



Università degli studi del Piemonte Orientale

“Amedeo Avogadro”

Dipartimento di Scienze e Innovazione Tecnologica

Laurea Magistrale in Scienze Chimiche

Anno Accademico 2023/2024

**Implementazione e ottimizzazione di metodi di analisi
HPLC per il controllo della qualità nella produzione
di perossidi organici**

Relatore:

Char.mo Prof. Lorenzo Tei

Correlatrice:

Dott. Chim. Carla Beretta

Candidata:

Giulia Tassinario

Matricola: 20035551

Sommario

1. INTRODUZIONE	5
1.1 AZIENDA OSPITANTE: ARKEMA S.R.L	5
1.2. ARGOMENTO DELLA TESI.....	8
1.3. SOSTANZE E SCELTA DELLA TECNICA DI ANALISI.....	9
1.3.1. I perossidi organici	9
1.3.2. Le caratteristiche dei perossidi organici	12
1.3.3. Tecnica cromatografica LC (Liquid Chromatography).....	15
1.3.4. Cromatografia liquida ad alta prestazione.....	16
2. SOSTANZE E METODI	28
2.1. SOSTANZE	28
2.2. NORME DI SICUREZZA E SERIE DI CAMPIONI	32
2.2.1. Norme principali di sicurezza da seguire nel laboratorio chimico	32
2.2.2. Serie di campioni analizzati.....	33
2.3. STRUMENTI UTILIZZATI.....	40
2.3.1. HPLC e software di gestione dello strumento	40
2.3.1.1. HPLC LC 300 PerkinElmer e colonne utilizzate	40
2.3.1.2. SimplicityChrome CDS Software	46
3. RISULTATI OTTENUTI	49
3.1. SERIE A	50
3.1.1. Analisi HPLC - lavoro con colonna Phenomenex 00F-4462 E0.....	50
3.1.1.1. Acquisition Method: AA.....	50
3.1.1.2. Processing Method: AA PM	53
3.1.1.3. Rette di calibrazione	54
3.1.1.4. Campioni analizzati.....	58
3.1.1.5. Processing Method per basse concentrazioni di isopropilbenzene AA LOW CONC PM.....	60
3.1.2. Analisi HPLC - lavoro con colonna PerkinElmer HyperSelect BDS C18	64
3.1.2.1. Acquisition Method: AB.....	64
3.1.2.2. Processing Method: AB PM	66
3.1.2.3. Rette di calibrazione	67
3.1.2.4. Campioni analizzati.....	71
3.1.2.5. Prova di ottimizzazione del metodo: utilizzo di una fase mobile di acqua e metanolo.....	75
3.1.3. Analisi HPLC - lavoro 1 con colonna Phenomenex 00G-4601-E0.....	89
3.1.3.1. Acquisition Method: AC1	89
3.1.3.2. Processing Method: AC1 PM	92
3.1.3.3. Rette di calibrazione	93
3.1.3.4. Campioni analizzati.....	98
3.1.4. Analisi HPLC - lavoro 2 con colonna Phenomenex 00G-4601-E0.....	102
3.1.4.1. Acquisition Method: AC2.....	102
3.1.4.2. Processing Method: AC2 PM	104
3.1.4.3. Rette di calibrazione	105

3.1.4.4. Campioni analizzati.....	110
3.2. SERIE B.....	111
3.2.1. Analisi HPLC - lavoro con colonna PerkinElmer HyperSelect BDS C18	111
3.2.1.1. Acquisition Method: BB	111
3.2.1.2. Processing Method: BB PM.....	114
3.2.1.3. Rette di calibrazione	115
3.2.1.4. Campioni analizzati.....	117
3.2.2. Analisi HPLC - lavoro con colonna Phenomenex 00G-4601-E0.....	124
3.2.2.1. Acquisition Method: BC	124
3.2.2.2. Processing Method: BC PM.....	126
3.2.2.3. Rette di calibrazione	129
3.2.2.4. Campioni analizzati.....	136
3.3. SERIE C.....	138
3.3.1. Lavoro con colonna Phenomenex 00G-4601-E0.....	138
3.3.1.1. Acquisition Method: CC	138
3.3.1.2. Processing Method: CC PM.....	140
3.3.1.3. Rette di calibrazione	147
3.3.1.4. Campioni analizzati.....	151
4. CONCLUSIONI	169
5. BIBLIOGRAFIA.....	172
APPENDICE 1	173
APPENDICE 2	178

1. INTRODUZIONE

1.1 Azienda ospitante: Arkema S.r.l

Per l'elaborazione della presente tesi di laurea, ho svolto l'attività sperimentale nel laboratorio chimico dello stabilimento di Spinetta Marengo (AL) della società Arkema S.r.l.

Il gruppo Arkema è stato creato nell'ottobre 2004, a seguito della riorganizzazione del settore Chemical di Total. Grazie all'innovazione, alle acquisizioni mirate e agli investimenti nei Paesi emergenti, Arkema è diventata un player riconosciuto a livello mondiale nel campo delle specialità chimiche.

Basandosi sulla sua esperienza unica nella scienza dei materiali, Arkema progetta e produce materiali per rispondere alla domanda sempre crescente di materiali innovativi e sostenibili, guidata dalle sfide delle nuove energie, delle nuove tecnologie, dell'esaurimento delle risorse, della mobilità e della crescente urbanizzazione.

Sostenuta dall'energia collettiva dei suoi 21.100 dipendenti, Arkema opera in circa 55 Paesi e registra un fatturato di 9,5 miliardi di euro.

Il Know-how è strutturato attorno a tre piattaforme di crescita con forti sinergie. Queste competenze sono organizzate in tre segmenti coerenti e complementari, incentrati sulla scienza dei materiali:

- Adhesive Solutions
- Advanced Materials
- Coating Solutions

Insieme, questi tre segmenti costituiscono la piattaforma "Specialty Materials" su cui Arkema costruisce il suo futuro e che costituiscono la base della sua visione a lungo termine dell'azienda.

Sulla base dell'esperienza e dell'analisi dei driver di crescita globale nei prossimi anni, Arkema ha identificato cinque sottomercati che dovrebbero generare una crescita esponenziale in futuro:

- Energia verde e mobilità elettrica
- Elettronica avanzata
- Stile di vita sostenibile
- Edifici e abitazioni efficienti
- Filtrazione dell'acqua, dispositivi medici e nutrizione delle colture.

Arkema offre più di venti famiglie di prodotti, tutte classificate in base ai segmenti principali:

- intermedi e soluzioni adesive;
- materiali avanzati;
- soluzioni di rivestimento.

L'impegno per la soddisfazione del cliente, la sicurezza, la gestione responsabile del prodotto e la sostenibilità sono per Arkema valori chiave.

Arkema è presente in Italia con circa 600 dipendenti e 4 stabilimenti (Spinetta Marengo, Boretto, Gissi e Anagni).

Nello stabilimento Arkema di Spinetta Marengo si producono perossidi organici.

Arkema è uno dei principali produttori mondiali di perossido organico dal 1953. Grazie alla vasta esperienza e all'elevata attenzione all'innovazione, fornisce perossidi organici per una varietà di applicazioni ad alte prestazioni richieste al giorno d'oggi.

I prodotti perossidici fabbricati nello stabilimento di Spinetta Marengo trovano applicazione in molteplici prodotti finali in ambiti quali l'imballaggio, l'edilizia, l'automotive, le energie rinnovabili, ecc.

I perossidi organici si impiegano come iniziatori di polimerizzazione radicalica, agenti indurenti per resine poliestere insature, agenti di reticolazione di poliolefine e di elastomeri. Nel campo delle materie plastiche, sono utilizzati nella modificazione del peso molecolare del polipropilene.

Lo stabilimento Arkema di Spinetta Marengo è dedicato alla produzione di perossidi organici appartenenti alle famiglie dei chetonperossidi e degli alchilperossidi/idroperossidi.

Nello stabilimento è presente un laboratorio ove vengono svolte le analisi di controllo e qualità di materie prime, intermedi e prodotti finiti fabbricati.

Nello stabilimento sono presenti varie unità produttive.

Nell'Unità 100 si producono perossidi chetonici; nello specifico:

- produzione di perossidi chetonici del Metiletilchetone;
Il perossido del Metiletilchetone, ad alta attività, trova impiego nella polimerizzazione di resine poliestere insature. A temperatura ambiente, in combinazione con un acceleratore di cobalto, viene utilizzato per applicazioni come il lay-up manuale, lo spray-up, ecc e grazie alla sua elevata attività è particolarmente adatto durante la stagione fredda. La sua bassa viscosità lo rende ideale per tecniche di irrorazione

(airless) con miscelazione esterna. L'uso in gel coat è possibile ma richiede uno studio caso per caso.

- produzione di perossidi chetonici del Metilisobutilchetone;

Il perossido di Metilisobutilchetone è utilizzato per la polimerizzazione a freddo e a media temperatura di resine poliestere insature, con o senza acceleratore di cobalto. Grazie alla sua temperatura di avvio di 60°C, può essere utilizzato in processi continui, come lamiere piane o ondulate, e anche in altri processi che funzionano con temperature comprese tra 60°C e 120°C.

- produzione di perossidi chetonici dell'Acetilacetone;

Il perossido di Acetilacetone si impiega nella polimerizzazione di resine poliestere insature a temperatura ambiente in combinazione con un acceleratore di cobalto. A temperatura ambiente o a temperature elevate (40°C-80°C), il perossido di Acetilacetone consente una polimerizzazione molto più rapida rispetto ad altri perossidi chetonici. L'indurimento più rapido consente tempi di ciclo più brevi e, di conseguenza, una maggiore produttività con qualsiasi tecnologia di stampaggio.

Nell'Unità 200 si produce Diisopropilbenzene.

L'Unità 250 è dedicata all'ossidazione del Diisopropilbenzene per ottenere:

- monoidroperossido del diisopropilbenzene in diisopropilbenzene;
- diidroperossido del diisopropilbenzene in soluzione di idrossido di sodio.

Infine, all'Unità 300 si producono alchilperossidi:

- Luperox® F è un perossido bifunzionale utilizzato per la reticolazione di gomme naturali e sintetiche. Viene utilizzato in molte applicazioni come profili per l'edilizia, parti in gomma per autoveicoli, fili e cavi, parti tecniche in gomme.
- Luperox® 801 è un perossido liquido monofunzionale utilizzato per la reticolazione di poliolefine con tecnologia ad iniezione diretta.

1.2. Argomento della tesi

L'argomento della tesi consiste nello sviluppo e implementazione di metodi analitici cromatografici ai fini del controllo della qualità di intermedi di processo e prodotti finiti nella produzione di perossidi organici.

I metodi analitici già in uso nel laboratorio chimico dello stabilimento Arkema di Spinetta Marengo sono stati trasferiti e adattati sullo strumento HPLC LC300 PerkinElmer, con software SimplicityChrom™ Chromatography Data System, per semplificare e ottimizzare le metodiche di controllo qualità.

1.3. Sostanze e scelta della tecnica di analisi

1.3.1. I perossidi organici

I perossidi organici sono composti organici caratterizzati dalla presenza nella loro struttura del gruppo perossidico (-O-O-).

Nella struttura di un perossido organico R-O-O-R', R e R' sono le catene laterali e i due atomi di ossigeno sono legati covalentemente. Vengono definiti idroperossidi quelli in cui una delle catene R è sostituita da un atomo di idrogeno.

Caratteristica peculiare dei perossidi è la ridotta stabilità che si esplica nella decomposizione, talvolta in condizioni relativamente blande, per dare sottoprodotti più stabili. In tali decomposizioni si formano dapprima frammenti altamente reattivi chiamati radicali: questi sotto l'azione del calore o di idonei attivatori favoriscono il decorso di molte reazioni chimiche, tra le quali emergono per la loro importanza quelle di polimerizzazione per la produzione di una larga gamma di polimeri.

Nel seguito sono riportate le classi principali di perossidi organici, per ciascuna classe è indicato il prodotto o prodotti rappresentativi (*Figura 1*).

Si riportano inoltre alcune reazioni di ottenimento dei perossidi organici appartenenti a diverse classi. I perossidi organici sono derivati dal perossido di idrogeno, direttamente o per reazione con idroperossidi (*Figura 2*).

CLASSI-PEROSSIDICHE

TABELLA N° 1

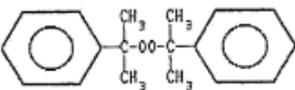
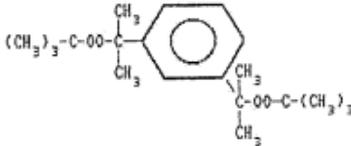
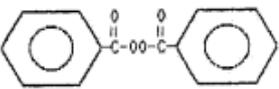
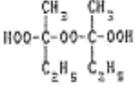
CLASSE	FORMULA BASE	ESEMPI	
		FORMULA DI STRUTTURA	NOME
IDROPEROSSIDI	R-OOH	$(\text{CH}_3)_3\text{-C-OOH}$	Tert-butil-idroperossido
DIALCHIL-DIARIL ALCHILARIL- PEROSSIDI	R-OO-R'	$(\text{CH}_3)_3\text{-C-OO-C-(CH}_3)_3$  	Di-tert-butil-perossido Di-cumil-perossido meta(di-tert-butil-perossi) di-iso-propil-benzene
PEROSSIIACIDI	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{R-C-OOH} \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{CH}_3\text{-C-OOH} \end{array}$	Acido per-acetico
PEROSSIESTERI	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H-C-OO-R}' \end{array}$	$(\text{CH}_3)_3\text{-C-}\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{C-OO-C(CH}_3)_3 \end{array}$	Tert-butil-perpivalato
DIACIL O DIARIL PEROSSIDI	$\begin{array}{c} \text{O} \quad \text{O} \\ \parallel \quad \parallel \\ \text{R-C-OO-C-R}' \end{array}$	$\text{C}_{11}\text{H}_{23}\text{-}\begin{array}{c} \text{O} \quad \text{O} \\ \parallel \quad \parallel \\ \text{C-OO-C-C}_{11}\text{H}_{23} \end{array}$ 	Di-lauroil-perossido Di-benzoil-perossido
PERCARBONATI	$\begin{array}{c} \text{O} \quad \text{O} \\ \parallel \quad \parallel \\ \text{RO-C-OO-C-OR} \end{array}$	$(\text{CH}_3)_2\text{-CH-O-}\begin{array}{c} \text{O} \quad \text{O} \\ \parallel \quad \parallel \\ \text{C-OO-C-O-} \end{array}\text{HC-(CH}_3)_2$	Di-isopropil-per-carbonato
PEROSSIIACETALI O PERCHETALI	$\begin{array}{c} \text{R}_1 \\ \\ \text{R-OO-C-OOR} \\ \\ \text{R}_2 \end{array}$	$(\text{CH}_3)_3\text{-C-OO-}\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ \text{C-OO-C-(CH}_3)_3 \\ \\ \text{C}_2\text{H}_5 \end{array}$	2,2-Di-(tert-butil-perossi) butano
CHETON-PEROSSIDI: α-OSSI-EX-PEROSSI -IDROPEROSSIDI E PEROSSIDI	$\left[\begin{array}{c} \text{R}_1 \\ \\ \text{-O-C-O-} \\ \\ \text{R}_2 \end{array} \right] \text{OH}$	 	Metil-etil-che ton-perossido

Figura 1: classi principali di perossidi organici.

PREPARAZIONE DEI PEROSSIDI DALL'ACQUA OSSIGENATA

TABELLA N° 2

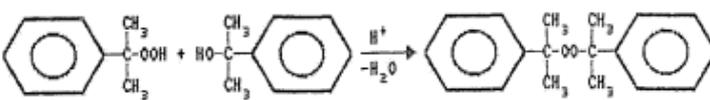
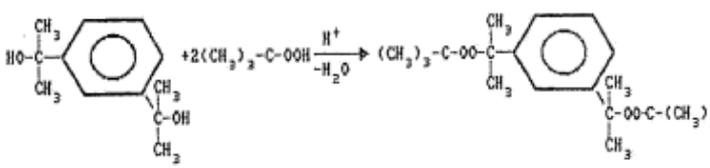
CLASSE	FORMULA BASE	ESEMPI DI REAZIONE DI SINTESI
IDROPEROSSIDI	R-OOH	$\text{CH}_2=\overset{\text{CH}_3}{\underset{\text{CH}_3}{\text{C}}} + \text{H}_2\text{O}_2 \xrightarrow{\text{H}^+} (\text{CH}_3)_3\text{-C-OOH}$ $\text{CH}_3-\overset{\text{CH}_3}{\underset{\text{CH}_3}{\text{C}}}-\text{OH} + \text{H}_2\text{O}_2 \xrightarrow[\text{-H}_2\text{O}]{\text{H}^+} (\text{CH}_3)_3\text{-C-OOH}$
DIALCHILPEROSSIDI	R-OO-R	$2\text{CH}_2=\overset{\text{CH}_3}{\underset{\text{CH}_3}{\text{C}}} + \text{H}_2\text{O}_2 \longrightarrow (\text{CH}_3)_3\text{-C-OO-C-(CH}_3)_3$
CHETON-PEROSSIDI	$\left[\begin{array}{c} \text{R}_1 \\ \\ \text{O}-\text{C}-\text{O} \\ \\ \text{R}_2 \end{array} \right] \text{OH}$	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ \text{CO} \\ \\ \text{C}_2\text{H}_5 \end{array} + \text{H}_2\text{O}_2 \xrightarrow{\text{H}^+} \begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ \text{HOO}-\text{C}-\text{OOH} \\ \\ \text{C}_2\text{H}_5 \end{array} \quad \begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ \text{HOO}-\text{C}-\text{OOH} \\ \\ \text{C}_2\text{H}_5 \end{array}$
DIARILPEROSSIDI	R-OO-R	
ALCHILARIL PEROSSIDI	R-OO-R'	

Figura 2: alcune reazioni di ottenimento di perossidi organici.

1.3.2. Le caratteristiche dei perossidi organici

I perossidi organici sono composti relativamente instabili che possono decomporsi violentemente se non trattati correttamente. La decomposizione può verificarsi se questi prodotti sono surriscaldati o se contaminati da una sostanza incompatibile. I perossidi organici rappresentano anche un pericolo di incendio poiché, se innescati, bruciano a una velocità molto più elevata rispetto ai comuni liquidi infiammabili come la benzina o l'acetone.

La sicurezza è il requisito principale per la manipolazione, lo stoccaggio e il trasporto dei perossidi organici. Arkema fornisce buone pratiche e procedure di sicurezza per garantire una manipolazione sicura di questi prodotti.

Per ulteriori informazioni sugli argomenti di sicurezza nell'uso di perossidi organici, consultare il sito Web EOPSG in Europa e il sito Web OPPSD negli Stati Uniti.

Decomposizione del perossido organico: instabilità termica

I perossidi organici sono composti relativamente instabili che possono decomporsi violentemente se conservati ad alte temperature. Le corrette temperature di stoccaggio sono elencate nella scheda di sicurezza (SDS) di ciascun prodotto.

La SADT (Self-Accelerating Decomposition Temperature) è elencata nella Sezione 9 della SDS ed è la temperatura alla quale il perossido organico subisce una decomposizione incontrollata che potrebbe essere violenta. La temperatura di decomposizione auto accelerata è caratteristica di ciascun perossido e dipende dalla struttura chimica, ma anche dalle dimensioni e dalla forma dell'imballaggio. Deve essere sempre attuato un rigoroso controllo della temperatura per evitare di superare la SADT.

La temperatura massima di conservazione è elencata nella Sezione 7 della SDS. Questa temperatura è notevolmente inferiore alla temperatura di SADT e non solo garantisce la sicurezza, ma anche che la qualità del prodotto sia preservata per l'intera durata di conservazione del prodotto. In merito allo stoccaggio della sostanza instabile, vengono individuate le temperature citate in *Figura 1*, che sono specifiche per ogni perossido.

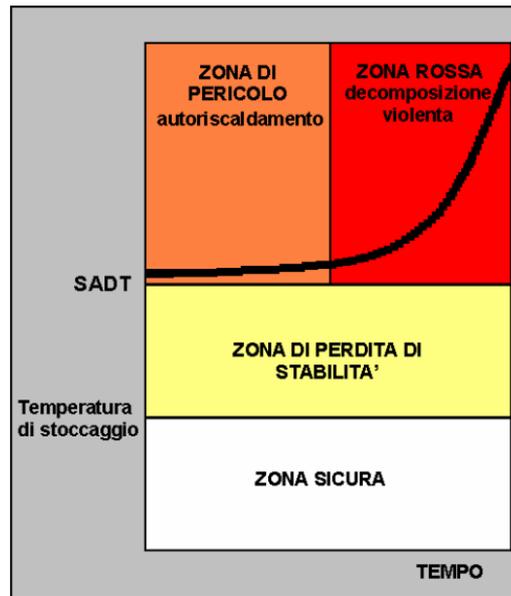


Figura 3: stabilità di una sostanza in funzione della temperatura di stoccaggio e del tempo¹.

Decomposizione del perossido organico: infiammabilità

La maggior parte dei perossidi organici ha punti di infiammabilità relativamente alti e sono difficili da innescare. Ma quando vengono innescati, quasi tutti i perossidi organici bruciano a una velocità molto più elevata rispetto ai comuni liquidi infiammabili.

Gli incendi di perossido organico sono più difficili da estinguere e causano danni maggiori agli impianti di stoccaggio rispetto agli incendi che coinvolgono comuni materiali infiammabili e combustibili. Questo è dovuto alla natura chimica dei perossidi organici che sono costituiti da atomi di ossigeno, il comburente, e dallo scheletro carbonioso, il combustibile. È difficile controllare e spegnere un incendio di perossido organico poiché la specie stessa è continua risorsa degli elementi necessari alla combustione.

Decomposizione del perossido organico: sensibilità alla contaminazione

I perossidi organici sono specie reattive che possono destabilizzarsi e decomporsi se mescolati con un materiale incompatibile. Ciò può provocare la generazione di fumo e persino di un incendio. I materiali incompatibili includono acidi, basi, ossidanti e agenti riducenti. Anche la ruggine, la cenere e la polvere possono destabilizzare alcuni perossidi, quindi qualsiasi contaminazione con questi deve essere evitata.

I materiali di costruzione come il rame, l'ottone, l'alluminio e i materiali ferrosi non dovrebbero mai essere utilizzati in processi che coinvolgono perossidi organici poiché è stato dimostrato che inducono la decomposizione.

Inoltre, assorbenti come Oil-Dri®, vermiculite e muschio di torba non devono essere utilizzati per pulire le fuoriuscite di perossidi organici a causa del loro effetto destabilizzante. Gli assorbenti idonei per la bonifica e il contenimento delle fuoriuscite di perossido organico sono il carbonato di calcio, il bicarbonato di sodio, la sabbia pulita e i/le tamponi/barriere a base di polipropilene.

Decomposizione del perossido organico: sensibilità all'urto (shock) e esplosività

Tutti i perossidi organici e le loro formulazioni sono stati ampiamente testati secondo i protocolli di trasporto delle Nazioni Unite per determinare il loro potenziale di esplosione.

Le formulazioni che risultano detonabili sono classificate come di tipo A e ne è vietato il trasporto su strade pubbliche.

I perossidi che risultano non esplodenti e/o deflagranti, ma possono subire un'esplosione termica, sono classificati come di tipo B. Questi sono autorizzati per il trasporto, ma le dimensioni del loro contenitore sono strettamente limitate e comportano un rischio esplosivo sussidiario.

È stato determinato che i perossidi organici rimanenti non presentano un rischio di esplosione termica così come sono confezionati. Ma tutti i perossidi organici possono presentare un rischio esplosivo se surriscaldati se conservati in contenitori che causano il confinamento.

Quando i perossidi organici si decompongono, si formano prodotti gassosi che aumentano la pressione interna di un contenitore. Se il contenitore non consentisse di alleviare questa pressione, il risultato potrebbe essere la rottura del contenitore che potrebbe espellere energicamente frammenti nell'ambiente.

1.3.3. Tecnica cromatografica LC (Liquid Chromatography)

La cromatografia è una tecnica analitica che permette di separare diversi costituenti di una miscela sfruttando l'equilibrio chimico-fisico che questi instaurano quando sono distribuiti tra due fasi distinte. Nel caso della cromatografia liquida (liquid chromatography, LC) le fasi sono immiscibili e sono una solida e una liquida, quest'ultima trascina il campione a contatto con la prima. In funzione della natura degli analiti e del meccanismo di separazione che interviene, si distinguono diversi tipi di cromatografia liquida:

- Adsorbimento
- Ripartizione
- Scambio ionico
- Affinità
- Esclusione dimensionale
 - Gel permeation
 - Gel filtration

In particolare:

- La cromatografia di adsorbimento è detta anche cromatografia liquido-solido, in quanto l'analita si ripartisce tra una fase stazionaria solida adsorbente e una fase mobile liquida. Nello specifico, la separazione si basa sull'adsorbimento selettivo dei vari componenti della miscela sui centri attivi della fase stazionaria.
- La separazione per ripartizione interviene, invece, quando la fase stazionaria è un liquido immiscibile con la fase mobile che impregna un supporto solido inerte di silice: anche in questo caso gli analiti si ripartiscono tra le due fasi in funzione delle interazioni che instaurano.
- La cromatografia a scambio ionico permette la separazione di analiti ionici che competono con i controioni che interagiscono attraverso interazione elettrostatiche con i siti attivi ionizzanti della fase stazionaria.
- Il meccanismo separativo per affinità si attua quando è necessario eluire sostanze che hanno interagito con un particolare e specifico ligando, questo viene utilizzato soprattutto per la separazione di biomolecole.
- Infine, attraverso il meccanismo di esclusione dimensionale, gli analiti (specie ad alto peso molecolare, polimeri, proteine...) vengono separati non in funzione delle interazioni chimiche fisiche che instaurano con la fase stazionaria, ma in base alla loro dimensione. Nello specifico si parla di Gel permeation quando le specie da separare

sono analiti insolubili in acqua, quando invece sono specie solubili in acqua si parla di Gel filtration.

Tuttavia, la classificazione in base al meccanismo ha dei limiti: non sempre interviene un unico tipo di interazione e non sempre è chiaro quale delle interazioni che intervengono sia predominante.

Per questo lavoro di tesi è stata utilizzata la cromatografia liquida ad alta prestazione (High Performance Liquid Chromatography, HPLC), anche chiamata cromatografia liquida ad alta pressione (High Pressure Liquid Chromatography), che utilizza il meccanismo separativo per ripartizione.

1.3.4. Cromatografia liquida ad alta prestazione

La cromatografia liquida ad alta prestazione o cromatografia liquida ad alta pressione è una tecnica cromatografica che permette di separare, identificare e quantificare, più analiti presenti in un campione incognito sfruttando il loro equilibrio di affinità tra la fase stazionaria solida posta all'interno della colonna cromatografica, caratterizzata da un'area superficiale molto estesa, e la fase mobile che fluisce in essa. L'HPLC è una tecnica avanzata di LC, poiché fa uso di particelle di diametro molto piccolo come fase stazionaria, dell'ordine delle decine di μm o inferiori, che permettono l'utilizzo di pressioni molto elevate, per cui il risultato di analisi si ottiene in un tempo molto breve, anche per quantità vicine alla soglia di rilevamento.

La capacità di migrazione di una sostanza tra le due fasi è determinata dal suo coefficiente di distribuzione K_d , ovvero la percentuale, all'equilibrio, del numero di molecole nella fase stazionaria rispetto al numero di molecole nella fase mobile. Le sostanze che si muovono più rapidamente sono distribuite principalmente nella fase mobile e il loro coefficiente di distribuzione tenderà a zero, mentre le sostanze che si muovono più lentamente, interagiscono maggiormente con la fase stazionaria, quindi il coefficiente di ripartizione tenderà a infinito. In funzione dell'interazione che instaurano gli analiti con la fase stazionaria e/o la fase mobile, questi vengono eluiti e rilevati in tempi diversi, quindi possono essere separati.

Un sistema HPLC (*Figura 4*) è generalmente costituito da più pompe che flussano i solventi, un autocampionatore che preleva automaticamente il campione da analizzare e lo inietta in colonna, un rivelatore e un software di acquisizione dati, ma il cuore dello strumento è la colonna cromatografica al cui interno avviene la separazione dei composti della miscela.

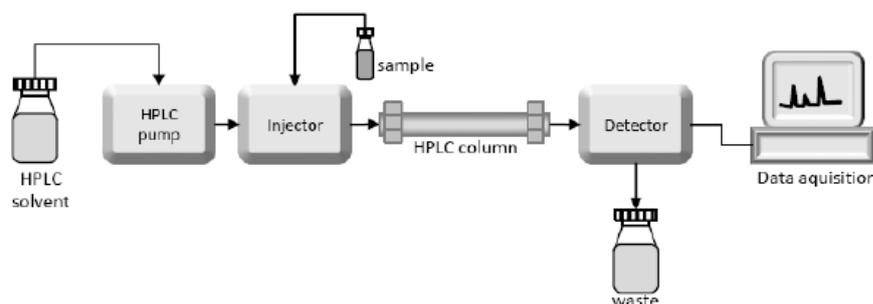


Figura 4: schema a blocchi del sistema HPLC.

Le pompe consentono di fluire l'eluente e il campione all'interno del sistema, devono assicurare un flusso costante e riproducibile, garantire una pressione stabile e consentire rapide operazioni di ricambio della fase mobile. Solitamente viene scelto un sistema di pompe reciprocanti che permette di generare pressioni molto elevate, fino a 10000 psi, mantenendo comunque flussi costanti. Queste pompe lavorano in parallelo e si alternano nei compiti: mentre una riempie la camera, l'altra la svuota spingendo il liquido in colonna.

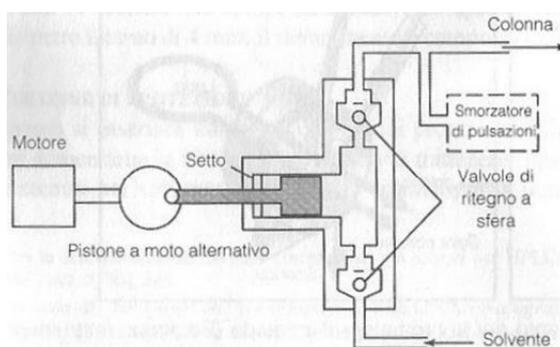


Figura 5: schema del sistema di pompe reciprocanti.

L'introduzione del campione in colonna avviene ad opera della valvola Rheodyne, il cui funzionamento è schematizzato nelle Figure 6 e 7.

Nel momento di caricamento, il campione viene inserito all'interno del loop che consente il riempimento ad una precisa portata e il volume in eccesso viene diretto agli scarti. Attraverso la rotazione della valvola, si passa alla modalità di iniezione del campione, dove il loop è connesso all'entrata della colonna. Il caricamento viene eseguito in modo automatico mediante un braccio meccanico che si occupa sia del prelievo del quantitativo del campione da analizzare sia dell'iniezione in colonna.

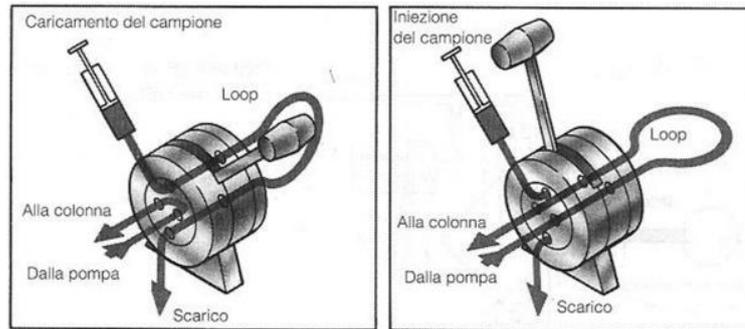


Figura 6: schema della valvola Rheodyne.

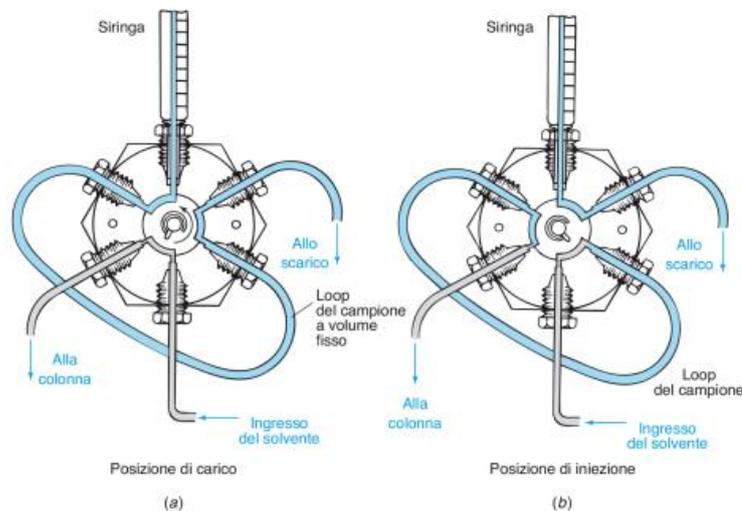


Figura 7: schema di funzionamento della valvola Rheodyne.

Lo strumento può essere dotato di un sistema di riscaldamento che permette di tenere sotto controllo la temperatura della colonna. Infatti, in molti casi, lavorare a temperatura diversa da quella ambiente incrementa notevolmente le prestazioni e la riproducibilità delle separazioni. Un altro componente importante è la pre-colonna. Questo dispositivo è capace di trattenere le particelle di grandi dimensioni eventualmente non trattenute nell'operazione di filtrazione dei solventi, che potrebbero otturare o danneggiare la colonna, ma anche di proteggere la colonna analitica da contaminanti e composti del campione che si legherebbero irreversibilmente alla fase stazionaria. La pre-colonna, quindi, ha il compito di preservare la colonna stessa aumentandone la durata. La pre-colonna presenta lo stesso riempimento della colonna ma con un impaccamento più grossolano per evitare una perdita di pressione e la separazione anticipata degli analiti.

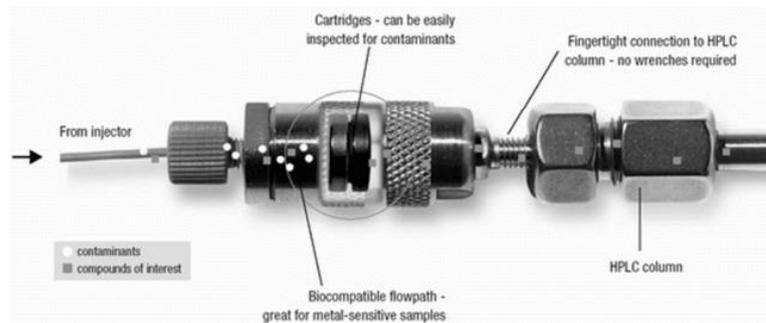


Figura 8: schema di esempio di una connessione precolonna-colonna.

Le colonne analitiche sono rivestite di acciaio inossidabile, materiale molto resistente alla corrosione, sono lunghe dai 5 ai 25 cm, hanno un diametro di circa 3-5 mm e le dimensioni dell'impaccamento sono di circa 3-5 μm .

Le particelle che costituiscono la fase stazionaria possono essere porose, quindi dotate di canali interni, oppure possono essere caratterizzate da un nucleo di silice non porosa circondato da un sottile strato di silice porosa, in quest'ultimo caso si parla di particelle core-shell.

Il detector, posto all'uscita della colonna, rileva i componenti eluiti attraverso una deviazione del segnale che si presenta sul cromatogramma come un picco gaussiano.

Esistono diversi tipi di detector che individuano la presenza di analiti sfruttando proprietà diverse:

- Rilevatore UV/Visibile: il segnale raccolto è un segnale di assorbanza e il cromatogramma viene acquisito a lunghezza d'onda fissa, variabile o utilizzando una serie di diodi che consentono la registrazione simultanea del cromatogramma a tutte le lunghezze d'onda dell'intervallo. È il tipo di detector più utilizzato.
- Rivelatore conduttimetrico: il risultato è legato alla registrazione di un segnale elettrico.
- Rivelatore a spettrometria di massa: gli analiti vengono identificati in funzione del loro rapporto massa/carica.
- Rivelatore a indice di rifrazione: il risultato viene fornito dalla misura della differenza nell'indice di rifrazione della cella del campione rispetto a quella del riferimento (solitamente il solvente).
- Rivelatore elettrochimico: quando i composti elettroattivi vengono eluiti subiscono una reazione elettrochimica, gli elettroni vengono trasferiti generando una corrente elettrica.
- Rivelatore ad assorbimento IR: in cui il segnale è dato dall'assorbimento di radiazione nell'intervallo dell'infrarosso.

- Rivelatore a fluorescenza: viene rilevata la fluorescenza generata dagli analiti eluiti.

I dati raccolti dal rivelatore vengono poi presentati sotto forma di un grafico, chiamato cromatogramma, che riporta il segnale in funzione del tempo di analisi.

Le caratteristiche che deve avere un buon rivelatore per HPLC sono: sensibilità e selettività adeguate, buona stabilità e riproducibilità, risposta lineare per più ordini di grandezza, minimo rumore di fondo, risposta rapida e meglio se non è distruttivo.

L'analisi HPLC può essere condotta in fase inversa o diretta.

Si definisce cromatografia a fase inversa, la tecnica che utilizza una fase stazionaria apolare e una fase mobile polare, mentre in cromatografia diretta la fase stazionaria è polare, mentre quella mobile apolare.

Una volta definite le due fasi (e quindi il tipo di cromatografia), il tempo di ritenzione è caratteristico per ogni sostanza, motivo per cui l'HPLC è un'ottima tecnica di identificazione.

Attualmente la tecnica a fase inversa è quella più utilizzata, poiché rispetto a quella a fase diretta riporta una serie di vantaggi: la fase mobile è costituita da acqua, poco costosa e facilmente disponibile, e/o solventi non acquosi facilmente disponibili e ad elevato grado di purezza, come metanolo e acetonitrile. Inoltre, utilizzando opportuni additivi come soluzioni tampone o sali, è possibile analizzare sia analiti non ionici che analiti ionici o ionizzabili, mentre con l'aggiunta di additivi chirali in una delle due fasi è possibile la separazione di enantiomeri.

Le fasi stazionarie apolari sono costituite da catene alchiliche ancorate su particelle silicee, tra le quali le più comuni sono catene a otto atomi di carbonio C₈ (-C₈H₁₇) e a diciotto atomi di carbonio C₁₈ (-C₁₈H₃₇).

Questo fattore è di grande importanza poiché la diminuzione della polarità della fase stazionaria (e quindi l'aumento di atomi di carbonio determina una diminuzione della polarità) aumenta il tempo di ritenzione dei composti meno polari, migliorando la separazione, a scapito del tempo totale di analisi.

L'acquisizione cromatografica può essere svolta in eluizione isocratica, quando la composizione della fase mobile non varia durante l'analisi o in eluizione a gradiente, quando c'è una variazione della composizione dell'eluente. Nel caso della separazione a fase inversa si aumenta progressivamente la percentuale del solvente organico diminuendo così la polarità della fase mobile in modo che prima possano essere eluiti i componenti più polari e poi quelli meno polari.

Quando l'obiettivo è mettere a punto un metodo analitico di analisi HPLC è necessario porre l'attenzione su alcuni fattori che devono essere studiati attentamente a fronte del campione di cui si vuole conoscere la composizione. Questi sono:

- La scelta del solvente o della miscela di solventi
- Il gradiente della fase mobile
- La scelta della colonna
- La temperatura a cui si conduce l'analisi
- La velocità di flusso
- Il volume di iniezione
- Il corretto sistema di rilevazione

È importante scegliere la corretta fase mobile, con l'obiettivo di trovare, per i soluti di interesse, il solvente o la miscela di solventi che assicurino un'ottimale ritenzione. È necessario valutarne il grado di purezza, la viscosità (solventi con bassa viscosità non garantiscono il mantenimento di una pressione alta e costante durante l'analisi), la temperatura di ebollizione che deve essere molto maggiore rispetto a quella a cui si conduce l'analisi, la compatibilità con il rivelatore (ad esempio se si utilizza un rivelatore UV-Vis il solvente deve avere un basso assorbimento nell'intervallo affinché non interferisca con il segnale del campione da analizzare).

Per aumentare la sicurezza operativa si scelgono solventi con bassi valori di tossicità, non corrosivi e non infiammabili. Inoltre, ogni solvente (o miscela di solventi) presenta una specifica forza e selettività, che dipendono dalla loro polarità e dal tipo di interazioni intermolecolari che possono instaurare con i componenti del campione in esame.

In particolare, i solventi vengono classificati in base alla loro forza eluente (o potere di eluizione) ϵ , ovvero la relativa energia di adsorbimento rispetto ad una determinata fase stazionaria (in genere silice o allumina). Data una fase stazionaria, i solventi vengono classificati in ordine di polarità crescente nella serie eluotropica. La tabella sottostante riporta l'elenco dei solventi con i loro valori di ϵ ed è utile considerarla quando si studia la corretta fase mobile per effettuare una specifica analisi.

SOLVENTI NON MISCIBILI IN ACQUA		SOLVENTI MISCIBILI IN ACQUA	
Solvente	ϵ	Solvente	ϵ
Pentano	0,0	Diossano	0,56
Etere	0,01	Acetone	0,56
Esano	0,01	Acetato di etile	0,58

SOLVENTI NON MISCIBILI IN ACQUA		SOLVENTI MISCIBILI IN ACQUA	
Solvente	ϵ	Solvente	ϵ
Cicloesano	0,04	Dimetilsolfossido	0,62
Tetracloruro di carbonio	0,18	Acetonitrile	0,65
Xilene	0,26	Piridina	0,71
Toluene	0,29	Isopropanolo	0,82
Clorobenzene	0,30	n-Propanolo	0,82
Benzene	0,32	Metanolo	0,95
Etere etilico	0,38	Acido acetico	1,0
Cloroformio	0,40	Acqua	>>1
Diclorometano	0,42	/	/
Tetraidrofurano	0,45	/	/
Dicloroetilene	0,49	/	/
Metiletilchetone	0,51	/	/

Tabella 1: serie eluotropica dei solventi valutati in relazione ad una fase stazionaria di silice.

Quando si ha a che fare con miscele ricche di analiti, lavorare in isocratica (eluizione costante nel tempo) rende difficile la separazione di tutte le componenti, quindi la scelta ricade sulla eluizione in gradiente in cui la composizione della fase mobile varia durante il corso dell'analisi.

La variazione delle componenti della fase mobile deve essere studiata attentamente poiché influisce sia sul tempo di ritenzione degli analiti sia sulla selettività.

La colonna cromatografica è il cuore del sistema HPLC e le caratteristiche del suo riempimento devono essere prese in attenta considerazione quando si va a definire un metodo soprattutto in termini di dimensioni e di struttura delle particelle. Infatti è importante ricordare che l'efficienza di una fase stazionaria è inversamente proporzionale al diametro delle particelle che la compongono.

La valutazione della temperatura di conduzione dell'analisi, della velocità di flusso e del volume di iniezione, in funzione della tipologia di campione e di fase stazionaria, è essenziale per l'ottimizzazione delle prestazioni e della riproducibilità delle separazioni.

Il sistema di rivelazione viene scelto considerando la sua compatibilità con la tipologia di analiti presenti nei campioni da analizzare. Infatti, se il componente non fosse visibile al detector, è

come se non fosse presente all'interno del campione e l'analisi perderebbe di significato. In questo ambito, talvolta vengono svolte delle derivatizzazioni specifiche sugli analiti da rilevare, ovvero delle funzionalizzazioni, per renderli visibili al detector.

Come discusso, sono molteplici i fattori da considerare prima di eseguire un'analisi HPLC. Nello specifico, questi fattori hanno un'influenza diretta sui parametri della misura, quali ad esempio:

- Coefficiente di distribuzione K_d : la percentuale, all'equilibrio, del numero di molecole nella fase stazionaria sul numero di molecole nella fase mobile.
- Tempo di ritenzione: il tempo richiesto ad una sostanza perché possa essere eluita, ovvero il tempo trascorso dall'iniezione del campione all'uscita del picco.
- Tempo morto: tempo trascorso dall'iniezione del campione all'uscita del solvente o di un soluto non trattenuto dalla fase stazionaria.
- Fattore di capacità K' : il rapporto tra la differenza del tempo di ritenzione di un determinato analita e il tempo morto diviso il tempo morto, fornisce quindi una misura del tempo trascorso nella fase stazionaria piuttosto che in quella mobile; maggiore è questo fattore, maggiore è il tempo di ritenzione.
- Fattore di asimmetria: fattore riferito alla forma del profilo di concentrazione (ovvero del picco) che può non essere gaussiano, ma presentare una coda. Affinché la banda sia perfettamente simmetrica, il coefficiente di ripartizione dovrebbe essere costante e indipendente dalla concentrazione di soluto, ma nella realtà K_d cambia all'aumentare della concentrazione del soluto e le bande si possono presentare più o meno codate. Si parla di Tailing, quando la zona più concentrata della banda corre più velocemente, quindi l'asimmetria si presenta al termine del picco; si parla di Fronting (o Overloading) quando l'asimmetria si presenta all'inizio del picco poiché la banda in uscita mostra un progressivo aumento della concentrazione. Questo fenomeno è dovuto a una scorretta introduzione del campione, ad un possibile adsorbimento dell'analita sulla fase stazionaria o alla ridotta solubilità dell'analita nella fase mobile.

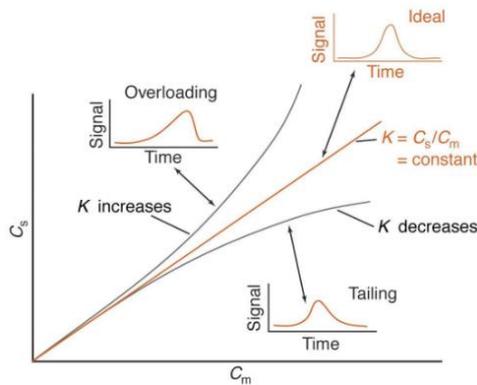


Figura 9: andamento del coefficiente di distribuzione dell'analita per spiegare il fattore di asimmetria.

- Selettività α : misura della distanza tra due picchi, si ricava dai tempi di ritenzione poiché è definita come il rapporto tra i fattori di capacità di due analiti. La selettività è funzione della composizione della fase stazionaria, di quella mobile, del pH e della temperatura. Quando $\alpha=1$, i picchi sono totalmente sovrapposti, quindi non si ha sovrapposizione. All'aumentare di α , invece, aumenta anche la separazione dei picchi. È importante ricordare che selettività e risoluzione sono due parametri ben distinti. Infatti, non è vero che due picchi selettivamente separati, siano anche risolti, poiché la selettività fa riferimento solo ai tempi di ritenzione.
- Efficienza del sistema: capacità del sistema cromatografico di eluire gli analiti con bande strette, un sistema efficiente produce picchi stretti e simmetrici. L'efficienza è funzione della lunghezza della colonna, della grandezza delle particelle impaccate e della velocità di flusso e si misura in termini di piatti teorici.
- Risoluzione: grandezza che misura l'effettiva bontà della separazione, rappresenta il grado di separazione tra due picchi e dipende sia dalla selettività che dall'efficienza del sistema. Due picchi risolti sono anche certamente selettivamente separati, ma in più esiste la totale certezza che non siano sovrapposti, nemmeno sulle code.

In merito all'allargamento dei picchi, è stata studiata un'equazione che spiega il fenomeno: l'equazione di van Deemter. Questa descrive la separazione degli analiti come un processo dinamico, dipendente da alcuni fenomeni che provocano l'allargamento di banda:

$$H = A + \frac{B}{v} + Cv$$

Dove:

- H è l'altezza del piatto teorico, ovvero il rapporto tra la lunghezza della colonna e il numero di piatti teorici ($H=L/N$). Un piatto teorico corrisponde ad un equilibrio di ripartizione che instaura l'analita con la fase stazionaria e quella mobile. Maggiore è il numero di equilibri che gli analiti instaurano, minore è l'altezza del piatto teorico e maggiore è l'efficienza del sistema.
- Il termine A (diffusione vorticoso) definisce l'allargamento di banda dovuto alla molteplicità di percorsi che l'analita può intraprendere all'interno della fase stazionaria in funzione della regolarità dell'impaccamento e del diametro delle particelle di fase stazionaria. Più l'impaccamento è fine e costituito da particelle di piccolo diametro, più le bande sono strette; il termine non dipende dalla velocità di flusso.

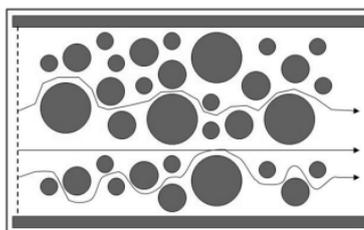


Figura 10: immagine illustrativa dei possibili percorsi che l'analita può intraprendere attraverso la fase stazionaria.

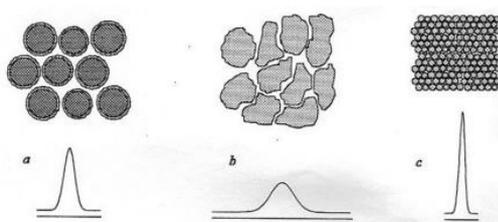


Figura 11: immagine illustrativa della variazione della forma del picco in funzione dell'impaccamento della fase stazionaria

- Il termine B correla la diffusione longitudinale, dovuta al naturale processo di diffusione delle molecole da una zona più concentrata ad una meno concentrata, all'allargamento del profilo di concentrazione. Questo contributo è inversamente proporzionale alla velocità di flusso ed è indipendente dalle dimensioni delle particelle.
- Il termine C descrive come il trasferimento di massa contribuisca all'allargamento dei picchi del cromatogramma ed è proporzionale alla velocità di flusso. Le particelle di

analita possono interagire e fluire all'interno dei pori della fase stazionaria e risiedervi per un periodo diverso in funzione del proprio coefficiente di diffusione e delle dimensioni della particella porosa. Le particelle che penetrano e interagiscono maggiormente danno luogo ad un allargamento maggiore del picco relativo. Per questo motivo, vengono quasi sempre preferite fasi stazionarie caratterizzate da particelle core-shell, in cui la diminuzione della superficie interfacciale tra la fase stazionaria e quella mobile, rispetto alle particelle porose, è compensata dalla diminuzione della probabilità di ristagno degli analiti all'interno dei pori con conseguente incremento dell'efficienza.

Nello specifico, l'equazione di van Deemter mette in relazione la varianza per unità di lunghezza di una colonna di separazione con la velocità della fase mobile lineare considerando le proprietà fisiche, cinetiche e termodinamiche di una separazione². Sommando i tre termini si ottiene una curva che è una funzione iperbolica. Al punto più basso della curva corrisponde la velocità di flusso alla quale si ottiene la massima efficienza e, di conseguenza, la massima risoluzione cromatografica.

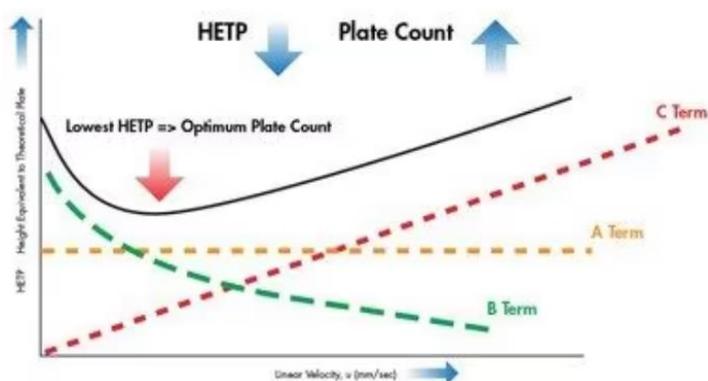


Figura 12: curva di van Deemter³.

Infine, è utile discutere i possibili metodi di calibrazione.

Attraverso il metodo di calibrazione con standard esterni, dall'analisi di campioni di standard a concentrazione nota, è possibile costruire le rette di calibrazione dall'interpolazione tra l'area del picco del relativo analita e la sua concentrazione conosciuta: queste vengono utilizzate per la quantificazione degli analiti all'interno di campioni incogniti.

La retta di taratura deriva dall'applicazione del metodo statistico dei minimi quadrati all'insieme dei dati ottenuti dall'analisi di almeno tre standard a concentrazione nota, questo permette di trovare la funzione che si avvicina di più ai punti sperimentali e che è descritta dall'equazione $y=mx+q$ dove y è il segnale rilevato, x la concentrazione, m la pendenza della

retta e q l'intercetta con l'asse delle y . Il software riporta l'area del picco di un analita di cui si vuole conoscere la quantità sulla retta di calibrazione, al punto di incontro è associata una determinata concentrazione, che è l'incognita. Chiaramente la concentrazione dell'analita deve rientrare nell'intervallo di concentrazioni coperto dalla retta e le condizioni operative di analisi devono essere le stesse per gli standard e per il campione.

Per campioni caratterizzati da matrici in cui il solvente o altre specie interferenti potrebbero influenzare la risposta strumentale, sarebbe necessario preparare standard che siano più reali possibili, quindi replicare in modo attendibile la matrice dei campioni da analizzare, così da non incorrere in futuri errori di valutazione. Questo però non è affatto semplice, se non addirittura impossibile per le matrici più complesse, per cui risulta utile applicare il metodo di calibrazione delle aggiunte standard che prevede l'utilizzo di soluzioni standard di analita che contengono anche una quantità nota di soluzione del campione.

Per fare ciò, in ogni matraccio si trasferisce un volume uguale di soluzione di campione a concentrazione incognita e volumi variabili di soluzione standard di analita a concentrazione nota, si porta a volume e si procede con l'analisi. In questo modo, in ogni matraccio è presente lo stesso effetto matrice, ma a differenza del metodo descritto precedentemente, il segnale viene rapportato rispetto al volume di soluzione standard aggiunto. In questo caso la retta risultante chiaramente non passerà per l'origine, poiché anche quando il volume di standard aggiunto è nullo, verrà rilevato un segnale attribuibile all'analita presente nell'aliquota di campione trasferito.

La concentrazione incognita viene trovata dal rapporto tra il prodotto dell'intercetta per la concentrazione di standard e il prodotto tra la pendenza della retta e il volume di soluzione incognita aggiunto.

Infine, si cita il metodo dello standard interno che non è sostituibile a uno dei due metodi descritti, ma può essere applicato parallelamente per uno studio approfondito del comportamento degli analiti durante l'analisi. Questo prevede che si aggiunga una sostanza agli standard e al campione che si comporti in modo abbastanza simile all'analita di interesse, ma anche abbastanza diverso da non dare interferenza. È necessario però trovare una sostanza che possa essere aggiunta in modo riproducibile, che abbia un segnale abbastanza vicino, ma anche abbastanza lontano dall'analita e che non sia già presente all'interno del campione. Inoltre è opportuno verificare che variazioni in concentrazione dell'analita non influenzino il segnale dello standard interno e che lo standard interno non sopprima o aumenti il segnale dell'analita. Lo studio con lo standard interno può rendere chiare eventuali fluttuazioni dello strumento o del metodo, ma anche mettere in evidenza eventuali perdite di analita durante il processo di analisi dovute ad esempio a reazioni secondarie o parassite.

2. SOSTANZE E METODI

2.1. Sostanze

Si riportano i riferimenti delle sostanze utilizzate.

Sostanze	Fornitore	Codice prodotto	Numero di lotto o serie	Purezza
1,3-bis(2-(ter-Butilperossi)propan-2-il)benzene	Arkema	/	/	99,90%
1,3-Diisopropilbenzene	Sigma Aldrich	113263	MKBD8848V	98,30%
1,3,5-Triisopropilbenzene	Fluka	92075	429570/1	98,60%
1,4-bis(2-(ter-Butilperossi)propan-2-il)benzene	Arkema	/	/	99,06%
1,4-Diisopropilbenzene	Thermo Scientific	B22871.14	10243082	99,20%
2,2'-(1,3-Fenil)bis(propan-2-olo)	Arkema	/	/	99,53%
2,2'-(1,4-Fenil)bis(propan-2-olo)	Arkema	/	/	99,73%
2-(3-(ter-Butil)fenil)propan-2-olo	Arkema	/	/	99,90%
2-(4-(ter-Butil)fenil)propan-2-olo	Arkema	/	/	99,90%
2-Butanone	Acros Organics	149670250	A017221301	99,90%
2-Fenil-2-propanolo	Alfa Aesar	A15580	10185022	98,00%
2-Fenilpropene	Alfa Aesar	L03609.AE	10187512	99,60%
2-Idroperossi-2-metilpropano	TCI	B3153	A38TN-LT	69,26%
(2-Idroperossi)propan-2-il)benzene	Acros Organics	349962500	A0364613	80,00%
2-Propanolo	VWR Chemicals	20880.290	/	99,90%
4-Idrossi-4-metil-2-pentanone	Acros Organics	121482500	A0420856	99,90%
4-Metil-2-pentanone	VWR	85673.180	21E272502	99,80%

Sostanze	Fornitore	Codice prodotto	Numero di lotto o serie	Purezza
Acetonitrile	Carlo Erba Reagents	412372000	/	≥ 99,90%
	Honeywell	34851	/	≥ 99,95%
	VWR Chemicals	83639.320	/	100,0%
Dimetilftalato	TCI	P0302	5PLTG	99,00%
Fenilmetilchetone	Alfa Aesar	A12727AP	10204758	99,70%
Fenolo	Sigma-Aldrich	102366057	BCCB8537	100,0%
Isopropilbenzene	Acros Organics	329735000	A0388471	99,95%
Metanolo	VWR Chemicals	20864.320	/	99,90%
(Perossibis(propan-2,2-diil)dibenzene	Arkema	/	/	99,80%
Perossido di idrogeno	Solvay Chimica Italia Spa	53595	/	70,00%
Solfato di sodio	Arkema	/	/	100,0%

Tabella 2: elenco e riferimenti delle sostanze utilizzate.

Di seguito si riportano le frasi di pericolo e i consigli di prudenza per ogni sostanza utilizzata in base alla Classificazione (REGOLAMENTO (CE) N. 1272/2008).

Materiale	Frasi di pericolo	Consigli di prudenza
1,3-bis(2-(ter-Butilperossi)propan-2-il)benzene	H242, H413	P210, P234, P273, P280
1,3-Diisopropilbenzene	H315	P264, P280, P302+P352, P332+P313, P362+364
1,3,5-Triisopropilbenzene	Non pericoloso	Non pericoloso
1,4-bis(2-(ter-Butilperossi)propan-2-il)benzene	H242, H413	P210, P234, P273, P280
1,4-Diisopropilbenzene	H315	P264, P280, P302+P352, P332+P313, P362+364

Materiale	Frasi di pericolo	Consigli di prudenza
2,2'-(1,3-Fenil)bis(propan-2-olo)	Non pericoloso	Non pericoloso
2,2'-(1,4-Fenil)bis(propan-2-olo)	Non pericoloso	Non pericoloso
2-Butanone	H225, H319, H336, EUH066	P261
2-Fenil-2-propanolo	H302, H315, H319	P280, P305+P351+P338, P362, P301+P330+P331, P302, P352
2-Fenilpropene	H226, H304, H317, H319, H335, H361fd, H411	P261, P210, P305+P351+P338, P303+P361+P353, P405, P501
2-Idroperossi-2-metilpropano	H226, H242, H302, H311, H314, H317, H318, H330, H335, H341, H335, H411, EUH044	P403+P233
(2-Idroperossipropan-2-il)benzene	H242, H302, H312, H331, H314, H373, H411	P210, P234, P235, P262, P273, P280, P301+P310, P303+P361+P353, P304+P340, P305+P351+P338, P411, P420
2-Propanolo	H225, H319, H336	P210, P280, P305+P351+P338
4-Idrossi-4-metilpentan-2-one	H319, H335, H361d	P201, P210, P261, P271, P280, P305+P351+P338, P337+P313, P403+P233, P405, P501
4-Metil-2-pentanone	H225, H332, H319, H351, H335, H336	P271
Acetonitrile	H225, H302, H312, H332, H319	P210, P240, P280, P301+P312, P302+P352, P303+P361+P353, P304+P340+P311, P305+P351+P338, P403+P235
Dimetilftalato	Non pericoloso	Non pericoloso

Materiale	Frasi di pericolo	Consigli di prudenza
Fenilmetilchetone	H302, H319	P280, P264, P305+P351+P338, P301+P312, P337+P313, P501
Fenolo	H301, H331, H311, H314	P260, P273, P280, P303+P361+P353, P304+P340+P310, P305+P351+P338
Isopropilbenzene	H226, H304, H335, H350, H411	P261, P210, P331, P304+P340, P312
Metanolo	H225, H301, H311, H331, H370	P210, P243, P280, P302+P352, P304+P340, P308+P310
(Perossibis(propan-2,2- diil))dibenzene	H242, H315, H319, H360d, H411	P210, P280, P302+P352, P332+P313, P305+P351+P338, P308+P313
Perossido di idrogeno	H271, H302, H332, H314, H335, H412	P241
Solfato di sodio	Non pericoloso	P391

Tabella 3: indicazioni di pericolo e consigli di prudenza delle sostanze utilizzate.

In *Appendice 2* si riportano esplicitamente le frasi di pericolo e i consigli di prudenza.

