

CHIMICA ANALITICA

RIVELATORI GC-HPLC

Prof. Manuel sergi

Rivelatori per GC

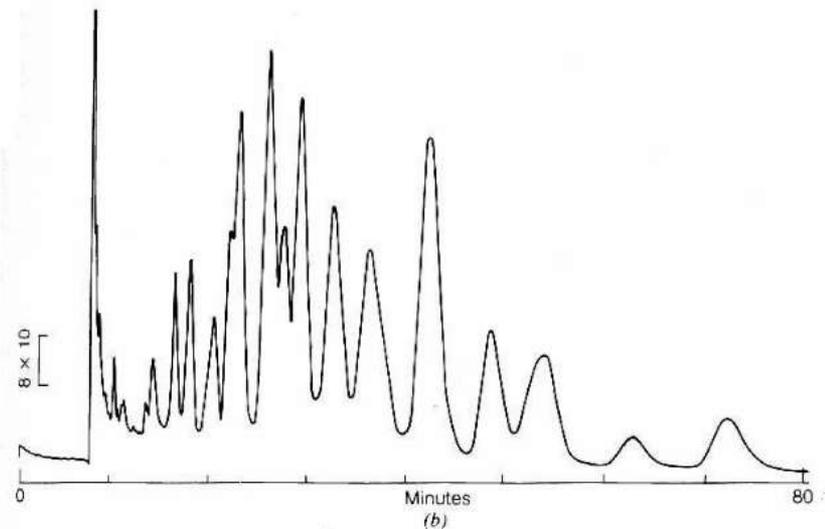
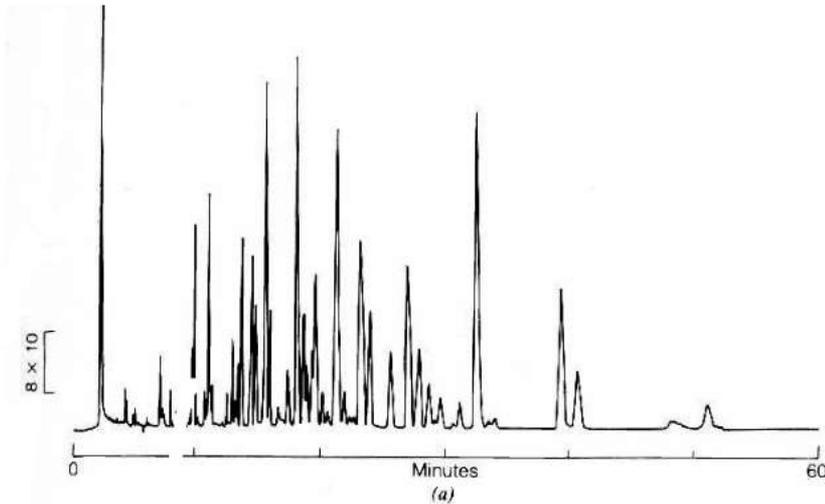
Gas Cromatografia

- 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

Colonne per gascromatografia

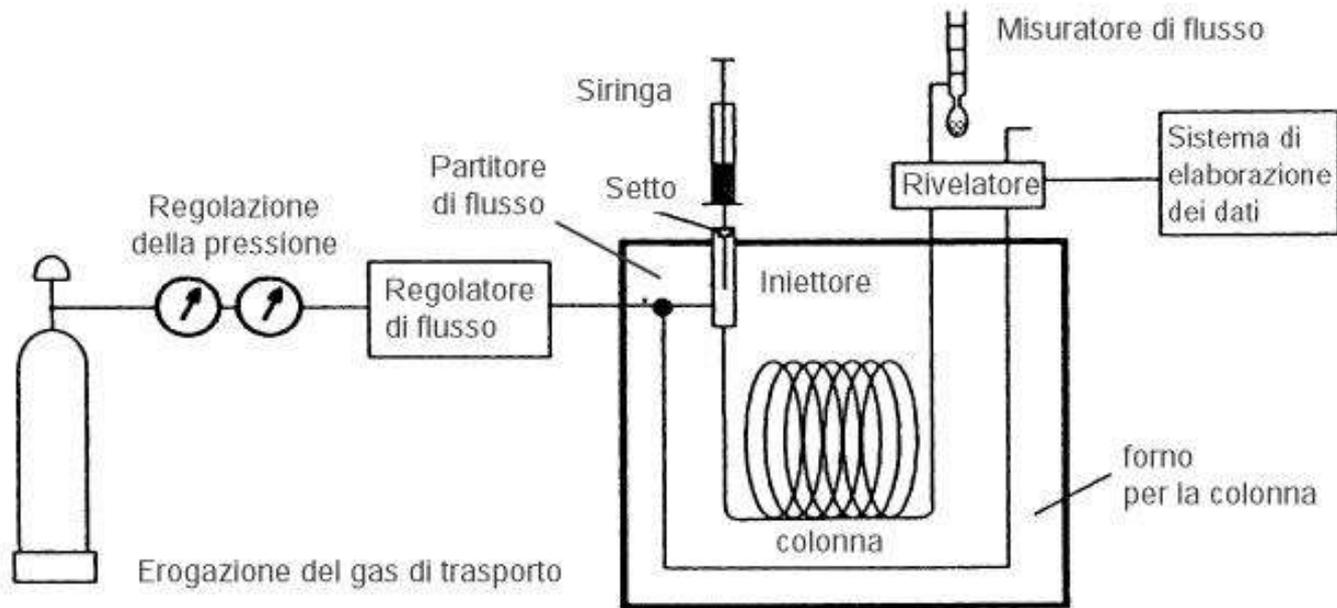
- Colonne impaccate
 - contengono un supporto solido inerte, finemente suddiviso (comunemente basato su terra di diatomee), ricoperto di fase stazionaria liquida
- Colonne capillari
 - WCOT (Wall Coated Open Tubular), strato sottile di fase liquida (1 μm) depositato sulla superficie
 - SCOT (Support 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)

Schema di un GC



Caratteristiche di un rivelatore ideale:

- Sensibilità adeguata al problema
- Buona stabilità e riproducibilità
- Risposta lineare al soluto, possibilmente per parecchi ordini di grandezza
- Tempi di risposta rapidi
- Risposta verso tutti i soluti, oppure risposta selettiva verso una o più classi di soluti

Scelta del rivelatore

La selezione è basata su:

- natura chimica degli analiti
- potenziali interferenze
- limite di rivelabilità richiesto
- disponibilità e/o costo

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

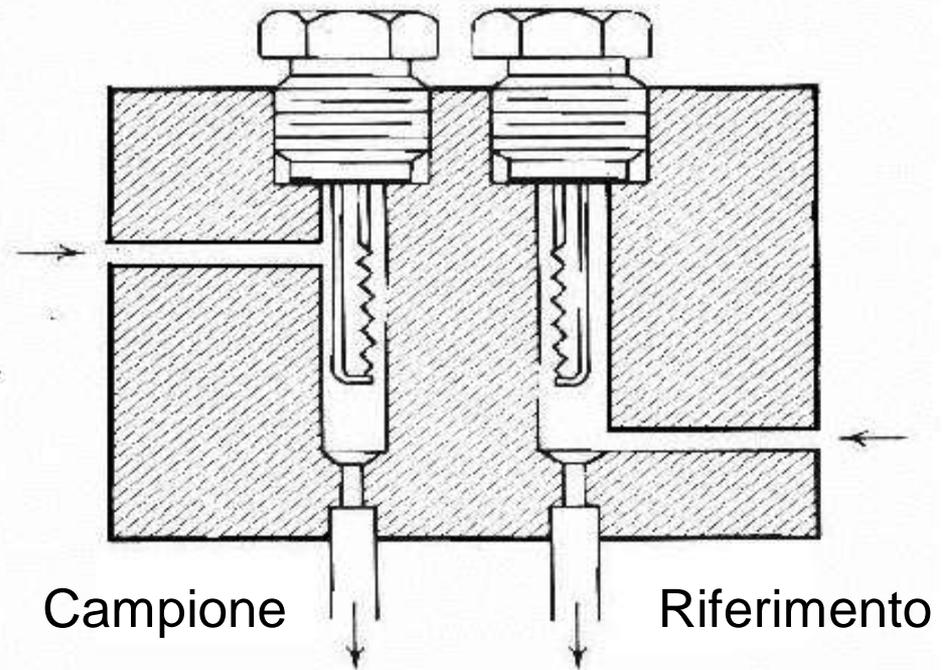
Un aspetto da considerare nella scelta del rivelatore è verificare se è distruttivo o no: nel secondo caso può essere interessante mettere in serie più rivelatori (es. TCD e MS)

Confronto tra rivelatori

Rivelatore	Target	LOD	Range lineare
TCD	non selettivo	1 ng	10^6
FID	idrocarburi	100 pg	10^7
ECD	alogeni	50 fg Cl	10^4
ELCD	composti di N, S, Cl	1 pg	$10^4 - 10^6$
ASD	composti di S	10 ppb S	10^4
NPD	composti di N, P	10 pg	10^4
FPD	composti di S, P	100 pg	10^3
PID	idrocarburi aromatici, eterocomposti	2 pg benzene	10^7
AED	elementi	0.1 – 20 pg/s	10^4
Chem	composti di N, S	10 pg	10^4
MS	specie	10 ng (SCAN), 10 pg (SIM)	10^5

