

## 2024-06-20 esame stato SVOLGIMENTO

### PRIMA PARTE

l'analisi del rapporto metanolo/etanolo nel vino avviene mediante l'utilizzo della Gascromatografia con detector FID (detector a ionizzazione di fiamma).

La gascromatografia è una tecnica cromatografica in cui si ha una fase mobile gas e una fase stazionaria liquida (si tratta di un liquido ad altissima viscosità).

Il principio cromatografico su cui si basa questa tecnica è la ripartizione.

La ripartizione esprime la tendenza di una sostanza ad essere più affine alla fase stazionaria o alla fase mobile.

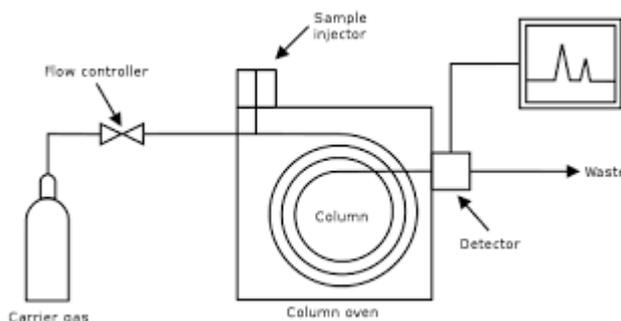
$$K_r = C_s / C_m$$

$C_s$  = concentrazione fase stazionaria

$C_m$  = concentrazione fase mobile

Questo permette la separazione nel tempo che intercorre prima dell'uscita dalla colonna, fra le sostanze presenti nella miscela.

### Schema a blocchi del gascromatografo con detector a ionizzazione di fiamma



I gas carrier utilizzati in gascromatografia possono essere azoto, elio o idrogeno.

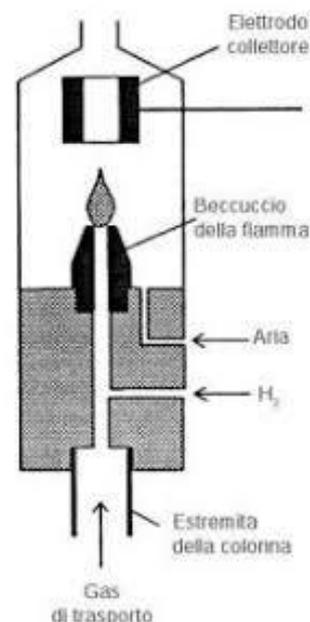
L'azoto risulta essere il più economico dei tre, ma meno efficace rispetto all'elio e all'idrogeno, tuttavia non è un ottimo gas carrier.

Elcio e idrogeno risultano essere buoni gas carrier anche se l'elio risulta essere più costoso e l'idrogeno più pericoloso per il rischio di esplosioni. Normalmente i gas carrier si trovano in bombole a 200 atm.

Un primo riduttore di pressione porta il gas contenuto nella bombola da 200 atm a 20 atm.

Un secondo riduttore di pressione porta il gas da 20 atm a 1,2/2 atm.

