

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI TERAMO

**Intensificazione sostenibile delle produzioni
ortofrutticole di qualità - 1° anno**

**Elementi di chimica analitica del
suolo e dei fitofarmaci (4 CFU)**

Prof. Marcello Mascini

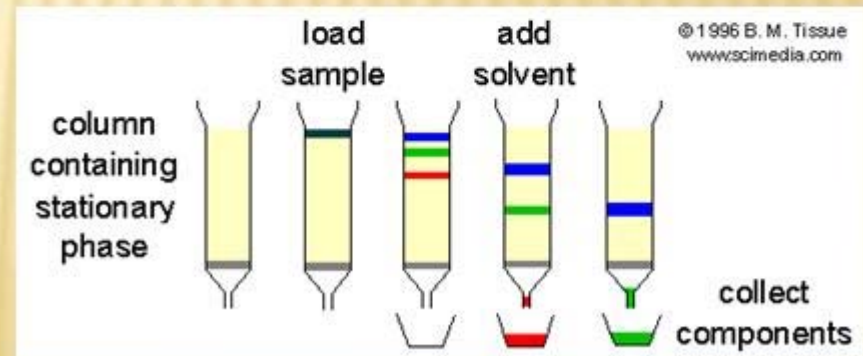
mmascini@unite.it

LA CROMATOGRAFIA



- ✘ Mikhail S. Tsvett, botanico russo, separò su di una colonna i pigmenti delle foglie verdi (1906);

✓ la separazione era visualizzata dalla comparsa di bande colorate, da cui il nome CROMATOGRAFIA che deriva infatti dal greco e significa “scrittura con il colore”



Descrizione generale della cromatografia

I metodi cromatografici sono accomunati dalla separazione di sostanze presenti in miscela attraverso l'uso di una **fase stazionaria** e di una **fase mobile**.

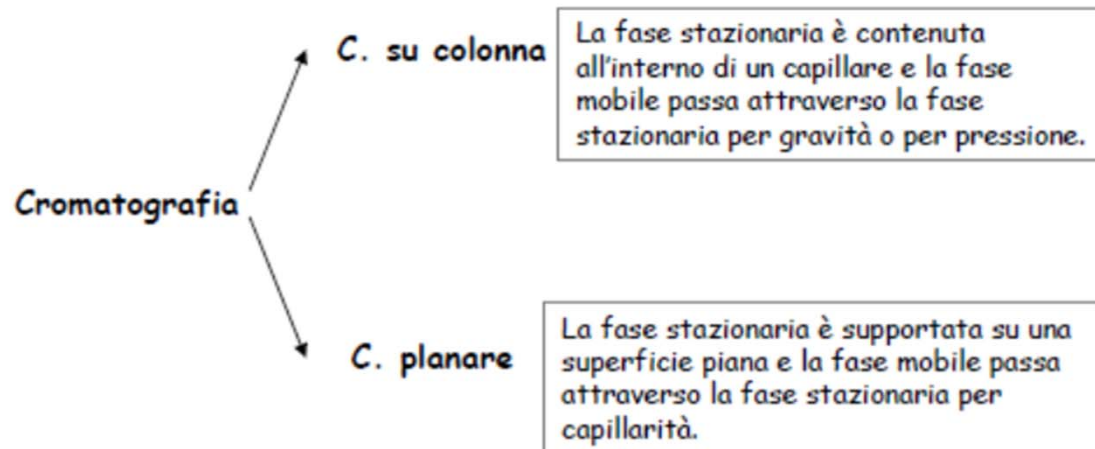
I componenti sono trasportati lungo la fase stazionaria dal flusso della fase mobile (**Eluizione**).

La diversa ripartizione tra queste due fasi determina la separazione dei componenti.

Fase stazionaria: fase fissa in una determinata posizione (o colonna o superficie planare)

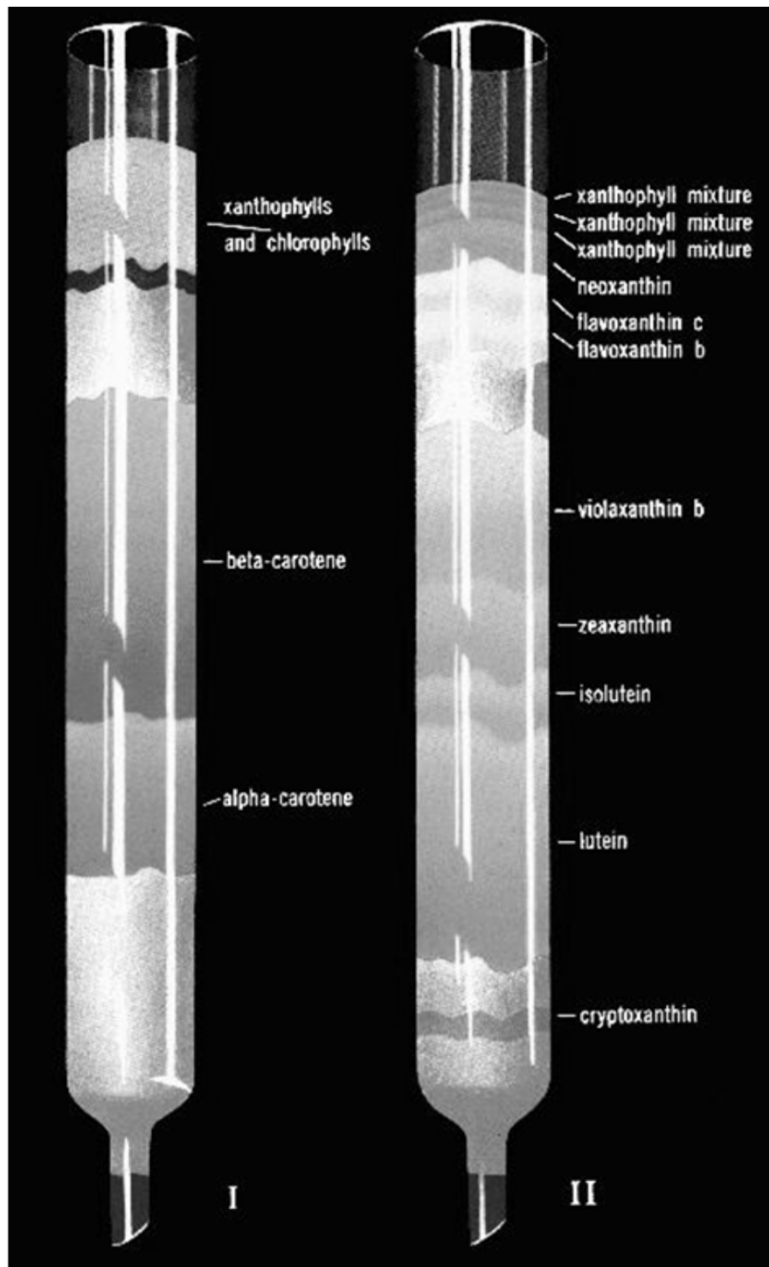
Fase mobile: fase che si muove lungo, o attraverso la fase stazionaria, trasportando con sé l'analita

Classificazione

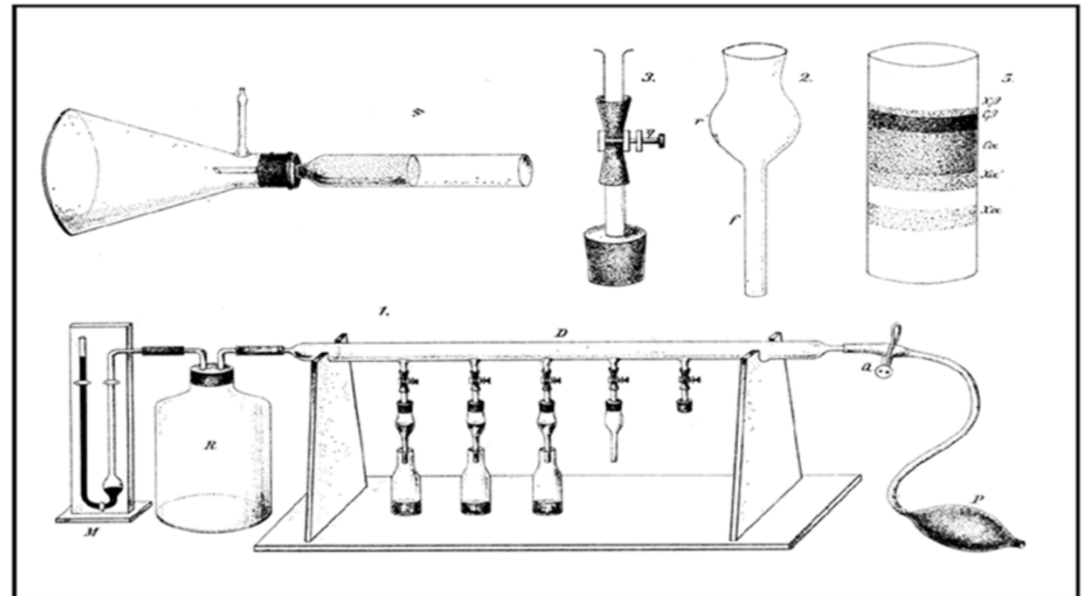


Classificazione generale	Metodo specifico	Fase stazionaria	Tipo di equilibrio
Cromatografia liquida (LC), fase mobile: liquido	Liquido-liquido	Liquido adsorbito su solido	Ripartizione tra liquidi non miscibili
	Liquido, a fase legata	Specie organiche legate a superficie solida	Ripartizione tra liquido e superficie legata
	Liquido-solido	Solido	Adsorbimento
	Scambio ionico	Resina a scambio ionico	Scambio ionico
	Esclusione dimensionale	Liquido in interstizi di solido polimerico	Ripartizione/setacciamento
Gas-cromatografia, Fase mobile: gas	Gas-liquido	Liquido adsorbito su solido	Ripartizione tra gas e liquido
	Gassoso, a fase legata	Specie organiche legate a superficie solida	Ripartizione tra gas e superficie legata
	Gas-solido	solido	Adsorbimento

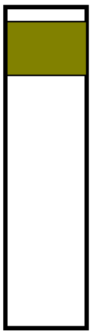
Cromatografia



La nascita della cromatografia si deve al botanico russo Mikhail Semenovich Cvet (Tsvett), che per primo la utilizzò nel 1906 per separare i pigmenti naturali contenuti in estratti vegetali.



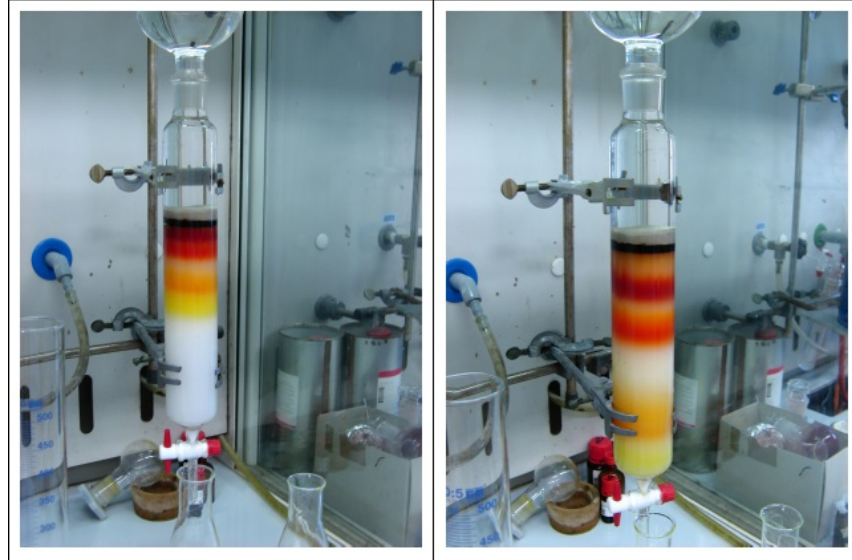
Cromatografia liquida: Dal 1906 ad oggi



La miscela di pigmenti,
prima di aggiungere
l'eluente

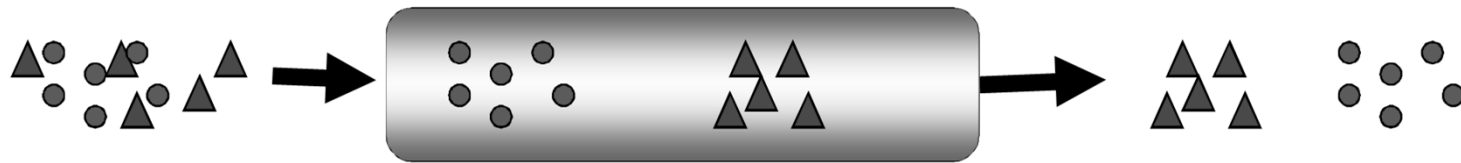


Dopo aver aggiunto l'eluente,
i componenti della miscela si
sono separati.



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.