2.2. Norme di sicurezza e serie di campioni

Oggetto di analisi, per il lavoro di tesi, sono stati i campioni di prodotti perossidici la cui composizione è specifica e rappresentativa della fase di processo soggetta al controllo qualità di produzione.

I campioni sono stati suddivisi in serie in relazione al processo produttivo:

- Serie A – Produzione di Alchilperossidi
- Serie B – Produzione di Idroperossidi
- Serie C -Produzione di Chetonperossidi.

Di seguito vengono descritte le caratteristiche rilevanti e il pre-trattamento, se necessario, dei campioni per i quali viene studiato o ottimizzato il metodo di analisi. Inoltre, viene spiegata la preparazione della soluzione di analisi per ogni campione. Al termine della sezione viene illustrato il metodo di preparazione delle soluzioni di standard, le cui analisi servono per la costruzione delle rette di calibrazione.

2.2.1. Norme principali di sicurezza da seguire nel laboratorio chimico

Tutte le attività eseguite per il lavoro di tesi sono state svolte in sicurezza, rispettando le procedure prescritte da Arkema, nel seguito descritte in sintesi.

Nel laboratorio è obbligatorio indossare gli indumenti protettivi (DPI) coprenti il corpo intero (pantaloni e camicia) scarpe, occhiali di sicurezza e guanti specifici per le sostanze da manipolare e, nei casi prescritti, anche lo schermo facciale a protezione del viso.

È obbligatorio lavorare sotto la cappa aspirante o sotto aspirazione flessibile localizzata.

Occorre leggere le etichette dei reagenti e dei solventi prima di farne uso e conoscere il contenuto delle schede di sicurezza delle sostanze utilizzate.

Il luogo di lavoro deve essere ordinato e pulito. Prima di iniziare qualsiasi attività accertarsi di avere con sé la procedura che spiega le operazioni da svolgere. Non sono autorizzate modifiche senza previa discussione con il Responsabile del laboratorio.

Controllare sempre la vetreria prima dell'utilizzo.

Porre attenzione alla raccolta dei rifiuti, per il corretto smaltimento.

2.2.2. Serie di campioni analizzati

Campioni della serie A

Campione	Stato fisico	Pre-trattamento
CMP 1	Liquido bifase	SI
CMP 2	Liquido bifase	SI
CMP 3	Liquido monofase	NO
CMP 4	Liquido bifase	NO
CMP 5	Liquido monofase	NO

Tabella 4: campioni della serie A che vengono analizzati.

Campione	Indicazioni di pericolo	Consigli di prudenza
CMP 1	H242, H302, H312, H314, H331, H350, H373, H411	P201, P210, P270, P280
CMP 2	H242, H302, H312, H314, H331, H350, H373, H411	P201, P210, P270, P280
CMP 3	H226, H304, H314, H302, H331, H335, H373, H350, H411	P201, P210, P260, P273, P280
CMP 4	H302, H315	P270, P280
CMP 5	H242, H315, H411	P210, P234, P220, P280, P273

Tabella 5: indicazioni di pericolo e consigli di prudenza dei campioni della serie A che vengono analizzati.

Pre-trattamento di CMP 1 e CMP 2

I campioni CMP 1 e CMP 2 si presentano come emulsioni e necessitano di un pre-trattamento specifico al fine di separare efficacemente la fase acquosa dalla fase organica di interesse.

Si prepara una soluzione acquosa di Na₂SO₄ al 10%: affinché il sale sia completamente solubilizzato, è necessario il riscaldamento a bagnomaria a circa 60°C fino a completa dissoluzione.

1. In un becker si uniscono in parti uguali (qualche mL) il campione e la soluzione di solfato di sodio calda. Il prodotto che viene campionato presenta un anello di fase acquosa in emulsione con la fase organica più densa di (2-idroperossipropan-2-il)benzene, 2-fenil-2-propanolo e fenilmetilchetone. Con l'aggiunta della soluzione

salina, il solfato aumenta la densità della fase acquosa che quindi stratifica verso il basso.

2. Si lasciano smistare le due fasi per circa dieci minuti.
3. Si preleva la fase organica sovrastante per preparare la soluzione di analisi del campione.

Procedimento di preparazione delle soluzioni di campione da analizzare

La soluzione d'analisi viene preparata ponendo in un matraccio tarato da 25 mL tra i 3,5 e i 250 mg di campione e portando a volume con acetonitrile.

La quantità di campione pesata varia in funzione della colonna in uso e del metodo di analisi da applicare. Per le analisi svolte sia con la colonna Phenomenex 00F-4462 E0 sia con la colonna PerkinElmer HyperSelect BDS C18, è prevista una pesata di 3,5-4,5 mg di campione. La preparazione delle soluzioni di CMP 1, CMP 2, CMP 3 e CMP 4 da analizzare con la colonna Phenomenex 00G-4601-E0 prevede che si pesino 5-10 mg di campione. Mentre, quando con la stessa colonna si vuole analizzare il campione CMP 5, la soluzione di analisi viene preparata trasferendo nel matraccio tarato circa 200 mg di campione.

La tabella di seguito riassume gli analiti da individuare e quantificare presenti nei campioni analizzati. In *Appendice 1* è possibile consultare le strutture degli analiti citati.

Campione	Analiti
CMP 1	2-Fenil-2-propanolo (2-Idroperossipropan-2-il)benzene Isopropilbenzene
CMP 2	2-Fenil-2-propanolo (2-Idroperossipropan-2-il)benzene isopropilbenzene
CMP 3	2-Fenil-2-propanolo (2-Idroperossipropan-2-il)benzene Isopropilbenzene
CMP 4	2-Fenil-2-propananolo (2-Idroperossipropan-2-il)benzene Isopropilbenzene

Campione	Analiti
CMP 5	2-Fenil-2-propanolo 2-Fenilpropene (2-Idroperossiopropan-2-il)benzene Fenilmetilchetone Fenolo Isopropilbenzene

Tabella 6: analiti ricercati all'interno dei campioni della serie A che vengono analizzati.

Campioni della serie B

Campione	Stato fisico	Pre-trattamento
CMP 6	Liquido bifase	SI
CMP 7	Liquido monofase	NO
CMP 8	Liquido monofase	NO
CMP 9	Liquido monofase	NO
CMP 10	Liquido monofase	NO

Tabella 7: campioni della serie B che vengono analizzati.

Campione	Indicazioni di pericolo	Consigli di prudenza
CMP 6	H242, H314, H317, H332, H411	P210, P270, P273, P280
CMP 7	H315, H400, H410	P273, P280
CMP 8	H242, H302, H312, H314, H331, H373, H411	P210, P270, P280
CMP 9	H315	P264, P280, P302+P352, P332+P313, P362+P364
CMP 10	H242, H304, H332, H314, H318, H317, H411	P210, P234, P260, P273, P280

Tabella 8: indicazioni di pericolo e consigli di prudenza dei campioni della serie B che vengono analizzati.

Pre-trattamento del campione CMP 6

Il campione CMP 6 raggiunge il laboratorio come liquido bifase ed è quindi necessario un pre-trattamento specifico prima di poter procedere con l'analisi.

1. Si scalda il campione a 60°C a bagnomaria per 30 minuti.
2. Si lascia raffreddare e smistare il campione per 30 minuti.
3. Si filtra la fase organica sovrastante con filtro di carta (qualche mL), questa è la fase con cui si prepara il campione.

Procedimento di preparazione delle soluzioni da analizzare

Le soluzioni da analizzare si preparano unendo in un matraccio tarato da 25 mL circa 20 mg di campione e 3 mL di soluzione tampone di H₂SO₄ a pH 2,9, poi si porta a volume con acetonitrile. È necessario filtrare la soluzione con filtro PTFE da 0,45 µm prima di trasferirla all'interno del vial.

Nella *Tabella 9* sono riportati gli analiti che si è interessati ad individuare e quantificare presenti all'interno di ogni campione analizzato. In *Appendice 1* è possibile consultare le strutture degli analiti citati.

Campione	Analiti
CMP 6	1-(2-Idroperossipropan-2-il)-3-isopropilbenzene 1-(2-Idroperossipropan-2-il)-4-isopropilbenzene 1,3-bis(2-Idroperossipropan-2-il)benzene 1,4-bis(2-Idroperossipropan-2-il)benzene (2-Idroperossipropan-2-il)benzene Isopropilbenzene
CMP 7	(2-Idroperossipropan-2-il)benzene Isopropilbenzene
CMP 8	(2-Idroperossipropan-2-il)benzene Isopropilbenzene
CMP 9	(2-Idroperossipropan-2-il)benzene Isopropilbenzene

Campione	Analiti
CMP 10	1-(2-Idroperossipropan-2-il)-3-isopropilbenzene 1-(2-Idroperossipropan-2-il)-4-isopropilbenzene 1-(3-(2-Idroperossipropan-2-il)fenil)etanone 1-(3-(2-Idrossipropan-2-il)fenil)etanone 1,3-bis(2-Idroperossipropan-2-il)benzene 1-(4-(2-Idroperossipropan-2-il)fenil)etanone 1-(4-(2-Idrossipropan-2-il)fenil)etanone 1,4-bis(2-Idroperossipropan-2-il)benzene 2,2'-(1,3-Fenil)bis(propan-2-olo) 2,2'-(1,4-Fenil)bis(propan-2-olo) 2-(3-(2-Idroperossipropan-2-il)fenil)propan-2-olo 2-(3-(ter-Butil)fenil)propan-2-olo 2-(4-(2-Idroperossipropan-2-il)fenil)propan-2-olo 2-(4-(ter-Butil)fenil)propan-2-olo (2-Idroperossipropan-2-il)benzene isopropilbenzene

Tabella 9: analiti ricercati all'interno dei campioni della serie B che vengono analizzati.

Campioni della serie C

Campione	Tipo di prodotto	Stato fisico	Pre-trattamento
CMP 11	Perossido chetonico del metiletilchetone	Liquido monofase	NO
CMP 12	Perossido chetonico del metiletilchetone	Liquido monofase	NO
CMP 13	Perossido chetonico del metiletilchetone	Liquido monofase	NO
CMP 14	Perossido chetonico del metiletilchetone	Liquido monofase	NO
CMP 15	Perossido chetonico del metilisobutilchetone	Liquido monofase	NO
CMP 16	Perossido chetonico dell'acetilacetone	Liquido monofase	NO

Tabella 10: campioni della serie C che vengono analizzati.

Campione	Indicazioni di pericolo	Consigli di prudenza
CMP 11	H242, H302, H332, H314, H318	P210, P234, P260, P273, P280
CMP 12	H226, H242, H302, H314, H335, H361d, H412	P201, P210, P234, P261, P273, P280
CMP 13	H242, H302, H332, H314, H318	P201, P210, P234, P261, P273, P280
CMP 14	H242, H302, H332, H314, H318	P210, P234, P273, P280
CMP 15	H242, H302, H332, H314, H318, H317, H361d, H411	P201, P210, P234, P261, P273, P280
CMP 16	H242, H319, H317, H361d, H335	P201, P210, P234, P261, P273, P280

Tabella 11: indicazioni di pericolo e consigli di prudenza dei campioni della serie C che vengono analizzati.

Procedimento di preparazione delle soluzioni da analizzare

La preparazione delle soluzioni di analisi prevede, per ogni perossido, di pesare circa 600 mg di campione all'interno di un matraccio tarato da 25 mL e poi portare a volume con acetonitrile. È importante filtrare la soluzione con filtri PTFE da 0,45 µm prima di trasferirla all'interno dei vial.

Nella *Tabella 12* si può consultare l'elenco degli analiti che si è interessati ad individuare e quantificare presenti all'interno di ogni campione analizzato. In *Appendice 1* è possibile consultare le strutture degli analiti citati.

Campione	Analiti
CMP 11	2-Butanone 4-Metil-2-pentanone Dimetilftalato Perossido di idrogeno
CMP 12	4-Idrossi-4-metil-2-pentanone Perossido di idrogeno
CMP 13	2-Butanone 4-Idrossi-4-metil-2-pentanone Dimetilftalato

	Perossido di idrogeno
Campione	Analiti
CMP 14	2-Butanone Dimetilftalato Perossido di idrogeno
CMP 15	4-Idrossi-4-metil-2-pentanone 4-Metil-2-pentanone Dimetilftalato Perossido di idrogeno
CMP 16	4-Idrossi-4-metil-2-pentanone Dimetilftalato Perossido di idrogeno

Tabella 12: analiti ricercati all'interno dei campioni della serie C che vengono analizzati.

Soluzioni di standard

La preparazione delle soluzioni di standard avviene pensando lo standard di analita all'interno di un matraccio tarato e portando a volume con acetonitrile. Spesso si prepara una soluzione madre più concentrata di uno o più analiti; di questa vengono trasferite aliquote differenti all'interno di matracci tarati da 25 mL, portando poi a volume si ottengono soluzioni di standard a concentrazioni diverse. Quando si prepara una soluzione in cui è presente più di un analita, è importante che i picchi relativi a questi siano completamente risolti, in modo che la calibrazione sia il più corretta possibile.

2.3. Strumenti utilizzati

2.3.1. HPLC e software di gestione dello strumento

Nei due paragrafi successivi vengono descritti lo strumento HPLC LC 300 PerkinElmer, le colonne utilizzate per svolgere le analisi e il funzionamento del software SimplicityChrome CDS Software.

2.3.1.1. HPLC LC 300 PerkinElmer e colonne utilizzate

L'oggetto di tesi è stato quello di trasferire, implementare e ottimizzare i metodi di analisi di perossidi organici sullo strumento HPLC LC 300 PerkinElmer (*Figura 13*).



Figura 13: strumento HPLC LC300 PerkinElmer.

Lo strumento presenta due coppie di pompe (*Figura 14*) che permettono di utilizzare una pressione di flusso fino a 10000 psi; è possibile collegare alle quattro pompe quattro solventi (A1, A2, B1, B2) ad utilizzo binario, si può lavorare con una coppia di solventi alla volta (A1-B1; A1-B2; A2-B1; A2-B2). Il design della testa della pompa, in attesa di brevetto, previene la formazione di bolle d'aria nella camera della pompa⁴.



Figura 14: coppie di pompe dello strumento HPLC LC300 PerkinElmer.

Il campionatore è automatico, questo permette di ottimizzare l'iniezione del campione, rendendola più precisa, riproducibile e accurata; anche il design della valvola di iniezione è stato brevettato⁴. In *Figura 15* è possibile osservare il piatto dell'autocampionatore che può ospitare fino a 100 vial, la siringa di iniezione (sulla sinistra) che viene azionata automaticamente e l'alloggiamento chiuso della colonna (in alto), visibile aperto in *Figura 16*.



Figura 15: alloggiamento dello strumento HPLC LC300 PerkinElmer.



Figura 16: alloggiamento colonna nello strumento HPLC LC300 PerkinElmer.

Integrato nell'autocampionatore c'è un forno che permette il riscaldamento della colonna alla temperatura desiderata: si può lavorare da 30°C fino a 60°C.

In alternativa all'utilizzo del forno interno, è possibile usufruire del forno esterno, ovvero l'apparecchiatura posta esternamente allo strumento dotata di un sistema di raffreddamento e riscaldamento dell'aria molto preciso, che permette di lavorare con un range di temperature maggiore, da 5°C a 90°C. Nel forno esterno lo spazio disponibile per l'alloggiamento della colonna è maggiore, quindi è possibile collocare colonne più lunghe munite di pre-colonna.



Figura 17: forno esterno dello strumento HPLC LC300 PerkinElmer.



Figura 18: alloggiamento colonna nel forno esterno dello strumento HPLC LC300 PerkinElmer.

Il detector (rivelatore) installato è di tipo PDA, quindi a diode array. La possibilità di ottenere risultati simultaneamente a diverse lunghezze d'onda, quindi riprocessare a posteriori l'analisi scegliendo una lunghezza d'onda differente da quella impostata, permette di individuare le condizioni migliori per una corretta risoluzione dei cromatogrammi.



Figura 19: rivelatore a PDA dello strumento HPLC LC300 PerkinElmer.

Colonne cromatografiche

Sono stati studiati metodi di analisi HPLC utilizzando tre colonne analitiche.

Si riportano le caratteristiche della prima che è stata scelta:

Colonna Phenomenex 00F-4462-E0

P/No.: 00F-4462-E0

Description: Kinetex 2.6 μm C18 100 Å

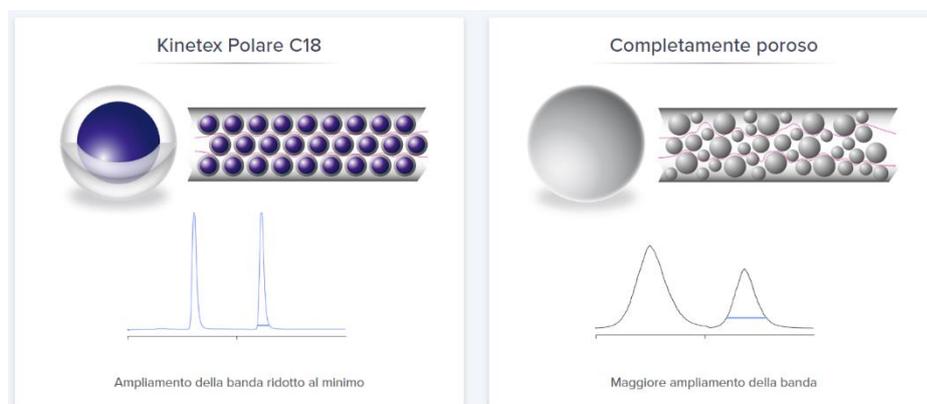
*Size: LC Column 150*4.6 mm*

S/No.: H22-395945

B/No.: 5569-0347

A differenza delle particelle porose che presentano canali interni, le particelle core-shell hanno un nucleo di silice non porosa circondato da un sottile strato di silice porosa. La diminuzione della superficie interfacciale tra la fase stazionaria e la fase mobile, rispetto alle prime, permette un incremento dell'efficienza del sistema, poiché vengono limitati gli effetti di trascinamento della fase mobile all'interno di quella stazionaria. La fase stazionaria apolare,

studiata secondo la tecnologia *Kinetex Core Shell*⁵, permette un guadagno in termini di risoluzione (*Figura 20*), produttività, riduzione del consumo di solventi e diminuzione dei costi.



*Figura 20: effetto dell'utilizzo di particelle core-shell sull'allargamento delle bande*⁵.

Come precedentemente descritto, la presenza di una pre-colonna è molto utile alla salvaguardia della colonna analitica, la colonna Phenomenex 00F-4462-E0 si alloggia perfettamente nello spazio a disposizione del forno interno dello strumento, ma non consente di montare una pre-colonna per eccessiva lunghezza. Si è pensato, quindi, di sostituirla con un'altra colonna più corta ma che mantenesse la stessa qualità di separazione.

Si riportano le caratteristiche della seconda colonna considerata.

Colonna PerkinElmer HyperSelect BDS C18

Part No.: 124191-HPC-BDSC18

*Size: 100*4.00 mm 3 μ m*

Serial No: 302-21-99244

Anche in questo caso, la fase stazionaria apolare è caratterizzata da particelle core shell, ma di dimensione più piccola, così da avere un ulteriore incremento delle prestazioni; inoltre la lunghezza ridotta permette la sistemazione anche di una pre-colonna nel forno interno dello strumento.

Questa colonna, purtroppo, non ha garantito un'ottimale separazione di tutti i picchi di interesse per alcuni campioni analizzati, caratterizzati da un grande numero di analiti, proprio a causa della lunghezza ridotta della colonna. Si è considerato, quindi, di utilizzare il sistema a forno

esterno che permette l'alloggiamento di colonne più lunghe munite di pre-colonna che assicurano una migliore separazione e quindi identificazione e quantificazione delle impurezze.

Si riportano quindi le caratteristiche della terza colonna scelta:

Colonna Phenomenex 00G-4601-E0

P/No.: 00G-4601-E0

Description: Kinetex 5 μ m C18 100 Å

*Size: LC Column 250*4.6 mm*

S/No.: H22-167715

B/No.: 5701-0139

La colonna sopra descritta è nettamente più lunga delle precedenti, questo permette una migliore separazione di tutti gli analiti, soprattutto in quei campioni ricchi di composti che interagiscono in modo molto simile con le due fasi e che quindi danno luogo a picchi sovrapposti e difficilmente separabili con colonne di lunghezza inferiore.

La fase stazionaria è, anche in questo caso, caratterizzata da particelle core shell di maggiori dimensioni rispetto a quelle presenti nelle due colonne utilizzate precedentemente. Questa colonna viene collegata alla pre-colonna Perkin Elmer e collocata nel forno esterno, dove è disponibile uno spazio maggiore per l'alloggiamento.

Pre-colonna cromatografica

Di seguito le caratteristiche della pre-colonna scelta:

Pre-colonna PerkinElmer Brownlee Guard Cartridge Holder with Filter

Brownlee Guard Cartridge Holder with Filter, 10 mm

Cat. # N9303713

Questa pre-colonna può essere collegata sia alla Colonna PerkinElmer HyperSelect BDS C18 sia alla Colonna Phenomenex 00G-4601-E0; le cartucce in dotazione mostrano le seguenti caratteristiche:

*C18 Analytical Guard Cart. 10 * 4 mm*

Cat. # N9303677.

2.3.1.2. SimplicityChrome CDS Software

Il software collegato al sistema è PerkinElmer SimplicityChrom™ Chromatography Data System (CDS), attraverso questo è possibile creare sia i metodi di acquisizione sia i metodi di processamento delle analisi dei campioni.

I metodi studiati e i relativi risultati vengono gestiti in cartelle dedicate nominate *Progetti*. Il software riconosce il collegamento con LC300 attraverso due possibili sistemi di lavoro, quello con il forno interno oppure quello con il forno esterno. È necessario creare due progetti distinti poiché le due modalità non possono essere attive contemporaneamente.

Il lavoro sul software viene gestito attraverso diversi moduli che vengono descritti di seguito.

- **Lab Management:** attraverso questo modulo è possibile testare la connessione tra strumento e software.
- **Acquisition:** è il modulo all'interno del quale è possibile attivare il sistema, creare metodi di acquisizione, generare sequenze di campioni e seguire in tempo reale l'acquisizione dei cromatogrammi. All'interno di questo blocco si lavora con le seguenti finestre.
 - **Direct Control** in cui si azionano e si spengono le pompe, il forno e il detector.
 - **Device Status** in cui si segue lo stato delle pompe, dell'autocampionatore, del forno e del detector in fase di lavoro e di riposo.
 - **Acquisition Method** dove si creano e modificano i metodi di acquisizione. Il metodo di acquisizione che viene caricato definisce le condizioni di analisi per un campione o un gruppo di campioni e deve essere studiato accuratamente in funzione delle caratteristiche degli analiti presenti all'interno. In particolare, si definiscono i seguenti parametri:
 - ❖ **Equilibration Time:** il tempo necessario affinché il sistema si prepari all'analisi;
 - ❖ **Run Time:** il tempo effettivo di analisi
 - ❖ **Il/I solvente/i utilizzato/i;**
 - ❖ **Time Program:** il programma di variazione delle componenti dei solventi durante il corso dell'analisi.

Quando si sviluppa il metodo, viene richiesto di impostare alcuni parametri riguardanti l'autocampionatore:

- ❖ **Needle Volume:** il volume di riempimento dell'ago della siringa;
- ❖ **Loop Volume:** il volume di riempimento del loop;
- ❖ **Syringe Volume:** il volume di campione che viene aspirato dal vial;

- ❖ *Injection Mode*: la modalità di iniezione;
- ❖ *Sample Speed*: la velocità di spinta del campione in colonna;
- ❖ *Needle Level*: l'altezza, dal fondo del vial, di pescaggio del campione;
- ❖ *Sample Pre-flush Volume*: il volume di campione utilizzato per fare un pre-lavaggio;
- ❖ *Headspace Pressure, Air Cushion e Air Cushion Volume*: l'attivazione dello spazio di testa o di un volume di aria prelevato prima del campione.

Nella sezione riguardante il sistema di riscaldamento interno si imposta:

- ❖ *Temperature Control*: la temperatura del forno interno, da definire solo se viene scelto questo come sistema di riscaldamento;
- ❖ *Pre-Sequence Flush*: il volume di solvente di lavaggio fatto fluire prima dell'avvio della sequenza di campioni da analizzare;
- ❖ *Post-Sequence Flush*: il volume di solvente di lavaggio fatto fluire al termine delle analisi della sequenza di campioni inviata.

Nella sezione riguardante il sistema di riscaldamento esterno si imposta:

- ❖ *Oven Temperature Setpoint*: la temperatura del forno esterno, da definire solo se viene scelto questo come sistema di riscaldamento;
- ❖ *Oven Temperature Tolerance*: l'intervallo tollerato di variazione della temperatura.

Infine, nella sezione dedicata al detector viene richiesto di definire:

- ❖ *Run Time*;
 - ❖ *Sampling Rate*: la frequenza di campionamento;
 - ❖ *Wavelength*: la lunghezza d'onda alla quale seguire l'acquisizione del cromatogramma in tempo reale.
- *Sequence* in cui si generano, modificano e attivano le sequenze di campioni da analizzare.
 - *Live Chromatogram* in cui è possibile seguire in tempo reale l'acquisizione del cromatogramma.
 - *Maintenance* attraverso la quale è possibile intervenire nel caso in cui sorgessero errori di manutenzione dello strumento.
- **Data Review**: è il modulo che interessa l'elaborazione dei cromatogrammi e la visione dei dati. Caricato un set di analisi, è possibile il loro studio attraverso le seguenti finestre.

- Chromatogram in cui viene riportato il cromatogramma acquisito.
- Result Table in cui, attraverso una tabella, vengono mostrati i risultati dell'analisi in esame.
- Processing Method dalla quale si può creare, caricare o modificare il metodo di processamento. Quando si crea un nuovo metodo di processamento, nella sezione *Integration Parameters* è necessario impostare i parametri seguenti.
 - ❖ *Bunching Factor*: indica il numero di punti di cui si calcola la media per stabilire un singolo punto sul cromatogramma.
 - ❖ *Noise Threshold*: è il valore che determina la differenza tra il rumore di fondo della linea di base e l'inizio del picco, quindi si basa sul rapporto segnale/rumore.
 - ❖ *Area Threshold*: parametro che permette di distinguere, in funzione dell'area, picchi di interesse e picchi di rumore.

Questi tre valori possono e devono essere modificati in modo da ottenere cromatogrammi chiari e interpretabili.

All'interno della stessa finestra, in *Compound Table*, si riportano le caratteristiche utili degli analiti da identificare.

In *Global Parameters* si sceglie l'unità di misura di restituzione del dato.

- Calibration Curve è la finestra in cui vengono riportate le rette di calibrazione relative ad ogni analita identificato dal metodo di processamento applicato.
 - Result Set Review in cui si ha una panoramica dei campioni presenti all'interno del data set. In questa sezione è possibile modificare alcune informazioni riguardanti l'analisi, come il nome o la pesata, cancellare analisi non utili al data set corrente, ma anche aggiungere altre analisi appartenenti ad altri data set.
 - Spectrum dove si può analizzare il profilo di assorbimento della specie di cui è stato selezionato il picco sul cromatogramma.
 - Acquisition Method è la finestra che riporta il metodo di acquisizione che è stato applicato all'analisi.
 - PDA Contour Map in cui è possibile prendere visione delle informazioni relative al detector.
 - Library che consiste in un archivio di tutti gli analiti riconosciuti nei cromatogrammi acquisiti nel tempo e del relativo spettro di assorbimento.
- **Report Templates**: è il modulo che permette di definire la modalità di lettura dei risultati delle analisi.

3. RISULTATI OTTENUTI

L'obiettivo della tesi è stato sviluppare e ottimizzare metodi di analisi HPLC.

In questo capitolo vengono illustrati i risultati ottenuti, ovvero i metodi analitici studiati.

La messa a punto di un metodo di analisi prevede lo sviluppo dell'*Acquisition Method* e del *Processing Method* e la costruzione delle rette di calibrazione utili per ottenere risultati quantitativi. L'*Acquisition Method* definisce la modalità di svolgimento dell'analisi, mentre il *Processing Method* è l'insieme dei parametri utili al processamento dei cromatogrammi acquisiti.

In particolare, i metodi di analisi sono stati studiati con tre diverse colonne separative.

La prima colonna utilizzata è la Phenomenex 00F-4462-E0 alloggiata nel compartimento riscaldato dal forno interno; a causa della sua lunghezza (150 mm) non è possibile montare la pre-colonna.

Per questo motivo, la seconda colonna in esame è la PerkinElmer HyperSelect BDS C18, la cui lunghezza è 100 mm. Il vantaggio nell'uso di quest'ultima risiede nella possibilità di collegare alla colonna la pre-colonna PerkinElmer Browlee Guard Cartridge Holder e sistemarle nell'alloggiamento interno dello strumento.

Viene richiesto di studiare metodi di analisi anche per campioni caratterizzati da una matrice molto complessa, i cui componenti non sono separabili attraverso l'utilizzo della colonna PerkinElmer. A tal proposito viene scelta una colonna più lunga da collocare, collegata alla pre-colonna, necessariamente all'interno del forno esterno dello strumento. La colonna in questione è la Phenomenex 00G-4601-E0, la cui lunghezza di 250 mm permette una separazione ottimale dei picchi relativi alle specie presenti nei campioni di interesse.

3.1. Serie A

I primi campioni di cui si vuole conoscere la composizione sono quelli inerenti alla serie A. In particolare, l'obiettivo è quello di determinare la concentrazione di alcuni analiti e confermare l'assenza di impurezze indesiderate.

Attualmente, le tecniche di analisi dei campioni della serie in esame sono: gas-cromatografia, titolazione Karl Fisher e titolazione iodometrica. L'analisi HPLC viene svolta solamente per determinare il contenuto di (2-idroperossipropan-2-il)benzene all'interno del campione CMP 5. Con lo sviluppo dei metodi descritti, l'obiettivo è quello di rendere primaria la tecnica di cromatografia liquida per l'analisi dei campioni di interesse.

3.1.1. Analisi HPLC - lavoro con colonna Phenomenex 00F-4462 E0

Il metodo seguente viene sviluppato per le analisi svolte con la colonna Phenomenex 00F-4462-E0, le cui caratteristiche sono state descritte nel *Paragrafo 2.3.1.1.* La colonna viene alloggiata nell'apposito compartimento riscaldato dal forno interno e non è provvista della pre-colonna.

3.1.1.1. Acquisition Method: AA

Le *Tabella 13 e 14* mostra i parametri dell'*Acquisition Method* studiato per le analisi HPLC sui campioni della serie A che è stato denominato AA.

LC300 (U)HPLC PUMP	
Initial Conditions	
Maximum Pressure (psi)	6000
Minimum Pressure (psi)	300
Equilibration Time (min)	4,00
Run Time (min)	18,0
Pump A	Solvent 1
Pump B	Solvent 1

Tabella 13: blocco LC300 (U)HPLC Pump - Acquisition Method AA per l'analisi dei campioni della serie A.

LC300 (U)HPLC PUMP			
Time Program			
Time (min)	Flow (mL/min)	%A	%B
0,0	1,000	70,0	30,0
7,0	1,000	35,0	65,0
16,5	1,000	16,8	83,2
17,0	1,000	0,0	100,0
18,0	1,000	0,0	100,0

Tabella 14: blocco LC300 (U)HPLC Pump - Acquisition Method AA per l'analisi dei campioni della serie A

Il tempo totale di analisi è di 22 minuti, di cui 4 di condizionamento (*Equilibration Time*) e 18 di corsa vera e propria (*Run Time*). Alla pompa A è collegata l'acqua ultra-pura, mentre alla pompa B l'acetonitrile. Come si osserva dal *Time Program*, l'eluizione è in gradiente: si inizia con una fase mobile al 70% di acqua e si termina con una fase mobile costituita da solo acetonitrile. Gran parte dello sviluppo del metodo consiste nella messa a punto del gradiente dei solventi, che deve essere studiato su misura in funzione della tipologia di campioni e delle specie presenti all'interno. A tal proposito, sono state svolte diverse prove per individuare il corretto *Time Program* adatto allo scopo.

LC300 (U)HPLC AUTOSAMPLER	
Injection	
Needle Volume (µL)	15
Loop Volume (µL)	100
Syringe Volume (µL)	500
Injection Mode	Partial Loop
Sample Speed	Medium
Needle Level (mm)	6,0
Sample Pre-flush Volume (µL)	20
Enable Headspace Pressure	Disabled
Enable Air Cushion	Enabled
Air Cushion Volume (µL)	5

Tabella 15: blocco LC300 (U)HPLC Autosampler - Acquisition Method AA per l'analisi dei campioni della serie

A.

LC300 (U)HPLC AUTOSAMPLER	
Temperature Control	
Enable Tray Temperature Control	Disabled
Enable Oven Temperature Control	Enabled
Oven Temperature Setpoint (°C)	40
Oven Temperature Tolernace (±°C)	2,0
Pre-Sequence Flush	
Flush Port	Flush Volume (µL)
Solvent 1	500
Post-Sequence Flush	
Flush Port	Flush Volume (µL)
Solvent 1	500

Tabella 16: blocco LC300 (U)HPLC Autosampler - Acquisition Method AA per l'analisi dei campioni della serie

A.

La colonna separativa utilizzata viene sistemata nell'apposito alloggiamento riscaldato dal forno interno a 40°C, con una possibile variazione di ±2,0°C.

LC300 PDA DETECTOR	
Initial Conditions	
Run Time (min)	18,0
Sampling Rate (Hz)	5
Channel for Live Chromatogram	
Wavelength (nm)	200

Tabella 17: blocco LC300 PDA Detector - Acquisition Method AA per l'analisi dei campioni della serie A.

L'acquisizione del cromatogramma viene seguita in tempo reale alla lunghezza d'onda di 200 nm.

Inoltre, in funzione delle caratteristiche del riempimento, la colonna è capace di sopportare un volume di carico di campione abbastanza elevato, quindi, nella preparazione della sequenza di campioni, l'*Injection volume* (il volume che viene iniettato) è impostato a 10 µL.

3.1.1.2. Processing Method: AA PM

Il metodo di processamento creato è stato denominato AA *PM*. Di seguito si riportano i parametri impostati per l'elaborazione dei cromatogrammi.

INTEGRATION PARAMETERS	
PDA-200	
Basic Parameters	
Bunching Factor [Pts]	7
Noise Threshold	4580
Area Threshold	22904

Tabella 18: blocco Integration Parameters - Processing Method AA PM per l'analisi dei campioni della serie A.

COMPOUND TABLE					
Compounds		Channel	Expected RT (min)	Absolute Window (s)	Relative Window (%)
2-fenilpropene	alfa-MS	PDA-200	8,636	12	3
2-fenil-2-propanolo	AC	PDA-200	3,834	12	3
Fenilmetilchetone	ACF	PDA-200	4,112	12	3
(2-Idroperossipropan-2-il)benzene	CHP	PDA-200	4,568	12	3
Isopropilbenzene	Cumene	PDA-200	9,485	12	3
Fenolo	Fenolo	PDA-200	2,896	12	3

Tabella 19: blocco Compound Table - Processing Method AA PM per l'analisi dei campioni della serie A.

Viene scelto un canale unico di processamento, quindi tutti i cromatogrammi vengono processati considerando una sola lunghezza d'onda. Infatti, a 200 nm, l'assorbimento di tutti gli analiti è ottimo, prossimo al massimo, di conseguenza la risposta che si ottiene è chiara e distinguibile dal rumore di fondo, per cui si può assicurare una perfetta identificazione e quantificazione di ogni singolo analita.

All'interno dei parametri modificabili del *Processing Method* si inserisce, come unità di misura di restituzione del dato, la percentuale.

3.1.1.3. Rette di calibrazione

Gli analiti che si è interessati a identificare e quantificare, per i quali è obbligatorio costruire le rette di calibrazione, sono: 2-fenilpropene (alfa-MS), 2-fenil-2-propanolo (AC), fenilmetilchetone (ACF), (2-idroperossipropan-2-il)benzene (CHP), isopropilbenzene (cumene) e fenolo. Le soluzioni di standard sono state preparate pesando l'analita all'interno di un matraccio tarato e portando a volume con acetonitrile, come descritto nel *Capitolo 2*.

Di seguito vengono riportate le rette di calibrazione ottenute per tutti gli analiti di interesse.

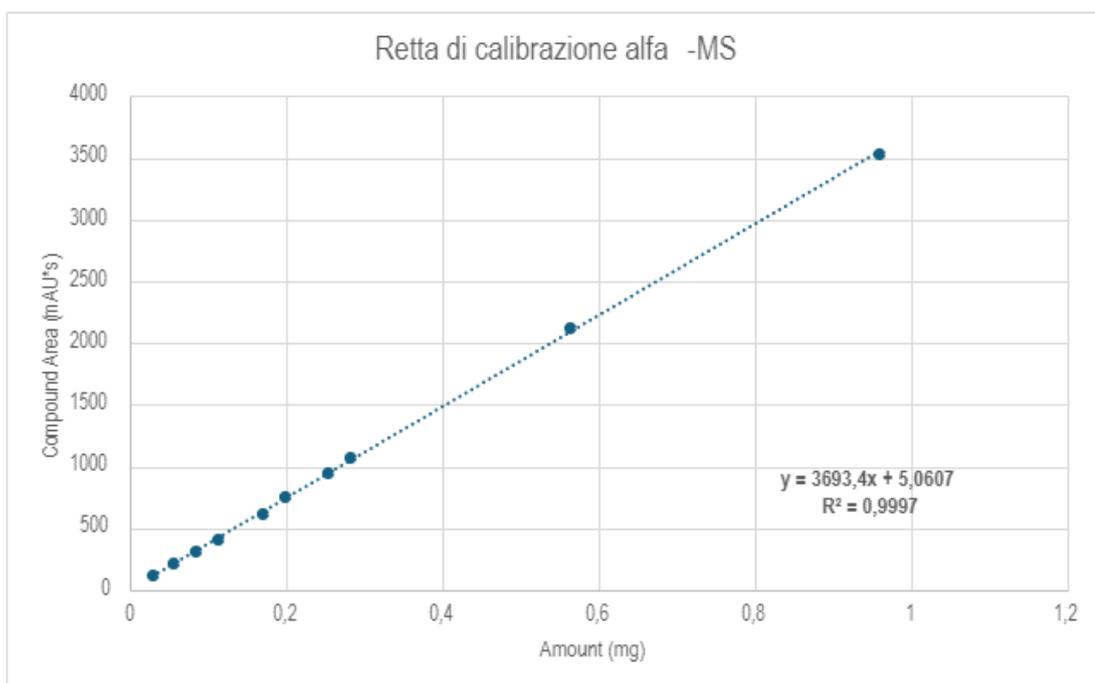


Figura 21: retta di calibrazione costruita per il 2-fenil-propene con Acquisition Method AA e Processing Method AA PM.

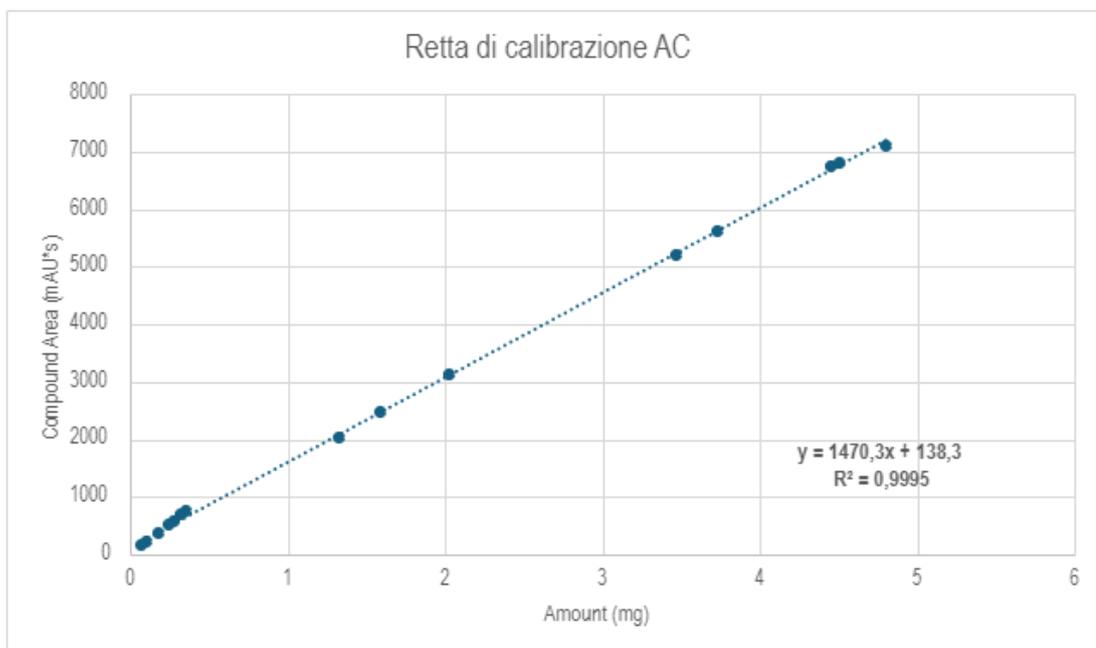


Figura 22: retta di calibrazione costruita per il 2-fenil-propene con Acquisition Method AA e Processing Method AA PM.

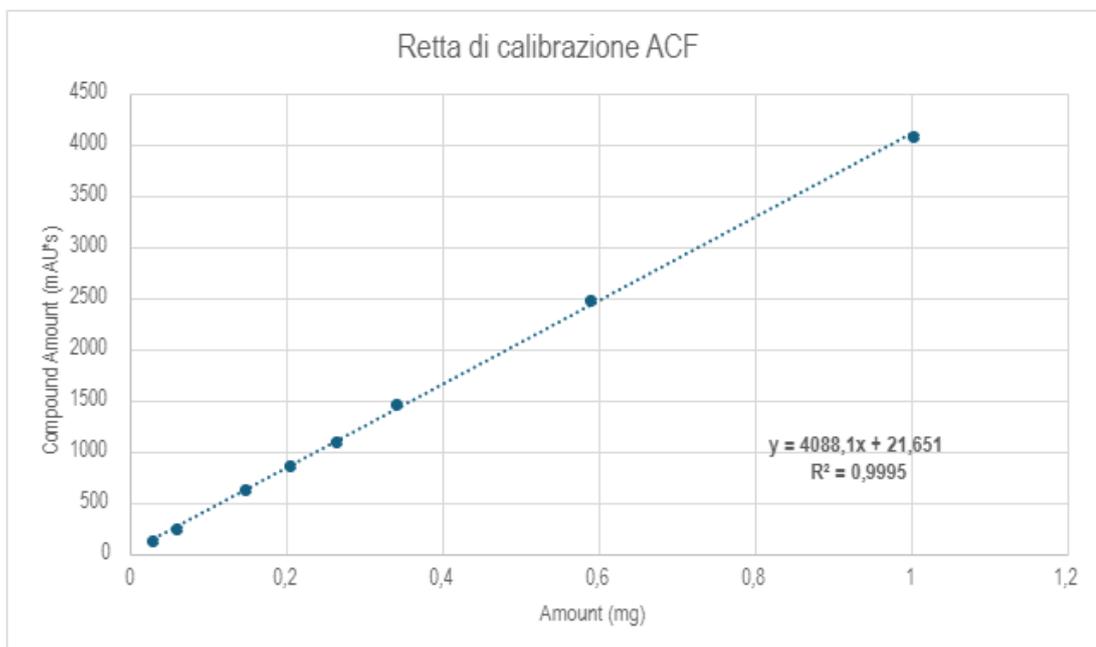


Figura 23: retta di calibrazione costruita per il fenilmetilchetone con Acquisition Method AA e Processing Method AA PM.

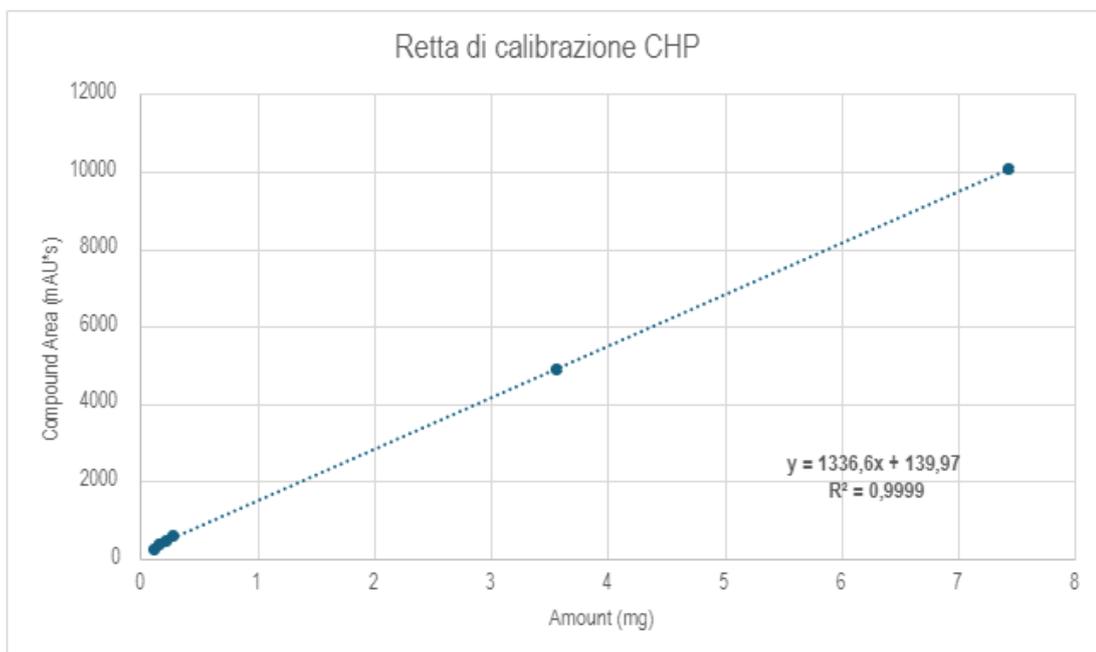


Figura 24: retta di calibrazione costruita per il (2-idroperossipropan-2-il)benzene con Acquisition Method AA e Processing Method AA PM.

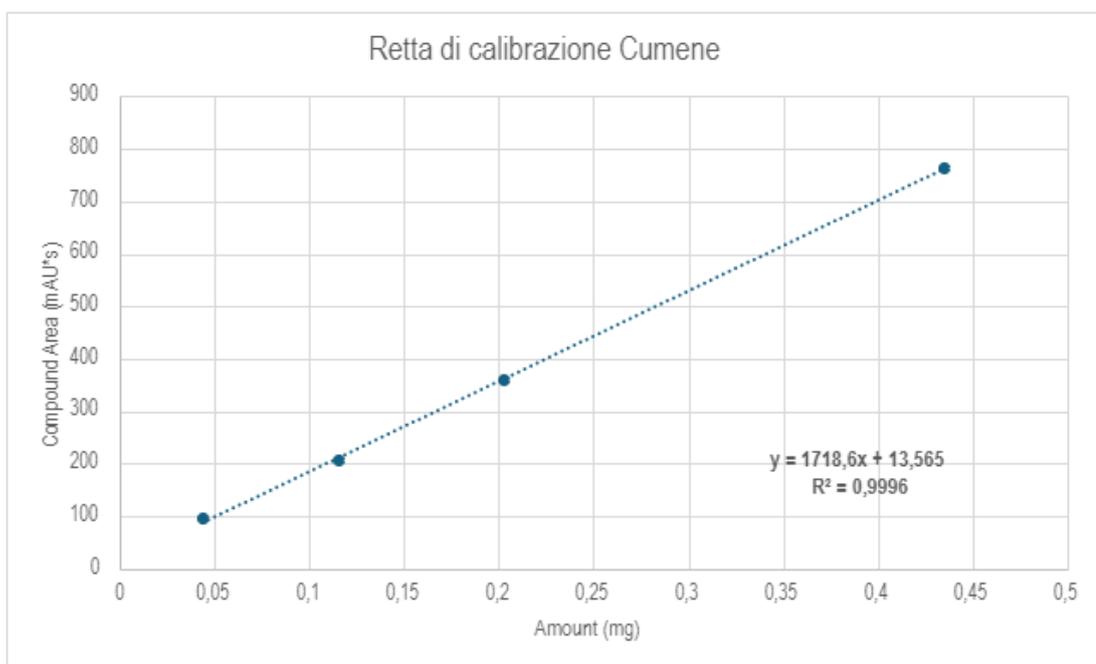


Figura 25: retta di calibrazione costruita per l'isopropilbenzene con Acquisition Method AA e Processing Method AA PM.

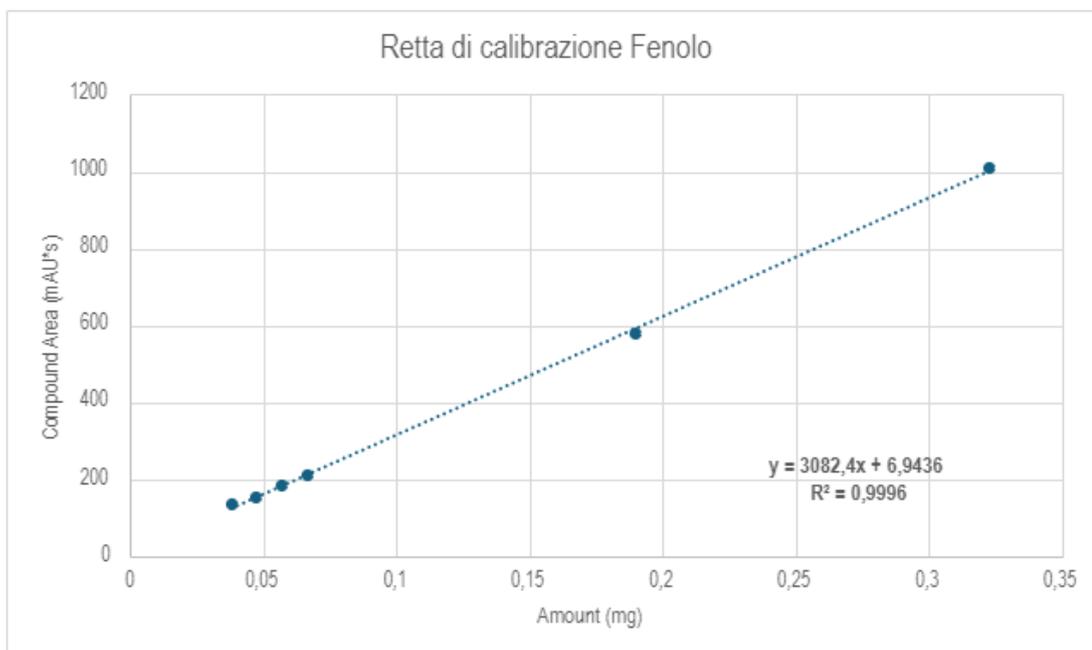


Figura 26: retta di calibrazione costruita per il fenolo con Acquisition Method AA e Processing Method AA PM.

Di seguito si riporta una tabella riassuntiva dei dati rilevanti ottenuti dalla costruzione delle rette di calibrazione.

Analita	R²	Equazione della retta	Limite inferiore (mg)	Limite superiore (mg)
alfa-MS	0,9997	$y=3693,4x+5,0607$	0,05640	0,9588
AC	0,9995	$y=1470,3x+138,3$	0,07000	4,8020
ACF	0,9995	$y=4088,1x+21,651$	0,02950	1,0030
CHP	0,9999	$y=1336,6x+139,97$	0,1120	7,4259
Cumene	0,9996	$y=1718,6x+13,565$	0,04350	0,4350
Fenolo	0,9996	$y=3082,4x+6,9436$	0,03800	0,2300

Tabella 20: tabella riassuntiva dei dati rilevanti ottenuti dalla costruzione delle rette di calibrazione con Acquisition Method AA e Processing Method AA PM.

Come si osserva, le rette costruite presentano tutte un $R^2 \geq 0,9995$, sono quindi caratterizzate da un'ottima linearità. Questo assicura una corretta estrapolazione dei dati di concentrazione degli analiti dall'interpolazione dell'intensità del segnale ottenuto con la retta. Inoltre, gli intervalli di concentrazioni coperti dalle rette di calibrazione mettono in evidenza la possibilità di rilevare anche quantità molto basse, a conferma della bontà dell'analisi HPLC per l'obiettivo prefissato.

3.1.1.4. Campioni analizzati

I campioni analizzati con l'*Acquisition Method* e il *Processing Method* descritti sono: CMP 2, CMP 4 e CMP 5. Lo scopo dell'applicazione del metodo di analisi sviluppato a questi campioni è quello di verificare la concentrazione degli analiti di interesse sui campionamenti eseguiti durante il processo produttivo. Infatti, viene verificata la concentrazione degli analiti per confermare il corretto avanzamento del processo produttivo nel rispetto della specifica qualitativa.

CMP 2

Lo scopo dell'analisi del campione CMP 2 è quantificare gli analiti presenti in concentrazione dell'ordine di: CHP > 90,0%, AC < 7,0% e cumene < 0,1% (espressa come percentuale in peso rispetto alla massa del campione). Come si può notare dai cromatogrammi ottenuti, i picchi relativi al 2-fenil-2-propanolo e il (2-idroperossipropan-2-il)benzene sono ben identificabili e separati. Inoltre, dalle analisi risulta che l'isopropilbenzene sia assente in tutti i campioni esaminati, mentre è presente il fenilmetilchetone in quantità molto basse. Le concentrazioni restituite rientrano negli intervalli coperti dalle rette di calibrazione. I metodi di acquisizione e processamento studiati risultano quindi adatti per l'analisi di questo campione.

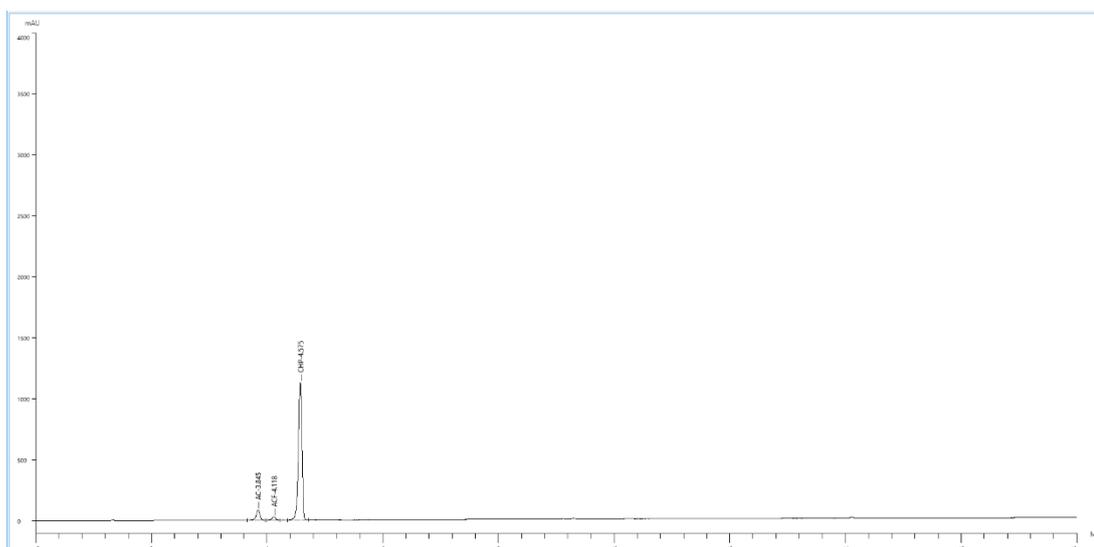


Figura 27: esempio di cromatogramma relativo all'analisi del campione CMP 2 con *Acquisition Method AA* e *Processing Method AA PM*.

CMP 4

Il campione presenta, nella fase organica, una concentrazione di AC > 98,0%, CHP < 0,5% e cumene < 0,1%, espressa come percentuale in peso rispetto alla massa del campione. Come visibile dai risultati ottenuti, i metodi di acquisizione e processamento sono risultati ottimali per l'analisi di questo campione in quanto i picchi di tutti gli analiti di interesse sono stretti e simmetrici. Da un punto di vista qualitativo, si riscontra la presenza del fenilmetilchetone e l'assenza di isopropilbenzene e (2-idroperossiopropan-2-il)benzene. Gli analiti ricercati vengono facilmente quantificati utilizzando le rette di calibrazione costruite, poiché le loro concentrazioni rientrano negli intervalli coperti.

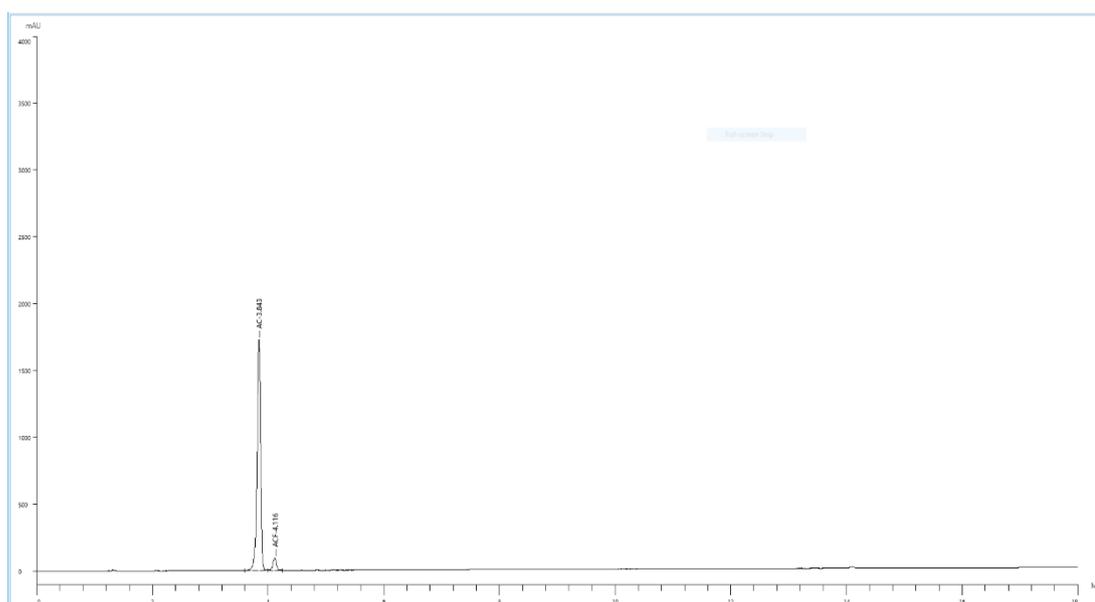


Figura 28: esempio di cromatogramma relativo all'analisi del campione CMP 4 con Acquisition Method AA e Processing Method AA PM.

CMP 5

Si conferma la bontà dei metodi di acquisizione e processamento, dal momento che anche per questo campione si ottengono cromatogrammi molto chiari. Infatti, i vari picchi si identificano facilmente e le impurezze di interesse possono essere quantificate mediante le rette di calibrazione. Il picco relativo al prodotto della reazione satura il segnale e non può essere quantificato poiché non sono state costruite le relative rette di calibrazione.

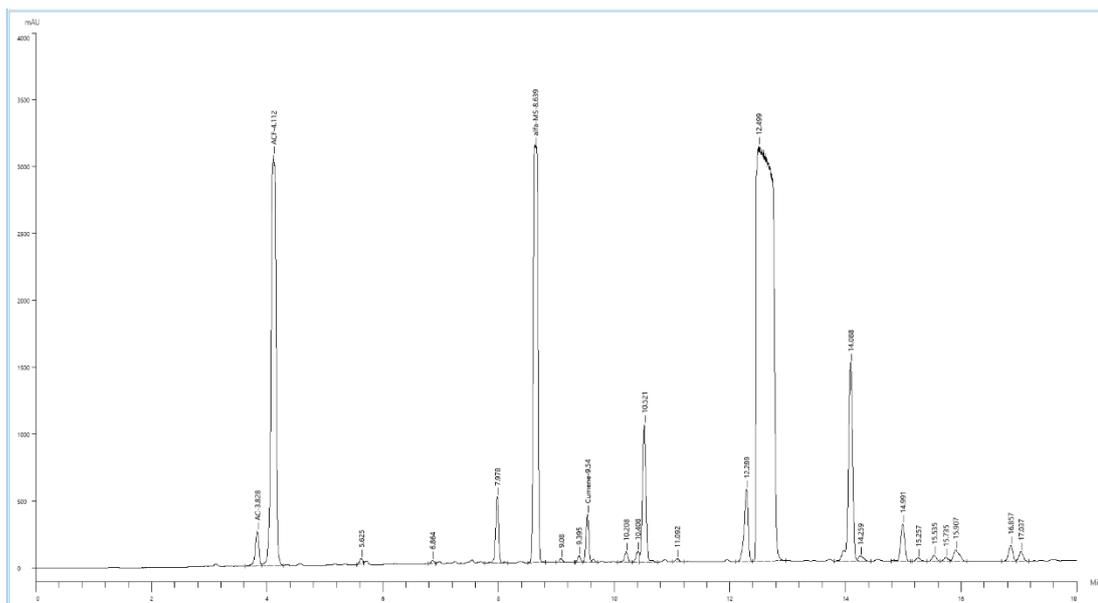


Figura 29: esempio di cromatogramma relativo all'analisi del campione CMP 5 con Acquisition Method AA e Processing Method AA PM.

