

Esercitazione 5: analisi HPLC di un composto aromatico

Strumentazione e condizioni cromatografiche

- ◆ Cromatografo ad alta pressione **Jasko PU-2089 Plus**
- ◆ iniettore a sei vie **Rheodyne** con loop da 20 μL
- ◆ colonna **Supelco** per cromatografia di ripartizione in fase inversa con fase stazionaria C18, avente lunghezza 25 cm, diametro interno 4.6 mm e diametro delle particelle dell'impaccamento 5 μm ;
- ◆ rivelatore UV a singola lunghezza d'onda **Jasko UV-2075 Plus**, impostato a $\lambda = 235 \text{ nm}$;
- ◆ interfaccia analogico-digitale **Jasko LC-Net-II/ADC**
- ◆ computer per il controllo della strumentazione e l'acquisizione/elaborazione dei cromatogrammi mediante il software **ChromNav**.

Tipo di eluizione: isocratica, con una miscela $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{OH}$ (45/55% v/v) contenente acido acetico 0.2 % (v/v), ad un flusso di 1 mL/min.

NOTA: La fase mobile è posta a riciclo, essendo trascurabile l'interferenza del composto precedentemente iniettato, progressivamente introdotto al suo interno.



Soluzioni

Soluzione madre del composto da analizzare. All'inizio dell'esercitazione sarà già disponibile una soluzione, indicata come **soluzione 0** e preparata con acqua di grado HPLC, del composto **4-cloro-fenolo** ad una concentrazione di **100 ppm** ($\mu\text{g/mL}$)

Condizionamento del sistema cromatografico

All'inizio dell'esercitazione la linea HPLC sarà già predisposta per le separazioni cromatografiche.

In particolare, sarà stato già premuto il tasto **Degasser** posto sul pannello del cromatografo, che accende il degassatore sottovuoto per le linee di solvente.

Sarà stata inoltre accesa la pompa cromatografica con flusso di fase mobile già attivato, per permettere un pre-condizionamento della colonna.

Il display del cromatografo mostrerà dunque i seguenti parametri:

Flow (mL/min): un valore di **1.0 mL/min**

Timer: A (indica, in realtà, la riserva di solvente impiegata)

Press: 160-180 (la pressione è misurata direttamente in atmosfere, non in MPa, come indicato vicino al display, e potrà variare in relazione alla temperatura del laboratorio)

P. Max: 290

P. Min: 0

Preparazione dei campioni e caricamento del loop di iniezione

A partire dalla **soluzione 0** andranno preparate, **SOTTO CAPPASPIRANTE** ed **usando ESCLUSIVAMENTE acqua di grado HPLC**, mediante una micropipetta da 200 µL (P200), le seguenti soluzioni, operando successive diluizioni 1 a 2:

Soluzione 1, 50 ppm: 200 µL di soluzione 0 + 200 µL di acqua HPLC;

Soluzione 2, 25 ppm: 200 µL di soluzione 1 + 200 µL di acqua HPLC;

Soluzione 3, 12.5 ppm: 200 µL di soluzione 2 + 200 µL di acqua HPLC;

Soluzione 4, 6.25 ppm: 200 µL di soluzione 3 + 200 µL di acqua HPLC.

Le soluzioni saranno preparate e poi conservate in **tubi Eppendorff con tappo a scatto**, opportunamente numerati, già disponibili sotto cappa.

Completata la preparazione delle soluzioni, sarà possibile effettuare la prima iniezione, che riguarderà la soluzione 100 ppm (**soluzione 0**).

A tal fine occorrerà prelevare la soluzione con la **microsiringa HPLC da 100 μ L**, che verrà fornita dal docente, facendo in modo che non vi siano bolle d'aria all'interno.

Dopo aver controllato che la valvola di iniezione del sistema HPLC sia in posizione LOAD, si potrà inserire l'ago della microsiringa all'interno del foro posto sulla parte anteriore della valvola, spingendolo finché è possibile (si avverterà un blocco, ad un certo punto).

A seguire, si inietterà lentamente la soluzione contenuta nella microsiringa, accertandosi che il suo eccesso goccioli dal tubicino collegato alla porta **WASTE** (scarico) dell'iniettore, posta sulla parte posteriore di quest'ultimo.

La siringa resterà inserita nella valvola dopo aver completato l'operazione e fino a quando l'iniettore passerà alla posizione INJECT.