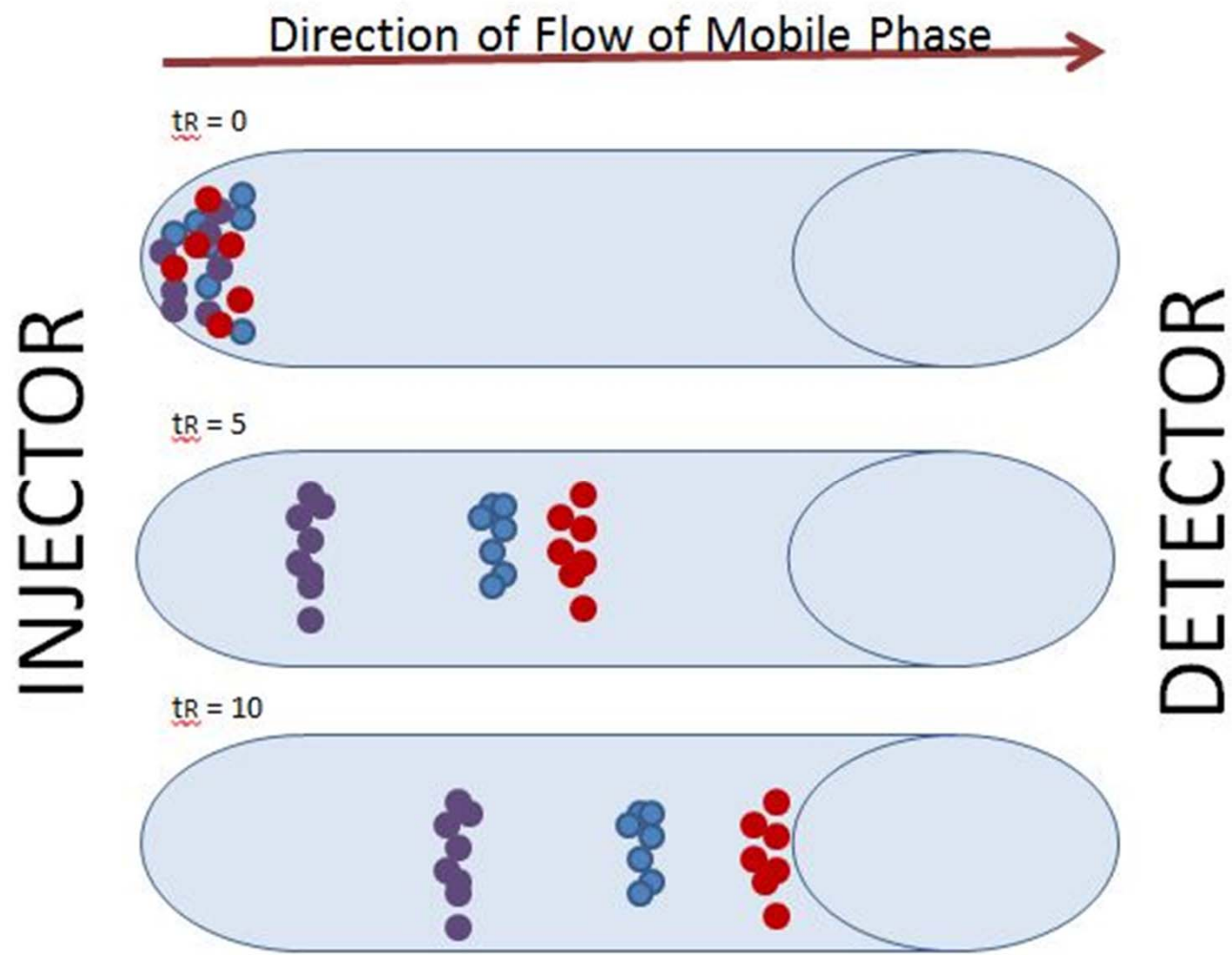


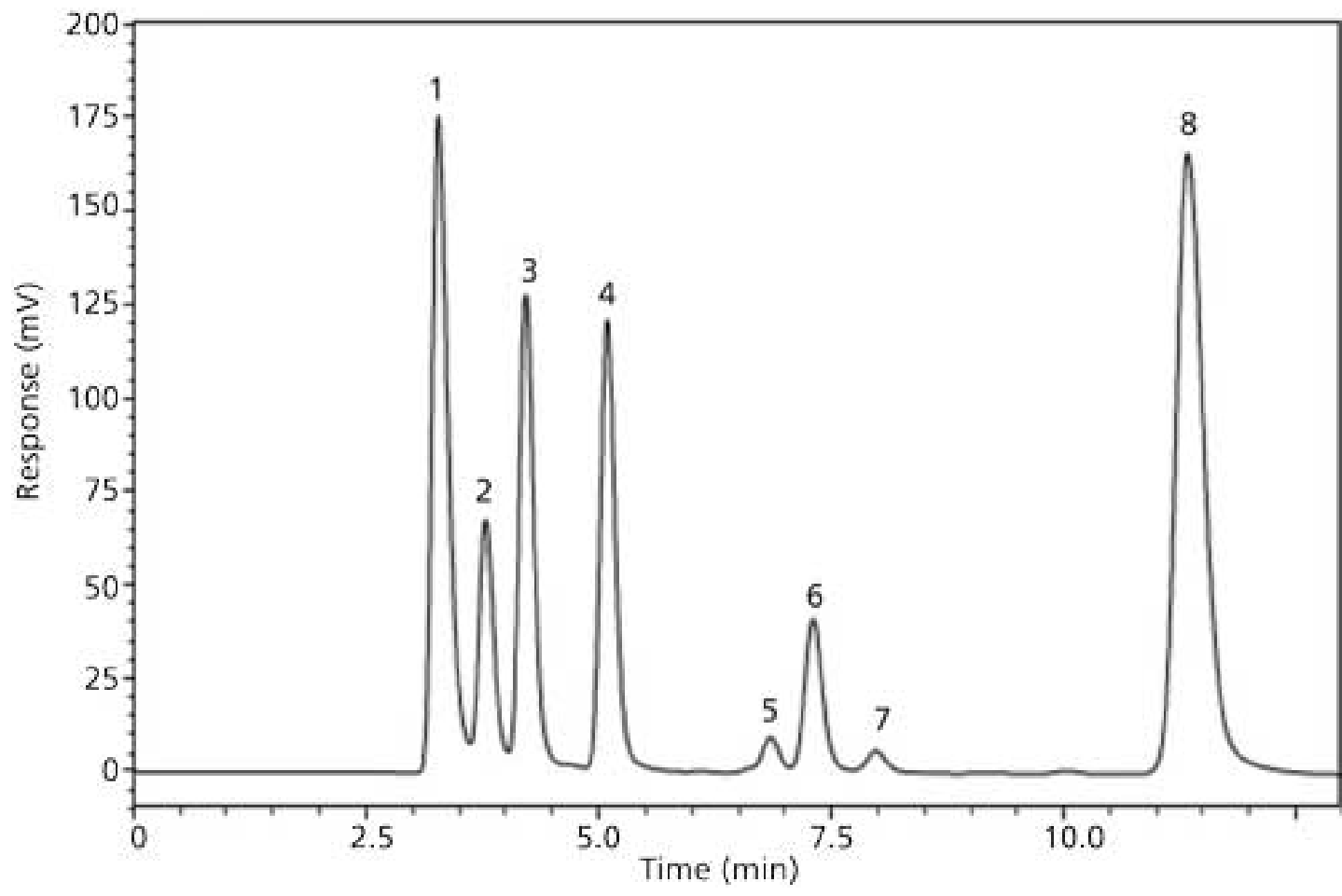
Cromatografia di Adsorbimento

Cromatografia di ripartizione

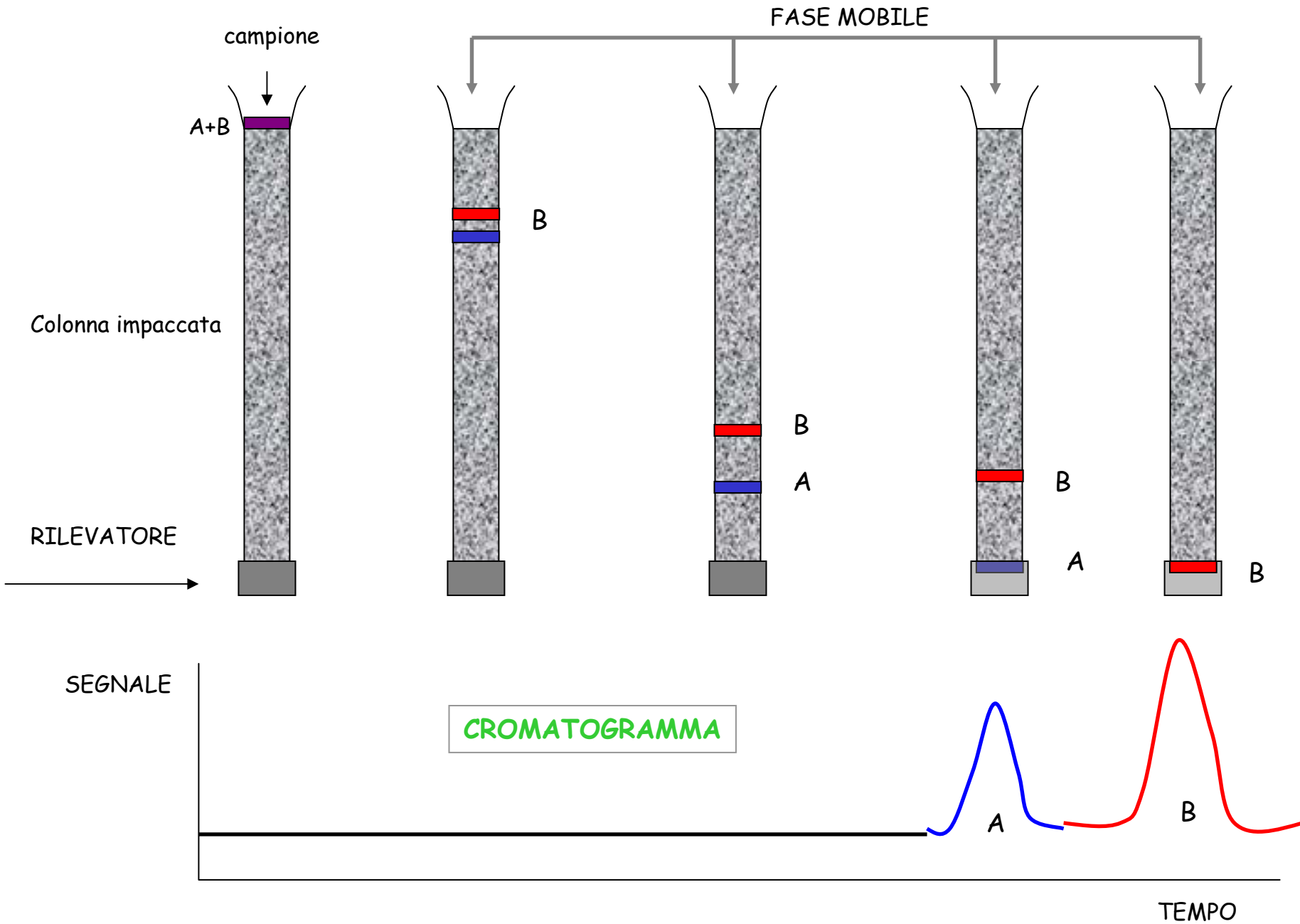
Cromatografia di esclusione
dimensionale

Cromatografia a scambio ionico

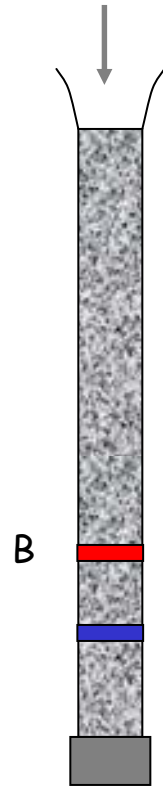




Cromatografia di eluizione



FASE MOBILE

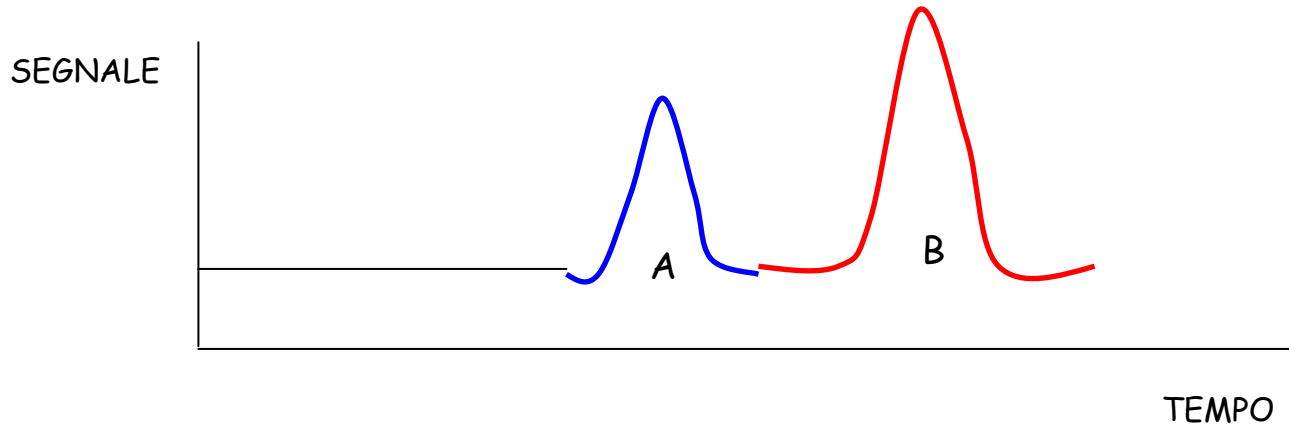


1. Il movimento lungo la colonna avviene solo quando il soluto si trova nella fase mobile
2. La velocità dipende quindi dal tempo che il soluto trascorre nella fase mobile

La frazione di tempo è piccola per composti molto **trattenuti (B)**, mentre è **grande per composti poco trattenuti (A)**.

La ripartizione di un soluto tra fase stazionaria e fase mobile determina quindi i tempi di eluizione, e la possibilità di separare miscele complesse.

CROMATOGRAMMA



Informazioni QUALITATIVE
Informazioni QUANTITATIVE

POSIZIONE DEI PICCHI

DIMENSIONI (ALTEZZA E AREA) DEI PICCHI



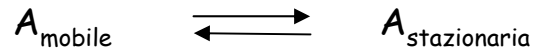
NECESSITA' DI AVERE PICCHI BEN DEFINITI

Velocità di migrazione dei soluti

Dalla velocità relativa di 2 o più molecole da separare dipende l'efficacia della colonna

La velocità dipende dai rapporti di ripartizione dei soluti nella FM e FS

Rapporto di ripartizione o coefficiente di ripartizione



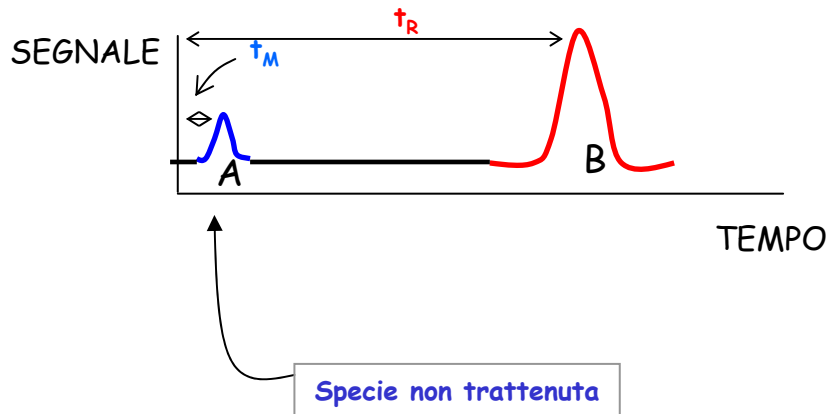
$$K = C_S / C_M$$



$$C_S = K C_M$$

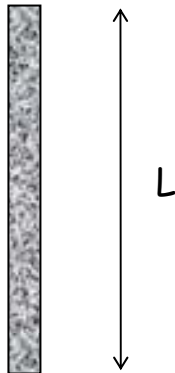
Questa proporzionalità è valida in un ampio intervallo di concentrazione, ciò determina l'indipendenza del tempo di eluzione dalla concentrazione

Tempo morto e tempo di ritenzione



t_M : tempo necessario ad una specie non trattenuta per attraversare una colonna

t_R : tempo che passa tra l'iniezione di un campione in colonna e la comparsa di un picco sul cromatogramma



Velocità media lineare del soluto e della fase mobile

$$v = L / T_R$$

$$u = L / T_M$$

Coefficiente di ripartizione e velocità di migrazione

$$K_A = C_S / C_M$$

$$V = u \times \text{frazione di tempo che il soluto trascorre in FM}$$



$$v = u \times \frac{\text{numero di moli di soluto in fase mobile}}{\text{numero di moli totali di soluto}}$$

$$v = u \times \frac{C_M V_M}{C_M V_M + C_S V_S} = u \times \frac{1}{1 + C_S V_S / C_M V_M}$$

$$C_S = K_A C_M$$

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

Fattore di capacità, indice della velocità di migrazione del soluto

➤ Parametro che può essere calcolato *sperimentalmente*

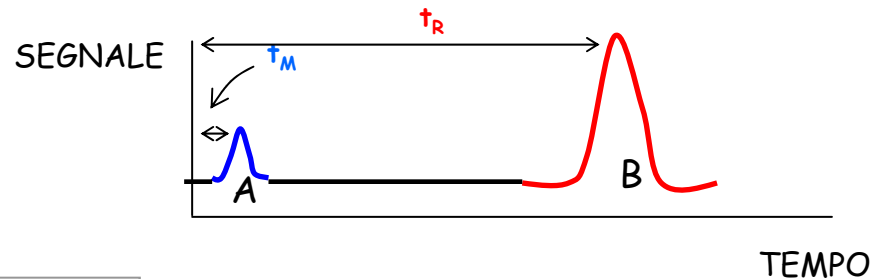
$$k'_A = \frac{K_A V_S}{V_M}$$

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

$$\rightarrow v = u \times \frac{1}{1 + k'_A} \rightarrow L/T_R = L/T_M \times \frac{1}{1 + k'_A} \rightarrow k'_A = \frac{t_R - t_M}{t_M}$$