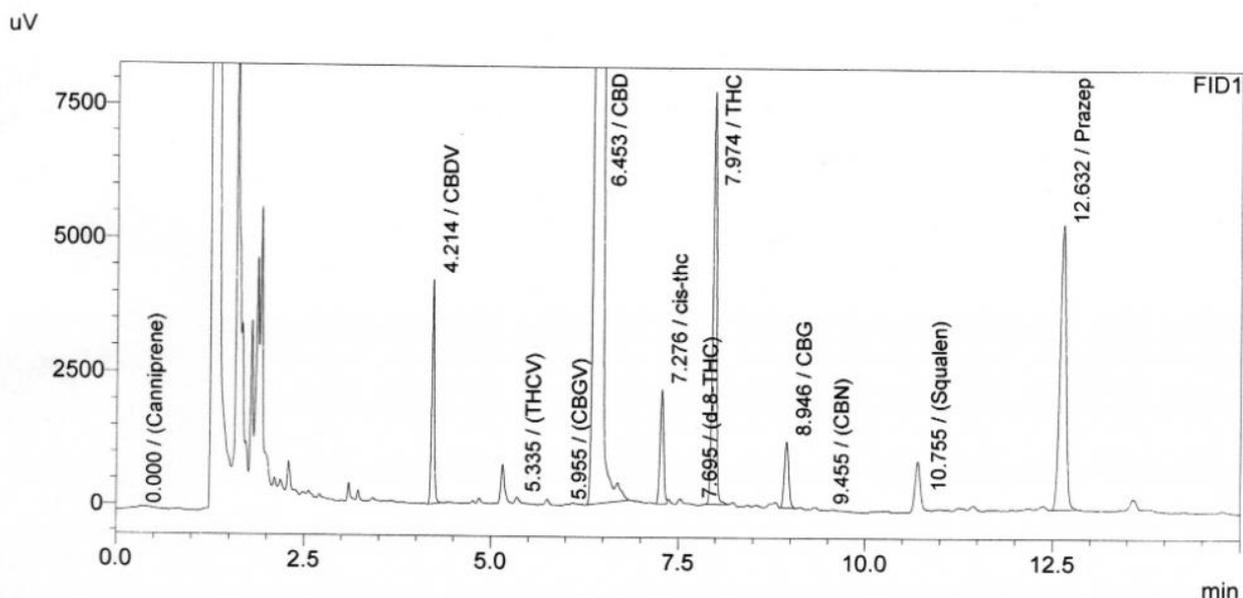
Il detector a ionizzazione di fiamma sfrutta una fiamma a idrogeno per produrre ioni come  $CO^+$  e  $C^+$ . Perché questi ioni si possano formare devono essere presenti sostanze contenenti carbonio, quindi sostanze organiche.



Schema del detector a ionizzazione di fiamma (FID)

La corrente generata da questi ioni viene rilevata da un Amperometro e riportata su un grafico rappresenta il cromatogramma.

In questo grafico viene riportato il tempo di ritenzione in minuti ( $T_r$ ) sull'asse X mentre sull'asse Y la corrente in mA o mV.



*Esempio di cromatogramma*

La determinazione della concentrazione di analita (in questo caso del metanolo) in gascromatografia avviene attraverso il metodo della retta di taratura con standard interno. Il rapporto metanolo/etanolo viene indicato come i ml di metanolo presenti in 100 ml di etanolo.

Si costruisce una retta di taratura con un range da 0,2 ml MetOH/100 ml EtOH a 1,2 ml MetOH/100 ml EtOH usando come standard di partenza una soluzione a 2 ml MetOH/100 ml EtOH.

Punti della retta di taratura:

0,2 ml MetOH/ 100 ml EtOH  
 0,5            "  
 0,8            "  
 1,2            "

Per calcolare il volume da prelevare dalla soluzione di partenza si applica la formula del fattore di diluizione:

Fattore di dil : Conc soluzione madre/conc che vogliamo ottenere

Volume da prelevare: Volume matraccio/fattore di diluizione

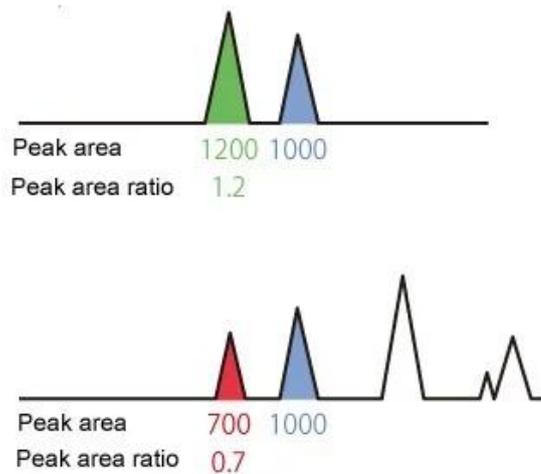
ml MetOH/100 ml EtOH	Volume da prelevare in ml
0.2	10 ml
0.5	25 ml
0.8	40 ml
1.2	60 ml

Gli standard della retta e lo standard di partenza vengono entrambi preparati in matracci da 100 ml con soluzioni idroalcoliche al 10 % di etanolo e si porta a volume con acqua. E' necessario creare questo ambiente negli standard per ricreare la matrice "vino". Il campione viene trattato distillando 100 ml di vino con un distillatore, il distillato viene raccolto in un matraccio da 100 ml e si porta a volume con acqua.

