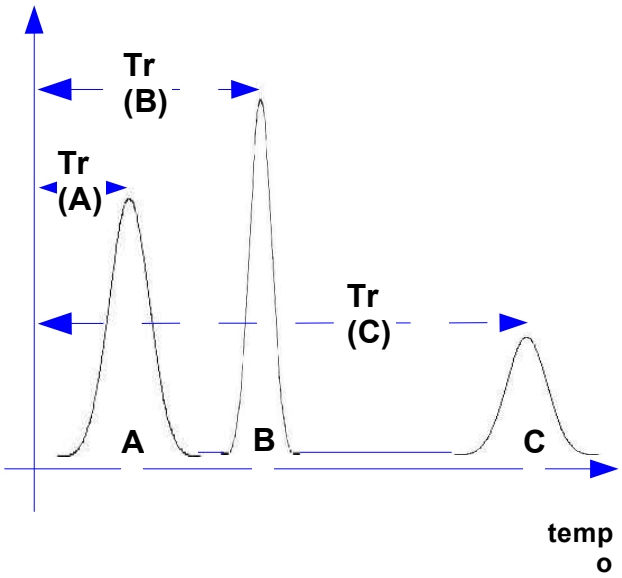
- quaderni di analisi chimica strumentale -

CROMATOGRAFIA



Indice generale

1 - SEPARAZIONI CROMATOGRAFICHE....2
1.1 Introduzione....2
1.2 L'esperimento fondamentale della cromatografia....4
1.3 I meccanismi sui quali si basa la separazione cromatografica....5
1.4 Le tecniche cromatografiche....6
2 - LA GAS CROMATOGRAFIA....7
2.1 Strumentazione....7
2.2 I picchi e il cromatogramma....10
2.3 Risoluzione, selettività ed efficienza in una separazione cromatografica....11
2.4 Tecnica operativa....13
2.5 Analisi qualitativa e quantitativa....15
3 - ESERCITAZIONI E VERIFICHE....21
3.1 Esercizi su calcoli utili per le analisi spettrofotometriche....21
3.2 Quesiti a risposta aperta....21
3.3 Quesiti a risposta multipla....22

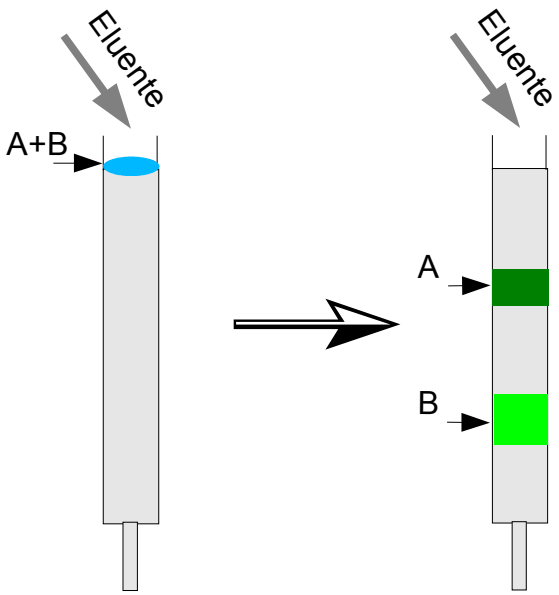
1 - SEPARAZIONI CROMATOGRAFICHE

1.1 Introduzione

La cromatografia é una tecnica di separazione di vari componenti di una miscela, al pari di una distillazione frazionata, di una cristallizzazione e una estrazione con solvente.

Fu ideata nel 1906 dal russo Tswett.

La tecnica sperimentale, su una soluzione di clorofille, evidenziò la separazione dei vari pigmenti utilizzando una colonna impaccata con carbonato di calcio, ed eluendo con etere di petrolio, dando luogo alla formazione di strati di diverso colore (da cui il nome: 'cromos'-colore).



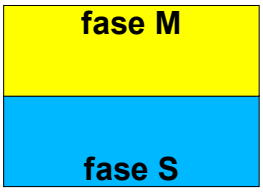
La tecnica cromatografica consiste nello sfruttare in modo particolarmente efficiente la diversa attitudine che ogni molecola o ione possiede nel distribuirsi tra due differenti fasi (una stazionaria e una mobile).

Nel caso della tecnica di estrazione con solvente, per ottenere un'efficiente separazione, può essere necessario un numero molto elevato di estrazioni separate, con relativi problemi di perdita di campione e impossibilità di operare con microcampioni.

Se invece una fase viene immobilizzata (fase stazionaria) e l'altra (fase mobile, o 'eluente') viene fatta scorrere sopra di essa, é possibile condurre l'estrazione in modo continuo. Una specie chimica depositata sulla fase stazionaria e immessa nella corrente di fase mobile si distribuirà infatti dinamicamente tra le due fasi, in misura proporzionale alla diversa affinità che possiede per esse.

La fase stazionaria può essere costituita da un solido o da un liquido opportunamente supportato, mentre la fase mobile é costituita da un fluido (gas o liquido) che contiene i componenti da separare e che si muove sopra quella stazionaria.

Consideriamo un sistema formato da due fasi in cui viene introdotta una sostanza: ***la sostanza si distribuirà fra le due fasi a seconda delle sue particolari proprietà chimico-fisiche.***



Indicando con C_m e C_s le sue concentrazioni nella fase mobile e nella fase stazionaria rispettivamente, e supponendo che le condizioni sperimentali siano tali da conseguire il raggiungimento di equilibri successivi del tipo: $C_m \leftrightarrows C_S$

possiamo rappresentare con K la corrispondente costante di equilibrio: $K = C_s / C_m$

K prende il nome di coefficiente di distribuzione.

E' dal valore di K che dipende il tempo di ritenzione, cioè il tempo che occorre per percorrere l'intera fase stazionaria. Infatti il tempo che una sostanza trascorre nella colonna dipende dal valore di C_s rispetto a C_m: così, un'elevata concentrazione nella fase stazionaria, rispetto a quella nella fase mobile, indica una maggiore affinità per la prima.

In altre parole, l'eluente (fase mobile) incontrerà una certa difficoltà nel trascinare con sé alcune sostanze, mentre altre, relativamente più affini ad esso e meno verso la fase stazionaria, verranno più facilmente dislocate dalle posizioni che occupano e trasportate così verso la coda della colonna, separandosi sempre di più dalle sostanze maggiormente trattenute.

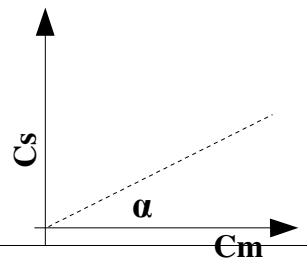
Coefficiente di distribuzione e isoterme di distribuzione

L'equazione

$$K = C_s / C_m$$

è l'equazione di una retta, la cui pendenza è data da

$$tg\ \alpha = K.$$

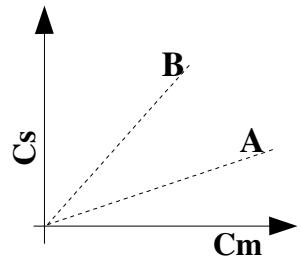


Nella figura 1 è riportata tale retta, detta **isoterma di distribuzione**, di due sostanze A e B per le quali Ka< Kb.

Ciò significa che la sostanza B è più affine per la fase fissa di quanto lo sia la sostanza A. Se queste due sostanze A e B percorrono insieme la colonna, accade che A uscirà per prima.

Quanto maggiore è la differenza di K tanto migliore sarà la separazione tra le sostanze.

fig. 1

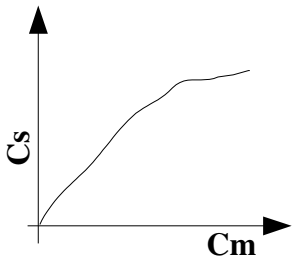


In pratica le isoterme non hanno l'andamento teorico visto, ma si presentano come in fig. 2.

Ad esempio ad un certo punto la fase fissa non trattiene la stessa quantità di sostanza rispetto alla fase mobile e si avvicina alla saturazione, cioè la capacità solvente della fase fissa può dirsi esaurita.

Per questa ragione le singole zone del cromatogramma non hanno contorno preciso e simmetrico.

fig. 2



1.2 L'esperimento fondamentale della cromatografia

Tutte le varie tecniche cromatografiche possono essere ricondotte ad un cosiddetto “esperimento fondamentale”, che illustra il principio su cui si basa la cromatografia.