$$u = L/T_M$$

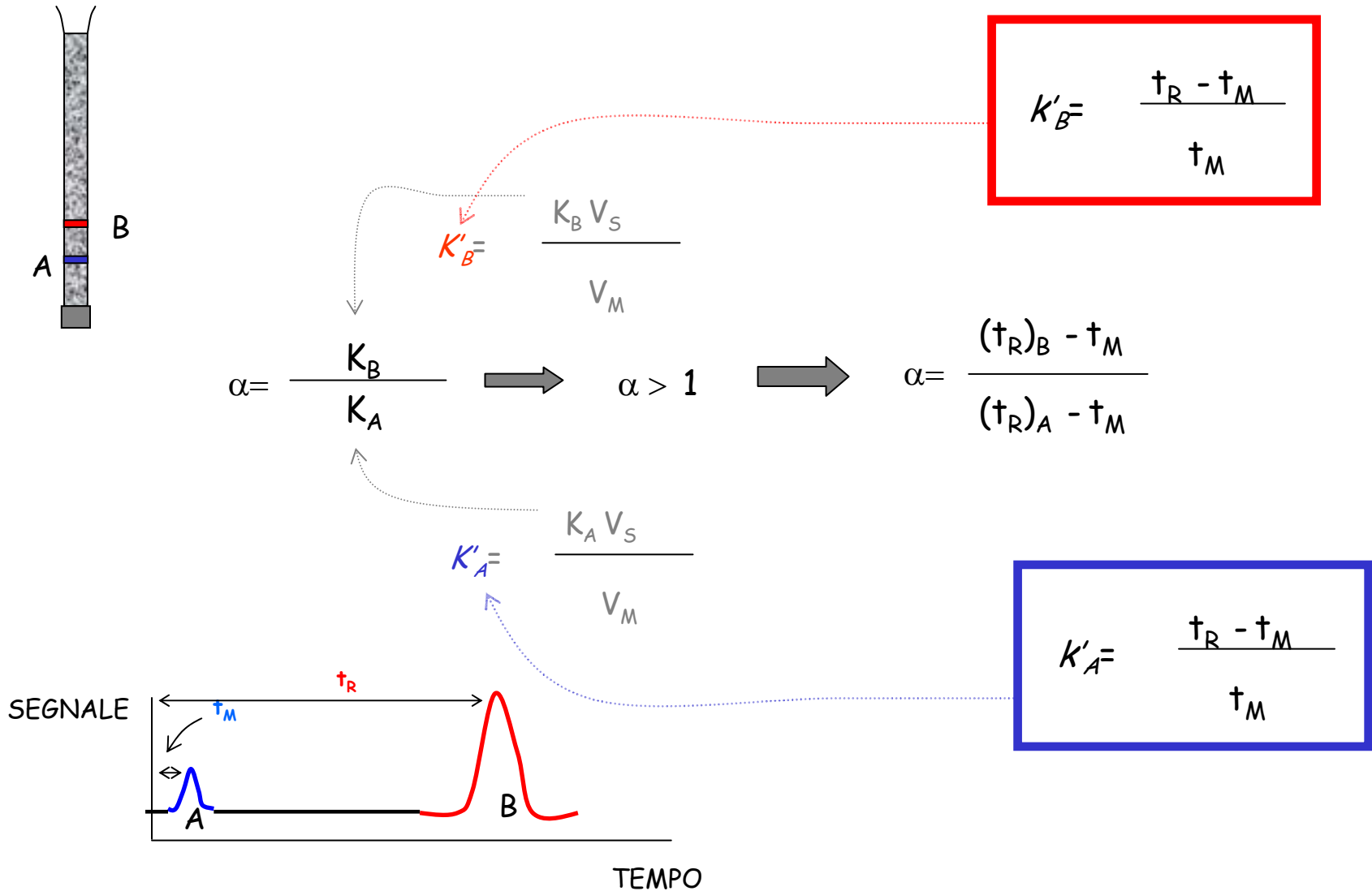
$$v = L/T_R$$



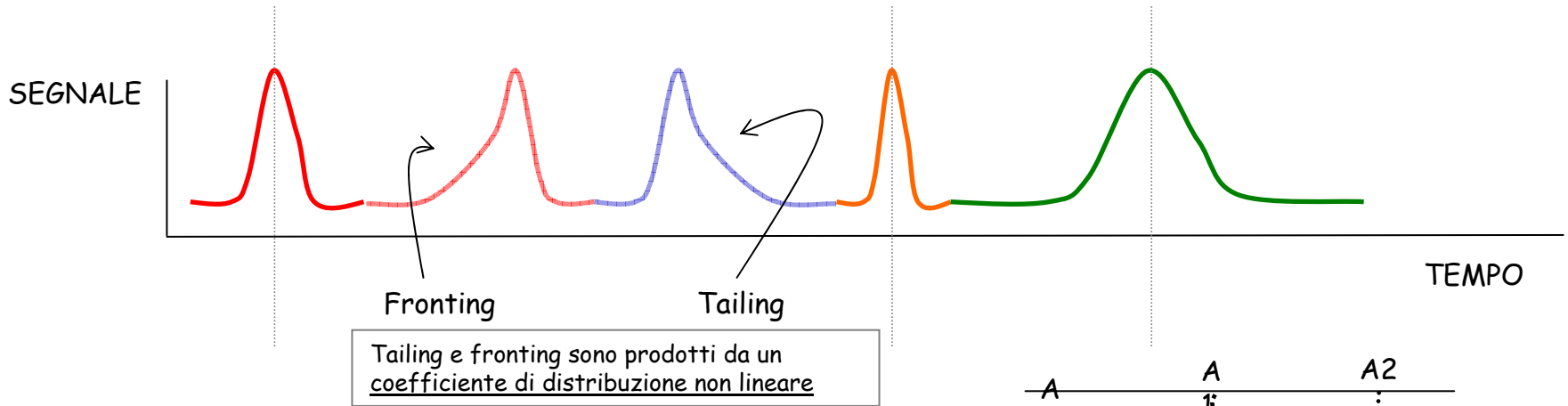
k'_A ideale tra 1 e 5!

Fattore di selettività, indice della velocità di migrazione relativa di due soluti

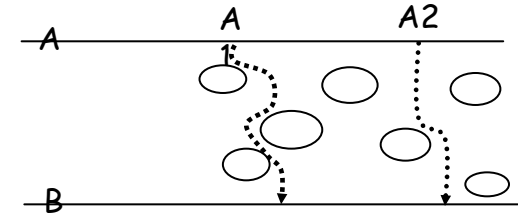
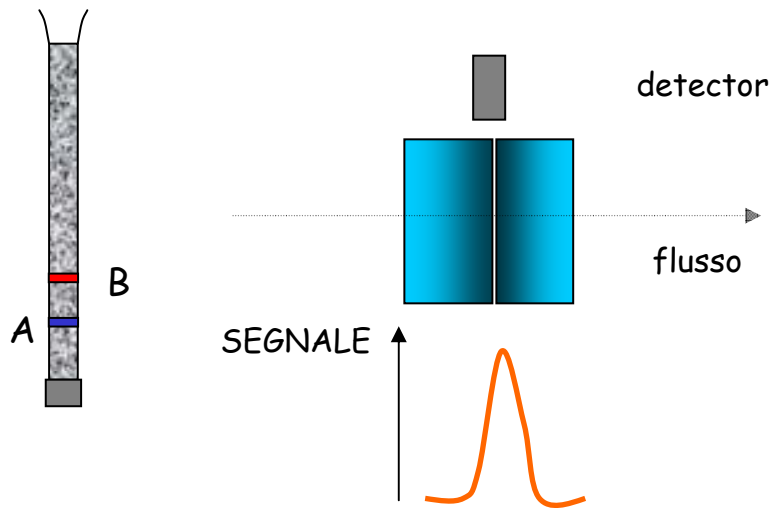
➤ Parametro che può essere calcolato *sperimentalmente*






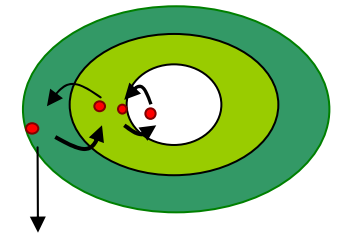
Geometria del picco e efficienza della colonna



variazione di geometria del picco



-  Fase stazionaria
-  Interfaccia di scambio
-  Fase mobile



considerando che una molecola è capace di effettuare migliaia di trasferimenti fase mobile-fase stazionaria possiamo immaginare il picco come centrato sul valore effettivo di t_R attorno al quale c'è una distribuzione di errori "casuali" di percorso

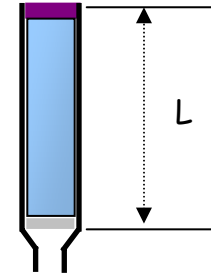
Efficienza di una colonna cromatografica

Altezza di un piatto teorico H

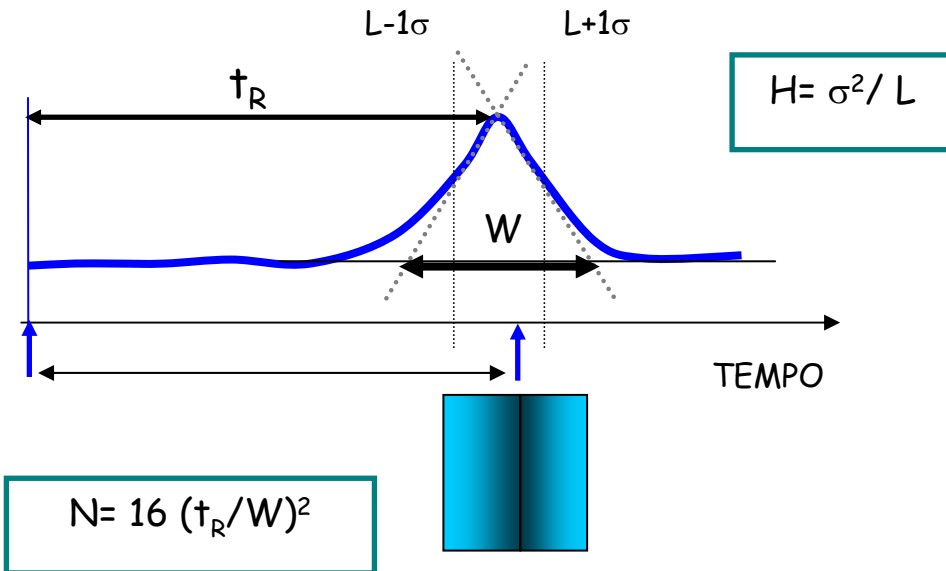
Numero di un piatti teorici N



$$N=L/H$$

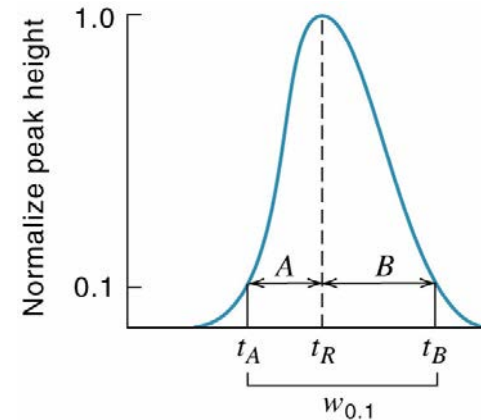


L'efficienza di una colonna è proporzionale ad N , quindi **inversamente** proporzionale **all'altezza** di un piatto.



Intensità di colore = numero di molecole di analita

Picco asimmetrico (tailing)

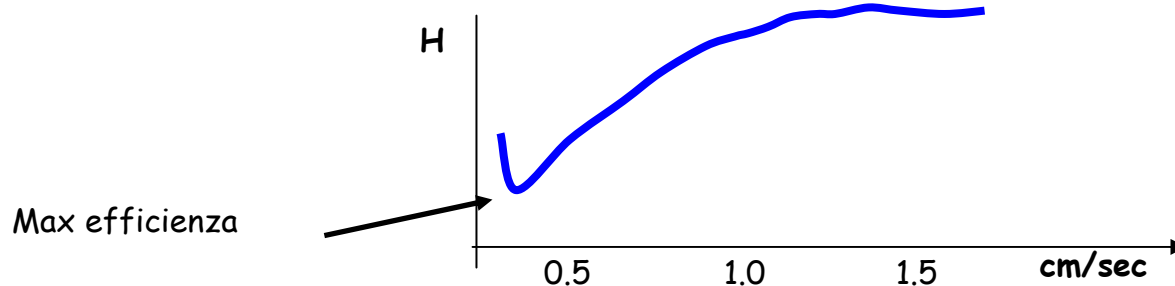


$$N = 41.7 (t_R / w_{0.1})^2 / (A/B + 1.25)$$

Variabili che influenzano l'efficienza di una colonna

- **Velocità lineare della fase mobile**
- Coefficiente di diffusione nella fase mobile (D_M)
- Coefficiente di diffusione nella fase stazionaria (D_S)
- Fattore di capacità
- **Diametro delle particelle della fase stazionaria impaccata**
- **Spessore del film liquido sulla fase stazionaria**

➤ Velocità lineare della fase mobile



➤ Cromatografia liquida colonne 25-50 cm

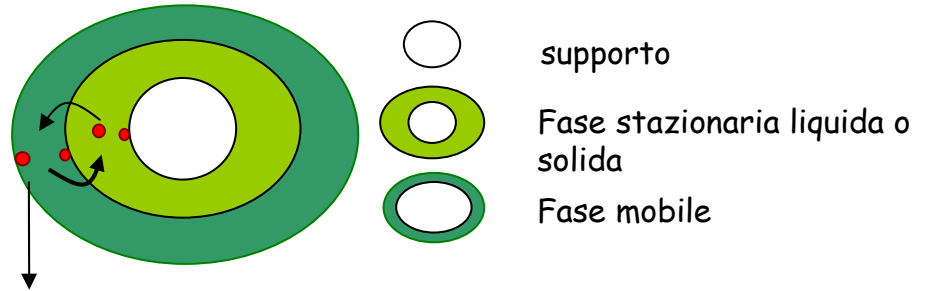
➤ Gas-cromatografia fino a decine di m

Teoria dell'allargamento della banda; equazione di Van Deemter

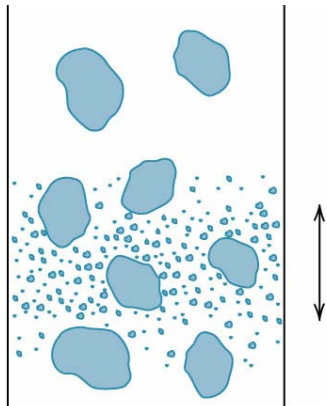
$$H = B/u + C_S u + C_M u$$

Coefficiente di **trasferimento di massa** nella fase stazionaria:
Film di liquido su particella solida - direttamente proporzionale a (spessore)², inversamente proporzionale a D_S nel film
Fase stazionaria solida - direttamente proporzionale al tempo adsorbimento/desorbimento

Diffusione longitudinale:
direttamente proporzionale al coefficiente di diffusione più importante in GC che in LC



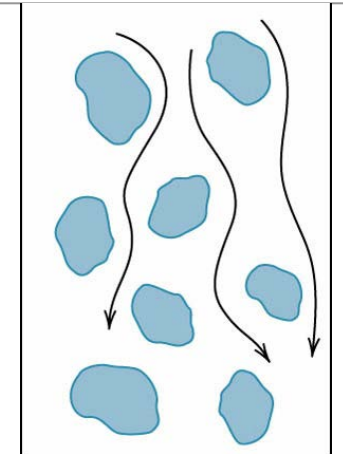
Coefficiente di **trasferimento di massa** nella fase mobile:
inv. prop. a D_M , funzione di (diametro particelle)² (diametro colonna)² e u



Molecular diffusion

La diffusione turbolenta diminuisce a flussi bassi di fase mobile
L'allargamento di banda può essere minimizzato dall'utilizzo di particelle piccole e regolari (p.es. sfere)

Diffusione turbolenta



Eddy diffusion

PARAMETRI DI UNA COLONNA CROMATOGRAFICA

- Fattore di Capacità

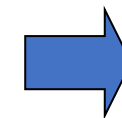
$$k'_A = \frac{t_R - t_M}{t_M}$$

- Selettività

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

- Efficienza

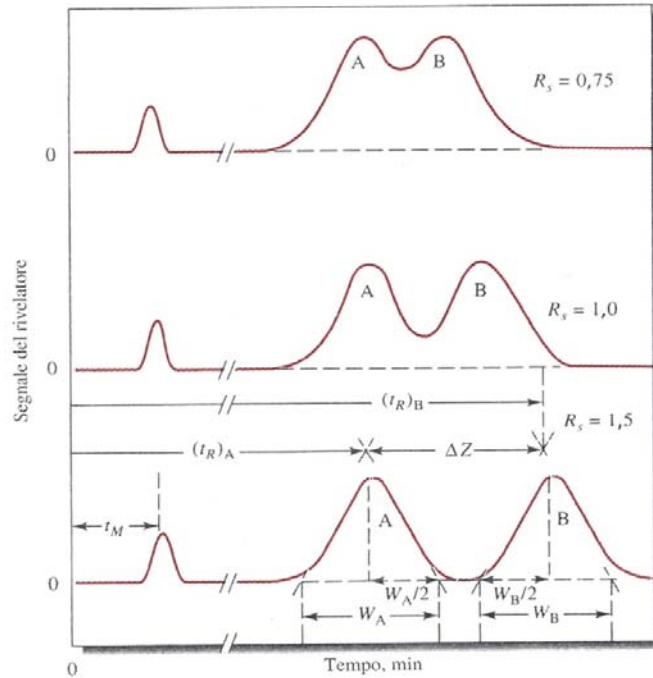
$$H = \sigma^2 / L$$



$$N = 16 (t_R / W)^2$$

Risoluzione di una colonna

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



← Sovrapposizione del 4%

← Sovrapposizione dello 0.3%

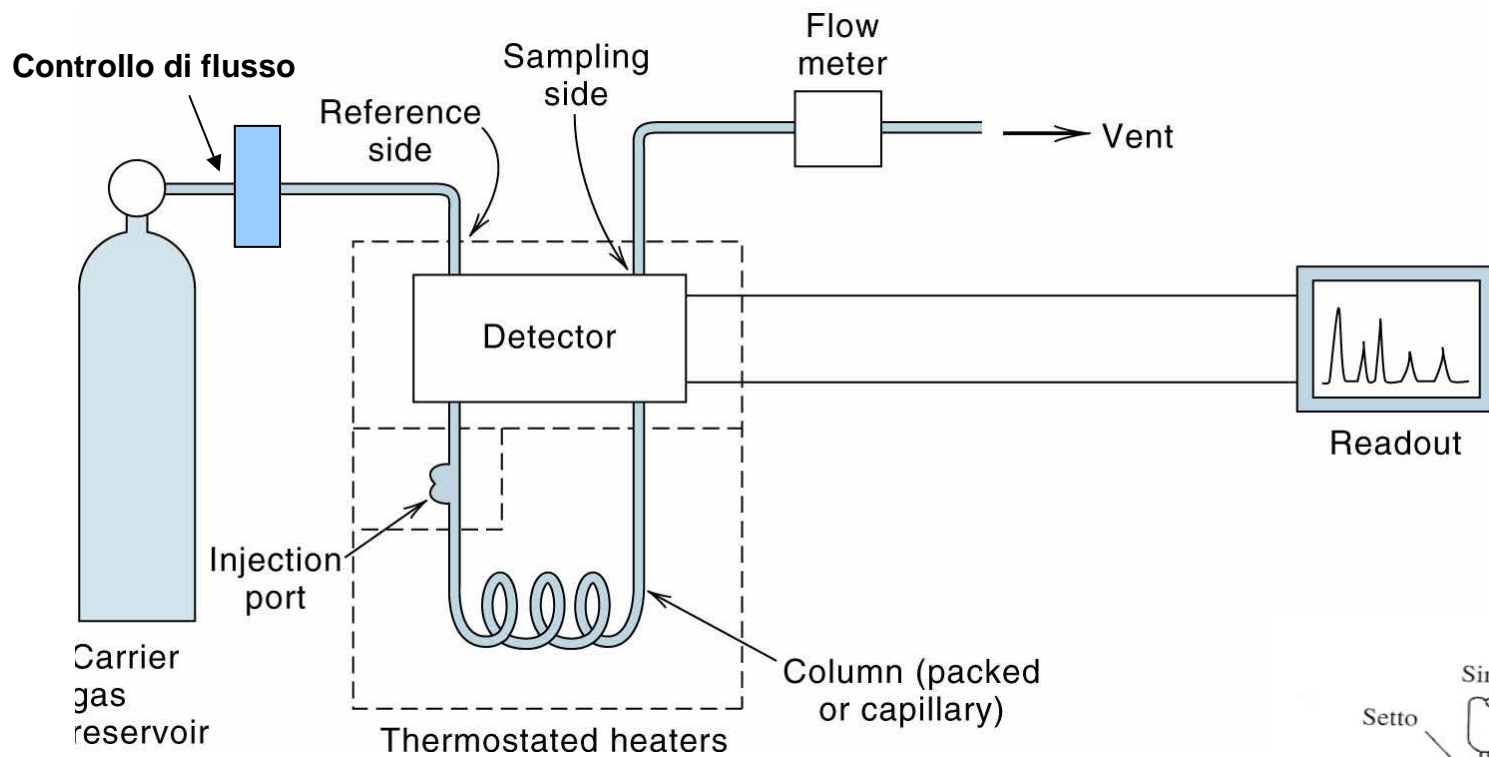


Strumento GC-MS da banco

Schema a blocchi di uno spettrometro di massa



La sorgente di ionizzazione converte molecole neutre in ioni che vengono separate secondo il loro rapporto m/z . Ogni molecola si frammenta (carica) in ioni caratteristici in base alla sorgente.