3.1.1.5. Processing Method per basse concentrazioni di isopropilbenzene AA LOW CONC PM

Il metodo di processamento *AA LOW CONC PM* è stato creato per rilevare concentrazioni molto basse di isopropilbenzene (cumene) all'interno dei campioni. In particolar modo, l'idea di costruire questo *Processing Method* nasce dalla curiosità di confermare l'effettiva assenza di isopropilbenzene all'interno dei campioni già processati con il metodo *AA PM*. È necessario sottolineare che, lavorando con concentrazioni così basse e abbassando di conseguenza i valori di *Bunching Factor*, *Noise Threshold* e *Area Threshold*, la percentuale di errore aumenta. Quindi i dati forniti risultano meno affidabili, ma offrono comunque un'ottima stima.

INTEGRATION PARAMETERS	
PDA-200	
Basic Parameters	
Bunching Factor [Pts]	4
Noise Threshold	227
Area Threshold	1136

Tabella 21: blocco Integration Parameters - Processing Method AA LOW CONC PM per l'analisi dei campioni della serie A.

COMPOUND TABLE					
Compounds		Channel	Expected RT (min)	Absolute Window (s)	Relative Window (%)
Isopropilbenzene	Cumene	PDA-200	9,485	12	3

Tabella 22: blocco Compound Table - Processing Method AA LOW CONC PM per l'analisi dei campioni della serie A.

Di seguito viene riportata la retta di calibrazione costruita per la quantificazione del dell'isopropilbenzene a basse concentrazioni con $R^2=0,9993$. Le soluzioni di standard sono state preparate pesando l'analita all'interno del matraccio tarato e portando a volume con acetonitrile, come descritto nel *Paragrafo 2.2*.

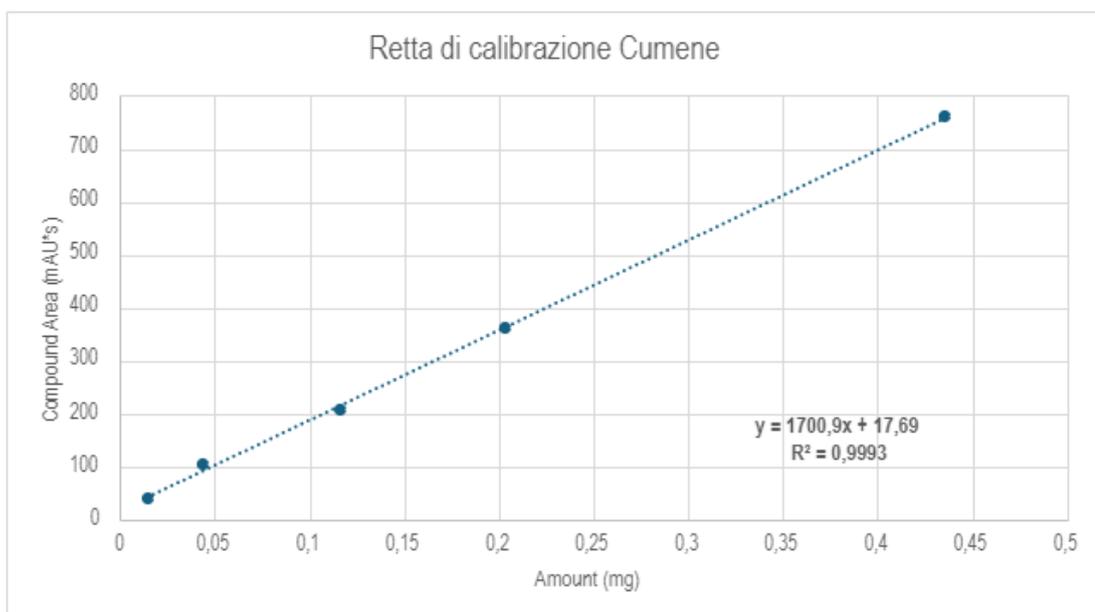


Figura 30: retta di calibrazione costruita per l'isopropilbenzene con Acquisition Method AA e Processing Method AA LOW CONC PM.

Di seguito si riporta una tabella riassuntiva dei dati rilevanti ottenuti dalla costruzione della retta di calibrazione.

Analita	R^2	Equazione della retta	Limite inferiore (mg)	Limite superiore (mg)
Cumene	0,9993	$y=1700,9x+17,690$	0,03800	0,2300

Tabella 23: tabella riassuntiva dei dati rilevanti ottenuti dalla costruzione delle rette di calibrazione con Acquisition Method AA e Processing Method AA LOW CONC PM.

La retta presenta un $R^2 \geq 0,9993$, dunque può essere utilizzata per determinare il contenuto di isopropilbenzene nei campioni analizzati.

All'interno dei parametri modificabili del *Processing Method* si inserisce, come unità di misura di restituzione del dato, la percentuale.

Applicando questo metodo alle analisi già acquisite dei campioni CMP 2, CMP 4 e CMP 5, per alcuni di loro si conferma l'assenza dell'analita ricercato o la possibile presenza ma a concentrazioni ancora più basse, non rilevabili dallo strumento. Per altri campioni viene invece restituita una stima della concentrazione di isopropilbenzene che risulta comunque molto più bassa rispetto al valore massimo di soglia.

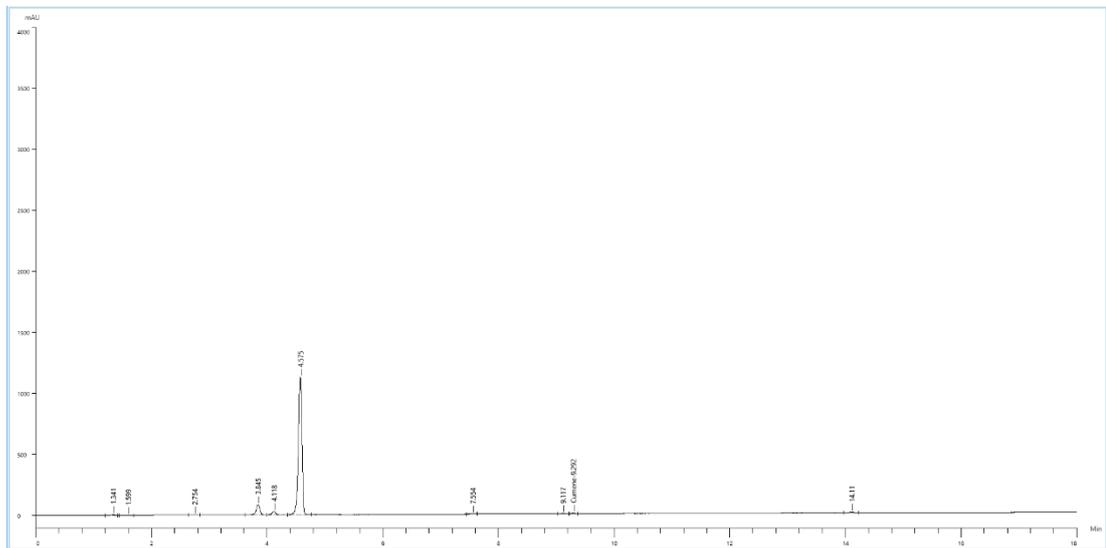


Figura 31: esempio di cromatogramma relativo all'analisi del campione CMP 2 con Acquisition Method AA e Processing Method AA LOW CONC PM.

In *Figura 31* viene mostrato un cromatogramma acquisito per un CMP 2 di esempio. A 9,292 minuti viene rilevata la presenza di isopropilbenzene, a concentrazione inferiore a 0,1%.

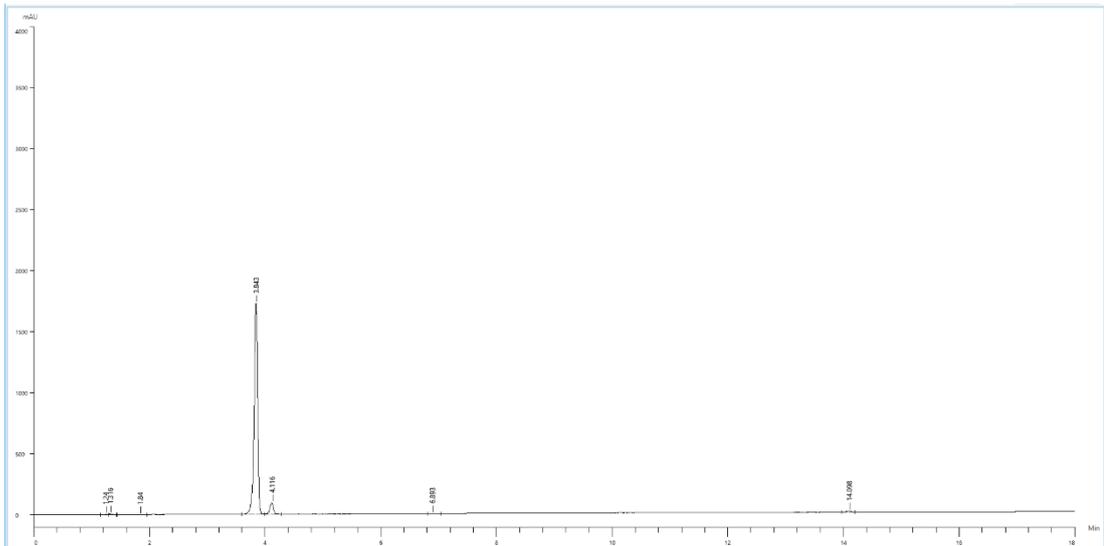


Figura 32: esempio di cromatogramma relativo all'analisi del campione CMP 4 con Acquisition Method AA e Processing Method AA LOW CONC PM.

Il cromatogramma riportato in Figura 32, riferito ad un campione CMP 4, conferma invece l'assenza dell'analita ricercato all'interno di questi campioni.

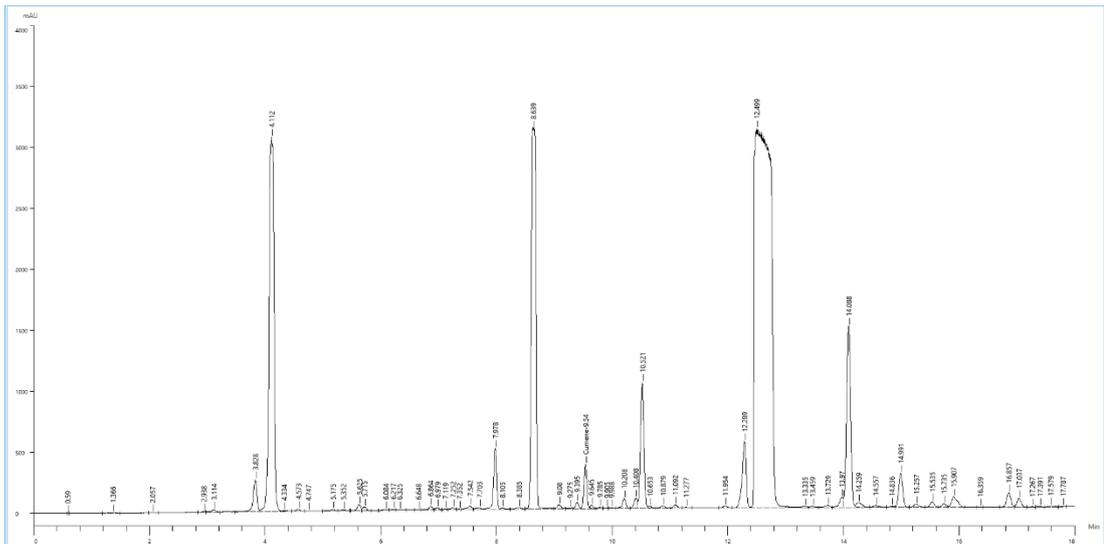


Figura 33: esempio di cromatogramma relativo all'analisi del campione CMP 5 con Acquisition Method AA e Processing Method AA LOW CONC PM.

Infine, quest'ultimo cromatogramma mette in luce la presenza di isopropilbenzene all'interno del campione CMP 5 in esame; come richiesto, la concentrazione rilevata è inferiore al 0,1%.

3.1.2. Analisi HPLC - lavoro con colonna PerkinElmer HyperSelect BDS C18

Dopo la sostituzione della colonna cromatografica (i motivi sono stati spiegati nel *Paragrafo 2.3.1.1.*) e l'aggiunta della pre-colonna, è necessario ristudiare nuovamente l'*Acquisition Method* e il *Processing Method* per le analisi dei campioni della serie A. La colonna in uso è la PerkinElmer HyperSelect BDS C18 e la pre-colonna è la PerkinElmer Browlee Guard Cartridge Holder. Queste due, collegate, sono posizionate nell'alloggiamento riscaldato dal forno interno.

3.1.2.1. Acquisition Method: AB

Il nuovo metodo di acquisizione è stato nominato *AB*, di seguito si riportano i parametri in tabella.

LC300 (U)HPLC PUMP			
Initial Conditions			
Maximum Pressure (psi)	6000		
Minimum Pressure (psi)	0		
Equilibration Time (min)	4,00		
Run Time (min)	15,0		
Pump A	Solvent 1		
Pump B	Solvent 1		
Time Program			
Time (min)	Flow (mL/min)	%A	%B
0,0	1,000	80,0	20,0
6,5	1,000	45,0	55,0
7,0	1,000	25,0	75,0
15,0	1,000	0,0	100,0

Tabella 24: blocco LC300 (U)HPLC Pump - Acquisition Method AB per l'analisi dei campioni della serie A.

Il tempo totale di analisi è di 19 minuti, di cui 4 di condizionamento (*Equilibration Time*) e 15 di corsa vera e propria (*Run Time*). Alla pompa A è collegata l'acqua ultra-pura, mentre alla pompa B l'acetonitrile. Come si osserva dal *Time Program*, l'eluizione è in gradiente: si inizia con una fase mobile all'80% di acqua e si termina con una fase mobile di solo acetonitrile.

Il gradiente dei solventi è stato studiato su misura per il tipo di analisi da condurre considerando anche le caratteristiche della colonna in uso. Sono state svolte diverse prove al fine di individuare il corretto *Time Program* adatto allo scopo.

LC300 (U)HPLC AUTOSAMPLER	
Injection	
Needle Volume (µL)	15
Loop Volume (µL)	100
Syringe Volume (µL)	500
Injection Mode	Partial Loop
Sample Speed	Medium
Needle Level (mm)	6,0
Sample Pre-flush Volume (µL)	20
Enable Headspace Pressure	Disabled
Enable Air Cushion	Enabled
Air Cushion Volume (µL)	5
Temperature Control	
Enable Tray Temperature Control	Disabled
Enable Oven Temperature Control	Enabled
Oven Temperature Setpoint (°C)	40
Oven Temperature Tolernace (±°C)	2,0
Pre-Sequence Flush	
Flush Port	Flush Volume (µL)
Solvent 1	500
Post-Sequence Flush	
Flush Port	Flush Volume (µL)
Solvent 1	500

Tabella 25: blocco LC300 (U)HPLC Autosampler - Acquisition Method AB per l'analisi dei campioni della serie

A.

La colonna separativa utilizzata viene sistemata nell'apposito alloggiamento riscaldato dal forno interno a 40°C, con una possibile variazione di ±2,0°C.

LC300 PDA DETECTOR	
Initial Conditions	
Run Time (min)	15,0
Sampling Rate (Hz)	5
Channel for Live Chromatogram	
Wavelength (nm)	200

Tabella 26: blocco LC300 PDA Detector - Acquisition Method AB per l'analisi dei campioni della serie A.

L'acquisizione del cromatogramma, quindi l'eluizione degli analiti, viene seguita in tempo reale alla lunghezza d'onda di 200 nm.

Avendo la nuova colonna un riempimento più fine, il volume di iniezione deve essere modificato, poiché un volume troppo grande comporterebbe un allargamento dei picchi del cromatogramma. Per questo motivo nella preparazione della sequenza di campioni, l'*Injection volume* è impostato a 5 µL.

3.1.2.2. Processing Method: AB PM

Il metodo di processamento creato è stato denominato *AB PM*. Di seguito si riportano i parametri impostati per la migliore elaborazione dei cromatogrammi.

INTEGRATION PARAMETERS	
PDA-200	
Basic Parameters	
Bunching Factor [Pts]	7
Noise Threshold	1850
Area Threshold	6000

Tabella 27: blocco Integration Parameters - Processing Method AB PM per l'analisi dei campioni della serie A.

COMPOUND TABLE					
Compounds		Channel	Expected RT (min)	Absolute Window (s)	Relative Window (%)
2-fenilpropene	alfa-MS	PDA-200	10,278	12	3
2-fenil-2-propanolo	AC	PDA-200	6,323	12	3
Fenilmetilchetone	ACF	PDA-200	6,549	12	3
(2-Idroperossipropan-2-il)benzene	CHP	PDA-200	7,190	12	3
Isopropilbenzene	Cumene	PDA-200	10,771	12	3
Fenolo	Fenolo	PDA-200	4,879	12	3

Tabella 28: blocco Compound Table - Processing Method AB PM per l'analisi dei campioni della serie A.

I cromatogrammi vengono processati a 200 nm, lunghezza d'onda alla quale tutti gli analiti assorbono adeguatamente. Questo permette di riuscire a distinguere i segnali degli analiti di interesse dal rumore di fondo.

All'interno dei parametri modificabili del *Processing Method* si inserisce, come unità di misura di restituzione del dato, la percentuale.

3.1.2.3. Rette di calibrazione

Gli analiti che si è interessati a identificare e quantificare all'interno dei campioni della serie A, per i quali è obbligatorio costruire le rette di calibrazione, sono: 2-fenilpropene (alfa-MS), 2-fenil-2-propanolo (AC), fenilmetilchetone (ACF), (2-idroperossipropan-2-il)benzene (CHP), isopropilbenzene (cumene) e fenolo. Le soluzioni di standard vengono preparate come descritto nel *Capitolo 2*.

Di seguito vengono riportate le rette di calibrazione ottenute per tutti gli analiti di interesse.

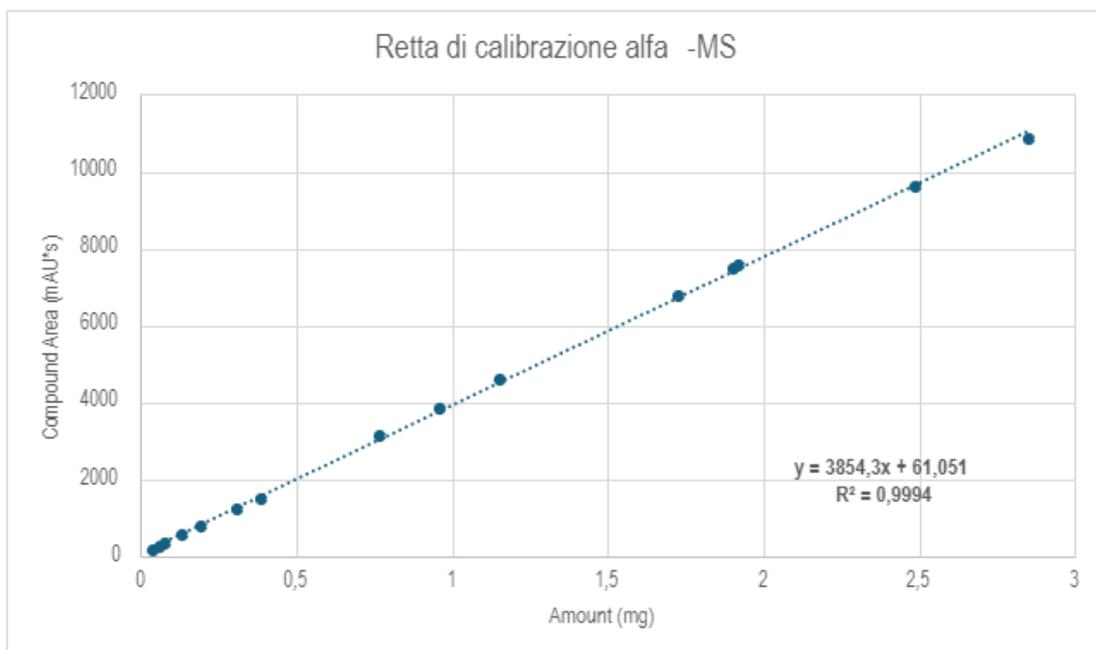


Figura 34: retta di calibrazione costruita per il 2-fenil-propene con Acquisition Method AB e Processing Method AB PM.

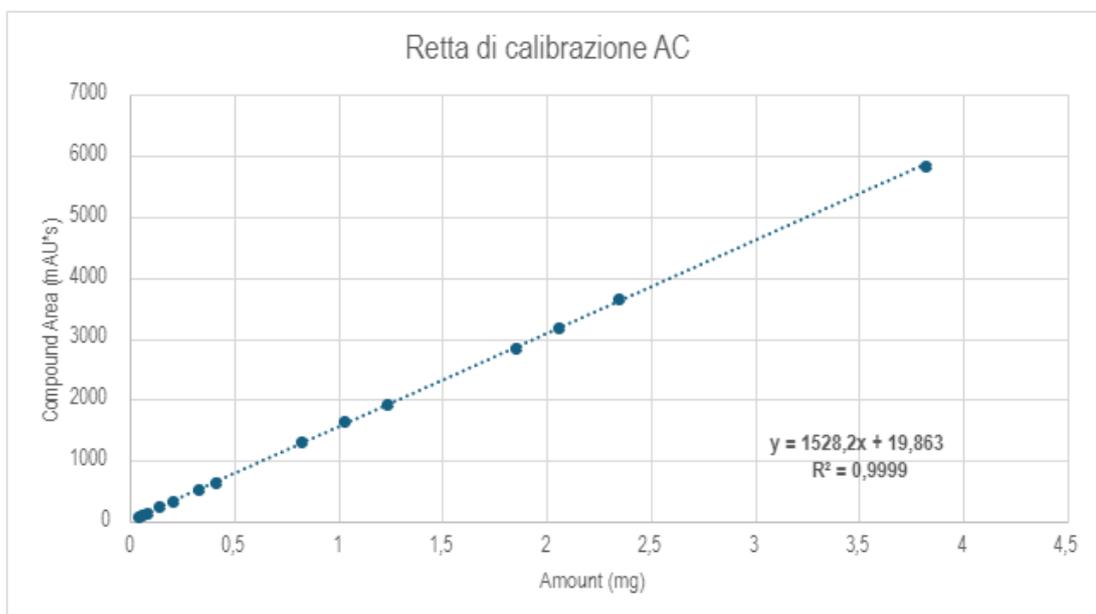


Figura 35: retta di calibrazione costruita per il 2-fenil-propene con Acquisition Method AB e Processing Method AB PM.

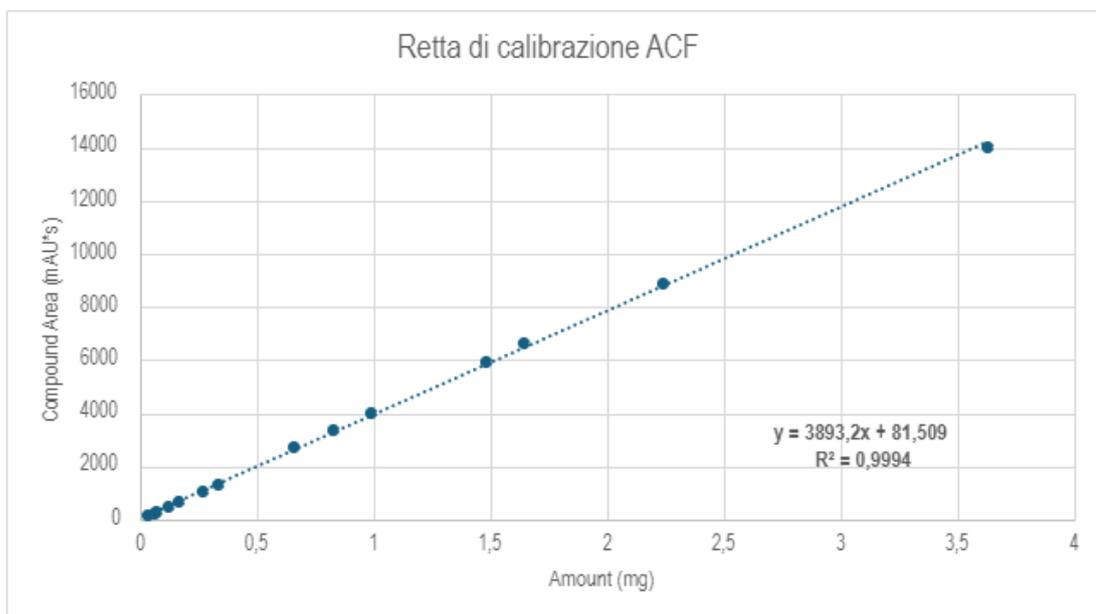


Figura 36: retta di calibrazione costruita per il fenilmetilchetone con Acquisition Method AB e Processing Method AB PM.

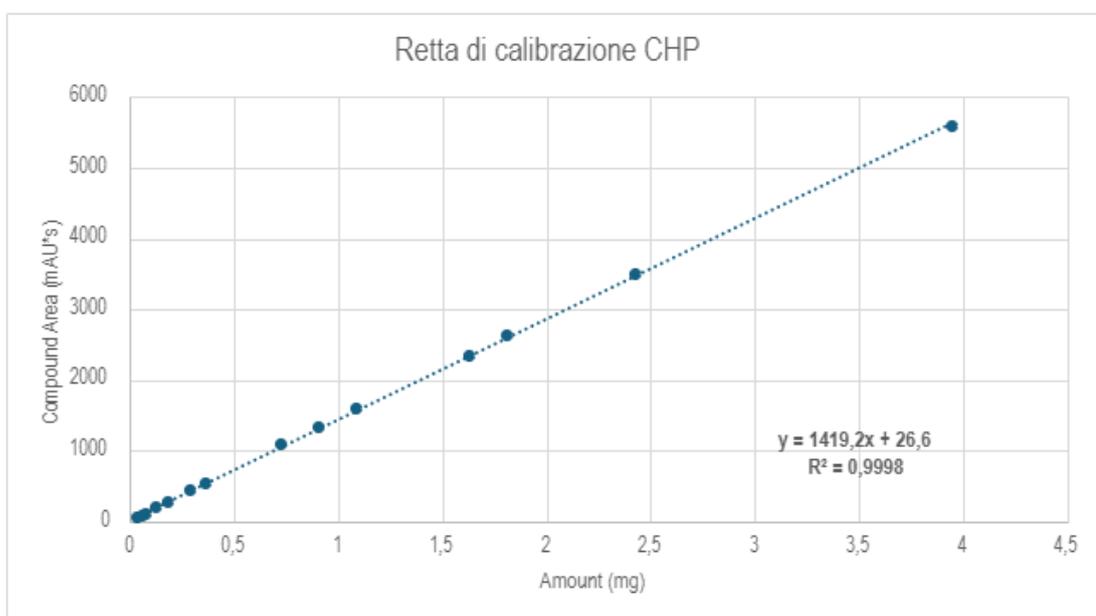


Figura 37: retta di calibrazione costruita per il (2-idroperossipropan-2-il)benzene con Acquisition Method AB e Processing Method AB PM

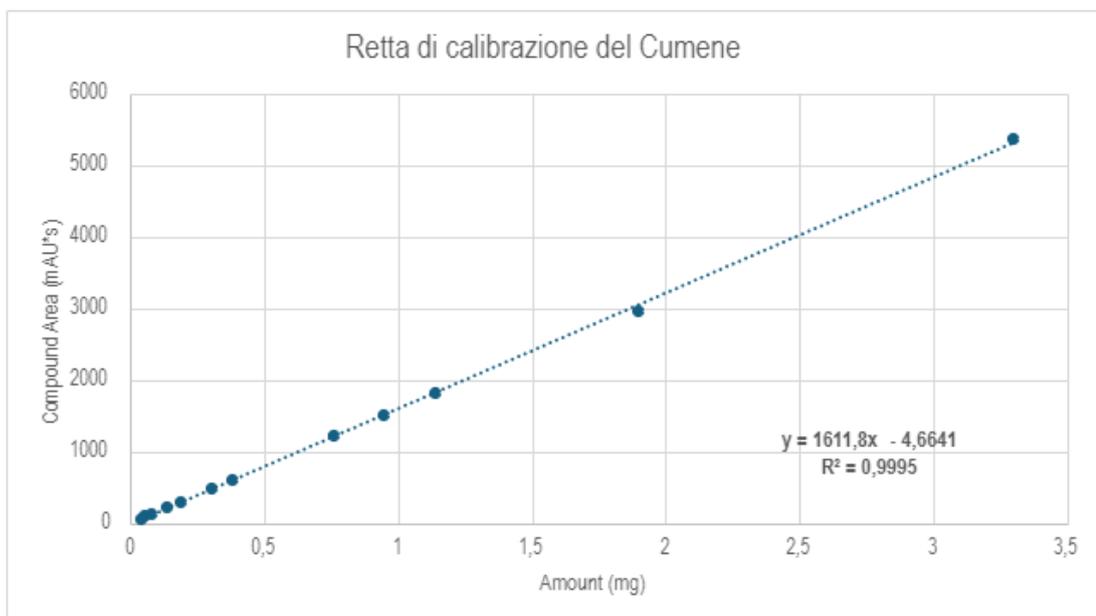


Figura 38: retta di calibrazione costruita per l'isopropilbenzene con Acquisition Method AB e Processing Method AB PM.

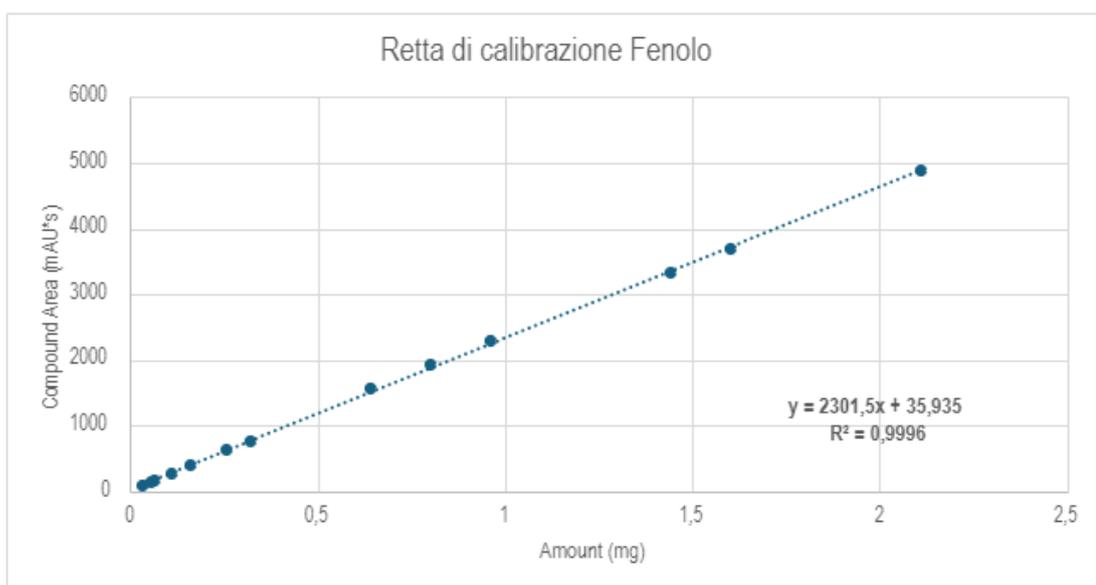


Figura 39: retta di calibrazione costruita per il fenolo con Acquisition Method AB e Processing Method AB PM.

Di seguito si riporta una tabella riassuntiva dei dati rilevanti ottenuti dalla costruzione delle rette di calibrazione.

Analita	R ²	Equazione della retta	Limite inferiore (mg)	Limite superiore (mg)
alfa-MS	0,9994	y=3854x+61,051	0,03841	2,8512
AC	0,9999	y=1528,2x+19,863	0,04116	3,8220
ACF	0,9994	y=3893,2x+81,509	0,03287	3,6293
CHP	0,9998	y=1419,2x+26,6	0,03625	3,9436
Cumene	0,9995	y=1611,8x-4,6641	0,03796	3,2987
Fenolo	0,9996	y=2301x+35,935	0,03200	2,1120

Tabella 29: tabella riassuntiva dei dati rilevanti ottenuti dalla costruzione delle rette di calibrazione con Acquisition Method AB e Processing Method AB PM.

Come si osserva, le rette costruite presentano tutte un $R^2 \geq 0,9994$, quindi un'ottima linearità. Questo assicura una corretta estrapolazione dei dati di concentrazione degli analiti dall'interpolazione dell'intensità del segnale ottenuto con la retta. Inoltre, gli intervalli di concentrazione coperti dalle rette di calibrazione mette in luce la possibilità di rilevare anche quantità molto basse, a conferma della bontà dell'analisi HPLC per l'obiettivo prefissato.

3.1.2.4. Campioni analizzati

I campioni analizzati con l'Acquisition Method e il Processing Method descritti sono: CMP 1, CMP 2, CMP 3, CMP 4 e CMP 5. L'obiettivo dell'applicazione del metodo di analisi sviluppato a questi campioni è quello di verificare la concentrazione degli analiti di interesse sui campionamenti eseguiti durante il processo produttivo. Infatti, è di fondamentale importanza tenere sotto controllo la variazione di concentrazione degli analiti per confermare il corretto avanzamento del processo produttivo nel rispetto delle specifiche di qualità.

CMP 1 e CMP 2

I campioni CMP 1 e CMP 2 presentano la stessa composizione, i limiti di soglia accettabili sono: CHP > 90,0%, AC < 7,0% e cumene < 0,1%, (in cui la concentrazione è espressa come percentuale in peso rispetto alla massa del campione). Come si osserva dai cromatogrammi ottenuti, i picchi relativi al 2-fenil-2-propanolo e al (2-idroperossipropan-2-il)benzene sono ben

identificabili e separati. Inoltre, in tutti i campioni si rileva la presenza di una bassa concentrazione di fenilmetilchetone e in alcuni cromatogrammi risulta presente l'isopropilbenzene in concentrazione molto inferiore a quanto sopra indicato. Talvolta, in alcuni cromatogrammi, si riscontra anche una bassa concentrazione di 2-fenil-propene. Le concentrazioni restituite rientrano negli intervalli coperti dalle rette di calibrazione. Si deduce quindi che i metodi di acquisizione e processamento studiati sono adatti per l'analisi di questi campioni.

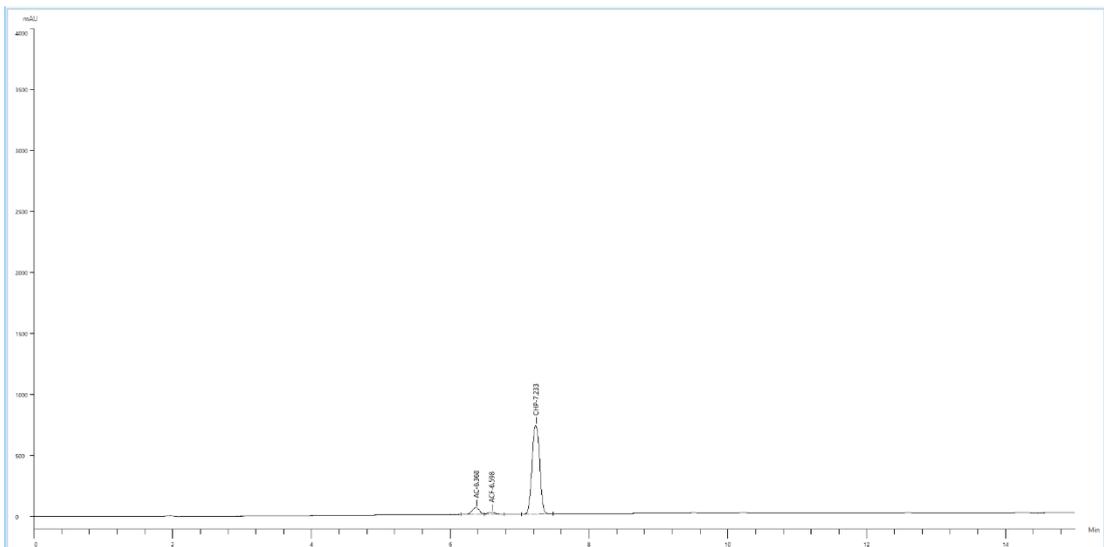


Figura 40: esempio di cromatogramma relativo all'analisi del campione CMP 1 con Acquisition Method AB e Processing Method AB PM.

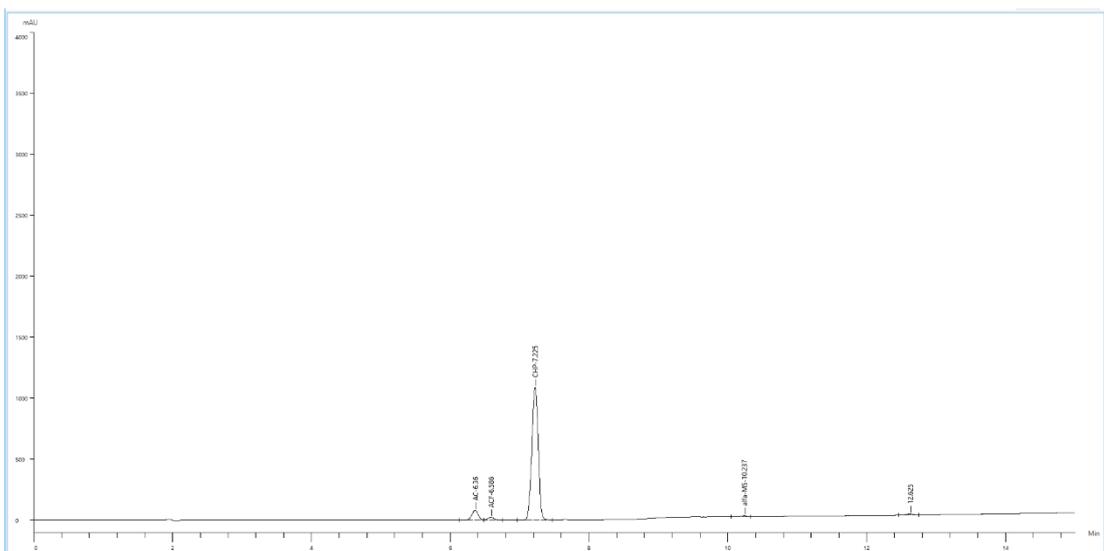


Figura 41: esempio di cromatogramma relativo all'analisi del campione CMP 2 con Acquisition Method AB e Processing Method AB PM.

CMP 3

La composizione di questo campione è: cumene 65,0-72,0%, CHP 23,0-25,0% e AC 3,0-12,0% (in cui la concentrazione è espressa come percentuale in peso rispetto alla massa del campione). Gli analiti rilevati durante le analisi di tutti i campioni disponibili sono 2-fenil-2-propanolo, fenilmetilchetone a basse concentrazioni, isopropilbenzene e (2-idroperossipropan-2-il)benzene. I dati restituiti sono in linea con ciò che ci si aspettava e le concentrazioni risultanti rientrano negli intervalli coperti dalle rette di calibrazione. I metodi di acquisizione e processamento possono essere applicati per l'analisi del CMP 3.

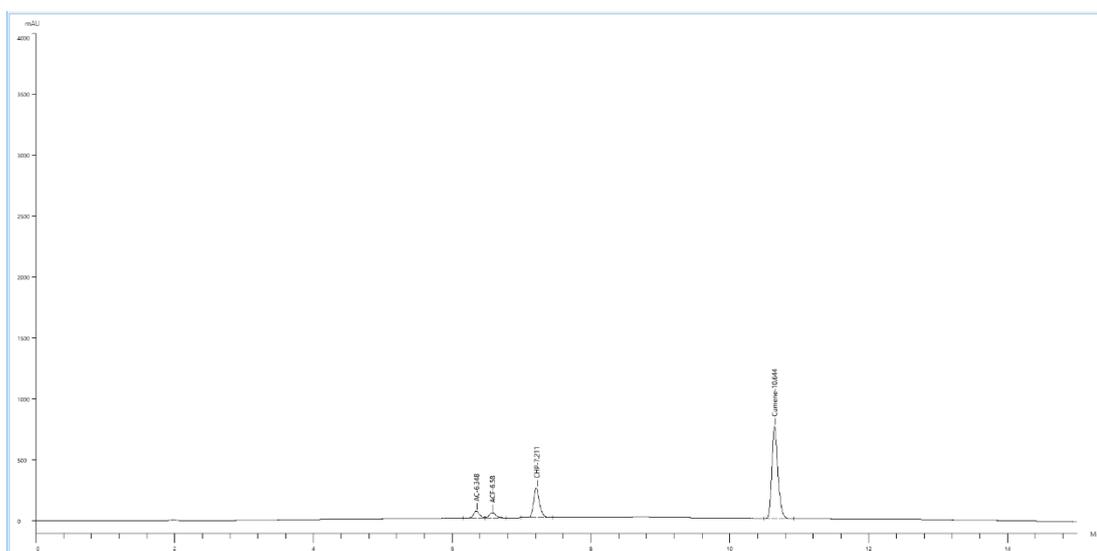


Figura 42: esempio di cromatogramma relativo all'analisi del campione CMP 3 con Acquisition Method AB e Processing Method AB PM.

CMP 4

All'interno di questo campione si trova: AC > 98,0%, CHP < 0,5% e cumene < 0,1% (in cui la concentrazione è espressa come percentuale in peso rispetto alla massa del campione). I metodi studiati risultano ideali per le analisi: in tutti i campioni si identifica il picco del 2-fenil-2-propanolo affiancato dal piccolo picco relativo al fenilmetilchetone, mentre sia l'isopropilbenzene sia il (2-idroperossipropan-2-il)benzene risultano assenti. Da un punto di vista quantitativo, è facile conoscere la concentrazione degli analiti ricercati poiché rientrano negli intervalli coperti dalle rette di calibrazione.

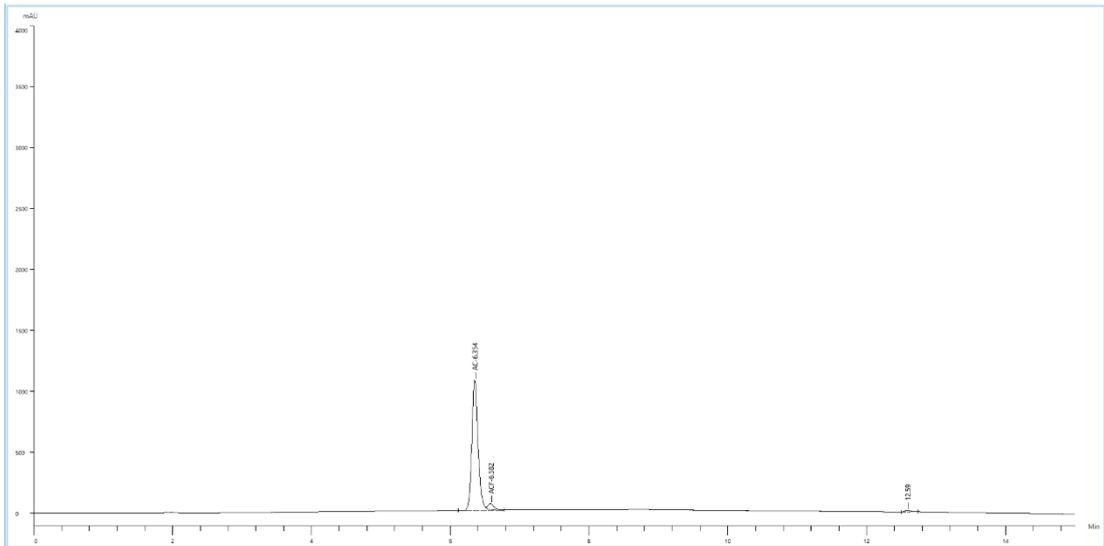


Figura 43: esempio di cromatogramma relativo all'analisi del campione CMP 4 con Acquisition Method AB e Processing Method AB PM.

CMP 5

All'interno dei cromatogrammi acquisiti, sono identificabili i picchi relativi alle impurezze di interesse. Nuovamente il picco relativo al prodotto della reazione satura il segnale e non può essere quantificato. Si può confermare l'applicabilità sia dell'Acquisition Method sia del Processing Method anche su questo campione con l'obiettivo di quantificare le impurezze presenti. Le concentrazioni restituite rientrano negli intervalli coperti dalle rette di calibrazione.

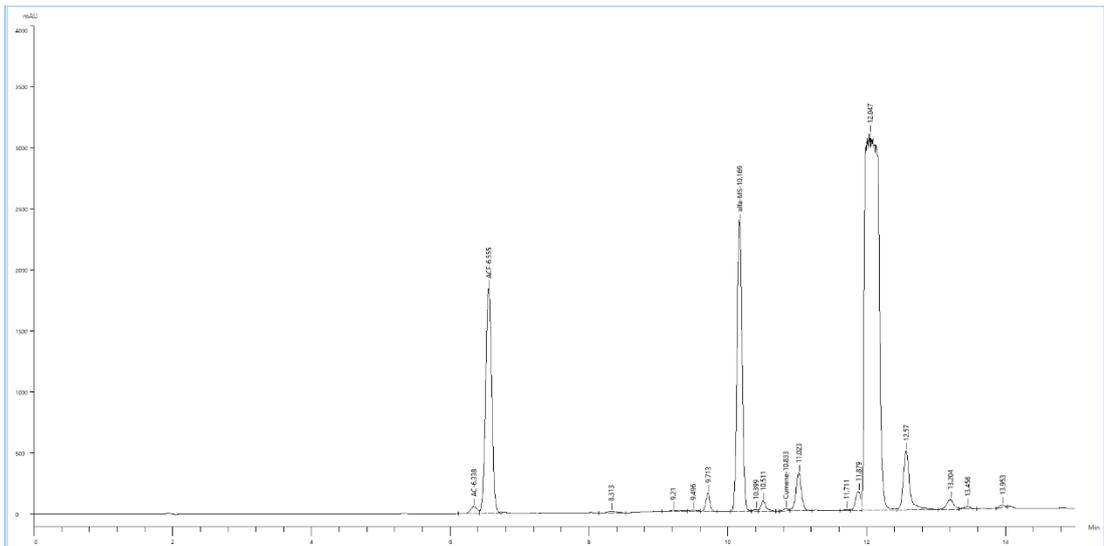


Figura 44: esempio di cromatogramma relativo all'analisi del campione CMP 5 con Acquisition Method AB e Processing Method AB PM.

3.1.2.5. Prova di ottimizzazione del metodo: utilizzo di una fase mobile di acqua e metanolo

Nonostante i cromatogrammi ottenuti dalle analisi con colonna PerkinElmer HyperSelect BDS C18 siano molto chiari e con poco rumore di fondo, quindi facilmente interpretabili, i picchi relativi al 2-fenil-2-propanolo e al fenilmetilchetone sono parzialmente sovrapposti come si vede nell'esempio riportato in *Figura 45*.

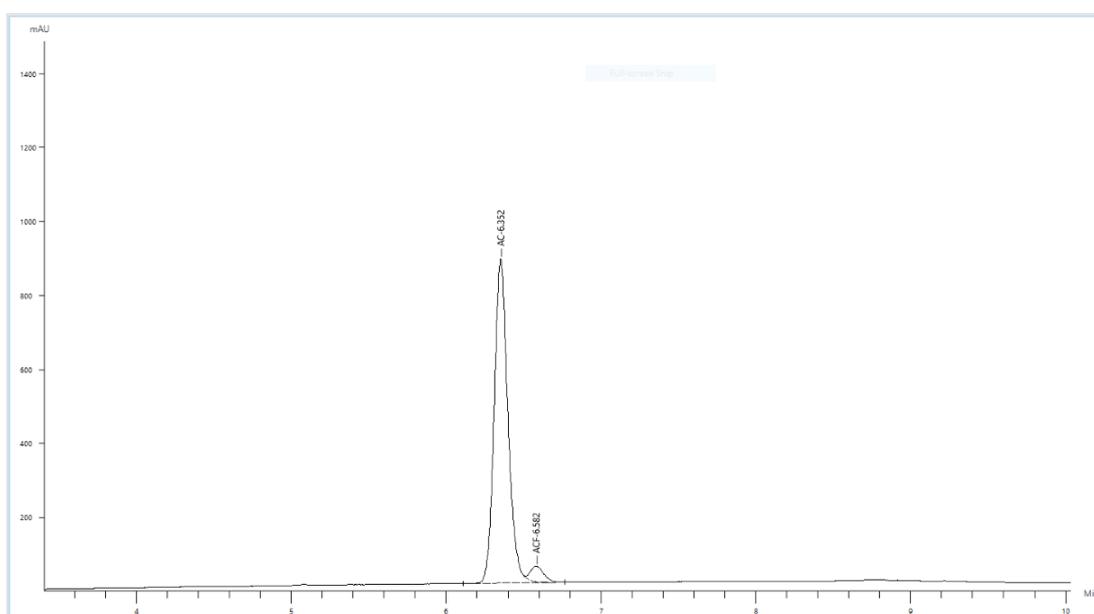


Figura 45: esempio di cromatogramma ingrandito per un campione CMP 4 in cui è stata evidenziata la sovrapposizione tra i picchi di 2-fenil-2-propanolo e fenilmetilchetone.

A tal proposito, si è pensato di provare a modificare i solventi della fase mobile, così da poter separare meglio i picchi e permettere una quantificazione più attendibile. Si sceglie di usare metanolo anziché acetonitrile: il metanolo è un solvente polare e ovviamente solubile in acqua, che, con il suo gruppo funzionale $-OH$, è capace di instaurare interazioni con lo stesso gruppo del 2-fenil-2-propanolo, quindi eluirlo prima e separarlo facilmente dal fenilmetilchetone.

Partendo dallo stesso *Acquisition Method* descritto nel *Paragrafo 3.1.2.1.*, si compiono diverse prove andando a modificare il *Time Program* e il flusso: ogni *Acquisition Method* creato viene subito testato andando ad analizzare una soluzione che contiene tutti gli analiti ricercati all'interno dei campioni della serie A.

Una volta ottenuti i cromatogrammi, viene richiesto di associare un *Processing Method*, in tutti i casi è stato associato il metodo *AB PM*, chiaro è che l'identificazione dei picchi non è

affidabile e non bisogna tenerne conto, la scelta di processare le analisi con questo metodo è utile solo per la scelta dei parametri *Bunching Factor*, *Noise Threshold* e *Area Threshold*.

1° PROVA

Soluzione di tutti gli analiti preparata in acetonitrile.

Injection Volume: 5 μ L

Time (min)	%A (H ₂ O)	%B (MeOH)	Flusso (mL/min)
0,0	80,0	20,0	0,500
7,0	45,0	55,0	0,500
16,5	26,8	73,2	0,500
17,0	0,0	100,0	0,500
18,0	0,0	100,0	0,500

Tabella 30: Time Program studiato per l'Acquisition Method AB con fase mobile di H₂O e MeOH - 1° prova.

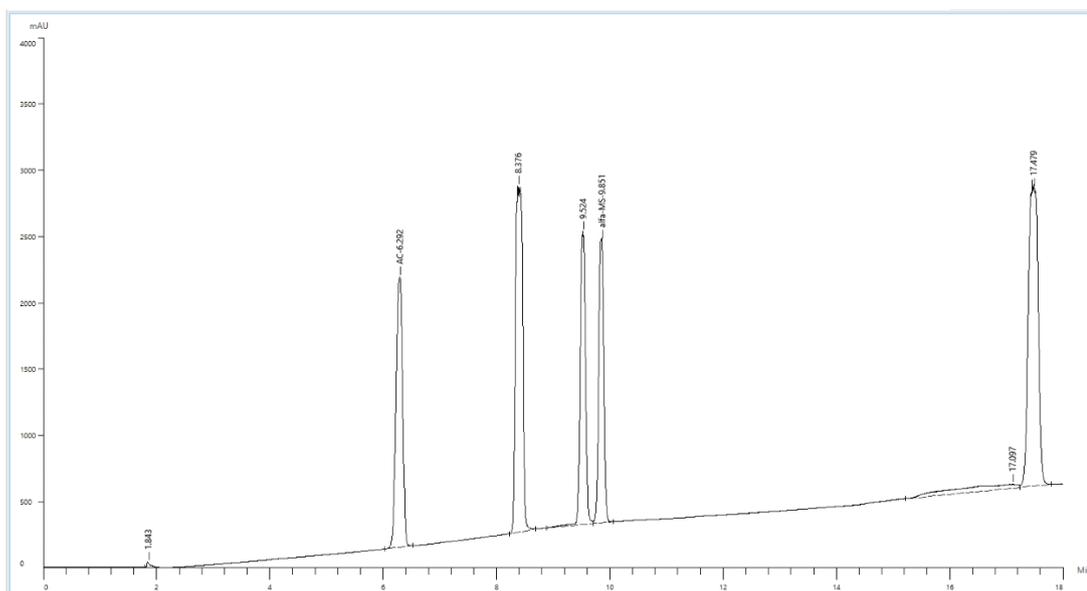


Figura 46: cromatogramma ottenuto per una soluzione di tutti gli analiti - 1° prova di utilizzo di una fase mobile di H₂O e MeOH.

Risultano osservabili solo cinque picchi su sei, l'innalzamento della linea di base è importante e non trascurabile.

2° PROVA: modifica, rispetto alla 1° prova, del solvente di preparazione del campione.

Soluzione di tutti gli analiti preparata in acqua ultra-pura.

Injection Volume: 5 μ L

Time (min)	%A (H ₂ O)	%B (MeOH)	Flusso (mL/min)
0,0	80,0	20,0	0,500
7,0	45,0	55,0	0,500
16,5	26,8	73,2	0,500
17,0	0,0	100,0	0,500
18,0	0,0	100,0	0,500

Tabella 31: Time Program studiato per l'Acquisition Method AB con fase mobile di H₂O e MeOH - 2° prova.

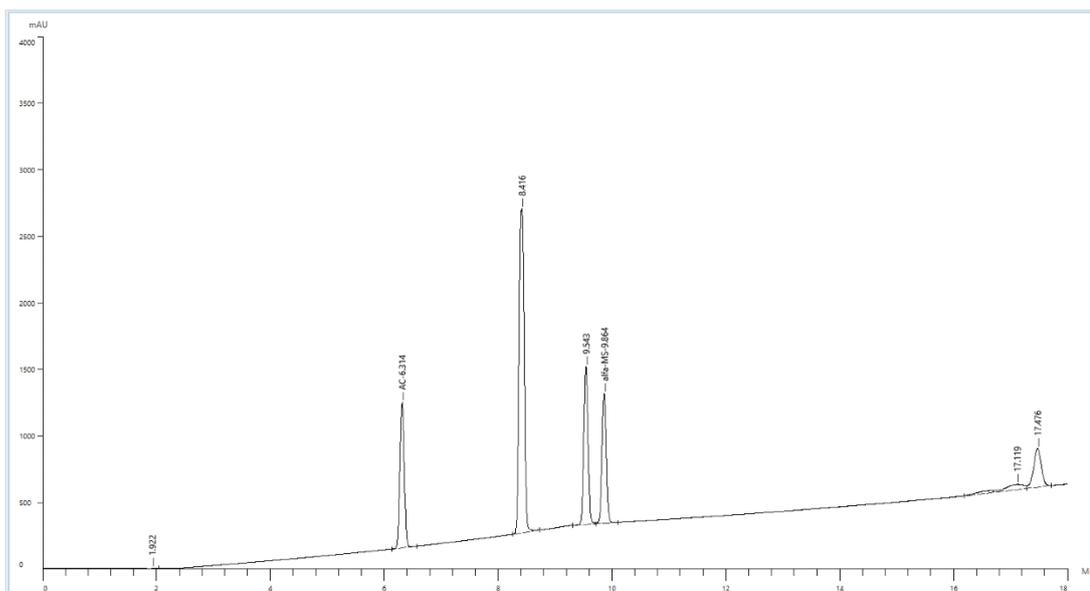


Figura 47: cromatogramma ottenuto per una soluzione di tutti gli analiti - 2° prova di utilizzo di una fase mobile di H₂O e MeOH.

Risultano nuovamente osservabili solo cinque picchi su sei, l'innalzamento della linea di base è importante e non trascurabile.

3° PROVA: modifica, rispetto alla 2° prova, del gradiente di solventi e del flusso.

Soluzione di tutti gli analiti preparata in acqua ultra-pura.

Injection Volume: 5 μ L

Time (min)	%A (H ₂ O)	%B (MeOH)	Flusso (mL/min)
0,0	70,0	30,0	1,000
6,0	50,0	50,0	1,000
12,0	15,0	85,0	1,000
17,0	0,0	100,0	1,000
18,0	0,0	100,0	1,000

Tabella 32: Time Program studiato per l'Acquisition Method AB con fase mobile di H₂O e MeOH - 3° prova.

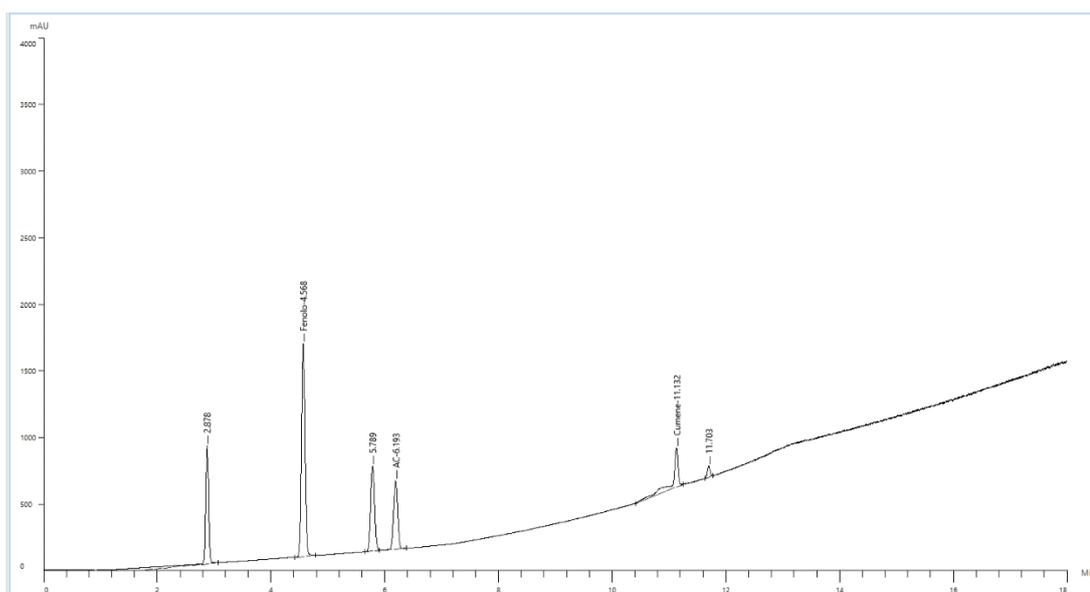


Figura 48: cromatogramma ottenuto per una soluzione di tutti gli analiti - 3° prova di utilizzo di una fase mobile di H₂O e MeOH.

Si osservano sei picchi, ma l'innalzamento di base è notevole e non trascurabile.

4° PROVA: modifica, rispetto alla 1° prova, nel solvente di preparazione del campione.

Soluzione di tutti gli analiti preparata in acqua ultra-pura.

Injection Volume: 5 μ L

Time (min)	%A (H ₂ O)	%B (MeOH)	Flusso (mL/min)
0,0	80,0	20,0	0,500
7,0	45,0	55,0	0,500
16,5	26,8	73,2	0,500
17,0	0,0	100,0	0,500
18,0	0,0	100,0	0,500

Tabella 33: Time Program studiato per l'Acquisition Method AB con fase mobile di H₂O e MeOH - 4° prova.

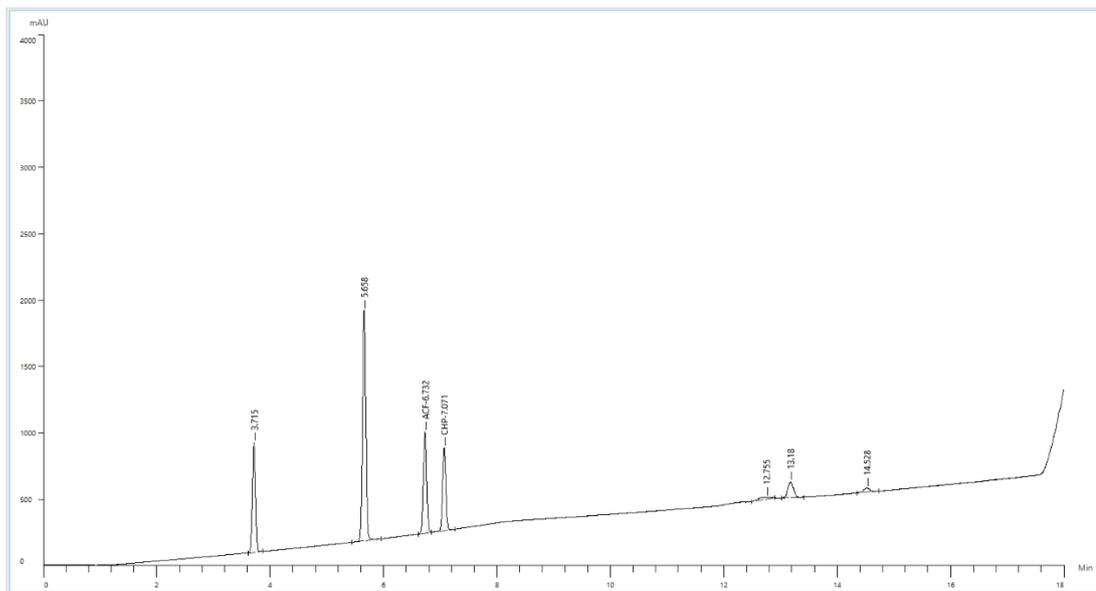


Figura 49: cromatogramma ottenuto per una soluzione di tutti gli analiti - 4° prova di utilizzo di una fase mobile di H₂O e MeOH.