Rivelatore a conducibilità termica

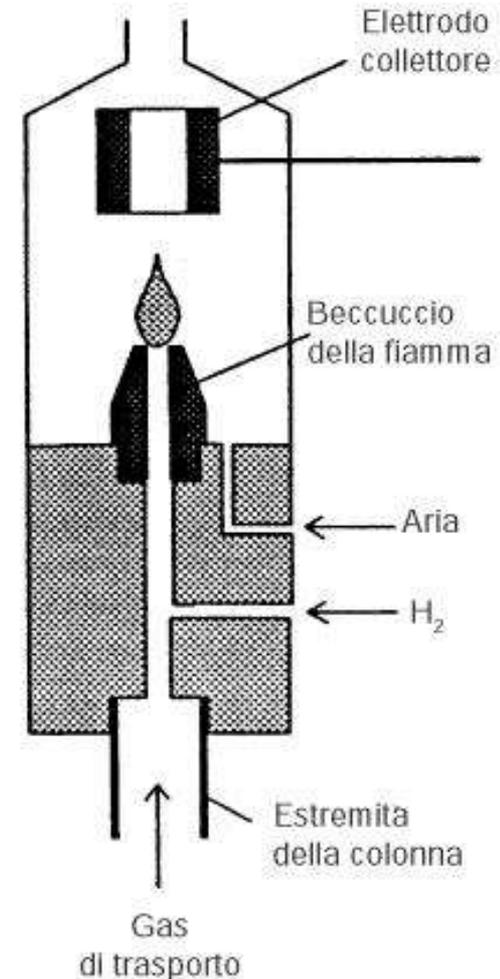
- si misura la variazione di conducibilità termica in un flusso di H₂ ed He
- si tratta di un rivelatore non specifico, quindi risponde ad ogni tipo di composto
- la sensibilità è una delle peggiori
- è un sistema non distruttivo



Quando gli analiti emergono dalla colonna, la conducibilità del flusso di gas diminuisce, il filamento si riscalda, la sua resistenza elettrica aumenta e il voltaggio ai capi del filamento cambia.

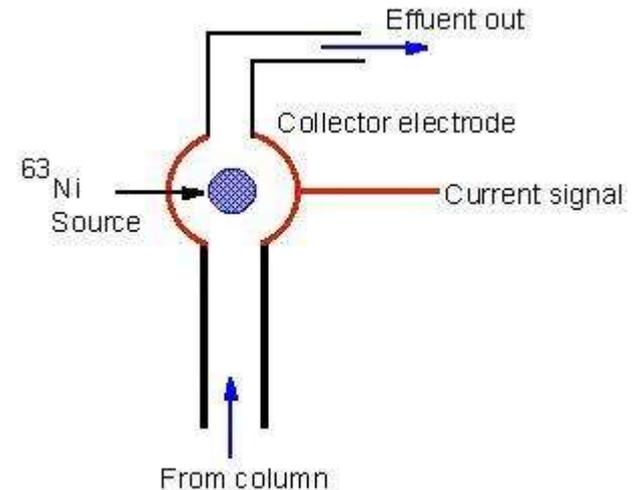
Rivelatore a ionizzazione di fiamma

- si misura la conducibilità elettrica di una fiamma in un campo elettrico
- è sensibile a tutti i composti contenenti legami C-C e C-H (per questo si tratta del rivelatore più utilizzato)
- non risponde a molecole volatili non infiammabili
- la sensibilità è buona
- è un sistema distruttivo



Rivelatore a cattura di elettroni

- si misura la diminuzione di corrente dovuta alla cattura di elettroni da parte di analiti all'uscita della colonna
- è sensibile soprattutto a composti con gruppi funzionali elettrofili (alogeni, perossidi, nitrogruppi, ecc.)
- la sorgente di elettroni è un beta-emettitore come ^3H o ^{63}Ni



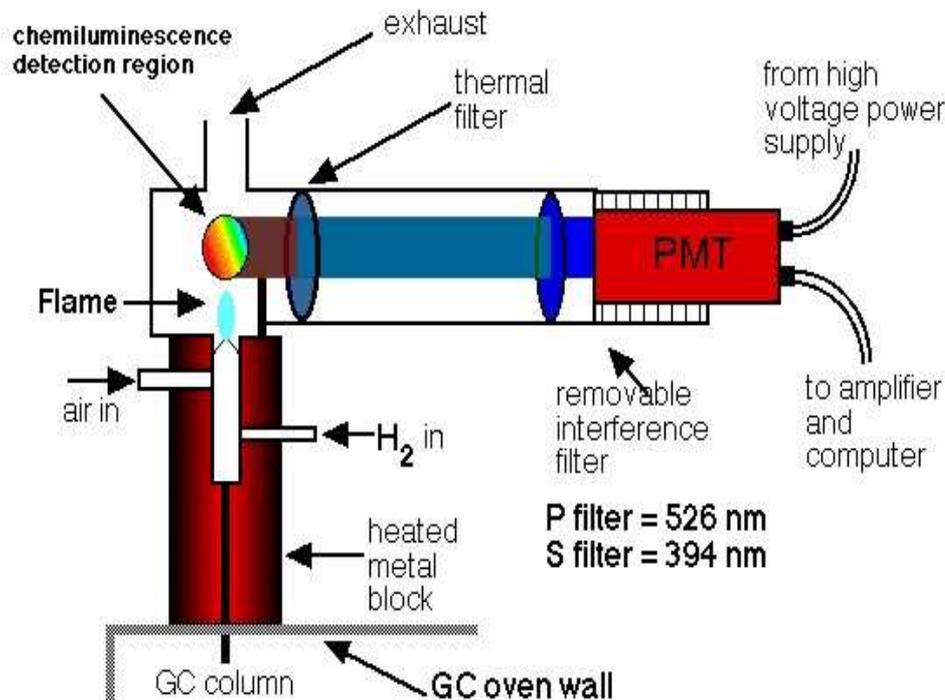
Il gas all'ingresso viene ionizzato da raggi beta. Gli elettroni che si formano sono attratti da un anodo che produce una corrente stazionaria. Quando gli analiti con elevata affinità elettronica entrano nel rivelatore catturano elettroni.

Il rivelatore risponde variando la frequenza per mantenere la corrente costante.

- la sensibilità è ottima per gli idrocarburi clorurati
- è un sistema non distruttivo

Rivelatore fotometrico a fiamma

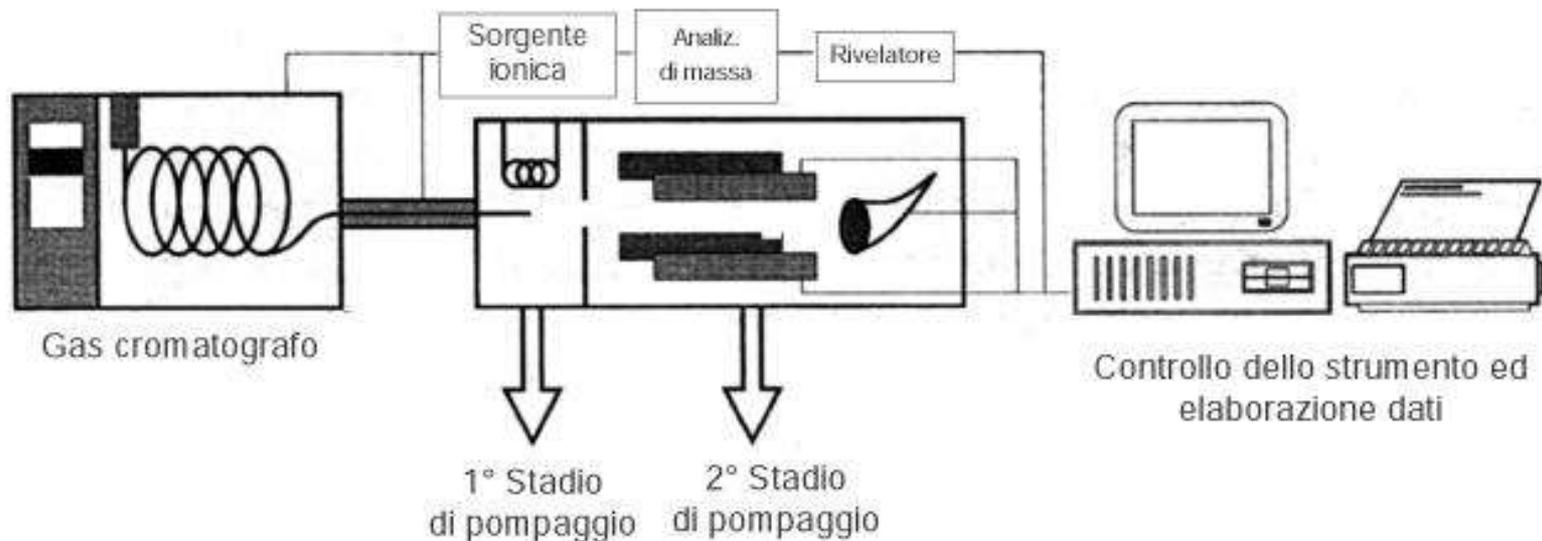
- è specifico per composti contenenti zolfo e fosforo
- si misura l'emissione ottica a 394 nm per S e 526 nm per P
- è un sistema distruttivo



Quando l'eluato passa attraverso una fiamma ad aria-H₂ gli ioni eccitati emettono radiazioni caratteristiche. L'emissione del fosforo e dello zolfo possono essere isolate con un filtro interferenziale a banda stretta e rivelate con un fotomoltiplicatore.