SCHEMA DI UN GAS CROMATOGRAFO

I gas di trasporto inerti utilizzati sono He, Ar, N₂, CO₂ e H₂. La pressione in ingresso è 10-50 psi corrispondenti a 30-150 mL/min per colonne impaccate e 1-25 mL/min per colonne capillari. (1 psi=lb/inch²=6.89 x 10³ Pa=6.8 x 10⁻² Atm)

Il campione (vol da nL fino a 20 µL) è iniettato mediante siringa in una camera a rapida vaporizzazione in testa alla colonna

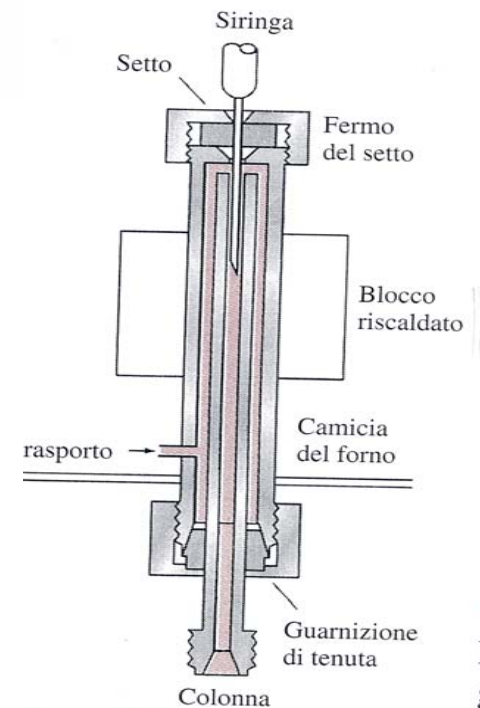


Figura 20.1

Le colonne possono essere impaccate o capillari (lunghezza da 2 a 50 m) e sono in acciaio, vetro, silice fusa o teflon. La t deve essere controllata a livello di decimi di grado e deve essere appena superiore alla temperatura di ebollizione dell'analita. Per campioni complessi si usano gradienti di temperatura programmabili.

Colonne impaccate: lunghezza 2-3 m, riempimento terra di diatomee (dia 0.15-0.25 mm; area superficiale $> 1\text{m}^2/\text{g}$) ricoperto di fase stazionaria liquida

Colonne tubolari aperte (WCOT): colonne capillari con pareti ricoperte da fase stazionaria

Colonne tubolari aperte a supporto ricoperto (SCOT): alla parete del capillare sono adese particelle solide ricoperte di fase stazionaria

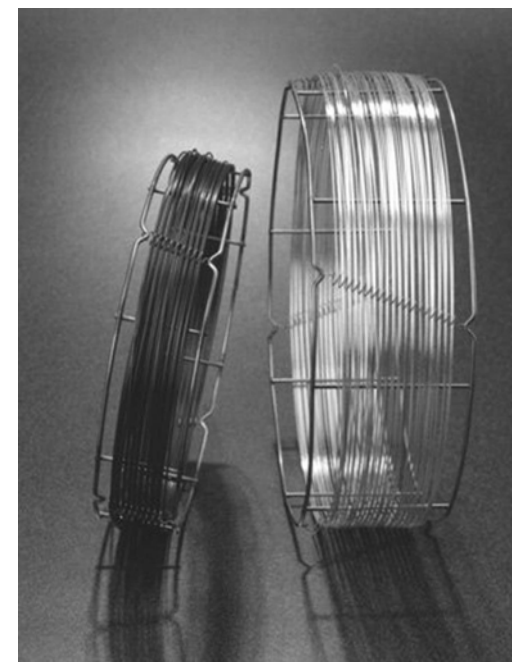
TABELLA 29-1 Proprietà e caratteristiche di tipiche colonne per gas cromatografia

	Tipo di colonna			
	FSOT*	WCOT†	SCOT‡	Impaccata
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	500-1000
Dimensione del campione, ng	10-75	10-1000	10-1000	10-10 ⁶
Pressione relativa	Bassa	Bassa	Bassa	Alta
Velocità relativa	Veloce	Veloce	Veloce	Lento
Inerzia chimica	La migliore			→La peggiore
È flessibile?	Sì	No	No	No

*Colonna tubolare aperta in silice fusa.

†Colonna tubolare aperta a parete ricoperta.

‡Colonna tubolare aperta a supporto ricoperto (anche chiamata tubolare aperta a strato poroso, o PLOT).



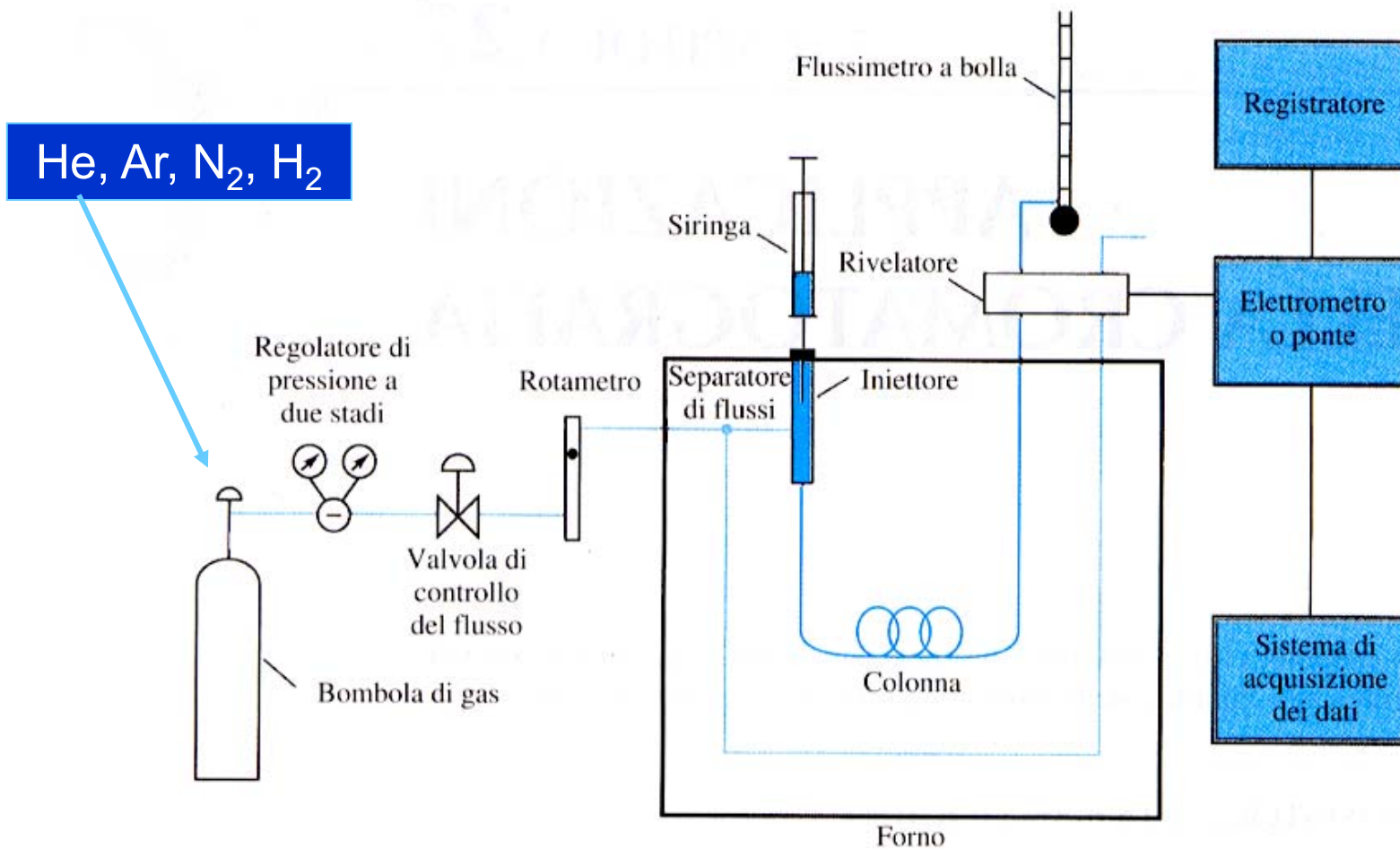
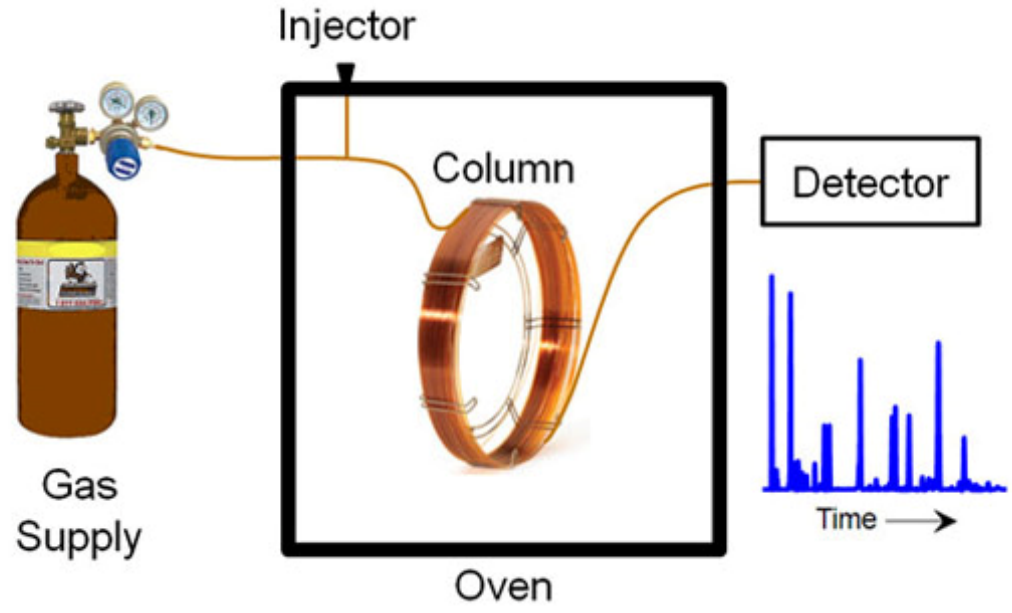


Figura 27-1
 Schema di un gascromatografo.

GC



HPLC



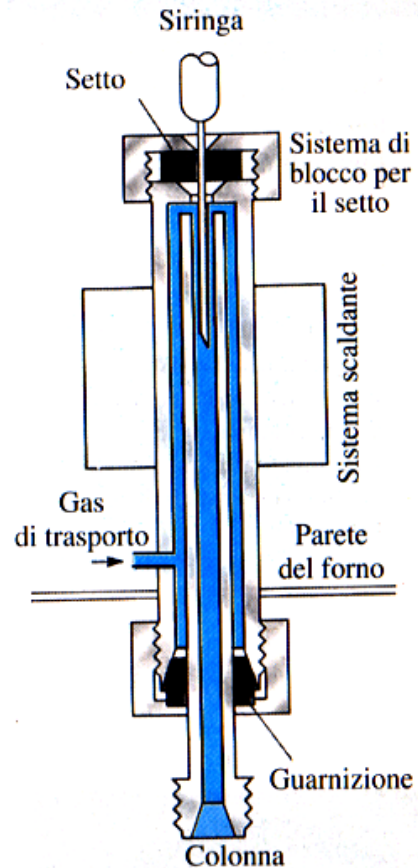


Figura 27-4

Sistema di iniezione riscaldato. (Da H. H. Willard, L. L. Merritt, J. A. Dean e F. A. Settle, *Instrumental Methods of Analysis*, VII ed., p. 542. Per gent. conc. della Belmont CA: Wadsworth, 1988).

Iniezione ed iniettori

Il campione viene iniettato in quantità molto piccole (fino a 0,5 ml per impaccate, fino a 100 volte inf. per capillari). L'entrata deve essere ad una temperatura sufficientemente elevata da permettere l'evaporazione istantanea del campione e abbastanza grande da permettere al vapore di espandersi senza essere spinto indietro.

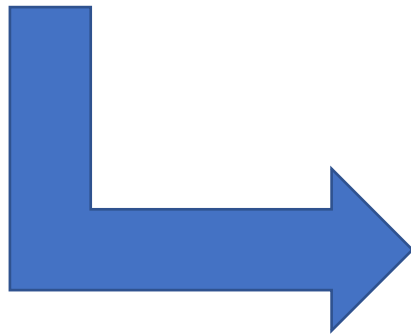
Colonne gascromatografiche

Si suddividono in impaccate e capillari.

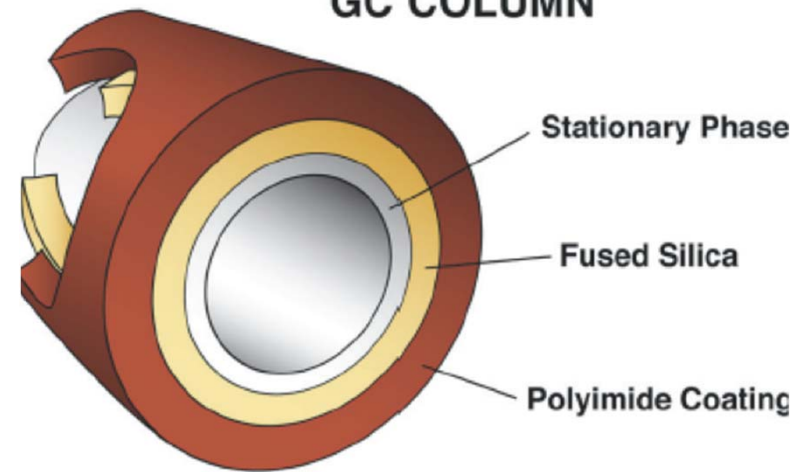
Le impaccate contengono particelle solide che vengono impaccate: diatomee o diatomee silanizzate, per ridurre la polarità mediante arricchimento superficiale di gruppi metilici.

Le capillari sono tubi molto più sottili e lunghi (diametro = 0.2-0.5 mm; lunghezza = 20-100 m) in cui la fase stazionaria è depositata sulle pareti interne. Queste ultime hanno un elevato numero di piatti teorici (anche 300.000) grazie alla loro elevata lunghezza.

