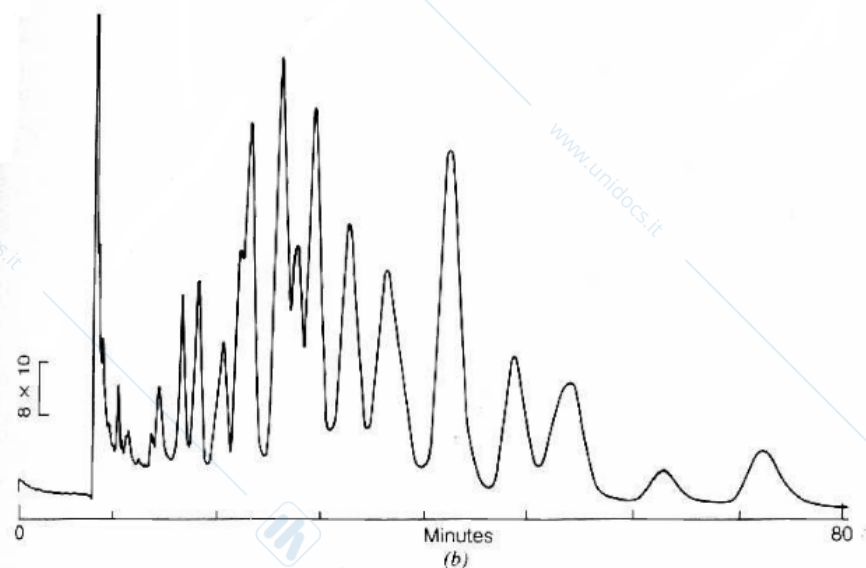
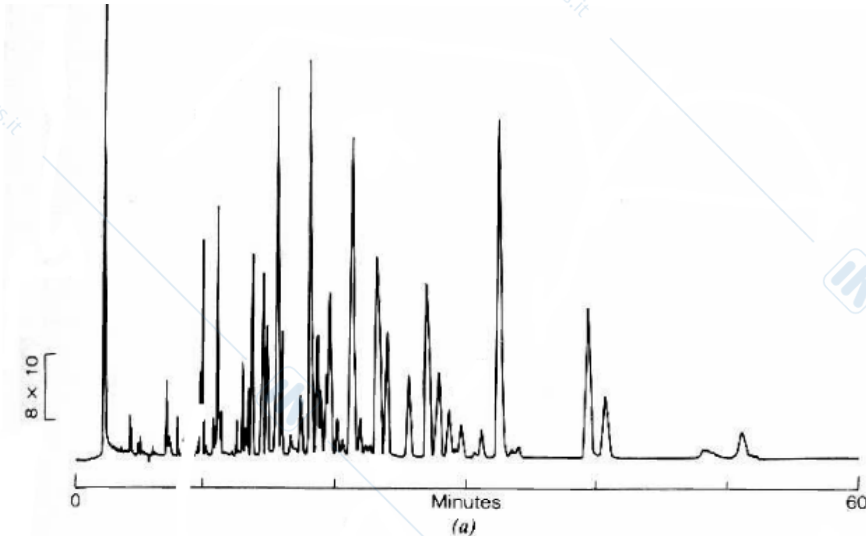
Schema di un GC



Colonne per gascromatografia

- Colonne impaccate
 - contengono un supporto solido inerte, finemente suddiviso (comumente basato su terra di diatomee), ricoperto di fase stazionaria liquida
- Colonne capillari
 - WCOT (Wall Coated Open Tubular), strato sottile di fase liquida ($1\ \mu\text{m}$) depositato sulla superficie
 - SCOT (Support Coated Open Tubular), strato poroso creato sulle pareti della colonna per trattamento o deposizione chimica
 - PLOT (Porous Layer Open Tubular), strato poroso polimerico o inorganico che funge da fase stazionaria per una cromatografia di adsorbimento

Confronto tra colonne impaccate e capillari



Le colonne capillari possono essere lunghe fino a 100 m e hanno quindi un numero di piatti teorici enormemente più elevato rispetto alle colonne impaccate. Questa differenza è esemplificata nella figura a lato (in alto separazione con colonna capillare, in basso la stessa separazione con colonna impaccata)