Acquisizione dei cromatogrammi

L'impostazione e acquisizione dei cromatogrammi avverrà all'interno della sezione **Single Run Monitor** appartenente al menu **Acquisition View** del software **ChromNav**, che sarà stato preventivamente avviato dal docente.

Nella sezione **Single Run Monitor** andranno specificate le seguenti informazioni (per quelle non indicate di seguito basterà lasciare le impostazioni di base già presenti):

Sequence Name: indicare il **nome del gruppo di lavoro**, in modo da aprire una sequenza che conterrà tutte le analisi del gruppo;

Chromatogram Name: indicare il **nome del file relativo al cromatogramma** che si sta per acquisire, specificando il nome del gruppo e la concentrazione di 4-Cl-fenolo iniettata, ad esempio GrA100ppm, GrA50ppm,, GrAincognita.

Control Method: cliccare sulla piccola icona con tre puntini posta accanto alla riga del metodo di controllo e **selezionare il file 4-cl-fenolo** nella finestra che si aprirà. Tale file contiene tutte le informazioni necessarie per l'effettuazione della corsa cromatografica (durata, valore del flusso, modalità di eluizione, che in questo caso sarà isocratica, lunghezza d'onda scelta per il monitoraggio dell'assorbanza).

Una volta caricato il metodo, specificare l'**Acq. Time**, in modo che sia analogo a quello impostato nel metodo, ossia **7 minuti**. Specificare anche il **Volume(μ L)**, ossia il volume di iniezione, pari a 20 μ L in questo caso.

Dopo aver controllato tutte le impostazioni si potrà avviare la fase di acquisizione, cliccando sull'icona **START**, **caratterizzata dal classico simbolo triangolare usato per il comando Play**. In alto nella finestra del software comparirà l'indicazione **Run/Wait** per il **System Status**, ad indicare che il software è in attesa che la corsa abbia inizio, con la rotazione della valvola dell'iniettore verso la posizione INJECT.

A questo punto sarà possibile dare inizio alla prima corsa cromatografica, **spostando la leva della valvola di iniezione da LOAD ad INJECT con uno scatto netto in senso orario.**

Con la rotazione della leva un segnale elettrico verrà inviato all'interfaccia analogico-digitale, dando inizio alla registrazione del cromatogramma.

Subito dopo, il **System Status** passerà nella condizione **RUN** e la sezione corrispondente si colorerà di verde chiaro.

Durante la corsa sarà possibile visualizzare in tempo reale il cromatogramma cliccando sulla **sezione Chromatogram Monitor** nel menu **Acquisition View**.

Trascorso il tempo previsto per la corsa (in questo caso 7 minuti) il file del cromatogramma verrà salvato automaticamente nel computer; tuttavia, l'acquisizione del segnale continuerà e **per interromperla occorrerà cliccare sull'icona EDIT**, posta subito a destra dell'icona START.

ATTENZIONE: non cliccare sull'icona STOP per fermare l'acquisizione perché tale comando farebbe in realtà spegnere la pompa cromatografica.

L'intera operazione descritta finora andrà ripetuta per tutte le successive soluzioni standard da analizzare, avendo cura di riportare manualmente in posizione LOAD la valvola di iniezione subito dopo il completamento di una corsa cromatografica.

Elaborazione dei dati relativi alle soluzioni standard

L'elaborazione dei dati avverrà accedendo alla sezione Analysis, la cui indicazione si trova a sinistra in basso nella pagina generale del software.

All'interno di tale sezione si potrà accedere al **menù File** e poi al sotto-menù **Open Chromatogram**. Da quest'ultimo si potrà selezionare la sequenza di interesse (quella del proprio gruppo) e poi il cromatogramma da elaborare.

L'elaborazione consisterà nel fissare i limiti di integrazione del picco del 4-Cl-fenolo, che eluirà a 6-7 minuti.

A tal fine occorrerà cliccare sull'icona contenente un picco gaussiano tagliato da una matita e, nella finestra che si aprirà, sull'icona contenente solo un picco gaussiano.

Una matita virtuale comparirà nel tracciato, "agganciata" alla sua linea di base.