COLONNE CAPILLARI PER GC

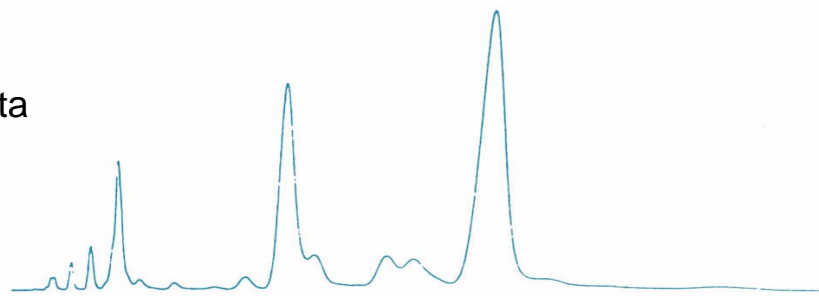


GC COLUMN

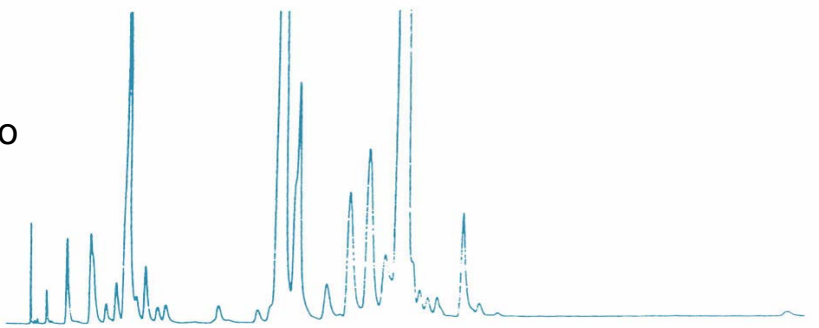


Le colonne capillari a base di silice fusa hanno una risoluzione migliore

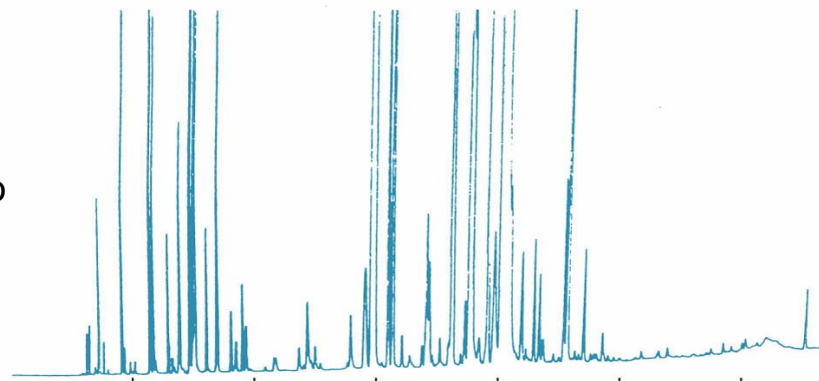
¼ inch dia. x 6ft impaccata



0.03 inch dia. X 500 ft acciaio capillare



0.25 dia. X 50 m in vetro capillare

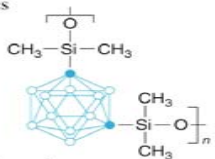


Gas cromatogramma di estratto di menta piperita

La chiave per la risoluzione è rappresentata dalle diverse fasi stazionarie. Tra le più comuni ci sono i polisilossani.

Table 20.1

Capillary Fused Silica Stationary Phases

Phase	Polarity	Use	Max. Temp. (°C)
100% Dimethyl polysiloxane $\left[\text{O}-\underset{\text{CH}_3}{\overset{\text{CH}_3}{\text{Si}}}-\right]_n$	Nonpolar	Basic general-purpose phase for routine use. Hydrocarbons, polynuclear aromatics, PCBs.	320
Diphenyl, dimethyl polysiloxane $\left[\text{O}-\underset{\text{C}_6\text{H}_5}{\overset{\text{C}_6\text{H}_5}{\text{Si}}}-\right]_{x\%} \left[\text{O}-\underset{\text{CH}_3}{\overset{\text{CH}_3}{\text{Si}}}-\right]_{100-x\%}$	5% Low 35%, 65% Intermediate 65%, 35% Intermediate	General-purpose, good high-temperature characteristics. Pesticides.	320 300 370
14% Cyanopropylphenyl–86% dimethylsiloxane $\left[\text{O}-\underset{\text{C}_6\text{H}_4\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CN}}{\text{Si}}-\right]_{14\%} \left[\text{O}-\underset{\text{CH}_3}{\overset{\text{CH}_3}{\text{Si}}}-\right]_{86\%}$	Intermediate	Separation of organochlorine pesticides listed in EPA 608 and 8081 methods. Susceptible to damage by moisture and oxygen.	280
80% Biscyanopropyl–20% cyanopropylphenyl polysiloxane $\left[\text{O}-\underset{\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CN}}{\overset{\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CN}}{\text{Si}}}-\right]_{80\%} \left[\text{O}-\underset{\text{C}_6\text{H}_4\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CN}}{\text{Si}}-\right]_{20\%}$	Very polar	Free acids, polysaturated fatty acids, alcohols. Avoid polar solvents such as water and methanol.	275
Arylenes $\left[\text{O}-\underset{\text{R}_2}{\overset{\text{R}_1}{\text{Si}}}-\text{C}_6\text{H}_4-\underset{\text{R}_4}{\overset{\text{R}_3}{\text{Si}}}-\right]_n$	Vary R as above to vary polarity	High temperature, low bleed	300–350
Carboranes 	Vary R as above to vary polarity	High temperature, low bleed	430
Poly(ethyleneglycol) (Carbowax) $\left[\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\right]_n$	Very polar	Alcohols, aldehydes, ketones, and separation of aromatic isomers, e.g., xylenes	250

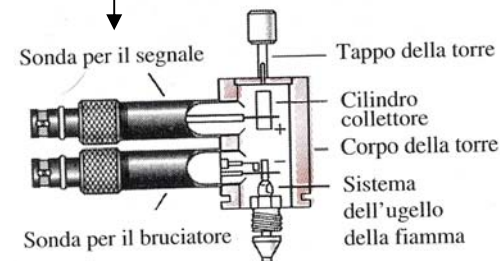
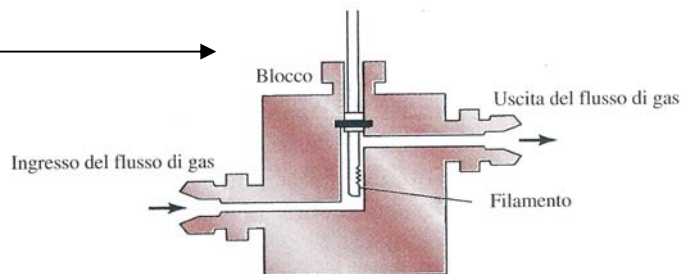
open circles = boron
filled circles = carbon

I rivelatori più comuni sono a ionizzazione di fiamma, a conducibilità termica, termoionici e quelli a spettrometria di Massa!

Table 20.2

Comparison of Gas-Chromatographic Detectors

Detector	Application	Sensitivity Range	Linearity	Remarks
Thermal conductivity	General, responds to all substances	Fair, 5–100 ng, 10 ppm–100%	Good, except thermistors at higher temperatures	Sensitive to temperature and flow changes; concentration sensitive
Flame ionization	All organic substances; some oxygenated products respond poorly. Good for hydrocarbons	Very good, 10–100 pg, 10 ppb–99%	Excellent, up to 10^6	Requires very stable gas flow; response for water is 10^4 – 10^6 times weaker than for hydrocarbons; mass-sensitive
Flame photometric	Sulfur compounds (393 nm), phosphorus compounds (526 nm)	Very good, 10 pg S, 1 pg P	Excellent	
Flame thermionic	All nitrogen- and phosphorus-containing substances	Excellent, 0.1–10 pg, 100 ppt–0.1%	Excellent	Needs recoating of sodium salts on screen; mass sensitive
Rubidium silicate bead	Specific for nitrogen- and phosphorus-containing substances	Excellent		Mass sensitive
Argon ionization (b-ray)	All organic substances; with ultrapure He carrier gas, also for inorganic and permanent gases	Very good; 0.1–100 ng, 0.1–100 ppm	Good	Very sensitive to impurities and water; needs very pure carrier gas; concentration sensitive
Electron capture	All substances that have affinity to capture electrons; no response for aliphatic and naphthenic hydrocarbons	Excellent for halogen-containing substances, 0.05–1 pg, 50 ppt–1 ppm	Poor	Very sensitive to impurities and temperature changes; quantitative analysis complicated; concentration sensitive
Mass spectrometry	Nearly all substances. Depends on ionization method	Excellent	Excellent	Can provide structural and molecular weight information



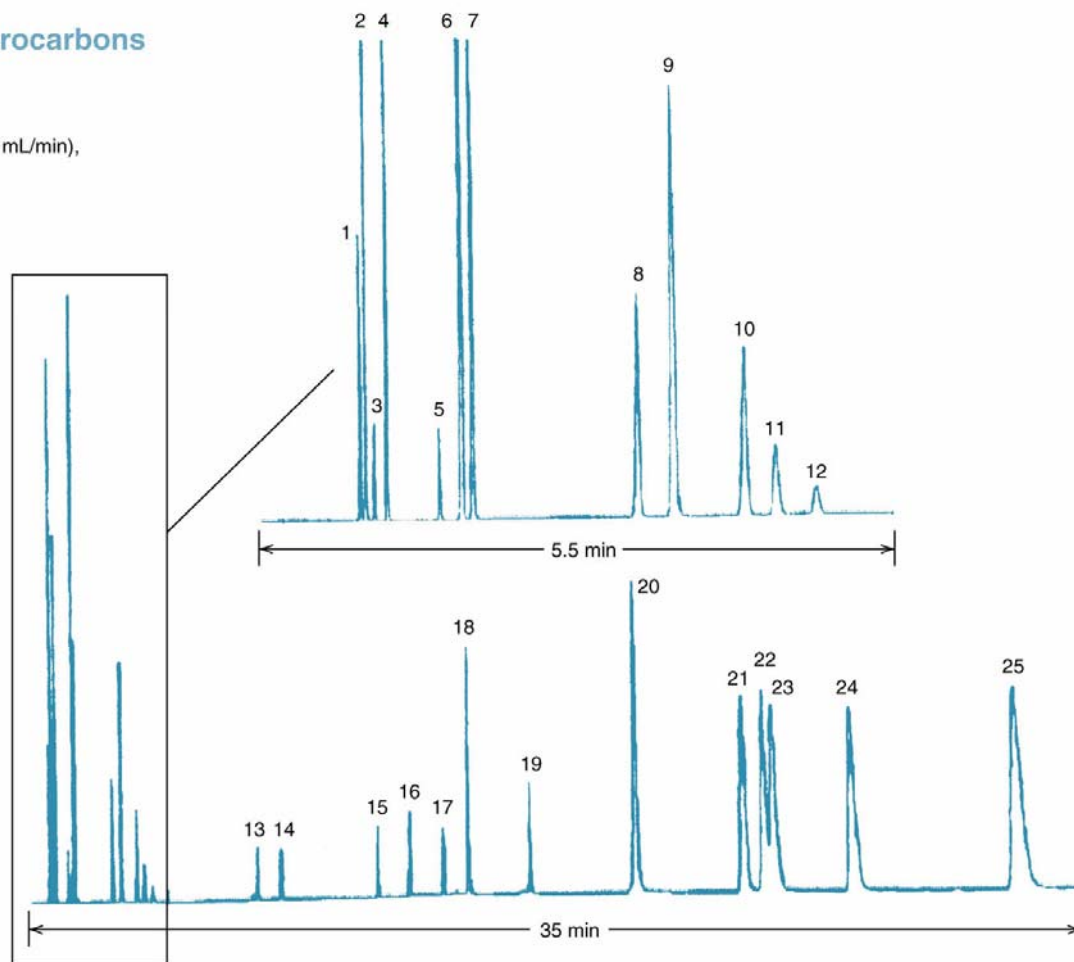
Le condizioni cromatografiche rappresentano sempre un compromesso tra tempo di analisi, risoluzione e sensibilità

Extended Analysis of Hydrocarbons

Column: GS-Alumina
 30 m x 0.53 mm I.D.
J&W P/N: 115-3532
Carrier: Helium at 51 cm/sec (6.8 mL/min),
 measured at 100°C
Oven: 100°C for 5 min
 100-200°C at 5°/min
 200°C for 15.5 min
Injector: Split 1:10, 4µL, 250°C
Detector: FID, 250°C
 Nitrogen makeup gas
 at 30 mL/min

- | | |
|-------------------|------------------|
| 1. Methane | 15. Heptane |
| 2. Ethane | 16. Benzene |
| 3. Ethylene | 17. Isooctane |
| 4. Propane | 18. Octane |
| 5. Propylene | 19. Toluene |
| 6. Isobutane | 20. Nonane |
| 7. n-Butane | 21. Ethylbenzene |
| 8. trans-2-Butene | 22. p-Xylene |
| 9. Butene-1 | 23. m-Xylene |
| 10. cis-2-Butene | 24. o-Xylene |
| 11. Isopentane | 25. Decane |
| 12. n-Pentane | |
| 13. Cyclohexane | |
| 14. Hexane | |

Extended HC analysis on GS-Alumina provides analysis of typical mixes in refinery and natural gas from C₁ to C₁₀



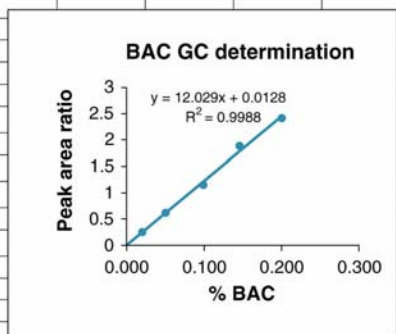
C155

Fig. 20.6. Analisi con temperatura programmata .

L'uso di standard interni è comune in GC. Questi migliorano l'analisi minimizzando variazioni tra diversi strumenti, nella preparazione dei campioni e nella iniezione del campione.

Per calcolare la concentrazione della specie si usa il rapporto tra i picchi analita/standard interno.

	A	B	C	D	E	F	G	H
1	GC Determination of blood ethanol using propanol internal standard.							
2	%EtOH	Peak area	Peak area	Ratio peak area				
3		EtOH	PrOH	EtOH/PrOH				
4	0.020	114	457	0.249453				
5	0.050	278	449	0.619154				
6	0.100	561	471	1.191083				
7	0.150	845	453	1.865342				
8	0.200	1070	447	2.393736				
9	Unknown (y _c)	782	455	1.718681				
10								
11	Slope, m:		12.0286923					
12	Intercept, b:		0.01276953					
13	Unknown % BAC, C:		0.14182022					
14								
15	S _r :	0.0345743						
16	N:	5						
17	S _{xx} :	0.02132						
18	y _{ave} :	1.2637535						
19	M:	1						
20	S _c :	0.0033365						
21								
22	Cell D4 = ratio = B4/C4 (copy down)							
23	Cell C11 = m = SLOPE(D4:D8,A4:A8)							
24	Cell C12 = b = INTERCEPT(D4:D8,A4:A8)							
25	Cell C13 = C = (y _c -b)/m = (Ratio _c - b)/m = (D9-C12)/C11							
26	Cell B15 = S _r = STEYX(D4:D8,A4:A8)							
27	Cell B16 = N = COUNT(A4:A8)							
28	Cell B17 = S _{xx} = N*VARP(A4:A8) = B16*VARP(A4:A8)							
29	Cell B18 = y _{ave} = AVERAGE(D4:D8)							
30	Cell B19 = sample replicates = M = 1							
31	Cell B20 = std. devn. S _c = S _r /m*((1/M + 1/N + (y _c - y _{ave})/m ² *S _{xx})) ^{1/2}							
32	= B15/C11*((1/B19+1/B16+(D9-B18)/C11^2*B17))^0.5							



autocampionatore

Le sorgenti a impatto elettronico sono ad elevata energia e frammentano le molecole in modo così intenso che a volte manca lo ione molecolare. Da informazioni sulla struttura della molecola.

Le sorgenti a ionizzazione chimica sono a energia inferiore, lo ione molecolare è sempre dominante.

Le sorgenti a Elettrospray e MALDI sono usate in HPLC

Table 20.3

Comparison of Ionization Methods^a

Ionization Method	Typical Analytes	Sample Introduction	Mass Range	Method Highlights
Electron impact (EI)	Relatively small volatile	GC or liquid–solid probe	To 1000 daltons	Hard method. Versatile, provides structure information
Chemical ionization (CI)	Relatively small, volatile	GC or liquid–solid probe	To 1000 daltons	Soft method. Molecular ion peak $[M + H]^+$
Electrospray (ESI)	Peptides, proteins, nonvolatile	Liquid chromatography or syringe	To 200,000 daltons	Soft method. Ions often multiply charged
Matrix-assisted laser desorption (MALDI)	Peptides, proteins, nucleotides	Sample mixed in solid matrix	To 500,000 daltons	Soft method, very high mass

^aFrom Web page of Professor Vicki Wysocki, University of Arizona. Reproduced by permission.