Rivelatori per GC

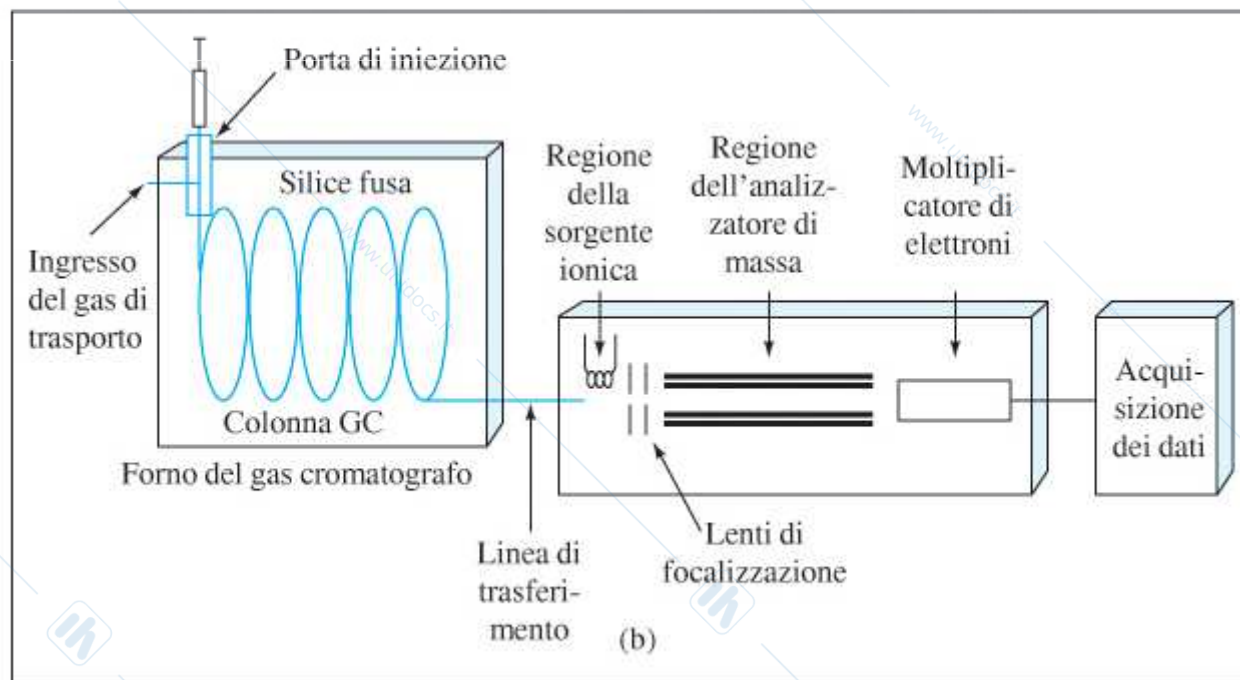
- a conducibilità termica (TCD)
- a ionizzazione di fiamma (FID)
- a cattura di elettroni (ECD)
- a conducibilità elettrolitica (ELCD)
- amperometrico per lo zolfo (ASD)
- termoionico (TID o NPD)
- fotometrico a fiamma (FPD)
- a fotoionizzazione (PID)
- ad emissione atomica (AED)
- a chemiluminescenza
- spettrometria di massa (MS)

Uno dei punti di forza della tecnica GC è la grande varietà dei rivelatori disponibili. Alcuni sono aspecifici e quindi di uso generale (TCD, FID), altri sono invece molto specifici (AED, ASD). Quelli universalmente accettati sono TCD ed FID, ma è sempre più diffuso l'impiego del rivelatore a spettrometria di massa (MS)

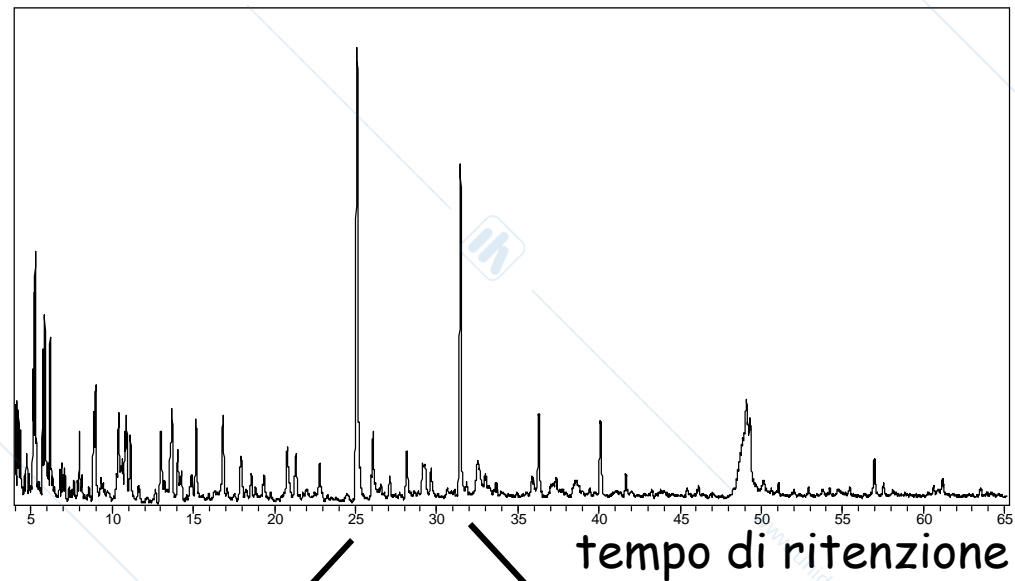
Un aspetto da considerare nella scelta del rivelatore è verificare se è distruttivo o no: nel secondo caso può essere interessante mettere in serie più rivelatori (es. TCD e MS)