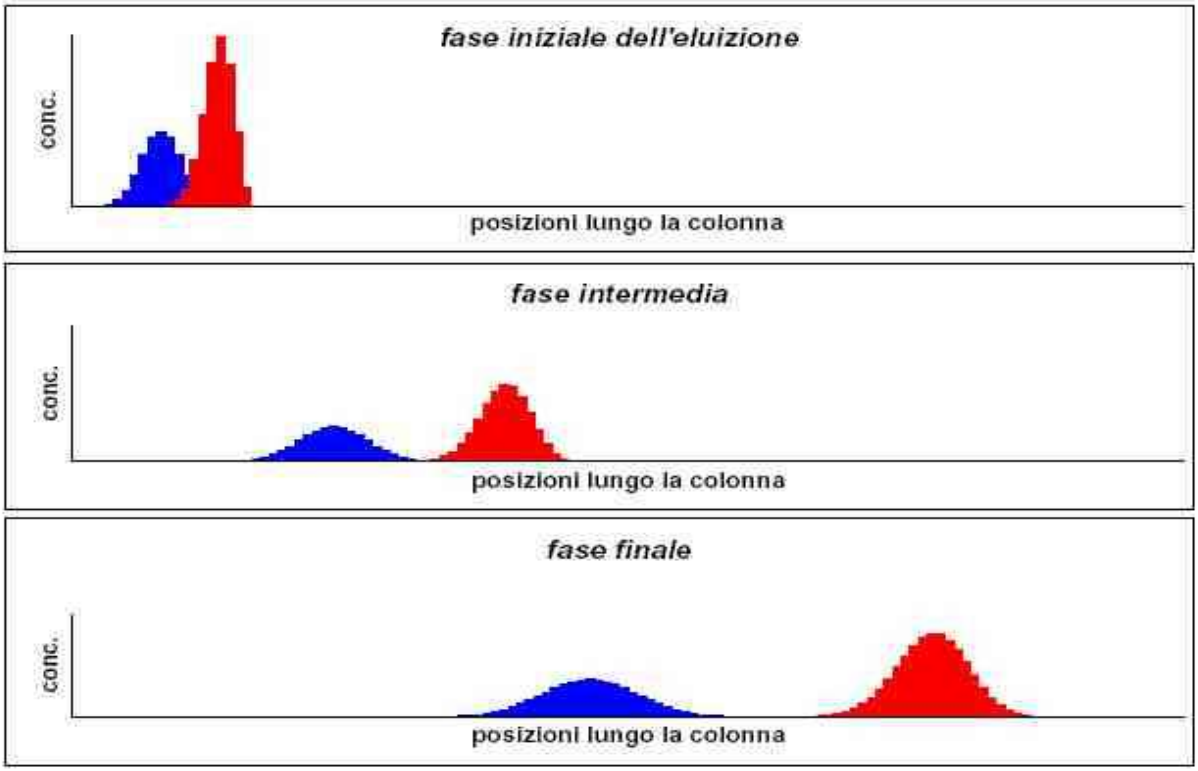
Supponiamo di avere una colonna riempita uniformemente di un materiale solido in granuli di dimensioni omogenee (la cosiddetta fase stazionaria, o fase fissa).

All'inizio della colonna si deposita la miscela contenente le sostanze da separare.

Si fa scorrere poi un solvente (la fase mobile, detta eluente): la fase mobile trascinerà in modo diverso le diverse sostanze l'ungo la colonna, a seconda della loro affinità verso le due fasi.

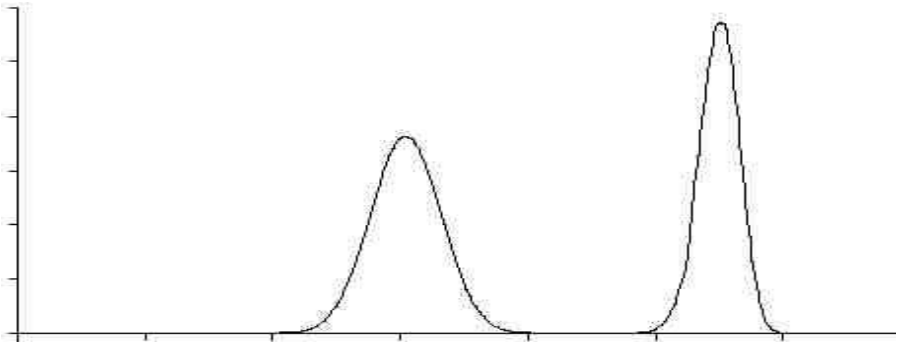
Tale effetto può essere ricostruito, anche numericamente, immaginando che nei vari strati della colonna si effettui una serie di estrazioni successive in cui si raggiunge l'equilibrio corrispondente al coefficiente di distribuzione.

Effettuando infatti una simulazione numerica di tale successione di “micro-equilibri” si ottengono facilmente grafici che mostrano il procedere della separazione, con la distribuzione di ogni sostanza secondo i picchi di concentrazione (di forma 'gaussiana') tipica dei cromatogrammi:



Con il procedere della separazione, le sostanze usciranno dalla colonna dopo il passaggio di un certo tempo (***tempo di ritenzione***) durante il quale è fluito un certo volume di solvente (***volume di ritenzione***).

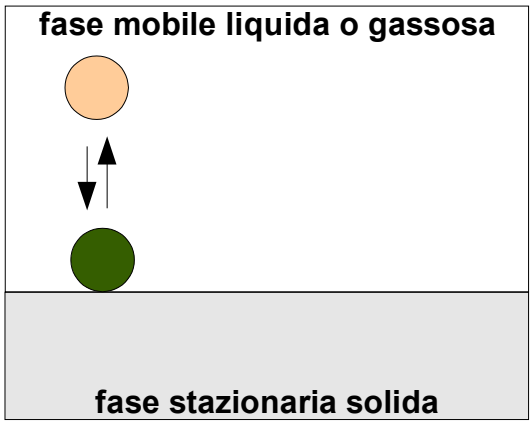
Se si misura la concentrazione delle sostanze in uscita dalla colonna si ottiene il cosiddetto ***cromatogramma*** (che riporta le **concentrazioni** di sostanza in uscita in funzione del **tempo** o del **volume** di eluente):



1.3 I meccanismi sui quali si basa la separazione cromatografica

I principali meccanismi chimico fisici della separazione cromatografica si basano su:

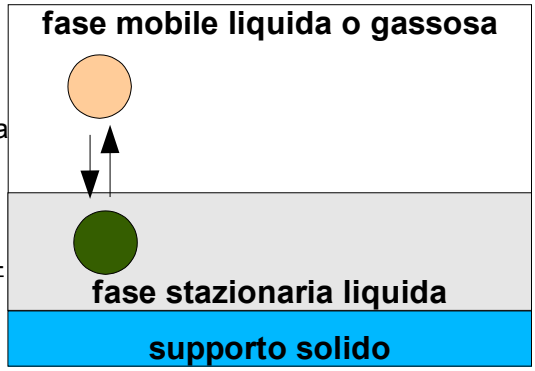
1) Adsorbimento



La fase stazionaria é un solido sulla cui superficie si trovano dei siti attivi in grado di stabilire legami secondari (dipolo-dipolo, ponte di idrogeno, Van der Waals) con le diverse molecole della miscela da risolvere (separare). Se la fase mobile é un liquido si parla di cromatografia liquido-solido (*LSC*), se invece é un gas, di cromatografia gas-solido (*GSC*).

In genere, le molecole che più facilmente vengono fissate sono quelle che presentano gruppi polari, anche se la natura dell'adsorbente influisce sul fenomeno. L'aumento di temperatura agisce negativamente sull'adsorbimento in quanto provoca una maggior agitazione termica.

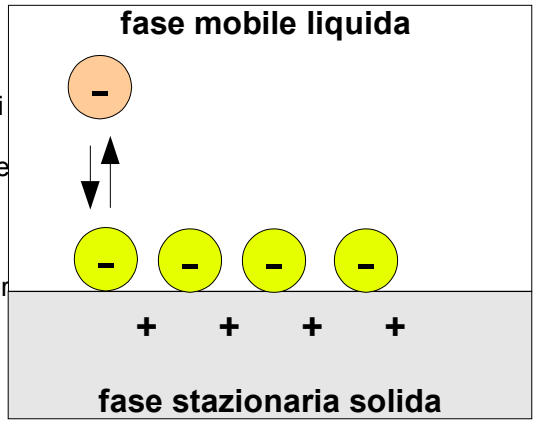
2) Ripartizione



La fase stazionaria é un liquido, in cui si verifica una vera e propria solubilizzazione delle sostanze da analizzare. Esse pertanto si ripartiscono fra le due fasi (immiscibili tra loro) e la costante K prende il nome di coefficiente di ripartizione e la legge $K = C_s / C_m$ legge di Nernst.

Se la fase mobile é un gas si parla di cromatografia gas-liquido (*GLC*), se invece é un liquido, di cromatografia liquido-liquido (*LLC*).

3) Scambio ionico



La fase stazionaria é costituita da molecole contenenti gruppi attivi, dotati di cariche elettriche (positive o negative), i quali sono in grado di scambiare i propri controioni con la soluzione da cui vengono lambiti, attraverso un meccanismo di competizione tra gli ioni della fase stazionaria e quelli con la stessa carica contenuti nella fase mobile. Anche in questo caso la separazione avviene secondo un criterio di affinità per la fase stazionaria, criterio dettato dalla maggiore o minore competitività.

4) Esclusione

Utilizzando una fase solida porosa (o un gel) con pori di opportune dimensioni, è possibile rallentare maggiormente le particelle più piccole che, penetrando nei pori, vengono poi trattenute.

1.4 Le tecniche cromatografiche

La classificazione fondamentale dei metodi cromatografici si basa sul fatto che la fase mobile può essere un liquido (cromatografia liquida) o un gas (cromatografia gassosa o gas-cromatografia).

Mentre la cromatografia liquida può essere realizzata su colonna, su strato sottile e su carta, la gas-cromatografia é limitata all'uso della colonna.

Tenuto conto dei diversi meccanismi di separazione e delle diverse soluzioni sperimentali adottabili, si sono sviluppate numerose tecniche cromatografiche, che comprendono:

Cromatografia su strato sottile (TLC), dove la fase stazionaria può essere gel di silice, allumina, cellulosa in polvere, fatta aderire ad un apposito supporto (alluminio, carta plastificata, lastra di vetro) e la fase mobile é costituita da vari solventi organici.

Le tecniche di eluizione possono essere di tipo ascendente, discendente o orizzontale.