I picchi vengono normalizzati assegnando il valore massimo al picco più frequente (picco base)

Nell'esempio il picco base corrisponde a CH_2OH^+ ($m/z = 31$), $m/z = 32$ è il picco molecolare e c'è un piccolo picco a $m/z=33$ corrispondente allo ione molecolare per l'isotopo ^{13}C (abbondanza relativa = 1.1%)

Le tabelle di abbondanza relativa sono usate per assegnare i vari picchi

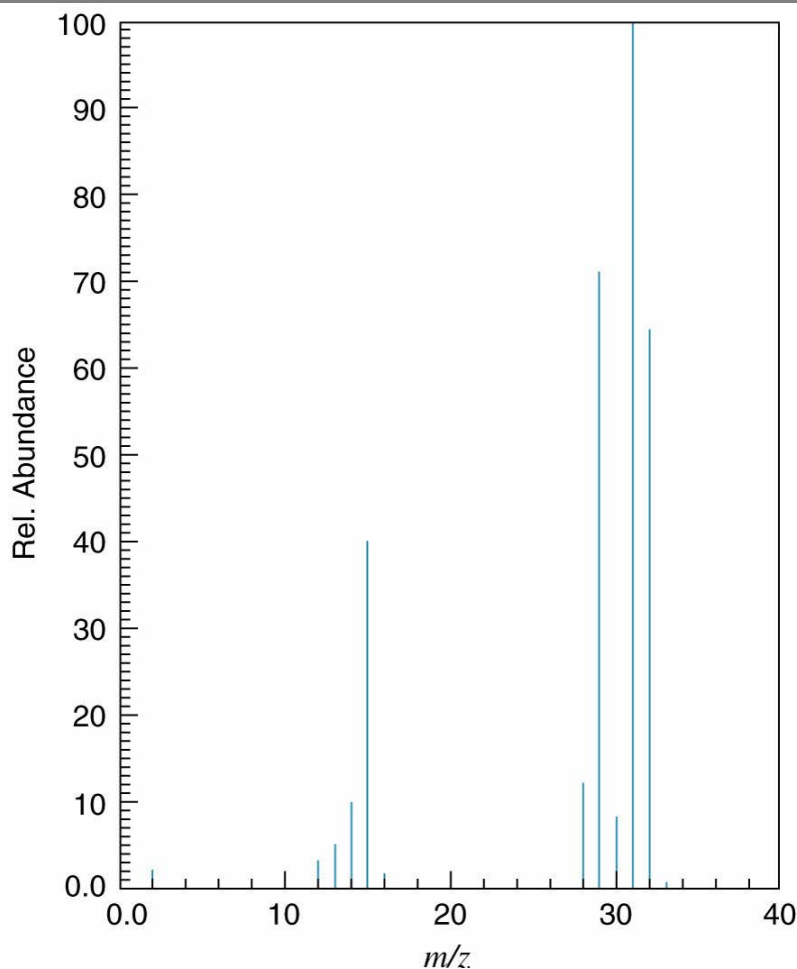


Table 20.4

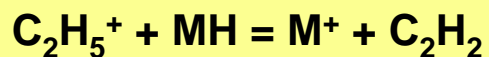
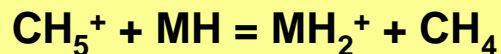
Relative Abundances and Exact Masses of Some Common Elements.^a

Element	Isotope	Mass	Relative Abundance (%)
Hydrogen	^1H	1.007825	100.0
	^2H	2.014102	0.0115
Carbon	^{12}C	12.000000	100.0
	^{13}C	13.003355	1.07
	^{14}C	14.003074	0.0001
Nitrogen	^{14}N	14.003074	100.0
	^{15}N	15.000109	0.369
	^{16}N	16.006100	0.0001
Oxygen	^{16}O	15.994915	100.0
	^{17}O	16.999132	0.038
	^{18}O	17.999160	0.205
Sulfur	^{32}S	31.972071	100.0
	^{33}S	32.971450	0.803
	^{34}S	33.967867	4.522
Chlorine	^{35}Cl	34.968852	100.0
	^{37}Cl	36.965903	31.96
Bromine	^{79}Br	78.918338	100.0
	^{81}Br	80.916291	97.28

^aThe most abundant isotope is assigned an abundance of 100%, and the others are listed relative to it.

Spettro di massa EI del metanolo

Nella ionizzazione chimica un gas reagisce con l'analita attraverso trasferimento di protoni o idruri e da una frammentazione limitata, lo ione molecolare è sempre dominante. Ad esempio il metano produce CH_5^+ e C_2H_5^+ che reagisce così:



La frammentazione da luogo a ioni M-H o M+H

Table 20.5

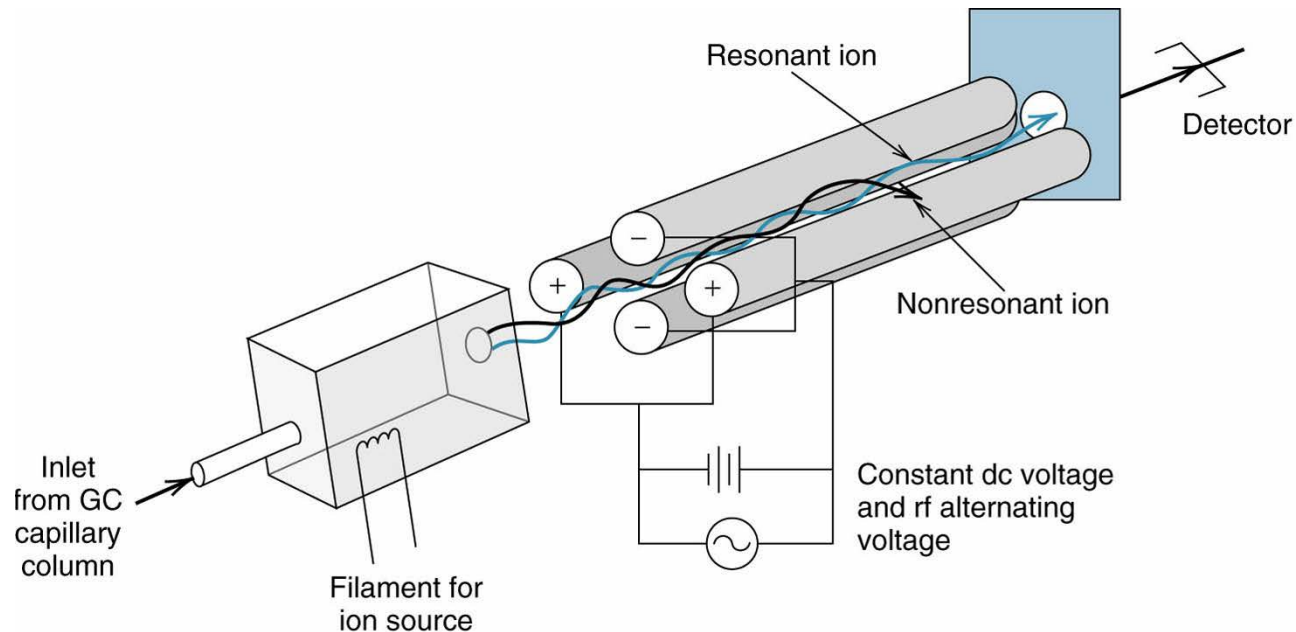
Chemical Ionization Characteristics of Different CI Reagents

Reagent	Adducts Produced	Uses/Limitations
Methane	M-H^+ , M-CH_3^+	Most organic compounds. Adducts not always abundant. Extreme fragmentation.
Isobutane	M-H^+ , $\text{M-C}_4\text{H}_9^+$	Less universal. Adducts more abundant. Some fragmentation.
Ammonia	M-H^+ (basic compounds) M-NH_4^+ (polar compounds)	Polar and basic compounds. Others not ionized. Virtually no fragmentation.

Analizzatore più utilizzato per GC-MS.

Una differenza di potenziale (U) diretta e una differenza di potenziale oscillante a radiofrequenze ($V \cos \omega t$) vengono applicate alle 4 barre parallele. (ω = frequenza, t = tempo).

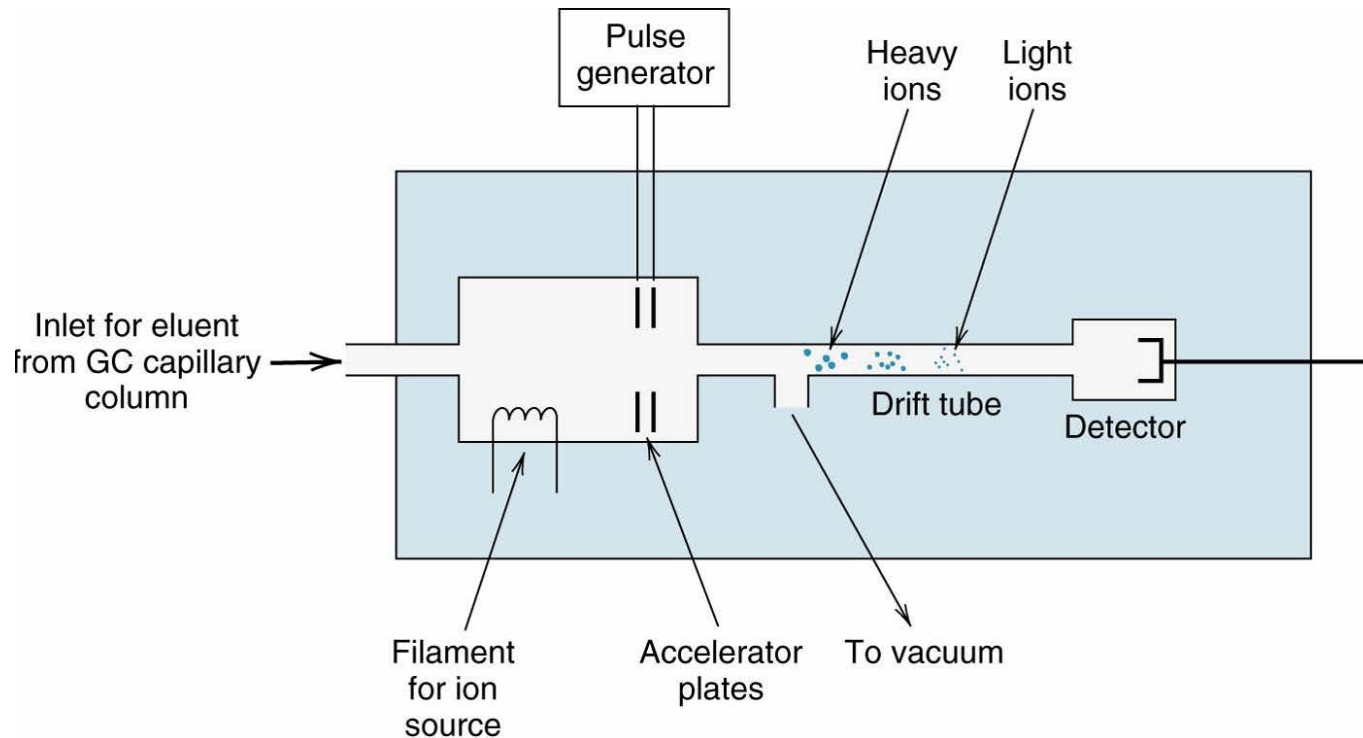
Due poli sono positivi ($U + V \cos \omega t$) e due negativi [$-(U + V \cos \omega t)$]. Il potenziale applicato determina la traiettoria degli ioni. Solo quelli con rapporto m/z particolare raggiungono il rivelatore.



spettrometro di massa a quadrupolo.

L'analizzatore a tempo di volo (TOF) è adatto per molecole grandi, gli ioni vengono accelerati ed entrano nel tubo con energia cinetica identica.

Ioni con m/z diversi raggiungono il rivelatore a tempi differenti.

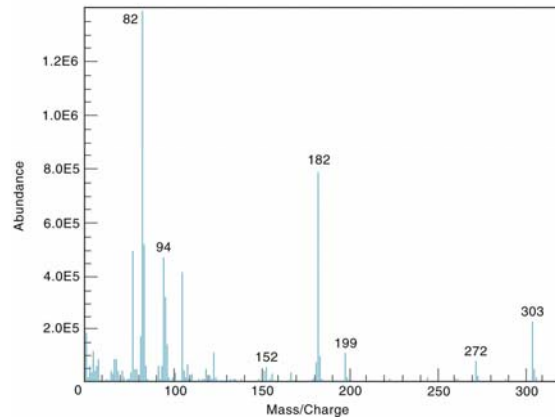
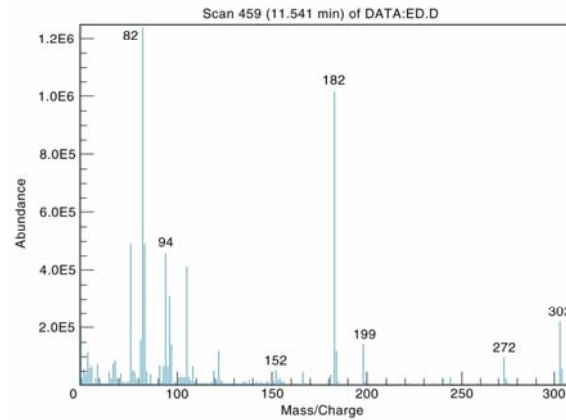
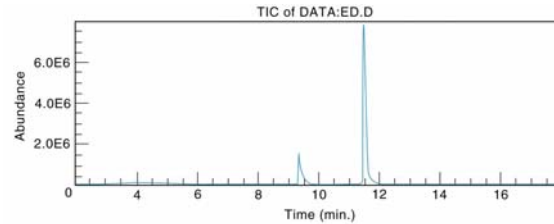


Spettrometro di massa a tempo di volo

sopra: gas cromatogramma (corrente ionica totale) di cocaina in campione di urina

In mezzo: spettro di massa del picco a 11.5 min.

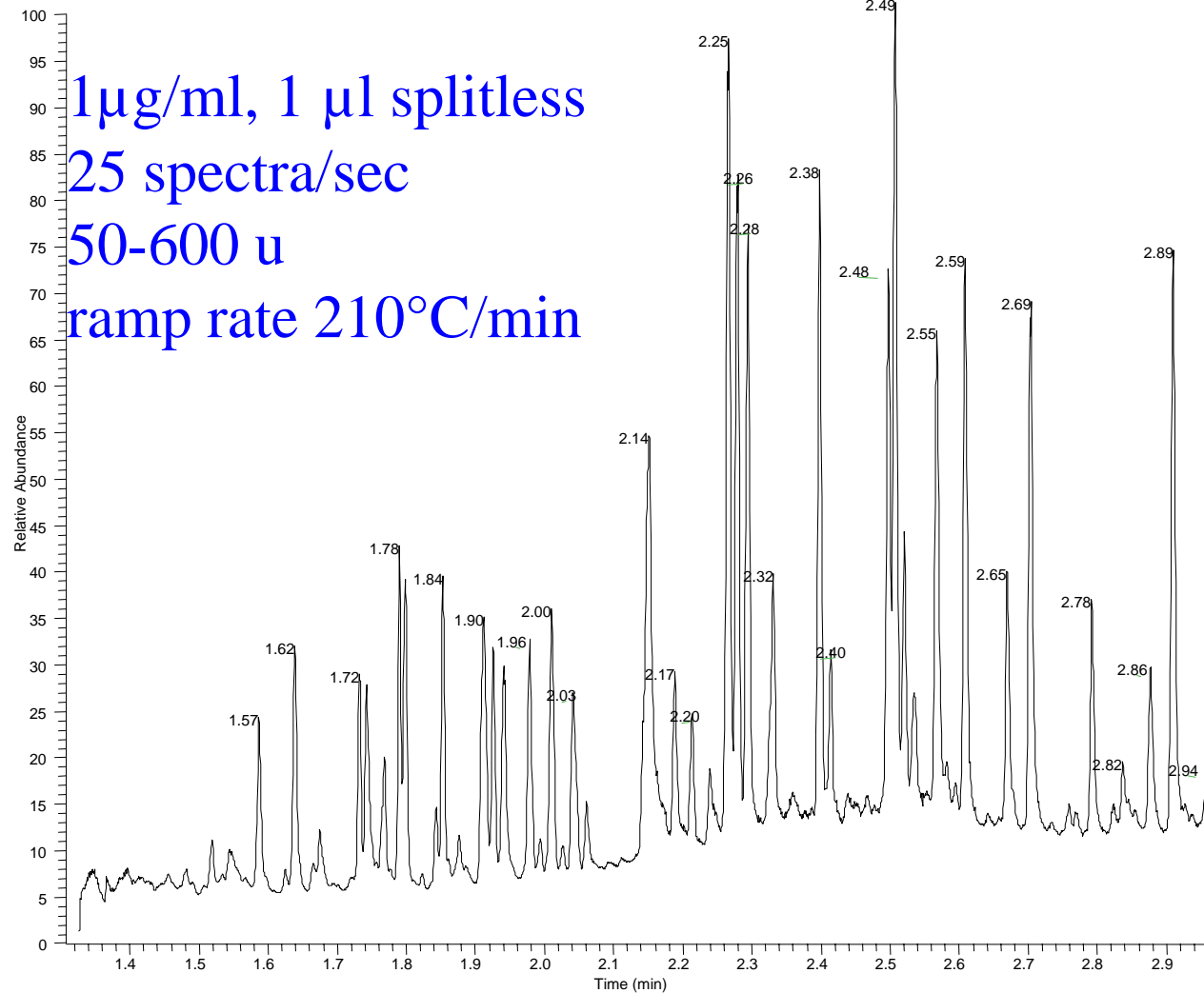
Sotto spettro di massa di uno standard di cocaina.