Compaiono sei picchi, ma l'innalzamento della linea di base rimane importante.

5° PROVA: modifica, rispetto alla 4° prova, nel volume di iniezione del campione.

Soluzione di tutti gli analiti preparata in acqua ultra-pura.

Injection Volume: 10 μ L

Time (min)	%A (H ₂ O)	%B (MeOH)	Flusso (mL/min)
0,0	80,0	20,0	0,500
7,0	45,0	55,0	0,500
16,5	26,8	73,2	0,500
17,0	0,0	100,0	0,500
18,0	0,0	100,0	0,500

Tabella 34: Time Program studiato per l'Acquisition Method AB con fase mobile di H₂O e MeOH - 5° prova.

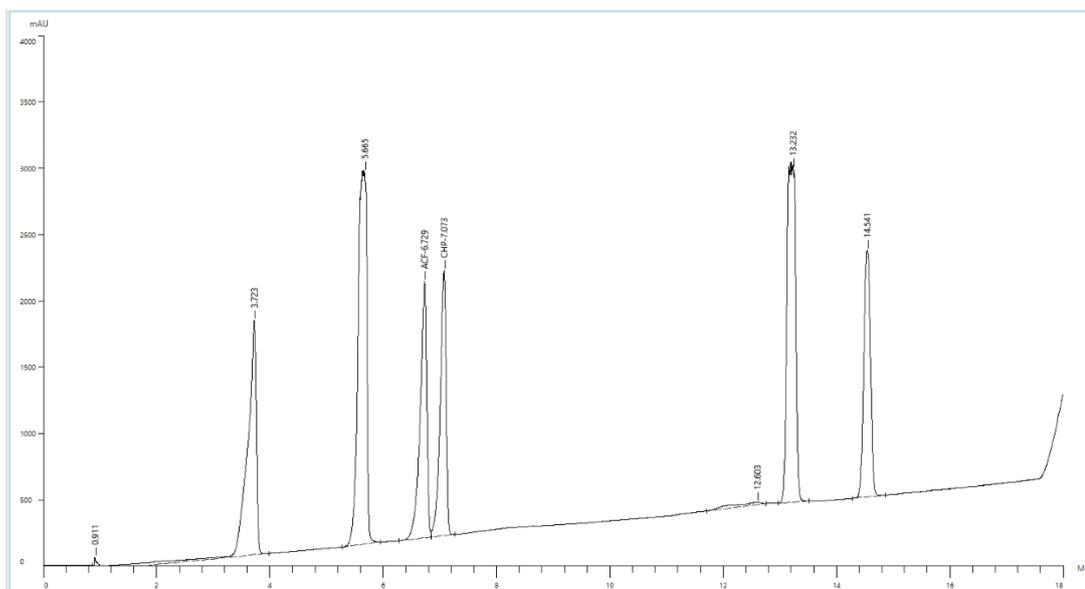


Figura 50: cromatogramma ottenuto per una soluzione di tutti gli analiti - 5° prova di utilizzo di una fase mobile di H₂O e MeOH.

Si osservano sei picchi, uno per ogni analita, il primo picco presenta una forte asimmetria, il terzo e il quarto picco sono molto vicini e leggermente sovrapposti, complice il volume di iniezione che è stato duplicato. L'innalzamento della linea di base rimane sempre notevole e non trascurabile, il metodo è alquanto ottimizzabile.

6° PROVA: modifica, rispetto alla 5° prova, nel flusso.

Soluzione di tutti gli analiti preparata in acetonitrile.

Injection Volume: 5 μ L

Time (min)	%A (H ₂ O)	%B (MeOH)	Flusso (mL/min)
0,0	80,0	20,0	0,800
6,5	45,0	55,0	0,800
7,0	25,0	75,0	0,800
15,0	0,0	100,0	0,800

Tabella 35: Time Program studiato per l'Acquisition Method AB con fase mobile di H₂O e MeOH - 6° prova.

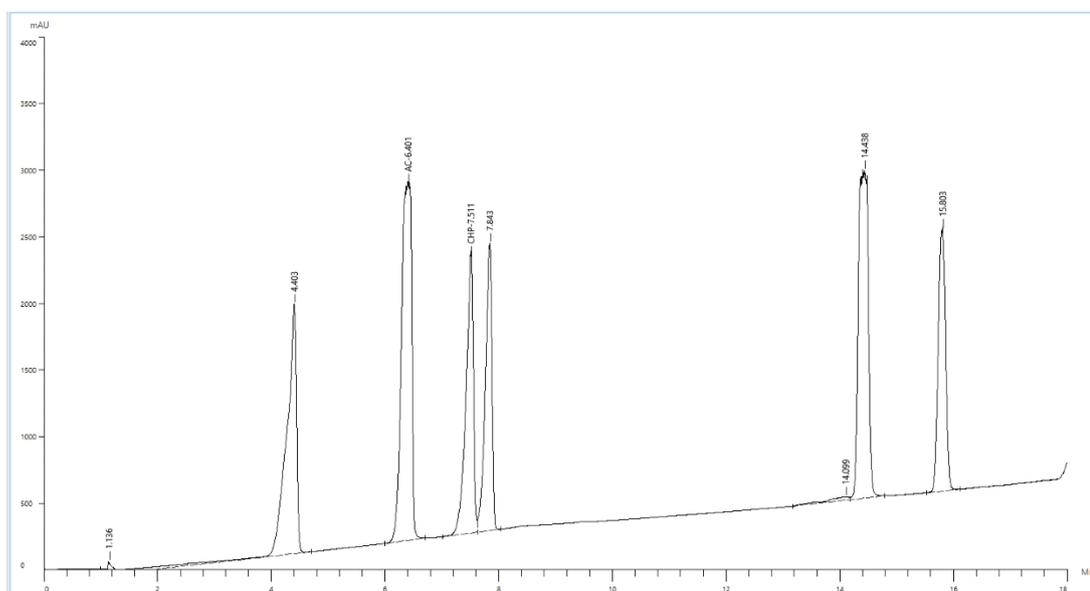


Figura 51: cromatogramma ottenuto per una soluzione di tutti gli analiti - 6° prova di utilizzo di una fase mobile di H₂O e MeOH.

Si osservano sei picchi, come gli analiti, ma la separazione tra il terzo e il quarto picco non migliora rispetto alla 5° prova, così anche l'asimmetria dei picchi e l'innalzamento della linea di base.

7° PROVA: modifica, rispetto alla 6° prova, nel solvente di preparazione del campione.

Soluzione di tutti gli analiti preparata in acqua ultra-pura.

Injection Volume: 5 μ L

Time (min)	%A (H ₂ O)	%B (MeOH)	Flusso (mL/min)
0,0	80,0	20,0	0,800
6,5	45,0	55,0	0,800
7,0	25,0	75,0	0,800
15,0	0,0	100,0	0,800

Tabella 36: Time Program studiato per l'Acquisition Method AB con fase mobile di H₂O e MeOH - 7° prova.

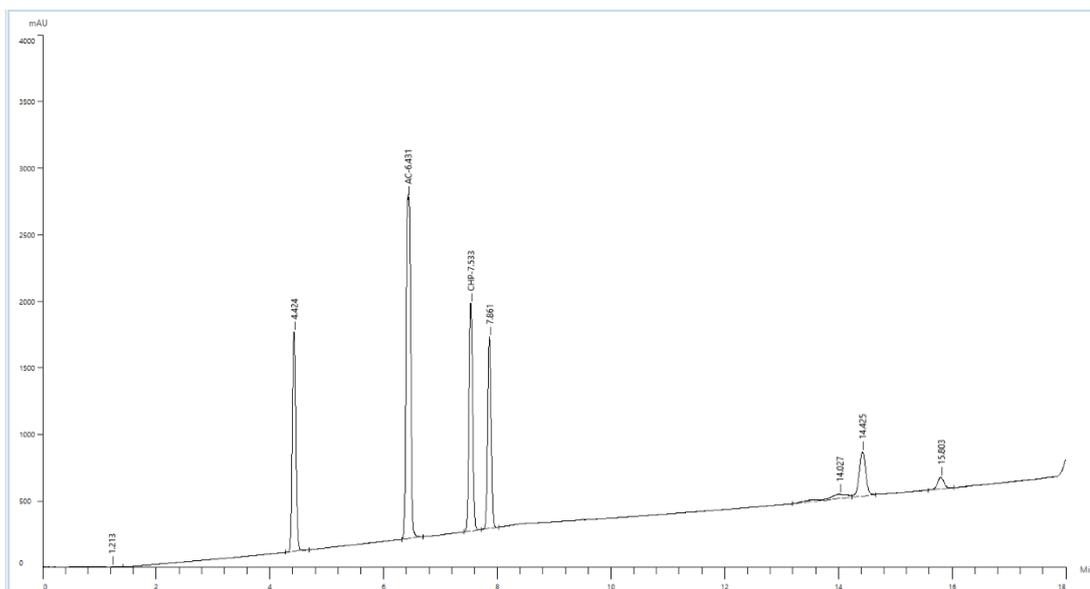


Figura 52: cromatogramma ottenuto per una soluzione di tutti gli analiti - 7° prova di utilizzo di una fase mobile di H₂O e MeOH.

Sei picchi risultano ben separati, sorge un ulteriore picco a circa 14 minuti che si fonde con il successivo, l'innalzamento della linea di base rimane importante e non trascurabile.

8° PROVA:

Soluzione di tutti gli analiti preparata in acetonitrile.

Injection Volume: 5 μ L

Time (min)	%A (H ₂ O)	%B (MeOH)	Flusso (mL/min)
0,0	70,0	30,0	0,900
6,0	50,0	50,0	0,900
7,0	50,0	50,0	0,900
10,0	15,0	85,0	0,900
15,0	0,0	100,0	0,900

Tabella 37: Time Program studiato per l'Acquisition Method AB con fase mobile di H₂O e MeOH - 8° prova.

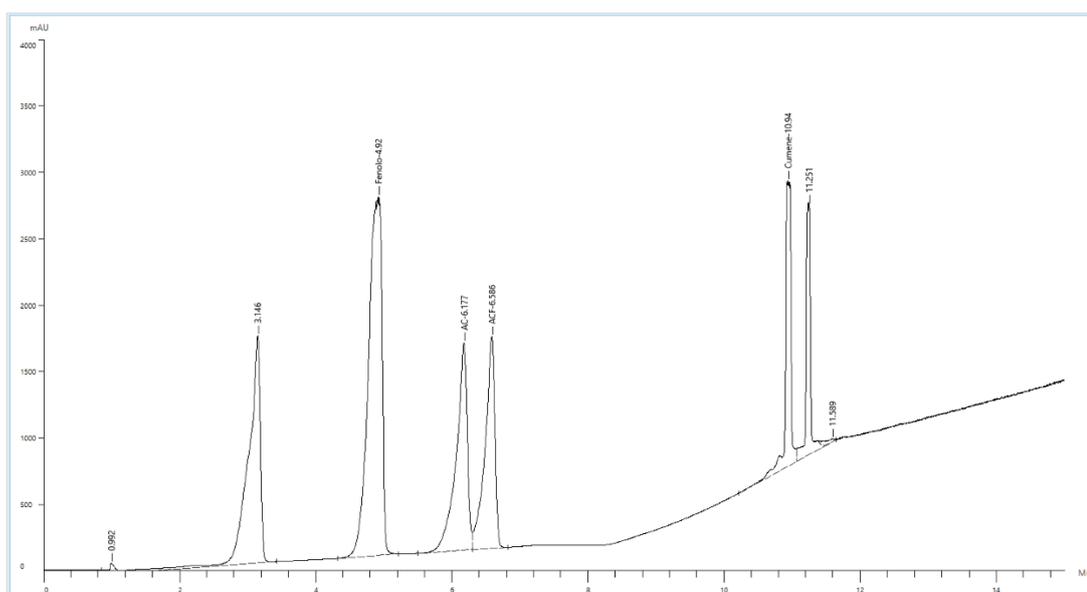


Figura 53: cromatogramma ottenuto per una soluzione di tutti gli analiti - 8° prova di utilizzo di una fase mobile di H₂O e MeOH.

I sei picchi osservabili sono ampiamente scodati, i primi quattro presentano una forte asimmetria in fronting, il terzo e il quarto picco sono sovrapposti; la pessima forma di tutti i picchi e l'eccessivo innalzamento della linea di base rendono questo metodo scartabile.

9° PROVA: utilizzo dello stesso metodo della 8° prova, ma viene cambiato il solvente di preparazione del campione.

Soluzione di tutti gli analiti preparata in acqua ultra-pura.

Injection Volume: 5 µL

Time (min)	%A (H ₂ O)	%B (MeOH)	Flusso (mL/min)
0,0	70,0	30,0	0,900
6,0	50,0	50,0	0,900
7,0	50,0	50,0	0,900
10,0	15,0	85,0	0,900
15,0	0,0	100,0	0,900

Tabella 38: Time Program studiato per l'Acquisition Method AB con fase mobile di H₂O e MeOH - 9° prova.

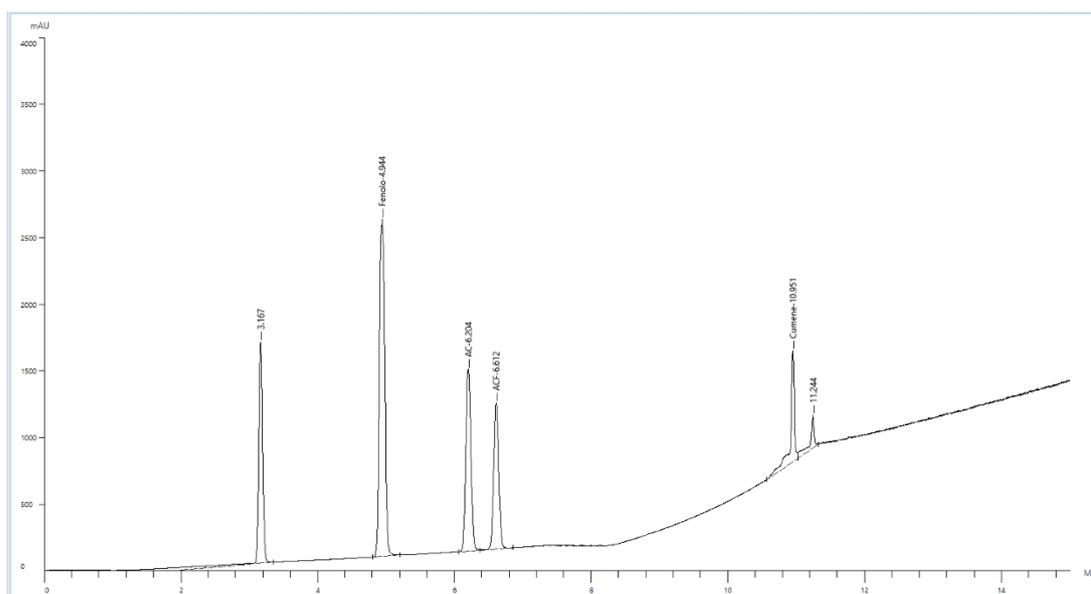


Figura 54: cromatogramma ottenuto per una soluzione di tutti gli analiti - 9° prova di utilizzo di una fase mobile di H₂O e MeOH.

Il grande innalzamento della linea di base non permette di apprezzare il miglioramento della forma dei picchi, il quinto picco sembra inglobare un piccolo picco adiacente.

Dalle prove svolte, si nota che le analisi compiute sulla soluzione di analiti in acqua ultra-pura offrono cromatogrammi migliori, sia dal punto di vista della separazione dei picchi, sia dal

punto di vista della forma dei picchi stessi. Si decide, quindi, di proseguire con altre prove, ma solo sulla soluzione in acqua ultra-pura.

10° PROVA

Soluzione di tutti gli analiti preparata in acqua ultra-pura.

Injection Volume: 5 μ L

Time (min)	%A (H ₂ O)	%B (MeOH)	Flusso (mL/min)
0,0	80,0	20,0	0,800
6,0	45,0	55,0	0,800
10,0	25,0	75,0	0,800
17,0	0,0	100,0	0,800
18,0	0,0	100,0	0,800

Tabella 39: Time Program studiato per l'Acquisition Method AB con fase mobile di H₂O e MeOH - 10° prova.

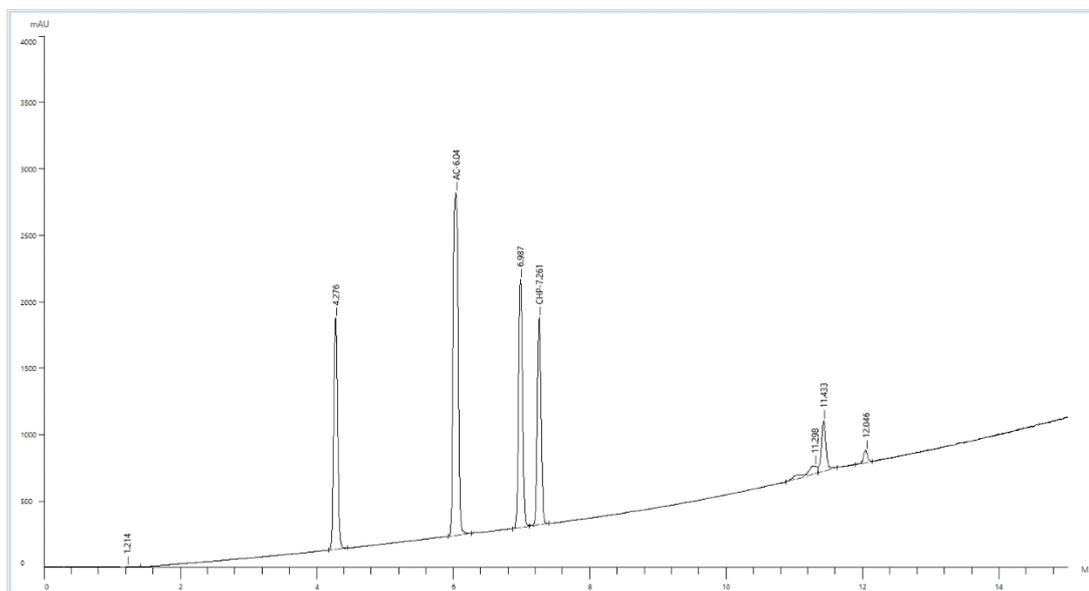


Figura 55: cromatogramma ottenuto per una soluzione di tutti gli analiti - 10° prova di utilizzo di una fase mobile di H₂O e MeOH.

I primi picchi risultano ben separati con un leggero effetto di asimmetria fronting, il problema precedentemente riscontrato sul quinto picco non si è risolto, così come l'innalzamento della linea di base che rimane notevole.

11° PROVA

Soluzione di tutti gli analiti preparata in acqua ultra-pura.

Injection Volume: 5 μ L

Time (min)	%A (H ₂ O)	%B (MeOH)	Flusso (mL/min)
0,0	80,0	20,0	0,900
6,0	45,0	55,0	0,900
10,0	25,0	75,0	0,900
11,0	0,0	100,0	0,900

Tabella 40: Time Program studiato per l'Acquisition Method AB con fase mobile di H₂O e MeOH - 11° prova.

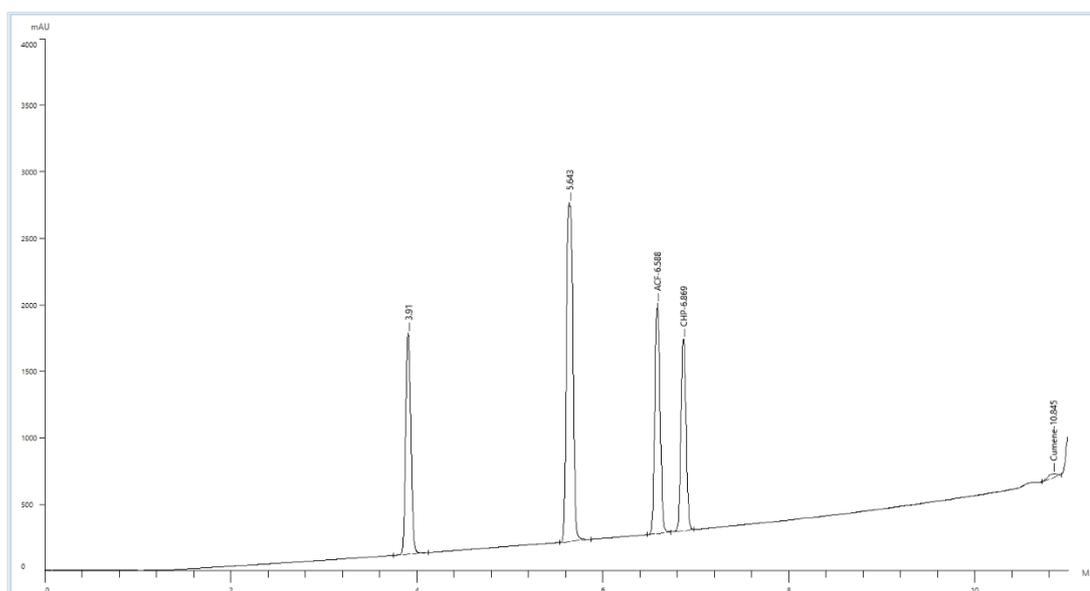


Figura 56: cromatogramma ottenuto per una soluzione di tutti gli analiti - 11° prova di utilizzo di una fase mobile di H₂O e MeOH.

I primi picchi risultano ben separati con un leggero effetto fronting, non si individuano gli ultimi due picchi riconducibili a 2-fenilpropene e isopropilbenzene e l'innalzamento della linea di base è sempre non trascurabile.

12° PROVA

Soluzione di tutti gli analiti preparata in acqua ultra-pura.

Injection Volume: 5 μ L

Time (min)	%A (H ₂ O)	%B (MeOH)	Flusso (mL/min)
0,0	80,0	20,0	0,800
6,0	45,0	55,0	0,800
8,5	25,0	75,0	0,800
10,0	10,0	90,0	0,800
12,0	0,0	100,0	0,800
15,0	0,0	100,0	0,800

Tabella 41: Time Program studiato per l'Acquisition Method AB con fase mobile di H₂O e MeOH - 12° prova.

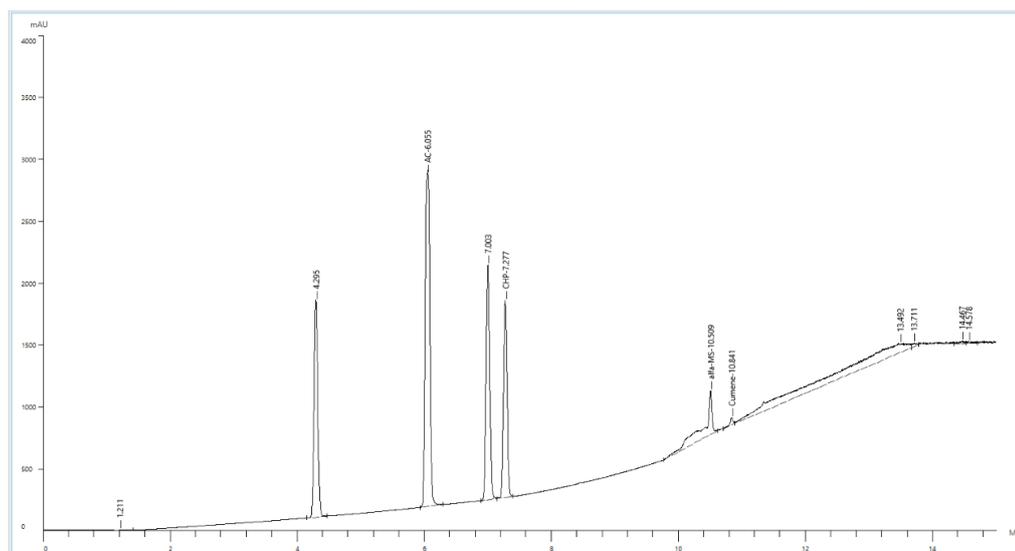


Figura 57: cromatogramma ottenuto per una soluzione di tutti gli analiti - 12° prova di utilizzo di una fase mobile di H₂O e MeOH.

I primi picchi sono ben separati, ma il metodo non permette l'identificazione degli ultimi due, il che rende questo metodo non applicabile; permane il problema sull'innalzamento della linea di base.

13° PROVA

Soluzione di tutti gli analiti preparata in acqua ultra-pura.

Injection Volume: 5 μ L

Time (min)	%A (H ₂ O)	%B (MeOH)	Flusso (mL/min)
0,0	80,0	20,0	0,800
6,0	45,0	55,0	0,800
8,0	25,0	75,0	0,800
8,3	20,0	80,0	0,800
12,5	20,0	80,0	0,800
13,0	0,0	100,0	0,800

Tabella 42: Time Program studiato per l'Acquisition Method AB con fase mobile di H₂O e MeOH - 13° prova.

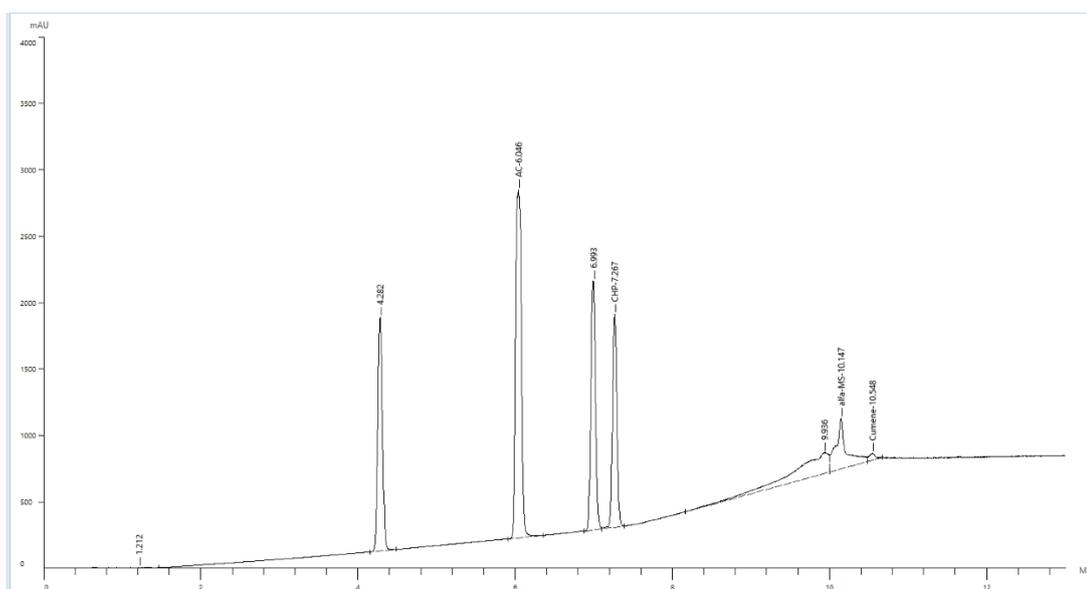


Figura 58: cromatogramma ottenuto per una soluzione di tutti gli analiti - 13° prova di utilizzo di una fase mobile di H₂O e MeOH.

Nuovamente, è stato utilizzato un metodo non applicabile; i problemi sono quelli riscontrati anche nei casi precedenti.

Nonostante l'utilizzo di una fase mobile di acqua e metanolo permetta una buona separazione dei picchi del 2-fenil-2-propanolo e del fenilmetilchetone, questo comporta dei problemi a livello di innalzamento della linea di base, ma soprattutto rende gli ultimi picchi difficili da identificare e una loro quantificazione porterebbe una percentuale di errore molto elevata.

Si deduce che, da questo punto di vista, il metodo di analisi studiato con la fase mobile di acqua e acetonitrile è più affine alle richieste del laboratorio.

3.1.3. Analisi HPLC - lavoro 1 con colonna Phenomenex 00G-4601-E0

Con la colonna Phenomenex 00G-4601-E0, collegata alla pre-colonna PerkinElmer Browlee Guard Cartridge Holder, sono stati sviluppati l'*Acquisition Method AC1* e il *Processing Method AC1* per l'analisi di alcuni campioni della serie A. Questo metodo di acquisizione, a differenza di quello descritto nel *Paragrafo 3.1.4.1.*, presenta un tempo di analisi inferiore, seppur di pochi minuti, questo lo rende migliore dal punto di vista applicativo in un contesto di produzione a ciclo continuo, dove, spesso, la restituzione del dato su un campione influisce sull'avanzamento del processo. Quindi è stata fatta questa distinzione solo per una questione di tempistica di analisi. Il lavoro viene svolto sfruttando il forno esterno del sistema.

3.1.3.1. Acquisition Method: AC1

Si riporta di seguito l'*Acquisition Method* studiato per le analisi HPLC, con colonna Phenomenex 00G-4601-E0, sui campioni della serie A che è stato denominato *AC1*.

LC300 (U)HPLC PUMP			
Initial Conditions			
Maximum Pressure (psi)	10000		
Minimum Pressure (psi)	0		
Equilibration Time (min)	5,00		
Run Time (min)	18,0		
Pump A	Solvent 1		
Pump B	Solvent 1		
Time Program			
Time (min)	Flow (mL/min)	%A	%B
0,0	1,000	70,0	30,0
7,0	1,000	35,0	65,0
16,5	1,000	16,8	83,2
17,0	1,000	0,0	100,0
18,0	1,000	0,0	100,0

Tabella 43: blocco LC300 (U)HPLC Pump - Acquisition Method AC1 per l'analisi dei campioni della serie A.

Il tempo totale di analisi è di 23 minuti, di cui 5 di condizionamento (*Equilibration Time*) e 18 di corsa vera e propria (*Run Time*). Alla pompa A è collegata l'acqua ultra-pura, mentre alla pompa B l'acetonitrile. Come si osserva dal *Time Program*, l'eluizione è in gradiente: si inizia con una fase mobile al 70% di acqua e si termina con una fase mobile di solo acetonitrile. A seguito del cambio di colonna, è risultato necessario studiare nuovamente il corretto *Time Program* per le analisi da svolgere. Attraverso una serie di prove, è stato individuato il corretto gradiente dei solventi adatto per le analisi volute.

LC300 (U)HPLC AUTOSAMPLER	
Injection	
Needle Volume (µL)	15
Loop Volume (µL)	100
Syringe Volume (µL)	500
Injection Mode	Partial Loop
Sample Speed	Medium
Needle Level (mm)	6,0
Sample Pre-flush Volume (µL)	45
Enable Headspace Pressure	Disabled
Enable Air Cushion	Enabled
Air Cushion Volume (µL)	5
Temperature Control	
Enable Tray Temperature Control	Disabled
Enable Oven Temperature Control	Disabled
Pre-Sequence Flush	
Flush Port	Flush Volume (µL)
Solvent 1	500
Post-Sequence Flush	
Flush Port	Flush Volume (µL)
Solvent 1	500

Tabella 44: blocco LC300 (U)HPLC Autosampler - Acquisition Method AC1 per l'analisi dei campioni della serie

A.

LC300 COLUMN OVEN	
Initial Conditions	
Enable Temperature Control	Enabled
Oven Temperature Setpoint (°C)	40
Oven Temperature Tolerance (±°C)	0,8

Tabella 45: blocco LC300 Column Oven - Acquisition Method AC1 per l'analisi dei campioni della serie A.

La temperatura del forno esterno in cui è alloggiata la colonna è impostata a 40°C, con una possibile variazione di ±0,8°C.

LC300 PDA DETECTOR	
Initial Conditions	
Run Time (min)	18,0
Sampling Rate (Hz)	5
Channel for Live Chromatogram	
Wavelength (nm)	200

Tabella 46: blocco LC300 PDA Detector - Acquisition Method AC1 per l'analisi dei campioni della serie A.

L'acquisizione del cromatogramma viene seguita in tempo reale alla lunghezza d'onda di 200 nm.

Date le caratteristiche del riempimento della colonna in uso, nella preparazione della sequenza, l'*Injection volume*, il volume di campione che viene iniettato, è impostato a 10 µL.

3.1.3.2. Processing Method: AC1 PM

Il metodo di processamento creato è stato denominato *AC1 PM*. Di seguito si riportano i parametri impostati per la migliore elaborazione dei cromatogrammi.

INTEGRATION PARAMETERS	
PDA-200	
Basic Parameters	
Bunching Factor [Pts]	8
Noise Threshold	1464
Area Threshold	7322

Tabella 47: blocco Integration Parameters - Processing Method AC1 PM per l'analisi dei campioni della serie A.

COMPOUND TABLE					
Compounds		Channel	Expected RT (min)	Absolute Window (s)	Relative Window (%)
2-fenilpropene	alfa-MS	PDA-200	11,333	12	3
2-fenil-2-propanolo	AC	PDA-200	5,893	12	3
Fenilmetilchetone	ACF	PDA-200	6,244	12	3
(2-Idroperossiopropan-2-il)benzene	CHP	PDA-200	6,704	12	3
Isopropilbenzene	Cumene	PDA-200	12,429	12	3
Fenolo	Fenolo	PDA-200	4,750	12	3
(Perossibis(propan-2,2-diil))dibenzene	DC	PDA-200	17,425	12	3

Tabella 48: blocco Compound Table - Processing Method AC1 PM per l'analisi dei campioni della serie A.

La lunghezza d'onda di processamento di tutti i cromatogrammi è 200 nm. A 200 nm tutti gli analiti presentano un'assorbanza tale da assicurare una corretta individuazione e quantificazione poiché il segnale si distingue bene dal rumore di fondo.

All'interno dei parametri modificabili del *Processing Method*, si inserisce come unità di misura di restituzione del dato, la percentuale.

3.1.3.3. Rette di calibrazione

Di seguito si riportano le rette di calibrazione ottenute dall'interpolazione della concentrazione del campione di standard preparato e l'area del segnale relativo. Gli analiti di cui sono state costruite le rette di taratura sono gli stessi ricercati precedentemente: 2-fenil-2-propanolo, 2-fenilpropene, fenilmetilchetone, (2-idroperossipropan-2-il)benzene, isopropilbenzene, (perossibis(propan-2,2-diil))benzene e fenolo. La preparazione delle soluzioni di standard è stata descritta nel *Capitolo 2*.

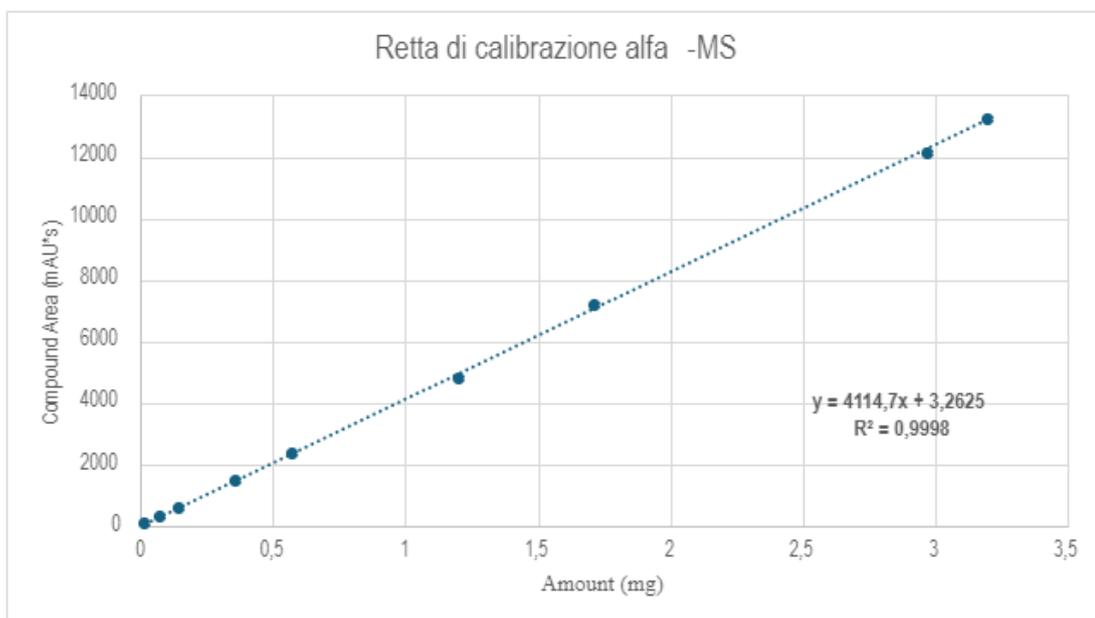


Figura 59: retta di calibrazione costruita per il 2-fenil-propene con Acquisition Method AC1 e Processing Method AC1 PM.

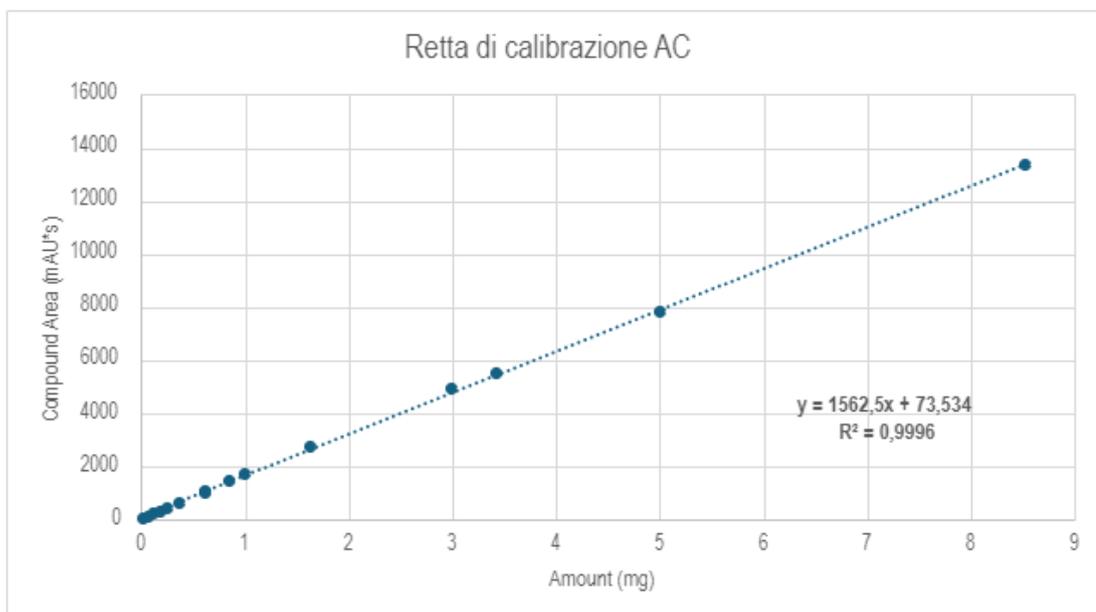


Figura 60: retta di calibrazione costruita per il 2-fenil-propene con Acquisition Method AC1 e Processing Method AC1 PM.

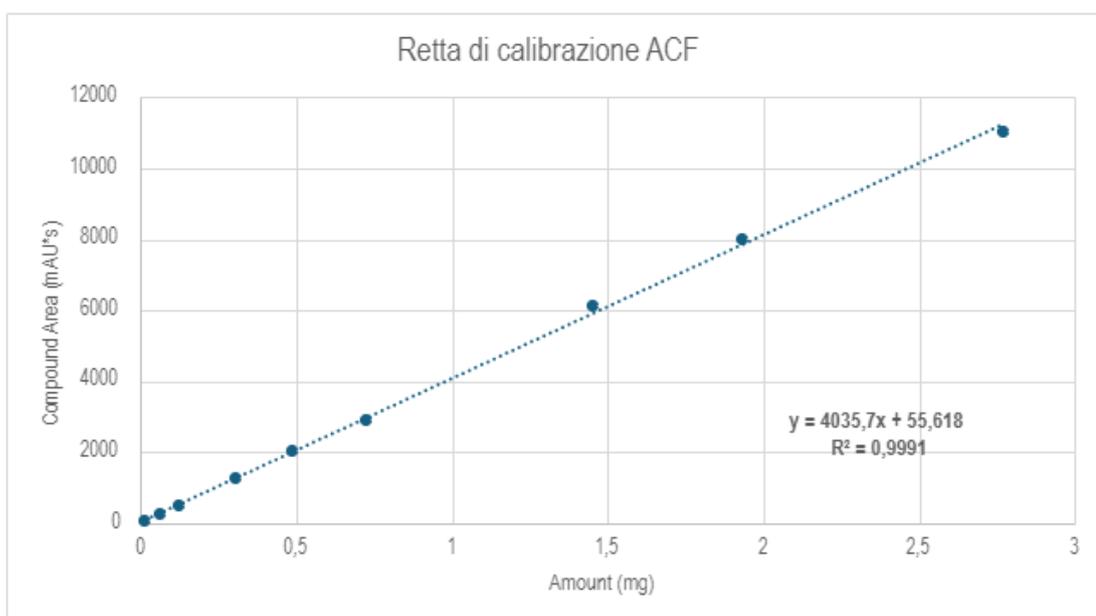


Figura 61: retta di calibrazione costruita per il fenilmetilchetone con Acquisition Method AC1 e Processing Method AC1 PM.

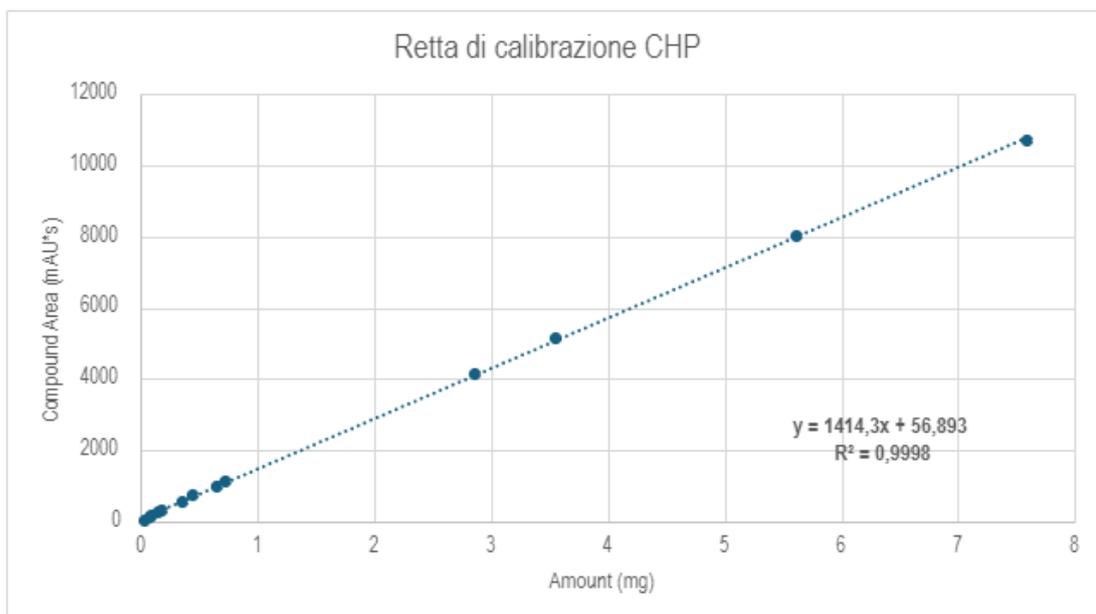


Figura 62: retta di calibrazione costruita per il (2-idroperossipropan-2-il)benzene con Acquisition Method AC1 e Processing Method AC1 PM.

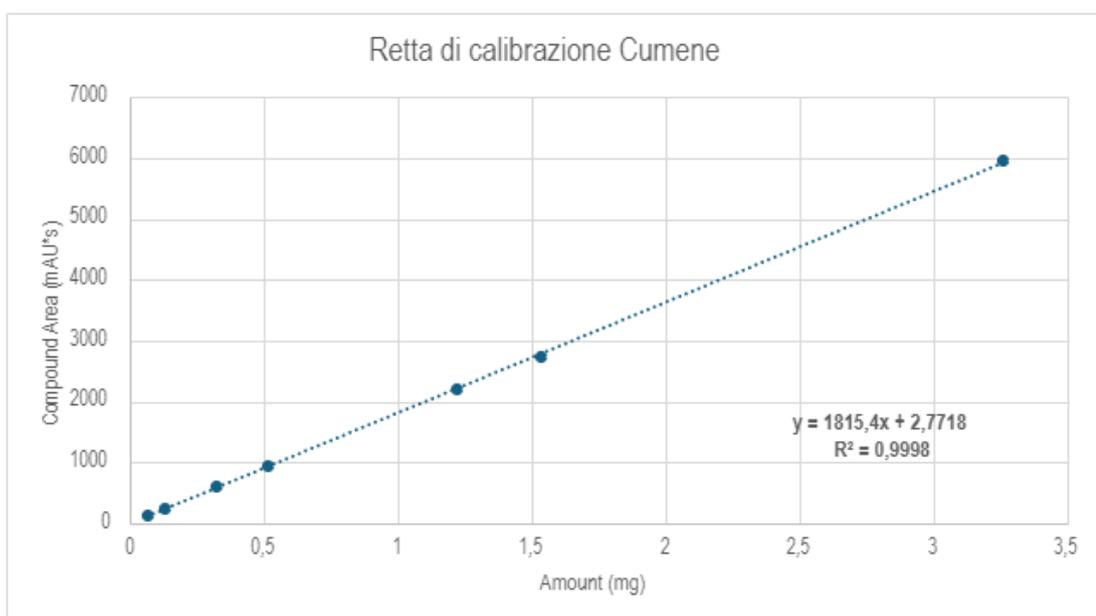


Figura 63: retta di calibrazione costruita per l'isopropilbenzene con Acquisition Method AC1 e Processing Method AC1 PM.

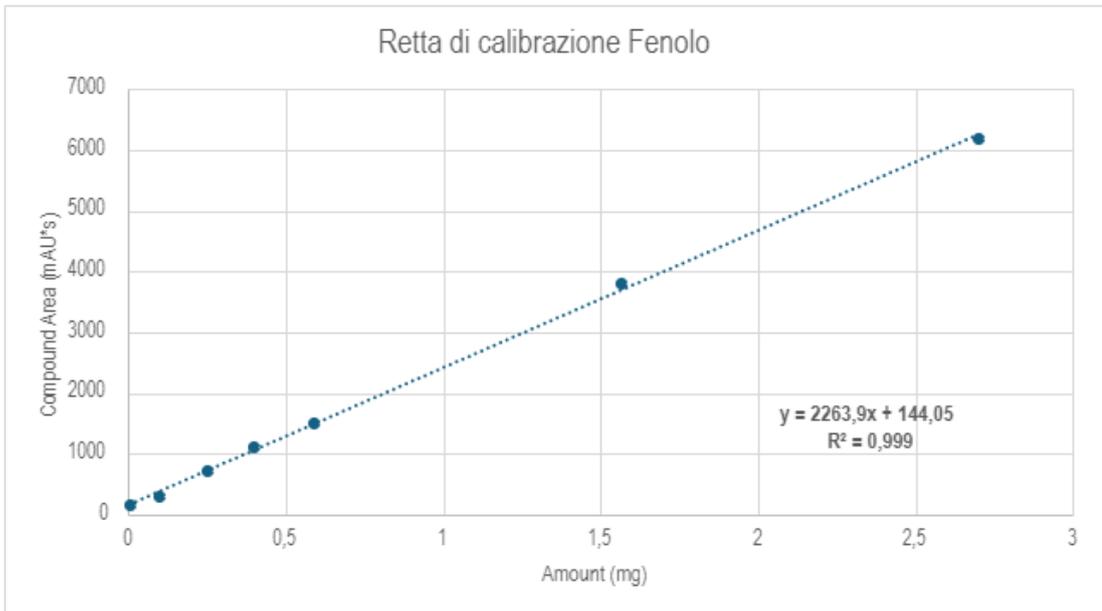


Figura 64: retta di calibrazione costruita per il fenolo con Acquisition Method AC1 e Processing Method AC1 PM.

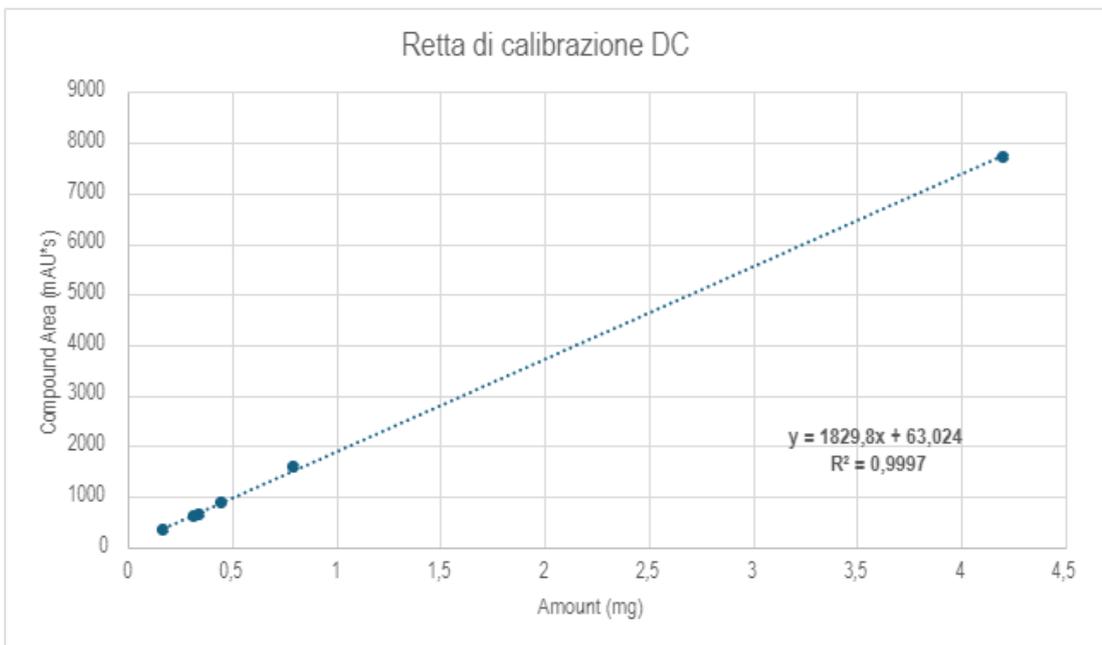


Figura 65: retta di calibrazione costruita per il fenolo con Acquisition Method AC1 e Processing Method AC1 PM.

Di seguito si riporta una tabella riassuntiva dei dati rilevanti ottenuti dalla costruzione delle rette di calibrazione.

Analita	R²	Equazione della retta	Limite inferiore (mg)	Limite superiore (mg)
alfa-MS	0,9998	y=4114,7x+3,2625	0,01426	3,1997
AC	0,9996	y=1562,5x+73,534	0,02489	8,5260
ACF	0,9991	y=4035,7x+55,618	0,01208	2,7720
CHP	0,9998	y=1414,3x+56,893	0,02561	7,5845
Cumene	0,9998	y=1815,4x+2,7718	0,06394	3,2607
Fenolo	0,9990	y=2263,9x+144,05	0,00500	2,7000
DC	0,9997	y=1829,8x+63,024	0,1680	4,1992

Tabella 49: tabella riassuntiva dei dati rilevanti ottenuti dalla costruzione delle rette di calibrazione con Acquisition Method AC1 e Processing Method AC1 PM.

Le rette costruite presentano tutte un $R^2 \geq 0,9990$. L'ottima linearità di tutte le rette di calibrazione costruite, assicura una corretta estrapolazione dei dati di concentrazione degli analiti. Inoltre, gli intervalli di concentrazioni coperti dalle rette di calibrazione mettono in evidenza la possibilità di rilevare anche quantità molto basse, a conferma della bontà dell'analisi HPLC per l'obiettivo prefissato.

3.1.3.4. Campioni analizzati

I campioni analizzati con l'*Acquisition Method* e il *Processing Method* descritti sono: CMP 1, CMP 2, CMP 3, CMP 4 e CMP 5. Lo scopo dell'applicazione del metodo di analisi studiato a questi campioni è quello di verificare la concentrazione degli analiti di interesse sui campionamenti eseguiti durante il processo produttivo. Infatti, è di fondamentale importanza tenere sotto controllo la variazione di concentrazione delle impurezze per confermare il corretto avanzamento del processo.

CMP 1 e CMP 2

Come anticipato nel *Paragrafo 2.2*, i campioni CMP 1 e CMP 2 che raggiungono il laboratorio subiscono un pre-trattamento specifico che permette di separare efficacemente la fase acquosa dalla fase organica. Quest'ultima è quella di interesse e la sua composizione è: CHP > 90,0%, AC < 7,0% e cumene < 0,1% (in cui la concentrazione è espressa come percentuale in peso rispetto alla massa del campione).

Di seguito si riportano due esempi di cromatogrammi acquisiti per le analisi di un campione CMP 1 e un campione CMP 2. Si osservano i picchi relativi al 2-fenil-propanolo, al (2-idroperossipropan-2-il)benzene e al fenilmetilchetone, mentre l'isopropilbenzene risulta assente in tutti i campioni. I picchi identificati sono ben separati, stretti e simmetrici, questo facilita chiaramente la loro quantificazione. Le concentrazioni ottenute rientrano negli intervalli coperti dalle rette di calibrazione. Dal momento che i risultati ottenuti sono in linea con le richieste produttive, i metodi di acquisizione e processamento sono applicabili all'analisi di questi campioni.

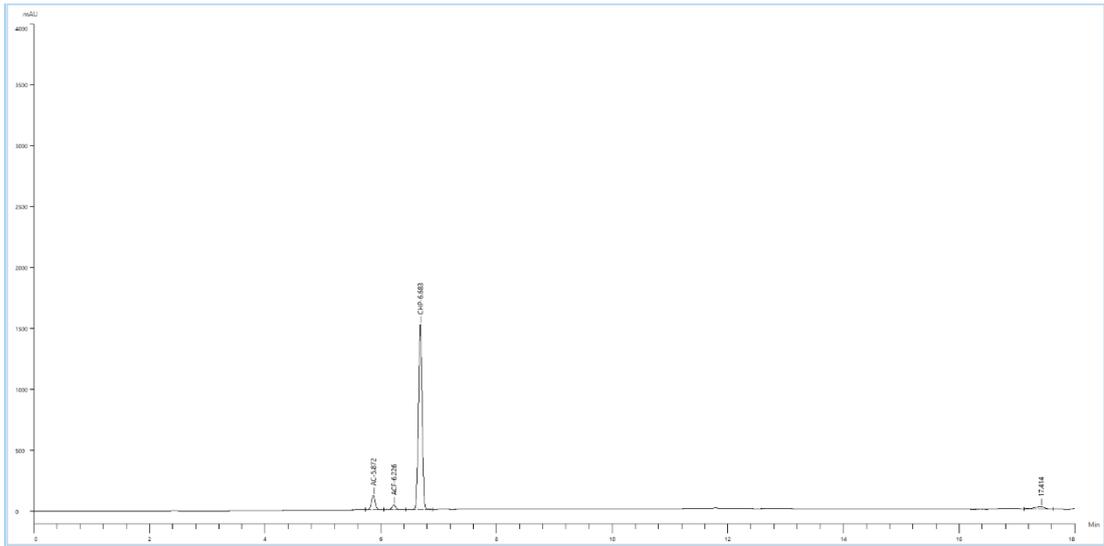


Figura 66: esempio di cromatogramma relativo all'analisi del campione CMP 1 con Acquisition Method AC1 e Processing Method AC1 PM.

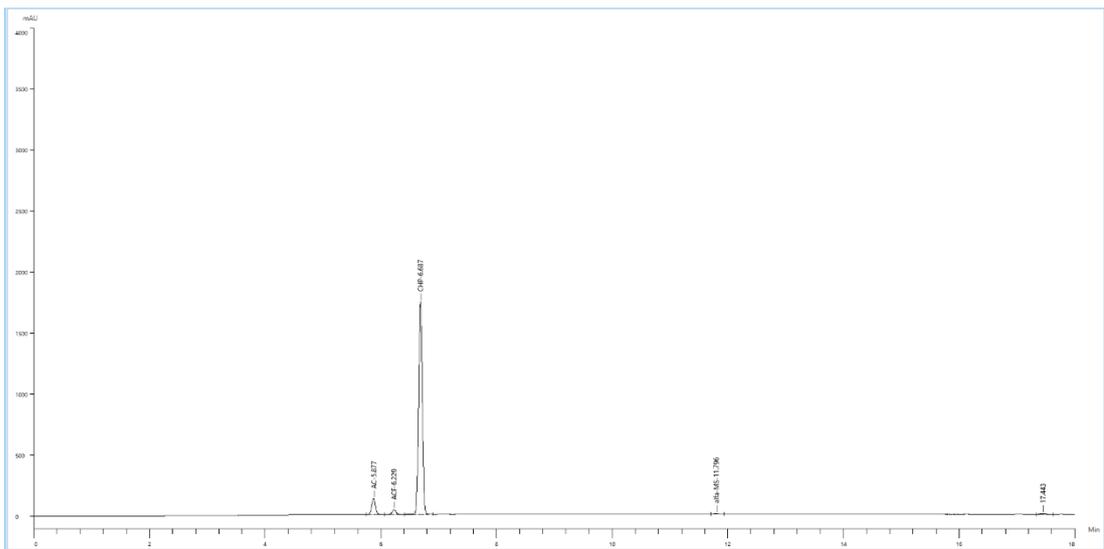


Figura 67: esempio di cromatogramma relativo all'analisi del campione CMP 2 con Acquisition Method AC1 e Processing Method AC1 PM.

CMP 3

All'interno di questo campione sono presenti i seguenti analiti: cumene 65,0-72,0%, CHP 23,0-25,0% e AC 3,00-12,0% (in cui la concentrazione è espressa come percentuale in peso rispetto alla massa del campione). Come si può osservare dalla *Figura 68*, dove viene riportato un esempio di cromatogramma acquisito, i picchi osservabili sono quelli degli analiti che ci si aspetta di trovare all'interno. In aggiunta, viene rilevato in tutti i campioni il picco relativo ad una bassa concentrazione di fenilmetilchetone. In generale i picchi sono ben separati, stretti e

simmetrici e le concentrazioni risultanti, in linea con i limiti di soglia, rientrano negli intervalli coperti dalle rette di calibrazione. L'Acquisition Method e il Processing Method sono ottimali per l'analisi di questo campione.

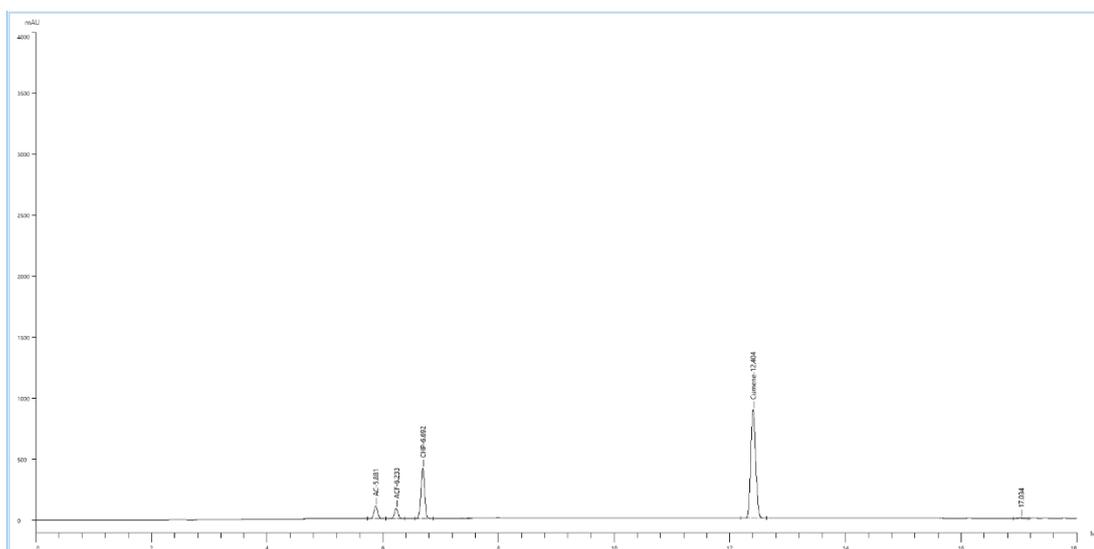


Figura 68: esempio di cromatogramma relativo all'analisi del campione CMP 3 con Acquisition Method AC1 e Processing Method AC1 PM.

