

Esercitazione 7: analisi di anioni in campioni di acqua mediante cromatografia ionica

Strumentazione e condizioni cromatografiche

- ◆ Cromatografo ionico Dionex ICS90 con soppressore a membrana, **occasionalmente integrato da pompa HP1050, in sostituzione della pompa intrinseca del cromatografo;**
- ◆ colonna per cromatografia ionica di anioni: lunghezza 25 cm, diametro interno 4 mm, diametro delle particelle dell'impaccamento 4 μm ;
- ◆ rivelatore conduttimetrico, preceduto da un soppressore ionico a membrana;
- ◆ computer per l'acquisizione ed elaborazione dati

Tipo di eluizione: isocratica, con una soluzione CO_3^{2-} 12 mM / HCO_3^- 1.5 mM, ad un flusso pari ad 1 mL/min.

Soppressione ionica: con dispositivo a membrana, sottoposto a rigenerazione continua mediante soluzione di H_2SO_4 30 mM.

Materiale già disponibile

Soluzione standard più concentrata (**Standard 1**) dei quattro anioni da analizzare:

F⁻ 2.5 ppm,
Cl⁻ 25 ppm,
NO₃⁻ 5 ppm,
SO₄²⁻ 25 ppm

Acqua per cromatografia ionica, contenuta in una bottiglia in plastica, da trasferire in un'apposita spruzzetta, per agevolare il prelievo delle aliquote necessarie per preparare le soluzioni.

L'eluente e il rigenerante per il soppressore saranno già pronti all'interno dei rispettivi contenitori in polietilene da 2 L, montati sul cromatografo.

Preparazione delle altre soluzioni standard dei quattro anioni

Standard 2: prelevare con una pipetta **10 mL** dello Standard 1, trasferirli in un matraccio da **20 mL** e portare a volume con acqua per cromatografia ionica. Le concentrazioni finali saranno: **F⁻ 1.25 ppm, Cl⁻ 12.5 ppm, NO₃⁻ 2.5 ppm e SO₄²⁻ 12.5 ppm**

Standard 3: prelevare con una pipetta **10 mL** dello Standard 2, trasferirli in un matraccio da **20 mL** e portare a volume con acqua per cromatografia ionica. Le concentrazioni finali saranno: **F⁻ 0.625 ppm, Cl⁻ 6.25 ppm, NO₃⁻ 1.25 ppm e SO₄²⁻ 6.25 ppm**

Standard 4: prelevare con una pipetta **10 mL** dello Standard 3, trasferirli in un matraccio da **20 mL** e portare a volume con acqua per cromatografia ionica. Le concentrazioni finali saranno: **F⁻ 0.313 ppm, Cl⁻ 3.125 ppm, NO₃⁻ 0.625 ppm e SO₄²⁻ 3.125 ppm**

Standard 5: prelevare con una pipetta **10 mL** dello Standard 4, trasferirli in un matraccio da **20 mL** e portare a volume con acqua per cromatografia ionica. Le concentrazioni finali saranno: **F⁻ 0.157 ppm, Cl⁻ 1.563 ppm, NO₃⁻ 0.313 ppm e SO₄²⁻ 1.563 ppm**

Porre ESTREMA cura nella preparazione delle soluzioni standard, sciacquando di volta in volta la pipetta con acqua deionizzata prima di usarla per una successiva preparazione.

Le soluzioni standard **andranno filtrate prima di essere iniettate** nel cromatografo. L'operazione andrà effettuata con l'ausilio di microfiltri, secondo tale procedura:

- 1) versare un'aliquota di soluzione da filtrare in una provettina in plastica;
- 2) prelevare circa 1 mL di soluzione con una siringa in plastica, dotata di un opportuno raccordo (quello con pallino rosso);
- 3) staccare il raccordo e montare sulla siringa un filtro con porosità da 0.45 µm o inferiore;
- 4) filtrare, spingendolo attraverso il filtro, circa 1 mL di soluzione, che verrà raccolta in un'altra provettina in plastica. Se la soluzione filtrata appare insufficiente, ripetere le operazioni 2-4.

Le provettine di cui ai punti 1 e 4, opportunamente contrassegnate (X e XF, rispettivamente, con X che rappresenta il numero dello standard), saranno sistemate in un porta-campione in polistirene provvisto di notazioni corrispondenti, per evitare lo scambio accidentale fra soluzioni.