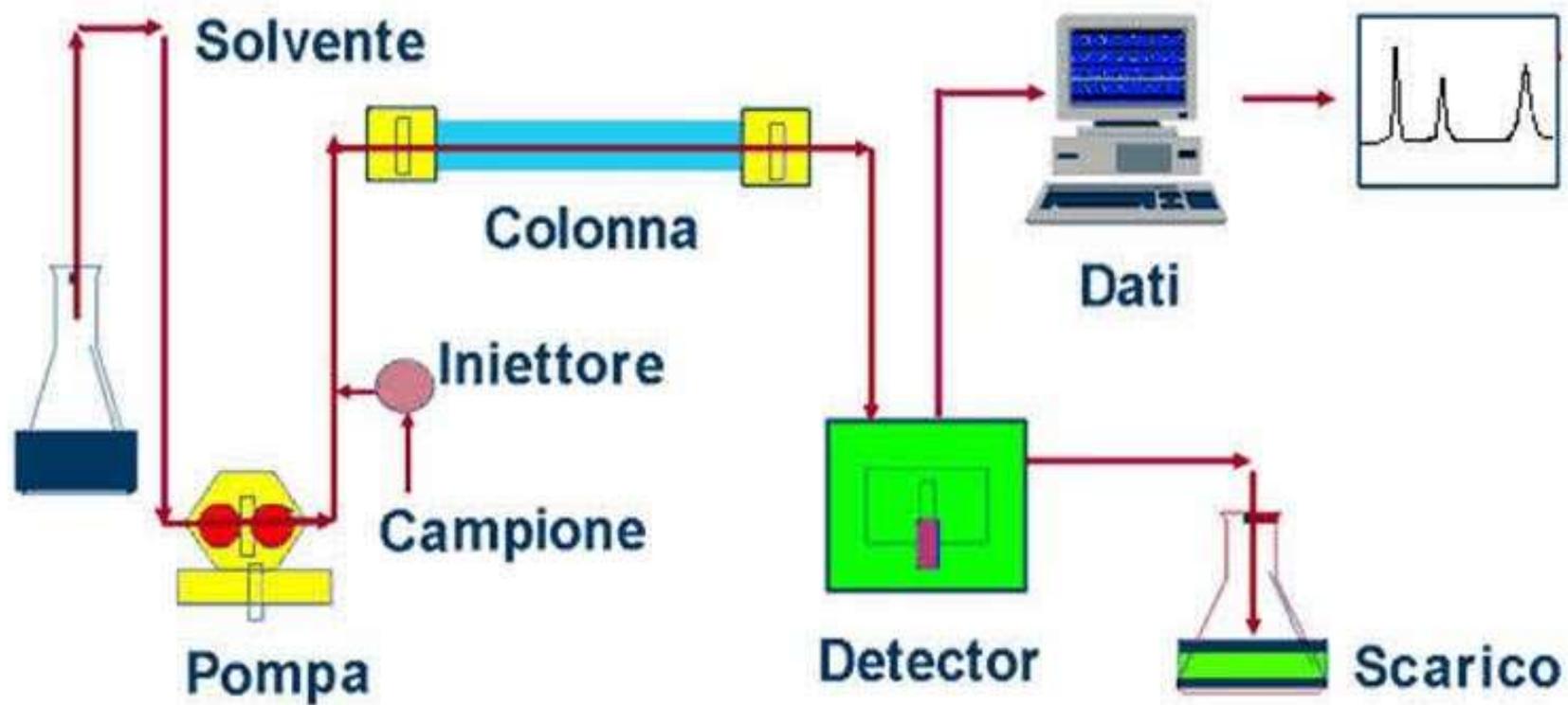
Rivelatore a spettrometria di massa

- accoppiamento ormai più che consolidato e di straordinaria potenza
- è l'unico rivelatore che fornisce informazioni strutturali
- è un sistema distruttivo

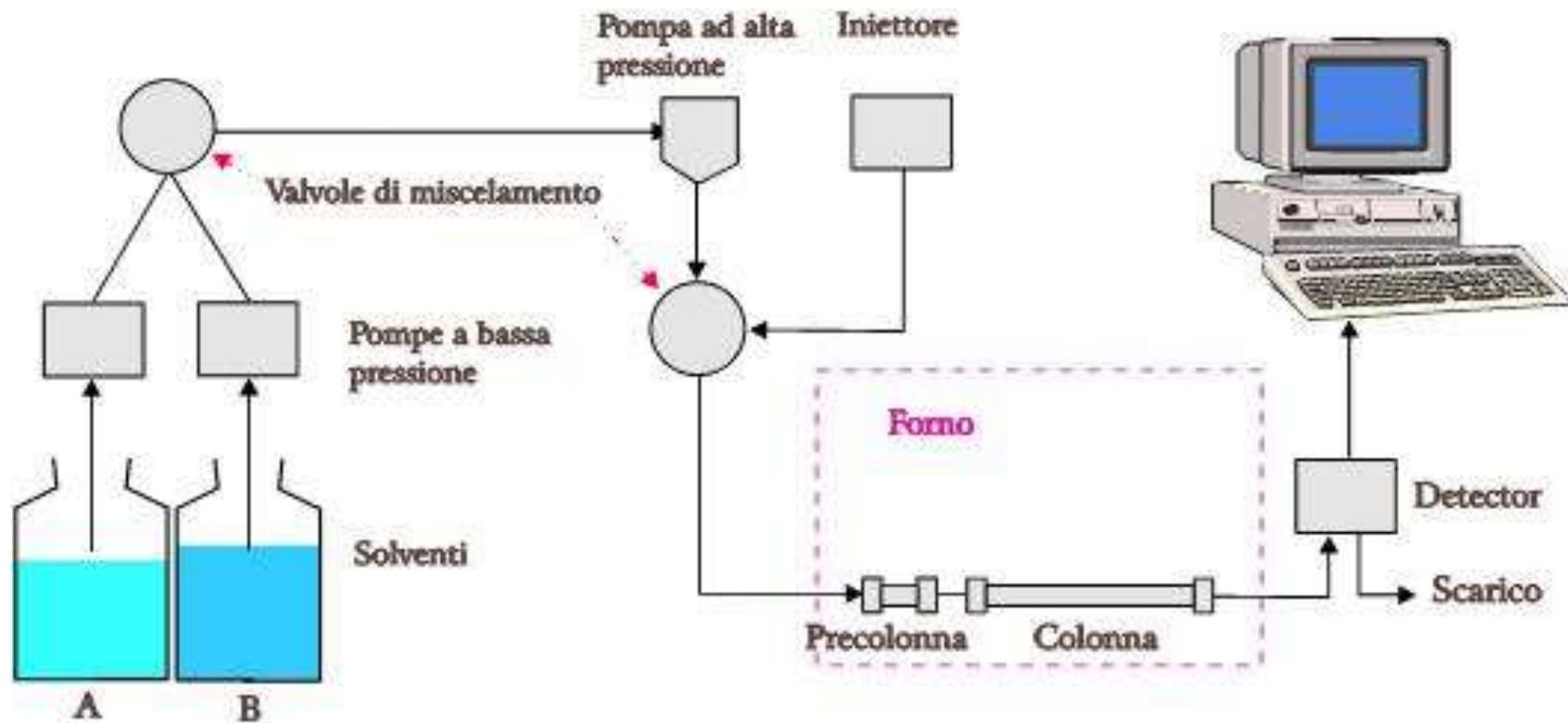


***Rivelatori
per HPLC***

SCHEMA DI UN HPLC



SCHEMA DI UN HPLC CON SISTEMA A GRADIENTE



Caratteristiche di un rivelatore ideale:

- Sensibilità adeguata al problema
- Buona stabilità e riproducibilità
- Risposta lineare al soluto, possibilmente per parecchi ordini di grandezza
- Tempi di risposta rapidi
- Risposta verso tutti i soluti, oppure risposta selettiva verso una o più classi di soluti

Un rivelatore universale per HPLC non è stato sviluppato!!!