CMP 4

Il campione presenta nella fase organica una concentrazione di AC > 98,0%, CHP < 0,5% e il cumene < 0,1%, espressa come percentuale in peso rispetto alla massa del campione. In tutti i campioni analizzati non vengono rilevati né il (2-idroperossipropan-2-il)benzene né l'isopropilbenzene. In tutti i cromatogrammi acquisiti, il picco del 2-fenil-2-propanolo è stretto e simmetrico, ciò assicura una buona stima della quantità, ed è affiancato dal piccolo relativo al fenilmetilchetone. I risultati di concentrazione sono in linea con ciò che si aspettava e rientrano all'interno degli intervalli coperti dalle rette di calibrazione. I metodi, anche in questo caso, risultano ottimali e applicabili. Di seguito si riporta un esempio di cromatogramma acquisito.

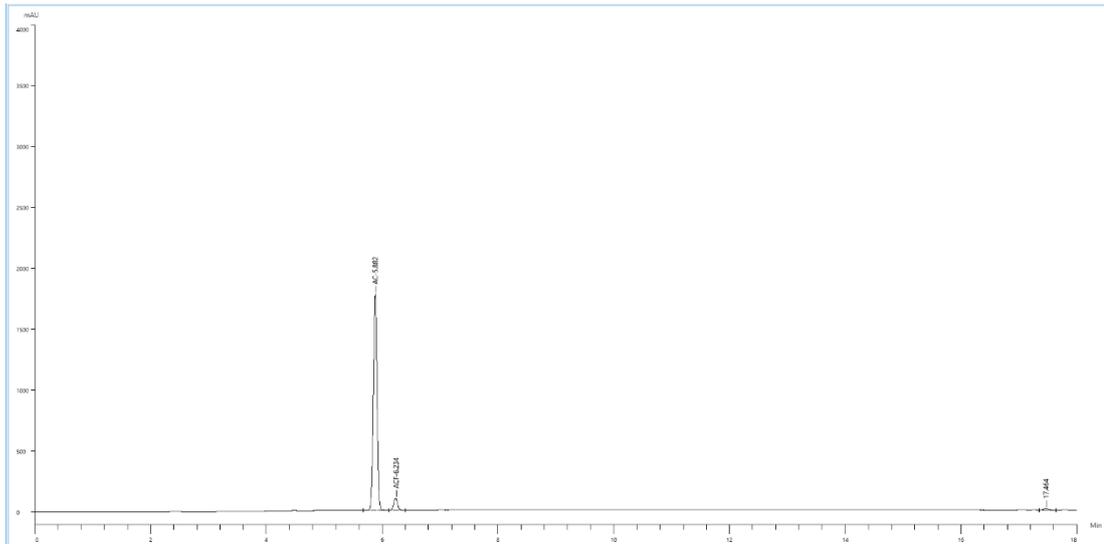


Figura 69: esempio di cromatogramma relativo all'analisi del campione CMP 4 con Acquisition Method AC1 e Processing Method AC1 PM.

CMP 5

I cromatogrammi acquisiti durante le analisi dei campioni CMP 5 sono molto chiari, i picchi non si sovrappongono, non c'è innalzamento della linea di base e le impurezze sono tutte facilmente quantificabili. Il picco relativo al prodotto della reazione satura il segnale e non può essere quantificato dal momento che non sono state costruite le rette di calibrazione. Sia l'Acquisition Method sia il Processing Method studiati sono applicabili per lo studio di questi campioni.

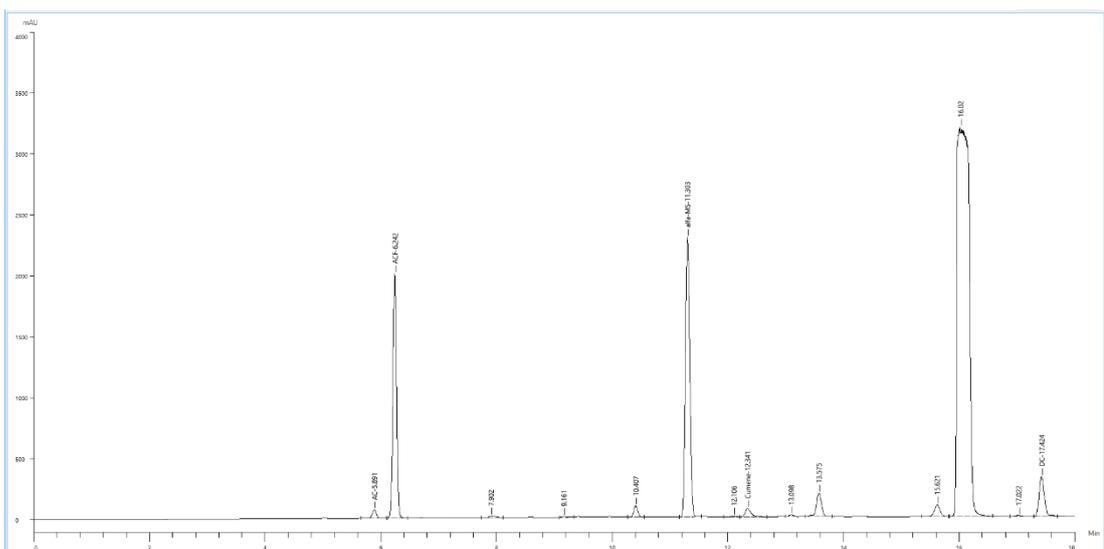


Figura 70: esempio di cromatogramma relativo all'analisi del campione CMP 5 con Acquisition Method AC1 e Processing Method AC1 PM.

3.1.4. Analisi HPLC - lavoro 2 con colonna Phenomenex 00G-4601-E0

Ciò che distingue questo metodo dal precedente è il tempo: in questo caso l'analisi dura qualche minuto in più.

3.1.4.1. Acquisition Method: AC2

Si riportano di seguito i parametri studiati dell'*Acquisition Method* che è stato denominato AC2.

LC300 (U)HPLC PUMP			
Initial Conditions			
Maximum Pressure (psi)	10000		
Minimum Pressure (psi)	0		
Equilibration Time (min)	5,00		
Run Time (min)	22,0		
Pump A	Solvent 1		
Pump B	Solvent 1		
Time Program			
Time (min)	Flow (mL/min)	%A	%B
0,0	1,000	70,0	30,0
7,0	1,000	65,0	35,0
20,0	1,000	10,0	90,0
22,0	1,000	0,0	100,0

Tabella 50: blocco LC300 (U)HPLC Pump - Acquisition Method AC2 per l'analisi dei campioni della serie A.

Il tempo totale di analisi è di 27 minuti, di cui 5 di condizionamento (*Equilibration Time*) e 22 di corsa vera e propria (*Run Time*). Alla pompa A è collegata l'acqua ultra-pura, mentre alla pompa B l'acetonitrile. Come si osserva dal *Time Program*, l'eluizione è in gradiente: si inizia con una fase mobile al 70% di acqua e si termina con una fase mobile di solo acetonitrile.

LC300 (U)HPLC AUTOSAMPLER	
Injection	
Needle Volume (µL)	15
Loop Volume (µL)	100
Syringe Volume (µL)	500
Injection Mode	Partial Loop
Sample Speed	Medium
Needle Level (mm)	6,0
Sample Pre-flush Volume (µL)	45
Enable Headspace Pressure	Disabled
Enable Air Cushion	Enabled
Air Cushion Volume (µL)	5
Temperature Control	
Enable Tray Temperature Control	Disabled
Enable Oven Temperature Control	Disabled
Pre-Sequence Flush	
Flush Port	Flush Volume (µL)
Solvent 1	500
Post-Sequence Flush	
Flush Port	Flush Volume (µL)
Solvent 1	500

Tabella 51: blocco LC300 (U)HPLC Autosampler - Acquisition Method AC2 per l'analisi dei campioni della serie

A.

LC300 COLUMN OVEN	
Initial Conditions	
Enable Temperature Control	Enabled
Oven Temperature Setpoint (°C)	40
Oven Temperature Tolerance (±°C)	0,8

Tabella 52: blocco LC300 Column Oven - Acquisition Method AC2 per l'analisi dei campioni della serie A.

La temperatura del forno esterno in cui è alloggiata la colonna è impostata a 40°C, con una possibile variazione di ±0,8°C.

LC300 PDA DETECTOR	
Initial Conditions	
Run Time (min)	22,0
Sampling Rate (Hz)	5
Channel for Live Chromatogram	
Wavelength (nm)	200

Tabella 53: blocco LC300 PDA Detector - Acquisition Method AC2 per l'analisi dei campioni della serie A.

L'acquisizione del cromatogramma viene seguita in tempo reale alla lunghezza d'onda di 200 nm.

Durante la preparazione della sequenza dei campioni da analizzare, l'*Injection volume* impostato è di 10 µL.

3.1.4.2. Processing Method: AC2 PM

Il metodo di processamento creato è stato denominato *AC2 PM*. Di seguito si riportano i parametri impostati per la corretta elaborazione dei cromatogrammi.

INTEGRATION PARAMETERS	
PDA-200	
Basic Parameters	
Bunching Factor [Pts]	4
Noise Threshold	850
Area Threshold	5000

Tabella 54: blocco Integration Parameters - Processing Method AC2 PM per l'analisi dei campioni della serie A.

COMPOUND TABLE					
Compounds		Channel	Expected RT (min)	Absolute Window (s)	Relative Window (%)
2-fenilpropene	alfa-MS	PDA-200	17,551	12	3
2-fenil-2-propanolo	AC	PDA-200	7,954	12	3
Fenilmetilchetone	ACF	PDA-200	8,592	12	3
(2-Idroperossipropan-2-il)benzene	CHP	PDA-200	10,311	12	3
Isopropilbenzene	Cumene	PDA-200	18,560	12	3
Fenolo	Fenolo	PDA-200	5,384	12	3
(Perossibis(propan-2,2-diil))dibenzene	DC	PDA-200	21,823	12	3

Tabella 55: blocco Compound Table - Processing Method AC2 PM per l'analisi dei campioni della serie A.

Il canale di processamento è unico per tutti gli analiti: i cromatogrammi vengono acquisiti a 200 nm. A questa lunghezza d'onda tutti gli analiti assorbono adeguatamente, così che i picchi risaltino abbastanza dal segnale di fondo.

All'interno dei parametri modificabili del *Processing Method*, si inserisce come unità di misura di restituzione del dato, la percentuale.

3.1.4.3. Rette di calibrazione

Di seguito si riportano le rette di calibrazione ottenute dall'interpolazione della concentrazione del campione di standard preparato e l'area del segnale relativo. Gli analiti di cui sono state costruite le rette di taratura sono gli stessi ricercati precedentemente: 2-fenil-2-propanolo, 2-fenilpropene, fenilmetilchetone, (2-idroperossipropan-2-il)benzene, isopropilbenzene, (perossibis(propan-2,2-diil))benzene e fenolo. Le soluzioni di standard vengono preparate pesando l'analita all'interno di un matraccio tarato da 25 mL e portando a volume con acetonitrile, come descritto nel *Paragrafo 2.2.*

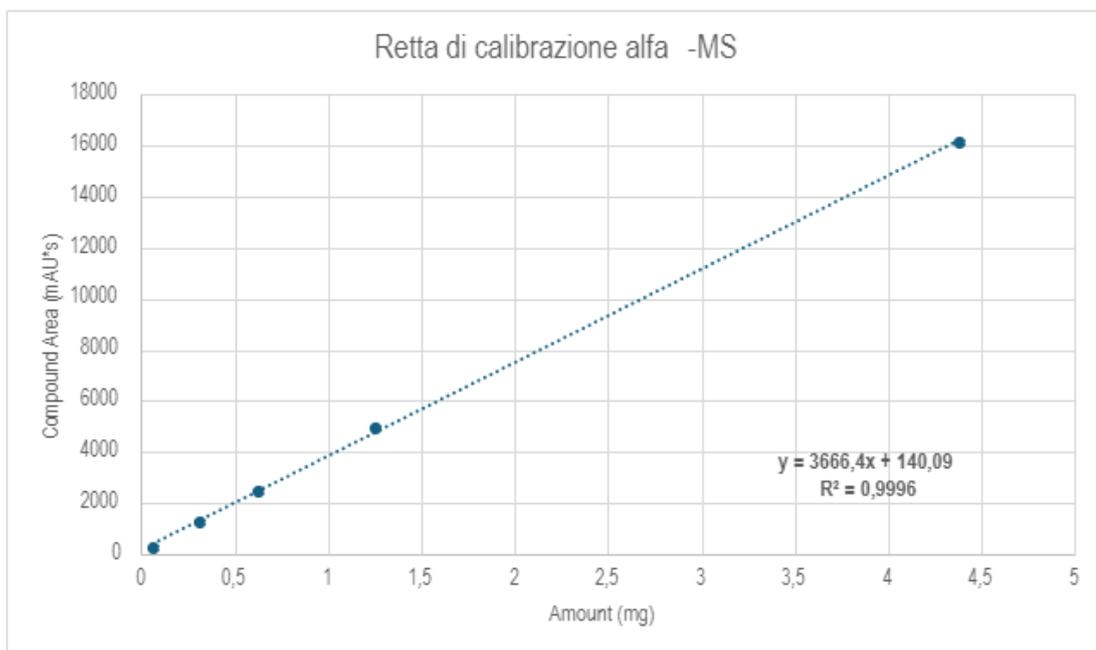


Figura 71: retta di calibrazione costruita per il 2-fenil-propene con Acquisition Method AC2 e Processing Method AC2 PM.

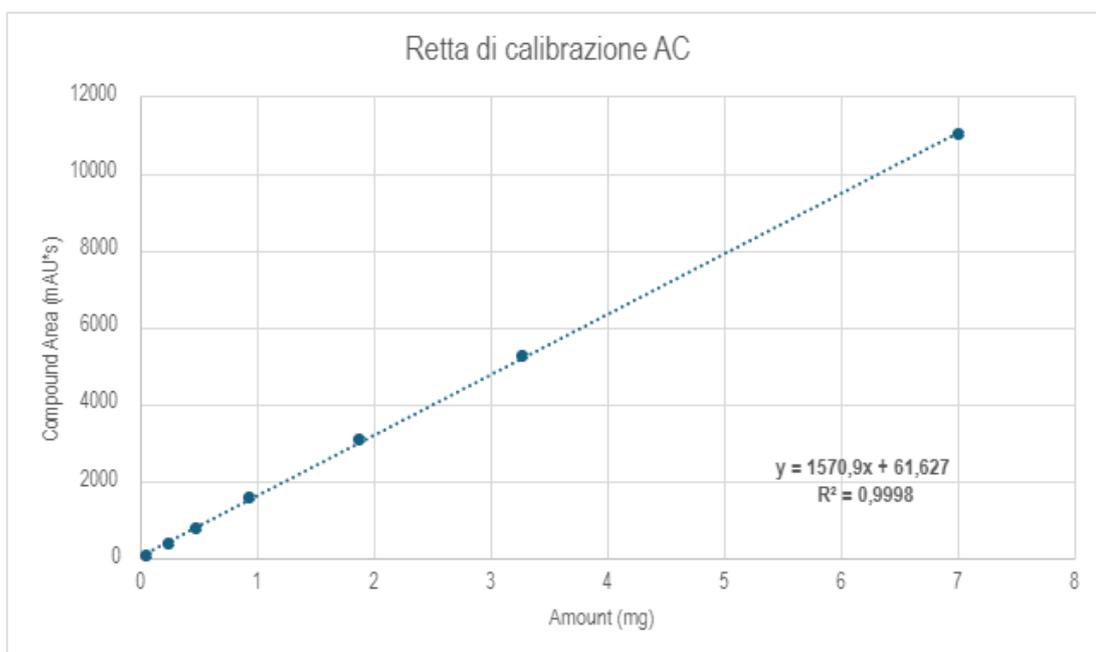


Figura 72: retta di calibrazione costruita per il 2-fenil-propene con Acquisition Method AC2 e Processing Method AC2 PM.

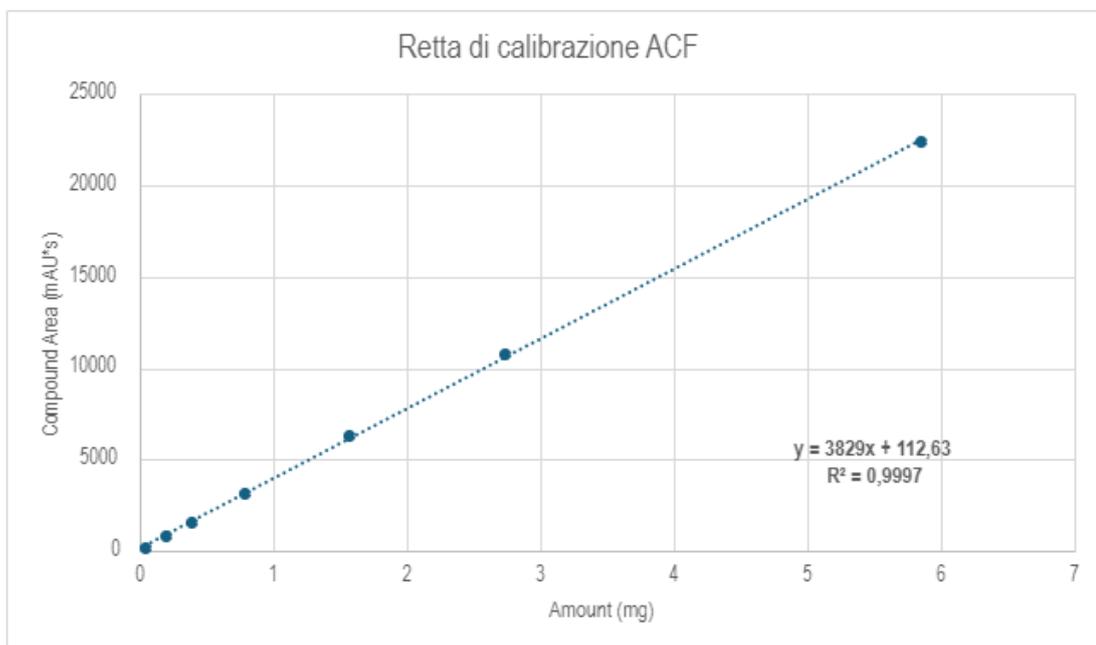


Figura 73: retta di calibrazione costruita per il fenilmetilchetone con Acquisition Method AC2 e Processing Method AC2 PM.

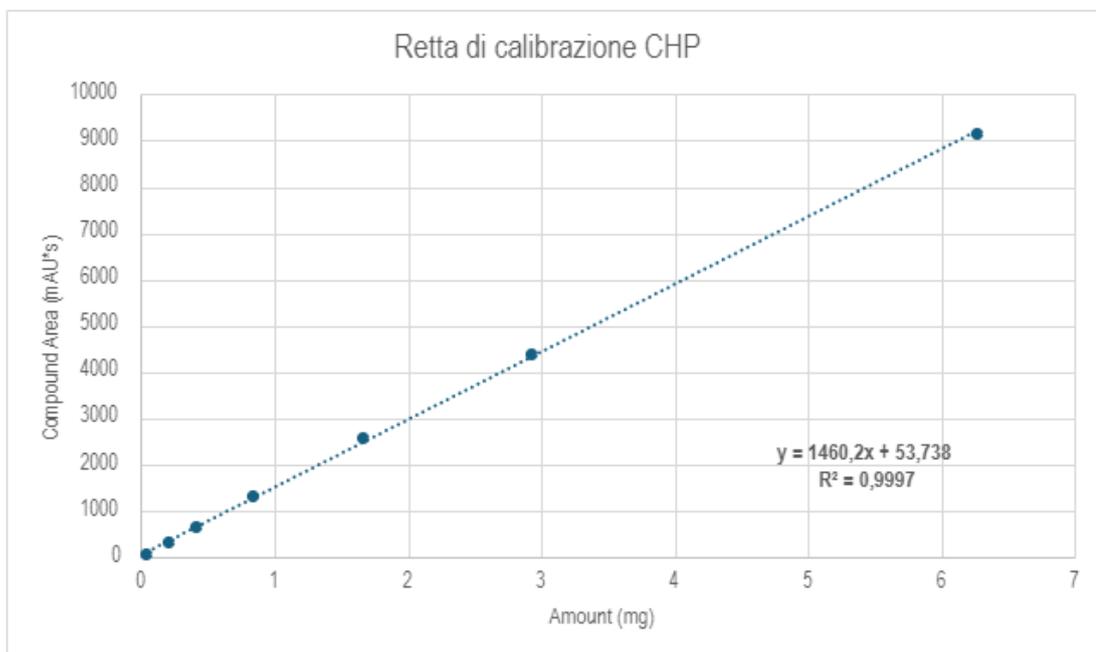


Figura 74: retta di calibrazione costruita per il (2-idroperossipropan-2-il)benzene con Acquisition Method AC2 e Processing Method AC2 PM.

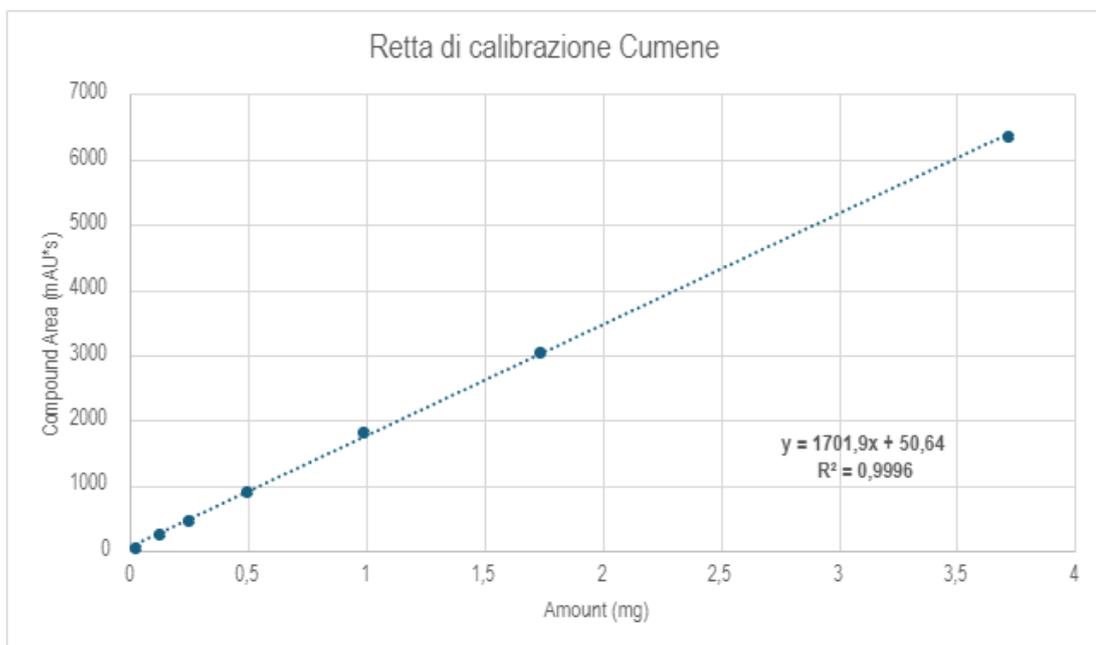


Figura 75: retta di calibrazione costruita per l'isopropilbenzene con Acquisition Method AC2 e Processing Method AC2 PM.

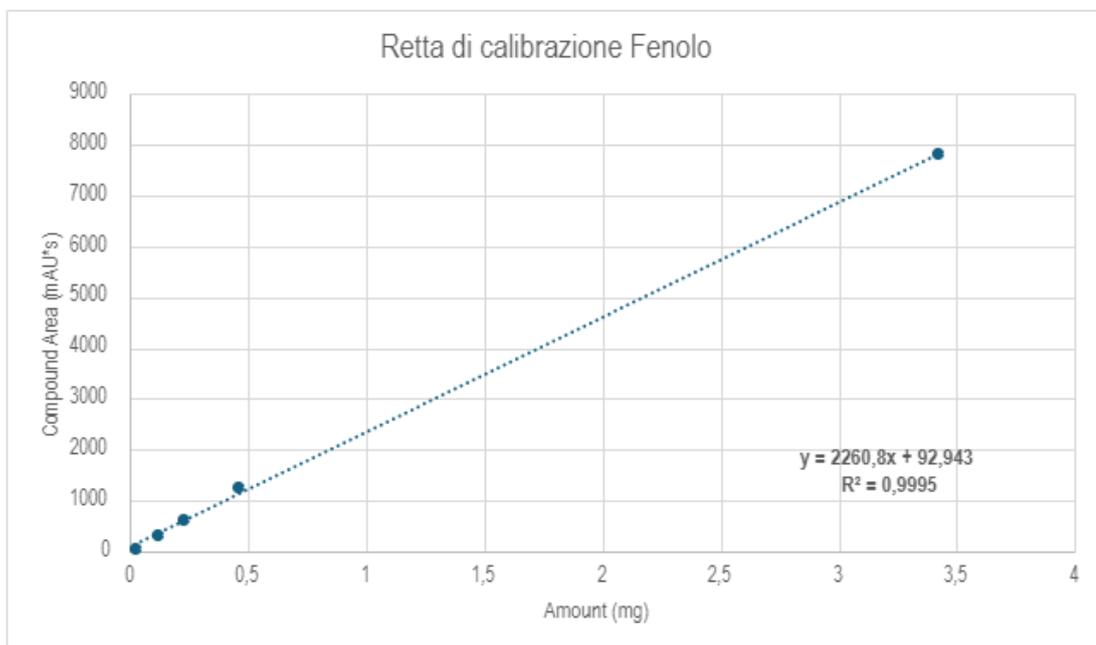


Figura 76: retta di calibrazione costruita per il fenolo con Acquisition Method AC2 e Processing Method AC2 PM.

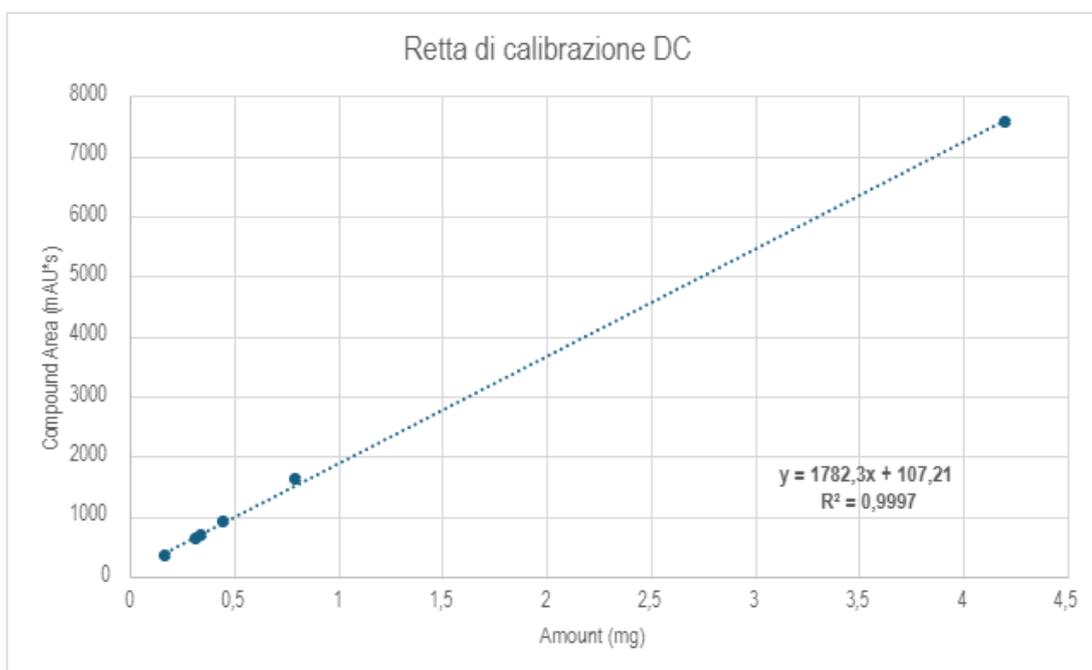


Figura 77: retta di calibrazione costruita per il fenolo con Acquisition Method AC2 e Processing Method AC2 PM.

Di seguito si riporta una tabella riassuntiva dei dati rilevanti ottenuti dalla costruzione delle rette di calibrazione.

Analita	R ²	Equazione della retta	Limite inferiore (mg)	Limite superiore (mg)
alfa-MS	0,9996	y=3666,4x+140,09	0,06257	4,3798
AC	0,9998	y=1570,9x+61,627	0,04665	6,9972
ACF	0,9991	y=3829,0x+112,63	0,03901	5,8509
CHP	0,9997	y=1460,2x+53,738	0,04176	6,26465
Cumene	0,9996	y=1701,9x+50,64	0,02478	3,7163
Fenolo	0,9995	y=2260,8x+92,943	0,02280	3,4200
DC	0,9997	y=1782,3x+107,21	0,1680	4,1992

Tabella 56: tabella riassuntiva dei dati rilevanti ottenuti dalla costruzione delle rette di calibrazione con Acquisition Method AC2 e Processing Method AC2 PM.

Le rette costruite presentano tutte un $R^2 \geq 0,9991$, presentano quindi un'ottima linearità. Questo assicura una corretta estrapolazione dei dati di concentrazione degli analiti dall'interpolazione dell'intensità del segnale ottenuto con la retta. Inoltre, gli intervalli di concentrazione coperti dalle rette di calibrazione mette in luce la possibilità di rilevare anche quantità molto basse, a conferma della bontà dell'analisi HPLC per l'obiettivo prefissato.

3.1.4.4. Campioni analizzati

Con l'*Acquisition Method* e il *Processing Method* descritti sono stati analizzati i campioni di CMP 5 per la valutazione delle impurezze presenti all'interno.

CMP 5

I metodi di acquisizione e di processamento studiati sono ottimali per le analisi richieste: i picchi relativi alle impurezze di interesse sono tutti facilmente identificabili e quantificabili. Il picco relativo al prodotto della reazione satura il segnale e non può essere quantificato.

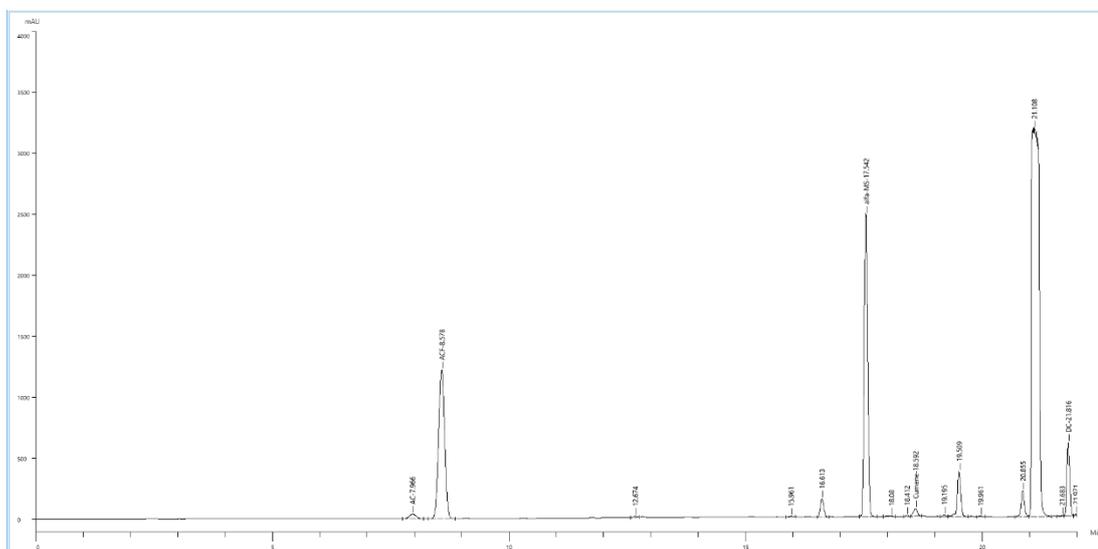


Figura 78: esempio di cromatogramma relativo all'analisi del campione CMP 5 con *Acquisition Method AC1* e *Processing Method AC1 PM*.

3.2. Serie B

I campioni della serie B derivano dal processo di produzione di un altro perossido organico alchilico prodotto in stabilimento. È stato sviluppato un metodo adattabile a più campioni della campagna produttiva per l'identificazione e la quantificazione delle sostanze isopropilbenzene e (2-idroperossipropan-2-il)benzene.

3.2.1. Analisi HPLC - lavoro con colonna PerkinElmer HyperSelect BDS C18

Lo sviluppo del metodo ha lo scopo di quantificare le sostanze isopropilbenzene e (2-idroperossipropan-2-il)benzene all'interno di campioni della serie B. Per lo scopo vengono utilizzati la colonna PerkinElmer HyperSelect BDS C18, la pre-colonna PerkinElmer Browlee Guard Cartridge Holder e il forno interno che garantisce il controllo della temperatura.

3.2.1.1. Acquisition Method: BB

La *Tabella 57* e *58* riporta i parametri dell'*Acquisition Method* denominato *BB*.

LC300 (U)HPLC PUMP	
Initial Conditions	
Maximum Pressure (psi)	10000
Minimum Pressure (psi)	0
Equilibration Time (min)	4,00
Run Time (min)	15,0
Pump A	Solvent 1
Pump B	Solvent 1

Tabella 57: blocco LC300 (U)HPLC Pump - Acquisition Method BB per l'analisi dei campioni della serie B.

LC300 (U)HPLC PUMP			
Time Program			
Time (min)	Flow (mL/min)	%A	%B
0,0	0,500	80,0	20,0
6,5	0,500	45,0	55,0
7,0	0,500	25,0	75,0
15,0	0,500	0,0	100,0

Tabella 58: blocco LC300 (U)HPLC Pump - Acquisition Method BB per l'analisi dei campioni della serie B.

Il tempo totale di analisi è di 19 minuti, di cui 4 di condizionamento (*Equilibration Time*) e 15 di corsa vera e propria (*Run Time*). Alla pompa A è collegata l'acqua ultra-pura, mentre alla pompa B l'acetonitrile. Come si osserva dal *Time Program*, l'eluizione è in gradiente partendo da un rapporto 80:20 di acqua e acetonitrile e concludendo con una fase mobile meno polare composta da solo acetonitrile. Lo studio del gradiente dei solventi è un passo di fondamentale importanza nello sviluppo di un metodo, poiché deve tenere conto di diversi fattori, quali ad esempio la tipologia di colonna in uso e la struttura chimica degli analiti da dover separare.

LC300 (U)HPLC AUTOSAMPLER	
Injection	
Needle Volume (µL)	15
Loop Volume (µL)	100
Syringe Volume (µL)	500
Injection Mode	Partial Loop
Sample Speed	Medium
Needle Level (mm)	6,0
Sample Pre-flush Volume (µL)	45
Enable Headspace Pressure	Disabled
Enable Air Cushion	Enabled
Air Cushion Volume (µL)	5
Temperature Control	
Enable Tray Temperature Control	Disabled
Enable Oven Temperature Control	Enabled
Oven Temperature Setpoint (°C)	40
Oven Temperature Tolernace (±°C)	2,0

Tabella 59: blocco LC300 (U)HPLC Autosampler -Acquisition Method BB per l'analisi dei campioni della serie B.

LC300 (U)HPLC AUTOSAMPLER	
Pre-Sequence Flush	
Flush Port	Flush Volume (µL)
Solvent 1	500
Post-Sequence Flush	
Flush Port	Flush Volume (µL)
Solvent 1	500

Tabella 60: blocco LC300 (U)HPLC Autosampler - Acquisition Method BB per l'analisi dei campioni della serie

B.

LC300 PDA DETECTOR	
Initial Conditions	
Run Time (min)	15,0
Sampling Rate (Hz)	5
Channel for Live Chromatogram	
Wavelength (nm)	190
Wavelength (nm)	200

Tabella 61: blocco LC300 PDA Detector - Acquisition Method BB per l'analisi dei campioni della serie B.

Le lunghezze d'onda a cui seguire l'acquisizione dei cromatogrammi in tempo reale sono 190 nm e 200 nm, le lunghezze di massimo assorbimento dei due analiti ricercati, isopropilbenzene e (2-idroperossipropan-2-il)benzene.

3.2.1.2. Processing Method: BB PM

Il metodo di processamento creato è stato denominato *BB PM*. Di seguito si riportano i parametri impostati per l'elaborazione dei cromatogrammi.

INTEGRATION PARAMETERS	
PDA-215	
Basic Parameters	
Bunching Factor [Pts]	5
Noise Threshold	383
Area Threshold	1916

Tabella 62: blocco Integration Parameters - Processing Method BB PM per l'analisi di campioni della serie B.

COMPOUND TABLE					
Compounds		Channel	Expected RT (min)	Absolute Window (s)	Relative Window (%)
(2-idroperossipropan-2-il)benzene	CHP	PDA-215	7,302	12	3
Isopropilbenzene	Cumene	PDA-215	11,035	12	3

Tabella 63: blocco Compound Table - Processing Method BB PM per l'analisi di campioni della serie B.

Si è scelto di processare i cromatogrammi alla lunghezza d'onda di 215 nm, nonostante non sia la lunghezza d'onda di massimo assorbimento né dell'isopropilbenzene né del (2-idroperossipropan-2-il)benzene. Il motivo per cui è stata selezionata questa lunghezza d'onda risiede nella possibilità di poter confrontare i cromatogrammi acquisiti con quelli ottenuti con lo strumento già operativo in laboratorio. Quest'ultimo non è provvisto di un detector PDA, le analisi vengono acquisite a lunghezza d'onda fissa a 215 nm.

All'interno dei parametri modificabili del *Processing Method*, si inserisce come unità di misura di restituzione del dato, la percentuale.

3.2.1.3. Rette di calibrazione

Come discusso, gli analiti che si è interessati a identificare e quantificare, per i quali è obbligatorio costruire le rette di calibrazione, sono: l'isopropilbenzene (cumene) e il (2-idroperossipropan-2-il)benzene (CHP). Le soluzioni di standard sono state preparate pesando l'analita all'interno di un matraccio tarato e portando a volume con acetonitrile, come descritto nel *Capitolo 2*.

Di seguito vengono riportate le rette di calibrazione ottenuti per gli analiti di interesse.

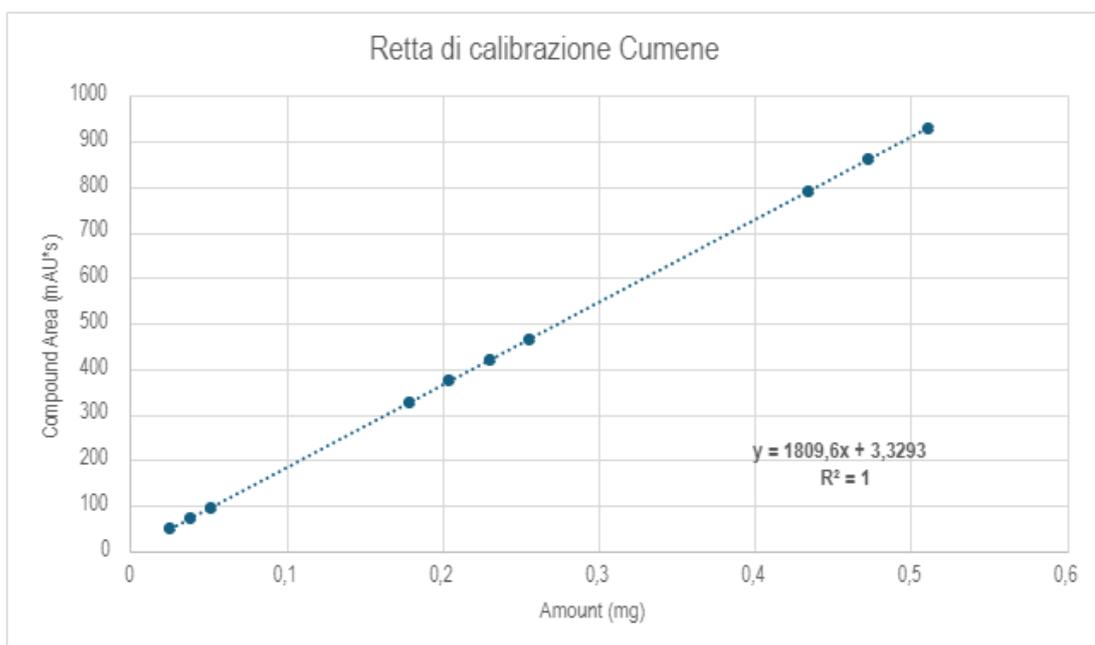


Figura 79: retta di calibrazione costruita per l'isopropilbenzene con Acquisition Method BB e Processing Method BB PM.

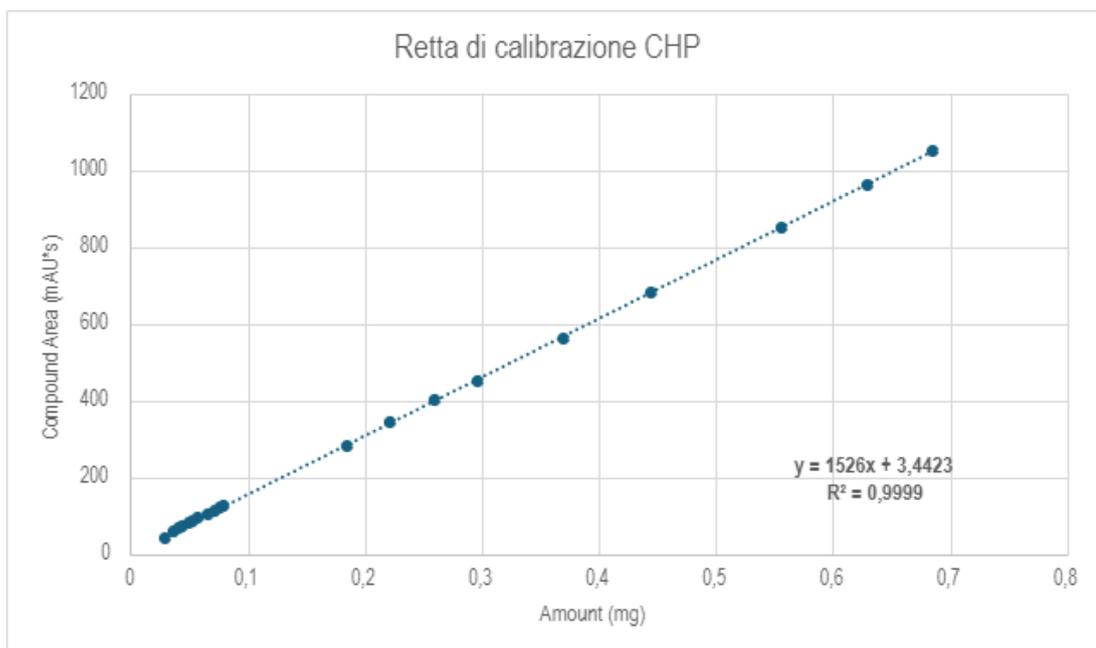


Figura 80: retta di calibrazione costruita per il (2-idroperossipropan-2-il)benzene con Acquisition Method BB e Processing Method BB PM.

Di seguito si riporta una tabella riassuntiva dei dati rilevanti ottenuti dalla costruzione delle rette di calibrazione.

Analita	R²	Equazione della retta	Limite inferiore (mg)	Limite superiore (mg)
CHP	0,9999	y=1526x+3,4423	0,02963	0,6851
Cumene	1	y=1809,6x+3,3293	0,02557	0,5115

Tabella 64: tabella riassuntiva dei dati rilevanti ottenuti dalla costruzione delle rette di calibrazione con Acquisition Method BB e Processing Method BB PM.

Le rette costruite presentano tutte un $R^2 \geq 0,9999$. L'eccellente linearità delle rette assicura la corretta estrapolazione dei dati di concentrazione degli analiti dall'interpolazione dell'intensità del segnale ottenuto con la retta. Inoltre, gli intervalli di concentrazioni coperti dalle rette di calibrazione mettono in evidenza la possibilità di rilevare anche quantità molto basse, a conferma della bontà dell'analisi HPLC per l'obiettivo prefissato.

3.2.1.4. Campioni analizzati

Attraverso l'Acquisition Method e il Processing Method descritti, con il fine di confermare l'assenza di isopropilbenzene e (2-idroperossipropan-2-il)benzene, sono stati analizzati i campioni CMP 6, CMP 7 e CMP 8, CMP 9 e CMP 10.

Per individuare correttamente il picco dell'isopropilbenzene che risulta trovarsi vicino ad una serie di picchi, si analizzano la soluzione di CMP 6 tal quale, la stessa soluzione a cui è stata aggiunta una goccia di standard di isopropilbenzene e la stessa soluzione a cui sono state aggiunte più gocce di standard di isopropilbenzene (Figura 81). In questa prova preliminare, non è necessario quantificare l'analita aggiunto, poiché si è interessati solamente ad individuare la corretta posizione, quindi il corretto tempo di ritenzione del picco del seguente analita. Di seguito si riportano i cromatogrammi delle tre prove eseguite.

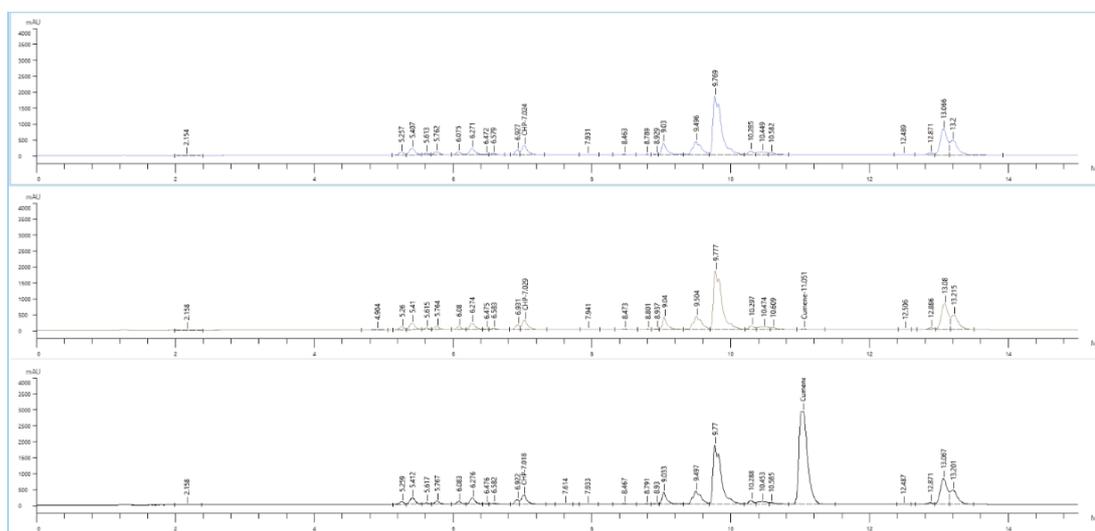


Figura 81: cromatogrammi relativi all'analisi della soluzione di CMP 6 tal quale, della stessa soluzione a cui è stata aggiunta una goccia di standard di isopropilbenzene e della stessa soluzione a cui sono state aggiunte più gocce dello stesso standard per l'individuazione del picco dell'isopropilbenzene.

In Figura 81 si identifica il picco relativo alla presenza di isopropilbenzene nei due campioni in cui è stato aggiunto e la sua assenza nel campione originario. Il tempo di eluizione dell'isopropilbenzene è tale da ben distanziarsi dai picchi vicini, perciò nel caso in cui fosse presente nel campione in esame sarebbe facilmente identificabile e quantificabile.

Di seguito si discutono i risultati ottenuti per i campioni analizzati.

CMP 6

All'interno dei campioni di CMP 6 analizzati, l'isopropilbenzene e il (2-idroperossipropan-2-il)benzene risultano assenti. Sono state eseguite anche due prove per confermare l'assenza dell'isopropilbenzene aggiungendo aliquote note di standard dell'analita ricercato a soluzioni del campione.

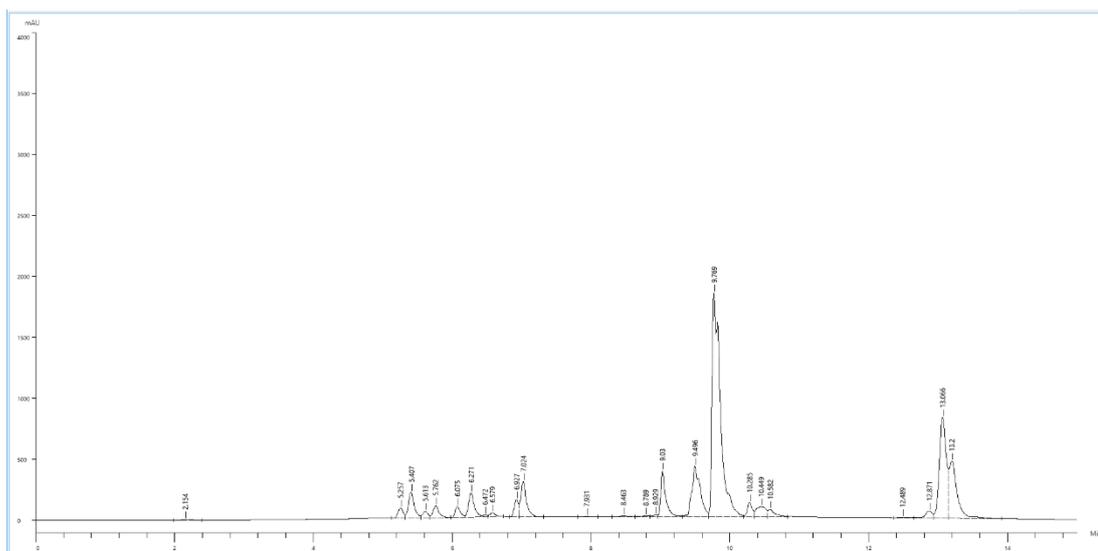


Figura 82: esempio di cromatogramma relativo all'analisi del campione CMP 6 con Acquisition Method BB e Processing Method BB PM.

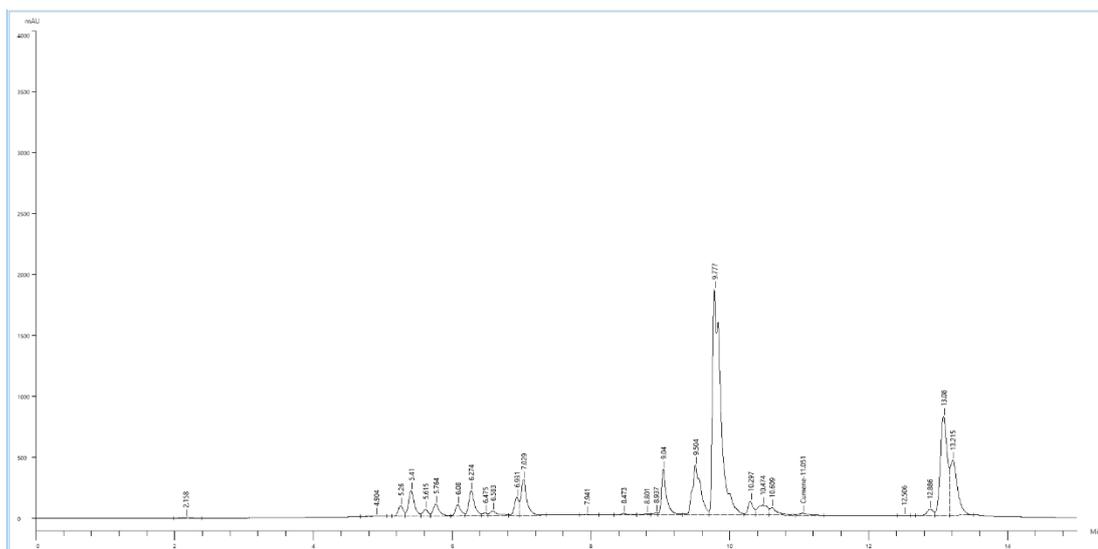


Figura 83: esempio di cromatogramma relativo all'analisi con Acquisition Method BB e Processing Method BB PM del campione CMP 6 a cui è stata aggiunta un'aliquota nota di standard di isopropilbenzene.

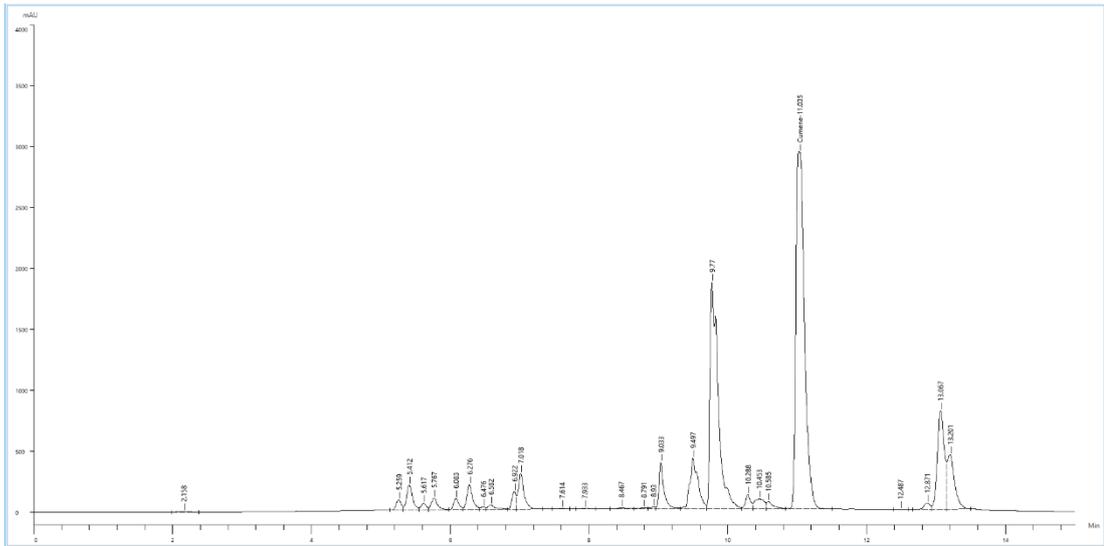


Figura 84: esempio di cromatogramma relativo all'analisi con Acquisition Method BB e Processing Method BB PM del campione CMP 6 a cui è stata aggiunta un'aliquota nota di standard di isopropilbenzene.

Come si osserva nelle Figure 83 e 84, se l'isopropilbenzene fosse presente all'interno dei campioni CMP 6 verrebbe eluito dopo poco più di 11 minuti. Dalle analisi delle soluzioni a cui è stato aggiunto lo standard, il dato di concentrazione di isopropilbenzene restituito è pari alla concentrazione nota aggiunta. Questo è il motivo per cui si può affermare che la sostanza in esame non è presente nei CMP 6.

CMP 7

L'analisi svolta sul campione CMP 7 ha confermato l'assenza di (2-idroperossipropan-2-il)benzene. L'isopropilbenzene risulta presente ad una concentrazione pari a $2,4777 \cdot 10^{-2}\%$. L'applicazione dei metodi di acquisizione e processamento studiati è utile allo scopo prefissato, ovvero quello di riuscire ad osservare concentrazioni molto basse della sostanza ricercata.

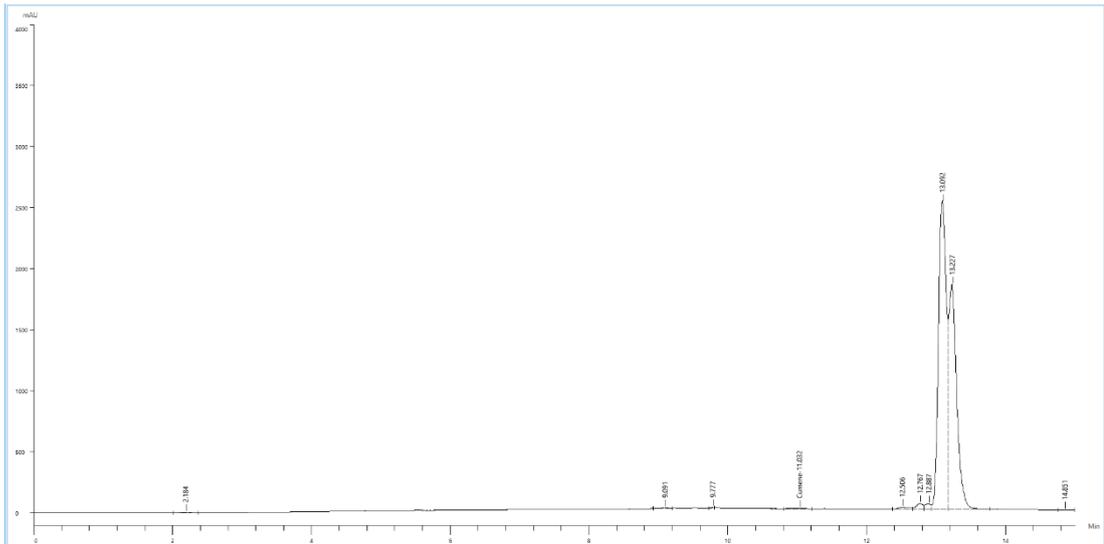


Figura 85: esempio di cromatogramma relativo all'analisi del campione CMP 7 con Acquisition Method BB e Processing Method BB PM.

CMP 8

I campioni CMP 8 sotto analisi sono risultati privi delle sostanze ricercate. L'assenza di isopropilbenzene è stata confermata da due prove in cui sono state aggiunte aliquote note di standard dell'analita ricercato a soluzioni del campione.

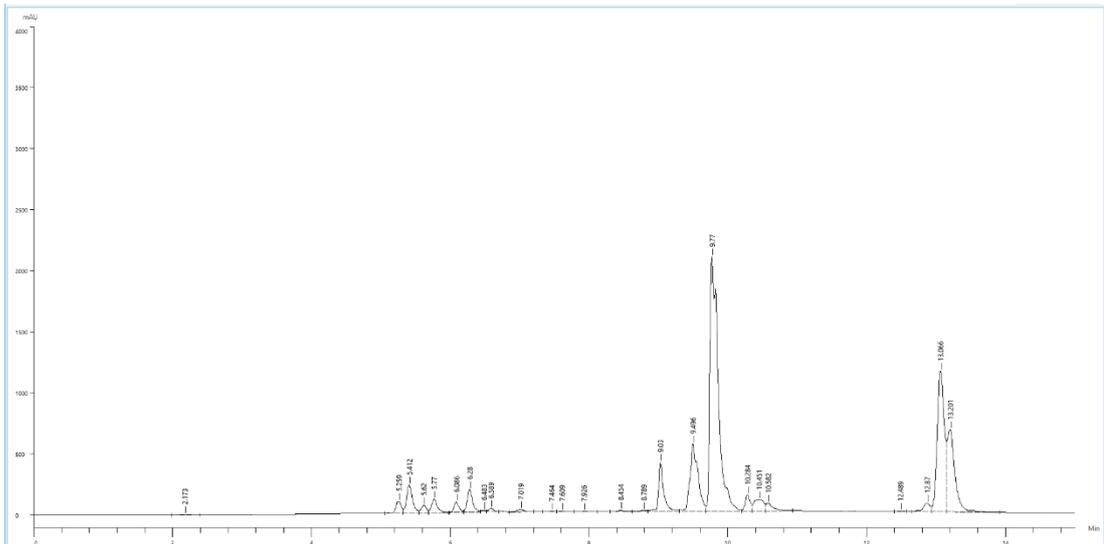


Figura 86: esempio di cromatogramma relativo all'analisi del campione CMP 8 con Acquisition Method BB e Processing Method BB PM.

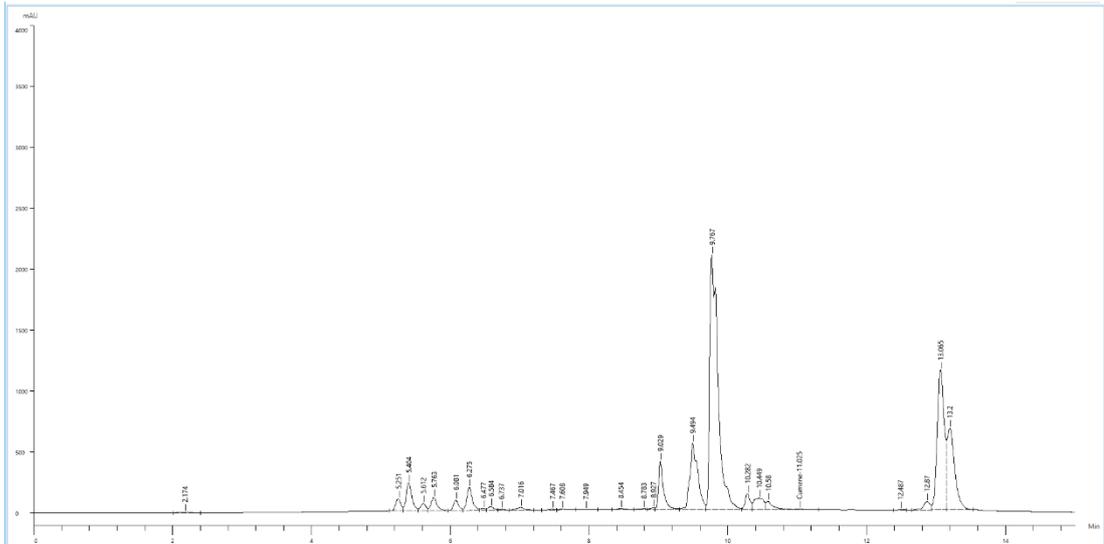


Figura 87: esempio di cromatogramma relativo all'analisi con Acquisition Method BB e Processing Method BB PM del campione CMP 8 a cui è stata aggiunta un'aliquota nota di standard di isopropilbenzene.