Impostazione del cromatografo

All'inizio dell'esercitazione il cromatografo ed il computer che lo gestisce, **nonché la pompa HP1050 sostitutiva della pompa intrinseca del cromatografo ICS90**, saranno già accesi.

Cliccare sull'icona **PeakNet** presente sul Desktop: si aprirà la finestra di controllo generale (Browser) del cromatografo, divisa in tre sezioni.

Nella sezione posta a sinistra sarà visibile l'icona della cartella **ICS90**, all'interno della quale sono state già predisposte delle sequenze di acquisizione, ciascuna contrassegnata con la lettera del gruppo che effettua l'esercitazione.

Riconosciuta la propria sequenza (ciascuna è contrassegnata da un'icona azzurra), occorrerà cliccare sull'icona corrispondente.

Nella parte destra della finestra generale saranno visibili due sezioni. Quella più in alto contiene i seguenti file di gestione della sequenza di acquisizione:

ANIONI.PGM: stabilisce i parametri della corsa cromatografica (durata, velocità di flusso, contropressione massima, ecc.);

ANIONI.QNT: stabilisce le modalità di riconoscimento ed integrazione dei picchi cromatografici osservati;

PANNELLO DI CONTROLLO.PAN: è la finestra da cui si può gestire l'acquisizione, nonché l'accensione stessa della pompa cromatografica.

Cliccando sulla riga corrispondente a quest'ultimo file si aprirà tale finestra, che dovrà essere mantenuta aperta per tutta la durata dell'esperienza.

Al suo interno sarà visibile la sotto-finestra **CONNECT**. Per collegare il cromatografo al computer, se non è già collegato, occorrerà cliccare sul tasto **Connect**.

L'operazione successiva sarà il progressivo incremento del flusso della fase mobile, che avverrà operando sulla tastiera della pompa HP1050, sotto la supervisione del docente.

In particolare, si procederà, in sequenza, all'accensione della pompa cromatografica e all'aumento del flusso di fase mobile, per stadi successivi, fino a raggiungere il flusso finale di 1 mL/min e una pressione di circa 160 bar.

Via via che la fase mobile comincerà a scorrere nella colonna cromatografica e, a seguire, nel soppressore ionico e nel rivelatore conduttimetrico, la conducibilità indicata sul monitor del computer, nell'apposito spazio del pannello di controllo, comincerà a diminuire, per poi stabilizzarsi progressivamente su un valore basso.

Preparazione della sequenza di acquisizione dei campioni.

L'esercitazione prevede l'analisi di **cinque soluzioni standard**, contenenti fluoruro, cloruro, nitrato e solfato, nelle concentrazioni indicate in precedenza, e successivamente, se vi sarà tempo utile, l'analisi di un **campione reale di acqua**, portato dai componenti del gruppo.

La sequenza delle analisi necessarie (denominata *Batch*) sarà già impostata per ciascun gruppo di lavoro e verrà caricata e fatta partire all'inizio dell'esercitazione, con la collaborazione del docente.

La sequenza potrà essere aperta mediante l'opzione *Open* all'interno del menu **File** contenuto nel *Pannello di Controllo*, che consente di scegliere una delle sequenze già disponibili.

La sua apertura avverrà in una finestra denominata *Browser*, che potrà restare aperta anche durante le analisi, parallelamente alla finestra del *Pannello di Controllo*.

Il *Browser* mostrerà, nella sua sezione principale, una sequenza di righe che descrivono i campioni da analizzare, suddivisi fra standard e campioni (incognito e reali).

Dopo aver impostato la partenza della sequenza *Batch* (operazione descritta successivamente) la riga del primo campione non ancora analizzato si colorerà di verde e lo status del campione sarà definito *Running*, anche se la partenza effettiva della corsa cromatografica avverrà unicamente a seguito di un comando fornito dall'operatore, naturalmente dopo aver riempito il loop di iniezione.

Non sarà necessario aggiungere ulteriori righe ad una sequenza pre-impostata, tuttavia, nel caso in cui ciò dovesse accadere, chiedere assistenza al docente.

Iniezione delle soluzioni standard ed acquisizione dei cromatogrammi

NOTA: ciascun componente del gruppo effettuerà almeno UNA iniezione, nonché la relativa procedura di filtrazione del campione, descritta in precedenza.

