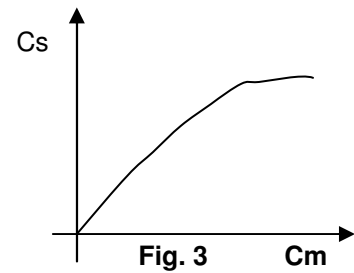
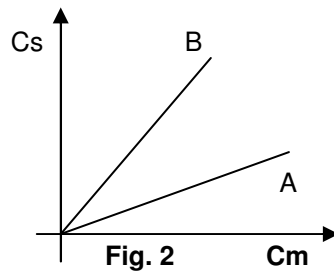
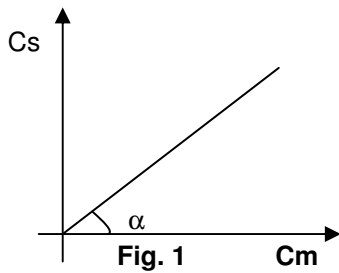
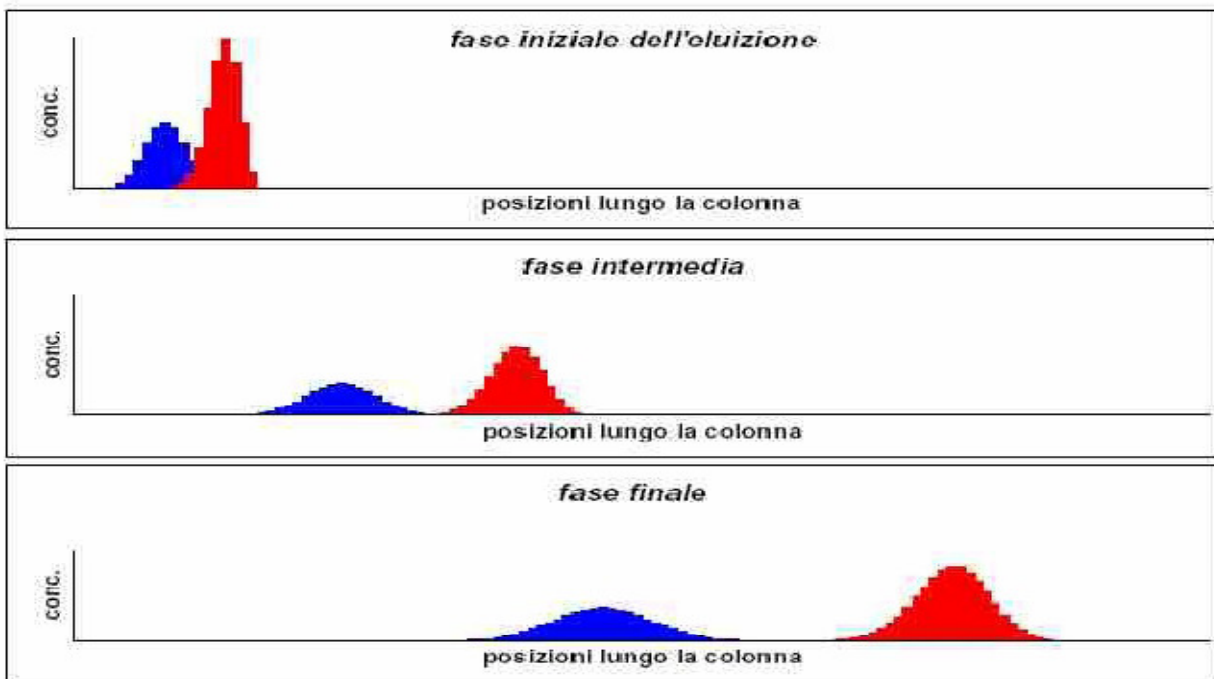