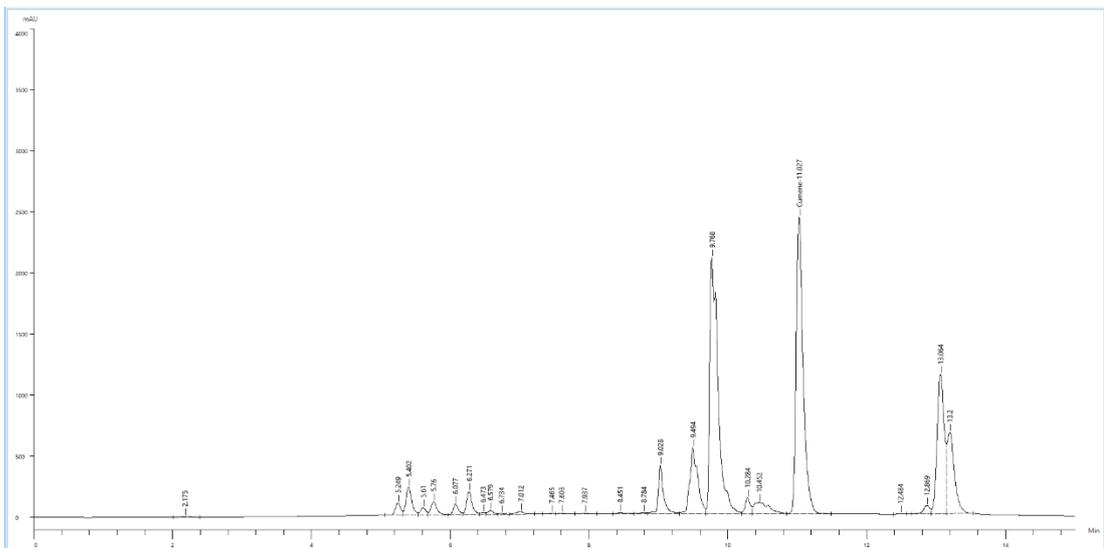


Figura 88: esempio di cromatogramma relativo all'analisi con Acquisition Method BB e Processing Method BB PM del campione CMP 8 a cui è stata aggiunta un'aliquota nota di standard di isopropilbenzene.

Come si osserva nelle Figure 87 e 88, se l'isopropilbenzene fosse presente all'interno dei campioni CMP 8 verrebbe eluito dopo poco più di 11 minuti. Dalle analisi delle soluzioni a cui è stato aggiunto lo standard, il dato di concentrazione di isopropilbenzene restituito è pari alla concentrazione nota aggiunta. Per questo, si può affermare che la sostanza in esame non è presente nei CMP 8.

CMP 9

I metodi studiati vengono utilizzati per testare la presenza di isopropilbenzene e (2-idroperossipropan-2-il)benzene all'interno di campioni CMP 9. Il riscontro è stato negativo, non si rilevano le sostanze ricercate.

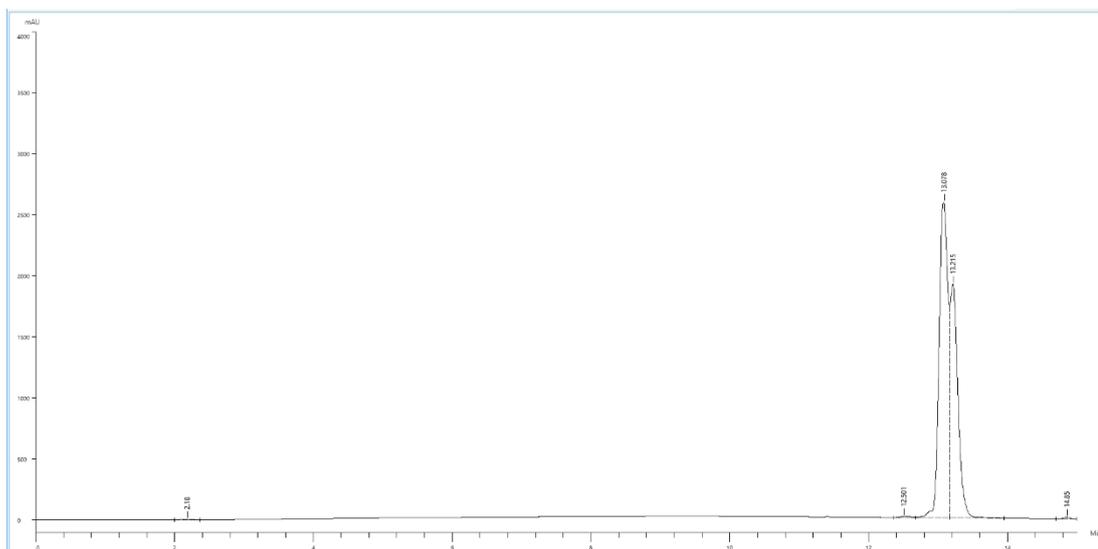


Figura 89: esempio di cromatogramma relativo all'analisi del campione CMP 9 con Acquisition Method BB e Processing Method BB PM.

CMP 10

All'interno dei campioni CMP 10 sottoposti ad analisi non vengono rilevati gli analiti di interesse. Anche in questo caso, l'assenza di isopropilbenzene viene confermata dall'analisi di una soluzione di campione a cui viene aggiunta un'aliquota nota di standard di isopropilbenzene.

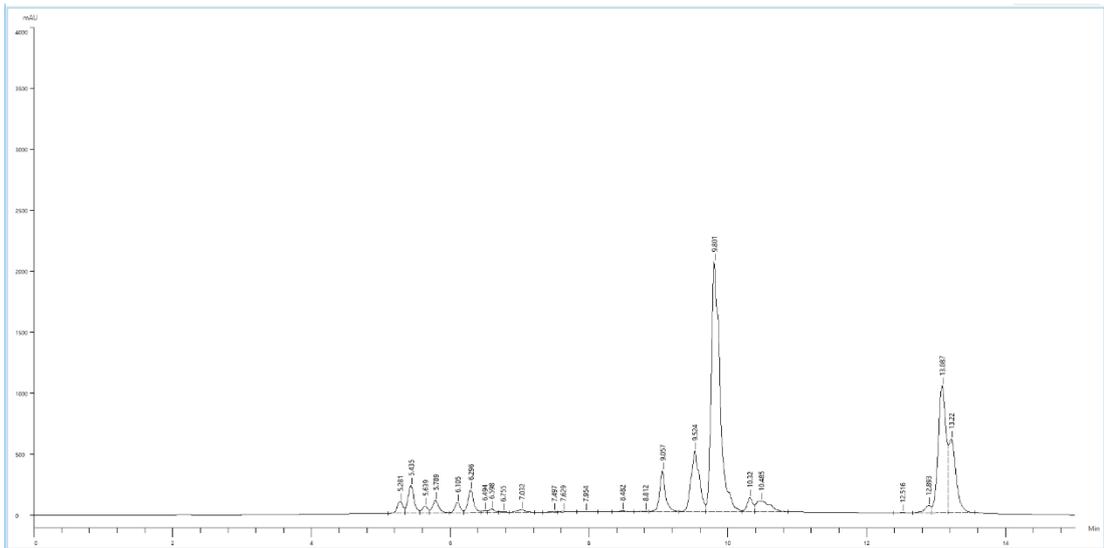


Figura 90: esempio di cromatogramma relativo all'analisi del campione CMP 10 con Acquisition Method BB e Processing Method BB PM.

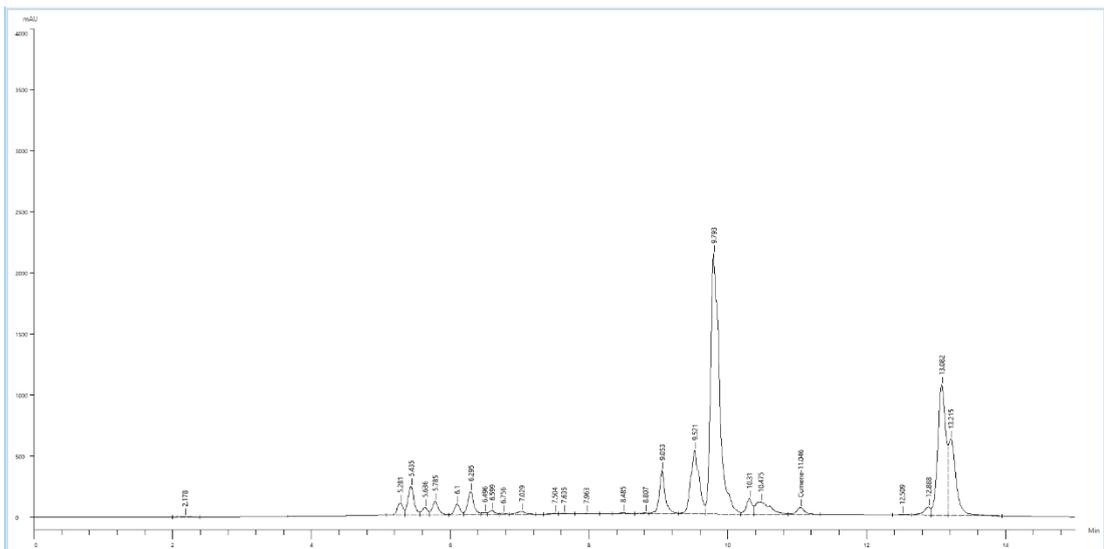


Figura 91: esempio di cromatogramma relativo all'analisi con Acquisition Method BB e Processing Method BB PM del campione CMP 10 a cui è stata aggiunta un'aliquota nota di standard di isopropilbenzene.

Dall'analisi della soluzione in cui è stata aggiunta un'aliquota nota dello standard di isopropilbenzene, viene restituita una concentrazione di questo analita pari a quella aggiunta. Questo è il motivo per cui si può affermare che la sostanza in esame non è presente nei CMP 10.

3.2.2. Analisi HPLC - lavoro con colonna Phenomenex 00G-4601-E0

Data la complessità della matrice di questi campioni, con la colonna PerkinElmer HyperSelect BDS C18 non è possibile riuscire a separare tutti i picchi dei cromatogrammi ottenuti, quindi identificare correttamente e soprattutto quantificare tutti gli analiti di interesse. Vengono quindi studiati l'*Acquisition Method* e il *Processing Method* per l'analisi dei campioni della serie B con la colonna Phenomenex 00G-4601-E0 alloggiata nel forno esterno dello strumento e munita di pre-colonna.

3.2.2.1. Acquisition Method: BC

Di seguito l'*Acquisition Method* studiato per le analisi HPLC del campione CMP 6 della serie B, che è stato denominato *BC*.

LC300 (U)HPLC PUMP			
Initial Conditions			
Maximum Pressure (psi)	10000		
Minimum Pressure (psi)	0		
Equilibration Time (min)	5,00		
Run Time (min)	27,0		
Pump A	Solvent 1		
Pump B	Solvent 1		
Time Program			
Time (min)	Flow (mL/min)	%A	%B
0,0	1,000	70,0	30,0
23,0	1,000	0,0	100,0
27,0	1,000	0,0	100,0

Tabella 65: blocco LC300 (U)HPLC Pump - Acquisition Method BC per l'analisi del campione CMP 6.

Il tempo totale di analisi è di 32 minuti, di cui 5 di condizionamento (*Equilibration Time*) e 27 di corsa vera e propria (*Run Time*). Alla pompa A è collegata l'acqua ultra-pura, mentre alla pompa B l'acetonitrile. Come si osserva dal *Time Program*, l'eluizione è in gradiente: si inizia con una fase mobile al 70% di acqua, dopo 23 minuti la fase mobile è composta da solo acetonitrile e rimane costante per altri 4 minuti. È necessario mettere a punto il corretto gradiente di solventi, in funzione della tipologia di campioni che si desidera analizzare. Sono

state svolte diverse prove di analisi attraverso le quali si è potuto individuare il corretto gradiente di solventi che permetta un'ottima separazione delle specie di interesse.

LC300 (U)HPLC AUTOSAMPLER	
Injection	
Needle Volume (µL)	15
Loop Volume (µL)	100
Syringe Volume (µL)	500
Injection Mode	Partial Loop
Sample Speed	Medium
Needle Level (mm)	6,0
Sample Pre-flush Volume (µL)	45
Enable Headspace Pressure	Disabled
Enable Air Cushion	Enabled
Air Cushion Volume (µL)	5
Temperature Control	
Enable Tray Temperature Control	Disabled
Enable Oven Temperature Control	Disabled
Pre-Sequence Flush	
Flush Port	Flush Volume (µL)
Solvent 1	500
Post-Sequence Flush	
Flush Port	Flush Volume (µL)
Solvent 1	500

Tabella 66: blocco LC300 (U)HPLC Autosampler - Acquisition Method BC per l'analisi del campione CMP 6.

LC300 COLUMN OVEN	
Initial Conditions	
Enable Temperature Control	Enabled
Oven Temperature Setpoint (°C)	25
Oven Temperature Tolerance (±°C)	0,5

Tabella 67: blocco LC300 Column Oven - Acquisition Method BC per l'analisi del campione CMP 6.

La temperatura del forno esterno in cui è alloggiata la colonna è impostata a 25°C, con una possibile variazione di $\pm 0,5^\circ\text{C}$.

LC300 PDA DETECTOR	
Initial Conditions	
Run Time (min)	27,0
Sampling Rate (Hz)	5
Channel for Live Chromatogram	
Wavelength (nm)	215

Tabella 68: blocco LC300 PDA Detector - Acquisition Method BC per l'analisi del campione CMP 6.

La lunghezza d'onda a cui si può seguire l'andamento del cromatogramma in tempo reale, quindi l'eluizione degli analiti, è 215 nm.

Nella preparazione della sequenza di campioni da analizzare, l'*Injection volume* è impostato a 10 μL .

3.2.2.2. Processing Method: BC PM

Il metodo di processamento creato è stato denominato *BC PM*. Di seguito si riportano i parametri impostati per la migliore elaborazione dei cromatogrammi.

INTEGRATION PARAMETERS	
PDA-215	
Basic Parameters	
Bunching Factor [Pts]	6
Noise Threshold	3416
Area Threshold	17084

Tabella 69: blocco Integration Parameters - Processing Method BC PM per l'analisi del campione CMP 6.

COMPOUND TABLE					
Compounds		Channel	Expected RT (min)	Absolute Window (s)	Relative Window (%)
2,2'-(1,4-fenil)bis(propan-2-olo)	p-diolo	PDA-215	4,609	12	3
2,2'-(1,3-fenil)bis(propan-2-olo)	m-diolo	PDA-215	4,747	12	3
(2-idroperossiopropan-2-il)benzene	CHP	PDA-215	8,237	12	3
1-(2-idroperossiopropan-2-il)-3-isopropilbenzene	m-MHP	PDA-215	13,221	12	3
1-(2-idroperossiopropan-2-il)-4-isopropilbenzene	p-MHP	PDA-215	13,395	12	3
Isopropilbenzene	Cumene	PDA-215	16,402	12	3
1,3-diisopropilbenzene	m-DIPB	PDA-215	20,738	12	3
1,4-diisopropilbenzene	p-DIPB	PDA-215	20,943	12	3
1,3,5-Triiso propilbenzene	1,3,5-Triiso propilbenzene	PDA-215	23,606	12	3
1,3-bis(2-(ter-butylperossi)propan-2-il)benzene	m-F	PDA-215	24,958	12	3
1,4-bis(2-(ter-butylperossi)propan-2-il)benzene	p-F	PDA-215	25,045	12	3
2-(3-(ter-butyl)fenil)propan-2-olo	m-MOH	PDA-215	11,877	12	3
2-(4-(ter-butyl)fenil)propan-2-olo	p-MOH	PDA-215	12,090	12	3
1-(4-(2-idrossipropan-2-il)fenil)etanone	p-AC-MOH	PDA-215	5,346	12	3
1-(3-(2-idrossipropan-2-il)fenil)etanone	m-AC-MOH	PDA-215	5,503	12	3
2-(4-(2-idroperossiopropan-2-il)fenil)propan-2-olo	p-MHP-MOH	PDA-215	5,761	12	3

COMPOUND TABLE					
Compounds		Channel	Expected RT (min)	Absolute Window (s)	Relative Window (%)
2-(3-(2-idroperossipropan-2-il)fenil)propan-2-olo	m-MHP-MOH	PDA-215	6,008	12	3
1-(3-(2-idroperossipropan-2-il)fenil)etanone	m-AC-MHP	PDA-215	6,789	12	3
1-(4-(2-idroperossipropan-2-il)fenil)etanone	p-AC-MHP	PDA-215	6,790	12	3
1,3-bis(2-idroperossipropan-2-il)benzene	p-DHP	PDA-215	7,144	12	3
1,4-bis(2-idroperossipropan-2-il)benzene	m-DHP	PDA-215	7,264	12	3

Tabella 70: blocco Compound Table - Processing Method BC PM per l'analisi del campione CMP 6.

Gli analiti 1-(3-(2-idrossipropan-2-il)fenil)etanone, 1-(4-(2-idrossipropan-2-il)fenil)etanone, 2-(3-(2-idroperossipropan-2-il)fenil)propan-2-olo, 2-(4-(2-idroperossipropan-2-il)fenil)propan-2-olo, 1-(3-(2-idroperossipropan-2-il)fenil)etanone, 1-(4-(2-idroperossipropan-2-il)fenil)etanone, 1,3-bis(2-idroperossipropan-2-il)benzene e 1,4-bis(2-idroperossipropan-2-il)benzene vengono qualitativamente identificati all'interno dei cromatogrammi, ma non è possibile fornire la loro concentrazione, poiché non sono disponibili i relativi standard, di conseguenza non è possibile costruire le rette di calibrazione.

Viene scelto un canale unico di processamento, quindi tutti i cromatogrammi vengono processati ad una sola lunghezza d'onda. A 215 nm tutti gli analiti di interesse rispondono con un buon assorbimento, così che i loro picchi possano essere individuati singolarmente.

All'interno dei parametri modificabili del *Processing Method*, si inserisce come unità di misura di restituzione del dato, la percentuale.

3.2.2.3. Rette di calibrazione

Gli analiti che si è interessati a identificare e quantificare all'interno dei campioni della serie in esame, quindi quelli per cui è obbligatorio costruire le rette di calibrazione, sono: 2,2'-(1,3-fenil)bis(propan-2-olo), 2,2'-(1,4-fenil)bis(propan-2-olo), (2-idroperossipropan-2-il)benzene, 1-(2-idroperossipropan-2-il)-3-isopropilbenzene, 1-(2-idroperossipropan-2-il)-4-isopropilbenzene, isopropilbenzene, 1,3-bis(2-idroperossipropan-2-il)benzene, 1,4-bis(2-idroperossipropan-2-il)benzene, 1,3-diisopropilbenzene, 1,4-diisopropilbenzene, 1,3-bis(2-(ter-butilperossi)propan-2-il)benzene, 1,4-bis(2-(ter-butilperossi)propan-2-il)benzene, 2-(3-(ter-butil)fenil)propan-2-olo e 2-(4-(ter-butil)fenil)propan-2-olo. La preparazione delle soluzioni di standard viene descritta nel *Paragrafo 2.2.*

Le rette di calibrazione vengono ottenute dall'interpolazione della concentrazione del campione di standard preparato e l'area del segnale relativo. Di seguito vengono riportate le rette di calibrazione costruite per tutti gli analiti di interesse.



Figura 92: retta di calibrazione costruita per il 2,2'-(1,4-fenil)bis(propan-2-olo) con Acquisition Method BC e Processing Method BC PM.



Figura 93: retta di calibrazione costruita per il 2,2'-(1,3-fenil)bis(propan-2-olo) con Acquisition Method BC e Processing Method BC PM.

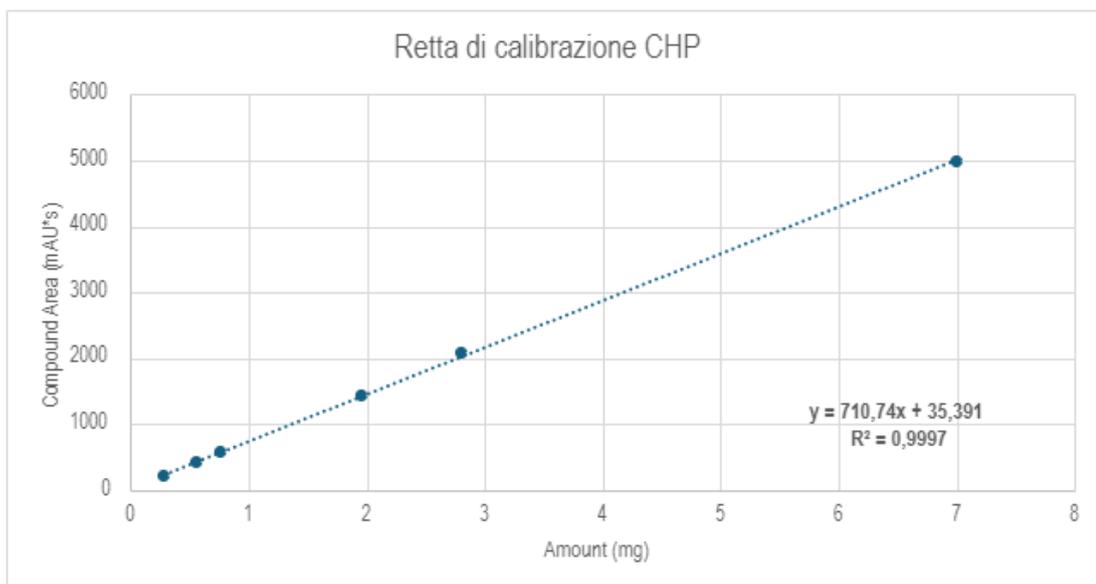


Figura 94: retta di calibrazione costruita per il (2-Idroperossipropan-2-il)benzene con Acquisition Method BC e Processing Method BC PM.

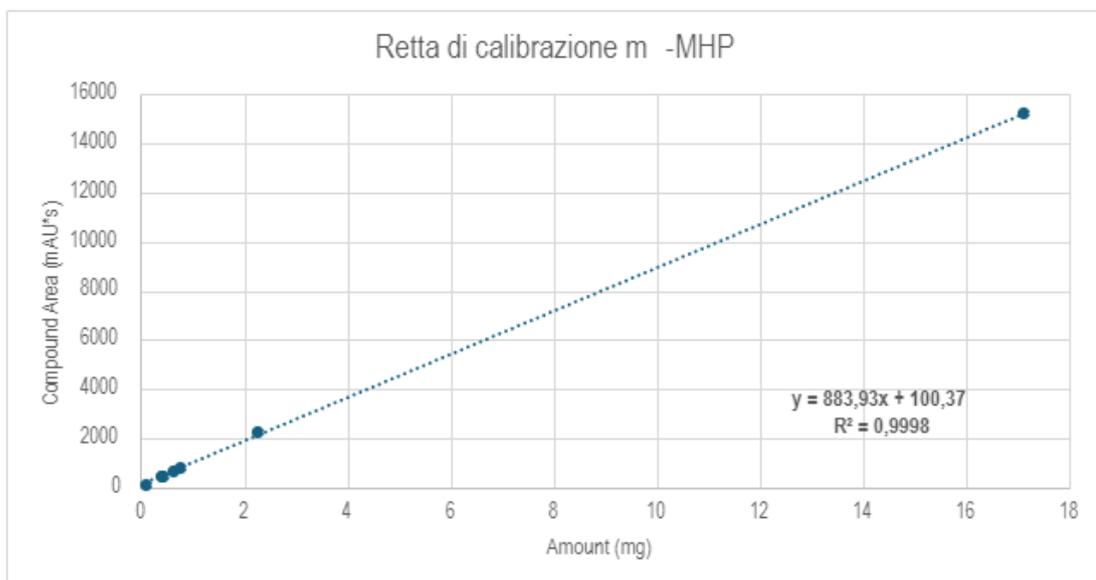


Figura 95: retta di calibrazione costruita per l'1-(2-idroperossipropan-2-il)-3-isopropilbenzene con Acquisition Method BC e Processing Method BC PM.

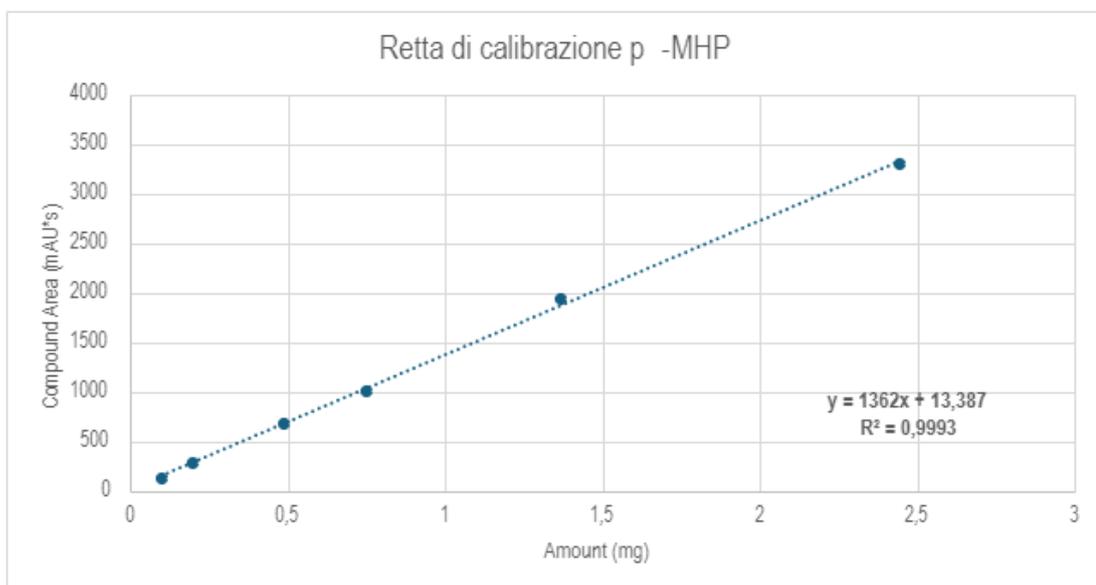


Figura 96: retta di calibrazione costruita per l'1-(2-idroperossipropan-2-il)-4-isopropilbenzene con Acquisition Method BC e Processing Method BC PM.

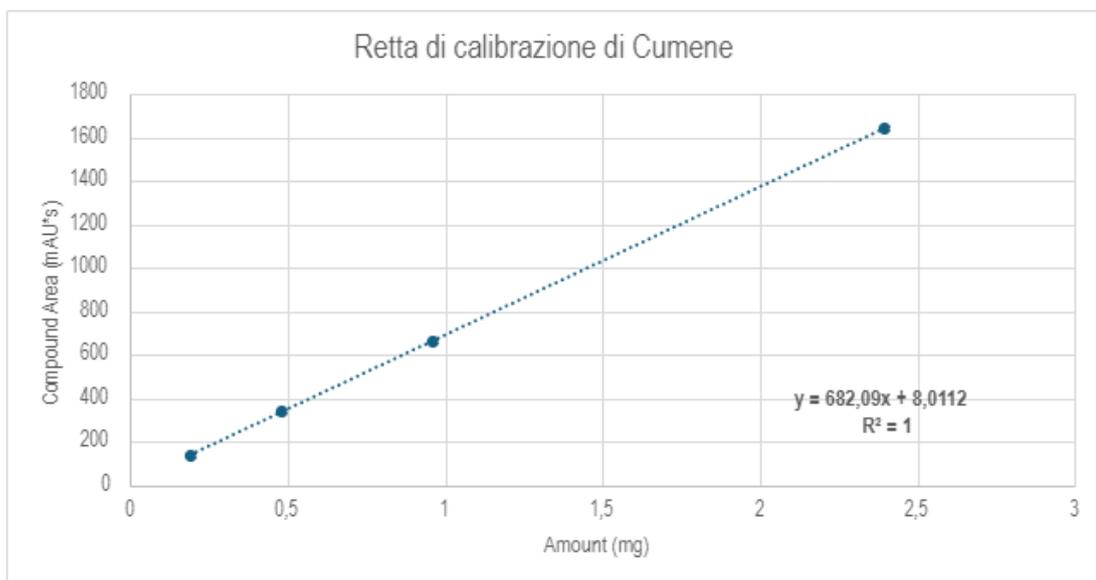


Figura 97: retta di calibrazione costruita per l'isopropilbenzene con Acquisition Method BC e Processing Method BC PM.

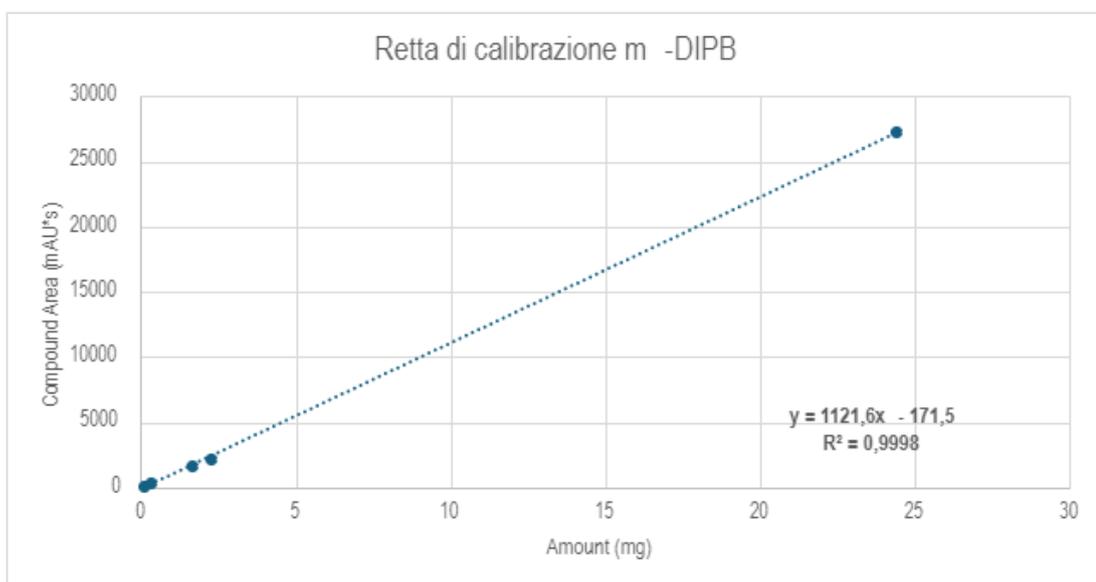


Figura 98: retta di calibrazione costruita per l'1,3-diisopropilbenzene con Acquisition Method BC e Processing Method BC PM.

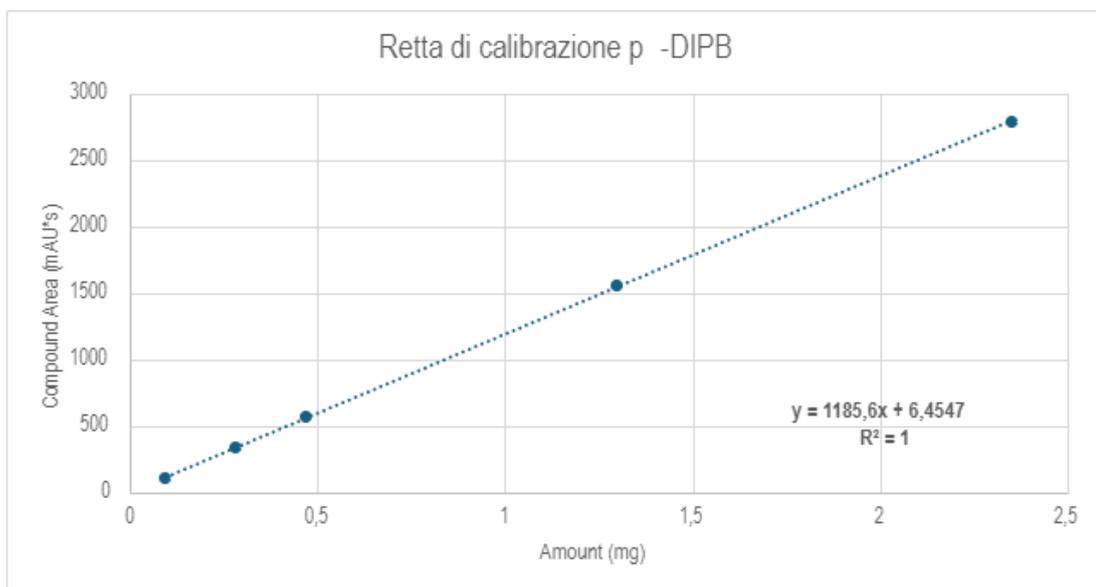


Figura 99: retta di calibrazione costruita per l'1,4-diisopropilbenzene con Acquisition Method BC e Processing Method BC PM.

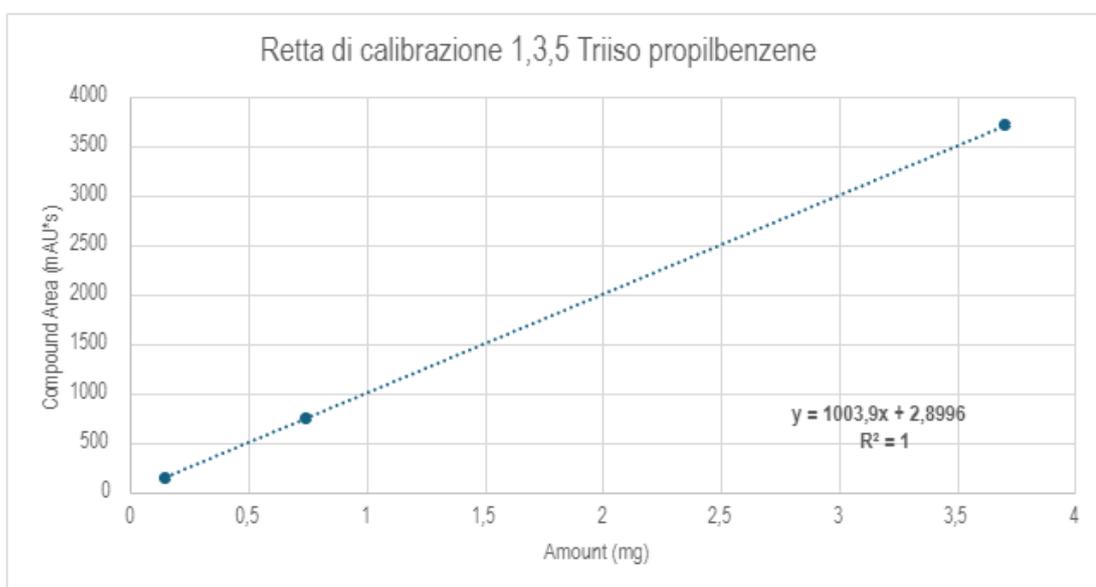


Figura 100: retta di calibrazione costruita per l'1,3,5-Triiso propilbenzene con Acquisition Method BC e Processing Method BC PM.

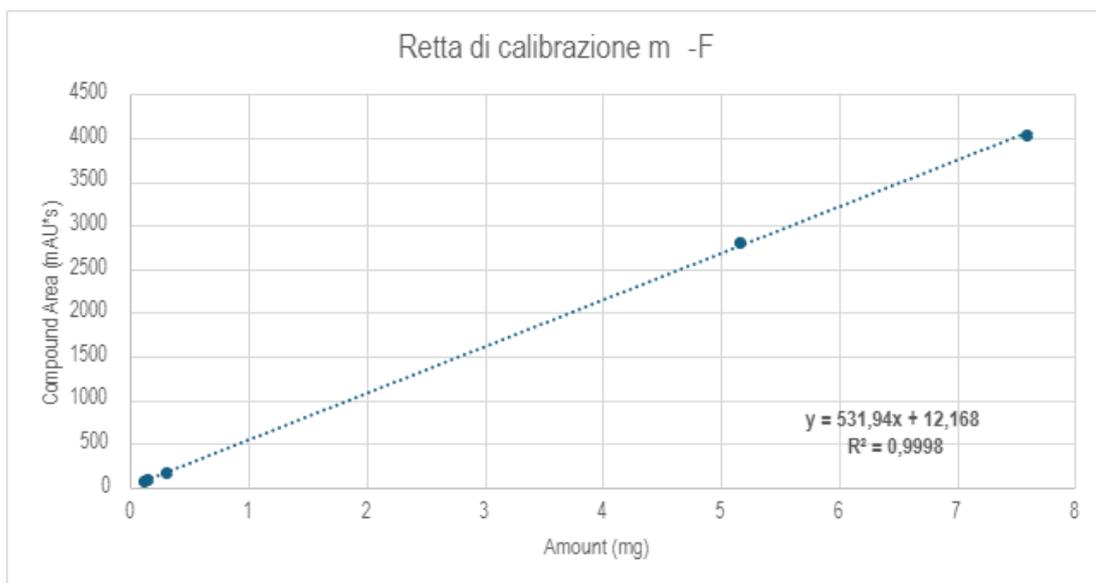


Figura 101: retta di calibrazione costruita per l'1,3-bis(2-(ter-butilperossi)propan-2-il)benzene con Acquisition Method BC e Processing Method BC PM.

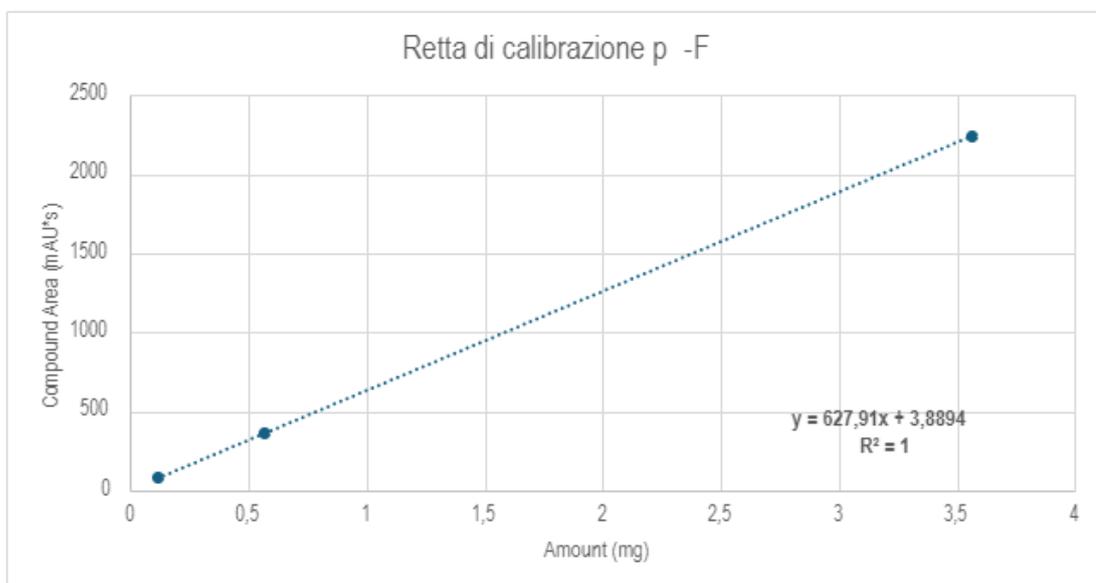


Figura 102: retta di calibrazione costruita per l'1,4-bis(2-(ter-butilperossi)propan-2-il)benzene con Acquisition Method BC e Processing Method BC PM.

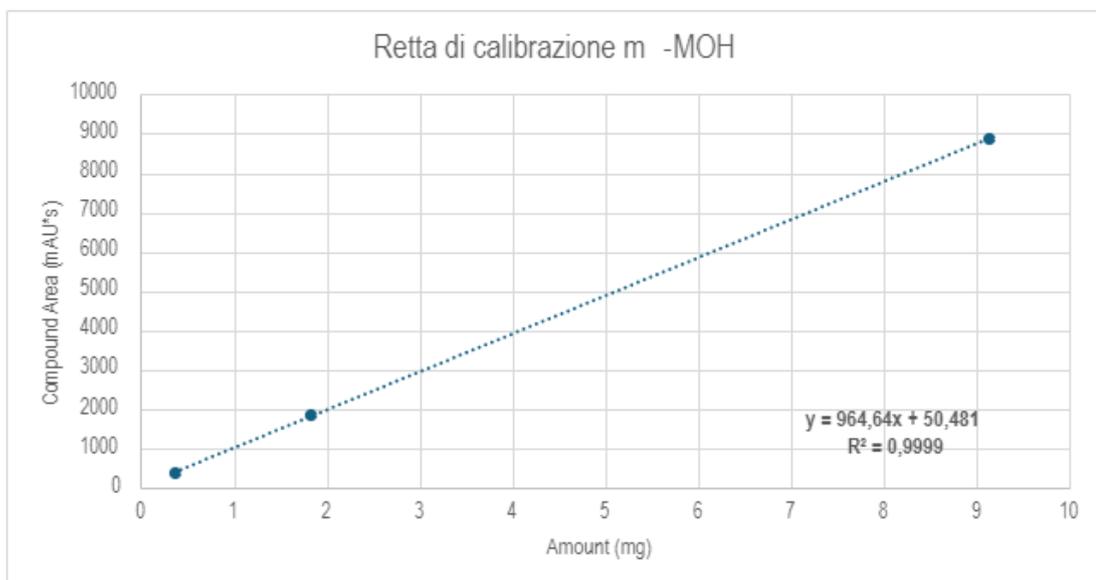


Figura 103: retta di calibrazione costruita per il 2-(3-(ter-butil)fenil)propan-2-olo con Acquisition Method BC e Processing Method BC PM.

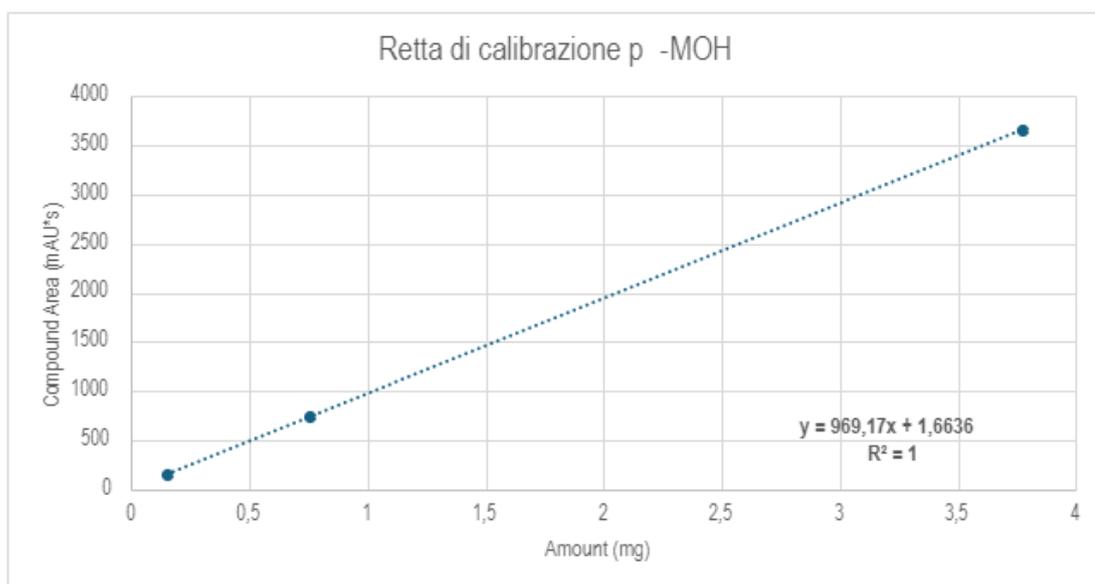


Figura 104: retta di calibrazione costruita per il 2-(4-(ter-butil)fenil)propan-2-olo con Acquisition Method BC e Processing Method BC PM.

Di seguito si riporta una tabella riassuntiva dei dati rilevanti ottenuti dalla costruzione delle rette di calibrazione.

Analita	R²	Equazione della retta	Limite inferiore (mg)	Limite superiore (mg)
p-diolo	0,9999	y=1033,5x+41,415	0,2334	7,7789
m-diolo	0,9996	y=677,04x+195,06	0,4917	24,5839
CHP	0,9997	y=710,74x+35,391	0,2797	6,9935
m-MHP	0,9998	y=883,93x+100,37	0,09099	17,1094
p-MHP	0,9993	y=1362x+13,387	0,09765	2,4412
Cumene	1	y=682,09x+8,0112	0,1918	2,3976
m-DIPB	0,9998	y=1121,6X-171,5	0,09216	24,3840
p-DIPB	1	y=1185,6x+6,4547	0,09408	2,3520
1,3,5-Triiso propil benzene	1	y=1003,9x+2,8996	0,1482	3,7050
m-F	0,9998	y=531,94x+12,168	0,1215	7,5924
p-F	1	y=627,91x+3,8894	0,1141	3,5662
m-MOH	0,9999	y=964,64x+50,481	0,3657	9,1426
p-MOH	1	y=969,17x+1,6636	0,1510	3,7740

Tabella 71: tabella riassuntiva dei dati rilevanti ottenuti dalla costruzione delle rette di calibrazione con Acquisition Method BC e Processing Method BC PM.

Le rette costruite presentano tutte un $R^2 \geq 0,9993$, sono caratterizzate quindi da un'ottima linearità. Questo assicura una corretta estrapolazione dei dati di concentrazione degli analiti dall'interpolazione dell'intensità del segnale ottenuto con la retta. Inoltre, gli intervalli di concentrazioni coperti dalle rette di calibrazione mettono in evidenza la possibilità di rilevare anche quantità molto basse, a conferma della bontà dell'analisi HPLC per l'obiettivo prefissato.

3.2.2.4. Campioni analizzati

Con l'*Acquisition Method* e il *Processing Method* descritti vengono analizzati dei campioni CMP 6. L'applicazione del metodo di analisi sviluppato a questi campioni permette di verificare la variazione della concentrazione degli analiti di interesse sui campionamenti eseguiti durante il processo produttivo. Questo è di fondamentale importanza, infatti l'analisi HPLC sui

campioni CMP 6, fornisce informazioni utili alla valutazione del corretto compimento di alcune reazioni della prima parte del processo produttivo.

CMP 6

La separazione dei picchi all'interno dei cromatogrammi ottenuti dalle analisi risulta buona e accettabile. Si conferma la possibilità di utilizzo dei metodi studiati per la ricerca e la quantificazione degli analiti di interesse all'interno di questo campione.

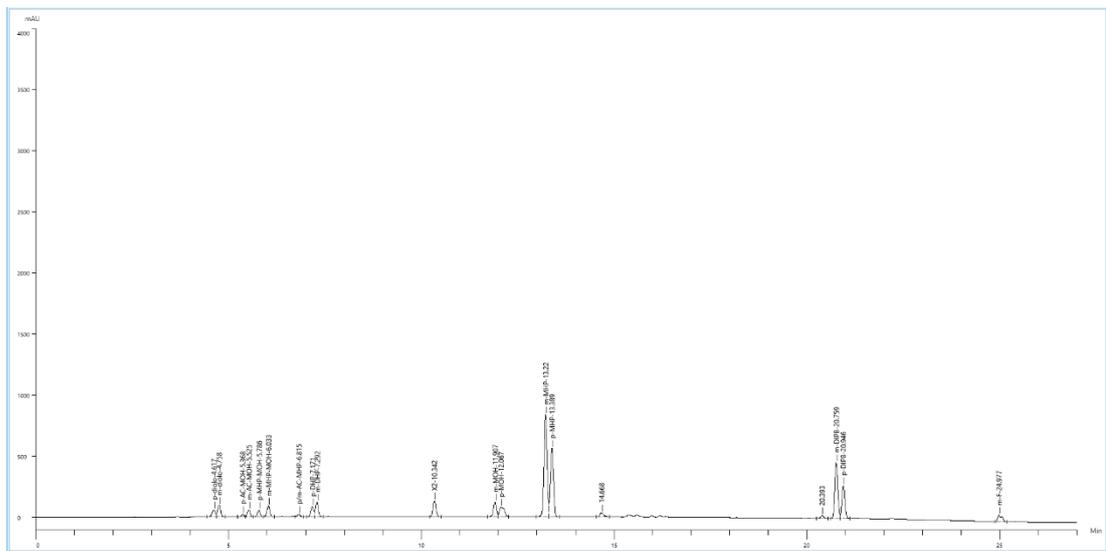


Figura 105: esempio di cromatogramma relativo all'analisi del campione CMP 6 con Acquisition Method BC e Processing Method BC PM.

3.3. Serie C

È stato studiato il metodo di analisi HPLC per i campioni della serie C. Attualmente, questi campioni vengono analizzati con la tecnica cromatografica in esame per la ricerca di impurezze a basse concentrazioni. I campioni della serie C vengono studiati sfruttando la possibilità di lavorare con il detector PDA, che permette un'acquisizione simultanea dei cromatogrammi a tutte le lunghezze d'onda. Il metodo sviluppato associa ad ogni analita la lunghezza d'onda che restituisce la risposta migliore per l'identificazione e la quantificazione dello stesso all'interno della soluzione d'analisi.

3.3.1. Lavoro con colonna Phenomenex 00G-4601-E0

Il metodo di analisi è stato sviluppato utilizzando la colonna Phenomenex 00G-4601-E0 collegata alla pre-colonna PerkinElmer Browlee Guard Cartridge Holder poste all'interno del forno esterno.

3.3.1.1. Acquisition Method: CC

Di seguito l'Acquisition Method CC studiato per le analisi HPLC dei campioni della serie C.

LC300 (U)HPLC PUMP			
Initial Conditions			
Maximum Pressure (psi)	10000		
Minimum Pressure (psi)	0		
Equilibration Time (min)	5,00		
Run Time (min)	25,0		
Pump A	Solvent 1		
Pump B	Solvent 1		
Time Program			
Time (min)	Flow (mL/min)	%A	%B
0,0	1,000	80,0	20,0
10,0	1,000	46,0	54,0
12,0	1,000	46,0	54,0
15,0	1,000	0,0	100,0
25,0	1,000	0,0	100,0

Tabella 72: blocco LC300 (U)HPLC Pump - Acquisition Method CC per l'analisi dei campioni della serie C.

Il tempo totale di analisi è di 30 minuti, di cui 5 di condizionamento (*Equilibration Time*) e 25 di corsa vera e propria (*Run Time*). Alla pompa A è collegata l'acqua ultra-pura, mentre alla pompa B l'acetonitrile. Come si osserva dal *Time Program*, l'eluizione è in gradiente: si inizia con una fase mobile all'80% di acqua, dopo 15 minuti l'eluente è composto da solo acetonitrile e rimane costante per altri 10 minuti. Affinché sia garantita l'ottimale eluizione degli analiti, è necessario studiare il *Time Program* adatto ai campioni che si desidera analizzare. Sono state svolte diverse prove che hanno permesso di individuare la corretta variazione della composizione di fase mobile.

LC300 (U)HPLC AUTOSAMPLER	
Injection	
Needle Volume (µL)	15
Loop Volume (µL)	100
Syringe Volume (µL)	500
Injection Mode	Partial Loop
Sample Speed	Medium
Needle Level (mm)	6,0
Sample Pre-flush Volume (µL)	45
Enable Headspace Pressure	Disabled
Enable Air Cushion	Enabled
Air Cushion Volume (µL)	5
Temperature Control	
Enable Tray Temperature Control	Disabled
Enable Oven Temperature Control	Disabled
Pre-Sequence Flush	
Flush Port	Flush Volume (µL)
Solvent 1	500
Post-Sequence Flush	
Flush Port	Flush Volume (µL)
Solvent 1	500

Tabella 73: blocco LC300 (U)HPLC Autosampler - Acquisition Method CC per l'analisi dei campioni della serie

C.

LC300 COLUMN OVEN	
Initial Conditions	
Enable Temperature Control	Enabled
Oven Temperature Setpoint (°C)	25
Oven Temperature Tolerance (±°C)	0,5

Tabella 74: blocco LC300 Column Oven - Acquisition Method CC per l'analisi dei campioni della serie C.

La temperatura del forno esterno in cui è alloggiata la colonna è impostata a 25°C, con una possibile variazione di ±0,5°C.

LC300 PDA DETECTOR	
Initial Conditions	
Run Time (min)	25,0
Sampling Rate (Hz)	5
Channel for Live Chromatogram	
Wavelength (nm)	255

Tabella 75: blocco LC300 PDA Detector - Acquisition Method CC per l'analisi dei campioni della serie C.

La lunghezza d'onda a cui si può seguire l'acquisizione del cromatogramma, quindi l'eluizione degli analiti è 255 nm.

La colonna in uso è capace di sopportare un volume di carico di campione abbastanza elevato, quindi, nella preparazione della sequenza, l'*Injection volume*, il volume di campione che viene iniettato, è impostato a 10 µL.

3.3.1.2. Processing Method: CC PM

Il metodo di processamento creato è stato denominato *CC PM*. A differenza degli altri *Processing Method* descritti, in questo metodo, è stata associata una lunghezza d'onda di analisi diversa per ogni analita, in modo che si abbia la risposta migliore da ciascuno.

Questo approccio è dettato dall'assenza di una lunghezza d'onda unica a cui tutti gli analiti ricercati rispondono in modo ottimale, ciò limita la costruzione di rette di calibrazione che possano ricoprire gli intervalli di concentrazione richiesti. Si è studiato, quindi, il profilo di

assorbanza delle diverse sostanze e si è individuata la lunghezza d'onda per cui si ottengono picchi relativi chiari, simmetrici e ben distinguibili dal rumore di fondo.

Per gli analiti 2-butanone (MEK) e 4-metil-2-pentanone (MIBK), questa lunghezza d'onda corrisponde a quella di massimo assorbimento.

Per il perossido di idrogeno (H_2O_2), si sceglie non quella di massimo assorbimento, ma quella per cui si ottengono picchi stretti e simmetrici.

Per il dimetilftalato (DMF), specie che assorbe particolarmente nell'intervallo dell'UV-visibile, si è selezionata la lunghezza d'onda per cui i picchi relativi sui cromatogrammi non saturino il segnale, così che la quantificazione porti una percentuale d'errore inferiore.

Infine, i picchi relativi al 4-idrossi-4-metil-2-pentanone (Daa) si presentano spesso fortemente asimmetrici: la coda viene limitata scegliendo una lunghezza d'onda appropriata.

Di seguito vengono riportati gli spettri di assorbimento nell'intervallo dell'UV-visibile per gli analiti in esame.

Lo spettro riferito al perossido di idrogeno (*Figura 106*) mostra un incremento di assorbimento a 198 nm, ma la lunghezza d'onda scelta per l'analisi è 255 nm.

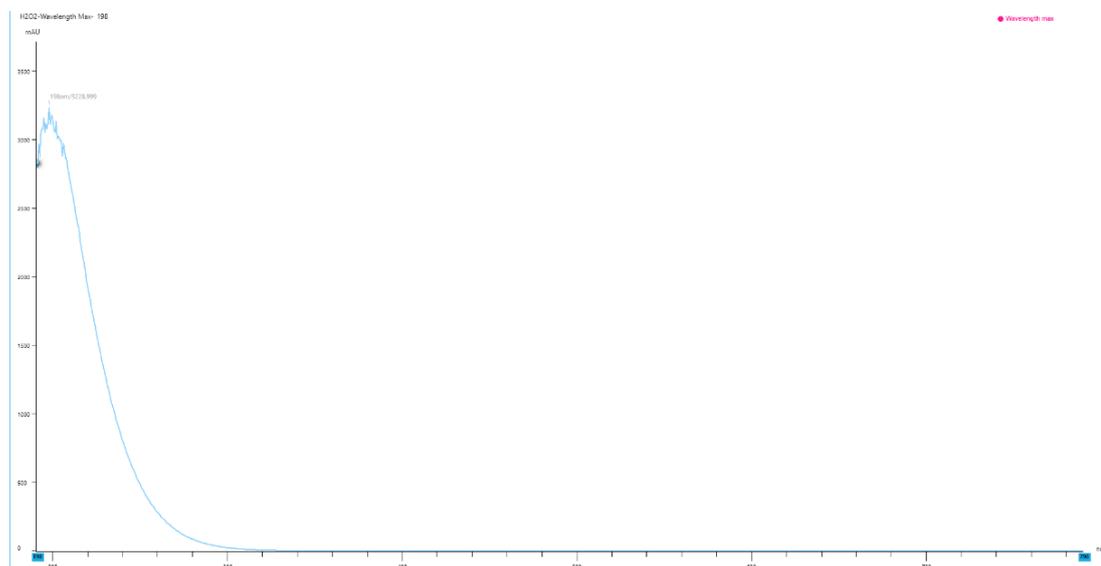


Figura 106: profilo di assorbimento nell'intervallo dell'UV-visibile per l'analita perossido di idrogeno.

Lo spettro in *Figura 106* viene riportato da 0 mAU a 1000 mAU di assorbanza e da 190 nm a 790 nm di lunghezza d'onda.

In *Figura 107* viene riportato lo spettro dell'analita dimetilftalato, in cui si può osservare l'elevato assorbimento da 190 nm a circa 275 nm; la lunghezza d'onda di analisi scelta è 290 nm.

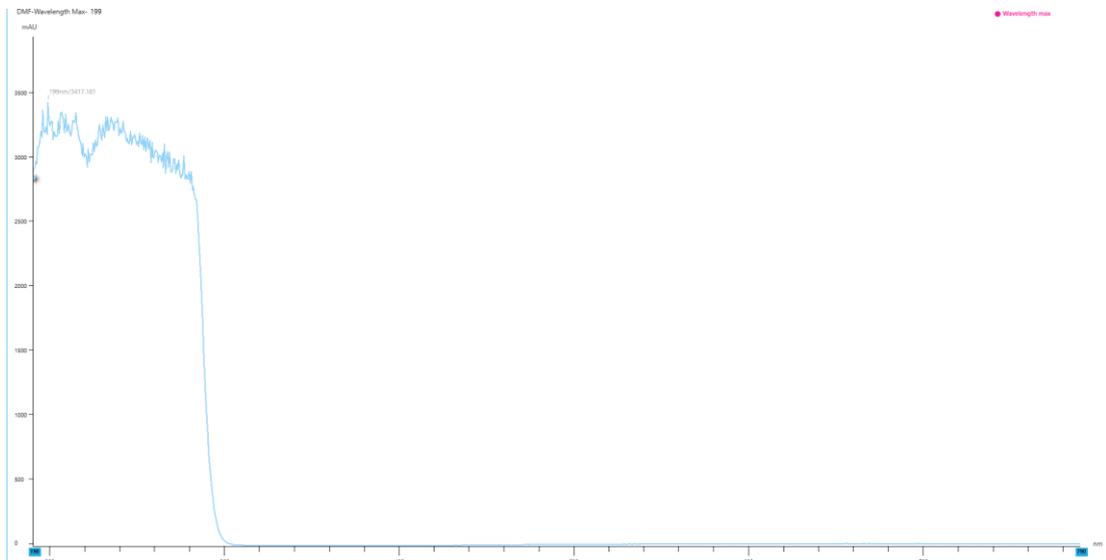


Figura 107: profilo di assorbimento nell'intervallo dell'UV-visibile per l'analita dimetilftalato.

Lo spettro in *Figura 107* viene riportato da 0 mAU a 3500 mAU di assorbanza e da 190 nm a 790 nm di lunghezza d'onda.

Per il 4-idrossi-4-metil-2-pentanone, la lunghezza d'onda di massimo assorbimento corrisponde a 278 nm, ma quella scelta per l'analisi è 193 nm.

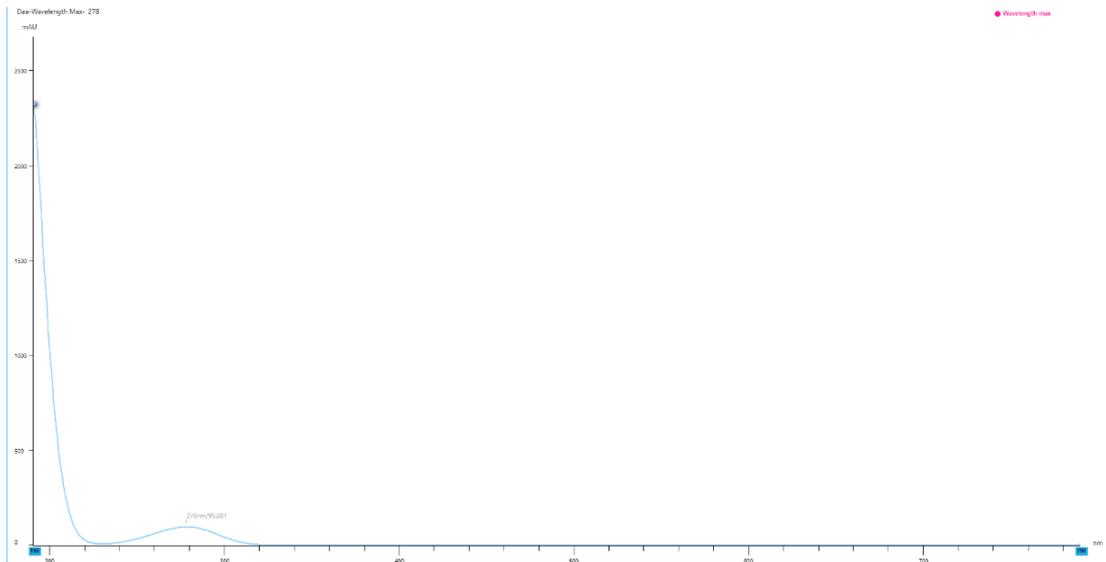


Figura 108: profilo di assorbimento nell'intervallo dell'UV-visibile per l'analita 4-idrossi-4-metil-2-pentanone.