- | | |
|------------------------|-----------------------|
| •Assorbimento UV | •Indice di rifrazione |
| •Fluorescenza | •Elettrochimico |
| •Conduttimetrico | •Assorbimento IR |
| •Spettrometro di massa | |

Rivelatori HPLC controllano in continuo una caratteristica dell'eluato della colonna in una cella a flusso connessa all'uscita della colonna

Si distinguono in:

❖ **Rivelatori 'bulk property' (rivelatori delle proprietà dell'eluato)**

- sensibili a proprietà specifiche dell'insieme soluto-solvente. Il segnale è proporzionale al prodotto del flusso per la concentrazione del soluto. Sono anche detti "flow sensitive"

❖ **Rivelatori 'solute property' (rivelatori delle proprietà del soluto)**

- sensibili a proprietà specifiche del soluto. Il segnale è proporzionale alla concentrazione del soluto "solute sensitive"

Rivelatore	LOD (ng)	Selettività	Utilizzabile in gradiente?
Assorbimento UV	0.1-1	selettivo	SI
Indice di rifrazione	100-1000	generale	NO
Fluorescenza	0.001-0.01	selettivo	SI
Elettrochimico	0.01-1	selettivo	NO
Conduttimetrico	0.5-1	selettivo	NO
Assorbimento IR	1000	selettivo	SI
Spettrometro di massa	0.0001-1	generale	SI

Rivelatore	Caratteristiche
Assorbanza (UV/Vis)	Il più comune rivelatore per composti che assorbono in UV/Vis. Buona sensibilità (ng)
Diode array	Aiuta identificazione dell'analita attraverso dati spettrali
Fluorescenza (FI)	Rivelatore specifico con grande sensibilità (pg)
Indice rifrazione (RI)	Universale, usato per composti senza cromoforo Polimeri, zuccheri, trigliceridi, acidi organici
Spettr. di massa (MS)	Eccellente sensibilità (fg) e specificità, definitiva identificazione di analiti
Elettrochimico	Per composti elettroattivi
Conducibilità	Per composti ionici
Radioattività	Specifico per composti marcati

Rivelatori fotometrici e spettrofotometrici

- Rivelatori HPLC più comuni
- Rispondono alla presenza di specie assorbenti nell'UV/visibile in un intervallo 190-700nm
- Risposta lineare in accordo con la legge di Lambert-Beer

$$A = \epsilon bc$$

Assorbanza →

← Concentrazione del campione (M)

Cammino ottico (cm)

Assorbività molare o coefficiente di estinzione ($M^{-1} \text{ cm}^{-1}$)

- non sensibili alla temperatura
- non sensibili al flusso
- ampio intervallo di linearità
- buona sensibilità

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
carbrossile	-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		220, 275	
nitrato	-ONO ₂	270	12

Scelta della lunghezza d'onda

La λ del rivelatore va scelta in base ad alcune considerazioni:

- massimizzare sensibilità e specificità
- il solvente della fase mobile può causare shifts in λ_{\max} (2-5 nm)
 - controllare l'assorbanza degli analiti nella fase mobile
- i solventi per fase mobile hanno cutoff nell'UV
- operando sotto la λ_{cutoff} può:
 - ridurre la sensibilità
 - introdurre rumore sulla linea di base

Rivelatori fotometrici e spettrofotometrici

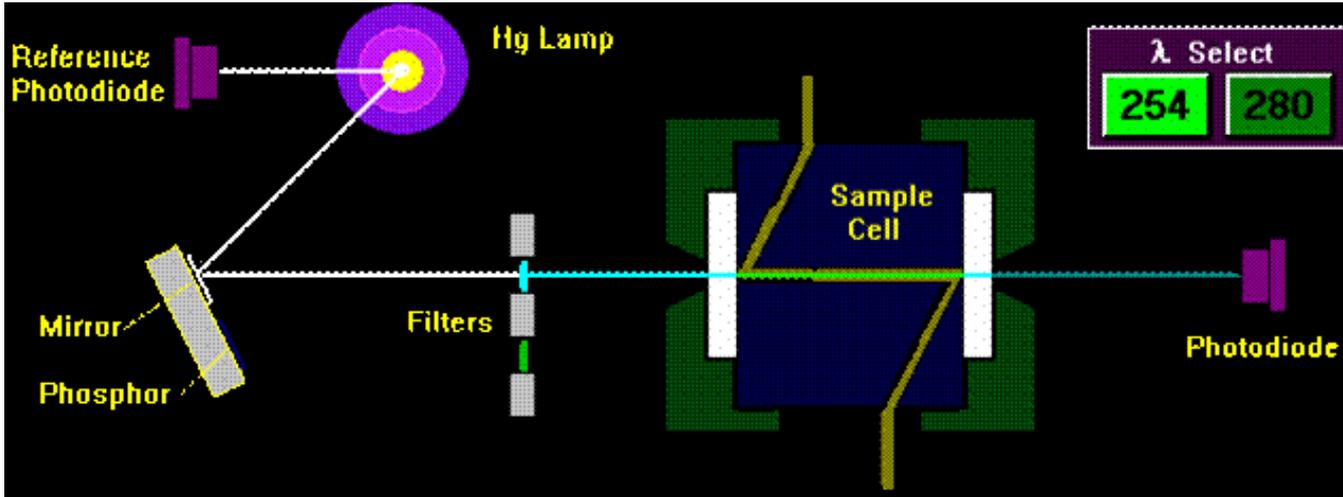
Fotometri: progettati per operare solo ad una o più lunghezze d'onda fisse (220, 254, 436 e 546nm)

Spettrofotometri: permettono letture ad ogni lunghezza d'onda nell'intervallo operativo dello strumento

Celle a flusso di piccolo volume (10 μ L o meno) dotate di finestre di quarzo per:

- Evitare fenomeni di rifrazione
- Per ridurre l'entità dei fenomeni di allargamento di banda e massimo cammino ottico
- Per ottenere elevate sensibilità

Rivelatori fotometrici



La radiazione proveniente da una lampada a vapori di Hg passa attraverso la cella del campione e arriva al fotodiode. L'intensità della luce assorbita è proporzionale alla concentrazione dell'analita.

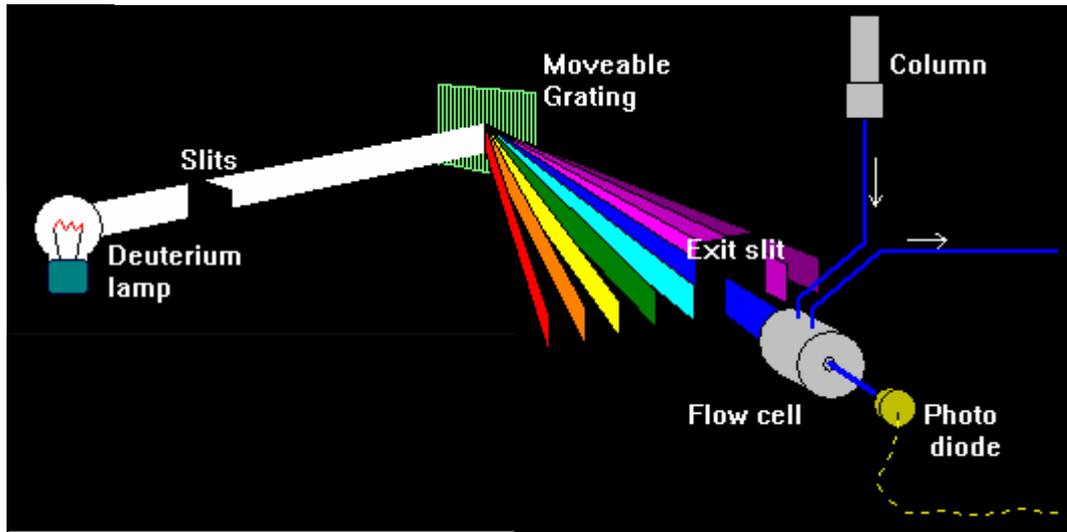
Vantaggi:

- Basso costo
- l'elevata intensità della radiazione della lampada a Hg permette di ottenere elevata sensibilità per composti che assorbono a 254 nm.

Svantaggi:

scarsa selettività dovuta alla necessità di lavorare a lunghezza d'onda fissa.

Rivelatori spettrofotometrici



Il rivelatore UV a lunghezza d'onda variabile è sicuramente quello maggiormente utilizzato in HPLC.

La luce UV proveniente dalla lampada a D_2 è scissa nelle sue componenti attraverso un monocromatore a gradini. L'intensità della luce trasmessa è misurata attraverso un fotodiode ed è proporzionale alla concentrazione dell'analita

Rivelatori spettrofotometrici

Caratteristiche:

- Monocromatore a reticolo
- Sorgente continua: lampada a deuterio per la regione UV e lampada al tungsteno-alogeno per la regione del visibile
- Ottiche a doppio raggio
- Elettroniche stabili con bassi livelli di rumore
- Possono essere programmati per selezionare una serie di lunghezze d'onda ottimali per la rivelazione
- Possibilità di registrare uno spettro UV completo relativo ad un picco di soluto a flusso fermo
- Capacità rapida di scansione delle λ per permettere la registrazione di uno spettro completo in una frazione di secondo senza fermare il flusso

Vantaggi:

- Versatilità: possibilità di selezionare lunghezze d'onda da 190 a 800 nm.
- Elevata sensibilità: potendo scegliere la lunghezza d'onda ottimale (max assorbanza) per un analita.
- Selettività: quando si hanno sovrapposizioni di picchi si può variare la I in modo tale da minimizzare l'assorbimento degli interferenti.
- Possibilità di utilizzare gradiente di eluizione, scegliendo una I alla quale la miscela solvente non assorbe.