Cromatografia su carta (PC), dove la fase stazionaria é costituita dall'acqua inevitabilmente presente nella cellulosa come umidità (20%), anche se la carta può essere all'occorrenza trattata con liquidi diversi, e la fase mobile é scelta in funzione del tipo di fase stazionaria e delle proprietà chimiche dei composti da separare. Quasi sempre comunque é una miscela contenente acqua.

Cromatografia su colonna a bassa pressione (LPC). Il modo non é molto dissimile da quello descritto originariamente da Tswett. La fase mobile é un liquido organico a bassa viscosità mentre le fasi stazionarie, solide, liquide o gel, possono avere caratteristiche chimico-fisiche molto variabili. La tecnica prevede la deposizione in testa ad una colonna (impaccata con un'opportuna fase fissa) di una certa quantità di miscela da separare. Facendo scorrere l'eluente lungo questa colonna si ottiene una certa distribuzione dei componenti della miscela lungo la fase stazionaria (vedi figura nella pagina iniziale).

Cromatografia in fase liquida ad elevate prestazioni (HPLC), che consiste nella versione strumentale della cromatografia su colonna. L'eluente viene fatto fluire ad alta pressione e le sostanze in uscita vengono rilevate strumentalmente con opportuni dispositivi.

Gasromatografia in fase liquida ad elevate prestazioni (GC), in cui la fase mobile è un gas, e che verrà dettagliatamente studiata nel capitolo successivo.

* * *

Di seguito verrà descritta più dettagliatamente la gascromatografia, in quanto tecnica importante e molto diffusa, nonché disponibile nei nostri laboratori.

Molti dei principi descritti possono essere adattati ad altre tecniche cromatografiche.

2 - LA GAS CROMATOGRAFIA

Nella tecnica gas-cromatografica la fase mobile é un gas che fluisce attraverso una colonna in cui si trova la fase stazionaria, la quale può essere un solido granulare poroso oppure un liquido.

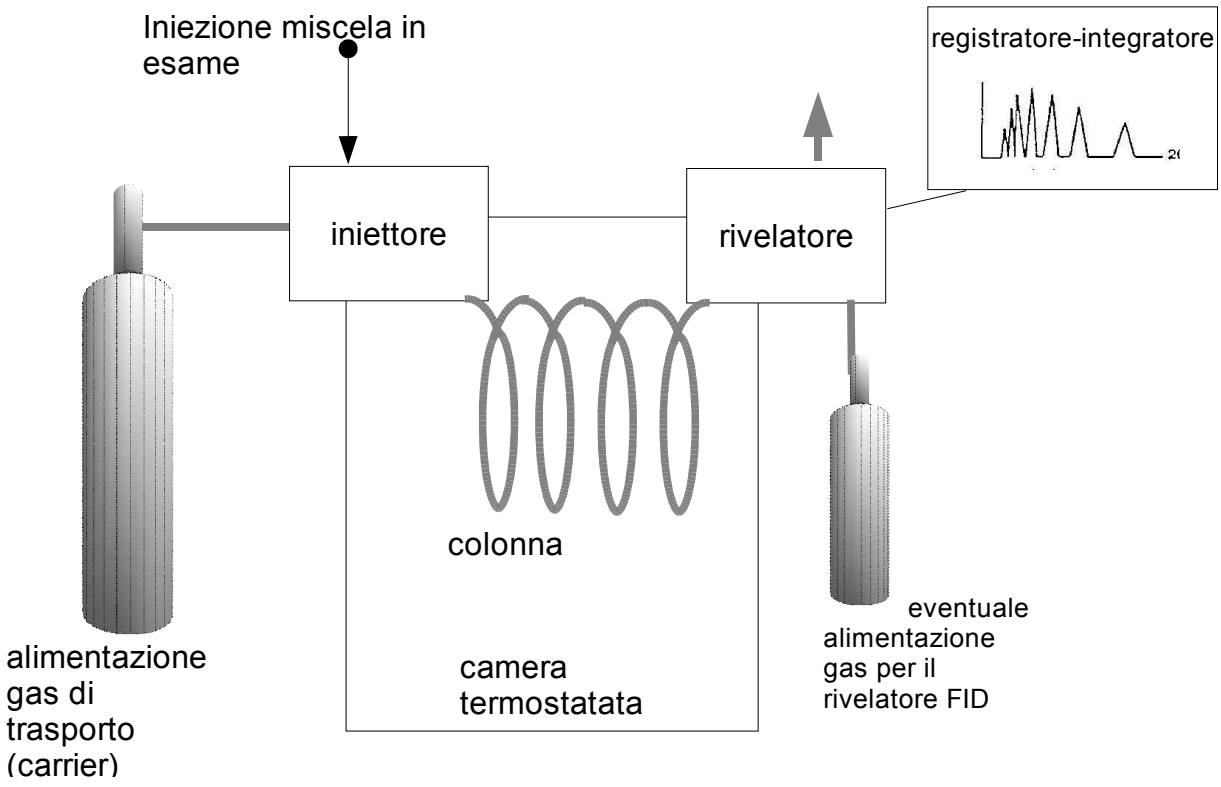
Secondo lo stato fisico della fase stazionaria, la gas-cromatografia si può suddividere in cromatografia gas solido (*GSC*) e in cromatografia gas liquido (*GLC*).

Questo metodo, che ha conosciuto un grande sviluppo dagli anni '60, conserva tuttora una posizione di primo piano come tecnica analitica. **L'unica limitazione della gas-cromatografia é la necessità di rendere volatili i campioni da analizzare**, per cui in alcuni casi essa é soppiantata dall' *HPLC* (cromatografia liquida ad alto potere risolutivo).

I meccanismi di separazione relativi alla *GC* sono sostanzialmente due: ripartizione e adsorbimento, di cui si é già parlato. Il primo nel caso che la fase stazionaria sia liquida, il secondo quando é solida.

2.1 Strumentazione

Vediamo ora lo schema essenziale dello strumento, il gas-cromatografo, per poter capire l'intero processo di analisi:



1) Sistema di alimentazione gas di trasporto (carrier).

Si tratta di bombole di gas inerte (azoto, elio, argon), talvolta può essere utilizzato anche l'idrogeno. Lo scopo principale é quello di trascinare i componenti della miscela in analisi lungo la colonna cromatografica.

2) Sistema di alimentazione dei gas per il rivelatore FID.

Qualora si utilizzi un rivelatore a ionizzazione di fiamma (FID) è necessario alimentare un combustibile e d un comburente (ad esempio idrogeno ed aria).

3) Iniettore o camera di iniezione.

Il suo compito é assicurare l'istantanea vaporizzazione del campione.

Poiché con l'uso di colonne capillari (vedi più avanti) la quantità di campione da iniettare é dell'ordine dei nanolitri, e misurare queste quantità con siringhe é praticamente impossibile (con apposite siringhe si arriva ai µL), sono state messe a punto particolari tecniche di iniezione. Spesso si utilizzano quindi opportune tecniche (*split*, ...) che consentono di far entrare effettivamente in colonna solo una parte (ad esempio ca. 1/100) del liquido iniettato.

La camera di iniezione è corredata da un sistema di resistenze variabili attraverso le quali è possibile fissare la temperatura ritenuta più adatta per la vaporizzazione della miscela. L'introduzione del campione viene effettuata con una iniezione su un apposito disco di gomma al silicone, posto tra una ghiera metallica e il dispositivi di attacco alla colonna.

4) Colonna.

La colonna può essere di due tipi: ***impaccata*** o ***capillare***..

L'impaccata (diametro interno 2-4 mm, lunghezza 1-4 m), usata nella gas-cromatografia classica, comporta una separazione in colonna di acciaio o di vetro(due metri circa) riempita di materiale inerte (supporto per la fase stazionaria) sul quale è distribuita una pellicola sottile di liquido (fase stazionaria) continuamente attraversata da un gas (fase mobile) detto gas di trasporto. Il processo di separazione è limitato dalla lentezza di eluizione della molecole del campione lungo la colonna.

La capillare (diametro interno 0,1-0,8 mm, lunghezza 10-100 m), ormai di uso comune, rappresenta un'importante innovazione per la sua rapidità di eluizione e per una migliore risoluzione (il numero di picchi risolti, in metà tempo, è superiore di oltre quattro volte quello della colonna impaccata). Essa è molto più lunga dell'impaccata (anche cento metri), di diametro molto minore e quindi contiene una quantità molto minore di fase stazionaria, per cui la quantità di campione da iniettare è infinitamente più piccola e viene eluita prima.

Le colonne sono alloggiate in una ***camera termostatica***, in genere a circolazione di aria calda, con questo sistema viene assicurata una stabilità di temperatura dell'ordine ±0,1°C . Un dispositivo permette all'operatore di fissare la temperatura, la quale può essere mantenuta costante per tutta la durata dell'analisi (isoterma) oppure fatta variare (programmata).

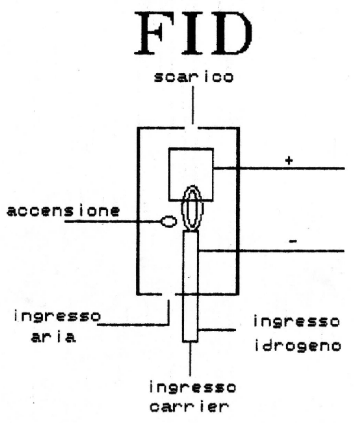
5) Rivelatore.

I dispositivi in grado di rivelare la presenza di una sostanza estranea nel gas di trasporto, a valle della colonna, possono dividersi in universali e selettivi. I primi consentono di individuare tutti i componenti di una miscela, i secondi rivelano solo particolari categorie di composti.