Lo spettro in *Figura 108* viene riportato da 0 mAU a 3000 mAU di assorbanza e da 190 nm a 790 nm di lunghezza d'onda.

Riguardo l'analita 2-butanone, la lunghezza d'onda di analisi corrisponde a quella di massimo assorbimento, ovvero 269 nm. In questo modo si assicura la corretta individuazione del picco che si distingue perfettamente dal rumore di fondo.

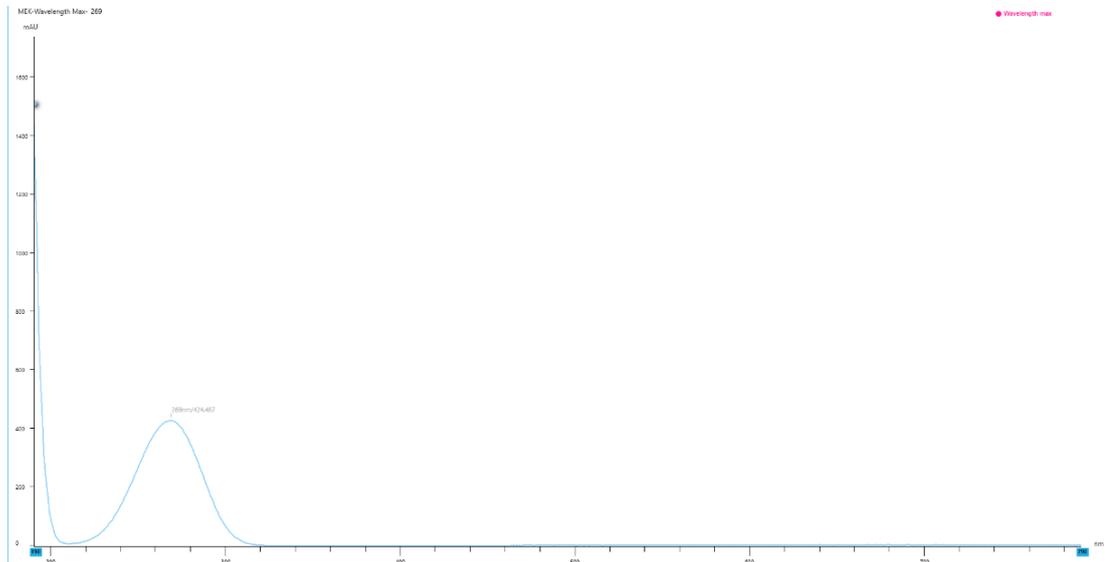


Figura 109: profilo di assorbimento nell'intervallo dell'UV-visibile per l'analita 2-butanone.

Lo spettro in *Figura 109* viene riportato da 0 mAU a 1000 mAU di assorbanza e da 190 nm a 790 nm di lunghezza d'onda.

Per risaltare il picco relativo all'analita 4-metil-2-pentanone rispetto al rumore di fondo, la lunghezza d'onda scelta per l'analisi corrisponde a quella di massimo assorbimento, ovvero 276 nm.

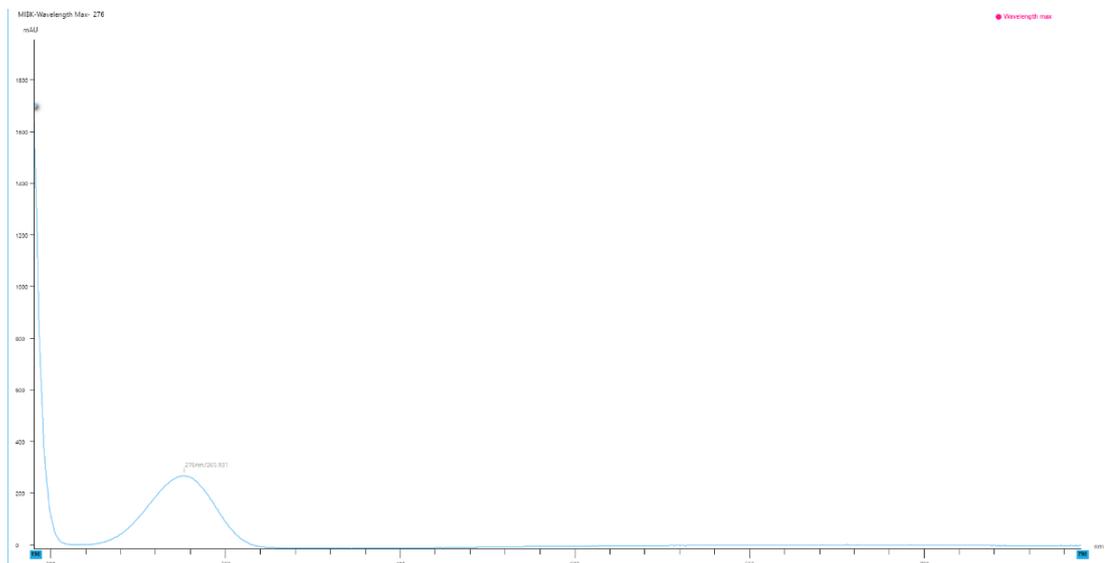


Figura 110: profilo di assorbimento nell'intervallo dell'UV-visibile per l'analita 4-metil-2-pentanone.

Lo spettro in *Figura 110* viene riportato da 0 mAU a 1800 mAU di assorbanza e da 190 nm a 790 nm di lunghezza d'onda.

La messa a punto di questo metodo di processamento prevede che si studino i parametri base per ogni canale di lunghezza d'onda aggiunto che permettano la migliore elaborazione dei cromatogrammi.

INTEGRATION PARAMETERS	
H₂O₂ - PDA-255	
Basic Parameters	
Bunching Factor [Pts]	2
Noise Threshold	488
Area Threshold	2445
DMF - PDA-290	
Basic Parameters	
Bunching Factor [Pts]	5
Noise Threshold	2009
Area Threshold	10049
Daa - PDA-193	
Basic Parameters	
Bunching Factor [Pts]	3
Noise Threshold	740
Area Threshold	3704
MEK - PDA-269	
Basic Parameters	
Bunching Factor [Pts]	4
Noise Threshold	1114
Area Threshold	5573
MIBK - PDA-276	
Basic Parameters	
Bunching Factor [Pts]	5
Noise Threshold	798
Area Threshold	3991

Tabella 76: blocco Integration Parameters - Processing Method CC PM per l'analisi dei campioni della serie C.

COMPOUND TABLE					
Compounds		Channel	Expected RT (min)	Absolute Window (s)	Relative Window (%)
Perossido di idrogeno	H ₂ O ₂	PDA-255	2,426	12	3
Dimetilftalato	DMF	PDA-290	3,420	12	3
4-idrossi-4-metil-2-pentanone	Daa	PDA-193	4,480	12	3
2-butanone	MEK	PDA-269	9,423	12	3
4-metil-2-pentanone	MIBK	PDA-276	10,312	12	3

Tabella 77: blocco Compound Table - Processing Method CC PM per l'analisi dei campioni della serie C.

All'interno dei parametri modificabili del *Processing Method* si inserisce, come unità di misura di restituzione del dato, la percentuale.

3.3.1.3. Rette di calibrazione

Gli analiti ricercati all'interno della serie in esame di cui si vuole conoscere la concentrazione sono: perossido di idrogeno (H₂O₂), dimetilftalato (DMF), 4-idrossi-4-metil-2-pentanone (Daa), 2-butanone (MEK) e 4-metil-2-pentanone (MIBK). Le soluzioni di standard sono state preparate pesando l'analita all'interno di un matraccio tarato e portando a volume con acetonitrile, come descritto nel *Capitolo 2*.

Di seguito vengono riportate le rette di calibrazione ottenuti per tutti gli analiti di interesse.

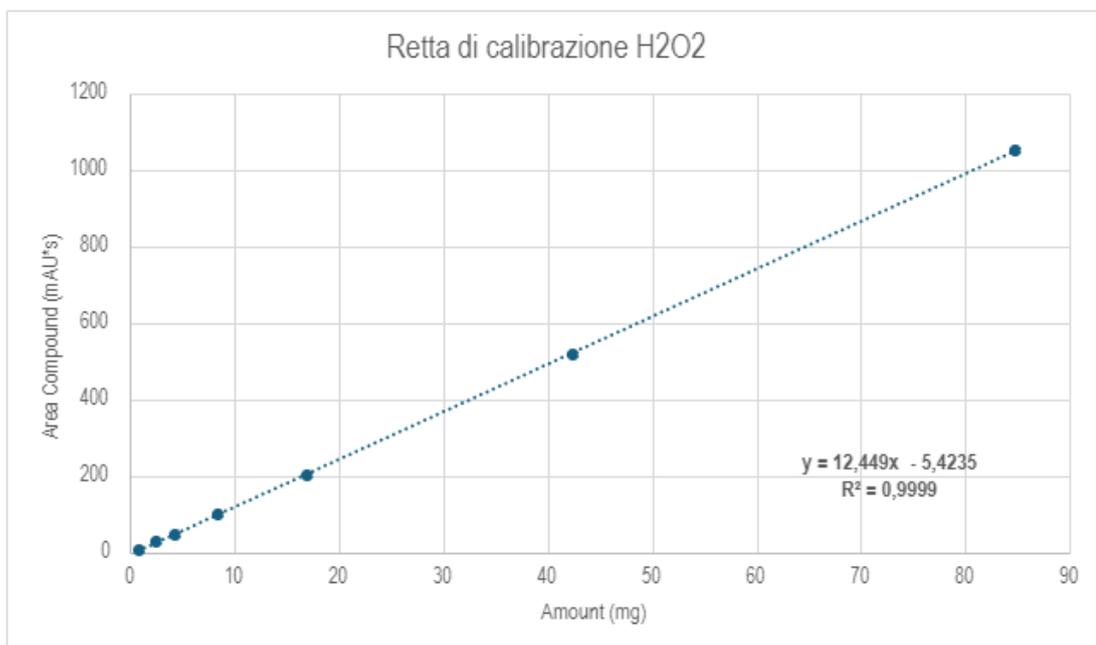


Figura 111: retta di calibrazione costruita per il perossido di idrogeno con Acquisition Method CC e Processing Method CC PM.

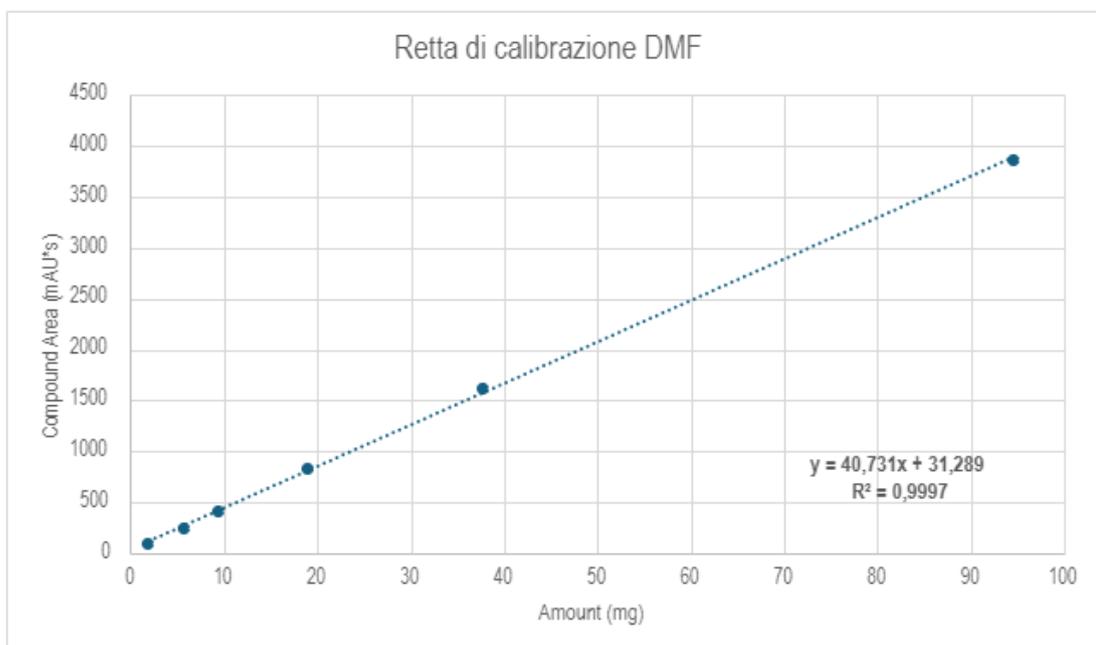


Figura 112: retta di calibrazione costruita per il dimetilftalato con Acquisition Method CC e Processing Method CC PM.

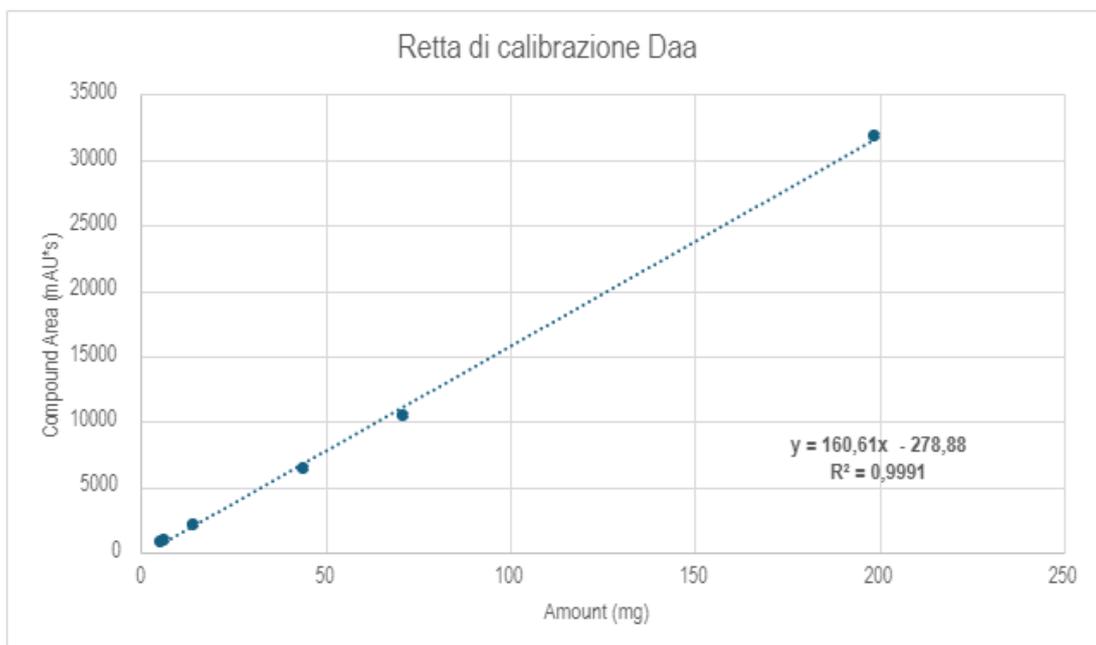


Figura 113: retta di calibrazione costruita per il 4-idrossi-4-metil-2-pentanone con Acquisition Method CC e Processing Method CC PM.

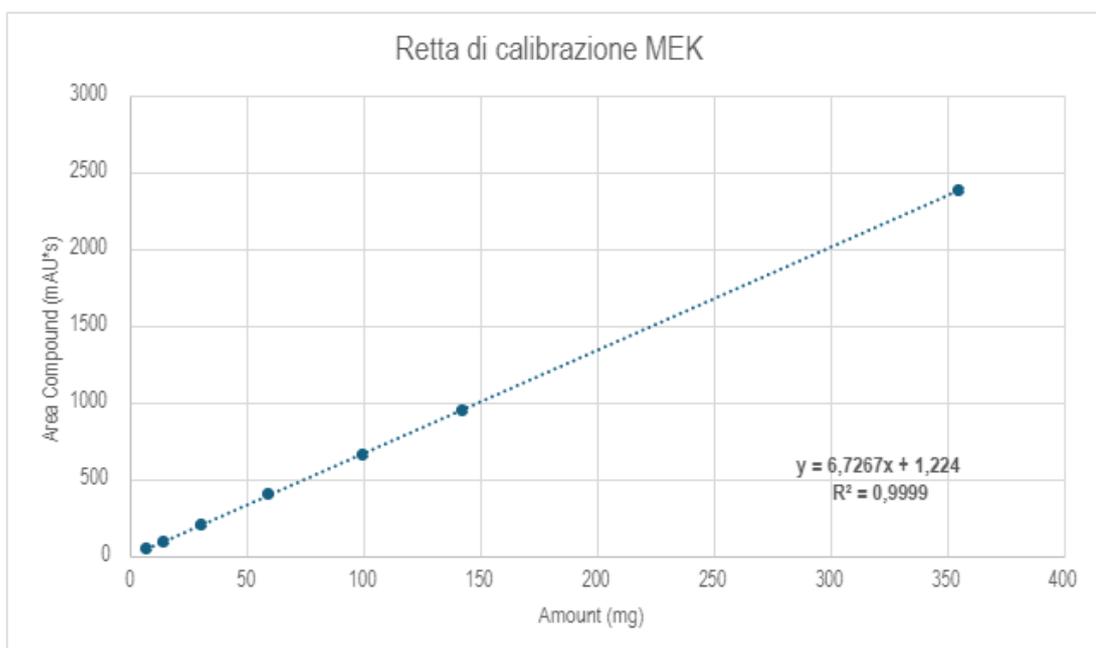


Figura 114: retta di calibrazione costruita per il 2-butanone con Acquisition Method CC e Processing Method CC PM.

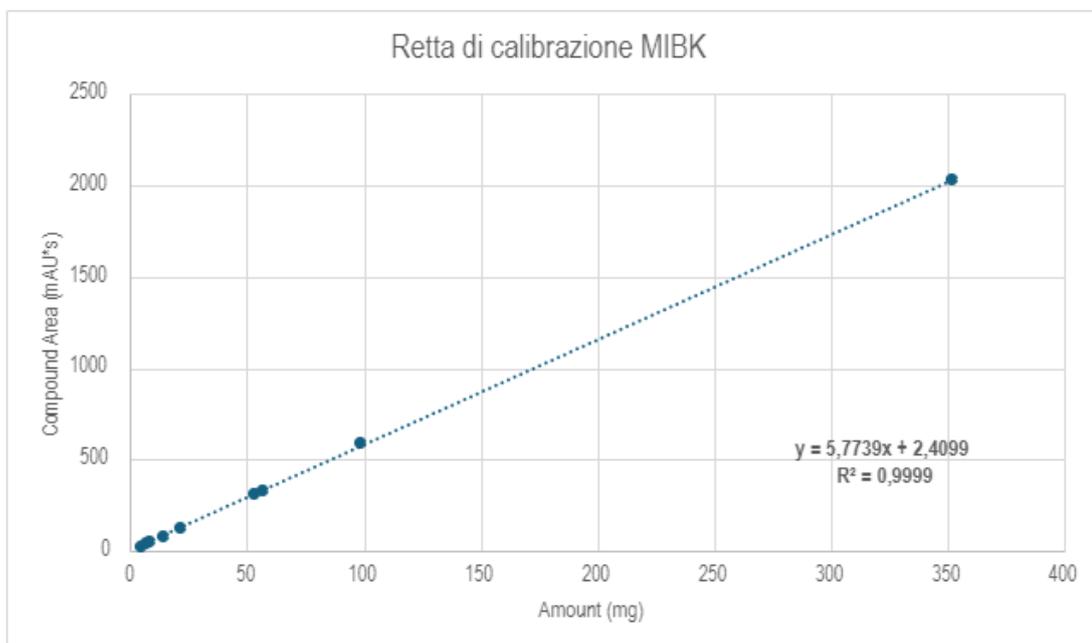


Figura 115: retta di calibrazione costruita per il 4-metil-2-pentanone con Acquisition Method CC e Processing Method CC PM.

Di seguito si riporta una tabella riassuntiva dei dati rilevanti ottenuti dalla costruzione delle rette di calibrazione.

Analita	R²	Equazione della retta	Limite inferiore (mg)	Limite superiore (mg)
H ₂ O ₂	0,9999	y=12,449x-5,4235	0,8477	84,7700
DMF	0,9997	y=40,731x+31,289	1,8707	94,5351
Daa	0,9991	y=160,61x-278,88	4,9616	198,4752
MEK	0,9999	y=6,7267x+1,224	4,7124	354,5190
MIBK	0,9999	y=5,7739x+2,4099	4,2555	351,7950

Tabella 78: tabella riassuntiva dei dati rilevanti ottenuti dalla costruzione delle rette di calibrazione con Acquisition Method CC e Processing Method CC PM.

Le rette costruite presentano tutte un $R^2 \geq 0,9993$. L'ottima linearità assicura una corretta estrapolazione dei dati di concentrazione degli analiti dall'interpolazione dell'intensità del segnale ottenuto con la retta. È possibile creare rette di calibrazione che ricoprono gli intervalli di concentrazione richiesti.

3.3.1.4. Campioni analizzati

I campioni analizzati con l'*Acquisition Method* e il *Processing Method* descritti sono: CMP 11, CMP 12, CMP 13, CMP 14, CMP 15 e CMP 16. Lo scopo dell'applicazione del metodo di analisi studiato a questi campioni è quello di verificare la concentrazione degli analiti di interesse nei campioni della serie C.

CMP 11

Dall'analisi HPLC si ottengono cromatogrammi chiari e con poco rumore di fondo dai quali si riescono a rilevare e quantificare gli analiti di interesse: 2-butanone, dimetilftalato e perossido di idrogeno. L'analita 4-metil-2-pentanone, talvolta presente in alcuni campioni CMP 11, non viene rilevato nei campioni presi in esame. Le concentrazioni restituite rientrano negli intervalli coperti dalle rette di calibrazione. L'*Acquisition Method CC* e il *Processing Method CC PM* sono adatti all'analisi di questo campione.

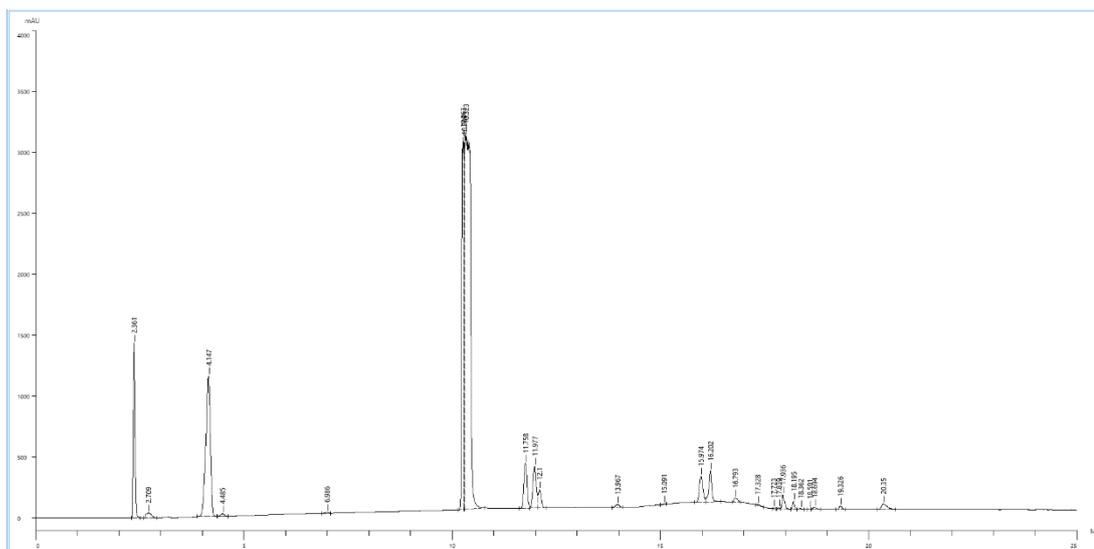


Figura 116: esempio di cromatogramma relativo all'analisi del campione CMP 11 con *Acquisition Method CC* e *Processing Method CC PM* - elaborazione del cromatogramma alla lunghezza d'onda di 193 nm.

Alla lunghezza d'onda di 193 nm non viene rilevato il 4-idrossi-4-metil-2-pentanone, quest'analita, infatti, non è presente all'interno dei campioni CMP11.

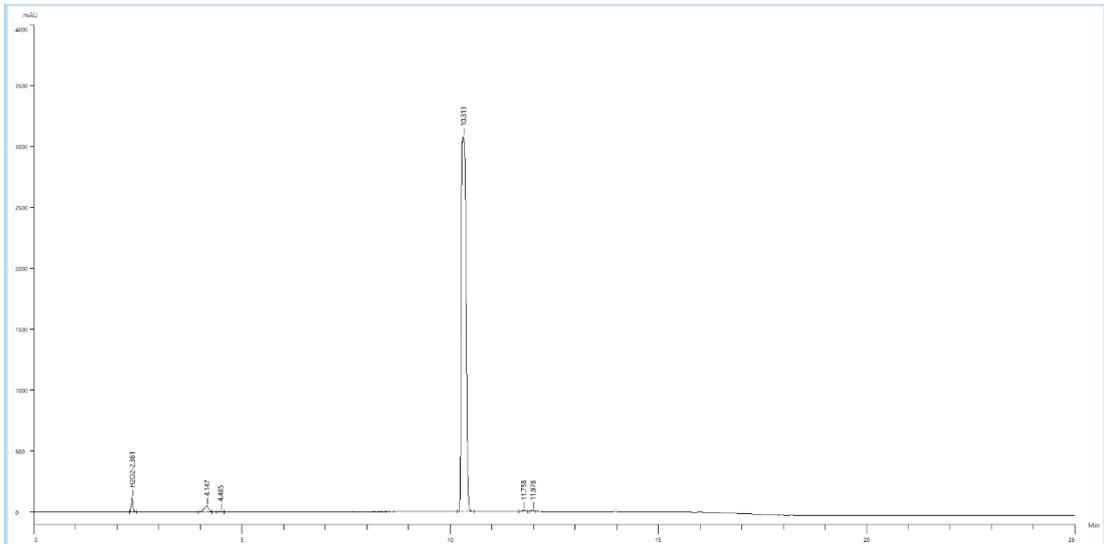


Figura 117: esempio di cromatogramma relativo all'analisi del campione CMP 11 con Acquisition Method CC e Processing Method CC PM - elaborazione del cromatogramma alla lunghezza d'onda di 255 nm.

Alla lunghezza d'onda di 255 nm è possibile mettere in evidenza, individuare e quantificare il picco relativo al perossido di idrogeno.

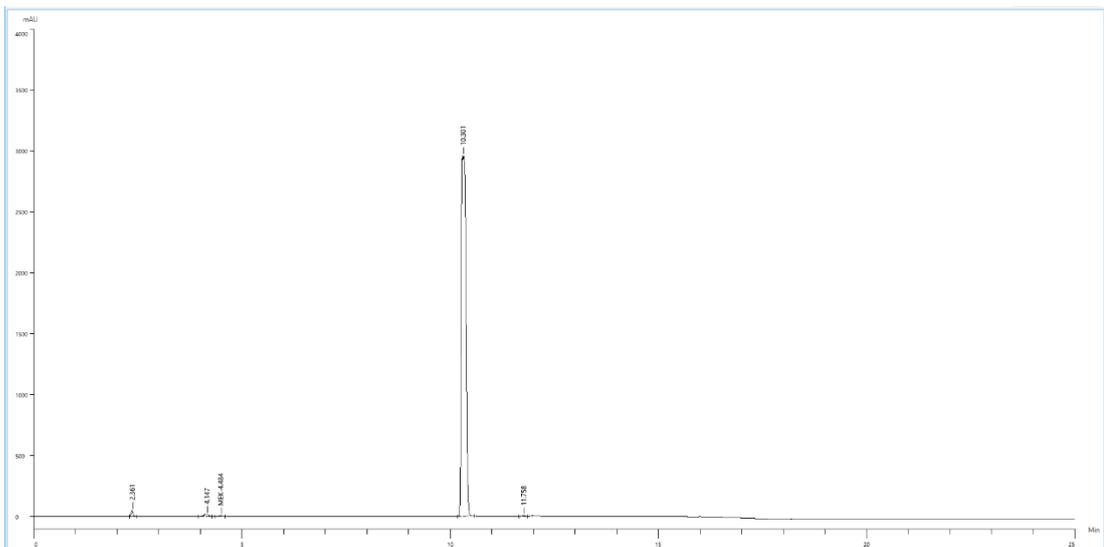


Figura 118: esempio di cromatogramma relativo all'analisi del campione CMP 11 con Acquisition Method CC e Processing Method CC PM - elaborazione del cromatogramma alla lunghezza d'onda di 269 nm.

Scegliendo la lunghezza d'onda di 269 nm è possibile ottenere per l'analita 2-butanone un picco individuabile e quantificabile.

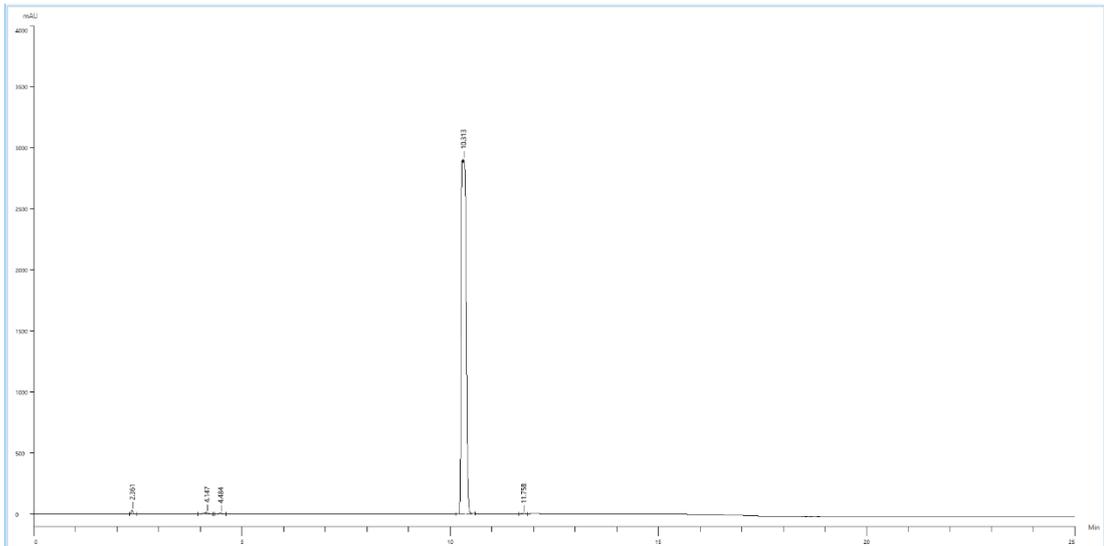


Figura 119: esempio di cromatogramma relativo all'analisi del campione CMP 11 con Acquisition Method CC e Processing Method CC PM - elaborazione del cromatogramma alla lunghezza d'onda di 276 nm.

L'analita 4-metil-2-pentanone non viene rilevato, nonostante il cromatogramma venga elaborato alla sua lunghezza d'onda di massimo assorbimento.

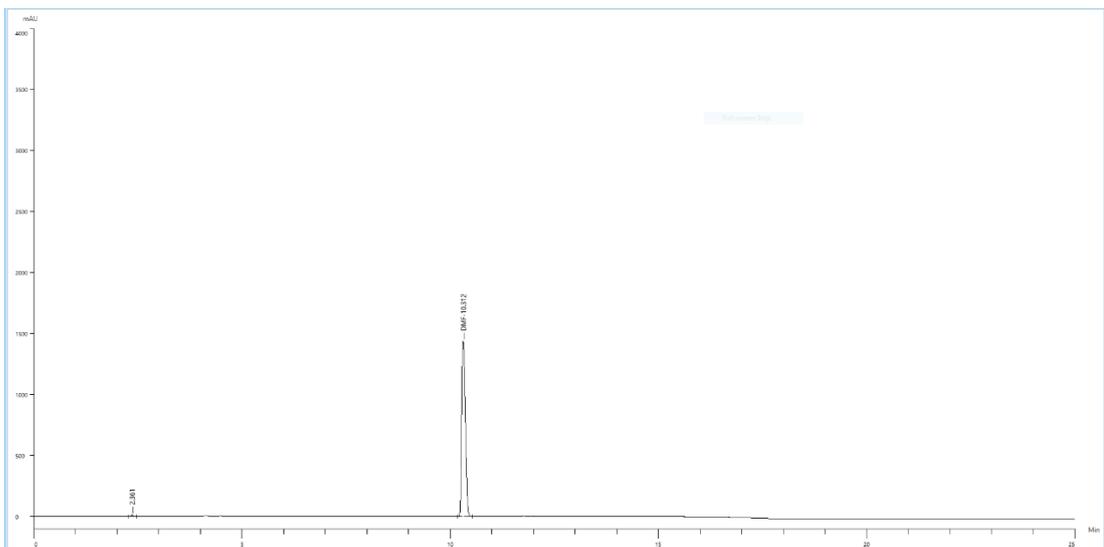


Figura 120: esempio di cromatogramma relativo all'analisi del campione CMP 11 con Acquisition Method CC e Processing Method CC PM - elaborazione del cromatogramma alla lunghezza d'onda di 290 nm.

Elaborando il cromatogramma a 290 nm, è possibile mettere in risalto il picco relativo al dimetilfitalato, senza che questo saturi il segnale come negli altri cromatogrammi.

CMP 12

All'interno dei campioni CMP 12 si vogliono individuare e quantificare il 4-idrossi-4-metil-2-pentanone e il perossido di idrogeno. Per quest'ultimo analita, sia il metodo di acquisizione che quello di processamento sono ottimali per la sua identificazione e quantificazione. Per quanto riguarda il primo, invece, si osservano picchi larghi e asimmetrici che, comunque, non impediscono la costruzione delle rette di calibrazione e la rilevazione e quantificazione della specie. I dati di concentrazione restituiti rientrano negli intervalli coperti dalle rette di calibrazione.

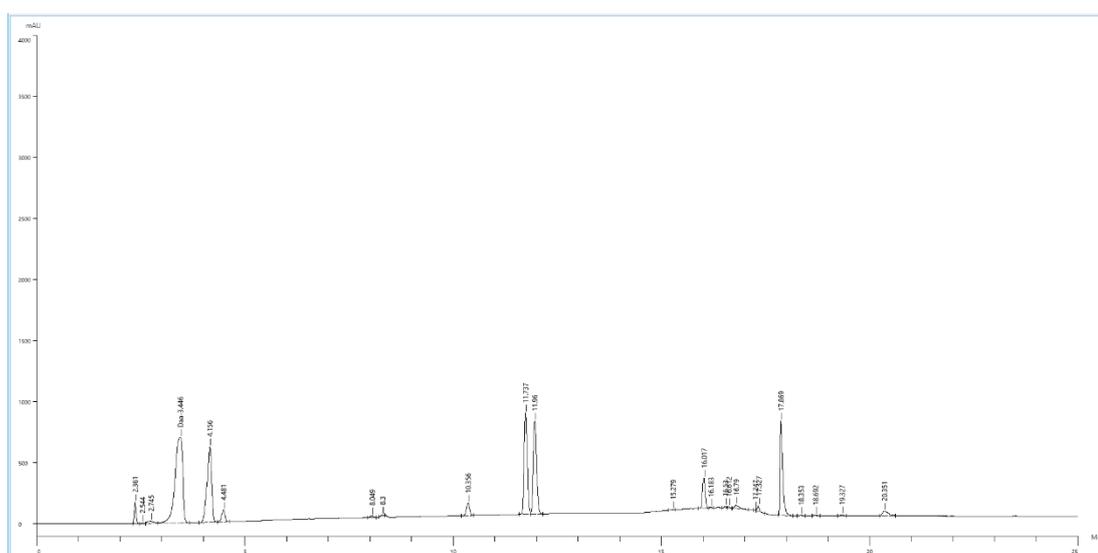


Figura 121: esempio di cromatogramma relativo all'analisi del campione CMP 12 con Acquisition Method CC e Processing Method CC PM - elaborazione del cromatogramma alla lunghezza d'onda di 193 nm.

Alla lunghezza d'onda di 193 nm viene messo in evidenza il picco relativo al 4-idrossi-4-metil-2-pentanone, nonostante presenti una notevole asimmetria in fronting, è comunque possibile la sua quantificazione.

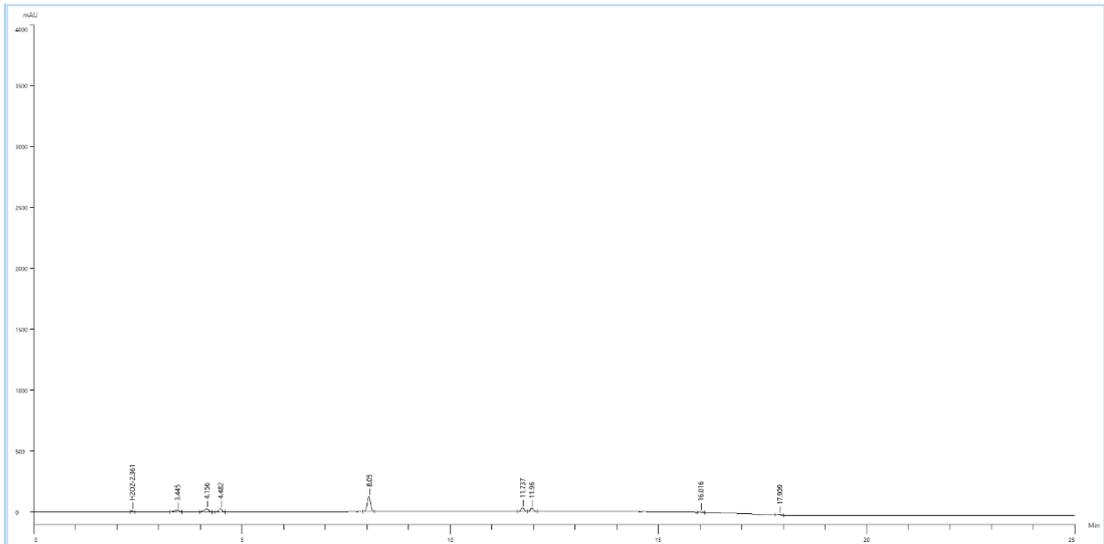


Figura 122: esempio di cromatogramma relativo all'analisi del campione CMP 12 con Acquisition Method CC e Processing Method CC PM - elaborazione del cromatogramma alla lunghezza d'onda di 255 nm.

Nel cromatogramma elaborato alla lunghezza d'onda di 255 nm, risalta il picco relativo al perossido di idrogeno.

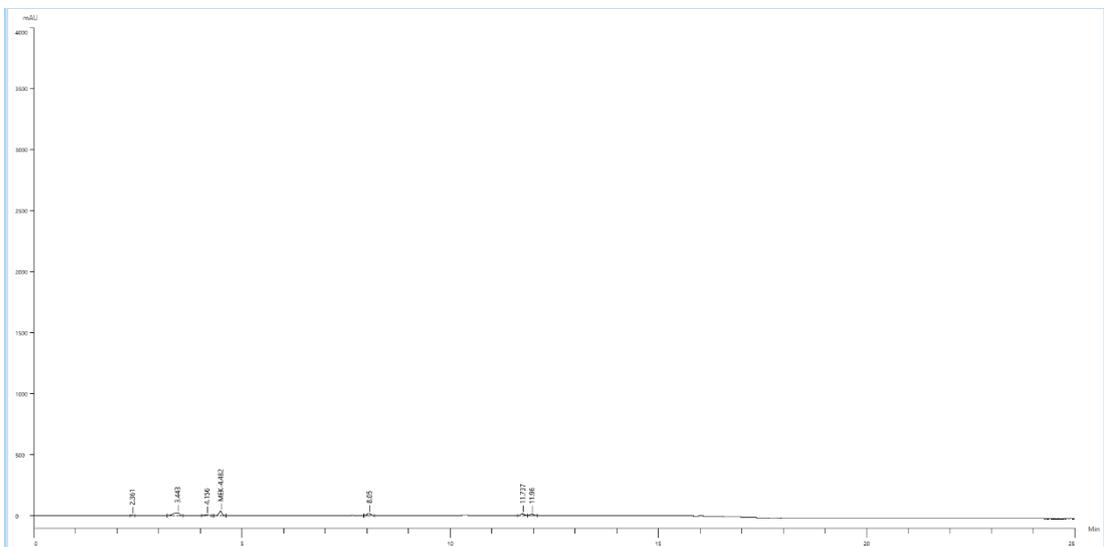


Figura 123: esempio di cromatogramma relativo all'analisi del campione CMP 12 con Acquisition Method CC e Processing Method CC PM - elaborazione del cromatogramma alla lunghezza d'onda di 269 nm.

Per l'analisi che è stata presa d'esempio, all'interno del campione in esame, viene rilevata a 269 nm una bassa concentrazione di 2-butanone. Questo sottolinea l'importanza di poter elaborare i cromatogrammi a posteriori scegliendo la lunghezza d'onda capace di mettere in evidenza anche i picchi relativi ad analiti meno concentrati.

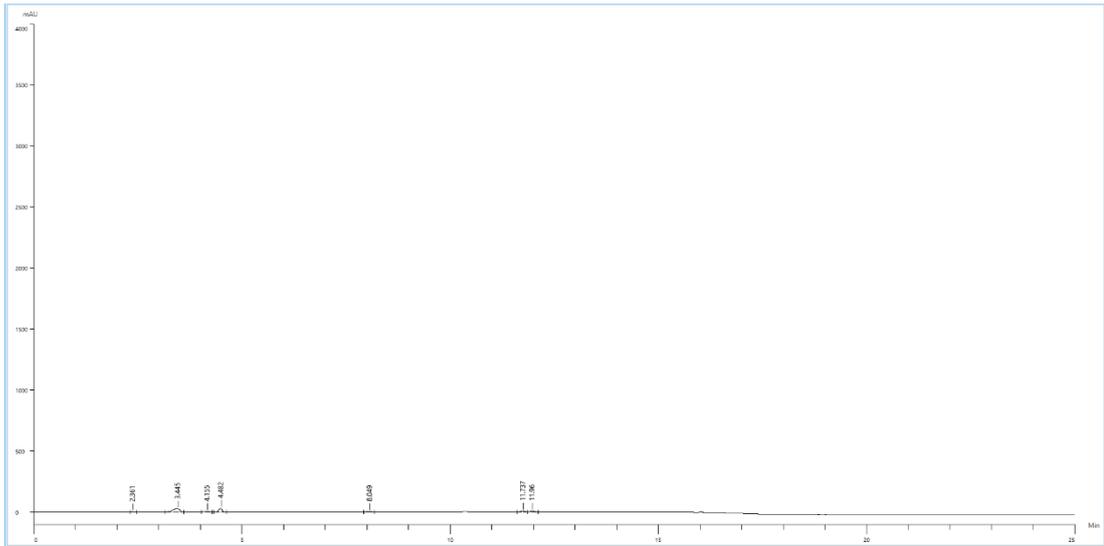


Figura 124: esempio di cromatogramma relativo all'analisi del campione CMP 12 con Acquisition Method CC e Processing Method CC PM - elaborazione del cromatogramma alla lunghezza d'onda di 276 nm.

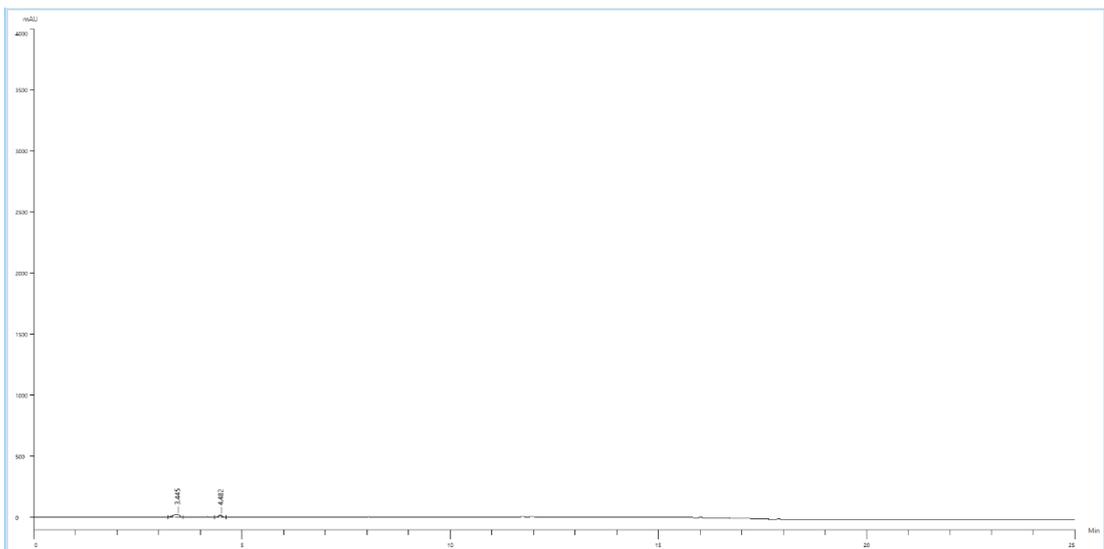


Figura 125: esempio di cromatogramma relativo all'analisi del campione CMP 12 con Acquisition Method CC e Processing Method CC PM - elaborazione del cromatogramma alla lunghezza d'onda di 290 nm.

CMP 13

Nel campione CMP ci si aspetta di trovare: 2-butanone, 4-idrossi-4-metil-2-pentanone e perossido di idrogeno. I cromatogrammi acquisiti testimoniano la validità dei metodi di acquisizione e di processamento studiati, gli analiti vengono tutti riconosciuti e quantificati. Nel caso del 4-idrossi-4-metil-2-pentanone, il picco relativo risulta più largo e asimmetrico, come discusso per il prodotto precedente. Le concentrazioni risultanti rientrano nell'intervallo coperto dalle rette di calibrazione.

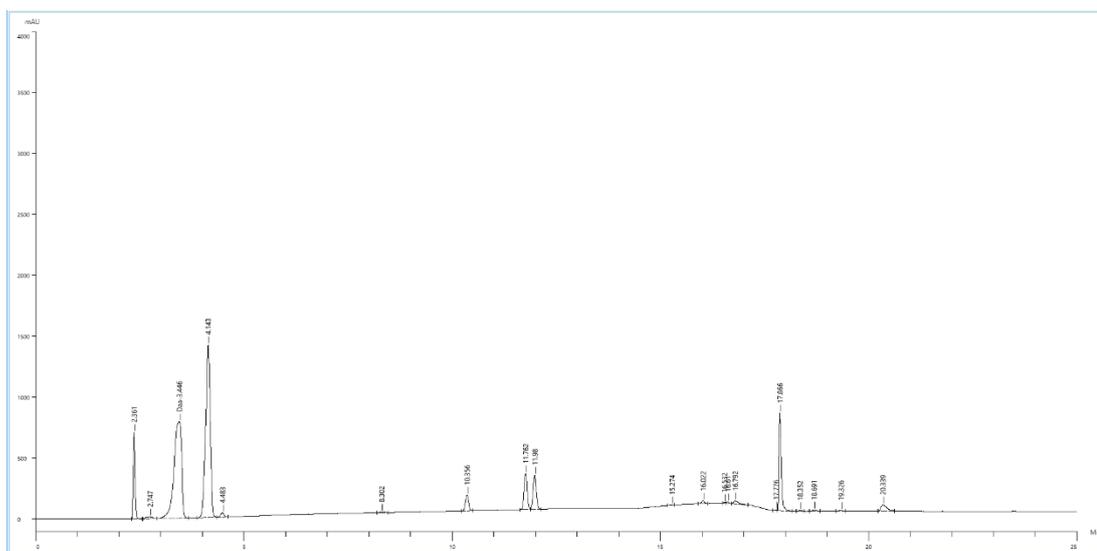


Figura 126: esempio di cromatogramma relativo all'analisi del campione CMP 13 con Acquisition Method CC e Processing Method CC PM - elaborazione del cromatogramma alla lunghezza d'onda di 193 nm.

Anche per il campione CMP 12, il picco riferito all'analita 4-idrossi-4-metil-2-pentanone viene messo in risalto a 193 nm ma si presenta con una asimmetria in fronting che non ne limita comunque la quantificazione.

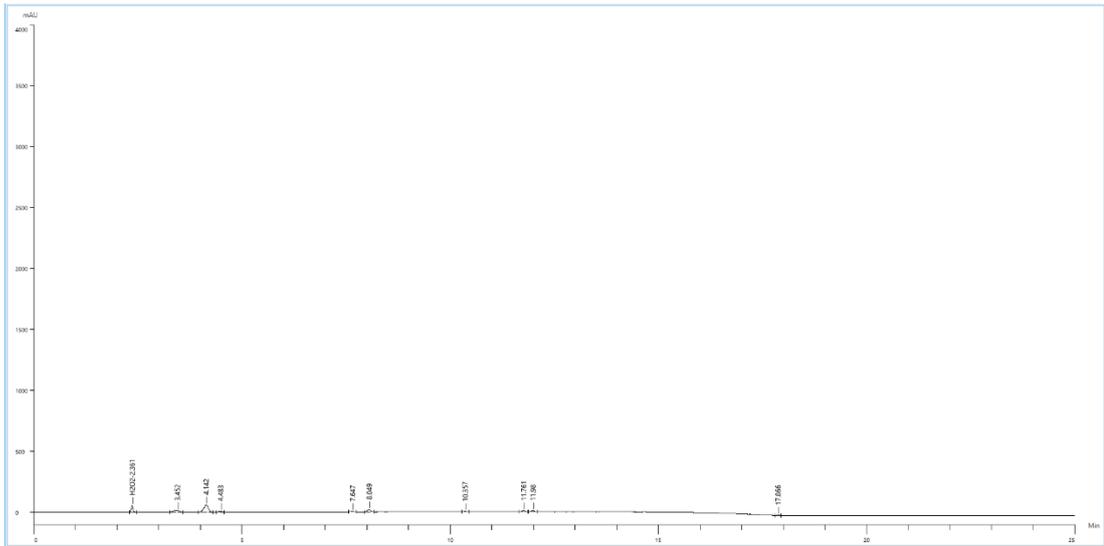


Figura 127: esempio di cromatogramma relativo all'analisi del campione CMP 13 con Acquisition Method CC e Processing Method CC PM - elaborazione del cromatogramma alla lunghezza d'onda di 255 nm.

Dopo circa 2 minuti viene eluito il perossido d'idrogeno che si presenta con un picco ben individuabile e quantificabile.

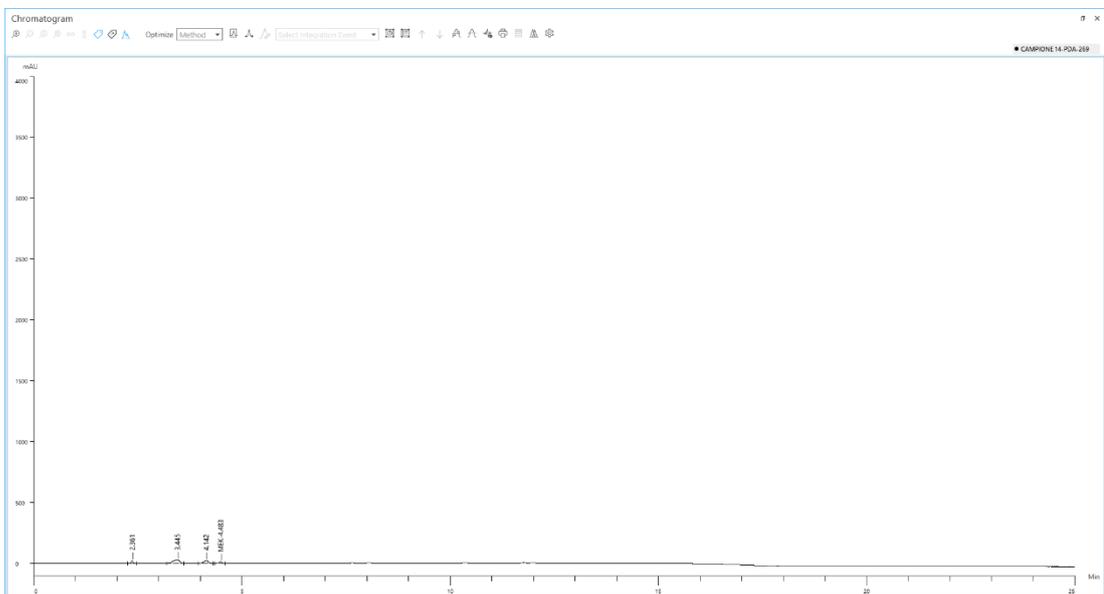


Figura 128: esempio di cromatogramma relativo all'analisi del campione CMP 13 con Acquisition Method CC e Processing Method CC PM - elaborazione del cromatogramma alla lunghezza d'onda di 269 nm.

Alla lunghezza d'onda di 269 nm viene messo in risalto il picco relativo al 2-butanone, quantificabile all'interno dei campioni CMP 13.

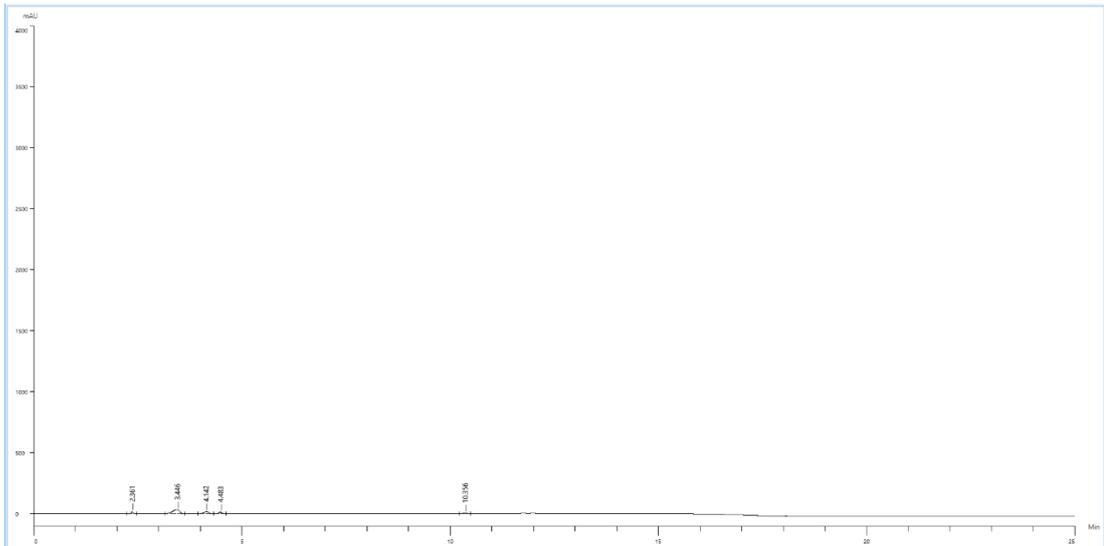


Figura 129: esempio di cromatogramma relativo all'analisi del campione CMP 13 con Acquisition Method CC e Processing Method CC PM - elaborazione del cromatogramma alla lunghezza d'onda di 276 nm.

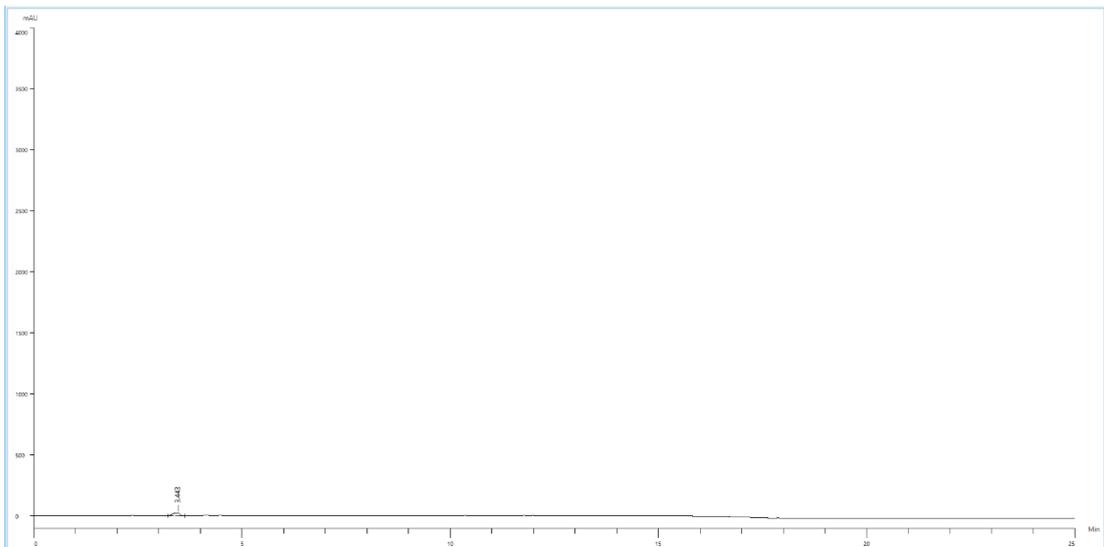


Figura 130: esempio di cromatogramma relativo all'analisi del campione CMP 13 con Acquisition Method CC e Processing Method CC PM - elaborazione del cromatogramma alla lunghezza d'onda di 290 nm.

Come ci si aspetta, non si riscontra la presenza né di 4-metil-2-pentanone né di dimetilftalato nei campioni CMP 13.

CMP 14

I metodi sviluppati per l'analisi del campione CMP 14, permettono di individuare e quantificare il 2-butanone, il dimetilftalato e il perossido di idrogeno e i risultati ottenuti rispecchiano i valori attesi.

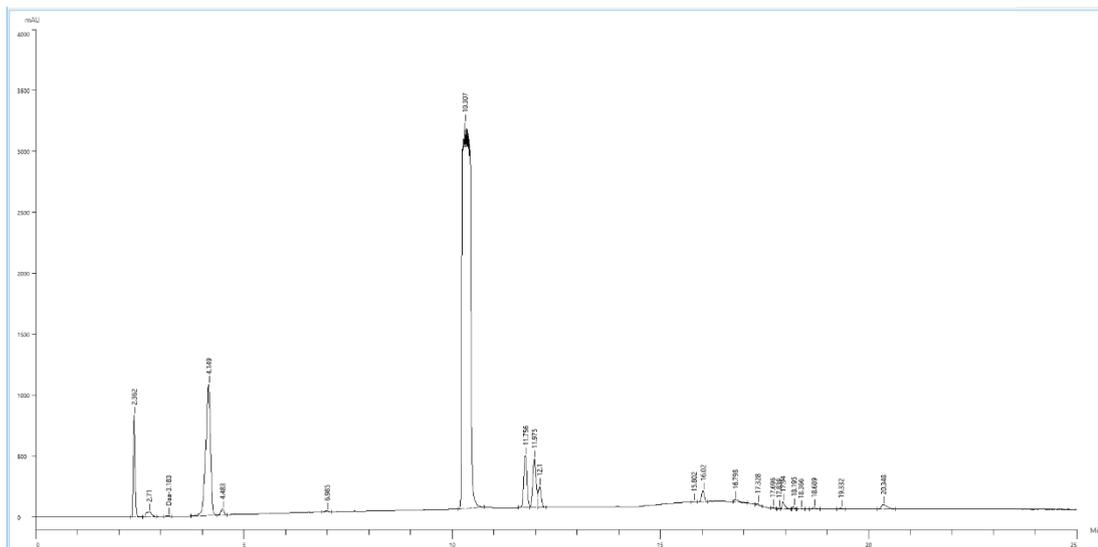


Figura 131: esempio di cromatogramma relativo all'analisi del campione CMP 14 con Acquisition Method CC e Processing Method CC PM - elaborazione del cromatogramma alla lunghezza d'onda di 193 nm.

Elaborando il cromatogramma a 193 nm si riscontra una piccola deviazione della linea di base riconducibile ad una bassa concentrazione di 4-idrossi-4-metil-2-pentanone. Ancora una volta, si sottolinea l'importanza di poter elaborare i cromatogrammi a lunghezze d'onda differenti, per rilevare sostanze con concentrazioni molto basse.