## CROMATOGRAFIA

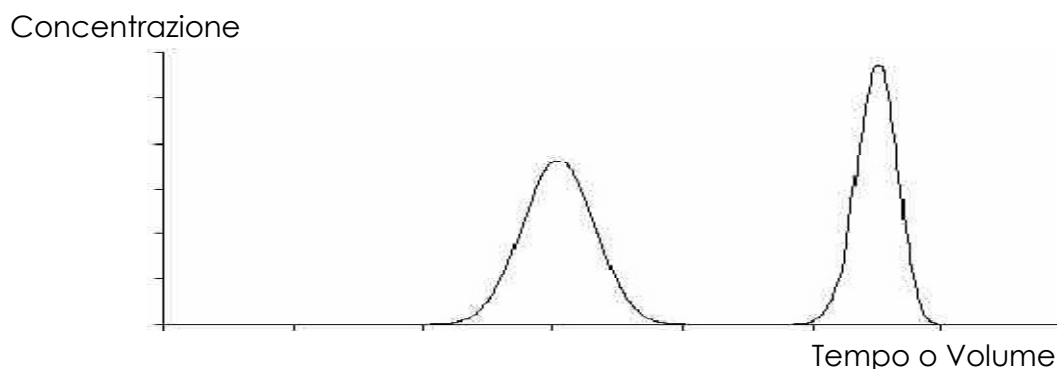
Prima di parlare di gascromatografia è necessario spiegare come funziona la tecnica cromatografica. La cromatografia è una tecnica di separazione di vari componenti di una miscela, al pari di una distillazione frazionata, di una cristallizzazione e una estrazione con solvente, ma è tuttavia molto più efficace. Fu ideata nel 1906 dal russo Tswett, la sua 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 viene fatta scorrere sopra di essa (fase mobile, o 'eluente'), è 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 è costituita da un fluido (che si muove sopra la fase stazionaria), cioè da un liquido o un gas. Se si considera un sistema formato da due fasi in cui viene introdotta una sostanza, questa si distribuirà fra le due fasi a seconda delle sue particolari proprietà chimico-fisiche. Indicando con  $C_m$  e  $C_s$ , rispettivamente, la concentrazione della sostanza nella fase mobile e quella nella fase stazionaria, e supponendo che le condizioni sperimentali siano tali da conseguire il raggiungimento di equilibri successivi del tipo:  $C_m \rightleftharpoons C_s$ , si può rappresentare con  $K$  la corrispondente costante di equilibrio:  $K = C_s / C_m$ , che 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 fine della colonna, separandosi sempre di più dalle sostanze maggiormente trattenute. L'equazione  $K = C_s / C_m$  è l'equazione di una retta la cui pendenza è data da  $\tan \alpha = K$  (vedi figura 1). Nella figura 2 viene riportata la retta, detta isoterma di distribuzione, di due sostanze A e B per le quali  $K_a < K_b$ . 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. In pratica le isoterme non hanno l'andamento teorico visto, ma si presentano come in figura 3. 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.



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), che trascinerà in modo diverso le diverse sostanze lungo 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):



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

**Adsorbimento:** la fase stazionaria è un solido sulla cui superficie si trovano dei siti attivi in grado di stabilire legami secondari (dipolo-dipolo<sup>1</sup>, ponte di idrogeno<sup>2</sup>, Van der Waals<sup>3</sup>) con le diverse molecole della miscela da risolvere (separare). Se la fase mobile è un liquido si parla di cromatografia liquido-solido (LSC), se invece è 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.

**Ripartizione:** la fase stazionaria è 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 è un gas si parla di cromatografia gas-liquido (GLC), se invece è un liquido, di cromatografia liquido-liquido (LLC).

**Scambio ionico:** la fase stazionaria è 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.

**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.

<sup>1</sup> Il legame dipolo-dipolo è determinato da una forza di natura elettrostatica che si manifesta tra molecole polari. Ogni molecola polare infatti, presenta un'estremità positiva e un'estremità negativa. La parte positiva attira a sé la parte negativa di una molecola vicina; le varie molecole risultano così legate l'una all'altra da una forza attrattiva di natura elettrostatica, detta appunto legame dipolo-dipolo.

<sup>2</sup> Il legame idrogeno si forma quando la relativamente forte carica positiva dell'idrogeno viene in contatto con un doppietto elettronico di un gruppo funzionale di un'altra molecola, il quale lega l'H e viene definito accettore. Il gruppo dove è legato l'H in maniera covalente viene detto donatore.

<sup>3</sup> In chimica per forza di van der Waals si intende un tipo di debole attrazione intermolecolare causata da dipoli indotti.

## **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 gascromatografia). Mentre la cromatografia liquida può essere realizzata su colonna, su strato sottile e su carta, la gascromatografia è 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):** 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 è costituita da vari solventi organici. Le tecniche di eluizione possono essere di tipo ascendente, discendente o orizzontale.

**Cromatografia su carta (PC):** la fase stazionaria è 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 è scelta in funzione del tipo di fase stazionaria e delle proprietà chimiche dei composti da separare. Quasi sempre comunque è una miscela contenente acqua.

**Cromatografia su colonna a bassa pressione (LPC):** Il modo non è molto dissimile da quello descritto originariamente da Tswett. La fase mobile è 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.