Tra i rivelatori più usati, si segnalano:

-Rivelatore a ionizzazione di fiamma (*FID)*

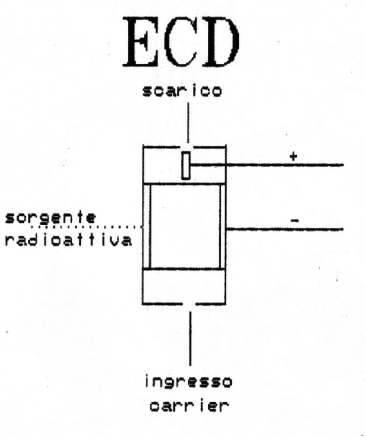
Si tratta di un rivelatore universale ma distruttivo in quanto i campioni vengono bruciati per ottenerne la trasformazione in ioni allo stato gassoso. Il carrier viene convogliato verso un ugello a cui giungono anche idrogeno ed aria, necessari per alimentare una piccola fiammella. Una resistenza posta accanto all'ugello provoca l'accensione della fiammella. Quest'ultima si trova circondata da un collettore cilindrico caricato positivamente; il secondo elettrodo del circuito, quello caricato negativamente, é costituito dall'ugello stesso.



La microfiamma provoca una debolissima corrente ionica tra gli elettrodi, che vengono mantenuti sotto una differenza di potenziale di circa 300V. Questa corrente, raccolta, trasformata in tensione e amplificata viene inviata ad un opportuno registratore e costituisce il rumore di fondo. Quando un componente della miscela raggiunge la

fiamma, viene subito ionizzato con conseguente aumento dell'intensità di corrente e quindi rivelato con un segnale più intenso. Come già detto questo rivelatore é di tipo universale, sono poche infatti le sostanze che hanno potenziali di ionizzazione così alti da non poter essere ionizzate nelle normali condizioni di lavoro, tra queste abbiamo acqua, solfuro di carbonio, anidride carbonica, ossido di carbonio, ossidi di azoto, ammoniaca, acido solfidrico, biossido di zolfo, acido formico, gas nobili, azoto e ossigeno. La sensibilità di questo rivelatore é molto elevata, infatti si può arrivare ai nanogrammi.

-Rivelatore a cattura di elettroni (*ECD)*



Si tratta di un rivelatore selettivo e non distruttivo. Esso é costituito da una sorgente radioattiva (^{63}Ni) che emette radiazioni beta (elettroni). Gli elettroni, detti primari, emessi dalla sorgente, vengono a trovarsi in un campo elettrico di cui la sorgente costituisce l'anodo, mentre il catodo si trova verso l'uscita. Gli elettroni primari colpiscono il carrier formando ioni positivi ed elettroni secondari. Il flusso di queste cariche costituisce la corrente di fondo e dipende dalla differenza di potenziale tra i due elettrodi. Quando insieme al carrier é presente un'altra sostanza elettroaffine, cioè in grado di catturare gli elettroni secondari, si verifica una diminuzione di corrente di fondo. La corrente tradotta in tensione, amplificata, viene inviata ad un registratore. I limiti di rivelabilità possono essere molto bassi, ad esempio per i pesticidi cloro-organici o derivati del fosforo, si può arrivare a rivelare i picogrammi. Le sostanze maggiormente rivelate sono quelle contenenti alogeni.

-Rivelatore a a termoconducibilità (HWD*)*

Si tratta di un rivelatore universale e non distruttivo. Si basa su due sensori contenenti un filamento la cui resistenza elettrica varia al variare della temperatura. La temperatura dipende a sua volta dalla conducibilità termica dei gas con cui sono a contatto i filamenti (e che varia con la composizione dei gas stessi). Un sensore è lambito dal carrier puro mentre l'altro è sull'uscita della colonna: un accurato sistema elettrico rileva ed amplifica le differenze dei due segnali.

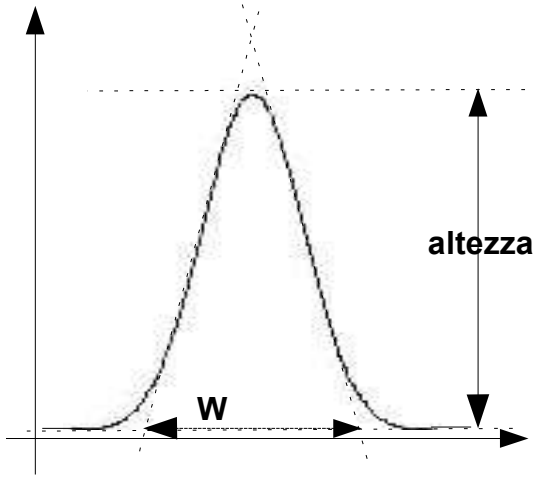
La sensibilità di questo rivelatore non è elevata ed inoltre costringe all'uso di carrier più costosi (ad esempio elio e argon).

6) Registratore e integratore.

Il segnale in uscita dal rivelatore passa ad un registratore che ha il compito di realizzare il tracciato cromatografico.

I moderni strumenti sono corredati anche di un integratore che permette il calcolo automatico delle aree dei picchi, operazione indispensabile per effettuare analisi di tipo quantitativo.

2.2 I picchi e il cromatogramma



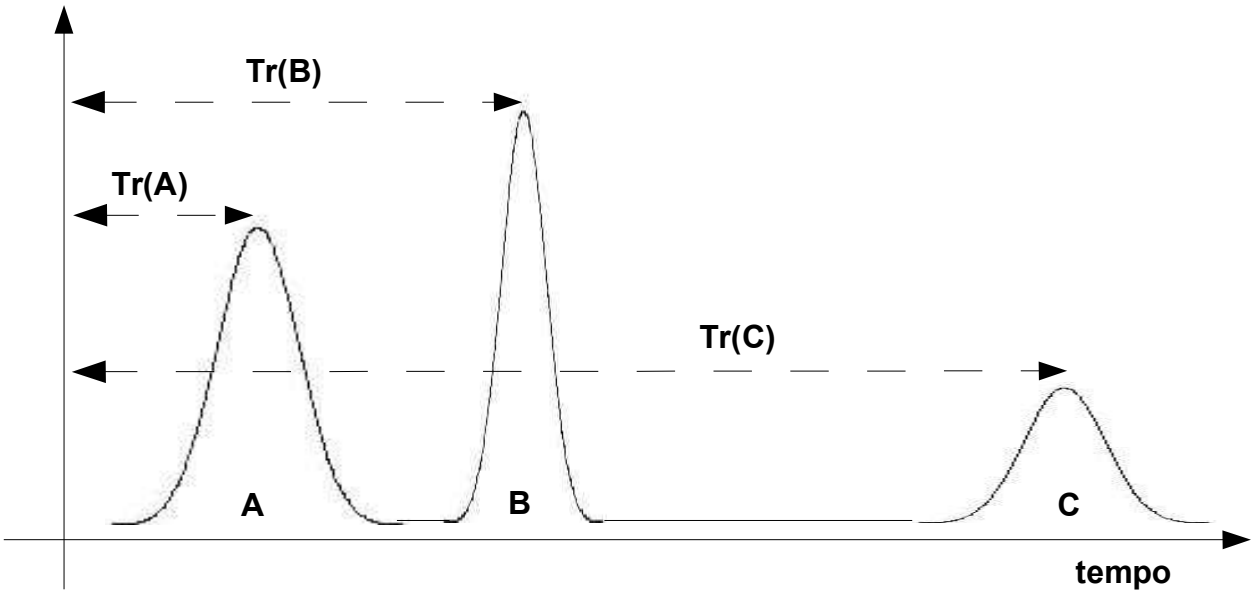
Ogni sostanza in uscita dalla colonna genera un segnale che verrà registrato sotto forma di '**picco**'.

Ogni picco è caratterizzato da:

-Altezza del picco. E' la distanza fra il massimo del picco e la sua base, misurata perpendicolarmente all'asse dei tempi.

-Ampiezza del picco. E' il segmento delimitato sulla base del picco dai punti di intersezione delle tangenti tracciate nei punti di flesso di ambedue i lati.

La successione dei vari picchi, corrispondenti alle varie sostanze in uscita dalla colonna, costituisce il **'cromatogramma'.** Il cromatogramma si presenta come in figura, dove in ordinate é riportata la risposta del rivelatore e in ascisse i tempi di uscita delle varie sostanze.



A questo punto, dal grafico (oltre a altezza e ampiezza dei picchi) si determina il

tempo di ritenzione

- è il tempo impiegato tra l'iniezione del campione e la registrazione del massimo del picco;
- dipende dalla natura della sostanza, dalla colonna e dalle condizioni operative;
- è fondamentale per le analisi qualitative.

L'altro parametro fondamentale ottenuto con il cromatogramma è l'

area del picco

- è la superficie delimitata dal contorno del picco e la linea di base;
- dipende dalla quantità di sostanza in uscita e dalle caratteristiche del rivelatore;
- è fondamentale per le analisi quantitative.