Una volta preparati gli standard della retta e il campione, in ogni matraccio si aggiunge 1 ml di standard interno.

Lo standard interno permette di compensare gli errori di volume e di perdita di analita durante il trattamento del campione assumendo che lo standard interno subisca una perdita analoga.

Lo standard interno deve comportarsi in maniera simile all'analita; per l'analisi del rapporto



metanolo/etanolo nel vino, si usa 2-metil-1-pentanololo.

Per creare la retta di taratura si riporta sull'asse x la concentrazione mentre sull'asse y si riporta il rapporto delle aree tra il picco del metanolo e quello dello standard interno.

Durante l'analisi dei campioni allo strumento è necessario lavorare in programmata di temperatura anziché in isoterma per far sì che la colonna si ripulisca ogni iniezione.

## SECONDA PARTE

### Quesito 1

L'equazione di Van Deemter è una equazione che permette di trovare il flusso ottimale quando si effettuano analisi in cromatografia.

L'equazione è la seguente:

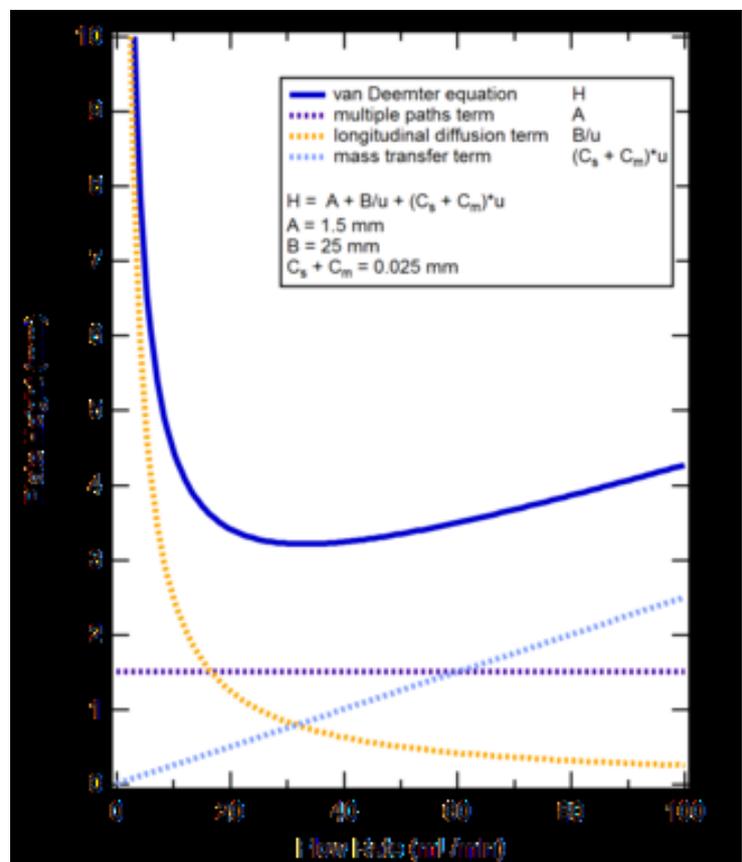
$$H = A + B/F + C * F$$

H corrisponde all'altezza del piatto teorico, A è il possibile cammino degli analiti nella colonna, B è la diffusione longitudinale degli analiti che aumenta con l'aumentare del tempo di stazionamento C è la resistenza al trasferimento di massa e F è il flusso.

Il flusso non deve essere troppo alto, per evitare che non si raggiunga l'equilibrio tra fase mobile e stazionaria per gli analiti.

Perciò bisogna trovare un flusso che permetta di ottimizzare al meglio l'efficienza della corsa cromatografica.