Conferma di Cocaina per GC-MS

UltraFast GC-TOF-MS of 30 pesticides in 3 minutes

RT: 1.31 - 2.96

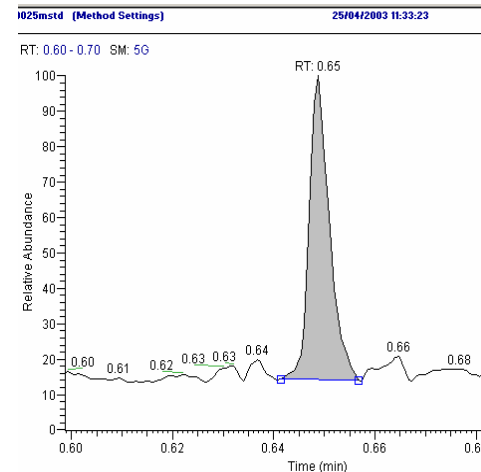


1 μ g/ml, 1 μ l splitless

25 spectra/sec

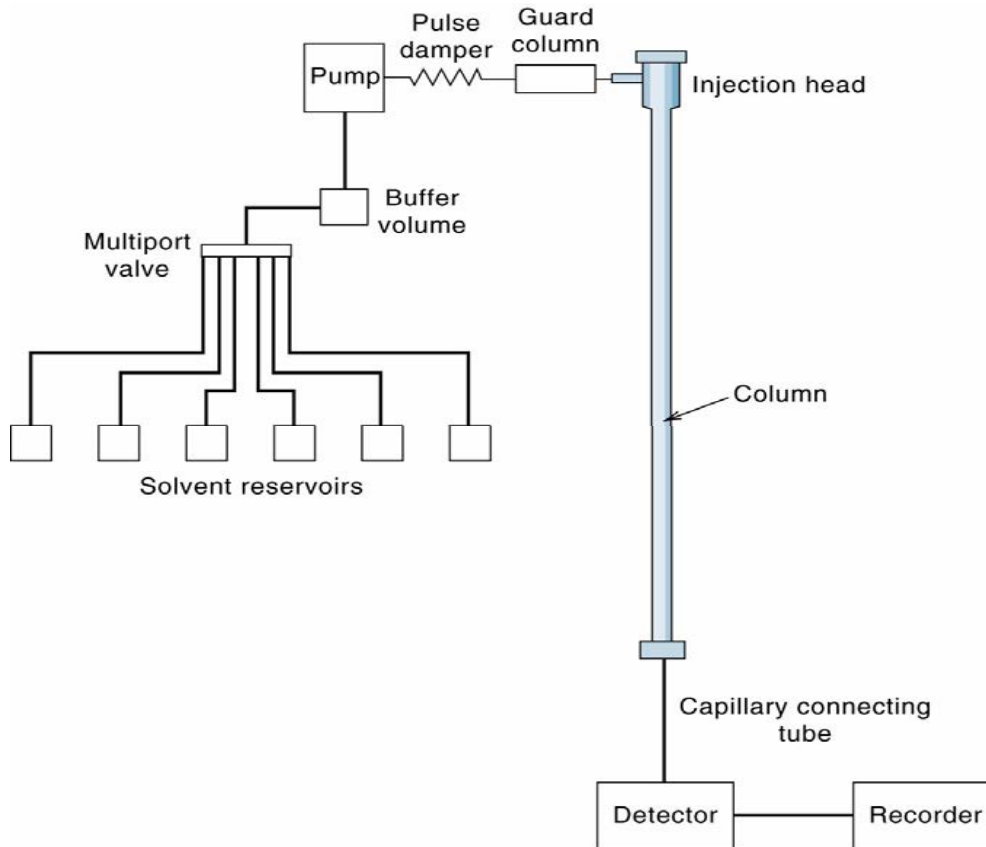
50-600 u

ramp rate 210°C/min



No deconvolution

Componenti per cromatografia liquida ad alta risoluzione (HPLC)



Vengono usate colonne impaccate con piccole particelle, in grado di operare a pressioni 1000-3000 psi

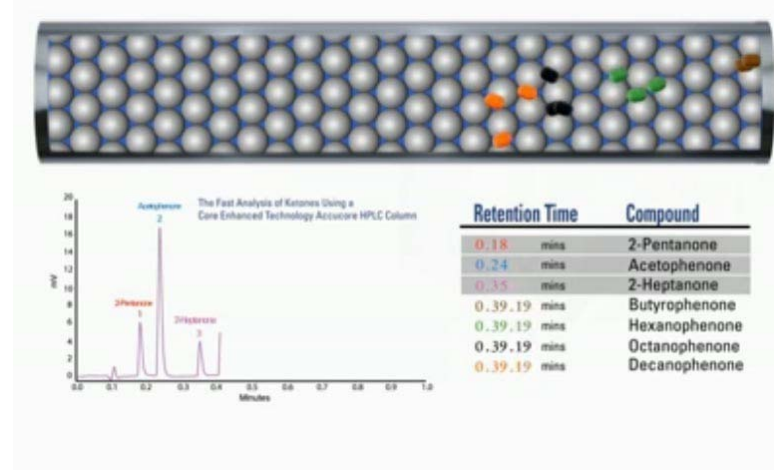
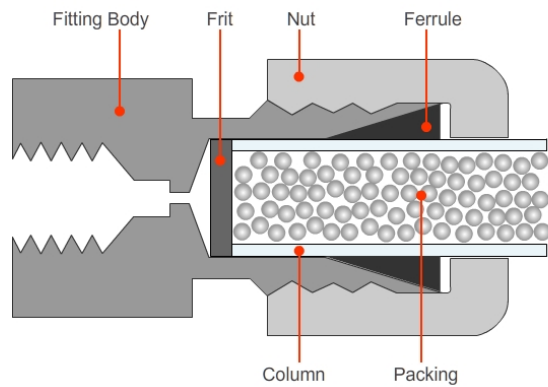
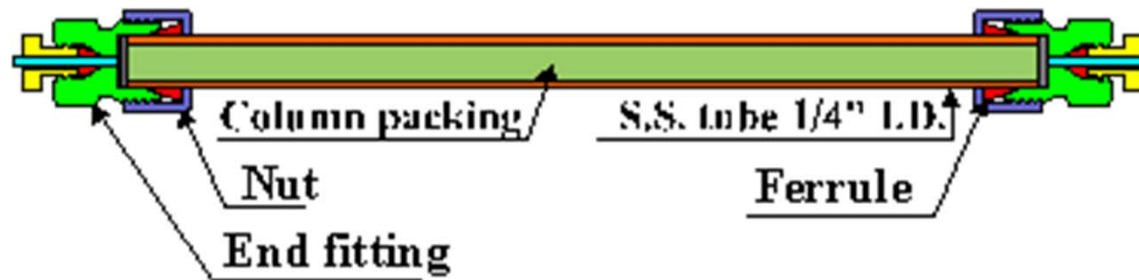
I contenitori per i solventi possono contenere solventi a diversa polarità per effettuare eluizioni in gradiente

Una pre-colonna è presente per trattenere composti ad elevato adsorbimento che non sarebbero eluiti e materiale particolato.

I rivelatori classici sono ad indici di rifrazione, UV, DAD, a fluorescenza e voltammetrici o MS

COLONNE IMPACCAATE PER HPLC

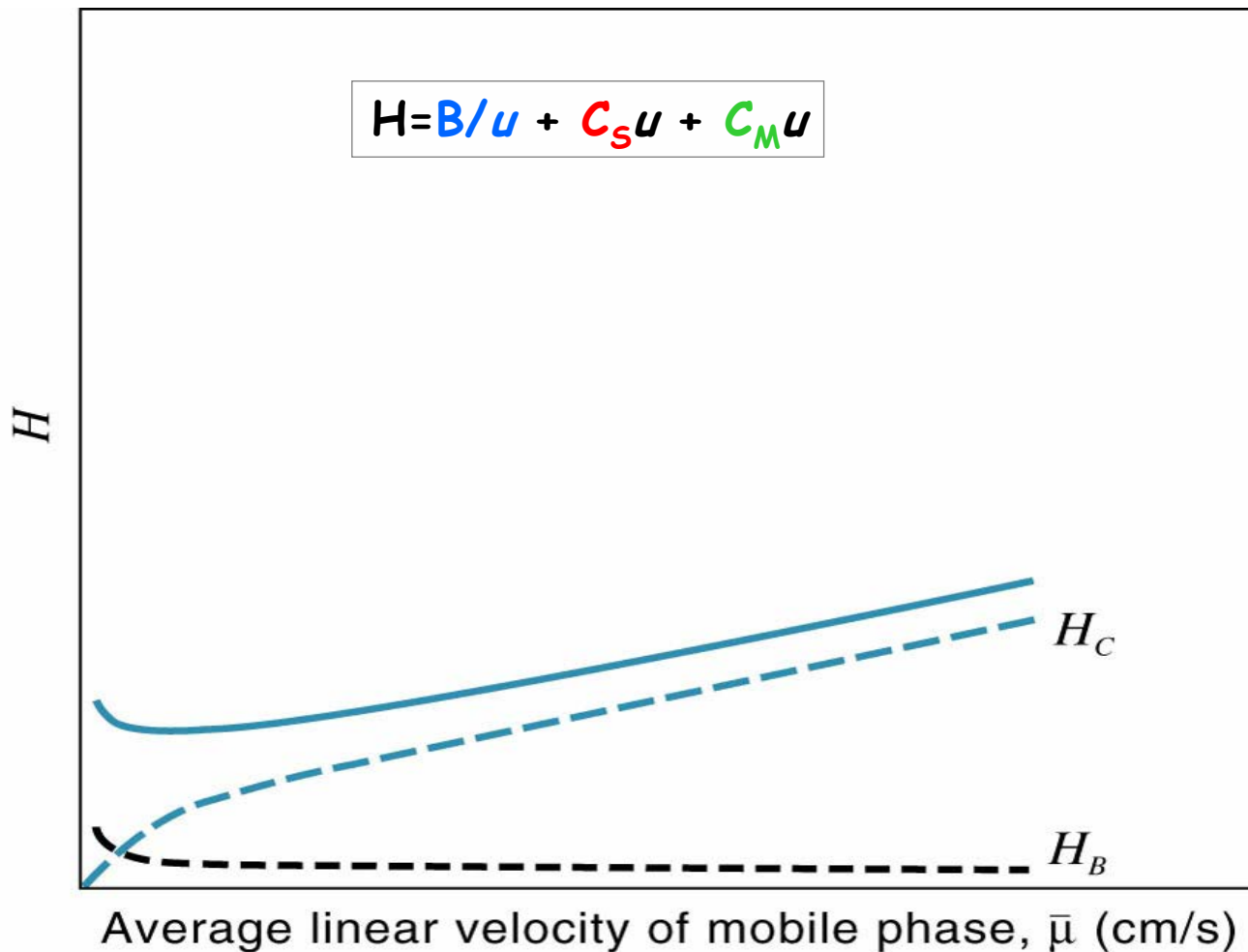
Standart column hardware



La diffusione molecolare è meno importante nei liquidi

Il trasferimento di massa è più importante

L'allargamento di banda è dovuto a effetti extra colonna



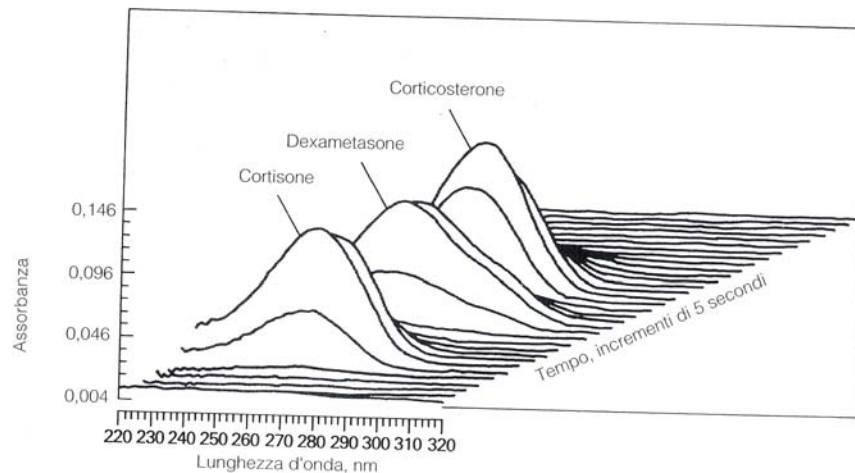
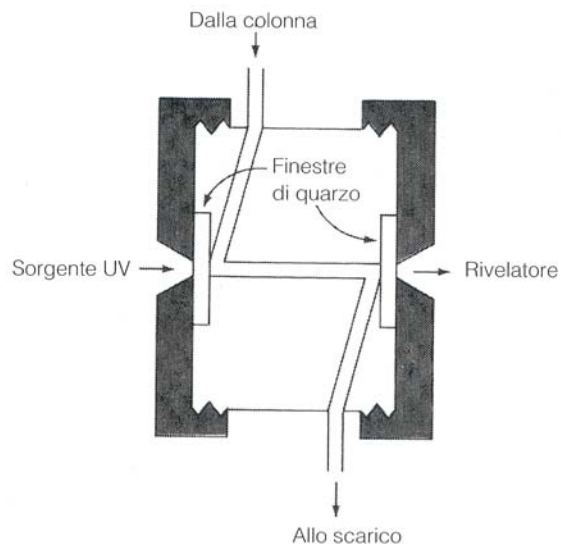


FIGURA 26-10 Spettri di assorbimento dell'eluato acquisiti ad intervalli di 5 secondi di una miscela di tre steroidi. (Per gentile concessione di Hewlett-Packard Company, Palo Alto, CA.).

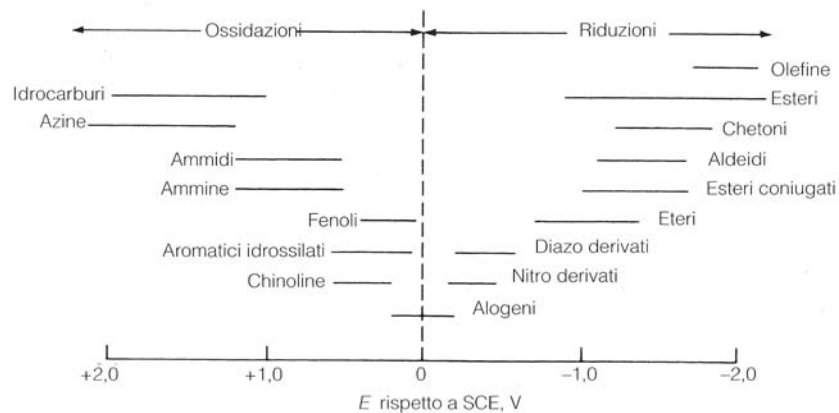
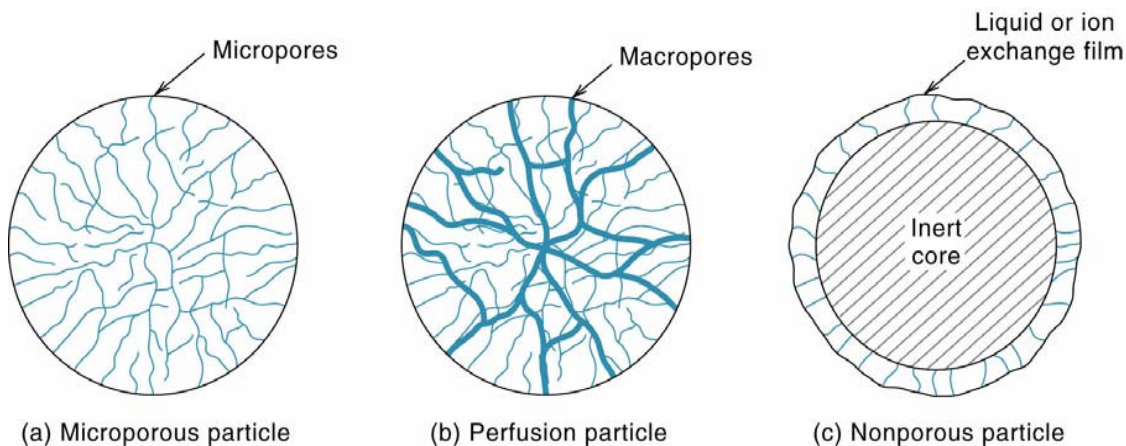


FIGURA 26-12 Gruppi funzionali organici potenzialmente rivelabili mediante misure elettroanalitiche. Le linee orizzontali mostrano il campo di potenziali di ossidazione o riduzione in cui sono elettroattivi i composti contenenti i gruppi funzionali indicati.