**Cromatografia in fase liquida ad elevate prestazioni (HPLC):** 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.

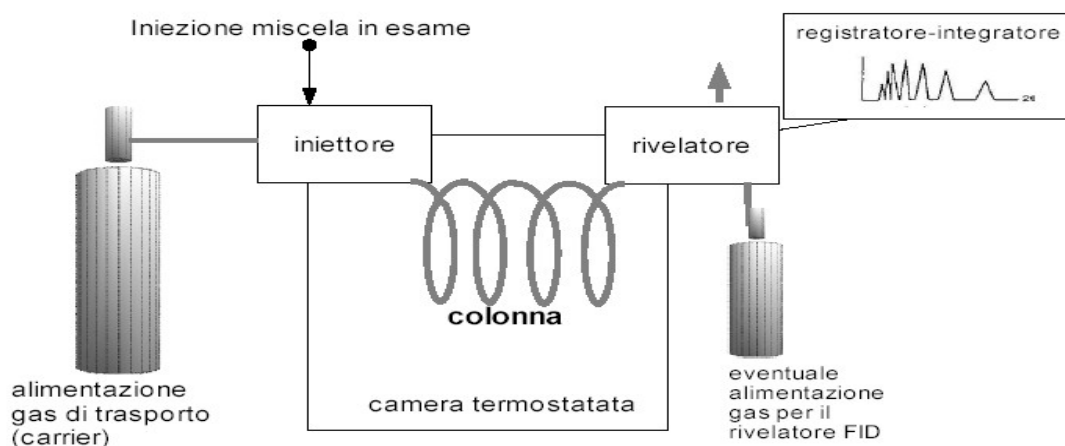
**Gascromatografia (GC):** la fase mobile è un gas.

### **Gascromatografia**

Nella tecnica gascromatografica la fase mobile è 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. A seconda dello 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 a partire dagli anni '60, conserva tuttora una posizione di primo piano come tecnica analitica. L'unica limitazione della gas-cromatografia è la necessità di rendere volatili i campioni da analizzare, per cui in alcuni casi essa è 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 è già parlato. Il primo nel caso che la fase stazionaria sia liquida, il secondo quando è solida.

## Strumentazione

In figura viene mostrato lo schema essenziale gas-cromatografo, in modo da capire l'intero processo di analisi:



**1) Sistema di alimentazione gas di trasporto (carrier):** si tratta di bombole di gas inerte che solitamente contengono azoto, elio od argon, talvolta può essere utilizzato anche l'idrogeno. Lo scopo principale è 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 un comburente (ad esempio idrogeno ed aria).

**3) Iniettore o camera di iniezione:** ha il compito di assicurare l'istantanea vaporizzazione del campione. Poiché con l'uso di colonne capillari (citate più avanti) la quantità di campione da iniettare è dell'ordine dei nanolitri, e misurare queste quantità con siringhe è praticamente impossibile (con apposite siringhe si arriva ai  $\mu\text{L}$ ), sono state messe a punto particolari tecniche di iniezione. Spesso si utilizzano quindi opportune tecniche (ad esempio di split) che consentono di far entrare effettivamente in colonna solo una parte (dell'ordine di 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:** può essere di due tipi: impaccata o capillare. L'impaccata (diametro interno 2-4 mm, lunghezza 1-4 m) è usata nella gascromatografia classica e comporta una separazione in colonna di acciaio o di vetro (due metri circa) riempita di materiale inerte (supporto per la fase stazionaria) sulla 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 delle 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 molto più piccola e viene eluita prima. Le colonne sono alloggiare in una camera termostatica, in genere a circolazione di aria calda, con questo sistema viene assicurata una buona stabilità di temperatura. 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:** è un dispositivo in grado di rivelare la presenza di una sostanza estranea nel gas di trasporto, a valle della colonna, può essere di due tipi: universale (FID e HWD) o selettivo (ECD). Il primo consente di individuare tutti i componenti di una miscela, il secondo rivela 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, è costituito dall'ugello stesso. La microfiamma provoca una debolissima corrente ionica tra gli elettrodi, che vengono mantenuti sotto una differenza di potenziale di circa 300 V. Questa corrente, elaborata, amplificata e misurata, 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 è 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 è molto elevata, infatti si può arrivare ai nanogrammi.