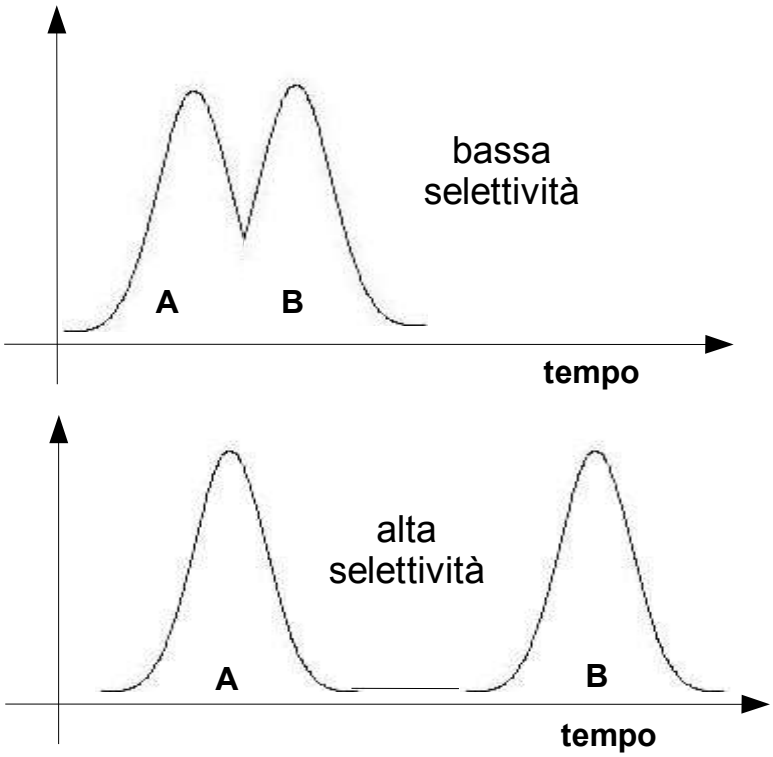
2.3 Risoluzione, selettività ed efficienza in una separazione cromatografica

Dall'esame del cromatogramma possiamo definire la selettività, l'efficienza e la risoluzione di una colonna.

Selettività.

E' definita come la capacità di una colonna di fornire picchi distanziati e dipende dalla temperatura e dalla natura della fase stazionaria.

A fianco sono riportati due cromatogrammi, di una miscela di due composti, ottenuti con due diverse fasi stazionarie: nel secondo caso si ha una maggior selettività.



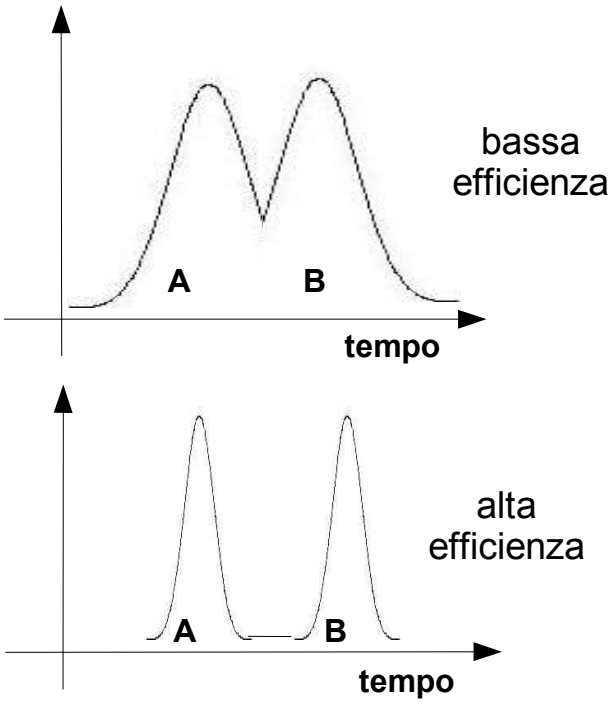
Efficienza.

E' la capacità del sistema cromatografico di mantenere compatta la banda di eluizione di una sostanza lungo tutto il percorso della fase mobile.

Ciò significa ottenere picchi alti e stretti all'uscita della colonna. La cosa é di grande importanza, perché qualora due sostanze avessero tempi di ritenzione molto vicini se ne potrebbe ottenere ugualmente la separazione.

Quindi, quanto più stretti sono i picchi tanto più efficiente risulta la colonna.

A fianco sono riportati due cromatogrammi di una miscela di due sostanze effettuati con colonne diverse; in ambedue i casi si ha la stessa selettività, ma nel secondo caso si ha una maggior efficienza.



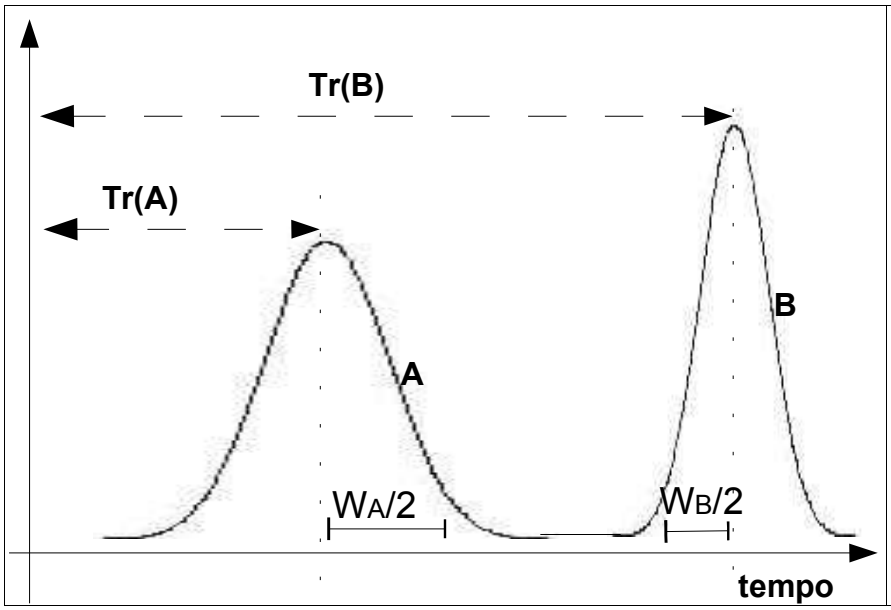
Risoluzione.

Questo fattore tiene conto sia della selettività che dell'efficienza, e indica il grado di effettiva separazione ottenuto per due sostanze in un processo cromatografico.

Dal punto di vista numerico si ottiene dalla relazione: $R = \frac{Tr(B) - Tr(A)}{W_A/2 + W_B/2}$

Per avere una buona separazione, dal punto di vista quantitativo, si deve avere risoluzione almeno 0,8 .

Per capire il significato di tale relazione si considerino questi due esempi:



Esempio 1

- picchi ben separati-

Tr(A)=93

Tr(B)=39

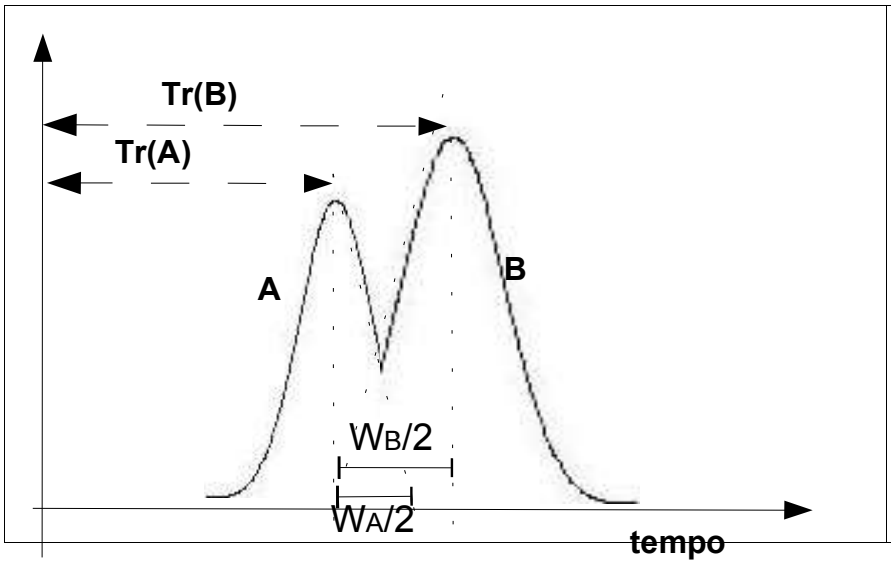
W_A/2=15

W_B/2=8

$$R = \frac{93-39}{15+8} = 2{,}3$$

La risoluzione è buona.

Le sostanze A e B sono state adeguatamente separate



Esempio 1

- picchi parzialmente sovrapposti-

Tr(A)=53

Tr(B)=40

W_A/2=16

W_B/2=11

$$R = \frac{53-40}{16+11} = 0{,}5$$

La risoluzione è insufficiente.

*Le sostanze A e B **non** sono state adeguatamente separate*

\- - - - -

L'esame di questi parametri (selettività, efficienza, risoluzione) é fondamentale per la scelta delle colonne e della temperatura.

Per colonne capillari non é necessario cercare grande selettività in quanto la loro grande efficienza può compensare una minor selettività.

2.4 Tecnica operativa

-Scelta della colonna.

I criteri per la scelta della colonna (più precisamente della fase stazionaria) sono sostanzialmente tre:

1) Per campioni con sostanze di polarità analoga ma con punti di ebollizione abbastanza diversi, non é necessario che la fase stazionaria sia particolarmente selettiva, per cui se ne impiega una apolare. In questo modo i composti usciranno in base alla loro volatilità decrescente.

2) Per campioni con sostanze di polarità diversa ma con punti di ebollizione abbastanza vicini, si possono usare fasi stazionarie sia polari che apolari. Infatti, con fasi polari sarà il componente polare a venir maggiormente trattenuto e l'altro uscirà per primo, mentre con fase apolare avverrà l'inverso.