Rivelatori fotometrici e spettrofotometrici

Fotometri

Più sensibili, più economici e più robusti degli spettrofotometri

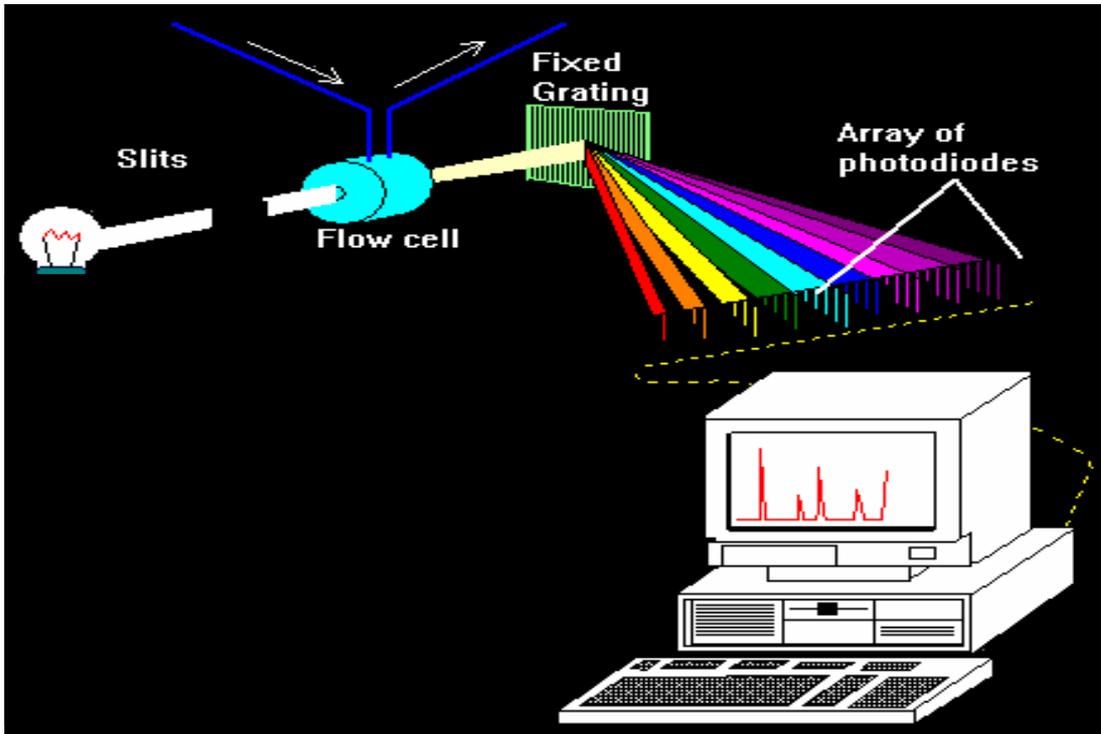
Risultano adatti a lavori di routine qualora sia sufficiente la rivelazione a 254nm o ad altre lunghezze d'onda fisse

Spettrofotometri

Permettono di “accordarsi” rispetto alle lunghezze d'onda più adatte a cui lavorare sia per massimizzare la sensibilità rispetto ad un particolare soluto sia per evitare la risposta di rispetto ad altri.

Con tali strumenti è possibile effettuare misurazioni fino a 190nm, pertanto si possono rivelare composti poco assorbenti o specie sature.

Rivelatori a serie di diodi



Il rivelatore UV a λ diode array è quello che attualmente viene sempre più utilizzato in HPLC.

La luce UV proveniente dalla lampada a D_2 passa attraverso una cella a flusso prima che venga scissa nelle sue componenti attraverso un monocromatore a gradini. L'intensità della luce trasmessa ad ogni λ è misurata simultaneamente attraverso un array di alcune centinaia di fotodiodi. Un pc può processare, registrare e mostrare gli spettri in continuo durante l'analisi. Inoltre si possono registrare i cromatogrammi a ciascuna λ .

Vantaggi e svantaggi

Permette la registrazione in tempo reale di spettri UV o UV/visibile completi per tutti i componenti al momento dell'eluizione dalla colonna

Presenta gli stessi vantaggi in termini di versatilità, sensibilità e selettività del rivelatore a λ variabile.

Fornendo anche gli spettri degli analiti, permette di effettuare anche il riconoscimento dei composti analizzati.

Svantaggio: è più costoso rispetto al rivelatore a λ variabile.

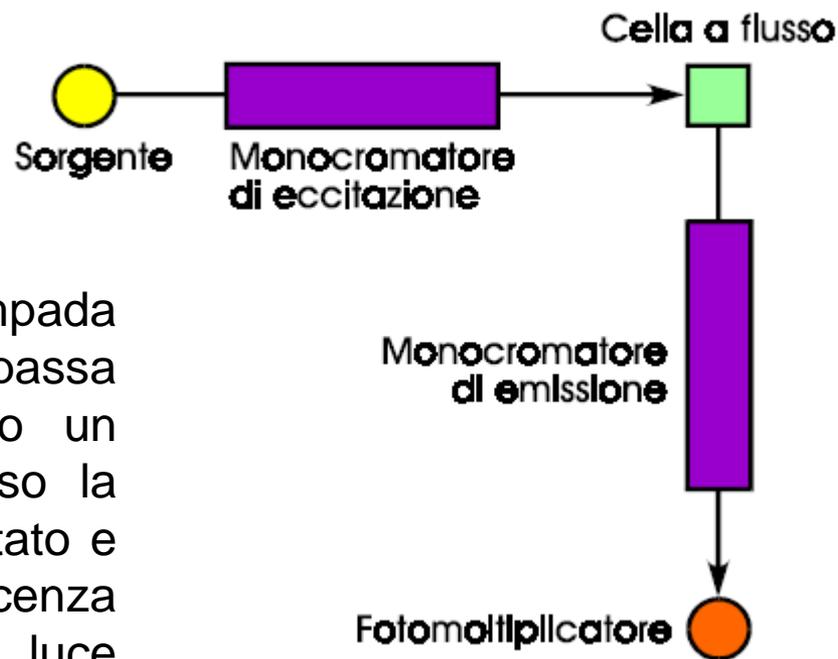
Rivelatore spettrofotometrico IR

- sensibilità tipica: 1 ppm
- applicabilità limitata dall'assorbanza della fase mobile nel range spettrale infrarosso

Rivelatore a fluorescenza

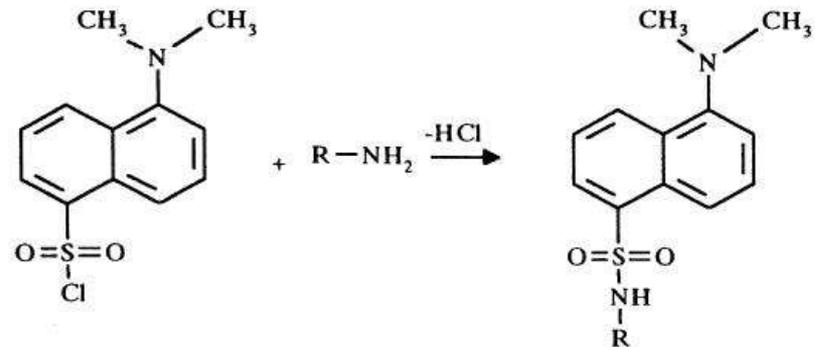
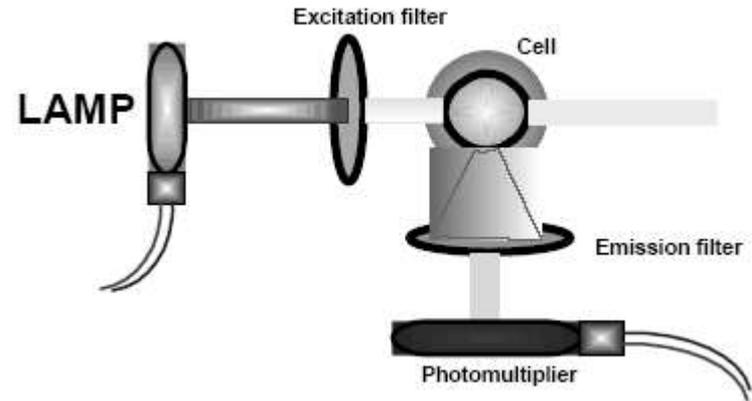
Un composto fluorescente assorbe un fotone (es., transizione elettronica $\pi - \pi^*$) ed emette un altro fotone a lunghezza d'onda maggiore

La luce UV proveniente da una lampada (filtrata alla opportuna λ) o da un laser, passa attraverso la cella a flusso. Quando un campione fluorescente passa attraverso la cella, assorbe la radiazione, viene eccitato e quindi emetterà la radiazione di fluorescenza ad una maggiore λ . L'intensità della luce emessa viene misurata attraverso un fotomoltiplicatore posto a 90° rispetto al fascio incidente.