La matita andrà posizionata in un punto opportuno alla sinistra del picco di interesse, che corrisponderà all'inizio dell'intervallo di integrazione. Una volta scelto il punto **occorrerà fissarne la posizione cliccando sul tasto sinistro del mouse**. A seguire si selezionerà in modo analogo il limite destro di integrazione.

Il software estrapolerà la linea di base sotto il picco di interesse e procederà alla sua integrazione, oltre che alla determinazione di una serie di altri parametri, indicati in un'apposita tabella.

Per accettare l'elaborazione occorrerà **cliccare sull'icona contenente un segno di spunta all'interno di un cerchio, posta in alto nella schermata**. A seguire **occorrerà cliccare sul tasto Apply**.

Si aprirà una finestra riassuntiva dell'elaborazione appena effettuata, i cui risultati, insieme al tracciato cromatografico, potranno essere stampati in forma PDF usando il comando di stampa per generare file di questo tipo.

Nei risultati sarà compresa, per ogni corsa, una **valutazione del numero di piatti teorici (NTP) effettuata per il picco di interesse dal software**.

I file PDF riassuntivi per le varie corse cromatografiche andranno salvati su pen drive alla fine dell'esercitazione.

Completamento della sequenza di iniezione degli standard

Seguendo le istruzioni riportate negli ultimi due paragrafi si potrà procedere con la sequenza di iniezione degli standard, che sarà costituita da **un replicato per ogni soluzione, nell'ordine da 0 a 4**.

Dopo aver eseguito il ciclo completo di misure sulle cinque soluzioni sarà possibile costruire, a casa, la **retta di taratura per il 4-cloro-fenolo**, riportando le aree del picco cromatografico in funzione della concentrazione iniettata. Per la costruzione della retta si avranno a disposizione in tutto 5 punti.

In fase di stesura della relazione sull'esercitazione i dati verranno sottoposti al **trattamento con il metodo dei minimi quadrati** ed andrà calcolato il **limite di rivelabilità** per l'analita. Anche in questo caso occorrerà **calcolare il LOD con entrambi i metodi spiegati a lezione e riportarlo con una sola cifra significativa, salvo che la prima cifra del valore non sia 1 perché in tal caso il LOD andrà riportato con due cifre significative.**

Analisi del campione incognito e valutazione dell'altezza di piatto teorico

A ciascun gruppo di lavoro verrà fornito dal docente, nella fase finale dell'esercitazione, un campione contenente 4-cloro-fenolo a concentrazione incognita.

Su tale campione verrà effettuata una corsa cromatografica, seguendo la stessa procedura adottata in precedenza per gli standard.

Partendo dal **valore dell'area di picco** ottenuto in questa corsa per il 4-cloro-fenolo e dalla retta di calibrazione si potrà valutare la concentrazione, con relativo intervallo di fiducia, dell'analita.

Per quanto concerne l'**altezza di piatto teorico**, la valutazione avverrà, a casa, stampando il cromatogramma corrispondente alla concentrazione più piccola dello standard (6.25 ppm) e tracciando le tangenti al picco del 4-Cl-fenolo nei suoi punti di flesso, per poi ricavare il parametro W e, noti anche il tempo di ritenzione e la lunghezza della colonna (25 cm), risalire al valore di H e a quello del numero di piatti teorici (L/H , con L = lunghezza della colonna).

Poiché, come evidenziato in precedenza, il software ChromNav fornirà in automatico per ogni corsa una stima del numero di piatti teorici (NTP) a partire dal picco del 4-Cl-fenolo, sarà possibile confrontare la sua stima con quella emersa dal disegno delle tangenti, nel caso della soluzione 6.25 ppm.

Sarà anche possibile confrontare i valori NTP ottenuti dal software per le varie corse, evidenziando nella relazione se essi siano riproducibili o meno al variare della concentrazione iniettata.

NOTA IMPORTANTE: al termine delle corse cromatografiche le soluzioni andranno scaricate, **SOTTO CAPPASPIRANTE**, nel contenitore apposito. Successivamente, i tubi Eppendorff che le contenevano andranno lavati con acqua HPLC, trasferendone al loro interno circa 1 mL con la pipetta P1000, tappandoli e agitandoli vigorosamente.

Anche l'acqua di lavaggio andrà poi scaricata nel contenitore di cui sopra e i tubi Eppendorff andranno lasciati con il tappo aperto per consentire l'evaporazione dell'acqua di lavaggio residua.