Rivelatore a spettrometria di massa

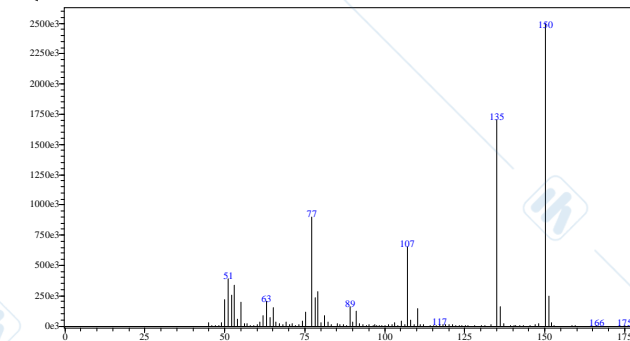
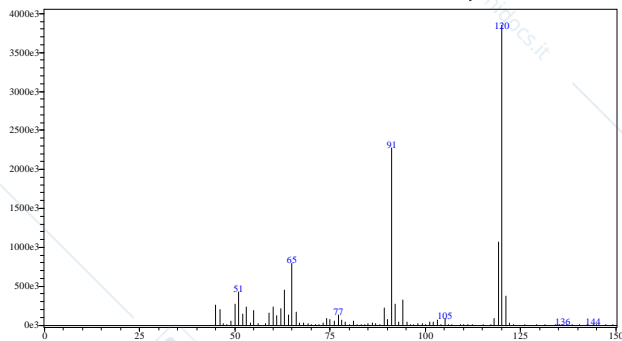
Questo rivelatore impiega uno spettrometro di massa. Come nel caso dell'LC-MS, l'analita è ionizzato e/o frammentato e si ottiene il suo spettro m/z . L'interfacciamento GC-MS è ormai più che consolidato, in quanto l'eluato in fase gassosa pone assai meno problemi se immesso in un sistema ad alto vuoto. Il riconoscimento degli analiti è aiutato dai database di spettri di massa che possono contenere fino a 250.000 sostanze diverse



Esempio di cromatogramma GC-MS



spettro di massa



Spettro di massa

Questo rivelatore impiega uno spettrometro di massa. Come nel caso dell'LC-MS, l'analita è ionizzato e/o frammentato e si ottiene il suo spettro m/z . L'interfacciamento GC-MS è ormai più che consolidato, in quanto l'eluato in fase gassosa pone assai meno problemi se immesso in un sistema ad alto vuoto. Il riconoscimento degli analiti è aiutato dai database di spettri di massa che possono contenere fino a 250.000 sostanze diverse