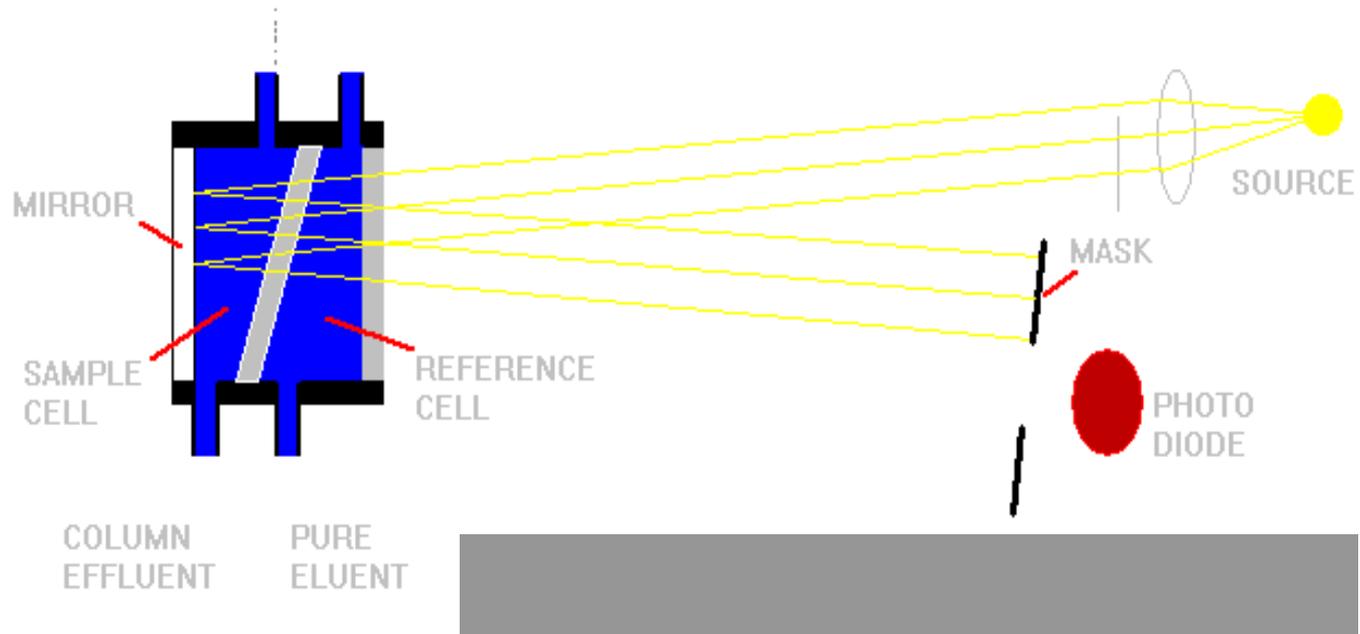


Rivelatore a fluorescenza

- sensibilità 1000 volte superiore rispetto all'assorbimento UV-visibile
- sensibilità tipica: 0.01 ppb
- limitato alla rivelazione di composti fluorescenti, ma è possibile la derivatizzazione
- è un sistema non distruttivo (tranne che con derivatizzazione)

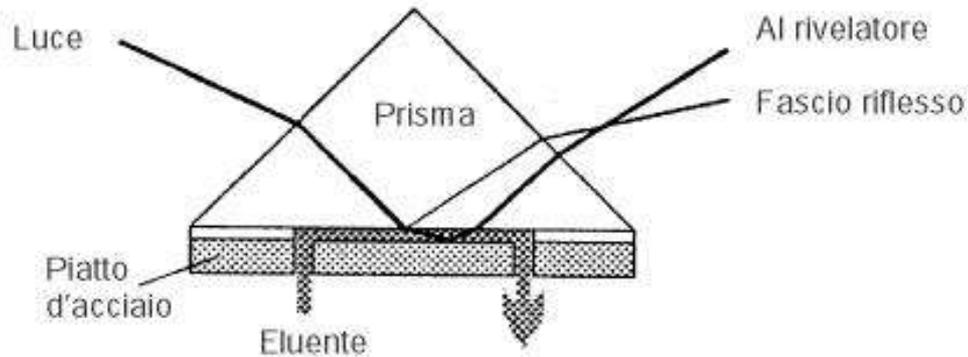


Rivelatore a indice di rifrazione



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

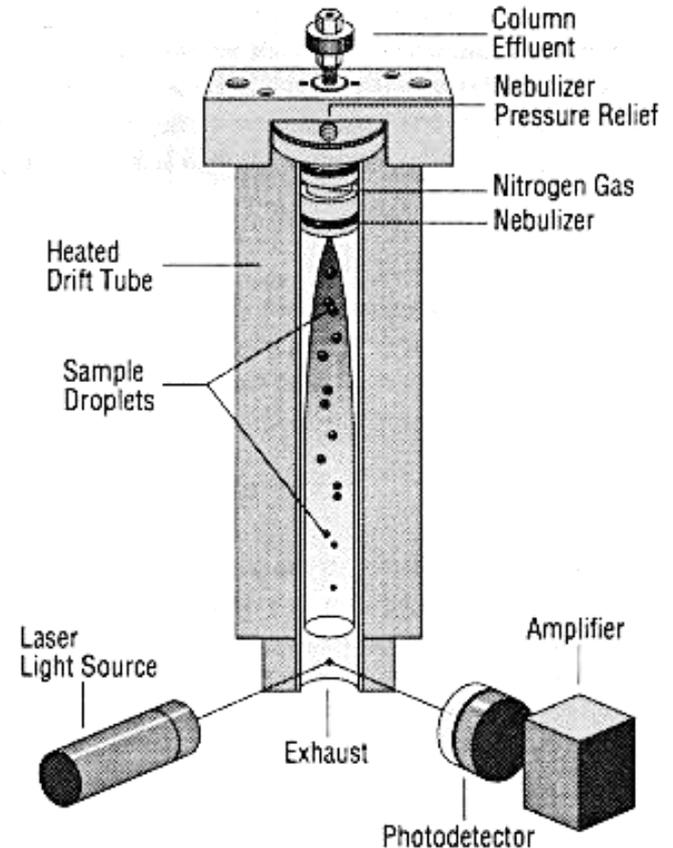
Rivelatore a indice di rifrazione



- basato sulla misura dell'indice di rifrazione dell'eluato (tipico rivelatore *bulk*)
- non adatto con eluizione in gradiente
- sensibilità tipica: 0. 1 ppm
- completamente aspecifico
- necessita di termostatazione accuratissima
- si usa per composti non attivi nel range UV-visibile (zuccheri)
- è un sistema non distruttivo
- Meno selettivo di altri detector poiché l'indice di rifrazione è meno specifico per le varie sostanze e può essere influenzato anche da soluti presenti nella fase mobile.

Rivelatore evaporative light scattering

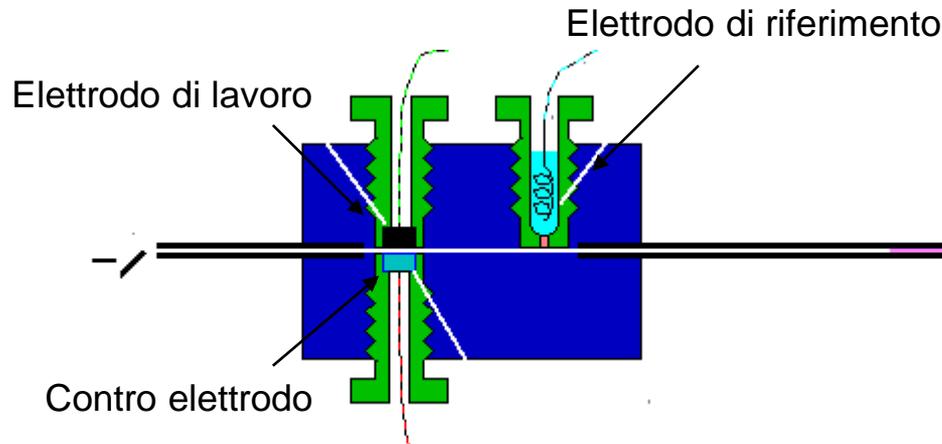
- l'eluato è trasformato in aerosol, desolvato e mandato in una cella nella quale si misura lo scattering della luce
- necessita di fasi mobili volatili
- ideale per composti ad alto PM, zuccheri e acidi non volatili
- è un sistema distruttivo



Rivelatore elettrochimico

- tra i più sensibili (sensibilità tipica: 1 ppt, femtomoli in modalità amperometrica)
- possibilità di misura in
 - voltammetria (per applicazioni particolari)
 - amperometria
 - coulometria (raro)
 - conducimetria (utilizzato in cromatografia ionica)
- generalmente poco adatto all'eluizione in gradiente

Rivelatore elettrochimico amperometrico



Questo rivelatore permette l'analisi di composti elettroattivi che possono essere cioè ossidati o ridotti. Ad esempio possono essere elettrochimicamente ossidati fenoli, ammine, mercaptani, perossidi, purine e alcuni eterocicli. Mentre possono essere elettrochimicamente ridotti aldeidi, chetoni e nitrocomposti.