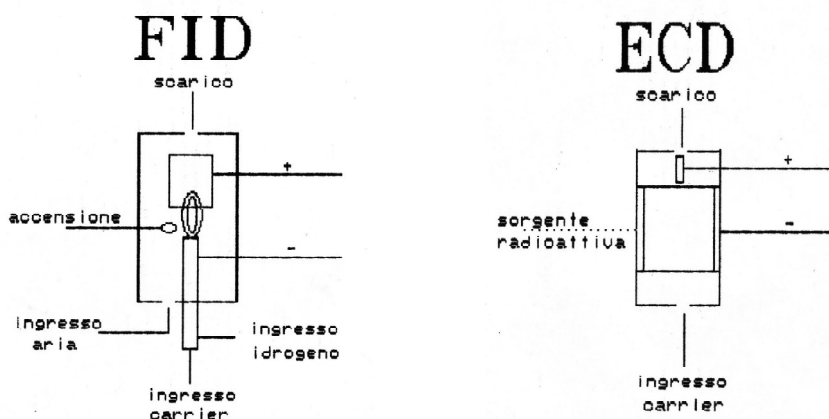
#### **-Rivelatore a cattura di elettroni (ECD)**

Si tratta di un rivelatore selettivo e non distruttivo. Esso è costituito da una sorgente radioattiva ( $^{63}\text{Ni}$ ) 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 è presente un'altra sostanza elettroaffine, cioè in grado di catturare gli elettroni secondari, si verifica una diminuzione di corrente di fondo. La corrente, elaborata, amplificata e misurata, 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).



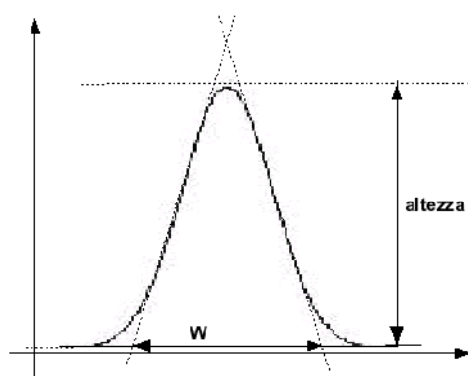
**6) Registratore e integratore:** il segnale in uscita dal rivelatore passa ad un registratore che ha il compito di realizzare il tracciato cromatografico. I moderni strumenti sono corredati anche di un integratore che permette il calcolo automatico delle aree dei picchi, operazione indispensabile per effettuare analisi di tipo quantitativo.

### **I picchi e il cromatogramma**

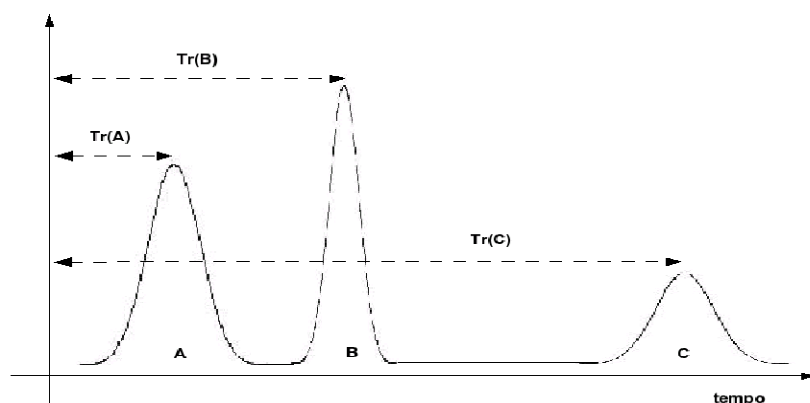
Ogni sostanza in uscita dalla colonna genera un segnale che verrà registrato sotto forma di '**picco**'. Ogni picco è caratterizzato da:

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

-Ampiezza del picco: è 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 ordinata è riportata la risposta del rivelatore e in ascissa il tempo di uscita delle varie sostanze.



A questo punto, dal grafico (oltre a altezza e ampiezza dei picchi) si determinano due parametri essenziali:

#### **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.

#### **area del picco:**

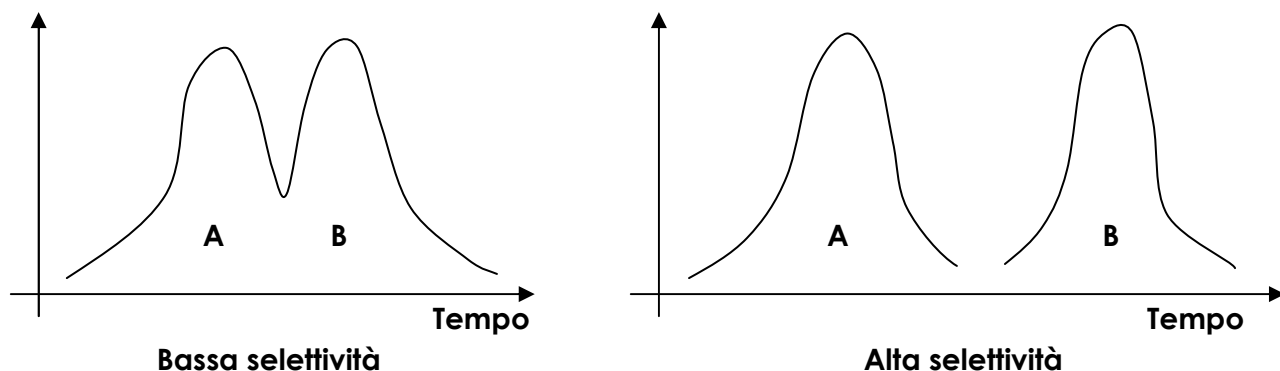
- è la superficie delimitata dal contorno del picco e la linea di base;
- dipende dalla quantità di sostanza in uscita e dalle caratteristiche del rivelatore;
- è fondamentale per le analisi quantitative.