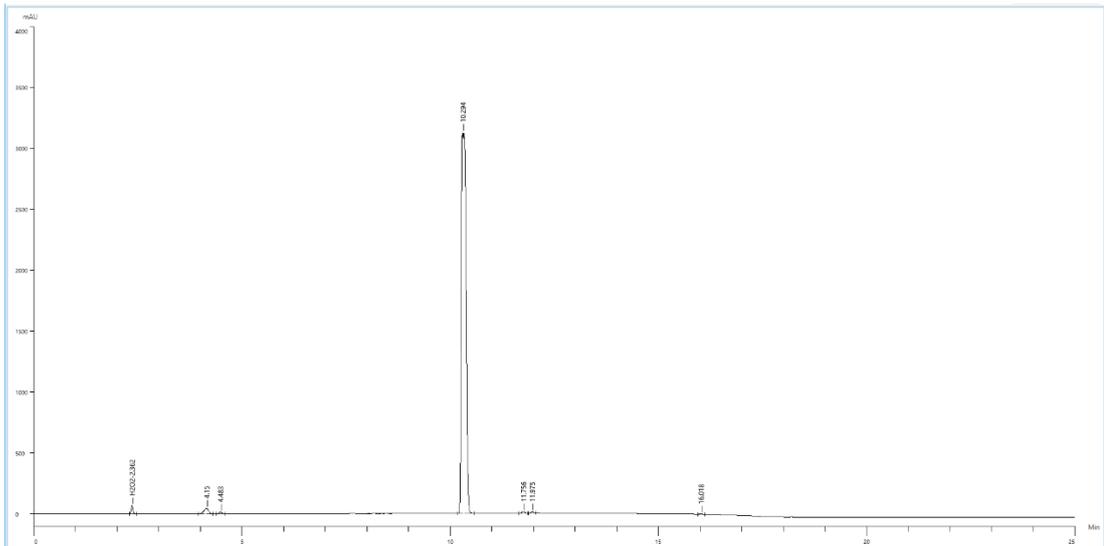


Figura 132: esempio di cromatogramma relativo all'analisi del campione CMP 14 con Acquisition Method CC e Processing Method CC PM - elaborazione del cromatogramma alla lunghezza d'onda di 255 nm.

Il picco relativo al perossido di idrogeno viene messo in evidenza elaborando il cromatogramma alla lunghezza d'onda di 255 nm.

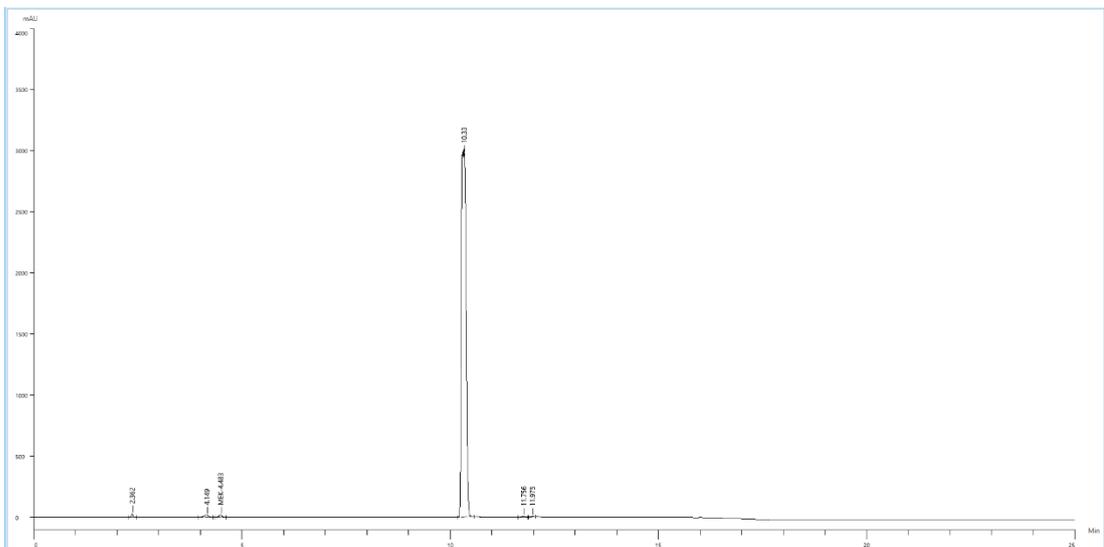


Figura 133: esempio di cromatogramma relativo all'analisi del campione CMP 14 con Acquisition Method CC e Processing Method CC PM - elaborazione del cromatogramma alla lunghezza d'onda di 269 nm.

Quantificare il 2-butanone presente all'interno dei campioni CMP 14 è facile se si elabora il cromatogramma alla lunghezza d'onda di 269 nm.

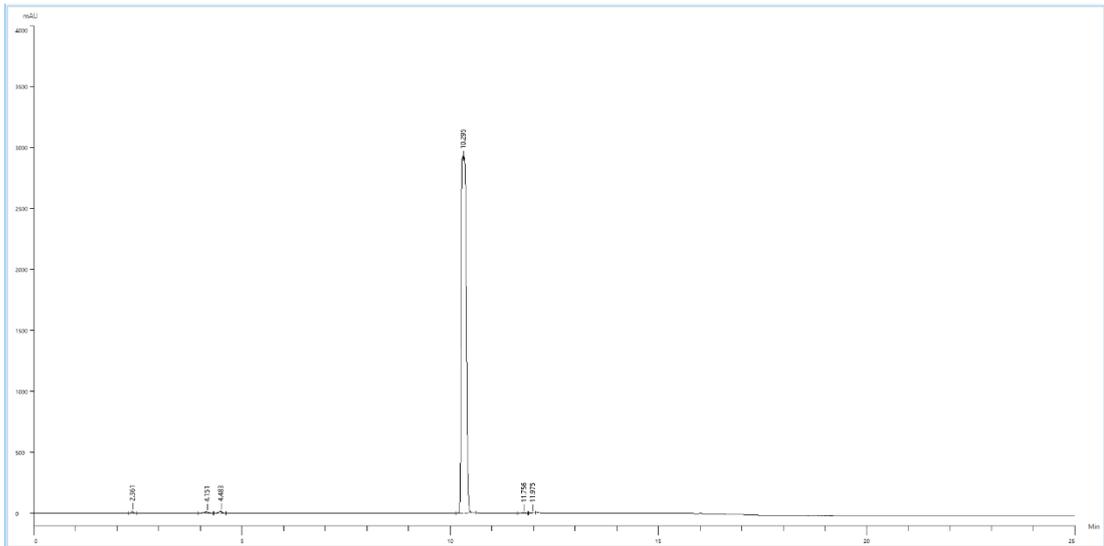


Figura 134: esempio di cromatogramma relativo all'analisi del campione CMP 14 con Acquisition Method CC e Processing Method CC PM - elaborazione del cromatogramma alla lunghezza d'onda di 276 nm.

Come atteso, l'analita 4-metil-2-pentanone non viene rilevato.

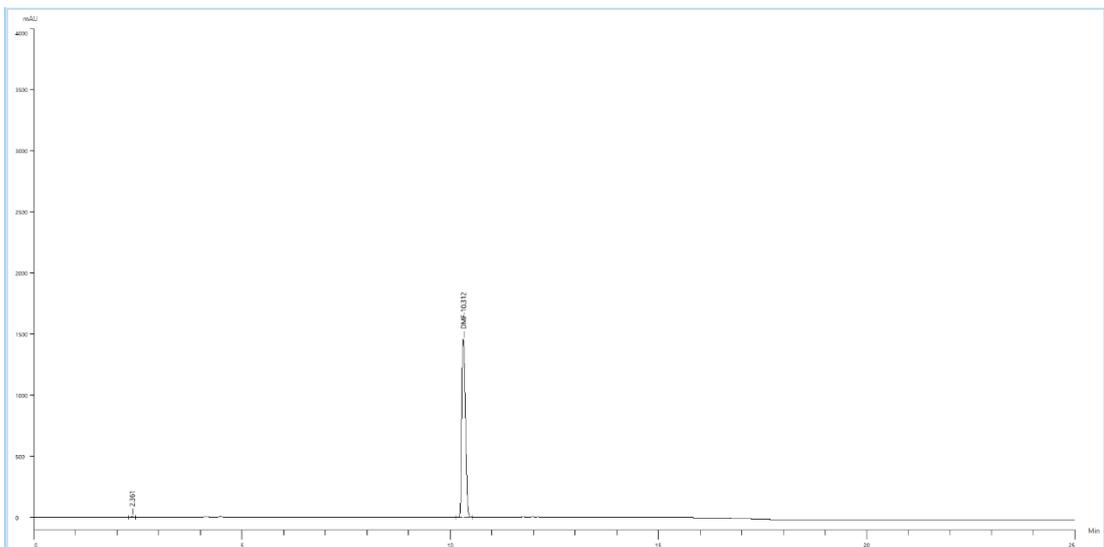


Figura 135: esempio di cromatogramma relativo all'analisi del campione CMP 14 con Acquisition Method CC e Processing Method CC PM - elaborazione del cromatogramma alla lunghezza d'onda di 290 nm.

Alla lunghezza d'onda di 290 nm, è possibile mettere in risalto il picco relativo al dimetilftalato, senza che questo saturi il segnale come negli altri cromatogrammi.

CMP 15

Nuovamente l'*Acquisition Method* e il *Processing Method* studiati risultano adatti all'analisi richiesta. Per questo prodotto si identificano e quantificano il 4-idrossi-4-metil-2-pentanone, il 4-metil-2-pentanone, il dimetilftalato e il perossido di idrogeno. Per il primo analita (*Figura 136*) vale ciò che è stato precedentemente discusso per i prodotti CMP 12 e CMP 13: il picco presenta asimmetria ma non ne limita la quantificazione.

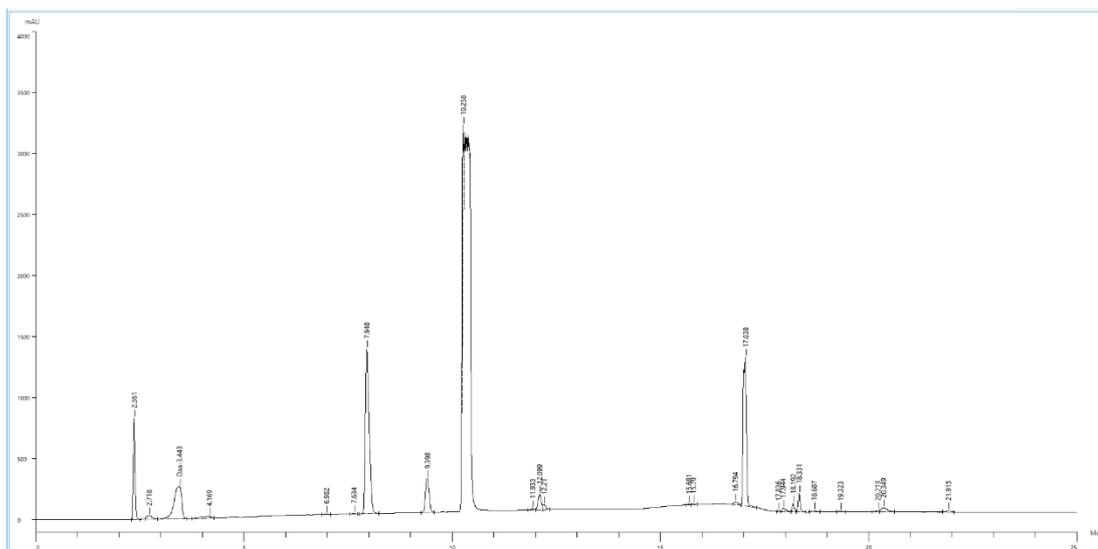


Figura 136: esempio di cromatogramma relativo all'analisi del campione CMP 15 con Acquisition Method CC e Processing Method CC PM - elaborazione del cromatogramma alla lunghezza d'onda di 193 nm.

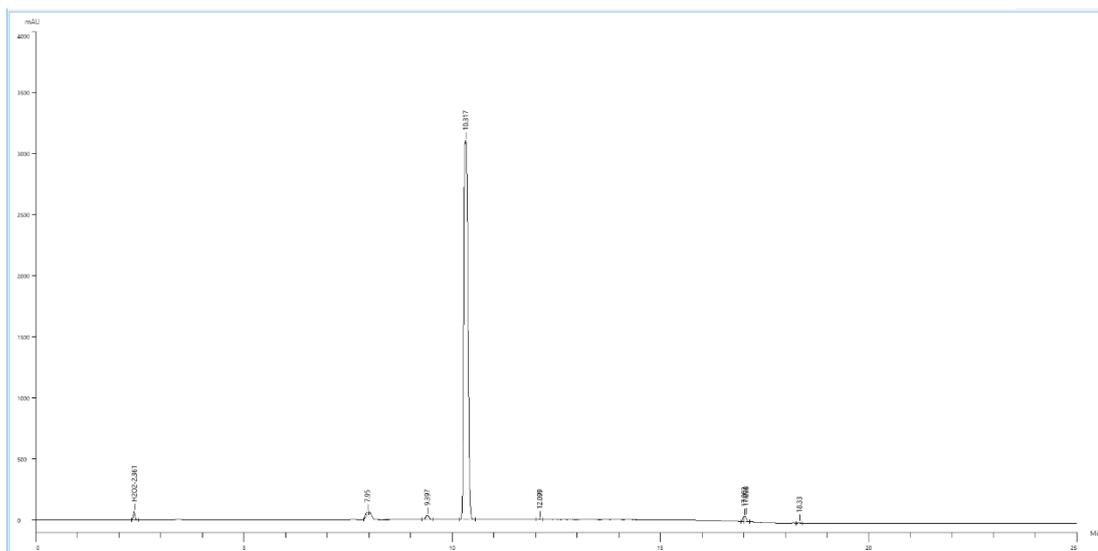


Figura 137: esempio di cromatogramma relativo all'analisi del campione CMP 15 con Acquisition Method CC e Processing Method CC PM - elaborazione del cromatogramma alla lunghezza d'onda di 255 nm.

Il perossido d'idrogeno viene eluito dopo circa 2 minuti e viene facilmente identificabile e quantificabile elaborando il cromatogramma a 255 nm.

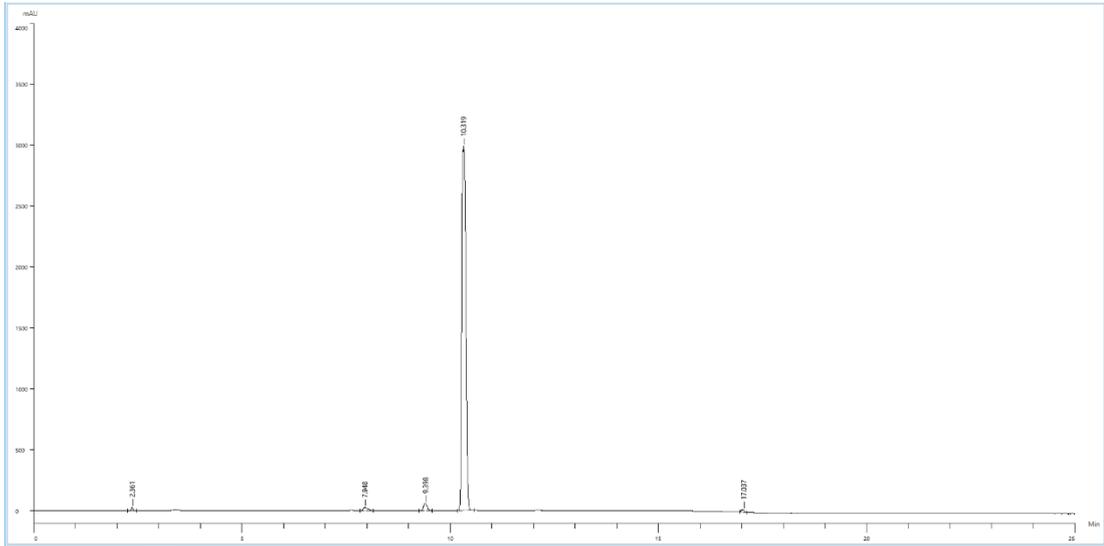


Figura 138: esempio di cromatogramma relativo all'analisi del campione CMP 15 con Acquisition Method CC e Processing Method CC PM - elaborazione del cromatogramma alla lunghezza d'onda di 269 nm.

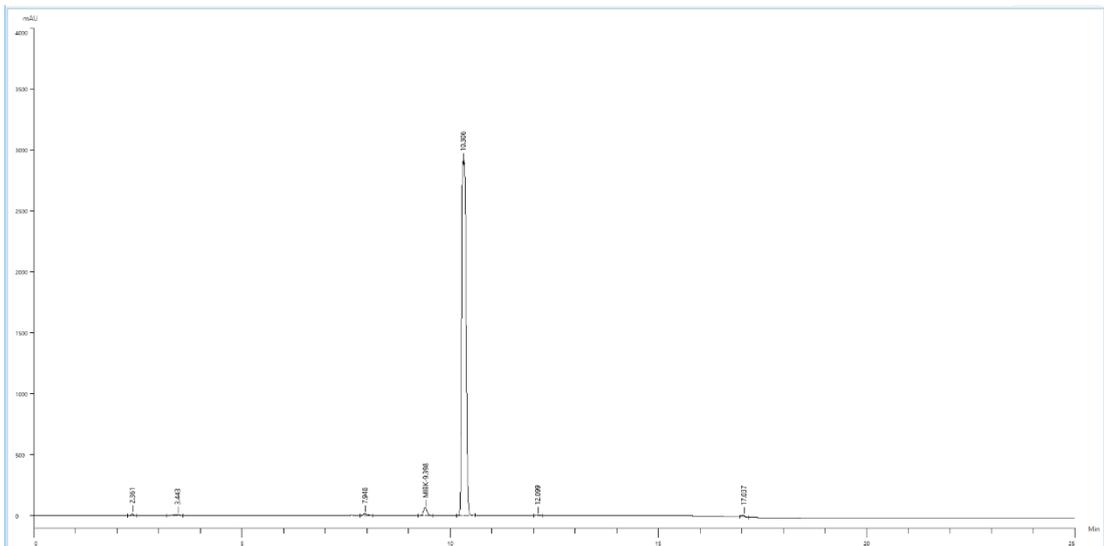


Figura 139: esempio di cromatogramma relativo all'analisi del campione CMP 15 con Acquisition Method CC e Processing Method CC PM - elaborazione del cromatogramma alla lunghezza d'onda di 276 nm.

All'interno dei campioni CMP 15 è presente l'analita 4-metil-2-pentanone che viene messo in evidenza elaborando il cromatogramma alla lunghezza d'onda di 276 nm.

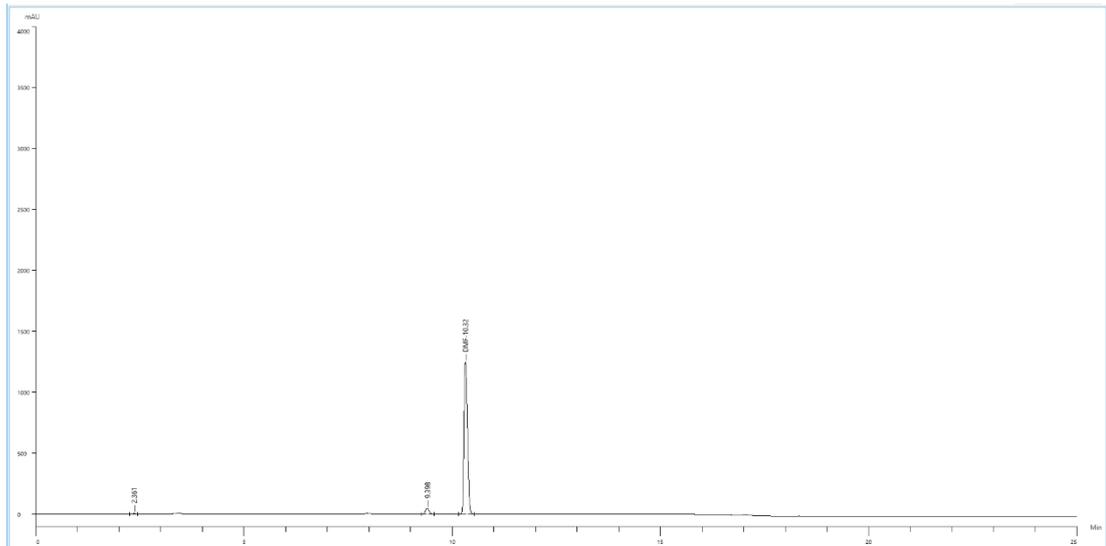


Figura 140: esempio di cromatogramma relativo all'analisi del campione CMP 15 con Acquisition Method CC e Processing Method CC PM - elaborazione del cromatogramma alla lunghezza d'onda di 290 nm.

Elaborando il cromatogramma a 290 nm, è possibile mettere in risalto il picco relativo al dimetilftalato, senza che questo saturi il segnale come negli altri cromatogrammi.

CMP 16

I cromatogrammi ottenuti per i campioni CMP 16 mostrano, nei primi otto minuti di acquisizione, indipendentemente dalla lunghezza d'onda, un caratteristico innalzamento della linea di base che non permette la corretta quantificazione di tutti gli analiti. In particolar modo, il risultato della concentrazione della specie 4-idrossi-4-metil-2-pentanone è quello più affetto da errore, seguito da quello del perossido di idrogeno. Invece, il picco del dimetilftalato non presenta nessuna variazione della linea di base. Per questo campione della serie C l'Acquisition Method CC può essere ottimizzato.

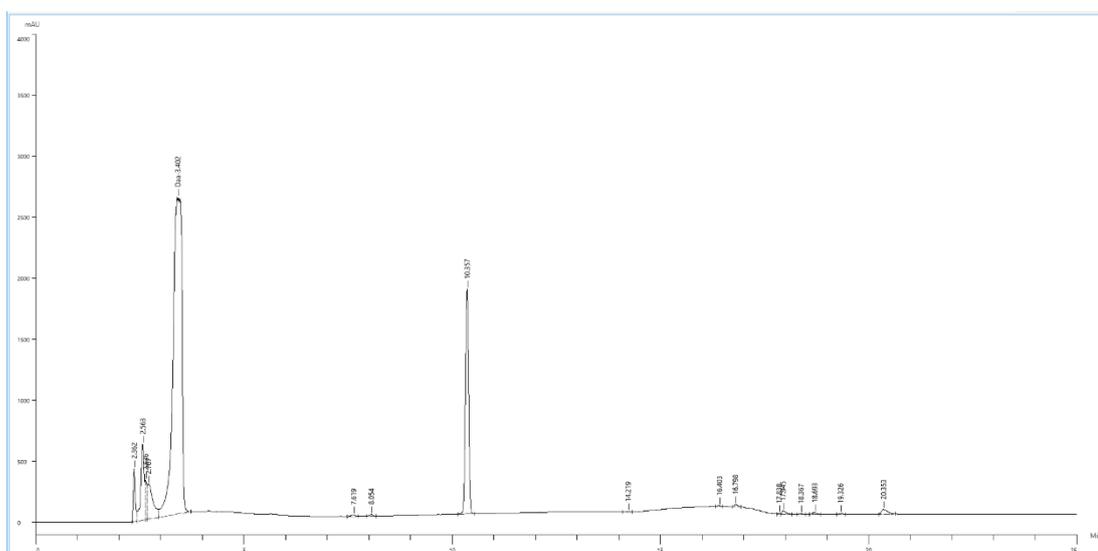


Figura 141: esempio di cromatogramma relativo all'analisi del campione CMP 16 con Acquisition Method CC e Processing Method CC PM - elaborazione del cromatogramma alla lunghezza d'onda di 193 nm.

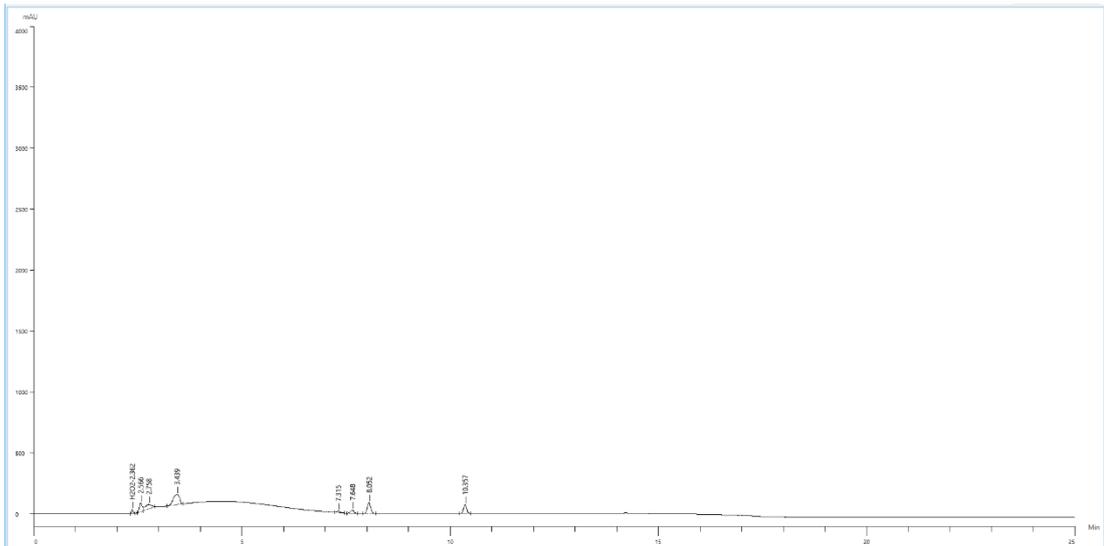


Figura 142: esempio di cromatogramma relativo all'analisi del campione CMP 16 con Acquisition Method CC e Processing Method CC PM - elaborazione del cromatogramma alla lunghezza d'onda di 255 nm.

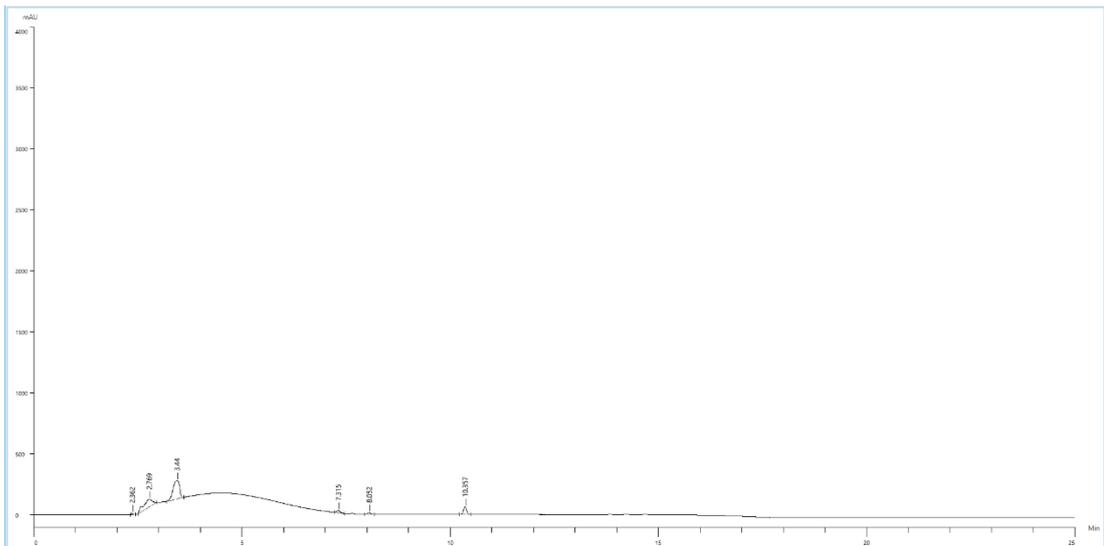


Figura 143: esempio di cromatogramma relativo all'analisi del campione CMP 16 con Acquisition Method CC e Processing Method CC PM - elaborazione del cromatogramma alla lunghezza d'onda di 269 nm.

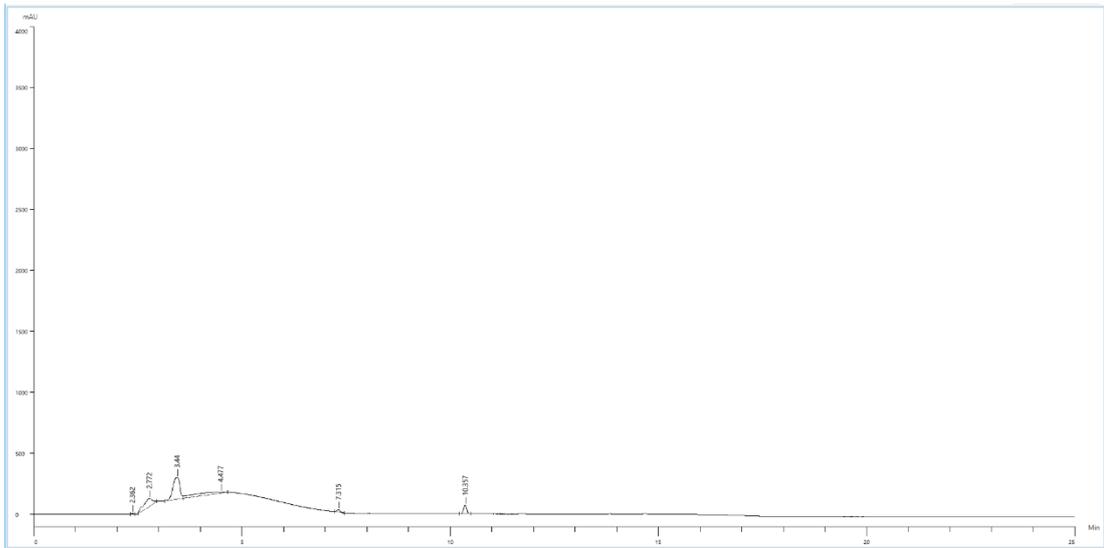


Figura 144: esempio di cromatogramma relativo all'analisi del campione CMP 16 con Acquisition Method CC e Processing Method CC PM - elaborazione del cromatogramma alla lunghezza d'onda di 276 nm.

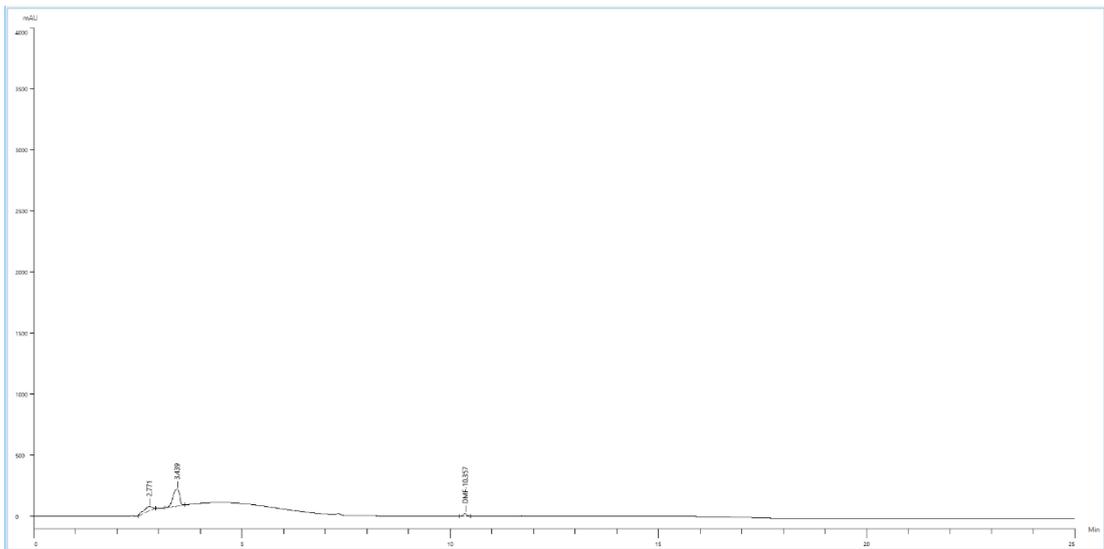


Figura 145: esempio di cromatogramma relativo all'analisi del campione CMP 16 con Acquisition Method CC e Processing Method CC PM - elaborazione del cromatogramma alla lunghezza d'onda di 290 nm.

4. CONCLUSIONI

Lo scopo della tesi è stato quello di sviluppare e ottimizzare metodi analitici cromatografici applicabili per il controllo qualità nella produzione di perossidi organici. I metodi sono stati messi a punto per lo strumento HPLC LC300 PerkinElmer associato al software SimplicityChrom™ Chromatography Data System.

Sono state utilizzate tre colonne cromatografiche diverse per le separazioni degli analiti: Phenomenex 00F-4462-E0, PerkinElmer HyperSelect BDS C18 e Phenomenex 00G-4601-E0.

Nello specifico, il lavoro di sviluppo e ottimizzazione di un metodo di analisi HPLC si fonda sulla messa a punto di:

- Acquisition Method, ovvero il metodo di acquisizione dei cromatogrammi, quindi l'insieme dei parametri che definiscono le condizioni di analisi;
- Processing Method, per l'elaborazione dei cromatogrammi acquisiti;
- Rette di calibrazione, necessarie per ottenere risultati quantitativi.

Per l'analisi dei campioni della serie A, sono stati studiati metodi di analisi HPLC utilizzando le tre colonne analitiche sopra indicate. In base alla lunghezza della colonna, è stato scelto il sistema di riscaldamento interno oppure quello esterno.

1. Con la colonna Phenomenex 00F-4462-E0, è stato possibile creare e testare metodi di acquisizione e processamento che si sono rivelati idonei per l'analisi di tutti i campioni di interesse della serie A. Inoltre, con la medesima colonna è stato studiato un ulteriore *Processing Method* dedicato alla ricerca di isopropilbenzene in concentrazioni inferiori al 0,1%.
2. Con la colonna PerkinElmer HyperSelect BDS C18 sono stati studiati l'*Acquisition Method* e il *Processing Method* per le analisi dei campioni disponibili della serie A con risultati ottimali nonostante i picchi del 2-fenil-2-propanolo e dell'acetone risultino nei cromatogrammi leggermente sovrapposti. Per ottenere una migliore separazione si è sperimentato l'utilizzo di una fase mobile di acqua e metanolo, che però non ha portato a un effettivo miglioramento del processo di eluizione.
3. Infine, con la colonna Phenomenex 00G-46-E0 sono stati messi a punto due metodi di analisi: il primo consente un'analisi veloce garantendo una buona separazione dei picchi, il secondo assicura una perfetta separazione dei picchi ma con un tempo di analisi più lungo. Il primo metodo soddisfa perfettamente le esigenze di controllo della

qualità della produzione a ciclo continuo dello stabilimento. Il secondo metodo studiato è stato pensato per analisi più specifiche sullo studio della composizione dei campioni per cui non è richiesto un immediato riscontro dei risultati.

Per l'analisi dei campioni della serie B, sono state utilizzate le colonne PerkinElmer HyperSelect BDS C18 e Phenomenex 00G-4601-E0.

1. Con la colonna PerkinElmer, il metodo di analisi sviluppato consente di verificare la presenza o l'assenza di isopropilbenzene e (2-idroperossipropan-2-il)benzene all'interno dei campioni della serie in esame. Data la natura molto complessa della matrice di questi campioni, non è stato però possibile studiare un metodo attraverso il quale correlare tutti i picchi ai relativi analiti e di conseguenza procedere con la quantificazione.
2. Invece, con la Phenomenex, grazie alla lunghezza della colonna e l'utilizzo di una temperatura di riscaldamento ottimale, si è riusciti ad ottenere la separazione dei picchi di interesse. Infatti, la colonna è stata alloggiata all'interno del forno esterno che permette di lavorare con un intervallo di temperature maggiore e quindi scegliere la temperatura in grado di ottenere la miglior separazione degli analiti. Con i metodi di acquisizione e processamento sviluppati, i cromatogrammi risultano chiari e interpretabili seppur ricchi di picchi.

Infine, l'analisi dei campioni della serie C è stata condotta solo con la colonna Phenomenex 00G-4601-E0 alloggiata nel forno esterno.

La messa a punto del *Processing Method* ha richiesto uno studio degli spettri di assorbimento degli analiti di interesse nell'intervallo dell'UV-visibile.

L'individuazione della lunghezza d'onda di massimo assorbimento per ogni analita è stata necessaria per riuscire ad ottenere segnali distinguibili dal rumore di fondo e quindi procedere con l'identificazione e la quantificazione delle singole sostanze. Conseguito questo risultato preliminare, l'*Acquisition Method* e il *Processing Method* studiati sono risultati applicabili per tutti i campioni della serie C.

In conclusione, l'attività sperimentale svolta in questo lavoro di tesi ha permesso di ottenere metodi di analisi HPLC robusti e applicabili per il controllo della qualità dei processi produttivi. Si ottengono cromatogrammi ben risolti in termini di separazione dei picchi e, mediante l'uso

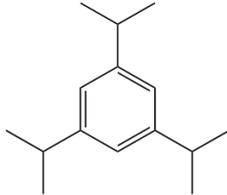
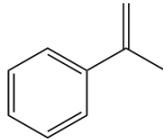
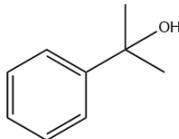
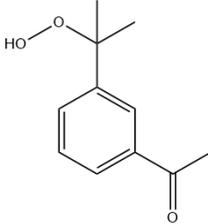
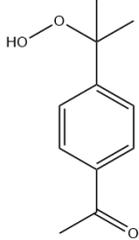
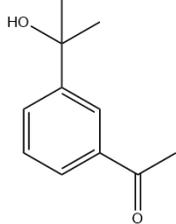
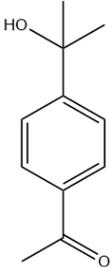
di dedicate rette di calibrazione, è possibile rilevare la presenza di analiti anche a concentrazioni molto basse, dell'ordine di pochi ppm.

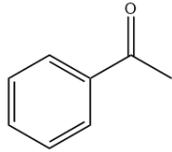
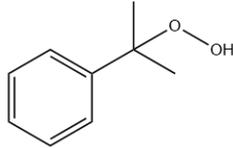
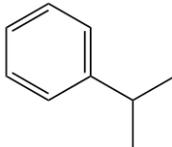
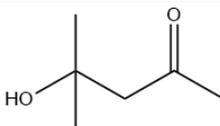
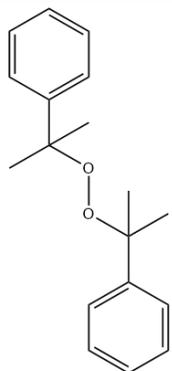
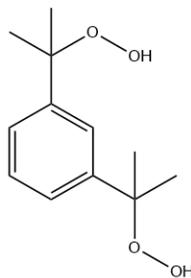
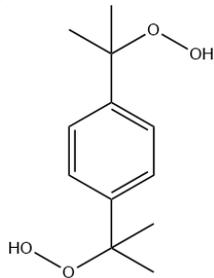
In particolare, la colonna Phenomenex 00G-4601-E0 alloggiata nel forno esterno si è dimostrata la più versatile e ha permesso l'estensione dell'analisi HPLC a tutti i campioni oggetto di studio.

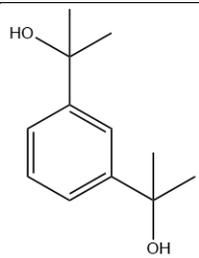
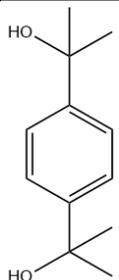
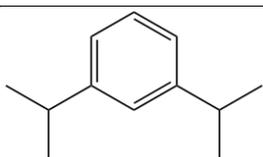
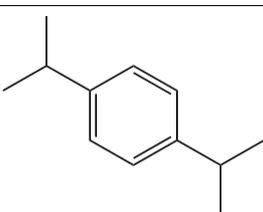
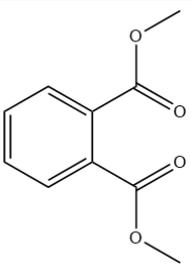
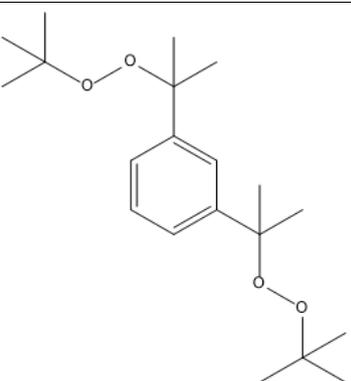
5. BIBLIOGRAFIA

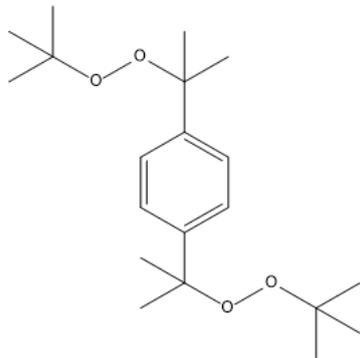
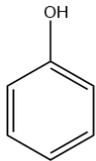
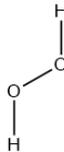
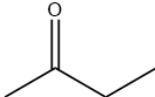
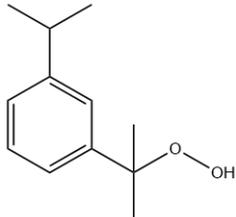
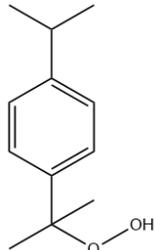
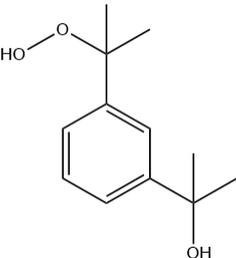
1. *La Stabilità Termica Nella Sicurezza Dei Processi Chimici Industriali Aggiornamento Della Linea Guida 'La Sicurezza Dei Reattori Chimici' (ANPA, 2000).*
2. van Deemter, J. J., Zuiderweg, F. J. & Klinkenberg, A. Longitudinal diffusion and resistance to mass transfer as causes of nonideality in chromatography. *Chem Eng Sci* **5**, 271–289 (1956).
3. <https://www.waters.com/nextgen/it/it/education/primers/beginner-s-guide-to-uplc/the-promise-of-small-particles.html>.
4. https://www.perkinelmer.com/it/category/discover-the-lc-300-hplc-and-uhplc-systems?utm_source=Google&utm_medium=cpc&utm_campaign=APP-TECLC-2023-EMEI-PaidSearch-SCH-DG-ZZ&sfid=7014V000002Iw2E&LS=PPC&adgroup=148024373946&ad=656478892958&keyword=perkinelmer%20hplc%20software&gclid=EAIaIQobChMIpsmY4uGggwMVaZ-DBx04nwBuEAAAYASAAEgIjNfD_BwE.
5. <https://www.phenomenex.com/products/kinetex-hplc-column>.

APPENDICE 1

SOSTANZE		
Acronimo	Nome IUPAC	Struttura chimica
1,3,5 - Triisopropil benzene	1,3,5 - Triisopropilbenzene	
α -Metil stirene	2-Fenilpropene	
AC	2-Fenil-2-propanolo	
m-AC- MHP	1-(3-(2-idroperossiopropan-2- il)fenil)etanone	
p-AC-MHP	1-(4-(2-idroperossiopropan-2- il)fenil)etanone	
m-AC- MOH	1-(3-(2-idrossipropan-2- il)fenil)etanone	
p-AC- MOH	1-(4-(2-idrossipropan-2- il)fenil)etanone	

SOSTANZE		
Acronimo	Nome IUPAC	Struttura chimica
ACF	Fenilmetilchetone	
CHP	(2-Idroperossipropan-2-il)benzene	
Cumene	Isopropilbenzene	
Daa	4-idrossi-4-metil-2-pentanone	
DC	(Perossibis(propan-2,2-diil)dibenzene	
m-DHP	1,3-bis(2-idroperossipropan-2-il)benzene	
p-DHP	1,4-bis(2-idroperossipropan-2-il)benzene	

SOSTANZE		
Acronimo	Nome IUPAC	Struttura chimica
m-Diolo	2,2'-(1,3-fenil)bis(propan-2-olo)	
p-Diolo	2,2'-(1,4-fenil)bis(propan-2-olo)	
m-DIPB	1,3-diisopropilbenzene	
p-DIPB	1,4-diisopropilbenzene	
DMF	Dimetilftalato	
m-F	1,3-bis(2-(ter-butilperossi)propan-2-il)benzene	

SOSTANZE		
Acronimo	Nome IUPAC	Struttura chimica
p-F	1,4-bis(2-(ter-butilperossi)propan-2-il)benzene	
Fenolo	Fenolo	
H ₂ O ₂	Perossido di idrogeno	
MEK	2-Butanone	
m-MHP	1-(2-idroperossiopropan-2-il)-3-isopropilbenzene	
p-MHP	1-(2-idroperossiopropan-2-il)-4-isopropilbenzene	
m-MHP-MOH	2-(3-(2-idroperossiopropan-2-il)fenil)propan-2-olo	

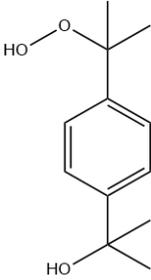
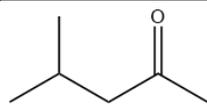
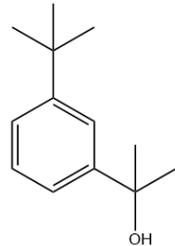
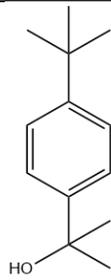
SOSTANZE		
Acronimo	Nome IUPAC	Struttura chimica
p-MHP-MOH	2-(4-(2-idroperossiopropan-2-il)fenil)propan-2-olo	
MIBK	4-metil-2-pentanone	
m-MOH	2-(3-(ter-butil)fenil)propan-2-olo	
p-MOH	2-(4-(ter-butil)fenil)propan-2-olo	

Tabella 79: strutture chimiche degli analiti citati in questa tesi.

APPENDICE 2

Frasi di pericolo

Frasi H	
H200	Esplosivo instabile.
H201	Esplosivo; pericolo di esplosione di massa.
H202	Esplosivo; grave pericolo di proiezione.
H203	Esplosivo; pericolo di incendio, di spostamento d'aria o di proiezione.
H204	Pericolo di incendio o di proiezione.
H205	Pericolo di esplosione di massa in caso d'incendio.
H220	Gas altamente infiammabile.
H221	Gas infiammabile.
H222	Aerosol altamente infiammabile.
H223	Aerosol infiammabile.
H224	Liquido e vapori altamente infiammabili.
H225	Liquido e vapori facilmente infiammabili.
H226	Liquido e vapori infiammabili.
H228	Solido infiammabile.
H240	Rischio di esplosione per riscaldamento.
H241	Rischio d'incendio o di esplosione per riscaldamento.
H242	Rischio d'incendio per riscaldamento.
H250	Spontaneamente infiammabile all'aria.
H251	Autoriscaldante; può infiammarsi.
H252	Autoriscaldante in grandi quantità; può infiammarsi.
H260	A contatto con l'acqua libera gas infiammabili che possono infiammarsi spontaneamente.
H261	A contatto con l'acqua libera gas infiammabili.
H270	Può provocare o aggravare un incendio; comburente.
H271	Può provocare un incendio o un'esplosione; molto comburente.
H272	Può aggravare un incendio; comburente.
H280	Contiene gas sotto pressione; può esplodere se riscaldato.
H281	Contiene gas refrigerato; può provocare ustioni o lesioni criogeniche.
H290	Può essere corrosivo per i metalli.
H300	Letale se ingerito.
H301	Tossico se ingerito.

Frasi H	
H302	Nocivo se ingerito.
H304	Può essere letale in caso di ingestione e di penetrazione nelle vie respiratorie.
H310	Letale per contatto con la pelle.
H311	Tossico per contatto con la pelle.
H312	Nocivo per contatto con la pelle.
H314	Provoca gravi ustioni cutanee e gravi lesioni oculari.
H315	Provoca irritazione cutanea.
H317	Può provocare una reazione allergica cutanea.
H318	Provoca gravi lesioni oculari.
H319	Provoca grave irritazione oculare.
H330	Letale se inalato.
H331	Tossico se inalato.
H332	Nocivo se inalato.
H334	Può provocare sintomi allergici o asmatici o difficoltà respiratorie se inalato.
H335	Può irritare le vie respiratorie.
H336	Può provocare sonnolenza o vertigini.
H340	Può provocare alterazioni genetiche <i><indicare la via di esposizione se è accertato che nessun'altra via di esposizione comporta il medesimo pericolo></i> .
H341	Sospettato di provocare alterazioni genetiche <i><indicare la via di esposizione se è accertato che nessun'altra via di esposizione comporta il medesimo pericolo></i> .
H350	Può provocare il cancro <i><indicare la via di esposizione se è accertato che nessun'altra via di esposizione comporta il medesimo pericolo></i> .
H351	Sospettato di provocare il cancro <i><indicare la via di esposizione se è accertato che nessun'altra via di esposizione comporta il medesimo pericolo></i> .
H360	Può nuocere alla fertilità o al feto <i><indicare l'effetto specifico, se noto></i> <i><indicare la via di esposizione se è accertato che nessun'altra via di esposizione comporta il medesimo pericolo></i> .
H361	Sospettato di nuocere alla fertilità o al feto <i><indicare l'effetto specifico, se noto></i> <i><indicare la via di esposizione se è accertato che nessun'altra via di esposizione comporta il medesimo pericolo></i> .
H362	Può essere nocivo per i lattanti allattati al seno.

Frase H	
H370	Provoca danni agli organi <o indicare tutti gli organi interessati, se noti> <indicare la via di esposizione se è accertato che nessun'altra via di esposizione comporta il medesimo pericolo>.
H371	Può provocare danni agli organi <o indicare tutti gli organi interessati, se noti> <indicare la via di esposizione se è accertato che nessun'altra via di esposizione comporta il medesimo pericolo>.
H372	Provoca danni agli organi <o indicare tutti gli organi interessati, se noti> in caso di esposizione prolungata o ripetuta <indicare la via di esposizione se è accertato che nessun'altra via di esposizione comporta il medesimo pericolo>.
H373	Può provocare danni agli organi <o indicare tutti gli organi interessati, se noti> in caso di esposizione prolungata o ripetuta <indicare la via di esposizione se è accertato che nessun'altra via di esposizione comporta il medesimo pericolo>.
H400	Molto tossico per gli organismi acquatici.
H410	Molto tossico per gli organismi acquatici con effetti di lunga durata.
H411	Tossico per gli organismi acquatici con effetti di lunga durata.
H412	Nocivo per gli organismi acquatici con effetti di lunga durata.
H413	Può essere nocivo per gli organismi acquatici con effetti di lunga durata.
INFORMAZIONI SUPPLEMENTARI SUI PERICOLI	
Proprietà fisiche	
EUH 001	Esplosivo allo stato secco.
EUH 014	Reagisce violentemente con l'acqua.
Frase H	
EUH 018	Durante l'uso può formarsi una miscela vapore-aria esplosiva/infiammabile.
EUH 019	Può formare perossidi esplosivi.
EUH 044	Rischio di esplosione per riscaldamento in ambiente confinato.
Proprietà pericolose per la salute	
EUH 029	A contatto con l'acqua libera un gas tossico.
EUH 031	A contatto con acidi libera un gas tossico.
EUH 032	A contatto con acidi libera gas molto tossici.
EUH 066	L'esposizione ripetuta può provocare secchezza o screpolature della pelle.
EUH 070	Tossico per contatto oculare.
EUH 071	Corrosivo per le vie respiratorie.

Frase H	
	Proprietà pericolose per l'ambiente
	Elementi dell'etichetta e informazioni supplementari per talune sostanze o miscele
EUH 201 EUH 201A	Contiene piombo. Non utilizzare su oggetti che possono essere masticati o succhiati dai bambini. Attenzione! Contiene piombo.
EUH 202	Cianoacrilato. Pericolo. Incolla la pelle e gli occhi in pochi secondi. Tenere fuori dalla portata dei bambini.
EUH 203	Contiene cromo (VI). Può provocare una reazione allergica.
EUH 204	Contiene isocianati. Può provocare una reazione allergica.
EUH 205	Contiene componenti epossidici. Può provocare una reazione allergica.
EUH 206	Attenzione! Non utilizzare in combinazione con altri prodotti. Possono liberarsi gas pericolosi (cloro).
EUH 207	Attenzione! Contiene cadmio. Durante l'uso si sviluppano fumi pericolosi. Leggere le informazioni fornite dal fabbricante. Rispettare le disposizioni di sicurezza.
EUH 208	Contiene . Può provocare una reazione allergica.
EUH 209 EUH 209A	Può diventare facilmente infiammabile durante l'uso. Può diventare infiammabile durante l'uso.
EUH 210	Scheda dati di sicurezza disponibile su richiesta.
EUH 401	Per evitare rischi per la salute umana e per l'ambiente, seguire le istruzioni per l'uso.

Tabella 80: frasi di pericolo.

Consigli di prudenza

Frase P	
P101	In caso di consultazione di un medico, tenere a disposizione il contenitore o l'etichetta del prodotto.
P102	Tenere fuori dalla portata dei bambini.
P103	Leggere l'etichetta prima dell'uso.
P201	Procurarsi istruzioni specifiche prima dell'uso.
P202	Non manipolare prima di avere letto e compreso tutte le avvertenze.
P210	Tenere lontano da fonti di calore, superfici calde, scintille, fiamme libere o altre fonti di accensione. Non fumare.
P211	Non vaporizzare su una fiamma libera o altra fonte di accensione.
P220	Tenere lontano da indumenti e altri materiali combustibili.
P222	Evitare il contatto con l'aria.
P223	Evitare qualunque contatto con l'acqua.
P230	Mantenere umido con...
P231	Manipolare e conservare in atmosfera di gas inerte/...
P232	Proteggere dall'umidità.
P233	Tenere il recipiente ben chiuso.
P234	Conservare soltanto nell'imballaggio originale.
P235	Conservare in luogo fresco.
P240	Mettere a terra e a massa il contenitore e il dispositivo ricevente.
P241	Utilizzare impianti [elettrici/di ventilazione/d'illuminazione/...] a prova di esplosione.
P242	Utilizzare utensili antiscintillamento.
P243	Fare in modo di prevenire le scariche elettrostatiche.
P244	Mantenere le valvole e i raccordi liberi da olio e grasso.
P250	Evitare le abrasioni/gli urti/gli attriti/... .
P251	Non perforare né bruciare, neppure dopo l'uso.
P260	Non respirare la polvere/i fumi/i gas/la nebbia/i vapori/gli aerosol.
P261	Evitare di respirare la polvere/i fumi/i gas/la nebbia/i vapori/gli aerosol.
P262	Evitare il contatto con gli occhi, la pelle o gli indumenti.
P263	Evitare il contatto durante la gravidanza e l'allattamento.
P264	Lavare accuratamente ... dopo l'uso.
P270	Non mangiare, né bere, né fumare durante l'uso.
P271	Utilizzare soltanto all'aperto o in luogo ben ventilato.

Frasi P	
P272	Gli indumenti da lavoro contaminati non devono essere portati fuori dal luogo di lavoro.
P273	Non disperdere nell'ambiente.
P280	Indossare guanti/indumenti protettivi/Proteggere gli occhi/il viso.
P282	Utilizzare guanti termici e schermo facciale o protezione per gli occhi.
P283	Indossare indumenti completamente ignifughi o in tessuti ritardanti di fiamma.
P284	[Quando la ventilazione del locale è insufficiente] indossare un apparecchio di protezione respiratoria.
P231 + P232	Manipolare e conservare in atmosfera di gas inerte/.... Tenere al riparo dall'umidità.
P301	IN CASO DI INGESTIONE:
P302	IN CASO DI CONTATTO CON LA PELLE:
P303	IN CASO DI CONTATTO CON LA PELLE (o con i capelli):
P304	IN CASO DI INALAZIONE:
P305	IN CASO DI CONTATTO CON GLI OCCHI:
P306	IN CASO DI CONTATTO CON GLI INDUMENTI:
P308	IN CASO di esposizione o di possibile esposizione:
P310	Contattare immediatamente un CENTRO ANTIVELENI/un medico...
P311	Contattare un CENTRO ANTIVELENI/un medico/...
P312	In caso di malessere, contattare un CENTRO ANTIVELENI/un medico/... .
P313	Consultare un medico.
P314	In caso di malessere, consultare un medico.
P315	Consultare immediatamente un medico.
P320	Trattamento specifico urgente (vedere..... su questa etichetta).
P321	Trattamento specifico (vederesu questa etichetta).
P330	Sciacquare la bocca.
P331	NON provocare il vomito.
P332	In caso di irritazione della pelle:
P333	In caso di irritazione o eruzione della pelle:
P334	Immergere in acqua fredda [o avvolgere con un bendaggio umido].
P335	Rimuovere le particelle depositate sulla pelle.
P336	Sgelare le parti congelate usando acqua tiepida. Non sfregare la parte interessata.

Frasi P	
P337	Se l'irritazione degli occhi persiste:
P338	Togliere le eventuali lenti a contatto se è agevole farlo. Continuare a sciacquare.
P340	Trasportare l'infortunato all'aria aperta e mantenerlo a riposo in posizione che favorisca la respirazione.
P342	In caso di sintomi respiratori:
P351	Sciacquare accuratamente per parecchi minuti.
P352	Lavare abbondantemente con acqua/...
P353	Sciacquare la pelle [o fare una doccia].
P360	Sciacquare immediatamente e abbondantemente gli indumenti contaminati e la pelle prima di togliersi gli indumenti.
P361	Togliere immediatamente tutti gli indumenti contaminati.
P362	Togliere gli indumenti contaminati.
P363	Lavare gli indumenti contaminati prima di indossarli nuovamente.
P370	In caso di incendio:
P371	In caso di incendio grave e di quantità rilevanti:
P372	Rischio di esplosione in caso di incendio.
P373	NON utilizzare mezzi estinguenti se l'incendio raggiunge materiali esplosivi.
P375	Rischio di esplosione. Utilizzare i mezzi estinguenti a grande distanza.
P376	Bloccare la perdita se non c'è pericolo.
P377	In caso d'incendio dovuto a perdita di gas, non estinguere a meno che non sia possibile bloccare la perdita senza pericolo.
P378	Utilizzare....per estinguere.
P380	Evacuare la zona.
P381	In caso di perdita, eliminare ogni fonte di accensione.
P390	Assorbire la fuoriuscita per evitare danni materiali.
P391	Raccogliere il materiale fuoriuscito.
P301 + P310	IN CASO DI INGESTIONE: contattare immediatamente un CENTRO ANTIVELENI/un medico/...
P301 + P312	IN CASO DI INGESTIONE: in presenza di malessere, contattare un CENTRO ANTIVELENI/un medico/... .
P301 + P330 + P331	IN CASO DI INGESTIONE: sciacquare la bocca. NON provocare il vomito.

Frase P	
P302 + P334	IN CASO DI CONTATTO CON LA PELLE: immergere in acqua fredda o avvolgere con un bendaggio umido.
P302 + P352	IN CASO DI CONTATTO CON LA PELLE: lavare abbondantemente con acqua/...
P303 + P361 + P353	IN CASO DI CONTATTO CON LA PELLE (o con i capelli): togliersi di dosso immediatamente tutti gli indumenti contaminati. Sciacquare la pelle [o fare una doccia].
P304 + P340	IN CASO DI INALAZIONE: trasportare l'infortunato all'aria aperta e mantenerlo a riposo in posizione che favorisca la respirazione.
P305 + P351 + P338	IN CASO DI CONTATTO CON GLI OCCHI: sciacquare accuratamente per parecchi minuti. Togliere le eventuali lenti a contatto se è agevole farlo. Continuare a sciacquare.
P306 + P360	IN CASO DI CONTATTO CON GLI INDUMENTI: sciacquare immediatamente e abbondantemente gli indumenti contaminati e la pelle prima di togliersi gli indumenti.
P308 + P313	IN CASO di esposizione o di possibile esposizione, consultare un medico.
P332 + P313	In caso di irritazione della pelle: consultare un medico.
P333 + P313	In caso di irritazione o eruzione della pelle: consultare un medico.
P337 + P313	Se l'irritazione degli occhi persiste, consultare un medico.
P342 + P311	In caso di sintomi respiratori: contattare un CENTRO ANTIVELENI/un medico/...
P370 + P376	In caso di incendio: bloccare la perdita se non c'è pericolo.
P370 + P378	In caso d'incendio: utilizzare...per estinguere.
P370 + P380 + P375	In caso di incendio: evacuare la zona. Rischio di esplosione. Utilizzare i mezzi estinguenti a grande distanza.
P371 + P380 + P375	In caso di incendio grave e di grandi quantità: evacuare la zona. Rischio di esplosione. Utilizzare i mezzi estinguenti a grande distanza.

Frase P	
P401	Conservare secondo... .
P402	Conservare in luogo asciutto.
P403	Conservare in luogo ben ventilato.
P404	Conservare in un recipiente chiuso.
P405	Conservare sotto chiave.
P406	Conservare in recipiente resistente alla corrosione/... provvisto di rivestimento interno resistente.
P407	Mantenere uno spazio libero tra gli scaffali o i pallet.
P410	Proteggere dai raggi solari.
P411	Conservare a temperature non superiori a ... °C/...°F.
P412	Non esporre a temperature superiori a 50 °C/122°F.
P413	Conservare le rinfuse di peso superiore a ...kg/...lb a temperature non superiori a ... °C/°F.
P420	Conservare separatamente.
P402 + P404	Conservare in luogo asciutto e in recipiente chiuso.
P403 + P233	Tenere il recipiente ben chiuso e in luogo ben ventilato.
P403 + P235	Conservare in luogo fresco e ben ventilato.
P410 + P403	Proteggere dai raggi solari. Conservare in luogo ben ventilato.
P410 + P412	Proteggere dai raggi solari. Non esporre a temperature superiori a 50 °C/122°F.
P501	Smaltire il prodotto/recipiente in ...

Tabella 81: frasi di pericolo.