Per l'iniezione occorrerà riempire il loop del cromatografo, seguendo attentamente le istruzioni che verranno fornite dal docente.

A questo punto sarà possibile dare inizio alla corsa cromatografica.

A tal fine si tornerà nel *Pannello di Controllo* (selezionare la voce **ICS-90/Timebase:ICS90 Computer name: COMPUTER** nel menù Window).

A seguire, si accederà al menu **Batch** e da questo al sottomenù **Start...**

Si aprirà una finestra ulteriore, denominata **Batch List**. Se non è già disponibile, si cercherà la sequenza di analisi, contrassegnata dal nome del gruppo, con il tasto **Add...** e, dopo aver visto apparire il nome della sequenza nella finestra, lo si selezionerà e si premerà il tasto **Start**.

Da questo momento in poi l'intera sequenza di analisi impostata sarà operativa.

Per dare inizio all'acquisizione del cromatogramma corrispondente al primo campione non ancora analizzato della sequenza sarà sufficiente premere il tasto **PARTENZA ANALISI**.

Apparirà un riquadro con la seguente domanda:

You are about to intercept a running batch. Do you really want to execute this command? Rispondere SI'.

A causa delle impostazioni automatiche della sequenza, la pompa intrinseca del cromatografo ICS90 si accenderà subito dopo ma poiché nella nuova configurazione sarà la pompa HP1050 a spingere la fase mobile, la pompa intrinseca andrà spenta, cliccando sull'apposito tasto presente nel pannello di controllo.

Dopo questa fase nel riquadro grande del pannello di controllo apparirà man mano il cromatogramma. La corsa si interromperà automaticamente dopo **8 minuti**, che dovrebbero essere sufficienti all'eluizione degli anioni oggetto dell'esperienza.

Tutta la procedura di iniezione/acquisizione verrà ripetuta per ciascuno standard.

Iniezione del campione reale

Anche il **campione reale** portato dai componenti del gruppo dovrà essere filtrato, come gli standard, usando un filtro di porosità 0.45 μm o inferiore.

Il campione andrà inizialmente trasferito nella provettina in plastica contrassegnata come CR e, una volta filtrato, trasferito in una provettina in plastica contrassegnata come CRF, da cui sarà poi prelevata l'aliquota per l'iniezione.

La procedura di acquisizione dei cromatogrammi relativi al campione reale sarà analoga a quella già descritta per le soluzioni standard.

Quantificazione dei dati cromatografici

Al termine di ciascuna corsa cromatografica andranno valutate le **aree dei picchi cromatografici** associate ai cinque anioni analizzati. Per ottimizzare i tempi dell'esercitazione è consigliabile effettuare l'operazione mentre sta procedendo la successiva corsa, sfruttando le potenzialità multi-tasking del software **PeakNet**.

Per osservare il tracciato relativo ad una corsa cromatografica sarà necessario accedere al *Browser* e cliccare sulla riga relativa al nome del campione di interesse.

Si aprirà automaticamente una **finestra di integrazione**, in cui saranno mostrati il cromatogramma corrispondente e, in basso, una tabella con i tempi di ritenzione, le altezze, le aree di picco e altri parametri, inizialmente stimati dal software.

I componenti del gruppo dovranno correggere eventuali errori di integrazione o di individuazione di picchi commessi dal software, seguendo le indicazioni che saranno date dal docente nella fase di elaborazione del tracciato della prima corsa effettuata.

Completata l'operazione si procederà con la copia della schermata contenente il tracciato cromatografico e i dati ed il suo trasferimento in un file di Word apposito, contrassegnato dal nome del gruppo.

Le aree di picco indicate per i vari anioni nei vari campioni andranno utilizzate successivamente per costruire rette di taratura, con il metodo dei minimi quadrati, per ciascuno dei quattro anioni analizzati: fluoruro, cloruro, nitrato e solfato.

Per ciascuno di essi andrà inoltre valutato il **limite di rivelabilità (LOD)** a partire dai parametri della regressione lineare, utilizzando le **due formule** descritte nel corso teorico e riportandolo seguendo la convenzione sulle cifre significative.

Dalle aree di picco relative ai quattro anioni presenti nei cromatogrammi del campione incognito e dei campioni reali di acqua si potrà risalire alle loro concentrazioni, **salvo che esse non risultino inferiori ad uno o ad entrambi i LOD**.