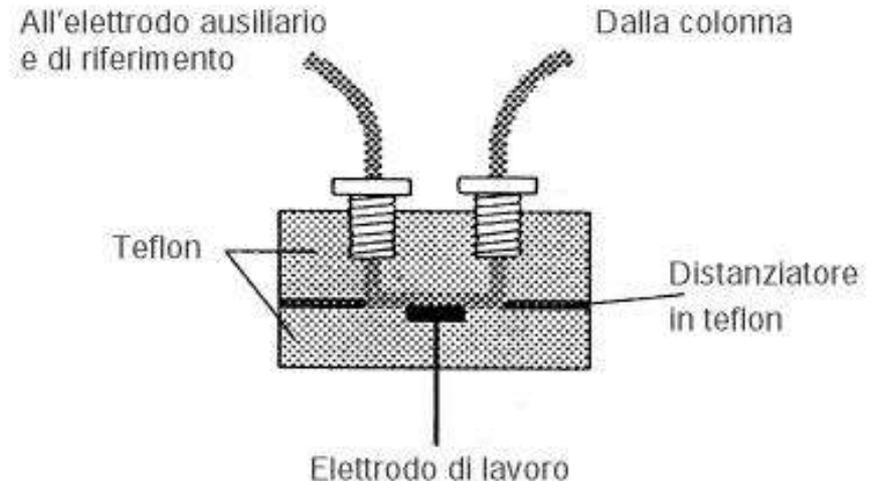
Un potenziale costante viene mantenuto tra l'elettrodo di lavoro e l'elettrodo di riferimento e la corrente, prodotta dalla reazione di ossidazione o riduzione dell'analita, è misurata tra l'elettrodo di lavoro e il contro elettrodo ed è proporzionale alla concentrazione di analita nel campione. Per soluti ossidabili si utilizzano elettrodi in Cu o glassy carbon, mentre per specie riducibili si utilizzano in genere elettrodi di Hg.

Poiché sono necessari eluenti conduttivi, questo tipo di rivelatori è utilizzato nelle separazioni a fase inversa impiegando solventi acquosi o polari contenenti elettroliti disciolti, generalmente dei tamponi.

Rivelatore elettrochimico amperometrico

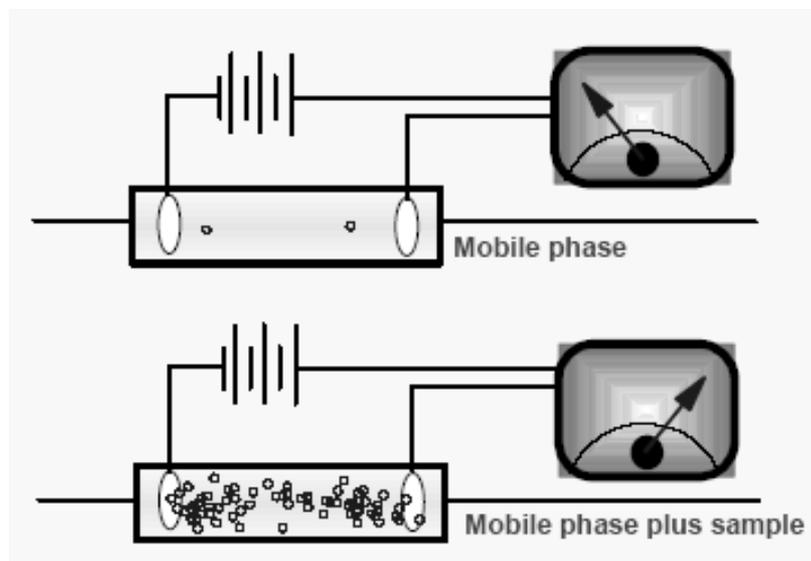
- basata sulla misura della corrente risultante da un'elettrolisi (ossidazione o riduzione) di molecole di analita alla superficie di un elettrodo
- il più sensibile tra i rivelatori per LC (fino a femtomoli per alcune applicazioni \Rightarrow dopamina)
- utilizzabile per tutte le sostanze elettroattive nel range di potenziale dell'elettrodo di lavoro impiegato

- possibile avvelenamento degli elettrodi
- utilizzo non semplice
- è un sistema parzialmente distruttivo



Rivelatore elettrochimico: conducimetria

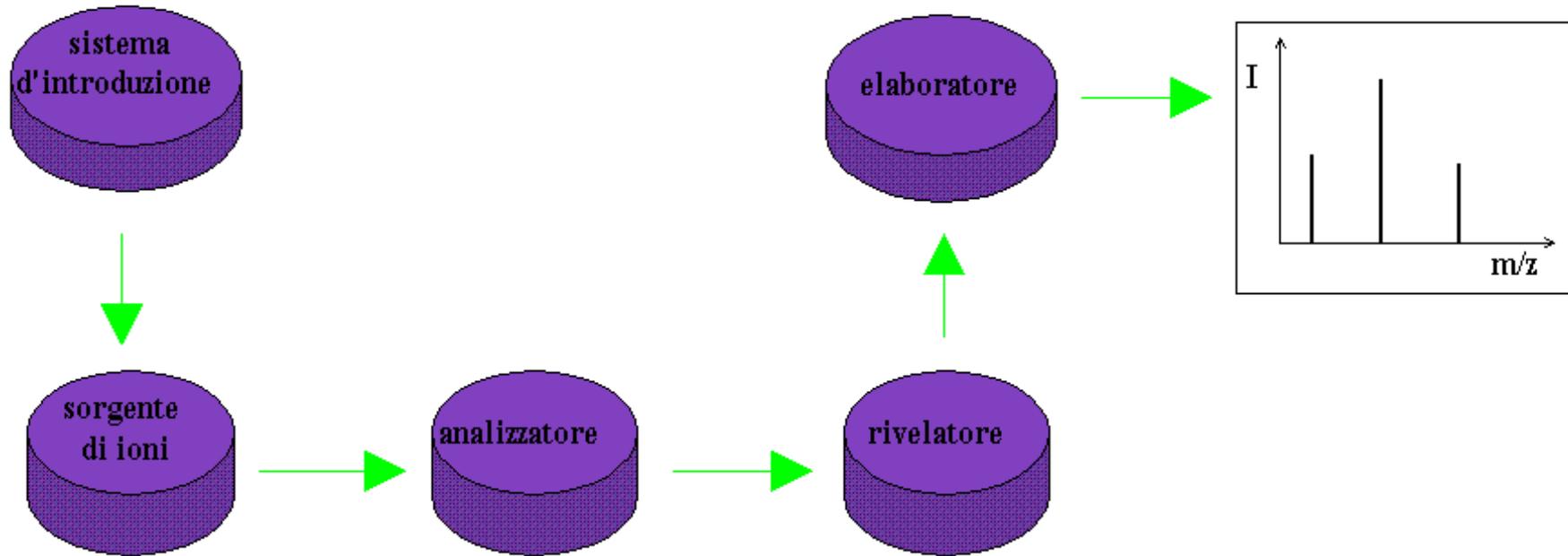
- basato sulla misura della corrente elettrica trasportata da ioni disciolti in un campo elettrico
- utile per sostanze ioniche o ionizzabili
- rivelatore più comune in cromatografia ionica
- sensibilità inferiore rispetto al rivelatore amperometrico
- utilizzo molto semplice
- è un sistema non distruttivo



Rivelatore a spettrometria di massa

La spettrometria di massa è una tecnica analitica in grado di ionizzare atomi e/o molecole e quindi di separarli e rivelarli come ioni gassosi in base al rapporto massa/carica (m/z). Il suo impiego consente di identificare composti incogniti (organici, inorganici e biomolecole), di ottenere informazioni strutturali e, mediante l'accoppiamento con altre tecniche analitiche quali la gascromatografia e la cromatografia liquida, di effettuare un'analisi quantitativa di analiti in miscele complesse. La spettrometria di massa si basa sulla ionizzazione di una molecola per assorbimento di energia (elettrica, termica, meccanica ed elettromagnetica).

Diagramma a blocchi di un generico spettrometro di massa.



Il campione, immesso nello spettrometro dal dispositivo d'introduzione viene ionizzato nella sorgente dando luogo ad un fascio di ioni positivi o negativi che vengono separati dall'analizzatore di massa in funzione al rapporto m/z e rivelati da un detector che trasforma il fascio ionico in un segnale elettrico; quest'ultimo viene registrato ed elaborato da un computer in uno spettro di massa

Gli analizzatori

Negli spettrometri di massa la funzione degli analizzatori è quella di separare gli ioni in base al rapporto carica/massa.