Tale efficienza è data dal numero di piatti della corsa.



Il numero di piatti è correlato all'interazione tra la fase mobile e la fase stazionaria. Minore è l'altezza del piatto teorico maggiore sarà il numero di piatti della separazione e quindi migliore l'efficienza di separazione.

## QUESITO 2

In chimica analitica uno dei metodi di preparazione degli standard per la costruzione delle rette di taratura è quello dell'aggiunta multipla.

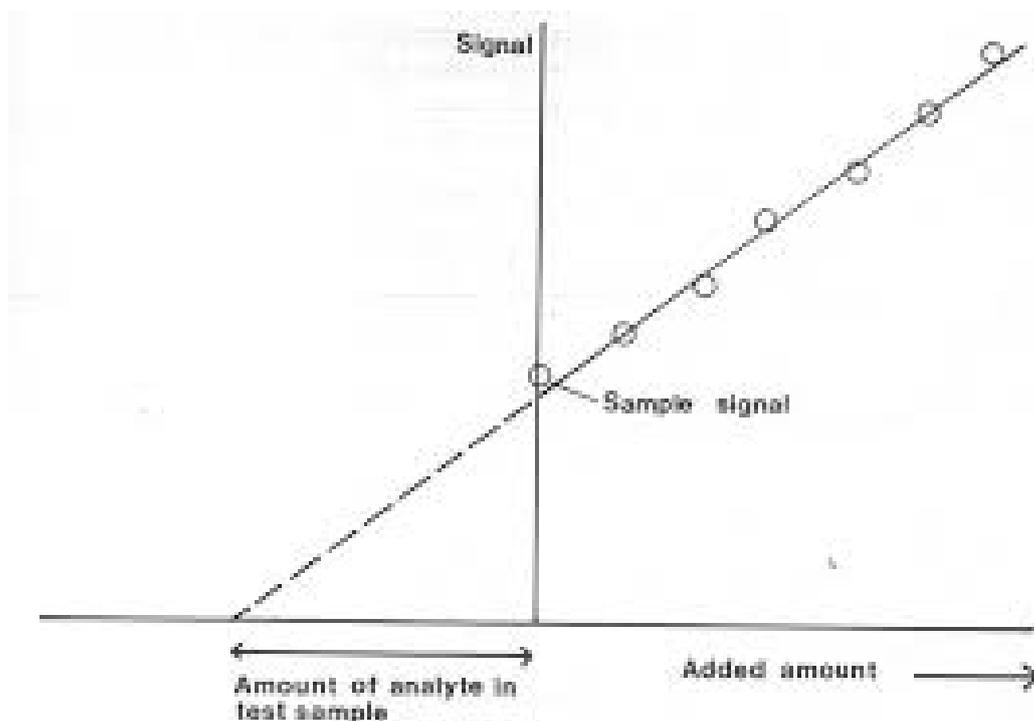
Questo metodo permette di ridurre le interferenze di matrice dato che nel metodo dello standard esterno l'ambiente non è lo stesso di quello dove si trova l'analita nel campione.

Un esempio di dove viene applicata questa tecnica è nell'analisi del rame nel vin santo mediante spettrofotometria di assorbimento atomico.

In 5 matracci da 50 ml si inseriscono 25 ml di campione, ed in ognuno di essi (eccetto per il primo matraccio) si aggiunge una quantità nota di analita, in questo caso si usa del solfato di rame.

In questo modo si ricrea in maniera più fedele possibile l'ambiente dove si trova l'analita riducendo le interferenze di matrice, dato che nel metodo dello standard esterno per questa analisi gli standard sarebbero stati preparati in ambiente acquoso.

La retta di taratura che ne deriva è una retta che non passa per l'origine.



Il risultato che ne deriverebbe sarebbe un valore negativo ma ne prendiamo il valore assoluto per ottenere un risultato positivo (infatti il processo comporta una transazione dell'asse cartesiano delle x).

## QUESITO 3

L' HPLC (cromatografia liquida ad alte pressioni) è una tecnica cromatografica in cui si ha una fase stazionaria solida e una fase mobile liquida.