3) Per campioni contenenti contemporaneamente sostanze non polari e sostanze non polari ma polarizzabili (esano-benzene), si utilizzano fasi molto polari. Quest'ultime infatti, polarizzano il composto aromatico stabilendo legami dipolo-dipolo indotto, mentre non trattengono l'esano che é assolutamente apolare e non polarizzabile, per cui sarà l'esano ad uscire per primo.

Per tutte le situazioni intermedie é necessario affidarsi soprattutto all'esperienza, concentrando comunque l'attenzione su fasi in grado di esaltare al massimo le differenze (polarità, polarizzabilità) tra le molecole.

-Scelta della temperatura della colonna.

La ricerca della temperatura ottimale va fatta per tentativi, tenendo presente che un aumento di 30°C può determinare in molti casi un dimezzamento dei tempi di ritenzione. Come primo approccio, la temperatura della colonna può essere decisa sulla base della media dei punti di ebollizione dei componenti la miscela.

Vi sono due possibilità di impostare la temperatura. Si può fare una isoterma, cioè la temperatura rimane sempre la stessa, oppure possiamo impostare una programmata, in cui la temperatura é variabile. La programmazione si esegue dando i seguenti comandi:

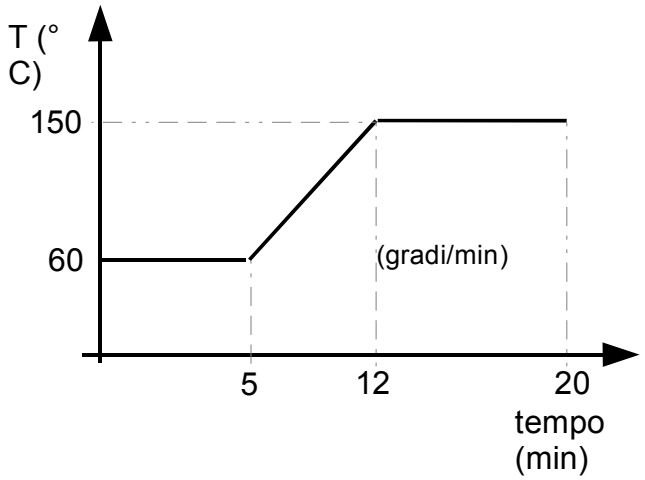
a) Temperatura iniziale T_i

b) Tempo di permanenza alla temperatura iniziale

c) Temperatura massima finale da raggiungere T_f

d) Velocità di incremento della temperatura

e) Tempo di permanenza alla temperatura finale



-Scelta della temperatura della camera di iniezione.

Questa deve essere in grado di vaporizzare l'intera miscela di composti quindi deve essere superiore alla temperatura di ebollizione del composto più altobollente.

-Scelta del rivelatore.

Dipende dalla natura del campione e dei suoi componenti e dalle esigenze analitiche. La scelta più importante riguarda le caratteristiche di universalità o di selettività, cioè in pratica si tratta di decidere se interessano tutti i componenti o solo particolari classi di composti.

-Scelta delle condizioni operative del rivelatore.

Per quanto riguarda il *FID*, la temperatura deve essere almeno di 40-50 gradi al di sopra di quella della colonna. Tale valore può essere incrementato se nel campione sono presenti composti altobollenti oppure un numero elevato di componenti. L'aria va mantenuta a 300-400 ml/min, l'idrogeno intorno a 30 ml/min.

Per l' *ECD* la temperatura deve essere di 25-30 gradi superiore a quella della colonna. La portata del carrier deve essere intorno a 50-60 ml/min. Se le condizioni operative per la colonna impongono flussi più bassi, é necessario inviare al detector un eccesso di carrier attraverso un apposito condotto ausiliario. E' opportuno non utilizzare acetone, cloruro di metilene o altri alogeno derivati. I solventi impiegati per i campioni non devono assolutamente essere elettrofili.

-Scelta del carrier e della sua portata.

La scelta del gas di trasporto dipende in misura preponderante dal tipo di rivelatore utilizzato, ma va tenuto presente che l'efficienza aumenta utilizzando gas con peso molecolare elevato.

La portata del gas eluente (carrier) ha influenza sull'efficienza della colonna, sui tempi di ritenzione e sulla risposta del rivelatore. In linea di massima il tempo di ritenzione é inversamente proporzionale alla velocità media del gas di trasporto. Il rivelatore produce segnali inversamente proporzionali al volume di gas che passa, quindi l'area del picco diminuisce con l'aumentare della portata. I flussi ottimali si aggirano intorno a 20-30 ml/min.

-Trattamento del campione.

Spesso il campione da esaminare non può essere iniettato come tale o in soluzione. Bisogna infatti aver presenti i pericoli a cui va incontro il sistema cromatografico e dall'altro la possibilità che il campione si decomponga o che il suo stato fisico sia tale da impedirne l'iniezione.

Alcuni accorgimenti sono i seguenti:

a) Disidratazione. Quando si opera con fasi stazionarie particolarmente sensibili all'umidità e si usano rivelatori (*ECD*) che ne risentono negativamente, é necessario procedere alla disidratazione dei campioni.

b) Derivatizzazione. L'analisi di composti altobollenti richiede temperature troppo elevate con rischi di decomposizione, polimerizzazioni o addirittura carbonizzazioni. In questi casi può essere molto utile la modificazione chimica del campione che permette di ottenere derivati a maggior volatilità. Ad esempio gli acidi grassi vengono trasformati nei loro esteri metilici che sono più volatili.

c) Cromatografia dello spazio di testa. Quando si devono analizzare tracce di composti volatili in campioni solidi o in una grande massa di solvente, il miglior modo é quello di iniettare il vapore che si trova in equilibrio con il campione da analizzare all'interno di un sistema chiuso costituito da un contenitore di vetro opportunamente sigillato.

-Iniezione.

Come prima cosa bisogna scegliere la tecnica e cioè se split oppure splitless. Nel primo caso sarà necessario fissare il rapporto di splittaggio. Mediante una microsiringa si inietta il campione.

E' bene iniettare la minor quantità possibile di sostanza, ponendo il rivelatore in condizioni di lavorare alla massima sensibilità. Si ottiene così un miglioramento dell'efficienza e una maggior simmetria dei picchi, in quanto, in queste condizioni, l'isoterma di ripartizione é una retta.

-Registrazione del cromatogramma

Quando i diversi componenti di una miscela hanno concentrazioni simili, non esistono particolari problemi di registrazione, in quanto si tratta di individuare l'attenuazione più adatta del rivelatore. I problemi si complicano se in una miscela vanno evidenziati componenti che si trovano in quantità massicce accanto a componenti presenti in piccola quantità. In questi casi se i picchi sono molto distanti é possibile cambiare l'attenuazione nel corso della cromatografia. Se sono molto vicini si può provare con la cosiddetta tecnica dei rientri.

Questi problemi non si pongono se lo strumento é corredato di un integratore per il calcolo delle aree dei picchi.

-Ottimizzazione della separazione.

In genere il primo cromatogramma non risulta perfetto, cioè costituito da picchi ben distanziati alti e stretti, per cui occorre modificare qualche parametro, vediamo qualche esempio:

- Picchi che escono fuori scala: basta aumentare l'attenuazione;
- Picchi troppi bassi: basta diminuire l'attenuazione;
- Picchi poco risolti: si può provare ad abbassare la temperatura della colonna o ad abbassare il flusso del carrier, quest'ultima soluzione risulta però poco efficace. Se non si ottiene un miglioramento sarà opportuno cambiare colonna.
- Picchi larghi: si può provare ad alzare la temperatura della colonna o aumentare il flusso.
- Picchi alti e stretti (ma poco risolti) all'inizio e larghi in coda: effettuare la cromatografia facendo variare la temperatura della colonna, cioè effettuare una programmata.

2.5 Analisi qualitativa e quantitativa

La gas-cromatografia permette di effettuare sia analisi qualitative che quantitative, anche se principalmente è utilizzata per quest'ultime.

-Analisi qualitativa.

L'interpretazione dei cromatogrammi rappresenta l'operazione più lunga. E' necessario innanzitutto avere la più completa serie di informazioni sulla natura e l'origine della miscela da analizzare.

I metodi utilizzabili per l'individuazione delle sostanze sono:

- Basarsi su dati di letteratura, quali i tempi di ritenzione; purtroppo tali valori dipendono da molti fattori quali le caratteristiche dello strumento, le condizioni operative e l'operatore.
- Metodo basato sull'arricchimento. Quando si ritiene che un determinato picco corrisponda ad una sostanza nota, si aggiunge alla miscela una certa quantità di sostanza pura. Se compare un altro picco, siamo sicuri che la specie nota non é presente nella miscela, mentre se un picco risulta più alto, potrebbe essere presente e per questo é necessario effettuare altre analisi cambiando condizioni operative.
- Impiego di reattivi. Per evidenziare la presenza di determinati componenti si può far gorgogliare il gas in uscita entro una provetta contenente reattivi specifici. Naturalmente il rivelatore non deve essere distruttivo.
- Impiego di strumenti ausiliari. Il gas in uscita da un rivelatore non distruttivo può essere fatto gorgogliare in appositi solventi e la soluzione indagata con altri metodi strumentali. ***Inoltre é possibile collegare direttamente il gas-cromatografo ad uno spettrometro di massa***, in questo modo si può registrare lo spettro di massa il quale é univoco per una certa specie chimica.

-Analisi quantitativa.

L'analisi quantitativa è basata sul confronto delle aree dei picchi.