Sulla base della dipendenza dal tempo di uno o più parametri del sistema analizzatore sono stati suddivisi in due gruppi:

1. analizzatori statici:

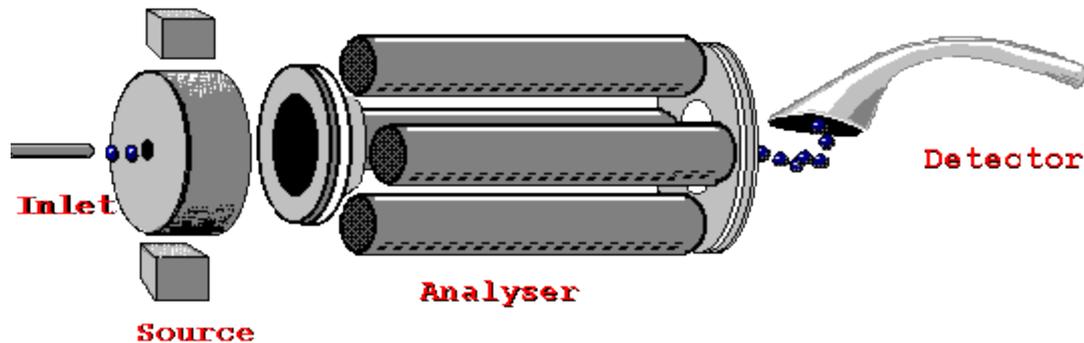
- *settori magnetici* a semplice o doppia focalizzazione; (originariamente i campi elettrici e magnetici venivano mantenuti costanti rispetto al tempo). Sono noti anche come analizzatori di quantità di moto.

2. analizzatori dinamici: a loro volta possono essere suddivisi in diversi sottogruppi:

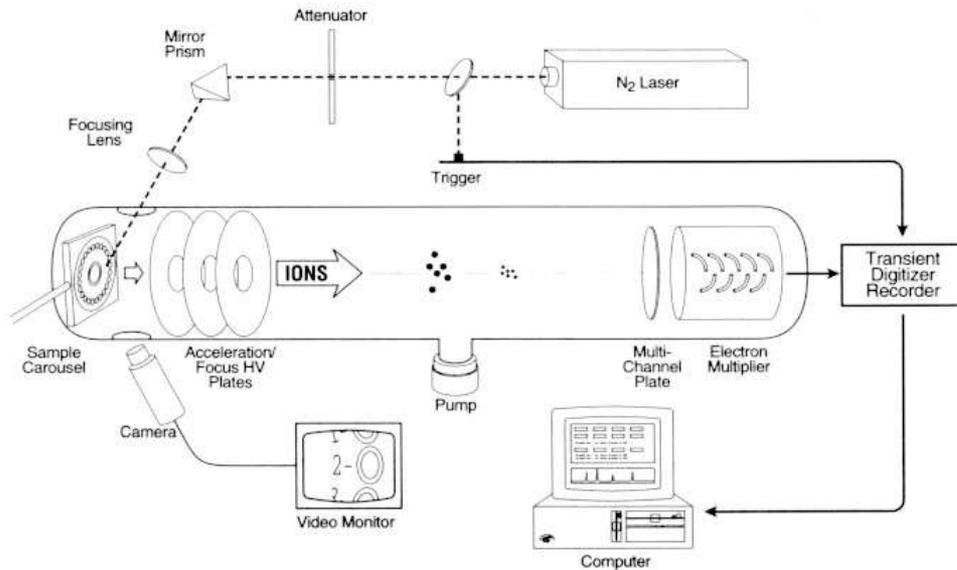
- analizzatori a stabilità di percorso (*quadropolo*)
- analizzatori a tempo di volo (*TOF=Time Of Flight*)
- analizzatori a trappola ionica (ion trap e FT-ICR= Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance)

Caratteristiche del quadrupolo

- semplicità e la compattezza
- elevata velocità di scansione
- elevata sensibilità
- sufficiente risoluzione
- possibilità di effettuare rapide inversioni di polarità degli elettrodi



Analizzatori a tempo di volo (TOF)



Il principio essenziale dell'analizzatore a tempo di volo è che se gli ioni con differenti masse sono accelerati alla stessa energia cinetica, ciascuno ione acquista una velocità caratteristica che dipende dal suo valore di m/z .

Il tempo di volo presenta altri **vantaggi** oltre alla sua *semplicità* e *robustezza*:

- *la velocità*: l'intero spettro di massa è ottenuto in ogni singolo ciclo di misura senza necessità di scansione di voltaggi e correnti ed i tempi di volo richiedono da 1 a 30 μs ;
- *la sensibilità*: poiché gli ioni attraversano pochi elementi ottici, la loro trasmissione dal punto di ionizzazione al detector è usualmente più alta di qualsiasi altro analizzatore (si potrebbe arrivare ad analizzare quantità femtomolari);
- *un intervallo di masse da analizzare praticamente illimitato* (potrebbero essere rilevati ioni a singola carica fino a 1Mda).

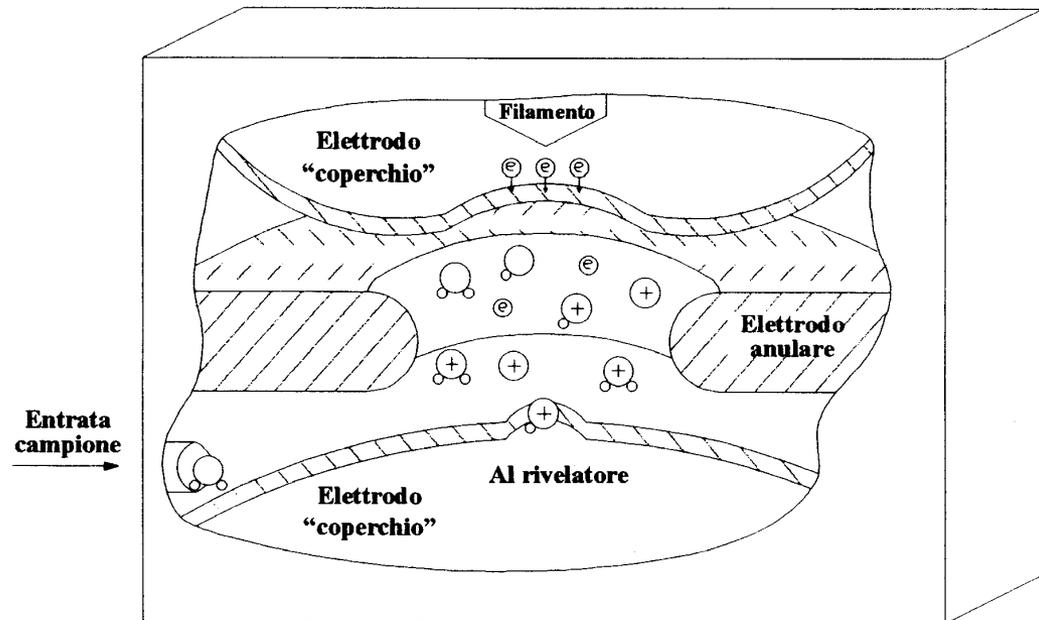
Analizzatori a trappola ionica

Una trappola ionica è un dispositivo in cui ioni gassosi possono essere trattieneuti nel suo interno per prolungati periodi di tempo mediante l'applicazione di campi elettrici e/o magnetici.

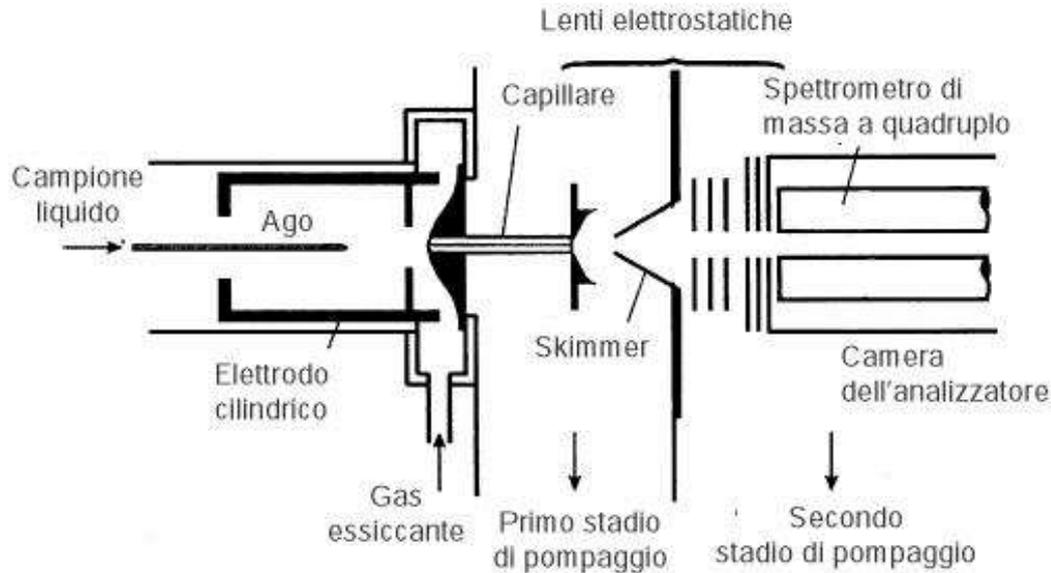
Sono state studiate diversi tipi di trappole, ma quelle più comuni sono due:

1. trappola ionica quadrupolare (più semplice)
2. trappola ionica a risonanza di ciclotrone (più complessa)

E' simile al quadrupolo, ma in esso il filtro a quadrupolo e' sferico e trattiene tutti gli ioni che vengono rilasciati progressivamente verso il rivelatore variando il campo elettrico.



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