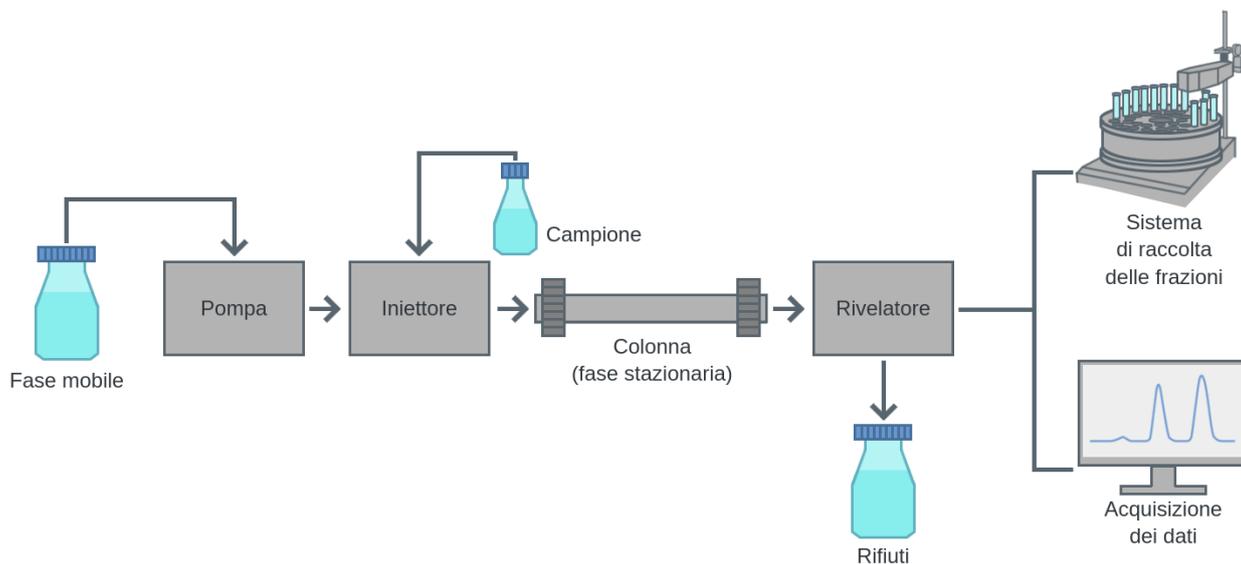
La tecnica si basa sulla diversa affinità dell'analita in esame alle due fasi.

Attualmente si preferisce lavorare in fase inversa in HPLC dove la fase stazionaria è apolare mentre la fase mobile è polare.

Volendo separare Acetone, toluene, Isoottano e etanolo l'ordine di uscita sarà il seguente:

- 1) Etanolo: E' il composto più polare, perciò è più affine alla fase mobile
- 2) Acetone: Anche l'acetone è abbastanza ma non come l'etanolo perciò esce per secondo.
- 3) Toluene: Il toluene è un idrocarburo aromatico perciò si tratta di un composto apolare ed è più affine alla fase stazionaria.
- 4) Isoottano: Anche l'isoottano è un composto apolare ma risulta avere una massa superiore al toluene perciò esce per ultimo

schema blocchi dell' HPLC:



- 1) Bottiglie contenenti i solventi HPLC grade che andranno a costituire l'eluente. I più usati attualmente sono: Acqua, metanolo, acetonitrile e acetone. L'acetone non è raccomandato specialmente se il detector utilizzato è uno spettrofotometro UV/visibile dato che il carbonile è un gruppo cromoforo e potrebbe influire sull'analisi.
- 2) Se l'analisi lo richiede è possibile usare anche dei tamponi acidi o basici. La pompa quaternaria aspira i solventi e crea l'eluente con la composizione da noi indicata. Prima di arrivare alla pompa, i solventi passano attraverso un degasser per eliminare le possibili bolle d'aria presenti. La pompa inoltre regola anche il flusso di eluente che va a influire sulla pressione esercitata sulla colonna
- 3) L'iniettore Rheodyne® permette di iniettare il campione all'interno dello strumento. E' costituito da due dischi in teflon e un loop da 40 µl. Si effettuano normalmente iniezioni da 20/40 µl con una siringa per HPLC.
- 4) La colonna è una colonna in acciaio dove all'interno è contenuta la fase stazionaria. Qui avviene la separazione cromatografica.