Bisogna però tenere conto di una serie di possibili complicazioni:

- non è detto che tutte le sostanze presenti nel campione si vedano nel cromatogramma;
- i rivelatori possono presentare diverse risposte per diverse sostanze;
- non tutti i picchi potrebbero essere ben separati;
- non è facile conoscere accuratamente la quantità di miscuglio effettivamente immesso in colonna.

A causa di ciò esistono diverse metodologie di studio quantitativo tramite GC, che si adattano alle

diverse situazioni.

CONFRONTO DIRETTO DELL'AREA DEI PICCHI

Vediamo il caso più semplice, che si può avere ad esempio usando un *FID* per la rivelazione di idrocarburi o degli esteri metilici degli acidi grassi (ciò non é rigorosamente vero ma l'approssimazione é molto buona):

Se **la risposta del rivelatore é uguale per tutti i componenti** e ....

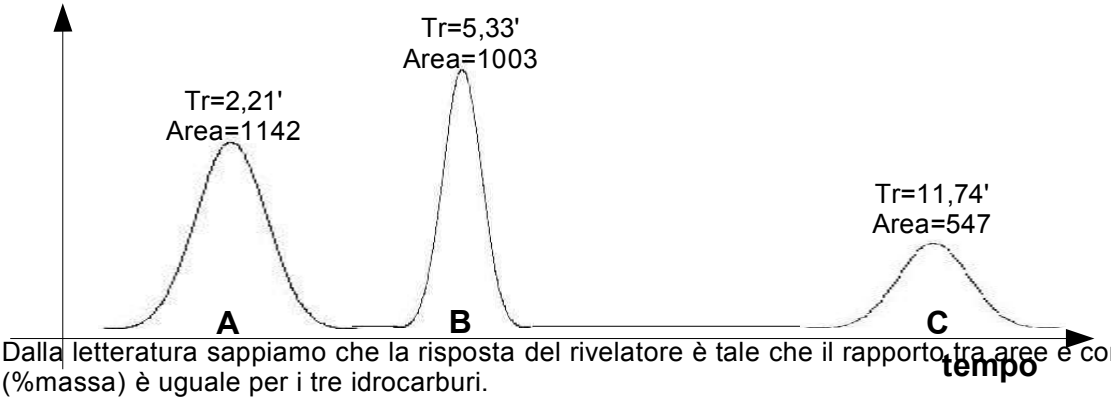
.... se questi **sono rappresentati tutti nel cromatogramma da picchi ben distinti e risolti** ....

si verifica quindi la condizione che il rapporto tra area picco e concentrazione del componente é uguale per tutti i picchi:

allora, in questo caso, il % in massa di ciascun componente si ottiene dividendo l'area del rispettivo picco per la somma delle aree di tutti i picchi, rapportando il valore a 100.

Esempio 1 (analisi quantitativa per confronto diretto delle aree dei picchi)

Abbiamo iniettato in colonna una miscela di tre idrocarburi (A, B e C) ottenendo (rivelatore FID) il cromatogramma sotto riportato:



Dalla letteratura sappiamo che la risposta del rivelatore è tale che il rapporto tra aree e concentrazioni (%massa) è uguale per i tre idrocarburi.

Area TOT = 1142 + 1003 + 547 = 2692

$$\%A = \frac{1142}{2692}\cdot 100 = 42{,}4\%$$

$$\%B = \frac{1003}{2692}\cdot 100 = 37{,}3\%$$

$$\%C = \frac{547}{2692}\cdot 100 = 20{,}3\%$$

Purtroppo non è questo il caso più frequente!

Nel caso in cui le condizioni suddette non fossero verificate si può procedere in diversi modi, come:

- normalizzazione interna;
- taratura diretta;
- standardizzazione esterna;
- per standardizzazione interna;
- metodo dell'aggiunta.

NORMALIZZAZIONE INTERNA

L'area (S) di ogni picco va corretta introducendo dei fattori di correzione (f) in modo da renderle confrontabili l'una con l'altra e cioè proporzionali alla concentrazione (C) dei rispettivi composti. Quindi bisogna fare in modo che:

$$\frac{S_A^{corr}}{C_A} = \frac{S_B^{corr}}{C_B} = \frac{S_C^{corr}}{C_A} = \ldots$$

Dove: $S_A^{corr} = S_A \cdot f_A$ $S_B^{corr} = S_B \cdot f_B$ $S_C^{corr} = S_C \cdot f_C$

Per calcolare i fattori correttivi **si prepara una miscela nota contenente tutti i componenti**, si inietta e si misurano le aree. In pratica, adottiamo un componente (ad es. *A*) come riferimento e poniamo f_a=1 :

$$\frac{S_A}{C_A} = \frac{S_B \cdot f_B}{C_B} = \frac{S_C \cdot f_C}{C_A} = \ldots$$

Possiamo così ricavare, basandoci sul cromatogramma del campione noto da noi preparato:

$$f_B = \frac{S_A}{C_A} \cdot \frac{C_B}{S_B} \qquad f_C = \frac{S_A}{C_A} \cdot \frac{C_C}{S_C} \qquad \ldots\ldots\ldots$$

A questo punto si procede all'esame del campione incognito ricavando le aree corrette (S^{corr}) e procedendo come nel caso precedente.

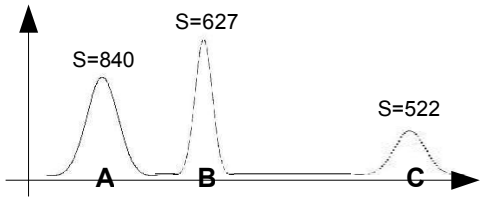
$$S_A^{corr} = S_A \qquad S_B^{corr} = S_B \cdot f_B \qquad S_C^{corr} = S_C \cdot f_C$$

Questo metodo é applicabile solo quando si ha la sicurezza che tutti i componenti di una miscela siano rappresentati nel cromatogramma.

Inoltre tutti i componenti devono essere noti e reperibili per poter preparare la soluzione di riferimento.

Esempio 2 (normalizzazione interna con fattori di correzione)

Abbiamo iniettato in colonna una miscela incognita di tre sostanze (A, B e C) ottenendo ottenendo il cromatogramma a fianco:



E' stata quindi preparata una soluzione nota contenente A (C=25%), B (C=25%) e C (C=50%) e sottoposta a cromatografia nelle stesse condizioni: si ottiene così S_A=450 , S_B=612 e S_C=889.

Poniamo f_A=1 e calcoliamo (basandoci sul cromatogramma del campione noto):

$$f_B = \frac{S_A}{C_A} \cdot \frac{C_B}{S_B} = \frac{450}{25} \cdot \frac{25}{612} = 0{,}735 \qquad f_C = \frac{S_A}{C_A} \cdot \frac{C_C}{S_C} = \frac{450}{25} \cdot \frac{50}{889} = 1{,}01$$

Basandoci sul cromatogramma del campione incognito calcoliamo le aree corrette:

$$S_A^{corr} = S_A = 840 \qquad S_B^{corr} = 627 \cdot 0{,}735 = 461 \qquad S_C^{corr} = 522 \cdot 1{,}01 = 527$$

S^{corr} TOT = 840 + 461 + 527 = 1828

%A= $\frac{840}{1828} \cdot 100$ = 46,0% %B= $\frac{461}{1828} \cdot 100$ = 25,2% %C= $\frac{527}{1828} \cdot 100$ = 28,8%

TARATURA DIRETTA

Con questo metodo é possibile determinare la concentrazione dei soli componenti che interessano.

- Si inietta un volume noto del campione e si registra il cromatogramma.
- Si inietta lo stesso volume di una miscela a concentrazione nota ('standard') dei componenti da determinare, e si registra il cromatogramma.
- Si procede al calcolo diretto; ad esempio per una sostanza A:

$$S_A^{standard} : C_A^{standard} = S_A^{campione} : C_A^{campione}$$

E' importante fare in modo che la concentrazione nello standard e nel campione non siano molto diverse.

Il principale inconveniente sta nella misurazione del volume da iniettare. Si consiglia di fare diverse iniezioni e di calcolare la media delle aree.

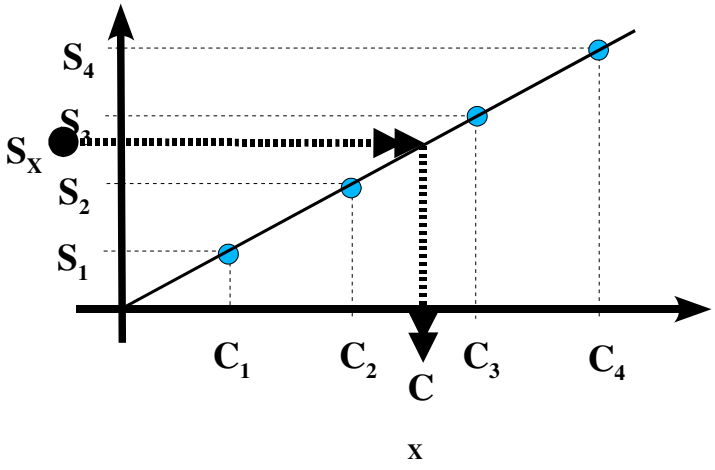
Il notevole vantaggio di questo metodo é che non obbliga a lavorare su tutti i componenti la miscela, come invece accade con la normalizzazione interna.

STANDARDIZZAZIONE ESTERNA

E' basato sullo stesso principio del metodo precedente, con la differenza che si procede alla costruzione di una curva di taratura:

- Si preparano soluzioni standard a concentrazione nota del componente da determinare.
- Si iniettano quantitativi rigorosamente uguali di ogni soluzione standard e si riportano su un grafico le aree dei picchi ottenuti in funzione della concentrazione dello standard corrispondente.
- Si inietta poi un'aliquota del campione rigorosamente uguale a quelle precedenti, si misura l'area del componente che interessa e, attraverso il grafico, si risale alla sua concentrazione.