Strumenti GC-MS

Esempi di strumenti GC-MS



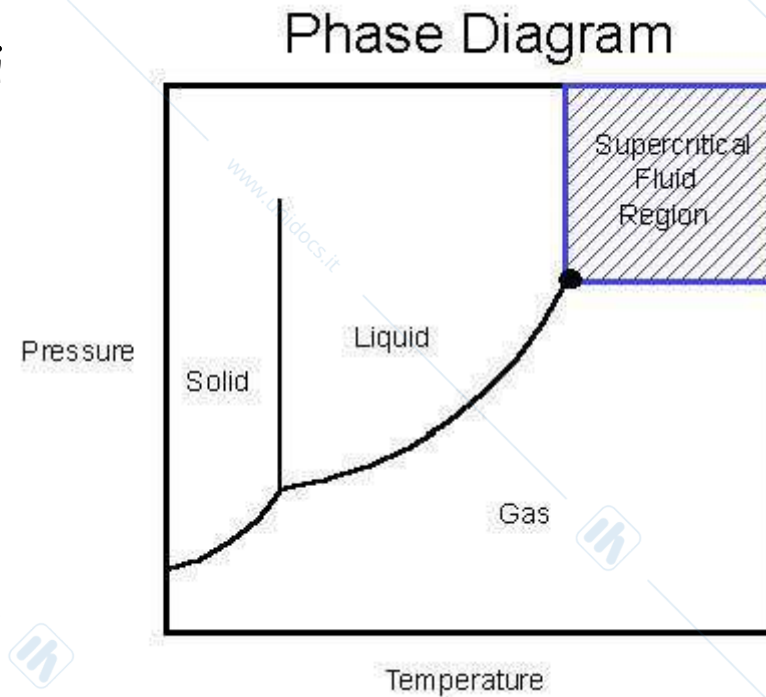
GC-MS da banco



GC-MS portatile

Cromatografia Fluida Supercritica

- si utilizza come fase mobile un fluido *supercritico* (cioè portato al di sopra della temperatura critica, T_c , sopra la quale una sostanza non può più essere trasformata in un liquido), avente caratteristiche fisiche intermedie tra i liquidi e i gas:
- maggiore densità rispetto ai gas
- minore viscosità rispetto ai liquidi
- alto potere solubilizzante
- fluidi supercritici impiegati in cromatografia:
 - CO_2 , $T_c = 31^\circ C$
 - C_2H_6 , $T_c = 32^\circ C$
 - N_2O , $T_c = 37^\circ C$

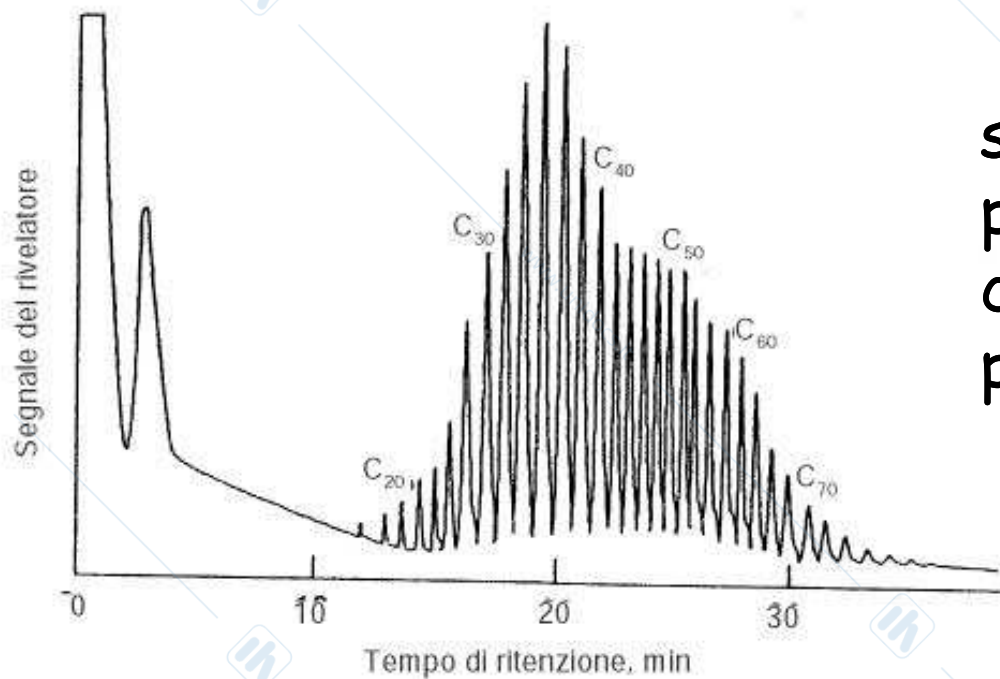


Caratteristiche della SFC

- è utile in particolare per analizzare composti che non possono essere determinati con GC o LC (25% dei problemi analitici):
 - composti non volatili
 - composti termicamente instabili
 - composti non rivelabili con i normali rivelatori per LC
- la strumentazione è simile a quelle per GC o LC; necessita di controllo accurato della temperatura
- fasi mobili analoghe a quelle per HPLC in ripartizione
- l'eluato si rivela come gas \Rightarrow rivelatori FID, MS (interfacciamento semplice), TCD, ECD

Applicazioni della SFC

- separazione di molecole ad alto PM (fino a 10^5), sostanze naturali, residui di alimenti, ecc.
- CO_2 supercritico può solubilizzare alcani C_5 - C_{40} e PAH



separazione di
polietilene oligomerici
con gradiente di
pressione

Riassumendo

- analiti volatili o volatilizabili, termicamente stabili, non ionici



Gas Cromatografia

- analiti non volatili o poco volatili, ionici, ionizzabili o non ionici, termicamente instabili



Cromatografia liquida

- analiti non volatili o termicamente instabili ma non rivelabili dai comuni detector per LC



Cromatografia fluida supercritica

GC, LC o SFC?

- **Caratteristiche comuni**
 - efficienti e altamente selettive; non distruttive (in senso analitico); possono essere quantitative
- **Vantaggi della GC**
 - rapida; risoluzione eccezionale; facilmente interfacciabile con MS
- **Vantaggi della LC**
 - determinazione di specie non volatili o termicamente instabili, specie ioniche inorganiche
- **Vantaggi della SFC**
 - caratteristiche intermedie tra GC ed LC