5) Il detector rileva il tempo di ritenzione e effettua la misurazione del segnale dell'analita può essere di vari tipi: Spettrofotometro UV/visibile, Fluorimetro, Detector a matrice di diodi.

E' possibile abbinare anche uno spettrometro di massa con Interfaccia Elettrospray.

6) Sul computer viene visualizzato il cromatogramma e la scheda di conversione analogico digitale permette di comunicare con tutto lo strumento.

In un cromatogramma bisogna tenere conto di alcuni fattori:

**Risoluzione** dei picchi la cui formula è la seguente

$$\frac{Tr_2 - Tr_1}{(W_1 + W_2) / 2}$$

**Tr = tempo di ritenzione**

$W_1$  e  $W_2$  = larghezze alla base dei picchi

Questo fattore determina con che facilità è possibile distinguere due picchi vicini

Numero dei piatti teorici:

$$N = 16 * (Tr/Wb)^2$$

Tr = tempo di ritenzione

Wb = Larghezza del picco alla base

Fattori che possono influenzare la separazione cromatografica sono:

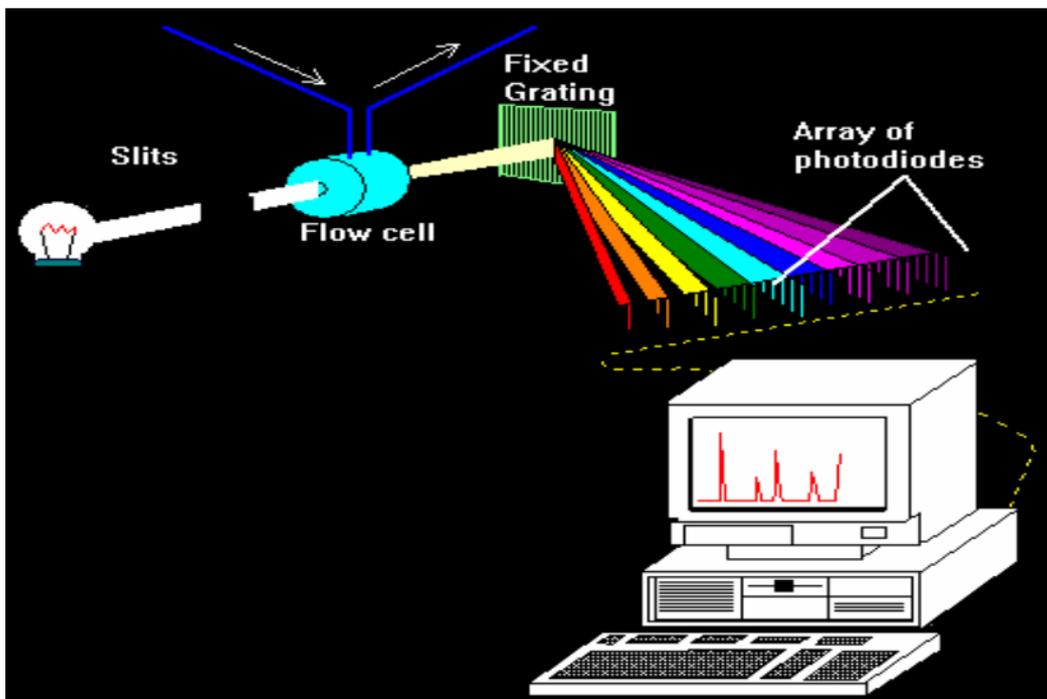
- Il flusso che di conseguenza influisce anche sulla pressione esercitata sulla colonna
- La temperatura che aumenta l'agitazione termica delle sostanze nella colonna.
- La modalità di lavoro se si lavora in eluizione isocratica o gradiente.