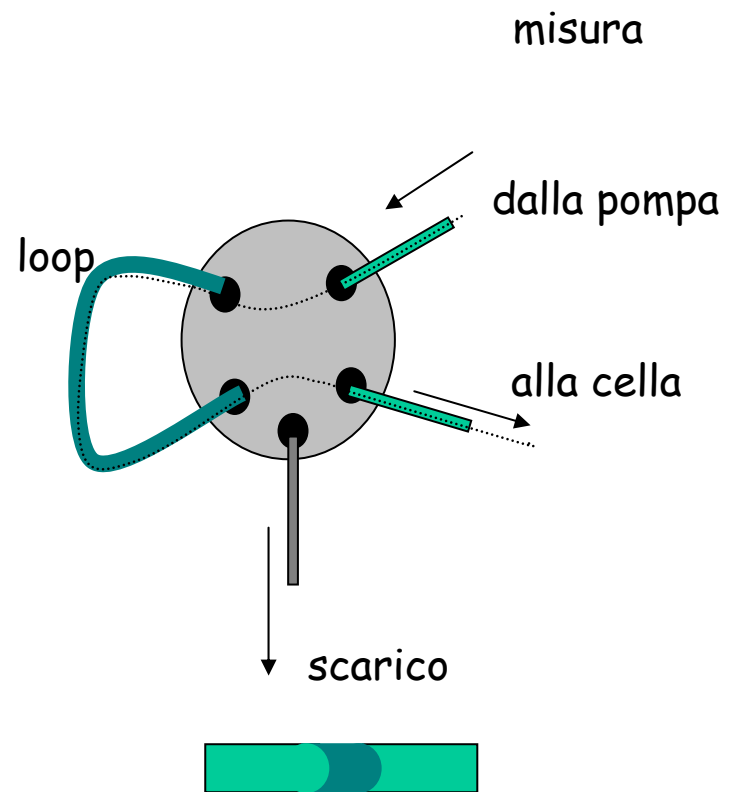
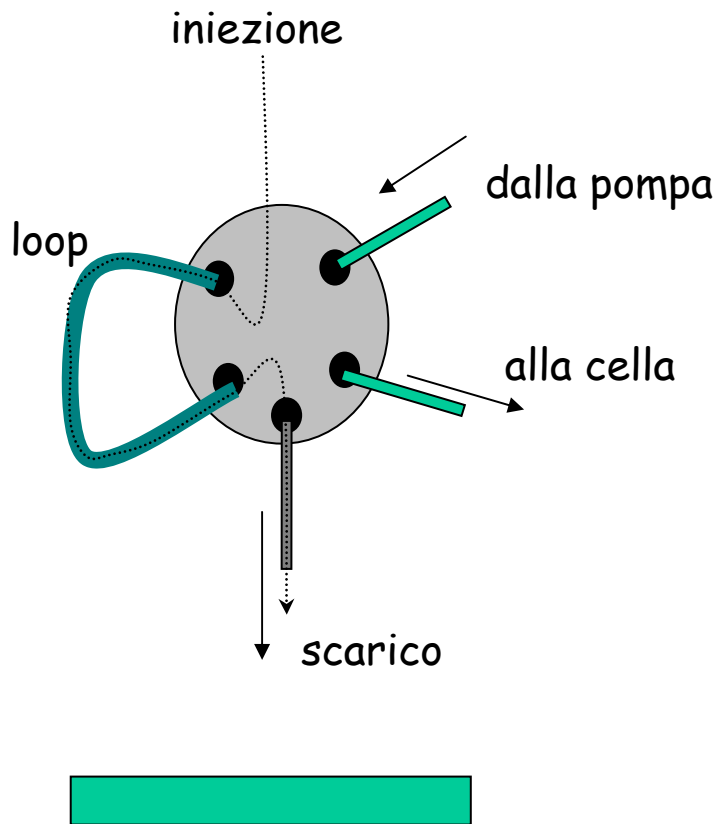
Nelle sfere microporose il soluto diffonde nella fase mobile stagnante bagnando i pori.

Le microsfele a perfusione hanno un mix di pori grandi e piccoli vengono usate a flussi elevati per molecole grandi e proteine. .

Microsfele non porose sono piccole (1.5-2.5 μm vs. 3-10 μm). Il film sottile non presenta fase mobile stagnante per un trasporto di massa ed una separazione rapidi. Presentano una capacità inferiore ed una contropressione elevata.



Colonne HPLC
N = 9000-15000

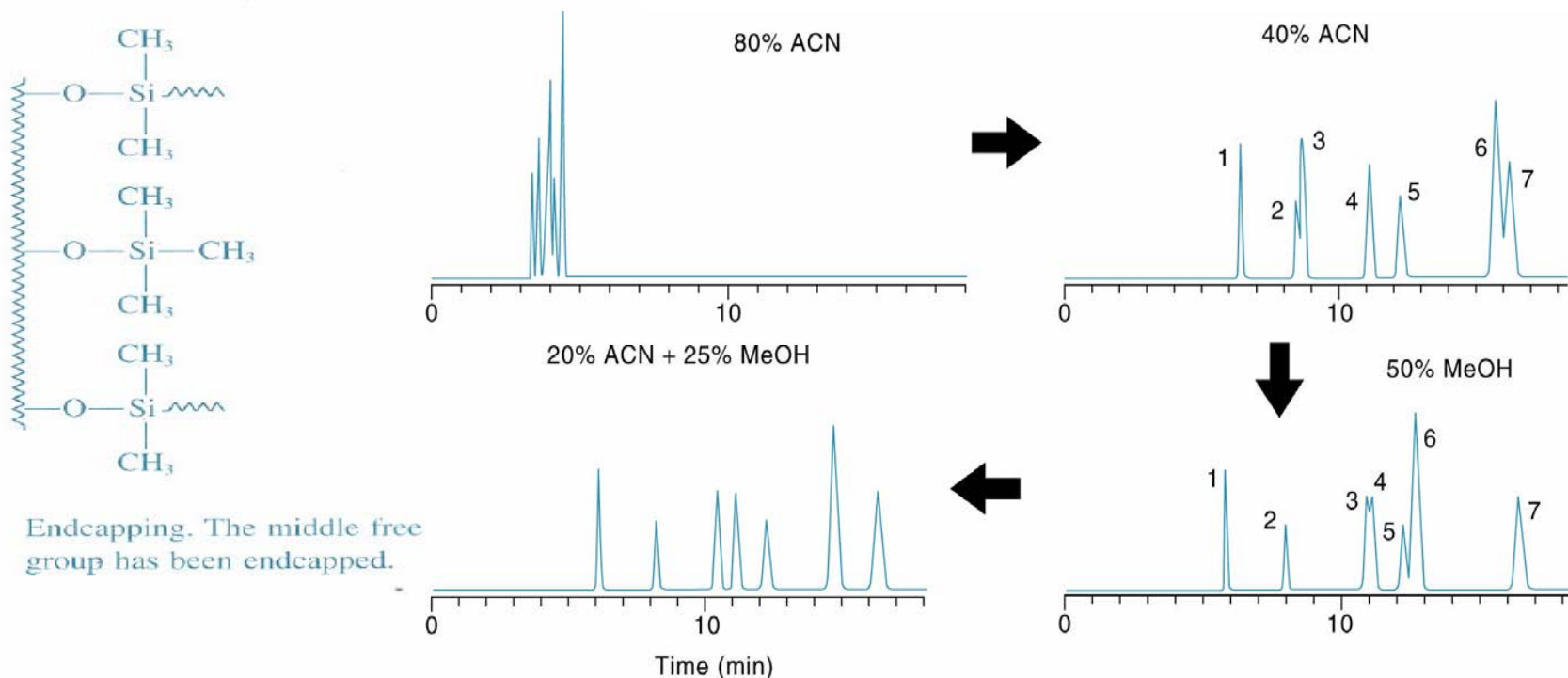


valvola ad iniezione

Cromatografia liquida di ripartizione a fase legata

Gruppi silanolici sulla fase stazionaria di silice fusa vengono legati a clorosilani per produrre una fase organica lipofila (C-8; C18)

La cromatografia si dice di **ripartizione a fase inversa**



In HPLC, le condizioni di separazione vengono variate cambiando la fase mobile.

Nell'esempio la polarità del solvente è stata aggiustata al fine di ottenere valori di 0.5 to 20 ($\alpha = k_2/k_1$).

Cromatografia a scambio ionico

La maggior parte delle separazioni utilizza resine con scambiatore acido forte.

Resine ad acido debole vengono utilizzate per proteine e peptidi ritenuti troppo fortemente da quelle ad acido forte.

Types of Ion Exchange Resins

Type of Exchanger	Functional Exchanger Group	Trade Name
<i>Cation</i>		
Strong acid	Sulfonic acid	Dowex ^a 50; Amberlite ^b IR120; Ionac ^c CGC-240; Rexyn ^d 101; Permutit ^e Q
Weak acid	Carboxylic acid	Amberlite IRC 50; Ionac CGC-270; Rexyn 102; Permutit H-70
<i>Anion</i>		
Strong base	Quaternary ammonium ion	Dowex 1; Amberlite IRA 400; Ionac AGA-542; Rexyn 201; Permutit S-1
Weak base	Amine group	Dowex 3; Amberlite IR 45; Ionac AGA-316; Rexyn 203; Permutit W

L'eluizione viene effettuata, in questo caso, con una soluzione di uno ione in grado di competere con gli analiti per i gruppi ionici della resina, il frazionamento avviene in base a K (p.es per una resina ad acido solfonico K va nell'ordine $Ba^{2+} > Pb^{2+} > Ca^{2+} > Ni^{2+} > Cd^{2+} \gg \gg Ag^+ > Cs^+ > K^+ > Na^+ > H^+ > Li^+$. Si può lavorare con un sistema a colonna singola o con *soppressore*

Cromatografia ad esclusione dimensionale

Le molecole penetrano nel gel in funzione della grandezza e della forma

Table 21.1

Sephadex Gels^a and Bio-Gels^b

Sephadex Type	Fractionation Range ^c for Peptides and Globular Proteins (MW)	Bio-Gel Type	Fractionation Range (MW)
G-10	Up to 700	P-2	100–1,800
G-15	Up to 1,500	P-4	800–4,000
G-25	1,000–5,000	P-6	1,000–6,000
G-50	1,500–30,000	P-10	1,500–20,000
G-75	3,000–70,000	P-30	2,500–40,000
G-100	4,000–150,000	P-60	3,000–60,000
G-150	5,000–400,000	P-100	5,000–100,000
G-200	5,000–800,000	P-150	15,000–150,000
		P-200	30,000–200,000
		P-300	60,000–400,000

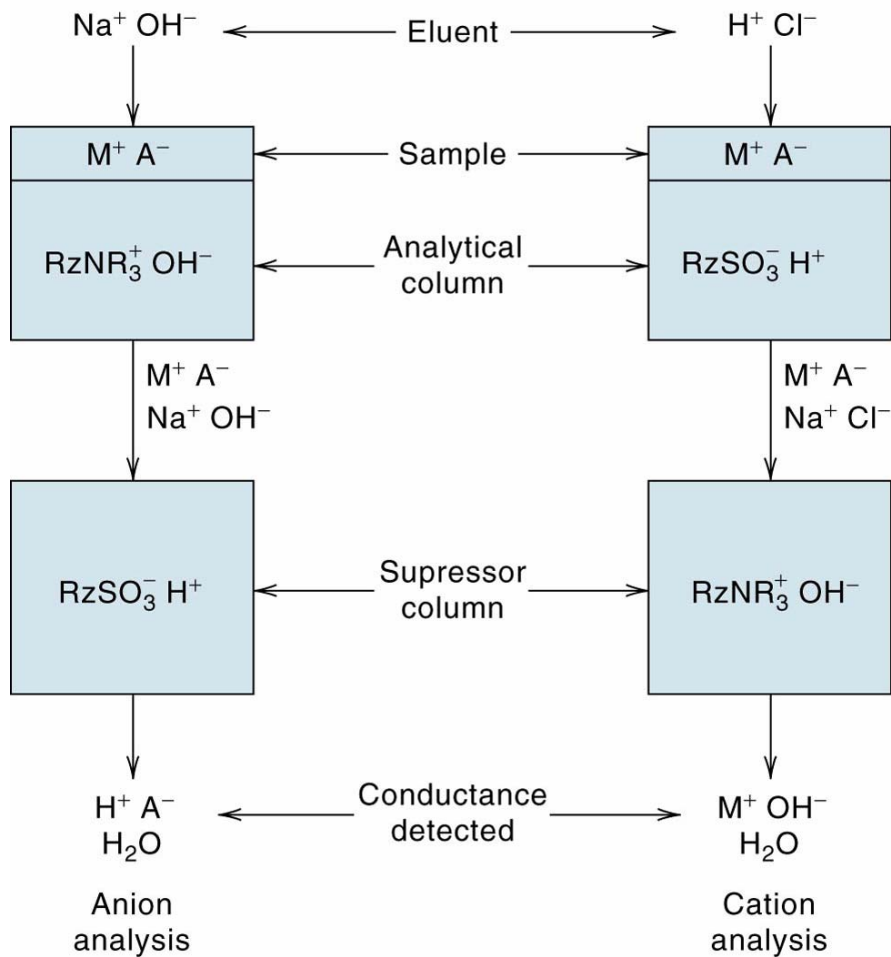
^aCourtesy of Pharmacia Fine Chemicals Inc.

^bCourtesy of Bio-Rad Laboratories.

^cUpper limit is the exclusion limit.

L'uso della colonna soppressore ha permesso la determinazione a bassi livelli di ioni mediante rivelatori conduttimetrici

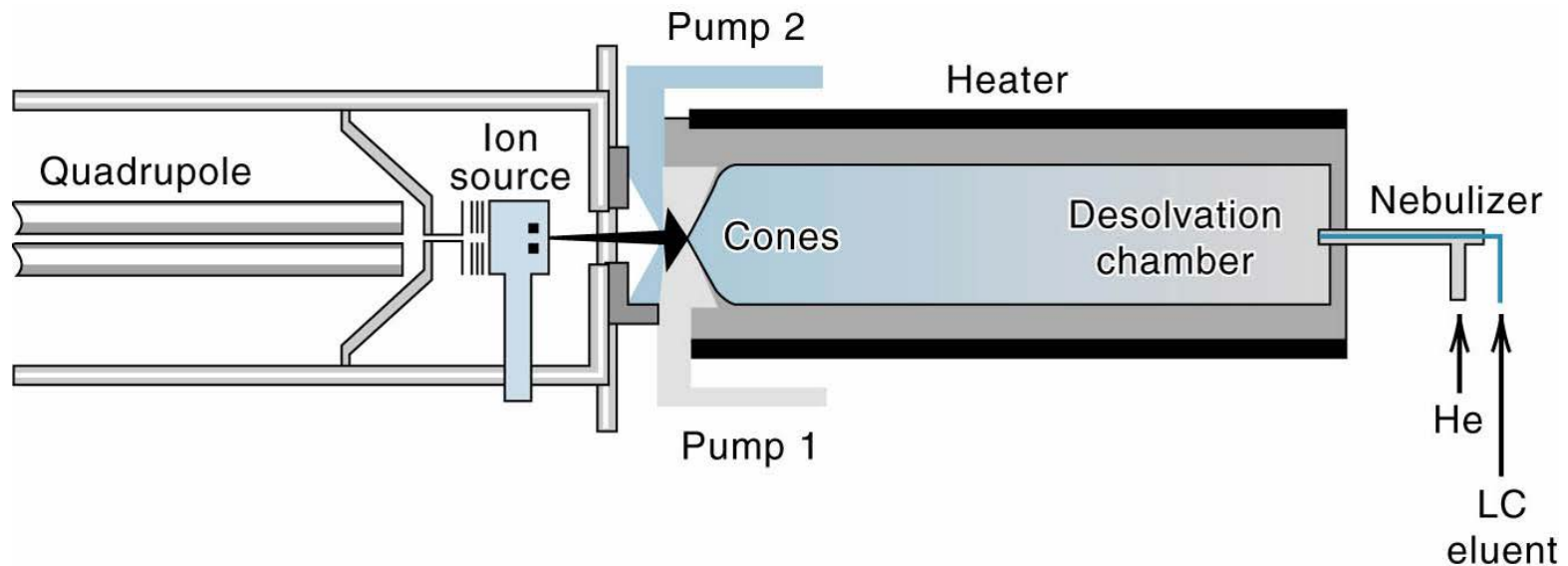
La colonna analitica separa gli analiti ionici, la colonna soppressore neutralizza il solvente riducendone la conducibilità e può convertire i sali ad acidi o basi forti



L'interfaccia per un HPLC-MS deve essere in grado di rimuovere il solvente e di convertire soluti labili non-volatili in forma gassosa.

Nell'interfaccia "particle beam" L'eluente viene nebulizzato con He in un aerosol in una camera riscaldata a bassa pressione. He e il solvente sono più leggeri e sono eliminati tramite una pompa

Gli analiti vengono introdotti in una sorgente ad impatto elettronico (EI).



L'interfaccia più utilizzata è l'elettrospray perché rappresenta un processo di ionizzazione soft.

Il campione viene nebulizzato ed è contemporaneamente soggetto ad una elevata differenza di potenziale all'interno dell'interfaccia. Si formano delle goccioline cariche che vengono desolvatate tramite calore e gas inerte. Le molecole cariche entrano nel rivelatore.

John Fenn ha ricevuto nel 2002 il premio Nobel in chimica per lo sviluppo dell'ESI