#### **Risoluzione, selettività ed efficienza in una separazione cromatografica**

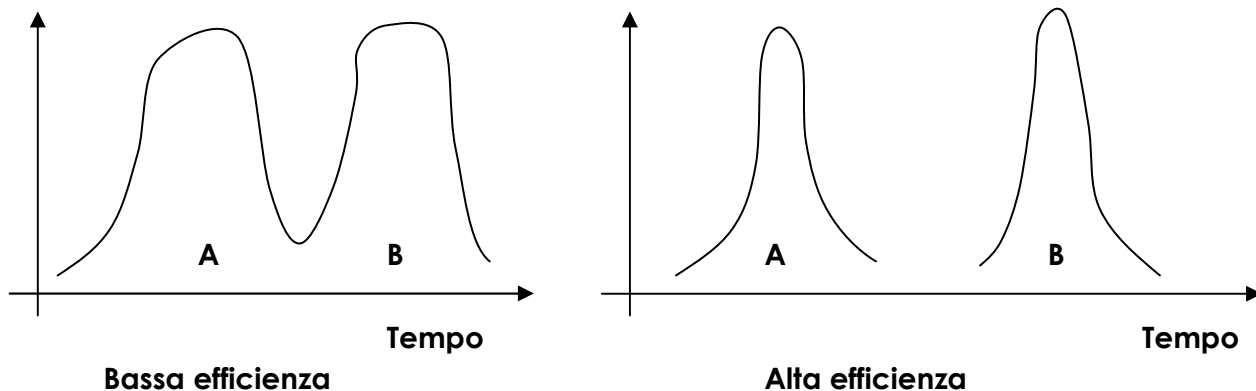
Dall'esame del cromatogramma si possono definire la selettività, l'efficienza e la risoluzione di una colonna.



**Selettività:** viene 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:** è 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 è 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. Sotto sono riportati due cromatogrammi di una miscela di due sostanze effettuati con colonne diverse, a parità di selettività, 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:  $R = (Tr (B) - Tr (A)) / (W_A/2 + W_B/2)$ .

Per avere una buona separazione, dal punto di vista quantitativo, si deve avere risoluzione almeno 0,8 . L'esame di questi parametri (selettività, efficienza, risoluzione) è fondamentale per la scelta delle colonne e della temperatura. Per colonne capillari non è necessario cercare grande selettività in quanto la loro grande efficienza può compensare una minor selettività.

## **Applicazioni analitiche**

La gas-cromatografia permette di effettuare sia analisi qualitative che quantitative, anche se principalmente è utilizzata per queste 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, tuttavia tali valori dipendono da molti fattori quali le caratteristiche dello strumento, le condizioni operative e l'operatore;
- effettuare un confronto dei tempi di ritenzione tra la miscela in esame e sostanze pure o miscele di composizione nota;
- 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, vi è la sicurezza che la specie nota non è presente nella miscela, mentre se un picco risulta più alto, potrebbe essere presente e per questo è 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 è possibile collegare direttamente il gas-cromatografo ad uno spettrometro di massa, in questo modo si può registrare lo spettro di massa il quale è univoco per una certa specie chimica (e fornisce poi importanti indicazioni strutturali).

- **Analisi quantitativa**

L'analisi quantitativa è basata sul confronto delle aree dei picchi. Si deve tuttavia tenere presente di una serie di possibili complicazioni:

- non è detto che tutte le sostanze presenti nel campione si riscontrino 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 queste complicazioni esistono diverse metodologie di studio quantitativo tramite GC, che si adattano alle diverse situazioni. Metodologie che qui non verranno illustrate in quanto gli strumenti che si utilizzano per la misura degli inquinanti sono automatici e forniscono direttamente i valori.