Con l' eluizione isocratica la concentrazione dell' eluente rimane costante, mentre lavorando in gradiente durante la corsa si cambia la composizione dell' eluente.

Lavorare in gradiente risulta avere degli svantaggi: Si rischia di avere una linea nel cromatogramma con deriva, l'analisi può richiedere più tempo dato che la pompa deve ricostituire l' eluente.

## DETECTOR PER HPLC

Detector a matrice di diodi



1) Lampada allo xeno: Questa lampada è in grado di coprire sia le lunghezze d'onda dell'ultravioletto.

- 2) Cuvetta: Qui arriva il flusso di eluente con gli analiti ed è qui che avviene il fenomeno di assorbimento.
- 3) Il monocromatore in questo detector è un' elemento fisso che separa tutte le varie lunghezze d'onda provenienti dalla cuvetta.
- 4) La matrice di diodi capta le varie lunghezze d'onda, può essere presente anche un diodo per nm.
- 5) La scheda di conversione analogico digitale permette di comunicare con tutto lo strumento.

Questo detector ha una sensibilità minore rispetto ad un normale spettrofotometro UV visibile, perciò lo si usa per identificare le sostanze presenti nelle matrici dato che per ogni picco cromatografico si ottiene uno spettro UV/visibile.

È molto utile nel campo delle scienze forensi per esempio come metodo per riconoscere un tipo di inchiostro usato per firmare i documenti.

Questo detector si basa sulla capacità di alcuni composti di emettere luce se eccitati con la corretta lunghezza d'onda. Questa proprietà viene chiamata fluorescenza e viene misurata con la luminanza.

Questo detector è stato ampiamente utilizzato in passato per l'analisi di sostanze molto pericolose per l'uomo, ovvero le micotossine le cui caratteristiche includono anche la fluorescenza. Sono sostanze prodotte dalle muffe e sono principalmente presenti su alimenti contaminati da questi organismi e hanno limiti di legge molto bassi che possono arrivare alle parti per trilione. Alcuni di queste sostanze sono le aflatossine e le fumonisine. L'alta sensibilità di questo detector ha permesso di analizzare queste sostanze, tuttavia questo detector richiede un'adeguata purificazione del campione con apposite colonnine di immunoaffinità ad elevati costi.

Questo detector ad oggi è stato sostituito con le moderne tecniche di spettrometria di massa come il triplo quadrupolo che non richiede un'attenta purificazione come per il fluorimetro.

#### Quesito 4

Nell'analisi UV/visibile si può lavorare sia a lunghezza d'onda fissa che a lunghezza d'onda variabile.

Si lavora a lunghezza d'onda fissa quando sappiamo cosa stiamo andando a ricercare e quantificare nella nostra matrice.

Si lavora a lunghezza d'onda variabile quando dobbiamo effettuare uno spettro per identificare una molecola nella nostra matrice o per verificare che la lunghezza d'onda selezionata per l'analisi a lunghezza d'onda fissa sia quella esatta ovvero dove si registra la massima assorbanza.

Questa tecnica spettrofotometrica si basa sulla capacità delle sostanze di assorbire la luce a certe lunghezze d'onda.

Si utilizza l'assorbanza come unità di misura che è descritta dalla legge di Lambert-Beer:

$$A = a \cdot b \cdot c$$

Dove  $a$  è il coefficiente di assorbimento che viene indicato con la lettera greca  $\epsilon$  se si usa la concentrazione  $c$  in mol/l.  $b$  è il diametro della cuvetta che normalmente è di 1 cm.

Altro fattore su cui si basa questa tecnica è la trasmittanza ovvero la capacità di una sostanza di trasmettere la luce.

viene indicata come il rapporto tra la luce incidente e la luce trasmessa. La si può mettere in correlazione con l'assorbanza tramite la seguente formula:

$$A = \log_{10}(1/T)$$

La trasmittanza può assumere valori da 0 a 1.

0 significa che la luce è stata completamente assorbita mentre se la trasmittanza ha un valore pari a 1 la luce è stata completamente trasmessa