Anche questo metodo presenta il problema dell'accuratezza delle quantità iniettate.



Esempio 3 (taratura diretta)

Abbiamo iniettato in colonna miscela incognita di diverse sostanze, tra cui il metanolo. Il picco relativo al metanolo ha S=12453.

Iniettando lo stesso volume di una soluzione al 10% di metanolo si ottiene un picco del metanolo con S=10004.

Si procede al calcolo: 10004 : 10% = 12453 : $C_{metanolo}$ $C_{metanolo} = 10 \cdot \frac{12453}{10004} = 12{,}5\,\%$

STANDARDIZZAZIONE INTERNA

E' un metodo che consente di ottenere risultati molto accurati, in quanto sfrutta il rapporto tra l'area del picco dell'analita e l'area del picco di una sostanza ("standard interno") ***appositamente aggiunto in quantità nota.***

Non si risente quindi del problema della difficile riproducibilità delle quantità realmente iniettate in colonna.

Si prepara una soluzione standard utilizzando due composti, dei quali uno deve essere il componente che interessa presente nella miscela da analizzare, l'altro é invece un composto, detto standard interno, che deve obbedire ai seguenti requisiti:

- non essere presente nella miscela da analizzare;
- essere ben risolto dagli altri componenti;
- avere un tempo di ritenzione simile a quello della sostanza da determinare;
- non contenere impurezze rivelabili;
- non reagire con nessun componente della miscela.

Come prima cosa si inietta una soluzione formata dal composto da determinare (A) e dallo standard interno (SI) in rapporto 1/1. Si registra il cromatogramma e si determina il fattore correttivo per l'area del picco della sostanza da determinare, assumendo uguale ad uno quello dello standard:

$$\frac{S_{SI}}{C_{SI}} = \frac{S_A \cdot f_A}{C_A} \qquad f_A = \frac{S_{SI}}{C_{SI}} \cdot \frac{C_A}{S_A} = \frac{S_{SI}}{S_A}$$

Si inietta il campione, ***a cui é stato aggiunto lo standard interno in quantità nota (e in modo che la concentrazione sia analoga a quella del componente da determinare)***, si esegue il cromatogramma, si calcolano le aree e si correggono e quindi si risale alla concentrazione tramite:

$$C_{SI} : C_A = S_{SI} : S_A^{corr}$$

Per una maggiore accuratezza, è possibile preparare più soluzioni note con diversi rapporti tra analita e standard interno e costruire così una retta di lavoro.

Risulta evidente che il metodo della standardizzazione interna comporta talune complicazioni di natura sperimentale, richiedendo la preparazione di un miscuglio, esattamente dosato, tra lo standard interno e la sostanza in esame. Tale metodo risulta però assai vantaggioso quando, per ragioni diverse, non é possibile o non é conveniente eluire tutto il cromatogramma ed é richiesta l'elaborazione di un numero limitato di picchi.

Esempio 4 (standard interno)

Si vuole determinare la concentrazione di propanolo in una soluzione che non contiene butanolo (useremo quindi il butanolo come standard interno).

Si prepara e poi si inietta una soluzione contenente 2,0mg/mL di propanolo e 2,0 mg/mL di butanolo:
$S_{propanolo}$= *1245* $S_{butanolo}$= *853* ricavo quindi $f_{propanolo}$=*853/1245=0,685*

Si prepara una soluzione mescolando 10 mL di campione in esame e 4 ml di soluzione contenente 2,0 mg/mL di butanolo. Se ne inietta una aliquota in colonna:
$S_{propanolo}$= 1070 $S_{butanolo}$= 991 (quindi $S_{propanolo}^{corr}$ = *1070 x 0,685 = 733*)

In questa soluzione iniettata: $C_{butnolo} = 2{,}0\,mg/mL \cdot 4\,\frac{mL}{14}\,mL$ $C_{propanolo} = Cx \cdot 10\,\frac{mL}{14}\,mL$

considerato che $C_{butanolo} : C_{propanolo} = S_{butanolo} : S_{propanolo}^{corr}$

$(2{,}0\,mg/mL \cdot \frac{4}{14}) : (Cx \cdot \frac{10}{14}) = 991 : 733$ otteniamo **Cx=0,59 mg/mL di propanolo**

METODO DELL'AGGIUNTA

Il 'metodo dell'aggiunta' viene utilizzato, con le dovute varianti, in quasi tutti i settori dell'analisi chimica strumentale.

E' molto importante, perché spesso è l'unico modo di eliminare interferenze in matrici complesse.

Consiste nell'aggiungere quantità note di analita alla soluzione da esaminare, studiando poi la corrispondente variazione del segnale ottenuto per risalire alla concentrazione nel campione in esame.

Si può effettuare una singola aggiunta oppure una serie di aggiunte multiple; per esaminare una possibile applicazione in gascromatografia, vedremo un esempio basato su singola aggiunta.

Esempio 5

- Determinazione del benzene in una miscela di idrocarburi con il metodo dell'aggiunta -

La miscela in esame contiene benzene (concentrazione $C_{benzene}$), toluene (concentrazione $C_{toluene}$) e altro.

Sottoponendo a GC la miscela incognita si ottengono numerosi picchi, tra i quali: $S_{benzene}$ e $S_{toluene}$

Si prepara quindi un miscuglio aggiungendo una quantità (A) di benzene ad un certo volume (V) di miscuglio incognito; le concentrazioni del benzene e del toluene diventeranno:

$$C^*_{benzene}=\frac{C_{benzene}\cdot V+A}{V+V_A} \quad \text{e} \quad C^*_{toluene}=\frac{C_{toluene}\cdot V}{V+V_A}$$ (dove V_A è il volume dell'aggiunta)

Sottoponendo a GC la miscela con l'aggiunta, misureremo $S^*_{benzene}$ e $S^*_{toluene}$

Con qualche passaggio algebrico si ricava: $$C_{benzene}=\frac{A}{V}\cdot\frac{\frac{S_{benzene}}{S_{toluene}}}{\frac{S^*_{benzene}}{S^*_{toluene}}-\frac{S_{benzene}}{S_{toluene}}}$$

Vediamo un esempio numerico:

Sottoponendo a GC la miscela incognita si ottengono numerosi picchi, tra i quali:

$S_{benzene}$=415 $S_{toluene}$=722 *(ricavo $S_{benzene}/S_{toluene}$=0,575)*

Si prepara una miscuglio con 100mL di miscuglio incognito + 2 g di benzene e si sottopone a GC:

$S^*_{benzene}$=475 $S^*_{toluene}$=618 *(ricavo $S^*_{benzene}/S^*_{toluene}$=0,769)*

Ottengo così la concentrazione del benzene nel campione in esame:

$$C_{benzene}=\frac{2{,}0\ \text{g}}{0{,}100\ \text{L}}\cdot\frac{0{,}575}{0{,}769-0{,}575}=59\ g/L$$

Naturalmente, per ottenere determinazioni accurate, è opportuno effettuare più misure, ricavare la media, ...

3 - ESERCITAZIONI E VERIFICHE

3.1 Esercizi sulle analisi gascromatografiche

Es. 1: Analisi gascromatografica di una miscela di alcol

Una miscela contiene esclusivamente tre alcol (metanolo, etanolo e 1-propanolo). Iniettando la miscela incognita si ottengono le seguenti aree: $S_{metanolo}$=137 $S_{etanolo}$=192 $S_{1\text{-}propanolo}$=604

E' stata quindi preparata una soluzione mescolando: 1,0g di ognuno dei tre alcol. Iniettando tale soluzione di riferimento si ottengono le seguenti aree: $S_{metanolo}$=560 $S_{etanolo}$=547 $S_{1\text{-}propanolo}$=581

Calcolare la concentrazione di ogni componente della miscela incognita.

Es. 2: Determinazione del benzene

Si vuole determinare la concentrazione di benzene in una miscela complessa.

La miscela da esaminare non contiene toluene in quantità rilevabili.

Viene preparata una soluzione conenente100mg/mL di benzene e 100mg/L di toluene. Iniettando tale soluzione di riferimento si ottengono le seguenti aree: $S_{benzene}$=1205 $S_{toluene}$=887

Viene poi preparata una soluzione mescolando 5mL di miscela incognita con 5 mL della soluzione contenente 100mg/L di toluene, ottenendo: $S_{benzene}$=420 $S_{toluene}$=188

Calcolare la concentrazione di benzene nella miscela incognita.

Es. 3: Determinazione dell'etanolo

Una miscela complessa contiene metanolo, etanolo e altre sostanze; sottoponendo a GC la miscela incognita si ottengono vari picchi, tra i quali: $S_{metanolo}$=1243 $S_{etanolo}$=1004

Si prepara una miscuglio con 50mL di miscela incognita + 0,54 g di etanolo e si sottopone a GC:

$S^*_{metanolo}$=1124 $S^*_{etanolo}$=1613

Calcolare la concentrazione dell'etanolo nella miscela in esame.

3.2 Quesiti a risposta aperta

1) .....*(max 25 righe)*

2) .....? *(max 10 righe)*

3.3 Quesiti a risposta multipla

*Indica **la** risposta corretta*

1. **.....**
   - ☐ .....
   - ☐ .....
   - ☐ .....
   - ☐ .....

2. **.....**
   - ☐ .....
   - ☐